[UCI]I804:24011-200000263901

2013年 8月
碩師學位論文

Berberine에 의한 구강암 KB 세포의 세포사멸 유도

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 眞 柱

Berberine에 의한 구강암 KB 세포의 세포사멸 유도

Induction of apoptosis by berberine in KB human oral cancer cells

2013年 8月 23日

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 眞 柱

Berberine에 의한 구강암 KB 세포의 세포사멸 유도

Induction of apoptosis by berberine in KB human oral cancer cells

指導敎授 金 秀 官

이 論文을 理學碩師學位신청 論文으로 제출함

2013年 4月

朝鮮大學校 大學院

齒醫生命工學科

朴 眞 柱

朴眞柱의 碩師學位論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校 敎　授 金 徒慶 (인)

委　　員　朝鮮大學校 敎　授 金 春成 (인)

委　　員　朝鮮大學校 敎　授 金 秀官 (인)

2013年 5月

朝鮮大學校 大學院

목 차

List of Figure ····· iii
List of Abbreviation ····· iv
ABSTRACT ····· vi

Ⅰ. 서론 ····· 1
Ⅱ. 실험 재료 및 방법 ····· 4
1. 균주 및 시약 ····· 4
2. 세포의 배양 ····· 4
3. MTT assay ····· 4
4. Morpholigical alteraion ····· 5
5. Caspase-3 activation assay ····· 7
6. Flow cytometric analysis ····· 7
7. Western blot analysis ····· 8
8. Statistics ····· 9
Ⅲ. 결과 ····· 10
1. MTT assay에 의한 Berberine이 구강암 KB 세포 생존율에 미치는 영향 ····· 10
2. Berberine에 의한 구강암 KB 세포 DNA 분절화12
3. Berberine에 의한 Morphological change ····· 14
4. Berberine에 의한 caspase의 활성화 ····· 18
5. Berberine에 의한 세포사멸 기전 분석 ····· 20
Ⅳ. 고찰 ····· 24
Ⅴ. 결론 ····· 28

Ⅵ. 참고문헌 ····· 29

List of Figure

Figure 1. The morphology of *Costidis Rhizoma* (A), dried roots of *C. Rhizoma* (B), and the chemical structure of berberine purified from *C. Rhizoma* (C) ····· 3
Figure 2. Berberine induced the cell cytotoxicity on KB oral cancer cell specific as a dose dependent manner. ····· 11
Figure 3. The cleavage of genomic DNA in KB oral cancer cells stimulated with Berberine. ····· 13
Figure 4. Berberine decreased the KB oral cancer cells number, changed the morphology, and induced the cell death. ····· 15
Figure 5. Nucleus condensation, signally was observed on KB oral cancer cells stimulated with berberine. ····· 17
Figure 6. Activated caspase-3 were significantly observed on the KB oral cancer cells stimulated with berberine. ····· 19
Figure 7. Berberine activate the caspase dependant apoptotic pathway in KB oral cancer cells. ····· 21
Figure 8. Berberine increases the apoptotic population of KB oral cancer cells. ····· 23
Figure 9. Mechanism of inhibition of oral cancer cells by berberine through caspase dependent pathway. ····· 26

List of Abbreviation

Ammonium Persulfate (APS)

Cyclooygenase-2 (COX-2)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)

Endoscope-Assisted Transoral Approach (EATA)

Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid (EDTA)

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Fas and its Ligand (FasL)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Fluorescein isothiocyanate (FITC)

Human Normal Oral Keratinocyte (HNOK)

Horseradish Peroxidase-conjugated (HRP-conjugated)

Hematoxylin-Eosin stain (H&E staining)

Inoxydable (iNOS)

Human oral epidermoid carcinoma cancer cell line (KB)

Lipopolysaccharide (LPS)

Minimum Essential Eagle's Medium (MEM)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, A Yellow Tetrazole (MTT)

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)

Phosphate buffer saline (PBS)

Phenylethanesulfonylfluoride or Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Poly-Acrylamide Gel eletrophoresis (PAGE)

Poly-Vinylidine DiFluoride (PVDF)

Treatment of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)

Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)

Tetramethylethylenediamine (TEMED)

Tris[hydroxymethyl] Aminomethane buffer Solution (TBS)

Tris Aminomethane buffer Solution - Tween-20 (TBS-Tor TTBS)

ABSTRACT

Induction of apoptosis by berberine in KB human oral cancer cells

Jin-Ju Park
Advisor : Prof. Su-Gwan Kim, DDS, Ph.D.
Department of Dental Biology
Graduates School of Chosun University

Costidis Rhizoma has been used as a seasoning vegetable for a long time. It is also a kind of natural phenol licorice compounds with multiple bio-activity including anti-inflammation, anti-microbial, anti-fungal, and anti-cancer. The anti-cancer effect of berberine, primary biologically active substance of *Costidis Rhizoma,* on KB human oral cancer cells was investigated in this study.

Berberine inhibits the viability of KB oral cancer cell, but it has no effect on the primary normal human oral keratinocyte. Berberine administered to KB oral cancer cells for 24 hours showed the chromatin condensation, the genomic fragmentation on agarose gel electrophoresis. To analyse this process 4′,6-Diamidino-2 - Phenylindole(DAPI) staining and DNA fragmentation assay were used. In addition, berberine induces the death of gradually increased the apoptotic cell. For this Fluorescence-Activated cell Sorting(FACS) analysis was used. These experiment resultant analysis data clearly suggest that Berberine induce apoptosis in KB oral cancer cell as an extrinsic apoptotic signaling pathway, which includes caspase dependent FasL/Fas-singaling-mediated death receptor pathway.

These results suggest that Berberine induce the suppression of cell

growth and apoptosis in KB human oral cancer cells. Therefore, it may have potential properties for the discovery of an anti-cancer drug.

Ⅰ. 서론

구강암은 구강종양 중 악성종양을 일컫는 말로서 발생 위치에 따라 구순암, 구강저암, 구개암 등으로 구분한다(노석선, 2003). 과거에는 일반적으로 구강암은 고 연령층에서 호발 하는 경향을 보였으나, 최근 들어 스트레스의 증가, 서구화된 식습관, 흡연 및 음주의 증가로 인해 젊은 층의 구강암 환자가 증가하고 있는 것으로 보고되었다(Vecchia CL. *et al.*, 1997 ; Liesellyn CD. *et al.*, 2001 ; Liewellyn CD. *et al.*, 2004). 구강암에 대한 다양한 임상적 치료방법들은 저작, 연하, 발음 등의 기능적 장애와 안면변형 등의 다양한 부작용을 초래함으로써 환자 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있는 위험성을 내포하고 있다(Chandu A. *et al.*, 2005). 따라서 최근 부작용을 최소화시킴으로써 환자 삶의 질을 유지할 수 있도록 정상세포에는 무해한 반면 암세포 특이적 세포사멸(Apoptosis)을 유도시키기 위한 연구의 일환으로 다양한 약용식물의 생리활성물질을 분리・정제하고 이들의 항암효능을 분석한 천연물 신약 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Apoptosis는 생명현상조절과 관련된 과정 중의 하나로써 세포 내에 미리 계획된 세포사멸 경로가 활성화됨으로써 개체의 항상성(Homeostasis) 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 개체방어 기전이다(Geoffrey M Copper. 2005).

구강 상피세포는 계속적으로 빠르게 세포교체가 일어나며 세포의 형태 및 기능을 유지하기 위해서는 세포사멸이 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 이러한 세포의 사멸이 적절하게 이루어지지 않을 경우 상피세포의 과증식으로 구강암이 발생하게 된다. 그러므로 세포사멸을 적절하게 촉진하는 것이 암 발생과 진전을 억제하고 암을 치료할 수 있는 좋은 방법이라 할 수 있다(윤상준, 2010).

Apoptosis와 관련된 종양연구에서 가장 중요한 점은 apoptosis가 종양의 형성과 치료에 있어서 중요한 역할을 할 수 있다는 것에 대한 인식이다(Elmore S. *et al.*, 2007 ; Debatin KM. *et al.*, 2004 ; Ramos S. *et al.*, 2007 ; Hunter AM. *et al.*, 2007 ; Johnstone RW. *et al.*, 2002 ; Herr I. *et al.*, 2001). 실제로 항암제는 대부분 목적 세포들을 종양 세포의 apoptosis를 유도

시킴으로서 유도 매개하는 것이 밝혀져 있다(Kaurmann SH. *et al.*, 2000). 따라서 높은 종양세포 특이적 사멸효능과 부작용을 최소화하여 안전을 증진시킨 우수하고 새로운 항암제 개발에 관심을 가지게 되었으며, 최근 국내・외 항암제 신약 개발 연구는 섭취가 가능할 뿐만 아니라 다양한 생리활성을 포함하고 있는 천연약용식물자원으로부터 안전성을 향상시킨 새로운 천연물 항암제 신약을 개발하기 위한 많은 연구가 시도되고 있다. 최근 고사리(오인석, 2010) 및 천궁(*Cnidium officinale*)(이두식, 2011) 등을 비롯한 섭취가 가능한 여러 천연 약용 식물 자원들을 이용한 항암효능 기전분석 연구결과들은 천연물들의 응용 가능성을 한층 더 높여주었고, 보다 더 다양한 천연물을 대상으로 한 기초연구의 필요성을 인식시켜 주었다. 뿐만 아니라 구강질환 세균에 대한 한약재의 항균효과 및 구강 질환 유발 미생물에 대한 항생작용을 갖는 천연물 추출물 검색에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있다.

미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초목인 *Costidis Rhizoma*(*Coptis japonica Makino*)의 뿌리를 채취하여 햇볕에 건조시킨 것을 황련이라고 한다. 황련은 전통적으로 건위, 진정, 소염, 항균 등의 효능이 있어 소화불량, 위염, 장염, 복통, 구토, 이질, 심계, 번열, 정신불안, 인후종통, 토혈, 코피, 하혈 및 화상 등에 복용되는 중요한 한방약재의 하나로 매우 잘 알려져 있다. 이러한 다양한 생리활성기능을 내포하고 있는 황련은 Alkaloid 계이며 특히, berberine을 주로 많이 포함하고 있으며 그 화학식은 $C_{20}H_{19}NO_5 5H_2O$이다(Fig. 1). 노란색 바늘 모양의 결정이며, 녹는점은 145℃이고, 예전에는 양주・명주・피혁 등의 염료로서 사용되었다.

최근 berberine은 항균작용, 항염증, 지혈, 혈압강하 및 항암작용 등이 우수하며, 중추신경억제, 신장염 치료효과 및 기관지 평활근 확장작용이 보고되었다(Lee *et al.*, 2003). Berberine의 항염증 효과에 대한 연구로는 Lipopolysaccharide(LPS)를 준 복강대식세포에서 Inducible nitric oxide synthase(iNOS), Cyclooygenase-2(COX-2) 및 Tumor necrosis factor-α (TNF-α)의 생성저해(Lee *et al.*, 2003), 췌장세포의 세포사멸억제(Kim *et al.*, 2007), Keratinocytes에서 TNF-α 생성억제(Enk *et al.*, 2007) 및 기억장애 개선효과(Wang *et al.*, 2005) 등이 보고되었다. 본 연구의 목적에서는 구강암 KB 세포에서 berberine에 의한 항암효능 및 이에 대한 분자적 기전을 분석하는데 하였다.

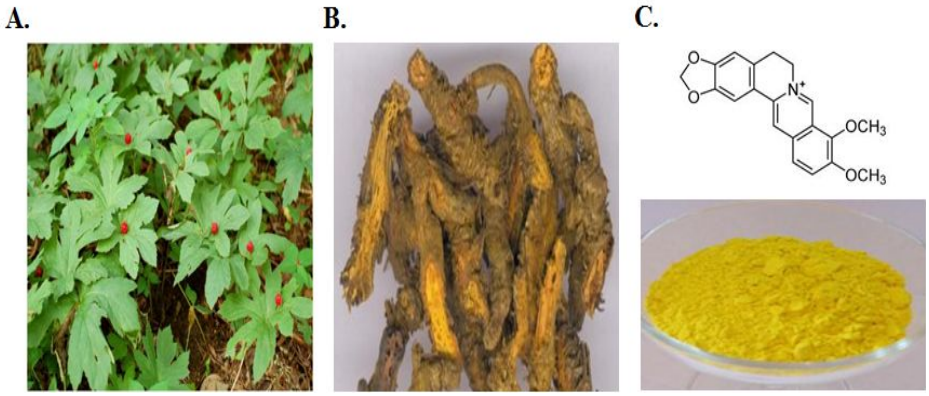

Fig. 1. The morphology of *Costidis Rhizoma* (A), dried roots of *C. Rhizoma* (B), and the chemical structure of berberine purified from *C. Rhizoma* (C).

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 균주 및 시약

본 실험에 사용한 구강암 KB 세포는 American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, UAS)와 Human Normal Oral Keratinocyte (HNOK)는 Science Cell Research Laboratories(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Berberine은 Sigma사(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 세포 배양

구강암 KB 세포는 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA), 100U/mL penicillin, 100μg/mL streptomycin(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 MEM(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하였다. HNOK는 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 배양하였다.

3. MTT assay

Berberine에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 37℃의 성장배지 하에서 배양된 구강암 KB 세포와 HNOK를 수집하여 96 well-plate에 각각 접종하고, $1x10^5$cells/well의 농도로 배양하였으며, 접종 24시간 후 다양한 berberine의 농도 (0, 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL)를 37℃, 5% CO_2,가 유지되는 항온 항습기(Forma, USA)에서 20시간 동안 반응시켰다. 이후, berberine 농도에 따른 세포성장 억제 효과를 분석하였다.

세포독성 분석은 구강암 KB 세포와 HNOK에 MTT Solution(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 20μL씩 각각 첨가하여 37℃에서 4시간 처리한 후,

MTT가 들어있는 배양액을 모두 제거하고 세포를 200μL Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 용해하여, ELISA microplate reader(Bio-Tek Instruments Inc., Wilnooski, VT)를 사용하여 흡광도를 570nm에서 측정하여 시행하였으며, 독립적인 동일 실험을 3회 반복하여 수행하였다.

4. Morphological alteration

1) DNA fragmentation assay

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 $2x10^6$의 구강암 KB 세포를 culture dish에 배양 하였다. 구강암 KB 세포에 0, 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL의 berberine을 24시간 처리한 그 다음 Lysis buffer(100mM NaCl, 10mM Endoscope-Assisted Transoral Approach(EATA), 300mM Tris - HCl, 200mM sucrose, 0.5% SDS, 0.5mg/mL proteinase K, pH 7.5) 500μL에 현탁하고 30분간 ice에서 반응하였다. 이후, RNase A 0.5mg/μL와 Proteinase K를 각각 0.5, 0.2mg/μL 넣고 반응시킨 뒤, 동일 양의 phenol / chloroform / isoamyl-alcohol을 첨가하여 원심분리를 통하여 상층액을 분리였다. 그 다음, 동일한 양으로 iso-propanol을 넣고 -70℃에서 24시간 동안 incubating 하였다. 그 뒤 4℃에서 15분간 반응시켰다. 그 후, 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet만 남도록 air-dry를 하고, TE buffer 30μL(1M Tris[pH 8.0] 10mM, 0.5M EDTA(Sigma Co., St. Louis, MO, USA, [pH 8.0]) 1mM, ddH_2O 100mL)를 넣어 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA는 260nm의 파장에서 DNA를 측정하고, Nanodrop을 이용하여 5μg, 10μg으로 정량한 후 260nm 파장의 Nanodrop을 이용하여 정량하였다. 그 후, agarose powder(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel을 제작하여 50voltage에서 2시간 동안 전기 영동하여 UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, NY, USA) 하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

2) Hematoxylin-Eosin stain (H&E staining)

Berberine에 의한 구강암 KB 세포의 형태적 변화 및 apoptotic body의 형

성을 분석하기 위하여 H&E staining을 수행하였다. $1x10^5$cells/mL의 구강암 KB 세포를 Chamber slide(Thermo Scientific Inc., NY, USA, 154534)에 0, 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL 농도의 berberine을 처리한 후, 4% paraformaldehyde 용액으로 세포 고정(Cell fixation)을 수행하였다. 세포 고정 후 멸균수로 2-3회 고정된 세포표면을 세척 시킨 후, Mayer's Hematoxylin Solution(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 5분간 침적하여 고정된 세포의 핵을 염색시킨 후 흐르는 물로 과 반응된 Hematoxylin을 제거하였다. 세척된 Slide를 Aqueous's Eosin Y solution(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 1분간 반응시킨 후 흐르는 물에 3-4분간 세척하여 과 반응된 Eosin을 제거하였으며, Xylene에 침적하여 탈수시킨 후 mounting solution을 처리한 후 cover glass로 봉입하였다. 이후 Inverted fluoroscopic microscope(Eclipse TE200; Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 이용하여 100X 배율에서 관찰하였다.

3) DAPI staining

DNA의 핵과 chromatin을 염색하여 morphology를 확인하거나 세포 핵으로의 permeability를 light intensity를 기준으로 비교하기 위하여 DAPI staining을 시행하였다. Apoptosis가 일어나면 cell nucleus의 morphology와 permeability가 변화하는데 DAPI staining을 통해 이러한 변화들을 비교함으로써 normal cell과 apoptotic cell을 구분해낼 수 있게 된다.

DAPI staining kit(based on Cell Apoptosis DAPI Detection Kit from© GenScript Corporation)를 사용하였는데, DNA에만 특이적으로 반응하는 형광염색시약은 DAPI(Sigma Co., St. Louis, MO, USA, D-8417)을 사용하였다.

DAPI의 염색성을 향상시키기 위해 Triton X-100(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Working solution은 0.1, 1.0, 1.5 및 2.0%의 Triton X-100용액 1mL에 DAPI stock solution 1μL를 혼합하여 사용하였고, DAPI 염색과정과 동일한 과정을 거쳐 검경하였다.

형광염색에는 berberine 1μg/mL을 24시간 동안 처리한 구강암 KB 세포에 사용하였으며 4% paraformaldehyde에서 30분간 고정한 후 70% ethanol에 옮겨 4℃에서 보관하였다. 고정한 후, 슬라이드 글라이스에 올려놓고, DAPI working solution을 20μL를 떨어뜨렸다. 슬라이드글라스에 남아있는 잔여 세포 조직들을 제거하고 다시 20μL의 DAPI working solution을 첨가하여 잘

섞은 다음 humidity chamber에서 암상태로 5분간 반응 시켰다.

5. Caspase activation assay

구강암 KB 세포에 세포사멸 유도의 분자유전학기전을 규명하기 위해 내인성과 외인성 세포사멸 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3의 발현정도를 확인 하였다. Berberine(0, 0.1, 및 1.0μg/mL)을 24시간 동안 처리하고 세포침투성 형광 기질인 PhiPhiLux-G_1G_2(OncoImmunin, Inc. Gaithersburg, MD, USA)을 한 시간 동안 반응 시켰다. 처리된 세포를 3회 PBS(Gibco, Grand Island, NY, USA)로 세척 시킨 후, filter paper에 압착 및 Mounting시킨 후, UV 필터(주파장 365nm)하에서 Inverted fluorosocopic microscope(Eclipse TE200; Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 이용하였다.

6. Flow cytometric analysis

FITC와 공유 결합된 annexin V(이하 annexin V-FITC, Cat. No. 556420), Propidium Iodide(50μg/mL in PBS, pH 7.4, Cat. No. 556463)과 10X binding buffer(Cat. No. 556454)들을 Pharmingen사로부터 구입하였으며, 각각은 사용시까지 4℃에 보관하였다. Berberin을 1.0μg/ml의 농도로 처리한 KB 세포를 회수하여 세포수를 산정한 구강암 KB 세포를 찬 PBS(Gibco, Grand Island, NY, USA)로 2회 세척한 후 $1x10^6$cells/mL의 농도로 1X binding buffer에 재부유 시켰다. 이 세포 부유액으로부터 100μL($1x10^5$세포)를 시험관에 나누어 가하였다.

시험관에 5μL의 annexin V-FITC를 가하고 세포들을 잘 섞은 후 15분 동안 실온에서 배양하였다. 다음에 1mL의 1X bingding buffer로 한 번 세척하였다. 상청액을 버리고 각각의 세포 침전물에 100μL의 1X binding buffer를 먼저 가한 다음 이어서 10μL의 PI 저장 용액을 가한 후 빛을 차단하고 실온에서 15분 동안 배양하였다. 배양을 완료한 후에는 400μL의 1X binding buffer를 각 tube에 가하여 한 시간 내에 flow cytometry로 분석하였다. Flow cytometry의 설정을 위한 대조군 표본의 준비를 위해서 100μ

L($1x10^5$cells)의 세포 부유액을 3개의 시험관에 가하고 첫 번째 시험관에는 annexin V-FITC나 PI를 모두 가하지 않았으며, 두 번째 시험관에는 annexin V-FITC만 가하고 세 번째 시험관에는 PI만을 가하였다.

염색한 세포들의 분석에는 488nm의 레이저가 장착된 표준 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하였고, Flow cytometer에 설치된 Cell Quest program(Becton Dickinson)을 사용하여 $1x10^4$개의 세포로부터 자료들을 획득하였고, 중복 세포들을 FL3A와 FL3W의 도수분포도(Histogram)상에서 제외하였다. 얻어진 모든 결과들은 WinList 4.0과 Modifit LT 3.0 software program(Verity Software House, Topsharm, ME)으로 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였다.

7. Western blot analysis

Berberine에 의한 세포성장 억제기전을 확인하기 위해 western blot을 시행하였다. $5X10^6$ 구강암 KB 세포를 Culture dish에 배양 후 berberine을 0, 0.1, 및 1.0μg/mL 농도로 처리하여 24시간 반응 후, DPBS로 2회 세척하여 세포를 회수하였다. 그리고 RIPA buffer를 이용하여 얼음에서 1시간 동안 반응시켜 세포를 깨고, 원심분리하여 pellet과 상등액에서 분리한 후, BCA Protein Assay Kit(Thermo scientific Inc., NY, USA)을 이용하여 1시간 동안 37℃ incubator에서 반응시켰다. 이후 ELISA microplate reader(Bio-Tek Instruments Inc., Wilnooski, VT)를 사용하여 562nm의 흡광도의 값을 기초로하여 BSA standard curve를 작성 후 이에 따라 시료의 단백질농도 정량하였다. Western-blotting을 위해 40μg 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 Power PAC 300(BIO-RAD)을 사용하여 120voltage에서 2시간 동안 전기영동시킨 후 methanol에 10분간 전 처리된 PVDF membrane(Millipore, Bedford, MA) 및 transfer buffer(25mM Tris, 192mM Glycine, 10% Methanol)를 사용하여 protein transfer를 수행하였다. Protein transfer가 완료된 PVDF membrane은 비 특이적 항체의 결합을 억제시키기 위하여blocking solution에 2시간 동안 상온에서 반응 하였다. 이후 각각의 1차 항체로 house keeping gene인 GAPDH, anti-cleaved caspase-3, anti-Cleaved caspase-8, anti-cleaved capsase-9, PARP, Anti-TRAIL, Anti-Bcl-2, Anti-Bax,

Anti-BAD antibody(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)를 Blocking solution에 1:1,000 비율로 희석한 후 4℃ 조건하에 24시간 동안 반응 하였다. 이후 TBS-T를 이용하여 15분 간격으로 3회 세척하였다. 이후 Blocking solution에 1:2,000 비율로 희석한 2차 항체 Horseradish Peroxidase -conjugated(HRP-conjugated) anti-rabbit 또는 HRP-conjugated anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)를 1시간 동안 상온에서 반응 시킨 후, TBS-T를 이용하여 15분 간격으로 3회 세척하였다. ECL Kit(Amersham Life Sciences, Arling Heights, IL, USA)을 이용하여 발색을 유도시킨 후 X-ray film(Amersham Hyperfilm™ECL, GE Healthcare Limited, UK)에 감광하여 단백질 발현양을 분석하였다.

8. Statistics

각각의 실험들은 3회 반복 이상으로 실험하였으며, 실험결과는 평균값 ±표준편차로 계산하여 측정하였으며, 대조군 간의 유의성은 One way analysis of varienced(ANOVA)로 검정한 후, Newman-Kleult test로 검정하였다. 모든 자료는 SPSS, PC WINDOWS(Version 10.0, Samsung, The repulic of Korea, Seoul)을 이용하여 실험결과를 분석 처리하였다. $p < 0.05$ 이하인 경우에 실험결과가 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과

1. MTT assay에 의한 Berberine이 구강암 KB 세포 생존율에 미치는 영향

Berberine에 의한 세포 증식 억제능을 알아보기 위하여 구강암 KB 세포와 HNOK에 농도별로 24시간 동안 처리한 후, MTT assay를 수행하였다.

Berberine은 0, 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL의 농도로 24시간 동안 구강암 KB 세포와 HNOK에 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. Fig. 2의 결과를 보면, HNOK에서는 berberine을 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포 독성 효과를 나타내지 않았음을 알 수 있었다. 또한, 구강암 KB 세포에서는 berberine을 처리하지 않은 대조군에 비교하였을 때 0.01μg/mL의 berberine을 처리한 세포는 영향을 미치지 못하였으며, 0.1 및 1.0μg/mL의 추출물을 처리한 세포는 각각 33%, 50%의 세포 억제능을 확인할 수 있었다. 이 결과는 구강암 KB 세포가 berberine의 농도 의존적으로 세포성장 억제 능을 보여줌을 확인할 수 있었다. 특히, berberine이 1.0μg/mL의 농도일 때, 대조군에 비하여 생존 세포수율이 50%에 가까운 항암효과를 보였다.

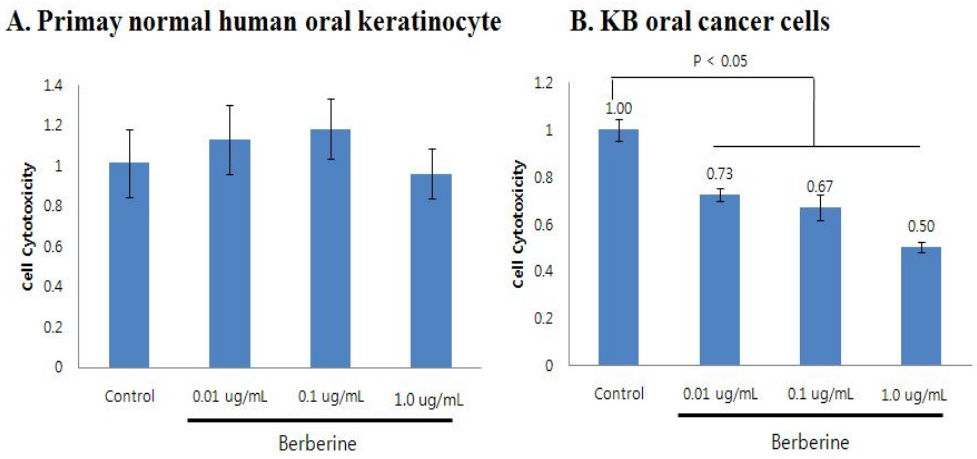

Fig. 2. Berberine induced the cell cytotoxicity on KB oral cancer cell specific as a dose dependent manner. Cells were stimulated with berberine at different concentrations for 24hrs and % viable cells were calculated using MTT assay.

2. Berberine에 의한 구강암 KB 세포 DNA 분절화

Berberine에 의한 구강암 KB 세포의 증식억제가 apoptosis에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 세포사멸의 대표적인 현상인 DNA의 분절화를 보고자 구강암 KB 세포에 0, 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL의 berberine을 시간동안 처리 하여 핵 내·외 DNA를 추출하여 전기영동을 통하여 Fig. 3에서 보는 바와 같이 확인할 수 있었다. 그 결과 berberine을 처리한 세포에서 DNA의 분절화 현상이 나타남을 확인하였으며 이는 apoptosis 에 의해 세포사멸이 유도됨으로써 구강암 KB 세포의 성장을 억제함을 확인 하였다(Fig. 3).

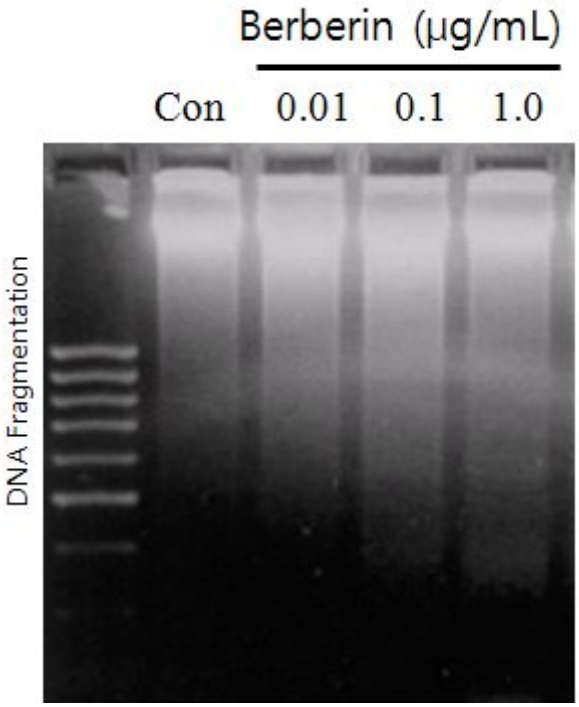

Fig. 3. The cleavage of genomic DNA in KB oral cancer cells stimulated with berberine. Cells were stimulated with berberine at differen concentration for 24hrs. And then, genomic DNA were isolated, Quantification the electronic porosis on 1.2% agarose gel. After that time, genomic DNA WERE observed using a UV transilluminator.

3. Berberine에 의한 Morphological change

1) Hematoxylin-Eosin stain(H&E staining)

Berberine 추출물의 처리에 따른 구강암 KB 세포의 처리 농도 의존적인 증식억제와 연관된 암 세포의 전체적인 형태 변화를 알아보기 위하여 berberine을 각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 4).

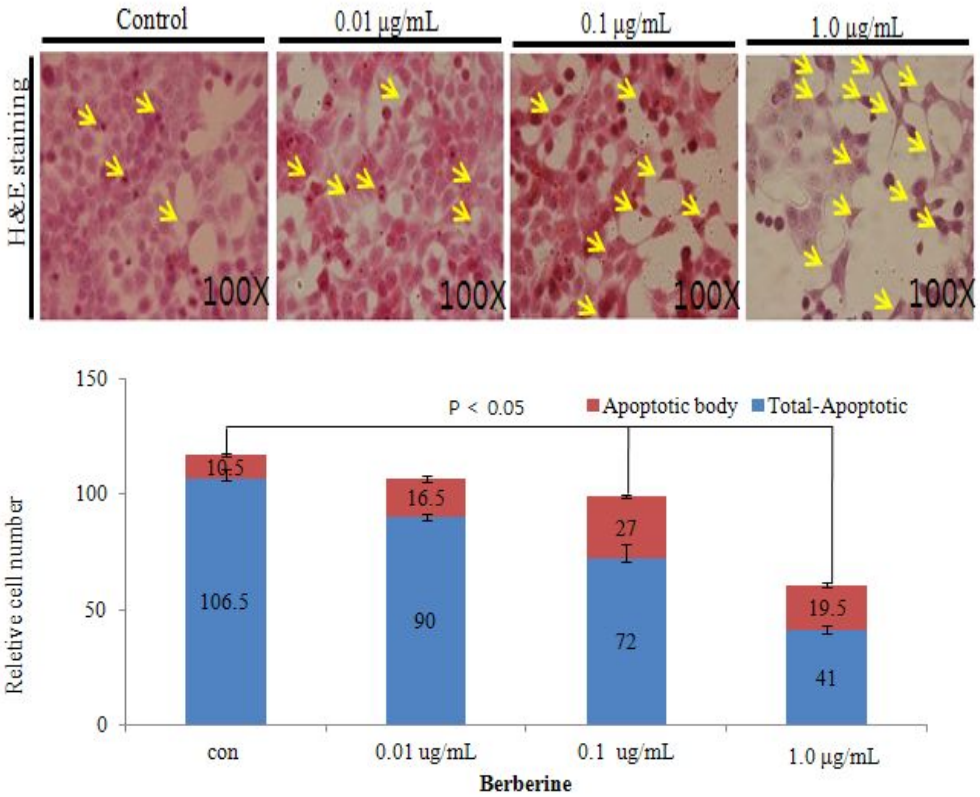

Fig. 4. Berberine decreased the KB oral cancer cells number, changed the morphology, and induced the cell death. After Cells were stimulated with berberine for 24hrs they were immediately fixed with pre-chilled 4% paraformaldehyde and then performed the H&E staining.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 berberine의 농도가 증가함에 따라 세포의 분열 증식은 점차적으로 감소하였으며 세포 사멸을 증가하였다.

Berberine에 노출된 세포들의 형태학적 특징을 광학현미경 하에서 관찰한 결과 세포 사멸에 의한 세포막 외부 용기의 돌출과 응축 현상을 볼 수 있었다. 이러한 세포 증식 억제 현상을 berberine이 구강암 KB 세포의 성장과 분열증식을 억제시키는 증거라고 보인다. 또한 대조군 세포와 같은 수로 분주하여 배양한 세포임에도 불구하고 berberine을 처리한 세포의 밀도는 의존적으로 현저하게 감소하였다. 따라서 구강암 KB 세포의 berberine 농도의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소를 berberine 처리에 따른 생존율 감소와 성장 억제와 부합되는 결과였다.

2) Nucleus condensation

Berberine 처리에 따른 구강암 KB 세포의 성장 억제와 형태적 변형이 apoptosis 유발과 상관성이 있는 지 조사하기 위하여 0, 0.1, 및 1.0μg/mL 의 berberine을 처리한 배지에서 24시간 동안 배양한 구강암 KB 세포를 대상으로 DAPI staining을 통해 핵의 형태학적 변화를 조사하였다.

그 결과, Fig. 4에서처럼 각 농도별 apoptotic body와 KB oral cancer cell 수치를 비교하여 그 비율을 비교한 결과, control의 total cell No.를 100%로 기준으로 하였을 때, 농도가 진해질수록 apoptotic body의 차지 비율은 control에 비하여 그 비율이 증가하였다. 그리고 각 농도별 apoptotic body의 차지비율을 계산하여 본 결과, control은 10.9%, 0.01μg/mL은 22.4%, 0.01μg/mL은 60.0%, 0.1μg/mL은 90.7%로 점점 apoptotic body의 dose가 증가함을 알 수 있었다.

그리고 berberine이 처리된 구강암 KB 세포는 대조군 세포에서는 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body가 나타났다(Fig. 5).

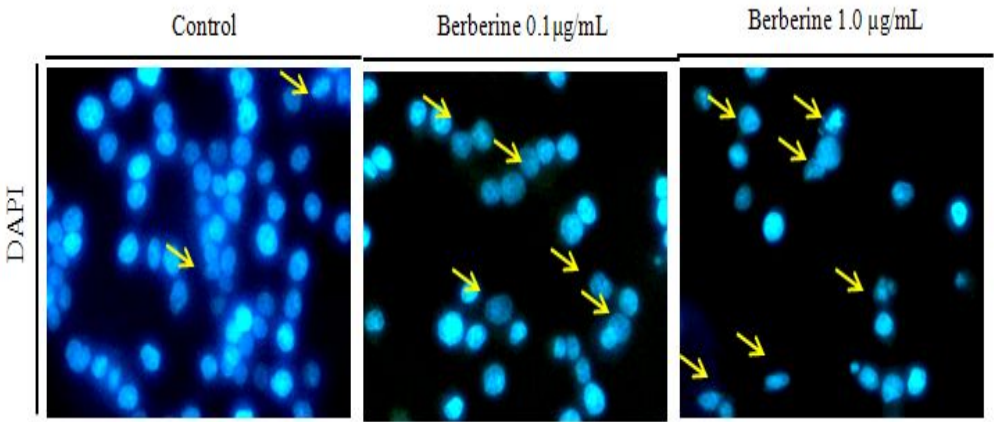

Fig. 5. Nucleus condensation, signally was observed on KB oral cancer cells stimulated with berberine. Berberine induces the apoptotic KB oral cancer cells were incresed by Berberine concertration.

또한 berberine의 농도 의존적으로 구강암 KB 세포의 밀도는 감소하였으며, apoptotic body의 출현 빈도가 크게 증가하였다. 이것은 Fig. 2에 나타난 생존율의 저하 현상과 밀접한 연관이 있다.

4. Berberine에 의한 caspase의 활성화

구강암 KB 세포에서 berberine에 의한 apoptosis의 대표적인 신호전달 factor인 caspase-3의 activity를 촬영하였다. 이러한 berberine에 의한 caspase-3 의 기질인 Phiphilux G_1G_2를 이용하였다. 0, 0.1 및 1.0μg/mL의 berberine을 동일한 방법으로 24시간 동안 처리한 후, Phiphilux G_1G_2를 세포에 첨가하여 Inverted fluorosocopic microscope(Eclipse TE200; Nikon Instruments, Melville, NY, USA)으로 관찰한 결과 berberine을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 세포의 형태가 변하였으며, berberine 처리에 의한 caspase의 활성화로 첨가된 기질이 형광을 뚜렷하게 나타냄을 확인 할 수 있었다(Fig. 6).

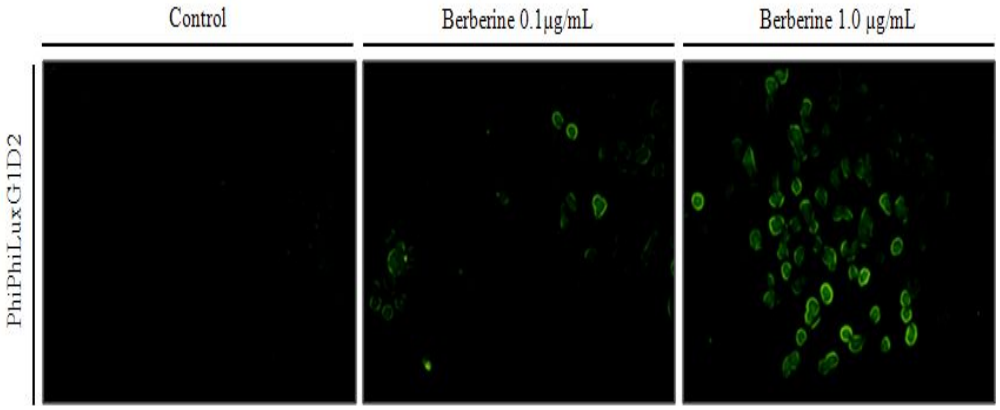

Fig. 6. Activated caspase-3 were significantly observed on the KB oral cancer cells stimulated with berberine. Berberine induces the apoptotic KB oral cancer cells were incresed by Berberine concertration.

대조군에서는 caspase의 활성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

5. Berberine에 의한 세포사멸 기전 분석

구강암 KB 세포에서 berberine이 구강암 KB 세포의 성장억제를 일으키는 기전을 규명하기 위해 내인성과 외인성 세포사멸 경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3, -8, 및 -9의 변화를 확인하였다.

먼저 조사된 TRAIL 은 Death Ligand 로 이에 상응하는 receptor 에 반응함으로써 caspase의 활성과 연관되어 단편화가 일어나는 것을 알 수 있다.

caspase는 세포의 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 인자로서 세포내의 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의해 활성화 된다. Berberine을 다양한 농도(0, 0.1 및 1.0μg/mL)로 처리한 구강암 KB 세포에서 여러 인자들의 발생 정도를 측정하기 위하여 1차 항체 house keeping gene인 GAPDH, anti-cleaved caspase-3, anti-Cleaved caspase-8, anti-cleaved capsase-8, PARP, Anti-TRAIL, Anti-Bcl-2, Anti-Bax, Anti-BAD antibody(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)과 2차 항체 HRP-conjugated anti-rabbit 또는 HRP-conjugated anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)를 이용하였으며, 실험의 정확성을 알아보기 위하여 house keeping gene인 GAPDH 일차 항체를 사용하였다. 특히 PARP는 일반적으로 세포자멸사가 유도될 때에는 핵 내에서 활성화된 PARP에 의하여 매개되어지며, 이러한 PARP의 활성화는 DNA 분절과 chromosome condensation을 유도하면서, 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. PARP의 활성화에 관여하는 상위 단백질은 주로 caspase로서, Fig. 7 의 결과에서 보여주듯이 활성화된 caspase-8, -9, 및 -3의 활성이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. 이와 연관된 caspase의 활성으로 인해 단백질이 부분적으로 잘리는 단백질 분해가 일어나게 되어 단편화가 berberine 농도 의존적으로 일어난다.

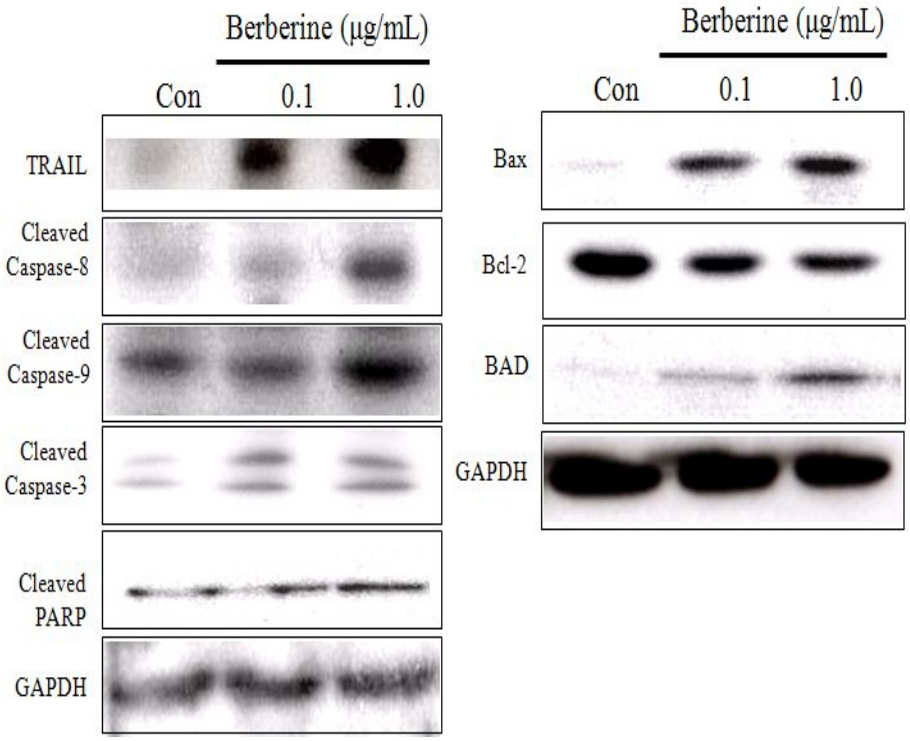

Fig. 7. Berberine activate the caspase dependant apoptotic pathway in KB oral cancer cells. Western blot analysis of TRAIL, Cleaved Caspase-8, -9, -3, PARP, house keeping gene GAPDH, Bcl-2, Bax, BAD in KB oral cancer cells. The diagram demonstrates all the possible genes altered by berberine in KB oral cancer cells. The cells were treated with 0, 0.1, 1.0μg/mL of berberine.

또한 apoptosis 현상을 유발하는 대표적인 유전자인 Bcl-2 family에 속하는 유전자 중 Bcl-2는 apoptosis 유발을 억제하는 anti-apoptotic 분자이며, Bax는 apoptosis 유발을 촉진하는 pro-apoptotic 분자이다.

Bax와 Bcl-2는 dimer를 이루고 있는 Bax의 발현이 증가하고 Bcl-2 의 발현이 감소하면 apoptsis가 유발될 수 있는 것으로 알려져 있다. Fig. 7의 결과와 같이 Bad의 발현이 증가하면서 Bcl-2 단백질의 발현이 berberine의 처리 농도 의존적으로 확연히 감소되었고, Bax 단백질의 발현은 berberine의 처리 농도 의존적으로 증가하였다.

그 결과, Fig. 8과 같이 berberine을 1.0μg/mL의 농도로 12시간 처리한 것에 비하여 24시간 처리한 KB세포에서 더 많은 apoptosis를 관찰할 수 있었으며, 이는 berberine이 시간 의존적으로 KB세포에 작용하였다는 것을 확인할 수 있었다.

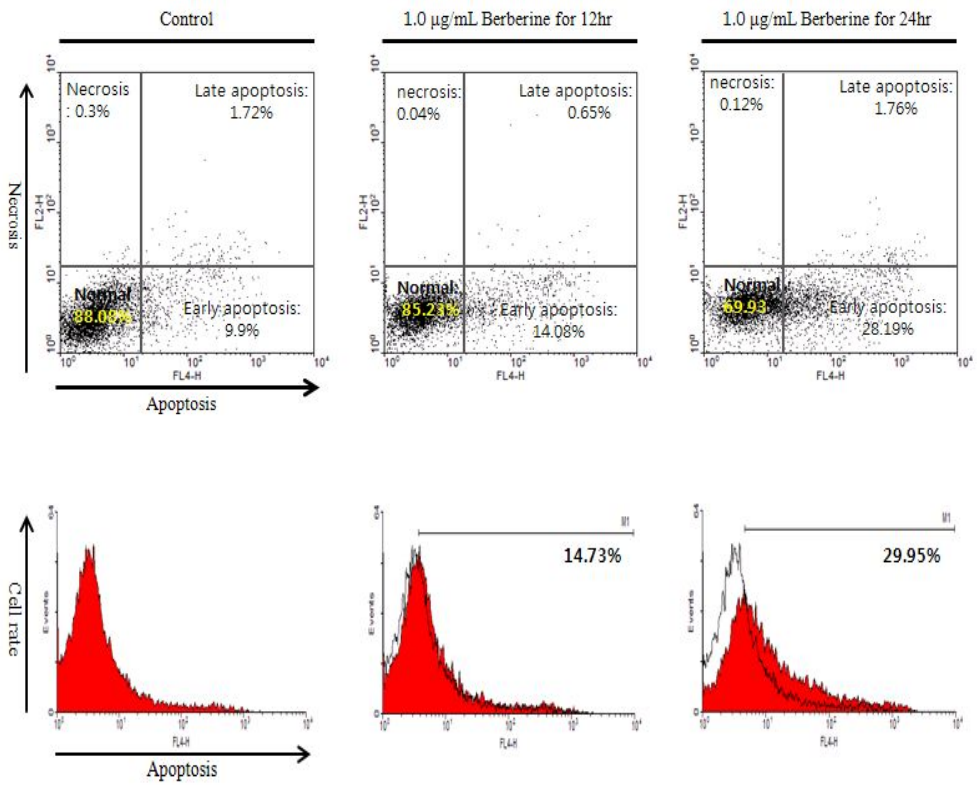

Fig. 8. Berberine increases the apoptotic population of KB oral cancer cells. To identify the berberine-induced KB oral cancer cells apoptosis, FACS analysis were performed by Annexin-V and PI staining. KB oral cancer cells were cultured in complete medium for 24hrs, and stimulated with 1.0μg/mL berberine(IC_{50} concentration) for 12 and 24 hrs. After stimulation, the cells were analyzed by flow cytometry.

Ⅳ. 고찰

세포자멸사는 외부의 자극이나, 내적인 변화에 의해서 원래 계획되어 있던 세포사멸의 경로가 활성화되어 그 세포가 자발적으로 죽음으로써 개체의 항상성 유지와 손상된 세포의 제거를 효율적으로 수행하는 자발적이고 능동적인 죽음의 기전이다(Geoffery M Cooper, 2000). 세포자별사가 여러 가지 원인에 의해 통제되지 못할 경우, cancer, auto-immune lymphoproliferative syndrome, AIDS, ischemia와 Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease 등과 같은 neurodegenerative disease, 심혈관질환, 당뇨 등을 유발하기도 한다.

구강암을 치료할 때 각 암세포의 항암제에 대한 감수성이 각기 다르다는 것을 생각하면 항암활성이 보고된 천연식물의 추출물에 대하여 구강암에 대한 항암효과를 검토하는 것이 의미 있는 일이라 할 수 있을 것이다.

우리나라에서 오랜 기간 동안 식용으로 사용되어 오면서 심각한 부작용을 나타내지 않는 전통의 천연식물 가운데 여러 효능을 가진 berberine을 선정하였는데, 황련(*Costidis Rhizoma, Coptis japonica Makino*)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초목으로서 berberine에 내재하는 기능성 물질들, 특히 항염증효과에 대해 연구자들의 관심이 한층 더 높아졌다. 본 연구에서는 주변에서 흔히 구할 수 있는 berberine을 이용하여 구강암 KB 세포의 세포증식 억제 및 세포사멸에 의한 분자적 기전에 대해 연구 하였다.

시료의 세포 생존율 측정을 위한 방법으로 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 berberine의 구강암 KB 세포에 대한 항암활성은 24시간 동안의 berberine에서 처리한 세포 생존율 측정 결과, 0.01μg/mL 농도에서는 27%, 0.1μg/mL 농도에서는 33%, 1.0μg/mL 농도에서는 50%의 세포 활성도를 보여 효과가 있음을 확인하였다. 이 같은 결과는 향후 *in vivo*에서의 실험을 통하여 *in vivo*에 대한 항암활성을 연구할 필요가 있다고 생각된다. 그러나 구강암 세포주 뿐만 아니라 여러 암 세포주에 대한 실험도 지속적으로 진행되어야 할 것이다.

또한, berberine의 구강암 KB 세포 증식 억제 효과가 apoptosis 유도 작용에 의한 것인지 알아보기 위해 우선 DNA 분절을 확인해 보았다(Fig. 3).

DNA 분절 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어 nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰할 수 있다 (Zimmermann KC *et al.,* 2001 ; Hyun *et al.,* 2008). Berberine을 0, 0.01, 0.1 및 1.0μg 농도로 구강암 KB 세포에 24시간 동안 처리하여 DNA ladder를 확인한 결과, Fig. 3에서와 같이 berberine 농도 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL 모두에서 뚜렷한 DNA ladder를 관찰 할 수 있었다.

Berberine 추출물의 처리에 따른 구강암 KB 세포의 처리 농도 의존적인 증식억제와 연관된 암 세포의 전체적인 형태 변화를 알아본 결과, Fig. 4와 같이 berberine의 농도가 증가함에 따라 세포의 분열 증식은 점차적으로 감소하였으며 세포 사멸을 증가하였다. 그리고 berberine이 처리된 구강암 KB 세포는 대조군 세포에서는 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

그리고 Phiphilux G_1G_2를 이용하여 apoptosis의 대표적인 신호전달 factor인 caspase-3의 activity를 관찰한 결과, berberine을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 세포의 형태가 변하였으며, berberine 처리에 의한 caspase의 활성화로 첨가된 기질이 형광을 뚜렷하게 나타냄을 확인 할 수 있었다. 대조군에서는 caspase의 활성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다(Fig. 6).

또한 결과를 통해서 berberine의 구강암 KB 세포 증식 억제가 전형적인 apoptosis의 세포사멸에 의한 결과임을 확인하였다. 이러한 apoptosis의 분자유전학적 기전을 확인하기 위해 Western blotting을 하여 caspase-8, -9, 및 -3의 활성이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. Fig. 7의 결과와 같이 Bad의 발현이 증가하면서 Bcl-2 단백질의 발현이 berberine의 처리 농도 의존적으로 확연히 감소되었고, Bax 단백질의 발현은 berberine의 처리 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 결과로 berberine을 구강암 KB 세포에 처리하면 apoptosis의 특징적인 경로에 의해 세포의 증식억제 및 세포사멸 과정을 유도하는 것으로 생각되었다(Fig. 9).

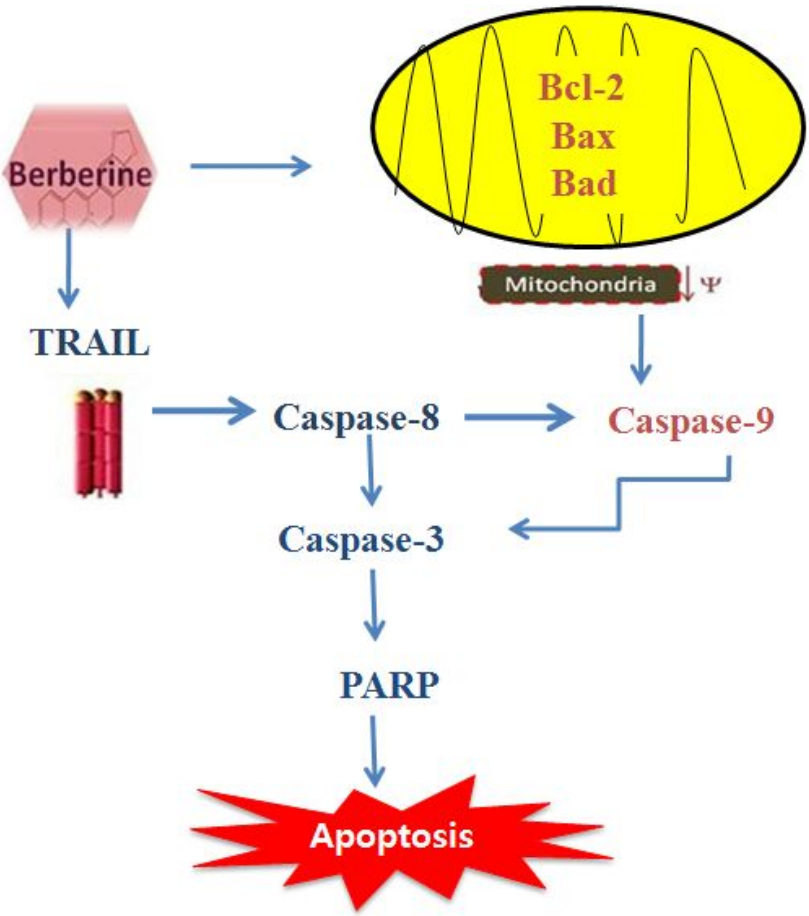

Fig. 9. Mechanism of inhibition of oral cancer cells by berberine through caspase dependent pathway.

결론적으로, 이 연구에서는 기존의 알려진 항암제보다 안전하고 뛰어난 항암 물질을 개발하고자 berberine의 효능을 구강암 KB 세포에 적용하여 연구하였다. 그 결과 구강암 KB 세포에 berberine 1.0μg/mL농도로 처리하게 되면 세포의 증식을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 apoptosis라는 세포사멸을 유도해 효과적인 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결론

황련(*Costidis Rhizoma, Coptis japonica Makino*)은 주로 한국에서 항균제, 항염증치료에 많이 사용되어지고 있다. 본 연구에서는 berberine을 이용하여 구강암 성장에 미치는 영향을 조사하고 그 기전을 밝히기 위해 연구를 수행하였다.

1. HNOK에서는 berberine을 처리하였을 때, 모든 농도에서 세포 독성 효과를 나타내지 않음을 확인하였다.

2. 구강암 KB 세포에 0.01, 0.1 및 1.0μg/mL의 berberine을 처리하였을 때 각각 27%, 33%, 50%의 세포 수 감소, apoptotic body의 형성, morphological 변화 등을 확인하였다.

3. 특히, berberine이 1.0μg/mL의 농도일 때, 대조군에 비하여 생존 세포수율이 50%로 나타남에 따라 berberine이 IC_{50}임을 확인하였다.

4. Berberine을 처리한 구강암 KB 세포에서 Nucleus condensation와 caspase-3의 activation의 apoptosis의 특이적인 대표 현상을 관찰하였다.

5. Berberine의 농도가 증가할수록 구강암 KB 세포의 apoptotic population이 증가되면서 더불어 death ligand로 보여지는 TRAIL이 증가하는 것을 볼 수 있었다.

6. 구강암 KB세포에서 TRAIL이 증가될수록 intrinsic과 extrinsic apoptosis pathway에 berberine의 activate가 발현되었다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, berberine은 구강암 KB 세포에 대한 항암작용이 높아 구강암을 예방하거나 치료할 목적으로 이용될 가치가 높은 것으로 사료되었다.

Ⅵ. 참고문헌

1. 노석선 : 원색안이비인후과학. 대전 ; 주민/ 2003:656-7.

2. Bary F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM : Estimated of cancer indicence and mortality in Europe in 1995. Euro J cancer. 2002;38:99-166.

3. Vecchia CL, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E : Epidemiology and prevention of Oral Cancer. Oral Oncology. 1997;33:302-12.

4. Liesellyn CD, Johnson NW : Warnakulasuriya KAAS. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. Oral Oncology. 2001;37:401-18.

5. Liewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya S : An annalysis of risk factors for oral cancer in young people ; a casecontrol study. Oral Oncology. 2004;40:304-13.

6. Chandu A, Sun KCV, De Silva RN, Smith ACH : The assessment of quality of life in patients who have undergone surgery for oral cancer: Apreliminary report. Oral Maxillofac Surg. 2005;63:1606-12.

7. Geoffrey M Copper. 세포학. 서울:한우리. 2005;599-636.

8. 김철현, 이경희, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수, 유철구 : 폐암 세포에서 proteasome inhibitor에 의한 apoptosis의 기전. 결핵 및 호흡기질환. 2003;54(4):403-14.

9. Elmore S : Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol

Pathol. 2007;35(4):495-516.

10. Nagata S : Fas-mediated apoptosis. Adv Exp Med Bio. 1996;406:119-24.

11. Duke RC, Ojcius DM, Young JD : Cell suicide in health and disease. Sci Am. 1996;275(6):80-7.

12. 김대곤 : 위장관 질환과 세포사멸. 대한소화기학회지. 2002;39:79-87.

13. Jana S, Paliwal J : Apoptosis: potential therapeutic targets for nes drug discovery. Curr Med Chem. 2007;14(22):2369-79.

14. Hunter AM, Laccase EC, Komeluk RG : The inhibitors of apoptosis(IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 2007;12(9):1543-68.

15. Debatin KM : Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. Cancer Immunol Immunother. 2004:53(3):153-9.

16. Ramos S : Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. J Nutr Biochem. 2007;18(7):427-42.

17. Hunter AM, Laccase EC, Komeluk RG : The Inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis. 2007;12(9):1543-68.

18. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW : Apoptosis; a link between cancer genetics and chemotherapy. Cel.. 2002;108(2):153-64.

19. Herr I, Debatin KM : Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood. 2001;98(9):2603-14.

20. Kaurmann SH, Earnshaw WC : Induction of apoptosis by cancer dhemotherapy. Exp Cell Res. 2000;256(1):42-9.

21. 김경주 : 황련이 Streptococcus Mutans 10449의 성장 및 pH변화에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1993;8:111-118.

22. 윤광로 : 황련의 항염증효과. 2009.

23. 안덕균 : 한국본초도감. (주)교학사. 2003;128.

24. 정상원 : Involvement of caspase-11 in thapsigargin induced the marophage cell death. 충남대학교. 2004.

25. 이종수, 김여갑 : 인삼사포닌의 구강암세포에 대한 항암활성 및 정상세포의 증식과 보호효과에 관한 연구, 경희의학, 1999;20(2):117-128.

26. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T : Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: A potential mechanism for inflammatory angiogenesis, FEBSL, 1995;372:83-87.

27. Zimmer KC, Bonson C and Green DR : The machinery of programmed cell death. Pharmacol. Ther, 2001;92:57-70.

28. Hyun JH, Kim E, Kang JI, Kim SC, Woo ES and Kang HK : Apoptosis Induction of HL-60 Keukemia cells by extract of crinum asiaticum. J. Pharm.Soc. Korea, 2008;52:1-6.