

## 인간의 대장암 HT-29 세포주에서 라이코펜이 Insulin-like Growth Factor-I Receptor Signaling Pathway에 미치는 영향

이현숙 · 정재인 · 강영희 · Frederick Khachik\* · 윤정한\*

한림대학교 생명과학부 식품영양전공

\*Dept. of Chemistry & Biochemistry, Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition,  
University of Maryland

### Effect of Lycopene on the Insulin-like Growth Factor-I Receptor Signaling Pathway in Human Colon Cancer HT-29 Cells

Hyun Sook Lee, Jae In Jung, Young-Hee Kang, Frederick Khachik\* and Jung Han Yoon Park\*

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

\*Dept. of Chemistry & Biochemistry, Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition,  
University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

#### Abstract

Epidemiological data suggest that lycopene has anticancer activities in humans. Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) is a transmembrane tyrosine kinase that mediates the biological actions of IGFs and may play an active role in cancer progression. Because our previous *in vitro* studies have indicated lycopene inhibits HT-29 cell growth, the aim of this study was to determine whether lycopene induces apoptotic cell death and the inhibitory effect of lycopene on HT-29 cell growth is related to changes in IGF-IR levels and the receptor's intracellular signalling pathways. HT-29 cells were incubated for 4 days in serum-free medium in the presence of 0, 25, 50, or 100  $\mu\text{M}$  lycopene, and the DNA fragmentation assay was performed. Cells treated with lycopene produced a distinct oligonucleosomal ladder with different sizes of DNA fragments, a typical characteristic of cells undergoing apoptosis. HT-29 cells were cultured for 4 days in serum-free medium in the presence of 0~100  $\mu\text{M}$  lycopene and IGF-I (10 nM) was added for 0~60 minutes immediately prior to lysate preparations. Western blot analysis of total lysates revealed that lycopene decreased the levels of IRS-1, Akt, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and IGF-IR  $\beta$ -subunit, and increased the levels of the IGF-IR precursor dose dependently. Lycopene also decreased IGF-I-induced phosphorylation of IGF-IR $\beta$ , IRS-1 and Akt, which were, at least in part, due to decreased expression of these proteins. These results suggest that lycopene induces apoptosis of HT-29 cells by inhibiting IGF-IR signaling thereby interfering with an IGF-II-driven autocrine growth loop, which is known to exist in this cell line.

**Key words:** insulin-like growth factor-I receptor, lycopene, colon cancer, apoptosis

#### 서론

암 예방을 위한 영양학적 접근은 오래 전부터 연구되어져 왔다. 많은 역학 조사 결과들은 채소와 과일의 섭취가 유방암 등 여러 종류의 인간의 암 발생률을 감소시키는 효과가 있음을 증명하였다. 식물성 성분 중에서 카로티노이드, 주로  $\beta$ -캐로틴이 이런 항암효과를 가질 것으로 기대되어졌다(1). 그러나 최근의  $\beta$ -캐로틴을 대상으로 한 영양중재 연구들에서는 항암효과가 없었거나(2,3) 또는 오히려 반대효과가 나타났다고 보고한 예도 있다(4). 이런 결과들은 채소와 과일 중에 다른 강력한 항암물질이 존재함을 의미한다.

최근 토마토 카로티노이드인 라이코펜(lycopene)의 작용에 대한 관심이 증가하고 있다. 역학조사에 의하면 라이코펜은 유방암(5), 전립선암(6), 폐암(7) 등 인간의 여러 종류의 암 발생률 감소와 관계 있는 것으로 보고되었다. Giovannucci(8)는 토마토 섭취량 또는 혈 중 라이코펜 수준이 암 발생률과 음의 상관관계가 있음을 보고했다. 이러한 역학조사 결과들은 세포와 동물을 대상으로 한 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서도 입증되었다(9-12). 본 연구실에서는 HT-29 세포를 대상으로  $\alpha$ -,  $\beta$ -캐로틴, 라이코펜의 항암작용을 비교한 결과 라이코펜의 암세포증식억제작용이 가장 큼을 밝혀냈다(13).

Insulin-like growth factors(IGFs)는 한 개의 사슬로 이루

\*Corresponding author. E-mail: jyoona@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-240-1477. Fax: 82-33-256-0199

어진 폴리펩타이드로서 정상 또는 악성 조직에서 mitogenic 또는 항세포사멸(antiapoptosis) 인자로 작용한다. IGFs는 여러 조직에서 합성되어 이들 조직에서 autocrine/paracrine 방법으로 성장 조절인자로 작용한다. 대부분의 IGF의 세포내 효과는 type I IGF receptor(IGF-IR)에 의해 매개되며, 그들의 작용은 IGF-결합단백질(IGFBP)들에 의해 조절된다. IGF-IR은  $\alpha\beta_2$ 형의 heterotetramer로 이루어진 glycoprotein으로  $\alpha$ -subunit과  $\beta$ -subunit의 분자량은 각각 130,000과 95,000 정도된다. IGF가 extracellular domain인  $\alpha$ -subunit에 결합하면  $\beta$ -subunit의 tyrosine kinase domain에 autophosphorylation이 일어나서 세포내의 여러 가지 단백질을 인산화시키는 tyrosine kinase로 활성화된다(14). 활성화된 IGF-IR에 결합하는 세포안의 단백질 중 잘 알려진 것이 insulin-receptor substrate(IRS) family이고, 인산화된 IRS에 결합하는 단백질중에서 가장 대표적인 것이 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)의 p85 regulatory subunit이다. PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화되거나 IRS에 의해 활성화되어 Akt를 활성화시켜 apoptosis를 방지하고 cell survival을 촉진한다(15,16).

IGFs는 정상조직의 세포증식을 촉진할 뿐만 아니라 종양 생성과 암세포증식 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 인지되어 왔으며, 근래에는 IGF-I과 IGF-IR이 종양발생에 있어 주요 역할을 함이 제안되었다. 혈중 IGF-I이 전립선암(17)과 유방암(18)발생 위험률 사이에 강력한 양의 상관관계가 있음이 보고되었으며, 대장암 세포를 비롯한 여러 암세포에서 IGF-I이 세포사멸을 방해할 뿐만 아니라 성장을 촉진하는 역할이 있음이 밝혀지고 있다. 또한 인간의 대장암에는 정상적인 주위의 점막조직과 비교하여 IGF-IR의 수가 증가된 것이 발표되었다(19). 본 연구에서 사용한 HT-29 세포는 인간의 대장암에서 유래한 세포주로서 IGF-II와 IGFBP-2, -4, -6을 생성하고, IGF-II는 autocrine mechanism으로 이 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다(20).

본 연구에서는 대장암 세포에서 라이코펜의 항암작용이 IGF-IR signaling pathway의 변화를 통하여 일어난다는 가설을 세우고 이를 증명하기 위한 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용한 HT-29 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12)와 fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, transferrin, selenium은 Gibco-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), bovine serum albumin(BSA) 등 기타 실험

에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 멸균된 1회용 플라스틱 용기는 Corning(Corning, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 라이코펜은 토마토로부터 합성하였다(21).

### 세포배양

세포는 37°C, 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 DMEM/F12를 사용하여 배양하였다. 실험에 사용할 세포를 유지하기 위해 DMEM/F12 배지에 10% FBS를 첨가하고 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 항생제(penicillin 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL)를 첨가한 배지를 사용하였다. 세포가 약 80% 정도 dish를 덮으면 phosphate-buffered saline solution(PBS)로 monolayer를 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA를 처리하여 계대 배양하고 배지는 2일마다 교환하였다.

### DNA laddering 측정

라이코펜의 암세포 증식 억제효과가 세포사멸(apoptosis)에 의한 것인지를 알아보기 위해 HT-29 세포를 기본 배양액으로 희석하여  $1 \times 10^6$  cells/dish의 농도로 100 mm dish에 분주하였다. 24시간 후 serum-free medium(SFM)으로 배지를 교환하여 24시간 동안 serum starvation 하였다. SFM은 FBS가 없는 DMEM/F12에 transferrin(5 µg/mL), selenium(5 ng/mL), penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 µg/mL)을 첨가하여 만들었다. 그 다음 라이코펜이 0, 25, 50, 100 µM가 함유된 SFM으로 72시간 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 세포를 긁고 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 수집하였다. 여기에 extraction buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) 2 mL을 넣고 4°C에서 2시간 동안 추출하였다. 그 후 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 1%가 되도록 넣고 4°C에서 2시간, 0.55 mg/mL의 RNase를 넣고 37°C에서 2시간, 0.55 mg/mL의 proteinase K를 넣고 42°C에서 2시간 incubation하였다. 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하여 DNA가 포함되어 있는 상층액을 얻었다. DNA를 포함한 상층액에 0.1배의 3 M sodium acetate와 2.5배의 100% ethanol을 넣어 DNA pellet을 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 작은 알갱이를 Tris-EDTA(TE) buffer(20 mM Tris, 1 mM EDTA)에 녹여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 뒤, 2% agarose gel에서 전기영동하였다(22).

### 라이코펜과 IGF-I이 암세포 증식에 미치는 영향 측정

라이코펜과 함께 IGF-I을 첨가해 주었을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 HT-29 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 50,000 cells/well의 밀도가 되게 24 well plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후에 SFM으로 배지를 교환하고 24시간 동안 serum starvation 시켰다. 그 후 실험 배지에 라이코펜을 0 또는 100 µM의 농도로 첨가하고 여기에 IGF-I을 10 nM의 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양

한 후 MTT 분석(23) 방법으로 세포수를 측정하였다. MTT 방법은 미토콘드리아의 탈수소효소가 MTT를 환원시켜 푸른색 물질인 formazan을 만든다는 원리를 기초로 한 것으로서, 이 formazan을 isopropanol을 사용하여 용해시킨 후 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 세포수를 측정하는 방법이다.

#### 라이코펜과 IGF-I에 의한 세포 내 단백질의 변화 측정

라이코펜의 암세포 증식 억제효과가 IGF-IR를 매개하여 일어나는지, IRS-1에 영향을 미치는지, 또한 세포사멸에 관련된 단백질인 Akt, PI3K와 관계 있는지 알아보기 위하여 HT-29 세포를  $1 \times 10^6$  cells/dish의 농도가 되도록 regular medium으로 희석하여 100 mm dish에 분주하였다. 24시간 후 SFM으로 배지를 교환하고 24시간 동안 serum starvation 하였다. 각 군의 SFM에 라이코펜을 0, 25, 50, 100  $\mu$ M의 농도로 첨가하여 72시간 배양하여 세포를 수집하고 여기에 150 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate와 0.2 mM PMSF, 20  $\mu$ g/mL aprotinin, 10  $\mu$ g/mL anti-pain, 10  $\mu$ g/mL leupeptin, 80  $\mu$ g/mL benzamidin HCl을 포함한 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 40분간 incubation 하였다. 이 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 모아서 BCA 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 또한 라이코펜의 항암작용이 IGF-IR를 매개하여 일어나는지 보기 위하여 세포 배지에 IGF-I을 첨가해주어 실험하였다. 즉 라이코펜 농도를 0 또는 100  $\mu$ M로 하여 세포를 배양한 뒤 lysis 직전에 IGF-I을 넣고 0, 1, 5, 또는 60분 동안 배양한 후 세포를 lysis하고 위에서와 같이 단백질을 정량하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후 Immobilon<sup>TM</sup>-P membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. Membrane은 4°C에서 5% milk-TBST(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 18시간 동안 incubation 한 후, anti-IGF-IR $\beta$ (IGF-IR  $\beta$ -subunit, 1 : 500), anti-IRS-1(1 : 720), anti-Akt(1 : 1,000), anti-p85(PI3K의 p85 regulatory subunit을 detect하는 antibody, 1 : 2,000), anti- $\beta$ -actin(1 : 2,000)를 첨가하여 상온에서 1시간 또는 4°C에서 8시간 이상 incubation하였다. 상온에서 TBST로 씻어낸 다음, 다시 anti-mouse 또는 anti-rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST에서 1시간 동안 incubation 하여 Supersignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate(Pierce, IL, USA)를 이용하여 각 단백질의 양을 탐색하였다. 이 때 이 단백질들의 band의 강도는 densitometer(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였고, 분자량은 molecular weight marker standard(Amersham Pharmacia Biotech Buxing-hamshire, England)와 비교, 분석하여 산정하였다.

#### Immunoprecipitation 방법

세포배양 후 lysis해서 얻은 상층액(1 mg protein/mL)에 1  $\mu$ g의 normal rabbit IgG와 50  $\mu$ L의 Protein A-Sepharose beads(Amersham)을 넣고 4°C에서 1시간 동안 incubation 하여 preclean 한 후 2,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액에 1  $\mu$ g의 anti-IGF-IR antibody를 넣고 4°C에서 1시간 동안 incubation한 다음 다시 Protein A-Sepharose beads를 50  $\mu$ L 첨가하고 4°C에서 1시간 동안 incubation하였다. Bead는 lysis buffer로 4번 씻었다. 이 면역침전물(immunoprecipitate)은 anti-IGF-IR $\beta$ (1 : 500), anti-IRS-1(1 : 720), anti-p85(1 : 2,000), anti-phosphotyrosine(PY20, 1 : 5,000) antibody를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다.

#### 통계처리

본 연구의 모든 실험분석 결과는 각 실험군의 평균과 표준 오차로 계산하였고, ANOVA로 분석 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군들의 평균값간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

## 결 과

#### 라이코펜에 의한 DNA fragmentation

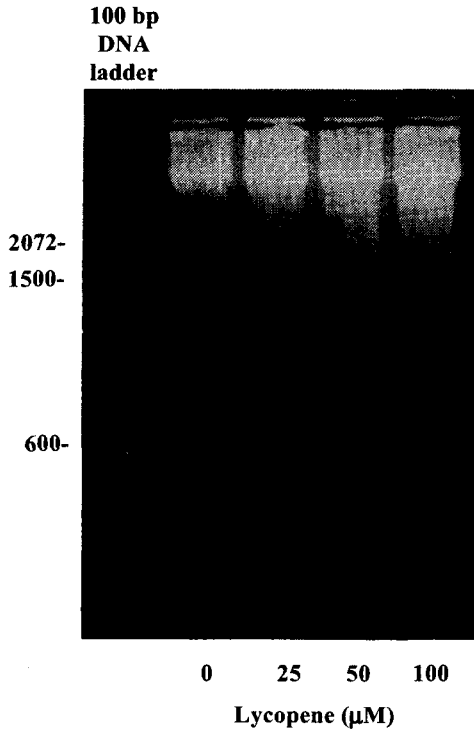
라이코펜이 세포사멸을 유도하는지 알아보기 위해 DNA fragmentation을 조사한 결과(Fig. 1), 라이코펜 농도가 증가할수록 DNA laddering이 현저하게 나타난 것을 관찰하였다.

#### 라이코펜이 IGF-1R signaling에 미치는 영향

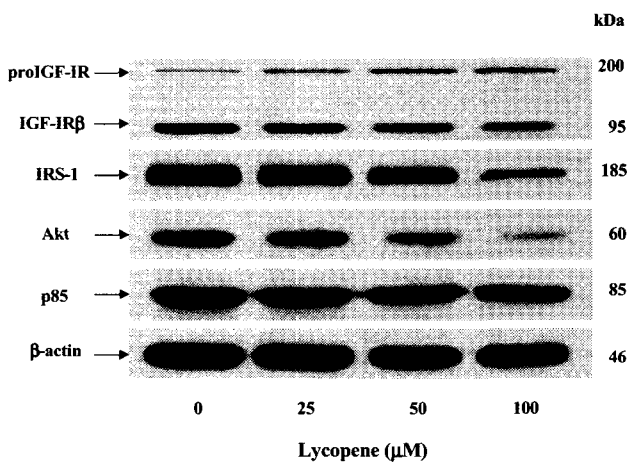
라이코펜의 세포 사멸효과가 IGF-IR의 신호전달에 변화를 초래하여 일어나는 것인지를 살펴보기 위해 라이코펜이 IGF-IR의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 IGF-IR의 신호전달 경로중의 하나인 IRS-1과 그 아래 신호전달 단계에 발현되는 단백질인 PI3K와 Akt의 발현에 라이코펜이 미친 영향을 조사하였다. 그 결과 라이코펜 농도가 증가할수록 IGF-IR $\beta$ , IRS-1, Akt 단백질의 발현이 유의적으로 감소하였고, PI3K도 약간 감소하였다. 반면 IGF-IR의 전구체(precursor) 수준은 증가하였다(Fig. 2).

라이코펜에 의한 암세포증식억제에 IGF-I이 미치는 영향을 보기 위하여 100  $\mu$ M의 라이코펜과 10 nM의 IGF-I을 첨가하여 2일 동안 배양하였다. 살아있는 세포수는 라이코펜 100  $\mu$ M 첨가시 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 라이코펜을 첨가해주지 않고 IGF-I만을 첨가해준 경우 유의적으로 증가하였다. 라이코펜과 IGF-I을 함께 첨가해준 경우에는 라이코펜만 첨가해준 군과 비교해 유의적인 차이가 없었다. 즉 IGF-I은 암세포증식을 증가시켰고 라이코펜은 암세포증식을 억제하였는데, 이 둘을 함께 첨가해주면 라이코펜에 의한 세포증식억제 효과가 IGF-I에 의해서 회복되지 않았다(Fig. 3).

리셉터 타이로신 카이네이즈(tyrosine kinase)는 리간드

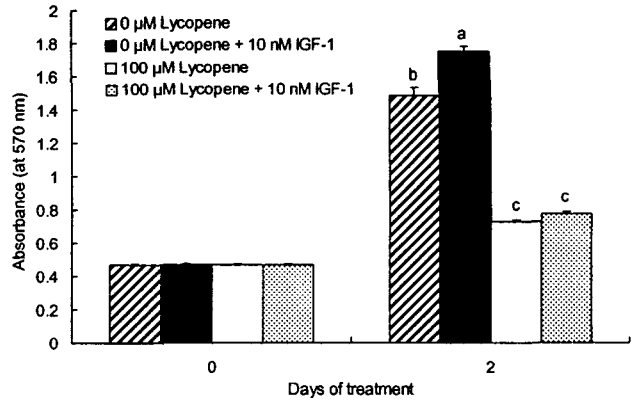


**Fig. 1. Effect of lycopene on apoptosis of HT-29 cells.** HT-29 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^6$  cells/dish with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayers were serum-starved for 24 hours. Cells were then treated with 0, 25, 50, or 100  $\mu$ M lycopene for 3 days. Genomic DNA was isolated, electrophoresed on 2% agarose gels (50  $\mu$ g/lane), and visualized by ethidium bromide staining.



**Fig. 2. Expression of IGF-IR $\beta$ , IRS-1, Akt, and the p85 regulatory subunit of PI3K proteins in HT-29 cells.** HT-29 cells were plated, serum-starved, and treated with lycopene as described in Fig. 1. Cells were lysed in lysis buffer. Total cell lysates (50  $\mu$ g protein) were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

에 의해 활성화되어 타이로신 잔기가 인산화된다. 라이코펜이 IGF-IR 타이로신 인산화에 영향을 미치는지 알아보고 IGF-IR와 결합하여 활성화되는 세포 내 단백질에 미치는 라이코펜의 영향을 조사하기 위해 세포를 0 또는 100  $\mu$ M 라이

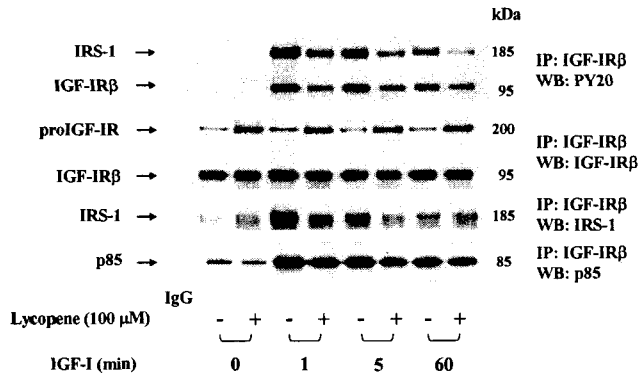


**Fig. 3. Effect of lycopene and IGF-I on viable HT-29 cell numbers.**

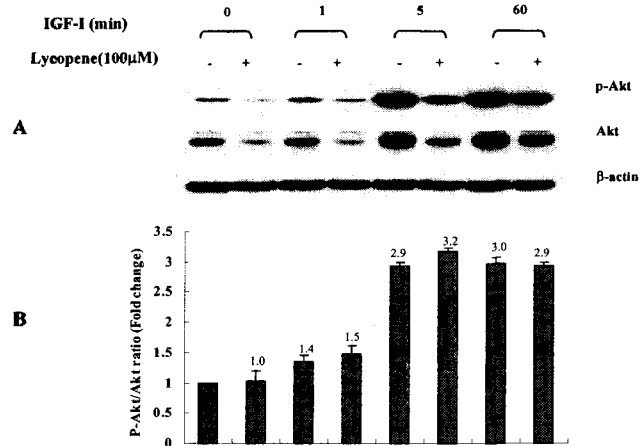
Cells were seeded in 24-well plates at a density of 50,000 cells per well and serum starved as described in Fig. 1. Cells were then treated with or without 100  $\mu$ M lycopene and/or 10 nM IGF-I for 2 days, and viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. Comparisons between different groups that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

코펜이 함유된 배지에서 4일간 배양하고 0, 1, 5, 60분 동안 IGF-I을 첨가하여 incubation 한 후 lysate를 만들어 anti-IGF-IR antibody를 첨가하여 immunoprecipitation 하였다. Anti-phosphotyrosine(PY20) antibody로 immunoblot 분석한 결과 IGF-I을 처리해 준 후 IRS-1과 IGF-IR  $\beta$ -subunit 인 것으로 기대되어지는 185 kDa과 95 kDa의 분자량을 가진 단백질의 tyrosine 잔기의 인산화가 증가했다. 이런 인산화의 증가는 IGF-I 처리 후 1분 일 때 가장 현저했으며 5분까지도 signal이 강하다가 60분에는 이보다는 약해지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 라이코펜에 의해 이 인산화된 단백질의 수준이 감소되었다. IGF-I 처리 후 1분에 IGF-IR $\beta$ 에 결합하는 IRS-1의 양은 현저하게 증가하였고 5분, 60분에는 결합이 감소하였다. 라이코펜은 IGF-IR $\beta$ 에 결합하는 IRS-1의 양을 감소시켰다. PI3K의 p85 regulatory subunit도 IGF-IR $\beta$ 와 같이 coimmunoprecipitation 되었고 IGF-I에 의해 그 결합이 증가되었는데, IGF-I 첨가 후 1분 동안 incubation 했을 때 그 증가효과가 가장 컸고 그 후에는 그 효과가 감소하는 경향이였다. IGF-IR $\beta$  항체에 의해 coimmunoprecipitate된 p85도 라이코펜에 의해 감소되었다(Fig. 4).

PI3K가 활성화되면 이것은 Akt의 활성을 유도한다. 본 연구에서는 anti-phosphoserine473-Akt(p-Akt) antibody를 사용하여 인산화된(즉 활성화된) Akt의 수준과 anti-Akt antibody를 사용하여 Akt의 수준을 측정하였고 상대적인 fold change를 densitometer로 측정하였다. IGF-I 처리 시간에 따른 Akt의 인산화를 Fig. 5에 나타내었다. p-Akt/Akt 비는 10 nM의 IGF-I으로 5분 또는 60분 incubation했을 때 2.9~3.2 배 증가하여 IGF-I에 의해 Akt의 인산화가 촉진됨을 알 수 있었다. 라이코펜은 Akt와 pAkt의 수준을 억제하였는데, pAkt의 수준 감소는 Akt 단백질의 감소 때문인 것 같다.



**Fig. 4. Effect of lycopene on IGF-I-induced tyrosine phosphorylation of IGF-IRβ in HT-29 cells.**  
 Cells were plated and cultured as described in Fig. 1 and treated for 3 day with or without 100 μM lycopene. IGF-I (10 nM) was added for 0-60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates (1 mg of total protein) were incubated with anti-IGF-IRβ antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with IGF-IR. The resulting proteins were analyzed by Western blotting analysis with their relevant antibodies.



**Fig. 5. Lycopene inhibits Akt expression thereby reducing phosphorylated Akt.**  
 Cells were cultured and treated, and lysed as described in Fig. 4. Total lysates were assayed for Western immunoblot analysis utilizing the indicated antibodies. A, Photograph of chemiluminescent detection of the representative blots. B, Quantitative analysis of the Western blots is shown. Each bar represents the mean ± SEM (n=3).

### 고찰

암은 현재 지구상의 최대 사인이다. 유전자, 나이, 생활습관, 식이요인, 성장인자가 암의 주요 위험인자로 작용하며, 특히 암의 50% 이상이 식이와 관련된 것으로 보고되고 있다(24). 산화적인 스트레스가 암과 심혈관계 질환과 매우 큰 관련이 있으며, 식이요인 중에 항산화효과를 가진 물질에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 라이코펜은 지구상에 존재하는 600여 가지의 카로티노이드 중의 하나로 이것은 토마토, 수박, 자몽 등의 붉은색 색소에 주로 존재한다. 이 물질은

오랫동안 식품 중의 색소로서의 의미만 크게 부각되어왔지만, 최근에 암과 동맥경화 같은 만성질환을 경감시키는 효과가 있음이 밝혀졌다. Giovannucci(8)는 라이코펜에 관한 역학과 임상 논문 72개를 고찰한 결과 이중 57개 논문에서 라이코펜과 암 사이에 음의 상관관계가 있었고 35개의 논문은 통계적으로 유의성이 있었다고 밝혔다.

라이코펜이 암 예방에 효과가 있다는 역학조사 결과에도 불구하고, 실제 그 역할에 대해서는 알려진 바가 적다(25). 토마토나 토마토 제품의 섭취와 지질, 단백질, DNA에 대한 산화적 손상에 관한 연구가 있었고(26-28) 최근에는 라이코펜이 cell cycle progression을 방해함으로써 유방암, 상피세포암종의 증식을 억제한다는 보고가 있었으나(29,30) 아직 라이코펜이 어떤 기전에 의해 항암효과를 가지는지 정확하게 밝혀지지 않았다.

Fig. 1서 보는 바와 같이 라이코펜은 인간의 대장암세포인 HT-29 세포에서 세포사멸을 촉진하였다. 이것은 라이코펜의 암세포증식 억제에 세포사멸을 통해 일어남을 의미한다. 배지에 IGF-I을 첨가해주면 세포증식이 유의적으로 증가했다(Fig. 3). 그러나 IGF-I을 라이코펜과 함께 첨가하면 IGF-I의 세포증식 촉진 효과를 거의 억제하는 것을 볼 수 있었다. 이것은 라이코펜이 IGF-I의 작용을 억제함을 증명해주는 것이다.

본 연구에서는 라이코펜이 HT-29 세포에서 IGF-IR signaling pathway를 방해하는 것을 밝혀냈다. 라이코펜 농도가 증가할수록 IGF-IRβ와 IRS-1 단백질의 발현이 감소했고(Fig. 2) 세포를 IGF-I을 넣고 1분~60분 동안 incubation 시켜 자극해도 라이코펜은 HT-29 세포의 인산화된 두 단백질의 수준을 감소시켰다(Fig. 4). 즉 라이코펜에 의한 IGF-IRβ와 IRS-1 단백질의 감소는 이들 단백질의 인산화 감소로 연결되었다. IRS-1은 185 kDa의 단백질로 인슐린과 IGF-I stimulation시 타이로신 잔기가 인산화되는 intracellular tyrosine kinase 중의 하나이다. 본 연구에서는 IGF-IRβ에 결합된 IRS-1 또는 PI3K의 양이 라이코펜에 의해 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4). 이것 역시 라이코펜에 의한 IGF-IRβ, IRS-1, PI3K 단백질의 감소 때문인 것으로 보인다. 따라서 라이코펜이 IGF-IR pathway에 속하는 단백질들의 발현 자체를 감소시키는 것이 세포가 IGF에 반응할 수 있는 능력을 감소시키는 원인의 하나가 되는 것 같다. 이 때문에 exogenous IGF-I을 첨가하여 세포를 배양했을 때 라이코펜의 세포 증식 억제 작용을 감소시킬 수 없었던 것 같다(Fig. 3). HT-29 세포는 IGF-II를 생성하고 이 endogenous IGF-II가 autocrine mechanism을 통해 세포 증식을 촉진한다고 알려져 있다(30). 따라서 라이코펜에 의한 IGF-IR signal의 억제는 이 세포의 IGF-II autocrine loop을 방해하여 apoptosis가 일어나는 원인이 되는 것 같다. 하지만 본 연구에서 라이코펜에 의한 IGF-II나 IGF-binding의 생성에 미치는 영향은 조사하지 않았다.

Karas 등(31)은 라이코펜에 의한 IGF-IR 활성의 억제가 IRS-1 수준의 감소, 결합체 수 감소, 또는 결합체 친화력 감소 등이 원인이 아니라 세포막에 결합된 IGFBP-3가 IGF-IR 기능을 억제하는 역할을 하기 때문이라고 했다. 본 연구 결과에 의하면 IGF-IR 단백질 감소가 라이코펜에 의한 IGF-IR signal의 감소의 원인중의 하나로 보인다. 그러나 라이코펜에 의한 인산화된 IGF-IR의 수준의 감소가 IGF-IR 단백질 수준의 감소보다 더 현저하였다(Fig. 4). 이 결과는 라이코펜에 의한 IGF-signaling의 억제는 IGF-IR 단백질 감소뿐만이 아니고 라이코펜이 직접적으로 IGF-IR의 기능(autophosphorylation)을 억제하기 때문인 것 같다. 라이코펜이 IGFBP의 작용에 미치는 영향, 그리고 이에 의해 초래되는 IGF-IR의 기능의 변화는 본 연구에서 수행하지 않았다.

Akt는 PI3K의 downstream target으로써 PI3K와 매개된 세포사멸억제 작용에서 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 라이코펜이 Akt 단백질의 발현을 억제함을 볼 수 있었다(Fig. 2). 10 nM의 IGF-I으로 처리해주었을 때는 5분 또는 60분에 p-Akt/Akt의 비가 3배정도 증가했다(Fig. 5). 그러나 라이코펜은 이 비율에 영향을 미치지 않았다. 이것도 라이코펜이 Akt 단백질 수준을 감소시킴으로써 인산화된 Akt의 수준의 감소를 가져오기 때문인 것 같다.

본 연구에서는 라이코펜이 HT-29 세포의 IGF signaling을 억제하고 apoptosis를 유도하는 것을 관찰하였다. 가까운 장래에 라이코펜이 어떤 경로를 통하여 IGF-I, PI3K, Akt 단백질의 발현을 억제하는지를 밝히는 연구와 라이코펜에 의한 IGFBP의 작용의 변화 여부, 그리고 이에 의해 초래되는 IGF-IR의 기능의 억제 여부를 밝히는 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

선행연구에서 라이코펜이 HT-29 세포의 증식을 억제하는 것을 관찰하였기 때문에 본 연구는 그 기전을 연구하기 위하여 수행되었다. 라이코펜이 HT-29 세포의 사멸을 유도하는지 조사하기 위해서 여러 농도의 라이코펜이 포함된 배지에서 세포를 4일 동안 배양하였다. 라이코펜 농도의 증가에 따라 사멸되는 세포에서 나타나는 특징의 하나인 DNA fragmentation이 증가하는 것을 관찰하였다. Western blot을 수행하여 얻은 결과에 의하면 라이코펜이 IGF-IR, IRS-1, PI3K, Akt와 같은 IGF-IR pathway에 속하는 단백질의 수준을 감소시켰다. IGF-IR의 인산화를 유도하기 위해서 라이코펜이 포함된 배지에서 세포를 배양하고 IGF-I을 첨가하여 0, 5, 10, 60분간 배양한 다음 IGF-IR antibody를 이용하여 immunoprecipitation을 수행하였다. 라이코펜은 IGF-I에 의한 IGF-IR, IRS-1의 인산화와 IGF-IR와 PI3K의 결합을 감소하고 인산화된 Akt를 감소시켰다. 이와 같은 IGF-IR signaling의 억제는 이 대장암세포에 존재하는 IGF-II의 autocrine

loop을 억제하는 원인이 될 수 있어, 라이코펜의 암세포증식을 억제하는 기전 중의 하나가 될 수 있다. 라이코펜은 토마토와 그 가공품에 많이 존재하는 물질로 자연적인 식사를 통해 많이 섭취할 수 있는 물질이다. 라이코펜의 항암 기전을 밝혀냄으로써 미래 암예방과 치료를 위한 중요한 기능성 영양소를 생산할 수 있는 기초를 마련해줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대 실버생물산업기술연구센터(R12-2001-047-02004-0)와 중소기업청의 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Van Poppel G. 1993. Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur J Cancer* 29A: 1335-1344.
2. Hennekens CH, Burning JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B. 1996. Lack of effect of long-term effect of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1145-1149.
3. Greenburg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman DH, Beck GJ. 1994. Clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 331: 141-147.
4. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR. 1996. Effects of a combination of  $\beta$ -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1150-1155.
5. Zhang SM, Tang GW, Russell RM, Mayzel KA, Stampfer MJ, Willett WC, Hunter DJ. 1997. Measurement of retinoids and carotenoids in breast adipose tissue and a comparison of concentrations in breast cancer and control subjects. *Am J Clin Nutr* 66: 626-632.
6. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1767-1776.
7. Michaud DS, Feskanich D, Rimm EB, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Giovannucci E. 2000. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am J Clin Nutr* 72: 990-997.
8. Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 59: 181-184.
9. Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahov T, Levy J, Sharoni Y. 1999. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer* 33: 105-112.
10. Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, Sekine K, Ota T, Asamoto M, Murakoshi M, Nishino H, Nir Z, Tsuda H. 1997. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett* 120: 15-22.
11. Sharoni Y, Giron E, Rise M, Levy J. 1997. Effects of lycopene enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-

- induced rat mammary tumors. *Cancer Detect Prev* 21: 118-123.
12. Narisawa T, Fukaura Y, Hasebe M, Ito M, Aizawa R, Murakoshi M, Uemura S, Khachik F, Nishino H. 1996. Inhibitory effects of natural carotenoids,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett* 107: 137-142.
  13. Jung JI, Khachik F, Kim EJ, Park JHY. 2002. Lycopene inhibits cell growth and decreases the level of ErbB2 and ErbB3 in human colon cancer HT-29 cells. Abstract No 735.2 presented at Experimental Biology 2002, New Orleans, Louisiana, USA.
  14. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163.
  15. Alessi DR, Cohen P. 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8: 55-62.
  16. Vanhaesebroeck B, Leevens SJ, Panayotou G, Waterfield MD. 1997. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272.
  17. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J. 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279: 563-566.
  18. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M. 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor I and risk of breast cancer. *Lancet* 351: 1393-1396.
  19. Guo Y, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. 1992. Characterization of insulin like growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102: 1101-1108.
  20. Oh YS, Kim EJ, Schaffer BS, Kang YH, Binderup L, MacDonald RG, Park JHY. 2001. Synthetic low-calcaemic vitamin D<sub>3</sub> analogues inhibit secretion of insulin-like growth factor II and stimulate production of insulin-like growth factor-binding protein-6 in conjunction with growth suppression of HT-29 colon cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 183: 141-149.
  21. Khachik F, Steck A, Niggli US, Pfander H. 1998. Partial synthesis and structural elucidation of the oxidative metabolites of lycopene identified in tomato paste, tomato juice, and human serum. *J Agr Food Chem* 46: 4874-4884.
  22. Goh ELK, Pircher RJ, Lobie PE. 1998. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilized the microtubule network and protects against colchicin-induced apoptosis. *Endocrinology* 139: 4364-4372.
  23. Denizot F, Lang R. 1986. 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.
  24. Williams GM, Williams CL, Weisburger JH. 1999. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. *Toxicol Sci* 52 (Suppl): 72-86.
  25. Agarwal S, Rao AV. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 163: 739-44.
  26. Agarwal S, Rao AV. 1998. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids* 33: 981-984.
  27. Rao AV, Agarwal S. 1998. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer* 31: 199-203.
  28. Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first result of a human intervention trial with carotenoids-rich foods. *Carcinogenesis* 18: 1847-1850.
  29. Nahum A, Hirsch K, Danilenko M, Watts CKW, Prall OWJ, Levy J, Sharoni Y. 2001. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endothelial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27<sup>Kip1</sup> in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene* 20: 3428-3436.
  30. Pommier GJ, Garrouste FL, el Atiq F, Roccabianca M, Marvaldi JL, Remacle-Bonnet MM. 1992. Potential autocrine role of insulin-like growth factor II during suramin-induced differentiation of HT29-D4 human colonic adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 52: 3182-3188.
  31. Karas M, Amir H, Fishman D, Danilenko M, Segal S, Nahum A, Koifmann A, Giat Y, Levy J, Sharoni Y. 2000. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer* 36: 101-111.

(2003년 1월 6일 접수; 2003년 3월 3일 채택)