약학회지 제 45 권 제 5 호 484~490 (2001)
Yakhak Hoeji Vol. 45, No. 5

반묘 BuOH 층의 U937 세포주에 대한 apoptosis 유도 효과

허정은* · 윤택준* · 이종수** · 정진홍*** · 김성훈*#
#경희대학교 동서의학대학원, **대웅제약연구소, ***대전대학교 한의과대학
(Received September 5, 2001; Revised October 9, 2001)

Effect of Butanol Fraction of Mylabris phalerata on Induction of Apoptosis in U937 cells

Jeong-Eun Huh*, Taek-Joon Yoon*, Jong-Soo Lee** and Jin-Hong Jung***, Sung-Hoon Kim*#
**Department of Oncology, Graduate School of East-West Medical Science, KyungHee University, Seochunri, Yongin, 449-701, Korea*
***Research Institute of Daewong Pharmaceutical Company, Sungnam 461-193, Korea*
****Oriental Medical College, Taejon university, Taejon 300-716, Korea*

Abstract — *Mylabris phalerata* (MP) is an insect that has been used for the treatment of cancer in oriental medicine. To evaluate the anticancer activity of *Mylabris phalerata,* We measured the cytotoxicity of *Mylabris phalerata* solvent fractions such as MC, EA, BuOH and residual layers on U937, human monocytic leukemia cells. Of those fractions BuOH layer of *Mylabris phalerata* was the most effective with IC_{50} of 140 μg/ml. It effectively caused DNA fragmentation from the concentration of 50 μg/ml, showed apoptotic nucleus by tenel assay and expressed apototic portion stained by Annexin-V. It also induced the activation of caspase-3 and cleavage of the substrate poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). These results suggest BuOH layer of *Mylabris phalerata* exerts anticancer activity by induction of apoptosis via activation of caspase-3 protease.

Keywords □ Mylabris phalerata, U937, DNA fragmentation, caspase-3, PARP

생명의 기본단위인 세포는 발생, 분화, 성장 및 노화 등의 전과정을 통하여 지속적인 사멸의 과정을 거치게 된다. 개체를 구성하는 세포들이 생존과 사멸의 균형을 통하여 개체의 homeostasis를 효과적으로 유지하게 된다. 그러나, 이와 같은 균형이 여러 가지 원인에 의해 붕괴되거나 한쪽으로 치우치게 될 경우에 제거되야 할 세포들이 살아남게 되어 암과 같은 질병이 발생하게 된다. 암세포의 증식을 억제하는 방법에는 necrosis(세포괴사)와 apoptosis(세포고사)가 있는데, apoptosis란 암세포를 직접적으로 사멸시키는 necrosis와는 달리 암세포가 정해진 과정을 지나면서 자연사하는 것으로 말할 수 있으며, 이와 같은 능동적인 세포의 사멸을 최근에 와서 아폽토시스(apoptosis) 또는 세포예정사(programmed cell death)로 명명하고 있다.[1-3] 이와 같은 아폽토시스 과정 중에는 세포의 크기가 축소, 세포막으로부터 세포막으로 쌓여져 있는 융기가 돌출하는 현상(membrane blebbing), 여러 형태의 세포내 용물이 세포막으로 쌓여져 세포로 부터 떨어져 나온 아폽토시스 소포체(apoptotic body)를 형성하는 형태학적인 특징을 보인다. 또한, 마이토콘드리아 등과 같은 대개의 세포내 소기관들은 자신의 원형 구조를 대체적으로 유지하는데 비해, 핵에서는 염색사 응축(chromatin condensation), 핵 분절(nuclear fragmentation)등과 같은 변화가 동반된다.[4,5] 아폽토시스는 이와 같은 형태학적인 변화 이외에도 여러 가지 생화학

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-201-2179 (팩스) 031-205-1074

적인 변화도 동반하게 된다. 최근에 와서는 세포내에 이미 존재하는 세포사멸기구들이 새로운 단백질의 합성이 없는 상황에서도 효소가 활성화되어 이들이 세포사멸의 충분조건을 만족시킨다는 보고가 있다.[6]

한의학에서 암 치료는 병증에 따라 활혈거어, 화담연견, 청열해독 등의 거사법과 건비익기 및 자보간신 등의 부정법이 응용되고 있는데, 최근에는 공독하고 산결하는 동물성 약재가 활용되고 있다.[7]

반묘는 *Mylabris phalerata* Pallas라는 학명을 갖는 건사체(곤충)로 중국에서는 China blister beetles로 분류되고 Ban Mao로 불리고 있으며 스페인에서도 Spanish fly로 불리우는데 한의학에서는 辛寒有毒한 성미를 가지며, 攻毒蝕瘡, 破血散結하여 효능이 있어 간암과 위장암에 활용되고 있다.[8] 최근에는 *Mylabris phalerata*가 항암활성을 갖으며 림파구를 증진시키는데 그 주요활성물질이 *cantharidin*으로 *mylabris*전체 중 0.61%에 해당한다. cantharidin은 serine/threonine protein phosphatase type 2A와 결합하여 protein phosphatase활성을 저해한다는 보고가 있으며, 매우 강한 독성을 제거하기 위하여 만든 cantharidin유도체도 항암활성이 있음이 보고되었지만,[9] *Mylabris phalerata*의 apoptosis유도작용 기전연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본인은 한의학에서 암 등의 난치병에 활용되어 온 *Mylabris phalerata* Pallas의 항암효과를 실험적으로 입증하고자, 사람의 백혈병 암주인 U937을 대상으로 세포성장 억제효과를 살펴보았고 그중 가장 효과적인 BuOH층을 시료로 DNA fragmentation assay, TUNEL assay, 유세포분석에 의한 apoptic portion변화, PARP 및 casapase-3 활성 등을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험방법

실험재료 – *Mylabris phalerata*(반묘)는 중국산으로 고려당건재사에서 구입하였다.

시약 및 기기 – Methanol, hexane, methylene chloride, ethylacetate, butanol은 merck사 제품으로 사용하였고, RPMI1640배지, FBS는 Gibco BRL사, MTT, DMSO, proteinase K, DNase-free RNase A, Poly-L-lysin, paraformaldehyde, PBS, propidium iodide, skim milk, Tween 20는 Sigma사, TUNEL staining kit는 promega사, Annexin-V-FITC, anti-PARP antibody, Hoseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody는 Pharmingen사, caspase-3 colorimetric assay kit는 R&D사, 30% polyacrylamide, bovine serum albumin(BSA), 단백질정량용액은 Bio-Rad사, nitrocellulose membrane, ECL kit는 Amersham사 제품을, x-ray film은 Kodak사 제품으로 각각 구입하여 사용하였다. 세포배양기는 Forma Science사, 유세포측정기는 Becton Dickinson사, 형광현미경(Axiovert S100)은 ZEISS사 , ELISA reader는 Molecular Device사, 원심분리기는 한일, Spectrophotometer는 Pharmacia Biotech사, 전기영동 및 transfer system은 Bio-Rad사, U.V. illuminator는 Pharmacia Biotech사, 자동현상기는 Amersham life Science사 제품을 사용하였다.

유기용매 분획추출 – 반묘 1 kg을 metanol로 추출하여 감압건조시켜 crude extract를 얻었고, 용매의 극성정도에 따라 순차적으로 methylene chloride, ethylacetate, butanol, 그리고 residue분획으로 각각 1000 ml씩 추출한 후 감압건조시켰다.

세포주 및 세포배양 – 단핵구 림파종(U937, ATCC CRL1593.2)세포주를 RPMI1640+10% FBS 배지로 5% CO_2, 37°C 배양기에서 배양하였다.

시험관내 세포독성 – 단핵구 림파종 세포주를 배양한후 5×10^4씩 96 well plate에 분주하였다. 각각의 반묘분획을 1000 μg/ml부터 31.25 μg/ml되게 2배씩 계대희석 하였고, camptothecine은 100 μg/ml부터 3.125 μg/ml까지 2배씩 계대희석 하여 세포가 분주된 96 well plate에 첨가한 후 24시간동안 처리하였다. Plate의 각 well에 0.05 mg(50 μl of 1 mg/ml)의 MTT를 가해주고 다시 4 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료시 plate를 15000 rpm ×5 분간 원심분리하여 생성된 formazan 결정을 가라앉히고 부유액을 제거시킨 후 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 200 μl씩 가한 후 formazan 결정이 녹을 수 있도록 약 15분간 가볍게 진탕해 주고 바로 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA fragmentation assay – 세포주를 각각 배양한후 세포를 2×10^6씩 6 well plate에 분주하였다. 세포를 배양한 후 각 well에 반묘의 BuOH분획을 500 μg/ml, 250 μg/ml, 125 μg/ml, 62.5 μg/ml로 계대희석하여 18시간동안 배양하였다. Proteinase K를 50°C

에서 3시간동안 방치한후 phenol 25 : chloroform 24 : isoamylalchoal 1을 이용하여 genomic DNA를 수확하였다. 2% agarose gel에서 50 V로 전기영동 한 후 U.V. illuminator로 확인하였다.

TUNEL staining – 형광물질을 이용하여 apoptosis가 일어난 세포의 핵을 표지하는 염색방법이다. 위와 동일한 방법으로 세포가 분주된 각 well에 반묘의 BuOH분획을 첨가하고 18시간동안 배양하였다. 배양 후 부유액과 세포를 모아 500 μl lysis buffer(0.7% SDS, 5 mM Tris pH 7.4, 20 mM EDTA)를 넣어 30분 동안 상온에서 방치한 후 0.5 mg/ml의 proteinase K를 섞어 주고 37°C에을 18시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 세포를 PBS로 세척하였다. Poly-L-lysin이 coating된 slide에 세포를 도말한 후 4% paraformaldehyde/PBS(pH 7.4)로 4°C에서 25분간 방치하고 PBS로 세척하였다. 0.2% Triton X-100을 5분간 처리한 후 다시 PBS로 세척하였다. Equilibration buffer로 10분간 방치한 후 FITC labeled dUTP 5 μl와 1 μl의 terminal transferase를 37°C에서 1시간 동안 반응을 시킨다. 2x SSC로 실온에서 15분간 처리한 후 PBS로 세척하고 1 μg/ml의 propidium iodide로 15분간 염색하고 증류수로 세척한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

Annexin-V 형광염색 – 위와 동일한 방법으로 세포주에 반묘의 BuOH분획을 18시간 동안 처리한 후 10^6 cells을 PBS로 세척하였다. 세포를 재부유시킨 후 staining solution(bottle 1; 20 μl Annexin V-fluorescence labeling reagent, bottle 2; 20 μl propidium iodide를 반응시켰다. 800 μl의 hepes buffer를 첨가한 후 유세포분석기로 분석하였다.

Caspase-3 colorimetric assay – 위와 동일한 방법으로 세포를 준비한 후 2×10^6의 세포를 50 μl의 cell lysis buffer를 넣고 10분간 얼음위에서 방치한 후 원심분리하여 세포부유액을 사용하였다. DTT가 포함된 reaction buffer 50 μl와 DEVD-pNA 5 μl를 추가로 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 정량하였다.

Western blotting – cell lysis 단백질은 BSA을 표준액으로 하여 단백질 정량용액을 이용해 Bradford 법으로 측정하였다. 10% polyacrylamide gel에 20 μg의 단백질을 loading한 후 전기영동하였다. 전기영동이 끈난 gel을 blotting kit를 이용해 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 TBST용액으로 세척하였다. 5% skim milk+0.02% tween 20용액으로 2시간 동안 blocking시키고 TBST용액으로 3회 세척하였다. Blocking용액에 anti-PARP antibody를 1:1000배 희석하여 1시간동안 반응 후 TBST용액으로 3회 세척하였다. Hoseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG antibody를 1:1000배 희석하여 1시간동안 반응시킨 후 TBST용액으로 3회 세척하였다. 결과를 확인하기 위하여 ECL kit를 이용해 발색시키고 x-ray film에 10초동안 노출시킨 후 현상하였다.

통계처리 – 실험결과는 sigma plot를 이용하여 independent sample t-test와 표준오차로 검정하였다.

실험결과 및 고찰

***Mylabris phalerata*의 유기용매 분획** – 반묘 1 kg을 methanol로 추출하여 감압건조시킨 결과 97.7 g의 crude extract를 얻었고, 용매의 극성정도에 따라 순차적으로 methylene chloride, ethylacetate, butanol 및 잔유(residual)분획을 각각 1000 ml씩 추출하여 감압농축하고 동결건건조시켜 각각 3.0 g, 2.7 g, 9.7 g 및 34.4 g을 얻었다.

암세포주에 대한 세포독성 – U937 단핵세포주에 대한 Mylabris phalerata의 유기용매 분획에서 세포독성 측정결과, 각각의 분획에서 효과가 인정되었다. 즉, U937 세포주에 대한 세포독성은 각 층의 IC_{50} 값이 각각 MC층은 375 μg/ml, EtOAc층은 200 μg/ml, BuOH층은 140 μg/ml, residual층은 260 μg/ml, Crude MeOH층은 350 μg/ml에서 나타났다. 가장 높은 세포독성을 나타낸 BuOH의 경우 IC_{50}값이 약140 μg/ml으로서, 가장 낮은 세포독성을 보인 methylene chloride층에 비교하면 약 2.6배의 높은 활성을 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 camptothecin의 IC_{50}값은 약 9.5 μg/ml이었다(Fig. 1). 이에 본 실험에서는 가장 강한 독성을 보인 BuOH층을 선택하여 세포독성 효과 기전을 규명하고자 하였다.

***Mylabris phalerata* BuOH 분획에 의한 DNA 분절능** – U937 세포주에 반묘 BuOH분획을 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml의 농도로 첨가한 후 18시간동안 배양 후 genomic DNA를 추출하여 DNA fragmentation이 유도되는지의 여부를 알아보기 위하여 실험하였다. DNA fragmentation은

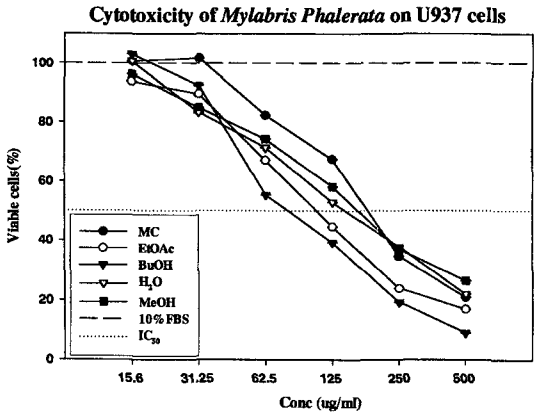

Fig. 1 – Cytotoxicity of *Mylabris phalerata* solvent fractions on U937 cells. Of those fractions BuOH layer of *Mylabris phalerata* was the most effective with IC_{50} of 140 μg/ml.

apoptosis가 일어날 경우 맨 마지막 단계에서 나타나는 것으로 특이적효소인 CAD(caspase activated DNase)가 chromosomal DNA의 3'-OH기가 fragmentation이 일어나 핵이 2-5개의 조각으로 나누어져 50-200 bp이하의 작은 DNA절편을 관찰할수 있다. 실험결과 반묘의 농도에 의존적으로 62.5 μg/ml에서부터 125 μg/ml과 250 μg/ml로는 DNA 단편조각이 증가되는 것이 확인되었으나, 500 μg/ml에서는 심한 세포독성에 의해 세포들이 모두 파괴되어 DNA ladder를 관찰할 수 없었는데 이는 반묘가 매우 강한 세포독성을 갖기때문으로 사료된다(Fig. 2).[10] 그러나 이 실험결과, IC_{50}인 140 μg/ml을 전후해서는 핵내에서 세포고사(apoptosis)의 형태적변화인 DNA fragmentation이 확실히 관찰되어 반묘의 BuOH층에 의한 세포독성 효과는 apoptosis에 의하여 유도되는 현상임을 확인하였다.

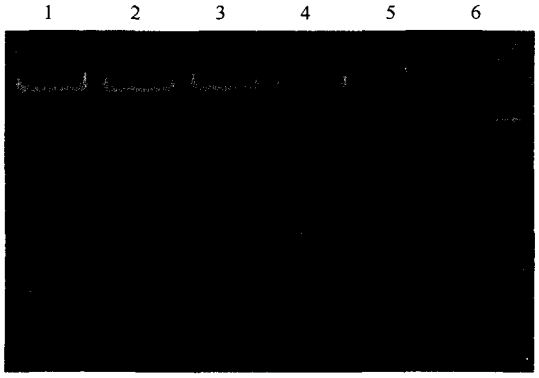

Fig. 2 – The DNA fragmentation analysis of U937 cells treated with BuOH layer of *Mylabris phalerata*. U937 were cultured with various concentrations of BuOH layer of *Mylabris phalerata*. Cells were washed with ice cold PBS (pH 7.4), centrifuged and resuspended in 10 mM Tris-HCL/1 mM EDTA. Cells were lysed and incubated with 1 mg/ml of proteinase K at 50° for 3 hr. After extraction with phenol-chlorofrom (1 : 1) and chloroform. precipitated DNA resuspended with TE buffer. DNase free RNase A (200 μg/ml) was added and incubated. The DNA was electrophoresed on 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining. lane 1. control, lane 2-5. 50 μg/ml, 100 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml, lane 6. size marker (100 bp ladder).

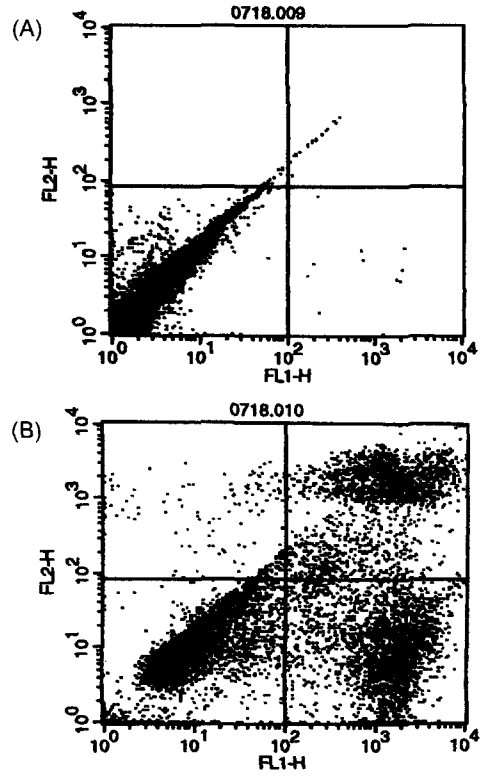

Fig. 3 – Flowcytometric analysis of apoptotic U937 cells stained with Annexin V fluorescence and propidium iodide (PI). U937 cells were cultured for 18 hr with (B) or without (A) 125 μg/ml BuOH layer of Mylabris phalerata. Cells were then stained with the Annexin-V-FLUOS staining kit and analyzed as follows: FL 1, Annexin V fluorescence; FL 2, PI. Flowcytometric analysis differentiates normal cells (left left), apoptotic cells (left right) with Annexin V(+)/PI(–) staining, and necrotic cells (upper right) with Annexin V(+)/PI(+) staining.

유세포분석에 의한 Mylabris phalerata BuOH분획의 apoptotic portion변화 – 배양된 U937세포주에 반묘의 BuOH층을 125 μg/ml을 세포에 첨가한 후 18시간동안 배양한 다음 Annexin-V와 PI staining을 하였다. Annexin V는 초기단계의 apoptotic cells과 necrotic cell 모두에 반응하므로 necrotic cell과 구별하기 위하여 propidium iodide를 동시에 염색하여 유세포분석기로 분석하였다. 실험결과, 반묘의 경우 분획된 BuOH층 125 μg/ml에서 28.44%의 apoptotic cell과 21.44%의 necrotic cell을 관찰하였다(Fig. 3). 결과적으로 아폽토시스 초기과정에서 세포의 세포막으로부터 세포막에 쌓여져 융기가 돌출한 세포표면의 apoptotic cell을 정량하였고, 역시 반묘의 BuOH층에 의한 세포독성 효과는 apoptosis에 의하여 유도되는 현상임을 확인하였다.

***Mylabris phalerata* BuOH분획에 의한 세포내 핵변화** – 배양된 U937세포주에 반묘의 BuOH층을 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml, camptothecin 9 μg/ml을 세포에 첨가하고 18시간 동안 배양한 후 TUNEL staining 하여 특이적으로 형광물질이 표지된 apoptotic nucleus를 형광현미경으로 관찰하였다. 실험결과 음성대조군으로, 세포만을 정상적으로 배양한 경우는 apoptotic nucleus가 관찰되지 않았으나, 반묘의 BuOH층에서는 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml의 농도 각각에서 31.5%, 39.3%, 29.7%를 apoptotic nucleus를 관찰하였고 양성대조군인 camptothecin 9 μg/ml에서도 역시 38.5%의 apoptotic nucleus를 관찰하였다(Fig. 4). 이 실험에서 반묘의 BuOH층 125 μg/ml(IC_{40})이 양성대조군인 camptothecin 9 μg/ml(IC_{40})보다 약 0.8% 높게 apototic nucleus가 관찰되었다. 이 실험결과 U937세포주가 반묘의 BuOH층에 의하여 핵이 작아지어 농축되거나, 세포가 swelling되고, 여러 형태의 세포내용물이 세포막으로 쌓인 후 세포로 부터 떨어져 나온 아폽토시스소포체(apoptotic body)가 역시 아폽토시스 과정에 의한 것임을 확인하였다.

***Mylabris phalerata* BuOH층이 Caspase-3 활성화에 의한 apoptosis유도** – 배양된 U937세포주에 반묘의 BuOH층을 15.6 μg/ml, 31.25 μg/ml, 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml, 양성대조군인 camptothecin 9 μg/ml을 세포에 각각 첨가한 후, 18시간동안 배양하여 활성화된 caspase-3 효소를 측정하였다. 실험결과 control에 비하여 반묘의 BuOH층 15.6 μg/ml에서 약 1.4배, 500 μg/ml에서는 약 2.8배로 농도에 의존적으로 caspase activity가 증가되었으며, 양성대조군인 camptothecin 9 μg/ml(IC_{40})은 반묘의 BuOH층 125 μg/ml(IC_{40})과 비교하면 campto- thecin이 약 2.7배 높은 활성을 보였다(Fig. 5). 실험결과 caspase-3의 activity는 아마도 pro-caspase에서 caspase 계열이 활성화되는 cascade를 거친 후 최종적으로 caspase-3가 활성화되어 세포내로 신호를 전달하여 아폽토시스 과정을 직접적, 간접적으로 유도하였고 이 자

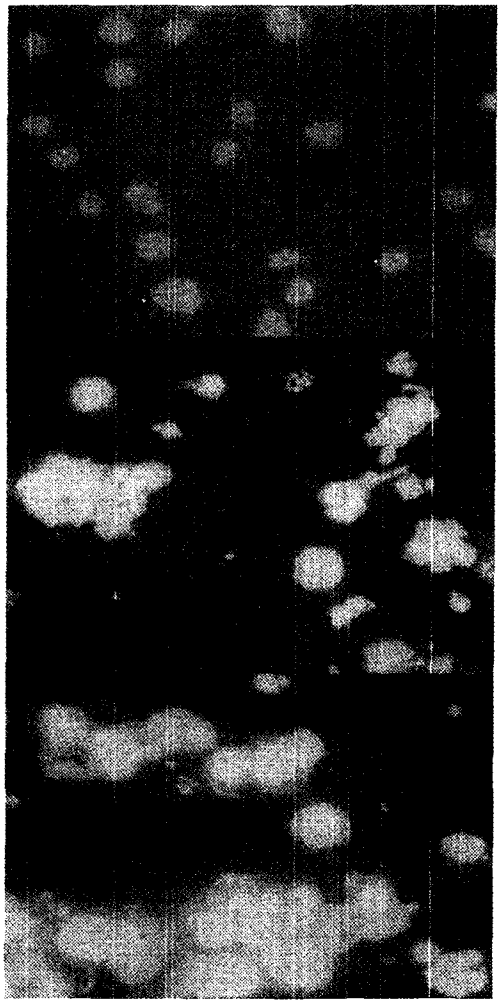

Fig. 4 – Fluorescence microscopic analysis of U937 cells by TUNEL staining. The U937 cells were treated and cultured with camptothecinand BuOH layer of *Mylabris phalerata* for 18 hr. upper; conterol, middle; BuOH layer of *Mylabris phalerata* 125 mg/ml lower; camptothecin 9 μg/ml

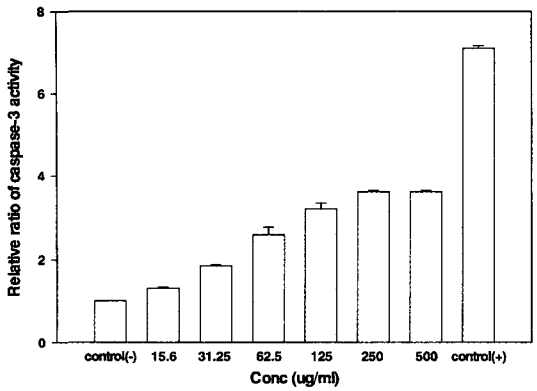

Fig. 5 – Colorimetric caspase-3 activity of U937 cells treated with BuOH layer of *Mylabris phalerata*. U937 cells were exposed to the various concentrations BuOH layer of *Mylabris phalerata* for 18 hr, or exposed to serum free media; control(–) and camptothecin (9 μg/ml); control(+). Cells lysates were prepared from each sample and used in caspase-3 activity assay using the substrate DEVD-pNA.

극으로 세포 표면 및 세포내의 형태적 변화 그리고 chromosomal DNA의 분절능의 apoptosis를 유도하였다고 사료된다.[10,11,12]

***Mylabris phalerata* BuOH분획에 의한 Poly(ADP-ribose)-Polymerase cleavage효과** – Caspase-3의 기질로 알려져 있으면서 DNA replication 효소로 알려져있는 nuclear binding protein인 Poly(ADP-ribose)-Polymerase(PARP)가 반묘의 BuOH층에 의하여 절단됨으로써 caspase-3가 활성을 나타내었는지를 확인하기 위하여 실험하였다. 반묘의 BuOH층을 각각 15.6 μg/ml, 31.25 μg/ml, 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml, camptothecin 9 μg/ml을 처리하고 18시간을 배양한 후 세포를 lysis하여 protein을 정량한 후 western blot을 실시하였다. 실험결과 116 kd의 intact PARP가 절단되면서 85 kd의 절단산물을 확인하였다(Fig. 6). 이 실험결과 반묘의 BuOH층 물질이 PARP의 절단함으로서 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis가 유도됨을 확인하였고, 추후에 caspase-3이외에도 cytochrome C 나 또다른 pro-caspase들이 활성화에 대한 연구의 필요성이 있다고 사료된다.[13,14]

결 론

한의학에서 동물성 항암약재로 분류되는 반묘 (*Mylabris phalerata*) BuOH층의 항암활성을 실험적으로 입증하고자 실험에 착수하였다. 그 결과 반묘 BuOH층의 U937 백혈병 암주에 대한 세포독성 IC_{50}은 140 μg/ml이었고, 50 μg/ml부터 U937 백혈병 암주 세포내 핵을 절단하여 200 bp이하의 DNA ladder를 나타냈으며, TUNEL assay에서도 apoptotic body를 관찰할 수 있었다. 반묘 BuOH층은 125 μg/ml에서 유세포분석에서 91.44%의 apoptotic portion을 발현시켰고, caspase-3의 활성화과 그의 기질인 Poly(ADP-Ribose)polymerase를 절단하는 효과를 나타냈다.

이상의 결과로 보아 반묘 BuOH분획의 U937 세포주에 대한 세포독성은 caspase-3 protease 활성화를 통한 apoptosis 유도작용으로 보며 이에 대한 유효물질 분리와 심도있는 작용기전 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 학술진흥재단 자유응모과제 연구비 (F00865)지원과 BK21 project에 의해 이루어졌는 바 이에 감사드립니다.

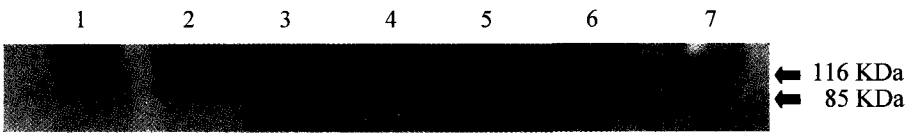

Fig. 6 – The western blot analysis of U937 cells treated with BuOH layer of Mylabris phalerata. U937 cells were exposed to the various concentrations BuOH layer of *Mylabris phalerata* for 18 hr, or exposed to serum free media; control and camptothecin. The cells were washed with PBS and lysed. Cell lysates were cetrifugaed and the protein content was determined. After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, proteins were transferred onto immobilon nitrocellulose membrane at 150 mA for 3 hr at 4°C. Blots were probed with anti-PARP. lane 1. control, lane 2-lane 7: 15.6 μg/ml, 31.25 μg/ml, 62.5 μg/ml, 125 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml, lane 8 : campthothecin 9 μg/ml.

문 헌

1) Wyllie, A. H. : Apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 205 (1993).
2) Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resche-Rigon, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 619 (1998).
3) Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L. and Mignotte, B. : The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* **9**, 1277 (1995).
4) Arends, M. J., Morris, R. G. and Wyllie A. H. : Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136**, 593 (1990)
5) Green, D. R. and Reed, J. C. : Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309 (1998).
6) Huang, Y., Nakada, S., Ishiko, T., Utsugisawa, T., Datta, R., Kharbanda, S., Yoshida, K., Talanian, R. V., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Yuan, Z. M. : Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2986 (1999).
7) 仁存 : 中醫腫瘤學, 上冊, 과학출판사, 북경, 120 (1997).
8) 歐明, 徐鴻華, 李衍文, 駱和生 : 항종류본초도보, 상무인서관, 144 (1990).
9) Wang, G. S. : Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J. Ethnopharm.* **26**, 147 (1989).
10) Nagata, S. : Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12 (2000).
11) Stennick, H. R., and Salvesen, G. S. : Properties of the caspases. *Bioche. Biophys. Acta.* **17**, 1387 (1998).
12) Zhang, J., Wang, X., Bove K., and Xu, M. : DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 37450 (1999).
13) Jiang, X., Wang, X. : Cytochrome C promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 31199 (2000).
14) Pandey, P. Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Kufe, D. and Kharbanda, S. : Negative regulation of cytochrome C-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heatshock. *EMBO J.* **19**, 4310 (2000).