

# 인돌이 인체 전립선암세포 PC3 Cell 전이 관련 Matrix Metalloproteinases (MMPs) 활성화와 발현에 미치는 영향

김 성 옥<sup>§</sup>

메릴랜드대학교 약학대학 제약학교실, 동의대학교 한의과대학 생화학교실

## Effect of Indole-3-Carbinol on Inhibition of MMP Activity via MAPK Signaling Pathway in Human Prostate Cancer Cell Line, PC3 Cells

Kim, Sung Ok<sup>§</sup>

Department of Pharmaceutical Science, University of Maryland, School of Pharmacy, Baltimore, MD 21201, USA  
Department of Biochemistry, Donggeui University, College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

### ABSTRACT

We examined the effect of indole-3-carbinol (I3C, C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO), an autolysis product of a glucosinolate and a glucobrassicin in vegetables, on MMP-2, -9 activities and TIMP-1 and -2 inductions via microtubule-associated protein kinase (MAPK) signaling pathway in prostate cancer cell line, PC3 cells. Our results indicated that I3C inhibited cell growth of PC3 cells in dose (0, 50, 100 μM) and time (0, 24, 48 and 72 h) dependent manners. Using gelatin zymography for MMP activity, we demonstrated that I3C significantly decrease MMP-2 and -9 activities in PC3 cells. We also observed that I3C decreased the proteins and mRNA levels of MMP-2 and -9 in PC3 cells as well. Inversely, expressions of TIMP-1 and -2 protein and mRNA in PC3 cells were increased by I3C in a dose dependent manner. In another experiment, we showed that I3C inhibited PC3 cells invasiveness by using marigel invasion assay and we also found that I3C suppressed MMP transcriptional activity by MAPK signaling pathways. Taken together, our results suggest that I3C may contribute to the potential beneficial food component to prevent the cancer metastasis in prostate cancer cells. (Korean J Nutr 2008; 41(3): 224~231)

**KEY WORDS :** indol-3-carbinol, MMP, TIMP, PC3 cells, MAPK pathway, invasion.

### 서 론

전립선암은 최근 우리나라 남성들에게 가장 빠르게 증가하고 있는 암으로 대부분 50대 이상의 중·장년층에서 발생한다.<sup>1)</sup> 북미나 서구 유럽 등의 남성암중 가장 흔한 암으로 미국의 경우 연간 발생하는 남성 암 중에서 빈도가 가장 높으며, 암으로 인한 사망원인 중 폐암에 이어 2위를 차지하고 있다.<sup>2)</sup> 우리나라의 경우도 평균수명의 증가, 노인인구의 증가, 식생활의 서구화로 전립선암의 빈도가 크게 증가하고 있을 뿐 아니라 향후 발생률이 더욱 증가될 것으로 예측되는 암이다.<sup>1)</sup> 전립선암의 발병과 진행에 영양 및 식

생활이 주요 요인으로 알려져 있으며 특히 붉은색 육류나 유제품 등의 고지방식은 전립선암의 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다.

따라서 저지방식 및 신선한 과일, 채소, 콩 종류를 충분히 섭취하는 것이 전립선암의 예방과 암의 진행을 줄이는데 도움이 될 것이다.<sup>3)</sup> 이러한 후보물질로는 토마토의 라이코펜 (lycopen), 콩의 제니스틴 (genistain)은 전립선암 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>4-6)</sup>

본 실험에서는 십자화과 채소류인 양배추, 브로콜리, 컬리플라워 같은 채소에 다량 함유되어 있는 glucosinolate, glucobrassicin의 체내 대사산물인 인돌 (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO, I3C)의 전립선암세포에 대한 항전이성에 대해 연구하였다. 인돌은 상기 식품의 섭취나 보충제로 섭취가 가능하다.<sup>7,8)</sup> 인돌은 세포실험에서 다양한 종양세포, 유방암세포, 전립선암, 대장암 그리고 자궁암 세포,의 증식억제와 G1/S기 세포주기 억제가 알려져 있다.<sup>9-12)</sup> 동물실험에서 대장, 폐, 유방, 자

접수일 : 2008년 2월 11일

채택일 : 2008년 4월 2일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : somebodykr@yahoo.co.kr

궁경부 그리고 간 조직에서 종양형성 억제를 보고<sup>13-21)</sup>하였고 또한 인들은 인체유방암세포와 자궁경부암세포의 침윤과 전이를 억제한다고 보고한다.<sup>22-24)</sup>

초기 암의 치료는 가능하지만 전이가 일단 발생되면 성공적인 치료가 어렵고 치료과정 중 합병증으로 인한 사망률이 높아진다. 그러므로 전립선암의 치료에 있어서 암의 전이를 예방하는 것은 매우 중요한 연구 분야이나 식이성분과 전립선암의 전이에 대한 연구는 미미하게 이루어지고 있다. 암의 침윤과 전이에는 cell adhesion과 extracellular matrix (ECM)를 분해하는 것이 필요하다.<sup>25,26)</sup> Matrix Metalloproteinase (MMP) 활성은 침윤에 작용하는 중요한 단백질효소로 ECM 단백질을 분해하여 세포가 다른 기관으로 이동하는데 중요한 역할을 한다.<sup>27)</sup> MMP는 ECM의 구성성분인 collagen, gelatin, fibronectin등을 분해하는 효소로 17 종류가 알려져 있으며 MMP-2 (gelatinase-A)와 MMP-9 (gelatinase-B)는 기저막의 주요 성분인 type IV collagen을 분해하는 효소로 전이성이 큰 암 조직과 그 주변 조직에서 활성이 활발한 것으로 보고되어져 있다.<sup>28)</sup> 그러므로 MMP 활성 억제물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)는 MMP 활성을 억제하는 유전자로 MMP와 균형을 맞추어 존재하며, 그 균형이 깨지면 암과 류마치스 같은 임상적인 현상이 나타난다. TIMP-1 vs. MMP-9, TIMP-2 vs. MMP-2의 균형은 암세포의 침윤과 전이 뿐만 아니라 암세포의 성장과 사멸에도 중요한 영향을 미친다.<sup>29,30)</sup>

Nuclear factor-kappa B (NF-kB)는 전사조절 인자로 세포생존, 세포 부착성, 염증반응, 세포분화 그리고 세포성장에 관련된 유전자의 전사조절 인자를 유도한다. NF-kB는 자궁, 난소, 소화기계 및 유방암에서 과발현 된다.<sup>31-34)</sup> 과발현 NF-kB는 MMP 발현을 증가시켜 종양세포의 침윤성을 증가시킨다.<sup>35,36)</sup> 따라서 선행연구에서 인들이 세포의 전이 및 침윤과 관련하여 세포의 밀착결합 변화에 미치는 영향을 살펴보았으며 본 연구에서는 인들에 의해 발현이 억제 되는 NF-kB의 상위 신호전달 기전 중에 하나인 MAPK 활성화<sup>37,38)</sup>의 조절에 대한 인들의 영향을 확인 하므로써 다양한 식품이나 보조제로 섭취한 인들의 세포내 조절 기전을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 인들이 인체 전립선암 세포 PC3 cell 암의 전이 과정에서 세포의 전이성과 전이 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질 분해효소인 MMP 활성과 발현 그리고 억제 유전자인 TIMP 발현에 미치는 영향 그리고 세포내 신호전달 기전에 관여하는 MAPK 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하였다.

## 연구방법

### 세포배양

본 실험에 사용한 인체 전립선암 세포인 PC3 cell은 AT-CC (American Type Culture Collection, UAS)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 DMEM 배지 (Gibco BRL, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 인돌 (LKT Labs, St Paul, MN)은 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO)에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 실험하였다.

### 세포증식

상기와 동일조건에서 배양 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Statistical analysis system (SAS) 프로그램 (v 9.0)으로 구하였다.

### 세포의 침윤성

Transwell plate에 matrigel (BD, Biosciences, Bedford, MA, USA)을 코팅하여 세포의 침윤성을 실험하였다. 5 × 10<sup>4</sup> cells/ml로 만들어 각각 DMSO, 인돌을 처리하였다. Attractant로 20% FBS 배지를 사용하였으며 인들과 DMSO 처리 세포는 upper chamber에 분주하여 serum free 조건으로 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양 하였다. Upper chamber 안쪽을 PBS를 적신 면봉으로 닦아내고 알코올로 고정하여 헤마톡실린과 에이오신 Y (Sigma)로 염색하였다. 염색된 필터를 떼어내어 슬라이드 글라스에 고정하여 현미경으로 그 세포 수를 측정하였다.

### Matrix metalloproteinase (MMP) 활성

MMP활성을 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. 상기조건으로 배양한 세포의 배양액을 400 × g로 5분간 원심분리하여 모았다. 상층액에 2X sample buffer

(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 넣어 전기영동 시료를 만들었다. 10% 폴리아크릴아마이드에 0.1% 젤라틴을 첨가한 겔을 이용하여 시료를 전기영동 한 후 2.5% Triton X-100으로 30분간 renaturation 하고 24시간 developing buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 μM ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub> at pH 7.5)로 37°C에서 배양하였다. 0.5% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad Laboratoies, Hercules, CA) 용액으로 1시간 염색하고 탈색용액 (methanol : acetic acid : water (3 : 1 : 6))으로 세척하여 단백질 분해 정도를 밴드로 확인하여 integrated optical density를 이용하여 정량하여 %로 환산하여 나타내었다. 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하여 각각의 실험에서 분주한 세포배양액으로 실시하였다.

### mRNA 발현

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen)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 cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mm dNTP, 10X buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다. RT-PCR을 이용하여 분석을 시도한 유전자의 종류는 Table 1에 나타난 바와 같으며, 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5X, Quality Biological Inc.)을 섞어서 loading 한 후 100 V 하

**Table 1.** Sequences of the primer pairs employed in the RT-PCR reactions

Gene	Sequences of the primer pairs (5' → 3')
GAPDH	Sense 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' Antisense 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
MMP-2	Sense 5'-CAGGCTCTCTCCTTCGCAAC-3' Antisense 5'-AAGCCACGGCTTGGTTTCCTC-3'
MMP-9	Sense 5'-TGGGCTACGTGACCTATGACCAT-3' Antisense 5'-GCCAGCCCCACCTCCACTCCTC-3'
TIMP-1	Sense 5'-TGG GGA CAC CAG AAG TCA AC-3' Antisense 5'-TTT TCA GAG CCT TGG AGG AG-3'
TIMP-2	Sense 5'-GTC AGT GAG AAG GAA GTG GAC TCT-3' Antisense 5'-ATG TTC TIC ICT GTG ACC CAG TC-3'

에서 확인하여 Kodak Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영 하였다.

### 단백질 발현

DMSO 및 인돌이 처리된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA로 부유시킨 다음 원심 분리하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 NP-40 lysis buffer를 첨가하여 4°C에서 반응시킨 후 원심 분리하여 그 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량하여 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 단백질을 13% SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 겔을 나일론막 (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 정도 세척하였다. 준비된 막에 1차 antibody (MMP-2, -9 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA), TIMP-1, -2, p38, ERK1/2, JNK (Santa Cruz, CA, USA), β-actin (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각각 처리하여 상온에서 1시간 또는 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp. Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

### 통계처리

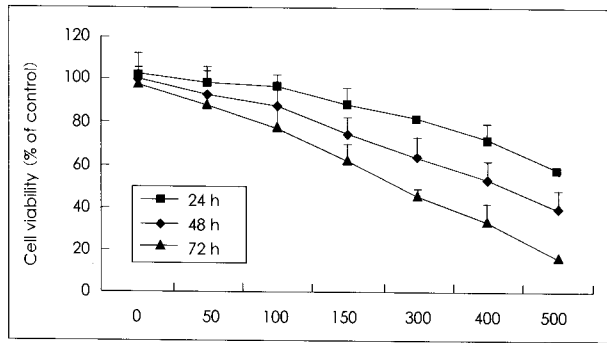
본 연구의 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다. 실험결과는 SAS 프로그램 (v 9.1)으로 각실험군의 평균과 편차를 계산하여 표시하였고 유의성을 p < 0.05 수준에서 Student's t-test를 실시하여 대조군에 대한 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 인돌이 전립선암세포의 세포증식에 미치는 영향

인돌이 인체 전립선암 세포 PC3 세포증식에 미치는 영향을 알아 보기 위해 인돌을 0, 50, 100, 150, 300, 400, 500 μM 농도로 각각 첨가하여 24, 48, 72시간 배양 후 MTT assay로 알아본 세포 증식실험으로 생존 세포 수를

측정하였다. 인돌 처리 후 대조 세포에 비해 세포증식이 인돌 첨가 농도 및 시간 의존적으로 억제되었다 (Fig. 1). 따라서 인돌이 전이성 암세포 PC3의 증식을 억제하는 것을

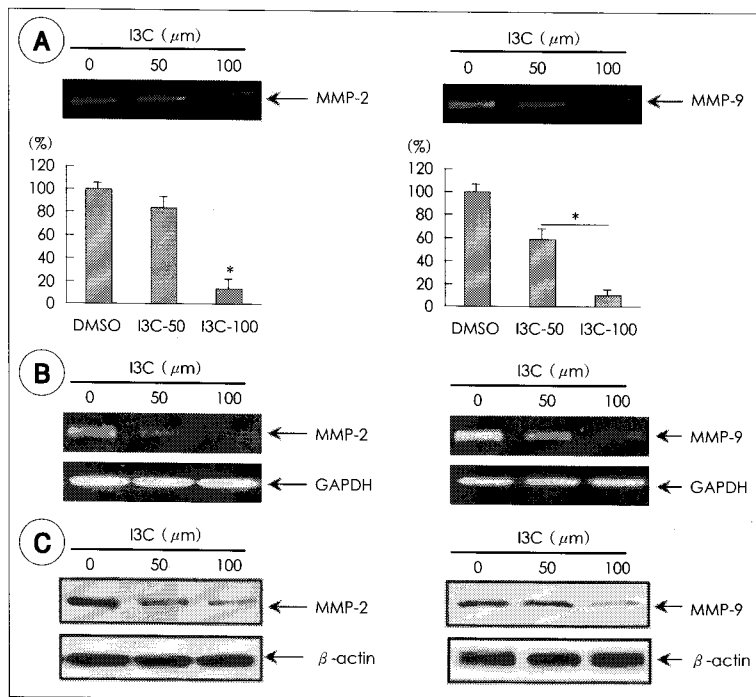


**Fig. 1.** Effect of I3C on cell viability in prostate cancer cell line, PC3 cells. Cells were seeded at an initial density of  $5 \times 10^4$ /ml. Cells were treated with various concentrations of I3C and incubated for 24, 48, 72 h.

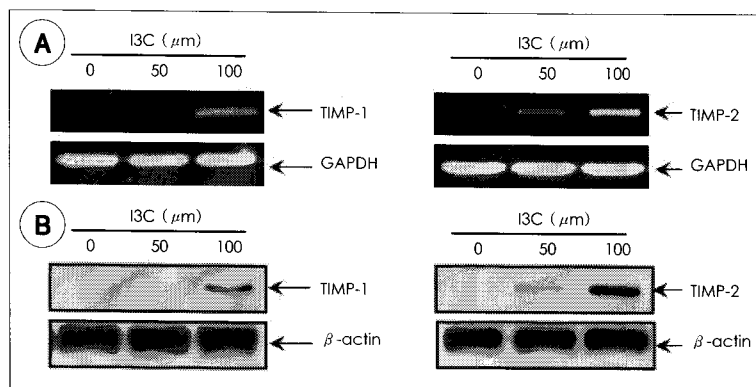
알 수 있었다. 이후 실험에서는 세포의 사멸에 영향을 미치지 않는 50, 100 μM 농도의 인돌을 처리하여 실험하였다.

### 인돌이 전립선암 세포의 MMP-2, -9 활성과 전사수준 및 단백질 발현에 미치는 영향

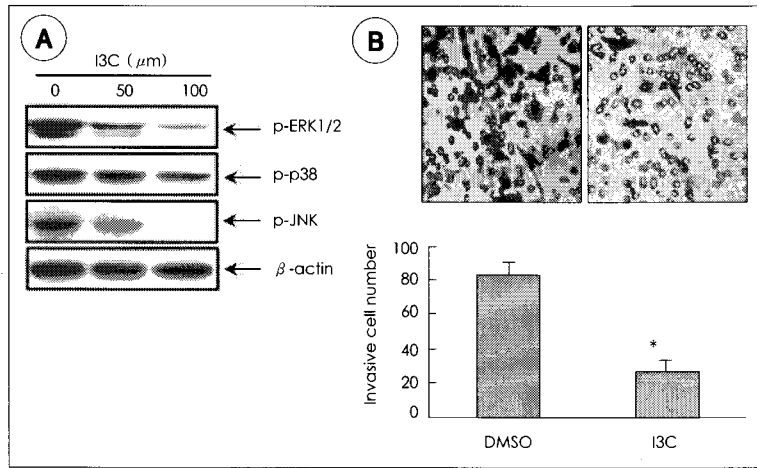
암세포가 타 조직으로 전이되는 과정에서 세포의 기저막을 분해하고 침윤하여 이동하는 과정에서 중요한 역할을 하는 MMP의 활성을 gelatin zymography로 알아보고 MMP 단백질과 전사수준 발현을 western blot과 RT-PCR로 측정하였다. 세포사멸에 의한 영향을 없애기 위해 세포사멸에 영향을 미치지 않는 50, 100 μM 농도의 인돌을 각각 처리하여 48시간 배양하고 각각의 배지를 모아 실험하였다. Fig. 2A와 같이 인돌처리 농도 의존적으로 MMP-2와 -9 활성이 유의적 ( $p < 0.05$ )으로 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 그리고 MMP-2, -9 mRNA와 단백질 발현양은 Fig. 2B,



**Fig. 2.** Effect of I3C on activity and expression of MMP-2 and -9 protein in PC3 cells. Cells were seeded in 100 mm dish at a density of  $5 \times 10^4$  cells/ml; the monolayers were incubated in the absence or presence of 0, 50, 100 μM I3C for 48 h. A: Medium was collected, and the activities of MMP-2 and -9 were measured by gelatin zymography. Photograph of the MMP bands, which is representative of three independent experiments, is shown and quantitative analysis of the bands. B: RT-PCR bands, photographs of ethidium bromide-stained gel, which were representative of three independent experiments, are shown. C: Western blotting bands were performed to expressions of TIMP-1 and -2 proteins listed to the right of the figure. Immunoblot analyses were performed as described in the materials and methods section. All experiments were taken to three independent experiments. The data were evaluated for statistic significance using a t-test. The means noted with a \* were statistically different compared with the control. A p-value  $< 0.05$  was considered significant.



**Fig. 3.** Effect of I3C on TIMP-1 and -2 mRNA and protein expression in PC3 cells. Cells were seeded in 100 mm dish at a density of  $5 \times 10^4$  cells/ml; the monolayers were incubated in 0, 50, 100 μM I3C. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed to investigate the mRNA expression of TIMP-1 and -2. A: RT-PCR bands, photographs of ethidium bromide-stained gel, which were representative of three independent experiments, are shown. B: Western blotting bands were performed to expressions of TIMP-1 and -2 proteins listed to the right of the figure. Immunoblot analyses were performed as described in the materials and methods section. All experiments were taken to three independent experiments.



**Fig. 4.** Effects of I3C on MARK signaling pathways and invasion in PC3 cells. A: Cells were treated with 100 uM I3C for 48 h phosphorylation levels of ERK1/2, p38 MAPK, and JNK were measured by Western blotting. B: The cells were cultured in 100 uM I3C for 48 h within a Matrigel invasion chamber. Microphotographs of filters and quantitative analysis of the Matrigel chamber invasion assay are shown. Invasion was expressed as invasive cell numbers. Each bar represents the mean ± S.D. calculated from three independent experiments. The data were evaluated for statistic significance using a t-test. The means noted with a \* were statistically different compared with the control. A p-value < 0.05 was considered significant.

C와 같이 인돌 처리에 따라 유사한 경향으로 감소하였다.

**인돌이 전립선암 세포의 TIMP-2, -9 전사수준 및 단백질 발현에 미치는 영향**

암 세포 전이에서 MMP와 TIMP의 발현은 상호조절 되고 이들의 불균형은 암 세포 전이 현상에 중요한 영향을 미친다.<sup>29,30</sup> Fig. 3에서 MMP inhibitor로 작용한다고 알려진 TIMP 발현에 대한 인돌의 영향을 살펴본 결과 그 발현 양이 인돌 처리 농도 의존적으로 증가 하였고 MMP의 활성화와 비교할 때 역의 상관관계를 나타내었다. 따라서 인돌 처리에 의해 증가된 TIMP 발현이 MMP활성과 그 발현 억제에 영향을 미치는 것으로 사려 된다. 따라서 다음 실험으로는 인돌은 종양조직에서 MAPK signaling 조절에 대한 영향과 전립선암세포 침윤성 실험을 통해 인돌의 항전이 효과를 검증하였다.

**인돌이 전립선암 세포에서 MAPK signaling pathway와 침윤성에 미치는 영향**

인돌이 몇몇 보고<sup>39-41</sup>에서 종양 진행과 전이 관련한 유전자 발현 조절 전사 인자인 NF-kB에 영향을 준다는 보고를 바탕으로 그상위 신호전달 유전자인 ERK1/2, p38, JNK 발현에 대한 영향을 실험하였다. Fig. 4A에 나타낸 바와 같이 인돌 처리 농도 의존적으로 ERK1/2, p38, JNK 인산화 발현이 억제됨을 볼 수 있었다. 따라서 인돌은 NF-kB 상위 MAPK 신호기전을 조절하며 NF-kB 발현을 억제하여 전립선암 세포 PC3 cells 전이 관련 MMP 활성을 억제하므로 항전이 효과를 나타내는 것으로 사료되어진다. 전립선암 세포의 침윤성을 알아보기 위해 생체 기저막 성분인 matrigel을 코팅한 chamber를 이용하여 실험한 결과 Fig. 4B와 같이, 인돌 처리 농도에 따라 암세포의 침윤성이 유의적 (p < 0.05)으로 감소하였다. 인돌 처리로 인한 암

세포 침윤성 억제가 세포독성으로 인한 것인지를 동일한 조건으로 세포를 배양 후 MTT assay 한 결과 인돌의 암 세포 침윤성 억제 효과는 세포독성과 독립적으로 나타나는 것을 확인하였다.

**고 찰**

전립선암에 다양한 식이인자가 영향을 미친다는 사실은 잘 알려져 있는데 지방의 섭취가 전체 에너지섭취량의 큰 비중을 차지하는 서구에서 아시아보다 전립선암이 많이 발생하고 있어 섬유질 섭취가 많은 음식, 신선한 과일과 야채, 콩 종류 등을 비교적 많이 섭취하는 것이 동양인 전립선암의 예방에 도움이 될 것으로 사료된다. 따라서 본 연구는 십자화과 채소의 섭취로 체내유용 물질인 인돌이 전립선암 세포 PC3 cell의 항전이 효과 기전에 대하여 알아보았다.

전이(metastasis)는 암 발병부위로부터 멀리 떨어진 다른 기관으로의 암의 확산으로 암환자의 가장 주된 사망원인이다. 전립선암 환자의 치료와 생존에 가장 큰 문제는 초기 종양이 아니라 다른 조직으로의 전이이다. 따라서 암 환자의 성공적인 치료를 위한 전이 기전에 대한 분자적 기작의 규명과 이해가 필요하다. 암세포의 침윤과 전이에 중요한 것은 ECM과 BM (basement membrane)을 분해 하는 것이다.<sup>42</sup> 암세포가 전이 관련 단백질 분해효소, MMP를 분비한다. 그 중에서 ECM과 BM을 파괴하는 중요한 인자는 MMP-2, -9로 이들의 과발현은 유방암, 대장암, 전립선암에서 전이와 관련이 있다고 보고 되었다.<sup>43-45</sup> 본 연구에서는 인체 전립선암 세포 PC3 cell에 인돌 처리시 전립선암 세포의 성장 억제 (Fig. 1)와 MMP-2와 -9의 활성화 발현이 억제되었다(Fig. 2) 이와 같은 결과는 Takada 등<sup>39</sup>이 혈액 암 세포에 50 uM I3C를 처리하였을 때 세포사멸과

항전이 효과에 대한 보고와 같다. Mang 등<sup>37)</sup>은 유방암 세포에 인돌 처리 시 암세포의 전이와 침윤억제를 보고하였다. 뿐만 아니라 본 연구 결과 인돌은 MMP 활성 억제와 TIMP 발현이 부의 상관관계<sup>29,30)</sup>를 나타내어 세포막 단백질분해효소 활성을 억제하여 암세포의 항전이 효과를 나타내었다. 선행연구에서 Kim 등<sup>46,47)</sup>은 대장암 세포와 전립선암 세포에서 인돌 처리는 세포 밀착결합(tight junction)을 조절하여 세포 이동과 침윤을 통한 암세포의 전이억제 효과를 보고하였다. 또 다른 몇몇 보고에서 세포의 밀착결합은 MMP활성과 정의 상관관계를 보고되었다.<sup>48-50)</sup> 이는 본 연구의 결과와 일치되는 결과들로 인돌의 MMP 억제와 TIMP 유도를 통해 전립선암 세포 PC3의 전이성 억제효과를 확인하였다고 사료된다. Chinni 등<sup>40,41)</sup>의 인돌 연구 결과 전립선암세포에서 인돌은 Akt와 NF- $\kappa$ B 기전 억제를 통한 세포 사멸을 유도한다고 보고하였다. 본 연구에서는 많은 항암제 개발에 주요한 targeting이 되는 세포신호전달 기전과 관련된 그 상위 기전인 MAPK 기전<sup>52,53)</sup> 활성도를 조사하여 인돌의 전립선암세포에서의 항전이 효과의 세포내 신호전달 기전을 확인하였다. Takada 등<sup>39)</sup>은 인돌의 NF- $\kappa$ B 기전 억제를 통한 암세포 항전이 효과를 보고하였다. 따라서 본 연구결과에서 인돌에 의한 MAPK pathway 관련 유전자 ERK1/2, p38, JNK의 발현 저해로 NF- $\kappa$ B 기전 억제가 유도되어 PC3 암세포의 전이관련 MMP 활성이 억제 될 것으로 사료된다. 이러한 결과들은 인돌에 의한 침윤성 감소 결과와도 일치하였다. 앞으로의 실험계획으로는 신호전달 기전의 확실한 검정을 위한 심도 있는 분자기작 연구와 동물실험을 통한 항전이 검증 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구는 십자화과 채소의 섭취로 체내유용 물질인 인돌이 전립선암 세포 PC3 cell의 항전이 효과 기전에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 인돌은 전립선암 세포증식을 농도 의존적으로 억제하였으며 인돌에 의한 세포 사멸의 영향과 관계없이 MMP-2, -9의 활성과 전사수준 및 단백질 발현을 억제하였다. 역으로 MMP활성 억제 물질인 TIMP-1, -2의 발현이 인돌 첨가에 의해 증가하였다. NF- $\kappa$ B의 upstream에 존재하는 MAPK signaling 유전자인 ERK1/2, p38, JNK 발현이 인돌처리로 인산화를 억제하였다. 그리고 전립선암 세포 PC3 침윤성이 인돌 처리 시 유의적으로 감소하였다. 결론적으로 인돌은 PC3 인체 전립선암 세포의 전이 과정을 MAPK pathway를 통한 MMP 활성과 발

현 억제, TIMP 발현 증가로 암 세포 전이 억제를 하는 것으로 나타나 암 전이 억제 식품으로 가능성을 제시한다.

## Literature cited

- 1) National Cancer Center, 2002 Cancer statistics in Korea; 2002
- 2) American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2002, Atlanta, GA: American Cancer Society, Inc.; 2002. p.6
- 3) Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 2003; 99(1): 1-13
- 4) Vaishampayan U, Hussain M, Banerjee M, Seren S, Sarkar FH, Fontana J, Forman JD, Cher ML, Powell I, Pontes JE, Kucuk O. Lycopene and soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutr Cancer* 2007; 59(1): 1-7
- 5) Von Low EC, Perabo FG, Siener R, Muller SC. Facts and fiction of phytotherapy for prostate cancer: a critical assessment of pre-clinical and clinical data. *In Vivo* 2007; 21(2): 189-204
- 6) McCarty MF. Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. *Integr Cancer Ther* 2004; 3(4): 349-380
- 7) Loub WD, Wattenberg LW, Davis DW. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in rat tissues by naturally occurring indoles of cruciferous plants. *J Natl Cancer Inst* 1975; 54(4): 985-988
- 8) Wattenberg LW, Loub WD. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res* 1978; 38(5): 1410-1413
- 9) Brandi G, Paiardini M, Cervasi B, Fiorucci C, Filippone P, De Marco C, Zaffaroni N, Magnani MA. New indole-3-carbinol tetrameric derivative inhibits cyclin-dependent kinase 6 expression, and induces G1 cell cycle arrest in both estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63(14): 4028-4036
- 10) Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(23): 2927-2936
- 11) Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res* 2001; 61(16): 6120-6130
- 12) Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273(7): 3838-3847
- 13) Exon JH, South EH, Magnuson BA, Hendrix K. Effects of indole-3-carbinol on immune responses, aberrant crypt foci, and colonic crypt cell proliferation in rats. *J Toxicol Environ Health A* 2001; 62(7): 561-573
- 14) XuM, Bailey AC, Hernaez JF, Taoka CR, Schut HA, Dashwood RH. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcino-*

- genesis* 1996; 17(7): 1429-1434
- 15) el-Bayoumy K, Upadhyaya P, Desai DH, Amin S, Hoffmann D, Wynder EL. Effects of 1,4-phenylene-bis-(methylene) selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and d-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Anticancer Res* 1996; 16(5A): 2709-2712
  - 16) Chung FL, Morse MA, Eklind KI, Xu Y. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis by compounds derived from cruciferous vegetables and green tea. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 186-201; discussion 201-202
  - 17) Morse MA, LaGreca SD, Amin SG, Chung FL. Effects of indole-3-carbinol on lung tumorigenesis and DNA methylation induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and on the metabolism and disposition of NNK in A/J mice. *Cancer Res* 1990; 50(9): 2613-2617
  - 18) Zhang X, Malejka-Giganti D. Effects of treatment of rats with indole-3-carbinol on apoptosis in the mammary gland and mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23(3B): 2473-2479
  - 19) Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, Auburn KJ. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59(16): 3991-3997
  - 20) Kojima T, Tanaka T, Mori H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res* 1994; 54(6): 1446-1449
  - 21) Dashwood RH, Fong AT, Arbogast DN, Bjeldanes LF, Hendricks JD, Bailey GS. Anticarcinogenic activity of indole-3-carbinol acid products: ultra-sensitive bioassay by trout embryo microinjection. *Cancer Res* 1994; 54(13): 3617-3619
  - 22) Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auburn K, Fan S. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor- $\alpha$  signaling in human tumor cells. *J Nutr* 2000; 130(12): 2927-2931
  - 23) Riby JE, Feng C, Chang YC, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry* 2000; 39(5): 910-918
  - 24) Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1201-1215
  - 25) Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003; 22(42): 6524-6536
  - 26) Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99(2): 157-166
  - 27) John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(1): 14-23
  - 28) Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56(1): 190-196
  - 29) Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21(14): 2245-2252
  - 30) Wang Z, Juttermann R, Soloway PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275(34): 26411-26415
  - 31) Yu YY, Li Q, Zhu ZG. NF- $\kappa$ B as a molecular target in adjuvant therapy of gastrointestinal carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31(4): 386-392
  - 32) Shehata M, Shehata M, Shehata F, Pater A. Dual apoptotic effect of Xrel3 c-Rel/NF- $\kappa$ B homolog in human cervical cancer cells. *Cell Biol Int* 2004; 28(12): 895-904
  - 33) Fujita M, Goto K, Yoshida K, Okamura H, Morimoto H, Kito S. Okadaic acid stimulates expression of Fas receptor and Fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004; 40(2): 199-206
  - 34) Hou MF, Lin SB, Yuan SS, Tsai SM, Wu SH, Ou-Yang F. The clinical significance between activation of nuclear factor kappa B transcription factor and overexpression of HER-2/neu oncoprotein in Taiwanese patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2003; 334(1-2): 137-144
  - 35) Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type I matrix metalloproteinase in melanoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 44926-44935
  - 36) Keutgens A, Robert I, Viator P, Chariot A. Deregulated NF- $\kappa$ B activity in haematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9): 1069-1080
  - 37) Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM, Fan S. Inhibitory effects of indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63(2): 147-152
  - 38) Nwankwo JO. Anti-metastatic activities of all-trans retinoic acid, indole-3-carbinol and (+)-catechin in Dunning rat invasive prostate adenocarcinoma cells. *Anticancer Res* 2002; 22(6C): 4129-4135
  - 39) Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF-kappaB and IkkappaB kinase activation, causing inhibition of expression of NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood* 2005; 106(2): 641-649
  - 40) Chinni SR, Sarkar FH. Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4): 1228-1236
  - 41) Chinni SR, LiY, Upadhyay S, Koppolu PK, Sarkar FH. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 2001; 20(23): 2927-2936
  - 42) Duffy MJ. The biochemistry of metastasis. *Adv Clin Chem* 1996; 32: 135-166
  - 43) Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004; 91(1): 100-117
  - 44) Madsen MA, Deryugina EI, Niessen S, Cravatt BF, Quigley JP. Activity-based protein profiling implicates urokinase activation as a key step in human fibrosarcoma invasion. *J Biol Chem* 2006; 281(23): 15997-16005
  - 45) Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death.

- Nat Rev Cancer* 2006; 6(6): 449-458
- 46) Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 9-34
- 47) Kim SO, Choi YH. Effects of indole-3-carbinol on tight junction activity in human prostate cancer cells. *Cancer Prev Res* 2007; 12(4): 261-267
- 48) Kim SO, Choi YH, Choe WK. Indol-3-Carbinol Regulated Tight Junction Permeability and Associated-Protein Level and Suppressed Cell Invasion in Human Colon Cancer Cell Line, HT-29. *Korean J Nutr* 2008; 41(1): 1-9
- 49) Leotlela PD, Wade MS, Duray PH, Rhode MJ, Brown HF, Rosenthal DT, Dissanayake SK, Earley R, Indig FE, Nickoloff BJ, Taub DD, Kallioniemi OP, Meltzer P, Morin PJ, Weeraratna AT. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. *Oncogene* 2007; 26(26): 3846-3856
- 50) Forster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol* 2007; 580(Pt.3): 937-949
- 51) Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 2007; 22(5): E4
- 52) Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9(9): 726-735
- 53) Sebolt-Leopold JS. Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* 2000; 19(56): 6594-6599