Adiponectin과 Leptin이 전립선암 세포의 증식에 미치는 영향

The Effects of Adiponectin and Leptin in the Proliferation of Prostate Cancer Cells

Seo Yeon Lee, Se Jun Park, In Ho Jang, Soon Chul Myung, Tae Hyoung Kim

From the Department of Urology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Purpose: With the westernization of dietary life, domestic prostate cancer prevalence has remarkably increased recently. Therefore, to examine the effects of obesity on prostate cancer, we analyzed the effects of leptin and adiponectin, which are the cytokines secreted from adipocytes, on prostate cancer *in vitro* and confirmed the results by *in vivo* experiment.
Materials and Methods: *In vitro*, the human androgen-independent prostate cancer cell line DU-145 was exposed to various concentrations of adiponectin and leptin, and their effects were measured with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. *In vivo*, the effects of tumor growth were observed in xenografted nude mice with prostate cancer.
Results: Adiponectin significantly repressed DU-145 cell growth in a dose-dependent manner. Leptin promoted DU-145 cell growth in dose-dependent manner, but it was not significant statistically. *In vivo*, adiponectin-treated mice demonstrated a reduced tumor volume, although it was not significant statistically. By contrast, leptin-treated mice showed a significantly increased tumor volume ($p < 0.01$).
Conclusions: The *in vitro* and *in vivo* finding suggested that adiponectin suppresses the proliferation of prostate cancer cells and that leptin plays an important role in the proliferation of prostate cancer cells. We suggest that adiponectin and leptin have a relation to the progression of prostate cancer in the obese population. **(Korean J Urol 2009;50:493-497)**

Key Words: Prostatic neoplasms, Adiponectin, Leptin

Korean Journal of Urology
Vol. 50 No. 5: 493-497, May 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.5.493

중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이소연 · 박세준 · 장인호
명순철 · 김태형

Received : December 24, 2008
Accepted : April 20, 2009

Correspondence to: Tae Hyoung Kim
Department of Urology, College of Medicine, Chung-Ang University, 65-207, Hankang-ro 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea
TEL: 02-748-9978
FAX: 02-798-8577
E-mail: kthlmk@hanafos.com

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2007-331-E00153).

© The Korean Urological Association, 2009

서 론

전립선암은 서구에서 암으로 인한 사망의 두 번째로 흔한 원인이며[1] 유병률과 사망률이 매우 높은 질병이지만[2] 아시아에서는 이에 비해 낮은 양상을 보인다. 이런 인종적인 차이는 유전 인자뿐만 아니라 여러 환경적인 원인들 때문으로 생각한다. 그 중 비만은 당뇨[3]나 심혈관 질환[4]뿐 아니라 악성종양의 위험인자[5]로도 널리 알려져 있는 대사질환이며, 서구의 높은 전립선암 유병률과 사망률을 설명해주는 하나의 요인으로 서구인들의 고지방 식이 및 높은 비만 유병률이 대두되고 있다. 최근 식생활의 서구화와 함께 국내 전립선암의 발생 빈도도 급격히 증가하고 있으며, 이에 비만과 전립선암의 관계에 대한 관심이 고조되고 있다.

지방조직은 우리 몸에서 가장 큰 내분비기관[6]으로 에너지 대사와 염증반응 등을 조절하며, 여러 악성종양과도 연관이 있다. 지방세포에서는 adipokine이라고 불리우는 cytokine을 분비하는데 leptin과 adiponectin이 대표적인 adipokine 중 하나이다.[7] 순환 leptin치는 복부비만율과 비례하고,[8] 악성 전립선암 환자에서 높다.[9] 반면 adiponectin치는 복부비만율과 반비례[10]하고 전립선암 환자에서 낮게 측정될 뿐 아니라 Gleason score와 반비례한다.[11]

본 연구에서는 비만이 전립선암에 미치는 영향을 알아보고자 leptin과 adiponectin이 전립선암 세포의 증식에 미치는

영향을 생체 외에서 분석하고, 생체 내 실험으로 입증하였다.

대상 및 방법

1. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) 검색법에 의한 세포생존율의 측정

종양 세포주는 한국 세포주 은행 (Korean Cell Line Bank)에서 인형 남성호르몬 비의존성 전립선암세포주 DU-145를 분양받아 사용하였다. 기본 배지는 RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, USA)에 10% 우태혈청, L-glutamine, penicillin과 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 배양 용기는 5% CO_2와 95% 공기가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되도록 하였다. DU-145 세포를 $3x10^3$의 세포로 10% 우태혈청을 함유한 RPMI-1640 배지에 부유시켜 96 well 배양조에 24시간 배양 후 우태혈청이 제거된 RPMI 1640로 교체하였다. Adiponectin/Acrp30 (R&D Systems, Minneapolis, USA) 시료는 0, 10, 100, 250, 500, 1,000, 2,000 ng/ml 농도로, hLeptin (R&D Systems) 시료는 0, 10, 50, 100 ng/ml 농도로 우태혈청이 제거된 RPMI-1640 배지에 각각 첨가하였다. 각각의 실험군은 96 well 배양조의 8 well을 동일한 조건으로 사용하였으며 adiponectin 실험군은 4, 8, 12, 24, 48시간, leptin 실험군은 6, 12, 24, 48시간 배양하였다. 두 시료 처리군에 각각 0.5 mg/ml MTT를 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 용해물질 100 μl를 첨가한 후 배양하여 formazan을 녹인 다음 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Spectra MAX 340, Molecular Devices, USA)로 550 nm에서 흡광도 (optical density; OD)를 측정하였다. 세포생존율은 같은 배양 기간 중 시료를 가한 군의 세포 밀도를 대조군의 세포 밀도와 비교하여 구하였다.

2. DU-145 세포를 주입한 누드마우스에서의 종양 부피 변화

18마리의 6주령 수컷 누드마우스 (BALB/c-nu)를 Japan SLC, Inc. (Haruno production facility, Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 몸무게는 약 25 g이었으며 중앙대학교 의과대학 동물실험실에서 무균상태로 사육하였다. 1주 후 $3x10^3$의 DU-145 세포 (total volume 0.2 ml)를 좌측 대퇴부 피하에 이종이식하였다. 10일 후 누드마우스 대퇴부의 종양을 확인한 후 종양 크기를 micrometer (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정한 후 $(단축)^2x(장축)x0.52$의 공식[12]으로 부피를 산출하여 부피가 육안적으로 확인되는 정도의 5 mm^3 이상의 크기에 도달하였을 때 대조군인 phosphate buffered saline (PBS) 처리군, adiponectin 처리군, leptin 처리군 등 세 군으로 나누어 주 3회 2주간 각각의 시료를 10 μg/ml 씩 복강 내 주사하였고, 동일한 실험자가 매회 종양 부피를 측정하여 주사 전 종양 부피와 비교하여 변화율을 측정하였다.

3. 통계 분석

Adiponectin/Acrp30와 hLeptin 처리 후 MTT 검색법에 의한 생존능 변화 측정은 세포 생존율로 평균±표준편차로 표시하였고, 이의 변화를 ANOVA (일원배치분산분석)를 적용하였으며, DU-145 세포를 주입한 누드마우스에서의 종양 부피 변화율은 평균±표준편차로 표시하였고, 이의 변화를 ANOVA (일원배치분산분석)를 적용하였다. 두 실험 모두 p값이 0.05 미만일 경우 의미 있는 것으로 간주하였다. 통계 프로그램은 SPSS 12.0을 사용하였다.

결 과

1. MTT 검색법에 의한 세포생존율의 측정

Adiponectin을 첨가한 배지에서는 용량에 따른 전립선암 세포의 생존율의 감소가 관찰되었고 특히 8시간과 48시간 배양 시 의미 있는 감소가 있었으며 (p=0.005, p=0.023) (Fig. 1) 500 ng 이상의 농도에서 의미 있는 차이가 관찰되었다. 4, 12, 24시간 배양 시에도 용량에 따른 생존율의 감소 경향이 관찰되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. Leptin을 첨가한 배지에서는 농도에 따른 세포생존율 증가 경향이 관찰 되었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Fig. 2).

2. DU-145 세포를 주입한 누드마우스에서의 종양 부피 변화

생체 내 실험에서 각 시료를 3회 이상 주사 하였을 때 세

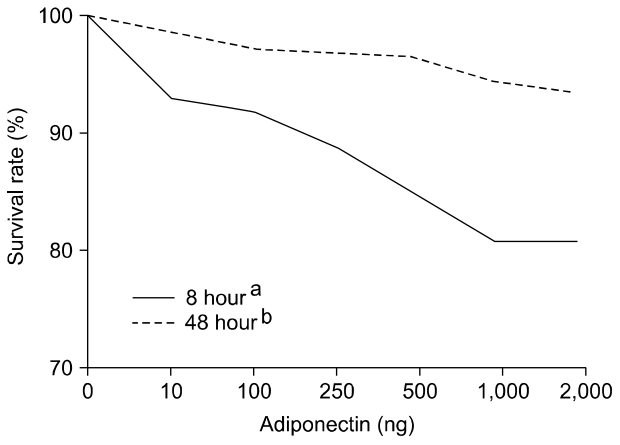


Fig. 1. Survival rate of DU-145 cells according to adiponectin dose. [a]: p=0.005, [b]: p=0.023.

군은 의미 있는 부피 변화율의 차이를 보였다. Leptin 처리군에서는 주입 횟수 증가에 따른 종괴 부피변화율의 증가가 관찰되었으나 (p=0.006), adiponectin 처리군에서는 통계적으로 유의한 종양 부피 변화율의 감소는 관찰되지 않았다. 그러나 여섯 마리 중 네 마리에서 육안으로 확인되지 않는 크기로 종양 부피의 감소가 관찰되어 종양 부피의 감소 경향을 보였다 (p＞0.05) (Table 1).

고 찰

Adiponectin은 체내 가장 많이 순환하는 혈장단백이며 비만환자에서 감소한다. Adiponectin은 사람의 혈장에서 homopolymer 또는 full-length adiponectin (fAD of Acrp30)으로 순환하고 N-terminal과 C-terminal globular domain을 가지고 있으며[7] adiponectin에 대한 유전자는 사람에서 대사증후군과 제2형 당뇨병에 감수성이 있는 locus로 알려져 있는[13] 염색체 3q27에 존재한다.[14] 한편 leptin은 1994년 Zhang 등[15]에 의해 처음 기술 되었으며 백색지방세포조직의 지방세포에서 주로 만들어지며, 에너지 항상성 조절, 신경내분비생리, 면역기능 이외에도 전립선을 포함한 생식기계의 발생과 유지에 중요한 인자로 추측되고 있다.[16] 순환 leptin 농도는 전체 체지방과 양의 상관관계가 있으며, 비만이 아닌 사람은 혈중 leptin치가 1-3 ng/ml지만 비만인 사람에서 100 ng/ml까지 증가될 수 있다.[17]

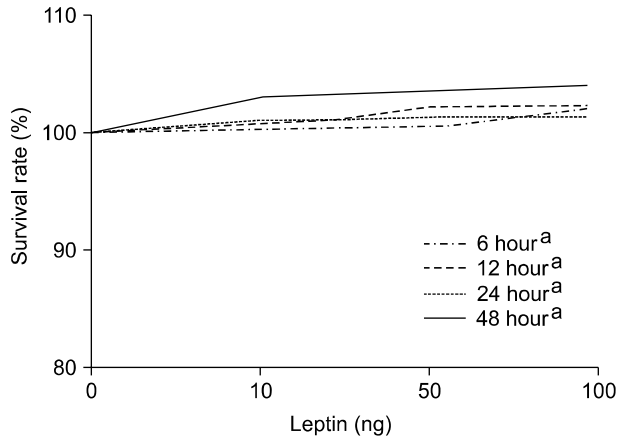


Fig. 2. Survival rate of DU-145 cells according to leptin dose. [a]: p＞0.05.

전립선암뿐만 아니라 간암,[18] 유방암,[19] 자궁내막암,[20] 대장암[21] 등의 암세포들에서도 adiponectin의 두 가지 수용체 (AdipoR1, AdipoR2)가 발현되는데, 이것으로 adiponectin이 수용체들을 통한 신호전달체계를 통하여 암세포들에 직접적인 영향을 주는 것을 추측할 수 있다.[18] 또한 순환 leptin치는 유방암, 대장암, 전립선암에서는 높고, 자궁평활근종에서는 대조군보다 낮고, 생체 외 실험에서 leptin이 유방암 (ZF75-1, MCF-7, T-47D), 식도암 (KYSE410, 150), 전립선암 (DU-145, PC-3), 급성골수성백혈병 (acute myeloblastic leukemia; AML)의 암세포들에서 증식을 자극할뿐 아니라 췌장암 암세포 (PANC-1, Mia-PaCa)의 성장은 억제하였다는 보고가 있다.[22]

비만에 따른 악성종양 위험도의 증가에 대한 기전으로 adiponectin 분비의 감소가 직, 간접적으로 인슐린저항성 또는 염증반응의 촉진을 통해 높은 암발생 위험도에 기여하게 된다고 알려져 있다.[7] 인슐린저항성은 adiponectin뿐만 아니라 다른 adipokine들 (TNF-α, interleukin (IL)-6)의 농도 증가의 결과로 나타나게 되며, 이에 보상적인 고인슐린혈증이 간에서의 생합성과 혈장 insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs)을 감소시켜 bioavailable IGF-1 (free IGF-1)의 농도를 증가시키게 된다. 또한 만성적인 고인슐린혈증은 간에서 sex hormone-binding globulin (SHBG)의 합성을 감소시켜 free sex steroid 농도의 증가에 기여하며, 비만인에서 enzymes aromatase의 활성 증가를 일으키고, 생물학적으로 덜 활동적인 성호르몬들을 estradiol이나 testosterone 같은 더 활동적인 호르몬들로 전환을 증가시킨다. 이렇게 변화된 adiponectin, insulin, IGF-1, sex hormones의 농도는 세포증식의 변화를 일으키고, 세포고사를 억제하여 암발생 위험도를 증가시키게 된다.[7] Leptin에 대한 전립선암세포의 증식반응은 phosphatidyl-inositol3-kinase (PI3-K)와 c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) 같은 세포 내 신호물질들과 연관이 있

Table 1. Correlation of the rate of tumor volume change and the number of injections

Rate of tumor volume change (%)	No. of injection						
	1	2	3	4	5	6	p-value
Control	62.19±13.84	98.72±51.35	149.81±45.41	147.93±47.81	170.11±72.47	256.16±100.36	＞0.05
Adiponectin	56.35±11.38	46.52±17.39	36.60±14.00	41.50±15.70	43.64±30.74	27.88±21.15	＞0.05
Leptin	88.41±23.94	124.81±45.77	175.54±37.38	243.96±39.07	250.19±35.42	286.15±51.85	0.006
p-value	＞0.05	＞0.05	0.030	0.005	0.032	0.029	

을 것으로 추측하고 있으며,[23] leptin에 의한 성장인자의 분비 증가가 전립선암세포의 이주, 전이, 혈관신생증가와 연관이 있다는 보고도 있다.[24]

Adiponectin 및 leptin과 전립선암에 대한 이전 연구에서 혈장 adiponectin 농도가 전립선비대증 환자 또는 정상 건강한 남성보다 전립선암 환자에서 유의하게 낮았으며[11] 높은 adiponectin 농도에 비해 낮은 adiponectin 농도는 나이나 체질량지수, 다른 고전적인 전립선암 위험인자와 관계없이 전립선암의 위험도를 증가시키고[25] 혈장 adiponectin 농도가 전립선암의 조직학적 등급이나 병기와 역관계를 보였다.[26] 반면 Chang 등[9]은 leptin 수치가 높을수록 전립선암의 크기가 크고, 높은 병기이며, 더 진행된 암이었다고 보고하였다. 전립선암의 호르몬 의존성 및 호르몬 비의존성 세포들에 대한 여러 cell line 연구에서 Bub 등[27]은 adiponectin이 호르몬 비의존성 세포인 DU-145 세포의 성장과 호르몬 의존성 세포인 LNCaP의 성장을 모두 억제한다고 하였으며, Mistry 등[28]은 호르몬 비의존성 세포인 PC-3에서 adiponectin이 종양유전자인 *bcl-2*의 발현을 억제하였으나 호르몬 의존성 세포인 LNCaP에서는 유의한 차이가 발견되지 않았다고 하였다. 저자들의 연구에서는 adiponectin이 호르몬 비의존성 세포인 DU-145 세포 증식을 억제하였다. 또한 leptin은 호르몬 비의존성 세포들인 DU-145와 PC-3의 성장을 자극하나, 호르몬 의존성 세포인 LNCaP에서는 그렇지 않다고 알려져 있고,[23] 저자들의 연구에서도 leptin이 DU-145 세포를 증식시키는 경향을 보였다. Ribeiro 등[29]은 이런 현상은 임상에서 시행되고 있는 antiandrogen과 luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) analogues를 이용한 전립선암의 호르몬 치료에서 androgen의 차단이 혈청 cortisol과 androgen을 포함한 스테로이드의 역관계를 고려해 보았을 때, leptin의 증가로 이어질 것이며, 이러한 혈청 leptin의 증가와 androgen의 감소로 인한 불균형이 호르몬 의존성 세포는 억제시키는 반면 호르몬 비의존성 세포의 성장은 촉진시킨다고 하였다.

저자들의 연구에서 adiponectin을 첨가한 배지에서 용량에 따른 세포생존율의 감소가 관찰되며 leptin 처리군은 통계적으로 유의하지는 않았으나 농도의존적인 세포생존율의 증가 경향을 보여 adiponectin의 전립선암세포 증식 억제효과와 leptin의 증식효과를 확인하였고 누드마우스를 사용한 생체 내 연구에서도 leptin 처리군에서 주입횟수 증가에 따른 유의한 종양부피 변화율의 증가와 유의하지는 않았지만 adiponectin 처리군의 종양부피 변화율 감소 효과가 관찰되어, leptin과 adiponectin의 전립선암 세포의 증식과 밀접한 연관성을 입증하였다. Adiponectin 처리군의 생체 내 실험이 통계적으로 유의하지 않았던 이유로는 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 주로 종양 부피가 작은 개체들이 adiponectin 처리군에 선정되었고, 실험 초기 종양부피가 육안적으로 확인되지 않는 상태로 감소한 개체가 많아 종양 부피 감소에 대한 추가적인 추적이 불가능했던 점을 들 수 있다. 이전 연구들이 주로 임상적이고, 후향적인 연구가 많았던 데 반해 저자들의 연구는 전향적으로 시행되었으며, 생체 내 실험도 시행되어 이들 연구들의 주장을 입증하였다는 점에 의의가 있을 것으로 생각한다.

결 론

Leptin은 생체 내 전립선암세포 증식에 중요한 역할을 하고 adiponectin은 전립선암 세포의 증식을 억제하는 역할을 하는 것으로 추측되며 이는 adiponectin의 감소와 leptin의 증가를 보이는 대부분의 비만 환자들에서의 빠른 진행과 관련이 있을 것으로 생각한다. 또한 PC-3, LNCaP 등 다른 전립선 암 세포 및 resistin과 같은 비만과 관련된 다른 adipokine 들에 대한 추가적인 분자 생물학적 검사와 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Song K, Song C, Ahn H. Continuing trends of the clinical parameter migration in patients with prostate cnacer in Korea. Korean J Urol 2007;48:574-8
2. Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;340:1158-66
3. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. J Biol Chem 2002;277:25863-6
4. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation 2002;106:2767-70
5. Carroll KK. Obesity as a risk factor for certain types of cancer. Lipids 1998;33:1055-9
6. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:2548-56
7. Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS. Adioponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. Am J Clin Nutr 2007;86:s858-66
8. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med 1996;334:292-5
9. Chang S, Hursting SD, Contois JH, Strom SS, Yamamura Y, Babaian RJ, et al. Leptin and prostate cancer. Prostate 2001;

46:62-7
10. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun 1999;257:79-83
11. Goktas S, Yilmaz MI, Caglar K, Sonmez A, Kilic S, Bedir S. Prostate cancer and adiponectin. Urology 2005;65:1168-72
12. Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. J Clin Invest 1998;101:1055-63
13. Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:14478-83
14. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. Int J Obes Relat Metab Disord 2000;24:861-8
15. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994;372:425-32
16. Nazian SJ, Cameron DF. Temporal relation between leptin and various indices of sexual maturation in the male rat. J Androl 1999;20:487-91
17. Blum WF, Englaro P, Attanasio AM, Kiess W, Rascher W. Human and clinical perspectives on leptin. Proc Nutr Soc 1998;57:477-85
18. Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, Iwamoto Y. Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:79-87
19. Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneveu MC, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;345:271-9
20. Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. Endocr Relat Cancer 2007;14:713-20
21. Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, et al. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. Oncol Rep 2008;20:479-83
22. Wang XJ, Yuan SL, Lu Q, Lu YR, Zhang J, Liu Y, et al. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2004;10:2478-81
23. Onuma M, Bub JD, Rummel TL, Iwamoto Y. Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. J Biol Chem 2003;278:42660-7
24. Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, et al. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. J Surg Res 2004;118:71-82
25. Michalakis K, Williams CJ, Mitsiades N, Blakeman J, Balafouta-Tselenis S, Giannopoulos A, et al. Serum adiponectin concentrations and tissue expression of adiponectin receptors are reduced in patients with prostate cancer: a case control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:308-13
26. Baillargeon J, Platz EA, Rose DP, Pollock BH, Ankerst DP, Haffner S, et al. Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1331-5
27. Bub JD, Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2006;340:1158-66
28. Mistry T, Digby JE, Desai KM, Randeva HS. Leptin and adiponectin interact in the regulation of prostate cancer cell growth via modulation of p53 and bcl-2 expression. BJU Int 2008;101:1317-22
29. Ribeiro R, Lopes C, Medeiros R. The link between obesity and prostate cancer: the leptin pathway and therapeutic perspectives. Prostate Cancer Prostatic Dis 2006;9:19-24