

대장암 세포주에서 genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포독성 효과

손성민 · 임승현 · 김효림 · 김민정 · 김태완¹ · 이종화¹ · 김종식*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹안동대학교 자연과학대학 식품생명공학과

Received July 8, 2009 / Accepted July 24, 2009

Synergistic Cytotoxic Effects by Combination Treatment of Genistein and Daidzein in Human Colorectal Cancer Cell. Seong-Min Son, Seung-Hyun Lim, Hyo-Rim Kim, Min-Jeong Kim, Taewan Kim¹, Jong-Hwa Lee¹ and Jong-Sik Kim*. *Dept. of Biological Sciences, ¹Dept. of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Andong, Korea* - To investigate whether isoflavone genistein and daidzein could affect cancer cell viability, human colorectal HCT116 cells were incubated with genistein or daidzein in a dose-dependent manner. Genistein decreased cancer cell viability in a dose-dependent manner, whereas daidzein did not show dramatic cytotoxic effects. We also found that 71 genes were up-regulated more than 2-fold, whereas 64 genes were down-regulated more than 2-fold with 24 hr of 50 μ M genistein treatment by our previous microarray data. Among the up-regulated genes, we selected 3 genes (*DKK1*, *ATF3* and *NAG-1*) and performed RT-PCR to confirm microarray data. The results of RT-PCR were highly correlated with those of the microarray experiment. In addition, we investigated whether a combination treatment of genistein and daidzein could affect cancer cell viability. Surprisingly, the combination treatment did show synergistic cytotoxic effects detected by MTS assay. The results of RT-PCR and real-time PCR indicate that a combination of genistein and daidzein can synergistically induce *NAG-1* expression in HCT116 cells. This result implies that *NAG-1* induction is highly associated with synergistic cytotoxic effects induced by a combination treatment of genistein and daidzein. Overall, these results may provide a clue in explaining the anti-cancer activity of soy bean in human colorectal cancer.

Key words : Cancer chemoprevention, genistein, daidzein, combination treatment, *NAG-1*

서 론

많은 역학 연구와 전임상 연구에 의하면 식물유래의 식품은 여러 가지 암을 예방할 수 있는 암 화학예방법(cancer chemoprevention)의 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[6,15]. 식물유래 식품에 의한 암 예방효과는 주로 식물내의 항산화 기능과 항성장 활성을 가지고 있는 파이토케미칼이 담당하는 것으로 생각된다[8]. 대표적 파이토케미칼로는 심황의 curcumin, 적포도 껍질의 resveratrol, 녹차의 catechin 성분, 대두의 genistein 등을 들 수 있으며, 이러한 파이토케미칼에 의한 암 화학예방법에 대한 소개와 다양한 기전들이 소개된 바 있다[14].

최근 대두 속에 함유된 이소플라본 중에 genistein에 대한 연구가 활발히 진행되면서 다양한 기전에 의해 암을 예방할 수 있다는 증거를 보여주어 많은 주목을 받고 있다[3,12,17]. 대두의 주요한 이소플라본으로는 genistein 이외에도 daidzein과 glycitin도 소량 함유되어 있다. 최근에는 daidzein에 의한 일부 암 화학예방법의 기전도 보고된 바 있다[4,7]. 하지만, genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 상승적인 항암

활성과 기전의 보고는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 대장암 세포주 모델에서 대두 이소플라본의 성분인 genistein과 daidzein의 처리에 의한 대장암 세포의 생존율을 연구하고, 형태적 변화를 관찰하였다. 또한, genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 세포독성 효과를 연구하였으며, 병합처리에 의한 항암유전자 *NAG-1* 유전자 발현을 분석하였다. 이러한 연구는 콩 함유 이소플라본에 의한 항암 활성은 물론 대두에 의한 항암 활성의 새로운 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

재료 및 방법

세포배양 및 isoflavone

인간 대장암 세포주인 HCT116는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양 및 계대에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지(Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였으며, 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Korea)을 첨가하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 콩 유래의 isoflavone인 genistein과 daidzein은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5798, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : jsk@andong.ac.kr

세포 생존율 연구

Genistein과 daidzein의 처리에 의한 HCT116 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTS 용액(Promega, USA)을 이용하여 세포생존율 연구를 수행하였다. 즉, 96 well plate에 well당 3×10^3 개의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, genistein과 daidzein의 최종 처리농도가 25, 50 그리고 100 μM 이 되도록 처리하였다. Genistein과 daidzein을 각각 24시간 동안 반응시킨 후, MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) 용액을 각 well 당 20 μl 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 mean \pm SD 값으로 나타내었다.

세포 형태변화 관찰

Genistein과 daidzein의 처리에 의한 암 세포주 형태 변화를 관찰하기 위하여, 6 well plate에 well 당 2.5×10^5 개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, genistein과 daidzein의 최종 처리 농도가 25, 50 그리고 100 μM 이 되도록 처리하였다. 추가적으로 24시간 배양한 후, 역상 현미경(Leica DMIL, Wetzlar, Germany)의 100배 배율 하에서 세포주의 형태 변화를 대조군과 비교 관찰 하였고, 현미경에 설치된 카메라를 (Olympus, Japan) 이용하여 well 단위로 세포 형태를 촬영하였다.

Total RNA 분리

Total RNA 분리는 RNeasy mini kit (Qiagen Inc., USA)을 이용해 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. 최종 단계에서 RNase-free water 40 μl 를 첨가하여 total RNA를 분리하였다. 분리 정제한 RNA는 정량 후, reverse transcription PCR 및 real-time PCR에 사용하였다.

RT-PCR과 real-time PCR

유전자의 발현의 확인을 mRNA 수준에서 측정하기 위하여 reverse transcription-PCR과 real-time PCR 방법으로 수행하였다. 각 시료로부터 total RNA를 추출한 후, 5 μg 을 취하여 MMLV RTase (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. RT-PCR의 경우 최종 cDNA를 50 μl 로 희석한 후 5 μl 를 사용하였으며, PCR 반응은 94°C에서 5분 denaturation시키고, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 cycle을 30번 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 수행하였다. Real-time PCR의 경우 최종 cDNA를 200 μl 로 희석한 후 5 μl 를 사용하였으며, PCR mixture는 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 반응 조건은 첫 번째 step으로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응

시키고, 두 번째 step으로 95°C에서 15초, 54°C에서 30초, 72°C에서 33초의 cycle을 40번 반복하여 수행하였다. 결과는 ABI Prism 7500 SDS software program (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 분석, 정량 하였으며 분석법으로는 comparative Ct (threshold cycle) method를 이용하였다[9].

결과 및 고찰

Genistein과 daidzein 처리에 의한 농도 의존적 세포생존율 억제 및 세포형태변화 관찰

콩의 대표적인 isoflavone인 genistein과 daidzein 처리에 의한 HCT116 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, genistein과 daidzein의 각각의 최종 처리 농도가 25, 50, 100 μM 이 되도록 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 다음, MTS 용액을 이용하여 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 genistein을 처리한 경우 처리한 genistein 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소함을 확인하였다(Fig. 1A). 그러나 daidzein을 처리한 경우, 25 μM 와 50 μM 처리농도에서는 세포 생존율에 영향이 없었으나, 100 μM 처리농도에서는 세포 생존율의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 연구 결과는 세포의 형태학적 변화의 결과와 일치하는 것으로, Fig. 2A에서 보는 바와 같이 genistein을 농도별로 처리한 경우, genistein에 의한 세포독성 효과가 농도 의존적임을 확인할 수 있다. 이에 반해 daidzein의 경우 MTS assay 결과와 동일하게, 25 μM 와 50 μM daidzein을 처리한 경우는 세포독성효과를 관찰할 수 없었으며, 100 μM 의 daidzein을 처리한 경우 약한 세포

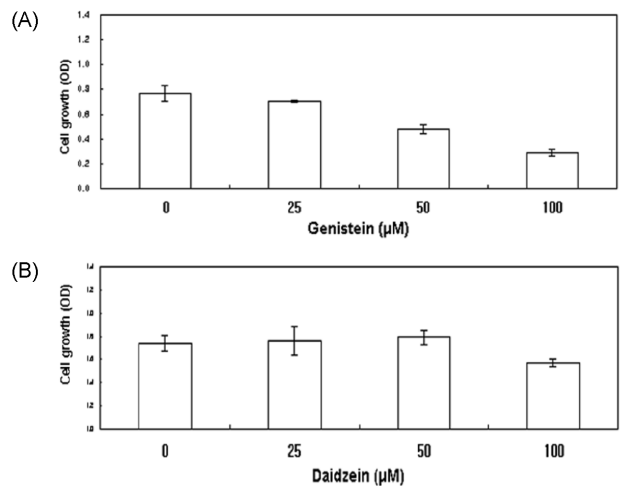


Fig. 1. Effects of genistein and daidzein on HCT116 cell viability. (A) HCT116 cells were plated at 3,000 cells/well in a 96-well plate and incubated with 0, 25, 50 or 100 μM of genistein for 24 hr. (B) HCT116 cells were treated with 0, 25, 50 or 100 μM of daidzein for 24 hr. After each treatment, cell viability was measured using MTS cell proliferation assay kit.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR and real-time PCR

Gene Name	GenBank Acc. No.	Primer Sequences
<i>NAG-1</i>	NM_004864	F: 5'-CTCTCAGATGCTCCTGGTGT-3' R: 5'-GAATCTTCCCAGCTCTGGTT-3'
<i>DKK1</i>	NM_012242	F: 5'-TTCCAACGCTATCAAGAACC-3' R: 5'-ATGACCGGAGACAAACAGAA-3'
<i>ATF3</i>	NM_001030287	F: 5'-TGGTGTGTTGAGGATTTTGGCT-3' R: 5'-ATTTCCTTTCCTGTCGCCTCT-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046	F: 5'-TCAACGGATTTGGTTCGATT-3' R: 5'-CTGTGGTCATGAGTCCTTCC-3'

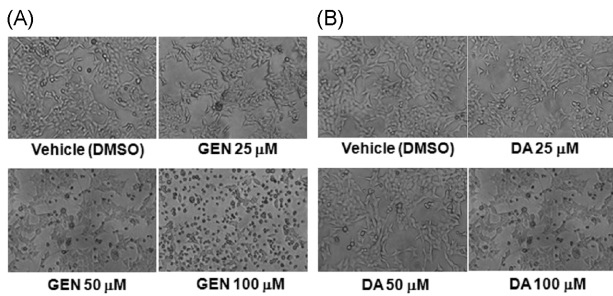


Fig. 2. Detection of morphological changes by genistein and daidzein treatments for 24 hr. HCT116 cells were treated with four different doses (0, 25, 50, and 100 μM) of genistein (A) or daidzein (B) for 24 hr.

독성 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

RT-PCR을 통한 유전자 발현변화 분석

Genistein의 처리에 의한 유전자 발현 변화를 확인하고자 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 즉, 대조군은 HCT116에 DMSO를 처리하고, 실험군은 HCT116에 genistein 50 μM을 24시간 동안 처리하였다. 실험결과에 의해 발현이 2배 이상 up-regulation된 유전자는 71개, 2배 이상 down-regulation된 유전자는 64개로 각각 분류되었다(unpublished data). DNA microarray 분석 결과를 검증하기 위하여, 2배 이상 up-regulation되는 유전자 중에 *DKK1*, *ATF3* 그리고 *NAG-1* 유전자를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. 한편 internal control로서 *GAPDH*를 사용하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 모든 유전자의 발현이 genistein을 처리 하였을 때, 대조군에 비해 발현이 증가됨을 확인하였다.

이 중 *NAG-1* 유전자는 항암 기능이 있는 것으로 알려져 있는 유전자로서, genistein의 처리에 의해 대표적인 암 억제 유전자인 p53을 경유하여 증가된다는 것이 보고 되었다[16]. 또한, 파이토케미칼인 resveratrol에 의해서도 p53 의존적으로 *NAG-1* 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되었다 [1]. 하지만, cyclooxygenase inhibitors에 의해서는 전사조절 인자인 EGR-1을 경유하여 *NAG-1* 유전자의 발현이 증가됨이 보고되었다[2]. 이러한 항암 유전자인 *NAG-1*은 여러 가지 다

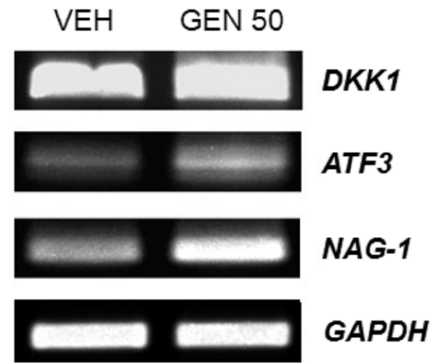


Fig. 3. Changes of gene expression in 50 μM genistein-treated HCT116 cells. HCT116 cells were treated with 50 μM of genistein (GEN) or vehicle (DMSO). Total RNA was prepared for RT-PCR with gene specific primers.

양한 chemopreventive agents에 의해서 발현이 유도되며, 이러한 발현은 여러 가지 기전에 의해 이루어진다. 본 연구에서는 genistein과 daidzein의 병합처리에 의해 *NAG-1* 유전자 발현의 변화를 확인하였다.

Genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 세포독성 상승 효과

Genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 대장암 세포주 HCT116의 세포독성 효과를 정량적으로 확인하기 위하여 24 시간 동안 genistein 25 μM, daidzein 25 μM 그리고 genistein 25 μM와 daidzein 25 μM를 병합 처리하여 비교하였다(Fig. 4). 그 결과 genistein 25 μM의 농도에서는 대조군에 비해 97.6%로 세포사멸이 조금 일어났으나, daidzein 25 μM의 농도에서는 116.7%로 오히려 세포 생존율을 증가시켰다. 하지만 genistein 25 μM과 daidzein 25 μM의 병합처리에서는 세포의 생존율이 84.8%로 병합처리에 의한 상승적인 세포사멸 효과를 확인하였다.

이러한 상승적인 세포 독성효과는 대두를 식품으로 섭취하는 관점에서 매우 의미 있다고 생각된다. Rayalam 등에 의하면 resveratrol이 전지방 세포인 3T3-L1에서 genistein에 의한 항비만 효과와 세포사멸 효과를 강화시킨다고 보고하였다

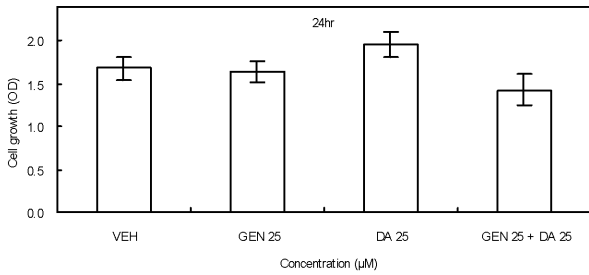


Fig. 4. Effects of combination treatment of genistein (GEN) and daidzein (DA) on HCT116 cell viability. HCT116 cells were plated at 3,000 cells/well in a 96-well plate and incubated with vehicle (VEH, DMSO), 25 µM of genistein, 25 µM of daidzein or combination of 25 µM genistein and 25 µM daidzein for 24 hr. After each treatment, cell viability was measured using MTS cell proliferation assay kit.

[10]. 또한, 최근에 여러 그룹에 의해 두 가지 이상의 파이토케미칼을 병합처리함으로써 상승적인 암 억제현상이 보고된바 있다[5,11,13]. 이러한 병합처리는 두 가지 측면에서 매우 중요하다. 즉, 처리하는 파이토케미칼의 각각의 농도를 감소시킬 수 있다는 점과 처리하는 파이토케미칼들이 각각 다른 신호전달 체계에 의해 효율적으로 암 세포를 사멸시킬 수 있다는 점이다. 따라서 이러한 두 가지 이상의 다른 파이토케미칼의 병합처리 및 관련된 기전연구 분야는 계속적으로 많은 주목을 받을 것으로 생각된다.

Genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 NAG-1 유전자의 발현증가

Genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포독성 효과와 항암유전자인 NAG-1과의 관련성을 확인하기 위하여 대장암 세포주 HCT116에 25, 50 µM의 genistein, 25 µM genistein과 25 µM daidzein의 병합처리, 그리고 25, 50 µM의 daidzein을 각각 처리한 후, RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 25 µM의 genistein과 25 µM의 daidzein의 병합처리에서 NAG-1 유전자의 발현이 가장 크게 증가하였다. 또한 vehicle에 비해 25 µM와 50 µM의 genistein에서 NAG-1의 발현이 증가하였으며, 50 µM daidzein을 처리한 경우에서도 NAG-1 유전자의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 또한 NAG-1의 발현 증가를 정량적으로 확인하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 RT-PCR과 마찬가지로 25 µM genistein과 25 µM daidzein의 병합처리에서 NAG-1의 발현이 가장 크게 증가하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 genistein과 daidzein의 병합처리에 의해 항암유전자인 NAG-1의 상승적인 발현이 유도된다는 것을 보여준다. 따라서, genistein과 daidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포 독성효과는 항암 유전자인 NAG-1 유전자의 과발현과 부분적으로 관련이 있

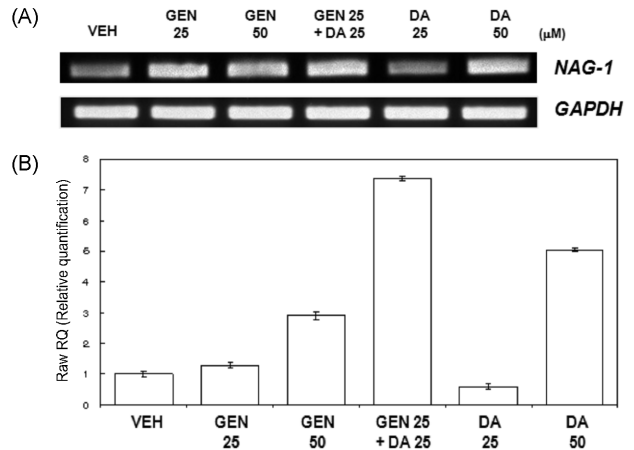


Fig. 5. Up-regulation of NAG-1 by combination treatment of genistein (GEN) and daidzein (DA). HCT116 cells were treated with VEH (vehicle, DMSO), 25, 50 µM of genistein, combination of 25 µM genistein and 25 µM daidzein or 25, 50 µM of daidzein for 24 hr. (A) Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with NAG-1 gene specific primers. (B) Expression of NAG-1 gene was detected with real-time PCR.

다고 생각된다.

따라서, 이러한 연구결과는 콩의 이소플라본뿐만 아니라 대두식품에 의한 암 화학예방법의 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

요 약

콩의 대표적인 이소플라본인 genistein과 daidzein에 의해 암세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, HCT116 세포주에 genistein과 daidzein을 농도 의존적으로 처리하였다. Genistein은 처리한 농도 의존적으로 암세포 생존율을 감소시켰으며, 이에 반해 daidzein은 세포생존율에 큰 변화를 보여주지는 못하였다. 이전의 마이크로어레이 실험 결과에 의하면, 50 µM의 genistein에 의해 2배 이상 증가되는 유전자 71개, 2배 이상 감소되는 유전자 64개가 검색되었다. 이중 3개의 유전자(DKK-1, ATF3 그리고 NAG-1)를 선택하여, 마이크로어레이 실험 결과를 검증하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 마이크로어레이 결과와 모두 일치함을 증명하였다. 한편, genistein과 daidzein에 의한 병합처리에 의해 암세포생존에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 병합처리에 의한 상승적인 세포독성 효과를 확인하였다. RT-PCR과 real-time PCR의 결과 genistein과 daidzein의 병합처리에 의해 항암유전자인 NAG-1 유전자가 상승적으로 발현이 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 이소플라본뿐만 아니라 대두제품에 의한 암 화학예방법의 기전을 이해하는 도움을 줄 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 Technology Development program (Grant No. 307003-03-2-HD130)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Baek, S. J., L. C. Wilson, and T. E. Eling. 2002. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* **23**, 425-434.
- Baek, S. J., J. S. Kim, S. M. Moore, S. H. Lee, J. Martinez, and T. E. Eling. 2005. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol. Pharmacol.* **67**, 356-364.
- Banerjee, S., Y. Li, Z. Wang, and F. H. Sarkar. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* **269**, 226-242.
- Constantinou, A. I., B. E. White, D. Tonetti, Y. Yang, W. Liang, W. Li, and R. B. van Breemen. 2005. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. *Eur. J. Cancer* **41**, 647-654.
- Hsieh, T. C. and J. M. Wu. 2008. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **33**, 851-859.
- Kelloff, G. J., C. W. Boone, J. A. Crowell, V. E. Steele, R. Lubet, and C. C. Sigman. 1994. Chemopreventive drug development: perspectives and progress. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**, 85-98.
- Lamartiniere, C. A., J. Wang, M. Smith-Johnson, and I. E. Eltoum. 2002. Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol. Sci.* **65**, 228-238.
- Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.* **134**(12 Suppl), 3479S-3485S.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Rayalam, S., M. A. Della-Fera, J. Y. Yang, H. J. Park, S. Ambati, and C. A. Baile. 2007. Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* **137**, 2668-2673.
- Reiter, E., A. Azzi, and J. M. Zingg. 2007. Enhanced anti-proliferative effects of combinatorial treatment of delta-tocopherol and resveratrol in human HMC-1 cells. *Biofactors* **30**, 67-77.
- Sarkar, F. H. and Y. Li. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* **21**, 265-280.
- Schlachterman, A., F. Valle, K. M. Wall, N. G. Azios, L. Castillo, L. Morell, A. V. Washington, L. A. Cubano, and S. F. Dharmawardhane. 2008. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl. Oncol.* **1**, 19-27.
- Surh, Y. J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-780.
- Thomasset, S. C., D. P. Berry, G. Garcea, T. Marczylo, W. P. Steward, and A. J. Gescher. 2007. Dietary polyphenolic phytochemicals-promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int. J. Cancer* **120**, 451-458.
- Wilson, L. C., S. J. Baek, A. Call, and T. E. Eling. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* **105**, 747-753.
- Ye, F., J. Wu, T. Dunn, J. Yi, X. Tong, and D. Zhang. 2004. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity in head and neck cancer cells by genistein. *Cancer Lett.* **211**, 39-46.