

# 인체유방암세포에서 Cyclooxygenase-2 활성 및 Prostaglandin E2 생성에 미치는 어성초 추출물의 영향

정일홍 · 조인주 · 박 철<sup>1</sup> · 최영현<sup>1</sup> · 박동일\*

동의대학교 한의과대학 폐계내과학교실, 1: 동의대학교 한의과대학 생화학교실

## Antiproliferative effect of *Houttuynia cordata* Thunb was Associated with the Inhibiton of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Breast Carcinoma Cells

Il Hong Jung, In Joo Jo, Cheol Park<sup>1</sup>, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Dong Il Park\*

*Department of Internal Medicine, Dongeui University College of Oriental Medicine,  
1: Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine*

*Houttuynia cordata* Thunb, well known as 'E-Sung-Cho' in Korea, is a traditional medicinal plant generally used in Oriental medicine therapy. In the present study, we investigated the effect of water extract of *H. cordata* (WEHC) on the growth of human breast carcinoma MCF-7 cells. Exposure of MCF-7 cells to WEHC resulted in growth inhibition and apoptosis in a dose-dependent manner as measured by MTT assay and fluorescent microscope. The anti-proliferative effect of WEHC was associated with a dose-dependent up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in a p53-independent fashion. We found WEHC decreased the levels of cyclooxygenase (COX)-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression without significant changes in the expression of COX-1, which was correlated with a decrease in prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis. Taken together, these findings provide important new insights into the possible molecular mechanisms of the anti-cancer activity of *H. cordata*.

Key words : *Houttuynia cordata* Thunb, MCF-7, p21, COX-2, PGE<sub>2</sub>

### 서 론

최근 급격한 산업의 발전과 식생활의 변화에 따라 암의 발생률은 급격히 증가되고 있는 추세이지만, 아직도 암의 발생기전이 완전히 밝혀져 있지 않은 상태이다. 이를 극복하기 위하여 많은 항암제가 개발되고 있으나, 현재 사용되어지고 있는 다양한 항암제는 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하게 나타나고 있기 때문에 암 치료시의 문제점으로 지적되고 있다. 또한 항암제들은 암세포의 증식을 효율적으로 억제할 수 있지만 많은 경우 정상 세포에 대해서도 심각한 독성 효과를 나타내고 있다. 따라서 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여 생약 및 천연물을 이용한 항암제 및 보조 치료제의 개발이 지속적으로

시도되어지고 있다. 이러한 관점에서 오랜 동안 임상적으로 사용되어져 온 한약제를 이용한 항암제, 암예방제 및 암치료 보조제의 개발은 매우 큰 장점을 지닐 수 있기 때문에 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>1,2)</sup>.

어성초(*Houttuynia cordata* Thunb.)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로 우리나라와 일본 등지에서 여러 가지 질병의 치유와 예방의 목적으로 널리 사용되어지고 있다. 본 초강목에 의하면 사혈, 해독, 소염 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 임상에서는 백말해, 기관지염, 폐렴, 편도선염 등에 응용되고 있으며, 만성 피부질환, 이뇨, 소염 등의 목적으로 한방에서 사용되고 있다<sup>3)</sup>. 최근 연구에 따르면 어성초의 추출물은 혈압 강하작용과 혈당강하작용, 항균작용, 항바이러스작용, 항암작용, 항돌연변이작용, 항염증작용 및 항알레르기작용, 항산화작용 등이 있음이 밝혀졌다<sup>4,5)</sup>. 또한 어성초 추출물은 마우스 대식세포의 항체 생산능을 향상시키거나<sup>6)</sup>, 사람의 B 림프구와 T 림프구의

\* 교신저자 : 박동일, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : dipark@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8650

· 접수 : 2006/02/08 · 수정 : 2006/05/24 · 채택 : 2006/06/12

활성을 증가시키며<sup>10)</sup>, insulin-like growth factor (IGF)- $\gamma$ 와 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 면역조절제에 의해 대식세포가 자극이 되었을 경우 사이토카인의 분비량을 증가시킴으로서 면역 반응을 향상시킨다는 등의 보고가 있다<sup>11)</sup>. 이러한 결과들은 어성초 추출물에 풍부하게 함유되어 있는 다양한 종류의 alkaloids 와 polyphenol류에 의한 작용으로 추정되어지고 있다<sup>12-14)</sup>.

이러한 선행연구의 결과들에서 어성초 추출물이 강력한 항암 및 암예방 효과도 있을 것으로 추정되어, 이와 연관된 연구들도 부분적으로 진행이 된 바 있는데, Jeong et al.<sup>15)</sup>은 다양한 종류의 정상 및 암세포주에서 어성초 추출물의 세포독성 정도를 비교하였으며, Bae et al.<sup>16)</sup>은 흑색종 암세포 모델을 이용하여 어성초 추출물의 항종양 및 면역반응의 정도를 조사한 바 있다. Cha et al.<sup>17)</sup>은 인체 위암 및 대장암 세포의 생육에 미치는 어성초 함유 발효 조성물의 영향을 조사하였으며, Chang et al.<sup>18)</sup>은 다양한 종류의 백혈병 세포주를 이용한 어성초 추출물의 영향을 조사하여 어성초 추출물의 항암효능을 제시한 바 있다.

그러나 현재까지 발표된 연구 결과들은 어성초 추출물에 의한 세포독성의 정도를 비교한 경우가 대부분이며, 기본적인 분자 생물학적 기전에 대한 해석이 이루어진 바는 없다. 본 연구에서는 강력한 항암작용을 가질 것으로 예상되는 어성초 추출물에 의한 항암작용 기전을 밝히기 위한 목적으로 인체 유방암 세포주를 대상으로 어성초 열수 추출물에 의한 암세포 증식 억제와 연관된 몇 가지 관련 유전자들의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 어성초는 동의대학교 부속 한방병원에서 제공 받았으며, 100 g을 1,000 ml의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 um의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 준비된 어성초 수용액 추출물(water extract of *H. cordata*, WEHC)은 3차 증류수에 용해하여 멸균과 여과 과정을 거쳐 배지에 적정 농도로 희석하여 처리하였다. MCF-7 인체 유방암 세포는 한국생명공학연구소(KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양은 선행방법에 준하여 90%의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다<sup>19)</sup>. 배지는 매 48시간마다 교환해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

### 2. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 인체 유방암 세포를 1 X 10<sup>5</sup>개/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 어성초 추출물을

배지에 희석하여 각 well 당 1 ~ 4 mg/ml의 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

### 3. 위상차 현미경을 이용한 세포의 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100 mm petri dish에 세포를 6 × 10<sup>5</sup> 개/ml 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 어성초 추출물을 1 ~ 4 mg/ml의 농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 사진을 촬영하였다.

### 4. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

어성초 추출물 처리에 의한 MCF-7 유방암세포의 apoptosis 유발 여부 확인을 위한 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 준비된 세포를 모은 다음 37% formaldehyde 용액과 PBS를 1 : 9의 비율로 섞은 fixing solution을 모아진 세포에 500  $\mu$ l 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 PBS 200  $\mu$ l를 넣어서 충분히 섞은 후, slide glass 위에 80  $\mu$ l 정도 떨어뜨려 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. PBS로 2 ~ 3회 washing하고 PBS가 다 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco)을 첨가하여 상온에서 10분간 고정하였다. 그 후 다시 PBS로 washing하고 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액을 세포가 고정된 slide glass 위에 적당량을 떨어뜨린 후 빛을 차단하고 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분하게 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 인체 유방암 세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

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

정상 및 어성초 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 PBS로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenymethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM dithiothreitol (DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간

반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량 한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분 (5분간 3번)정도 세척하였다. 준비된 membrane에 1차 antibody를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척 (15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 antibody에 맞는 2차 antibody (PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척 (10분간 4번)하고 Enhanced Chemiluminoesence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science에서 구입하였다.

#### 6. RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

상기와 동일한 조건에서 준비된 암세포를 PBS로 세척하고 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer (Table 1), DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1x TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV) 하에서 확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

#### 7. Prostaglandin E<sub>2</sub>의 측정

PGE2의 생성에 미치는 여성초 추출물의 영향을 측정하기 위하여 enzyme immunoassay (EIA) kit는 Amersham Corp.에서 구입하여 사용하였다. 먼저 준비된 암 세포를 96-well plate에 well 당 160 μl의 배지에 10<sup>4</sup> cell/well 정도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 여성초 추출물을 농도별로 배지에 희석하여 처리하였다. 이때 마지막 배지의 양을 모두 180 μl로 통일시켰다.

48시간 후 배지에 2.5%의 dodecyltrimethylammonium bromide 가 함유된 buffer를 20 μl 첨가하여 총 배지의 양이 200 μl 되게 한 후 lysis가 잘 일어나도록 pipetting을 수회 실시하였다. 상온에 약 10분간 incubation 한 후 Trypan blue를 이용하여 암세포의 수를 계수하였다. 약 50 μl의 lysate를 취하여 kit에 준한 protocol에 따라 EIA를 실시한 후 450 nm의 파장에서 얻어진 값 을 기준으로 PGE2의 양을 추정하였다.

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
p53	Sense	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Antisense	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sense	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Antisense	5'-GGG-CCG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
COX-1	Sense	5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3'
	Antisense	5'-GTC-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3'
COX-2	Sense	5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3'
	Antisense	5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
iNOS	Sense	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisense	5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3'
GAPDH	Sense	5'-CGG-AGT-CAA-CCG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisense	5'-AGG-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

## 결 과

#### 1. 암세포의 증식 및 형태에 미치는 여성초 추출물의 영향

인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포의 증식에 미치는 여성초 추출물(WEHC)의 영향을 알아보기 위해 이를 48시간동안 농도 별로 처리한 후 MTT assay를 이용하여 조사하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 여성초 추출물의 처리 농도가 증가함에 따라 유방암의 증식이 강하게 억제됨을 알 수 있었다. 특히 3 mg/ml의 여성초 추출물을 처리하였을 경우 50% 이상의 증식억제 효과가 있었고, 4 mg/ml의 농도에서는 약 70% 정도의 증식 억제 효과가 나타났다. 이상의 결과들에서 여성초 추출물이 처리된 배지에서 배양된 암세포는 여성초 추출물의 처리농도 의존적으로 정상적인 암세포 증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

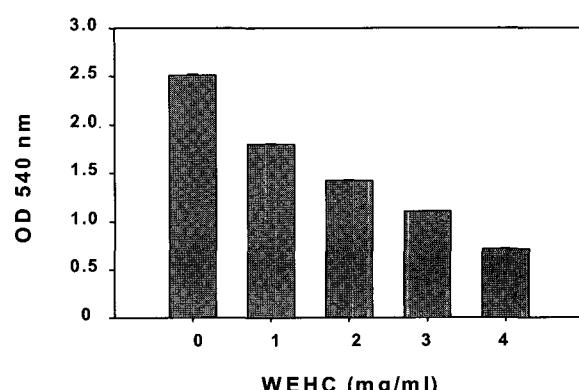
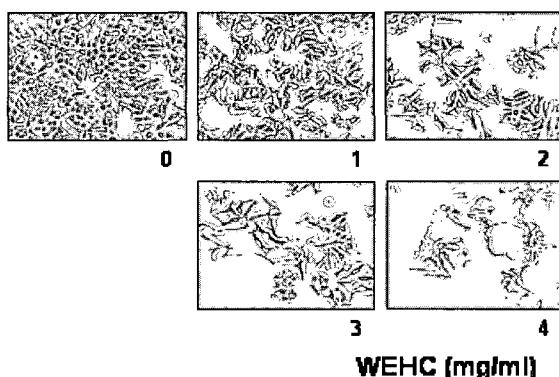


Fig. 1. Growth inhibition and morphological changes of human breast carcinoma MCF-7 cells after treatment with water extract of *H. cordata* (WEHC). Cells were plated at 1x10<sup>5</sup> cells per 60-mm plate, and incubated for 24 h. Cells were treated with variable concentrations of WEHC for 48 h. The growth inhibition was measured by the metabolic-dye-based MTT assay. Results are expressed as the means ± S.E. of three independent experiments.

## 2. 여성초 추출물 처리에 의한 암세포의 형태변화

여성초 추출물의 처리에 따른 암세포의 전체적인 형태변화를 알아보기 위하여 여성초 추출물을 다양한 농도로 처리하여 48시간동안 배양한 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이 여성초 추출물의 농도 증가에 따른 암세포의 심한 형태적 변화가 관찰되었다. 특히 여성초 추출물의 농도가 증가할수록 암세포의 밀도가 감소하면서 길고 분지를 형성하는 듯한 *dendrite-like*한 구조로 바뀌었으며, 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가함을 알 수 있었다. 이는 인체 유방암세포에 여성초 추출물의 처리농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 여성초 추출물의 처리에 따른 증식억제와 부합되는 결과였다.



**Fig. 2. Morphological changes and induction of apoptotic bodies of human breast carcinoma MCF-7 cells after treatment with WEHC.**  
(A) Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells per 60-mm plate, and incubated for 24 h. The cells were incubated with variable concentrations of WEHC. After 24 h incubation cells were sampled and examined under light microscopy. Magnification, X200. (B) Cells were treated with WEHC for 48 h, and fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

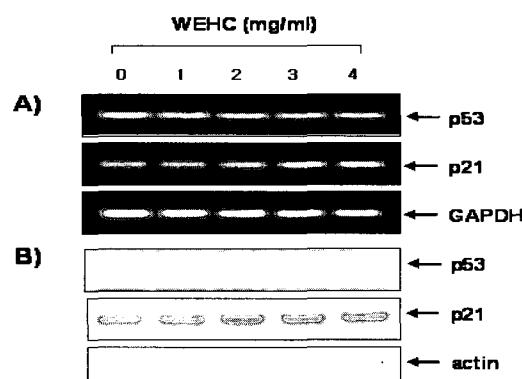
## 3. 여성초 추출물에 의한 암세포의 apoptosis 유발

여성초 추출물의 처리에 의한 증식을 감소가 apoptosis의 유발과 연관성이 있을 것으로 기대되어 여성초 추출물 처리 후 암세포 핵의 형태변화를 DAPI 염색을 통하여 비교 조사하였다. Fig. 2B에서 나타난 바와 같이 정상 배지에서 배양된 세포의 경우 핵의 전체가 완전한 형태로 염색되는 양상을 보였으나 여성초 추출물의 농도가 증가할수록 apoptosis 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 염색질의 응축된 형태인 apoptotic body의 형성 정도가 증가되었다. 이는 여성초 추출물의 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 결과이다.

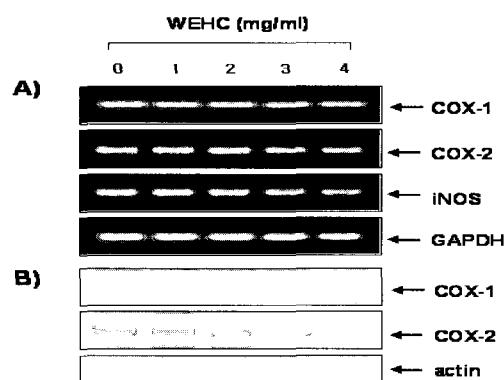
## 4. p53 및 p21(WAF1/CIP1)의 발현에 미치는 여성초 추출물의 영향

다음은 여성초 추출물의 처리에 의한 유방암세포의 증식억제 현상이 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 중 가장 중요한 p53 및 전체적인 세

포주기 진행 조절에 중요한 역할을 하는 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21(WAF1/CIP1)의 발현에 미치는 여성초 추출물의 영향을 조사하였다. Fig. 2A 및 B의 결과에서 볼 수 있듯이 p53 유전자의 경우는 전사 및 번역 수준에서 큰 변화가 관찰되지 않았지만, p21 유전자의 발현은 여성초 추출물의 처리에 따라 전사 및 번역 수준에서 모두 증가하였음을 알 수 있었다. Cdk inhibitor인 p21은 p53의 발현 증가에 의하여 조절될 수 있고 또한 p53 비의존적으로 발현이 조절될 수도 있으며, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점에서 여성초 추출물의 처리에 의하여 p53의 발현과 상관없이 p21 유전자가 증가되었다는 점은 매우 흥미로운 결과라고 사료된다.



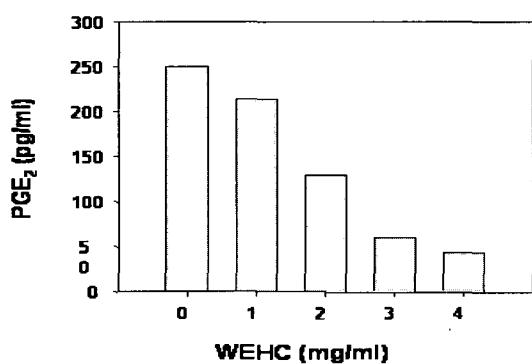
**Fig. 3. Induction of Cdk inhibitor p21 expression by WEHC in human breast carcinoma MCF-7 cells.** (A) After 48 h incubation with WEHC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with p53 and p21 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.



**Fig. 4. Induction of COX-2 and iNOS expression by WEHC in human breast carcinoma MCF-7 cells.** (A) After 48 h incubation with WEHC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with COX-1, COX-2 and iNOS primers 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 then cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

### 5. COXs의 발현 및 PGE<sub>2</sub>의 생성에 미치는 여성초 추출물의 영향

이상의 여성초 추출물 처리에 의한 암세포의 증식억제와 염증성 질환이나 암화 개시 단계에서 중요한 역할을 하는 cyclooxygenases (COXs)의 발현 및 그들 산물에 해당되는 prostaglandin (PG) 생성 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현과의 상관성을 조사하였다. Fig. 3A의 결과에서 볼 수 있듯이 전사수준에서 COX-1의 발현에는 거의 변화가 없었으나, iNOS 및 COX-2의 경우 여성초 추출물 처리 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. 번역수준에서도 Fig. 3B에서 보는 바와 같이 COX-1의 발현은 변화가 없었지만 COX-2의 발현은 여성초 추출물의 처리 농도 증가에 따라 매우 유의적으로 감소되었다. 또한 COX-2에 의해 생성이 조절되는 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 경우도 Fig. 4의 결과에서 나타난 바와 같이 여성초 추출물 처리농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 여성초 추출물 처리에 의한 암세포의 증식 억제에는 iNOS 및 COX-2의 선택적 발현 억제와 이로 인한 PGE<sub>2</sub>의 생성 저해 작용이 있는 것으로 생각된다.



**Fig. 5. Inhibition of PGE<sub>2</sub> production in human breast carcinoma MCF-7 cells after exposure to WEHC.** Cells were treated with the indicated concentrations of WEHC for 48 h and collected. The PGE<sub>2</sub> accumulation in the medium was determined by an EIA kit as described in materials and methods. Data represent the mean values of two independent experiments.

## 고 찰

본 연구에서는 인체 유방 암세포주 MCF-7을 대상으로 여성초의 항암작용 기전의 해석을 시도하였다. 본 연구에서 설정된 조건에서 여성초 열수 추출물은 처리 농도 의존적으로 암세포의 증식을 억제하였으며, 이는 암세포의 심한 형태적 변형과 핵 내 apoptotic body의 형성과 연관성이 있었다. 암세포의 형태적 변형은 부착력 상실에 의한 배지 내로의 부유 및 신경세포로의 분화 가능성을 제시하여 주었으나 이에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 그러나 전형적인 apoptosis가 유발되었을 경우 endonuclease의 활성에 의한 DNA의 절단 현상에 수반된 염색질 응축 및 apoptotic body의 형성은 여성초 추출물 처리에 의한 MCF-7 암세포의 증식 억제가 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 의미하여 주는 결과이다. 여성초 추출물에 의한 암세포의 증식억제에 관한 선행연구가 부분적으로 이루어 진 바 있으나, 사용한 여성초 추출물의 추출 방법 및 실험 조건 등의 차이로 인

하여 직접적인 비교는 어려웠다<sup>15-18)</sup>. 그러나 정상세포에서 보다 암세포에서 강력한 암세포증식 억제 작용이 있었다는 Cha et al.<sup>17)</sup>의 결과를 고려할 경우 여성초 추출물은 암세포 선택적인 증식 억제 효과가 있음을 간접적으로 알 수 있었다. 특히 apoptosis의 유도 현상은 여성초 추출물의 강력한 항암작용 가능성을 시사하는 결과로서 이에 관한 기전 해석이 요구되어진다.

한편 세포주기 조절에서의 음성 조절자로 작용하는 Cdk inhibitors는 Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데<sup>20)</sup>, 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21(WAF1/CIP1)은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 세포주기 G1기뿐 아니라 G2/M기의 진행을 억제하기도 한다(Li et al., 1994; Taylor and Stark, 2001). p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주에 따라서 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화된다고도 알려져 있으며<sup>20-23)</sup>, 아울러 대부분의 DNA damaging agent에 의한 세포증식 억제에는 p21과 관련이 있음이 증명되어져왔다<sup>24-27)</sup>. 따라서 본 실험에서는 여성초 추출물 처리에 의한 인체 유방암 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발과정에서 종양 억제 유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 관련 여부를 조사하였다. Fig. 3의 결과에서와 같이 종양 억제 유전자인 p53의 경우는 mRNA 및 단백질 수준에서는 발현에 여성초 추출물은 큰 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있었다. 하지만 Cdk inhibitor인 p21의 경우는 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 여성초 추출물 처리농도 의존적으로 점차 증가되는 것으로 관찰되었다. 이는 p21의 발현증가가 p53 비의존적인 경로를 통하여 있을 가능성이 있음을 의미하며, 이러한 p21의 발현 변화가 어느 정도 여성초 추출물 처리에 의한 유방암 세포의 증식억제에 관여할 것으로 추정된다.

최근 염증성 질환을 포함한 다양한 생체 반응에서 PG는 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 향이 최근 밝혀지고 있다<sup>28,29)</sup>. PG의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하고 있다. 그러나 COX-2는 다양한 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들에 의해 자극에 의한 유도성 isoform으로서 세포성장을 촉진하고 apoptosis를 억제하며 세포의 유동성 및 부착성을 강화시킴으로서 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다<sup>30,31)</sup>. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 iNOS가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다<sup>32)</sup>. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2의 선택적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다<sup>32-34)</sup>. 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자 발현을 유도하는 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)에 의하여 COX-2 발현이 조절된

다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다<sup>32,34)</sup>. 또한 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 따라서 어성초 추출물이 처리된 MCF-7 유방암 세포의 증식 억제 및 apoptosis 유발에 이러한 유전자들이 관여하는지를 조사하여 보았다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 COX-1의 발현에 어성초 추출물은 아무런 영향을 주지 못하였으나, COX-2의 발현은 특히 단백질 수준에서 매우 유의적으로 감소함을 알 수 있었다. 그리고 iNOS의 전사 수준 역시 다소 감소되었음을 알 수 있었다. 어성초 추출물에 의한 COX-2의 선택적 발현 억제 현상이 PGE2 생성 저하와 직접적인 연관성이 있는지의 여부를 조사한 결과, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 어성초 추출물 처리 농도의 증가에 따라 PGE2의 생성이 매우 유의적으로 감소하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 어성초 추출물 처리에 의한 MCF-7 유방암 세포의 증식억제는 Cdk inhibitor p21 및 COX-2가 중요한 역할을 할 것으로 추정되어지며, 본 연구의 결과는 향후 추가적인 연구의 진행을 통하여 어성초 추출물의 보다 구체적인 암세포 증식억제 기전을 이해할 수 있는 기초자료로서 활용될 것이다.

## 결 론

본 연구에서는 다양한 약리작용을 가진 것으로 알려진 어성초 추출물의 항암작용을 조사하기 위하여 인체 유방암세포 MCF-7의 증식에 미치는 어성초 열수 추출물의 영향을 조사하였다. 어성초 추출물이 처리된 MCF-7 세포는 어성초 추출물 처리 농도 의존적으로 세포의 증식이 억제 및 apoptosis 유발과 연관성이 있음을 알 수 있었으며, 이는 종양억제 유전자 p53 비의존적인 Cdk inhibitor p21의 발현 증가와 연관성이 있었다. 어성초 추출물은 COX-1의 발현에는 변화를 주지 않았으나, COX-2 발현의 경우 전사 및 번역 수준에서 어성초 추출물의 처리 농도가 증가할수록 매우 유의적으로 감소되었다. 따라서 어성초 추출물 처리에 따른 PGE2의 생성 저하는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 2005년도 동의대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

## 참고문헌

1. Beinfield, H. and Korr gold, E. Chinese medicine and cancer care. *Altern. Ther. Health Med.* 9, 8-52, 2003.
2. Monti, D.A. and Yang, J. Complementary medicine in chronic cancer care. *Semin. Oncol.* 32, 225-231, 2005.
3. Yoo, H.T., Noh, J.S. and Lim, Y.D. *Hyangyak Jipsungbang*, Haenglim Publishing Co., Seoul, p 717-718, 1977.
4. Wang, Y.S. *Jungyi Yakli Yo Yngyong*. People's Sanitation Publishing Co., Peking, p 709-710, 1983.
5. Choi, Y.H., Kim, E.Y., Park, K.Y., Rhee, S.H. and Lee, W.H. Antimutagenic effects of the juice and boiling water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 23, 916-921, 1994.
6. Chung, C.K., Ham, S.S., Lee, S.Y., Oh, D.H., Choi, S.Y., Kang, I.J. and Nam, S.M., Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipies and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 205-211, 1999.
7. Song, J.H., Kim, M.J., Kwon, H.D. and Park, I.H., Antimicrobial activity of fractional exyracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32, 1053-1058, 2003.
8. Li, G.Z., Chai, O.H., Lee, M.S., Han, E.H., Kim, H.T. and Song, C.H. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1864-1868, 2005.
9. Kim, H.J. Biological effects of *Houttuynia cordata* Thunb extract on murine and human immuno system. MS Thesis, Seoul National University, 2000.
10. Chun, E.Y. Partial purification of *Houttuynia cordata* Thunb extract and characterization of its immunological activities in human. MS Thesis, Seoul National University, 1997.
11. Kim, J., Ryu, H.S., Shin, J.H. and Kim, H.S. In vitro and ex vivo supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34, 167-175, 2005.
12. Kim, S.K., Ryu, S.Y., No, J., Choi, S.U. and Kim, Y.S. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* 24, 518-521, 2001.
13. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Shon, G.M., Lee, H.J. and Heo, J.S. Composition of quercetin and soluble tanin in *Houttuynia cordata* Thunb according to growth stages and plant parts. *Kor. J. Medicinal Corp Sci.* 10, 12-16, 2002.
14. Toda, S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide in vitro. *J. Med. Food.* 8, 266-268, 2005.
15. Jeong, H.W., Choi, J.H. and Jin, C.S. Effects of water extracts of *Flos Lonicerae* and *herba* on the proliferation of human cancer cell lines. *Kor. J. Oriental Med. Pathol.* 10, 126-132, 1996.
16. Bae, W.Y., Go, H.G. and Kim, C.H. Experimental study on the effects of heral acupuncture on the growth of melanoma B16 in mice. *J. Kor. Acupuncture Moxibustion Soc.* 18, 186-201, 2001.
17. Cha, J.Y., Jeon, B.S., Park, J.W., Moon, J.C. and Cho, Y.S.

- Effects of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* and *Houttuynia cordata* on growth of human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47, 202-207, 2004.
18. Chang, J.S., Chiang, L.C., Chen, C.C., Liu, L.T., Wang, K.C. and Lin, C.C. Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *Am. J. Chin. Med.* 29, 303-312, 2001.
  19. Choi, Y.H. Proteasome-mediated degradation of BRCA1 protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 19, 687-693, 2001.
  20. Harper, J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* 29, 91-107, 1997.
  21. Datto, M.B., Yu, Y. and Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor  $\beta$  responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 28623-28628, 1995.
  22. Zeng, Y.X. and El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12, 1557-1564, 1996.
  23. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y. and Zhang, L. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 164-173, 2000.
  24. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704, 1993.
  25. Tchou, W.W., Rom, W.N. and Tchou-Wong, K.M. Novel form of p21 (WAF1/CIP1/SDII) protein in phorbol ester-induced G2/M arrest. *J. Biol. Chem.* 271, 29556-29560, 1996.
  26. Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. and Reed, S.I. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell Biol.* 18, 546-557, 1998.
  27. Musgrove, E.A., Davison, E.A. and Ormandy, C.J. Role of the CDK Inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: Insights from knockout mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 9, 55-66, 2004.
  28. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 15, 821-833, 2001.
  29. Thun, M.J., Henley, S.J. and Patrono, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 252-266, 2002.
  30. Vainio, H. Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? *Int. J. Cancer* 94, 613-614, 2001.
  31. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A. and Schmoll, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 411-417, 2001.
  32. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Mutat. Res.* 480-481, 243-268, 2001.
  33. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S. and Horii, M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79, 1469-1477, 1999.
  34. Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107, 135-142, 2001.