

사람 유방암세포들에서 Gleditsin의 항암효과

고현숙 · 강경원 · 김정희

영남대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실

Anticancer Effects of Gleditsin in Human Mammary Cancer Cells

Hyun Sook Ko, Kyung Won Kang, Jung Hye Kim

*Department of Biochemistry and Molecular Biology,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Background : Gleditsin is a herb medicine from extracted by Gleditschia spina. In order to investigate anticancer effects of gleditsin in human various breast cancer cells, we tested with gleditsin on cytotoxicity of materials, observed to cell survival and cell cycle progression, and analyzed in starvation condition.

Materials and Methods : The cytotoxicity and cell cycle progression were analyzed in human breast cells, MCF-10A and human breast cancer cell lines, MDA-MB-231, MDA-MB-361, and MDA-MB-435. IC50s of breast cancer cell lines were measured by MTT assay. The cell cycle were showed by flow cytometric analysis in cells treated with gleditsin. We analyzed DNA content of sub-G₀/G₁ phase, it was detected apoptosis.

Results : Cell survivals were decreased in a dose-dependent manner by the treatment of cells with gleditsin. IC50s were 4.11-fold higher in MDA-MB-435, 2.53-fold higher in MDA-MB-231, and 2.55-fold higher in MDA-MB-361 than in normal breast cells. Flow cytometric analysis showed that sub-G₀/G₁ fractions in cancer cells treated with gleditsin were higher than that normal cells, suggesting that increases in cytotoxicity of cancer cells by gleditsin were resulted from apoptosis. Cell cycle progression was also changed by the treatment of gleditsin. The treatments of gleditsin resulted in a decrease in G₁ phase and an increase in G₂/M phase in normal breast cells as well as cancer cell lines. Apoptotic cell death was

synergistically increased by cell starvation and gleditsin treatments in cancer cells. MDA-MB-435 cells were more sensitive to apoptotic cell death by gleditsin than other cells.

Conclusion : An anti-tumor effect of gleditsin was selectively higher in hman breast cancer cells than in normal human breast cells, and was mediated by apoptotic cell death.

Key Words : Gleditsin, Apoptosis, Cell Cycle Progression

서 론

Gleditsin은 조각자나무(*Gleditschia spina*)로부터 추출한 생약성분이다. 조각자나무는 원산지가 중국인 콩과 식물에 속하는 낙엽교목으로, 우리나라에서는 관상용이나 약용으로 들여와 경북 중남부 지방에 식재하는 귀화식물이다. 중국본초도감(1994)에 과실인 조엽, 종자인 조각자, 각인 조각자와 수피, 엽 등에 관하여 그 부위별 효능이 기록되어 있다. 성분은 phytopolysaccharide, 아미노산, 플라보노이드, 다당류, 페놀류 등이 있다.¹⁾ 각 부위별로 사용되고 있지만 주성분은 gleditsin으로서 항암 및 항균효과가 있다고 알려져 있다.²⁾ 생쥐의 복강내로 sarcoma-180 세포를 주입한 후, Gleditsin을 처리한 경우 세포수가 현저히 감소하여 항암효과가 있는 것으로 보고되었으며, 포도상구균, 살모넬라균 등에 대하여 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다.^{3, 4)}

세포의 성장과 분화는 여러 성장인자들의 신호전달에 의해 조절되고 있다. 세포외부의 성장인자는 세포막에 존재하는 이들 수용체와 결합함으로써 세포 내에 이차신호전달물질들을 생성하게 된다. 이차 신호전달물질들은 각종 인산화효소인 protein kinase A(PKA), protein kinase C(PKC), calcium/calmodulin-dependent protein kinase, casein kinase, MAP kinase들

을 활성화시킨 후 이차 표적단백질(target protein)을 인산화시켜 그 신호를 전달한다. 이후 일련의 전달과정을 거쳐 핵내로 그 신호가 전달되면 세포 증식에 필요한 여러 유전자들이 합성되고 세포주기(cell cycle) 등의 생리활동이 조절되어 세포성장이 이루어진다.⁵⁾

세포외부로부터의 신호전달에 의한 세포성장은 여러 가지 원인에 의해 조절이 되며 그 균형이 깨어지게 되면 정상세포는 통제 불가능한 암세포로 전이된다. 이러한 작용 기전은 세포증식 과정인 세포주기의 진행을 조절하는 인자들의 기능을 밝혀야 할 것이다.^{6, 7)} 최근 들어 세포주기 조절에 관여하는 많은 유전자들이 발견되고 그들의 특성이 일부 밝혀지면서 cyclin-dependent kinase (cdk)와 pRb (retinoblastoma), p53등의 암억제유전자(tumor suppressor gene)들이 세포주기의 진행에 중추적 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다.^{8, 9)} Cdk 억제인자 중 Waf1 (p21)과 Kip1 (p27)은 모든 cdk에 작용하여 pRb 인산화를 저해하며, CDKN2(p16)는 cdk4와 cdk6에만 작용하여 억제효과를 나타낸다. 많은 암세포주들에서 cdk 억제인자가 결손되어 있음이 밝혀졌으며,¹⁰⁾ 이로 인하여 G1기의 진행을 통제하는 기능이 소실되어 암으로의 진행과정이 유도되는 것으로 추측되고 있다. 또한 pRb의 발현이 소실되거나 cyclin D가 과발현되어 cdk의 활성이 지속되면 과도한 세포분열이 초

래되어 암화 과정이 유발된다고 한다.¹¹⁾ 이와 같이 G1 check point의 기능손실이나 과잉활성은 세포주기의 정상적인 기능을 마비시켜 암으로 진행되는 것으로 추측하고 있다.^{12, 13)}

본 연구는 조각자나무의 주성분인 gleditsin에 의한 유방암세포에 미치는 항암작용의 관찰과 세포주기 분석을 통하여 세포사멸 정도와 세포주기에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

재료

정상 사람 유방세포 MCF-10A와 유방암 세포 MDA-MB-231과 MDA-MB-361, MDA-MB-435는 ATCC사 (USA)로부터 구입하였다. Fetal calf serum (FCS)은 Hyclone사(Australia), penicillin/streptomycin, RPMI 1640 배양액은 Life Technologies사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

조각자나무로부터 추출한 gleditsin은 Bio-Tech 사로부터 추출한 것을 공급받았다.

방법

세포배양

유방암 세포주들은 10% fetal calf serum과 1% penicillin/streptomycin이 섞인 RPMI1640 배양액으로 36°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한다.

조각자 추출물의 조제

조각자 100g을 reflux condenser가 달린 round bottle flask에 넣고 증류수 1000 ml를 가하여 5시간 동안 환류 추출하였다. 추출물을 여과한 후, 회전증발기를 이용하여 농축하고, 동결건조

기에서 완전히 건조시켰다. 건조된 분말을 증류수에 녹인 후, 0.2um 여과지를 통과시켜 사용하였다.

Gleditsin의 준비 및 처치

Gleditsin을 20 mg/ml 농도로 증류수에 녹인 후 -20°C 냉동고에 보관하였다. 실험에 따라서 원하는 최종 농도가 되도록 gleditsin을 첨가하고 16~24시간 배양하였다. 장시간 배양 시에는 매 24시간마다 배양액을 교환하고 gleditsin을 새로 처리하였다.

3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)법

Gleditsin에 의한 세포의 독성정도는 MTT assay로 조사하였다. 유방암 세포들을 96 well plate에 5000개로 분주한 후 24시간 배양하였다. Gleditsin을 농도별로 각각 처리한 후 24, 48, 72, 96시간 동안 배양하고 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)용액 (50 mM in PBS) 50 μ l를 각 well에 첨가한 후 이산화탄소 배양기에서 3시간 반응하였다. 상청액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 200 μ l를 첨가한 후 microplate reader (Biorad사, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유세포 분석

Gleditsin을 처리한 세포를 trypsin으로 처리하여 수확한 후 PBS로 3회 세척하였다. 90% ethanol 1ml를 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 반응시켜 세포를 고정하였다. 원침한 후 상청액을 제거하고 1 mg/ml RNase A와 100 μ g/ml propidium iodide가 포함된 PBS 1 ml을

가한 다음 빛에 노출되지 않도록 하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 각 세포의 DNA양을 flow cytometer (FACS, Becton Dickson사)를 이용하여 측정하였다.

Apoptosis의 측정을 위해서는 정상 유방세포와 암세포들을 각각 0.5 mg/ml gleditsin을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 구분하여 72시간 배양한 후 세포사멸 정도를 측정하였고 세포주기 분석을 위해서는 각 세포를 serum starvation 시킨 후 각각의 세포에 농도 의존적으로 0.1 mg/ml에서 1.0 mg/ml로, 시간 의존적으로 12, 48, 72, 96시간에 세포주기분포를 각각 관찰하여 cell cycle progression을 관찰하였다.

성 적

유방암세포들에서 Gleditsin에 의한 세포 독성 효과

정상 유방세포와 유방암 세포에 대한 gleditsin의 세포독성 효과를 MTT법으로 조사하였다. 유방암세포 MDA-MB-231, MDA-MB-361,

Table 1. Fifty percent survival values (IC₅₀) of human breast cancer cell lines by Gleditsin treatment

Human Breast Cell Lines	Survival Values IC ₅₀ (mg/ml)	Sensitivity fold
Normal cell		
MCF-10A	0.288	1
Carcinoma cell		
MDA 231	0.114	2.53
MDA 361	0.113	2.55
MDA 435	0.070	4.11

MTT assay

MDA-MB-435와 정상유방세포 MCF-10A에 gleditsin 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml농도로 72시간 처리한 후, 세포생존율을 측정하였다.

각 세포들에 대한 IC₅₀ 값을 측정하여 Table 1에 도시하였다. 정상유방세포 MCF-10A의 IC₅₀ 값이 0.288 mg/ml 인데 비해 유방암세포 MDA-MB-231이 0.114 mg/ml이며, MDA-MB-361이 0.113 mg/ml, MDA-MB-435가 0.07 mg/ml이었다. 정상 세포와 비교했을 때 gleditsin에 의한 세포 독성이 MDA-MB-435가 4.11로 가장 높았고 MDA-MB-231과 MDA-MB-361은 2.53과 2.55로 관찰되었다. 이상의 결과로부터 정상 세포에 비해 유방암세포에서 gleditsin에 의해 세포 독성이 더 높게 나타남을 알 수 있었다.

Gleditsin에 의한 세포사멸

유방암세포들에 대한 gleditsin의 독성효과가 세포사멸과정을 통해서 나타나는지를 관찰하기 위하여 유세포 분석을 통하여 세포사멸에서 특징적으로 나타나는 sub-G₀/G₁ 세포 분획을 조사하였다. Gleditsin을 0.1 mg/ml를 72시간 처리 한 후, 세포를 수확하여 유세포 분석을 시행하였다. 그 결과 정상 유방세포 MCF-10A에서는 sub-G₀/G₁ 세포 분획이 6.22%, 유방암 세포에서는 MDA-MB-231이 15.75%, MDA-MB-361이 32.3%로 높게 관찰되었다(Fig.1). MDA-MB-435는 figure에는 도시하지 않았으나 gleditsin을 처리한 군에서는 48시간 때에 96.97%였고 72시간에는 98.3%로 관찰되었다. 이상의결과 유방암세포들에서 gleditsin의 처리에 의해 유도되는 세포독성은 세포사멸에 의한 것으로 생각된다.

Fig. 1. Comparisons of apoptotic contents by cell cycle analysis in human breast MCF-10A and breast cancer MDA231 and MDA361 cells. The cells were treated with 0.1 mg/ml of Gleditsin for 72 hours and harvested. Cells not treated with Gleditsin were used as a control. Apoptotic peaks were expressed as M2 in the above figures.

Gleditsin에 의한 세포주기 변화

유방암세포들에 대한 gleditsin에 의한 세포주기 변화를 관찰하기 위하여 유세포분석을 이용하여 세포주기를 분석하였다. 세포를 serum-free 배양액으로 48시간 배양하고, serum과 gleditsin을 72시간 동안 처리한 후, 유세포 분

석을 시행하였다. 정상유방세포인 MCF-10A의 경우 gleditsin을 처리하지 않았을 때는 G1기가 73.9%, G2+M기가 25.7%인데 비하여 0.1 mg/ml의 gleditsin을 처리하였을 때는 G1이 50.2%, G2+M기가 47.6%로 G1기의 감소와 G2+M기의 증가를 관찰하였다. 유방암세포들의 경우, MDA-

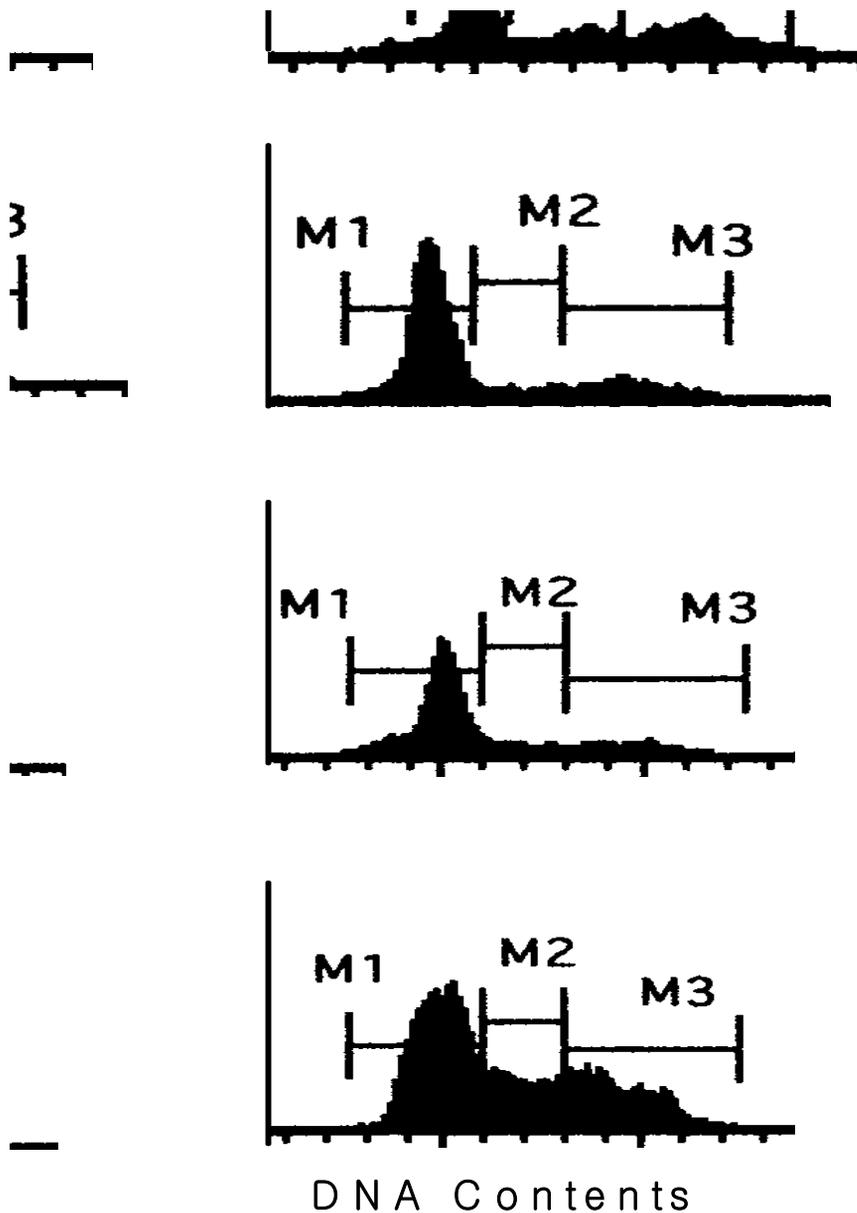


Fig. 2. Comparisons of cell cycle analysis in human breast MCF-10A and breast cancer MDA231, MDA361 and MDA435 cells. The cells were treated gleditsin for 72 hour and harvested. NT was not treated gleditsin. The concentration of gleditsin were different, MCF10A, 0.1 mg/ml, DDA231 and 361, 0.02 mg/ml and MDA435, 0.01 mg/ml.

MB-231은 gleditsin을 처리하지 않았을 때 G1기가 84.7%, G2+M기 11.5%였고, gleditsin을 처리하였을 때 G1기가 66.5%, G2+M기 30.5%였다. MDA-MB-361은 gleditsin을 처리하지 않은 군에서 G1기가 80.7%, G2+M기 18.9%였고, gleditsin을 처리하였을 때 G1기가 69.6%,

Table 2. Time dependent effect of cell cycle progression in human breast cancer MDA435. The cells were treated with 0.01 mg/ml of gleditsin and harvested at indicated time. NT was not treated gleditsin

Time (Hour)	Not Treatment			Gleditsin Treatment		
	48	72	96	48	72	96
G1 phase DNA(%)	58.5	69.2	74.4	54.9	58.8	61.4
S phase DNA(%)	15.9	12.7	8.8	21.1	18.6	15.4
G2/M phase DNA(%)	26.0	18.5	17.0	24.6	23.1	23.8

G2+M기 28.3%으로 두 세포가 비슷하게 G1기의 감소와 G2+M기의 증가함을 관찰하였다.

MDA-MB-435의 경우 gleditsin을 처리하지 않은 군에서 G1기가 58.5%, G2+M기 41.9%였고, 0.1 mg/ml gleditsin을 처리하였을 때 G1기가 54.0%, G2+M기 45.5%로 관찰되었다 (Fig. 2).

Gleditsin에 의한 시간에 따른 세포주기 변화 유방암세포 중 gleditsin에 세포 독성효과가 가장 높게 관찰된 MDA-MB-435를 대상으로

gleditsin 처리 시간에 따른 세포주기 진행의 변화를 관찰하였다.

Gleditsin을 0.01 mg/ml 처리하였을 때 G1기가 48, 72, 96시간에 각각 3.6, 10.5, 13.0%로 감소하였으며 (Fig. 3A), S+G2/M기의 DNA는 3.8, 10.5, 13.4%로 상승하였다 (Fig. 3B, Table 2). G1기의 감소 정도는 96시간에 13% 였으나 S기의 증가는 6.6% 였고, G2/M기의 증가는 6.8%로 나타났다.

Gleditsin에 의한 암세포들의 세포사멸 효과 유방암세포들에서 starvation과 gleditsin에 대

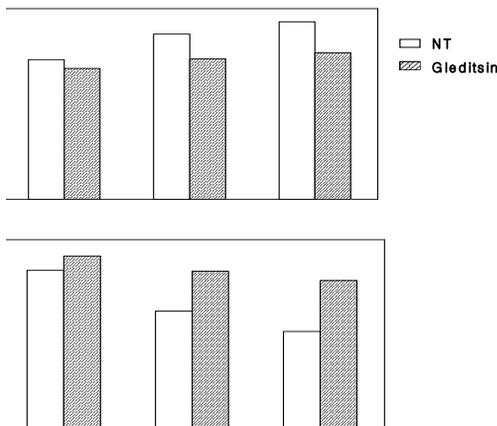


Fig. 3. Time dependent effect of cell cycle progression in human breast cancer MDA435. The cells were treated with 0.01 mg/ml of gleditsin and harvested at indicated time. NT was not treated gleditsin.

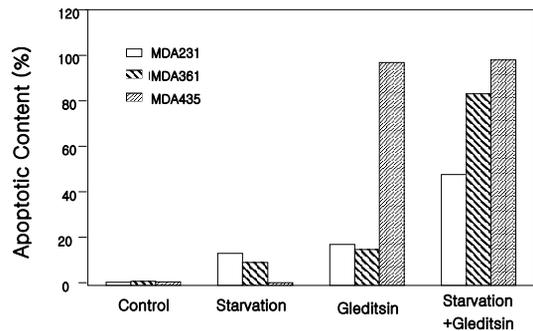


Fig. 4. Synergistic apoptotic effect of gleditsin and starvation in human breast cancer MDA231, MDA361 and MDA435. The cells were pretreated with starvation for 48hour and treated with 0.1 mg/ml of gleditsin, and harvested at 96 hour. Control was not treated any other starvation and gleditsin.

한 효과를 관찰하기 위하여 48시간 starvation 한 세포와 gleditsin만 처치한 세포와 병행처리 한 세포들에서 세포사멸정도를 비교하였다. MDA-MB-231과 MDA-MB-361 세포에서 starvation에 대한 세포사멸 효과가 13.9%와 10.04%였고, gleditsin처치로 17.7%와 15.66%로 경미한 상승을 관찰하였다. 그러나 starvation 후에 gleditsin 처치 시 48.11%와 83.39%로 아주 강한 세포사멸 효과를 관찰하였다. MDA-MB-435에서는 starvation 효과가 관찰되지 않았으나 0.1 mg/ml gleditsin 만 처치하여도 이미 98.97%의 세포사멸을 보여주고 있으므로 starvation과 gleditsin을 동시에 투여한 세포에서는 98.15%이었다. 이는 MDA-MB-435는 gleditsin에 대한 세포독성이 매우 강하게 나타난 때문으로 생각된다 (Fig. 4).

고 찰

정상 세포에서는 DNA 손상시 세포 주기가 G1/S 기 또는 G2/M 기에서 정체되어 손상된 DNA를 수복할 수 있는 DNA 수복 기전이 존재하고 있다. 그러나 과도한 DNA 손상이 야기되어 DNA 수복이 어려워지게 되면 G1/S 또는 G2/M check point에서 이를 감지하여 apoptosis가 유도되어 게놈상의 안정성을 유지하고 있다. 본 연구에서는 조각자 나무로부터 추출한 gleditsin의 항암효과를 유방암 세포주들에서 항암효과와 세포사멸의 유도를 관찰하였고 세포주기의 변화를 조사하였다.

정상유방암 세포 MCF-10A에 비해 유방암 세포에서 항암효과가 더 강하게 관찰되었다. 세가지 유방암세포 MD-MB-A231은 2.53배이며 MDA-MB-361은 2.55배, MDA-MB-435는

4.11배로 이들 중 MDA-MB-435가 가장 예민하게 반응하였다.

세포주를 대상으로 유세포 분석을 통하여 각 세포내의 DNA의 양을 조사한 후, 세포주기 분포를 관찰하였을 때, 2n DNA 함량을 가지는 세포는 G1기 세포로, 2n-4n 사이의 DNA 함량을 가지는 세포는 S기 세포로, 4n DNA 함량을 가지는 세포는 G2/M기의 세포로 간주하였다. 유방암세포들 중 대조세포에 비해 MDA-MB-435세포가 gleditsin의 세포독성과 세포사멸유도에 민감하게 작용하였으며 세포주기 변화에서도 특히 G1기의 감소와 G2/M기의 증가가 현저하였다.

세포주기는 여러 조절인자들의 영향을 받게 되는데 이러한 조절 부위를 check point라 한다. G1기의 진행을 조절하는 check point에는 G1 cyclins, pRb와 p53 등의 암 억제유전자, p21(Waf1)과 p27(Kip1), CDKN2(p16^{INK4}) 등의 cdk 억제인자들이 관여한다.^{14, 15)} pRb는 전사 조절인자인 E2F나 c-Abl등과 결합하여 이들을 불활성화 시키지만 G1 cyclin에 의해 활성화된 cdk들에 의해 인산화되면 이들과의 결합이 해제되어 결과적으로 E2F나 c-Abl 등의 전사활성이 일어나고 세포분열에 필요한 유전자들의 발현을 유도하여 G1기에서 S기로 진행되게 한다.^{11, 16)} p53은 방사선이나 자외선 조사, 발암물질 등에 의해 DNA가 손상되면 발현 양이 증가되어 CDK 저해제인 Waf1의 발현을 증가시킨다.^{17, 18)} Waf1은 CDKs와 결합하여 pRb 인산화를 저해하여 G1 arrest를 유도함으로써 손상된 DNA의 S주기 진입을 차단하거나, PCNA와 결합하여 PCNA의 DNA 복제기능을 억제하여 결과적으로 게놈의 돌연변이 축적을 최소화하는 기능을 수행한다.¹⁹⁾ PCNA는 세포주기의

S기에서 DNA 합성에 관여하며 DNA polymerase와 결합하여 DNA의 합성을 조절하는 물질로 알려져 있으며 세포의 증식정도와 조절에 중추적 역할을 하는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ Lee 등²¹⁾은 비소세포암 환자에서 PCNA의 발현이 일부 증가되었다고 하였으며 세포주기 변화로 인한 수술 후의 예후인자로 유용할 것으로 추정하였다. Lim 등²²⁾은 한국인 위암세포주들에서 pRb의 강한 발현과 세포주기조절 유전자들 중 cyclin A와 cyclin E가 과발현된 것을 관찰하였으며 이는 세포주기의 G1에서 S기로의 이행이 촉진된다고 하였다. 그러므로 암세포의 세포주기와 관련인자들의 변화가 중요하며 이들에 의해 세포주기 변화가 암세포의 증가에 중요한 역할을 하리라 생각된다.

본 연구에서 세가지 유방암 세포에 대하여 starvation과 gleditsin 병행 처리에 의한 세포사멸효과를 유세포 분석을 통하여 조사하였다. 세포사멸은 starvation단독 처리시에는 MDA-MB-231과 MD-MB-A361에서 약간 관찰되었으며, gleditsin 처치 시에도 약간 관찰되었으나 starvation과 gleditsin을 동시에 처리하였을 때 48%와 83%로 아주 높게 관찰되었다. MDA-MB-435에서는 gleditsin 단독으로도 아주 높은 세포사멸이 관찰되어 gleditsin의 세포독성 효과가 아주 높음을 관찰할 수 있었다.

본 연구를 통하여 gleditsin은 정상 유방 세포에 비해 유방암세포에서 세포 독성 효과가 우수하며, 그 중에서 MDA-MB-435가 가장 높은 세포 독성이 관찰되었다. Starvation을 병행하였을 때 gleditsin의 세포독성효과는 더욱 증가된다는 사실을 확인하였으며 향후 gleditsin의 세포 독성효과에 대한 기전을 밝히는 좋은 자료가 될 것이다.

요 약

유방암세포에서 조각자나무의 주성분인 gleditsin에 의한 항암작용을 관찰하고, 세포주기 분석을 통하여 세포사멸 정도와 세포주기에 미치는 영향을 분석하였다.

정상 유방세포와 유방암세포들에서 gleditsin에 의한 세포 독성을 MTT법으로 조사한 결과 세포생존율은 gleditsin의 농도 증가에 따라 세포독성이 증가하였다. 각 세포들에 대한 IC₅₀ 값을 정상유방세포와 비교하였을 때 MDA-MB-435가 4.11배 MD-MB-231과 MDA-MB-361은 2.53과 2.55배로 관찰되어, 유방암세포가 정상세포에 비해 세포독성이 더 강하게 나타났다. Gleditsin에 의한 유방암세포들에 대한 gleditsin의 독성효과가 세포사멸과정을 통해서 나타나는지를 관찰하기 위하여 유세포 분석을 통하여 sub-G0/G1기의 세포분획을 조사하였다. 그 결과 유방암세포들에서 정상 세포에 비해 sub-G0/G1 분획이 현저히 증가하여 유방암 세포에서 gleditsin에 의한 세포독성은 세포사멸에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 유방암세포들에서 starvation과 gleditsin을 병용 처리하였을 때의 세포사멸 효과를 관찰하였다. MDA-MB-231과 MDA-MB-361 세포에서 gleditsin 처치로 경미한 상승을 관찰하였으나 starvation 후에 gleditsin 처치 시 아주 강한 세포사멸 효과를 관찰하였다. MDA-MB-435에서는 starvation 효과가 관찰되지 않았으나 0.1 mg/ml gleditsin만 처치하여도 이미 98.97%의 세포사멸을 보였으며, gleditsin에 훨씬 민감하게 작용하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 정재동의 2명 공저. 생물공학(Plant Biotechnology) 경북대학교출판부 1992.
2. 남상윤. Sarcoma-180 암세포를 이식한 마우스에서 lymphokine-activated killer 세포활성의 변화. 단국대학교 대학원 박사학위논문집 1991.
3. 하재청. Sarcoma-180에 대한 약용식물 성분의 항암효과. 대한암학회지 1991;23:197-205.
4. 전인기, 박성용, 이학수, 김대현, 이광신, 최영태. Effect of Gleditsia spina extract on ascites tumor sarcoma-180 in mice. 동국대학교 이학사학위논문 1994.
5. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling. Nature 1993;361:315-25.
6. Wahl MT, Nishibe S, Suh PG, Rhee SG, Carpenter G. Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:1568-72.
7. Nishibe S, Wahl MI, Wedegaertner PB, Kim JW, Rhee SG, Carpenter G. Selectivity of phospholipase C phosphorylation by the epidermal growth factor receptor, the insulin receptor, and their cytoplasmic domains. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:424-8.
8. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75:817-25.
9. Levine AJ. The tumor suppressor genes. Ann Rev Biochem 1993;62:623-51.
10. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS-3rd, Johnson BE, Skolnick MHA. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994; 264:436-40.
11. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 1995; 9:1149-63.
12. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 1994; 79:181-4.
13. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995;81:323-30.
14. Kamb A. Role of a cell cycle regulator in hereditary and sporadic cancer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994;59:39-47.
15. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveetil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. Cancer Res 1995;55:493-7.
16. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 1994;368:753-6.
17. Haapajarvi T, Kivinen L, Pitkanen K, Laiho M. Cell cycle dependent effects of u.v.-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. Oncogene 1995;11:151-9.
18. Leonard CJ, Canman CE, Kastam MB. The role of p53 in cell-cycle control and apoptosis: implications for cancer. Important Adv Oncol 1995;33-42.
19. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267: 1456-62.
20. Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 1987;111:841-5.
21. Lee YH, Ahn JB, Shin DH, Hong SW, Shim JY, Jung KY, Kim SK, Chang J, Kim JH, Lee WY, Kim BS, Kim SK. Prognostic value of PCNA, c-erbB-2, c-fos in patients with

- non-small cell lung cancer. J Korean Cancer Assoc 1999;31:678-85.
22. Lim CC, Kim IH, Cho JW, Baek JS, Shon SS. Expression of cell cycle control genes in korean gastric cancer cell lines. J Korean Cancer Assoc 2000;32:279-87.