

전이성 유방암 세포주에 대한 당목향의 항암효과탐색

김치홍[#] · 최윤경[#] · 김우영 · 신용철 · 고성규^{*}

경희대학교 기초한의과학과

Anti-cancer Effects by *Saussurea lappa* Clarke in Highly-metastatic MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

Chi Hong Kim[#], Youn Kyung Choi[#], Woo Young Kim, Yong Cheol Shin, Seong Gyu Ko^{*}

Department of Basic Science of Oriental medicine, Kyung Hee University

Saussurea lappa Clarke is a well-known transitional medicine in Asia including Korea, China and Japan. It has been reported that Clarke has diverse effects such as anti-viral, anti-inflammatory, anti-cancer in human gastric cells and human prostate cancer cells. However, the anti-cancer effects and the mechanism of actions of *Saussurea lappa* Clarke are still unknown in breast cancer. In this study, we observed that *Saussurea lappa* Clarke inhibits the cell growth in a dose- and time-dependent manner in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. In order to examine whether *Saussurea lappa* Clarke suppresses cell growth inducing apoptosis cell death or cell cycle arrest, we analyzed DNA contents and cell cycle distribution using a flow cytometer and western blotting in MDA-MB-231 cells. We suggest that *Saussurea lappa* Clarke dose not induced apoptosis and induced G2/M phase cell cycle arrest. Moreover, *Saussurea lappa* Clarke also decreased the expression level of metastasis-angiogenesis related protein such as VEGF. However, dose not changed the expression level of metastasis related protease MMP-1 in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. Therefore, *Saussurea lappa* Clarke might be good and useful chemotherapy agent highly-metastatic breast cancer patients.

Key words : breast metastasis, *saussurea lappa clarke*, G2 cell cycle arrest, vascular endothelial growth factor

서 론

여성의 사망률과 가장 밀접하다고 알려진 유방암은 선암종의 일종으로 서양을 넘어서 아시아에서도 빈도와 사망률이 급증하고 있는 실정이다^{1,2)}. 이러한 사망률은 유방암이 처음 발견된 원발 부위로부터 림프절이나 혈관을 타고 다른 곳으로 쉽게 이동하여 이차성 암을 형성하는 전이 능력과도 관계된다. 특히 유방암은 선택적으로 뼈나 폐로 전이가 잘 된다고 알려져 있고, 이러한 전이에 의한 전이성 유방암 환자들은 수술과 같은 여러 치료요법으로도 개선되기 힘들다고 알려져 있다^{3,4)}.

종양 형성은 수많은 암세포에 의해서 형성되는데 이는 암세포의 과도한 증식, 세포의 전이, 분자수준에서의 종양형성 관련

신호, 암세포의 세포사멸 회피 등과 관련한 복합적인 과정이라 할 수 있다⁵⁾. 그렇기 때문에 이러한 복합적 과정 중 여러 단계에 작용할 수 있는 새로운 치료제를 개발하는 것이 중요하게 여겨지고 있다. 암세포의 과도한 증식은 세포주기와 증식 및 분열과 관계된 기전을 조절함으로써 억제할 수 있다⁶⁾. 세포주기는 S, M, G1, G2의 네 단계로 나눌 수 있고, S기는 DNA를 합성하고, M기는 세포분열을 조절 한다. G1, G2기는 checkpoint로 G1기는 DNA복제를 준비하여 DNA의 이상과 복제에 필요한 구성성분 점검을 통해 M기에서 S기로의 진행을 조절하고, G2기도 DNA의 이상과 분열에 필요한 구성성분을 점검하여 S기에서 M기로의 진행을 조절 한다⁷⁾. 진핵세포에서는 여러 요인에 의해 DNA가 위험을 감지하면 G1, G2 checkpoint를 통해 세포주기가 중단되고, 이는 대표적으로 cyclin, cyclin-의존적 인산화효소(cyclin-dependent kinase, CDK) 그리고 cyclin-의존적 인산화효소 억제제(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)에 의해 조절된다⁷⁻⁹⁾.

* 교신저자 : 고성규, 서울 동대문구 회기동 1번지, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : epiko@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0329

· 접수 : 2011/11/16 · 수정 : 2011/12/02 · 채택 : 2011/12/09

Both authors contributed equally to this work

암세포의 전이는 암세포의 부착, 침윤, 이동, 신 혈관생성 등 다양한 과정을 수반하는 복합적인 단계라고 할 수 있다¹⁰. 세포-세포, 세포-기질간의 부착능력이 감소되어 운동성을 지니게 되는 암세포는 세포외부를 둘러싸는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)과 기저막을 분해시켜 침윤하고 암세포 주위로 새롭게 형성된 혈관을 따라 다른 곳으로 이동하여 이차 전이성 암을 형성한다⁴. 특히 세포외기질과 기저막의 분해는 Matrix metalloproteinase (MMP) 라는 아연(Zn)-의존성 중성 단백질 분해효소에 의해 조절 된다^{11,12}. 또한 암세포는 주위에 새로운 혈관을 형성하여 산소와 양분을 공급받음으로써 자신들의 성장을 촉진시키고, 생성된 혈관을 통하여 다른 곳으로의 전이를 용이하게 한다. 신혈관생성은 혈관을 필요로 하는 암세포가 분비해 내는 인자로부터 활성화 될 수 있는데, 그중에서도 특히 혈관내피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 연구가 가장 많이 되어있다. 암세포로부터 분비된 VEGF는 혈관내피세포의 수용체에 결합하고, 신호전달을 통해 혈관내피세포의 증식과 이동을 조절하게 된다¹³.

당목향(*Saussurea lappa Clarke*)은 국화과에 속하며 중국 목향의 뿌리로 알려져 있다. 이전 보고에 따르면 당목향은 항바이러스¹⁴, 항염¹⁵등의 효과가 있고, 항암과 관련하여 위암 세포주^{16,17}, 전립선암 세포주¹⁸)에 대한 보고가 있었지만 아직까지 유방암 세포주에 대한 보고는 알려진 바 없다. 본 연구에서는 당목향 (*Saussurea lappa Clarke*)이 전이성 유방암 세포주의 증식을 억제하는 기전과 전이를 억제시키는 기전에 관한 내용을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 한약재

본 실험에서 사용한 당목향 (SLC-*Saussurea lappa Clarke*, the roots extract)은 옴니허브 (Omniherb, Korea)에서 구입하였다. 무게 100 g 정량하고 분쇄한 후 분쇄시료 무게를 다시 측정하여 총 95.8 g의 시료를 획득했다. 80% 에탄올(1 l x2)을 가하여 30분씩 2회 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 획득한 추출액을 지름 185 mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 사용하여 감압 여과 한 후, 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축하였다. 농축이 완료 된 후 30분 동안 예비 동결을 시키고 나서 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)를 사용하여 48시간 동안 동결 건조하였다. 결과, 23.7 g (수율 24.7%)의 당목향 (SLC) 분말을 얻었고 0.2 g을 정량한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide, sigma, USA) 1 ml에 녹이고 37°C incubator에서 24시간 동안 균질화 시킨 후, syringe filter (0.20 um, Sartorius, Germany)을 이용하여 여과한 후 200 µg/ml의 stock 농도를 가지고 실험에 사용하였다.

2. 세포주

높은 전이성 특징을 가지는 유방암 세포주 MDA-MB-231은 미국 세포주은행 (American Type Culture Collection, USA)을

통하여 구입하여 실험에 사용하였다.

3. MDA-MB-231 세포 배양

전이성 유방암 세포주 MDA-MB-231은 RPMI-1640배지에 10% (v/v) 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 1% 항생제 (antibiotic-antimycotic)을 넣어 5% CO₂와 37°C를 유지하는 humidified incubator에서 키운다.

4. 세포형태 관찰

당목향에 의한 전이성 유방암 세포주 MDA-MB-231의 세포 형태 변화를 관찰하기 위해 세포주를 96-well plate에, 배지 100 µl 안에 4×10⁶cells의 초기세포 농도가 되도록 각각의 well에 분주하였다. 24시간 동안 5% CO₂와 37°C humidified incubator에서 안정화 시킨 후 각각 0, 25, 50, 75, 100 µg/ml이 되도록 80% 에탄올로 추출한 당목향을 처리하였다. 비교를 위해 당목향을 녹인 DMSO도 같은 농도로 각각 0, 25, 50, 75, 100 µg/ml를 처리하였다. 48시간 동안 배양 한 후에 세포형태의 변화를 현미경을 사용하여 관찰하고 비교하였다.

5. 세포증식 측정

당목향에 의해 전이성 유방암 세포주 MDA-MB-231의 세포 증식이 억제되는가를 MTT assay를 통하여 확인하였다. 세포주를 96-well plate에, 4×10⁶cells의 초기세포 농도가 되도록 각각의 well에 분주하였다. 특히 48시간 동안 약 처리를 할 세포주는 배지 100 µl안에, 72시간 동안 약 처리를 할 세포주는 배지 200 µl 안에 초기세포 농도가 되도록 한다. 5% CO₂와 37°C humidified incubator에서 안정화 시킨 후 각각 0, 25, 50, 75, 100 µg/ml이 되도록 당목향을 처리하였다. 비교를 위해 당목향을 녹인 DMSO도 같은 농도로 각각 0, 25, 50, 75, 100 µg/ml를 처리하였다. 약 처리 후 48시간과 72시간 동안 37°C humidified incubator에서 배양하고 각각의 well에 MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)을 첨가하였다 (MTT solution 20 µl/배지 100 µl). 2시간동안 어두운 상태를 유지한 채로 5% CO₂와 37°C humidified incubator에서 반응 시킨다. 2시간 후 well 바닥에 형성된 결정을 확인 한 후 이 결정을 DMSO로 녹여 내고, 570 nm 파장에서 ELISA reader (Molecular Devices, Palo Alto, CA)를 사용하여 세포증식 정도를 측정한다.

6. 세포사멸 및 세포주기 측정

당목향에 의한 세포사멸 정도와 세포주기 변화를 측정하기 위하여 전이성 유방암 MDA-MB-231 세포주를 100 mm dish에 5×10⁵cells의 초기농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에서 24시간 동안 배양 시켰다. 후에 당목향과 DMSO를 각각 100 µg/ml 처리하여 12, 24, 36, 48시간 동안 배양하였다. 각각의 시간마다 세포를 수집하기 위해 트립신을 처리하여 dish 바닥에 붙어있는 세포주를 떼어내고 이를 튜브에 모아 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리 시켜 튜브 바닥에 세포주를 모은다. 세포를 깨끗하게 하기 위해 Cold-PBS를 사용하여 다

시 원심분리 한다. 상등액을 모두 제거하고, 0.5% Tween-20이 첨가된 95% 에탄올을 사용하여 세포주를 고정한 후, -20℃에서 최소한 30분 정도 반응 시킨다. 반응이 끝나면 두 번 정도 Cold-PBS를 사용하여 원심분리로 세포주를 씻어내고 상온, 어두운 상태에서 propidium iodide (50 µg/ml, 1% sodium citrate, 50 µg/ml RNase A가 포함)를 사용하여 세포주를 염색한다. 세포사멸과 세포주기는 모두 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 측정한다. 특히 세포사멸은 DNA content histogram을 이용하고 세포주기는 ModFit LT V2.0 프로그램을 사용하여 확인하였다.

7. 세포내 단백질 분리

전이성 유방암 MDA-MB-231 세포주를 100 mm dish에 5×10⁵cells의 초기농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37℃ humidified incubator에서 24시간 동안 배양 시켰다. 후에 당목향과 DMSO를 각각 100 µg/ml 처리하여 12, 24, 36시간 동안 배양하였다. 각각의 시간마다 세포를 수집하기 위해 100 mm dish의 상청액 뿐만 아니라 scraper를 사용하여 dish 바닥에 붙어있는 세포주를 떼어내고 이를 모두 튜브에 모아 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리 시켜 튜브 바닥에 세포주를 모은다. 세포를 깨끗하게 하기 위해 Cold-PBS를 사용하여 다시 원심분리 한다. 상등액을 모두 제거하고, RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 사용하여 30분 동안 4℃에서 반응시킨다. 후에 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 시켜 lysis된 단백질을 분리한다.

8. 세포로부터 분리되는 단백질의 분리

세포로부터 분리되는 단백질의 경우 농도가 매우 적기 때문에 필터가 장착되어 있는 특수 튜브를 사용하여 농축과정을 필요로 한다. 전이성 유방암 MDA-MB-231 세포주를 100 mm dish에 5×10⁵cells의 초기농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37℃ humidified incubator에서 24시간 동안 배양 시켰다. 후에 당목향과 DMSO를 각각 100 µg/ml 처리하여 36시간 동안 배양하였다. 세포로부터 분리되는 단백질을 분리할 것이기 때문에 상청액만을 특수 튜브인 centricon에 모아 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 시킨다. 원심분리 후 필터 안의 상등액만을 모아 분리한다.

9. Western Blotting

분리된 단백질로 Western Blotting을 수행하기 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하였다. SDS-PAGE 시 동량의 단백질을 loading하여 separating 한 후, nitrocellulose membrane으로 옮긴다. 그 후, 단백질이 membrane으로 잘 옮겨왔는지 확인하기 위해 ponceau 염색을 하였다. 다음으로 membrane을 0.1% Tween-20이 포함된 PBS (PBS-T)에 skim milk와 BSA를 각각 1%씩 넣어 1시간 동안 상온에서 blocking시

킨다. PBS-T로 5분씩 3번 washing 한 후, membrane을 다양한 1차 항체 - Cdc2, cyclin B1, α-actin, MMP-1, VEGF를 사용하여 4℃에서 12시간 정도 반응시킨다. PBS-T로 30분 동안 washing (10분 X 3회)하고, 2차 항체를 HRP-conjugated secondary antibodies와 1시간 정도 상온에서 반응시킨다. 그 후 PBS-T로 1시간 washing (15분 X 4회)을 하고 EZ-western detection kit를 사용하여 X-ray film으로 단백질 발현여부를 확인하였다.

10. 통계처리

실험결과의 통계처리는 SPSS 프로그램을 사용하였으며, 모든 측정값은 평균 ± 표준오차(Mean±SEM)로 표시하였고, 분석에 대한 유의성은 Student's t-test로 검증 하였으며, p-value < 0.001 에서 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. 당목향이 전이성 유방암 세포주 세포형태에 미치는 영향

이미 기존 연구에서 몇몇 암세포에서 항암작용이 있다고 알려진 당목향이 전이성 악성 종양 유래세포주인 MDA-MB-231 유방암 세포주에서도 항암효과가 있는지 확인 하였다. 가장 처음으로 당목향을 처리했을 때, MDA-MB-231 세포주의 세포형태의 변화를 관찰하였다(Fig. 1). 아무것도 처리하지 않은 (0 µg/ml) MDA-MB-231 세포주와 DMSO를 처리한 MDA-MB-231 세포주에서는 길고 뾰족한 본연의 세포형태를 유지하는 반면에 당목향을 48시간 동안 처리했더니 저농도 (25, 50 µg/ml)보다 고농도 (75, 100 µg/ml)에서 세포의 원래 형태를 잃어버리는 것을 확인할 수 있었고, 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제되었다.

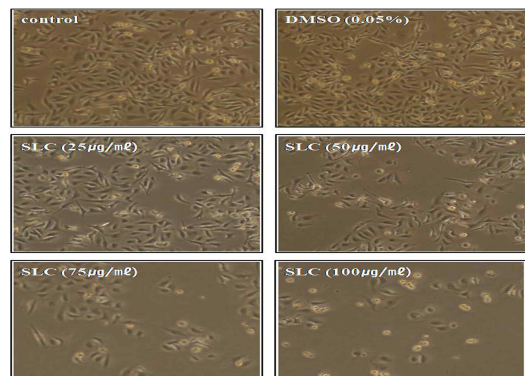


Fig. 1. Effect of the ethanol extract of *Saussurea lappa* Clarke (SLC) on the cell morphology in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 5×10⁵cells/100 mm dish and treated with SLC for 48 h. The changes of morphology observed by microscopy on 4X magnification.

2. 당목향의 전이성 유방암 세포주에 대한 세포증식억제 효과

다음으로는 당목향이 전이성 악성 종양 유래세포주인 MDA-MB-231 유방암 세포주에서 항암효과를 보이는지 확인하기 위해서 당목향을 세포주에 처리했을 때, 세포주의 증식정도를 MTT assay를 통하여 확인하였다(Fig. 2). 당목향을 처리하였을

때, 농도 의존적으로 그리고 시간 의존적으로 세포주의 증식이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 가장 최고 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 같은 경우는 48시간에서는 약 40%, 72시간에서는 약 60%의 증식억제를 확인할 수 있었다. 반면에 당목향을 녹인 DMSO 같은 경우는 농도 그리고 시간과 관계없이 세포주의 증식에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

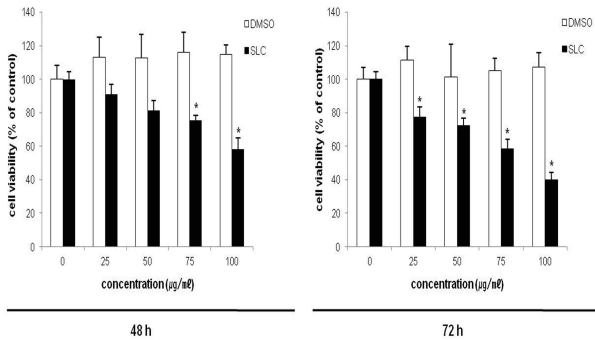


Fig. 2. Effect of the ethanol extract of *Saussurea lappa* Clarke (SLC) on the cell growth in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. SLC suppressed cell growth in time and dose dependent manner. MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 4×10^5 cells/well and treated with SLC for 48 h and 72 h. Cell viability was measured by MTT assay. Data are shown as the mean of separate experiments performed on three different culture [error bars mean \pm standard deviation (SD)]. * $p < 0.001$ vs. control.

3. 당목향이 전이성 유방암 세포주의 세포사멸에 미치는 영향

당목향이 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 증식을 억제했기 때문에 이와 관련된 기전을 확인하였다. 당목향에 의한 세포주의 증식 억제 결과가 당목향이 세포주에 대해서 세포사멸을 유도함으로써 나타나는 것이 아닌지 세포사멸과 관련하여 subG1 세포의 증가 정도를 유세포 분석기를 통해 관찰해 보았다 (Fig. 3). 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 실험을 진행 했을 때, 48시간에 40%의 증식이 억제되더라도 불구하고 subG1 fraction은 아무것도 처리하지 않은 그룹(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한 그룹에 비해 그리 크게 증가하지 않았다. 이러한 결과로 볼 때, 당목향에 의한 전이성 MDA-MB-231 세포주의 증식억제는 세포사멸과는 관련이 없고, 다른 기전에 의해서 진행 된다는 것을 알 수 있었다.

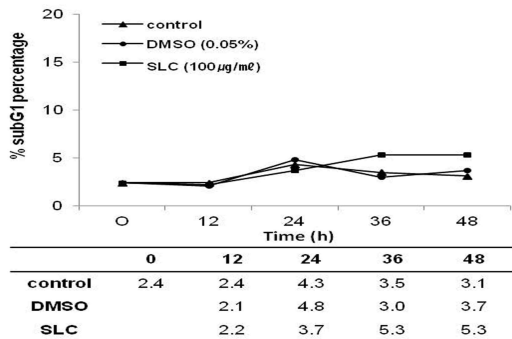


Fig. 3. Effect of the ethanol extract of *Saussurea lappa* Clarke (SLC) on the apoptosis in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. SLC dose not induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. cells were seeded at a density of 5×10^5 cells/100 mm and treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SLC for the indicated time. Percentage of sub-G1 phase cells were determined DNA content histogram of a FACStal flow cytometer.

4. 당목향의 전이성 유방암 세포주의 세포주기에 미치는 효과와 관계된 단백질과의 관련성

당목향의 전이성 유방암 MDA-MB-231 세포주 증식억제에 대한 다른 기전을 확인하기 위하여 당목향이 세포주의 세포주기에 미치는 영향을 확인하여 보았다. Fig. 4a. 의 유세포 분석 결과를 보면 당목향을 12, 24, 36시간 처리했을 때, 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한 그룹 보다 상대적으로 S기와 G2기 집단이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 48시간이 되었을 때는 거의 아무것도 처리하지 않은 그룹과 DMSO를 처리한 그룹과 비슷하게 유지하였다 (data not shown). G2기 집단 같은 경우는 36시간에 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한 그룹에 비해서 각각 대략 100, 80%가 증가되었다(Fig. 4b). 다음으로는 당목향을 처리했을 때, G2기와 관련된 단백질 발현의 변화를 Western Blotting으로 확인하였다(Fig. 4c). 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 h)과, DMSO를 처리한 그룹에 비해서 G2 세포주기와 관련된 Cyclin B1과 Cyclin 의존적 인산화 효소인 Cdc2의 발현정도가 당목향을 처리 한 후 24 시간부터 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 CDK 억제제 (Cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)로 알려진 p21은 12시간에 현저하게 증가되어 있음을 확인했다. 결국, 당목향이 p21을 증가시키고 이것이 Cdc2에 작용하여 이 발현정도를 억제시키고, 뿐만아니라 Cyclin B1도 감소시킴으로써 세포주기가 G2기에서 M기로 진행되지 못하고 세포분열을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

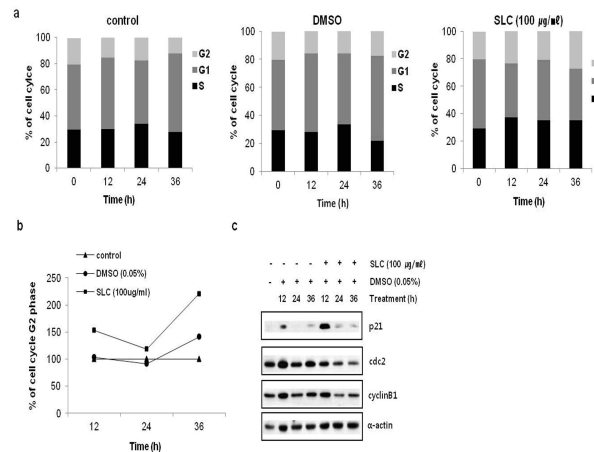


Fig. 4. Effect of the ethanol extract of *Saussurea lappa* Clarke (SLC) on the cell cycle in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. (a) Cells were seeded at a density of 5×10^5 cells/100 mm and treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SLC for the indicated time. G1, S and G2 cell cycle distribution were determined using a FACStal flow cytometer. (b) The graph of SLC treated cells against untreated cells in G2 cell cycle. (c) Analysis of G2/M cell cycle-related molecule, such as p21, cdc2 and cyclin B1 by western blotting. α -actin used as a loading control.

5. 당목향이 전이성 유방암 세포주의 전이관련 단백질에 미치는 영향

MDA-MB-231 유방암 세포주 같은 경우는 악성세포에서 유래되었기 때문에 다른 장기로 전이가 잘 될 수 있는 특징을 가지

고 있다. 때문에 이러한 세포주에서는 전이와 관련된 기전을 차단시키는 것 또한 하나의 항암효능의 측면이라 볼 수 있다. 당목향이 MDA-MB-231 전이성 유방암 세포주에서 전이와 관련된 단백질 분해효소인 MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)과 전이가 더 잘 진행되도록 도와주는 신혈관생성과 관련된 VEGF (Vascular endothelial growth factor)의 발현정도를 조절하는지를 확인해보았다(Fig. 5). MMP-1과 VEGF 단백질은 세포내에서 합성되어 세포 밖으로 분비되는 단백질이기 때문에 특수 필터 장착 튜브인 centricon을 사용하여 분비된 단백질을 농축하고 Western Blotting을 수행하여 발현정도를 비교했다. 결과를 보면, 당목향을 처리한지 36시간 되었을 때, loading control로 사용한 ponceau와 비교하면 MMP-1 같은 경우는 발현정도가 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), DMSO를 처리한 그룹과 거의 차이가 없는 것을 볼 수 있다. 반면에 VEGF 같은 경우는 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), DMSO를 처리한 그룹에 비해 현저하게 감소시켰다.

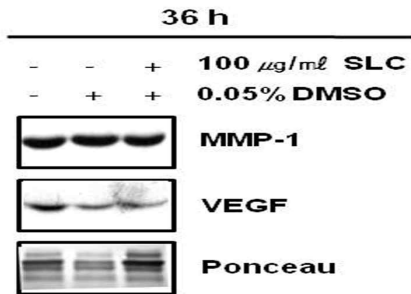


Fig. 5. Effect of the ethanol extract of *Saussurea lappa* Clarke (SLC) on metastasis-related proteins in highly-metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. SLC decreased angiogenesis-related protein, such as Vascular endothelial growth factor (VEGF), but dose not affected Matrix-metalloproteinase-1 (MMP-1) protein expression levels. Cells were seeded at a density of 5×10^5 cells/100 mm and treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SLC for 36 h. MMP-1 and VEGF secreted proteins were detected in culture media by western blotting and ponceau used as a loading control.

고찰

유방암은 미국을 포함하여 서양 여성에게서 발병률이 가장 높은 암으로 서양에 비해 동양인에게는 발생이 다소 낮은 편이지만 식생활 등의 환경 변화 등의 요인에 의해 그 발병률이 증가하고 있는 추세이다¹⁹. 유방암과 유사한 한의학적 질환으로는 乳巖, 吹乳, 乳中結核, 乳勞, 乳癰, 乳癰, 乳痰 등이 있고, 이 중에서도 乳巖이 현재 유방암에 가장 부합된다고 알려져 있다. 또한 疏氣行血之法이 치료의 기본이 되고 있다²⁰. 한의학에서 유방암과 관련된 여러 기록 중에서 龔은 「萬病回春」 乳巖에서 아직 터지지 않은 경우는 치료가 가능하지만 瘡이 생기게 되면 不治라 여기고, 진행된 乳巖의 예후가 不良함을 서술하였다²¹. 약재 및 탕약 중 黃芩, 鬼箭羽, 抗癌丹, 半枝蓮, 清肝解鬱湯, 加味雙和湯 등이 유방암에서 효과가 있다고 보고된 바가 있다²²⁻²⁷.

당목향 (唐木香, *Saussurea lappa* Clarke)은 국화과 (Compositae)에 속하는 *Saussurea lappa* Clarke의 뿌리로 理氣,

健脾, 止痛 등의 작용으로 한의학에서 널리 사용하는 한약재로 알려져 있다²⁸. 또한 당목향은 몇 가지의 암 세포주에서 항암효과를 보인다고 기존에 보고되었기 때문에 이러한 사실을 바탕으로 본 실험에서는 아직 항암효과가 보고되지 않은 악성종양으로부터 유래된 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주에 대한 당목향의 증식억제 및 전이 억제와 관련하여 기전을 살펴보았다.

우선 당목향이 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 세포 형태에 영향을 미치는지 현미경으로 확인을 해 본 결과, 당목향에 의해 세포 본연의 형태를 잃어갈 뿐만 아니라 세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

또한 당목향을 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주에 농도별로 (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 시간별로 (48, 72시간) 처리했을 때, 농도 및 시간 의존적으로 세포주의 증식을 억제하였다. 반면에 아무것도 처리하지 않거나 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 당목향을 녹인 용매인 DMSO를 처리한 경우에는 세포의 증식에 아무런 영향을 미치지 않았다. 결과, 당목향만이 특이적으로 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 증식을 억제한다는 것을 알 수 있다(Fig. 2).

다음으로는 이러한 증식억제가 어떠한 기전에 의해서 일어나는지 확인하기 위해 당목향이 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주에 대해 세포사멸을 유도하는지 혹은 세포주기와 관련하여 세포가 성장하고 분열하는 과정에 영향을 끼쳐 세포주기를 억제하는지 두 가지 경우로 나누어 실험을 진행했다. 세포사멸 (apoptosis)의 경우 조직의 항상성을 유지하거나 발생 과정에서 개체를 보호하기 위한 일련의 진화적 과정으로 세포표면의 죽음 수용체 (death receptor)를 통하는 외재적 경로 (extrinsic pathway)와 미토콘드리아를 경유하는 내재적 경로 (intrinsic pathway)로 나뉜다고 알려져 있다. 먼저, 당목향에 의한 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 세포사멸을 확인하기 위해 당목향을 시간별로 처리하고 (0, 12, 24, 36, 48시간) 수집하여 에탄올 고정과 PI 염색을 한 후 유세포 분석기를 통해 subG1 fraction에 모여 있는 세포를 확인했다. 결과, 당목향에 의해 36시간에 40% 정도의 증식이 억제 되었다는 것을 MTT assay로 확인을 했음에도 불구하고, subG1 fraction의 세포가 아무것도 처리하지 않은 그룹(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한 그룹 보다 각각, 2.2, 1.6% 정도만이 증가되었다(Fig. 3). 결국, 당목향에 의한 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 증식억제는 세포사멸과 관련된 기전에는 영향을 받지 않는다는 것으로 사료된다.

다음으로 당목향이 전이성 MDA-MB-231 유방암 세포주의 세포주기와 관련하여 영향을 미치는지 유세포 분석기를 통해 확인하였다. S기는 DNA가 위협을 인지하면 순간적으로 증가할 수 있다고 알려져 있다. 그리고 G2기는 checkpoint를 가짐으로써 세포분열을 준비하고 분열을 할 것인지 결정하는 단계라고 알려져 있고, 이 checkpoint에 의해 S기에서 M기로의 이행이 조절된다. 또한 이 시기는 cyclin B-CDK1 (cdc2) 복합체에 의해 조절되고, cyclin-의존적 인산화효소 억제제 CKI의 한 종류인 p21에 의해 CDK1 (cdc2)의 활성이 차단되고 cyclin B와의 복합체 형성을 억제시킨다고 알려져 있다²⁹⁻³⁵. Fig. 4의 유세포 분석 결과를 보면, 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한

그룹에 비해 당목향을 처리하면 36시간째에 S기가 증가하였고 이것으로 보아 DNA가 위협을 인지했다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 DNA damage와 관련된 checkpoint를 가지는 G2기를 확인한 결과, 당목향을 처리한지 12, 24, 36시간에서 모두 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 DMSO를 처리한 그룹에 비해서 증가했고, 특히 36시간째에 G2기에 머무르는 세포가 80% 이상이 증가했다. 이는 세포주기 G2기가 정지되어 세포분열이 억제되고 있다는 것을 나타내고 결국 당목향이 세포주기와 관련된 기전을 조절함으로써 전이성 MDA-MB-231 세포주의 증식을 억제한다는 것으로 사료된다. 다음 결과와 관련된 기전을 확인하기 위하여 당목향에 의한 G2 세포주기와 관계 있는 단백질의 발현정도를 Western Blotting 실험을 통하여 수행했다(Fig. 4c). 이 연구 결과 당목향을 처리하면 다른 그룹에 비해 p21은 12시간에 현저하게 증가되고, Cdc2와 Cyclin B1은 24시간부터 감소하였다. 다음의 결과로 당목향은 특히 G2 세포주기를 차단함으로써 세포의 증식이 억제되는데 이는 CDK 억제제 (Cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)인 p21의 발현을 증가시키고, 이 단백질이 표적인 Cdc2에 작용함으로써 Cdc2의 발현 정도를 감소시키고, 뿐만 아니라 당목향이 직접적으로 Cyclin B1을 조절하여 G2 세포주기와 관련된 대표적인 단백질의 발현과 관련하여 기전에 영향을 준다는 것으로 사료된다.

유방암은 그 자체로는 큰 위협성을 가지지 않지만 뼈나 폐와 같은 다른 장기로 전이가 쉽게 될 수 있기 때문에 사망까지 이르게 하는 위협성을 나타낼 수 있다. 특히 본 논문에서 사용한 MDA-MB-231 유방암 세포주는 악성세포에서 유래되었기 때문에 높은 전이성 특징을 가지고 있다. 그렇기 때문에 높은 전이성 특징을 지니는 암세포의 경우에는 증식을 차단하는 기전도 중요하지만 전이를 억제시키는 것 또한 중요한 요소로 작용된다. 전이는 여러 단계가 함께 수반되어 일어나는 복합적인 과정이기 때문에 이를 조절하는 기전을 밝히기 위해서는 여러 시각에서 접근할 필요가 있을 것이다. 본 논문에서는 당목향이 전이와 관련하여 세포의 이동을 용이하게 하는데 관여하는 효소인 Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)과 암이 처음 생긴 장소인 원발 부위로부터 다른 장기로 이동하는데 통로가 될 수 있는 혈관생성에 관여하는 Vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현에 영향을 미치는지 확인했다(Fig. 5). 당목향에 의해 MMP-1은 조절되지 않지만, VEGF의 발현은 감소시켰다. 결과, 당목향이 전이성 유방암 세포주가 분비해 내는 VEGF 양을 감소시킴으로써 신생혈관생성을 억제하여 다른 장기로 전이되는 정도를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 유방암 세포주를 제외한 몇 가지 세포주에 대해 항암효과가 이미 알려진 당목향이 전이성 유방암 세포주에 대해서 항암효과를 보이는지, 어떤 기전과 관련하여 나타내는지, 당목향과 아무것도 처리하지 않은 그룹 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0 h) 그리고 당목향을 녹인 DMSO 그룹과 비교 관찰한 결과 다음과 같은 결

론을 내렸다.

당목향은 전이성 유방암 MDA-MB-231 세포주에 대해서 다른 두 그룹보다 농도와 시간 의존적으로 증식을 억제할 뿐만 아니라 세포의 형태도 본연의 전이성 세포주가 가지는 뾰족한 형태를 잃어버리게 했다. 당목향에 의한 증식억제 기전은 세포사멸과 상관없이 G2기 세포주기를 정지시키고 결과, 그 다음 단계인 M기로의 진행을 차단함으로써 세포의 분열을 억제하는 것을 확인했다. 뿐만 아니라 당목향은 전이와 관련하여 Matrix metalloproteinase-

1 (MMP-1)의 분비에는 영향을 미치지 않지만, 전이-신혈관생성과 관련된 Vascular endothelial growth factor (VEGF)의 발현을 현저하게 감소시켰다. 이러한 결과로부터 본 저자는 당목향에 의한 증식억제와, 전이와 관련된 단백질의 발현을 조절하는 것을 통해 항암효과에 대한 가능성을 발견하였다. 신생혈관과 관련된 부분은 대표적인 분자의 수준에서만 확인을 했기 때문에 당목향에 의한 신생혈관억제 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 (과제번호 20111577)의 재원으로 수행되어진 연구입니다.

참고문헌

1. Edwards, B.K., Brown, M.L., Wingo, P.A., Howe, H.L., Ward, E., Ries, L.A., Schrag, D., Jamison, P.M., Jemal, A., Wu, X. C., Friedman, C., Harlan, L., Warren, J., Anderson, R.N., Pickle, L.W. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 97(19):1407-1427, 2005.
2. Park, S., Bae, J., Nam, B.H., Yoo, K.Y. Aetiology of cancer in asia. *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 9(3):371-380, 2008.
3. Block, K.I., Gyllenhaal, C., Tripathy, D., Freels, S., Mead, M.N., Block, P.B., Steinmann, W.C., Newman, R.A., Shoham, J. Survival impact of integrative cancer care in advanced metastatic breast cancer. *Breast J.* 15(4):357-366, 2009.
4. Gupta, G.P., Minn, A.J., Kang, Y., Siegel, P.M., Serganova, I., Cordon-Cardo, C., Olshen, A.B., Gerald, W.L., Massague, J. Identifying site-specific metastasis genes and functions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 70: 149-158, 2005.
5. Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of Ikkappa α Balphak kinase and p65 phosphorylation:

- Correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res.* 63(15):4375-4383, 2003.
6. Lopez-Saez, J.F., de la Torre, C., Pincheira, J., Gimenez-Martin, G. Cell proliferation and cancer. *Histol. Histopathol.* 13(4):1197-1214, 1998.
 7. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36(3):131-149, 2003.
 8. Nasmyth, K. Viewpoint: Putting the cell cycle in order. *Science.* 274(5293):1643-1645, 1996.
 9. Cox, L.S., Lane, D.P. Tumour suppressors, kinases and clamps: How p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays.* 17(6):501-508, 1995.
 10. Cavallaro, U., Christofori, G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: Loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta.* 1552(1):39-45, 2001.
 11. Visse, R., Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92(8):827-839, 2003.
 12. Vu, T.H., Werb, Z. Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14(17):2123-2133, 2000.
 13. Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE.* 2001(112):re21, 2001.
 14. Chen, H.C., Chou, C.K., Lee, S.D., Wang, J.C., Yeh, S.F. Active compounds from *saussurea lappa* clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* 27(1-2):99-109, 1995.
 15. Cho, J.Y., Baik, K.U., Jung, J.H., Park, M.H. In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* 398(3):399-407, 2000.
 16. Ko, S.G., Kim, H.P., Jin, D.H., Bae, H.S., Kim, S.H., Park, C.H., Lee, J.W. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 220(1):11-19, 2005.
 17. Ko, S.G., Koh, S.H., Jun, C.Y., Nam, C.G., Bae, H.S., Shin, M.K. Induction of apoptosis by *saussurea lappa* and *pharbitis nil* on AGS gastric cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27(10):1604-1610, 2004.
 18. Kim, E.J., Lim, S.S., Park, S.Y., Shin, H.K., Kim, J.S., Park, J.H. Apoptosis of DU145 human prostate cancer cells induced by dehydrocostus lactone isolated from the root of *saussurea lappa*. *Food Chem. Toxicol.* 46(12):3651-3658, 2008.
 19. 통계청. 보도자료.
http://www.nso.go.kr/newnso/notice/reportview.html?content_id=3343.
 20. 김정진, 이경섭, 송병기, 유방종괴에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지 11(2):29-43, 1998.
 21. 龔廷賢. 萬病回春. 북경, 人民衛生出版社, p 73, 1990.
 22. 윤형순, 고성규. 황금의 유방암 세포주에 대한 항암작용. 대한한방내과학회지 25(3):451-460, 2004.
 23. 박영수, 한지영, 이태균, 김동일. SKBR3 유방암 세포주에 대한 귀전우 메탄올 추출물의 성장억제 및 항산화 효과. 대한한방부인과학회지 18(1):45-54, 2005.
 24. 송기철, 최병렬, 이용연, 유화승, 서상훈, 최우진 등. 항암단을 투여한 유방암환자 60예에 대한 임상보고. 대한한방내과학회지 22(4):669-674, 2001.
 25. 권은정, 강형정, 이용호, 이태균. 반지련이 유방암에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한방부인과학회지 12(2):148-182, 1999.
 26. 서정민, 유동열. 청간해울탕이 소염, 진통, 면역세포 및 유방암 세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 10(2):69-83, 1997.
 27. 현동환, 김준기, 최달영, 김철호, 박원환. 가미쌍화탕의 유방암 발생 및 전이 억제에 대한 실험적 연구. 대한동의병리학회지 11(2):108-112, 1997.
 28. 전국한의과대학 본초학공동고재편찬위원회. 本草學. 서울, 영림사, pp 395-396, 408-409, 2007.
 29. Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 366(6456):704-707, 1993.
 30. Bringol, F., Serrano, M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol.* 35(3):317-329, 2000.
 31. Sherr, C.J., Roberts, J.M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512, 1993.
 32. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282: 1497-1501, 1998.
 33. Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P., Medema, R.H. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J.Biol. Chem.* 275(39):30638-30643, 2000.
 34. Taylor, W.R., Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 20(15):1803-1815, 2001.
 35. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39-85, 2004.