Journal of Life Science 2009 Vol. 19. No. 12. 1787~1793 ⓒJLS / ISSN 1225-9918

Caffeic acid phenethyl ester의 처리에 의한 NSAID activated gene-1의 과대발현

장민정 · 김효은 · 손성민 · 김민정 · 서을원 · 김영호[1] · 김종식*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과, [1]경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Received September 15, 2009 / Accepted September 22, 2009

Over-expression of NSAID Activated Gene-1 by Caffeic Acid Phenethyl Ester. Min-Jeong Jang, Hyo-Eun Kim, Seong-Min Son, Min-Jeong Kim, Eul-Won Seo, Young-Ho Kim[1] and Jong-Sik Kim*. *Dept. of Biological Sciences, Andong National University, Andong, Korea,* [1]*Dept. of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu, Korea* - To investigate whether caffeic acid phenethyl ester (CAPE) could affect cancer cell viabilities and gene expression, human colorectal HCT116 cells were incubated with CAPE. CAPE decreased cancer cell viabilities and induced apoptosis in a dose-dependent manner. To analyse differently expressed genes by CAPE, we performed oligo DNA microarray analysis. We found that 266 genes were up-regulated more than twofold, whereas 143 genes were down-regulated more than twofold by 24 hr of treatment with 20 μM CAPE. Among the up-regulated genes, we selected 3 genes (NSAID activated gene-1 [*NAG-1*], cyclin-dependent kinase inhibitor 1A [*CDKN1A*, *p21*] and growth arrest and DNA-damage-inducible alpha [*GADD45A*]) and performed reverse-transcription PCR to confirm microarray data. In addition, we found that CAPE increased *NAG-1* gene and *NAG-1* protein expression in a dose-dependent manner. And, several other phytochemicals (resveratrol, genistein, daidzein and capsaicin) also could induce *NAG-1* expression in human colorectal HCT116 cells. However, CAPE was the highest inducer of *NAG-1*, even in low concentrations. Overall, these results imply that cancer cell death by CAPE is closely related with over-expression of *NAG-1*.

Key words : Phytochemical, CAPE, DNA microarray, gene expression, *NAG-1*

서 론

파이토케미칼(phytochemical)은 식물 유래의 다양한 비 영양 성분으로서, 항산화, 항염증, 항암 등을 포함한 여러 가지 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 정의된다[14]. 최근에는 암 화학예방법(cancer chemoprevention)에 사용되는 제제 중 가장 부작용이 적다는 점에서 많은 주목을 받고 있다. 일부 역학 연구에 의하면 곡류, 채소, 과일 등 파이토케미칼이 풍부한 식물 유래의 음식을 꾸준히 섭취하면, 암의 발생률이 감소한다는 보고가 있었다[10]. 또한, 최근 여러 가지 파이토케미칼에 의한 다양한 암 화학예방법의 기전과 효능이 보고된 바 있으며[21], 암 화학예방법의 중요한 작용기전 중의 하나로서 apoptosis가 소개된 바 있다[20].

프로폴리스 유래의 파이토케미칼인 CAPE는 전통적인 약재의 첨가제로 많이 사용되어 왔으며, 항바이러스[7], 항산화[4], 항염증[12,17] 등과 같은 여러 가지 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 여러 종류의 암을 대상으로 항암작용과 일부 기전들이 보고된 바 있다[5,11,15]. 특히 최근의 두 보고에 의하면 CAPE의 처리에 의해 대장암 세포주에서 세포사멸을 유도함과 beta-catenin signal을 저해하는 것으로 보고되었다[9,25]. 하지만 파이토케미칼 CAPE에 의한 유전자 발현 분석을 유전체 전체 수준에서 확인하고, 이를 이용하여 작용기전을 유추한 보고는 없다.

DNA microarray 실험은 1995년 스탠포드 대학교의 Brown 박사에 의해 처음 소개된 이후로[19], 현재는 기능 유전체학의 일반적인 실험방법으로 사용되어 지고 있다. 이러한 DNA microarray 실험은 다양한 약물제제나 파이토케미칼에 의한 유전체 수준에서의 유전자 발현을 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 작용 기전을 유추할 수 있다는 장점을 가지고 있다[18,22].

따라서 본 연구에서는 CAPE에 의한 암 화학예방법의 분자생물학적 기전을 이해하기 위한 연구의 일환으로, CAPE에 의한 대장암 세포주 HCT116의 성장에 미치는 영향을 확인하고, CAPE에 의한 세포사멸의 기전을 유전자 발현 수준에서 밝히고자 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 또한 이중 항암유전자로 알려진 *NAG-1* 유전자를 선택하여 CAPE를 비롯한 여러 가지 파이토케미칼에 의한 발현을 비교 연구하였다. 이러한 연구는 CAPE의 항암 활성연구에 대한 분자 생물학적 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포배양 및 파이토케미칼

인간 대장암 세포주인 HCT116은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양 및

*Corresponding author
Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705
E-mail : jsk@andong.ac.kr

계대는 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Korea)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지 (Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 CAPE는 LKT laboratories, Inc. (USA)에서 구입한 반면, 그 외 파이토케미칼(capsaicin, resveratrol, genistein, daidzein) 및 DMSO (dimethyl sulfoxide)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

세포 생존율 연구

CAPE 처리에 의한 HCT116 세포생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 One solution cell proliferatrion assay kit (Promega, USA)를 이용하여 세포생존율 연구를 수행하였다. 즉, 96 well plate에 well 당 3×10^3 개의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, CAPE의 최종 처리농도가 10 μM, 20 μM, 그리고 30 μM이 되도록 처리하였다. CAPE에 24시간 동안 노출시킨 후, MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) 용액을 각 well 당 20 μl씩 넣고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응 시켰다. 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well 에서 수행한 값을 mean±SD 값으로 나타내었다.

Flow cytometric analysis

암세포의 생존율 감소 원인을 규명하기 위하여 Flow cytometric analysis를 수행하였다. 즉, 60 mm dish에 1×10^6 세포를 접종하고 24시간 추가 배양 한 후 CAPE의 최종 처리농도가 10 μM, 20 μM, 그리고 30 μM이 되도록 처리하였다. CAPE의 존재하에서 24시간 동안 추가배양 한 후, 세포들을 수확하였다. 수확한 세포는 PBS로 2번 wash한 후, 상등액을 제거하여 PBS 100 μl, 4°C 보관중인 absolute ethanol 200 μl를 섞어 세포를 고정하였다. 고정한 세포에 2% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO Inc. USA), PBS, NaN_3가 포함된 FACS buffer 2 ml을 넣어 inverting한 후, 1,000 rpm으로 원심분리를 실행하여 상등액을 제거하는 과정을 2번 반복하였다. RNase를 250 μl씩 처리하여 약하게 vortex하여 섞어준 후 30분간 37°C에서 incubation한 후, 같은 volume의 propidium iodide (Sigma Inc. USA) 250 μl를 처리한 후, 빛을 차단한 상태에서 20분간 37°C에서 incubation하였다. 준비된 각 sample을 450 nm의 파장으로 Flow cytometric analysis를 수행하였다.

Total RNA 분리

Total RNA 분리는 RNeasy mini kit (Qiagen Inc., USA)를 이용해 제조사의 매뉴얼에 따라 추출 하였다. 마지막 단계에서 새로운 1.5 ml collection tube에 옮기고 RNase-free water 40 μl를 첨가하여 10,000 rpm에서 1분간 원심 분리 하여 RNA 용액을 정제하였다. 정제한 total RNA 중 2 μl는 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 200배 dilution하여 흡광도를 측정 하였다. 분리 정제한 RNA는 oligo DNA microarray, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 및 정량적인 real-time PCR에 사용하였다.

Oligo DNA microarray 실험

Oligo DNA microarray 실험은 미국 Microarrays사의 48.5 K Human Array-Illumina HEEBO oligo microarray (USA)를 사용하였으며, GenomicTree Inc. (Daejeon, Korea)에 위탁하여 수행하였다. 실험조건은 HCT116 세포주에 DMSO (vehicle)와 CAPE 20 μM을 처리하여 다시 24시간 배양한 후에 세포를 수확하여 사용하였다. 결과분석은 Gene Spring 7.3 program (Agilent, USA)을 이용하여 2배 이상 발현이 증가되거나 발현이 감소되는 유전자를 선별하여 목록화 하였다.

RT-PCR 과 real-time PCR

유전자의 발현을 mRNA 수준에서 측정하기 위하여 RT-PCR과 real-time PCR을 병행하여 이용하였다. 각 시료로부터 total RNA를 추출한 후 5 μg을 취하여 MMLV kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. PCR의 경우 제조한 cDNA에 DW를 60 μl를 첨가하여 희석한 cDNA로부터 5 μl를 취하여 실시하였으며, 2X PCR master mix (SeeGene Inc. Korea)를 이용하였다. PCR cycle의 조건은 94°C에서 5분 반응 후, 94°C에서 1분(denaturation), 58°C에서 1분(annealing), 72°C에서 1분(extension)씩 25 cycle 증폭 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension 반응을 시행하였다. Real-time PCR의 경우는 최종 cDNA에 DW를 180 μl를 첨가하여 희석하여 사용하였으며, 이 중 2 μl를 주형으로 사용하였다. Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems. USA)를 사용하였으며, 반응 조건은 첫 번째 step에서 50°C에서 20분, 95°C에서 10분 후, 두 번째 step에서 95°C에서 30초, 54°C에서 30초, 그리고 72°C에서 33초씩 40 cycle 증폭을 수행 하였다. 결과 분석은 먼저 dissociation curve를 그려서 dimer가 생성 되었는지 확인 하였으며, relative transcript level은 Foo 등의 논문[8]에서 설명한 comparative Ct (Critical threshold) 방법을 이용하여 계산하였다.

Western blot analysis

수확한 세포로 부터 RIPA 용액을 이용하여 총 단백질을 분리하였으며, 단백질 정량은 Bradford protein assay 용액 (Bio-Rad, USA)을 사용하여 측정하였다. 총 30 μg의 단백질을 취하여 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane (Invitrogen, USA)으로 electroblotting에 의해 전달하였다. Skim milk (5%)

가 함유된 1X TBS-T (0.1% Tween-20, 100 mM Tris-Cl [pH 7.5], 0.9% NaCl) 용액에서 12시간 이상 4°C에서 blocking 하였다. 1차 antibody 처리는 1% skim milk가 함유된 1X TBS-T 용액을 사용하여 실온에서 2시간 수행하였다. 그 후 TBS-T 용액으로 15분간 3회 세척하였고, 2차 antibody의 경우는 같은 조성으로 실온에서 1시간 수행한 후 일련의 세척과정을 마쳤다. 마친 후 ECL western blotting detection system (Pierce, USA)을 사용하여 발광시켜 Chemi-DOC system (Bio-Rad, USA)으로 expose한 후 확인하였다. 본 실험에 사용된 1차 antibody로는 anti-NAG1, anti-ACTIN이 사용되었고, 2차 antibody로는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody, horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat antibody를 사용하였다. NAG-1 항체를 제외한 모든 항체는 Santa Cruz사(USA)로부터 구입하였고, NAG-1항체는 이전에 보고된 것을 사용하였다[1].

결과 및 고찰

CAPE 처리에 의한 농도 의존적 세포생존율 억제

파이토케미칼 CAPE 처리에 의한 HCT116 세포의 생존율에 미치는 영향을 정량적으로 확인하기 위하여, CAPE의 최종 처리농도를 10, 20, 30 μM이 되도록 처리하였다. 그 후 CAPE 존재 하에 24시간 동안 배양한 다음, MTS 용액을 첨가하여 cell viability assay를 수행한 결과 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1). 암세포 생존율을 대조군과 비교하면 CAPE 10 μM을 처리한 경우는 92%, CAPE 20 μM에서는 70%, CAPE 30 μM을 처리한 실험군에서는 45% 정도의 세포 생존율을 보여주었다. 이러한 연구 결과는 세포의 형태학적으로 관찰한 결과와 일치하는 것으로(data not shown), CAPE의 처리에 의해 농도 의존적으로 세포의 생장이 억제됨을 확인할 수 있다.

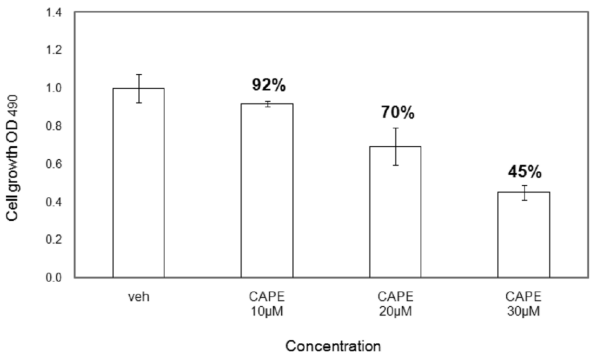

Fig. 1. Assay of cell viability changes by caffeic acid phenethyl ester treatment. HCT116 cells were treated with vehicle (DMSO), CAPE 10 μM, CAPE 20 μM or CAPE 30 μM for 24 hr. Cell viability was measured using the cell proliferatrion assay kit.

세포생존율의 감소는 apoptosis에 의해 유도

CAPE에 의한 대장암 세포주 HCT116의 농도 의존적인 세포의 생존율의 감소 원인을 증명하기 위하여, HCT116에 10, 20, 30 μM의 CAPE를 처리한 후 24시간 배양 후, 세포를 수확해 바로 고정하여 DNA와 propidium iodide 염색시약을 결합시킨 후 450 nm의 파장에서 Flow cytometric analysis를 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, CAPE의 처리 농도가 증가할수록 M1 (sub-G1), 즉 apoptosis 지수가 높아지는 것을 확인하였다. 분석한 결과의 M1 (sub-G1) 수치를 비교하면 대조군의 경우는 10%, CAPE 10 μM 처리 농도에서는 27%, CAPE 20 μM 처리 농도에서는 39%, CAPE 30 μM 처리 농도에서는 52%를 나타내었다.

이러한 연구 결과는 처리한 CAPE가 농도 의존적으로 apoptosis를 유도함을 알 수 있었으며, CAPE의 처리에 의한 생존율 감소 또한 apoptosis에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 Wang등의 보고[23]와 일치하는 것이며, CAPE의 처리에 의해 세포주기 억제와 apoptosis가 유발된다는 것을 보고하였다.

Oligo DNA microarray 실험결과 검증

CAPE의 처리에 의한 세포사멸의 원인을 유전자 발현에서 확인하고자 oligo DNA microarray analysis를 수행하였다. 즉, 대조군은 HCT116에 DMSO를 처리하고, 실험군은 HCT116에 CAPE 20 μM을 24시간 동안 처리하였다. 실험결과, CAPE에 의해 발현이 2배 이상 up-regulation된 유전자는 266개, 2배 이상 down-regulation 된 유전자는 143개로 각각 분류 되었다. 이중 up-regulation 되는 유전자를 선별하여 Table 1에 나타내었다. DNA microarray analysis 결과를 검증하기 위하여, 2배 이상 up-regulation 되는 유전자 중에 *NAG-1*, *p21* 그리고 *GADD45A*를 선정하여 유전자 특이적인

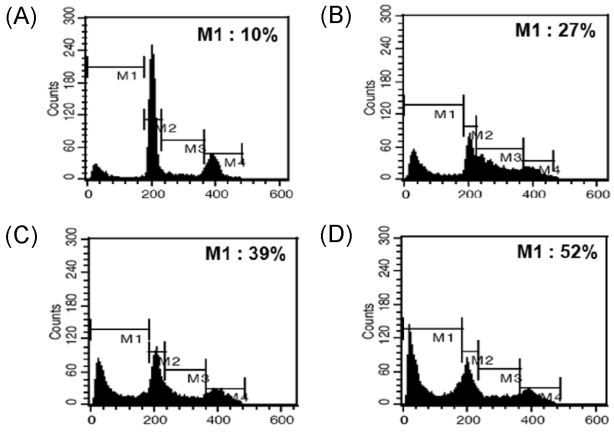

Fig. 2. Flow cytometric analysis. HCT116 cells were incubated with (A) vehicle (DMSO), (B) CAPE 10 μM, (C) CAPE 20 μM, or (D) CAPE 30 μM for 24 hr. And then, cell cycle was analysed with Flow cytometric analysis.

Table 1. Several up-regulated genes more than 4 folds by 20 μM caffeic acid phenethyl ester treatment

No.	Gene Name	GeneBank Acc.No	Gene Description	Fold change
1	CHAC1	NM_024111	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli)	12.38
2	OR52N5	NM_001001922	Olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 5	10.56
3	RNF175	NM_173662	Ring finger protein 175	9.05
4	NCOR1	NM_006311	nuclear receptor co-repressor 1	8.18
5	NAG-1	NM_004864	NSAIDs activated gene-1	7.87
6	SEC14L3	NM_174975	SEC14-like 3 (S. cerevisiae)	7.46
7	SPRR2D	NM_006945	small proline-rich protein 2D	7.23
8	COBRA1	NM_015456	cofactor of BRCA1	7.19
9	SPRR2F	NM_001014450	small proline-rich protein 2F	7.04
10	STC2	NM_003714	stanniocalcin 2	6.24
11	PCK2	NM_004563	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	5.69
12	DDIT3	NM_004083	DNA-damage-inducible transcript 3	5.39
13	CDKN1A	NM_000389	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	5.08
14	CENPA	NM_001809	centromere protein A	4.69
15	ASNS	NM_133436	asparagine synthetase	4.63
16	INHBE	NM_031479	inhibin, beta E	4.62
17	UPP1	NM_181597	uridine phosphorylase 1	4.44
18	NDRG1	NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1	4.4
19	PLK3	NM_004073	polo-like kinase 3 (Drosophila)	4.34
20	SLC7A11	NM_014331	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	4.3

primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다(Table 2). 한편 internal control로서 *GAPDH* 유전자를 사용하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 모든 유전자의 발현이 CAPE를 처리 하였을 때, 대조군에 비해 발현이 증가됨을 확인하였다.

NAG-1 유전자는 non-steroidal anti-inflammatory drugs에 유도되어 지는 TGF-beta superfamily의 하나로서, anti-tumorigenic과 pro-apoptotic 기능이 있는 것으로 알려져 있다[1,3]. *p21* 유전자는 cyclin dependent kinase 억제자로서, CAPE에 의해 발현이 유도된다고 보고된 바 있다[13]. *GADD45A* 유전자는 세포주기 억제 스트레스나 DNA damage에 의해 발현이 유도되어 지는 유전자중의 하나로서, 발현은 암 억제자인 p53 의존적으로 되기도 하고, 비 의존적으로 이루어지기도 한다[6,16]. 따라서 CAPE는 세포주기 억제나 세포사멸을 유도하는 여러 유전자의 발현을 증가시킴으로서 항암 활성을 가지는 것으로 생각된다.

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR and real-time PCR

Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequences
NAG-1	NM_004864	F: 5′-CTCTCAGATGCTCCTGGTGT-3′ R: 5′-GAATATTCCCAGCTCTGGTT-3′
p21	NM_078467	F: 5′-CGATGGAACTTCGACTTTGT-3′ R: 5′-GTCCACATGGTCTTCCTCTG-3′
GADD45A	NM_001924	F: 5′-TGCGAGAACGACATCAACAT-3′ R: 5′-TCCCGGCAAAAACAAATAAG-3′
GAPDH	NM_002046	F: 5′-CTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3′ R: 5′-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3′

농도별 CAPE 처리에 따른 *NAG-1* 유전자와 단백질의 발현 분석

DNA microarray 결과 발현이 증가되는 유전자들 중에서 대표적인 항암 유전자인 *NAG-1*을 선택하여, HCT116 세포주에 여러 가지 농도별로 CAPE를 처리한 후 *NAG-1* 유전자와 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 Fig. 4A 와 Fig. 4B에서 보는 바와 같이 10 μM의 CAPE를 처리한 경우는 유전자와 단백질의 발현이 미약한 반면, 20 μM 와 30 μM의 CAPE를 처리한 경우 유전자와 단백질의 발현이 최대에 이르는 것으로

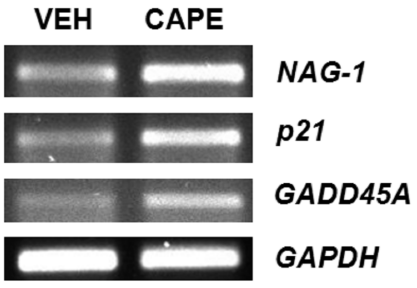

Fig. 3. Changes of gene expression in 20 μM CAPE-treated HCT116 cells. HCT116 cells were treated with 20 μM of CAPE or vehicle (DMSO). Total RNA was prepared and RT-PCR was performed with each gene specific primer.

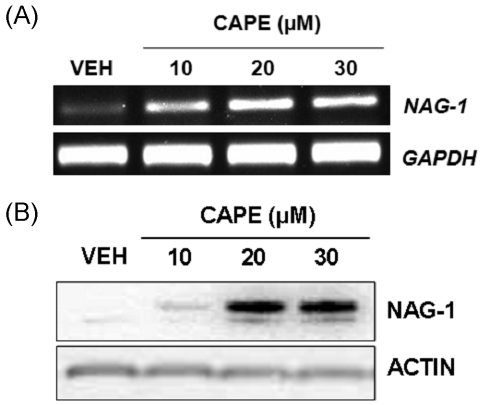

Fig. 4. Detection of *NAG-1* gene and NAG-1 protein expression by CAPE. HCT116 cells were treated with VEH (vehicle, DMSO), 10 μM, 20 μM or 30 μM of CAPE for 24 hr. (A) RT-PCR was performed with NAG-1 specific primers. (B) Western blot analysis was carried out with anti-NAG-1 and anti-Actin antibodies.

생각된다. 이러한 결과는 Fig. 1의 cell viability assay 결과에서 세포증식 억제가 20 μM 때부터 급격히 이루어지는 것을 볼 때, pro-apoptotic 유전자인 *NAG-1*의 발현증가와 세포증식 억제 간의 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다.

여러 가지 파이토케미칼 처리에 의한 항암유전자 *NAG-1*의 발현증가

HCT116 세포주에 여러 가지 파이토케미칼을 처리한 후 *NAG-1* 유전자의 발현을 확인하였다. 즉, 인간 대장암 세포주인 HCT116 세포주에 VEH (vehicle, DMSO), 50 μM resveratrol (RES), 50 μM genistein (GEN), 50 μM daidzein (DA), 50 μM capsaicin (CPS) 그리고 20 μM CAPE를 각각 24시간 동안 처리한 후, RT-PCR을 수행하였다(Fig. 5A). 처리한 파이토케미칼의 농도는 선행된 cell viability assay 결과 대조군에 비해 생존율을 60~80% 정도 보여주는 농도로 정하였다(data not shown). 실험결과 DMSO 처리군에 비해 모든 파이토케미칼 처리군에서 항암 유전자인 *NAG-1*의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이것을 정량적으로 확인하기 위하여 동일한 RNA를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다(Fig. 5B). 그 결과 RT-PCR의 결과와 유사한 결과를 보여주었으며, 특히 CAPE를 처리한 경우 다른 파이토케미칼에 비하여 낮은 처리농도에도 불구하고 항암 유전자인 *NAG-1*의 발현이 가장 높게 증가되었다. 이전 보고에 의하면 resveratrol과 genistein은 전사조절인자 p53을 통하여 *NAG-1* 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[2,24]. 그러나 daidzein, capsaicin, CAPE에 의한 *NAG-1*의 발현과 발현조절은 보고된 바 없다. 따라서, 추후 이러한 파이토케미칼에 의한 *NAG-1*의 발현과 발현조절의 연구가 필요하다고 판단된다. 결론적으로, 이러한 연구결과는 CAPE가 다른 파이토케미칼에 비해 항암유전자인 *NAG-1*을 강하게 유

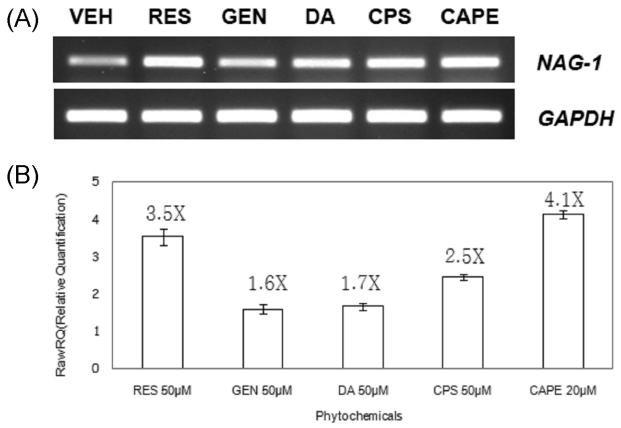

Fig. 5. Up-regulation of *NAG-1* by several phytochemicals. HCT116 cells were treated with vehicle (DMSO), resveratrol (RES, 50 μM), genistein (GEN, 50 μM), daidzein (DA, 50 μM), capsaicin (CPS, 50 μM) or caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 20 μM) for 24 hr. (A) Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with *NAG-1* gene specific primers. (B) Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR with *NAG-1* gene specific primers.

도함으로서, 낮은 처리농도에서도 효율적인 암세포 증식억제 활성을 가지는 것으로 생각된다.

요 약

파이토케미칼의 일종인 CAPE가 암세포 생장에 미치는 영향과 유전자 발현을 연구하기 위하여, 인간 대장암 세포주 HCT116에 CAPE를 처리하였다. CAPE의 처리는 농도 의존적으로 암 세포 생존율을 감소시키고, 세포사멸을 유도함을 확인하였다. CAPE에 의해 차별적으로 발현되는 유전자를 분석하기 위하여, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과, 20 μM CAPE를 24시간 동안 처리한 경우, 2배 이상 발현이 증가되는 유전자 266개, 2배 이상 발현이 감소되는 유전자 143개를 확인하였다. 발현이 증가되는 유전자중 3개(*NAG-1*, *p21*, *GADD45A*)를 선택하여, RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 모든 유전자의 발현이 마이크로어레이 실험결과와 일치하였다. 또한, CAPE를 농도 의존적으로 처리한 후, NAG-1 유전자와 단백질의 발현을 확인한 결과, mRNA 수준과 단백질 수준에서의 발현양상이 동일함을 확인하였다. 게다가, CAPE를 포함한 5개의 다른 종류의 파이토케미칼(resveratrol, genistein, daidzein, capsaicin)을 처리한 경우, 처리한 모든 파이토케미칼에 의해 *NAG-1* 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이 중 CAPE가 가장 낮은 농도의 처리임에도 불구하고 *NAG-1*의 발현을 가장 강하게 유도하였다. 결론적으로 이러한 연구결과는 CAPE에 의한 세포사멸은 항암유전자인 *NAG-1*의 과대발현과 밀접한 관련이 있음을 의미한다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-313-F00132).

References

1. Baek, S. J., J. S. Kim, J. B. Nixon, L. C. Wilson, and T. E. Eling. 2001. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol. Pharmacol.* **59**, 901-908.
2. Baek, S. J., L. C. Wilson, and T. E. Eling. 2002. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. Carcinogenesis **23**, 425-434.
3. 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.
4. Chen, Y. J., M. S. Shiao, and S. Y. Wang. 2001. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs* **12**, 143-149.
5. Chen, M. J., W. H. Chang, C. C. Lin, C. Y. Liu, T. E. Wang, C. H. Chu, S. C. Shih, and Y. J. Chen. 2008. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology* **8**, 566-576.
6. Corn, P. G. and W. S. El-Deiry. 2007. Microarray analysis of p53-dependent gene expression in response to hypoxia and DNA damage. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1858-1866.
7. Fesen, M. R., Y. Pommier, F. Leteurtre, S. Hiroguchi, J. Yung, and K. W. Kohn. 1994. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 595-608.
8. Foo, E., E. Bullier, M. Goussot, F. Foucher, C. Rameau, and C. A. Beverideg. 2005. The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* **17**, 464-474.
9. He, Y. J., B. H. Liu, D. B. Xiang, Z. Y. Qiao, T. Fu, and Y. H. He. 2006. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J. Gastroenterol.* **12**, 4981-4985.
10. Jacobs, D. R. Jr, L. Marquart, J. Slavin, and L. H. Kushi. 1998. Whole-grain intake and cancer: an expanded review and meta-analysis. *Nutr. Cancer* **30**, 85-96.
11. Jin, U. H., K. H. Song, M. Motomura, I. Suzuki, Y. H. Gu, Y. J. Kang, T. C. Moon, and C. H. Kim. 2008. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol. Cell Biochem.* **310**, 43-48.
12. Jung, W. K., I. Choi, D. Y. Lee, S. S. Yea, Y. H. Choi, M. M. Kim, S. G. Park, S. K. Seo, S. W. Lee, C. M. Lee, Y. M. Park, and I. W. Choi. 2008. Caffeic acid phenethyl ester protects mice from lethal endotoxin shock and inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages via the p38/ERK and NF-kappaB pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 2572-2582.
13. Kuo, H. C., W. H. Kuo, Y. J. Lee, W. L. Lin, F. P. Chou, and T. H. Tseng. 2006. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* **234**, 199-208.
14. Lampe, J. W. and J. L. Chang. 2007. Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition. *Senin. Cancer Biol.* **17**, 347-353.
15. Lee, K. W., N. J. Kang, J. H. Kim, K. M. Lee, D. E. Lee, H. J. Hur, and H. J. Lee. 2008. Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes Nutr.* **2**, 319-322.
16. Maekawa, T, Y. Sano, T. Shinagawa, Z. Rahman, T. Sakuma, S. Nomura, J. D. Licht, and S. Ishii. 2008. ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* **27**, 1045-1054.
17. Michaluart, P, J. L. Masferrer, A. M. Carothers, K. Subbaramaiah, B. S. Zweifel, C. Koboldt, J. R. Mestre, D. Grunberger, P. G. Sacks, T. Tanabe, and A. J. Dannenberg. 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res.* **59**, 2347-2352.
18. Rahman, K. W., Y. Li, Z. Wang, S. H. Sarkar, and F. H. Sarkar. 2006. Gene expression profiling revealed survivin as a target of 3,3'-diindolylmethane-induced cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 4952-4960.
19. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
20. Sun, S. Y., N. Hail Jr, and R. Lotan. 2004. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 662-672.
21. Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
22. Takahashi, Y., J. A. Lavigne, S. D. Hursting, G. V. Chandramouli, S. N. Perkins, J. C. Barrett, and T. T. Wang. 2004. Using DNA microarray analyses to elucidate the effects of genistein in androgen-responsive prostate cancer cells: identification of novel targets. *Mol. Carcinog.* **41**, 108-119.
23. Wang, D, D. B. Xiang, Y. J. He, Z. P. Li, X. H. Wu, J. H.

Mou, H. L. Xiao, and Q. H. Zhang. 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* **11**, 4008-4012.

24. Wilson, L. C., S. J. Baek, 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.
25. Xiang, D., D. Wang, Y. He, J. Xie, Z. Zhong, Z. Li, and J. Xie. 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* **17**, 753-762.