J Korean Soc Food Sci Nutr
35(9), 1115 ~1120(2006)

육계 에탄올 추출물이 HT-29 대장암 세포주의 성장 및 COX-2 기전에 미치는 영향

이승연·김희석·김정옥·황성완·황성연†
(주) KMSI 부설 한국의과학연구소

Effect of Ethanol Extracts of Cinnamon on the Proliferation and COX-2 Pathway in HT-29 Human Colon Cancer Cell Line

Seung Youn Lee, Hee Seok Kim, Jeoung Ok Kim, Sung Wan Hwang and Sung Yeoun Hwang†

Korea Medical Science Institute, Incheon 400-103, Korea

Abstract

The effect of cinnamon ethanol extract (CN) on HT-29 cancer cell line has been examined. CN inhibited the growth of HT-29 colon cancer cells in a concentration- and time-dependent manner but not the growth of CCD-112CoN normal colon cells. And CN markedly inhibited the production of PGE_2 and cGMP as well as the mRNA expression of COX-2. These data suggest that non-toxic concentration of CN has a significant inhibition effect on the growth of HT-29 cells, probably through the inhibition of PGE_2 production via COX-2 inhibition, and may have value as a safe chemopreventive agent for colon cancer.

Key words: cinnamon, HT-29, COX-2, PGE_2

서 론

대장암은 미국과 캐나다를 포함한 성인 남녀의 암발병률 및 사망률의 주요 원인이며, 최근 국내에서도 식생활방식의 서구화로 인하여 대장암 발병률이 급격히 증가하고 있다(1). 따라서 이의 조기진단과 치료에 대한 관심이 날로 높아가고 있으며, 다양한 물질에 의한 예방은 매우 중요하다. 현재까지 연구된 대표적인 대장암을 예방하는 화학 약물로는 cyclooxygenase-2(COX-2) 선택 억제제(2), 아스피린을 포함한 비스테로이드 항염제(3,4), eflornithine(5,6), 호르몬 대치요법(7,8), ursodil(9,10), epidermal growth factor receptor (EGFR) 억제제(11), protease 억제제(12), matrilysin 억제제(13,14), 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 억제제(15,16) 등이 있는데, 이 중 비스테로이드 항염제는 여러 측면에서 가장 효과적인 약물로, COX-1과 COX-2를 억제함으로써 세포증식과 신생혈관 생성을 억제하고, 세포사멸을 촉진함으로써 대장암 예방효과를 보이는 것으로 보고되어 있으며(17), 비스테로이드 항염제의 위장관계 부작용을 줄일 수 있는 COX-2 선택 억제제 또한 보고된 바 있다(2).

육계는 일반적으로 계피라고 하여 한방에서 건위약으로 식욕부진, 소화불량에 주로 쓰였으며 감기, 진통 등에도 사용되어 왔다(18). Mina 등(19)은 육계의 Ethanol:Methylene chloride 추출물의 *Helicobacter pylori*에 대한 항균작용을 보고하여 육계의 건위제로서의 효과의 가능성을 입증하였다. 또한 Schene 등(20)은 육계에서 분리한 수용성의 polymeric polyphenol 화합물이 Jurkat과 U937 tumor cell line의 성장과 cell cycle의 조절에 영향을 미친다고 하였으며, Chung 등(21)은 인삼과 계피 혼합물이 HT-29, HRT-18, HepG2 세포의 증식억제 효과가 있다고 보고하였다. 그러나 육계의 암세포 증식 억제 기전에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다.

따라서, 본 연구에서는 육계 EtOH 추출물이 HT-29 대장암 세포의 증식 및 PGE_2, cGMP 생성, 또한 정상세포의 증식에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻어 대장암을 예방하는 보조식품으로서의 가능성이 있기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 육계는 대영제약에서 국내산을 구입하여 시료로 사용하였고, 육계 50 g에 70% EtOH 100 mL를 첨가하여 12시간동안 침지 추출하였고, 추출액을 여과한 후 여과액을 감압농축하고, 동결건조하여 분말을 얻었고, 이를 200 mg/mL 농도로 DMSO에 녹인 후 실험에 사용하였다.

†Corresponding author. E-mail: blue@kmsi.co.kr
Phone: 82-32-255-2500, Fax: 82-32-255-2505

세포배양

본 연구에 사용된 대장암 HT-29 세포주(KCLB 30038)는 Korean cell line bank(Seoul, Korea)에서 구입하여 10% FBS가 포함된 RPMI1640 배지에 penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다. 대장 정상세포인 CCD-112CoN(CRL 1541)은 American type culture collection(ATCC, Rockvile, MD, USA)에서 구입하였으며, EMEM 배지에 10% FBS, penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 모두 37°C CO_2 incubator(5%)에서 실시하였다.

세포생존률 측정

세포의 증식률은 Mosmann(22)의 방법에 의하여 측정하였다. 96 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 육계 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하고 12, 24, 48, 72시간 배양하였다. 배양완료 후 0.1% MTT 용액을 넣어 37°C, 3시간동안 배양한 다음 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 15분간 실온에서 shaking 한 후 570 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포생존률을 계산하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

세포의 RNA를 easy-spin RNA extraction kit(Intron biotechnology, Korea)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 즉, 세포를 PBS로 세척한 후 lysis buffer에 용해하고, chloroform을 가한 후 13,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 RNA가 있는 상층액을 얻고, 이를 RNA-binding column에 통과시켰다. Column을 2회 세척한 후, elution buffer를 통과시켜 RNA를 얻은 후 정량하여 total RNA가 500 ng이 되도록 각각 맞춘 후, Maxime RT-PCR Premix kit(Intron biotechnology, Korea)을 이용하여 COX-2에 대한 semi-quantitive RT-PCR을 실시하였는데, β-actin 발현량이 일정함을 확인한 후 실시하였다. 사용된 COX-2 primer의 염기서열은 다음과 같다; 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT-3'(sense strand), 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'(antisense strand). 온도조건은 denaturation(94°C, 30 sec), annealing(58°C, 30 sec), extention(72°C, 1 min)의 조건에서 30 cycle 실시하였다.

PGE_2 측정

세포내 염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE_2의 농도변화를 assay kit(Cayman chemical, USA)를 사용하여 enzyme-linked immunoabsorbent assay(ELISA) 방법으로 제조사의 방법에 따라 정량하였다. 48 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 육계 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하여 18시간 배양하고, 배양액을 시료로 사용하였다. Goat anti-mouse IgG가 부착되어 있는 96 well plate에 PGE_2 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE_2-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE_2를 각각 50 μL씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 완충액으로 항체와 결합하지 않은 PGE_2 혹은 PGE_2-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 발색시약을 가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 PGE_2와 첨가된 PGE_2-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE_2의 함량을 계산하였다.

cGMP 측정

세포배양액으로 분비된 cGMP의 농도변화를 ELISA kit (R&D systems, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 정량하였다. 48 well plate에 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 육계 추출물을 10, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 처리하여 18시간 배양하고, 배양액을 시료로 사용하였다. Goat anti-rabbit IgG가 부착되어 있는 96 well plate에 cGMP 표준액 또는 시료를 가한 후, alkaline phosphatase conjugate와 rabbit anti-cGMP를 각각 50 μL씩 가하고 실온에서 2시간 반응시킨 후 항체와 결합하지 않은 cGMP 혹은 conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 p-nitrophenyl phosphate가 함유된 substrate 용액을 가하여 실온에서 30분간 반응시키고, trisodium phosphate 용액으로 발색반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 cGMP와 첨가된 cGMP-alkaline phosphatase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 cGMP의 함량을 계산하였다.

통계처리

본 연구에서 얻은 결과는 mean±SD로 표시하였으며, 대조군과 육계추출물 사이의 유의성은 paired Student's *t*-test를 이용하여 $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$인 경우 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

세포증식 억제효과

HT-29 세포에 육계 추출물을 10 μg/mL에서 200 μg/mL까지 농도별로 처리하고 6, 12, 24, 72시간동안 배양한 후, MTT 측정방법으로 세포생존률을 관찰하였다. 6시간 처리군의 경우 세포 생존률이 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도에서 각각 대조군의 99.7, 99.9, 97.1, 97.5%로 저해효과를 보이지 않았으나, 12, 24, 72시간 처리군의 경우에는 시간, 농도에 의존적으로 HT-29 세포의 생존률 억제효과를 나타내었다 (Fig. 1).

이와 같은 육계 추출물에 의한 HT-29 세포 생존률의 감소현상이 단순히 육계추출물의 독성에 의한 세포 손상 때문인지 조사하기 위하여 정상 대장세포인 CCD-112CoN 세포에 육계 추출물을 각 농도별로 처리하고, MTT 방법으로

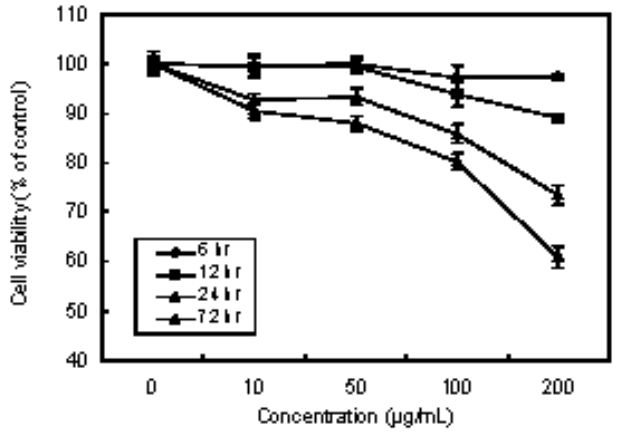

Fig. 1. Inhibitory effect of CN on the growth of HT29 human colon cancer cell line.
HT-29 cells were plated in 96 well plates and treated with various concentration of CN for 6, 12, 24, 72 hrs. Data are mean ±SD of triplicate per treatment.

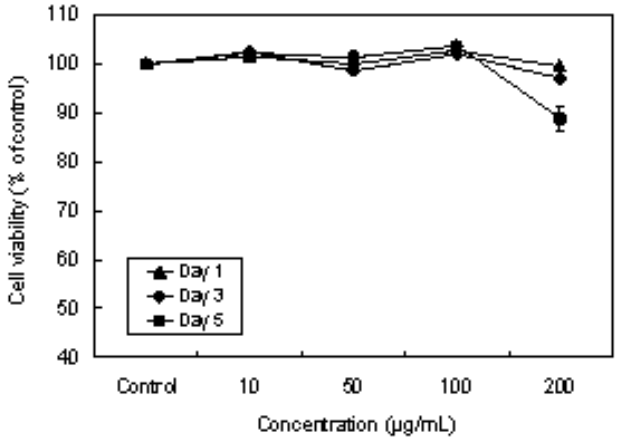

Fig. 2. Effect of CN on the growth of CCD-112CoN normal colon cells.
Cells were plated in 96 well plates and treated with various concentration of CN for 1, 3, 5 days. Data are mean ±SD of triplicate per treatment.

세포생존률을 측정하였다. 정상세포인 CCD-112CoN의 경우, 세포 분열시간을 고려해 HT-29 세포와 차별하여 1일, 3일, 5일 후 MTT 측정을 실시하였다. 그 결과, 육계 추출물 200 μg/mL의 농도로 5일 처리군에서 세포생존률이 대조군의 88.68%로 12% 감소현상을 나타냈으나, 1일, 3일 처리군에서는 99.5%, 97.2%로 대조군과 차이를 보이지 않았으며, 10, 50, 100 μg/mL 농도 처리군에서 또한 대조군과 동일하였다(Fig. 2).

이상의 결과, 육계 추출물은 HT-29 세포의 증식을 농도와 시간에 의존적으로 억제하였으나, CCD-112CoN 세포의 증식은 억제하지 않았으며(Fig. 1, Fig. 2), 이러한 현상은 육계 추출물이 대장암 세포에 선택적으로 작용하여 세포증식을 억제한 것으로 사료된다.

COX-2 mRNA 발현 양상

COX-2 경로는 종양세포 성장에 관여하는 중요한 조절자이며, 이 경로를 차단하면 대장종양이나 대장암의 성장을 억제할 수 있기 때문에 COX-2 유전자의 발현 양상은 대장암의 성장에 매우 중요한 요소인 것으로 보고되어 있다(28). 따라서 육계 추출물에 의한 COX-2 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 HT-29 세포에 육계추출물을 10 μg/mL에서 200 μg/mL까지 농도별로 처리하고 24시간동안 배양한 후, RT-PCR을 실시하여 육계 추출물 농도의 증가에 따라 세포내 COX-2 mRNA 발현량이 감소하였음을 확인하였다(Fig. 3).

대장암 화학예방 약물 중 비스테로이드 항염제는 여러 측면에서 가장 효과적인 약물로, 대장암의 모든 임상단계(aberrant crypt foci, 선종, 암, 암 관련 사망률)에서 예방효과를 보이며, COX-1과 COX-2를 억제함으로써 세포증식과 신생혈관 생성을 억제하고 세포사멸과 면역감시를 촉진한다(17). 비스테로이드 항염제 중 아스피린은 대장암이나 대장선종의 과거력이 있는 위험군에서 선종재발을 감소시켰으며(24,25), sulindac은 가족성 선종 용종증 환자에서 선종을 감소시켰다는 보고가 있다(26). Steinbach 등(2)은 비스테로이드 항염제의 위장관계 부작용을 줄일 수 있는 COX-2 선택 억제제의 경우 가족성 선종 용종증 환자에서 선종 수를 28% 감소시켰으나, 장기간의 투여효과와 대장암 발생 및 사망률에 대한 효과에 대한 연구가 필요하다고 하였다. 대장암의 화학예방 약제의 이상적인 조건은 종양 예방효과와 비용의 효율성이 있고, 약물독성이나 부작용은 없어야 한다. 그러나 이러한 모든 조건을 충족하는 약제는 아직까지 없으므로, 독성이 없으면서 예방효과가 있는 약제와 식이성분에 의한 대장암 화학예방에 관한 연구가 진행되고 있다(27-29).

본 실험의 결과, 육계 추출물은 대장 정상 세포의 독성이

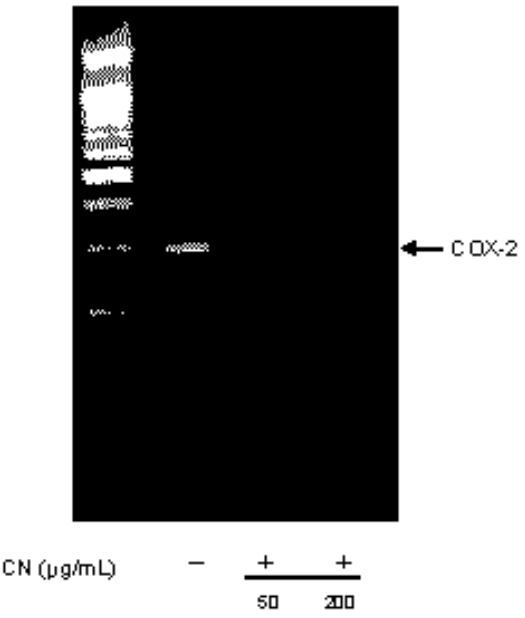

Fig. 3. Effect of CN on the mRNA expression of COX-2.
Cells were cultured and treated with CN for 18 hours and analyzed by RT-PCR.

없이 대장암 세포의 성장과 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 사료된다.

PGE_2 생성 억제효과

COX-2는 arachidonic acid가 다양한 prostaglandin으로 합성되는데 촉매역할을 하여 생체내에서 여러 중요한 작용을 하도록 하는데, 그 중 PGE_2는 대장암 세포에서 많은 양이 생성되며, 대장암 세포의 고사작용 조절과 면역 불균형 등 대장암에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(23,30). 따라서 대장암의 화학예방으로 COX-2에 의해 생성된 PGE_2 생성 조절물질을 찾는 노력들이 행해져 왔다(9).

따라서 HT-29 세포에 육계추출물을 10 μg/mL에서 200 μg/mL까지 농도별로 처리하고 18시간동안 배양한 후, PGE_2 생성량을 관찰하였다. 대조군(254.7±4.3 pg/mL)과 비교하여 보면 육계 추출물은 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도에서 각각 6.4%(238.4±9.51 pg/mL), 16.7%(212.01±22.93 pg/mL), 20.9%(201.35±6.56 pg/mL), 40.1%(152.47±11.63 pg/mL)로 유의성 있는 저해 효과를 나타내었다(Fig. 4).

위 결과에서 육계 추출물은 HT-29 세포의 COX-2 mRNA 발현량과 PGE_2 생성량을 감소시킴으로써, 결과적으로 HT-29 세포의 성장을 억제한 것으로 사료되며, 세포사멸 기전에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

cGMP 생성 억제효과

육계 추출물에 의하여 대장암 세포의 cGMP 생성량이 변화하는지 알아보기 위하여 HT-29 세포에 육계 추출물을 10 μg/mL에서 200 μg/mL까지 농도별로 처리하고 18시간 동안 배양한 후, cGMP 생성량을 관찰하였다. 대조군(438.03±2.3 pM)과 비교하여 보면 육계 추출물은 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도에서 각각 10.04%(394.7±8.81 pg/mL), 15%(372.3±4.21 pg/mL), 29.5%(308.6±6.14 pg/mL), 50.5%

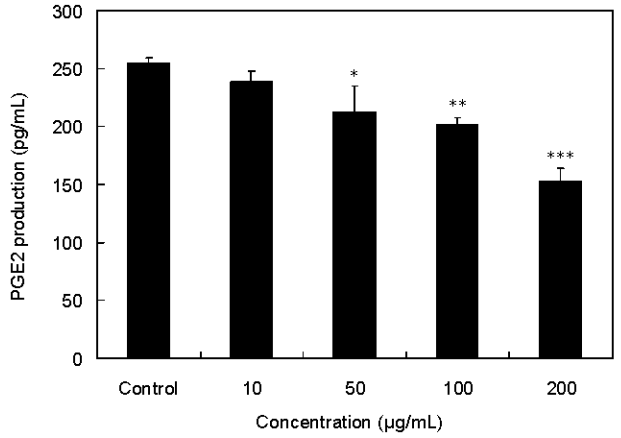

Fig. 4. Inhibitory effect of CN on the PGE_2 production in HT-29 cells.
PGE_2 was measured after treatment with various concentration of CN for 18 hours. Data are mean±SD of triplicate per treatment. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$.

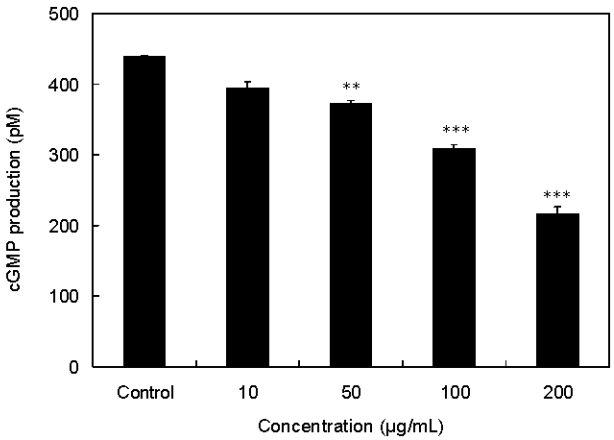

Fig. 5. Inhibitory effect of CN on the cGMP production in HT-29 cells.
cGMP was measured after treatment with various concentration of CN for 18 hours. Data are mean±SD of triplicate per treatment. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$.

(216.9±9.75 pg/mL)로 유의하게 cGMP 생성을 저해하였다(Fig. 5).

대장암 진행과정에서 COX-2 활성과 PGE_2 생성량은 cAMP 뿐만 아니라 cGMP 생성에 의한 영향을 받는 것으로 보고된 바 있다(31). 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의한 cGMP 생성과 PGE_2 생합성은 밀접하게 연관되어 있으며(32), 간암 및 유방암에서 또한 iNOS 활성과 COX-2가 암세포의 신생혈관 생성과 매우 관련되어 있다는 보고들이 있다(33,34).

대장에서 cGMP와 iNOS는 대장암 뿐 아니라 배변능력 조절에 매우 중요한 요소이다(35). Nitric oxide(NO)에 의한 Fe-nitrosyl complex는 cGMP 합성을 촉진시키고, 따라서 cGMP에 의존적인 protein kinase C(PKC)를 활성화시키게 되는데, PKC가 활성화, 즉, phosphorylation되면 chloride의 유출, sodium의 유실로 인한 이온 불균형, potassium 불균형 등으로 인하여 대장내에서 배변 조절능력이 손실되어 결국 설사로 이어지게 된다는 연구 결과들이 있다(36,37).

위 결과에서 육계 추출물은 HT-29 세포의 PGE_2 생성과 cGMP 생성을 억제하였고, 이들 억제기전이 서로 연관되어 있는지는 PGE_2 및 cGMP/iNOS inhibitor 또는 overexpression, knockdown 등의 기법을 이용한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

요 약

육계 추출물의 대장암 세포에 미치는 영향을 HT-29 인체 결장암 세포주를 이용하여 조사하였다. 육계 추출물은 대장 정상세포인 CCD-112CoN의 성장에는 크게 영향을 미치지 않았으나, 대장암 세포인 HT-29의 성장은 농도, 시간에 의존적으로 크게 억제하였고, 대장암의 진행 과정에서 매우

중요한 COX-2 mRNA 발현량 및 PGE_2 생성, cGMP 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 이상의 결과에서 육계 추출물은 정상세포에는 독성 없이 대장암 세포의 COX-2 및 PGE_2, cGMP 생성을 억제함으로써 결과적으로 대장암 세포의 성장을 감소시킨 것으로 판단된다. 따라서 육계는 부작용이 없는 대장암 예방 건강 보조식품으로서 개발 가능성이 있으며, 암세포 사멸에 대한 더욱 정확한 작용기전의 규명과 활성성분의 분리 및 정제, 응용법 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

문 헌

1. 대한민국 보건복지부. 2003. 한국인 암등록 조사자료 분석 보고서.
2. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS, Kelloff G. 2000. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342: 1946-1952.
3. Kaza CS, Kashfi K, Rigas B. 2002. Colon cancer prevention with NO-releasing NSAIDs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 67: 107-120.
4. Thun MJ, Hmley SJ, Patrono C. 2002. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94: 252-266.
5. Meyskens FLJ, Gerner EW. 1995. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin Cancer Res* 5: 945-951.
6. Kathryn RL, Natalia AI, Gary AP, Hiayan C, Eugene WG. 2000. Influence of K-ras activation on the survival responses of Caco-2 cells to the chemopreventive agents sulindac and difluoromethylornithine. *Cancer Epiderm Biomarkers Prev* 9: 1155-1162.
7. Grodstein F, Martinez ME, Platz EA. 1998. Postmenopausal hormone use and risk for colorectal cancer and adenoma. *Ann Intern Med* 128: 705-712.
8. Borgelt L, Umland E. 2004. Benefits and challenges of hormone replacement therapy. *J Am Pharm Asso Wash* 40: 30S-31S.
9. Ikegami T, Matsuzaki Y, Shoda J, Kano M, Hirabayashi N, Tanaka N. 1998. The chemoptrventive role of ursodeoxycholic acid in azoxymethane-treated rats: suppressive effects on enhanced group II phospholipase A2 expression in colonic tissue. *Cancer Lett* 134: 129-139.
10. Narisawa T, Fukaura Y, Terada K, Sekiguchi H. 1999. Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis and colonic mucosal telomerase activity in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res* 18: 259-266.
11. Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. 2006. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6: 29-31.
12. Pettinari A, Amici M, Cuccioloni M, Angeletti M, Fioretti E, Eleuteri AM. 2006. Effect of polyphenolic compounds on the proteolytic activities of constitutive and immunoproteasomes. *Antioxid Redox Signal* 8(1-2): 121-129.
13. Carole LW, Kathleen JH, Patricia AL, Brigid LMH, Lynn MM. 1997. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1402-1407.
14. Yamamoto K, Higashi S, Kioi M, Tsunezumi J, Honke K, Miyazaki K. 2006. Binding of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion. *J Biol Chem* 281: 9170-9180.
15. Narisawa T, Morotomi M, Fukahara Y, Hasebe M, Ito M, Aizawa R. 1996. Chemoprevention by pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, of N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 87: 798-804.
16. Notarnicola M, Messa C, Pricci M, Guerra V, Altomare DF, Montemurro S, Caruso MG. 2004. Up-regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in left-sided human colon cancer. *Anticancer Res* 24: 3837-3842.
17. Marnett LJ, DuBois RN. 2002. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 55-80.
18. 김영중, 김종원, 김창민, 도상학, 배기환, 성충기, 신승원, 유경수, 유승조, 육창수, 이경순, 이숙연, 이정규, 임종필, 정보섭, 한대석. 1998. 생약학. 동명사, 서울. Vol 11, p 110-113.
19. Mina T, Robert A, Ishak N. 1999. Cinamon extract's inhibitory effect on *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacology* 67: 269-277.
20. Schene NW, Kelly MA, Marilyn MP, Anderson RA. 2005. Water-soluble polymeric polyphenols from cinnamon inhibit proliferation and alter cell cycle distribution patterns of hematologic tumor cell lines. *Cancer Lett* 230: 134-140.
21. Chung HR, Lee JY, Kim DC, Hwang WI. 1999. Synergistic effect of Panax ginseng and Cinnamon blume mixture on the inhibition of cancer cell in vitro. *J Ginseng Res* 23: 99-104.
22. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods* 65: 56-58.
23. Yasuhide M, Minoru I, Akihiko S, Noriko F, Yoshikazu I, Hitoshi A, Kohji H. 2000. Potential role of group X secretory phospholipase A_2 in cyclooxygenase-2-dependent PGE_2 formation during colon tumorigenesis. *FEBS Lett* 487: 262-266.
24. Baron JA, Cole BF, Sandler RS. 2003. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348: 891-899.
25. Benamouzig R, Deyra J, Martin A. 2003. Daily soluble aspirin and prevention of colorectal adenoma recurrence: one year results of the APACC trial. *Gastroenterology* 125: 328-336.
26. Hawk E, Lubet R, Limburg P. 1999. Chemoprevention in hereditary colorectal cancer syndrome. *Cancer* 86: 2551S-2563S.
27. Zhao LP, Kushi LH, Klein RD, Prentice RL. 1991. Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 15: 169-177.
28. Torzsas TL, Kendall CWC, Sugano M, Iwamoto Y, Rao AZ. 1996. The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and abberent crypt foci development in CFI mice. *Fd Chem Toxicol* 34: 73-77.
29. Pereira MA, Barnes LH, Steele VE, Kellof GV, Lubet R. 1996. Piroxicam-induced aberrant crypt foci and prevention of colon cancer in rats. *Carcinogenesis* 17: 373-376.
30. Craven PA, Saito R, Derubertis FR. 1983. Role of local prostaglandin synthesis in the modulation of proliferative activity of rat colonic epithelium. *J Clin Invest* 72: 1365-1375.
31. Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Felice AD, Perigli G,

Mazzanti R, Masini E. 2004. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 2694-2704.
32. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. 1996. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide antivates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15069-15074.
33. Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. 2001. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 7: 1325-1332.
34. Bing RJ, Miyataka M, Rich KA, Hanson N, Wang X, Slosser HD, Shi S-R. 2001. Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer. *Clin Cancer Res* 7: 3385-3392.
35. Wapnir RA, Teichberg S. 2002. Regulation mechanism of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *J Nut Biochem* 13: 190-199.
36. Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. 1993. Nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178: 153-175.
37. Lincoln TM, Komalavilas P, Boerth NJ, MacMillanCrow LA, Cornwell TL. 1995. cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Adv Pharmacol* 34: 305-322.

(2006년 7월 31일 접수; 2006년 9월 23일 채택)