

동충하초 열수 추출물에 의한 인체 간암세포 성장억제 및 apoptosis 유발에 관한 연구

김경미 · 박철 · 최영현¹ · 이원호*

부산대학교 자연과학대학 생물학과, ¹동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과

Received March 22, 2008 / Accepted April 14, 2008

Induction of Apoptosis by Water Extract of *Cordyceps militaris* (WECM) in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. Kyung Mi Kim, Cheol Park, Yung Hyun Choi¹ and Won Ho Lee*. Department of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ¹Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea - *Cordyceps militaris*, the Chinese medicinal fungal genus *Cordyceps*, is reported to possess many pharmacological activities including immunological stimulating, anti-cancer, anti-virus and anti-infection activities. However, the molecular mechanisms of *C. militaris* on biochemical actions in cancer have not been clearly elucidated yet. In the present study, we investigated the anti-proliferative activity of the water extract of *C. militaris* (WECM) in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. It was found that WECM could inhibit the cell growth in a dose-dependent manner, which was associated with morphological changes and apoptotic cell death such as formation of apoptotic bodies and increased populations of apoptotic sub-G1 phase. Apoptotic cell death of HepG2 cells by WECM was connected with a up-regulation of pro-apoptotic Bax expression, tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/CIP1). In addition, WECM treatment induced the proteolytic activation of caspase-3 and a concomitant degradation and/or inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), β -catenin and phospholipase (PLC)- γ 1 protein. Furthermore, caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, significantly inhibited WECM-induced apoptosis demonstrating the important role of caspase-3 in the observed cytotoxic effect. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of *C. militaris*.

Key words : *Cordyceps militaris*, HepG2, apoptosis, Bax, p21, caspase-3

서 론

자낭균아문, 맥각균강, 맥각균목, 맥각균과에 속하는 동충하초는 일반적으로 곤충의 몸을 숙주로 사용하여 내생균핵을 만든 다음 밖으로 자실체를 형성하는 것으로 알려져 있고, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등지에 많이 분포하며 세계적으로 약 300여 종이 분포한다. 이 중 한국에는 약 78 종이 분포하는 것으로 알려져 있으며 대표적인 종으로는 *C. militaris* (번데기동충하초), *C. sobolifera* (큰매미동충하초), *C. martialis* (유충흑색다발동충하초), *C. kyushuensis* (큰유충방망이동충하초), *C. scarabaicola* (풍뎅이동충하초), *C. gracilioides* (유충긴목구형동충하초), *C. nutans* (노린재동충하초), *C. sphecocephala* (벌동충하초) 및 *Paecilomyces japonica* (눈꽃동충하초) 등이 있다. 동양의 전통의학에 사용되고 있는 *Cordyceps* 속에 속하는 동충하초 중 가장 대표적인 종인 *C. militaris*는 아시아에서 건강기능식품으로 널리 사용되는 *C. sinensis*보다 더 높은 약리학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 예전부터 암환자들에게 많이 사용되어져 왔다[21].

최근에 발표된 여러 연구 결과에 따르면 *C. militaris* 내에 포함되어 있는 cordycepin 및 많은 종류의 polysaccharide 등과 같은 여러 구성요소 및 추출물들이 *C. sinensis* 및 *C. kyushuensis* 보다 더 강력한 항염증 활성, humoral-immunity 억제 활성, 인슐린 조절 능력, 항산화 활성, hypotensive 및 vasorelaxant 활성, 항스트레스 등의 작용이 있는 것으로 보고되어 지고 있다[4,5,23,34,36-38]. 또한 *C. militaris*가 종양 성장의 억제 및 apoptosis의 유발에 관여하는 것으로도 알려져 있지만 그 기작에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

본 연구에서는 *C. militaris*의 항암 효과에 관한 생화학적 기전의 해석을 위하여 인체 간암세포주인 HepG2 세포를 대상으로 *C. militaris* 열수 추출물에 의한 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였고, 이와 연관된 apoptosis 과정에 관여하는 몇 가지 중요한 유전자들의 발현 변화를 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 동충하초(*C. militaris*)는 대전대학교 부

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2257, Fax : +82-51-581-2961

E-mail : leo1969@hanmail.net

속 한방병원에서 제공 받았으며, 수용액 추출물(water extract of *C. militaris*, WECM)을 얻기 위하여 약재 100 g당 증류수 100 ml을 가하여 환류 냉각장치가 장착된 가열기에서 180-200°C의 온도로 2시간 동안 끓이고, 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시켜 찌꺼기를 제거한 후, 그 상층액을 Whatman 필터(No. 2)로 걸러내고 감압 농축과 가열을 통해 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 이를 암세포에 처리하기 위해서 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 µm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1 회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다. mRNA 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타내었고, 단백질 분석을 위하여 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 CalBiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며 immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. 또한 caspase의 *in vitro* 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, caspase-3의 활성을 억제하기 위하여 사용된 caspase-3 specific inhibitor인 z-DEVD-fmk는 CalBiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
p53	Sense	5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense	5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-ATG CAC CTA CCC AGC-3'
Bcl-X _L	Sense	5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'
	Antisense	5'-TCA GGA ACC AGC GGT TGA AG-3'
XIAP	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
cIAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
cIAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'
survivin	Sense	5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'
	Antisense	5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3'

암세포의 배양, MTT assay 및 세포의 형태 변화 관찰

실험에 사용한 HepG2 세포는 한국생명공학연구소 (KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분주 받아 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. WECM 처리에 따른 증식 억제의 정도를 관찰하기 위하여 세포배양용 6 well plate에 HepG2 세포를 1×10⁵ 개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 WECM을 적정 농도로 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 2 ml씩 분주하고 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Amresco, Solon, OH, USA)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다. WECM 처리에 따른 세포의 형태 변화를 관찰하기 위하여 세포배양용 페트리 접시에 HepG2 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 WECM을 적정 농도로 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 WECM 처리농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다.

DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

Apoptosis 유발 시 특이적으로 관찰되는 핵의 형태 변화인 apoptotic body의 관찰을 위하여 준비된 세포에 37% formaldehyde 용액과 phosphate buffered saline (PBS)을 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 첨가하여 상온에서 10분 동안 고정하였다. 이렇게 고정된 세포에 다시 PBS로 수세 후, 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 처리하고, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Luis, MO, USA) 용액을 이용하여 염색하였다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

Flow cytometry 분석

준비된 세포에 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고

세포들만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 세척한 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포에 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer (Table 1), DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1× TAE buffer로 만든 1.0% agarose gel로 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물을 100 V에서 전기영동을 하였다. DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Gibco BRL)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

WECM 처리에 따른 단백질 발현 변화의 정도를 관찰하기 위하여 정상 및 WECM이 처리된 배지에서 자란 세포들을 모아서 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 반응시켜 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 세척하였다. 준비된

membrane에 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

In vitro caspase-3, -8 및 -9의 activity 측정

Caspases의 활성 정도가 WECM 처리에 의하여 어떠한 변화를 유발하는지 알아보기 위하여 정상 및 WECM이 처리된 배지에서 48시간 배양된 세포를 모은 뒤 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하고 정량하였다. 이렇게 준비된 단백질 150 µg에 fluorogenic peptide 기질 100 µM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µl을 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-8의 경우에는 Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-pNA이었으며, caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 빛을 차단한 다음 3시간 동안 incubation 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결 과

WECM에 의한 HepG2 세포의 증식 억제

WECM이 인체 간암 세포주인 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 WECM을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 MTT assay를 이용하여 조사하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 0.2 mg/ml의 WECM을 처리하였을 경우에는 약 20% 정도의 증식 억제가 나타났지만 처리 농도의 증가에 따라 증식 억제 정도가 증가하여 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 65% 정도의 증식 억제 효과가 나타났다. WECM 처리에 따른 증식 억제 현상이 HepG2 세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 도립 현미경을 이용하여 정상 및 WECM이 처리된 조건에서 배양된 HepG2 세포의 모양을 관찰하였다. Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 WECM의 농도가 증가할수록 암세포의 밀도가 감소되었고, 전체적으로 세포질이 응축되었다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 분지를 형성하는 듯한 dendrite-like한 구조로 바뀌었으며, WECM 처리 농도의 증가에 따라 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가하는 것과 같은 심한 형태적 변화가 관찰되었다.

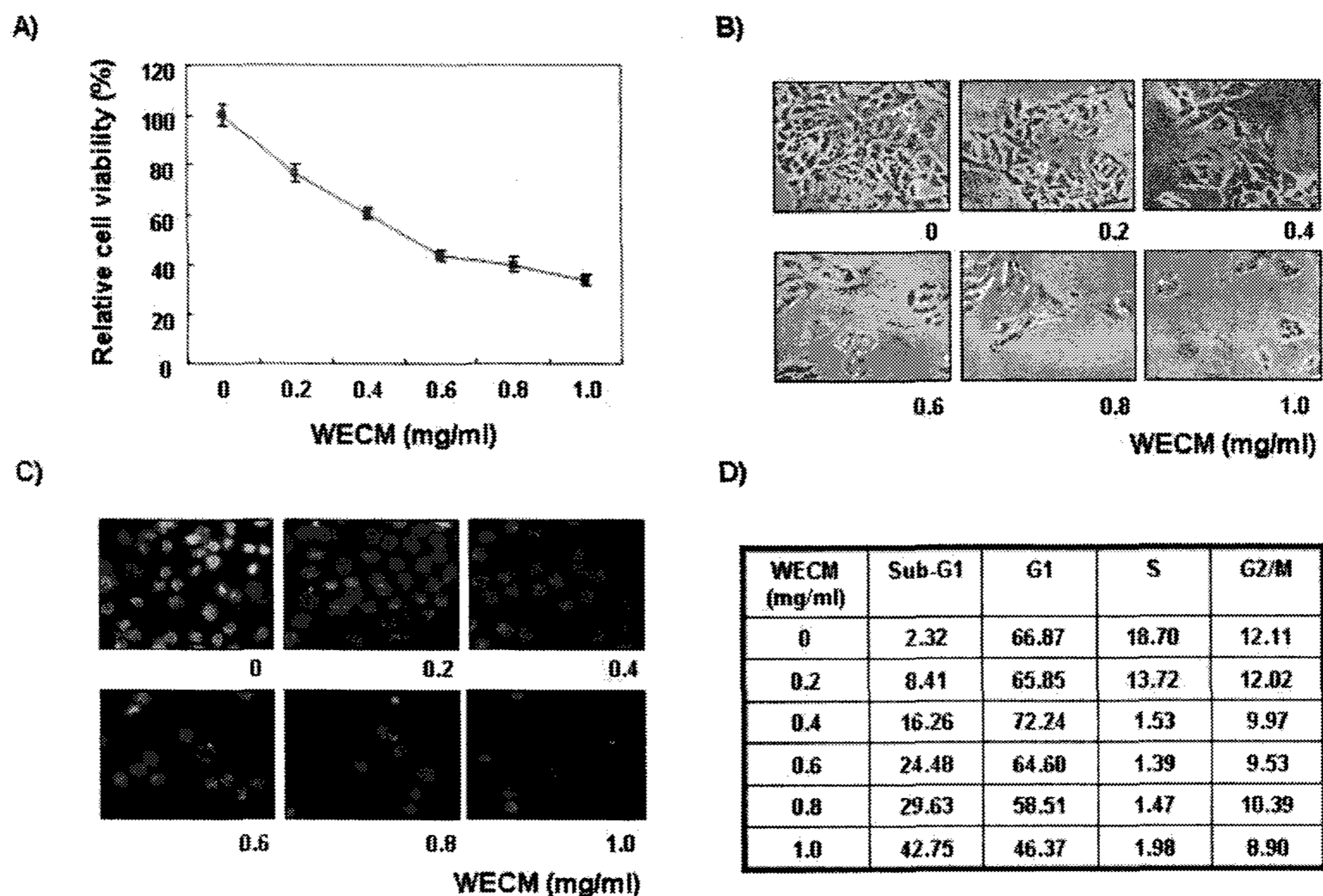


Fig. 1. Growth inhibition of apoptosis induction of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells after treatment with WECM. (A) HepG2 cells were seeded at 1×10^5 /ml in a 6-well plate and incubated for 24 hr. The cells were treated with variable concentrations of WECM for 48 hr. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. The data shown are means \pm SD of three independent experiments. (B) After 48 hr incubation with various concentrations of WECM, cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, $\times 200$. (C) Cells grown under the same conditions as (B) were stained with DAPI for 10 min and photographed with a fluorescence microscope using a blue filter. Magnification, $\times 400$. (D) The cells were fixed and stained with CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit, and analyzed by a flow cytometer. The data shown are means of two independent experiments.

WECM에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유도

WECM 처리에 의한 HepG2 세포의 증식 억제 현상 및 형태적 변형이 apoptosis의 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 정상 및 WECM이 처리된 배지에서 배양된 암세포를 고정시킨 후 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 1C에 나타난 바와 같이 WECM이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 WECM이 처리된 암세포의 경우는 전체적으로 WECM 처리 농도의 증가에 따른 밀도의 감소가 관찰되었고, 또한 apoptosis 유발 시 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 염색질 응축에 의해 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 처리 농도 의존적으로 증가되었다. 이러한 WECM에 의한 apoptosis 유발의 정도를 정량적으로 비교하기 위하여 DNA flow cytometry 분석을 이용하여 세포주기 중 apoptosis가 일어난 세포군에 해당하는 sub-G1기의 빈도를 조사하였다. Fig. 1D에 나타난 바와 같이 WECM 처리 농도의 증가에 따라 세포주기 각 기에 해당되는 빈도의 차이는 큰 변화가 없었지만, apoptosis 유발군으로 평가할 수 있는 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도는 매우

증가함을 알 수 있었다. 특히 WECM를 처리하지 않았을 경우에 sub-G1기의 세포의 빈도는 약 2.3% 정도였지만 WECM 처리 농도가 증가할수록 sub-G1기의 세포의 빈도가 증가하여 0.8 mg/ml의 농도에서는 약 29.6%가 관찰되었고 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 42.7%에 해당하는 세포가 sub-G1기로 관찰되었다. 이상의 결과에서 WECM에 의한 HepG2 세포의 증식 억제 및 형태 변화는 apoptosis유도와 연관이 있음을 알 수 있었다.

p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 WECM의 영향

다음은 WECM의 처리에 의해 유발되는 HepG2 세포에서의 apoptosis가 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절억제 인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세포주기 조절에 중요한 역할을 하는 p21의 발현에 미치는 WECM의 영향을 조사하였다. Fig. 2의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 및 p21의 전사 및 번역 수준 모두에서 WECM의 처리에 따른 발현의 증가가 관찰되어, WECM의 처리에 따른 p21의 발현 증가는 p53 증가와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

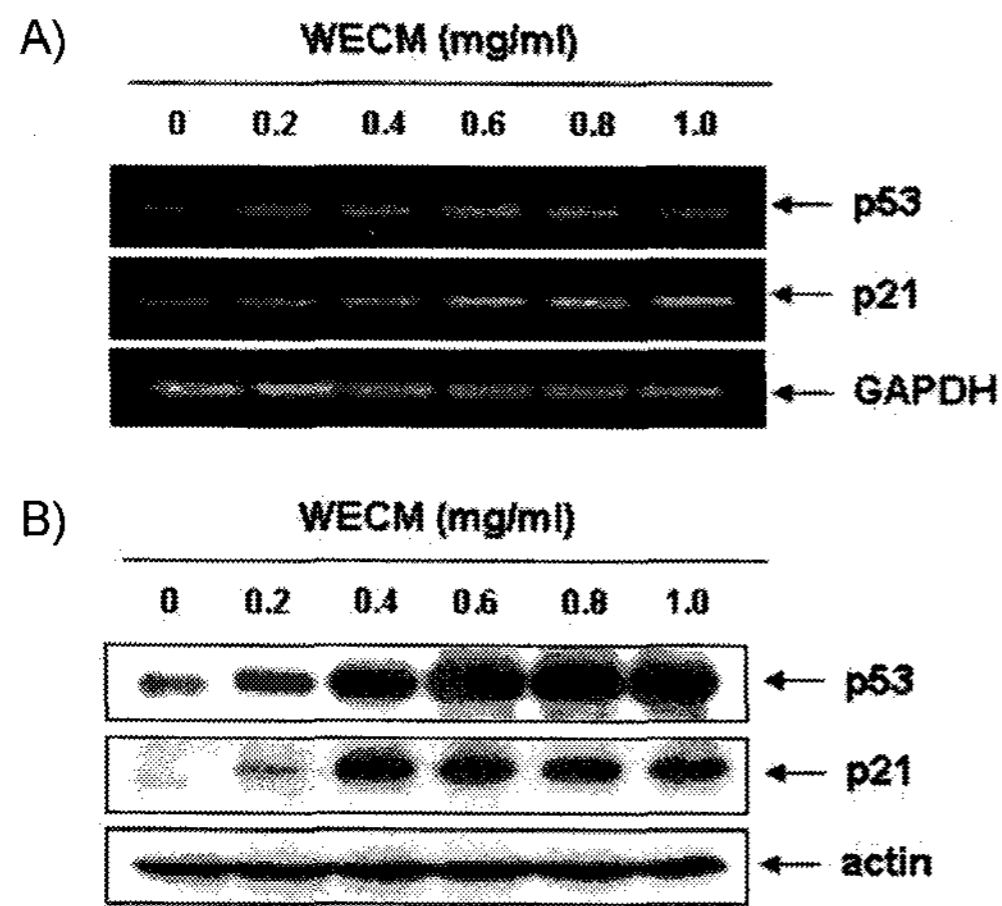


Fig. 2. Induction of p53 and p21 by WECM treatment in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. (A) After 48 hr incubation with WECM, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with p53 and p21 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

Bcl-2 및 IAP family의 발현에 미치는 WECM의 영향

WECM 처리에 의한 apoptosis 유발에 관한 기전 해석을 시도하기 위하여 apoptosis 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려진 Bcl-2 및 IAP family의 발현에 미치는 WECM의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 결과에서 나타난 바와 같이 조사된 다양한 Bcl-2 family에 속하는 인자들 중, pro-apoptotic 인자에 속하는 Bax 및 Bad의 발현양은 WECM 처리군에서 다소 증가된 것으로 나타났다. 그러나 anti-apoptotic 인자에 속하는 Bcl-2의 경우 mRNA 발현은 다소 감소되었지만 단백질 수준에서는 큰 변화가 없었으며, Bcl-xL의 발현에서도 변화를 관찰할 수 없었고, Bid의 경우 활성화를 의미하는 절단된 형태의 밴드를 관찰할 수 없었다. 또한 IAP family에 속하는 인자들도 WECM 처리에 큰 변화를 보여주지 않았다. 이와 같이 apoptosis 억제 인자들의 발현에 비하여 WECM 처리에 의하여 apoptosis이 유발에 관여하는 Bax의 상대적인 발현 증가는 최소한 apoptosis 유발에 어느 정도 관여하였을 것으로 추측되며, IAP family는 크게 관여하지 않을 것으로 생각되어 진다.

Caspases의 발현 및 활성화에 미치는 WECM의 영향

다음은 apoptosis 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하는

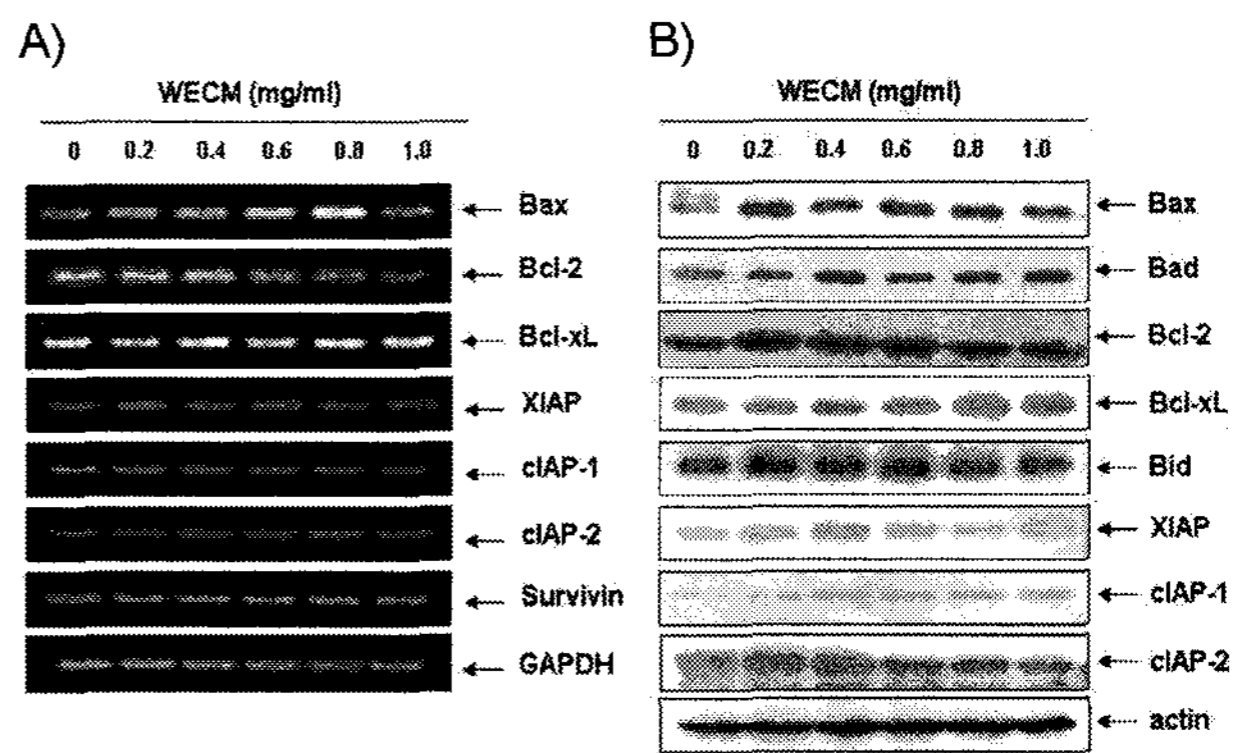


Fig. 3. Effects of WECM treatment on the levels of Bcl-2 and IAP family members in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. (A) After 48 hr incubation with WECM, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

caspases 중에서 가장 대표적인 caspase-3, -8 및 -9의 발현 및 활성화에 미치는 WECM의 영향을 조사하였다. Fig. 4A에서 나타난 바와 같이 initiator caspase인 caspase-8 및 -9의 경우는 WECM 처리에 따른 큰 변화가 관찰되지 않았지만 effector caspase로 알려진 caspase-3의 경우는 WECM의 처리에 따라 활성형 단백질의 발현 증가가 관찰되었다. 이를 정량적으로 재확인하기 위하여 caspases의 활성화 정도를 직접 분석한 결과는 Fig. 4B에 나타난 바와 같다. Fig. 4A의 결과와 마찬가지로 WECM의 처리에 의해 caspase-8 및 -9의 활성화는 크게 증가하지 않았지만, caspase-3의 활성화는 정상배지에서 자란 대조군에 비하여 약 4배 정도 증가한 것으로 나타나, WECM 처리에 따른 HepG2 세포의 apoptosis 유발에 있어서 caspase-3이 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

PARP, β-catenin 및 PLC-γ1의 발현에 미치는 WECM의 영향

상기의 결과에서 WECM에 의한 apoptosis에 있어서 caspase-3이 중요한 역할을 할 것으로 나타났으므로 caspase-3에 의해 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 WECM 영향을 조사하였다. Fig. 4A에서 알 수 있듯이 WECM의 처리에 의하여 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP와 세포내 골격 유지와 부착성 세포의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 β-catenin 및 세포의

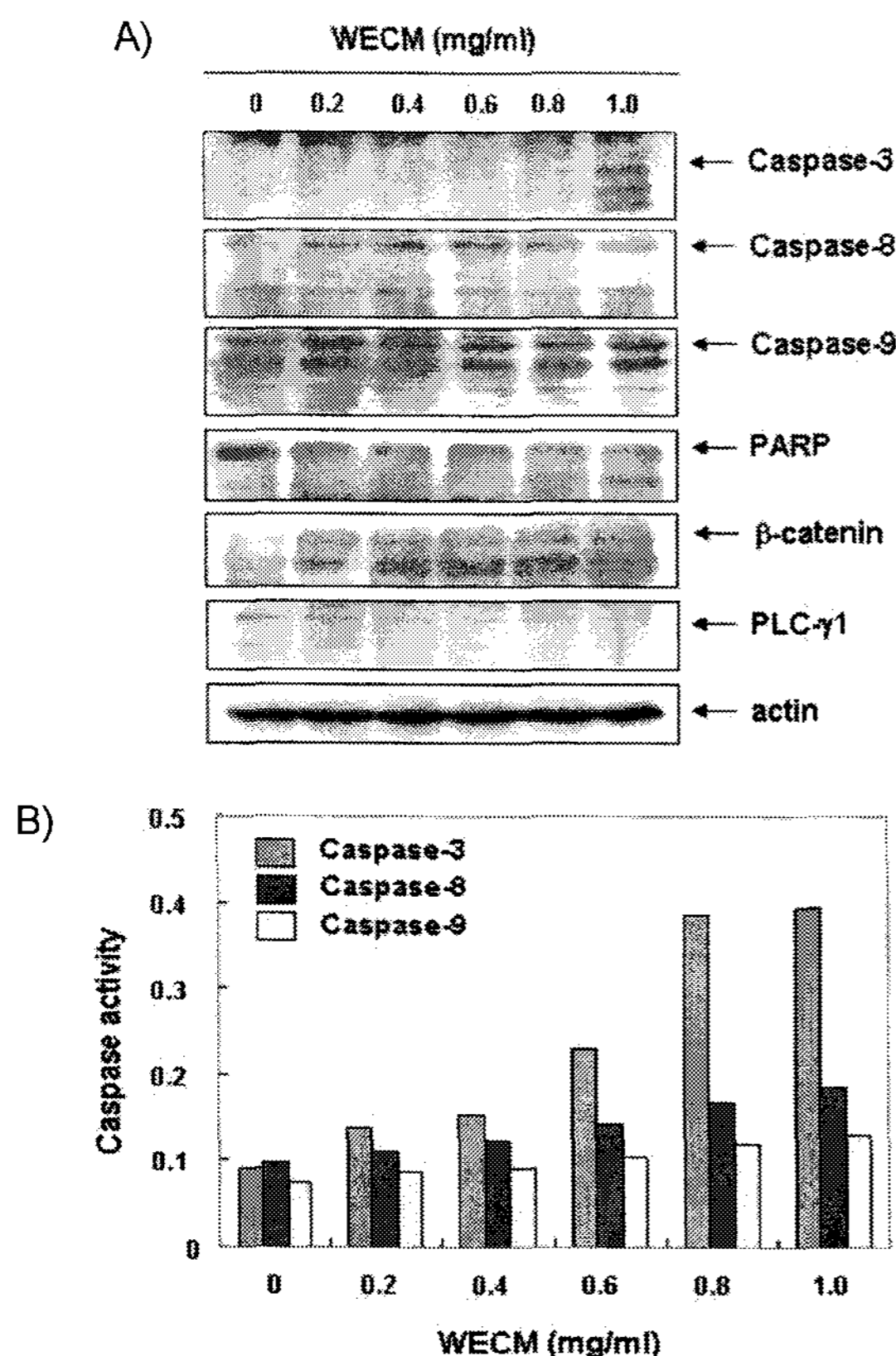


Fig. 4. Effects of WECM treatment on the levels and activities of caspases in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with indicated concentrations of WECM for 48 hr, collected and then lysed. The cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were collected and then lysed. Aliquots (150 μg proteins) were incubated with DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3, -8 and -9 activity, respectively, at 37°C for 3 hr. The released fluorescent products were measured. The data shown are means ±SD of three independent experiments.

성장과 증식에 관여하는 PLC-γ1 단백질의 발현은 감소되었거나 또는 단편화가 유발되었다. 이는 WECM 처리에 따른 caspase-3의 활성 증가가 apoptosis 유발에 직접적인 관련이 있음을 의미하는 것이다.

Caspase-3 선택적 저해제가 WECM에 의한 apoptosis에 미치는 영향

이상의 결과에서 WECM에 의한 HepG2 세포의 apoptosis에 caspase-3이 매우 중요한 역할을 할 것으로 나타났기 때문에 caspase-3의 활성을 억제할 경우 WECM에 의해 유발되

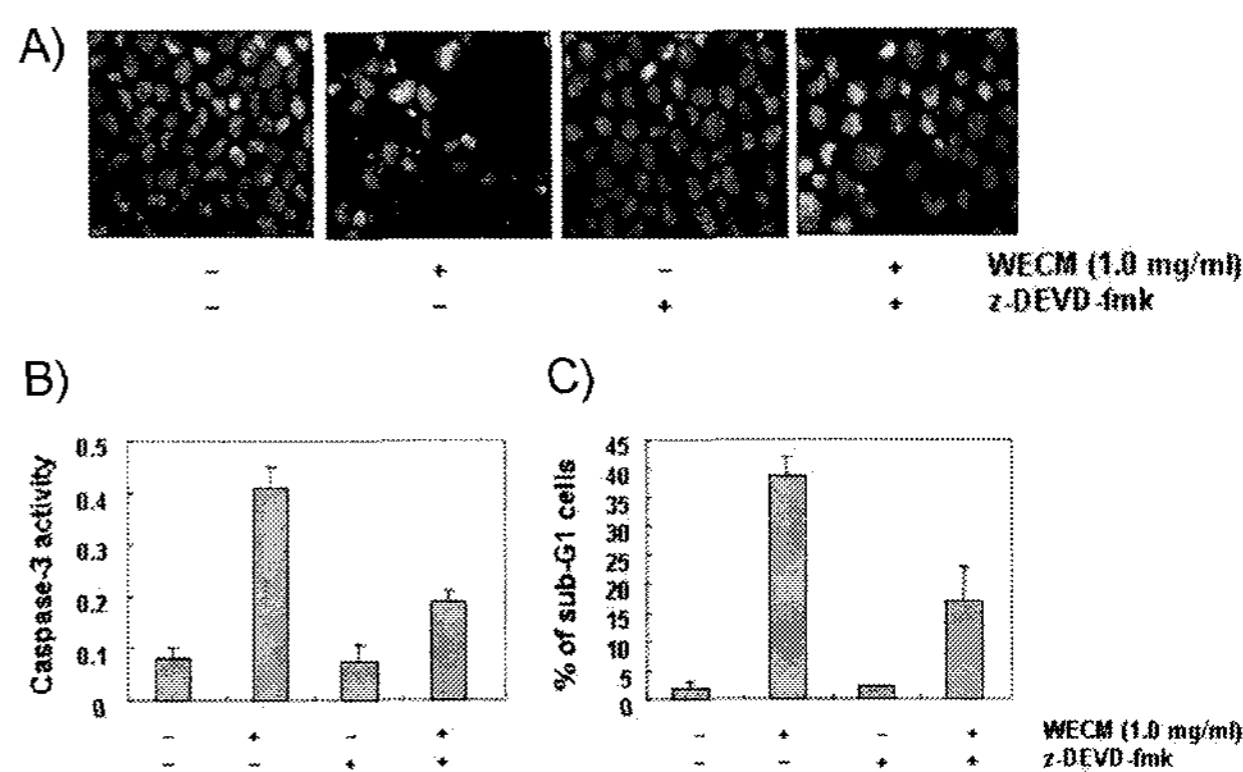


Fig. 5. Caspase-3 inhibitor, z-DEVD-fmk, alleviated WECM-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. (A) HepG2 cells were pretreated for 1 hr with or without z-DEVD-fmk (50 μM), and then with WECM (1.0 mg/ml) for additional 48 hr. The cells were stained with DAPI for 10 min and photographed with a fluorescence microscope using a blue filter. Magnification, ×400. Caspase-3 activity (B) and DNA contents (C) were determined using manufacturer's protocol and a flow cytometer after 48 hr in the presence of the caspase-3 inhibitor z-DEVD-fmk (50 μM) for 1 hr before WECM (1.0 mg/ml) treatment. Data are expressed as mean±SD of three independent experiments.

는 apoptosis에 어떠한 변화가 나타나는지의 여부를 조사하였다. 먼저 DAPI 염색을 이용하여 핵의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 5A에서 나타난 바와 같이, 정상배지에서 자란 HepG2 세포의 경우는 핵의 형태가 정상으로 염색된 반면에 WECM이 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우는 전형적인 apoptotic body가 관찰되었다. 그러나 caspase-3 선택적 저해제인 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하였을 경우 정상배지에서 자란 세포와 마찬가지로 apoptotic body가 관찰되지 않았다. 또한 caspase-3의 활성을 직접 관찰한 결과는 Fig. 5B에 나타난 바와 같이, WECM을 단독으로 처리했을 경우에는 약 4배 정도의 활성 증가가 관찰되었지만 z-DEVD-fmk를 1시간 선처리하였을 경우에는 약 50% 이상의 활성 억제가 관찰되었으며, WECM을 단독으로 처리했을 경우에는 약 40% 정도의 sub-G1 빈도가 관찰되었지만 z-DEVD-fmk 선처리에 의하여 sub-G1에 속하는 세포의 빈도는 현저히 감소하여 약 17% 정도로 나타났다(Fig. 5C). 이는 HepG2 세포에서 WECM에 의하여 유발되는 apoptosis에 있어서 caspase-3이 매우 중요한 역할을 하고 있음을 확인시켜주는 결과로 생각된다.

고 찰

본 연구에서는 인체 간암세포주인 HepG2 세포의 성장에 미치는 동충하초 열수 추출물(WECM)의 영향과 WECM 처

리에 의한 암세포 성장 억제와 연관된 apoptosis 유발 여부 및 관련 유전자들의 발현 변화를 조사하였다. 이를 위하여 먼저 HepG2 세포의 증식에 WECM이 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같다. WECM을 처리하지 않은 군과 비교하여 WECM의 처리 농도가 증가할수록 암세포의 증식이 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 증식 억제는 Fig. 1B에서 볼 수 있듯이 세포질의 응축 및 부착력 상실에 따른 부유되는 세포의 증가 현상과 더불어 분지를 형성하는 듯한 dendrite-like한 구조의 형성 등과 같은 심한 형태적 변형을 동반하였다. 이러한 증식 억제 및 형태 변형이 apoptosis 유발과 관계가 있는지를 확인하기 위하여 DAPI 염색을 이용한 apoptotic body의 형성 유무를 관찰하였다. Fig. 1C에 나타난 바와 같이 WECM을 처리하지 않았을 경우에는 핵의 모양이 정상적으로 염색된 반면에 WECM의 처리 농도가 증가할수록 세포 밀도의 감소와 더불어 apoptotic body의 형성도 관찰되었다. 또한 WECM에 의해 유발된 apoptosis 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 flow cytometry를 이용하여 apoptosis 유발 세포 군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도를 측정 한 결과, Fig. 1D에 나타난 바와 같이 WECM을 처리하지 않은 세포의 경우는 sub-G1기에 해당하는 세포가 약 2.3%에 불과했지만 WECM 처리 농도의 증가에 따라 증가하여 1.0 mg/ml의 농도에서는 약 42.7%로 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과는 WECM 처리에 의한 인체 간암 HepG2 세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

한편 암의 발생 및 예방에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 p53은 DNA 손상 또는 세포 내·외 신호에 따라 세포 주기 진행의 억제 및 apoptosis를 유발하는 종양억제 유전자로 알려져 있다[32]. 이러한 p53은 인체 암세포의 약 절반 정도에서 돌연변이 되어 있어 제 기능을 하지 못하지만 나머지 절반 정도의 암세포에서는 정상형으로 존재하고 있다. 본 연구에 사용된 HepG2 세포는 정상 p53 유전자를 가지는 세포이며, WECM 처리에 따른 p53의 발현 여부를 조사한 결과 전사 및 번역 수준에서 WECM 처리 농도 의존적으로 매우 강하게 발현이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). p21 유전자는 일반적으로 p53에 의해서 직접적으로 활성화되는 transcriptional target으로 알려져 있지만 p53 비의존적으로 활성화되기도 하며[7,12], 활성화된 p21은 cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (CDKI)로서 작용하여 세포주기의 진행을 억제하며 apoptosis 활성을 직·간접적으로 조절할 수도 있다[3,15,30,35]. WECM 처리에 의한 p53의 발현 증가가 p21 발현과의 연관성이 있는지를 조사한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 p21의 발현도 WECM 처리 농도가 증가함에 따라 매우 증가되었다. 그러나 세포주기 분석의 결과 WECM 처리에 따른 HepG2 세포의 증식 억제는 세포주기 특이적

arrest 현상을 유발하지는 않았으므로(Fig. 1D) WECM에 의한 p53 및 p21의 발현 증가는 HepG2 세포의 증식 억제와 연관성을 지닐 수는 있으나, 세포주기 교란에는 큰 영향이 없음을 알 수 있었다.

Apoptosis 조절에서 mitochondria 외막에 존재하는 Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 네 가지의 Bcl homology (BH) domains (BH1-BH4) 중 최소한 한 개의 domain을 포함하고 있으며 mitochondria 기능 보존과 연관된 apoptosis에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10]. Bcl-2 family에 속하는 단백질들의 종류로는 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic member인 Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w 및 Mcl-1과 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic member인 Bax, Bad, Bak, Bid 및 Bcl-X_s 등이 있으며, anti-apoptotic 및 pro-apoptotic member들은 dimer의 형태로 결합하여 균형을 이루고 있는 것으로 알려져 있다[19,26]. 하지만 이러한 균형이 깨어지게 되면 mitochondria 내부로부터 세포질로 cytochrome c 등과 같은 apoptosis를 유발하는 물질들이 방출되어 cysteine-related proteases인 caspases, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하여 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[8,28]. 본 실험에서 HepG2 세포에 WECM을 처리하였을 경우 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현 변화를 조사한 결과, 대표적인 pro-apoptotic 인자인 Bax의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 증가되어, WECM에 의하여 유도되는 apoptosis에 Bcl-2 family에 속하는 유전자들이 어느 정도 관여할 것으로 생각되어진다. 그러나 apoptosis의 조절에 caspase 활성을 억제하는 것으로 알려진 inhibitor of apoptosis protein (IAP) family에 속하는 인자들은 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 WECM 처리에 따른 apoptosis 유도에서 이들 유전자의 전사 및 번역 수준에서의 발현뿐만 아니라 anti-apoptotic 및 pro-apoptotic member들 간의 binding activity 및 phosphorylation 유무 등과 같은 연구도 추가적으로 실시되어야 할 것이다.

Intracellular cysteine proteases family인 caspases 또한 apoptosis에 의해 유발되는 많은 생화학적 또는 형태적 변화에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 단백질들은 large subunit와 small subunit로 구성되어 있으며 평상시에는 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 pro-enzyme 형태로 존재하지만 apoptosis를 유발하는 세포 내·외의 자극에 의하여 활성화되어 표적 단백질들의 분해를 유발한다[1,6]. 이러한 caspases에는 initiator caspases인 caspase-8, -9, -10, 12 및 effector caspases인 caspase-3, -6, -7 등으로 나누어지는데 외부의 다양한 신호전달에 의해서 initiator caspases가 활성화가 되어 effector caspases를 활성화시켜 apoptosis를 유발하므로[11,13], 많은 선행연구에서 caspases의 활성화가 apoptosis의 유발에 대한 증거가 될 수 있

다고 보고되어지고 있다[29,31]. 따라서 caspases의 활성화에 미치는 WECM의 영향을 조사한 결과, initiator caspase인 caspase-8 및 -9의 활성화 증가에는 WECM이 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났지만 effector caspase인 caspase-3의 경우에는 WECM 처리에 의하여 활성화된 단백질 발현의 증가뿐만 아니라 *in vitro* 활성화 역시 매우 증가되어 WECM 처리에 따른 apoptosis 유발에 caspase-3 활성화 증가가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 진다(Fig. 4). 특히 effector caspase는 세포의 생존 및 증식에 중요한 역할을 하는 많은 단백질들의 분해에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 그 중 하나인 PARP 단백질은 eukaryotic nuclear enzyme family로서 DNA repair, gene transcription, cell cycle progression, chromatin function, genomic stability 및 cell death를 조절하는 것으로 알려져 있다[29]. 또한 PARP 단백질은 effector caspase인 caspase-3 또는 -7의 활성화에서 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질의 Asp214와 Gly215 사이에서 분해가 일어나서 85 및 24 kDa의 단편으로 잘리게 된다[17,20]. 한편 cell-cell adhesion 및 Wnt signaling에 관여하는 E-cadherin-associated protein으로서 세포 내 골격 유지, 다양한 부착성 세포의 전사 조절 및 세포 유착에 관여하는 β -catenin도 caspases의 표적 단백질로서 apoptosis 조절에 관여는 것으로 알려져 있다[16,26,33]. 정상 세포의 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis가 유발되면 proteasome degradation complex에 의해 분해되어 62-72 kDa로 단편화가 일어나는 것으로 알려져 있다[14,25]. 또한 최근 연구에 의하면 epidermal growth factor, transforming growth factor, insulin-like growth factor-1 및 cytokine 등과 같은 세포 성장을 촉진하는 인자들이 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 보고되어지고 있는데 이러한 세포의 성장에 있어서 phospholipase C (PLC) signaling pathway는 매우 중요하다고 보고되어지고 있다[18,27]. PLC는 세포 및 조직에 넓게 분포하고 있는 PLC- γ 1 및 조혈세포에만 존재하는 PLC- γ 2과 같은 두 가지 isoform이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이들 중 PLC- γ 1의 경우 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase 효소에 의하여 분해될 수 있기 때문에 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 되고 있다[2,22]. 본 실험에서는 WECM에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유발에 이 단백질들의 분해 또는 발현 감소가 수반되는지를 조사한 결과, Fig. 4A에서 볼 수 있듯이 WECM 처리에 의하여 PARP, β -catenin 및 PLC- γ 1 단백질 모두의 발현 감소 및 단편화 현상이 WECM 처리 농도의존적으로 관찰되었다. 즉 WECM에 의하여 유발되는 apoptosis에 있어서 caspases의 활성화에 의해 유발된 기질 단백질의 분해가 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 진다. 본 연구의 결과에서도 알 수 있듯이 WECM에 의해 유발되는 apoptosis에 여러 가지 유전자들이 관여할 것으로 생각되지만, 특히 cas-

pase-3이 가장 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어 caspase-3의 선택적 저해제인 z-DEVD-fmk를 이용하여 caspase-3의 활성을 억제하였을 경우에 WECM에 의하여 유발되는 apoptosis가 억제되는지의 여부를 조사하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 WECM을 단독으로 처리하였을 경우에 유발되는 apoptotic body의 형성이 z-DEVD-fmk의 선처리에 의해서 현저하게 감소하였으며, caspase-3 activity 및 sub-G1 빈도 역시 z-DEVD-fmk의 선처리에 의해서 유의적으로 감소하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 HepG2 세포에 WECM을 처리하였을 경우에 유발되는 세포 증식의 억제 및 형태 변화는 apoptosis 유발과 밀접한 연관이 있었으며, 이러한 apoptosis 유발에는 종양억제 유전자인 p53의 증가와 그에 따른 CDKI p21의 증가가 어느 정도 관여할 것으로 생각되어 진다. 또한 caspases 중 effector caspase인 caspase-3의 활성화와 그에 따른 기질 단백질들의 분해가 WECM에 의한 apoptosis 유도에 결정적인 역할을 할 것으로 생각되어 진다.

요 약

본 연구에서는 전통 민간의학에서 많이 사용되는 동충하초(*C. militaris*)의 항암 작용에 관한 근거 자료의 제시를 위하여 동충하초 열수 추출물(WECM)의 항암 기전 해석을 시도하였다. 이를 위하여 HepG2 인체 간암세포를 사용하였으며, WECM의 처리에 의하여 HepG2 세포의 증식은 처리 농도의 증가에 따라 매우 억제되었다. WECM 처리에 의한 HepG2 세포의 증식 억제는 암세포의 심한 형태적 변형을 수반하였고, 이는 apoptosis 유도와 연관성이 있음을 DAPI 염색을 통한 apoptotic body 출현의 증가 및 flow cytometry 분석에 의한 sub-G1 기에 속하는 세포 빈도의 증가로 확인하였다. WECM 처리에 의한 HepG2 세포의 증식 억제는 또한 종양 억제 유전자 p53 및 CDKI p21의 발현 증가와도 연관성이 있음을 알 수 있었다. WECM 처리에 의한 apoptosis 유도에서 pro-apoptotic 인자인 Bax의 발현이 전사 및 번역 수준에서 매우 증가하였으며, caspase-3의 활성이 매우 높게 증가되었다. 특히 caspase-3 특이적 억제제인 z-DEVD-fmk로 caspase-3의 활성을 인위적으로 차단시켰을 경우, WECM에 의한 apoptosis 유도 현상이 유의적으로 감소되어 WECM에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유발에 caspase-3이 중심적인 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 WECM의 생화학적 항암기전 해석을 이해하고 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

References

1. Allen, R. T., M. W. Cluck and D. K. Agrawal. 1998.

- Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 427-445.
2. Bae, S. S., D. K. Perry, Y. S. Oh, J. H. Choi, S. H. Galadari, T. Ghayur, S. H. Ryu, Hannun, Y. A. and P. G. Suh. 2000. Proteolytic cleavage of phospholipase C- γ 1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* **14**, 1083-1092.
 3. Brugarolas, J., K. Moberg, S. D. Boyd, Y. Taya, T. Jacks and J. A. Lees. 1999. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after γ -irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1002-1007.
 4. Chiou, W. F., P. C. Chang, C. J. Chou and C. F. Chen. 2000. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Cordyceps sinensis*. *Life Sci.* **66**, 1369-1376.
 5. Choi, S. B., C. H. Park, M. K. Choi, D. W. Jun and S. Park. 2004. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2257-2264.
 6. Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16.
 7. Ding, Z., R. E. Parchment, P. M. LoRusso, J. Y. Zhou, J. Li, T. S. Lawrence, Y. Sun and G. S. Wu. 2001. The investigational new drug XK469 induces G(2)-M cell cycle arrest by p53-dependent and -independent pathways. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3336-3342.
 8. Donovan, M. and T. G. Cotter. 2004. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 133-147.
 9. Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
 10. Du, J., G. G. Chen, A. C. Vlantis, P. K. Chan, R. K. Tsang and C. A. van Hasselt. 2004. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett.* **205**, 81-88.
 11. Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
 12. el-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, K. G. Wiman, W. E. Mercer, M. B. Kastan, K. W. Kohn, S. J. Elledge, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **54**, 1169-1174.
 13. Fischer, U., R. U. Jänicke and K. Schulze-Osthoff. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* **10**, 76-100.
 14. Fukuda, K. 1999. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 519-529.
 15. Hengst, L., U. Göpfert, H. A. Lashuel and S. I. Reed. 1998. Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21 (Cip1). *Genes Dev.* **12**, 3882-3888.
 16. Johnson, J. P. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 345-357.
 17. Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson and G. G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
 18. Kim, M. J., E. Kim, S. H. Ryu and P. G. Suh. 2000. The mechanism of phospholipase C- γ 1 regulation. *Exp. Mol. Med.* **32**, 101-109.
 19. Kroemer, G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614-620.
 20. Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.
 21. Li, S. P., F. Q. Yang and K. W. Tsim. 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1571-1584.
 22. Myklebust, J. H., H. K. Blomhoff, L. S. Rusten, T. Stokke and E. B. Smeland. 2002. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34 (+) hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **30**, 990-1000.
 23. Ng, T. B. and H. X. Wang. 2005. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 1509-1519.
 24. Olmeda, D., S. Castel, S. Vilaró and A. Cano. 2003. β -catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2844-2860.
 25. Polakis, P. 2001. More than one way to skin a catenin. *Cell* **105**, 563-566.
 26. Reed, J. C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
 27. Rhee, S. G. and Y. S. Bae. 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15045-15048.
 28. Rossé, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**, 496-499.
 29. Schreiber, V., F. Dantzer, J. C. Ame, and G. de Murcia. 2006. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517-528.
 30. Suzuki, A., H. Kawano, M. Hayashida, Y. Hayasaki, Y. Tsutomi and K. Akahane. 2000. Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ.* **7**, 721-728.
 31. Vegran, F., R. Boidot, C. Oudin, J. M. Riedinger and S. Lizard-Nacol. 2005. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull. Cancer* **92**, 219-226.

32. Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
33. Wijnhoven, B. P., W. N. Dinjens and M. E. Pignatelli. 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* **87**, 992-1005.
34. Won, S. Y. and E. H. Park. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 555-561.
35. Yang, H. L., J. X. Pan, L. Sun, and S. C. Yeung. 2003. p21 Waf-1 (Cip-1) enhances apoptosis induced by manumycin and paclitaxel in anaplastic thyroid cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 763-772.
36. Yang, L. Y., W. J. Huang, H. G. Hsieh and C. Y. Lin. 2003. H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J. Lab. Clin. Med.* **141**, 74-83.
37. Yu, R., L. Song, Y. Zhao, W. Bin, L. Wang, H. Zhang, Y. Wu, W. Ye and X. Yao. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* **75**, 465-472.
38. Yu, R., L. Wang, H. Zhang, C. Zhou and Y. Zhao. 2004. Isolation, purification and identification of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* **75**, 662-666.