

## Effect of Soy Isoflavones on the Expression of TGF- $\beta$ 1 and Its Receptors in Cultured Human Breast Cancer Cell Lines

Young-Hwa Kim, Kyong-Suk Jin and Yong-Woo Lee<sup>†</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

The two major isoflavones in soy, genistein and daidzein, are well known to prevent hormone-dependent cancers by their antiestrogenic activity. The exact molecular mechanisms for the protective action are, however, not provided yet. It has been reported that genistein and daidzein have a potential anticancer activity through their antiproliferative effect in many hormone-dependent cancer cell lines. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) has also been found to have cell growth inhibitory effect, especially in mammary epithelial cells. This knowledge led to a hypothetical mechanism that the soy isoflavones-induced growth inhibitory effect can be derived from the regulation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$  receptors. In order to test this hypothesis, the effects of the soy isoflavones at various concentrations and periods on the expression of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$  receptors were investigated by using Northern blot analysis in human breast carcinoma epithelial cell lines, an estrogen receptor positive cell line (MCF-7) and an estrogen receptor negative cell line (MDA-MB-231). As a result, only genistein has shown a profound dose-dependent effect on TGF- $\beta$ 1 expression in the ER<sup>+</sup> cell line within the range of doses tested, and the expression levels are correspondent to their inhibitory activities of cell growth. Moreover, daidzein showed down-regulated TGF- $\beta$ 1 expression at a low dose, the cell growth proliferation was promoted at the same condition. Therefore, antiproliferative activity of the soy isoflavones can be mediated by TGF- $\beta$ 1 expression, and the effects are mainly, if not all, occurred by ER dependent pathway. The expression of TGF- $\beta$  receptors was induced at a lower dose than the one for TGF- $\beta$ 1 induction regardless of the presence of ER, and the expression patterns are similar to those of the cell growth inhibition. These results indicated that the regulation of TGF- $\beta$  receptor expression as well, prior to TGF- $\beta$ 1 expression, may be involved in the antiproliferative activity of soy isoflavones. Little or no expression of TGF- $\beta$  receptors was found in the MCF-7 and MDA-MB-231 cells, suggesting refractory properties of the cells to growth inhibitory effect of the TGF- $\beta$ 1. The soy isoflavones can seemingly restore the sensitivity of growth inhibitory responses to TGF- $\beta$ 1 by re-inducing TGF- $\beta$  receptors expression. In conclusions, our findings presented in this study show that the antitumorigenic activity of the soy isoflavones could be mediated by not only TGF- $\beta$ 1 induction but TGF- $\beta$  receptor restoration. Thus, soy isoflavones could be good model molecules to develop new nonsteroidal antiestrogenic chemopreventive agents, associated with, regulation of TGF- $\beta$  and its receptors.

**Key Words:** Genistein, Daidzein, Human breast cancer cell lines, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$  receptor I, TGF- $\beta$  receptor II, Antiproliferation

### 서 론

식습관이 암 발생의 위험률과 중요한 상관관계를 보이며, 동양인이 많이 섭취하는 대두에 함유되어 있는 주요한 이소플라본인 genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)과 daidzein (4',7-

dihydroxyisoflavone)이 유방암과 전립선암 등을 비롯한 호르몬과 연관된 암의 예방과 밀접하게 연관된 것으로 알려졌다 (Steel et al., 1995). 이들은 17- $\beta$ -estradiol과 구조적으로 또는 작용면에서 유사하여 식물성 호르몬 (phytoestrogen)으로 불리기도 하며, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자 (selective estrogen receptor modulator; SERM)로서 17- $\beta$ -estradiol이 에스트로겐 수용체에 결합하는 것을 방해함으로써 항 에스트로겐 효과를 나타내게 되는데 이소플라본의 이러한 항 에스트로겐 효과는 항암활성을 나타내는 데 중요한 역할을 한다 (Diel et al., 2001).

대두 이소플라본의 대표적인 생화학적 활성은 1) tyrosine

\* 논문 접수: 2005년 5월 24일

수정재접수: 2005년 6월 24일

<sup>†</sup> 교신저자: 이용우, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과

Tel: 055-320-3307, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlsywoo@inje.ac.kr

**Table 1.** Cellular effects of TGF- $\beta$ 1 on various cell types

Cell type	Effect of TGF- $\beta$ 1	Reference
Fibroblasts	proliferation (+) transcription of <i>c-myc</i> , <i>v-sis</i> , collagen and fibronectin genes	Kataoka, et al., 1993
Epithelial cells	inhibition (-) transcription of <i>c-myc</i>	Law et al., 1993
Ovarian granulosa cells	inhibition (-) phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate	Pennybacker et al., 1992
Vascular smooth muscle cells	proliferation signaling via protein kinase C	Sadoshima et al., 1993
Articular chondrocytes	proliferation (+) inositol phospholipid breakdown (+) DNA synthesis (-) cAMP levels	Vivien et al., 1993

(+) = increase, (-) = decrease

kinase 활성 억제, 2) DNA topoisomerase II 및 S6 kinase 활성 억제, 3) protein kinase 활성 억제, 4) cyclin dependent kinase (CDK) 활성 억제 및 CDK 억제제 발현 증대, 5) 항산화능, 6) 호르몬 유사체인 prostaglandin E2, F2의 합성 억제 및 불활성화 촉진능, 7) 신생혈관생성 억제능 등을 들 수 있으며 (Valachovicova et al., 2004). 이러한 작용으로 genistein과 daidzein이 유방암 세포를 비롯한 각종 호르몬과 연관된 암세포에 대하여 성장 억제 작용을 나타내는 것으로 알려졌으나 이러한 항암 작용에 대한 분자적인 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다.

세포 증식·억제에 관련된 대표적인 cytokine인 TGF- $\beta$ 는 activin, inhibin, bone morphogenic proteins (BMPs)로 구성되는 TGF- $\beta$  superfamily의 하나이며, mammalian TGF- $\beta$ 는 3가지 isoform (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3)을 가진다. 이들은 in vitro에서는 유사한 생물학적 활성을 가지는 cytokine이며, 주로 세포의 성장과 분화, 세포 외 상호 작용, 면역 체계 기능, 세포 괴사, 신생혈관 생성 등에 관여하는 다 기능성 peptide이다. 이 중 가장 많이 존재하는 것이 25 kDa의 homodimer인 TGF- $\beta$ 1로서 세포의 transformation을 유도하는 인자로 알려졌으나 (Hata, 2001), 최근의 많은 연구 결과는 TGF- $\beta$ 1은 일반적으로 성장을 촉진시키기보다는 상피 세포와 내피 세포, 조혈 세포 등을 포함한 대부분의 세포주에 대하여 성장 억제 효과를 보임이 밝혀졌다 (Table 1).

대부분의 성장 인자나 호르몬과 마찬가지로 TGF- $\beta$ 는 세포막에 존재하는 수용체에 결합함으로써 세포의 신호를 전달하게 되는데, 이런 신호 전달에 주로 관여하는 TGF- $\beta$  수용체는 type I과 type II 수용체로서 transmembrane serine/threonine kinase이다. 이들은 cysteine-rich extracellular region과 intracellular kinase domain을 가지고 있고 구조적으로 유사하다

(Walker, 2000). TGF- $\beta$ 의 신호를 전달하기 위한 과정으로, 우선 TGF- $\beta$ 가 TGF- $\beta$  receptor II (TGF- $\beta$  RII)에 먼저 결합하게 되면 TGF- $\beta$  RII가 활성화되는데 이로 인해 TGF- $\beta$  receptor I (TGF- $\beta$  RI)의 glycine-, serine-rich domain을 transphosphorylation하여 TGF- $\beta$  RI kinase를 활성화시키게 된다. Ligand에 의해 TGF- $\beta$  수용체가 활성화되면서, TGF- $\beta$  수용체의 downstream으로 작용하는 Smad2와 Smad3 단백질을 인산화시킨다. 인산화된 Smad2와 Smad3은 Smad4와 heteromeric complex를 형성하여 핵으로 이동함으로써 transcriptional activator로 작용하게 된다 (Lynch et al., 2001). 그리하여 TGF- $\beta$ 는 세포 주기의 진행을 억제하는 성장 억제 단백질, 가령 CDK 억제제인 p15<sup>Ink4B</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>이나, insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)과 같은 mitogenic signaling을 방해하는 단백질의 발현을 유도할 수 있게 된다. CDK는 세포 주기에 관여하는 cyclin과 결합하여 pRB를 인산화 시킴으로써 전사인자인 E2F를 통해 세포 주기의 G1에서 S기로의 진행을 유도하게 되는데, TGF- $\beta$ 에 의해 활성화된 CDK 억제제가 G1 cyclin-CDK complex에 의한 pRB의 인산화를 막고 저 인산화 혹은 비 인산화된 pRB에 E2F가 결합함으로써 E2F의 기능의 상실로 G1기를 통한 세포 주기를 막음으로써 결국 세포 사멸이 일어나게 된다 (Salatino et al., 2001). 또한 TGF- $\beta$ 는 proto-oncogene인 *c-myc*의 transcription을 억제하며 *c-myc* 합성의 감소로, CDK2의 비 인산화와 CDK2 kinase 활성에 중요한 단백질을 encoding하는 *cdc25A*의 transcription을 억제하게 된다 (Liu et al., 1997).

TGF- $\beta$ 는 mammary gland에서 종양 억제제로 작용하며, in vitro와 in vivo에서 mammary epithelial cells에 강한 성장 억제 효과를 나타낸다 (Sanford et al., 1996). 이러한 작용은 mammary epithelium에서 TGF- $\beta$ 의 반응성, 종양 생성의 단계.

그리고 TGF- $\beta$  ligand와 수용체의 발현율에 의존한다. 그런데, 많은 종류의 암세포주가 TGF- $\beta$ 에 의한 성장 억제 효과를 받지 않으며, 이는 암세포주에서의 TGF- $\beta$  수용체의 발현 감소 및 TGF- $\beta$  수용체 유전자 상의 돌연변이나 손실 또는 TGF- $\beta$ 의 신호 전달 체계의 손상으로 인한 것임이 밝혀졌다 (Park et al., 1994). 한편 손상된 TGF- $\beta$  수용체를 가지게 된 암세포는 TGF- $\beta$ 에 의한 성장 규제에서 벗어남으로써 선택적으로 우수한 성장 조건에 놓이게 된다. 또한 주목해야 할 점은 이렇게 변형된 암세포주들의 대부분이 암 진행과정 중 TGF- $\beta$ 를 직접 분비하게 되고 이는 암세포주 자체의 성장 조건을 더욱 더 유리하게 한다는 점이다. 게다가 많은 유방암 세포주는 TGF- $\beta$ 에 대한 반응이 없거나 감소하는데, 이는 TGF- $\beta$  수용체의 발현의 감소로 인한 것이다 (Sun et al., 1997).

본 연구에서는, 유방암 세포에서 autocrine/paracrine으로 작용하며 autoinhibitory potential을 가지는 (Knabbe et al., 1987) TGF- $\beta$ 1 분비의 증가를 유도하여 세포성장 억제 작용에 기여할 것이라는 가설을 human breast carcinoma epithelial cell lines를 이용하여 genistein과 daidzein에 의한 TGF- $\beta$ 1과 그 수용체의 발현 변화를 Northern blot 분석을 통해 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양과 이소플라본

유방암 세포로서 에스트로젠 수용체 (이하 ER) 양성 세포주인 MCF-7과 ER 음성 세포주인 MDA-MB-231 (한국세포주은행)을 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL), 200 mM L-glutamine (Gibco BRL)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco BRL)을 배지로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 실험을 수행하기에 앞서 외부의 에스트로젠 영향을 제거하기 위해 phenol red free RPMI 1640 (Gibco BRL)에 2% FBS와 20 mM glucose를 첨가한 배지로 배양하였다 (Cappelletti et al., 2000). 대두 (Glycine max)에서 HPLC로 정제한 genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)과 화학적으로 합성한 daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)

(Sigma)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 녹여 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 2. 세포 독성 측정

Human breast cancer cell lines에 대해 genistein과 daidzein의 성장 억제 효과를 보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 96-well microtiter plate (flat bottom, Corning)에 한 well당 7×10<sup>3</sup> cells가 되도록 seeding하고 24시간 후 배양한 뒤, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ M의 genistein과 daidzein을 처리하였다. 72시간 후, 멸균한 PBS로 세척하고 정상 배지로 바꾸어준 뒤 각 well에 5 mg/ml의 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)를 20  $\mu$ l 씩 첨가하였다. Plate를 빛을 차단하여 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 200  $\mu$ l의 DMSO를 넣어 crystal을 녹여 주었다. 여기에 Sorenson's glycine buffer (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.5)를 각 well에 25  $\mu$ l 씩 첨가하고 ELISA microplate reader (Emax, Molecular Devices)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. Hybridization probes 제작

MCF-7 세포에서 분리한 total RNA로 부터 Oligotex<sup>TM</sup> mRNA spin column (Qiagen)을 사용하여 제조사에서 제공하는 protocol에 따라 poly A<sup>+</sup> mRNA를 정제한 후 역 전사반응을 다음과 같이 수행하여 cDNA를 제작하였다. Poly A<sup>+</sup> mRNA, oligo d(T)<sub>19</sub> primer 50 pmole 그리고 10 mM dNTPs 2.5  $\mu$ l를 75°C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에서 바로 식히고 5× first strand buffer, 0.1 M dithiothreitol (DTT), DEPC-treated water로 25  $\mu$ l를 맞추어 50°C 2분간 두었다. Superscript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase 200 U를 첨가하고 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 효소를 비 활성화하기 위해 70°C에서 15분간 두었다. RNase H (TaKaRa) 60 U를 첨가한 후 30°C에서 20분간 유지하여 남아 있는 RNA를 제거하고 single strand cDNA만 남게 하였다. PCR하기 전에 Sephadex G-50 spin column (Roche)을 이용하여 single strand

Table 2. PCR primers used to prepare probes for Northern blot analysis

Name	Genebank Accession Number		PCR primer	Size (bp)
TGF- $\beta$ 1	X02812	F	5'-AAGCCTCCCCTCCACTG-3'	1,289
		R	5'-GCTTGCGGGCCACGTCGTAGTAC-3'	
TGF- $\beta$ RI	NM_004612	F	5'-CGATTTGGAGAAGTTTGGAGA-3'	1,206
		R	5'-CCAACCTCTTTGCCCTTAAA-3'	
TGF- $\beta$ RII	D50683	F	5'-AGCAGAAGCTGAGTTCAACC-3'	699
		R	5'-GAGCCATGTATCTTGCAGTTC-3'	
GAPDH	NM_002046	F	5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCA-3'	802
		R	5'-ACTGAGTGTGGCAGGGACTC-3'	

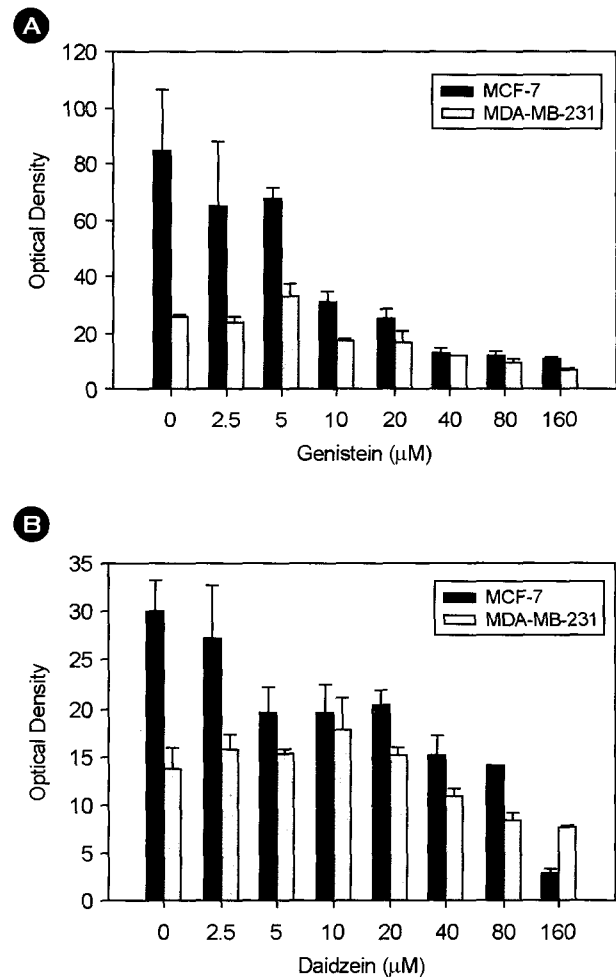
cDNA를 정제하였다.

NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GeneBank를 통해 각 유전자에 대한 sequence를 얻은 후, primer design software (Genamics Expression)를 이용하여 결정한 primer sequence와 PCR 조건은 Table 2와 같다. Single strand cDNA를 주형으로, 10× Taq buffer 5 μl, 각 primer는 20 pmole, 1.25 mM dNTPs 4 μl, Super Taq polymerase (SUPER-Bio) 1.25 U를 넣은 후 DW로 최종 부피가 50 μl가 되도록 맞춘 다음 thermocycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR System)를 이용하여 PCR을 수행 후 PCR 산물을 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)의 protocol에 따라 정제하여 cloning에 이용하였다. 정제한 PCR 산물을 pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (Promega)을 이용하여 TA cloning을 수행하였다. PCR 산물, pGEM<sup>®</sup>-T vector 25 ng, 2× ligation buffer 12.5 μl, T4 DNA ligase 3 U에 최종 부피가 25 μl가 되도록 DW를 첨가하였다. 4°C에서 16~24시간 동안 반응시켜 재조합 DNA를 제조하였다. 50 mM CaCl<sub>2</sub>를 이용하여 *E. coli* JM 109 (Promega)로 competent cell을 만든 후 heat shock 방식으로 재조합 DNA를 transformation시켰다. X-gal (Bioneer)을 이용한 Lac selection을 통하여 한 transformant colony를 선택하고 broth culture한 후 Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA Purification Systems (Promega)를 이용하여 plasmid를 분리한 후 제한 효소를 이용하여 올바른 재조합 DNA임과 동시에 insert의 방향성을 확인하였다. 제한 효소로 절단한 plasmid로부터 QIAEX<sup>®</sup>II Gel Extraction Kit (Qiagen)를 이용한 gel elution을 통해 해당 유전자의 cDNA를 포함하는 DNA fragment를 준비하여 방사선 표지용 probe로 사용하였다.

#### 4. TGF-β1 및 그 수용체의 발현 분석

TGF-β1 및 그 수용체의 발현에 대한 이소플라본의 영향을 처리 시간과 농도에 따라 각각 살펴보았다. 100 mm 조직 배양용 plate (Corning) 당 3×10<sup>6</sup> cells가 되도록 하여 seeding하고 24시간 후, 세포가 배양용 plate에 부착되고 난 뒤에 성장 억제 효과를 나타내는 특정 농도인 20 μM의 genistein과 40 μM의 daidzein을 처리하고 3, 6, 12, 24, 48시간 후에 각각 RNA를 분리하였다. 또한, 농도에 따른 발현 정도를 보기 위해 각 세포주에 이소플라본을 12 시간 동안 2.5, 5, 10, 20 μM의 genistein과 5, 10, 20, 40 μM의 daidzein을 처리한 후 각각 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 농도와 총량, 그리고 순도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하고 1% agarose/formaldehyde gel을 사용하여 전기영동한 후 vacuum transfer 방법으로 blotting하였다. Probe DNA는 Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 labeling하였다. Labeled probe를 95°C에서 5분간 변성시킨 후 hybridization에 이용하였다. 60°C에서 30분 이상 prehybridiza-

tion을 수행하였는데, prehybridization buffer는 membrane 제조사의 protocol을 참조하여 1% non-fat dried milk, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS)로 제조하였다. Prehybridization이 끝난 후 열 변성시킨 방사능 표지 cDNA probe를 넣은 hybridization buffer로 바꾸어 하루 밤 동안 hybridization oven에서 수행하였다. Hybridization이 끝난 membrane을 washing solution I (0.2× SSC (sodium chloride, sodium citrate), 0.1% SDS)으로 65°C에서 20분씩 2회, 그리고 washing solution II (0.1× SSC, 0.1% SDS)로 65°C에서 20분씩 2회 세척하였다. Membrane을 3 MM paper 위에서 살짝 말린 후 saran wrap으로 싸서 cassette에 넣고 phosphoimager screen에 2시간 노출시켰다. Screen의 image를 phosphoimager (Packard Cyclone, OptiQuant)를 이용하여 scanning하고 정량 하였다. Deprobing을 위해 끓인 0.1% SDS를 membrane에 넣고 실온으로 식을 때까지 두었다가 3



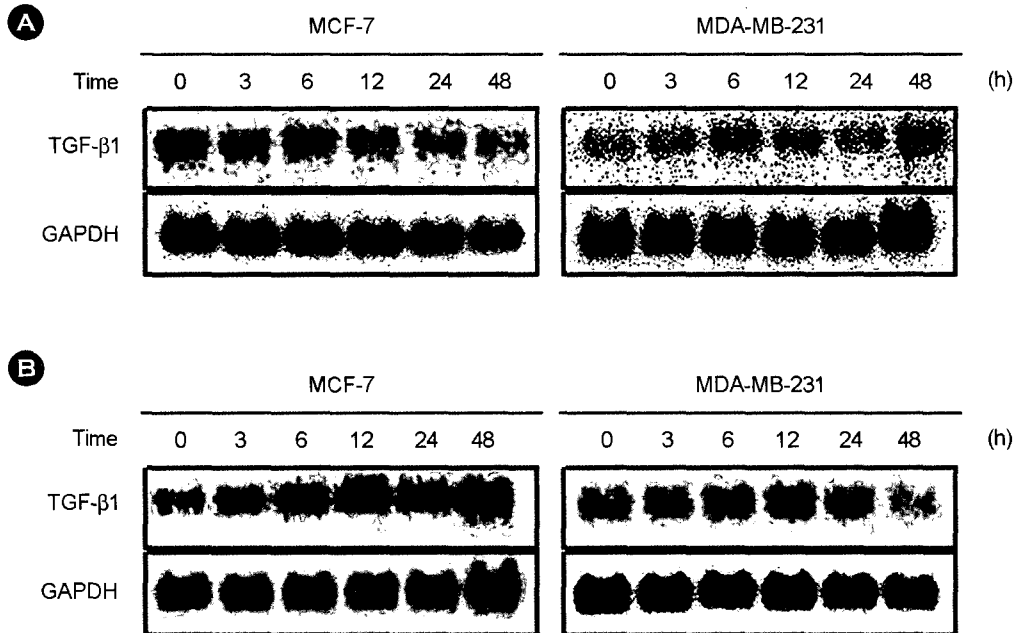
**Fig. 1.** Effects of genistein and daidzein on growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The cells were plated in 96-well culture plate, and cultured in the presence of various concentrations of genistein (A) or daidzein (B) for 72 h. Cell growth was estimated by MTT assay. All data are derived from triplicate samples.

MM paper에서 membrane을 살짝 말린 후 cassette에 넣고 deprobing 여부를 확인하였다. Normalization을 위해서 deprobing한 membrane에 housekeeping gene인 GAPDH cDNA probe로 65°C에서 hybridization하였다.

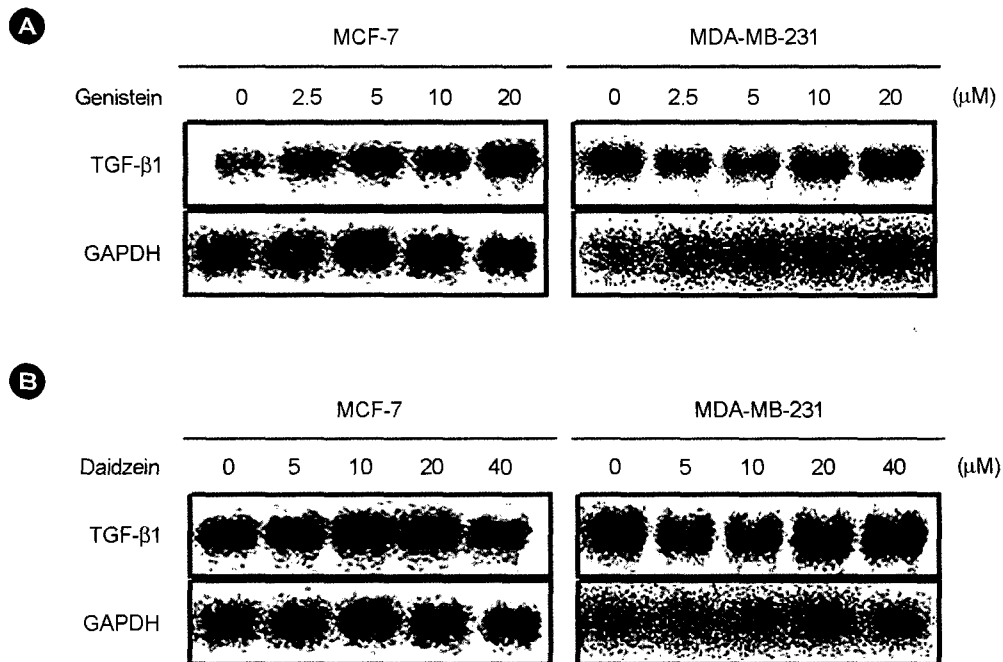
## 결 과

### 1. 세포성장에 미치는 영향

MCF-7과 MDA-MB-231 세포에 genistein과 daidzein을 농



**Fig. 2.** Effect of genistein and daidzein on TGF-β1 mRNA expression by treatment period. The cells were treated with 20 μM genistein (A) or 40 μM daidzein (B) for up to 48 h and subjected to Northern blot analysis. GAPDH was used as a loading control.



**Fig. 3.** Effect of genistein and daidzein on TGF-β1 mRNA expression by dose. The cells were treated with various concentrations of genistein (A) or daidzein (B) for 12 h and subjected to Northern blot analysis. GAPDH was used as a loading control.

도별로 3일간 처리한 후 MTT assay법으로 세포 독성을 측정하였다. Genistein과 daidzein을 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{M}$ 의 농도로 두 세포주에 각각 처리한 결과, genistein이 daidzein보다 농도에 따른 성장 억제 효과가 더 크게 나타남을 알 수 있었다. Genistein을 MCF-7 세포에 처리한 후의 농도에 따른 세포 생존율은, 무 처리 대조군 대비 각각 77, 80, 37, 30, 15, 14, 13%였으며, MDA-MB-231 세포에서는 각각 92, 128, 67, 66, 46, 38, 26%를 나타내었다 (Fig. 1A). 마찬가지로 daidzein을 처리했을 때의 세포 생존율은, MCF-7 세포에서 각 농도에 따라 90, 65, 65, 68, 51, 42, 10%였고, MDA-MB-231 세포에서는 113, 110, 128, 109, 79, 61, 55%를 보였다. 낮은 농도 (2.5~10  $\mu\text{M}$ )에서는 세포성장이 거의 일정하거나 오히려 증식하는 경향을 보이는데, 이는 대두 이소플라본의 약한 에스트로겐 효과를 나타내는 것이다 (Fig. 1B). 그리고 ER<sup>+</sup> 세포인 MCF-7과 ER<sup>-</sup> 세포인 MDA-MB-231을 비교하였을 때, 두 이소플라본은 ER<sup>+</sup> 세포에 더 민감하게 성장을 억제시키는 것으로 보여 genistein과 daidzein이 주로 에스트로겐 수용체 의존성 경로를 통해 작용함을 암시하였다.

## 2. TGF- $\beta$ 1의 발현에 미치는 영향

MCF-7과 MDA-MB-231 세포에 각각 30%, 66%의 세포 생존율을 보이는 20  $\mu\text{M}$ 의 genistein을 3, 6, 12, 24, 48시간까지 처리하였을 때, MCF-7 세포에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현이 6시간까지 증가하다가 그 이후에는 오히려 감소함을 보였다. 반면, MDA-MB-231 세포에서는 점차적으로 증가함을 나타내었다 (Fig. 2A). MCF-7 세포에서 51%, MDA-MB-231 세포에서 79%의 세포 생존율을 나타내는 농도인 40  $\mu\text{M}$ 의 daidzein을 처리하였을 때, MCF-7 세포에서는 TGF- $\beta$ 1 mRNA의 발현이 시간 의존적으로 두드러지게 증가함을 보였다. 그러나 MDA-MB-231 세포에서는 12시간에서 최대 발현율을 보이고 그 이후에는 오히려 감소함을 보였다 (Fig. 2B).

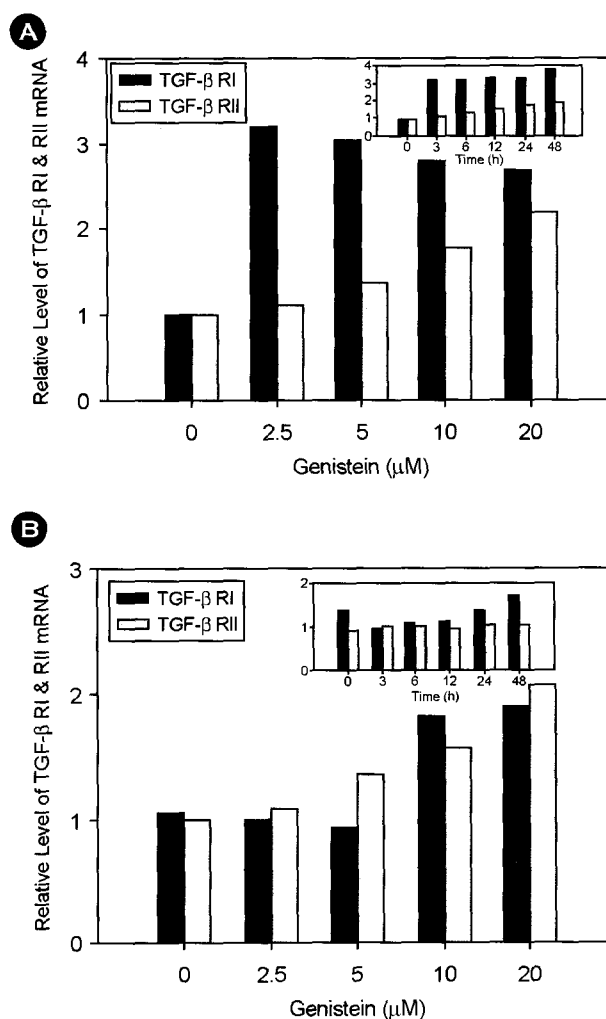
각종 농도의 대두 이소플라본이 TGF- $\beta$ 1의 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ 의 genistein을 12시간 동안 처리하였을 때, MCF-7 세포에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현율이 세포 독성 효과와는 상관없이 농도 의존적으로 크게 증가함을 보이나, MDA-MB-231 세포에서는 5  $\mu\text{M}$ 까지는 감소한 후 세포 독성 효과를 보이는 10  $\mu\text{M}$ 부터는 차츰 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3A). 5, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$ 의 daidzein을 12시간 동안 처리하였을 때, 두 세포주간의 mRNA 발현의 변화는 거의 없었다 (Fig. 3B).

## 3. TGF- $\beta$ 수용체의 발현에 미치는 영향

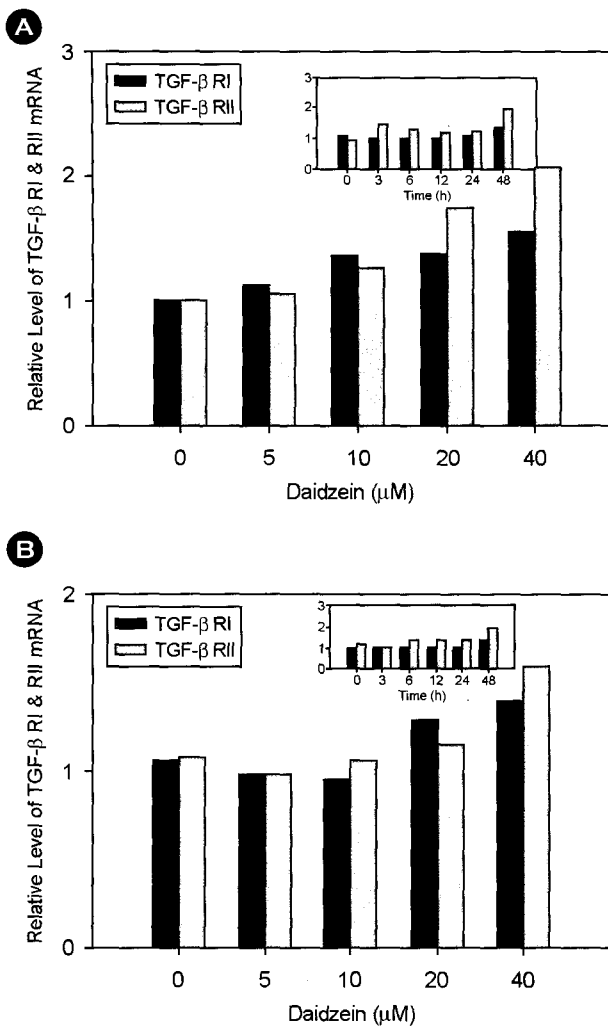
이소플라본을 처리하지 않은 유방암 세포에서, TGF- $\beta$  수용체의 발현이 거의 나타나지 않거나 비교적 낮은 발현율을 보였다. 이는 TGF- $\beta$  수용체의 발현의 감소로 인하여 TGF-

의 반응성이 없거나 감소한 암세포의 TGF- $\beta$  수용체의 상태를 보여주는 것으로 MCF-7 세포에서는 거의 나타나지 않았지만, MDA-MB-231 세포에서는 비교적 약한 발현율을 보였다 (Not shown data).

MCF-7 (ER<sup>+</sup>) 세포에, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ 의 genistein을 처리하였는데, genistein의 처리를 하지 않은 대조군에서는 TGF- $\beta$  RI과 TGF- $\beta$  RII의 발현이 거의 나타나지 않았지만, 2.5  $\mu\text{M}$ 의 genistein을 처리하였을 때 TGF- $\beta$  RI의 발현 정도가 급격하게 증가함을 보였다. 또한, 3시간 처리 한 후에 TGF- $\beta$  RI의 발현 정도가 두드러지게 증가하여 24시간까지 일정한 level로 유지되다가 48시간째에 최대 발현 정도를 나타내었다. 낮은 농도에서 짧은 시간 내에 발현율의 변화가 큰 TGF-



**Fig. 4.** Effect of genistein on TGF- $\beta$  RI and RII mRNA expressions in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (A) MCF-7 (ER<sup>+</sup>) cells or (B) MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>) cells were treated with various doses of genistein for 12 h subjected to Northern blot analysis. The inset figures show time course effect of genistein at 20  $\mu\text{M}$  concentration. Relative levels of TGF- $\beta$  RI and RII mRNA were quantified by phosphoimager and normalized to the GAPDH mRNA.



**Fig. 5.** Effect of daidzein on TGF- $\beta$  RI and RII mRNA expressions in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (A) MCF-7 (ER<sup>+</sup>) cells or (B) MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>) cells were treated with various doses of daidzein for 12 h subjected to Northern blot analysis. The inset figures show time course effect of daidzein at 40  $\mu$ M concentration. Relative levels of TGF- $\beta$  RI and RII mRNA were quantified by phosphorimager and normalized to the GAPDH mRNA.

$\beta$  RI과는 달리, TGF- $\beta$  RII는 시간과 농도 의존적으로 점차적으로 증가하는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 4A). 또한, MDA-MB-231 (ER<sup>-</sup>) 세포에서 TGF- $\beta$  RI은 5  $\mu$ M까지는 약간 감소함을 보이나, 10  $\mu$ M부터는 큰 폭으로 증가하였다. 그리고 시간에 따른 TGF- $\beta$  RI과 TGF- $\beta$  RII의 변화는 거의 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4B).

MCF-7 세포에 5, 10, 20, 40  $\mu$ M의 daidzein을 농도별로 처리하였을 때, TGF- $\beta$  RI과 TGF- $\beta$  RII는 서로 비슷한 발현 양상을 보였으며, 10  $\mu$ M 처리했을 때부터 발현 정도가 점차 증가함을 보였다. 시간에 따른 변화는 거의 없었지만, 48시간에 최대 발현 정도를 나타내었다 (Fig. 5A). 그리고 MDA-MB-231 세포에서는 5  $\mu$ M까지는 감소하다가 차츰 증가함을

보이는데 48시간에서 최대 발현 정도를 나타내었다. 하지만, 시간과 농도에 따른 변화가 그다지 크지 않았다 (Fig. 5B).

## 고찰

Mammary epithelial cells에서 TGF- $\beta$ 는 세포성장 억제 활성을 가지는 cytokine이다. 이미 다른 연구에서, 유방암 치료제로 주로 이용되고 있는 tamoxifen을 비롯한 많은 다른 항 에스트로겐의 작용을 TGF- $\beta$ 1의 유도로 설명하였다 (Perry et al. 1995). 따라서 항 에스트로겐 활성을 통해 세포 증식을 억제하며 항암활성을 가지는 것으로 믿어지는 대두 이소플라본 또한 TGF- $\beta$ 1를 매개하는 신호 전달의 조절을 통하여 일어나는 것으로 생각되었다.

본 연구에 사용한 유방암 세포주에서 genistein이 daidzein보다 농도에 따른 성장 억제 효과가 더 크게 나타남을 알 수 있었다. 이는, genistein의 대표적인 생화학적 활성 중, DNA topoisomerase II의 기능을 저하시켜 암세포의 DNA 합성을 방해함으로써 암세포의 성장 억제를 나타내는 반면, 하나의 -OH기 (hydroxyl group)만으로 차이가 나는 daidzein은 이러한 기능을 나타내지 않는 것으로 알려져 있으므로 (Constantinou and Mehta, 1995) 암세포의 성장 억제 작용이 비교적 효과적이지 못한 것으로 설명할 수 있을 것이다. 그리고 낮은 농도 (2.5~10  $\mu$ M)에서는 세포성장이 거의 일정하거나 오히려 증식하는 경향을 보이는데, 이는 대두 이소플라본의 약한 에스트로겐 효과를 나타내는 것이다. 반면, 대두 이소플라본의 농도가 높아질수록 세포 생존률이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 대두 이소플라본이 항 에스트로겐 영향을 나타냄으로써 세포의 성장을 억제시키는 것을 알 수 있었다. 또한 ER<sup>+</sup> 세포인 MCF-7과 ER<sup>-</sup> 세포인 MDA-MB-231을 비교하였을 때, genistein과 daidzein이 ER<sup>+</sup> 세포주에 더 민감하게 작용하는 것으로 보여 주로 에스트로겐 수용체 의존성 경로를 통해 세포성장 억제 작용을 나타냄을 암시하였다.

대두 이소플라본은 TGF- $\beta$ 1의 발현에 시간과 농도 의존적인 영향을 보였다. MCF-7과 MDA-MB-231 세포의 성장을 억제하는 이소플라본의 특정 농도에서, 시간에 따라 TGF- $\beta$ 1의 발현이 점차적으로 증가함을 보였다. 그리고 두 세포주는 daidzein보다 genistein에 더 민감하게 반응을 보였으며, 특히 MCF-7 세포에서 그 변화가 두드러짐을 보였다. 또한 genistein을 다양한 농도에 따라 처리하였을 때, 세포 독성 효과와는 상관없이 TGF- $\beta$ 1의 발현이 농도 의존적으로 크게 증가함을 보였지만, daidzein을 처리하였을 때는 발현의 변화가 거의 없었다. 그리고 genistein과 daidzein이 TGF- $\beta$ 1을 유도하고, 이렇게 유도되어 분비되는 TGF- $\beta$ 1이 그에 따른 TGF- $\beta$  수용체와 반응하여 세포의 성장을 억제시킬 것으로 생각하

었으나, TGF- $\beta$  수용체의 발현 양상이 TGF- $\beta$ 1의 발현을 유도하는 대두 이소플라본의 농도보다 낮은 농도에서 뚜렷하게 발현이 유도됨을 보여 대두 이소플라본의 세포성장 억제 효과에 TGF- $\beta$  수용체의 발현의 조절 기전도 관여함을 알 수 있었고, 이는 TGF- $\beta$ 1의 발현에 앞서 일어남을 처음으로 증명하였다.

TGF- $\beta$ 는 breast epithelial cells의 성장과 증식에 강력한 억제제로 작용하게 되는데, 이 세포가 TGF- $\beta$ 의 반응성을 잃게 되면 malignant transformation과 tumorigenesis를 일으키게 된다는 보고가 있는데 (Sun et al., 1997), 본 연구에 사용한 암 세포주의 TGF- $\beta$  수용체의 발현이 약하거나 거의 관찰되지 않음을 확인함으로써 TGF- $\beta$ 의 반응성이 감소되어 있음을 확인하였다. 이런 상태에서, 대두 이소플라본은 TGF- $\beta$  수용체의 발현을 회복시킴으로써 TGF- $\beta$ 로 인한 성장 억제 활성의 반응성이 증가됨을 시사하였다.

암 발생의 화학적 예방 효과를 가지는 새로운 성분을 확인하고 평가하기 위해서, 그 물질의 구조와 기능의 상호관계 및 기전 연구를 통해 개념적 토대를 마련하게 된다. 발암원을 차단하는 작용, 가령 발암원 섭취의 억제, 발암원의 형성과 작용을 억제, 발암원의 불활성화 및 비 독성화, DNA의 발암원 결합 방지, DNA 수복율이나 충실도를 높이는 등의 작용을 가능하게 하는 성분의 기전 연구를 통해 intermediate biomarker를 확인함으로써 항암요법제의 효능을 평가할 수 있을 것이다 (Steele et al., 1995). 본 연구에서, 대두의 주요 이소플라본인 genistein과 daidzein은 TGF- $\beta$ 를 marker로 하는 항암요법제의 가능성을 제시하였다. 그리하여, TGF- $\beta$ 1의 유도를 시킬 뿐만 아니라 TGF- $\beta$  수용체를 회복시키는 것이 유방암의 새로운 치료법을 발전시키는 데 도움이 될 것이다. 대두 성분들의 생리활성 효과 규명에 대해서는 비교적 많은 연구가 행해졌지만, 그 작용 기전이 명확히 밝혀진 경우는 드물었다. 본 연구를 통해 대두 이소플라본의 항암 효과에 대한 기전을 설명하는 새로운 이론을 제시하였고, 앞으로 TGF- $\beta$ 1의 기능적 분석과 TGF- $\beta$  수용체에 의해 인산화 되는 단백질의 발현 양상을 확인하여 TGF- $\beta$ 1에 의한 이소플라본의 항 에스트로젠 활성을 뒷받침하는 연구는 유방암을 비롯한 호르몬 의존성 암의 이해와 이를 효과적으로 대처하는 방법의 개발에도 도움이 될 것이라 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구과제 (2000-2-2200-001-3) 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

## REFERENCES

Cappelletti V, Fioravanti L. Genistein blocks breast cancer cells in

the G2/M phase of the cell cycle. *J Cell Biochem.* 2000. 79: 594-600.

Constantinou A, Mehta RG. Plant flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationship. *J Nat Prod.* 1995. 58: 217-225.

Diel P, Olf S. Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7. *Planta Med.* 2001. 6: 510-514.

Hata A. TGF- $\beta$  signaling and cancer. *Exp Cell Res.* 2001. 264: 111-116.

Kataoka R, Sherlock J. Signaling events initiated by transforming growth factor- $\beta$ 1 that require Gi alpha 1. *J Biol Chem.* 1993. 268: 19851-19857.

Law F, Rizzoli R. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits phosphate transport in renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1993. 264: 623-628.

Liu X, Sun Y. Transforming growth factor- $\beta$ -induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. 94: 10669-10674.

Lynch MA, Petrel TA. Responsiveness to transforming growth factor- $\beta$ -mediated growth inhibition is a function of membrane-bound TGF  $\beta$  type II receptor in human breast cancer cells. *Gene Expr.* 2001. 9: 157-171.

Park K, Kim SJ. Genetic change in the transforming growth factor- $\beta$  type II receptor gene in human gastric cancer cells: Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. 91: 8772-8776.

Pennybacker M, Herman B. Transforming growth factor- $\beta$  induced phosphorylation of the myristoylated alanine rich C kinase substrate (MARCKS) protein in ovarian granulosa cells is modulated by follicle stimulating hormone (FSH). *Res Commun Chem Path Pharmacol.* 1992. 78: 359-366.

Perry RR, Kang Y. Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor- $\beta$ 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Brit J Cancer.* 1995. 72: 1441-1446.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 1993. 73: 413-423.

Salatino M, Labriola L. Mechanism of cell cycle arrest in response to TGF- $\beta$  in progesterin-dependent and -independent growth of mammary tumors. *Exp Cell Res.* 2001. 265: 152-166.



- Sanford DM, Anita BR. Tumor suppressor activity of the TGF- $\beta$  pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Review*. 1996. 7: 93-102.
- Steele VE, Pereira MA. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nut*. 1995. 125: 713S-716S.
- Sun L., Chen C. Expression of transforming growth factor- $\beta$  type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Biol Chem*. 1997. 272: 25367-25372
- Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Med Chem*. 2004. 4: 881-887.
- Vivien D, Petitfrere E. IPG (inositolphosphate glycan) as a cellular signal for TGF- $\beta$ 1 modulation of chondrocyte cell cycle. *J Cell Physiol*. 1993. 155: 437-444.
- Walker RA. Transforming growth factor- $\beta$  and its receptors: their role in breast cancer. *Histopathology* 2000. 36: 178-180.
-