

2007년 2월

박사학위 논문

인디루빈 유도체에 의한 구강암 KB 세포의 apoptosis 유도

조선대학교 대학원

치의공학과

전 영 찬

인디루빈 유도체에 의한 구강암 KB 세포의 apoptosis 유도

Indirubin Derivatives induces Apoptosis in Oral
Squamous Carcinoma KB Cells

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

전 영 찬

인디루빈 유도체에 의한 구강암 KB 세포의 apoptosis 유도

지도교수 윤 정 훈

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로
제출함

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

전 영 찬

전영찬의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	이상호	인
위원	조선대학교	교수	김명수	인
위원	조선대학교	교수	안상건	인
위원	조선대학교	교수	윤정훈	인
위원	동국대학교	교수	김수아	인

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

목 차	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법	3
1. 인디루빈 유도체의 합성	3
2. 세포 배양	3
3. MTT 분석	4
4. Apoptosis 분석	4
5. DNA fragmentation Assay	4
6. Western Blot Assay	5
III. 연구결과	6
1. 인디루빈 유도체의 구강암세포증식억제효과.....	6
2. 인디루빈 유도체의 Apoptosis 유도효과	7
3. DNA fragmentation assay	7
4. Western blot 분석	8
IV. 고 찰	11
V. 결 론	14
VI. 참고 문헌	15

ABSTRACT

Indirubin Derivatives induces Apoptosis in Oral Squamous Carcinoma KB Cells

Chon Young Chan

Advisor : Prof. Jung-Hoon Yoon, DDS, PhD

Department of Dental Engineering, Graduate School of Chosun University

Indirubin is the active ingredient of a traditional Chinese herbal medicine, Danggui Longhui Wan, used for the treatment of chronic myelocytic leukemia. The author reports that novel indirubin derivative, 5'-nitro-indirubinoxime (5'-NIO), has potent anti-proliferative activity on human oral cancer cells. Treatment of KB cells with 5'-NIO showed a strong cell growth inhibition during indicated time point. A typical apoptosis pattern was obtained with DNA fragmentation and immunofluorescence analysis of annexin-v-fluor. Western blot data revealed that p53 and p21^{CIP1/Waf-1} level increased strongly upon 5'-NIO treatment. The author next tested whether 5'-NIO could activate apoptosis related proteins such as caspase-3/-7/-9. In cells exposed to 5'-NIO, activation of caspase-3 and -7 was observed. Interestingly, caspase-9 and cytochrome c could slightly activate in response to 5'-NIO. These results indicate that 5'-NIO strongly induces oral cancer cells apoptosis *via* a Mitochondria-mediated caspase cascade pathway. These observations together suggest that 5'-NIO may have a possible therapeutic potential to oral cancer.

I. 서론

인디루빈은 만성 골수구성 백혈병 (chronic myelocytic leukemia)의 치료에 사용되는 Danggui Longhui Wan 이라는 약초의 구성 성분이다¹⁾. 인디루빈은 다양한 형태의 악성종양 치료에 적용했을 때 심각한 골수 억제 없이 항암작용을 나타낸다^{2,3)}. 최근 연구결과에 의하면 인디루빈이 다양한 종류의 악성종양 치료에 적용이 가능하다는 사실을 보고하고 있다⁴⁻⁷⁾.

인디루빈과 그 유도체들은 cyclin-dependent kinases (CDKs)의 활성을 저해하는 강력한 억제제이다. CDKs는 cyclin과 함께 세포주기 진행에 중요한 역할을 수행한다. 특히, 세포주기를 표적으로 하는 항암 물질들은 주로 CDKs의 활성을 억제함으로써 그 기능을 수행한다. 지금까지 많은 CDK의 억제제들이 보고되었는데 현재까지 대표적인 CDK inhibitors로는 flavopiridol, UCN-01, olomoucine, rocosvitine, butyrolactone I, indirubin-5'-sulfonate과 indirubin-30-monoxime 등이 알려져 있다. 이 약물들은 주로 세포주기를 정지시키고 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 성장을 억제한다. 인디루빈은 CDK의 ATP-binding 부위에 ATP와 경쟁적으로 결합함으로써 세포증식을 억제한다^{4,5,8)}. 인디루빈의 상세한 작용 기전이 아직 밝혀져 있지는 않지만 이상과 같은 연구결과들로 부터 인디루빈의 암세포 증식 억제 효과는 세포주기 과정을 저해함으로써 일어난다고 생각되고 있다. 인디루빈 유도체가 세포주기를 G₂/M기에서 정지시킴으로써 폐암 세포의 증식을 억제한다는 보고가 있었다⁵⁾. 다른 종류의 인디루빈 유도체들은 유방암과 전립선 암세포에서 종양 세포의 생존과 증식에 중요한 역할을 한다고 알려진 stat3를 억제한다⁶⁾. 또한 indirubin-3'-monoxime은 p27^{Kip1}을 활성화시키고 c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)의 활성을 억제하여 apoptosis에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹²⁾.

두경부 편평세포암종은 선진국에서 여섯 번째로 흔한 암으로 미국에서는 매년 44,000건의 새로운 환자가 발생하고 약 11,000명이 사망한다고 보고되어 있다¹³⁻¹⁵⁾. 두경부 편평세포암종이 항암화학 요법과 방사선 치료에 좋은 반응을 보이기는 하지만 조절이 쉽지 않으며 예후도 좋지 않다. 따라서 두경부 편평세포암종을 표적으로 삼는 새로운 항암기능 물질의 개발이 매우 필요한 실정이다.

지금까지 강력하고 안정적인 항암 효과 물질을 찾기 위하여 새로운 인디루빈 유도체인 5'-nitro-indirubinoxime을 합성하여 그 효능을 다양한 암세포에서 확인하였다⁵⁾. 그러나 새로운 인디루빈 유도체가 구강암 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 전무하다. 따라서 이 연구에서는 구강 편평세포암종 세포를 대상으로 새로운 인디루빈 유도체를 처리한 후 구강암 세포의 성장억제와 apoptosis 유도효과를 알아보고, apoptosis를 유도하는 기전을 규명하고자 하였다. 이 연구의 결과는 새로운 인디루빈의 작용 기전을 이해할 뿐 아니라 구강암의 진단과 치료, 탐지를 위한 새로운 표적을 찾기 위한 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 인디루빈 유도체의 합성

인디루빈을 pyridine에 녹인 뒤 hydroxylamine hydrochloride (10 equiv.)을 첨가하고 80-90°C로 열을 가하면서 magnetic stirring으로 교반하여 녹였다. 용매를 증발시켜 제거하고 물로 수세하였다. Cyclohexane은 선택적으로 3'-oxime을 만들어내며, Fig 1에서처럼 indirubin 구조의 R-group을 NO₂, F, NHCO^tBu로 치환하여 인디루빈 유도체를 합성하였다.

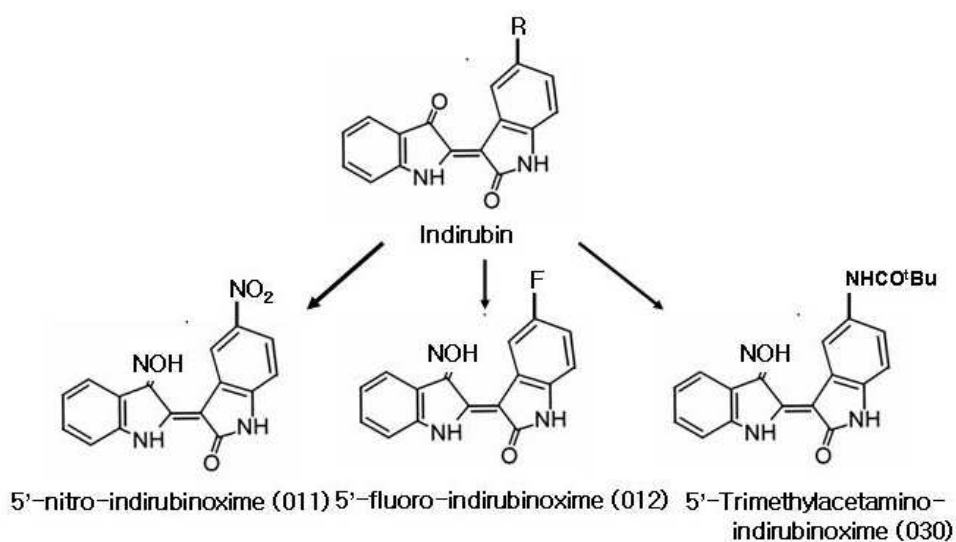


Fig 1. Chemical structure of indirubin and its derivatives.

2. 세포 배양

구강 편평세포암종 KB 세포는 ATCC (Manassa, VA, USA)로 부터 구입하였고 5% bovine calf serum과 100 µg/ml streptomycin, 100 units/ml

penicillin, 1XMEM Non-Essential Amino Acid Solution이 포함된 Minimum Essential Medium (MEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 계대 배양하였다. 5'-nitro-indirubinoxime은 KB 세포에 정해진 시간 및 농도별로 처리하였다.

3. MTT 분석

인디루빈 유도체에 대한 KB 세포의 생존율을 조사하기 위하여 6-well plate에 3×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 12시간 후 10 μ M의 인디루빈 유도체를 시간별로 처리 하였다. KB 세포를 PBS로 washing 하고 MTT 가 포함된 배지에서 4시간, 37 °C에서 배양하고, plate reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Apoptosis 분석

KB 세포를 10 μ M의 인디루빈 유도체로 24 또는 48시간동안 처리하고 Annexin V-FLUOS staining kit (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)를 이용하여 Annexin V-FITC와 propidium iododide (PI)로 표지하였다. Apoptosis된 세포들은 디지털 카메라가 장착된 형광 현미경 (Nikon Eclipse E800)으로 관찰하였다. Flow cytometry 분석은 Cell Quest software를 사용하여 FACS Caliber flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)로 측정하였다.

5. DNA Fragmentation Assay

6×10^5 KB 세포를 6-well culture plate에 seeding 한 후 인디루빈 유도체 (1 또는 5 μ g/ml)를 24 또는 48 시간 처리하였다. 5분간 4°C에서 1500 rpm으로 원심분리하여 세포를 수거하고 lysis buffer로 용해시킨 후 phenol (pH 7.5)로 DNA를 추출하였고, aqueous supernatant는 2.5 volume의 ice-cold ethanol과

3M sodium acetate (pH 5.2)를 가하여 20°C에서 침전시켰다. 동량의 DNA 0.5 mg/L ethidium bromide가 포함된 1.8% agarose gel에서 전기영동하고 자외선 하에서 관찰하였다.

6. *Western Blot Assay*

KB 세포를 인디루빈 유도체 중 5'-nitro-indirubinoxime로 24시간동안 처리한 후 PBS로 두 번씩 세척하고, RIPA buffer(1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate가 포함된 PBS)로 용해하였다. 세포 용해물을 4°C에서 30분간 배양한 후 10,000Xg로 10분간 원심분리 하였다. Immunoblotting을 위해 단백질(10µg/lane)은 12% SDS-Polyacrylaide gel 상에서 전기영동 하고, anti-caspase 3/7 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-cleaved caspase 3/7 antibody (Cell Signaling Technology), anti-p53, anti-p21과 anti-cytochrome c antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa CS)를 이용하여 immunoblotting 하였다.

III. 연구 결과

1. 인디루빈 유도체의 구강암 세포 증식 억제 효과

구강암 세포 증식억제에 대한 인디루빈 유도체의 효과를 조사하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 먼저 KB 세포를 6-well에 3×10^5 cell/ml 로 seeding 하고 인디루빈 유도체를 10 μ M을 6, 12, 24, 48 시간 처리하고 MTT assay를 한 결과 인디루빈 유도체는 시간의존적으로 KB 세포의 성장을 저해하는 것이 관찰되었다 (Fig 2). 세 종류의 인디루빈 유도체 모두 성장억제를 보였으나 5'-NIO가 가장 강력한 억제작용을 보였다. 10 μ M 5'-NIO (011)를 6, 12, 24, 48시간 처리 시 KB 세포는 각각 45%, 30%, 10%, 5% 정도로 생존율이 감소하였다.

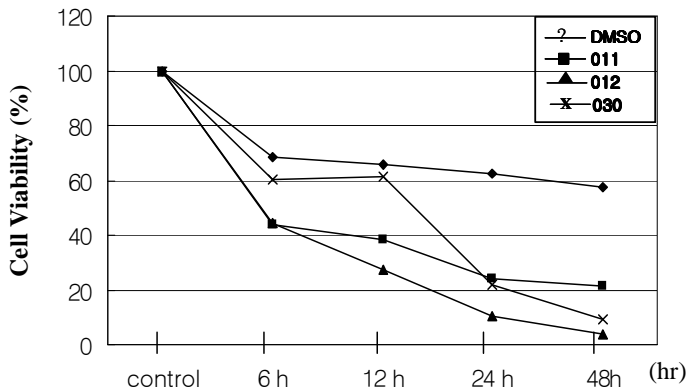


Fig 2. Effect of indirubin derivatives on KB cell proliferation.

2. 인디루빈 유도체의 *apoptosis* 유도 효과

인디루빈 유도체가 *apoptosis*를 유도하는지를 알아보기 위해 인디루빈 유도체를 KB 세포에 24, 48시간 처리한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과 세 종류의 인디루빈 유도체는 구강암 세포의 *apoptosis*를 유도하였다. 그러나 다른 유형에 비해 5'-NIO (5 μ M/ml)를 처리하였을 때 Annexin에 양성을 보이는 *apoptosis*된 세포가 가장 많이 관찰되었다 (Fig 3).

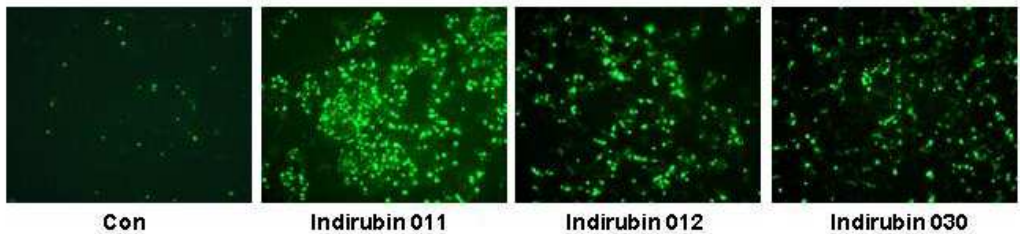


Fig 3. Annexin-V-fluorescein and PI double staining assays examined by fluorescent microscope.

3. DNA fragmentation assay

*Apoptosis*유도를 DNA fragmentation 분석을 통해 더 확인하였다. Fig 4에서 보듯이 인디루빈 유도체 세가지 모두 5 μ M/ml 처리후 24시간과 48시간에 DNA fragmentation을 분명하게 볼 수 있었다.

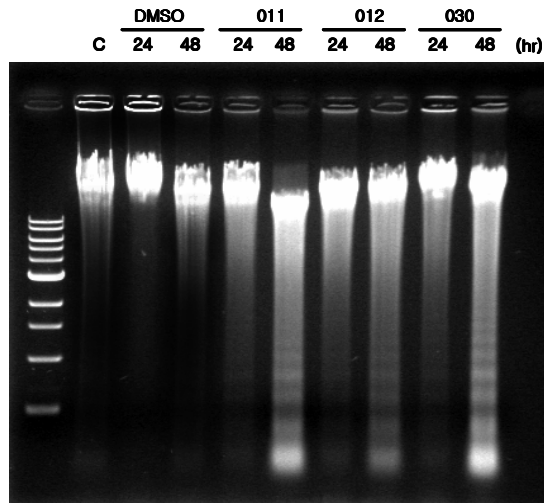


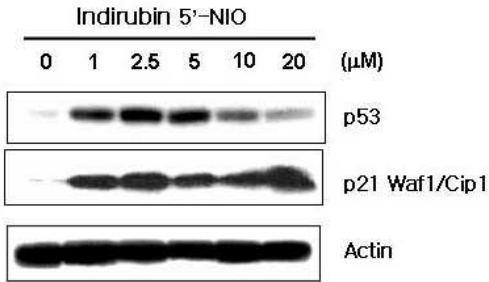
Fig 4. Induction of DNA fragmentation by indirubin derivatives in KB cells.

4. Western blot 분석

이상의 실험결과 5'-NIO가 다른 인디루빈 유도체에 비해 강력한 항암효과가 관찰되어 이후의 실험은 5'-NIO를 이용하여 수행하였다. 이전 다른 연구에서 5'-NIO가 폐 암세포에서 세포조절 인자인 p53과 p21^{Waf1/CIP1}의 발현을 증가시키고 G₂/M phase를 억제함이 보고되었다. 5'-NIO가 세포주기 및 apoptosis 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하고자 KB 세포를 6-well 에 3 x 10⁵ cell/ml 로 seeding 하고 5'-NIO를 1, 2.5, 5, 10, 20 μM을 24 시간 처리한 후 western blot을 수행하였다. 5'-NIO 처리후 p53과 p21의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig 5A). 흥미롭게도 p53은 낮은 농도인 1 μM 5'-NIO에 의해 강하게 발현되며 높은 농도에서는 그 발현이 감소하였다 (Fig 5A). 또한 저자는 세포주기 및 apoptosis 조절 단백질의 시간에 따른 발현 변화를 조사하였다. 그 결과 5'-NIO는 p21과 p21의 조절인자인 p53의 발현이 증가하였다. 특히 p21^{CIP1}과 p53의 발현은 6 시간 내에 강하게 발현되

며, 30시간 후 정상 수준으로 감소되었다 (Fig 5B).

A.



B.

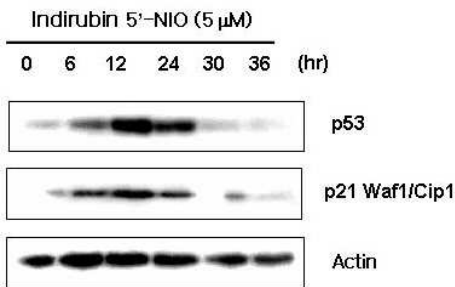


Fig 5. Effect of 5'-NIO on the expression of p21 and p53 proteins in KB oral cancer cells.

저자는 5'-NIO가 apoptosis를 활성화 시키는 단백질인 caspase-3/-7/-9의 발현을 조사하였다. 5'-NIO 처리후, caspase-3와 -7이 활성화 되었고, caspase-9도 약간 활성화 됨을 관찰 할 수 있었다. Caspase-9은 mitochondria에서 cytochrome c를 유리하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있는데, 이 연구에서도 5'-NIO 처리후 cytochrome c가 농도 의존적으로 증가함을 관찰하여 mitochondria 매개 경로를 통해 apoptosis가 일어남을 확인하였다 (Fig 6).

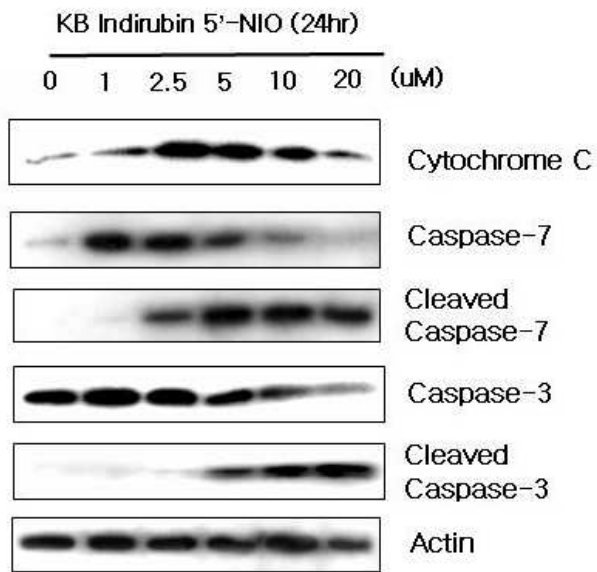


Fig 6. Effect of 5'-NIO on the expression of caspase-3/7 and cytochrome C in KB oral cancer cells.

III. 고 찰

인디루빈은 최근에 항암치료제로 주목을 받고 있으며, 만성 골수성 백혈병 치료를 위해 사용된 Danggui Longhui Wan의 주성분으로 항암효과가 우수한 여러 인디루빈 유도체들이 보고되고 있다. 이들 유도체들은 cyclin-dependent kinase (CDK)1/cyclin B, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, GSK3 β , 그리고 CDK5/p25 저해를 통해 여러 종류의 사람 암세포의 성장 억제 효과를 가지고 있음이 확인되었다^{4,8,9,16-19}. 인디루빈을 처리한 암세포의 세포주기는 G₁/S 또는 G₂/M기에서 정지되며 이로 인해 세포증식의 저해와 세포사가 유도된다. 인디루빈은 CDK의 catalytic domain 내의 ATP binding pocket에 결합, 분자적 변형을 유도함으로써 CDK에 ATP의 결합을 억제하여 종양세포의 세포주기를 억제한다^{8,19}.

저자는 이 연구에서 인디루빈 유도체에 의한 사람 구강암 세포에 대한 항암 활성도를 확인하기 위해 성장 억제 효과와 apoptosis의 유도에 대해 연구하였다. 이 *in vitro* 실험결과 세 종류의 인디루빈 유도체 모두 배양된 구강암 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하였다. 그러나 증식억제와 apoptosis 유도는 5'-NIO이 가장 강력한 효과를 보여 이후 실험은 5'-NIO를 이용하여 수행하였다. 이 연구에서 5'-NIO가 KB 세포에서 apoptosis를 유도하는 전형적인 형태학적 양상은 DNA fragmentation과 annexin-V-fluorescence 염색 후 면역형광 소견으로 확인하였다. 5'-NIO (5 μ M/ml) 처리 후 대조군에 비해 실험군에서 annexin 양성 세포의 수가 현저하게 증가하였다. 또한 5'-NIO처리 후 DNA fragmentation이 24시간과 48시간 후에 뚜렷하게 관찰되었다.

세포주기 중에서 p53과 p21^{CIP1/Waf-1}은 세포사 신호과정 후에 증가하는 중요한 억제인자이다. Lee 등은 사람 폐암세포에서 5'-NIO가 p53 의존성 경로를 통해 G₂/M기를 지연시키고 mitochondria 매개 경로를 통해 apoptosis를 유도함을 보고한 바 있다⁵. 이 연구의 Western blot 결과에서도 구강암 세포에서

5'-NIO 처리 후 p53과 p21^{Waf1/Cip1}이 증가하여, 5'-NIO이 구강암 세포에서 p53과 p21^{Waf1/Cip1}을 조절함을 확인하였다.

저자는 구강암 세포에서 5'-NIO가 전형적인 apoptosis의 특징적인 세포사의 형태를 관찰하였다. 또한 5'-NIO 처리 후 p53과 p21^{Waf1/Cip1}이 증가하여 p53의존성 경로를 통해 G₂/M기를 지연시키고 mitochondria 매개 경로를 통해 apoptosis를 유도할 가능성이 있음을 확인하였다. 일반적으로 mitochondria-mediated cell death pathways는 mitochondria로부터 만들어지는 cytochrome c가 caspase cascade 과정을 통해 caspase 9을 활성화시키고 caspase 9은 caspase 3를 활성화 시킨다²⁰⁻²². 세포사의 effect인자인 caspase 3는 활성화된 caspase 7과 함께 DNA 수복에 관여하는 Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)를 억제한다²². 이 연구에서도 5'-NIO 처리가 apoptosis 관련 단백질인 caspase-3/-7/-9을 활성화 시키는지를 실험하였다. 그 결과 5'-NIO 처리 후 caspase-3와 -7의 활성화를 관찰하였다. 그 결과 caspase-9은 약간 증가하였다 (data not shown). Caspase-9은 항암제에 의해 유도되는 apoptosis 과정에서 mitochondria에서 유리되는 cytochrome c에 의해 활성화된다고 알려져 있어, 5'-NIO에 의해 유도되는 apoptosis는 mitochondria 매개 경로를 통해 일어남을 알 수 있었다.

결론적으로, 이 연구에서는 기존의 알려진 항암제보다 효능이 탁월한 항암 물질을 개발하기 위해 새로운 인디루빈 유도체인 5'-NIO의 효과를 구강암 KB 세포에서 연구하였다. 이 연구에서 5'-NIO가 p53과 p21^{Waf1/Cip1}의 단백질 발현 조절에 관여하는 결과는 기존 연구결과와 일치하였다. 5'-NIO가 p53의 활성을 유도하고 p53의 down stream의 또 다른 세포주기 억제인자인 p21^{Waf1/Cip1}의 발현을 유도하여 p21^{Waf1/Cip1}의 주 표적인 CDK의 활성을 억제하는 것으로 추정된다. 또한 p53의 활성화는 mitochondria로부터 만들어지는 cytochrome c가 caspase cascade 과정을 통해 caspase 9을 활성화시키고 caspase 9은 caspase 3를 활성화 시키며, 세포사의 effect인자인 caspase 3는

활성화된 caspase 7과 함께 DNA 수복에 관여하는 Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)를 억제하여 apoptosis를 유도할 것으로 생각하였다 (Fig 7).

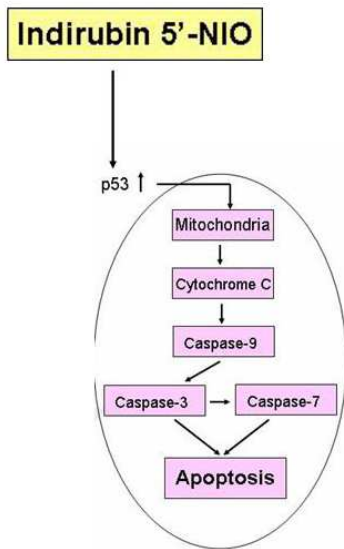


Fig 7. Schematics of 5'-NIO-induced effects upon apoptosis signal transduction pathways.

V. 결 론

이 연구에서는 기존의 알려진 항암제보다 효능이 탁월한 항암 물질을 개발하기 위해 새로운 인디루빈 유도체인 5'-NIO의 효과를 구강암 KB 세포에서 연구하였다. 이 연구에서 5'-NIO가 p53의 활성을 유도하고 p53의 downstream의 또 다른 세포주기 억제인자인 p21^{Waf1/Cip1}의 발현을 유도하여 p21^{Waf1/Cip1}의 주 표적인 CDK의 활성을 억제하는 것으로 추정된다. 또한 p53의 활성화는 mitochondria로부터 만들어지는 cytochrome c가 caspase cascade 과정을 통해 caspase 9을 활성화시키고 caspase 9은 caspase 3를 활성화 시키며, 세포사의 effect인자인 caspase 3는 활성화된 caspase 7과 함께 apoptosis를 유도할 것으로 생각하였다.

VI. 참고문헌

1. Zhang ZN, Liu EK, Zheng TL and Li DG. Treatment of chronic myelocytic leukemia by traditional Chinese medicine and Western medicine alternately. *J Tradit Chin Med* 5: 246-8, 1985
2. Han J. Traditional Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. *J Ethnopharmacol* 24; 1-17, 1988.
3. Qin GW, and Xu RS. Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants. *Med Res Rev* 18; 375-382, 1998.
4. Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L and Eisenbrand G. Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br J Cancer* 84; 283-9, 2001.
5. Lee JW, Moon MJ, Min HY, Chung HJ, Park EJ, Park HJ, Hong JY, Kim YC and Lee SK. Induction of apoptosis by a novel indirubin-5-nitro-3'-monoxime, a CDK inhibitor, in human lung cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 15; 3948-52, 2005.
6. Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, Hippe F, Vatter S, Merz KH, Eisenbrand G and Jove R. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102; 5998-6003, 2005.
7. Xie Y, Liu Y, Ma C, Yuan Z, Wang W, Zhu Z, Gao G, Liu X, Yuan H, Chen R, Huang S, Wang X, Zhu X, Wang X, Mao Z and Li M. Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 367; 355-9, 2004.
8. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G and Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia

- medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1; 60-7, 1999.
9. Damiens E, Baratte B, Marie D, Eisenbrand G and Meijer L. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* 20; 3786-97, 2001.
10. Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA 3rd, Kato T, Saeki K and Matsuda T. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276; 31475-8, 2001.
11. Knockaert M, Blondel M, Bach S, Leost M, Elbi C, Hager GL, Nagy SR, Han D, Denison M, Ffrench M, Ryan XP, Magiatis P, Polychronopoulos P, Greengard P, Skaltsounis L and Meijer L. Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins. *Oncogene* 23; 4400-12, 2004.
12. Xie Y, Liu Y, Ma C, Yuan Z, Wang W, Zhu Z, Gao G, Liu X, Yuan H, Chen R, Huang S, Wang X, Zhu X, Wang X, Mao Z and Li M. Indirubin-3'-oxime inhibits c-Jun NH2-terminal kinase: anti-apoptotic effect in cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 367; 355-9, 2004.
13. Landis SH, Murray T, Bolden S and Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 49; 8-31, 1999.
14. Parkin DM, Pisani P and Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49; 33-64, 1999.
15. Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A and Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B; 143-9, 1996.
16. Moon MJ, Lee SK, Lee JW, Song WK, Kim SW, Kim JI, Cho C, Choi SJ, Kim YC. Synthesis and structure-activity relationships of novel

indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. *Bioorg Med Chem* 14(1); 237-46, 2006.

17. Eisenbrand G, Hippe F, Jakobs S, Muehlbeyer S. Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine. *J Cancer Res Clin Oncol* 130(11); 627-35, 2004.

18. Merz KH, Schwahn S, Hippe F, Muehlbeyer S, Jakobs S, Eisenbrand G. Novel indirubin derivatives, promising anti-tumor agents inhibiting cyclin-dependent kinases. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42(11); 656-8, 2004.

19. Xiao Z, Hao Y, Liu B, Qian L. Indirubin and meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk Lymphoma* 43(9); 1763-8, 2002.

20. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell* 116(2); 205-9, 2004.

21. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281; 1309-12, 1998.

22. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15(6); 725-31, 2003.

저작물 이용 허락서

학 과	치의공학과	학 번	20057602	과 정	박사
성 명	한글: 전 영 찬 한문: 영문: Chon Young Chan				
주 소	경기도 수원시 팔달구 595 LG 세브란스치과				
연락처	E-MAIL : ycchon@hanmir.com				
논문제목	한글: 인디루빈 유도체에 의한 구강암 KB 세포의 apoptosis 유도 영문: Indirubin derivatives induces apoptosis in oral squamous carcinoma KB cells				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2006년 12월 일

저작자: 전 영 찬 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하