

친환경 배 및 관행재배 배 추출물이 간세포 성장에 미치는 효과

윤병철¹ · 김길용² · 박수현^{1,*}

¹친환경 농업연구 사업단, 전남대학교 수의과대학 생리학고실, 바이오 치료 산업인력 양성팀

²친환경 농업 연구사업단, 전남대학교 농업 생명과학대학

Effects of Pear Extracts Cultured Under Conventional and Environment-friendly Conditions on Cell Proliferation in Rat Hepatocytes

Byung-Chul Yoon¹, Kil-Yong Kim² and Soo Hyun Park^{1,*}

¹Environmental-Friendly Agriculture Research Center, Bio-therapy Human Resources Center, Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

²Environmental-Friendly Agriculture Research Center, Division of Biological and Environmental Chemistry, School of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Received June 14, 2006; Accepted July 10, 2006

In the present study, we compared the functional analysis of pear extracts cultured in conventional and environment-friendly conditions in primary cultured rat hepatocytes. ATP synthesis significantly increased by the treatment with environment friendly cultured pear powder but not by conventional group. In addition, cell proliferation using [³H]-thymidine incorporation was also stimulated by environment-friendly cultured pear extract compared to conventional group. Moreover, the expressions of CDK-2 and CDK-4 were increased but p21WAF1/Cip1 and p27 Kip1 decreased by environment-friendly cultured pear extract but not by conventional group. In conclusion, environment-friendly cultured pear powder has stimulatory effect on cell proliferation compared to conventional group in primary cultured rat hepatocytes.

Key words: Environment-friendly pear, hepatocyte, ATP, cell proliferation

서 론

배는 배나무과속(Pyruce)에 속하는 낙엽고목식물이며 우리나라의 주요 4대 과실 작물중의 하나로 기호도가 좋아 남한의 전역에서 널리 재배 생산되고 있다. 그러나 재배 농가의 증가로 인한 과다 생산으로 인하여 시장에서의 가격 하락 현상이 나타나고 있고 또한 외국으로부터의 농산물의 전면 개방을 앞두고 있어 품질의 향상을 키우지 않고서는 경쟁력을 가질 수 없는 것으로 판단되는 시점에 있다. 이러한 시점에서 웰빙의 건강 지표인 친환경 농산물의 도래가 필수적인 것으로 도래 되고 있다^{1,2}.

배에 대한 기능성 연구로 Fernandez 등³은 배의 pectin은 고콜레스테롤 식이한 동물에 대하여 혈장 LDL 농도를 낮춘다고 하였으며 배의 dietary fiber 등을 함유한 제제가 장기적인 투여 시 항 고혈당증 효과가 있는 것으로 보고되었다⁴. 배의 phenolic

compound에 연구로는 phenolic compound의 투여 시 혈압 강하작용⁵ 및 심근 수축력 증가 작용⁶이 있는 것으로 알려지고 있다. 그럼에도 불구하고 배에 대한 간의 기능성에 대한 연구는 보고되고 있지 않다.

간은 생체에서 대사에 중추적인 역할을 담당하는 기관으로 특히 당대사와 관련이 밀접한 장기이다⁷. 정상 간세포 배양은 세포 성장 및 분화기전, 대사과정, 약제의 생화학적 변환 √ 등의 여러 연구에 이용될 수 있다⁸. ATP는 생체 에너지원으로서 간세포의 기능과 조직 내 다양한 생리적 현상에 관여하는 것으로 알려져 있다⁹. 세포성장 조절작용에는 다양한 성장 단백질들이 관여한다. 세포 성장을 촉진 시키는 단백질로는 cyclins과 이들의 촉매 결합체인 cyclin-dependent kinases(CDK)들이 다양한 세포 성장주기를 촉진시켜 다양한 세포 주기의 점진 단백질 복합체로서 역할을 담당하고 있다^{10,11}. 세포 성장주기에 역제적으로 작용하는 세포성장 단백질로는 cyclin kinase inhibitors (CKI)를 들 수 있다¹². p21WAF1/Cip1 및 p27 Kip1은 CKI의 CIP/KIP family 중의 하나로서 G1에서 S기로의 이동에 활성형인 cyclin-CDK 복합체의 조절에 역제적으로 작용하여 세포성장주기에 관

*Corresponding author

Phone: 82-62-530-2832; Fax: 82-62-530-2809

E-mail: parksh@chonnam.ac.kr

여 한다¹³⁻¹⁵). 배에 대한 간세포의 성장 연구 및 이와 관련된 세포 성장조절 단백질의 발현 정도에 대한 연구는 간 기능의 중요성 및 농산물의 우수성을 부여 할 수 있을 것으로 판단된다. 현재까지, 국내적으로는 물론 국제적으로 친환경 농산물의 생물학적 평가 지표에 대한 연구는 극히 미미한 실정에 있다. 따라서 본 연구는 친환경 (키틴 분해 농산물) 배와 일반 관행 재배 사이의 간세포 성장 및 이와 관련된 단백질의 발현에 대해서 비교 분석하여 친환경 농산물의 우월성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12(D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 본 실험에서 사용한 친환경 재배 배는 키틴분해 미생물제제로 재배한 무농약 배로서 조호현씨(영암군 덕진면)로부터 구입하였으며 관행재배 배의 경우는 일반 농약을 처리하여 키운 배를 이용하였다. 배를 세척하여 믹서에 갈고 난 부분을 동결 건조기를 이용하여 powder 부분만을 추출하였다. [³H]-thymidine은 Dupont/NEN (Boston, MA, USA)으로부터 구입하였다.

Hepatocyte의 초대배양. 간세포는 수컷 200-250g의 Sprague-Dawley 랫트(Charles River Laboratories)를 이용하여 분리하였다. Liu 등¹⁶에 의해 발표된 두단계의 Collagenase 관류 방법이 이용되었다. 간단히 기술하면 isoflurane/O₂ 마취를 시도한후 복정증상을 따라 개복을 실시한다. 이후 문맥의 아랫부분을 절찰한 후 catheter를 삽입한 후 30 mM HEPES가 들어 있는 Mg²⁺/Ca²⁺이 없는 Kanks buffer로 37°C에서 약 10분 동안 관류시킨다. 이후 0.05% type I collagenase가 있는 Eagle's 배지로 교환한다. 이후 분리된 간을 petri dish에 놓고 Glisson 피막을 벗긴다. 세포수는 5 × 10⁵ 정도의 세포로 배양시킨다. 세포의 생존율은 Trypan blue exclusion 방법을 이용하여 실시하였으며 생존율이 90%가 넘는 경우에만 실험에 사용하였다.

[³H]-thymidine incorporation. 간세포들이 50-60% 성장하여 subconfluent를 형성하였을 때, 배지를 교환하였다. [³H]-thymidine incorporation 실험은 Brete 등¹⁷에 의해 기술된 대로 실시하였다. 세포들에 1 μCi의 [³H]-thymidine을 투여 후 2시간 후에 시료를 처리하여 24시간 배양시킨 후 실험에 사용하였다. 세포들은 PBS로 2번 세척한 후 10% trichloroacetic acid(TCA)에서 15분간 고정시켰다. 이후 5% TCA를 5분간 2번 세척을 하였다. 산에 불용성인 부분을 실온에서 2 N NaOH를 처리하여 Liquid scintillation counting에 의하여 방사성을 측정하였다. 실험 결과는 대조군(어떠한 시료도 첨가하지 않은 군)의 %로 보정하였다.

ATP assay. ATP hygiene monitoring kits(Promega, USA)를 구매하여 제조회사의 지시사항에 따라 실험을 행하였다. 100 μl negative control을 tube에 취한 후 100 μl extractant를 첨가한 후 바로 luminometer(LS-50B, Perkin-Elmer, Boston, MA)로 luminescence를 측정하였다. Negative control의 값은 50 RLU 이하, positive control의 값은 20,000 RLU 이상인 경우에 실험을 실시하였다.

Trypan blue exclusion 방법. 세포를 혈청이 없는 배지로 희석하여 대략 200-2,000 cells/ml 되도록 한다. 1 ml의 현탁된 세포와 4 ml의 0.4% trypan blue 용액을 혼합하여 5분간 정지한 후 hemocytometer를 사용하여 염색되지 않은 생세포수와 염색된 사세포의 수를 측정하여 생존율을 계산하였다. Trypan blue에 염색된 세포는 죽은 세포로 간주하며 trypan blue에 저항성을 나타내는 세포를 살아있는 세포로 간주하였다. 실험 결과는 대조군(어떠한 시료도 첨가하지 않은 군)의 %로 보정하였다.

Western immunoblotting. 배지를 제거한 간세포를 phosphate buffered saline으로 2번씩 세척한 후, 각기 150 μl의 lysis buffer(10×PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A)를 처리하여 균질화 시켰다. 균질화된 세포를 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 각각 60 μg의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 blocking을 시켰고, 각각의 항체(anti-CDK-2, CDK-4, p21 WAF1/Cip1, p27 kip1)를 1% skim milk에 5,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1×TBS에 10분 간격으로 3번 세척하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간동안 incubating한 후, 3번 washing을 거쳐서 ECL 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

통계처리. 실험결과와 통계처리는 Student's *t*-test 및 Analysis of Variance(ANOVA)로 하였으며, *p* < 0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과와 표현은 means ± S.E로 하였다.

결과 및 고찰

친환경 재배 배 및 관행 재배 배의 간세포 생존율 및 ATP 생성율에 미치는 영향. 간세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 친환경 재배 추출물 및 관행 재배 배 추출물을 4시간 동안 농도별(5, 10, 20, 40 μg/ml)로 처리하여 trypan blue exclusion test를 실시하였다. 실험결과 양군 모두에서 대조군과 유의성 있는 차이는 인정 되지 않는 것으로 나타났다(Table 1). 본 실험에서 사용한 친환경 재배 배의 경우는 관행 농약 대신 키틴 분해 미생물 첨가 키틴 퇴비사용을 통하여 재배한 배를 사용하였다¹⁸). 이는 토양 길항 미생물과 유기 자재를 적절하게 이용한 방법이 토마토 및 다양한 농산물에 있어서 효율적인 친환경 농법의 대안으로 제시되고 있는 실정을¹⁹) 감안할 때 전혀 세포 독성이 없는 것으로 사료된다. 배의 주성분으로는 수분, 단백질, 당, 지질, 당, pectin, phenolic compound, ascorbic acid, carotene등으로 알려져 있다^{6,20}). 본 실험결과는 이러한 배의 성분들 중에는 세포 독성을 나타내는 성분을 갖고 있지 않기 때문으로 판단된다. 한편 친환경 재배 추출물 및 관행 재배 배 추출물에 의한 간세포 ATP 합성 효과를 알아보았다. Fig. 1에서 보이듯이 관행재배 배를 농도별로 처리하여 ATP 생성율을 측정된 결과 대조군과 별 차이 없었으나 친환경 재배 배 추

Table 1. Effects of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts on cell viability

Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cell viability compared with control (% of control)	
	Treated with conventionally cultured pear extracts	Treated with environment-friendly cultured pear extracts
5	101.3 \pm 3.8	102.3 \pm 4.1
10	104.6 \pm 3.9	103.4 \pm 4.7
20	109.2 \pm 5.9	104.5 \pm 6.0
40	107.6 \pm 5.1	103.4 \pm 5.8

Hepatocytes were incubated with different dosage of conventionally and environment-friendly cultured pear extract (0 to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hr. Then, The cells were detached from the culture dishes utilizing 0.05% trypsin/0.5 mM EDTA solution, and proteolytic activity was then inhibited by soybean trypsin inhibitor (0.05 mg/mL). And then 0.4% (w/v) trypan blue solution (500 μL) was added to the cell suspension and the cells were counted, keeping a separate count of blue cells, using a hemocytometer under light microscopy. Cells failing to exclude the dye were considered non-viable and the data are expressed as percentage of viable cells. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures.

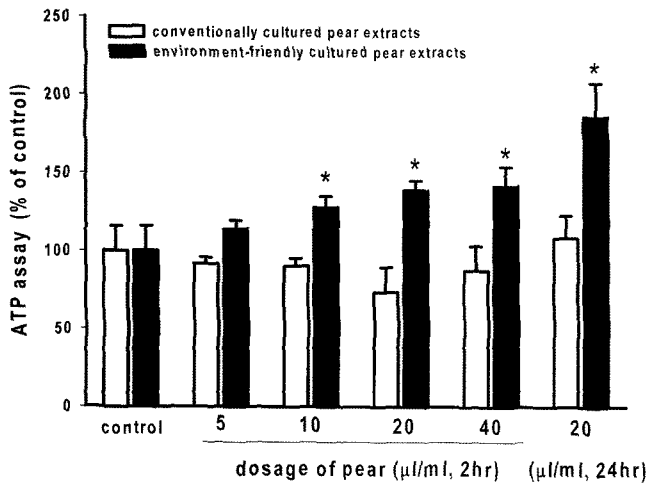


Fig. 1. Effects of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts on ATP synthesis. Hepatocytes were incubated with different dosage of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts (0 to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 2 hr or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

출물에서는 180%까지 증가한 것으로 나타났다(Fig. 1; $p < 0.05$ vs. 대조군). 지금까지 ATP는 세포에서 에너지원으로만 알려져 왔다²¹⁾. 그러나 최근 이러한 ATP가 세포성장 및 다양한 세포의 기능에 신호전달 물질로 작용하고 있다는 보고가 되고 있다^{22,23)}. 그러므로 ATP의 증가는 간세포 기능 및 성장 등의 간세포 활성화에 도움을 줄 것으로 사료된다.

친환경 재배 배 및 관행 재배 배의 간세포 세포 성장 및 세포성장 주기 조절 단백질의 발현 효과. Thevananther 등²⁴⁾은 세포외의 ATP 처리 시 간세포의 성장을 증가시켰다고 하여 본 실험에서 친환경 재배 배 추출물 처리 시 나타났던 ATP 증가 현상이 세포 성장과 관련이 되는지를 알아보았다. 간세포 성장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 관행 재배 및 친환경 재배

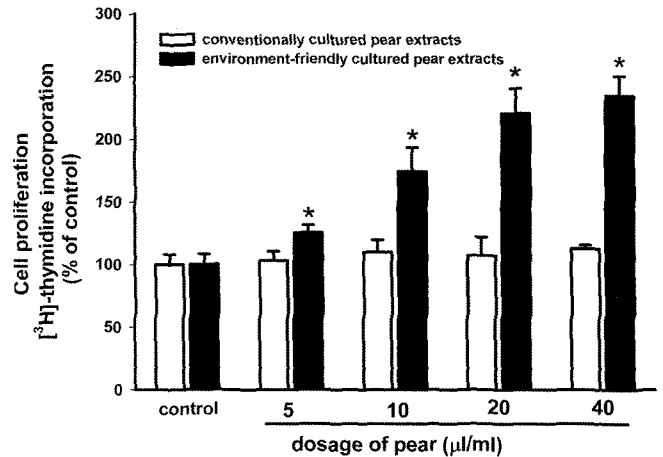


Fig. 2. Effects of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts on cell proliferation. Hepatocytes were incubated with different dosage of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts (0 to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

배 추출물을 처리한 결과 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 투여했을 경우 아무것도 처리하지 않는 간세포 성장을 기준으로 관행재배 배 추출물은 103%, 친환경 재배 배 추출물은 125%, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 투여했을 경우 관행재배 배 추출물은 110%, 친환경 재배 배 추출물은 174%, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 투여했을 경우 관행재배 배 추출물 107%, 친환경 재배 배 추출물은 220%, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 투여했을 경우 관행 재배 배 추출물은 112%였는데 비해 친환경 재배 배 추출물은 234%까지 간세포 성장을 증가시켰다(Fig. 2). 이러한 결과들은 친환경 재배 배 추출물 처리 시 간세포 ATP 생성이 세포 성장을 증가시킨다는 것을 시사해주고 있다. 본 실험 결과로서는 친환경 재배 추출물의 어떠한 성분이 간세포의 ATP 생성 및 세포 성장을 증가시키는지를 확인할 수가 없었다. 이에 대한 부분은 여러 가지 가능성이 있겠지만 농약 또는 키틴 분해 미생물에 의해 생성된 토양의 변화등에 의한 증감속 같은 미량원소의 차이의 경우도 가능성을 볼수 있다 하겠다. 예를 들어 selenium 같은 미량원소는 환경 친화적인 조건인 적은 농도에서는 포유동물 및 인간의 세포에 유익하나 농도가 높아지면 해로운 작용을 나타내고²⁵⁾, 친환경 제재 물질 사용 시 수은과 같은 세포내 독성 물질을 제거할 수 있다고 보고²⁶⁾되어 그 가능성이 있을 수 있음을 말해 주고 있다. 하지만 이것은 어디까지나 가능성에 대한 부분으로 향후 친환경 재배 배의 물질 분석을 통한 간세포 성장 촉진 효과를 나타내는 물질 규명이 필요하리라 생각된다. 세포의 성장에 관련된 단백질로는 cyclin과 cyclin-dependent kinase(CDK)들이 세포 성장주기를 촉진시키는 역할을 담당하고 있으며 세포 성장주기를 억제적으로 작용하는 p21WAF1/Cip1 및 p27 Kip1으로서 G1에서 S-phase의 이동에 활성을 나타내는 cyclin-CDK 복합체 조절에 관여하고 있다^{13,27)}. 이러한 친환경 재배 배 추출물에 의한 배의 간세포 성장이 세포성장 주기에 관여하는 어떠한 단백질의 발현과 관련되는지를 알아보기 위하여 CDK-2 및 CDK-4의 발현을 살펴 보았다. 관행재배 배 추출물(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4시간) 처리 시 CDK-2 및 CDK-4의 발현은 대조군과 유의한 차이는 인정

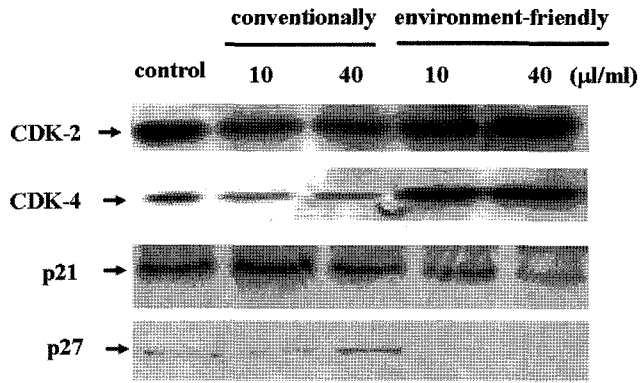


Fig. 3. Effects of conventionally and environment-friendly cultured pear extracts on the expression of CDK-2, CDK-4, p21 WAF1/Cip1 and p27 kip1. Hepatocytes were incubated with different dosage of conventionally and environment-friendly cultured pear powder (10, 40 40 µg/ml). CDK-2, CDK-4, p21, and p27 were detected as described in "Materials and Methods". Each electrophoretogram is representative of three different experiments.

되지 않았으나 친환경 재배 배 추출물(10 µg/ml, 40 µg/ml, 4시간) 처리 시 대조군에 비해 현저한 발현 증가 작용을 보였다(Fig. 3). 나아가 무농약 배 처리 시 p21WAF1/Cip1 및 p27 Kip1은 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 친환경 재배 배 추출물 처리 시 간세포 성장 효과는 무농약 배 처리 추출물의 성분이 G1에서 S-phase의 이동을 촉진 시키는 단백질들을 활성화시켜 작용하는 것으로 판단된다.

초 록

Sprague-Dawley 랫트(실험용 쥐)에서 간을 적출하여 Collagen coating된 세포 배양 접시에 간세포 배양을 하여 친환경 재배 배 추출물과 일반 관행 재배 배 추출물의 간세포 기능성을 분석하였다. 3일간 적용 시킨 후 관행 재배 배 추출물과 친환경 재배 배 추출물을 농도 별(동결 건조된 5 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml) 처리하여 간세포의 에너지원인 ATP assay를 실시한 결과 관행 재배 배 추출물의 경우는 대조군과 유의한 차이는 인정이 되지 않았으나 친환경 재배 배 추출물의 경우 농도 의존적으로 정상군에 비해 180%까지 증가하는 것으로 나타났다. 한편 세포 성장의 경우도 DNA의 특유 염기 구성성분중의 하나인 thymine의 전구체인 [³H]-thymidine을 간세포에 처리하여 DNA 합성을 알아본 결과 친환경 재배 배 추출물을 농도별로 처리하였을 때 관행재배 배 추출물에 비해 간세포의 세포 성장율이 증가하는 것으로 나타났다(40 µg/ml 투여 시 관행 재배 배 추출물 112% vs. 친환경 재배 배 추출물은 234%; $p < 0.05$). 아울러 세포성장 단백질인 CDK-2, CDK-4의 경우도 친환경 배 추출물 처리 시 현저하게 증가하는 것으로 나타났으며 세포성장 억제 단백질인 p21WAF1/Cip1 및 p27 Kip1의 경우는 억제시키는 것으로 나타났다.

Key words: 친환경 농산물, 배, 간 기능, ATP, 세포 성장.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 친환경 농업연구 사업 지원 및 BK21 바이오치료 산업인력 양성사업팀의 지원을 받아 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Park, H. S. and Baek J. H. (2005) A Study on the Forecasting Demand for Organic Agricultural Product. *Kor. J. Food Marketing*. **22**, 177-194.
2. Kwon, K. D. and Heo M. Y. (2003) Choice of Pro-Environmental Agriculture Brand Patterns & Impact of Satisfaction on Customer Value. *Kor. J. Agri. Policy*. **30**, 718-742.
3. Fernandez, M. L., Lin, E. C., Trejo, A. and McNamara, D. J. (1994) Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin alters hepatic cholesterol metabolism without affecting cholesterol absorption in guinea pigs fed a hypercholesterolemic diet. *J. Nutr.* **124**, 817-824.
4. Trejo-Gonzalez, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Perez, A. M., Huizar-Contreras, M. D., Munguia-Mazariegos, M. R., Mejia-Arreguin, S. and Calva, E. (1996) A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *J. Ethnopharmacol.* **55**, 27-33.
5. Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1986) Antihypertensive substance in seeds of Areca catechu L. *Life Sci.* **38**, 1375-1382.
6. Na, C. S., Youn, D. H., Choi, D. H., Jeong, J. G., Eun, J. B. and Kim, J. S. (2003) The Effect of Pear Pectin & Phenolic Compounds on Regional Cerebral Blood Flow, Mean Arterial Blood Pressure, Heart Rate and Cardiac Contractile Force in Hypertensive Rat Induced by 2K1C. *Kor. J. Berbiology* **18**, 101-108.
7. Beck-Nielsen, H., Vaag, A., Poulsen, P. and Gaster, M. (2003) Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects—experiences from relatives and twin studies. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **17**, 445-467.
8. Martinez-Diez, M. C., Serrano, M. A., Monte, M. J. and Marin, J. J. (2000) Comparison of the effects of bile acids on cell viability and DNA synthesis by rat hepatocytes in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1500**, 153-160.
9. Cunningham, C. C. and Van Horn, C. G. (2003) Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol. Res. Health.* **27**, 291-299.
10. Sherr C. J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555.
11. Sherr, C. J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065.
12. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-63.
13. Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.
14. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive

- and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512.
15. Bartek, J. and Lukas, J. (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* **490**, 117-122.
16. Liu, X. L., Li, L. J. and Chen, Z. (2002) Isolation and primary culture of rat hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* **1**, 77-79.
17. Brett, C. M., Washington, C. B. and Ott, R. J. (1993) Interaction of nucleoside analogues with the sodium-nucleoside transport system in brush border membrane vesicles from human kidney. *Pharmacol. Res.* **10**, 423-426.
18. Lee, S. H., Kim, W. S., Kim, K. Y., Kim, T. H., Whangbo, H., Jung, W. J. and Chung, S. J. (2003) Effect of Chitin Compost Incorporated with Chitinolytic Bacteria and Rice Bran on Chemical Properties and Microbial Community in Pear Orchard Soil. *J. Kor Soc. Hort. Sci.* **44**, 201-206.
19. Jin, R. D., Cho, M. Y., Kim, S. J., Ryu, J. Y., Chae, D. H., Kim, Y. W. and Kim, K. Y. (2006) Effect of Chitin Compost on Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Field. *Kor. J. Soil. Sci. Fertil.* **39**, 20-26.
20. Rodriguez-Felix, A. and Cantwell, M. (1988) Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum Nutr.* **38**, 83-93.
21. Ataullakhanov, F. I. and Vitvitsky, V. M. (2002) What determines the intracellular ATP concentration. *Biosci Rep.* **22**, 501-511.
22. Michoud, M. C., Napolitano, G., Maghni, K., Govindaraju, V., Cogo, A. and Martin J. G. (2002) Effects of extracellular triphosphate nucleotides and nucleosides on airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **27**, 732-738.
23. Choi, K. C., Tai, C. J., Tzeng, C. R., Auersperg, N. and Leung, P. C. (2003) Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in pre-neoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod.* **68**, 309-315.
24. Thevananther, S., Sun, H., Li, D., Arjunan, V., Awad, S. S., Wyllie, S., Zimmerman, T. L., Goss, J. A. and Karpen, S. J. (2004) Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* **39**, 393-402.
25. Banuelos, G. S., Lin, Z. Q., Wu, L. and Terry N. (2002) Phytoremediation of selenium-contaminated soils and waters: fundamentals and future prospects. *Rev Environ Health.* **17**, 291-306.
26. Cathum, S., Velicogna, D., Obenauf, A., Dumouchel, A., Punt, M., Brown, C. E. and Ridal, J. (2005) Detoxification of mercury in the environment. *Anal Bioanal Chem.* **381**, 1491-1498.
27. Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. and Massague, J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.