

남성호르몬 비의존형 전립선 암세포에서 敗醬 추출물의 세포고사 유도 효과

권강범 · 김은경 · 류철인 · 박형권 · 성기호 · 송제문 · 이경용 · 권영달¹ · 서은아² · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학교실, 2: 원광대학교 생활과학대학 식품영양학과

Apoptosis-Inducing Effect of *Herba Patriniae* Extract in Androgen Independent Prostate Cancer DU145 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Cheal In Ryu, Hyung Kwon Park, Ki Ho Seong, Je Moon Song, Kyung Yong Lee, Young Dal Kwon¹, Eun A Seo², Do Gon Ryu*

Department of Physiology, School of Oriental Medicine,

1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine,

2: Department of Food and Nutrition, School of Human Environmental Science, Wonkwang University

Herba Patriniae(HP) has been known to exert anti-tumoral activity in Korea. However, its molecular mechanism of action is not understood. In this study, we found that HP induced apoptosis in androgen-dependent prostate cancer DU145 cells as evidenced by DNA fragmentation and chromatine condensation in hoechst dye staining. Our data demonstrated that HP-induced apoptotic cell death was accompanied by activation of caspase-3 and cleavages of its substrates, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) in a time- and concentration-dependent manner. Taken together, these results suggest that HP induces the activation of caspase-3, degradation of PARP, and eventually leads to apoptotic cell death.

Key words : *Herba Patriniae*, DU145 cells, apoptosis, poly(ADP-ribose) polymerase

서론

敗醬은 敗醬科에 속한 다년생 초본인 뿌갈나물 및 마타리와 동속 근연식물의 帶根全草로서 辛 · 苦, 微寒 無毒하고 清熱解毒, 消癥排膿, 活血行瘀의 효능이 있어 腸癰, 肺癰, 瘡癰腫毒, 胸腹疼痛 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}.

종양은 정상세포가 여러 가지 자극에 의해 유전자의 형질전환이 일어나 비정상적인 세포가 생체 내 조절기능에 지배를 받지 않고 점점 과잉으로 증식되어 인체에 해를 끼치는 것을 말하는 것으로 양성종양과 흔히 암이라 부르는 악성종양으로 나누는데 최근 암에 의한 사망률이 선진국을 비롯한 우리나라에서 증가하고 있는 추세이다³⁻⁶⁾. 특히 전립선 암은 우리나라에서 식생활의 서구화 및 고령화 사회로의 이행에 따라 빈도가 증가하는 추

세이다. 전립선암은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있으나⁷⁾ 대부분의 남성호르몬 의존형 전립선암은 3년 이내에 남성호르몬 중지 치료법에 반응하는 세포고사(apoptosis)에 내성을 지니게 되어 남성호르몬 비의존형(androgen independent) 전립선암으로 진행하게 된다^{8,9)}. 세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말하는 것으로 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화화적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절 받는 생리과정으로 암 치료제 개발의 한 수단으로서 이용되고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

이에 저자는 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포를 이용하여 敗醬 추출물의 세포고사 유도효과를 조사하고 그 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2004/10/06 · 수정 : 2004/11/04 · 채택 : 2004/12/01

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, caspase-3에 대한 형광기질(fluorogenic substrates)과 PARP 항체, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), Alkaline phosphatase-conjugated mouse IgG secondary antibody는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고 세포배양액 RPMI, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 95% 공기 및 5% 이산화탄소(CO₂)가 소용되는 습기가 충분한 대기에서 37℃를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. 敗醬 추출물의 제조

본 연구에 사용된 敗醬은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였으며 敗醬 200g에 3차 증류수 1.8L를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 13.96g의 분말 시료를 얻었다.

4. MTT 분석

DU145 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10^4 cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 DU145 세포에 敗醬 추출물을 72 시간 처리하여 MTT(0.5mg/ml)와 3시간 반응시켰다. 생존 세포가 MTT로부터 생성한 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 570nm 파장에서 ELISA reader(Molecular Device, E-max, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 대조군 세포에 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

5. DNA 분절(fragmentation) 조사

DNA 분절현상을 조사하기 위하여 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하였다. 敗醬 추출물을 DU145 세포에 72시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조한다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의

Spectrophotometer하에서 OD값을 측정하여 DNA를 정량한다. DNA 5 μ g을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6. Caspase-3 활성도 측정

세포를 4℃에서 30분 세포파쇄용액(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 5mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM dithiothreitol(DTT), 10mM Tris/HCl, pH 8.0)과 반응 후, 14,000rpm으로 15분 원심분리하여 이 때 얻어진 상층액 30 μ g을 caspase assay buffer(100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2mM DTT, pH 7.5)와 caspase-3의 형광기질인 Ac-DEVD-AFC와 37℃에서 60분 반응시킨 후 fluorometer (F2500, Hitachi, Japan)로 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

7. PARP Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4℃에서 30분 반응시킨 후, 30 μ g의 단백질을 두 배의 sample buffer(5mM EDTA, 4% sodium dodecyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 200mM Tris, pH 6.8, 0.06% bromophenol blue)와 혼합 후, 100℃에서 3분 가열하여 단백질 변성을 유도하고 10% gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동을 마친 gel의 단백질은 semi-dry electrotransfer system(0.8mA/cm²)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 다음, 5% skim milk와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적인 항체반응을 억제시켰다. 일차항체(primary antibody)는 TBS-T에 1:1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 24시간 반응시키고 TBS-T로 10분 3번 세척한 후, 이차항체(secondary antibody)인 anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase(TBS-T로 1:3,000으로 희석, Amersham Co., England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, NBT/BCIP 시약을 이용하여 노출시켰다.

8. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹³⁾에 의거하여 정량하였다.

9. 통계 분석

실험 결과는 mean \pm S.E.M으로 표시하였으며 유의성의 검정은 Microcal Origin(Version 6.0)을 이용하여 ANOVA one-way test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 敗醬 추출물의 효과

敗醬 추출물이 DU145 세포의 세포생존율에 미치는 영향을

알아보기 위하여, 1×10^6 cells/ml의 세포를 RPMI 배지에 접종하고 24시간 후에 敗醬 추출물을 0.2-5.0mg/ml의 농도로 72시간 처리한 후 MTT을 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 생존율이 각각 23.5%, 16.3%, 16.2%, 5.1%로 감소하였다(Fig. 1).

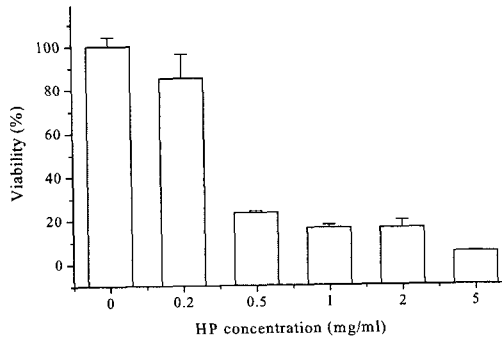


Fig. 1. Effects of *Herba Patriniae*(HP) extract on cell viability in DU145 cells. Cells were treated with various concentrations of HP extract for 72 hour. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean \pm SEV of four independent experiments.

2. 세포고사에 미치는 敗醬 추출물의 효과

敗醬 추출물이 Du145 세포의 생존율 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인 하고자 agarose gel을 세포고사의 특징적인 현상인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다. 敗醬 추출물은 1.0mg/ml의 농도로 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 DU145 세포에 처리한 후 DNA 분절 현상을 조사한 결과 48시간에 DNA 분절현상이 나타났으며 그 효과는 72시간까지 지속되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

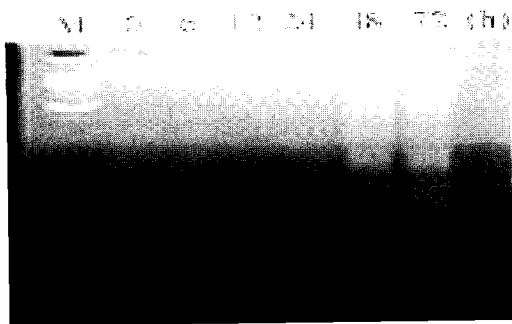


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of *Herba Patriniae*(HP) extract in DU145 cells. Cells were treated with 1.0mg/ml HP extract for 6, 12, 24, 48 and 72 hour. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in materials and methods.

3. 敗醬 추출물이 caspase-3 활성도에 미치는 영향

敗醬 추출물에 의한 DU145 세포의 고사과정에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자 다양한 농도의 敗醬 추출물을 48시간 동안 세포에 노출시킨 후 caspase-3에 특정한 형광 염료인 Ac-DEVD-AFC를 이용하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 의존적으로 활성도가 증가하였으며 특히

1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 1.65배($p < 0.05$), 1.73배($p < 0.05$), 1.8배($p < 0.05$)로 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3).

또한 1.0mg/ml 敗醬 추출물을 6, 12, 24, 48, 72시간 동안 처리한 후 caspase-3 활성도를 측정한 결과 처리한 시간에 비례하여 활성도가 증가하였으며 특히 처리한 후 48, 72시간에 대조군에 비하여 각각 1.79배($p < 0.05$), 1.90배($p < 0.05$) 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

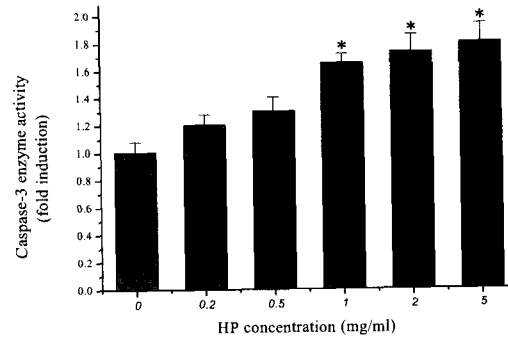


Fig. 3. Dose- response of *Herba Patriniae*(HP) extract on caspase-3 enzyme activity in DU145 cells. Cells were incubated with indicated concentrations of HP extract for 72 hour. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 using Ac-DEVD-AFC as fluorogenic substrate as described in material and methods. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean \pm SEV from four experiments. * $p < 0.05$ vs control

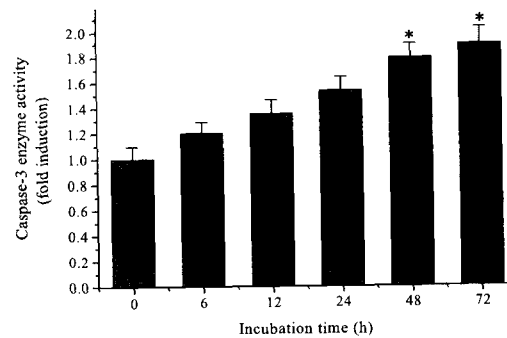


Fig. 4. Time-response of *Herba Patriniae*(HP) extract on caspase-3 enzyme activity in DU145 cells. Cells were incubated with 1.0mg/ml of HP extract for various time intervals. Other legends are the same as Fig. 3. * $p < 0.05$ vs control

4. 敗醬 추출물이 PARP 절단에 미치는 효과

敗醬 추출물에 의한 DU145 세포의 caspase-3 protease의 활성도의 증가를 확인하였으므로(Fig. 3 & 4) caspase-3 protease의 세포내 기질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP)의 절단에 대한 敗醬 추출물의 효과를 관찰하고자 PARP 1차 항체를 이용하여 Western blotting을 시행하였다. PARP는 DNA 복구 효소로서 정상세포에서 116kD의 형태로 존재하다가 세포고사를 유도하는 자극이 주어지면 85kD으로 절단되어 세포고사를 촉진하는 단백질로 알려져 있다^{14,15}.

0.2-5.0mg/ml 敗醬 추출물을 DU145 세포에 72시간 동안 처

리한 후 PARP의 절단 정도를 조사하였다. 그 결과 대조군에서는 85kD의 절단된 PARP가 발견되지 않았다. 그러나 0.5mg/ml 敗醬 추출물을 처리한 군에서 85kD의 절단된 PARP가 나타나기 시작되어 그 효과가 5.0mg/ml의 농도까지 지속되었으며 이에 상응하는 116kD의 PARP가 감소하였다(Fig. 5).



Fig. 5. Effects of *Herba Patriniae*(HP) extract on PARP cleavage in DU145 cells. DU145 cells were treated with various concentrations of HP extracts for 72 hour. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was proved with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by NBT/BCIP solution.

고찰 및 결론

敗醬은 清熱解毒, 消癰排膿, 活血行瘀의 효능으로 腸癰, 肺癰, 瘡癰腫毒, 胸腹疼痛 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 본 논문은 敗醬의 전립선암에 대한 응용 가능성을 확인하고자 남성호르몬 비의존형 전립선 암세포인 DU145 세포에 敗醬 추출물을 처리한 후 세포고사 유도 효과와 그 기전을 조사한 논문이다.

敗醬 추출물은 DU145 세포의 생존율을 처리한 농도에 비례하여 감소시켰으며 1.0mg/ml의 농도에서부터 대조군에 비하여 약 75%의 세포 생존율의 억제효과를 나타냈으며 이러한 효과는 2.0, 5.0mg/ml의 농도에서도 비슷한 효과를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 敗醬 추출물의 생존율 감소효과가 세포고사 유도에 의한 것인지 확인하고자 DU145 세포에 1.0mg/ml 농도의 敗醬 추출물을 다양한 시간 동안 처리한 후 세포고사의 특징적인 현상인 염색체 응축과 DNA 분절 현상을 조사하였다^{14,15)}. 敗醬 추출물은 24시간까지 DNA 분절 현상을 나타내지 못하였으나 48시간 72 시간에서 DNA 분절 현상을 나타내 세포고사를 유도하였다(Fig. 2). 세포고사(apoptosis)는 1980년대 후반기부터 중요 관심분야로 세포생물학 영역에 도입되면서 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에 중요하게 작용하고 있음이 밝혀졌다^{16,17)}. 최근 연구에 의하면 대부분의 항암제가 암세포에 세포고사를 유발한다는 것을 알게 되었다¹⁸⁾. 그러나 이들 항암제는 정상세포에도 거의 같은 정도로 세포고사를 일으켜 부작용이 큰 원인이 되고 있다. 그래서 선택적으로 암세포에만 작용하여 세포고사를 유도하는 것이 항암제 개발의 새로운 목표가 되어¹⁹⁾ 최근 세포고사를 유도하는 한약재의 개발을 위하여 많은 연구가 시도되고 있는 실정이다^{20,21)}. 세포고사 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화되며 현재까지 14종류가 알려져 있다²²⁻²⁴⁾. 그 중 caspase-3 protease는 mammalian ced-3 homologue로서 세포질에서는 proenzyme 형태로 존재하다가 proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 9 같은 initiator caspase에 의

하여 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환되어 세포의 기능 유지에 필요한 단백질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase(PARP), inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD), 그리고 actin, fodrin, lamin 등과 같은 구조 단백질들을 절단하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다^{25,26)}. 敗醬 추출물에 의한 DU145 세포 고사 유도효과 기전을 알아보기 위하여 敗醬 추출물을 다양한 농도에서 72시간 처리한 후 caspase-3 효소 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 caspase-3 활성도가 증가하였으며 2.0, 5.0mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가효과를 나타냈다(Fig. 3). 또한 시간에 대한 의존성을 조사하기 위하여 1.0mg/ml 敗醬 추출물을 다양한 시간 동안 처리한 후 caspase-3 효소 활성도를 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 caspase-3 활성도를 증가시켰다(Fig. 4). 이러한 결과는 敗醬 추출물의 DU145 세포에 대한 고사효과는 caspase-3 활성도의 증가가 관여한다는 것을 시사한다. 또한 caspase-3의 세포내 기질 중의 하나인 PARP의 절단에 대한 敗醬 추출물의 효과를 조사한 결과 Fig. 5에서 보여주듯이 0.5mg/ml 농도에서 72시간 처리한 군에서부터 116kD의 PARP가 절단되기 시작하여 그 효과가 1.0, 2.0, 5.0mg/ml의 농도까지 지속되었다.

이상의 결과를 요약하면, 인간 전립선 암세포인 DU145 세포에서 敗醬 추출물은 세포고사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 기전은 caspase-3 활성도의 증가와 PARP 절단과 관계가 있다. 앞으로 다른 암세포에서의 敗醬의 고사 유도효과를 조사하고 그 유도 기전을 밝힌다면 암을 치료할 수 있는 화학요법제로 사용할 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. 신민교 편저 : 臨床本草學. 서울, 남산당. p.564, 1997.
2. 歐明 主編 : 漢英常用中藥手冊. 廣東, 廣東科技出版社. pp. 525- 526, 2000.
3. 최정신, 김정혜 : 최신병리학, 서울, 도서출판 정담, p. 117, 1996.
4. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 高文社, pp. 201-202, 1997.
5. 송계용 외 : 핵심 병리학, 서울, 고려의학, p. 147, 1998.
6. 趙鍾寬 : 한방임상중양학, 대전, 周珉出版社, pp. 725-758, 2001.
7. Lu-Yao GL, et al. : An assessment of radical prostatectomy. Time trends, geographic variation, and outcomes. The Prostate Patient Outcomes Research Team. *Jama*, 269(20): 2633-2636. 1993.
8. Walsh PC, AW Partin, JI Epstein : Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol*, 152(5 Pt 2): 1831-1836. 1994.
9. Isaacs JT et al. : Androgen regulation of programmed death

- of normal and malignant prostatic cells. *J Androl*, 13(6): 457-464, 1992.
10. Janus TJ, Kyritsis AP, Forman AD, Levin VA : Biology and treatment of gliomas. *Ann Oncol*, 3(6):423-433. Review, 1992.
 11. Yoshida T, Kawano N : Clinical cure of glioblastoma-two case reports. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 40(4):224-229, 2000.
 12. Madajewicz S, Chowhan N : Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer*, 88(10):2350-2356, 2000.
 13. Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254, 1976.
 14. Kwon KB et al. : Induction of apoptosis by Takrisodokyeum through generation of hydrogen peroxide and activation of caspase-3 in HL-60 cells. *Life Sci*, 73(15): 1895-1906. 2003.
 15. Kwon KB et al. : *Vibrio vulnificus* cytolyisin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J Biol Chem*, 276(50):47518-47523. 2001.
 16. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD : Programed cell death and the control of cell survival. *Science* 262:695-700. 1993.
 17. Thomson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462, 1995.
 18. Igney FH, Krammer PH : Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Review Cancer* 2:277-288, 2002.
 19. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW : Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164, 2002.
 20. Kwon KB, Kim EK, Shin BC, Seo EA, Park JW, Kim JS, Park BH, Ryu DG. Induction of apoptosis by takrisodokyeum through generation of hydrogen peroxide and activation of caspase-3 HL-60 cells. *Life Sciences* 73:1895-1906, 2003.
 21. Kwon KB, Kim EK, Shin BC, Seo EA, Yang JY, Ryu DG : Herba houttuyniae extract induces apoptotic death of human promyelocytic leukemia cells via caspase activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release, *Experimental and Molecular Medicine*. 35(2):91-97, 2003.
 22. Goldberg YP : Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract, *Nature Genetics* 13 : 442-449, 1996.
 23. Kim TW, Warren H, Jung YK, Kovacs D, Tanzi R : Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease, *Science*. 277:373-376, 1997.
 24. Takahashi A : Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA*. 93 : 8395-8400, 1996.
 25. Lazebnik YA : Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature*. 371:346-347, 1994.
 26. Wang ZQ : Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease, *Genes Dev*. 9 : 509-520, 1995.