

대장암 세포에서 5-FU(Fluorouracil)의 세포독성과 관련된 단백질 분석

이서영 · 송진수* · 노시훈 · 김근태 · 홍순선** · 김희준* · 권성원 · 박정일#

서울대학교 약학대학, *서울대학교 화학부, **인하대학교 의과대학

(Received March 16, 2009; Revised March 30, 2009; Accepted April 10, 2009)

Proteomic Approach to the Cytotoxicity of 5-FU(Fluorouracil) in Colon Cancer Cells

Seo Young Lee, Jin-Su Song*, Si Hun Roh, Geun Tae Kim, Soon-Sun Hong**,
Hie-Joon Kim*, Sung Won Kwon and Jeong Hill Park#

College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**College of Medicine (BK21), Inha University, Incheon 400-712, Korea

Abstract — We evaluated cytotoxic effect based on the MTT assay and identified altered proteins in 5-FU(fluorouracil) treated HT29 cells using two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF-MS. As proteins inducing apoptosis, siah binding protein 1 and p47 protein isoform a were up-regulated and tumor protein translationally-controlled 1 was down-regulated by 5-FU treatment. And mannose 6 phosphate receptor binding protein 1 controls DNA mismatch repair system was increased. We suggest 5-FU promotes a cytotoxicity under the action of these proteins in colon cancer cells.

Keywords □ 5-FU, colon cancer, proteomics, MALDI-TOF/TOF

Fluoropyrimidine 5-fluorouracil(5-FU)은 대사길항제이며 대장암을 비롯한 항암치료에 광범위하게 사용된다. 우라실, 티민과 유사한 구조를 가진 5-FU는 인산화 과정을 통해 RNA와 DNA의 합성을 억제하여 세포사멸을 유도한다.¹⁾

임상에서 5-FU의 반응을 결정하는 인자들로는 dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, p53, microsatellite instability가 알려져 있다. 5-FU의 80% 이상이 간에서 dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)에 의해 dihydrofluorouracil로 이화(catabolism)된다. DPD가 저하된 환자의 경우 5-FU 투여 시 심각한 독성을 초래하며, *in vitro*에서 DPD의 과발현은 5-FU의 내성을 유도하였다.²⁾

5-FU는 thymidine phosphorylase(TP)에 의해 fluorodeoxyuridine monophosphate(FdUMP)로 대사되며 이것은 thymidylate synthase(TS)를 억제하여 DNA 손상을 유도한다. 5-FU의 투여 시 TS는 자신의 mRNA에 결합하여 번역(translation)을 억제하는 음성 피드백을 감소시켜 암세포에서 급격하게 TS의 발

현을 유도할 수 있다.³⁾ TS의 과발현은 항암 치료 시 5-FU의 대한 감수성을 예측하는 인자이다. 5-FU의 감수성에 TP가 미치는 영향은 전임상과 임상에서 대조적이었다. 전임상에서 TP의 과발현은 FdUMP 증가로 인하여 5-FU의 감수성을 고양시켰으나 대장암에서 TP의 과발현은 5-FU에 대한 반응을 감소시켰다. 이러한 결과는 대장암에서 TP가 내분비 신생혈관-세포성장인자로 작용하기 때문이다.⁴⁾

종양억제 유전자인 p53은 DNA 손상 시 세포주기 검거(cell cycle arrest)를 유도하는 유전자들(예; CDKN1A와 GADD45 α)의 전사를 활성화시킴으로써 DNA를 보존한다. 그러나 손상된 DNA와 세포의 상태에 따라 p53에 의해 proapoptotic gene인 FAS(CD95/AP01), BAX는 증가하고 anti-apoptotic gene인 Bcl2는 감소하여 apoptosis를 유도한다. 또한 여러 임상연구에서 TP53 돌연변이에 대한 대리 표지인 p53의 과발현이 5-FU에 대한 내성과 관련 있었다. DNA와 FdUTP의 결합, FdUMP에 의한 TS의 억제 등 DNA를 손상시키는 기전에 의해 5-FU는 p53을 활성화시킬 수 있다.⁵⁾ DNA 불일치 복구(mismatch-repair; MMR)는 DNA 복제 동안 발생한 에러를 수정하는 과정이며, microsatellite instability(MSI)는 MMR의 실패로 일어난다. 대장암의 10~15%에서 MMR 기능의 저하는 5-FU에 대한 낮은 반응률의

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-7857 (팩스) 02-874-8928
(E-mail) hillpark@snu.ac.kr

원인이 된다.⁶⁾ 이러한 단백질들의 증감은 항암제의 세포독성을 유도하거나 세포독성으로부터 보호하는 작용을 한다.

프로테오믹스는 특정 조건에서 유전체(genome)에 의해 발현되는 단백질체(proteome)를 연구하는 학문이며, 세포 내의 총체적 단백질 분석은 항암 기전을 이해하는데 중요한 정보들을 제공한다. 프로테오믹스를 사용한 기존 연구에서는 대장암 세포에서 heat shock protein 27, peroxiredoxin 6, heat shock protein 70 등을 5-FU에 반응하는 단백질로 규명하였으며,⁷⁾ metabotropic glutamate receptor4(mGluR4)의 과발현과 mitochondrial F₁F₀-ATP synthase의 감소는 5-FU의 내성과 관련 있다고 보고하였다.^{8,9)} 이에 본 연구에서는 이차원 전기영동과 MALDI TOF/TOF MS를 사용하여 대장암 세포에서 5-FU의 세포독성에 의해 특이적으로 발현되는 단백질들을 분석하였다.

실험방법

시약

사람의 대장암 세포인 HT29는 한국세포주은행에서 구입하였으며, fetal bovine serum, 항생제, DMEM/F12 배지는 Gibco(Grand Island, NY)에서 구입하였다. 전기영동에 사용한 시약(acrylamide solution(40%), urea, thiourea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate(CHAPS), dithiothreitol(DTT), tris base, sodium dodecyl sulfate(SDS), ammonium persulfate(AP), N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED), glycine, glycerol, agarose, iodoacetamide(IAA), immobilized pH gradient(IPG) strips(pH 4~7, linear), IPG cover mineral oil, protein marker, protein assay kit, colloidal coomassie blue staining kit, silver staining kit)은 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), protease inhibitor cocktail, bovine serum albumin (BSA), tris-(hydroxymethyl)-aminomethane α -cyano-4 hydroxy cinnamic acid(CHCA), 5-fluorouracil(5-FU), trypsin(modified)은 Sigma(ST. Louis, MO)에서 구입하였다.

기기

세포 배양기는 Forma direct heat CO₂ incubator(Thermo Electron, Somerset, NJ)를 사용하였으며, MTT 정량은 Microplate reader SpectraMax 340 PC(Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. 이차원 전기영동은 PROTEAN IEF Cell과 PROTEAN II xi cell(Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하였으며, 단백질 동정에는 Auto flex II MALDI-TOF/TOF MS(Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 사용하였다.

MTT 활성

HT29 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomycin 항생제를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. HT29의 5-FU에 대한 IC₅₀(half-maximal inhibitory concentration)는 살아있는 세포에 의한 MTT의 환원을 측정하는 MTT 정량법에 의해 결정하였다. HT29(1×10⁵/cm²)를 24시간 동안 96 well에서 배양하였다. 5-FU를 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 µM 농도에서 24 시간 투여 후 40 µl MTT 용액(5 mg/ml)을 37°C에서 4시간 보관하였다. DMSO 100 µl를 처리하여 MTT formazan을 녹였다. 4시간 후, 550 nm에서 흡광도는 microplate reader로 측정하였다.

단백질 추출 및 정량

HT29 세포는 T-75 플라스크에서 60~70%까지 배양한 뒤 0.1% DMSO 배지에 70 µM 5-FU를 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 투여 후 세포는 500 µl cell lysis buffer(7M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 65 mM DTT, protease inhibitor cocktail)로 추출하여 16,000 rcf, 30 min, 15°C에서 원심분리 후 상층액은 bradford method(protein assay kit; Bio-Rad)를 사용하여 정량하였으며, 이차원전기영동을 위해 -80°C에서 저장하였다.

이차원 전기영동과 이미지분석

단백질 80 µg을 300 µl의 rehydration 용액(8 M urea, 2% w/v CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer)에 희석한 뒤, rehydration 용액은 17 cm, pH 4~7 linear gradient IPG strip과 함께 12시간 동안 보관하였다. Biorad IPGphor에서 단계별(step 1 250 V, 15분; step 2 10 kV, 3시간; step 3 10000 V, 60 kVh)로 전압을 증가시켜 등전점에 따라 단백질을 분리하였다. IEF (Isoelectric focusing) 과정 후 strip은 equilibration buffer 1(50 mM tris pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 1% SDS, 0.002% bromophenol blue, 5 mg/ml DTT), equilibration buffer 2(50 mM tris pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 1% SDS, 0.002% bromophenol blue, 25 mg/ml iodoacetamide)에 순차적으로 담근 후, strip은 12% polyacrylamide gel에 단백질 마커와 함께 삽입하고 5 mg/ml agrose에 의해 남은 부분을 고정하였다. Gel을 20°C에서 26 mA/gel 전류로 8시간 동안 전기영동 후 silver staining kit으로 염색하였으며, PDQuest version 7.2(Bio-Rad)로 이미지 분석하였다. 증감된 단백질의 발현을 확인하기 위해 스팟의 농도(intensity)를 측정하여 전체 농도의 백분율로 표준화한 뒤 농도의 차이를 보이는 스팟 중 t 검정 테스트에서 $p < 0.05$ 인 spot들을 단백질 동정을 하였다.

트립신을 사용한 in-gel digestion

Silver staining에서 사용하였던 300 µg의 단백질은 위와 동일한

방법으로 전기영동 후 colloidal coomassie blue staining kit으로 염색하였으며, in-gel digestion을 위해 동일한 spot을 절개하였다. 절개된 spot은 10 mM ammonium bicarbonate에서 10분 동안 탈색하였으며 증류수와 아세트나트릴에 gel이 투명해질 때까지 보관하였다. SpeedVac으로 건조 후 gel은 10 mM ammonium bicarbonate에 4 µl/ml 트립신 20 µl를 37°C에서 12시간 이상 보관하였다. 상층액을 SpeedVac에서 건조 후 0.1% TFA에 녹였다.

MALDI-TOF TOF/MS를 이용한 단백질 동정

매스 분석을 위해 0.1% TFA가 첨가된 60% 아세트나트릴에 2 mg CHCA를 포함하는 매트릭스를 동일량의 in-gel digests에 혼합한 뒤 AnchorChip™ target plate에 로딩하였다. Auto flex II MALDI-TOF TOF/MS는 Peptide Mass Standards kit을 사용하여 보정하고, 양이온 모드에서 평균 150 shot의 매스 스펙트럼을 측정하였다. 데이터는 Flexanalysis software에서 분석하였으며, 단백질은 NCBI 데이터 베이스를 사용하여 MASCOT peptide mass fingerprint search program에서 동정하였다. 매스 오차(tolerance)는 50 ppm을 허용하였으며, 메티오닌의 산화를 고려하여 단백질을 검색하였다.

통계처리

MTT 데이터는 means±SD로 나타내며 Duncan's multiple-range test에 따른 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 사용하였다. 프로테오믹스 데이터들은 재현성을 위해 세 번의 독립적인 실험에 student's t-test를 적용하였다. 모든 경우에, *p* value가 0.05 미만인 데이터를 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

대장암세포 HT29에서 5-FU를 24시간 투여 후 세포독성을

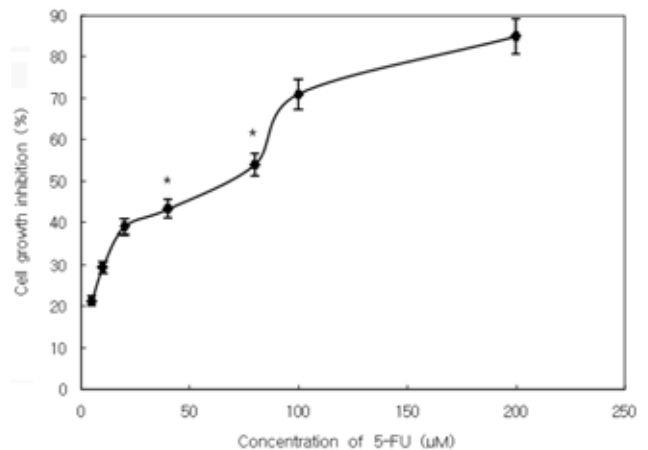


Fig. 1 – Cell growth inhibition of HT29 cells by 5-FU for 24 h. Anti-proliferative effects were assessed using MTT assays at 5-FU concentration of 0~200 µM. The data shown are means (percentage of controls)±SEM of three independent experiments. *Significantly different from untreated controls (*p*<0.05).

MTT 정량법으로 측정된 결과 0~200 µM에서 농도의존적으로 증가하였으며, 5-FU의 IC₅₀는 70 µM이었다(Fig. 1). 독립적으로 세 번 5-FU 70 µM을 24시간 동안 투여한 세포와 투여하지 않은 세포로부터 단백질을 추출하였다. 추출액은 정량 후 동일량을 로딩하여 이차원 전기영동으로 전개하였으며, 등전점과 분자량에 따라 단백질을 분리하였다. Gel은 silver staining으로 염색하였으며, PDQuest를 사용하여 spot density를 측정하였다. 세 번의 독립적으로 실험한 density에 대해 student's t-test를 적용하여 *p* value가 0.05 미만으로 유의성이 있는 spot만을 취하여 트립신 처리 후 MALDI-TOF TOF/MS를 사용하여 동정하였다. Spot density는 대조군과 5-FU를 투여한 경우의 spot 67개를 PDQuest에서 match하여 전체 spot density의 합에 대한 각각의 density를 백분율로 계산하였으며, fold change는 다른 spot과의 상대적

Table I – Identification of differentially expressed proteins in 70 µM 5-FU treated cells

Spot no.	Protein identified	Fold change ^{a)}	Accession No. ^{b)}	Mr/pI ^{c)}	Score
S1	P47 protein isoform a	+5.6	gi 20149635	41/4.99	200
S2	Mannose 6 phosphate receptor binding protein 1	+2.5	gi 20127486	47/5.30	66
S3	Reticulocalbin 1 precursor	-2.0	gi 4506455	93/4.86	84
S4	Tropomodulin 3 (Ubiquitous)	+2.2	gi 7657649	40/5.08	92
S5	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 5	-3.1	gi 54696300	26/4.74	65
S6	Tumor protein, translationally-controlled 1	-3.3	gi 4507669	20/4.84	119
S7	Human M-calpain form 1	-2.7	gi 17943181	21/4.90	44
S8	Siah binding protein 1	+5.3	gi 1809248	58/5.25	61
S9	Thiol-specific antioxidant protein (TSA)	+3.5	gi 1617118	22/6.84	48
S10	Mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor	-2.6	gi 12707570	61/8.34	61

Proteins identified using MALDI-TOF/TOF-MS through PMF

^{a)}Positive value means up-regulation against control and negative value means down-regulation in fold change. All the ratio are statistically significant with *p*<0.05 of student's t-test.

^{b)}Entry number from NCBI database

^{c)}Mr; Theoretical molecular mass of the identified protein in KDa, pI; Theoretical isoelectric point of the identified protein

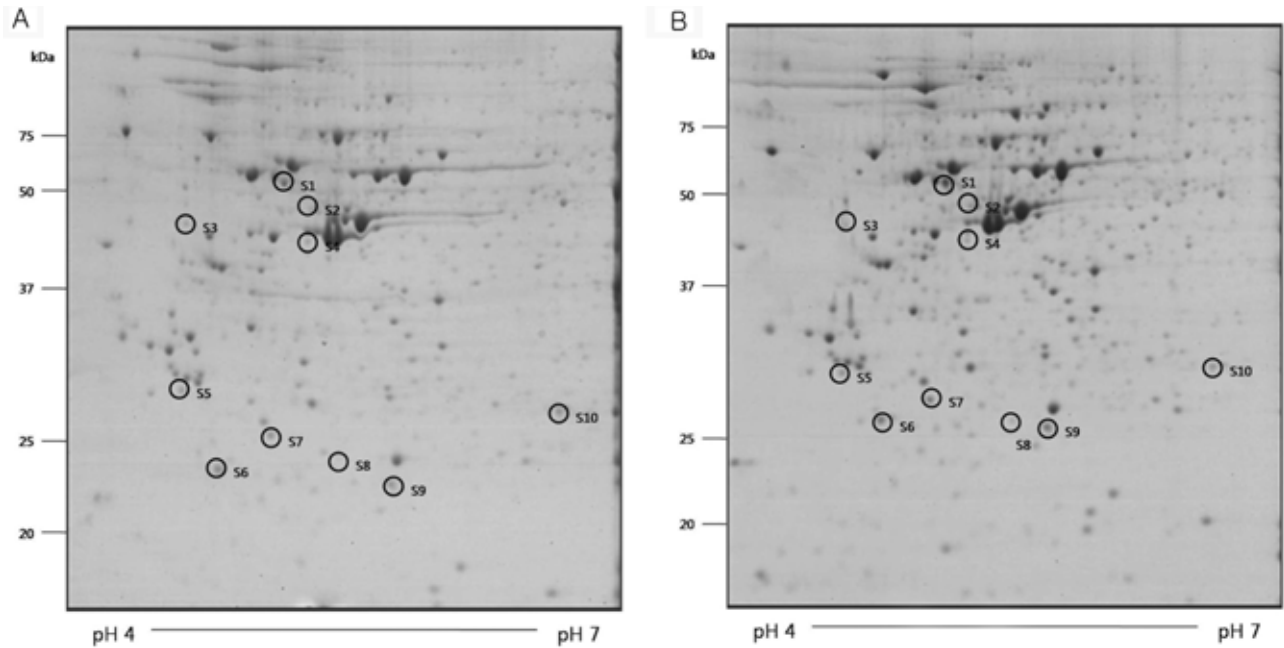


Fig. 2 – Comparative 2-DE gel analyses of control (A) and 70 μ M 5-FU treated HT29 cells (B) for 24 h. The protein extracts (80 μ g/300 μ l) were displayed across a 17 cm IPG strip (pH 4~7) in the first dimension and a 12% SDS-PAGE gel in the second dimension, stained with silver stain. The gel pair was the representative gel from three independent experiments. Differentially expressed protein spots were indicated by circles.

density를 의미한다. Spot 6는 대조군에서 주변 spot의 density가 5-FU를 투여한 경우보다 상대적으로 감소하여서 fold change가 -3.3이었다. NCBI 데이터 베이스에서 검색한 후보 단백질 중 점수가 가장 높은 단백질을 선택하였으며, 이들의 분자량과 등전점은 2D gel에서 spot의 위치와 일치하였다(Table I, Fig. 2, 3).

발현이 증가된 단백질로는 p47 protein isoform a, mannose 6 phosphate receptor binding protein 1, tropomodulin 3(Ubiquitous), siah binding protein 1, thiol-specific antioxidant protein (TSA)가 있었으며, 감소된 단백질로는 reticulocalbin 1 precursor, proteasome(prosome, macropain) subunit alpha type 5, tumor protein translationally-controlled 1, human M-calpain form 1, mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor를 동정하였다.

고 찰

5-FU의 보고된 기전과 관련된 단백질들로는 증가된 siah binding protein과 감소된 tumor protein translationally-controlled 1이 있으며, 이들은 p53의 활성화와 Mcl-1, Bcl-XL의 억제에 의해 apoptosis를 촉진한다. 그러나 증가된 mannose 6 phosphate receptor binding protein 1은 DNA 불일치 복구(mismatch repair) 기능을 저하시키며, 이로 인해 5-FU에 대한 세포독성은 감소하였을 것으로 사료된다. Siah proteins은 중앙

억제인자인 p53의 하부경로의 효과기(effector)로서 p53의 과발현은 siah1을 유도하며, siah1의 과발현은 세포주기검거와 apoptosis를 유도하여 p53의 활성화와 동일한 효과를 가진다.¹⁰⁾ Translationally controlled tumor protein(TCTP)은 세포 외 신호와 세포 상태를 조절하는, 성장조절 인자이며 증가 혹은 감소 시 세포성장을 억제한다. 또한 TCTP는 Mcl-1, Bcl-XL과 함께 상호 작용하여 apoptosis를 억제한다.¹¹⁾ Mannose-6-phosphate receptor (M6PR)은 multi-functional transmembrane glycoprotein으로 주기능은 골지체나 세포표면에서 lysosomes으로 glycoprotein과 결합하여 이를 운송하는 것이다. 중앙억제 유전자의 가능성이 있으며, M6PR은 microsatellite instability(MSI)를 유도하는 DNA 불일치 복구 시스템을 저하시킨다.¹²⁾ 세포 내의 활성산소를 공급하는 NADPH 산화효소(oxidase)의 adapter인 p47은 정상세포보다 대장암 세포에서 감소하였다. p47의 과발현은 p53과 불일치 복구능(competency)과는 독립적으로 대장암 세포에서 apoptosis를 유도한다.¹³⁾

세포 내 Ca^{2+} 농도, 단백질의 퇴화, 지방산의 대사를 조절하는 것으로 알려진 단백질들이 5-FU 투여에 의해 감소하였다. Reticulocalbin(RCN)은 소포체에 존재하며 Ca^{2+} 과 결합하는 단백질이며, RCN의 과발현은 중앙 생성 및 침투, 약물내성과 관련 있다.¹⁴⁾ M-Calpains은 Ca^{2+} 을 활성화시키는 cysteine proteases로 생체 내 Ca^{2+} 의 주요 조절인자이며, 다양한 신호전달 효소와 함께 단백질을 분해한다. M-Calpains는 대장암에서 증

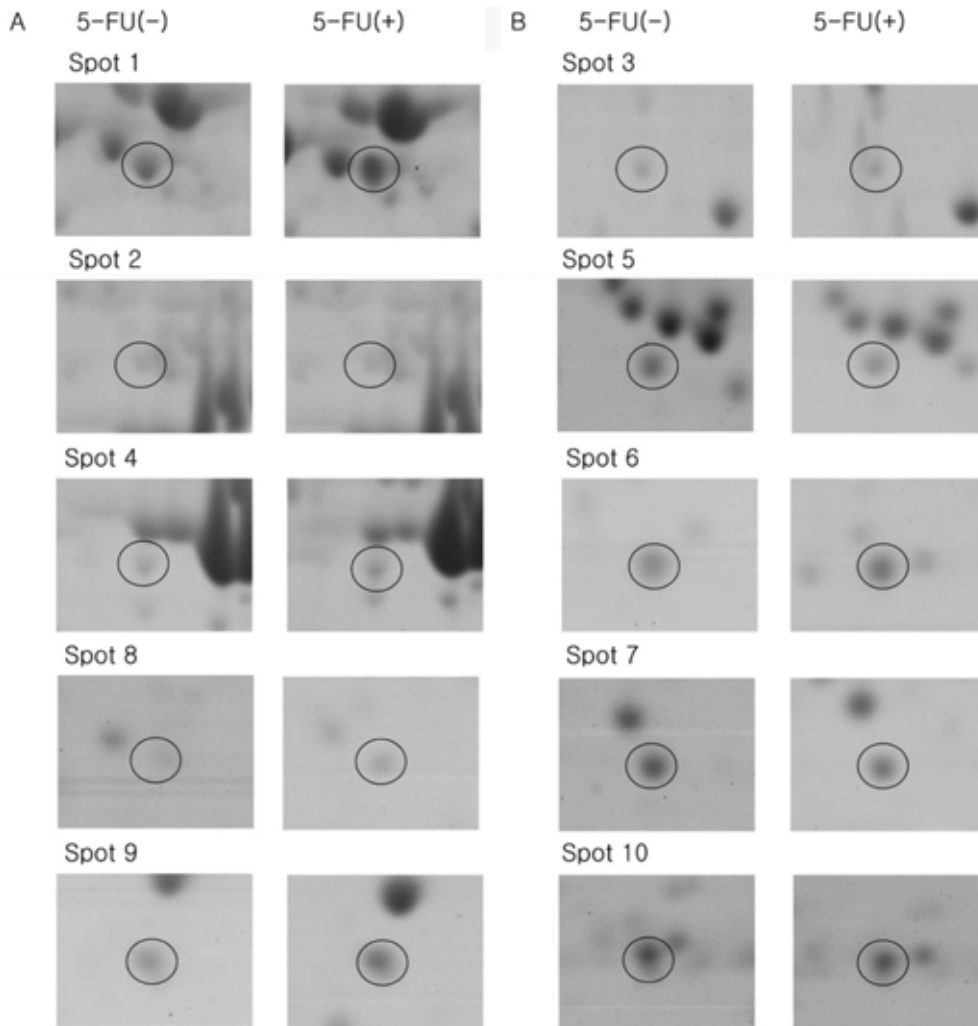


Fig. 3 - Enlarged view of (A) the up-regulations and (B) the down-regulations of altered protein spots in 2D gel.

가하였으며 초기 대장암 진단 마커의 가능성이 있다.¹⁵⁾ ATP의 존적으로 ubiquitin을 첨가하여 불필요한 단백질과 대사효소를 제거하는 프로테아좀은 세포의 항상성, 성장 및 발달을 조절한다.¹⁶⁾ 5-FU에 의해 유도된 proteasome(prosome, macropain) subunit, alpha type 5의 감소는 저하된 단백질의 퇴화에 의해 암세포의 성장을 억제하였을 수 있다. Mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase(ECHS1)은 체내의 저혈당 시 미토콘드리아에서 일어나는 지방산 β -산화의 두 번째 단계에 작용하는 촉매 효소이다. 사람의 대장암에서 ECHS1은 지방산 대사과정에 관여하며, 암 생성을 촉진한다.¹⁷⁾ 5-FU에 의한 ECHS1 precursor의 감소는 지방산 대사의 저해를 일으키며, 이는 세포증식억제 효과와 관련 있다.

이 밖에도 Tropomodulins은 액틴의 구조에서 말단의 cap 필라멘트로 40 kDa 이하의 단백질군이다. Tropomodulin3(Tmod3)은 세포의 이동에서 음성조절인자(negative regulator)이며,¹⁸⁾ 5-

FU의 투여 시 증가하였다. Thiol-specific antioxidant protein (TSA)은 활성산소종(reactive oxygen species)에 대한 방어 작용을 하는 과산화효소(peroxidase)의 한 종류이며, DTT와 함께 H_2O_2 와 alkyl hydroperoxides를 제거한다.¹⁹⁾ 5-FU는 H_2O_2 의 생성을 저해함으로써 세포독성에 대한 보호 작용을 할 수 있다.

결론

대장암 세포 HT29에 대한 5-FU의 24시간 투여 시 IC_{50} 를 MTT 정량법에 의해 $70 \mu M$ 로 측정하였으며, $0 \sim 200 \mu M$ 범위에서 농도의존적으로 세포독성을 보였다. 5-FU의 IC_{50} 농도에서 24시간 투여 후 siah binding protein 1의 증가, tumor protein translationally-controlled 1의 감소, p47 protein isoform a의 증가를 확인하였으며, 이것은 apoptosis의 유도와 관련된 단백질들이다. DNA 불일치 복구 시스템을 조절하는 mannose 6 pho-

sphate receptor binding protein 1과 세포독성에 대해 보호작용을 하는 thiol-specific antioxidant protein는 증가하였다. 또한 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 조절하는 reticulocalbin 1 precursor와 human M-calpain form 1, 단백질의 퇴화를 조절하는 proteasome(prosome, macropain) subunit alpha type 5, 지방산 대사 효소인 mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor은 감소하였다. 이상의 연구 결과에 의하면, 5-FU는 HT29에 세포독성을 유도하며 apoptosis 등 여러 기전과 관련된 단백질들이 암세포 증식을 억제하였을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2007년도 보건장학회의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Longley, D. B., Harkin, D. P. and Johnston, P. G. : 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature* **3**, 330 (2003).
- Takebe, N., Zhao, S. C., Ural, A. U., Johnson, M. R., Banerjee, D., Diasio, R. B. and Bertino, J. R. : Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+ -enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther.* **8**, 966 (2001).
- Chu, E., Voeller, D. M., Jones, K. L., Takechi, T., Maley, G. F., Maley, F., Segal, S. and Allegra, C. J. : Identification of a thymidylate synthase ribonucleoprotein complex in human colon cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 207 (1994).
- Takebayashi, Y., Akiyama, S., Akiba, S., Yamada, K., Miyadera, K., Sumizawa, T., Yamada, Y., Murata, F. and Aikou, T. : Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1110 (1996).
- Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y. G., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. : Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* **104**, 263 (1999).
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaidis, N. C., Lynch, H. T., Watson, P., Jass, J. R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomaki, P., DelaChapelle, A., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. : Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nature Med.* **2**, 169 (1996).
- Wong, C. S. C., Wong, V. W. K., Chan, C. M. L., Ma, B. B. Y., Hui, E. P., Wong, M. C. K., Lam, M. Y. Y., Au, T. C. C., Chan, W. H., Cheuk, W. and Chan, A. T. C. : Identification of 5-fluorouracil response proteins in colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Oncol. Rep.* **20**, 89 (2008).
- Yoo, B. C., Jeon, E. K., Hong, S. H., Shin, Y. K., Chang, H. J. and Park, J. G. : Metabotropic glutamate receptor 4-mediated 5-fluorouracil resistance in a human colon cancer cell line. *Clin. Cancer Res.* **10**, 4176 (2004).
- Shin, Y. K., Yoo, B. C., Chang, H. J., Jeon, E. K., Hong, S. H., Jung, M. S., Lim, S. J. and Park, J. G. : Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res.* **65**, 3162 (2005).
- Zu, Z., Sproul, A., Wang, W., Kukekov, N. and Greene, L. A. : Siah1 interacts with the scaffold protein POSH to promote JNK activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 303 (2006).
- Liu, H., Peng, H. W., Cheng, Y. S., Yuan, H. S. and Yang-Yen, H. F. : Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3117 (2005).
- Hebert, E. : Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor expression and tumor development. *Biosci. Rep.* **26**, 7 (2006).
- Gu, Y., Souza, R. F., Wu, R. E., Xu, Y. C. and Terada, L. S. : Induction of colonic epithelial cell apoptosis by p47-dependent oxidants. *FEBS Lett.* **540**, 195 (2003).
- Ozawa, M. and Muramatsu, T. : Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca^{2+} -binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J. Biol. Chem.* **268**, 699 (1993).
- Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., Kanthan, R., Kanthan, S. C. and Sharma, R. K. : Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **13**, 1604 (2004).
- Ciechanover, A. : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13 (1994).
- Yeh, C. S., Wang, J. Y., Cheng, T. L., Juan, C. H., Wu, C. H. and Lin, S. R. : Fatty acid metabolism pathway play an important role in carcinogenesis of human colorectal cancers by Microarray-Bioinformatics analysis. *Cancer Lett.* **233**, 297 (2006).
- Fischer, R. S., Yarmola, E. G., Weber, K. L., Speicher, K. D., Speicher, D. W. and Bubb, M. R. : Tropomodulin 3 binds to actin monomers. *J. Biol. Chem.* **281**, 36454 (2006).
- Lim, Y. S., Cha, M. K., Yun, C. H., Kim, H. K., Kim, K. and Kim, I. H. : Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 199 (1994).