

5637 인체 방광암세포의 이동성과 침윤성에 미치는 황흑산(黃黑散)의 영향

심원석¹, 김민서¹, 박상은¹, 최영현², 홍상훈¹

¹동의대학교 한의과대학 한방내과, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실

Inhibition of Migration and Invasion of Human Bladder Cancer 5637 cells by *Hwangheuk-san*

Won-suk Shim¹, Min-serh Kim¹, Sang-eun Park¹, Yung-hyun Choi², Sang-hoon Hong¹

¹Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Eui University,

²Dept. of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

ABSTRACT

Objectives: The purpose of this study was to identify the inhibitory effects of *Hwangheuk-san* (HHS), a Korean multi-herb formula comprising four medicinal herbs, on cell migration and invasion, two critical cellular processes that are often deregulated during metastasis, using the human bladder cancer 5637 cell line.

Methods: Cell viability, motility, and invasion were assessed by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), wound healing migration, and Transwell assays, respectively. Gene expression was detected by Western blot analysis. In addition, the activities of matrix metalloproteinases (MMPs) and the values for transepithelial electrical resistance (TER) were analyzed using a Gelatinase Activity Assay Kit and an Epithelial Tissue Voltohmmeter, respectively.

Results: Our data indicated that within the concentration range that was not cytotoxic, HHS effectively inhibited the cell motility and invasiveness of 5637 cells. HHS markedly decreased the expression and activity of MMP-2 and MMP-9, which was associated with upregulation of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. Further investigation revealed that phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and AKT was decreased in HHS-treated 5637 cells, and a PI3K/AKT inhibitor synergistically reduced the inhibition of migration and invasion and also inactivated MMP-2 and MMP-9. Moreover, HHS increased the tightening of tight junctions (TJs), which was demonstrated by an increase in the TER, and reduced the expression levels of claudin family members (claudin-3 and -4), which are major components involved in the tightening of TJs.

Conclusions: The present findings demonstrated that HHS attenuated the migration and invasion of bladder cancer 5637 cells by modulating the activity of the PI3K/Akt signaling pathway and also through TJ tightening.

Key words: *Hwangheuk-san*, invasion, MMP, PI3K/Akt, tight junction

1. 서론

- 투고일: 2016.02.16, 심사일: 2016.03.23, 게재확정일: 2016.03.25
- 교신저자: 홍상훈 부산광역시 부산진구 양정로 52-57
동의대학교 부속 한방병원 내과
TEL: 051-850-8810 FAX: 051-867-5162
E-mail: shhong@deu.ac.kr
- 이 논문은 2016년도 동의대학교 한의과대학 대학원 석사학위
논문임.

방광암은 비뇨기와 종양 중에서 두 번째로 흔하며, 여성보다 남성에서 발생률이 높고, 특히 50대 이후 발생률은 전체 방광암 발생률의 70% 정도이다. 그 중에서도 70대에서의 발생률이 30% 이상으

로 고령화와 직접적인 연관이 있다¹⁻³. 또한 방광암은 다른 종양에 비하여 전이(metastasis)가 잘되는 암으로, 항암치료 후 전이의 차단이 방광암의 재발과 사망률을 감소시키기 위해 매우 중요하다⁴. 중앙암등록본부의 암등록통계자료에 의하면 1999년부터 2012년까지 국내 방광암 발생자수는 해마다 점진적으로 증가추세이며, 방광암 발생자수의 연령별 분포도를 보았을 때 고령자에게서 많다³.

그동안 한양방의학계에서는 각각 방광암 치료 및 전이 억제를 위해 많은 연구를 시행하였다. 방광암에 대한 최근의 연구를 살펴보면, 서양의학계에서는 여러 연구 중에서 면역 항암제인 Atezolizumab이라는 치료제로 방광암 치료에 대한 연구를 진행 중에 있으며⁵, 한의학계에서는 Lee 등⁶이 폐에서 전이된 방광암을 치료하는 사례가 있는 등 주로 증례보고 위주의 연구가 진행되고 있다.

황흑산(黃黑散)은 동의보감(東醫寶鑑)에 기재된 장옹(腸癰)과 복옹(腹癰)을 치료하는 처방으로 대황(*Rheum Rhizoma*, 大黃), 보골지(*Psoralea Semen*, 補骨脂), 견우자(*Pharbitidis Semen*, 牽牛子) 및 우방자(*Arctii Fructus*, 牛蒡子)로 구성되어 있고, 대황 4.5錢, 보골지 2錢, 견우자 2錢, 우방자 1錢을 가루로 내어 고루 섞어 2첩으로 나누고, 한번에 1첩씩 꿀물에 개어 빈속에 설사할 때까지 복용하는 처방이다⁷.

황흑산에 대한 연구를 찾아보면, AGS 위암세포에서 황흑산 추출물은 활성산소종(reactive oxygen species) 생성의존적인 caspase의 활성을 증가시킴으로써 apoptosis를 유발하여 항암활성 효과를 보였고⁸, 황흑산 추출물은 항염증, 항산화 및 항균 활성에도 우수한 효과를 보였다⁹. 그러나 황흑산의 항암 효과 및 기전에 대한 연구는 국내외에서 모두 미비한 편이다.

본 연구에서는 암세포의 전이 억제를 위한 한약 처방전 발굴 및 효능 검증을 위하여 황흑산 추출

물에 의한 인체 방광암세포(5637)의 전이 억제 효과와 관련된 기전 해석을 시도하였다. 이를 위하여 황흑산 추출물이 암세포의 전이 억제 여부를 평가하는 중요한 기준인 암세포의 이동성과 침윤성에 미치는 영향을 먼저 조사하였고, 암세포의 전이를 위한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 분해에 결정적인 역할을 하는 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 활성에 미치는 영향, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신호계에 미치는 영향과 세포 간 다양한 junction 중에서 세포와 세포 사이의 결합력 유지에 관여하는 tight junction (TJ)의 견고성에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 황흑산 추출물의 준비

본 실험에서 사용한 황흑산(*Hwangheuk-san*, HHS: Table 1)의 4가지 구성 한약재는 대한생약(주)(부산, 한국)에서 건조된 상태로 구입하였다. 각 한약재를 세절한 후 약재 무게의 10배에 해당하는 증류수로 100 °C에서 3시간 동안 추출하여 사용하였다. 황흑산 열수 추출액을 Whatman No.2 filter paper(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 거른 후 동결건조기를 사용하여 분말로 만들어 증류수에 100 mg/ml의 농도로 녹인 후 고압증기멸균기에서 멸균 처리하였다. 황흑산 추출물을 세포에 처리하기 위하여, 무균실험대에서 Minisart® Syringe filter(0.2 µm, Sartorius AG Weender Landstr, Germany)를 사용하여 거른 후 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다. 추출 수율은 약 35% 정도였으며, 황흑산 추출물 처리를 위하여 황흑산 추출물을 3차 증류수를 이용하여 100 mg/ml의 농도로 만든 다음, 이를 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다.

Table 1. Herbal Components and Amounts of *Hwangheuk-san*

Herbal medicine	Pharmacognostic nomenclature	Raw material amount g (%)
<i>Rheum palmatum</i> L.	Rhei Radix et Rhizoma	36.0 (47.4)
<i>Psoralea corylifolia</i> L.	Psoraleae Fructus	16.0 (21.0)
<i>Pharbitis nil</i> Chois.	Pharbitidis Semen	16.0 (21.0)
<i>Arctium lappa</i> L.	Arctii Fructus	8.0 (10.5)
Total amounts		76 (100)

2. 세포배양

본 연구에 사용된 5637 방광암세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 및 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포수의 과도한 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 성장배지의 교환을 매 48시간마다 실시하여 적정수의 세포를 유지하였다.

3. MTT assay에 의한 세포 증식억제 조사

황흑산 추출물 처리에 의한 5637 방광암세포의 증식억제 정도를 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하였다. 이를 위하여 6 well plate에 5637 세포를 2×10⁵개/ml 씩 분주한 다음 24시간 배양한 후 적정 농도의 황흑산 추출물을 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.5 mg/ml의 MTT(Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 분주하고 37 °C에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.)로 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Wound healing migration assay

5637 방광암세포의 이동성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사하기 위하여 20 µg/ml의 rat tail

collagen이 코팅된 dish(BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에 5637 방광암세포를 24시간 동안 배양한 후, pipette tip을 이용한 scraping으로 wounded 영역을 만들고 배지로 2~3회 수세하였다. 다시 1% FBS가 함유된 배지로 교체 후 적정 농도의 황흑산 추출물을 12시간 또는 24시간 처리 후 wounded 영역으로의 세포 이동성의 정도를 비교 관찰하였다.

5. *In vitro* invasiveness assay

5637 방광암세포의 침윤성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사하기 위하여 정상 및 적정 농도의 황흑산 추출물이 처리된 배지에서 6시간 동안 배양하였다. 이들 세포를 황흑산 추출물이 처리된 FBS-free 배지를 함유한 Matrigel-coated filter의 apical side에 분주하였다. 이때 basolateral chamber에는 20% FBS가 포함된 배지를 분주하였으며, 24시간 후 filter의 하단부로 이동한 세포를 hematoxylin 및 Eosin Y 염색액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 염색하고 계수하였다.

6. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

변역 수준에서 황흑산 추출물 처리에 따른 해당 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) 및 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4 °C에서 1시간 이상 반응시킨 후, 단백질을 분리하였다. Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량 한 다음 동

량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시키고 skim milk 용액을 이용하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 준비된 membrane을 수세 후 적정 항체를 처리하여 4 °C에서 over night 반응시킨 후 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence(ECL) solution(Amersham Life Science Corp.)을 적용시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다.

7. *In vitro* MMPs 활성 측정

황흑산 추출물 처리에 따른 5637 방광암세포에서의 MMP 활성 변화의 정량적 측정을 위하여 MMP Gelatinase Activity Assay Kit(Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 적정량의 세포 배양액을 biotinylated gelatinase 기질과 혼합하여 세포 배양액에 존재하는 활성형 MMP-2 및 MMP-9에 의한 기질의 분해를 유도하였다. 분절된 기질들을 biotin-binding 96-well plate로 옮겨 biotin이 결합된 기질이 plate에 결합하도록 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 분절되었으나 결합되지 않은 기질은 제거하고, 분절되지 않은 biotin이 결합된 gelatinase에 streptavidin-enzyme complex를 첨가하여 발색 반응을 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm 조건에서 활성의 정도를 비교하였다.

8. TER 값의 측정

황흑산 추출물 처리에 따른 TJ의 견고성을 의미

하는 상피세포 전기 저항성(trans epithelial electrical resistance, TER) 값의 변화를 조사하기 위하여 STX-2 chopstick electrode가 짝으로 형성된 EVOM Epithelial Tissue Volt ohmmeter(World Precision Instruments, FL, USA)를 이용하였다. 이를 위하여 5637 방광암세포를 Transwell®(Corning Costar Corp., NY, USA)의 8.0 µm pore size insert(upper chamber)로 seeding한 후 100% confluence를 이룰 때까지 배양하였다. 이 후 황흑산 추출물을 24시간 동안 처리하고, upper 및 lower chamber에 electrode를 넣어 전기 저항도를 측정하였다¹⁰.

9. 통계 처리

상기의 모든 실험 결과는 SPSS ver. 18.0 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타났다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성 검증은 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)을 한 후, Student t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 5637 방광암세포의 증식에 미치는 황흑산 추출물의 영향

5637 방광암세포의 증식에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사하기 위하여 적정 농도의 황흑산 추출물이 처리된 배지에서 5637 방광암세포를 24시간 배양 후 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 황흑산 추출물이 첨가된 배지에서 24시간 배양된 5637 방광암세포의 생존율이 500 µg/ml 처리군까지는 유의한 변화가 나타나지 않았으나, 800 µg/ml 이상의 처리군에서는 대조군에 비하여 다소 유의한 세포독성 효과가 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 세포독성을 나타내지 않았던 농도 중, 500 µg/ml 이하의 조건에서 이동성 및 침윤성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사하였다.

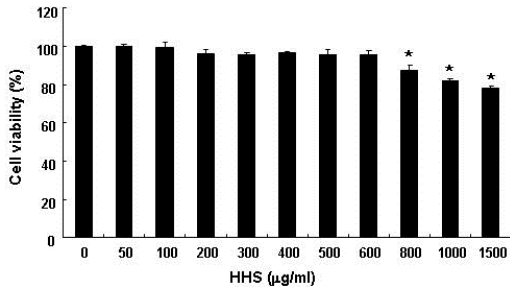


Fig. 1. Effects of HHS on the cell viability in human bladder cancer 5637 cells.

Over 800 µg/ml HHS treatment groups had more or less significantly cytotoxic effects (* $p < 0.05$ versus untreated control).
HHS : *Hwangheuk-san*

2. 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제

Wound healing migration에 의한 5637 방광암세포의 이동성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사한 결과, 정상배지에 배양된 세포에 비하여 황흑산 추출물이 처리된 배지에서 배양된 5637 방광암세포에서 wounded 영역으로의 이동성은 억제되었다(Fig. 2A). 또한 이와 유사하게 matrigel invasion assay에 의한 침윤성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 조사한 결과에서도, 황흑산 추출물 처리 농도의 증가에 따라 침윤성이 현저하게 감소하였다(Fig. 2B 및 2C).

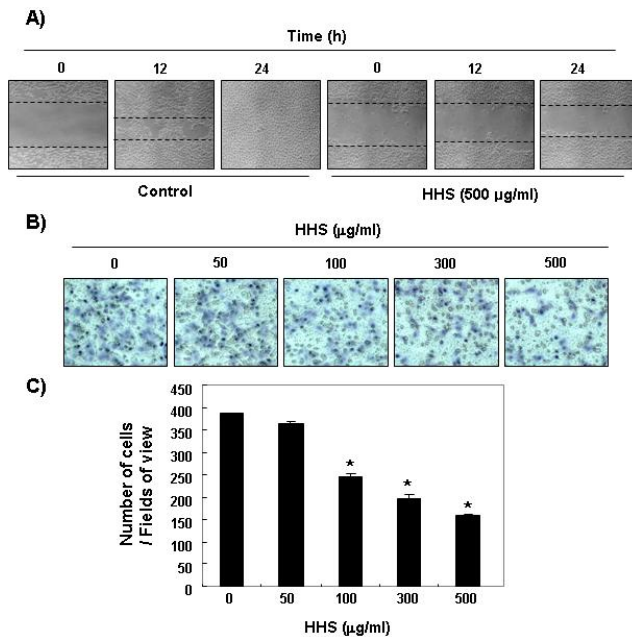


Fig. 2. Effects of HHS on cell motility and invasion in 5637 cells.

(A) HHS (500 µg/ml) effectively inhibited the cell motility of 5637 cells. Photographs of the wounded area were taken for evaluation of cell movement into the wounded area. (B and C) Over 100 µg/ml HHS effectively inhibited the cell invasiveness of 5637 cells. Cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and Eosin Y, and then photographed (B) and the imigrated cells were counted (C) (*, $p < 0.05$ versus untreated control).
HHS : *Hwangheuk-san*

3. 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 MMPs 발현 및 활성의 억제

황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성 억제가 MMPs의 발현 억제와 연관

이 있는지를 조사하였다. 황흑산 추출물 처리 농도의 증가에 따라 MMP-2 및 MMP-9 단백질의 발현이 모두 감소하였으며, MMPs의 억제제인 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1 및 TIMP-2의 발현은 상대적으로 증가되었다(Fig. 3A). MMPs의 효소 활성 저하와의 연관성을 조사한 결과, 황흑산 추출물 처리 농도에 따라 MMP-2 및 -9의 활성은 유의하게 감소하였다(Fig. 3B).

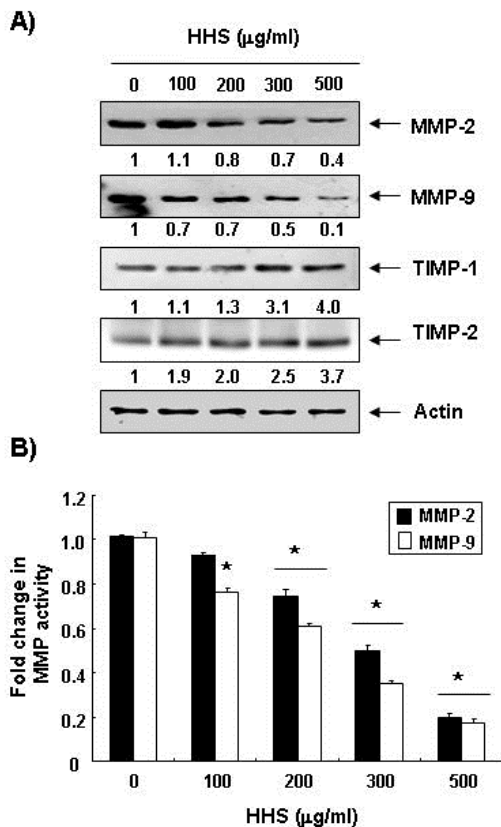


Fig. 3. Inhibition of MMPs and induction of TIMPs expression by HHS in 5637 cells.

(A) HHS markedly decreased the expression of MMP-2 and MMP-9, which was associated with unregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. (B) Over 200 µg/ml HHS significantly decreased the activity of MMP-2 and MMP-9. After incubation with the indicated

concentrations of HHS for 24 hours, in vitro activities of MMP-2 and -9 in cell culture supernatant were measured using a MMP-2 and -9 gelatinase activity assay kit (*, $p < 0.05$ versus untreated control).
 HHS : *Hwangheuk-san*
 MMP : matrix metalloproteinases
 TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase

4. 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포 PI3K/Akt 신호계의 불활성화

PI3K/Akt 신호계와 황흑산 추출물에 의한 이동성 및 침윤성 억제 사이의 연관성을 조사하기 위하여 먼저 PI3K 및 PI3K의 하위 조절 단백질에 해당되는 Akt의 활성화에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 각각 두 단백질의 인산화 정도로 평가하였다. PI3K와 Akt의 총 단백질의 발현 변화에는 황흑산 추출물이 큰 변화를 주지 못하였지만, 황흑산 추출물 처리 농도의 증가에 따라 두 단백질의 인산화 수준은 매우 감소되었다(Fig. 4).

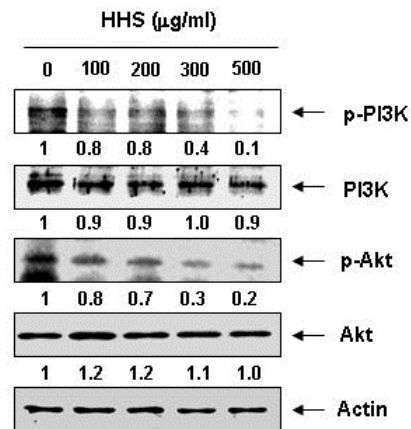


Fig. 4. Inactivation of PI3K/Akt signaling pathway by HHS in 5637 cells.

PI3K and Akt were not significantly decreased in HHS-treated 5637 cells, but p-PI3K and p-AKT were decreased in HHS-treated 5637 cells according to HHS amount. Actin was used as an internal control.
 HHS : *Hwangheuk-san*
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 p-PI3K : phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase
 p-Akt : phosphorylation of Akt

5. 5637 방광암세포에서 PI3K/Akt 신호계에 미치는 황흑산 추출물의 영향

황흑산 추출물 처리에 따른 PI3K/Akt 신호계의 비활성화가 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성 억제와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 황흑산 추출물(200 µg/ml)과 PI3K 활성의 선택적 저해제인 LY294002(20 mM)를 동시에 처리한 후, 이동성 및 침윤성의 정도를 비교하였다. Fig. 5의 결과에서

알 수 있듯이, LY294002 단독 처리군에서도 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성이 다소 억제되었으며, 동시 처리군에서는 이들의 억제 정도가 더욱 증가되었다. 아울러 황흑산 추출물과 LY294002가 동시에 처리된 5637 방광암세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 활성은 각각의 단독 처리군에 비하여 더욱 억제되었다(Fig. 5, 6).

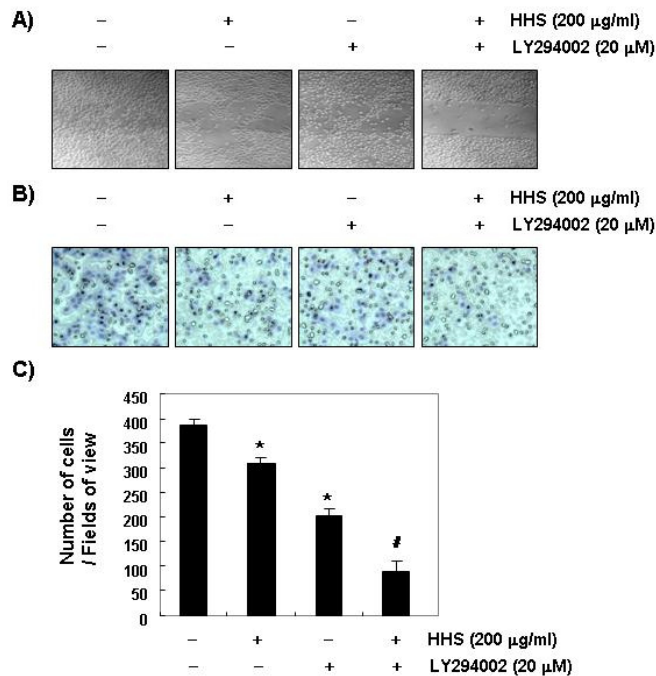


Fig. 5. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in the inhibition of cell motility and invasion in HHS-treated 5637 cells.

With PI3K/AKT inhibitor(LY294002, 20 mM), HHS (200 µg/ml) synergistically reduced the inhibition of migration and invasion. (A) Photographs of the wounded area were taken for evaluation of cell movement into the wounded area. (B and C) Cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and Eosin Y, and then photographed (B) and the immigrated cells were counted (C) (+, treated; -, not treated; *, $p < 0.05$ versus untreated control; #, $p < 0.05$ versus HHS-treated cells).

HHS : *Hwangheuk-san*

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

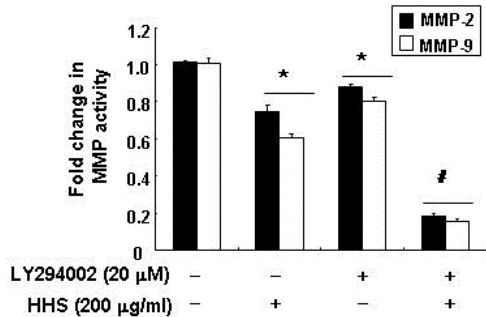


Fig. 6. Effects of HHS and PI3K inhibitor on the MMPs activity in 5637 cells.

With PI3K/AKT inhibitor (LY294002, 20 mM), HHS (200 μg/ml) synergistically reduced as well as inactivation of MMP-2 and MMP-9 (+, treated; -, not treated; *, $p < 0.05$ versus untreated control; #, $p < 0.05$ versus HHS-treated cells).
 HHS : *Hwangheuk-san*
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 MMP : matrix metalloproteinases

6. 5637 방광암세포의 TJ 견고성에 미치는 황흑산 추출물의 영향

황흑산 추출물 처리에 따른 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성 억제가 TJ의 기능 강화와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 TJ의 견고성의 측도로 사용되는 TER 값과 TJ의 주된 구성 단백질인 claudin family 인자들의 변화를 조사하였다. 황흑산 추출물 처리 농도의 증가에 따라 TER 값이 유의하게 증가하였으며(Fig. 7), 조사된 2가지의 claudin family 단백질의 발현(claudin-3 및 -4)이 감소되었다(Fig. 8).

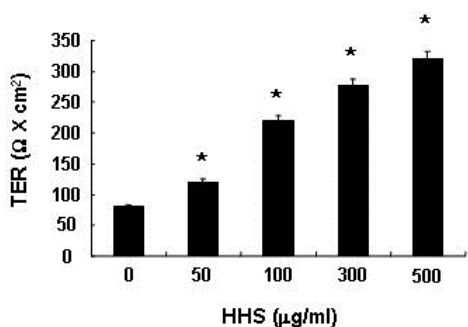


Fig. 7. Effects of HHS on the values of TER in

5637 cells.

According to HHS amount, HHS increased TER which was used to measure the tightening of TJ (*, $p < 0.05$ versus untreated control).
 HHS : *Hwangheuk-san*
 TER : transepithelial electrical resistance
 TJ : tight junction

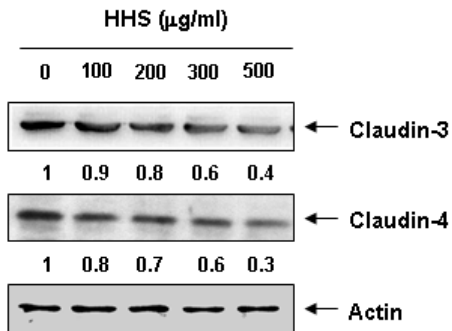


Fig. 8. Effects of HHS on the expression of claudins in 5637 cells.

According to HHS amount, HHS reduced the expression the levels of claudin family members (claudin-3 and -4), major components of tightening of TJ. Actin was used as an internal control.
 HHS : *Hwangheuk-san*
 ECL : enhanced chemiluminescence
 TJ : tight junction

IV. 고찰

황흑산은 동의보감 잡병편 응저문(癰疽門)에 기재되어 있는데, 대황, 보골지, 견우자, 우방자로 구성되어 있으며⁷, Hong 등⁸은 AGS위암세포에서 황흑산 추출물이 항암활성 효과가 있다고 하였고, Lee 등⁹은 황흑산이 항산화, 항염증 및 항균활성 효과가 있다고 발표하였다. 그리고 최근 들어 황흑산을 구성하는 각각의 한약재인 대황¹¹, 보골지¹², 견우자¹³, 우방자¹⁴에 대한 항암, 항산화 및 면역활성 등의 효능이 국내외에서 보고되었다.

이에 본 연구에서는 황흑산에 대한 기존의 문헌, 연구 등에서 밝혀진 항암, 항산화, 항염증, 항균 효

과 등을 바탕으로 하여, 황흑산 추출물의 효능을 5637 방광암 세포를 대상으로 조사하였다. 세포독성을 보이지 않는 범위의 황흑산 추출물 처리 농도 범위를 설정하였고, 황흑산 추출물이 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성을 현저하게 억제하였음을 먼저 확인할 수 있었다(Fig. 1 및 2).

비록 암세포의 침윤과 전이가 매우 복잡적이고 연속적인 분자적 기전들에 의해 유발된다고 알려져 있으나, 암세포에서부터 분비되는 단백질 분해 효소에 의해서 빠른 시간 내에 ECM의 파괴가 이루어지는 것이 특징이며, 그 중 zinc-dependent endopeptidase family에 속하는 MMPs는 ECM의 분해와 전이 동안 기저채 막의 붕괴를 촉진함으로써 암세포의 침윤과 전이를 증대시키는 핵심인자들이다¹⁵. 특히 gelatinase type에 속하는 MMP-2와 -9는 효소로서 암세포의 침윤과 전이에 가장 중요한 요소로 인식되어 있으며¹⁶, MMPs는 TIMPs와의 복합체 형성을 통하여 이들 활성이 억제된다¹⁷. 본 연구의 결과에 의하면 황흑산 추출물 처리 농도의 증가에 따라 TIMP-1와 TIMP-2의 발현은 증가하였으며, MMP-2 및 MMP-9의 발현이 모두 감소하였고 그들의 효소적 활성도 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 즉 황흑산 추출물 처리에 따른 MMP-2와 MMP-9의 효소 활성 저하는 TIMPs의 발현 증가와 동반된 MMP-2 및 MMP-9의 발현 억제에 의한 것임을 의미하는 결과이며, 황흑산 추출물의 TIMPs 발현 증가와 동반된 MMPs의 생성 및 활성 억제는 ECM의 분해를 차단함으로써 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성을 억제하였을 것으로 추정된다.

한편 PI3K/Akt 신호계는 세포의 증식을 촉진시키는 대표적인 신호 전달계로서 대부분의 종양조직에서 활성이 증가되어 있으며, 이들 신호계의 활성 증가는 MMPs 활성 증가와 깊은 연관이 있다¹⁸. 특히 최근 몇몇 연구들에서 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제는 PI3K/Akt 신호계와 MMPs 활성의 억제가 관련이 있음을 보여 주었는데^{19,20},

이는 PI3K/Akt 신호계의 억제제는 특정 항암활성을 가지는 물질들의 항전이 효능을 증대시킬 수 있음을 의미한다. 따라서 PI3K/Akt 신호계의 활성 차단이 황흑산 추출물 처리에 따른 MMP-2와 -9 활성의 감소뿐만 아니라, 이동성과 침윤성의 억제에 영향을 미치는지를 조사하였다. 이를 위하여 PI3K/Akt 신호계의 활성에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 먼저 조사한 결과, 이들 신호계의 활성 정도를 의미하는 PI3K 및 Akt 단백질의 인산화형 발현이 황흑산 추출물 처리 농도에 따라 억제되었으나, 이들의 총 단백질 발현은 큰 변화가 없었다(Fig. 4). 아울러 PI3K/Akt 신호계 억제제(LY294002)와 황흑산 추출물이 동시 처리된 5637 방광암세포에서 이동성과 침윤성이 더욱 억제되었으며(Fig. 5), 이는 MMP-2 및 MMP-9 활성의 효과적인 차단과 관련이 있었다(Fig. 6). 따라서 이러한 결과는 황흑산 추출물 처리에 의한 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제가 MMPs 저해 효능과 PI3K/Akt 신호계 활성의 동시 차단에 의한 것임을 의미한다.

암세포의 이동성이 촉진되기 위해서는 암세포들이 종양 덩어리에서 개개의 세포로 분리가 되어야 한다. 이를 위해서는 세포와 세포 사이의 연결 요소들의 해리가 동반되어야 하는데, 그 중 TJ는 세포 사이의 치밀한 이음부로서 다양한 분자와 이온의 이동을 차단하는 역할을 한다. 즉 암세포의 침윤과 전이의 초기 단계에 나타나는 현상중의 하나가 TJ 구성 단백질들의 비정상적인 발현과 수반된 TJ 기능의 붕괴 현상이다²¹. 또한 방광암세포를 포함한 상피조직 유래 암세포들의 경우, TJ 체계가 무질서해지거나 붕괴됨으로써 TER로 대변되는 TJ의 전기적 저항이 감소되어 있거나 상피결세포 투과성(transsepithelial paracellular permeability, TPP)이 증가되어 있다^{22,23}. 이러한 TJ의 견고성 유지는 TJ를 감싸는 transmembrane 단백질인 claudin family 단백질들의 발현과 직접적인 연관이 있다. 즉 claudin family 단백질들은 상호간에 복합체를 형성하여 TJ를 통한 TPP의 조절뿐만 아니라 세포와 세포사

이의 접착성 조절에 중요한 인자로 작용한다²⁴. 선행 연구들에 의하면, 비록 어떤 claudin 단백질들이 일부 전이성 암세포에서는 발현이 저해되어 있지만^{25,26}, 방광암을 포함한 다른 많은 암 조직에서 특히 claudin-3과 -4 발현은 현저히 증가되어 있으며^{27,28}, 특히 난소암의 경우에 claudin-3과 -4가 발현이 증가 되어있었고, 이들 단백질을 차단하였을 경우 암세포의 침윤성이 억제되었다는 것이 보고된 바 있다²⁹. 이러한 결과는 황흑산 추출물이 TJ의 견고성과 함께 claudin 단백질들이 암세포의 전이성 획득의 검출과 진단을 위한 biomarker로서의 활용 가능성을 보여주는 것이다. 따라서 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성 저해 효과가 TJ의 기능 변화와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 TJ의 견고성을 나타내는 TER의 값³⁰에 미치는 황흑산 추출물의 영향을 먼저 조사한 결과, TER 값은 황흑산 추출물 처리 농도에 따라 유의하게 증가되어 5637 방광암세포의 TJ의 견고성을 증가시켰음을 보여주었다(Fig. 7). 또한 황흑산 추출물은 처리 농도에 따라 조사된 2종류의 claudin family(-3 및 -4)의 단백질 발현을 억제하여(Fig. 8) 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성의 억제는 TJ의 견고성 강화와 밀접한 관련이 있음을 보여주었다.

기존의 황흑산 추출물에 대한 연구들은 항암활성, 항산화, 항염증, 항균활성 등의 효과^{8,9}를 밝힌 것에 더 나아가, 본 연구에서는 이상의 결과를 토대로 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제는 TJ의 견고성 유지와 TIMPs의 발현 증가에 의한 MMPs의 발현과 활성의 억제에 의한 것임을 보여주었다. 또한 claudin family 단백질의 발현을 억제시킴으로써 방광암뿐만 아니라, 더 나아가 다른 각종 암세포 전이 억제에 황흑산 추출물이 효과가 있을 것으로 추정할 수 있다. 이는 방광암세포만의 특이한 현상이라고는 할 수 없으므로, 향후 암세포 전이 억제에 핵심적인 역할을 하는 황흑산 추출물의 생리활성 성분 규명과

동물 실험을 포함한 추가 연구가 필요할 것이다.

IV. 결론

본 연구에서는 5637 방광암세포를 이용하여 암 전이의 주요 과정인 암세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 황흑산 추출물의 효능에 관하여 조사하였다. 황흑산 추출물은 세포독성이 없는 범위에서 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성을 효과적으로 억제하였다. 황흑산 추출물은 또한 MMP-2 및 MMP-9의 발현과 활성을 저해함과 동시에 TIMP-1과 TIMP-2의 발현을 증가시켰으며, 이는 PI3K/Akt 신호계의 활성 억제와 연관이 있었다. 그리고 황흑산 추출물은 PI3K 활성 억제제로써 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성 억제뿐만 아니라 MMP-2 및 -9의 활성을 더 감소시켰다. 또한 황흑산 추출물은 TJs의 주요 구성인자인 claudin family 단백질(claudin-3 및 -4)의 발현을 억제하였으며, 이는 TJ의 전기적 저항성의 증대와 연관이 있었다. 따라서 황흑산 추출물에 의한 5637 방광암세포의 전이능 억제는 PI3K/Akt 신호계의 활성 저하와 TJ의 견고성 증대와 관련이 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 김형진, 윤상민, 서성일. 방광암의 역학, 원인 및 병인. *Korean J Uro-Oncol* 2005;3(1):1-11.
2. Kirkali Z, Cahn T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005;66(6 suppl 1):4-34.
3. Jung KW, Won YJ, Kong HJ, Oh CM, Cho H, Lee DH, et al. Cancer statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2012. *Cancer Res Treat* 2015;47(2):127-41.
4. Mueller J, Schrader AJ, Schrader M, Schnoeller

- T, Jentzmik F. Management of muscle-invasive bladder cancer. *Minerva Urol Nefrol* 2013;65(4): 235-48.
5. Peter S. Bladder cancer: Atezolizumab effective against advanced-stage disease. *Nat Rev Urol* 2016(published online). <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.60>.
 6. Lee DH, Kim SS, Seong S, Woo CR, Han JB. A case of metastatic bladder cancer in both lungs treated with Korean medicine therapy alone. *Case Rep Oncol* 2014;7(2):534-40.
 7. 허준. 신대역 동의보감. 수정증보판. 서울: 법인문화사; 2009, p. 1501-25.
 8. Hong SH, Park C, Kim KM, Choi YH. Induction of apoptosis by Hwangcheuk-san in AGS human gastric carcinoma cells through the generation of reactive oxygen species and activation of caspases. *Journal of Life Science* 2015;25(11):1235-43.
 9. Lee MH, Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Choi YH. Antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of seven traditional herb-combined remedies. *Journal of Life Science* 2015;25(4): 406-15.
 10. Utech M, Brüwer M, Nusrat A. Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol* 2006;341:185-95.
 11. Ma YS, Hsiao YP, Lin JH, Hsu SC, Chueh FS, Weng SW, et al. Crude extract of *Rheum palmatum* L inhibits migration and invasion of LS1034 human colon cancer cells acts through the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 by MAPK signaling. *Environ Toxicol* 2015; 30(7):852-63.
 12. Mohammadparast B, Rustaiee AR, Rasouli M, Zardari S, Agrawal V. *In vitro* enhancement of psoralen as an important anticancer compound in *Psoralea corylifolia* through precursor feeding. *Pharm Biol* 2015;53(5):735-8.
 13. Sohn HY, Shin YK, Kim JS. Anti-Proliferative activities of solid-state fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* against Human Colorectal HCT116 Cell. *Journal of Life Science* 2010;20(8):1268-75.
 14. Sun Q, Liu K, Shen X, Jin W, Jiang L, Sheikh MS, et al. Lappaol F, a novel anticancer agent isolated from plant *Arctium Lappa* L. *Mol Cancer Ther* 2014;13(1):49-59.
 15. Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5(3): 203-20.
 16. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705(2):69-89.
 17. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49(3):187-98.
 18. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 2007;13(2):121-41.
 19. Jayasooriya RG, Choi YH, Moon SK, Kim WJ, Kim GY. Methanol extract of *Hydroclathrus clathratus* suppresses matrix metalloproteinase-9 in T24 bladder carcinoma cells by suppressing the NF- κ B and MAPK pathways. *Oncol Rep* 2012;27(2):541-6.
 20. Cho TM, Kim WJ, Moon SK. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer

- cells. *Food Chem Toxicol* 2014;64:344-52.
21. Turksen K, Troy TC. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816(1):73-9.
 22. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):1213-28.
 23. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999;20(8):1425-31.
 24. Angelow S, Yu AS. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16(5):459-64.
 25. Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem* 2001;276(22):19150-9.
 26. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22(13):2021-33.
 27. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006;6:186.
 28. Boireau S, Buchert M, Samuel MS, Pannequin J, Ryan JL, Choquet A, et al. DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis* 2007;28(2):246-58.
 29. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005;65(16):7378-85.
 30. Grant-Tschudy KS, Wira CR. Effect of oestradiol on mouse uterine epithelial cell tumour necrosis factor-alpha release is mediated through uterine stromal cells. *Immunology* 2005;115(1):99-107.