

# 인돌 (Indol-3-Carbinol) 이 인체대장암세포 HT-29 세포의 투과성 밀착결합조절과 세포 침윤성 억제에 미치는 영향

김성옥<sup>\*,\*\*</sup> · 최영현<sup>\*\*</sup> · 최원경<sup>\*\*\*§</sup>

메릴랜드대학교 약학대학 제약학교실, \* 동의대학교 한의과대학 생화학교실, \*\* 김천대학 식품영양과<sup>\*\*\*\*§</sup>

## Indol-3-Carbinol Regulated Tight Junction Permeability and Associated-Protein Level and Suppressed Cell Invasion in Human Colon Cancer Cell Line, HT-29

Kim, Sung Ok<sup>\*,\*\*</sup> · Choi, Yung Hyun<sup>\*\*</sup> · Choe, Won Kyung<sup>\*\*\*§</sup>

Department of Pharmaceutical Science, \* University of Maryland, School of Pharmacy, Baltimore, MD 21201, USA

Department of Biochemistry, \*\* Donggeui University, College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

Department of Food and Nutrition<sup>\*\*\*</sup> Gimcheon College, Gimcheon 740-704, Korea

### ABSTRACT

To determine whether indol-3-carbinol (I3C, C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO), an autolysis product of a glucosinolate and a glucobrassicin in vegetables, regulated tight junction proteins (TJ) and suppressed cell invasion in colon cancer cells, this experiment was performed. Our results indicate that I3C inhibit cell growth of HT-29 cells in a dose (0, 50, 100 μM) and time (0, 24 and 48 h) dependent manner. Using the wound healing and matrigel invasion study, respectively, I3C inhibits the cell motility and invasion of the ovarian cancer cell line. The TEER values were increased in HT-29 cells grown in transwells treated with I3C, reversely, paracellular permeability was decreased in those of condition. Claudin-1, claudin-5, ZO-1 and occludin have been shown to be positively expressed in HT-29 coloncancer cells. I3C occurs concurrently with a significant decrease in the levels of those of proteins in HT-29 cells. But E-cadherin level in the HT-29 was increased by I3C. The reduction of claudin-1 and claudin-5 protein levels occurred post-transcriptionally since their mRNA levels are no difference by I3C. Therefore, our results suggest that I3C may be expected to inhibit cancer metastasis and invasion by tighten the cell junction and restoring tight junction in colon cancer cell line, HT-29. (Korean J Nutr 2008; 41(1): 13~21)

KEY WORDS : indol-3-carbinol, TER, claudin, invasion.

## 서론

우리나라의 최근 각종 암 발병률과 암 사망률은 현저히 증가 하는 추세이다. 암의 원인으로 유전, 환경 등이 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있으며 환경인자 중 식생활과 관련 소화기관 암인 위암과 대장암 발병에 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있다.<sup>1-3)</sup> 대장암은 선진국에서 가장 흔한 암 이었으나 최근 우리나라에서도 대장암 발병은 남녀 함께 최근 10년 사이 가장 빠른 속도로 증가하고 있는 암이다. 급속한 경제발전으로 생활수준의 향상으로 식생활

문화의 서구화로 섭취열량 증가와 동물성 식품소비 증가가 대장암 발병을 증가 시킨다. 다양한 항암치료제가 많이 개발되지만 대부분 화학합성 품으로 심각한 부작용을 초래하여 많은 연구자들은 자연에 존재하는 식품에서 유용한 항암생리활성 물질을 찾아 부작용은 최소화하면서 우수한 항암효과를 물질의 검색에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다.<sup>4,5)</sup>

인돌-3-카비놀 (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO, I3C)은 십자화과 채소류인 양배추, 브로콜리, 콜리플라워 같은 채소에 다량 함유되어 있는 glucosinolate, glucobrassicin의 자동적인 체내 대사산물로 이러한 식품의 섭취나 보충제로 섭취가 가능하다.<sup>6,7)</sup> 세포실험에서 I3C는 다양한 종양세포, 지방암세포, 전립선암, 대장암 그리고 자궁암 세포의 증식억제<sup>8-10)</sup>와 G1/S기 세포주기 억제<sup>11)</sup>가 알려져 있다. 동물실험에서 대장,<sup>12,13)</sup> 폐,<sup>14-16)</sup> 유방,<sup>17)</sup> 자궁경부<sup>18,19)</sup> 그리고 간 조직<sup>20)</sup>에서의 종양형성 억

접수일 : 2007년 12월 5일

채택일 : 2008년 1월 14일

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : wkchoe@gmail.com

제를 보고하였고 또한 I3C는 인체유방암세포와 자궁경부암세포의 침윤과 전이를 억제한다고 보고한다.<sup>21-23)</sup> 대장암 치료에 있어 암전이의 예방은 매우 중요한 분야이지만 세포 밀착결합과 대장암의 전이에 대한 연구는 국내에서 거의 연구되지 않으며, 외국에서도 미미하게 이루어지고 있다.

세포 밀착결합은 다이나믹 구조를 가지고 있어 상처회복, 염증 그리고 중앙진행 동안 구조적 변화를 유발한다. 상피세포판 안쪽에 존재하는 밀착결합은 선단에 위치하는 여러 단백질 복합체로 세포를 가로지르는 루트를 통한 병원성 물질과 거대분자의 차단하고 이온 물질과 미량분자의 통과 조절을 위해 세포사이의 strand를 형성 한다.<sup>24)</sup> 그리고 밀착결합 연결 단백질인 ZO-1, claudin류와 결합하여 골격근 액틴과 연결되어 세포극성 유지도 중요하다.<sup>25-29)</sup> Martinez<sup>30)</sup>은 1970년대 초 상피세포 암에서 TJ의 구조가 변한다고 제안하였다. Peralta 등<sup>25)</sup>은 대장암의 투과성상피세포의 전기적 저항성 (밀착결합 형성정도 측정)이 정상 대장 조직보다 낮고 반대로 대장암에서 투과성상피세포의 투과도가 정상 대장세포보다 높다고 보고하였다. 최근 연구자들<sup>31,32)</sup>에 의해 TJ 구성단백질들 (특히 21개의 claudin 단백질군)이 밝혀졌다. Claudin 단백질은 막 단백질로 인접세포의 claudin 단백질군의 세포외 영역과 서로 인접되어 있다고 알려져 있다. 21 종류의 투과성막 단백질을 포함하는 claudin군은 밀착결합 strand의 중요한 구성요소로 큰 범위에서 TJ의 투과도 특성을 결정 한다.<sup>33)</sup> 또한 TJ는 세포막의 선단과 좌우양측 사이에 지방과 단백질의 이동을 막는 연속적인 완곡한 울타리를 형성하므로 세포의 극성의 형성과 유지에도 claudin 이 중요하다.<sup>24)</sup> 따라서 이러한 TJ 단백질인 claudin의 부조로 인한 TJ의 파괴는 암세포의 초기 침윤과 전이에 관련한 명백한 증거로 최근 연구되고 있다. 이와 같이 밀착결합 단백질 (claudins, ZO-1, occludin)과 밀착결합 관련단백질 (E-cadherin)에 대한 연구는 매우 중요 하다고 사료된다.

그러므로 본 연구는 인체 대장암 세포인 HT-29 cell에서 I3C의 항암작용 기전을 연구하기 위하여 I3C이 대장암 세포에서 TJ 형성을 유도하여 세포를 가로지르는 투과도를 억제하는지 세포의 이동성, 침윤성 그리고 claudin-1, -5, ZO-1, occludin, E-cadherin 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보려고 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

본 실험에 사용한 인체대장암 세포인 HT-29 cell은 ATCC

(American Type Culture Collection, UAS)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 DMEM 배지 (Gibco BRL, USA)를 사용하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. I3C (LKT Labs, St Paul, MN)은 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO)에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 실험하였다.

### 세포 증식 실험

상기와 동일조건에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다

### 세포 운동성 실험

본 실험은 세포 운동성 (motility)을 측정하는 실험이다. 세포가 배양되어있는 배양접시에 1 ml 팁으로 상처를 만들어 생긴 빈 공간으로 세포가 이동하여 채우는 것을 시간 의존적으로 관찰하는 실험이다. 30-mm 세포배양 접시에 20 µg/ml rat tail collagen (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)으로 코팅하여 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml HT-29 세포 배양 후 DMSO, I3C를 적정농도로 12시간 전 처리 하여 1ml 팁으로 상처를 만들었다. PBS로 세포 찌거기를 제거하고 혈청 free 배지 (세포의 증식에 의한 이동성을 막기 위해서)에 DMSO, 인돌을 각각 처리하여 시간 의존적으로 48시간 동안 관찰하여 상처난 영역으로 세포이동을 현미경으로 관찰하여 사진을 찍는다.

### 투과성상피세포의 전기적 저항성 측정

본 실험은 12-well 폴리카본 막 배양기에 (1 cm<sup>2</sup> surface area, 0.4 mm pore size, Costar, Corning, NY)에 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml HT-29 세포를 처리하여 일정시간 배양하여 이때 세포막에 걸리는 전류의 전기 저항치를 측정하여 단층 세포의 integrity를 측정하였다. 다양한 농도의 인돌을 배양 세포에 48시간 처리하여 투과성상피세포의 전기적 저

항성을 측정하여 세포 밀착결합과 세포를 가로지르는 투과성에 미치는 인돌의 영향을 평가하였다. 측정 시 4군데 각각 다른 영역을 측정하여 평균하여 사용 하였다.

**세포투과성 실험**

투과성상피세포의 물질이동을 알아보는 실험으로 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml HT-29 세포를 transwell에서 세포결합을 형성시킨 후 DMSO, 인돌을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. Transwell에서 배지를 모두 제거하고 미리 데워둔 PBS (Ca<sup>++</sup> 포함된 것 반드시 사용)로 2번 세척하고 시간의존적으로 [<sup>14</sup>C] D-mannitol (Sigma)를 apical 영역에 첨가하고 계속해서 일정한 곡도로 교반시켜 세포를 통과하는 동위원소 양을 측정하였다. 세포막을 통과한 mannitol을 LS 6500TA liquid scintillation counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA)를 사용하여 측정하였다.

Mannitol에 대한 겔보기 투과성 계수 (P<sub>app</sub> (cm/sec))는 P<sub>app</sub> = (Vr/A · D<sub>0</sub>) · (dQ/dt) 방정식을 사용하여 계산하였다.<sup>21)</sup> (dQ/dt, 막 유입률 Vr, 막 통과 량 (1.5 ml); A, transwell 막 면적 (1 cm<sup>2</sup>); D<sub>0</sub>, 초기 mannitol 농도).

**세포 침윤성**

Transwell plate에 matrigel (BD, Biosciences, Bedford, MA, USA)을 코팅하여 세포의 침윤성을 실험하였다. 2 × 10<sup>5</sup> cells/ml 로 HT-29 세포를 배양하여 각각 DMSO, 인돌을 처리하였다. 배양기 아래쪽에는 20% FBS 배지를 사용하였으며 인돌과 DMSO 처리 세포는 배양기 위쪽에 분주하여 무혈청 조건으로 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양한 후 배양기 위쪽의 안쪽을 생리식염수를 적신 면봉으로 닦아내고 헤마톡실린과 에이오신 Y (Sigma)로 염색하였다. 슬라이드 글라스에 염색한 필터를 고정하여 현미경으로 matrigel에 침윤된 세포 수를 측정하였다.

**mRNA 발현**

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 생리식염수로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mm dNTP, 10X buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. RT-PCR을 이용하여 분

**Table 1.** Oligonucleotides Used in RT-PCR

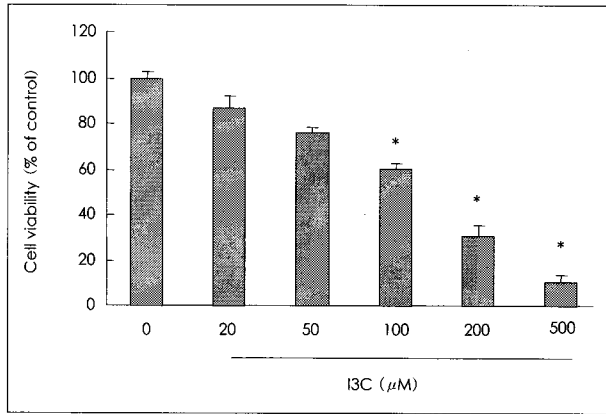
Protein		Primer sequence
Cluadin 1	Sense	5'-TCA GCA CTG CCC TGC CCC AGT-3'
	Antisense	5'-TGG TGT TGG GTA AGA GGT TGT-3'
Cluadin 5	Sense	5'-GACTGCCTTCCTGGACCAC-3'
	Antisense	5'-TGACCGGGAAGCTGAACTC-3'
ZO-1	Sense	5'-CCCTACCAACCTCGGCCIT-3'
	Antisense	5'-AACGCTGGAAATAACCTCGTTC-3'
Occudin	Sense	5'-CTGTCTATGCTCGTCATCG-3'
	Antisense	5'-CATTCCCAGTCTAATGACGC-3'
E-cadherin	Sense	5'-GAA CAG CAC GTA CAC AGC CCT-3'
	Antisense	5'-GCA GAA GTG TCC CTG TTC CAG-3'
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

석을 시도한 유전자의 종류는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 이때 비교 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 세포내 대조 유전자로 사용하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading 용액 (5x, Quality Biological Inc.)을 섞어서 loading 한 후 100 V 하에서 확인하여 Kodak Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영 하였다.

**단백질 발현**

DMSO 및 인돌이 처리된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA로 부유시킨 다음 원심분리 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 NP-40 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 그 상층 액을 취하였다. 상층 액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 샘플버퍼를 섞어서 시료를 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 8~12% SDS 폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 겔을 니트로셀룰로오즈 막 (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 10% 탈지분유를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 반응시켜 비 특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 막에 1차 anticody (claudin-1, -5, ZO-1; Zymed, San Francisco, CA, USA), MMP-2, -9; Neo-Markers, Fremont, CA, USA), β-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA))를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에

서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp. Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray 필름에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. Western blot을 위해 사용된 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 amersham Life Science에서 구입하였다.



**Fig. 1.** Effect of I3C on HT-29 cell growth and cytotoxicity. HT-29 cells seeded  $5 \times 10^3$  cells in  $100 \mu\text{l}$  culture media into 96 well plate. After cultured for 24 h, these cells were treated with I3C according to concentrations for 24 h. Thereafter, cell survival and toxicity were determined by MTT test according to dose and time dependents. DMSO (0.01%) used as a vehicle control, and 0.1% DMSO did not affect cell viability or morphology (data not shown). And also DMSO treated the same concentration in each cell group. Data are shown as mean of triplicate samples (error bars,  $\pm$  SE) and represent the invasive cell numbers compared with those of control cells. The significance was determined by Student's t-test. \*:  $p < 0.05$  vs. untreated control cells.

**통계처리**

본 연구의 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다. 실험결과는 평균과 편차로 표시하였고 분산분석으로 분석 후 유의성이 나타난 항목에서 유의성 0.05% 수준에서 Student's t-test를 실시하여 대조군에 대한 유의성을 검증하였다.

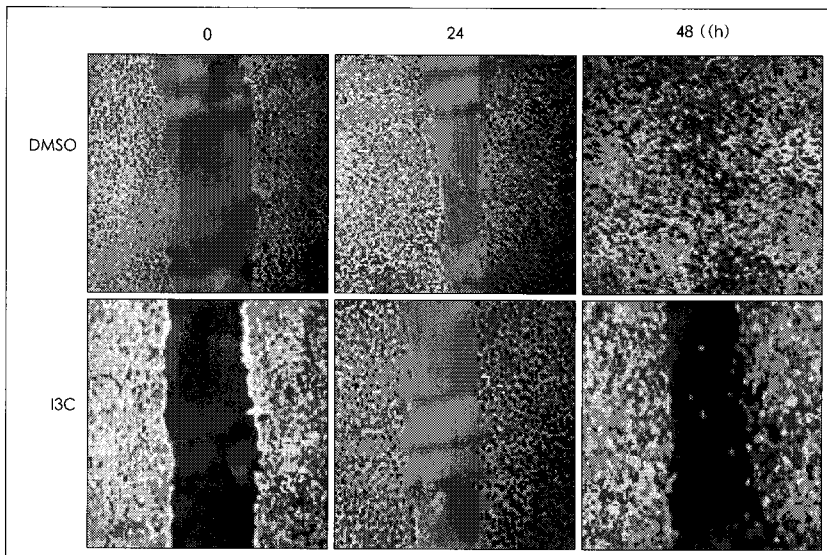
**결 과**

**세포증식 억제에 미치는 인돌의 영향**

인체 대장암 세포의 증식억제에 미치는 인돌의 영향을 알아보기 위해 적정의 인돌을 24시간 동안 처리 후 MTT를 실시하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 HT-29 세포는 인돌처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 유의적으로 억제되었으며, 특히  $100 \mu\text{M}$  이상의 농도에서 증식억제 효과는 약 70% 정도 보여 주었다. 따라서 모든 실험에서 인돌 농도는 세포의 증식 억제에 미치는 영향이 적은 50,  $100 \mu\text{M}$  농도로 처리하여 각각의 실험을 하였다.

**세포이동성에 미치는 인돌의 영향**

인돌 처리에 의한 대장암 세포 HT-29의 증식억제와 전이억제의 연관성을 알아보기 위해 선행 실험으로 HT-29의 이동성에 미치는 인돌의 영향을 상처회복 방법을 이용한 세포이동성을 실험하였다. 실험방법에서 언급한 바와 같이 세포 증식에 의한 세포 이동을 억제하기 위해서 무혈청 배지에서 실험하였다. 세포배양 접시에 피펫 팁으로 상처를 만들어 만든 공간에 농도별 인돌을 처리하여 48시간 동안 배양하면서 일정 시간 간격으로 현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다 (Fig. 2). 인돌 처리 농도 의존적으로 대조세포

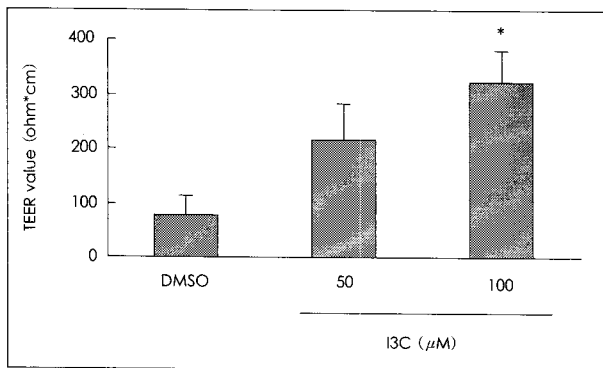


**Fig. 2.** Effect of I3C on HT-29 cell motility. The  $2 \times 10^5/\text{ml}$  cells were grown to confluency on 30-mm cell culture dishes coated with rat tail collagen ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) and then treated with vehicle or  $100 \mu\text{M}$  I3C for 24 h. A scratch was made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum free media (to prevent cell proliferation) containing either vehicle (DMSO) or I3C ( $100 \mu\text{M}$ ) was added. DMSO (0.01%) used as a vehicle control, and also treated the same concentration in each cell group. Photographs of the wounded area was taken right after the scratch was made (0 h) and 48 h later to monitor cell movement into the wounded area.

에 비해 세포의 이동성이 현저히 억제되는 현상을 보여주었다. 본 실험에서 인돌의 세포이동성 억제에 영향을 미치는 이유는 세포의 밀착결합 형성의 부조 또는 파괴가 그 원인으로 가정하였다. 따라서 다음 실험으로 밀착결합 형성을 측정하는 실험을 하였다.

**세포의 밀착결합 형성에 미치는 인돌의 영향**

투과성상피세포의 전기적 저항성 측정은 세포의 투과성을 알아보는 이동성 실험을 시작할 때 단층세포의 confluence와 integrity의 알아보는 지표<sup>25)</sup>가 되며 EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 사용하여 전기적 저항을 측정한다. Fig. 3의 결과에서 DMSO를 처리한 세포는 74.3 ± 13.6 (Ω × cm<sup>2</sup>) 이었고 50, 100 μM 인돌을 처리한 세포에서의 전류저항은 200.31 ± 27.1, 321.47 ± 17.7 (Ω × cm<sup>2</sup>)로 각각 유의적 (p < 0.05)으로 증가하였다. 또한 결과로 나타내지는 않았지만 암세포의 투과성상피세포의 전기적 저항성 증가에 대한 인돌의 영향을 재검정 하기 위해서 세포에 인돌을 처리하여 72시간 배양 후 배지에서 인돌을 제거하여 투과성상피세포의 전기적 저항성을 측정한 결과 증가된 투과성상피세포의 전기적 저항성은 24시간 유지하다가 서서히 원래 수준으로 되돌아갔다. 이러한 결과는 인돌에 의한 투과성상피세포의 전기적 저항성 증가는 안정적으로 세포변화에 관여하고 그 변화는 가역적이다는 것을 제한한다. 또 다른 실험으로 혹시 증가된 투과성상피세포의 전기적 저항성이 세포증식으로 인한 증가인지를 확인하기 위해 72시간 동안 세포를 배양한 후 MTT를 실시한

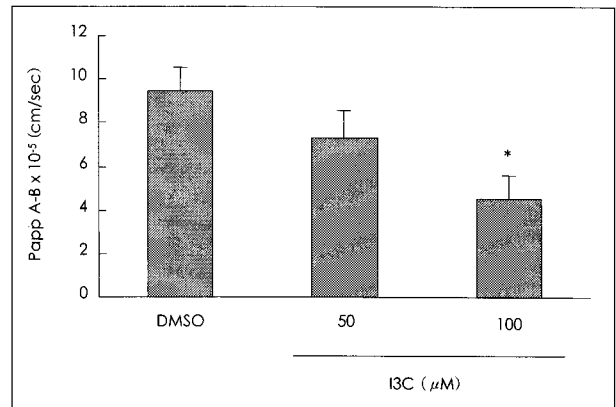


**Fig. 3.** Effect of I3C on TEER: The 2 × 10<sup>5</sup>/ml HT-29 cells were grown to confluency on transwell plate and then treated with either I3C (50 μM or 100 μM). Compounds, as indicated, were added to both the apical and basolateral compartments in triplicates. Transepithelial electrical resistance (TEER) was measured after the times indicated. DMSO (0.01%) used as a vehicle control and also treated the same concentration in each cell group. Data are shown as mean of triplicate samples (error bars, ± SE) and represent the invasive cell numbers compared with those of control cells. The significance was determined by Student's t-test. \*: p < 0.05 vs. untreated control cells.

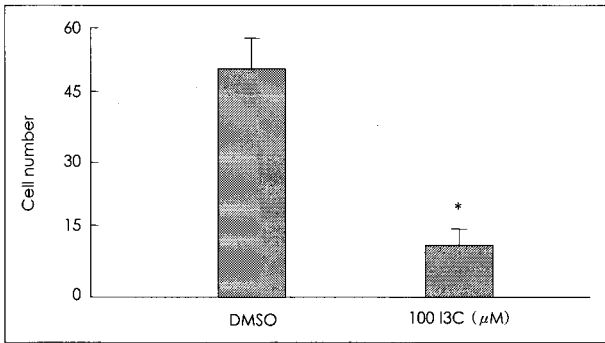
결과 24시간 배양하여 실시한 MTT 결과와 동일한 결과를 얻어 본 실험의 투과성상피세포의 전기적 저항성 증가가 세포증식에 의한 것이 아니라 인돌의 영향임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 대장암 세포에 처리한 인돌이 밀착결합 활성화에 영향을 주어 세포의 결합 조절 효과에 연관이 있음을 알 수 있었다. 따라서 다음 실험으로 증가된 투과성상피세포의 전기적 저항성을 확인하기 위해 mannitol에 동위원소를 표지한 [<sup>14</sup>C]D-mannitol를 이용하여 세포막을 통과한 mannitol을 감마선 측정기로 세포 투과성을 확인하는 실험을 하였다.

**세포를 가로지르는 투과성에 미치는 인돌의 영향**

Fig. 4의 결과에서 transwell을 통과한 mannitol 유입이 대조군 (9.3 ± 1.6)에 비해 인돌 처리 세포 (6.8 ± 1.71, 4.1 ± 1.33)에서 각각 감소하였고 특히, 100 μM 인돌 처리 세포에서는 현저한 유의적 (p < 0.05) 감소하여 투과성상피세포의 전기적 저항성과 역의 상관관계를 나타내었다. 이와 같은 결과는 대장암 세포에 인돌 처리시 인돌의 세포 밀착결합 형성에 영향을 미쳐 중앙생성으로 증가된 세포를 가로지르는 투과성을 감소시킨다는 것을 확인 할 수 있었다. 다음 실험으로 이상의 결과들이 결과적으로 암의 사망률에 가장 영향을 많이 주는 암의 전이 억제에 영향을 미치는지 알아보기 위해 matrigel 침윤성 실험을 하였다.



**Fig. 4.** Effect of I3C on the paracellular permeability of HT-29 monolayer. The 2 × 10<sup>5</sup>/ml HT-29 cells were grown to confluency on transwell plate and then treated with either I3C (50 μM or 100 μM). The apparent permeability coefficient, Papp (cm/sec) for mannitol of HT-29 cells treated for three days with either I3C (100 μM) or the vehicle, DMSO was determined as follows: Papp = (Vd) · (dQ/dt)/ADo, where dQ/dt is the linear appearance rate of mass in the receiver compartment, Vd is the donor compartment volume, A is the surface area of the transwell membrane and Do is the initial amount of mannitol in the donor compartment. DMSO (0.01%) used as a vehicle control and also treated the same concentration in each cell group. Data are shown as mean of triplicate samples (error bars, ± SE) and represent the invasive cell numbers compared with those of control cells. The significance was determined by Student's t-test. \*: p < 0.05 vs. untreated control cells.



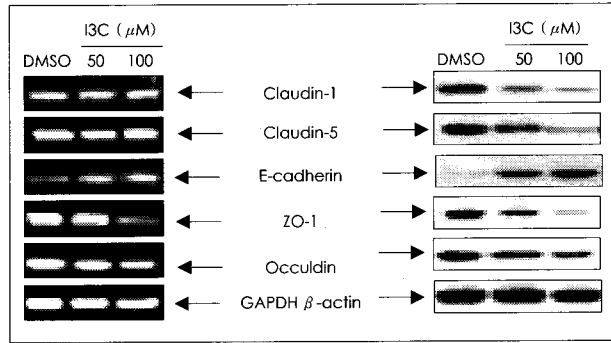
**Fig. 5.** Effect of I3C on HT-29 cell invasiveness. The cells were exposed to 100 µM of I3C for 6 h. Treated  $2 \times 10^5$ /ml cells were plated onto the apical side of the matrigel coated filters in serum-free medium containing either I3C (100 µM) or DMSO. 0.01% DMSO used as a vehicle control and also treated the same concentration in each cell group. Medium containing 20% FBS was placed in the basolateral chamber to act as a chemoattractant. After 48 h, the cells on the apical side were wiped off using a Q-tip. The cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and counted (three fields of each triplicate filter) using an inverted microscope. Data are shown as mean of triplicate samples (error bars,  $\pm$  SE) and represent the invasive cell numbers compared with those of control cells. The significance was determined by Student's t-test. \*:  $p < 0.05$  vs. untreated control cells.

**세포의 침윤성에 미치는 인돌의 영향**

생체 기저막 성분인 matrigel로 코팅한 chamber를 이용하여 HT-29세포의 침윤성을 알아본 결과 Fig. 5와 같이 100 µM 인돌을 처리한 결과 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 감소하였다. 따라서 인돌은 대장암세포 HT-29의 이동성과 침윤성을 유의적으로 억제함을 볼 수 있었다. 다음 실험은 세포 결합 (세포-세포 연결, 밀착결합)과 관련된 단백질 발현을 알아보고 세포 전이 억제에 영향을 미치는지 검증해 보기 위해 관련 단백질을 western blot으로 실험하였다.

**세포의 밀착결합 유전자의 전사수준과 단백질 발현조절에 미치는 인돌의 영향**

세포 밀착결합 단백질인 claudin-1과 claudin-5의 단백질 및 mRNA 발현은 대조세포에서 발현양이 높았으며 claudin-1과 claudin-5 단백질 발현양은 인돌 처리 농도 의존적으로 현저한 감소하여 RT-PCR로 mRNA 수준을 확인한 결과 mRNA 발현은 변화를 보이지 않았다 (Fig. 6A, B). 이를 다시 확인을 위해 PCR primer 배열을 달리한 primer를 사용하여 확인한 결과에서도 그 양에 변화가 없었다. 따라서 HT-29 세포에서 인돌의 claudin-1, -5 발현 억제는 post-transcriptional 기전에 의한 것으로 사료된다. TJ 단백질 결합 지표인 ZO-1과 occludin의 단백질과 mRNA 발현은 인돌 처리 농도에 따라 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6). E-cadherin은 세포-세포 연결 역할과 전이/종양억제 단백질 기능을 가진다. 종양세포에서의 E-cadherin 발현의



**Fig. 6.** Effect of I3C on TJ protein expression and distribution: (A) mRNA levels and GAPDH was used as an internal standard (B). Protein levels; Western immunoblots were performed to quantify TJ proteins listed to the middle of the Fig. HT-29 cells were treated with 50 µM or 100 µM of I3C for 72 hrs and then Immunoblot analyses were performed as described in the materials and methods section. Actin was used as an internal control.

감소는 세포의 침윤성을 더 잘 유도 한다.<sup>34)</sup> 본 실험에서 E-cadherin 발현은 대조세포에서 발현양이 현저히 낮았지만 인돌 처리 농도에 따라 단백질과 mRNA 발현이 유의적으로 증가 하였다 (Fig. 6).

**고 찰**

최근 급속히 증가하는 대장암환자의 성공적인 치료를 위해서는 초기 종양의 다른 조직으로의 전이를 효과적으로 방지하는 것이 매우 중요하므로 암세포의 이동과 침윤, 전이에 영향을 미칠 수 있는 분자수준의 기전의 이해와 연구가 중요하다. 밀착결합은 상피성세포의 극성과 선택적 장벽 기능을 유지하는 선단 세포내 접합점 이다. 상피성 암의 특징은 밀착결합의 느슨해짐 이다. 전암 병소와 암화 상피세포에서 밀착결합은 증가된 세포를 가로지르는 투과성을 조절, 극성을 상실한 세포를 유지와 부가적으로 21 종류의 claudin 단백질군을 포함하는 밀착결합 단백질을 불균형적으로 조절한다.<sup>32)</sup> Claudin 단백질은 대장암, 자궁암, 유방암 그리고 전립선암 세포에서 과발현을 한다. 최근 연구자들은 밀착결합 변화는 암 경과에 관여 한다고 보고 하였다.<sup>33)</sup> 예를 들면 자궁암 조직으로 멀리 떨어진 조직에서의 claudin-3, -4의 발현은 암세포의 생존을 증가시키고 암세포의 침윤과 이동을 자극한다고 보고하였다.<sup>35)</sup> 그러므로 암의 전이를 막기 위해서 종양세포에서의 TJ의 복구에 영향을 미치는 물질 탐색 연구는 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 인체 대장암 세포 HT-29 cell에 인돌을 처리하였을 때 밀착결합이 회복되어 세포의 투과성상피세포의 전기적 저항성의 증가를 시켜 세포를 가로지르는 투과성을 억제하였다 (Fig. 3, 4). 이러한 결과는 Dhawan

등<sup>36)</sup>도 대장암 세포에서 투과성상피세포의 전기적 저항성이 세포를 가로지르는 투과성과 역의 상관관계를 나타낸다고 보고하여 일치된 결과를 보였다. Aggarwal 등<sup>37)</sup>은 다른 대장암 세포와 자궁경부암 세포에 인돌 처리시 밀착결합 활성을 향상시키므로 암의 경과를 억제하는 효과가 있다고 보고 하였다. 따라서 인돌이 암세포의 밀착결합 활성을 향상시키므로 항암효과를 나타낸다고 사료된다.

단단한 밀착결합이 되는 방법은 밀착결합 복합체에서 단백질 구성의 변화이다. 밀착결합 복합체에 claudin 존재의 형태가 투과성상피세포의 전기적 저항성과 세포 투과성을 결정한다고 보고 되어져 있다.<sup>24)</sup> 따라서 본 실험은 대장암 세포 HT-29에서 인돌이 밀착결합의 총수 또는 단백질 구성을 조절하는지를 알아보기 위해 밀착결합 관련 단백질의 mRNA 수준과 단백질 수준을 알아보았다. 그 결과 (Fig. 6) HT-29에 과발현된 claudin-1, -5은 인돌 처리로 단백질 수준에서 현저한 감소를 보였다. 그러나 mRNA 량은 변화가 없어 claudin 단백질 발현은 post-transcriptional 기전으로 조절 된다고 사료된다. 이와 같은 결과는 인돌이 대장암세포 SW480에서 과발현 된 claudin-1이 세포증식과 전이를 증가시키고 claudin-1을 억제하므로 세포의 이동과 전이가 억제되었다는 보고와 일치<sup>36)</sup>하여 인돌이 밀착결합 단백질인 claudin-1, -5의 발현양에 영향을 주어 밀착결합 활성에 영향을 주어 암세포의 이동성과 전이에 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다. Claudin과 다른 단백질들과 결합을 이루고 있는 ZO-1은 밀착결합 단백질 수와 밀접한 상호관계로 조절된다.<sup>24)</sup> 본 실험결과 (Fig. 6)에서 ZO-1은 claudin 발현 형태와 동일하여 상호관계를 나타내어 본 실험에서 HT-29 세포에서 처리한 I3C는 밀착결합 관련 단백질인 claudin, ZO-1 단백질 수준의 변화에 관여함을 확인 할 수 있었다. 그러나 Hoover 등<sup>38)</sup>은 밀착결합의 중요한 조절자인 ZO-1이 유방암 세포에서 64%의 감소를 보였다고 하여 여전히 논쟁의 되고 있다. Adherens junction 단백질인 E-cadherin은 중요한 세포간 상호작용과 밀착결합 형성을 조절한다.<sup>39)</sup> 암세포에서 E-cadherin의 손실은 전이에 밀접한 영향을 미치는 중요한 단백질<sup>34)</sup>로 인돌 처리로 발현량이 증가하였다. 이상의 결과를 종합하여 보면 인체 대장암세포인 HT-29 세포에 처리한 인돌은 밀착결합 단백질인 claudin-1, -5, ZO-1과 TJ관련 단백질인 E-cadherin의 단백질 발현에 영향을 미쳐 밀착결합 복합체의 총수 또는 단백질 구성 조절에 관여 하는 것으로 나타났다. 따라서 I3C는 HT-29 세포에서 밀착결합 단백질의 발현 조절 및 그 활성에 영향을 미쳐 세포막 투과성 조절로 암의 경과와 전이를 예방 할 수 있을 것으로 사료

된다. 본 연구의 결과는 claudin의 생물학적 기능에 대한 미흡한 단서를 밝혔다고 사료된다. 여전히 많은 부분이 알려지지 않고 남아 있다. 앞으로 계속해서 진행하여 확인 할 실험으로는 claudin siRNA 또는 shRNA를 이용한 검증과 동물실험을 통한 확인을 통해 claudin의 암세포에서의 기능과 더불어 인돌의 항암효과 기전을 더 확실히 규명 할 수 있을 것이다.

## 요 약

본 실험은 인돌의 인체 대장암세포의 경과 및 전이억제와 TJ 활성 조절에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 인돌은 십자화 야채류인 양배추, 컬리플라워, 브로콜리 등에 존재하는 glucosinolate, glucobrassicin의 대사산물이다. 본 연구의 결과는 인돌이 대장암 세포 HT-29에서 농도 의존적으로 세포증식 저해를 나타내었다. 상처회복 실험을 통한 세포이동성과 세포 침윤성 실험결과 인돌이 암세포의 이동과 침윤성을 억제하였고 투과성상피세포의 전기적 저항성 측정치는 인돌 처리 세포에서 증가하였다. HT-29 세포에서 과발현을 나타내는 밀착결합 단백질인 claudin-1, claudin-5 발현은 인돌 처리로 유전자의 전사수준과 단백질 수준에서 유의적인 감소를 나타내었다. 이상의 결과에서 인돌이 HT-29 세포의 밀착결합과 그 구성 단백질 중 claudin 발현 현상을 회복시키므로 암 경과와 전이 억제를 나타내었다. 결론적으로, 천연 항암화합물인 인돌은 대장암 세포 HT-29에서 밀착결합 단백질인 claudin-1, -5을 억제하여 밀착결합을 활성화하므로 암진행과 전이를 억제할 수 있는 인돌에 의한 새로운 기전을 보고합니다.

## Literature cited

- 1) Annual report on the cause of death statistics. Korea National statistical office; 2001
- 2) Kim HY, Yang EJ. A study on dietary related to the incidence of stomach cancer and colon cancer in Korea. *Korean J Nutr* 1993; 26(5): 603-614
- 3) Doll P. The cause of cancer. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308
- 4) Klass CM, Shin DM. Current status and future perspectives of chemoprevention in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(7): 623-632
- 5) Lila MA. From Beans to Berries and Beyond: Teamwork between Plant Chemicals for Protection of Optimal Human Health. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1114: 372- 380
- 6) Loub WD, Wattenberg LW, Davis DW. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles

- of cruciferous plants. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54(4): 985-988
- 7) Wattenberg LW, Loub WD. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res* 1978; 38(5): 1410-1413
  - 8) Brandi G, Paiardini M, Cervasi B, Fiorucci C, Filippone P, De Marco C, Zaffaroni N, Magnani MA. New indole-3-carbinol tetrameric derivative inhibits cyclin-dependent kinase 6 expression, and induces G1 cell cycle arrest in both estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4028-4036
  - 9) Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(23): 2927-2936
  - 10) Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* 2001; 61(16): 6120-6130
  - 11) Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(7): 3838-3847
  - 12) Exon JH, South EH, Magnuson BA, Hendrix K. Effects of indole-3-carbinol on immune responses, aberrant crypt foci, and colonic crypt cell proliferation in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2001; 62(7): 561-573
  - 13) Xu M, Bailey AC, Hernaez JF, Taoka CR, Schut HA, Dashwood RH. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis* 1996; 17(7): 1429-1434
  - 14) el-Bayoumy K, Upadhyaya P, Desai DH, Amin S, Hoffmann D, Wynder EL. Effects of 1,4-phenylene-bis-(methylene) selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and d-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Anticancer Res* 1996; 16(5A): 2709-2712
  - 15) Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Xu Y. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis by compounds derived from cruciferous vegetables and green tea. *Ann NY Acad Sci* 1993; 686: 186-201; discussion 201-202
  - 16) Morse MA, LaGreca SD, Amin SG, Chung FL. Effects of indole-3-carbinol on lung tumorigenesis and DNA methylation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and on the metabolism and disposition of NNK in A/J mice. *Cancer Res* 1990; 50(9): 2613-2617
  - 17) Zhang X, Malejka-Giganti D. Effects of treatment of rats with indole-3-carbinol on apoptosis in the mammary gland and mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23(3B): 2473-2479
  - 18) Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, Auburn KJ. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3991-3997
  - 19) Kojima T, Tanaka T, Mori H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res* 1994; 54(6): 1446-1449
  - 20) Dashwood RH, Fong AT, Arbogast DN, Bjeldanes LF, Hendricks JD, Bailey GS. Anticarcinogenic activity of indole-3-carbinol acid products: ultra-sensitive bioassay by trout embryo microinjection. *Cancer Res* 1994; 54(13): 3617-3619
  - 21) Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auburn K, Fan S. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *J Nutr* 2000; 130(12): 2927-2931
  - 22) Riby JE, Feng C, Chang YC, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry* 2000; 39(5): 910-918
  - 23) Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1201-1215
  - 24) Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6): C1213-C1228
  - 25) Peralta SA, Mullin JM, Knudsen KA, Marano CW. Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1996; 270(5 pt 2): F869-F879
  - 26) McCartney MD, Cantu-CD. Rabbit corneal epithelial wound repair: tight junction reformation. *Curr Eye Res* 1992; 11(1): 15-24
  - 27) Madara JL, Parkos C, Colgan S, Nusrat A, Atisook K, Koustzani P. The movement of solutes and cells across tight junctions. *Ann NY Acad Sci* 1992; 664: 47-60
  - 28) Riehl TE, Stenson WF. Mechanisms of transit of lipid mediators of inflammation and bacterial peptides across intestinal epithelia. *Am J Physiol* 1994; 267(4 pt 1): G687-G695
  - 29) Mullin JM. Potential interplay between luminal growth factors and increased tight junction permeability in epithelial carcinogenesis. *J Exp Zool* 1997; 279(5): 484-489
  - 30) Martinez PA. Ultrastructural modifications of intercellular junctions between tumor cells. *Lab Invest* 1970; 22(6): 605-14
  - 31) Swift JG, Mukherjee TM, Rowland R. Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. *J Submicrosc Cytol* 1983; 15(3): 799-810
  - 32) Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding fourtransmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(2): 511-516
  - 33) Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiol (Bethesda)* 2004; 19: 331-338
  - 34) Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol* 2003; 161(6): 1191-1203
  - 35) Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005; 65(15): 7378-7385



- 36) Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1765-1776
- 37) Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1201-1215
- 38) Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 1998; 153(6): 1767-1773
- 39) Tungal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J* 2005; 24(6): 1146-1156