

原 著

HeLa細胞におけるオレイン酸によるアポトーシスの機構： I κ B β の誘導によるcaspase非依存性経路の関与

溝谷 香壽美, 井上 郁夫

The Mechanism of Apoptosis by the Oleic Acid in HeLa Cells : Caspase-independent Pathway by Induction of I κ B β

Kasumi Mizotani, Ikuro Inoue (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Epidemiological studies of breast and pancreatic cancer in several Mediterranean countries, including Southern Europe, North Africa, and the Middle East have demonstrated that increased dietary intake of oleic acid may reduce a risk of cancer onset. It is well-known that eicosapentaenoic acid (EPA), which is one of the PUFAs, was demonstrated to inhibit proliferation of human leukemic HL-60 cells *in vitro*. We studied the mechanism of apoptosis in HeLa cells by oleic acids as compared with those by EPA, which was previously reported to induce apoptosis. In this study, we found that the fragmentation of DNA was detected in agarose electrophoresis and apoptotic features, such as cell shrinkage, condensation, and fragmentation of nucleus after addition by 100 μ M of oleic acids and EPA. After 24 hours of medication by EPA and oleic acid, the apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, Fas, cytochrome C, Apaf-1, caspase 3) were analyzed by the Western blot analysis. The Bcl-2 expression was inhibited and the ratio of Bax/Bcl-2 expression increased at 50 μ M and 100 μ M oleic acid. The apoptosis-related proteins (Fas, cytochrome C, Apaf-1, caspase 3) were increased by 50 μ M and 100 μ M EPA. In contrast, there was not the significant change in expression of apoptosis-related proteins (Fas, cytochrome C, Apaf-1, caspase 3) at 50 μ M and 100 μ M oleic acid. Moreover, EPA significantly increased the activity of caspase 3, while oleic acid did not affect the caspase 3 activity. Our results indicate that the apoptosis of HeLa cells by oleic acids might be through caspase-independent mechanism. We also analyzed the change of NF- κ B, I κ B α and I κ B β , to which have been, recently, paid much attention with relation to apoptosis. We found that NF- κ B was dose-dependently inhibited by oleic acid and I κ B β was dose-dependently increased, although there was no change in I κ B α . Our results suggest that the apoptosis by oleic acids might be associated with I κ B β , indicating that the mechanism of apoptosis by oleic acid might be different from those by EPA.

Keywords: oleic acids, apoptosis, HeLa cells, NF- κ B, I κ B α , I κ B β

J Saitama Med School 2002;29:117-123

(Received November 5, 2001)

緒 言

アポトーシス¹⁾は1972年, Kerr, WyllieおよびCurrieらによって, ネクローシスと形態学的に異なる細胞死として発見され, 定義された細胞死であり, 遺伝子レベルで制御された細胞死の一型であると言われている。また, アポトーシスは個体発生における組織, 臓器の形成に重要な働きをしているだけでは

なく, 癌の発生とも深い関係を持つといわれている。本来個々の細胞には外界からの刺激に対して細胞内の環境を一定に保ち, 細胞間の相互作用を正常に保とうとする能力があると言われている。しかし, DNA損傷, 癌遺伝子異常発現により, 細胞の持つ恒常性に異常が生じ, 独自に不必要な分裂・増殖を行う細胞が出現する。これが癌化の初期である。しかしながら, 細胞にはもともと生体防御機構が備わっており, 遺伝子が障害された場合に, それを回復できる能力がある。さらに, その障害が多岐にわたる場合や, 回復

が容易でない場合,あるいは遺伝子の変異や増幅がもとで,その発現が異常亢進した場合などでは,その細胞を死滅させ,排除する能力をも備えている.これがアポトーシス誘導能である.

以前より ω -3系の多価不飽和であるエイコサペンタエン酸は癌細胞のアポトーシス誘導能を有し,癌細胞の増殖を抑制する事が知られている²⁻⁴⁾.また,一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸を多量摂取している南ヨーロッパ,北アフリカ,中東などの地中海沿岸の国々では癌の死亡率が低いといわれている⁵⁾.さらに,ギリシャでは脂肪の40%がオリーブオイルから摂取されているといわれているが,ギリシャの女性の乳癌の発生率は,アメリカの女性のそれと比較すると,半分以下と著しく低いと報告されている^{5,8)}.さらに,スペインでのケースコントロールスタディでは,オリーブオイルを最も多く摂取していた女性では乳癌のリスクが減少していることも報告されている^{5,9)}.また,ギリシャの大規模なケースコントロールスタディおよびスペインでの小規模のケースコントロールスタディでも,乳癌のリスクがオリーブオイルの摂取量に反比例するとの報告もなされている^{5,10,11)}.また,イタリアで行われた最近のケースコントロールスタディの報告によれば,乳癌以外にもオリーブ油の摂取量が膵臓癌のリスクを著しく低下させるとの報告もある^{5,12)}.

オリーブオイルの約70%がオレイン酸であるため,これらオリーブオイルの作用はオレイン酸による作用と考えられ,オレイン酸の意義が,最近非常に注目されてきている⁵⁾.しかしながら,オレイン酸が濃度依存性に癌の発生を抑制するという仮説の証明は,現在のところまだ報告はなく,オレイン酸による癌細胞のアポトーシスの報告もまだなされていない.

そこで今回我々は,ヒト子宮頸部癌細胞であるHeLa細胞のアポトーシス伝達機構を,癌細胞のアポトーシスを誘導する事が証明されているエイコサペンタエン酸のアポトーシス伝達機構と比較をし,最近アポトーシスとの関連で注目されているNF- κ B, I κ B α , I κ B β のオレイン酸による変化をウェスタンブロット法にて解析した.

方 法

1 細胞株と細胞培養

ヒト子宮頸部癌細胞であるHeLa 229細胞(大日本製薬,大阪,日本)を用いた.HeLa 229細胞は37℃,5%CO₂条件下で培養シャーレにFetal Bovine Serum(Invitrogen Corp, Carlsbad, USA)を10%,ペニシリンストレプトマイシン(Invitrogen Corp, Carlsbad, USA)1%を添加したD-MEM (High

Glucose) with D-Glucose 4500 mg/dl L-Glu・NaHCO₃(日研生物医学研究所,京都,日本)を用いて,初期濃度 1×10^4 細胞/cm²で10日間静置培養した.培養したHeLa細胞に,エイコサペンタエン酸,オレイン酸を各々50 μ M, 100 μ M添加し,24時間後semi-confluentの状態にて回収した.

2 アポトーシスの検出

アポトーシスは,以前我々が実施した方法¹³⁾にしたがって,DNA ladderおよびHoechst 33258によるHeLa 229細胞の核の凝縮,濃染にて評価した.

DNA ladderは,Apoptosis Ladder Detection Kit (Wako, Osaka, Japan)を用いて行った.Hoechst 33258によるアポトーシス細胞の検出及び細胞数の算出には,蛍光顕微鏡下($\times 400$)で一視野当たり少なくとも500個の細胞からアポトーシス細胞計測を10回を行い,百分率として算出した.

3 ウェスタンブロット

HeLa 229細胞は10% SDS, PBSを用いて溶解し,ソニケーションを行った後14,000 g, 4℃で10分間遠心分離し上清を抽出し蛋白測定を行った.培養したHela細胞の24時間後のアポトーシス関連蛋白の発現(Bax, Bcl-2, Fas, チトクロームC, Apaf-1, カスパーゼ3)をウェスタンブロット法にて解析した.Hela細胞より調整した蛋白を各サンプル20 μ g /20 μ lになるようにPBSで調整し,2-メルカプトエタノール存在下で95℃,5分間熱処理した.泳動,転写後,5%スキムミルクを含む0.05% Tween 20/PBSにより非特異的反応をブロックした後,一次抗体としてBcl-2 (mouse monoclonal antibody: BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA), Bax (rabbit polyclonal antibody: Santa Cruz, California, USA), チトクロームC (mouse monoclonal antibody: R&B System Inc, Minneapolis, USA), Apaf-1 (goat polyclonal antibody: Santa Cruz, California, USA), カスパーゼ3 (rabbit polyclonal antibody: BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA), Fas (mouse monoclonal antibody: BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA), NF κ -B (rabbit polyclonal antibody: Santa Cruz, California, USA), I κ B α (rabbit polyclonal antibody: Santa Cruz, California, USA), I κ B β (rabbit polyclonal antibody: Oncogene Research Products, Boston, USA)を,2次抗体にはHRP標識抗マウスIgヤギポリクロナール抗体,抗ウサギIgヤギポリクロナール抗体(The Binding Site, Birmingham, UK),抗ヤギIgG (H+L) (ICN Pharmaceuticals Inc, Cosla Mesa, USA)を,それぞれ反応させた.なおチトクロームCのミトコンドリアから流出した量を評価するため,160,000 g,20分間超遠心分離後の

上清を使用した。以上, これらの検出には, ペルオキシターゼにより触媒されるルミノール系の化学発光 ECL™ (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, England) を利用した。感光用フィルムとしては, ECL系の発光波長に一致した特性をもつ Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, England) を用いた。フィルム上で検出したバンドを GAPDH (Biogenesis Ltd, Poole, England) で補正し, Macintosh, NIH image を用いて定量, 解析を行った。

4 カスパーゼ 3 活性測定

カスパーゼ 3 活性は, 以前我々が実施した方法¹³⁾ およびコマーシャルキット (Promega Corporation, Madison, USA) にしたがって, 異なった方法にて, 確認した。我々が実施した方法を簡単に記す。細胞を回収後 400 g, 5 分間遠心分離し, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM ジチオスレイトール, 1 mM phenyl methionyl sulfonyl fluoride を含む 25 mM Heps-NaOH (pH 7.5) を用いて 2 回洗浄した。2 分間ソニケーションを行った後, サンプルを 4℃, 160,000 g で 20 分間超遠心分離し, 上清の蛋白濃度を Bradford 法で測定した。50 μ g 蛋白を 50 μ M N-acetyl Asp-Glu-Val-Asp-a-4-methyl-coumaryl-7-amide (ac-DEVD-MCA) を用いて 25 mM Heps-NaOH (pH 7.5), 10 % sucrose, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol から成る protease assay buffer 中に 37℃, 30 分間インキュベートした。1 M 酢酸を添加して酵素反応させた後, 遊離した MCAs を励起波長 460 nm と蛍光波長 380 nm をスペクトロフルオロメーターで測定した。

5 統計

全ての結果は独立した 5 回の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差として表し, ノンパラメトリック検定の Mann-Whitney の U 検定で行い, 有意差は $p < 0.05$ とした。

結 果

1 DNA 電気泳動による断片化 DNA の検出

アガロース電気泳動にて, 100 μ M エイコサペンタエン酸あるいは 100 μ M オレイン酸の添加 24 時間後に断片化 DNA が検出された。また positive control として PMA を呈示した (Fig. 1)。

2 Hoechst 33258 染色によるアポトーシス細胞の検出

蛍光顕微鏡下 ($\times 400$) において, 100 μ M エイコサペンタエン酸あるいは 100 μ M オレイン酸の添加 24 時間後に, 核の凝縮, 濃染した典型的なアポトーシス細胞が検出され (Fig. 2-A), アポトーシス細胞の数が, エイコサペンタエン酸あるいはオレイン酸の添加量に依存して, 有意に増加した (Fig. 2-B)。

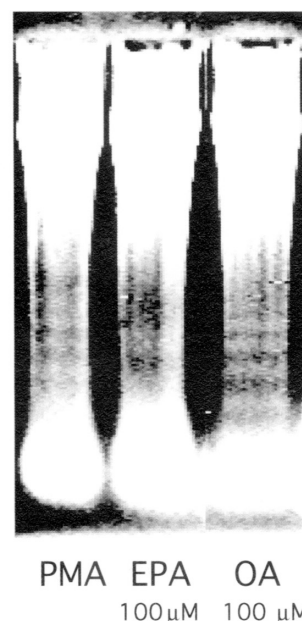


Fig. 1. The fragmentation of DNA was detected in agarose electrophoresis 24 hours after adding 100 μ M oleic acid (OA) and eicosapentaenoic acid (EPA). PMA was used as positive control.

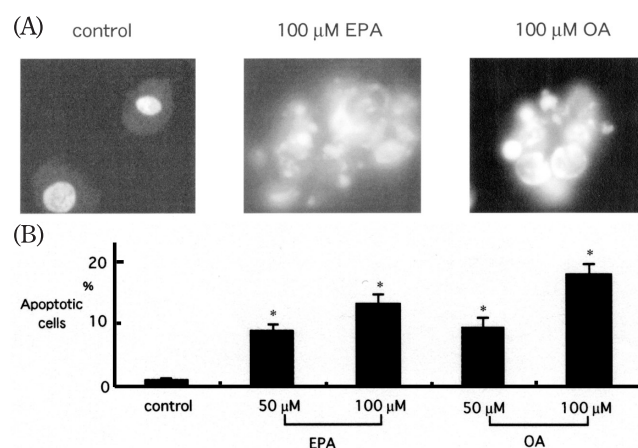


Fig. 2. Under a fluorescent microscope, nuclear contraction and the typical apoptotic cell (A) which carried out the dark stain were detected after 24 hours adding 100 μ M oleic acid (OA) and EPA by Hoechst 33258 stain (original magnification, $\times 400$), and the rate of apoptotic cells were increased to dose-dependently by either of them (B).

3 ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット法で, エイコサペンタエン酸あるいはオレイン酸投与後 24 時間のアポトーシス関連蛋白の発現を解析したところ, エイコサペンタエン酸で, Bax/Bcl-2 の比率はコントロールと比較して差は認められなかったが (Fig. 3), Fas (CD95), チトクローム C, Apaf-1, カスパーゼ 3 の発現が 50 μ M, 100 μ M で有意に上昇した (Fig. 4)。一方, オレイン酸において Bcl-2 の発現が抑制され, Bax/Bcl-2 の比率

が50 μ M, 100 μ Mにおいて有意に上昇した (Fig. 3). しかしながら, 結果には示さないが, オレイン酸によってFas (CD95), チトクロームC, Apaf-1, カスパーゼ3はコントロールと比較して変化を認めなかった.

4 カスパーゼ3 活性測定

エイコサペンタエン酸において, カスパーゼ3活性は濃度依存性に有意に上昇し, またcaspase inhibitorによりカスパーゼ3活性が低下した (Fig. 5-A,B). 一方, オレイン酸においては, コントロールと比較して変化を認めなかった. これにより, エイコサペンタエン酸によりカスパーゼ3が活性化することが示された.

5 オレイン酸のNF- κ B, I κ B α , I κ B β への作用

オレイン酸ではNF- κ Bは濃度依存性に低下し, I κ B β は濃度依存性に上昇したが, I κ B α には変化は認められなかった (Fig. 6).

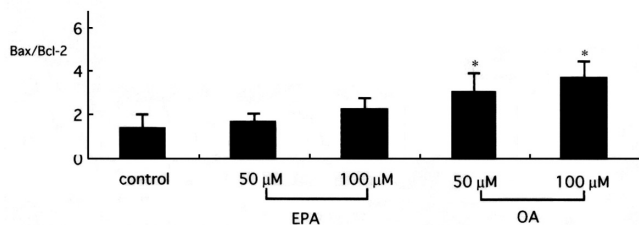


Fig. 3. The change of Bax/Bcl-2 expression in HeLa cells with EPA and oleic acid (OA) by Western blotting analysis. The Bcl-2 expression was inhibited and the ratio of Bax/Bcl-2 expression increased at 50 μ M and 100 μ M OA.

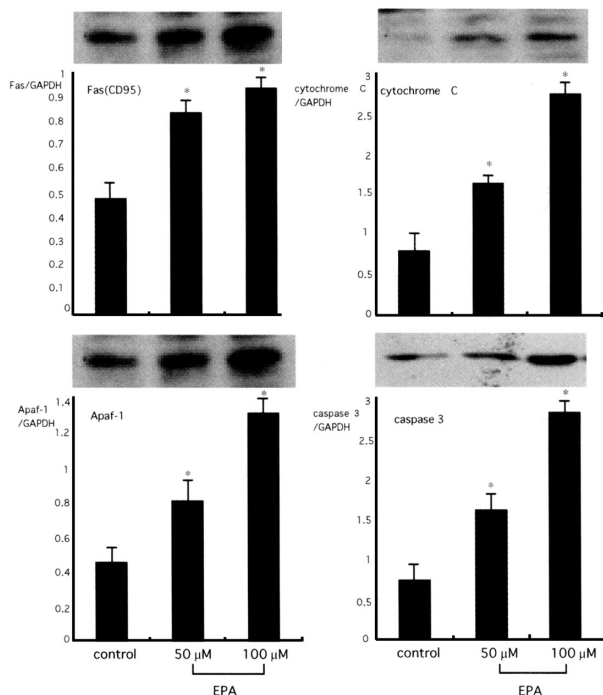


Fig. 4. The change of Fas (CD95), cytochrome C, Apaf-1 and caspase 3 expressions in response to EPA in HeLa cells by Western blotting analysis. Compared with control, all expressions were increased at 50 μ M and 100 μ M EPA.

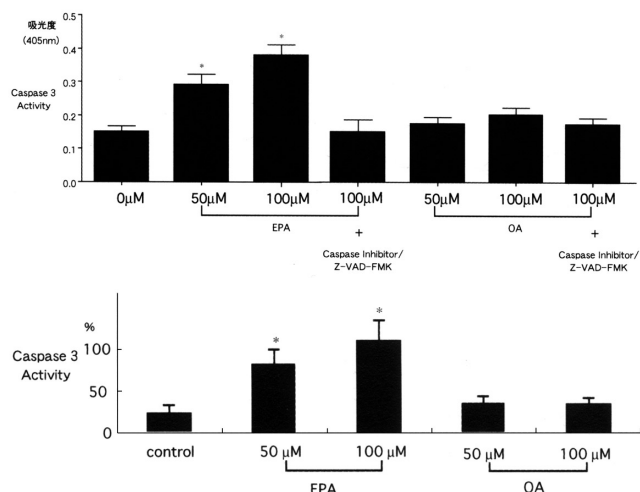


Fig. 5. The activity of caspase 3 was significantly increased by EPA, but not oleic acid (OA). EPA-induced increase in caspase 3 activity was reduced by caspase-inhibitor.

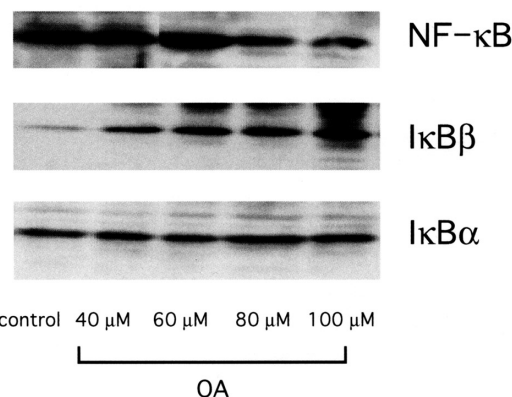


Fig. 6. The change of NF- κ B, I κ B α and I κ B β expression in HeLa cells by oleic acid (OA) by Western blot analysis. NF- κ B was dose-dependently inhibited by OA and I κ B β was increased dose-dependently although there was no change in I κ B α .

考 察

癌予防および治療としての食事療法は, 容易で低コストで, 体内の新陳代謝を促し, 正常細胞に害を及ぼさないという理由で薬物療法に比較し重要である^{2,14,15}. その中でも, 植物および動物性油から主に構成される多価不飽和脂肪酸 (PUFAs) は, 癌細胞の増殖を調節しているといわれている^{2,16-18}. PUFAsの中でも, 特に魚油は, *in vitro*ではあるが, 白血病細胞の増殖を抑制する事が明らかとなっている^{2,4,19,20}. 加えて, 魚油は, 正常細胞や全ての動物において, 全く副作用が認められないと報告されている^{2,21-23}. PUFAsの抗癌作用機序の仮説としては, 細胞膜の組成を変化させたり, eicosanoid を形成したり, フリーラジカル産生抑制・消去作用など, 幾つか報告されている^{2,24-26}.

今回の我々の成績では、単価不飽和脂肪酸であるオレイン酸も PUFAs の中の魚油の主要な脂肪酸であるエイコサペンタエン酸と同様にアポトーシスを誘導し、癌予防および治療として応用できる可能性が示唆された。

そこで、我々はエイコサペンタエン酸およびオレイン酸によるアポトーシス誘導能を比較検討した。エイコサペンタエン酸およびオレイン酸により、DNAの断片化および典型的なアポトーシス細胞の増加を認め、エイコサペンタエン酸およびオレイン酸により、明らかに HeLa 細胞はアポトーシスをもたらした。

次に、エイコサペンタエン酸およびオレイン酸による、アポトーシスに関連した調節遺伝子の蛋白発現の変化を比較検討した。オレイン酸により Bcl-2 の発現が抑制され、Bax/Bcl-2 の比率が上昇した (Fig. 2)。しかしながら、Fas (CD95)、チトクローム C、Apaf-1、カスパーゼ 3 には、オレイン酸により変化を認めず、カスパーゼ 3 活性にも変化は認められなかった。一方、エイコサペンタエン酸は Fas (CD95)、チトクローム C、Apaf-1、カスパーゼ 3 の発現を上昇させ (Fig. 3)、カスパーゼ 3 活性も有意に上昇した。以上の結果は、オレイン酸によるアポトーシスの機序が、エイコサペンタエン酸によるアポトーシスの機序と異なり、カスパーゼ非依存的な別の細胞死のプログラムを活性化する場合を示唆している。

次に我々は最近アポトーシスとの関連が注目されていて、炎症過程に関連する転写因子である NF- κ B が、どのように、オレイン酸により変動するかを検討した。Fig. 4 で示しているように、オレイン酸では NF- κ B が濃度依存性に低下し、I κ B β が濃度依存性に増加した。しかしながら、エイコサペンタエン酸では NF- κ B、I κ B α 、I κ B β の変化を認めなかった。

近年、正常細胞および癌細胞のアポトーシス調節における NF- κ B の役割が広く研究されている²⁷⁾。ホジキン病はもちろん乳癌細胞の B リンパ球における NF- κ B の活性化は、これらの細胞に対してアポトーシスを抑制するとの報告がある^{27,30)}。TNF α などによる NF- κ B の活性化は癌細胞に対してアポトーシスを抑制し、NF- κ B が癌治療に対する抵抗性と関係しているとも報告されている^{27,31-37)}。これらの結果から、アポトーシスに関連する遺伝子の発現は NF- κ B によって調節されている可能性があり、癌の治療として、NF- κ B の活性化を抑制する治療が考えられる。さらに、NF- κ B はアポトーシスのみならず、細胞増殖・分化を調節したり、免疫反応や炎症をも調節している^{27,38-41)}。種々の刺激に対して、NF- κ B は核に移行し、多くの標的遺伝子の発現を誘導する。

NF- κ B の活性化は、NF- κ B の核への移行による。そしてそれは I κ B により調節を受けている^{38,42)}が、I κ B には I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ 、I κ B ϵ 、Bcl-3 の存在が報告されており³⁸⁾、いずれの I κ B も、NF- κ B の領域部位をマスクし、DNA との結合活性を抑制し、NF- κ B の核内への流入を抑制する作用を有する⁴³⁾。さらに、様々な刺激に際して、I κ B kinase により I κ B は速やかにリン酸化され、ユビキチンが負荷され、I κ B がデグラデーションをうける²⁷⁾。オレイン酸により、I κ B β のユビキチン化が抑制されていることも考えられる。また、最近では、ミトコンドリア膜間隙に I κ B α および NF- κ B 複合体が貯留することで、アポトーシスを調節しているとの報告があり^{44,45)}、ミトコンドリアの膜に存在する Bax および Bcl-2 が、ミトコンドリアに貯留した I κ B α および NF- κ B 複合体によりどのように調節を受けているかは、興味あるところである。また、NF- κ B 活性化は Bcl-2 の発現に影響しているという報告はあるが^{46,47)}、直接 Bcl-2 遺伝子を調節しているという報告は現在のところ認められていない。また様々な細胞において、NF- κ B 抑制は Bax の発現を増加させ、Bcl-2 の発現を減少させるとの報告もあり²⁷⁾、今後、オレイン酸により変動する Bax、Bcl-2、NF- κ B、I κ B β がどのように相互作用しているのか、またオレイン酸がどのような機序で I κ B 蛋白ファミリーの誘導の違いが生じるのかを検討する必要がある。加えて、オレイン酸の抗癌作用の機序として、PUFAs 同様、オレイン酸による細胞膜の組成変化、eicosanoid の形成、フリーラジカル産生・消去作用なども検討する必要があると考える。

結 論

オレイン酸による HeLa 細胞のアポトーシスは、エイコサペンタエン酸による機序とは異なり、カスパーゼ非依存性経路により I κ B β が関わるアポトーシス伝達機構の存在が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導御校閲賜りました埼玉医科大学第四内科学教室、片山茂裕教授に深謝いたします。また、本研究に協力頂きました佐藤さわ子実験助手に感謝いたします。

文 献

- 1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26: 239-57.

- 2) Chiu LC, Wan JM. Induction of apoptosis in HL-60 cells by eicosapentaenoic acid (EPA) is associated with downregulation of bcl-2 expression. *Cancer Lett* 1999;145:17-27.
- 3) Lai PB, Ross JA, Fearon KC, Anderson JD, Carter DC. Cell cycle arrest and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells exposed to eicosapentaenoic acid in vitro. *Br J Cancer* 1996; 74:1375-83.
- 4) Finstad HS, Kolset SO, Holme JA, Wiger R, Farrants AK, Blomhoff R, et al. Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemic HL-60 cells. *Blood* 1994; 84:3799-809.
- 5) Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889:193-203.
- 6) Gerber M. Olive oil and cancer. In: Giacosa A, Hill Mj, editors. *Mediterranean diet and cancer prevention. Proceeding of a workshop of the European Cancer Prevention Organization Cosenza. Italy, 1991*:p128-9.
- 7) Trichopoulou A, Toupadaki N, Tzonou A, Katsouyanni K, Manousos O, Kada E, et al. The macronutrient composition of the Greek diet: estimates derived from six case-control studies. *Eur J Clin Nutr* 1993;47:549-58.
- 8) Willett WC. Diet and health: what should we eat? *Science* 1994;264:532-7.
- 9) Martin-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Fernandez-Rodriguez JC, et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1994;58:774-80.
- 10) Trichopoulou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, et al. Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:110-6.
- 11) Landa MC, Frago N, Tres A. Diet and the risk of breast cancer in Spain. *Eur J Cancer Prev* 1994;3: 313-20.
- 12) La Vecchia C, Negri E. Fats in seasoning and the relationship to pancreatic cancer. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:370-3.
- 13) Matsunaga T, Iguchi K, Nakajima T, Koyama I, Miyazaki T, Inoue I, et al. Glycated high-density lipoprotein induces apoptosis of endothelial cells via a mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:714-20.
- 14) Arai S. Studies on functional food in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:9-15.
- 15) Murakami A, Ohigashi H, Koshimizu K. Anti-tumor promotion with food phytochemicals: a strategy for cancer chemoprevention. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:1-8.
- 16) Kaizer L, Boyd NF, Kriukov V, Tritchler D. Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study. *Nutr Cancer* 1989;12:61-8.
- 17) Karmali RA, Adams L, Trout JR. Plant and marine n-3 fatty acids inhibit experimental metastasis of rat mammary adenocarcinoma cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;48:309-14.
- 18) Noguchi M, Minami M, Yagasaki R, Kinoshita K, Earashi M, Kitagawa H, et al. Chemoprevention of DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats by low-dose EPA and DHA. *Br J Cancer* 1997;75: 348-53.
- 19) Anderson KM, Seed T, Plate JM, Jajeh A, Meng J, Harris JE. Selective inhibitors of 5-lipoxygenase reduce CML blast cell proliferation and induced limited differentiation and apoptosis. *Leuk Res* 1995;19:789-801.
- 20) Tsukada T, Nakashima K, Shirakawa S. Arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors show potent antiproliferative effects on human leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140:832-6.
- 21) Anel A, Naval J, Desportes P, Gonzalez B, Uriel J, Pineiro A. Increased cytotoxicity of polyunsaturated fatty acids on human tumoral B and T-cell lines compared with normal lymphocytes. *Leukemia* 1992;6:680-8.
- 22) Begin ME, Ells G, Das UN, Horrobin DF. Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med* 1985;19: 177-86.
- 23) Koskelo EK, Boswell K, Carl L, Lanoue S, Kelly C, Kyle D. High levels of dietary arachidonic acid triglyceride exhibit no subchronic toxicity in rats. *Lipids* 1997;32:397-405.
- 24) Spector AA, Burns CP. Biological and therapeutic potential of membrane lipid modification in tumors. *Cancer Res* 1987;47:4529-37.
- 25) Das UN. Agranulocytosis, aplastic anemia, and leukemia: relevance to arachidonic acid

- metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1990;39:217-20.
- 26) Mayer AM, Brenic S, Glaser KB. Pharmacological targeting of signaling pathway in protein kinase C-stimulated superoxide generation in neutrophil-like HL-60 cells: effect of phorbol ester, arachidonic acid and inhibitors of kinase(s), phosphate(s) and phospholipase A2. J Pharmacol Exp Ther 1996; 279:633-44.
- 27) Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, et al. Nuclear Factor- κ B, cancer and apoptosis. Biochem Pharmacol 2000;60:1085-9.
- 28) Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, et al. Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. EMBO J 1996;15:4682-90.
- 29) Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest 1997;100:2952-60.
- 30) Bargou RC, Emmerich F, Kappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. J Clin Invest 1997;100:2961-9.
- 31) Liu Z, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. Cell 1996;87:565-76.
- 32) Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. Science 1996;274:782-4.
- 33) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. Science 1996;274:787-9.
- 34) Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. Science 1996;274:784-7.
- 35) Barkett M, Glimore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. Oncogene 1999; 18:6910-24.
- 36) Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. Nature 1995;376:167-70.
- 37) Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. Nat Med 1999;5:412-7.
- 38) Bourke E, Kennedy EJ, Moynagh PN. Loss of I κ B- β is associated with prolonged NF- κ B activity in Human Glial Cells. J Biol Chem 2000;275: 39996-40002.
- 39) Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 1998;16:225-60.
- 40) Baeuerle PA, Baltimore D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. Science 1988;242: 540-6.
- 41) Kawakami K, Scheidereit C, Roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin enhancer-binding protein (NF- κ B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type1 promoter *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;85:4700-4.
- 42) May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B Immunol Today 1998;19:80-8.
- 43) Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. Biochim Biophys Acta 1991;1072:63-80.
- 44) Bottero V, Rossi F, Samson M, Samson M, Mari M, Hofman P, Peyron J. I κ B- α , the NF- κ B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. J Biol Chem 2001;276: 21317-24.
- 45) Bernadri P, Scorrano P, Clonna R, Petronilli V, Di Lasa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. Eur J Biochem 1999;264:687-701.
- 46) Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-X expression through NF- κ B activation in primary hippocampal neurons. J Biol Chem 1999;274:8531-8.
- 47) Feuillard J, Schuhmacher M, Kohana S, Asso-Bonnet M, Ledeur F, Joubert-Caron R, et al. Inducible loss of NF- κ B activity is associated with apoptosis Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. Blood 2000;95: 2068-75.