Butein에 의한 MCF-7 유방암 세포의 세포사멸에 의한 항암 효과

송바다[1,2] · 김순례[1,2] · 김성훈[2] · 신용철[1] · 고성규[1]*

1 : 경희대학교 한의과대학 예방의학교실, 2 : 경희대학교 한의과대학 암예방소재개발센터

Apoptosis Induction of MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells by Butein

Ba Da Song[1,2], Sun Rye Kim[1,2], Sung Hun Kim[2], Yong Cheol Shin[1], Seong-Gyu Ko[1]*

1 : Department of Preventive Meidicine, Cancer Preventive,
2 : Material Development Research Center, College of Oriental Medicine, Kyung Hee Univeristy

Butein(3,4,2',4-tetrahydroxychalcone) has been reported anticancer effects in several cancer type, which is prostate, bladder cancer but breast cancer is not. This study was to investigate the antiproliferative effects by butein(3,4,2',4-tetrahydroxychalcone) in MCF-7 human breast carcinoma cells. We invastigated the effects of dose-dependently cell growth inhibition by butein, which could be proved by WST-1 assay. Also, flow cytometry analysis was butein increase percentage of subG1 phase. As well as, butein induces apoptosis through the expression of caspase-8,-3 and poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) activation but not in DMSO treated cells. Taken together, this results suggest that butein induced MCF-7 apoptosis through extrinsic pathway and thus may have potential tumor suppressor in breast cancer.

Key words : Butein(3,4,2',4-tetrahydroxychalcone), apoptosis, extrinsic pathway, PARP(poly(ADP-ribose) polymerase)

서 론

건칠은 한국, 중국, 일본 등에서 오래전부터 사용된 약재로, 강한 파혈작용이 있어서 월경폐색, 징가 (배 속에 덩어리가 생기는 병) 등에 쓰이며, 풍한습이 원인이 되어 일어난 사지마비 등에 활용 된다. 최근에는 건칠이 reactive oxygen species (ROS)의 소거 능력이 뛰어나 산화적인 손상을 막아주는 효과뿐만 아니라 세포활성을 억제시키는 것으로 보고되었고, 위암, 염증 및 동맥경화증 등의 질병에 대한 치료제로써의 효능이 지속적으로 연구되고 있다[1-3]. 건칠 추출물의 주성분은 gallic acid, protocatechuic acid, sulfuretin, butein 등과 같은 phenolic compound 및 flavonoids 가 많아 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[4].

암에 의한 사망률은 국내에서 사망원인 1위로, 매년 그 수가 증가하고 있다[5]. 그 중 유방암의 발병 원인이 산업화 사회가 진행 될수록 현대인들의 식습관이 고단백, 고지방식으로 변화함에 따라 발병률이 더욱 증가하는 것으로 한 역학조사에서 보고된바 있다[6]. 서양에서 여성들의 암에 의한 사망원인으로 높은 수치를 차지하고 있는 유방암은 우리나라 여성들에게서도 매년 증가하여 현재 여성 암 중 1위를 차지하고 있다[7,8]. 이러한 유방암을 치료하기 위한 항암제 중 식물 추출물 및 성분이 유방암의 예방과 치료에 긍정적인 효과를 나타내고 있다는 보고가 MCF-7 인체 유방암 세포주에서 많이 밝혀지고 있다[9-12].

이에 본 연구에서는 이미 다른 암에서는 항암 및 항염증 효과를 나타내는 건칠의 유효성분 중 하나인 butein을[13,14](Fig. 1) MCF-7 유방암 세포에 처리하여, butein에 의한 유방암 세포의 활성 억제 기전에 대해 조사하였다.

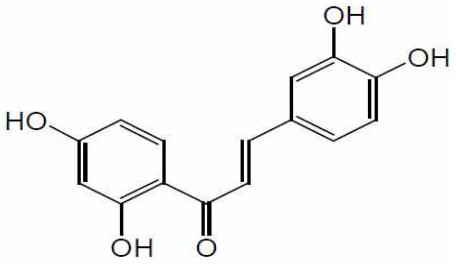

Fig. 1. The structure of butein.

* 교신저자 : 고성규, 서울시 동대문구 경희대학교 한의과대학 예방의학교실
· E-mail : epiko@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0329
· 접수 : 2010/04/26 · 수정 : 2010/05/06 · 채택 : 2010/06/04

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 항체

Propidium Iodide 염색 시약 및 butein은 sigma에서 구입하였다. 실험에 사용한 antibody인 FasR(Fas receptor)는 cell signaling에서 구입하였으며, procaspase-8, cleved-caspase-8, procaspase-3, cleaved-caspase-3, actin 및 PARP는 Santa Cruz에서 구입하였다. pan-apoptosis inhibitor인 z-BAD-fmk는 calbiochem에서 구입하였으며, Wst-1 assay 시약은 Roche에서 구입하였다. 세포 배양에 사용한 DMEM 배지 및 fetal bovine serum(FBS)과 antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island , NY)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인간 유방암세포주 MCF-7은 한국세포주은행을 통해 구입하였으며, DMEM배지에 10% (v/v) 혈청과 1% 항생제를 넣어 5% CO_2가 든 37℃ humidified incubator에서 배양한다. 각 실험에 사용된 세포는 70% 정도의 밀도로 준비하였다.

2) WST-1 assay

세포는 하루 전날 96well plate에 1x10^5/well로 각 농도당 6well씩 깔아놓은 후 세포가 하루 동안 plate바닥에 붙도록 안정화 시킨다. 다음 날 각 조건의 농도에 맞게 100 ㎕ volume에 butein 및 control로 사용한 DMSO를 0~100 ㎍/ml되게 넣어 준 후 배양기에서 72시간 동안 배양한다. 72시간 후 WST-1 solution을 10 ㎕씩 각각의 well에 넣어 주고 2시간 동안 배양 후 물에 녹아져 나온 formazan(water-soluble formazan)을 ELISA reder 기기로 440 nm 필터에서 값을 측정한다.

3) FACs(flow analysis cytometry sorting)를 통한 세포사멸 측정

FACs를 통한 세포사멸을 보기 위해 4X10^5의 세포를 60 mm culture plate에 배양하고, 다음 날 20 ㎍/ml의 DMSO와 butein을 처리 한 후, 0, 6, 12, 24, 36시간 동안 3 ml의 95% ethanol(0.5% Tween-20첨가)에 세포를 고정시킨다. 36시간동안 샘플은 -20℃에서 보관한다. 샘플을 다 모으면 에탄올에 고정시켜둔 세포를 차가운 PBS로 두 번 washing한 후 암상태에서 10 mg/ml propidium iodide (PI)으로 염색한다. 세포사멸정도(subG1)를 FACStar flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)와 ModFit LT V2.0 software를 이용하여 분석하였다.

4) Western blot analysis

MCF7 세포를 100 mm culture plate에 7X10^5/plate로 10% FBS DMEM에 12시간 동안 안정화 시킨다. 안정화 후 세포는 각 조건에 맞게 DMSO, butein을 처리한 후 시간에 맞게 샘플을 모은다. 샘플을 모을 때는 plate에 붙어있는 세포뿐만 아니라 붙어있지 않는 세포까지 튜브에 다 모은 후 원심분리(2000 RPM, 5 min)로 cell down한 후 그 상층액을 버리고, 차가운 PBS로 2번 washing하여 cell pellet만 남긴다. 각 시간별로 모아진 세포는 protein lysis buffer를 이용하여 단백질만 분리하고, 단백질의 정량은 bradford(bio-rad protein assay kit) 시약으로 하였으며, SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 loading하여 분리한 후, nitrocellulose membrane(Watman)에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1% BAS+1% skim milk가 섞인 PBST로 상온에서 1시간동안 blocking한 후, 여러 가지 1차 항체를 4℃에서 O/N(over night)으로 반응시킨 후, PBST로 washing후 HRP-conjugated 2차 항체를 상온에서 1시간동안 반응시킨다. 역시 PBST로 washing과정을 거친 후 Electrochemiluminescence detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 이용하여 X-ray film으로 결과를 확인한다. 실험에 사용한 z-BAD-fmk는 DMSO, butein처리 1시간 전에 미리 처리한 후 뒤에 모든 과정은 동일하게 수행하였다.

5) 통계 분석

실험결과의 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 Mean(평균) ± S.E(표준오차)로 요약하였으며, student t- test method로 분석하여 p-value가 0.05이하일 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

1. MCF-7세포에서 butein에 의한 농도의존적인 세포생존율 감소

butein이 세포 proliferation에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 butein 및 butein을 녹인 DMSO도 함께 각각의 농도별로 72시간 동안 처리하여 WST-1 assay를 통해 알아보았다.

WST-1 assay는 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,a tetrazole)assay 보다 개선된 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay와 동일한 원리의 실험방법으로서, MTS assay와 동일하게 살아있는 세포에 처리시 water-soluble한 formazan을 형성하여, 살아있는 세포정도를 값으로 측정할 수 있다. 그 결과 MCF-7 세포에 butein을 처리 72시간째 농도 의존적으로 세포생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2). 하지만 DMSO 처리 시, 값이 거의 변화하지 않는 것으로 봐서 DMSO에 의한 독성은 세포의 생존율에 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다.

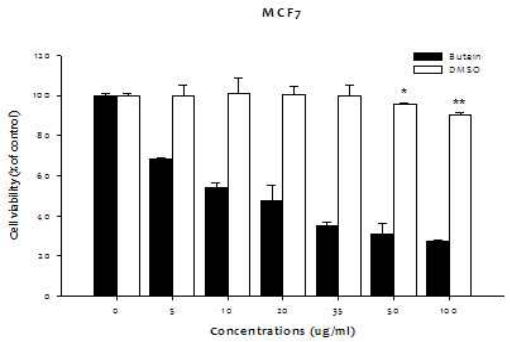

Fig. 2. Effects of butein on cell viability in MCF-7 cells. Cell growth inhibition of MCF-7 cells by butein. Cells were treated with 5~100 ㎍/ml butein for 72hours. And cell viability was measured by the WST-1 assay. The data shown is a representative of three independent experiments. (error bars were shown in mean ± standard error means (SEM)). *p < 0.05 , **p < 0.01, ***p < 0.001.

2. butein에 의한 MCF-7세포의 세포사멸 유도

WST-1 assay 결과를 바탕으로 실제 butein에 의해 세포사멸이 일어나는지 FACs 실험을 통해 알아보았다. butein의 농도는 WST-1 assay에서 IC50(half maximal inhibitory concentration)값을 보이는 butein 20 ㎍/ml의 농도로 MCF-7 세포에 처리하였으며, PI staining을 통해 DNA content를 관찰하였다. 그 결과 약물처리 36시간째에 DMSO 및 control 군 대비 butein을 처리한 군에서 약 32%가량 subG1 값이 높아지는 것을 확인하였으며, 이로써 butein에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다(Fig. 3A, B).

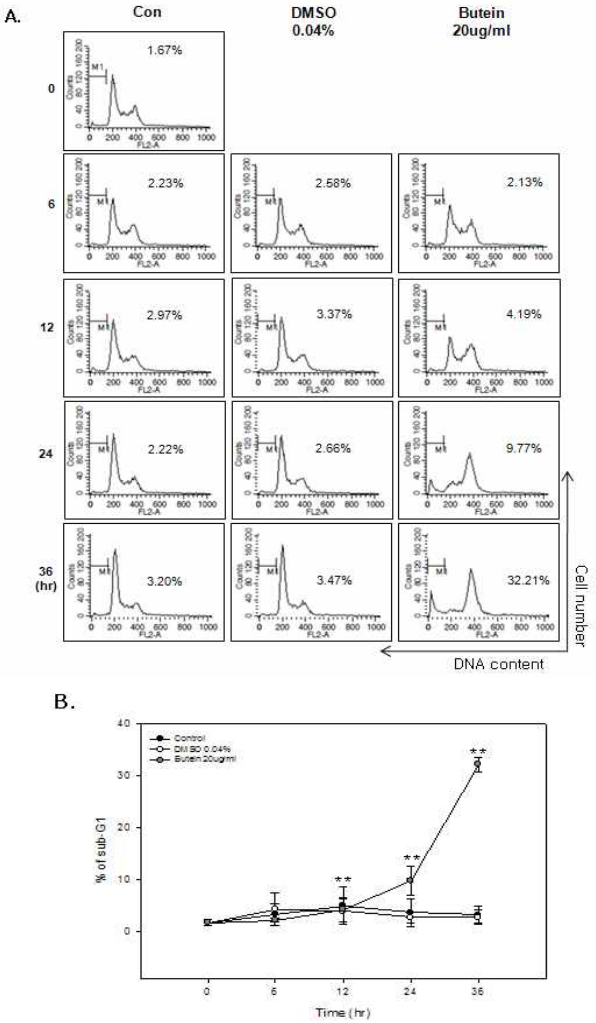

Fig. 3. Butein induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. Sub-G1 (designated as "M1") population following treatment with butein. MCF-7 cells were exposed to 20 ug/ml of butein for indicated periods of time. DNA content distribution was analyzed using a FACScalibur flow cytometer (Becton-Dickinson), and percentages of sub-G1 phase cells were determined based on a DNA content histogram. The data shown is a representative of three independent experiments. (error bars were shown in mean ± standard error means (SEM)). *p < 0.05 , **p < 0.01, ***p < 0.001.

3. MCF-7세포에서 butein에 의한 caspase 발현 및 활성 조절

FACs 분석결과 butein이 subG1 level을 높이는 결과를 바탕으로 실제 apoptosis가 일어나기 위해 중요한 인자인 caspase의 발현 및 활성을 western blot을 통해 살펴보았다. caspase-8의 활성은 death receptor와 관련된 extrinsic pathway, caspase-9은 미토콘드리아를 통한 intrinsic pathway를 통해 최종적으로 caspase의 최하위 단계인 caspase-3를 활성화시켜 최종적으로 세포사멸과 관련된다. 이에 butein을 MCF-7세포에 처리하였을 경우 death receptor인 FASR(FAS receptor) level이 control에 비해 3hr, 6hr에 높게 발현하는 것을 확인할 수 있으며, caspase-8및 caspase-3의 활성은 24시간 36시간에 높게 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 4A). caspase-3 활성뿐만 아니라 직접적인 세포사멸의 marker인 PARP(Poly ADP ribose polymerase)의 활성이 증가됨을 확인하므로 써 butein에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다(Fig. 4A).

z-VAD-fmk(pan-caspase inhibitor)를 이용하여 caspase의 활성을 억제하였을 경우에는 butein을 처리하더라도 caspase-3, -8 및 PARP의 활성역시 억제됨을 확인하였다(Fig. 4B).

이를 통해 butein에 의한 세포사멸 유도는 미토콘드리아를 통한 intrinsic pathway를 통한 세포사멸이 아닌 death receptor와 관련된 extrinsic pathway를 통해 caspase-3 활성 및 PARP활성을 조절하여 세포사멸을 유도하는 것임을 확인하였다.

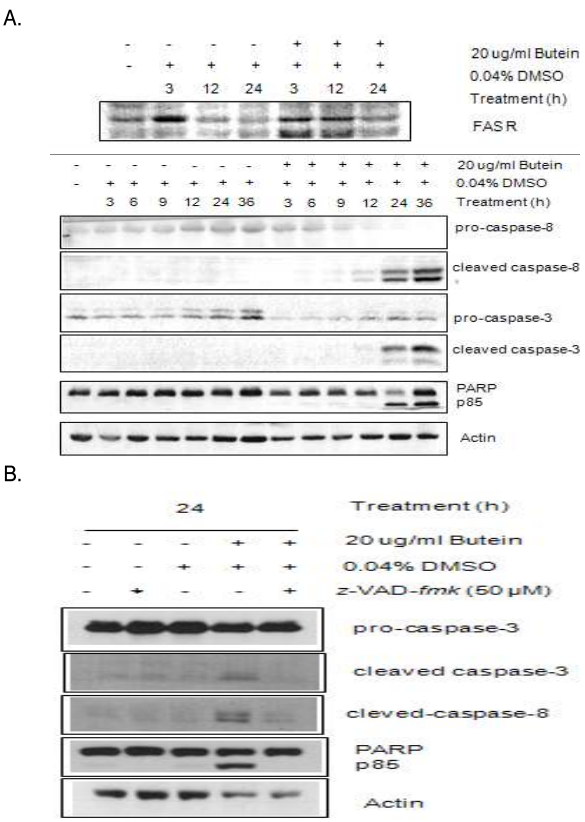

Fig. 4. Effects of butein on the expression of caspase protein in human breast cancer MCF-7 cells. (A) After 3~36 hr incubation with butein, the cells were lysed, and cellular proteins were western blotted. Death receptor, FASR expresson level were up-regulation in butein treat time 3hr to 6hr. cleaved procaspase-8 and -3, subsequently poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) in MCF-7 cells. Significant cleavage of PARP was observed at 24h after the treatment of butein. (B) Involvement of caspase expression in butein induced apoptosis. MCF-7 cells were pretreated with z-VAD-fmk(50 ㎍) for 1h and then exposed to 20 ㎍/ml butein for 48h. The cellular proteins were analyzed by western blots with procaspase-3, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, PARP, and actin.

고 찰

본 연구에서는 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 butein이 세포의 증식억제와 관련된 apoptosis의 유발 여부 및 관련된 인자들의 단백질 변화 여부를 조사하였다. 이를 위해 먼저 butein이 MCF-7 세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 WST-1 assay를 하였다. 그 결과 세포주에 DMSO와 butein을 처리한 그룹을 비교하였을때, butein을 처리한 그룹에서만 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다. 이는 butein이 세포질의 응축에 의한 세포의 부착력을 상실시켰고, 농도가 증가할수록 세포의 부착력의 상실이 늘어나는 것 같았지만, 확연히 눈으로 관찰하기는 힘들었다. 그래서 이러한 차이를 수치로 정량화하기 위해서 FACs 실험을 통한 PI 염색방법을 이용해 apoptosis 수치를 나타내는 subG1의 양의 변화를 확인해보았다. PI 염색결과 butein에 의한 subG1의 수치량이 확연히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

FACs 결과를 바탕으로 butein에 의한 MCF-7세포의 감소는 apoptosis에 의한 감소라는 결과를 알수 있었으며, 이를 확인하기 위해 apoptosis 관련 인자들을 western blot을 통해 살펴보았다. Apoptosis pathway는 미토콘드리아를 통한 intrinsic pathway 와 death receptor를 통해 caspase-8의 활성을 일으키는 extrinsic pathway가 있다[15]. 이러한 apoptosis pathway가 활성화되면, 최종적으로 caspase의 최하위 단계이며, 세포사멸 과정에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 caspase-3가 활성화되어지고, 세포 내에서 PARP나 retinoblastoma(Rb)와 같은 단백질 등을 분해시킨다[16]. 이에 우리는 먼저 caspase-3와 PARP의 발현 및 활성정도를 확인하였는데 butein에 의해 이 두 단백질의 활성이 증가하는 것을 western blot을 통해 관찰할 수 있었다. 그렇다면 butein에 의한 apoptosis의 활성은 intrinsic pathway를 통한 것인지 intrinsic pathway를 통한것인지 알아보기 위해 caspase-8와 caspase-9의 활성을 관찰한 결과 caspase-8의 활성은 증가하는 반면 caspase-9의 활성에는 butein이 관여하지 않는 것을 관찰했다. 또한 caspase-8의 활성은 death receptor와의 관련성을 알아보기 위해 FasR의 발현을 관찰한 결과 butein에 의한 FasR의 발현이 3hr, 12hr까지 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, DMSO 3h에도 증가하는 것 으로 보아 FasR의 발현이 butein 단독에 의한 효과인지는 확신 할 수 없었다. 하지만 death receptor가 DMSO에 의해 발현하다고 하더라도 caspase의 활성에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보아, butein에 의해 MCF-7세포가 세포사멸에 의해 세포증식이 억제된다는 사실을 의미한다. 이상의 결과로 butein을 MCF-7 세포에 처리하였을 경우 세포의 증식을 강하게 억제하는 것으로 나타났고, 세포의 형태도 변화시켰다. 이러한 세포의 증식억제는 butein이 caspase-8의 활성을 증가시켜 extrinsic pathway를 통한 세포사멸에 의한 것으로 나타났다. 그러나 이러한 butein에 의한 세포사멸의 항암기전 및 MCF-7 인체 유방암 세포뿐만 아니라 다른 유전학적 특성을 가지고 있는 인체 유방암 세포에서의 효과뿐만 아니라 기전 또한 추가적으로 연구해야할 과제라고 생각된다.

결 론

본 실험은 MCF-7인체 세포주에서 butein의 항암효과를 확인하고자 수행하였으며, 세포증식억제 확인을 위해 WST-1 assay와 FACs(Flow cytometry) 및 Western blotting을 통해 세포사멸 정도 및 caspase의 활성을 확인하였다.

그 결과 butein을 MCF-7에 72hr동안 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포증식을 감소하였으며, 여러 농도 중 butein 20 ug/ml에서 IC50 값을 보였다. butein의 세포사멸은 FACs결과 세포사멸의 정도를 나타내는 subG1 부분이 butein인 36시간 처리시 32.21%까지 증가하는 것을 확인하였다. Western blotting을 통해 세포사멸에 의해 활성화 되어지는 caspase-3 및 PARP의 분해를 통해 확인하였다. 세포사멸과정의 상위단계에 있는 caspase-8과 최하위 단계에 있는 caspase-3와 PARP의 분해는 butein처리 24h, 36h에 specific하게 활성화되는 것을 관찰할 수 있으며, caspase-8이 활성화되기 위해 필요한 FAS receptor는 좀 더 빠른 시기인 3hr부터 12hr까지 활성이 유지되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이와 같은 결과로, 건칠의 구성성분 중 하나인 butein에 의한 MCF-7 인체 유방암 세포주의 세포증식 억제는 extrinsic pathway를 통한 세포사멸의 활성을 유도하여 증식을 억제시킨다는 사실을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 서울시 전략산업 혁신클러스터육성 지원사업 (과제번호 10524)과 교육과학기술부 (과제번호 2009-0063466)의 재원으로 수행되어진 연구입니다.

참고문헌

1. Lee, J.C., Kim, J., Lim, K.T., Yang, M.S. and Jang, Y.S. Ethanol eluted extract of Rhus verniciflua Stokes showed both antioxidant and cytotoxic effects on mouse thymocytes depending on the dose and time of the treatment. J Biochem Mol Biol 34: 250-258, 2001.
2. Lee, J.C., Lim, K.T. and Jang, Y.S. Identification of Rhus verniciflua Stokes compounds that exhibit free radical scavenging and antiapoptotic properties. Biochim Biophys Acta 1570: 181-191, 2002.
3. Kitts, D.D. and Lim, K.T. Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from Rhus verniciflua Stokes (RVS). J Toxicol Environ Health Part 64: 357-371, 2001.
4. Jung, C.H., Jun, C.Y., Lee, S., Park, C.H., Cho, K., Ko, S.G. Rhus verniciflua stokes extract: radical scavenging activities and protective effects on H_2O_2-induced cytotoxicity in macrophage RAW 264.7 cell lines. Biol Pharm Bull. Aug; 29(8):1603-1607, 2006.

5. 통계청. Death Rate, 2007.
6. Wu, C., Ray, R.M., Lin, M.G., Gao, D.L., Horner, N.K., Nelson, Z.C., Lampe, J.W., Hu, Y.W., Shannon, J., Stalsberg, H., Li, W., Fitzgibbons, D., Porter, P., Patterson, R.E., Satia, J.A., Thomas, D.B. A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: Shanghai nutrition and breast disease study, China, 1995-2000. Am J Epidemiol 160: 945-960, 2004.
7. Horner, M.J., Ries, L.A.G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., Altekruse, S.F., Feuer, E.J., Huang, L., Mariotto, A., Miller, B.A., Lewis, D.R., Eisner, M.P., Stinchcomb, D.G. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. National Cancer Institute. 2009.
8. Soung, M.G., S.M. Joo, A.R. Song and N.D. Sung. QSAR on the inhibition activity of flavopiridol analogues against breast cancer MCF-7. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50: 147-153, 2007.
9. Chen, W.F., M.H. Huang, C.H. Tzang, M. Yang and M.S. Wong. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease 1638: 187-196, 2003.
10. Lozoya, M. Hypogiucaemic activity of Opuntia streptacantha throughout it's annual cycle. Am J Chin Med 17: 221-224, 1989.
11. Park, C., Moon, D.O., Ryu, C.H., Choi, B., Lee, W., Kim, G.Y., Choi, Y. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis.. Acta Pharmacol Sin. Mar, 29(3):341-348, 2008.
12. Woyengo, T.A., Ramprasath, V.R., Jones, P.J. Anticancer effects of phytosterols. Eur J Clin Nutr. Jul, 63(7):813-820, 2009.
13. Pandey, M.K., Sung, B., Ahn, K.S., Aggarwal, B.B. Butein suppresses constitutive and inducible signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 activation and STAT3-regulated gene products through the induction of a protein tyrosine phosphatase SHP-1. Mol Pharmacol. Mar, 75(3):525-533, 2009.
14. Zhang, L., Chen, W., Li, X. A novel anticancer effect of butein: inhibition of invasion through the ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways in bladder cancer cells. FEBS Lett. Jun 11, 582(13):1821-1828. 2008.
15. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4):495-516, 2007.
16. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. Science, 278: 294-298, 1997.