

Sodium Butyrate 처리가 대장암 세포주인 HT29 Cell의 Sphingolipid 생합성에 미치는 영향

김 희 숙[†]

경성대학교 식품공학과

Effects of Sodium Butyrate on the Biosynthesis of Sphingolipids in HT29, a Human Colon Cancer Cell Line

Hee Sook Kim[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

Butyrate is one of the short-chain fatty acids that are present in the colon of mammals in millimolar concentration as a result of microbial anaerobic fermentation of dietary fiber, undigested starch, and proteins. In this study, sodium butyrate was examined in HT29 cell, human colonic cancer cell line, on cell viability, alkaline phosphatase activity, PLC- γ 1 expression and complex sphingolipid biosynthesis. Treatment with butyrate showed that the decrease of cell adhesion and viability was time-dependent. Sodium butyrate also induced to increase the activity of alkaline phosphatase which is a differentiation marker enzyme and decrease the expression of PLC- γ 1. Biosynthesis of sphingomyelin and galactosylceramide by butyrate treatment were decreased so fast but ceramide was increased 680dpm/mg protein% more than untreated group on first day and then decreased fast. In addition, acid ceramidase and neutral ceramidase activity were inhibited early stage by sodium butyrate. These results suggest that sodium butyrate causes cell differentiation or cell growth arrest of HT29 cell accompanied by early increase of ceramide content and alkaline phosphatase activity and decrease of galactosylceramide content and PLC- γ 1 expression.

Key words – Sodium butyrate, Alkaline phosphatase, PLC- γ 1, Sphingolipid

서 론

Butyrate는 식이성 섬유질의 대사부산물 중 하나로 많은 연구들이 높은 식이성 섬유의 섭취와 대장암의 발생빈도

사이의 역의 상관관계가 있다고 보여주고 있어 butyrate가 항종양인자의 역할을 할 것이라는 가설들을 세우게까지 되었다[17,19]. 역학적 연구와 동물실험들은 식이성 지질과 단백질이 대장에서 발암을 촉진시키고, 반면에 식이성 섬유

[†]Corresponding author

유와 복합 탄수화물의 증가는 대장암 예방의 길임을 보여 주었다[18,23]. 사람을 상대로 한 실험에서도 섬유질이 풍부한 식품의 섭취가 대장과 직장의 암발생을 감소시켜 이러한 결과를 증명하여 주었다. Butyrate는 탄소사슬이 짧은 지방산(short-chain fatty acids, SCFA) 중 하나로 이들 화합물은 소화되지 않은 식이의 혐기적 발효결과로 포유동물의 위장관내에서 만들어지며 대장의 상피세포에서 흡수되어 energy원으로 사용된다[26]. 식이성 섬유는 사람에게 있어 SCFA의 생성을 위한 기질로서 작용하며 전분이나 단백질 역시 SCFA의 생산에 기여한다. Butyrate는 *in vivo* 와 *in vitro*에서 대장암세포의 증식을 감소시키는데 반하여 정상 대장 상피세포의 증식을 촉진시킨다는 보고가 있으며 SCFA를 대장에 주입하였을 때 대장의 점막 뿐만 아니라 인접된 대장의 상피세포, 회장 및 공장까지도 증식이 촉진되었다고 하였다[21,37]. 반면에 butyrate를 배양하는 여러종류의 대장암 세포주에 처리하였을 때 대장암세포의 DNA합성이 저해되며 세포주기의 G1 phase에서 성장이 멈추었다고 하였다[36,38].

암의 발병기전에 대한 많은 연구들은 첫째, 세포내에 존재하고 있는 암 유전자 산물들이 일련의 성장인자에 의한 세포내 신호전달 과정에 관여하는 물질들의 변이에 의하여 활성화됨으로써 발암되거나, 둘째, 성장인자 및 관련 암 유전자 산물의 과발현에 의하여 암이 발생한다고 주장한다[3,4,40]. 세포의 암발생과정 및 신호전달계에 관여하는 phospholipase들과 protein kinase들 및 transcription factor들을 연구함으로써 암발생을 예방하거나 암을 치료하는 항암제를 개발하려고 노력하고 있다[6,24,34]. 그러나 세포의 풍부한 막지질성분들인 sphingolipid의 중요성은 최근에 들어서야 그 대사산물들이 복잡한 신호경로들의 일부로서의 특성을 가진다는 것이 알려지기 시작하였다 [28,29,35].

Sphingolipid들은 Fig. 1과 같이 sphingosine, ceramide 및 sphingosine 1-phosphate와 같이 긴사슬염기(sphingoid base)의 유도체들이다. Sphingolipid들이 종양에 미치는 영향들에 대한 연구들로는 protein kinase C를 저해하는 sphingosine의 활성때문에 항암효과가 있을 것[2]이라는 관심에서부터 C3H-10T1/2 세포주에 있어 sphingosine은 세포형질전환을 저해하며[5], 생쥐피부의 ornithine decarboxylase의 유도를 저해하여 피부암 발생을 저해하였

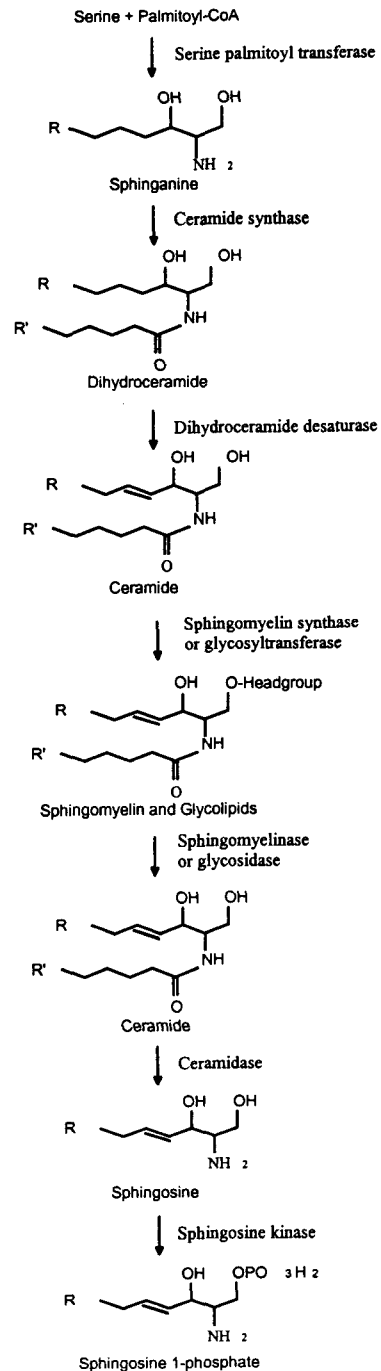


Fig. 1. The pathway of sphingolipid metabolism.

다는[12] 보고들이 있다. 최근 연구[10,27]에서는 CF1 암컷 생쥐에서 발암물질인 1,2-dimethylhydrazine (DMH)를 처리한 다음, 우유 sphingomyelin을 0.025% 섞은 식이를 먹인 생쥐에서 crypt epithelium당 증식세포가 더 증가하였으나 비정상 대장소낭의 수는 감소하였고 대장암발생 47%인 대조군에 비하여 20%의 발암율을 보였다고 하였으며 이는 sphingomyelin이 DMH에 의하여 유도된 악성화 단계가 저해되었기 때문이라고 주장하였다. 또한 Endo 등 [11] 또는 Sadahira 등[33]은 sphingosine이나 다른 여러 유도체들의 처리가 생쥐에게 주사한 사람과 생쥐의 종양 세포주의 성장과 전이를 저해한다고 하였다.

본 연구에서는 대장암의 발생을 저해하는 것으로 알려진 식이성섬유의 발효산물인 sodium butyrate를 대장암세포주인 HT29 cell에 처리하였을 때 differentiation parameter인 phospholipase C- γ 1 및 alkaline phosphatase의 발현의 변화, 복합 sphingolipid의 생합성의 변화 및 ceramidase 활성에 대하여 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 및 세포배양에 관련된 시약들은 Gibco BRL 제품(NY, USA)을 사용하였다. Silica gel 60 F254는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서, [3-H]-L-Serine는 Amersham Life Science사(Buckinghamshire, England)에서 구입하였고 sodium butyrate 및 그 외의 시약들은 Sigma 사(MO, USA) 제품을 사용하였다. Phospholipase C- γ 1의 단일항체는 포항대학교 생명과학과에서 개발한 항체로 F-7 clone의 항체를 사용하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 사람의 대장암세포주인 HT29-EMS12 cell은 미국 Emory 의과대학 생화학교실의 A. H. Merrill 교수로부터 얻었으며 passage number가 130에서 140인 세포들을 사용하였다. 세포배양시 5% CO₂분위기를 유지하였으며 10% FBS, 100U/ml penicillin 및 streptomycin 이 함유된 DMEM 배양액으로 37°C에서 배양하였다. 세포

를 1×10^6 cell/100mm dish 또는 3.5×10^5 cell/60mm dish되도록 seeding한 후 70% confluent하게 자랄 때까지 배양하여(약 4일) 5mM sodium butyrate를 정해진 기간동안 처리하였으며 매일 배양액을 교환하였고 마지막 교환 후 12시간 후에 실험에 사용하였다. 또한 모든 실험에서 serum을 고갈시키지 않았으며 10%를 유지하였다.

세포의 생존율 및 단백질 정량

5mM sodium butyrate 또는 PBS를 정해진 기간동안 처리한 plate의 배양액을 모으고 PBS로 세척한 후, trypsin 처리하여 얻은 세포를 합하여 trypan blue를 가하고 광학 현미경 상에서 Hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하였다. 세포의 단백질함량은 Lowry법으로 정량하였으며 표준품으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

Alkaline phosphatase activity

정해진 기간동안 5mM sodium butyrate로 처리된 세포를 PBS로 3번 세척한 후 rubber policeman으로 긁어 5mM Tris-HCl(pH 7.4)에서 균질화하였다. 420 μ l의 0.1M sodium bicarbonate/5mM MgCl₂용액과 50 μ l의 효소용액(100 μ g)을 혼합한 다음, 기질의 최종농도가 7mM이 되도록 p-nitrophenyl phosphate용액을 가하여 500 μ l로 만들고 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응액에 1ml의 1M NaOH 용액을 가하여 반응을 끝내고 410nm에서 흡광도를 측정하였다.

Immunoblotting에 의한 PLC- γ 1의 발현정도 측정

Sodium butyrate로 처리된 세포를 냉 PBS로 씻은 다음 Kim 등[20]의 방법에 따라 Immunoblotting을 행하였다. 1% Triton X-100이 함유된 lysis buffer로 녹인 후 상층액을 얻은 다음 단백질 함량 100 μ g씩을 8% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하고 nitrocellulose paper에 전기적으로 단백질을 옮겼다. Nitrocellulose paper를 5% skim milk로 blocking한 후, PLC- γ 1의 단일항체로 결합시키고 peroxidase labeled anti-mouse IgG antibody로 2차 blotting을 행하여 ECL 시약으로 형광을 검출하였다. 동시에 전기영동한 다른 한 gel은 Coomassie Brilliant blue R-250으로 염색하여 비교하였다.

Complex sphingolipid들의 생합성 측정법

1.0×10⁶의 HT29 세포를 100mm dish에 깔은 후 70% confluent하게 배양한 다음, 0.5 μCi [3H]-L-serine 및 10% FBS를 함유한 DMEM 조건에서 24시간 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 세포의 지질은 Bligh와 Dyer 방법을 수정한 방법[39]에 따라 chloroform/methanol로 추출하고 silica gel G60이 입혀진 TLC로 분리하였다. 전개용매로는 chloroform : methanol : formic acid : water (56:30:4:2, v/v)를 사용하였다. 전개한 TLC plate를 공기중에서 건조한 후 방사능이 있는 곳을 System 200 Image Scanner (Bioscan Inc., USA)으로 검출한 후 같은 판에 함께 올린 표준품의 지질위치와 비교하기 위하여 iodine 증기로 확인하였고, 지질위치의 silica gel을 긁어 cocktail 용액에 넣어 방사능을 측정하였다.

*in vitro*에서 ceramidase 활성 측정법[30]

60mm dish에서 배양된 HT29 cell에 정해진 기간동안 5mM sodium butyrate를 처리한 후 냉 PBS로 세척하여 세포를 긁어모은 다음, 0.5% Triton X-10과 1mM sodium vanadate가 함유된 10mM Tris-HCl(pH 7.4)용액에 세포를 현탁시키고 초음파 파쇄기를 이용하여 균질화하였다. 기질로는 형광물질이 결합되어 있는 C₆-NBD-ceramide를 사용하였으며 최종 농도는 2 μM이었다. Acid ceramidase인 경우에는 100mM sodium acetate 용액(pH 5.0)을 사용하였고 neutral ceramidase인 경우에는 100mM Tris-HCl 용액(pH 7.4)을 사용하였으며 1mM CaCl₂ 및 1mM Na₃VO₄가 함유되어 있었다. 효소액과 기질의 혼합물을 완충용액과 합하여 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 HPLC의 이동상인 methanol : H₂O : H₃PO₄ 혼합액(850 : 150 : 1.5) 1ml를 가하여 반응을 정지시키고 10분동안 원심분리하여 상층액을 Radial Pak C18 column으로 분석하였다. Ceramidase 활성은 1시간 동안 생성되는 C₆-Fatty acid의 pmole/mg protein으로 나타내었다.

결과 및 고찰

세포의 생존율 및 단백질 함량의 변화

사람의 대장암 세포주인 HT29 cell이 60mm dish에 3.5 × 10⁵ cell이 되게 하여 약 70% 정도 confluent하게 되는 4

일째부터 매일 5mM sodium butyrate 및 PBS를 처리한 후 세포의 생존율을 측정하였다. 그림 2에서와 같이 PBS를 처리한 대조군은 seeding 6일째 98~100% confluent하게 자랐으며 세포수는 1.0×10⁷ ± 1.6×10⁶ cell이었으나 sodium butyrate를 처리한 경우 바닥에서 떨어져 떠다니는 세포들이 증가하고 떠있는 세포들을 trypan blue로 측정하였을 때 5.6% 정도의 생존율을 보였다. Plate에 monolayer로 붙어있는 세포들은 sodium butyrate 4일 처리시 40~45% confluent하였고 10일 이상 장기적으로 sodium butyrate를 처리한 경우에 생존 세포수는 더 이상 감소하지 않았으며 그 수준을 유지하였다.

Sodium butyrate가 alkaline phosphatase 발현에 미치는 영향

사람에게는 적어도 3종류의 alkaline phosphatase gene이 있으며 term-placental 형, intestinal 형, 및 liver/bone/kidney 형들이 그들이다[15]. 사람대장의 adenocarcinoma로부터 유도된 HT-29 cell은 intestinal alkaline phosphatase gene을 가지고 있으며 삼투압의 변화와 sodium butyrate에 의하여 발현이 영향을 받는다는 보고가 있으므로, 본 실험에서는 소장세포 및 대장세포에 특이적으로 발현되는

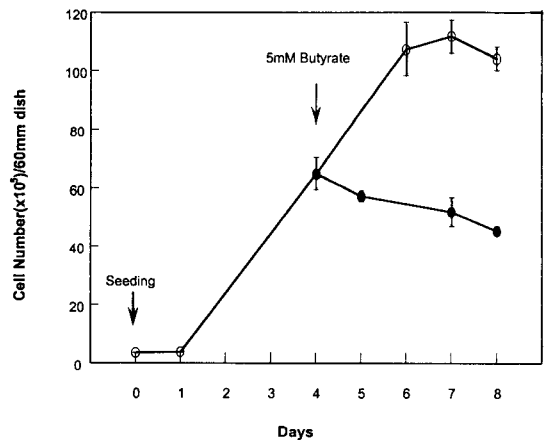


Fig. 2. Time course of cell number change upon treatment with sodium butyrate.

HT29 cells cultured for 4 days were treated with 5mM sodium butyrate for another 4 days. Values are means + S.E. (n=3).

형질막 효소로서 differentiation 정도를 측정하는데 사용되고 있는 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 그림 3에서와 같이 PBS만을 처리한 대조군은 confluent하게 자라서 죽어나가도 alkaline phosphatase 활성이 거의 변하지 않았으나 5mM sodium butyrate를 처리한 세포는 처리한 시간이 길어질수록 alkaline phosphatase 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. Sodium butyrate 처리할 당시 HT29 세포 confluent 정도가 적을수록 예민하게 반응하여 alkaline phosphatase 활성이 급격히 증가하여었으며 90% 이상 confluent한 경우에는 alkaline phosphatase 활성의 증가폭이 크지 않았다(data not shown). Chung 등[7,37]에 의하면 14종 대장암세포에 sodium butyrate를 처리하였을 때 10종의 세포에서 alkaline phosphatase 활성이 증가하였다고 하였으며 대장암세포의 분화 정도를 알기 위하여는 다른 형질막 효소들인 sucrase, lactase 또는 aminopeptidase 등보다 alkaline phosphatase 활성을 측정하는 것이 좋다고 하였다.

Sodium butyrate가 PLC- γ 1의 발현 정도에 미치는 영향

5mM sodium butyrate가 대장암 세포주인 HT29 세포의 PLC- γ 1의 발현 정도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여

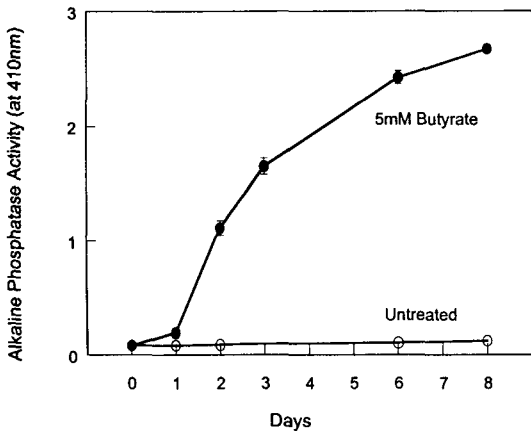


Fig. 3. The effect of sodium butyrate on the activity of alkaline phosphatase.

70% confluent HT29 cells were treated with 5mM sodium butyrate or PBS for 8 days. 100 μ g of cell homogenate was assayed. Values are mean+S.E. (n=3).

70% confluent하게 자란 세포에 sodium butyrate를 1일, 2일 및 4일 동안 처리하였다. 세포균질액의 단백질 100 μ g 씩을 전기영동하여 anti-PLC- γ 1 단일항체로 immunoblotting을 행한 결과 그림 4와 같이 PBS만 처리한 대조군에 비하여 5mM sodium butyrate를 처리하였을 때, 처리 시간이 길어질수록 PLC- γ 1의 발현 정도가 감소하였다. 그러나 장기간 sodium butyrate 처리한 경우(10일 처리군) 살아 남은 세포들의 PLC- γ 1 발현이 처리하지 않은 대조군에 비하여 그다지 감소하지 않아 어떤 경로가 활성화된 것인지는 더욱 연구가 필요한 것으로 사료된다. PLC 동위 효소 중 특히 PLC- γ 1의 유전자가 유방암, 과잉증식상피 세포 및 가계성 대장암인 Familial adenomatous polyposis (FAP) 등에 과잉 발현되었음이 보고되었고[31], 대장암환자의 경우 점액세포에서부터 adenoma, carcinoma로 진행되면서 PLC- γ 1의 발현이 증가되었다고 하였다[33]. 또한 Lee 등[25]은 기형암종세포인 F9 cell에 retinoic acid를 처리하면 분화가 유도되면서 PLC- γ 1의 발현이 감소되었다고 하였으며 Gao와 Malbon[13] 역시 F9 stem cell이 primitive endodermis로 분화하는데 adenylyl cyclase가 아

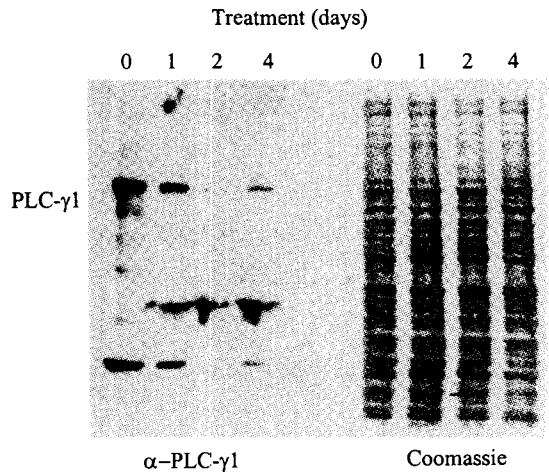


Fig. 4. Reduction in PLC- γ 1 expression level by sodium butyrate.

70% confluent HT 29 cells were treated with 5mM sodium butyrate for 4 days. Cells homogenate(100 μ g protein) was subjected to 8% SDS-PAGE and the probed with monoclonal antibody for PLC- γ 1. The second panel shows cell homogenate protein separation by coomassie staining.

나라 PLC- γ 1가 관여한다고 주장하였다. 그러므로, 본 실험에서 sodium butyrate 처리가 대장암세포의 PLC- γ 1의 발현을 감소시켰고 세포성장을 저해하였으므로 sodium butyrate 처리 또는 식이성 섬유 섭취가 대장암세포의 증식을 억제할 수 있을 것이라는 가능성을 다시 한번 시사해준다.

Complex sphingolipid 생합성에 미치는 영향

70% confluent한 HT29 cell를 [3-H]-L-serine으로 표지한 후, 5mM sodium butyrate를 8일간 처리하면서 sphingolipid의 생합성을 측정 한 결과는 그림 5와 같았다. Sphingomyelin의 경우 sodium butyrate 처리 2일까지는 급격히 감소하여 mg protein당 7017 \pm 1246dpm에서 3728 \pm 590dpm까지 감소하였으나 그 이후로는 유지되었으며, 세포를 apoptosis로 이르게 한다고 알려져 있는 ceramide의 생합성은 1일째 4901 \pm 201dpm까지 증가하였으나 2일째부터 2447 \pm 141dpm으로 급격한 감소를 보였고 3일째부터는 완만한 감소추세를 보였다. 또한, galactosylceramide의 경우 sodium butyrate를 처리하면 1일째부터 급격한 감소를 보이고 3일째부터는 완만한 감소를 보였다. Glycosphingolipid들은 진핵세포 형질막에 적은 양이 존재하며 당성분에 따라 300종 이상 존재하며, 세포성장, 분화, virus 형질변환 및 발암화에 따라 pattern이 변화한다고 하였으며[14] 배아형성, 신경세포 및 백혈구의 분화, 세포부착, 세포신호전달 및 백혈구 신호전달 등 생리현상이 glycosphingolipid들에 의하여 영향을 받는다고 하였다[22]. 또한, 최근 연구에 따르면, TNF- α 및 interleukin-1 β 등은 sphingomyelinase의 활성을 증가시키고 ceramidase에는 영향을 미치지 않아 ceramide가 축적되므로서 세포독성을 일으켜 세포를 죽이거나(apoptosis) 세포를 분화시키나[8], PDGF와 같은 성장인자들은 오히려 ceramidase를 활성화시켜 sphingosine, sphingosine-1 phosphate를 생성하도록 유도하여 세포성장을 촉진시킨다고 하였다[9]. 또한 glucosylceramide syntase의 저해제인 PDMP유도체를 암세포에 처리하였을 때 암세포의 성장이 저해되었으며 항암제의 효과를 증폭시켰다는 보고도 있다[1].

Sodium butyrate의 처리가 ceramidase 활성에 미치는 영향

70% confluent한 HT29 cell에 5mM sodium butyrate를

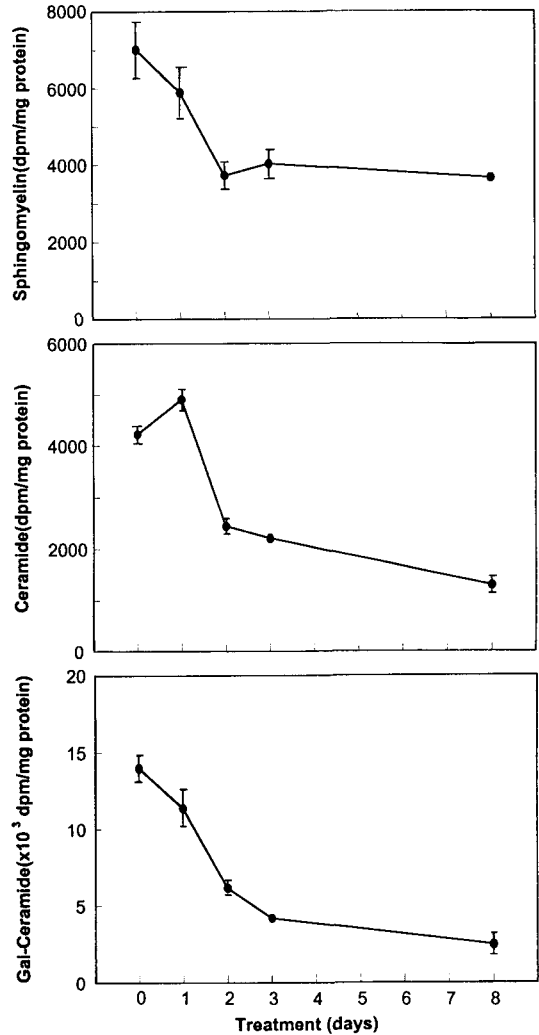


Fig. 5. Effect of sodium butyrate on the biosynthesis of complex sphingolipids.

70% confluent HT 29 cells were treated with 5mM sodium butyrate for 8 days. Values were means+S.E. (n=3).

4일간 처리하면서 acid ceramidase 및 neutral ceramidase 활성을 측정 한 결과는 그림 6과 같았다. Acid ceramidase 및 neutral ceramidase 모두 처리 1일째 활성이 급격히 감소하여 대조군과 비교하여 각각 56.7% 및 50.4%의 활성을 가졌으나 2일째부터는 감소폭이 크지 않았다. 이는 sodium butyrate 처리에 의한 ceramidase의 활성저하로 인하여 그림 5에서와 같이 처리 1일째 ceramide 함량이 감소된 결과

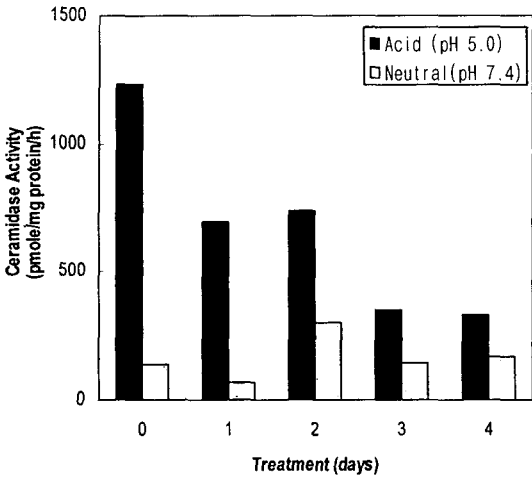


Fig. 6. Time-Dependent effect of sodium butyrate on acid and neutral ceramidase activity. 70% confluent HT 29 cells were treated with 5mM sodium butyrate for 4 days. Ceramidase activity of cell homogenate were assayed in acetate buffer(pH 5.0) or Tris-HCl buffer (pH 7.4).

가 초래되고 세포성장의 지연을 가져왔다고 할 수 있을 것이다. Ceramide 함량의 증가원인으로는 ceramide synthase, sphingomyelinase 및 glycosidase활성의 촉진 또는 ceramidase 및 glycosylceramidase활성의 저해 등이 많은 변수가 있을 수 있으나 본 실험에서는 2종류의 ceramidase 활성만을 측정하였다. 또한 여기에서 아직 측정하지 못한 free sphingoid인 sphinganine이나 sphingosine 역시 성장, 분화 및 apoptosis에 관여하며 이식시킨 종양의 성장 및 전이를 저해한다는 연구보고들[16,41]이 있으므로 sodium butyrate치리에 의한 대장암세포내의 free sphingoid의 변화 및 관련효소의 활성 등을 관찰하는 것도 중요하다고 사료된다.

요 약

Butyrate는 탄소사슬이 짧은 지방산 중 하나로 소화되지 않은 식이성 섬유질의 혐기적 발효결과 포유동물의 위장관내에 millimolar 농도로 유지되며 대장의 상피세포에서 흡수되어 energy원으로 사용된다. 70%정도 confluent하게 자란 사람의 대장암세포주인 HT29 cell에 5mM sodium

butyrate를 시간별로 처리하고 세포의 생존율, 암세포의 분화정도의 biomarker로 알려진 alkaline phosphatase 및 PLC- γ 1의 발현정도를 측정하였으며 sphingolipid의 생합성 및 ceramidase 활성도 측정하였다. Sodium butyrate 처리는 성장중인 HT29 cell의 부착을 저해하여 처리 1일째부터 세포수가 감소하였고 형질막 효소인 alkaline phosphatase의 발현을 증가시켰으며 PLC- γ 의 발현을 감소시켰다. 또한, 복합 sphingolipid들의 생합성을 측정된 결과, 세포성장의 저해와 함께 sphingomyelin은 2일째부터 감소하였으며, galactosyl ceramide는 1일째부터 급속히 감소하였다. 그러나 ceramide의 경우, 1일째는 처리하기 전보다 680dpm/mg protein정도 증가하였으며 2일째에는 다시 급속히 감소하였다. 또한 butyrate치리에 의하여 HT29 cell의 acid ceramidase와 neutral ceramidase활성이 저해됨을 관찰하였는데 그 결과 ceramide함량이 초기에 증가된 것으로 생각된다. 본 실험결과들로부터 HT29 cell의 sodium butyrate치리는 세포분화 또는 세포성장저해를 가져오는데 이와 함께 초기의 ceramide함량 및 alkaline phosphatase활성의 증가와 galactosylceramide함량 및 PLC- γ 1 발현의 감소현상이 동반됨을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Abe, A., Radin, N. S., Shayman, J. A., Wotring, L. L., Zipkin, R. E., Sivakumar, R., Ruggieri, J. M., Carson, K. G. and Ganem, B. 1995. Structural and stereochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth. *J. Lipid Res.*, **36**, 611.
2. Bell, R. M., Hannun, Y. A., and Merrill, A. H. Jr. 1993. Sphingolipids and their metabolites in cell regulation. eds Vols. **25** and **26**, *Advances in Lipid Research*, Academic Press, California.
3. Berridge, M. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 159.
4. Berridge, M. J. and Irvine, R. F. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, **341**, 197.
5. Borek, C., Ong, A., Stevens, V. L., Wang, E. and Merrill, A. H., Jr. 1991. Long-chain (sphingoid) bases inhibit multistage carcinogenesis in mouse C3H/10T1/2 cells treated with radiation and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 1953.

6. Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., Soltoff, S. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64**, 281.
7. Chung, Y. S., Song, I. S., Erickson, R. H., Sleisenger, M. H., and Kim, Y. S. 1985. Effect of growth and sodium butyrate on brush border membrane-associated hydrolases in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Res.*, **45**, 2976.
8. Coroneos, E., Martinez, M., McKenna, S. and Kester, M. 1995. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23305.
9. Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. and Spiegel, S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, **381**, 800.
10. Dillehay, D. L., Webb, S. K., Schmelz, E.-M. and Merrill, A. H. Jr. 1994. Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.*, **124**, 615.
11. Endo, K., Igarashi, Y., Nisar, M., Zhou, Q. H., and Hakomori, S. 1991. Cell membrane signaling as target in cancer therapy. *Cancer Res.*, **51**, 1613.
12. Enkvetchakul, B., Barnett, T., Liotta, D. C., Geisler, V., Menaldino, D., Merrill, A. H. Jr. and Birt, D. F. 1992. Influences of sphingosine on two-stage skin tumorigenesis in sencar mice. *Cancer Lett.*, **62**, 35.
13. Gao, P. and Malbon, C. C. 1996. Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells to primitive endoderm is regulated by the G α 2/G α axis via phospholipase C and not adenyllylcyclase. *J Biol Chem.*, **271**, 30692.
14. Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 733.
15. Herz, F., Schermer, A., Halwer, M., and Bogart, E. H. 1981. Alkaline phosphatase in HT-29, a human colon cancer cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 581.
16. Igarashi, Y. 1997. Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines. *J. Biochem.*, **122**, 1080.
17. Jacobs, L. R. 1988. Fiber and colon cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **17**, 747.
18. Jacobs, L. R. 1990. Influence of soluble fibers on experimental colon carcinogenesis. Vahoun, G. B. and Kritchevsky, D. eds. *In Dietary Fiber : Basic and Clinical Aspects*. New York. Plenum Press, pp.389-403,
19. Jacobs, L. R. 1986. Relationship between dietary fiber and cancer: metabolic, physiologic, and cellular mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **183**, 299.
20. Kim, H. S., Lee, Y. H., Min, D. S., Chang, J. S., Ryu, S. H., Ahn, B.-Y. and Suh, P.-G. 1995. tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 by vaccinia virus growth factor. *Virology*. **214**, 21.
21. Kim, Y. S., Tsao, D., Siddiqui, B., Whitehead, J. S., Arnstein, P., Bennette, J. and Hicks, J. 1980. Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer*, **45**, 1185.
22. Kolter, T. and Sandhoff, K. 1998. Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses, *Brain Pathol.*, **8**, 79.
23. Lee, D. Y., Chapkin, R. S. and Lupton, J. R. 1993. Dietary fat and fiber modulate colonic cell proliferation in an interactive site-specific manner. *Nutr. Cancer*, **20**, 107.
24. Lee, Y. H., Kim, H. S., Pai, J.-K., Ryu, S. H., and Suh, P.-G. 1994. Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C-gamma 1. *J. Biol. Chem.*, **269**, 26842.
25. Lee, Y. H., Lee, H. Y., Ryu, S. H., Suh, P. G. and Kim, K. W. 1993. Reduced expression of PLC-gama during the differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells. *Cancer Lett*, **68**, 237.
26. McIntyre, A., Gibson, P. R. and Young, G. P. 1993. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, **34**, 386.
27. Merrill, A. H. Jr., Schmelz, E.-M., Wang, E., Schroeder, J. J., Dillehay, D. L. and Riley, R. T. 1995. Role of dietary sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism in cancer and other diseases. *J. Nutr.*, **125**, 1677S.
28. Merrill, A. H. Jr., Schmelz, E.-M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A. and Wang, E. 1997. Sphingolipids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 208.
29. Merrill, A. H. Jr., Liotta, D. C. and Riley, R. T. 1996. Fumonisin, fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends in Cell Biology*, **6**, 218.
30. Nikolova-Karakashian, M., Morgan, E. T., Alexander, C., Liotta, D. C. and Merrill, A. H. Jr. 1997. Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1 β . *J. Biol.*

- Chem.*, **272**, 18718.
31. Noh, D.-Y., Lee, Y. H., Kim, S. S., Kim, Y. I., Ryu, S. H., Suh, P.-G. and Park, J.-G. 1994. Elevated content of phospholipase C- γ 1 in colorectal cancer tissues. *Cancer*, **73**, 36.
 32. Park, J. G., Lee, Y. H., Kim, S. S., Park, K. J., Noh, D. Y., Ryu, S. H. and Suh, P. G. 1994. Over-expression of phospholipase C- γ 1 in familial adenomatous polyposis. *Cancer res.*, **54**, 2240.
 33. Sadahira, Y., Ruan, F., Hakomori, S. and Igarashi, Y. 1992. Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 9686.
 34. Sano, T., Ohyama, K., Yamano, Y., Nakagomi, Y., Nakazawa, S., Kikyo, M., Shirai, H., Blank, J. S., Exton, J. H. and Inagami, T. 1997. A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23631.
 35. Spiegel, S. and Merrill, A. H. Jr. 1996. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J.*, **10**, 1388.
 36. Toscani, A., Soprano, D. R. and Soprano, K. J. 1988. Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogene Res.*, **3**, 223.
 37. Tsao, D., Morita, A., Bella, A. Jr., Luu, P. and Kim, Y. S. 1982. Differential effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxide, and retinoic acid on membrane-associated antigen, enzymes, and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, **42**, 1052.
 38. Velazquez, O. C., Lederer, H. M. and Rombeau, J. L. 1996. Butyrate and the colonocyte implications for neoplasia. *Digest. Dis. Sci.*, **41**, 727.
 39. Williams, R. D., Wang, E. and Merrill, A. H. Jr. 1984. Enzymology of long-chain base synthesis by liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 282.
 40. Yaish, P., Gazit, A., Levitzki, A. and Gillon, C. 1988. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science*, **242**, 933.
 41. Yamagnchi, Y., Sasagasako, N., Goto, I. and Kobagashi, T. 1994. The synthetic pathway for glucosylsphingosin in cultured fibroblasts. *J. Biochem(Tokyo)*, **116**, 704.