

커큐민에 의한 노치발현 조절에서 Sp의 역할

박선영^{1,a}, 강용규^{1,a}, 배윤희¹, 김수륜¹, 박현주², 강영순¹, 김미경², 위희준³, 장혜옥¹, 배문경², 우재석⁴, 배수경^{1*}

Role of Sp in the Regulation of Notch1 Gene Expression by Curcumin

Seon-Yeong Park^{1,a}, Yong-Gyu Kang^{1,a}, Yun-Hee Bae¹, Su-Ryun Kim¹, Hyun-Joo Park¹, Young-Soon Kang¹, Mi-Kyoung Kim², Hee-Jun Wee³, Hye-Ock Jang¹, Moon-Kyoung Bae², Jae Suk Woo⁴, and Soo-Kyung Bae^{1*}

접수: 2012년 11월 15일 / 게재승인: 2012년 12월 12일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Curcumin has diverse anticancer activities that lead to tumor growth inhibition of cancer cells and induction of apoptosis. Curcumin is involved in the regulation of multiple genes via transcription factors including NF- κ B, STATs, AP1, and SP. Notch signaling plays critical roles in maintaining the balance between cell proliferation, differentiation and apoptosis, and thereby may contribute to the development of various cancers involving breast cancer. This study was to investigate the effects of curcumin on Notch1 gene expression and to explore the underlying mechanism. Here, we found that curcumin decreased the levels of Notch1 mRNA and protein in MDA-MB-231 human breast cancer cells, along with the downregulation of Sp family genes (Sp1, Sp2, Sp3, and Sp4). The repressive effect of curcumin on Notch1 gene transcription was confirmed by performing Notch1 promoter- driven

reporter assay and three Sp-binding sites were identified on Notch1 promoter that may act as curcumin-respose elements. Moreover, treatment with mitramycin A, a specific Sp inhibitor, decreased the levels of Notch1 mRNA and protein in human breast cancer cells. Taken together, our results indicate that Notch1 gene expression is downregulated by curcumin, at least in part, through the suppression of Sp family, which may lead to apoptosis in human breast cancer cells.

Keywords: Notch, Sp, curcumin, breast cancer, MDA-MB-231

1. 서론

유방암은 잘 알려진 악성종양으로, 비정상적인 세포증식과 다른 장기로의 전이를 통해 높은 사망률을 차지하는 치명적인 병이다 [1,2]. 유방암의 치료방법으로 수술을 통한 암 부위 절제와 방사선치료 등을 통해 효과를 보고 있으나 치료 이후에 재발되는 이차성 치료에서는 항암제가 크게 효과를 나타내지 못하는 문제가 생겨 최근에는 식물에서 추출한 물질을 이용하여 암세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하려는 관심이 증가하고 있다 [3].

커큐민 (curcumin)은 인도산의 생강과에 속하는 식물인 *curcuma longa* Linn (Zingiberaceae)의 뿌리에서 추출된 폴리페놀 성분으로, 강황의 curcuminoid 중 하나이다. 식품 첨가물에서는 노란색 색소로 사용되며 향신료로도 이용되고 있으며 항산화성, 항아밀로이드 및 항염증 작용에 탁월한 효능을 보인다는 사실이 많은 연구 결과를 통해 밝혀지면서 커큐민에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있다 [4]. 특히 커큐민은 대장암, 구강암, 방광암, 췌장암, 그리고 유방암 등을 비

¹부산대학교 치의학전문대학원 치과약리학교실
1Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Yangsan Campus of Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea
Tel: +82-51-510-8253, Fax: +82-51-510-8233
e-mail: skbae@pusan.ac.kr

²부산대학교 치의학전문대학원 구강생리학교실
²Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Yangsan Campus of Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea

³서울대학교 약학대학 생화학교실
³Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

⁴부산대학교 의학전문대학원 생리학교실
⁴Department of Physiology, School of Medicine, Yangsan Campus of Pusan National University, Yangsan 626-870, South Korea

*Denotes co-first authors.

못하여 다양한 종류의 암세포와 동물모델을 이용한 실험에서 항암효과를 가지는 것으로 이미 입증된 바 있다 [5-8]. 예를 들면, 방광암세포에 대한 커큐민의 항암효과가 보고되었는데 이는 커큐민에 의해 specificity protein (Sp)의 family인 Sp1, Sp3, Sp4의 발현이 감소됨으로써 세포생존억제, 혈관신생억제, 성장촉진 유전자의 발현감소 등이 유발되기 때문이다 [6]. 또한 췌장암세포에서는 커큐민에 의한 Notch1의 발현감소가 세포 성장의 억제와 사멸을 유도한다고 알려져 있다 [7]. 특히 최근 본 연구진은 유방암 세포에 대한 커큐민의 증식억제 기능에 관한 연구결과를 발표한 바 있다 [8].

Notch signal은 초파리에서부터 사람에 이르기까지 진화론적으로 잘 보존되어 있으며 세포의 발달과 사멸 그리고 많은 기관의 배발생과 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [9]. Notch 수용체와 그 리간드들은 모두 막단백질로써 세포 외부분과 세포내부분 그리고 막내에 존재하는 부분으로 이루어져 있다. 포유류에서는 Notch 수용체 4가지 (Notch1-4)와 리간드 5가지 (Delta에 해당하는 Delta like (Dll) 1,3,4와 serrate에 해당하는 jagged 1,2)가 확인되었다. Notch signal은, 세포간 접촉에서 수용체와 리간드가 결합하게 되면 단백질 분해효소 gamma-secretase가 tNotch (total Notch)의 세포 안쪽 부분을 잘라주어 활성화 형태인 cNotch (cleaved Notch)로 바뀌면서 시작된다. 잘린 cNotch는 핵 내로 이동하여 CSL과 결합하게 되는데 그때 repressor활성을 가지던 CSL이 activator로 전환됨으로써 억제되고 있던 유전자의 전사가 활성화 된다. 최근 연구결과에 따르면 Notch 신호전달 경로 (signaling pathway)의 활성화는 유방암의 발달과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지게 되었으며 이러한 결과들은 유방암 치료에 있어서 Notch가 좋은 타겟 유전자 (therapeutic target gene)가 될 수 있음을 보여준다 [10,11].

Sp는 Sp/Klf family에 속하는 전사인자로서, 각 기관의 발생초기단계 및 암화과정에 관여한다[12]. Sp family에는 Sp1, Sp2, Sp3, Sp4가 있고 Sp1과 Sp4는 gene의 활성화제이고, Sp2는 아직 그 기능이 알려지지 않았으며, Sp3는 활성화제와 억제제의 기능을 모두 가진다고 보고되어 있다. 최근 보고에 따르면 케라티노사이트 (keratinocytes) 세포에서 klf4와 sp3 이라는 두 가지 전사인자가 함께 Notch의 발현을 조절한다고 알려져 있다 [13]. 그리고 폐암세포에서 Sp1 단백질의 DNA 결합능이 커큐민에 의해 억제되며, 방광암 세포에서는 커큐민에 의해 Sp의 발현이 감소된다고 보고되었다 [6,14].

따라서 본 연구에서는 커큐민을 처리하였을 때 유방암 세포내 Notch1의 발현 변화를 조사하고 이 과정에서 Sp 전사인자의 관련성에 대해 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

커큐민과 mithramycin A은 Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 제품으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mM stock으

로 만들어 -20°C에 보관하여 사용하였다. tNotch1 항체와 cNotch1 항체는 각각 Santa-Cruz와 Millipore에서 구입하였다. β -actin 항체는 Abcam 제품이고, Western blot analysis에 사용한 이차항체는 모두 Pierce에서 구입하였다.

2.2. 세포배양

인간 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받았다. 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, GenDEPOT)과 1% antibiotics (Penicillin-Streptomycin, GIBCO)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)을 사용하였고, 37°C로 유지되는 5% (vol/vol)의 CO₂배양기를 사용하여 배양하였다.

2.3. MTT assay

세포배양용 24 well plate에 MDA-MB-231 세포를 1×10^5 /mL로 분주하고 24시간동안 배양시킨 후 mithramycin A를 농도 별로 처리하였다. 처리 후 24시간이 지나면 0.5 mg/mL의 농도로 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 처리하여 4시간 동안 CO₂배양기에서 배양하였다. 다음 단계로, MTT시약이 들어있는 배지를 제거한 후에 DMSO를 500 μ L 넣어 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후, 96 well plate에 100 μ L씩 옮겨서 microplate reader (Dynex Technologies, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Plasmids and constructs

Genomic DNA는 정상 혈관내피세포인 HMEC (human microvessel endothelial cells)에서 분리하였으며 이를 주형으로 사람 Notch1 promoter 상의 484nt (-225+259)과 268nt (-9+259)부분을 PCR로 각각 클로닝 한 뒤 pGL3-basic vector에 삽입하여 Notch1 promoter-driven luciferase reporter vector인 p(484)luc과 p(286)luc을 제작하였다.

2.5. Transfections Luciferase assay

MDA-MB-231 세포에 lipofectamin 2000 reagents (Invitrogen)을 사용하여 p(484)luc과 p(286)luc 벡터를 transfection 하였으며, 48시간 뒤에 세포를 lysis하였다. Mithramycin A를 처리하여 프로모터 활성을 조사하는 실험의 경우엔, reporter vector를 세포에 transfection하고 24시간 뒤에 mithramycin A를 처리하였으며, 24시간 후 세포를 lysis 하였다. Luciferase assay kit (Promega)와 luminometer (Tuner Biosystems)를 사용하여 luciferase 활성도를 측정하였다.

2.6. Western blot analysis

MDA-MB-231 세포에 60 μ l lysis buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 120 mM NaCl and 0.1% NP-40 with protease inhibitor cocktail (Sigma))를 처리하여 단백질을 분리하였고, 단백질은 30 μ g/lane으로 SDS/PAGE에서 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech)에 transfer하였다. 그리고 5% skim milk에 blocking을 하였고

0.1% tween-20이 들어있는 PBS에 1차 항체와 2차 항체를 순차적으로 처리하여 적당한 시간동안 반응시킨다. Enhanced chemiluminescence (ECL, amersham Pharmacia Biotech) 용액을 사용하여 암실에서 X-ray 필름에 감광시켜 특정 단백질 양을 분석하였다.

2.7. Total RNA Reverse Transcription-PCR

Total RNA는 MDA-MB-231 세포에 TRIzol reagent kit (Invitrogen)를 처리하여 분리하였고, cDNA는 2 µg의 total RNA를 사용하여 reverse transcription kit (Promega)로 합성하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide primers는 다음과 같다.

Notch1, (559 bp)	5'-GCAACAGCTCCTTCCACTTC-3'와 5'-GCCTCAGACACTTTGAAGCC-3'
GAPDH, (550 bp)	5'-GACCACAGTCCATGCCATCAC-3'와 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGT-3'
Sp1, (427 bp)	5'-TTGAAAAAGGAGTTGGTGGC-3'와 5'-TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG-3'
Sp2, (337 bp)	5'-TGCCACTGCTGCTGTGAGTC-3'와 5'-CCGCCTGGTACTGGATATTGG-3'
Sp3, (468 bp)	5'-CCAGGATGTGGTAAAGTCTA-3'와 5'-CTCCATTGTCTCATTCCAG-3'
Sp4, (263 bp)	5'-CAGGTGCTTATCCGGGCTCCA-3'와 5'-GTTGGCAACGCTCACTGTCTG-3'

조건은 cDNA 합성 후에 Notch1, Sp1, Sp3는 94°C에서 30s, 57°C에서 30s 그리고 72°C에서 30s으로 28 cycles 그리고 Sp2, Sp4는 94°C에서 30s, 60°C에서 30s 그리고 72°C에서 30s으로 28 cycles의 조건으로 PCR 반응을 진행하였다. PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

2.8. 통계처리

본 실험에 대한 실험결과는 세 번 실험하여 얻어진 평균치를 나타내었고 대조군의 값을 100으로 하여 실험군의 상대적 값을 %로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MDA-MB-231 Notch1

식물 유래 물질 중 하나인 커큐민은 카레의 주성분인 강황에서 추출한 색소성분으로 다양한 종류의 종양에 대해 항암효과를 가지며 이는 암세포 증식을 억제하거나 세포자멸사를 유도하는 기전에 의한 것으로 보고되어 있다 [4-7]. 최근 본 연구진은 커큐민 처리에 의해 유방암세포 MDA-MB-231의 세포자멸사가 유도됨을 보고한 바 있다 [8]. 따라서 본 연구에서는 커큐민 처리에 의한 MDA-MB-231의 세포자멸사 유도과정에서 유방암 세포의 증식 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 Notch1 유전자의 발현 변화를 조사하였다. 먼저 이를 위하여 다양한 농도와 시간으로 커큐민을

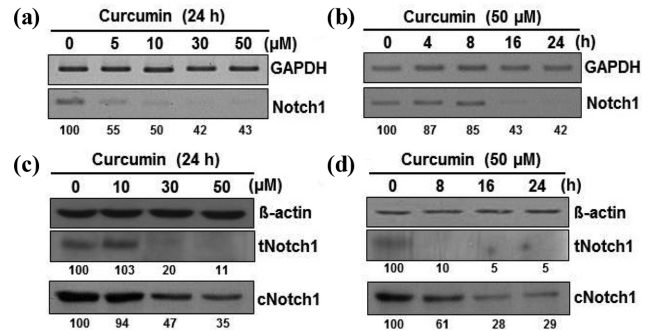


Fig. 1. Effects of curcumin on Notch1 expression. MDA-MB-231 cells were plated at 5×10^4 cells per well of 24-well plate, and incubated for 24 h. The cells were treated with variable concentrations of curcumin for 24 h (a and c) and 50 µM curcumin for the indicated times (b and d). Total RNAs were isolated and then analyzed by RT-PCR using specific primers to human Notch1. GAPDH served as an internal control (a and b). Cell lysates were subjected to Western blotting for total Notch1 (tNotch1) and cleaved Notch1 (cNotch1). β-actin served the loading control (c and d). The density of the control bands (untreated) was set to 100%.

처리한 뒤 세포내 Notch1 유전자의 발현 변화를 RT-PCR과 Western blot analysis 방법으로 확인하였다.

커큐민은 5 µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM으로 24시간 처리하였으며 농도가 증가함에 따라 MDA-MB-231 세포내에서 Notch1의 mRNA양이 점점 감소하였고, 50 µM에서는 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1(a)). 그리고 50 µM의 커큐민을 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 간격으로 처리하였을 때 시간이 지남에 따라 Notch1의 mRNA의 양이 감소하였고 24시간에서는 현저히 감소하였다 (Fig. 1(b)). 또한 Notch1의 단백질 양의 변화를 알기 위해 Western blot analysis를 실시하였다. 그 결과, 커큐민 농도 30 µM에서부터 Notch1의 발현이 감소하였으며 50 µM에서는 급격한 감소를 나타내었다 (Fig. 1(c)). 또한 50 µM 커큐민 처리한 경우 8시간부터 급격한 감소를 관찰할 수 있었고 이러한 양상은 24시간째까지 지속되었다 (Fig. 1(d)). 또한 total form인 tNotch1 단백질뿐만 아니라 Notch1의 active form인 cNotch1의 단백질 양도 감소함을 관찰하였다 (Fig. 1(c),(d)). 최근 연구에 의하면 식도암세포에 처리된 커큐민은 세포의 사멸을 유발하는데 이때 Notch signaling 활성이 감소되며 이는 tNotch1에 작용하여 cNotch1으로의 전환에 관여하는 효소인 γ-secretase의 구성단백질인 Presenilin 1과 Nicastrin의 발현 감소 때문인 것으로 보고되었다 [15]. 따라서 유방암세포를 사용한 본 연구에서 활성화형태인 cNotch1 단백질의 감소가 커큐민에 의한 tNotch1의 발현감소로 인한 것인지 또는 gamma-secretase의 활성감소 때문인지에 대해서는 향후 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각한다.

3.2. 커큐민에 의한 Notch1의 발현조절 기전 규명

커큐민에 의해 발현이 감소하는 Notch1 유전자의 발현조절 기전을 규명하기 위해 Notch1 promoter-driven reporter vector

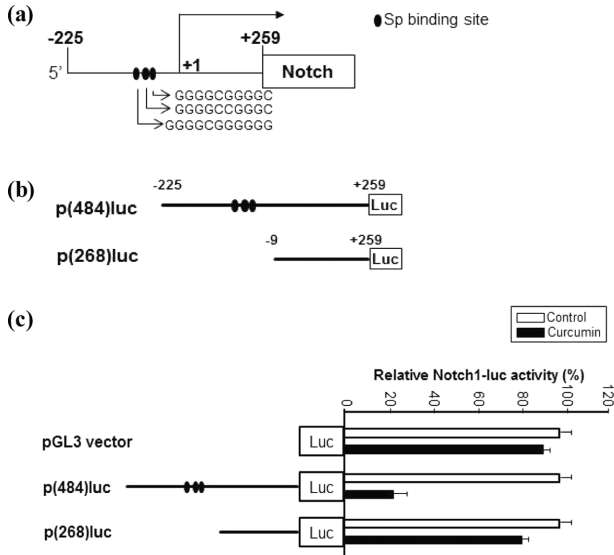


Fig. 2. Localization and identification of curcumin-response elements on the Notch1 promoter. (a and b) Schematic representation of the human Notch1 promoter containing three putative Sp-binding sites that were identified by the computer database TRANSFAC and the Notch1 reporter vector. (c) MDA-MB-231 cells were transiently transfected with each of Notch1 reporter vectors and pCMV- β -galactosidase and then treated with curcumin (50 μ M) for 24 h. Cell lysates were then subjected to β -galactosidase enzyme assay and were tested for luciferase activity by using an assay kit (Promega) and luminometer (Turner Designs). The relative level of promoter activation in each experiment was calculated by dividing the luciferase activity by β -galactosidase activity.

를 제작하였다. PCR방법으로 클로닝 한 Notch1 promoter 영역을 pGL3-basic vector에 삽입하여 p(484)luc과 p(268)luc을 각각 제작하였다 (Fig. 2(a),(b)). MDA-MB-231 세포에 커큐민을 처리하였을 때 각각의 luciferase 활성이 어떻게 변화하는지를 조사하였으며 그 결과, p(484)luc의 경우는 curcumin에 의해 luciferase의 활성감소를 보였던 반면 p(268)luc는 커큐민에 대한 반응이 나타나지 않았다 (Fig. 2(c)). 이러한 결과로 미루어보아 p(484)luc의 Notch1 promoter 영역내에 curcumin-response element가 존재하는 것으로 예상되어 이 영역의 염기서열을 분석하였으며 그 결과, Sp 전사인자 결합부위로 예상되는 곳이 총 세군데 (-79에서 -69 (5'-GGG GCGGGGG-3')까지, -56에서 -47 (5'-GGGGCCGGGC-3')까지, 그리고 -46에서 -37 (5'-GGGGCGGGGC-3')까지) 존재함을 확인하였다 (Fig. 2(a),(b)). 이전 연구결과에 따르면 커큐민에 의해 전사인자 NF-kB의 발현 및 활성이 감소 [16] 되었기 때문에 Notch1 유전자 발현감소에 대한 NF-kB의 관련성에 관해 조사해 보았다. 하지만 커큐민에 의해 그 활성이 감소하는 p(496)luc의 Notch1 promoter 영역 내에는 NF-kB 결합부위가 존재하지 않으므로 적어도 NF-kB가 직접적으로는 관여하지 않을 것이라고 생각한다. 따라서 이상의 연구결과를 통해 커큐민에 의한 Notch1 발현 감소에 Sp family가 관여할 가능성이 높음을 알 수 있었다.

3.3. 유방암 세포 MDA-MB-231에서 커큐민이 Sp family 발현에 미치는 영향

커큐민처리 시 Sp family의 발현변화 양상을 조사하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 커큐민을 농도별 (5 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M) 그리고 시간별 (4시간, 8시간, 16시간, 24시간)로 처리하였을 때 Sp family 즉 Sp1, Sp2, Sp3, 그리고 Sp4 유전자들 모두, 커큐민 농도가 증가할수록 그리고 처리시간이 증가할수록 그 발현이 감소함을 확인하였다 (Fig. 3(a),(b)). 따라서 본 연구결과는 유방암세포에 커큐민을 처리하였을 때 유도된 Notch1의 발현감소는 Sp 전사인자들의 발현 감소와 관련이 있음을 시사해 준다. 최근의 연구결과들에 의하면 커큐민 처리 시 방광암세포의 증식억제가 유발되고 간성상세포내 srebp-2유전자의 발현이 감소되는데 이러한 현상들은 커큐민에 의한 Sp family의 발현 및 활성 감소와 밀접한 관련성이 있다고 알려져 있다 [6,17]. 또한 케라티노사이트의 Notch1유전자 발현조절에 Sp3가 관여한다는 연구결과도 있다 [13]. 하지만 유방암세포를 사용한 본 연구에서는 Sp family 모두가 커큐민에 의해 발현이 감소 (Fig. 3) 되는 것으로 나타났기에 이들 모두가 Notch1 발현 조절에 관여하는지 아니면 이 중에 특정인자만이 Notch1 유전자 발현조절에 직접적으로 관여하는지에 대해서는 정확히 알 수 없으므로 향후 이에 대한 추가적인 실험을 해야 할 것으로 생각한다.

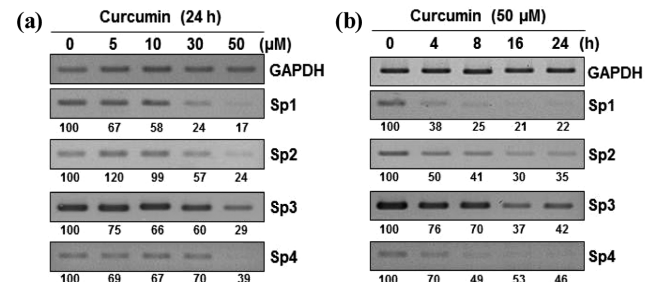


Fig. 3. Effects of curcumin on Sp family expression. MDA-MB-231 cells were plated at 5×10^4 cells per well of 24-well plate, and incubated for 24 h. The cells were treated with variable concentrations of curcumin for 24 h (a) and 50 μ M curcumin for the indicated times (b). Total RNAs were isolated and then analyzed by RT-PCR using specific primers to human Sp1, Sp2, Sp3, and Sp4, respectively. GAPDH served as an internal control. The density of the control bands (untreated) was set to 100%.

3.4. 유방암세포 MDA-MB-231에서 mithramycin A이 Notch1 발현에 미치는 영향

상기의 luciferase reporter assay의 결과를 통해 Sp family가 Notch1의 발현조절에 관여할 것으로 예상되므로 Sp 전사인자의 억제제인 mithramycin A을 처리하였을 때 Notch1의 발현이 감소하는지를 조사하였다. 먼저 MTT assay를 통해 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 mithramycin A 농도가 25~50 nM이며 100 nM의 경우엔 생존율이 50% 정도 감소함을 밝혔고 (data not shown) 이러한 실험결과에 근거하여 이후

의 실험에는 25 nM과 50 nM 농도의 mithramycin A를 사용하였다. MDA-MB-231 세포에 mithramycin A를 처리한 뒤 시간별로 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 4시간, 8시간, 12시간, 16시간, 24시간으로 mithramycin A를 처리하면 시간이 지남에 따라 Notch1의 mRNA의 양이 감소하고 24시간에서 가장 큰 감소를 나타내는 것을 확인하였다 (Fig. 4(a)). 또한 mithramycin A에 의한 Notch1 단백질 발현변화를 조사하기 위하여 Western blot analysis를 실시한 결과, mRNA 발현양상과 유사한 Notch1 단백질 발현 감소를 확인할 수 있었다 (Fig. 4(b)). Notch1 유전자의 promoter 영역 484 bp를 삽입한 reporter vector p(484)luc를 사용하여 mithramycin A 처리에 의한 프로모터 활성도 변화를 조사하였다. 그 결과 50 nM의 mithramycin A를 처리하였을 때 50% 정도의 Notch1 프로모터 활성의 감소효과를 나타내었다. 따라서 MDA-MB-231 유방암세포에서 높은 발현을 보이는 Notch1의 발현이 Sp 전사인자의 억제제인 mithramycin A 처리에 의해 감소함을 확인한 본 연구결과를 통해 유방암세포 내 Notch1 유전자의 전사조절 과정에 Sp family가 관여할 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

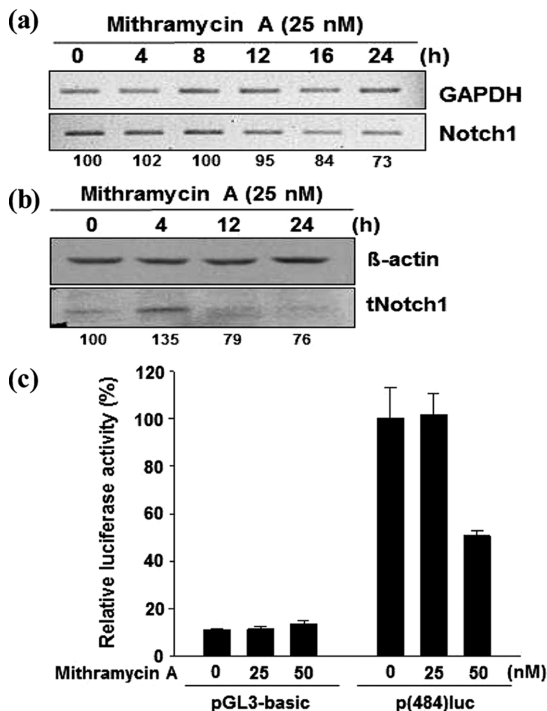


Fig. 4. Effects of Mithramycin A on Notch1 expression. (a,b) MDA-MB-231 cells were treated with 25 nM Mithramycin A for the indicated times. (a) Total RNAs were isolated and then analyzed by RT-PCR using specific primers to human Notch1. GAPDH served as an internal control. (b) Cell lysates were subjected to Western blotting for Notch1. β-actin served the loading control. The density of the control bands (untreated) was set to 100%. (c) MDA-MB-231 cells were transfected with p(484)luc and pCMV-β-galactosidase vector, and then treated with different concentrations of mithramycin A (0, 25, and 50 nM). After 24 h, the cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activity.

4. 결론

커큐민이 유방암 세포의 Notch1 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- ① 커큐민 처리에 의해 Notch1의 발현이 감소한다.
- ② 커큐민에 반응을 나타내는 Notch1 promoter 영역 내에는 세 개의 Sp-결합부위가 있다.
- ③ 커큐민 처리에 의해 Sp family의 발현이 감소한다.
- ④ Sp 전사인자의 억제제인 mithramycin A를 처리하면 Notch1의 발현이 감소한다.

이상의 결과를 통해 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포에서 커큐민에 의한 Notch1의 발현 감소는 적어도 Sp pathway를 통해 이루어짐을 알 수 있다. 따라서 커큐민에 의한 Sp-Notch1 axis의 활성 감소는 MDA-MB-231 유방암 세포의 증식억제 및 세포자멸사를 일으키는 하나의 경로로 작용할 가능성이 클 것으로 생각한다.

감사

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

1. McSherry, E. A., S. Donatello, A. M. Hopkins, and S. McDonnell (2007) Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 64: 3201-3218.
2. Mego, M., S. A. Mani, and M. Cristofanilli (2010) Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7: 693-701.
3. Moiseeva, E. P. and M. M. Manson (2009) Dietary chemopreventive phytochemicals: too little or too much? *Cancer. Prev. Res.* 2: 611-616.
4. Menon, V. P. and A. R. Sudheer (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 105-125.
5. Kunnumakkara, A. B., P. Anand, and B. B. Aggarwal (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett.* 269: 199-225.
6. Chadalapaka, G., I. Jutooru, S. Chintharlapalli, S. Papineni, R. Smith 3rd, X. Li, and S. Safe (2008) Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. *Cancer Res.* 68: 5345-5354.
7. Wang, Z., Y. Zhang, S. Banerjee, Y. Li, and F. H. Sarkar (2006) Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer.* 106: 2503-2513.
8. Kang, Y. G., S. R. Kim, M. K. Bae, I. Yoon, H. O. Jang, and S. K. Bae (2011) Effects of curcumin on growth inhibition and visfatin

- expression in human breast cancer cells. *Cancer Prevention Research*. 16: 110-117.
9. Bray, S. J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 678-689.
 10. Al-Hussaini, H., D. Subramanyam, M. Reedijk, and S. S. Sridhar (2011) Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 10: 9-15.
 11. Reedijk, M. (2012) Notch signaling and breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 727: 241-257.
 12. Safe, S. and M. Abdelrahim (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur. J. Cancer*. 41: 2438-2448.
 13. Lambertini, C., S. Pantano, and G. P. Dotto (2010) Differential control of Notch1 gene transcription by Klf4 and Sp3 transcription factors in normal versus cancer-derived keratinocytes. *PLoS One*. 5: e10369.
 14. Cui, J., X. Meng, X. Gao, and G. Tan (2010) Curcumin decreases the expression of Pokemon by suppressing the binding activity of the Sp1 protein in human lung cancer cells. *Mol. Biol. Rep.* 37: 1627-1632.
 15. Subramaniam, D., S. Ponnuram, P. Ramamoorthy, D. Standing, R. J. Battafarano, S. Anant, and P. Sharma (2012) Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling. *PLoS One*. 7: e30590.
 16. Kim, S. R., H. J. Park, Y. H. Bae, S. C. Ahn, H. J. Wee, I. Yun, H. O. Jang, M. K. Bae, and S. K. Bae (2012) Curcumin down-regulates visfatin expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Endocrinology*. 153: 554-563.
 17. Kang, Q. and A. Chen (2009) Curcumin inhibits srebp-2 expression in activated hepatic stellate cells in vitro by reducing the activity of specificity protein-1. *Endocrinology*. 150: 5384-5394.