

Scopoletin의 간암세포에 대한 고사 유도 효과 및 기전 연구

권강범 · 김은경 · 박성주¹ · 송호준¹ · 이영래^{2,3} · 박병현^{2,3} · 박진우^{2,3} · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 본초학교실, 2: 전북대학교 의과대학 생화학교실, 3: 전북대학교 헬스케어기술개발사업단

Apoptotic Effects and Mechanism Study of Scopoletin in HepG2 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Sung Joo Park¹, Ho Joon Song¹,
Young Rae Lee^{2,3}, Byung Hyun Park^{2,3}, Jin Woo Park^{2,3}, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, 1: Department of herbology, School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
2: Department of Biochemistry, 3: Institute for Healthcare Technology Development, Medical School, Chonbuk National University

Scopoletin (6-methoxy-7-hydroxycoumarin) is a phenolic coumarin and a member of the phytoalexins. In this study we investigated whether scopoletin causes apoptosis in human hepatoma HepG2 cells and, if so, by what mechanisms. We report that scopoletin induced apoptosis as confirmed by a chromatin condensation. The signal cascade activated by scopoletin included the activation of caspase-3 as evidenced by increased protease activity. Activation of caspase-3 resulted in the cleavage of 116 kDa poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) to 85 kDa cleavage product in a dose-dependent fashion. Also, scopoletin-induced apoptotic mechanism of HepG2 cells involved the generation of hydrogen peroxide. Taken together, these results suggest that scopoletin induces hydrogen peroxide generation, which, in turn, causes activation of caspase-3, degradation of PARP, and eventually leads to apoptotic cell death in HepG2 cells.

Key words : scopoletin, HepG2 cells, apoptosis, caspase-3, PARP, hydrogen peroxide

서 론

암은 유전적 요소와 암 발생 유발요소로 작용되는 발암 화학물질, 방사선과 자외선, 지속적인 염증과 손상, 암 유발 바이러스 감염의 복합적 요소 등이 작용하여 숙주의 조절기구에서 벗어난 미분화 세포가 자율적으로 증식하는 질환이다^{1,2)}. 이러한 암의 치료는 주로 암세포에 직접적으로 살상작용을 나타내는 치료 방법으로서 수술요법 · 방사선요법 · 화학요법 등이 사용되어 왔으나, 정상세포에 대한 많은 부작용 때문에 최근 부작용이 적은 천연물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 특히 새로운 치료법으로서 면역요법이나, 세포분화 유도법, 혈관형성 저해법, 세포고사(apoptosis) 유도법 등과 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있다³⁾.

세포고사(apoptosis)는 항암제의 암세포 사멸효과에 주된 기전이라고 제시되고 있으며, 암치료 결과의 예후인자로 세포고사가 많이 연구되고 있다^{4,7)}. 세포고사는 세포의 특수한 형태로 염

색질의 농축, DNA의 분절, 핵막의 발아, apoptosis 소포체(apoptotic body) 형성을 특징으로 하며 정상발달, 기관형성, 조직의 성장 등에서 세포를 제거하는 기능을 가진 괴사(necrosis)와는 다른 유전자 활성화에 의해 조절받는 생리과정이다⁸⁻¹¹⁾.

Scopoletin은 6-methoxy-7-hydroxycoumarin으로 *Sinomonium acutum*, *Solanum lyratum*, *Brunfelsia hopeana*의 뿌리, *Artemisia feddei*, *Lycium barbarum*의 열매 등과 같은 다양한 식물에 포함되어 있는 물질이다¹²⁻¹⁴⁾. 실험적으로 scopoletin은 전립선 암세포의 세포주기를 억제하고 고사를 유도하는 것으로 알려졌다¹⁵⁾. 그러나 scopoletin의 세포고사 유도 효과와 자세한 기전에 대해서는 알려져 있지 않다.

본 논문에서 인간 간암세포인 HepG2세포를 이용하여 scopoletin의 고사 효과와 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

세포배양에 사용한 세포배양 용기는 Falcon사(Becton

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

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

· 접수 : 2005/10/21 · 수정 : 2005/11/10 · 채택 : 2005/12/06

Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하였으며, caspase-3에 대한 형광기질(fluorogenic substrates)과, PARP 항체는 BD pharmingen에서 구입하였으며, scopoletin, 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 DMEM, Fetal bovine serum(우태아혈청), 항생제 등은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

인간 유래 간암세포인 HepG2 세포는 American Type Culture Collection(ATCC; Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 95% 공기와 5% 이산화탄소(CO₂)가 소통되는 습기가 충분한 대기에서 37°C를 유지하였다. 세포는 지수 성장을 유지하기 위해서 2-3일 마다 분주하여 배양하였다. 세포 수는 hemacytometer를 이용한 표준 절차에 의해서 측정하였다.

3. MTT 분석

세포를 96 well 세포배양 용기에 1×10^4 cells/ml씩 분주하여 24 시간 세포배양 용기에 부착시키고, 안정화된 세포에 scopoletin을 24시간 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.

4. Hoechst 33342 dye를 이용한 핵 염색

HepG2 세포 (1×10^6 cells/ml)를 10%의 FBS가 포함된 DMEM배지를 이용하여 6-well dishes에서 배양하였다. 48시간 후에 1 ml의 세포부유액은 3분 동안 1000 rpm으로 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 세포 침전물은 4%의 중성 완충된 포르말린(100 μ l)을 첨가하여 고정했다. 고정된 세포부유액 (50 μ l)을 슬라이드에 옮겼고 실온에서 건조하였다. 고정된 세포는 PBS로 3번 세척했고, 건조시킨 뒤, nucleus-specific Hoechst 33342 염료 (1 μ g/ml)로 10분간 상온에서 염색한 후 PBS를 이용해 세척했고, 건조시킨 후 90% 글리세롤(glycerol)로 마운트 (연구용 표본이나 슬라이드를 제작하였다. 슬라이드는 형광현미경 (Olympus, Japan)을 이용해 조사했다.

5. Caspase-3 활성도 측정

세포를 4°C에서 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°C에서 60분 반응시킨 후 fluorometer (F2500, Hitachi, Japan)로 caspase-3의 활성도를 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(400nm)와 emission wavelength(505nm)를 사용하였다.

6. Western blotting

포집된 세포는 세포파쇄용액과 4°C에서 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°C에서 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, Image Analyzer (Biorad, USA)를 이용하여 발색시켰다.

7. Hydrogen peroxide 생성 측정

세포내 생성된 hydrogen peroxide양의 측정은 형광 염료인 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포에 1.0 mg/ml scopoletin을 처리한 후 PBS를 이용하여 2번 washing한 후 fluorometer (F2500, Hitachi, Japan)를 이용하여 세포내 생성된 hydrogen peroxide양을 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (495nm)와 emission wavelength(525nm)를 사용하였다.

8. 단백질 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 기준으로 이용한 Bradford의 방법¹⁶⁾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. Scopoletin이 세포생존율과 세포고사에 미치는 효과

Scopoletin이 HepG2 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 1×10^6 cells/ml의 세포를 DMEM 배지에 접종하고 24시간 후에 0.05-1.0mg/ml의 scopoletin을 24시간 처리한 후

MTT을 이용하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 처리한 농도와 시간에 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며, scopoletin의 간암세포에 대한 생존율 감소 효과가 세포고사에 의한 것인지 확인 하고자 세포고사의 특징적인 현상인 염색체 응축(chromatin condensation), DNA 분절(fragmentation) 현상을 Hoechst33342 염료를 이용하여 조사하였다. Fig. 2의 화살표 표시부에서 나타났듯이 scopoletin를 0.5, 1.0mg/ml의 농도로 처리한 군에서 고사의 특징적인 현상들이 나타났다.

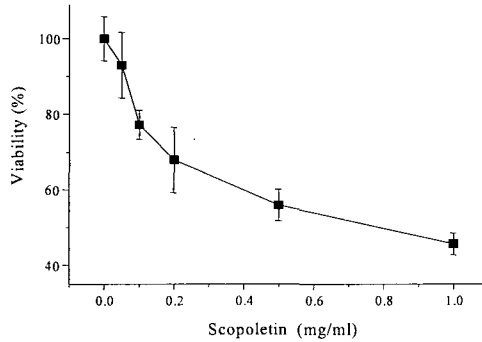


Fig. 1. Effects of scopoletin on cell viability in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations of scopoletin for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as a ratio of A570 of treated- to control cells (treated with 0.05% DMSO vehicle). Each value is the mean \pm SEM of four independent experiments.

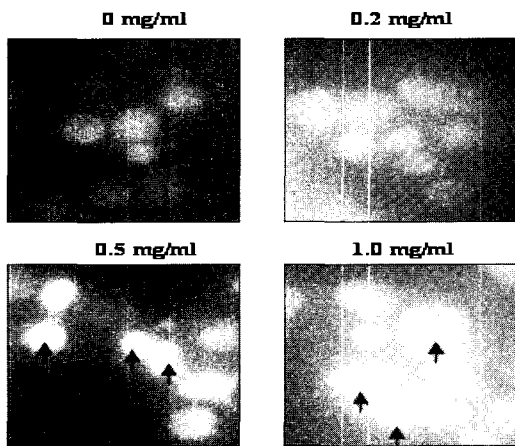


Fig. 2. Apoptosis inducing effects of scopoletin in HepG2 cells. Cells were treated with 0.2, 0.5, 1.0mg/ml scopoletin for 24 hours. Hoechst 33342 staining was analyzed as described in Materials and Methods. The arrows indicate the chromatin condensation and DNA fragmentation.

2. Scopoletin이 caspase-3 활성도 및 PARP 절단에 미치는 영향

Scopoletin에 의한 HepG2 세포의 고사과정에 caspase-3 활성도의 증가가 관여하는지를 확인하고자 다양한 농도의 scopoletin을 24시간동안 세포에 노출시킨 후 caspase-3에 특정한 형광 염료인 Ac-DEVD-AFC를 이용하여 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 활성도가 증가하였으며 특히 0.5, 1.0mg/ml의 농도로 처리한 군은 대조군에 비하여 각각 5.6 배($p < 0.01$), 6.1배($p < 0.01$) 증가하여 통계적으로 유의성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 caspase-3 활성도의 증가는 DNA 복구 효소로 알려진 PARP의 절단을 유도하였다(Fig. 4).

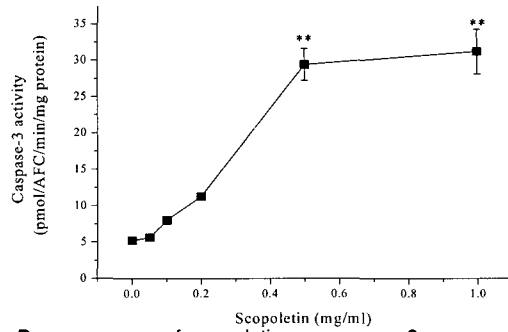


Fig. 3. Dose-response of scopoletin on caspase-3 enzyme activity in HepG2 cells. Cells were incubated with various concentrations of scopoletin for 24 hours. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase-3 using Ac-DEVD-AFC as fluorogenic substrate as described in material and methods. Data were represented as a relative fluorescence compared with the control value. Values are mean \pm SEM from four experiments. *** $p < 0.01$ vs control

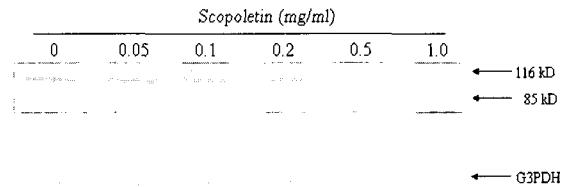


Fig. 4. Effects of scopoletin on PARP cleavage in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with various concentrations of scopoletin for 24 hours. Lysate from cells was separated on 10.0% SDS-PAGE. PARP on the nitrocellulose membrane was probed with anti-PARP antibody and the immunoreactive band was visualized by image analyzer. G3PDH is a loading control.

3. Scopoletin이 hydrogen peroxide에 미치는 영향

Scopoletin이 간암세포내 hydrogen peroxide 생성에 미치는 효과 1.0mg/ml의 농도로 처리한 후 hydrogen peroxide에 특이적인 염료인 CM-H₂DCFDA를 이용하여 조사하였다. 그 결과 세포내 생성된 hydrogen peroxide의 양은 scopoletin를 30분간 처리한 군에서 대조군에 비하여 약 2배의 증가를 나타냈으며 그 이후로는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

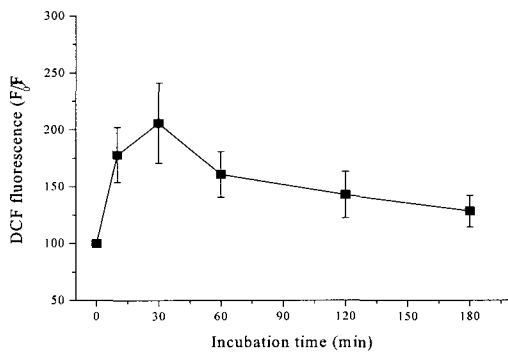


Fig. 5. Time course of the effect of scopoletin on intracellular hydrogen peroxide production. HepG2 cells preloaded with the fluorogenic probe (CM-H₂DCFDA) were exposed to 1.0 mg/ml scopoletin and the fluorescence change of the oxidized probe was determined as indicated under 'Materials and Methods'. Values represents mean \pm SEM from four experiments.

고찰 및 결론

본 연구에서 scopoletin은 인간의 간암세포인 HepG2 세포

의 그사를 유도하였으면 그 기전에 caspase-3 활성화에 의한 PARP의 절단, hydrogen peroxide 생성의 증가가 관여하는 것으로 나타났다.

Scopoletin은 다양한 연구에서 spasmolytic 효과, 항산화 효과, 산화질소 합성의 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있으며¹²⁻¹⁴. 특히 전립선 암세포의 그사 유도 효과, 증식 억제 효과가 보고되었다¹⁵.

세포그사는 세포그사와 달리 세포안에서 일어나는 정해진 순서에 의하여 1세포가 죽어가는 것을 일컫는 말로서¹⁷ chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 분절, 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성 등 특징적인 현상을 수반하게 된다^{5,18-20}. 본 실험에서 scopoletin을 다양한 농도로 간암세포인 HepG2 세포에 처리한 후 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 조사한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포 독성이 증가하였으며(Fig. 1) 이러한 세포 독성의 증가는 세포그사에 의한 것으로 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 scopoletin의 HepG2 세포에 대한 그사 효과 기전을 밝히고자 caspase-3 proteases의 활성화, PARP의 절단 여부를 조사하였다.

최근 세포사멸 유도 기전으로 중요시되고 있는 caspase protease family는 염증반응 및 세포사멸 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 procaspases와 effector caspases로 나뉘어 있는데 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화되며 현재까지 14종류가 알려져 있다²¹⁻²⁴. 그 중 caspase-3, -6 protease는 effector caspases로서, caspase-8 protease와 -9 protease의 활성화신호에 의하여 활성화 형태로 바뀌어 세포의 기능 유지에 필요한 단백질인 poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP), inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease(ICAD), 그리고 actin, fodrin, lamin 등과 같은 구조 단백질을 절단하여 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁵⁻³¹. HepG2 세포에 scopoletin을 처리한 후 caspase-3 proteases의 활성도를 조사한 결과 caspase-3의 활성도가 처리한 농도에 의존적으로 증가하였다(Fig. 3). Fig. 4는 이러한 caspase-3 활성도의 증가가 DNA 복구 효소인 PARP의 절단을 유도하는지 조사한 결과이다. PARP는 정상세포에서 NAD를 nicotinamide로 전환시키는 protein-linked ADP-ribose polymer로서 116kD의 분자량을 유지하다가 다양한 항암제로 인하여 절단되어 85kD의 cleaved product를 형성하여 DNA의 손상을 회복하지 못하도록 함으로써 세포사멸을 촉진시키는 기능을 한다^{32,33}. Scopoletin은 HepG2 세포에 처리한 농도에 의존적으로 PARP의 절단을 유도하였다. 이와 같은 PARP의 85kD로의 절단은 Fig. 2에 나타난 염색체 응축, DNA 분절 현상을 유도한 것으로 생각된다.

다양한 연구에서 hydrogen peroxide를 포함한 활성산소의 생성이 세포그사를 유도하는 것으로 밝혀지고 있다^{34,35}. 본 연구에서 scopoletin은 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide의 발생을 증가시켰다(Fig. 5).

이상의 결과를 요약하면, 인간 간암세포에서 scopoletin은 세포그사에 의한 생존율의 감소를 유도하였으며 세포그사 기전에 hydrogen peroxide의 생성, caspase-3 활성화에 의한 PARP의

절단이 관여하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 교육인적자원부 지방연구중심대학육성 사업 헬스케어기술개발사업단의 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울, 高文社. pp 201-222, 231-258, 1997.
2. 송계용 외. 핵심병리학. 서울, 고려의학. pp 147-189, 1998.
3. 東西醫學融合研究會編. 臨床東西醫學. 서울, 영림사. pp 538-546, 1997.
4. Cohen, J.J. Apoptosis. Immunol. Today 14, 126-130, 1993.
5. Dewey, W.C., Ling, C.C., Meyn, R.E. Radiation-induced apoptosis :relevance to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 33(4):781-796, 1995.
6. Aihara, M., Scardino, P.T., Truong, L.D. et al. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of prostate. Cancer 75, 522-529, 1995.
7. Komaki, R., Milas, L., Ro, J.Y. et al. Prognostic biomarker study in pathologically staged N1 non-small cell lung cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 40, 787-796, 1998.
8. Williams, G.T. Apoptosis in the immune system, J Pathol 173, 1-4, 1994.
9. Milross, C.G., Mason, K.A., Hunter, N.R., Chung, W.K., Peters, L.J., Milas, L. Relationship of Mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. J NCI 88, 1308-1314, 1996.
10. Provinciali, M., Ciavattini, A., Di Stefano, G., Argentati, K., Garzetti, G.G. In vivo amifostine (WR-2721) prevents chemotherapy-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes from cancer patients. Life Sci 64(17):1525-1532, 1999.
11. Shrivastava, P., Sodhi, A., Ranjan, P. Anticancer drug-induced apoptosis in human monocytic leukemic cell line U937 requires activation of endonuclease. Anticancer Drugs 11(1):39-48, 2000.
12. Kang, T.H., Pae, H.O., Jeong, S.J., Yoo, J.C., Choi, B.M., Jun, C.D., Chung, H.T., Miyamoto, T., Higuchi, R., Kim, Y.C. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from Artemisia feddei. Planta Med 65, 400-403, 1999.
13. Oliveira, E.J., Romero, M.A., Silva, M.S., Silva, B.A., Medeiros, I.A. Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin. Planta Med 67, 605-608, 2001.

14. Shaw, C.Y., Chen, C.H., Hsu, C.C., Chen, C.C., Tsai, Y.C. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytother Res* 17, 823-825, 2003.
15. Liu, X.L., Zhang, L., Fu, X.L., Chen, K., Qian, B.C. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. *Acta Pharmacol Sin* 22, 929-933, 2001.
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. V.J. Kidd. Proteolytic activities that mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60, 533-573, 1998.
18. Searle, J., Kerr, J.F.R., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis : distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17, 229-259, 1982.
19. Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E., Galand, P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138, 447-453, 1991.
20. Klaus, S.O., Davide, F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459, 1998.
21. Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. Apaf-1, a human protein homologues to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413, 1997.
22. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126, 1997.
23. Vaux, D.L. CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* 90, 389-390, 1997.
24. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
25. Lazebnik, Y.A. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
26. Wang, Z.Q. Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl) ation develop normally but are susceptible to skin disease, *Genes Dev* 9, 509-520, 1995.
27. Chang, L.C., Tsai, T.R., Wang, J.J., Lin, C.N., Kuo, K.W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 242(1):21-25, 1998.
28. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
29. Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D.K., Nicholson, D.W., Tsuruo, T. Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14, 1007-1012, 1997.
30. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298, 1997.
31. Zhivotovsky, B., Burgess, D.H., Vanags, D.M., Orrenius, S. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 481-488, 1997.
32. Kwon, K.B., Yang, J.Y., Ryu, D.G., Rho, H.W., Kim, J.S., Park, J.W., Kim, H.R., Park, B.H. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *Journal of Biological Chemistry* 276(50):47518-47523, 2001.
33. Kwon, K.B., Yoo, S.J., Ryu, D.G., Yang, J.Y., Rho, H.W., Kim, J.S., Park, J.W., Kim, H.R., Park, B.H. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology* 63, 41-47, 2002.
34. Chen, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177, 324-333, 1998.
35. Hildeman, D.A., Mitchell, T., Teague, T.K., Henson, P., Day B.J., Kappler, J., Marrack, P.C. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity* 10, 735-744, 1999.