

대장암세포의 증식억제 기전: 영양소, growth factor, binding protein, 그리고 receptor의 신호전달체계에 대한 연구

윤정한 · 조한진 · 김은지

한림대학교 생명과학부

1. 서론

우리 나라는 최근 20 여년간 경제수준의 향상과 의료기술의 발달로 평균수명이 급속히 증가하였다. 그런데 경제적 발달과 식품의 수입개방 등은 식생활의 서구화를 유도하여 이와 함께 질병 형태의 변화를 초래하였고 대표적인 예가 암의 발생빈도와 암에 의한 사망률이 증가한 것이다. 특히 과거 서구 선진국에서 다발하는 암으로 알려진 대장, 전립선, 유방, 폐암 유병률이 우리나라에서도 급증하고 있다. 암에 의한 사망률을 줄이기 위해서는 발병 후 치료보다는 예방이 더 효과적이라는 것은 이미 인지하고 있는 사실이다. 암의 발생은 유전적, 환경적 요인을 포함한 다양한 발생요인에 의해 시작된다고 볼 수 있다. 역학조사들에 의하면 암 사망률의 35%은 식이에 기인한다고 알 수 있는데⁽¹⁾ 식이중 고지방, 저섬유소 식이는 대장암에 대한 위험을 증가시키는 반면 vitamin A, carotenoid, vitamin C, calcium 등은 대장암의 예방에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다⁽²⁾.

Vitamin A와 대장암

역학 조사들을 통해 vitamin A가 대장과 직장암의 발생을 결정하는 중요한 요인이라는 것이 알려졌다⁽³⁻⁶⁾. La Vecchia 등⁽⁷⁾의 역학 조사에서도 녹색채소와 특정한 종류의 과일이 colorectal cancer 발생을 억제하였다고 보고하고 이 식품들에 많이 포함된 비타민 A나 β -carotene의 섭취 부족과 colorectal cancer의 위험도는 반비례하여 β -carotene이 암을 예방하는 물질임을 암시해준다⁽⁸⁻⁹⁾. 하지만 위에서 언급한 역학 조사에서는 과일이나 녹색채소 섭취량을 조사하여 vitamin A의 지표로서 사용하였는데 과일과 채소에는 vitamin A 뿐만 아니라 대장암과 직장암의 발생을 막는 다른 항암제들이 포함되어 있다는 증거들이 제시되어⁽¹⁰⁾ 역학조사의 결과에 큰 의미를 부여하기 어렵다. 다른

연구 결과는 β -carotene이나 Vitamin A가 대장암 발생과 연관이 없거나^(4, 11) 오히려 위험 인자인 것을 암시하기도 하여⁽¹²⁾ 비타민 A나 β -carotene이 암을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각되나 단정할 수는 없는 상태이다.

Vitamin A의 항암효과는 주로 동물실험을 통해 증명되었다. 대장암의 발생은 vitamin A가 결핍된 쥐에게서 증가되고⁽¹³⁻¹⁴⁾ vitamin A의 섭취가 충분하면 감소되는 것이 관찰되었다⁽¹⁵⁾. 비타민 A의 전구체인 β -carotene을 투여하면 대장암 환자의 직장에서 ornithine decarboxylase의 활성을 억제한다는 연구 결과도 발표되었다⁽¹⁶⁾. 이러한 항암 작용은 주로 비타민 A가 retinoic acid (RA)로 대사 되기 때문이라고 믿고 있다⁽¹⁷⁾. 13-cis-RA는 대장암 발생에 있어 발생 회수를 줄여 주는 것으로 보고되었다⁽¹⁸⁾. Stopera와 Bird⁽¹⁹⁾는 쥐에게 발암원인 azoxymethane을 주사하여 대장암의 전구체라고 할 수 있는 비정상적인 crypt foci를 발생시켰는데 이는 all-trans-RA를 식이에 섞어 먹임으로서 감소시킬 수 있었다. 대장 외에도 피부, 방광, 폐, 췌장, 전립선을 포함한 여러 상피조직에서 나타나는 악성 암의 진행을 RA 유사체가 억제하는 것이 동물 실험을 통해 관찰되었다⁽²⁰⁻²¹⁾.

Retinoids는 거의 모든 포유동물의 발생초기부터 말까지 정상적인 세포증식과 분화를 유지하는 역할을 한다⁽²²⁾. Retinoids 중에서 RA는 가장 활성이 강한 유도체로서 세포의 증식, 분화, 그리고 세포와 세포사이의 신호 전달을 포함한 여러 가지 생물학적 현상을 조절한다⁽²³⁾. 생체에 존재하는 RA isomer로는 all-trans-RA, 13-cis-RA 그리고 9-cis-RA를 들 수 있고⁽²⁴⁻²⁵⁾ RA의 효과는 세포 안에 존재하는 여러 가지의 수용체 (RAR, RXR)에 의해 전달되는데 이 수용체가 핵의 transcription factor들이다. RA에 결합하는 여러 가지의 수용체는 다른 thyroid-steroid hormone receptor family와 같이 핵에 존재하여 ligand가 핵에 가서

수용체와 결합하게 되는데 RAR은 all-*trans*-RA와 9-*cis*-RA에 결합하고 RXR은 9-*cis*-RA에만 결합한다. 이 결합으로 인해 수용체의 구조에 변화가 생겨 RAR은 RXR과 heterodimer를 형성할 수 있고 target gene의 RA-responsive elements에 결합하여 gene의 전사속도가 증가되거나 억제되는 원인이 된다⁽²⁶⁾. RA는 세포의 증식을 억제하고 분화를 촉진하는데 이 작용은 RA가 암 발생을 방지하거나 진행을 정지시키는 치료제로서 쓰일 수 있다는 가능성을 제시해준다.

식이지방과 대장암 발생

식사에 포함된 지방산과 그 대사산물이 증식하는 암세포에서 일어나는 분자생물학적과정들의 조절에 중요한 영향을 미친다⁽²⁷⁻²⁸⁾. 대장암의 발생도 전체적인 식이 지방의 양뿐만 아니라 식이 지방을 구성하는 지방산의 종류에 의해 영향을 받는다고 생각되고 있다⁽²⁹⁾. 23%의 옥수수 기름과 잇꽃 기름은 대장암 발생을 촉진하나 코코넛 기름이나 올리브유는 대장암 발생을 촉진하지 않았다는 Reddy등의⁽³⁰⁾ 보고나, ω-3계 지방산이 풍부한 어유 식이가 대장암의 발생을 억제하는 효과가 있었다는 실험 결과⁽³¹⁻³²⁾ 등은 식이 지방을 구성하는 지방산의 종류에 따라 대장암의 발생에 미치는 영향이 다르다는 것을 보여 준다.

Conjugated linoleic acid (CLA)와 암

유지방이나 반추동물에서 유래한 고기에 포함된 CLA는 항암작용을 비롯하여 여러 가지 생리활성을 갖는 것이 밝혀졌다⁽³³⁻³⁴⁾. 이 연구들에 사용된 CLA는 화학적으로 linoleic acid로부터 알카리이성화 방법으로 합성된 것으로 적어도 *cis*-9,*cis*-11, *cis*-9,*trans*-11, *trans*-9,*cis*-11, *trans*-9,*trans*-11, *cis*-10,*cis*-12, *cis*-10,*trans*-12, *trans*-10,*cis*-12, *trans*-10,*trans*-12 CLA의 8개 이성체를 모두 함유하고 있으며 그중 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA 이성체가 각각 약 48%를 차지하고 있고 나머지 6개의 CLA 이성체는 미량으로 존재한다. CLA는 인간의 지방조직, 혈청, 담즙, 십이지장의 내용물에서 발견되는데 식사의 CLA의 양에 따라 그 농도가 변하는 것 같아 흥미를 자아낸다⁽³⁵⁾. 동물실험 결과에 의하면 CLA는 유방암^(33, 36), 피부암⁽³⁷⁾, 대장암⁽³⁸⁾, 전립선암⁽³⁹⁾의 유발 및 발생을 저해하는 물질로 알려져 있다.

CLA의 항암 효과의 기전

CLA가 암의 유발 및 발생을 방지하는 기전중의 하나로 첫째 eicosanoids 생성억제를 들 수 있다. 식이 지방산은

체내에서 사슬이 더 길고 고도로 불포화된 지방산으로 대사된 다음 prostaglandin (PG), leukotriene (LT), thromboxane (TX) 등의 eicosanoid로 전환되어 각 조직에서 서로 다른 기능을 나타낸다. 암세포에서는 정상세포에 비해 비정상적으로 고농도의 PG들이 관찰되고 있으며 대장암인 경우 대장에서 cyclooxygenase-2와 PG가 고농도로 존재하고 있음⁽⁴⁰⁾이 보고되었다. PG의 inhibitor인 indomethacin, piroxicam 등은 암의 치료 효과가 있었다고 보고되었다⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Park 등⁽⁴⁴⁾은 CLA를 먹인 쥐의 대장점막에서 PGE₂와 TXB₄가 감소한 것을 관찰하였다. 둘째로는 CLA의 항산화제로의 역할이다. 8 개의 CLA isomer들 중에서 *cis*-9,*trans*-11-CLA는 인지질로 삽입되며 항산화제로의 역할이 CLA의 항암작용의 하나의 기전이 된다는 것이 검토되었으나⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾ 최근의 연구에 의하면 CLA의 항산화 작용과 항암작용과는 관계가 없는 것 같다⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾. 셋째로는 CLA가 암세포 증식을 조절하는 성장 인자들의 생성을 조절하므로써 세포증식을 방지하는 기전이다. 아래에서 나타낸 것처럼 CLA mixture, *trans*-10,*cis*-12 CLA isomer가 세포증식을 감소하고 insulin-like growth factor-II의 생성을 억제한다⁽⁴⁹⁾. 넷째로는 아래에 언급한대로 CLA가 암세포 내에서 성장인자의 신호전달경로를 감소하므로써 세포증식을 방지하는 기전이다.

Insulin-like growth factor (IGF) system과 암

IGF는 한 개의 사슬로 이루어진 polypeptide로서 proinsulin의 아미노산 구조와 유사하며 포유류의 다양한 세포의 증식을 촉진하는 효력이 강한 성장 인자이다⁽⁵⁰⁾. IGF는 간에서 생성 분비되어 혈액을 통해 각 조직에 운반되는 endocrine hormone의 역할을 할 뿐 아니라 insulin과 같은 전형적인 endocrine hormone들과는 달리 체내 여러 조직에서 생성되어 조직 내에서 autocrine이나 paracrine mechanism으로 세포의 성장이나 분화를 조절한다⁽⁵⁰⁾. 세포의 성장이나 분화를 조절하는 IGF의 작용은 세포의 plasma membrane에 존재하는 특이한 수용체인 IGF receptor에 IGF가 결합한 후 그 작용이 세포 내로 전달됨으로써 이루어진다⁽⁵¹⁾. IGF들은 혈액이나 세포 외액에 free form으로 존재하는 것이 아니라 IGF에 강한 친화력을 갖는 여러 종류의 IGF-binding protein (IGFBP)에 결합하여 순환되고 존재한다. 현재까지 6 가지의 IGFBP가 순수 분리되고 clone 되어 많은 연구가 진행되고 있었는데 최근에 4 가지의 친화력이 좀 낮은 binding protein이 발견되어 IGFBP-related protein이라고 명명할 것이 제시되었다⁽⁵²⁾. IGFBP는 IGF에 결합하여 세포에서 생성된 IGF를 다른 조직이나 세

포로 운반하는 운반체의 역할을 하거나 IGF가 수용체에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로서 IGF의 작용을 촉진하거나 억제한다고 알려져 있다⁽⁵²⁾. 이렇게 IGFBP는 IGF의 작용을 촉진시키기도 억제하기도 하지만 최근의 연구에 의하면 IGF에 결합하는 것과는 관계없이 독립된 작용으로 세포 증식을 조절할 가능성도 크다⁽⁵³⁾. IGF와 마찬가지로 IGFBP의 혈액이나 조직의 농도는 동물의 영양상태에 따라 아주 민감하게 변한다⁽⁵⁴⁾.

암세포들이 급속도로 증식하는 원인 중의 하나는 각 조직 내에서 국소적으로 생성되는 성장 인자(growth factor)들이 autocrine 또는 paracrine mechanism으로 세포증식을 촉진하기 때문이다. IGF-I, IGF-II, IGFBP, IGF receptor로 구성된 IGF system은 대장암을 비롯한 인간의 암의 발생과 진전에 아주 밀접한 관계를 가지고 있다⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾. 예를 들면 정상적인 대장점막과 비교하여 대장암 환자의 혈액의 IGF-II와 IGFBP-2의 농도가 증가한다⁽⁶⁰⁾. 또 대장암에는 주위의 정상적인 점막 조직과 비교하여 IGF-I receptor (IGF-IR) 수가 증가된 것이 발표되었다⁽⁶³⁾.

IGF-IR은 세포막을 가로지르는 glycoprotein으로 두 개의 α -subunit과 두 개의 β -subunit으로 구성되어 있다.

세포밖에 위치한 α -subunit은 IGF-I, IGF-II, insulin이 결합하는 여러 개의 cysteine으로 구성된 domain을 포함하고 있고, β -subunit은 세포막을 관통하는 부분과 세포안의 tyrosine kinase domain을 포함하고 있다⁽⁶⁴⁾. IGF-IR은 IGF-I이나 IGF-II가 없이는 그 효력을 발생하지 못한다. 즉 이 receptor의 작용은 이 두 가지 ligand중 하나가 IGF-IR에 결합하므로써 세포내의 cytoplasmic domain의 tyrosine 잔기가 인산화 됨으로서 시작된다. IGF-I receptor는 적어도 3 가지 방법으로 암발생과 진전을 촉진한다고 알려져 있다. 1) 세포분열을 촉진하고 2) 암세포로의 전환에 절대적으로 필요하고 3) 여러 가지 apoptotic 손상으로부터 세포를 보호한다. 즉 정상세포가 암세포로 전환되려면 IGF-IR이 필요하고 세포의 IGF-IR의 발현을 방해하면 apoptosis를 초래한다⁽⁶⁵⁾. 혈액의 IGF-I과 IGF-II의 농도는 아주 높지만⁽⁶⁶⁾ 이 두 가지 growth factor는 대부분 IGFBP와 결합하여 순환되어 세포막에 위치한 IGF-IR에 결합할 수 없으므로⁽⁶⁷⁾ IGF-IR의 활성화는 각 조직에서 생성된 IGF들에 의해 autocrine 또는 paracrine mechanism에 의해 주로 이루어진다⁽⁶⁸⁾.

Figure 1에 나타난 것처럼 세포 내에는 활성화 된 IGF-IR에 결합하여 그 신호를 전달하는 adaptor protein family들이 존재한다. (1) Grb (growth factor receptor-bound

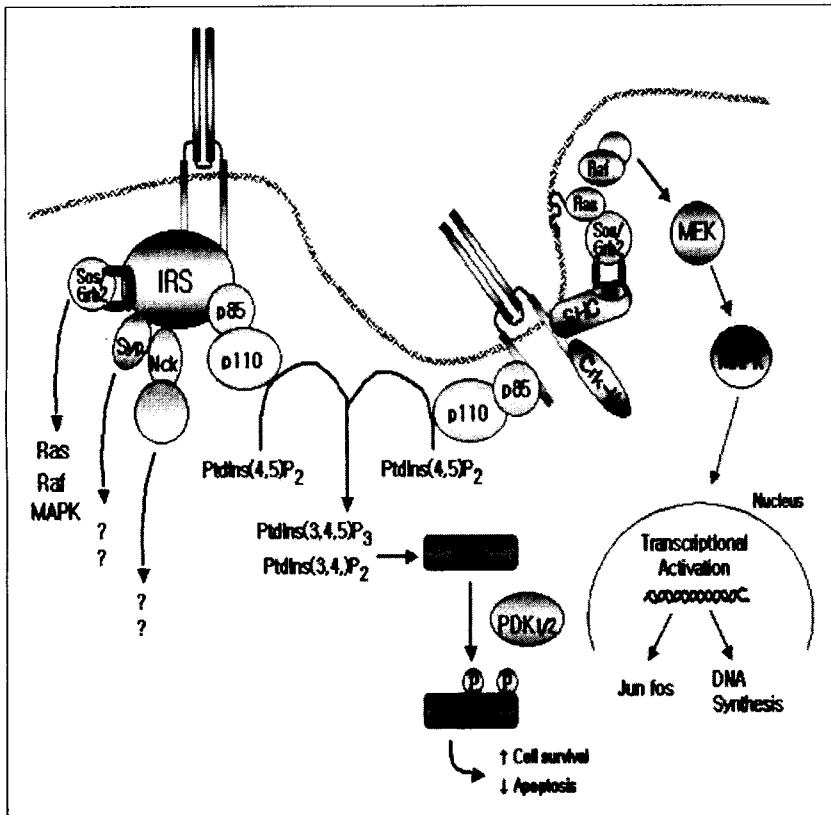


Figure 1. Schematic representation of intracellular signaling pathways of the IGF-I receptor.

protein) family로 Src-homology (SH)2와 SH3 domain을 포함하고 있는 adaptor protein들 (2) SHC family로 SH2 domain을 가진 adaptor protein들 (3) IRS (insulin receptor substrate) family로 PTB (phosphotyrosine binding) domain과 다른 downstream protein에 docking site를 제공하는 여러 개의 tyrosine 잔기를 가진 adaptor protein들 (4) CRK family로 SH2와 SH3 domain을 포함하고 있는 adaptor protein들 (5) p85로 세포내의 지질을 인산화시키는 효소인 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)의 regulatory subunit이다.

IGF에 의한 IGF-IR의 인산화는 IRS protein들에 의해서 세포 내로 전달된다. 이 adaptor protein들은 Grb, Syp, p85, Crk-II, Nck등을 통해서 신호를 전달한다⁽⁶⁹⁻⁷²⁾. 또한 IGF에 의해 이루어진 IGF-IR의 인산화는 SHC를 통해 Grb family protein들에 의해 Ras pathway를 활성화하고 이는 다시 Raf serine/threonine kinase를 활성화시켜, MEK (MAP kinase kinase), MAP kinase (ERK1 & ERK2) 등을 활성화시키면, MAP kinase는 transcription factor들의 인산화를 유도하여 mitogenesis를 촉진하게 된다⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. 이 경로는 IGF에 의해 매개되는 세포의 증식동안에 고도로 활성화되는 것으로 알려져 있다⁽⁷⁶⁻⁷⁹⁾. 또한 IGF-IR은 IRS protein들과의 작용에 의해서 Grb-SOS complex를 통해 이 경로를 활성화시킨다. PI3K는 IGF-IR에 의해 직접 활성화되거나, IRS에 의해 활성화되어 Akt를 활성화시켜 apoptosis를 방지하고 cell survival을 촉진한다⁽⁸⁰⁻⁸¹⁾.

이 연구들에서는 RA와 CLA가 IGF system을 변화시키므로서 대장암세포의 증식을 억제한다는 가설을 시험하기 위해 인간의 대장암에서 유래한 Caco-2와 HT-29 cell을 실험 model로 이용하였다.

2. 결 과

RA가 대장암세포 증식에 미치는 영향⁽⁸²⁻⁸³⁾

RA가 IGFBP-6의 생성을 촉진하므로서 Caco-2 세포의 증식을 억제한다는 가설을 시험하였다. 1) RA가 Caco-2 세포의 증식을 억제하는지 조사하기 위해서 Caco-2 세포를 여러 가지 농도의 RA와 같이 혈청이 포함되지 않은 배지 (serum-free medium)에서 배양한 결과 RA는 세포증식을 농도가 증가함에 따라 더 억제하였다. Caco-2 cell은 serum-free medium에서 혈청을 포함한 medium에서 처

럼 정상적인 성장곡선을 보여주어 10일에 plateau cell density에 도달하였다. RA의 세포 증식억제 효과는 장기간 계속되어 최종 세포 밀도는 1 μ M RA 농도에서 33% 감소하였다. 2) Northern blot analysis와 immunoblot analysis를 이용하여 IGF-II mRNA 축적량과 IGF-II protein 생성을 각각 측정하였는데 RA는 IGF-II mRNA나 IGF-II protein 농도에 영향을 미치지 않았다. Ligand analysis의 결과를 보면 Caco-2 cell은 IGFBP-2 (34,000 M_r), IGFBP-4 (24,000 M_r), IGFBP-6 (31,000 M_r)를 생성하는데 IGFBP-6의 존재는 conditioned medium을 O-glycosidase로 처리한 다음 ligand blot analysis로 분석하고 또 N-terminal amino acid sequence 분석으로 확인하였다. RA에 의해 IGFBP-2와 IGFBP-4 생성 분비는 각각 20 \pm 3%와 50 \pm 8% 감소하였으나 IGFBP-6는 698 \pm 2% 증가하였다. IGFBP-2와 IGFBP-4 mRNA 발현은 RA에 의해 각각 20 \pm 3%, 50 \pm 8% 감소한 반면에 IGFBP-6 mRNA는 660 \pm 20% 증가하였다. Exogenous IGFBP-6를 배양액에 첨가한 경우 20 nM 농도에서 Caco-2 cell의 증식을 감소시켰다. 3) 세포가 생성하는 IGFBP-6의 양을 조절하기 위해서 IGFBP-6 cDNA를 pcDNA3 vector에 삽입하고, Caco-2 cell에 transfect 하여, 세포의 유전자에 anti-sense 또는 sense IGFBP-6 cDNA가 영구히 삽입된 clone들을 G418 sulfate를 이용하여 선택하였다. Anti-sense clone들의 IGFBP-6 mRNA의 축적이거나 IGFBP-6 분비는 pcDNA3를 삽입시킨 clone들 보다 현저히 감소되었고, 이 clone들의 증식속도는 훨씬 빨랐다. Exogenous IGF-II에 대한 반응은 pcDNA3 vector control에 비해 anti-sense clone에서 훨씬 민감했고 IGF-I도 높은 농도에서는 (200 nM) 그 효과가 더 컸다. 반면에 sense clone들의 IGFBP-6 mRNA의 축적과 IGFBP-6 protein의 생성이 높았고 증식 속도는 감소하였다. 따라서 대장암세포의 IGFBP-6 생성량을 조절 하므로서 세포증식을 조절할 수 있고 IGFBP-6은 세포가 생성하는 IGF-II에 결합하여 IGF-II가 IGF-I receptor에 결합하는 것을 방해하므로 세포증식을 방해한다는 결론을 내릴 수 있다.

위의 실험결과는 RA에 의해 활성화된 retinoic acid receptor (RAR)가 9-cis-retinoic acid에 의해서 활성화되는 RXR과 heterodimer를 이루어 IGFBP-6 유전자의 promotor region에 존재하는 RA response element에 결합하여 유전자 발현을 촉진한다는 가설을 낭계한다. 결론을 도표로 요약한 것이 Figure 2에 나와 있다.

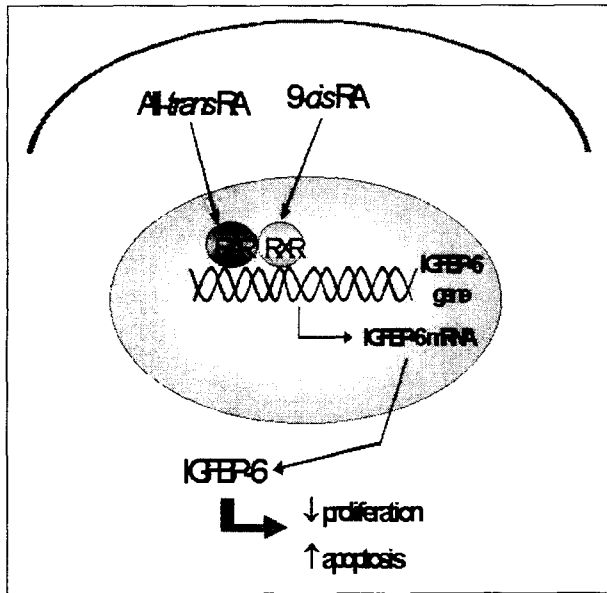


Fig. 2. A schematic diagram for the mechanism by which all-trans retinoic acid inhibits Caco-2 cell proliferation. RAR, retinoic acid receptor; RXR, 9-cis-retinoic acid receptor.

CLA가 대장암 세포의 증식에 미치는 영향^(49, 84-85)

A. Caco-2 cells

CLA가 인간의 대장에서 유래한 cell line인 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청이 없는 serum-free medium에 0, 10, 25, 50 μM 농도로 CLA를 첨가하여 세포 배양하였다. CLA는 농도에 따라 세포의 증식을 현저하게 억제하여 50 μM 농도로 CLA를 첨가하고 96 시간 배양한 경우 CLA 0 μM 에 비해 $57 \pm 4\%$ 의 세포 증식이 감소하였다. 그러나 같은 농도의 linoleic acid (LA)는 세포의 증식을 다소 증가시켰다. CLA의 세포 증식 감소가 IGF system과 관련 있는지를 조사하기 위해 immunoblot analysis, ligand blot analysis, northern blot analysis를 실시하였다. 세포의 증식을 억제한 CLA는 pro-, mature IGF-II protein을 dose-dependently 방식으로 감소시켰다. 세포의 증식을 증가시켰던 LA에 의해서는 IGF-II protein이 증가하였다. IGF-II mRNA의 변화도 protein의 변화와 같은 경향을 보여 CLA에 의해 유의적으로 감소하였고 LA에 의해서는 증가하였다. IGF-II와 결합하여 IGF-II의 작용을 조절하는 IGFBP가 CLA에 의해 어떻게 변화하는지 알아보기 위해 ligand blot을 실시하였다. Caco-2 세포에는 IGFBP-2, -4, -6가 분비되었다. CLA에 의해 IGFBP-2의 분비가 감소하였으나 IGFBP-4, IGFBP-6의 분비는 변화가 없었다. LA에 의해서는 IGFBP-2, -4, -6 모두 유의적인 변화가 없었다.

CLA를 구성하고 있는 주요 이성체인 *trans*-10,*cis*-12 CLA 또는 *cis*-9,*trans*-11 CLA가 Caco-2 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 이성체의 농도를 0, 1, 2.5, 5 μM 으로 달리하여 세포 배양액에 첨가한 후 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA는 농도 증가에 따라 세포의 증식을 현저하게 억제하였다. 반면 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 세포 증식에 아무런 영향을 미치지 않았다. CLA 이성체의 세포 증식 억제 작용이 IGF system과 관련 있는지를 조사하기 위해 immunoblot analysis, ligand blot analysis, northern blot analysis를 실시하였다. 세포의 증식을 억제한 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 pro-, mature-IGF-II protein의 분비를 감소시켜 5 μM *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 각각 $50 \pm 3\%$, $22 \pm 4\%$ 감소하였다. 반면 세포 증식에 영향을 미치지 않았던 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 IGF-II 분비에 영향을 미치지 않았다. IGF-II mRNA 발현도 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 감소하였으나 *cis*-9,*trans*-11 CLA에 의해서는 약간 증가하였다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-6 모두 소폭 감소하였다. *Cis*-9,*trans*-11 CLA는 IGFBP 분비에는 영향을 미치지 않았다. CLA의 세포 증식 억제 작용이 apoptosis에 의한 것인지를 알아보기 위해 *trans*-10,*cis*-12 CLA를 첨가한 후 DNA laddering을 실시하였다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA는 apoptosis를 현저하게 야기했으며 배양액에 exogenous IGF-II를 200 nM의 농도로 첨가한 경우 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 야기된 apoptosis는 현저하게 감소하였다.

B. HT-29 cells

CLA가 인간의 대장암 세포에서 유래한 cell line인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 CLA를 0, 5, 10, 20 μM 농도로 serum-free medium에 첨가하여 48시간 또는 96시간이 경과한 후 세포수를 측정하였다. HT-29 세포는 CLA를 첨가하지 않은 serum-free medium에서 그 수가 증가하여 96시간 동안 5배 정도의 증가를 보였다. 이 세포의 증식은 CLA를 첨가하고 48 시간이 경과한 후부터 CLA의 농도가 증가할수록 유의적으로 감소하였으나 5 μM CLA를 첨가한 경우는 유의적인 차이가 없었다. CLA에 의한 세포 증식의 감소는 96시간에는 더욱 현저하게 나타났다. 20 μM CLA를 첨가한 세포는 CLA를 첨가하지 않은 세포에 비해 세포 증식이 $70 \pm 1\%$ 감소하였다. CLA가 HT-29 세포의 DNA 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 [^3H]-thymidine incorporation을 측정하였다. CLA는 [^3H]-thymidine incorporation을 농도에 따라 현

저하게 감소시켰으며 20 μ M CLA에 의해 CLA를 첨가하지 않은 세포에 비해 DNA 합성을 $86 \pm 3\%$ 감소하였다. CLA가 apoptosis를 야기하는지를 살펴보기 위해 DNA laddering을 실시하여 apoptosis의 특징인 DNA fragmentation을 살펴보았다. CLA의 농도가 증가할수록 DNA fragmentation은 현저하게 증가하였다. 세포를 Annexin-V로 staining하여 flow cytometer를 사용하여 early stage apoptotic cell를 측정된 결과 CLA의 농도에 따라 early stage apoptotic cell이 유의적으로 증가하였다.

CLA의 세포 증식 억제 효과가 IGF-I과 IGF-II에 의해 어떻게 변화하는지를 보기 위해 10 μ M CLA가 첨가된 배지에 IGF-I 또는 IGF-II를 100 nM로 첨가하여 CLA에 의한 세포 증식 효과가 IGF-I 또는 IGF-II에 의해 어떻게 변화하는지를 조사하였다. IGF-I과 IGF-II 모두 HT-29 세포의 증식을 현저하게 증가시켰다. 그러나 CLA가 포함된 배지에 IGF-I과 IGF-II 첨가 한 경우 CLA의 세포 증식 억제 효과를 감소시키지 못했다. CLA가 IGF-II와 IGF-I receptor의 mRNA 발현에 미치는 영향은 RT-PCR을 이용하여 측정하였다. CLA는 IGF-II와 IGF-I receptor의 mRNA 발현을 유의적으로 감소시켰다. CLA의 농도에 따라 IGF-I receptor의 mRNA의 변화가 나타나 CLA의 세포 증식 억제가 IGF-I receptor signaling에 미치는 영향을 조사하였다. CLA를 여러 농도로 첨가하여 세포를 배양한 후 total lysate를 얻어 IGF-I receptor β (IGF-1 R β), IRS-1, phosphoinositide 3-kinase p85 subunit (PI3K p85) 등의 antibody를 이용하여 Western blot 하였다. CLA의 농도에 따라 IRS-1과 PI3K의 p85 subunit은 유의적인 차이가 없었다. 그러나 IGF-1 R β 는 CLA 농도에 따라 유의적인 차이가 있어 CLA의 농도가 증가할수록 IGF-1 R β 의 precursor는 증가 한 반면 IGF-1 R β 는 유의적으로 감소하였다. CLA가 IGF-1 R β 의 인산화에 미치는 영향을 조사하기 위해 20 μ M CLA 첨가된 배지에서 세포를 4일 간 배양한 다음 10 nM IGF-I을 첨가하여 0, 1, 5, 60분 배양 후 cell lysate를 얻었다. Cell lysate를 anti-IGF-1 R β antibody로 immunoprecipitate하여 anti-phosphotyrosine, IGF-1 R β , IRS-1, PI3K p85 antibody를 사용하여 Western blot하였다. IGF-I은 IGF-1 R β 와 IRS-1의 인산화를 증가시켰고 CLA는 이 두 단백질의 인산화를 감소시켰다. IRS-1과 PI3K p85의 protein은 CLA에 의해 영향을 받지 않았으나 CLA는 IRS-1과 PI3K p85의 IGF-1 R β 과의 association을 현저하게 감소하였다. PI3K는 Akt, MAP-kinase (MAPK)의 인산화를 변화시켜 세포의 survival

이나 apoptosis에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 CLA가 Akt, MAPK protein양과 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 20 μ M CLA는 Akt, MAPK protein을 조금 감소시킨 반면 p-Akt, p-MAPK는 현저하게 감소시켰다.

요약하면 CLA는 IGF-II mRNA와 protein의 생성을 감소시키고 IGF-I receptor mRNA와 protein의 생성을 감소시키므로서 IGF-I receptor 신호전달을 감소시킨다. 결과적으로 IGF-I receptor 신호전달 감소에 의한 Akt와 MAPK의 인산화의 억제는 apoptosis를 촉진하고 DNA 합성을 방지하여 세포의 성장을 감소시킨다는 결론을 내릴 수 있다.

3. 참고문헌

- 1) Doll, R. (1992) The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 52: 2024s-2029s.
- 2) Peipins, L. A., & Sandler, R. S. (1994) Epidemiology of colorectal adenomas. *Epidemiol Rev* 16: 273-297.
- 3) Boyle, P., Zaridze, D. G., & Smans, M. (1985) Descriptive epidemiology of colorectal cancer. *Int J Cancer* 36: 9-18.
- 4) Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N. R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., Willett, W., & Peto, R. (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1145-1149.
- 5) Neugut, A. I., Garbowski, G. C., Lee, W. C., Murray, T., Nieves, J. W., Forde, K. A., Treat, M. R., Wayne, J. D., & Fenoglio-Preiser, C. (1993) Dietary risk factors for the incidence and recurrence of colorectal adenomatous polyps. A case-control study. *Ann Intern Med* 118: 91-95.
- 6) Willett, W. (1989) The search for the causes of breast and colon cancer. *Nature* 338: 389-394.
- 7) La Vecchia, C., Negri, E., Decarli, A., D'Avanzo, B., Gallotti, L., Gentile, A., & Franceschi, S. (1988) A case-control study of diet and colorectal cancer in northern Italy. *Int J Cancer* 41: 492-498.
- 8) van Poppel, G. (1993) Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur J Cancer* 29A: 1335-1344.
- 9) West, D. W., Slattery, M. L., Robison, L. M., Schuman, K. L., Ford, M. H., Mahoney, A. W., Lyon, J. L., & Sorensen, A. W. (1989) Dietary intake and colon cancer: sex- and anatomic site-specific associations. *Am J Epidemiol* 130: 883-894.
- 10) Waterberg, L. W. (1992) Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In M. Wattenberg, C.W. Lipkin, C.W. Boone, & G.J. Kelloff, eds. *Cancer Prevention* CRS Press, Boca Raton, FL.
- 11) Greenberg, E. R., Baron, J. A., Tosteson, T. D., Freeman, D. H., Jr., Beck, G. J., Bond, J. H., Colacchio, T. A., Collier, J. A., Frankl, H. D., Haile, R. W., & et al. (1994) A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 331: 141-147.
- 12) Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., & Hammar, S. (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1150-1155.

- 13) Narisawa, T., Reddy, B. S., Wong, C. Q., & Weisburger, J. H. (1976) Effect of vitamin A deficiency on rat colon carcinogenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 36: 1379-1383.
- 14) Newberne, P. M., Bueche, D., Riangropitak, S., & Schrager, T. F. (1990) The influence of dietary levels of vitamin A and fat on colon cancer. *Nutr Cancer* 13: 235-242.
- 15) Rogers, A. E., Herndon, B. J., & Newberne, P. M. (1973) Induction by dimethylhydrazine of intestinal carcinoma in normal rats and rats fed high or low levels of vitamin A. *Cancer Res* 33: 1003-1009.
- 16) Phillips, R. W., Kikendall, J. W., Luk, G. D., Willis, S. M., Murphy, J. R., Maydonovitch, C., Bowen, P. E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., & Wong, R. K. (1993) beta-Carotene inhibits rectal mucosal ornithine decarboxylase activity in colon cancer patients. *Cancer Res* 53: 3723-3725.
- 17) Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1983) Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 43: 3034-3040.
- 18) O'Dwyer, P. J., Ravikumar, T. S., McCabe, D. P., & Steele, G., Jr. (1987) Effect of 13-cis-retinoic acid on tumor prevention, tumor growth, and metastasis in experimental colon cancer. *J Surg Res* 43: 550-557.
- 19) Stopera, S. A., & Bird, R. P. (1993) Effects of all-trans retinoic acid as a potential chemopreventive agent on the formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci: differential expression of c-myc and c-fos mRNA and protein. *Int J Cancer* 53: 798-803.
- 20) Hill, D. L., & Grubbs, C. J. (1982) Retinoids as chemopreventive and anticancer agents intact animals (review). *Anticancer Res* 2: 111-124.
- 21) Moon, R. C., Mehta, R. G., & Rao, K. V. N., eds. (1994) Retinoids and cancer in experimental animals. Raven Press, New York.
- 22) Jetten, A. M. (1985) Retinoids and their modulation of cell growth. In G. Giroff, ed. *Growth and Maturation Factors* Wiley and Sons, New York.
- 23) De Luca, L. M. (1991) Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* 5: 2924-2933.
- 24) Eckhoff, C., & Nau, H. (1990) Identification and quantitation of all-trans- and 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxoretinoic acid in human plasma. *J Lipid Res* 31: 1445-1454.
- 25) Tang, G. W., & Russell, R. M. (1990) 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res* 31: 175-182.
- 26) Giguere, V. (1994) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15: 61-79.
- 27) Dai, W., Liu, T., Wang, Q., Rao, C. V., & Reddy, B. S. (2002) Down-regulation of PLK3 gene expression by types and amount of dietary fat in rat colon tumors. *Int J Oncol* 20: 121-126.
- 28) Lu, J., Jiang, C., Fontaine, S., & Thompson, H. J. (1995) ras may mediate mammary cancer promotion by high fat. *Nutr Cancer* 23: 283-290.
- 29) Reddy, B. S. (1992) Dietary fat and colon cancer: animal model studies. *Lipids* 27: 807-813.
- 30) Reddy, B. S., & Maruyama, H. (1986a) Effect of different levels of dietary corn oil and lard during the initiation phase of colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst* 77: 815-822.
- 31) Minoura, T., Takata, T., Sakaguchi, M., Takada, H., Yamamura, M., Hioki, K., & Yamamoto, M. (1988) Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 48: 4790-4794.
- 32) Reddy, B.S Maruyama, H. (1986b) Effect of dietary fish oil on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res* 46: 3367-3370
- 33) Ip, C. (1997) Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523S-1529S.
- 34) Whigham, L. D., Cook, M. E., & Atkinson, R. L. (2000) Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol Res* 42: 503-510.
- 35) Cawood, P., Wickens, D. G., Iversen, S. A., Braganza, J. M., & Dormandy, T. L. (1983) The nature of diene conjugation in human serum, bile and duodenal juice. *FEBS Lett* 162: 239-243.
- 36) Ip, C., Briggs, S. P., Haegele, A. D., Thompson, H. J., Storkson, J., & Scimeca, J. A. (1996) The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050.
- 37) Belury, M. A., Nickel, K. P., Bird, C. E., & Wu, Y. (1996) Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer* 26: 149-157.
- 38) Liew, C., Schut, H. A., Chin, S. F., Pariza, M. W., & Dashwood, R. H. (1995) Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline-induced colon carcinogenesis in the F 344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 16: 3037-3043.
- 39) Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J. A., Kritchevsky, D., & Santoli, D. (1998) Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434.
- 40) Smalley, W. E., & DuBois, R. N. (1997) Colorectal cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 39: 1-20.
- 41) Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., & Taketo, M. M. (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87: 803-809.
- 42) Prescott, S. M., & Fitzpatrick, F. A. (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1470: M69-M78.
- 43) Williams, C. S., Smalley, W., & DuBois, R. N. (1997) Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 100: 1325-1329.
- 44) Park, H. S., Ryu, J. H., Ha, Y. L., & Park, J. H. Y. (2001) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1, 2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86: 549-555.
- 45) Pariza, M. W., & Ha, Y. L. (1990) Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: a new class of anticarcinogens. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 7: 169-171.
- 46) Pariza, M. W., Ha, Y. L., Benjamin, H., Sword, J. T., Gruter, A., Chin, S. F., Storkson, J., Faith, N., & Albright, K. (1991) Formation and action of anticarcinogenic fatty acids. *Adv Exp Med Biol* 289: 269-272.
- 47) Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991) Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124.
- 48) van den Berg, J. J., Cook, N. E., & Tribble, D. L. (1995) Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids* 30: 599-605.
- 49) Kim, E. J., Holthuisen, P. E., Park, H. S., Ha, Y. L., Jung, K. C., & Park, J. H. Y. (2002a) Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid inhibits cell growth and secretion of insulin-like growth factor-II in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*: In Press.
- 50) Jones, J. I., & Clemmons, D. R. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 16: 3-34.
- 51) Czech, M. P. (1989) Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59: 235-238.
- 52) Baxter, R. C. (2000) Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E967-E976.
- 53) Rechler, M. M. (1997) Growth inhibition by insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 -what's IGF got to do with it? *Endocrinology* 138: 2645-2647.
- 54) Underwood, L. E. (1996) Nutritional regulation of IGF-I and IGF-BPs. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9 Suppl 3: 303-312.

- 55) Burroughs, K. D., Dunn, S. E., Barrett, J. C., & Taylor, J. A. (1999) Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk? [editorial: comment] [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 91: 579-581.
- 56) Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., Hennekens, C. H., & Pollak, M. (1998) Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279: 563-566.
- 57) Cullen, K. J., Yee, D., & Rosen, N. (1991) Insulinlike growth factors in human malignancy. *Cancer Invest* 9: 443-454.
- 58) Macaulay, V. M. (1992) Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65: 311-320.
- 59) Singh, P., & Rubin, N. (1993) Insulin-like growth factors and binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 105: 1218-1237.
- 60) Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997) Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272.
- 61) Mishra, L., Bass, B., Ooi, B., Sidawy, A., & Korman, L. (1998) Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. *Growth Horm IGF Res* 8: 473-479.
- 62) Renehan, A. G., Painter, J. E., O'Halloran, D., Atkins, W. S., Potten, C. S., O'Dwyer, S. T., & Shalet, S. M. (2000) Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3402-3408.
- 63) Guo, Y., Narayan, S., Yallampalli, C., & Singh, P. (1992) Characterization of insulinlike growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102: 1101-1108.
- 64) LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., & Roberts, C. T., Jr. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163.
- 65) Baserga, R. (1999) The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 253: 1-6.
- 66) Nystrom, F. H., Ohman, P. K., Ekman, B. A., Osterlund, M. K., Karlberg, B. E., & Arnqvist, H. J. (1997) Population-based reference values for IGF-I and IGF-binding protein-1: relations with metabolic and anthropometric variables. *Eur J Endocrinol* 136: 165-172.
- 67) Bereket, A., Wilson, T. A., Blethen, S. L., Fan, J., Frost, R. A., Gelato, M. C., & Lang, C. H. (1996) Effect of short-term fasting on free/dissociable insulin-like growth factor I concentrations in normal human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4379-4384.
- 68) Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., & Valentini, B. (1997) The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332: F105-126.
- 69) Kooijman, R., Lauf, J. J., Kappers, A. C., & Rijkers, G. T. (1995) Insulin-like growth factor induces phosphorylation of immunoreactive insulin receptor substrate and its association with phosphatidylinositol-3 kinase in human thymocytes. *J Exp Med* 182: 593-597.
- 70) Kotani, K., Yonezawa, K., Hara, K., Ueda, H., Kitamura, Y., Sakaue, H., Ando, A., Chavanieu, A., Calas, B., Grigorescu, F., & et al. (1994) Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *Embo J* 13: 2313-2321.
- 71) Kuhne, M. R., Pawson, T., Lienhard, G. E., & Feng, G. S. (1993) The insulin receptor substrate 1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp. *J Biol Chem* 268: 11479-11481.
- 72) Myers, M. G., Jr., Backer, J. M., Sun, X. J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., & White, M. F. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10350-10354.
- 73) Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5889-5892.
- 74) Davis, R. J. (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 42: 459-467.
- 75) Pelech, S. L., & Charest, D. L. (1995) MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1: 33-52.
- 76) Hansson, A., & Thoren, M. (1995) Activation of MAP kinase in Swiss 3T3 fibroblasts by insulin-like growth factor-I. *Growth Regul* 5: 92-100.
- 77) Lamothe, B., Buchini, D., Jami, J., & Joshi, R. L. (1995) Interaction of p85 subunit of PI 3-kinase with insulin and IGF-1 receptors analysed by using the two-hybrid system. *FEBS Lett* 373: 51-55.
- 78) Skolnik, E. Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C. H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., & Schlessinger, J. (1993) The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260: 1953-1955.
- 79) Webster, J., Prager, D., & Melmed, S. (1994) Insulin-like growth factor-1 activation of extracellular signal-related kinase-1 and -2 in growth hormone-secreting cells. *Mol Endocrinol* 8: 539-544.
- 80) Alessi, D. R., & Cohen, P. (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8: 55-62.
- 81) Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G., & Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272.
- 82) Kim, E. J., Kang, Y.-H., Schaffer, B. S., Bach, L. A., MacDonald, R. G., & Park, J. H. Y. (2002b) Inhibition of Caco-2 cell proliferation by all-trans retinoic acid (tRA): role of insulin-like growth factor binding protein-6. *J Cell Physiol* 190: 92-100.
- 83) Kim, E. J., Schaffer, B. S., Kang, Y.-H., MacDonald, R. G., & Park, J. H. Y. (2002c) Decreased production of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-6 by transfection of colon cancer cells with an antisense IGFBP-6 cDNA construct leads to stimulation of cell proliferation. *J Gastroenterol Hepatol* 17.
- 84) Kim, E. J., Cho, H. J., Kim, S. J., Kang, Y.-H., Ha, Y. L., & Park, J. H. Y. (2001) Effect of conjugated linoleic acid on the proliferation of the human colon cancer cell line, HT-29. *Korean J Nutr* 34: 896-904.
- 85) Kim, E. J., Jun, J.-G., Park, H. S., Kim, S.-M., Ha, Y. L., & Park, J. H. Y. (2002d) Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of Caco-2 colon cancer cells: possible mediation by oleamide. *Anticancer Res*: In press.