

## Genistein과 TRAIL의 복합처리에 의한 U937 인체 혈구암 세포의 Apoptosis 유도

최영현<sup>†</sup> · 한민호

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 대학원 바이오품질제어학과(BK21 program) 및 블루바이오소재개발센터

### Induction of Apoptosis by Combined-treatment with Genistein and TRAIL in U937 Human Leukemia Cells

Yung Hyun Choi<sup>†</sup> and Min Ho Han

Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Department of Biomaterial Control (BK21 Program), Graduate School, Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Donggeui University, Busan 614-052, Korea

#### Abstract

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) has been proposed as a potent tool to trigger apoptosis in cancer therapy. However, as many types of cancer cells remain resistant towards TRAIL-induced cytotoxicity, several combined therapy approaches aimed to sensitize cells to TRAIL have been developed. Genistein, a natural isoflavonoid phytoestrogen, has been shown to have anticancer activity by inducing cell cycle arrest at G2M phase as well as apoptosis in various cancer cell lines. In the present study, we showed that treatment with TRAIL in combination with subtoxic concentrations of genistein sensitized U937 human leukemia cells to TRAIL-mediated apoptosis. Combined treatment with genistein and TRAIL effectively activated caspases through Bid truncation (tBid) and down-regulation of cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein<sub>L</sub> (cFLIP<sub>L</sub>). However, the apoptotic effects of co-treatment with genistein and TRAIL were significantly inhibited by specific caspase inhibitors, which demonstrates the important role of caspases in apoptosis induced by genistein and TRAIL. Overall, our results indicate that genistein can potentiate TRAIL-induced apoptosis through down-regulation of cFLIP<sub>L</sub> and up-regulation of pro-apoptotic tBid proteins.

Key words: genistein, TRAIL, U937, apoptosis

#### 서 론

전 세계인의 사망원인 중 약 30% 정도를 차지하고 있는 암은 인체 내에서 여러 가지 요인으로 발생하며, 정상적으로 조절되지 않는 증식과 침윤 및 전이를 유발하는 질병으로 정의된다. 특히 이종 혈구암은 혈액이나 골수에 발생하는 암으로서 백혈구의 비정상적인 증식을 유발시키는 암으로서 임상 및 병리학적으로 급성 및 만성 혈구암으로 구분되어 지는데, 급성 혈구암의 경우에는 어린이나 젊은 층에서 주로 발생하지만 만성 혈구암의 경우에는 나이가 많은 사람에게 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한 혈구암은 골수에서 유발되는 급성 림프구성 백혈병과 과립성 백혈구 및 단핵 백혈구에서 발생하는 골수성 백혈병으로 나누어지고 완전한 치료가 어려우며 재발의 확률도 매우 높은 것으로 보고되어지고 있다(1-3). 따라서 혈구암을 치료하는데 있어서 보다 더 효과적인 생리활성을 지닌 물질을 발굴하고 이들의 분자 및 세포 수준에서의 기전을 밝히는 것이 중요할 것이다.

Apoptosis(programed cell death)는 개체의 발생이나 항

상성 유지 조절에 중요한 역할을 하는 정상적인 생리학적 현상이다. 최근 apoptosis 조절에는 많은 유전자들이 관여하고 있으며, 이들 유전자 산물들의 기능과 특징을 조사함으로써 apoptosis 현상의 분자생물학적 설명이 가능해지고 있다. 그중 tumor necrosis factor(TNF) superfamily에 속하는 TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)는 trans-membrane 단백질의 일종이다(4). TRAIL은 세포막에 결합되어 있는 죽음의 수용체(death receptors, DR4 및 DR5)와의 결합을 통하여 세포내 death domains를 경유한 apoptotic signal을 보내는 apoptosis의 extrinsic(death receptor) pathway에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 수용체는 리간드와 결합하게 되면 수용체의 다중화(multimerization)를 통하여 활성화되고, 그 결과로 여러 adapter 단백질들이 수용체와 결합하게 된다. 결합한 adapter 단백질들은 apoptosis에 있어서 중요하게 작용을 하는 다양한 caspases 등과 같은 단백질들의 활성화를 통해서 apoptosis를 유도하게 된다(4, 5). 따라서 많은 세포에서 TRAIL에 대한 감수성은 세포막에 존재하는 세포막 TRAIL 수용체들 및 caspase-8에 의존적

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: choiyh@deu.ac.kr  
Phone: 82-51-850-7413, Fax: 82-51-853-4036

이다. TRAIL에 의해 활성화된 caspase-8은 세포질로 유리 되어 caspase-3 및 caspase-7을 포함한 effector caspases를 활성화시키는 protease cascade를 개시한다. 특히 TRAIL은 정상세포에는 전혀 영향을 주지 않으면서 암세포와 같은 형질 전환된 세포의 치료 전략에 매우 유용하여 임상적 가치가 매우 높다(3,5-7). 하지만 여러 암세포들에서 TRAIL 저항성을 나타낸다는 것이 알려지면서 저항성을 극복할 수 있는 새로운 항암전략이 요구되어진다. 이러한 새로운 항암치료 전략으로 저농도의 항암제를 TRAIL과 동시에 투여할 경우 TRAIL의 저항성을 극복할 수는 있으나 정상세포에 대한 항암제 자체의 세포독성은 여전히 해결되어야 할 문제로 남아있다. 따라서 TRAIL의 저항성을 극복하면서 효율적인 항암 전략으로 정상세포에 세포독성을 지니지 않는 천연물의 이용이 새로운 해결 방안으로 제시되어지고 있다.

최근에는 질병 예방 측면에서 과일이나 채소의 중요성이 새롭게 대두되면서 다양한 phytochemical이 많은 관심을 받고 있다. Phytochemical은 외부의 여러 가지 자극에 대해서 식물체 자신을 보호하는 물질이지만 인체에서 발병하는 여러 가지 질병에 대해서도 예방 및 치료 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다. 그중 genistein은 콩에서 많이 발견되는 천연 isoflavonoid의 일종으로 여러 가지 암세포의 성장 및 분화 억제와 세포주기 차단과 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다(8-10). 최근 연구에 따르면, genistein과 TRAIL 복합 처리에 의해 췌장암에 성장을 억제할 수 있다는 것(11)과 A549 폐암세포에서 Akt 신호전달조절을 통해 TRAIL에 의한 세포사멸을 genistein이 증가시키는 것으로 보고되었다(12). 유사한 결과들이 위암(13), 자궁경부암(14,15), 간암(16,17), 악성 신경교종(18) 등에서 보고되어 왔으며, 이러한 결과들은 genistein과 TRAIL 복합 처리는 TRAIL에 의한 암 치료에서 보다 안전한 방법으로 제시될 수 있으나, 백혈병세포에서의 연구는 진행된 바 없다.

따라서 본 연구에서 인간 혈구암 세포인 U937에서 genistein과 TRAIL의 복합 처리에 의한 apoptosis 증진 효과 가능성을 확인하였고, 그와 관한 몇 가지 분자적 기전에 대해 연구하여 유의적인 결과를 얻었으므로 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### U937 세포의 배양 및 genistein과 TRAIL의 처리

U937 혈구암 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin(Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간마다 세포 배양용 페트리 접시로 옮겨 계대 배양하였다. Genistein(Sig-

ma, St. Louis, MO, USA)과 TRAIL(KOMA Biotech Inc, Seoul, Korea)은 각각 DMSO와 PBS에 적정 농도로 녹여 배지에 희석하여 처리하였다.

### DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 genistein과 TRAIL의 단독 및 혼합 처리된 배지에서 자란 세포들을 2,000 rpm에 5분간 원심분리 하여 상층의 배지를 버리고 세포를 모아서 PBS 1 mL로 충분히 재부유시켰다. 이를 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층의 PBS만 버리고 CycleTEST kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 고정 및 propidium iodide(PI, concentration, 50 µg/mL; Sigma) 염색액을 처리하여 암실, 4°C에서 15분 동안 염색하였다. 염색 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 분석하였다.

### SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

준비된 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리 하여 세포를 수집하였다. 이렇게 모아진 세포에 protease inhibitor cocktail이 포함된 적당량의 lysis buffer[250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA) pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 M 1,4-dithio-DL-threitol(DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(β-mercaptoethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. Western blot analysis를 위하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 단백질을 분리한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 이동시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS) 용액을 이용하여 상온에서 1시간 이상 반응시켜 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고, PBS-T 용액을 이용하여 5분 간격으로 최소 3회 이상 세척하였다. 세척 후 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 상온에서 1시간 이상 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 3회 이상 수세한 후, 특정 항체에 대한 이차 항체를 적용시켜 상온에서 1시간 이상 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척하고 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, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

#### 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 Sigma-Plot을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

### 결 과

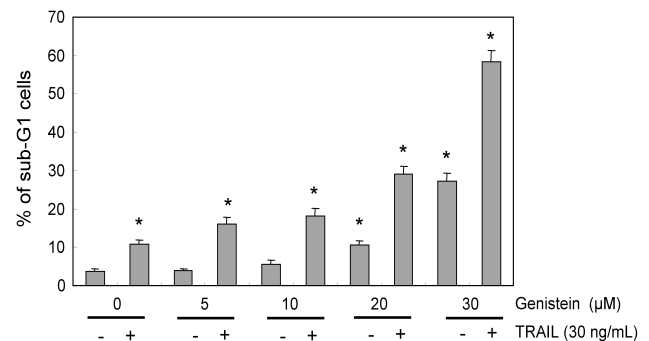
#### U937 세포의 세포주기 진행에 미치는 genistein 및 TRAIL의 영향

Genistein은 이미 많은 암세포의 증식을 세포주기 G2/M기에서 억제하며 이는 apoptosis 유발과 연관이 있는 것으로 보고되었기에(19-24), 이러한 현상이 U937 혈구암세포에서 동일하게 나타나는지를 먼저 조사하였다. 이를 위하여 U937 세포에 적정 농도의 genistein을 24시간 및 48시간 동안 처리한 후, flow cytometry 분석을 실시하였다. Table 1의 결과에서 알 수 있듯이 24시간 처리군에서는 농도 의존적인 결과를 보이지 않았으나, genistein의 처리 농도 및 처리 시간의 증가에 따라 전반적으로 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 매우 증가되었으며, G2/M기 세포의 빈도 증가에 따라 G1기 및 S기에 속하는 세포의 빈도는 상대적으로 감소되어, genistein은 U937 혈구암세포에서도 G2/M arrest를 유발하였음을 알 수 있었다. 동일 조건에서 TRAIL 처리가 U937 세포의 세포주기 특이적 차단 효과가 있는지를 조사한 결과, Table 1에서 알 수 있듯이 TRAIL 처리에 의한 세포주기 특이적 arrest 현상은 관찰할 수 없었으며, 이는 현재까지 TRAIL 단독 처리에 의한 세포주기 교란 현상이 보고된 바

없는 결과와도 잘 일치하였다. 아울러 genistein에 의한 G2/M arrest 유발에 미치는 TRAIL의 영향을 조사한 결과에서도, TRAIL은 genistein에 의한 G2/M arrest에는 유의적인 영향을 주지 못하였다(Table 2). 이상의 결과에서 genistein 단독 처리는 세포주기 G2/M arrest를 유발하지만, TRAIL과의 복합 처리는 genistein의 G2/M arrest 유발에는 큰 영향이 없는 것으로 결론을 내릴 수 있었다.

#### TRAIL에 의한 apoptosis 유발에 미치는 genistein의 영향

다음은 TRAIL에 의한 apoptosis 유도에 genistein이 미치는 영향을 조사하기 위하여 약 15% 정도의 apoptosis가 일어나는 TRAIL 단독 처리조건(30 ng/mL)에서 genistein을 동시에 처리하였을 경우 apoptosis 유발이 증가하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 1의 결과에서 알 수 있듯이 genistein을



**Fig. 1. Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis in U937 human leukemia cells.** Cells were treated with the indicated concentrations of genistein in the presence or absence of TRAIL (30 ng/mL) for 48 hr. To quantify the degree of apoptosis, cells were evaluated for sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, using a flow cytometer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control±SD of three separate experiments. The significance was determined by a Student's *t*-test (\**p*<0.05 vs. untreated control).

**Table 1. Effects of genistein and TRAIL on the cell cycle progression in U937 human leukemia cells**

|                |     | % of cells |       |       |       |       |       |
|----------------|-----|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                |     | G1         |       | S     |       | G2/M  |       |
|                |     | 24 hr      | 48 hr | 24 hr | 48 hr | 24 hr | 48 hr |
| Genistein (μM) | 0   | 51.28      | 57.01 | 27.44 | 27.57 | 21.28 | 15.42 |
|                | 5   | 54.55      | 61.41 | 28.03 | 21.57 | 17.43 | 17.02 |
|                | 10  | 55.01      | 57.53 | 28.42 | 23.88 | 16.57 | 18.59 |
|                | 20  | 54.69      | 53.37 | 24.02 | 23.64 | 21.29 | 24.00 |
|                | 30  | 44.05      | 38.14 | 21.41 | 20.67 | 34.53 | 41.19 |
| TRAIL (nM)     | 0   | 52.05      | 57.01 | 25.18 | 27.57 | 22.77 | 15.42 |
|                | 2.5 | 50.69      | 54.81 | 26.57 | 29.83 | 22.74 | 15.36 |
|                | 5   | 49.43      | 54.31 | 26.25 | 29.65 | 24.32 | 16.04 |
|                | 10  | 51.77      | 60.53 | 26.66 | 25.52 | 21.57 | 13.96 |
|                | 20  | 53.78      | 58.28 | 25.36 | 25.75 | 21.86 | 15.97 |
|                | 30  | 51.39      | 58.27 | 27.73 | 25.30 | 19.89 | 16.43 |

U937 cells were seeded at an initial density of  $1 \times 10^5$  cells per 60 mm plate and treated with the indicated concentrations of genistein or TRAIL for 24 hr and 48 hr. The cells were collected, stained with PI and DNA contents were analyzed by a flow cytometer. The percentages of cells in the each phase are presented. The data represent the average of two independent experiments.

Table 2. Effects of combined treatment with genistein and TRAIL on the cell cycle progression in U937 human leukemia cells

| Genistein<br>( $\mu$ M) | TRAIL<br>(nM) | % of cells |       |       |       |       |       |
|-------------------------|---------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                         |               | G1         |       | S     |       | G2/M  |       |
|                         |               | 24 hr      | 48 hr | 24 hr | 48 hr | 24 hr | 48 hr |
| 0                       | 0             | 51.28      | 57.01 | 27.44 | 27.57 | 21.28 | 15.42 |
| 20                      | 0             | 54.69      | 53.37 | 24.02 | 23.64 | 21.29 | 24.00 |
| 0                       | 30            | 51.39      | 58.27 | 27.73 | 25.30 | 19.89 | 16.43 |
| 20                      | 2.5           | 55.81      | 51.94 | 23.17 | 23.85 | 21.03 | 24.22 |
| 20                      | 5             | 57.36      | 53.06 | 22.02 | 24.18 | 20.62 | 22.76 |
| 20                      | 10            | 58.44      | 52.32 | 21.51 | 24.40 | 20.04 | 23.28 |
| 20                      | 20            | 57.79      | 52.86 | 21.13 | 24.52 | 21.07 | 22.62 |
| 20                      | 30            | 58.54      | 53.37 | 22.46 | 24.54 | 19.00 | 22.09 |
| 30                      | 0             | 44.05      | 38.14 | 21.41 | 20.67 | 34.53 | 41.19 |
| 0                       | 30            | 51.39      | 58.27 | 27.73 | 25.30 | 19.89 | 16.43 |
| 30                      | 2.5           | 54.12      | 43.96 | 13.07 | 20.34 | 32.81 | 35.69 |
| 30                      | 5             | 53.34      | 44.48 | 15.78 | 20.59 | 30.87 | 34.93 |
| 30                      | 10            | 50.77      | 41.91 | 15.50 | 19.49 | 33.73 | 38.60 |
| 30                      | 20            | 52.72      | 42.14 | 15.03 | 20.92 | 32.24 | 36.95 |
| 30                      | 30            | 53.70      | 41.19 | 16.09 | 21.81 | 30.21 | 37.01 |

U937 cells were treated with genistein (20 and 30  $\mu$ M) with or without various concentrations of TRAIL. After 24 hr or 48 hr incubation, the cells were collected, stained with PI and DNA contents were analyzed by a flow cytometer. The percentages of cells in the each phase are presented. The data represent the average of two independent experiments.

동시에 처리할 경우, TRAIL에 의하여 유발되는 apoptosis가 genistein 처리 농도 의존적으로 매우 증가되어, 30  $\mu$ M genistein 복합 처리군에서 apoptosis 유발 빈도는 약 58% 정도로 나타났으며, 이는 genistein 단독 처리군에 비하여 약 2배 정도 증가한 값으로 U937 세포에서 genistein은 TRAIL에 의한 apoptosis 유도를 매우 효과적으로 증진시킬 수 있음을 보여주는 결과이다.

cFLIP과 Bcl-2 family의 발현 미치는 genistein과 TRAIL 영향

이상에서 관찰된 genistein의 TRAIL 유도 apoptosis 증진 효과가 어떤 경로를 통하여 이루어지는 지를 조사하기 위하여 apoptosis 유도의 주요 인자 몇 가지의 발현 변화를 조사하였다. 그중 cellular caspase-8(FLICE)-like inhibitory protein(cFLIP)은 caspase-8의 억제자로 apoptosis의 extrinsic pathway에서 중요한 조절자 역할을 한다고 알려져 있다(25). Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이, genistein과 TRAIL을 복합처리 하였을 때, 대조군과 각각의 단독 처리군에 비하여 cFLIP<sub>L</sub>의 발현이 현저하게 감소되었다. 그리고 intrinsic pathway에 의한 apoptosis 주요 조절자로 알려진 Bcl-2 family에 속하는 유전자들의 발현을 조사한 결과, 대표적인 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 anti-apoptotic Bcl-2는 genistein과 TRAIL의 단독이나 복합처리군에서 다소 감소하였거나 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 type II apoptosis에서 intrinsic pathway와 extrinsic pathway의 매개자로 알려진 Bid의 truncated form(tBid)이 genistein과 TRAIL의 복합처리 군에서 현저하게 증가되었다.

Caspase의 활성화 미치는 genistein과 TRAIL의 영향

Cysteine-related protease인 caspases는 세포의 apopto-

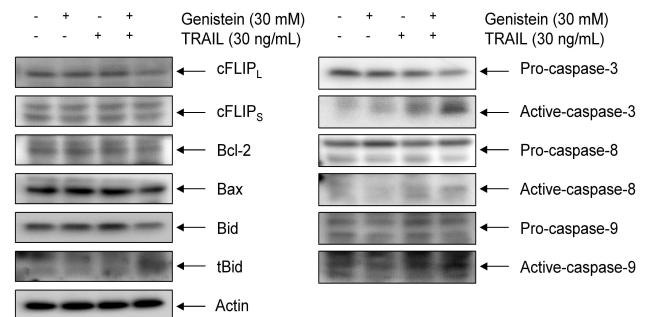
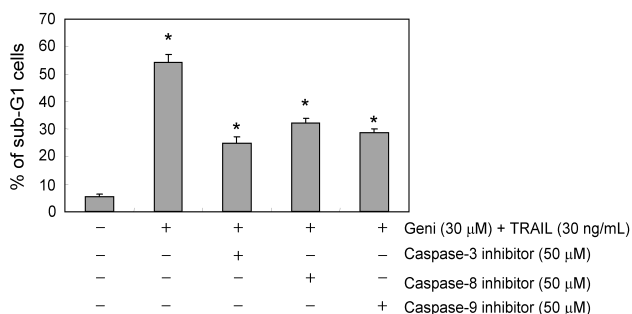


Fig. 2. Effects of combined treatment with genistein and TRAIL on the levels of apoptosis-related proteins in U937 human leukemia cells. The cells were cultured for 48 hr in the absence (control) or presence of genistein, TRAIL or genistein plus TRAIL, and lysed. The cellular proteins were separated by 10% or 13% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitro-cellulose membranes. The membranes were probed with the anti-FLIP, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-Bid, anti-caspase-3, anti-caspase-8 and anti-caspase-9 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

sis 유발에 핵심적인 역할을 하는 효소로서 핵과 미토콘드리아의 외막에 불활성 상태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의하여 활성화될 수 있다(6). 특히 extrinsic pathway의 개시에 caspase-8의 활성이 필수적이며, caspase-8의 활성화는 caspase-3의 활성을 유발할 수 있다. 아울러 intrinsic pathway의 개시에는 caspase-9의 활성이 요구되며, 활성화된 caspase-9는 역시 caspase-3을 활성화시킨다. 따라서 genistein에 의한 TRAIL의 apoptosis 유도 증진과 연관된 이들 caspase의 활성 연관성의 정도를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 U937 세포를 대상으로 이들 caspase의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이, 대조군과 genistein 및 TRAIL 각각의 단독 처리군



**Fig. 3.** Effects of caspase inhibitors on the apoptosis induced by combined treatment with genistein and TRAIL in U937 human leukemia cells. Cells were pretreated for 1 hr with or without the caspase inhibitors (z-DEVD-fmk, caspase-3 inhibitor; z-IETD-fmk, caspase-8 inhibitor; z-LEHD-fmk, caspase-9 inhibitor) and then treated with genistein and TRAIL for an additional 48 hr. To quantify the degree of apoptosis, cells were evaluated for sub-G1 DNA content using a flow cytometer. Results are expressed as percentage of the vehicle treated control  $\pm$ SD of three separate experiments. The significance was determined by a Student's *t*-test (\* $p$ <0.05 vs. untreated control).

에 비하여 복합 처리군에서 caspase-3을 비롯하여, intrinsic pathway와 extrinsic pathway의 활성화에 중요한 caspase-9와 caspase-8의 활성화형 단백질의 발현이 현저하게 증가되었음을 확인하였다. 따라서 이러한 caspase들의 활성화가 TRAIL과 genistein 복합 처리에 의한 apoptosis에 직접 관여하는지를 확인하기 위하여 각 caspase의 활성화 저해제가 이들 복합 처리에 의한 apoptosis 유도에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 각각의 caspase 저해제는 TRAIL과 genistein 복합 처리에 의한 apoptosis 유발을 유의적으로 감소시켜, 이들 복합 처리에 의한 apoptosis 유도에 caspase 활성화가 직접 관여하고 있음을 알 수 있었다.

## 고 찰

본 연구는 U937 인체 혈구암세포에서 genistein과 TRAIL의 혼합 처리가 genistein 및 TRAIL 단독 처리 비하여 효율적으로 apoptosis를 유도할 수 있음을 제시하고자 실시되었다. 본 연구를 통하여 얻은 결과에 의하면, TRAIL에 의하여 유도되는 apoptosis가 genistein과의 동시 처리에 의하여 매우 증가되었으며, 이러한 과정에는 cFLIP의 발현 감소 및 tBid의 발현 증가와 동반된 다양한 caspase의 활성화가 관여하고 있음을 알 수 있었다.

TRAIL은 최근 발견된 apoptosis 유도 인자로서, 정상세포에는 영향을 주지 않으면서 암세포와 형질 전환된 세포 및 바이러스가 감염된 세포 등을 포함한 비정상적인 세포들에서만 apoptosis를 유발할 수 있기 때문에 임상적 유용 가치가 매우 높은 인자이다(5,6,26). 그러나 TRAIL의 효능에 대한 잠재적 유효성에 관해 여전히 많은 연구가 요구되어지고 있다. TRAIL에 의한 caspase-8의 활성화는 세포의 종류

에 따라 두 가지의 서로 다른 apoptotic pathway를 유도하는데, TRAIL은 caspase-8에 의한 caspase-3과 같은 downstream effector caspase의 활성화를 통한 type I apoptosis를 유발하거나(27), caspase-8 활성화에 의한 tBid 발현 증가를 통한 caspase-9의 활성을 유도하는 type II apoptosis를 유발할 수도 있다(6,28). 비록 TRAIL이 암의 치료에 생물학적으로 안전하고 효과적이지만 TRAIL에 저항성을 나타내는 암세포가 많이 알려지고 있는데, 이러한 저항성들은 암세포 표면에 TRAIL receptor의 결핍(26,29)이나 cFLIP의 과발현(7) 혹은 Bcl-2 family의 anti-apoptosis 인자들의 과발현에 의한 것들(30)이 많은 부분을 차지한다.

본 연구의 결과에 의하면, genistein과 TRAIL의 복합 처리는 각각의 단독 처리에 비하여 현저하게 apoptosis 유도 증가 효과가 있었으며(Fig. 1), 이 과정에 cFLIP<sub>L</sub>의 발현 감소와 tBid의 증가가 동반된 반면, 대표적인 anti-apoptotic 및 pro-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 Bax의 발현에는 큰 변화가 없었다(Fig. 2). 또한 extrinsic pathway에 의한 apoptosis 개시에 중요한 caspase-8의 활성화형 발현이 증가되었는데, 이는 cFLIP<sub>L</sub>의 발현에 의한 결과로 해석되며, tBid의 발현 증가는 caspase-8의 활성화 증가에 의한 결과로 추정된다. 아울러 genistein과 TRAIL의 복합 처리군에서 intrinsic pathway의 개시에 중요한 caspase-9의 활성이 증가되었는데, 이는 Bid의 활성화형인 tBid의 발현 증가에 기인한 것으로서, caspase-8과 caspase-9의 활성화 증가는 caspase-3의 활성을 동시에 증가시켰을 것으로 생각된다. 아울러 각각의 caspase 특이적 활성화 저해제의 선 처리에 의하여 genistein과 TRAIL의 복합 처리에 의한 apoptosis가 차단되었음은 cFLIP<sub>L</sub>의 발현 감소와 tBid의 증가에 의한 이들 caspase의 활성화 증가가 genistein과 TRAIL 동시 처리에 의한 apoptosis 유도에 관여하고 있음을 보여 주는 것이다.

암 치료에 있어서 가장 먼저 처리해야 할 과제 중 하나가 각각의 암세포들이 특정 약물에 저항성을 가진다는 것이다. TRAIL은 *in vitro* model에서 다양한 암세포에서 효과적으로 apoptosis 유도를 할 수는 있으나, 많은 암세포가 TRAIL에 대하여 저항성을 보이고 있기 때문에 TRAIL을 암 치료에 효과적으로 사용하기 위해서는 이러한 저항성을 극복하는 것과 관련 기전의 해석이 우선적으로 해결해야 할 과제이다. 결론적으로 본 연구의 결과는 genistein과 TRAIL 동시 처리에 의한 apoptosis 유발 증가에는 type I apoptosis와 type II apoptosis가 동시에 관여하는 것으로 추정되며, 본 연구의 결과에서 제시한 TRAIL과 genistein의 동시 처리에 의한 효율적인 apoptosis 유도는 TRAIL 단독 처리에서 저항성을 보이는 다양한 암세포의 증식억제를 해결할 수 있는 매우 유의적인 결과라고 생각되어진다. 그러나 본 연구의 결과만으로 genistein과 TRAIL 동시 처리에 의한 apoptosis 유도 기전의 모두를 제시할 수는 없으며, 특히 death receptor와 연관된 부가적인 실험들이 지속적으로 요구되어진다.

## 요 약

TRAIL은 최근 암세포의 apoptosis 유도를 위한 효율적인 도구로 제시되었으나 많은 암세포들이 TRAIL 저항성을 획득한 것으로 알려져 TRAIL 저항성 극복을 위한 새로운 방법론의 제시가 요구되어지고 있다. Genistein은 대두의 대표적인 생리활성 물질인 isoflavonoid의 일종으로 많은 암세포에서 G2/M arrest를 유발하면서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 U937 인체백혈병세포를 대상으로 genistein에 의한 TRAIL 유도 apoptosis의 감수성 증대 여부를 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 U937 세포에서 세포독성이 없는 범위의 genistein 처리는 TRAIL에 의한 apoptosis 유도를 매우 증진시켰으며, 이는 tBid의 발현 증가와 cFLIP<sub>L</sub>의 발현 감소와 연계된 caspase의 활성 증가와 연관성이 있었다. 또한 caspase의 활성 저해제는 genistein과 TRAIL의 복합처리에 의한 apoptosis를 유의적으로 감소시켜 복합 처리에 의한 apoptosis의 유도에 caspase의 활성 증대가 필수적임을 알 수 있었다. 따라서 genistein은 TRAIL 저항성을 획득한 암세포의 효율적인 combined therapy approach를 위해 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업 동의대학교 블루바이오 소재 개발 및 실용화 지원 센터 (RIC 08-06-07)의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다.

## 문 헌

- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 80-97.
- Abramson N, Melton B. 2000. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *Am Fam Physician* 62: 2053-2060.
- Wiernik PH. 1988. Leukemias and myeloma. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 10: 129-147.
- Wang S, EI-Deiry SW. 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633.
- French LE, Tschopp J. 1999. The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5: 146-147.
- Srivastava RK. 2001. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3: 535-546.
- Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. 1999. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* 59: 2747-2753.
- Aggarwal B, Shishodia S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71: 1397-1421.
- Sarkar FH, Adsule S, Padhye S, Kulkarni S, Li Y. 2006. The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini Rev Med Chem* 6: 401-407.
- Pinski J, Wang Q, Quek ML, Cole A, Cooc J, Danenberg K, Danenberg PV. 2006. Genistein-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Prostate* 66: 1136-1143.
- Nozawa F, Itami A, SarucM, Kim M, Standop J, Picha KS, Cowan KH, Pour PM. 2004. The combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and genistein is effective in inhibiting pancreatic cancer growth. *Pancreas* 29: 45-52.
- Park SY, Seol DW. 2002. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 515-518.
- Jin CY, Park C, Cheong J, Choi BT, Lee TH, Lee JD, Lee WH, Kim GY, Ryu CH, Choi YH. 2007. Genistein sensitizes TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS cells through activation of caspase-3. *Cancer Lett* 257: 56-64.
- Szliszka E, Czuba ZP, Jernas K, Król W. 2008. Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Int J Mol Sci* 9: 56-64.
- Bronikowska J, Szliszka E, Czuba ZP, Zwolinski D, Szmydki D, Krol W. 2010. The combination of TRAIL and isoflavones enhances apoptosis in cancer cells. *Molecules* 15: 2000-2015.
- Jin CY, Park C, Kim GY, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH. 2009. Genistein enhances TRAIL-induced apoptosis through inhibition of p38 MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Chem Biol Interact* 180: 143-150.
- Jin CY, Park C, Moon SK, Kim GY, Kwon TK, Lee SJ, Kim WJ, Choi YH. 2009. Genistein sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by enhancing Bid cleavage. *Anticancer Drugs* 20: 713-722.
- Siegelin MD, Siegelin Y, Habel A, Gaiser T. 2009. Genistein enhances proteasomal degradation of the short isoform of FLIP in malignant glioma cells and thereby augments TRAIL-mediated apoptosis. *Neurosci Lett* 453: 92-97.
- Lian F, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, Sarkar FH. 1998. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr Cancer* 31: 184-191.
- Choi YH, Lee WH, Park KY, Zhang L. 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.
- Choi YH, Zhang L, Lee WH, Park KY. 1998. Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells. *Int J Oncol* 13: 391-396.
- Raffoul JJ, Wang Y, Kucuk O, Forman JD, Sarkar FH, Hillman GG. 2006. Genistein inhibits radiation-induced activation of NF-kappaB in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *BMC Cancer* 6: 107.
- Ouyang G, Yao L, Ruan K, Song G, Mao Y, Bao S. 2009. Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of human ovarian cancer cells via activation of DNA damage checkpoint pathways. *Cell Biol Int* 33: 1237-1244.
- Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W. 2009. Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 61: 397-407.
- Zhang L, Fang B. 2005. Mechanisms of resistance to TRAIL induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12:

- 228-237.
26. Yang LQ, Fang DC, Wang QR, Yang SM. 2004. Effect of NF- $\kappa$ B, survivin, Bcl-2 and caspase-3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 10: 22-25.
27. Harris P, Ralph P. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37: 407-422.
28. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Yama/ CPP32  $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81: 801-809.
29. Griffith TS, Lynch DH. 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 10: 559-563.
30. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. 2007. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1462-1475.

(2011년 6월 30일 접수; 2011년 8월 2일 채택)