

MDA-MB-231 인체 전이성 유방암 세포의 침윤에 대한 Kalopanaxsaponin A의 억제 효능

연세대학교 치과대학 ¹구강종양연구소, ²구강생물학교실 및 BK 21 사업단, ³상지대학교 자원식물학과

황영선¹ · 박광균^{1,2} · 박희준³ · 정원윤^{1,2}

Kalopanaxsaponin A Inhibits the Invasion of MDA-MB-231 Human Metastatic Breast Cancer Cells

Young Sun Hwang¹, Kwang-Kyun Park^{1,2}, Hee-Juhn Park³ and Won-Yoon Chung^{1,2}

¹Oral Cancer Research Institute, ²Department of Oral Biology and Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, ³Department of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Invasion and metastasis of cancer cells are the leading cause of death for cancer patients, and matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in these steps. In this study, we determined the effect of kalopanaxsaponin A (KPS-A), isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus* Nakai, on the invasion of MDA-MB-231 human metastatic breast cancer cells. KPS-A significantly inhibited the viability and PMA-induced invasion of MDA-MB-231 cells in dose-related manner. We also found that PMA-induced invasion was suppressed by KPS-A through decreasing the MMP-9 secretion. In addition, KPS-A remarkably reduced PMA-induced DNA binding and transcriptional activity of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1), and blocked PMA-induced phosphorylation of ERK1/2 and Akt, not p38 MAPK. Furthermore, we confirmed that PMA-induced MMP-9 activity and transcriptional activity of NF- κ B and AP-1 were regulated by p38 MAPK, Akt, ERK1/2. Taken together, the suppression of MMP-9 activity through ERK1/2/AP-1 and Akt/NF- κ B pathway may contribute to the anti-invasion activity of KPS-A in PMA-stimulated MDA-MB-231 cells. (*Cancer Prev Res* 13, 108-115, 2008)

Key Words: Kalopanaxsaponin A, PMA-induced invasion, Matrix metalloproteinase-9

서 론

유방암은 미국이나 유럽 등 선진 국가에서 가장 흔한 여성 암으로 40세에서 55세 사이의 미국 여성의 제 1의 사망 원인이 되고 있다. 통계적으로 평생 동안 9 명의 여성 중 1 명에서 유방암이 발생하였고, 환자 수 역시 매년 약 15%씩 증가하는 추세이다. 나이, 유전자 변이, 가족력, 종족, 월경 시기, 피임 약, 무자녀, 여성호르몬 치료, 음주, 그리고 비만과 고지방 식이 등이 발병 요인인 것으로 보고되었다. 미국이나 유럽 등 선진국에서 나

이가 증가할수록 많아지는 것과는 다르게, 한국에서는 45~55세 여성에서 유방암 위험도가 가장 높게 나타나고 있고, 총 유방암의 20%가 40세 미만에서 진단되어 젊은 여성의 유방암 발병이 상대적으로 높은 추이를 보인다. 젊은 여성의 유방은 고령 환자에 비해 보다 활동적이고 여성의 생리 주기에 따라 주기적으로 변화하며 풍부한 유선조직을 함유하고 있어 자가 진찰이나 정기 검진을 통한 질병의 발견이 어렵다. 뿐만 아니라 유방암 조기 발견을 위해 가장 광범위하게 사용되고 있는 유방촬영술에 대한 민감도도 고령의 환자보다 낮다. 진단에 있어서의 문제뿐만 아니라 젊은 연령에서 발생한 유방암의

책임저자 : 정원윤, ☎ 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 치과대학 구강생물학교실
Tel: 02-2228-3057, Fax: 02-364-7113

E-mail: wychung@yuhs.ac

접수일 : 2008년 6월 2일, 게재승인일 : 2008년 6월 20일

Correspondence to : Won Yoon Chung

Department of Oral Biology, Yonsei University College of Dentistry,
134, Shinchon-Dong, Seodaemun-Ku, Seoul 120-752, Korea

Tel: +82-2-2228-3057, Fax: +82-2-364-7113

E-mail: wychung@yuhs.ac

경우 그 예후가 상대적으로 불량하여 국소재발 및 원격 전이율이 높고 질병관련 사망률도 높은 것으로 보고되어 있다. 또한, 유방암과 같은 호르몬 의존성 암 환자를 치료하기 위하여 호르몬을 고갈시키는 내분비요법을 사용하는데 병의 진행을 완화시키기는 하지만 골다공증을 비롯한 부작용이 유발될 뿐만 아니라 그 효과가 오래 지속되지 못하고 내분비요법에 반응을 보이지 않는 호르몬 비의존성 상태로 발전하여 사망하는 자연경과를 보인다.¹⁾ 따라서 부작용이 없고 항암 및 항전이 효능이 우수한 새로운 약물의 개발이 필요하다.

방사선 치료나 약물 요법의 발달로 암 환자의 수명과 삶의 질이 현저히 개선된 것은 사실이나 아직까지 암 환자의 주된 사망 원인은 암세포의 전이이다. 따라서 암의 침윤(invasion)이나 전이(metastasis)를 억제하는 메커니즘 규명이나 효과적인 치료 약물 개발이 많은 연구들의 주된 타깃이 되고 있다. 암 전이는 복잡한 여러 단계의 과정이 수반되며 암세포의 기저막(extracellular matrix, ECM) 침윤이 전이 초기에 중요한 단계가 된다. 암세포에 의해 분비되는 matrix metalloproteinases (MMPs)나 urokinase type plasminogen activators (uPAs) 등과 같은 단백질 분해효소들과 이들의 저해제간 상호작용은 암세포가 기저막을 침윤하여 제 2의 부위로 전이되는 과정에 중요한 작용을 한다. 특히 MMP-2와 MMP-9은 암 및 주위 조직에서 발현이 증가되어 기저막의 분해를 통해 세포 침윤을 돕는 역할을 한다. 최근 몇몇 MMP 저해제가 항암제로 개발되어 임상시험 중에 있지만 근골격통 등의 부작용이 나타나 사용이 제한되고 있다.²⁾

오갈피 나무과(Araliaceae)에 속하는 으나무(*Kalopanax pictus* Nakai)의 수피(해동피)로부터 분리된 Kalopanaxsaponin A [KPS-A; hederagenin 3-O- α -L-rhamnosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinoside]는 항염증,³⁾ anti-diabetes,⁴⁾ 그리고 anti-tumorigenesis⁵⁾의 여러 생리활성들이 보고되었지만 아직까지 암세포의 침윤과 전이에 대한 효능은 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 MDA-MB-231 인체 전이성 유방암 세포를 이용하여 암세포의 침윤에 대한 KPS-A의 효능을 평가하였다. 종양 형성 유도제인 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)에 의해 증가된 유방암 세포의 침윤이 KPS-A에 의해 억제되는지 조사하고, KPS-A가 암세포의 침윤을 억제하는 작용기전을 밝히고자 PMA로 유도된 MMP-9에 대한 KPS-A의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,4-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, PD98059, SB203580 그리고 LY294002은 Calbiochem (San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였으며, fetal bovine serum (FBS)과 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Gibco (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Rabbit polyclonal anti-phosphospecific p44/42 MAPK, anti-phosphospecific p38 MAPK, anti-phosphospecific Akt (Ser473)와 anti- β -actin antibody는 New England Biolabs (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 anti-MMP-9는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. KPS-A는 상지대학교 자원식물학과 박희준 교수님으로부터 받아 10% DMSO에 1 mg/ml로 녹인 후 배지로 희석하여 사용하였다.

2. 세포배양

MDA-MB-231 인체 전이성 유방암 세포는 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다.

3. MTT assay

세포 배양용 96 well plate에 well당 1 \times 10³개의 MDA-MB-231 세포를 분주하고 37°C에서 24시간 동안 안정화시킨 후, KPS-A와 혈청을 포함한 배지 또는 KPS-A만을 포함한 혈청이 없는 배지에서 다시 48시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 0.5 mg/ml 농도가 되게 가하고 4시간 동안 배양한 후, 배지와 MTT 용액을 제거하였다. 세포내에 형성된 formazan을 0.1 ml DMSO로 녹인 후, ELISA reader (Powerwave X340, Biotek Instrument, Beun-De Ronde Serlabo, Drogenbos, Belgium)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 KPS-A를 가하지 않은 well의 흡광도에 대한 KPS-A를 가한 well의 흡광도의 백분율로 표시하였다.

4. Cell invasion assay

MDA-MB-231 세포의 침윤 정도는 Matrigel (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA)로 insert chamber를 코팅시킨 Transwellchamber plates (Corning Costar, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. Matrigel을 일정 시간

녹이고 30 $\mu\text{g/ml}$ 를 insert chamber에 가하여 코팅하였다. [^3H] thymidine으로 표지한 세포를 well당 50,000개씩 넣고 0.2 μM PMA와 KPS-A로 처리하였다. 48시간 동안 배양한 후, Matrigel을 통과하여 lower chamber로 이동한 세포의 총 cpm을 Scintillation counter로 측정하였다. 세포의 침윤 정도는 처음 넣어준 세포의 총 cpm에 대한 백분율로 표시하였다.

5. Zymography

MDA-MB-231 세포(1×10^5 cells/ml)를 정상 및 0.2 μM PMA 와 KPS-A가 포함된 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 원심분리 하였다. 또는 세포를 ERK 저해제인 PD98059, p38 MAPK 저해제인 SB203580, Akt 저해제인 LY294002로 1시간 동안 전처리하고 PMA로 16시간 자극하였다. 20 μg 의 단백질을 포함하는 상등액을 0.1% (w/v) gelatin이 함유된 10% polyacrylamide 겔에서 전기 영동하였다. 겔을 2.5% Triton X-100이 함유된 Tris-HCl 완충용액에 2시간 동안 방치하였다가 37°C, 10 mM CaCl_2 , 0.15 M NaCl이 함유된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에서 16시간 동안 반응시켰다. 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue로 염색하여 MMP-9에 의해 기질이 분해된 부분을 확인하였다.

6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF- κB 와 AP-1의 DNA 결합 활성을 측정하기 위해 EMSA를 수행하였다. MDA-MB-231 세포를 KPS-A, PD98059, SB203580 또는 LY294002로 1시간 동안 전처리하고 PMA를 포함한 배지에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 모아 완충액 [20 mM HEPES (pH 8.0), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0), 1 mM EGTA (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM PMSF]으로 제조된 핵 추출물을 Klenow ^{32}P -labeled NF- κB 나 AP-1 consensus oligonucleotides (NF- κB ; 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3', AP-1 ; 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGAA-3') (Promega, Madison, WI, USA), poly dI-dC/dI-dC (Amersham Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ, USA)와 상온에서 20 분간 반응시켰다. 5% polyacrylamide gel에서 3시간 동안 10 volts/cm으로 분리하였고, Kodak XAR film에 노출해 NF- κB 나 AP-1의 DNA 결합 활성을 조사하였다.

7. Transient transfection and luciferase reporter assay

pNF- κB -Luc와 pAP-1-Luc reporter plasmid (Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 LipofectAMINE 2000 (Life Technologies,

Rockville, MD, USA)을 이용하여 MDA-MB-231 세포에 transient transfection하였고 대조군에는 pTAL-Luc vector (empty vector)를 사용하였다. Transfection efficiency를 비교하기 위해 세포에 pSV- β -galactosidase (Promega, Madison, WI, USA)를 co-transfection하였다. MDA-MB-231 세포에서 NF- κB 와 AP-1에 의한 전사를 KPS-A가 억제하는지 알아보기 위해, 세포를 1시간 동안 KPS-A로 전처리한 후 PMA를 포함한 배지에서 8시간 동안 배양하였다. PD98059, SB203580, LY294002는 1시간 동안 전처리하였다. Luciferase 활성은 Luciferase Reporter Assay System (Promega)를 사용하여 luminometer에서 측정하였다.

8. Western blot analysis

80~90%의 confluence를 보이는 MDA-MB-231 세포를 KPS-A가 포함된 배지에서 1시간 동안 배양한 후 0.2 μM PMA로 20분 동안 자극하였다. 원심분리하여 세포를 모으고 lysis buffer로 용해하였다. 다시 원심분리하여 세포 내 잔사물을 분리한 후, 동량의 단백질을 10% polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 전이시킨 후, 5% BSA를 함유한 PBS-T에 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 결합을 차단하였다. 1 : 1000로 희석된 rabbit polyclonal anti-phosphospecific 항체로 하룻밤 동안 처리한 다음 세척하고 1 : 3000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 이차항체(New England Biolabs, Beverly, MA, USA)와 반응시켰다. Enhanced chemiluminescence kit (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

9. 통계 처리

실험결과는 InStatTM statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 one-way ANOVA test로 분석하였으며, Western blot 분석에는 non-parametric Mann-Whitney test가 그리고 transfection 효율을 적용한 luciferase 활성 분석에는 Wilcoxon matched pairs test가 수행되었다. 각 실험군 간의 평균치의 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 평균과 표준오차로 표시하였다.

결과 및 고찰

새로운 항암물질들을 개발하고자 하는 연구가 계속되고 있지만 강한 세포 독성을 수반하는 경우 치료제로서 임상적 접근이 어려워지는 문제점이 있다. 이런 이유로 민간이나 한방에서 오랫동안 사용되어 온 약용식물 성

분으로부터 새로운 항암물질을 도출하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 위장 질환이나 간 질환에 대한 한약재로 널리 사용되고 있는 해동피에서 분리된 KPS-A가 전이성 유방암 세포의 침윤을 억제하는 지 조사하였으며, KPS-A가 암세포의 침윤을 억제하는 기전을 밝히기 위하여 암세포의 초기 침윤 및 전이에 중요한 MMP-9의 발현 및 MMP-9의 발현에 관여하는 세포 신호전달 단백질들의 변화를 조사하였다.

먼저, 10% FBS가 포함된 배지에서 MDA-MB-231 유방암 세포에 KPS-A를 농도별로 처리한 후 MTT assay로 세포 생존율을 측정된 결과, 6 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 KPS-A가 세포 독성을 보이지 않은 반면 8 $\mu\text{g/ml}$ 과 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 각각 60%와 35%의 세포만 생존하여 세포 독

성을 나타내었다. 혈청이 없는 배지에서도 6 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 KPS-A가 세포 독성을 보이지 않았으나 8 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 혈청이 포함된 배지에서보다 세포 독성이 더 높게 나타났다(Fig. 1A). MDA-MB-231 세포에 대한 KPS-A의 세포독성을 조사한 후 PMA에 의해 증가된 MDA-MB-231 세포의 침윤을 KPS-A가 억제하는 지 조사한 결과, 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 농도의존적으로 MDA-MB-231 세포의 침윤이 KPS-A에 의해 억제하였다(Fig. 1B). PMA에 의해 증가된 MDA-MB-231 세포의 침윤에서 MMP-9의 역할을 확인하고자 Matrigel 로 코팅된 transwell의 inner chamber에 anti-MMP-9 항체를 넣은 후 침윤 활성을 측정하였다. 그 결과, PMA를 처리하지 않은 MDA-MB-231 세포의 침윤은 anti-MMP-9 항체에

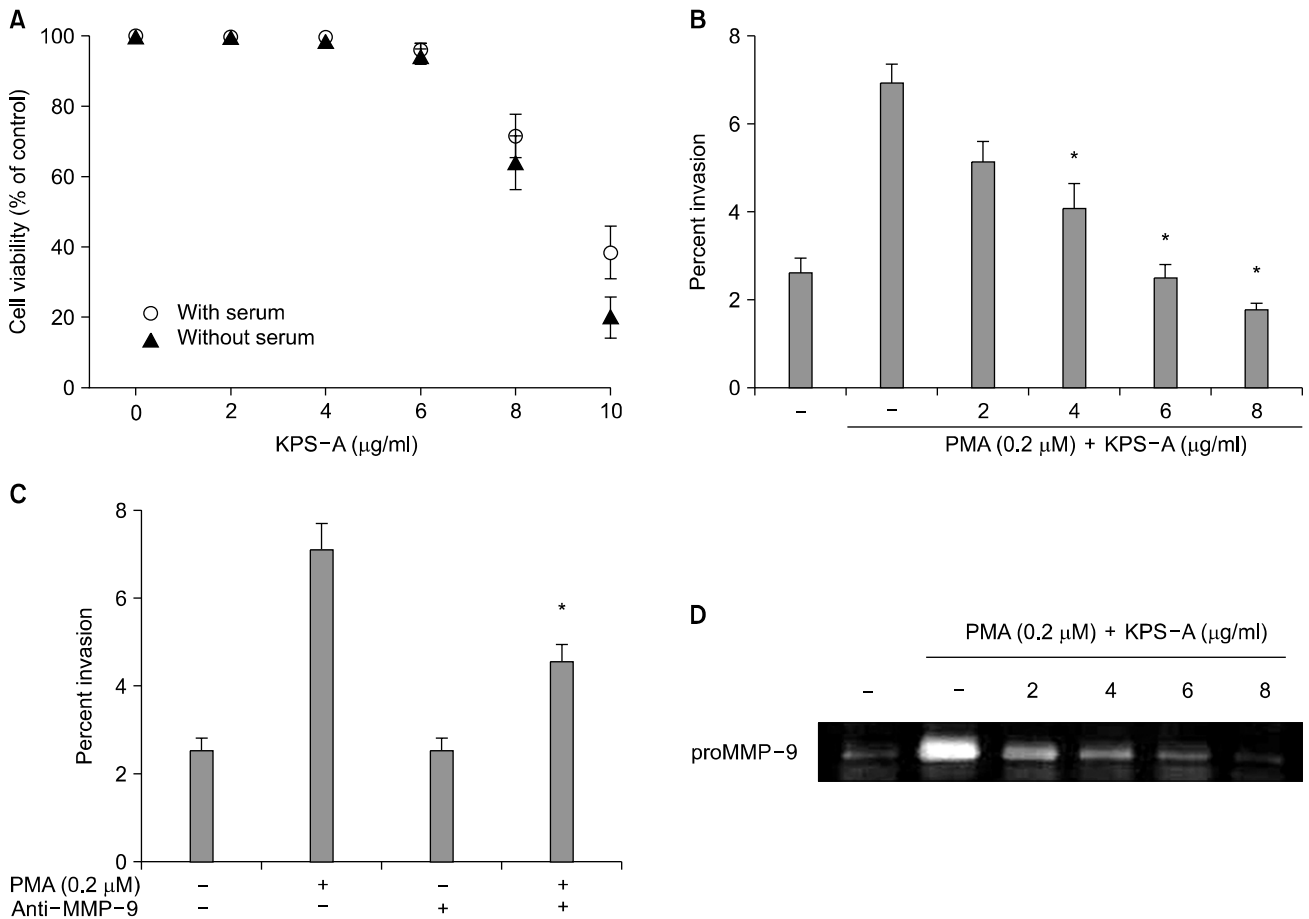


Fig. 1. KPS-A inhibits PMA-induced invasion and MMP-9 activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. (A) MDA-MB-231 cells were treated with various concentrations of KPS-A in the presence (○) or absence (▲) of serum for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. (B) MDA-MB-231 cells were incubated in serum-free media with PMA (0.2 μM) or/and KPS-A for 48 h. Cell invasion activity was measured by using Matrigel-coated Transwell. (C) Cells were incubated in serum-free media with or without PMA (0.2 μM) or/and anti-MMP-9 antibody (1 mg/ml) and invasion assay was performed. (D) MDA-MB-231 cells were treated with PMA (0.2 μM) or/and KPS-A for 24 h. Conditioned media were collected and MMP-9 activity was measured by gelatin zymography. Data represents the mean \pm SE from three independent experiments. * $p < 0.01$ versus PMA-treated cells.

의해 영향을 받지 않지만, PMA에 의해 증가된 MDA-MB-231 세포의 침윤은 유의적으로 억제되었다 (Fig. 1C). 또한, zymography로 세포배양액 내 MMP-9의 활성을 조사한 결과, PMA에 의해 현저히 증가된 MMP-9의 분비가 KPS-A에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 1D). 이상의 결과로부터 MDA-MB-231 전이성 유방암 세포에서 KPS-A가 MMP-9의 활성을 감소시켜 PMA로 유도된 세포의 침윤을 억제한다는 것을 알 수 있다.

암세포에서 MMP-9의 발현과 세포 외액으로의 분비는 insulin-like growth factor I (IGF-1), fibroblast growth factor-2 (FGF-2), heregulin- β 1과 같은 다양한 성장인자들과 PMA와 같이 protein kinase C (PKC)를 활성화하는 물질에 의해 유도되는데, 이들 물질에 의해 유도된 MMP-9의 발현이

식물 유래 화합물들에 의해 다양한 메커니즘을 통해 조절된다는 결과들이 광범위하게 보고되고 있다. 콩에서 분리된 식물성 에스트로젠인 genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)은 두경부 암세포⁶⁾와 인체 glioblastoma U87MG 세포⁷⁾에서 MMP-9의 분비를 감소시키고, nude mice에서 salivary adenoid cystic carcinoma (ACC-M)의 전이를 부분적으로 억제하는 활성을 나타내며,⁸⁾ 전립선암에서는 osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling을 조절하여 docetaxel의 anti-tumor와 anti-metastatic 활성을 증가시켰다.⁹⁾ 녹차의 주된 catechin 성분인 (-)-epigallocatechin gallate (EGCG)은 인체 gastric AGS 세포에서 MAPK과 AP-1의 활성화를 억제하여 tumor promoter에 의해 증가된 MMP-9의 발현을 억제하였다.¹⁰⁾

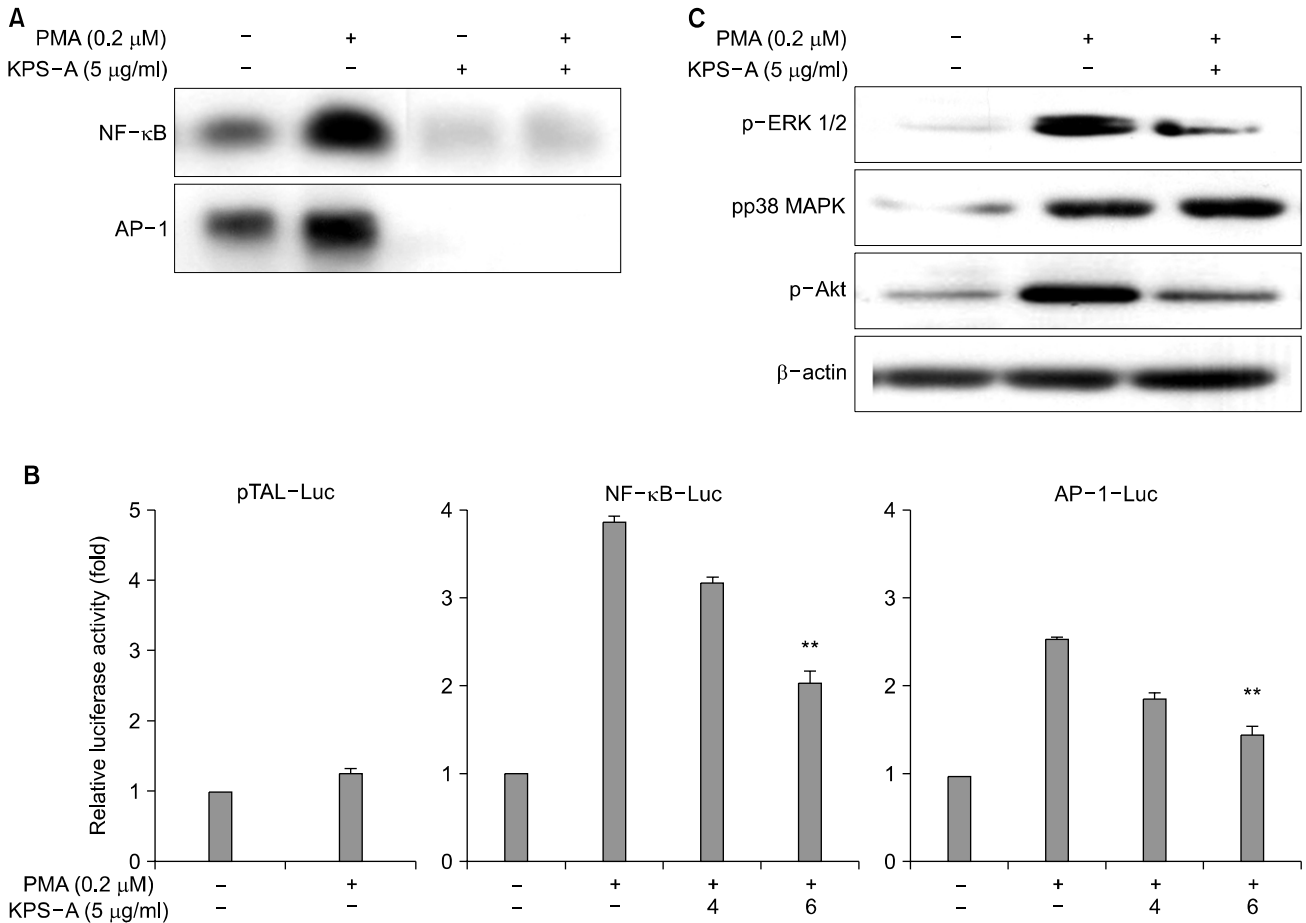


Fig. 2. KPS-A inhibits the transcriptional activation of NF- κ B and AP-1 and the phosphorylation of ERK, p38 MAPK and Akt in PMA-treated MDA-MB-231 cells. (A) Cells were treated with PMA (0.2 μ M) for 1 h after 1 h-pretreatment with KPS-A (5 μ g/ml) and EMSA was performed. (B) Cells were transfected with pTAL-Luc, pNF- κ B-Luc or pAP-1-Luc by the LipofectAMINE technique. The luciferase activity was measured in the transfected cells stimulated with PMA (0.2 μ M) for 8 h. Data for the NF- κ B- and AP-1-dependent luciferase activity were normalized to β -galactosidase activity from co-transfection of pRSV β -galactosidase. The data represent the mean \pm SE of three independent experiments. * p <0.01 versus PMA-treated cells. (C) Cells were pretreated with KPS-A 1 h prior to PMA treatment for 20 min. The phosphorylated ERK1/2, p38 MAPK and Akt were detected by western blot analysis.

*Curcuma longa*에서 분리된 curcumin의 경우 articular chondrocytes에서 NF- κ B의 활성화를 억제하여 MMP-9의 발현을 저해하였고,¹¹⁾ 인체의 폐 상피세포에서 흡연에 의해 유도된 NF- κ B 활성화 및 I κ B α kinase를 억제함으로써 MMP-9의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다.¹²⁾ *Silybum marianum* L. 성분으로서 항산화 활성이 보고된 silybinin은 MCF-7 인체 유방암 세포에서 MAPK/AP-1 신호전달을 억제하여 PMA에 의해 증가된 MMP-9의 발현을 억제하였다.¹³⁾ MMP-9의 발현에 관여하는 세포 내 신호전달 물질들이 암세포,^{14,15)} 혈관내피세포,¹⁶⁾ vascular smooth muscle cells (VSMC),^{17,18)} 그리고 keratinocytes¹⁹⁾ 등에서 보고가 되었는데, MAP kinase가 NF- κ B와 AP-1 전사인자를

활성화 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. Tracheal smooth muscle cells²⁰⁾에서는 TNF-alpha에 의해 NF- κ B pathway와 더불어 Src/EGFR/PI3K/Akt pathway 또는 Src/ PDGFR/PI3K/Akt pathway가 활성화되어 Akt가 직접 핵으로 이동된 후, 활성화 된 NF- κ B와 작용하여 MMP-9의 발현을 유도하는 것으로 보고되었다.

이러한 연구결과를 토대로 KPS-A가 MMP-9의 발현을 억제하는 기전을 밝히기 위하여 MDA-MB-231 유방암 세포에 KPS-A를 처리하였을 때 NF- κ B와 AP-1 전사인자에 의해 MMP-9의 전사가 억제되는지 조사하였다. MMP-9의 promoter에는 2개의 AP-1 결합부위(located at -79 and -533 bp)와 1개의 NF- κ B 결합부위(located at -600 bp)가 *cis-*

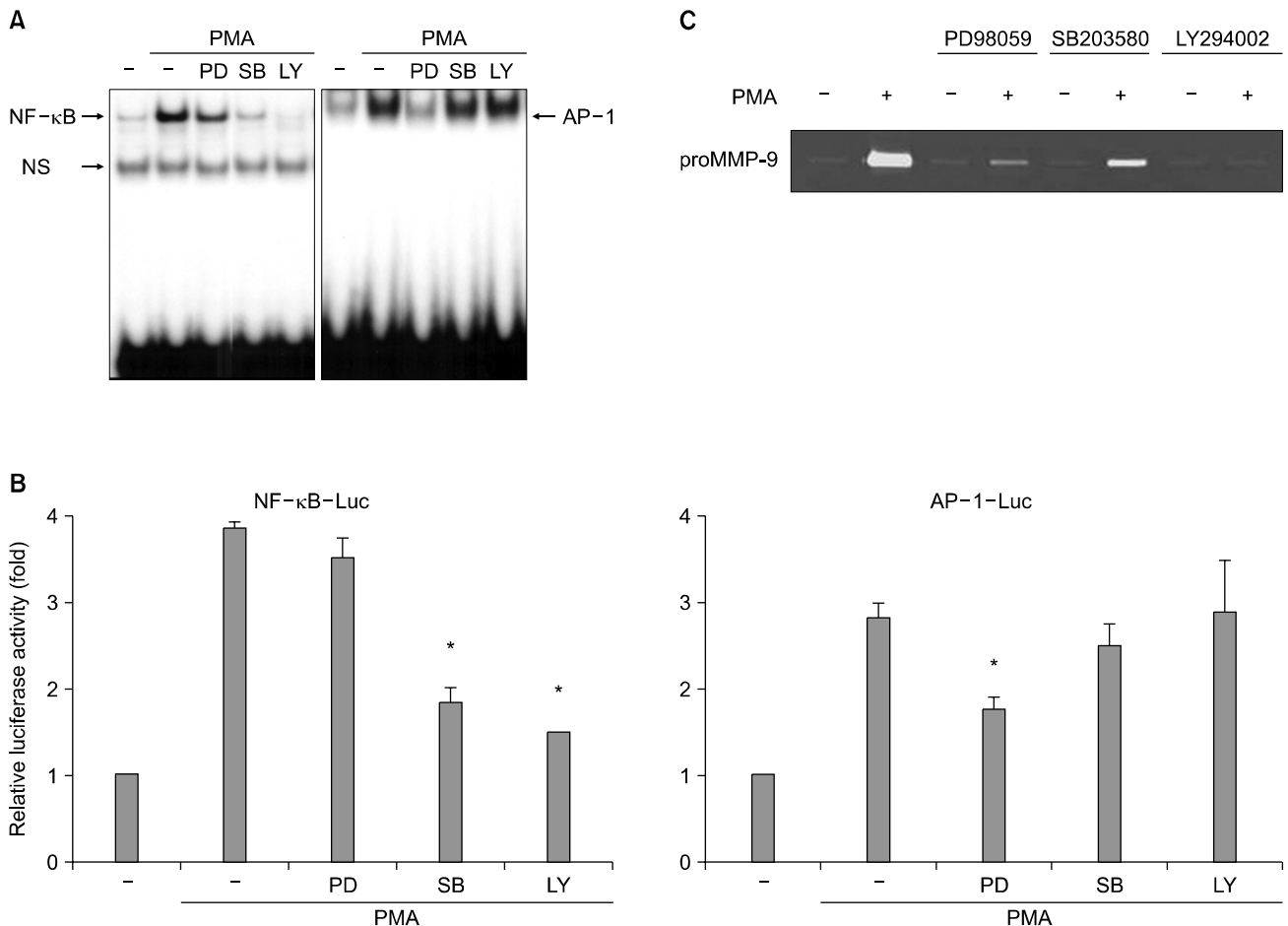


Fig. 3. PMA increases MMP-9 activity by activating NF- κ B via Akt and p38 MAPK, and AP-1 via ERK. (A) MDA-MB-231 cell were stimulated with PMA (0.2 μ M) for 1 h after the pretreatment with PD98059 (PD, 50 μ M), SB203580 (SB, 20 μ M), or LY294002 (LY, 50 μ M) for 1 h. EMSA were performed with radioactive-labeled NF- κ B or AP-1 probe. (B) The luciferase activity was in MDA-MB-231 cells transfected with pTAL-Luc, pNF- κ B-Luc or pAP-1-Luc. The transfected cells were treated with PMA (0.2 μ M) for 8 h after the pretreatment with PD98059, SB203580, or LY294002 for 1 h. Data for the NF- κ B-, AP-1-dependent luciferase activity were normalized to β -galactosidase activity from co-transfection of pRSV β -galactosidase. The data represent the mean \pm SE of three independent experiments. * $p < 0.01$ versus PMA-treated cells. (C) Cells were stimulated with PMA (0.2 μ M) for 16 h after the pretreatment with PD98059, SB203580 or LY294002 for 1 h. Supernatants were collected and equal amounts of protein were loaded onto a gelatin-containing polyacrylamide gel for MMP-9 gelatinase activities.

acting regulatory elements에 위치하여 NF- κ B와 AP-1은 PMA에 의해 MMP-9 유전자가 발현될 때 필수적인 전사 인자인 것으로 알려져 있다.²¹⁾ Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 수행한 결과 MDA-MB-231 세포를 PMA로 자극하면 NF- κ B와 AP-1의 DNA 결합이 현저히 증가되며 이러한 증가는 KPS-A에 의해 억제되었다(Fig. 2A). PMA로 유도한 NF- κ B와 AP-1에 의한 전사 활성화를 KPS-A가 억제하는지 확인하고자 pNF- κ B-Luc와 pAP-1-Luc reporter plasmid를 transient transfection한 MDA-MB-231 세포에서 luciferase 활성을 측정하였다. pTAL-Luc vector를 넣은 세포의 경우 PMA에 의한 luciferase 활성 변화를 보이지 않은 반면 pNF- κ B-Luc reporter plasmid를 넣은 세포의 경우 PMA에 의해 luciferase 활성이 3.9배 증가되었고 pAP-1-Luc reporter plasmid를 넣은 세포에서는 luciferase 활성이 2.5 배 증가하였다. NF- κ B와 AP-1을 통해 PMA에 의해 증가된 luciferase 활성은 KPS-A에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 2B). 이어서 세포신호전달 단백질에 대한 효과를 western blotting으로 분석한 결과, PMA로 처리된 MDA-MB-231 세포에서 ERK1/2, p38 MAPK와 Akt의 인산화가 현저히 증가하였으며, PMA에 의해 유도된 ERK1/2와 Akt의 인산화가 KPS-A에 의해 억제되었으나 p38 MAPK의 인산화는 KPS-A에 의해 감소되지 않았다(Fig. 2C).

PMA로 자극한 MDA-MB-231 세포에서 ERK1/2, p38 MAPK, Akt의 활성화가 NF- κ B와 AP-1에 의한 전사 활성 및 MMP-9의 발현을 조절하는지 밝히기 위해, MDA-MB-231 세포를 ERK1/2의 억제제인 PD98059, p38 MAPK의 억제제인 SB203580과 Akt의 억제제인 LY294002로 전처리한 후, PMA로 자극하여 NF- κ B와 AP-1에 대한 EMSA (Fig. 3A)와 luciferase reporter assay (Fig. 3B)를 수행하였다. 실험 결과 SB203580과 LY294002에 의해 NF- κ B의 DNA 결합 활성과 luciferase 활성이 현저히 억제되었으며, AP-1의 DNA 결합 활성과 luciferase 활성은 PD98059에 의해서만 유의적으로 억제되었다. Zymography로 세포 배양액 내 MMP-9의 활성을 조사한 결과, PD98059, SB203580, LY294002에 의해 MMP-9의 분비가 감소되었으며, 특히 PD98059와 LY294002에 의해 현저히 감소되었다(Fig. 3C). 따라서 MDA-MB-231 유방암 세포를 PMA로 자극하면 p38 MAPK와 Akt가 활성화되어 NF- κ B에 의한 전사 활성이 증가될 뿐만 아니라 ERK가 활성화되어 AP-1에 의한 전사 활성도 증가되어 MMP-9의 활성이 증가된다는 것을 알 수 있다.

결론

본 연구에서는 위장 질환이나 간 질환에 대한 한약재로 널리 사용되고 있는 해동피에서 분리된 KPS-A가 전이성 유방암 세포의 침윤을 억제하는지 조사하였으며, KPS-A가 암세포의 침윤을 억제하는 기전을 밝히기 위하여 MMP-9의 활성 및 MMP-9의 활성화에 관여하는 세포신호전달 단백질의 변화를 조사하였다.

KPS-A는 PMA로 자극한 MDA-MB-231 인체 전이성 유방암 세포의 침윤을 세포독성이 없는 농도에서 유의적으로 억제하였으며, PMA에 의해 증가된 MMP-9의 분비를 농도 의존적으로 억제하였다. PMA로 처리한 MDA-MB-231 세포의 배양액내 MMP-9의 증가는 p38 MAPK와 Akt 활성화를 통한 NF- κ B에 의한 전사 활성의 증가와 ERK 활성화를 통한 AP-1에 의한 전사 활성의 증가 때문으로 확인되었다. KPS-A는 PMA로 자극한 MDA-MB-231 세포에서 Akt/NF- κ B pathway와 ERK1/2/AP-1 pathway를 억제함으로써 MMP-9의 활성을 억제하고 결과적으로 MDA-MB-231의 침윤을 억제하였다. 따라서 KPS-A가 유방암 세포의 전이를 억제할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소지원사업(과제번호 KRF-2005-005-J05902)에 의해 이루어졌습니다.

참고 문헌

- 1) 이경식. 유방암의 진단과 치료의 실제. 서울, 도서출판 의학문화사, pp 186, 2002.
- 2) Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, Opolon P, Menashi S, Soria C, Yeh P, Perricaudet M, Lu H. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice. *Hum Gene Ther* 20, 515-526, 2001.
- 3) Kim YK, Kim RG, Park SJ, Ha JH, Choi JW, Park HJ, Lee KT. In vitro antiinflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bul* 25, 472-476, 2002.
- 4) Park HJ, Kim DH, Choi JW, Park JH, Han YN. A potent anti-diabetic agent from *Kalopanax pictus*. *Arch Pharm Res* 21, 24-29, 1998.
- 5) Park HJ, Kwon SH, Lee JH, Lee KH, Miyamoto K, Lee KT. Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the anti-tumor activity of hederagenin monodesmosides. *Planta Med* 67, 118-121, 2001.
- 6) Alhasan SA, Aranha O, Sarkar FH. Genistein elicits

- pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* 7, 4174-4181, 2001.
- 7) Puli S, Lai JC, Bhushan A. Inhibition of matrix degrading enzymes and invasion in human glioblastoma (U87MG) cells by isoflavones. *J Neurooncol* 79, 135-142, 2006.
 - 8) Liu H, Yu GY. Antimetastatic effects of genistein on salivary adenoid cystic carcinoma in vivo. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 39, 373-375, 2004.
 - 9) Li Y, Kucuk O, Hussain M, Abrams J, Cher ML, Sarkar FH. Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 66, 4816-4825, 2006.
 - 10) Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Shin BA, Ahn BW, Jung YD. EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Res* 24, 747-753, 2004.
 - 11) Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasher A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 73, 1434-1445, 2007.
 - 12) Shishodia S, Potdar P, Gairola CG, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis* 24, 1269-1279, 2003.
 - 13) Lee SO, Jeong YJ, Im HG, Kim CH, Chang YC, Lee IS. Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 165-171, 2007.
 - 14) Gum R, Lengyel E, Juarez J, Chen JH, Sato H, Seiki M, Boyd D. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1- independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem* 271, 10672-10680, 1996.
 - 15) Simon C, Goepfert H, Boyd D. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res* 58, 1135-1139, 1998.
 - 16) Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 23, 4319-4330, 2000.
 - 17) Cho A, Graves J, Reidy MA. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2527-2532, 2000.
 - 18) Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol* 198, 417-427, 2004.
 - 19) McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)-mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 176, 255-265, 1998.
 - 20) Lee CW, Lin CC, Lin WN, Liang KC, Luo SF, Wu CB, Wang SW, Yang CM. TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L799-812, 2007.
 - 21) Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB Journal* 18, 1670-1681, 2004.