

Indole-3-carbinol과 Genistein에 의한 자궁근종세포의 성장억제 효과

계명대학교 의과대학 동산의료원 산부인과학교실

정희웅 · 김윤옥 · 신소진 · 권상훈 · 차순도 · 조치흠

Indole-3-carbinol and genistein inhibit growth of human uterine leiomyoma cells

Hee Woong Jeong, M.D., Yun Ok Kim, M.D., So Jin Shin, M.D.,
Sang Hoon Kwon, M.D., Soon Do Cha, M.D., Chi Heum Cho, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Keimyung university, Daegu, Korea*

Objective: To determine whether Indole-3-carbinol (I3C) can enhance the inhibitory effect of genistein on a human uterine leiomyoma cells.

Methods: Five uterine leiomyoma tissues were obtained from hysterectomies conducted on the benign diseases and cultured primarily. MTS reduction assay was carried out to determine the viability of human uterine leiomyoma cells. Cell cycle analysis for I3C and genistein treated human uterine leiomyoma cells was done by Fluorescent activated cell sorter (FACS) analysis. To detect the presence and expression of cell cycle related proteins was done by Western blot analysis.

Results: I3C and genistein induced growth inhibition in a dose dependent manner, treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ I3C and 100 $\mu\text{mol/L}$ genistein blocked 60% cell growth. FACS results showed that treatment with the I3C and genistein increased the percentage of cells in G2/M phase and decreased S phase. From Western blot analysis it revealed I3C and genistein induced the expression of p53, p21, and p27 increasing. Reduced expression of cyclin B1 and cyclin E were detected in treatment with I3C and genistein. The expression levels of these proteins correlate with G2/M cell cycle arrest. Activation of caspase pathway and fragmentation of PARP did not take place.

Conclusions: These results demonstrate that I3C enhances genistein-mediated uterine leiomyoma cell growth inhibition through the cell cycle arrest at G2/M phase by decreasing the production of cyclin B1. Because of the synergistic effect of I3C and genistein, the potential exists for the therapeutic efficacy of each phytochemical when used in combination.

Key Words: Uterine leiomyoma cells, Indole-3-carbinol, Genistein

서 론

자궁 근종은 여성에서 발생하는 종양 가운데 가장 흔한

종양으로, 가임기 여성의 20~30%에서 발생하는 것으로 보고 되며, 40세 이상의 여성에서는 40~50%가 발견되는 매우 흔한 질병이다.^{1,2} 자궁근종의 원인은 현재까지 그 원인이 정확하게 알려져 있지 않으나, 자궁 평활근내에 있는 하나의 신생세포 (neoplastic cell)에서부터 기인한다고 알려져 있다.³ 이외에 가족적 경향도 있고, 임신 중에는 크기가 커지고 폐경후에는 크기가 줄어드는 형태를 보이므로 여성호르몬의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 우리나라

접수일 : 2007. 2. 24.
채택일 : 2007. 5. 21.
교신저자 : 조치흠
E-mail : c0035@dsmc.or.kr

* 이 논문은 한국과학재단 MRC 연구센터 (R13-2002-028-01003-0) 지원으로 수행되었음.

에서 시행되는 자궁절제술에 있어 45%에서 자궁근종 때문에 시술되며,^{4,5} 미국에서는 연간 200,000~300,000명의 환자가 자궁근종으로 자궁절제술을 시행하고 있다.⁶

자궁근종의 진단율은 가임기에는 증가하고, 폐경기에는 감소하는 것은 전자궁 적출술을 시행한 경우의 후향적 연구로 검증되었다.⁷ 이러한 것으로 볼 때 자궁근종은 에스트로겐과 가장 밀접한 관계가 있다고 보여진다. Indole-3-carbinol (I3C)은 겨자과 식물인 브로콜리, 양배추, 케일 등에 존재하는 것으로 에스트로겐 의존성 암의 예방이나 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다.⁸ 스웨덴에서 시행된 실험적, 통계적 자료에서 I3C를 포함하는 겨자과 식물의 많은 섭취는 유방암의 유병율을 낮추는 것으로 보고하고 있고,⁹ 실험적으로 I3C의 투여로 유방암, 자궁내막암, 자궁경부암을 예방하는 것을 동물실험을 통해 증명하였다.¹⁰⁻¹² Genistein은 콩에서 추출된 추출물로 항 증식, 혈관 신생억제 및 항산화효과를 가진 것으로 알려져 있다.^{13,14} 또한 유방암세포에서 I3C와 genistein의 동시 투여로 GADD의 발현이 증가되어 에스트로겐 수용체에 작용하여 세포자멸사를 유도하는 역할을 한다고 알려져 있다.⁸ 이에 본 연구자는 자궁근종세포에 I3C와 genistein을 각각 혹은 동시투여로 세포증식 억제에 미치는 영향을 분석하여 치료에 유용한지를 알아보고자 이 연구를 계획 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본원에서 자궁근종으로 수술 받은 5명의 환자에서 수술 시 신선한 자궁근종과 자궁 근 조직을 채취하여 실험 시까지 -78℃에서 냉동 보관하였다. 조직의 채취는 환자의 동의와 윤리 위원회에 통과한 지침서에 준해서 시행하였다. 이외에 1차 조직배양을 위해 수술시 신선한 조직을 얻어 자궁근종과 정상 자궁근 세포를 배양하였다.

2. 연구 방법

1) 세포 배양

일차정상 자궁 평활근 조직과 자궁근종 조직을 수술 후 얻어 가능한 신선한 조직을 Hank's balanced salt solu-

tion (HBSS) 상에서 잘게 절단 한 후 15 mL 튜브에 옮겨 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거하였다. 절단한 조직에 HEPES (25 mmol/L), penicillin (200 U/mL), streptomycin (200 µg/mL), collagenase type IV (1.5 mg/mL), DNase (0.2 mg/mL)를 HBSS에 넣고 37℃ 수조에서 3~4시간 배양하였다. 충분히 소화된 조직을 피펫을 이용하여 강하게 혼합해서 단일 세포로 분리한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이것을 다시 phosphate-buffered saline (PBS)으로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거하였다. 모아진 세포를 10% fetal bovine serum이 든 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24~48시간 후 배양액을 교환하였다. 배양된 세포는 smooth muscle actin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 양성 및 음성 결과에 따라 근육 세포인지를 확인하였다.

2) MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] 분석

96 well plate에 정상 자궁 근과 자궁 근종세포를 multi pipet을 사용하여 4×10^3 /well로 분주하였다. 배양기에 24시간 배양 후 I3C와 genistein을 농도별로 72시간 처리한 후 MTS 측정 시, One Solution Reagent를 실온에 90분 또는 37℃에 10분간 방치하였다. 각 well당 들어있는 media 200 µL multi pipet을 이용하여 pipeting하여 cell이 suspension된 후 well 당 100 µL 되도록 하였다. 각 well 당 One Solution Reagent를 20 µL 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에 배양한 후 1~4시간 사이, 1시간 간격으로 MTS 측정하였다. 96 well plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) FACS (fluorescence-activated cell sorter)에 의한 세포주기 분석

자궁근종 세포를 60 mm tissue culture dish에 3×10^5 cells/dish로 cell seeding 하였다. 배양기에 24시간배양 후 I3C와 genistein을 용량별로 투여 하였다. 24~48시간 배양 시킨 세포를 PBS로 수세 후, 1×trypsin-EDTA로 재부유시킨 뒤, 1,000 rpm 3분간 원심분리 하였다. 상층액

을 제거하고 PBS로 재부유 시킨 뒤, 1.5 mL tube에 옮겼다. 1,000 rpm 3분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 cold absolute EtOH 1 mL 넣고 재부유 시킨 후, 4℃에 1시간 이상 세포를 고정시켰다. 1000 rpm으로 3분간 원심 분리하고 상층액을 제거하여 PBS 수세한 후, Trisodium citrate (Sigma Chemical Co., USA) 0.1%, IGEPAL-Ca-630 (Sigma Chemical Co., USA) 0.1%가 함유된 용액에 RNase A 5 mg/mL, propidium iodide (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 첨가하여 암실에서 1시간 동안 4℃에서 염색하였다. 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량에 따른 histogram을 측정하였다.

4) Western blot analysis

자궁근종 세포에서 I3C와 genistein을 투여 후 세포 주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보고자 시행하였다. 분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mmol/L Tris-Cl [pH 7.4], 5 mmol/L EDTA [pH 8.0], 130 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 mol/L phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계 (Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질을 분획을 전기영동하고 Nitrocellulose paper (Immobilon, Milipore Co., USA)로 전기이동 (electrotransfer)를 시행하였다. 전기 이동된 막을 blocking용액에 넣어 cold chamber내에서 12시간 shaking하였다. Blocking용액을 제거하고 일차항체 (Santa Cruze Biotecology Inc., USA)인 p27, p53, p21, cyclin A, cyclin E, cyclin D1, cyclin B1(Santa Cruz, CA, USA)과 세포자멸사에 관계하는 일차항체인 procaspase3, PARP (Santa Cruz, CA, USA)을 1 : 1,000으로 희석하여 실온에 3시간 동안 반응 시킨 후 1×TBS-T 용액 (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl, 0.5% Tween 20)으로 nitrocellulose 막을 넣고 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruze Biotecology Inc., USA)를 1 : 1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose막을 넣고 2시간 동안 반응시

켜 항체를 결합시킨다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 3회 세척하여 비 특이적으로 결합해있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아있는 TBS-T를 제거하고 ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)로 검출하였다.

5) 통계처리

통계의 처리는 대조군은 근종 세포에 DMSO만 투여한 군이며 실험군으로는 I3C와 genistein을 농도별로 처리하여 두 군사이의 유의성을 student - t 방법을 이용하여 검정하였으며, 최소 3번의 실험을 하여 mean±SD로 나타내었고, p<0.05일 때 유의성이 있다고 나타내었다.

결 과

1. I3C와 genistein의 자궁근종세포에 대한 72시간 농도별 세포생존율:

일차 배양된 자궁근종세포에 I3C와 genistein을 농도별로 처리한 결과 72시간 후 I3C는 100 μmol/L의 농도에서도 10%의 증식억제만 보였으며, genistein의 경우 100 μmol/L의 농도에서 40%의 증식억제 효과를 보였으나, 동시 투여한 경우 억제효과는 통계적으로 의미 있는 60%까지 효과가 증가하였다 (Fig. 1).

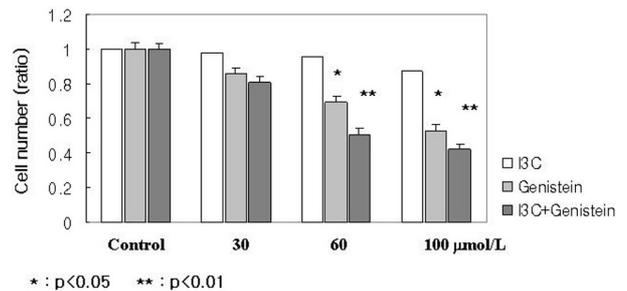


Fig. 1. Effect of indole-3-carbinol (I3C) and genistein on cell growth of human uterine leiomyoma cells. Growth inhibition in human uterine leiomyoma cells treated for 72 hours with various concentrations of I3C and genistein. Cell viability was measured using Cell Titer cell Proliferation Assay (Promega Corp) and expressed as % of control culture conditions.

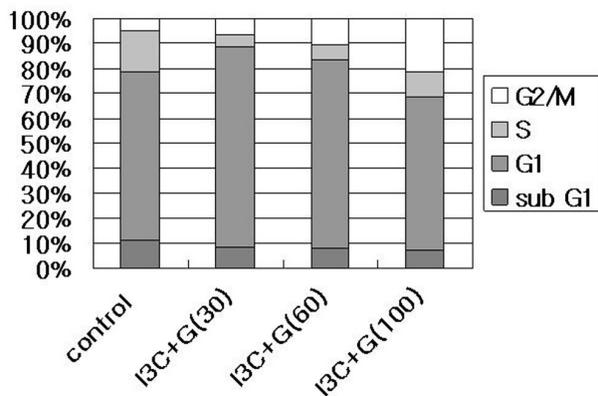


Fig. 2. Effect of indole-3-carbinol (I3C) and genistein treatment on the cell cycle profile.

After treatment with 100 $\mu\text{mol/L}$ I3C with 30, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$ genistein treatment for 72 hours, uterine leiomyoma cells were collected, fixed, stained with PI and analyzed by flow cytometry. The values represent the number of cells in a phase of the cell cycle as a percentage of total cells.

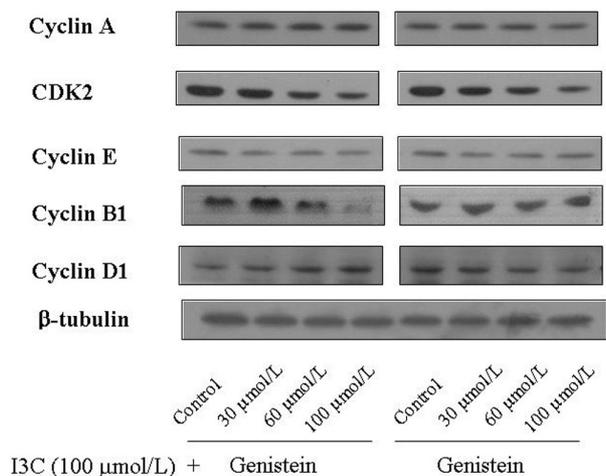


Fig. 4. Effect of the combination of indole-3-carbinol (I3C) and genistein treatment on the cell cycle related gene expression. β -tubulin was used as an internal control.

2. I3C와 genistein이 세포주기에 미치는 효과:

자궁근종세포에 I3C 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 고정하고 genistein의 농도를 30, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 증량하면서 처리하고 72시간 후 세포주기를 분석한 결과, 대조군과 비교하여 I3C와 genistein의 농도가 증가할수록 G2/M

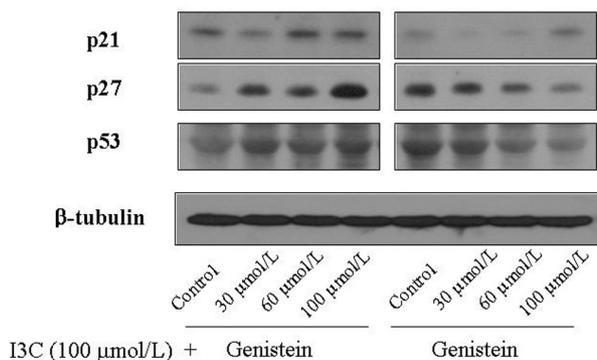


Fig. 3. Effect of the combination of indole-3-carbinol (I3C) and genistein treatment on the cell cycle related gene expression. β -tubulin was used as an internal control.

주기의 지연 증가와 S 주기의 감소가 확인되었다 (Fig. 2).

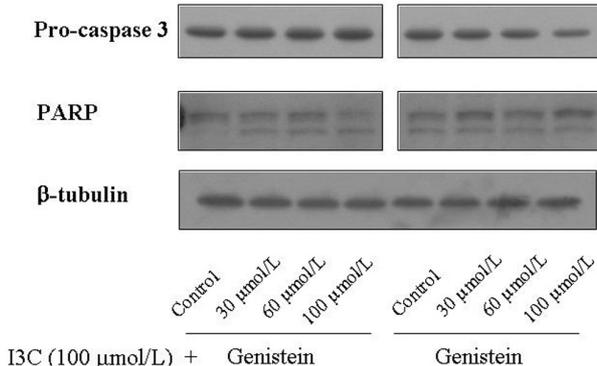


Fig. 5. Effect of the combination of indole-3-carbinol and genistein treatment on the apoptosis related gene expression. β -tubulin was used as an internal control.

3. I3C와 genistein의 p27, p53, p21, CDK2, cyclin A, cyclin D1, cyclin E, 및 cyclin B1 유전자에 대한 효과:

자궁근종세포에 I3C 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 고정하고

genistein의 농도를 30, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 증량하면서 처리하고 72시간 후 세포주기에 관계하는 유전자 발현을 관찰한 결과, p53, p27, p21 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으며 (Fig. 3), cyclin E와 CDK2는 발현 감소를 보였으며, G2/M 주기에 관여하는 cyclin B1의 감소를 확인하였다. 이외의 cyclin의 발현변화는 보이지 않았다 (Fig. 4).

4. I3C와 genistein의 pro-caspase 3와 PARP 유전자에 대한 효과:

자궁근종세포에 I3C 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 고정하고 genistein의 농도를 30, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 증량하면서 처리하고 72시간 후 세포자멸사의 경로를 알아보기 위하여 pro-caspase 3, PARP 단백질의 발현을 측정하고, pro-caspase 3 단백질의 양적 변화는 없었으며, PARP는 농도가 증가할수록 발현이 조금은 감소하나 의미를 보이지는 않았다 (Fig. 5).

고찰

자궁근종은 지속적인 생존력과 성장을 위해 에스트로겐의 자극이 필요하기 때문에 일반적으로 폐경후 성장이 퇴행한다. 그러나 호르몬 대체요법을 투여하는 폐경 후 여성은 폐경 후에도 증상이 지속될 위험성이 높아진다. 호르몬 대체요법은 자궁근종의 성장을 자극할 가능성이 있다. 호르몬 대체요법이 자궁근종에 미치는 영향에 대한 연구에서는, 무증상의 폐경 후 여성에게 호르몬 대체요법을 시행하고 자궁 평활근종의 성장을 12개월 동안 감시하였다.¹⁵ 이 연구에서 에스트로겐 요법이 분명한 자궁 평활근종 성장과 관련이 있었다는 것을 보여 주었다. 그러므로 에스트로겐이 자궁근종의 발생이나 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 의미하는 것으로 생각된다. 지금까지 잘 알려진 자궁근종의 분자생물학적 이상소견으로는 에스트로겐과 황체호르몬 수용체의 증가, aromatase P450의 증가, 및 bcl-2 단백질의 증가 등이 있다.¹⁶⁻¹⁸ 이들은 자궁근종의 발생과 성장에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있는데, 특히 에스트로겐은 자궁근종의 성장에 중요한 인자로 알려져 있으며 bcl-2는 세포자멸사를 억제하는 유전자로 이 역시 근종의

성장에 관여할 것으로 알려져 있으며 이 인자는 또한 황체호르몬에 의해 발현이 증가된다. 유방암세포에서 I3C와 genistein에 의해 GADD의 발현이 증가되어 에스트로겐 수용체에 작용하여 세포자멸사를 유도한다는 보고가 있다.⁸ 그러므로 에스트로겐을 자연 천연추출물에서 제어하는 기능을 보인 I3C와 genistein을 투여하여 자궁근종에서의 증식에 영향을 미치는가를 본 연구에서는 알아보고자 하였다.

I3C는 겨자과 식물인 브로컬리, 양배추, 케일 등에 존재하는 것으로 에스트로겐 의존성 암의 예방이나 치료에 효과적이며, genistein은 콩에서 발견되는 플라보노이드로 다양한 세포에서 세포주기 조절과 세포자멸사를 유도하며, 또한 항에스트로겐의 성격을 가지고 있다.¹⁹ 그러므로 이 두 약제의 투여로 자궁근종 성장 억제에 상승효과가 있는지를 보고자 하였다.

먼저 I3C와 genistein에 의한 자궁근종세포의 증식억제 효과를 알아보기 위하여 I3C와 genistein의 농도를 유방암에서 시행한 연구에서 I3C가 에스트로겐 수용체 알파에 영향을 미친다는 발표²⁰에서 I3C의 농도가 100 $\mu\text{mol/L}$ 에서 적정하였으며, 본 실험에서도 농도를 높여가면서 실험하였으나 그 이상의 농도에서는 효과가 없었다. I3C와 genistein을 각, 각 또는 동시 투여하여 농도별로 처리한 결과 72시간 후 I3C는 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도에서도 10%의 증식억제만 보였으며, genistein의 경우 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도에서 40%의 증식억제 효과를 보였으나, 동시 투여시 억제효과는 통계적으로 의미 있는 60%까지 효과가 증가하였다 (Fig. 1). 이것으로 보아 I3C 단독투여는 근종증식 억제 효과가 의미가 없으며, genistein 단독 투여군에서는 효과를 보였으나, I3C와 genistein 동시투여로 효과가 성장 억제 효과가 상승되는 것을 관찰하였다. I3C와 genistein 투여가 세포주기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자궁근종 세포에 I3C 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 고정하고 genistein의 농도를 30, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$ 의 농도로 증량하면서 72시간 후 세포주기를 분석한 결과, 대조군과 비교하여 I3C와 genistein의 농도가 증가할수록 G2/M 주기의 지연 증가와 S 주기의 감소가 확인되었다. 이러한 결과는 G2/M 주기의 감소를 동반하는 세포증식 억제를 보였으며, 세포자멸사를 초래하는 subG1 주기의 변화는 관찰할 수 없어 세포자멸

사로는 이르지 않는다는 것을 알았다. 이것은 다른 보고에서⁸ I3C와 genistein 동시 투여로 유방암이나 다른 암종에서는 세포자멸사를 보이는 것과는 달리, 자궁근종 세포는 양성종양으로 세포의 증식도 악성과는 달리 늦은 것을 보여, 세포자멸사보다는 세포주기 조절을 통한 세포성장 억제를 보이는 것으로 판단된다. 즉 다시 말하면 암세포의 배양에서는 세포의 증식 속도가 빠른 것을 일차 배양에서 확인할 수 있지만, 실제 실험에서 자궁근종 세포는 암세포와는 달리 일차 배양해보면 2배로 증식 되는 속도가 많이 느린 것을 알 수 있어 이와 연관된 것으로 생각된다. 이후에 시행한 세포자멸사를 확인하기 위한 DNA 분절검사를 시행하였으나, 세포자멸사를 보이지는 않았다 (data not shown).

세포의 성장 및 분화의 조절은 세포가 정상적으로 자라는데 필수적이며 이 과정이 어떤 원인에 의하여 손상되면 정상세포는 비정상적인 세포주기를 거치게 된다. 그러므로 세포주기에 관여하는 단백질 발현을 살펴본 결과 p53, p27, p21 유전자는 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으며, cyclin E와 CDK2는 발현 감소를 보였고, G2/M 주기에 관여하는 cyclin B1은 예상대로 감소를 확인하였다. 이외의 cyclin의 발현변화는 보이지 않았다. 세포 주기를 조절하는 요인 중 하나로 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)가 있으며 인산화와 cyclin 결합에 영향을 받으며 세포 주기는 p21, p27과 같은 다양한 세포 주기 조절

억제유전자에 의해서 억제된다.²¹ 그 중 p27은 보편적인 CKI 중 하나로 알려져 있으며 세포주기의 여러 단계에서 억제 역할을 한다.²² p27의 주된 억제 역할은 cyclinE-CDK2 (cyclin-dependent kinase) 와 결합하여 복합적으로 이루어지며 그 외 CKI로서 p27은 유방암, 폐암, 대장암, 전립선암, 난소암 등 여러 종양의 발달 시기에 p27단백질의 발현이 감소되는 종양 억제 유전자로 알려져 있다.²³ 또한 p53 종양 억제인자는 G1 주기 정지에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 이온화 방사선 및 DNA에 손상을 주는 약제들에 의한 G1 분기 정지에도 필수적인 인자로 알려져 있다.²⁴ 본 연구에서도 저 농도에서는 G1 주기의 정지를 세포주기 분석에서 보였으며, G1 주기에 관여하는 p21, p27 유전자의 발현과 더불어 CDK의 감소를 보여 세포주기를 정지하게 만들며, 이것은 p53 의존적 경로를 통하는 것을 확인하였다.

I3C와 genistein 투여로 세포자멸사에 이르는 경로를 알아보기 위해 caspase 단백질과 PARP 단백질발현을 보았으나, 세포주기 분석에서 보이는 것 같이 pro-caspase 3의 활성화는 보이지 않았으며, PARP의 분절도 보이지 않았다.

결론적으로 I3C와 genistein의 동시투여가 자궁근종세포의 증식억제에 효과가 있으며, 이는 세포주기에서 G2/M 주기의 지연과 세포주기 관련 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 일어나며, 향후 자궁근종의 치료에 있어 대체 약물로서의 가능성이 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Zaloudek CJ, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In : RJ Kurman(ed.). Blaesteins' pathology of the female genital tract. 4th ed. New York. 1994; 484-94.
- Hendrickson MR, Kempson RL. Pure mesenchymal neoplasms of the uterine corpus. In : H Fox and M Ellis(eds.) Obstetrical and gynecological pathology. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1995; 542-73.
- Townsend DE, sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Obstet gynecol 1970; 107: 1169-73.
- 정진국, 고만석, 정병욱, 이호형, 최호준, 신승권. 자궁근종에 관한 임상통계학적 고찰. 대한산부회지 1998; 41: 210-7.
- 권상훈, 조지흠, 차순도, 백원기, 김문규, 김정철. DNA Chip을 이용한 자궁평활근종과 정상 자궁근조직에서의 유전자발현 비교 분석. 대한산부회지 2003; 46: 701-6.
- Wilcox LS, Koonin LM, Pokras R, Strauss LT, Xia Z, Peterson HB. Hysterectomy in the United States, 1988-1990. Obstet Gynecol 1994; 83: 549-55.
- Brett KM, Marsh JV, Madans JH. Epidemiology of hysterectomy in the United States: demographic and reproductive factors in a nationally representative sample. J Womens Health 1997; 6: 309-16.
- Auborn KJ, Fan S, Rosen EM, Goodwin L, Chandraskaren A, Williams DE, et al. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. J Nutr 2003; 133: 2470-5.
- Terry P, Wolk A, Persson I, Magnusson, C. Brassica vegetables and breast cancer risk. J Am Med Assoc 2001; 285: 2975-7.
- Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT, Osborne MP. Effects of dietary indole-3-carbinol on estrogen metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. Carcinogenesis 1991; 12: 1571-4.
- Kojima T, Tanaka T, Mori, H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol.

- Cancer Res 1994; 54: 1446-9.
12. Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM et al. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3991-7.
 13. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, et al. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 1995; 125: 790-7.
 14. Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S, Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 124-30.
 15. Sener AB, Seckin NC, Ozmen S, Gokmen O, Dogu N, Ekici E. The effects of hormone replacement therapy on uterine fibroids in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1996; 65: 354-7.
 16. Brandon DD, Erickson TE, Keenan EJ, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, et al. Estrogen receptor gene expression in human uterine leiomyomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1876-81.
 17. Matuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 293-9.
 18. Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K, et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. *Endocrinology* 2000; 141: 3852-61.
 19. Yoon HS, Moon SC, Kim ND, Park BS, Jeong MH. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 151-6.
 20. Wang TT, Milner MJ, Milner JA, Kim YS. Estrogen receptor α as a target for indole-3-carbinol. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 659-64.
 21. Yue H, Song FL, Zhang N, Feng XL, An TY, Yu JP. Expression of p27kip1, Rb protein and proliferating cell nuclear antigen and its relationship with clinicopathology in human pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 142-6.
 22. Zhou Q, He Q, Liang LJ. Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2450-4.
 23. Barnes A, Pinder S, Bell J, Paish E, Wencyk P, Robertson J, et al. Expression of p27kip1 in breast cancer and its prognostic significance. *J Pathol* 2003; 2001: 451-9.
 24. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.

= 국문초록 =

목적: 자궁근종세포에 I3C와 genistein을 각 각 혹은 동시투여로 세포에 미치는 영향을 분석하여 치료에 유용한 지를 알아보고자 하였다.

연구 방법: 자궁근종으로 수술 받은 5명의 환자에서 자궁근종세포를 일차 배양하였다. I3C와 genistein 각각 혹은 동시 투여 후 자궁근종세포에 대한 세포생존율을 알아보기 위해 MTS 분석을 이용하였고, 세포 주기 회로에 관계하는 유전자의 발현을 보기 위해 Western blot analysis를 시행하였다. 세포주기분석은 유세포분석기를 이용하였다.

결과: 일차 배양된 자궁근종세포에 I3C와 genistein을 농도별로 처리한 결과 72시간 후의 결과에서 독립적으로 투여한 것보다 동시투여시 증식억제의 증가를 보여 100 μ mol/L의 농도에서 60%의 증식억제 효과를 보였으며, genistein의 농도에 비례하여 증식억제 효과가 증가하였다. 세포 주기분석에서 I3C와 genistein의 농도가 증가할수록 G2/M 주기의 지연 증가와 S 주기의 감소가 확인 되었다. p53, p21과 p27 단백질은 농도가 증가할수록 발현이 증가하였고 cyclin B1은 감소하였으며, I3C와 genistein의 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 pro-caspase 3 단백질의 양적 감소와 PARP cleavage의 증가는 관찰되지 않아 세포자멸사로 유도되지는 않았다.

결론: 이상으로 I3C 와 genistein의 동시투여가 자궁근종세포의 증식억제에 효과가 있으며, 이는 세포주기에서 G2/M 주기의 지연과 세포주기 관련 유전자들의 발현에 영향을 미침으로써 일어나며, 향후 자궁근종의 치료에 있어 대체약물로서의 가능성이 있는 것으로 생각된다.

중심단어: 자궁근종세포, Indole-3-carbinol, Genistein
