

## Apigenin과 대사물 isovitexin에 의한 인체 대장암세포의 세포활성 억제효과에 있어서의 EGR-1의 역할 연구

문유석<sup>1\*</sup> · 최뢰광<sup>1</sup> · 양 현

부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학교실

Received April 4, 2006 / Accepted November 13, 2006

**Involvement of Early Growth Response Gene 1 (EGR-1) in Growth Suppression of the Human Colonic Tumor Cells By Apigenin and Its Derivative Isovitexin.** Yuseok Moon, Lei Guang Cui and Hyun Yang. *Department of Microbiology and Immunology, Medical Research Institute, 1-10 Ami-dong, Pusan National University School of Medicine. Busan, Korea* – It has been previously described that transcription factor early growth response gene product 1 (EGR-1) functions as a tumor suppressor gene. This study was conducted to demonstrate that EGR-1 induction by phytochemical apigenin and its derivative isovitexin can mediate the growth suppression of the intestinal epithelial tumor cells. Apigenin and isovitexin induced EGR-1 gene expression both in the dose and time-dependent manners. Moreover the induction was relatively late around 9-12 hr after treatment of HCT-116 cells, while several anti-inflammatory agent such as NSAIDs and catechins elicit the EGR-1 gene expression at much earlier time about 1-3 hr after treatment. In terms of signal transduction, ERK1/2 was critical for apigenin-induced EGR-1 gene expression and its promoter activation. When EGR-1 gene expression was blocked with EGR-1 small interference RNA, the cytotoxicity of apigenin in the human epithelial cells was attenuated, suggesting the involvement of EGR-1 in the anti-tumoric activity of apigenin. To link the EGR-1 induction to EGR-1-regulated gene products in colon cancer, NSAID-Activated Gene 1 (NAG-1) was demonstrated to be elevated by apigenin and isovitexin at 24-48 hr after treatment. Taken together, apigenin-activated ERK1/2 mediated EGR-1 gene induction, which was associated with suppression of the cellular viability by apigenin compound.

**Key words** – EGR-1, apigenin, isovitexin, NAG-1, colon cancer, apoptosis

### 서 론

최근 cyclooxygenase-2 특이저해제의 안전성에 대한 논란과 비특이 저해제인 conventional 비스테로이드계 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)의 상피성종양에 대한 항종양효과에 대한 기전적인 연구가 상당히 진행되어져 오고 있다[17,13,15,17]. 일반적으로 cyclooxygenase (COX)의 효소활성의 저해로 COX 대사물중 특히 prostaglandin E2의 종양세포증식 및 암전이 촉진효과를 억제하는 것으로 그 기전들이 설명되어져 오고 있다[6,12,22-24]. COX 저해성의 다양한 천연물에 존재하는 항산화물질의 경우 상피성종양의 억제효과가 COX 대사조절외의 독립적인 기전으로 조절되어 지는 것들이 밝혀져 오고 있는데 NSAID 또한 COX 외의 독립적인 조절의 신호전달기전들이 최근에 다양하게 밝혀져 오고 있다. 특히 NSAID의 상피조직에 대한 케양성 부작용이 적은 천연물소재 물질의 항염증성 및 항종양성효과에 대하여 암세포에 있어서의 특이적인 암억제 유전

자로서 sulindac sulfide나 indomethacin등의 NSAID에 의하여 유도되는 NSAID-Activated Gene 1 (NAG-1)의 역할에 대한 대장암세포에 대한 항종양효과에서의 역할이 밝혀지고 있다[4,5,16].

NAG-1은 분비형 사이토카인의 형태로서 일반적으로 tumor growth factor beta (TGF- $\beta$ ) superfamily의 일종으로서 placental transforming growth factor- $\beta$ , prostate-derived factor, macrophage inhibitory cytokine, placental bone morphogenetic factor으로도 불리어진다. NAG-1의 발현은 암세포에서의 세포사멸을 매개하며 특히 Sp1, Sp3, COUP-1, p53에 의하여 전사가 촉진 되어 진다[1,2,3,8]. 따라서 NAG-1은 NSAID와 천연물 소염제에 의한 항종양 효과는 상피성종양의 apoptosis 유도를 통해 전반적인 종양의 증식을 억제한다는 것이 세포배양과 실험동물 수준에서 밝혀지고 있다.

최근 이 NAG-1의 전사촉진 전사인자로서 early growth response gene 1 (EGR-1)이 NAG-1의 promoter에 EGR-1의 binding이 tandem GC 상자부위에서 확인되었다[2,3]. 특히 NSAID와 천연물중 green tea catechin 인 epigallocatechin gallate (EGCG)에 의하여 EGR-1 단백질의 발현이 증가 한다[20,21]. 증가된 EGR-1은 핵내 이동 후 다양한 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로서 일반적으로 UV 등 초기 스트레스

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7711, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : moon@pusan.ac.kr

<sup>1</sup>두저자는 본 논문에 동일하게 기여하였음

반응에 의해 발현되는 early response gene에 속한다. 이는 또한 p53에 대하여 의존적 또는 비의존적으로 유도되며 암억제 인자로서 작용하며 몇가지 암조직과 암세포에서 down-regulation되어 있다. EGR-1은 또한 thrombospondin-1 등의 조절을 통하여 암세포의 전이와 침투의 억제에서 매우 중요하다는 것이 최근에 밝혀졌다[20].

본 연구는 천연물 flavonoid 중 apigenin과 곡물의 배아 및 왕겨에 다량 존재하는 apigenin 대사물인 isovitexin의 의하여 상피성 종양세포 HCT-116 대장암세포에서의 EGR-1 유전자의 발현에 대하여 분석하고 이 유전자에 의한 대표적 표적 단백질 중 NAG-1과 이에 따른 세포활성에 대한 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양, 유전자 및 시약

HCT 116 세포주는 미국 유형 배양 콜렉션 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD)에서 구매하여 McCoy's 5A media (10 % FBS, 50 unit/ml penicillin (Sigma, St. Louis, MO), 50mg/ml streptomycin (Sigma, St. Louis, MO)에 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37도에서 배양하였다. 세포수와 생존활성(viability)은 trypan blue (Sigma) dye exclusion을 이용해서 hemacytometer상에서 측정하였다. 화합물 노출 실험 중에는 혈청이 없는 배지를 이용하였다. 저해제 등은 Calbiochem (EMD biosciences, Inc. La Jolla, CA)에서 구매하였다.

### Western Immunoblot Analysis

Cell lysate는 RIPA buffer (1x PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 100 mg/ml PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma))로 준비하고 2-3초 정도의 sonication 후 lysate protein은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL)를 이용해서 정량하였다. 각각 50 mg 단백질을 소형 전기영동기를 이용해서 분리한 후 단백질을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 이동하였다. 블롯은 1 시간 동안 5% skim milk Tris-buffered saline plus Tween 0.05% (TBST) 로 blocking 후 각각의 일차항체로 2시간 상온에서 반응 후 3회 TBST로 세척 후 horseradish-conjugated secondary antibody로 1 시간 상온 반응 후 3회 세척 후 ECL Chemiluminescent substrate (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)로 발색 현상하였다. 각 일차항체는 rabbit polyclonal anti-human Actin antibody (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 토끼 polyclonal anti-p-MAPKs, anti-Egr-1 항체 (Cell signaling technology, Beverly, MA)를 사용하였다.

### Transient / stable transfection

세포는 Trans-LT1 transfection reagent (Mirus, Madison, WI)를 이용해서 제조자 프로토콜에 따라 transfection을 수행하였다. Luciferase reporter gene의 transfection을 위해서 각 well 당 1.5 mg firefly luciferase reporter plasmid와 0.15 mg renilla luciferase, pRL-null vector (Promega, Madison, WI)를 4.5 ml Trans-LT1 reagent에 혼합하여 6 well culture plate에 처리하였다. Transfection 후 24시간 뒤 세포는 화합물에 24시간 노출하였다. Firefly 와 대조구인 renilla luciferase를 동시에 transfection 하는 Dual-luciferase reporter assay system (Promega)을 이용해서 정량하였다. 모든 transfection 효율은 50대지 60% 정도를 유지하였고 이 효율은 pMX enhanced GFP vector를 이용해서 transfection 후 동시에 확인하였다. Stable cell lines을 추가로 만들기 위하여 48시간 뒤 1000 mg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 로서 선별을 가하였다. 선별은 monolayer colonies 가 형성될때까지 하며 안정된 transfectants 는 500 mg/ml G418의 일반배양액에서 유지한다.

### Luciferase Assay

세포는 차가운 PBS로 세척 후 수동 분해 버퍼 (Promega)로 분해물을 준비하였다. 12,000 g에서 4 분간 원심분리후 상층 효소액을 assay에 이용하였다. 상층액은 이후 실험을 위해서 -80 °C에 보관하였다. Luciferase activity는 dual-mode luminometer (Model TD-20/20, Turner Designs Co., Sunnyvale, CA)를 이용해서 측정하였다. Firefly luciferase activity은 renilla luciferase activity에 대해서 일반화 하였고 활성은 다음의 상대치로 표시하였다 (firefly luciferase activity / renilla luciferase activity).

### 세포활성측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)을 이용하여 발색반응을 분석 하였다. 세포주 (2 x 10<sup>4</sup>/well)를 96-well plate에서 화합물을 처리 하였고 처리 시간이 경과한 후 각 well당 50 ml MTS를 투입하여 2시간 반응 시킨 후 배지를 버려내고 각 well에 DMSO 100 ml을 넣고 20분간 반응 시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Small interference RNA (siRNA) 처리

세포는 EGR-1 (Dharmacon, Lafayette, CO)의 siRNA를 lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 처리하여 manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 따라 transfection 하였다. 모든 처리반응 시간은 72 시간이었다.

### 통계처리

데이터는 SigmaStat for windows (Jandel Scientific, San

Rafael, CA, USA)를 이용해서 분석하였다. 두그룹의 데이터 비교는 Student's *t* test를 하였고, multiple groups 비교는 ANOVA를 실시한다.

**결과 및 고찰**

**Apigenin과 isovitexin에 의한 EGR-1의 발현에 대한 영향**

Flavonoid인 apigenin과 곡물에서의 대표적인 apigenen 대사물인 isoviexin에 의하여 EGR-1 단백질을 분석한 결과 일반적으로 초기에 유도되는 EGR-1 발현양상과는 달리 노출 후 9-12시간 이후에 apigenin에 의해 EGR-1이 유도되었다[2,3,20,21]. Sulindac의 주요 대사물인 sulindac sulfone, sulindac sulfide와 그 외 항암효과가 일부 알려진 NSAIDs의 경우에도 대장상피세포에 대한 EGR-1의 발현이 알려지고 있는데 이 경우에는 1-3시간의 빠른 시간에 EGR-1이 증가된다[3]. Apigenin의 경우는 9-12시간 후에 EGR-1이 유도되는 것으로 판단하여 유전자 발현 과정 중 apigenin에 의한 단백질의 안정화나 mRNA stability가 관여되는 것으로 보인다 (Fig. 1A). 특히 isovitexin의 경우에는 24시간 이후에 뚜렷한 증가 양상을 보인다 (Fig. 1C). 한가지 예로서 p53 단백질의 경우 apigenin에 의하여 단백질의 반감기가 증가되는 효과가 있다[19]. 이를 바탕으로 isoflavone 계통의 화합물의 EGR-1유도에 대한 신호전달 체계를 연구하였다. 또한 농도 실험에서 12시간 노출에서 50-100 mM apigenin에 의해 EGR-1이 발현이 최고점이었다 (Fig. 1B). Apigenin과 isovitexin에 의한 EGR-1유전자의 발현유도효과를 대장암세포에서 관찰하였고 이는 다른 항염증성 특히 COX 저해성 약물 및 천연물에서 보이는 EGR-1 양상과는 다른 유도 kinetics를 보인다. 따라서 이에 따른 유전자발현의 신호전달계의 분석이 요구된다.

**Apigenin에 의한 EGR-1 유도에 있어서의 ERK MAP kinase의 역할**

많은 기존의 연구들에 있어 EGR-1의 발현에 있어 ERK/Elk-1 경로의 중심적인 역할들이 보고 되고 있다[9,10,18]. 본 실험에서 HCT-116 세포에서의 MAP Kinase의 인산화를 비교하였을 때 주요 kinase 인 JNK, ERK, p38 MAP kinase 모두가 활성화 되었다. 특히 ERK의 인산화가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 2A). 그 활성화 kinetics 또한 매우 다르게 나타났는데 p38과 JNK의 경우 4시간 이후는 현저히 감소되었으나, ERK MAP kinase의 경우는 노출시킨 9시간 동안 장기적으로 활성화 되었다. 따라서 ERK가 EGR-1 발현에 관련 되는 중심 신호전달자라는 가정 하에 ERK의 신호전달계를 저해하는 U0126을 동시 처리시 현저하게 apigenin에 의해 유도된 EGR-1의 발현이 현저하게 억제 되었다 (Fig. 2B). 이러한 결과들을 바탕으로 직접 EGR-1 유전자의 5-untranslated

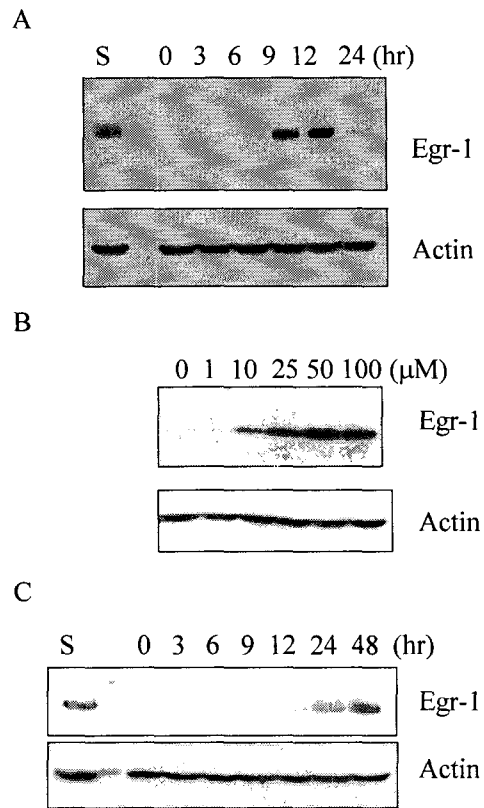


Fig 1. Effect of apigenin and isovitexin on EGR-1 gene expression in the colon tumor cells. A. HCT-116 cells were exposed to apigenin (50 mM) for the indicated time. B. HCT-116 cells were exposed to apigenin at the indicated doses for 12 hr. C. HCT-116 cells were exposed to 50 mM isovitexin for the indicated time. Protein was detected with Western blot analysis. Data are representative of the three repeated experiments. S indicates the HEK293 cell lysate which was transfected with human EGR-1 gene-cloned pCDNA3.1 plasmid.

region (UTR)의 luciferase 리포터를 이용해서 apigenin에 의한 EGR-1 promoter activity에 대한 효과를 분석한 결과 apigenin은 매우 낮은 농도 (1-2 mM)에서도 EGR-1 promoter를 활성화 할 수 있었고, ERK의 신호전달계를 저해하면 거의 완전하게 EGR-1 promoter activity를 감소시켰다 (Fig. 3). 결론적으로 apigenin에 의해 활성화된 ERK MAP kinase가 직접적으로 EGR-1의 발현과 전사활성화에 관여되어 지는 것으로 사료되어 진다.

**Apigenin에 의한 상피종양세포의 세포활성저하에 있어 EGR-1의 역할규명**

Apigenin에 의하여 상피성 종양에 대한 세포활성의 효과를 MTS assay를 통해 실시하였다. 특히 HCT-116 세포에 대하여 농도 의존적으로 세포활성이 억제되었다 (Fig. 4A). Apigenin의 대장암세포에 대한 독성효과는 다양한 논문을

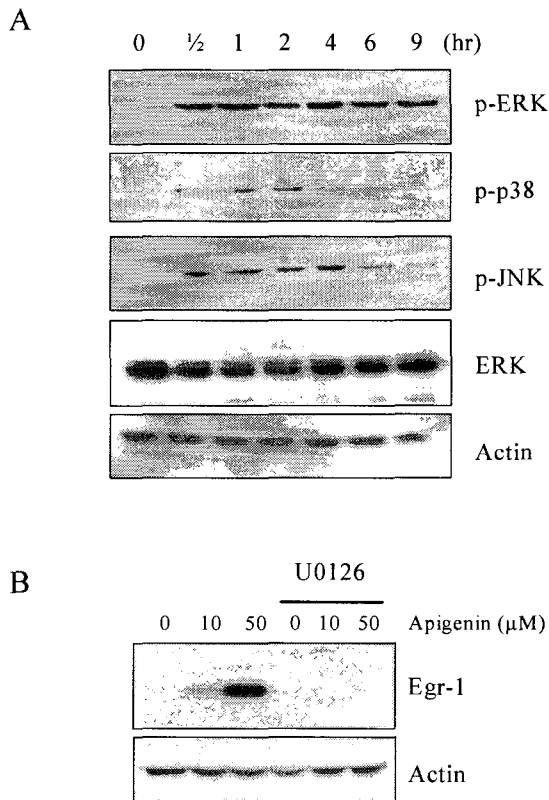


Fig 2. A. Effect of apigenin on MAP Kinases in the colon tumor cells. HCT-116 cells were exposed to apigenin (50 μM) for the indicated time. B. Involvement of ERK signals in the apigenin-induced EGR-1. HCT-116 cells were pre-treated with vehicle or U0126 for 1 hr and cells were exposed to apigenin for 12 hr. Protein was detected with Western blot analysis. Data are representative of the three repeated experiments.

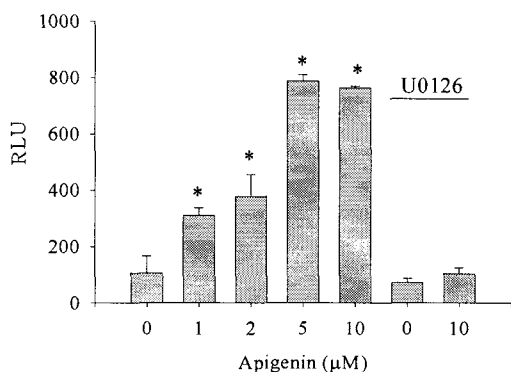


Fig 3. B. Involvement of ERK signals in the apigenin-induced EGR-1. HCT-116 cells were transfected with EGR-1 promoter luciferase plasmid using TransIT-LT1. At 15 hr after transfection, HCT-116 cells were co-treated with vehicle or U0126 in the presence of apigenin for 12 hr. Cellular lysates were analyzed using dual luciferase assay system. Asterisks indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) from vehicle group. Data are representative of the three repeated experiments.

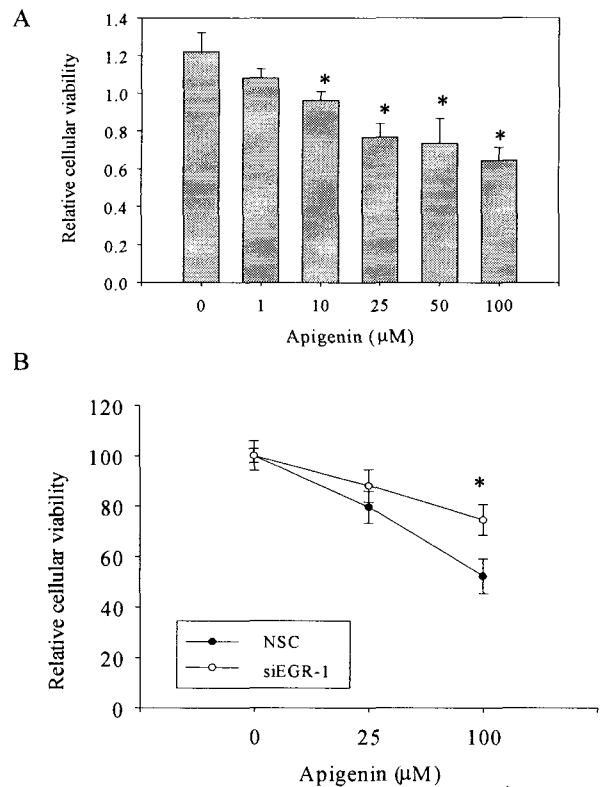


Fig 4. A. Effect of apigenin on the cellular viability of HCT-116 cells. Cells were exposed to each dose of apigenin for 24 hr. Asterisks indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) from the zero vehicle. B. Cells were transfected with non specific control (NSC) and EGR-1 siRNA (siEGR-1) and cultured for 3 days and apigenin were treated for another 24 hr. Asterisk indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from the each pair of NSC group.

통해서 증명 되어 지고 있다[11,14,25]. 본 연구는 이런 암세포활성 저하에 있어서의 EGR-1 단백질의 관련성을 조사하였다. 특히 EGR-1 small interference RNA를 이용하여 EGR-1을 발현을 저해 시킨 후 apigenin에 의한 암세포활성 저해효과를 비교하였을 때, EGR-1가 저해된 세포주에서의 세포활성저해가 훨씬 완화되었다 (Fig. 4B). 따라서 apigenin에 의한 세포활성저해는 상당부분 EGR-1에 의해 매개된다는 것을 알 수 있다. 이런 EGR-1 매개의 세포독성효과의 연결단백질을 분석하는 중 EGR-1에 의해 조절되는 세포증식억제 및 pro-apoptotic의 NAG-1 단백질이 24시간에서 현저하게 증가 되었으며 48시간에 현저히 증가되는 현상을 보였다 (Fig. 5A, 5B). 따라서 이런 지속적인 NAG-1의 발현은 현저한 중앙세포활성의 저하에 관여 될 수 있다는 것을 암시한다. Baek 등에 의하면 NAG-1에 의하여 대장암세포의 억제효과가 growth arrest와 pro-apoptosis에 의하여 매개되며 특히 troglitazone이나 NSAID의 경우 EGR-1에 의한 NAG-1 유전자의 유도가 직접적인 대장암세포활성억제의 주요 인자

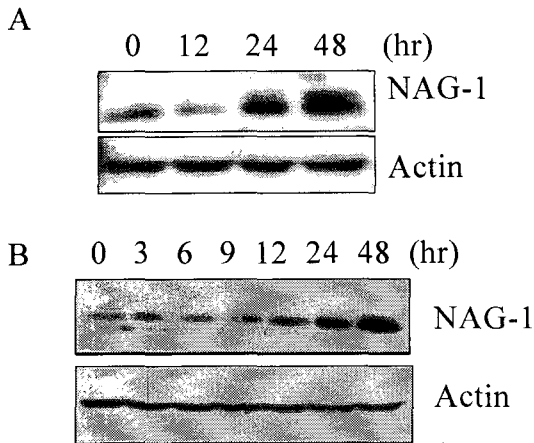


Fig 5. Effect of apigenin and isovitexin on NAG-1 gene expression in the colon tumor cells. HCT-116 cells were exposed to 50 mM apigenin (fig 5A) or 50 mM isovitexin (figure 5B) for the indicated time. Protein was detected with Western blot analysis. Data are representative of the three repeated experiments.

라는 것이 세포실험을 통하여 밝혀졌다[2,3]. 하지만 선행의 연구들에 있어서 EGR-1이 직접적으로 NAG-1을 유도하는 것은 밝혀져 있지 않고 대부분 초기에 일시적으로 유도되는데 비하여 apigenin의 경우 9-12시간의 비교적 후기의 발현이며 이는 24-48시간에 나타나는 NAG-1발현의 시간대에 더욱 직접적으로 영향을 미칠 가능성이 클 것으로 사료 된다. 따라서 향후 동물실험을 통하여 유전자 발현을 분석하고 EGR-1이 직접적으로 대장암의 진행과 연관되는 것을 밝히는 것이 요구되어 진다.

요 약

Tumor suppressor 유전자로 알려진 early growth response gene 1 (EGR-1)에 있어 항산화 천연물인 apigenin과 그대사물인 isovitexin에 의한 장관 상피성 종양세포에 대하여 항종양 역할을 규명하였다. Apigenin 과 isovitexin은 대장암세포에서의 EGR-1 단백질의 발현을 9-12시간의 노출에 의해 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 신호전달측면에서 이런 apigenin에 의한 EGR-1 유전자의 유도가 U0126 화합물에 의해 완벽하게 저해 받는 것으로 보아 ERK1/2 MAP kinase pathway의 이 신호전달계에서의 관여를 보여주었다. 본 연구에서 apigenin에 의해 농도 의존적으로 대장암세포의 세포활성의 저해를 MTT assay를 통해 보였고, 또한 EGR-1 siRNA를 transfection한 세포의 경우 이런 apigenin에 의한 세포활성의 저해효과를 완화하였다. 따라서 apigenin에 의한 항종양세포 세포활성 억제에 있어 EGR-1의 중요성을 보여 준다. 이런 EGR-1에 의해 유도되는 유전자중 대표적으로 NAG-1 유전자의 경우 apigenin과 isovitexin에 의해 24-48시

간에 발현이 증가하였다. 결론적으로 암세포 증식억제활성이 있고 apoptosis 유도효과가 있는 NAG-1의 유도에 의해 대장암 세포의 세포활성이 억제된 것으로 의미되고 향후 apigenin 유도의 NAG-1유전자에 의한 암세포증식의 억제 기전에 대한 명확한 연구가 요구된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Baek, S. J., J. M. Horowitz and T. E. Eling. 2001. Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3. *J. Biol. Chem.* **276**, 33384-33392.
2. Baek, S. J., J. S. Kim, J. B. Nixon, R. P. DiAugustine, and T. E. Eling. 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.
3. Baek, S. J., J. S. Kim, S. M. Moore, S. H. Lee, J. Martinez, J. and T. E. Eling. 2005. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an anti-tumorigenic protein. *Mol. Pharmacol.* **67**, 356-364.
4. Baek, S. J., L. C. Wilson, C. H. Lee and T. E. Eling. 2002. Dual function of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): inhibition of cyclooxygenase and induction of NSAID-activated gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 1126-1131.
5. Bottone, F. G., Jr., S. J. Baek, J. B. Nixon, and T. E. Eling. 2002. Diallyl disulfide (DADS) induces the anti-tumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J. Nutr.* **132**, 773-778.
6. Castellone, M. D., H. Teramoto, B. O. Williams, K. M. Druey and J. S. Gutkind. 2005. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* **310**, 1504-1510.
7. Chell, S., H. A. Patsos, D. Qualtrough, H. Z. AM, D. J. Hicks, A. Kaidi, I. R. Witherden, A. C. Williams, and C. Paraskeva. 2005. Prospects in NSAID-derived chemoprevention of colorectal cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 667-671.
8. Chintharlapalli, S., S. Papineni, S. J. Baek, S. Liu, S. and S. Safe. 2005. 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substitutedphenyl) methanes are peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists but decrease HCT-116 colon cancer cell survival through receptor-independent activation of early growth response-1 and nonsteroidal anti-inflammatory

- drug-activated gene-1. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1782-1792.
9. De Sousa, L. P., B. S. Brasil, B. M. Silva, M. H. Freitas, S. V. Nogueira, P. C. Ferreira, E. G. Kroon, and C. A. Bonjardim. 2005. Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 237-245.
  10. Dieckgraefe, B. K. and D. M. Weems. 1999. Epithelial injury induces egr-1 and fos expression by a pathway involving protein kinase C and ERK. *Am. J. Physiol.* **276**, G322-G330.
  11. Fenton J. I., and N. G. Hord. 2004. Flavonoids promote cell migration in nontumorigenic colon epithelial cells differing in Apc genotype: implications of matrix metalloproteinase activity. *Nutr. Cancer.* **48**, 182-188.
  12. Fukuda, R., B. Kelly, and G. L. Semenza. 2003. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* **63**, 2330-2334.
  13. Hampton, T. 2005 NSAID studies abound in cancer research: drugs may have niche in prevention and treatment, *JAMA.* **293**, 2579-2580.
  14. Horinaka M, T. Yoshida, T. Shiraishi, S. Nakata, M. Wakada, and T. Sakai. 2006. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Mol. Cancer. Ther.* **5**, 945-951.
  15. Husain, S. S., I. L. Szabo, and A. S. Tamawski. 2002. NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 542-553.
  16. Iczkowski, K. A. and C. G. Pantazis. 2003. Overexpression of NSAID-activated gene product in prostate cancer. *Int. J. Surg. Pathol.* **11**, 159-166.
  17. Kune, G. A. 2000. Colorectal cancer chemoprevention: aspirin, other NSAID and COX-2 inhibitors. *Aust. N. Z. J. Surg.* **70**, 452-455.
  18. Liang, K. W., C. T. Ting, S. C. Yin, Y. T. Chen, S. J. Lin, J. K. Liao and S. L. Hsu. 2006. Berberine suppresses MEK/ERK-dependent Egr-1 signaling pathway and inhibits vascular smooth muscle cell regrowth after in vitro mechanical injury. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 806-817.
  19. McVean, M., H. Xiao, K. Isobe, and J. C. Pelling. 2000. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis* **21**, 633-639.
  20. Moon, Y., F. G. Bottone, M. F. McEntee, T. E. Eling. 2005. Suppression of tumor cell invasion by cyclooxygenase inhibitors is mediated by thrombospondin-1 via the early growth response gene Egr-1. *Mol. Cancer. Ther.* **4**, 1551-1558.
  21. Moon, Y., M. Lee, and H. Yang. 2006. Involvement of early growth response gene 1 in the modulation of microsomal prostaglandin E synthase1 by epigallocatechin gallate in A549 human pulmonary epithelial cells. *Biochem. Pharmacol.* in press.
  22. Pai, R., B. Soreghan, I. L. Szabo, M. Pavelka, D. Baatar, and A. S. Tarnawski. 2002. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* **8**, 289-293.
  23. Shao, J., B. M. Evers, and H. Sheng. 2004. Prostaglandin E2 synergistically enhances receptor tyrosine kinase-dependent signaling system in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 14287-14293.
  24. Shao, J., C. Jung, C. Liu, and H. Sheng. 2005. Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *J. Biol. Chem.* **280**, 26565-26572.
  25. Wang W, P. C. VanAlstyne, K. A. Irons, S. Chen, J. W. Stewart, and D. F. Birt. 2004. Individual and interactive effects of apigenin analogs on G2/M cell-cycle arrest in human colon carcinoma cell lines. *Nutr. Cancer.* **48**, 106-114.