

## 쥐에서 식이에 첨가한 n-3 PUFA 함량에 따라 대장 암화과정에 미치는 영향\*

박현서<sup>§</sup> · 광혜경 · 김민석

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

### Effect of Different Amount of Dietary n-3 PUFA on Colon Carcinogenesis in DMH-treated Rats\*

Park, Hyun-Suh<sup>§</sup> · Kwak, Hye-Kyoung · Kim, Min-Seok

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

#### ABSTRACT

The objective of the study was to observe the effect of n-3 PUFA on cell proliferation and apoptosis by determining mRNA and protein of COX-2 and eicosanoid product and the mRNA and protein of Bax and Bcl-2 related to apoptosis in colon carcinogenesis of 1,2- dimethylhydrazine (DMH)-treated rats. Ninety male Sprague Dawley rats weighing about 170g were divided into 3 groups, control and n-3 PUFA supplemented groups (FO group: 6.2 mmoles n-3 PUFA; 2FO group: 12.4 mmoles n-3 PUFA) and fed experimental diet for 14 weeks. All rats were intramuscularly injected with DMH 15 mg/kg twice a week for 6 weeks to deliver total dose of 180 mg/kg body weight. Compared with the control group, 6.2 mmoles n-3 PUFA significantly reduced the levels of mRNA and protein expression of COX-2 and 2-series eicosanoids (TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>) and decreased cell proliferation in colonic mucosa. However, high levels of n-3 PUFA supplementation significantly increased the levels of mRNA and protein expression of COX-2, TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>, and increased cell proliferation which was similar level to that of control group. Compared with the control group, n-3 PUFA, regardless of the amount, significantly increased apoptotic index in colonic mucosa. Western blot and RT-PCR analyses showed that the levels of mRNA and protein expression of Bax were significantly increased by 6.2 mmoles n-3 PUFA, but decreased by 12.4 mmoles n-3 PUFA. The analyses also showed the levels of mRNA and protein expression of Bcl-2 were significantly reduced by 6.2 mmoles n-3 PUFA, but increased by 12.4 mmoles n-3 PUFA. The ratio of Bcl-2/Bax in mRNA and protein was significantly reduced by 6.2 mmoles n-3 PUFA but increased by 12.4 mmoles n-3 PUFA. Overall, these results indicate that n-3 PUFA could be effective in preventing colon carcinogenesis by reducing cell proliferation with lower level of COX-2 and 2-series eicosanoid, and increasing apoptosis by inducing pro-apoptotic gene, Bax and inhibiting anti-apoptotic gene, Bcl-2 in the colonic mucosa of DMH-treated rats. However, high level of n-3 PUFA supplementation could stimulate colon carcinogenesis by increasing cell proliferation and inhibiting apoptosis. (*Korean J Nutrition* 38(10): 807~816, 2005)

KEY WORDS : n-3 PUFA, cell proliferation, apoptosis, COX-2, Bax, Bcl-2, eicosanoid.

## 서 론

역학조사에 의하면 n-3 polyunsaturated fatty acid (P-

UFA)를 많이 섭취하는 Greenland Eskimo에서 대장암의 발생률이 유의하게 낮았고, 동물 연구에서도 포화지방산을 첨가한 사료보다 n-3 PUFA를 첨가한 사료로 사육한 동물에서 대장암 발생률이 유의하게 더 낮았다고 보고되었다.<sup>1,2)</sup> 그러나 최근 역학보고에 의하면 비교적 지방섭취량이 적은 아시아 지역의 주민에서는 생선류 섭취가 약간 높을 때는 대장암 위험도가 줄어드는 경향을 보였으나 더 높을 때는 그러한 경향이 나타나지 않았으며, 오히려 우유 및 유제품이나 곡류, 과일, 채소 및 전분 섭취가 높은 사람에 비하여 생선이나 해산물을 많이 섭취하는 식이패턴을 가진

접수일 : 2005년 10월 20일

채택일 : 2005년 12월 16일

\*Supported by a grant No. R01-1999-000-00166-0 (2004) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : hspark@khu.ac.kr

사람에서 대장암 발병위험율이 증가하는 경향을 보였다고 하였다.<sup>3,4)</sup>

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid (AA)가 eicosanoids로 대사되는 과정을 촉매하는 rate-limiting enzyme이다.<sup>5)</sup> COX의 isoenzymes중 COX-2는 AA로부터 PGE2와 TXA2를 유도하여 세포증식에 관여한다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 병태 생리학적 상태에서 apoptosis가 감소되면 변이된 세포의 증식이 증가되므로 이로 인해 암화과정은 더욱 진전된다.<sup>6-8)</sup> Reed<sup>9)</sup>의 보고에서는 Bcl-2는 anti-apoptotic 인자로서 세포사멸을 조절한다고 하였다. Siddiqui 등<sup>10)</sup>의 연구에 의하면 n-3 PUFA가 암세포의 apoptosis를 유도한다고 보고하였으며, 또한 n-3 PUFA가 대장기간, 전립선, 유선 등의 암세포에서 세포증식을 억제하였다고 하였다.<sup>6,11)</sup> 역학조사에 의하면 생선이나 해산물을 많이 섭취하여도 대장암 발병율이 높을 수도 있다는 보고가 있었고,<sup>3)</sup> 동물 연구에서도 어유로 사육하여도 총 지방공급량이 높으면 대장암 발생율이 높았다고 보고되었으나<sup>12)</sup> 그에 관한 생화학적 기전은 발표되지 않아서 본 연구에서는 일단 총지방량은 같아도 n-3 PUFA 첨가량을 두배의 수준으로 다르게 제조한 실험식으로 동물을 장기간 사육하여 n-3 PUFA 첨가량에 따라 대장 암화과정의 세포증식과 apoptosis에 미치는 영향을 비교하고자 생화학적 기전을 살펴보았다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험계획

평균 체중 160~170 g인 Sprague Dawley 중 수컷 쥐 (Orient, Seoul, Korea) 90마리를 체중에 따른 난괴법으로 3군으로 분류하였다. 실험군은 대조군과 어유의 함량에 따라 2군, 즉 FO군 (n-3 PUFA: 6.2 mmole)과 2FO군 (n-3 PUFA: 12.4 mmole)으로 나누었으며, 동물은 실험식으로 14주간 사육하였다. 화학적 발암원은 DMH (1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, 99% Acros Organics, 306-37-6, New Jersey, USA) 1.5g을 0.9% saline 100 ml에 용해시킨 후 1M NaOH로 pH 6.7이 되도록 조절하여 3군 모두에 투여하였으며, 좌, 우 대퇴근에 교대로 주 2회씩 체중 kg당 DMH 15 mg을 6주간 투여하여 총 투여량이 180 mg/kg이 되도록 근육 주사하였다.

### 2. 실험식이

대조군 (Control)의 실험식은 총 식이무게 1 kg 중 casein 200 g; corn starch 562 g; fat 145 g (beef tallow

**Table 1.** Composition of linoleic acid and n-3 fatty acids in experimental groups

Fatty acids	Experimental groups		
	Control	FO <sup>1)</sup>	2FO
	g/100 g diet		
C18:2	1.94g	1.94 g	1.94 g
n-3 fatty acids (C20:5 + C22:6)	-	2.00 g	4.00 g

C18:2 = 1.94 g (6.93 mmole); n-3 fatty acids = 2 g (6.2 mmole); 4 g (12.4 mmole)

<sup>1)</sup>Fish oil contains 6.58% (w/w) EPA and 29.11% (w/w) DHA.

114.7 g, corn oil 30.3 g); L-methionine 30 g;  $\alpha$ -cellulose 37 g; AIN-97 mineral mixture 40 g; AIN-97 vitamin mixture 10 g; choline bitartrate 3 g으로 구성되었다. 그러나 FO군과 2FO군에서는 대조군에서와 일반적인 식이구성은 같게 하였으나 FO군에서는 beef tallow 57.5 g, fish oil 56 g, corn oil 31.5 g을 혼합하였고, 2FO군에서는 fish oil 112.2 g, corn oil 32.8 g을 혼합하여 총 지방량이 145 g이 되게 조절하였다. 각 실험식의 linoleic acid 함량은 똑같이 조절하였으며 총 n-3 PUFA 함량은 Table 1에서와 같게 하였다. 이때 fish oil은 동원산업 식품연구소에서 제공받아 사용하였다. 실험식은 매 2주마다 제조하였으며, 제조한 식이는 -30°C 냉동고에 보관하였다. 동물 사육실은 12hr dark-light cycle로 조절되었고 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였고, 체중은 주 2회 같은 시간에 측정하였다.

### 3. 시료제취

14주간의 실험기간이 끝난 후 overnight fasting시킨 쥐를 ethyl ether로 마취시켜 대장을 절개하고 PBS buffer로 적신 솜으로 조심스럽게 대장의 내용물을 제거한다. 대장의 distal 끝부분에서 1.5 cm 위쪽 부분의 조직을 1 cm 취하여 여과지에 붙여 70% ethanol과 10% formalin 용액에 각각 fix시킨 다음 세포증식과 apoptosis를 각각 측정하기 위해 냉장 보관하였다. TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량 측정, 인지질의 지방산조성 분석, mRNA와 protein 추출에 사용하기 위하여 대장점막 조직 (mucosa)을 채취하였으며, liquid nitrogen에 급속 냉동하여 -70°C 냉동고에 저장하였다. 이때 특히 mRNA 추출에 이용될 조직은 RNase로부터 보호되어야 하므로 해부에 이용되는 모든 기구는 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate: RNase inhibitor)에 24시간 담구워 두었다가 121°C, 30분간 autoclave하였다. Autoclave 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 30분간 소독한 다음 absolute ethanol로 세척 후 사용하였다.

#### 4. 대장상피세포의 Cell proliferation (세포증식) 측정

대장상피세포의 세포증식을 측정하는데 사용될 쥐는 체중 1 kg당 5 mg의 BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 복강에 주사한 후 정확히 1시간 후에 대장을 절개하였다. PBS buffer로 적신 솜으로 대장 상피조직을 닦고 Gavrieli 등<sup>13)</sup>의 방법을 이용하여 대장의 distal 끝부분으로부터 1.5 cm 위쪽 부분의 조직을 1 cm 정도 잘라서 여과지에 고정시켜 70% ethanol 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다가 paraffin block을 만든 뒤 조직을 4 μm로 절편한 후 ion coated slide에 고정시켰다. BrdU staining kit (Zymed, #93-3943, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 BrdU가 DNA에 결합한 정도를 염색한 후 광학 현미경을 사용해 세포증식 정도를 비교하였다. 이때 각 마리당 온전한 10개의 crypt를 선택하여 염색된 세포를 세어서 한 군의 평균을 계산하였다. 이때 crypt height는 crypt의 하단부터 상단까지 이르는 총 세포수를 세워서 10개 crypt의 평균값을 계산한 것이다. Labeling index (LI)는 세포증식이 일어난 세포의 DNA에 BrdU가 유입되며 이를 대조 염색하여 염색된 세포를 labeled cell이라 하며, LI는 한 crypt 세포 중 labeled cell의 수효를 백분율로 나타낸 것으로 LI 수치가 높을수록 세포증식이 증가했음을 나타낸다. Proliferative zone 값이란 crypt내에서 세포증식이 진행된 범위를 나타낸 것으로 이 값이 높을수록 세포증식이 활발하다는 것을 의미한다. 가장 높은 위치에 염색된 세포를 crypt height로 나누어 백분율로 나타낸 값으로 수치가 높을수록 세포증식이 증가했다는 것을 의미한다.

#### 5. 대장상피세포의 Apoptosis 측정

대장상피세포의 apoptosis를 측정하기 위해서 세포증식 측정을 위해서 준비한 경우와 같게 대장의 distal 끝부분으로부터 1.5 cm 위쪽 부분의 조직을 약 1 cm 잘라서 여과지에 고정시켜 10% formalin 용액에 넣어 4°C에서 보관하였다가 paraffin block을 만든 뒤 조직을 4 μm로 절편한 후 ion coated slide에 고정시켰다. 세포의 DNA strand break와 3'-OH 말단의 TdT (terminal deoxynucleotide transferase)의 결합에 기초를 둔 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 방법을 이용한 ApoTag Peroxydase In Situ Apoptosis Detection kit (Intergen, NY, USA)를 사용하여 염색한 후 광학 현미경으로 세포의 변화 정도를 비교하였다. 세포증식 측정할 때와 같게 각 마리당 온전한 10개의 crypt를 선택하여 염색된 세포를 세어

서 한 군의 평균을 계산하였다.

#### 6. 대장점막의 thromboxane (TX)<sub>B2</sub>와 prostaglandin (PG)<sub>E2</sub> 함량 측정

대장점막의 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 분석<sup>14)</sup>을 위해 대장점막조직 50 mg을 indomethacin을 첨가한 0.05M Tris buffer 2 ml을 넣어 균질화 하여 37°C humidified chamber에서 30 분간 incubation한 후 absolute ethanol을 첨가하여 ethanol 농도가 15%가 되도록 한다. 1M citric acid를 첨가하여 산성상태 (pH 3.0~3.5)로 만들어 4,000 × g, 4°C에서 15 분간 원심분리한 후 상층액을 취한다. TXB<sub>2</sub> 분석을 위해서는 상층액을 전 처리한 Amprep C2 column (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)에 loading한 후 methylformate를 통과시켜 점막의 TXB<sub>2</sub>를 추출하여 질소가스로 건조시켰다. 그리고 PGE<sub>2</sub> 분석을 위해서는 상층액을 Amprep C18 column (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)에 loading한 후 ethyl acetate를 통과시켜 점막의 PGE<sub>2</sub>를 추출하여 질소가스로 건조시켰다. 각각을 일정량의 assay buffer에 적절하게 희석시켜 preformed 된 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>를 각각 enzyme immunoassay kits system (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, UK)을 사용해 통상적인 방법으로 분석하였다.

#### 7. 대장점막의 지방산 조성

대장점막을 일정량 취하고 phosphate buffer를 첨가하여 20% homogenate를 만들었다. 이것을 300~500 μl를 취한 후 Lepage와 Roy<sup>15)</sup>의 one-step methylation 방법에 따라 methylation하였다. Fatty acid methyl ester (FAME)는 gas chromatography (Hewlett Packard, 5890 II, USA)를 이용하여 분석하였으며, volume은 SP-2330 fused silica capillary column (Supelco, Bellefonte PA, USA)을 사용하였다. 각 지방산의 retention time은 각 지방산의 표준 지방산과 비교하여 확인하여 그 양을 백분율로 표시하였다.

#### 8. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

대장점막의 COX-2, Bax, Bcl-2의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 재빠르게 끊어낸 대장점막 50~100 mg에 다 1 ml의 TRIzol® reagent (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 Chomczynski와 Sacchi<sup>16)</sup>에 의해 개발된 single-step RNA isolation 방법을 이용

**Table 2.** Primer sequences used for PCR amplification

MRNA (Expected size)	Primer sequences (in 5'-3' direction)
COX-2 (376 bps)	forward-AGC AGG CTC ATA CTG ATA GG backward-ATT GGA ACA TTC CTT CCC CC
Bax (310 bps)	forward-AGG CGA ATT GGC GAT GAA CTG G backward-TCC CGA AGT AGG AAA GGA GG
Bcl-2 (227 bps)	forward-AGC GTC AAC AGG GAG ATG TAC C backward-AGG TAT GCA CCC AGA GTG ATG C
GAPDH (384 bps)	forward-AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG G backward-TCA CAA ACA TGG GGG CAT CAG C

하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 1% agarose gel에서 전기영동하여 18S와 28S의 밴드를 확인하였으며, 파장 260 nm와 280 nm에서 optical density를 측정하여 그 ratio가 1.7~2.1 범위내에 속하는지 확인하고, 각 sample의 260 nm의 optical density 값을 이용해 RNA를 정량하였다. RNA 1 µg을 RNA PCR kit (ver. 2.1, Takara Shuzo Inc., Otsu, Japan)를 이용해 cDNA (1 µg RNA/20 µl)로 전환하여 Table 2에서와 같이 각 유전자에 맞게 제작된 primer를 이용하여 최적 조건에서 thermal cycler (Applied Biosystems, GeneAmp PCR system 9600, CA, USA)로 PCR을 수행하였다. 각 PCR cycle의 반응온도는 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation하여 35 cycle 시행하였다. PCR primer sets and PCR amplification products의 size는 Table 2에서와 같다. 그리고 PCR product 5 µl를 1% agarose gel에서 전기영동하여 UV상에서 Polaroid film GelCam으로 사진을 찍어 Image densitometer (Bio-Rad Laboratories, GS-700, LA, USA)를 이용하여 상대적인 농도를 측정하였다. mRNA 수준은 glyceraldehyde dehydrogenase mRNA 수준과 비교해서 표준화하였고, 대조군 (Control)의 수준을 100%로 정하여 상대적량을 계산하였다.

### 9. Western blot analysis

대장점막의 COX-2와 Bax, Bcl-2의 단백질 수준을 측정하기 위해 50~100 mg의 대장점막을 ice-cold lysis buffer (20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>3</sub> 함유)에 넣고 10초동안 균질화하였다. 사용한 protease inhibitors로서 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain,

10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamidine HCl, 0.2 mM PMSF를 사용하였으며, 10분간 원심분리 (13,000 × g)하여 침전물을 제거한 후 단백질 함량을 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. 용액 중 단백질 80~120 µg을 취해 sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동 한 후 electrotransfer를 통해 nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 단백질을 이동시켰다. 그리고 blocking solution (5% non-fat milk in TBS-T: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 membrane을 1시간 동안 blocking한 후 각각 anti-COX-2, Bax와 Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, 1 : 1,000) 또는 β-actin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA, 1 : 2,000)와 같이 1시간 동안 incubation 하였고, 다시 이 blot를 anti-mouse 또는 anti-rabbit HRP-conjugated antibody (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)와 같이 incubate한 후 signal을 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 chemiluminescence 방법으로 감광하였다. 각 band의 함량은 Image Densitometer (Bio-RAD Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였고, 모든 sample의 발현수준은 β-actin에 맞추어 표준화하였으며, 그리고 같이 실행한 batch의 sample의 상대적량은 대조군의 수준을 100%로 간주하고 그 함량 (%)을 계산하였다.

### 10. 통계분석

실험결과는 Statistic Analysis System (SAS) program (version 8.1)을 이용하여 one-way ANOVA로 분석하고 평균 ± 표준편차 (mean ± SD)로 표시하였다. General linear model (GLM)을 이용하여 Duncan's multiple test로 비교하였고, p < 0.05 유의수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

DMH로 대장암을 유발시키고 n-3 PUFA를 식이에 첨가한 실험식으로 14주간 사육한 후 n-3 PUFA의 함량에 따라 대장의 암화과정에 미치는 생화학적 기전을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. 식이섭취량과 체중증가량

식이에 첨가한 n-3 PUFA 함량에 따라 동물의 식이섭취량과 체중증가에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

**Table 3.** Food intake and body weight gain in rats during experimental period

Groups	Food intake	Initial body weight	Final body weight	Total weight gain
	g/day	g	g	g/day
Control	39.60 ± 9.74	210.28 ± 14.95	599.52 ± 71.11	3.94 ± 0.71
FO	38.60 ± 5.25	212.37 ± 12.99	599.85 ± 61.43	3.95 ± 0.58
2FO	38.01 ± 5.10	212.28 ± 12.35	595.46 ± 54.02	3.91 ± 0.49

Number of animals = 30 per group  
Values are means ± SD.

**Table 4.** Effect of dietary supplementation of n-3 PUFA on cell kinetic indices of the colonic mucosa in DMH-treated rats

Groups	Circumference	Crypt height <sup>1)</sup>	Labeling index <sup>2)</sup>	Proliferative zone <sup>3)</sup>
	(No. of cells)	(No. of cells)	(%)	(%)
Control	27.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	32.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	35.7 ± 3.3 <sup>a</sup>	57.3 ± 2.1 <sup>ab</sup>
FO <sup>4)</sup>	22.2 ± 2.3 <sup>c</sup>	24.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	27.0 ± 6.0 <sup>b</sup>	36.0 ± 3.0 <sup>c</sup>
2FO <sup>5)</sup>	24.7 ± 3.7 <sup>ab</sup>	32.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	32.7 ± 5.4 <sup>ab</sup>	59.8 ± 4.6 <sup>a</sup>

Values are means ± SD. N = 6  
Values with different superscripts were significantly different at p < 0.05.

<sup>1)</sup>Crypt height = total # of cells in each crypt

<sup>2)</sup>Labeling index = (total # of labeled cells/crypt height) × 100

<sup>3)</sup>Proliferative zone = (position of highest labeled cell/crypt height) × 100

<sup>4)</sup>The experimental diet of FO group contains 2 g (6.2mmoles) n-3 PUFA per 100 g.

<sup>5)</sup>The experimental diet of 2FO group contains 4 g (12.4mmoles) n-3 PUFA per 100 g.

## 2. 대장상피세포의 세포증식

식의 n-3 PUFA 함량에 따라 세포증식에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다 (Table 4).

### 1) Circumference

대장상피세포의 crypt를 절단하여 circumference의 세포수는 대조군에 비해 FO군에서는 유의하게 감소하였으나 2FO군에서는 대조군과 유의한 차이가 없었다.

### 2) Crypt height

마찬가지로 대조군과 비교해서 FO군에서는 유의하게 감소하였으나 2FO군에서는 유의한 차이가 없었다.

### 3) Labeling index (LI)

대조군에 비해 FO군의 LI 값은 유의하게 감소하였으나 2FO군에서는 다시 증가하였는데 유의적인 차이는 아니었다.

### 4) Proliferative zone (PZ)

대조군에 비해 FO군에서는 유의하게 감소하였으나 2FO군에서는 다시 유의하게 증가하여 대조군과 비슷한 수준이었다.

## 3. 대장점막의 Thromboxane (TX)<sub>2</sub> 및 prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> 함량

대장점막의 eicosanoid 함량을 비교해 본 결과 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량 모두 대조군에 비해 FO군에서 유의하게 감소하였으며, 2FO군은 대조군과 FO군에 비해 오히려 유의하게 증가되었다 (Table 5).

**Table 5.** Effect of high level of n-3 PUFA on TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> levels in colonic mucosa of DMH-treated rats

Groups	TXB <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>
	ng/g mucosa	
Control	268 ± 12 <sup>b</sup>	295 ± 11 <sup>b</sup>
FO <sup>1)</sup>	230 ± 11 <sup>c</sup>	251 ± 6 <sup>c</sup>
2FO <sup>2)</sup>	303 ± 14 <sup>a</sup>	316 ± 5 <sup>a</sup>

Values are means ± SD. N = 7

Values with different superscripts were significantly different at p < 0.0001.

<sup>1)</sup>The experimental diet of FO group contains 2 g (6.2mmole) n-3 PUFA per 100 g.

<sup>2)</sup>The experimental diet of 2FO group contains 4 g (12.4mmole) n-3 PUFA per 100 g.

**Table 6.** Effect of n-3 PUFA supplementation on the relative % of major fatty acids in the colonic mucosa of DMH-treated rats

Groups	AA	EPA	DHA
	%	%	%
Control	1.10 ± 0.55 <sup>a</sup>	ND	ND
FO	0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.04 <sup>b</sup>	3.24 ± 0.09 <sup>b</sup>
2FO	0.30 ± 0.07 <sup>b</sup>	3.29 ± 0.80 <sup>a</sup>	6.87 ± 1.81 <sup>a</sup>

Values are means ± SD. N = 6

Values with different superscripts were significantly different at p < 0.05.

Fatty acid composition was expressed as the relative % of total fatty acid methyl ester. ND = Not detected

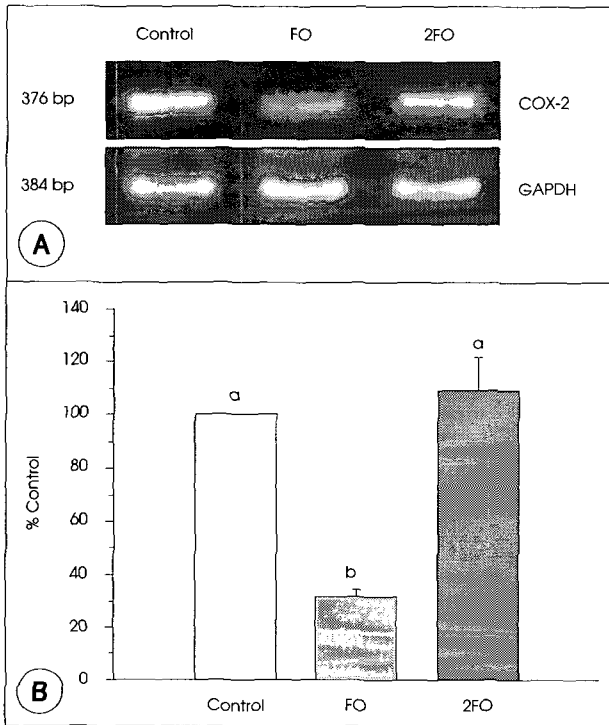
## 4. 대장점막의 주요 지방산함량

대장점막의 총 인지질에 유입된 arachidonic acid (C20 : 4)는 대조군에 비해 FO와 2FO군에서 유의하게 감소하였으나 두군 간에 차이는 나타나지 않았다. EPA (C20 : 5)와 DHA (22 : 6)는 대조군에서는 검출되지 않았으나 FO군에 비해 2FO군에서 유의하게 2배 이상 더 높았다 (Table 6)

**Table 7.** Effect of different amount of n-3 PUFA on apoptotic index in colonic mucosa of DMH-treated rats

Groups	N	Apoptotic index (%)
Control	6	40.52 ± 7.69 <sup>b</sup>
FO	6	57.39 ± 3.24 <sup>a</sup>
2FO	6	54.36 ± 0.86 <sup>a</sup>
P-value		p < 0.05

Values are means ± SD. Values with different superscripts were significantly different at p < 0.05.



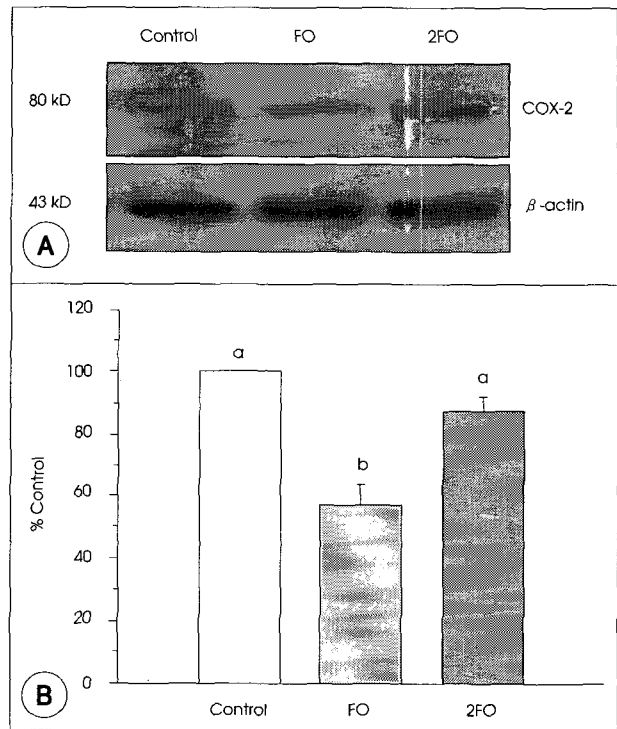
**Fig. 1.** Effect of dietary supplementation of n-3 PUFA on COX-2 mRNA levels in the colonic mucosa of DMH-treated rats. A : Representative RT-PCR analysis for COX-2 mRNA. B : The data for COX-2 in both control and treated groups were normalized by comparing them to the respective mRNA expression levels of GAPDH and the control level were set at 100%. Bars with different alphabet were significantly different at p < 0.05 (Mean ± SE for 6 samples in each group).

**5. 대장상피세포의 Apoptosis**

대장상피세포를 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 결합에 기초를 둔 TUNEL 염색으로 apoptotic index를 살펴본 본 결과, 대조군에 비해 2FO군과 FO군에서 1.3~1.4배이상 유의하게 증가하였다. 그러나 FO군과 2FO군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 7).

**6. 대장점막의 COX-2, Bax, Bcl-2의 mRNA와 단백질 발현**

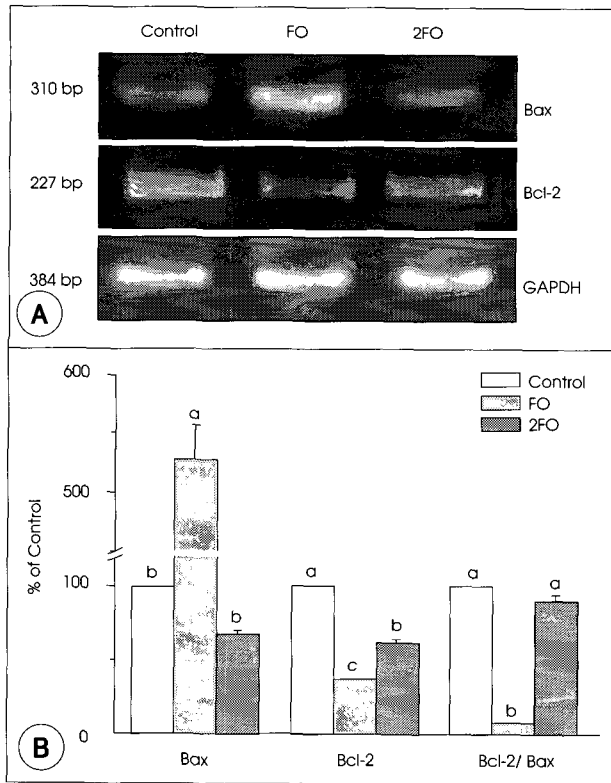
대장점막의 COX-2, Bax, Bcl-2의 mRNA와 단백질 발현 함량을 비교하기 위해서 RT-PCR과 Western blots을 수행하여 Fig. 1~4에서 각각 비교하였다.



**Fig. 2.** Effect of dietary supplementation of n-3 PUFA on COX-2 protein levels in the colonic mucosa of DMH-treated rats. A : Representative Western blots analysis for COX-2 protein. B : The data for COX-2 in both control and treated groups were normalized by comparing them to the respective protein expression levels of beta-actin and the control level were set at 100%. Bars with different alphabet were significantly different at p < 0.05 (Mean ± SE for 6 samples in each group).

대장점막에서 eicosanoid 합성을 조절하는 COX-2 mRNA (Fig. 1) 함량은 대조군에 비해 FO군에서 약 32%로서 유의하게 감소하였으며, 2FO군에서는 오히려 FO군에서 보다 약 3.4배 유의하게 증가하여 대조군보다 더 높았으나 유의한 수준은 아니었다. 마찬가지로 단백질 (Fig. 2) 발현 함량은 대조군에 비해 FO군에서 약 57% 수준으로 유의하게 감소하였으며 2FO군에서는 오히려 FO군보다 유의하게 증가하여 대조군의 수준과 유의한 차이를 보이지 않았다.

Apoptosis를 유도하는 pro-apoptotic gene인 Bax mRNA 수준을 살펴본 결과, 대조군에 비해 FO군에서 약 5.3배 유의하게 증가하였으나 2FO군에서는 대조군보다도 오히려 유의하게 감소되어 대조군의 68% 수준으로 낮았다 (Fig. 3). 반면에 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic gene인 Bcl-2 mRNA 수준은 대조군에 비해 FO군에서는 37%수준으로 유의하게 감소되었고 2FO군에서는 대조군의 62% 수준으로 감소되었으나 FO군보다 유의하게 더 높았다. 다음은 Bax 단백질 발현 함량은 대조군에 비해 FO군에서는 약 1.6배 유의하게 더 높았으며, 2FO군에서는 FO군에 비

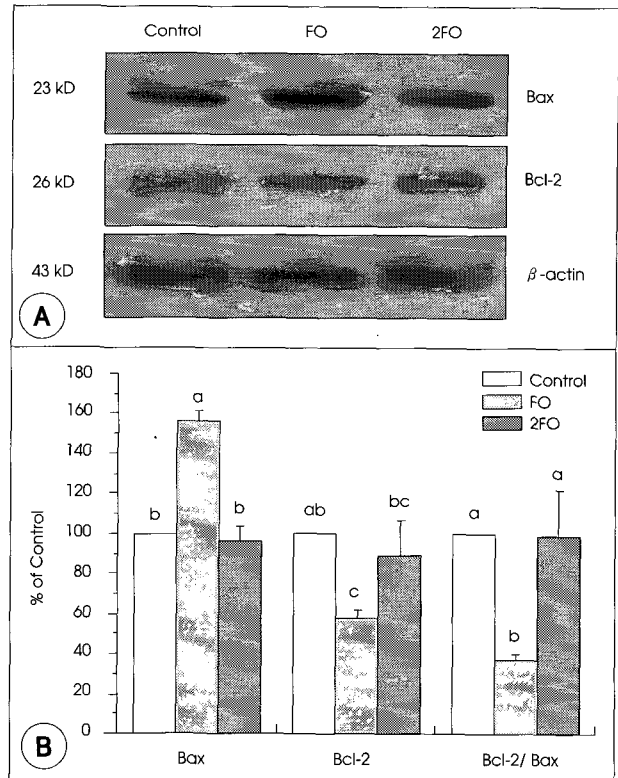


**Fig. 3.** Effect of dietary supplementation of n-3 PUFA on Bax and Bcl-2 mRNA levels in the colonic mucosa of DMH-treated rats. A : Representative RT-PCR analysis for Bax and Bcl-2 mRNA. B : The data for Bax and Bcl-2 in both control and treated groups were normalized by comparing them to the respective mRNA expression level of GAPDH and the control level were set at 100%. Bars with different alphabet were significantly different at  $p < 0.05$  (Mean  $\pm$  SE for 6 samples).

해 유의하게 더 낮았으며 대조군과 거의 비슷한 수준으로 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4). 반면에 Bcl-2 단백질 수준은 대조군에 비해 FO군에서는 58%수준으로 유의하게 감소하였고, 2FO군에서는 FO군보다 증가하긴 하였으나 유의한 수준은 아니었으며, 대조군보다 낮은 경향을 보였다. 다음은 Bcl-2 mRNA와 Bax mRNA의 상대적 함량을 비교하기 위해서 Bcl-2/Bax ratio를 계산하였을 때 대조군에 비해 FO군이 유의하게 낮았으며 2FO군은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 Bcl-2와 Bax 단백질의 상대적 비율 (Bcl-2/Bax)에서도 대조군에 비해 FO군에서는 유의하게 감소하였고 2FO군에서는 대조군과 비슷한 수준이었다.

### 고 찰

본 연구에서는 식이에 첨가한 n-3 PUFA의 함량에 따라 대장의 암화과정에 미치는 영향을 비교하였다. 세포증식은 암화과정의 진행에 있어서 필수적으로 발생하는 과정



**Fig. 4.** Effect of dietary supplementation of n-3 PUFA on Bax and Bcl-2 protein levels in the colonic mucosa of DMH-treated rats. A : Representative Western blots analysis for Bax and Bcl-2 protein. B : The data for Bax and Bcl-2 in both control and treated groups were normalized by comparing them to the respective protein expression levels of  $\beta$ -actin and the control level were set at 100%. Bars with different alphabets were significantly different at  $p < 0.05$  (Mean  $\pm$  SE for 6 samples).

인데,<sup>17)</sup> 세포증식이 촉진될 때는 증식되는 세포의 수가 사멸되는 세포 수보다 더 많아져 대정점막의 crypt의 길이가 길어지게 된다. 또한, 세포증식은 식이요인의 영향을 많이 받아 세포막의 지방산 조성 및 eicosanoid의 합성에 변화를 주어 세포증식을 조절한다. 그러므로 본 연구에서는 BrdU method를 이용해 세포증식을 측정된 결과, n-3 PUFA를 6.2 mmole 첨가한 군에서는 대조군에 비해 cell kinetic indices 중 모든 parameter (circumference, crypt height, LI, PZ)가 유의하게 감소되었으나 n-3 PUFA 함량을 2배로 먹여 사육한 2FO군에서는 모두 대조군과 같은 수준으로 세포증식이 증가하였다. 한편 변병학적 상태에서 cell membrane에 자극이 전달되면 인지질로부터 arachidonic acid (AA)가 유리되어 cyclooxygenase (COX)-2에 의해 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>등의 2-series의 eicosanoids가 생성된다.<sup>5)</sup> 본 연구에서 세포막 인지질에 AA가 유입된 것을 비교하면 n-3 PUFA를 첨가한 두 군은 대조군에 비해 유의하게 감소되었던 반면에 EPA와 DHA가 유입된 것은 n-3 PUFA를 첨가한 군에서만 발견되었으며 n-3 PUFA

를 2배로 첨가한 군에서는 유의하게 더 높았다. COX는 AA에서 eicosanoids의 생성을 매개하는 rate-limiting enzyme로서 이 중에서 COX-2는 중앙축진제나 면역반응 등에 의한 발현이 빠르고, 이렇게 발현된 COX-2에 의해 AA는 eicosanoid로 대사되어 세포증식에 중요한 영향을 미친다.<sup>18)</sup> 본 연구의 결과에 의하면 대장점막의 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량 모두 대조군에 비해 n-3 PUFA 6.2 mmole를 먹인 FO군에서 유의하게 감소하였으나 12.4 mmole n-3 PUFA를 먹인 2FO군에서는 유의하게 더욱 증가하여 대조군과 FO군에 비해서 오히려 유의하게 높았다 (Table 5). 이와 마찬가지로 COX-2의 mRNA와 단백질 발현도 FO군에서 유의한 감소를 보였지만 2FO군에서는 COX-2의 mRNA와 단백질 발현이 오히려 유의하게 증가되었으며 세포증식도 증가되었다. 이미 보고된 바에 의하면 정상조직에 비해 암 조직에서 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub>의 함량이 높게 관찰되었다.<sup>19)</sup> 또한 중앙조직에서 COX-2의 발현이 증가되었으며 유선암 환자의 혈청내 PGE<sub>2</sub> 함량 역시 증가되었다.<sup>19-21)</sup> N-3 PUFA의 암화과정의 억제효과에 관한 보고에서도 n-3 PUFA를 투여하였을 때 대조군에 비해 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 함량이 유의하게 감소되었으며 apoptosis도 유의하게 증가하였다.<sup>6)</sup> 본 연구에서도 n-3 PUFA 6.2 mmole를 첨가한 실험식으로 사육한 쥐에서는 대장점막의 COX-2의 mRNA와 단백질 발현이 억제되어 대장점막의 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 합성도 감소되었다. 그러나 n-3 PUFA를 12.4 mmole로 많은 양을 첨가한 식으로 사육한 경우에는 오히려 대장점막의 COX-2의 mRNA와 단백질 발현이 증가하였고 2-series eicosanoid 합성도 증가하였으며 이에 따라 세포증식도 같이 증가하였다고 사료된다. 그러므로 대장의 암화과정을 억제시키기 위해 n-3 PUFA를 투여한다면 세심한 주의가 필요하며, 너무 많은 양을 투여하는 것은 역효과를 줄 수도 있다고 본다. 이와 같은 결과에 관한 기전을 밝힌 보고는 아직 없으나 본 연구에서 사용한 어유에는 불포화지방산 함량이 높아서 어유 100 g당 100 mg DL- $\alpha$ -tocopherol을 첨가하여 사용하였으나 in vivo 조직내에서는 불포화지방산과 tocopherol의 turnover가 다르기 때문에 얼마나 과산화물이 형성되었는지 측정하지를 않아서 정확하게 언급하기는 어려우나 12.4 mmole의 n-3 PUFA를 첨가한 식이를 먹었을 때는 조직내에서 더 많은 과산화물이 형성되었을 가능성이 있었을 것이고 이를 제거하는 항산화 기능을 초과하여 암화과정이 더욱 촉진되었을 가능성이 있을 수 있다고 예측하지만 현재로서는 더욱 심도 있는 연구가 요구된다.

Apoptosis는 세포주기에서 특정 세포 자체 내에 내재된

세포자사 프로그램에 의해 세포가 사멸되는 것으로 유기체로부터 손상되거나 해로운 세포를 제거하여<sup>22)</sup> 조직의 정상적인 기능이 유지되도록 해준다. 그러므로 병태 생리학적 상태에서 apoptosis가 감소되면 변이된 세포의 증식이 증가되므로 이로 인해 암화과정은 더욱 진전된다.<sup>8)</sup> 그 중에서도 mitochondria에서 Bax는 tumor cell에서 apoptosis의 증가를 수행하는 인자이고, Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 인자이다.<sup>23)</sup> 따라서 본 연구에서는 n-3 PUFA의 함량에 따라 대장상피세포의 apoptosis와 apoptosis 조절 유전자의 발현에 어느 정도로 영향을 미치는지 살펴보았다. Siddiqui 등<sup>10)</sup>의 연구에 의하면 n-3 PUFA인 EPA와 DHA가 암세포의 cell cycle의 arrest와 apoptosis를 유도한다는 연구 보고가 있다. 본 연구에서도 TUNEL method<sup>13)</sup>를 이용하여 대장상피세포의 apoptosis를 측정한 결과, 대조군에 비해 n-3 PUFA를 첨가한 두 군에서는 apoptosis가 유의하게 증가하였으며 n-3 PUFA 함량에 따른 유의한 차이는 없었다. Heimli 등<sup>11)</sup>의 연구에서는 n-3 PUFA가 간, 전립선, 유선 등의 암세포에서 Bcl-2 단백질 발현을 억제하여 세포증식을 억제하는 것으로 보고하였다. 또한, 사람의 대장암 세포에서 PGE<sub>2</sub>의 생성은 Bcl-2의 발현을 증진시키고 apoptosis를 감소시켰다고 하였다.<sup>24)</sup> 본 연구에서도 RT-PCR과 Western blots을 수행하였을 때 대장점막의 pro-apoptotic gene인 Bax의 mRNA와 단백질 수준은 대조군에 비해 n-3 PUFA 6.2 mmole 투여한 FO군에서 유의하게 그 수준이 증가되었으나 n-3 PUFA를 2배인 12.4 mmole 투여한 2FO군에서는 오히려 감소하였다. 그러나 Bax와 상반된 작용을 하는 Bcl-2의 mRNA와 단백질의 발현은 대조군에 비해 n-3 PUFA를 6.2 mmole 투여한 군에서는 발현 수준이 감소되었으나 n-3 PUFA 12.4 mmole를 투여한 군에서는 다시 증가하였다. 전체적으로 pro-apoptotic gene인 Bax와 anti-apoptotic gene인 Bcl-2의 mRNA와 단백질에서 각각 Bcl-2/Bax ratio를 비교해 보면 대조군에 비해 FO군에서는 mRNA의 Bcl-2/Bax ratio와 단백질의 Bcl-2/Bax ratio는 모두 유의하게 감소되었으나 n-3 PUFA를 12.4 mmole 투여하였을 때는 오히려 유의하게 다시 증가하여 대조군과 같은 결과를 보였다. 이와 같이 n-3 PUFA 지방산은 대장 점막세포의 COX-2의 발현을 억제시키고 이에 따라 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 생성도 감소시켜서 세포증식을 감소시킨 결과를 보였으며, 또한 Bax의 발현을 증가시키고 Bcl-2의 발현은 억제시켜 결과적으로 대장 점막의 apoptotic index를 증가시켜 암화과정을 지연시켰을 것이라고 사료된다. 그러나 2FO군에서 처럼 n-3 PUFA를 12.4 mmole 섭취하면 기대와는 다르게 오히려 COX-2의 mRNA



와 단백질이 더욱 유도되어서 2-series eicosanoid 합성도 증가되고, 이에 따라 세포증식이 더욱 증진되었다. 또한 apoptosis를 증가시키는 Bax의 mRNA와 단백질 발현은 감소되고 apoptosis를 억제시키는 Bcl-2의 mRNA와 단백질 발현은 증가되어 apoptosis가 감소하는 결과를 보였다. 그러므로 본 연구에서는 n-3 PUFA가 암화과정을 억제시키는 효과를 보였지만 너무 많은 양을 섭취하면 오히려 암화과정이 촉진될 수도 있다는 경고를 주는 결과라고 사료되며, 앞으로 대장의 암화과정을 억제시키는 n-3 PUFA의 적절량 또는 섭취의 한계치를 정하는 연구가 필요하다고 본다.

### 요약 및 결론

본 연구에서는 Sprague Dawley종 수컷 쥐에서 DMH로 대장암을 유발시킨 후 식이에 첨가한 n-3 PUFA 함량에 따라 대장의 암화과정에 어떤 영향을 미치는지 생화학적 기전을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 식이에 n-3 PUFA를 6.2 mmole 첨가하여 먹인 경우에는 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 및 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 합성이 유의하게 감소되었으며, 이에 따라 세포증식도 억제되었다. 그러나 n-3 PUFA를 12.4 mmole 첨가한 식이로 사육한 경우에는 오히려 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 및 TXB<sub>2</sub>와 PGE<sub>2</sub> 합성이 대조군보다도 더 많이 증가되었고 세포증식도 대조군과 같은 수준으로 증가하여 암화과정을 촉진하였다.

2) 식이에 n-3 PUFA를 6.2 mmole 첨가한 경우 대장 점막의 인지질의 지방산 조성중 arachidonic acid 함량은 유의하게 낮았고, EPA와 DHA 함량은 유의하게 높았으며 n-3 PUFA를 12.4 mmole 첨가한 경우에는 EPA와 DHA 함량은 2배 이상 유의하게 더 높았다.

3) 대장 상피세포의 apoptosis는 식이에 n-3 PUFA를 첨가한 함량과는 관계없이 대조군에 비해 유의하게 약 34~42% 증가하였다.

4) 식이에 n-3 PUFA를 6.2 mmole 첨가하였을 때 Bax의 mRNA와 단백질 발현은 각각 유의하게 증가되었으나 n-3 PUFA를 12.4 mmole 첨가한 경우에는 유의하게 감소되었다. 반면에 Bcl-2의 mRNA와 단백질 발현은 n-3 PUFA 6.2 mmole 첨가한 경우에 각각 유의하게 감소되었으나 n-3 PUFA를 12.4 mmole 첨가한 경우에는 오히려 증가하였다.

총괄해서, 본 연구 결과에 의하면 항암효과가 있다고 알려진 n-3 PUFA는 식이에 첨가한 함량에 따라 암화과정

에 미치는 효과가 다르게 나타났다. 그러므로 앞으로 대장의 암화과정을 억제시키는 n-3 PUFA의 적절량 또는 섭취의 한계치를 정하는 연구가 필요하다고 본다.

### Literature cited

- 1) Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Yamamura M, Hioko K, Yamamoto M. Effect of dietary eicosapentaenoic acid on AOM-induced colon carcinogenesis. *Cancer Res* 49: 4790-4794, 1988
- 2) Reddy BS, Hedges AR, Laakso K, Wynder EL. Metabolic epidemiology of large bowel cancer: fecal bulk and constituents of high-risk North American and low-risk Finnish population. *Cancer* 42(6): 2832-2838, 1978
- 3) Mizoue T, Yamaji T, Tabata S, Yamaguchi K, Shimizu E, Mine-shita M, Ogawa S, Kono S. Dietary patterns and colorectal adenomas in Japanese men: the Self-Defense Forces Health Study. *Am J Epidemiol* 161 (4): 338-345, 2005
- 4) Oh SY, Lee JH, Kim HJ. Analyses on the associations of dietary patterns with colon cancer risk. *Korean J Nutr* 37(7): 550-556, 2004
- 5) Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* 270: G393-G400, 1996
- 6) Kim KH, Park HS. Dietary supplementation of conjugated linoleic acid reduces colon tumor incidence in DMH-treated rats by increasing apoptosis with modulation of biomarkers. *Nutrition* 19: 772-777, 2003
- 7) Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A. Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis. *Toxicology Letters* 64: 569-574, 1992
- 8) Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 18: 137-153, 1995
- 9) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6, 1994
- 10) Siddiqui RA, Shaikh SR, Sech LA, Yount HR, Sillwell W, Zaloga GP. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem* 4(8): 859-871, 2004
- 11) Heimli H, Giske C, Naderi S, Drevon CA, Hollung K. Eicosapentaenoic acid promotes apoptosis in Ramos cells via activation of caspase-3 and -9. *Lipids* 37(8): 797-802, 2002
- 12) Cheah PY. Hypotheses on the etiology of colorectal cancer. An overview. *Nutr Cancer* 14: 5-13, 1990
- 13) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 14) Granstron E, Samuelson B. In: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. JC Frolich, ed. Raven Press, New York, pp.1-13, 1981
- 15) Lepage G, Roy CC. Direct trans-esterification of all class of lipid in a one step reaction. *J Lipid Res* 27: 225-230, 1986
- 16) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159, 1987

- 17) Butterworth BE, Goldsworthy TL. The role of cell proliferation in multistage carcinogenesis. *Cell Proliferation* 37: 683-687, 1991
- 18) Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 33: 179-207, 1996
- 19) Kim KH. Effect of dietary supplementation of conjugated linoleic acid on tumor incidence and colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. Ph.D dissertation, Kyung Hee University, Feb., 2000
- 20) Song JH, Park HS, Seo ES, Kim DY. Effect of different dietary fats on colon tumor incidence and in vivo cell proliferation in colonic mucosa of MNU-treated rats. *Korean J Nutr* 27 (6): 552-562, 1994
- 21) Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Mukherjee P. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 11 (3): 328-339, 2004
- 22) Bedi A, Pasrica PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbaauer BA, Hamilton SR, Jones RJ. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 1811-1816, 1995
- 23) Roz L, Andriani F, Ferreira CG, Giaccone G, Sozzi G. The apoptotic pathway triggered by the protein in lung cancer cell lines is not affected by Bcl-2 or Bcl-x (L) overexpression. *Oncogene* 23 (56): 9102-9110, 2004
- 24) Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cell. *Cancer Res* 58: 362-366, 1998