

Sulforaphane에 의한 HeLa 인체자궁경부암세포의 증식 억제 기전 연구

박성영¹ · 배송자¹ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과, ¹신라대학교 자연과학대학 식품영양학과 및 마린바이오산업화지원센터

Received April 19, 2005 / Accepted May 17, 2005

Anti-proliferative Effects of the Isothiocyanate Sulforaphane on the Growth of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells. Soung Young Park¹, Song-Ja Bae¹ and Yung Hyun Choi*. *Department of Biochemistry, Donggeui University Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Silla University and Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries, Busan 617-736, Korea* – Sulforaphane, an isothiocyanate derived from hydrolysis of glucoraphanin in broccoli and other cruciferous vegetables, was shown to induce phase II detoxification enzymes and inhibit chemically induced mammary tumors in rodents. Recently, sulforaphane is known to induce cell cycle arrest and apoptosis in human cancer cells, however its molecular mechanisms are poorly understood. In the present study, we demonstrated that sulforaphane acted to inhibit proliferation and induce morphological changes of human cervical carcinoma HeLa cells. Treatment of HeLa cells with 10 μ M or 15 μ M sulforaphane resulted in significant G2/M cell cycle arrest as determined by flow cytometry. Moreover, 20 μ M sulforaphane significantly induced the population of sub-G1 cells (9.83 fold of control). This anti-proliferative effect of sulforaphane was accompanied by a marked inhibition of cyclin A and cyclin-dependent kinase (Cdk)4 protein and concomitant induction of Cdc2, Cdk inhibitor p16 and p21. However, sulforaphane did not affect the levels of cyclooxygenases and telomere-regulatory gene products. Although further studies are needed, the present work suggests that sulforaphane may be a potential chemopreventive/chemotherapeutic agent for the treatment of human cancer cells.

Key words – sulforaphane, HeLa cells, cell cycle

십자화과 식물에서 많이 발견되는 isothiocyanates는 -N = S = S 그룹으로 존재하며 다양한 실험동물에서 항암효과가 뛰어난 것으로 알려져 있는데[1,31], 이들 식물들은 myrosinase를 통해 가수분해 될 때 sulforaphane이란 물질로 전환되는 전구체인 glucosinolate glucoraphanin을 높은 농도 함유한다[27]. 특히 브로콜리에 존재하는 glucosinolate로부터 얻어지는 isothiocyanate 중에서 sulforaphane [1-isothiocyanato (4R)-(methylsulfanyl)butane: CH₃S(O)(CH₂)₄-N=C=S]는 강력한 항암효과를 가지며, 역학적 조사를 포함한 다양한 선행 연구에서 androgen 비 의존적으로 성장하는 전립선 암세포의 증식을 억제하는데 효과가 있었다는 연구가 발표된 후 항암 및 암예방 가능성 소재로서 많은 관심을 모으고 있다[21,23]. 아울러 sulforaphane은 발암 억제에 중요한 역할을 하는 제2상 효소(phase 2 enzyme)를 활성화하여 발암물질을 세포내에서 제거하는 효과를 가지는 것으로 알려져 있다[2,5].

한편 세포주기에 관한 개념은 20세기 이전에 광학 현미경의 관찰을 통한 간기 및 유사 분열기 세포들의 구별이 가능해진 후, 1995년에 Swift와 Howard에 의해 G1 (Gap 1), S (DNA 합성기), G2 (Gap 2) 및 M (유사분열기)기에 대한 정

의가 내려지면서 성립되었다. 그 후 1983년 세포주기조절의 양성인자인 cyclin이 동정되었으며, Hunt, Ruderman 및 공동 연구자들은 cyclin의 합성, 인산화 및 분해 연구를 통하여 이들이 전 세포주기에 걸쳐 매우 다양하게 존재한다는 것을 발견하였다[24,28]. 그 후 세포주기 특이적인 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 기능이 세포주기 진행에 필수적임이 밝혀졌고, 이것이 cyclins에 의해 활성화된다는 것도 알려지게 되었다[6,24]. 세포주기에서 G1기의 진행과 G1→S 전이는 D-type cyclins와 이들과 결합하는 Cdk4/Cdk6, 그리고 cyclin E와 결합하는 Cdk2에 의해서 조절된다[24,28]. Cdk2가 cyclin A 다시 결합하여 S기를 조절하는 동안 G2→M의 전이가 cyclin A, B와 결합하는 Cdc2에 의해서 결정되어진다[7,9]. 세포주기 조절에서 중요한 역할을 하는 Cdks의 활성은 Cdk inhibitors (CKIs)에 의해서도 조절되어지는데, 포유동물 세포에서 CKIs는 CIP/KIP 군(p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} 등)과 INK4 군(p16^{INK4A}, p15^{INK4B} 등)으로 구별된다[6,10]. INK4 군은 Cdk4/Cdk6와 결합하여 cyclin D와의 complex 형성을 억제하고, CIP/KIP 군은 여러 종류의 보다 다양한 Cdks와의 결합을 통하여 cyclin/Cdk complex이 활성 억제를 통하여 세포주기 특이적인 증식의 억제 및 apoptosis에 의한 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 세포주기 조절관점에서 특정 후보물질의 암세포 증식 억제 현상의 규명은 항암제의 개발이나, 후보물질의 항암작용 규명에 필수적인 과정으로 인식되어지고 있다.

***Corresponding author**

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

Sulforaphane의 항암작용에 대한 최근의 연구 결과들에 의하면 sulforaphane은 다양한 인체 암세포에서 세포주기 진행과정의 G2/M기를 선택적 교란함으로써 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[2,14,18,20,22,25]. 아울러 이러한 G2/M arrest는 apoptosis 유발로 연결되면서 암세포의 생존을 억제하는 것으로 보고 되어져 오고 있다[14,20,22, 25]. 그러나 세포주기 조절과 연관된 연구의 대부분이 극히 최근에 이루어졌고, 아직도 암세포주의 종류에 따라 항암 기전이 다소 상이하게 보고 되어져 오고 있으므로 다양한 암세포를 대상으로 보다 추가적인 연구가 절실히 요구되어지고 있다.

본 연구에서는 sulforaphane의 항암 기전에 관한 연구가 거의 이루어져 있지 않은 자궁 경부암세포를 선택하여 sulforaphane이 자궁경부암세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 sulforaphane은 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며 10 mM의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20℃에 보관하여 사용하였고, 매회 처리 전 배지에 희석 후 사용하였다. 실험에 사용한 인체 자궁경부암 HeLa 세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, 세포의 배양을 위해 90%의 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위해 적정시간 배양 후 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포 배양용 petridish로 옮겨 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장율의 측정 및 세포형태 변화의 관찰

암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, sulforaphane을 적정 농도별로 처리하고 48시간동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도가 되게 성장배지로 희석하여 분주하고 3시간 동안 배양 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정상 배지에서 배양된 암세포와 sulforaphane이 처리된 배지에서 배양된 세포들의 성장률을 비교하였다. 세포형태 변화 관찰을 위해서는 세포배양용 petridish에 세포를 24시간동안 안정화시킨 다음

sulforaphane을 농도별로 처리하여 48시간동안 배양한 후, 위상차 현미경하에서 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기의 분석

세포주기의 분포도에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하기 위하여 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, 정상 및 sulforaphane이 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들을 buffer solution을 이용하여 두세 번 씻어내고, Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후 Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4℃에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

상기와 동일한 조건으로 준비된 암세포를 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4℃에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV)하에서 확인하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 sulforaphane이 처리된 배지에서 자란 세포들을 수집하여 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4℃에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemilum-

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

| Gene name | | Sequence |
|-----------|-----------|--|
| Cyclin A | Sence | 5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3' |
| | Antisence | 5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3' |
| Cyclin B1 | Sence | 5'-AAG-AGC-TTT-AAA-CTT-TGG-TCT-GGG-3' |
| | Antisence | 5'-CTT-TGT-AAG-TCC-TTG-ATT-TAC-CAT-G-3' |
| Cyclin D1 | Sence | 5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3' |
| | Antisence | 5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3' |
| Cyclin E | Sence | 5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3' |
| | Antisence | 5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3' |
| Cdc2 | Sence | 5'-GGG-GAT-TCA-GAA-ATT-GAT-CA-3' |
| | Antisence | 5'-TGT-CAG-AAA-GCT-ACA-TCT-TC-3' |
| Cdk2 | Sence | 5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3' |
| | Antisence | 5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3' |
| Cdk4 | Sence | 5'-ACG-GGT-GTA-AGT-GCC-ATC-TG-3' |
| | Antisence | 5'-TGG-TGT-CGG-TGC-CTA-TGG-GA-3' |
| Cdk6 | Sence | 5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3' |
| | Antisence | 5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3' |
| p53 | Sence | 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3' |
| | Antisence | 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3' |
| p16 | Sence | 5'-CGG-AAG-GTC-CCT-CAG-ACA-TC-3' |
| | Antisence | 5'-TCA-TGA-AGT-CGA-CAG-CTT-CCG-3' |
| p21 | Sence | 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3' |
| | Antisence | 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3' |
| p27 | Sence | 5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3' |
| | Antisence | 5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3' |
| COX-1 | Sence | 5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CIT-3' |
| | Antisence | 5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3' |
| COX-2 | Sence | 5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3' |
| | Antisence | 5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CIT-3' |
| hTERT | Sence | 5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3' |
| hTR | Sence | 5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3' |
| TEP-1 | Sence | 5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3' |
| | Antisence | 5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CIT-TCT-ACG-C-3' |
| c-myc | Sence | 5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3' |
| GAPDH | Sence | 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3' |
| | Antisence | 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3' |

inoesence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

HeLa 자궁경부암세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향

먼저 인체 자궁경부암 HeLa 세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향을 알아보기 위하여 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 HeLa 세포를 안정화 시킨 후 48시간 동안 배지에 sulforaphane을 적정 농도로 희석하여 처리한 후, MTT assay를 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. Fig.

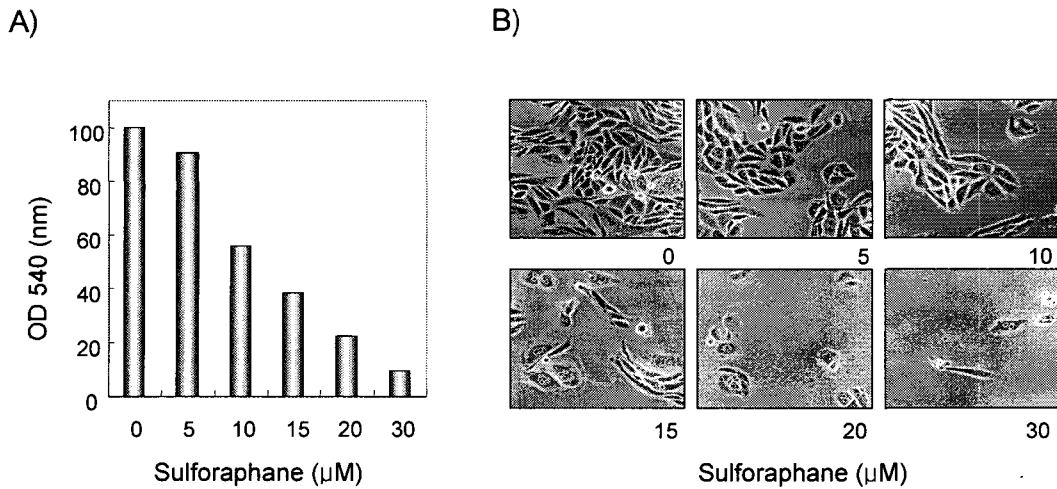


Fig. 1. Anti-proliferative effect and morphological changes of human cervical carcinoma HeLa cells following incubation with sulforaphane. (A) Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of sulforaphane. After 48 h incubation with sulforaphane, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments. (B) Exponentially growing HeLa cells were incubated with sulforaphane for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

1A에 나타난 바와 같이 48시간 동안 정상 배지에서 자란 HeLa 세포에 비하여 sulforaphane이 함유된 배지에서는 sulforaphane의 첨가 농도 의존적으로 세포의 증식이 감소하였음을 알 수 있었다. 즉 10 μM 처리군의 경우 대조군에 비하여 40% 이상 세포증식이 억제되었으며, 20 μM 처리군에서는 약 78% 정도의 세포증식 억제현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 30 μM 처리군에서는 생존율이 10% 정도로 암세포가 정상적인 생존을 하지 못하였음을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 인체 유방암세포, 전립선암세포, 대장암세포, 췌장암세포 및 악성 백혈구 등에서 관찰된 최근의 선행연구들에서 관찰된 경우와 유사한 경향성을 보여주는 것으로[2,14,18,20,22,25], sulforaphane은 자궁경부암세포에서도 다른 암세포에서처럼 비슷한 증식억제 효능이 있음을 알 수 있었다. 아울러 sulforaphane의 처리가 암세포의 형태에 어떠한 영향을 주는 지에 대해 알아보기 위하여 여러 농도의 sulforaphane을 48시간동안 처리 후 위상차 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 1B에 나타난 바와 같다. 즉 sulforaphane 처리 농도 의존적으로 현저한 세포밀도의 감소현상과 형태적인 변화를 관찰 할 수 있으며, sulforaphane의 처리 농도 증가에 따라 세포막의 shrinking 및 blebbing 현상도 관찰할 수 있었고, 처리농도가 높은 경우 cell elongation을 포함하는 dendrite-like structure가 관찰되었다. 따라서 인체 자궁경부암세포의 sulforaphane 처리 농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 sulforaphane 처리에 따른 세포 증식 억제와 부합되는 결과임을 알 수 있었다.

세포주기 분포에 미치는 sulforaphane의 영향

세포 증식과 연관된 세포주기의 조절은 각 주기별 관여하

는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화 불활성이 결정되어진다[24,28]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다[6,24]. 따라서 sulforaphane의 처리에 의한 HeLa 자궁경부암세포의 성장억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 세포주기 분포에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 sulforaphane이 처리된 배지에서 48시간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2 및 Table 2에 나타난 바와 같다. 즉 sulforaphane이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포의 경우 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 66.55%, 6.82% 및 21.86% 정도였다. 그리고 10 μM 및 15 μM 처리군의 경우 S기 및 G2/M기의 빈도는 대조군과 유사하였으나, apoptosis 유발에 해당되는 sub-G1기에 해당되는 빈도가 대조군의 5.06%에 비하여 각각 22.18% 및 31.40%로 매우 증가되었다. 따라서 sub-G1기에 속한 세포를 제외한 나머지 세포들을 고려할 경우, sulforaphane의 처리에 따라 G1기에 속하는 세포의 빈도는 감소된 반면, G2/M기에 속하는 암세포의 빈도가 상대적으로 증가하였음을 알 수 있었다. 그리고 20 μM sulforaphane의 처리군의 경우 약 50%에 해당되는 세포가 sub-G1기에 속하여 sulforaphane 처리에 따른 암세포의 증식억제는 세포주기 G2/M arrest와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. HeLa 자궁경부암세포에서 관찰된 이러한 현

상은 췌장암세포, 유방암세포, 대장암세포, 전립선암세포, 흑색종세포 등에서 나타난 결과와 매우 유사하였다[14,20,22,25].

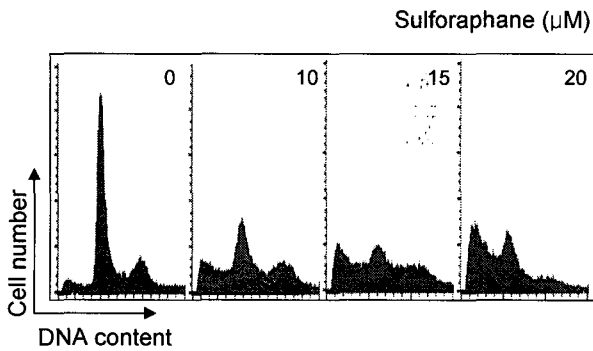


Fig. 2. DNA-fluorescence histogram of human cervical carcinoma HeLa cell nuclei after treatment with sulforaphane. Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of sulforaphane. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of human cervical carcinoma cell line HeLa cultured in the presence or absence of various concentrations of sulforaphane. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with sulforaphane.

| Dose (μM) | % of cells | | | |
|-----------|------------|-------|------|-------|
| | Sub G1 | G1 | S | G2/M |
| 0 | 5.06 | 66.55 | 6.82 | 21.86 |
| 10 | 22.18 | 44.24 | 6.66 | 27.37 |
| 15 | 31.40 | 37.49 | 6.97 | 24.62 |
| 20 | 49.74 | 36.36 | 4.15 | 10.15 |

Cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

일반적으로 진핵세포에서 세포주기의 진행을 위해서는 세포주기 특이적인 cyclin의 발현 증가가 우선적으로 이루어져야한다. 즉 mid G1에서 D-type cyclin (cyclin D1, D2 및 D3)의 발현을 필요로 하며, late G1에서 S기로의 진입을 위해서는 cyclin E의 발현이 증가되어야한다[24,28]. 그리고 S기에서 G2기로의 진입 및 G2기와 M기 진행 동안에는 각각 cyclin A 및 B-type cyclin (cyclin B1 및 B2)의 발현이 증가되어야한다. 그리고 이들 cyclin들은 특정 Cdks와 특이적인 결합에 의하여 cyclin/Cdk complex를 형성하여 세포주기진행을 조절한다[6,24]. 특히 Cdk2는 cyclin A와 결합하여 S기와 G2기 동안 역할을[7,9] 하는 반면 Cdc2는 cyclin B1과 결합하면 핵막의 histone H1과 lamin이 인산화에 의해 kinase 활성이 증가하여 핵막의 붕괴 및 염색체의 재배열이 일어나서 M기로 진행이 된다[15,19]. 따라서 HeLa 자궁경부암세포에서 sulforaphane의 처리에 따른 세포주기 조절관련 기전을 조사하기 위하여 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향을 RT-PCR 및 Western immunoblotting 법으로 먼저 조사하였다. Fig. 3A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 cyclins 중, cyclin B1을 제외한 다른 cyclin은 전사 수준에서 sulforaphane 처리에 따라 농도 의존적으로 다소 감소되는 경향을 보였으나, 단백질 수준에서의 발현은 sulforaphane 처리에 의하여 cyclin A의 발현이 다른 cyclin에 비하여 매우 억제되었음을 알 수 있었다. 그리고 Cdks의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4A 및 B에서 알 수 있듯이, Cdk4가 sulforaphane 처리 농도의존적으로 강하게 전사 및 번역 수준에서 발현이 감소되었으나, Cdk2 및 Cdk6의 경우 sulforaphane 처리에 따른 유의적인 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 Cdc2의 경우 대조군에 비하여 sulforaphane 처

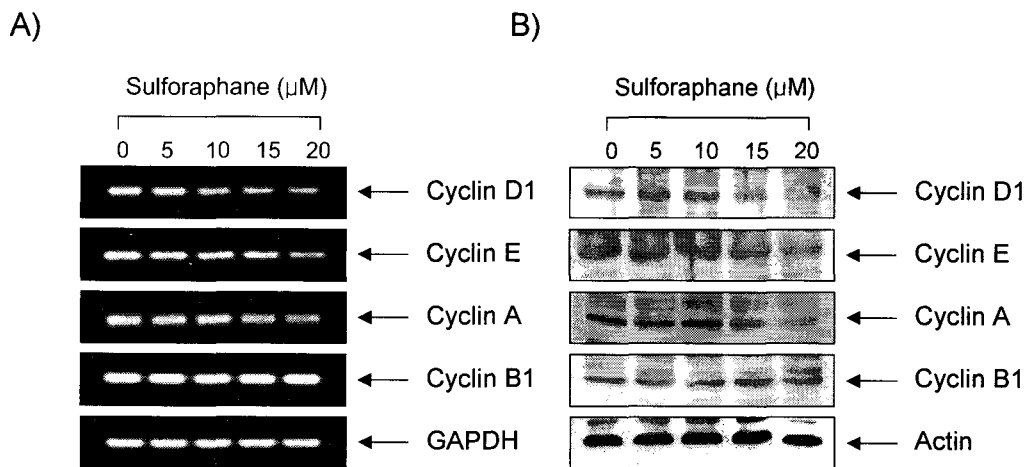


Fig. 3. Effects of sulforaphane treatment on the levels of cyclins in human cervical carcinoma HeLa cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

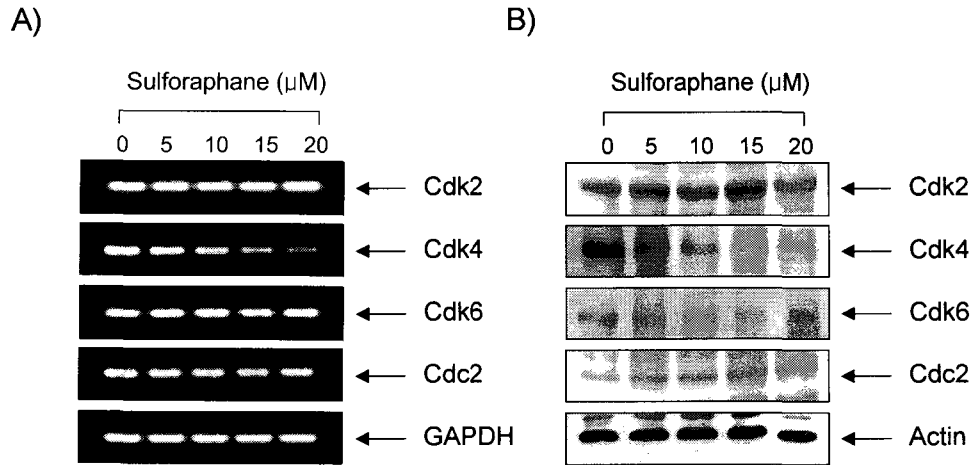


Fig. 4. Effects of sulforaphane treatment on the levels of Cdks in human cervical carcinoma HeLa cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

리군에서 전체적으로 단백질 발현이 오히려 다소 증가되었음을 알 수 있었다. 최근 Jackson과 Singletary [14]는 MCF-7 인체 유방암세포에서 sulforaphane의 처리에 의한 G2/M arrest 유발은 cyclin B1의 발현 증가에 따른 histone H1의 인산화 증가와 연관성이 있다고 보고한 바 있었다. 그러나 PC-3 인체 전립선암세포에서 sulforaphane 처리에 따른 G2/M arrest에서는 오히려 cyclin B1, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현이 감소되면서 Cdc2의 인산화 증가와 연관성이 있는 것으로 보고된 바 있다[25]. 특히 sulforaphane 처리에 따른 Cdc2의 인산화 증가현상은 인체암세포에서 뿐만 아니라 쥐의 유방암 세포에서도 관찰된 현상이다[13]. 따라서 HeLa 세포에서 Cdc2의 단백질 발현이 sulforaphane 처리로 다소 증가되었던 것은 아마도 sulforaphane에 의하여 Cdc2 단백질의 인산화 유도와 연관되었을 가능성이 클 것으로 추정되어진다.

p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

Cdk inhibitors는 cyclin/Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데[6,10], 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다[16]. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포의 종류나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있다[3,4,29,30]. 그러나 p16의 경우 일반적으로 G1기 arrest에만 관여하는 것으로 알려져 있으며, p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[6,10]. 따라서 본 연구에서는 sulforaphane의 처리에 의

한 인체 자궁경부암세포의 G2/M기의 억제 유발에 종양 억제 유전자 p53 및 p16, p21 그리고 p27과 같은 Cdk inhibitors들의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 5A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 종양 억제 유전자 p53의 경우 전사수준에서의 큰 변화 없이 10 μM 및 15 μM 처리군에서 부분적인 단백질의 축적 현상을 관찰할 수 있었으나 sulforaphane 처리 농도의 존적으로 발현 자체가 증가하는 것은 아닌 것으로 판단된다. Cdk inhibitor 중에서 p27은 sulforaphane 처리에 의하여 큰 변화가 없었으나, p21의 경우 sulforaphane이 처리된 배지에서 배양된 세포에서 전체적으로 다소 높게 나타났다. 그리고 p16의 경우 단백질의 발현이 다소 증가되어 특히 최고농도 처리군에서는 대조군에 비하여 매우 높은 발현을 보여주었다. 그러나 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 조사된 p53 및 Cdk inhibitor 모두가 전사수준에서는 발현의 양상에 큰 변화 없이 단백질 발현이 sulforaphane 처리에 따라 다소의 차이를 보이는 것으로 보아 아마도 이들 단백질들은 sulforaphane의 처리에 의한 번역 후 다른 기전에 의하여 조절 받을 가능성도 있기 때문에 이에 관한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Prostaglandin 생성 및 telomere 조절인자들의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 계열 물질들은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다[26]. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 cyclooxygenases (COXs) isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능에 관여한다. 반면 COX-2는 성장인자, cyto-

kines, 종양 촉진인자 등의 자극에 의한 유도성 isoform으로서 COX-2의 활성화는 세포성장 촉진을 유발하고 apoptosis를 억제하며 세포의 유동성 및 부착성을 강화시키는 것으로 알려져 있다[26]. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 sulforaphane 처리에 의한 인체암세포의 증식억제가 COX-2의 선택적 발현 억제와 관련이 있는지의 여부를 조사하였다. 상기에서와 동일 조건에서 얻어진 암세포들을 대상으로 COX-1 및 COX-2의

발현에 미치는 β -lapachone의 영향을 조사하였으나, Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 sulforaphane의 처리에 따른 COX-1 또는 COX-2의 선택적 발현 저하 현상을 관찰할 수 없었다. 한편 telomere는 모든 진핵세포의 염색체 말단에 존재하는 간단한 DNA 절편으로서 인간의 경우에는(TTAGGG)_n의 염기서열이 계속 반복되는 구조를 가지고 있으며 비정상적인 DNA 재조합을 억제하며 염색체가 핵막으로 부착되는 것을 돕고, mitotic clock으로서의 기능을 할 것이라는 사실이 밝혀짐에 따라 종양 형성(tumorigenesis)의 이해와 그 예방에 이용될 가능성을 제시해 주고 있으며[8,17], telomere의 손실은 p53의 발현과 세포주기 교란에도 관여를 하는 것으로 알

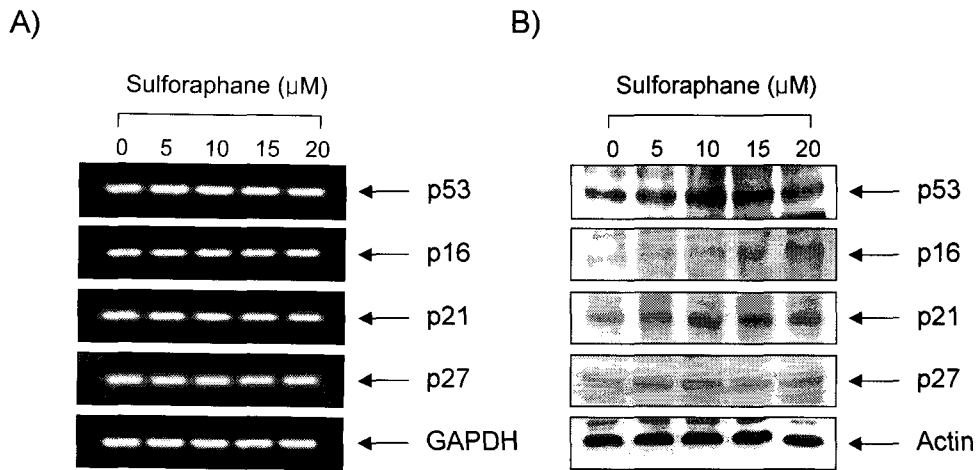


Fig. 5. Induction of Cdk inhibitor p16 and p21 by sulforaphane treatment in human cervical carcinoma HeLa cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

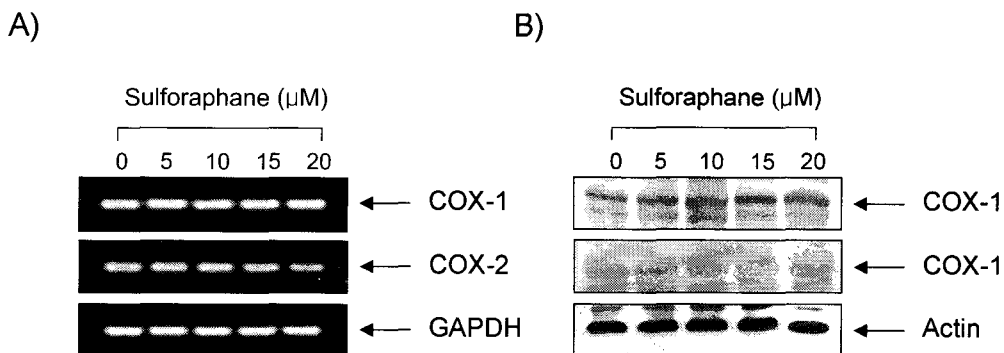


Fig. 6. Effects of sulforaphane on the levels of COXs expression in human cervical carcinoma HeLa cells. (A) After 48 h treatment with sulforaphane, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using COX-1 and COX-2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, and then lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

려져 있다[12]. 따라서 본 연구에서는 sulforaphane의 처리가 이러한 telomere 조절 관련 유전자들의 발현에 영향을 미칠 수 있을지의 가능성을 조사하여 보았다. Fig. 7에서 보여주는 바와 같이 telomere와 관련된 human telomere reverse transcriptase (hTERT), human telomerase RNA (hTR), mammalian telomerase-associated protein-1 (TEP-1), 그리고 transcription control factor인 c-myc 등을 조사해 보았으나, 유의적인 차이점은 관찰할 수 없었다. 이상의 결과에서 sulforaphane의 처리에 의한 HeLa 세포의 증식 억제에는 prostagandin 및 telomere 조절인자들의 발현변화와는 무관함을 알 수 있었다. 그러나 Raw 264.7 murine macrophages를 대상으로 염증유발인자인 lipopolysaccharide에 의한 COX-2의 발현 증가는 sulforaphane의 처리에 의하여 매우 효과적으로 억제되었다는 선행연구의 결과[11]를 고려해 볼때 sulforaphane이 HeLa 세포의 COXs 발현 자체를 조절할 수는 없지만 잠재적인 염증유발 억제 효능이 있는 것으로 추정되어지기 때문에 암세포증식 억제 뿐 만 아니라 정상세포에서 강력한 항암효능이 있을 것으로 생각되어진다.

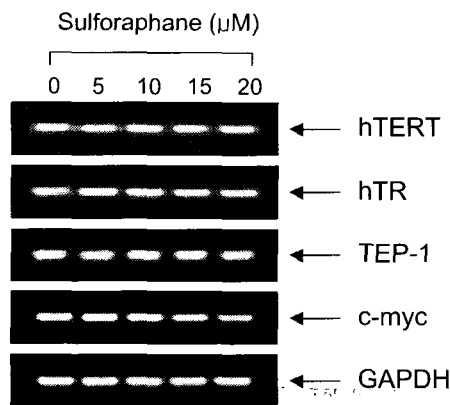


Fig. 7. Effects of sulforaphane on the levels of telomere regulatory genes in human cervical carcinoma HeLa cells. Cells were treated with various concentrations of sulforaphane. After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers described. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

요 약

브로콜리와 같은 십자화과 식물에서 glucoraphanin의 가수분해를 통해 생성되는 isothiocyanate의 일종인 sulforaphane은 강력한 항암효과를 가지며, 역학적 조사를 포함한 다양한 선행 연구에서 androgen 비 의존적으로 성장하는 전립선 암세포의 증식을 억제하는데 효과가 있었다. 최근 연구 결과에 따르면 sulforaphane은 다양한 인체암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유발할 수 있는 것으로 알려지고 있으나, 정확한 분자생물학적 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 본

연구에서는 sulforaphane의 항암작용 기전을 조사하기 위하여 HeLa 인체자궁경부암세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하였다. Sulforaphane의 처리에 의한 HeLa 세포의 증식억제 및 형태적 변형은 세포주기 G2/M arrest 및 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. RT-PCR 및 Western blot 분석 결과, sulforaphane 처리에 의하여 cyclin A 및 cyclin-dependent kinase (Cdk)4 단백질의 발현이 선택적으로 저하되었으며, Cdc2, Cdk inhibitor인 p16 및 p21의 발현은 증가되었다. 그러나 sulforaphane은 cyclooxygenases의 발현이나 telomere 조절에 중요한 역할을 하는 인자들의 발현에는 큰 영향을 주지 못하였다. Sulforaphane의 항암 기전을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 부가적으로 필요하겠지만, 본 연구의 결과들에 의하면 sulforaphane은 강력한 인체암세포의 증식 억제 및 항암작용이 있을 것을 시사하여 준다고 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Ajita, V. S., Dong, X., Karen, L. L., Rajiv, D and Shivendra, V. S. 2004. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth PC-3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis* **25**, 83-90.
2. Chiao, J. W., Chung, F. L., Kancherla, R., Ahmed, T., Mittelman, A and Conaway, C. C. 2002. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **20**, 631-636.
3. Choi, Y. H., Lee, W. H., Park, K. Y and Zhang, L. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 164-173.
4. Datto, M. B., Yu, Y and Wang, X. F. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 28623-28628.
5. Denis, G., Martin, G., Dominique, B., Albert, M., Yves, T and Richard, B. 2004. Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetable. *Cancer Lett.* **203**, 35-43.
6. Elledge, S. J and Harper, J. W. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 847-852.
7. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A and Lamb, N. J. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-1179.
8. Greenwood, M. J and Landsdorpe, P. M. 2003. Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology. *Arch. Med. Res.* **34**, 489-495.
9. Guadagno, T. M., Ohtsubo, M., Roberts, J. M and Assoian, R. K. 1993. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* **262**, 1572-1575.
10. Harper, J. W. 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors.

- Cancer Surv.* **29**, 91-107.
11. Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H and Gerhauser, C. 2001. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **276**, 32008-32015.
 12. Homayoun, V and Sam, B. 1996. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* **31**, 295-301.
 13. Jackson, S. J and Singletary, K. W. 2004. Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis* **25**, 219-227.
 14. Jackson, S. J and Singletary, K. W. 2004. Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J. Nutr.* **134**, 2229-2236.
 15. Krek, W and Nigg, E. A. 1991. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO. J.* **10**, 305-316.
 16. Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A and Xiong, Y. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-2268.
 17. Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriere, M. A., Desmaze, C and Sabatier, L. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 641-656.
 18. Misiewicz, I., Skupinska, K and Kasprzycka-Guttman, T. 2003. Sulforaphane and 2-oxohexyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **10**, 2045-2050.
 19. Ohsumi, K., Katagiri, C and Kishimoto, T. 1993. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science* **262**, 2033-2035.
 20. Parnaud, G., Li, P., Cassar, G., Rouimi, P., Tulliez, J., Combare, L and Gamet-Payrastra, L. 2004. Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutr. Cancer* **48**, 198-206.
 21. Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F. A., Bao, Y., Plumb, G. W., Bacon, J., O'leary, K. A., Kroon, P. A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H and Williamson, G. 2003. Absorption/Metabolism of Sulforaphane and Quercetin and regulation of phase 2 enzymes, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 805-813.
 22. Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M and Hedley, D. W. 2004. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1239-1248.
 23. Shang, J., Vanda, S., Bao, Y., Howie, A. F., Beckett, G. J and Gary, W. 2003. Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis* **24**, 497-503.
 24. Sherr, C. J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
 25. Singh, S. V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A. V., Lew, K. L., Srivastava, S. K., Kamath, R., Brown, K. D., Zhang, L and Baskaran, R. 2004. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J. Biol. Chem.* **279**, 25813-25822.
 26. Surh, Y. J., Chun, K. S., Cha, H. H., Han, S. S., Keum, Y. S., Park, K. K and Lee, S. S. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
 27. Wang, L., Liu, D., Ahmed, T., Chung, F. L., Conaway, H and Chiao, J. W. 2004. Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int. J. Oncol.* **24**, 187-192.
 28. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
 29. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R and Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
 30. Zeng, Y. X and El-Deiry, W. S. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* **12**, 1557-1564.
 31. Zhang, Y., Li, J and Tang, L. 2005. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 70-77.