

Influence of Tyrosol on Cell Growth Inhibition of KB Human Oral Cancer Cells

Ue-Kyung Lee¹, Su-Gwan Kim¹, Dae-San Go¹, Sun-Kyoung Yu¹, Chun Sung Kim¹, Jeongsun Kim² and Do Kyung Kim^{1,*}

¹Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Department of Dental Hygiene, Gwangju Health University, Gwangju 62287, Republic of Korea

(received November 10, 2016; revised November 21, 2016; accepted November 22, 2016)

Tyrosol, a phenylethanoid and a derivative of phenethyl alcohol, possesses various biological properties, such as anti-oxidative and cardioprotective activity. Olive oil is the principal source of tyrosol in the human diet. However, so far the anti-cancer activity of tyrosol has not yet been well defined. This study therefore undertakes to examine the cytotoxic activity and the mechanism of cell death exhibited by tyrosol in KB human oral cancer cells. Treatment of KB cells with tyrosol induced the cell growth inhibition in a concentration- and a time-dependent manner. Furthermore, the treatment of tyrosol induced nuclear condensation and fragmentation of KB cells. Tyrosol also promoted proteolytic cleavage of procaspase-3, -7, -8 and -9, increasing the amounts of cleaved caspase-3, -7, -8 and -9. In addition, tyrosol increased the levels of cleaved PARP in KB cells. These results suggest that tyrosol induces the suppression of cell growth and cell apoptosis in KB human oral cancer cells, and is therefore a potential candidate for anti-cancer drug discovery.

*Correspondence to: Do Kyung Kim, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea.
Tel: +82-62-230-6893, Fax: +82-62-232-6896
E-mail: kdk@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0001-6254-946X

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words: tyrosol, cell death, apoptosis, oral cancer cells

서론

세포가 유전자에 의해 제어되는 세포사의 한 형태인 apoptosis는 정상적인 세포를 새로 바꾸거나 이상이 생긴 세포를 제거하여, 세포의 항상성과 조직성장의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다[1-3]. 또한 항암물질의 대부분은 apoptosis를 야기하여 암세포 증식을 억제함으로써 암의 치료제 역할을 하기 때문에, 이러한 항암물질을 사용하여 발생하는 암세포의 apoptosis는 암 치료법의 결과에 대한 중요한 지표가 되었다[4-7]. Apoptosis는 외인성의 death receptor-dependent pathway 또는 내인성의 mitochondria-dependent pathway를 따라 일어나는 것으로 보이며, 이는 암의 화학적 치료제에 의해서 일어나기도 한다[8,9].

Tyrosol(2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol)은 phenylethanoid의 한 종류로서 phenethyl alcohol 유사체이다[10-11]. 올리브 오일 등 천연물들에 존재하는 tyrosol은 천연 항산화제로 널리 알려져 있으며, 특히 생체 이용률이 다른 항산화제들에 비해 매우 우수하다고 보고된 바 있다[11-14]. 또한 tyrosol은 심장보호 작용이 있어 심장의 노화 치료제로 고려되고 있으며[12,13], 사람의 대장암 세포의 성장을 억제한다는 연구결과도 보고된 바 있다[15]. 그러나 현재까지 대장암을 제외한 다른 암세포들의 성장억제에 관한 보고는 없었으며, 특히 구강암에서 tyrosol의 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 사람 구강암세포주 KB 세포를 이용하여 tyrosol의 구강암 세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하며, 아울러 tyrosol에 의한 구강암 치료의 효용성을 제시 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Tyrosol, N-methylthiotetrazole(MTT) 및 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)는 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8, anti-cleaved caspase-9 및 anti-cleaved PARP 항체는 Cell Signaling Technology, Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. 사람 구강암세포 KB는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 세포주와 세포배양

사람 구강암세포 KB는 5% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), 항생제(100u/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) 및 1% non-essential amino acids(NEAA, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)가 함유된 37°C의 성장배지 minimal essential medium(MEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다[16].

3. 세포성장 억제실험(MTT 분석)

Tyrosol에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 5 X 10³cells/well의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, tyrosol을 다양한 농도와 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다[17]. MTT 분석은 tyrosol을 처리한 KB 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 0.5 μ g/ μ l)을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

4. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰

Tyrosol에 의한 KB 세포 증식억제가 apoptosis 유도와의 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI 염색을 이용한 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 10cm 배양접

시에 5 X 10⁵개의 KB 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, tyrosol 1000 μ M을 처리하여 96시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양한 KB 세포를 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1:9의 비율로 섞은 fixing solution을 이용하여 상온에서 10분 동안 고정한 후 DAPI 용액을 이용하여 15분 동안 염색하였다. 염색한 KB 세포를 형광현미경(IX71, Olympus, Japan)을 이용하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5. DNA fragmentation 분석

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. Tyrosol에 의한 세포 DNA fragmentation 효과를 관찰하기 위해, 10cm 배양접시에 5 X 10⁵개의 KB 세포를 접종하였다. 24시간 배양한 후, tyrosol 1000 μ M을 처리하여 96시간 동안 37°C에서 배양한 후, 세포를 수집하여 lysis buffer(0.1M NaCl, 0.001M EDTA, 0.3M Tris-HCl(pH, 7.5), 0.2M sucrose)를 이용한 통상의 phenol-chloroform extraction법으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 2% agarose gel에서 전기영동(50volts, 90분) 하였으며, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

6. Immunoblotting

세포 apoptosis의 지표가 되는 caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 및 PARP(anti-cleaved caspase-3, anti-cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8, anti-cleaved caspase-9 및 anti-cleaved PARP) 분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다[18]. 10cm 배양접시에 5 X 10⁵개의 KB 세포를 접종하고 24시간 배양한 후, tyrosol 1000 μ M을 처리하여 96시간 동안 37°C에서 배양한 후 세포를 수집하였다. 세포를 4°C의 PBS로 2회 세척한 후, 4°C의 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.5mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml aprotinin 및 5 μ g/ml leupeptin이 포함된 PBS)에서 30분 반응시켰다. 세포 용해물을 12,500 x g에서 20분간 원심분리한 후, 단백질을 정량하였다. 단백질을 2배의 SDS sample buffer(60mM Tris-HCl(pH, 6.8), 4% SDS, 25% glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 100°C에서 5분간 변성시킨 후, 12% SDS-polyacrylamide gel에 120volt에서 2시간 전기영동 한 다음, 단백질 transfer를 이용하여 nitrocellulose membrane(Millipore Co., Billerica, MA, USA)으로 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking하였고, PBST buffer로 15분간 3회 세척하였다. 일차항체로 anti-caspase-3, anti-caspase-7, anti-caspase-8, anti-caspase-9 및 anti-PARP(anti-cleaved caspase-3, anti-

cleaved caspase-7, anti-cleaved caspase-8, anti-cleaved caspase-9 및 anti-cleaved PARP) 항체를 1,000배 희석하여 사용하였으며, anti- β -actin 항체는 2,000배 희석하여 사용하였다. 이차항체로 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG를 5,000배 희석하여 사용하였으며, ECL detection kit를 사용하여 X-ray 필름에 현상한 후 분석하였다.

7. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean \pm SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만($p < 0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 또한 본 연구의 통계적 검정은 SPSS ver. 12.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 세포성장에 영향을 미치는 tyrosol의 효과

KB 세포에서 tyrosol에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 MTT 분석을 시행하였다. Tyrosol을 10, 30, 100, 300, 1000 및 3000 μ M의 다양한 농도로 24, 48, 72 및 96시간 동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, tyrosol 처리 24시간과 48시간의 경우에는 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 1A, 1B). 그러나 tyrosol 처리 72시간과 96시간의 경

Table 1. Anti-proliferative effect of tyrosol in KB cells

Time	IC_{50} (μ M)
24 hours	ND
48 hours	ND
72 hours	941.8 \pm 113.7
96 hours	191.7 \pm 30.2

The IC_{50} values represent the mean \pm SEM for three experiments. ND; not detected.

우, tyrosol 처리군은 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 농도(Fig. 1A)와 시간(Fig. 1B)에 의존적임을 확인할 수 있었다. KB 세포성장 억제에 대한 tyrosol의 IC_{50} (최대 억제량의 50%를 유발시키는 농도)은 tyrosol 처리 24시간과 48시간의 경우에는 결정할 수 없었으며, 72시간과 96시간에서는 각각 약 942 μ M과 192 μ M이었다(Table 1).

2. DAPI 염색에 의한 세포핵 형태 관찰

Tyrosol 처리에 따른 KB 세포의 성장억제가 세포 apoptosis 유발과 상관성이 있는지 조사하기 위하여 0과 1000 μ M의 tyrosol을 처리한 배지에서 96시간 동안 배양한 후, DAPI 염색을 통해 세포핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. 세포핵에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 tyrosol을 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷

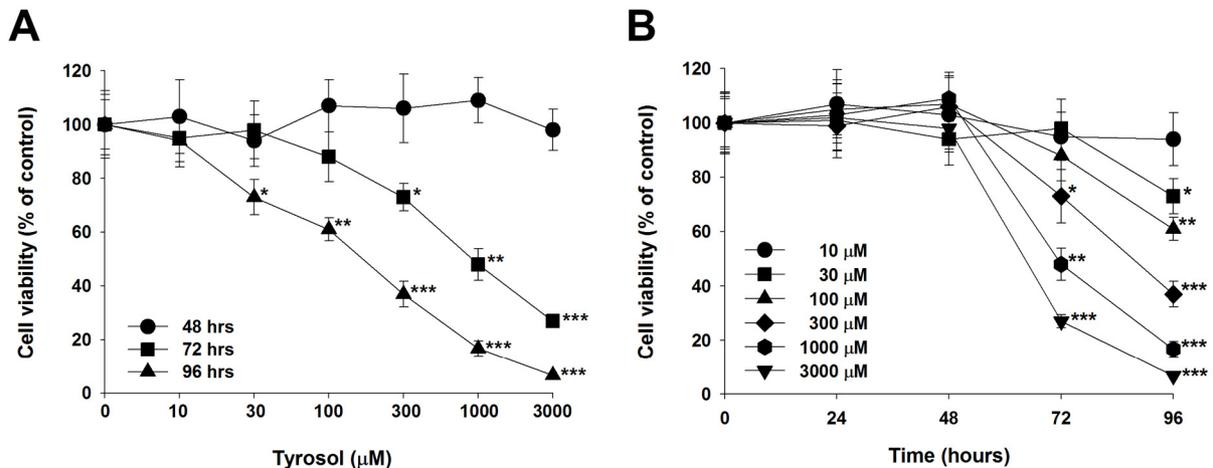


Fig. 1. Concentration- and time-dependent effects of tyrosol on the cell viability in KB human oral cancer cells. (A) Concentration-dependent effect of tyrosol on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with various concentrations of tyrosol or without tyrosol for 48 (circle), 72 (square) and 96 hours (triangle). (B) Time-dependent effect of tyrosol on the cell viability in KB cells. The KB cells were treated with 10 (circle), 30 (square), 100 (triangle), 300 (diamond), 1000 (hexagon) and 3000 μ M (inverted triangle) tyrosol for 0 - 96 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A570_{nms} of tyrosol treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of tyrosol).

Nuclear staining with DAPI

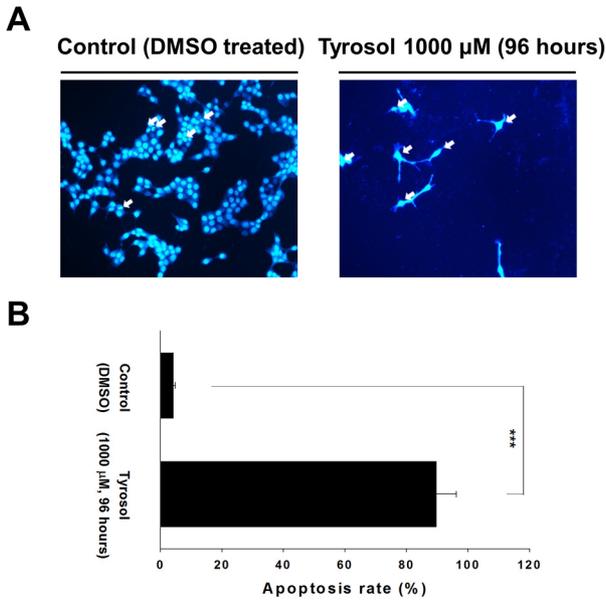


Fig. 2. Induction of apoptosis by tyrosol in KB cells. (A) Changes in nuclear morphology by tyrosol. The cells were treated with 0 or 1000 μM tyrosol for 96 hours. Representative fluorescence photomicrographs show the nuclei morphology of KB cells. The arrows indicate chromatin condensation, reduced nuclear size and nuclear fragmentation typically observed in apoptotic cells. (B) The percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells to living KB cells. ****P*<0.001 vs. control (the control cells measured in the absence of tyrosol).

DNA fragmentation

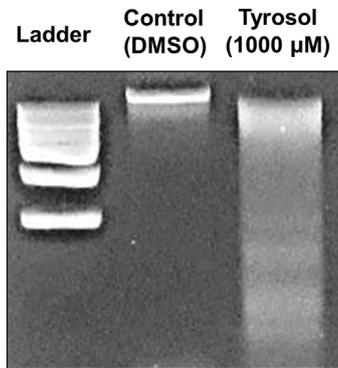


Fig. 3. Fragmentation of internucleosomal DNA by tyrosol in KB cells. The cells were treated with 0 or 1000 μM tyrosol for 96 hours and nuclear DNA was subjected to agarose gel electrophoresis.

하게 정상으로 염색이 되었으나, tyrosol 1000μM을 처리한 세포에서는 apoptosis 발생 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 다수 관찰되었다(Fig. 2A). Apoptosis가 발생하지 않은 정상세포를 100%

로 기준하여 apoptotic body를 비율로 나타내어 비교한 결과, tyrosol을 처리하지 않은 대조군 KB 세포에서는 약 4.1%, tyrosol 1000μM을 처리한 세포에서는 약 89.7%로, tyrosol 농도가 증가함에 따라 apoptotic body의 비율이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2B).

3. DNA fragmentation 분석

Tyrosol에 의한 KB 세포의 성장억제 기전을 확인하기 위하여 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. Tyrosol 0과 1000μM을 처리한 배지에서 96시간 동안 처리한 KB 세포의 DNA를 추출하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, tyrosol 1000μM을 처리한 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3).

4. Tyrosol에 의한 caspase의 활성화

Caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 및 PARP가 세포 apoptosis의 지표가 되므로[8,9,19-21], tyrosol을 처리한

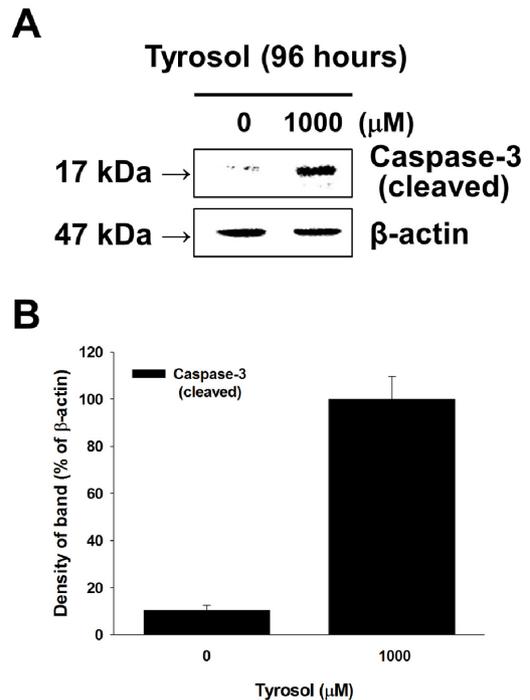


Fig. 4. Proteolytic cleavage of caspase-3 by tyrosol treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-3 by tyrosol was measured in KB cells. The cells were treated with 0 or 1000 μM tyrosol for 96 hours. The cell lysate was prepared and analyzed by immunoblotting as described in “MATERIALS AND METHODS”. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β-actin normalization. The deviations in the results represent four separate experiments. The deviations in the results represent four separate experiments.

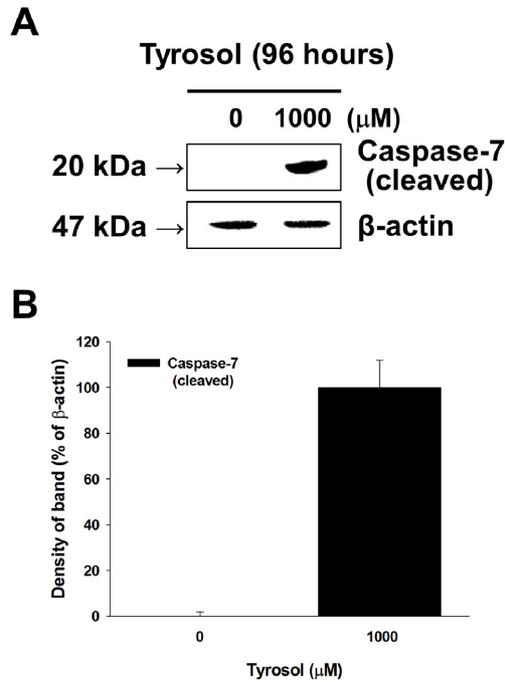


Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-7 by tyrosol treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-7 by tyrosol was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization. The deviations in the results represent four separate experiments.

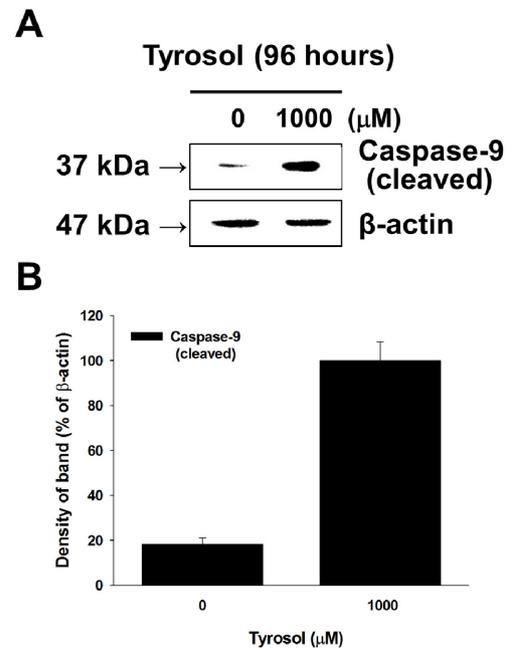


Fig. 7. Proteolytic cleavage of caspase-9 by tyrosol treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-9 by tyrosol was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization. The deviations in the results represent four separate experiments.

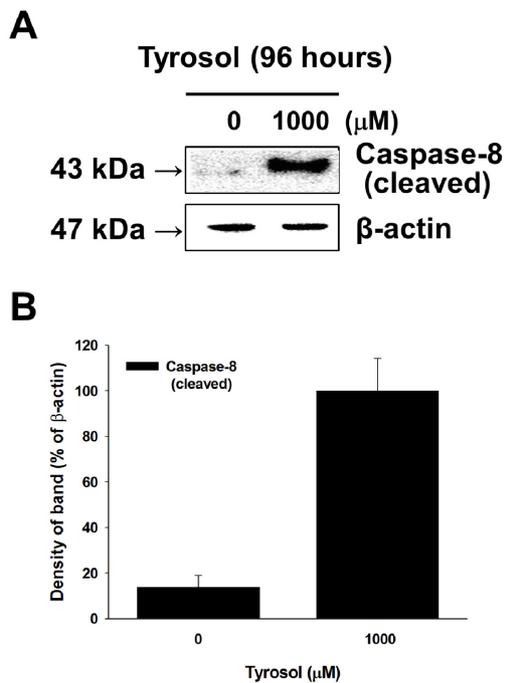


Fig. 6. Proteolytic cleavage of caspase-8 by tyrosol treatment in KB cells. (A) Activity of cleaved caspase-8 by tyrosol was measured in KB cells. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization. The deviations in the results represent four separate experiments.

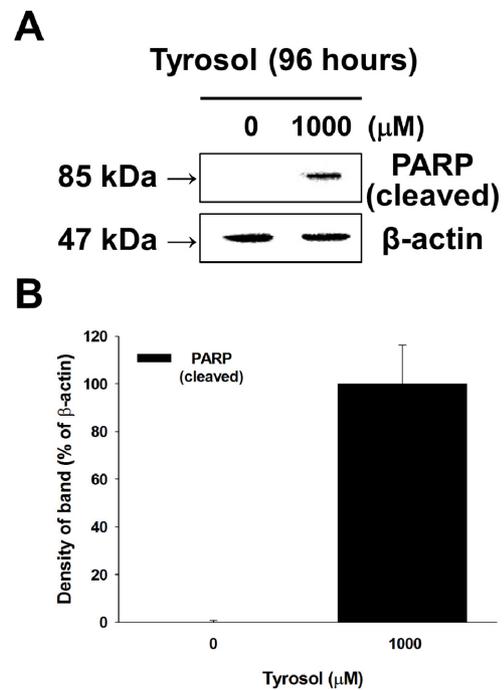


Fig. 8. Activation of cleaved PARP by tyrosol treatment in KB cells. (A) The activity of cleaved PARP by tyrosol was measured in KB cells. The KB cells were stimulated with 0 or 1000 μM tyrosol for 96 hours, harvested and lysed using a cell lysate buffer. (B) Quantitative data for (A) were analyzed by using Imagegauge 3.12 software after β -actin normalization. The deviations in the results represent four separate experiments.

KB 세포에서 cleaved caspase-3, cleaved caspase-7, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9 및 cleaved PARP 발현분석을 위해 immunoblotting을 시행하였다. Tyrosol을 처리한 KB 세포의 단백질을 추출하여 확인한 결과, 대조군에서는 procaspase-3, procaspase-7, procaspase-8, procaspase-9 및 PARP의 단백질 가수분해(proteolytic cleavage) 현상을 볼 수 없었으나, tyrosol 1000 μ M을 96시간 동안 처리한 실험군에서는 단백질 가수분해 현상을 뚜렷이 볼 수 있었다 (Fig. 4-8).

고 찰

올리브 오일 등 천연물들에 존재하는 tyrosol은 phenylethanoid의 한 종류로서 천연 항산화제로 널리 알려져 있으며[10-14], 심장보호 작용이 있어 심장의 노화 치료제로 고려되고 있다[12,13]. 그러나 tyrosol의 항암효과에 관한 자료는 매우 부족하며, 특히 구강암에서 tyrosol의 효과에 대해서는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 사람 구강암세포주 KB 세포를 이용하여 tyrosol의 구강암 세포 성장억제에 미치는 효과와 세포성장 억제기전을 밝히고자 하며, 아울러 tyrosol에 의한 구강암 치료의 효용성을 제시 하고자 하였다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 분석에서 tyrosol은 시간과 농도에 의존적으로 KB 구강암 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 1). 이는 시간과 농도에 의존적으로 암세포 사멸을 유도하는 항암효과를 지닌 여러 생약 유래 물질(curcumin, resveratrol, β -carotene)에서의 연구결과와 유사한 것이었다[22-24]. 더욱이 다른 생약 유래 물질과 비교하여 상대적으로 낮은 농도의 tyrosol에서도 충분히 KB 구강암 세포의 사멸을 유도하였다[22-24]. 이러한 결과는 tyrosol이 구강암 세포 성장억제에 대한 특이적인 효과를 가지고 있다는 것을 시사하며, 또 tyrosol의 항암치료제로서의 잠재적인 가치를 시사하고 있다.

암세포 성장억제 과정에서 apoptosis의 유도는 생약 유래 물질로부터 항암물질의 개발에 유용한 전략이 된다 [25]. 그러므로 과학자들은 생약을 포함한 다양한 천연물로부터 암세포들의 apoptosis를 유도하는 연구들을 시행하고 있다. 본 연구에서도 tyrosol에 의한 KB 세포 성장억제 기전에 apoptosis가 포함되는지를 확인하기 위하여, DAPI 염색을 이용한 세포핵의 형태학적 변화 관찰 및 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI 염색을 실시하고 형광현미경을 이용하여 관찰한 결과, tyrosol을 처리하지 않은 대조군

KB 세포에서는 대부분의 세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나, tyrosol을 처리한 세포에서는 세포 밀도의 감소와 더불어 apoptosis 발생 세포에서 전형적으로 관찰되는 염색질 응축에 의한 apoptotic body가 다수 관찰되었다(Fig. 2). 또한 apoptosis 유발의 또 다른 증거에 해당하는 DNA fragmentation 여부를 조사한 결과, tyrosol을 처리하지 않은 대조군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었으나, tyrosol 처리 실험군에서는 DNA fragmentation 현상을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이는 암세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 생약 유래 물질들이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 암세포를 사멸시킨다는 연구결과[22-24]와 일치하는 것으로서, tyrosol에 의해 유도되는 KB 구강암 세포 성장억제 과정에는 endonuclease가 활성화되어 세포핵의 DNA가 fragmentation 되는 apoptosis 기전이 포함되는 것으로 사료된다.

Cysteine protease인 caspase의 세포 내 활성화는 다양한 자극에 의해 유도된 apoptosis를 개시하고 실행하는데 중요한 역할을 한다[19-21]. 사람의 세포에서 확인된 caspase 아형 중에 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9 등이 apoptosis 유도의 실행 caspase로 알려져 있으며, 이들은 각각 다양한 자극에 의해 apoptosis가 일어날 때 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[19-21]. 본 연구에서 caspase-3, caspase-7, caspase-8 및 caspase-9의 proteolytic cleavage 현상을 확인하기 위해 이들의 항체를 이용하여 immunoblotting을 시행한 결과, tyrosol 처리 실험군에서 caspase들의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다(Fig. 4-7). PARP는 apoptosis의 기전 중 외인성 death receptor-의존적 경로의 중요한 조절인자이며, PARP 또한 어떤 자극에 의해 apoptosis가 일어날 때 proteolytic cleavage 현상이 일어난다[24]. 본 연구에서도 tyrosol 처리 실험군에서 PARP의 proteolytic cleavage 현상을 볼 수 있었다(Fig. 8). 이러한 실험결과들은 tyrosol에 의해 유도되는 KB 구강암 세포 성장억제 과정에 caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 및 PARP를 통한 외인성의 death receptor-dependent pathway와 내인성의 mitochondria-dependent pathway를 경유하는 apoptosis가 포함되어 있음을 시사한다. 그러나 tyrosol이 유도하는 구강암 세포 성장억제에 관한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하고야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, tyrosol은 사람 구강암 세포주 KB 세포의 apoptosis를 유도하여 구강암 세포성장을 억제시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로, tyrosol을 이용한 암세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgements

This study was supported by research fund from Chosun University, 2016.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1308-1312. doi: 10.1126/science.281.5381.1309.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770 - 776. doi: 10.1038/35037710.
- Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001;11:526-534. doi: 10.1016/S0962-8924(01)02173-0.
- Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs.* 1994;5:3-9.
- Paschka AG, Butler R, Young CYF. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett.* 1998;130:1-7. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00084-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00084-6).
- Christou L, Hatzimichael E, Chaidos A, Tsiara S, Bourantas KL. Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. *Eur J Haematol.* 2001;67:51-53. doi: 10.1034/j.1600-0609.2001.067001051.x.
- Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem.* 2001;8:1467-1486. doi: 10.2174/0929867013372094.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000;256:42-49. doi: 10.1006/excr.2000.4838.
- Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med.* 2001;7:314-319. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02026-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02026-3).
- Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr.* 1999;129:1269-1277.
- Charrouf Z, Guillaume D. Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *Am J Food Technol.* 2007;2:679-683. doi: 10.3923/ajft.2007.679.683.
- Miró-Casas E, Covas M, Fitó M, Farré-Albadalejo M, Marrugat J, de la Torre R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:186-190. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601532.
- Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N. Akt/FOXO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: Switching gears toward survival and longevity. *J Agri Food Chem.* 2008;56:9692-9698. doi: 10.1021/jf802050h.
- Lucas R, Comelles F, Alcántara D, Maldonado OS, Curcuroze M, Parra JL, Morales JC. Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: A potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions. *J Agri Food Chem.* 2010;58:8021 - 8026. doi: 10.1021/jf1009928.
- Hashim YZ, Rowland IR, McGlynn H, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G, Kaisalo L, Wähälä K, Gill CI. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*. *Int J Cancer.* 2008;122:495 - 500. doi: 10.1002/ijc.23148.
- Yang SS, Kim SG, Park BS, Go DS, Yu SK, Kim CS, Kim J, Kim DK. Effect of β-carotene on cell growth inhibition of KB human oral cancer cells. *Int J Oral Biol.* 2016;41:105-111. doi: <https://doi.org/10.11620/IJOB.2016.41.3.105>.
- Kim JS, Cho SH, Park JT, Yu SK, Kim SG, Kim DK. Effect of *Sambucus sieboldiana* extract on the cell growth and extracellular matrix formation in osteoblast cells. *Int J Oral Biol.* 2014;39:121-128. doi: <http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2014.39.2.121>.
- Kim JY, Kim HS, Kang HS, Choi JS, Yokozawa T, Chung HY. Antioxidant potential of dimethyl lithospermate isolated from *Salvia miltiorrhiza* (red sage) against peroxynitrite. *J Med Food.* 2008;11:21 - 28. doi: 10.1089/jmf.2007.040.
- Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:20317-20320. doi:10.1074/jbc.272.33.20317.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997;89:175-184. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80197-X.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326:1-16. doi: 10.1042/bj3260001.
- Kim SH, Kim HJ, Lee MH, Yu SK, Kim CS, Kook JK, Chun HS, Park E, Lee SY, Kim SG, Kim HR, Kim DK. Resveratrol induces apoptosis of KB human oral cancer cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2011;54:966-971. doi: <http://dx.doi.org/10.3839/jksabc.2011.145>.
- Wang SK, Yang L, Wang TT, Huang GL, Yang LG, Sun GJ. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by the combination of β-carotene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human esophageal cancer EC9706 cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:6327-6332. doi: <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.12.6327>.
- Yang SJ, Lee SA, Park MG, Kim JS, Yu SK, Kim CS, Kim JS, Kim SG, Oh JS, Kim HJ, Chun HS, Kim YH, Kim DK. Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases. *Oncol Rep.* 2014;31:2286-2292. doi:10.3892/or.2014.3066.
- Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.* 2003;4:721-729. doi: 10.1016/S1470-2045(03)01277-4.