

포도근 에탄올 추출물이 Hep G2 세포의 자연사에 미치는 효과

이동교 · 이강파 · 김 혁¹ · 최병진² · 장해룡* · 박원환^{1*}

동국대학교 과학기술대학 세포유전학 실험실, 1: 동국대학교 심혈관계질환 천연물개발연구센터,
2: 동국대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of the Ethanol Extract of *Vitis labrusca* Root on Apoptosis in Hep G2 Cells

Dong Kyo Lee, Kang Pa Lee, Hyuck Kim¹, Byung Jin Choi², Hae Ryong Chang*, Won Hwan Park^{1*}

Department of Cellular Genetics, College of Sciences, 1: Cardiovascular Medical Research Center College of Korean Medicine, 2: Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dongguk University

The root of *Vitis labrusca*, is used as a source of health promoting drug in Korean traditional medicine. It has been reported that root of *Vitis labrusca* has antioxidant, anti lipid peroxidation and anti-reactive nitrogen species (RNS) activities. The aim of this study was to elucidate the molecular changes of apoptotic signaling pathways in phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA)-induced human hepatocellular carcinoma cell line (Hep G2). The root of *Vitis labrusca*, ethanol extract (RVLEE) was tested for cell viability on Hep G2 cell using the MTT assay. RVLEE exhibited weak cytotoxic activity. However, treatment of Hep G2 cells with RVLEE suppressed PMA-induced cell proliferation. Also, dramatic changes of cell death signals in cellular molecules such as Chk2/Cds1, CIDE-B, CLIMP-63, Bax, Bcl-xL, C-myc, Bcl-2, Birc-5, NIP-3, TRAF2 and BAR but not CIDE-B and DR4. Furthermore, our results showed that the treatment of Hep G2 cells with 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of RVLEE suppressed PMA-induced COX-2 gene activity. These data suggest that RVLEE have inhibitory effect of cell proliferation, induction of apoptosis and, thus, may offer therapeutic potential in Hep G2.

Key words : *Vitis labrusca*, apoptotic signaling, hepatocellular carcinoma, apoptosis

서 론

암(癌)은 질병 및 사망률을 유의적으로 증가시키는 원인이며, 세계적으로 건강을 관리하기 위한 주요한 문제로서 치료 및 예방에 대한 관심이 높다¹⁾. 효과적인 암의 예방 프로그램으로 식이요법과 적당한 운동은 암의 발생 빈도를 줄인다고 보여지며, 특히 식물 및 다양한 전통의학 자원에 포함된 성분이 암을 억제하는 것으로 연구되고 있다²⁻⁵⁾. 한편, 간암의 경우 세계적으로 빈도가 높은 악성종양으로 아시아 및 일부 아프리카 지역에서 많이 발생한다는 보고가 있다³⁾. 식물 및 다양한 한약에서 추출한 성분이 이러

한 간세포의 암화 진행을 막기 위한 노력으로 계통 분류된 추출물을 검증하고⁴⁾, 분리된 추출물로부터 단일 성분을 얻는 방법이 유효한 것으로 파악된다⁵⁾. 동시에 부작용이 없거나 매우 적어야 하며, 암의 특성인 증식 및 분화를 조절할 수 있어야 한다. 따라서 이러한 암세포의 무한 증식 및 다른 조직으로의 침투를 억제하기 위한 세포 신호 단계에서의 사멸에 대한 연구가 암을 예방하거나 치료하기 위한 천연물 대상의 최신 지견으로 보여진다^{6,7)}.

현재 세포의 죽음(cell death)에 관한 두 가지 경우의 중요한 기전이 밝혀져 있으며, 이를 괴사(necrosis) 및 자연사(apoptosis)라 한다⁸⁾. 조절된 세포의 죽음(programmed cell death), 즉 아폽토시스는 세포가 외부 및 내부로부터 죽음에 관련된 신호 또는 자극을 받게 되면서 일어나는 일련의 과정을 말하며, 대부분의 경우 주변 세포 또는 다른 조직 및 기관에 영향을 미치지 않는다. 일단 세포가 아폽토시스 기전을 작용하게 되면 다양한 변화

* 교신저자 : 박원환, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학 장해룡, 경주시 석장동 동국대학교 과학기술대학 바이오학부
· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373, 054-770-2212
· 접수 : 2007/12/17 · 채택 : 2008/02/04

를 나타내게 되는데, 먼저 세포의 막을 보존시키면서 핵 및 세포 자체를 응축시키게 된다. 그리고 DNA를 절단(fragmentation)하며 이러한 과정에서 에너지를 소모하게 된다. 이러한 일련의 과정을 통하여 생성된 apoptotic body는 대식세포(macrophage)에 의해 제거 되는 역동적 형태를 띤다⁹. 한편 아팝토시스는 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)과 관계가 있다고 알려져 있으며¹⁰, 여러 경로의 신호 및 이에 따른 반응이 수용체 (receptor) 매개의 세포사에 관련된 것으로 보인다¹¹. 또한 염증성 반응의 경로와도 밀접한 것으로 보고되어 있으며¹², 어떤 경우 세포사에 관련된 단백질 및 유전자를 차례로 파괴하는 암호화된 기능으로 세포의 비대 증식을 조절하는 작용을 한다¹³.

포도나무의 뿌리인 포도근(Root of *Vitis labrusca* L., 葡萄根)은 선행된 실험 연구에서 추출물이 항산화 효과가 우수한 것으로 보고된 바 있으며¹⁴, 이를 약침으로 추출하였을 때 지질과산화 및 cytochrome P450의 일부를 저해하는 것으로 알려 졌다¹⁵. 동의보감에서 이를 달여 마시면 구역질과 딸꾹질이 멎는다고 기록되어 있다. 또한 임신부의 태기가 명치로 치밀 때 사용 한다고 하였다¹⁶. 한편, 포도근을 대상으로 한 단일 성분 분리 및 활성에 관련된 연구로서 포도과 왕머루 (*Vitis amurensis*)의 뿌리에서 추출한 resveratrol의 항염증 효과에 관한 보고가 있으며¹⁷, 까마귀 머루 (*Vitis thunbergii*)의 뿌리에서 resveratrol을 분리 동정한 경우가 있다¹⁸. 선행 연구에서 보고된 바와 같이 산화적 손상에 의한 퇴행은 여러 가지 병변으로의 진행과정에 관련되어 있으며, 특히 노화 (aging), 암¹⁹ 그리고 만성심장질환²⁰에 밀접한 연관이 있다. 이상과 같이 포도근의 항산화 효과와 포함된 성분연구가 다양하게 진행되어 왔음에도 불구하고, 아직 crude한 에탄올 추출물이 세포사에 미치는 영향을 보고한 실험적 발표는 미흡한 것으로 보여 진다.

따라서 본 연구에서는 항산화 및 지질의 과산화를 방어하는 효과가 우수한 것으로 알려진 포도근을 대상으로 에탄올 추출을 실시하였으며, Hep G2 세포의 증식 억제에 관련한 세포사 기전을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 플라스틱 및 시약

본 실험에 사용된 100 mm 세포배양용 dish는 Corning (Corning Incorporated, NY, USA)사의 제품을 사용하였고, 96 well plate 및 기타 플라스틱 제품은 Falcon Labware (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)사로부터 구입하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 ethanol은 Merck(Merck KGaA, Germany)사로부터, agarose, ethidium bromide(EtBr), loading dye, TAE buffer, 그리고 reverse transcription을 위한 역전사 키트 및 효소는 Promega(Promega, Madison, WI, USA)사로부터 각각 구입하였다. 그리고 전체 RNA의 분리를 위한 Tri reagent는 MRC (Molecular Research Center, Inc., OH, USA)사 제품을 사용하였으며, phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) 및 proteinase K를 포함한 본 실험에 이용된 시약은 모두 Sigma사 (St. Louis, Mo,

USA)에서 판매하는 특급 제품을 구입하였다.

2. 재료 및 추출

재료는 서울 약령시 (藥令市)에서 국내산 포도근을 구입하였으며, 에탄올 추출물의 제조는 300 g의 포도근을 삼각 플라스크에 분쇄하여 넣고, 2.5 l의 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 72 시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출이 완료된 후 상층액만 선별하고, 얻어진 에탄올 추출물을 filter paper에 여과 (Whatman No. 2)하였다. 진공농축기 (EYELA SB-1000, Japan)에서 최종 부피가 200 ml이 되도록 농축하였고, 최종 건조된 시료는 냉동건조기 (Freezone, LABCONCO, USA)를 통하여 20.5 g (수율 : 6.83%)을 얻었다. 세포에 처리하기 위한 재료의 준비과정으로 각각의 실험 목적에 따라 배지에 녹여 사용했으며, 0.45 및 0.22 μm 실린지 필터(sartorius, Minisart, Germany)를 시행하였다.

3. 세포의 배양

본 연구에 사용한 human hepatocarcinoma cell line인 Hep G2 세포는 ATCC로부터 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Corporation, NY, USA) 및 1% antibiotics (penicilin-streptomycin)가 첨가된 Dulbecco's modifide eagle medium (DMEM)으로 37°C의 온도와 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양 하였다. 그리고 세포가 적정 밀도가 되었을 때 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 실험 전까지 계대를 유지 하였으며, 배지는 3일 마다 교환하였다.

4. 세포독성평가 (MTT assay)

포도근 에탄올 추출물 (RVLEE : root of *Vitis labrusca* ethanol extract)이 Hep G2 세포에 미치는 독성을 평가하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 먼저 96 well plate에 5,000 cells/well로 세포를 분주하고 FBS가 함유된 DMEM에서 24시간 동안 안정된 세포 부착을 유도하였다. 그리고 24시간이 경과한 후 배양액을 모두 제거하였고, FBS가 첨가되지 않은 190 μl의 DMEM과 최종 농도로 희석한 10 μl의 RVLEE를 첨가하였다. 다시 24시간이 지나 상등액 배지를 모두 제거하고 1X PBS (potassium buffered saline, pH 7.4, sterile filter)를 이용하여 잔여물을 세척하였다. 다음과정으로 180 μl의 DMEM을 첨가하고, 5 mg/ml로 조성된 MTT solution (in PBS, pH 7.4)을 20 μl 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 생세포의 미토콘드리아 formazone 형성을 유도하였다. 끝으로 96 well plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 배양 상층액을 제거하고 1:1 부피로 조제된 EtOH:DMSO 용액을 각 well에 150 μl씩 넣어 주었다. 그리고 20분간 흔들어 주면서 형성된 formazone을 용해시켜 발색을 균질하게 진행시켰다. 세포의 생존율은 ELISA reader (VersaMax, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 570nm에서 측정하였고, 결과는 무처리군 (control)에 대한 생존율(%)로 다음과 같이 환산하여 표기하였다.

$$\text{Cell survival (\% of control)} = (\text{Abs}_{570} \text{ of control} - \text{Abs}_{570})$$

of sample) / Abs570 of control

다음으로 PMA를 농도별 처리하였을 때 세포의 증식 능력을 평가하기 위하여, RVLEE 처리군 조건과 같이 96 well plate에 세포를 분주하고, 0-1,000 nM의 PMA를 24시간 동안 처리하여 동일한 방법으로 MTT를 실시하였다. 또한 RVLEE와 PMA를 동시에 처리한 경우의 세포 생존율을 평가하였다. 그리고 RVLEE 및 PMA를 Hep G2 세포에 처리하였을 때 세포의 형태학적 변화를 살펴보기 위하여 도립 현미경 (Nikon, ECLIPSE TE200, Japan)을 사용하여 이를 관찰하였다.

5. 역전사 효소 반응 (RT-PCR) 및 polymerase chain reaction

농도별 RVLEE (25 또는 50 µg/ml) 및 200 nM의 PMA를 Hep G2 세포에 처리하고 24시간이 경과한 후 다음과 같은 방법에 의하여 RNA를 분리 하였다. 우선 세포 상등액을 제거한 배양 용기에 1X PBS를 이용하여 세척하고, 1 ml의 total RNA isolation reagent를 처리하여 5분간 혼합 하였다. 그리고 0.2 ml의 chloroform을 첨가하여 강하게 혼합반응을 일으킨 후 실온에서 10분간 정치하였으며, 4°C 조건의 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리를 실시하였다. 다음으로 맑은 층의 상등액을 새로운 튜브에 옮기고, 0.5 ml의 isopropanol을 첨가한 후 실온에서 10분간 정치하였다. 12,000 rpm에서 8분 동안 원심분리를 하여 RNA pellet를 얻었으며, DEPC가 처리된 75%의 에탄올을 1 ml 넣고 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리 과정을 반복하였다. 최종 회수된 RNA는 공기 중에서 10분 이상 건조 시켰으며, 50 µl의 DNase/RNase 간섭이 없는 초순수 물에 용해 시켜 UV spectrometer (Shimadzu 1700, Japan)에서 정량을 하였다.

역전사 효소 반응은 promega사에서 제공된 manufacture에 따라 DNase의 처리 및 reverse transcription 과정을 순차적으로 실시하였으며, 과정은 다음과 같다. 먼저 2 µg의 RNA를 DNase와 섞고 DNA 제거 효소를 37°C에서 30분 동안 활성화 시켰다. 반응이 종료한 뒤 75°C에서 DNase를 불활성화 시킨 후 역전사 반응을 진행 하였다. 역전사 반응에서는 주형인 RNA와 oligo dT primer (Vitry, Genomine, Korea)를 섞고 70°C에서 5분간 반응을 전개시킨 후 4°C에서 5분 동안 정치하였다. 다음으로 RNA inhibitor (1 unit/µl)가 포함된 15 µl의 조성물 (최종농도 : 1X reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP mix)과 미리 oligo dT와 반응을 시킨 5 µl의 RNA 주형을 혼합하여 25°C에서 5분간 anneal하고, 42°C에서 60분 동안 extension 과정을 거친 후 마지막으로 70°C에서 15분 동안 heat-inactivate 하였다. 합성이 완료된 cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 이용하였다. PCR 과정을 수행하기 위한 조건으로 다음과 같은 primers를 제작하였다.

Chk2/Cds1	Forward	AAGTGGTGCCTGTGGAGAGGTAAA
	Reverse	TACCCAGCAGTCCCAACAGAAACA
CIDE-A	Forward	GACCTTGGGAGACAACACGCATTT
	Reverse	TGTCGTAGGACACGGAGTACATCT
CIDE-B	Forward	AACTGCACTGGACAGTGAGGACTT
	Reverse	AGAGCCCGTAGAATGTGGCTTTGA

CLIMP-63	Forward	GGTGCAGTCTTTGCAAGCCACATT
	Reverse	TCTGACTTCTGTGAAGATGGCGA
Bax	Forward	AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGC
	Reverse	TCCCGCCACAAGATGGTCAACG
Bcl-xL	Forward	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCGC
	Reverse	TTCTCTGGTGGCAATGGCG
C-myc	Forward	CAAGGACTGTATGTCGAGCG
	Reverse	CTTGAGGACCAGTGGGCTGT
Bcl-2	Forward	AGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC
	Reverse	AGATAGGCACCCAGGTTGATGCAAGCT
Birc-5	Forward	TTTCTCSSGGSCCACCAGCATCTCT
	Reverse	TTGACAGAAAGGAAAGCGCAACCG
NIP-3	Forward	ACACCACAAGATACCAACAGGGCT
	Reverse	TCTTCATGACGCTCGTGTCTCTCA
TRAF2	Forward	TCTGAGGCAGTGTGCCAAGAGAAA
	Reverse	AAGGTGCATCAGATGGTCCAGAA
DR4	Forward	ACAGAGGGTGTGGTTACACCAAT
	Reverse	AGTCTGCGTTGCTCAGAATCTCGT
BAR	Forward	TTTCATCCACACCATCTGCCCTCT
	Reverse	AGGCACGGTCTTCAGTTCAGTCTCT
COX-2	Forward	TGAAACCCACTCCAACACACAG
	Reverse	TCATCAGGCACAGGAGGAAG
β-actin	Forward	CTGTCTGGCGGCACCCACCAT
	Reverse	GCAACTAAGTCATAGTCCGC

PCR 결과의 최종 산물은 agarose gel electrophoresis에서 진행하였으며, ethidium bromide를 통하여 시각화 하였다.

결 과

1. Hep G2 세포의 증식 억제 효과

Hep G2 세포에 대한 RVLEE의 농도에 따른 증식 억제와 PMA를 단독으로 처리하였을 경우 세포의 증식에 미치는 영향, 그리고 RVLEE와 PMA를 동시에 처리하였을 때 세포이 증식에 관여하는 정도를 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다.

먼저 RVLEE 단독 처리군에 대한 독성을 평가하기 위하여 시료의 최종농도가 1, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 및 1,000 µg/ml가 되도록 처리한 결과 최저 농도(1 µg/ml)에서는 시료에 의한 증식 억제가 관찰되지 않았다(data not shown). 한편 500 µg/ml 이상의 고농도에서는 세포의 생존이 거의 대부분 저해 되었으며 (data not shown), 10-250 µg/ml의 농도에서 대조군 활성에 의존적인 생존을 저하가 관찰되었다(Fig. 1A). 다음으로 다양한 농도의 PMA 처리에 의한 Hep G2 세포의 증식 변화를 살펴보았을 때 100, 200, 500 및 1,000 nM에서 무처리군에 비해 최고 140.7% 까지 세포 생존율이 증가하였다. 하지만 농도에 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 세포 증식 억제 효과를 측정하는 마지막 조건으로 200 nM의 PMA와 10, 25, 50, 100 및 250 µg/ml의 RVLEE를 처리한 경우 시료 10 µg/ml의 농도에서 38.3%(생존율 : 61.7%)의 세포사망이 관찰되었으며, 250 µg/ml에서는 87.1%(생존율 : 12.9%)의 증식 억제가 보여 졌다(Fig. 1C).

한편 RVLEE에 의한 Hep G2 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과에서는 200 nM의 PMA를 단독처리 하였을 때(Fig. 2B) 아무것도 처리하지 않은 정상군(Fig. 2A)에 비하여 세포 밀도가 높아진 것을 알 수 있었다. 그러나 PMA와 동시에 처리한 시료

25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 RVLEE에 의한 세포사가 관찰되었고(Fig. 2C), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였을 때 현저한 세포 밀도의 저하와 세포사가 나타났다(Fig. 2D).

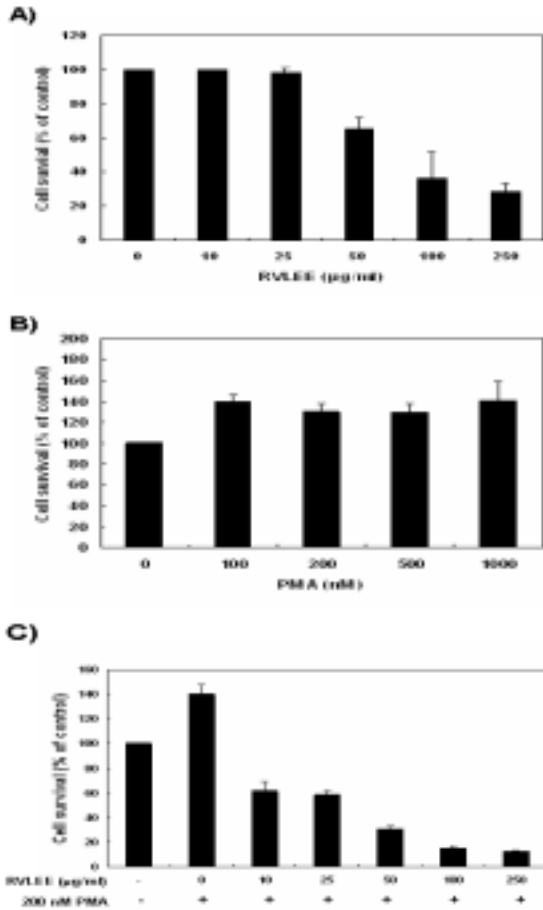


Fig. 1. Effects of RVLEE, PMA, and RVLEE plus PMA on the growth of Hep G2. Hep G2 cells were treated with the indicated concentrations of RVLEE, PMA, and RVLEE plus PMA for 24 h. Cell survival was determined by MTT assay. (A) Cells were treated with the indicated concentrations of RVLEE. (B) Hep G2 cells were treated with the indicated concentrations of PMA. (C) Cell were treated with the indicated concentrations of RVLEE in the presence of PMA (200 nM) for 24 h. Results are represents the means \pm SD of three independent experiments and is expressed as % of control.

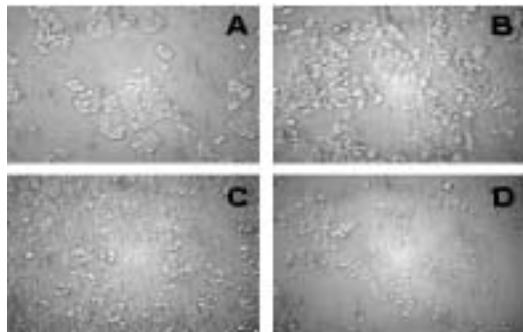


Fig. 2. Apoptotic effect of RVLEE on Hep G2 growth and microscopic observation in cultured Hep G2. Apoptotic effect observation was carried out with 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RVLEE in the presence of PMA (200 nM). (A) Control (without treatment), (B) 200 nM PMA alone, (C) 200 nM PMA with 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of RVLEE, (D) 200 nM PMA with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of RVLEE.

2. 역전사 효소 반응에 의한 cell death signal의 발현 양상

Cell cycle arrest 및 복구 그리고 아폽토시스에 관련한 유전자인 Chk2/Cds1의 발현 양상을 관찰한 결과 PMA를 Hep G2 세포에 단독 처리하였을 때 대조군에 비하여 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 RVLEE를 각각 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리한 경우 농도에 의존한 저해가 나타났다(Fig. 3).

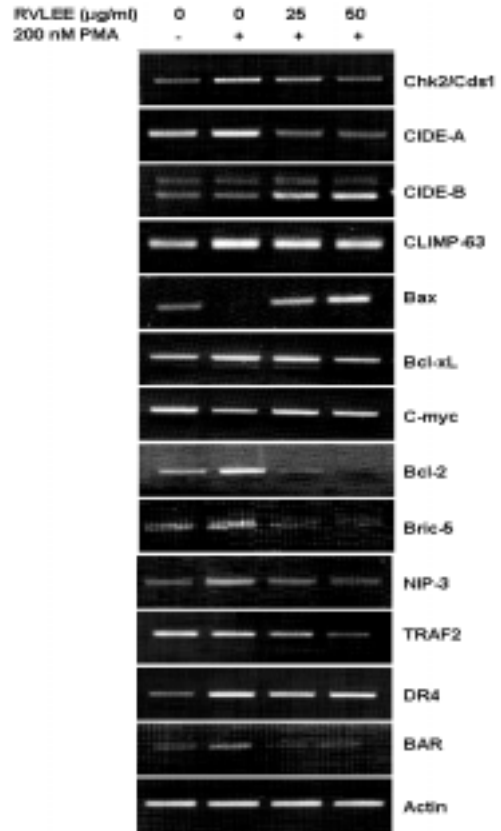


Fig. 3. Expression of cell death signaling genes in Hep G2 cells following exposure to RVLEE for 24 h. Hep G2 cells were plated on 96 well plates and after 24 h they were treated with the indicated concentrations of RVLEE (25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively) in the presence of PMA (200 nM) for 24 h. RNA isolation and RT-PCR were performed as described in the Materials and Methods section. PCR products were resolved on a 1.0 % agarose gel electrophoresis. Actin was included as an internal control.

다음으로 포유동물의 세포에서 아폽토시스를 활성화 시키는 CIDE-A와 CIDE-B의 발현 형태는 CIDE-A의 경우 감소하는 것으로 보여 졌으나, CIDE-B는 RVLEE 처리 농도에 따른 유의적 증가를 나타내었다. DNA의 손상을 받으면 활성화 되는 CLIMP-63(p63)은 PMA 단독 처리군에서 대조군에 활성화에 비하여 증가하는 양상이었으며, RVLEE를 함께 처리한 실험군에서는 농도에 의존하여 감소하는 경향을 보였다. Mitochondrial apoptosis 경로에서 세포사멸에 관련한 특정 유전자인 Bax는 PMA를 처리하였을 때 나타나지 않았으나, RVLEE의 다양한 농도로부터 그 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 Bcl-xL의 경우에는 RVLEE에 의존하여 발현이 저해됨을 관찰할 수 있었다. C-myc는 PMA를 처리하였을 때 억제 되었다가, RVLEE를 함께 첨가한 경우에는 거의 정상 대조군 수준으로 환원되는 것을 확

인하였으며, mitochondrial 수준에서 cytochrome c의 방출을 저해하는 것으로 알려진 Bcl-2는 유의성 높은 억제력을 보여 주었다. Bric-4와 -5는 survivin의 일원으로 아폽토시스의 inhibitor로 작용하며, 암세포에서 주로 과다 발현되는 양상을 보이는데 본 실험 결과에서는 RVLEE의 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 농도 의존하여 Bric-5의 발현이 감소하였다. 하지만 Bric-4의 발현에는 아무런 영향을 미치지 못했다(data not shown). 한편 BH-3를 포함한 BNIP-3는 RVLEE의 농도에 영향을 받아서 발현이 감소하는 형태로 관찰되었다. 세포의 분화 능력을 조절하는데 관여하는 TRAF2는 무처리군 및 PMA를 단독 처리 하였을 때 뚜렷한 발현 양상을 나타내었으나, RVLEE를 첨가한 경우에는 농도에 의존하여 감소하는 경향을 나타내었다. 또 다른 세포사의 신호 기전에 속하는 DR4의 경우에는 PMA를 단독 처리하였을 때 가장 강력한 발현을 보였으며, RVLEE를 처리하였을 때 대조군에 비하여 약간 높은 발현 수준을 유지 하였다. 그리고 anti-apoptotic gene에 속하는 BAR는 PMA 처리군에서 발현이 증가하였으나 RVLEE의 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 농도에서 감소하는 결과를 관찰할 수 있었으며, beta-actin은 모든 실험에서 동일한 발현 형태를 나타내었다.

마지막으로 Hep G2 세포에 PMA를 처리하였을 때 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현 양상을 검토한 결과 무처리 대조군에 약 1.9배 증가 하였다. RVLEE는 PMA로부터 증가된 COX-2 유전자의 발현을 억제하였으며, 이는 농도에 매우 의존적 결과였다(Fig. 4A and B).

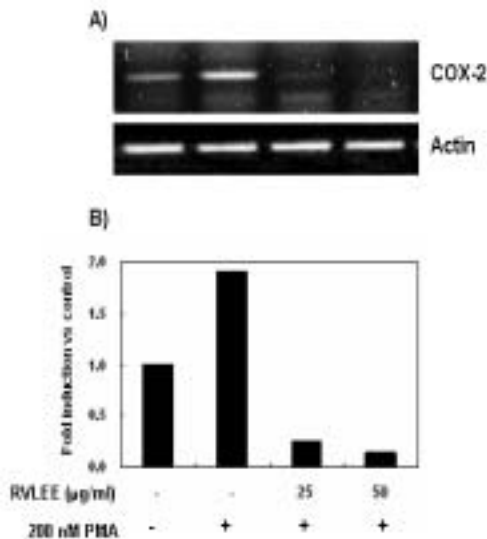


Fig. 4. Effect of the RVLEE on PMA-induced expression of mRNA of COX-2 in the HEp G2 cells. The Hep G2 cells were treated with RVLEE at the indicated concentrations (25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively) for 24 h in the presence of PMA (200 nM). (A) mRNA were analyzed by RT-PCR as described in the Materials and Methods. Actin was used for a marker of equal loading. (B) The density of the bands was quantified by the UVP image program.

고찰

포도근은 동의보감¹⁶⁾에서 구역질과 딸꾹질을 멎게 하는데 효과적이라 하였으며, 오가피장척탕 등에 처방하고 있다²¹⁾. 최근

의 연구에 의하면 임¹⁴⁾등은 포도근 열수 추출물 및 약침액이 항산화에 미치는 효과가 우수하다고 하였고, 지질과산화물을 저해하는 것으로 보고 하였다¹⁵⁾. 한편 동일한 포도과 식물인 왕머루 (*Vitis amurensis*)¹⁷⁾ 및 까마귀 머루(*Vitis thunbergii*)의 뿌리에서는 항산화, 항염증 및 암의 예방에 우수하다고 알려진 resveratrol을 분리하였다¹⁸⁾. 이와 같이 식물 및 천연자원에서 암 예방 또는 항암에 관한 연구는 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 사람의 hepatocarcinoma cell line인 Hep G2를 대상으로 세포 증식 억제를 통한 세포사 기작에 관심이 집중되고 있다⁴⁾. Hep G2 세포는 phorbol 12-myristate-13acetate(PMA)를 처리하여 세포의 증식 및 이주능을 증가 시키게 되는데⁵⁾, PMA는 이미 잘 알려진 것처럼 protein kinase C를 선택적으로 활성화 한다²²⁾. 활성화된 protein kinase C 등은 여러 가지 반응 경로를 통해 COX-2의 과다 발현을 일으키거나, 염증 자극에 의한 정상적 세포사멸을 억제하게 된다. 따라서 본 연구에서는 포도근 추출물이 PMA로 유도된 Hep G2 세포의 증식을 저해하는 정도를 관찰하고자 하였다.

먼저 세포의 증식 억제를 MTT assay로 평가하였을 때 RVLEE는 PMA로 유도한 세포의 이상 증식을 농도에 의존하여 저해하였다(Fig. 1). 따라서 RVLEE는 COX-2의 발현을 저해 경로를 통하여 정상적인 세포의 사멸을 유도하는 근거로 보이며, 농도에 유의적인 것으로 관찰되었다. 다음으로 이러한 세포사 현상이 조절된 죽음 (programmed cell death: PCD), 즉 아폽토시스에 의한 것인지를 형태학적으로 관찰하고자 하였는데, 일반적인 세포의 괴사(necrosis)는 세포막 및 핵막이 붕괴되는 것에 비하여, 아폽토시스는 막을 유지하면서 에너지를 사용하는 세포 형태의 수축 및 apoptotic body를 형성하게 된다²³⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면 Hep G2 세포는 200 nM의 PMA에 단독으로 노출시켰을 때 아무것도 처리하지 않은 정상군 (Fig. 2A) 보다 과다한 세포의 증식을 일으키는 것을 알 수 있으며 (Fig. 2B), RVLEE는 농도 (20-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의존적으로 세포의 증식을 저해하였다. 또한 apoptotic body와 같은 형태를 형성하는 것으로 보여 졌다 (Fig. 2C and D).

이상의 결과를 분자 수준에서 검증하기 위하여 역전사 효소 반응 (reverse-transcriptase polymerase chain reaction)을 기반으로 한 실험을 수행 하였다. Chk2/Cds1은 세포 cycle의 정지에 관련한 제어에 관계하며, 특히 DNA가 손상될 경우 복구 (repair)를 진행하거나 아폽토시스를 조절하는데 관여 한다²⁴⁾. 한번 손상된 DNA는 이러한 수복 기구를 통하여 본래의 성질을 유지하게 되는데, 아폽토시스가 일어 날 경우 Chk2/Cds1이 낮은 수준으로 발현 되어 fragmentation 시킨 유전자의 복구를 막아야 한다. 따라서 본 실험에서 RVLEE는 PMA로 유도한 Hep G2 세포의 과다 증식을 억제하였고, 아폽토시스의 수행을 위한 DNA 분절 복구 기능을 제어하였으므로, Chk2/Cds1의 유전자 발현 저해는 의미 있는 결과라고 할 수 있다. 한편 Chk2/Cds1의 경우와는 대조적으로 apoptotic 효과를 나타내기 위한 DNA의 분절을 유도하는 인자에 대하여 검증하였다. DNA의 fragmentation을 돕는데 대표적으로 알려진 CIDE-A 및 CIDE-B는 포유류의 세포에서 아폽토시스를 활성화 시키며, 아폽토시스 과정에서 DNA 분절이

유도될 때 증가되는 양상을 나타내는 유전자형이다²⁵). RVLEE는 CIDE-B를 증가시키는 양상으로 관찰 되었고, 이러한 결과는 Hep G2가 RVLEE의 자극에 의하여 세포막 및 핵막 응축시키고, DNA fragmentation을 유발하여 단계적인 아폽토시스의 경로를 따르는 것이라 생각할 수 있다. 한편 DNA 손상원 (DNA damage agent)에 의하여 활성화되는 유전자인 CLIMP-63(p63)은 다양한 약물로서 p63의 발현을 저해 시켜 아폽토시스 수준의 세포사를 검증하게 된다²⁶). 따라서 PMA에 의한 Hep G2 세포의 과다 증식 과정에서 유발된 CLIMP-63의 과발현 수준을 RVLEE가 정상 수준에 가깝게 조절한 것은 주목할 만한 결과이다.

암세포에서 조절된 세포의 사멸은 AMP-activated protein kinase²⁷ 및 다양한 경로에 의하여 일어나는 것이며, 특히 mitochondrial 경로에 의존한 신호 전달이 주요하다²⁸). 따라서 RVLEE가 mitochondrial 경로에 의존한 세포 사멸의 신호전달 과정에 미치는 영향을 검토하기 위하여 Bax, Bcl-xL, C-myc 및 Bcl-2 유전자들의 발현을 검색하였다. 먼저 pro-apoptotic protein인 Bax는 non-apoptotic 세포에서는 cytoplasm에 비활성화된 형태로 존재하다가 세포가 아폽토시스를 진행하는 신호를 받게 되면 mitochondrial death pathway를 따라 유도되어 cytochrome c의 분비와 caspase의 활성화에 관여한다^{28,29}). RVLEE는 Bax의 유전자 발현을 처리 농도에 따라 유의적으로 증가시켰으며, RVLEE는 PMA를 처리한 Hep G2 세포의 조절된 세포 사멸을 유도하는 것으로 판단된다. Bcl-xL은 anti-apoptotic 유전자이며, down-regulation된 Bcl-xL은 아폽토시스를 활성화시키게 된다³¹). 또한 Bcl-xL의 유전자 발현 저하는 c-myc protein에 의해 조절되며, c-myc의 증가는 정상적 아폽토시스를 진행하는데 있어 cytochrome c의 분비를 유도하는 역할을 한다^{1,30}). 따라서 Bcl-xL의 저하와 c-myc의 증가는 상호 연관이 있으며, RVLEE는 이들의 발현 수준을 효과적으로 감소시키거나 증가하게 하였으므로 cytochrome c의 분비를 촉진시킬 것으로 사료된다. 이러한 결과를 증명하기 위한 단계로 cytochrome c의 분비를 저해하는 것으로 알려져 있는 Bcl-2에 대하여 RVLEE의 효과를 살펴보았는데, 먼저 PMA를 단독으로 처리한 경우 Bcl-2는 매우 높은 수준의 발현을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 현상은 PMA가 세포의 증식 및 분화를 촉진할 뿐만 아니라, Bcl-2의 조절을 통하여 Hep G 세포의 apoptic event를 막는 것으로 보여 졌으며, RVLEE는 Bcl-2의 과발현을 차단하는 역할을 하였다. 또한 Bcl-2와 같은 anti-apoptotic한 protein은 Fas-매개의 apoptic 신호를 차단하는 것으로 보여 지며, Bric-5 역시 직접적인 caspase-3와 -7의 저해를 통하여 아폽토시스의 진행을 방해³¹)하게 되므로, RVLEE는 세포사 경로의 다양한 저해 요인들을 효과적으로 제어하는 것을 알 수 있었다.

NIP2(BNIP3)는 BH-3를 포함한 protein으로 Bcl-2의 계열로 분류되며, 세포 사멸의 조절 인자중 하나이다. 최근의 연구에 의하면 상향 조절된 BNIP2가 폐암 세포의 아폽토시스를 promotion 한다고 보고되었으며, NIP-3는 아폽토시스 신호 경로에 있어 caspase에 비존존적인 necrosis-like 세포사로 보여 진다³²). 한편 tumor necrosis factor receptor- associated factor

(TRAFs)는 세포내 증식 및 성장에 관련하고 있으며, nuclear factor -kappaB (NF- κ B)를 활성화 시켜 세포의 생존을 유지하도록 한다³³). 따라서 정상적으로 조절된 세포의 사멸을 유도하기 위한 TRAFs의 발현 저하는 필수적이라 보여 지며, RVLEE는 TRAF2를 효과적으로 차단하는 역할을 하였다. 하지만, 아폽토시스 promotor인 NIP-3의 경우 RVLEE에 의한 유의한 변화가 관찰되지 않았고, 관련한 작용 기전은 아직 명확하지 않다.

세포의 분화와 증식에 관련한 NF- κ B와 같은 전사인자(transcription factor)의 활성화는 결과적으로 antiapoptotic한 유전자의 발현을 증가시키지만, 또한 일부 proapoptotic한 유전자의 발현을 조절하기도 한다. 여기에 death receptor (DR)-4 혹은 -5 등이 포함되는데, inhibited kappaB alpha (IkB α)를 과다 발현시켰을 때 caspase 및 DR4 및 5가 활성화 되어 DNA fragmentation 등을 증가시키게 된다³⁴). 하지만 본 연구의 결과에서는 RVLEE에 의한 유전자의 발현 변화가 PMA를 처리한 실험군에 발견되지 않았다. 아폽토시스의 또 다른 조절 유전자인 BAR은 caspase와 Bcl-2 사이에서 간섭하는 역할을 하며, BAR의 발현은 아폽토시스의 신호를 이해하는데 주요한 경로로 인식된다³⁵). BAR는 SAM domain을 포함하고 있으면서 Bcl-2와 Bcl-xL의 상호 작용이 요구되며, Bax 유도의 세포 사멸을 저해하는 과정에서 yeast를 이용하여 동정 되었다. 따라서 포유류와 yeast에서 모두 Bax 유도의 아폽토시스를 저해하는 유전자로 밝혀져 있으며, BAR의 mRNA 발현 수준은 아폽토시스의 민감한 예보 체계라 할 수 있다³⁶). RVLEE에 의한 BAR의 유전자 발현 변화는 PMA를 단독 처리한 경우 증가 하였으며, 25 와 50 μ g/ml를 함께 첨가하였을 때 유의적으로 저하 되는 것을 관찰할 수가 있었다. 이러한 결과는 RVLEE에 의하여 Bax의 유전자 발현이 증가 양상을 나타낸 것에 대한 중요한 근거가 되며, 동일 경로 상에서 일어나는 일련의 반응으로 추측된다.

사람의 간암세포주에서 COX-2는 oncogene 및 다른 cytokines를 매우 높게 유도하며, 이러한 반응 경로를 통하여 염증과 암이 유발 된다⁶). 이와 연관된 COX-2의 특이적 저해 물질(specific COX-2 inhibitor)에 관한 연구는 지속적으로 관심의 대상이 되어 왔으며, 기전에 관한 다양한 실험적 보고가 진행되어 왔다^{37,38}). 특히 COX-2의 과다 발현은 아폽토시스에 저항하는 것으로 보여 지므로, PMA에 의한 COX-2 유전자 발현의 증가를 특이적으로 차단하는 경우 아폽토시스에 의존한 암세포의 성장 및 증식을 막을 수 있다고 보여 진다. 따라서 RVLEE는 PMA 처리 실험군 뿐만 아니라 대조군의 COX-2 활성 보다 낮은 발현을 나타내었으므로, 세포의 이상 증식에 의한 각종 질병의 유발을 막을 것으로 사료된다.

결 론

포도근 에탄올 추출물 (RVLEE : root of *Vitis labrusca* ethanol extract)을 대상으로 Hep G2 세포에서 세포 독성 및 형태학적 변화 관찰, 그리고 세포사 신호에 관련한 유전자들의 발현 양상을 검토하고 COX-2의 발현을 살펴본 결과 다음과 같은

결론을 얻었다. 먼저 RVLEE는 Hep G2 세포의 증식을 억제 하였으며, 특히 PMA를 처리하였을 때 증가한 세포의 성장과 증식을 유의적으로 제어하였다. 이를 세포의 형태학적 측면에서 검토한 결과로서 apoptic body가 형성되는 것을 알 수 있었고, 역전사 효소 반응을 통하여 세포의 죽음에 관련된 유전자 신호의 변화가 차례로 나타났다. Chk2/Cds1는 RVLEE를 처리하였을 경우 농도 의존적인 감소가 보였고, CIDE-B는 증가 하였다. p63은 PMA 단독 처리군에서 증가하였으나 RVLEE를 첨가하였을 때 감소하였다. 또한 Bax 유전자의 발현이 증가하였고, Bcl-x1는 RVLEE에 의존하여 감소하였다. C-myc는 RVLEE와 함께한 경우 증가, Bcl-2는 감소하였다. Bric-5는 발현이 감소하였고, BNIP-3 역시 RVLEE의 농도에 영향을 받아 감소하는 형태였다. 끝으로 TRAF2 및 DR4는 농도 의존적 감소를 나타내었으며, BAR 또한 마찬가지로의 결과를 보였다. 염증관련 유전자인 COX-2는 RVLEE 처리군으로부터 유전자 발현을 감소시키는 결과를 얻었다. 이상의 결과에서 RVLEE는 Hep G2 세포의 이상 증식을 억제하고 조절된 세포의 죽음을 유도하여 항암 및 그에 관련한 질환을 억제 하는 효과적인 약물로 기대 된다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비/연구년 지원 및 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업 (과제번호 : R13- 2005-013-00000-0)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Pillai, G.R., Srivastava, A.S., Hassanein, T.I., Chauhan, D.P., Carrier, E. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer letters*. 208: 163-170, 2004.
2. Kim, H.C., An, R.B., Jeong, G.S., Bum, J.S., Oh, S.H., Lee, H.S., Kwon, J.W., Kwon, T.O., Kim, Y.C. Hepatoprotective ligna compound from *Schizandrae fructus* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 20: 1282-1284, 2006.
3. Yun, H.J.(1), Hwang, S.G., Yun, H.J.(2), Kim, C.H., Seo, G.S., Park, W.H., Park, S.D. Anticancer effect of *Rheum rhizoma* on human liver cancer HepG2 cells. *Kor. J. Herbology*. 21: 27-36, 2006.
4. Cha, B.Y., Park, C.J., Lee, D.G., Lee, Y.C., Kim, D.W., Kim, J.D., Seo, W.G., Kim, C.H. Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase- 9. *Journal of Ethnopharmacology*. 85: 163-167, 2003.
5. Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., Kim, C.H. Novel and therapeutic effect of caffeic and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J*. 18:

- 1670-1681, 2004.
6. Huang, D.S., Shen, K.Z., Wei, J.F., Liang, T.B., Zheng, S.S., Xie, H.Y. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol*. 11: 204-207, 2005.
7. Lee, S.M.Y., Li, M.L.Y., Tse, Y.C., Leung, S.C.L., Lee, M.M.S., Tsui, S.K.W., Fung, K.P., Lee, C.Y., Waye, M.M.Y. *Paeoniae radix* a Chinese herbal extract inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Sciences*. 71: 2267-2277, 2002.
8. Brien, T.O., Babcock, G., Cornelius, J., Dingeldein, M., Talaska, G., Warshawsky, D., Mitchell, M. A comparison of apoptosis and necrosis induced by hepatotoxins in HepG2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 164: 280-290, 2000.
9. Moss, D.K., Betin, V.M., Malesinsk, S.D., Lane, J.D. A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation. *J. Cell Sci*. 119: 2362-2374, 2006.
10. Hug, H., Strand, S., Grambihler, A., Galle, J., Hack, V., Stremmel, W., Krammer, P.H., Galle, P.R. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J. Biol. Chem*. 272: 28191-28193, 1997.
11. Fumarola, C., Guidotti, G.G. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*. 9: 77-82, 2004.
12. Ma, Z., Otsuyama, K.I., Liu, S., Abroun, S., Ishikawa, H., Tsuyama, N., Obata, M., Li, F.J., Zheng, Y.M., Miyamoto, K., Kawano, M.M. Baicalein a component of *Scutellaria radix* from *Huang-Lian-Jie-Du-Tang* (HLJDT) leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells. *Blood*. 105: 3312-3318, 2005.
13. Semenkov, L.N., Dudich, E.I., Dudich, I.V. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alphafetoprotein. *Tumour Biol*. 18: 261-273, 1997.
14. Lim, S.C., Moon, J.Y. Antioxidant effects of the root of *Vitis labrusca* water and aqua-acupuncture solution. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 20: 76-82, 2006.
15. Lim, S.C., Kim, H., Yi, H.S., Park, W.H., Moon, J.Y. Effects of herbal-acupuncture solution from *Vitis labrusca* root on LPO, RNS and cytochrome P450. *Kor. J. Meridian & Acupoint*. 24: 161-170, 2007.
16. 許俊. *東醫寶鑑*. 서울, 대한민국, 법인문화사, pp 3448-3449, 2005.
17. Huang, K.S., Lin, M., Cheng, G.F. Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochemistry*. 58: 357-362, 2001.
18. Huang, Y.L., Tsai, W.J., Shen, C.C., Chen, C.C. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *J. Nat. Prod*.

- 68: 271-220, 2005.
19. Halliwell, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* 55: 44-52, 1997.
 20. Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 29-38, 2005.
 21. 金亨泰. 도해 도의수세보원. 서울, 대한민국, 정담, pp 192-193, 1999.
 22. Hah, N., Lee, S.T. An absolute role of the PKC-dependent NF- κ B activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *BBRC.* 305: 428-433, 2003.
 23. Green, D.R. Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. *Cell.* 102: 1-4, 2000.
 24. Wroble, B.N., Sible, J.C. Chk2/Cds1 protein kinase blocks apoptosis during early development of *Xenopus laevis*. *Devel. Dyn.* 233: 1359-1365, 2005.
 25. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Nunez, G. CIDE a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* 17: 2526-2533, 1998.
 26. Ongkeko, W.M., An, Y., Shu, T.s., Aguilera, J., Dang, C.L., Rodriguez, W.R. Gleevec suppresses p63 expression in head and neck squamous cell carcinoma despite p63 activation by DNA-damage agents. *Laryngoscope.* 116: 1390-1396, 2006.
 27. Hwang, J.T., Ha, J.H., Park, I.J., Lee, S.K., Baik, H.W., Kim, Y.M., Park, O.J. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters.* 247: 115-121, 2007.
 28. Rose, P., Armstrong, J.S., Chua, Y.L, Ong, C.N., Whiteman, M. β -Phenylethyl isothiocyanate mediated apoptosis; contribution of Bax and the mitochondrial death pathway. *IJBCB.* 37: 100-119, 2005.
 29. Esposti, M.D., Dive, C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *BBRC.* 304: 455-461, 2003.
 30. Iaccarino, I., Hancock, d., Evan, G., Downward, J. c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in Bid-dependent manner. *Cell. Death Differ.* 10: 599-608, 2003.
 31. Asanuma, K., Tsuji, N., Endoh, E., Yahihashi, A., Watanabe, N. Survivin enhances Fas ligand expression via up-regulation of specificity protein 1-mediated gene transcription in colon cancer cells. *J. Immunology.* 172: 3922-3929, 2004.
 32. Yan, J., Yun, H., Yang, Y., Jing, B., Feng, C., Song-bin, F. Upregulation of BNIP3 promotes apoptosis of lung cancer cells that were induced by p53. *BBRC.* 346: 501-507, 2006.
 33. Conti, A., Ageunouz, M., La Toree, D., Cardali, S., Angeileri, F.F., Buemi, C., Tomasello, C, Iacopino, D.G., D'Avella, D., Vita, G., Tomasello, F. Expression of the tumor necrosis factor receptor-associated factors 1 and 2 and regulation of the nuclear factor-kappaB antiapoptotic activity in human gliomas. *J. Neurosurg.* 103: 873-881, 2005.
 34. Jin, F., Liu, X., Zhou, Z., Yue, P., Lotan, R., Khuri, F.R., Chung, L.W.K., Sun, S.Y. Activation of nuclear factor- κ B contributes to induction of death receptors and apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in DU145 human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 65: 6354-6363, 2005.
 35. Zhang, H., Xu, Q., Krahewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Kitada, S., Pawlowski, K., Godzik, A., Reed, J.C. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family protein. *PNAS.* 97: 2597-2602, 2000.
 36. Lee, B., Galli, S., Tsokos, M. Sensitive ewing sarcoma and neuroblastoma cell lines have increased levels of BAD expression and decreased levels of BAR expression compared to resistant cell lines. *Cancer Letter.* 247: 110-114, 2007.
 37. Pan, Y.Y., Xu, S.P., Jia, X.Y., Zhang, Y., Rui, L.X., Wei, W. Combination of cyclooxygenase-2 inhibitor and doxorubicin increases the growth inhibition and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Oncol.* 29: 23-29, 2007.
 38. Kren, A.K., Schubert, D., Sahi, D., Schonewei, M.M., Moll, I., Haugg, A.M., Dines, H.P., Breuhahn, K., Schirmacher, P. Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitor in human liver tumor cells. *Hepatology.* 36: 885-894, 2002.