

새로운 화합물 c-127의 세포고사 유도에 의한 항암효과

원광대학교 의과대학 소아과학교실, 가정의학과교실*, 인수공통감염병 연구센터†

백기환 · 한아름* · 신새론* · 진춘매† · 윤영욱 · 유승택 · 김종덕 · 최두영

= Abstract =

Anti-tumor effect of new compound, 127, through the induction of apoptosis

Ki Hwan Baek, M.D., A Lum Han, M.D.*, Sae Ron Shin, M.D.*, Chun Mae Jin†,
Seung Taek Yu, M.D., Young Wook Yoon, M.D., Jong Duk Kim, M.D. and Du Young Choi, M.D.

Department of Pediatrics, Family Medicine*, Zoonosis Research Center†, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea

Purpose : We screened more than 350 compounds with an endoperoxide ring structure in search of an anti-leukemic drug and found that compound 127 (c-127) could induce significant cytotoxicity in HL-60 cells. In this study, we investigated the molecular mechanisms of compound 127-induced antitumor activity on HL-60 cells.

Methods : HL-60 cells were cultured in Rosewell Park Memorial Institute 1640 and cell viability was measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], a tetrazole assay. Apoptosis was assessed by a DNA fragmentation test. Apoptotic machineries were determined by Western blot analysis.

Results : C-127 could induce a cytotoxic effect at 24 h and apoptosis at 6 h, which was demonstrated with MTT assay and DNA fragmentation test, respectively. The apoptotic effect of this drug was caused by the activation of the intracellular caspase-8,3 activation, the cleavage of pro-apoptotic Bid, and the increase of c-Jun expression accompanied with JNK (Jun N-terminal kinases) phosphorylation. On the contrary, it increased the expression of anti-apoptotic Bcl-2 levels, leading to the induction of the induction of anti-apoptotic effect. Taken together, the present study demonstrated that c-127 was a potent inducer of cytotoxicity on HL-60 cells through apoptotic mechanisms, which included the activation of caspase family, the regulation of Bcl-2 family, and the activation of JNK signaling pathway.

Conclusion : Our results suggest that c-127 has a strong antitumor activity through the regulation of various apoptotic machineries on HL-60 cells. The compound may be utilized as an effective and potentially therapeutic drug in leukemia. (Korean J Pediatr 2009;52:696-700)

Key Words : Compound-127, Endoperoxide ring, Artemisinin, Leukemia apoptosis

서론

Artemisinin은 천연물인 *Artemisia annua* L로부터 1972년 중국에서 말라리아 약제 개발을 위해 추출되었으며 endoperoxide ring 구조를 가지고 있다¹⁾. 이후 이 약제에 대한 많은 유도체가 합성되어 환자에 부작용이 적고, 기존의 약제에 내성이 발현된 말라리아균에서도 높은 효과를 보여 말라리아 치료약제로 널리

사용되어 왔으며, 또한 항암효과, 혈관신생억제(angiogenesis), 항바이러스, 항진균, 면역억제 등의 효능이 있음이 밝혀졌다²⁻⁵⁾.

Artemisinin의 항암효과는 1995년 National Cancer Institute (NCI)에서 55여 종의 암세포주를 이용하여 시험관내 항암제 개발 선별검사(in vitro anticancer drug discovery screening)를 시행한 결과 백혈병과 대장암을 비롯한 많은 암세포에서 항암 효과가 있음이 밝혀졌으며 생쥐 모델을 이용한 생체 내 실험에서도 증명되었다⁶⁻⁸⁾. 이후 이런 항암효과는 다양한 종류의 암에서 주로 세포고사(apoptosis)을 유도하여 발생하며 그 기전으로는 BCL-2와 BAX와 같은 Bcl-2 family, 산화 스트레스(oxidative stress)관련 유전자, 암억제 유전자(tumor suppressor gene) 등의 조절과 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)의 억제 등을 통한 혈관신생억제 등이 보고되었으나 다약제내성(multidrug resistance) 기전과는 직접적인 관련이 없음이 밝혀졌다⁹⁻¹²⁾.

Received : 5 December 2008, Revised : 6 February 2009

Accepted : 8 May 2009

Address for correspondence : Du Young Choi, M.D.

Department of Pediatrics, Wonkwang University College of Medicine, 344-2 Shinyong-Dong, Iksan-si, Jeonbuk 570-711 Korea

Tel : +82,63-859-1514, Fax : +82,63-853-3670

E-mail : cdy8118@wonkwang.ac.kr

This work was supported by research grant of the Wonkwang University in 2008

저자들은 새로운 항백혈병 항암제를 개발하기 위해 일본 오카야마(Okayama)약학대학에서 제공받은 endoperoxide ring을 가진 350개의 화합물을 가지고 HL-60 백혈병 세포주를 이용한 선별검사를 시행하여 c-127이 강력한 항암효과가 있음을 알았다. 본 연구는 c-127의 HL-60세포에 대한 이런 세포독성이 세포고사 유도에 의해 발생하는지를 먼저 알아보고 그 분자유전학적 기전을 규명하고자 시행하였다.

대상 및 방법

1. C-127약제와 HL-60 세포주 배양

기본적인 구조로 endoperoxide구조를 가지고 있는 c-127약제(C₂₂H₁₈O₂, 분자량 314.3771)는 일본 오카야마 약학대학에서 합성 공급받았다(Fig. 1). HL-60세포주는 RPMI 1640 (Gibco BRL, MD, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 완전 습윤 된 조건하의 CO₂ 배양기 내에서 실험조건에 따라 c-127을 처리하여 검사하였다.

2. 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 세포 배양관(24-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/mL)를 1 mL씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, MTT 용액(5 mg/mL in PBS)을 배양액 최종부피의 1/10 되게 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100 μL/well을 첨가하여 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3. DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절 현상을 조사하기 위한 genomic DNA추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하였다. c-127이 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer (100 mM NaCl, 40 mM Tris-Cl, pH 7.4, 20 mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 세포를 파쇄한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 없앴고, 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거 하였으며 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 파장에서 spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μg을 1.5% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

4. Western blotting

배양된 세포에 c-127을 일정 시간 처리한 후에 포집하여, 차가운 HBSS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/mL aprotinin)과 4°C에서 30분 동안 반응 시켰다. 그 다음 13,000 rpm에서 20분 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액을 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 200 μg)은 2×sample buffer와 섞어 100°C에서 5분 끓인 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. 측정하고자 하는 항체는 0.01%의 Tween-20이 포함된 3% skim milk에 1:100으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 시킨 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase을 1시간 처리 한 후, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

결 과

1. C-127에 의한 HL-60세포의 세포고사유도

먼저 c-127의 세포 독성을 알아보기 위하여 농도를 달리하여 24시간 처리한 후 세포 생존력을 측정 한 결과 농도 의존적으로 세포 생존력이 감소하였다(Fig. 2A). 이런 세포독성이 세포고사유도에 의해 발생하는지 알아보기 위해 c-127을 농도를 달리하여 6시간 처리 한 후 DNA를 추출하여 전기영동을 시행한 결과 DNA 분절 현상이 10 μm에서 관찰되었다(Fig. 2B).

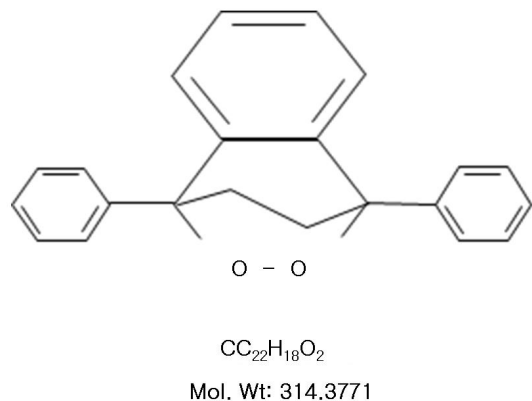


Fig. 1. Structure of c-127.

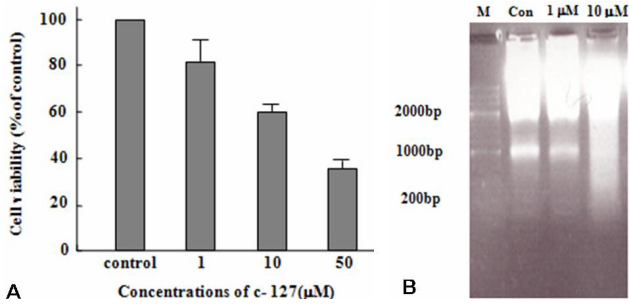


Fig. 2. C-127 induced antitumor cytotoxicity in a dose dependent manner through apoptosis on HL-60 cells. Cells were exposed to different concentration of c-127. Cell viability was measured by MTT assay. Each point represents the mean \pm S.D of three independent experiments. Results are presented as a percentage of viable cells relatives to that in target cell alone (A). And genomic DNA was extracted and separated on 1.5% agarose gel. The ladder pattern of DNA fragmentation represented the apoptotic death of cells (B).

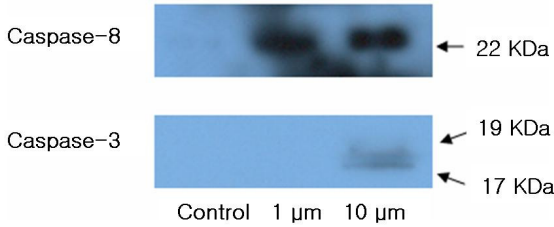


Fig. 3. C-127 facilitated the activation of caspase-8, 3 on HL-60 cells, which was performed with central roles of apoptotic signaling pathway. HL-60 cells were treated with different concentration of c-127 for 3 hr, and the expression of caspase 8, 3 was analyzed by Western blotting using the corresponding antibody.

2. C-127이 caspase-8, 3의 발현에 미치는 영향

다음은 c-127의 세포고사 유도 of 분자유전학기전을 규명하기 위해 먼저 외인성 세포고사 유도에서 사망 수용체 바로 하방에서 활성화 되어 신호를 전달하는 caspase-8의 발현정도를 알아본 결과, 1시간 처리 후 활성도가 1, 10 μm에서 저명하게 증가하였다. 또한 내인성과 외인성 세포고사 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3의 활성도 역시 3시간 처리 후 10 μm에서 증가하였다(Fig. 3).

3. C-127이 Bcl-2 family 활성화에 미치는 영향

C-127에 의한 HL-60세포의 세포고사 유도에 Bcl-2 family의 관여 여부를 알아보기 위해 western blot을 시행하여 그 발현정도를 알아보았다. 그 결과 세포고사를 촉진하는(pro-apoptotic) Bid 분절(cleavage)은 처리 한 시간 후 10 μm에서 증가하였고 세포고사를 억제하는(anti-apoptotic) Bcl-2는 처리 3시간 후 발현이 10 μm에서 현저히 증가하였다(Fig. 4).

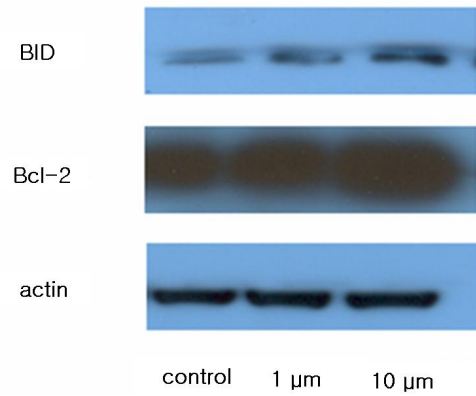


Fig. 4. C-127 regulated the expression of Bcl-2 family. HL-60 cells were treated with different concentration of c-127 for 3 hr, and the expression of Bcl-2 and BID was analyzed by Western blotting using the corresponding antibody.

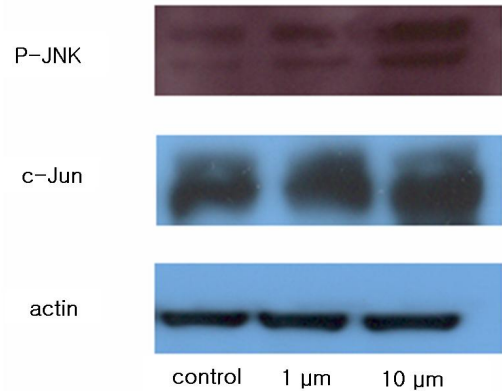


Fig. 5. C-127 induced the JNK phosphorylation and the activation of c-Jun on HL-60 cells. HL-60 cells were treated with different concentration of c-127 for 3 hr, and the expression of JNK phosphorylation and c-Jun was analyzed by Western blotting using the corresponding antibody.

4. C-127이 JNK 인산화와 c-Jun발현에 미치는 영향

C-127에 의한 세포고사유도에 JNK 참여 여부를 확인하기 위하여 JNK 인산화와 c-Jun발현을 측정 한 결과 10 μm에서 모두 증가하여, 이들이 c-127 세포고사에 관여함을 알 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

항암치료는 항암제에 대한 내성 발현과 환자에 대한 부작용으로 제한점이 많은데 이를 극복하기 위한 새로운 항암제의 개발의 일환으로 천연물 특히 전통적인 민간요법에 사용된 식물에 대해 관심이 증가 되었다. 이런 연구의 성공적인 결과로 *camptotheca acuminata*로부터 camptothecin, *taxus brevifolia*로부터 paclitaxel이 개발되어 다양한 암에서 사용되고 있다¹³⁾.

Artemisia annua L (*qinghao*) 천연물은 수세기 전부터 중국 민간요법으로 열이나 오한의 치료로 사용되어 왔으며, 1972년 전통적인 중국의학(traditional chinese medicine)로부터 새로운 말라리아 치료약제 개발 프로그램으로 이 식물로부터 artemisinin 이 추출되어 말라리아 치료에 사용 되었다¹⁾. 이후 artemisinin 반합성 유도체인 artemeter, arteether, artesunate 등이 개발되어 다약제 내성을 보이는 말라리아균에 효과 가 있을 뿐 아니라 환자에 부작용이 드물게 발생한다는 장점으로 널리 사용되었으며¹⁴⁾, 또한 이들은 항암효과, 혈관신생억제(antiangiogenesis), 항바이러스, 항진균, 면역억제 등의 효과가 있음이 보고되어 관심이 증가하였다^{3-5, 16)}. artemisinin과 그 유도체의 이런 효과는 주로 endoperoxide moiety 성분에 의해 발생하는데^{17, 18)}, 본 연구에 사용된 c-127는 일본 오카야마 약학대학에서 합성한 350개의 endoperoxide 구조를 가진 물질 중 하나로 저자들에 의해 선별 검사를 통해 항암효과가 있는 것으로 증명되었다.

Artemisinin에 의한 항암효과는 1995년 NCI의 시험관내 항암제 개발 선별검사에서 백혈병과 대장암에서 증명되었으며⁶⁾, 이후 흑색종, 유방암, 난소암, 전립선암, 뇌종양, 신장암, 갑상선암 등 많은 암 중에서 시험관 및 동물 생체 실험을 통해 확인되었다^{7-9, 11, 12)}. 이런 항암효과는 세포 증식억제와 세포고사 유도에 의해 발생함이 보고되었으며^{7, 9, 10)}, 본 연구에서도 c-127이 HL-60 세포에 대해 농도 의존적으로 세포 독성을 보였고, DNA 추출과 전기영동 실험을 통해 DNA 분절 현상을 확인하여 세포고사 유도에 의함을 알 수 있었다.

Caspase는 cysteine protease family로 cysteine residue가 표적 단백질의 aspartic acid residues의 다음 배열을 절단하는 공통된 특성을 가지고 있으며, 정상적으로는 불활성화 형태(zymogen)로 존재하며 여러 자극에 의해 활성화 되어 배아발생과 많은 질환의 병리에 필수적인 세포고사와 염증반응을 조절한다. Caspases는 prodomain의 구조와 기능에 따라 caspase-1,4,5,11, 12,13,14의 염증군, caspase-2,8,9,10의 N-terminal adapter domain을 갖고 있어 하방의 caspase를 활성화 할 수 있는 세포고사 시작군(apoptosis initiator group), N-terminal adapter domain이 없는 caspase-3,6,7의 실행군(executioner group)으로 분류한다¹⁹⁻²³⁾. Caspase-8은 외인성 세포고사 경로에서 사망 수용체 바로 하방에서 death-inducing signaling complex (DISC)내에서 활성화 되어 다음 단계의 caspase-3,7의 활성화 뿐 아니라 Bcl-2 family를 조절하는 역할을 하는 중요한 단백질이다. Caspase-3는 protease cascade의 하방에 위치하여 세포고사 실행에 필수적인 역할을 하는 단백질 분해 효소로서 DNA 복구와 스트레스관련 발현유전자의 활성화 기능유지에 중요한 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)단백질을 분해하여 세포고사에 관여 한다^{20, 22)}. 저자들은 c-127 처리 후 caspase-8, 3의 발현이 모두 증가하여 이들이 c-127에 의한 세포고사에 중요하게 작용함을 알 수 있었다.

Bcl-2 family는 내인성 세포고사 경로의 핵심적인 역할을 수

행하는 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하여 세포고사에 중요하게 관여하는데, 세포고사를 촉진하는 군으로 BAX, Bcl-xS, BAK, BOK, BIK, BAD, BID 등이 있으며 세포고사를 억제하는 군으로 Bcl-2, Bcl-xL, BCL-w 등이 밝혀졌다^{24, 25)}. Wang 등²⁶⁾은 간암을 대상으로 artesunate 투여 후 면역조직화학적 염색을 통해 Bcl-2는 감소하고 Bax는 증가함을 보고 하였다. 저자들은 c-127의 세포고사에 일부 Bcl-2 family의 관련성을 알아본 결과, 세포고사를 촉진하는 Bid 분절(cleavage)이 증가하였고 예상과 달리 세포고사를 억제하는 Bcl-2또한 발현이 증가 하여, 동시에 세포고사 유도와 억제의 상반된 반응을 일으킴을 알 수 있었다.

JNK는 ERK (extracellular signal regulated kinase), p38과 함께 MAPK (mitogen-activated protein kinase)에 속하며 대부분의 세포에 존재하여 자외선, 고삼투압, 저산소증, 허혈, 단백질 합성억제(anisomycin), 독소, 열충격(heat shock), 항암제, ceramide, TNF α 등의 다양한 스트레스 자극에 의해 활성화 된다. JNK의 주된 역할은 세포의 증식, 분화, 변형(transformation), 사망, 이동과 세포골격 보전(cytoskeletal integrity)을 위해 다양한 세포내 신호전달경로에 참여하는데, c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53, c-Myc 등의 전사인자 뿐 아니라 Bcl-2, Bcl-xL, paxillin, MAP 등의 비전사인자의 인산화로 이루어진다^{27, 28)}. JNK-c-Jun 경로는 세포종류와 세포가 받는 자극인자에 따라 세포고사를 촉진 할 수 있으나 정상 포유동물 발달(normal mammalian development)에서처럼 세포 증식이나 분화를 촉진 할 수 있음이 보고되었다²⁹⁾. 저자들은 c-127의 처리에 의해 JNK 인산화와 c-Jun발현이 증가하여 c-127에 의한 세포고사 유도 시 이들의 활성화가 관여됨을 알 수 있었으나 정확한 결론을 내리기 위해서는 이들에 대한 억제 실험이나 생체 실험 등의 추가적인 연구가 필요 할 것으로 사료 된다.

저자들은 endoperoxide ring 구조를 가진 artemisinin의 새로운 합성 유도체 350 중 중 선별검사를 통해 HL-60 백혈병 세포주에서 항암효과를 보였던 c-127의 세포고사에 의한 세포독성을 확인하였으며, 그 분자 유전학적 기전으로 caspase-8,3의 활성화, Bcl-2 family인 Bid 분절, JNK 인산화와 c-Jun발현이 관여함을 알 수 있었다. Artemisinin유도체가 인체에 부작용이 적은 장점을 고려 할 때 기존의 백혈병 치료에 사용되는 약제와 상호 약물작용 및 상승적 효과(synergistic effect), 부작용에 미치는 영향 등에 대한 많은 연구를 통해 새로운 백혈병 치료제로 이용 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

목적 : Artemisinin은 인체에 대한 부작용이 적고 항말라리아 효능 뿐 아니라 강력한 항암효과가 있음이 알려져 있다. 저자들은 오카야마 약학대학에서 합성 된 350여개의 endoperoxide ring구조를 가진 artemisinin 유도체를 선별검사 하여 HL-60세

포 주에 강력한 세포독성을 보여 준 c-127의 세포고사 유도 여부와 그 분자유전학적 기전을 알아보고자 하였다.

방법 : HL-60세포는 RPMI 1640배지로 배양하였고 세포 생존율은 MTT분석으로 측정하였다. 세포고사 여부는 DNA추출과 전기영동법으로 확인하였으며 세포고사 유도 기전은 western blotting을 시행하여 알아보았다.

결과 : C-127이 세포고사를 유도하여 HL-60세포의 세포 생존력을 농도 의존적으로 감소시켰다. C-127의 이런 항암효과의 분자유전학적 기전으로는 caspase-8,3 활성화, Bcl-2 family인 Bid분절, JNK 인산화와 c-Jun 발현이 관여하였다.

결론 : C-127이 HL-60 세포에서 세포고사를 유도하여 강력한 항암효과를 발현하였고, 그 기전으로 caspase cascade, Bcl-2 family, JNK인산화와 c-Jun활성화가 관여하였다.

References

- 1) Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* 1985;31:1049-55.
- 2) Woerdenbag HJ, Pras N, van Uden W, Wallaart TE, Beekman AC, Lugt CB. Progress in the research of artemisinin-related antimalarials: an update. *Pharm World Sci* 1994;16:169-80.
- 3) Sadava D, Phillips T, Lin C, Kane SE. Transferrin overcomes drug resistance to artemisinin in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 2002;179:151-6.
- 4) Jung M, Lee S, Ham J, Lee K, Kim H, Kim SK. Antitumor activity of novel deoxoartemisinin monomers, dimers, and trimer. *J Med Chem* 2003;46:987-94.
- 5) Chen HH, Zhou HJ, Wang WQ, Wu GD. Antimalarial dihydroartemisinin also inhibits angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;53:423-32.
- 6) Boyd MR, Paull KD. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Dev Res* 1995;34:91-109.
- 7) Posner GH, Ploypradith P, Parker MH, O'Dowd H, Woo SH, Northrop J, et al. Antimalarial, antiproliferative, and antitumor activities of artemisinin-derived, chemically robust, trioxane dimers. *J Med Chem* 1999;42:4275-80.
- 8) Posner GH, McRiner AJ, Paik IH, Sur S, Borstnik K, Xie S, et al. Anticancer and antimalarial efficacy and safety of artemisinin-derived trioxane dimers in rodents. *J Med Chem* 2004;47:1299-301.
- 9) Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* 2004;24:2277-80.
- 10) Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2005;8:85-97.
- 11) Jiao Y, Ge CM, Meng QH, Cao JP, Tong J, Fan SJ. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1045-56.
- 12) Reungpatthanaphong P, Mankhetkorn S. Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/adr and GLC4/adr resistant cell lines. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1555-61.
- 13) Wall ME, Wani MC. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 1996;51:239-53.
- 14) Price R, van Vugt M, Nosten F, Luxemburger C, Brockman A, Phaipun L, et al. Artesunate versus artemether for the treatment of recrudescing multidrug-resistant falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:883-8.
- 15) Ribeiro IR, Olliaro P. Safety of artemisinin and its derivatives. A review of published and unpublished clinical trials. *Med Trop (Mars)* 1998;58(3 Suppl):50S-53.
- 16) Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar CR. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int J Oncol* 2001;18:767-73.
- 17) Efferth T. Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells. *Curr Drug Targets* 2006;7:407-21.
- 18) Taylor DK, Avery TD, Greatrex BW, Tiekink ER, Macreadie IG, Macreadie PI, et al. Novel endoperoxide antimalarials: synthesis, heme binding, and antimalarial activity. *J Med Chem* 2004;47:1833-9.
- 19) Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood* 2001;98:3541-53.
- 20) Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
- 21) Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115:2665-72.
- 22) Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:725-31.
- 23) Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther* 2006;5:763-5.
- 24) Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995;7:541-6.
- 25) Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:47-59.
- 26) Wang Q, Wu LM, Zhao Y, Zhang XL, Wang NP. The anti-cancer effect of artesunate and its mechanism. *Yao Xue Xue Bao* 2002;37:477-8.
- 27) Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008;27:6245-51.
- 28) Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* 2004;136:123-6.
- 29) Lepä S, Bohmann D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 1999;18:6158-62.