



Sulforaphane의 Human MCF-7 Mammary 종양세포 유사분열의 억제 및 Tubulin의 중합화 저해

김 현 정

(주) 두비엘 연구소

Abstract

Sulforaphane은 브로컬리나 십자화과 채소중의 glucoraphanin의 가수분해 산물인 isothiocyanate로서 이는 detoxification 효소의 phase II를 일으키는 것으로 나타났고 설치류에서 화학적으로 발생된 유선 종양을 억제하고 최근에는 대장암 세포에서 cell cycle arrest와 apoptosis를 일으킨다고 알려져 왔다. 여기서는 SUL이 Human Mammary MCF-7 adenocarcinoma 세포의 증폭을 억제하는 역할을 제시하였다. MCF-7 cell에 15umol/L SUL을 처리하였을 때 G₂/M cell cycle이 arrest를 보였고 cyclin B1 protein이 24시간 이내에 증가하였다. 15umol/L의 SUL은 *in vivo* 상에서 histon H1의 인산화를 유도하고, 초기 mitosis에서 cell을 block하며 mitotic microtubule의 중합화를 방해하였다. *In vitro* 상에서 정제된 bovine brain tubulin에 대한 SUL을 고농도로 투여했을 때, tubulin의 중합율과 총 tubulin 중합도의 억제를 보였다. 덧붙여서, isothiocyanate를 함유하는 SUL

analog로 처리된 정제 tubulin도 비슷하게 저해를 받았다. 본 연구는 SUL이 mitotic cell cycle arrest를 포함한 mammary cancer 억제력을 가진 것과, 이러한 기작으로 정상적인 tubulin 중합화 및 microtubule dynamic에 한층 효과적인 영향을 준다는 것을 제시하였다.

1. Introduction

Sulforaphane은 glucosinolate compound glucoraphanin을 식물내의 효소인 thioglucoside glucohydrolase으로 가수분해한 산물로서 브로컬리나 십자화과 채소에서 기인된 isothiocyanate이다. Sulforaphane(SUL)은 몇 가지 이유로 영양과 유방암 연구 분야에서 주목을 받아왔다. 첫 번째로, 소수의 epidemiologic한 연구에서 야채의 섭취와 유방암 유병율이 반비례 관계라는 것을 지적하였다. SUL은 일반적으로 흡수하는 채소의 구성분이고 특히 broccoli에 다량 존재한다. 두 번째로, 식이적으로 섭취되는 SUL은 쥐에서 화학적으로

유도된 유선종양을 억제하는 것을 보여주었다. 마지막으로, SUL은 phase II detoxification 효소를 유도하고 carcinogen 활성화에 관여하는 효소인 phase I 효소 cytochrome p450 isozyme 2E1을 완벽하게 억제시켰다. 즉, cancer 개시의 억제제로서 잠재적인 물질로 SUL은 주목받아왔다.

최근에, SUL은 neoplastic cell의 증폭을 억제하고 G₂/M에서 cell cycle progression을 block하여 apoptosis를 유발하고 signal transduction pathway를 조절하여 cancer의 promotion/progression의 효과적인 저해제로 작용한다고 할 수 있었다.

SUL의 antiproliferative action에 대한 첫 번째 보고는 Gamet-Payaste등의 발표로 알려졌다. 본 연구에서 15μmol/L SUL로 처리된 HT29 human colon cancer cell에서 cell cycle의 G₂/M phase가 누적되었고 24시간 이내에 cyclin B1 protein의 증가를 보였다. Sulforaphane으로 처리된 세포는 Bax 발현, poly(ADP-ribose) polymerase cleavage와 nuclear chromatin condensation의 증가를 보였고 이러한 현상은 apoptosis를 의미한다. SUL와 비슷한 phenethyl isothiocyanate는 십자화와 채소의 일종인 glucosinolate에 존재하는데 이는 비슷한 세포내 반응을 유발하는 것으로 보이고 또한 양과 시간에 따른 caspase activation에 관련된 apoptosis를 일으킨다.

Cyclin 의존적 kinase p34^{cdc2} 혹은 cdc2 (CDK1)의 역할은 G₂에서 mitosis로 가는 cell cycle progression의 조절과 세로사멸 경로의 시작에 중요한 것으로 알려져 왔다. 특히, cdc2의 역할은 일반적으로 threonine 161의 인산화, cyclin B1의 결합, threonine 14와 tyrosine 15의 탈 인산화에 관계되어 있다. Threonine 14와 tyrosine 15에서 cdc2의 인산화와 순차적인 탈 인산화가 일어날 때 이는 각각 Wee 1과 Myt 1 Kinase와 cdc25C phosphatase의 역할로 발생 한다. 활성화된 cdc2는 mitosis로 진행하게 할 수 있는 H1 histone, nuclear lamins, vimentin, caldesmon, nucleolin 등

과 같은 여러 기질들을 인산화 시킨다. Mitosis의 종결과 G₁ phase로 돌아가는 것은 cdc2의 불활성화에 의해서 일어나는데 이는 threonine 161의 탈 인산화와 cyclin B1의 degradation에 의해서 일어난다.

이러한 cdc2의 비정상적인 활성화는 mitotic catastrophe로 알려진 cell death의 한 형태를 이끈다. 예를 들어, murine mammary carcinoma FT10 세포에서 증가된 cdc2 활성화는 fragmentin-2에 의해서 유도된 apoptosis를 일으키는데 필요한 것으로 보였다. Fotedar 등은 murine T cell hybridoma (All cells)를 이용하여 apoptosis의 활성화와 cdc2 Kinase activity의 증가와 G₂/M에서의 cell cycle arrest의 관계를 나타내었다. 즉, G₂/M transition에서의 cdc2 활성화는 mitotic progression 전이나 기간동안 cell cycle arrest 여부를 판단하는 중요한 인자이고 apoptosis가 개시되었는지를 판단하는 중요한 인자이다.

다양한 화학구조를 지닌 분화된 자연의 복합물은 첨가량에 따라서 M phase 기간에 microtubule의 붕괴에 관여되어있고 cell death에 대한 기폭제로 작용하는 것으로 보고 되고 있다. Vinca alkaloid vinblastubulin 단백질과 같은 화합물은 상대적으로 낮은 농도에서 tubulin 단백질에 직접적으로 반응하고 정상적인 microtubule의 운동성에 지장을 주어서 mitotic cell cycle arrest를 유도한다. 상대적으로 높은 농도에서도 mitotic arrest를 일으키는데 그 작용기작은 tubulin 중합화의 억제와 mitotic microtubule의 depolymerization을 일으키는데 기초로 해서 일어난다. 낮은 vinblastin 투여량에 의해서 일어나는 mitotic arrest는 prometaphase에서 첫 번째나 두 번째 chromosome이 metaphase plate 도달하지 못하게 되어 나타나고 microtubule이 짧아지거나 microtubule이 정상보다 길어지는 경우이다. Vinblastine의 농도가 높아짐에 따라 정상적인 metaphase에서 벗어나게 되어

이는 더욱 심각해지고 bipolar로 되어 사라진다. 높은 농도에서 vinblastine은 tubulin 단백질과 낮은 친화도로 반응하고 필수적으로 microtubule가 없는 상태에서 농축된 chromosomal 뭉침을 보이는 mitotic 현상을 보인다. *Vinca* alkaloid vinblastin의 최근 알려진 3개의 tubulin을 붕괴하는 mechanistic class 3가지 중 한가지 이다. (Vinca alkaloid, colchicines, taxanes) 이러한 구분이 tubulin/microtubule에 대한 결합력에 의존적이기는 하지만 새로이 알려진 mitotic arresting 복합물이 microtubulin관련 단백질과 cell growth factor가 없는 *in vitro* 상태에서 정제 tubulin의 중합화를 억제 할 수 있는 tubulin disrupting agent와는 구분이 필요하다.

2. Materials and Methods

2.1. cell culture

MCF-7 human mammary Epithelial cell line은 malignant adenocarcinoma에서 분리된 것인데 ATCC에서 구입 사용하였다. 세포는 MEM Eagle 배지에 10% FBS를 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하고 배지는 매 48시간마다 바꿔주었다. 접종 3일 후 배양을 hydroxyurea를 이용하여 G₁/S에 synchronize시키고 세포 세척 후 새로운 배지로 바꿔주었다. D,L-Sulforaphan이나 DMSO는 synchronization이 마무리된 2시간 후에 처리하였다. SUL의 cell proliferation과 cell cycle distribution에 대한 다른 효과를 확인하기 위해서 다른 세포로 (estrogen receptor positive, negative) 이용하여 실험하였다. 다양한 세포배양 배지를 사용해서 나타날 수 있는 proliferation에 대한 혼동을 없애기 위해서 ER⁺ 세포는 MCF-7, ZR-75, ER⁻ 세포는 BT-20과 MDA-MA-231을 사용하였

고 배지는 MEM Eagle에 5% FBS를 첨가하였고 접종 48-72 시간에 SUL과 DMSO를 처리하였다.

2.2. [³H] Thymidine incorporation assay of DNA synthesis

MCF-7 세포는 1.25x10⁴cells/cm²의 농도에서 48 well plate에 접종하였다. SUL이나 DMSO에 [³H] thymidine이 존재하는 상태에 투여량을 늘려 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 PBS와 세포세척 후 5% TCA로 처리하고 침전물을 다시 absolute 메탄올로 세척 후 88% formic acid에 첨가 후 5분간 상온에서 방치하여 녹였다. 시료는 Beckman LS6500 scintillation counter로 측정하였다.

2.3. Cell cycle analysis and quantification of mitotic figures.

MCF-7 세포는 15umol/L SUL이나 DMSO로 처리하고 적절한 시간에 trypsinization으로 회수하였다. 세포는 PBS로 세척하고(10⁸cell/L가 될 때) Vindelov's DNA 염색용액에 부유시켰다. 형광은 1시간 후 Coulter XL flow Cytometer로 측정하였다. ER⁺와 ER⁻ human mammary cancer cell line에서 cell cycle distribution에 대한 SUL의 효과를 비교하기 위해서 MCF-7, ZR-75, BT-20, MDA-MB23 세포 또한 비슷하게 실험하였다. Mitosis에서의 세포를 측정하기 위하여 MCF-7 세포는 접종, 처리, 회수하여서 세척하고 PBS에 부유시키기 전에 현미경 슬라이드에 놓았다. 세포는 wright-Giemsa도 염색하고 최소 10개의 세포를 분석하여 mitotic 형상의 비율을 광학현미경으로 확인하였다.

2.4. Western blot analysis

MCF-7 세포는 접종하고 15umol/SUL DMSO로

지정시간까지 처리하였다. TBS로 두 번 세척한 cell은 ice cold lysis buffer로 회수하여 sonication 하고 원심분리해서 상정액을 취한다. 이를 단백질 정량하여 SDS-PAGE를 실시하고 N/C membrane에 단백질을 transfer시킨다. Membrane은 blocking한 후에 cyclin B1에 대한 항체, histone H1에 대한 phospecific 항체를 처리한다. Incubation 후에 HRP conjugated antibody를 처리한 다음 ECL을 이용하여 확인하였다. X-ray film은 Adobe photoshop에서 확인하고 densito metric 분석은 Apple Macintosh G4 computer를 이용한 NIH image program으로 분석하였다. 같은 량의 단백질의 확인은 actin으로 확인할 수 있었다.

2.5. Immunofluorescence staining

MCF-7세포는 12mm round glass에 놓고 15umol/L SUL이나 DMSO를 24시간 동안 처리하였다. PBS로 세척한 다음 Sodium hydride glutaraldehyde로 처리한 다음 고정된 세포는 PBS로 세 번 헹구고 wash buffer로 10분간 처리한 다음 alpha-tubulin에 대한 단 클론 항체로 30분간 처리 하였다. wash buffer로 세척 후 fluorescein isothiocyanate conjugation 된 goat anti-mouse IgG antibody로 처리 하였고 DAPI로 DNA를 counter-stain하였다. 마지막에 wash buffer로 5회 세척 후 증류수로 처리하고 형광현미경으로 분석 하였다.

2.6. *In vitro* tubulin polymerization assay

D,L-sulporaphan의 효과뿐만 아니라 D, L 각각의 sulporaphane isomer, sulporaphane nitrile, erucine, sulporaphane 각각의 tubulin 중합화에 대한 효과를 *in vitro*상에서 관찰하였다. whole cell 배양에서 tubulin 저해효과를 보여준 이러한 선택

된 복합물이 SUL과 함께 isomer가 화학적 운동성을 지녔는지 관찰 하고자 하였다. Bovine brain tubulin은 D, L sulforaphane isomer, sulporaphane nitrile, erucine, sulporaphane 이나 DMSO로 처리 하여 96well plate에서 37°C로 배양하였다. 340nm에서 1시간 동안 1분씩 kit의 지시대로 확인하였고 tubulin 중합율은 각 시료에 따라 계산하였다. 그룹의 평균 중합율은 통계적으로 유의 하게 분석 하였다. 각각의 그룹은 반응 마지막에서의 총 tubulin 중합율의 차로 분석하였다.

2.7. 통계적 분석

2개의 평균값과의 비교에서 산출된 분석결과는 test와 accompanying test로 독립적으로 분석하였다. 2가지 이상으로 분석 할 경우 ANOVA는 HSD에 따라서 실시하였다. 모든 통계적 계산은 SAS system을 이용하였고 반복 실험은 독립적으로 분석하였다. 통계적인 유의차는 $p < 0.05$ 에서 확립하였고 astrisk로 표현 하였다.

3. Results

3.1. Sulporaphan의 유방암 세포 증식 억제

Synchronized된 MCF-7세포를 SUL 30umol/L의 량으로 처리 하였을 때 그 처리량에 따라 세포 증식이 억제 되었다. 46시간 내에 SUL의 투여량 10umol/L에서 DNA합성이 저해 되었다. (그림. 1) 또한, SUL의 농도가 15umol/L이상일 경우 특별히 다르지 않은 결과를 보여서 그 이상의 농도와 SUL이 MCF-7의 세포에서 시간에 따른 효과를 확인 할 때의 농도로 15umol/L의 농도로 결정하였다. 또, 우리는 SUL은 ER이 포함 되거나 포함 되지 않은 세포 모두에서 1umol/L의 낮은 농도로 DNA합성에 확실한 저해요소로 작용하였다. (그림. 2)

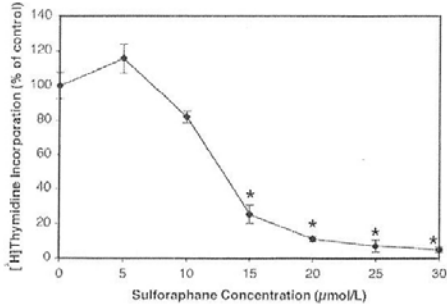


Fig. 1. Sulforaphane inhibits MCF-7 cell proliferation. Synchronized cultures were exposed to increasing dosages of SUL in the presence of [³H]thymidine (1μCi) for 48 h. Values are expressed as the percentage of control group [³H]thymidine incorporation(*different from the vehicle control, $P<0.0001$). Values are means±SEM, $n=6$. Data are representative of 2 independent experiments.

3.2. Sulporaphan의 G2/M 개시 지연 및 mitotic cell cycle arrest 야기

MCF-7세포의 기초 cycling을 확인하고 hydroxyurea synchronization의 효율을 확인하고자 DMSO vehicle이나 15umol/L SUL을 처리하여 cell cycle의 분포를 48시간 이내에 flow cytometry로 분석하였다. (그림. 3) Hydroxyurea의 제거로 45시간에 80% 이상의 세포가 G₁ phase에 있었던 반면 대조군의 경우 G₁ phase가 끝이 나고 1cycle이 마무리 된 것을 볼 수 있었다. 더 나아가서 대조군의 세포는 12시간 후에 G₂/M이 최고조에 도달한 반면 15umol/L SUL을 처리한 군의 경우 G₂/M이 18시간 이후에도 최고조에 도달하지 못하였다. 이러한 SUL의 G₂/M의 지연유도를 보이는 것은 처리 12시간 후 G₁ phase에서 세포수의 비율이 증가하는 것과 관계가 있다. 처리 24시간 경과 후 SUL이 G₂/M의 축적을 현저하게 증가 한다고는

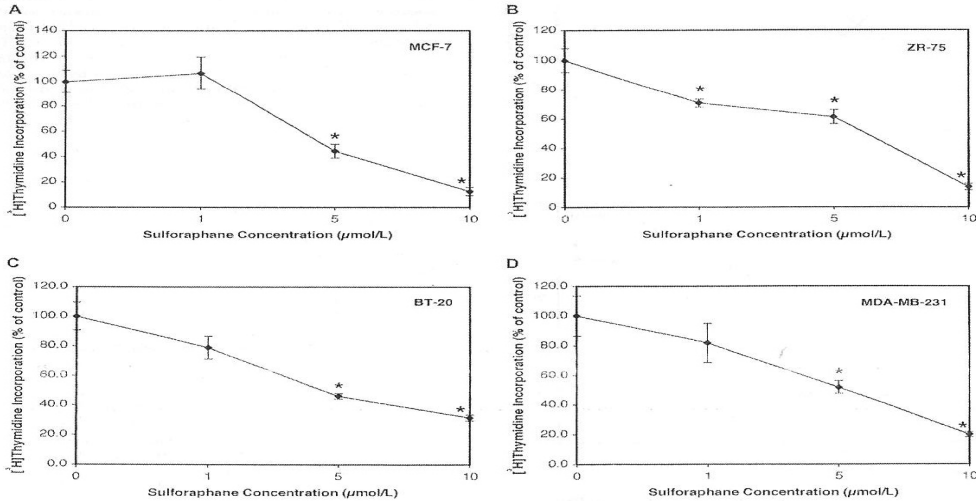


Fig. 2. Sulforaphane inhibits both ER⁺ and ER⁻ human mammary cancer cell proliferation. ER⁺ (A,B) and ER⁻ (C,D) cultures were exposed to increasing dosages of SUL for a total of 48 h, with fresh medium, treatments, and [³H]thymidine pulse(1μCi) during the final 24 h. Values are expressed as the percentage of control group [³H]thymidine incorporation (*different from the vehicle control, $P<0.05$). Values are means±SEM, $n=6$. Data are representative of 2 independent experiments.

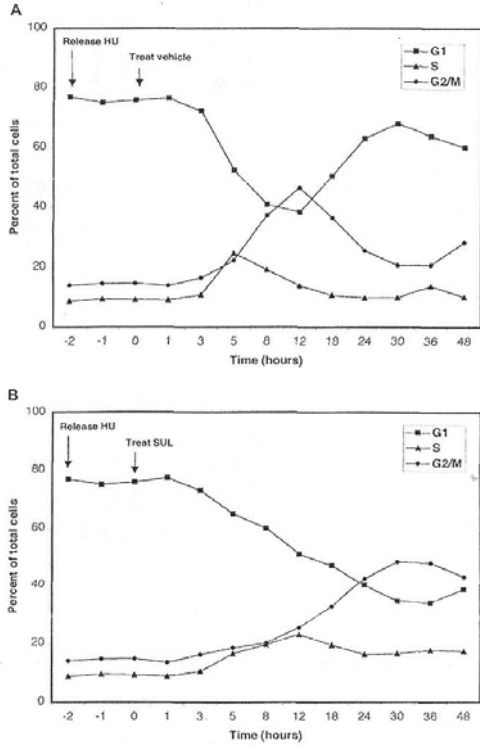


Fig. 3. Cell cycle characteristics of the MCF-7 cell population. Synchronized cultures were released from hydroxyurea(HU) cell cycle block; 2h later, they were treated with either DMSO vehicle (A) or 15 μ mol/L SUL(SUL, B) for the indicated times, before analysis by flow cytometry.

하지만 48시간과 72시간 경과 후에는 G₂/M의 block이 관찰 되었다. synchronization되지 않은 MCF-7의 배양 또한 SUL에 의한 G₂/M arrest를 24시간 이내에 나타냈다. (그림. 4D) 그러나 그 정도는 synchronized cell에 비하여 작았다. 또한, asynchronous 세포는 SUL처리 12시간 후에도 G₁의 축적을 보이지 않았다. (그림. 4C) SUL의 투여량이 5 μ mol/L정도로 낮을 경우 ER+나 ER-세포에서 G₂/M의 축적이 거의 비슷하게 유지 되었다.

(그림. 5) Synchronized MCF-7에 15 μ mol/L의 SUL 처리 후 cyclin B1과 histon H1의 인산화는 증가를 보였다. (그림. 6) 이것은 cdc2 kinase의 활성화와 G₂에서의 cell cycle progression을 의미한다. MCF-7세포에 15 μ mol/L의 SUL 처리하고 Wright-Giemsa염색하여 24시간이 경과 되면 다량의 mitotic 농축물이 metaphase plate에 정렬되지 않은 상태로 존재하는 것을 볼 수 있었다. 72시간 경과 비정상적 핵의 형성과 micronucleation이 명백하게 나타났다. (그림. 7)

3.3. Sulforaphane의 mitotic microtubules 파괴

세포의 Immunofluorescence tubulin과 DNA의 염색은 SUL로 유발되는 초기 mitotic arrest세포에서 비슷하게 나타나는데 이는 농축된 chromosome이 metaphase로 정렬되는 것이 부족한 phenotype을 의미하고 특히, 비정상적인 어떤 경우에는 mitotic microtubule의 부재를 보여준다. (그림. 8)

3.4. Isothiocyanate group의 in vitro 상에서 tubulin 중합화 억제

D,L-, D-, L-sulforaphane 뿐만 아니라 isothiocyanate를 함유하는 SUL의 analog인 sulforaphane과 erucin은 tubulin 중합율과 총 tubulin의 중합화를 억제하는 것으로 나타났다. 또한, tubulin을 isothiocyanate가 결합된 sulforaphane nitrile로 반응시켰을 때 중합화 되는 형태는 DMSO에 처리한 대조군의 것과 거의 유사하게 나타났다. (그림. 9)

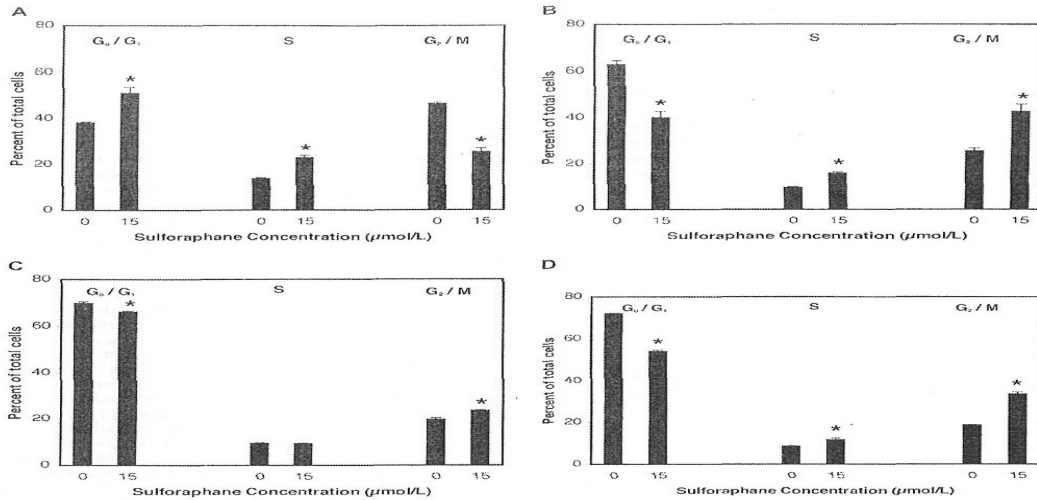


Fig. 4. Sulforaphane induces G₂/M accumulation in MCF-7 cells. Synchronized (A, B) and nonsynchronized (C, D) cultures were exposed to 15 μmol/L SUL for 12 h (A, C) or 24 h (B, D), before analysis by flow cytometry. Values are expressed as the percentage of total cells in all phases (*different from the vehicle control, P < 0.05). Values are means ± SEM, n=3. Data are representative of 2 independent experiments.

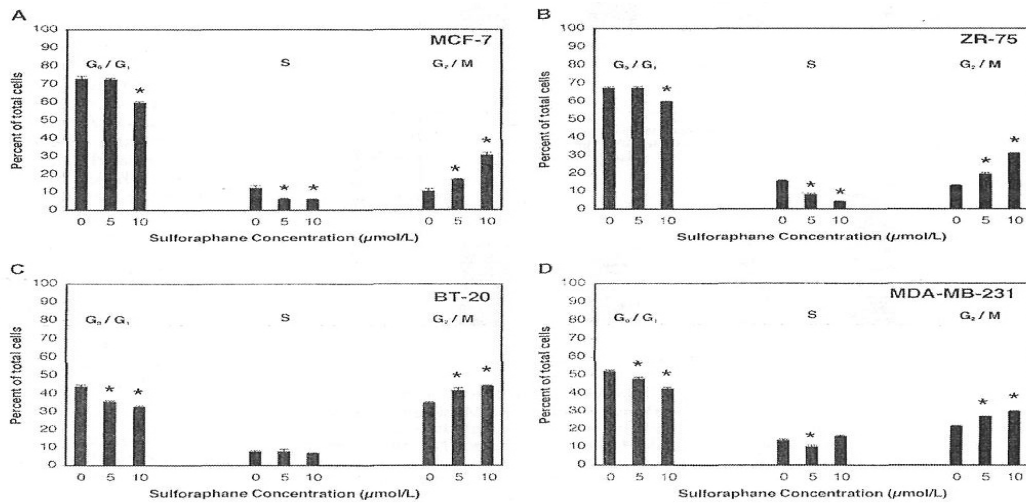


Fig. 5. Sulforaphane induces G₂/M accumulation in ER+ and ER- cells. ER+ (A, B) and ER- (C, D) cultures were exposed to increasing dosages of SUL for 48 h before analysis by flow cytometry. Values are expressed as the percentage of total cells in all phases (*different from the vehicle control, P < 0.05). Values are means ± SEM, n=3. Data are representative of 2 independent experiments.

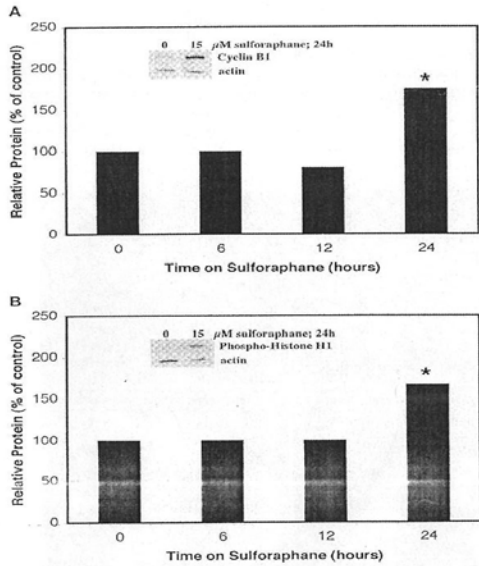


Fig. 6. Sulforaphane induces biochemical markers of early mitotic arrest in MCF-7 cells. Synchronized cultures were exposed to 15 μ mol/L SUL for the indicated times before Western blot analysis. Both cyclin B1 protein (A) and histone H1 phosphorylation (B) were significantly elevated within 24h of SUL treatment (*different from the vehicle control, $P < 0.05$). Values are means \pm SEM, $n = 3$. Data are representative of 2 independent experiments.

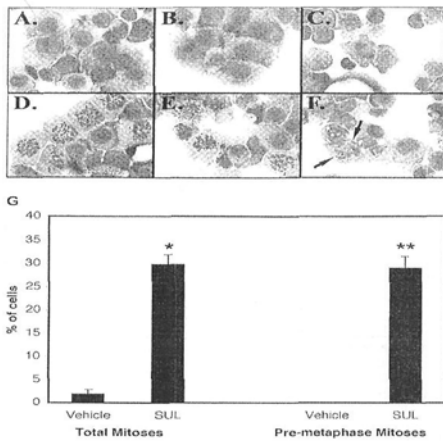


Fig. 7. Sulforaphane induces morphological markers of early mitotic arrest in MCF-7 cells.

Synchronized cultures were exposed to 15 μ mol/L SUL (D, E, F) or DMSO (vehicle; A, B, C) for 24 (A, D), 48 (B, E), or 72h (C, F) before Wright-Giemsa staining. The figure represents the abundance of mitotic figures in a prophase/prometaphase-like state with chromosomes condensed yet not aligned at the metaphase plate (D, E) followed by aberrant nuclear formation and micronucleation (F, see arrows). (G) Quantification of both total (*different from the vehicle control, $P = 0.0003$) and prophase/prometaphase (**different from the vehicle control, $P = 0.0071$) mitotic figures after the 24- treatment with SUL or DMSO (Vehicle). Values are means \pm SEM, $n = 3$. Data are representative of 2 independent experiments.

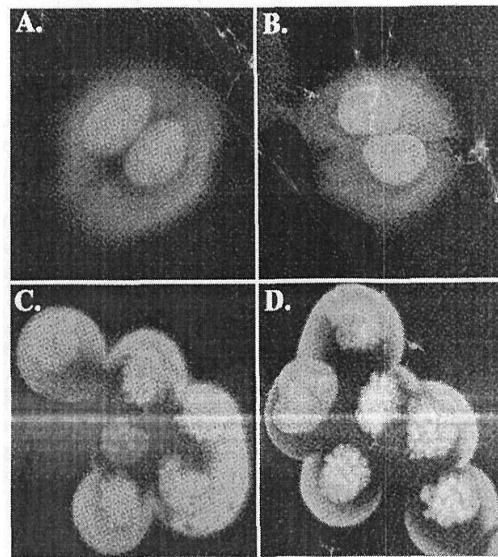


Fig. 8. Sulforaphane disrupts MCF-7 cell mitotic microtubule polymerization. Synchronized cultures were exposed to 15 μ mol/L SUL (C, D) or DMSO (A, B) for 24 h before immunofluorescence staining. The figure represents the abundance of prophase/prometaphase-like mitotic figures lacking polymerized mitotic spindle microtubule networks (C, D)

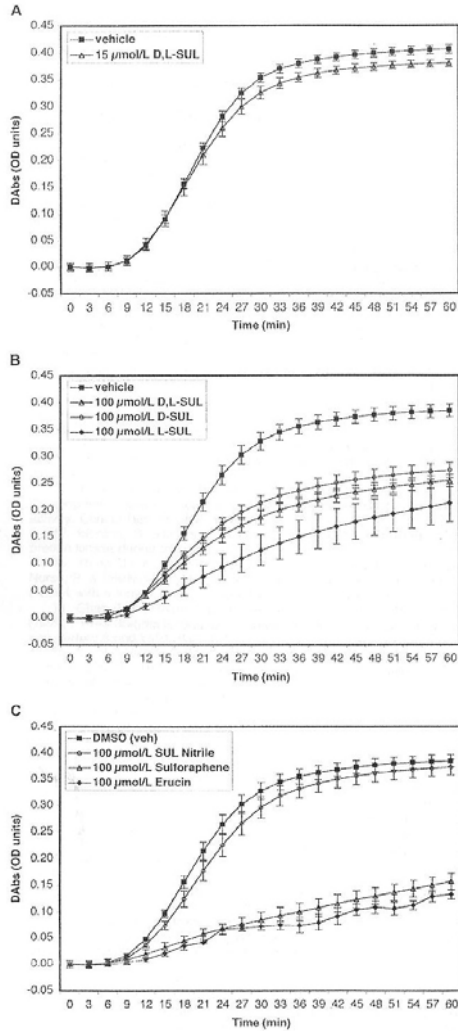


Fig. 9. Sulforaphane and isothiocyanate-containing SUL analogs inhibit tubulin polymerization *in vitro*. Purified bovine brain tubulin was incubated in the presence of the indicated concentrations of SUL isomers (A, B), analogs (C), or DMSO (vehicle) at 37°C, and absorbance readings were recorded each minute for 1 h. For clarity, mean differences (Dabs±SEM) from baseline absorbance (taken at time 0 min) are plotted at 3-min intervals. Tubulin polymerization rate and maximum tubulin polymerization values (means±SEM) are presented in Table 1.

4. Discussion

본고는 SUL이 MCF-7 세포에서 mitotic arrest와 microtubulin disruption이 유도되는 것을 나타낸 보고로 이는 mouse mammary F311 세포에서 SUL이 보여준 효과와 유사하다.

우리는 SUL이 synchronized 세포뿐만 아니라 asynchronous 세포에서 G₂/M cell cycle arrest를 유도하는 것을 보였다. G₂/M의 축적은 ER-75 BT-20과 MDA-MB-231 세포에 비슷하게 발견되었고 이는 ER 상태에 상관없이 유방암 세포 처리에 SUL의 잠재적 효율을 의미한다. 24시간 이내에 synchronized MCF-7 세포에서 SUL의해 생긴 G₂/M 축적은 cyclin B1 단백질의 증가와 관련있고 cdc2 kinase activation 증거가 된다. (그림 6) 더 나아가서 SUL 처리세포는 prophase나 prometaphase 비슷한 단계를 보여주는데 이는 metaphase 전 mitosis 초기에 cell cycle arrest를 의미한다. 흥미롭게도 초기 mitotic 형상은 normal spindle microtubules가 없었고 이는 과거에 보고된 자연발생적 antimitotic agent와 비슷하게 SUL에 의한 mitotic arrest의 기작은 tubulin의 중합화와 microtubule의 운동성을 포함하고 있다. 또한 이는 자연적으로 일어나는 antimitotic agent로 보고된 바 있다. 우리는 MCF-7 세포에 대한 SUL의 처리는 mitotic catastrophe에 의한 cell death의 형태로 비정상적 mitosis와 micronucleation을 일으켰다. MCF-7 세포에 SUL을 하고 24시간 후에 aberrant mitosis와 micronucleation을 보였고 mitotic 붕괴를 보였다. 이러한 결과는 지난 연구에서 보였던 쥐의 유선종양세포에서의 M-phase arrest로 SUL에 의해서 야기된 apoptosis의 형태학적 분자수준에서의 결과와 일치한다. *In vitro* 상에서 상대적으로 높은 농도의 (100μmol/L 이상) SUL은 중합화율을 감소시켰다(그림 9B, 표 1) 그림에도 불구하고 *in vitro* 상에서 tubulin 중합화의 현저한 억제를 위한 필요량은 확실히 phase II 무독화 효소를 유도하는 양 보다는 많이 필요하고

이는 식이적으로 섭취하는 양 이상이라 할 수 있다. 정제 tubulin의 사용으로 도출된 결과는 microtubule 중합화가 SUL의 항 증폭 기능을 쉽게 하는 기작의 target임을 강력하게 시사한다. 하지만 화학적으로 반응성이 강한 thiol이 SUL은 효소들과 반응하고 이를 억제하는 tubulin dynamic에 참여한다고 볼 수는 없다. 한편으로 어떤 isothiocyanate는 DNA 손상의 증폭제가 되어 carcinogenesis를 유발할 수 있다는 점도 유념해야 한다. 즉, 다른 조건의 실험으로 상반된 결과가 나올 수 있다.

Racemic D,L-sulforaphane으로 실험한 것과 비슷하게 tubulin 중합화는 각각 D-L-sulforaphane isomer로 억제되었고 뿐만 아니라 isothiocyanate 함유하는 SUL 유사물질인 erucin과 sulforaphane도 마찬가지였다. 그러나 sulforaphane의 전구체인 glucoraphanin의 분해산물인 sulforaphane uitrile은 isothiocyanate로서의 역할이 부족하였다. 즉, tubulin 중합화를 확실하게 바꾸지 못하였다. 결과는 isothiocyanate group이 tubulin 중합화의 억제제로서 SUL의 효과를 어느 정도 공유하는 것에서 나온 것이라 할 수 있다. SUL 반응의 생화학적 성질에 대한 분석이나 tubulin 단백질과의 반응성 분석 그리고 전체 세포에서 tubulin 운동성에 대해 상대적으로 소량의 SUL의 효과 등의 자세한 분석이 확실하게 되었다. 또한 G₂/M arrest를 일으킨다고 알려진 다른 자연 발생적인 isothiocyanate 복합물도 잠재적으로 비슷한 기작을 통해서 정상 tubulin 중합화나 운동성에 혼란을 일으키는 것과 비슷한 것인지, 즉, G₂보다 mitotic cell cycle에 arrest가 가능한지도 확인해 보아야 한다.

결론적으로 본 연구는 SUL의 human mammary carcinoma proliferation에 대한 첫 번째 보고이고 이는 최초로 밝혀진 SUL의 기능에 대한 확실한 증거라 할 수 있다. Cancer 개시의 저해효과로 이미 알려진 것에 더해서 mitotic microtubules의 붕괴와 cdc2 kinase의 활성화 그리고 G₂/M 기간에 cell cycle을 arrest 시킴으로써 human breast

cancer promotion/progression에 영향을 주는 자연 발생적인 물질로 나타났다. 마지막으로, SUL의 세포내 mitotic cell cycle arrest를 유발하는 cellular target과 SUL의 반응성을 확인하고 식이적 섭취되는 SUL과의 관련성과 화학적 치료 가능성에 대한 연구가 요구된다.

5. 참고문헌

1. Gamet-Payraastre, L., Lumeau, S., Gasc, N., Cassar, G., Rollin, P. & Tulliez, J. (1998) Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs* 9: 141-148
2. Freundeheim, J. L., Marshall, J. R., Vena, J. E., Laughlin, R., Brasure, J. R., Swanson, M. K., Nemoto, T. & Graham, S. (1996) Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:340-348.
3. Franceschi, S., Parpinel, M., La Vecchia, C., Favero, A., Talamini, R. & Negri, E. (1998) Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum, and breast. *Epidemiology* 9:338-341.
4. Franceschi, S., Favero, A., Carlo, L. V., Negri, E., Luigino, D. M., Salvini, S., Decarli, A. & Giacosa, A. (1995) Influence of food groups and food diversity on breast cancer risk in Italy. *Int. J. Cancer* 63:785-789.
5. Faulkner, K., Mithen, R. & Williamson, G. (1998) Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphanylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis* 19:605-609
6. Zhang, T., Kensler, T.W., Cho, C.-G., Posner, G. H. & Talalay, P. (1994) Anticarcinogenic

- activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbomyl isothiocyanates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:3147-3150.
7. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.-G. & Posner, G. H. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:2399-2403.
 8. Barcelo, S., Gardiner, J. M., Gescher, A. & Chipman, J. K. (1996) CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. Carcinogenesis 17:277-282.
 9. Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.-A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tuilliez, J. & Terce, F. (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 colon cancer cells. Cancer Res. 60:1426-1433.
 10. Huang, C., Ma, W. Y., Li, J., Hecht, S. S. & Dong, Z. (1998) Essential role of p53 in phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis. Cancer Res. 58:4102-4106.
 11. Yu, R., Mandlikar, S., Harvey, K. J., Ucker, D.S. & Kong, A. N. (1998) Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. Cancer Res. 58:402-408.
 12. Moreno, S., Hayles, J. & Nurse, P. (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. Cell 58:361-372
 13. Th'ng, J.P.H., Wright, P. S., Hamaguchi, J., Lee, M. G., Norbury, C. J., Nurse, P. & Bradbury, E. M. (1990) The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with temperature-sensitive CDC2 gene product. Cell 63:313-324.
 14. Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. Nature(Lond.) 401:616-620.
 15. Shi, L., Nishioka, W. K., Th'ng, J., Bradbury, E. M., Litchfield, D. W. & Greenberg, A. H. (1994) Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. Science (Washington, DC) 263:1143-1145
 16. Krek, W. & Nigg, E. A. (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. EMBO J. 10: 305-316.
 17. Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S. & Nurse, P. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34cdc2 function. EMBO J. 10: 3297-3309.
 18. Norbury, C., Blow, J. & Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. EMBO J. 10: 3321-3329.
 19. Norbury, C. & Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. Annu. Rev. Biochem. 61: 441-470.
 20. Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. & Maller, J. L. (1990) Cyclin is a component of maturation-promotion factor from *Xenopus*. Cell 60: 487-494.
 21. Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, M. W. (1990) Cyclin activation of p34cdc2. Cell 63: 1013-1024.
 22. Labbe, J.-C., Capony, J.-P., Caput, D., Cavadore, J.-C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J.-M., Picard, A. & Doree, M. (1989) MPF from starfish oocytes at first meiotic

- metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8: 3053-3058
23. McGowan, C. H. & Russell, P. (1993) Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J.* 12: 75-85.
24. Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., Lee, M. S., Ogg, S., Falk, J. L., Swenson, K. I. & Piwnica-Worms, H. (1991) Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+dependent manner. *EMBO J.* 10: 1255-1263.
25. Russell, P. & Nurse, P. (1987) Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog, *cell* 49: 559-567.
26. McGowan, C. H. & Russell, P. (1995) Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* 14: 2166-2175.
27. Watanabe, N., Broome, M. & Hunter, T. (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* 14: 1878-1891.
28. Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. & Beach, D. (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64: 1111-1122
29. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates CDC2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science (Washington, DC)* 270: 86-90.
30. Lee, M. S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L. L., Donoghue, D. J., Maller, J. L. & Piwnica-Worms, H. (1992) cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol. Biol. Cell* 3: 73-84.
- <출처 *J. Nutri.* 134, 2229-2236, 2004>

