

## 3,3'-Diindolylmethane(DIM)이 Human Mammary Epithelial Cell에서 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate에 의해 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향

박소영<sup>1</sup> · 심재훈<sup>2</sup> · 김종대<sup>3\*</sup> · 윤정한<sup>2</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 농업생명공학사업단

<sup>2</sup>한림대학교 식품영양학과

<sup>3</sup>강원대학교 농업생명과학대학 식품생명공학과

## The Effect of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced COX-2 Expression by 3,3'-Diindolylmethane (DIM) on Human Mammary Epithelial Cells

So Young Park<sup>1</sup>, Jae-Hoon Shim<sup>2</sup>, Jong-Dae Kim<sup>3\*</sup>, and Jung Han Yoon Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Agricultural Biotechnology, Center for Agricultural Biomaterials,  
Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Sciences and Nutrition, Hallym University, Gangwon 200-702, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Science,  
Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

### Abstract

3,3'-Diindolylmethane (DIM) is a major *in vivo* derivative of the putative anticancer agent indole-3-carbinol, which is present in cruciferous vegetables and has been reported to have anti-carcinogenic properties. An abnormally elevated level of cyclooxygenase-2 (COX-2) has been implicated in the pathogenesis of carcinogenesis. To investigate the mechanism by which DIM exhibits anti-carcinogenic effects, we investigated the effects of DIM on COX-2 expression in MCF-10A human mammary epithelial cells treated with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). DIM inhibited TPA-induced COX-2 expression and suppressed the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub>, one of the major products of COX-2. Nuclear factor-kappa B (NF-κB) is a transcription factor known to play a role in regulation of COX-2 expression. Treatment of MCF-10A cells with TPA increased nuclear translocation of phospho-p65, with the maximal levels being reached at 1 hour, while DIM inhibited the TPA-induced nuclear translocation of phospho-p65. Overall, we demonstrated that DIM suppresses phorbol ester-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression in MCF-10A cells. The reduction in COX-2 levels by DIM maybe mediated through inhibition of NF-κB signaling.

**Key words:** 3,3'-diindolylmethane (DIM), anti-inflammation, human mammary epithelial cell, cyclooxygenase-2 (COX-2)

### 서 론

브로콜리, 양배추, 케일 등의 십자화과 채소(cruciferous vegetable)에 함유되어 있는 indole-3-carbinol(I3C)은 그 자체로 항암, 항산화, 항알레르기 효능을 지니고 있으며(1) 이들 채소를 씹고 소화하는 과정에서 중합되어 생성되는 3,3'-diindolylmethane(DIM)은 항산화(2), 항신생혈관형성(3) 그리고 유방암, 전립선암, 대장암을 포함하여 여러 종류의 암을 억제하는 탁월한 효능을 지니는 것으로 알려져 있다(4). 특히, DIM은 감염이나 암예방에 중요한 역할을 하는 염증반응을 억제하는 것으로 보고되었다(5).

염증반응은 특정 자극에 대한 생체 조직의 방어 반응 중 하나로 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다. 일단 자극이 가해지면 국소적으로 prostaglandins(PGs), hydroxyecosatetraenoic acid, leukotriene과 같은 물질이 유리되어 염증을 유발한다. 그러나 지속적인 염증반응은 도리어 점막 손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암을 일으키기도 한다(6). 최근에는 역학조사를 통해 *Helicobacter pylori*에 의한 위염, 바이러스성 간염, inflammatory bowel disease, 그리고 prostatitis 같은 만성염증이 위암, 간암, 대장암 그리고 전립선암의 원인

\*Corresponding author. E-mail: jongdai@kangwon.ac.kr  
Phone: 82-33-250-6456, Fax: 82-33-250-6456

이 된다는 것이 발표되었고 non-steroidal anti-inflammatory agent들을 이용하는 사람들과 암의 발생률과 암으로 인한 사망률이 감소하였다는 결과가 발표되어 염증과 암의 연관성에 큰 힘을 실어주고 있다(7). 따라서 염증을 일으키는 유전자를 억제할 경우 암의 발생과 진전을 차단할 수 있으며(8), 암화과정 중 염증반응을 억제하는 것은 암의 예방 및 치료에 있어 매우 중요하다 할 수 있다. 염증억제는 주로 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 활성을 억제하여 nitric oxide(NO)나 cyclooxygenase-2(COX-2)가 생성하는 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등과 같은 염증 관련 인자들의 생성을 감소시키는 기작으로 알려져 있다(9). 외부의 자극에 의해 염증반응이 일어나면 NO, PG, 염증성 cytokine과 같은 다양한 물질이 생성되며 염증반응을 조절하는 다양한 병리학적인 반응이 유도된다(10). 즉, 염증반응에 의하여 arachidonic acid가 세포막 인지질로부터 유리되면 lipooxygenase(LOX) 또는 COX-2의 작용에 의해 leukotriene 또는 PG가 합성된다. COX는 COX-1과 COX-2로 나누어지는데 다양한 세포에서 각각 다른 발현 양상을 나타낸다. COX-1은 위 및 신장 기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 PG의 합성에 작용하며(11), COX-2는 정상적인 조직에서는 거의 발현되지 않으며 대식세포에서 유도되어 암세포의 증식은 물론 종양세포의 전이나 암세포 주변의 새로운 혈관신생에도 관여하고 자기사멸을 억제하는 역할을 한다. 따라서 선택적 COX-2 저해 성분은 항염증 및 암발생 예방 성분의 발견을 위한 중요한 표적으로 사용할 수 있다(12).

NF- $\kappa$ B는 세포분화, 염증반응, 세포부착 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자이다. 활성화된 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 translocation되어 표적 유전자의 promoter regions에 있는  $\kappa$ B 결합자리에 결합하여 nitric oxide synthase(NOS), COX-2, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  그리고 interleukin(IL)-6 등 여러 염증매개물질의 전사를 촉진한다(13). 세포에 특정 자극이 가해지면 NF- $\kappa$ B signal이 활성화되어 특정 효소나 단백질을 과다하게 생성한다. 즉, NF- $\kappa$ B의 자극으로 특정 유전자 발현 속도가 증가하면 관련 효소 및 단백질 생산이 늘어나서 염증성 PG 및 기타 eicosanoid 생산을 비정상적으로 증가시킨다. 또한 NF- $\kappa$ B 활성이 증가하면 면역계가 과도하게 활성화되어 다양한 자가면역질환 및 염증반응이 악화된다(14). Inhibitor (I)- $\kappa$ B는 세포질 내에서 NF- $\kappa$ B와 결합하여 NF- $\kappa$ B가 세포 핵 내로 유입되는 것을 억제하는 단백질이다. 즉, NF- $\kappa$ B의 부정적 기능을 막아주는 유익한 물질이다. I $\kappa$ B는 평소에 세포질 내에서 NF- $\kappa$ B를 묶고 있다가 특정 자극을 받으면 묶고 있는 NF- $\kappa$ B를 놓아준다(15).

현재 만성염증과 암 또는 다른 질병과의 상관관계가 보고되면서 식이섭취변화를 이용하여 염증반응을 감소시킴으로써 질병의 위험을 줄이려는 노력이 진행되고 있다(16). 녹차의 polyphenol, curcumin, 포도씨 추출물 등 식물성 화합물

질(phytochemical)은 대표적인 COX 억제제로 알려져 있다(17-19).

본 연구팀은 선행 연구를 통해 DIM이 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)로 유도된 피부암의 발생을 억제하고(20), 유방암의 폐 전이를 억제함을(21) 관찰하였다. 따라서 본 연구에서는 유방상피세포에서 염증상태가 암의 발달을 촉진하고 더 나아가 암의 전이를 촉진할 수 있다는 전제를 가지고 염증반응에 미치는 DIM의 효과를 조사하고자 하였다. 즉, 유방상피세포인 MCF-10A 세포를 사용하여 염증상태를 유도하고 DIM이 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향 및 그 기전을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Normal mammary epithelial 세포인 MCF-10A는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12)는 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Horse serum(HS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA 등은 Lonza(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. DIM(MW 246.3, C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>, Fig. 1)은 LKT Laboratories(St. Paul, MN, USA)에서, PGE<sub>2</sub> assay kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였고 p65 antibody는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. P-I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , P-p65 antibody는 Cell Signaling Technology, Inc.(Beverly, MA, USA)에서,  $\beta$ -actin antibody와 TPA는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서, COX-2 antibody는 BD Transduction Laboratories(Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다. Horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG와 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. 이외에 언급되지 않은 시약들은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다.

### 세포배양

인간의 유방상피세포인 MCF-10A 세포는 DMEM/F12 배지에 5% HS, 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin과 2 mmol/L glutamine을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포가 80% confluent 해지면

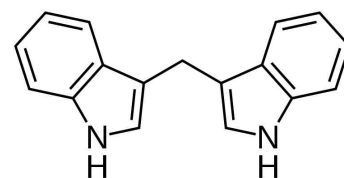


Fig. 1. The structure of DIM.

phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mmol/L EDTA로 처리하여 계대배양 하였고 배지는 2일마다 교환하였다. 세포의 염증반응을 유도하기 위하여 배양액에 TPA를 10 nmol/L의 농도로 첨가하였다.

#### PGE<sub>2</sub> 분비량 측정

MCF-10A 세포를 50,000 cells/well의 밀도로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. DIM이 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 10 nmol/L TPA와 함께 DIM을 여러 농도(0, 5, 10, 20 µmol/L)로 처리하여 배양하였다. 48시간 배양 후 conditioned medium을 사용하여 PGE<sub>2</sub>의 분비량을 PGE<sub>2</sub> assay kit(R&D Systems)를 이용하여 측정하였다.

#### Western blot analysis

위에서 언급한 바와 같이 각각의 세포에 TPA와 DIM을 처리한 후, 1 mmol/L iodoacetic acid와 1 mmol/L PMSF가 포함된 ice-cold PBS로 세척하였다. Scraper를 사용하여 cell을 모은 후, pellet에 lysis buffer(20 mmol/L HEPES, 1% triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L iodoacetic acid, 0.2 mmol/L PMSF, 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamidine HCl)를 넣고 4°C에서 40분 동안 lysis하였다. 단백질을 분리하기 위하여 total cell lysate(50 µg protein)를 SDS-PAGE에서 분리한 뒤, polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. Membrane은 5% milk-TBST(20 mmol/L tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% tween-20, pH 7.5)로 blocking 하였으며, 각각의 antibody를 5% milk/TBST 혹은 5% BSA/TBST에 희석하여 incubation하였다. Antibody에 결합된 단백질의 signal은 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore)를 사용한 chemiluminescence 방법을 통하여 가시화하였다.

#### Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA는 RNeasy Mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 사용하여 분리하였다. RNA(2 µg)를 Superscript II RNase H-reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 42°C에서 1시간 45분, 70°C에서 15분 반응시켜 cDNA를 얻었다. cDNA를 이용하여 PCR을 수행해 COX-2의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. COX-2의 primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 제작하였으며 다음과 같다. COX-2 sense 5'-GGAGAGACTATC-AAGATAGT-3', antisense 5'-ATGGTCAGTAGACTTTTACA-3', β-actin sense 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3', antisense 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG-

3'(22). PCR product는 1% agarose gel에서 분리하여 ethidium bromide로 가시화하였다.

#### Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)

**Nuclear fraction의 준비:** 위에서 언급한 바와 같이 각각의 세포에 TPA와 DIM을 처리한 후 cold PBS로 세척하여 세포를 모았다. 세포 volume의 5배의 hypotonic buffer(10 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L DTT, 0.5% NP-40, 10 mmol/L iodoacetic acid, 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamidine HCl)를 첨가하여 얼음에서 10분간 방치하였다. 10초간 vortex한 후, 원심분리(5,000 rpm, 4°C, 15분)하여 상층액을 모았다. Pellet에는 NP-40을 포함하지 않은 hypotonic buffer를 동량 첨가하고 resuspension하여 원심분리 하였으며, 상층액은 앞서 얻은 상층액과 섞어 세포질 분획을 준비하였다. Pellet에 3배 volume의 low salt buffer(20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 10% glycerol)를 넣어 suspension한 후, pellet volume과 동량의 high salt buffer(20 mmol/L HEPES, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.6 mol/L KCl, 0.2 mmol/L PMSF, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 10% glycerol)를 dropwise 방식으로 떨어뜨리면서 잘 섞은 후, 얼음에서 1시간 배양하였다. 원심분리(25,000×g, 4°C, 30분)하여 얻어진 상층액을 핵분획으로 준비하였다. 핵분획을 이용하여 전기영동한 후 Western blot을 통해 단백질의 핵으로의 이동변화를 조사하였다.

**EMSA:** NF-κB-specific consensus oligonucleotide(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5')에 [<sup>32</sup>P]ATP(5)와 T4 kinase, 그리고 T4 kinase buffer를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, G-50 Sephadex column을 사용하여 radiolabeled DNA를 정제함으로써 <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide probe를 준비하였다. Nuclear extract(8 µg)에 <sup>32</sup>P-labeled probe(40,000 cpm)를 첨가하여 상온에서 30분 배양하였고, 생성된 DNA-protein complex는 5% nondenaturing acrylamide gel에서 150 V로 분리하였으며 autoradiography로 가시화하였다.

#### Immunocytochemistry

위에서 언급한 바와 같이 각각의 세포를 chamber slide(NUNC, Rochester, NY, USA)에 50,000 cells/well의 밀도로 분주하고 TPA와 DIM을 처리하였다. 처리 1시간 후 배지를 제거하고 4% formaldehyde로 15분간 고정한 다음 0.1% triton X-100으로 상온에서 30분간 permeabilization하였다. 이렇게 고정된 세포에 p65 antibody를 넣어 4°C에서 다음날 까지 배양하고 DAPI로 핵을 염색한 후 mounting하여 광학 현미경 시스템을 이용하여 관찰하였다.

### 통계 처리

모든 분석 수치는  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램 (ver. 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

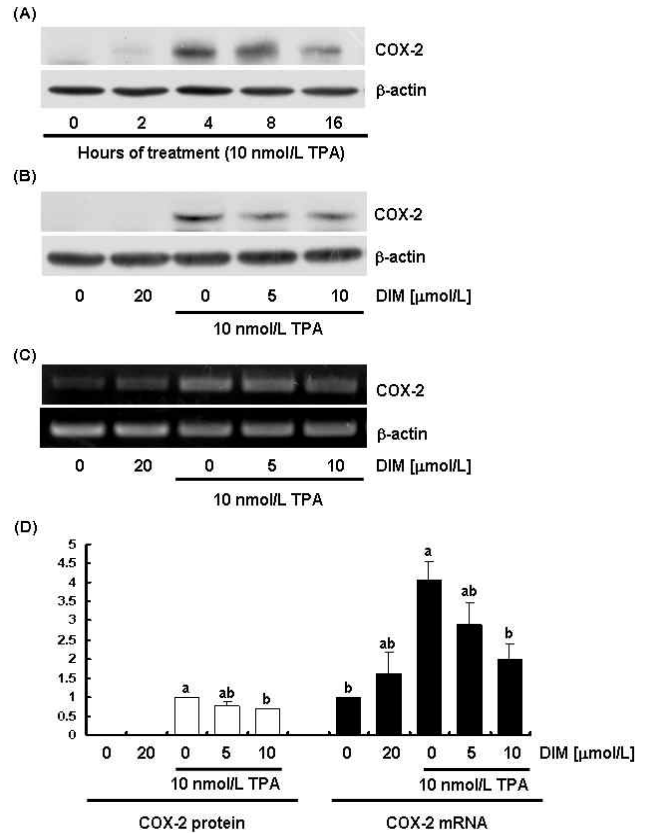
### 결과 및 고찰

#### DIM이 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 COX-2 발현에 미치는 영향

외부의 화학물질이나 세균 같은 염증인자가 생체에 작용하면 생체내에서 방어기전의 하나로 염증반응이 일어난다. 염증상태에서는 COX-2와 NO synthase가 유도되어 과량의  $\text{PGE}_2$ , NO 등이 생성되며 여러 가지 질병 및 암화가 촉진된다(23). COX-2의 발현을 촉진시키는 물질로는 growth factors, pro-inflammatory cytokines, tumor promoters 또는 bacterial toxin 등이 있다(24). 본 연구에서는 유방상피세포를 이용하여 암의 발생과 진전을 촉진하는 것으로 알려진 염증상태를 유도하기 위하여 이들 물질 중 tumor promoter인 TPA를 세포에 처리하고 COX-2 단백질 발현이 최고에 달하는 시간을 측정하였다. MCF-10A 세포에 10 nmol/L TPA를 처리하고 0, 2, 4, 8, 16시간이 경과한 후 세포를 모아 lysate를 만들어 Western blot을 수행하였다. 그 결과 TPA 처리 4시간 경과 후 COX-2의 발현이 최고에 달했다가 8시간까지 지속된 후 16시간부터는 서서히 COX-2의 발현이 감소하였다(Fig. 2A). DIM이 TPA에 의해 증가된 COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TPA와 동시에 DIM을 0, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  농도로 처리하고 4시간 배양한 후 세포를 모아 Western blot을 실시하였다. 그 결과 TPA의 처리에 의하여 현저히 증가된 COX-2 단백질이 DIM의 처리에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2B, 2D). 뿐만 아니라 10  $\mu\text{mol/L}$ 의 DIM 처리는 TPA에 의해 증가된 COX-2의 mRNA transcription 수준도 유의적으로 감소시켰다(Fig. 2C, 2D). 그러나 DIM은 iNOS의 발현에는 영향을 주지 않았다(data not shown). Cho 등의 결과(5)에 따르면 LPS로 염증상태를 유도한 macrophage에서 DIM은 NO와  $\text{PGE}_2$ 의 생성을 모두 억제하는 것으로 나타났으나 본 결과에서는 iNOS의 발현 및 NO의 생성에는 영향을 주지 않았다. 즉, 염증세포에서 보인 효과와는 달리 DIM은 유방상피세포에서 COX-2 inhibitor로서의 효과만을 나타냈다.

#### DIM이 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 $\text{PGE}_2$ 생성에 미치는 영향

COX-2는 arachidonic acid로부터 prostaglandin들을 형성하는 과정을 촉매한다(25). 본 연구에서는 TPA의 처리에 의해 증가한 COX-2 단백질과 mRNA의 발현이 DIM 처리

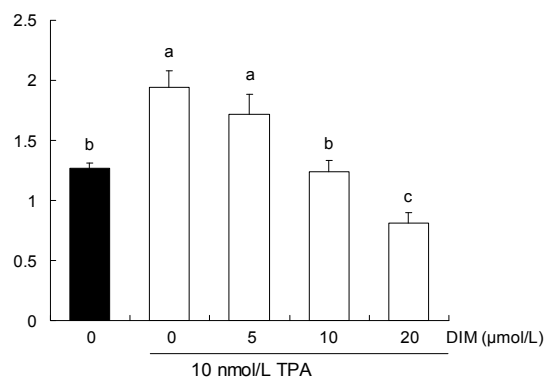


**Fig. 2.** DIM inhibits the TPA-induced expression of COX-2 in MCF-10A human mammary epithelial cells. (A) Cells were treated with 10 nmol/L TPA for the indicated time periods. Cells were lysed, and the total cell lysates were prepared for Western blotting with a COX-2 antibody. (B) Cells were plated in 100 mm dishes at  $1.5 \times 10^6$  cells each other. After 24 hr incubation, cells were treated with various concentrations (0, 5 or 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of DIM in the absence or presence of 10 nmol/L TPA for 4 hr. Total cell lysates were analyzed via Western blotting with COX-2 antibody. (C) Cells were treated with various concentrations (0, 5 or 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of DIM in the absence or presence of 10 nmol/L TPA for 3 hr. Total RNA was isolated and RT-PCR performed. Photographs of chemiluminescent detection of the blots (A, B) and ethidium bromide-stained gels (C), which were representative of three independent experiments, are shown. (D) The relative abundance of each band to its own  $\beta$ -actin was quantified and the control levels were set at 1. The adjusted mean  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) is shown with graph. Means without a common letter differ,  $p < 0.05$ .

에 의해 감소함을 관찰하였다. 따라서 세포에 TPA와 DIM을 처리하고 48시간 배양한 후 conditioned medium을 수집하여 COX-2에 의해 형성된  $\text{PGE}_2$ 의 분비량을  $\text{PGE}_2$  assay kit를 이용하여 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이  $\text{PGE}_2$ 의 분비는 TPA 처리에 의하여 약 1.5배 증가하였으며 DIM의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다.

#### DIM이 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B 신호전달 체계에 미치는 영향

유전자의 발현은 유전자의 promotor region에 결합하여 유전자의 발현을 유도하는 transcription factor에 의해 조절된다. NF- $\kappa$ B는 대표적인 transcription factor로 염증반응을

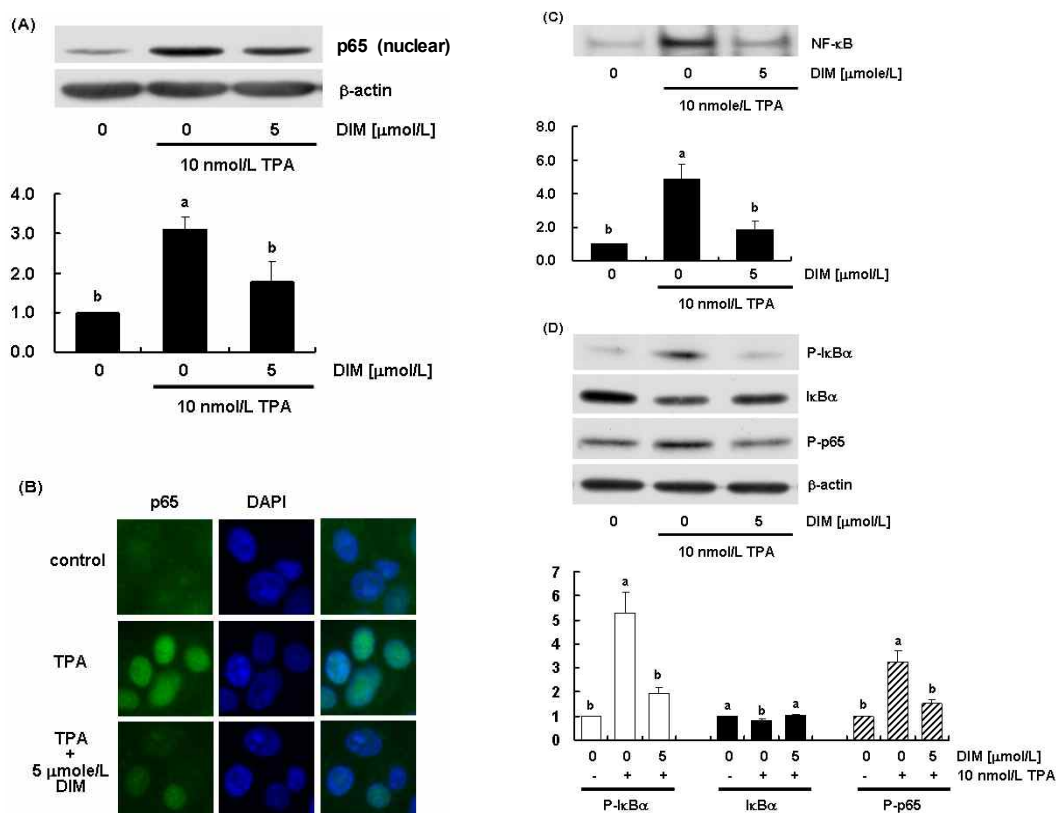


**Fig. 3.** DIM decreases the TPA-induced PGE<sub>2</sub> production in MCF-10A human mammary epithelial cells. Cells were treated with various concentrations (0, 5, 10 or 20 μmol/L) of DIM in the absence or presence of 10 nmol/L TPA for 48 hr. The media was conditioned and collected. PGE<sub>2</sub> in the conditioned media were measured using the PGE<sub>2</sub> assay kit. Each bar represents the mean ± SEM (n=6). Means without a common letter differ, p<0.05.

매개하는 COX-2의 발현도 NF-κB에 의해 조절된다(26). 위의 결과를 통해 DIM이 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현

을 억제함을 관찰하였으므로 COX-2의 발현을 조절하는 NF-κB 신호전달에 미치는 DIM의 영향을 조사하였다. NF-κB p65의 핵으로의 이동을 조사하기 위해 각각의 세포에 TPA와 DIM을 처리하고 1시간 배양한 후 세포를 모아 핵을 분리하였다. 핵 분획을 사용하여 Western blot을 수행한 결과, TPA의 처리에 의해 핵으로 이동한 NF-κB p65가 증가하였고 이는 DIM의 처리에 의해 감소하였다(Fig. 4A). 뿐만 아니라 면역염색법을 이용하여 핵으로 이동한 NF-κB p65를 염색한 결과, Western blot 결과와 마찬가지로 TPA 처리에 의해 NF-κB p65의 핵으로 이동이 증가하였고 증가된 NF-κB p65는 DIM 처리에 의해 감소하였다(Fig. 4B). 또한, NF-κB DNA binding activity를 측정하기 위해 NF-κB-specific consensus oligonucleotide(NF-κB probe)를 이용하여 EMSA를 수행한 결과, DIM은 TPA에 의해 유도된 NF-κB DNA binding activity를 현저히 감소시킴을 관찰하였다(Fig. 4C).

NF-κB는 보통 Rel protein[RelA(p65), c-Rel, RelB, NF-κB1(p50/105), NF-κB2(p52/100)]의 heterodimer 형태로 Iκ



**Fig. 4.** DIM inhibits the TPA-induced NF-κB activation in MCF-10A human mammary epithelial cells. Serum deprived cells were treated with 0 or 5 μmol/L of DIM in the absence or presence of 10 nmol/L TPA for 1 hr. (A) The nuclear fraction was prepared for Western blotting with p65 antibody. (B) Cells treated with 5 μmol/L of DIM were fixed, permeabilized, and then subjected to immunofluorescent double staining with antibody against p65. Nuclei were counterstained with DAPI. (C) For electrophoretic mobility shift assay, nuclear extracts were incubated with <sup>32</sup>P-labeled NF-κB consensus oligonucleotide for 30 min. Each sample was subjected to 5% nondenaturing gel, and the gels were dried and visualized by autoradiography. (D) Total cell lysates were analyzed via Western blotting with their relevant antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blot (A, D) and autoradiography of the dried gels (C), which were representative of 3 independent experiments, are shown. The control levels were set at 1. The adjusted means ± SEM (n=3) are shown under each blot with graph. Means without a common letter differ, p<0.05.

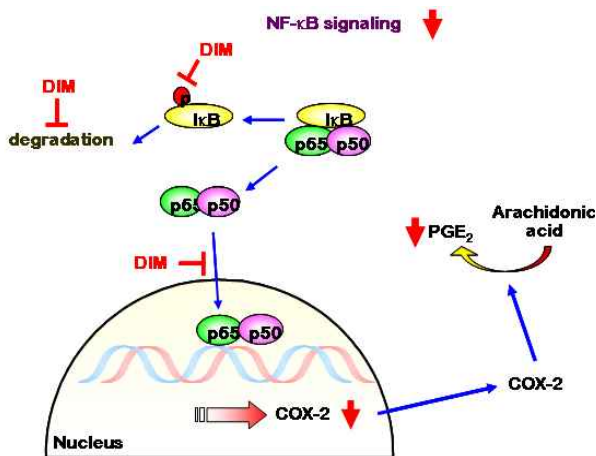


Fig. 5. A schematic representation of anti-inflammatory effect of DIM in human mammary epithelial cells.

B라는 inhibitory protein과 결합하여 불활성 상태로 세포질에 존재한다. 외부에서 자극이 오면 IκB가 인산화 되어 NF-κB에서 분리된다. IκB가 분리되어 남은 NF-κB dimer(p50/p65)는 세포질에서 핵으로 이동하여 특정 유전자의 promoter 또는 enhancer의 κB site에 부착하여 전사를 유도한다(27). 본 연구 결과 DIM은 NF-κB의 핵으로의 이동을 감소시키고 NF-κB의 DNA binding activity도 감소시켰기 때문에 DIM에 의한 IκB 인산화의 변화를 조사하였다. MCF-10A 세포에 TPA를 처리한 경우 IκB의 분해가 증가하여 total IκB 단백질 수준은 감소하였고 인산화된 IκB의 단백질 수준은 증가하였다(Fig. 4D). TPA에 의해 감소된 total IκB 단백질은 DIM 처리에 의해 증가하였고, TPA에 의해 증가된 인산화된 IκB 단백질 수준은 DIM 처리에 의해서 다시 감소하였다(Fig. 4D). 또한, TPA 처리에 의해 증가한 NF-κB p65의 인산화 형태도 DIM 처리에 의해 감소하였다(Fig. 4D).

본 연구를 통해 DIM은 인간의 유방상피세포인 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 NF-κB signaling의 활성을 억제함으로써 COX-2의 발현을 억제하여 염증반응을 조절할 수 있을 것으로 판단되며 이를 Fig. 5에 요약하여 나타내었다. 그러므로 이러한 결과들은 DIM을 염증성 질환 예방제 또는 치료제로 개발할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

## 요 약

3,3'-Diindolylmethane(DIM)은 십자화과 채소에 포함되어 있는 indole-3-carbinol(I3C)이 동물의 산성 위액에서 중합되어 생성된 물질이다. 지금까지 DIM은 유방암, 전립선암 그리고 대장암 세포주에서 항암효과가 있다고 알려져 있으며 그 기작에 대한 연구도 다양하게 진행되고 있다. 그러나 정상세포에서 암화과정 중 암의 촉진과 진행과정의 주요한 항암 표적인 항염증에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 유방상피세포인 MCF-10A 세포에 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)로 염증반응을 유도한 후 DIM이 염증작용에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 COX-2 단백질 및 mRNA 발현이 DIM 처리에 의해 현저히 감소하였다. 또한 TPA에 의해 유도된 IκB-α의 분해, p65의 핵으로의 이동, NF-κB DNA binding activity 역시 DIM의 처리에 의해 감소하였다. 이는 DIM이 인간의 유방상피세포인 MCF-10A 세포에서 TPA에 의해 유도된 NF-κB 신호전달체계의 활성을 억제함으로써 COX-2의 발현을 억제하여 염증반응을 조절함을 나타낸다. 그러므로 이러한 결과들은 DIM을 염증성 질환 예방제 또는 치료제로 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 2012년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학 육성사업의 결과이며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res* 55: 224-236.
- Arnao MB, Sanchez-Bravo J, Acosta M. 1996. Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals. *Biochem Mol Biol Int* 39: 1125-1134.
- Kunimasa K, Kobayashi T, Kaji K, Ohta T. 2010. Antiangiogenic effects of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane are associated with their differential regulation of ERK1/2 and Akt in tube-forming HUVEC. *J Nutr* 140: 1-6.
- Rogan EG. 2006. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In Vivo* 20: 221-228.
- Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim JK, Kim SG, Park JHY. 2008. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Nutr* 138: 17-23.
- Willoughby DA. 1975. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann Rheum Dis* 34: 471-478.
- Mann JR, Backlund MG, DuBois RN. 2005. Mechanisms of disease: Inflammatory mediators and cancer prevention. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 202-210.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. 2004. IKKβ links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118: 285-296.
- Surh YJ, Na HK. 2008. NF-κB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes Nutr* 2: 313-317.
- Laflamme N, Rivest S. 2001. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 15: 155-163.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K. 1994. Selective in-

- hibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *PNAS* 91: 3228-3232.
12. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. 2001. Cyclo-oxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2: 544-551.
  13. Liu SF, Malik AB. 2005. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L622-L645.
  14. Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a001651.
  15. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. 2009. NF- $\kappa$ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* 6: 327-334.
  16. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. 2006. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72: 1605-1621.
  17. Peng G, Dixon DA, Muga SJ, Smith TJ, Wargovich MJ. 2006. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog* 5: 309-319.
  18. Goel A, Boland CR, Chauhan DP. 2001. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 172: 111-118.
  19. Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Zayachivska O, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik WW, Hahn EG. 2005. Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesions via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J Gastroenterol* 11: 6450-6458.
  20. Kim EJ, Shin M, Park H, Hong JE, Shin HK, Kim J, Kwon DY, Park JHY. 2009. Oral administration of 3,3'-diindolylmethane inhibits lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells in BALB/c mice. *J Nutr* 139: 2373-2379.
  21. Kim EJ, Park H, Kim J, Park JHY. 2010. 3,3'-Diindolylmethane suppresses 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin via the downregulation of inflammatory mediators. *Mol Carcinog* 49: 672-683.
  22. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, Lee KT. 2006. Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull* 29: 985-990.
  23. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 58: 759-765.
  24. Kim JA, Kong CS, Pyun SY, Kim SK. 2010. Phosphorylated glucosamine inhibits the inflammatory response in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. *Carbohydr Res* 345: 1851-1855.
  25. Aid S, Bosetti F. 2011. Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie* 93: 46-51.
  26. Kwon KH, Barve A, Yu S, Huang MT, Kong AN. 2007. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin* 28: 1409-1421.
  27. Turco MC, Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Tassone P, Venuta S. 2004. NF- $\kappa$ B/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia* 18: 11-17.

(2012년 8월 16일 접수; 2012년 10월 10일 채택)