

HCV 核心蛋白、P53、Mdm2、P21^{waf1} 在 HCV 肝炎、肝硬化中的表达及意义

黄立军, 邓南生, 王小平, 张志培

黄立军, 王小平, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科
陕西省西安市 710032

邓南生, 北方医院病理科 陕西省西安市 710032

张志培, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院实验外科
陕西省西安市 710032

项目负责人: 黄立军, 710031, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科. hljyxq@fmmu.edu.cn

电话: 029-83377494 传真: 029-83377494

收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2004-12-08

摘要

目的: 调查 HCV 肝炎、肝硬化组织核心蛋白、突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 的表达以及他们间的相关性, 探讨 HCV 核心蛋白对突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 的表达作用及意义。

方法: 收集 HCV 表达阳性的肝炎、肝硬化组织 23 例, 采用免疫组织化学 EnVision 法检测 HCV 感染的肝炎、肝硬化组织中核心蛋白、突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 的表达, 用统计学方法及临床联系分析他们之间的关系。

结果: 核心蛋白、突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 的阳性表达主要定位于细胞核中; 核心蛋白阳性表达的组织中突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 阳性率分别为 87%、91.3%、13.0%; 四组间的 Kruskal-Wallis 检验 $P = 0.000$, 差异有显著性意义, 核心蛋白与 P53、P21^{waf1} 间的 Mann-Whitney U 秩和检验 P 值分别为 0.041、0.000; HCV-c 蛋白与突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 阳性强度二者间相关性 Pearson 检验 P 值分别为 0.011、0.067、0.2, 相关系数 r_p 分别为 0.71、0.493、0.45。

结论: HCV 核心蛋白可能促进 P53 突变, 同时间接促进 Mdm2 并共同抑制了 P21^{waf1} 表达; 核心蛋白、突变 P53、Mdm2 的共同作用可促进肝细胞增生、非典型性增生。

黄立军, 邓南生, 王小平, 张志培. HCV 核心蛋白、P53、Mdm2、P21^{waf1} 在 HCV 肝炎、肝硬化中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005; 13(2): 261-264
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/261.asp>

0 引言

丙肝病毒(HCV)可引起无症状携带至慢性肝炎、肝硬化、肝癌等一些列疾病, 极大部分 HCV 感染患者难以康复, 导致慢性肝炎, 有些国家 HCV 感染已被确定为导致肝细胞癌(HCC)的主要原因^[1]. 大部分感染 HCV 患者的血清、肝组织中, 甚至有些肝癌组织中能检出 HCV RNA; 慢性 HCV 感染还能引起自身免疫综合征、免疫复合物病. 不幸的是 HCV 介导疾病发展的许多重要问题仍不清楚. 核心蛋白对细胞生长的调节起着重要作用, 如参与细胞蛋白的相互作用、参与细胞信号传导、致癌和脂质代谢. 核心蛋白对 P53/P21^{waf1} 有调节作用, 有人认为核心蛋白促进野生 P53 的转录和表达, 上调 P21^{waf1} 的表达^[2-4], 而有的报道则认为核心蛋白抑制野生 P53 的转录, 下调 P21^{waf1}

的表达^[5]. 因此我们收集了 HCV 核心蛋白表达阳性的肝炎肝硬化组织石蜡块, 通过免疫组织化学方法检测核心蛋白、P53、Mdm2 和 P21^{waf1} 蛋白的表达, 探讨 HCV 核心蛋白与 P53、Mdm2 和 P21^{waf1} 表达之间的关系及意义, 为研究 HCV 导致慢性肝炎、肝细胞转化及恶变的分子机制提供临床依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集 1998-2003 西京医院外周血检验 HCV 阳性患者的经手术切除或活检肝脏标本 23 例(19 例肝炎后肝硬化, 4 例慢性肝炎), 其中男 18 例, 女 5 例, 年龄 25-65 岁(平均年龄 47.22±11.67 岁), 所有标本均用 10 g/L 甲醛固定、脱水, 常规石蜡包埋. HCV 核心蛋白抗体购自博士德生物工程商品化的产品; P53、Mdm2 抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司; P21^{waf1} 抗体购自迈新公司; EnVisionTM 免疫组化试剂盒购自西安基因公司。

1.2 方法 收集的标本经 5 μ m 连续切片, 60℃过夜, 分别做 H E 和免疫组化染色. 免疫组化染色采用两步法(EnVisionTM), 核心蛋白抗体用 1:50 稀释, P53 和 P21^{waf1} 抗体用 1:100 稀释. 具体步骤如下: 切片脱蜡至水, PBS 洗涤; 用尿素消化 30 min, PBS 洗涤; 30 g/L 过氧化氢封闭 30 min 以灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗; 然后用柠檬酸缓冲液进行微波修复抗原, 自然冷却, PBS 洗; 羊血清封闭 15 min, 擦干周围液体加一抗 4℃过夜; 从冰箱取出 37℃复温 30 min, 用自来水冲洗抗体, PBS 洗涤; 加入抗鼠或抗兔的二抗(EnVisionTM), 37℃恒温反应 50 min; 加 DAB 显色, 在显微镜观察终止显色. 用苏木精轻微复染, 脱水透明封片, 光镜下观察. 对照组设阳性、阴性、和空白对照: 用已知阳性表达组织作为阳性对照; 正常肝组织作核心蛋白的阴性对照; 以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.2.1 阳性判断 HCV 核心蛋白、P53、Mdm2 和 P21^{waf1} 的阳性表达主要在核、核膜上, 核心蛋白偶见于胞质中表达; 每例均随机观察 5 个高倍视野($\times 400$), 进行半定量积分判断结果: 阳性细胞 $\leq 5\%$ 为 0 分, 6-25% 为 1 分, 26-50% 为 2 分, 51-75% 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分; 阳性强度黄色为 1 分, 棕黄为 2 分, 棕褐色为 3 分. 将细胞阳性率与染色强度二者积分相乘: 0 分为阴性(-), 1-4 分为弱阳性(+), 5-8 分为中度阳性(++), 9-12 分为强阳性(+++). 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理, 四组间采用多组等级资料 Kruskal-Wallis 秩和检验, 二组间采用二组等级资料 Mann-Whitney U 秩和检验, HCV 核心蛋白与 P53、Mdm2、P21^{waf1} 蛋白表达的两相关性用双

向有序R×C表 χ^2 检验,以Pearson积矩相关系数来计算相关系数 r_p .

2 结果

所有组织的HCV核心蛋白都呈阳性表达,这些组织主要表现为结节性肝硬化,有的仍有慢性活动性肝炎表现,有非典型性肝细胞增生、非典型胆管样细胞增生的表现;核心蛋白、P53、Mdm2和P21^{waf1}的阳性表达主要定位于细胞核中(图1-4).P53、Mdm2的阳性表达率分别为87%(20/23)、91.3%(22/23),而P21的阳性率只有13%(3/23),四组间的阳性强度等级资料Kruskal-Wallis秩和检验 $H = 44.08$, $P = 0.000$,有显著差异;HCV核心蛋白与P53、P21^{waf1}各两组间Mann-Whitney秩和检验 P 值分别为 $P = 0.041$ 、 $P = 0.000$ (表1);HCV核心蛋白与P53、Mdm2和P21^{waf1}阳性强度相关性Pearson检验 χ^2 值分别为16.51、8.79、5.95, P 值分别为0.011、0.067、0.2,相关系数 r_p 分别为0.71、0.493、0.45(表2-4).

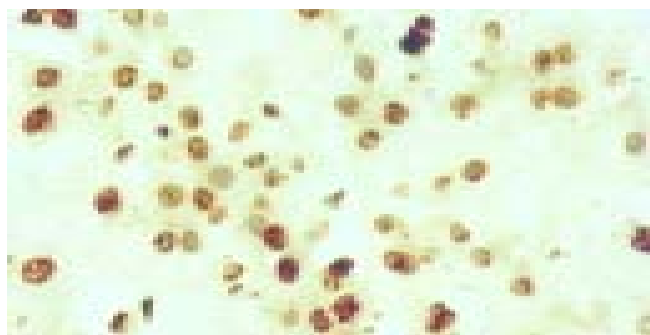


图1 核心蛋白在慢性肝炎肝硬化中的表达,EnVision法.



图2 核心蛋白阳性的肝硬化组织P53表达,EnVision法.

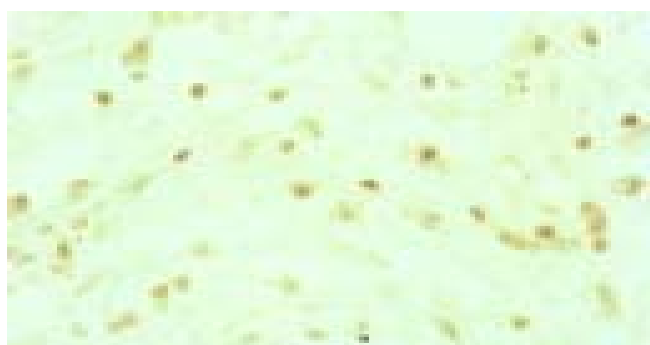


图3 核心蛋白阳性的肝硬化中Mdm2表达,EnVision法.



图4 P21^{waf1}在肝硬化非典型增生中的表达(×200),EnVision法.

表1 HCV-core、P53、Mdm2、P21^{waf1}蛋白在组织中的表达

group	n	阳性强度				阳性率 (%)
		-	+	++	+++	
HCV-C	23	0	10	8	5	100
P53	23	3	12	7	1	87.0
Mdm2	23	2	17	4	0	91.3
P21	23	20	2	1	0	13.0

四组间比较 $H = 44.08$, $P = 0.000$;HCV-C vs P53, Mdm2, P21^{waf1}间 $U = 178.5, 141.0, 24$, $P = 0.041, 0.002, 0.000$.

表2 HCV核心蛋白和P53表达的相关性

HCV core 表达	P53 表达				n
	-	+	++	+++	
+	3	6	1	0	10
++	0	6	2	0	8
+++	0	0	4	1	5
n	3	12	7	1	23

$\chi^2 = 16.51$, $r_p = 0.7$, $P = 0.011$.

表3 HCV核心蛋白和Mdm2表达的相关性

HCV核心蛋白表达	Mdm2 表达			总数
	-	+	++	
+	1	9	0	10
++	1	6	1	8
+++	0	2	3	5
总数	2	17	4	23

$\chi^2 = 8.79$, $r_p = 0.493$, $P = 0.067$.

表4 HCV核心蛋白和P21^{waf1}表达的相关性

HCV核心蛋白表达	P21 ^{waf1} 表达			n
	-	+	++	
+	10	0	0	10
++	7	1	0	8
+++	3	1	1	5
总数	20	2	1	23

$\chi^2 = 5.95$, $r_p = -0.45$, $P = 0.2$.

3 讨论

HCV 常导致各种肝脏疾病,引起慢性肝炎、脂肪变性(是 HCV 引起的主要特征之一)、肝硬化和肝癌,在许多国家里是导致肝细胞癌的主要因素.在 HCV 的蛋白中核心蛋白是细胞信号传导最强的信号“转换器”^[6-8].核心蛋白有核定位信号、磷酸化位点、核浆定位及 DNA 结合区的存在,是一种有基因调节功能的蛋白;核心蛋白能与许多细胞因子作用,促进细胞增生、增生,诱导细胞永生化和细胞转化;P53/P21^{waf1} 是抑制细胞生长、增生,促使细胞停止和肿瘤发生的重要信号通路,对核心蛋白与 P53/P21^{waf1} 通路之间的关系还没有明确的结论,有人认为核心蛋白抑制 P53 依赖的 P21^{waf1} 蛋白表达,有人则认为能促进 P53 转录和表达,上调 P21^{waf1} 蛋白的表达^[9].本实验所收集到的 HCV 核心蛋白阳性表达病例在病理诊断上主要表现慢性肝炎、结节性肝硬化、脂肪变,非典型性胆管样和肝细胞增生,表明 HCV 的确可引起慢性肝脏疾病和肝细胞转化.那么,核心蛋白与突变 P53、Mdm2、P21^{waf1} 这些细胞因子的关系如何呢?

体外实验表明,HCV 核心蛋白下调 P53 启动子活性,抑制 P53 蛋白的表达同时也抑制 P21^{waf1} 启动子,从而抑制细胞凋亡,促进细胞生长^[10-11];而核心蛋白是否引起 P53 基因的突变,导致突变 P53 蛋白的表达,是值得探讨并进一步研究的问题.虽然还没见到有关 HCV 核心蛋白导致 P53 突变的报道,但是我们的实验表明,突变 P53 与核心蛋白的表达趋于一致;P53 和核心蛋白间的双向有序相关性检验 $P = 0.011$,有显著性意义,从统计学上讲二者的表达是有关联的.所以,突变 P53 的表达与核心蛋白存在着一种必然的联系.核心蛋白很有可能促进 P53 的突变,因为突变的 P53 能直接引起细胞的永生化和癌的发生.P53 突变后有 3 个机制促进细胞生长和肿瘤的发生:(1)野生 P53 功能丢失(LOF);(2)优势否定效应(DNE);(3)获得性功能(GOF).突变 P53 不具备野生型的功能,使得 P53 不能与 DNA 结合引起反式激活,使下游的几个目标基因 P21^{waf1}、Bax、Bcl-2 启动子不能激活,失去了对细胞的凋亡作用,失去了对细胞生长的抑制作用.突变 P53 蛋白稳定,不易被泛素通路 Mdm2 蛋白降解,且稳定地积蓄在细胞中,而突变 P53 仍有小聚合的能力,可与野生的发生杂合型聚合,有效封闭野生 P53 与 DNA 的结合从而抑制野生 P53 对细胞生长和肿瘤的抑制效应,因此,即使细胞中有野生 P53 的存在,这种否定效应(DNE)也会使野生 P53 失去作用^[12].突变 P53 获得性功能是指他获得了与野生 P53 相反的功能,他能激活本被野生 P53 抑制的启动子或基因,如 VEGF、PCNA、Bcl-2、c-myc 启动子,促进细胞生长、转化,恶性转化率增高^[13-14].

Mdm2(murine double minute 2 基因产物,染色体位于 12q13-14)被称为原癌基因,在调节野生 P53 的稳定性和活性起着十分重要的作用.研究认为 Mdm2 起着泛素 E3 连接酶作用,促进野生 P53 泛素化和降解,也能通过自身泛素化来调节自身的稳定^[15-17].正常细胞中(非

应激条件下),野生 P53 的调节存在着负反馈环,使得 P53 存活时间很短.野生 P53 蛋白是 mdm2 基因的转录激活剂,Mdm2 蛋白的表达反过来与野生 P53 蛋白结合,起泛素 E3 连接酶的功能,使 P53 偶联到多聚泛素上,Mdm2 与 P53 结合后还能封闭 P53 的转录活性^[18-22].Mdm2 有出胞核序列,Mdm2 与 P53 结合后引导野生 P53 出胞核,在胞质中通过泛素通路 26S 蛋白酶体降解野生 P53 蛋白^[23-24],使 P53 维持低水平状态,保持细胞正常增生.本实验中的 Mdm2 的阳性表达高达 91.3%,这种高表达的结果可导致即使组织有野生 P53 蛋白的表达也不能发挥对细胞的停滞、衰老和凋亡作用.突变 P53 和 Mdm2 的共同作用几乎使组织失去了对细胞增生抑制,很可能是本实验观察到的组织持续增生或有非典型性增生的重要原因.

P21^{waf1} 基因位于 P53 基因的下游,是 P53 的目标基因,许多信号,如 DNA 损伤、辐射、缺氧等可激活 P53 转录表达,P53 蛋白通过反式激活 P21^{waf1} 启动子,引起 P21^{waf1} 蛋白的表达.P21^{waf1} 在 P53 介导的细胞周期停止、凋亡中起着重要的作用,他通过结合周期蛋白-CDKs 复合物(包括 CyclinA-CDK2、CyclinE-CDK2、CyclinD-CDK4、CyclinD-CDK2),抑制酶的活性阻止细胞从 G1 期进入 S 期.P21^{waf1} 启动子有 P53 的结合位点,在正常情况下,主要依赖 P53 通路来促进 P21^{waf1} 的表达,抑制各种 Cyclin-CDK 复合物的激酶活性^[3].但是,在转化细胞中往往缺乏 P21^{waf1} 的表达,表明 P21^{waf1} 的减少和缺失在细胞转化和肿瘤发生中起重要作用.我们结果显示,在 HCV 感染的肝炎、脂肪变、肝硬化中 P21^{waf1} 的表达缺失是很普遍的,也说明他的表达缺失在慢性肝炎、肝细胞转化和癌变中起着一定的作用.那么在 HCV 感染组织中 HCV 或其核心蛋白对 P21^{waf1} 起着怎样的作用呢?

有两种机制可能引起 P21^{waf1} 的下调或缺失.我们知道 P21^{waf1} 的表达主要通过野生 P53 反式激活而非突变 P53 的作用所致,而 HCV 感染的组织中核心蛋白可抑制 P53 野生的转录和表达^[25-26].因此,在本研究中 P21^{waf1} 的表达缺失,首先是野生 P53 被抑制或发生 P53 突变,不能正常激活 P21^{waf1} 的转录和表达.其次,可能还存在另外一种因素来调节 P21^{waf1} 的表达.有人报道,野生 P53 阴性的细胞也能诱导 P21^{waf1} 的表达^[3],说明还有一非依赖于 P53 的通道诱导 P21^{waf1} 的表达.本实验 HCV 核心蛋白阳性组织中 P21^{waf1} 表达缺失,HCV 核心蛋白与 P21 表达的相关性 P 值为 0.2,即核心蛋白与 P21^{waf1} 的表达不存在线性关系,说明另有因素抑制或下调 P21^{waf1} 的表达,这一作用很可能有 HCV 核心蛋白参与,因为核心蛋白是一很强的细胞基因调节因子,并能与许多细胞蛋白发生作用^[1].现也有报道^[27] HCV 核心蛋白可抑制 P21^{waf1} 启动子的活性降低 P21^{waf1} mRNA 的转录和合成.本实验中有 P21^{waf1} 蛋白 3 例呈阳性表达,其表达是否与组织仍有野生 P53 的表达有关,还是通过 Smad 和 Sp1 激活肿瘤生长因子(TGF β)诱导 P21^{waf1} 转录^[28-30],其机制仍不清楚.

总之,HCV 核心蛋白很可能促进 P53 的突变,也间

接提高了 Mdm2 的表达水平, 从而抑制了野生 P53 和 P21^{waf1} 的转录和表达, 促进肝细胞增生、增生、转化和恶变。所以, HCV 核心蛋白是导致慢性肝炎、脂肪变性、肝硬化、肝细胞永生化和恶性变的重要因素, 但其作用机制有待进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Letters* 2001; 202:149-156
- 2 Otsuka M, Kato N, Lan KH, Yoshida H, Kato J, Goto T. Hepatitis C virus core protein enhances P53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000;275:34122-34130
- 3 Kao CF, Chen SY, Chen JY, Wu Lee YH. Modulation of P53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene* 2004;23: 2472-2483
- 4 Gong GZ, Jiang YF, He Y, Lai LY, Zhu YH, Su XS. HCV NS5A abrogates P53 protein function by interfering with P53-DNA binding. *World J Gastroenterol* 2004;10:2223-2227
- 5 Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced P21^{waf1/CIP1} protein expression is predominantly related to altered P53 in hepatocellular carcinoma. *Br J Can Res* 2000;83:50-55
- 6 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32: 405-412
- 7 Taniguchi H, Kato N, Otsuka M, Goto T, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *J Med Virol* 2004; 72:52-59
- 8 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:529-540
- 9 Jung EY, Lee MN, Yang HY, Yu D, Jang KL. The repressive activity of hepatitis C virus core protein on the transcription of P21(waf1) is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Virus Res* 2001;79:109-115
- 10 Dubourdeau M, Miyamura T, Matsuura Y, Alric L, Pipy B, Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces P21^{waf1} down-regulation-effect of transforming growth factor β . *J Hepatol* 2002;37:486-492
- 11 Miyazaki M, Sakaguchi M, Akiyama I, Sakaguchi Y, Nagamori S, Huh NH. Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2004;64:4155-4161
- 12 Blagosklonny MV. P53 from complexity to simplicity: mutant P53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *Fadeb J* 2000;14:1901-1907
- 13 Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002;84:83-93
- 14 Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 157:247-270
- 15 Xirodimas DP, Chisholm J, Desterro JMS, Lane DP, Hay RT. P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H) Mdm2. *FEBS Letters* 2002;528:207-211
- 16 Ghimenti C, Fiano V, Chiado-Piat L, Chio A, Cavalla P, Schiffer D. Deregulation of the p14ARF/Mdm2/P53 pathway and G1/S transition in two glioblastoma sets. *J Neurooncol* 2003; 61:95-102
- 17 Korgaonkar C, Zhao L, Modestou M, Quelle DE. ARF function does not require P53 stabilization or Mdm2 relocalization. *Mol Cell Biol* 2002;22:196-206
- 18 Yin Y, Luciani MG, Fahraeus R. P53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative P53 translation products. *Nat Cell Biol* 2002;4:462-467
- 19 Huang Y, Tyler T, Saadatmandi N, Lee C, Borgstrom P, Gjerset RA. Enhanced tumor suppression by a p14ARF/P53 bicistronic adenovirus through increased P53 protein translation and stability. *Cancer Res* 2003;63:3646-3653
- 20 Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human P53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2004;24:7987-7997
- 21 Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T, Wiels J. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type P53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998;16:1603-1610
- 22 Xia L, Paik A, Li JJ. P53 activation in chronic radiation-treated breast cancer cells: regulation of MDM2/p14ARF. *Cancer Res* 2004;64:221-228
- 23 Lain S, Lane D. Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of P53. *Eur J Cancer* 2003;39:1053-1060
- 24 Lain S. Protecting P53 from degradation. *Biochem Soc Trans* 2003;31:482-485
- 25 Zondervan PE, Wink J, Alers JC, Ijzermans JN, Schalm SW. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000;192:207-215
- 26 van Dekken H, Wink J, Alers JC, de Man RA, Ijzermans JN, Zondervan PE. Genetic evaluation of the dysplasia-carcinoma sequence in chronic viral liver disease: a detailed analysis of two cases and a review of the literature. *Acta Histochem* 2003; 105:29-41
- 27 Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999;73:4713-4720
- 28 Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus protein inhibits via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002;296:84-93
- 29 Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 2003;195:290-297
- 30 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* 2003;24:1199-1208