

# Curcumin이 인체대장암세포주인 SW480 cell에서 세포사멸에 미치는 영향\*

최 옥 숙 · 김 우 경<sup>§</sup>

단국대학교 자연과학부 식품영양학전공

## Effects of Curcumin on Apoptosis in SW480 Human Colon Cancer Cell Line\*

Choi, Ok Suk · Kim, Woo Kyoung<sup>§</sup>

Department of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

### ABSTRACT

Curcumin, a natural compound extracted from rhizomes of *Curcuma longa*, has been shown to possess potent anti-inflammatory and anti-tumor activity. The mechanism by which curcumin initiates apoptosis remains poorly understood. In this study, we investigated the effects of curcumin on caspase-3 activity and protein expression of procaspase-3, Bcl-2, Bax, total Akt and phosphorylated Akt in SW480 human colon cancer cell. We cultured SW480 cells in the presence of various concentrations (0, 10, 20 or 30  $\mu$ M) of curcumin. Curcumin inhibited colon cancer cell growth in a dose-dependent manner ( $p < 0.05$ ). Caspase-3 activity was significantly increased dose-dependently in cells treated with curcumin ( $p < 0.05$ ), concisely procaspase-3 expression was significantly decreased. Bcl-2 levels were decreased dose-dependently in cells treated with curcumin ( $p < 0.05$ ), but Bax remained unchanged. In addition, phosphorylated Akt levels and total Akt levels were markedly lower in cells treated with 20  $\mu$ M of curcumin treatment ( $p < 0.05$ ). In conclusion, we have shown that curcumin inhibits cell growth and induces apoptosis in SW480 human colon cancer cell lines via Akt signal pathway. (*Korean J Nutrition* 37(1): 31~37, 2004)

KEY WORDS : curcumin, apoptosis, caspase-3, Bcl-2, Bax, Akt.

### 서 론

우리나라에서 최근 각종 암의 발생률이 증가하여 2001년도에는 암으로 인한 사망률이 전체 사망률의 24.4%를 차지하여 사망 원인 1위를 차지하게 되었다.<sup>1)</sup> 암의 원인으로는 유전, 환경 등이 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며,<sup>2)</sup> 환경인자 중에서도 식생활이 위암, 대장암 등의 소화기관 암과 유방암, 자궁암, 전립선암 등 호르몬 관련 암 발생에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 대장암은 서구에서 많이 발생되어 왔으나, 우리 나라에서도 경제 발전으로 인한 생활 수준 향상과 그로 인해 식생활 문화가 서구화되어 열량 섭취가 증가하고 동물성 식품의 소비가 증가하여 대장암 발생이 높은 증가 추세를 보이고 있다.<sup>4)</sup>

이에 암을 예방하고 치료하는 약품과 식품의 개발이 활발하게 이루어지고 있으나 항암제의 경우 대부분 화학물질로 부작용이 심하여 문제가 되고 있다. 그러므로 부작용이 적으면서 유효한 항암제 개발을 하기 위해 천연물에 존재하는 생리활성 물질의 검색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>5)</sup>

Curcumin [1, 7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione]은 울금 (*Curcuma longa*)의 구근에서 추출한 turmeric 분말의 주요 구성성분으로 하루에 180 mg 정도를 섭취하여도 부작용이 없는 안전한 물질로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 생체실험에서 curcumin은 암의 개시과정을 억제하고,<sup>7,8)</sup> 세포실험에서 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 그리고 curcumin이 여러 세포에서 세포사멸을 촉진하는 것으로 보고되고 있으나<sup>10-12)</sup> curcumin이 세포사멸에 미치는 세포, 분자생물학적 기전에 대해서는 아직 알려져 있지 않다.

세포사멸 (apoptosis)은 예정세포사멸 (programmed cell death)로 세포의 위축 (shrinkage), DNA 분절 (DNA fra-

접수일 : 2003년 12월 10일

채택일 : 2004년 1월 15일

\*This work was supported by grant from Dankook University, 2003.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

gmentation), caspase로 알려져 있는 cysteine protease의 활성화 등으로 특징지워진다.<sup>13)</sup> 일반적으로 세포사멸은 두 가지 다른 경로에 의해 일어나는데 하나는 수용체매개경로이며 다른 하나는 화학적물질이 유도하는 세포사멸경로이다.<sup>14,15)</sup> 첫 번째 경로에는 tumor necrosis factor (TNF) family와 같은 cytokine이 그들의 death 수용체와 작용하여 결과적으로 caspase-3을 활성화시켜 세포사멸을 유도하는 것이다. 이와는 달리 화학적 물질에 의해 유도되는 세포사멸경로에는 caspase-8에 의한 BID의 분해과정, 미토콘드리아로부터의 cytochrome c의 분비 촉진, caspase-9의 활성화를 통한 caspase-3의 활성을 유도한다. 미토콘드리아가 관련하는 화학적 세포사멸에는 Bcl-family가 관여하는데 Bcl-2 family에는 세포사멸을 억제하는 단백질과 촉진시키는 단백질로 구성되어 있다.<sup>16)</sup> 세포사멸을 억제하는 단백질에는 Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, 세포사멸을 촉진시키는 단백질에는 Bax, Bad, Bak 등이 대표적이며 Bcl-2와 Bax의 균형이 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup>

그러므로 본 실험에서는 curcumin의 항암작용에 대한 기전을 연구하기 위해 curcumin이 암세포에서 세포사멸을 유도하는지, 여기에 Bcl-2 family, Akt가 관여하는 지를 알아보고자 하였다.

## 연구방법

### 1. 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 인간의 대장암세포인 SW480 cell은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco/BRL, USA)를 사용하여 배양하였다. 3차 증류수로 배지 용액을 만들고 0.22 μm pore size membrane filter (Millipore, USA)를 사용하여 멸균하였고, 세포의 유지를 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL)과 오염방지를 위해 항생제로 1,000 units/ml penicillin, 1,000 μg/ml streptomycin (Gibco/BRL)를 첨가하였다. 세포는 dish의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어주고 trypsin EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하고 배지는 2일마다 교환하여 주었다. Curcumin (Sigma, St. Louis, MO, USA)은 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma)에 25 mM로 stock을 만들어 냉동 보관하여 사용하였고 대조군을 포함하여 모든 well에는 DMSO의 농도를 일정하게 하였다.

### 2. 세포증식실험 (MTT assay)

Curcumin의 첨가농도 증가가 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 24 well plate에  $2.5 \times 10^4$  cells/well의 농도로 plating 하고, 48시간 후에 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium (SFM, transferrin 5 μg/ml, selenium 5 ng/ml)으로 배지를 교환하고 24시간 후 0, 10, 20, 30 uM의 curcumin을 medium에 첨가하여 교환하였다. Curcumin 첨가 후 0, 48, 96시간이 경과한 후 MTT assay 방법으로 살아있는 세포를 측정하였다. MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide], sigma, USA)를 1 mg/ml를 1 ml씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 incubation시켜 iso-propanol 0.5 ml에 용해시킨 다음 490 nm의 파장에서 microplate reader (Molecular devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 3. Caspase-3 activity 실험

Apoptosis를 유도하는 caspase-3는 cystein protease family로써 활성화되어 기질결합체인 DEVD-pNA를 분해하여 p-nitoranilin, pNA을 생성하는데 이러한 성질을 이용하여 pNA의 푸른빛으로 활성정도를 측정할 수 있다. Curcumin을 처리하여 배양한 세포를  $2 \times 10^6$  cells/ml로 맞추어 2,000 rpm으로 원심 분리하고 상층액을 버리고 세포만을 얻었다. 세포에 차가운 lysis buffer 50 μl를 첨가하고 10분간 얼음위에서 두었다가 4°C 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이것의 상층액 50 μl를 96 well plate에 옮기고 2X reaction buffer/DTT용액을 가한 다음 37°C에서 incubation하였다. Caspase-3 substrate (DEVD-pNA)를 첨가하여 3시간동안 37°C에서 incubation한 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하고 실험군의 활성을 대조군에 대한 상대적인 활성정도로 표시하였다.

### 4. Western blot 실험

세포사멸과 관련한 여러 단백질의 발현을 western blot을 실시하여 알아보았다. SW480 cell을  $1 \times 10^5$  cell/dish의 농도로 100 mm dish에 분주하고 48시간 후에 SFM으로 배지를 교환하고 24시간 후 0, 10, 20, 30 microM의 curcumin medium을 만들어 교환하였다. 48시간 후에 새로운 medium을 교환하고 그 후 24시간 후에 차가운 rinse buffer (PBS, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate)를 이용하여 세척하고 세포를 모아 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 차가운 lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF, 20 μg/ml

aprotinin, 10  $\mu$ g/ml antipain, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 80  $\mu$ g/ml benzamidine HCl)를 1 ml씩 넣어 40분간 4°C에서 end of end shaker로 incubation 시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 모아 시료로 사용하였다. Bio-rad법으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였으며 4~20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후 immobilon™-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 4°C, overnight으로 transfer하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 incubation 한 후 알아보하고자 하는 단백질의 antibody (Bcl-2, Bax, Akt, pAkt ; Santacruz, USA, procaspase-3 ; Upstate)를 사용하여 incubation 시켰다. TBST로 씻어낸 후 다시 anti-mouse Ig horseradish peroxidase/TBST 또는 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST (Amersham Buckinghamshire, England)으로 incubation 시켰고, Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, IL, USA) 사용하여 발색시킨 후 X-Omat film (Kodak)으로 현상하여 high molecular weight marker (Amersham, England)로 분자량을 비교하여 분석하였다. 각 밴드는 densitometer로 강도를 측정하였다.

**5. 자료처리**

모든 실험은 3회 반복하였다. SAS 통계 프로그램을 이용하여 모든 실험치는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였으며, 분산분석 (ANOVA)으로 분석한 후 유의성이 나타난 항목에 대해서 Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 군간의 차이를 검증하였다.

**연구결과 및 고찰**

**1. 세포증식에 미치는 영향**

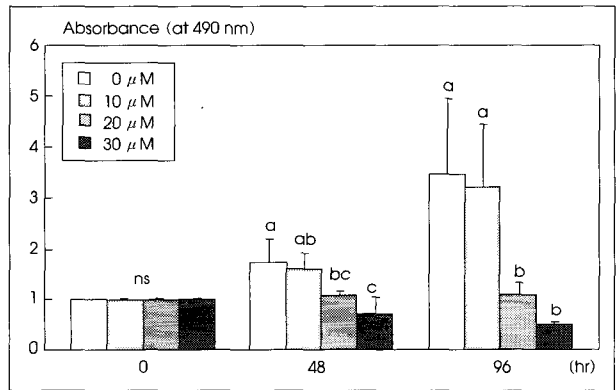
MTT assay로 알아본 세포증식실험에서 curcumin을 첨가하지 않은 대조군에 비해 curcumin의 첨가 농도가 증가할수록 세포증식이 유의적으로 억제되었다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). Curcumin의 항암효과는 여러 실험에서 보고되고 있으며, benzo [a]pyrene과 7, 12-dimethylbenzen [a]anthracene<sup>18)</sup>에 의한 암의 개시를 억제하고, phobal ester로 유도된 암의 촉진과정을 억제한다고 하였다.<sup>19)</sup> 또한 curcumin은 피부암,<sup>20)</sup> 위암,<sup>21)</sup> 대장암,<sup>22)</sup> 유방암<sup>23)</sup>의 발생을 억제한다고 보고하고 있으나 curcumin이 어떤 기전에 의해 항암

작용을 하고 있는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

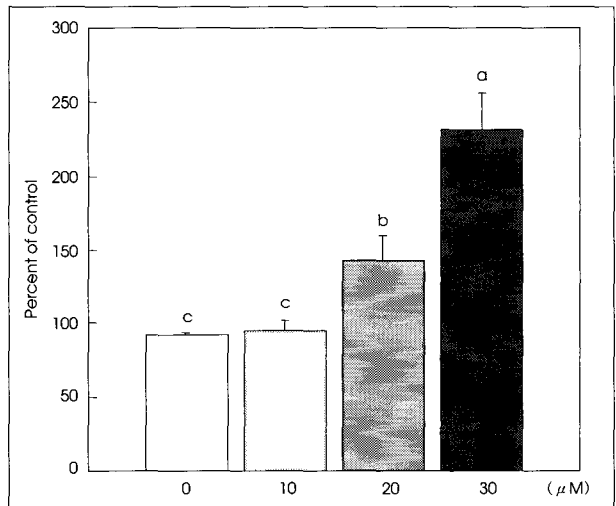
**2. Caspase-3의 활성화와 procaspase-3 발현**

Caspase-3는 세포사멸에서 중요한 역할을 하는 단백질로 배양액의 curcumin의 첨가량이 20  $\mu$ M 이상일때 caspase-3의 활성이 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). Caspase-3는 불활성화상태인 32 kDa의 procaspase-3 형태로 있다가 두 개의 작은 조각으로 분해되면서 활성을 얻게 된다. Fig. 3에서는 curcumin의 첨가에 따라 20  $\mu$ M 이상에서 procaspase-3의 발현이 유의적으로 감소하는 것으로 볼 수 있으며 ( $p < 0.05$ ) 이는 Fig. 2에서의 활성 증가와 일치하고 있다.

인체 leukemia U937 cells에서 curcumin 첨가시 10~40  $\mu$ M 사이에서 dose-dependent하게 procaspase-3의 발현이 감소하였고, 이는 본 연구에서와 같은 방법으로 DEVD-



**Fig. 1.** Effect of curcumin on cell proliferation. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range-test.



**Fig. 2.** Effect of curcumin on caspase-3 activities in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha = 0.05$  by Duncan's multiple range-test.

pNA를 chromophore *p*-nitroanilide (pNA)로 분해하는 정도로 caspase-3의 단백질분해활성을 측정하였을 때 10  $\mu$ M 이상에서 caspase-3의 활성이 유의적으로 증가하였다.<sup>24)</sup> 그리고 대장암세포인 SW480 cell과<sup>3)</sup> 인체의 신장 Caki cell에서<sup>25)</sup> curcumin을 50  $\mu$ M로 첨가하였을 때 caspase-3이 증가하였다고 하여 curcumin 첨가시 caspase-3 활성 증가에 의한 세포사멸이 유도되었으며 이는 본 연구 결과와 일치하였다.

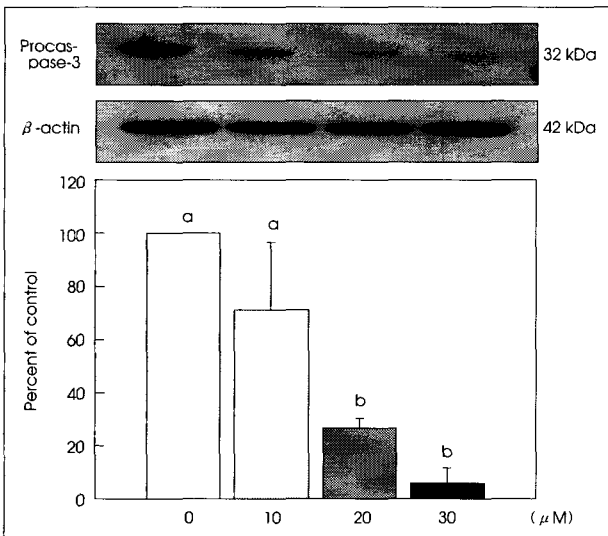
그러나 다른 인체 대장암세포인 LoVo cell에서 curcumin이 세포사멸을 증가시켰으나 caspase-3의 활성과는

관련이 없었다는 보고도 있다.<sup>26)</sup>

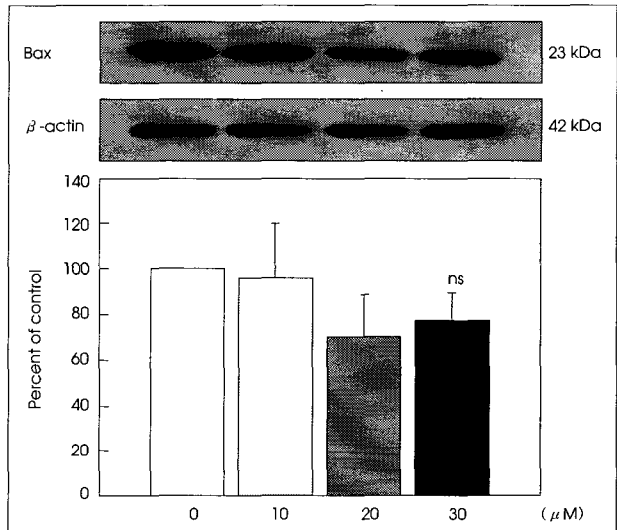
### 3. Bcl-2와 Bax 발현

세포사멸에서 Bcl-2 family의 작용을 알아보기 위해 세포사멸을 억제하는 Bcl-2와 세포사멸을 촉진하는 Bax의 발현을 western blot으로 알아본 결과는 Fig. 4, 5와 같다. Bcl-2의 발현은 curcumin의 첨가농도가 증가할수록 억제되었으며, 20  $\mu$ M부터 유의적인 차이가 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 그러나 Bax의 발현은 curcumin 첨가에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그리고 Bcl-2와 Bax의 비율을 계산한 결과는 curcumin의 첨가농도가 증가할수록 그 비율은 감소하여 20  $\mu$ M부터 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6).

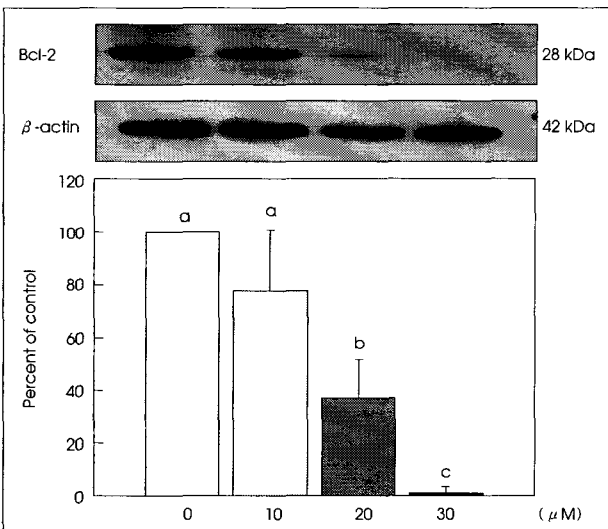
Bcl-2 family는 세포 밖이나 세포내의 상황을 전달받는



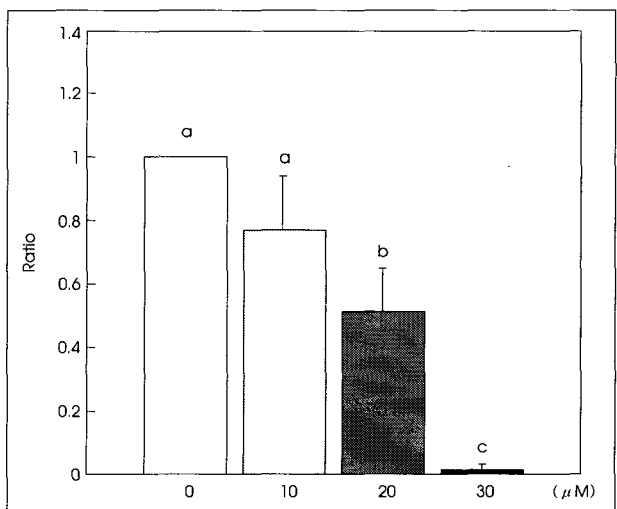
**Fig. 3.** Effect of curcumin on pro caspase-3 expression in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range-test.



**Fig. 5.** Effect of curcumin on Bax expression in SW480 cells. Ns: Not significant.



**Fig. 4.** Effect of curcumin on Bcl-2 expression in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range-test.



**Fig. 6.** Effect of curcumin on Bcl-2/Bax ratio in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range-test.

중요한 신호전달체계로서 작용을 하며, Bcl-2 단백질은 미토콘드리아 세포막의 안전성을 조절하는 단백질로 알려져 있다.<sup>27)</sup> Bax는 cytosol에서 미토콘드리아로 이동하면서 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비를 촉진하여 결국은 세포사멸을 촉진하는 기능을 가지고 있는 반면에 Bcl-2는 미토콘드리아로의 Bax의 이동을 억제하므로써 세포사멸을 억제시키는 작용을 한다.<sup>28,29)</sup> 그러므로 Bcl-2 수준의 감소는 Bax의 이동을 촉진시킴으로써 cytochrom c의 분비를 촉진하는 것으로 보인다.

본 연구에서 배양액에 첨가하는 curcumin의 농도가 증가됨에 따라 Bcl-2의 발현은 감소하고, Bax의 발현은 변화가 없었는데 결과적으로 Bcl-2/Bax 비율이 현저하게 감소하여 curcumin이 세포사멸을 유도하는 것으로 알 수 있다.

Miyosh 등은<sup>30)</sup> curcumin을 포함하고 있는 생강의 추출물이 인체의 T lymphoma Jurkat cell에서 procaspase-3의 분해를 촉진시키고, caspase-3의 활성을 유도함으로써 세포사멸을 유도하였는데 이는 Bcl-2의 발현억제와 Bax 발현 증가와 관련이 있다고 보고하였다. 인체의 유방암세포인 H-ras MCF10A에서도 curcumin은 Bcl-2의 발현을 억제하고, Bax의 발현을 증가시켜 세포사멸을 유도하였다고 보고하고 있다.<sup>31)</sup>

그러나 Bush 등은<sup>32)</sup> 인체 melanoma cell에서 curcumin의 첨가는 세포배양액에 첨가된 양과 시간의존적으로 세포사멸을 유도하였는데 Bcl-2의 발현에는 영향이 없었고, Fas receptor aggregation을 촉진하므로 death receptor pathway에 의해 세포사멸을 일으킨다고 보고하였다. 인체의 Burkitt's lymphoma에서는 curcumin의 처리는 c-myc, Bcl-2, mutant-type p53 단백질과 mRNA를 감소시키며 Fas 단백질은 증가시켜 두가지 경로에 의해 모두 세포사멸을 증가시킨다고 하였다.<sup>33)</sup> 이와 같이 curcumin에 의한 세포사멸기전이 조직에 따라 다르다는 것을 알 수 있다.

#### 4. Akt와 pAkt 발현

Akt 단백질발현은 curcumin 첨가량이 증가할수록 감소하며 20 uM 이상에서 유의적인 차이를 보이며 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7), 인산화된 Akt의 발현도 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 8).

Akt는 세포사멸을 억제하므로써 세포의 생존을 촉진하는 단백질로 HMN1 세포에서 C2-ceramide에 의해 유도된 세포사멸이 활성화된 Akt에 의해 억제되는 것도 관찰되었다.<sup>34)</sup> Akt의 인산화는 Akt의 활성과 관련이 있는데<sup>35)</sup> 기전은 확실하지 않으나 Akt는 Bax를 인산화시킴으로써 Bcl-2의

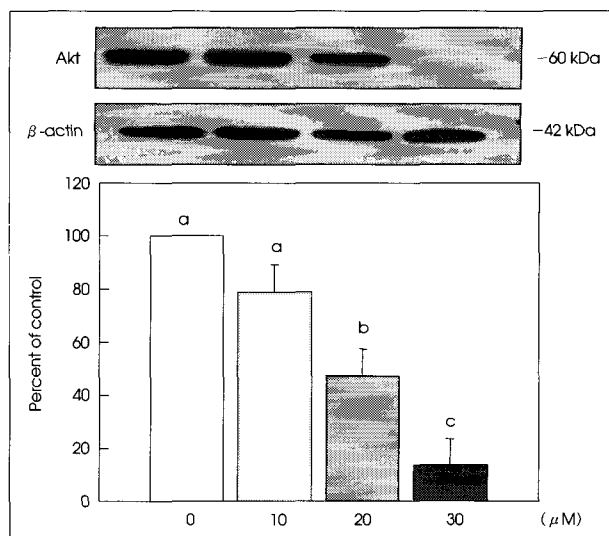


Fig. 7. Effect of Curcumin on Akt expression in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range-test.

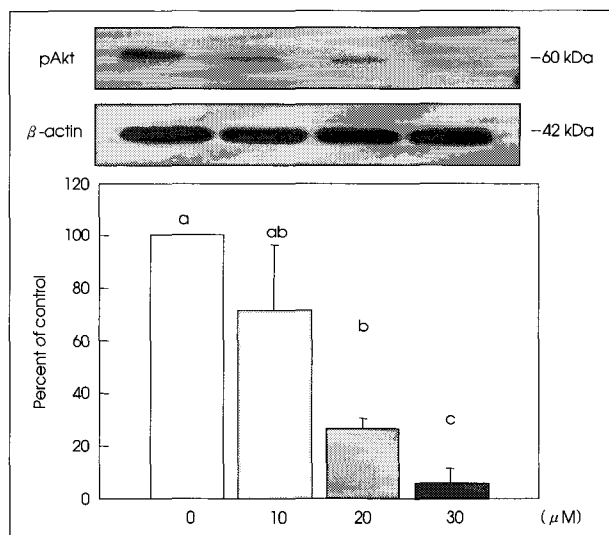


Fig. 8. Effect of curcumin on posphorylated-Akt expression in SW480 cells. Different alphabet represents the significant differences among groups at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range-test.

분비를 자극하여 세포사멸을 억제시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>36)</sup>

Squires 등은<sup>37)</sup> 인체 유방암세포인 MDA-MB-468에서 curcumin은 40 uM에서 Akt의 인산화를 억제하여 Akt의 활성을 억제하므로 세포사멸을 유도한다고 보고하였다. 또한 curcumin은 신장의 Caki cell에서 Akt의 dephosphorylation을 촉진하고 (75 uM), 세포사멸을 억제하는 Bcl-2, Bcl-XL 단백질 발현을 억제하고, cytochrome c의 분비, caspase 3활성을 촉진하였다.<sup>25)</sup> 본 연구에서도

인체 대장암 세포인 SW480 cell에서 curcumin은 Akt와 관련된 세포 survival pathway를 경유하여 세포사멸을 촉진하는 것으로 보인다.

## 요약 및 결론

본 연구는 curcumin에 의한 세포증식 억제가 세포사멸과 관련이 있는지를 알아보기 위해 실시되었다. 인체 대장암세포인 SW480 cell을 배양하면서 curcumin을 배양액에 0, 10, 20, 30 uM로 첨가시키면서 세포증식과 세포사멸에 관련된 단백질의 발현과 활성을 관찰하였다. Curcumin의 첨가농도가 증가할수록 유의적으로 세포증식이 억제되었고, caspase-3의 활성은 유의적으로 증가하였으며 이는 불활성형태인 32 kDa의 procaspase-3 발현 감소와 일치하였다. 세포사멸과 관련된 Bcl-family의 발현에 있어 curcumin의 첨가는 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2의 발현을 감소시키고, 세포사멸을 촉진하는 Bax의 발현에는 영향을 주지 않았다. 결과적으로 Bcl-2/Bax의 비율이 유의적으로 감소하였다. 또한 Akt와 pAkt 발현도 curcumin의 첨가에 의해 유의적으로 감소하였다. 결과들을 종합해보면, SW480 인체 대장암세포에서 curcumin은 Akt 세포전달신호경로를 억제함으로써, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현을 억제하고, caspase-3의 활성을 촉진시켜 세포사멸을 유도하여 세포증식을 억제하는 것으로 보인다. 이로서 식품성 식품에 포함되어 일상생활에서 섭취할 수 있는 curcumin이 세포사멸에 뛰어난 효과가 있다는 것을 알 수 있었으며, 이는 암을 치료하는 약품이나 기능성 식품의 새로운 소재로써 사용 가능성을 제시하고 있다.

## Literature cited

- 1) Annual report on the cause of death statistics. Korea National statistical office, 2001
- 2) Kim HY, Yang EJ. A study on dietary related to the incidence of stomach cancer and colon cancer in Korea. *Kor J Nutr* 26(5): 603-614, 1993
- 3) Doll P. The cause of cancer. *J Nut Can Inst* 66: 1191-1308, 1981
- 4) Kim HY, Yang EJ. A Study on Dietary Factors Related to the Incidence of Stomach Cancer and Colon Cancer in Korean. *Kor J Nutr* 26(5): 603-615, 1993
- 5) Rho SN, Oh HS. Effect of Omija extracts on the growth of liver cancer cell line SNU-398. *Kor J Nutr* 35(2): 201-206, 2002
- 6) Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*

- 7(7): 1894-1900, 2001
- 7) Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48: 5941-5943, 1988
- 8) Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem Suppl* 27: 26-34, 1997
- 9) Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drug* 8: 85-98, 1994
- 10) Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schneckeburger M, Galteau MM, Dicato M, Diederich M. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol* 66(8): 1475-1483, 2003
- 11) Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 19(5A):3675-3680, 1999
- 12) Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 8(5): 470-481, 1997
- 13) Rashmi R, Santhosh Kumar TR, Karunagaran D. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. *FEBS Lett* 538(1-3): 19-24, 2003
- 14) Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-260, 1999
- 15) Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274(8): 5053-5060, 1999
- 16) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4): 479-489, 1997
- 17) Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten JJ. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol cell cardiol* 33: 57-68, 2001
- 18) Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* (11): 2183-2186, 1992
- 19) Conney AH, Lysz T, Ferraro T, Abidi TF, Manchand PS, Laskin JD, Huang MT. Inhibitory effect of curcumin and some related dietary compounds on tumor promotion and arachidonic acid metabolism in mouse skin. *Adv Enzyme Regul* 31: 385-396, 1991
- 20) Lu YP, Chang RL, Lou YR, Huang MT, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 15(10): 2363-2670, 1994
- 21) Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney

- AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 54(22): 5841-5847, 1994
- 22) Kim JM, Araki S, Kim DJ, Park CB, Takasuka N, Baba-Toriyama H, Ota T, Nir Z, Khachik F, Shimidzu N, Tanaka Y, Osawa T, Uraji T, Murakoshi M, Nishino H, Tsuda H. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1, 2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* 19(1): 81-85, 1998
- 23) Simon A, Allais DP, Duroux JL, Basly JP, Durand-Fontanier S, Delage C. Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Lett* 129(1): 111-116, 1998
- 24) Bae JH, Park JW, Kwon TK. Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca<sup>2+</sup> depletion and cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1073-1079, 2003
- 25) Woo JH, Kim YH, Choi YJ, Kim DG, Lee KS, Bae JH, Min do S, Chang JS, Jeong YJ, Lee YH, Park JW, Kwon TK. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 24(7): 1199-1208, 2003
- 26) Piwocka K, Bielak-Mijewska A, Sikora E. Curcumin induces caspase-3-independent apoptosis in human multidrug-resistant cells. *Ann N Y Acad Sci* 973: 250-254, 2002
- 27) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381): 1322-1326, 1998
- 28) Nomura M, Shimizu S, Ito T, Narita M, Matsuda H, Tsujimoto Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res* 59(21): 5542-5548, 1999
- 29) Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 7(1): 102-111, 2000
- 30) Miyoshi N, Nakamura Y, Ueda Y, Abe M, Ozawa Y, Uchida K, Osawa T. Dietary ginger constituents, galanals A and B, are potent apoptosis inducers in Human T lymphoma Jurkat cells. *Cancer Lett* 199(2): 113-119, 2003
- 31) Kim MS, Kang HJ, Moon A. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF 10A human breast epithelial cells. *Arch Pharm Res* 24(4): 349-354, 2001
- 32) Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* 271(2):305-314, 2001
- 33) Wu Y, Chen Y, Xu J, Lu L. Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 24(4): 348-352, 2002
- 34) Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 151(3): 483-494, 2000
- 35) Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7(4): 261-269, 1997
- 36) Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2): 231-241, 1997
- 37) Squires MS, Hudson EA, Howells L, Sale S, Houghton CE, Jones JL, Fox LH, Dickens M, Prigent SA, Manson MM. Relevance of mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cells. *Biochem Pharmacol* 65(3):361-376, 2003