

HepG2 인체간암세포의 세포주기조절인자 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

배송자¹ · 김기영² · 유영현³ · 최병태⁴ · 최영현^{5,*}

¹신라대학교 자연과학대학 식품영양학과 및 마린바이오산업화지원센터

²제주대학교 해양과학대학 해양과학부

³동아대학교 의과대학 해부학교실

동의대학교 한의과대학 ⁴해부학교실, ⁵생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과(BK21 program)

Received October 26, 2006 / Accepted November 20, 2006

Modulation of Cell Cycle Regulators by Sulforaphane in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. Song-Ja Bae¹, Gi-Young Kim², Young Hyun Yoo³, Byung Tae Choi⁴ and Yung Hyun Choi^{5,*}. ¹Department of Food and Nutrition, Silla University and Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries, Busan 617-736, Korea, ²Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, ³Department of Anatomy and Cell Biology, Dong-A University College of Medicine, Busan 602-714, Korea, Departments of ⁴Anatomy and ⁵Biochemistry, Donggeui University Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control (BK21 program), Donggeui University Graduate School, Busan 614-052, Korea – Sulforaphane, an isothiocyanate derived from hydrolysis of glucoraphanin in broccoli and other cruciferous vegetables, was shown to induce phase II detoxification enzymes and inhibit chemically induced mammary tumors in rodents. Recently, sulforaphane is known to induce cell cycle arrest and apoptosis in human cancer cells, however its molecular mechanisms are poorly understood. In the present study, we demonstrated that sulforaphane acted to inhibit proliferation and induce morphological changes of human hepatocarcinoma HepG2 cells. Treatment of HepG2 cells with 10 μ M or 15 μ M sulforaphane resulted in significant G2/M cell cycle arrest as determined by DNA flow cytometry. Moreover, 20 μ M sulforaphane significantly induced the population of sub-G1 cells suggesting that sulforaphane induced apoptosis. This anti-proliferative effect of sulforaphane was accompanied by a marked inhibition of cyclin A, cyclin B1 and Cdc2 protein. However, the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 mRNA and protein expression were significantly increased by sulforaphane treatment in a concentration-dependent manner. Although further studies are needed, the present work suggests that sulforaphane may be a potential chemopreventive/chemotherapeutic agent for the treatment of human cancer cells.

Key words – Sulforaphane, HepG2 cells, cell cycle, p53, p21

서론

세포주기에 관한 개념은 광학 현미경의 관찰을 통한 간기 및 유사 분열기 세포들의 구별이 가능해진 후, 1995년에 Swift와 Howard에 의해 G1 (Gap 1), S (DNA 합성기), G2 (Gap 2) 및 M (유사분열기)기에 대한 정의가 내려지면서 성립되었다. 그 후 1983년 세포주기조절의 양성인자에 해당되는 cyclin들이 동정되었으며, Hunt, Ruderman 및 공동 연구자들은 cyclin의 합성, 인산화 및 분해 기전 등의 연구를 통하여 이들이 세포주기 전체에 걸쳐 매우 다양하게 존재한다는 것을 발견하였다[24,28]. 또한 세포주기 특이적인 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 기능이 세포주기 진행에 필수적임이 밝혀졌고, 이것이 cyclins에 의해 활성화된다는 것도 알려지게 되었다[6,24]. 포유동물의 세포주기에서 G1기의 진행과 G1에서 S기로의 전이에는 D-type cyclins (cyclin D1, D2 및 D3)와 이들과 결합하는 Cdk4/Cdk6, 그리고 cyclin E와 결합하는 Cdk2에 의해서 조절된다[24,28]. Cdk2가 cyclin A와 다시 결합하여 S기 전이를 조절하는 동안 G2기에

서 M기로의 전이에는 cyclin A 및 B-type cyclin (cyclin B1 및 B2)과 결합하는 Cdc2에 의해서 결정되어진다[7,9]. 세포주기 조절에서 중요한 역할을 하는 Cdks의 활성은 Cdk inhibitors에 의해서도 조절되어지는데, 포유동물 세포에서 Cdk inhibitors는 CIP/KIP 군(p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} 등)과 INK4 군(p16^{INK4A}, p15^{INK4B} 등)으로 구별된다[6,10]. INK4 군은 Cdk4/Cdk6와 결합하여 D-type cyclin과의 complex 형성을 억제하고, CIP/KIP 군은 여러 종류의 보다 다양한 Cdks와의 결합을 통하여 cyclin/Cdk complex의 활성 억제를 통하여 세포주기 특이적인 증식의 억제 및 apoptosis에 의한 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 세포주기 조절관점에서 암은 세포주기 조절이 교란된 세포의 집단으로 정의될 수 있으므로 특정 후보물질의 암세포 증식 억제 현상의 규명에서 세포주기 조절인자의 발현 변화 관찰은 항암제의 개발이나, 후보물질의 항암작용 규명에 필수적인 과정으로 인식되어지고 있다.

십자화과 식물에서 많이 발견되는 isothiocyanates는 -N=S=S 그룹으로 존재하며 다양한 *in vivo* 실험동물모델에서 항암효과가 뛰어난 것으로 알려져 있는데[1,31], 이들 식물들은 myrosinase를 통해 가수분해 될 때 sulforaphane이란 물질로 전환되는 전구체인 glucosinolate glucoraphanin

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-8649, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choihy@deu.ac.kr

을 높은 농도 함유한다[27]. 특히 브로콜리에 존재하는 glucosinolate로부터 얻어지는 isothiocyanate 중에서 sulforaphane [1-isothiocyanato(4R)-(methylsulfinyl)butane: $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})(\text{CH}_2)_4\text{N}=\text{C}=\text{S}$]은 강력한 항암효과를 가지며, 역학적 조사를 포함한 다양한 선행 연구에서 androgen 비 의존적으로 성장하는 전립선 암세포의 증식을 억제하는데 효과가 있었다는 연구가 발표된 후 항암 및 암예방 가능성 소재로서 많은 관심을 모으고 있다[21,23]. 아울러 sulforaphane은 발암 억제에 중요한 역할을 하는 제2상 효소(phase 2 enzyme)를 활성화하여 발암물질을 세포내에서 제거하는 효과를 가지는 것으로도 알려져 있다[25].

Sulforaphane의 항암작용에 대한 최근의 연구 결과들에 의하면 sulforaphane은 다양한 인체 암세포에서 세포주기 진행과정의 G2/M기를 선택적으로 교란함으로써 암세포의 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다[2,14,18,20,22,25]. 아울러 이러한 G2/M arrest는 apoptosis 유발로 연결되면서 암세포의 생존을 억제하는 것으로 보고되어져 오고 있다[14,20,22,25]. 그러나 세포주기 조절과 연관된 연구의 대부분이 극히 최근에 이루어졌고, 아직도 암세포주의 종류에 따라 항암 기전이 다소 상이하게 보고되어져 오고 있으므로 다양한 암세포를 대상으로 보다 부가적인 연구가 절실히 요구되어지고 있다.

본 연구에서는 sulforaphane의 항암 기전에 관한 연구가 거의 이루어져 있지 않은 인체 간암세포를 대상으로 sulforaphane에 의한 간암세포의 성장에 미치는 영향을 세포주기 조절인자를 중심으로 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 sulforaphane은 Sigma Chemical Co. (St. Luis, MO, USA)에서 구입하였으며 10 mM의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20°C에 보관하여 사용하였고, 매회 처리 전 배지에 희석 후 사용하였다. 실험에 사용한 간암 세포주인 HepG2는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, 세포의 배양을 위해 90%의 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위해 적정시간 배양 후 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포 배양용 petridish로 옮겨 배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장율의 측정 및 세포형태 변화의 관찰

HepG2 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, sulforaphane을 적정 농도별로 처리하고 48시간동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도가 되게 성장배지로 희석하여 분주하고 3시간 동안 배양 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 첨가하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정상 배지에서 배양된 암세포와 sulforaphane이 처리된 배지에서 배양된 세포들의 성장율을 비교하였다. 세포형태 변화 관찰을 위해서는 세포배양용 petridish에 세포를 24시간동안 안정화시킨 다음 sulforaphane을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경하에서 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기의 분석

세포주기의 분포도에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하기 위하여 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, 정상 및 sulforaphane이 함유된 배지에서 48시간 배양된 암세포들을 buffer solution을 이용하여 두세 번 씻어내고, Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후 Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

상기와 동일한 조건으로 준비된 암세포를 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 single stranded cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자(Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV)하에서 확인하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 sulforaphane이 처리된 배지에서 자란 세포들을

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Cyclin A	Sense	5'-TCC-AAG-AGG-ACC-AGG-AGA-ATA-TCA-3'
	Antisense	5'-TCC-TCA-TGG-TAG-TCT-GGT-ACT-TCA-3'
Cyclin B1	Sense	5'-AAG-AGC-TTT-AAA-CTT-TGG-TCT-GGG-3'
	Antisense	5'-CTT-TGT-AAG-TCC-TTG-ATT-TAC-CAT-G-3'
Cyclin D1	Sense	5'-TGG-ATG-CTG-GAG-GTC-TGC-GAG-GAA-3'
	Antisense	5'-GGC-TTC-GAT-CTG-CTC-CTG-GCA-GGC-3'
Cyclin E	Sense	5'-AGT-TCT-CGG-CTC-GCT-CCA-GGA-AGA-3'
	Antisense	5'-TCT-TGT-GTC-GCC-ATA-TAC-CGG-TCA-3'
Cdc2	Sense	5'-GGG-GAT-TCA-GAA-ATT-GAT-CA-3'
	Antisense	5'-TGT-CAG-AAA-GCT-ACA-TCT-TC-3'
Cdk2	Sense	5'-GCT-TTC-TGC-CAT-TCT-CAT-CG-3'
	Antisense	5'-GTC-CCC-AGA-GTC-CGA-AAG-AT-3'
Cdk4	Sense	5'-ACG-GGT-GTA-AGT-GCC-ATC-TG-3'
	Antisense	5'-TGG-TGT-CGG-TGC-CTA-TGG-GA-3'
Cdk6	Sense	5'-CGA-ATG-CGT-GGC-GGA-GAT-C-3'
	Antisense	5'-CCA-CTG-AGG-TTA-GAG-CCA-TC-3'
p53	Sense	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisense	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisense	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
p27	Sense	5'-AAG-CAC-TGC-CGG-GAT-ATG-GA-3'
	Antisense	5'-AAC-CCA-GCC-TGA-TTG-TCT-GAC-3'
GAPDH	Sense	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisense	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

수집하여 적당량의 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 4°C에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish

peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

결과 및 고찰

HepG2 간암세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향

HepG2 세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하기 위하여 준비된 HepG2 세포에 48시간 동안 sulforaphane을 적정 농도로 희석하여 처리한 후, MTT assay를 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 48시간 동안 정상 배지에서 자란 HepG2 세포에 비하여 sulforaphane이 함유된 배지에서는 sulforaphane의 첨가 농도 의존적으로 세포의 증식이 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 10 µM 처리군의 경우 대조군에 비하여 30% 이상 세포증식이 억제되었으며, 20 µM 처리군에서는 약 80% 정도의 세포증식 억제현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 30 µM 처리군에서는 생존율이 10% 이하로 나타나 HepG2 세포가 정상적인 생존을 하지 못하였음을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 인체 유방암세포, 전립선암세포, 대장

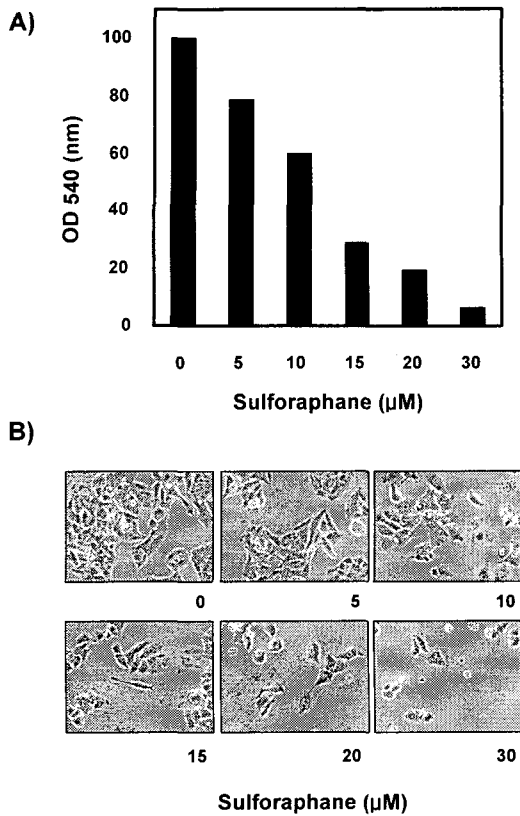


Fig. 1. Anti-proliferative activity and morphological changes of human hepatoma HepG2 cells following incubation with sulforaphane. (A) Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of sulforaphane. After 48 h incubation with sulforaphane, MTT assay was performed. Results are expressed as average of two separate experiments. (B) Exponentially growing HepG2 cells were incubated with sulforaphane for 48 h. Cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

암세포, 췌장암세포 및 악성 백혈구 등에서 관찰된 최근의 선행연구들에서 관찰된 경우와 유사한 경향성을 보여주는 것으로[2,14,18,20,22,25], sulforaphane은 간암세포에서도 다른 암세포에서처럼 비슷한 증식억제 효능이 있음을 알 수 있었다. 아울러 sulforaphane의 처리가 HepG2 세포의 형태에 어떠한 영향을 주는 지에 대해 알아보기 위하여 여러 농도의 sulforaphane을 48시간동안 처리 후 도립 현미경을 이용하여 세포의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 1B에 나타난 바와 같다. 즉 sulforaphane 처리 농도 의존적으로 현저한 세포밀도의 감소현상과 형태적인 변화를 관찰 할 수 있으며, sulforaphane의 처리 농도 증가에 따라 세포막의 shrinkage 및 blebbing 현상도 관찰할 수 있었고, 처리농도가 높은 경우 cell elongation을 포함하는 dendrite-like structure가 관찰되었다. 이러한 sulforaphane 처리 농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 Fig. 1A에 나타난 sulforaphane 처리에 따

른 세포 증식 억제와 부합되는 결과임을 알 수 있었다.

세포주기 분포에 미치는 sulforaphane의 영향

세포 증식과 연관된 세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk와 complex 형성을 통한 연속적인 활성화 불활성이 결정되어진다[24,28]. 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다[6,24]. 따라서 sulforaphane의 처리에 의한 HepG2 간암세포의 성장억제가 세포주기 특정 시기의 교란과 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 세포주기 분포에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 sulforaphane이 처리된 배지에서 48시간 배양한 후 flow cytometer를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2A 및 B에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 sulforaphane이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포의 경우 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 62.03%, 23.69% 및 13.41% 정도였다. 그리고 5 µM 처리군의 경우 G1기, S기 및 G2/M기의 빈도는 대조군과 유사하였으나, 10 µM 처리군에서는 G1 및 G2/M기가 다소 증가(71.62% 및 15.90%)되는 경향성을 보여주었으며, 상대적으로 S기에 속하는 세포의 빈도(10.30%)는 감소되었다. 그러나 15 µM 처리군에서는 G2/M기에 속하는 세포의 빈도가 대조군에 비하여 약 2배 정도 증가(26.71%)되었으며, S기에 속하는 세포의 빈도는 매우 감소되었다(7.87%). 즉 sulforaphane 처리 농도의 증가에 따라 DNA 합성기에 해당되는 S기의 감소가 상대적으로 감소되었으며, G2/M arrest 가능성을 보여주었다. 그러나 20 µM 처리군에서는 apoptosis 유발에 해당되는 sub-G1기의 급격한 증가(54.62%)로 세포주기 특이적인 교란 현상을 관찰할 수가 없었다. 따라서 sub-G1기에 속한 세포를 제외한 나머지 세포들을 고려할 경우, sulforaphane의 처리에 따라 G1기에 속하는 세포의 빈도는 감소된 반면, G2/M기에 속하는 암세포의 빈도가 상대적으로 증가하였음을 알 수 있었고, sulforaphane 처리에 따른 HepG2 세포의 증식억제는 세포주기 G2/M arrest와 연관된 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. HepG2 간암세포에서 관찰된 이러한 현상은 췌장암세포, 유방암세포, 대장암세포, 전립선암세포, 흑색종세포 등에서 나타난 결과와 매우 유사하였다[14,20,22,25].

Cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

포유동물에서 세포주기의 진행을 위해서는 세포주기 특이적인 cyclin의 발현 증가가 우선적으로 이루어져야한다. 즉

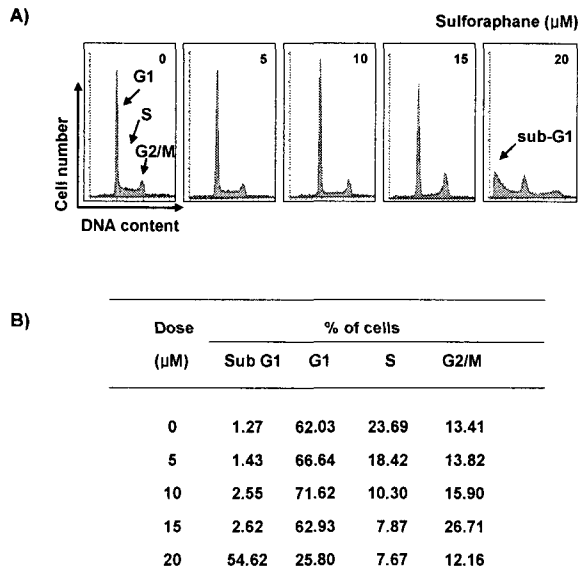


Fig. 2. DNA-fluorescence histogram of human hepatoma HepG2 cell nuclei after treatment with sulforaphane. (A) Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of sulforaphane. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. (B) Fractions of each cell cycle phase of HepG2 cells cultured in the absence or presence of various concentrations of sulforaphane. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with sulforaphane.

mid G1에서는 D-type cyclin의 발현을 필요로 하며, late G1에서 S기로의 진입을 위해서는 cyclin E의 발현이 증가되어야 한다[24,28]. 그리고 S기에서 G2기로의 진입 및 G2기와 M기 진행 동안에는 각각 cyclin A 및 B-type cyclin의 발현이 증가되어야 한다. 그리고 이들 cyclin들은 특정 Cdk와 특이적인 결합에 의하여 cyclin/Cdk complex를 형성하여 세포주기진행을 조절한다[6,24]. 특히 Cdk2는 cyclin A와 결합하여 S기와 G2기 동안 역할을[7,9] 하는 반면 Cdc2는 cyclin B1과 결합하면 핵막의 histone H1과 lamin이 인산화에 의해 kinase 활성이 증가하여 핵막의 붕괴 및 염색체의 재배열이 일어나서 M기로 진행이 된다[15,19]. 따라서 HepG2 간암세포에서 sulforaphane의 처리에 따른 세포주기 조절관련 기전을 조사하기 위하여 cyclins 및 Cdk의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향을 RT-PCR 및 Western blot 법으로 먼저 조사하였다. Fig. 3A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 cyclins 중, cyclin D1 및 cyclin E는 전사 및 번역 수준에서 sulforaphane 처리에 따른 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그리고 cyclin A 및 cyclin B1 역시 전사 수준에서는 큰 변화가 없었으나, 단백질 발현은 sulforaphane 처리 농도 의존적으로 때

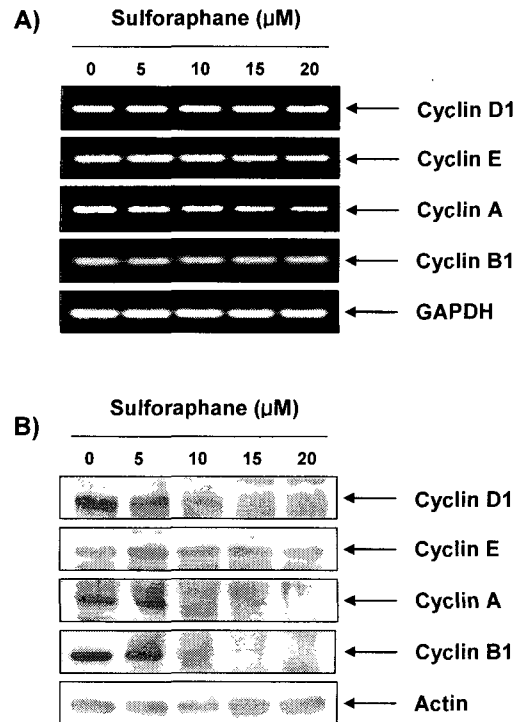


Fig. 3. Effects of sulforaphane treatment on the levels of cyclins in human hepatoma HepG2 cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

우 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 그리고 Cdk의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4A 및 B에서 알 수 있듯이, 조사된 4가지 Cdk 중 Cdk2, Cdk4 및 Cdk6는 전사 및 번역 수준에서 sulforaphane의 처리에 따른 큰 변화를 관찰할 수 없었으며, Cdc2의 경우 10 μM 이상 처리군에서 거의 발현이 되지 않았다. 아울러 G2/M기 조절인자에 해당되는 Wee1 및 Cdc25C의 발현 역시 단백질 수준에서 매우 강하게 억제되었다. 선행연구에 의하면 인체 유방암 MCF-7 세포주에서 sulforaphane의 처리에 의한 G2/M arrest 유발은 cyclin B1의 발현 증가에 따른 histone H1의 인산화 증가와 연관성이 있다고 보고된 바 있다[14]. 그러나 PC-3 인체 전립선암세포에서 sulforaphane 처리에 따른 G2/M arrest에서는 오히려 cyclin B1, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현이 감소되면서 Cdc2의 인산화 증가와 연관성이 있는 것으로 보고된 바 있다[25]. 특히 sulforaphane 처리에 따른

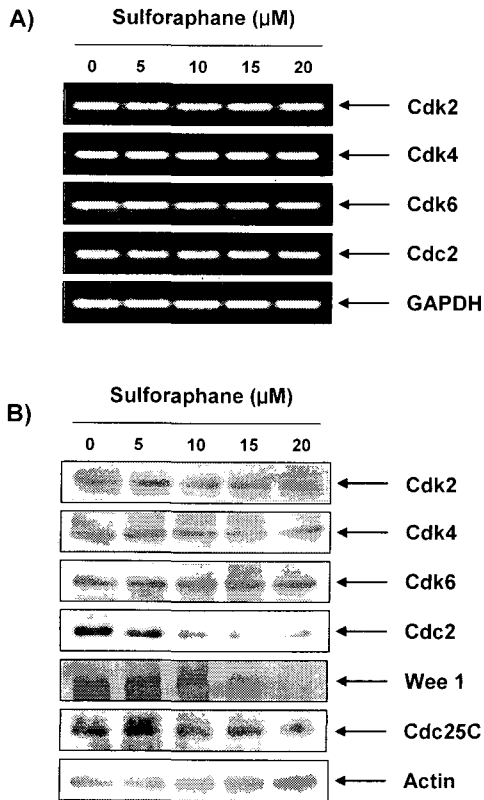


Fig. 4. Effects of sulforaphane treatment on the levels of Cdk in human hepatoma HepG2 cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

Cdc2의 인산화 증가현상은 인체암세포에서 뿐만 아니라 쥐의 유방암세포에서도 관찰된 현상이다[13]. 본 연구에서는 세포주기의 G2/M기의 전이 조절에 중요한 유전자들의 단백질 발현이 sulforaphane의 처리에 따라 대부분 감소되었는데, 특히 cyclin A 및 B1은 세포주기 조절인자 중 half-life가 짧은 단백질군에 해당되기 때문에 sulforaphane 처리에 따른 post-translational 수준에서 더 조절 받을 것으로 생각되어진다. 아울러 이러한 세포주기 진행에 중요한 양성인자들의 선택적 발현 저하는 sulforaphane 처리에 따른 G2/M기에 속하는 세포의 빈도 증가와도 연관성이 있는 것으로 추정된다.

p53 및 Cdk inhibitors의 발현에 미치는 sulforaphane의 영향

Cdk inhibitors는 cyclin/Cdk complex와 선택적으로 결합

하여 그들의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데[6,10], 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기뿐만 아니라 G2/M기를 포함한 전체 세포주기의 진행을 억제하는 주요한 조절인자이다[16]. p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포의 종류나 항암제 및 후보물질의 종류에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있다 [3,4,29,30]. 그러나 CIP/KIP 군에 속하는 p16의 경우 일반적으로 G1기 arrest에만 관여하는 것으로 알려져 있으며, p27 역시 G1기 arrest에 중요하지만 부분적으로 G2/M기 arrest에도 관여할 수 있는 것으로 보고되어지고 있다[6,10]. 따라서 본 연구에서는 sulforaphane의 처리에 의한 인체 간암세포의 G2/M기의 억제 유발에 종양 억제 유전자 p53 및 p21 그리고 p27과 같은 Cdk inhibitors들의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 5A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 종양 억제 유전자 p53의 경우 전사 및 번역 수준에서 sulforaphane 처리 농도 의존적으로 발현이 증가되었으며, p21 역시 p53의 발현 변화와 유사한 경향성을 보여 주었다. 그러나 p27의 경우 sulforaphane 처리에 따라 약간의 변화를 보였으나, sulfor-

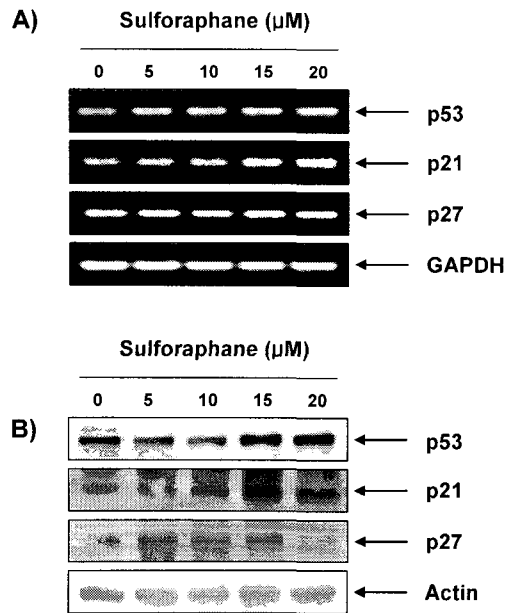


Fig. 5. Induction of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 by sulforaphane treatment in human hepatoma HepG2 cells. (A) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with sulforaphane for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

aphane 처리 농도 증가에 따른 발현 증가 현상이 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 비록 본 연구의 결과로만 sulforaphane에 의한 p21의 발현이 전사 활성 수준에서 조절된다고 결론을 지을 수는 없으나, sulforaphane 처리에 의한 p53이 발현 증가는 최소한 세포증식 억제 또는 apoptosis 유발에 어느 정도 기여할 것으로 추정되며 이에 관한 추가적인 연구의 실시가 요구되어진다. 아울러 sulforaphane 처리 의하여 발현이 증가된 p21 단백질은 cyclin/Cdk complex 형성의 방해 요소로 작용하여 그들의 kinase 활성을 억제할 것이며, 이로 인한 세포주기의 진행이 부분적으로 억제되었을 것으로 추정된다.

요 약

브로콜리를 포함한 십자화과 식물에서 glucoraphanin의 가수분해를 통해 생성되는 isothiocyanate의 일종인 sulforaphane은 역학적 조사를 포함한 다양한 선행 연구에서 강력한 암예방 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 항암효과에 관한 최근 연구 결과에 따르면 sulforaphane은 다양한 인체 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유발할 수 있는 것으로 알려지고 있으나, 정확한 분자생물학적 기전은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 sulforaphane의 항암작용 기전을 조사하기 위하여 HepG2 인체간암세포의 증식에 미치는 sulforaphane의 영향을 조사하였다. Sulforaphane의 처리에 의한 HepG2 세포의 증식억제 및 형태적 변형은 세포주기 G2/M arrest 및 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. RT-PCR 및 Western blot 분석 결과, sulforaphane 처리에 의하여 cyclin A 및 cyclin B1, Cdc2의 발현이 단백질 수준에서 선택적으로 저하되었으며, 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현은 전사 및 번역 수준에서 sulforaphane 처리 농도 의존적으로 증가되었다. Sulforaphane의 항암 기전을 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 추가적으로 필요하겠지만, 본 연구의 결과들에 의하면 sulforaphane은 강력한 인체암세포의 증식 억제 및 항암작용이 있을 것을 시사하여 준다고 할 수 있다.

감사의 글

This study was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2004-005-E00007).

참 고 문 헌

- Ajita, V.S., X. Dong, L.L. Karen, D. Rajiv and V.S. Shivendra. 2004. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* **25**, 83-90.
- Chiao, J.W., F.L. Chung, R. Kancherla, T. Ahmed, A. Mittelman and C.C. Conaway. 2002. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **20**, 631-636.
- Choi, Y.H., W.H. Lee, K.Y. Park and L. Zhang. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 164-173.
- Datto, M.B., Y. Yu and X.F. Wang. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 28623-28628.
- Denis, G., G. Martin, B. Dominique, M. Albert, T. Yves and B. Richard. 2004. Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetable. *Cancer Lett.* **203**, 35-43.
- Elledge, S.J and J.W. Harper. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 847-852.
- Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez and N.J. Lamb. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-1179.
- Greenwood, M.J and P.M. Landsdorp. 2003. Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology. *Arch. Med. Res.* **34**, 489-495.
- Guadagno, T.M., M. Ohtsubo, J.M. Roberts and R.K. Assoian. 1993. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* **262**, 1572-1575.
- Harper, J.W. 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* **29**, 91-107.
- Heiss, E., C. Herhaus, K. Klimo, H. Bartsch and C. Gerhauser. 2001. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **276**, 32008-32015.
- Homayoun, V and B. Sam. 1996. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* **31**, 295-301.
- Jackson, S.J and K.W. Singletary. 2004. Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis* **25**, 219-227.
- Jackson, S.J and K.W. Singletary. 2004. Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J. Nutr.* **134**, 2229-2236.
- Krek, W and E.A. Nigg. 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.
- Li, Y., C.W. Jenkins, M.A. Nichols and Y. Xiong. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-depend-

- ent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-2268.
17. Mathieu, N., L. Pirzio, M.A. Freulet-Marriere, C. Desmaze and L. Sabatier. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 641-656.
 18. Misiewicz, I., K. Skupinska and T. Kasprzycka-Guttman. 2003. Sulforaphane and 2-oxohexyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **10**, 2045-2050.
 19. Ohsumi, K., C. Katagiri and T. Kishimoto. 1993. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science* **262**, 2033-2035.
 20. Parnaud, G., P. Li, G. Cassar, P. Rouimi, J. Tulliez, L. Combaret and L. Gamet-Payrastre. 2004. Mechanism of sulforaphane-induced cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Nutr. Cancer* **48**, 198-206.
 21. Petri, N., C. Tannergren, B. Holst, F.A. Mellon, Y. Bao, G.W. Plumb, J. Bacon, K.A. O'leary, P.A. Kroon, L. Knutson, P. Forsell, T. Eriksson, H. Lennernas and G. Williamson. 2003. Absorption/Metabolism of Sulforaphane and Quercetin and regulation of phase 2 enzymes, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 805-813.
 22. Pham, N.A., J.W. Jacobberger, A.D. Schimmer, P. Cao, M. Gronda and D.W. Hedley. 2004. The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1239-1248.
 23. Shang, J., S. Vanda, Y. Bao, A.F. Howie, G.J. Beckett and W. Gary. 2003. Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis* **24**, 497-503.
 24. Sherr, C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* **60**, 3689-3695.
 25. Singh, S.V., A. Herman-Antosiewicz, A.V. Singh, K.L. Lew, S.K. Srivastava, R. Kamath, K.D. Brown, L. Zhang and R. Baskaran. 2004. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J. Biol. Chem.* **279**, 25813-25822.
 26. Surh, Y.J., K.S. Chun, H.H. Cha, S.S. Han, Y.S. Keum, K.K. Park and S.S. Lee. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* **480-481**, 243-268.
 27. Wang, L., D. Liu, T. Ahmed, F.L. Chung, H. Conaway and J.W. Chiao. 2004. Targeting cell cycle machinery as a molecular mechanism of sulforaphane in prostate cancer prevention. *Int. J. Oncol.* **24**, 187-192.
 28. Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
 29. Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
 30. Zeng, Y.X. and W.S. El-Deiry. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* **12**, 1557-1564.
 31. Zhang, Y., J. Li and L. Tang. 2005. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 70-77.