

메톡시화 플라본 유도체 합성과 유도체들이 HT-29 인간 대장암 세포 성장에 미치는 영향

한림대학교 식품영양학과, 식의약품 효능평가 및 기능성 소재개발센터

임순성 · 이연실 · 조한진 · 신현경 · 윤정한

Synthesis of Methoxylated Flavone Derivatives and Examination of Their Effects on HT-29 Human Colon Cancer Cell Growth

Soon Sung Lim, Yeon Sil Lee, Han Jin Cho, Hyun-Kyung Shin and Jung Han Yoon Park

Department of Food Science and Nutrition, Regional Innovation Center,
Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

In a search for new potential anticancer agents, we have synthesized methoxylated flavone derivatives and examined their effects on colon cancer cell growth. To examine whether these compounds inhibit HT-29 cell growth, cells were cultured with various concentrations of the test compounds for 2 days and the viable cell numbers were estimated by a colorimetric MTT assay. Among the synthesized compounds, 6,7-dimethyl-3',4'-dimethoxyflavone (the compound 9) was most potent and efficacious, with an IC_{50} value as low as $21.68 \pm 0.13 \mu M$. However, the same concentrations of this compound did not inhibit the growth of IEC-6 cells, normal rat intestinal crypt cells. Staining cells with annexin V revealed that the compound 9 induced apoptosis of HT-29 cells in a dose-dependent manner. Western blot analysis of cell lysates revealed that the compound 9 inhibited phosphorylation of Akt and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 and induced cleavage of caspase-3, -7, -9 and poly (ADP-ribose) polymerase. These results indicate that the induction of apoptosis is one of the mechanisms by which the synthetic flavone (the compound 9) inhibits HT-29 cell growth. The compound 9 may have potential as a chemopreventive agent and/or adjuvant for chemotherapeutic drugs. (*Cancer Prev Res* 11, 211-217, 2006)

Key Words: 6,7-dimethyl-3',4'-dimethoxyflavone, HT-29 human colon cancer cells, Apoptosis

서 론

미국의 경우 대장암은 암 사망 원인의 두 번째를 차지하며,¹⁾ 국내에서도 식생활 습관이 서구화되면서 급격히 증가하고 있다. 2002년 국내 대장암의 발생률은 위암, 폐암, 간암에 이어서 네 번째로 높은 비율을 차지하고 있으며, 암으로 인한 사망 원인 중에서도 폐암, 위암, 간암에

이어서 네 번째를 차지하고 있다.²⁾ 대장암은 S자 결장 이상의 근위부에 생긴 결장암과 직장이나 항문 관에 생긴 직장암을 합친 것을 말하며 다른 암에 비해 환경적인 요인이 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 위험요인으로는 식이, 음주, 흡연, 방사선, 직업성 노출 등인데 그 중 식이 요인이 그 영향력이 가장 큰 것으로 알려져 있다. 대장암을 포함한 여러 종류의 암을 예방할 수 있는 생리활성물질이 과일 및 채소에 다수 포함되어 있는 것

책임저자 : 윤정한, ☎ 200-702, 강원도 춘천시 한림대학길 39
한림대학교 식품영양학과
Tel: 033-248-2134, Fax: 033-256-0199
E-mail: jyoonyon@hallym.ac.kr
접수일 : 2006년 7월 26일, 게재승인일 : 2006년 8월 8일

Correspondence to : Jung Han Yoon Park
Department of Food and Nutrition, Hallym University, 39, Hallymdae-
hak-gil, Chuncheon 200-702, Korea
Tel: +82-33-248-2134, Fax: +82-33-256-0199
E-mail: jyoonyon@hallym.ac.kr

으로 보고되고 있으며 대표적인 항암물질로는 quercetin과 hesperidin 등의 플라보노이드계 화합물이 알려져 있다.³⁻⁷⁾ 그러나 quercetin은 azoxymethane을 주사한 생쥐의 대장에서 세포자살을 촉진하였지만 azoxymethane에 의해 유도된 대장암의 발생을 오히려 촉진시키고, 대장암에서 나타나는 이형성증을 유도하며, estradiol에 의해 유도된 신장암을 악화시키는 것으로 보고되어 있어 quercetin을 항암제로 사용하기 어려운 실정이다.^{8,9)}

또한 소장의 상피세포는 일반적인 체세포와는 달리 음와에서 생성 및 분화되어 단시간에 제거되는 세포로 항암약물이나 방사능 치료법에 의해 쉽게 사멸된다. 그리하여 대부분의 항암제나 방사선 치료는 소장상피세포의 사멸을 유도하여 소화기관에 부작용을 야기한다. 따라서, 대장암 예방 및 치료효과가 우수하며 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있는 항암제의 개발이 절실히 요구된다.

본 연구는 새로운 강력한 항암제를 창출하기 위하여 Claisen-Schmidt 반응을 이용하여 여러 가지 chalcone 화합물을 합성한 후, DMSO/I₂를 이용한 분자 내 원형화반응을 유도하여 여러 가지 형태의 플라본 유도체를 합성하였다. 메톡시화된 플라본 유도체의 대장암 세포 증식억제 효능을 갖는 물질을 선별하였고 암세포의 증식억제 작용이 cell cycle progression 억제 또는 apoptosis 유도에 의한 것인지를 규명하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료

인간의 대장암 세포인 HT-29과 흰쥐의 소장에서 유래한 crypt 세포인 IEC-6은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, selenium은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), bovine serum albumin (BSA), transferrin, luteolin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 플라본 유도체 합성

플라본 유도체는 전보에 나타난 방법을 이용하여 합성하였다.¹⁰⁾ 간단히 요약하면, 먼저 chalcone 유도체를 합성한 후, ring cyclization을 하여 최종의 플라본 화합물을 합성하였다. Chalcone 유도체 제조법은 base-catalyzed con-

densation법을 이용하였다. 50~60% KOH 혹은 NaOH로 0~20°C에서 15~48시간 정도 반응시키는데 출발물질이 methoxylated되어 있거나 benzylated되어 있으면 높은 수득률을 보였다. 보호된 수산기를 가지고 있는 aldehyde 유도체와 acetophenone 유도체를 96% ethanol에서 KOH을 가하여 Claisen-Schmidt condensation 반응을 통해 2'-hydroxychalcone을 합성하였다. 2'-hydroxychalcone을 DMSO에 녹인 후 iodine을 가하여 150°C에서 1시간 동안 reflux하였다. TLC로 반응물이 소실된 것을 확인한 후 얼음물을 가하여 반응을 종결하였다. 수용액을 ethyl acetate로 추출하여 유기층을 brine으로 세척한 후 무수망초로 건조, 여과 후 얻은 여액을 감압농축하여 얻고, 그 잔사를 크로마토그래피를 실시하여 플라본 결정을 수득하였다.

3. Cell culture

인간의 대장암 세포인 HT-29 세포와 쥐의 소장에서 유래된 crypt cell인 IEC-6 세포는 DMEM/F12 배지를 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. HT-29 세포를 유지하기 위해서 DMEM/F12 배지를 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였고, IEC-6 세포의 경우 10µg/ml insulin을 더 첨가하였다. 세포가 80% confluent 해지면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

4. MTT assay

합성 플라본 유도체가 대장암 세포 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해서 HT-29 세포를 10% FBS가 포함된 DMEM/F12 배지에 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하였다. 24시간 배양한 후, DMEM/F12에 5µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 0.1 mg/ml BSA가 첨가된 배지(serum-free medium)에서 serum starvation하였다. 24시간 serum starvation 한 후, 여러 농도(0, 15, 30, 45µM)의 플라본 유도체가 들어있는 serum-free medium으로 배지를 교환하였다. 플라본 유도체가 들어있는 배지는 2일 후 교환하고 플라본 유도체를 첨가하고 매 24, 48, 72시간이 경과할 때마다 MTT assay로 살아있는 세포수를 측정하였다. 플라본 유도체는 DMSO에 용해하였으며, DMSO는 모든 well의 배지에 0.1%로 포함되게 하였다.

5. Cell cycle 조사

화합물9을 0, 5, 15, 30µM 농도가 포함된 배지에서 세포를 배양한 다음 PBS로 행구고, 70% ethanol도 4°C에서

1시간 이상 고정하였다. Ethanol을 PBS로 헹군 다음 RNase를 첨가하여 배양하고 propidium iodine을 첨가한 다음 FACS analysis을 수행하여 플라본 유도체가 암세포의 cell cycle에 미치는 영향을 조사하였다.¹¹⁾

6. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석에 의한 apoptosis 효과

Apoptotic cell을 정량하기 위해 FACS 분석을 수행하였다.¹²⁾ 이는 살아있는 세포에서 세포막 인지질 이중층의 세포 안쪽을 향해 있던 phosphatidyl serine이 apoptotic cell에서는 바깥쪽으로 이동하는데, 이 phosphatidyl serine이 Annexin V에 결합하는 성질을 이용하는 것이다. 화합물 9을 첨가한 배지에서 세포를 배양한 후 trypsin을 이용하여 세포들을 분리하고, phycoerythrin (PE)-conjugated Annexin V와 7-aminoactinomycin D를 넣고 15분 동안 암실에서 배양하였다. Apoptotic cell은 FACScan™ (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ)을 사용하여 정량하였다.

7. 화합물9이 Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2, caspase, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)에 미치는 영향

세포를 화합물9로 처리하여 cell lysate을 얻은 후 Akt, p-Akt, ERK-1/2, p-ERK-1/2 antibody, cleaved-caspase-3, -9, -7, cleaved-PARP 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다.^{13~18)}

8. 통계처리

분석수치는 mean±SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS (Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석한다. 각 실험군들의 평균치 간의 유의성은 p=0.05 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 합성 플라본 유도체의 대장암 세포증식억제 효과

합성 플라본 유도체가 인간의 대장암에서 유래한 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0, 15, 30, 45µM의 농도로 배지에 첨가하여 MTT assay을 수행하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 또한 천연 플라본인 luteolin을 같은 농도로 첨가하여 합성 플라본의 효과를 비교하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이 대부분의 합성 플라본 유도체들이 대장암세포의 증식을 감소시키는 것으로 나타

났으며, 화합물2를 제외하고는 모든 화합물이 천연 플라본인 luteolin보다 높은 효과를 보였다. 그 중에서도 화합물9 (IC₅₀=21.68±0.13µM)이 가장 높은 활성을 나타내었다.

정상 장세포에 미치는 영향을 살펴본 결과 몇몇 합성 플라본을 제외하고는 IEC-6 세포의 수를 감소시켰으나, 대조군으로 사용한 천연 플라본인 luteolin보다 정상세포에서의 toxicity가 낮음을 알 수 있다. 특히 화합물2의 경우 대장암세포의 증식억제 효과는 luteolin보다 낮았지만 정상세포에 대한 toxicity가 현저히 낮으므로 luteolin보다 효과적인 물질이라 할 수 있다.

따라서 모든 화합물들이 천연 플라본인 luteolin보다 대장암세포 증식억제 효과가 뛰어난 것을 알 수 있다. 이들 화합물 중 화합물9은 대장암세포 증식억제 효과가 가장 뛰어났으며, 30µM의 농도에서는 IEC-6 세포에 toxicity를 나타내지 않았다(data not shown). 따라서 화합물9을 30µM 이하의 농도로 처리하여 화합물의 세포증식 억제기전을 조사하였다.

2. 화합물9에 의한 HT-29 세포의 apoptosis 유도

암세포의 증식속도가 정상세포보다 앞서는 것은 세포 주기의 진행과 apoptosis의 균형이 깨지기 때문이다.¹⁹⁾ 먼저 화합물9가 apoptosis에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0, 5, 15, 30µM 농도로 처리하여 세포를 배양한 후, Annexin V로 염색시켜 FACS 분석을 수행함으로써 apoptotic cell을 정량하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 화합물9의 처리농도가 증가함에 따라 살아있는 세포의 수는 감소하였으며, early apoptotic cell 수는 증가하였다. 따라서 화합물9은 대장암 세포의 apoptosis를 유도하여 세포증식을 억제한다는 결론을 내릴 수 있다.

3. 화합물9에 의한 HT-29 세포에서 sub-G1 fraction 증가

화합물9로 세포를 처리하여 배양한 후, propidium iodide로 DNA를 염색하여 flow cytometry로 cell cycle analysis을 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 화합물9의 처리는 대조군에 비해 G1 phase에 머무른 세포의 수를 감소시키고 S phase와 G2/M phase에 머무른 세포 수에는 영향을 미치지 않았다. 반면 sub-G1 phase에 머무른 세포 수는 화합물9의 농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 증가하였으며, 이는 Fig. 1의 결과와 함께 화합물9가 대장암세포의 apoptosis 증가를 유도함을 알 수 있다.

Table 1. Chemical structures of methoxylated flavone derivatives and their growth inhibitory effects on HT-29 and IEC-6 cells

| No. | Chemical structure | IC ₅₀ (μmol/ml) | |
|----------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | HT-29 cells | IEC-6 cells |
| Luteolin | | 35.79 ± 0.66 | 25.37 ± 0.46 |
| 1 | | 23.67 ± 0.19 [†] | 34.05 ± 0.64 |
| 2 | | 42.65 ± 1.8 | 74.91 ± 4.41* |
| 3 | | 26.21 ± 1.25 [†] | 93.49 ± 5.97 [†] |
| 4 | | 31.07 ± 0.47* | 51.39 ± 1.32* |
| 5 | | 27.18 ± 0.22* | 37.73 ± 0.72* |
| 6 | | 31.14 ± 0.41* | 437.05 ± 42.79 [†] |
| 7 | | 32.16 ± 1.09 | 73.33 ± 2.43* |
| 8 | | 26.64 ± 0.55 [†] | 72.46 ± 8.54* |
| 9 | | 21.68 ± 0.13* | 36.57 ± 0.17* |

HT-29 and IEC-6 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 μg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, and 1 mg/ml BSA for 24 hours. After serum starvation, cells were incubated for 24, 48 or 72 h in serum-free medium containing the compound 9 at 0, 15, 30 or 45 μM. Viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Values (IC₅₀) represent the means ± SEM (n=6). Significantly different from the luteolin-treated group (*p < 0.1, [†] p < 0.05).

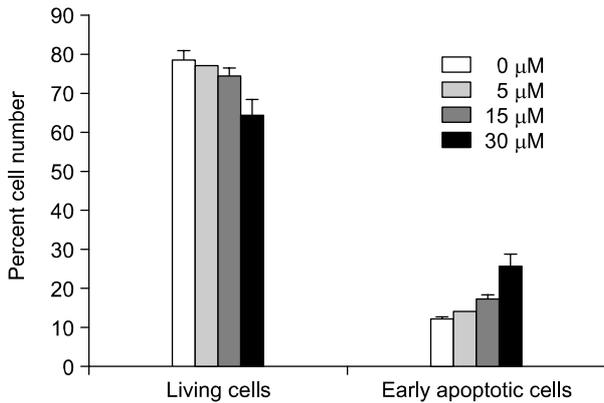


Fig. 1. 6,7-Dimethyl-3',4'-dimethoxy flavone (9) increases apoptotic cell numbers in HT-29 cells. HT-29 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with DMEM/F12 supplemented with 5 μg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, and 1 mg/ml BSA [serum-free medium (SFM)] for 24 h. After serum starvation, cells were incubated for 24 h in SFM containing 0, 5, 15, 30 μM the compound 9. Cells were trypsinized, loaded with 7-amino-actinomycin D and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The number of living cells and early apoptotic cells are expressed as a percentage of total cell number. Each bar represents the mean ± SEM (n=6).

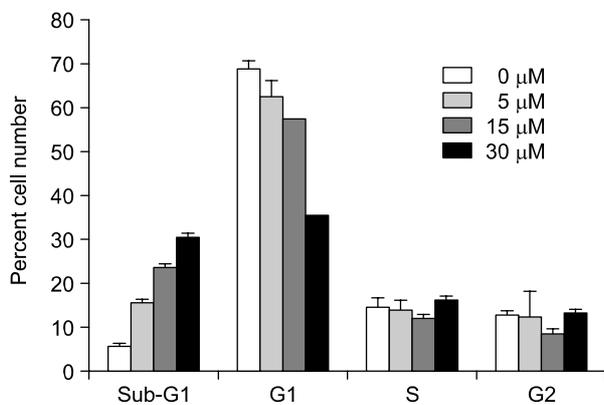


Fig. 2. 6,7-Dimethyl-3',4'-dimethoxy flavone (9) increases cell numbers in sub-G1 phase in HT-29 cells. Cells were plated and treated with the compound 9 for 24 h as described in Fig. 1. Cells were trypsinized, fixed, and treated with RNase. Cellular DNA was then stained with propidium iodide. The percentages of cells in sub-G1, G1, S, and G2 phases of the cell cycle were analyzed by flow cytometry.

4. 화합물9에 의한 HT-29 세포에서 Akt와 ERK-1/2의 단백질 발현 및 인산화 감소

화합물9을 처리하여 얻은 세포분쇄물의 western blot

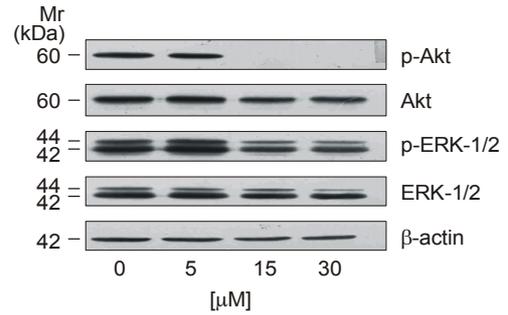


Fig. 3. 6,7-Dimethyl-3',4'-dimethoxy flavone (9) decreases on the levels of phospho-Akt (p-Akt), Akt, phospho-ERK-1/2 (p-ERK-1/2), and ERK-1/2 in HT-29 cells. Cells were plated in 100 mm dishes at 2×10^6 cells/dish in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Cells were serum-starved and treated with the compound 9 for 24 h as described in Fig. 1. Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

분석으로부터 Akt, p-Akt, ERK-1/2, p-ERK-1/2의 단백질 발현을 조사하였다. 화합물9의 처리 농도가 증가함에 따라 p-Akt와 p-ERK-1/2 level이 현저히 저하되었다. Akt와 ERK-1/2 단백질 수준도 화합물9으로 처리한 세포에서 다소 감소하였다(Fig. 3). Akt와 ERK-1/2는 survival factor로서 세포내의 다른 단백질들을 조절하여 apoptosis를 억제하고 cell survival을 증가시키며 다양한 growth factor에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다. ERK-1/2는 Ras/Raf serine/threonine kinase에 의해 활성화되며, 활성화된 ERK-1/2는 다양한 transcription factors, kinases, phosphatase의 인산화를 유도하여 세포의 증식 및 분화에 관여한다.²⁰⁾ Akt는 phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)의 주요 target으로 PI3K의 생성물에 의해 활성화되고 phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) tumor suppressor에 의해 활성화가 억제된다.²¹⁾ 여러 가지 암에서 Akt가 과발현되거나 활성화되기 때문에 Akt를 억제하는 물질을 항암제로 개발하려는 연구들이 진행 중이다.²²⁾ 본 실험에서 화합물9에 의한 apoptosis의 증가는 Akt와 ERK-1/2의 인산화 감소와 관련된다.

5. 화합물9에 의한 HT-29 세포에서 caspase 활성화의 증가

Caspase는 cysteine protease로서 apoptosis를 조절한다. 불활성의 zymogen으로서 세포질에 존재하는 caspase들은 intracellular caspase cascade를 통해 활성화되면 다양한 표적단백질들을 cleave하여 apoptosis의 형태학적, 기능적 변

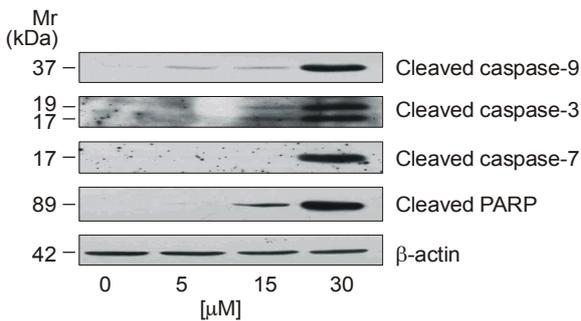


Fig. 4. 6,7-Dimethyl-3',4'-dimethoxy flavone (9) induces cleavage of caspases and PARP. Cells were plated and treated with the compound 9 as described in Fig. 3. Cells were lysed, and the lysates were subjected to Western blotting with their relevant antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

화를 야기시킨다.²³⁾ ERK-1/2와 Akt는 procaspase-9의 인산화 유도하여 caspase-9의 활성화를 억제하여 apoptosis를 억제한다고 알려져 있기 때문에,^{24,25)} 화합물9이 caspase family 단백질들에 미치는 영향을 조사하였다. Western blot 결과, 화합물9의 처리농도가 증가함에 따라 caspase-9의 cleavage가 증가되고 이에 의한 effector caspase인 caspase-3, -7의 cleavage도 증가됨을 관찰하였다. 또한 DNA repair를 담당하여 세포의 생존에 중요한 역할을 하는 PARP²⁶⁾의 cleavage 또한 화합물9의 처리에 의해 증가함을 관찰하였다(Fig. 4). 이 단백질은 caspase-3에 의해 절단되며,²⁷⁾ 이 효소가 절단되면 세포의 분해가 용이하게 되어 apoptosis의 지표로 사용된다.²⁸⁾ 따라서 화합물9에 의한 caspase들의 활성화와 PARP의 절단은 화합물9가 caspase들을 활성화하여 apoptosis를 유도하는 것을 나타낸다.

결론

메톡시화 플라본 유도체인 화합물9이 HT-29 세포 증식 억제효능이 탁월하고 정상소장 상피세포에는 독성이 없었다. 본 연구에 의하여 화합물9이 HT-29 세포의 apoptosis를 유도함으로써 세포 성장을 억제하였고, apoptosis 유도는 ERK-1/2와 Akt의 인산화 억제에 의한 caspase cascade의 활성화와 관련이 있다는 사실을 알 수 있었다. 그러나 이 화합물이 어떤 기전으로 ERK-1/2, Akt의 활성화를 억제하는지 가까운 장래에 연구되어야 할 것이다. 이 결과는 화합물9 (6,7-dimethyl-3',4'-dimethoxy-flavone)이 항암제 혹은 암 치료제로서의 개발될 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-041-C00440).

참고 문헌

- 1) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55, 10-30, 2005.
- 2) 한국중앙암등록본부. 보건복지부 한국중앙암등록본부 연례보고서(2002.1~2002.12).
- 3) Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 428, 305-327, 1999.
- 4) Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* 20, 21-29, 1993.
- 5) Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21, 381-406, 2001.
- 6) Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JH. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanus* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition* 21, 1141-1148, 2005.
- 7) Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 60, 3823-3831, 2000.
- 8) Tanaka T, Kohno H, Murakami M, Shimada R, Kagami S, Sumida T, Azuma Y, Ogawa H. Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in beta-cryptoxanthin and hesperidin. *Int J Cancer* 88, 146-50, 2000.
- 9) Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, Newmark H, Steele VE, Kelloff GJ, Lipkin M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 21, 1655-1660, 2000.
- 10) Lim SS, Jung SH, Ji J, Shin KH, Keum SR. Synthesis of flavonoids and their effects on aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *J Pharm Pharmacol* 53, 653-668, 2001.
- 11) Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348, 2001.
- 12) Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 153-159, 2004.
- 13) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13, 2905-2927, 1999.
- 14) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on

- apoptosis. *Science* 270, 1326-1331, 1995.
- 15) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
 - 16) Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144, 281-292, 1999.
 - 17) Satoh MS and Lindahl T. Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356, 356-358, 1992.
 - 18) Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Rolli-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* 273, 33533-33539, 1998.
 - 19) Jacks T and Weinberg RA. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* 111, 923-925, 2002.
 - 20) Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74, 49-139, 1998.
 - 21) Kim D, Dan HC, Park S, Yang L, Liu Q, Kaneko S, Ning J, He L, Yang H, Sun M, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front Biosci* 10, 975-987, 2005.
 - 22) Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455-7464, 2005.
 - 23) Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 153-159, 2004.
 - 24) Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* 5, 647-654, 2003.
 - 25) Caron RW, Yacoub A, Mitchell C, Zhu X, Hong Y, Sasazuki T, Shirasawa S, Hagan MP, Grant S, Dent P. Radiation-stimulated ERK1/2 and JNK1/2 signaling can promote cell cycle progression in human colon cancer cells. *Cell Cycle* 4, 456-464, 2005.
 - 26) Satoh MS and Lindahl T. Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356, 356-358, 1992.
 - 27) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju S, Smulson ME, Yamin T, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43, 1995.
 - 28) Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273, 33533-33539, 1998.