

Genistein이 유방암예방 활성에 미치는 영향

손윤희 · 김호창 · 남경수*

동국대학교 난치병한양방치료연구센터, 심혈관계질환 천연물개발연구센터 및 의과대학 약리학교실

Effect of Genistein on Chemopreventive Activity of Human Brest Cancer

Yun Hee Shon, Ho Chang Kim, Kyung Soo Nam*

Intractable Diseases Research Center and Cardiovascular Medical Research Center and Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University

Genistein was tested for chemopreventive potential against breast cancer by measuring the effect on proliferation of human breast cancer cells, human placental aromatase activity and cyclooxygenases-2 (COX-2) expression and activity. Genistein inhibited the growth of estrogen-independent MDA-MB-231 human breast cancer cell. However, there is no inhibitory effect of genistein on human placental aromatase activity. The expression of COX-2 was inhibited by genistein in Western blot analysis. Genistein significantly inhibited COX-2 activity at the concentrations of 10 ($p<0.05$), 25 ($p<0.05$) and 50 μ M ($p<0.01$). These results suggest that genistein may have breast cancer chemopreventive potential by inhibiting the growth of human breast cancer cell and expression and activity of COX-2.

Key words : Genistein, aromatase, cyclooxygenase-2, breast cancer chemoprevention

서 론

유방암은 전 세계적으로 매년 약 100만명의 새로운 환자가 발생하며, 서구 여러 나라에서 가장 빈번한 여성 사망의 원인질환 중 하나이다. 우리나라도 식생활 및 생활양식의 서구화, 출산율 및 모유수유 감소, 암환자의 조기발견 증가 등으로 유방암 환자가 수년 동안 지속적으로 증가하고 있고 여성암 중에서 자궁암, 위암 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다. 유방종양은 대부분 estrogen 의존성으로 estrogen이 암세포의 증식을 위해 필수 요인이다. 특히, 폐경이후 estrogen 생성이 유방암 발병과정에 중요한 생물학적 요인으로 증명되었다^{1,2}. Estrogen은 cytochrome P450 효소 복합체인 aromatase에 의하여 세 번의 수산화반응으로 androgen에서 estrogen으로 전환되어 생성되며 aromatase 표현이 유방종양에서 나타나며 종양 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다^{1,3}.

Cyclooxygenase (COX, prostaglandin endoperoxide synthase)는 prostanoids (prostaglandins, prostacyclins 과

thromboxanes) 합성을 위한 주요 효소이다. COX는 두 종류의 isoforms이 있는데, 그 중 하나인 COX-1은 대부분의 조직에서 구성성분으로 표현되어 있고 일반적인 생리기능을 위해 prostaglandin (PG)을 생성하는 것으로 알려져 있다⁴. 그러나 COX-2는 lipopolysaccharide (LPS), tumor promoters, oncogenes, 발암물질, mitogens, 호르몬, 사이토카인과 성장인자와 같은 여러 종류의 자극에 반응하여 유도된다. 또한 COX-2는 유방암, 대장암, 전립선암 등의 고형암에서 과대표현되며 특히 COX-2의 주요 생성물인 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 증가현상은 사람의 유방암과 실험동물의 유선종양의 모델에서 증명되었다^{5,6}. 쥐의 유선종양에서 PGE₂가 유방암의 성장과 전이 및 면역반응 조절 기능을 가지고 있다고 발표되었으며⁷, 높은 농도의 PGE₂는 전이성을 가진 에스트로젠 수용체가 없는 종양과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다^{5,7}. 즉, 많은 유방암세포에서 합성된 PGE₂는 세포간 cAMP 함량을 증가시키고 cAMP는 aromatase 촉진자를 자극하여 estrogen 생합성이 시작된다. 이와 같이 COX-2와 aromatase의 전사적 관계는 유방암 발생에 중요하고, 이에 COX에 의한 PGE₂ 생성은 estrogen 생합성과 estrogen-의존성 유방암에 영향을 미친다.

이에 본 연구에서는 genistein의 유방암세포증식, aromatase

* 교신저자 : 남경수, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 의과대학 약리학교실

· E-mail : namks@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2412

· 접수 : 2005/12/05 · 수정 : 2006/01/20 · 채택 : 2006/02/03

와 COX-2 활성에 미치는 영향을 측정하여 유방암 유발 억제효능을 측정하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

Genistein, RPMI 1640 medium, potassium phosphate buffer (pH 7.4), glycerol, sucrose, dithiothreitol, glucose-6-phosphate, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced tetrasodium salt (β -NADPH), glucose-6-phosphate dehydrogenase, progesterone, bovine serum albumin (BSA), trichloroacetic acid (TCA), activated charcoal, dextran, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 Join Bio-Innovation (JBI)사 (Daegu, Korea), [1β - ^3H (N)]androst-4-ene-3,17-dione은 Amersham Pharmacia Biosciences (Arlington Heights, IL, USA)사 제품을 사용하였다. 기타 시약은 세포 배양용 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. 태반의 aromatase 준비

사람의 태반 조직은 1% KCl과 potassium phosphate buffer로 세척한 후, sucrose, potassium phosphate buffer, dithiothreitol과 NADPH가 포함된 용액에서 균질화시킨 후 원심분리하였다 (800× g, 15분). 그리고 상층액은 10,000× g 에서 15분간 다시 원심분리한 후, 그 상층액은 단백질 정량 후 -70°C에 보관하였다.

3. 유방암세포 증식에 미치는 영향

사람유방암세포인 MDA-MB-231 (estrogen-비의존성) 세포주를 10% FBS나 5% charcoal과 dextran을 처리한 FBS (CDS)가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 96-well plate의 well당 0.5×10^4 cells을 접종시키고 24시간 후에 농도별 시료를 처리하여 2, 4, 6일 동안 배양하였다. 그리고 세포 성장은 MTT assay로 측정하였다.

4. Aromatase 활성 측정

Aromatase 활성은 Thompson과 Siiteri의 방법⁸⁾을 변형하여 실시하였다. 즉, 기질 [1β - ^3H (N)]androst-4-ene-3,17-dione (specific activity 24.7 Ci/mmol) (100 nM), 태반 마이크로솜 (40 μg), progesterone (10 μM), bovine serum albumin (0.1%), potassium phosphate (67 mM, pH 7.4)와 시료를 포함한 반응액 500 μl 를 상온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 12 mM NADPH를 반응액에 넣고 37°C에서 10분간 다시 반응시킨 후 5% TCA로 반응을 중단시켰다. 1,000× g에서 10분간 원심분리 후 동량의 chloroform으로 반응시킨 후 그 상층액은 dextran-charcoal 혼합액에 옮긴 후 원심분리하고 상층액의 radioactivity를 측정하였다.

5. COX-2 효소 활성 측정

MDA-MB-231의 최종수를 2×10^5 cells/ml로 조정하여 12 well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후 0.1% BSA가 포함된

RPMI 1640 배지로 24시간 동안 배양하고, 농도별 시료와 150 nM의 TPA를 처리하여 COX-2를 유도하였다. 이를 30시간 동안 배양한 후 세포의 lysate를 준비하여 COX-2의 발현은 western blot 분석으로 실험하고 COX-2 활성측정은 PGE₂ Biotrak kit (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 PGE₂ 생성 측정으로 실험하였다. 즉, COX-2 활성 측정은 PGE₂ Biotrak kit의 96 well plate에 세포의 lysate인 sample 용액을 50 μl 씩 가한 뒤, 희석한 mouse anti-PGE₂ antibody를 50 μl 씩 넣었다. Peroxidase conjugated second antibody를 50 μl 씩 넣고 상온에서 1시간 배양하였다. 배양 후 washing buffer로 4회 세척하고 기질시약을 150 μl 씩 가한 뒤, 상온에서 30분간 배양하고 1 M H₂SO₄ 용액을 사용하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

6. Western blot 분석

세포 lysate의 단백질은 9% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하고 10% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF)막 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 실온에서 5% non-fat dry milk 용액으로 비특이적 반응을 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 human COX-2 monoclonal antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)로 막을 2시간 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 3회 세척한 뒤, biotinylated-rabbit anti-mouse IgG+A+M (ZYMED Laboratories Inc. South San Francisco, CA, USA)과 2시간 반응시키고 TTBS로 3회 세척하였다. 그리고 alkaline phosphatase (AP) streptavidin을 1시간동안 반응시키고 alkaline phosphatase buffer로 3회 세척하였다. 세척이 끝나면 막을 AP buffer와 혼합한 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT, Roche, Mannheim, Germany)와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 밴드를 확인한 후 증류수로 여러 차례 세척하고 막을 건조시킨 다음 밴드의 두께를 비교하여 COX-2 단백질의 발현 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 유방암세포의 증식에 미치는 영향

Genistein이 estrogen-비의존성 유방암세포인 MDA-MB-231의 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, MDA-MB-231은 estrogen이 포함된 배지에서 genistein 농도 150 μM 에서 2.7%~46.2%의 세포증식 억제가 관찰되었으며 (Fig. 1A), estrogen이 포함되지 않은 배지에서도 genistein 농도 150 μM 에서 농도의존적으로 세포의 증식이 억제되었다 (Fig. 1B). 이러한 genistein의 유방암세포에 대한 성장촉진과 성장저해효과는 genistein이 원래 자연적으로 생성되는 estrogen 즉, phytoestrogen이므로 estrogen receptor를 통해서 세포성장을 억제하거나 또는 자극하는 작용에 영향을 미치는 것으로 보인다.

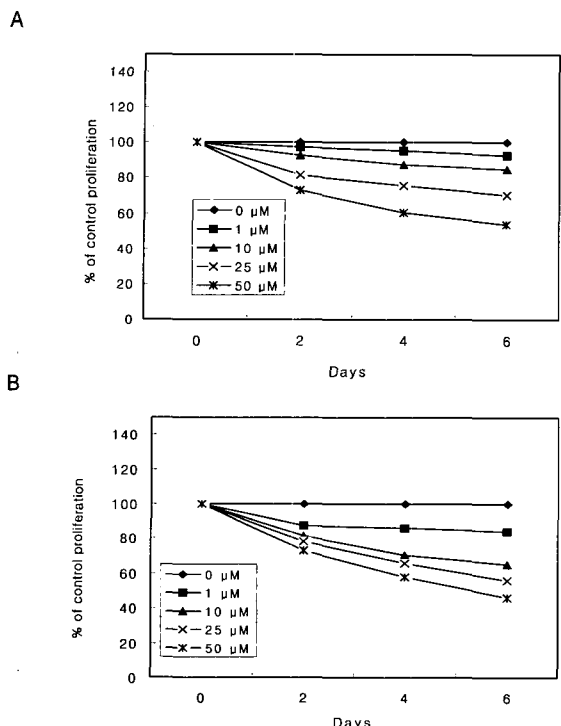


Fig. 1. Effect of genistein on proliferation of estrogen-independent MDA-MB-231 human breast cancer cells in the media (RPMI 1640) containing estrogen (A) and phenol red-free media (RPMI 1640) containing 5% charcoal and dextran-treated serum (B). The percentage of cell proliferation (assays were carried out three times) was determined at 2, 4 and 6 days at various concentrations of genistein.

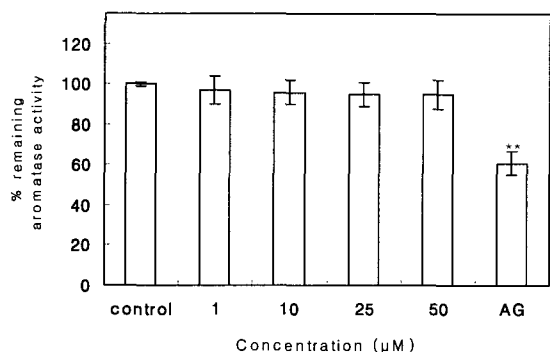


Fig. 2. Inhibition of human placental aromatase activity by genistein. AG, 5 μM aminoglutethimide. 40 μg of microsomes isolated from human placenta were incubated with 100 nM [1, 2, 6, 7-³H] androst-4-ene-3,17-dione, 10 μM progesterone, 0.1% bovine serum albumin, 67 mM potassium phosphate (pH 7.4) and 12 mM NADPH, and the amount of ³H₂O released was measured as described. Indicated values represent mean±SD (n=3). A value statistically significant compared to the control are marked as asterisk (** p<0.01).

2. Aromatase 활성

유방암예방 연구에서는 유방암에 의한 사망률과 질병률을 줄이기 위해 더 나은 유방암 예방제 개발에 역점을 두고 있다. Tamoxifen에 의한 호르몬 차단이 유방암 발생의 높은 위험인자를 가진 여성에서 유방암 발생을 줄였으며⁹⁾ 다른 호르몬 조절을 위한 연구방법으로 aromatase 활성 저해제를 이용하기도 한다¹⁰⁾. Aromatase 저해제는 건강한 여성과 동물실험에서 혈청 estradiol 함량을 줄이는 효과가 있음이 증명되었다¹⁰⁻¹²⁾. 그러므로 유방암의

예방 및 치료를 위한 연구에서는 estrogen 합성의 마지막 단계를 촉매하는 aromatase 활성 저해물질 탐색에 주력하고 있다. 의약제재 사용에 의한 유방암의 치료와 예방이 가능하지만 근래에는 천연물을 이용한 유방암예방에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 생약 추출물, 과일, 야채, 비타민과 무기질 등이 암예방제재로서 그 활성이 검증되고 있다. 본 실험에서는 genistein이 사람 태반에서 분리한 aromatase 활성에 미치는 효과를 측정하였다. 그리고 aromatase 저해제인 5 μM aminoglutethimide를 양성대조군으로 사용하였다¹³⁾. 그 결과, genistein에 의한 aromatase 활성은 감소하는 경향은 보이나 통계적으로 유의성은 없었다 (Fig. 2).

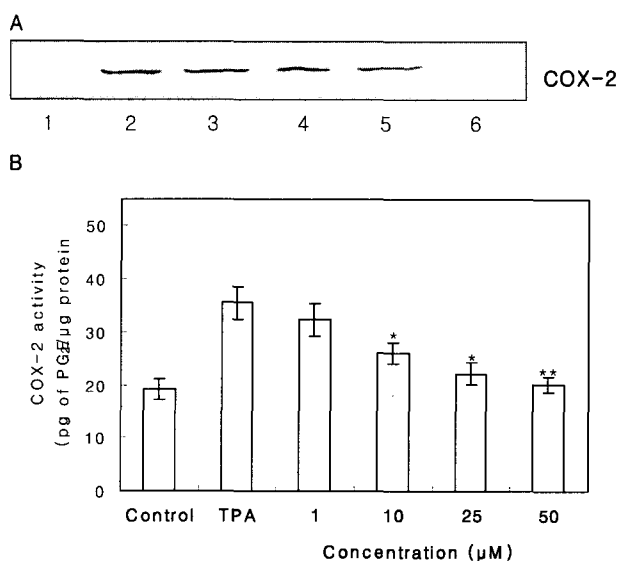


Fig. 3. Effect of genistein on expression (A) and activity of COX-2 (B). Lane 1, untreated; lane 2, TPA (150 nM) treated; lanes 3, 4, 5 and 6, TPA (150 nM) and genistein (1, 10, 25, and 50 μM, respectively) treated. Indicated values represent mean±SD (n=3). Values statistically significant compared to the control are marked as asterisks (* p<0.05, ** p<0.01).

3. COX-2에 미치는 영향

Genistein이 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 western blotting technique으로 분석하였다. 그 결과 MDA-MB-231에서의 COX-2 발현이 genistein에 의해 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 또한 genistein이 COX-2 효소활성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 시료 처리 후 MDA-MB-231 세포 상층액으로 PGE₂의 생성을 측정하였다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이 genistein은 농도의존적으로 COX-2 효소활성을 억제하여 genistein 농도 10 (p<0.05), 25 (p<0.05)와 50 μM (p<0.01)에서는 통계적으로 유의성있는 억제효과를 측정할 수 있었다.

임상연구에 의하면 높은 PGE₂ 농도는 전이성이 높고 estrogen이나 progesterone 수용체가 없는 유방암과 관련이 있는 것으로 증명되었다¹⁴⁾. 또한 Fulton과 Heppner¹⁵⁾도 쥐의 유선암에서는 PGE₂ 함량과 전이성은 강한 상관관계가 있다는 것을 발견하였다. 그리고 nude mice에 이식한 사람의 유방암세포가 indolemethacin (COX-1 저해제)에 의하여 억제되는 것이 관찰되었다¹⁶⁾. 그러나 indolemethacin은 COX-1 저해제이고 또한 합성제제는 위장장애 등의 부작용이 있으므로¹⁷⁾ 부작용이 없

는 천연물제재로서 선택적 COX-2 저해제의 개발이 매우 중요하다. 본 논문에 의하면 genistein은 estrogen-비의존성 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 증식 억제효과와 COX-2 단백질 발현과 효소활성 억제효과가 매우 탁월하였다. 따라서 이러한 활성에 의하여 genistein은 유방암 발생을 저해할 것으로 기대되며, 더 많은 유방암예방효능을 측정하여 유방암예방 제재로 개발할 수 있을 것이다.

결 론

Genistein의 암예방 활성을 알아보기 위해 사람의 유방암세포주의 증식에 미치는 효과, aromatase활성 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 단백질발현에 미치는 영향을 살펴보았다. Genistein은 사람태반 유래의 aromatase의 활성에는 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나, estrogen 비의존성 유방암세포주인 MDA-MB-231세포의 성장을 유의성 있게 저해시켰다. 또한 genistein은 10 ($p < 0.05$), 25 ($p < 0.05$) 그리고 50 μM ($p < 0.01$)의 농도에서 COX-2의 활성 및 단백질발현을 유의성 있게 저해시킴을 알았다. 이러한 사실로 미루어 보아 genistein은 유방암 예방활성에 효능이 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초의과학연구센터육성사업의 지원 (R13-2005-013-01003-0)을 받아 수행된 연구과제이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Zhou, C., Zhou, D., Esteban, J., Murai, J., Sitteri, P.K., Wilczynski, S., Chen, S. Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59, 163-171, 1996.
- Lu, Q., Nakamura, J., Savinov, A., Yue, W., Weisz, J., Dabbs, D.J., Wolz, G., Brodie, A. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* 137, 3061-3077, 1996.
- Brodie, A., Qing, L., Nakamura, J. Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 281-286, 1997.
- Kargman, S.L., O'Neill, G.P., Viekers, P.J., Evens, J.F., Mancini, J.A., Jothy, S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* 55, 2556-2559, 1995.
- Schrey, M.P., Patel, K.V. Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br. J. Cancer* 72, 1412-1419, 1995.
- Tan, W.C., Privett, S., Goldyne, M.E. Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7.12-dimethylbenzanthracene. *Cancer Res.* 34, 3229-3231, 1974.
- Rolland, P.H., Martin, P.M., Jacquemier, J., Rolland, A., Toga, M. Prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1061-1070, 1980.
- Thompson, E.A.Jr., Siiteri, P.K. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* 249, 5364-5372, 1974.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 1371-1388, 1998.
- Santen, R., Yue, W., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. The potential of aromatase inhibitors in breast cancer prevention. *Endocr. Relat. Cancer* 6, 235-243, 1999.
- Yates, R.A., Dowsett, M., Fisher, G.V., Selen, A., Wyld, P.J. Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers. *Br. J. Cancer* 73, 543-548, 1996.
- Lubet, R.A., Steele, V.E., DeCoster, R., Bowden, C., You, M., Juliana, M.M., Eto, I., Kelloff, G.J., Grubbs, C.J. Chemopreventive effects of the aromatase inhibitor vorozole (R 83842) in the methylnitrosourea-induced mammary cancer model. *Carcinogenesis* 19, 1345-1351, 1998.
- Kitawaki, J., Kim, T., Kanno, H., Noguchi, T., Yamamoto, T., Okada, H. Growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells by aromatase inhibitors: a new system for aromatase inhibitor screening. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 667-670, 1993.
- Rolland, P.H., Martin, P.M., Jacquemier, J., Rolland, A., Toga, M. Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1061-1070, 1980.
- Fulton, A.M., Heppner, G.H. Relationships of prostaglandin E and natural killer sensitivity to metastatic potential in murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 45, 4779-4784, 1985.

16. Connolly, J.M., Liu, X.H., Rose, D.P. Dietary linoleic acid-stimulated human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice and their suppression by indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor. *Nutr. Cancer* 25, 231-240, 1996.
17. Loll, P.J., Garavito, R.M. The isoforms of cyclooxygenase structure and function. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 3 1171-1180, 1994.