

# 유방암세포에서 괴화 에탄올 추출물의 NF-κB 의존적인 MMP-9 발현의 조절 규명을 위한 연구

김정미<sup>1#</sup> · 이영래<sup>1,2#</sup> · 황진기<sup>1</sup> · 김미성<sup>1</sup> · 김하림<sup>1</sup> · 박연주<sup>1</sup> · 유용욱<sup>2</sup> · 김성철<sup>3</sup> · 류도곤<sup>3</sup> · 권강범<sup>3\*</sup>

1: 원광대학교 대사질환 연구센터, 2: 원광대학교 치과대학 생화학교실, 생체재료·매식 연구소,  
3: 원광대학교 한의과대학 한방생리학교실

## Effects of Flos *Sophorae* Ethanol Extract on NF-κB Dependent MMP-9 Expression in Human Breast Cancer Cell

Jeong Mi Kim<sup>1#</sup>, Young Rae Lee<sup>1,2#</sup>, Jin Ki Hwang<sup>1</sup>, Mi Seong Kim<sup>1</sup>, Ha Rim Kim<sup>1</sup>, Yeon Ju Park<sup>1</sup>,  
Yong Ouk You<sup>2</sup>, Seong Cheol Kim<sup>3</sup>, Do Gon Ryu<sup>3</sup>, Kang Beom Kwon<sup>3\*</sup>

1: Center for Metabolic Function Regulation, Wonkwang University School of Medicine,  
2: Department of Oral Biochemistry, and Institute of Biomaterials · Implant, School of Dentistry, Wonkwang University  
3: Department of Korean Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University

Flos Sophorae, the dried flower bud of *Sophora japonica* L, possesses anti-inflammatory properties, prevents and treats blood capillary and hypertension diseases and can also be used as a hemostat. However, the effect of Flos Sophorae on breast cancer invasion is unknown. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), which degrades the extracellular matrix, is a major component in cancer cell invasion. In this study, we investigated the inhibitory effect of Flos Sophorae extract (FSE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and cell invasion, as well as the molecular mechanisms involved in Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) cells. FSE inhibited the TPA-induced transcriptional activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB). These results indicate that FSE-mediated inhibition of TPA-induced MMP-9 expression and cell invasion involves the suppression of NF-κB pathway in MCF-7 cells. Thus, FSE may have therapeutic potential for controlling breast cancer invasiveness.

Key words : MMP-9, NF-κB, Invasion, MCF-7 breast carcinoma cells

### 서 론

괴화는 콩과(Leguminosae)에 속한 낙엽관목인 회화나무의 미개한 꽃 봉우리를 말한다. 괴화 (*Sophora Japonica* L.)는 냄새가 거의 없으며 맛은 쓰고 성질은 약간 차다. 괴화의 효능은 涼血止血, 殺蟲癩瘡, 清肝降火, 抗癌, 血熱로 인한 便秘, 崩漏 등을 멈추게 하고 肝熱로 인한 안구충혈, 장출혈, 자궁출혈, 코피, 혈변, 피를 토할 때 지혈약으로 사용한다. 또한 고혈압, 두통, 어지럼증, 동맥경화증, 중풍, 뇌일혈, 가슴이 답답한 증세에도 효과가 있다<sup>1)</sup>. 약리작용으로 지혈작용, 모세혈관 투과성 감소, 혈압강하,

콜레스테롤강하, 항경련, 항괴양, 항방사능작용, 동상치료, 사하작용이 보고되었다<sup>2-7)</sup>. 우리나라에서 유방암은 여성에서 발생하는 암으로는 발생률 2위를 기록하고 있다<sup>8)</sup>. 외국에서 유방암은 주로 50대 이후에 호발하는 반면, 국내에서는 젊은 연령층인 40대에서 가장 많이 발생하며 40세 이하인 경우도 전체 유방암 환자의 약 20% 정도를 차지한다<sup>9)</sup>. 이 유방암 세포들은 유방조직을 파괴하고 변형시키는 한편 림프관이나 혈액을 타고 다른 기관으로 이동하기도 한다. 특히 유방에는 많은 림프관들이 광범위하게 뻗어있기 때문에 암세포가 겨드랑이의 림프절로 쉽게 퍼지게 된다. 그렇기 때문에 유방암의 전이를 억제하기 위해 효과적인 치료 약물 개발이 필요한 실정이다. 이러한 유방암을 치료하기 위한 항암제 중 식물추출물 및 성분이 유방암의 예방과 치료에 긍정적인 효과를 나타내고 있다는 보고가 MCF-7 인체 유방암 세포주에서 많이 밝혀지고 있다<sup>10)</sup>. 하지만 아직 유방암세포에서 괴

\* 교신저자 : 권강범, 전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 한의과대학

· E-mail : dession@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6917

· 접수 : 2013/12/11 · 수정 : 2014/02/05 · 채택 : 2014/02/11

# Both authors contributed equally to this work

화 추출물의 효과에 대한 논문은 보고되지 않았다.

Matrix metalloproteinase (MMP)에 속하는 효소군은 고도로 유사한 아미노산 서열을 가진 단백질효소로서 여러 가지 기질 특이성을 가지고 정상적인 조직의 재형성(tissue remodeling) 과정뿐만 아니라 관절염, 종양의 침윤 등과 같은 여러 질환에 관여하는데 특히 72 kDa (MMP-2) 및 92 kDa (MMP-9) type IV collagenase는 기저막의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. 기저막은 주로 laminin, fibronectin, heparan sulphate, proteoglycan 및 type IV collagen 등으로 구성되는데 전이를 위한 기저막의 파괴를 위해서는 기저막의 주성분을 이루는 type IV collagen의 분해가 필수적이다<sup>12)</sup>.

이 중 MMP-9는 분자량 92 kDa이며, MMP-2와 비슷한 구조를 보이고, 생체의 조직 재조합 과정과 MMP-2와 마찬가지로 악성 종양의 침윤성 성장에 관여한다고 한다<sup>13)</sup>.

MMPs의 버팀질 분해작용은 MMPs의 조직억제인자(tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)에 의해서 주로 조절되며<sup>14)</sup>, 정상조직에서는 MMPs와 TIMPs의 분비가 균형을 이루므로써 기저막의 분해 대사가 적절히 조절되고 있으나 악성 종양에서는 이들 간의 불균형으로 인해 침윤과 전이가 조장될 수 있다<sup>15)</sup>.

따라서 본 연구에서는 항 괴양 등의 효능을 가진 괴화 추출물이 유방암에 효과적으로 작용할 수 있을 것으로 생각되어 유방암 세포인 MCF-7에 전이 억제효과에 미치는 영향을 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 재료

인간 유방암 세포주 MCF-7은 한국세포주 은행을 통해 구입하였으며, DMEM 배지에 10% (v/v) 혈청과 1% 항생제를 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 든 37°C incubator에서 배양하였다. TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), Dimethylsulfoxide (DMSO), 그리고 anti- $\beta$ -actin 항체는 SIGMA에서 구입하였다. EZ-cytox viability assay kit는 Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea 에서 구입하였다.

항체 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , 그리고 p-IKK $\alpha$  $\beta$ , IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ 는 cell signaling에서 구입하였다 (Beverly, MA, USA). 항체 MMP-9, p50, p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , 그리고 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 및 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. [ $\alpha$ -32P]dCTP는 Amersham (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. High glucose-containing DMEM, 혈청, 그리고 phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco-BRL (Gaithersburg, ME, USA)에서 구입하였다.

### 2. 괴화 추출물의 분리

괴화 추출물은 한국식물추출물은행(<http://extract.pdrc.re.kr>)에서 구입하여 사용하였다. 간략하게 설명하면, 괴화(분양번호:CA01-014, Bar code:PBC-048A)을 95% ethyl alcohol에 3일 동

안 노출시킨 후 무형광 흡을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45°C에서 Rotary Evaporator(N-1000SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하고, 그 추출물을 -4°C에서 보관한다.

### 3. EZ-CYTOX를 통한 세포 독성 측정

세포는 하루 전날 96 well plate에 2 × 10<sup>6</sup>/well씩 분주한 후 세포가 하루 동안 안정화 시키고, 괴화 추출물을 농도 조건에 맞게 처리하고 24시간 후에 Assay reagent 10 ul을 넣어주었다. 30분 정도 배양기 내에서 반응 시킨 후 microplate spectrophotometer (Molecular Device, USA) 로 450 nm파장에서 흡광도를 측정한다.

### 4. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

MCF-7 cells (5 × 10<sup>5</sup>)에 괴화 추출물 50  $\mu$ g/ml을 1시간 전 처리 후에 TPA를 처리하고 37°C배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 내 단백질은 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리하였다. 단백질의 농도는 Bradford method(38)을 사용하여 조사하였다. 샘플(20  $\mu$ g)은 10% 아크릴아마이드와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond TM-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk를 사용하여 2시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체는 1  $\mu$ g/ml of a 1:2000 dilution 하여 4°C 냉장고에서 overnight 처리하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG(1:2000 dilution)를 사용하였다. 단백질 발현양은 image analyzer(EZ-Capture ST, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

### 5. Gelatin zymography assay (효소활성 측정)

MMP-9의 활성을 측정하기 위하여 zymography 방법을 이용하였다. 세포를 6 well plate에 분주한 후 serum이 없는 상태에서 시약을 처리하여 세포 배양액을 수확하였다. 세포 배양액을 1 mg/ml gelatin이 함유된 10% polyacrylamide gel로 전기영동한 후 2.5% Triton X-100으로 SDS를 제거하였다. 그 후 Developing solution으로 gel을 24시간 동안 반응시킨 후 0.25% Coomassie blue로 염색하고 acetic acid와 metanol로 destaining 하였다. MMP-9의 proteolytic activity는 gelatin이 분해되어 투명한 band의 세기를 비교하여 측정하였다.

### 6. 실시간 역전사 효소 중합반응 (Quantitative real-time polymerase chain reaction)

MMP-9의 발현되는 유전자 발현량을 비교하기 위해 RNA 분리를 RNA Kit (TAKARA PrimeScript™ RT reagent Kit, CAT# RR037A)를 사용하였고, cDNA를 합성한 다음, Applied Biosystems PRISM 7000 Sequence Detection System을 이용하여 Real time RT-PCR을 수행하였다. 2 ul의 합성 cDNA, primer, 10

ul의 SYBR Green을 넣은 다음, DEPC-H2O로 총 20 ul를 맞춘 후, 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 60℃에서 1분 동안 총 45 cycle을 반응시키고 housekeeping gene (GAPDH)과 비교하여 정량화 하였다.

7. 핵산 추출 (Preparation of nuclear extract)

MCF-7 세포 ( $2 \times 10^6$  cells)에 괴화 추출물을 1시간 전처리 후 TPA를 4시간 동안 처리하였다. 즉시, PBS로 세척 후 포집된 세포를 1,500 g에서 3분 원심분리하고, Cytoplasmic과 nuclear 분리에는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Protein Research Products, Thermo)를 사용하였다.

8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용한 NF-κB의 활성화 측정

전사인자의 활성화 측정을 위해 NF-κB consensus binding site를 가진 oligonucleotide probe (5'-CCGGTTAACAGAGGGGCTTCCGAG-3') oligo를 2 ul 씩 사용하였으며, 2 ug의 poly (dI-dC)가 들어있는 10 mM Tris (pH 8.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 2M DTT 을 함유, 250 ug/ml BSA)에 희석하여 85℃에서 5분간 변성시킨 후 각각의 32 P-labelled-probe들 (0.5-1.0 ng, 100,000-2,000,000 cpm)을 이용하여 32 P-ATP 효소를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 20 ug의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 6% polyacrylamide gel에 걸어 150 V, 10 mA로 3시간 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue (BPB)의 염색이 밑으로부터 1-2cm 정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추었고, 이를 gel dryer에서 약 2시간 건조한 다음, X-ray flim에 노출시켜 감광시켰다.

9. Matrigel invasion assay

종양 세포의 조직 내 침투 능력은 8.0 um 크기의 구멍으로 구성된 transwell 용 24 well insert system을 사용하였다. matrigel이 전 처리된 insert에  $3 \times 10^5$  세포를 접종한 후 시약을 처리한 다음, 24 시간 후 세포를 고정시키고, crystal violet을 이용하여 아래로 침투한 세포를 염색하여 측정하였다.

10. 통계처리

실험 결과는 mean ± S.E.M으로 표시하였고, 유의성의 검정은 One-Way Anova test (Microcal Origin; version6.0; Microsoft; USA)에 의하였으며, p < 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 괴화 에탄올 추출물이 MCF-7 세포의 생존율에 미치는 영향

세포는 96 well plate에  $2 \times 10^6$  cells/well의 밀도로 분주하였다. MCF-7에 대한 괴화 에탄올 추출물의 세포 독성은 EZ-CYTOX를 통해 세포 생존율을 측정하였다. MCF-7 세포에 괴화 에탄올 추출물을 각각 0 μg/ml, 1 μg/ml, 5 μg/ml, 10 μg/ml,

25 μg/ml, 50 μg/ml의 농도로 24시간 동안 노출시켰다. 그 결과 세포 생존율은 괴화 에탄올 추출물 0 μg/ml를 대조군으로써 100%로 정했을 때, 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml 농도에서도 세포 생존율이 80% 이상으로 나타나 확인한 세포 독성이 낮은 것으로 생각된다. 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml 이하의 농도에서 MCF-7 세포 생존율이 전부 80% 이상이었다 (Fig. 1). 따라서 이후의 실험에서는 괴화 에탄올 추출물에 대하여 세포 생존율이 80% 이상인 25, 50 μg/ml의 농도로 진행하였다.

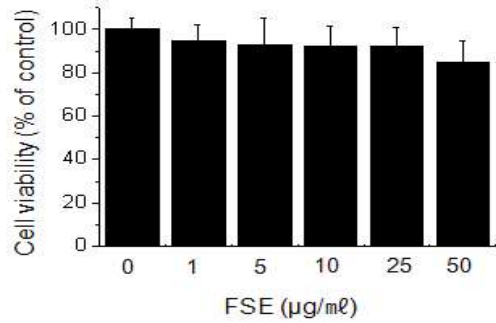


Fig. 1. Effects of FSE on MCF-7 viability. For the cytotoxicity test of FSE, cells were cultured in 96-well plates until 70% confluence and various concentrations (0, 1, 5, 10, 25 and 50 μg/ml) of FSE were added to the cells for 24 h. EZ-CYTOX was used to detect the viability of the cells. The optical density value of control was regarded as 100%. Data represents are the mean ± SEM of six independent experiments.

2. 괴화 에탄올 추출물이 TPA에 의해 유도된 MMP-9 발현에 미치는 영향

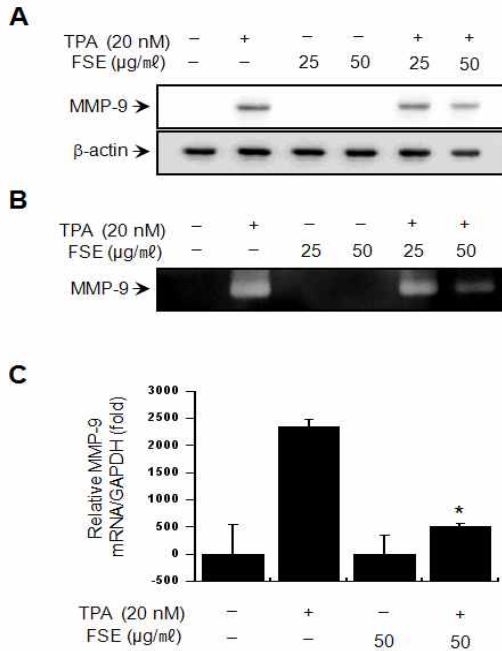
세포 내 MMP-9 단백질 발현량을 측정하기 위해 Western blot analysis를 실행한 결과, MCF-7 세포에 괴화 에탄올 추출물을 50 μg/ml를 처리한 후 TPA로 유도된 MMP-9 단백질의 발현이 50μg/ml 농도에서 유의적으로 억제되었다(Fig. 2A).

MCF-7 세포에서 MMP-9의 mRNA 발현 억제효과를 측정하기 위해 qRT-PCR 실험을 시행한 결과, MCF-7 세포에 TPA 및 괴화 에탄올 추출물 처리를 모두 하지 않은 대조군은 mRNA 발현량이  $1 \pm 538.18\%$ 이었으며, TPA만 처리한 세포 샘플의 mRNA는  $2342.292 \pm 134.89\%$ 로 발현되었다. 반면 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml만 처리한 MCF-7 세포 샘플은  $0.933 \pm 350.84\%$  mRNA 발현을 보였다. 또한 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml를 처리한 후 TPA 처리를 한 MCF-7 세포 샘플은  $506.419 \pm 61.1\%$ 로 mRNA 발현량을 보였다. 이에 따라 TPA는 MMP-9 mRNA 발현을 유도시켰으나 괴화 에탄올 추출물을 처리했을 때에는 TPA로 유도된 MMP-9 mRNA 발현이 유의적으로 억제된 것을 확인하였다 (p<0.05, Fig. 2C).

MMP-9 단백질 효소 활성화도 억제효과를 측정하기 위해 zymography analysis를 시행한 결과, MCF-7 세포에 TPA 처리를 하였을 때 MMP-9의 단백질 효소 활성이 증폭되었으나 괴화 에탄올 추출물은 이를 억제하였으며, 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml 농도에서 유의성 있게 TPA로 유도된 MMP-9의 단백질 효소 활성을 감소시켰다 (Fig. 2B).

상기 세 가지 실험을 통해 괴화 에탄올 추출물이 MCF-7 세

포에서 TPA로 유도된 MMP-9의 발현을 억제하여 향후 암세포의 침습 및 전이를 억제한다는 것이 확인되었다.



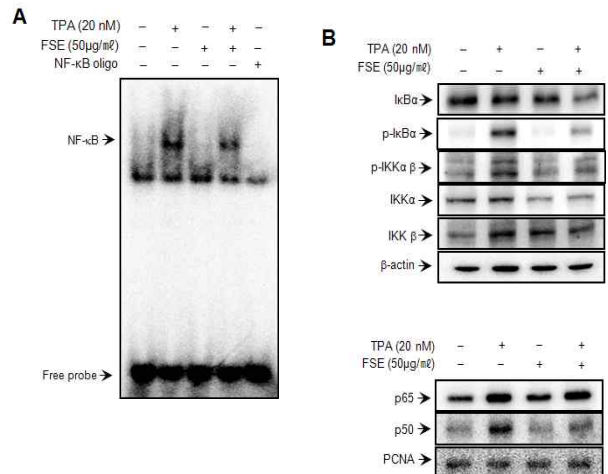
**Fig. 2. FSE inhibits TPA-induced MMP-9 expression in MCF-7 cells.** MCF-7 cells in monolayer were treated with the indicated FSE concentrations in the presence of TPA for 24 h. Cell lysates were analyzed by Western blot with anti-MMP-9. The blot was reprobed with anti-β-actin to confirm equal loading (A). MMP-9 mRNA levels were analyzed by real-time PCR and GAPDH was used as an internal control (B). Conditioned medium was prepared and used for gelatin zymography. Effects of FSE on the MMP-9 activity in MCF-7 cells. Cells were pretreated with FSE for 1h followed by TPA stimulation for 24 h (C). Each value represents the mean ± SEM of three independent experiments. \*p<0.05 vs TPA

### 3. 괴화 에탄올 추출물이 MCF-7세포에서 MMP-9 발현억제 중 NF-κB 신호전달경로에 미치는 영향

괴화 에탄올 추출물에 의해 MMP-9 발현이 억제되는 기전을 더욱 상세하게 밝히기 위해 EMSA를 이용하여 괴화 에탄올 추출물이 TPA로 활성화가 유도된 NF-κB에 미치는 영향을 확인하였다. TPA 유도 3시간 후 준비된 핵단백질에서 NF-κB 신호전달경로를 분석하였다. TPA는 확연하게 NF-κB의 결합반응을 활성화시켰다. TPA 유도 전에 괴화 에탄올 추출물을 50 μg/ml 처리한 샘플에서는 TPA로 유도된 NF-κB 결합반응이 억제되었다. 이로부터 괴화 에탄올 추출물은 TPA로 유도된 NF-κB DNA 결합 반응을 억제하는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 3A).

더 나아가 괴화 에탄올 추출물에 의해 MCF-7 세포에서 유도된 MMP-9의 발현이 억제될 때 NF-κB 신호전달경로의 활성화 정도를 단백질량으로 정량하여 비교하기 위하여 Western blotting analysis를 실시하였다. 실험 중 괴화 에탄올 추출물은 세포 독성을 보이지 않으면서 MMP-9의 발현을 억제하는 것이 전 실험에서 확인된 농도인 50 μg/ml로 처리하였다. NF-κB 신호전달경로의 활성을 측정하기 위해서는 그 대표적인 하위단위인 p50 및 p65를 PCNA는 대조군 정량화를 위해 사용되었다. 그 결과 MCF-7 세포에서 TPA 20 nM만 단독으로 처리했을 때 p50,

p65 단백질의 핵내로의 이동이 모두 증가하였다. 반면 MCF-7 세포에 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml를 처리한 후 TPA 20 nM를 처리한 경우 p50 단백질의 핵내로의 이동은 억제되었으나 p65 단백질의 핵내로 이동은 억제되지 않았다 (Fig. 3B). 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml가 NF-κB 신호전달경로를 억제하여 MCF-7 세포에서 TPA로 유도된 MMP-9의 발현을 억제하는 기전을 더욱 자세하게 관찰하기 위하여 western blotting analysis를 통해 IKK 및 IκBa 신호전달경로에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, TPA만 처리한 MCF-7 세포 샘플에서 활성화된 p-IKKαβ가 억제되었다. 반면 IκBa의 경우 TPA만 처리한 MCF-7 세포군에서는 분해되지 않고 괴화 추출물 50 μg/ml TPA와 같이 처리한 군에서는 IκBa의 분해가 일어났다. 더 나아가 TPA만 처리한 MCF-7 세포 샘플에서 활성화된 p-IκBa (인산화반응을 거친 IκBa)는 괴화 추출물 50 μg/ml를 함께 처리한 군에서 p-IκBa가 억제되었다 (Fig. 3B). 이러한 실험결과는 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml는 p-IκBa의 감소를 통해 NF-κB를 억제하여 MCF-7 세포에서 TPA로 유도된 MMP-9의 발현을 억제하는 것을 시사한다.



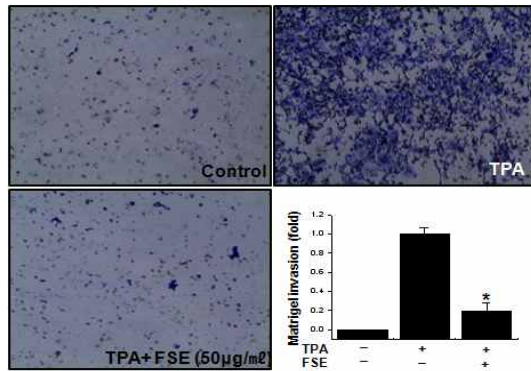
**Fig. 3. FSE inhibits TPA-induced DNA binding of NF-κB, translocation of p50 to the Nucleus, and IκBa Degradation in MCF-7 cells.** Cells were stimulated with TPA and the indicated concentrations of FSE. Following 3 h incubation, DNA binding of NF-κB was analyzed by EMSA (A), and the translocation of p65 and p50 to the nucleus and IκBa degradation in the cytoplasm (B) were determined by western blot analysis.

### 4. 괴화 에탄올 추출물이 TPA에 의한 MCF-7 세포의 침투에 대한 효과

괴화 에탄올 추출물이 MCF-7 유방암 세포의 침습력을 억제하는지에 대하여 알아보기 위해 In vitro invasion assay를 시행하였다. Matrigel invasion assay에 따라, 아무런 처리를 하지 않은 MCF-7 세포 샘플과 TPA로 유도되어 MCF-7 세포 침습이 증가된 샘플, 그리고 TPA로 MCF-7 세포 침습을 유도하기 전에 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml를 처리한 샘플을 비교하였다. TPA 처리를 한 MCF-7 세포를 배양한 결과, 처리 없이 MCF-7 세포를 배양했을 때에 비해 세포 침습이 1.0 ± 0.07%로 증가하였다. 더 나아가, 괴화 에탄올 추출물 50 μg/ml를 세포에 처리한 후 TPA로 MCF-7 세포의 침습을 유도했을 때 세포침습은 0.19 ± 0.09%



로 TPA만 처리했을 때에 비해 세포 침습을 감소시켰다(Fig. 4).



**Fig. 4.** FSE inhibits TPA-induced Matrigel invasion in MCF-7 cells. Cells were seeded onto the upper chamber and drugs placed in the well. After a 24 h incubation, cells on the bottom of filter were fixed, stained, and counted. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs TPA.

## 고찰

괴화(槐花, *Flos Sophorajaponica* L.)는 두과 Leguminosae에 속하는 회화나무(*Sophorajaponica* L.)에 속하는 콩과식물의 꽃송이 혹은 꽃봉우리로서 괴각(槐角)과 함께 신농본초경(神農本草經)에는 상품(上品)으로 수재되어 있다. 한국, 중국 및 일본의 전역에서 생산되나 중국의 하강성(河北省)에서 생산되는 것이 가장 품질이 양호하며 꽃이 피는 시기는 7~8월경이다<sup>16</sup>. 괴화는 괴화미(槐花米), 괴미(槐米) 등으로 불리기도 하고, 역대의 중국본초서(本草書)에는 회화나무의 괴실(槐實)을 괴화의 이명으로 기록하고 있으며 우리나라 조선시대 본초서에는 회화나무 꽃이라 기록하고 있다. 괴화는 한방 약리학적으로 맛(味)은 쓰고 성질(性)은 서늘하고 간과 대장으로 귀경(歸經)하여 열을 내리고 피를 차게 하며 출혈을 멎게 하고 눈의 출혈에 의한 떨림(風熱目赤), 혈압강화작용 및 중풍을 치료한다고 알려져 있다<sup>16</sup>. 괴화에는 triterpenoid saponin, betulin, sophoradiol, glucose, glucuronic acid와 rutin, tannin 등의 flavonoids류가 함유되어 있다. 괴화 속의 rutin과 quercetin은 모세혈관에 작용하여 혈관의 탄력성을 회복시키고 항염증 효능을 발휘하게 한다<sup>17</sup>. 우리나라 사망자 중 암에 의한 사망이 25.6%로 가장 크고 증가하고 있는 추세이며, 암 치료에 투입되는 사회적 비용이 증가하고 있는 실정이다. 암 치료를 가장 어렵게 하는 것은 암세포의 전이(metastasis)이다. 이 때 세포를 둘러싸고 있는 조직으로 침입해 들어가는 세포 침윤(invasion)과정이 필수적이며 이는 악성 암세포의 특징 중 하나이다.

여성의 사망률과 가장 밀접하다고 알려진 유방암은 선암종의 일종으로 서양을 넘어서 아시아에서도 빈도와 사망률이 급증하고 있는 실정이다<sup>18,19</sup>. 이러한 사망률은 유방암이 처음 발견된 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 치료요법

으로도 개선되기 힘들다고 알려져 있다<sup>20,21</sup>.

암세포의 전이는 암세포의 부착, 침윤, 이동, 신 혈관생성 등 다양한 과정을 수반하는 복합적인 단계라고 할 수 있다<sup>22</sup>. 세포-세포, 세포-기질간의 부착능력이 감소되어 운동성을 지니게 되는 암세포는 세포 외부를 둘러싸는 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막을 분해시켜 침윤하고 암세포 주위로 새롭게 형성된 혈관을 따라 다른 곳으로 이동하여 이차 전이성 암을 형성한다<sup>21</sup>.

ECM을 분해하는 단백질 분해 효소 중 대표적인 것이 matrix metalloproteinase (MMP)이며 이 중 특히 MMP-2와 MMP-9이 세포 침윤성에 중요한 역할을 담당한다고 보고되고 있다<sup>23</sup>.

MMP는 포유류, 조류, 양서류, 식물류 등에서 그 존재가 밝혀져 있는 아연의존성 분해효소로 혈관주변의 세포 외 기질을 구성하는 collagen, elastin 등의 구조단백질 및 fibronectin, laminin 등의 구조단백질 및 fibronectin, laminin 등의 부착단백질의 재형성에 관여하는 세포 외 기질 대부분의 구성물질을 분해시키며, 조직의 분해와 복구, 세포의 유입에 관여하는데<sup>24</sup>, 배아이식, 골재형성, 기관형성, 조직 회복, 혈관형성 등의 생리적 반응 및 염증반응, 주름형성, 관절염, 골다공증, 암세포의 침윤과 전이 같은 병리적 과정에서 조직개편의 역할을 수행하며, 이중 MMP-2, 9의 활성조절이 상실되면 류마티드 관절염, 골관절염, 종양침윤 및 신경염증질환이 발생된다고 알려져 있다<sup>25</sup>.

또한 MMP-9은 유방의 정상 혹은 양성 유방암세포의 전이와 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀졌다<sup>26</sup>.

본 연구에서는 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 괴화 에탄올 추출물이 유방암 세포의 암전이 억제 효과에 관련된 단백질 변화 여부를 조사하였다.

괴화 에탄올 추출물을 사용하여 유방암의 억제 기전을 확인하고자 한 연구에서 첫 번째로 실시한 실험은 괴화 에탄올 추출물이 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 독성을 나타내지는지 확인하기 위해 세포독성 실험을 실시한 결과 괴화 에탄올 추출물은 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 80% 이상의 세포 생존율을 나타냈다 따라서 괴화 에탄올 추출물은 세포독성을 거의 나타내지 않았다(Fig 1). 다음 실험으로는 유방암 세포의 전이와 밀접한 관련이 있다고 보고된 MMP-9<sup>26</sup>의 발현을 측정하기 위해 단백질량을 정량하는 western blot analysis, mRNA량을 측정하는 RT-PCR, 그리고 단백질 효소 활성도를 측정하는 zymography를 시행하였다(Fig 2). MMP는 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)과 기저막을 분해시켜 침윤하고 암세포 주위로 새롭게 형성된 혈관을 따라 다른 곳으로 이동하여 이차 전이성 암을 형성한다<sup>21</sup>.

세가지 실험 모두 TPA 20 nM를 처리하여 MMP-9의 발현을 유도하였다. 80% 이상의 세포생존율을 보인 괴화 에탄올 추출물 농도인 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였다. 이러한 결과 괴화 에탄올 추출물이 MCF-7 세포에서 TPA 자극에 의해 발현되는 MMP-9 단백질 발현량을 억제하였으며(Fig. 2A), RT-PCR를 통해 MMP-9 mRNA 발현량을 감소시켰고(Fig. 2B), zymography를 통해 MMP-9의 단백질효소 활성을 억제하는 것을 확인하였

다(Fig. 2C). MMP-9 유전자의 promoter 영역은 NF- $\kappa$ B, AP-1을 포함한 binding site 를 가지고 있다. 암세포들 중에는 NF- $\kappa$ B, AP-1 binding sites의 활성을 통해서 MMP-9의 발현이 증가된다고 알려져 있다<sup>27</sup>. 이번 연구에서는 NF- $\kappa$ B 활성화에 의한 MMP-9 발현을 조사 하였다(Fig. 3). NF- $\kappa$ B는 다양한 이유로 항암제 개발에 있어 이상적인 연구대상이다. 우선 이는 세포자살을 억제하면서 세포재생을 유도한다<sup>27</sup>. 둘째로, 암세포에서 이것이 활성화 되었을 때 세포재생이 유도된다<sup>28</sup>. 셋째로, 암세포의 저산소성 미세환경이 NF- $\kappa$ B의 활성을 유도할 수 있다<sup>29</sup>. 넷째로 NF- $\kappa$ B 활성이 항암제에 대한 내성을 유도한다<sup>27</sup>. 그리고 마지막으로 암의 발생, 촉진 및 전이와 관련 있는 여러 유전자들이 NF- $\kappa$ B에 의해 조절된다<sup>27,30</sup>. 괴화 에탄올 추출물의 경우 MCF-7 세포에서 TPA로 유도된 MMP-9의 발현 억제효과가 NF- $\kappa$ B 신호전달경로와 어떠한 연관이 있는지를 확인하기 위해 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)를 이용하였다(Fig. 3A). 또한 괴화 에탄올 추출물의 MMP-9 발현억제 과정에 있어서 NF- $\kappa$ B의 상위신호전달 경로인 IKK 및 I $\kappa$ Ba와 관련이 있는지 확인한 결과 괴화 에탄올 추출물이 IKK/ $\alpha$ B의 활성을 억제하여 I $\kappa$ Ba의 인산화를 억제하는 것을 보여준다(Fig. 3B), 또 western blot을 통해 NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 활성을 측정하기 위한 대표적인 하위단위인 p50 및 p65를 측정하였다. 그 결과 TPA 20nM을 처리했을 때 p50 및 p65의 활성이 증가하였으며, 괴화 에탄올 추출물을 처리한 경우 p50의 활성을 감소시켰다. P65 활성에는 영향을 주지 않았다. 따라서 괴화 에탄올 추출물은 MCF-7 세포에서 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 MMP-9의 발현을 억제한다는 결론을 얻을 수 있었다. 마지막으로 괴화 에탄올 추출물이 MCF-7 세포에 TPA 처리 후 세포 침습을 억제하는지 확인하기 위하여 invasion assay를 시행하였다. 그 결과, TPA 처리 한 후 세포를 배양한 경우 세포 침습이 발생하였으며, 괴화 에탄올 추출물 50  $\mu$ g/ml 을 처리한 후 TPA 세포 침습을 유도한 결과 세포 침습을 유의성 있게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과로 볼 때 괴화 에탄올 추출물의 생화학적 항암기전을 이해하는데 중요할 것으로 생각되며, 결론적으로, 괴화 에탄올 추출물이 유방암 세포의 전이를 억제할 수 있는 새로운 항 괴양 표적물질로 사용될 수 있을 것이라고 생각한다.

## 결 론

본 연구는 천연물질을 응용한 항암제, 특히 신생혈관 생성의 억제를 통해 암세포 전이의 억제를 하는 물질의 탐색을 위한 연구의 일환으로 사람의 유방암세포주인 MCF-7 세포에 대한 괴화 에탄올 추출물의 항암효과 및 작용기전을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

괴화 에탄올 추출물을 MCF-7 세포에 농도별로 처리 하여 세포독성 여부를 확인한 결과 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.

괴화 에탄올 추출물 25  $\mu$ g/ml와 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 TPA로 유도된 MCF-7 세포의 MMP-9의 발현 유의성 있게 억제하였

다, 효소 활성 역시 감소시켰다.

괴화 에탄올 추출물은 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 p50 단백질의 핵내로의 이동을 억제하였으나 p65의 이동은 억제하지 않았다.

괴화 에탄올 추출물은 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 p-I $\kappa$ B와p-IKK  $\alpha$ B의 감소를 통해 NF- $\kappa$ B활성 역시 감소시켰다.

괴화 에탄올 추출물은 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 TPA로 유도된 MCF-7 세포의 침습을 이상 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 보아 인체 유방암세포인 MCF-7 세포에 TPA 처리를 하여 유방암 세포의 전이의 주요 발현인자인 MMP-9의 활성을 유도하였을 때 괴화 에탄올 추출물은 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의하게 MMP-9의 발현을 억제하였다. MMP-9의 발현과 직접적인 관련이 있는 NF- $\kappa$ B의 활성 역시 괴화 에탄올 추출물에 의해 억제되는 것을 확인 할 수 있었으며, 최종적으로 MCF-7 세포의 전이에도 억제 효과를 보이는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2012학년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

1. 신민교. 임상본초학, 서울, 영림사, p 489, 2002.
2. Kite, G.C., Veitch, N.C., Boalch, M.E., Lewis, G.P., Leon, C.J., Simmonds, M.S. Flavonol tetraglycosides from fruits of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and the authentication of *Fructus Sophorae* and *Flos Sophorae*. *Phytochemistry* 70(6):785-794, 2009.
3. Kim, J.M., Yun Choi, H.S. Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Arch Pharm Res.* 31(7):886-890, 2008.
4. Tang, Y.P., Zhu, H.X., Duan, J.A. Two new isoflavone triglycosides from the small branches of *Sophora japonica* a. *J Asian Nat Prod Res.* 10(1-2):65-70, 2008.
5. Tang, Y., Yang, R., Duan, J.A., Shang, E., Su, S., Zhu, M., Qian, D. Isoflavone tetraglycosides from *Sophora japonica* Leaves. *J Nat Prod.* 71(3):448-450, 2008.
6. Jung, C.H., Zhou, S., Ding, G.X., Kim, J.H., Hong, M.H., Shin, Y.C., Kim, G.J., Ko, S.G. Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(10):2556-2559, 2006.
7. Kim, B.H., Chung, E.Y., Min, B.K., Lee, S.H., Kim, M.K., Min, K.R., Kim, Y. Anti-inflammatory action of legume isoflavonoid sophoricoside through inhibition on cyclooxygenase-2 activity. *Planta Med.* 69(5):474-476, 2003.
8. National Cancer Information Center. National Cancer Statistics 2008. Available at: <http://www.cancer.go.kr> [accessed on 15 December 2010].

9. Korean Breast Cancer Society Policy Committee. Breast Cancer Facts & Figures 2006-2008. Seoul, Korean Breast Cancer Society, 2008.
10. 송바다, 김순례, 김성훈, 신용철, 고성균. Butein에 의한 MCF-7 유방암 세포의 세포사멸에 의한 항암효과. 동의생리병리학회지 24: 385-389, 2010.
11. Stetler-Stevenson, W.G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 9: 289-303, 1990.
12. Davies, B., Miles, D.W., Happerfield, L.C., Naylor, M.S., Bobrow, L.G., Rubens, R.D., et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 67: 1126-1131, 1993.
13. Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L., Quigley, J.P. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274: 13066-13076, 1999.
14. Iwata, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Masaoka, A., Fujimoto, N., Okada, Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 87: 602-611, 1996.
15. Liotta, L.A., Steeg, P.S., Stetler-Stevenson, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336, 1991.
16. Lee, K.S., Shin, M.K. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Jungdam, Seoul, Korea. pp 381-383, 1997.
17. Brannen, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *JAmOilChemSoc* 52: 59-63, 1975.
18. 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., Friedrnan, 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 문 구, 정병학, 김병주, 암 동성의 결합치료. 원광대학교 출판국. 1: 118-119, 1999.
24. Woessner, J.F., Nagase, H. MMP and TIMPs. Newyork, Oxford Univ Press, 1: 253-256, 2000.
25. Inomara, S., Matsunaga, Y., Amano, S., Nishiyama, T. Possible involvement of gelatinases in basal membrane damage and Wrinkle formation in chronically UVB-exposed hairless mouse. *J.Inv. Derm.* pp 120-134, 2003.
26. Rha, S.Y., Kim, S.J., Chung, H.C., Kim, J.H., Roh, J.K., Lee, K.S., Kim, B.S. Expression of Matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) in breast cancer. *J. Kor. Cancer* 28(2):247-252, 1996.
27. Schwartz, S.A., Hernandez, S.A., Mark, E.B. The role of NF-kappaB/ IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg. Oncol.* 8(3):143-153, 1999.
28. Oya, M., Ohtsubo, M., Takayanagi, A., Tachibana, M., Shimizu, N., Murai, M. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. *Oncogene* 20(29):3888-3896, 2001.
29. Figueroa, Y.G., Chan, A.K., Ibrahim, R., Tang, Y., Burow, M.E., Alam, J., Scandurro, A.B., Beckman, B.S. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1 regulated erythropoietin gene expression. *Exp. Hematol.* 30(12):1419-1427, 2002.
30. eyaert, R., Heyninck, K., Van Huffel, S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 60(8):1143-1151, 2000.