



Original Article / 원저

## B16F10 흑색종 세포의 이동과 침윤에 미치는 동의보감 “유암” 처방에 근거한 한약복합처방들의 영향

최은옥<sup>1,2</sup>, 권다혜<sup>1,2</sup>, 황보현<sup>1,2</sup>, 김민영<sup>1,2</sup>, 지선영<sup>1,2</sup>, 홍수현<sup>1,2</sup>, 박철<sup>3</sup>, 황혜진<sup>4</sup>, 최영현<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 항노화연구소, <sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 생화학교실, <sup>3</sup>동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, <sup>4</sup>동의대학교 의료·보건·생활대학 식품영양학과

## Influence of Herb-combined Remedies Based on "Yooam" Prescription of Dongeuibogam on Migration and Invasion of B16F10 Melanoma Cells

Eun Ok Choi<sup>1,2</sup>, Da Hye Kwon<sup>1,2</sup>, Hyun Hwang-Bo<sup>1,2</sup>, Min Young Kim<sup>1,2</sup>, Seon Yeong Ji<sup>1,2</sup>, Su Hyun Hong<sup>1,2</sup>, Cheol Park<sup>3</sup>, Hye-Jin Hwang<sup>4</sup>, Yung Hyun Choi<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Anti-Aging Research Center, Dong-eui University

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Dong-eui University

<sup>4</sup>Department of Food and Nutrition, College of Nursing, Healthcare Sciences & Human Ecology, Dong-eui University

### ABSTRACT

**Objectives** : We compared the inhibitory effects of herb-combined remedies, which were recorded on "Yooam" prescription of Dongeuibogam, on cell migration and invasion, two critical cellular processes that are often deregulated during metastasis, in B16F10 melanoma cells. For this purpose, water extracts of Sipyukmiryukieum (SYMRKU), Danjacheongpitang (DJCPT), Cheongganhaeultang (CGHUT) and Jipaesan (JPS) were used.

**Methods** : Cytotoxicity was assessed by an MTT assay. Wound healing and matrigel transwell assays were used to examine on B16F10 cell migration and invasion. The levels of mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) were analyzed by RT-PCR and Western blotting.

© 2018 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Results** : Our data showed that DJCPT showed the strongest inhibitory effect among the four prescriptions in inhibiting cell motility of B16F10 melanoma cells within the concentration range that was not cytotoxic. The inhibitory potential of colony formation was higher in DJCPT and SYMRKU compared to the other two types of prescriptions, and the inhibitory effect of invasiveness is shown in order of DJCPT, SYMRKU, CGHUT and JPS. DJCPT, and SYMRKU strongly inhibited the activity and expression of MMP-2 and MMP-9, which are important mediators in cancer invasion, compared to CGHUT and JPS, and the increased expression of TIMP-1 and TIMP-2 was also more effective in these two prescriptions. In conclusion, DJCPT is expected to exhibit the most potent blocking effect on migration and invasion among four herb-combined remedies compared in B16F10 melanoma cells.

**Conclusion** : Overall, the results of this study will be used as an important source to validate these prescriptions in animal models and to understand the mechanism of action of herbal remedies recorded in Dongeuibogam.

**Key words** : Herb-combined remedies; Dongeuibogam; Invasion; MMPs.

## I. 서론

최근 암의 치료를 위한 다양한 치료술과 의약품의 발달로 암 환자의 수명과 삶의 질이 현저히 개선된 것은 사실이나 여전히 암에 의한 사망률이 높은 편이며, 이러한 사망의 주된 원인은 암세포의 전이(metastasis)이다. 전이는 암이 발병 부위로부터 인체의 다른 곳으로 이동하여 증식하는 현상으로, 암세포의 이동(migration)이나 침윤(invasion)을 억제하는 기전의 규명이나 효과적인 치료 약물 개발이 암 치료법의 주된 표적이 되고 있다. 암세포의 전이가 매우 복잡적이고 연속적인 분자적 기전들에 의해 유발된다고 알려져 있으나, 암세포의 이동이나 침윤과정에서 암세포에서부터 분비되는 단백질 분해효소(proteinases)에 의해서 빠른 시간 내에 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 파괴가 이루어지는 것이 특징이다<sup>1,2)</sup>. 특히 zinc-dependent endopeptidase family에 속하는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)는 세포외 기질의 분해와 전이 동안 기저세포막의 붕괴를 촉진함으로써 암세포의 침윤과 전이를 증대시키는 핵심인자들이다<sup>2,3)</sup>. MMPs 중, 특히 gelatinase type에 속하는 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (gelatinase B)는 암세포의 침윤과 전이에 가장 중요한 요소로서 인식되어져 있으며<sup>3,4)</sup>, MMPs의 활성화는 금속단백분해효소 조직억제제(inhibitor of

metalloproteinases, TIMPs)와의 stoichiometric 복합체 형성을 통하여 억제된다<sup>5,6)</sup>. 그들은 MMPs에 직접 결합하여 그들의 효소적 활성을 저해함으로써 ECM의 파괴를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>3,6)</sup>. 따라서 MMPs와 TIMPs 사이의 적절한 균형 조절을 위한 MMPs의 저해제와 TIMPs의 활성제는 암세포의 전이를 차단할 수 있는 표적 물질이 될 수 있다.

최근 암세포의 증식억제나 전이 차단을 위한 많은 항암제들의 개발을 위한 자원으로 전통 의학천연물에 큰 관심이 쏠리고 있다. 따라서 임상적으로 효능이 검증된 다양한 약재들에 대한 효능의 폭이 증대될 수 있지만 여전히 그에 대한 근거가 부족한 현실이다. 특히 고한외서에 수록된 다양한 처방전에 대한 임상적 적용 가능성을 높이기 위해서는 각 질환별 한약복합처방들에 대한 재고찰이 신속히 요구된다. 본 연구에서는 동의보감(東醫寶鑑) 외형편(外形篇) 제3권 “유(乳)”부분에 기술된 “유암(乳巖)”의 치료에 쓰이는 한약복합처방전들에 대한 항암활성의 효능 검증을 위한 차원에서 이들 처방전들에 의한 암세포의 전이 억제 가능성을 조사하였다. 동의보감에는 유암 관련 6가지 처방[십육미류기음(十六味流氣飲), 단자청피탕(單煮靑皮湯), 청간해울탕(淸肝解鬱湯), 지패산(芷貝散), 가감사물탕(加減四物湯) 및 귤엽산(橘葉散)]이 기술되어 있으나, 이 중 가감사물탕에 대한 명확한 처방 구성을 알 수 없고, 귤엽산의 경우는 청귤엽의 양이 정확하지

\*Corresponding author : Yung Hyun Choi, Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University, 52-57, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, 47227, Republic of Korea.

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036, E-mail : choiyh@deu.ac.kr

• Received : July 29, 2018 / Revised : August 7, 2018 / Accepted : August 17, 2018



않아 두 가지 처방의 적용이 어렵다고 판단되어 이를 제외한 4가지 처방전을 선정하였다. 비록 이들 처방전이 유암 치료의 목적이 강하지만, 암세포의 전이 억제 실험에 가장 많이 사용되는 B16F10 흑색종 세포 모델을 이용하여 암세포의 전이 단계에 관여하는 여러 현상들에 미치는 영향과 MMPs 및 TIMPs의 발현과의 상관성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 한약복합처방전 추출물의 준비

본 연구에 사용된 각 처방전의 구성 한약재는 (주서경한방약업사(Busan, Korea)에서 구입하였다 (Sipyukmiryukieum), 자소엽 6 g, 인삼, 황기, 당귀 각각 4 g, 천궁, 육계, 후박, 백지, 방풍, 오약, 빈랑, 백작약, 지각, 목향, 감초 각각 2 g, 길경 1.2 g, 청피 4 g; 단자청피탕(Danjacheongpitang), 청피 단독, 청간해울탕(Cheongganhaeultang), 당귀, 백출 각각 4 g, 패모, 적복령, 백작약, 숙지황, 산치자 각각 2.8 g, 인삼, 시호, 목단피, 진피, 천궁, 감초 각각 2 g; 지폐산(Jipaesan), 백지, 패모, 천궁, 당귀, 승마, 시호 각각 같은 양). 각 처방전의 열수 추출물 [water extracts of Sipyukmiryukieum (SYMRKU), Danjacheongpitang (DJCPT), Cheongganhaeultang (CGHUT) and Jipaesan (JPS)]을 얻기 위하여 약재 무게의 10배에 해당하는 증류수로 100°C에서 3시간 동안 추출하였고, 추출된 물질을 여과지(Whatman No. 3 filter paper, Whatman International Ltd, Maidstone, England)를 이용하여 불순물 등을 제거하였다. 여과된 추출물을 동결건조기를 사용하여 분말화 하였으며, 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹여 0.2 µm Minisart® Syringe filter로 여과 한 후 실험에 이용하였다.

### 2. 세포배양 및 MTT assay

본 연구에 사용된 B16F10 흑색종 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 및 1% penicillin-streptomycin과 1% L-glutamine이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. B16F10 세포의 증식에 미치는 각

추출물의 영향은 3-(4,5-dimethyl-2 thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)가 미토콘드리아 효소에 의하여 MTT-formazan을 형성하는 원리에 기반을 둔 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 즉, B16F10 세포를 다양한 농도의 추출물들이 함유된 배지에서 24시간 배양 후, 배지를 제거하고 0.5 mg/ml 농도의 MTT (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) 시약을 넣고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시켰다. 2시간 후, 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO, AMRESCO Inc., Solon, OH, USA)로 생성된 formazan을 모두 녹인 후 540 nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도 변화를 측정하였다. 각 세포에 대한 증식 억제 여부는 대조군 기준으로 백분율로 나타내었다.

### 3. Wound healing migration assay

20 µg/ml의 rat tail collagen이 코팅된 dish (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에 B16F10 세포를 적정 시간 동안 배양한 후, pipette tip을 이용한 scraping으로 wounded 영역을 만들고 배지로 2~3회 수세하였다. 다시 1% FBS가 함유된 배지로 교체 후 적정 농도의 각 추출물을 500 및 1000 µg/ml 농도로 24시간 처리 후 wounded 영역으로의 세포 이동성의 정도를 도립현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 비교 관찰하였다.

### 4. Colony formation assay

B16F10 세포를 6-well plate의 well 당 500개 정도 분주 후, colony가 형성될 때 까지 배양하고, 500 및 1000 µg/ml 추출물이 함유된 배지를 매 72시간마다 교체하면서 14일 동안 배양하였다. 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 30분 동안 세포들을 고정시키고 0.1% crystal violet (Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 30분 노출시켜 염색 후, 도립현미경하에서 관찰하였다.

### 5. In vitro invasiveness assay

B16F10 세포의 침윤성에 미치는 각 추출물의 영향을 조사하기 위하여 matrigel invasion assay를 사용하였다. 이를 위하여 각 추출물이 6시간 동안 처리

된 B16F10 세포를 추출물들이 함유된 FBS-free 배지를 Matrigel-coated filter의 apical side에 분주하였다. 이때 basolateral chamber에는 20% FBS가 함유된 배지를 분주하였으며, 24시간 후 filter의 하단부로 이동한 세포를 hematoxylin 및 Eosin Y 염색액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 염색하고 계수하였다.

## 6. RNA의 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR)

각 처방전 추출물이 24시간 처리된 세포들의 RNA를 RNeasy kit (Qiagen, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분리한 후, AMV reverse transcriptase (Amersham Corp., Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 특정 유전자에 적절한 primer (Table 1)를 이용한 PCR은 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 수행하였으며, PCR 반응 산물을 1% agarose를 이용하여 분리한 후, ethidium bromide (EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 염색을 실시한 후 발현의 정도를 비교하였다.

## 7. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

각 추출물 처리에 따른 MMPs 및 TIMPs의 발현 변화를 조사하기 위하여 준비된 세포에 적당량의 lysis buffer (25 mM Tris-Cl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Nonidet-P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM dithiothreitol)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량 한 다음 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 적정 항체를 처리하여 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin (Amersham Life

Science Corp.)을 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시켜 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다.

## 8. In vitro MMPs 활성 측정

각 추출물 처리에 따른 MMPs 활성 변화의 정량적 측정을 위하여 MMP Gelatinase Activity Assay Kit (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 각 추출물이 처리된 조건에서 24시간 배양 후, 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 540 nm 조건에서 활성의 정도를 비교하였다.

## 9. 통계 처리

모든 실험결과를 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고 SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

## III. 결과

### 1. 각 처방전 추출물이 B16F10 세포의 증식에 미치는 영향

암세포의 이동성과 침윤성에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 각 처방전 추출물이 B16F10 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위한 각 추출물이 적정량 함유된 배지에서 24시간 배양 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 1에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이, 조사된 농도 범위 내의



4가지 종류의 열수 추출물(SYMRKU, water extracts of Sipyukmiryukieum; DJCPT, water extracts of Danjacheongpitang; CGHUT, water extracts of Cheongganhaeultang; JPS, water extracts of Jipaesan) 모두에서 유의적인 세포독성을 관찰할 수는 없었다. 따라서 추후 실험은 500 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 두 농도에서 각 추출물의 영향을 비교하였다.

## 2. B16F10 세포의 이동성에 미치는 각 처방전 추출물의 영향

MTT assay 결과에서 세포독성을 보이지 않았던 조건에서 B16F10 세포의 이동성에 미치는 각 추출물의 영향을 조사하기 위하여 wound healing migration assay를 실시하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이, wounded 영역으로의 세포 이동성이 단자청피탕 추출물 처리군에서 가장 낮게 나타났으며, 청간해울탕과 지폐산 추출물 처리군에서는 상대적으로 이동성 억제 효능이 낮게 나타났다.

## 3. B16F10 세포의 침윤성에 미치는 각 처방전 추출물의 영향

다음은 matrigel invasion assay를 이용한 B16F10 세포의 침윤성에 미치는 각 처방전 추출물의 효능을 비교하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 단자청피탕 처리군에서 청간해울탕과 지폐산에 비하여 Matrigel-coated filter로 이동한 세포가 현저히 높게 나타났으며 십육미류기음은 그 다음 침윤성의 저해 효과를 보여 주었다.

## 4. B16F10 세포의 colony formation에 미치는 각 처방전 추출물의 영향

Colony formation assay는 특정 물질의 노출에 따른 세포의 잠재적인 영향을 평가하는 방법 중의 하나이다. MTT assay에서 세포 독성을 보이지 않았던 500 및 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 추출물에 장기간 노출된 B16F10 세포의 colony formation에 가장 강한 억제 효과를 보인 것인 단자청피탕이며, 지폐산 추출물 처리군에서 가장 낮게 나왔다(Fig. 4).

## 5. B16F10 세포의 MMPs 발현 및 활성화에 미치는 각 처방전 추출물의 영향

암의 전이 과정에서 필수적인 ECM의 분해에 중요

한 역할을 담당하는 MMP-2와 MMP-9의 발현에 미치는 각 처방전 추출물의 영향을 비교하였다. 이를 위하여 각 처방전 추출물이 처리된 B16F10 세포를 대상으로 RT-PCR 및 Western blotting 분석을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 5A 및 B에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 십육미류기음과 단자청피탕 추출물 처리군에서 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 및 단백질의 발현이 청간해울탕 및 지폐산 추출물 처리군에 비하여 상대적으로 낮게 나타났다. 아울러 두 이들의 활성 역시 청간해울탕 및 지폐산 처리군에 비하여 십육미류기음과 단자청피탕 처리군에서 낮은 수준임을 알 수 있었다(Fig. 5C 및 D).

## 6. B16F10 세포의 TIMPs 발현에 미치는 각 처방전 추출물의 영향

이상에서 관찰된 MMPs의 발현 차이가 TIMPs의 발현 변화와 연계성이 있는지를 조사한 결과, TIMP-1 및 TIMP-2의 mRNA 발현이 청간해울탕 및 지폐산 추출물이 처리된 B16F10 세포에서 십육미류기음과 단자청피탕 추출물 처리군에 비하여 다소 높게 관찰되었으며(Fig. 6A), 이러한 경향성은 단백질 수준에서도 유사하게 관찰되었다(Fig. 6B).

## IV. 고찰

본 연구에서 사용된 4가지 한약복합처방전 중, 십육미류기음은 항산화, 항균 및 항암 활성에 대한 보고와 함께<sup>7-9)</sup>, 갑상선 세포의 DNA 합성을 억제하며 이는 cAMP 합성과 MHC-class II의 발현 억제와 연관성을 보여 갑상선종과 자가면역성 반응 조절 등 광범위한 응용 가능성을 보여준 바 있다<sup>10)</sup>. 단자청피탕에 해당하는 청피 추출물에 대한 항암 활성은 활성산소종 의존적 apoptosis 유도<sup>11-13)</sup>이외에 항암활성 관련 면역증강 관련 연구 등이 보고된 바 있으나<sup>14,15)</sup> 암세포 전이 억제 관련 연구는 전무한 실정이다. 한편 청간해울탕은 면역 증강 효능에 관한 연구가 수행된 바 있고<sup>16)</sup>, 지폐산의 경우, 항염증 및 선천면역 활성화와 연관된 항암 효과 등에 대한 연구가 보고된 바 있으나<sup>17-19)</sup>, 암세포의 전이와 연관된 이들 한약복합처방전들에 대한 분자생물학적 기전 연구 역시 거의 수행된 바가 없다.

암세포의 이동과 침윤은 전이과정에 필수적인 현상

으로 항암활성을 지니는 물질들의 전이 억제 여부를 평가하는 중요한 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서는 동의보감에서 유암 치료 처방전으로 기록된 몇 가지 한약복합처방전들의 암세포 이동성 및 침윤성 억제 가능성을 조사하였다. 이를 위하여 십육미류기음, 단자청피탕, 청간해울탕 및 지패산을 선정하였으며, B16F10 세포의 이동성 및 침윤성 억제 가능성을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 B16F10 세포의 증식에 미치는 이들 추출물의 영향을 먼저 조사하였다. MTT assay의 결과에 의하면, 각 추출물이 첨가된 배지에서 24시간 배양된 B16F10 암세포의 생존율에 1000 µg/ml 처리군까지 유의적인 변화를 나타내지 않았다(Fig. 1). 따라서 세포독성을 나타내지 않은 1000 µg/ml 및 500 µg/ml을 설정하여 B16F10 세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 각 추출물의 영향을 조사하였다.

각 처방전 추출물에 의한 B16F10 세포의 이동성과 침윤성의 억제 여부를 조사하기 위하여 Wound healing migration 및 matrigel invasion assay를 실시하였다. 먼저 Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에 배양된 세포에 비하여 각 추출물이 함유된 배지에서 배양된 B16F10 세포의 이동성이 전체적으로 처리농도 의존적으로 억제되었으나, 단자청피탕이 가장 큰 억제 효과를 보여주었다. 또한 이와 유사하게 matrigel을 통한 B16F10 세포의 침윤성도 단자청피탕 추출물 처리군에서 현저하게 감소되었다(Fig. 3). 즉 두 가지 방법에 의한 B16F10 세포의 전이 억제 가능성 검증에서 청간해울탕과 지패산 추출물이 비교적 억제 효과가 낮게 나타났으며, 단자청피탕이 가장 강한 억제 효과를 보여 주었으며, 이는 colony formation 형성 효능 결과와도 연계성이 있었다(Fig. 4).

한편 ECM의 분해에 결정적인 역할을 하는 MMPs는 정상 기관의 발생과 조직 재생에 필수적인 효소이지만, 암세포의 전이를 위한 침윤성 증대에 핵심적인 역할을 담당하고 있다<sup>1-3)</sup>. 특히 MMPs 중에서 MMP-2와 MMP-9는 대부분의 암세포 침윤과 암조직 주변의 혈관신생에 필수적이므로, 이들의 발현과 활성의 차단은 암세포의 전이 및 증식 억제를 위한 필수적인 방법이다<sup>4-6)</sup>. 따라서 각 처방전 추출물에 의한 B16F10 세포의 침윤성 억제가 이들 효소의 활성 억제와 연관성을 가지는지를 *in vitro* gelatinase 활성 비교 방법으로 조사한 결과, 청간해울탕과 지패

산 추출물 처리군에서는 대조군에 비하여 MMP-2 및 MMP-9 모두에서 유의적인 활성 변화를 보여주지 않았으나, 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물 처리군에서는 두 MMP의 활성이 유의적으로 감소하였다. 이러한 정량적 비교 결과가 비록 전사 수준에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현과는 정확하게 일치하지 않았으나 단백질 수준에서의 결과와는 매우 일치되었음을 알 수 있었다(Fig. 5). 많은 선행연구에서 잘 알려진 바와 같이, MMPs의 활성은 MMPs의 억제인자인 TIMPs의 발현 증대에 따라 상대적으로 억제될 수 있으므로<sup>20,21)</sup> MMPs에 대한 TIMPs의 상대적인 발현 증가는 암세포 침윤성의 억제를 측정하는 주요 인자로 활용이 가능하다<sup>22,23)</sup>. 따라서 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물 처리에 따른 MMP-2 및 MMP-9의 활성 저하가 이들 TIMPs의 발현 변화와 연관성이 있는지의 여부를 확인한 결과, 두 추출물이 처리된 B16F10 세포에서 TIMP-1의 발현이 청간해울탕과 지패산 추출물 처리군에 비하여 다소 높게 나타났음을 알 수 있었다(Fig. 6). 또한 mRNA 수준에서는 큰 차이가 없었지만, 단백질 수준에서 TIMP-2의 발현 역시 청간해울탕과 지패산 추출물 처리군에 비하여 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물 처리군에서 다소 증가된 양상을 보였다. 이는 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물 처리에 따른 MMP-2 및 MMP-9의 효소 활성 저하는 TIMPs의 발현 증가와 동반된 MMP-2 및 MMP-9의 발현 억제에 의한 것임을 의미하는 결과이다. 따라서 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물의 TIMPs 발현 증가와 동반된 MMPs의 생성 및 활성 억제는 ECM의 분해를 차단함으로써 B16F10 세포의 이동성과 침윤성을 억제하였을 것으로 생각된다.

결과론적으로 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물에 의한 B16F10 세포의 이동성과 침윤성의 억제는 TIMPs의 발현 증가에 의한 MMPs의 발현과 활성 억제에 의한 것임을 보여주는 것이다. 물론 이러한 결과가 B16F10 세포 특이적인 현상이라고는 할 수 없으며, 암세포 전이 억제에 핵심적인 역할을 하는 각 추출물의 생리활성 성분 규명과 동물 실험을 포함한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 아울러 본 연구의 유암 처방전이 항전이 인자로서 항암활성을 나타낼 수 있을 가능성을 보여주는 귀중한 실험적 증거로서 활용될 것이다.



## V. 결론

본 연구에서는 B16F10 세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 동의보감 유암 치료 처방전으로 기술된 4가지 한약복합처방전 추출물의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 세포독성이 없는 범위에서 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물은 B16F10 세포의 이동성과 침윤성을 유의적으로 억제하였다. RT-PCR 및 Western blotting 결과에 의하면 이들 두 추출물은 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 대한 억제 효능도 청간해울탕과 지패산 추출물에 비하여 높게 나타났으며, 이는 그들의 효소적 활성 감소와 연관성이 있었다. 그러나 TIMPs의 발현이 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물 처리군에서 다소 증가되어, 단자청피탕 및 십육미류기음 추출물에 의한 B16F10 세포의 이동성 및 침윤성 억제는 TIMPs의 발현 증가에 의한 MMPs의 활성 저해와 최소한 관련이 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (2015R1A2A2A01004633 및 2018R1A2B2005705).

## References

1. Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: Turning past failures into future successes. *Mol Cancer Ther.* 2018;17:1147-55.
2. Brown GT, Murray GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 2015;237:273-81.
3. Liu HY, Gu WJ, Wang CZ, Ji XJ, Mu YM. Matrix metalloproteinase-9 and -2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in invasive pituitary adenomas: A systematic review and meta-analysis of case-control trials. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e3904.
4. Rudek MA, Venitz J, Figg WD. Matrix metalloproteinase inhibitors: do they have a place in anticancer therapy? *Pharmacotherapy.* 2002;22:705-20.
5. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31:177-83.
6. Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol.* 2015;44-46:184-90.
7. Shim SH, Kim JH, Choi JH, Jeong HW. Influences on the anticancer and inhibitive effects of the secondary effects by anticarcinogen of Shibyukmiyouki-Eum. *J Orient Med Surg Ophthalmol Otolaryngol.* 2002;15:302-14.
8. Lee MH, Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Choi YH. Antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of seven traditional herb-combined remedies. *J Life Sci.* 2015;25:406-15.
9. Choi EO, Son DH, Kim MY, Hwang-Bo H, Kim HJ, Jeong JW, Hong SH, Park C, Choi YH. Antioxidant and antimicrobial activities of herb-combined remedies used in traditional Korean medicine for treating breast cancer. *J Life Sci.* 2016;26:680-8.
10. Yi J, Kim B. Effects of Sipyukmiyukieum on DNA synthesis, cAMP synthesis and MHC-class II expression of FRTL-5 thyroid cells. *Korean J Orient Int Med.* 2005;26:398-408.
11. Kim MY, Bo HH, Choi EO, Kwon DH, Kim HJ, Ahn KI, Ji SY, Jeong JW, Park SH, Hong SH, Kim GY, Park C, Kim HS, Moon SK, Yun SJ, Kim WJ, Choi YH. Induction of apoptosis by *Citrus unshiu* Peel in human breast cancer MCF-7 cells: Involvement of ROS-dependent activation of AMPK. *Biol Pharm Bull.* 2018;41:713-21.
12. Kim MY, Choi EO, HwangBo H, Kwon DH, Ahn KI, Kim HJ, Ji SY, Hong SH, Jeong JW, Kim

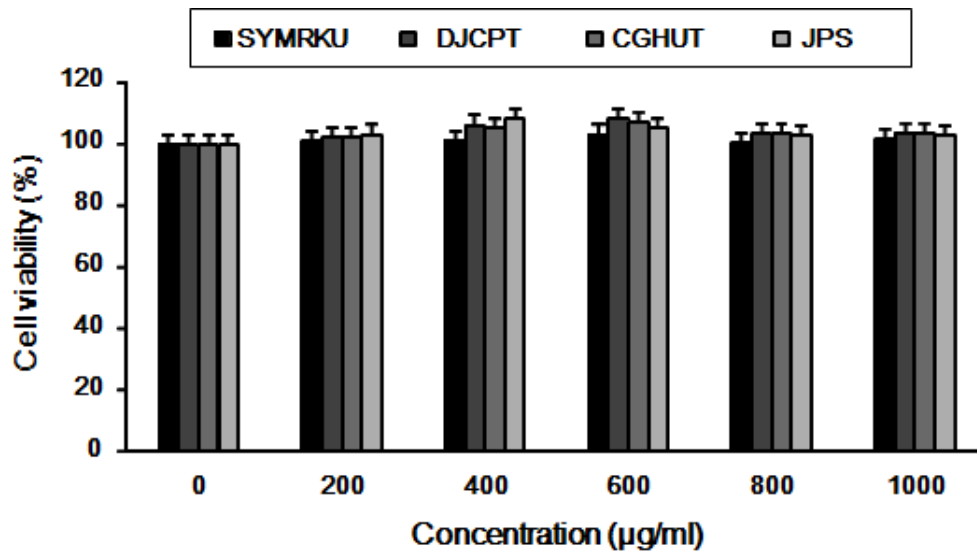
- GY, Park C, Choi YH. Reactive oxygen species-dependent apoptosis induction by water extract of *Citrus unshiu* peel in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Nutr Res Pract*. 2018;12:129-34.
13. Ahn KI, Choi EO, Kwon DH, HwangBo H, Kim MY, Kim HJ, Ji SY, Hong SH, Jeong JW, Park C, Kim ND, Kim WJ, Choi YH. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Citrus unshiu* Markovich peel in human bladder cancer T24 cells through ROS-mediated inactivation of the PI3K/Akt pathway. *Biosci Trends*. 2017;11:565-73.
14. Lee S, Ra J, Song JY, Gwak C, Kwon HJ, Yim SV, Hong SP, Kim J, Lee KH, Cho JJ, Park YS, Park CS, Ahn HJ. Extracts from *Citrus unshiu* promote immune-mediated inhibition of tumor growth in a murine renal cell carcinoma model. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133:973-9.
15. Kim A, Im M, Gu MJ, Ma JY. *Citrus unshiu* peel extract alleviates cancer-induced weight loss in mice bearing CT-26 adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2016;6:24214.
16. Kang BH, Jung WS, Kim SB, Yoo SK. Effects of Chungganhaewooltang on serum levels of histamine and corticosterone and immune response after immobilization-stress or cold-stress in mice. *J Orient Obstet Gynecol*. 2005;18:85-105.
17. Lee SH, Park CK. Anti-inflammatory effects of Ji-Pae-San water extract. *Korean J Orient Med Prescription*. 2008;16:79-94.
18. Hwang KM. Anti-leukemic effects of JIPAESAN and its components on leukemic cells HL-60. *Korean J Orient Med Prescription* 2002;10: 143-155.
19. Heo SJ, Hwang DS, Lee JM, Lee CH, Lee KS, Jang JB. Antimetastatic effects of Jipae-san by inflammation control and activation of innate immune system. *J Korean Obstet Gynecol*. 2014; 27:1-14.
20. Zhang Y, Chen Q. Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50:e6104.
21. Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutat Res*. 2013; 753:7-23.
22. Sampieri CL, León-Córdoba K, Remes-Troche JM. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in gastric cancer as molecular markers. *J Cancer Res Ther*. 2013;9:356-63.
23. Grzelczyk WL, Szemraj J, Józefowicz-Korczyńska M. The matrix metalloproteinase in larynx cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:1190-7.



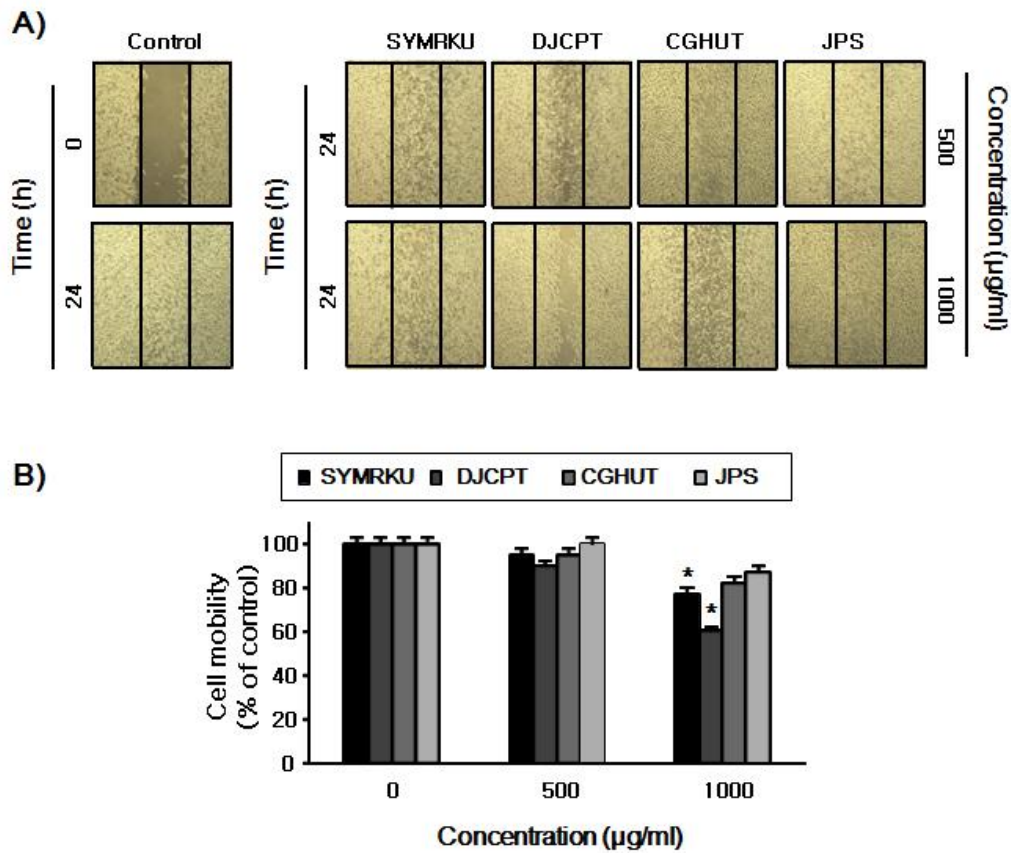
**Table 1.** Sequences of the primer pairs employed in the RT-PCR reactions

Name		Sequence of primers
MMP-2	sense	5'-CTT CTT CAA GGA CCG GTT CAT-3'
	antisense	5'-GCT GGC TGA GTA GAT CCA GTA-3'
MMP-2	sense	5'-CGG AGC ACG GAG ACG GGT AT-3'
	antisense	5'-TGA AGG GGA AGA CGC ACA GC-3'
TIMP-1	sense	5'-TGG GGA CAC CAG AAG TCA AC-3'
	antisense	5'-TTT TCA GAG CCT TGG AGG AG-3'
TIMP-2	sense	5'-GTC AGT GAG AAG GAA GTG GAC TCT-3'
	antisense	5'-ATG TTC TTC TCT GTG ACC CAG TC-3'
GAPDH	sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'

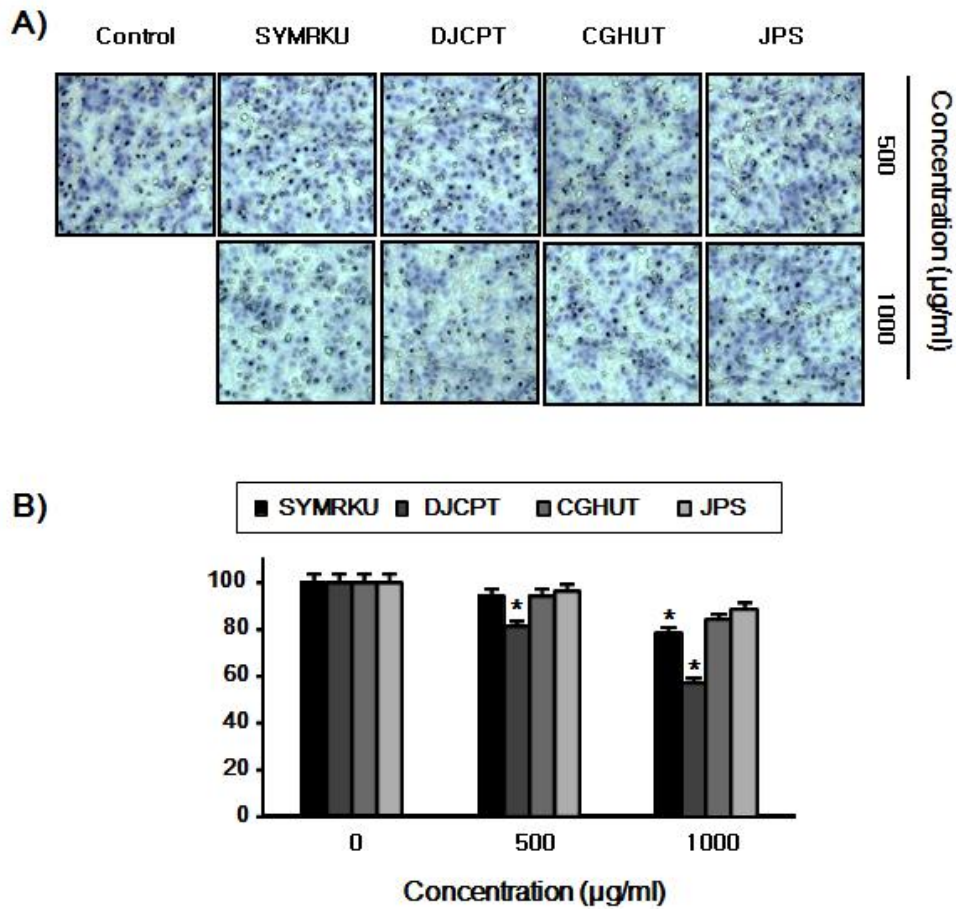
**Figure legends**



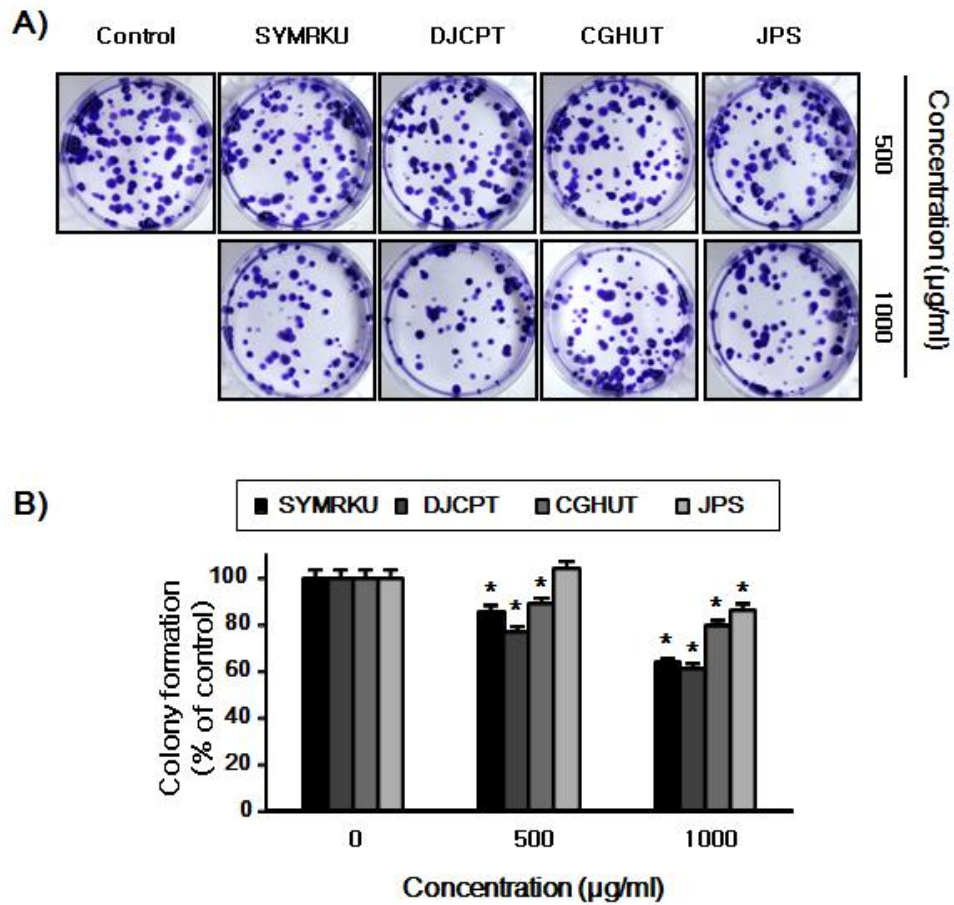
**Fig. 1.** Effects of water extracts of Sipyukmiryukieum (SYMRKU), Danjacheongpitang (DJCPT), Cheongganhaeultang (CGHUT) and Jipaesan (JPS) on cell viability in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded at an initial density of  $2.5 \times 10^5$  cells per 60-mm plate, incubated for 24 h, and treated with various concentrations of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS for 24 h. Cell viability was measured using an MTT assay. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.



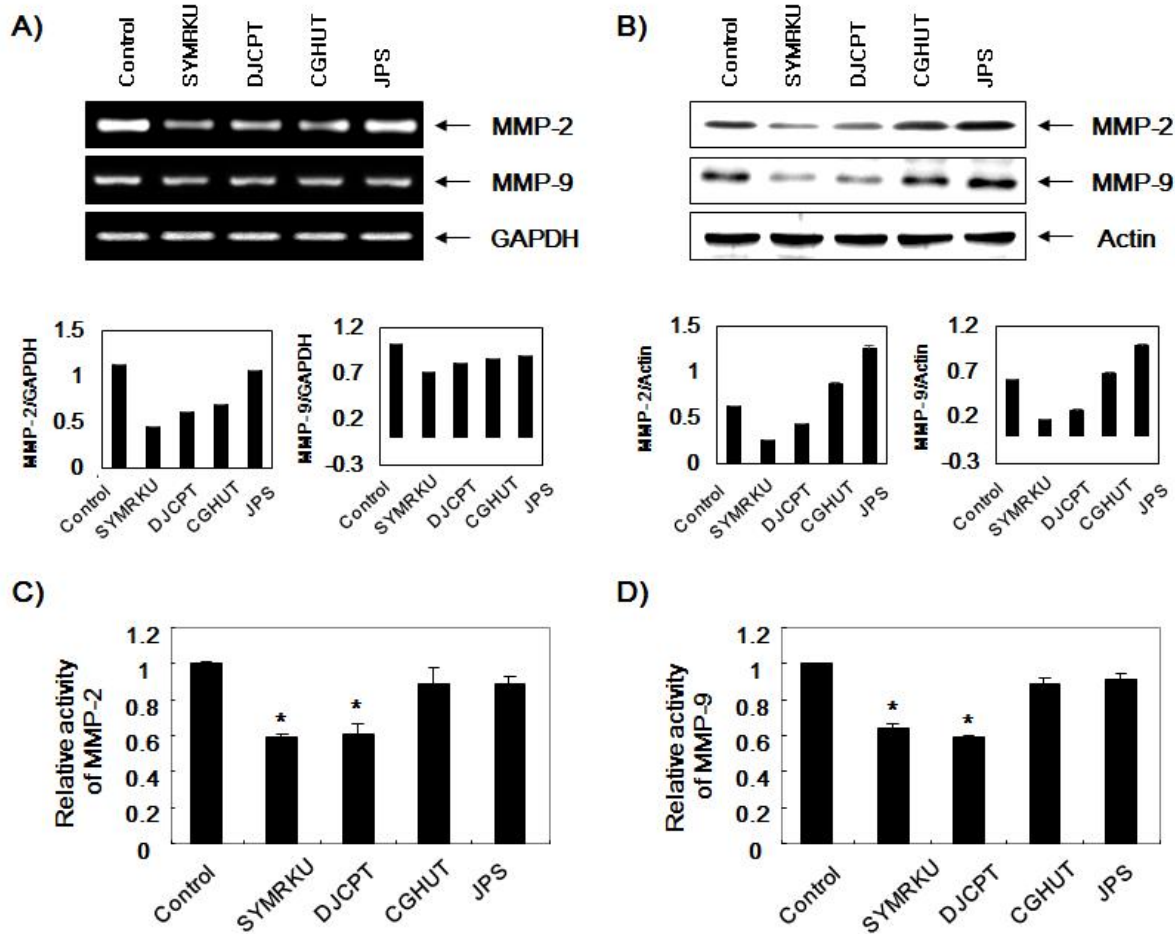
**Fig. 2.** Effects of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS on cell motility in B16F10 melanoma cells. Cells were grown to confluency on 30-mm cell culture dishes; a scratch was then made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum free medium (to prevent cell proliferation) containing either vehicle or indicated concentrations of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS was added for 24 h. (A) Photographs of the wounded area were taken for evaluation of cell movement into the wounded area. (B) The number of cells migrated toward the wounded area was indicated as a relative value. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. A Student's *t*-test was used for determination of significance (\*  $p < 0.05$  versus untreated control).



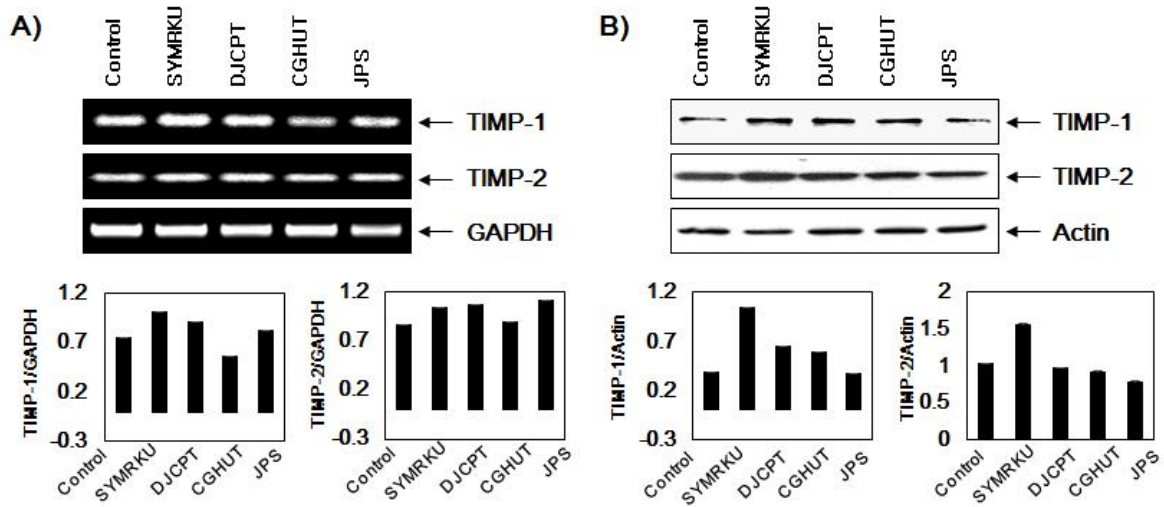
**Fig. 3.** Effects of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS on invasion in B16F10 melanoma cells. Cells pretreated with the indicated concentration of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS for 6 h were plated onto the apical side of matrigel coated filters in serum-free medium containing either vehicle or SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS. Medium containing 20% FBS was placed in the basolateral chamber to act as a chemoattractant. After 24 h, cells on the apical side were wiped off using a Q-tip. Next, cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and Eosin Y (A), and then counted (B). Data are shown as the mean of triplicate samples and represent invasive cell numbers compared with those of control cells (\*  $p < 0.05$  versus untreated control).



**Fig. 4.** Effects of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS on colony formation in B16F10 melanoma cells. For the colony formation assay, cells were seeded at a low density (500 cells per plate) and allowed to grow until visible colonies appeared. Culture medium containing either vehicle or indicated concentrations of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS was replaced every 72 h. (A) After 14 days, the cells were stained with common crystal violet dye and then photographs were taken. (B) The number of colonies was indicated as a relative value. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. A Student's t-test was used for determination of significance (\*  $p < 0.05$  versus untreated control).



**Fig. 5.** Effects of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS on expression and activity of MMPs in B16F10 melanoma cells. (A) B16F10 cells were treated with 1000  $\mu\text{g/ml}$  of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS for 24 h. Total RNA was isolated and reverse-transcribed. Resulting cDNAs were then subjected to PCR. The reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells grown under the same conditions as (A) were sampled, lysed, and 50  $\mu\text{g}$  of proteins were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. Bands were quantified using ImageJ and normalized to GAPDH and actin. (C and D) *In vitro* activity of MMP-2 (C) and MMP-9 (D) in cell culture supernatant was measured using MMP-2 and -9 gelatinase activity assay kits. Data are mean  $\pm$  SD from three independent experiments and are presented as fold change compared with vector control (\*,  $p < 0.05$  versus untreated control).



**Fig. 6.** Effects of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS on expression TIMPs in B16F10 melanoma cells. B16F10 cells were treated with 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SYMRKU, DJCPT, CGHUT and JPS for 24 h. Total RNA was isolated and reverse-transcribed using the indicated primers. Resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed, and 50  $\mu\text{g}$  of proteins were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control. Bands were quantified using ImageJ and normalized to GAPDH and actin.