

노랑하늘타리 추출물의 HL-60 혈액종양세포 Apoptosis 유도 효과

김상철 · 박수영 · 현재희 · 이영기 · 박덕배 · 강사윤 · 유은숙 · 강희경[#]

제주대학교 의과대학 의학과

(Received July 21, 2003; Revised September 29, 2003)

Induction of Apoptosis by Extracts of *Trichosanthes kirilpui* var. *japonica* in HL-60 Leukemia Cells

Sang-Cheol Kim, Soo-Young Park, Jae-Hee Hyoun, Young-Ki Lee, Deok-Bae Park, Sa-Yoon Kang, Eun-Sook Yoo and Hee-Kyoung Kang[#]

Department of medicine, College of Medicine, Cheju National University, Ara 1-dong, Jeju 690-756, Korea

Abstract — This study examined the inhibitory effect of extracts of *Trichosanthes kirilpui* sorted according to the parts on the growth of HL-60 cells. The growth of HL-60 leukemia cells was markedly inhibited by the treatment of the 80% methanol extract of roots (10 µg/ml), stems (50 µg/ml), pips (10 µg/ml), and gourds (100 µg/ml), or the ethylacetate fraction of leaves (100 µg/ml). when the HL-60 cells were treated with the extracts of *T. kirilpui* sorted according to the parts, DNA fragmentation and sub-G1 hypodiploid cells were observed. Moreover, *T. kirilpui* extracts increased the level of the expression of the active form of caspase-3 and the activation of caspase-3 was demonstrated by the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, a vital substrate of effector caspase. The results suggest that the inhibitory effect of extracts of *T. kirilpui* sorted according to the parts on the growth of HL-60 cells seems to arise from the induction of apoptosis.

Keywords □ HL-60, *Trichosanthes kirilpui* var. *japonica*, apoptosis, DNA fragmentation, sub-G1 hypodiploid cells, caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase

천연물에는 항종양 효과를 비롯하여 다양한 생리활성을 나타내는 물질들이 포함되어 있으며, 이들 생리활성 물질의 작용기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁻³⁾ 이에 본 연구자들은 천연물 유래의 물질을 이용하여 항암제를 개발하려는 노력의 일환으로 제주에 자생하는 식물체들의 항암 효과를 검색하였다.⁴⁾ 그 결과, 특히 제주도의 산이나 들에 자생하는 노랑하늘타리의 잎이 혈액 종양 세포의 성장을 현저히 억제함을 확인하였다. 노랑하늘타리는 우리나라 남부지방(제주도·흑산도 등 남부 대도해 섬 지방)과 중부지방의 구릉지나 숲 가장자리에 자생하는 다년생 초본이다. 그 뿌리에서 전분을 빼내어 식용으로 쓰며, 지방에서는 열매와 뿌리를 타박상·어혈·황달·피부병 등의 약재로 쓰고, 과피는 기침약에 사용한다고 알려져 있다.⁶⁾ 이처럼 노랑하늘타리의 뿌리와 열매가 민간에서 오랫동안 사용되고 있으나, 노랑하늘타리의 각 부위별 성분 및 항종양 효과에 대

한 연구는 매우 미흡하다.⁷⁻⁹⁾ 본 연구에서는 노랑하늘타리의 잎을 비롯하여 부위별로 항종양 효과를 조사하여, 노랑하늘타리의 성분을 암 치료제로 이용할 수 있는 근거를 마련하고자 하였다. 항종양 효과는 HL-60(급성 전골수성 백혈병세포)를 사용하여 노랑하늘타리의 각 부위별 추출물 처리에 의하여 HL-60 세포의 성장을 억제하는 효과가 있는가를 검색하여 알아보았으며, 노랑하늘타리의 HL-60 세포 성장 억제 효과가 apoptosis유도에 의한 것인지 그 기전을 조사하였다.

실험방법

노랑하늘타리 부위별 추출물의 제조

제주도에 자생하고 있는 노랑하늘타리의 잎, 줄기, 뿌리, 과피 및 씨를 각각 2001년 5월에 월평지역에서 채집하여 음건한 다음 마쇄기로 갈아 미세말로 하였다. 잎(312 g), 줄기(45 g), 뿌리(42 g), 과피(31 g), 씨(35 g)의 미세말 시료에 80% 메탄올을 시료무게의 3배에 해당하는 양을 가한 후 상온에서 24시간 동안 교반하였으며, 진공여과에 의해 상층액을 회수하였다. 이 과정을 3회 반복

[#]본 저술에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 064-754-3846 (팩스) 064-702-2687
(E-mail) pharmkhk@cheju.ac.kr

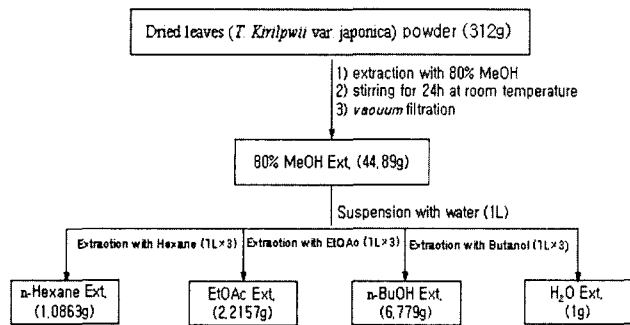


Fig. 1 - Systematic purification using solvent partitioning from leaves of *T. kirilpui* var. *japonica*.

하여 상층액을 모으고 감압농축하여 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물로 사용하였다. 그리고 노랑하늘타리 잎의 메탄올 추출물 44.89 g을 증류수 1 l에 현탁시킨 후에 헥산(1 l×3), 에틸 아세테이트(1 l×3), 부탄올(1 l×3)로 순차적으로 추출하였으며, 각각의 분획물을 진공 건조하여, 노랑하늘타리 잎의 용매 분획물로 사용하였다(Fig. 1).

세포배양

급성 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin(GIBCO)과 10%의 fetal bovine serum(FBS, GIBCO)가 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

Cytotoxicity tests

노랑하늘타리의 추출물 처리에 의한 HL-60 세포 독성 측정은 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하였다.¹⁰⁾ HL-60 세포(2.5×10⁵/ml)를 96 well plate의 각 well에 넣고, 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물 또는 잎의 용매 분획물을 농도별로 첨가하였다. 이를 4일간 배양한 다음, MTT(Sigma) 100 µg을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma) 150 µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(BIO-TEK INSTRUMENTS, INC)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장 억제 정도를 조사하였다.

Analysis for DNA fragmentation

HL-60 세포(2.5×10⁵/ml)에 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물 또는 잎의 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양

하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 30분(100 V) 동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator하에서 DNA 단편화 현상을 관찰하였다.¹¹⁾

Cell cycle analysis

HL-60 세포(2.5×10⁵/ml)에 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물 또는 잎의 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, HL-60 세포를 수확하여 phosphate buffered saline(PBS, Sigma)로 세척하였다. HL-60 세포를 -20°C에서 70% 에탄올로 30분 동안 고정시킨 후, PBS로 세척하고, RNase A(1 mg/ml)를 처리한 다음에 propidium iodide(PI, Sigma)로 염색하고, COULTER® EPICS®XL™ Flow Cytometer(BECKMAN COULTER)로 세포주기를 분석하였다.¹²⁾

Western blot analysis

HL-60 세포(2.5×10⁵/ml)에 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물 또는 잎의 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS로 세척 후, 500 µl의 lysis buffer를 첨가하여 1시간 동안 lysis 시킨 후 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량 하였다.¹³⁾ 40 µg의 lysate를 10% mini gel SDS-PAGE(Polyacrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(TBS+0.1% Tween 20) 용액을 이용하였으며, 상온에서 2시간 동안 실시하였다. Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)의 발현 양을 검토하기 위한 항체로 anti-PARP(1:1000)(Santa-Cruz)와 caspase-3의 활성화 발현을 검토하기 위한 항체로 cleaved caspase-3 Ab(1:1000)(Cell Signaling)를 TTBS 용액으로 희석하여 사용하였으며, 반응은 상온에서 2시간 동안 진행하였다. 2차 항체로는 Horseradish Peroxidase(HRP)가 결합된 anti-rabbit IgG (Amersham Co.)를 1:5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 30분 동안 진행하였다. 그 후 membrane을 TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co.)과 1~3분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

결 과

노랑하늘타리의 세포 성장 억제 효과

노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 추출물 및 잎의 용매 분획물의 HL-60 세포의 성장 억제에 대한 효과는 tetrazolium salt의

하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다.¹⁰⁾ 노랑하늘타리 잎의 메탄올 추출물을 100 µg/ml의 농도 처리시의 세포 성장 억제 효과는 약 43%로 나타났다으며, hexan 분획물에서 19.2%, 에틸아세테이트 분획물에서 73.2%, 부탄올 분획물에서는 47.6%의 세포 성장 억제 효과를 보였다(Fig. 2-I). 그 중 억제 효과가 가장 높게 나타났던 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 10 µg/ml 농도에서 8.6%, 25 µg/ml 농도에서 24.3%, 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도에서 약 70% 이상의 세포 성장 억제 효과를 보였다. 이때 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물의 HL-60 세포 성장 억제에 대한 IC₅₀은 36.7 µg/ml이었다(Fig. 2-II). 그리고 노랑하늘타리의 뿌리, 줄기, 씨 및 과피의 메탄올 추출물을 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 또는 100 µg/ml의 농도로 처리한 결과, 뿌리는 10 µg/ml, 줄기는 50 µg/ml, 씨는 10 µg/ml, 과피는 100 µg/ml 농도 이상에서 62.9%, 88.2%, 88.4%, 45.7%로 세포 성장 억제 효과를 보였다(Table I). 이와 같은 결과에 의하여 노랑하늘타리의

Table I – Cytotoxic effect of *T. kirilpwii* extracts on HL-60 cells

Extracts	Inhibition (%)			
	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
roots	62.90±4.48*	81.70±1.02*	80.50±1.09*	79.70±2.98*
stems	2.78±0.70*	8.05±3.07*	88.20±1.18*	88.50±0.58*
pips	88.40±0.50*	87.70±0.69*	88.10±0.41*	89.20±0.42*
gourds	4.98±0.66	11.46±1.42*	14.59±1.41*	45.70±3.70*

HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with 80% MeOH extracts of *T. kirilpwii* for 4 days. The effects of the MeOH extracts on the growth of HL-60 cells was determined by the MTT assay. The mean absorbance value for each extract was calculated. Results are expressed as the percentage inhibition that produced a reduction in the absorbance in the treated cells compared to the untreated controls. All the experiments were performed in triplicate. The data is presented as a mean±SD. *p<0.05 compared to the control.

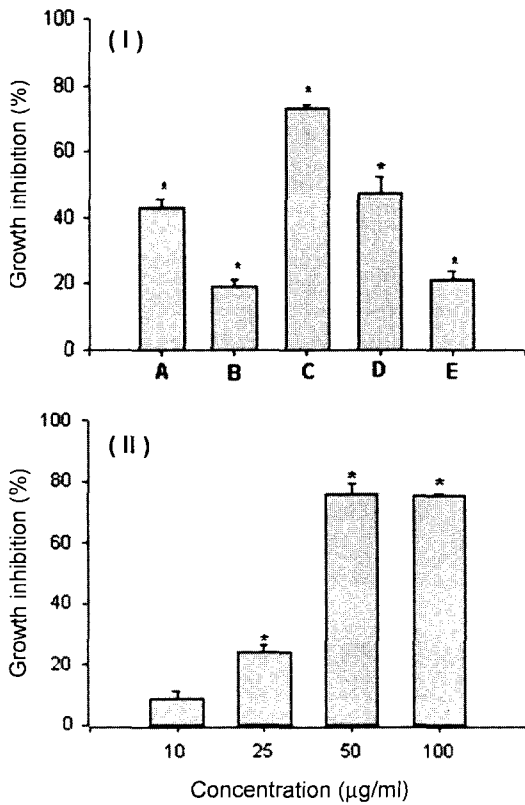


Fig. 2 – Inhibitory effect of the MeOH extract or several solvent fractions of *T. kirilpwii* leaves on the growth of HL-60 cells. (I) HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with 100 µg/ml of the 80% MeOH extract or several solvent fractions (A: 80% MeOH extract, B: n-Hexane fraction, C: EtoAc fraction, D: n-Butanol fraction, E: H₂O fraction) of *T. kirilpwii* leaves. (II) HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with indicated various concentration of EtOAc fraction of *T. kirilpwii* leaves.

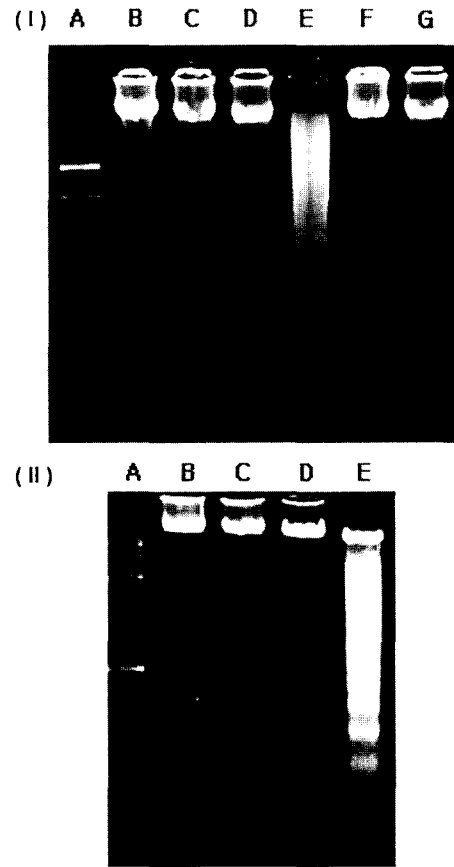


Fig. 3 – DNA fragmentation by the MeOH extract or several solvent fractions of *T. kirilpwii* in HL-60 cells. (I) HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with 100 µg/ml of the 80% MeOH extract or several solvent fractions from *T. kirilpwii* leaves for 24 hr; Lane A: 100 bp DNA ladder size marker, Lane B: control, Lane C: 80% MeOH extract, Lane D: n-Hexane fraction, Lane E: EtoAc fraction, Lane F: n-Butanol fraction, Lane G: H₂O fraction. (II) HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with the MeOH extracts for 24 hr; Lane A: 1 Kb DNA ladder size marker, Lane B: control, Lane C: 10 µg/ml of roots extract, D: 10 µg/ml of pips extract, Lane E: 50 µg/ml of stems extract.

각 부위별 메탄올 추출물에 대한 항종양 기전 연구에 이 농도를 사용하였다.

HL-60 세포에서의 Apoptosis 유도효과

노랑하늘타리 추출물에 의한 HL-60 세포 성장 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 그 기전을 알아보기 위하여, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 DNA 단편화 현상을 전기영동으로 관찰하였다. 노랑하늘타리 잎의 용매 분획물을 HL-60 세포에 각각 100 µg/ml 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, 에틸아세테이트 분획물에서 뚜렷한 DNA 단편화 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3-I). 그리고 노랑하늘타리의 뿌리, 씨 및 줄기 메탄올 추출물을 각각 10 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때에는 줄기 메탄올 추출물을 처리한 세포에서 DNA 단편화가 가장 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 3-II). 또한, 노랑하늘타리 추출물에 의한 apoptosis 유도에 의하여 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는지 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 유세포분석기로 분석하였다. 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물을 100 µg/ml의 농도로 처리하여 시간별로 측정된 결과, sub-G1 hypodiploid 세포가 3시간에서 13.6%, 4시간에서 55.9%, 5시간에서 70.5%, 6시간에서 71.3%, 7시간에서 94.8%, 8시간에서 96.9%로 시간이 지남에 따라 증가하였다(Table II). 노랑하늘타리의 각 부위별 추출물을 처리 시에는 sub-G1 hypodiploid 세포가 줄기 추출물 50 µg/ml 처리에 의하여 37.7%, 뿌리 추출물 10 µg/ml 처리에 의하여 12%, 씨 추출물 10 µg/ml 처리에 의하여 22.7%로 관찰되었다(Fig. 4). HL-60 세포에 노랑하늘타리의 각 부위별 추출물을 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 후 단백질을 분리하여 effector caspase의 하나인 caspase-3의 활성화 발현이 증가하는지 조사하였으며, caspase-3의 활성화에 의하여 caspase 기질의 하나인 PARP가 분해되는지 확인하여 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄올 및 잎의 용매 분획물의 HL-60 세포 성장 억제 효과가 apoptosis 유

Table II – The cell cycle pattern in HL-60 cells treated by the EtOAc fraction of *T. kirilpwii* leaves

Time	% of cells		
	Apoptotic cells	G0-G1	G2/M
0 hr	0.46	55.3	18.3
3 hr	13.6	49.2	18.6
4 hr	55.9	27.2	5.86
5 hr	70.5	18.1	3.99
6 hr	71.3	20.2	2.41
7 hr	94.8	4.13	0.85
8 hr	96.9	4.60	0.09

HL-60 cell ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with 100 µg/ml of EtOAc fraction of *T. kirilpwii* leaves for indicated hours. Flow cytometry was performed with EPICS-XL FACScan flow cytometer (Coulter, Miami, FL, USA).

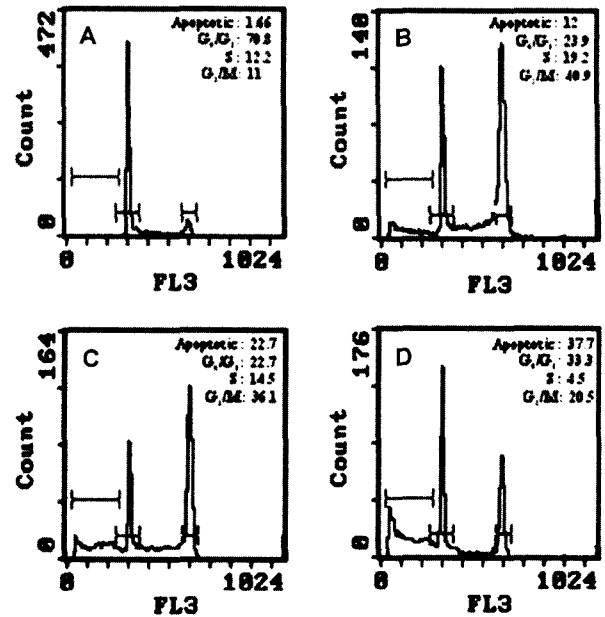


Fig. 4 – The degree of apoptosis is represented as the DNA content measured by flow cytometry. HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated without (A) or with the MeOH extracts of *T. kirilpwii* for 24 hr (B: 10 µg/ml of roots extract, C: 10 µg/ml of pips extract, D: 50 µg/ml of stems extract). Flow cytometry was performed with EPICS-XL FACScan flow cytometer (Coulter, Miami, FL, USA).

도에 의한 것인지를 알아보았다. 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 용매 분획물을 50 µg/ml 이상의 농도로 처리하였을 때 caspase-3의 활성화형(19 kDa)의 밴드가 나타났으며, 이는 caspase-

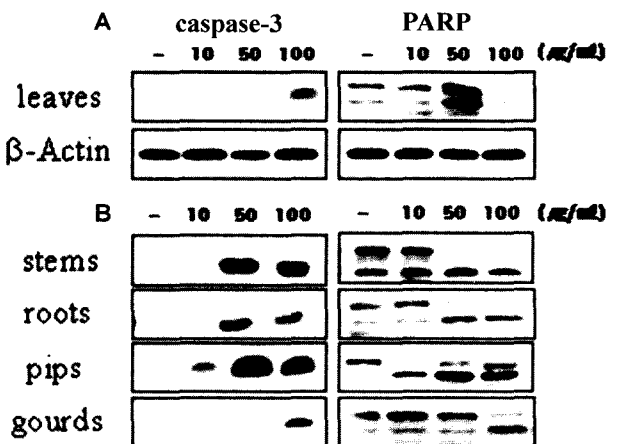


Fig. 5 – Activation of caspase-3 and cleavage of PARP in HL-60 cells treated with the EtOAc fraction or MeOH extracts of *T. Kirilpwii*. HL-60 cells ($2.5 \times 10^5/ml$) were treated with the indicated various concentrations of the EtOAc fraction (A) or MeOH extracts (B) of *T. Kirilpwii* for 24 hr. Western blot analysis of caspase-3 or PARP using the antibodies against caspase-3 recognized a protein at 19 kDa and PARP recognized both the full-length enzyme (116 kDa) and its 85-kDa fragment.

3의 활성화에 의하여 기질인 PARP(116 kDa)가 절단되어 85 kDa의 밴드가 나타나는 농도와 거의 일치함을 보였다(Fig. 5-A). 또한 줄기, 뿌리, 씨, 과피 메탄을 추출물도 각각 50 µg/ml, 50 µg/ml, 1) µg/ml, 100 µg/ml 이상의 농도로 처리하였을 때, caspase-3 활성형 밴드와 caspase-3의 활성화에 의한 PARP의 절단된 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 5-B).

고 찰

본 연구에서는 급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포를 이용하여 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄을 추출물과 잎의 용매 분획물이 HL-60 세포의 성장을 억제하는지 조사하고, 세포 성장 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다. 노랑하늘타리에 의한 HL-60 백혈병 세포의 성장 억제 효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 형성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. 그 결과, 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트와 부탄을 분획물 100 µg/ml 농도에서 세포 성장 억제 효과가 가장 높게 나타났다(Fig. 2-I). 그 중에서 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 HL-60 세포에 처리한 결과 성장 억제 효과는 농도에 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2-II). 그리고 노랑하늘타리의 뿌리, 씨, 줄기 및 과피 메탄을 추출물을 각각 10 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml 및 100 µg/ml 이상의 농도로 처리하였을 때 HL-60 세포의 성장이 현저히 억제되었다(Table I). 이와 같은 노랑하늘타리의 HL-60 세포의 성장에 대한 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다. Apoptosis는 세포질내 칼슘치가 증가되어 칼슘의존성 endonuclease가 활성화되어 핵내 DNA 분절이 일어나며, transglutaminase가 활성화되어 세포질내 단백질의 cross-linking이 일어나며 세포질 농축이 일어나고 수액이 세포 밖으로 빠져나가면서 apoptotic bodies를 형성하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 그래서, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상의 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 세포 성장 억제 효과가 가장 높았던 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물에서 뚜렷한 DNA 단편화 현상을 볼 수 있었다. 노랑하늘타리의 각 부위별 메탄을 추출물에서는 특히 줄기의 메탄을 추출물에서 DNA 단편화 현상을 가장 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 그리고 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 EtBr를 이용하여 노랑하늘타리 추출물의 처리에 의한 apoptotic 세포 즉 sub-G1 hypodiploid 세포의 증가를 유세포분석기로 확인하였다. 그 결과 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물의 처리에 의하여 시간 의존적으로 apoptotic 세포가 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Table II). 또한 뿌리, 씨, 줄기 메탄을 추출물을 처리하였을 때 apoptotic 세포가 증가됨을 관찰할 수 있었으며, 특히 뿌리와 씨의 메탄을 추출물을 처리시 G2/M 세포 peak

도 같이 증가됨 관찰할 수 있었다(Fig. 4). Caspase는 효소 활성 부위에 모두 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해 효소로서 지금까지 14종류가 알려져 있는데 이들은 대부분 apoptosis에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,¹⁸⁾ PARP는 손상된 DNA 복구에 관여된 단백질로서 apoptosis 과정 중 caspase에 의해서 절단되는 것으로 보고되어 있다.¹⁹⁾ Fig. 5에서 보는 바와 같이 노랑하늘타리 잎의 에틸아세테이트 분획물, 줄기, 뿌리, 씨 및 과피 메탄을 추출물 처리에 의하여 caspase-3 활성형(19 kDa)의 밴드를 확인할 수 있었으며, 또한 caspase-3의 활성화되는 농도에서 PARP의 분절을 관찰할 수 있었다. 그러나, 씨의 메탄을 추출물을 10 µg/ml의 농도로 처리하였을 때의 HL-60 세포의 성장 억제 정도가 줄기 메탄을 추출물(50 µg/ml)을 처리하였을 때와 비슷하였으나, DNA 단편화 현상, sub-G1 hypodiploid 세포 증가 등 apoptosis 유도 현상이 뚜렷하지 않은 것은 apoptosis와는 다른 세포사 즉, necrosis에 의해서도 영향을 받는 것으로 여겨진다. 이와 같은 결과는 노랑하늘타리의 항암 성분을 분리하여 그 기전을 연구한다면 명확히 밝혀질 것으로 사료된다.

노랑하늘타리의 각 부위별 추출물이 HL-60 세포의 apoptosis를 유도하여 백혈병 세포의 성장을 저해한다는 본 연구 결과는 노랑하늘타리를 암 치료제로 이용할 수 있는 새로운 근거를 제시하며, 항암 치료제 또는 예방제의 유효 성분 분리 및 그 작용 기전 연구에 중요한 기초자료가 될 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 제주대학교 아열대원예산업연구센터와 2000년도 제주대학교 발전 기금 학술연구비 지원에 의한 것입니다.

문 헌

- 1) Sugimura, T. : Mutagen, carcinogens and tumor promoters in our dairy food. *Cancer* **49**, 1970 (1982).
- 2) Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens : Oxygen radicals and degenerative disease. *Science* **221**, 1256 (1983).
- 3) Sugimura, T. and Sato, S. : Mutagens-carcinogens in foods. *Cancer Res.* **43**, 2415 (1983).
- 4) Park, S. Y. and Kang, H. K. : Effects of extracts of plants growing in Jeju on the growth of HL-60 cells. *Cheju Journal of Life Science* **3**, 85 (2000).
- 5) Kim, S. C., Park, S. Y., Her, K. H., Kim, S. J. and Kang, H. K. : Effects of extracts of *Trichosanthes kirilipwii* var. *japonica* on the growth of HL-60 leukemia cells. *Cheju Journal of Life Science* **4**, 95 (2001).
- 6) 김태정 : 한국의 자원식물, 서울대학교출판부, 서울 4권 173

- (1996).
- 7) Kondo, T., Inoue, M., Mizukami, H. and Ogihara, Y. : Cytotoxic activity of bryonolic acid isolated from transformed hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* var. *japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 726 (1995).
 - 8) Toyokawa, S., Takeda, T. and Ogihara, Y. : Isolation and characterization of a new abortifacient protein, karasurin, from root tubers of *Trichosanthes kirilowii* Max. var. *japonicum* Kita. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 716 (1991).
 - 9) Takeda, T., Kondo, T., Mizukami, H. and Ogihara, Y. : Bryonolic acid production in hairy roots of *Trichosanthes kirilowii* Max. var. *japonica* Kitam. Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and its cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). **42**, 730 (1994).
 - 10) Carmichael, J., DeGraff, W. G. and Gazdar, A. F. : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Research* **47**, 936 (1987).
 - 11) Purohit, A., Hejaz, H. A. M., Walden, L., MacCarthy-Morrogh, L., Packham, G., Potter, B. V. L. and Reed, M. J. : The effect of 2-methoxyestrone-3-O-sulphamate on the growth of breast cancer cells and induced mammary tumors. *Int. J. Cancer* **85**, 584 (2000).
 - 12) Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grinani, F. and Riccardi, C. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271 (1991).
 - 13) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
 - 14) Wyllie, A. H. : Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metastasis Reviews* **11**, 95 (1992).
 - 15) Fesus, L., Davies, P. J. A. and Piacentini, M. : Molecular mechanisms in the program of cell death by apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* **56**, 170 (1991).
 - 16) Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M. P., Tarcsa, E. and Piacentini, M. : Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett.* **245**, 150 (1989).
 - 17) Piacentini, M., Autuori, F., Dini, L., Farrace, M. G., Ghibelli, L., Piredda, L. and Fesus, L. : Tissue transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor stimulation. *Cell Tissue Res.* **263**, 227 (1991).
 - 18) Alnemri, E. S., Livingstone, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* **87**, 171 (1996).
 - 19) Hideki, Sakahira and Masato, Enari : Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96 (1998).