

Curcumin의 유방암 세포인 MCF-7 세포 증식 억제 효과

¹한림대학교 생명과학부, ²실버생물산업기술연구센터, ³한국영양연구소,
⁴서울스포츠대학원대학교 스포츠과학학과

김은지² · 이선화¹ · 이현숙⁴ · 조한진¹ · 윤정환^{1,2,3}

Inhibitory Effect of Curcumin on the Growth of MCF-7 Human Breast Cancer Cells

Eun Ji Kim², Sunwha Yi¹, Hyun Sook Lee⁴, Han Jin Cho¹ and Jung Han Yoon Park^{1,2,3}

¹Division of Life Sciences, ²Silver Biotechnology Research Center, ³The Korean Institute of Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, ⁴Department of Sports Science, Seoul Sports Graduate University, Seoul 150-034, Korea

Curcumin, a natural phenolic compound present in the rhizome of turmeric, is commonly used as a coloring agent in foods, drugs, and cosmetics and exhibits anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tumor activities. The four members of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase family is implicated in the genesis or progression of human cancers and the overexpression of ErbB2 is associated with a poor prognosis of breast cancer patients. The present study examined whether curcumin inhibits MCF-7 cell growth and whether such an effect is related to changes in the protein expression of ErbB receptor family. When MCF-7 cells were treated with different concentrations of curcumin, curcumin decreased viable cell numbers in a concentration dependent manner. Curcumin inhibited DNA synthesis, induced a G1 cycle arrest, and induced apoptosis in MCF-7 cells. Western blot analysis of total cell lysates revealed that curcumin decreased the protein levels of ErbB2 and ErbB3. Curcumin decreased the phosphorylation of ERK-1/2. These results indicate that downregulation of ErbB2-ErbB3-Erk-1/2 signaling may be one of the mechanisms by which curcumin inhibits MCF-7 cell proliferation and induces apoptosis.

Key Words: Curcumin, Breast cancer cell, ErbB2, Erk-1/2

서 론

미국이나 유럽 여성에게서 발생 빈도가 가장

높은 유방암은 최근 우리 나라에서도 그 발생이 급격히 증가하여 2001년도부터는 여성 암 중 1위의 발생 빈도를 나타내고 있다.^{1,2)} 유방암의 발생은 여성 호르몬과 깊은 관련이 있는 것으로 알려

지고 있으며, 식이 또한 유방암의 발생에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. 역학 조사를 통해 고지방, 고단백질 식이는 유방암의 발생을 증가시키는 반면 야채와 과일의 섭취는 유방암 발생을 억제하는 것으로 보고되었다.^{3,4)} 야채와 과일 등의 식물유래 천연물이 유방암뿐만 아니라 다양한 종류의 암에 예방 및 치료효과가 알려짐에 따라,⁵⁾ 식물유래 천연물에 함유되어 있으며 항암 효과를 나타내는 phytochemicals의 분리, 동정, 항암기전 연구가 활발히 진행되고 있다.

Curcumin [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione]은 울금(*Curcuma longa*)의 근에서 추출한 심황(turmeric)의 주요 색소 성분으로, 인도 등 동남아시아에서 카레(curry)의 향신료로서 또는 염증질환의 약초로 사용되었다. Curcumin은 항산화효과,⁶⁾ 항염증효과⁷⁾를 나타낼 뿐만 아니라 강한 항암 효과⁸⁾가 있는 것으로 보고되고 있다. Huang 등^{8,9)}은 생쥐의 피부에 화학발암원을 도포하여 암을 유발하였을 때 암의 개시와 진전이 curcumin에 의해 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. Curcumin은 피부암뿐만 아니라 위, 십이지장, 대장의 암 발생을 감소시켰다.¹⁰⁾ 암세포를 사용한 실험에서도 curcumin은 유방암,^{11,12)} 대장암,¹³⁾ 구강암¹⁴⁾ 세포의 증식을 억제하였다. Curcumin은 면역계에 중요하게 작용하는 NF- κ B의 강력한 저해제로 작용하여 암의 개시 및 진전을 억제하고,¹⁵⁾ 암세포의 세포주기 진행을 방해하고 apoptosis를 일으킴으로써 암세포의 증식을 억제한다¹¹⁻¹⁴⁾는 보고가 있으나 curcumin의 암세포 증식 억제 기전에 대해 명확하게 밝혀지지 않았다.

p44와 p42 mitogenic-activated protein kinase (MAPK)인 extracellular signal regulated kinase (ERK)-1과 ERK-2는 serine/threonine protein kinase로 세포내 신호전달에 중요한 역할을 한다. ERK-1/2의 활성을 억제하거나,¹⁶⁾ ERK-1/2 transcript에 대한 antisense RNA 보체를 주입하면¹⁷⁾ growth factor에 의해 촉진되는 유전자들의 전사와 세포 증식이 차단된다는 보고가 있으며 이는 ERK-1/2가 세포 증식에 중요한 작용을 함을 제시한다. ERK-1/2는 외부의 여러 자극에 의해 활성화되고, 특히 세포들이 생성 분비하는 growth factor가 세포 표면에 있는 receptor에 결합하면 일련의 인산

화 과정에 의해 ERK-1/2가 활성화되어 세포 증식에 중요한 작용을 한다. 그러나 ERK-1/2의 활성이 비정상적으로 증가하면 유방암 등 암의 발생과 전이를 촉진한다.¹⁸⁾

Tyrosine kinase 활성을 가지고 있으며 세포 표면에 존재하는 receptor들은 외부의 자극을 세포내로 전달하여 MAPK 등과 같은 여러 단백질에 신호를 전달하는 매개체로 작용하며, 암과 깊은 관련이 있는 것으로 알려졌다. ErbB receptor family는 epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어 있고 대표적인 receptor tyrosine kinase 중의 하나이다. Ligand들이 ErbB receptor에 결합하면 receptor의 tyrosine 잔기가 인산화되며, 인산화된 tyrosine 잔기는 intracellular signaling protein의 결합자리의 역할을 하여, phosphoinositide 3-kinase/Akt¹⁹⁾ 또는 ERK-1/2²⁰⁾ 신호전달 경로를 활성화한다. 여러 암에서 ErbB gene들의 발현이 증가하였고,²¹⁾ ErbB receptor family는 암의 발생 및 진전과 깊은 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다. Slamon 등²²⁾은 유방과 난소암에서, Safran 등²³⁾은 십이지장 암에서 ErbB2가 과발현됨을 확인하였다. 대장암에서 ErbB2와 ErbB3의 mRNA의 발현과 단백질의 수준이 증가함이 관찰되었다.²⁴⁾ ErbB receptor family의 과발현이 암의 원인 중의 하나로 사료되므로 ErbB receptor family의 과발현 억제는 암예방 및 항암 치료의 중요 표적으로 생각할 수 있다.

본 연구에서는 curcumin이 인간의 유방 상피에서 유래한 암세포인 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하고, 항암 기전 규명의 일환으로 curcumin이 ErbB receptor 발현과 ERK-1/2의 인산화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 재료

MCF-7 세포(HTB-22)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium:Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA 등은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD,

USA)에서 구입하였다. Curcumin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), RNase A, propidium iodide, 7-amino-actinomycin D, dextran coated-charcoal, anti- β -actin antibody 등 실험에 사용한 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Phycoerythrin-conjugated Annexin V는 Phamingen (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. [Methyl- 3 H] thymidine, horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG, horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. Anti-ErbB2, anti-ErbB3 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Anti-ERK-1/2, anti-phospho-ERK-1/2 antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. BCA protein assay kit과 SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

2) 세포배양

MCF-7 세포는 DMEM/F12 배지를 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 실험에 사용할 세포를 유지하기 위해서는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% confluent 해지면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

3) 살아있는 세포수 측정

Curcumin이 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포를 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 60,000 cells/well의 밀도로 24 well plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 1% charcoal-stripped FBS를 첨가한 DMEM/F12 배지로 교환하여 24시간 동안 세포를 배양하였다. Charcoal-stripped FBS는 FBS에 Dextran coated charcoal을 첨가하여 4°C에서 30분간 교반한 후 원심분리하여 상층액을 취해 0.22 μ m filter로 멸균하여 만들었다. 1% charcoal-stripped FBS를 포함한 DMEM/

F12 배지에 0, 10, 20 또는 30 μ M로 curcumin을 첨가하여 배지를 교환하였다. Curcumin을 첨가하고 0, 24, 48, 72시간이 경과한 후 MTT assay 방법²⁵⁾을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였다.

4) [3 H]Thymidine incorporation 측정

Curcumin이 DNA 합성에 미치는 영향을 측정하기 위해서 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 희석하여 6,000 cells/well의 밀도로 96 well-plate에 분주하였다. 위와 동일한 방법으로 1% charcoal-stripped FBS를 포함한 배지에서 24시간 동안 배양한 후 여러 농도의 curcumin이 들어있는 배지로 교환하였다. Curcumin을 첨가하고 21시간이 경과한 후 각 well 당 1 μ Ci [3 H]thymidine을 첨가하여 3시간 배양하였다. 생성된 DNA에 삽입된 [3 H]thymidine을 측정하기 위해 세포의 DNA를 cell harvester (Skatron, Lier, Norway)를 사용하여 filter (Skatron)에 옮긴 후 DNA가 옮겨진 filter를 cocktail solution (ICN, Costa Mesa, CA, USA)에 넣어 녹여 liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA, USA)로 측정하였다.

5) 세포주기 분석

MCF-7 세포를 60,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 0 또는 20 μ M 농도로 curcumin을 첨가하여 배양하였다. Curcumin을 세포 배양액에 첨가하여 48시간 배양한 후 PBS로 세포 단층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA를 첨가하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 차가운 PBS로 씻어낸 후 70% ethanol을 넣어 4°C에서 1시간 보관하여 고정하였다. 고정된 세포에 RNase를 첨가하여 상온에서 15분간 방치한 후 propidium iodide을 첨가하여 30분간 염색하여 FACScan[™] (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)를 사용하여 flow cytometry 방법으로 세포주기를 분석하였다.

6) 세포사멸 분석

세포를 24 well-plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 curcumin을 0 또는 20 μ M 농도로 첨가하여 배양하였다. 48시간이 지난 후 차가운 PBS로 세포 단층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA으로 처리

하여 세포를 수집하였다. Annexin V-phycoerythrin과 7-amino-actinomycin D를 첨가하여 세포를 암실에서 15분 염색하여 FACScan™ (Becton Dickinson)를 사용하여 flow cytometry 방법으로 apoptotic cell 수를 측정하였다.

7) Western blot analysis

세포를 100 mm dish에 분주하여 위에서 언급한 것처럼 처리한 후 0 또는 20µM curcumin을 배양액에 첨가하여 2, 6, 12, 또는 24시간 배양하여 cell lysate를 만들었다. Cell lysate를 만들기 위해 세포를 차가운 PBS로 헹구고, lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄)를 첨가하여 4°C에서 40분간 섞었다. 이때 단백질분해를 방지하기 위해서 20µg/ml aprotinin, 10µg/ml antipain, 10µg/ml leupeptin, 80µg/ml benzamidin HCl, 0.2 mM phenylsufonyl fluoride를 첨가하였다. 침전물은 13,000×g에서 10분간 원심 분리하여 제거하고 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit을 사용하여 측정하였다. Cell lysate (50µg protein)를 4~20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하여 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, anti-ErbB2 antibody (1 : 500, 희석), anti-ErbB3 antibody (1 : 2000 희석), anti-phospho-ERK-1/2 (1 : 1000 희석), anti-ERK-1/2 (1 : 1000 희석), anti-β-actin antibody (1 : 2000 희석) 등 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 1시간 교반하였다. 그 후 horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 또는 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 protein band는 SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate를 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다.

8) 통계처리

본 연구의 모든 분석 수치는 각 실험군의 평균 ± 표준오차로 나타내었고, 결과는 SAS (Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 α=0.05 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

식용이나 약용으로 사용되고 있는 식물에 들어 있는 phytochemical들의 항암 작용에 대한 연구가 다각적으로 이루어지고 있다. 예로부터 인도 등 동남아시아에서 식용 및 약용으로 널리 사용되었고, 하루에 비교적 많은 양(180 mg/day)을 섭취하여도 부작용이 없는 것²⁶⁾으로 알려진 phytochemical인 curcumin에 대한 항암 작용 연구도 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 curcumin의 항암 작용을 조사하기 위해 인체의 유방 상피세포에서 유래한 암세포인 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 세포 배양액에 curcumin의 농도를 0, 10, 20, 또는 30µM로 다양하게 첨가하여 배양한 후 MTT assay 방법²⁵⁾으로 살아있는 세포수를 측정하였다. Fig. 1에 나타난 것과 같이 curcumin은 살아있는 세포수를 현저하게 감소시켰다. Curcumin에 의한 살아있는 세포수는 curcumin 첨가 후 24시간부터 유의적으로 감소하였으며, curcumin 첨가 농도가 증가할수록 현저히 감소하였다. 또한 curcumin에 의한 세포수 감소는 배양 시간에 의존적으로 나타나, curcumin을 첨가하여 배양한 시간이 길수록 살아있는 세포수 감소 현상은 현저히 나타났다(Fig. 1). Curcumin에 의해 살아있는 세포수가 감소하였으므로, curcumin이 세포의 증식 (proliferation)에 미치는 영향을 직접적으로 조사하기 위해 [³H]thymidine incorporation을 측정하였다. Curcumin을 다양한 농도로 세포 배양액에 첨가하여 21시간 배양한 후 [³H]thymidine을 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 생성된 DNA에 삽입된 [³H]thymidine을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. DNA의 합성은 curcumin에 의해 현저하게 억제되어

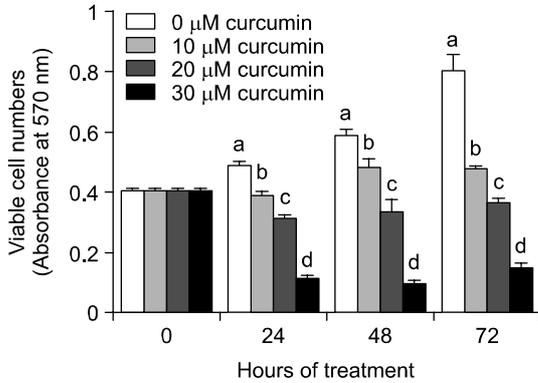


Fig. 1. Effect of curcumin on viable MCF-7 cell numbers. Cells were plated in 24-well plates at 60,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were incubated in DMEM/F12 supplemented with 1% charcoal-stripped FBS for 24 h. Cells were then incubated for 24, 48, or 72 h in DMEM/F12 supplemented with 1% charcoal-stripped FBS and various concentrations of curcumin. The viable cell numbers were estimated by the MTT assay, and each bar represents the mean±SEM (n=6). Values with different letters above each bar are significantly different (p<0.05) among different treatments.

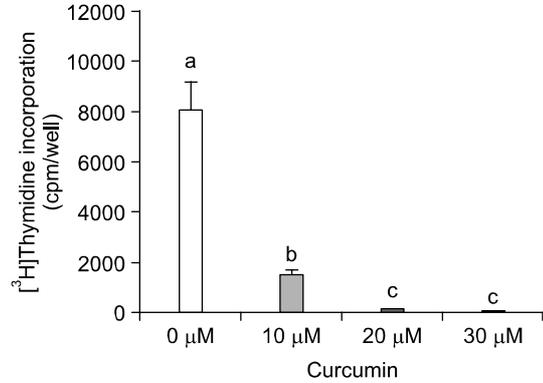


Fig. 2. Effect of curcumin on [³H]thymidine incorporation in MCF-7 cells. Cells were plated in 96-well plates at 6,000 cells/well and treated with curcumin for 21 h as described in Fig. 1. [³H]Thymidine was then added and the incubation was continued for another 3 h to measure the incorporation into DNA. Each bar represents the mean±SEM (n=6). Values with different letters above each bar are significantly different (p<0.05) among different treatments.

curcumin을 20 또는 30μM 농도로 첨가한 경우 DNA 합성은 거의 이루어지지 않았고, curcumin을 10μM 농도로 첨가한 경우 DNA 합성이 81.3±10.2% 감소하였다(Fig. 2). Mehta 등¹¹⁾은 curcumin이 호르몬 의존적, 호르몬 비의존적, 그리고 multidrug-resistant (MDR) 등 다양한 유방암 세포주의 증식을 억제하였다고 보고하였다. Ramachandran 등¹²⁾은 유방 상피 세포인 MCF-10A 세포와 유방암 세포인 MCF-7/TH 세포에 각각 curcumin을 처리한 결과 정상 세포인 MCF-10A 세포보다 암세포인 MCF-7/TH 세포에서 세포 증식 억제가 더 현저하게 나타났다고 보고하였다. 이들 결과는 curcumin이 유방암 세포의 증식을 효과적으로 억제하는 효력이 큰 물질임을 제시한다.

조직의 항상성은 세포 증식과 apoptosis 사이의 균형에 의해 조절되고,²⁷⁾ 세포 증식, 세포주기 진행과 apoptosis의 균형이 비정상적으로 이루어지면 암이 초래된다.²⁸⁾ 그러므로 암세포의 세포 증식을 억제하고 세포주기 진행을 지연하며 apoptosis를 유도하는 것은 암을 억제하는 효과적인 방

법이다. 본 실험에서 유방암 세포의 증식을 현저하게 억제한 curcumin이 세포주기 진행에 미치는 영향을 조사하였다. MCF-7 세포 배양액에 20μM curcumin을 첨가하여 48시간 배양한 후 cellular DNA을 propidium iodide로 염색하여 flow cytometry 방법으로 세포 주기를 분석하였다. Curcumin에 의해 G1기의 세포는 curcumin을 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 반면 S기와 G2/M기의 세포는 curcumin에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 3). 이는 curcumin이 MCF-7 세포의 G1 arrest를 유도함을 나타낸다. 여러 연구에서 curcumin이 세포 주기 지연을 유도했다고 보고하였다. 대장암 세포,¹³⁾ 구강암 세포¹⁴⁾ 등을 사용한 연구에서는 curcumin에 의해 G2/M arrest가 유도되었다. Ramachandran 등¹²⁾은 MCF-7/TH 유방암 세포에 curcumin의 농도를 20 또는 40μM 농도로 농도를 달리하여 처리한 결과 20μM curcumin에 의해서는 G2/M arrest가 유도되고, 40μM curcumin에 의해서는 G1 arrest가 유도되었다고 보고하였다. 이는 세포 종류와 실험 조건의 차이에 의한 것으로 사료된다.

Curcumin이 세포의 apoptosis에 미치는 영향을

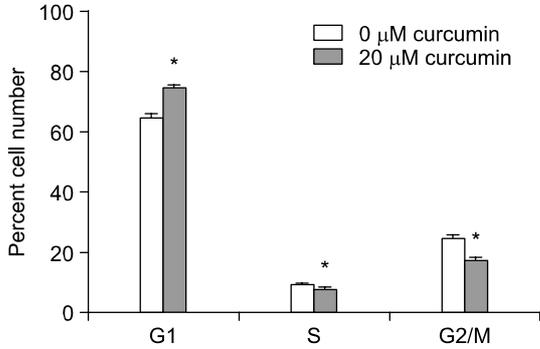


Fig. 3. Effect of curcumin on the cell cycle of MCF-7 cells. Cells were plated and treated with curcumin for 48 h as described in Fig. 1. Cells were trypsinized, fixed, and treated with RNase. Cellular DNA was then stained with propidium iodide. The percentages of G1, S, and G2/M phases of the cell cycle were analyzed by flow cytometry. *Significantly different from 0μM curcumin (p<0.05).

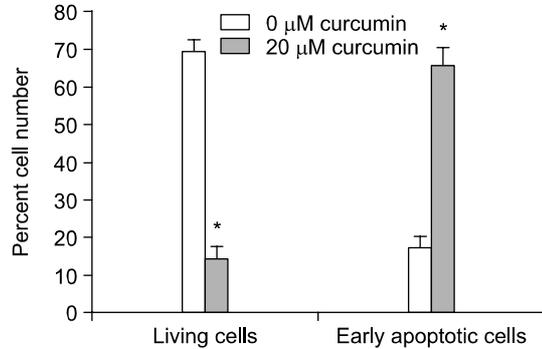


Fig. 4. Effect of curcumin on apoptotic cell numbers. Cells were plated and treated with curcumin for 48 h as described in Fig. 1. Cells were loaded with 7-aminoactinomycin D and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The numbers of living and early apoptotic cells are expressed as a percentage of total cell number. Each bar represents the mean±SEM (n=6). *Significantly different from 0μM curcumin (p<0.05).

조사하기 위해 Annexin-V를 사용하여 flow cytometry 방법으로 apoptosis 초기 단계에 있는 세포 수를 정량한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Curcumin을 20μM 농도로 첨가하여 세포를 48시간 배양한 결과 살아있는 세포수는 현저하게 감소하였고, apoptotic cell 수는 대조군에 비해 약 4배 증가하였다(Fig. 4). 본 실험에서는 curcumin에 의한 세포사멸 유도기전을 연구하지 않았다. 다른 연구자의 결과에 의하면 인체 대장암 세포인 SW480 세포에서 curcumin 처리에 의해 Bax의 수준은 변화하지 않았으나 Bcl-2 수준은 감소하였고 caspase-3의 활성화는 증가하였다.²⁹⁾ Choudhuri 등³⁰⁾은 curcumin이 p53에 의존하여 Bax의 발현을 증가시켜 유방암 세포의 apoptosis를 유도함을 보고하였다. 이들 연구들은 curcumin이 다양한 기전을 통해 암세포의 apoptosis를 유도함을 보여준다.

ErbB receptor family는 여러 암에서 과발현됨이 관찰되었으며, ErbB receptor family 활성화의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 요인으로 간주되고 있다.²¹⁾ 그러므로 본 연구에서는 curcumin이 ErbB receptor family의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험조건 하에서 MCF-7 세포에서 ErbB2와 ErbB3 단백질 발현은 탐지되었으나 ErbB1과 ErbB4 단백질은 탐지되지 않았다.

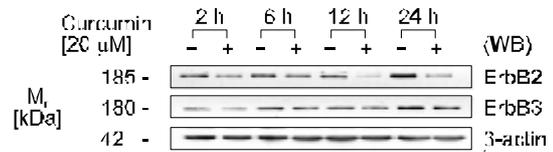


Fig. 5. Effects of curcumin on the protein levels of ErbB2 and ErbB3 in MCF-7 cells. Cells were plated in 100 mm dishes at 1×10^7 cells/dish and treated with curcumin for 2, 6, 12, or 24 h as described in Fig. 1. Cells were lysed and the cell lysates were analyzed by Western blotting with anti-ErbB2, anti-ErbB3, or β-actin antibody. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which are representative of three independent experiments, are shown.

ErbB3의 단백질 수준은 curcumin에 의해 감소하였으나 감소폭이 크지 않았고, ErbB2 단백질 수준은 curcumin 처리 후 12시간부터 현저하게 감소하였다(Fig. 5). ErbB2가 과발현되는 암세포인 BT474 세포에 ErbB2를 표적으로 하는 단일 항체인 4D5 또는 ErbB receptor의 활성을 차단하는 저분자 억제제인 CGP59326와 PKI166를 처리한 경우 세포의 증식이 현저히 감소한다.³¹⁾ 또한 ErbB receptor의 억제제들은 ErbB receptor family가 과발현되는 암세포의 증식(proliferation), 생존(survival), 침입

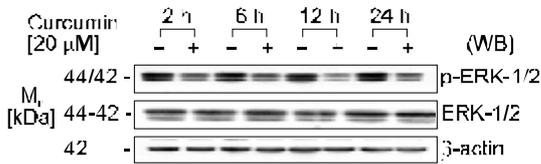


Fig. 6. Effects of curcumin on the protein levels of ERK-1/2 and phospho-ERK-1/2 in MCF-7 cells. Cell lysates were prepared with curcumin as described in Fig 5, and the lysates were subjected to immunoblotting with an antibody against ERK-1/2, phospho-ERK-1/2, or β -actin. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of three independent experiments, are shown.

(invasion), 혈관생성(angiogenesis) 등 여러 과정을 억제한다고 보고되었기 때문에³²⁾ ErbB receptor의 발현을 억제하는 물질은 암의 예방제나 치료제로 사용할 수 있는 가능성을 제시해준다. 본 연구에서 curcumin은 ErbB2와 ErbB3의 발현을 감소하였다(Fig. 5). 따라서 curcumin에 의한 ErbB2와 ErbB3의 감소가 curcumin의 암세포 증식 억제 기전 중의 하나가 될 수 있을 것으로 생각된다.

외부의 자극이 세포 표면에 존재하는 ErbB3/ErbB2를 통해 전달되어 ERK-1/2를 활성화하고, 활성화된 ERK-1/2는 직접적으로 세포 증식에 관여한다. Keshamouni 등³³⁾은 호르몬에 의존하고 estrogen에 양성 반응을 보이는 유방암 세포에서 ErbB2가 매개하는 신호 전달을 차단하는 경우 estrogen에 의해 유도되는 ERK-1/2의 활성화가 60~70% 감소함을 보고하였고, ErbB2가 유방암 세포에서 ERK-1/2의 활성화에 직접적으로 관여함을 제시하였다. 본 연구에서 유방암 세포인 MCF-7 세포의 ErbB2와 ErbB3 수준이 curcumin에 의해 감소함을 관찰하였으므로(Fig. 5), curcumin이 ERK-1/2의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 세포배양액에 curcumin을 첨가하여 2, 6, 12, 또는 24시간 배양한 후 cell lysate를 만들어 Western blotting 하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 ERK-1/2 수준은 curcumin에 의해 변화하지 않았으나 phospho-ERK-1/2는 curcumin 처리 후 2시간부터 유의적으로 감소하였다(Fig. 6). 이는 curcumin이 ERK-1/2 수준에는 영향을 미치지 않고 ERK-1/2의 활성화를 억제함을 제시한다. 이 연구 결과로부터 curcu-

min이 ErbB2/3 signaling을 억제하여 그 결과로 ERK-1/2의 활성화가 억제되었다는 가설을 세울 수 있다. ERK-1/2의 활성이 비정상적으로 증가하면 유방암이 발생된다고 간주되므로¹⁸⁾ curcumin이 ERK-1/2의 활성을 감소시킴을 관찰한 본 연구 결과는 curcumin을 효과적인 항암 물질로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

요약 및 결론

본 연구에서는 curcumin이 인간의 유방 상피에서 유래한 암세포인 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 curcumin의 유방암 세포 증식 억제 기전을 밝히기 위해 유방암의 발생과 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 ErbB receptor의 발현에 미치는 curcumin의 영향을 조사하였다. Curcumin에 의해 MCF-7 세포의 살아있는 세포수는 농도에 의존적으로 감소하였고, DNA 합성은 현저히 억제되었다. 세포 배양액에 curcumin을 첨가한 경우 세포에 apoptosis가 유도되었으며, G1 arrest가 일어나 세포주기 진행이 지연되었다. 본 연구조건 하에서 MCF-7 세포에서 ErbB2와 ErbB3 단백질 발현이 탐지되었으나 ErbB1과 ErbB4 단백질은 탐지되지 않았다. ErbB3의 단백질 수준은 curcumin에 의해 소폭 감소한 반면 ErbB2의 단백질 수준은 현저히 감소하였다. ErbB receptor 신호 전달에 의해 활성화되고 세포 증식에 중요한 역할을 담당하는 MAPK인 ERK-1/2는 curcumin에 의해 단백질 수준은 변화하지 않았으나 활성화는 현저하게 감소하였다. 이 결과들은 유방암 세포의 DNA 합성을 억제하고, 세포주기를 지연하고, apoptosis를 유도한 curcumin의 세포 증식 억제 효과의 일부는 ErbB2/3 signaling 억제와 ERK-1/2의 활성화 억제에 기인함을 나타내며, curcumin을 효과적인 항암 물질로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한림대학교 교비연구비(HRF-2004-36)에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) 한국중앙암등록본부, 보건복지부, 2003.
- 2) 백남선. 유방암의 원인, 진단, 및 최신 치료법. 대한 암예방학회지 2003; 8: 236-244.
- 3) Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Nutrition and breast cancer. *The Breast* 2003; 12: 412-416.
- 4) Wu C, Ray RM, Lin MG, Gao DL, Horner NK, Nelson ZC, Lampe JW, Hu YW, Shannon J, Stalsberg H, Li W, Fitzgibbons D, Porter P, Patterson RE, Satia JA, Thomas DB. A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: shanghai nutrition and breast disease study, China, 1995-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 945-960.
- 5) Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem* 1995; 22: 169-180.
- 6) Sharma OP. Anti-oxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol* 1976; 25: 1811-1812.
- 7) Satoskar RR, Shah SJ, Shenoy SG. Evaluation of anti-inflammatory properties of curcumin (diferuloylmethane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986; 24: 651-654.
- 8) Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice. *J Cell Biochem* 1997; 27: 26-34.
- 9) Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988; 48: 5941-5946.
- 10) Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 1994; 54: 5841-5847.
- 11) Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 1997; 8: 470-481.
- 12) Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54: 269-278.
- 13) Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 1999; 9(5A): 3675-3680.
- 14) Khafif A, Schantz SP, Chou TC, Edelstein D, Sacks PG. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 1998; 19: 419-424.
- 15) Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem* 1995; 270: 24995-25000.
- 16) Reddy KB, Krueger JS, Kondapaka SB, Diglio CA. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int J Cancer* 1999; 82: 268-273.
- 17) Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8319-8323.
- 18) Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1478-1483.
- 19) Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; 14: 381-395.
- 20) Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-185.
- 21) Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232.
- 22) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Sciences* 1989; 244: 707-712.
- 23) Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 496-499.
- 24) Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Zimmermann A, Stauffer A, Baer HU, Korc M, Buchler MW. Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is

- associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol* 1998; 29: 771-777.
- 25) Denizot F, Lanf H. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensivity and reliability. *J Immunological Methods* 1986; 89: 271-277.
- 26) Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1894-1900.
- 27) Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J Sci Am* 1998; 4(Suppl 1): S8-S14.
- 28) Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348.
- 29) 최옥순, 김우경. Curcumin이 인체대장암세포주인 SW480 cell에서 세포사멸에 미치는 영향. *한국영양학회지* 2004; 37: 31-37.
- 30) Choudhuri T, Pal S, Agwarwal ML, Das T, Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett* 2002; 512: 334-340.
- 31) Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002; 62: 3151-3158.
- 32) Anderson NG, Ahmad T. ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. *Front Biosci* 2002; 7: 1926-1940.
- 33) Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 7-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem* 2002; 277: 22558-22565.