

Carotenoids가 인체의 대장암 세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향

김은지 · 정재인* · 이현숙* · 강일준* · Frederick Khachik** · 윤정한*

한림대학교 실버생물산업기술연구센터

*한림대학교 생명과학부

**Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition, University of Maryland

Effect of Carotenoids on the Growth of HT-29 Human Colon Cancer Cells

Eun Ji Kim, Jae In Jung*, Hyun Sook Lee*, Il-Jun Kang*,
Frederick Khachik** and Jung Han Yoon Park*

Silver Biotechnology Research Center, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

*Division of Life Sciences, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

**Joint Institute for Food Safety & Applied Nutrition, University of Maryland, MD 20742, USA

Abstract

Epidemiological studies have observed a negative association between increased consumption of green and yellow vegetables and cancer incidence. These vegetables contain carotenoids, which are reported to exhibit anticarcinogenic effects. Overexpression of ErbB2 and ErbB3 genes is a frequent event in several human cancers. The present study was performed to determine whether α -carotene, β -carotene, lutein, or lycopene inhibits cell growth and to assess such an effect is related to changes in the levels of the ErbB receptor family and the ErbB3 receptor signaling pathway in HT-29 cells. HT-29 cells were cultured in serum-free medium in the presence of various concentrations (0~100 μ M) of the individual carotenoids. α -Carotene and lycopene significantly inhibited cell growth in a dose-dependent manner, whereas lutein slightly inhibited cell growth and β -carotene increased cell growth. Lycopene is more potent than α -carotene in inhibiting HT-29 cell growth. Lycopene inhibited DNA synthesis and induced apoptosis of HT-29 cells. The ErbB3 ligand heregulin (HRG) increased cell growth but did not prevent the lycopene-induced inhibition of cell growth. Lycopene decreased ErbB2 protein levels in a dose-dependent manner. Immunoprecipitation/Western blot studies revealed that lycopene inhibited HRG-induced phosphorylation of ErbB3, recruitment of the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) to the ErbB3 receptor, and phosphorylation of Akt. These results indicate that downregulation of ErbB2/ErbB3/PI3K/Akt signaling may be one of the mechanisms by which lycopene inhibits HT-29 cell proliferation and induces apoptosis.

Key words: carotenoids, lycopene, ErbB, apoptosis, DNA synthesis

서 론

최근 통계청 발표에 의하면 암은 한국인의 사망원인 중 1위를 차지하고 있으며 특히 대장암에 의한 사망률이 급증하고 있다. 대장암을 비롯한 여러 암의 발생은 유전적 요인과 환경적 요인에 의하여 영향을 받고, 환경적 요인 중에서도 식이와 가장 밀접한 관련이 있다(1). 이에 근거하여 식품 내 존재하는 암의 원인물질을 탐색하는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 또한 항암 효과를 가지고 있는 식품 성분에 대한 연구가 이루어지고 있다.

여러 역학조사에 의해 채소와 과일의 섭취가 여러 종류의 암 발생 위험도를 감소시킨다고 보고되어(2,3) 채소나 과일 등에 포함되어 있는 색소의 주요 성분인 carotenoids가 항암 효과가 있을 것으로 주목되고 있다. 현재까지 carotenoids중

β -carotene에 대한 연구가 활발히 진행되었으나 β -carotene을 대상으로 한 중재 연구들 간에도 항암 효과가 없거나(4,5) 오히려 암의 발생을 촉진하는 등(6) 서로 다른 결과들이 나타났다. 최근에는 토마토에 다량으로 함유되어 있는 carotenoid인 lycopene의 항암 작용에 대한 관심이 증가되고 있다. 역학 조사를 이용한 연구들은 lycopene이 유방암(7), 폐암(8), 전립선암(9)의 발생 위험도와 역의 상관관계를 가진다고 보고하였고, Giovannucci 등(10)은 여러 역학조사 결과를 분석하여 토마토 섭취량 또는 혈중 lycopene 수준이 암 발생과 역의 상관관계가 있음을 밝혔다. 동물실험(11)과 세포 배양 실험(12,13)에서도 lycopene이 항암 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 β -carotene과 lycopene을 제외한 다른 carotenoids의 항암 효과에 대한 연구는 미미하며, 특히 carotenoids가 대장암에 미치는 영향에 대한 연구는 전혀 이루어지지 않았다.

*Corresponding author. E-mail: jyoona@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-240-1477. Fax: 82-33-256-0199

암은 세포 증식 작용이 정상적으로 조절되지 않은 경우에 생기며, 비정상적인 세포 증식은 세포내 신호 전달의 이상에 의해 야기된다. Protein tyrosine kinase(PTK)는 세포내 신호 전달에서 중요한 조절인자로 작용하며 PTK에 의한 신호 전달이 정상적으로 조절되지 않으면 암 발생의 하나의 원인이 된다(14). Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor family는 epidermal growth factor receptor(EGFR or ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어있고 암의 발생과 진전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ErbB receptor에 결합하는 여러 종류의 ligand들이 존재하는데 EGF와 transforming growth factor- α 는 EGFR에 결합하고(15), heregulin(HRG)은 ErbB3와 ErbB4에 결합한다(16). Ligand가 ErbB receptor의 extracellular domain에 결합하면 receptor의 dimerization이 일어나고 intrinsic tyrosine kinase가 활성화되어 receptor의 cytoplasmic domain의 tyrosine 잔기의 인산화가 일어난다. 인산화된 tyrosine 잔기는 intracellular signaling protein의 결합자리의 역할을 하는데 이 자리에 결합하는 단백질 중에서 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)의 regulatory subunit인 p85가 존재한다(17). 이 결합에 의해 활성화되는 PI3K는 inositol을 포함한 인지질을 인산화하는 효소인데, 이때 inositol ring의 3번째 탄소를 인산화한다. 이렇게 생성된 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate는 Akt의 인산화를 촉진하여 활성화한다(18-20). 활성화된 Akt는 caspase-9, Bad, forkhead transcription factor 등 apoptosis에 관여하는 단백질을 인산화하여, 불활성화시키므로서 세포의 apoptosis를 억제하고 cell survival을 촉진한다고 알려져 있다(20).

여러 암에서 ErbB receptor gene의 발현이 증가한다고 보고되었다(21). Slamon 등(22)은 유방과 난소암에서, Safran 등(23)은 십이지장 암에서 ErbB2가 과발현됨을 확인하였다. 대장암에서도 정상세포에 비해 ErbB2와 ErbB3의 mRNA의 발현과 단백질의 수준이 증가하였다고 보고되었다(24). 또한 ErbB receptor family 신호전달 과정의 조절 이상은 폐, 유방, 전립선암 등의 암 발생과 진전에 중요한 요소로 작용한다고 보고되었다(21).

본 연구는 채소 및 과일에 포함되어 있는 carotenoid들 중에서 대장암에 항암 작용이 있는 물질을 탐색하고, carotenoid의 항암 작용 기전을 규명하기 위한 일환으로 lycopene이 HRG/ErbB3 신호 전달 경로에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에 사용한 인간의 대장암 세포주인 HT-29 cell(ATCC HTB-38)은 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포를 유지하기 위해서는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium:Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD,

USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco/BRL)와 항생제(100 units/mL penicillin 과 100 μ g/mL streptomycin, Gibco/BRL)를 첨가하여 사용하였다. 세포가 약 80% 정도 접시를 덮으면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA(Gibco/BRL)로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

살아 있는 세포수 측정

Carotenoids가 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포를 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24 well plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 FBS가 없는 무혈청 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하여 혈청의 효과를 제거하였다. 무혈청 배지는 DMEM/F12에 transferrin(5 μ g/mL, Gibco/BRL), selenium(5 ng/mL, Gibco/BRL)을 첨가하여 만들었다. 무혈청 배지에서 24시간 배양 후 무혈청 배지에 여러 농도의 carotenoids를 첨가하여 배지를 교환하였다. Carotenoids는 tetrahydrofuran에 녹인 후 배양액에 첨가하였고 모든 well이 같은 농도의 tetrahydrofuran을 포함하도록 하였다. Carotenoids를 첨가하고 0, 2, 4, 6일이 경과한 후 MTT assay(25) 방법을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였다.

HRG가 lycopene의 세포 증식 억제 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 위와 동일한 방법으로 세포를 분주하고 무혈청 배지에서 24시간 배양한 후 lycopene이 첨가되거나 첨가되지 않은 세포 배양액에 HRG- α 를 100 ng/mL의 농도로 첨가하여 살아 있는 세포수를 측정하였다.

[³H]Thymidine incorporation 측정

Lycopene이 DNA 합성에 미치는 영향을 측정하기 위해서 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 6,000 cells/well의 밀도로 96 well-plate에 분주하였다. 위에서 언급한 것처럼 24시간 무혈청 배지에서 배양한 후 여러 농도의 lycopene이 들어 있는 무혈청 배지로 교환하였다. Lycopene을 첨가하고 72시간이 경과한 후 각 well 당 0.5 μ Ci [³H]thymidine을 첨가하여 14시간 동안 배양하였다. 생성된 DNA에 삽입된 [³H]thymidine을 측정하기 위해 세포의 DNA를 cell harvester(Skatron, Lier, Norway)를 사용하여 filter(Skatron)에 옮긴 후 DNA가 옮겨진 filter를 cocktail solution(ICN, Costa Mesa, CA, USA)에 넣어 녹여 liquid scintillation counter(Beckman, Fullerton, CA, USA)로 측정하였다.

DNA laddering 측정

Lycopene이 apoptosis를 유도하는지 조사하기 위해서 apoptosis 초기에 일어나는 DNA laddering을 측정하였다. 세포를 100 mm dish에서 위에서 언급한대로 여러 농도의 lycopene을 첨가하여 4일간 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 두 번 행군 다음 extraction buffer(50 mM Tris, pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)를 넣고 4°C에서 2시간 동안

섞었다. SDS(1%)와 RNase A(500 µg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37°C에서 2시간 섞은 후, proteinase K(500 µg/mL, Sigma)을 첨가하여 42°C에서 2시간 섞었다. DNA는 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25:24:1)로 추출하였으며 0.3 M sodium acetate와 2.5 배의 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 20 µg의 DNA를 2% agarose gel에 Tris-borate EDTA buffer를 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하고 탈색하여 가시화하였다.

Western blot analysis

세포를 100 mm dish에서 위에서 언급한 것처럼 lycopene을 첨가하여 배양하여 cell lysate를 만들었다. Cell lysate를 만들기 위해 세포를 차가운 PBS로 헹구고, lysis buffer(20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄)를 첨가하여 4°C에서 40분간 섞었다. 이때 단백질분해를 방지하기 위해서 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamide HCl, 0.2 mM phenylsufonyl fluoride를 첨가하였다. 침전물은 13,000×g에서 10분간 원심 분리하여 제거하고 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 측정하였다. Cell lysate(50 µg protein)를 4~20% 까지 농도를 다르게 한 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, anti-phosphotyrosine antibody(1:5000 희석), anti-EGFR antibody(1:250 희석), anti-ErbB2 antibody(1:500, 희석), anti-ErbB3 antibody(1:2000 희석), Anti-p85 antibody(1:2000 희석), anti-phospho-Akt(1:1000 희석), anti-Akt(1:1000 희석), anti-β-actin antibody(1:2000 희석) 등 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 1시간 교반하였다. 그 후 horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG(Amersham, Buckinghamshire, England) 또는 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG(Amersham)를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 protein band는 SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate(Pierce)을 사용하는 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다.

Immunoprecipitation

세포를 배양하여 위에서 언급된 방법으로 얻은 cell lysate(750 µg protein)에 1 µg normal rabbit IgG와 50 µL protein A Sepharose bead slurry(50%, Amersham)를 넣어 4°C에서 1시간 섞어 preclean하였다. Preclean된 cell lysate에 1 µg anti-ErbB3 antibody를 첨가하여 4°C에서 1시간 섞었고, 이

antibody에 결합된 단백질들을 침전시키기 위해서 50 µL protein A Sepharose bead slurry(50%)를 첨가하고 1시간 동안 섞었다. Protein A Sepharose bead를 lysis buffer로 4번 씻은 다음 bead에 결합된 단백질을 위에서 언급한대로 SDS-PAGE로 분리한 후 Western blot하였다.

통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 각 실험군의 평균±표준오차로 나타내었고, 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결 과

α -Carotene, β -carotene, lutein, lycopene이 인체의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 살펴보기 위해 각각의 carotenoid를 배양액에 첨가하여 배양하고 0, 2, 4, 6일이 경과한 후 살아있는 세포수를 측정하였다. α -Carotene을 첨가하여 세포를 배양한 경우 2일까지는 세포의 수에 아무런 변화가 없었다. 그러나 4일과 6일이 경과하면서 세포의 증식은 유의적으로 감소하여 100 µM α -carotene에 의해 40±8% 세포의 수가 감소하였다(Fig. 1A). β -Carotene 효과는 2일, 4일에는 나타나지 않았으나 6일이 지난 후에는 β -carotene을 첨가한 군에서 세포수가 오히려 유의적으로 증가하였다. 그러나 농도에 따른 차이는 없었다(Fig. 1B). Lutein의 경우 100 µM 농도로 첨가했을 때에만 세포수가 다소 감소하였다(Fig. 1C). Lycopene 첨가는 세포수를 현저하게 감소시켰다. Lycopene에 의한 세포수의 감소는 2일부터 나타났고 농도가 증가할수록 세포수는 유의적으로 감소하였다. Lycopene의 농도를 100 µM로 첨가하고 6일이 지난 후에 세포수는 lycopene을 첨가하지 않은 군에 비해 69±4% 감소하였다(Fig. 1D). 이 4가지 종류의 carotenoids가 HT-29 세포의 살아 있는 세포수에 미치는 영향을 비교해 본 결과 β -carotene은 4일까지는 세포의 증식에 영향을 미치지 않았고 6일에 세포의 증식을 다소 증가시켰다. 반면 α -carotene, lutein, lycopene은 세포 증식을 감소하였고 이 세 가지 carotenoids 중에서 lycopene의 세포 증식 감소 효과가 가장 컸으며 α -carotene, lutein의 순으로 세포의 증식을 감소하였다.

세포 증식 억제 효과가 가장 컸던 lycopene에 의한 HT-29 세포의 증식 억제 효과가 DNA 합성 억제에 의한 것인지 알아보기 위해 thymidine incorporation을 측정함으로써 DNA 합성 정도를 조사하였다. Lycopene을 0, 25, 50, 100 µM 농도로 세포 배양액에 첨가하여 72시간 배양한 후 [³H]thymidine을 첨가하여 14시간 동안 배양하였다. 생성된 DNA에 삽입된 [³H]thymidine을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. DNA의 합성은 lycopene의 농도 증가에 따라 현저하게 감소

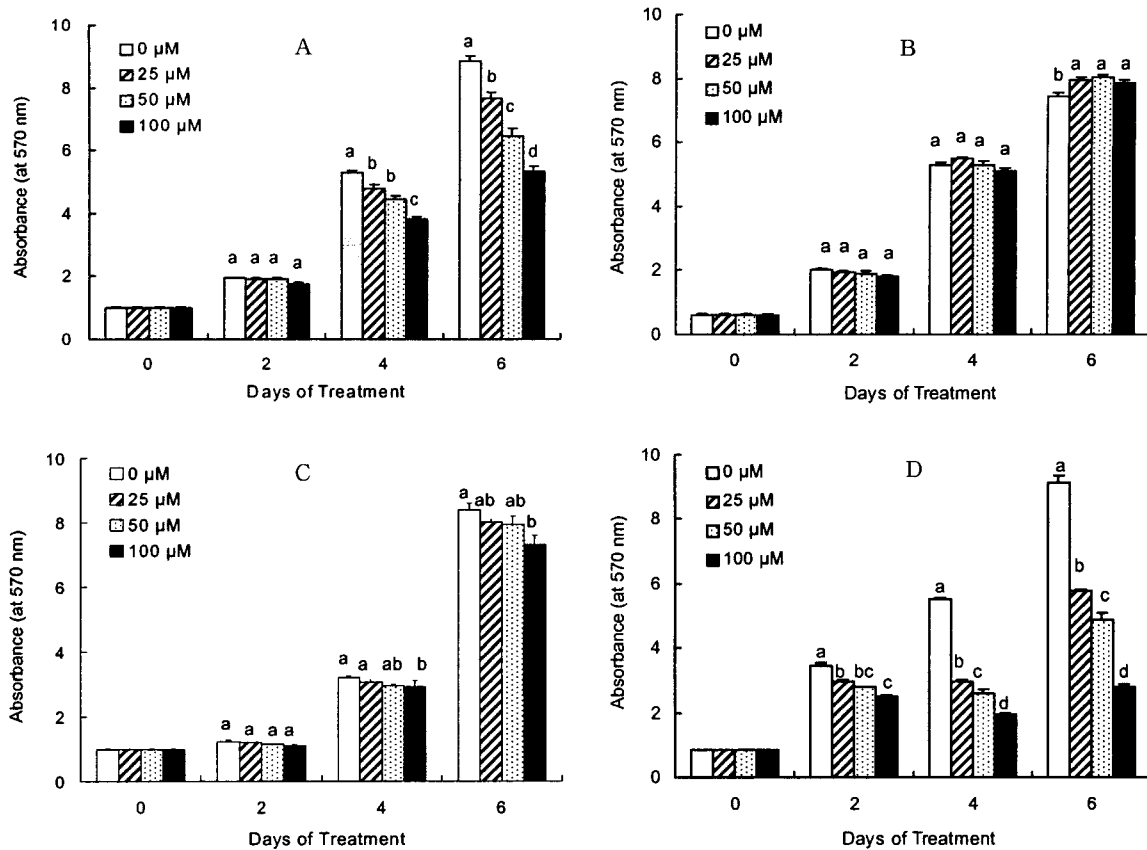


Fig. 1. Effect of carotenoids on viable HT-29 cell number.

Cells were seeded at a density of 50,000 cells/well in 24-well plates with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Twenty-four hours after plating, the monolayers were rinsed with serum-free medium and serum-starved for 24 h. The cells were then incubated in serum-free medium containing 0, 25, 50, or 100 μM α -carotene (A), β -carotene (B), lutein (C), or lycopene (D). The medium was replaced every two days. The viable cell numbers were estimated by the MTT assay, and each bar represents the mean \pm SEM (n=6). Analysis of variance followed by Duncan's multiple range test was used to determine significant differences among the different concentrations of the individual carotenoids. Values with different letters above each bar are significantly different ($p < 0.05$) between different treatments (e.g., a vs. b, b vs. c, etc.).

하여 100 μM lycopene에 의해 $90 \pm 12\%$ DNA 합성이 감소하였다(Fig. 2).

Lycopene의 세포 증식 억제 효과가 apoptosis에 의한 것 인지를 알아보기 위해 apoptosis가 일어날때 나타나는 DNA fragmentation을 genomic DNA를 분리하여 agarose gel electrophoresis 방법을 통해 살펴보았다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 lycopene의 농도가 증가할수록 DNA laddering이 증가 되는 것을 관찰하였다.

Lycopene에 의해 protein들의 tyrosine의 인산화가 변화 하는 지 조사하기 위해 세포를 lycopene이 포함된 배지에서 배양한 후 total cell lysate를 얻어 anti-phosphotyrosine antibody를 사용하여 Western blot을 실시하였다. 여러 가지 단백질의 인산화가 감소되었으나 특히 분자량이 180,000인 단백질의 tyrosine phosphorylation은 lycopene의 농도 증가에 따라 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 이 단백질의 분자량이 ErbB receptor family의 분자량과 일치하였기 때문에 다음 실험에서는 ErbB receptor family의 발현이 lycopene에 의해 변화하는지 Western blotting을 실시하여 조사하였다. HT-

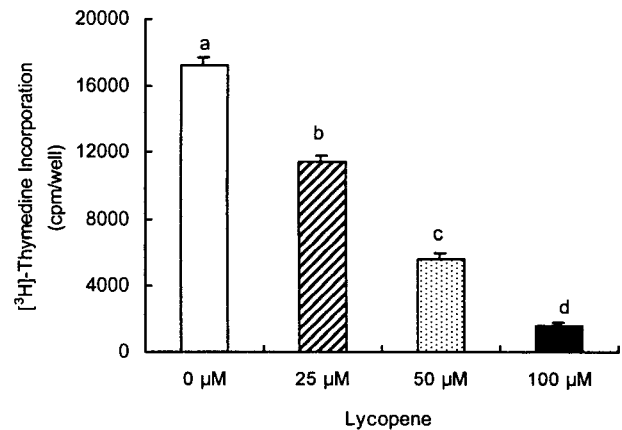


Fig. 2. Effect of lycopene on [³H]thymidine incorporation in HT-29 cells.

Cells were plated at a density of 6,000 cells/well in 96-well plates and treated with lycopene for 72 h as described in Fig. 1. [³H] Thymidine was then added and the incubation was continued for another 14 h to measure the incorporation into DNA. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

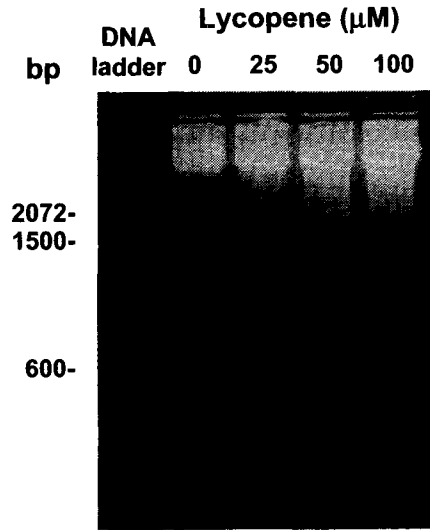


Fig. 3. Effect of lycopene on DNA fragmentation in HT-29 cells.

Cells were plated at a density of 1×10^6 cells/dish in 100 mm dishes and treated with lycopene for 72 h as described in Fig. 1. DNA samples were prepared and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. A photograph of the ethidium bromide-stained gel, which is representative of three independent experiments, is shown.

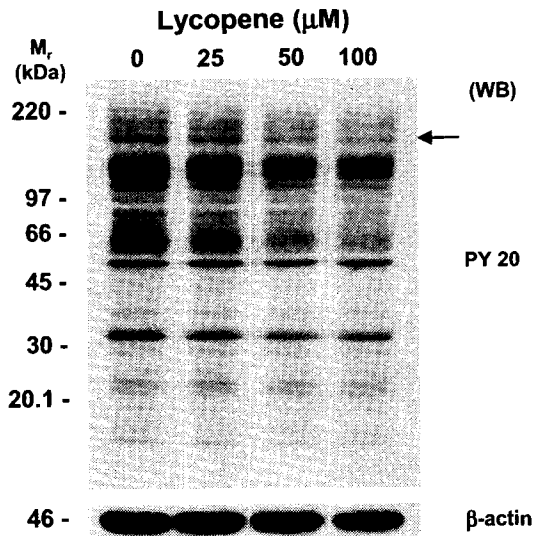


Fig. 4. Effect of lycopene on tyrosine phosphorylation in HT-29 cells.

Cells were treated with lycopene for three days as described in Fig. 1. Cells were lysed and the cell lysates were analysed by Western blotting with anti-phosphotyrosine (PY-20) or β -actin antibody. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown.

29 세포에서 EGFR, ErbB2, ErbB3의 단백질이 탐지되었으나 ErbB4는 탐지되지 않았다. Lycopene의 농도가 증가할수록 ErbB2의 수준은 유의적으로 감소하였다. EGFR과 ErbB3는 각각 두 band로 나타났는데, EGFR과 ErbB3의 윗 band는 lycopene 증가에 따라 감소하였으나 아랫 band는 lycopene 증가에 따라 증가하였다(Fig. 5).

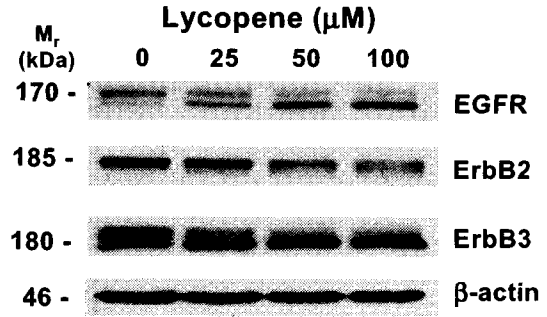


Fig. 5. Effect of lycopene on the expression of EGFR, ErbB2, ErbB3, and β -actin in HT-29 cells.

Cell lysates were prepared as described in Fig. 4 and subjected to immunoblotting with an antibody against EGFR, ErbB2, ErbB3, or β -actin. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

Lycopene에 의해 ErbB receptor family가 변화하였기 때문에 ErbB receptor family의 ligand인 HRG- α 가 lycopene의 세포 증식 억제를 감소하는지를 조사하였다. Lycopene이 첨가되거나 첨가되지 않은 세포 배양액에 HRG를 100 ng/mL의 농도로 첨가하여 살아 있는 세포수를 측정하였다. HRG에 의해 HT-29 세포의 증식은 유의적으로 증가하였으나 lycopene에 의한 세포 증식 억제는 HRG 첨가에 의해 회복되지 않았다(Fig. 6)

다음 실험에서는 Lycopene이 HRG에 의해 유도된 ErbB3의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 세포에 lycopene을 처리하여 3일간 배양한 후 HRG를 첨가하여 0분, 1분, 5분, 60분 incubation한 다음 cell lysate를 만들어 anti-ErbB3 antibody를 첨가하여 immunoprecipitation한 후 anti-phos-

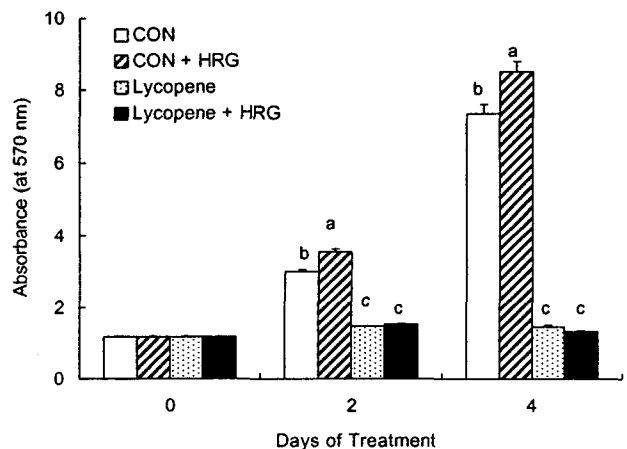


Fig. 6. Effect of lycopene and/or heregulin (HRG)- α on viable HT-29 cell number.

Cells were plated and serum starved as described in Fig. 1. After serum-starvation, cells were incubated in serum-free medium in the absence or presence of 100 μ M lycopene and/or 100 ng/mL HRG- α . Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean \pm SEM (n=6). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar.

phosphotyrosine antibody를 사용하여 Western blot을 하였다. HRG는 ErbB3의 인산화를 증가시켰다. Lycopene를 첨가하지 않은 대조군에 비해 lycopene을 첨가한 경우 ErbB3의 인산화는 현저하게 감소하였다. ErbB3의 단백질 수준은 HRG나 lycopene에 의해 변화하지 않았다(Fig. 7). PI3K의 regulatory subunit인 p85는 ErbB3와 같이 coimmunoprecipitation되었고 ErbB3에 결합한 p85는 HRG 첨가에 의해 증가하였다. 그러나 ErbB3에 결합하는 p85는 lycopene에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 7).

Akt는 PI3K의 target protein으로 cell survival과 apoptosis에 관여하는 protein kinase이다. Lycopene이 Akt의 인산화에 미치는 영향을 조사하기 위해 lycopene을 첨가하여 세포를 배양한 후 cell lysate를 얻어 Akt와 phospho-Akt (Ser473) antibody를 이용하여 immunoblot을 실시하였다. Total Akt 수준은 lycopene의 첨가에 의해 현저히 감소하였다. Phospho-Akt는 HRG를 첨가한 후 시간이 경과함에 따라 증가하여 5분이 지났을 때 최대로 증가하였으나 lycopene에 의해 현저하게 감소하였다. 따라서 lycopene에 의한 Akt의 인산화의 감소는 주로 Akt 단백질의 감소에 의한 것임을 알 수 있었다(Fig. 8).

고찰

채소와 과일에 포함되어 있는 색소 성분인 carotenoids의 항암 작용에 대한 연구가 다각적으로 이루어지고 있다. 발암원을 투여하여 종양을 유도한 동물실험에서 carotenoids는 종양 형성을 현저히 억제하였고(11,26), 암세포를 이용한 세포 실험에서도 carotenoids는 암세포의 증식을 억제하였다(12,13,27). Carotenoids가 대장암에 미치는 영향을 알아보기 위해 본 연구에서는 α -carotene, β -carotene, lutein, lycopene

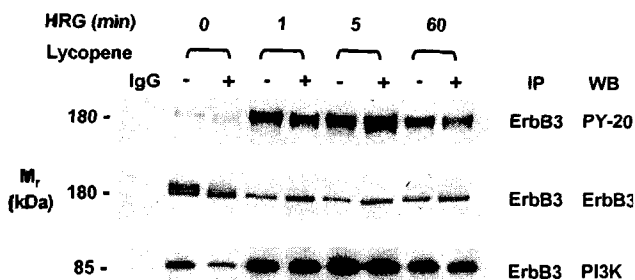


Fig. 7. Effect of lycopene on heregulin (HRG)- α -induced tyrosine phosphorylation of ErbB3 and recruitment of the p85 subunit of PI3K to ErbB3.

Cells were treated in the absence or presence of 100 μ M lycopene for three days and lysed without stimulation (0) or after 1, 5, or 60 min of stimulation with HRG- α . Cell lysates were prepared and incubated with an anti-ErbB3 antibody and the immune complexes were precipitated with Protein A-Sepharose. The immunoprecipitated proteins were analysed by Western blotting with antibodies against phosphotyrosine (PY-20), ErbB3, or p85. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

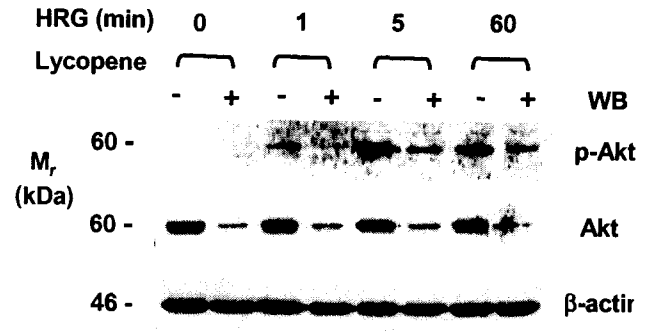


Fig. 8. Effect of lycopene on heregulin (HRG)- α -induced Akt activation.

Cell lysates were prepared as described in Fig. 7 and analyzed by immunoblotting with anti-phospho-Ser473 Akt (p-Akt) or anti-Akt antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

이 인체의 대장암에서 유래한 세포주인 HT-29의 증식에 미치는 영향을 비교하였다. β -carotene은 세포 증식을 다소 증가시켰고 α -carotene, lutein, lycopene은 세포 증식을 감소시켰다(Fig. 1). 세포의 증식을 감소시킨 carotenoids 중에서 lycopene이 세포 증식 억제 효과가 가장 강력한 것을 관찰하였는데, 이는 lycopene이 대장암에 항암 효과가 있을 가능성을 제시한다. Lycopene이 다른 carotenoids보다 강한 효과가 있음은 다른 연구에서도 보고되었다. Levy 등(28)도 자궁암세포, 유방암세포(MCF-7), 폐암세포(NCI-H226) 등을 대상으로 carotenoids의 효과를 비교하였는데 lycopene은 α -carotene과 β -carotene보다 암세포 증식 억제 효과가 강한 것을 보고하였다. Narisawa 등(29)은 Sprague-Dawley 쥐에 *N*-methylnitrosourea를 주사하여 발암을 유도한 후 대장암의 전구 병변인 aberrant crypt foci(ACF)를 조사하였다. ACF 형성은 β -carotene에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나 lycopene, lutein, α -carotene과 palm carotenoids(α -carotene, β -carotene과 lycopene의 혼합물)은 ACF의 형성을 억제하였고 특히 lycopene이 강한 억제 효과를 나타내었다.

Lycopene을 비롯한 carotenoid의 암세포 증식 억제 기전에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없으나 여러 측면으로 고려되고 있다. Carotenoid는 gap junctional communication을 증가시키거나(30) 세포 주기를 방해하거나(13,31), apoptosis(31)와 분화(13)를 유도함으로써 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 다른 carotenoid들보다 암세포 억제 작용이 큰 lycopene을 선택하여 암세포 증식 억제가 어떤 기전에 의해 이루어지는지를 알아보기 위해 DNA 합성과 DNA laddering을 측정하였다. Lycopene에 의해 DNA 합성은 억제되고 apoptosis는 증가하였다(Fig. 2, Fig. 3). Lycopene에 의해 DNA 합성 및 DNA laddering 결과(Fig. 2, Fig. 3)를 비교해 보면, lycopene에 의해 apoptosis 증가보다는 DNA 합성 감소 정도가 큼을 확인할 수 있었다. 이는 lycopene의 대장암 세포 증식 억제는 주로 세포의 proliferation

감소에 의함을 제시한다.

ErbB receptor family는 대장암 등 여러 암에서 과발현됨이 관찰되었으며, ErbB receptor family 활성의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 요인으로 제안되었다(21). 이 receptor의 억제제들은 ErbB receptor family가 과발현되는 암세포의 증식(proliferation), 생존(survival), 침입(invasion), 혈관생성(angiogenesis) 등 여러 과정을 억제한다고 보고되었기 때문에(32) 암의 예방제나 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 제시해준다. Motoyama 등(33)은 ErbB2가 과발현되는 암세포인 BT474 세포에 ErbB2를 타겟으로 하는 단일 항체인 4D5 또는 ErbB receptor의 활성을 차단하는 저분자 억제제인 CGP59326과 PKI166를 처리한 경우 세포의 증식이 현저히 감소함을 보고하였다. 본 연구에서 lycopene은 ErbB2의 발현을 감소하고 HRG에 의한 ErbB3의 인산화를 억제하였다. 따라서 lycopene에 의한 ErbB receptor의 변화가 암세포 증식 억제의 하나의 기전중의 하나가 될 수 있을 것으로 생각된다.

성장 인자가 tyrosine kinase 활성을 가지고 있는 receptor에 결합을 하면 세포의 증식과 생존의 조절자의 하나인 PI3K가 활성화되는데 HRG의 경우는 ErbB3와 결합하여 PI3K의 활성을 증가시킨다(34). ErbB3는 intrinsic tyrosine kinase의 활성이 없으므로(35) HRG에 결합되면 다른 ErbB receptor와 heterodimer를 이루어서 활성화될 수 있지만(36), 특히 orphan receptor로 알려진 ErbB2와 heterodimer를 형성하므로서 인산화되고 활성화된다고 알려져 있다(37). ErbB3는 COOH-말단에 PI3K의 regulatory subunit인 p85가 결합하는 6개의 Tyr-Xaa-Xaa-Met(YXXM) consensus-binding site를 가지고 있어 PI3K 신호 전달의 주요 매개자로서 작용을 한다(38). Motoyama 등의 연구에서는 EGF, betacellulin, HRG 등의 ligand의 존재 하에 BT474 세포에 ErbB2를 타겟으로 하는 단일 항체인 4D5를 첨가한 경우 4D5에 의한 세포 증식 억제는 감소하였으나(33), 본 연구에서는 HRG를 처리한 경우 lycopene의 HT-29 세포 증식 억제에 변화가 없었다(Fig. 6). 4D5는 ErbB2와 결합하여 ErbB2가 EGFR이나 ErbB3와 heterodimer 형성을 감소한다. 그러나 과량의 ligand를 첨가하면 EGFR와 ErbB3의 활성화가 증가하게 되며 이로써 4D5와 ErbB2의 결합이 감소한다. 그러나 본 실험에서 lycopene에 의한 세포 증식 억제는 ErbB2의 절대적인 감소 때문에 ErbB3의 ligand인 HRG를 첨가했을 때 ErbB3 활성을 회복시킬 수 없었고, 이 외에도 세포내의 Akt의 단백질 수준의 감소가 Akt 인산화의 저하에 기여한 것으로 사료된다.

본 연구에서 lycopene은 ErbB3의 단백질 수준에는 영향을 미치지 않았으나, HRG에 의해 유도된 ErbB3의 인산화를 억제하고 ErbB3에 결합된 PI3K의 regulatory subunit인 p85의 수준을 감소시켰다(Fig. 7). 또 lycopene에 의해 ErbB2의 감소를 관찰하였는데(Fig. 5), ErbB2는 ErbB3와 heterodimer를 이루어 이 receptor를 활성화시키므로 ErbB2의 감소가

ErbB3의 인산화 저하의 원인의 하나이고, 이 ErbB3의 인산화 저하가 ErbB3에 결합하는 p85 수준을 감소시킨 직접적 원인으로 간주된다. 이렇게 되어 PI3K의 활성이 감소되었을 것으로 사료된다.

PI3K의 활성화는 하위 목표 단백질인 Akt에 전달된다. Akt는 세포의 apoptosis를 억제하고 생존을 촉진할 뿐만 아니라(20), 세포 주기, 혈관생성, 암의 전이 등을 촉진하는 protein kinase이다(39). HRG는 HT-29 세포의 Akt의 인산화를 유도하였고, lycopene은 HRG에 의해 유도된 Akt의 인산화를 감소하였다. 그러나 Akt의 단백질 수준이 현저히 감소하였으므로(Fig. 8) lycopene에 인산화된 Akt의 감소의 주요 원인은 Akt 단백질 발현의 감소 때문이라고 할 수 있다. Lycopene은 여러 기전을 통해 암세포의 증식을 억제한다. 본 연구 결과는 lycopene에 의한 PI3K/Akt 신호전달 감소가 lycopene에 의한 대장암 세포 증식 억제의 가능한 기전 중의 하나임을 제시한다. 인체에서 나타나는 여러 암에서 Akt의 신호전달의 이상이 발견되었으므로(40,41) lycopene에 의한 ErbB/PI3K/Akt 경로의 조절은 더 깊이 연구될 필요가 있다고 사료된다.

요 약

Carotenoids는 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 각각의 carotenoids가 대장암에 미치는 영향에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 4가지 종류의 carotenoids가 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. α -carotene, β -carotene, lutein, lycopene을 농도를 달리하여 세포 배양액에 첨가하여 살아있는 세포의 수를 측정된 결과 β -carotene은 세포의 증식을 다소 증가시키는 반면 α -carotene, lutein, lycopene은 세포의 증식을 감소하였다. 세포의 증식을 억제한 carotenoids 중에서 lycopene이 그 효과가 가장 컸다. ErbB receptor family는 세포의 증식을 촉진하고 대장암에서 그 발현이 증가된 것으로 보고되었기 때문에 lycopene이 heregulin-ErbB3 signaling을 억제하는지를 조사하였다. Lycopene은 ErbB2 단백질을 감소하였고 ErbB3 단백질의 변화를 초래하였다. Heregulin을 첨가하여 인산화를 유도한 경우 ErbB3의 인산화, ErbB3와 p85의 결합, Akt 인산화가 lycopene에 의해 억제되었다. 이 결과들은 carotenoids 중 lycopene이 대장암 세포 증식 억제 효과가 가장 크고, 대장암 세포의 DNA 합성을 억제하고 apoptosis를 유도하는 lycopene 효과의 일부는 ErbB3와 Akt의 인산화 감소에 기인하는 것임을 나타낸다.

감사의 글

본 연구 논문은 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-007204-0와 중소

기업청의 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Doll R, Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1191-1308.
- Weisburger JH. 1991. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants, and carotenoids. *Am J Clin Nutr* 53 (Suppl.): 226S-237S.
- Ziegler RG. 1991. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. *Am J Clin Nutr* 53 (Suppl.): 251S-259S.
- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R. 1996. Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1145-1149.
- Greenberg ER, Baron JA, Tosteson TD, Freeman DH, Beck GJ, Bond JH, Colacchio TA, Collier JA, Frankl HD, Haile RW, Mandel JS, Nierenberg DW, Rothstein R, Snover DC, Stevens MM, Summers RW, van Stolk RU, The Polps Prevention Study Group. 1994. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *N Engl J Med* 331: 141-147.
- Beta Carotene Cancer Prevention Study Group The Alpha-tocopherol. 1994. Effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 330: 1029-1035.
- Zhang SM, Tang GW, Russell RM, Mayzel KA, Stempfer MJ, Willet WC, Hunter DJ. 1997. Measurement of retinoids and carotenoids in breast adipose tissue and a comparison of concentrations in breast cancer cases and control subjects. *Am J Clin Nutr* 334: 626-632
- Goodman MT, Kolonel LN, Wilkens LR, Yoshizawa CN, Lemarchand L, Hankin JH. 1992. Dietary factors in lung cancer prognosis. *Eur J Cancer* 28: 495-501.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. 1995. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1767-1776.
- Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 91: 317-331
- Kim DJ, Takasuka N, Kim JM, Sekine K, Ota T, Asamoto M, Murakoshi M, Nishino H, Nir Z, Tsuda H. 1997. Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett* 120: 15-22.
- Wang C-J, Lin J-K. 1989. Inhibitory effects of carotenoids and retinoids on the in vitro growth of rat C-6 glioma cells. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 13: 176-183.
- Amir H, Karas M, Giat J, Danilenko M, Levy R, Yermiahu T, Levy J, Sharoni Y. 1999. Lycopene and 1,25-dihydroxy-vitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer* 33: 105-112.
- Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355-365.
- Toyoda H, Komurasaki T, Ikeda Y, Yoshimoto M, Morimoto S. 1995. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett* 377: 403-407.
- Tzahar E, Levkowitz G, Karunagaran D, Yi L, Peles E, Lavi S, Chang D, Liu N, Yayon A, Wen D. 1994. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms. *J Biol Chem* 269: 25226-25233.
- Varticovski L, Harrison-Findik D, Keeler ML, Susa M. 1994. Role of PI3-kinase in mitogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1226: 1-11.
- Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676.
- Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. 1997. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17: 338-344.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg M. 1999 Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Sciences* 244: 707-712.
- Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U. 2001. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 24: 496-499.
- Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Zimmermann A, Stauffer A, Baer HU, Korc M, Buchler MW. 1998. Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol* 29: 771-777.
- Denizot F, Lanf H. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunological Methods* 89: 271-277.
- Ziegler RG, Colavito EA, Hartge P, McAdams MJ, Schoenberg JB, Mason TJ, Fraumeni JF Jr. 1996. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 88: 612-615.
- Kotake-Nara E, Kushiro M, Zhang H, Sugawara T, Miyashita K, Nagao A. 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J Nutr* 131: 3303-3306.
- Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Münster A, Danilenko M, Sharoni Y. 1995. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer* 24: 257-266.
- Narisawa T, Fukaura Y, Hasebe M, Ito M, Aizawa R, Murakoshi M, Uemura S, Khachik F, Nishino H. 1996. Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett* 107: 137-142.
- Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. 1991. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 12: 2109-2114.
- Palozza P, Serini S, Maggiano N, Angelini M, Boninsegna A, Di Nicuolo F, Ranelletti FO, Calviello G. 2002. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis* 23: 11-18.
- Anderson NG, Ahmad T. 2002. ErbB receptor tyrosine ki-

- nase inhibitors as therapeutic agents. *Front Biosci* 7: 1926-1940.
33. Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. 2002. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62: 3151-3158.
 34. Ram TG, Hosick HL, Ethier SP. 2000. Heregulin-beta is especially potent in activating phosphatidylinositol 3-kinase in nontransformed human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 183: 301-313.
 35. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd. 1994. Insect cell-expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8132-8136.
 36. Alroy I, Yarden Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 410: 83-86.
 37. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL 3rd. 1994. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269: 14661-14665.
 38. Hellyer NJ, Kim HH, Greaves CH, Sierke SL, Koland JG. 1995. Cloning of the rat ErbB3 cDNA and characterization of the recombinant protein. *Gene* 165: 279-284.
 39. Kim D, Chung J. 2002. Akt: Versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 35: 106-115.
 40. Kandel ES, Hay N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253: 210-229.
 41. Nicholson KM, Anderson NG. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14: 381-395.

(2003년 1월 8일 접수; 2003년 3월 24일 채택)