

Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces the Expression of NAG-1 via Activating Transcription Factor 3

Min-Hee Park¹, Chungwook Chung¹, Seong Ho Lee², Seung Joon Baek³ and Jong Sik Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Department of Nutrition & Food Science, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

³College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

Received September 21, 2017 / Revised November 21, 2017 / Accepted November 24, 2017

Non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 (NAG-1) is a transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily gene associated with pro-apoptotic and anti-tumorigenic activities. In the present study, we investigated if caffeic acid phenethyl ester (CAPE) derived from propolis could induce the expression of anti-tumorigenic gene NAG-1. Our results indicate that CAPE significantly induced NAG-1 expression in a time- and concentration-dependent manner in HCT116 cells. We also found that CAPE induced NAG-1 expression in a concentration-dependent manner in another human colorectal cancer cell line, LOVO. In addition, CAPE triggered apoptosis, which was detected with Western blot analysis using poly-(ADP-ribose) polymerase antibody. NAG-1 induction by CAPE was not dependent on transcription factor p53, which was confirmed with Western blot analysis using p53 null HCT116 cells. The luciferase assay results indicated that the new cis-elements candidates were located between -474 and -1,086 of the NAG-1 gene promoter. CAPE dramatically induced activating transcription factor 3 (ATF3) expression, but not cAMP response element-binding protein (CREB), which shares the same binding sites with ATF3. The co-transfection experiment with pCG-ATF3 and pCREB showed that only ATF3 was associated with NAG-1 up-regulation by CAPE, whereas CREB had no effect. In conclusion, the results suggest that CAPE could induce the expression of anti-tumorigenic gene NAG-1 mainly through ATF3.

Key words : Apoptosis, ATF3, caffeic acid phenethyl ester, human colorectal cancer, NAG-1

서 론

대장암은 남성과 여성에서 암의 발병률과 사망률에 있어서 상위 3개의 암 중의 하나이다[23]. 대장암은 어떤 종류의 암보다도 음식과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[3, 14]. 붉은 고기를 포함한 대부분의 육류 섭취는 대장암의 위험을 증가시키는 반면, 채소와 과일 등의 섭취는 대장암의 위험을 감소시키는 것으로 보고되고 있다[1, 2, 11, 19]. 이러한 배경하에 채소, 과일 또는 식물 유래의 다양한 생리활성물질에 의해 암을 예방하는 방법인 암 화학예방법(cancer chemo-prevention)이 주목을 받고 있다[20]. 이러한 식물유래의 생리활성물질을 파이토케미칼(phytochemical)이라고 하며, 대표적인 예로는 강황유래의 curcumin, 녹차의 카테킨 중 하나인 EGCG 그리고 포도 껍질 유래의 resveratrol 등이 있으며, 이들에 의

한 대장암 예방활성과 작용기전이 보고되었다[10, 21, 25]. 암 화학예방법에 사용되는 대표적인 물질로는 파이토케미칼 이외에 아스피린과 같은 NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs)와 비타민 등을 들 수 있으나, 천연물유래인 파이토케미칼이 가장 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 프로폴리스에 다량 함유되어 있는 파이토케미칼인 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)의 항암 활성과 작용기전을 연구하고자 하였다. CAPE는 항산화, 항염증, 항암 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 물질로서 알려져 있다[12, 15, 18]. 그러나, 아직까지 CAPE에 의한 항암 유전자 NAG-1의 발현과 발현조절에 대한 연구는 보고된 바 없다. NAG-1 유전자는 TGF- β superfamily의 하나로서 NSAID에 의해 발현이 증가되는 유전자로 처음 보고 되었으며[5], 다양한 생리활성물질에 의해 발현이 증가되며 anti-tumorigenic 활성과 pro-apoptotic 활성이 보고 된 바 있다[6, 8, 27]. 특히, NAG-1을 과대 발현하는 transgenic 마우스모델에서도 항암 활성이 보고 되었으며, 최근에는 동일한 마우스에서 항 비만 활성이 보고된 바 있다[7, 13].

본 연구에서는 파이토케미칼 CAPE에 의한 항암 활성과 작용기전을 이해하기 위하여, 항암 유전자인 NAG-1 유전자의

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

발현과 발현조절을 연구하였다. 이러한 연구는 프로폴리스 유래 파이토케미칼 CAPE에 의한 암 예방활성과 작용기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 판단된다.

재료 및 방법

세포주 및 시약

인간 대장암 세포주 HCT116와 LOVO 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) 에서 구입하였고, p53-null HCT116 세포주는 Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) 박사로부터 제공받았다. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)는 Calbiochem 사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 3종류의 NAG-1 promoter constructs (pNAG-1086/+41, pNAG-474/+41, pNAG-133/+41)는 National Institute of Environmental Health Sciences (Research Triangle Park, NC, USA)의 Dr. Eling group으로부터 제공받았다. ATF3 발현 벡터 (pCG-ATF3)는 T. Hai 박사(Ohio state University, Columbus, OH, USA)로부터 제공받았고, CREB 발현벡터(pCREB)는 Philip Cohen 박사(University of Dundee, Scotland, UK)로부터 제공받았다.

Western blot analysis

수확한 세포로부터 RIPA 용액(50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate)을 이용하여 총 단백질을 분리하였다. 총 30 µg의 단백질을 4-12% acrylamide gel에서 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane으로 전기적으로 전달하였다. 본 연구에 사용한 1차 항체인 ATF3, CREB, ACTIN에 대한 항체와 2차 항체인 HRP-conjugated rabbit antibody와 HRP-conjugated mouse antibody는 모두 Santa Cruz 사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p53과 PARP에 대한 항체는 Cell Signaling사 (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. NAG-1 항체는 미국 National Institute of Environmental Health Sciences (Research Triangle Park, NC, USA)의 Dr. Eling group으로부터 제공받았다.

Transfection과 luciferase assay

HCT116 세포주를 6 well plate에 well당 1×10^5 세포를 접종한 후, 24시간 이후에 3종류의 NAG-1 promoter constructs (pNAG-1086/+41, pNAG-474/+41, pNAG-133/+41)를 1 µg, 그리고 pRL-null (Promega, Madison, WI, USA)을 0.05 µg씩 Fugene 6 (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 transfection 하였다. Transfection 24시간 후에 25 µM CAPE와 DMSO를 24시간 동안 처리한 후 Dual Luciferase Assay Kit (Promega)를 이용하여 luciferase assay를 수행하였다. Co-transfection 실험을 위해서는 NAG-1 promoter construct

(pNAG-1086/+41) 0.5 µg, pRL-null vector를 0.05 µg 그리고 pCREB과 pCG-ATF3를 각각 주어진 농도조건에 따라 첨가하고 48시간 동안 transfection 하였다. 이 후 Dual Luciferase Assay Kit (Promega)를 이용하여 luciferase assay를 수행하였다.

통계처리

Luciferase assay는 3회 반복 실험을 실시하였으며, 실험결과를 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험결과와 유의성 검토는 Student's t-test에 의해 판정하였으며 p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

CAPE에 의한 NAG-1 단백질의 발현 증가와 세포 사멸

인간 대장암 세포주 HCT116에서 프로폴리스에 함유되어 있는 파이토케미칼인 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)의 처리에 의해 항암 유전자인 nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) 단백질의 발현 변화를 확인하였다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이, CAPE를 5, 10, 20 µM의 농도로 24시간 처리한 경우 농도 의존적으로 NAG-1 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한, 10 µM의 CAPE를 2, 4, 6, 8, 24시간 처리한 후 NAG-1 단백질의 발현을 확인한 결과, 6시간 처리 후부터 NAG-1 단백질의 발현이 확연히 증가되었고 처리시간이 경과됨에 따라 NAG-1 단백질의 발현이 지속적으로 증가됨을 확인하였다(Fig. 1B). 인간 대장암의 다른 세포주인 LoVo 세포주에 CAPE를 1, 5, 10, 25 µM 농도로 24시간 처리한 후, NAG-1 단백질의 발현 증가를 확인하였다(Fig. 1C). 1 µM 처리군부터 NAG-1 단백질의 약한 증가를 보이면서, 10 µM 처리군부터 농도의존적인 증가 양상을 보여주었다. 이러한 결과는 CAPE에 의한 NAG-1 단백질의 발현 증가가 HCT 116 세포주에 특이적인 현상이 아니라는 것을 시사한다.

대장암 세포주 HCT116에서 CAPE의 처리는 β-catenin 경로를 저해하면서 apoptosis를 유도하는 것으로 보고 된바 있으나[26, 28], 아직까지 항암 유전자인 NAG-1 발현과의 연관성이나 기전을 연구한 논문은 전혀 없다. 본 연구에서는 HCT 116 세포주에서 CAPE에 의한 apoptosis가 일어나는지 규명하기 위하여 poly (ADP-ribose)-polymerase (PARP) 단백질의 cleavage를 확인하였다. PARP 단백질은 116 kDa의 apoptosis 지표 단백질 중 하나로서 세포 내에서 apoptosis가 일어나면 89 kDa과 24 kDa으로 cleavage가 일어난다[24]. 10 µM의 CAPE를 처리한 경우 약한 PARP cleavage를 확인할 수 있었으며, 20 µM의 CAPE를 처리한 경우 cleaved PARP가 확연히 증가됨을 확인하였다(Fig. 1D). 또한, 20 µM의 CAPE를 24시간 동안 처리한 후 DAPI 염색을 하여 핵을 관찰한 결과 apoptosis의 특징인 핵의 fragmentation과 condensation 현상을 관찰할 수 있었다(data not shown). 이러한 결과는 CAPE의 처리

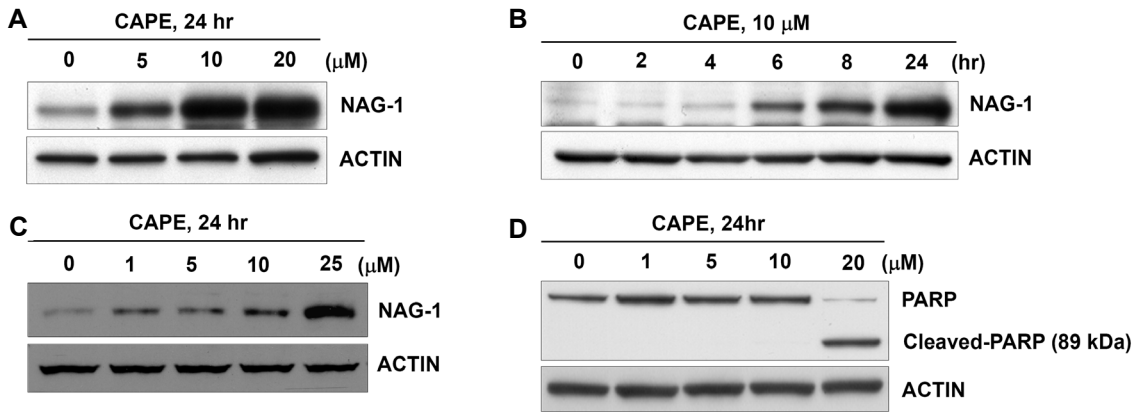


Fig. 1. NAG-1 induction by CAPE in human colorectal cancer cells. (A) HCT116 cells were incubated with indicated concentrations of CAPE for 24 hr. Thirty micrograms of total proteins were prepared and Western blot analysis was done using NAG-1 and ACTIN antibodies. (B) HCT116 cells were treated with 10 μ M CAPE and then cells were harvested at indicated time points after treatment. Total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed with using NAG-1 and ACTIN antibodies. (C) LOVO cells were treated with indicated concentrations of CAPE for 24 hr. Total proteins were prepared and Western blot analysis was done using NAG1 and ACTIN antibodies. (D) HCT116 cells were incubated with indicated concentrations of CAPE for 24 hr. Thirty micrograms of total proteins were prepared and Western blot analysis was done using PARP and ACTIN antibodies.

에 의해 HCT116 세포주에서 apoptosis가 일어나고 있음을 시사한다.

CAPE에 의한 NAG-1의 발현 증가는 p53 비의존적으로 일어남

몇 종류의 파이트케미칼 처리에 의한 NAG-1의 발현 증가가 전사조절인자 p53을 통해 조절된다는 보고가 있었다[8, 9, 27]. CPAE에 의한 NAG-1의 조절 또한 p53에 의해 이루어지는지 확인하기 위하여 p53 null HCT116 세포주를 이용하여 CAPE의 처리에 의한 NAG-1의 발현 유무를 확인하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 대조구에 비해 p53 null HCT116 세포주에서 NAG-1의 발현양이 전반적으로 감소하지만, p53 null HCT116 세포주에서도 CAPE에 의한 NAG-1의 발현이 농도의존적으로 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 CAPE에 의한 NAG-1의 발현증가가 전사조절인자 p53이 아닌 다른 전사조절인자에 의해서도 발현이 조절된다는 것을 의미한다. 새로운 NAG-1의 전사조절인자를 검색하기 위하여 3가지의 NAG-1 promoter construct (pNAG-1086/+41, pNAG-474/+41, pNAG-133/+41)을 이용하여 promoter assay를 수행하였다. 그 결과, CAPE에 의한 NAG-1의 발현에 관련된 cis-element는 NAG-1 promoter의 -474에서 -1,086에 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2B). 이러한 NAG-1 promoter 부위에 작용하는 새로운 전사조절인자를 검색하기 위하여 추가 실험을 진행하였다.

CAPE에 의한 NAG-1의 발현은 ATF3를 통하여 유도

Baek, *et al.* [4]의 보고에 의하면 녹차의 카테킨 성분 중 하나인 ECG에 의한 NAG-1의 발현증가가 ATF3에 의해 일어나며,

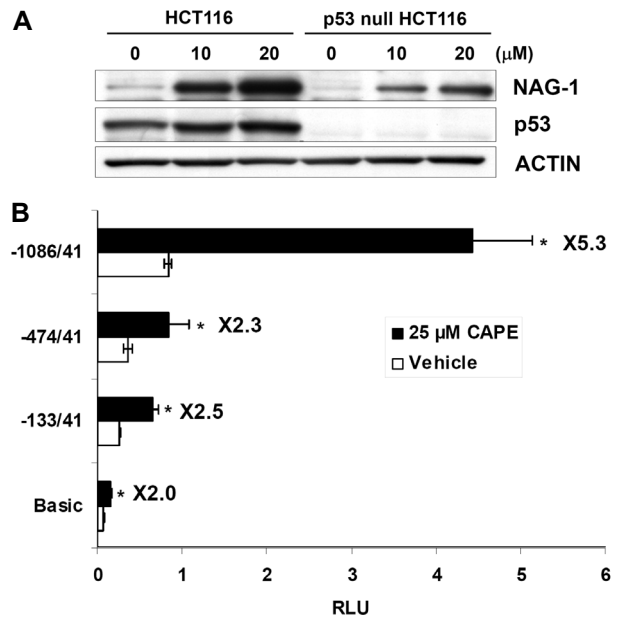


Fig. 2. P53 dependency on NAG-1 up-regulation by CAPE. (A) HCT116 cells or p53 null HCT116 were treated with indicated concentrations of CAPE for 24 hr. Total cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed using NAG-1 and ACTIN antibodies. (B) HCT116 cells were co-transfected with three different NAG-1 promoter constructs and pRL-null vector whereas pGL3-Basic vector (Basic) was used as a negative control. After 24 hr of transfection, the cells were incubated with 25 μ M CAPE for 24 hr. The cells were harvested and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Assay Kit. Bars are mean values \pm SD from 3 independent experiments. * p <0.05 vs vehicle.

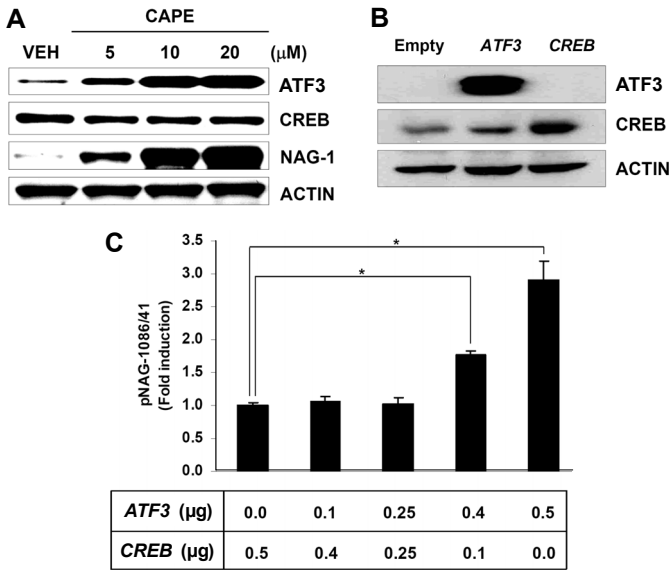


Fig. 3. Involvement of ATF3 in NAG-1 induction by CAPE. (A) HCT116 cells were incubated with indicated concentrations of CAPE for 24 hr. Total cell lysates were prepared and Western blot analysis was done using ATF3, CREB, NAG-1 and ACTIN antibodies. (B) HCT116 cells were transfected with pCG-ATF3 or pCREB. After 48 hr of transfection, the expression of ATF3 and CREB was detected with Western blot analysis using ATF3 and CREB antibodies. (C) For co-transfection experiment, 0.5 μg of pNAG-1086/+41 construct and indicated amounts of pCG-ATF3 and pCREB were transfected with 0.05 μg of pRL-null vector. After 48 hr of transfection, the cells were harvested and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Assay Kit. Bars are mean values ± SD from 3 independent experiments. **p*<0.05.

NAG-1 프로모터의 -955와 -948사이에 ATF3 결합부위(5'-TGACGTCA-3')가 있는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 연구에서도 CAPE에 의한 NAG-1의 발현증가가 전사인자인 ATF3를 통해 이루어지는지 확인하고자 하였다. 먼저, CAPE에 의한 ATF3 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 그 결과, ATF3 단백질은 CAPE의 처리에 의해 농도의존적으로 발현이 증가되었다 (Fig. 3A). 한편 ATF3와 결합부위를 공유하는 전사인자 CREB 단백질의 발현 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 3A). ATF3 유전자와 CREB 유전자를 transient transfection 시켜서, ATF3와 CREB 단백질의 발현을 확인한 다음(Fig. 3B), ATF3와 CREB 유전자를 농도별로 pNAG-1086/+41 construct와 co-transfection 시키고 promoter assay를 수행 한 결과, ATF3의 농도가 증가됨에 따라 luciferase 활성이 증가되었으나, 이에 반해 co-transfection한 CREB의 농도 변화는 luciferase 활성의 변화에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 3C). 이러한 연구결과는 CAPE에 의한 NAG-1의 발현증가는 주로 전사조절인자인 ATF3를 통해 이루어진다는 것을 시사한다. ATF3는

ATF/CREB 가계의 전사조절인자로서 대장암 세포주 모델에서 다양한 천연물에 의해 발현이 유도되며, 이러한 ATF3의 발현증가와 apoptosis 유도가 직접적인 관련이 있음이 보고되었다[16, 17, 22].

지금까지 보고된 파이토케미칼이나 일부 NSAID에 의한 NAG-1의 발현 조절기전을 정리하면 Fig. 4와 같다. 파이토케미칼 resveratrol (RES), genestein (GEN), diallyl disulfide (DADS)에 의한 NAG-1의 발현 증가는 전사조절인자 p53에 의해 조절되고[8, 9, 27], NSAID의 하나인 sulindac sulfide (SS)에 의한 NAG-1의 발현은 전사조절인자 EGR-1을 통해 이루어지며[5], 녹차의 카테킨 성분 중 하나인 ECG에 의한 NAG-1의 발현 증가는 전사조절인자인 ATF3에 의해 이루어진다고 보고 되었다[4]. 본 연구에서는 프로폴리스에 함유되어 있는 파이토케미칼인 CAPE에 의해 NAG-1 단백질의 발현이 증대되고, 이는 전사조절인자인 ATF3에 의해 이루어진다는 것을 최초로 보고하는 것이다.

감사의 글

본 연구는 2015학년도 안동대학교 연구비에 의하여 연구되었음.

References

- Annema, N., Heyworth, J. S., McNaughton, S. A., Iacopetta, B. and Fritschi, L. 2011. Fruit and vegetable consumption and the risk of proximal colon, distal colon, and rectal cancers in a case-control study in Western Australia. *J. Am. Diet. Assoc.* **111**, 1479-1490.
- Aykan, N. F. 2015. Red meat and colorectal cancer. *Oncol. Rev.* **9**, 288.
- Azeem, S., Gillani, S. W., Siddiqui, A., Jandrajupalli, S. B.,

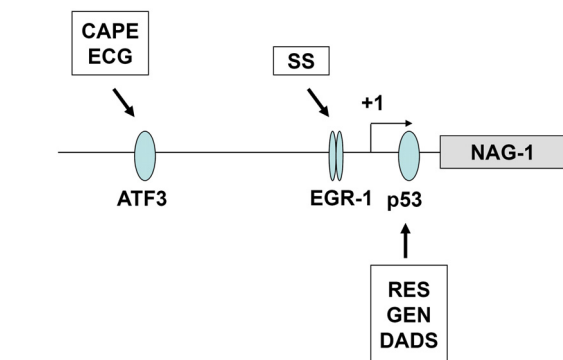


Fig. 4. Summarized schematic diagram on NAG-1 induction by various chemo-preventive chemicals.

- Poh, V. and Syed Sulaiman, S. A. 2015. Diet and Colorectal Cancer Risk in Asia--a Systematic Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 5389-5396.
4. Baek, S. J., Kim, J. S., Jackson, F. R., Eling, T. E., McEntee, M. F. and Lee, S. H. 2004. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**, 2425-2432.
 5. Baek, S. J., Kim, J. S., Moore, S. M., Lee, S. H., Martinez, J. and Eling, T. E. 2005. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol. Pharmacol.* **67**, 356-364.
 6. Baek, S. J., Kim, J. S., Nixon, J. B., DiAugustine, R. P. and Eling, T. E. 2004. Expression of NAG-1, a transforming growth factor-beta superfamily member, by troglitazone requires the early growth response gene EGR-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 6883-6892.
 7. Baek, S. J., Okazaki, R., Lee, S. H., Martinez, J., Kim, J. S., Yamaguchi, K., Mishina, Y., Martin, D. W., Shoieb, A., McEntee, M. F. and Eling, T. E. 2006. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 over expression in transgenic mice suppresses intestinal neoplasia. *Gastroenterology* **131**, 1553-1560.
 8. Baek, S. J., Wilson, L. C. and Eling, T. E. 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.
 9. Bottone, F. G. Jr, Baek, S. J., Nixon, J. B. and Eling, T. E. 2002. Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J. Nutr.* **132**, 773-778.
 10. Buhmann, C., Shayan, P., Popper, B., Goel, A. and Shakibaei, M. 2016. Sirt1 Is Required for Resveratrol-Mediated Chemopreventive Effects in Colorectal Cancer Cells. *Nutrients* **8**, 145.
 11. Carr, P. R., Holleczeck, B., Stegmaier, C., Brenner, H. and Hoffmeister, M. 2017. Meat intake and risk of colorectal polyps: results from a large population-based screening study in Germany. *Am. J. Clin. Nutr.* **105**, 1453-1461.
 12. Chiang, E. P., Tsai, S. Y., Kuo, Y. H., Pai, M. H., Chiu, H. L., Rodriguez, R. L. and Tang, F. Y. 2014. Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PLoS One* **9**, e99631.
 13. Chrysovergis, K., Wang, X., Kosak, J., Lee, S. H., Kim, J. S., Foley, J. F., Travlos, G., Singh, S., Baek, S. J. and Eling, T. E. 2014. NAG-1/GDF-15 prevents obesity by increasing thermogenesis, lipolysis and oxidative metabolism. *Int. J. Obes. (Lond)* **38**, 1555-1564.
 14. Godos, J., Bella, F., Torrisi, A., Sciacca, S., Galvano, F. and Grosso, G. 2016. Dietary patterns and risk of colorectal adenoma: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J. Hum. Nutr. Diet* **29**, 757-767.
 15. Kim, H., Kim, W., Yum, S., Hong, S., Oh, J. E., Lee, J. W., Kwak, M. K., Park, E. J., Na, D. H. and Jung, Y. 2013. Caffeic acid phenethyl ester activation of Nrf2 pathway is enhanced under oxidative state: structural analysis and potential as a pathologically targeted therapeutic agent in treatment of colonic inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 552-562.
 16. Kim, K. J., Lee, J., Park, Y. and Lee, S. H. 2015. ATF3 mediates anti-cancer activity of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid in human colon cancer cells. *Biomol. Ther. (Seoul)* **23**, 134-140.
 17. Lee, S. H., Krisanapun, C. and Baek, S. J. 2010. NSAID-activated gene-1 as a molecular target for capsaicin-induced apoptosis through a novel molecular mechanism involving GSK3beta, C/EBPbeta and ATF3. *Carcinogenesis* **31**, 719-728.
 18. Li, L., Sun, W., Wu, T., Lu, R. and Shi, B. 2017. Caffeic acid phenethyl ester attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses in human gingival fibroblasts via NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **794**, 61-68.
 19. Luo, W. P., Fang, Y. J., Lu, M. S., Zhong, X., Chen, Y. M. and Zhang, C. X. 2015. High consumption of vegetable and fruit colour groups is inversely associated with the risk of colorectal cancer: a case-control study. *Br. J. Nutr.* **113**, 1129-1138.
 20. Maru, G. B., Hudlikar, R. R., Kumar, G., Gandhi, K. and Mahimkar, M. B. 2016. Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World J. Biol. Chem.* **7**, 88-99.
 21. Oh, S., Gwak, J., Park, S. and Yang, C. S. 2014. Green tea polyphenol EGCG suppresses Wnt/ β -catenin signaling by promoting GSK-3 β - and PP2A-independent β -catenin phosphorylation/degradation. *Biofactors* **40**, 586-595.
 22. Piyanuch, R., Sukhthankar, M., Wandee, G. and Baek, S. J. 2007. Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* **258**, 230-240.
 23. Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.* **66**, 7-30.
 24. Soldani, C. and Scovassi, A. I. 2002. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**, 321-328.
 25. Tong, W., Wang, Q., Sun, D. and Suo, J. 2016. Curcumin suppresses colon cancer cell invasion via AMPK-induced inhibition of NF- κ B, uPA activator and MMP9. *Oncol Lett.* **12**, 4139-4146.
 26. Wang, D., Xiang, D. B., He, Y. J., Li, Z. P., Wu, X. H., Mou, J. H., Xiao, H. L. and Zhang, Q. H. 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.* **11**, 4008-4012.
 27. Wilson, L. C., Baek, S. J., Call, A. and Eling, T. E. 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.
 28. Xiang, D., Wang, D., He, Y., Xie, J., Zhong, Z., Li, Z. and Xie, J. 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.

초록 : ATF3를 통한 caffeic acid phenethyl ester에 의한 NAG-1 유전자의 발현 증가

박민희¹ · 정정욱¹ · 이성호² · 백승준³ · 김종식^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²미국 메릴랜드대학교 영양식품과학과, ³서울대학교 수의과대학)

NAG-1 단백질은 TGF- β superfamily 유전자로서 암세포의 apoptosis를 유도하고 항암 활성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 프로폴리스 유래의 파이토케미칼 CAPE (caffeic acid phenethyl ester)에 의한 항암유전자 NAG-1의 발현과 발현조절에 대해 연구하였다. 인간 대장암 세포주 HCT116에서 CAPE의 처리에 의해 농도의존적, 시간의존적으로 NAG-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. 게다가, 다른 대장암 세포주인 LOVO 세포주에서도 농도의존적으로 NAG-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. p53-null HCT116세포주를 이용한 실험에서 CAPE에 의한 NAG-1의 발현은 전사조절인자인 p53에 의존하지 않음을 증명하였다. 또한, 3가지 종류의 NAG-1 프로모터 construct를 이용한 실험에서, cis-element 후보가 -474와 -1,086사이에 있음을 증명하였다. CAPE에 의해 전사조절인자인 ATF3와 CREB의 발현이 변화되는 지를 확인한 결과, CREB은 전혀 발현이 증가되지 않는 반면 ATF3는 CAPE 처리에 의해 농도의존적으로 발현이 증가함을 확인하였다. 그리고, pCG-ATF3와 pCREB의 co-transfection 실험에서 CREB은 NAG-1의 발현에 영향을 못 미치는 반면, ATF3의 과대발현에 의해 NAG-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. 결론적으로, CAPE에 의한 NAG-1의 발현은 주로 전사조절인자인 ATF3를 경유하여 일어남을 시사한다.