

## 간암 세포주에서의 Indole-3-Carbinol에 의해 유도되는 세포주기 억제 기전

김동우 · 이광수 · 김민경<sup>1</sup> · 조율희<sup>1</sup> · 이철호<sup>1\*</sup>

한양대학교 의과대학 일반외과학교실, <sup>1</sup>유전학교실 및 의과학연구소

**Inhibitory Mechanisms of Cell Cycle Regulation Induced by Indole-3-carbinol in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells.** Kim, Dong Woo, Kwang Soo Lee, Min Kyoung Kim<sup>1</sup>, Youl-Hee Cho<sup>1</sup>, and Chul-Hoon Lee<sup>1\*</sup>. Department of General Surgery, <sup>1</sup>Department of Medical Genetics & Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea – The naturally occurring chemical indole-3-carbinol (I3C), found in vegetables of the Brassica genus, is a promising anticancer agent that was shown previously to induce a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cell lines, independent of estrogen receptor signaling. The anticancer activity of I3C and the possible mechanisms of its action were explored in a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2. Treatment of HepG2 cells with I3C suppressed the growth of the cells. The growth suppression caused by I3C ( $IC_{50}$ : 444  $\mu$ M) was found to be partially due to its ability to stop the cell cycle in HepG2 cells. Western blot analysis for the G1 phase arrest demonstrated that the expression-levels of cyclin-dependent kinase (Cdk4, Cdk6) and cyclin D were reduced strongly after treatment of HepG2 cells with I3C (400  $\mu$ M) for 24–72 hrs. Furthermore, I3C selectively abolished the expression of Cdk6 in a dose- and time-dependent manner, and accordingly, inhibited the phosphorylation of retinoblastoma. Interestingly, after the HepG2 cells reached their maximal growth arrest, the level of the p21, a well-known Cdk inhibitor, increased significantly. Therefore, it could be considered that the G1 arrest of HepG2 cells treated with I3C was due to the indirect inhibition of Cdk4/6 activities by p21. Western blot analysis for G2/M phase arrest demonstrated the levels of Cdc2 and cyclin B1 were reduced dramatically after the treatment of HepG2 cells with I3C (40  $\mu$ M) for 24–72 hrs. Flow cytometry of propidium iodide-stained HepG2 cells revealed that I3C induces a G1 (53%, 72hr incubation) and G2 (25%, 24hr incubation) cell cycle arrest. Thus, our observations have uncovered a previously undefined antiproliferative pathway for I3C that implicates Cdk4/6 and Cdc2 as a target for cell cycle control in human HepG2 cells. However, the I3C-mediated cell cycle arrest and repression of Cdk4/6 production did not affect the apoptotic induction of HepG2 cell.

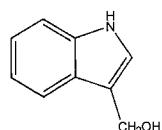
**Key words:** Indole-3-carbinol, cell cycle regulation, HepG2 cells

기존의 항암 약물요법의 가장 큰 문제점은 사용되고 있는 항암제가 정상세포와 암세포의 구별할 수 있는 선택적인 활성을 갖지 못하기 때문에 발생되는 심각한 부작용이다. 따라서 최근 몇 년간 세포주기 조절 억제에 의한 암세포의 자살 유도(apoptosis)에 관한 연구 분야가 전 세계적으로 주목을 받고 있다. 이것은 암세포가 정상세포에 비해 월등히 활발한 세포증식을 하므로, cell cycle 역시 매우 활발히 운영될 것이라는 판단 아래, cell cycle을 억제 시키면 암세포 만을 선택적으로 공략할 수 있다는 이론에 기초한 것이다. Cell cycle을 조절하는 check-points로는 두 곳 (G1/G2)이 알려지고 있다[1]. 이들 check-points를 운영하는 대표적인 인자로는 다양한 종류의 Cdk와 cyclins를 들 수

있으며[13-19], 이중에서 G1 phase 조절에 관여하는 인자는 Cdk4/6와 cyclin D이다. Cdk가 cyclin과 결합하게 되면 활성형이 되어서, Rb protein의 인산화를 일으키게 되고, 과인산화된 Rb protein은 E2F를 유리시키며[2,6], 이 E2F는 S phase로의 진입에 매우 중요한 factor로서의 역할을 한다. 그러나 Cdk4/6와 cyclin D가 활성화되지 못하게 되면 G1 phase arrest가 일어나게 되며, 동시에 Rb protein의 인산화도 일어나지 못하므로, E2F가 유리되지 않아, S phase로 진입이 억제된다[12,17]. 또한 이외에도 세포주기의 중요한 조절인자로서 Cdc2와 cyclin B를 들 수 있으며, 이들은 G2 phase 진입 여부를 결정하는 중요한 인자이다. 따라서 이들 인자가 억제되면 G2 phase arrest가 일어나서, M phase로의 진입이 억제된다[10,11,19].

일반적으로 cell cycle arrest는 세포가 외부로부터의 death signal을 받기 때문에 일어나게 되고, 따라서 cell cycle arrest는 대부분의 경우 세포의 사멸과 연관이 되게

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-2290-0673, Fax. 82-2-2298-5737  
E-mail: chhlee@hanyang.ac.kr

**Fig. 1. Structure of indole-3-carbinol.**

된다[8]. 이와 같은 cell cycle arrest와 관련되는 apoptosis (programmed cell death)는 크게 두 가지의 중요한 경로를 통해 유발된다. 첫 번째 경로는 세포 표면의 receptors를 통한 death signal의 전달이다. 대표적인 receptor로는 Fas 와 TNF receptor를 들 수 있으며, 이 경우엔 caspase 8이 활성화되며 [17], 또 다른 경로는 세포 내의 미토콘드리아의 Bax와 Bcl2 등을 통한 caspase 9의 활성화를 들 수 있다[8, 9]. 이 두 경로를 통해 활성화된 caspase 8과 9은 소위 caspase-cascade를 거쳐, 결국 caspase 3를 활성형으로 변형 시키게 되며, 핵 속에서 이 caspase3가 최종적으로 PARP를 파괴하게 된다[18]. DNA repair enzyme인 PARP가 파괴되면, 세포는 결국 apoptosis에 의해 제거되며, 이러한 현상을 세포의 자살이라 명명하게 되었다[8].

양배추 등의 야채류에 풍부히 존재하는 indole-3-carbinol (Fig. 1)은 오래 전부터 우수한 항암 활성을 보이며, 암의 예방 측면에서 많은 주목을 받고 있음에도 불구하고, 그의 암세포에서의 작용기전에 관한 기초연구 결과가 많이 보고되지 않았다[5]. 1998년에 breast cancer (MCF7 cell)에서의 I3C의 작용기전이 보고되었고, 그것의 주된 활성은 cell cycle의 G1 phase arrest임이 밝혀졌다. 그러나 최근에 이러한 I3C의 유방암 (MCF7 cell)에서의 항암활성을 직접적인 I3C의 apoptotic induction 보다는, I3C가 estrogen 대사경로를 바꾸어 유방암의 신호전달 체계에서 hormone의 receptor를 자극하여 세포주기 조절인자에 변화를 일으킨다는 사실이 보고되었다[3,4,7,20].

본 논문에서는 I3C가 보이는 항암 활성이 유방암의 경우와 같이 estrogen hormone receptor와 관련이 있는 암의 경우에만 국한되는 것인지, 아니면 I3C의 세포주기 억제 활성과 그에 의해 유도되는 apoptosis mechanism에 의한 광범위한 항암 활성인지를 확인하고자 하였다. 따라서 호르몬 수용체 경로와는 무관한 hepatocellular carcinoma cell (HepG2)에서, 그의 성장과 기능에 미치는 I3C의 효과를 세포주기 조절 및 세포사멸 유도 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용된 세포주 및 배양조건

Human hepatocellular carcinoma cell line(HepG2)은 ATCC로부터 구입했다. 세포는 rich media (RPMI1640) 또는 minimal media (MEM) FBS 10% 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 세포 성장 억제시험

96 well plate에 시험물질이 다양한 농도로 포함된 배지 50 μl과 세포 5 × 10<sup>3</sup> cells를 함유한 배지 50 μl를 각각의 well에 넣어 총 100 μl가 되게 하였다. Microplate를 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 24, 48, 72시간 배양하며. 시간별로 배양된 세포의 성장 억제율을 측정하기 위해 각 well에 MTT dye를 15 μl씩 분주 후, formazin 형성을 위해 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 2시간 후 상층액을 제거하고, solubilization/stop 용액을 각 well에 100 μl씩 분주한뒤, 형성된 formazin이 잘 녹을 때까지 훈들어주었다. 세포 성장 억제농도를 측정하기 위해 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Flow cytometer 분석

세포주기별 분포비율을 분석하기 위해 propidium iodine (PI)을 이용하였다. 시험물질을 처리한 세포를 잘 recovery 한 뒤, 모든 세포를 PBS로 2회 세척, 70% ethanol을 넣은 후 4°C에서 4시간 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 세척하고, 250 μg/ml RNaseA와 25 μg/ml PI가 포함된 PBS로 4°C에서 30분간 반응시켰다. 염색된 DNA 함량 분석은 488 excitation, 15 milliwatts인 FASTAR flow cytometer (Becton Dickinson, U.S.A.)를 이용하여 측정하고 Cell Quest software로 분석하였다. 세포의 초기, 말기의 apoptosis의 분포를 보기 위해 두 종류의 염색시약(Annexin V+PI)을 사용하였다. 시험물질을 처리한 세포를 binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)에 혼탁시킨 뒤, Annexin V (1 μg/ml)를 가한 후, PI (10 μg/ml)와 추가로 반응시켰다. 세포를 두 종류의 형광물질로 염색한 후, FASTAR flow cytometer로 측정하고 Cell Quest software로 분석하였다.

### 단백질 추출 및 Western blot 분석

세포를 lysis buffer (50mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF)를 사용하여 lysis 시킨 후, 추출 단백질을 정량하였다. 단백질 (30 μg)을 10-15% SDS-PAGE에 분리시키고, PVDF membrane에 transfer하였다. Transfer된 membrane을 5% non-fat dried milk가 포함된 TBS-T buffer를 이용하여 non-specific binding site를 억제시킨 뒤, TBS-T buffer로 세척하였다. 세포주기 조절에 관여하는 단백질들의 항체를 이용하여 membrane에 부착된 단백질들의 빌현양상을 보기 위해 ECL-plus reagent (Amersham Co., U.S.A.)로 반응, X-ray film에 노출하여 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### I3C의 HepG2 세포에서의 성장 억제 효과

I3C가 HepG2 cells의 증식을 시간과 농도 의존적으로

억제하는 기를 확인하기 위하여, MTT dye assay를 이용한 세포 성장 억제 효과 실험을 수행하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이, I3C의 IC<sub>50</sub> 값이 24시간 배양 시에는 600 μM 이상, 48시간에는 466 μM, 그리고 72시간의 경우엔 444 μM 이었다. 이상의 결과로 I3C는 HepG2 cell의 성장을 시간 및 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다.

#### 세포 주기의 G1 phase에서의 성장 조절

400 μM의 I3C을 투여하고, HepG2 cell을 배양하면서 24, 48, 72 시간에서 HepG2 cell의 cell cycle pattern을 분석하였다. 1차적으로 G1 phase arrest를 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서 Cdk4는 시간이 경과함에 따라 약간의 감소가 확인된 반면, Cdk6는 확연한 감소가 48시간에서부터 확인되었다. 마찬가지로 cyclin D의 경우도 48시간부터 현격한 양적 감소를 볼 수 있었다(Data not shown). 특히 흥미로운 사실은 이들 Cdk6, cyclin D의 감소는, I3C의 직접적인 억제에 기인된 것이 아니라, 대표적인 CKI인 p21 단백질의 증가로 인한 억제기전이라고 말할 수 있다(cyclin D data not shown). 이러한 G1 arrest는 Rb protein의 hypo-phorylation과도 잘 부합되었다. 이상의 Western blot 분석에서 일정량의 단백질 양이 사용된 것을 확인하기 위해 actin에 대한 항체를 이용하여 실험을 병행하였다.

#### 세포 주기의 G2 phase에서의 성장 조절

Fig. 4에서 보듯이, HepG2 cell을 I3C와 반응시킨 결과, 배양 24시간 경과 후부터 Cdc2와 cyclin B1의 급격한 감소가 발생하기 시작하며, 이러한 Cdc2와 cyclin B level의 급격한 감소는 G1 arrest의 간접적 저해와는 달리, G2 arrest에 직접적으로 관여하는 cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI)는 알려져 있지 않기 때문에, I3C가 직접적으로 억제

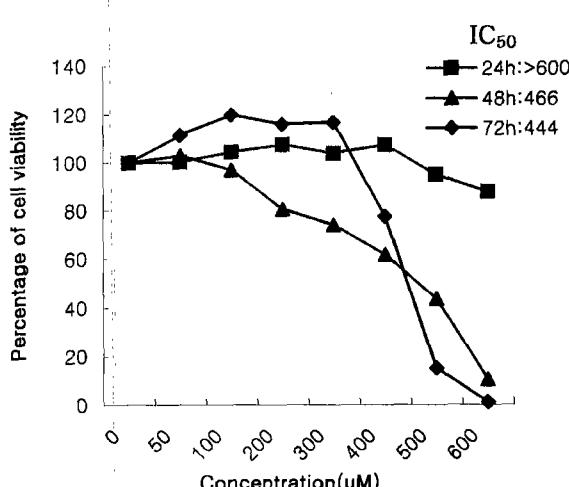


Fig. 2. Inhibition of HepG2 cell growth of I3C. HepG2 cells were treated with I3C for 24h, 48h and 72h. Cell viability was determined by the MTT assay.

하는 것으로 판단된다. 특히 이 G2/ M phase arrest는 지금까지 보고된 어떠한 breast cancer (MCF7 cell) 연구 경우에도 전혀 보고되지 않은, HepG2 특유의 저해 기전으로 확인되었다.

#### Flow cytometry를 통한 세포 주기 분석

Fig. 5에서 볼 수 있듯이, G1 및 G2 arrest를 확인 할 수 있으며, 주된 arrest는 G1 arrest임을 알 수 있다. 또한 G1 arrest의 경우엔 배양시간이 증가함에 따라, cell population 내에서 차지하는 비율이 같이 증가하여 72시간 배양 시 전체 population의 53%를 차지하게 되는 반면, G2 arrest 경우는 배양 후 24시간이 경과되면 최대치인 25%에 도달되며, 그 이후엔 점차 감소하는 경향을 보이고 있다.

이상의 결과로 HepG2 cell에 I3C를 처리하고 배양 후

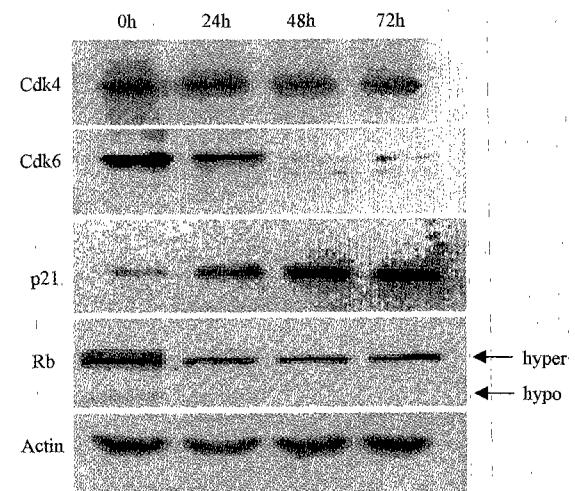


Fig. 3. Western blot analysis of G1 regulator protein (Cdk 4, 6, p21 and Rb) expression in HepG2 cells treated with 400 μM I3C.

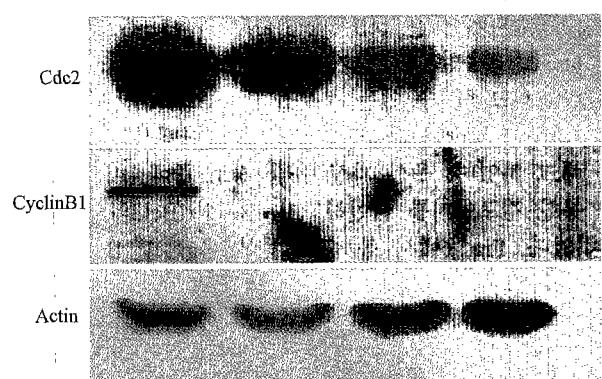
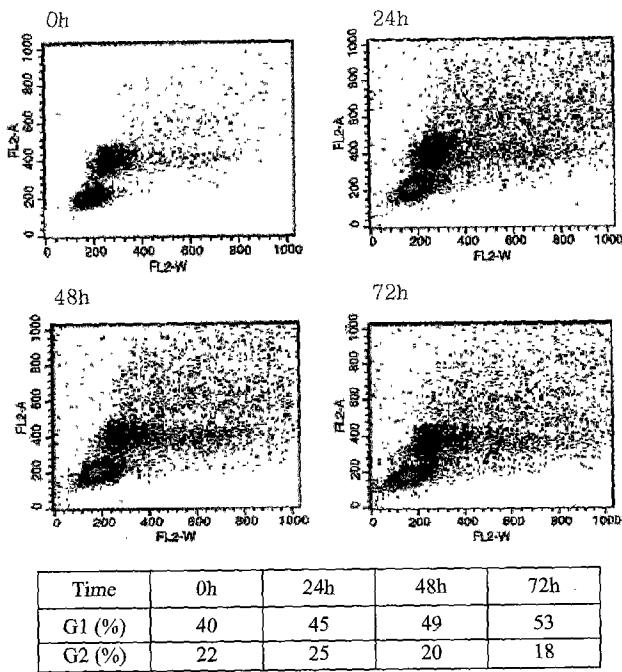


Fig. 4. Western blot analysis of G2 regulator protein (Cdc2 and cyclin B1) expression in HepG2 cells treated with 400 μM I3C.

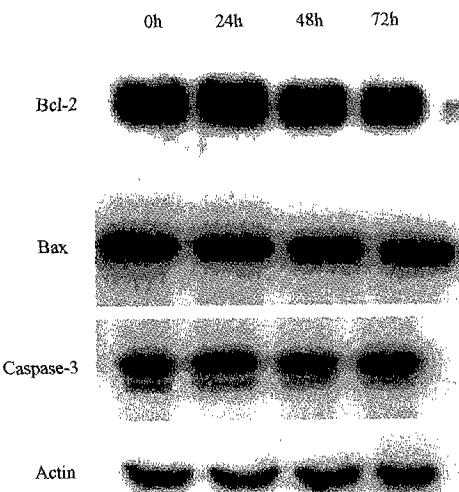


**Fig. 5. Flow cytometry analysis of HepG2 cells stained with propidium iodide. HepG2 cells were treated with 400  $\mu$ M I3C and collected at the indicated time points.**

24시간이 되면, I3C이 Cdc2 및 cyclin B1의 발현을 직접적으로 억제하여 일차적으로 G2/M phase arrest를 유도하게 된다. 그러나 배양 시간이 계속 진행됨에 따라 I3C은 Cdk4 및 Cdk6, 그리고 cyclin D의 활성을 p21인 CKI의 발현을 promotion하여 간접적으로 저해하게 되며, 따라서 p21의 충분한 발현을 위한 시간이 필요하게 되어 G2/M arrest보다는 훨씬 뒤인 72시간이 경과되어 G1 arrest를 유도하게 된다. 이와 같은 작용 기전을 바탕으로 I3C는 HepG2 cell의 cell cycle을 거의 완벽하게 정지시킬 수 있으며, HepG2 cell의 proliferation이 억제되는 것을 확인하였다.

#### 세포 사멸 분석

앞의 결과에서 본 cell cycle arrest가 HepG2 cell에서의 apoptosis를 유발시키는 가를 확인하기 위해, apoptosis의 유발을 체크 할 수 있는 부분을 두 곳으로 선정한 뒤, 그들을 regulation하는 중요 factors들의 단백질의 양적 변화를 체크 하였다. 우선 자살 유발 경로 중에, 미토콘드리아를 통한 경로인지를 확인하고자, Bax와 Bcl2의 변화를 조사하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이, Bax 및 Bcl2 level엔 아무런 변화가 없었으며, 이를 통해 미토콘드리아 경로에 의한 apoptosis는 아니라는 것을 확인하였다. 또한 apoptosis와 관련된 대표적인 단백질인 caspase 3의 activation 여부를 알아 보았다. 그러나 caspase 3는 72시간 약물처리 후에도 전혀 변화가 없었다. 결론적으로 I3C에 의해 야기된 cell cycle arrest는 apoptosis와는 연관되지 않는다는 사실



**Fig. 6. Western blot analysis of Bax and caspase-3 protein expression in HepG2 cells treated with 400  $\mu$ M I3C for 0, 24, 48 and 72h.**

을 확인하였다. 결국 I3C는 광범위한 모든 암세포에서 직접적인 I3C의 apoptotic induction으로 항암활성을 보이는 것이 아니라, 유방암의 경우에만 국한적으로 I3C가 estrogen 대사경로를 바꾸어 유방암의 신호전달 체계에서 hormone의 receptor를 자극하여 세포주기 조절인자에 변화를 일으키며 동시에 세포사멸을 유도한다는 사실을 확인하였다.

#### 요약

유방암 세포주에서는 우수한 항암활성을 가진 것으로 알려진 indole-3-carbinol을 HepG2 세포주에 시간과 농도별로 처리한 결과, cell growth inhibition을 확인하였으며, IC<sub>50</sub>값은 48시간 배양에서 466  $\mu$ M, 72시간 배양에서 444  $\mu$ M로 나타났다. 400  $\mu$ M의 I3C을 투여하고 24, 48, 72시간에서 HepG2 세포주의 cell cycle pattern을 분석한 결과, G1 phase에서 p21의 증가와 함께 Cdk6와 cyclin D의 확인한 감소와 Rb protein의 hypo-phosphorylation을 확인하였다. 반면 G2 phase에서는 I3C의 직접적인 억제로 인해 24시간 후부터 Cdc2와 cyclin B1가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. Flow cytometry 분석 결과 I3C 처리 24시간 뒤 G2 arrest (25%)가 발생하였으며, 72시간이 지난 후 G1 arrest (53%)가 발생하였다. 이러한 I3C의 간암세포주인 HepG2 cell의 cell cycle arrest가 apoptosis를 유발하는지를 알고자 caspase 3, Bcl2, Bax protein의 발현양상을 확인한 결과 아무런 변화가 보이지 않았다. 즉 I3C은 간암세포주인 HepG2 cell에서는 apoptosis를 유도하지 못한다는 것을 확인하였다. 결론적으로 I3C는 HepG2 세포주에서 G1과 G2 phase에서 cell cycle arrest는 발생시키나, 특이적으로 apoptosis와는 연관되지 않는다는 사실을 확인하였다.

## 감사의 말

이 논문은 2000년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

## REFERENCES

- Aktas, H., H. Cai, and G. M. Cooper. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3850–3857.
- Arellano, M. and S. Moreno. 1997. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 559–573.
- Cover, C. M., S. J. Hsieh, E. J. Cram, C. Hong, J. E. Riby, L. F. Bjeldanes, and G. L. Firestone. 1999. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **59**: 1244–1251.
- Cover, C. M., S. J. Hsieh, S. H. Tran, G. Hallden, G. S. Kim, L. F. Bjeldanes, and G. L. Firestone. 1998. 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.* **273**: 3838–3847.
- Dashwood, R. H. 1998. Indole-3-carbinol: Anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables? *Chemico-Biol. Interact.* **110**: 1–5.
- Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**: 1664–1672.
- Ge, X., F. A. Fares, and S. Yannai. 1999. Induction of apoptosis in MCF-7 cells by indole-3-carbinol is independent of p53 and bax. *Anticancer Res.* **19**: 3199–3203.
- Hall, M. and G. Peters. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* **68**: 67–108.
- Katdare, M., M. P. Osborne, and N. T. Telang. 1998. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in preneoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncogene Report.* **5**: 311–315.
- Lees, E. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 773–780.
- Meijer, L. 1996. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* **6**: 393–397.
- Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131–134.
- Morgan, D. O., R. P. Fisher, and F. H. Espinoza. 1998. Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. *Cancer J. Sci. Am.* **4** (Suppl 1): 7783.
- Nasmyth, K. 1996. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* **274**: 1643–1645.
- Nomoto, T., K. Nishio, and N. Saijo. 1995. Cell cycle regulation by anticancer agent. *Gan To Kagaku Ryoho.* **22**: 1719–1723.
- Nurse, P., Y. Masui, and L. Hartwell. 1998. Understanding the cell cycle. *Nat. Med.* **4**: 1103–1106.
- Pepper, D. S. and R. Bernards. 1997. Communication between the extracellular environment, cytoplasmic signalling cascades and the nuclear cell-cycle machinery. *FEBS Lett.* **410**: 11–16.
- Raff, M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature* **396**: 119–122.
- Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672–1677.
- Yuan, F., D. Z. Chen, K. Liu, D. W. Sepkovic, H. L. Bradlow, and K. Auborn. 1999. Anti-estrogenic activities of indole-3-carbinol in cervical cells: implication for prevention of cervical cancer. *Anticancer Res.* **19**: 1673–1680.

(Received Aug. 6, 2001/Accepted Sep. 10, 2001)