

문주란 추출물의 HL-60 백혈병 세포 Apoptosis 유도 효과

현재희 · 김엘비라 · 강정일 · 김상철 · 유은숙 · 강희경*

제주대학교 의과대학 의학과

(Received August 16, 2007; Revised January 2, 2008)

Apoptosis Induction of HL-60 Leukemia Cells by Extract of *Crinum asiaticum*

Jae Hee Hyun, Elvira Kim, Jung Il Kang, Sang Cheol Kim, Eun-Sook Yoo and Hee-Kyoung Kang*

Department of Medicine, College of Medicine, Cheju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea

Abstract — The present study investigated the antiproliferative effects of *Crinum asiaticum* var. *japonicum* against HL-60 human leukemia cells. The 80% MeOH extract or several solvent fractions from the *C. asiaticum* inhibited the growth of HL-60 cells, whereas the growth of HEL-299 cells, human embryonic lung fibroblast, was scarcely inhibited. When the HL-60 cells were treated with the CHCl₃ fraction, the BuOH fraction, the EtOAc fraction and the H₂O fraction, DNA ladder, chromatin condensation and increase of sub-G1 hypodiploid cells were observed. Furthermore, the CHCl₃ fraction and the BuOH fraction reduced Bcl-2 mRNA level, whereas Bax mRNA level was increased. These results suggest that the inhibitory effect of *C. asiaticum* on the growth of the HL-60 cell might be mediated through the induction of apoptosis via the down-regulation of Bcl-2. Taken together, components of *C. asiaticum* might have a therapeutic potential for the treatment of human leukemia.

Keywords □ *Crinum asiaticum*, HL-60 cell, apoptosis

천연물의 다양한 생리활성 및 이들의 작용기전에 대한 연구가 활발히 진행되면서 천연물로부터 새로운 항암물질을 도출하려는 시도들이 이루어지고 있다.^{1,2)}

본 연구에 사용한 문주란(*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)은 문주란 속(*Crinum*) 수선화 과(*Amarylidaceae*)에 속하는 식물로 열대와 아열대에 약 130여종이 분포되어 있다.²⁾ 문주란 속에서 분리 보고된 alkaloids는 lycorine, homolycorine-lycorine, galanthamine, crinan과 tazettine 등이 있으며, 항바이러스 효과, 항종양 효과 및 항염작용 등을 나타냄이 알려져 있다.³⁾ Winiger 등이 수선화 과에 속한 alkaloid인 pretazettine이 사람 종양 세포인 Molt4 및 HepG2 hepatoma에서 세포독성을 나타냄을 보고하였으며, 또한 문주란에서 분리된 flavan의 Molt4 종양세포에 대한 세포독성도 보고되었다.^{4,5)} 이들 보고 이외에도 수선화 과 식물들의 다양한 생리활성에 대한 연구결과들이 보고되고 있다.⁶⁻⁸⁾

이에 본 연구에서는 다양한 생리활성을 나타내는 수선화 과에 속하는 문주란의 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60 세포에서의 세포 증식 억제 효과를 검색하고 그 기전을 조사하였다. 문주란에 의한 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보기 위해 DNA fragmentation 및 DNA content 변화를 알아보았으며, apoptosis 유도 신호전달 기전에 중요한 Bcl-2와 Bax의 발현 양상을 조사하였다. 이러한 실험 결과로 문주란 추출물의 효과적인 항암작용을 밝혀 항암제로 사용 가능한 근거를 제시하고자 하였다.

실험재료 및 방법

시료 추출

시료는 제주도에서 자생하는 문주란(*Crinum asiaticum*)으로 2004년 북제주군 구좌읍 하도리 일대에서 채취하였다. 채취한 문주란을 실내에서 통풍 건조한 후 분쇄하고, 미세분말 100 g을 취하여 중량의 10배에 해당하는 80% methanol을 가한 후 상온에서 3일 동안 교반 하였으며, 진공여과를 통해 상층액을 회수하였다. 이 과정을 3회 반복하여 모은 상층액을 감압 농축법을 이

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 064-754-3846 (팩스) 064-702-2687
(E-mail) pharmkhk@cheju.ac.kr

용하여 문주란 80% MeOH 추출물 20 g을 얻었다. 80% MeOH 추출물은 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법에 따라 증류수 1 l에 현탁시키고 hexane 1 l씩 3회 분배 추출하여 감압농축 후 hexane 분획 497 mg을 얻고, 잔여 수층에 chloroform 1 l를 부어 상기와 동일한 방법으로 추출하여 CHCl_3 분획 162 mg을 얻고, 이상과 같은 방법으로 EtOAc 분획 200 mg, BuOH 분획 1160 mg, H_2O 분획 4800 mg을 얻었다. 각각의 분획물은 phosphate-buffered saline(PBS) 또는 ethanol에 용해시킨 후 원하는 농도에 따라 실험용 배지로 희석하여 사용하였다.

세포 배양

HL-60(human promyelocytic leukemia) 세포 및 HEL-299(human embryonic lung cell)는 한국 세포 주 은행(Korea Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 100 units/ml의 penicillin-streptomycin(GIBCO Inc, NY, USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO Inc, NY, USA)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 , humidified incubator에서 배양하였으며, 계대 배양은 약 70~80%의 confluence가 되는 3~4일 마다 한번씩 시행하였다.

세포 독성 측정

세포의 성장증식에 대한 문주란의 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 검색하였다. 살아있는 암세포 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate(ELISA) reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 생존하면서 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 조사하였다.⁹⁾ HL-60 세포 또는 HEL-299(2.5×10^5 cells/ml)를 96 well plate에 넣고 문주란 분획물을 20, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 이를 4일간 배양한 다음 MTT(Sigma, MO, USA) 200 μl (2 mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 반응시킨 후 plate를 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma, MO, USA) 150 μl 를 가하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 조사하였다.

DNA fragmentation

HL-60 세포(2.5×10^5 cells/ml)에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 문주란의 80% MeOH 추출물 및 용매 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수집한 후 Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega, WI, USA)를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 40분(100 V) 동안

전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 DNA fragmentation 현상을 관찰하였다.¹⁰⁾

세포주기변화 측정

HL-60 세포(2.5×10^5 cells/ml)에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 문주란의 CHCl_3 , BuOH, EtOAc과 H_2O 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, 세포를 수확하여 PBS로 세척하였다. 그 후 -20°C에서 70% ethanol로 30분 동안 고정 시키고 PBS 세척 후 RNase A(1 mg/ml)를 처리한 다음에 propidium iodide(PI; Sigma, MO, USA)로 염색하고, COULTER EPICS XL™ Flow Cytometer(Coulter, Miami, FL, USA)로 세포주기를 분석하였다.¹¹⁾

핵의 형태학적 변화 관찰

HL-60 세포(2.5×10^5 cells/ml)에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 문주란의 CHCl_3 , BuOH, EtOAc과 H_2O 분획물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, DNA에 특이적으로 결합하는 형광색소인 Hoechst 33342(H33342; Sigma, MO, USA) 용액을 가하여 37°C에서 10분간 염색한 후 형광현미경(IX-71, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다.¹²⁾

RNA extraction and RT-PCR analysis

HL-60 세포(5.0×10^5 cells/ml)에 문주란의 CHCl_3 , BuOH, EtOAc과 H_2O 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후 총 RNA 추출은 TRI-reagent(MRC)를 사용하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, chloroform을 첨가하여 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심 분리하여 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량 하였고, A260/A280의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.¹³⁾

1 μg 의 total RNA에 oligo(dT)₁₈ primer, dNTP(0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 및 M-MuLV reverse transcriptase(2 U)를 가하여 70°C에서 5분, 37°C에서 5분, 37°C에서 60분, 그리고 70°C에서 10분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 Bcl-2,¹⁴⁾ Bax¹⁵⁾ 및 β_2 -MG¹⁶⁾을 증폭시키기 위하여 2 μl cDNA, 4 μM 의 primer pair, 10 \times buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM MgCl_2 , 1 unit Taq polymerase(Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μl 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer thermal cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 Table I의 primer를 사용하여 94°C에서 30초(denaturing), 55°C에서 42초(annealing) 및 72°C에서 1분

Table I – The sequences of primers and the expected sizes of the RT-PCR products

Gene	Primer sequences	Fragment size
Bcl-2	F 5'-TGCACCTGACGCCCTTAC-3'	292 bp
	R 5'-AGACAFCCAFFAFAAATCAAACAG-3'	
Bax	F 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'	364 bp
	R 5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'	
β_2 -MG	F 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	114 bp
	R 5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'	

(primer extension)을 35회 반복하는 조건에서 수행하였다. PCR에 의하여 생성된 산물은 3.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 문주란의 급성 전골수성 백혈병 세포인 HL-60의 증식 억제 효과를 조사하고, 세포 증식 억제 작용이 apoptosis 유도에 의한 것인지 알아보았다.

문주란의 추출물 및 용매 분획물의 HL-60 세포 증식에 대한 억제 효과는 MTT assay를 이용하여 검색하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondria 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색 MTT가 환원되어 자주색을 띠는 비수용성의 formazan이 형성되며, 이를 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하는 검색법이다. 문주란의 80% MeOH 분획물을 비롯한 각각의 용매 분획물을 20, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 HL-60 세포에 처리한 결과, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 기준으로 BuOH 분획물이 약 83%로 가장 높은 HL-60 세포 증식 저해 효과를 보였고, CHCl_3 ,

EtOAc, H_2O , 80% MeOH, hexane 분획물 순으로 HL-60 세포 증식 저해 효과가 나타났다(Table II). 정상 세포의 증식을 억제하는지 알아보기 위하여 HEL-299(human embryonic lung cell)에 같은 방법으로 문주란을 처리하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 15%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 20%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 40%까지 HEL-299 세포 증식을 억제하는 것으로 확인되었다(Table III). 문주란의 추출물 및 용매 분획물이 HEL-299 세포보다 HL-60 백혈병 세포의 증식을 더 강력히 억제하는 것을 알 수 있으며, HL-60 백혈병 세포의 증식을 50% 억제하는 농도에서는 HEL-299 세포의 증식은 10% 이하로 억제 되었다.

문주란에 의한 HL-60 백혈병 세포의 성장 증식 억제효과의 기전으로는 HL-60 세포의 분화유도 또는 apoptosis 유도를 고려할 수 있다. 우선, 본 연구에서는 문주란의 HL-60 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도 작용에 의한 것인지 알아보았다. DNA 분절현상은 apoptosis의 대표적 현상으로 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어 nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰할 수 있다.¹⁷⁾ 문주란 80% MeOH 추출물 및 용매 분획물 처리에 의하여 HL-60 세포의 apoptosis가 유도되는 지 DNA 분절현상을 전기영동으로 관찰하였다. 문주란의 80% MeOH 추출물 및 용매 분획물을 HL-60 세포에 각각 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 24시간 동안 처리하여 DNA ladder를 확인한 결과, Fig. 1에서와 같이 문주란의 CHCl_3 , BuOH 및 H_2O 분획물 처리군에서 뚜렷한 DNA ladder를 관찰 할 수 있었고, EtOAc 분획물 처리군에서도 희미하게 단편화 현상을 관찰할 수 있었다. HL-60 세포의 DNA 분절을 유도하는 문주란의 CHCl_3 , BuOH, EtOAc 및 H_2O

Table II – Inhibitory effects of the 80% MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HL-60 cells

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)					
	80% MeOH	hexane	CHCl_3	EtOAc	BuOH	H_2O
20	30.0 \pm 3.7*	23.8 \pm 3.8**	36.5 \pm 5.0*	24.3 \pm 6.9*	74.8 \pm 2.2*	33.7 \pm 2.8**
50	50.6 \pm 4.2**	28.7 \pm 2.5	69.5 \pm 2.1**	57.7 \pm 2.2*	82.7 \pm 1.1**	54.5 \pm 3.2**
100	63.0 \pm 3.8**	37.9 \pm 4.2*	87.1 \pm 2.0	83.3 \pm 2.0	85.7 \pm 1.3*	57.7 \pm 2.2*

HL-60 cells (2.5×10^5 cells/ml) were treated with 20, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of 80% MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data are presented as a mean \pm SD from three separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

Table III – Inhibitory effects of the 80% MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* on the growth of HEL-299 cells

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)					
	80% MeOH	hexane	CHCl_3	EtOAc	BuOH	H_2O
20	7.5 \pm 1.5*	8.1 \pm 1.5**	11.1 \pm 1.6*	7.2 \pm 0.8*	15.6 \pm 2.6*	15.8 \pm 1.4*
50	10.5 \pm 1.4	5.6 \pm 1.8	19.8 \pm 1.4*	15.4 \pm 1.7**	22.6 \pm 0.6*	17.6 \pm 0.5**
100	26.3 \pm 3.2**	29.9 \pm 3.0	37.3 \pm 2.1**	41.7 \pm 3.2**	32.6 \pm 2.0*	24.5 \pm 1.6**

HEL-299 cells (1.5×10^5 cells/ml) were treated with 20, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of the 80% MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 4 days and measured for viability by MTT assay. All experiments were performed in triplicate. Data are presented as a mean \pm SD from three separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

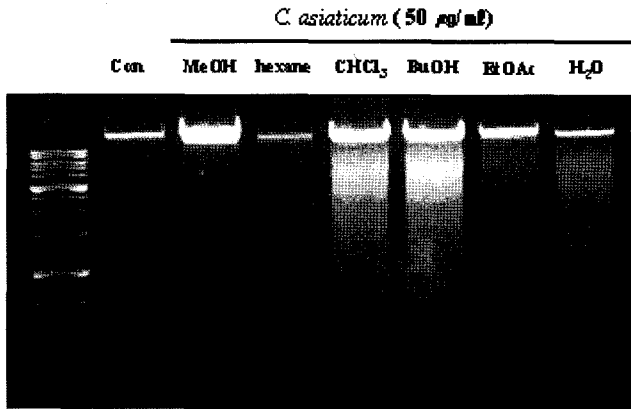


Fig. 1 - DNA fragmentation by the 80% MeOH extract or several solvent fractions from *C. asiaticum* in HL-60 cells. HL-60 cells (2.5×10^5 cell/ml) were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of the 80% MeOH extract or solvent fractions from *C. asiaticum* for 24 h. Analysis for DNA fragmentation was performed as described in materials and methods.

분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리한 다음, DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 PI를 처리하여 세포주기를 유세포 분석기로 조사하였다.¹⁸⁾ 그 결과, 문주란의 CHCl₃, BuOH, EtOAc 및 H₂O 분획물 처리에 의하여 apoptotic 세포, 즉 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가하는 것을 확인하였으며, BuOH, EtOAc 및 H₂O 분획물 처리군에서는 necrosis도 일어나는 것으로 보아 이들 용매 분획에 의하여 HL-60 세포의 apoptosis와 necrosis가 함께 유도되는 것으로 보인다(Fig. 2). 동일한 처리 방법으로 apoptosis 동안에 나타나는 형태학적 변화를 H33342를

이용한 핵 염색으로 조사한 결과, 문주란의 CHCl₃, BuOH, EtOAc 및 H₂O 분획물 처리에 의하여 cell shrinking, chromatin 응축 및 apoptotic body 등과 같은 형태학적 변화들이 뚜렷하게 확인 되었다(Fig. 3).¹⁹⁾

문주란에 의한 HL-60 세포의 apoptosis 유도 기전을 밝히기 위해 anti-apoptosis 유전자로 알려진 Bcl-2와 pro-apoptosis 유전자로 알려진 Bax의 mRNA level을 조사하였다. Bcl-2는 미토콘드리아로부터 apoptosis 동안에 중요한 사건이라고 여겨지는 AIF(apoptosis induced factor)와 cytochrome c의 방출을 방해함으로써 apoptosis를 방지한다. Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 것과 촉진하는 집단으로 나눌 수 있는데 Bcl-2나 Bcl-xL은 apoptosis를 억제하며 Bax, Bcl-xS 등은 촉진하는 작용을 한다. 특히 세포 사멸을 촉진하는 여러가지 조건 아래서도 세포가 지속적으로 생존하는 것으로 봐서 bcl-2가 세포 생존에 중요한 역할을 한다고 판단하였고, 이어서 bcl-2의 역할이 세포의 apoptosis를 억제하기 때문이라는 것이 증명되었다.²⁰⁾ Fig. 4에서 보는 바와 같이 CHCl₃, BuOH, EtOAc 또는 H₂O 분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리하고, RT-PCR 방법을 이용하여 Bcl-2와 Bax 발현 변화를 관찰한 결과, CHCl₃ 및 BuOH 분획물 처리군에서 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, Bax 발현은 증가됨을 확인할 수 있었다. 문주란의 CHCl₃ 및 BuOH 분획물은 HL-60 백혈병 세포의 Bcl-2 level을 down-regulation하여 apoptosis를 유도함으로써 HL-60 세포의 성장 증식을 억제함을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구실에서는 향후 문주란을 급성 전골수성 백혈병 치료제로 개발하기 위

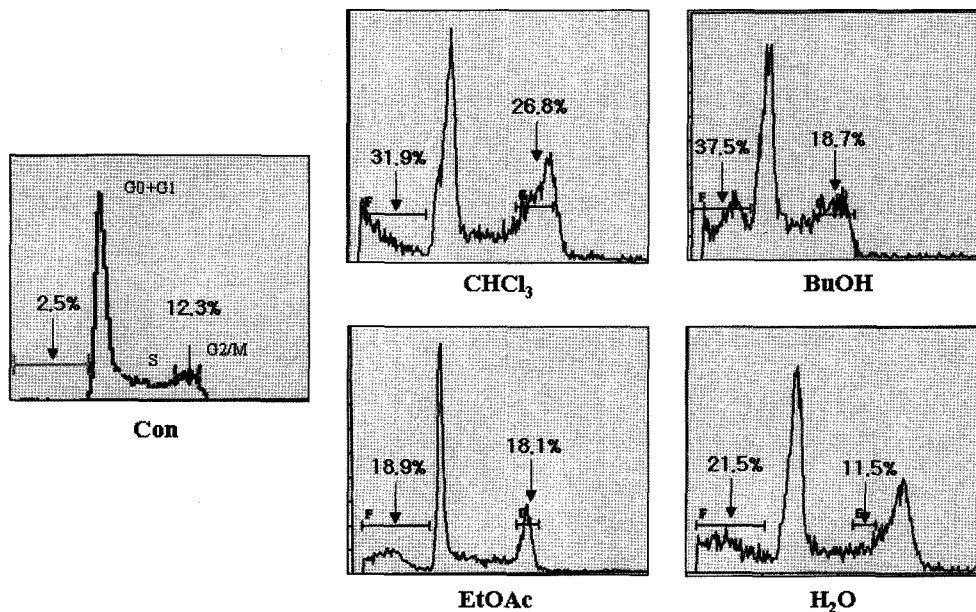


Fig. 2 - The degree of apoptosis represented as the DNA content measured by flow cytometric analysis in HL-60 cells. HL-60 cells (2.5×10^5 cells/ml) were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of CHCl₃, BuOH, EtOAc and H₂O fraction of *C. asiaticum* for 24 h. For the measurement of the sub-G1 hypodiploid cells, the flow cytometric analysis was performed as described in materials and methods.

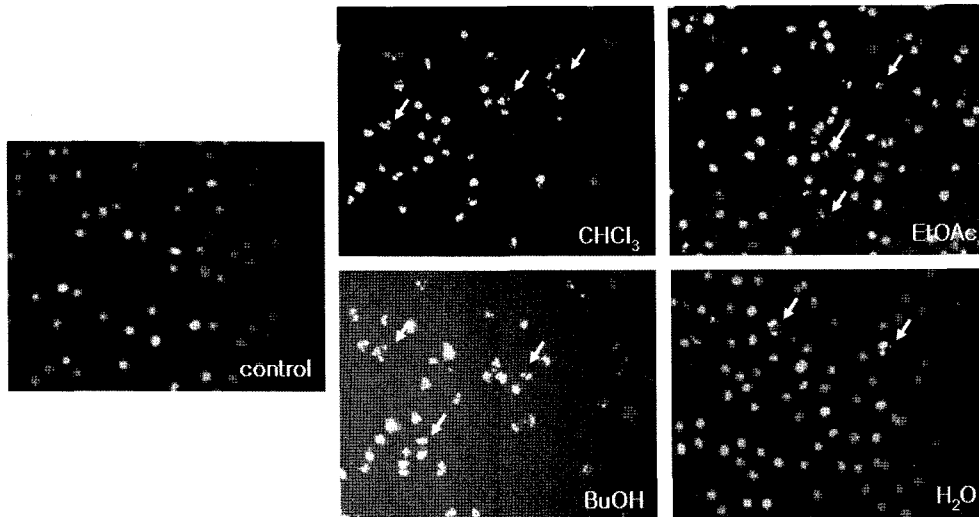


Fig. 3 – The degree of apoptosis represented as the fluorescent image of nuclei in HL-60 cells by fluorescent microscope. HL-60 cells (2.5×10^5 cells/ml) were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of CHCl_3 , BuOH, EtOAc and H_2O fraction of *C. asiaticum* for 24 h. DNA-specific fluorescent dye, H333342 (10 $\mu\text{g/ml}$ medium at final) was directly added to cultured cells. The fluorescent images of nuclei of cells were observed and photographed under inverted fluorescent microscope equipped with a IX-71 Olympus camera. The cells were photographed under microscopy ($\times 400$).

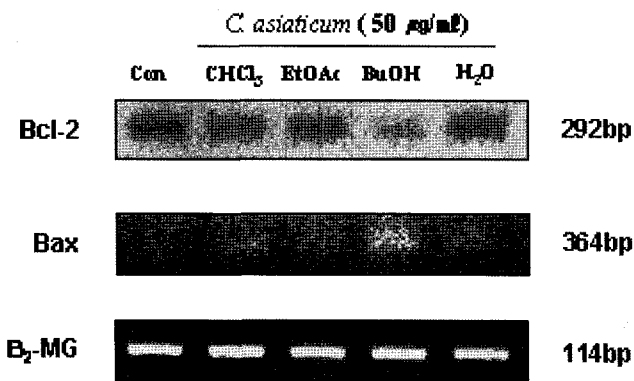


Fig. 4 – RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax expression in the HL-60 cells treated with several solvent fractions from *C. asiaticum*. HL-60 cells (2.5×10^5 cells/ml) were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ of CHCl_3 , EtOAc, BuOH and H_2O fraction of *C. asiaticum* for 24 h. RT-PCR analyses of BCL-2 and Bax were performed after synthesizing the cDNA as described in the materials and method.

하여 분리된 활성성분에 의한 mRNA 및 단백질 수준에서의 apoptosis 유도 기전에 대한 연구를 진행할 계획이다.

결론

본 연구에서는 문주란의 HL-60 백혈병 세포의 성장증식에 대한 효과를 조사한 결과, 문주란의 CHCl_3 및 BuOH 분획물이 HL-60의 Bcl-2 level을 down-regulation하여 apoptosis를 유도함으로써 HL-60 세포의 성장 증식을 억제함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 연구 결과는 문주란의 CHCl_3 및 BuOH 분획물의 활성성분

을 급성 전골수성 백혈병의 치료에 이용할 수 있는 가능성의 근거를 제시하는 것이다.

참고문헌

- Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anti-carcinogens. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **22**, 291 (1984).
- Gullo, V. P., McAlpine, J., Baker, D. and Petersen, F. : Drug discovery from natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 523 (2006).
- Fennell, C. W. and van Staden, J. : Crinum species in traditional and modern medicine. *J. Ethnopharmacol.* **78**, 15 (2001).
- Beutner, D. and Frahm, A. W. : New alkaloid from *Crinum asiaticum*. *Planta Med.* **52**, 523 (1986).
- Winiger, B., Italiano, L., Beck, J. P., Bastida, J., Bergonon, S., Codina, C., Lobstein, A. and Anton, R. : Cytotoxic activity of amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **61**, 77 (1995).
- Abd el Hagiz, M. A., Ramadan, M. A., Jung, M. L., Beck, J. P. and Anton, R. : Cytotoxic activity of amaryllidaceae alkaloids from *Crinum augustum* and *Crinum bulbispermum*. *Planta Med.* **57**, 437 (1991).
- Szlavik, L., Gyuris, A., Minarovits, J., Forgo, P., Molnar, J. and Hohmann, J. : Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **70**, 871 (2004).
- Hohman, J., Forgo, P., Molnar, J., Wolfard, K., Molnar, A., Thalhammer, T., Mathe, I. and Sharples, D. : Antiproliferative amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. *Planta Med.* **68**, 454

- (2002).
- 9) Carmichael, J., DeGraff, W. G. Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* **47**, 943 (1987).
 - 10) Lee, K. T., Kim, J. I., Rho, Y. S., Chang, S. G., Jung, J. C., Park, H. J. and Miyamoto, K. : Hypericin induces both differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 1271 (1999).
 - 11) Nicoletti, I., Migliorati, C., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271 (1991).
 - 12) Luo, Y. and Kessel, D. : Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* **66**, 479 (1997).
 - 13) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.8.1 (1989).
 - 14) Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T. A., Dyer, M. J., Mason, D. Y. and Greaves, M. F. : Ultrastructural localization of BCL2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* **40**, 1819 (1992).
 - 15) Miyashita, T. and Reed, J. C. : Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **27**, 293 (1995).
 - 16) Xie, J., Wang, Y., Freeman, M. E., Barlogie, B. and Yi, O. : Beta2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit *in vitro* generation of functional dendritic cells. *Blood* **101**, 4005 (2000).
 - 17) Zimmermann, K. C., Bonzon, C. and Green, D. R. : The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* **92**, 57 (2001).
 - 18) Chiarugi, V., Magnelli, L., Cinelli, M. and Basi, G. : Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.* **40**, 603 (1994).
 - 19) Frey, T. : Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* **21**, 265 (1995).
 - 20) Antonsson, B. and Martinou, J. C. : The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50 (2000).