

Conjugated Linoleic Acid에 의한 대장암 세포 증식 억제 기전 연구*

김은지 · 오윤신* · 이현숙* · 박현서** · 윤정환*[§]

한림대학교 실버생물산업기술연구센터, 한림대학교 생명과학부, * 경희대학교 식품영양학과**

Study of the Mechanism for the Growth Inhibitory Effects of Conjugated Linoleic Acid on Caco-2 Colon Cancer Cells*

Kim, Eun Ji · Oh, Yoon Sin* · Lee, Hyun Sook*

Park, Hyun Suh** · Park, Jung Han Yoon*[§]

Silver Biotechnology Research Center, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Division of Life Sciences, * Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Department of Food and Nutrition, ** Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a group of positional and geometric isomers of linoleic acid (LA) and exhibits anticarcinogenic activity in a variety of animal models. We have previously observed that CLA inhibited the growth of Caco-2 cells, a human colon adenocarcinoma cell line. The present study was performed to determine whether the growth inhibitory effect of CLA is related to change in secretion of IGF- II and/or IGF-binding proteins (IGFBPs) that have been shown to regulate Caco-2 cell proliferation by an autocrine mechanism. Cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of CLA or linoleic acid (LA). Immunoblot analysis of 24-hours, serum-free, conditioned medium using a monoclonal anti-IGF-II antibody revealed that Caco-2 cells secreted both mature 6,500 Mr and higher Mr forms of pro IGF-II. The levels of pro IGF-II and mature IGF-II were decreased by $43 \pm 2\%$ and $53 \pm 6\%$, respectively by treatment with $50 \mu\text{M}$ CLA. LA slightly increased pro IGF- II levels. Results from Northern blot analysis showed that CLA decreased IGF- II mRNA levels at $50 \mu\text{M}$ concentration suggesting that CLA regulation of IGF- II protein expression occurs partly at the transcriptional level. Ligand blot analysis of conditioned media using ^{125}I -IGF- II revealed that CLA slightly decreased IGFBP-2 levels and increased IGFBP-4 levels. We confirmed our previous results that CLA inhibited cell growth in a dose-dependent manner but LA slightly increased cell growth. Exogenous IGF-II mitigated the growth inhibitory effect of CLA. These results indicate that the growth inhibitory effect of CLA may be at least in part mediated by decreasing IGF-II and IGFBP-2 secretion and increasing IGFBP-4 secretion in Caco-2 cells. (*Korean J Nutrition* 36(3) : 270~279, 2003)

KEY WORDS : conjugated linoleic acid, colon cancer cells, insulin-like growth factor- II, insulin-like growth factor-binding proteins.

서 론

Conjugated linoleic acid (CLA)는 공액 (conjugated) 된 이중 결합을 가지고 있는 linoleic acid (LA)의 위치적, 기하학적 이성체의 혼합물로, 반추 동물의 고기와 유제품에 포함되어 있는 지방산이다.¹⁾ CLA는 반추동물의 장관에

존재하는 박테리아에 의해 linoleic acid (LA)의 수소화 과정을 통해 생성되며,²⁾ 또한 인공적으로 LA를 기질로 하여 화학적인 알카리이성화 반응에 의해서도 합성된다.³⁾ 채식주의자가 아닌 경우 혈액내 CLA의 농도는 $20\sim 70 \mu\text{M}$ 정도이며,⁴⁾ 아직 명확하게 알려지진 않았으나 혈액내 CLA는 식이에서 유래한 것으로 생각되고 있다.⁵⁾ CLA는 LA와 매우 유사한 구조를 가지고 있지만 LA와는 다른 생물학적인 효과를 나타낸다. 가장 특징적인 면으로, LA는 암을 촉진하는^{6,7)} 반면 CLA는 강한 항암 효과가 있는 것으로 알려졌다.^{8,9)}

CLA의 항암 효과는 여러 실험을 통해 입증되었다. Knek 등¹⁰⁾은 역학 조사를 통해 유제품의 섭취와 유방암의 위험

접수일 : 2003년 2월 5일

채택일 : 2003년 3월 5일

*This work was supported by grant No. (R01-1999-00166) from the Korea Science & Engineering Foundation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

도와는 역의 상관관계가 있음을 보여줌으로서 CLA의 항암 효과의 가능성을 제시하였다. 많은 동물 실험들은 CLA에 의해 유방암,¹¹⁾ 피부암,¹²⁾ 전립선암,¹³⁾ 및 대장암¹⁴⁾의 발생이 억제됨을 보여주었다. Ip 등¹⁵⁾은 유방암에서 CLA의 항암 효과는 식이에 포함되어 있는 지방의 양과 종류에 관계없이 독립적으로 나타나며, CLA의 양이 증가할수록 그 효과가 증가한다고 보고하였다. 인간에서 유래한 암세포주를 사용한 *in vitro* 실험에서도 CLA는 암세포의 증식을 억제하였다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 그러나 CLA의 항암 기전은 현재까지 명확하게 밝혀지지 않았다.

Insulin-like growth factor (IGF) system은 ligand인 IGF-I 과 IGF-II, receptor인 type I 과 type II IGF receptor, 그리고 IGF-binding proteins (IGFBPs)로 구성되어 있다.²³⁾ IGF-I 과 IGF-II는 proinsulin과 아미노산 구조가 유사한 polypeptide로 여러 가지 세포의 증식과 분화에 중요한 역할을 한다. IGF들은 endocrine mechanism으로 세포의 증식과 분화를 조절할 뿐 아니라 체내 각 조직에서 생성되어 그 조직 내에서 autocrine이나 paracrine mechanism으로도 세포의 증식과 분화를 조절한다.²³⁾ IGF의 작용은 세포막에 존재하는 type I IGF receptor에 의해 매개되며 IGFBP에 의해 조절된다.²⁴⁾ IGF에 대한 친화력이 큰 6종류의 IGFBP가 순수 분리되었고 최근에 IGFBP보다는 IGF에 대한 친화력이 낮은 단백질인 IGFBP-related protein들이 발견되었다.²⁵⁾ IGFBP은 IGF에 결합하여 세포에서 생성된 IGF를 다른 조직이나 세포로 운반하는 운반체의 역할을 하거나 또는 IGF가 receptor에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로서 IGF의 작용을 조절한다.²³⁾ 몇몇 IGFBP는 IGF의 작용을 조절하는 것과는 상관없이 독립적으로 세포의 증식과 분화를 조절한다고 보고되었다.²⁶⁾

IGF system의 비정상적인 변화는 여러 종류의 암을 유발하는 원인 중 하나로 간주되고 있다.²⁷⁾ 대장암에서도 IGF system의 변화가 관찰되었는데 대장암 조직에서는 정상 조직보다 IGF-II mRNA²⁸⁾ IGFBP-2 mRNA의 발현이 증가하였다고²⁹⁾ 보고 되었고, 대장암 환자에서 혈중 IGF-II와 IGFBP-2의 증가가 관찰되었다.³⁰⁾ Buckbinder 등³¹⁾은 EBI 대장암 세포에서 tumor suppressor인 p53이 IGFBP-3의 발현을 유도하여 apoptosis를 초래한다고 보고하였다. 이상의 결과들은 IGF system이 대장암의 발생과 진전에 중요한 역할을 담당하고 있음을 제시한다.

본 실험실에서는 CLA가 인간의 대장에서 유래한 암세포인 Caco-2 세포의 증식을 억제하는 것을 관찰하였다.³²⁾ 이 결과의 후속 연구로 본 연구에서는 이 CLA에 의한 세

포 증식 억제가 IGF system의 변화와 관련이 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Caco-2 세포 (HTB-37)은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium : Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, transferrin, penicillin-streptomycin, selenium 등은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Linoleic acid (LA)와 conjugated linoleic acid (CLA), bovine serum albumin (BSA), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), ascorbic acid, α -tocopherol, Tri reagent 등 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 전기영동시 사용한 acrylamide, TEMED는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며 BA83 nitrocellulose membrane과 nylon membrane은 Schleicher and Schuell (Keene, NH, USA)과 Micron Separations (Westborough, MA, USA)에서 각각 구입하였다. Digoxigenin-UTP과 DIG Luminescent detection kit은 Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. IGF-II monoclonal antibody는 Amano International Enzyme (Troy, VA, USA)에서 구입하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit, anti-mouse secondary antibody, 3-[¹²⁵I]iodotyrosyl IGF-II (specific activity 2,000 Ci/mmol) 등은 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양, Immunoblot analysis

Caco-2 세포를 유지하기 위해 DMEM/F12에 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하여 계대 배양하였다. 세포가 생성, 분비하는 IGF-II의 양을 측정하기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. Caco-2 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 40,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 serum-free medium으로 배지를 교환하여 serum-starvation시켰다. Serum-free medium은 DMEM/F12에 transferrin (5 μ l/ml), selenium (5 ng/ml)을 첨가하여 만들었고 지방산의 산화

를 방지하기 위해 ascorbic acid (50 ng/ml)와 α -tocopherol (20 ng/ml)을 첨가하였다. 24시간 동안 serum-starvation을 한 후 여러 농도의 지방산이 들어있는 serum-free medium으로 교환하였다. 배지에 첨가한 지방산은 Kim 등³³⁾이 사용한 방법을 변형하여, 지방산이 없는 BSA와 4 : 1의 몰비로 결합시켜 만든 지방산-BSA 결합체를 사용하였다. 지방산은 0, 10, 25, 50 μ M 농도로 배지에 첨가하였고, 모든 well에 같은 농도의 BSA가 포함되도록 BSA의 양을 조절하여 첨가하였다. 지방산을 농도별로 첨가하고 세포를 48시간 배양한 후 배양액을 교환하였다. 세포를 24시간 동안 배양시킨 후 수거한 배양액을 수거하여 microconcentrator (molecular weight exclusion of 3,000)을 사용하여 10배 농축하였다. 10~20% gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후 BA83 nitrocellulose transfer membrane에 이동시켰다. Kim 등³³⁾과 같은 방법으로 membrane에 3% milk-PBST (154 mM NaCl, 0.81 mM Na_2HPO_4 , 0.19 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05% Tween-20, pH 7.4)을 넣어 4°C에서 18시간 동안 교반한 후 monoclonal IGF-II antibody/PBST (1 : 1000 희석)을 넣어 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후 biotinylated anti-mouse IgG/PBST (1 : 1000 희석)와 streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex/PBST (1 : 1000 희석)을 넣어 상온에서 1시간씩 차례로 교반하였다. 각 band들은 ECL kit을 사용하여 가시화하였고, IGF-II band들의 강도는 densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. Ligand blot analysis

Immunoblot analysis에서와 같은 방법으로 세포 배양액을 수거하여 농축한 후 10~13% gradient SDS-PAGE에서 단백질을 분리하여 BA83 nitrocellulose transfer membrane에 이동시켰다. 1% BSA-TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, pH 7.4)에 membrane을 넣어 blocking 한 후 ¹²⁵I-labeled IGF-II (100,000 count per minute/ml)을 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 교반하였다. Membrane을 TBST로 씻은 다음 autoradiography 방법으로 IGFBP들을 가시화하였다. 각 IGFBP band의 강도는 densitometer를 이용하여 측정하였다.³³⁾

4. Northern blot analysis

세포를 6×10^5 cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 지방산을 농도별로 처리하

여 세포를 배양하였다. 72시간 배양한 후 Chomczynski³⁴⁾ 방법을 응용한 Tri reagent를 사용해 total RNA를 분리한 후, 1% agarose-formaldehyde gel에서 전기영동하여 크기에 따라 분리하였다. 크기에 따라 분리된 RNA를 nylon membrane에 이동시킨 후 UV-cross linker (Stratalinker, Stratagene, USA)를 사용하여 membrane에 RNA를 cross-link시켰다. RNA가 cross-link된 membrane을 5x SSC (3 M NaCl, 300 mM tri-sodium citrate), 0.02% SDS, 1% sodium lauryl sarcosine, 2% blocking reagent (Roche), 50% formamide로 구성된 용액으로 68°C에서 2시간 동안 prehybridization한 다음 antisense IGF-II cRNA probe를 첨가하여 68°C에서 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization하기 위한 probe는 980 bp IGF-II cDNA³⁵⁾를 *Sal* I으로 자른 후 digoxigenin-UTP을 사용하여 in vitro transcription 방법으로 antisense IGF-II cRNA probe를 만들어 사용하였다. DIG Luminescent detection kit을 사용하여 mRNA를 가시화하였고 mRNA band들의 강도는 densitometer를 이용하여 측정하였다. Northern blot 방법을 검증하기 위해 각 blot마다 antisense human cyclophilin cRNA probe (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용해 Northern blot을 수행하였다.

5. 세포증식 변화측정

지방산의 농도를 달리하였을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 위와 동일한 방법으로 세포를 plate하고, serum-starvation을 하고, 지방산을 농도별로 첨가하고 세포를 배양하였다. 배지는 2일 마다 교환하였으며, 지방산을 첨가하고 48시간, 96시간이 경과한 후 MTT assay³⁶⁾로 살아있는 세포수를 측정하였다.

Exogenous한 IGF-II가 CLA의 세포 증식 억제 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 위와 동일한 방법으로 세포를 분주하고 serum-starvation한 후 25 μ M CLA를 첨가하거나 첨가하지 않은 세포 배양액에 IGF-II를 200 nM의 농도로 첨가하여 48시간, 96시간 배양한 후 살아 있는 세포수를 측정하였다.

6. 세포의 성장 곡선 측정

지방산이 세포의 증식에 미치는 영향이 장기적으로 지속되는지 살펴보기 위해 성장 곡선을 측정하였다. 세포는 10% FBS가 포함된 배지로 30,000 cells/well의 밀도가 되게 희석하여 24 well-plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후에 DMEM/F12로 세포의 단층을 헹구어 낸 후 지방산이 들어 있는 serum-free medium으로 교환하였다. 세

또는 총 12일 동안 배양하였고 2일마다 배지를 교환하였으며 2일마다 MTT assay³⁰⁾로 살아있는 세포수를 측정하였다.

7. 통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 각 실험군의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 결과는 SAS (Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결 과

1. CLA가 IGF-II의 생성과 mRNA 발현에 미치는 영향

본 실험실에서는 Caco-2 세포를 여러 농도의 CLA가

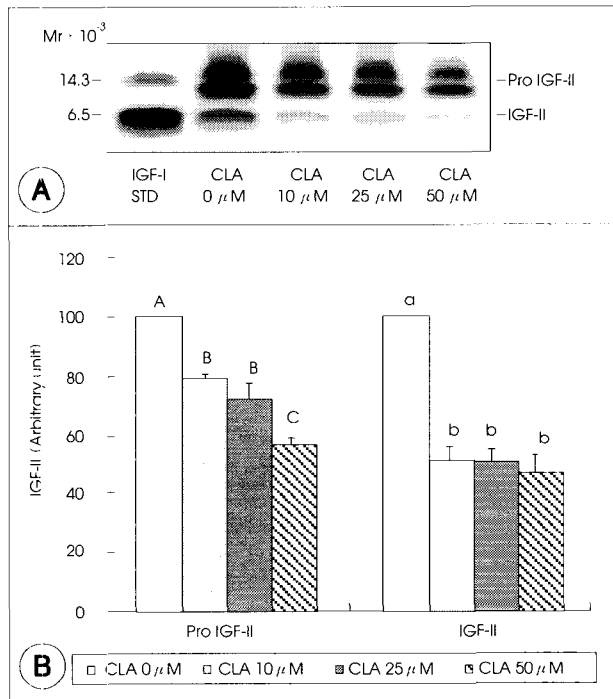


Fig. 1. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on IGF-II secretion by Caco-2 cells. Caco-2 cells were plated in 24-well plates at 40,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 μg/ml transferrin and 5 ng/ml selenium for 24 hours. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium containing 0, 10, 25, or 50 μM CLA. Twenty four-hour conditioned media were collected and concentrated for immunoblot analysis with a monoclonal antibody against IGF-II. The volumes of media loaded onto the gel were adjusted for equivalent cell numbers. (A) A photograph of chemiluminescent detection of a blot, which is representative of three independent experiments, is shown. (B) Quantitative analysis of the immunoblots. Each bar represents the mean ± SEM (n = 3). Comparisons between groups that yielded significant differences (p < 0.05) are indicated by different letters above each bar (e.g., a vs. b, b vs. c, etc.).

포함된 배지에서 배양했을 때 CLA의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 세포수가 감소하는 것을 관찰하였다.³¹⁾ 본 연구에서는 CLA의 세포 증식 억제 효과가 Caco-2 세포의 autocrine growth factor로 알려진 IGF-II의 생성, 분비 변화와 관련 있는지를 조사하였다. 배양액에 CLA를 0, 10, 25, 50 μM 농도로 첨가하여 세포를 48시간 배양한 후 배양액을 교환한 다음 세포가 24시간 동안 condition한 배양액을 수거하여 immunoblot을 수행하였다. 본 연구진에 의해 이미 보고된 바와 같이³²⁾ Caco-2 세포의 배양액에서는 분자량이 14,300, 11,500인 pro IGF-II와 분자량이 6,500인 mature IGF-II band들이 관찰되었다. CLA의 농도가 증가할수록 pro IGF-II와 mature IGF-II 수준은 모두 유의적으로 감소하였다. CLA를 50 μM 농도로 처리한 경우 CLA를 첨가하지 않은 대조군에 비해 pro IGF-II와 mature IGF-II는 각각 43 ± 5%, 53 ± 4% 감소하였다 (Fig. 1). 세포 증식을 다소 증가시킨 LA에 의해 pro IGF-II의 생성은 유의적으로 증가하였으나 mature IGF-II의 생성은 변화하지 않았다 (Fig. 2).

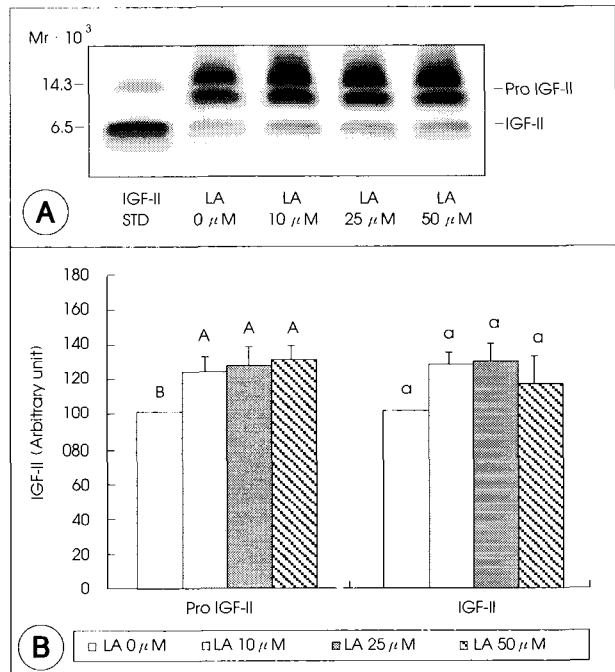


Fig. 2. Effect of linoleic acid (LA) on IGF-II secretion by Caco-2 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum-starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of LA. Twenty four-hour conditioned media were collected and concentrated for immunoblot analysis with a monoclonal antibody against IGF-II. The volumes of media loaded onto the gel were adjusted for equivalent cell numbers. (A) A photograph of chemiluminescent detection of a blot, which is representative of three independent experiments, is shown. (B) Quantitative analysis of the immunoblots. Each bar represents the mean ± SEM (n = 3).

CLA에 의한 IGF-II 생성 감소가 IGF-II mRNA 발현 변화에 의한 것인지를 조사하기 위해 Northern blot를 실시하였다. Caco-2 세포에서는 6.0 kb와 4.8 kb IGF-II mRNA가 관찰되었다. 4.8 kb IGF-II mRNA는 CLA와 LA에 의해 변화하지 않았다. 그러나 6.0 kb IGF-II mRNA는 CLA를 50 μM 농도로 처리한 경우 유의적으로 감소하였고, LA 첨가에 의해 증가하였다 (Fig. 3, Fig. 4).

2. CLA가 IGFBP의 생성, 분비에 미치는 영향

IGF-II와 결합하므로써 IGF-II의 세포 증식 작용을 조절하는 IGFBP들의 생성, 분비량을 조사하기 위해 세포 배양액에 CLA를 농도별로 첨가하여 24시간 동안 세포가 condition한 medium을 수거하여, 125I-IGF-II를 사용하여 ligand blot을 실시하였다. 이미 보고된 바와 같이,³⁷⁾ Caco-2 세포에서는 분자량이 34,000인 IGFBP-2, 분자량이 24,000인 IGFBP-4와 분자량인 30,000인 IGFBP-

6가 생성, 분비되었다. CLA에 의해 IGFBP-2는 감소하였고, IGFBP-4는 증가하였으나 농도에 따른 차이는 없었다. 반면 IGFBP-6의 생성, 분비는 CLA에 의해 변화하지 않았다 (Fig. 5). CLA 첨가 때와는 달리 LA를 첨가한 경우 IGFBP-2, -4, -6의 생성, 분비는 증가하였다 (Fig. 6).

3. CLA가 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향

CLA가 인간의 대장암 세포에서 유래한 cell line인 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 CLA를 0, 10, 25, 50 μM 농도로 처리한 후 살아 있는 세포수를 측정하였다. 이미 보고한 바와 같이³²⁾ CLA를 첨가한 후 48시간이 경과한 후부터 CLA의 농도 증가에 따라 유의적으로 세포수가 감소하였다. CLA에 의한 세포수의 감소는 96시간에는 더욱 현저하게 나타나, 50 μM CLA를 첨가한 경우 CLA를 첨가하지 않은 대조군에 비해 57 ± 4% 감소하였다 (Fig. 7A). LA의 대장암 세포 증식 효과를 확인하기 위해 LA를 CLA와 동일한 농도로 세포 배양액에 첨가

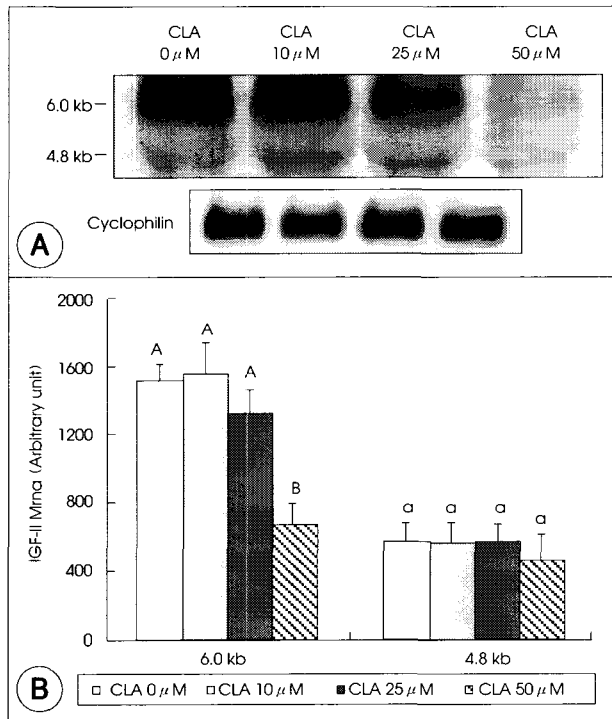


Fig. 3. Effect of CLA on IGF-II mRNA levels in Caco-2 cells. Cells were seeded at a density of 6×10^5 cells/dish in 100 mm dishes with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. After 24 h, the monolayers were rinsed with serum-free medium and serum-starved for 24 h. Cells were then incubated in serum-free medium with various concentrations of CLA. (A) Total RNA was isolated for Northern blot analysis probing with IGF-II cRNA (top) or human cyclophilin cRNA (bottom). Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown. (B) Relative abundance of each IGF-II band relative to its cyclophilin control band on Northern blot was estimated by densitometric analysis. Each bar represents the mean \pm SEM from three independent experiments.

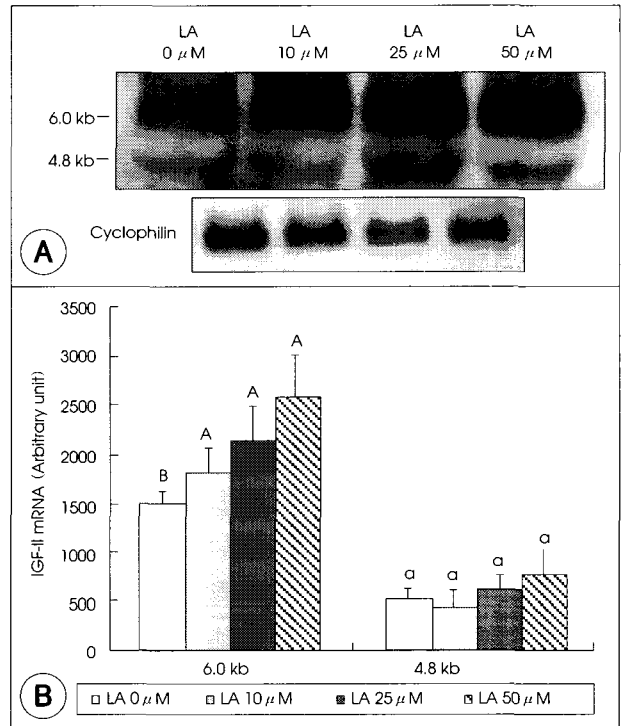


Fig. 4. Effect of LA on IGF-II mRNA levels in Caco-2 cells. Cells were seeded and serum-starved as described in Fig. 3. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of LA. (A) Total RNA was isolated for Northern blot analysis and probed with IGF-II cRNA (top) or human cyclophilin cRNA (bottom). Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown. (B) Relative abundance of each IGF-II band relative to its cyclophilin control band on Northern blot was estimated by densitometric analysis. Each bar represents the mean \pm SEM from three independent experiments.

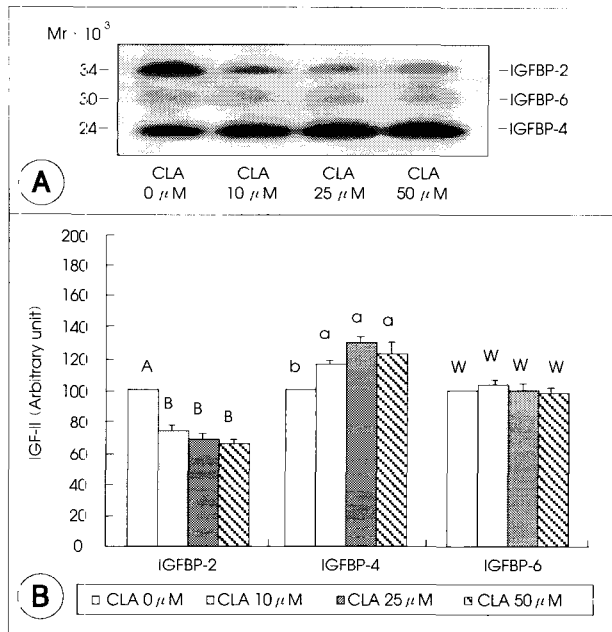


Fig. 5. Effect of CLA on IGFBP secretion by Caco-2 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum-starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of CLA. Twenty four-hour conditioned media were collected and concentrated for ligand blot analysis utilizing ¹²⁵I-IGF-II. (A) An autoradiograph of a ligand blot, which is representative of three independent experiments, is shown. (B) Quantitative analysis of ligand blots. Each bar represents the mean ± SEM (n = 3).

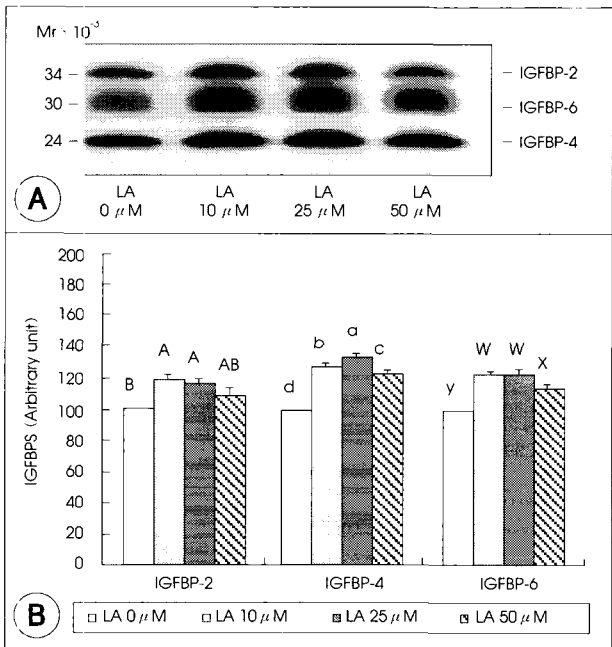


Fig. 6. Effect of LA on IGFBP secretion by Caco-2 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum-starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of LA. Twenty four-hour conditioned media were collected and concentrated for ligand blot analysis utilizing ¹²⁵I-IGF-II. (A) An autoradiograph of a ligand blot, which is representative of three independent experiments, is shown. (B) Quantitative analysis of ligand blots. Each bar represents the mean ± SEM (n = 3).

하여 살아있는 세포수를 측정하였다. LA 첨가한 후 48시간에는 세포수에 유의적인 차이는 없었으나 96시간이 경과했을 때는 농도 증가에 따라 세포수가 유의적으로 증가하였다(Fig. 7B). CLA의 세포 증식 억제 효과가 장기간에 걸쳐 유지되는지를 알아보기 위해 12일 동안 세포의 성장 곡선을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 지방산을 처리하지 않은 control군은 세포 배양을 시작하고 8일이 경과할 때까지 직선적인 성장을 하고 그 이후 성장이 둔화되어 plateau를 이루었다. 이와 같은 성장 곡선은 Kim³³⁾ 등에 의해 보고된 Caco-2의 성장 곡선과 유사한 경향을 보인 정상적인 성장 곡선이다. 10 μM CLA 첨가에 의해 살아있는 세포수는 대조군에 비해 감소하였다. CLA에 의한 세포수 감소는 4일부터 유의적으로 나타났고, 12일까지 세포수 감소가 유지되었다. 반면에 LA를 10 μM 농도로 첨가한 경우 살아있는 세포수는 6일부터 대조군에 비해 증가하였고, 세포 배양을 한 12일까지 세포수의 유의적인 증가를 보였다 (Fig. 8).

4. IGF-II 첨가 CLA의 세포 증식 억제 작용에 미치는 영향

IGF-II의 감소가 CLA에 의한 세포 증식 억제의 원인

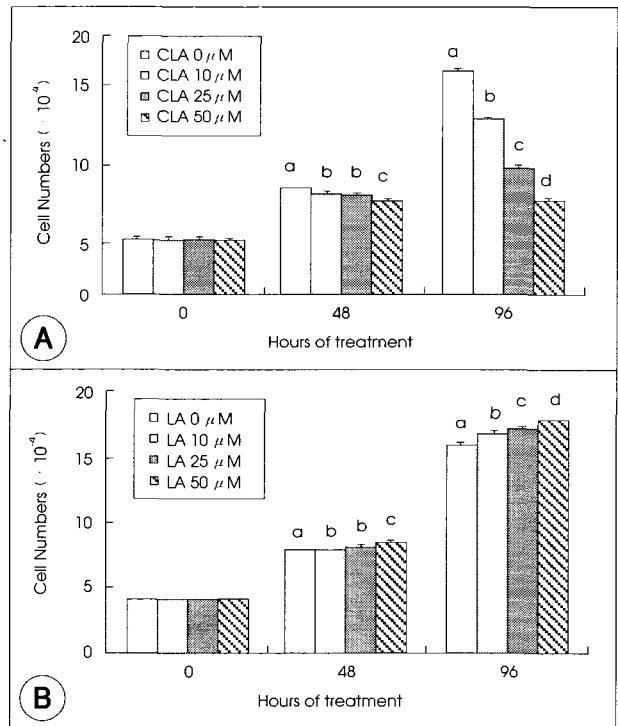


Fig. 7. Effect of CLA and LA on viable Caco-2 cells. Cells were plated and cultured as described in Fig. 1. After serum-starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of CLA. Cell numbers were estimated by the MIT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n = 6). Bars with different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test at each time point.

의 하나일 것으로 생각되어 exogenous IGF-II가 CLA의 세포 증식 억제 효과에 미치는 영향을 조사하였다. 25 μ M CLA가 첨가되거나 첨가되지 않은 세포 배양액에 IGF-II를 200 nM의 농도로 첨가하여 세포를 배양한 후 살아 있는 세포수를 측정된 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 세포 증식은 IGF-II 첨가에 의해 대조군보다 현저하게 증가하였다. CLA를 첨가한 경우 세포의 증식은 48시간부터 유의적으로 감소하였고 96시간에는 현저하게 세포 증식이 감소하였다. CLA에 의한 세포 증식 억제 정도는 Fig. 7의 결과와 비슷하였다. CLA와 IGF-II를 세포 배양액에 첨가하여 배양한 후 48시간이 경과한 경우 CLA의 세포 증식 억제 효과가 감소되어 대조군과 비슷한 세포 증식을 보였

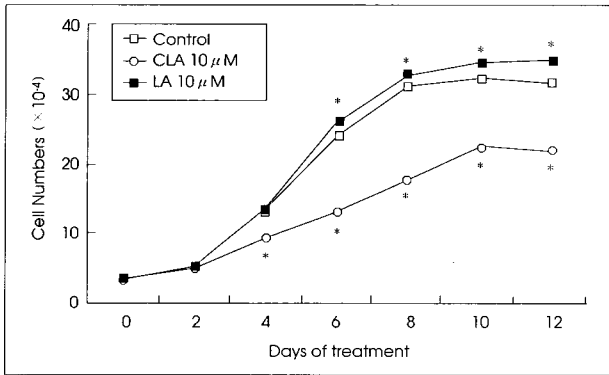


Fig. 8. Caco-2 cell growth curves. Caco-2 cells were plated in 24-well plates at 30,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and serum starved as described in Fig. 1. After serum-starvation, cells were incubated in serum-free medium in the absence or presence of 10 μ M CLA or LA. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM (n = 6). * Significantly different from control (p < 0.05).

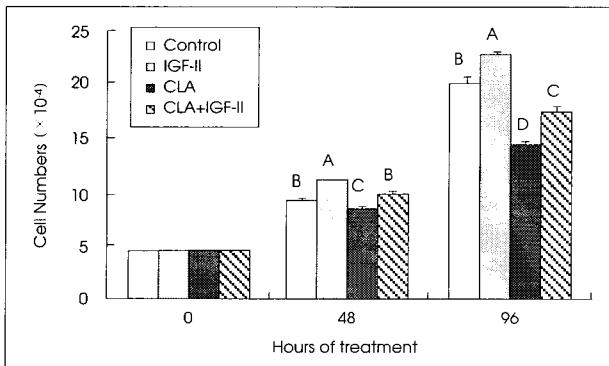


Fig. 9. Effect of IGF-II and/or CLA on viable Caco-2 cell number. Cells were cultured in 24-well plates and serum-starved as described in Fig. 7. After serum-starvation, the monolayers were incubated with or without 25 μ M CLA in the absence or presence of 200 nM IGF-II. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM (n = 6). Comparisons between groups that yielded significant differences (p \leq 0.05) are indicated by different letters above each bar (e.g., a vs. b, b vs. c, etc.).

다. 96시간이 지난 후에는 세포 증식 정도는 CLA만을 첨가했을 때보다는 증가하였으나 대조군보다는 감소하였다 (Fig. 9).

고 찰

최근에 반추동물의 육류와 유제품에 함유되어 있는 지방산인 CLA의 항암 작용에 대한 관심이 고조되고 있다. CLA의 항암 작용은 많은 연구에서 증명되고 있는데, 면역능력이 결여된 쥐에 암세포를 주입하거나 발암원을 투여하여 종양을 유도한 동물실험에서 CLA는 여러 부위의 종양 형성을 억제하였다.¹¹⁻¹⁵ Park 등³⁸)은 1, 2-dimethylhydrazine로 대장암을 유발시킨 쥐에게 식이로 섭취시킨 CLA가 대장의 종양 형성을 억제하였다고 보고하였다. *In vitro* 실험에서도 CLA는 대장암 세포인 SW480 세포,³⁹ HT-29 세포,¹⁸ Caco-2 세포³²)의 증식을 억제하였다. 이 결과들은 CLA가 대장암을 효과적으로 예방할 수 있는 물질임을 제시한다. 본 실험에서 Caco-2 세포의 배양액에 CLA를 첨가한 경우 세포의 증식이 현저히 감소하였으며 CLA의 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 정도는 큰 것을 확인하였다 (Fig. 7). 세포의 성장 곡선을 측정된 결과 CLA를 처리한 경우 대조군에 비해 세포 증식이 4일부터 감소하여 12일까지 감소하였는데 (Fig. 8), 이는 CLA에 의한 세포 증식 억제 효과가 일시적인 현상이 아닌 장기간에 걸쳐 유지되는 것임을 나타낸다. CLA와는 달리 LA는 세포의 증식을 증가시켰다 (Fig. 7). 이 결과는 CLA는 Caco-2 세포 증식을 억제하고 LA는 세포증식을 촉진하였다는 선행연구의 결과를 확인한 것이라 하겠다.³²⁾

IGF system의 변화에 의해 여러 암이 발생하고 그 진행이 촉진된다고 보고 되었으며,²⁷⁾ 대장암에서도 IGF system의 다양한 변화가 관찰되었다.²⁸⁻³⁰⁾ 또한 동물의 영양상태에 따라 혈액이나 조직의 IGF system 농도가 변화함이 관찰되었다.⁴⁰⁾ 영양소에 의해 IGF system이 변화한다는 증거들이 제시되고 있는데, Kim 등^{33,37)}은 Caco-2 세포에서 n-3 fatty acid와 all-trans retinoic acid가 Caco-2 세포의 증식을 억제하고 IGFBP-6의 생성을 증가시켰다고 보고하였고, n-3 fatty acid와 all-trans retinoic acid에 의한 세포 증식 억제가 IGFBP-6의 생성 증가에 기인한다고 제안하였다. 본 연구는 CLA에 의한 Caco-2 세포 증식 억제가 IGF-II와 IGFBP의 생성 변화에 의한다는 가설을 증명하기 위해 수행되었다.

Caco-2 세포는 pro IGF-II와 mature IGF-II를 생성, 분비한다.^{33,37)} Zarrilli 등⁴¹⁾은 Caco-2 세포에서 세포의 증식

이 활발할 때는 IGF- I receptor 수준과 IGF- II 분비가 증가하는 반면 세포의 증식이 감소하거나 분화시에는 IGF- I receptor 수준과 IGF- II 분비가 감소한다고 보고하였다. IGF- I receptor의 결합 부위를 차단하는 alpha-IR3 항체를 배양액에 첨가하면 Caco-2 세포의 증식이 감소하였을 뿐 아니라 IGF- II에 의해 유도된 세포의 증식도 감소하였다.⁴¹⁾ 이는 IGF- II가 Caco-2 세포의 자가분비 증식 조절 요소 (autocrine growth regulator)로 작용함을 제시한다. 본 연구에서는 Caco-2 세포의 증식을 억제한 CLA는 pro IGF- II와 mature IGF- II의 생성 분비를 감소하였고 (Fig. 1) 세포의 증식을 다소 증가시킨 LA는 IGF- II의 생성 분비를 증가하였다 (Fig. 2). 또한 CLA와 함께 exogenous한 IGF- II를 첨가한 경우 CLA에 의한 세포 증식 억제 효과가 감소하였다 (Fig. 9). 이는 CLA에 의한 IGF- II의 감소가 Caco-2 세포의 증식 억제의 원인들 중의 하나라는 것을 시사한다.

CLA는 50 μ M 농도에서 IGF- II mRNA의 발현을 감소시켰고 (Fig. 3) LA는 IGF- II mRNA의 발현을 증가하였다 (Fig. 4). 따라서 이 지방산들은 transcription level에서 IGF- II mRNA 발현을 변화시켜 IGF- II 단백질 생성의 변화를 가져온다는 결론을 내릴 수 있다. 그러나 CLA의 50 μ M 농도에서만 IGF- II의 transcript가 감소 되었으므로 transcription 후의 과정에서도 조절이 이루어질 가능성을 배제할 수 없다. 본 연구에서는 이 지방산들이 어떤 기전으로 IGF- II mRNA 발현을 조절하는지 조사하지 않았다. CLA는 peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) γ 에 결합하여 PPAR γ 를 활성화하여 유전자의 전사를 조절한다.⁴²⁾ IGF- II 유전자의 promoter에는 몇 개의 peroxisomal proliferator response element가 존재한다. 따라서 CLA가 PPAR γ 을 활성화시켜 IGF- II 유전자의 발현을 억제한다는 가설을 세울 수가 있다.

Caco-2 세포는 IGFBP-2, -3, -4, -6를 생성 분비하는 것으로 보고되었다. 그러나 IGFBP-3는 Caco-2 세포의 증식이 끝나고 분화가 진행될 때 생성되고 배양초기의 세포가 활발히 증식할 때는 생성되지 않는 것으로 알려져 있다.⁴³⁻⁴⁵⁾ 본 연구에서는 세포의 증식이 활발히 진행되는 세포들을 사용했으므로 예상한대로 Caco-2 세포가 IGFBP-2, -4, -6를 생성, 분비하는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 5, 6), CLA와 LA에 의해 IGFBP의 양이 변화됨을 관찰하였다. IGFBP는 IGF의 작용을 조절하거나 또는 독립적으로 세포의 증식을 조절한다.²⁶⁾ 선행 연구에서 Caco-2 세포의 IGFBP의 생성, 분비를 유전자의 삽입

을 통하여 변화시켰을 때 세포의 증식을 변화시키는 것이 관찰되었다. Park 등⁴⁵⁾은 Caco-2 세포에 IGFBP-4를 과발현시킨 경우 세포의 증식이 억제되었다고 보고하였다. Caco-2 세포에 IGFBP-6를 과발현하면 세포의 증식이 억제되고,³⁷⁾ antisense IGFBP-6 cDNA를 세포에 삽입하여 IGFBP-6의 생성을 감소시키면 세포의 증식이 증가되었다고 보고하였다.⁴⁶⁾ 이 연구들은 IGFBP-4, -6가 세포의 증식을 억제함을 나타낸다. 정상세포보다 대장암에서 IGFBP-2 mRNA이 과발현되고 순환하는 IGFBP-2가 증가하였다고 보고되었다.³⁰⁾ 최근에 Miraki-Moud 등⁴⁷⁾은 Caco-2 세포에 IGFBP-2를 과발현하면 세포의 증식률이 증가하고 apoptosis가 감소한다고 발표하였다. 이상의 결과는 다른 IGFBP와는 달리 IGFBP-2는 대장암 세포의 증식을 촉진할 가능성을 제시한다. CLA에 의해 IGFBP-6는 변화하지 않았고, 대장암 세포의 증식을 증가시킬 것으로 생각되는 IGFBP-2의 생성, 분비는 감소하였으며, 세포의 증식을 억제할 것으로 간주되는 IGFBP-4의 생성, 분비는 증가하였다 (Fig. 5). 따라서 본 연구의 결과는 IGFBP의 생성, 분비 변화가 CLA에 의한 Caco-2 세포의 증식 억제 기전 중의 하나임을 제시한다.

본 연구에서 사용한 CLA는 *cis*-9, *trans*-11 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA가 각각 48% 함유되어 있고 *cis*-9, *cis*-11 CLA, *trans*-9, *cis*-11 CLA, *trans*-9, *trans*-11 CLA, *cis*-10, *cis*-12 CLA, *cis*-10, *trans*-12 CLA, *trans*-10, *trans*-12 CLA는 미량 함유되어 있는 혼합물이다.³⁾ CLA를 구성하는 주요 이성체인 *cis*-9, *trans*-11 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA의 암세포 증식에 미치는 영향을 비교한 연구에서 *cis*-9, *trans*-11 CLA는 암세포 증식에 영향을 미치지 않은 반면 *trans*-10, *cis*-12 CLA은 암세포의 증식을 현저하게 감소하였다.^{18,19)} 또한 *trans*-10, *cis*-12 CLA은 암세포의 DNA 합성을 억제함과 동시에 apoptosis를 야기하였다.⁴⁸⁾ 위의 연구를 통해 CLA에 의한 Caco-2 세포의 증식 억제는 CLA에 포함되어 있는 *trans*-10, *cis*-12 CLA에 기인하는 것으로 생각되나 CLA에 포함되어 있는 다른 이성체의 항암 효과와 그 기전에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

요약 및 결론

본 연구에서는 CLA에 의한 대장암 세포 증식 억제가 IGF system의 변화와 관련이 있는 지를 인간의 대장에서 유래한 암세포인 Caco-2 세포를 이용하여 규명하고자 하였다.

Caco-2 세포의 자가분비 조절 요소로 알려진 IGF-II 생성, 분비가 CLA에 의해 감소되었고 LA에 의해 증가되었다. CLA는 50 μ M 농도에서 IGF-II transcript를 감소시켰고 LA는 IGF-II transcript 수준을 증가시켰다. 따라서 이 지방산들에 의한 IGF-II 생성 분비의 변화는 transcription level에서 조절되는 것 같으나 transcription 후의 과정에서의 조절 가능성도 배제할 수 없다. IGF-II의 작용을 조절하는 단백질인 IGFBP의 생성, 분비는 CLA에 의해 변화하였는데, CLA에 의해 IGFBP-2는 감소하였고 IGFBP-4는 증가하였다. LA는 Caco-2 세포의 증식을 증가시켰으나 CLA는 세포의 증식을 현저하게 억제하였다. Exogenous한 IGF-II를 CLA와 같이 세포 배양액에 첨가한 경우 CLA에 의한 세포 증식 억제 효과가 감소하였다. 이상의 결과로 IGF-II의 생성, 분비 감소와 IGFBP의 생성, 분비의 변화가 CLA의 대장암 세포 증식 억제 기전의 하나라는 결론을 내릴 수 있다. 대장암 예방을 위해 CLA가 함유되어 있는 유제품과 육류의 섭취를 권장하는 것이 바람직하나 무분별한 육류 섭취 증가는 암 등 건강에 역효과를 초래할 수 있으므로 실생활에 적용하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

Literature cited

- 1) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: Identification and quantification in natural and processed chesses. *J Agr Food Chem* 37: 75-81, 1989
- 2) Kepler CR, Hirons KP, McNeill JJ, Tove SB. Intermediate and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 241: 1350-1354, 1966
- 3) Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 5: 185-197, 1992
- 4) Forgerty A, Ford G, Svomonos D. Octadeca-9, 11-dienoic acid in foodstuffs and in lipids of human blood and breast milk. *Nutr Rep Int* 38: 937-944, 1988
- 5) Huang YC, Luedecke LO, Shultz TD. Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid concentrations in men. *Nutr Res* 14: 373-386, 1994
- 6) Erickson KL. Is there a relation between dietary linoleic acid and cancer of the breast, colon, or prostate? *Am J Clin Nutr* 68: 5-7, 1998
- 7) Ip C, Carter CA, Ip MM. Requirement of essential fatty acid for mammary tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 45: 1997-2001, 1985
- 8) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 9) Ip C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523S-1529S, 1997
- 10) Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Pukkala E, Aromaa A. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br J Cancer* 73: 687-691, 1996
- 11) Visonneau S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca J, Santoli D, Kritchevsky D. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17: 969-974, 1997
- 12) Belury MA, Nickel KP, Bird CE, Wu Y. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer* 26: 149-157, 1996
- 13) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effect of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434, 1998
- 14) Liew C, Schutt HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 Rat: A study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043, 1995
- 15) Ip C, Briggs SP, Haegle AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. The conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050, 1996
- 16) Shultz TD, Chew BP, Seaman WR. Differential stimulatory and inhibitory responses of human MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid and conjugated linoleic acid in culture. *Anticancer Res* 12: 2143-2145, 1992
- 17) Schonberg S, Krokan HE. The inhibitory effect of conjugated linoleic acid derivatives (CLA) of linoleic acid on the growth of human tumor cell lines is in part due to increased lipid peroxidation. *Anticancer Res* 15: 1241-1246, 1995
- 18) Kim EJ, Cho HJ, Kim SJ, Kang Y-H, Ha Y-L, Park JHY. Effect of conjugated linoleic acid on the proliferation of the human colon cancer cell line, HT-29. *Korean J Nutrition* 34: 894-904, 2001
- 19) Oh YS, Kim EJ, Kim JW, Kim WK, Lee HS, Yoon JH. The effect of conjugated linoleic acid and its isomers on the proliferation of prostate TSU-Pr1 cancer cells. *Korean J Nutrition* 35: 192-200, 2002
- 20) Park HS. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. *Korean J Nutrition* 33: 556-565, 2000
- 21) Oh YS, Kim EJ, Lee SG, Chung C-K, Kang I-J, Shin HK, Park JHY. Induction of apoptosis cell death and depression of Bcl-2 protein levels by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in human prostate cancer. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1126-1133, 2002
- 22) McCarty MF. Activation of PPAR gamma may mediated a portion of the anticancer activity of conjugated linoleic acid. *Medical Hypothesis* 55: 187-188, 2000

- 23) Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 16: 3-34, 1995
- 24) Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76: 1005-1026, 1996
- 25) Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-787, 1999
- 26) Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat* 47: 283-293, 1998
- 27) Beserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79: 927-930, 1995
- 28) Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hurban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272, 1997
- 29) Mishra L, Bass B, Ooi B, Sidawy A, Korman L. Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancer. *Growth Horm IGF Res* 8: 473-479, 1998
- 30) Renehan AG, Painter JE, O'Halloran D, Atkins WS, Potten CS, O'Dwyer ST, Shalet SM. Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3402-3408, 2000
- 31) Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Tokenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein-3 by p53. *Nature* 377: 646-649, 1995
- 32) Kim EJ, Jun J-G, Park HS, Kim SM, Ha YL, Park JHY. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of Caco-2 colon cancer cells: possible mediation by oleamide. *Anticancer Res* 22: 2193-2198, 2002
- 33) Kim EJ, Kim WY, Kang YH, Ha YL, Bach LA, Park JHY. 2000. Inhibition of Caco-2 cell proliferation by (n-3) fatty acids: possible mediation by increased secretion of insulin-like growth factor binding protein-6. *Nutr Res* 20: 1409-1421
- 34) Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 536-537.
- 35) Jansen M, van Schaik FM, van Tol H, Van den Brande JL, Sussenbach JS. Nucleotide sequences of cDNAs encoding precursors of human insulin-like growth factor II (IGF-II) and an IGF-II variant. *FEBS Lett* 179: 243, 1985
- 36) Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunological Methods* 89: 271-277.
- 37) Kim EJ, Kang YH, Schaffer BS, Bach LA, MacDonald RG, Park JH. Inhibition of Caco-2 cell proliferation by all-trans retinoic acid: role of insulin-like growth factor binding protein-6. *J Cell Physiol* 190: 92-100, 2002
- 38) Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park JH. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: A possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86: 549-555, 2001
- 39) O'Shea M, Stanton C, Devery R. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res* 19: 1953-1959, 1999
- 40) Underwood LE. Nutritional regulation of IGF-I and IGFBPs. *J Pediatr Endocrinol and metab* 9: 302-312, 1996
- 41) Zarrilli R, Pignata S, Romano M, Gravina A, Casola S, Bruni CB, Acquaviva AM. Expression of insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-I receptor during proliferation and differentiation of CaCo-2 human colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 5: 1085-1091, 1994
- 42) Yu Y, Correll PH, Vanden Heuvel JP. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR gamma-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1581: 89-99, 2002
- 43) Oguchi S, Walker WA, Sanderson IR. Profile of IGF-binding proteins secreted by intestinal epithelial cells changes with differentiation. *Am J Physiol* 267: G843-G850, 1994
- 44) Hoeflich A, Yang Y, Huber S, Rascher W, Keopf G, Blum WF, Heinz-Erian P, Kolb HJ, Kiess W. Expression of IGFBP-2, -3, and -4 mRNA during differentiation of Caco-2 epithelial cells. *Am J Physiol* 271: E922-E931, 1996
- 45) Park JH, Corkins MR, Vanderhoof JA, Caruso NM, Hrbek MJ, Schaffer BS, Slentz DH, McCusker RH, MacDonald RG. Expression of insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding proteins during Caco-2 cell proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* 166: 396-406, 1996
- 46) Kim EJ, Schaffer BS, Kang YH, Macdonald RG, Park JH. Decreased production of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-6 by transfection of colon cancer cells with an antisense IGFBP-6 cDNA construct leads to stimulation of cell proliferation. *J Gastroenterol Hepatol* 17: 563-570, 2002
- 47) Miraki-Moud F, Ooi B, Sidawy A, Korman L. Role of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) stimulates proliferation and decreases apoptosis in Caco-2 colon cancer cells. *Endocr Soc 83rd Annu Meet Progr Abstr*, 196, 2001
- 48) Kim EJ, Holthuizen PE, Park HS, Ha YL, Jung KC, Park JHY. Trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G357-G367, 2002