

DNA topoisomerase I 억제제 β -lapachone에 의한 전립선 암세포의 성장억제 기전연구

공규리 · 최병태¹ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, ¹해부학교실 및 한의학연구소

Up-regulation of Bax is associated with DNA topoisomerase I inhibitor β -lapachone-induced apoptosis in human prostate carcinoma cells

Kyu Ri Kong, Byung Tae Choi¹ and Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry and ¹Anatomy, Dong-Eui University College of Oriental Medicine
and Research Institute of Oriental Medicine, Pusan 614-052, Korea

Abstract

The DNA topoisomerase I inhibitor β -lapachone, the product of a tree from South America, is known to exhibit various biological properties, however the mechanisms of which are poorly understood. In the present report, we investigated the effects of β -lapachone on the growth of human prostate carcinoma DU-145 cells. Upon treatment with β -lapachone, a concentration-dependent inhibition of cell viability was observed and cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including condensation of chromatin and DNA fragmentation. Flow cytometry analysis confirmed that β -lapachone increased populations of apoptotic-sub G1 phase. In addition, proteolytic cleavages of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and β -catenin protein were observed after treatment of β -lapachone. These apoptotic effects of β -lapachone in DU-145 cells were associated with marked induction of Bax protein, however the levels of Bcl-2 expression were decreased in a dose-dependent manner.

Key words – β -lapachone, prostate carcinoma, apoptosis, Bax, Bcl-2

서 론

새로운 DNA topoisomerase I 억제제로 알려진 β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione, Fig. 1A)은 남미지역에 서식하는 lapacho (*Tabebuia avellanedae*)라는 나무의 수피에서 처음 동정된 천연

quinone계 물질의 하나이다[35]. 이미 잘 알려진 DNA topoisomerase I 억제제인 camptothecin (CPT)과는 달리, 이 물질은 topoisomerase I-cleavable complex의 유도 없이 DNA topoisomerase I의 촉매 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다[25]. β -lapachone은 anti-bacterial, anti-fungal, anti-trypanocidal 및 cytotoxic activities를 포함한 많은 약리학적 작용을 가지는데[14,15,24,26], 이는 reactive oxygen species (ROS)의 생성과 연관성이 있는 것으로 알려져 있다[10]. β -lapachone을 이용한 최근 연구보고들에서 이는

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-850-7413, Fax : 051-853-4036
E-mail : choiyh@dongeui.ac.kr

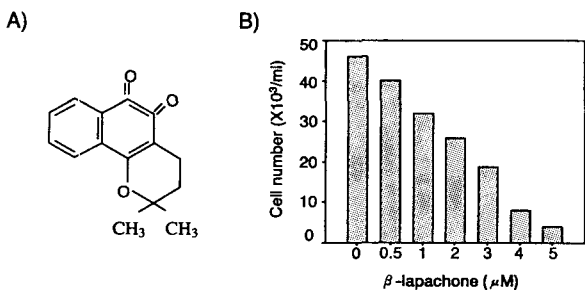


Fig. 1. (A) Chemical structure of β -lapachone. (B) Growth inhibition by β -lapachone treatment. DU-145 cells were seeded at an initial density of 0.5×10^4 cells per 100-mm plate, incubated for 24 h, and treated with β -lapachone at different concentrations for 24 h. Cell number was determined by hemacytometer counts of trypan blue-excluding cells. Each point represents the mean \pm S.E. of two independent experiments.

다양한 종류의 표적 세포에서 세포의 성장을 억제시키고 apoptosis (programmed cell death)를 일으키는 것으로 보고된 바 있다[21,24,30-32,41,43]. Leukemic HL-60 세포를 포함한 암 세포를 이용한 연구에서 β -lapachone은 종양억제유전자 p53 및 apoptosis 억제 유전자인 Bcl-2의 발현과는 무관하게 apoptosis를 유발하였음[24,31]이 보고되어 세포 성장 억제와 연관된 apoptosis 유발 기전 해석을 위한 시도가 이루어져 왔다. 그러나 현재까지 몇몇 보고가 꾸준히 있어 왔음에도 불구하고 세포증식에서 β -lapachone에 의한 성장억제의 분자생물학적 기전은 여전히 거의 알려지지 않았다.

한편 apoptosis는 특이 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체 방어기전이란 점에서 necrosis와 구별되며, 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이다[2,12]. Apoptosis는 세포주기 의존적 또는 비의존적으로 동시에 일어날 수 있으나[27,44], 정상적인 세포주기의 이탈이나 세포주기조절에 중요한 cyclin-dependent kinases (Cdk) 활성의 변화가 apoptotic cell death의 주원인이 될 수 있다[36]. Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다[3]. 그중 대표적인 것으로 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 과발현되었을 때 apoptosis를 유도하는데, 두 단백질은 서로 dimer

를 형성하면서 cytochrome *c*와 같은 apoptosis 유발에 관여하는 인자들의 조절에 관여한다[1,16,23,38]. 또한 caspases라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는데, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 Bax를 포함한 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related proteases로 되어 직접 또는 간접적으로 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다[28,38].

본 연구에서는 DNA topoisomerase I 억제제인 β -lapachone의 항암기전 해석의 일환으로 인체 전립선 암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 β -lapachone의 처리 농도 의존적으로 DU-145 전립선 암세포의 성장은 억제되었으며, 핵 내 apoptotic body의 형성과 DNA fragmentation 및 sub-G1 군의 증가 현상이 뚜렷하여 apoptosis의 과정에 의하여 암세포의 사멸이 유도되는 것임을 알 수 있었다. 아울러 Bax의 발현 증가 및 Bcl-2의 발현 감소가 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

재료 및 방법

암세포의 배양 및 β -lapachone의 처리

본 실험에 사용한 DU-145 전립선 암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C의 조건 하에서 배양하였다. β -lapachone은 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며 이를 순수 alcohol에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

암세포의 성장억제 및 형태적 변화 관찰

β -lapachone의 처리에 의한 암세포의 성장억제 분석을 위하여 DU-145 세포를 100-mm plate에 0.5×10^4 개 정도로 분주한 후 24시간 배양하였다. 24시간 후 β -lapachone이 농도별로 희석된 배지로 교환하고 24시간 더 배양한 후, trypsin을 처리하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 수세하였다. 수세한 세포들을 trypan blue로 염색한 뒤 hemacytometer를 이용하여 살아 있는 세포의 수를 정상

배지에서 자란 암세포와 비교하였다. 암세포의 형태에 미치는 β -lapachone의 영향을 알아보기 위하여 세포를 coverslip 위에서 배양한 후 24시간 동안 β -lapachone을 처리한 후 Wright-staining (Fisher Scientific, Pittsbergh, PA, USA)을 실시하여 현미경하에서 관찰하였다.

DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

β -lapachone에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 β -lapachone이 처리된 세포들을 PBS로 수세하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 fluorescence microscope를 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다[5].

DNA fragmentation 분석

준비된 세포를 PBS로 수세한 후 apoptotic DNA Ladder Kit (Roche Molecular Biochemical, Manheim, Germany)를 사용하여 DNA fragmentation 현상 여부를 조사하였다. 즉 binding/lysis buffer를 이용하여 세포내의 단백질과 지질을 녹여낸 다음, ethanol이 함유된 washing buffer를 이용하여 수 차례 씻어내고, elution buffer로 DNA fragments를 얻어내었다. 얻어낸 DNA는 적당량의 DNA loading buffer와 섞어 1% agarose (Sigma) gel을 이용하여 120 V 조건하에서 전이시킨 후, gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma) 용액으로 염색하여 UV-transiluminator로 DNA fragment의 여부를 관찰하였다[4].

DNA flow cytometry 분석

정상 및 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액(70% ethyl alcohol, 0.5% Tween20)을 첨가하여 4°C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 μ g/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4°C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 세포를 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포덩어리를 하나씩으로 떼어내고 DNA

flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램을 사용하여 분석하였다[8].

Western blot analysis 및 항체

선행 방법[7,8]에 준하여 정상 및 β -lapachone이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 incubation 하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced Chemiluminescence) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향

인체 전립선 DU-145 암세포의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 알아보기 위하여 24시간동안 β -lapachone을 처리한 후 살아있는 세포를 hemacytometer를 이용하여 조사해본 결과, Fig. 1B에서처럼 β -lapachone의 처리농도 의존적으로 암세포의 증식이 억제되었다. 특히 조사된 농도 중 2-3 μ M의 β -lapachone 처리에서 50% 정도 세포성장억제 효과가 있었으며, 이는 다른 종류의 전립선 암세포[24,31], 간암세포[21], 대장암세포[17] 및 유방암 세포[30] 등에서 나타난 결과들과 유사하였다. 그리고 β -

lapachone을 일정 시간 처리 후 정상 배지로 교환하였을 경우에도 β -lapachone에 의한 암세포 성장 억제가 회복되지 않아 β -lapachone에 의한 효과가 irreversible하다는 것을 알 수 있었다(data not shown).

β -lapachone에 의한 암세포의 형태변화

β -lapachone의 처리에 따른 암세포의 성장억제과정에서 암세포의 전체적인 형태변화를 관찰하기 위하여 세포를 coverslip 위에서 배양한 후 24시간 동안 β -lapachone을 처리한 후 Wright-staining을 실시하였다. β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포는 β -lapachone 처리 농도 의존적으로 membrane shrinking 및 세포의 rounding up 현상 등 매우 심한 세포의 형태적 변형을 초래하였으며 5 μ M 농도에서 거의 모든 세포들이 부착력을 상실하였다(Fig. 2A). 이는 정상 전립선 상피세포에서 관찰된 dendrite 형태와 비슷한 구조를 형성하는 것과는 매우 대조적인 양상이었으나[6], Don 등[11], Lai 등[21] 및 Hueber 등[18]의 결과들과는 유사하여 세포의 종류에 따라 β -lapachone에 의한 세포의 형태 변형은 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

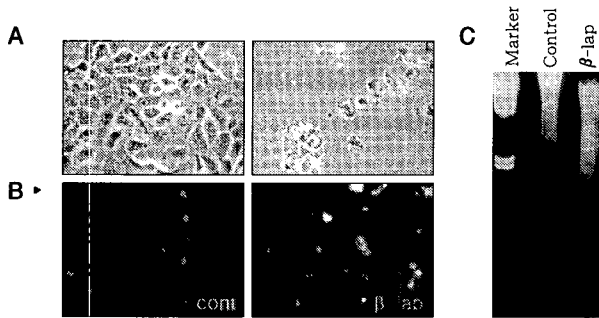


Fig. 2. Morphological changes, chromatin condensation and DNA fragmentation by β -lapachone treatment in DU-145 cells.

Cells were untreated or treated with 5 μ M β -lapachone for 24 h, stained and then photographed by microscope. Magnification, x200 (A). The untreated cells (cont) and β -lapachone treated cells with 5 μ M for 24 h were harvested, and spun down. After fixing, the cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using blue filter. Magnification, 400 (B). Genomic DNA was extracted and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in the presence of EtBr. Molecular weight standards of DNA/*Hind* III fragments are shown in lane 1 (C).

β -lapachone에 의한 apoptosis의 유발

β -lapachone에 의한 암세포의 세포성장 억제에 따른 심한 형태적 변형이 apoptosis 유발과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI 염색에 의한 암세포의 핵 형태를 조사하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 정상 배지에서 자란 암세포의 핵에 비하여 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 암세포에서는 apoptosis의 전형적인 특징인 chromatin condensation 현상에 의한 apoptotic body를 쉽게 관찰할 수 있었다[2,9]. 한편 apoptotic body 형성과 함께 apoptosis 유발의 직접적인 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 agarose gel 전기영동으로 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포를 대상으로 총 DNA를 추출하여 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타난 바와 같다. 즉 β -lapachone이 처리된 암세포에서는 apoptosis가 일어난 세포들에서 볼 수 있는 전형적인 DNA laddering을 관찰할 수 있었다. 이는 결국 β -lapachone의 처리에 의하여 endonuclease가 활성화되어 chromosomal DNA가 단편화되었음을 의미하는 것이며[2,9], β -lapachone 처리에 의한 이상의 두 가지 현상은 간암세포[21], leukemia [31,32,37], 유방암 세포[43] 등에서 관찰된 결과들과 일치하였다. 이상의 결과에서 β -lapachone에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis의 유발과 직접적 연관성이 있음을 알 수

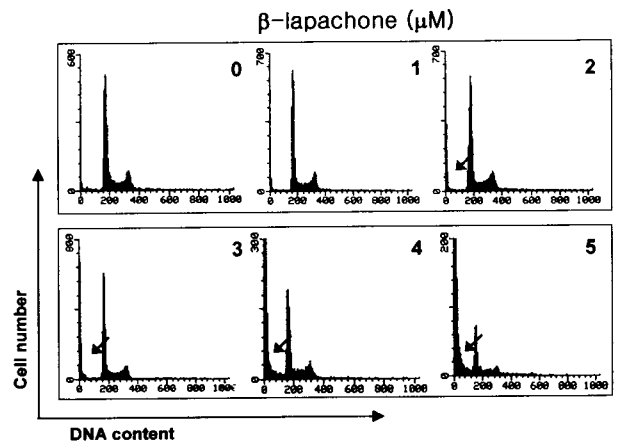


Fig. 3. Induction of sub-G1 by β -lapachone treatment. Exponentially growing DU-145 cells were treated with β -lapachone for 24 h and flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated controls with cells treated with β -lapachone. Arrows mean the portions of apoptotic sub G1-population.

있었으며 이를 DNA flow cytometry를 이용하여 확인한 결과, Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 β -lapachone 농도 의존적으로 apoptosis 유발을 의미하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도가 증가되었음을 알 수 있었다.

β -lapachone에 의한 PARP 및 β -catenin의 degradation

이상에서 얻어진 β -lapachone에 의한 전립선 암세포 apoptosis 유발의 추가적인 증거와 apoptosis 유도 기전 해석의 일환으로 Western blot 분석에 의한 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 및 β -catenin의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. 잘 알려진 바와 같이 특정 내, 외부 자극에 의하여 apoptosis가 일어나면 PARP 단백질은 부분적으로 잘리는 단백질 분해 과정을 거친다. 그 결과 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편을 관찰할 수 있다[20,22]. 특히 PARP는 정상세포의 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며[40], apoptosis의 과정 중 caspase라는 효소의 활성화에 의해 단백질의 분해가 일어나면[20,22] PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다[29]. Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포들의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있으나 β -lapachone이 처리된 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa 및 85 kDa 위치에서 발현되는 2개의 band를 관찰할 수 있었다. 또한 처리농도가 증가할수록 85 kDa에 해당하는 band의 발현이 증가되어 β -lapachone 처리 농도 의존적인 암세포의 성장억제가 apoptosis의 유발과 직접적인 관계가 있다는 것을 잘 나타내어주는 것이며, 몇 가지 다른 종류의 암세포에서와 관찰된 것들과 동일한 결과이다[11,30,32].

한편 catenin family 단백질(α , β 및 γ)은 모든 세포에서 발현되는 세포질 단백질로서 E-cadherin과 결합하여 세포 연결기능에 중요한 역할을 한다[19,42]. 특히 β -catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다[34,42]. 정상 세포의 경우 β -catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis (adherent

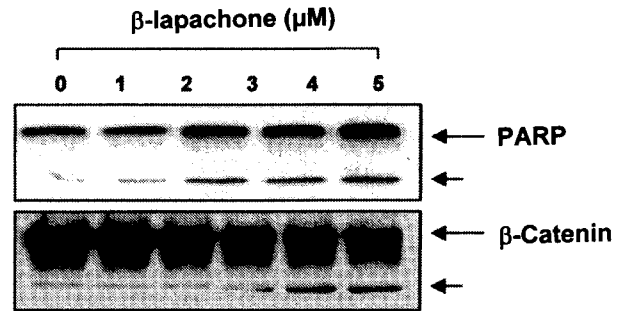


Fig. 4. Degradation of PARP and β -catenin in β -lapachone- treated cells.

Cells were treated with indicated concentrations of β -lapachone. After 24 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against PARP and β -catenin, and ECL detection.

cell apoptosis)가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다[13,39]. β -lapachone 처리에 의한 apoptosis가 이러한 현상과 관련이 있는지의 여부를 조사하기 위해서 β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 세포들의 β -catenin 발현을 조사한 결과 Fig. 4의 결과에서처럼 정상배지에서 자란 세포들의 경우 92 kDa의 주 band의 발현이 강하였지만 β -lapachone이 처리된 암세포에서는 처리농도 의존적으로 단편화된 band의 축적을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 β -lapachone에 의한 암세포의 전체적인 형태 변형관찰의 결과를 잘 뒷받침하여 주는 결과이며, 이와 연관된 정확한 기전 해석의 보안을 위해서는 관련 cadherin 단백질들과의 상호작용 및 kinase 활성도와 연관된 연구가 요구되어진다.

Bcl-2/Bax family의 발현에 미치는 β -lapachone의 영향

Apoptosis와 연관성을 가지는 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2/Bax family 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 pro-apoptotic 분자로 Bax 단백질 발현의 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다. 이들 두 유전자는 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양 억제 유전자인 p53, caspases, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다[27,33]. 이들은 서로

dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다[1,16,23,39]. 따라서 인간 전립선 암세포에서 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 이들 유전자가 관련되어 있는지의 여부를 조사한 결과, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는 Bax 유전자의 발현은 β -lapachone 4 및 5 μ M 처리군에서 매우 증가된 반면, Bcl-2의 발현은 4 μ M β -lapachone 처리군에서부터 거의 발현이 되지 않았다. 이는 결국 β -lapachone 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2/Bax family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이며, Bax의 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 효소들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다. 본 연구의 결과는 Weller 등[41]에 의한 glioma 세포 및 Hueber 등[18]에 의한 망막상피세포에서 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에서 나타난 것과 유사한 결과를 나타내고 있다. Bcl-2의 또한 과발현된 leukemia 세포에서 β -lapachone에 의한 apoptosis가 억제되었음[32]은 β -lapachone에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2의 발현감소에 따른 Bax의 발현증가가 중요한 역할을 하고 있음을 뒷받침하여 주는 결과이다.

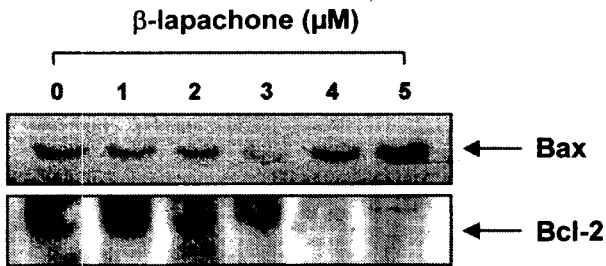


Fig. 5. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 by β -lapachone treatment. DU-145 cells were treated with indicated concentrations of β -lapachone. After 24 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were detected with antibodies against Bax and Bcl-2, and ECL detection.

요 약

남미지역에 서식하는 *Tabebuia avellanedae*의 수피에서 동정된 천연 quinone계 물질인 β -lapachone은 DNA

topoisomerase I 억제제 이외의 다양한 약리학적 기능이 있을 것으로 추정되지만 그 기능이 명확하지 않다. β -lapachone의 생리활성 기전 해석의 일환으로 본 연구에서는 인체 전립선 DU-145 암세포주의 성장에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였다. β -lapachone이 함유된 배지에서 자란 암세포들은 β -lapachone 처리 농도의존적으로 성장이 억제되었으며, 이는 apoptosis가 유발된 세포에서 특징적으로 관찰되는 chromatin condensation 및 DNA fragmentation 현상을 유발하였고, DNA flow cytometry 분석결과 apoptotic-sub G1기에 해당하는 세포들의 빈도도 증가되었다. 또한 poly (ADP-ribose) polymerase 및 β -catenin 단백질의 발현에서도 apoptosis 유발 특이적인 분해 현상을 보여주었으며, DU-145 전립선 암세포에서 β -lapachone에 의한 이러한 apoptosis의 유발에는 Bax의 발현증가에 따른 Bcl-2 발현의 감소가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2001년 동의대학교 교내연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Antonsson, B. and J.C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell. Res.* **256**, 50-57.
2. Arends, M.J., R.G. Morris and A.H. Wyllie. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J. Pathol.* **136**, 593-608.
3. Chiarugi, V., L. Magnelli, A. Turchetti, M. Cinelli, S. Cavari and M. Ruggiero. 1994. Cell survival and death programmes. *Pharmacol. Res.* **29**, 101-110.
4. Choi, Y.H., E.O. Im, H.S. Suh, Y.E. Jin, W.H. Lee, Y.H. Yoo, K.W. Kim and N.D. Kim. 2001. Apoptotic activity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.* **18**, 979-984.
5. Choi, Y.H., J.H. Baek, M.A. Yoo, H.Y. Chung, N.D. Kim and K.W. Kim. 2000. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **17**, 565-571.

6. Choi, Y.H., M.J. Kim, S.Y. Lee, Y.N. Lee, G.Y. Chi, H.S. Eom, N.D. Kim and B.T. Choi. 2002. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during β -lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* **21**, in press.
7. Choi, Y.H., S.J. Lee, P. Nguyen, J.S. Jang, J. Lee, M.L. Wu, E. Takano, M. Maki, P.A. Henkart and J.B. Trepel. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 28479-28484.
8. Choi, Y.H., W.H. Lee, K.Y. Park and L. Zhang. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 164-173.
9. Cohen, J.J., R.C. Duke, V.A. Fadok and K.S. Sellins. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 267-93.
10. Docampo, R, F.S. Cruz, A. Boveris, R.P. Muniz and D.M. Esquivel. 1979. β -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 723-728.
11. Don, M.J., Y.H. Chang, K.K. Chen, L.K. Ho and Y.P. Chau. 2001. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the β -lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 784-794.
12. Evans, V.G. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* **17**, 461-476.
13. Fukuda, K. 1999. Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**, 519-529.
14. Goijman, S.G. and A.O. Stoppani. 1985. Effects of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 273-280.
15. Guiraud, P., R. Steiman, G.M. Campos-Takaki, F. Seigle-Murandi and M. Simeon de Buochberg. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. *Planta Med.* **60**, 373-374.
16. Hsu, S.Y. and A.J. Hsueh. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol. Rev.* **80**, 593-614.
17. Huang, L. and A.B. Pardee. 1999. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol. Med.* **5**, 711-720.
18. Hueber, A., P. Esser, K. Heimann, N. Kociok, S. Winter and M. Weller. 1998. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and β -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **67**, 525-530.
19. Johnson, J.P. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis. Rev.* **18**, 345-357
20. Kaufmann, S.H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson and G.G. Poirier. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
21. Lai, C.C., T.J. Liu, L.K. Ho, M.J. Don and Y.P. Chau. 1998. β -lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol. Histopathol.* **13**, 89-97.
22. Lazebnik, Y.A., S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, G.G. Poirier and W.C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347
23. Lenaz, G., C. Bovina, G. Formiggini and G.P. Castelli. 1999. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta. Biochim. Pol.* **46**, 1-21.
24. Li, C.J., C. Wang and A.B. Pardee. 1995. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 3712-3715.
25. Li, C.J., L. Averboukh and A.B. Pardee. 1993. β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J. Biol. Chem.* **268**, 22463-22468.
26. Lopes, J.N., F.S. Cruz, R. Docampo, M.E. Vasconcellos, M.C. Sampaio, A.V. Pinto and B. Gilbert. 1978. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**, 523-531.
27. Lowe, S.W., E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne and T. Jacks. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**, 847-849.
28. Martin, S.J., D.M. Finucane, G.P. Amarante-Mendes, G.A. O'Brien and D.R. Green. 1996. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 28753-28756.
29. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
30. Pink, J.J., S. Wuerzberger-Davis, C. Tagliarino, S.M.

- Planchon, X. Yang, C.J. Froelich and D.A. Boothman. 2000. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.* **255**, 144-155.
31. Planchon, S.M., S. Wuerzberger, B. Frydman, D.T. Witiak, P. Hutson, D.R. Church, G. Wilding and D.A. Boothman. 1995. β -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. *Cancer Res.* **55**, 3706-3711.
32. Planchon, S.M., S.M. Wuerzberger-Davis, J.J. Pink, K.A. Robertson, W.G. Bornmann and D.A. Boothman. 1999. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol. Rep.* **6**, 485-492.
33. Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen and C. Borner. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome *c*. *Nature* **391**, 496-499.
34. Rowlands, T.M., J.M. Symonds, R. Farookhi and O.W. Blaschuk. 2000. Cadherins ; crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev. Reprod.* **5**, 53-61.
35. Schaffner-Sabba, K., K.H. Schmidt-Ruppin, W. Wehrli, A.R. Schuerch and J.W. Wasley. 1984. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J. Med. Chem.* **27**, 990-994.
36. Shi, L., W.K. Nishioka, J. Th'ng, E.M. Bradbury, D.W. Litchfield and A.H. Greenberg. 1994. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **263**, 1143-1145.
37. Shiah, S.G., S.E. Chuang, Y.P. Chau, S.C. Shen and M.L. Kuo. 1999. Activation of *c-Jun* NH2-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis through an oxidation-dependent pathway. *Cancer Res.* **59**, 391-398.
38. Steinhilber, U., V. Badock, A. Bauer, J. Behrens, B. Wittman-Liebold, B. Dorken and K. Bommert. 2000. Apoptosis-induced cleavage of β -catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* **275**, 16345-16353.
39. Steinman, R.A., B. Hoffman, A. Iro, C. Guillouf, D.A. Liebermann and M.E. El-Houseini. 1994. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* **9**, 3389-3396.
40. Tewari, M., L.T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen and V.M. Dixit. 1995. Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
41. Weller, M., S. Winter, C. Schmidt, P. Esser, A. Fontana, J. Dichgans and P. Groscurth. 1997. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and β -lapachone. *Int. J. Cancer* **73**, 707-714.
42. Wijnhoven, B.P., W.N. Dinjens and M. Pignatelli. 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* **87**, 992-1005.
43. Wuerzberger, S.M., J.J. Pink, S.M. Planchon, K.L. Byers, W.G. Bornmann and D.A. Boothman. 1998. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β -lapachone. *Cancer Res.* **58**, 1876-1885.
44. Zhan, Q., S. Fan, I. Bae, C. Guillouf, D.A. Liebermann, P.M. O'Connor and A.J. Jr. Fornace. 1994. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* **9**, 3743-3751.

(Received June 29, 2002; Accepted August 21, 2002)