

단삼 유래 단일 물질 cryptotanshione의 전립선 암주에서의 HIF-1alpha와 STAT3 억제를 통한 신생혈관억제효과

이효정* · 홍상혁 · 김성훈

경희대학교 한의과대학

Anti-angiogenic Effect of Cryptotanshinone through Inhibition of HIF-1alpha and STAT3 in Prostate Cancer Cells

Hyo Jeong Lee*, Sang Hyuk Hong, Sung Hoon Kim

Korean Medicine, Kyunghee University

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a transcription factor that regulates various cellular processes such as cell survival, angiogenesis and proliferation. In the present study, we examined that Cryptotanshinone(CT), a tanshinone from oriental traditional medicinal herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza Bunge*), had the inhibitory effects on hypoxia-mediated activation of STAT3 in androgen independent human prostate cancer PC-3 cells. CT inhibited the protein expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1 α) under hypoxic condition. Consistently, CT blocked hypoxia-induced phosphorylation and nuclear accumulation of STAT3. In addition, CT reduced cellular of vascular endothelial growth factor (VEGF), a critical angiogenic factor and a target gene of STAT3 induced under hypoxia. Of note, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay revealed that CT inhibited binding of STAT3 to VEGF promoter. Taken together, our results suggest that CT has anti-angiogenic activity by disturbing the binding STAT3 to the VEGF promoter in PC-3 cells.

Key words : Danshen, *Salvia miltiorrhiza Bunge*, Cryptotanshinone, HIF-1 α , STAT-3

서 론

STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)는 STAT 단백질 분류 중 하나이며, 여러 암 세포에서 활성화 되어져 있다¹⁾. 사이토카인들과 성장인자들에 의해 활성화된 STAT3 단백질들은 세포질에서 핵내로 이동하며, 세포사멸 억제, 세포증식, 신생혈관과 연관있는 유전자들의 프로모터와 직접 결합하여 암발달에 기여한다²⁾. 최근 연구에 의하면 STAT3는 고형암 발달과정에서 형성되는 저산소환경에서 활성화 되어짐이 보고되고 있다^{3,4)}. 암세포의 과발달로 인하여 저산소환경에 직면하게 되는데 이때 많이 활성화 되는 유전자가 HIF-1 α 로 저산소 환경에서 더욱더 안정화 되게 되며, 암세포의 발달을 촉진 시키게 된다. 최근 STAT3와 HIF-1 α 는 암연구에 있어서 새로운 표적으

로 떠오르고 있다⁵⁾.

Cryptotanshinone (CT)는 단삼 (*Salvia miltiorrhiza Bunge*)으로 부터 분리된 tanshinone계 물질중의 하나이다. 예로부터 한의학에선 관상동맥관련 질환인 고지혈증, 허혈성질환, 만성신장병, 만성간염 그리고 알츠하이머병 치료에 이용 되었다⁶⁻⁹⁾. 최근 연구에서는 단삼의 항암효과에 대해 보고되고 있다¹⁰⁾. tanshinone 계통의 물질들의 암세포에서의 세포성장 억제에 대해 보고 하고 있다¹⁰⁾.

CT는 cyclin D1의 감소에 의한 세포증식억제를 보였으며, Rb (retinoblastoma) 단백질의 인산화를 감소시키며, 세포주기 G1부분에 정지가 되어 세포증식억제를 야기함과, STAT3를 억제함이 보고 되어 있다¹¹⁻¹³⁾. 그럼에도 불구하고 아직까지 단삼의 주요성분중 하나인 CT의 혈관형성저해의 분자생물학적 기전연구는 아직까지 이루어진 바가 없다.

이에 본 연구는 CT의 혈관형성저해기전을 HIF-1 α 와 STAT3 신호와 연계하여 연구하였던 바 유의한 결과가 있어 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 이효정, 서울시 동대문구 경희대학교 암예방소개발연구센터

· E-mail : strong79@khu.ac.kr, · Tel : 02-964-2730

· 접수 : 2012/07/06 · 수정 : 2012/08/16 · 채택 : 2012/08/20

재료 및 방법

1. 재료

CT는 단삼으로부터 분리된 것으로 한국화학연구원 유시용 박사님께 받아 실험 하였으며, 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

2. 세포배양

In vitro 실험에 사용된 세포주는 안드로젠 비의존형 전립선 암 세포주인 PC-3 (human prostate cancer cell line)을 사용하였다. PC-3세포주는 RPMI 1640 (Welgene, Korea) 배지에 10% FBS, 1% antibiotic solution (100×, penicillin 10,000 units/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B in 0.85% NaCl, Wellgene, Korea)을 첨가하여 T75 plate에서 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였으며, 70~80% confluence 상태가 되었을 때 실험에 사용하였다.

3. 저산소환경 유도

암세포주에 저산소환경을 유도하기 위해 Hypoxia chamber (Thermo scientific, Rockford, IL)를 이용하여 94% N₂, 5%CO₂, and 1% O₂의 혼합 가스를 공급하여 저산소환경을 만들었다.

4. Western blot analysis

세포를 lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.01% SDS, 1 mM EDTA (pH 8.0), protease inhibitor cocktail 타블렛 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN))를 사용하여 단백질을 분리하였다. 핵과 세포질의 단백질은 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo scientific, Rockford, IL)을 사용하여 분리하였다. 분리된 단백질 시료들은 10% SDS-PAGE gel로 전기영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 이동시킨후 그 membrane을 5% 탈지분유로 블로킹 시키고 1차 항체들로 (HIF-1α:GenTeX, Irvine, CA., STAT3, p-STAT3, pAKT, AKT, ERK, pERK: Cell signaling, Danvers, MA., VEGF: Santa Cruz Biotechnologies, CA., β-actin: Sigma, St. Louis, MO) 4°C에서 하루동안 반응 시킨다. 그후, 2차 항체로 반응한 후 ECL (enchanced chemiluminescence: GE Health care bio-sciences, NJ)를 이용하여 단백질 발현정도를 확인한다.

5. Chromatin immunoprecipitation (ChiP) assay

세포를 100 mm 배양접시에 1.5×10⁶ cells/dish가 되게 배양한 후, CT를 정상배양조건과 저산소환경조건에서 4시간동안 배양한 후 1% formaldehyde 과 0.125 M glycine을 처리한 후, Soluble chromatins은 EZ-Zyme chromatin prep kit (Millipore, Billerica, MA)를 사용하여 분리하고 normal rabbit IgG (EMD biosciences, Gibbstown, NJ), HIF-1α or STAT3의 항체를 이용하여 특정 단백질을 침전시키는 immunoprecipitation을 진행한다. Histone/DNA crosslinks는 65°C에서 5 M NaCl를 4 h 처리하여 풀어준다. phenol/chloroform 과 ethanol precipitation으로

protein과 binding한 DNA를 분리한다. 분리 후 PCR반응을 통해 VEGF promoter 부분을 증폭한다. VEGF promoter using ChiP primers (sense 5' -AGACTCCACAGTGCATACGTG-3' and antisense 5' -AGTGTGTCCCTCTGACAATG-3').

6. siRNA transfection

PC-3 전립선암 세포주에 control, AKT siRNA와 INTERFERRIN siRNA transfection reagent를 이용하여 일시적 transfection을 한다. 24시간 배양 후, CT를 저산소 환경에서 24 시간 처리한다.

7. 통계처리

모든 데이터들은 mean±S.D.로 나타내었으며, 통계적 유의성은 student's t-test를 통해 분석하여 나타내었다.

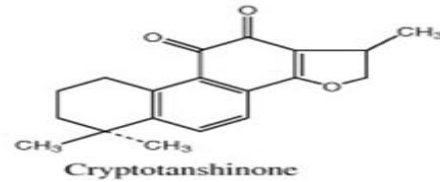


Fig. 1. Chemical structure of Cryptotanshinone from Danshen (*Salvia miltiorrhiza Bunge*).

결과 및 고찰

1. 저산소 환경 전립선 암주에서의 CT 처리에 의한 HIF-1α의 시간별, 농도별 변화

암세포는 빠르고 제어되지 않는 세포성장에 의해 저산소 환경에 노출되고 이를 극복하기 위해 HIF-1α가 발현된다. HIF-1α에 의해 암발달에 도움이 되는 유전자들의 발현이 증가된다. 그러므로, CT의 처리에 의해 HIF-1α가 억제 되어 질 수 있는지를 알아보기 위해 저산소 환경에서 CT를 시간별 처리하였다. 그 결과, CT를 처리하지 않은 대조군에서 6시간 까지는 시간에 따라 HIF-1α의 발현이 증가되다가 8시간 이후로 감소되는 경향을 보였다. CT 처리군에서는 대조군에 비해 HIF-1α의 발현이 현저히 감소 되었으며, 시간별에서는 6시간에서 높은 발현량을 보였다 (Fig. 2A). 6시간 저산소환경과 정상 환경에서의 CT 농도별 처리에 의한 HIF-1α 발현량을 조사한 결과 CT의 처리가 농도 의존적으로 HIF-1α의 발현량이 감소됨을 확인하였다(Fig. 2B).

2. CT 처리에 의한 HIF-1α와 관련된 signaling factor들에 미치는 영향

HIF-1α는 PI3K/AKT^{14,16}와 MAPK/ERK^{15,16}에 signaling pathway와 관련성이 깊은 것으로 알려져 있다. 우리는 CT의 처리로 인한 HIF1-alpha의 감소가 어떠한 signal과 연관성을 알아보기 위해, Hypoxia와 CT를 24시간동안 처리 후 연관성 있는 signal의 대표적 factor들의 발현량을 western blotting을 통해 확인하였다. 확인 결과, Fig. 3에서 보여주듯이, ERK.

phosphorylated ERK에는 아무런 영향을 주지 않는 반면 phosphorylated AKT의 발현이 CT 농도별 처리에 따라 감소하였다. STAT3는 hypoxia에 의해 활성화되는 대표적 전사인자로서 HIF-1a와 유사하게 VEGF의 promoter에 binding 하여 VEGF를 발현유도를 돕는다²⁾. 이때 phosphorylated STAT3의 발현율이 CT 농도별 처리에 따라 감소함을 확인하였다. 이 HIF-1a와 STAT3에 의해 영향을 받는 VEGF의 발현량도 CT의 농도별 처리에 따라 감소하였다.

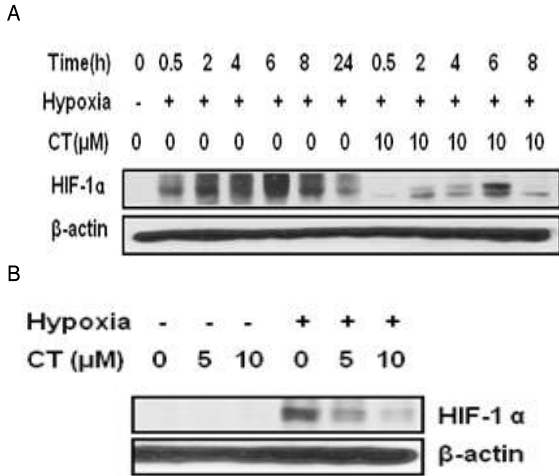


Fig. 2. Effect of Cryptotanshinone of Hypoxia-induced HIF-1α Expression in PC-3cells. (A) Cells were treated with CT(10μM) for 0.5,2,4,6,8, of 24h under hypoxia condition. Cell lysate were prepared and subjected to western blotting to determine HIF-1α protein expression. (B) Cells were treated with various concentrations of CT (0,5,or 10 μM) for 6h uner hypoxia or normoxia condition.

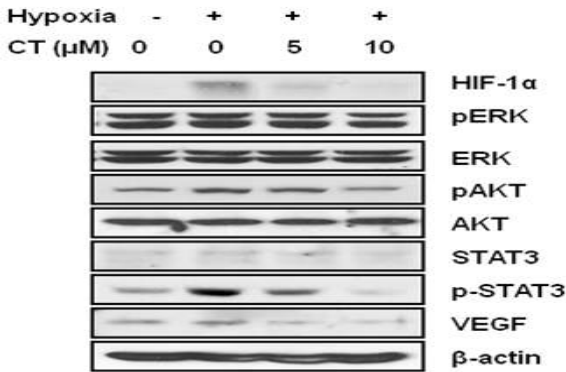


Fig. 3. Effect of CT on hypoxia-mediated AKT, ERK, STAT3 pathway in PC-3cells. The cells were treated with or without CT (5 or 10 μM) under hypoxia for 24h, and Western blotting was performed phospho-AKT, phospho-ERK, phospho-STAT3 and VEGF.

3. CT처리에 의한 저산소환경 전립선 암주에서의 AKT에 의한 HIF-1a의 감소

Fig. 3에서의 결과를 토대로 CT의 처리로 인해 pAKT의 감소가 HIF-1a의 억제와 관련이 있는지를 알아보기 위해, siRNA transfection을 통해 연관성을 검증 하였다. AKT siRNA transfection에 의해 HIF-1a의 발현이 감소되었음을 확인 하였으며, CT 단독 처리 및 동시처리에서도 HIF-1a 발현이 저해 됨을

확인하였다. 이로써 CT의 HIF-1a의 억제효과는 AKT signaling 과 관련이 있음을 확인 하였다(Fig. 4).

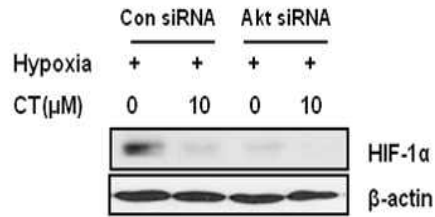


Fig. 4. Effect of CT and/or Akt siRNA on the expression of HIF-1α. Cells were transiently transfected with siRNA for scramble or AKT for 24h and treated with or without CT(10μM) for 24h under hypoxia.

4. CT 처리에 의한 저산소환경 전립선 암주에서의 핵내의 pSTAT3의 감소

HIF-1a와 마찬가지로, STAT3는 전사 인자로서 활성화가 되면 핵내로 이동하여 survival, angiogenesis, proliferation과 관련된 있는 gene들의 발현에 영향을 주게 된다²⁾. Fig. 3에서의 결과를 토대로 CT의 처리로 인한 pSTAT3의 감소가 세포의 핵내의 축적에도 영향을 주는지를 알아보기 위해 세포를 세포질과 핵으로 분리하여 확인하였다. 그 결과, Hypoxia에 의해 HIF-1a와 pSTAT3의 핵내로 축적의 증가가 CT처리에 의해 감소됨을 확인 하였다(Fig. 5A).

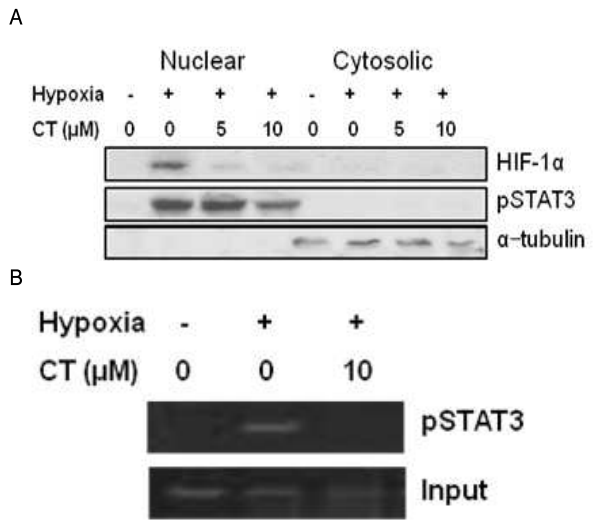


Fig. 5. Effect of Cryptotanshinone (CT) on hypoxia-induced STAT3 activation in PC-3 cells. (A) Cells were treated with or without CT (10μM) under hypoxia. 50ug each of nuclear extracts and cytoplasmic fractions were analyzed by immunoblotting. (B) Cells were treated with or without CT (10μM) under hypoxia or normoxia for 6h. The immunoprecipitated DNAwith STAT3 antibody was amplified by PCR analysis for VEGF promoter.

5. CT 처리에 의한 저산소환경 전립선 암주에서의 핵내의 STAT3와 VEGF promoter 결합에 미치는 영향

Fig. 5A에 대한 결과에서 CT는 pSTAT3의 핵내로의 축적을 억제 시켰다. 핵내로의 감소된 STAT3의 축적이 활성화에도 영향을 미치는지 알아보기 위해 ChIP assay 시행하였다. STAT3의 활성이 직접적으로 VEGF promoter에 결합하여 VEGF의 전사적조절

과 관련이 있다^{17,18}). Fig. 5B에서 보여주는 것과 같이, 대조군인 저산소 환경에서는 STAT3가 VEGF promoter로의 결합이 보였지만, CT 처리에 의해 VEGF promoter에 결합이 감소됨을 확인하였다.

결 론

암세포 발달에 있어 저산소환경은 필연적으로 발생하며, 이 환경이 암세포의 성장과 이동을 용이하기 위한 발판이 된다. 이 저산소 환경에서 암세포를 어떻게 제어를 해야 신생혈관과 전이를 막을 수 있다. 여기서 중요한 전사인자로 작용 하는 것이 HIF-1 α 이다. 본 연구에서는 단삼에서 유래된 Cryptotanshione이라는 단일 물질이 HIF-1 α 를 억제 함을 보여 주었으며, 이 HIF-1 α 의 억제가 AKT를 통한 조절임을 확인 하였다. 또한 Hypoxia에서도 활성화 되는 STAT3를 CT의 처리에 의해 감소함을 하였으며, 이 감소가 핵내 축적의 감소에 의한 것임을 확인하였다. 더불어, 이 억제가 VEGF promoter 결합에 영향을 미쳐 직접적 전사 조절에도 영향을 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 2011년도 경희대학교 연구비지원에 의한 결과임 (KHU-20111740)

참고문헌

- Bowman, T., Garcia, R., Tuskon, J., Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19: 2474-2488, 2000.
- Aggarwal, B.B., Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Kynnakkara, A.B., Sung, B., Ichikawa, H. Targeting signal-transducer-and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann N Y Acad Sci*. 1091: 151-169, 2006.
- Koh, M., Spivak-Kroizman, TR., Powis, G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trend Biochem Sci*. 33: 526-534, 2008.
- Jung, J.E., Lee, H.G., Cho, I.H., Chung, D.H., Yoon, S.H., et al. STAT3 is a potential modulator of HIF-1 mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J*. 19: 1286-1298, 2005.
- Jung, J.E., Kim, H.S., Lee, C.S., Shin, Y.J., Kim, Y.N., et al. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1 α by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med* 40: 479-485, 2008.
- Cheng, T.O. Cardiovascular effects of Danshen. *Int J Cardiol*. 121: 9-22, 2007.
- Zhou, L., Zuo, Z., Chow, M.S. Danshen : an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *J clin Pharmacol*. 45: 1345-1359, 2005.
- Wojcikowski, K., Johnson, DW., Gobe, G. Herbs or natural substances as complementary therapies for chronic kidney disease: ideas for future studies. *J Lab Clin Med*. 147: 160-166, 2006.
- Yu, X.Y., Lin, S.G., Chen, X., Zhou, Z.W., Liang, J., Duan, W., et al. Transport of cryptotanshinone, a major active triterpenoid in *Salvia miltiorrhiza* Bunge widely used in the treatment of stroke and Alzheimer's disease, across the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab*. 8: 365-378, 2007.
- Liu, J., Shen, H.M., Ong, C.N.. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG(2) cells. *Cancer Lett*. 153: 85-93, 2000.
- Shin, D.S., Kim, H.N., Shin, K.D., Yoon, Y.J., Kim, S.J., Han, D.C., et al. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Res*. 69: 193-202, 2009.
- Chen, W., Luo, Y., Liu, L., Zhou, H., Xu, B., Han, X., et al. Cryptotanshinone inhibits cancer cell proliferation by suppressing mammalian target of rapamycin-mediated cyclin D1 expression and Rb phosphorylation. *Cancer Prev Res* 3: 1015-1025, 2010.
- Kim, S.H., Ahn, K.S., Jeong, S.J., Kwon, T.R., Jung, J.H., et al. Janus activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway mediates icariside II-induced apoptosis in U266 multiple myeloma cells. *Eur J Pharmacol*. 654: 10-16, 2011.
- Mottet, D., Dumont, V., Deccache, Y., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M., Michiels, C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 278(33):31277-31285, 2003.
- Du, J., Xu, R., Hu, Z., Tian, Y., Zhu, Y., Gu, L., Zhou, L. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS one*. 6(9):e 25213, 2011.
- Zhu, C., Qi, X., Chen, Y., Sun, B., Dai, Y., Gu, Y. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 137(11):1587-1594, 2011.
- Niu, G., Wright, KL., Huang, M., Song, L., Haura, E, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*. 21: 2000-2008, 2002.
- Wei, D., Le, X., Zheng, L., Wang, L., Frey, J.A., et al. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*. 22: 319-329, 2003.