

Membrane Microarray를 이용한 Resveratrol에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 군의 분석

김종식 · 장민정 · 김효은 · 김순영 · 김병오¹ · 손호용^{2*}

안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹상주대학교 생명자원과학대학 생물응용학과, ²안동대학교 생활과학대학 식품영양학과

Received June 1, 2007 / Accepted July 25, 2007

Analysis of Differentially Expressed Genes by Resveratrol Using Membrane Microarray. Jong-Sik Kim, Min-Jung Jang, Hyo-Eun Kim, Soon-Young Kim, Byung-Oh Kim¹ and Ho-Yong Sohn^{2*}. Dept. of Biological Sciences, Andong National University, ¹Dept. of Applied Biology, Sangju National University ²Dept. of Food & Nutrition, Andong National University, Andong, Korea, – In the present study, we investigated whether several phytochemicals (resveratrol, genistein, epicatechin gallate, diallyl disulfide, caffeic acid phenethyl ester) and sulindac sulfide could induce expression of tumor suppressor p53 protein in human colorectal HCT116 cells. We found that p53 was dramatically induced by all phytochemical treatments except sulindac sulfide. Among treated phytochemicals, we selected resveratrol for further experiments because it is one of the highest p53 inducer. Using a Western blot analysis, we found that resveratrol induced p53 in a dose- and time-dependent manner. Additionally, using membrane-based microarray analysis, we found that twenty-five genes were up-regulated and two genes were down-regulated by resveratrol treatment. Among the up-regulated genes, we selected 4 genes and performed reverse-transcription-PCR to confirm microarray data. The results of RT-PCR were highly accorded with those of membrane microarray. In addition, we found that thrombospondin-1 (TSP-1) expression was not dependent on p53 presence, whereas mammary serine protease inhibitor (MASPIN) expression was dependent on p53 expressed by resveratrol treatment. The results of this study may help to promote our understandings of the molecular mechanisms of chemoprevention that are mediated by resveratrol in human colorectal cancer.

Key words – Colorectal cancer, resveratrol, chemoprevention, membrane microarray, p53

서 론

화학적 암 예방법(cancer chemoprevention)은 암의 발생을 예방하거나, 암의 진행을 되돌리거나 혹은 전이 단계로 진행되는 것을 막기 위하여 천연물, 합성제제, 혹은 생물학적 제제를 사용하는 것을 말한다[16]. 현재 암 화학예방법에 많이 사용되고 있는 제제로는 비 스테로이드성 항염증약(NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug), 파이토케미칼(phytochemical), 그 외 칼슘과 비타민 등을 들 수 있다[9,14,15].

Phytochemical은 식물유래의 비 영양성 화학제제로서 항염증[12], 항산화[18], 항암[3,11] 기능이 있는 것으로 알려져 있으며, 다른 암 화학예방제제와는 달리 부작용이 적다는 점에서 많은 주목을 받고 있다. 최근 역학 연구에 의하면 곡류, 채소, 과일 등 phytochemical이 풍부한 식물 유래의 음식을 섭취하면, 암의 발생률이 감소한다는 결과가 보고되었다[8].

이러한 식용 가능한 식물에 함유된 대표적인 phytochemical로는 포도껍질이나 포도주에 많이 함유되어 있는 resveratrol, 녹차에 많이 함유되어 있는 catechin 성분 중 하나인 epicatechin gallate, 콩에 함유되어 있는 isoflavone 중의 하나인 genistein, 마늘에 많이 함유되어 있는 sulfide 계 화합물 중

하나인 diallyl disulfide, 그리고 벌꿀 등에 많이 함유되어 있는 caffeic acid phenethyl ester 등을 예로 들 수 있다[15]. 이들 phytochemical들의 항암 효능과 분자생물학적 기전들이 여러 가지 암을 대상으로 하여 보고된 바 있다[4,13,20,21].

암 억제 유전자인 p53 유전자는 전사조절인자로서 세포성장, 세포사멸의 중심 조절자로서 알려져 있다[17]. 따라서 p53 유전자의 전사조절 대상을 확인하는 것은 p53에 의해 발현되는 세포사멸이나 세포성장 억제를 이해하는데 매우 중요하다[10]. 또한 많은 종류의 다른 phytochemical들이 p53 유전자들의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다[1,2,5,7,19].

본 연구에서는 5종류의 다른 phytochemical과 NSAID의 한 종류인 sulindac sulfide가 암 억제 유전자인 p53의 발현을 유도하는지 확인하였고, p53 유전자의 전사 대상 유전자 가 집적되어 있는 membrane microarray를 이용하여 resveratrol의 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 군을 검색하고, 이들 유전자들의 발현이 p53 의존적인지 여부에 대해 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 시약

대장암 세포주 HCT116는 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)에서 구입하였고, p53 null인

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-5491
E-mail : hysohn@andong.ac.kr

HCT116 세포주는 Johns Hopkins 의대의 Bert Vogelstein 박사로부터 분양 받았다. 두 종류의 세포주 배양은 10% FBS가 첨가된 McCoy5A 배지를 사용하였으며, 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건 하의 incubator에서 실시하였다. Resveratrol을 비롯한 시약들은 Sigma사(MO, USA)로부터 구입을 하였다. 각종 항체(anti-p53, anti-ACTIN)는 Santa Cruz사(CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Western blot analysis

수확된 세포는 RIPA 완충액(50 mM Tris-Cl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 그리고 0.5% sodium deoxycholate)을 첨가하여 lysis시켰다. 총 세포 추출물 중 30 µg의 단백질을 정량하여, 4-12% acrylamide gel (Invitrogen, CA, USA)에서 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane (Invitrogen, CA, USA)으로 전기적으로 전달하였다. Transfer를 마친 membrane은 5% skim milk가 함유된 TTBS 용액(0.1% Tween-20, 100 mM Tris-Cl [pH 7.5], 0.9% NaCl)에서 1시간 이상 blocking 하였다. 1차 항체의 처리는 blocking 용액과 같은 조성에서 12시간 이상 4°C cold chamber에서 수행하였고, 2차 항체의 경우 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 혹은 anti-rabbit 항체를 1시간 실온에서 처리하였다. 일련의 세척과정을 마친 후, ECL kit (Amersham, England)을 사용하여 발광시켜 X-ray film으로 expose한 후 확인하였다.

Total RNA 추출

수확한 세포주로부터 RNeasy mini-prep kit (Qiagen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 분리된 total RNA는 정량 후 membrane microarray 실험 혹은 reverse-transcription-PCR에 각각 사용하였다.

Membrane microarray 실험

사용한 membrane은 p53 유전자의 전사조절 유전자만 집적되어 있는 GEarray p53 signaling pathway microarray (Superarray Inc. MD, USA)를 구입하여 사용하였다. Biotinylated cDNA의 합성은 Amphi-LPR labeling kit (Superarray Inc, MD, USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 실험과정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 총 RNA의 5 µg을 사용하여 cDNA 합성의 주형으로 사용하였고, 합성된 cDNA는 PCR 과정동안 biotin-dUTP (Roche, IN, USA)로 labeling 하였다. 제조된 DNA probe는 prehybridized GEArray에 첨가하였다. Hybridization은 60°C에서 12시간 동안 실시하고, 일련의 세척과정을 통해 membrane microarray를 세척하였다. Blocking을 실시한 후, phosphatase-conjugated streptavidine으로 처리한 후, CDP-Star alkaline phosphatase chemiluminiscent 기질에 노출하였다.

발광된 membrane을 X-ray film에 노출한 후, 각 spot의 intensity를 GAPDH 유전자를 기준으로 육안으로 비교분석 하였다.

RT-PCR

세포로부터 추출한 total RNA 10 µg을 주형으로 하여 cDNA를 제조하였다. 합성된 cDNA의 1/10 부피(1 µl)를 이용하여, 유전자 특이적인 oligo primer와 물을 이용하여 최종 농도를 25 µl로 하였다. 마지막으로 Red Taq polymerase mixture (Sigma, USA) 25 µl를 첨가하여 PCR 반응의 최종농도를 50 µl로 하였다. PCR 반응의 조건은 94°C에서 4분간 denaturation시키고, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 45초의 cycle을 25번 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 최종적인 PCR 산물은 전기영동 후, UV 하에서 사진 촬영하였다.

결과 및 고찰

Phytochemical에 의한 암 억제 유전자 p53의 과대발현

Phytochemical과 sulindac sulfide에 의해 암 억제 유전자인 p53 단백질의 발현이 유도되는 것을 확인하기 위하여, 대장암 세포주인 HCT116 세포주에 50 µM resveratrol, 50 µM genistein, 50 µM epicatechin gallate, 50 µM diallyl disulfide, 10 µM caffeic acid phenethyl ester, 그리고 5 µM의 sulindac sulfide를 24시간 동안 처리하였다. 각 처리군에서 p53 단백질의 발현을 확인하기 위하여 p53 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다(Fig. 1). 그 결과 처리한 모든 phytochemical에 의해 p53 단백질의 발현이 현저히 증가됨을 확인하였다. 반면 비 스테로이드성 항염증약인 sulindac sulfide에 의해서는 p53 단백질이 증가되지는 않았다. 처리한 phytochemical 중 resveratrol과 genistein에 의해 많은 양의 p53 단백질이 발현됨을 확인하였다.

이중 포도껍질이나 적포도주에 많이 존재하는 resveratrol을 농도별(0, 10, 25, 50, 100 µM), 시간별(0, 3, 6, 7, 12, 24, 48시간)로 처리한 다음, p53 단백질의 발현의 변화를 조사하

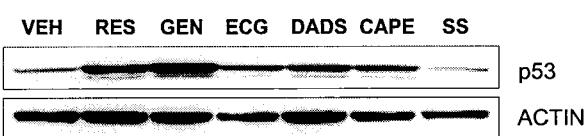


Fig. 1. p53 protein expression in phytochemical-treated HCT116 cells. HCT116 cells were incubated with either VEH (0.1% DMSO), resveratrol (RES, 50 µM), genistein (GEN, 50 µM), epicatechin gallate (ECG, 50 µM), diallyl disulfide (DADS, 50 µM), caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 10 µM), or sulindac sulfide (SS, 5 µM) for 24 hr. The cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis using p53 and Actin antibodies.

였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 농도별로 처리한 경우, 10 μM resveratrol 처리에 의해서는 약한 p53 단백질의 증가를 보여주었고, 처리농도가 증가됨에 따라 p53 단백질의 발현이 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였다. Resveratrol을 시간 대 별로 처리한 결과, 처리한 3시간 이후부터 급격하게 p53 단백질이 증가됨을 확인하였고, 이러한 증가 추세는 처리 후 24시간 까지 지속되었다(Fig. 2B).

Resveratrol에 의해 차별적으로 발현되는 유전자의 분석

Resveratrol에 의해 암 억제 유전자인 p53이 대량으로 발현되는 것을 확인하였다. 암억제 유전자인 p53은 대표적인 전사조절인자로서 암의 조절에 관련된 많은 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 암 억제 유전자 p53의 하위단계의 유전자가 집적되어 있는 미국 Superarray사의 GEarray p53 signaling pathway microarray를 이용하여, resveratrol의 처리에 의해 어떤 유전자들의 발현이 조절되는지를 분석하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 100 μM 의 resveratrol의 처리에 의해 약 25개의 p53 하위 유전자들이 up-regulation 되는 것을 확인하였고, 이에 반해 2개의 유전자들이 resveratrol의 처리에 의해 down-regulation 되는 것을 확인하였다(Table 1, 2).

RT-PCR을 통한 마이크로어레이 실험결과의 검증

Resveratrol의 처리에 up-regulation 되는 유전자들 중 4개(mammary serine protease inhibitor [MASPIN], thrombospondin-1 [TSP-1], tumor necrosis factor-alpha-induced protein 1 [TNFAIP1], wild type p53-induced gene 1 [WIG1])를 선택하여 membrane microarray 실험결과를 검증하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 모든 유전자의 발현이 resveratrol에 의해 up-regulation

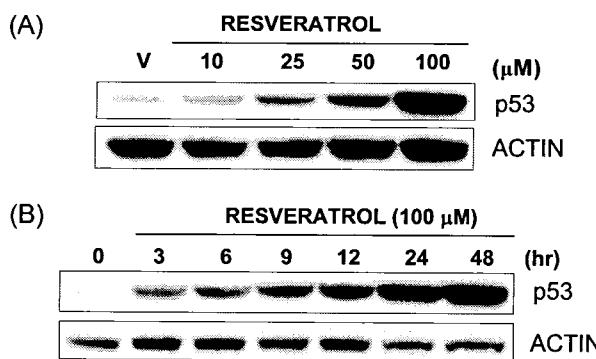


Fig. 2. p53 protein expression by resveratrol. (A) HCT116 cells were treated with four different doses of resveratrol. (B) HCT116 cells were collected at six different time points after 100 μM resveratrol treatment. Thirty micrograms of total proteins were used for Western blot analysis.

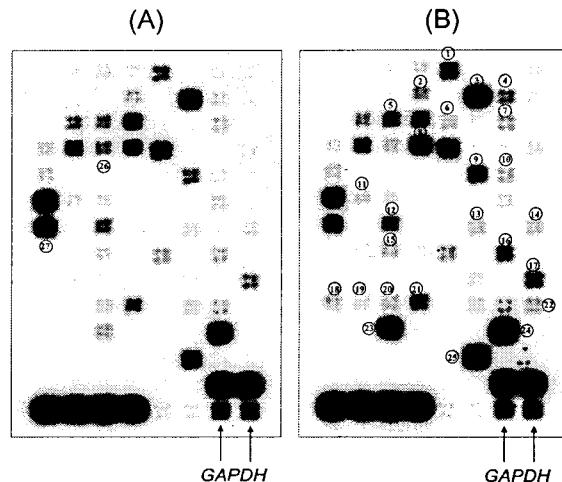


Fig. 3. Changes in gene expression by sulindac sulfide. HCT116 cells were treated either with DMSO (A) or 100 μM resveratrol (B) for 48 hr and then superarray analysis was performed according to the manufacturer's instructions.

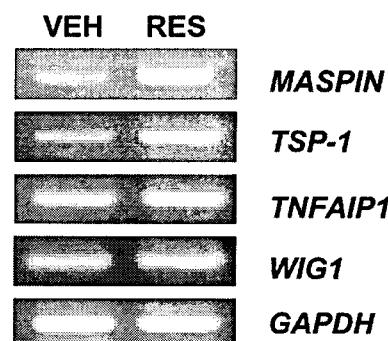


Fig. 4. Gene expression changes by sulindac sulfide-treated HCT116 cells. HCT116 cells were treated either with DMSO (A) or 100 μM resveratrol (B) for 48 hr and then RT-PCR was performed using gene-specific primers.

되는 것을 검증하였고, 반면에 control로 사용한 GAPDH 유전자의 발현의 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 membrane microarray 실험결과와 모두 일치하였다.

p53 null HCT116 세포주를 이용한 p53 의존성 유전자 검증

Membrane microarray에 의해 확인된 유전자의 발현이 실제 p53 발현 의존인지 확인하기 위하여 p53 유전자가 null인 HCT116 세포주를 이용하여 TSP-1 유전자와 MASPIN 유전자의 발현을 확인하였다. TSP-1 유전자는 angiogenesis의 negative regulator로 알려져 있으며, wild type p53의 발현에 의해 TSP-1 유전자의 발현이 촉진되는 것으로 알려져 있다[6]. MASPIN 유전자는 암의 전이를 막는 것으로 알려져 있는 항암 유전자로서 p53 단백질이 MASPIN 유전

Table 1. Up-regulated genes by 50 μM resveratrol treatment

No.	Gene Name	GenBank	Description
1	<i>APEX/Ref1</i>	BC015601	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme)
2	<i>PUMA/BBC3</i>	AF332558	Bcl-1 binding component
3	<i>BRAP</i>	NM_006768	BRCA1 associated protein
4	<i>BRCA1</i>	U68041	Breast cancer 1, early onset
5	<i>cdk1</i>	NM_001786	Cell division cycle2, G1 to S and G2 to M
6	<i>p21Waf1</i>	LA7233	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
7	<i>chk1</i>	AF016582	CHK1(checkpoint, S.Pombe) homolog
8	<i>CSNK2A2</i>	NM_001896	Casein kinase 1, alpha 1
9	<i>FAF1</i>	NM_007051	Fas(TNFRSF6) associated factor 1
10	<i>GADD45</i>	M60974	DNA-damage-inducible transcript 1
11	<i>HIPK2</i>	NM_022740	Homeodomain interacting protein kinase 2
12	<i>mdm2</i>	Z12020	Mouse double minute 2, human homolog
13	<i>RTP</i>	NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1
14	<i>NUMB</i>	NM_003744	Numb homolog (Drosophila)
15	<i>pig8</i>	AF010313	Etoposide-induced mRNA
16	<i>PKC alpha</i>	NM_002737	Homo sapiens protein kinase C, alpha
17	<i>p53R2</i>	AB036063	Homo sapiens p53R2 mRNA for ribonucleotide reductase
18	<i>MASPIN</i>	NM_002639	protease inhibitor 5
19	<i>stratifin</i>	AF252284	Homo sapiens 14-3-3 sigma protein
20	<i>SIRT1</i>	NM_012238	Sirtuin silent mating type information regulation 2 homolog
21	<i>Sp1</i>	AF252284	Homo sapiens transcription specificity factor Sp1
22	<i>TSP1</i>	NM_003246	Homo sapiens thrombospondin protein
23	<i>TNFAIP1</i>	NM_021137	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein
24	<i>ASPP2</i>	U09582	Tumor protein p53 binding protein, 2
25	<i>WIG1</i>	NM_022470	p53 target zinc finger protein

Table 2. Down-regulated genes by 50 μM resveratrol treatment

No.	Gene Name	GenBank	Description
26	<i>CK II</i>	NM_001895	Homo sapiens casein kinase 2, alpha 1 polypeptide
27	<i>MAP4</i>	M64571	Microtubule-associated protein 4

자의 프로모터에 있는 p53 consensus-binding site에 직접 결합 함으로서 *MASPIN* 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[22]. 따라서 두 유전자 모두 p53 유전자에 의해 up-regulation 되는 것으로 생각된다.

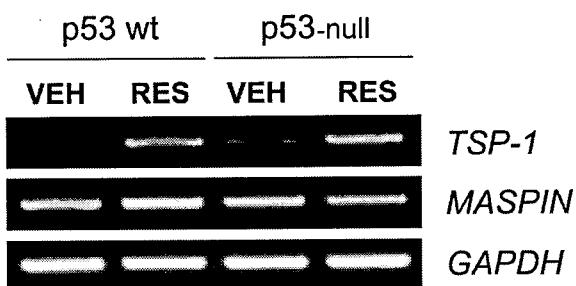


Fig. 5. Confirmation of regulatory effect of *TSP-1* and *MASPIN* gene expressions by p53. HCT116 cells or p53-null HCT116 cells were treated with 100 μM resveratrol for 24 hr and then RT-PCR was carried out using gene-specific primers.

하지만, Fig. 5에서 보는 바와 같이 *TSP-1* 유전자는 p53 유전자의 존재와 관계없이 발현이 up-regulation 되는 것을 확인할 수 있었고, 이에 반해 *MASPIN* 유전자의 발현은 p53이 존재해야만 up-regulation 된다는 것을 확인할 수 있었다. 이 연구 결과는 *TSP-1* 유전자와 *MASPIN* 유전자가 모두 p53 하위의 유전자이기는 하나, resveratrol에 의한 두 유전자의 발현 증가는 서로 다른 기전에 의해 조절된다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 모델과 연구 방법은 어떤 유전자의 발현이 암 억제유전자인 p53의 존속인지를 결정하는데 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다.

요약

본 연구에서는 다섯 종류의 phytochemical (resveratrol, genistein, epicatechin gallate, diallyl disulfide, caffeic acid phenethyl ester)과 sulindac sulfide가 암 억제 단백질 p53을 유도할 수 있는지에 대해 연구하였다. 처리한 모든 phy-

tochemical에 의해 p53 단백질의 발현이 강하게 유도된 반면, sulindac sulfide에 의해서는 p53 단백질이 유도되지 않았다. 처리한 phytochemical 중 포도껍질이나 와인에 많이 들어있는 resveratrol에 의해 p53 단백질이 농도의존적 혹은 처리시간 의존적으로 증가 발현되는 것을 확인하였다. 암 억제 단백질인 p53 하위 단계의 유전자들만 집적되어 있는 membrane microarray를 이용하여 실험을 수행한 결과, 25개의 유전자가 up-regulation 된 반면, 2개의 유전자가 down-regulation 되는 것을 확인하였다. Up-regulation 되는 유전자중 4개를 선택하여, RT-PCR을 수행한 결과 모두 membrane microarray 실험의 결과와 일치하였다. 게다가 p53 null인 HCT116 세포주를 이용한 RT-PCR을 통하여 TSP-1 유전자의 발현은 p53 의존적이지 않은 반면, MASPIN 유전자는 p53 의존적임을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 resveratrol에 의한 화학적 암 예방법의 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 안동대학교 특성화 추진 지원 사업비에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Baek, S. J., J. S. Kim, F. R. Jackson, T. E. Eling, M. F. McEntee and S. H. Lee. 2004. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 2425-2432.
- Bottone, F. G. Jr., S. J. Baek, J. B. Nixon and T. E. Eling. 2002. Diallyl disulfide(DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene(NAG-1) by a p53-dependent mechanisms in human colorectal HCT116 cells. *J. Nutr.* **132**, 773-778.
- Cal, C., H. Garban, A. Jazirehi, C. Yeh, Y. Mizutani and B. Bonavida. 2003. Resveratrol and cancer: chemo-prevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **3**, 77-93.
- De Martino, A., G. Fliomeni, K. Aquilano, M. R. Ciriolo and G. Rotilio. 2006. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 742-749.
- Ding, H., W. Duan, W. G. Zhu, R. Ju, K. Srinivasan, G. A. Otterson and M. A. Villalona-Calero. 2003. P21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 950-956.
- Harada, H., K. Nakagawa, M. Saito, S. Kohno, S. Nagato, K. Furukawa, Y. Kumon, K. Hamada and T. Ohnishi. 2003. Induction of wild-type p53 enhances thrombo-spondin-1 expression in human glioma cells. *Cancer Lett.* **191**, 109-119.
- Huang, C., W. Y. Ma, A. Goranson and Z. Dong. 1999. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis* **20**, 237-242.
- Jacobs, D., R. Jr., L. Marquart, J. Slavin, L. H. Kushi. 1998. Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutr. Cancer* **30**, 85-96.
- Lamprecht, S. A. and M. Lipkin. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: Molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 601-614.
- Mirza, A., Q. Wu, L. Wang, T. McClanahan, W. R. Sishop, F. Gheyas, W. Ding, B. Hutchins, T. Hockenberry, P. Kirschmeier, J. R. Greene and S. Liu. 2003. Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene* **22**, 3645-3654.
- Nair, S., W. Li and A. N. Kong. 2007. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **28**, 459-472.
- Nonn, L., D. Duong and D. M. Peehl. 2007. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. *Carcinogenesis* **28**, 1188-1196.
- Qin, J., L. P. Xie, X. Y. Zheng, Y. B. Wang, Y. Bai, H. F. Shen, L. C. Li and R. Dahiya. 2007. A component green tea, (-)-epicatechingallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 852-857.
- Ricchi, P., R. Zarrilli, A. di Palma and A.M. Acquaviva. 2003. Onsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br. J. Cancer* **88**, 803-807.
- Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
- Tsao, A. S., E. S. Kim and W. K. Hong. 2004. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J. Clin.* **54**, 150-180.
- Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Wang, S. Y., H. N. Chang, K. T. Lin, C. P. Lo, N. S. Yang and L. F. Shyur. 2003. Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extracts from *Lactuca indica*. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1506-1512.
- Watabe, M., K. Hishikawa, A. Takyanaqi, N. Shimizu and T. Nakaki. 2004. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NF- κ B and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 6017-6026.
- Whitsett, T. G. Jr and C. A. Lamartiniere. 2006. Genistein and resveratrol: mammary cancer chemoprevention and

- mechanisms of action in the rat. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **6**, 1699-1706.
21. Xiang, D., D. Wang, Y. He, J. Xie, Z. Zhong, Z. Li and J. Xie. 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-cat-
- enin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* **17**, 753-762.
22. Zou, Z., C. Gao, A. K. Nagaich, T. Connell, S. Saito, J. W. Moul, P. Seth, E. Appella and S. Srivastava. 2000. p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J. Biol. Chem.* **275**, 6051-6054.