ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2012** Vol. 22. No. 4. 492~498 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.4.492

Curcumin Inhibits Cell Proliferation of Human Colorectal HCT116 Cells through Up-Regulation of Activating Transcription Factor 3 (ATF3)

Hyo-Rim Kim, Jung-Bin Son, Seung-Hyun Lim and Jong-Sik Kim*

Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received November 8, 2011 / Revised March 23, 2012 / Accepted April 23, 2012

To investigate whether phytochemicals affect cancer cell viability, human colorectal HCT116 cells were treated with four different phytochemicals. Among these phytochemicals, curcumin is the strongest inhibitor of cell proliferation. In addition, it decreased cell viability in a dose-dependent manner. To unveil the molecular mechanisms involved in the inhibition of cell proliferation by curcumin, we carried out oligo DNA microarray analysis. We found that 137 genes were up-regulated more than 2-fold, and 141 genes were down-regulated more than 2-fold by 25 μM curcumin treatment. Among the up-regulated genes, we selected 3 genes (ATF-3, GADD45A, and NR4A1) to confirm microarray data. The results of RT-PCR strongly agreed with those of the microarray data. Among the phytochemicals used in this study, curcumin is the strongest inducer of ATF3 expression, and increased ATF3 expression in a dose-dependent manner. Interestingly, FACS analysis showed that the inhibition of cell growth by curcumin was recovered by ATF3-siRNA transfection. Finally, we detected the changes of gene expression by ectopic expression of ATF3. The results indicated that many up-regulated genes were related to apoptosis. Overall, these results suggest that ATF3 may play an important role in the anti-proliferative activity of curcumin in human colorectal cancer cells.

Key words : Curcumin, cell proliferation, gene expression, ATF3, human colorectal cell

서 론

식물에서 추출된 화학 물질들을 총칭하는 파이토케미칼은 항염증, 항산화, 및 항암 활성 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[2,12,13]. 대표적인 식이용 파이토케미칼과 이들에 의한 화학적 암 예방법의 소개와 일부 기전들이 보고된 바 있다[16]. 이 총설에 소개된 대표적인 파이토케미칼은 강황에 풍부한 curcumin, 고추의 매운 맛 성분인 capsaicin, 포도껍질에 풍부한 resveratrol, 그리고 콩의 이소플라본 중의 하나인 genistein등을 들 수 있다.

이 중 curcumin은 다년생 식물인 강황(*Curcuma longa*)의 주요 파이토케미칼 성분으로서 항산화, 항염증, 항균 및 항암 등의 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다[4,6,9,18]. 최근 전립선암 모델에서 curcumin이 epigenetic regulator로서 활성을 가지며, 유전자 발현을 조절하는 것으로 보고되었다[7]. 또한, 이러한 curcumin을 비롯한 다른 천연물에 의한 epigenetic 변화 활성에 대한 총설이 발표된 바 있다[14]. 구강암 세포주에서는 curcumin이 notch-1과 NF-kB 신호전달체계를 억제시킴으로써, 암세포의 성장을 저해하고 세포사멸을 유도하는 것으로 보고 되었다[10]. 또한, 대장암 세포주 모델에서는curcumin이 miR-21의 발현을 조절함으로써, 암세포의 성장과 전이과정을 저해하는 것으로 보고되었다[11]. 그러나, 대장암 HCT116 세포주에서 curcumin에 의한 유전체 수준에서의 유전자 발현 변화와 조절에 관한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는 대장암 세포주에서 curcumin을 포함한 네 종류의 파이토케미칼에 의한 대장암 세포주 성장 억제 활성을 연구하였다. 또한, oligo DNA microarray실험을 수행하여 curcumin에 의해 발현 변화되는 유전자 군을 선별하였다. 발현이 증가되는 유전자 중 ATF3를 선택하여 curcumin에 의한 세포사멸과의 관련성을 검증하였으며, ATF3를 과대 발현시킨 후 유전자 발현 변화를 연구하였다. 이러한 연구결과는 curcumin에 의한 항암 활성과 이러한 활성의 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포배양 및 재료

대장암 세포주 HCT116는 American Type Culture Collection (ATCC, Frederick, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에는 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Daegu, Korea)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였다. 파이토케미칼(curcumin, capsaicin, resvera-

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

trol, genistein)과 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입을 하였다.

Cell viability assay (MTS assay)

파이토케미칼이 대장암 세포주 HCT116 세포의 성장에 미치는 영향을 확인 하기 위해 MTS assay를 수행하였다. 먼저 96 well plate에 3×10^3 cells/well의 세포를 접종하고, 24시간 후에 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium으로 배지를 교환한 후 25 μM의 파이토케미칼(capsaicin, curcumin, resveratrol, genistein)을 처리 또는 각 실험의 조건에 맞는 농도로 처리하였다. 이 후 실험과정은 기 발표된 논문에 의거하여 수행하였다[5].

Total RNA 추출 및 oligo DNA microarray 실험

Total RNA 추출은 수확한 세포주로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 최종적으로 정제된 total RNA는 NanoQuant Plate™를 이용하여 흡광도를 측정하여 정량 하였다. 유전자 발현분석을 위한 oligo DNA micaroarray 실험과 데이터의 분석은, 지노믹트리사에 위탁하여 수행하였다. 사용한 마이크로어레이는 Agilent사의 Agilent human oligo 1A arrays를 이용하였다.

RT-PCR 및 정량적 real-time PCR

RT-PCR은 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)을 이용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 정량적 real-time PCR은 ABI Prism 7500 cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 사용한 Primer는 Table 1과 같으며, PCR mixture는 10 μl의 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1 μl의 reverse primer, 1 μl의 forward primer를 첨가하여 증류수로 최종부피를 15 μl로 하였다. PCR mixture 15 μl와 cDNA 5 μl를 96 well optical reaction plate에 첨가하여 PCR 반응의 최종부피를 20 μl 로 하였다. 이 후 반응조건과 데이터의 분석은 기 발표된 논문에 의거하여 수행하였다[8].

Transient transfection

HCT116 세포주를 60 mm dish에 $3x10^5$개 분주하고, Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 대조군인 negative control (NC)-siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea)와 실험군인 ATF3-siRNA (Bioneer, Daejeon, Korea)를 제조사의 매뉴얼에 따라 transfection 하였다. 24시간 후, DMSO 혹은 25 μM의 curcumin을 처리하여 다시 24시간 동안 배양시킨 후 세포를 수확하여 RT-PCR 혹은 Flow cytometric 분석에 이용하였다. 한편, ATF3 유전자를 ectopic 발현시키기 위하여, pCG-ATF3 construct을 transfection 시켰다. 24시간 후에 세포를 수확하고 RNA를 추출하여 RT-PCR과 oligo DNA microarray실험에 이용하였다. pCG-ATF3 construct는 Dr. Tsonwin Hai (Ohio State University)에게서 제공받았다.

Flow cytometric analysis

분석을 위하여 수확한 세포는 PBS로 wash한 후 absolute ethanol로 세포를 고정하였다. 고정한 세포를 2% FBS, PBS, 1/1,000으로 filteration된 NaN_3가 포함된 FACS buffer 2 ml 넣어 두 번 wash후 RNase를 250 μl 처리하여 30분간 37℃에서 incubation하였다. 같은 volume의 Propidium Iodide (Sigma, St. Louis, MO, USA) 250 μl를 처리한 후, 빛을 차단한 상태에서 20분간 37℃에서 incubation하였다. 준비된 각 sample을 450 nm의 파장으로 FACS analysis를 수행하였다.

결과 및 고찰

파이토케미칼이 HCT116 세포주 성장에 미치는 영향

대장암 HCT116 세포주에서 4가지 종류의 파이토케미칼이 세포성장에 미치는 영향을 연구하였다. 즉, 파이토케미칼capsaicin (CAP), curcumin (CUR), genistein (GEN), 그리고 resveratrol (RES)을 최종처리 농도가 25 μM가 되도록 24시간 동안 처리한 후, cell viability assay를 수행하였다. 그 결과

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR or quantitative real-time PCR

Gene name	GenBank Acc. No.	Sequence / gene ID
GAPDH	NM_002046	F: 5′-CTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3′ R: 5′-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3′
GADD45A	NM_001924	F: 5′-TGCGAGAACGACATCAACAT-3′ R: 5′-TCCCGGCAAAAACAAATAAG-3′
ATF3	NM_004024	F: 5′-TGGTGTTTGAGGATTTTGCT-3′ R: 5′-ATTTCTTTCTCGTCGCCTCT-3′
ATF3	NM_004024	*Primer No. 467 (Bioneer, for real-time PCR)
NR4A1	NM_002135	**Primer No. 3,164 (Bioneer, for real-time PCR)

*, ** : These primers are purchased from Bioneer Inc. and used for only real-time PCR

capsaicin, resveratrol, genistein 처리군에서는 대조군에 비해 세포 생존율에 큰 변화를 보이지 않았으나, curcumin 처리군에서는 대조군과 비교하였을 때 약 35%의 세포 생존율 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 이러한 결과는 처리한 파이토케미칼 중curcumin에 의한 암세포 성장 억제 효과가 가장 높다는 것을 보여주는 것이다. 이러한 curcumin의 처리농도에 따른 대장암 세포주 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, curcumin을 5, 10, 15, 그리고 25 μM의 농도로 24시간 동안 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 1B에서 보는 바와 같이5 μM, 10 μM curcumin 처리군에서는 세포생존율에 미치는 영향이 거의 없었으나, 15 μM curcumin 처리군부터

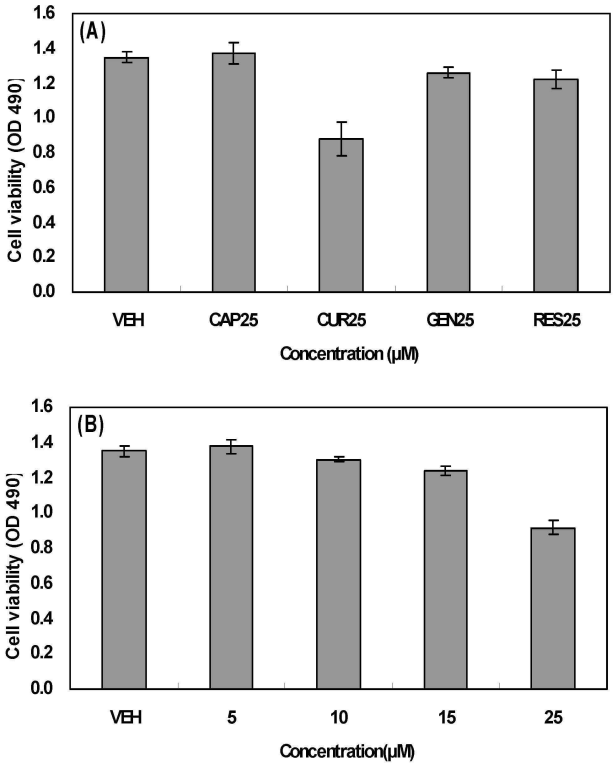

Fig. 1. Effects of phytochemicals on HCT116 cell viability. (A) HCT116 cells were treated with VEH (DMSO), capsaicin (CPS, 25 μM), curcumin (CUR, 25 μM), genistein (GEN, 25 μM), and resveratrol (RES, 25 μM) for 24 hr. Cell viability was measured by MTS assay. (B) HCT116 cells were incubated with various concentrations of curcumin (5, 10, 15, 25 μM) for 24hr. And then, cell viability was measured by MTS assay.

약 9% 정도의 생존율 감소를 확인하였다. 그리고, 25 μM curcumin 처리군에서는 약 33%의 세포 생존율 감소를 확인할 수 있었다.

Curcumin에 의한 유전자 발현 변화 분석

Curcumin의 처리에 의한 세포성장 억제 기전을 유전자 발현수준에서 이해하고자, oligo DNA microarray실험을 수행하였다. 대장암 세포주 HCT116에서 25 μM curcumin의 처리에 의해 발현이 변화되는 유전자 분석 결과, 2배 이상 발현이 증가된 유전자는 6,855개, 2배 이상 발현이 감소된 유전자는 8,134개가 검색되었다. 이 중 gene ontology 분석에 의해 세포사멸과 직접적으로 관련이 있는 것으로 생각되는 유전자를 분석한 결과 세포사멸과 관련된 유전자 중 2배 이상 발현이 증가된 유전자 137개, 2배 이상 발현이 감소되는 유전자 141개가 선별되었다. 발현이 증가된 유전자 중 activating transcription factor 3 (ATF3), nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1), growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A) 3개의 유전자를 선택하여 추후 연구를 진행하였다(Table 2). ATF3 유전자는 전사인자로서 ATF/CREB family에 속하며 전형적인 전사조절인자가 가지는 basic resion/leucine zipper (bZIP) domain을 가진다. 이러한 유전자는 physiological stress에 의해 유도되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 보고되었다[3]. 최근 연구 결과에 따르면 MDA-1986 세포에 ATF3를 과대 발현시켰을 경우 curcumin에 의한 apoptotic 효과를 증진시킨다고 보고되었다[19]. NR4A1 유전자는 nuclear orphan receptor로서 세포분화와 세포 생존에 관련이 있는 것으로 알려져 있으나, 최근 많은 연구에 의해 pro-apoptotic 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다[1,21]. GADD45A 유전자는 암 억제유전자 p53에 의해 유도되는 유전자로서, 최근 폐암세포주에서 curcumin처리에 의해 유도되며 세포사멸과 관련이 있는 것으로 보고되었다[15].

Real-time PCR을 통한 DNA microarray의 실험 검증

DNA microarray 실험 결과를 정량적으로 검증하기 위하여 25 μM curcimin 처리에 의해 발현이 증가되는 유전자 중 ATF3, NR4A1, GADD45A 유전자의 발현을 real-time PCR을 수행하여 확인하였다. 그 결과 대조군에 비해 curcumin을 처리하였을 때 모든 유전자들의 발현이 증가되었으며, microarray 실험 결과와 일치함을 확인하였다(Fig. 2). 이 중 curcu-

Table 2. Selected up-regulated genes by 25 μM curcumin treatment

No.	Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence Description	Fold Change
1	*NR4A1*	NM_002135	Nuclear receptor subfamily 4, groupA Member 1	7.69
2	*ATF3*	NM_001040619	Activating transcription factor 3	3.50
3	*GADD45A*	NM_001924	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	3.08

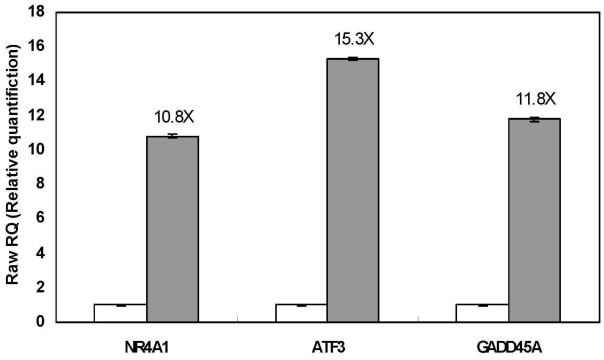

Fig. 2. Confirmation of microarray analysis with real time PCR. HCT116 cells were treated with 25 μM of curcumin or vehicle (VEH). Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR.

min에 의한 발현 증가가 가장 높은 ATF3 유전자(15.1배)를 선택하여 추후 실험을 진행하였다.

파이토케미칼 처리 및 농도별 curcumin 처리에 의한 ATF3 유전 자의 발현

대장암 세포주에 네 종류의 파이토케미칼(curcumin, capsaicin, genistein, resveratrol)을 처리 한 후, ATF3의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, capsaicin, genistein을 처리한 경우는 ATF3 유전자의 발현증가가 없었고, 그에 반해 curcumin과 resveratrol을 처리한 경우는 각각 11.8배와 5.3배의 발현증가를 보여 주었다(Fig. 3A). 이러한 연구결과를 Fig. 1A의 결과와 비교해 보면 ATF3유전자의 발현이 높을 수록 암세포 성장 저해률이 높음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 curcumin에 의한 세포사멸은 ATF3 유전자의 과대발현과 관련이 있음을 간접적으로 보여주는 결과이다.

또한, curcumin을 농도별(5, 10, 15, 25 μM)로 처리한 후 ATF3 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교해서 5 μM, 10 μM curcumin 처리군에서는 큰 변화를 보이지 않은 반면, 15, 25 μM 처리군에서는 ATF3 유전자의 발현이 각각3배, 10.3배 증가함을 확인하였다(Fig. 3B). 이러한 연구결과를 Fig. 1B의 결과와 비교 분석하면, 세포 생존율이 감소되는 시점과 ATF3 유전자의 발현 증가의 시점이 일치함을 확인할 수 있다. 이러한 연구결과는 curcumin에 의한 세포사멸은 ATF3 유전자의 과대발현과 관련이 있음을 간접적으로 보여주는 결과이다.

Curcumin에 의해 유도되는 세포사멸현상은 ATF3 발현 억제를 통해 회복

Curcumin 25 μM를 처리한 대장암 세포주의 세포사멸과 ATF3와의 직접적인 관련성을 확인하기 위해 ATF3-siRNA를 이용한 실험을 수행하였다. 즉, 대장암 세포주에 NC- siRNA와 ATF3-siRNA를 transient transfection하고, 24시간 후에

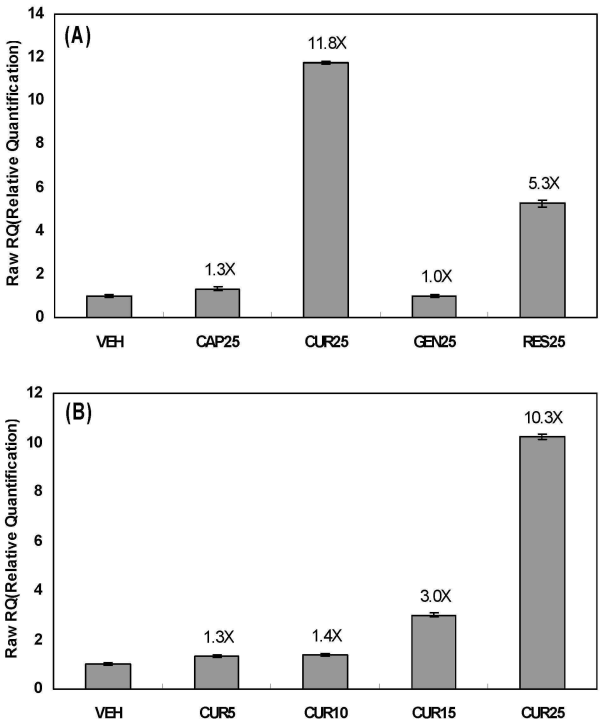

Fig. 3. Expression of ATF3 by phytochemicals. (A) HCT116 cells were treated with DMSO, capsaicin, curcumin, genistein, and resveratrol for 24 hr. Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR with ATF3 gene specific primers. (B) HCT 116 cells were treated with VEH or various concentrations of curcumin for 24 hr. Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR.

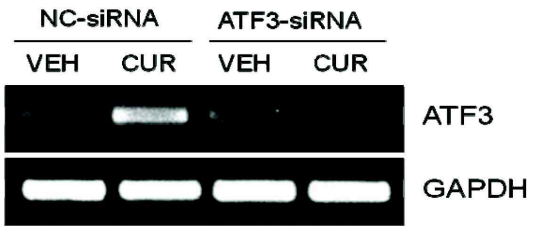

Fig. 4. Effects of knock-down of ATF3 on curcumin treated HCT116 cells. HCT116 cells were transfected with negative control(NC)-siRNA or ATF3-siRNA for 24 hr. After transfection, HCT116 cells were treated with VEH (DMSO) or curcumin 25 μM for 24 hr. Total RNA was prepared from treated cells and used for reverse-transcription PCR with ATF3 gene specific primers.

VEH (DMSO), 25 μM curcumin 을 24시간 동안 처리한 후 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, NC-siRNA를 transfection 한 후에 25 μM curcumin을 처리한 경우 ATF3 유전자의 발현이 큰 증가를 보인 반면, ATF3-siRNA를 transfection 한 후에 25

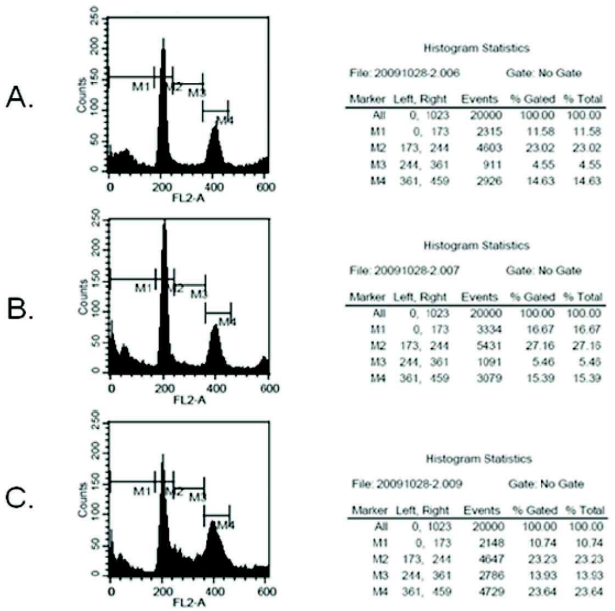

Fig. 5. Flow cytometric analysis in curcumin treated HCT116 cells. HCT116 cells were transfected with NC-siRNA or ATF3-siRNA before curcumin or DMSO treatment. And treated cells were collected and analyzed with Flow Cytometry. (A) NC-siRNA transfection and DMSO treatment, (B) NC-siRNA transfection and curcumin treatement, (C) ATF3-siRNA transfection and curcumin treatment.

μM curcumin 을 처리한 경우, ATF3 유전자의 발현이 대조군 수준까지 저해됨을 확인하였다(Fig. 4). 동일한 조건하에서 transfection과 curcumin을 처리한 후, flow cytometric analysis를 수행하였다. 그 결과, Fig. 5에서 보는 것과 같이, sub-G1기의 population 지수로써 apoptosis 정도를 나타내 주는 M1 수치를 비교해보면 NC-siRNA transfection 후에 VEH (DMSO)과 25 μM curcumin을 처리한 경우 M1 값이 각각 12%, 17%를 나타내어, curcumin에 의한 세포사멸이 증가함을 확인하였다. 그러나, ATF3-siRNA transfection 후에 25 μM curcumin을 처리한 경우 M1 수치가 11%로 ATF3의 발현 저해를 통해 curcumin에 의한 세포사멸이 회복됨을 확인할 수 있었다. 이러한 연구결과는 curcumin에 의한 세포사멸은 ATF3 유전자의 과대발현과 직접적인 관련이 있음을 보여주는 결과이다. 최근 resveratrol에 의한 세포사멸이 ATF3에 의해 유도 되는 것으로 보고되어[17], 본 연구결과와 일치함을 확인하였다.

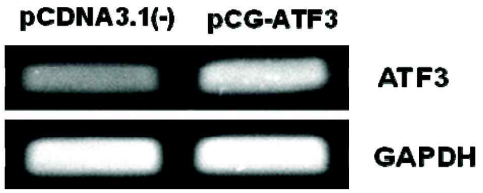

Fig. 6. ATF3 overexpression by pCG-ATF3 transfection. HCT116 cells were transfected with pCDNA3.1(-) or pCG-ATF3 for 24 hr. Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with GAPDH or ATF3 primers.

ATF3 과대 발현에 의해 차별적으로 발현되는 유전자군 선별

ATF3 유전자의 과대발현에 의해 조절되는 유전자들을 확인하기 위해 pCG-ATF3 construct을 transfection시킨 후, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. ATF3 과대 발현 여부는 RT-PCR을 통해 검증하였다(Fig. 6). DNA microarray실험 결과, Table 3에서 보는 것과 같이 세포사멸과 관련된 유전자들을 확인할 수 있었다. 이 중 가장 높은 발현 증가율을 보여준 DFFB 유전자는 세포사멸 동안 DNA 분절과 염색체 응축을 촉진하는 것으로 알려져 있다[20]. 이러한 연구결과는 curcumin에 의한 항 성장효과 혹은 세포사멸 현상은 ATF3 유전자의 과대발현과 직접적인 관련이 있으며, 이러한 ATF3유전자는 세포사멸과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것으로 생각된다.

Table 3. Selected up-regulated genes by ectopic expression of ATF3

No.	Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence Description	Fold Change
1	*DFFB*	NM_004402	DNA fragmentation factor, 40kDa, beta polypeptide (caspase-activated DNase)	12.7
2	*CFLAR*	NM_003879	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	12.4
3	*TLR2*	NM_003264	Toll-like receptor 2	5.7
4	*TGFB1*	NM_000660	Transforming growth factor, beta 1	3.7
5	*AIFM3*	NM_001018060	Apoptosis-inducing factor, itochondrion-associated, 3	2.8
6	*GADD45B*	NM_015675	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	2.5
7	*TP53AIP1*	NM_022112	Tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1	2.5
8	*TP73*	NM_005427	Tumor protein p73	2.1

References

1. Chang, L. F., P. C. Lin, L. I. Ho, P. Y. Liu, W. C. Wu, I. P. Chiang, H. W. Chang, S. Z. Lin, Y. C. Harn, H. J. Harn, and T. W. Chiou. 2011. Overexpression of the orphan receptor Nur77 and its translocation induced by PCH4 may inhibit malignant glioma cell growth and induce cell apoptosis. *J. Surg. Oncol.* **103**, 442-450.
2. Das, S. and D. K. Das. 2007. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **6**, 168-173.
3. Hartman, M. G., D. Lu, M. L. Kim, G. J. Kociba, T. Shukri, J. Buteau, X. Wang, W. L. Frankel, D. Guttridge, M. Prentki, S. T. Grey, D. Ron, and T. Hai. 2004. Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5721-5732.
4. Jacob, A., R. Wu, M. Zhou, and P. Wang. 2007. Mechanism of the anti-inflammatory effect of curcumin: PPAR-gamma. *PPAR Res.* **2007**, 1-5.
5. Jang, M. J., H. E. Kim, S. M. Son, M. J. Kim, E. W. Seo, Y. H. Kim, and J. S. Kim. 2009. Over-expression of NSAID activated gene-1 by caffeic acid phenethyl ester. *J. Life Sci.* **19**, 1787-1793.
6. Kaur, S., N. H. Modi, D. Panda, and N. Roy. 2010. Probing the binding site of curcumin in Escherichia coli and Bacillus subtilis FtsZ--a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4209-4214.
7. Khor, T. O., Y. Huang, T. Y. Wu, L. Shu, J. Lee, and A. N. Kong. 2011. Pharmacodynamics of curcumin as DNA hypomethylation agent in restoring the expression of Nrf2 via promoter CpGs demethylation. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 1073-1078.
8. Kim, H. E., M. J. Jang, S. H. Lim, H. R. Kim, S. Y. Kim, G. J. Lee, and J. S. Kim. 2010. Analysis of p53 dependency of differentially expressed genes by capsaicin in human colorectal cancer cell. *J. Life Sci.* **20**, 213-218.
9. Kolodziejczyk, J., B. Olas, J. Saluk-Juszczak, and B. Wachowicz. 2011. Antioxidative properties of curcumin in the protection of blood platelets against oxidative stress in vitro. *Platelets* **22**, 270-276.
10. Liao, S., J. Xia, Z. Chen, S. Zhang, A. Ahmad, L. Miele, F. H. Sarkar, and Z. Wang. 2011. Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of Notch-1 and NF-κB signaling pathways. *J. Cell Biochem.* **112**, 1055-1065.
11. Mudduluru, G., J. N. George-William, S. Muppala, I. A. Asangani, R. Kumarswamy, L. D. Nelson, and H. Allgayer. 2011. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci. Rep.* **31**, 185-197.
12. Park, C. E., H. Yun, E. B. Lee, B. I. Min, H. Bae, W. Choe, I. Kang, S. S. Kim, and J. Ha. 2010. The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. *J. Med. Food* **13**, 815-820.
13. Rajamanickam, S. and R. Agarwal. 2008. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Dev. Res.* **69**, 460-471.
14. Reuter, S., S. C. Gupta, B. Park, A. Goel, and B. B. Aggarwal. Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes Nutr.* **6**, 93-108.
15. Saha, A., T. Kuzuhara, N. Echigo, A. Fujii, M. Suganuma, and H. Fujiki. 2010. Apoptosis of human lung cancer cells by curcumin mediated through up-regulation of "growth arrest and DNA damage inducible genes 45 and 153. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1291-1299.
16. Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
17. Whitlock, N. C., J. H. Bahn, S. H. Lee, T. E. Eling, and S. J. Baek. 2011. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Krüppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. *Cancer Prev. Res.* **4**, 116-127.
18. Wilken, R., M. S. Veena, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan. 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **10**, 1-19.
19. Yan, C., M. S. Jamaluddin, B. Aggarwal, J. Myers, and D. D. Boyd. 2005. Gene expression profiling identifies activating transcription factor 3 as a novel contributor to the proapoptotic effect of curcumin. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 233-241.
20. Yoshida, A., Y. Pommier, and T. Ueda. 2006. Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. *Int. J. Hematol.* **84**, 31-37.
21. Yu, H., S. M. Kumar, D. Fang, G. Acs, and X. Xu. 2007. Nuclear orphan receptor TR3/Nur77 mediates melanoma cell apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 405-412.

초록 : ATF3 발현을 통한 curcumin의 대장암 세포 성장 저해

김효림 · 손정빈 · 임승현 · 김종식*
(안동대학교 자연과학대학 생명과학과)

파이토케미칼이 암 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 대장암 세포주 HCT116에 네 종류의 파이토케미칼을 각각 25 μM의 농도로 처리하였다. 처리한 파이토케미칼 중 curcumin이 가장 강력하게 세포 성장을 억제하였다. 또한 curcumin은 농도의존적으로 세포 성장을 억제하였다. Curcumin에 의한 대장암 세포주 성장 저해 활성에 대한 분자생물학적 기전을 연구하기 위하여 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과, 25 μM curcumin 처리에 의해 2배 이상 발현이 증가된 유전자 137개, 발현이 감소된 유전자 141개를 선별하였다. 발현이 증가된 유전자 중, 세포사멸과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 유전자 3개를 선택하여, RT-PCR을 통해 이들 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 처리한 파이토케미칼 중 curcumin은 가장 강력한 ATF3의 유도자였으며, 농도의존적으로 ATF3의 발현을 증가시켰다. 흥미롭게도, curcumin에 의한 성장 저해는 ATF3-siRNA에 의한 ATF3 유전자 발현감소에 의해 성장이 회복되었다. 또한, ATF3 유전자의 과대발현 후 발현이 변화되는 유전자를 선별한 결과, 세포사멸과 관련된 많은 유전자들이 증가됨을 확인하였다. 결론적으로, 대장암 세포주에서 curcumin에 의한 항 성장활성에 있어서 ATF3 유전자가 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.