

## Conjugated Linoleic Acid (CLA)와 그 이성체가 전립선 암세포의 증식에 미치는 영향\*

오윤신 · 김은지 · 김종우\*\* · 김우경\*\*\* · 이현숙 · 윤정환<sup>§</sup>

한림대학교 생명과학부 식품영양전공, 한림대학교 비뇨기과,\*\* 단국대학교 식품영양학과\*\*\*

### The Effect of Conjugated Linoleic Acid and Its Isomers on the Proliferation of Prostate TSU-Pr1 Cancer Cells\*

Oh, Yoon Sin · Kim, Eun Ji · Kim, Jong Woo\*\*

Kim, Woo Kyung\*\*\* · Lee, Hyun Sook · Yoon, Jung Han<sup>§</sup>

Division of Life Sciences, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

Department of Urology,\*\* Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

Department of Food Science and Nutrition,\*\*\* Dankook University, Seoul 140-714, Korea

#### ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term for positional and geometric isomers of octadecadienoic acid in which the double bonds are conjugated. CLA has anticancer activity in a variety of animal cancer models, and *cis-9,trans-11* (*c9t11*) and *trans-10,cis-12* (*t10c12*) CLA are the most predominant isomers present in the synthetic preparations utilized in these animal studies. To compare the ability of *c9t11*, *t10c12* and an isomeric mixture of CLA to inhibit TSU-Pr1 cell growth, cells were incubated in a serum-free medium with various concentrations of these fatty acids. The isomeric mixture inhibited cell growth in a dose-dependent manner ( $1-3 \mu\text{M}$ ) with a  $41 \pm 1\%$  inhibition observed at  $3 \mu\text{M}$  concentration after 48 hours. *T10c12* also inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. However, the efficacy and potency of this isomer was much greater than that of the isomeric mixture with a  $49 \pm 2\%$  inhibition observed at  $0.3 \mu\text{M}$  concentration after 48 hours. By contrast, *c9t11* slightly increased cell proliferation. To determine whether the growth-inhibiting effect of CLA is related to the changes in production of insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins (IGFBP) by these cells, serum-free conditioned media were collected. Immunoblot analysis of conditioned media using a monoclonal anti-IGF-II antibody showed that both the isomeric mixture and *t10c12* inhibited secretion of both mature 7,500 Mr and higher Mr forms of pro IGF-II, whereas *c9t11* had no effect. Ligand blot analysis with 125I-IGF-II revealed the presence of two types of IGFBPs: 24,000 Mr IGFBP-4 and 30,000 Mr IGFBP-6. The production of IGFBP-4 slightly decreased at the highest concentrations of the isomeric mixture and *t10c12*. These results indicate that CLA inhibits human prostate cancer cell growth, an effect largely due to the action of *t10c12*. The growth inhibition may result, at least in part, from decreased production of IGF-II and IGFBP-4 by these cells. (*Korean J Nutrition* 35(2) : 192~200, 2002)

**KEY WORDS:** conjugated linoleic acid (CLA), prostate cancer, CLA isomers, insulin-like growth factor-II (IGF-II), insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs).

#### 서 론

전립선암은 서구의 남성 비뇨기계 종양 중 가장 많이 발

접수일 : 2001년 11월 5일

채택일 : 2002년 1월 8일

\*This work was supported by grant No.(R01-1999-00166) from the Korea Science & Engineering Foundation and a grant of the Korea Science and Engineering Foundation RRC project.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

생하는 질환이며 우리 나라에서는 방광암, 신장암에 이어 세 번째로 흔한 비뇨기계 종양으로 지속적인 증가 추세에 있다.<sup>1)</sup> 전립선암의 발생에는 매우 복합적인 요인이 관여하고 있어 암세포 증식의 직접적인 인자들과 그에 관한 기전을 밝히는 연구가 매우 필요한 분야이다. 전립선암을 비롯하여 여러 암의 주요 발생에는 유전적인 요인 및 환경적인 요인들이 관여하는데 환경적인 요인중에서 특히 식이가 중요한 요소로 생각되어지고 있다.<sup>2)</sup> 식이 요인 중에서 지방과 관련된 연구가 많이 이루어지고 있고, linoleic acid (LA)

는 종양형성을 증가시키고,  $\omega$ -3 지방산은 종양형성을 억제한다는 보고들이 있다.<sup>3)</sup> 지방산들이 종양형성에 미치는 영향은 eicosanoid 생성과 관련이 있다고 보고되고 있으나 그 기전에 대해서는 아직 정확하게 밝혀져 있지 않다.<sup>4)</sup>

Conjugated linoleic acid (CLA)는 linoleic acid의 위치상, 기하학적 이성체로서 유제품이나 반추동물의 고기에 많은 양이 포함되어 있다.<sup>5)</sup> CLA는 *in vivo*에서 장관의 박테리아에 의해 linoleic acid로부터 산화적 과정과 효소의 이성질화 과정을 통해서 합성된다.<sup>6)</sup> 동물실험에 많이 사용하고 있는 화학적으로 합성한 CLA는 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 각각 48%로 많은 양을 차지하고 있으며,<sup>7)</sup> *cis*-9,*cis*-11 CLA, *trans*-9,*cis*-11 CLA, *trans*-9,*trans*-11 CLA, *cis*-10,*trans*-12 CLA 등 다양한 이성체들이 마가린의 제조와 같이 지방의 화학적 수소화 과정을 통해서 생성된다.<sup>8)</sup> 최근 CLA의 다양한 기능성이 생화학적 구조에 따른 것이라는 증거들이 제시되고 있으며 특히 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 서로 다른 효과를 나타내는 연구가 많이 진행되고 있다.<sup>7)</sup>

CLA가 발암물질을 투여한 동물에서 대장암, 피부암, 위암, 유방암을 포함한 여러 암의 억제 효과를 나타내는 것이 보고되었다.<sup>9)</sup> 특히 Cesano 등<sup>10)</sup>은 DU-145 human prostate cancer 세포를 면역이 결핍된 SCID mice에 주사했을 때 식이의 CLA가 종양의 크기와 폐로의 전이를 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 이러한 CLA의 항암 기전에 대한 여러 가지 가설이 대두되고 있는데, 대표적인 기전으로는 조직의 성숙과 분화를 직접적으로 조절하거나, 항산화제로서 작용하거나, eicosanoid의 합성을 억제하거나, 여러 가지 성장인자 (growth factors)를 조절하는 것들이다.<sup>11)</sup>

Insulin-like growth factor (IGF)는 여러 가지 세포의 증식과 분화에 있어 중요한 역할을 한다.<sup>12)</sup> IGF-I과 IGF-II의 두가지 형태로 구성되어, 세포막의 type I IGF 수용체, type II IGF 수용체와 인슐린 수용체에 결합한다. IGF-I과 IGF-II는 67개 아미노산 잔기를 가진 단일 사슬 폴리펩타이드로서 IGF-I, proinsulin과 매우 유사한 구조를 가진다. IGF-I과 IGF-II는 IGF-I 수용체에 높은 친화성을 가지고 있으며 이에 결합함으로써 세포 내로 작용이 전달되어 mitogenic response를 나타낸다. IGFs는 암세포에 중요한 증식 촉진인자이며 여러 암세포에서 생성되어 autocrine이나 paracrine mechanism으로 세포의 성장과 분화를 조절한다.<sup>13)</sup> IGF는 혈액이나 세포외액에 유리형으로 존재하지 않고 IGF에 강한 친화력을 갖는 IGF binding proteins (IGFBPs)에 결합하여 순환된다. 현재까지 IGFs에

대해 친화력이 아주 높은 6개의 결합 단백질과<sup>14)</sup> 친화력이 낮은 4개의 단백질이 발견되었다.<sup>15)</sup> 이러한 IGFBPs는 IGF에 결합하여 세포에서 생성된 IGF를 다른 조직이나 세포로 운반하는 운반체의 역할을 하거나 IGF가 수용체에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로써 IGF의 작용을 촉진하거나 억제한다고 알려졌다.<sup>16)</sup> 이와 같이 IGF에 결합하여 그 작용을 조절하는 외에도 IGFBP는 독립적으로 세포의 증식을 조절하는 것으로 보고되었다.<sup>17)</sup>

IGFs, IGF receptors, IGFBPs로 구성된 IGF system의 변화가 전립선암의 발생과 높은 상관 관계가 있다는 연구들이 발표되었다. Shi 등<sup>18)</sup>은 meta-analysis를 통해 IGF-I과 IGFBP-3의 혈액 농도가 전립선암 환자에서 높으며 이 두 단백질이 높아지면 전립선암에 걸릴 위험도가 증가한다고 발표하였다. 또한 IGF system은 전립선의 정상세포와 암세포 증식을 조절하는 중요한 인자로 알려지고 있다. Cohen 등<sup>19)</sup>은 정상적인 전립선 상피세포의 증식이 IGF-I, IGF-II 그리고 IGF receptor와 IGFBPs에 의해서 촉진된다고 보고하였다. Iwamura 등<sup>20)</sup>은 전립선 암세포인 DU-145와 PC-3 세포에서 IGF-I이 세포 분열에 중요한 역할을 한다고 밝혔으나, 세포 배양액에서는 IGF-I을 발견하지 못하였으며 Connolly와 Rose<sup>4)</sup>는 DU-145 세포 배양액에서 IGFBPs를 발견하였으나 IGF-I이나 IGF-II는 발견하지 못하였다. 이와 같이 전립선 암세포에 있어서 IGF system에 대한 연구가 많이 진행되고는 있으나 그 역할이나 메커니즘에 대해서는 잘 알려지지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서 인간 전립선 암세포인 TSU-Pr1을 이용하여 CLA 이성체 mixture와 CLA의 주요 두 가지 이성질체가 암세포 증식억제에 미치는 영향을 비교하고, 또한 CLA에 의한 암세포 증식 억제효과가 IGF system과 관련이 있는지 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

실험에 사용한 인간의 전립선 암세포인 TSU-Pr1 세포는 Iizumi group에 의해서 만들어진 것으로 Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA)의 John Isaacs 교수로부터 공급받았다.<sup>21)</sup> 세포는 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 배양하였다. 탈 이온화된 3차 증류수로 배지용액을 제조하여

0.22  $\mu\text{m}$  pore size membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 멸균하였다. 세포를 유지하기 위해 DMEM/F12 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco/BRL)를 첨가하고 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 항생제 (100 units/mL penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, Gibco/BRL)를 첨가한 배지를 사용하였다. 세포가 약 80% 정도 dish를 덮으면 phosphate-buffered saline solution (PBS)로 monolayer를 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하고 배지는 2일마다 교환하였다.

## 2. CLA 이성체 mixture, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA의 농도에 따른 세포 증식의 변화 측정

지방산들의 농도를 달리했을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 TSU-Pr1 cell (passage No. 40~55)을 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 24 well plate에 40,000 cells/well의 농도로 plating하였다. 24시간이 지난 후 serum-free medium (DMEM/F12, transferrin 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , selenium 5 ng/mL, ascorbic acid 50 ng/mL,  $\alpha$ -tocopherol 20 ng/mL)으로 배지를 교환하고 serum starvation시켰다. Transferrin, selenium, ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol은 Gibco/BRL에서 구입하였다. 24시간 serum starvation 후 배지를 여러 농도의 CLA 이성체 mixture, LA (Sigma, St. Louis, MO, USA), *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA (Cayman, Ann Arbor, MI, USA)가 들어있는 serum-free medium으로 교환하였다. 이때 사용한 지방산들은 fatty acid-free bovine serum albumin (BSA, Sigma)과 4:1의 몰비로 결합시켜 4 mM stock solution으로 만들어 나누어서  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다. 대조군을 포함한 모든 well에 BSA의 농도를 일정하게 유지하여 첨가시켰다. CLA 이성체 mixture와 LA는 0, 1, 2, 3  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하고, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA는 0, 0.1, 0.2, 0.3  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하여 0, 48, 96시간이 경과한 후 MTT assay<sup>23)</sup> 방법으로 살아 있는 세포수를 측정하였다. MTT assay 방법은 mitochondria의 dehydrogenase가 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma)를 환원시켜 푸른색 물질인 formazan을 만든다는 원리에 기초로 한 것이다. 본 실험에서는 formazan을 isopropanol에 용해시킨 다음 570 nm의 파장에서 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

## 3. Immunoblot analysis<sup>23)</sup>

IGF-II의 생성량을 측정하기 위해 지방산을 농도별로 첨가하고 세포들을 48시간 배양하여 배양액을 수거하여 microconcentrator (molecular weight exclusion of 3,000)을 사용하여 25배 농축시켰다. 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 뒤에 0.2  $\mu\text{m}$  BA83 nitrocellulose 종이 (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 transfer하였다. Nitrocellulose 종이는  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 3% milk-PBST (15.4 mM NaCl, 0.81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.19 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.05% Tween-20, pH 7.4)에서 18시간 동안  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 incubation한 다음 상온에서 PBST에 씻어 내었다. 다시 monoclonal IGF-II antibody/PBST에서 (1:1000 dilution, Amano Enzyme, Troy, VA, USA) 1시간 incubation하고 PBST로 씻어낸 다음 1000배 희석한 biotinylated anti-mouse antibody/PBST와 Streptavidin-HRP complex/PBST에서 1시간씩 차례로 상온에서 incubation하였다.<sup>24)</sup> ECL kit을 이용하여 탐색하고 film의 IGF-II band들의 강도는 Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이 때 분자량은 미리 착색시킨 molecular weight standard (Amersham, Buckinghamshire, England)와 비교, 분석하여 산정하였다.

## 4. Ligand blot analysis<sup>25)</sup>

Immunoblot과 같은 방법으로 배양액을 수거하여 IGFBP를 ligand blot analysis를 이용하여 측정하였다. 즉 SDS-PAGE에 단백질을 크기에 따라 분리한 후 0.2  $\mu\text{m}$  BA83 nitrocellulose 종이에 transfer하였다. 1% BSA-TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 membrane을 blocking한 다음  $^{125}\text{I}$ -IGF-II (100,000 count per minute/mL, Amersham)를 포함한 1% BSA-TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)에 하루동안  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 incubation하였다. Nitrocellulose 종이를 TBST로 씻은 후, IGFBP들은 X-Omat AR X-ray film (Eastman Kodak (Rochester, NY, USA)을 이용하여 나타내었다. 이 때 분자량은 molecular weight standard와 비교, 분석하여 산정하였다. 각 band의 강도는 Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 정량 분석하였다.

## 5. 통계처리

본 연구의 모든 실험 분석 결과는 각 실험군의 평균과 표

준오자로 계산하였고, analysis of variance로 분석 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험 군들의 평균값간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.<sup>20)</sup>

## 결 과

### 1. CLA 이성체 mixture와 이성체들의 농도에 따른 세포 증식의 변화

CLA가 전립선 암세포인 TSU-Pr1의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. CLA 이성체 mixture를 0, 1, 2, 3  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 CLA의 농도가 증가함에 따라 암세포 수가 유의적으로 감소하였고, 96시간에는 3  $\mu\text{M}$ 에서 대조군에 비해  $75 \pm 1\%$  감소하여 그 효과가 현저하게 나타났다 (Fig. 1A). 같은 농도의 LA를 세포 배양액에 첨가한 경우 효과가 없었다 (data not shown).

CLA의 주요 이성체인 *trans*-10,*cis*-12 CLA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 CLA 이성체 mixture의 실험에서 사용한 농도의 1/10인 0, 0.1, 0.2, 0.3  $\mu\text{M}$  농도로 처리하여 효과를 비교하였다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA의 경우에는 세포 증식 억제 효과가 48시간이 지난 후부터 나타났으며 96시간에는 최고 농도인 0.3  $\mu\text{M}$ 에서 대조군에 비해  $72 \pm 1\%$ 가 유의적으로 감소

하였다 (Fig. 1B). 반면 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 첨가한 경우에는 세포의 증식에 아무런 영향을 미치지 않았다 (Fig. 1C).

### 2. CLA 이성체 mixture와 이성체들이 IGF-II의 생성, 분비에 미치는 영향

전립선 암세포에 있어 CLA의 증식억제 효과가 IGF-II 생성, 분비에 의한 것인지를 알아보기 위해 Fig. 1에서와 같은 농도로 CLA를 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 배양액을 수거하여 immunoblot analysis를 수행하였다. Immunoblot시 분자량이 14,300, 11,500인 pro IGF-II, 6,500인 mature IGF-II band들이 관찰되었고, CLA 이성체 mixture를 첨가 시 농도에 따라서 이 band들이 모두 감소하였다 (Fig. 2A). CLA 이성체 mixture를 3  $\mu\text{M}$ 로 첨가하였을 때 대조군에 비해 pro IGF-II, mature IGF-II가 각각  $40 \pm 6\%$ ,  $38 \pm 6\%$ 씩 감소하여 유의적인 차이가 나타났다 (Fig. 2B). 따라서 CLA의 전립선 암세포 증식 억제 작용이 IGF-II의 생성 분비량 감소와 관계가 있는 것을 알 수 있었다.

각각의 이성체에 대한 실험에서 *trans*-10,*cis*-12 CLA의 경우 첨가한 농도가 증가함에 따라 IGF-II 분비량이 감소하였으며 (Fig. 3A), 0.3  $\mu\text{M}$ 에서만 대조군에 비해 pro IGF-II와 mature IGF-II 분비량이 각각  $40 \pm 4\%$ ,  $38 \pm$

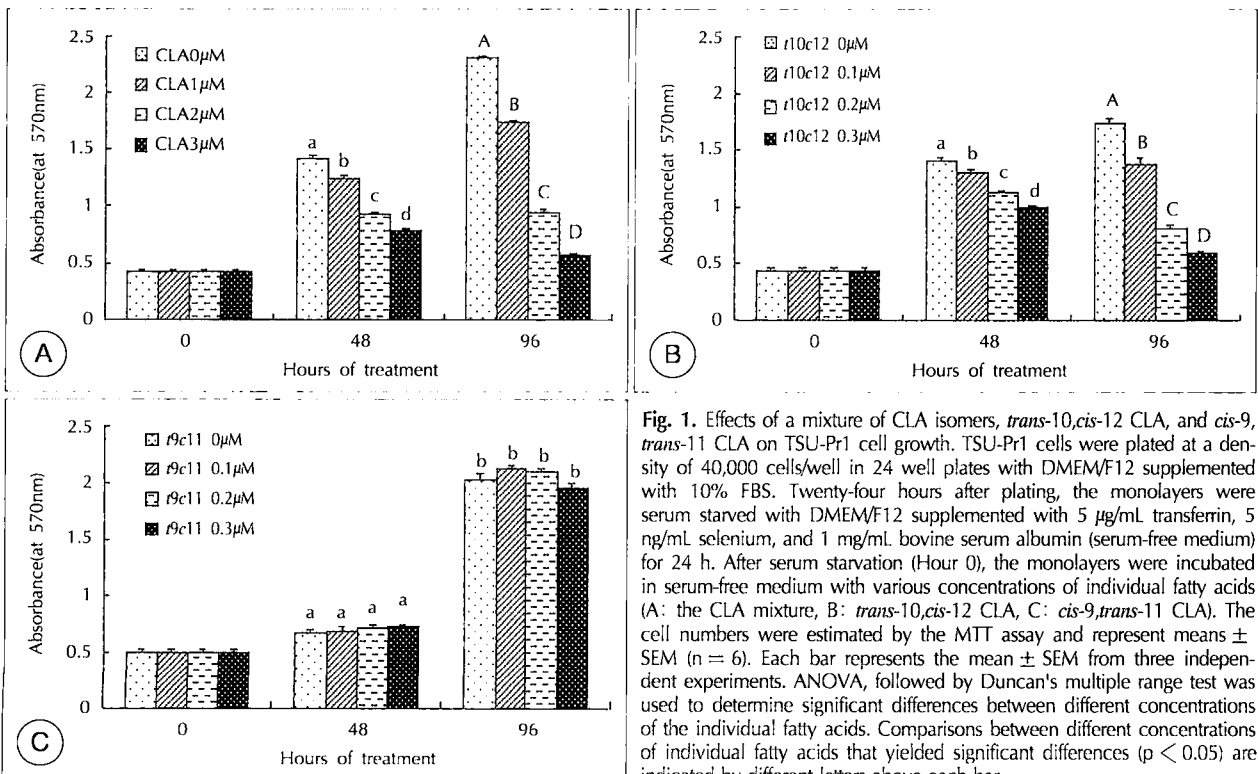


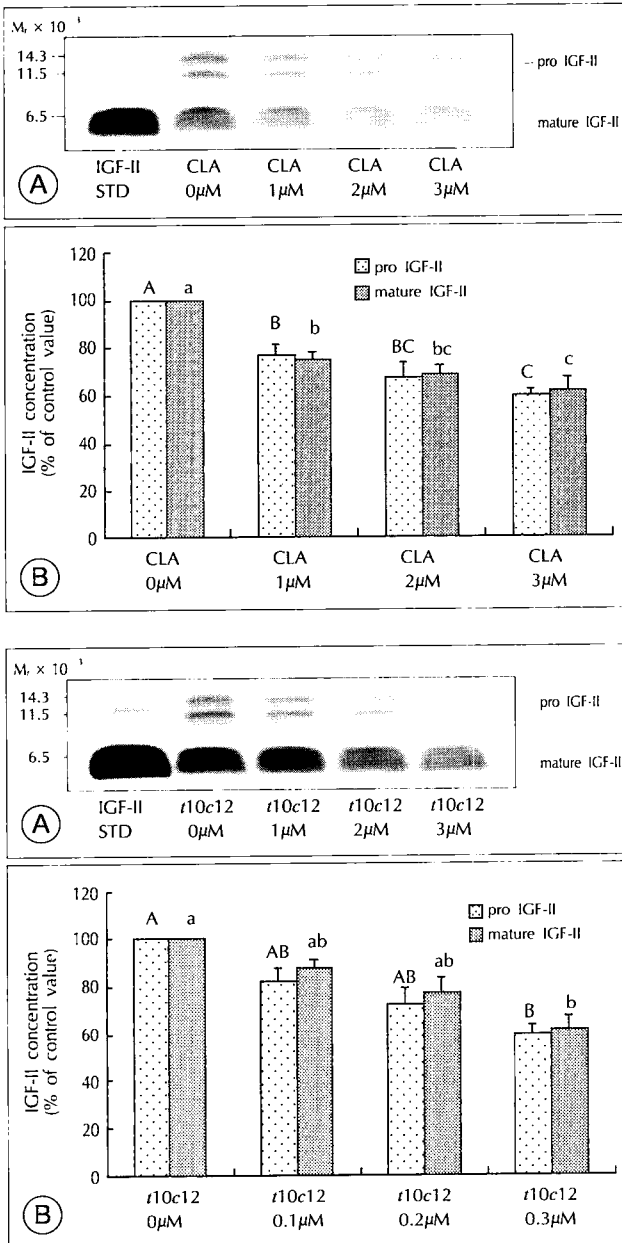
Fig. 1. Effects of a mixture of CLA isomers, *trans*-10,*cis*-12 CLA, and *cis*-9,*trans*-11 CLA on TSU-Pr1 cell growth. TSU-Pr1 cells were plated at a density of 40,000 cells/well in 24 well plates with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayers were serum starved with DMEM/F12 supplemented with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  transferrin, 5 ng/ml selenium, and 1 mg/ml bovine serum albumin (serum-free medium) for 24 h. After serum starvation (Hour 0), the monolayers were incubated in serum-free medium with various concentrations of individual fatty acids (A: the CLA mixture, B: *trans*-10,*cis*-12 CLA, C: *cis*-9,*trans*-11 CLA). The cell numbers were estimated by the MTT assay and represent means  $\pm$  SEM (n = 6). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. ANOVA, followed by Duncan's multiple range test was used to determine significant differences between different concentrations of the individual fatty acids. Comparisons between different concentrations of individual fatty acids that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

6%씩 유의적으로 감소되었다 (Fig. 3B). 반면 세포증식에 아무런 영향이 없었던 *cis-9,trans-11* CLA는 첨가농도에 따른 IGF-II 분비량 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 3C, 3D). 이 결과로 CLA의 암세포 증식 억제 작용이 이성체 중에서도 *trans-10,cis-12* CLA에 의한 IGF-II 감소에 의

해 이루어진다는 것을 알 수 있었다.

### 3. CLA 이성체 mixture와 이성체들이 IGFBPs의 생성, 분비에 미치는 영향

IGF-II와 결합하여 세포 증식 작용을 조절하는 IGFBP



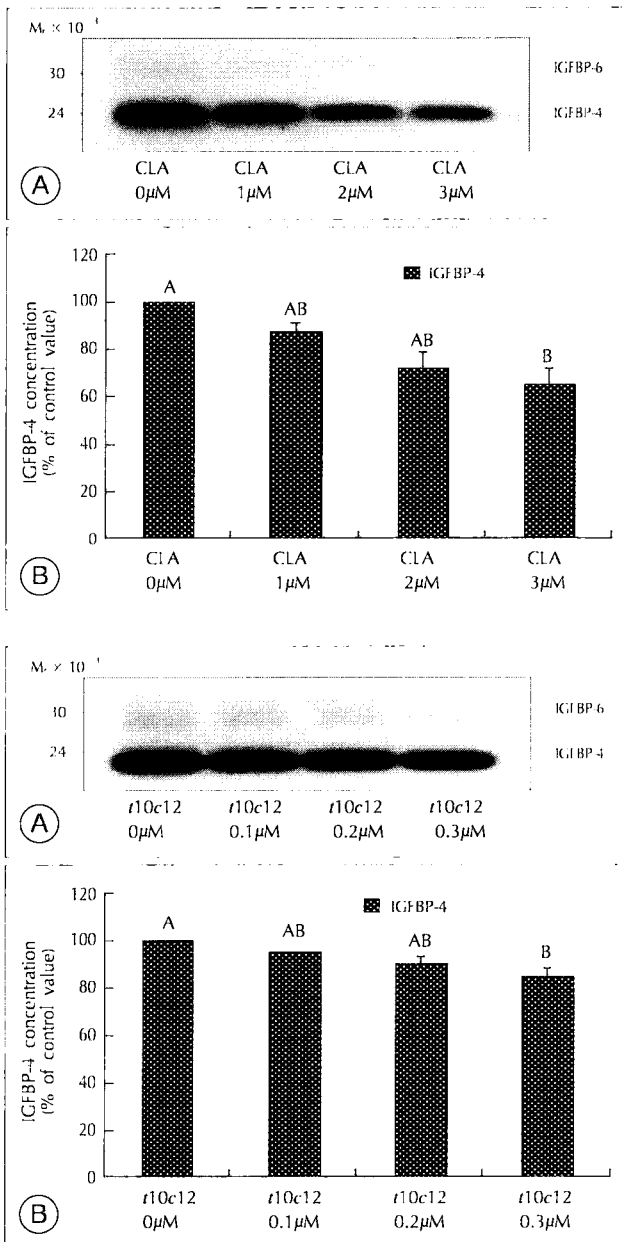
**Fig. 3.** Effects of *trans-10, cis-12* CLA (*t10c12*) and *cis-9,trans-11* CLA (*t9c11*) on secretion of IGF-II peptides by TSU-Pr1 cells. TSU-Pr1 cells were cultured as described in Fig. 1. After serum starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of *t10c12* (A, B) or *t9c11* (C, D). Forty-eight hour, conditioned media were collected and concentrated for immunoblot analysis using a monoclonal antibody against IGF-II. A and C. Photographs of chemiluminescent detection of immunoblot, which is representative of three independent experiments, are shown. IGF-II STD, recombinant human IGF-II, 20 ng. B and D. Quantitative analysis of immunoblots. Relative abundance of each band was estimated by densitometric analysis. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Comparisons between different concentrations of each CLA isomer that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

**Fig. 2.** Effects of a mixture of CLA isomers on secretion of IGF-II peptides by TSU-Pr1 cells. TSU-Pr1 cells were cultured as described in Fig. 1. After serum starvation, the monolayers were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of CLA. Forty-eight hour, conditioned media were collected and concentrated for immunoblot analysis using a monoclonal antibody against IGF-II. A: A photograph of chemiluminescent detection of an immunoblot, which is representative of three independent experiments, is shown. IGF-II STD, recombinant human IGF-II, 20 ng. B: Quantitative analysis of immunoblots. Relative abundance of each band was estimated by densitometric analysis. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. ANOVA, followed by Duncan's multiple range test was used to determine significant differences between different concentrations of the CLA isomer mixture. Comparisons between different concentrations of the CLA isomer mixture that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

의 생성, 분비량을 조사하기 위하여 ligand blot analysis 를 수행하였다. CLA를 첨가하고 48시간이 지난 배양액을 수 거하여 실험한 결과, 분자량이 30,000인 IGFBP-6와 분자량 이 24,000인 IGFBP-4가 관찰되었다 (Fig. 4A). CLA 이 성체 mixture에서는 농도가 증가됨에 따라 IGFBP-4가 감소되어 최고 농도인 3  $\mu$ M에서 유의적으로 감소하였다

(Fig. 4B). TSU-Pr1 세포에서 분비되는 IGFBP-6는 그 양이 매우 적기 때문에 IGFBP-4만을 densitometer로 측정하였다.

*Trans*-10,*cis*-12 CLA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 배양하였 을 때 배양액에서 IGFBP-6와 IGFBP-4가 관찰되었다 (Fig. 5A, 5C). *Trans*-10,*cis*-12 CLA에서는 IGFBP-4 양



**Fig. 4.** Effects of a mixture of CLA isomers on secretion of IGFFBPs by TSU-Pr1 cells. TSU-Pr1 cells were cultured and treated as described in Fig. 2. Forty-eight hour, serum-free conditioned media were collected between day 0 and 2, and the concentrated media were subjected to ligand blot analysis utilizing  $^{125}$ I-IGF-II. A: An autoradiograph of a ligand blot, which is representative of three independent blots, is shown. B: Quantitative analysis of ligand blots. Relative abundance of IGFBP-4 was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean amount of IGFBP-4  $\pm$  SEM from three independent experiments. Comparisons between different concentrations of the CLA isomer mixture that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

**Fig. 5.** Effects of r10c12 (A, B) and r9c11 (C, D) on secretion of IGFFBPs by TSU-Pr1 cells. TSU-Pr1 cells were cultured and treated as described in Fig. 3. Forty-eight hour, serum-free conditioned media were collected between day 0 and 2, and the concentrated media were subjected to ligand blot analysis utilizing  $^{125}$ I-IGF-II. A and C. Autoradiographs of ligand blot, which is representative of three independent blots, are shown. B and D. Quantitative analysis of ligand blots. Relative abundance of IGFBP-4 was estimated by densitometric scanning of the exposed films. Each bar represents the mean amount of IGFBP-4  $\pm$  SEM from three independent experiments. Comparisons between different concentrations of each CLA isomer that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

이 최고 농도인 0.3  $\mu\text{M}$ 에서 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 5B). 반면 *cis-9,trans-11* CLA는 IGF-BPs 생성과 분비에 영향을 주지 않았다 (Fig. 5C, 5D).

## 고 찰

화학적으로 유발한 동물의 종양 연구들에 의하면 CLA는 피부, 위, 유방, 대장암 발생을 현저히 억제하여 많은 관심을 모으고 있다.<sup>27)</sup> Cesano 등<sup>10)</sup>의 연구에서는 인간의 전립선 암세포인 DU-145 세포를 면역능력이 심하게 결여된 SCID mice에 피하주사 했을 때 종양의 크기나 허파로의 전이가 1% CLA가 포함된 식이를 먹었을 때 현저히 감소하는 것을 관찰하였다. 그러나 CLA가 암 억제 효과가 뛰어난 물질이라 알려졌어도 그것이 어떠한 기전에 의해서 기능을 나타내는지 정확하게 알려져 있지 않았다. 본 연구에서는 CLA가 전립선암 세포증식을 감소시킨다는 직접적인 증거를 처음으로 제공하였다. CLA 이성체 mixture를 낮은 농도 (0~3  $\mu\text{M}$ )로 처리해 주었을 때 암세포의 증식이 48시간 이후부터 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1A).

현재까지 CLA의 연구들은 여러 가지 이성체가 포함된, 화학적으로 합성한 CLA를 이용하여 진행되어 오고 있다. 따라서 어떤 이성체가 생리 활성을 가지고 있는지 규명하는 것이 중요하다. 본 연구에서 사용한 CLA 이성체 mixture는 *trans-10,cis-12* CLA와 *cis-9,trans-11* CLA로 각각 48%를 포함하고 있다.<sup>28)</sup> Ha 등<sup>29)</sup>은 생쥐를 이용한 동물 실험을 통해 *cis-9,trans-11* CLA만이 인지질에 결합하는 이성체이며 이것이 생물학적으로 활성이 있는 이성체라 제안하였다. 그러나 Kang 등<sup>30)</sup>은 *trans-10,cis-12* CLA가 지단백 가수분해효소 (lipoprotein lipase)의 활성을 억제하며 3T3-L1 지방세포에서도 지방의 축적을 감소시키며 쥐에게 섭취시 체지방을 감소시키는 결과처럼 여러 가지 생리 활성 효과에 관여하는 이성체라고 제안하였다. 인간의 전립선 암세포인 TSU-Pr1을 사용한 본 실험에서는 *trans-10,cis-12* CLA 이성체가 CLA 이성체 mixture의 1/10 농도에 의해서도 세포의 증식억제 현상이 일어나고 (Fig. 1B) *cis-9,trans-11* CLA는 전립선암세포 증식에 아무런 효과를 나타내지 않는 것으로 미루어 보아 (Fig. 1C) *trans-10,cis-12* CLA가 전립선 암세포에 증식을 방지하는 효과적인 이성체임을 증명해 주었다.

IGF system에 변화가 생김으로서 여러 가지 암이 발생되고 그 진행이 촉진된다는 가설이 여러 연구자에 의해 수립되었다.<sup>31-33)</sup> 현재까지 수행된 여러 가지 역학 조사는 혈액의 IGF-I와 IGF-BP-3 농도가 전립선암 발생에 높은 상관

관계가 있음이 보고되고 있다.<sup>34)</sup> 또한 개인의 영양상태가 IGF system에 영향을 미치므로<sup>35)</sup> IGF system이 식이요인에 의한 전립선암발생의 중간매개자라는 가설이 제안되었다.<sup>36)</sup> 본 실험은 TSU-Pr1 세포가 분자량 6,500의 mature IGF-II와 분자량 11,500, 14,300의 pro IGF-II를 생성하는 것을 보여 주었다. IGF-II는 대장암이나 전립선암, 유방암에서 분비되며, 이러한 암들의 성장에 있어 IGF-II가 중요한 자가분비 조절요소로 작용한다는 것은 이미 밝혀진 바이다.<sup>37)</sup> 본 실험실에서는 TSU-Pr1 cell이 장기간 혈청이 첨가되지 않은 배양액에서 증식하는 것을 관찰하였다. 따라서 이 세포가 생산하는 IGF-II가 세포의 증식에 기여한다는 가설을 세울 수가 있었다. Fig. 2를 보면, CLA의 농도가 증가함에 따라 IGF-II가 감소하였다. 이는 CLA가 세포의 증식을 촉진하는 인자, 즉 IGF-II의 생성과 분비를 억제함으로써 이에 의해 암세포의 증식이 억제되었을 가능성을 시사한다. 이러한 효과가 어떤 이성체에 의해서 나타나는지 알아보기 위해서 같은 조건에서 두 가지 이성체를 비교하여 immunoblot analysis을 수행한 결과를 보면 세포증식을 감소시키는 *trans-10,cis-12* CLA는 농도에 따라서 IGF-II 분비량을 유의적으로 감소시켰으며, 세포의 증식에 영향을 미치지 않는 *cis-9,trans-11* CLA는 IGF-II 분비량에 영향이 없었다. 즉, CLA isomer mixture를 배양액에 첨가했을 때 감소된 IGF-II는 *trans-10,cis-12* CLA의 작용에 의한 것임을 알 수 있었다.

위에서 언급한 것처럼 IGF-BP는 IGF의 작용을 조절하거나 독립적인 기전으로 암세포를 비롯한 세포의 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>14,17)</sup> Kimura 등<sup>38)</sup>은 같은 전립선 암세포에서도 LNCaP 세포는 IGF-BP-2를, DU-145 세포는 IGF-BP-2, 3, 4, 6을, PC-3 세포는 IGF-BP-2, 3, 4, 5, 6을 분비한다고 밝혔다. TSU-Pr1 세포에서는 분자량이 24,000인 IGF-BP-4와 30,000인 IGF-BP-6가 생성 분비되었다 (Fig. 4A). CLA 이성체 mixture인 경우 농도가 증가함에 따라 IGF-BP-4가 감소하는 경향을 보였으나 3  $\mu\text{M}$ 에서만 유의적인 차이를 관찰하였다 (Fig. 4B). 이성체인 *trans-10,cis-12* CLA의 경우에도 최고 농도에서만 IGF-BP-4의 유의적인 감소가 있었다 (Fig. 5B). 반면, *cis-9,trans-11* CLA는 IGF-BPs의 생성에 아무런 영향을 주지 않았다 (Fig. 5C, 5D). 최근 전립선암을 가진 환자의 혈청을 조사한 결과, IGF-BP-3는 감소한 반면, IGF-BP-2의 농도가 증가되었다.<sup>39)</sup> 또한 Kacir 등<sup>40)</sup>은 정상적인 전립선의 상피세포의 성장을 IGF-BP-3가 억제하는 것을 관찰하였으며, 반면 인간에서 유래된 전립선 암세포인 PC-3 세포에서는 IGF-BP-3에 의해서 성장이 증가하는 것을 관찰하였다. 본

실험에서는 CLA mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서 TSU-Pr1 세포의 IGFBP-4 생성이 감소되었으나 이 단백질의 역할을 규명하지 않았기 때문에 이 IGFBP-4가 TSU-Pr1 세포 증식에 어떤 역할을 하는지 추측할 수 없었다. 그러나 M12 prostate cancer cell line에 antisense IGFBP-4 cDNA를 삽입하여 IGFBP-4 protein 생성을 감소시켰을 때 IGFBP-4의 감소는 전립선 암세포증식을 감소시켰다는 결과가 최근에 발표되었다.<sup>41)</sup> 이 결과는 IGFBP-4는 TSU-Pr1 세포 증식을 촉진하고 CLA에 의한 세포 증식감소가 IGFBP-4의 감소에 의해서 매개되었다는 가설을 받게 해 준다. 전립선 암세포와 IGFBP-4와의 관계는 후속연구를 통해서 계속 밝혀나갈 계획이다.

### 요약 및 결론

CLA 이성체 mixture는 인간의 전립선 암세포인 TSU-Pr1의 증식을 억제하였는데 이 효과는 주요 이성체 중에서도 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 관찰되었으며 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 효과가 없었다. 또한 CLA mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA을 첨가했을 때 IGF-II와 IGFBP-4의 감소를 가져 왔다. 따라서 CLA의 세포 증식 억제 작용이 IGF-II와 IGFBP-4의 감소에 의해 이루어진다는 가설을 세울 수 있었다.

### Literature cited

- 1) Walsh PC. The natural history of localized prostate cancer: a guide to therapy. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, eds. *Cambell's Urology* 7th ed. 2539-2546, Saunders, Philadelphia, 1998
- 2) Doll R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res* 52: 2024S-2029S, 1992
- 3) Doll R, Peto R. The cause of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1308, 1981
- 4) Rose DP, Connolly JM. Regulation of DU145 human prostate cancer cell proliferation by insulin-like growth factors and its interaction with the epidermal growth factor autocrine loop. *Prostate* 24: 167-175, 1994
- 5) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887, 1987
- 6) Chin SF, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo (a)pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990
- 7) Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 8-13, 2000
- 8) Carpenter DL, Slover HT. Lipid composition of selected margarines. *J Am Oil Chem Soc* 50: 372-376, 1973
- 9) Hubbard NE, Lim D, Summers L, Erickson KL. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett* 150: 93-100, 2000
- 10) Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santoli D. Opposite effect of linoleic acid and conjugated linoleic acid on human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 19: 833-838, 1998
- 11) Ip C, Chin SF, Scimeca Joseph A, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51: 6118-6124, 1991
- 12) Daughday WH. The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrine* 127: 1-4, 1990
- 13) Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34, 1995
- 14) Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E967-976, 2000
- 15) Hwa V, Oh T, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-87, 1999
- 16) Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Conover C, De Leon DD, Domovan SM, Ocrant I, Giudice L. Insulin-like growth factor binding proteins. *Rec Prog Horm Res* 46: 99-163, 1990
- 17) Oh Y. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat* 47: 283-293, 1998
- 18) Shi R, Berkel HJ, Yu H. Insulin-like growth factor-I and prostate cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 85: 991-996, 2001
- 19) Cohen P, Peehl DM, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors, IGF receptors, and IGF binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 401-407, 1991
- 20) Iwamura M, Sluss PM, Casamento JB, Cockett AT. Insulin-like growth factor-I-action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 22: 243-252, 1993
- 21) Iizumi T, Yazaki T, Kanoh S, Kondo I, Koiso K. Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). *J Urol* 137: 1304-1306, 1987
- 22) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunological Method* 89: 271-277, 1986
- 23) De Leon DD, Terr C, Nissley P. Direct detection of insulin-like growth factor II (IGF-II) by chemiluminescence without interference by IGF binding proteins. *Endocrinology* 134: 1960-1963, 1994
- 24) Tanaka H, Asami O, Hayano T, Sasaki I, Yoshitake Y, Nishikawa K. Identification of a family of insulin-like growth factor II secreted by cultured rat epithelial-like cell line 18.54-SF: application of a monoclonal antibody. *Endocrinology* 124: 870-877, 1989
- 25) Hossenlopp P, Segovia-Quinson B, Portolan G, Binoux M. Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins between structure and affinity. 1. Circulating forms in man. *Eur J Biochem* 170: 133-142, 1987
- 26) Steel RGD, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1980
- 27) Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip C. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis.



- tosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exp Cell Res* 250: 22-34, 1999
- 28) Pariza MW, Ha YL, Benjamin H, Sword JT, Gruter A, Chin SF, Storkson, Faith N, Albright K. Formation and action of anticarcinogenic fatty acids. *Adv Exp Med Biol* 289: 269-272, 1991
  - 29) Ha YL, Storkson J, Parizza MW. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990
  - 30) Kang K, Pariza MW. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid reduced leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 377-382, 2001
  - 31) Baserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79: 927-930, 1994
  - 32) Baserga R. The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res* 55: 249-252, 1995
  - 33) Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 68: 183-223, 1996
  - 34) Djavan B, Waldert M, Seitz C, Margerger M. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *World J Urol* 19: 225-233, 2001
  - 35) Rosen CJ, Conover C. Growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in aging: a summary of an NIA sponsored symposium. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3119-3922, 1997
  - 36) Mucci LA, Tamimi R, Lagiou P, Trichopoulou A, Benetou V, Spanos E, Trichopoulos D. Are dietary influences on the risk of prostate cancer mediated through the insulin-like growth factor system? *BJU Int* 87: 814-20, 2001
  - 37) Li SL, goko H, Xu ZD, Kimura G, Sun Y, Kawachi MH, Wilson TG, Wilczynski S, Fujita Yamaguchi Y. Expression of insulin-like growth factor (IGF)-II in human prostate, breast, bladder, and paraganglioma tumors. *Cell tissue Res* 291: 409-419, 1998
  - 38) Kimura G, Kasuya J, Giannini S, Honda Y, Mohan S, Kawachi Mark H, Akimoto M, Fujita-Yamaguchi Y. Insulin-like Growth Factor (IGF) system components in human prostatic cancer cell-line: LNCaP, DU-145, and PC-3 cells. *Int J Urol* 3: 39-46, 1996
  - 39) Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Golewasser B, Karasik A. Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: Correlation with serum prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 229-233, 1993
  - 40) Kacier EK, Blat C, Imbenotte J, Troalen F, Cussenot O, Calvo F, Harel L. IGF binding protein-3 secreted by the prostate adenocarcinoma cells (PC-3): differentiation effect on PC-3 and normal prostate cell growth. *Growth Regul* 3: 180-189, 1993
  - 41) Drivdahl RH, Sprenger C, Trimm K, Plymate SR. Inhibition of growth and increased expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and -6 in prostate cancer cells stably transfected with antisense IGFBP-3 complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 142: 1990-1998, 2001