

인체 방광암 및 백혈병세포에서 genistein에 의한 세포주기 G2/M arrest 유발에 관한 연구

김의겸¹ · 명유호¹ · 송관성¹ · 이기홍¹ · 류충호² · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실 및 대학원 바이오물질제어학과, ¹한국과학영재학교, ²경상대학교 농과대학 식품공학과

Received March 15, 2006 / Accepted April 10, 2006

Induction of G2/M Arrest of the Cell Cycle by Genistein in Human Bladder Carcinoma and Leukemic Cells. Eu Kyum Kim¹, You Ho Myong¹, Kwan Sung Song¹, Ki Hong Lee¹, Chung-Ho Rhu² and Yung Hyun Choi*. *Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine and Department of Biomaterial Control, Dongeui University Graduate School, Busan 614-052, ¹Korea Science Academy, Busan 614-822; ²Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea* – Genistein, a natural isoflavonoid phytoestrogen, is a strong inhibitor of protein tyrosine kinase and DNA topoisomerase activities. There are several studies documenting molecular alterations leading to cell cycle arrest and induction of apoptosis by genistein as a chemopreventive agent in a variety of cancer cell lines; however, its mechanism of action and its molecular targets on human bladder carcinoma and leukemic cells remain unclear. In the present study, we have addressed the mechanism of action by which genistein suppressed the proliferation of T24 bladder carcinoma and U937 leukemic cells. Genistein significantly inhibited the cell growth and induced morphological changes, and induced the G2/M arrest of the cell cycle in both T24 and U937 cells with a relatively stronger cytotoxicity in U937. The G2/M arrest in T24 cells was associated with the inhibition of cyclin A, cyclin B1 and Cdc25C protein expression without alteration of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21(WAF1/CIP1). However, the inhibitory effects of genistein on the cell growth of U937 cells were connected with a marked inhibition of cyclin B1 and an induction of Cdk inhibitor p21 proteins by p53-independent manner. These data suggest that genistein may exert a strong anti-cancer effect and additional studies will be needed to evaluate the different mechanisms between T24 and U937 cells.

Key words – Genistein, T24, U937, cell cycle, G2/M arrest

서 론

암의 발생은 식생활의 습관과 매우 밀접한 연관이 있음이 그동안의 다양한 역학적 조사에서 입증되어왔으며, 암의 예방에 식품 유래 천연물의 중요성이 대두되어지고 있다. 그중 대두에는 발암의 위험 요소를 줄일 수 있는 다양한 천연물이 풍부하게 함유되어 있으며, 그에 대한 항암 활성 연구가 꾸준히 이루어지고 있다[24,32,35]. 대두의 isoflavone 성분 중 가장 풍부한 genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)이 강력한 항암활성을 가질 것이라는 증거는 Akiyama et al. [1]에 의하여 암화과정이나 분화 조절에 중요한 역할을 하는 protein tyrosine kinase (PTK) 활성을 저하시킨다고 보고됨으로서 처음 제시되었다. 그 후 genistein은 DNA topoisomerase의 활성과 ribosomal S6 kinase 활성을 저하시킴으로서 protein-linked DNA strand를 절단할 수 있음이 보고된 바 있다 [7,22]. 또한 genistein은 강력한 혈관신행 억제[14] 및 전이 차단 효능[28]이 있음이 알려지게 되었고, 동물 실험에서 암화 억제에 매우 효과적임이 밝혀졌다[28,38]. 비록 genistein

의 효능이 완전히 밝혀지지지는 않았지만, 암세포를 대상으로 실시된 많은 선행연구들에서 분화 및 세포사멸 유도를 통한 다양한 종류의 암세포 증식을 억제할 수 있음이 알려지게 되었으나[2,5,6,31,32,34-37,40], 인체 방광암 및 백혈병 세포를 대상으로 한 세포주기 조절 측면에서의 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

세포의 증식 측면에서 암은 세포주기 진행의 조절이 통제되지 않은 세포의 집단으로 정의할 수 있다. 따라서 특정 항암제 및 암예방제의 개발을 위하여 이들이 암세포의 세포주기 진행에 어떤 영향을 미치는지를 조사하는 것은 가장 기본적인 사항이다[10,26]. 또한 암세포에 따라 genetic background가 매우 다양하기 때문에 세포주에 따른 감수성의 차이를 밝히는 것도 암세포의 항암제 약제 내성을 극복하기 위해 필수적으로 선행되어야 하는 사항이다. 세포주기의 진행은 연속적인 cyclin-dependent kinases (Cdks)의 활성과 비활성의 정도에 의하여 조절된다. Cdks는 세포주기 특이적인 cyclin과의 결합에 의하여 활성화되는데, D-type cyclin과 cyclin E는 G1기의 진행에 필수적으로 요구된다. 즉 세포가 초기 G1기에 접어들기 위해서는 cyclin D/Cdk4 (and/or Cdk6) complex 형성이 이루어져야하며[23,25], G1 후기에서 S기로의 진입을 위해서는 cyclin E/Cdk2 complex 형성이 선

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

행되어야 한다[18,30]. Cyclin A는 G1 후기에서부터 발현되기 시작하여 S 및 G2기에 발현이 증가되며, cyclin B는 G2기에서 M기로의 전이 과정에 발현이 최고로 증가되는데, cyclin A는 Cdk2와 cyclin B는 Cdc2와 complex를 형성하면서 활성화된다[15,16]. Cdk는 세포증식 억제 신호에 따라 발현이 증가되는 Cdk inhibitor와 결합을 함으로서 그들의 활성이 억제될 수 있다[12,27]. Cdk inhibitor 중 특히 p21 (WAF1/CIP1)은 DNA 손상과 연계된 종양 억제 유전자 p53 발현 증가에 따라 발현이 조절될 수 있는 것으로 처음 알려졌다[9,42], 최근 연구에 의하면 p21은 세포증식 억제뿐만 아니라 세포사멸 및 분화의 유도를 촉진할 수도 있다[17,42]. 또한 p21은 세포주기 진행에 필수적인 proliferating-cell nuclear antigen의 작용을 억제함으로써 DNA 복제를 억제할 수도 있으며[41], p53 비의존적으로도 조절 받을 수 있는 것으로 알려져 있다[9,17,41,43].

본 연구에서는 비교적 genistein의 효능에 관한 조사가 이루어지지 않은 인체 방광암(T24) 및 백혈병(U937) 세포를 대상으로 그들의 증식에 미치는 genistein의 영향을 주로 세포주기 조절 측면에서 조사하여 선행 연구 결과들과 비교하였다.

재료 및 방법

세포배양, genistein 처리 및 형태 관찰

실험에 사용한 T24 및 U937 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분양 받았으며, 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 실험에 사용된 genistein은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 100 mM의 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 용해하여 -20°C에 보관하였고, 처리 전 배지에 희석하여 사용하였다. Genistein 처리에 따른 형태 변화 관찰을 위해서 세포 배양용 100 mm petri dishes에 1x10⁵개/ml 정도로 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein을 적정농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율 하에서 관찰하였다.

MTT assay에 의한 세포 증식억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 5x10⁴개/ml 정도로 세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 genistein을 적정농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지로 희석하여 적정량 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 DMSO로 well에

생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램(SPSS Ins.)으로 구하였다.

DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

정상 및 genistein을 처리한 배지에서 48시간 동안 배양시킨 세포를 모아서 PBS로 충분히 씻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포를 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol을 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포들을 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실, 4°C에서 1시간 동안 염색하였다. 다시 PBS로 두 번 washing 과정을 거친 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. RT-PCR을 이용하여 분석을 시도한 유전자의 종류는 Table 1에 나타낸 바와 같으며, 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다.

Western blotting 분석

정상 및 genistein이 처리된 배지에서 자란 세포들을 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]로 용해한 후, 고속원심분리로 세포내 잔사물을 제거시킨 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name	Sequence
GAPDH	Sense 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
cyclin A	Sense 5'-TCC AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA-3'
	Antisense 5'-TCC TCA TGG TAG TCT GGT ACT TCA-3'
cyclin B1	Sense 5'-AAG AGC TTT AAA CTT TGG TCT GGG-3'
	Antisense 5'-CTT TGT AAG TCC TTG ATT TAC CAT G-3'
Cdc2	Sense 5'-GGG GAT TCA GAA ATT GAT CA-3'
	Antisense 5'-TGT CAG AAA GCT ACA TCT TC-3'
Cdk2	Sense 5'-GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG-3'
	Antisense 5'-GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT-3'
p53	Sense 5'-GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC-3'
	Antisense 5'-CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG-3'
p21	Sense 5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense 5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'

and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 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 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

결 과

Genistein에 의한 T24 및 U937 세포의 증식 억제

T24 인체 방광암 및 U937 백혈병 세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 조사하기 위하여 이들 세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 MTT assay로 비교 조사하였다. Fig. 1은 다양한 농도의 genistein 처리 48시간 후의 결과로서 두 세포주에서 모두 genistein 처리 농도 의존적으로 증식 억제 효과를 관찰할 수 있었으나, T24 보다 U937 세포가 genistein에 5배 이상 감수성이 높음을 알 수 있었다. 이러한 암세포의 증식 억제 효과는 genistein의 농도 증가에 따른 심한 형태적 변형과도 연관성이 있었다(Fig. 2).

Genistein에 의한 T24 및 U937 세포의 G2/M arrest

다음은 genistein의 암세포 증식억제 현상이 특정 세포주기 관련 현상과의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 PI 염색 후 flow cytometry 분석을 실시한 결과는 Fig. 3A에 나타낸 바와 같다. Fig. 3A의 결과에서 sub-G1기를 제외한 나머지 세포군을 대상으로 세포주기 각각의 시기에 해당

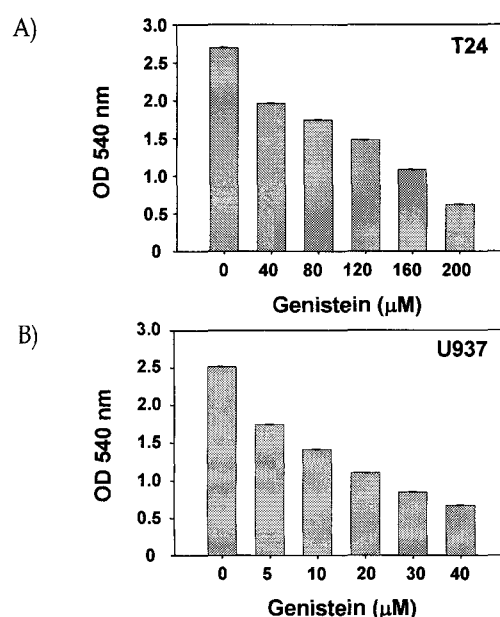


Fig. 1. Anti-proliferative effects of genistein in T24 (A) human bladder carcinoma and U937 (B) human leukemic cells. Cells were seeds as described in materials and methods, and treated with various concentrations of genistein. After 48 h incubation with genistein, MTT assay was performed. Results are expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments.

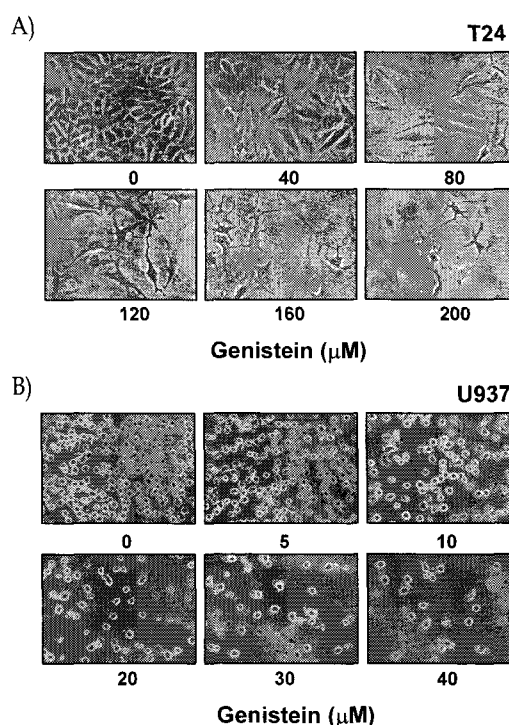


Fig. 2. Morphological changes by genistein treatment in T24 (A) human bladder carcinoma and U937 (B) human leukemic cells. Cells were treated with various concentrations of genistein. After 48 h incubation with genistein, cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

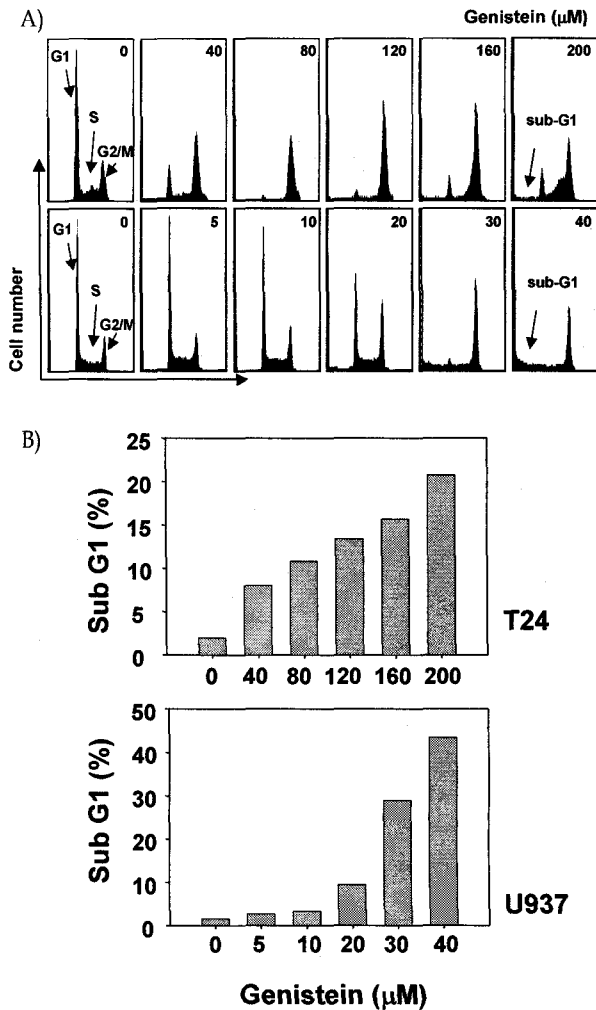


Fig. 3. (A) DNA-fluorescence histogram of T24 human bladder carcinoma and U937 human leukemic cell nuclei after treatment with genistein. Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of genistein. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry. (B) Increase of sub-G1 cell population by genistein treatment in T24 and U937 cells. Cells were exposed for 48 h with increasing concentration of Genistein. Then the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. Data are means average of two separate experiments.

되는 세포의 빈도를 정량화한 결과는 Table 2에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 정상 조건에서 배양된 U937 세포의 경우 G1기에 해당되는 세포의 빈도가 약 51% 정도인데 비하여 S 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 각각 약 29% 및 21% 정도였다. 그러나 genistein이 처리된 배지에서 배양된

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of T24 and U937 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of genistein

Cell line	Genistein (μM)	% of cell		
		G1	S	G2/M
U937	0	50.75	28.61	20.64
	5	50.43	28.80	20.77
	10	45.66	28.38	25.96
	20	37.49	25.85	36.66
	30	10.11	17.14	72.75
	40	9.44	19.24	71.32
T24	0	53.95	19.89	26.16
	40	18.99	11.48	69.53
	80	3.75	3.19	93.06
	120	5.68	4.46	89.86
	160	9.14	10.17	80.69
	200	15.37	28.39	56.24

Exponentially growing cells at 50% confluency were treated for 48 h with indicated concentrations of genistein. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI, and analyzed by flow cytometry.

U937 세포의 경우 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 genistein 처리 농도가 증가할수록 매우 증가되어 20 μM 및 40 μM 처리군에서 각각 약 37% 및 71%로 나타났으며, 상대적으로 G1기 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 genistein 처리에 따른 G2/M arrest 현상은 T24 세포에서도 같은 결과를 보여 주었다. 또한 Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이 genistein의 처리 농도가 증가될수록 apoptosis 유발군으로 추정할 수 있는 sub-G1기의 빈도가 점차 증가함을 알 수 있었기에 이를 정량적으로 비교한 결과는 Fig. 3B에 나타낸 바와 같다. Fig. 3B의 결과에서 알 수 있듯이 genistein의 apoptosis 유발의 정도에서도 T24 세포보다 U937 세포에서 매우 감수성이 높음을 알 수 있었다.

G2/M기 조절 관련 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 genistein의 영향

이상의 결과에서 감수성의 차이는 있었으나 genistein 처리에 의한 암세포의 증식억제는 G2/M arrest 유발과 연관성이 있었기에 세포주기 G2/M 조절 관련 cyclins 및 Cdks의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. Fig. 4A 및 B의 RT-PCR 및 Western blotting의 결과에서 나타낸 바와 같이 cyclin B1의 경우 T24 및 U937 세포에서 전사 및 번역 수준에서 genistein 처리 농도 의존적으로 발현이 감소되었으나, cyclin A의 경우 전사 수준에서 큰 변화 없이 번역 수준에서 서로 다른 결과를 보여 주었다. 즉 T24 세포에서는 cyclin A의 발현이 감소되었으나 U937 세포에서의 경우 genistein

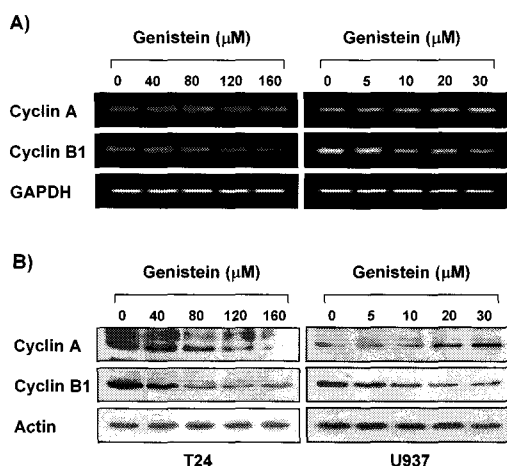


Fig. 4. Effects of genistein on the levels of cyclin A and cyclin B1 expression in T24 human bladder carcinoma and U937 human leukemic cells. (A) Cells were incubated with genistein for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using cyclin A and cyclin B1 primers. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-cyclin A and anti-cyclin B1 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

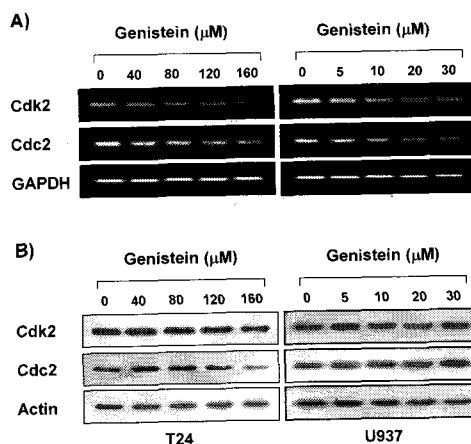


Fig. 5. Effects of genistein on the levels of Cdk2 and Cdc2 expression in T24 human bladder carcinoma and U937 human leukemic cells. (A) Cells were incubated with genistein for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using Cdk2 and Cdc2 primers. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-Cdk2 and anti-Cdc2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

처리 농도가 증가될수록 cyclin A의 발현은 증가되었다. Cdk2의 경우, T24 세포에서 Cdc2의 경우를 제외하고 단백질 수준에서 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 5). 역시 G2/M기 조절에 중요한 역할을 하는 Wee1 단백질 발현의 경우는 두 세포주에서 genistein 처리에 따른 큰 차이가 없었으나 U937 세포에서와는 달리 T24 세포에서 genistein의 처리에 따라 Cdc25C의 발현과 활성이 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 6).

종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 genistein의 영향

다음은 세포증식 억제 인자에 해당되는 유전자 중 세포주기 조절과 가장 밀접한 관련을 가지는 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용된 T24 세포는 정상 p53 유전자를 가지지만[8], U937 세포는 p53 유전자가 결손된 세포주이다[4]. Fig. 7의 결과에서 볼 수 있듯이 T24 세포에서 genistein 처리에 의하여 p53 및 p21 유전자 모두 전사 및 번역 수준에서 큰 차이가 없었다. 그러나 p53이 결손된 U937 세포에서는 genistein 처리에 따라 p21의 단백질 수준에서의 발현 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 T24 세포에서 genistein 처리에 따른 세포증식 억제에 두 유전자는 큰 관여를 하는 것 같지 않으며, U937 세포에서 p21 단백질의 발현 증가가 p53 비의존적으로 일어날 수 있음을 의미한다.

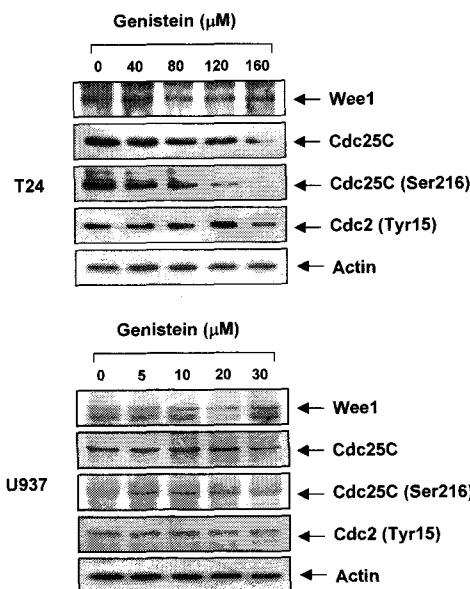


Fig. 6. Effects of genistein on the levels of Wee1 and Cdc25C expression, and Cdc2 phosphorylation in T24 human bladder carcinoma and U937 human leukemic cells. After 48 h incubation with genistein, cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

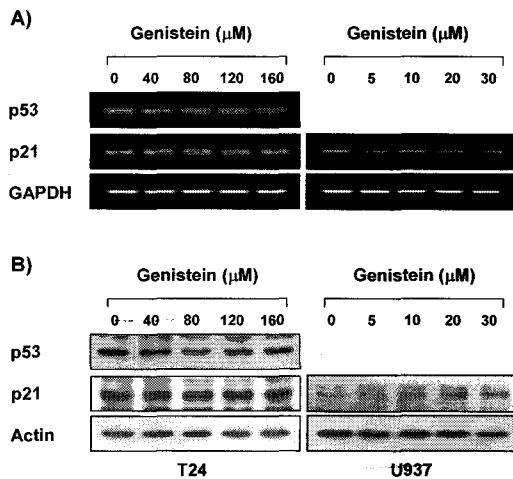


Fig. 7. Effects of genistein on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 expression in T24 human bladder carcinoma and U937 human leukemic cells. (A) Cells were incubated with genistein for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells were lysed, and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

논 의

다양한 암세포들을 대상으로 이루어진 최근 연구의 결과들에 의하면 대두에 다량으로 함유되어 있는 isoflavonoid phytoestrogen 계열인 genistein은 세포주기 G2/M arrest를 유발하는 것으로 보고되어지고 있다. 이는 G1 arrest를 일으키는 daidzein와 같은 isoflavones 이나 다른 flavones에 비하여 매우 특이적인 현상이지만[25,32,44], 그에 관한 분자생물학적 기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 상대적으로 연구가 미비한 인체 방광암 및 백혈병 세포를 대상으로 genistein의 증식억제 현상을 세포주기 조절 측면에서 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 조사된 T24 방광암 및 U937 백혈병 세포 모두 genistein 처리 농도 의존적으로 심한 형태적 변형을 유발하였으며, 세포의 증식도 억제되었으나, T24 세포에 비하여 U937 세포는 훨씬 저농도 처리군에서 증식이 억제되었으며 apoptosis 유발의 정도에서도 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다(Fig. 1,2 및 3). 또한 실험에 사용된 genistein의 농도 및 처리 시간을 유방암 및 전립선암 등의 선행 연구의 결과들과 비교했을 때도 전반적으로 고형암 유래 세포주에서 보다 백혈병 세포에서 감수성이 높음을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 사용된 T24 및 U937 세포의 genistein에 의한 증식 억제는 다른 암세포주에서 관

찰된 것과 같이 G2/M arrest와 관련이 있음을 flow cytometry 분석을 통하여 확인하였다[2,5,6,31,32,34-37,40].

세포주기의 진행은 다양한 Cdk의 활성 여부에 의하여 조절되는데, 세포주기의 각 시기 및 세포 내·외부 신호에 따라 cyclin/Cdk complex가 catalytic subunit 인 cyclin에 의하여 활성화되거나 Cdk inhibitor에 의하여 불활성화 될 수 있다. 이러한 cyclin/Cdk complex들의 활성 변화에 따라 세포는 성장과 증식이 촉진되거나, 분화의 유도 및 apoptosis에 의한 세포의 죽음이 유도되기도 한다[10,26]. 포유동물 세포에서 cyclin A 단백질은 G1 후기에 발현이 시작되어 S기와 G2기 동안 축적되면서 Cdk2와 결합하여 활성화를 유도한다[15,16]. 그리고 serine/threonine kinase로서 maturation promoting factor로 알려진 Cdc2는 M기가 시작될 때 cyclin B의 결합에 의하여 활성화된다. 이어서 histone 및 lamin 단백질 등의 인산화를 유도하고 핵막의 붕괴와 염색체의 형성을 촉진함으로써 M기를 진행을 조절한다[19,29]. 한편 Cdc2의 활성은 cyclin B1과의 결합에서 뿐만 아니라 Cdc2 자체의 인산화 정도에도 영향을 받는데, Cdc2를 인산화하여 활성을 조절하는 kinase로 Wee1이 알려져 있다. Wee1은 세포가 mitosis로 들어갈 수 있는 조건이 될 때까지 Cdc2의 Tyr15 잔기를 인산화하여 그 활성을 억제하며[13,33], Wee1은 Cdc2 및 Nim1/Cdr kinase 등에 의하여 mitosis 동안 불활성 상태로 유지되어진다[3]. Wee1의 작용과는 반대로 세포주기를 G2기로부터 mitosis로 진행하는데 역할을 하는 것이 phosphatase인 Cdc25 단백질로서, Cdc25는 Cdc2의 Tyr15 잔기를 탈인산화하여 Cdc2를 활성화한다[20]. 이러한 선행연구 결과를 바탕으로 T24 및 U937 세포의 G2/M기 관련 이들 조절인자들의 발현에 미치는 genistein의 영향을 조사하였다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 cyclin A는 두 세포주에서 모두 전사 수준에서는 큰 변화가 없었으나, 단백질의 발현은 T24 세포에서는 genistein 처리에 따라 점차 감소된 반면 U937 세포에서는 고농도 처리군에서 다소 증가되어 서로 반대되는 결과를 보여 주었다. Cdk2는 단백질 수준에서 두 세포주에서 모두 차이가 없었으나, Cdc2의 경우 T24 세포주에서 genistein 처리에 따라 다소 발현이 감소되었는데(Fig. 5), 이는 선행연구들과는 다소 차이가 나는 결과였다[5,6]. 그러나 세포주기 G2/M 전이에 가장 중요한 Cdc2의 양성 조절인자인 cyclin B1의 경우 전사 및 번역 수준에서 genistein 처리에 따라 두 세포주에서 모두 감소되었다(Fig. 4). 그리고 Wee1의 경우 두 세포주에서 큰 변화가 없었으며, Cdc25C의 경우 U937 세포주에서는 genistein의 처리 유무에 따라 큰 차이가 없었으나, T24 세포에서는 genistein 처리 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 6). 이상의 결과에서 알 수 있듯이 genistein 처리에 따라 G2/M기 조절에 관여하는 주요 유전자들의 발현이 T24 및 U937 세포에서 다소 차이가 남을 알 수 있었는데, U937 세포에서는 선행 조사된 암세포주에서의 결과들과 유사한 유전자 변화를 보인 반면, T24 세포에서 관찰되는 결과들은 다른 세

포주에서 볼 수 없는 결과들이었다. 그리고 조사된 유전자의 종류에 따라 전사 및 번역 수준에서의 발현 차이가 상이하게 나타나는 인자들도 있었으며, 이들의 전사 후 modification에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 그러나 cyclin B1의 발현이 genistein 처리에 따라 억제되는 현상은 다른 암 세포주에서 대부분 공통적으로 나타나는 결과로서[5,6], genistein 처리에 따른 cyclin B1의 발현 억제가 세포주기 G2/M arrest를 유발하는 공통 경로 중의 하나로 추정되어진다.

한편 다양한 세포증식 억제 신호에 의해서 유도되는 Cdk inhibitor들은 Cdk와 강한 결합을 통하여 그들의 활성을 억제하는데, INK4 및 CIP/KIP family 두 가지로 분류된다. 이들 중 CIP/KIP family에 속하는 p21의 발현은 DNA 손상에 의한 종양억제 유전자인 p53에 의해 조절을 받으며, 세포주기 G1 arrest 유발하는 것으로 알려져 왔다[12,27]. 그러나 최근 연구에 따르면 p53 비의존적인 p21의 조절 기전이 밝혀지고 있으며, 인체 섬유아세포의 세포주기 진행에서 p21의 mRNA 발현이 G1 및 G2기에서 두 번 증가됨이 보고된 후 G2/M기에서도 p21이 중요한 조절 인자로 작용할 가능성이 보고된 바 있다[21]. 그 후 다양한 연구 논문에서 DNA 손상 인자들에 의한 p21의 발현 증가가 세포주기 G2/M arrest를 유발하였음이 보고되어지고 있다[11,39]. Shao et al. [36] 및 Choi et al. [6] 등의 선행연구에 의하면 정상 p53 유전자를 가지거나 돌연변이된 p53 유전자를 가진 유방암세포에서 모두 genistein 처리에 따른 p21 유전자 단백질의 발현 증가 현상이 보고된 바 있으며, 특히 p21의 전사활성이 p53 비의존적이 Choi et al. [5]에 의하여 p53 유전자가 결손된 전립선 암세포주에서 확인된 바 있다. 따라서 genistein의 처리에 의한 T24 및 U937 세포의 증식억제 현상이 p53 및 p21의 발현 변화와 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, p53 유전자를 정상으로 가지는 T24 세포[8]에서는 두 유전자 모두 genistein의 처리에 따른 변화를 보이지 않았다. 그러나 p53 유전자 결손된 U937 세포[4]에서는 genistein의 처리 농도가 증가함에 따라 단백질 수준에서의 증가 현상을 보여, 선행연구에서와 동일하게 p53 비의존적으로 p21의 단백질 발현이 증가될 수 있음을 알 수 있었다. 특히 U937 세포에서 cyclin B1과 p21의 상대적인 발현 변화는 대부분의 암세포에서 관찰된 것과 매우 유사한 경우였으나, T24 세포에서는 기존의 연구 결과와는 매우 상이함을 알 수 있었다. 따라서 T24 방광암세포가 genistein에 대하여 U937 백혈병 세포보다 감수성이 낮은 것이 이러한 특정 유전자들의 발현 차이로 인한 것으로 추정할 수 있으며, 이에 관한 보다 구체적인 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 T24 인체방광암 및 U937 백혈병 세포의 증식에 미치는 genistein의 영향을 조사 하였다. Genistein이 처

리된 T24 및 U937 세포는 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 현저히 감소되었으며 심한 형태적 변형이 동반되었으나, U937 세포에서 보다 높은 감수성을 보였다. 이러한 T24 및 U937 세포의 증식억제 및 형태 변형은 G2/M기의 세포주기 억제 및 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 flow cytometry를 이용한 세포주기의 분석을 통하여 확인하였다. T24 세포에서 genistein에 의한 G2/M arrest는 cyclin A, cyclin B1 및 Cdc25C 등의 단백질 발현 감소와 연관성이 있었으나, 종양억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에는 큰 변화가 없었다. U937 세포에서 genistein에 의한 G2/M arrest는 cyclin B1 및 p53 비의존적인 p21의 발현 증가와 연관성이 있었다. 이상의 결과들은 현재까지 거의 연구가 진행된 바 없는 인체방광암 및 백혈병 세포에서 genistein의 항암 작용을 이해하는데 중요한 자료가 될 것이고 나아가 genistein을 포함한 그와 유사한 항암제 후보물질들의 연구에 있어서 기초 자료로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 결과의 일부입니다(No. 105113-3).

참 고 문 헌

1. Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya and Y. Fukami. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595.
2. Bektic, J., R. Guggenberger, I.E. Eder, A.E. Pelzer, A.P. Berger, G. Bartsch and H. Klocker. 2005. Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clin. Prostate Cancer* **4**, 124-129.
3. Belenguer, P., L. Pelloquin, V. Baldin, M.L. Oustrin and B. Ducommun. 1995. The fission yeast Nim1/Cdr1 kinase: a link between nutritional state and cell cycle control. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 207-214.
4. Biggs, J.R., J.E. Kudlow and A.S. Kraft. 1995. The role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the WAF1/CIP1 gene in U937 leukemic cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 901-906.
5. Choi, Y.H., W.H. Lee, K.Y. Park and L. Zhang. 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.
6. Choi, Y.H., L. Zhang, W.H. Lee and K.Y. Park. 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.
7. Constantinou, A., K. Kiguchi and E. Huberman. 1990. Induction of differentiation and DNA strand breakage in

- human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res.* **50**, 2618-2624.
8. Cooper, M.J., J.J. Haluschak, D. Johnson, S. Schwartz, L.J. Morrison, M. Lippa, G. Hatzivassiliou and J. Tan. 1994. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol. Res.* **6**, 569-579.
 9. Datto, M.B., Y. Yu and X.-F. Wang. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 28623-28628.
 10. Dorai, T. and B.B. Aggarwal. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129-140.
 11. Dulic, V., G.H. Stein, D.F. Far and S.I. Reed. 1998. Nuclear accumulation of p21^{Cip1} at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 546-557.
 12. Elledge, S.J. and J.W. Harper. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 847-852.
 13. Fattaey, A. and R.N. Booher. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog. Cell Cycle Res.* **3**, 233-240.
 14. Fotsis, T., M. Pepper, H. Adlercreutz, G. Fleishmann, T. Hase, R. Montesano and L. Schweigerer. 1993. Genistein, a dietary-derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2690-2694.
 15. Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez and N.J.C. Lamb. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-1179.
 16. Guadagno, T.M., M. Ohtsubo, J.M. Roberts and R.K. Assoian. 1993. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* **262**, 1572-1575.
 17. Jiang, H., J. Lin, Z.Z. Su, F.R. Collart, E. Huberman and P.B. Fisher. 1994. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* **9**, 3397-3406.
 18. Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J.W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D.O. Morgan, B.R. Franza and J.M. Roberts. 1992. Formation and activation of a cyclin E-Cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**, 1689-1694.
 19. Krek, W. and E.A. Nigg. 1991. Differential phosphorylation of vertebrate p34^{Cdk2} kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10**, 305-316.
 20. Kumagai, A. and W.G. Dunphy. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-914.
 21. Li, Y., C.W. Jenkins, M.A. Nichols and Y. Xiong. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase p21. *Oncogene* **9**, 2261-2268.
 22. Markovits, J., C. Linassier, P.H. Fosse, J. Couprie, A. Jacquemin-Cablon, J.M. Saucier, J.B. Le Pecq and A. Larsen. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase. *Cancer Res.* **49**, 5111-5117.
 23. Matsushime, H., D.E. Quelle, S.A. Shurtleff, M. Shibuya, C.J. Sherr and J.Y. Kato. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2066-2076.
 24. Messina, M.J., V. Persky, K.D. Setchell and S. Barnes. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* **21**, 113-131.
 25. Meyerson, M. and E. Harlow. 1994. Identification of G1 kinase activity for Cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2077-2086.
 26. Mezecev, R., J. Mojzis, M. Pilatova and P. Kutschy. 2003. Antiproliferative and cancer chemopreventive activity of phytoalexins: focus on indole phytoalexins from crucifers. *Neoplasma* **50**, 239-245.
 27. Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
 28. Mueller, S.C., Y. Yeh and W.T. Chen. 1992. Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells. *J. Cell Biol.* **119**, 1309-1325.
 29. Ohsumi, K., C. Katagiri and T. Kishimoto. 1993. Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science* **262**, 2033-2035.
 30. Ohtsubo, M. and J.M. Roberts. 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* **259**, 1908-1912.
 31. Rauth, S., J. Kichina and A. Green. 1997. Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells *in vitro* by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular p53. *Bri. J. Cancer* **75**, 1559-1566.
 32. Ravindranath, M.H., S. Muthugounder, N. Presser and S. Viswanathan. 2004. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv Exp Med Biol* **546**, 121-165.
 33. Sanchez, V., A.K. McElroy and D.H. Spector. 2003. Mechanisms governing maintenance of Cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.* **77**, 13214-13224.
 34. Santibanez, J.F., A. Navapro and J. Martinez. 1997. Genistein inhibits proliferation and *in vitro* invasive potential of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res.* **17**, 1199-1204.
 35. Sarkar, F.H. and Y. Li. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev* **21**, 265-280.
 36. Shao, Z.-M., M.L. Alpaugh, J.A. Fontana and S.H. Barsky. 1998. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by p21^{WAF1/CIP1} induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J. Cell. Biochem.* **69**, 44-54.
 37. Spinozzi, F., C. Pagliacci, M. Graziella, M. Rasalba, F. Grignani, C. Riccardi and I. Nicoletti. 1994. The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in jurkat T-leukemia cells. *Leuk. Res.* **18**, 431-439.

38. Steele, V.E., M.A. Pereira, C.C. Sigman and G.J. Kelloff. 1995. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J. Nutri.* **125**, 713S-716S.
39. Tchou, W.-W., W.N. Rom and K.-M. Tchou-Wong. 1996. Novel form of p21^{WAF1/CIP1/SD1} protein in phorbol ester-induced G2/M arrest. *J. Biol. Chem.* **271**, 29556-29560.
40. Traganos, F., B. Ardel, N. Halko, S. Bruno and Z. Darzynkiewicz. 1992. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.* **52**, 6200-6208.
41. Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578.
42. Xiong, Y., G. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**,701-704.
43. Zhang, W., L. Grasso, C.D. McClain, A.M. Gambel, Y. Cha, S. Travali, A.B. Deisseroth and W.E. Mercer. 1995. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res.* **55**, 668-674.
44. Zi, X., D.K. Feyes and R. Agarwal. 1998. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinase and associated cyclins. *Clinical Cancer Res.* **4**, 1055-1064.