

## β-Sitosterol에 의한 인체 대장암 HCT116 세포의 증식억제에 관한 연구

최영현<sup>1</sup> · 김영애<sup>2</sup> · 박 철<sup>3</sup> · 최병태<sup>4</sup> · 이원호<sup>3</sup> · 황경미<sup>2</sup> · 정근옥<sup>2</sup> · 박건영<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>2</sup>부산대학교 생활과학대학 식품영양학과

<sup>3</sup>부산대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>4</sup>동의대학교 한의과대학 해부학교실

### β-Sitosterol Induced Growth Inhibition is Associated with Up-regulation of Cdk Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in Human Colon Cancer Cells

Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Young-Ae Kim<sup>2</sup>, Cheol Park<sup>3</sup>, Byung Tae Choi<sup>4</sup>, Won Ho Lee<sup>3</sup>,  
Kyung-Mi Hwang<sup>2</sup>, Keun-Ok Jung<sup>2</sup> and Kun-Young Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-052, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, and

<sup>3</sup>Dept. of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>4</sup>Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-052, Korea

#### Abstract

β-Sitosterol is the major phytosterol in higher plants, including fruits and vegetables. The molecule has been shown to have the potential for prevention and therapy for human cancer. We investigated the effects of β-sitosterol on the cell proliferation of HCT116 human colon cancer cells in order to understand its anti-proliferative mechanism. β-Sitosterol treatment resulted in the inhibition of cell proliferation in a concentration-dependent manner. The anti-proliferative effect of HCT116 cells by β-sitosterol was associated with formation of apoptotic bodies and degradation of β-catenin protein. In addition, β-sitosterol-treatment induced a marked accumulation of tumor suppressor p53 and a concomitant induction of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 without alteration in the levels of cyclins and Cdks. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of β-sitosterol.

**Key words:** β-sitosterol, cell cycle, p53, p21

#### 서 론

최근 역학조사에 의하면 야채와 과일의 섭취가 상대적으로 많은 집단에서 각종 암을 포함한 심혈관질환, 당뇨병 및 기타 만성 질환의 빈도가 매우 낮은 것으로 보고되어져 오고 있다(1). Sterol 및 sterolin과 같은 phytosterol은 과일과 야채를 포함한 모든 식물에 풍부하게 존재하는 지방의 일종이다. 비록 그들이 구조적으로 cholesterol과 유사하지만 사람 및 동물에서의 작용은 매우 다르다(2). 이들은 인체에서 합성이 되지 않기 때문에 전적으로 장의 흡수를 통한 식이에 의하여 섭취되어진다(3). Phytosterol 중 β sitosterol은 고등 식물에 가장 풍부하게 존재하는 phytosterol이다. 이는 이미 발암원으로 유발된 쥐의 대장암을 억제할 수 있는 것으로 보고된 바 있으며(4), 항염증 효과(5,6), 혈관신생억제 효과(7), 항 보체 활성화(8) 및 면역증강 효과(9,10) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 *in vitro* 연구를 통하여 β-sitosterol은 대

장암(11,12), 전립선암(13) 및 유방암을(14,15) 포함한 다양한 암세포의 증식이 억제되었음이 보고되어져 왔다. 이러한 암세포의 증식억제 효과는 sphingomyelin cycle의 활성화(12, 13), 세포주기의 교란(15) 및 세포사멸 유발(12,14) 등과 연관이 있었다.

그러나 현재까지 대부분의 β-sitosterol 함양 작용에 관한 연구에서 β-sitosterol의 처리에 따른 단순한 관찰수준에서의 현상만을 보고한 경우가 대부분이며, 이에 관한 정확한 분자생물학적 기전해석을 시도한 예는 거의 없다. 최근 Awad 등(15)에 의하여 세포주기 교란에 관한 접근이 시도되어 β-sitosterol이 세포주기 진행의 G2/M기 특이적 세포증식 억제를 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 β-sitosterol에 의한 암세포 성장억제 기전해석의 일환으로 이들 연구에 기초를 두어 β-sitosterol에 의한 세포주기 G2/M기 arrest에 관여하는 중요한 유전자들의 발현에 미치는 β-sitosterol의 영향을 조사하였다.

\*Corresponding author. E mail: kunypark@pusan.ac.kr  
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

## 재료 및 방법

### 암세포배양 및 $\beta$ -sitosterol의 처리

본 실험에 사용된 HCT116 인체대장암세포는 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine 및 2%의 penicillin-streptomycin이 함유된 Dulbecco's minimum Essential medium를 이용하여 배양하였으며,  $\beta$ -sitosterol(Fig. 1)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Greenberg-Ofrath 등(16)의 방법에 준하여 적정 용액으로 희석하여 배지에 처리하였다.

### Hemocytometer를 이용한 세포 성장률의 측정

세포배양용 6 well plate를 이용하여  $1 \times 10^5$ 개/mL의 농도로 HCT116 세포를 1 mL씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후,  $\beta$ -sitosterol을 48시간동안 처리하였다. 준비된 세포를 phosphate-buffered saline(PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue(Gibco BRL, Gaithersburg, MA, USA)로 염색하였다. 이를 hemocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경( $\times 200$ ) 하에서 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

### DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

$\beta$ -Sitosterol의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여  $\beta$ -sitosterol이 처리된 세포들을 PBS로 세척하고 3.7% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Sigma) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 fluorescence microscope를 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

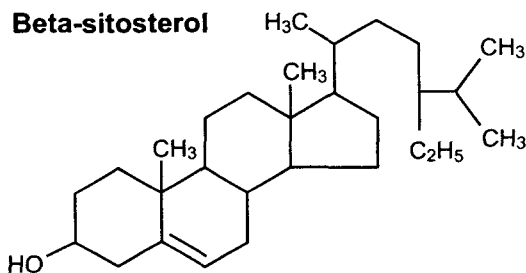


Fig. 1. Chemical structure of  $\beta$ -sitosterol.

### SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

선행 방법에 준하여 정상 및  $\beta$ -sitosterol이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다(17). 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL(Enhanced Chemi Luminosence) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.(Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, Inc., Texas, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2  $\mu$ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다(18). 이 cDNA를 template로 사용하여 p53 및 p21 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
p53	Sence	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisence	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisence	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

### 결과 및 고찰

#### β-Sitosterol에 의한 인체 대장암세포 증식의 억제

세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의한 세포가 끝없이 이어져 증식에 계속되는 것이 암세포라고 할 수 있다(19,20). 따라서 세포주기 조절과 연관된 특정인자들의 발현 조절을 통한 암세포의 증식억제 기구해석은 암을 포함한 특정 약제의 개발에 매우 중요한 의의를 가질 수 있다. 본 연구에서는 β-sitosterol에 의한 인체 대장암 세포의 성장억제와 연관된 기전의 해석을 시도하기 위하여 G2/M기 관련 조절 인자들의 발현에 미치는 β-sitosterol의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 HCT116 인체 대장암 세포의 성장에 미치는 β-sitosterol의 영향을 알아보기 위하여 48시간 동안 다양한 농도의 β-sitosterol을 처리한 후 살아 있는 세포의 수를 계수하여 β-sitosterol이 처리되지 않은 대조군의 세포 수와 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 β-sitosterol의 처리농도 증가에 따라 대장암세포의 생존율은 처리된 β-sitosterol의 농도 의존적으로 강하게 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 암세포의 성장 억제 효과는 β-sitosterol의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었는데, 저농도 처리군에서는 전체적으로 세포질이 응축되면서 짧고 많은 가지를 친 듯한 모양으로 바뀌었으며, 이러한 수상돌기와 같은 형태가 더욱 신장되면서 고농도 처리군에서는 암세포들의 부착력이 상실되었음을 알 수 있었다(data not shown).

#### β-Sitosterol에 의한 인체 대장암세포의 apoptosis 유발

이상의 β sitosterol에 의한 암세포의 성장억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 이에 관한 직접적인 증거를 제시하기 위하여 정상 및 β-sitosterol이 함유된

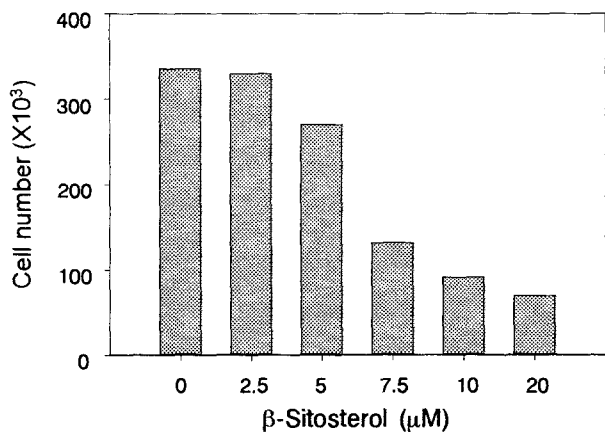


Fig. 2. Effects of β-sitosterol on the growth of HCT116 human colon cancer cells.

As described in Materials and methods, the cells were plated at 1 × 10<sup>5</sup> cells per 6 well plate, and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of β-sitosterol for 48 h and the viability was counted by hemacytometer. Results are expressed as the means of two independent experiments.

배지에서 배양된 암세포를 대상으로 핵의 형태적인 변화를 조사하였다. Fig. 3A는 DAPI 염색에 의한 핵의 형태에 미치는 β-sitosterol의 영향을 나타낸 결과로서, β-sitosterol이 처리된 배지에서 자란 암세포의 경우 정상배지에서 자란 세포들에서 관찰할 수 없는 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body의 출현(21,22)이 증가되어 β-sitosterol의 처리에 의한 암세포 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다. 다음은 β-sitosterol에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 표적 단백질인 β-catenin의 발현에 미치는 β-sitosterol의 영향을 Western blot 분석으로 조사하였다. β-Catenin은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다(23-26). β-Sitosterol에 의한 apoptosis가 이러한 세포 유착과 밀접한 관계를 지니는지의 여부를 조사하기 위해서 β-sitosterol이 함유된 배지에서 자란 세포들의 β-catenin 발현을 조사한 결과 Fig. 3B에서처럼 고농도의 β-sitosterol 처리군에서는 대조군에 비하여 β-catenin의 발현이 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 실험 과정에서 관찰된 β-sitosterol이 함유된 배지에서 배양된 암세포의 부착력 상실과 연관성이 있었음을 알 수 있었다. 그러나 β-sitosterol 처리에 의한 암세포의 생존율이 7.5 μM 처리군에서 급격하게 떨어지지만 β-catenin의 발현은 7.5 μM 처리군에서 큰 차이가

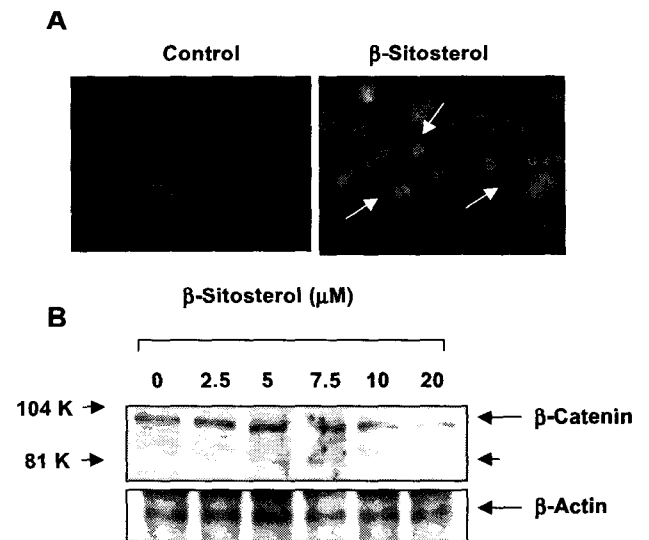


Fig. 3. Induction of apoptosis by β-sitosterol.

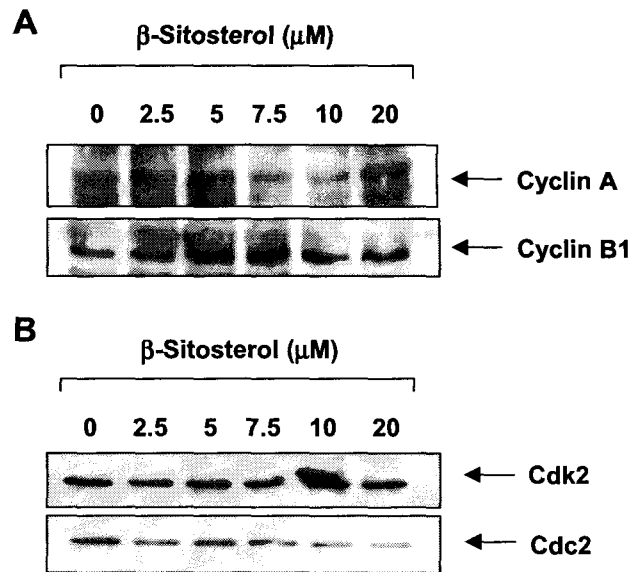
(A) HCT116 cells were incubated with β-sitosterol for 48 h, and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, ×400. (B) After 48 h incubation with β-sitosterol, cells were lysed and equal proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the antibodies against β-catenin and β-actin. Proteins were visualized using ECL detection system. β-Actin was used as an internal control.

나타나지 않았다. 따라서  $\beta$ -catenin 발현 조절과 연관된 다른 유전자산물의 변화나,  $\beta$ -catenin 단백질 활성의 정도 등에 관한 후속 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

G2/M 관련 조절인자 발현에 미치는  $\beta$ -sitosterol의 영향 최근 아주 활발한 연구가 진행중인 세포주기 조절은 각 세포주기별로 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다(19,20). 먼저 Cdk4 및 Cdk6와 complex를 이루는 D 유형의 cyclin은 G1기의 조절에 중요하며(27), cyclin E는 Cdk2와 complex를 이루면서 S기로의 전이에 중요한 역할을 담당하고 있다(28,29). Cyclin A는 G1 후기에 발현을 시작하여 S기와 G2기 동안 발현이 증가되고 cyclin B1은 G2기에서 M기로의 이행을 조절하며, 각각은 Cdk2 및 Cdc2의 kinase 활성의 조절에 중요한 역할을 한다(30,31). Awad 등(15)에 의한 결과에 의하면 동일 처리 농도에서 phytosterol에 속하며 구조적으로  $\beta$ -sitosterol과 매우 유사한 campesterol은 암세포의 세포주기 진행에 아무런 영향을 미치지 않았으나  $\beta$ -sitosterol의 처리에 의한 암세포의 성장억제는 세포주기의 G2/M arrest와 연관이 있었다. 그리고 cholesterol의 경우 동일 조건에서 S기의 증가 현상이 있었다는 결과는 암세포에 대한  $\beta$ -sitosterol 고유의 특징적인 작용이 있음을 시사하는 바이지만 이와 연관된 연구가 진행된 예는 없다. 따라서 본 실험의 결과와 연관된  $\beta$ -sitosterol의 항암기전 해석의 일환으로  $\beta$ -sitosterol이 함유된 배지에서 배양한 세포들을 대상으로 세포주기 G2/M checkpoint 관점에서 중요한 몇 가지 cyclin 및 Cdk의 발현 정도를 비교 조사하였다. Fig. 4A에 나타낸 바와 같이 cyclin A 단백질의 경우  $\beta$ -sitosterol 처리에 따른 발현의 차이는 크게 관찰되지 않았다. Cyclin B1의 경우 저농도  $\beta$ -sitosterol 처리군에서 다소 증가되는 양상을 보였으나, 고농도 처리군에서는 대조군과 유사한 발현을 보였다. 한편 세포주기 양성 조절인자와의 결합을 통해 세포의 증식을 활성화할 수 있으면서 그의 inhibitor에 의해 활성화가 억제되는 Cdk의 발현에 미치는  $\beta$ -sitosterol의 영향을 조사한 결과에서는, Fig. 4B에서처럼, Cdk2는 유의적인 변화가 없었으나, G2/M기 조절에 중요한 Cdc2는  $\beta$ -sitosterol의 처리농도 의존적으로 발현이 다소 감소되었다.

#### p53 및 p21의 발현에 미치는 $\beta$ -sitosterol의 영향

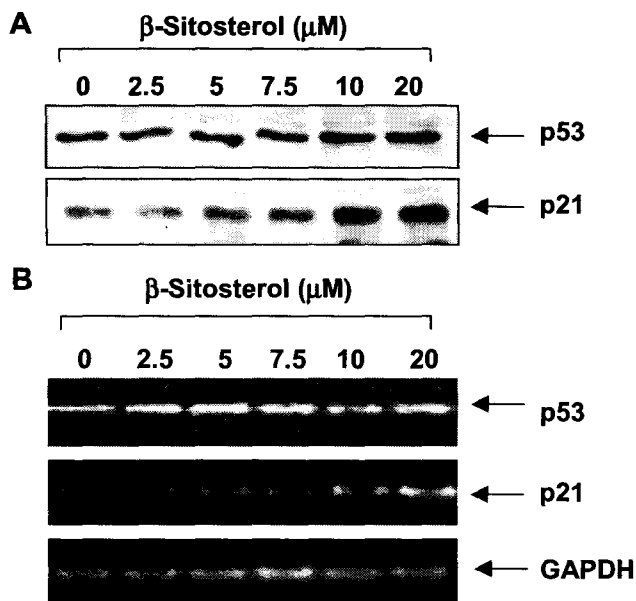
한편 다양한 세포증식 억제 신호에 의해 유도되는 Cdk inhibitor는 Cdk와의 강한 결합을 통하여 그들의 활성을 억제시키는 역할을 하는데, 그들은 크게 두 가지의 family로 분류(INK4 및 CIP/KIP family)되어지고 있다(32). 이들 중 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21은 DNA 손상에 의한 종양억제 유전자 p53에 의해 조절을 받으며, 이는 세포주기 상 G1기에서 세포증식을 억제하는 세포주기와 연관된 가장 중요한 조



**Fig. 4. Effect of  $\beta$ -sitosterol on the expression of cyclins and Cdk.**

HCT116 cells were treated with indicated concentrations of  $\beta$ -sitosterol. After 48 h incubation, cells were lysed and equal proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

절인자로 알려져 왔다(33,34). 그러나 최근 연구에 의하면 p53에 의한 p21의 전사조절과는 관계없이 암세포의 성장억제나 분화 유도에 p53 비의존적인 p21 조절 기전이 하나씩 밝혀지고 있으며 p21 전사조절에 관여하는 coactivator와 suppressor에 대한 연구들이 활발하게 진행 중이다(35-38) 그리고 최근 새로운 연구 결과들로부터 p21은 세포주기 상 G1기의 조절뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 세포주기 전반에 걸친 조절자로서 다양한 cyclin/Cdk complex의 활성을 조절하며, 노화 및 apoptosis에도 관여하는 세포증식에 가장 중요한 조절인자로 인식되어져 오고 있다(39-41). Fig. 4의 결과에서  $\beta$ -sitosterol 처리에 의한 암세포의 성장억제 효과에 Cdk의 활성을 조절하는 cyclin의 발현 감소효과는 비교적 강하게 나타나지 않았다. 따라서 이들 양성조절인자 외 다른 유전자 산물에 의한 조절 가능성이 매우 크기 때문에  $\beta$ -sitosterol의 처리에 의한 암세포의 증식억제가 Cdk inhibitor의 발현과 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 현재까지 알려진 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어져 있는 p21과 종양억제인자 p53의 발현에 미치는  $\beta$ -sitosterol의 영향을 Western blotting 및 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 5A의 결과에서 알 수 있듯이 저농도의  $\beta$ -sitosterol 처리군에서는 거의 변화가 없었던 p21의 발현이고 농도의  $\beta$ -sitosterol 처리군에서는 매우 유의적으로 증가되었으나 p53은 다소 증가되는 양상을 보여 주었다. 이는 RT-PCR에 의한 두 유전자의 전사 수준에 미치는  $\beta$ -sitosterol의 영향에서도 유사한 결과임을 알 수 있었다(Fig. 5B). 따라서



**Fig. 5.** Induction of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 by β-treatment in HCT116 cells.

(A) Cells were incubated with β-sitosterol for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. (B) After 48 h incubation with β-sitosterol, total RNA was isolated using an RNA Zol B reagent and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers. The amplified PCR products were run in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

β-sitosterol 처리에 의한 세포 증식의 억제에는 Cdk의 단백질 발현 변화보다는 Cdk inhibitor의 발현 증가를 통하여 그들 활성 자체를 감소시켰을 것으로 생각되어지며 이때 p21이 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 β-sitosterol에 의한 p21의 발현 증가가 p53의 발현과 관계가 있는지의 여부를 조사하기 위해서는 추가적으로 p53 null 또는 mutant 세포주를 사용한 세포주기 관련 연구의 검증이 필요할 것으로 생각되어진다.

**요 약**

β-Sitosterol은 과일과 야채 등을 포함한 대부분의 고등식물에 존재하는 중요한 phytosterol의 하나로서, 인체 암의 예방과 치료에 매우 유효한 것으로 보고되어져 오고 있다. 본 연구에서는 β-sitosterol의 암세포 증식억제 기전의 해석을 시도하기 위하여 인체 대장암세포 HCT116의 증식에 미치는 β-sitosterol의 영향을 조사하였다. β-Sitosterol의 처리로 HCT116 암세포의 증식은 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, 특히 7.5 μM 이상 처리에서는 급격한 성장억제 효과가 있었다. 또한 5.0 μM 처리군에서부터 apoptotic body의 형성이 관찰되었고, β-catenin 단백질의 분해 현상과 연관성이 있었다. 그리고 β-sitosterol이 처리된 암세포에서는 증양억제

유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 증가되었다. 본 결과는 그동안 연구가 거의 진행되어져 있지 않았던 β-sitosterol에 의한 암세포주기 조절 해석을 위한 주요한 자료로 활용될 것이다.

**감사의 글**

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 대구대학교 농산물저장·가공 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

**문 헌**

1. Dwyer JT. 1988. Health aspects of vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* 48: 712-738.
2. Weihrauch JL, Gardner JM. 1978. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc* 73: 39-47.
3. Vanhanen HT, Miettinen TA. 1992. Effects of unsaturated and saturated dietary plant sterols on their serum contents. *Clin Chim Acta* 205: 97-107.
4. Raicht RF, Cohen BI, Fazzini EP, Sarwal AN, Takahashi M. 1980. Protective effect of plant sterol against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res* 40: 403-405.
5. Gupta MB, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP. 1980. Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of β-sitosterol. *Planta Med* 39: 157-163.
6. Garcia MD, Saenz MT, Gomez MA, Fernandez MA. 1999. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. *Phytother Res* 13: 78-80.
7. Choi S, Kim KW, Choi JS, Han ST, Park YI, Lee SK, Kim JS, Chung MH. 2002. Angiogenic activity of β-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta Med* 68: 330-335.
8. Yamada H, Yoshino M, Matsumoto T, Nagai T, Kiyohara H, Cyong JC, Nakagawa A, Tanaka H, Omura S. 1987. Effects of phytosterols on anti-complementary activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 35: 4851-4855.
9. Bouic PJ, Lamprecht JH. 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immune-modulating properties. *Altern Med Rev* 4: 170-177.
10. Bouic PJ. 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 471-475.
11. Awad AB, Chen YC, Fink CS, Hennessey T. 1996. β-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res* 16: 2797-2804.
12. Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC. 1998. β-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res* 18:471-473.
13. von Holtz RL, Fink CS, Awad AB. 1998. β-Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 32: 8-12.
14. Awad AB, Roy R, Fink CS. 2003. β-Sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 10: 497-500.
15. Awad AB, Williams H, Fink CS. 2001. Phytosterols reduce *in vitro* metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 40: 157-164.
16. Greenberg-Ofrath N, Terespolosky Y, Kahane I, Bar R. 1993. Cyclodextrins as carriers of cholesterol and fatty acids

- in cultivation of mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol* 59: 547-551.
17. Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 272: 28479-28484.
  18. Choi YH. 2001. Research technics for the cell cycle study. *Exp Mol Med* 33: S15-36.
  19. Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
  20. Sherr CJ. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60: 3689-3695.
  21. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92: 57-70.
  22. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. 1998. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 18: 505-518.
  23. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 87: 992-1005.
  24. Debruyne P, Vermeulen S, Mareel M. 1999. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol Belg* 62: 393-402.
  25. Fukuda K. 1999. Apoptosis-associated cleavage of  $\beta$ -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 519-529.
  26. Choi YH, Baek JH, Yoo M, Chung H, Kim ND, Kim KW. 2000. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int J Oncol* 17: 565-571.
  27. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14: 2066-2076.
  28. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257: 1689-1694.
  29. Meyerson M, Harlow E. 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14: 2077-2086.
  30. Walker DH, Maller JL. 1991. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 354: 314-317.
  31. Ohtsubo M, Roberts JM. 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259: 1908-1912.
  32. Elledge SJ, Harper JW. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 6: 847-852.
  33. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
  34. Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134.
  35. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54: 1169-1174.
  36. Datto MB, Yu Y, Wang XF. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor  $\beta$  responsive elements in the WAF/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270: 28623-28628.
  37. Zeng YX, El-Deiry WS. 1996. Regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12: 1557-1564.
  38. Sowa Y, Orita T, Hiranabe-Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. 1999. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci* 886: 195-199.
  39. Zhang H, Hannon GJ, Casso D, Beach D. 1994. p21 is a component of active cell cycle kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 21-29.
  40. Xiao ZQ, Jaszewski R, Majumdar AP. 2000. Aging enhances G(1) phase in the colonic mucosa of rats. *Mech Ageing Dev* 116: 1-14.
  41. Choi YH, Lee WH, Park KY, Zhang L. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 91: 164-173.

(2003년 7월 25일 접수; 2003년 11월 17일 채택)