

인간 대장암 세포주에서 sulindac sulfide 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 군의 분석

신승화 · 김종식*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과

Received July 5, 2007 / Accepted July 18, 2007

Analysis of Differentially Expressed Genes by Sulindac Sulfide in Human Colorectal Cells.

Seung-Hwa Shin and Jong-Sik Kim*. Dept. of Biological Sciences, Andong National University, Andong, Korea.

– To investigate whether sulindac, sulindac sulfone, and sulindac sulfide could affect cancer cell viabilities, human colorectal HCT116 cells were treated with 10 μ M of each NSAID. Among treated NSAIDs, sulindac sulfide dramatically decreased the cell viabilities detected by MTS and the cytotoxic effect showed dose-dependent manner. To understand the molecular mechanism of cell death in response to sulindac sulfide treatment, we performed oligo DNA microarray analysis. We found that 23 genes were up-regulated more than 2 folds, whereas 33 genes were down-regulated more than 2 folds by treatment of 10 μ M sulindac sulfide. Among the up-regulated genes, we selected 3 genes (*NAG-1*, *DDIT3*, *PCK2*) and performed RT-PCR and quantitative real-time PCR to confirm microarray data. The results of RT-PCR and real-time PCR were highly accorded with those of microarray experiment. As *NAG-1* is well-known gene as tumor suppressor, we detected changes of *NAG-1* expression by 10 μ M of sulindac, sulindac sulfone, and sulindac sulfide. The results of RT-PCR and quantitative real-time PCR indicated that sulindac sulfide was the strongest inducer of *NAG-1* among treated NSAIDs. This result implies that induction of *NAG-1* by sulindac sulfide plays important role in cell death of colorectal cancer. Overall, we speculate that these results may be helpful in understanding the molecular mechanism of the cancer chemoprevention by sulindac sulfide in human colorectal cancer.

Key words – Colorectal cancer, chemoprevention, NSAID, DNA microarray, gene expression

서 론

암은 미국에서 질환으로 인한 사망 원인 중 심장병 다음으로 2위를 차지하고 있으며, 이중 대장암은 미국에서 암으로 인한 사망률 및 발생율이 각각 3위를 차지하는 것으로 보고되었다[6]. 현재 우리나라를 포함한 아시아 지역에서도 지난 수십 년간 대장암 발생률이 2배에서 4배 이상 증가하였다[18]. 특히 대장암의 경우 65세 전후의 노령인구에서 발생이 급격하게 증가하는 것으로 알려져 있다[14]. 따라서 우리나라 사회도 고령인구가 계속 증가된다는 점과 음식문화가 서구화 되면서 사회적으로도 매우 중요한 질환이 될 것이다. 이러한 견지에서 암의 발생을 미리 예방하는 화학적 암 예방법(cancer chemoprevention)이 많은 주목을 받고 있다.

화학적 암 예방법이란 암의 발생을 예방하고 암의 진행을 막거나 천천히 진행시키고자 하는 방법으로서, 다양한 유래의 약물제제 및 천연물 제제를 사용하는 방법을 일컫는다[8]. 화학적 암 예방제제로 많이 사용되고 있는 제제로는 비 스테로이드성 항염증약(NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug), 식물유래의 비영양성 물질인 파이토케미칼(phytochemical), 비타민(Vitamin)과 칼슘 등을 들 수 있는데 이리

한 화학 제제들에 의한 화학적 암 예방법의 소개와 일부 작용 기전들이 발표되었다[10,16,19].

비 스테로이드성 항염증약은 항염증 제제로 널리 사용되고 있으며, 여러 역학 연구에 의하면 이러한 항염증 제제의 장기복용은 여러가지 종류의 암 발생율과 관련이 있다고 알려져 있다[5,7,12,15]. 이러한 NSAID에 의한 암 예방법의 주된 기전 중의 하나는, 이러한 NSAID에 의한 암세포 성장 억제와 apoptosis에 의해 암세포를 사멸시키는 것이다[17]. 본 연구에 사용된 sulindac도 대표적인 항염증제제의 한 종류로서 인체 내에서 대사되어 sulindac sulfide와 sulindac sulfone으로 대사된다[21]. 이러한 sulindac, sulindac sulfone, sulindac sulfide에 의한 암 화학예방법의 소개와 분자생물학적 기전들이 여러 암을 대상으로 보고되었다[3,9,20]. 하지만, 아직까지 sulindac과 그 대사체들에 의한 화학적 암 예방법의 정확한 분자 생물학적 기전들을 밝힐 부분들이 많이 남아 있다.

본 연구에서는 sulindac과 그의 대사체인 sulindac sulfide, sulindac sulfone이 대장암 세포주인 HCT116 세포주의 생존율에 미치는 영향을 확인하고, sulindac sulfide에 의한 화학적 암 예방법의 분자생물학적 기전을 연구하기 위한 방법으로 oligo DNA microarray 분석을 수행하였다. 또한 oligo DNA microarray 분석 결과를 검증하기 위하여 RT-PCR 및 real-time PCR로 sulindac sulfide의 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자의 발현 분석을 정성적, 정량적으로 분석하

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-823-1627

E-mail : jsk@andong.ac.kr

였다. 이러한 연구결과는 sulindac sulfide에 의한 화학적 압 예방법의 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포배양 및 시약

본 연구에 사용된 HCT116 대장암 세포주의 배양은 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO Inc. USA)와 1% penicillin/streptomycin (WelGENE Inc. Korea)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO Inc. USA)을 사용하였으며, 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건 하의 incubator에서 실시하였다. NSAID인 sulindac, sulindac sulfone, sulindac sulfide 그리고 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. Sulindac sulfide는 DMSO에 녹여 100 mM의 stock solution을 제조한 후, 이를 aliquot하여 -20°C에서 저장하여 사용하였다.

세포 생존율 측정

세포 생존율 측정을 위하여 96 well plate의 각 well에 3,000 개의 HCT116 세포를 접종한 후, 24시간 후에 sulindac, sulindac sulfone 그리고 sulindac sulfide의 최종농도가 10 µM 가 되게 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 미국 Promega사의 MTS 용액 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. NSAID 처리 후, 각 well 당 MTS 용액을 20 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4 시간 동안 반응한 다음, 96-well plate reader (Expert 96UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 실험 결과는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 mean±SD값으로 나타내었다. Sulindac sulfide의 농도 의존적 처리 실험의 경우, 최종농도가 0, 10, 20 그리고 30 µM이 되도록 처리한 다음, 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

Total RNA의 분리

Total RNA의 분리는 Qiagen 사의 RNeasy mini kit (USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

정제된 total RNA는 UV-spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리된 total RNA는 DNA micorarray 실험, RT-PCR, quantitative real-time PCR 등에 각각 사용하였다.

Oligo DNA microarray 실험 및 데이터 분석

Microarray 실험은 GenomicTree, Inc. (Korea)에 위탁하여 수행하였다. DNA microarray는 미국 Microarrays사의 48.5K Human Array-Illumina HEEBO oligo microarray (USA)를 사용하였다. 간단하게 실험 방법을 설명하면, 세포 주에서 분리한 total RNA를 주형으로 형광표지된 cDNA를 얻기 위해 역전사 과정을 진행하였다. 역전사 반응 과정 동안 total RNA 18 µg에 oligo dT primer를 annealing 한 후, 대조군의 total RNA는 Cy3-dUTP를, 실험군의 total RNA는 Cy5-dUTP를 이용하여 각각 labeling 하였다. 일련의 합성과정과 정제과정을 통해 만들어진 두 개의 probe를 섞어서, microarray에 적용 하였다. 16시간 동안 hybridization한 후, 일련의 세척과정을 거친 후 원심분리하여 DNA microarray 를 건조하였다. DNA microarray는 Axon 4000B scanner (USA)를 이용하여 scan한 다음, 미국 Agilent 사의 GeneSpringGX 7.3 프로그램을 이용하여 분석하였다. Normalization은 intensity dependent (LOWESS) normalization 방법을 사용하였다. 유전자의 filtering은 median의 값이 1,000 이상이 되는 유전자만 선별하였다.

Reverse Transcription - PCR

정제된 total RNA 4 µg을 주형으로 하여, 역전사 반응을 수행하였다. 만들어진 cDNA를 주형으로 사용하여 microarray 실험에서 증가되는 유전자 중 3개를 선별하여 각 유전자 특이적인 primers (Table 1)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다. GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 대조 유전자로 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분 후, 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 25 cycle을 수행한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension 반응을 수행하였다. PCR 산물들은 전기영동 한 후, UV 하에서 관찰하였다.

Table 1. Primer sequences for RT-PCR and real-time PCR

Gene name	GenBank Acc.No.	Primer sequences	
GAPDH	NM_002046	Forward	5'-CTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3'
		Reverse	5'-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'
NAG-1	NM_004864	Forward	5'-CTCTCAGATGCTCCTGGTGT-3'
		Reverse	5'-GAATATTCCCAGCTCTGGTT-3'
DDIT3	NM_004083	Forward	5'-CATTGCCITTCCTCTCCGGG-3'
		Reverse	5'-TGCTGGTTCTGGCTCCTCCT-3'
PK2	NM_004563	Forward	5'-ACACGGTACAACCTCCCGCCT-3'
		Reverse	5'-ATACGCATGCTTGCCACCAC-3'

Quantitative real-time PCR

역전사 반응은 RT-PCR 방법과 동일하게 수행하였다. 유전자 특이적인 primer 농도는 2 pmol/μl로 낮추어 real-time PCR을 수행하였다. PCR mixture는 forward primer 2 μl, reverse primer 2 μl, Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 10 μl를 첨가하여 제조한 뒤, 96 well optical reaction plate에 cDNA 6 μl, PCR mixture 14 μl를 첨가하여 다음의 조건에 따라 수행하였다. 첫 번째 step인 50°C에서 20분, 95°C에서 10분 후, 두 번째 step인 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 33초씩 40 cycle 증폭을 시행하여 결과를 얻은 후, dissociation curve를 그려 primer dimer가 생성되었는지 확인한 후 분석하였다. 각 유전자에 대한 발현은 control (GAPDH)을 지정해 준 후 각각의 유전자에 대한 RQ value (Relative Quantification value)를 계산하여 이를 그래프화 하였다.

결과 및 고찰

Sulindac, sulindac sulfone 및 sulindac sulfide 처리에 따른 세포생존율의 변화

Sulindac과 대사체인 sulindac sulfone, sulindac sulfide의 처리에 의한 대장암 세포주 HCT116의 세포 생존율에 미치는 영향을 연구하기 위해, 24시간 동안 10 μM의 sulindac, sulindac sulfone 그리고 sulindac sulfide를 처리한 후, MTS assay를 실시하였다(Fig. 1A). 결과에서 보는 바와 같이 sulindac이나 sulindac sulfone에 비해 sulindac sulfide 처리에 의해 세포 생존율이 급격하게 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 즉, Sulindac을 처리한 경우 대조군에 비해 암세포 생존율은 89%, sulindac sulfone은 79%, sulindac sulfide의 처리에 의해서는 50% 정도의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 다른 두 NSAID에 비해 sulindac sulfide에 의한 암세포 사멸효과가 가장 효율적이라는 것을 확인할 수 있었다.

처리한 NSAIDs 중 가장 암 세포 사멸효과가 뛰어났던 sulindac sulfide의 농도의존적 처리에 따른 대장암 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, sulindac sulfide의 최종 처리농도가 10, 20 그리고 30 μM가 되도록 처리한 후, 24 시간 후에 MTS assay를 수행하였다. 그 결과, Fig. 1B에서와 같이 대조군과 비교해서 10 μM sulindac sulfide 처리의 경우 50%, 20 μM 처리의 경우 33%, 30 μM 처리의 경우에는 32% 정도만의 암세포가 생존함을 확인할 수 있었다. 따라서 sulindac sulfide의 처리농도가 20 μM 까지 증가됨에 따라 대장암 세포주의 생존율은 sulindac sulfide의 처리농도의존적으로 감소됨을 확인하였으나, 30 μM sulindac sulfide의 처리 그룹에는 20 μM sulindac sulfide 처리 그룹과 유사한 세포 생존율을 보였다(Fig. 1B). 이러한 연구 결과는 20 μM 이상의 농도에서는 sulindac sulfide에 의한 암세포 사멸 효능이 유사하기 때문인 것으로 생각된다.

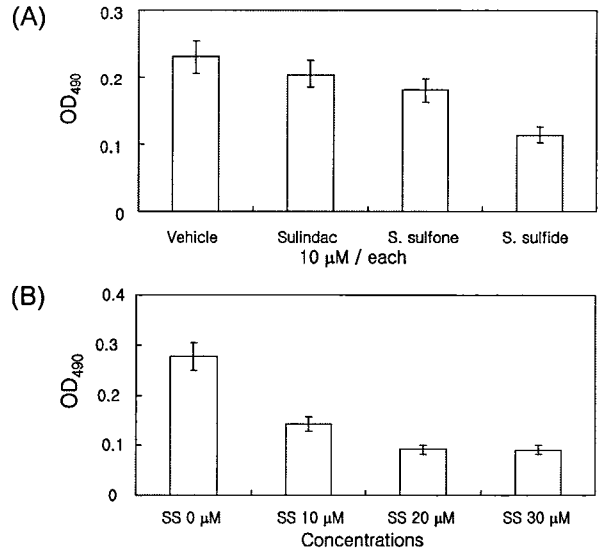


Fig. 1. Effects-of sulindac, sulindac sulfone and sulindac sulfide on HCT116 cell growth. (A) HCT116 cells were seeded at about 3,000 cells/well in a 96-well plate and treated with 10 μM of sulindac, sulindac sulfone or sulindac sulfide for 24 hr. Cell growth was measured using MTS solution. Values are expressed as mean ± SD of 4 replicated experiments. (B) HCT116 cells were incubated with three different doses of sulindac sulfide. And then cell growth was measured by same method as mentioned above.

Sulindac sulfide에 의해 차별적으로 발현되는 유전자군의 분석

HCT116 대장암 세포에서 sulindac sulfide의 처리에 의해 차별적으로 발현되는 유전자 군을 선별하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 대조군에서 추출한 total RNA는 Cy3-dUTP로, 10 μM의 sulindac sulfide를 처리한 실험군에서 추출한 total RNA는 Cy5-dUTP로 각각 labeling 하여 DNA microarray 실험을 실시하였다.

그 결과, sulindac sulfide의 처리에 의해 2배 이상 up-regulation 된 유전자는 23개, 반대로 2배 이상 down-regulation 된 유전자는 33개가 선별되었다. 이 중 각각 상위 10 개의 높은 발현차이를 보이는 유전자를 표에 나타냈다(Table 2, 3). Table 2에서 보는 바와 같이 up-regulation 된 유전자 중 NAG-1 유전자가 4.26으로 가장 큰 변화를 나타냈다.

RT-PCR과 quantitative real-time PCR 을 이용한 DNA microarray 결과의 검증

Sulindac sulfide의 처리에 의해 up-regulation 되는 유전자들 중 3개 (NAG-1, DDIT3, PCK2)를 선택하여 RT-PCR과 quantitative real-time PCR을 수행하여 DNA microarray 실험 결과를 검증하였다. Fig 2A에서 보는 바와 같이 microarray 실험에서 증가되는 것으로 확인된 3개의 유전자의 발

Table 2. Lists of up-regulated genes in response to 10 μM sulindac sulfide treatment

No.	Gene Name	GenBank Acc.No	Gene Description	Fold change
1	<i>NAG-1</i>	NM_004864	NSAID-activated gene - 1	4.26
2	<i>DDIT3</i>	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3	4.05
3	<i>PCK2</i>	NM_004563	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	3.66
4	<i>ASNS</i>	NM_133436	asparagine synthetase	3.55
5	<i>TRIB3</i>	NM_021158	tribbles homolog 3 (Drosophila)	3.40
6	<i>SLC3A2</i>	NM_002394	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	3.32
7	<i>STC2</i>	NM_003714	Stanniocalcin 2	3.24
8	<i>CSTA</i>	NM_005213	cystatin A (stefin A)	3.19
9	<i>VGF</i>	NM_003378	VGF nerve growth factor inducible	3.05
10	<i>PHGDH</i>	NM_006623	Phosphoglycerate dehydrogenase	3.02

Table 3. Lists of down-regulated genes by 10 μM sulindac sulfide treatment

No.	Gene Name	GenBank Acc.No	Gene Description	Fold change
1	<i>REEP4</i>	NM_025232	receptor accessory protein 4	-3.26
2	<i>SLC6A6</i>	NM_003043	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-3.16
3	<i>UNC93B1</i>	NM_030930	unc-93 homolog B1 (C. elegans)	-3.16
4	<i>CD276</i>	NM_001024	CD276 molecule	-3.11
5	<i>KIAA2010</i>	NM_032560	KIAA2010	-3.10
6	<i>KITLG</i>	NM_000899	KIT ligand	-2.86
7	<i>FASN</i>	NM_004104	fatty acid synthase	-2.80
8	<i>SYTL2</i>	NM_032943	synaptotagmin-like 2	-2.72
9	<i>CTNND1</i>	NM_001331	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	-2.15
10	<i>WNT16</i>	NM_057168	wingless-type MMTV integration site family, member 16	-2.04

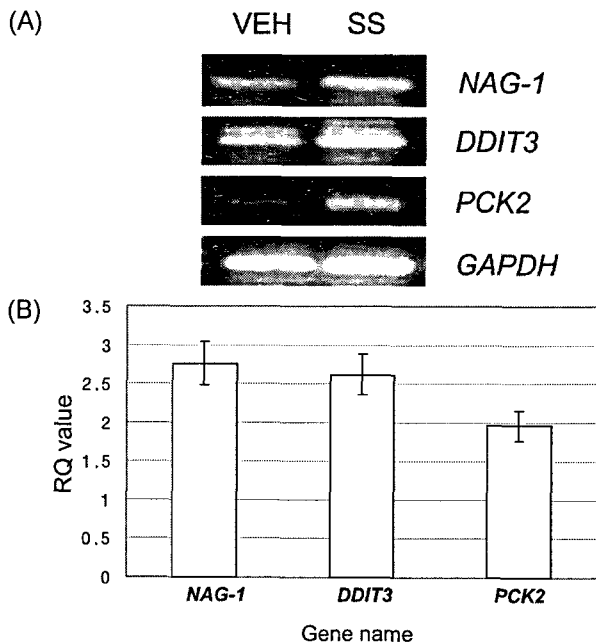


Fig. 2. Changes of gene expression by sulindac sulfide. HCT116 cells were treated with 10 μM sulindac sulfide or DMSO for 24 hr and total RNAs were isolated from NSAID treated cells. Total RNAs were subjected to RT-PCR (A) and quantitative real-time PCR (B) using gene-specific primers.

현이 RT-PCR의 결과에 의해서도 up-regulation 되는 것을 확인하였다. 이에 반해 internal control 유전자로 사용한 GAPDH 유전자의 발현의 변화는 관찰되지 않았다.

이러한 3개의 유전자의 발현 변화를 정량화 하기 위하여 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 그 결과, Fig. 2B에서와 같이 up-regulation 된 유전자중 NAG-1의 경우 2.7 배, DDIT3 유전자는 2.6 배, PCK2 유전자는 2배씩 각각 증가되는 것을 확인하였다. 이 결과는 DNA microarray 실험 결과 (Table 2)와 매우 일치하였다.

한편, 선택한 세가지 유전자에 대한 현재까지 보고된 연구 결과는 다음과 같다. NAG-1 (NSAID-activated gene-1) 유전자는 항암유전자로 알려져 있으며, 여러 가지 화학요법제에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다[1,11,22]. 또한 최근에는 NAG-1 transgenic 쥐를 이용한 실험에서 항암 기능이 보고된 바 있다[2]. DDIT3 (DNA-damage-inducible transcript 3) 유전자는 CHOP 혹은 GADD153 유전자라고도 하며, 이 유전자의 과대발현은 세포주기 억제나 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되었다[4,13]. 또한 최근에는 resveratrol에 의해 유도되는 세포사멸에 관련이 있는 것으로 보고되었다[23]. PCK2 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) 유전자는 미토콘드리아 효소로서 gluconeogenesis에 관련되어 있다. 하지만 암세포의 세포주기 조절이나 세포사멸과의 기능은 아직 알려져 있지 않다.

NAG-1 발현과 세포사멸과의 관련성 검증

DNA microarray 실험 결과와 real-time PCR의 결과 sulindac sulfide에 의해 가장 많이 발현되는 항암유전자 NAG-1의 발현이 가장 높게 확인되었다. 이러한 NAG-1 유전자와 대장암 세포주 사멸과의 관련성을 검증하기 위하여 10 µM의 sulindac, sulindac sulfone 그리고 sulindac sulfide를 처리 후, RT-PCR과 real-time PCR을 수행하여 NAG-1 유전자의 발현 정도를 확인하였다. Fig. 3A에서와 같이 RT-PCR의 결과, sulindac sulfide의 처리에 의해 가장 많은 양의 NAG-1 transcript가 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 정량적인 real-time PCR의 결과에서도 NAG-1의 발현이 sulindac 처리 경우 2.1배, sulindac sulfone 처리의 경우 3.1배, sulindac sulfide 처리에 의해 3.3배 각각 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 따라서 quantitative RT-PCR의 결과에 의해서도 sulindac sulfide에 의한 NAG-1의 발현이 가장 높게 증가되는 것을 확인하였다. 이러한 연구결과는 세포생존율의 실험 결과에서 sulindac sulfide 처리에 의한 암세포 생존율이 가장 낮았으므로, NAG-1의 높은 발현과 대장암 세포의 사멸과의 관련성을 간접적으로 암시한다. 직접적인 NAG-1의 발현과 세포사멸과의 관련성을 확인하기 위해서는 siRNA-NAG-1을 이용한 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 NSAID계 약물인 sulindac, sulindac sulfone, 그리고 sulindac sulfide 처리에 의한 암세포 생존율에

미치는 영향을 확인하기 위하여, 인간 대장암 세포주인 HCT116에 각각 10 µM의 NSAID들을 처리하였다. 처리한 약물 중 sulindac sulfide에 의한 암세포 생존율이 가장 높게 감소하는 것으로 MTS assay 결과 확인되었다. 또한 sulindac sulfide의 처리 농도가 증가됨에 따라 세포 생존율이 감소하는 것으로 확인되었다. Sulindac sulfide의 처리에 따른 이러한 암 세포 사멸의 분자생물학적 기전을 이해하기 위하여, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과, 10 µM의 sulindac sulfide의 처리에 의해 2배 이상 발현이 증가되는 유전자가 23개 확인되었고, 반대로 2배 이상 발현이 감소되는 유전자가 33개 확인되었다. 증가되는 유전자중 3개 (NAG-1, DDIT3, PCK2)를 선택하여, RT-PCR과 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 두 실험 모두 DNA microarray 실험결과와 동일하게 발현이 증가되었다. 이 중 sulindac, sulindac sulfone, sulindac sulfide에 의한 NAG-1 유전자의 발현변화를 RT-PCR 과 real-time PCR 방법으로 확인한 결과, sulindac sulfide에 의한 암 억제유전자인 NAG-1의 발현이 가장 많이 발현되었다. 이러한 연구결과는 세포생존율 결과와 비교하였을 때, NAG-1의 높은 발현과 암 세포 생존율의 감소가 관련이 있음을 간접적으로 시사한다. 따라서 이들 연구결과는 sulindac sulfide에 의한 화학적 암 예방법의 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2005년 안동대학교 신진교수 연구비에 의해 수행되었습니다.

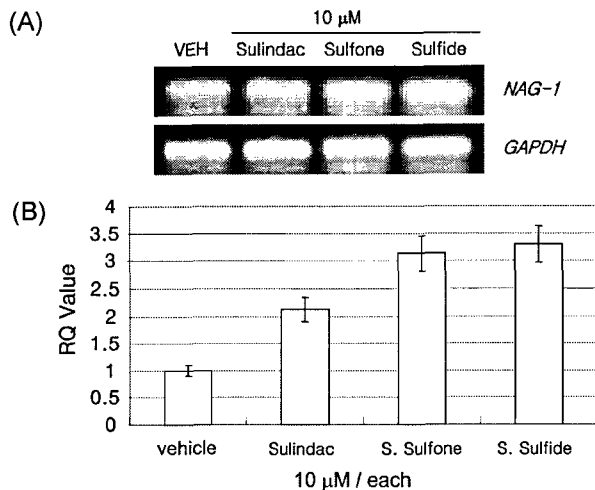


Fig. 3. NAG-1 expression by sulindac, sulindac sulfone and sulindac sulfide. HCT116 cells were incubated with 10 µM of sulindac, sulindac sulfone, or sulindac sulfide for 24 hr and total RNAs were isolated from NSAID treated cells. Total RNAs were subjected to RT-PCR (A) and quantitative real-time PCR (B) using NAG-1 and GAPDH-specific primers.

참고 문헌

- Baek, S. J., J. S. Kim, S. M. Moore, S. H. Lee, J. Martinez and T. E. Eling. 2005. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an anti-tumorigenic protein. *Mol. Pharmacol.* **67**, 356-364.
- Baek, S. J., R. Okazaki, S. H. Lee, J. Martinez, J. S. Kim, K. Yamaguchi, Y. Mishina, D. W. Martin, A. Shoieb, M. F. McEntee and T. E. Eling. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* **131**, 1553-1560.
- Barnes, A. P., B. E. Miller and G. L. Kucera. 2007. Cyclooxygenase inhibition and hyperthermia for the potentiation of the cytotoxic response in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **104**, 443-450.
- Barone, M. V., A. Crozat, A. Tabae, L. Philipson and D. Ron. 1994. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev.* **8**, 453 - 464.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, M. J. Stampfer, G. A.

- Colditz, A. Ascherio and W. C. Willett. 1994. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* **121**, 241-246.
6. Greenlee, R. T., T. Murray, S. Bolden and P. A. Wingo. 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J. Clin.* **50**, 7-33.
 7. Harris, R. E., J. Beebe-Donk and G. A. Alshafie. 2007. Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of a case control study. *Int. J. Biol. Sci.* **3**, 328-334.
 8. Hong, W. K. and M. B. Sporn. 1997. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* **278**, 1073-1077.
 9. Jarvis, M. C., T. J. Gray and C. N. Palmer. 2005. Both PPARgamma and PPARdelta influence sulindac sulfide-mediated p21WAF/CIP1 upregulation in a human prostate epithelial cell line. *Oncogene* **24**, 8211-8215.
 10. Lamprecht, S. A. and M. Lipkin. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 601-613.
 11. Lee, S. H., K. Yamaguchi, J. S. Kim, T. E. Eling, S. Safe, Y. Park and S. J. Baik. 2006. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis* **27**, 972-981.
 12. Liu, X., S. J. Plummer, N. L. Nock, G. Casey and J. S. Witte. 2006. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and decreased risk of advanced prostate cancer: modification by lymphotoxin alpha. *Am. J. Epidemiol.* **164**, 984-989.
 13. Matsumoto, M., M. Minami, K. Takeda, Y. Sakao and S. Akira. 1996. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett.* **395**, 143-147.
 14. Parkin, D. M., S. L. Whelan, J. Ferlay, L. Teppo and D. B. Tomas. 2003. Cancer incidence in five continents. Vol 8. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer.
 15. Rahme, E., J. Ghosn, K. Dasgupta, R. Rajan and M. Hudson. 2005. Association between frequent use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *BMC Cancer* **5**, 159.
 16. Ricchi, P., R. Zarrilli, A. di Palma and A. M. Acquaviva. 2003. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br. J. Cancer* **88**, 803-807.
 17. Richter, M., M. Weiss, I. Weinberger, G. Furstenberger and B. Marian. 2001. Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis* **22**, 17-25.
 18. Sung, J. J., J. Y. Lau, K. L. Goh and W. K. Leung. 2005. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. *Lancet Oncol.* **6**, 871-876.
 19. Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
 20. Thompson, H. J., C. Jiang, J. Lu, R. G. Mehta, G. A. Piazza, N. S. Paranka, R. Pamukcu and D. J. Ahnen. 1997. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **57**, 267-271.
 21. Williams, C. S., A. P. Goldman, H. Sheng, J. D. Morrow and R. N. DuBois. 1999. Sulindac sulfide, but not sulindac sulfone, inhibits colorectal cancer growth. *Neoplasia* **1**, 170-176.
 22. Wilson, L. C., S. J. Baik, A. Call and T. E. Eling. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* **105**, 747-753.
 23. Woo, K. J., T. J. Lee, S. H. Lee, J. M. Lee, J. H. Seo, Y. J. Jeong, J. W. Park and T. K. Kwon. 2007. Elevated gadd153/chop expression during resveratrol-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **73**, 68-76.