

구강편평세포암종에서 미슬토 추출물의 Apoptosis 유도 효과에 대한 실험적 연구

허균행 · 이재훈 · 김철환

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:13-23)

AN EXPERIMENTAL STUDY ON MISTLETOE EXTRACT-INDUCED APOPTOSIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Gyun-Haeng Heo, Jae-Hoon Lee, Chul-Hwan Kim

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University

This study was performed to investigate mistletoe extract-induced apoptosis in oral squamous cell carcinoma.

In vivo study, HN22 cells were xenografted in nude mice. After tumor was experimentally induced, mistletoe extract was directly injected on the tumor mass. The specimens were evaluated using light and transmission electron microscopes.

In vitro study, HN22 cells were cultured and exposed to mistletoe extract. The cells were evaluated using transmission electron microscope. To evaluate apoptotic cells, flow cytometric analysis was done.

The results were obtained as follows:

1. Light microscopic view of tumor mass showed necrosis at 2-4 weeks.
2. Transmission electron micrographs of tumor mass showed apoptosis and necrosis.
3. In TEM view of cell lines, necrosis and apoptosis were shown with mistletoe extract at 300µg/ml, apoptosis was shown with mistletoe extract at 100µg/ml.
4. In flow cytometric analysis, early and late apoptosis was shown when using caspase-3Ab and annexin-V, but no significant change was noted when using mebstain and Apo2.7 Ab.

In this study, mistletoe extract induced necrosis and apoptosis in the tumor mass was induced by HN22 cells, early and late apoptosis in vitro study. Mistletoe extract was likely to induce cell death in oral squamous cell carcinoma through apoptosis.

Key words : Mistletoe Extract, Apoptosis, Oral Squamous Cell Carcinoma, HN22 cells, Flow cytometric analysis

I. 서 론

미슬토(mistletoe)는 관목에 기생하는 식물로 수천년 전부터 약용식물로 사용되어 왔으나 그 추출물을 이용하여 악성종양에 대한 의학적 접근을 시도한 것은 최근이다¹⁾. 현재 독일을 비롯한 유럽지역에서 미슬토 추출물은 기존 항암치료에 단독으로 혹은 보조적으로 사용되고 있으며, 기존 요법의 치료효과를 증진시키거나 부작용을 감소시키는데 효과가 있다고 알려져 있다. 임상적으로는 종양의 성장억제와 환자의 생존율의

증가에 기여한다고 한다²⁾.

미슬토 추출물(mistletoe extract)의 성분은 복합적으로 구성되어 있으며 일부 그 작용이 알려진 중요 성분은 크게 미슬토크틴(mistletoe lectin)과 비스코톡신(viscotoxin)이며 이들은 각기 다른 생물학적 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다³⁾. 미슬토크틴은 4가지 정도가 알려져 있으며 결합되는 당(sugar)에 따라 D-galactose가 결합되는 미슬토크틴 I(ML I), N-acetylgalactosamine이 결합된 미슬토크틴 II(ML II), N-acetylgalactosamine과 D-galactose가 결합된 미슬토크틴 III(ML III)로 분류되며, VisalbcBA라 불리는 키틴결합단백(Chitin binding protein)이 최근에 발견되었다^{4,5)}. 비스코톡신은 alkaline polypeptide로 분자량이 약 5kDa이며 최근 A₁, A₂, A₃, B, I-PS 및 U-PS의 6가지의 다른 아형이 존재하는 것이 발견되었다⁶⁾.

미슬토 추출물의 작용을 보면 우선 면역계에 대한 비특이적인 자극을 통하여 악성 종양에 대한 저항을 증가시킨다⁷⁾. 미슬토크틴은 미슬토 추출물의 주작용 성분으로 세포독성과 면역

이재훈

330-716, 충남 천안시 신부동 산 7-1
단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jae-Hoon Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook Univ.
san 7-1, Shinbu-dong, Chon-an, Chung-Nam, 330-716, Korea
Tel : 82-41-550-1993 Fax : 82-41-551-8988
E-mail : lee201@dku.edu

조절 기능을 갖는다. 미슬토크틴은 세포독성작용을 하는 A-chain과 탄수화물과 결합하는 B-chain으로 구성되어 있으며 이들의 상호작용에 의해 세포사를 유도한다⁸.

면역조절인자(immunomodulator)는 종양세포의 성장에 대하여 숙주의 방어 기능을 증가시키는데 미슬토 추출물은 면역 기능을 자극하는 기능을 갖고 있어서 항암치료에 기여한다. 예로 미슬토 추출물 투여시 흉선의 무게가 증가되는 것이 실험적으로 발견되었으며 종양내로 백혈구의 침윤이 증가되고 대식세포와 NK세포, 종양괴사인자(tumor necrosis factor)의 활성이 증가되었다⁹.

항암요법이나 외과적 처치가 계속 발전되어 오고 있는 현재에도 종양환자를 죽음에 이르게 하는 가장 큰 원인은 전이(metastasis)에 있다¹⁰. 미슬토 추출물은 종양세포들의 진행 및 전이를 억제하여 종양의 성장을 줄이고 다른 기관 및 인접 부위의 확산을 줄이는 작용이 있다¹¹. 성인에 있어서 혈관 형성(angiogenesis)은 종양이나 상처의 치유에서처럼 병적인 현상이다. 반면 종양의 성장과 전이를 위해서는 적절한 혈류의 공급과 이에 수반되는 지속적인 혈관의 형성이 요구된다. 종양에서 혈관의 형성은 혈관형성인자에 의해 내피세포(endothelial cell)의 증식을 자극해서 주위 조직으로부터 종양 조직 쪽으로 모세혈관이 자라도록 유도하게 된다^{12,13}. 미슬토 추출물은 종양세포에서 혈관 형성의 억제 및 혈관성 전이를 억제한다고 한다¹⁴.

세포독성(cytotoxicity)은 미슬토크틴과 비스코톡신에서 모두 나타날 수 있다. 미슬토크틴의 경우 사람의 종양세포주나 동물실험에서 강한 세포독성을 나타내고 특히 신장암, 전립선암, 유방암 세포에서 매우 높은 세포독성 효과가 있었다⁹. 비스코톡신은 면역 기능에 대한 자극 없이 세포독성 효과를 나타낸다고 알려져 있으며¹⁵, 미슬토크틴과 비교하여 열에 안정적인 세포독성 효과가 있다고 한다¹⁶. 그러나 최근의 연구에서 사람의 과립구에 대하여 작용 경로를 확실히 파악하지는 못하였으나 강한 면역조절 기능이 있다는 것이 발견되었다¹⁷.

종양 세포의 제거를 위한 수단으로 미슬토 추출물을 사용할 때 최근 주목받고 있는 부분이 apoptosis를 유도하는가 하는 것이다. 종양세포의 제거 방법으로 외과적 방법, 방사선 요법, 항암제에 의한 화학요법이 단독 또는 복합적으로 사용되어 진다. 이때 사용되는 항암제는 주로 강한 세포독성을 유발하며 종양세포 뿐만 아니라 주위의 건전한 숙주세포에도 심각한 부작용을 유발하기도 한다. Apoptosis는 발생 및 분화과정 뿐만 아니라 세포손상 및 감염, 방사선, 약물에 의해서도 나타날 수 있는 과정으로 일종의 프로그램화된 세포사멸을 유도한다. 따라서 주위 조직에 부작용 없이 apoptosis가 일어나는 세포만 제거되는 것이다^{18,19}.

본 연구에서는 종양에 대한 억제 효과가 있다고 알려진 미슬토 추출물을 구강편평세포암종에 투여한 후 apoptosis를 유도하는지에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다. 우선 HN22 세포주를 누드 마우스에 이종 이식하여 암종을 형성한 후 미슬토 추출물을 직접 투여 후 조직을 채취하여 광학현미경 및 투과

전자현미경 하에서 관찰하였고, HN22 세포주를 배양하여 시험관에서 미슬토 추출물을 투여한 후 투과전자현미경 하에서 관찰하고 유세포 분석(flow cytometry)을 통하여 apoptosis 유도에 대한 증거를 찾고자 하였다. 본 연구의 목적은 미슬토 추출물이 구강편평세포암종에서 항종양 효과가 있는지 알아보고 특히 apoptosis를 충분히 유도하는지 관찰하여 미슬토 추출물의 임상적 적용 시 치료 접근과 방향, 효과에 대한 전략적 치료 계획에 기여하고자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 동물실험

1) 누드마우스 및 세포접종체(cell inoculum) 준비

BALB/c/nu/nu(charsliver[®], Japan)를 실험동물로 사용하였으며, 생후 5주된 약 25g 내외의 수컷을 사용하였다. 소독된 쥐장에서 소독된 물과 사료를 공급하고 모든 실험을 크린벤취 속에서 시행하였다. 실험동물의 생물학적 주기를 위해 실내등을 주야 12시간씩 조영, 점멸하였다.

HN22세포주(Main state university, USA)를 기본 세포주로 하여 10% FBS 및 스트렙토마이신/페니실린을 포함하는 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium, Hyclone[®], USA)을 배양액으로 사용하였다.

2) 종양유도 후 약제투여

배양된 세포접종체를 누드마우스의 양측 둔부에 이식하여 일정 크기(약 500mm³정도)의 편평세포암종을 유도한 후 미슬토 추출물(ABNOBA viscum[®] ABNOBA Heilmittel GmbH, Germany)을 유도된 암종내에 직접 주사하였다. 제조사의 권고용량을 참조하여 kg당 20mg씩 1주에 2회 투여한 후 2, 4 및 6주에 대조군과 함께 희생하여 결과를 관찰하였다.

3) 조직병리학적 관찰

2, 4 및 6주에 채취된 실험군과 대조군의 종양조직을 10% 중성 포르말린에 고정 후 4-5 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하고 통법에 따라 헤마톡실린-에오진 염색(H&E stain)을 시행 후 광학현미경하에서 200배로 관찰하였다.

4) 투과전자현미경 연구

2, 4, 6주에 채취된 실험군과 대조군의 조직을 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 2.0% Glutaraldehyde에 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 고정 후 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 1.0% osmium tetroxide에 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 후고정하였다. Graded ethanol에서 탈수 후 Epon 812(TAAB Lab, Berk)에 포매 후 LKB microtome에서 diamond knife를 이용하여 초박절편을 제작하였고, uranyl acetate lead citrate로 염색하였다. 이후 H-800 TEM (Hitachi, Tokyo Japan)에서 관찰하였다.

2. 세포주 실험

1) 종양세포 배양

HN22 세포주를 10% FBS 및 스트렙토마이신/페니실린을 포함하는 DMEM을 배양액으로 사용하여 37°C 하의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 100mm 세포배양접시에서 5×10⁶ 개의 세포를 분주하여 5일마다 Trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대배양하였다.

2) 약제 저항성 실험

100mm 세포배양접시에서 HN22 세포주를 2×10⁶개 세포로 세어 분주하고 배양하였다. 3일 후 실험에 필요한 미슬토 추출물의 농도를 달리하여 100µg/ml와 300µg/ml를 투여 후 각각 일주일간 더 배양하였다. 이후 위상차현미경하에서 세포의 상태 및 생존을 관찰하였다.

3) 유세포 계측 연구(Flow cytometry)

배양된 세포주에 미슬토 추출물의 농도를 달리하여 100 µg/ml와 300µg/ml를 투여 후 각각 48시간을 더 배양하였다. 이후 유세포 계측을 위한 처치를 시행하였다.

(1) Annexin V-FITC를 이용한 분석

배양된 세포를 PBS를 사용하여 세척한 후 원심분리하고 재부유시킨다. 이후 dilution binding buffer를 사용하여 1×10⁶ cell/ml로 만든다. 희석된 Annexin V-FITC를 넣고 녹인 propidium iodide를 첨가한다. 암소의 얼음위에서 배양한다. 이후 유세포 계측을 시행한다.

(2) Mebstain을 이용한 분석

1.5ml 원심분리 tube에 2×10⁶ cell/ml가 되게 하여 2% BSA가 포함된 PBS로 두 번 세척하고 4% PFA로 고정된 후, 0.2% BSA가 포함된 PBS로 두 번 세척한다. -20°C에서 30분간 incubation 시켜서 permeabilization한다. 원심분리 후 부유액을 버리고 0.2% BSA가 포함된 PBS로 두 번 세척한다. 부유액을 버리고 TdT 용액을 첨가 후 incubation한다. 0.2% BSA가 포함된 PBS 첨가 후 원심분리한 후 세척한다. 부유액을 버리고 0.2% BSA가 포함된 PBS로 재부유 후 계측한다.

(3) Caspase-3 antibody를 이용한 분석

PBS로 세척 후 1×10⁶ cells/0.5ml가 되게 cytofix/cytoperm™ 용액에 부유시킨다. 이후 얼음위에서 incubation한다. Cytofix/cytoperm™ 용액은 버리고 perm/wash™ buffer와 antibody를 섞은 용액에서 재부유 시킨 후 실온에서 incubation 한다. 세척 후 재부유 시켜서 계측한다.

(4) Apo 2.7 antibody를 이용한 분석

1×10⁶ cells을 분리하여 실온에서 원심분리 후 상청액을 버리고 PE표식 Apo2.7 monoclonal antibody와 digitonin을 첨가하여 재부

유 시킨 후 얼음위에서 incubation 시킨다. 이후 PBS를 첨가하여 원심분리 후 상청액을 버리고 PBS로 재부유 시킨 후 계측한다.

4) 투과전자현미경 연구

70~80% 정도의 증만전(preconfluency) 상태에서 배양된 HN22 세포주에 미슬토 추출물을 농도(300µg/ml, 100µg/ml)를 달리하여 투여 후 0.1M cacodylate buffer(pH 7.4)하의 2.0% glutaraldehyde에 4°C에서 1시간 고정 후, 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4)하여 1.0% osmium tetroxide에 4°C에서 후 고정하였다. Graded ethanol에서 탈수 후 Epon812(TAAB Lab. Berk)에 포매한 후 LKB microtome에서 diamond knife를 이용하여 초박절편을 제작하였다. Uranyl acetate lead citrate로 염색 후 H-800 TEM (Hitachi, Tokyo, Japan)에서 관찰하였다.

III. 연구 결과

1. 동물실험

1) 조직병리학적 소견

누드마우스에 이종이식되어 성장한 편평세포암종은 미슬토 추출물을 투여하지 않은 대조군에서 농염된 핵과 2-3개의 다형핵을 가진 세포 및 핵이 거대해진 세포가 보이는 등 분화도가 좋은 암종으로 관찰되었다(Fig. 1). 실험군의 2주 조직소견에서는 괴사소견이 일부 관찰되기 시작하였으며, 4주 소견에서는 광범위한 괴사가 진행되고, 6주 소견에서는 괴사가 심화되고 섬유육이 보이며 괴사에 의한 염증세포 침윤과 퇴행성 석회화 소견도 관찰되었으며 반흔조직도 관찰되었다(Fig. 2-6).

2) 투과전자현미경 소견

대조군에서는 용모가 많고 서로 연결되어 있으며 각화띠가 보이는 등 편평세포암종의 특징을 보이며 핵과 핵인이 커져 있는 것이 관찰되고 다형핵이 관찰되는 다양한 형태의 종양세포가 관찰되었다(Fig. 7).

실험 2주군에서는 세포막의 경계가 불명확해지고 파괴된 양상이 관찰되며 핵이 변연으로 몰리며 농염된 상을 보였고, 일부 공포가 나타나기도 했다(Fig. 8). 실험 4주군에서는 염색질의 핵막쪽으로의 변연화 양상이 더욱 뚜렷해지고 핵이 파괴된 양상이 일부 보이며 미토콘드리아의 팽창 소견도 보였다(Fig. 9). 실험 6주군에서는 치밀한 교원섬유육이 보이고 거대해진 미토콘드리아가 관찰되었다(Fig. 10).

2. 세포주실험

1) 투과전자현미경 소견

미슬토 추출물 300µg/ml를 투여한 후 관찰한 군에서는 세포막 손상으로 소기관이 상실되고 핵막이 불규칙하고 염색질은 농축되어 있으며, RER, 미토콘드리아 등도 거의 파괴되어 있

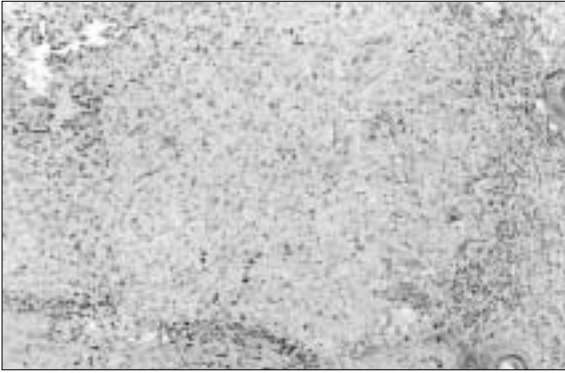


Fig. 1. Microscopic view of Tumor Mass Tissue (H&E, ×200)

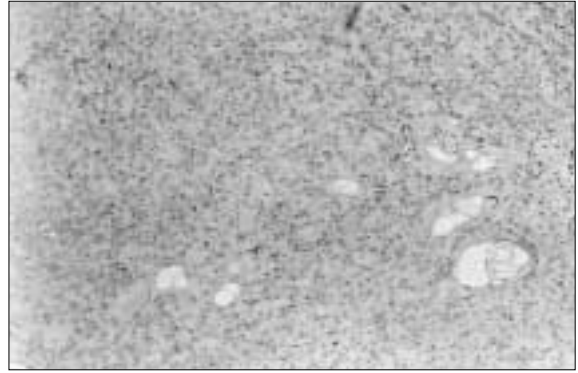


Fig. 2. Microscopic view of Experimental Group (at week 2) (H&E, ×200)

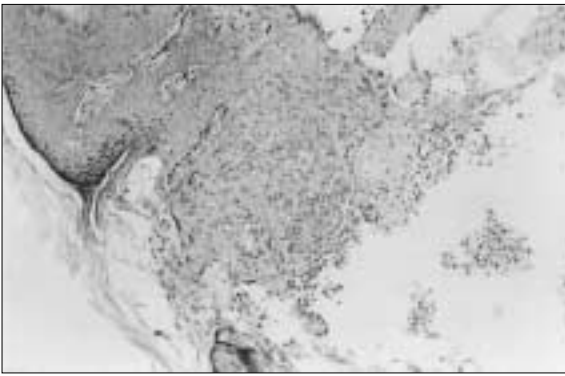


Fig. 3. Microscopic view of Experimental Group (at week 4) (H&E, ×200)

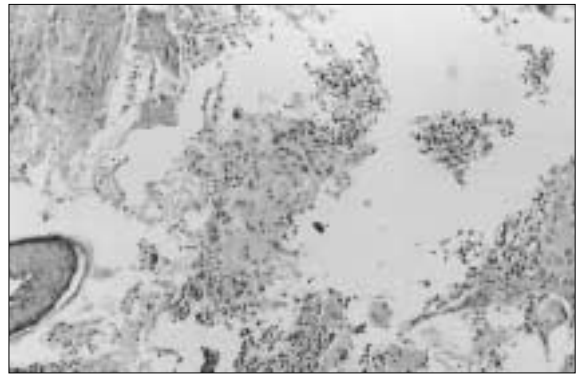


Fig. 4. Microscopic view of Experimental Group (at week 4) (H&E, ×200)

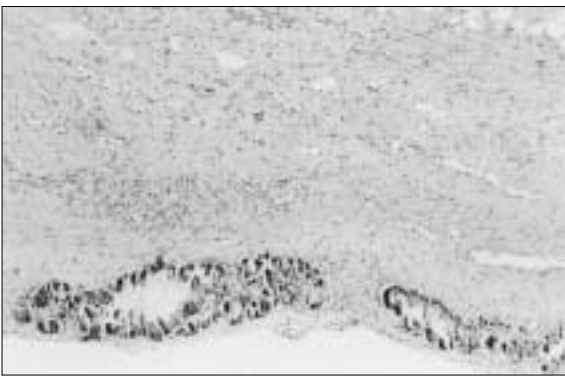


Fig. 5. Microscopic view of Experimental Group (at week 6) (H&E, ×200)



Fig. 6. Microscopic view of Experimental Group (at week 6) (H&E, ×200)

는 양상이 관찰되었다(Fig. 11).

100 μ g/ml를 투여한 군에서는 염색질이 반달형의 모양을 하고 있으며 핵내에 공포가 일부 보이고 일부에서는 염색질의 분절이 관찰되기도 하며 핵인의 손상도 관찰되었다(Fig. 12).

2) 약제 저항성 실험

미슬토 추출물을 농도를 달리하여(100, 300 μ g/ml) 각각 투여한 후 위상차현미경하에서 관찰하였다. 300 μ g/ml의 농도에서는 대부분의 세포가 커지고 늘어지며 돌기가 보였으며 농염

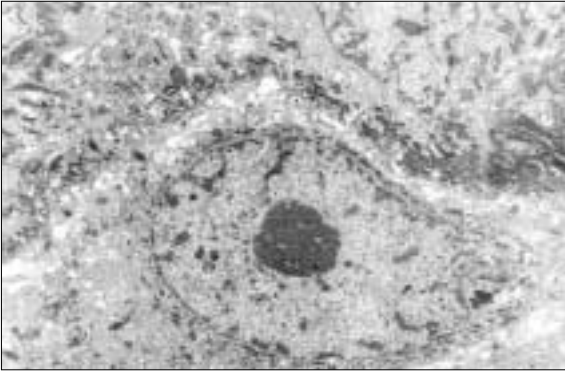


Fig. 7. TEM view of Tumor Mass Tissue



Fig. 8. TEM view of Experimental Group (at Week 2)

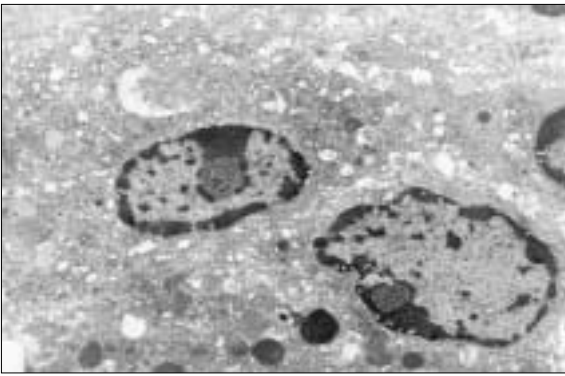


Fig. 9. TEM view of Experimental Group (at Week 4)

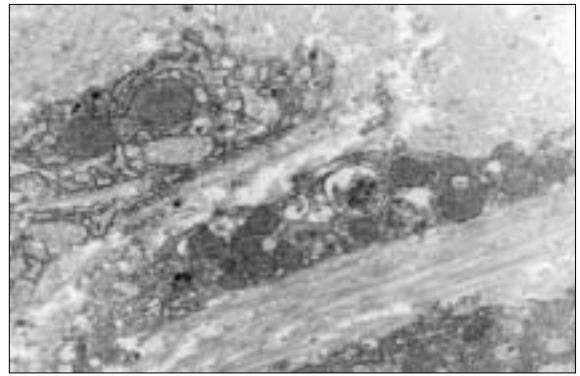


Fig. 10. TEM view of Experimental Group (at Week 6)

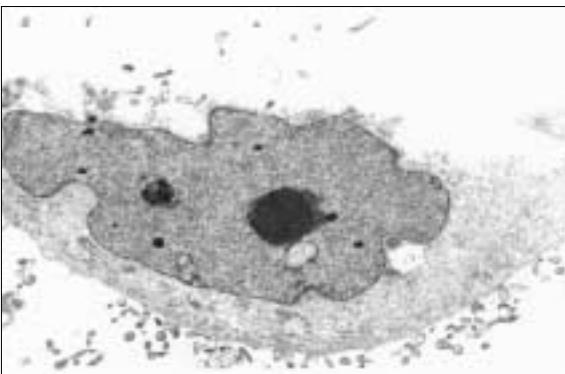


Fig. 11. TEM view of HN22 Cell Line (with mistletoe extract at 300 $\mu\text{g/ml}$)

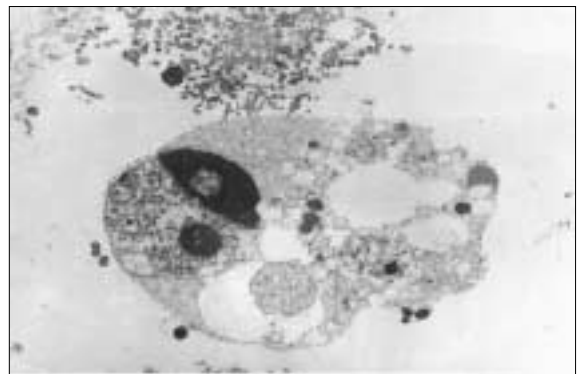


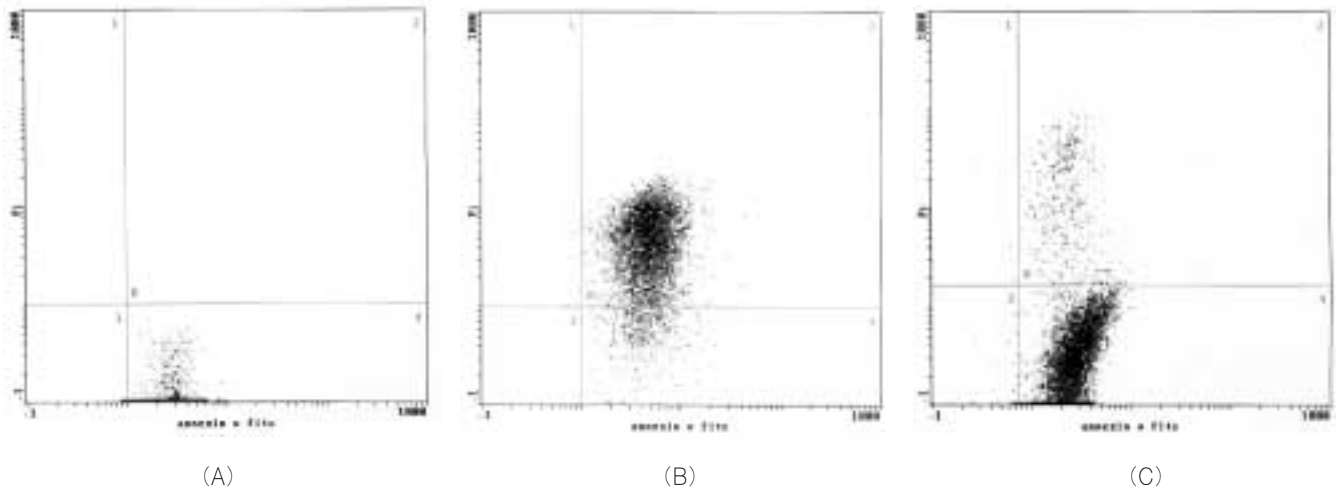
Fig. 12. TEM view of HN22 Cell Line (with mistletoe extract at 100 $\mu\text{g/ml}$)

된 핵의 상이 관찰되며 생존된 세포가 거의 없었으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 다형핵이 관찰되고 세포의 형태도 중앙 세포의 형태를 그대로 유지하며 대부분 생존해 있는 것이 관찰되었다.

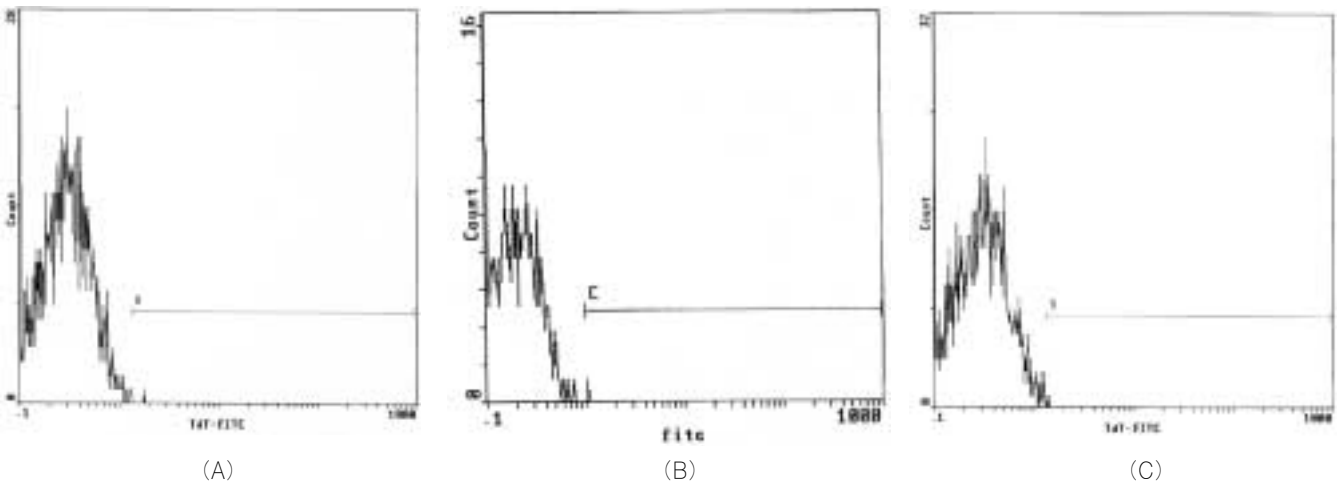
3) 유세포 분석에 의한 소견

(1) Annexin V-FITC를 이용한 분석

미슬토 추출물 300 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군에서는 2구획에서의 반응이 크게 나타났으며 이것은 apoptosis보다 괴사의 양상이 많



Graph 1. Flow Cytometry Analysis of NH22 Cells.
While Fluorescence of Annexin-V
(A) with medium (B) with mistletoe extract at 300 μ g/ml (C) with mistletoe extract at 100 μ g/ml



Graph 2. Expression of DNA Fragment under Mebstain
(A) with medium (B) with mistletoe extract at 300 μ g/ml (C) with mistletoe extract at 100 μ g/ml

다고 분석되었다. 100 μ g/ml를 투여한 군에서는 4구획에서의 반응이 현저하게 나타나 apoptosis 유도가 높게 나타나는 소견이 관찰되었다(Graph 1).

(2) Mebstain에 의한 분석

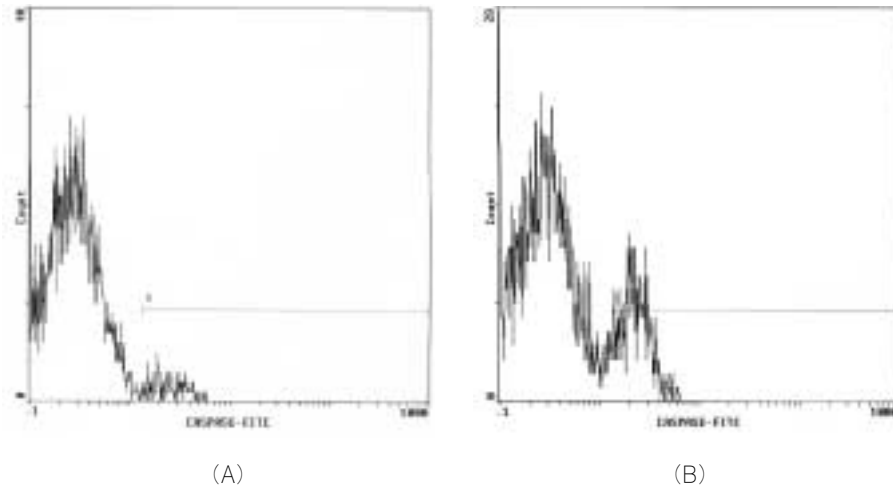
미슬토 추출물 300 μ g/ml를 투여한 군에서나 100 μ g/ml를 투여한 군에서 대조군과 비교하여 apoptosis 구획에서의 변화가 크게 나타나지 않았다(Graph 2).

(3) Caspase-3 antibody를 이용한 분석

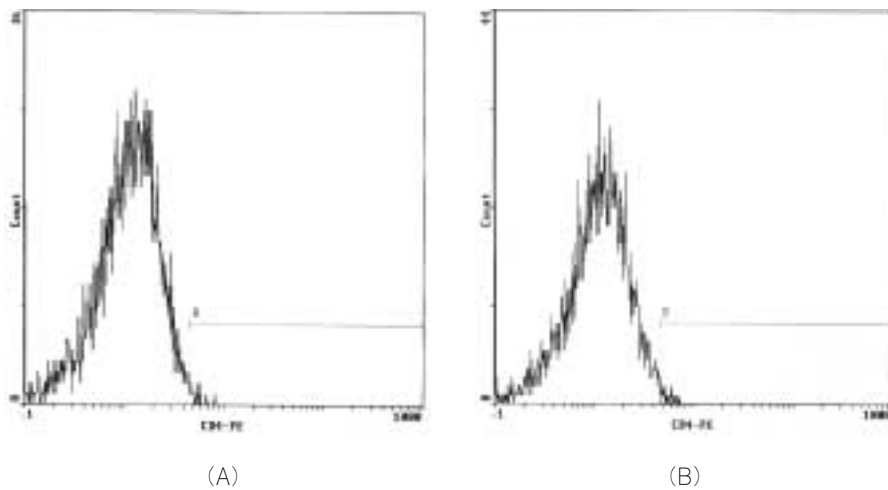
미슬토 추출물 100 μ g/ml를 투여한 결과에서 대조군과 비교하여 B구획에서 큰 변화 양상이 관찰되었으며 apoptosis로 유도된 세포가 많이 계측되었다(Graph 3).

(4) Apo2.7 antibody를 이용한 분석

미슬토 추출물 100 μ g/ml를 투여한 후 계측한 결과 B구획에서 대조군에 비해 상승한 양상이 나타났으나 차이는 미미하였다(Graph 4).



Graph 3. Active Caspase-3 Expression
(A) with medium (B) with mistletoe extract at 100 μ g/ml



Graph 4. Expression of Apo2.7
(A) with medium (B) with mistletoe extract at 100 μ g/ml

IV. 총괄 및 고찰

Apoptosis는 생리적 변화뿐 아니라, 병적인 상태에서도 나타날 수 있는 보존적이며 적극적인 세포기전이다. 이 과정은 세포의 발생과정이나 숙주의 방어기전, 종양의 발현 등 다양한 세포의 상태에서 나타난다. Apoptosis과정은 항암제, 산화과정, 열자극, 방사선, 발암물질, 종양유발인자, cytokine 등의 세포외적, 내적요인 등에 의해서도 시작될 수 있으며 배아상태나 발생, 면역 등의 생물학적 상태에서는 세포성장의 중요한 조절기능이 되기도 한다. 괴사와 비교하여 apoptosis는 Ca^{2+}/Mg^{2+} 의 존재 endogenous endonuclease의 활성화에 의해 진행되는 점진적인 세포의 자살과정이다. 서로 다른 외적요인에 의한 신호전

달 후 apoptosis로 진행되는 세포군의 감수성은 적절한 결합부위의 노출, 활동하기 위한 적절한 상태, endonuclease의 유도능력 등에 영향을 받으며 동물실험에서 apoptosis 유도물질, 또는 항체의 투여 후 세포사의 시작은 결국 종양세포를 감소시키는 것으로 알려졌다^{20,21)}.

Apoptosis과정에는 여러 종류의 단백 및 효소, 유전자 등의 발현 및 이들의 상호작용이 나타나게 되며 악성종양의 많은 경우에 있어 apoptosis의 감소현상이 나타나게 된다^{22,23)}. 이 중 p53 돌연변이는 사람의 종양에서 대부분 나타나게 되며 진행된 종양이나 불량한 예후와 연관이 있다고 한다^{24,25)}. 많은 경우에 p53의 상실은 apoptosis의 감소와 연관되어 있으며 DNA의 손상에 대한 반응을 증가시킨다. 그러나 p53의 존재가 약물에 의해 유

도된 세포사에서 반드시 요구되지는 않는다. 충분한 용량을 공급하는 약물에 의해 유도된 apoptosis는 p53에 의존적이지 않을 수도 있으며 사실상 약물에 의해 유도된 apoptosis에서 p53은 약물의 종류, 용량, 종양조직과 돌연변이 등의 다양한 요인에 영향을 받는다²⁶⁻²⁸. p21은 cyclin-dependent kinase(cdk) inhibitor로 작용하는 중요 cell cycle protein이며, 세포주기과정을 조절하는 tumor suppressor p53의 downstream mediator의 역할을 한다^{29,30}. Wild type p53에 의한 직접적인 p21의 유도는 cdk 활성을 억제하여 성장을 중지시키게 된다. 최근 mutant 또는 null p53세포의 apoptosis에서 DNA 손상효과에 대한 연구 시 p21 gene의 발현 증가는 p53 비의존성 apoptosis 유도와 짝을 이루어 나타났다^{31,32}.

Bax는 pro-apoptotic Bcl-2 family protein으로 cytosol에 존재하며 apoptosis 유도 시 미토콘드리아에서 변환된다. Bax는 미토콘드리아에서 cytochrome C의 해리를 직접적으로 유도하며 caspase를 활성화시킨다. 반면에 Bcl-2는 apoptosis가 진행되는 세포에서 cytochrome C의 해리를 억제한다. 그러나 Bcl-2 자신은 tumor suppressor molecule p53에 의해 억제된다^{33,34}.

Apoptosis 과정을 증진시키거나 억제하는데 관여하는 단백질을 포함하여 포유동물의 세포에서 적어도 15개의 Bcl-2 family가 발견되었다. 모든 Bcl-2 family들은 4개의 Bcl-2 homology domain (BH1에서 BH4)중 하나이상의 domain을 가지고 있다. 이 중 apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic Bcl-2 family에는 크게 Bcl-2와 유사한 Bax, Bak, Bok 등이 포함되는 Bax subfamily와 BH3 family로 나뉘며 anti-apoptotic 단백질에는 Bcl-2, Bcl-XL 등이 있으며 pro-apoptotic 단백질은 anti-apoptotic 단백질의 antagonist로 작용하여 apoptosis를 유도하는데 관여하며 각 Bcl-2 family들은 상호간에 기능을 약화시켜 apoptosis 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다³⁵⁻³⁷.

인간 telomerase, cellular reverse transcriptase(hTERT)는 nuclear ribonucleoprotein enzyme complex로 telomeric DNA의 합성과 확장에 관여한다. 이 효소는 대부분의 악성종양에서는 발현되나 정상 세포에서는 발현되지 않는다. 그래서 telomerase는 세포사와 종양유발에 있어서 중요한 역할을 한다. 즉 telomerase의 활성화와 종양사이의 관계에서 종양세포의 성장이 telomerase의 재활성을 유발할 수 있다는 것이다. 그러므로 telomerase는 항종양 약물의 연구에서의 대상이 될 수 있으며 더욱이 proto-oncogene과 tumor suppressor gene 등은 직간접적으로 telomerase에 영향을 줄 수 있다^{38,39}.

Apoptosis 초기 단계에서부터 계속 관찰되는 현상 중 cytosolic protease series중 하나인 caspase의 유도가 있는데 이들 caspase는 단백질질들을 분해하고 apoptosis의 형태적 특징을 발현시키는 역할을 한다. Apoptosis 신호의 전달과 수행에 있어서 caspase cascade의 협조가 요구되며 이중 caspase-3는 apoptosis 초기단계에 활동하는 중요 protease로 알려져 있다. Apoptosis가 진행되는 세포에서만 볼 수 있는 활성화된 caspase-3는 16과 12kDa subunit의 heterodimer로 구성되어 있으며 이들은 32kDa의 proenzyme으로부터 유도된다. 활성화된 caspase-3는 단백질분해뿐만 아니라 다른 caspase도 활성화 시키며 cytoplasm내의 D4-GDI나

핵내의 PARP (poly ADP-ribose polymerase)같은 연관된 표적들도 활성화 시키게 된다. 116kDa PARP는 caspase-3 subunit중의 하나로 caspase-3 활성화는 apoptosis동안 DNA를 분절화시키고 이와함께 PARP를 85, 25kDa으로 분리시킨다⁴⁰. Caspase-3는 cysteine protease이며 PARP뿐만아니라 DNA-PK(DNA dependent protein kinase), actin, fodrin 그리고 Fas/Apo-, TNF α -mediated apoptosis에서의 laminin도 분해한다. 이런 caspase의 활성화는 몇몇 biosubstrate를 분해하게 되고 DNA 분절화보다 먼저 나타나게 된다. 또 PKC- δ 와 PARP의 분해에 있어서는 PKC- δ 가 PARP보다 먼저 분해된다⁴¹. Apoptosis 유도에 대한 이온화방사선의 조사에서도 PKC- δ 의 aspartate 330에서의 단백질분해 효과가 나타나며 이는 활성화된 40kDa C-terminal 분절을 이끌게 된다. Caspase-3에 의한 PKC- δ 의 활성화는 apoptosis와 연관된 세포에서 phenotype변화를 나타내게 된다⁴². 한 연구에서는 full length의 PKC- δ 가 시험관내 실험에서 cysteine protease cpp32(caspase3-like protease)에 의해 DMQD 330N에서 활성화된 분절로 분해되었다⁴³. 최근의 보고에 의하면 PKC- δ 의 inhibitor는 apoptosis의 mediator로 작용하는 reactive oxygen species(ROS)의 작용을 감소시켜서 중성구의 생존을 증가시켰다. 이런 결과로 PKC- δ 의 early cleaved activation은 ROS같은 2차중계자의 작용에 관여하는 것 같다⁴⁴. 이렇게 caspase family protease는 그들의 precursor로부터 온 다양한 proteolytic cleavage에 의해 활성화된다⁴⁵.

최근 caspase를 활성화시키는 2개의 주경로가 밝혀졌는데 하나는 death receptor를 경유한 것이고 다른 하나는 미토콘드리아에서 기시되는 것이다. Death pathway는 CD95같은 death receptor에서 caspase-8 protease의 FADD를 매개로 한 활성화 과정을 거치게 되며 다른 경로는 미토콘드리아에서 많은 apoptosis에 대한 자극으로 시작되어 기시되는데, caspase-9 protease가 cytochrome C 의존성 apoptosis 경로에 대표적이다. 세포가 apoptosis 자극을 받으면 미토콘드리아에서 해리된 cytochrome C는 dATP와 함께 포유류의 Ced-4 homologue인 Apf-1 (apoptotic protease activating factor)과 결합하며 이 결합물은 caspase-9을 활성화시켜 apoptosis를 기시하는 caspase-3, -6, -7 protease를 활성화시킨다⁴⁶.

본 연구에서는 HN22 세포주에 미슬토 추출물을 투여 후 유세포 분석을 통하여 caspase-3의 검출을 시도하였다. 100 μ g/ml의 농도하에서 48시간 노출된 세포주에 caspase-3 항체를 투여 후 유세포분석기상에서 분석 후 그래프 상에 증가된 반응이 나타났으며 이는 caspase-3의 증가된 증거로 볼 수 있었다. Caspase-3는 초기 apoptosis에서 관찰된 미토콘드리아의 막단백이어서 미슬토 추출물은 HN22 세포주에서 초기의 apoptosis를 유도한다고 생각되었다. 그러나 caspase-8, -9 등의 전단계의 자극 인자에 대한 실험을 실행하지 않아 단지 미슬토 추출물의 apoptosis 유도 증거만 도출할 수 있었으며 향후 caspase-3를 자극하는 전구 물질에 대한 연구가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

Apoptosis 세포에서 대표적 변화중의 하나인 미토콘드리아의 변화 중 permeability transition pore의 opening은 미토콘드리아의

transmembrane의 potential의 파괴에 기인하며, 투과성의 변화는 reactive oxygen intermediate(ROI)의 발현과 phosphatidyl serine(PS)의 세포외막에서의 빠른 상승을 유발한다. 이 변화는 apoptosis의 후기에 나타나게 되며 DNA의 분절화 현상도 나타나게 된다^{47,48}. 본 실험에서는 PS의 검출을 위해 Annexin V를 이용하였다. Annexin V는 PS에 선택적으로 결합하여 괴사된 세포와 apoptosis 유도된 세포를 모두 검출할 수 있게 하는데, 유세포 분석에 의한 계측에서 미슬토 추출물의 농도가 300 μ g/ml의 경우 괴사 세포가 많이 계측되는 반면 100 μ g/ml의 농도에서는 apoptosis 유도된 세포가 증가되는 양상이 나타났다. 이것은 PS의 발현이 후기 apoptosis에서 나타나는 현상이기도 하며 초기에 apoptosis 유도 신호를 충분히 감지하지 못하는 한계에서 기인하기도 한다고 생각된다. 또한 고농도의 미슬토 추출물은 apoptosis를 유도하는 미슬토크틴과 함께 세포 용해의 성질이 강한 비스코톡신도 다량 함유하므로 세포의 괴사 양상이 강하게 나타난다고 생각된다. 향후의 연구에서는 미슬토크틴과 비스코톡신의 분리 후 농도에 따른 반응을 검토하는 것도 생각해 볼 수 있겠다.

세포 괴사와 구별되어 apoptosis 세포는 세포핵의 분절화와 농염상을 보이며 세포질의 밀도가 상승하고 핵막의 돌출이 나타나며 핵의 파괴양상이 나타나는 반면 괴사에서는 세포막의 빠른 파괴와 미토콘드리아의 팽창, 세포질과 염색질의 파괴가 나타난다^{48,49}. 본 실험에서 동물 실험의 조직소견을 살펴보면 광학현미경 하에서는 2주에서부터 전체 조직의 괴사 양상이 나타나기 시작하고 4주, 6주에서는 더 광범위한 괴사 소견이 보였으며 투과전자현미경소견에서는 세포막의 파괴와 미토콘드리아의 팽창, 핵막의 심한 파괴 등의 괴사 양상과 함께 염색질의 변연화와 핵의 농염화 및 염색질의 분절된 파편 등이 일부 관찰되어 apoptosis 양상도 함께 관찰되었다. 이런 결과는 미슬토 추출물이 중물내로의 직접적인 주사에 의한 강한 세포 파괴가 주로 괴사를 유발시켜 종양세포를 파괴하였고 일부 주위 종양세포에 서서히 작용하면서 apoptosis를 유도한 것으로 생각된다. 그러나 apoptosis만을 유발하기는 동물실험에서는 힘들 것으로 생각되며 다만 직접 주사가 아닌 근육 및 복강 등을 통한 간접적 접근을 시도하여 그 반응을 관찰하는 것도 의의가 있을 것으로 생각된다.

HN22 세포주에 미슬토 추출물을 300 μ g/ml, 100 μ g/ml를 각각 투여 후 투과전자현미경 하에서 관찰한 경우 300 μ g/ml 농도의 상에서는 세포막과 세포질의 심한 손상 및 세포 소기관의 상실이 심하게 나타났으며 RER, 미토콘드리아도 거의 파괴되어 괴사가 심하게 진행된 소견을 보였으나, 100 μ g/ml 농도에서는 반달형의 염색질 형태와 apoptotic body로 보이는 일부 염색질의 분절이 관찰되기도 하는 apoptosis 유도 소견이 관찰되었다. 고농도의 미슬토 추출물 투여는 직접적인 세포괴사를 유발하여 apoptosis 유도를 가리게 되는 것으로 보여 향후 apoptosis 유도를 위한 실험의 경우 저농도 하에서의 관찰이 유리할 것으로 보인다.

DNA 분절화에 대한 검토를 위해 Mebstain을 이용하였는데

이것은 전통적인 TUNEL 법을 약간 변형시켜 복잡성을 줄인 검출 kit을 사용하였다. Biotinylated dUTP가 DNA 분절의 3-OH end에 부착하게 되는 성질을 이용하여 avidin-conjugated FITC를 사용하여 유세포 분석을 시도하였다⁵⁰. 300 μ g/ml와 100 μ g/ml의 투여군 모두에서 유의성 있는 결과를 도출하지 못하였다. 일반적으로 TUNEL 법은 조직세포에서 사용되어 왔으며 세포주의 시험관내에 실험에서도 사용되어 DNA 분절을 검출하는데 유용하다고 하였으나 세포주의 경우 유세포 분석 전처리 과정에서 세포의 파괴가 많이 나타나 apoptosis로 유도된 증거를 찾기 힘든 단점이 있다고 생각된다. 또한 후기 apoptosis의 검출 방법이어서 유세포 계측 전까지 세포의 유지가 힘들 수도 있다. 본 실험에서는 미슬토 추출물의 투여 후 48시간을 기다린 후 전처리를 시행한 바 세포의 apoptosis 유도에 실패한 것으로 보이며 향후 실험에서는 세포의 유지에 좀더 세심한 주의가 필요할 것으로 보인다.

미토콘드리아의 막단백인 Apo2.7(7A6 antigen) 분자는 38kDa의 단백질로 apoptosis가 진행되는 세포에서 나타난다. 이것은 digitonin-permeabilization 후 PE-labelled mAb Apo2.7에 의해 염색될 수 있다^{51,52}. Apo2.7의 표출은 endoplasmic reticulum에서 golgi complex로 단백질의 전달이 막히는 경우 나타나며 이것으로 protein synthesis/transport의 역제는 apoptosis를 유도한다고 유추할 수 있다⁵³. 또한 Apo2.7의 발현은 새로운 단백질의 합성을 요구하지 않는다. 즉 미토콘드리아의 한 부분이거나 이미 형성되어 있는 존재라는 것을 의미한다. Apo2.7의 발현이 반드시 apoptosis에서만 나타나는 것은 아니고 세포괴사의 경우에도 나타날 수 있으며 이 경우에는 DNA 분절은 관찰되지 않는다⁵⁴. 본 실험에서는 배양된 HN22 세포주에 100 μ g/ml의 미슬토 추출물을 투여 후 48시간 경과한 후 유세포 분석을 시행하였다. 대조군에 비하여 apoptosis 유도 세포가 약간 증가하는 양상을 나타내었으나 그 차이는 미미하였다. Apo2.7 검출을 위한 단계에서 permeabilization이 반드시 시행되어야 하며 permeabilization은 시간 경과에 따라 달라지는 양상이 나타나는데 본 실험에서는 시간 경과에 대한 고려를 하지 않고 유세포 분석의 전처리 과정을 시행 후 측정된 바 결과에 있어 큰 변화양상은 볼 수 없었다. 향후 연구에 있어서는 Apo2.7 검출을 위하여 시간 경과에 따른 검출량의 차이를 시도해 보는 것도 의미가 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 미슬토 추출물이 구강편평세포암종에서 apoptosis를 유발하는지의 여부를 관찰하기 위하여 HN22 세포주를 누드마우스에 이종이식 후 유도된 종물에 미슬토 추출물을 직접 주사한 후 세포의 형태적 변화를 광학현미경과 투과전자현미경 하에서 관찰하였으며 시험관내에서 배양된 HN22 세포주에 미슬토 추출물을 투여 후 투과전자현미경에서 관찰하고 유세포 분석을 통하여 apoptosis의 세포형태적 변화와 각 세포의 apoptosis 유도 여부를 관찰하였다. 동물 실험의 경우 apoptosis 보다는 괴사의 소견이 강하게 나타났는데 일부 apoptosis 소견도 관찰되었으며 세포주 실험에서는 apoptosis 유도 소견이 높게 나타났다. 이상의 결과로 미슬토 추출물은 HN22 세포에서

apoptosis를 유발한다고 생각되었으며, 향후 apoptosis 유도 의 각 단계별로 관여되는 요소들에 대한 연구 및 미슬토 추출물의 성분 및 농도에 따른 apoptosis 효과에 대한 추가 연구가 요망된다.

V. 결 론

미슬토 추출물이 구강편평세포암종에서 apoptosis 유도 효과가 있는지 알아보기 위해 HN22 세포주를 누드마우스에 이식한 후 형성된 암종에 미슬토 추출물을 직접 투여하여 조직편을 채취하고 광학현미경과 투과전자현미경하에서 관찰하고, 유세포 분석을 통하여 apoptosis를 계측한 후 다음의 결과를 얻었다.

1. 광학현미경하의 조직소견에서는 미슬토 추출물 투여 후 2-4주에서 종양세포의 괴사 양상이 관찰되었다.
2. 투과전자현미경하의 조직소견에서는 일부 괴사와 apoptosis 소견이 관찰 되었다.
3. 세포주의 투과전자현미경 소견에서는 300 μ g/ml의 농도에서는 주로 괴사와 일부 apoptosis 양상이 관찰되었고, 100 μ g/ml의 농도에서는 apoptosis의 양상이 주로 관찰되었다.
4. 유세포 분석에서는 caspase-3 Ab와 Annexin V를 이용한 경우 초기에서 후기까지 전체적으로 현저한 apoptosis 양상이 계측되었으나 Mebstain과 Apo2.7 Ab를 이용한 경우에는 apoptosis 양상이 미미하였다.

이상의 결과로 미슬토 추출물은 HN22세포주로 유도된 종양 조직에서는 괴사와 일부 apoptosis를 유도하였고, 시험관내 실험에서는 초기에서 후기까지의 apoptosis현상이 관찰되어 apoptosis를 통하여 종양을 소멸시키는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Mansky PJ: Mistletoe and Cancer: controversies and perspectives. Seminar in Oncology Dec 2002;29(6):589-594.
2. Kovac S, Hajto T, Hostanska K: Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patient treated with viscum album extract(Iscador). Eur J Cancer 1991;27:1672-1676.
3. Büsling A: Mistletoe: A story with an open end. Anticancer Drugs 1997;8(suppl.1):1-2.
4. Frauz H, Ziska P, kindt A: Isolation and properties of three lectin from mistletoe(Viscum album L.). J Biochem 1981;195:481-484.
5. Peumans WJ, Verhaert P, Pfüller U, et al.: Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lection from mistletoe (Viscum-album). FEBS Lett 1996;396:261-265.
6. Schaller G, Urech K: Cytotoxicity and different viscotoxins and extracts from the europeans subspecies of Viscum album L. phytotherapy Research 1996;10:473-477.
7. Bocci V: Mistletoe(Viscum album) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. J Biol Reg Homeos Agent 1993;7:1-6.
8. Franz H: Mistletoe lectins and their A and B chains. Oncology 1986;54:23-24.
9. Burger AM, Mengs U, Schtler JB, et al.: Antiproliferative activity of an aqueous mistletoe extract in human tumor cell line and xenografts in vitro. Drug Res 2001;51:748-757.
10. Yokoda J: Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis

- 2000;21:497-503.
11. Kutun SAR, Kuttan G: Effect of Viscum album in the inhibition of lung metasis in mice induced by B 6F10 melanoma cells. J Exp Clin Cancer Res 1999;6:159-162.
12. Folkman J: Tumour angiogenesis. Adv Cancer Res 1985;43:175-203.
13. Forkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. Science 1987;235:442-447.
14. Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, et al.: Inhibitory effect of Korean mistletoe(Viscum album coloratum) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. Cancer Lett 1995;97:83-91.
15. Stein GM, Berg PA: Mistletoe extract-Induced effects on Immunocompetent cells : In vitro study. Anticancer Drugs(Suppl 1): 1997;s39-42.
16. Park JH, Hyun CK, Shin HK: Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (Viscum album). Cancer Lett 1999;139:207-213.
17. Stein GM, Schaller G, Pfüller U: Thionins from Viscum album L : Influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. Anticancer Res 1999;19:1037-1042.
18. Fillis RE, Yuan J, Horvitz HR: Mechanism and functions of cell death. Ann Rev Cell Biol 1991;7:663-698.
19. Krammer PH, Behnmann I, Daniel P, et al.: Regulation of apoptosis in the immune system. Curr Biol 1994;6:279-289.
20. Jassen O, Scheffler A, Kabelitz D: In vitro effect of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Drug Res 1993;43(11):1221-1227.
21. Kimura C, Kondo OL, Amatsu M, et al.: Mechanism of UV-induced apoptosis in Human leukemia cells: roles of Ca²⁺/Mg²⁺ endonuclease, caspase-3, and stress-activated protein kinase. Exp Cell Res 1998;239:411-422.
22. Schewartz LM, Osborn BA: Programmed cell death, apoptosis and killer genes. Immunol Today 1993;14:582-590.
23. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis-its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73:2013-2026.
24. Wallace BRR, lowe SW: Clinical implications of mutations. Cell Mol Life Sci 1999;55:64-75.
25. Yonish-Rouach E, Resnizky D, Lotem J, et al.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature 1991;352:345-347.
26. Lowe SW, Lin AW: Apoptosis in cancer. Carcinogenesis 2000; 21:485-495.
27. Tereda N, Lucas JJ, Gelfand EW: Differential regulation of tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells. J Immunol 1991;147:698-704.
28. Kuirbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al.: Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:7491-7495.
29. El-Deiry WS, Harper JW, OConner PM, et al.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994;54:1169-1174.
30. Jiang H, Lin J, Su Z, Collart FR, et al.: Induction of Differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1 expression in the absence of p53. Oncogene 1994;9:3397-3406.
31. Kano A, Watanabe Y, Takeda N, et al.: Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes. J Biochem 1997;121:677-683.
32. Kim WH, Kang KH, Kim MY, et al.: Induction of p53-independent p21 during ceramide-induced G1 arrest in human hepatocarcinoma cells. Biochem Cell Biol 2000;78:127-135.
33. Antonsson B, Martinou JC: The Bcl-2 protein family. Exp Cell Res 2000;256:50-57.
34. Hofmann B, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene 1994;9:1799-1805.
35. Kim YS, Jin SH, Lee YH, et al.: Ginsenoside Rh2 induces apoptosis independently of Bcl-2, Bcl-XL or Bax in C6Bu-1 cells. Arc Pharm

- Res 1999;22:448-453.
36. Kelekar A, Thompson CB: Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998;8:324-330.
 37. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, et al.: Bcl-xL, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
 38. Hodes R: Molecular targeting of cancer : Telomeres as targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7649-7651.
 39. Liu JP: Studies on the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999;13:2091-2104.
 40. Lyu SY, Park WB, Choi KH, et al.: involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65(3):534-541.
 41. Martin SJ, Green DR: Protease activation during apoptosis : death by a thousand cuts. *Cell* 1995;82:349-352.
 42. Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, et al.: Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 1995;14:6148-6156.
 43. Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, et al.: Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 1996;184:2399-2404.
 44. Khwaja A, Tatton L: Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase Cdelta plays a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* 1999;94:291-301.
 45. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al.: Human ICE/CED-3 protease nomenclature(letter). *Cell* 1996;87:171.
 46. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, et al.: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-459.
 47. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA: Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:44-51.
 48. Lizard GL, Fournel S, Genestier L, et al.: Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 1995;21:275-283.
 49. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis, an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.
 50. Büssing A, Wagner M, Wagner B, et al.: Induction of mitochondrial Apo 2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates cultured lymphocytes by the toxic protein from *Viscum album* L. *Cancer Lett* 1999;139:79-88.
 51. Koester SK, Roth P, Mikulka WR, et al.: Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein specific monoclonal antibody Apo 2.7. *Cytometry* 1997;29:306-312.
 52. Zhang C, Ao Z, Seth A, et al.: Mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 1996;157:3980-3987.
 53. Martin SJ: Protein or RNA synthesis inhibitor induces apoptosis of mature human CD4+ T cell blasts. *Immunol Lett* 1993;35:125-134.
 54. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, et al.: Early feature of apoptosis detected by four different cytometric assay. *Apoptosis* 1998;3:115-121.