J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 4, pp. 398~402 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

사람구강편평상피암세포주인 KB세포에서 십자화과채소 유래물질인 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 세포사멸유도를 통한 항종양효능에 관한 연구

조현태 · 최은선 · 조남표 · 조성대*
전북대학교 치의학전문대학원 구강병리학교실

Anti-tumorigenic Effect of DIM-pPhBr and DIM-pPhF Originating from Cruciferous Vegetables in KB Human Oral Squamous Cell Carcinoma Through Apoptotic Cell Death

Hyun-Tai Cho, Eun-Sun Choi, Nam-Pyo Cho, and Sung-Dae Cho*
Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea
(Received October 10, 2011/Revised November 13, 2011/Accepted December 6, 2011)

ABSTRACT - Cruciferous vegetables including diindolylmethane (DIM) have been shown to have anticancer activity. Especially, DIM-pPhBr and DIM-pPhF used in this study was reported to have more effective and less toxic effects than DIM. However, there is no report presenting their anti-tumorigenic activity in oral cancer. In the present study, we examined the effects of DIM-pPhBr and DIM-pPhF on the cell proliferation and apoptosis in KB human oral cancer cells. DIM-pPhBr and DIM-pPhF decreased cell proliferation and induced apoptosis evidenced by western blot analysis, DAPI staining and sub-G_1 population. This provides the first evidence that DIM-pPhBr and DIM-pPhF originating from cruciferous vegetables induce apoptotic cell death in human oral cancer cells to inhibit cancer cell proliferation.

Key words: DIM-C-pPhBr, DIM-C-pPhF, Oral Squamous Cell Carcinoma, Apoptosis

구강편평상피세포암종(Oral Squamous cell carcinoma)은 전체 암 중 6번째로 빈도가 높은 암이며, 해마다 전세계적으로 500,000명의 환자가 이 질환에 의해 고통받는 것으로 알려져 있다[1,2]. 수술적 요법, 방사선적 요법 및 항암화학요법이 구강편평상피세포암종을 치료하기 위해 사용되는 치료방법이다. 하지만, 구강편평상피세포암종의 경우, 적절한 치료에 의해 장기 생존을 하더라도 수술로 인한 후유증 (기형과 기능의 장애)과 이로 인한 정신적 불구감 및 사회로의 정상복귀의 어려움 등이 초래되어 삶의 질을 저하시키는 등의 많은 문제점을 안고 있기 때문에 다른 종양에 비해 천연물질이나 합성물질을 사용하여 암의 성장을 방해하고 억제할 수 있는 화학적 암예방법(Chemoprevntion)이 부각되는 것이 현실이다.

십자화과채소 유래 천연물은 다양한 질병 치료 및 증상을 완화하는 전통적인 약물로 널리 사용되어져왔고, 이러한 천연화합물과 그 유도체가 신약을 개발하는데 중요한 구성성분이 되어 왔다[3-5]. 특히, 십자화과 채소에는 indole-3-carbinol (I3C)와 isothiocyanates계 화합물이 포함되어 있는데, 이들이 십자화과채소의 항암활성과 밀접한 관련이 있음은 여러 논문에서 검증된 바 있다[6-9]. 이 중에서 I3C는 위와 같은 강산성 조건에서 상당히 불안정하기 때문에 bis(3-indolyl)methane (DIM)으로 전환되며, DIM은 다양한 종양의 세포증식을 억제하는 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. DIM의 세포증식억제효능은 또한, 세포사멸기전에 의한 것으로 알려지면서 DIM이 종양에서 세포사멸을 유도하는 좋은 활성물질로써 제안되어지고 있다[10-15]. 미국 텍사스 A&M대학의 Safe박사는 DIM보다 훨씬 효능은 좋고, 독성이 낮은 DIM 유도체인 (C-DIM)를 합성하였다. 최근에 발표된 논문에 따르면, C-DIM은 방광암, 전립선암, 대장암, 신장암, 유방암세포주 및 동물실험에서 세포사멸을 유도함으로써 종양세포증식을 억제할 수 있다는 것이 밝혀졌다[16-20]. 하지만, 아직까지 구강편평상피세포암종에서의 세포증식 및 세포사멸에 대한 효능연구는 보고된

*Correspondence to: Assistant Professor Sung-Dae Cho, Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju, Korea
Tel: 82-63-270-4027, Fax: 82-63-270-4025
E-mail: efiwdsc@chonbuk.ac.kr

바가 없다. 따라서, 이번 연구에서는 C-DIM 중에 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 구강편평상피세포암종 세포주인 KB 세포에서의 세포증식 및 세포사멸유도효능을 확인함으로써 C-DIM의 항종양능력을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용된 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF는 미국 텍사스 A&M 대학의 Safe 박사로부터 공급받았고, PARP항체는 BD Pharmingen (San Jose, CA, USA)에서 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Propidium Iodide는 Calbiochem (SAn Diego, CA, USA), RNase A는 Sigma-Aldrich Korea에서 구입하여 실험에 이용하였다.

세포배양

구강편평세포암종세포주인 KB 세포는 미국세포주은행인 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 10% Fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine이 함유된 DMEM에서 5% CO_2, 37°C가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 시험에 사용되는 세포는 배양접시 (6-well cell culture plate와 60 mm^2 세포배양접시)에 세포가 60-70%되었을 때, 5, 10, 15 μM의 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF를 48시간 동안 처리한 후, 다음의 실험을 진행하였다.

세포계수

물질을 처리한 배지를 제거한 후, 1.5 ml PBS 용액으로 세척해준 다음, 300 μl Trypsin과 DMEM 배지를 이용해 부착세포를 떼어낸다. 부착한 세포 10 μl와 Trypan blue염색액 10 μl을 혼합한 다음 세포계수용 슬라이드에 세포를 얹어 세포수를 측정하였다.

MTS 분석법

48시간동안 용매대조군인 DMSO와 5, 10, 15 μM의 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF을 KB세포에 처리한 다음, MTS와 PMS의 혼합액을 well당 20 μl씩 넣어준 후, 2시간 후에 ELISA reader를 이용해 490 nm파장에서 OD값을 측정하였다.

FACScan 유세포 분석법

48시간동안 용매대조군인 DMSO와 5, 10, 15 μM의 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF을 KB세포에 처리한 다음, trypsin을 통해 세포를 배양접시에서 분리하고, 원심분리 (1500 rpm, 5분)를 통해 세포를 수거하였다. Sub-G1기 축적은 flow cytometry를 이용하여 분석을 하였는데, 먼저 세포를 –20°C, 70% 에탄올에서 하루동안 고정하고, 원심분리를 하여 에탄올을 제거하고, 0.02 mg/ml의 propidium iodide (PI)과 0.05 mg/ml의 RNase A로 염색한 다음, FACScan (Beckon-Dickinson, USA) 유세포분석을 이용하여 DNA content를 측정하였다.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색법

48시간 동안 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF을 처리한 후, 세포를 수거하여 실온에서 20분동안 4% paraformaldehyde에 고정시켰다. 세포들을 PBS 용액으로 세척한다음, DAPI용액 (2 mg/ml)로 염색시킨 후, poly-L-lysin으로 처리된 슬라이드에 고정시키고, 형광현미경하에서 핵분절 및 핵농축을 관찰하였다.

Western Blot분석법

Lysis buffer (20% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM iodoacetoamide, 1 mM leupeptin, 1 mM antipain, 0.1 mM sodium orthovanadate, 5 mM sodium fluoride)를 이용하여 세포를 융해시킨 다음, Bio-Rad(Hercules, CA, USA)로부터 구입한 DC protein assay kit를 이용하여 단백질을 정량하였다. 20-60 μg의 단백질을 SDS-PAGE에 의해서 크기별로 분리하고, nitrocellulose membrane으로 transfer한 다음, 상온에서 한시간 동안 blocking 용액을 이용하여 배양했다. 그런 다음, 1차항체로 4°C에서 하루동안 배양하고, horseradish peroxidase (HRP)가 복합된 2차 항체를 이용하여 상온에서 2시간동안 배양하였다. 항체에 결합한 단백질은 ECL kit (Perkin Elmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA)를 이용하여 X-ray film에 노출시켜 현상하였다.

결과 및 고찰

DIM-pPhBr과 DIM-pPhF에 의한 구강암세포주인 KB세포의 증식억제

구강편평상피암종세포주인 KB세포에서 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 세포증식억제효능을 확인하기 위해 5, 10, 15 μM의 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF를 48시간동안 처리한 다음, 세포계수와 MTS분석법을 실시하였다. 세포계수 결과, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF를 10, 15 μM 처리하였을 때, 용매대조군에 비해 살아있는 KB세포의 수가 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하는 것을 확인하였고, MTS분석법에 따른 결과에서는 5, 10, 15 μM에서 용매대조군에 비해 유의성있는 결과를 확인하였다(Fig. 1). 이는 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF를 KB 세포주에 처리했을 때, 농도의존적으로 KB세포의 세포증식을 억제하는 결과로써, 이는 십자화과 채소유래물질인 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 구강암세포의 증식을 억제하는 가능성이 있음을 의미한다. 특히, DIM의 경우, 종양세포에서 세포증식 억제를 나타내기 위해서 약 50 μM

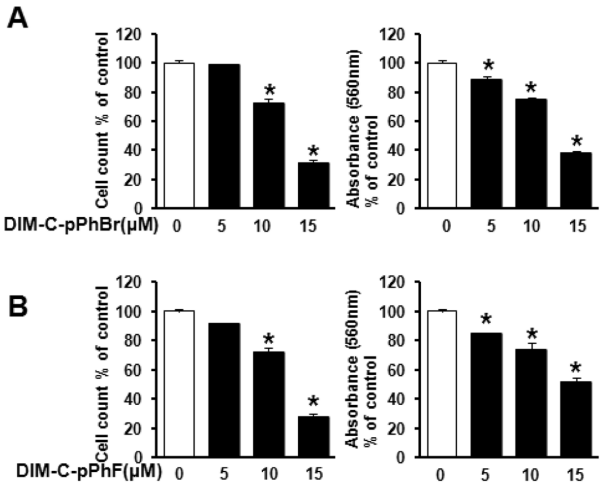

Fig. 1. The effect of DIM-pPhBr (A) and DIM-pPhF (B) on the cell number and cell viability in KB human oral cancer cells.

의 농도가 요구되는 반면에, 두 물질은 < 15 μM의 농도에서도 효과적으로 세포증식을 억제시키는 것으로 보아 DIM에 비해 훨씬 효과적인 물질임을 확인할 수 있었다[21,22]. 또한, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 췌장암과 대장암의 세포증식을 억제한다는 보고에서도 보듯이 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 종양의 증식을 억제하는 유용한 물질임을 암시하는 것으로 사료된다[23,24].

DIM-pPhBr과 DIM-pPhF에 의한 구강암세포주인 KB세포의 세포사멸 유도

DIM-pPhBr과 DIM-pPhF에 의한 KB세포의 세포증식억제 효능이 세포사멸유도에 의한 것인지를 확인하기 위해 Western blot분석법을 이용하여 세포사멸이 유도되었을 때 일어나는 현상인 PARP(Poly(ADP-ribose) polymerase)의 cleavage를 관찰하였고, actin은 단백질 loading량이 일정함을 확인하기 위해 관찰하였다. DIM-pPhBr과 DIM-pPhF을 5, 10, 15 μM의 농도로 48시간 처리하였을 때, DIM-pPhBr은 10, 15 μM의 농도에서 DIM-pPhF은 5, 10, 15 μM의 농도에서 cleaved PARP단백질이 관찰되었고, 이 현상은 농도의존적으로 진행됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

세포사멸이 일어나면 세포 핵의 형태와 투과성이 변화하는데 DAPI염색법을 통해 이러한 변화를 비교함으로써 세포사멸을 구분해낼 수 있다. 특히, 세포사멸이 진행되는 세포의 경우, DAPI염색의 투과성이 증가함으로써 핵응축과 핵분절의 현상을 쉽게 관찰할 수 있는데, 이번 연구에서도 Western blot분석법에서 나온 결과를 검증하기 위해 DAPI 염색법을 실시하였다. 형광현미경을 통해 DAPI에 염색된 세포핵을 관찰한 결과, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 농도가 높아질수록 KB세포의 핵응축과 분절이 현저히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

또한, 세포사멸의 중요한 특징 중에 하나인 Sub-G_1기 축적을 FACScan 유세포분석기를 이용하여 측정한 결과, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 농도가 증가함에 따라 Sub-G_1기가 더 많이 축적됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이는 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 KB세포의 세포사멸을 유도하고 있음을 확인시켜주는 결과이고, 이를 통해 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 구강암세포의 세포증식억제를 위해서는 세포사멸 과정이 필수적임을 암시하여 준다. 2008년 Lei P에 연구결과서 보듯이, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF은 췌장암 세포주인 Panc-1과 Panc-28 그리고 대장암세포주인 SW480과 RKO에서 소포체스트레스 및 c-jun N-terminal kinase를 통해 세포사멸을 유도하고 이로 인해 종양세포의 증식이 억제됨을 확인하였다[23,24]. 위의 연구결과에서 확인할 수 있듯이 이번 연구의 결과는 기존의 연구결과와 일치하는 결과라 할 수 있으며, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 세포증식을 억제하기 위해 세포사멸을 유도한다는 공통기전을 갖고 있음을 제시해준다[23]. 이러한 결과를 종합하여 보면, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF이 구강암을 예방 및 치료를 위해 사용되어지기 위해서는 추가적인 동물실험이 요구되며, 특히 독성시험을 통해 안전성을 확보하는 것이 매우 중요한 일이지만, DIM-pPhBr과 DIM-pPhF가 구강암세포주에서 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 것으로 볼 수 있듯이 구강암의 발생을 억제하고 예방하는 잠재적인 후보물질로서의 가능성을 확인할 수 있다.

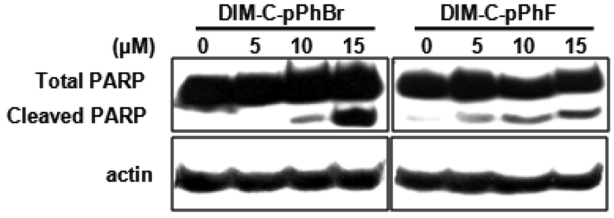

Fig. 2. The apoptotic effect of DIM-pPhBr and DIM-pPhF in KB cells using immunoblot detection of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP).

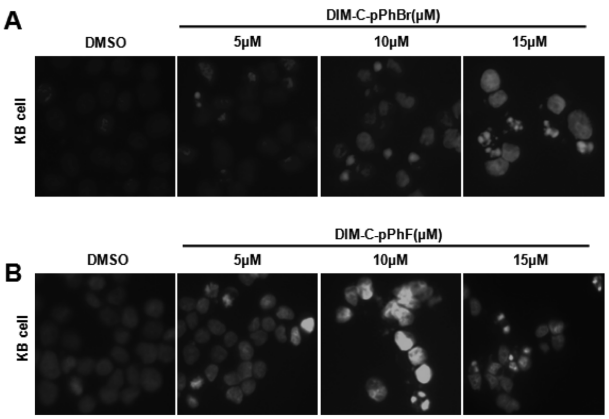

Fig. 3. The effect of DIM-pPhBr (A) and DIM-pPhF (B) on apoptotic cell death in KB cells using DAPI staining.

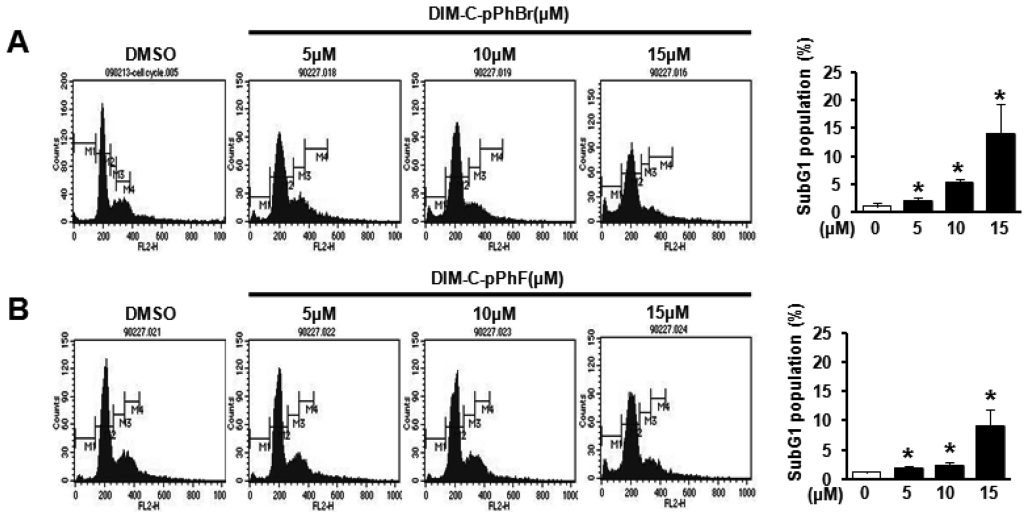

Fig. 4. The measurement of the sub-G_1 population in KB cells using propidium iodide staining and flow cytometry analysis.

요 약

십자화과 채소는 Diindolylmethane (DIM)을 포함한 Isothiocyanates계 화합물을 함유하고 있는데, 이들이 암을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 이번 연구에 사용되어진DIM-C-pPhBr과 DIM-C-pPhF를 기존에 알려진 DIM보다 독성은 최소화되고, 효능은 높은 물질로 보고되어져 있다. 하지만, 아직까지 구강편평상피세포암종에서의 세포증식 및 세포사멸에 대한 효능연구는 보고된 바가 없다. 따라서, 이번 연구에서는 C-DIM 중에 DIM-pPhBr과 DIM-pPhF의 구강편평상피세포암종 세포주인 KB세포에서의 세포증식 및 세포사멸유도효능을 확인함으로써 C-DIM의 항종양능력을 확인하고자 하였다. 결과를 분석해보면, DIM-C-pPhBr과 DIM-C-pPhF은 구강편평상피세포암종 세포주인 KB의 세포증식을 감소시키고 Western blot분석법, DAPI염색법, 및 Sub-G_1축적분석결과에서 알 수 있듯이 세포증식을 억제하기 위해 세포사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 따라서, DIM-C-pPhBr과 DIM-C-pPhF에 의해 유도되는 세포사멸 및 세포증식억제는 구강암 예방 및 치료를 위한 좋은 전략이 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sawhney, M., Rohatgi, N., Kaur, J., Shishodia, S., Sethi, G., Gupta, S.D., Deo, S.V., Shukla, N.K., Aggarwal, B.B., and Ralhan, R.: Expression of NF-kappaB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer* **120**, 2545-2556 (2007)
2. Shen, J., Huang, C., Jiang, L., Gao, F., Wang, Z., Zhang, Y.: Enhancement of cisplatin induced apoptosis by suberoylanilide hydroxamic acid in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol* **73**, 1901-1909 (2007)
3. Butler, M.S.: The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* **67**, 2141-2153 (2004)
4. Koehn, F.E., and Carter, G.T.: The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 206-220 (2005)
5. Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M.: Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**, 1022-1037 (2003)
6. Aggarwal, B.B., and Ichikawa, H.: Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* **4**, 1201-1215 (2005)
7. Broadbent, T.A., and Broadbent, H.S.: The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl)indole. [Part II]. *Curr Med Chem* **5**, 469-491 (1998)
8. Preobrazhenskaya, M.N., Bukhman, V.M., Korolev, A.M., and Efimov, S.A.: Ascorbigen and other indole-derived compounds from Brassica vegetables and their analogs as anticarcinogenic and immunomodulating agents. *Pharmacol Ther* **60**, 301-313 (1993)
9. Verhoeven, D.T., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., van den Brandt, P.A., and van Poppel, G.: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* **103**, 79-129 (1997)
10. Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F.: 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis* **26,** 771-778 (2005)
11. Grubbs, C.J., Steele, V.E., Casebolt, T., Juliana, M.M., Eto, I., Whitaker, L.M., Dragnev, K.H., Kelloff, G.J., and Lubet, R.L.: Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res* **15**, 709-716 (1995)
12. Lee, S.H., Kim, J.S., Yamaguchi, K., Eling, T.E., and Baek, S.J.: Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce expression of NAG-1 in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **328,** 63-69 (2005)
13. Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Haj, A., and Fares, F.A.:

Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol* **41**, 745-752 (2003)

14. Rahman, K.M., Aranha, O., and Sarkar, F.H.: Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells. *Nutr Cancer* **45**, 101-112 (2003)
15. Rahman, K.M., Li, Y., and Sarkar, F.H.: Inactivation of akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr Cancer* **48**, 84-94 (2004)
16. Cho, S.D., Lee, S.O., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Khan, S., Yoon, K., Kamat, A.M., Safe, S.: Activation of nerve growth factor-induced B alpha by methylene-substituted diindolylmethanes in bladder cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Mol Pharmacol* **77(3)**, 396-404 (2010)
17. York, M., Abdelrahim, M., Chintharlapalli, S., Lucero, S.D., Safe, S.:1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substitutedphenyl)methanes induce apoptosis and inhibit renal cell carcinoma growth. *Clin Cancer Res* **13(22 Pt 1)**, 6743-6752 (2007)
18. Cho, S.D., Lei, P., Abdelrahim, M., Yoon, K., Liu, S., Guo, J., Papineni, S., Chintharlapalli, S., Safe, S.: 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane activates Nur77-independent proapoptotic responses in colon cancer cells. *Mol Carcinog* **47(4)**, 252-263 (2008)
19. Cho, S.D., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lei, P., Hamilton, S., Khan, S., Ramaiah, S.K., Safe, S.: Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways. *Cancer Res* **67(2)**, 674-683 (2007)
20. Chintharlapalli, S., Papineni, S., Safe, S.: 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-substitutedphenyl)methanes inhibit growth, induce apoptosis, and decrease the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells through peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent pathways. *Mol Pharmacol* **71(2)**, 558-569 (2007)
21. Chinnakannu, K., Chen, D., Li, Y., Wang, Z., Dou, Q.P., Reddy, G.P., Sarkar, F.H.: Cell cycle-dependent effects of 3,3'-diindolylmethane on proliferation and apoptosis of prostate cancer cells. *J Cell Physiol*. **219(1)**, 94-99 (2009)
22. Wang, Z., Yu, B.W., Rahman, K.M., Ahmad, F., Sarkar, F.H.: Induction of growth arrest and apoptosis in human breast cancer cells by 3,3-diindolylmethane is associated with induction and nuclear localization of p27kip. *Mol Cancer Ther.* **7(2)**, 341-349 (2008)
23. Lei, P., Abdelrahim, M., Cho, S.D., Liu, X., Safe, S.: Structure-dependent activation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic cancer by 1,1-bis(3'-indoly)-1-(p-substituted phenyl)methanes. *Mol Cancer Ther.* **7(10)**, 3363-3372 (2008)
24. Lei, P., Abdelrahim, M., Cho, S.D., Liu, S., Chintharlapalli, S., Safe, S.: 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes inhibit colon cancer cell and tumor growth through activation of c-jun N-terminal kinase. *Carcinogenesis.* **29(6)**,1139-1147 (2008)