

Piceatannol에 의한 인체 혈구암세포의 증식 억제 및 telomerase 활성 저하

최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오품질제어학과

Received December 11, 2007 / Accepted January 7, 2008

Induction of S Phase Arrest of the Cell Cycle by Piceatannol is Associated with Inhibition of Telomerase Activity in Human Leukemic U937 Cells. Yung Hyun Choi*. *Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, South Korea* - Piceatannol is a polyphenol that is found in abundant quantities in grapes and wine. Although recent experimental data revealed the anti-cancer potency of piceatannol, the molecular mechanisms underlying the antileukemic activity have not yet been studied in detail. In the present study, we investigated further possible mechanisms by which piceatannol exerts its anti-proliferative action in cultured human leukemia U937 cells. Exposure of U937 cells to piceatannol resulted in growth inhibition and induction of apoptosis as measured by MTT assay and flow cytometry analysis, which was associated with S phase arrest of the cell cycle. Piceatannol treatment markedly inhibited the activity of telomerase, and the levels of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and telomerase-associated protein-1 (TEP-1), main determinants of the telomerase enzymatic activity, were progressively down-regulated by piceatannol treatment in a dose-dependent fashion. However, the levels of cyclooxygenases (COXs) expression and prostaglandin E2 (PGE2) release were not changed in piceatannol-treated U937 cells. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of piceatannol.

Key words : U937 cells, piceatannol, human telomerase reverse transcriptase (hTERT), telomerase-associated protein-1 (TEP-1), telomerase

서론

많은 역학적 조사에서 풍부한 채소와 야채의 섭취는 암의 예방 및 발생 억제와 매우 밀접한 상관성이 있음이 밝혀지고 있다[6,18]. Piceatannol (3,3',4,5'-tetrahydroxy-*trans*-stilbene)은 resveratrol의 derivatives 중 하나로서 포도, 대황, 사탕수수 등에 많이 함유되어 있는 ydroxystilbene의 일종으로[3,19], 등대풀속(屬) 식물인 *Euphorbia lagascae*에서 처음 분리되었다[8]. Piceatannol은 면역 억제력을 가지는 protein-tyrosine kinase 저해제로서 처음 보고된 이후[9], 전사 조절 인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)의 활성 억제를 통하여 강력한 항염증 효능이 있는 것으로 보고되어지고 있다[1,12]. Piceatannol은 또한 B 및 T 림프구에서 interferon- α 에 의해 유도된 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)의 signal transducer 및 활성화로서의 기능을 억제함이 밝혀졌는데[13,22], 이는 piceatannol이 다양한 세포 내 표적인자의 발현을 조절함으로써 pro-inflammatory 반응을 억제할 수 있음을 의미한다. 최근 연구에 의하면 piceatannol은 세포주기 교란 및 apoptosis 유도를 통하여 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있으나[2,7,15,26],

새로운 암예방 및 항암 작용 기전의 표적이 되고 있는 cyclooxygenase (COX) 및 telomerase 활성과 연관된 연구는 거의 이루어진 바가 없다. 본 연구에서는 piceatannol의 항암 효능에 관한 추가적인 자료를 얻기 위하여 piceatannol에 의한 인체 혈구암세포의 증식억제와 연관된 COX 및 telomerase 활성과 그들에 의해 조절 받는 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성 및 telomere 조절인자에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 piceatannol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 적정농도로 희석하여 준비하였다. mRNA 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타내었고, 단백질 분석을 위하여 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. PGE2 생성량의 측정을 위한 enzyme immunoassay (EIA) kit는 Amersham Corp.에서 구입하여 사용하였다. Telomerase 활

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : lab301@nate.com

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
hTERT	Sence	5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CIT-CAA-CC-3'
	Antisence	5'-GTT-CIT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3'
TEP-1	Sence	5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3'
	Antisence	5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3'
hTR	Sence	5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'
	Antisence	5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence	5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3'
	Antisence	5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
Sp-1	Sence	5'-ACA-GGT-GAG-VTT-GAC-CTC-AC-3'
	Antisence	5'-GTT-GGT-TTG-CAC-CTG-GTA-GT-3'
COX-1	Sence	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CIT-3'
	Antisence	5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sence	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisence	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CIT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CIT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

성의 측정은 PCR에 기초를 둔 면역반응분석법[PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany]을 이용하였다.

암세포의 배양

실험에 사용한 U937 인체혈구암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장억제 조사

세포배양용 6 well plate에 well 당 1×10⁵개의 U937 세포를 분주하고 piceatannol을 농도별로 처리한 다음 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 200 μl씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 100 μl씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

정상 및 piceatannol이 함유된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, CycleTEST PLUS DNA REAGENT

Kit를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 primer, DEPC water, ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다[11].

단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

정상 및 piceatannol이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감

광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

PGE2의 측정

동일 조건에서 준비된 세포에 piceatannol을 농도별로 배지에 희석하여 처리하고, 이때 마지막 배지의 양을 모두 180 μ l로 통일시켰다. 48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide가 함유된 buffer를 20 μ l 첨가하여 총 배지의 양이 200 μ l 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 Trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50 μ l의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값을 기준으로 PGE2의 양을 추정하였다.

Telomerase 활성 측정

준비된 세포들을 모아 200 ml lysis reagent에 1×10^6 개의 세포를 섞어서 30분간 얼음 위에서 lysis를 실시하였다. TRAP 반응을 위하여 2 mg의 단백질이 함유된 2 ml의 세포 추출액을 25 ml의 reaction mixture에 혼합 후, 증류수를 첨가하여 최종 volume이 50 ml가 되도록 하였다. PCR은 primer elongation (25°C에서 30분간), telomerase inactivation (94°C에서 5분간), product amplification (94°C에서 30초, 50°C에서 30초 및 72°C에서 90초를 30 cycles)의 순서로 진행이 되었으며, 이를 이용하여 hybridization과 ELISA reaction 반응을 시켰다.

결과 및 고찰

Piceatannol에 의한 U937 세포의 증식 억제

인체 혈구암세포의 증식에 미치는 piceatannol의 영향을 조사하기 위하여 U937 세포에 piceatannol을 48시간 동안 처리한 후, MTT assay법에 준하여 piceatannol 처리에 의한 세포증식의 억제 정도를 조사하였다. 실험방법에 서술한 것처럼 piceatannol이 처리된 U937 세포를 대상으로 ELISA reader를 이용하여 얻은 흡광도 결과는 Fig. 1A와 같다. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이 20 μ M 이하의 저농도 처리군서는 대조군에 비하여 큰 차이가 없었으나, piceatannol 처리농도가 증가될수록 흡광도는 더욱 감소되어 60 μ M 및 80 μ M 처리군에서는 대조군에 비하여 약 67% 및 75% 정도 감소되었다. 즉 piceatannol이 적정 농도이상 처리된 배지에서 자란 암세포는 piceatannol 처리농도 의존적으로 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

Piceatannol에 의한 세포주기 S기 arrest 및 apoptosis 유도

세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다[21,25]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며,

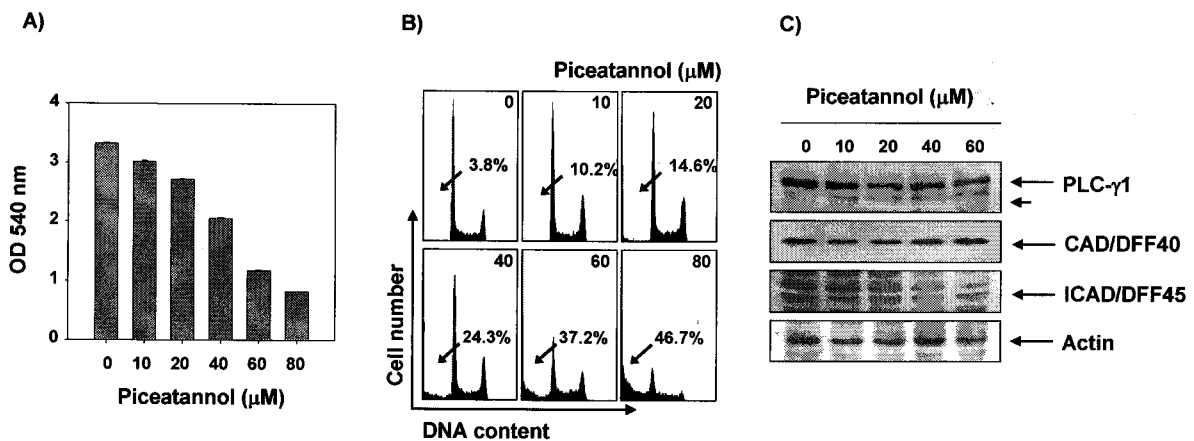


Fig. 1. Growth inhibition and apoptosis induction by piceatannol treatment in U937 human leukemic cells. (A) U937 cells were plated at 1×10^5 cells per 60-mm plate, and incubated for 24 hr. The cells were treated with variable concentrations of piceatannol for 48 hr. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments. (B) Effects of piceatannol on cell cycle distribution of U937 cells. Exponentially growing cells were treated for 48 hr with indicated concentrations of piceatannol. The cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. Arrows mean the frequency sub-G1 cell population. Results are expressed as average from two separate experiments. (C) The cells were incubated with piceatannol for 48 hr, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

특정 시기의 세포주기 억제제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다[21,25]. 따라서 piceatannol의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 진행억제와 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 U937 세포의 세포주기 분포에 미치는 piceatannol의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 piceatannol이 처리된 배지에서 U937 세포를 48시간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 즉 piceatannol이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포의 경우 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 50%, 28% 및 22% 정도였다. 그러나 piceatannol이 처리된 배지에서 자란 U937 세포의 경우 특히 S기에 속하는 세포의 빈도가 piceatannol 처리 농도가 증가할수록 유의적으로 상승되어 60 μ M 및 80 μ M 처리군에서 각각 약 36% 및 42%를 차지하였다. 이러한 S기 세포의 빈도 증가에 따라 G1 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 상대적으로 감소되어 piceatannol에 의한 U937 세포의 증식억제는 세포주기 S기 arrest와 연관이 있음을 알 수 있었다. 이는 인체 흑색종 SK-Mel-28 세포에서 관찰된 경우와 잘 일치되는 결과였다[15]. 또한 apoptosis가 일어난 세포의 정량적 빈도에 해당되는 세포주기 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도 역시 매우 증가되었고, apoptosis 유발이 일어난 세포들에서 관찰되는 phospholipase C (PLC)- γ 1 및 inhibitor of caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor (ICAD/DFF)45의 단편화[11,28]도 관찰되어, piceatannol 처리에 의한 U937 세포의 S기 arrest를 통한 증식억제는 apoptosis 유발과 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Telomerase의 활성 및 관련 조절인자의 발현에 미치는 piceatannol의 영향

Telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences (TTAGGG)로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다[17]. 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서

는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다[14,17]. 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현증가로 인한 세포주기 arrest 유발로 설명되어지고 있다[16,24]. 특히 암과 관련된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절 인자의 결합부위(Sp-1 및 c-myc 등)를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다[4,17]. 이러한 중요성을 고려하여 piceatannol의 처리에 의한 U937 세포의 증식 억제가 혈구암세포 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 hTERT를 포함한 human telomerase RNA (hTR), telomerase-associated protein-1 (TEP-1) 및 Sp-1과 c-myc과 같은 전사조절인자의 발현에 미치는 piceatannol의 영향과 telomerase 활성에 미치는 piceatannol의 영향을 측정하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 piceatannol의 처리에 의하여 hTERT의 전사수준이 piceatannol 처리 농도 의존적으로 가장 많이 감소되었으며, 또 다른 조절인자인 TEP-1도 다소 감소되었다. 그러나 hTERT의 전사조절에 중요한 역할을 하는 c-myc 및 Sp-1의 발현에는 큰 변화가 없었다(Fig. 2A). 또한 piceatannol의 처리에 따라 telomerase의 활성 역시 piceatannol 처리 농도가 증가될수록 매우 유의적으로 감소되어, piceatannol 처리에 따른 U937 세포의 증식억제는 telomerase 활성 저하와 어느 정도 연관성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 2B).

COXs의 발현 및 PGE2 생성에 미치는 piceatannol의 영향

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다[10]. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다[5,23]. 또한 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2가 밀접한 관계

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of U937 human leukemic cells cultured in the presence or absence of various concentration of piceatannol for 48 hr

Ppiceatannol	% of cell		
	G1	S	G2/M
0	49.87	28.33	21.80
10	46.76	25.77	27.47
20	44.82	27.74	27.44
40	48.82	24.27	26.91
60	38.63	36.48	24.89
80	44.54	41.48	13.98

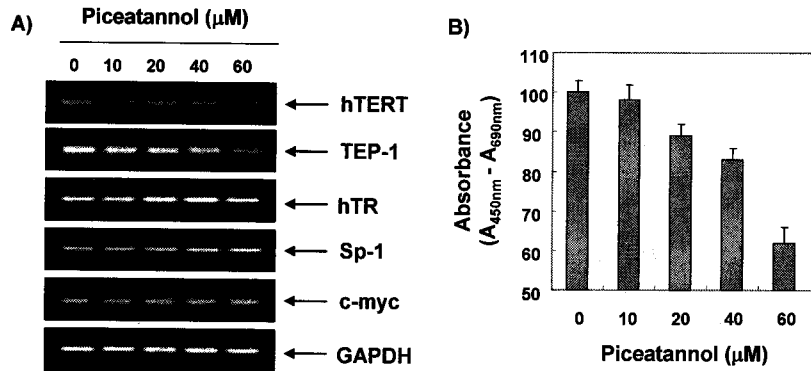


Fig. 2. Down-regulation of hTERT and TEP-1, and inhibition of telomerase activity by piceatannol treatment in U937 human leukemic cells. (A) After 48 hr incubation with piceatannol, total RNAs were isolated using an RNA Zol B reagent and RT-PCR was performed using indicated primers described in materials and methods. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 hr incubation with piceatannol, telomerase activity of U937 cells was measured using a TRAP-ELISA kit. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

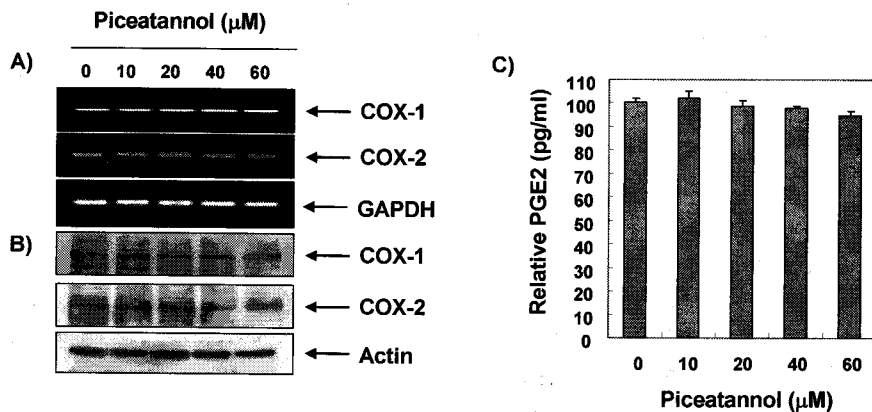


Fig. 3. Effects of piceatannol treatment on the levels of COXs and PGE2 in U937 human leukemic cells. (A) The cells were incubated with piceatannol for 48 hr and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using COX-1 and COX-2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) The cells were incubated with piceatannol for 48 hr, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. (C) U937 cells were treated with the indicated concentrations of piceatannol for 48 hr and collected. The PGE2 accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. Results are expressed as the means±S.E. of three independent experiments.

를 가진다고 볼 수 있다. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 항암 전략이 대두되고 있다[10,20]. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor kappa B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다[27]. 이러한 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고

있다. 따라서 piceatannol이 처리된 U937 세포를 대상으로 COX-1 및 -2의 mRNA 발현과 단백질 변화 가능성과 PGE2의 생성에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 그러나 Fig. 3의 결과에서 볼 수 있듯이 piceatannol의 처리에 따라 COX-1 및 -2 뿐만 아니라 PGE2의 생성에는 아무런 영향이 없는 것으로 나타나, piceatannol 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에는 이들 인자들의 발현 변화가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

요 약

이상의 연구 결과에 의하면 piceatannol의 처리에 의한

U937 세포의 증식억제는 세포주기 S기 arrest 및 apoptosis 유발과 뚜렷한 연관성이 있었다. 또한 piceatannol은 hTERT 및 TEP-1 유전자의 발현 저하와 연관된 telomerase 활성의 저하 효과도 나타내었으나, COXs의 발현 및 PGE2의 생성에는 큰 변화를 주지 못하였다. 따라서 본 연구의 결과는 암세포에서 높게 발현되는 telomerase 활성 조절제로서 piceatannol의 적용이 가능함을 보여주며, 이는 piceatannol의 항암작용을 이해하는데 매우 유용한 자료라 생각한다.

감사의 글

본 논문은 농림부 농림기술개발사업의 지원(105113-03-2-SB010)에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

References

- Ashikawa, K., S. Majumdar, S. Banerjee, A. C. Bharti, S. Shishodia and B. B. Aggarwal. 2002. Piceatannol inhibits TNF-induced NF- κ B activation and NF- κ B-mediated gene expression through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation. *J. Immunol.* **169**, 6490-6497.
- Barton, B. E., J. G. Karras, T. F. Murphy, A. Barton and H. F. Huang. 2004. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 11-20.
- Bavaresco, L., C. Fregoni, E. Cantu and M. Trevisan. 1999. Stilbene compounds: from the grapevine to wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **25**, 57-63.
- Cerni, C. 2000. Telomeres, telomerase, and myc. *An. Update. Mutat. Res.* **462**, 31-47.
- Dempke, W., C. Rie, A. Grothey and H. J. Schmoll. 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**, 411-417.
- Dwyer, J. T. 1998. Health aspects of vegetarian diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**, 712-738.
- Ferreira, M. J., N. Duarte, N. Gyemant, R. Radics, G. Cherepnev, A. Varga and J. Molnar. 2006. Interaction between doxorubicin and the resistance modifier stilbene on multidrug resistant mouse lymphoma and human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **26**, 3541-3546.
- Ferrigni, N. R., J. L. McLaughlin, R. G. Powell and C. R. Smith Jr. 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *J. Nat. Prod.* **47**, 347-352.
- Geahlen, R. L. and J. L. McLaughlin. 1989. Piceatannol (3,4,3',5'-tetrahydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 241-245.
- Giercksky, K. E. 2001. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15**, 821-831.
- Han, M. H., S. O. Kim, G. Y. Kim, T. K. Kwon, B. T. Choi, W. H. Lee and Y. H. Choi. 2007. Induction of apoptosis by sanguinarine in C6 rat glioblastoma cells is associated with the modulation of the Bcl-2 family and activation of caspases through downregulation of extracellular signal-regulated kinase and Akt. *Anticancer Drugs* **18**, 913-921.
- Jin, C. Y., D. O. Moon, K. J. Lee, M. O. Kim, J. D.F. Lee, Y. H. Choi, Y. M. Park and G. Y. Kim. 2006. Piceatannol attenuates lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and NF- κ B-related proinflammatory mediators in BV2 microglia. *Pharmacol. Res.* **54**, 461-467.
- Kumari, A. L., A. M. Ali, S. Das, B. V. Pardhasaradhi, C. H. Varalakshmi and A. Khar. 2005. Role of STAT3 and NF- κ B signaling in the serum factor-induced apoptosis in AK-5 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 860-867.
- Kyo, S. and M. Inoue. 2002. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 688-697.
- Larrosa, M., F. A. Tomas-Barberan and J. C. Espin. 2003. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4576-4584.
- Narayan, S., A. S. Jaiswal, A. S. Multani and S. Pathak. 2001. DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* **85**, 898-901.
- Poole, J. C., L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol. 2001. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* **269**, 1-12.
- Riboli, E. and T. Norat. 2003. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruits and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 559S - 569S.
- Roupe, K., X. W. Teng, X. Fu, G. G. Meadows and N. M. Davies. 2004. Determination of piceatannol in rat serum and liver microsomes: pharmacokinetics and phase I and II biotransformation. *Biomed. Chromatogr.* **18**, 486-491.
- Sawaoka, H., S. Tsuji, M. Tsujii, E. S. Gunawan, Y. Sasaki, S. Kawano and M. Hori. 1999. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. *Lab. Invest.* **79**, 1469-1477.
- Sherr, C. J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
- Su, L. and M. David. 2000. Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon- α/β receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J. Biol. Chem.* **275**, 12661-12666.
- Vainio, H. 2001. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* **94**, 613-614.
- Vaziri, H., M. D. West, R. C. Allsopp, T. S. Davison, Y. S. Wu, C. H. Arrowsmith, G. G. Poirier and S. Benchimol. 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ri-

- bose) polymerase. *EMBO J.* **16**, 6018-6033.
25. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
26. Wieder, T., A. Prokop, B. Bagci, F. Essmann, D. Bernicke, K. Schulze-Osthoff, B. orken, H. G. Schmalz, P. T. Daniel and G. Henze. 2001. Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia* **15**, 1735-1742.
27. Yamamoto, Y. and R. B. Gaynor. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **107**, 135-142.
28. Yoshida, A., Y. Pommier and T. Ueda. 2006. Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. *Int. J. Hematol.* **84**, 31-37.