

전립선 암세포에서 敗醬 추출물의 세포고사 유도 효과

문형철*

원광대학교 한의과대학 침구학교실

Apoptosis-inducing Effect of *Herba Patriniae* Extract in the Prostate Cancer LNCaP Cells

Hyung Cheal Moon*

Department of Acupuncture & Moxibustion, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Herba Patriniae(HP) has been known to exert anti-inflammation and -tumoral activity in Korea. However, its molecular mechanism of action is not understood. In this study, we found that HP extract induced apoptosis in androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells as evidenced by DNA fragmentation. Our data demonstrated that HP extract-induced apoptotic cell death was accompanied by inhibition of NF- κ B activation, lowering effects of intracellular prostate specific antigen(PSA) and androgen receptor(AR) expression in a time dependent manner. Taken together, HP extract may inhibit the proliferation of prostate cancer LNCaP cell associated with inhibition of NF- κ B activation, PSA and AR expression and that of apoptosis.

Key words : *Herba Patriniae*, LNCaP cells, apoptosis, NF- κ B, Prostate Specific Antigen, Androgen Receptor

서 론

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, 消癰排膿, 活血行瘀의 효능이 있어 腸癰, 肺癰, 疔癰腫毒, 胸腹疼痛 등의 병증을 치료하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}.

전립선암이란 전립선 속에 암세포가 발견되는 병으로서 미국이나 유럽에서는 암으로 인한 사망자의 2번째 요인으로 빈도 높은 암이며³⁾ 우리나라에서 또한 생활의 서구화 및 고령화 사회로의 이행에 따라 빈도가 증가하는 추세이다. 전립선암은 초기에 국소적인 부위에 국한되어 나타나는 남성호르몬 의존형(androgen dependent)으로 존재하며 이에 대하여 남성호르몬 중지(androgen ablation)법의 치료를 시행하고 있다⁴⁾. PSA(prostate specific antigen, 전립선 특이 항원)는 전립선 세포에 특이적으로 발현하는 항원으로서 혈청내 PSA의 양의 검사는 전립선암의 진행도와 치료수준을 판단할 수 있는 근거로서 이용되고 있다⁵⁾. 실험적으로 남성호르몬 의존형(androgen dependent) 전립선 암세포인 LNCaP

세포는 PSA와 AR(남성호르몬 수용체, androgen receptor)를 합성하고 분비하는 기능이 있어⁶⁻⁸⁾ 남성호르몬 의존형 전립선암에 대한 연구에 유용하게 사용되고 있다. Nuclear factor(NF)- κ B는 세포의 생존 기전을 유지시켜주는 전사 인자로서⁹⁾ LNCaP 세포에서 항상 활성화되어 있다고 보고되고 있다^{10,11)}.

최근에 암을 치료하는데 화학요법이 많이 사용되어 왔는데, 이는 유전자를 손상시켜 세포독성을 유발하는 것으로 알려졌다. 즉, 화학 치료제는 세포고사 또는 계획된 세포사멸(programmed cell death)이라고 알려진 세포사멸 과정을 유도한다는 많은 보고가 있다¹²⁻¹⁴⁾.

이에 저자는 남성호르몬 의존형 전립선 암세포인 LNCaP 세포를 이용하여 敗醬 추출물의 세포고사 유도효과와 NF- κ B, PSA, AR의 발현 정도를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, caspase-3

* 교신저자 : 문형철, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원

· E-mail : freer9@hanmail.net, · Tel : 062-670-6446

· 접수 : 2004/03/20 · 수정 : 2004/04/26 · 채택 : 2004/05/26

에 대한 형광기질(fluorogenic substrates)과 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), PSA와 AR 항체, 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 의존형 전립선 암세포인 LNCaP 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 RPMI에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 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 추출물 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

LNCaP 세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10⁴ cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 LNCaP 세포에 敗醬 추출물을 48 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 LNCaP 세포에 48시간 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 5μg을 2% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

6. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4℃에서 30분 반응시킨 후, 30μg의 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. PSA와 AR에 대한 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.

7. NF-κB의 활성측정

전사인자 활성을 측정기 위해 먼저 약제가 처리된 LNCaP 세포에서 핵 추출물은 Jeong 등의 방법으로 모아졌다¹⁵). 세포는 저 삼투압 용해용액(0.2 mM PMSE, 10 μg/ml aprotinin, 20 μM pepstatin A, 0.1 mM antipain)으로 10분 얼음에서 팽창시켜 최종적으로 Nonidet P-40을 0.1%되게 처리한 후 2,500rpm에서 원심분리 하여 핵단백질만을 모았다. NF-κB의 활성측정은 NF-κB의 consensus binding site을 가진 oligonucleotide probe (5'-CCG GCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 3'-CCG GCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG)를 10 mM Tris-HCl 용액(pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85℃에서 5분 annealing 한 후 100 ng을 Rediprime kit(Amersham, England)를 이용하여 32P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10 μg의 핵단백질과 상온에서 30분 반응시킨 후 냉온실에서 4% polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF-κB 활성을 측정하였다.

8. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹⁶)에 의거하여 정량하였다.

9. 통계 분석

실험 결과는 mean ± S.E.M.으로 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 LNCaP 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 24시간, 48시간 처리한 후 MTT을 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 2.0, 5.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 24시간에서 생존율이 각각 66.3%, 50.2%로 감소하였으며 48시간 처리한 군에서는 각각 50.2%, 32.1%로 나타났다(Fig. 1).

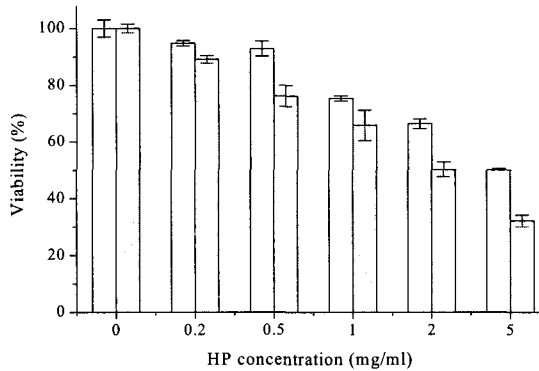


Fig. 1. Effects of *Herba Patriniae*(HP) extract on cell viability in LNCaP cells. Cells were treated with various concentrations of HP extract for 24 and 48 hour. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean \pm SEM of four independent experiments.

2. 세포고사에 미치는 敗醬 추출물의 효과

敗醬 추출물이 LNCaP 세포의 생존을 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인 하고자 agarose gel을 세포고사의 특징적인 현상인 DNA 분절(fragmentation) 현상을 조사하였다. 敗醬 추출물은 2.0mg/ml의 농도로 12, 24, 48시간 동안 LNCaP 세포에 처리한 후 DNA 분절 현상을 조사한 결과 24시간에 DNA 분절현상이 나타났으며 그 효과는 48시간까지 지속되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

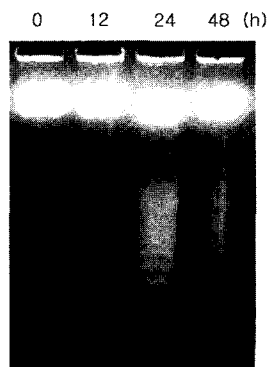


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of *Herba Patriniae*(HP) extract in LNCaP cells. Cells were treated with 2.0mg/ml HP extract for 12, 24 and 48 hour. DNA was extracted and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

3. 敗醬 추출물이 PSA 발현에 미치는 영향

敗醬 추출물에 의한 LNCaP 세포의 고사과정에 PSA의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 다양한 농도의 2.0 mg/ml 敗醬 추출물을 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 세포에 노출시킨 후 PSA 발현 정도를 Western blot을 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리

한 시간에 비례하여 PSA의 발현이 감소하였다(Fig. 3).

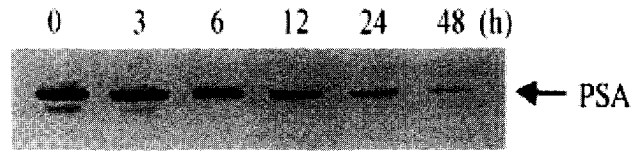


Fig. 3. Effects of *Herba Patriniae*(HP) extract on PSA expression in LNCaP cells. Cells were treated with 2.0mg/ml HP extract for indicated periods. Lysate from cells was used to measure PSA expression using Western blot, as described in Material and Methods.

4. 敗醬 추출물이 AR 발현에 미치는 영향

敗醬 추출물에 의한 LNCaP 세포의 고사과정에 AR의 발현 변화가 관여하는지를 확인하고자 다양한 농도의 2.0 mg/ml 敗醬 추출물을 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 세포에 노출시킨 후 AR 발현 정도를 Western blot을 이용하여 조사하였다. 그 결과 처리한 시간에 비례하여 AR의 발현이 감소하였다(Fig. 4).

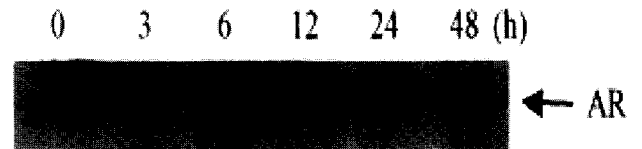


Fig. 4. Effects of *Herba Patriniae*(HP) extract on AR expression in LNCaP cells. Cells were treated with 2.0mg/ml HP extract for indicated periods. Lysate from cells was used to measure AR expression using Western blot, as described in Material and Methods.

5. 敗醬 추출물이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

敗醬 추출물이 LNCaP 세포에서 NF- κ B 활성화도에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 2.0mg/ml 敗醬 추출물을 3, 6, 12, 24, 48시간 동안 처리한 후 핵 추출물을 수집하여 NF- κ B 활성도를 조사하였다. 그 결과 敗醬 추출물을 처리한 시간에 비례하여 NF- κ B 활성도가 감소하였으며 48시간에서는 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 또한 NF- κ B의 특이성(specificity)을 확인하기 위하여 100 배 (Lane N)의 κ B oligonucleotide를 첨가하여 확인한 결과 NF- κ B 활성도가 감소하여 NF- κ B의 특이성을 확인하였다(Fig. 5).

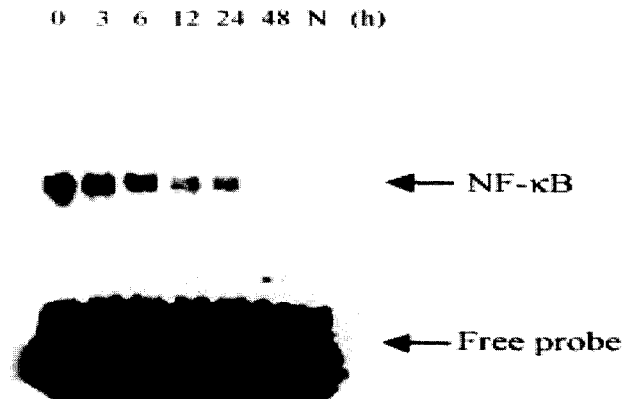


Fig. 5. Effect of *Herba Patriniae*(HP) extract on cytokines-induced translocation of NF- κ B from cytosol to the nucleus. Cells were treated with 2.0mg/ml HP extract for indicated periods. Nuclear extracts were prepared and NF- κ B activation was analyzed by electrophoretic mobility shift assay as described in Materials and Methods. Lane N: 100 fold κ B oligonucleotide

고찰 및 결론

敗醬은 淸熱解毒, 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 의존형 전립선 암세포인 LNCaP 세포에 敗醬 추출물을 처리한 후 세포고사 유도 효과를 조사하고 또한 전립선 암세포의 생존에 중요한 단백질인 전립선 특이 항원(prostate specific antigen, PSA), 남성호르몬 수용체(Androgen receptor, AR)의 발현에 미치는 효과를 관찰하고 마지막으로 전사 인자인 NF- κ B의 활성화를 조사하였다.

敗醬 추출물은 LNCaP 세포의 생존율을 처리한 농도에 비해 하여 감소시켰으며 24시간 처리에서는 5.0mg/ml의 농도에서 48시간 처리에서는 2.0mg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 50%의 생존율 감소를 나타냈다(Fig. 1). 이러한 敗醬 추출물의 생존율 감소효과가 세포고사 유도에 의한 것인지 확인하고자 LNCaP 세포에 2.0mg/ml 농도의 敗醬 추출물을 12, 24, 48시간동안 처리한 후 세포고사의 특징적인 현상중의 하나인 DNA 분절 현상^{17,18)}을 조사하였다. 敗醬 추출물을 12시간 동안 처리한 군에서는 대조군에 비하여 DNA 분절 현상이 나타나지 않았으나 24시간 동안 처리한 군에서 DNA 분절 현상이 나타났으며 그 효과는 48시간 동안 지속되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 敗醬의 LNCaP 세포에 대한 생존율 감소효과는 세포고사 유도에 의한 것임을 알 수 있었다. 최근 한약재를 이용하여 다양한 암세포를 대상으로 세포고사를 유도하여 항암제로서 응용하고자 많은 시도가 이루어지고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 敗醬 추출물의 LNCaP 세포에 대한 고사 유도 효과는 敗醬을 전립선암에 응용할 수 있는 근거가 될 수 있으리라 사료된다.

PSA(prostate specific antigen, 전립선 특이 항원)는 남성호르몬 의존형 전립선암 세포인 LNCaP 세포에서 DNA 합성과 증식(proliferation)을 촉진하는 인자로서 정상 LNCaP 세포에서 발현되고 있음이 밝혀졌으며²¹⁾ 또한, 임상적으로 전립선암의 진행 정도와 치료수준을 판단할 수 있는 근거로 이용되고 있어⁹⁾ 전립선 암 치료제 개발 시 표준 인자(marker protein)로 이용되고 있다. 본 실험에서 敗醬 추출물을 2.0mg/ml의 농도로 처리한 경우 시간 의존적으로 PSA의 발현을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 敗醬 추출물의 LNCaP 세포에 대한 고사 유도 효과와 더불어 전립선 암치료제 개발에 敗醬의 가능성을 시사한다. AR(androgen receptor, 남성호르몬 수용체)은 스테로이드 호르몬 수용체군(steroid hormone receptor gene family)중의 하나로 PSA를 포함한 다양한 단백질의 발현을 조절하는 전사 인자(transcription factor)이다²²⁾. Fig. 4에서 보여주듯이 敗醬 추출물은 2.0mg/ml의 농도에서 처리한 시간에 의존적으로 AR의 발현을 억제하였다. 위의 결과는 敗醬 추출물에 의한 PSA 발현의 감소 효과는 전사 인자인 AR의 발현 감소로 인하여 나타난 것으로 생각된다.

전립선 암세포에서 NF- κ B는 세포 생존 기전을 활성화시키는 기능을 가진 전사 인자로서 발현되어 cell death 기전을 방어

하는 역할을 하고 있다²³⁾. NF- κ B는 불활성화 상태에서 I κ B와 같이 복합체를 이루어 적절한 신호가 전달되면 I κ B가 인산화되며 분해되고 NF- κ B는 핵내로 이동하여 활성화되는 것으로 알려져 있다^{24,25)}. 정상 LNCaP 세포에서 NF- κ B는 적은 양이 활성화되어 있다고 보고되고 있다^{10,11)}. 敗醬 추출물을 LNCaP 세포에 처리하였을 경우 핵내로 이동한 NF- κ B의 양은 대조군에 비하여 감소하였고 특히 48시간 동안 처리했을 경우 대부분 억제하였다. 이러한 결과는 敗醬 추출물의 LNCaP 세포에 대한 생존율 감소 효과는 NF- κ B의 활성화를 억제시켜 세포 생존 기전이 활성화 되는 것을 억제하여 나타난 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면, 인간 전립선 암세포인 LNCaP 세포에서 敗醬 추출물은 세포고사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 또한 전립선 암세포 증식의 중요한 표지 물질인 PSA를 AR의 억제를 통하여 감소시키는 효과가 있으며 세포 생존 기전중의 하나인 NF- κ B의 활성화를 억제시켰다. 앞으로 다른 암세포에서의 敗醬의 고사 유도효과를 조사하고 그 유도 기전을 밝힌다면 암을 치료할 수 있는 후보 물질중의 하나로 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. Greenlee, R.T., et al., Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin, 51(1)15-36, 2001.
4. Isaacs, J.T., et al., Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. J Androl, 13(6):457-64, 1992.
5. Chen, C.D., C. L. Sawyers, NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. Mol Cell Biol, 22(8):2862-70, 2002.
6. Hsieh, T.C.m J.M. Wu, Effects of fenretinide (4-HPR) on prostate LNCaP cell growth, apoptosis, and prostate-specific gene expression. Prostate, 33(2):97-104, 1997.
7. Porterfield, H. UsToo PC-SPES surveys: review of studies and update of previous survey results. Mol Urol, 4(3):289-91;discussion 293, 2000.
8. Hsieh, T.C., J.M. Wu, Cell growth and gene modulatory activities of Yunzhi (Windsor Wunxi) from mushroom *Trametes versicolor* in androgen-dependent and androgen-insensitive human prostate cancer cells. Int J Oncol, 18(1):81-8, 2001.

9. Mayo, M.W. and A.S. Baldwin, The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1470(2):M55-62, 2000.
10. Palayoor, S.T., et al., Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene*, 18(51):7389-94, 1999.
11. Huang, S., et al., Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*, 20(31):4188-97, 2001.
12. Panchal R.G.. Novel therapeutic strategies to selectively kill cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 55:247-252, 1998.
13. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs*. 5:3-9, 1994.
14. Watson A.J. Review article: manipulation of cell death the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 9:215-226, 1995.
15. Jeong JY, Jue DM. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Immunology* 158:4901-4907, 1997.
16. 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, 248-254, 1976.
17. Kwon, K.B., et al., *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J Biol Chem*, 276(50):47518-23, 2001.
18. Kwon, K.B., et al., Induction of apoptosis by takrisodokyum through generation of hydrogen peroxide and activation of caspase-3 in HL-60 cells. *Life Sci*, 73(15):1895-906, 2003.
19. Zhang, D.Y., et al., Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. *Cancer Res*, 63(14):4037-43, 2003.
20. Hsieh, T.C., et al., Effects of herbal preparation Equiguard on hormone-responsive and hormone-refractory prostate carcinoma cells: mechanistic studies. *Int J Oncol*, 20(4):681-9, 2002.
21. Wang, L. G., et al., Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res*, 57(4):714-9, 1997.
22. Lu, X., et al., Inhibition of proliferation and expression of AR/PSA by herbal supplement Equiguard in LNCaP cells cultured in androgen-proficient FBS and androgen-deficient charcoal-stripped FBS is correlated with increased serine-15 phosphorylation of the tumor suppressor gene p53. *Anticancer Res*, 23(3B):2489-98, 2003.
23. Beg, A. A., et al., Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, 9(22):2736-46, 1995.
24. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology* 12:141-179, 1994.
25. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins : new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14:649-683, 1996.