

인체 유방암 세포에서 retinoids의 영향에 대한 연구

윤현정 · 신윤용¹ · 공 구*
한양대학교 의과대학 병리학교실
¹이화여자대학교 약학대학

Effect of Retinoids on Human Breast Cancer Cells

Hyun Jung Yoon, Yhun Yhong Sheen¹, and Gu Kong*

Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University #17 Haengdang-Dong, Sungdong-Ku, Seoul, 133-792, Korea

¹Collage of Pharmacy, Ewha Womans University #11-1, Daehyun-dong, Sudaemun-ku, Seoul, 120-750, Korea

(Received May 17, 2004 / Accepted May 31, 2004)

Abstract : Retinoids, better known as vitamin A, have been reported to inhibit the growth of several breast cancer cell lines in culture and to reduce breast tumor growth in animal models. Furthermore, retinoids can augment the action of other breast cancer cell growth inhibitors both in vitro and in vivo. Clinically, interest has increased in the potential use of retinoids for the prevention and treatment of human breast cancer. We have examine the effect of all-trans retinoic acid(tRA) and 9-cis retinoic acid(9-cis RA) on human breast cancer cell(MCF-10A, T47-D, MCF-7) proliferation using MTT assay and cell cycle analysis(FACS). Overexpression of cyclin D1 protein is observed in the majority of breast cancers, suggesting that dysregulated expression of cyclin D1 might be a critical event in breast cancer carcinogenesis. We investigated whether tRA and 9-cis RA might affect expression of cyclin D1 on human breast cancer cells(MCF-10A, T47-D, MCF-7) using RT-PCR and western bolt. In MCF-10A cells, either tRA or 9-cis RA treatment did not affect the cell proliferation. In T47-D cells and MCF-7 cells, either tRA or 9-cis RA treatment showed the inhibition of the cell proliferation over control cells and also inhibit the estrogen stimulated cell proliferation when it was given together with estrogen. The effect of retinoids was dose- and time- dependent. T47-D cells treated with 1.0 μM tRA undergo G0/G1-phase arrest by Day 5. MCF-7 cells treated with 1.0 μM tRA undergo S-phase arrest by Day 5. All-trans retinoic acid(tRA) and 9-cis retinoic acid(9-cis RA) inhibited the cyclin D1 mRNA and protein expression levels of human MCF-7 and T47-D breast carcinoma cells in vitro. The data indicate that retinoids can reduce cyclin D1 expression levels in a variety of breast cell lines in vitro and result in inhibition of cell proliferation. tRA-mediated growth inhibition and cyclin D1 expression inhibition is more potent than 9-cis RA mediated that. tRA-mediated inhibition effect is more potent on T47-D cells than on MCF-7 cells. Our data suggest that retinoids activity is different according to property of cell lines. Future chemoprevention of breast cancer studies using retinoids will be necessary to determine the mechanism of the retinoids-mediated growth inhibition.

Key words : Breast cancer, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, cycin D1 and MCF-7

서 론

사람의 유방암은 호르몬 의존성과 호르몬 비의존성 두 가지의 아류형으로 나누어진다. 에스트로젠은 호르몬 의존성 유방암에서 성장을 촉진하는 가장 중요한 내분비성 호르몬이다. 에스트로젠은 폐경기전의 여성에서는 난소에서 생성되고 폐경기후의 여성에서는 지방조직 같은 말초조직에서 생성된다(Hemsell *et al.*, 1974). 에스트로젠 효과는 대부분 핵 수용체의 상과(superfamily)에 속하는 에스트로젠 수용체

(estrogen receptor, ER)를 매개로 이루어진다(Evans *et al.*, 1988). 에스트로젠이 세포막을 통과한 뒤(Rao *et al.*, 1981) 핵 내에 존재하는 에스트로젠 수용체와 결합하면, 열충격 단백질(heat-shock protein 90, Hsp 90)이 유리되고 동종 중합체(homodimer)가 형성된다. 동종중합체를 이룬 호르몬과 수용체의 결합은 에스트로젠 유전자의 조절 부위(촉진부위, promotor region)에 존재하는 특정 염기서열인 ERE (estrogen response elements)에 결합함으로써 유전자 전사를 활성화시킨다. 새로 형성된 단백질은 세포 내 기능을 변화시키고 다양한 생리학적 변화를 유발하게 된다(Ing *et al.*, 1995; Gronemeyer *et al.*, 1991).

*To whom correspondence should be addressed

사람 유방암의 치료와 예방을 위한 새로운 접근이 요구되고 있는 현재, 최근 관심을 가지고 연구되고 있는 새로운 치료 방법 중에 하나는 retinoids를 이용하는 것이다. 비타민 A와 β -carotene을 낮게 섭취하는 여성에서 유방암으로 진행될 위험이 증가하며(Hunter *et al.*, 1993), 2기(phase II) 시도에서는 합성 retinoid인 fenretinide가 폐경기 전 여성에서 대측성 유방암(contralateral breast cancer)을 예방하는데 효과적이라고 보고된바 있다(Costa *et al.*, 1995; De palo *et al.*, 1955, 1977). 비타민 A결핍과 암으로의 발달 사이의 연관성은 retinoid 의존성 신호전달 경로가 발암을 억제하는 역할을 한다는 사실을 말해주고 있는데, 특정한 신호전달 표적 유전자의 비정상적 발현은 이런 경로를 폐지하고 악성으로 진행하도록 촉진한다.

Retinoids는 비타민 A의 구조적, 기능적으로 연관된 유사체인 자연화합물, 합성화합물이다. 자연화합물로는 all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid가 있다. Retinoids는 정상 조직의 유지와 성장, 발달을 조절하는 과정에서 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있을 뿐 아니라 세포소멸(apoptosis, programmed cell death)과 세포증식과 분화에도 작용한다고 알려져 있다. Retinoids는 자유화산으로 세포막을 통과하여 세포질로 들어오면 세포 안에서 retinoic acid와 결합하는 단백질(CRABP type I, II)과 상호작용하거나, 핵까지 이동하여 수용체 단백질(RAR, RXR)과 결합한다. Retinoids가 핵까지 이동했을 때는 전사 활성을 가지는 핵 수용체 단백질과 결합하는데, 수용체로는 retinoic acid receptor(RAR), retinoid X receptor(RXR)가 있다. 이들은 스테로이드와 갑상선 호르몬 수용체의 상과에 속하며, RAR 과(family)에는 α , β , γ 세 가지 동종형이 있고, RXR도 α , β , γ 세 가지 동종형이 있다. RARs는 리간드와 결합한 후 이종 중합체(heterodimer, RAR/RXR)를 이루고 RXR는 리간드와 결합한 후 동종 중합체(homodimer, RXR/RXR)를 이룬다. 그리고 표적 유전자의 조절부위에 있는 RARE(retinoic acid response element)에 결합하여 표적 유전자를 발현시킨다.

RAR과 RXR은 유방암 세포에서 발현된다고 보고된바 있고(Titcomb *et al.*, 1994), retinoids는 생체 내 실험, 생체 외 실험 둘 다에서 유방암 세포의 성장과 분화에 중요한 영향을 미친다고 알려졌다. 또한 이미 알려진 바에 따르면 전형적인 retinoids는 유방암 세포에서 세포성장을 억제하고, 세포소멸을 유도할 수 있다고 알려져 있고(Lacroix *et al.*, 1980; Fontana *et al.*, 1988; Fanjul *et al.*, 1994), retinoids에 의한 세포소멸은 leukemic HL-60 같은 종양성 세포와 신경모세포종, 폐암에서도 일어난다고 한다(Delia *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1990; Ponzoni *et al.*, 1995; Kalemkerian *et al.*, 1995). 그리고 에스트로젠 수용체가 존

재하지 않는(estrogen receptor negative, ER-) 유방암보다는 에스트로젠 수용체가 존재하는(estrogen receptor positive, ER+) 유방암에서 retinoids에 대한 민감성이 더 크다고 하는데(Toma S *et al.*, 1997, 1998; Wu Q *et al.*, 1997; Liuy *et al.*, 1996), all-trans retinoic acid는 에스트로젠 수용체가 있는 유방암 세포의 성장을 억제한다고 보고된바 있다. All-trans retinoic acid와 다른 retinoids에 의해 세포성장이 억제되는 것은 일반적인 세포독성에 의한 것이 아닌데 이는 retinoids를 처치한 상태에서도 세포 분열이 계속 유지되기 때문이다(Garacia *et al.*, 1992). 많은 유방암 세포가 retinoids의 세포성장 억제효과에 민감하지만 이렇게 억제하는 기전은 아직 알려져 있지 않았고 세포의 유형이나 특정한 retinoid 리간드에 따라 다른 결과를 나타내고 있다. 이전에 연구에서 특히 RXR 수용체를 활성화시키는 retinoid 리간드는 세포소멸을 강하게 유도한다고 보고했고, 반면에 RXR 수용체를 활성화시키지 않고 RARs를 활성화시키는 다른 retinoids는 세포분화 조절한다고 보고했다(Nagy L *et al.*, 1995). 또한 retinoids는 암세포에서 성장과 침윤을 억제하고 암 예방과 치료를 위해 임상적으로 유용하다고 발표되었다(Latan *et al.*, 1980; Bollaget *et al.*, 1992). 이뿐 아니라 retinoids는 피부, 자궁경부, 구강의 전구암성 병변에서 병의 진행을 정지시키고 폐의 이차 원발 종양으로의 진행을 막는데 효과적이라는 논문이 발표되었다(Hong *et al.*, 1990; Lippman *et al.*, 1993; Pastorino *et al.*, 1993).

유방의 분화에는 cyclin D1이 발현하는 것도 중요한데, 진행세포의 세포 주기 진행은 세포의 cyclin, cyclin 저해제, cyclin-dependent kinase(cdks), 망막모세포종 단백질(retinoblastoma protein, pRB)의 활성화와 불활성화를 통해 조절된다. G1기에서 S기로의 이동은 cyclin D와 cyclin E의 활성도를 통해 조절되고 이들은 G1기에서 S기로 이동하는데 필요한 pRB의 인산화에 중요한 역할을 한다. 이에 관한 최근 모형에서는 G1기 초기단계에 cyclin D1/cdk4 결합체가 pRB와 결합하여 과인산화가 시작되도록 하고 중기와 후기의 G1기에서는 cyclinE/cdk2 복합체가 이를 완성하도록 한다고 알려져 있다(Weinberg *et al.*, 1995; Riley *et al.*, 1994). D 유형의 cyclin은 pRB 인산화의 조절에만 중요한 것이 아니라 세포증식에서 분화까지의 과정을 조절하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데(Dulic *et al.*, 1993; Fantl *et al.*, 1995), G1기의 cyclin-cdk 복합체는 D type cyclin (D1, D2, D3)이고 이들은 cdk2, cdk4 또는 cdk6와 복합체를 이루고 있고, cyclin E는 cdk2와 복합체를 이루고 있다(Sherr and Roberts *et al.*, 1995; Sherr *et al.*, 1996). Cyclin을 조절하는 소단위 단백질의 축적과 파괴는 정기적으로 일어나며, 이것이 cyclin-cdk 복합체 활성의 조절에서 첫

번째로 일어나는 것이다. 촉매역할을 하는 소단위는 완전한 활성을 위해 인산화와 비인산화가 필요하다. Cdks가 이 과정에 참여하는데 세포를 증식시키는 신호전달, 성장을 억제시키는 신호전달, 세포주기 전이를 조절하는 생화학적 검사점(checkpoint) 경로를 조절한다(Hartwell *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992). 또한 이 cdk를 조절하는 CKI(cyclin dependent kinase inhibitor)가 있는데 먼저 INK4 과 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D})는 cdk4와 cdk6를 억제하여 D 유형 cyclin과 결합하지 못하게 한다. 다른 저해제인 p21, p27은 cdks와 cyclins 모두에 결합하여 kinase 활성도를 억제한다.

세포의 cyclin과 관련된 단백질 중 cyclin D1은 에스트로젠이 MCF-7 세포증식을 일으키는데 중요한 조절인자 중에 하나라고 보고된 적이 있다. 침윤성 유방암 계열에서 cyclin D 과에 포함된 cyclin D1이 과발현 또는 증폭이 되었다는 보고가 있었는데 cyclin D1 발현의 증가는 에스트로젠 수용체의 존재여부와도 관련이 있는 것으로 보고되었다. 사람 유방암 세포인 MCF-7 세포는 에스트로젠 수용체가 존재하는 세포로써 에스트로젠에 의존적으로 세포성장을 하는데 이런 에스트로젠 의존적인 세포증식은 항에스트로젠(antiestrogen)에 의해 억제된다(Gillete *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Zuckerberg *et al.*, 1995; Courjal *et al.*, 1996; Michalides *et al.*, 1996). Cyclin D1과 유방암 세포와의 관계에 대해 연구한 논문이 많이 발표되었는데 먼저 유전자 변형 마우스 (transgenic mice) 연구를 통해 유전자 변형 마우스의 유방 상피 세포에서 cyclin을 목표하여 과발현 시켰을 때 유방 관 세포가 과도하게 증식되도록 하며, 그 결과 암 형성이 유도된다는 보고가 있었다(Wang *et al.*, 1994). 이는 유방 상피 세포(mammary epithelium)에서 cyclin이 암 유전자가 될 수 있다는 가설을 뒷받침하는 것이다. Cyclin D1의 증폭 또는 과발현이 초기 유방암 세포 표본과 암 유래 세포에서 관찰된다는 연구가 있었고(Buckley *et al.*, 1993), cyclin D1 유전자를 포함하고 있는 염색체 부분 중 11q13의 증폭은 ER+ 세포에서 자주 관찰되며 좋지 않은 예후의 지표가 되기도 한다고 한다(Keyomarsi *et al.*, 1993). 특히 cyclin D1 과발현은 유방암이 악성으로 전개되는 초기에 일어나며 (Alle *et al.*, 1997), 초기 유방암에서는 40%-50% 정도에서 일어난다고 한다(Buckley *et al.*, 1993; Bartcova *et al.*, 1994). 그러나 이와 상반되는 결과도 있는데 정상 마우스와 사람 유방 상피 세포에서 cyclin D1과 cyclin E의 과발현은 세포주기 진행을 억제한다는 보고도 있다(Han *et al.*, 1995, 1996; Sgambato *et al.*, 1996, 1997). 이렇게 cyclin 과발현이 세포마다 그 표현형에 있어서 다르게 나타나는 이유는 세포의 환경에 따라 다른 것 같은데 아마도

cyclin-cdk 복합체의 활성제와 저해제의 발현정도가 다른 것이 가장 큰 이유일 것 같다. 사람이 정상 유방 상피세포(normal human mammary epithelial cell, HMECs)에서 all-trans retinoic acid(tRA)는 48시간 약물 처치시 G0/G1기에서 진행의 억제가 일어난다는 보고가 있는데 이는 cyclin D1이 세포 안에서 존재하는 정도가 감소하는 것과 연관된다고 한다. 또한 HMEC(human mammary epithelial cells)에서 cyclin D1의 발현은 tRA에 의해 일어나는 세포 성장억제에 중요하고, cyclin D1의 과발현은 tRA에 대한 민감도를 감소시킨다고 한다(Seewaldt *et al.*, 1997).

본 실험에서는 사람의 유방암세포인 MCF-7 cell과 T47-D cell, 사람 유방 불멸화 세포인 MCF-10A cell을 이용하여 all-trans retinoic acid와 9-cis retinoic acid가 세포 증식에 미치는 영향에 대해 알아보았고 특히 유방암에서 중요한 역할을 하는 에스트로젠과 어떠한 관계가 있는지 관찰하였다. 그리고 tRA와 9RA가 세포 증식에 영향을 미칠 때 세포 주기와는 어떤 관계가 있는지 세포주기의 분석을 통해 관찰하였고, 유방암 세포에서 세포주기의 변화에 중요한 역할을 하는 유전자인 cyclin D1의 변화를 RT-PCR과 western blot방법을 통해 관찰하였다.

재료 및 방법

세포주 배양

모든 종류의 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기(VWR)에서 배양하였고 계대 배양 시에는 1× trypsin-EDTA(GIBCO-BRL)에서 1분간 반응시켰다(단, MCF-10A 세포만 6분간 반응 시켰음). MCF-7 세포는 10% FBS-MEM 배지(MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO-BRL) 1포, 0.22% NaHCO₃(Sigma), 5% fetal bovine serum(FBS, GIBCO-BRL), 1% 100× Penicillin-Streptomycin (GIBCO-BRL))에서 5일에 1회 정도 1:4의 비율로 계대 배양하였다. T47D 세포는 5% FBS-RPMI 1640 배지(RPMI 1640 (GIBCO-BRL) 1포, 0.22% NaHCO₃, 5% FBS, 1% 100× Penicillin-Streptomycin)에서 5일에 1회 정도 1:4의 비율로 계대 배양하였다. MCF-10A cell은 10% FBS-DMEM/F12(1:1) 배지(DMEM/F12(1:1)(GIBCO-BRL) 1포, 0.22% NaHCO₃, 5% FBS, 1% 100×Penicillin-streptomycin)에서 3일에 1회 정도 1:3의 비율로 계대 배양하였다.

약물처리

처리한 약물은 17β-estradiol(E2), all-trans retinoic acid (tRA), 9-cis retinoic acid(9RA)(Sigma)이고, 모든 약물은 dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해시켰다. 대조군은 약물을

용해시킨 용매인 DMSO만 처치한 것이다. 약물을 처치할 때는 최종농도가 0.2%가 넘지 않게 하였다.

세포 생존율 측정

세포생존율은 MTT assay를 사용하였다. MCF-10A 세포, MCF-7 세포, T47D 세포를 각각 96 well 세포 배양판에 3×10^3 cells/well씩 분주하여 24 시간 CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 retinoids를 처치한 다음 5 mg/ml MTT(Sigma)를 15 µl/well 첨가하여 4시간 반응시켰다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 100 µl DMSO로 용해하여 ELISA reader(Bio-rad)로 570 nm 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

세포주기 분석(FACS)

각각의 세포를 5×10^6 cell/dish로 100 mm dish에 분주하여 24 시간 CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 retinoids를 처치하였다. 1× trypsin-EDTA를 이용하여 모은 다음 원심분리하여 상층액을 버리고 1× PBS로 현탁하여 세척한 후 다시 원심분리 했는데 이 과정을 2회 반복했다. 70% ethanol 1 ml을 넣고 현탁하여 -4°C에서 3 시간 이상 반응시킨 후 1× PBS 세척하고 원심분리 하여 모은 세포에 RAase A(ribonuclease A, 1 mg/mL) 500 µl을 넣고 37°C에서 20분간 반응시킨다. 그리고 1000 rpm, 5분으로 원심분리 하여 세포를 모은 후 상층액은 버리고 1× PBS 2번 세척한다. PI(propidium iodide, 50 µg/mL) 500 µl로 현탁하고, 이것으로 Flow cytometry(Becton Dickinson FACS Calibur)를 이용하여 세포주기 분석을 하였다.

역전사연쇄증폭반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

1) 세포에서 total RNA 분리

60 mm dish에 약물처리 된 세포를 1× PBS로 3번 세척한 후 RNA-Bee(RNA isolation solvent, TEL-TEST, INC) 2 ml를 가한 후 4°C에서 5분간 반응시키고 이것중에 0.5 ml를 취하여 CHCl₃(Chloroform, Mallinckrodt)를 0.05 ml를 가한 후, 15초 동안 강하게 섞어주고, 4°C에서 다시 5분간 방치시켰다. 4°C에서 15분간 13,000 rpm로 원심분리 한 후, 수층인 상층을 취하였다. 동일 용적의 차가운 isopropyl alcohol(dimethylsulfoxide)을 가하고 위·아래로 흔들어서 섞어 주었다. -70°C에서 1시간 반응시키고 4°C에서 15분간 13,000 rpm로 원심분리 하여 RNA pellet을 얻었다. 이를 isopropyl alcohol과 동일한 용적의 75% ethanol (Absolute

ethanol은 Hyman Limited)로 세척한 후, 4°C에서 5분간 11,000 rpm로 원심분리 하였다. 이후 얻은 RNA pellet을 gel상으로 말린 후 적당량의 diethyl pyro-carbonate(DEPC, Fluka) 용액에 녹였다. 260 nm, 280 nm의 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 260 nm에서의 흡광도와 280 nm에서의 흡광도의 비율을 계산하여 OD260/OD280이 1.65 이상인 것을 RT-PCR에 사용하였다.

2) Reverse Transcription(RT)

분리한 total RNA의 2 µg에 해당하는 양에 DEPC 용액을 가해서 10.5 µl가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.1 µg을 넣고 70°C에서 10 분간 반응시킨 후, 얼음에서 급속히 냉각시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 µl, 100 mM DTT(dithiothreitol) 2 µl, 5× first strand buffer 4 µl와 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus, Gibco-BRL), Reverse Transcriptase 200 units (Gibco-BRL), RNasin(RNase inhibitor, Promega) 20 units을 넣었다. 23°C에서 10분간 방치시키고 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

3) Polymerase chain reaction(PCR)

RT product 2 µl에 forward primer와 reverse primer를 각각 2 pmol씩 넣고 10× reaction buffer 1 µl, 25 mM MgCl₂ 1 µl, 2.5 mM dNTPs 0.5 µl, Taq polymerase 0.5 units(Promega)을 가하고 삼차 증류수로 전체 양이 20 µl이 되게 한 후에 다음의 조건으로 Touch Down(Hybrid Limited equipment class 1)에서 반응시켰다. PCR 조건은 Pre-denaturation 95°C 5분, Denaturation 95°C 1분, Annealing 60°C 1분, Elongation 72°C 1분, Pose-elongation 72°C 10분이다. Primer(Takara) GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)는 forward primer 5'-ACATCGCTCAGACACCATGG-3', reverse primer 5'-GTAGTTGAGGTCAA TGAAGGG-3'이고 25 cycle로 실험하였다. Cyclin D1은 forward primer 5'-AACAGATCATCCGCAAACAC-3', reverse primer 5'-TCACACTTGATCACTCTGGA-3', 25 cycle로 실험하였다. PCR 반응의 결과는 ethidium bromide(Sigma)로 염색한 2% agarose gel(agarose(FMC Bio Products), 1× TAE(0.5% Tris base, 0.11% glacial acetic acid, 0.2% 0.5 M EDTA, pH 8.0))에서 전기영동 하여 확인하였다. 여기서 확인된 DNA는 컴퓨터 이미지 시스템인 Bio-1D software(Vilber Lourmat)를 이용하여 정량하였다.

Western blot

각각의 세포를 10⁷ cell/dish로 100 mm dish에 분주하여 24시간 CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 retinoids를 처치하였다. 1× trypsin-EDTA를 이용하

여 세포를 모은 다음 원심분리하여 상층액을 버리고 lysis buffer(Pro-Prep(protein extraction solution), iNtRON Biotechnology) 100-200 μ l를 첨가하였다. lysis buffer에서 세포를 현탁 한 후 4°C에서 30분 반응시키고, 4°C 13000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 수층인 상층을 취하였다. 상층액 일부를 BCA용액에서 30분 반응시켜 정량 한 후 단백질 25 μ g을 취하고 4 \times loading buffer와 혼합하여 100°C에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시킨 후, 12% sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 PVDF membrane (Millipore)으로 2시간 이동시킨 후 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시키고 0.01% Tween 20이 함유된TBS-T(Tris-buffered sample saline)로 5분씩 2회 세척하였다. 그 후 anti-cyclin D1 또는 anti- β actin 항체를 TBS-T에 1:1000-1:10000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 10분씩 2번 TBS-T로 세척하였다. 그 다음 이차항체인 anti-mouse IgG-HRP 또는 anti-rabbit IgG-HRP (horseradish peroxidase)로 상온에서 1시간 반응시키고 TBS-T로 세척한 후 ECL (enhanced chemiluminescence) Plus kit (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 X-ray 필름 상에서 확인하였다. 여기서 확인된 단백질은 컴퓨터 이미지 시스템인 Bio-1D software(Vilber Lourmat)를 이용하여 정량하였다.

결 과

Retinoids가 세포 생존율에 미치는 효과

MCF-10A 세포에 10^{-6} M all-trans retinoic acid(tRA)와 10^{-6} M 9-cis retinoic acid(9-cis RA)를 시간별로 처치한 후 MTT assay 방법을 이용하여 세포성장률을 측정하였다. ELISA reader를 이용하여 570 nm 파장에서 측정하였다. 먼저 tRA를 단독으로 처치하였을 때 시간이 지날수록 세포정장을 대조군과 비슷하게 나타났고 5일째에는 대조군의 OD 값보다 조금 높은 OD 값을 나타내어 약간의 세포성장이 있는 것으로 나타났지만 큰 차이는 없었다. 9-cis RA 단독 처치시에도 tRA와 비슷한 경향을 보였다. 에스트로젠 수용체가 있는 세포에서 세포성장효과가 있는 10^{-10} M 17 β -estradiol(E2)을 병용처치 하였을 때는 tRA, 9-cis RA 모두 대조군에 비해 조금 낮은 OD 값을 나타내기도 하였으나 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. MCF-10A 세포는 에스트로젠 수용체가 존재하지 않기 때문에 E2의 처치시에도 변화가 없었던 것 같다(Fig. 1). 다음으로 tRA, 9-cis RA를 10^{-8} M- 10^{-6} M의 농도별로 5일 동안 처치하여 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. tRA, 9-cis RA 단독 처치시

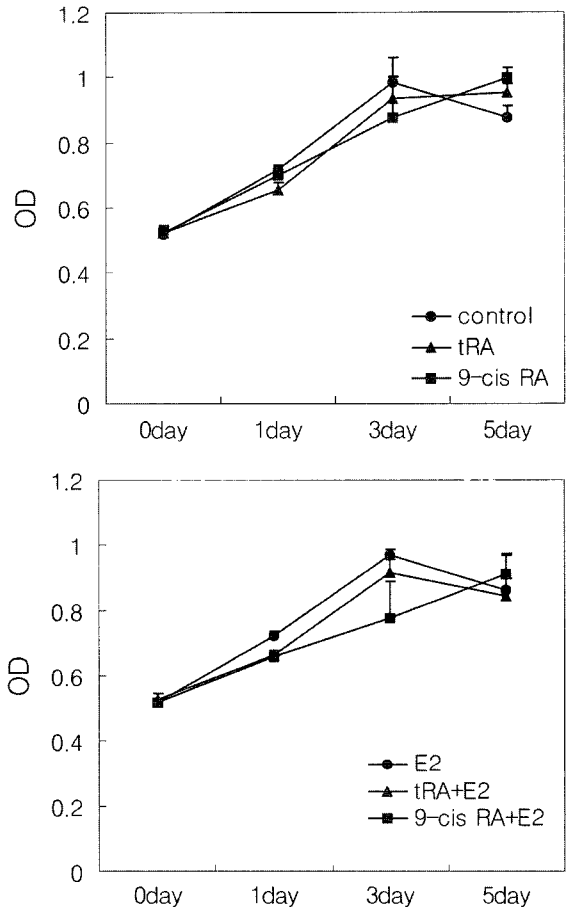


Fig. 1. Effect of retinoic acids on the proliferation of MCF-10 A immortalized breast cell line. MCF-10A cell grown in 96 well plates(3000 cells/wells) and treated with 10^{-6} M all-trans retinoic acid(tRA) or 10^{-6} M 9-cis retinoic acid(9-cis RA) treated with or without 10^{-10} M 17 β -estradiol(E2). The cell proliferation was analysed using MTT assay. The data represent mean \pm S.D.

10^{-8} M에서 대조군에 비해 OD 값이 조금 높게 나타났고 10^{-6} M에서는 조금 낮은 OD 값을 나타내었다. 그러나 세포 성장에 큰 영향을 미치지지는 않았다. tRA, 9-cis RA를 E2와 병용처치 하였을 때도 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 2).

T47-D 세포에서도 MCF-10A에서 실험한 방법과 동일한 조건으로 실험하였다. 먼저 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA를 시간별로 단독 처치하였을 때, 시간이 지날수록 대조군에 비하여 OD 값이 50% 이하로 세포성장이 눈에 띄게 감소하였고, 9-cis RA보다는 tRA의 세포성장 억제효과가 조금 더 크게 나타났다. tRA, 9-cis RA를 E2와 병용처치 했을 때도 비슷한 결과를 보였다(Fig. 3). tRA, 9-cis RA를 농도별로 처치하였을 때 10^{-8} M의 저농도에서 10^{-6} M 고농도로

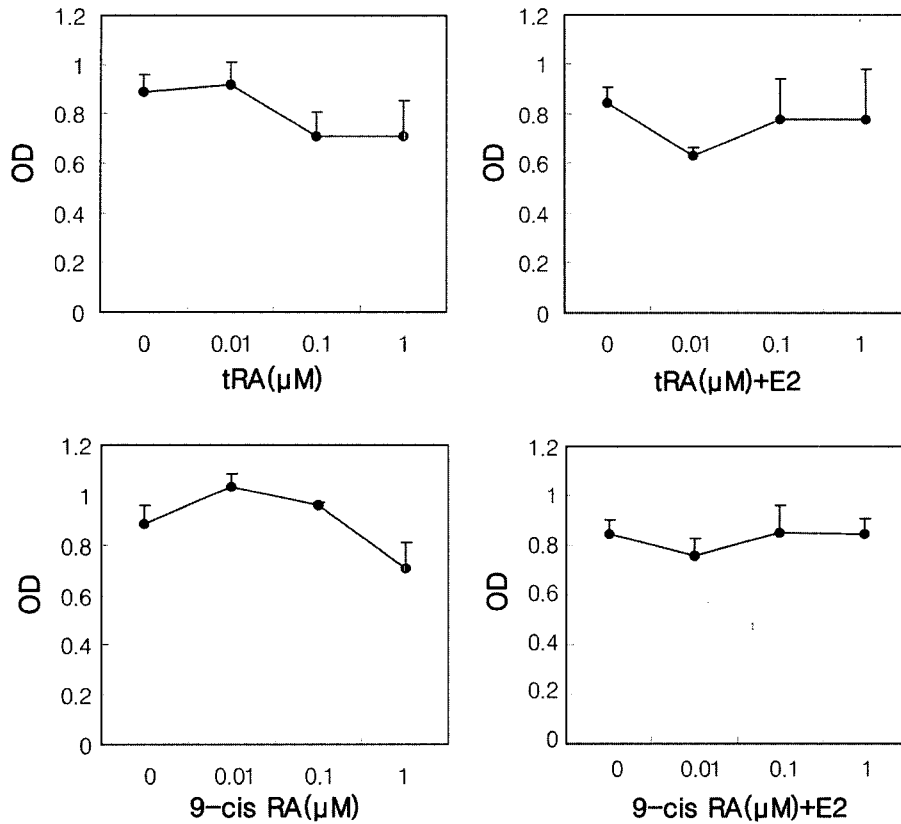


Fig. 2. Growth curve of MCF-10A cells after tRA or 9-cis RA treatment at concentrations ranging from 1 μM to 0.01 μM with or without 10^{-10} M E2. MCF-10A cell grown in 96 well plates(3000 cells/wells) and treated with tRA or 9-cis RA. On day 5, cell growth was analysed using MTT assay. The data represent mean \pm S.D.

갈수록 세포성장은 급격히 감소함을 보였고 10^{-6} M일 때 세포성장억제의 효과가 가장 컸다. 저농도에서는 tRA가 9-cis RA에 비하여 더 낮은 OD 값을 나타내어 9-cis RA보다 더 강하게 세포성장을 억제시킨다는 것을 알 수 있다. RA, 9-cis RA를 E2와 병용처리 하였을 때도 tRA, 9-cis RA 단독 처리 때와 비슷하게 세포성장 억제효과가 나타났다 (Fig. 4).

MCF-7 세포에서도 역시 동일한 조건으로 실험하였다. 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA를 시간별로 단독 처리하였을 때, tRA, 9-cis RA 모두에서 시간이 지남에 따라 대조군에 비하여 낮은 OD 값을 나타내서 세포성장 억제효과가 있음을 알 수 있었다. tRA, 9-cis RA를 E2와 병용처리 했을 때도 비슷한 결과를 보였다(Fig. 5). tRA, 9-cis RA를 농도별로 처리하였을 때 10^{-8} M의 저농도에서 대조군에 비해 조금 높은 OD 값을 나타내어 세포성장효과가 있는 것으로 보이지만 10^{-6} M 고농도로 갈수록 세포성장억제 효과를 보였고 10^{-6} M일 때 세포성장억제의 효과가 가장 컸다. tRA, 9-cis RA를 E2와 병용처리 하였을 때도 10^{-8} M에서부터 세포성장

억제 효과가 있었고 10^{-6} M일 때 가장 큰 효과가 있었다 (Fig. 6).

Retinoids가 세포주기에 미치는 영향

유방암 세포에서 RA의 세포성장억제 효과는 세포주기의 변화에 어떤 연관성이 있는지 알아보기 위하여 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA를 단독처리 하거나 또는 10^{-10} M E2와 병용처리 하여 5일 후에 flow cytometry를 이용하여 MCF-10A, T47-D, MCF-7 각각에 대한 세포주기를 분석하였다. G0+G1, S, G2+M 기로 나누어 분석하였고 각각은 백분율로 환산하여 나타내었다.

MCF-10A 세포에서 대조군의 G0/G1기가 83.95%, S기가 2.35% 인 것에 비해 tRA 단독 처리시 G0/G1기가 83.8%, S기가 2.02%로 큰 차이를 보이지 않았고 9-cis RA를 단독 처리하였을 때 대조군에 비하여 G0/G1기가 81.62%, S기가 4.06%로 약간 증가하였고, 세포소멸(apoptosis)이 0.4%에서 3.74%로 증가했다. E2를 단독처리 하였을 때 S기가 2.64% 인 것에 비하여 tRA+E2 처리했을 때는 S기가 1.78%로 감

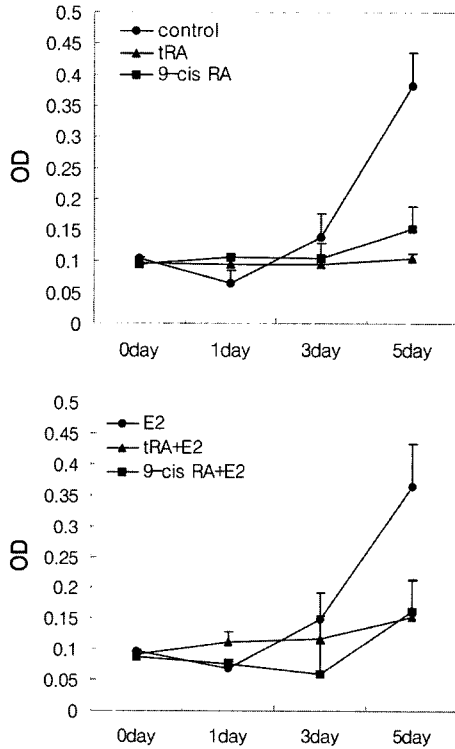


Fig. 3. Effect of retinoic acids on the proliferation of human breast cancer line T47-D. T47-D cell grown in 96 well plates (3000 cells/wells) and treated with 10^{-6} M all-trans retinoic acid (tRA) or 10^{-6} M 9-cis retinoic acid(9-cis RA) treated with or without 10^{-10} M 17 β -estradiol(E2). The cell proliferation was analysed using MTT assay. The data represent mean \pm S.D.

소하였다. 9-cis RA 처치시 G0/G1기가 80.55%로 약간 감소하였으나 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. T47-D 세포에서 대조군이 G0/G1기가 58.51%, S기가 6.46%, G2/M기가 27%인 것에 비해 tRA 처치시 G0/G1기가 64.95%, S기가 3.08%, G2/M기가 22.45% 나타나 G1기에서 정지가 나타나는 것이 관찰되었고 9-cis RA+E2에서도 G0/G1기가 61.59%, S기가 3.4%, G2/M기가 24.46%으로 나타나 G1기에서 정지가 있음을 보였다. 다른 조건의 약물 처치 조건에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. MCF-7 세포에서 대조군의 G0/G1기가 63.31%인 것에 비해 9-cis RA, 9-cis RA+ E2에서 G0/G1기가 60% 정도로 조금 감소하였으나 큰 변화는 없었다. tRA 단독처치시 대조군의 S기가 8.1%인 것에 비하여 tRA 조건에서는 S기가 5.6%로 감소하였고, E2와 병용처치 하였을때도 E2 조건에서 S기가 8.8%인 것에 비하여 tRA+E2 조건에서 5.72%로 감소하였다. tRA+E2 조건에서는 세포소멸(apoptosis)이 10% 이상으로 높게 나타났다. 이것을 통해서 MCF-7 세포에서는 tRA가 S기를 감소시킴을 알 수 있었다(Table 1).

Retinoids가 cyclin D1 mRNA 발현에 미치는 영향

세포성장률, 세포주기와 관련하여 retinoids가 cyclin D1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MCF-10A, T47-D, MCF-7 세포에 시간별로(6, 24, 48, 72시간) 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA를 처치하여 세포에서 분리해낸

Table 1. Retinoic acid effect of cell cycle distribution of human MCF-7, T47-D breast cancer cell lines and MCF-10A immortalized breast cell line.

Cell line	Treatment	%G0+G1	%S	%G2+M	Apoptosis
MCF-10A	control	83.95	2.35	12.98	0.40
	tRA	83.80	2.02	13.29	0.50
	9-cis RA	81.62	4.06	10.47	3.74
	E2	82.93	2.64	12.77	0.95
	tRA+E2	82.42	1.78	14.61	0.64
	9-cis RA+E2	80.55	2.73	14.74	1.45
T47-D	control	58.51	6.46	27.00	2.02
	tRA	64.95	3.08	22.46	1.85
	9-cis RA	54.87	5.74	28.55	1.37
	E2	57.58	6.15	25.06	4.69
	tRA+E2	57.45	6.08	26.85	1.96
	9-cis RA+E2	61.59	3.40	24.46	0.89
MCF-7	control	63.31	8.10	23.86	0.94
	tRA	63.49	5.60	24.80	1.25
	9-cis RA	60.77	7.65	23.94	1.02
	E2	63.75	8.80	23.12	0.38
	tRA+E2	59.13	5.72	19.80	10.71
	9-cis RA+E2	60.76	8.15	22.24	4.55

Cell treated with or without 10^{-6} M tRA and 10^{-6} M 9-cis RA with or without 10^{-10} M E2 were harvested on day 5 and cell cycle distribution was analysed by flow cytometry. The values represent the percentage of cells in the indicated phase of cell cycle.

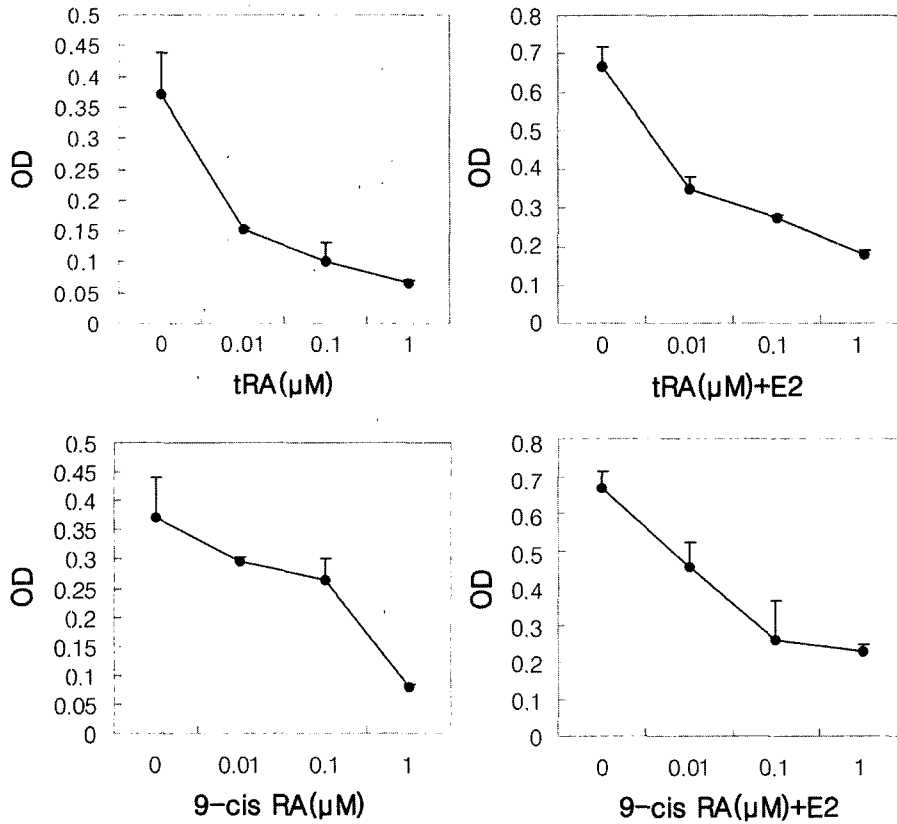


Fig. 4. Growth curve of T47-D cells after tRA or 9-cis RA treatment at concentrations ranging from 1 μM to 0.01 μM with or without 10^{-10} M E2. T47-D cell grown in 96 well plates(3000 cells/wells) and treated with tRA or 9-cis RA. On day 5, cell growth was analysed using MTT assay. The data represent mean \pm S.D.

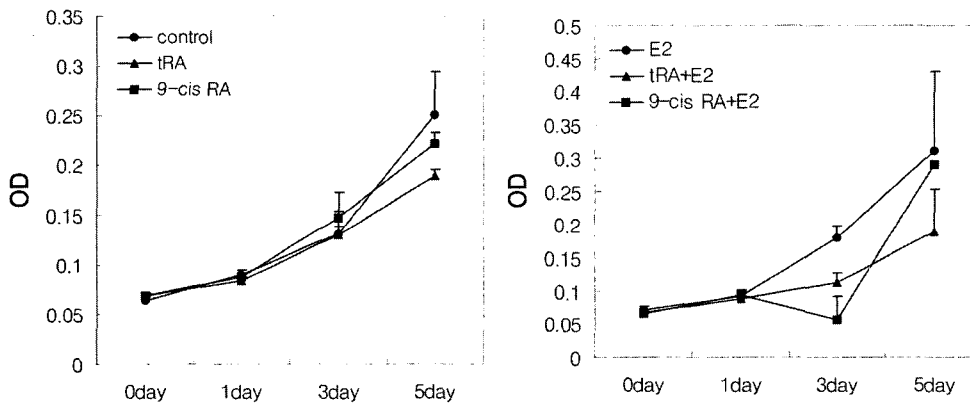


Fig. 5. Effect of retinoic acids on the proliferation of human breast carcinoma line MCF-7. MCF-7 cell grown in 96 well plates (3000 cells/wells) and treated with 10^{-6} M all-trans retinoic acid (tRA) or 10^{-6} M 9-cis retinoic acid(9-cis RA) treated with or without 10^{-10} M 17β -estradiol(E2). The cell proliferation was analysed using MTT assay. The data represent mean \pm S.D.

total RNA를 역전사 시킨 후 PCR을 통해 증폭시켰다. 여기서 확인된 DNA는 컴퓨터 이미지 시스템인 Bio-1D software(Vilber Lourmat)를 이용하여 대조군 값을 1로 하여 상

대적인 값을 정량하였다.

MCF-10A 세포에서 실험한 결과 tRA 처치시 6, 24, 48 시간에서는 cyclin D1 mRNA는 2.61-1.10으로 증가하였으

나 72시간에는 0.86으로 감소하였으며 9-cis RA에서도 6, 24시간에서는 cyclin D1 mRNA가 2.27, 1.92로 증가하였으나 48, 72시간 처치 후에는 0.82, 0.73으로 감소하였다 (Fig. 7).

T47-D 세포에서는 tRA 처치시 대조군에 비하여 시간의 존적으로 cyclin D1 mRNA 발현이 0.33까지 급격히 감소

함을 나타냈고 반면에 9-cis RA 처치시 6, 24, 48시간에서는 0.97, 1.03, 1.32로 대조군과 비슷하였으나 72시간에서는 0.73으로 cyclin D1 mRNA 발현이 감소하였다(Fig. 8).

MCF-7 세포에서는 tRA 처치시 cyclin D1 mRNA 발현이 감소하는 것으로 나타났는데 24, 48 시간일 때 0.62, 0.77로 발현 억제 효과가 가장 컸고, 9-cis RA 처치시 24

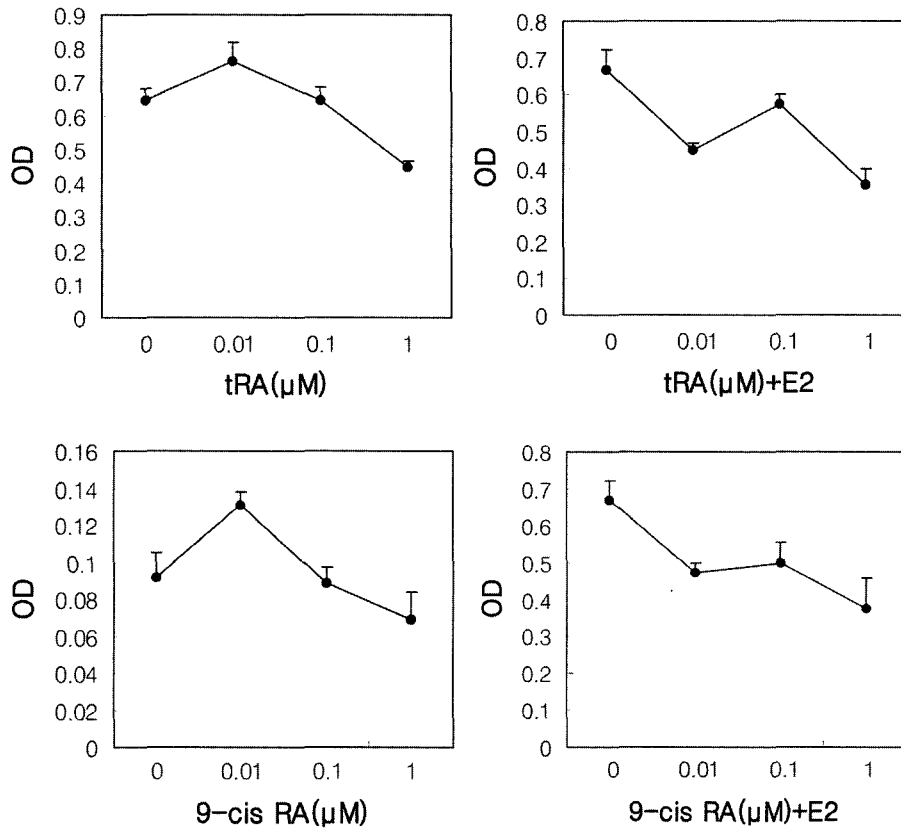


Fig. 6. Growth curve of MCF-7 cells after tRA or 9-cis RA treatment at concentrations ranging from 1 μM to 0.01 μM with or without 10⁻¹⁰ M E2. MCF-7 cell grown in 96 well plates(3000 cells/wells) and treated with tRA or 9-cis RA. On day 5, cell growth was analysed using MTT assay. The data represent mean±S.D.

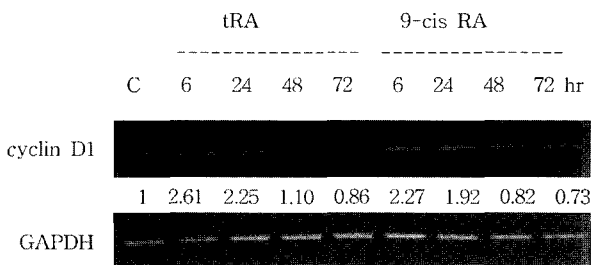


Fig. 7. RT-PCR analysis of cyclin D1 mRNA expression. MCF-10A cells grown on 6 mm dish(3×10⁵ cells/dish) treated with 10⁻⁶ M tRA, 10⁻⁶ M 9-cis RA from 6 hrs to 72 hrs. The PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

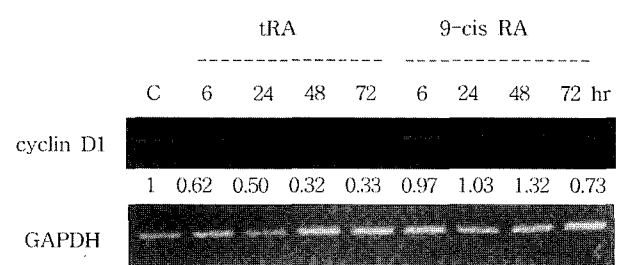


Fig. 8. RT-PCR analysis of cyclin D1 mRNA expression. T47-D cells grown on 6 mm dish(3×10⁵ cells/dish) treated with 10⁻⁶ M tRA, 10⁻⁶ M 9-cis RA from 6 hrs to 72 hrs. The PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

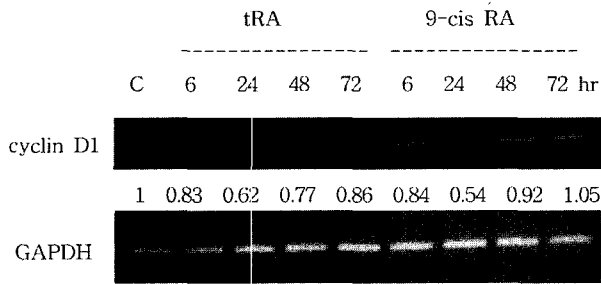


Fig. 9. RT-PCR analysis of cyclin D1 mRNA expression. MCF-7 cells grown on 6 mm dish(3×10^5 cells/dish) treated with 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA from 6 hrs to 72 hrs. The PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.

시간에 0.54로 억제 효과가 가장 크게 나타났으며 48, 72 시간이 되었을 때는 0.92, 1.05로 대조군과 비슷한 값을 나타내었다(Fig. 9).

Retinoids가 cyclin D1 단백질 발현에 미치는 영향

Cylin D1 mRNA 발현에 이어 단백질 발현에서도 retinoids가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험을 하였다. MCF-10A, T47-D, MCF-7 세포에 시간별로(6, 24, 48, 72시간) 10^{-6} M tRA, 10^{-6} M 9-cis RA를 처리하여 세포에서 분리해낸 단백질을 western blot 방법을 통해 cyclin D1 단백질 발현정도를 관찰하였다. 12% SDS-PAGE를 통해 확인된 단백질은 컴퓨터 이미지 시스템인 Bio-1D soft ware(Vilber Lourmat)를 이용하여 대조군 값을 1로 하여 상대적인 값을 정량하였다.

그 결과 MCF-10A 세포에서 tRA 처리시 6, 24시간에서는 cyclin D1 단백질이 3.89, 1.19로 증가하였으나 48시간에는 0.83으로 감소하였으며 9-cis RA 처리하였을 때도 cyclin D1 단백질 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 10).

T47-D 세포에서는 tRA 처리시 6, 24시간에서 1.41, 1.44로 약간 증가하였고, 48, 72시간이 되면서 0.93, 0.47로 cyclin D1 단백질이 급격히 감소하였다. 9-cis RA를 처리하였을 때 6-48시간까지 2.54, 1.57, 1.02로 cyclin D1 단백질 발현이 증가하지만 72시간에서 0.66으로 감소하였다(Fig. 11).

MCF-7 세포에서는 tRA 처리시 6시간을 제외한 24, 48, 72시간에서 각각 0.45, 0.54, 0.50으로 cyclin D1 단백질이 감소함을 보였고 9-cis RA를 처리하였을 때는 이와는 조금 달리 6, 24시간에서는 0.35, 0.57로 cyclin D1 단백질 발현이 감소하였으나 48시간에서는 대조군과 비슷하였고 72시간에서 0.72로 감소하였다(Fig. 12).

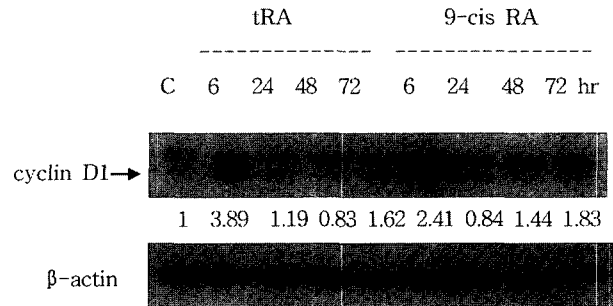


Fig. 10. Expression of cyclin D1 protein on MCF-10A cells treated with or without 10^{-6} M tRA and 10^{-6} M 9-cis RA from 6 hrs to 72 hrs. 25 μg protein of lysate from MCF-10A cells was electrophoresed on a 12% SDS-PAGE and Western blots were performed using antibodies to cyclin D1 or β-actin.

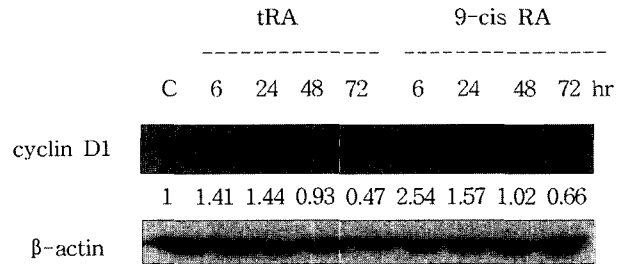


Fig. 11. Expression of cyclin D1 protein on T47-D cells treated with or without 10^{-6} M tRA and 10^{-6} M 9-cis RA from 6 hrs to 72 hrs. 25 μg protein of lysate from T47-D cells was electrophoresed on a 12% SDS-PAGE and Western blots were performed using antibodies to cyclin D1 or β-actin.

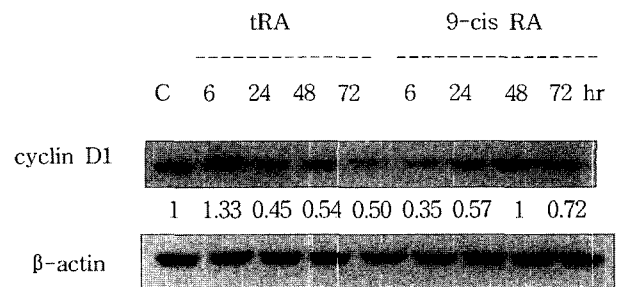


Fig. 12. Expression of cyclin D1 protein on MCF-7 cells treated with or without 10^{-6} M tRA and 10^{-6} M 9-cis RA from 6 hr to 72 hr. 25 μg protein of lysate from MCF-7 cells was electrophoresed on a 12% SDS-PAGE and Western blots were performed using antibodies to cyclin D1 or β-actin.

고 찰

유방암은 선진국형 질병으로 미국의 경우, 가장 흔한 암으로 미국 여성의 8명 중 1명이 평생 동안 유방암에 걸릴 가

능성이 있다고 한다. 한국의 경우 유방암은 1994년 통계에 의하면 한국 여성 암 등록 환자의 약 11.9%로 자궁경부암, 위암에 이어 세번째이나, 이후 급속한 증가율을 보여 2000년 보건복지부 통계를 보면 15.1%로 여성 암 중 15.8%의 위암에 이어 2번째로 흔한 암으로 보고되고 있다. 유방암은 당연히 여성의 질병이지만 드물게(여성 빈도의 1/100) 남성에게도 발생할 수 있습니다. 대개 유방의 유관(乳管)의 세포에서 시작되어 비정형적 과증식증(atypical ductal hyperplasia, ADH)에서 관상피내암(암세포가 유관 내에만 존재)의 단계를 거쳐 침윤형 유관암(암세포가 유관 밖으로 퍼짐)으로 진행한다고 생각하고 있다. 유방암의 흔한 종류로는 유관에서 생기는 암(ductal carcinoma)과 유엽(유선)에서 발생하는 암(lobular carcinoma)이 있다. 유방암의 치료와 예방을 위해 여러 가지 시도들이 이루어지고 있는 현재 비타민 A 유도체인 retinoic acid(RA)는 전립선암, 백혈병과 같은 몇몇 암에 대한 치료제로 사용되고 있으며 유방암 치료를 위한 실험도 진행 중에 있다. RA는 유전자 전사를 조절하는 'retinoid'라는 물질의 한 종류이며 세포분열, 분화, 면역반응, 태아발생과 같은 여러 가지 기능을 통제한다. 이 물질은 암세포의 번식을 방해하여 종양의 성장을 억제하는 역할을 수행한다고 알려져 있다. Retinoids는 현재 두경부암, 유방암, 당뇨병, 동맥경화, 기종(emphysema)과 같은 질환 치료로써 임상실험 중에 있다.

많은 연구를 통해서 retinoids는 유방암 발생을 억제한다고 보고되고(Sporn and Roberts *et al.*, 1983) 이런 암세포의 성장억제효과는 에스트로젠 수용체 발현의 변화에 기인하는 것일 수도 있고(Rubin *et al.*, 1994), TGF- β 2 발현을 유도하는 결과로 생기는 것일 수도 있다는 보고가 있다(Glick *et al.*, 1989).

본 연구에서는 사람 유방암 세포인 MCF-7, T47-D 세포와 사람 유방 불멸화 세포인 MCF-10A 세포를 이용하여 retinoids가 세포 성장을 억제하는 효과가 있는지 알아보았다. 에스트로젠 수용체가 존재하지 않는 MCF-10A 세포에서 시간별로 all-trans retinoic acid(tRA), 9-cis retinoic acid(9-cis RA)를 처리했을 때 대조군에 비해 세포를 성장시키는 효과가 조금 있는 것으로 나타났지만 큰 변화는 없었다. 또한 각각의 retinoids와 17 β -estradiol(E2)와 병용처리 하였을 때 tRA, 9-cis RA 단독처리와 유사한 결과를 나타내었다. 농도별로 retinoids를 단독처리 하였을 때는 세포성장 억제효과가 약간 있었고 병용처리 하였을 때는 변화가 없었는데, 전반적으로 세포성장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이외는 달리 에스트로젠 수용체와 프로게스테론 수용체가 존재하는 T47-D 세포에서는 시간별로 tRA, 9-cis RA 처리시 대조군에 비해 약 50% 이상의 세포성장 억제효과가

있었고, E2와 병용처리 하였을 때도 결과는 비슷했다. 또한 저농도에서 tRA와 9-cis RA의 억제효과를 비교하였을 때 tRA의 억제효과가 더 크게 나타났다. retinoids를 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포성장 억제효과가 있었는데 대조군에 비해 60%-70% 정도까지 세포성장이 감소하였다. retinoids를 E2와 병용처리 하였을 때도 비슷한 결과가 나왔다. 에스트로젠 수용체가 존재하는 MCF-7 세포에서도 RA의 시간별 처리시 세포성장 억제효과가 있었는데 대조군에 비해 10%-30% 정도 감소하는 정도였고 T47-D일 때 보였던 억제효과보다 크지 않았다. E2와 RA를 병용처리 했을 때도 비슷한 결과였고 9-cis RA에서보다 tRA 처리시 더 큰 세포성장 억제효과를 보였다.

이렇게 에스트로젠 수용체가 존재하지 않는 세포에서보다 에스트로젠 수용체가 존재하는 세포에서 억제효과가 더 크게 나타났고 세포에 E2를 첨가하는 것은 retinoids가 세포성장을 억제시키는 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 tRA가 에스트로젠 수용체가 있는 유방암 세포에서 성장을 억제한다는 보고와 유사한 결과이다(Toma Set *et al.*, 1997, 1998; Wu Q *et al.*, 1997; Liuy *et al.*, 1996). 특히 retinoids의 활성이 에스트로젠 수용체, 안드로젠 수용체, 프로게스테론 수용체와 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 9-cis RA는 핵 수용체인 에스트로젠 수용체와 안드로젠 수용체의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하며, 에스트로젠 수용체의 단백질도 감소시킨다는 보고가 있었다(Kurie *et al.*, 1993). 뿐만 아니라 안드로젠 수용체가 존재하는 전립선암 세포에서 tRA는 안드로젠 수용체의 mRNA, 단백질 발현을 감소한다는 보고도 있었다(Clarke *et al.*, 1990; Fontana *et al.*, 1992). MCF-7 세포에서도 tRA 처리시 에스트로젠 수용체와 안드로젠 수용체의 발현이 감소하며 T47-D에서도 안드로젠 수용체가 감소한다고 한다. 또한 tRA, 9-cis RA 모두 유전자 pS2와 프로게스테론 수용체의 발현을 감소시킨다고 보고되었는데 다른 연구에서도 retinoid 수용체와 다른 스테로이드 호르몬 수용체 사이에 상호작용이 있다고 보고되었다(Demirpence *et al.*, 1994; Lehmann *et al.*, 1992). 에스트로젠 수용체의 발현과 RA의 조절은 세포 성장억제효과와 중요하게 연관되어있는데 retinoids가 에스트로젠을 약하게 하거나 에스트로젠 수용체에 길항제로 작용할 가능성도 있다고 하며, retinoids가 에스트로젠 또는 프로게스테론과 각각의 수용체간의 경쟁은 없고 retinoids가 에스트로젠 수용체의 down stream의 활성을 방해할 가능성이 있다고 한다. 에스트로젠은 retinoids가 세포성장을 억제하는데 중요한 역할을 하는 것 같다(Rubin M *et al.*, 1994).

Retinoids가 사람 유방암 세포에서 성장억제 효과를 일으키는 데는 세포주기에서 G0/G1기가 증가하고 S기가 감소하

는 것과 연관된다는 보고가 많이 있다(Rubin *et al.*, 1994; Shao *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Lotan *et al.*, 1996). T47-D 세포에서도 cyclin D1 발현의 잘못된 조절은 G1기에서 S기로 계속 진행되도록 하며, cyclin D1의 과발현이 pRB를 과인산화 시켜 세포주기의 통제를 벗어나도록 한다고 알려져 있다(Musgrove *et al.*, 1994).

본 연구에서도 MCF-10A, MCF-7, T47-D 세포에 대하여 세포주기 분석을 실시하였다. tRA와 9-cis RA를 단독으로 또는 E2와 병용처리 하였을 때 MCF-10A 세포에서는 G0/G1, S, G2/M기 모두에서 큰 변화가 없었고, T47-D 세포에서는 대조군의 G0/G1기가 58.51%인 것에 비해 tRA 처리하였을 때 G0/G1기가 64.95%로 증가하여 G1기에서 정지가 일어났음을 알 수 있었다. MCF-7 세포에서는 tRA 단독 처리시 S기가 8.1%에서 5.6%로 감소하였고, E2와 병용처리 하였을 때는 S기가 8.8%에서 5.72%로 감소하였다. 이것으로 tRA에 의한 세포 성장 억제에서 세포주기의 S기 감소도 일어남을 알 수 있었다.

Cyclin D1의 증폭과 발현은 일차 유방암에서 또는 초기단계에서 관찰되고 이렇게 cyclin D1 발현에 문제가 생기면 결국 유방암으로 진행하게 된다. 또한 cyclin D1 유전자변형 마우스를 이용한 실험에서도 cyclin D1의 과발현은 발암 유전자의 역할을 한다는 연구가 있었고(Jiang *et al.*, 1993; Hind *et al.*, 1994; Lovic *et al.*, 1994), cyclin D1 발현 증가는 침윤성 유방암으로 진행될 위험이 8-10배 정도 높으며 침윤성 유방암으로 진행되기에 앞서 cyclin D1의 발현이 증가하는 분자적 현상이 나타난다고 한다.

이 연구에서 retinoids가 cyclin D1의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 MCF-10A, T47-D, MCF-7 세포를 이용하여 실험하였다. 먼저 MCF-10A 세포에서는 tRA, 9-cis RA를 시간별로 처리하였을 때, mRNA의 발현은 6-24시간으로 짧게 약물을 처리하였을 때 대조군이 1인 것에 비해 2.61-1.92 정도로 증가하였지만 48-72시간 동안 진행될 때는 0.86-0.73으로 약간 줄어들었다. 단백질 발현에서는 이와 유사하게 짧은 시간 약물 처리하였을 때 약간 증가하다가 24시간 이상에서는 약간 감소함을 보였다. 그러나 대조군과 비교했을 때 최종 시간(72 시간)에서는 큰 변화가 없었다. 반면 T47-D 세포에서는 tRA, 9-cis RA 모두에서 cyclin D1의 mRNA와 단백질 발현이 대조군에 비해 약 70%까지 감소가 일어났고 9-cis RA에서 보다는 tRA에서 더 강하게 발현의 억제가 나타났다. MCF-7 세포에서도 tRA, 9-cis RA 처리시간이 지남에 따라 cyclin D1의 mRNA와 단백질 발현이 감소하는 것으로 나타났고 대조군에 비하여 50-60% 정도의 감소효과가 있었고 9-cis RA보다는 tRA에서 억제효과가 더 크게 나타났다.

Retinoids를 유방암세포에 처리하였을 때 cyclin D 과(family)에서 여러 가지 cyclin D의 단백질 발현이 감소하며 이것이 세포성장억제의 효과를 나타낸다고 보고된 논문의 결과와 일치한다(Qun Zhou *et al.*, 1997). Retinoids에 의해 조절되는 cyclin D1 단백질 감소에는 유전자 번역 후 단백질 가수분해가 관여된다고 하는데, proteasome 억제제인 calpain I inhibitor와 lactacystin 둘 다 tRA가 G1기에서 S기로 가는 것을 막는 능력을 억제했고 cyclin D1의 단백질 발현의 감소도 억제했다는 연구가 보고되었다(Langenfield *et al.*, 1997).

본 실험에서는 사람 유방암 세포인 MCF-7, T47-D 세포와 사람 유방 불멸화 세포인 MCF-10A 세포를 이용하여 retinoids가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보았고, 특히 그 중에서도 세포 성장에 중요한 역할을 한다고 알려진 cyclin D1의 mRNA, 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과 에스트로젠 수용체가 있는 세포에서는 tRA와 9-cis RA 둘 다 세포의 성장을 억제하였고 cyclin D1의 mRNA, 단백질의 감소효과가 있었다. 또한 9-cis RA보다는 tRA에서 세포 성장억제효과나 cyclin D1 mRNA, 단백질 발현 억제 효과가 더 크게 나타났고, retinoids를 1-2일 단시간 처리보다는 그보다 더 긴 3-5일을 처리하였을 때 더 크고 확실한 억제 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 MCF-7세포에서보다 T47D 세포에서 더 큰 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이를 통해 retinoids가 세포 성장을 억제시키는 것은 cyclin D1의 mRNA와 단백질의 감소시키는 경로를 거친다는 것을 알 수 있었고, 앞으로 cyclin D와 관련하여 세포주기에 관여하는 많은 단백질과 이들간의 복합적인 상호작용에 retinoids가 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 더 필요하다. 또한 MCF-7 세포에서보다 T47-D 세포에서 retinoids의 세포 성장 억제, cyclin D1 mRNA와 단백질 억제효과가 가장 컸던 것은 MCF-7 세포에서는 에스트로젠 수용체의 역할이 중요하지만 T47-D는 에스트로젠 수용체뿐만 아니라 프로세스테론 수용체도 중요한 역할을 하는 차이점 때문인 것으로 추측되며, RA의 세포성장 억제효과는 에스트로젠 수용체 뿐 아니라 프로세스테론 수용체도 중요한 역할을 한다고 생각된다. Retinoids가 유방암에 화학적 예방 물질로 유용하게 사용되기 위하여 앞으로 RA와 각종 스테로이드 호르몬 수용체사이의 상호작용에 대한 연구가 더 필요하다.

결 론

Retinoids가 사람 유방암 세포에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, 사람 유방암세포인 MCF-7 세포, T47-D 세포, 사람 유방 불멸화 세포인 MCF-10A세포를 이용하여 all-

trans retinoic acid와 9-cis retinoic acid를 다양한 방법으로 처리하여 세포성장에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 또한 retinoids가 대부분의 유방암세포에서 과발현 된다는 보고가 있고 세포주기와 관련하여 세포성장에 중요한 역할을 하는 cyclin D1의 발현에 미치는 영향을 살펴보았으며 다음의 결과를 얻었다.

1. All-trans retinoic acid와 9-cis retinoic acid는 에스트로젠 수용체가 없는 MCF-10A 세포에서는 세포성장 억제효과를 나타내지 않았고 에스트로젠 수용체가 있는 MCF-7 세포와 T47-D 세포에서 세포성장의 억제효과를 나타내었다. 9-cis retinoic acid 보다는 all-trans retinoic acid에서 더 강한 억제효과가 있었고 MCF-7에서 보다는 T47-D 세포에서 retinoids의 세포 성장 억제효과가 더 강하게 나타났다.

2. All-trans retinoic acid와 9-cis retinoic acid가 세포주기에 어떠한 영향을 미치는지 알아본 결과 MCF-10A 세포나 MCF-7 세포에서는 세포주기에 큰 변화가 없었고 T47-D 세포에서 all-trans retinoic acid를 처리했을 때 대조군에 비해 G0/G1기가 58.51%에서 64.95%로 증가하고, S기가 6.46%에서 3.08%로 감소하여 G1기에서 정지되는 것이 관찰되었다. MCF-7 세포에서는 all-trans retinoic acid 처리시 S기가 감소하는 것으로 나타났다.

3. MCF-10A, MCF-7, T47-D 세포에서 10^{-6} M retinoids를 시간별로 처리한 후 cyclin D1의 mRNA 변화를 관찰한 결과 MCF-10A 세포에서는 단시간(6-24시간) 처리시 대조군에 비해 cyclin D1이 약간 증가하였으나 장시간(48-72시간) 처리시 큰 변화가 없었다. T47-D 세포에서는 시간 의존적으로 강하게 cyclin D1의 mRNA 발현이 억제되었고 MCF-7 세포에서도 역시 억제 효과가 있었다. Retinoids의 억제효과는 MCF-7 세포에서 보다 T47-D 세포에서 더 강하게 나타났고 9-cis retinoic acid 보다 all-trans retinoic acid에서 더 강한 억제효과가 나타났다.

4. Retinoids가 cyclin D1의 단백질 발현 변화에 어떠한 영향을 미치는지 관찰한 결과 MCF-10A 세포에서는 단시간 처리시 cyclin D1의 단백질 발현은 약간 증가시켰고 장시간 처리시에는 대조군과 큰 차이가 없었다. T47-D 세포에서는 시간 의존적으로 cyclin D1의 단백질 발현이 강하게 감소되었고 MCF-7 세포에서도 시간 의존적으로 감소하였고 9-cis retinoic acid 보다는 all-trans retinoic acid에서 더 강한 억제효과가 나타났다.

이 결과로 retinoids는 사람 유방암 세포의 성장을 억제시키며 cyclin D1의 감소가 세포성장을 억제시키는 경로중의

하나에 해당된다고 생각된다. 또한 9-cis retinoic acid 보다 all-trans retinoic acid에서 더 강한 세포성장 억제효과를 보였고 MCF-7 세포에서보다 T47-D 세포에서 더 강한 세포 성장 억제효과를 보이는 것으로 보아 세포에 따라 RA의 활성이 다른 것으로 생각되며 특히 스테로이드 호르몬 수용체와 연관이 있는 것으로 추정된다. 앞으로 RA가 세포에 따라 다른 억제효과를 나타내는 원인에 대한 분석이 더 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- Agadir A., Chen G., Bost F., Li Y., Mercola D., Zhang X. (1999) Differential effect of retinoic acid on growth regulation by phorbol ester in human cancer cell lines. *J. Biol. Chem.*, **274**(42), 29779-85.
- Alle K.M., Henshall S.M., Field A.S., Sutherland R.L. (1998) Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin. Cancer Res.*, **4**(4), 847-54.
- Bartkova J., Lukas J., Muller H., Lutzhoft D., Strauss M., Bartek J. (1994) Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Cancer.*, **1**; **57**(3), 353-61.
- Bollag W., Holdener E.E., (1992) Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann. Oncol.*, **3**(7), 513-26. Review.
- Buckley M.F., Sweeney K.J., Hamilton J.A., Sini R.L., Manning D.L., Nicholson R.I., deFazio A., Watts C.K., Musgrove E.A., Sutherland R.L. (1993) Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, **8**(8), 2127-33.
- Clarke C.L., Roman S.D., Graham J., Koga M., Sutherland R.L. (1990) Progesterone receptor regulation by retinoic acid in the human breast cancer cell line T-47D. *J. Biol. Chem.*, **265** (21), 12694-700.
- Costa A., De Palo G., Decensi A., Formelli F., Chiesa F., Nava M., Camerini T., Marubini E., Veronesi U. (1995) Retinoids in cancer chemoprevention. Clinical trials with the synthetic analogue fenretinide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **768**, 148-62. Review.
- Courjal F., Louason G., Speiser P., Katsaros D., Zeillinger R., Theillet C. (1996) Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. Cancer*, **69**(4), 247-53.
- Dawson M.I., Chao W.R., Pine P., Jong L., Hobbs P.D., Rudd C.K., Quick T.C., Niles R.M., Zhang X.K., Lombardo A., (1995) Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Res.*, **55**(19), 4446-51.
- De Palo G., Veronesi U., Marubini E., Camerini T., Chiesa F., Nava M., Formelli F., Del Vecchio M., Costa A., Boracchi P. (1995) Controlled clinical trials with fenretinide in breast cancer, basal cell carcinoma and oral leukoplakia. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **22**, 11-7. Review.
- De Palo G., Camerini T., Marubini E., Costa A., Formelli F., Del

- Vecchio M., Mariani L., Miceli R., Mascotti G., Magni A., Campa T., Di Mauro M.G., Attili A., Maltoni C., Del Turco M.R., Deceusi A., D'Aiuto G., Veronesi U. (1997) Chemoprevention trial of contralateral breast cancer with fenretinide. Rationale, design, methodology, organization, data management, statistics and accrual. *Tumori*, **83**(6), 884-94.
- Delia D., Aiello A., Lombardi L., Pelicci PG., Grignani F., Grignani F., Formelli F., Menard S., Costa A., Veronesi U. (1993) N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer Res.*, **53**(24), 6036-41.
- Demirpence E., Balaguer P., Trousse F., Nicolas J.C., Pons M., Gagne D. (1994) Antiestrogenic effects of all-trans retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in breast cancer cells occur at the estrogen response element level but through different molecular mechanisms. *Cancer Res.*, **54**(6), 1458-64.
- Dulic V., Drullinger LF., Lees E., Reed S.I., Stein G.H. (1993) Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(23), 11034-8.
- Evans R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**(4854), 889-95. Review.
- Fanjul A., Dawson M.I., Hobbs P.D., Jong L., Cameron J.F., Harlev E., Graupner G., Lu X.P., Pfahl M. (1994) A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature*, **372**(6501): 107-11.
- Fantl V., Stamp G., Andrews A., Rosewell I., Dickson C. (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev.*, **9**(19), 2364-72.
- Fontana J.A., Hobbs P.D., Dawson M.I. (1988) Inhibition of mammary carcinoma growth by retinoidal benzoic acid derivative. *Exp. Cell. Biol.*, **56**(5), 254-63.
- Fontana J.A., Nervi C., Shao Z.M., Jetten A.M. (1992) Retinoid antagonism of estrogen-responsive transforming growth factor alpha and pS2 gene expression in breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, **52**(14), 3938-45.
- Garcia M., Derocq D., Freiss G., Rochefort H. (1992) Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1**; **89**(23), 11538-42.
- Gillett C., Fantl V., Smith R., Fisher C., Bartek J., Dickson C., Barnes D., Peters G. (1994) Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.*, **54**(7), 1812-7.
- Glick A.B., Flanders K.C., Danielpour D., Yuspa S.H., Sporn M.B. (1989) Retinoic acid induces transforming growth factor-beta2 in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regul.*, **1**(1), 87-97.
- Gronemeyer H. (1991) Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 89-123. Review.
- Han E.K., Sgambato A., Jiang W., Zhang Y.J., Santella R.M., Doki Y., Cacace A.M., Schieren I., Weinstein I.B. (1995) Stable overexpression of cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth. *Oncogene*, **10**(5), 953-61.
- Han E.K., Begemann M., Sgambato A., Soh J.W., Doki Y., Xing W.Q., Liu W., Weinstein I.B. (1996) Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ.*, **7**(6), 699-710.
- Hartwell L. (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, **71**(4), 543-6. Review.
- Hemsell D.L., Grodin J.M., Brenner P.F., Siiteri P.K., MacDonald P.C. (1974) Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**(3), 476-9.
- Hinds P.W., Dowdy S.F., Eaton E.N., Arnold A., Weinberg R.A. (1994) Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(2), 709-13.
- Hong W.K., Lippman S.M., Itri L.M., Karp D.D., Lee J.S., Byers R.M., Schantz S.P., Kramer A.M., Lotan R., Peters L.J. (1990) Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, **323**(12), 795-801.
- Hunter T., Pines J. (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, **79**(4), 573-82. Review.
- Jiang W., Kahn S.M., Zhou P., Zhang Y.J., Cacace A.M., Infante A.S., Doi S., Santella R.M., Weinstein I.B. (1993) Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene*, **8**(12), 3447-57.
- Kalemkerian G.P., Slusher R., Ramalingam S., Gadgeel S., Mabry M. (1995) Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**(22), 1674-80.
- Keum J.S., Kong G., Yang S.C., Shin D.H., Park S.S., Lee J.H., Lee J.D. (1999) Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, **81**(1), 127-32.
- Keyomarsi K., Pardee A.B. (1993) Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(3), 1112-6.
- Kurie J.M., Buck J., Eppinger T.M., Moy D., Dmitrovsky E. (1993) 9-cis and all-trans retinoic acid induce a similar phenotype in human teratocarcinoma cells. *Differentiation*, **54**(2), 123-9.
- Lacroix A., Lippman M.E. (1980) Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. *J. Clin. Invest.*, **65**(3), 586-91.
- Langenfeld J., Kiyokawa H., Sekula D., Boyle J., Dmitrovsky E. (1997) Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(22):12070-4.
- Lehmann J.M., Zhang X.K., Pfahl M. (1992) RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Mol. Cell Biol.*, **12**(7), 2976-85.
- Lippman S.M., Batsakis J.G., Toth B.B., Weber R.S., Lee J.J., Martin J.W., Hays G.L., Goepfert H., Hong W.K. (1993) Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. *N. Engl. J. Med.*, **328**(1), 15-20.

- Liu Y., Lee M.O., Wang H.G., Li Y., Hashimoto Y., Klaus M., Reed J.C., Zhang X. (1996) Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.*, **16**(3), 1138-49.
- Lotan R. (1980) Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **605**(1), 33-91. Review.
- Lotan R. (1996) Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, **10**(9), 1031-9. Review.
- Lovec H., Sewing A., Lucibello F.C., Muller R., Moroy T. (1994) Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene*, **9**(1), 323-6.
- Martin S.J., Bradley J.G., Cotter T.G. (1990) HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**(3), 448-53.
- Michalides R., Hageman P., van Tinteren H., Houben L., Wientjens E., Klompmaaker R., Peterse J. (1996) A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br. J. Cancer*, **73**(6), 728-34.
- Mu Y.M., Yanase T., Nishi Y., Hirase N., Goto K., Takayanagi R., Nawata H. (2000) A nuclear receptor system constituted by RAR and RXR induces aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, **166**(2), 137-45.
- Murray A.W. (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, **359**(6396), 599-604. Review.
- Musgrove E.A., Lee C.S., Buckley M.F., Sutherland R.L. (1994) Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(17), 8022-6.
- Nagy L., Thomazy V.A., Shipley G.L., Fesus L., Lamph W., Heyman R.A., Chandraratna R.A., Davies P.J. (1995) Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol. Cell Biol.*, **15**(7), 3540-51.
- Niu M.Y., Menard M., Reed J.C., Krajewski S., Pratt M.A. (2001) Ectopic expression of cyclin D1 amplifies a retinoic acid-induced mitochondrial death pathway in breast cancer cells. *Oncogene*, **20**(27), 3506-18.
- Pastorino U., Infante M., Maioli M., Chiesa G., Buyse M., Firket P., Rosmentz N., Clerici M., Soresi E., Valente M. (1993) Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J. Clin. Oncol.*, **11**(7), 1216-22.
- Ponzoni M., Bocca P., Chiesa V., Decensi A., Pistoia V., Raffaghello L., Rozzo C., Montaldo P.G. (1995) Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res.*, **55**(4), 853-61.
- Prakash P., Russell R.M., Krinsky N.I. (2001) In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids. *J. Nutr.*, **131**(5), 1574-80.
- Raffo P., Emionite L., Colucci L., Belmondo F., Moro M.G., Bolzag W., Toma S. (2000) Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res.*, **20**(3A), 1535-43.
- Rao G.S. (1981) Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, **21**(2), 97-108. Review.
- Riley D.J., Lee E.Y., Lee W.H. (1994) The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**: 1-29. Review.
- Roman S.D., Ormandy C.J., Manning D.L., Blamey R.W., Nicholson R.I., Sutherland R.L., Clarke C.L. (1993) Estradiol induction of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **53**(24), 5940-5.
- Rubin M., Fenig E., Rosenauer A., Menendez-Botet C., Achkar C., Bentel J.M., Yahalom J., Mendelsohn J., Miller WH Jr. (1994) 9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein. *Cancer Res.*, **54**(24), 6549-56.
- Shao Z.M., Dawson M.I., Li X.S., Rishi A.K., Sheikh M.S., Han Q.X., Ordonez J.V., Shroot B., Fontana J.A. (1995) p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. *Oncogene*, **11**(3), 493-504.
- Sporn M.B., Roberts A.B. (1983) Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res.*, **43**(7), 3034-40.
- Stephen R., Darbre P.D. (2000) Loss of growth inhibitory effects of retinoic acid in human breast cancer cells following long-term exposure to retinoic acid. *Br. J. Cancer*, **83**(9), 1183-91.
- Sweeney K.J., Swarbrick A., Sutherland R.L., Musgrove E.A. (1998) Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene*, **16**(22), 2865-78.
- Seewaldt V.L., Kim J.H., Parker M.B., Dietze E.C., Srinivasan K.V., Caldwell L.E. (1999) Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits all-trans retinoic acid-mediated G0/G1-phase arrest and differentiation in vitro. *Exp. Cell Res.*, **249**(1), 70-85.
- Seewaldt V.L., Dietze E.C., Johnson B.S., Collins S.J., Parker M.B. (1999) Retinoic acid-mediated G1-S-phase arrest of normal human mammary epithelial cells is independent of the level of p53 protein expression. *Cell Growth Differ.*, **10**(1), 49-59.
- Seewaldt V.L., Kim J.H., Caldwell L.E., Johnson B.S., Swishelm K., Collins S.J. (1997) All-trans-retinoic acid mediates G1 arrest but not apoptosis of normal human mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.*, **8**(6), 631-41.
- Sherr C.J., Roberts J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **9**(10), 1149-63. Review.
- Sherr C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**(5293), 1672-7. Review.
- Sgambato A., Han E.K., Zhou P., Schieren I., Weinstein I.B. (1996) Overexpression of cyclin E in the HC11 mouse mammary epithelial cell line is associated with growth inhibition and increased expression of p27(Kip1). *Cancer Res.*, **56**(6), 1389-99.
- Sgambato A., Doki Y., Schieren I., Weinstein I.B. (1997) Effects of cyclin E overexpression on cell growth and response to transforming growth factor beta depend on cell context and p27Kip1 expression. *Cell Growth Differ.*, **8**(4), 393-405.
- Tanaka T., Rodriguez de la Concepcion M.L., De Luca L.M.

- (2001) Involvement of all-trans-retinoic acid in the breakdown of retinoic acid receptors alpha and gamma through proteasomes in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **61**(11), 1347-55.
- Titcomb M.W., Gottardis M.M., Pike J.W., Allegretto E.A. (1994) Sensitive and specific detection of retinoid receptor subtype proteins in cultured cell and tumor extracts. *Mol. Endocrinol.*, **8**(7), 870-7.
- Toma S., Isnardi L., Raffo P., Dastoli G., De Francisci E., Riccardi L., Palumbo R., Bollag W. (1997) Effects of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid on breast-cancer cell lines: growth inhibition and apoptosis induction. *Int. J. Cancer*, **70**(5), 619-27.
- Toma S., Isnardi L., Riccardi L., Bollag W. (1998) Induction of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cell line by RAR and RXR selective retinoids. *Anticancer Res.*, **18**(2A), 935-42.
- Wang T.C., Cardiff R.D., Zukerberg L., Lees E., Arnold A., Schmidt E.V. (1994) Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, **369**(6482), 669-71.
- Weinberg R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**(3), 323-30. Review.
- Wu Q., Dawson M.I., Zheng Y., Hobbs P.D., Agadir A., Jong L., Li Y., Liu R., Lin B., Zhang X.K. (1997) Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol. Cell Biol.*, **17**(11), 6598-608.
- Yang L., Kim H.T., Munoz-Medellin D., Reddy P., Brown P.H. (1997) Induction of retinoid resistance in breast cancer cells by overexpression of cJun. *Cancer Res.*, **57**(20), 4652-61.
- Zhang S.Y., Caamano J., Cooper F., Guo X., Klein-Szanto A.J. (1994) Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **102**(5), 695-8.
- Zhou J.N., Ljungdahl S., Shoshan M.C., Swedenborg J., Linder S. (1998) Activation of tissue-factor gene expression in breast carcinoma cells by stimulation of the RAF-ERK signaling pathway. *Mol. Carcinog.*, **21**(4), 234-43.
- Zhou Q., Stetler-Stevenson M., Steeg P.S. (1997) Inhibition of cyclin D expression in human breast carcinoma cells by retinoids in vitro. *Oncogene*, **15**(1), 107-15.
- Zukerberg L.R., Yang W.I., Gadd M., Thor A.D., Koerner F.C., Schmidt E.V., Arnold A. (1995) Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod. Pathol.*, **8**(5), 560-7.