

## 머위로부터 분리한 apoptosis 조절물질

이충환 · 정명철 · 이호재 · 고영희  
생명공학연구소 효소저해연구실

### An Apoptosis Regulator isolated from *Petasites japonicum*.

Choong-Hwan Lee, Myung-Chul Chung, Ho-Jae Lee and Yung-Hee Kho  
Enzyme Inhibition Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

#### Abstract

During the screening of inhibitors of caspase-3 induction in U937 human monocytic leukemia cells from natural sources, *Petasites japonicum*, which showed a high level of inhibition was selected. The inhibiting compound was purified from the methanol extract by Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxopropyl]ester, petasiphenol, by spectroscopic methods of UV, EIMS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HMBC. It showed a caspase-3 inducing inhibitory activity at 8 µg/ml of IC<sub>50</sub> value with DNA fragmentation inhibition in U937 human leukemia cells. It also showed a free radical scavenging ability of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

Key words : caspase, apoptosis, *Petasites japonicum*

#### 서 론

Apoptosis는 necrosis와는 달리 세포 내에 본래부터 존재하던 자살기작이 여러 가지 세포 내부, 외부의 자극에 의하여 활성화되어 세포가 계획된 대로 스스로 죽는 현상이다. 이러한 apoptosis의 특징으로는 형태학적으로 세포막의 blebbing, 세포질과 핵의 condensation, 세포가 조각나면서 apoptotic body가 형성되는 등의 변화가 발생하고, 생화학적으로는 염색체 DNA가 우선 50-300 kbp정도의 큰 조각으로 잘라진 이후에 200 bp의 정수배 크기의 절편으로 잘려져 apoptosis의 전형적인 특징으로 쓰이는 DNA fragmentation 현상이 일어난다. Apoptosis에서는 necrosis와는 달리 죽어 가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포들에 손상을 주지 않는다<sup>(1-3)</sup>.

Caspase는 아미노산배열의 상동성에 따라 추정된 진화계통수에 의하여 ICE, CPP32, ICH-1을 중심으로 하는 세 가지 형태로 나눌 수 있으며, CPP32의 활성화 경로가 apoptosis에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다

다. ICE inhibitor인 CrmA가 apoptosis를 억제한다는 보고가 있어 이들 protease의 활성이 apoptosis유도에 필수적인 것으로 나타났다<sup>(4,5)</sup>. 세포사 실행인자로서 caspase family의 활성화가 세포사에 필수적인 것에는 의심의 여지가 없지만 실제의 세포사는 후기과정인 DNase 등의 endonuclease의 활성화에 의한 DNA절편화, 핵응축, 세포골격의 붕괴라는 여러 가지 현상을 거쳐 종료된다<sup>(6,7)</sup>.

Apoptosis와 관련된 질병은 apoptosis 저해와 유도에 의해 각각 야기되어진다. Apoptosis 저해와 관련된 질병은 암, 자가면역 질환, 바이러스 감염 등을 들 수 있으며<sup>(8-11)</sup>, apoptosis의 증가와 관련된 질환은 AIDS, 신경관련질환(Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, retinitis pigmentosa, cerebellar degeneration), 허혈성 질환(뇌졸중, myocardial infraction, reperfusion injury) 그리고 알콜 등 독성물질에 의한 간질환 등이 있다<sup>(12-16)</sup>.

머위(*Petasites japonicum*)는 제주도, 울릉도, 남부지방, 중부지방의 습지에서 자생 또는 재배되는 다년생 초본 식물로 식용, 관상용, 약용(종창, 보신, 수종, 식욕촉진) 등의 용도로 사용되어왔다<sup>(17)</sup>.

본 연구에서는 apoptosis 조절물질을 탐색하고자 apoptosis 유도물질의 하나인 etoposide를 이용하여 U937세포주의 apoptosis를 유도한 후 apoptosis 정도를

Corresponding author : Yung-Hee Kho, Enzyme Inhibition Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. BOX 115, Yusong Taejon 305-600, Korea.  
Tel : 82-42-860-5350  
Fax : 82-42-860-4595  
E-mail : yhkho@mail.kribb.re.kr

caspase-3 활성으로 측정하는 시스템을 확립하였으며, 이를 이용하여 저해활성을 나타내는 머위를 선별한 후 저해물질을 정제하고, 구조결정 및 저해활성을 조사하였는 바 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 시약

실험에 사용한 무기염류 및 일반용매는 시약특급을 사용하였고, 배양에 사용한 배지류는 주로 Difco(USA) 제품을 사용하였다. 물질분리 및 확인에 사용한 silica gel은 Merck사(Germany)의 silica gel 60(63-200  $\mu\text{m}$ )을, TLC plate는 Merck TLC plate silica 60F254를 사용하였고, HPLC column은 YMC사(Japan), Phenomenex 사(USA)의 제품을, Sephadex LH-20은 Pharmacia (Sweden) 제품을 각각 사용하였다. 각 정제단계 및 column chromatography에 사용된 부탄올, 에탄올, 에틸 아세테이트 등의 용매는 일반시약을, HPLC 용매는 Baxter(Burdick & Jackson, USA), Merck 제품을 사용하였다. NMR용  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$  등은 Aldrich사(USA) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지류는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, caspase assay에 사용된 기질 및 저해제 등은 Enzyme System Products(USA) 제품을 사용하였다.

### 공시재료

대전시 유성에서 구입한 머위를 건조한 후, 메탄올로 추출하여 20 mg/ml의 농도로 DMSO 녹여 apoptosis 저해활성을 측정하였다.

### 활성물질의 분리정제

저해물질을 Sephadex LH-20(Pharmacia LKB, Sweden), PLRP-s HPLC column(300 $\times$ 7.5 mm, Phenomenex, USA), ODS-AM HPLC column(250 $\times$ 4.6 mm, YMC Co., Japan) 등을 사용하여 분리하였다. HPLC는 Hitachi사(Japan)의 L-6200 intelligent pump, L-6000 pump, L-4000 UV detector를 사용하였다.

### 이화학적 특성 및 구조분석

UV-visible 스펙트럼과 FT-IR(Fourier-Transform Infrared) 스펙트럼은 각각 Shimadzu UV-260(Japan)과 Laser Precision Analytical IFX-65s(USA)를 사용하여 측정하였다. Mass 스펙트럼은 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA), EI-MS(electron impact

mass spectrometry, Jeol JMS-DX303, Japan) 및 CI-MS(chemical ionization mass spectrometry, Jeol JMS-HX 110A/110A, Japan)를 사용하여 측정하였다.

NMR 스펙트럼은 Varian UNITY 300(USA), JEOL JNM-A 400(Japan), Bruker AMX FT500(USA) 그리고 JEOL JNM-A600(Japan)를 이용하여 측정하였다. 화학이동 값은 ppm으로 나타내었고, 짝지움 상수(*J* value)는 Hz로 나타내었다. NMR 신호의 표기는 s=singlet, d=doublet, dd=doublet of doublets, ddd=doublet of doublet of doublets, t=triplet, m=multiplet 등으로 표시하였다. NMR 실험은 각 시료를  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  등의 용매로 녹여 5 mm NMR tube에서 측정하였으며, 각 용매의 피이크를 내부 표준물질로 하거나 TMS(tetramethylsilane)의 피이크를 기준으로 하여 화학이동을 측정하였다.

### Caspase-3 활성 발현유도 및 저해물질의 탐색

Caspase 유도물질 탐색은 세포를 배양한 plate에 각각 시료를 처리하고 일정시간 후 세포를 파쇄하여 유리된 효소의 활성을 측정함으로써 행할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 caspase 유도물질 탐색법을 응용하여 caspase 유도 및 유도저해 물질을 동시에 탐색하는 방법을 고안하고자 하였다.

U937 인체 백혈병 세포와 96-well microplate를 이용하여 apoptosis 조절 물질 탐색계를 확립하고자 하였다. Apoptosis 유도물질의 하나인 etoposide의 농도와 처리 시간을 각각 달리하며 U937 세포의 apoptosis를 유도하고, cell lysate의 caspase-3 활성과 cell의 상태를 현미경으로 검정하였다. 그 결과 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 etoposide를 시료와 함께 5시간동안 처리하여 apoptosis를 유도시켰다.

이러한 조건을 바탕으로 sample을 처리하고 etoposide로 apoptosis를 유도한 후 5시간 후에 현미경으로 cell의 모양을 관찰하여 apoptosis 여부를 1차 판정하였으며, 세포를 harvest 한 후 lysis buffer를 처리하여 얻은 lysate를 이용하여 caspase-3의 활성을 Z-DEVD-AFC (Z-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethyl coumarin)를 기질로 측정하였다<sup>(18)</sup>. Etoposide를 처리한 경우 유도된 caspase 활성과 비 처리시의 활성을 기준으로 각 시료의 저해 활성을 환산하였으며, pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)를 표준 caspase-3 유도 저해제로 사용하였다<sup>(19)</sup>.

### Caspase-3 활성 측정

Caspase 활성은 형광합성 기질을 사용하여 측정하였

다. 미생물 배양액을 에틸아세테이트로 추출한 후 DMSO에 녹여 assay에 이용하였으며, 세포 lysate를 효소원으로 사용하였다. 시료 1  $\mu$ L, 5 mM의 기질(Z-DEVD-AFC)을 100  $\mu$ L의 buffer [100 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-2(2-ethanesulfonic acid), pH 7.5, 10 mM dithiothreitol(DTT), 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1% BSA at 25°C]와 혼합하여 25°C에서 반응시켰다. AFC의 생성은 spectrofluorometer (Perkin-Elmer LS-50B)를 사용하여 측정하였다<sup>(18)</sup>.

#### DNA fragmentation assay

U937 human leukemia 세포를 10% FCS가 포함된 RPMI 1640 배지에  $3 \times 10^5$  cells/mL 농도로 33 mm dish에 시료와 함께 6시간 배양한 후, 2000 rpm, 5분간 원심분리하여 cell을 회수하였다. 20  $\mu$ L의 lysis buffer(20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.8% sodium lauryl sarcosinate)를 넣고 tip 끝을 잘라 stirring 하였다. RNase A/T1 cocktail(1 mg/mL) 10  $\mu$ L를 넣고 10분간 37°C에서 incubation한 후 proteinase K(20 mg/mL) 10  $\mu$ L를 넣어 50°C에서 2시간 incubation 하였다. Loading buffer 5  $\mu$ L를 넣어 2% agarose gel에 80V로 전기영동하였다.

#### DPPH 라디칼 소거활성

항산화 활성의 지표로서 free 라디칼 소거활성 측정법의 하나인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)법을 이용하여 라디칼 소거활성을 측정하여 항산화활성을

조사하였다. 즉 에탄올에 녹인 DPPH 용액 ( $1.5 \times 10^{-4}$  M) 1 mL에 시료 10  $\mu$ L를 첨가한 후 20분간 방치한 다음 517 nm에서의 광흡수도 감소 정도를 측정하였다.

### 결과 및 고찰

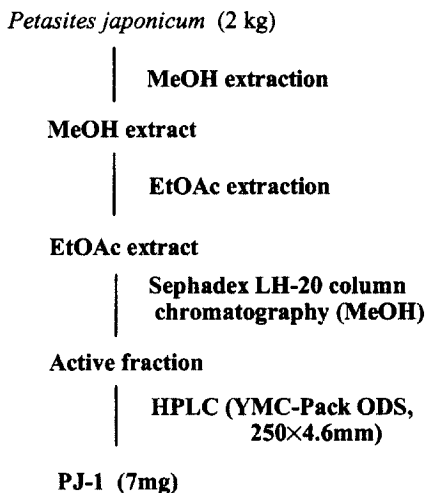
머위(*Petasites japonicum*)로부터 caspase-3 유도 저해물질의 분리

머위로부터의 활성물질 분리 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 머위 2 kg을 실온에서 메타올로 2 회 추출하였다. 여과한 메타올 추출액을 감압농축한 후 증류수에 현탁하여 에틸아세테이트로 추출하였다. 추출물을 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 각 fraction의 caspase 유도저해 활성을 측정하였다. 활성분획을 모은 후 HPLC(YMC-Pack ODS AM, 250  $\times$  4.6 mm, UV 220 nm)를 통해 PJ-1(7 mg)을 순수분리하였다.

#### PJ-1의 이화학적 성질 및 구조분석

PJ-1은 UV  $\lambda$ (MeOH) 218, 300, 329 nm에서 흡수 피크를 나타내었다. ESI-MS 분석 결과  $m/z$  343에서 (M-H)<sup>+</sup> 피크가 관찰되어 분자량 344로 확인되었다.

PJ-1에 대한 <sup>13</sup>C NMR data 분석 결과(Table 1) 18 개의 carbon peaks가 관찰되었으며, <sup>1</sup>H, HMQC 및 DEPT 분석에 의하여 2개의 CH<sub>2</sub>(46.24, 68.48 ppm),



**Table 1.** <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and HMBC NMR data of an apoptosis inhibitory compound (PJ-1) from *Petasites japonicum* in CD<sub>3</sub>OD

Position	<sup>1</sup> H(ppm, J)	<sup>13</sup> C(ppm)	HMBC <sup>a</sup>
1		127.59	
2	7.06(1H, s)	115.20	C-3, C-4, C-6, C-7
3		146.78	
4		149.72	
5	6.80(1H, d, 8.1)	116.50	C-1, C-3, C-4
6	6.96(1H, d, 8.1)	123.14	C-2, C-4, C-7
7	7.68(1H, d, 15.84)	147.79	C-1, C-2, C-6, C-9
8	6.31(1H, d, 15.84)	114.16	C-1, C-9
9		168.23	
1'	4.84(2H, s)	68.48	C-9-C-2'
2'		204.53	
3'	3.62(2H, s)	46.24	C-2', C-1'', C-2'', C-6''
1''		126.01	
2''	6.68(1H, s)	117.60	C-3', C-4', C-6''
3''		146.49	
4''		145.58	
5''	6.73(1H, d, 7.98)	116.54	C-1'', C-3''
6''	6.56(1H, d, 8.04)	121.99	C-3', C-2'', C-4''

<sup>a</sup>Carbon resonances that were long-range correlated with protons.

**Fig. 1.** Isolation procedure of an apoptosis inhibitory compound (PJ-1) from *Petasites japonicum*.

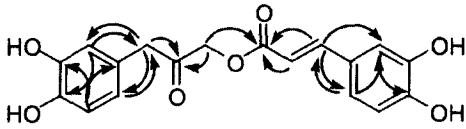


Fig. 2. C-H long range correlation observed by HMBC NMR data of an apoptosis inhibitory compound (PJ-1) from *Petasites japonicum* in CD<sub>3</sub>OD.

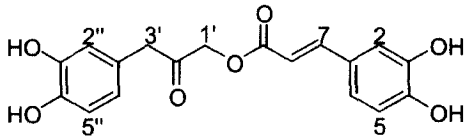


Fig. 3. Chemical structure of an apoptosis inhibitory compound (PJ-1) isolated from *Petasites japonicum*.

Fig. 4. Effects of PDTC and PJ-1 on the caspase-3 inducing activity treated with 10 µg/mL etoposide in U937 human leukemia cells.

114.16~147.79 ppm 사이에 8개의 CH 그리고 168.23, 204.53 ppm에서 관찰된 2개의 carbonyl을 포함하여 8개의 사차탄소 signal이 관찰되었다. <sup>1</sup>H-NMR data로부터(Table 1) 두 개의 mono-substituted catechol moieties [6.56 ppm (*J*=8.04), 6.68 ppm, 6.73 ppm (*J*=7.98), 6.80 ppm (*J*=8.1), 6.96 ppm (*J*=8.1), 7.06 ppm]와 한 개의 trans double bond [6.32 ppm (*J*=15.84), 7.68 ppm (*J*=15.84)] 그리고 두 개의 methylenes이 관찰되었다. HMQC data로부터 C-H chemical shift assign을 확인하였으며, HMBC data로부터(Fig. 2) long-range C-H correlation을 확인한 결과 그 구조를 petasiphenol, [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxopropyl]ester로 동정하였다. Petasiphenol은 Iriye등<sup>(19)</sup>에 의해 bio-antimutagen으로 보고된 바 있다(Fig. 3).

PJ-1의 생물활성

PJ-1(petasiphenol)은 U937 human leukemia cell에서 etoposide 10 µg/mL에 의해 5시간 동안 유도된 caspase

Fig. 5. Electrophoretic DNA analysis. U937 cells were treated with 20 µg/ml etoposide in the presence of various concentrations of PJ-1 or PDTC for the times indicated.

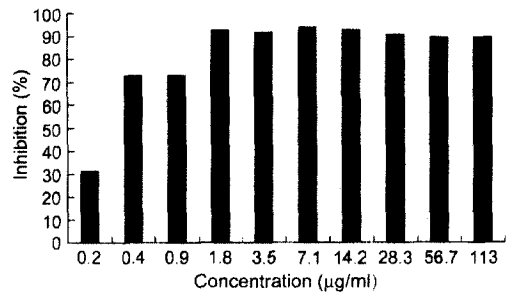


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of an apoptosis inhibitory compound (PJ-1).

-3 활성을 농도 의존적으로 저해하였으며, IC<sub>50</sub> 값은 8 µg/mL이었다(Fig. 4). Petasiphenol의 caspase-3 유도 저해활성은 본 실험에 표준시료로 사용된 pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)와 유사한 활성을 나타내었다. PJ-1의 caspase-3 유도저해활성이 apoptosis에 미치는 영향을 확인하기 위해 DNA fragmentation assay를 실시하였다(Fig. 5). PJ-1은 10 µg/mL의 etoposide에 의해 5시간동안 유도된 U937 세포의 DNA fragmentation을 농도 의존적으로 저해하여 apoptosis를 저해하는 것으로 확인되었다.

항산화 활성 검색 결과, DPPH법에 의한 radical 생성에 대한 IC<sub>50</sub>값이 약 0.3 µg/mL로 매우 우수하였으며, 농도 의존적인 저해 활성을 나타내었다(Fig. 6).

항산화 활성과 apoptosis 조절과의 상관성은 많은 연구결과가 보고되었다. Verhaegen 등<sup>(20)</sup>은 human HL-60 Leukemia cell에서 항산화제에 의해 apoptosis가 저해된다고 보고하였으며, Tsai 등<sup>(21)</sup>은 vascular smooth muscle cells에서 PDTC(pyrrolidinedithiocarbamate),

NAC(N-acetylcystein)등의 항산화제가 apoptosis를 유도하는 것으로 보고하는 등 apoptosis 조절활성은 항산화활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있다<sup>(22)</sup>. 이러한 결과를 바탕으로 petasiphenol의 apoptosis 저해활성은 강력한 항산화 활성에 기인하는 것으로 추정되어지며, 그 작용기작에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이번 실험에 의해 분리된 petasiphenol은 머위에서 이전에 분리보고된 물질이나, 머위의 apoptosis 저해 및 항산화 활성을 나타내는 성분으로는 본 실험에 의해 처음 밝혀졌다. Petasiphenol은 0.4 µg/mL의 농도에서 72%의 radical 소거활성을 나타내어 매우 높은 활성을 보여주었다. 이 화합물의 항산화 활성에 대하여 다양한 측정계를 사용한 연구가 필요할 것이다.

## 요 약

천연물로부터 U937 세포주를 사용한 caspase-3 유도 저해물질을 탐색한 결과 머위(*Petasites japonicum*)를 선발하였다. 머위의 메탄올 추출물로부터 Sephadex LH-20 column chromatography, HPLC 등을 사용하여 저해물질을 분리하였으며, UV, EIMS, 1H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC등의 기기분석을 실시한 결과 [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxopropyl] ester로 동정되었다. 이 물질은 IC<sub>50</sub> 8 µg/mL의 농도로 U937 세포주의 etoposide에 의한 caspase 3 유도를 저해하였으며, DNA fragmentation도 저해하였다. 또한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능을 나타내었다.

## 문 헌

- Cohen G. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326: 1-16 (1997)
- Barinaga M. Death by Dozens of cuts. *Science* 280: 32-34 (1998)
- Thornberry N. Caspases : Key mediators of apoptosis. *Chem. & Biol.* 5: 97-103 (1998)
- Friedlander R., Brown R. Gagliardini V., Wang J. and Yuan J. Inhibition of ICE slows ALS in mice. *Nature* 388: 31 (1997)
- Salvatore M., Hensens O., Zink D., Liesch J., Dufresne C., Ondeyka J., Jurgens T., Borris R., Raghoobar S., Mccauley E., Kong L., Gartner S., Koch S., Pelaez F., Diez M., Cascales C., Martin I., PolishookvJ., Balick M., Beck H., King S., Hsu A. and Lingham R. L-741, 494, a fungal metabolite that is an inhibitor of interleukin-1  $\beta$  converting enzyme. *J. Nat. Prod.* 57: 755-760 (1994)
- Wright C., Schellenberger U., Wang H., Wang Y. and Kinder D. Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: Requirement for caspase 3-like-proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 797-803 (1998)
- Polverino A. and Patterson S. Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 Cells. *J. Biol. Chem.* 272: 7013-7021 (1997)
- Yamashita N., Shin-Ya K., Furihata K., Hayakawa Y. and Seto H. New ravidomycin analogues, FE35A and FE35B, apoptosis inducers produced by *Streptomyces rochei*. *J. Antibiotics* 51: 1105-1108 (1998)
- Yamashita N., Harada T., Shin-Ya K. and Seto H. 6-Hydroxytetragulol, a new CPP32 protease inducer produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiotics* 51: 79-81 (1997)
- Kim J. W., Adachi H., Shin-Ya K., Hayakawa T., Seto H. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardioopsis* sp. *J. Antibiotics* 50: 628-630 (1997)
- Takeya H., Zhang H., Kobinata K., Onose R., Onozaawa C., Kudo T., Osada H. Cytotrienin A, a novel apoptosis inducer in human leukemia HL-60 Cells. *J. Antibiotics* 50: 370-372 (1997)
- Mastrangelo A. and Betenbaugh M. Overcoming apoptosis: new methods for improving protein-expression systems. *TIBTECH.* 16: 88-95 (1998)
- Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1462 (1995)
- Lee E., Miura M., Yoshinari M., Iwai H. and Kariya K. Selective inhibition of dexamethasone-induced apoptosis in rat thymocytes by herbimycin A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 128-134 (1994)
- Ji L., Zhang G. and Hirabayashi Y. Inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$  and ceramide-induced internucleosomal DNA Fragmentation by herbimycin A in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 640-647 (1995)
- Shimura M., Ishizaka Y., Yuo A., Hatake K., Oshima M., Sasaki T., Takaku F. Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60. *FEBS Letters* 417: 379-384 (1997)
- Kim T. Korean resources plants IV., p.238. Seoul National Univ., Seoul, Korea (1996)
- Gurtu V., Kain S. R. and Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* 251: 98-102 (1997)
- Iriye, R., Furukawa K., Nishida R., Kim C. and Fukami H. Isolation and synthesis of a new bio-anti-mutagen, petasiphenol, from scapes of *Petasites japonicum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 55: 1773-1775 (1992)
- Bessho R., Matsubara K., Kubota M., Kuwakado K., Hirota H., Wakazono Y., Lin Y., Okuda A., KaWai M., Nishikomori R. and Heike T. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem. Pharmacol.* 48: 883-1889 (1994)
- Verhaegen S., MCGowan A., Brophy A., Fernandes R. and Cotter T. Inhibition of apoptosis by antioxidants in

the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1021-1029 (1995)

21. Tsai J., Jain M., Hsieh C., Lee W., Yoshizumi M., Patterson C., Perrella M., Cooke C., Wang H., Haber E., Schlegel R. and Lee M. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 271: 3667-

3670 (1996)

22. Buttker T. and Sandstrom P. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today.* 15: 167-169 (1994)

---

(1999년 7월 15일 접수)