

## 인간 전립선 암세포인 TSU-Pr1에서 *trans*-10,*cis*-12 Conjugated Linoleic Acid에 의한 Apoptosis 유발과 Bcl-2 단백질의 발현억제

오윤신 · 김은지 · 이상곤\* · 정차권 · 강일준 · 신현경 · 윤정환†

한림대학교 식품영양학과

\*한림대학교 비뇨기과

## Induction of Apoptotic Cell Death and Depression of Bcl-2 Protein Levels by *Trans*-10,*cis*-12 Conjugated Linoleic Acid in Human Prostate Cancer

Yoon Sin Oh, Eun Ji Kim, Sang Gon Lee\*, Cha-Kwon Chung, Il-Jun Kang,  
Hyun Kyung Shin and Jung H. Y. Park†

Division of Life Sciences and \*Dept. of Urology, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

### Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term for a class of positional and geometric conjugated dienoic isomers of linoleic acid (LA) and has anti-cancer activity in experimental animals. We have previously observed that an isomeric mixture of CLA and *trans*-10,*cis*-12 (*t10c12*) inhibited cell growth in a dose-dependent manner, whereas LA and *cis*-9,*trans*-11 (*c9t11*) had no effect. The present study examined whether the CLA mixture and *t10c12* induce apoptotic cell death. TSU-Pr1 cells were incubated for three days in serum-free medium in the absence or presence of individual fatty acids, and the DNA fragmentation assay was performed. Cells treated with the CLA mixture or *t10c12* produced a distinct oligonucleosomal ladder with different sizes of DNA fragments, a typical characteristic of cells undergoing apoptosis. By contrast, LA and *c9t11* had no effect. Western immunoblot analysis of total lysates revealed that *t10c12* reduced anti-apoptotic, 26 kDa, Bcl-2 protein levels by  $49 \pm 8\%$  compared with controls, whereas this CLA isomer did not alter pro-apoptotic, 21 kDa, Bax protein levels. These results suggest that growth inhibitory effect of the *t10c12* CLA isomer may, at least in part, be attributed to increased apoptotic death in TSU-Pr1 cells.

**Key words:** conjugated linoleic acid, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA, apoptosis, Bcl-2

### 서 론

여러 역학조사들은 전립선암을 비롯한 여러 암의 발생률이 나 사망률이 식이 지방과 관계가 깊은 것을 뒷받침해준다(1). 따라서 암세포가 어떻게 분화하는지 생물학적으로 이해하기 위한 방법중의 하나는 종양생성에 관련된 식이 지방을 알아내어 그 기전을 연구하는 것이다. 현재 인간의 암 발생 초기에 지방산의 역할에 대해서는 아직 불분명 하지만, linoleic acid(LA)는 다량 섭취 시 전립선암이나 대장암 발생과 관계가 깊다는 것이 알려져 있다(2). Conjugated linoleic acid(CLA)는 LA의 유도체로서 요리한 쇠고기에서 항암 효과를 가진 물질로 Ha 등(3)에 의해 처음 분리 동정되었고 반추 동물에서 유래한 육류와 다양한 유제품에 포함되어 있으며 가공처리 과정에 따라 그 함량이 변한다(4). 동물 실험을 통해 CLA는 체지방 감소, 혈중 cholesterol 감소, 면역 증진 효과 등 여러 가지 생리적인 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며 특히 항암 효과가 강한 것으로 보고되

었다(5,6). 동물실험을 통해 여러 가지 생리적인 효과를 나타낸 CLA는 화학적으로 LA로부터 합성된 것으로 *cis*-9,*cis*-11, *cis*-9,*trans*-11, *trans*-9,*cis*-11, *trans* 9,*trans* 11, *cis*-10,*cis*-12, *cis*-10,*trans*-12, *trans*-10,*cis*-12, *trans* 10,*trans*-12 CLA의 8개의 이성체를 함유하고 있으며 그 중 *cis* 9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA 이성체가 각각 48%를 차지하고 있고 나머지 6개 CLA 이성체는 미량 존재하는 혼합물이다(7,8).

동물실험의 결과에 의하면 CLA 이성체 mixture가 유방암이나 대장암뿐만 아니라, 피부암의 생성을 방해하는 것으로 알려졌다(9-11). 특히, 유방종양에 있어 CLA의 효과는 식이에 포함된 지방의 양과 종류에 관계없이 독립적으로 나타나며, 농도가 증가함에 따라 그 효과가 증가하는 것으로 알려졌다(10). 또한 유방암이나 전립선 암세포를 nude mice에 이식하였을 때, 이들의 성장이 1.0% CLA를 첨가한 식이를 먹인 쥐에서 현저하게 감소되는 것이 보고되었다(11). Ip 등(12)의 연구에서는 CLA의 이성체인 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,

†Corresponding author. E-mail: jyoons@hallym.ac.kr  
Phone: 82-33-240-1477, Fax: 82-33-256-0199

*cis*-12 CLA 모두 rat에서 지방산의 생성을 억제하는데 효과를 나타내었다고 보고하였다. 최근에 Oh 등(13)은 CLA 이성체 혼합물과 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 인간의 전립선 암세포인 TSU-Pr1의 증식을 억제하는 것을 관찰하였다. 이렇듯 CLA의 항암효과나 암세포 증식 억제작용에 대한 연구가 많이 진행되고 있으나, 이들이 어떠한 기전을 통해 이루어지는지는 아직 확실하지 않다.

CLA의 효과에 대한 기전의 가설로는, 세포 인지질의 arachidonic acid(AA) 대사를 억제하여 eicosanoids의 생성을 변화시키거나 DNA 합성을 억제하거나 apoptosis를 유도하는 것 등이 있다(14,15). 또한 CLA가 peroxisomal proliferator-activated receptor(PPAR) family중의 하나인 PPAR  $\gamma$ 를 활성화시켜 유전자의 전사를 직접 또는 간접적으로 조절하여 상피세포의 성장을 변화시킨다는 Houseknecht 등(16)의 연구 결과도 있었다.

조직의 항상성은 세포의 분열과 apoptosis 사이의 균형에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(17). Programed cell death라고도 불리는 apoptosis는 세포가 정상적인 상태에서나 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리학적 과정을 말하는 것으로 apoptotic cell은 세포막의 팽창, 세포 수축, 핵의 응축과 DNA 절단과 같은 형태학적 특징을 나타낸다(18). 이러한 과정은 다중세포 기관의 발달이나 조직의 항상성, 감염이나 손상된 세포에 대한 방어에 매우 중요하다. 그리고 apoptosis의 조절 이상은 자가 면역 또는 신경발달의 질병이나 적혈구의 부족과 같은 중요한 결과를 낳으며 암의 시작과 진행을 의미하기도 한다(19,20).

Apoptosis의 유도에 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family는 세포밖이나 세포내의 상황을 전달받는 중요한 신호전달체로서 작용을 하며, anti-apoptotic, pro-apoptotic 기능을 하는 단백질들로 구성되어 있다(21). 즉, apoptosis를 방해하는 Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1과 A1 단백질과 apoptosis를 촉진하는 Bax, Bak, Bad 단백질 등이 있는데, 이러한 많은 단백질 중에 Bcl-2와 Bax 단백질 사이의 균형이 apoptotic cell death를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려졌다(22).

Bcl-2 발현이 전립선 종양을 포함한 상피세포의 악성종양의 전이와 관계가 깊다고 McDonnell 등(23)에 의해 보고되었으며, Krajewski 등(24)은 지방산에 pro-apoptotic Bax의 발현이 감소되면 환자의 생존율이 낮아지고 약물요법에 민감하지 않게 반응하는 것을 관찰하였다. 또한 Bargou 등(25)의 연구에서는 지방산 세포에 Bax 단백질을 과발현시켰을 때 apoptosis의 민감성을 회복하며, nude mice에 주사했을 때 종양의 성장을 감소하는 것을 관찰하였다. p53, ras, DCC와 같은 유전자 부족, 또는 *c-myc*의 과발현과 같은 유전적인 변화들이 암세포의 증식이나 apoptosis와 관련이 있다는 것이 알려지면서, Bcl-2가 이들의 발현에 영향을 미친다는 연구들도 진행되고 있다(26). 그러나 전립선암인 TSU-Pr1 세포에서의 Bcl-2, Bax 발현에 관한 연구는 거의 진행되지 않았으며, 또한 이와

관련된 CLA에 의한 암세포 증식 억제 기전에 관해서는 더욱 미흡한 상태이다.

Oh 등은 세포증식을 억제하는 CLA mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA 이성체가 IGF-II의 생성분비를 방지하는 반면에 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 아무런 효과가 없는 것을 관찰하였다(13). 따라서 본 연구에서는 CLA 이성체 mixture와 CLA의 주요 이성체가 apoptotic cell death를 유도하는지 알아보았으며, 이러한 지방산들에 의해 apoptosis에 관련된다고 알려진 단백질 Bcl-2, Bax가 변화하는지 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

실험에 사용한 인간의 전립선 암세포인 TSU-Pr1 세포는 Iizumi group(27)에 의해서 만들어진 것으로 Johns Hopkins University(Baltimore, MD, USA)의 John Isaacs 교수로부터 공급받았다. 세포는 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 배양하였다. 탈 이온화된 3차 증류수로 배지용액을 제조하여 0.22  $\mu$ m pore size membrane filter(Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 멸균하였다. 세포를 유지하기 위해 DMEM/F12 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco/BRL)을 첨가하고 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 항생제(100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, Gibco/BRL)를 첨가한 배지를 사용하였다. 세포가 약 80% 정도 dish를 덮으면 phosphate buffered saline solution(PBS)로 monolayer를 씻어내고 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하고 배지는 2일마다 교환하였다.

CLA 이성체 mixture, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA, linoleic acid(LA) 농도에 따른 살아있는 세포 수 측정

지방산들의 농도를 달리했을 때 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 TSU-Pr1 cell(passage No. 40~55)을 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 24 well plate에 40,000 cells/well의 농도로 plating 하였다. 24시간이 지난 후 serum-free medium(SFM)(DMEM/F12, transferrin 5  $\mu$ g/mL, selenium 5 ng/mL, ascorbic acid 50 ng/mL,  $\alpha$ -tocopherol 20 ng/mL)으로 배지를 교환하여 serum starvation 시켰다. Transferrin, selenium, ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol은 Gibco/BRL에서 구입하였다. 24시간 serum starvation 후 배지를 여러 농도의 CLA 이성체 mixture, LA(Sigma, St. Louis, MO, USA), *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)가 들어있는 serum-free medium으로 교환하였다. 이때 사용한 지방산들은 fatty acid-free bovine serum albumin

(BSA, Sigma)과 4:1의 물비로 결합시켜 4 mM stock solution으로 만들어 나누어서  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다. 대조군을 포함한 모든 well에 BSA의 농도를 일정하게 유지하여 첨가시켰다. CLA 이성체 mixture와 LA는 0, 2, 5, 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하고, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA는 0, 0.2, 0.5, 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하여 0, 48, 96시간이 경과한 후 MTT assay 방법(28)으로 살아있는 세포수를 측정하였다. MTT assay 방법은 mitochondria의 dehydrogenase가 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]를 환원시켜 푸른색 물질인 formazan을 만든다는 원리에 기초로 한 것이다. 본 실험에서는 formazan을 isopropanol에 용해시킨 다음 570 nm의 파장에서 microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

#### CLA 이성체 mixture와 각각의 지방산에 의한 DNA laddering 측정

CLA 이성체 mixture와 이성체들의 암세포 증식 억제효과가 apoptosis에 의한 것인지를 알아보기 위해 TSU-Pr1 세포를  $1 \times 10^6$  cells/dish의 농도가 되도록 regular medium으로 희석하여 100 mm dishes(Corning, NY, USA)에 분주하였다. 24시간이 지난 후에 SFM으로 배지를 교환하고 24시간 동안 serum starvation하였다. 각 군의 SFM에 CLA 이성체 mixture와 LA는 10  $\mu\text{M}$ , 각각의 이성체들은 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하여 배지를 교환하였고, 48시간 후에 한번 더 배지를 교환하였다. 72시간 뒤에 얼음에서 차갑게 한 PBS를 넣어 긁은 후 2000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수집하였다. 여기에 extraction buffer(50 mM Tris, 20 mM EDTA, 1% Nonidet, pH 7.5) 2 mL를 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 incubation하였다. 그 후에 SDS를 1%가 되도록 넣고 2시간동안  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 incubation하고, RNase를 0.55 mg/mL 넣어  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간, proteinase K를 0.55 mg/mL 농도로 하여  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 incubation하였다(29). 단백질을 제거하기 위해서 총 volume과 같은 양의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)를 넣어 잘 섞은 후에 원심 분리하였다. 윗층을 조심스럽게 걸어서 Eppendorf tube에 모았다. 상층액의 DNA를 0.3 M sodium acetate와 2.5배의 100% ethanol을 넣어 DNA pellet를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 pellet를 TE buffer(20 mM Tris, 1 mM EDTA)에 녹여 260, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 뒤, 2% agarose gel에서 전기 영동하였다.

#### CLA 이성체 mixture와 각각의 지방산들에 의한 Bcl-2, Bax 단백질 변화 측정

CLA 이성체 mixture와 이성체들의 암세포 증식 억제효과가 apoptosis에 관련된 단백질인 Bcl-2, Bax와 관계가 있는지 알아보기 위해 DNA laddering 실험에서와 같은 조건으로 100 mm dishes에 TSU-Pr1 세포를 분주하였다. 24시간이 지난 후에 SFM으로 교환하여 24시간동안 serum starvation한 후

CLA 이성체 mixture와 LA는 10  $\mu\text{M}$ , 각각의 이성체들은 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하였다. 72시간 뒤에 PBS로 세포를 긁어모은 다음, lysis buffer(137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate와 1 mM PMSF, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  anti-pain, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  benzamidin HCl을 첨가하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 40분간 incubation하였다. 이 후  $4^{\circ}\text{C}$ , 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 상층액만을 모아서 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 12.5% 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  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5% milk-TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 18시간 동안 incubation한 다음, anti-Bcl-2 또는 anti-Bax antibody (1:500 dilution, BD Transduction, CA, USA)를 첨가하여 상온에서 1시간 incubation하였다. 상온에서 TBST로 씻어낸 다음, 다시 anti-mouse Ig horseradish peroxidase/TBST에서 1시간 incubation하여 Supersignal<sup>R</sup> West Dura Extended Duration Substrate(Pierce, IL, USA)를 이용하여 탐색하였다(21). 이때 Bcl-2, Bax 단백질의 band의 강도는 densitometer(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였고, 분자량은 molecular weight marker standard(Amersham, Buckinghamshire, England)와 비교, 분석하여 산정하였다.

#### CLA 이성체 mixture와 각각의 지방산들에 의한 Bcl-2, Bax mRNA 변화 측정

CLA 이성체 mixture와 이성체들의 암세포 증식 억제효과가 Bcl-2, Bax 단백질뿐만 아니라 mRNA 수준에서도 변화하는지 알아보기 위해 Bax, Bcl-2 immunoblot 실험에서와 같은 조건으로 100 mm dishes에 TSU-Pr1 세포를 분주하였다. 24시간이 지난 후에 SFM으로 교환하여 24시간동안 serum starvation한 후 CLA 이성체 mixture와 LA는 10  $\mu\text{M}$ , 각각의 이성체들은 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가하였다. 72시간 뒤에 Chomczynski 방법(30)을 응용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA 2  $\mu\text{g}$ 을 취해 oligo(dT)를 사용하여 reverse transcription(RT)을 실시하였다. RT product 일부를 취해 각각의 specific primer를 사용하여 Bcl-2는 35 cycles( $95^{\circ}\text{C}$ 에서 45초 동안 변성,  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 45초 동안 가열냉각,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 동안 증폭), Bax는 32 cycles( $94^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 동안 변성,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 동안 가열냉각,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 동안 증폭) polymerase chain reaction을 수행하였다. 사용한 primer는 다음과 같다. Bcl-2 sense, 5'-CGA CTT CGC CGA GAT GTC CAG CCA G-3'; antisense 5'-ACT TGT GGC CCA GAT AGG CAC CCA G-3' Bax sense, 5'-CTG ACA TGT TTT CTG ACG GC-3'; antisense 5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA GA-3' 이후 RT-PCR한 RNA를 1% agarose gel에서 전기영동하

였고, ethidium bromide로 염색하여 가시화하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험 분석 결과는 각 실험군의 평균과 표준 오차로 계산하였고, analysis of variance로 분석 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군들의 평균값 간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다(31).

결 과

CLA 이성체 mixture와 LA 농도에 따른 살아있는 세포 수의 변화

CLA 이성체 mixture와 LA가 TSU-Pr1의 세포수에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 각 지방산을 0, 2, 5, 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였을 때 CLA 이성체 mixture의 경우, 48시간 후부터 암세포 수가 유의적으로 감소하였고, 96시간에는 최고농도인 10  $\mu\text{M}$ 에서 대조군에 비해 살아있는 세포수가 90% 감소하여 그 효과가 현저하게 나타났다(Fig. 1A). 반면

LA를 같은 농도로 배양액에 첨가하였을 때, 세포수에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 1B). 48시간과 96시간 후에도 LA에 의한 영향 없이 TSU-Pr1 세포 증식은 정상적으로 이루어졌다.

*Trans*-10,*cis*-12 CLA (*t10c12*), *cis*-9,*trans*-11 CLA (*c9t11*) 농도에 따른 살아있는 세포수의 변화

CLA를 구성하는 이성체중 그 함량이 가장 많은 이성체인 *trans* 10,*cis*-12 CLA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 CLA 이성체 mixture의 실험에서 사용한 농도의 1/10인 0, 0.2, 0.5, 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하여 그 효과를 비교하였다(Fig. 2). *Trans*-10, *cis*-12 CLA 경우 48시간이 지난 후부터 살아있는 세포수가 감소하기 시작했으며, 96시간에는 1  $\mu\text{M}$ 에서 대조군에 비해 92%가 유의적으로 감소하였다(Fig. 2A). 그러나 *cis*-9,*trans*-11 CLA를 같은 농도로 첨가 시, *trans*-10,*cis*-12 CLA와는 달리 TSU-Pr1 세포수에 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 2B).

CLA 이성체 mixture와 그 이성체들의 DNA laddering  
CLA와 각각의 지방산들이 apoptosis를 유도하는지 알아보

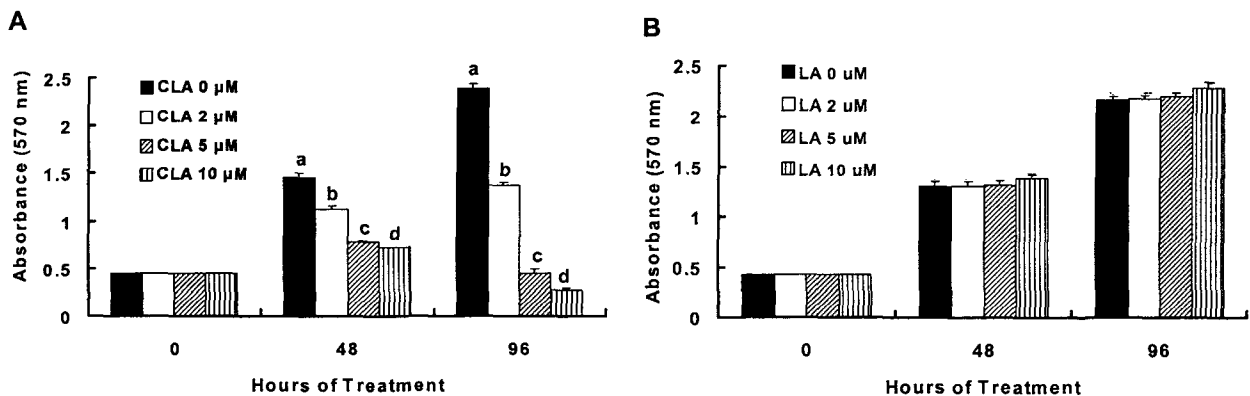


Fig. 1. Effect of CLA mixture and LA on viable TSU-Pr1 cell number. TSU-Pr1 cells were treated with various concentrations of CLA mixture (A) or LA (B) as described in Materials and Methods and viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM (n = 6). Comparisons between different concentrations of individual fatty acids that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

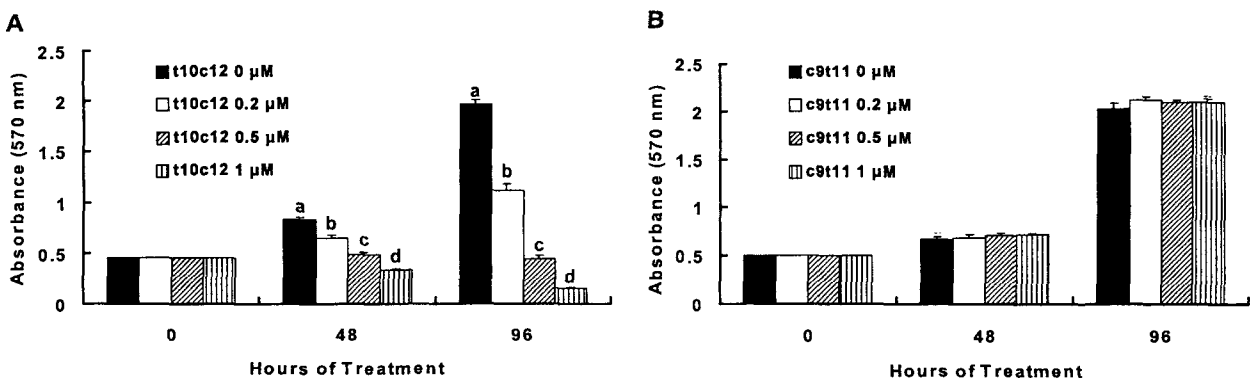


Fig. 2. Effect of *trans*-10,*cis*-12 CLA (*t10c12*) and *cis*-9,*trans*-11 CLA (*c9t11*) on viable TSU-Pr1 cell number. Cells were treated with various concentration of *t10c12* (A) or *c9t11* (B) and viable cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM (n = 6). Comparisons between different concentrations of individual fatty acids that yielded significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by different letters above each bar.

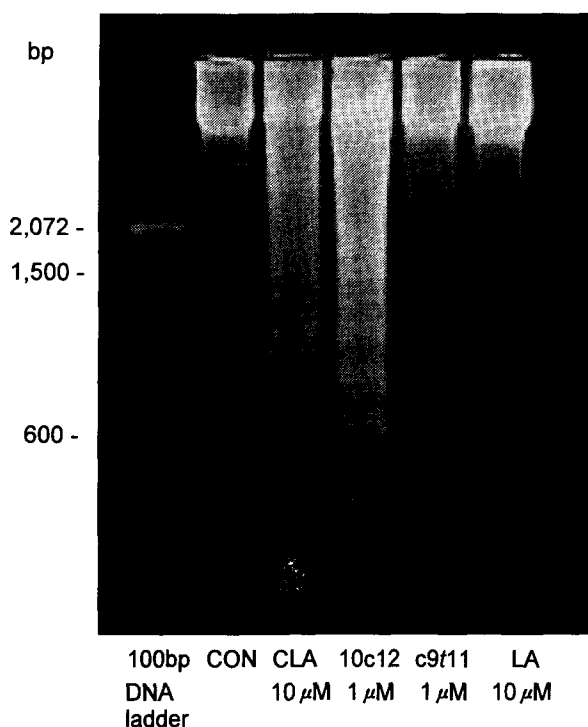


Fig. 3. Effect of different fatty acids on the apoptosis of TSU-Pr1 cells.

Cells were treated in the absence or presence of 10  $\mu$ M CLA, 10  $\mu$ M LA, 1  $\mu$ M t10c12 or 1  $\mu$ M c9t11 for 3 days. Genomic DNA was isolated, electrophoresed on 2% agarose gels (30  $\mu$ g/lane) with TBE buffer, and visualized by ethidium bromide staining.

기 위해 DNA fragmentation을 조사한 결과(Fig. 3), 살아있는 세포수를 감소시켰던 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에서 대조군에 비해 DNA laddering이 현저하게 나타난 것을 관찰하였다. 또한 CLA 이성체 mixture와 비교하여 1/10 농도의 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 DNA laddering을 더 현저히 증가시키는 것을 관찰하였다. 반면, 세포수의 감소 효과가 없던 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 LA에서는 아무런 효과가 없었다.

#### CLA 이성체 mixture와 그 이성체들에 의한 Bcl-2, Bax 단백질의 발현

Apoptosis와 관련된 Bcl-2, Bax 단백질 변화를 알아보기 위해 CLA, LA, *trans*-10,*cis*-12 CLA, *cis*-9,*trans*-11 CLA를 DNA laddering을 측정할 때와 같은 농도로 처리하여 얻은 cell lysate로 immunoblot analysis를 수행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2는 26 kDa에서, pro-apoptotic 단백질인 Bax는 21 kDa에서 band들이 나타났다. 같은 양의 단백질이 loading된 것을 나타내기 위한  $\beta$ -actin의 분자량은 42 kDa이다. Bcl-2 단백질인 경우, *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서만 감소하였으며, 반면 Bax 단백질은 각각의 지방산에 의해 아무런 영향을 받지 않았다(Fig. 4A). 이 band들의 강도를 densitometer를 이용하여 측정된 다음, Bcl-2/Bax ratio를 계산하여 Fig. 4B에 나타내었는데, *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서만 그 비율이 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있었다.

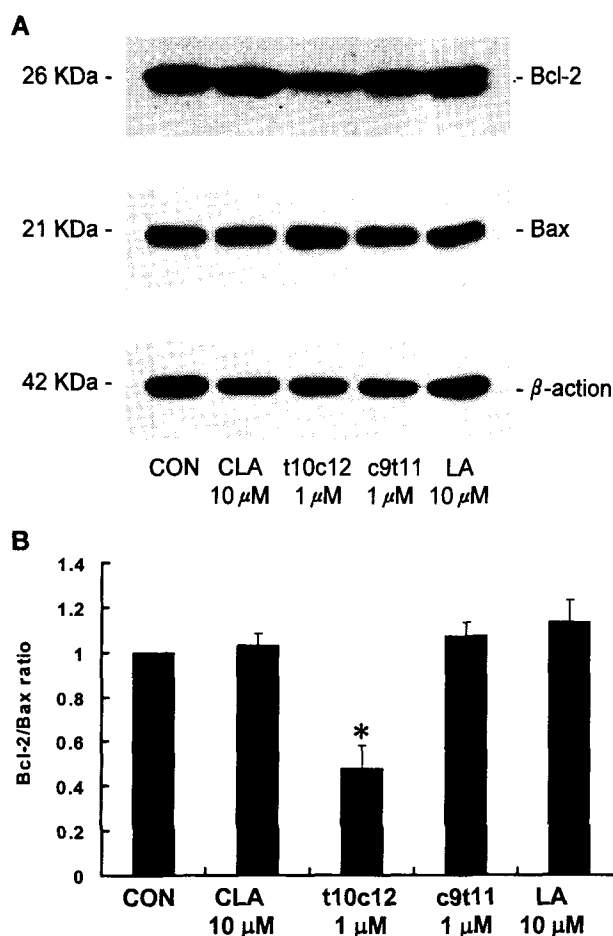


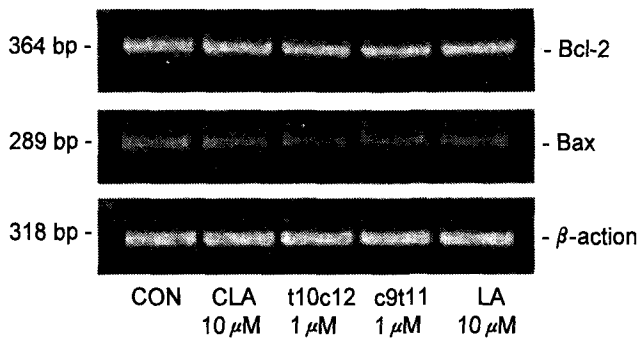
Fig. 4. Expression of Bcl-2 and Bax protein in TSU-Pr1 cells. Cells were treated with CLA, LA, t10c12 or c9t11 as described in Materials and Methods. Total lysates were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. Bound antibody was detected by horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG. A, Photographs of chemiluminescent detection of the blots are shown. B, Quantitative analysis of immunoblots. The intensity of each bands was analysed by densitometry. Each bar represents the mean of Bcl-2/Bax ratios  $\pm$  SEM from three independent experiments.

#### CLA 이성체 mixture와 그 이성체들에 의한 Bcl-2, Bax mRNA 발현

CLA 이성체 mixture와 각각의 이성체에 의한 Bcl-2, Bax mRNA 발현정도를 측정하기 위해, 세포를 immunoblot을 수행할 때와 같은 방법으로 처리하여 total RNA를 추출하였다. 이 RNA를 이용하여 RT-PCR 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 예상했던 대로 Bcl-2는 364 bp에서, Bax는 289 bp에서,  $\beta$ -actin은 318 bp에서 band들이 나타났다. Immunoblot시에는 Bcl-2의 단백질이 감소된 것을 관찰할 수 있었으나, mRNA 수준에서는 Bcl-2, Bax가 CLA mixture와 그 이성체들에 의해서 아무런 영향을 받지 않았다.

#### 고 찰

전립선암이나 대장암과 같은 암세포의 분열은 유전자나 성



**Fig. 5. Expression of Bcl-2 and Bax mRNA in TSU-Pr1 cells.** For RT-PCR, TSU-Pr1 cells were treated with CLA, LA, t10c12 or c9t11 as describes in Materials and Methods, and PCR was performed by the specific primers of Bcl-2, Bax, or  $\beta$ -actin. The sizes of expected PCR product were 364 bp and 282 bp for Bcl-2 and Bax, respectively. Samples were seperated on a 1% agarose gel.

장인자와 영양소간의 복잡한 관계에 의해서 이루어진다. 또한 programmed cell death 기전의 결함이나 적절한 apoptotic 신호가 부족시 세포가 증식할 수 있다는 것이 알려짐에 따라 암세포의 분화를 촉진시키거나 또는 apoptotic 기전을 회복시켜 암세포 증식을 억제하는 여러 식이 요소나 약품의 효능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(32).

최근 n-6 계열의 지방산은 전립선암이나 대장암의 형성에 중요한 역할을 하는 영양소로 알려졌으며(1) 특히 linoleic acid (LA)는 필수 지방산으로, 이의 섭취가 전립선암이나 대장암, 유방암의 발생률과 상관관계가 높다(33). 그러나 LA의 기하학적, 위치학적 이성체로 알려진 CLA는 인간 암세포의 분열이나 종양생성을 억제한다는 증거들이 제시됨에 따라(11), 암을 안전하고 효과적으로 치료하는데 CLA를 사용하려는 관심이 높아지고 있다. 그러나 전립선암이나 대장암을 앓고 있는 환자나 이의 위험이 높은 사람들에게 시도하기에 앞서, CLA와 이를 구성하는 이성체의 항암 효과의 기전에 대한 연구가 선행되어야 한다. 이미 여러 연구에 의해 CLA는 유방암, 피부암, 대장암의 유발 및 발생을 저해하는 것으로 알려졌으나(34), 어떠한 기전에 의한 것인지는 아직 정확하게 밝혀지지 않았다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 CLA 이성체 mixture에 의해 살아 있는 전립선 암세포의 수가 감소되었으나, LA에 의해서는 아무런 변화가 없었다. 또한 이성체중 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서 암세포의 수가 감소되었으나 *cis*-9,*trans*-11 CLA에 의한 변화는 없었다(Fig. 2). 이와 같은 CLA 이성체 mixture와 각 이성체들의 전립선 암세포 증식 억제 효과는 Oh 등에 의해서 이미 발표되었고(13), Kim 등(35)의 연구에서도 이 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서 대장암 세포인 HT-29의 증식이 감소되는 것을 관찰하였다. 위에서 언급한 바와 같이, 이러한 CLA의 세포증식 억제 효과가 apoptosis와 관계가 있는지 알아보기 위해 apoptosis의 일반적인 지표인 DNA laddering을 수행한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 1과 2 실험에서 세포 증식 억제를 유도한 최고 농도로 각각의

지방산을 처리하였을 때, 세포의 증식이 현저히 감소하였던 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA에서 DNA fragmentation이 현저하게 나타난 것을 볼 수 있었다. 비슷한 연구로서, Ip 등은 CLA 이성체 mixture에 의해 유방암 세포의 apoptosis가 유발됨을 관찰하였다(36). 또한 Palombo 등(32)의 연구에서는 전립선 암세포인 PC-3를 이용하여 apoptosis의 또 다른 경로에서 증가된다고 알려진 caspase 활성을 측정하였는데, *trans*-10,*cis*-12 CLA의 경우 대조군에 비해 total caspase 활성이 증가함을 관찰하였다. 그러나 PC-3 세포에서 CLA에 의해 유도되는 caspase 활성과 apoptosis와의 관계에 대해서는 정확히 밝혀지지 않았다고 보고했다. 그러나 전립선 암세포인 TSU-Pr1을 사용한 본 연구에서는 CLA에 의해 apoptosis가 유도됨과 동시에 Bcl-2 단백질이 감소하는 것을 관찰하였다.

이미 언급한 바와 같이, Bcl-2와 Bax 단백질의 발현 균형이 apoptotic cell death 과정에 중요한 역할을 한다고 보고되었으므로(37), 본 연구에서도 이의 발현정도를 측정하기 위해 DNA laddering을 측정할 때와 같은 농도의 지방산을 첨가하여 immunoblot analysis를 실시하였다. 그 결과, 분자량이 26 kDa인 Bcl-2는 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해서 발현이 감소된 것을 관찰할 수 있었고, 다른 지방산들에 의해서는 변화가 없었다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 Bax는 분자량 21 kDa에서 관찰되었고, 이 단백질의 생성은 여러 지방산들에 의해서 변화가 없었다. Bcl-2/Bax ratio를 Fig. 4B에 그래프로 나타내었다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA에서 Bcl-2/Bax ratio가 현저하게 감소하였는데 이러한 결과는 이 지방산에 의해, Bcl-2 단백질이 감소되었기 때문이다.

본 연구에서는 CLA 이성체 mixture의 전립선 암세포증식 억제효과가 *trans*-10,*cis*-12 CLA에 의한 것임도 다시 확인할 수 있었다. 그리고 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 apoptosis를 유도하였으나 DNA의 laddering의 강도는 CLA 이성체 mixture에 비해 *trans*-10,*cis*-12 CLA로 처리한 세포에서 훨씬 강했으며, Bcl-2/Bax ratio는 오직 *trans*-10,*cis*-12 CLA로 처리한 세포에서만 감소하였다. 위에서 언급한 바와 같이 본 연구에서 사용한 CLA 혼합물은 *cis*-9,*cis*-11, *cis*-9,*trans*-11, *trans*-9,*cis*-11, *trans*-9,*trans*-11, *cis*-10,*cis*-12, *cis*-10,*trans*-12, *trans*-10,*cis*-12, *trans*-10,*trans*-12 CLA의 8개의 이성체를 함유하고 있으며 그 중 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA 이성체가 각각 48%를 차지하고 있고 나머지 6개 CLA 이성체는 미량 존재하는 혼합물이다(7, 8). 이와 같은 결과는 CLA 이성체 mixture에 포함된 다른 이성체들이 *trans*-10,*cis*-12 CLA가 Bcl-2에 미치는 영향에 반대 작용을 하는 것을 암시한다. 따라서 각각의 이성체가 Bcl-2에 미치는 효과를 더 연구할 필요가 있다고 하겠다.

현재 다양한 암세포에서 apoptosis가 어떠한 기전에 의해서 일어나는지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Herrmann 등은(38) Bcl-2가 전립선 암세포에서 ceramide와 ara-

chidonate 신호 전달체계를 통해 세포의 생존과 죽음에 관여한다고 밝혔으며, Ip 등(36)은 CLA가 유방 상피세포의 성장을 방해하는데 있어 DNA 합성 감소와 apoptosis 유도가 관여하는데, 이는 아마도 p53 tumor necrosis factor(TNF) receptor와 같은 수용체의 활성화와 관련될 것이라 보고하였다. CLA가 Bcl-2 유전자를 어떻게 조절하여 효과를 나타내는지에 관한 연구는 아직 확실하게 밝혀지지 않았지만, 위에서 언급한 바와 같이 CLA가 PPAR $\gamma$ 의 ligand로 작용하여 p53이나 *c myc* 등의 Bcl-2와 관련된 유전자들을 조절하게 될 것이라 여겨진다.

본 연구를 통해서 CLA가 전립선 암세포에서 apoptosis를 유도한다는 것을 관찰하였으므로 앞으로 apoptosis 기전에 대한 좀더 깊은 연구를 진행시킬 계획이다.

## 요 약

CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 살아있는 TSU-Pr1 세포 수를 감소시키는 반면 LA와 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 세포 수에 아무런 효과가 없었다. 세포 수를 감소시키는 CLA 이성체 mixture와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 apoptotic cell death를 유도하는 것을 관찰하였고, 특히 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 Bcl-2/Bax 비율을 감소시켰다. *Trans*-10,*cis*-12 CLA에 의해 Bax와 Bcl-2 mRNA의 수준이 변하지 않았으므로 이 지방산에 의한 Bcl-2의 변화는 mRNA 전사 후에 일어나는 단계에서 일어난다고 결론지을 수 있다. 이로써 CLA에 의한 세포증식 억제는 부분적으로 TSU-Pr1 세포의 apoptosis를 유도함으로써 이루어지는 것이라 할 수 있다.

## 감사의 글

본 연구논문은 한국과학재단(R01-1999-000-00166-0), 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대 실버생물산업기술 연구센터 (R12-2001-007204-0)와 중소기업청의 산학연 공동 기술개발 컨소시엄사업의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Giovannucci E, Goldin B. 1997. The role of fat, fatty acid, and total energy intake in the etiology of human colon cancer cell. *Am J Clin Nutr* 66: 1564S-1571S.
- Zock PL, Katan MB. 1998. Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 68: 142-153.
- Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.
- Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: Identification and quantification in natural and processed cheeses. *J Agric Food Chem* 37: 75-81.
- Park HS. 2000. Mechanism of cancer prevention and other physiological function by conjugated linoleic acid. *Korean J Nutr* 33: 556-565.
- Ip C. 1997. Review of the effects of trans fatty acid, oleic acid, n 3 polyunsaturated fatty acid, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr* 66: 1523S-1529S.
- Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 5: 185-197.
- Ip C, Scimeca J, Thompson HJ. 1994. Conjugated linoleic acid. *Cancer* 74: 1050-1054.
- Belury MA, Nickel K, Bird CE, Wu Y. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr Cancer* 26: 149-157.
- Ip C, Briggs SP, Haegele AD, Thompson HJ, Storkson JM, Scimeca JA. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17: 1045-1050.
- Cesano A, Visonneau S, Scimeca JA, Kritchevsky D, Santol D. 1998. Opposite effects of linoleic acid and conjugated linoleic acid in human prostatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res* 18: 1429-1434.
- Ip C, Dong Y, Ip MN, Banni S, Carta G. 2002. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr Cancer* In press.
- Oh YS, Kim EJ, Kim JW, Kim WK, Lee HS, Park JHY. 2002. The effect of conjugated linoleic acid and its isomers on the proliferation of prostate TSU-Pr1 cancer cells. *Korean J Nutrition* 35: 192-200.
- Parodi PW. 1997. Cow's milk components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr* 127: 1055-1060.
- Vanden Heuvel JP. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acid, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr* 129: 575S-580S.
- Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 678-682.
- Reed JC. 1998. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J Sci Am* 4 Suppl. 1: S8-S14.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. 1999. Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.
- Pellegrini M, Strasser A. 1999. A portrait of the Bcl-2 protein family: life, death, and the whole picture. *J Clin Immunol* 19: 365-377.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev* 13: 1899-1911.
- Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J. 2001. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 33: 57-68.
- McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschenbach AC, Brisbay S, Logothetis CJ. 1997. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Uro* 157: 569-74.
- Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wase-nius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC. 1995. Reduced expression of pro-apoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter

- survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 55: 4471-4478.
25. Bargou RC, Wagener C, Bommer K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, Dietel M, Guski H, Feller A, Royer HD, Dorken B. 1996. Overexpression of the death-promoting gene *bax- $\alpha$*  which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest* 97: 2651-2659.
  26. Fandi A, Harrington EA, Evan GI. 1992. Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes. *Nature* 359: 554-556.
  27. Iizumi T, Yazaki T, Kanoh S, Kondo I, Koiso K. 1987. Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). *J Urol* 137: 1304-1306.
  28. 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.
  29. 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.
  30. Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-537.
  31. Steel RGD, Torrie JH. 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
  32. Palombo JD, Ganguly A, Bistrrian BR, Menard MP. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Letters* 177: 163-172.
  33. Erickson KL. 1998. Is there a relation between dietary linoleic acid and cancer of the breast, colon, or prostate? *Am J Clin Nutr* 68: 5-7.
  34. Visonneas S, Cesano A, Tepper SA, Scimeca J, Santoli D, Kritchevsky D. 1997. Conjugated linoleic acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID mice. *Anticancer Res* 17: 969-974.
  35. Kim EJ, Cho HJ, Kim SJ, Kang YH, Ha YH, Park JHY. 2001. Effect of conjugated linoleic acid on the proliferation of the colon cancer cell line, HT-29. *Korean J Nutrition* 34: 896-904.
  36. Ip MM, Masso-Welch PA, Shoemaker SF, Shea-Eaton WK, Ip C. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Experimental Cell Research* 250: 22-34.
  37. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. 1996. Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 94: 1506-1512.
  38. Herrmann JL, Menter DG, Beham A, von Eschenbach A, McDonnell TJ. 1997. Regulation of lipid signaling pathways for cell survival and apoptosis by *bcl-2* in prostate carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 234: 442-451.

(2002년 9월 13일 접수; 2002년 11월 6일 채택)