

에스트로겐 수용체 양성 MCF-7 유방암 세포주에 대한 costunolide의 항암효과

김운지¹ · 최윤경^{1,2} · 우상미^{1,2} · 박남규¹ · 정혜인¹ · 김용국¹ · 신용철¹ · 고성규^{1*}

1: 경희대학교 한의과대학 예방의학교실, 2: 암예방소재개발센터

Anti-cancer Effects of Costunolide in Estrogen Receptor Positive MCF-7 Breast Cancer Cells

Woon Ji Kim¹, Youn Kyung Choi^{1,2}, Sang Mi Woo^{1,2}, Nam Gyu Park¹, Hye In Jung¹, Yong Gook Kim¹, Yong Cheol Shin¹, Seong Gyu Ko^{1*}

1: Department of Preventive Medicine,

2: Material Development Research Center, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Costunolide (C₁₅H₂₀O₂) is a sesquiterpene lactone that was isolated from many herbal medicines and it has diverse effects (anti-viral, anti-fungal, and anti-inflammatory) according to previous reports. However, the anti-cancer effects of Costunolide and its mechanism of actions are not well known in estrogen receptor positive breast cancer. In this study, we observed that costunolide suppresses cell growth in estrogen receptor positive MCF-7 breast cancer cells as shown by MTT assay and soft agar colony formation assay. To examine the mechanism by which costunolide inhibits MCF-7 cell growth, we performed FACS analysis. We found that costunolide induced G2/M and S cell cycle arrest, and regulated cycle-related protein expression. In addition, costunolide inhibited ERK signaling pathway and induced autophagy. Therefore, costunolide might be a good and useful chemotherapy agent for estrogen receptor positive breast cancer patients.

Key words : Estrogen receptor positive breast cancer, Costunolide, cell cycle arrest, ERK pathway, autophagy

서 론

유방암은 주로 유선에서 발생하는 선암종의 일종으로 알려져 있고 이러한 유방암의 발생은 최근 들어 식생활과 생활양식의 서구화로 인해 서양뿐만 아니라 한국과 중국을 포함한 아시아에서도 빈도와 사망률이 급속도로 증가되고 있다¹⁻³.

종양의 형성은 수많은 과정에 의해 조절되는데 종양세포는 정상세포와는 다르게 무한 증식을 하고 혈관형성을 유도하고, 분자수준에서의 종양형성 관련신호가 활성화 되어 있으며 세포사멸 과정을 회피하는 특징을 나타낸다⁴. 특히 이 중에서도 암 세포의 증식억제는 세포주기를 조절 하거나 종양형성과 관련하여 활성화 되어 있는 신호를 조절함으로써 접근 할 수 있다⁵. 세포

주기는 G1기 (휴지기1), S기 (합성), G2기 (휴지기2), M기 (유사분열기) 이 네 가지 단계로 구분될 수 있고, 이들의 계속된 순환에 의해 세포 증식이 가능하게 된다^{6,7}. G1, S, G2, M기 세포주기는 분자적 수준에서 대표적으로 싸이클린 (Cyclin), 싸이클린-의존적 인산화 효소 (Cyclin-dependent kinase, CDK), 싸이클린-의존적 인산화효소 억제제 (Cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)에 의해 조절된다. 또한 세포주기 단계마다 이들을 조절하는 Cyclin, CDK, CKI의 종류는 다르다고 알려져 있다⁸. 각 세포주기에서 특이적인 Cyclin과 CDK는 서로 결합한 형태인 복합체를 형성하여 활성을 나타내며 이러한 활성에 의하여 세포주기가 이행되고 세포증식이 이루어지게 된다. 또한 CKI는 p21, p27, p57등이 포함되는 Cip/Kip family와 p16, p15, p18, p19가 포함되는 INK4 family로 분류가 가능하며 이들은 Cyclin-CDK 복합체에 결합하여 활성을 억제시키고, 결과 세포주기 이행을 정지시키는 역할을 한다고 알려져 있다^{9,10}.

세포사멸 (cell death)은 크게 세포계획사 (programed cell

* 교신저자 : 고성규, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교 한의과대학

· E-mail : epiko@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0329

· 접수 : 2012/11/26 · 수정 : 2013/05/15 · 채택 : 2013/05/28

death, PCD)와 괴사 (necrosis)로 분류된다. 이 중 세포계획사의 경우 제 1형 PCD인 세포자멸사 (apoptosis)와 제 2형 PCD인 자가포식 (autophagy)으로 나눌 수 있고, 이들은 세포내의 항상성 유지를 위해서도 중요하다고 알려져 있다¹¹⁾. 특히 진핵세포의 경우 항상성 유지를 위해 proteasome에 의한 단백질 분해와 autophagy에 의한 단백질 및 소포체 분해의 두 가지 기전을 가진다^{11,12)}. 또한 자가포식은 암¹³⁾, 퇴행성 신경질환¹⁴⁾, 근육 이상 질환¹⁵⁾, 감염¹⁶⁾, 노화¹⁷⁾ 등의 질환과 관련되어 있다. 이 중에서도 암과 관련하여 자가포식이 유도됨으로써 암의 증식을 억제시킨다는 연구결과가 보고되고 있다^{18,19)}.

Costunolide (C₁₅H₂₀O₂)는 sesquiterpene lactone계 화합물로 당목향²⁰⁾, 목련²¹⁾, 태산목²²⁾, 함박꽃나무²³⁾, 월계수²⁴⁾ 등 많은 식물 종에 포함되어 있다. 이에 대한 효능은 항염증²⁵⁾, 항바이러스²⁶⁾, 항균²⁷⁾, 등에 대해 알려져 있고 피부암²⁸⁾, 장암²⁹⁾, 혈액암³⁰⁾, 전립선암³¹⁾, 유방암³²⁾에 대한 항암효과가 보고되고 있다.

본 연구에서는 costunolide가 에스트로겐 수용체 양성 유방암 세포주의 증식을 억제하는 기전에 관한 내용을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 기기 및 시약

본 실험에 사용한 Costunolide 시약은 Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)에서 구입하여 DMSO (Dimethyl sulfoxide, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여 실험에 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용된 RPMI-1640 배지와 혈청 (fetal bovine serum), 항생제 (antibiotic-antimycotic), PBS (phosphate-buffered Saline)는 Gibco-BRL (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정 실험에 사용된 MTT 시약은 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blot 분석 실험에 사용된 Cdc2, Cyclin B1 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포주

에스트로겐 수용체 양성 유방암 세포주인 MCF-7은 RPMI-1640 배지에 혈청(FBS)과 항생제(antibiotic-antimycotic)를 넣어 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에 키웠다.

3. 세포배양

에스트로겐 수용체 양성 유방암 세포주인 MCF-7은 RPMI-1640 배지를 사용하고 10% (v/v) 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL))과 1% 항생제 (antibiotic-antimycotic, (Gibco BRL))를 넣어 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에 키웠다. 혈청은 잔존하는 보체 성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에 30분간 가열)하여 사용하였다. 세포를 회수할 때에는 trypsin-EDTA 1 mL를 가하여 37°C에서 1분간 반응시켜 세포를 분리하고 배지를 넣고 원심분리(1,200 rpm, 2분)를 하여 세척

한 후 실험에 사용하였다.

4. 세포독성 확인 (MTT assay)

Costunolide에 의한 에스트로겐 수용체 양성 유방암 MCF-7 세포주의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 세포주를 96-well plate에, 4 × 10⁶ cells/배지 100 μl의 초기세포 농도가 되도록 각각의 well에 분주하였다. 5% CO₂와 37°C humidified incubator에서 안정화 시킨 후 각각 0, 5, 10, 20, 40 μM의 농도가 되도록 Costunolide를 처리하였다. 48 시간 동안 37°C humidified incubator에서 배양하고 각각의 well에 MTT solution을 첨가하였다 (MTT 용액 10 μl/배지 100 μl). 2시간동안 어두운 상태를 유지한 채로 5% CO₂와 37°C humidified incubator에서 반응 시켰다. 2시간 후 well 바닥에 형성된 결정을 확인 한 후, 이 결정을 DMSO로 녹여내고, 570 nm 파장에서 ELISA reader (Molecular Devices, Palo Alto, CA)를 사용하여 세포증식 정도를 측정하였다.

5. 부착비의존성 집락형성 억제 능력 확인

암세포는 정상 세포와 비교하여 부착 비의존적 집락을 형성하는 특성을 보인다. 또한 이런 집락형성은 암세포가 전이된 후에 새로운 조직에서 전이성 암을 형성 할 수 있는 능력에 대한 판단도 가능하다. 때문에 costunolide에 의한 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암 세포주의 부착비의존성 집락형성 억제 정도를 확인하기 위해 두 종류의 agar (1.2%, 0.6%)를 멸균시킨 후 사용하였다. 6well을 준비 한 후, 1.2% agar를 배지와 섞어 base agar를 만들고 well에 넣어 굳혔다. 그 후 0.6% agar와 배지를 섞어 top agar를 만들고 세포와 costunolide를 처리한 후 섞어 굳힌 base agar위에 분주하였다. 3일에 한번 씩 costunolide를 처리하고 집락형성 정도를 14일 동안 관찰하였다. 세포를 가시화하기 위해 crystal violet 시약으로 염색 한 후, 현미경으로 형성된 집락을 확인하였다.

6. 세포주기측정

costunolide의한 세포주기 변화를 측정하기 위하여 에스트로겐 수용체 양성 MCF-7 유방암 세포주를 100 mm dish에 5 × 10⁵ cells의 초기농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에서 24시간 동안 배양 시켰다. 안정화 시킨 후에 costunolide를 농도별로 (20, 30 μM) 처리한 후, 시간별로 (12, 24 시간) 약 처리를 유지하였다. 각각의 시간마다 세포를 회수하기 위해 트립신을 사용하여 바닥에 붙어 있는 세포를 떼어내고 이를 모아 1,500 rpm, 5분동안 원심분리 후에 Cold-PBS를 사용하여 세포를 깨끗이 하였다. 다시 원심분리를 시키고, 상등액을 모두 제거한 후, 0.5% Twen-20이 첨가된 95% 에탄올을 사용하여 세포를 고정시켰다. -20°C에서 최소한 30분 정도 반응 시킨 후 Cold-PBS를 사용하여 세포를 깨끗하게 하였다. 그 후에 세포를 propidium iodide (50 μg/ml, 1% sodium citrate, 50 μg/ml RNase A가 포함) 시약을 사용하여 염색시켰다. 유세포분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 측정하고 ModFit LT V2.0 프로그램을

램을 사용하여 세포주기를 분석하였다.

7. 단백질 분리

에스트로겐 양성 MCF-7 유방암 세포주를 100 mm dish에 5×10^5 cells의 초기농도로 분주하여 5% CO₂가 든 37°C humidified incubator에서 24시간 동안 배양 시켰다. 후에 costunolide를 시간별로 처리 한 후, 100 mm dish의 상청액 뿐만 아니라 scraper를 사용하여 dish 바닥에 붙어있는 세포주를 떼어 내었다. 이를 모두 튜브에 모아 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리 시키고, 세포를 깨끗하게 하기 위해 Cold-PBS를 사용하여 다시 원심분리 하였다. 상등액을 모두 제거하고, RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50mM Tris (pH8.0), 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na3VO₄, 1 ug/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 사용하여 20분 동안 4°C에서 반응 시켰다. 후에 13,000 rpm으로 20분 동안 원심분리 시켜 lysis된 단백질을 분리하였다.

8. Western blotting

분리한 단백질을 정량하기 위해 Bio-Rad protein assay kit를 사용하였다. SDS-PAGE시 동량의 단백질을 loading하여 separating한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 그 후, membrane을 0.1% Tween 20이 포함 된 1X-PBS (1X-PBST)에 skim milk와 BSA를 각각 2%씩 넣어 1시간 동안 blocking시켰다. membrane을 다양한 1차 항체에 넣어 4°C에서 반응시켰다. 1X-PBST로 15분 동안 washing (15분X3회)하고, 2차 항체를 1시간 정도 상온에서 반응시켰다. 그 후 1X-PBST로 1시간 washing (10분X6회)을 하고 chemiluminescence detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)을 사용하여 X-ray film으로 결과를 확인하였다.

9. 통계 처리

본 실험에서 얻은 결과의 측정값을 Mean(평균)±S.E(표준오차)로 처리하였으며, student t-testmethod(unpaired)로 분석하여 p값이 0.05 이하일 때 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. Costunolide의 에스트로겐 양성 유방암 세포주 증식 억제 효과

이미 기존 연구에서 몇몇 암세포에서 항암작용이 있다고 알려진 Costunolide가 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암세포의 증식 억제에도 효능이 있는지 확인하였다. Costunolide를 48시간 처리한 후 MTT 방법을 통해 확인해 본 결과, 10 µM 부터 농도 의존적으로 세포의 증식이 감소하였다. 특히 40 µM의 Costunolide를 처리 한 경우, 대조군에 비해 75.44% 세포독성을 나타내는 것을 확인하였다 (Control vs. Costunolide 40 µM = 100% vs. 24.56%, $P=5.82E-12$) (Fig. 1b). 다음으로는 Costunolide가 MCF-7 세포주의 집락형성정도에 미치는 영향을 확인하기 위해 soft agar 실험을 수행하였다. 결과 Costunolide 20 µM를 처리한 실험군에서

대조군보다 집락형성이 억제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 1d). 형성된 집락을 그래프화 하여 나타낸 결과 Costunolide를 처리하였을 때, 대조군에 비해 집락형성이 6배 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1d).

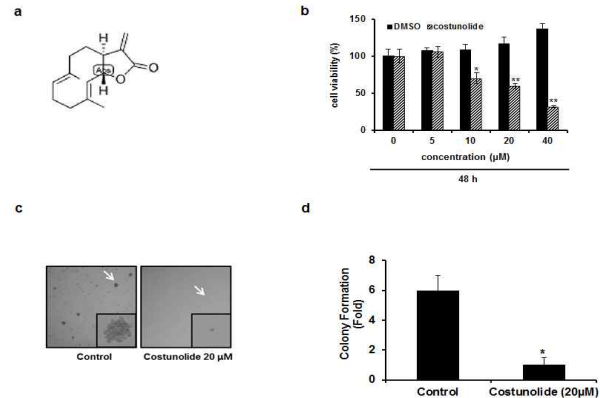


Fig. 1. Growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by costunolide. (a) The chemical structure of costunolide. (b) MCF-7 cells were seeded and treated with costunolide for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Data are shown as the mean of three independent experiments [error bars are mean ± standard deviation (SD)] * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. (c) MCF-7 cells were cultured in soft agar and treated with the costunolide for 15 days. Colonies were then stained with crystal violet and observed by microscopy (magnification of x4 and x20 in the bottom right block box). (d) Colony numbers were determined by counting. * $p < 0.05$.

2. 에스트로겐 양성 유방암 세포주에서 Costunolide에 의한 세포주기 조절 효과

Costunolide가 MCF-7 유방암세포주의 증식억제를 세포주기 조절을 통해 일어나는 현상인지 확인위해 Costunolide를 두 가지 농도 (20, 30 µM)로 12, 24시간 처리한 후, 유세포분석기를 이용하여 DNA contents histogram을 이용하여 측정하였다(Fig. 2a). 그리고 ModFit LT V2.0 프로그램을 사용하여 세포주기를 분석하였다. 결과 Costunolide가 G1 세포주기에는 영향을 미치지 않았다 (Control vs. Costunolide 20 µM 12 h = 35.81% vs. 21.60%, $P=0.01$; Control vs. Costunolide 20 µM 24 h = 34.25% vs. 30.42%, $P=0.29$; Control vs. Costunolide 30 µM 12 h = 35.81% vs. 23.77%, $P=0.04$; Control vs. Costunolide 30 µM 24 h = 34.257% vs. 24.89%, $P=0.03$). 반면 Costunolide는 G2/M기와 S기에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2b). G2/M기의 경우 모든 시간 (12, 24시간) 및 모든 농도 (20, 30µM)에서 Costunolide를 처리한 실험군에서 10% 이상 G2/M기에 머무르는 세포가 증가하였고, 이 결과 세포주기이행이 억제되어 세포증식이 억제된다는 것을 알 수 있었다 (Control vs. Costunolide 20 µM 12 h = 18.2% vs. 36.0%, $P=0.08$; Control vs. Costunolide 20 µM 24 h = 20.6% vs. 30.9%, $P=0.0003$; Control vs. Costunolide 30 µM 12 h = 18.2% vs. 32.6%, $P=0.19$; Control vs. Costunolide 30 µM 24 h = 20.57% vs. 34.105%, $P=0.009$). 또한 S기 역시 30µM Costunolide를 처리한 경우 S기에 머무르는 세포가 증가하여 세포주기이행이 억제되었다 (Control vs. Costunolide 20 µM 12 h = 38.1% vs. 52.5%, $P=0.0009$; Control vs. Costunolide 20 µM

24 h = 45.6% vs. 44.6%, P=0.83; Control vs. Costunolide 30 μ M
 12 h = 38.1% vs. 53.4%, P=0.05; Control vs. Costunolide 30 μ M
 24 h = 45.6% vs. 55.03%, P=0.14).

다음으로는 Costunolide 처리 후, 세포주기와 관련된 단백질 발현의 변화를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 결과 G1 세포주기와 관련된 단백질인 CDK4, CDK6, Cyclin D의 발현은 대조군에 비해 Costunolide를 처리한 실험군에서 변화가 나타나지 않았다. 반면 G2/M기 및 S기 조절에 관련된 사이클린 단백질 (Cyclin B1, Cyclin E)의 발현이 Costunolide 농도 의존적으로 감소하였다(Fig 3a, b). 결국 이는 Costunolide가 사이클린을 조절하여 세포가 G2기와 S기에 머무르는 시간을 길게 하고, 결과 세포주기 이행 억제를 통해 세포가 증식하는 것을 막는 것으로 판단된다.

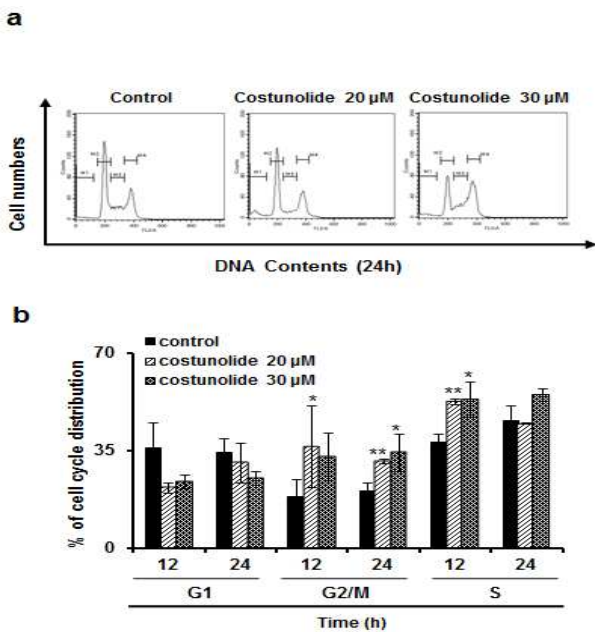


Fig. 2. Costunolide induced G2/M and S cell cycle arrest in MCF-7 breast cancer cells. (a) MCF-7 cells were seeded and treated with various doses of costunolide (20 and 30 μ M) for 12 and 24 hours. Cell cycle distribution was analyzed using a FACStar flow cytometer. (b) Data are shown as the mean of three independent experiments [error bars are mean \pm standard deviation (SD)] * p <0.05 and ** p <0.001.

3. 에스트로겐 양성 유방암 세포주에서 ERK 신호 전달 경로에 미치는 Costunolide의 영향

세포 내 신호전달체계에서 종양세포의 세포증식과 생존을 조절하는데 중심적인 역할을 하는 ERK의 과도한 활성화는 암 생성을 야기한다고 보고되어 있다. 다음으로는 ERK의 활성화에 미치는 Costunolide의 영향을 하기 위하여 Costunolide를 농도 별로 처리한 후 ERK 신호전달과 관련된 단백질의 발현 변화를 western blot을 통해 확인하였다. 결과 대조군에 비해 Costunolide를 처리한 실험군에서 ERK의 활성화를 조절하는 인산화가 억제되는 것을 확인할 수 있었고, ERK의 하위 신호전달 인자인 p90RSK의 인산화도 억제되었다. 또한 이러한 결과는 Costunolide 농도 의존적으로 즉, 농도가 높아질수록 ERK 및 p90RSK의 인산화가 더 억제 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4a, b).

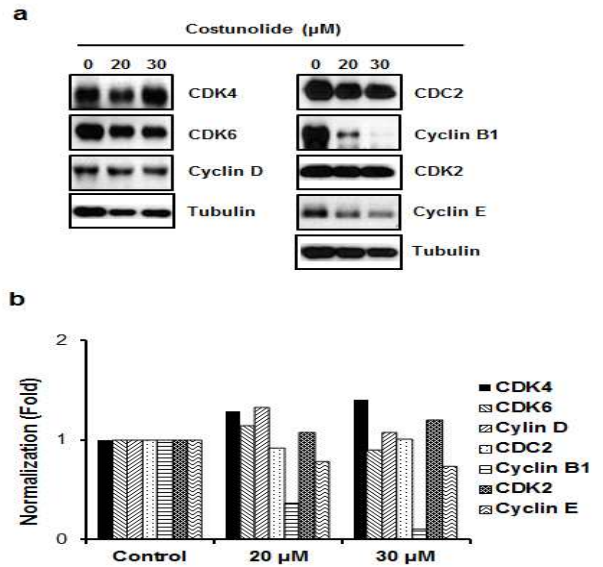


Fig. 3. Effect of costunolide on cell cycle-related protein in MCF-7 breast cancer cells. (a) MCF-7 cells were seeded and treated with costunolide (20 and 30 μ M) for 24 hours. Whole cell lysates were subjected to western blotting for the detection of specific protein as indicated (CDK4, CDK6, Cyclin D, CDC2, Cyclin B1, CDK2 and cyclin E). Tubulin was used as loading control. (b) Protein level of CDK4, CDK6, Cyclin D, CDC2, Cyclin B1, CDK2 and Cyclin E are normalized to Tubulin.

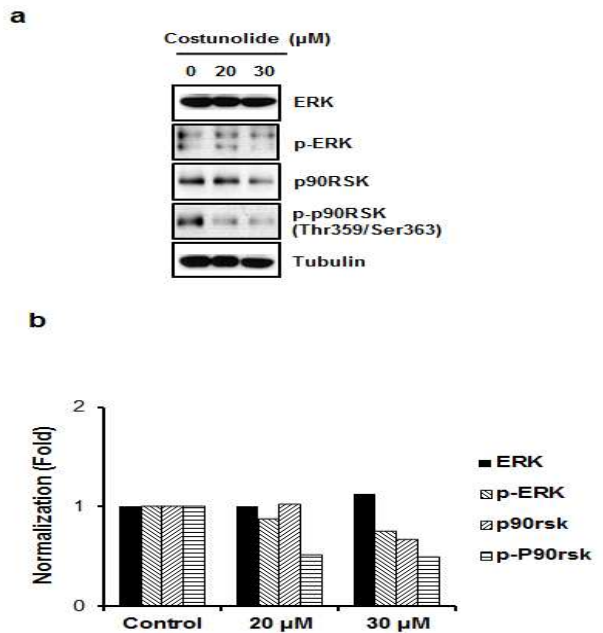


Fig. 4. Effect of costunolide on ERK signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were seeded and treated with various concentrations of costunolide (20 and 30 μ M) for 6 hours. Whole cell lysates were subjected to western blotting for the detection of specific protein as indicated (ERK, phospho-ERK, p90RSK, phospho-p90RSK). Tubulin was used as loading control. (b) Protein level of ERK, phospho-ERK, p90RSK and phospho-p90RSK are normalized to Tubulin.

4. 에스트로겐 양성 유방암 세포주에서 자가포식 신호경로에 미치는 Costunolide의 영향

자가포식 현상과 세포주기 조절과정은 신호전달 경로 측면에서 많은 부분이 서로 crosstalk한다고 알려져 있다. 제2형 세포

계획사 (type II programmed cell death)라고 알려진 자가포식에 Costunolide가 미치는 영향을 확인하였다. 자가포식체 (autophagosome) 형성과 관련된 자가포식 개시 (initiation)를 조절하는 Atg13, TSC2와 Raptor의 발현정도를 확인하였다. 결과 Costunolide는 TSC2, Raptor, Atg 13의 단백질 발현을 증가시킴으로써 자가포식을 유도 할 수 있는 신호전달 경로를 활성화 시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5a, b). 다음으로는 Costunolide에 일어난 자가포식에 의해 세포증식이 억제되는 것인지 확인하기 위하여 자가포식 억제제(Chloroquine)를 처리한 후 세포생존률을 MTT를 통해 확인하였다. 결과 Costunolide에 의해서 감소되었던 세포생존률이 자가포식을 억제함으로써 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5c).

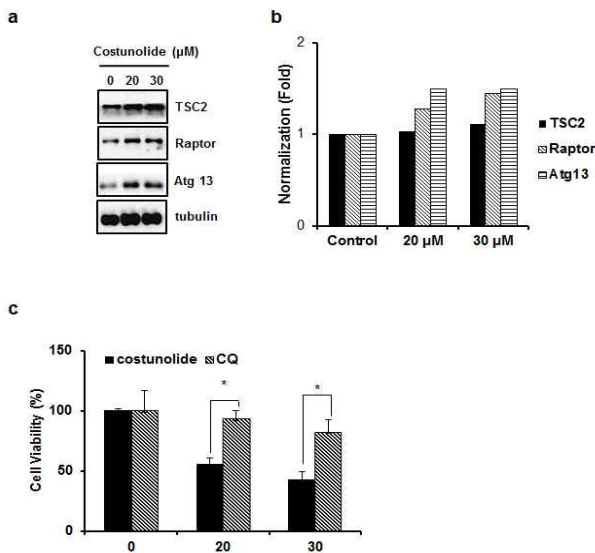


Fig. 5. Effect of costunolide on autophagy in MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were seeded and treated with various concentrations of costunolide (20 and 30 μM) for 48 hours. Whole cell lysates were subjected to western blotting for the detection of autophagy-related specific protein as indicated (TSC2, Raptor and Atg13). Tubulin was used as loading control. (b) Protein level of TSC2, Raptor and Atg13 are normalized to Tubulin. (c) MCF-7 cells were co-treated with costunolide and Chloroquine (CQ) for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Data are shown as the mean of three independent experiments [error bars are mean ± standard deviation (SD)]. *p<0.05

고찰

Costunolide는 세포사멸 (apoptosis)을 유도하고 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현을 억제하여 혈관신생을 조절하는 등 항암효과를 보인다고 기존에 보고되고 있다²⁸⁻³³. 이러한 사실을 바탕으로 본 실험에서는 에스트로젠 수용체 양성 MCF-7 유방암세포에서의 암세포 증식억제와 관련하여 Costunolide가 영향을 미치는 기전에 대해 검토하였다.

우선 Costunolide가 실제로 MCF-7 세포주의 증식을 억제하는지 확인하기 위해 MTT 방법을 통한 세포독성, soft agar 실험을 통한 부착비의존성 집락형성 억제 능력 정도를 확인하였다 (Fig. 1b, c). Costunolide를 처리한 실험군에서 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 농도의존적으로 세포독성은 증가하였고,

집락형성 정도는 억제되었다. 형성된 집락의 개수를 세어 그래프한 결과 Costunolide를 처리했을 때 대조군에 비해 6배 감소하였다 (p<0.003). 특히 집락형성 실험의 경우는 Costunolide를 15일 동안 처리한 실험한 결과로, Costunolide에 대한 장기간 효능 (long-term effect)을 확인할 수 있고 세포 수준의 실험 중 가장 동물 모델과 비슷한 결과를 얻어낼 수 있는 실험방법으로 알려져 있어 Costunolide가 세포뿐만 아니라 암 유발 동물 모델에서도 효과를 나타낼 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

다음으로는 Costunolide가 에스트로젠 양성 유방암 세포주의 증식을 억제시키는 기전을 확인하였다. 첫 번째 기전으로 세포주기를 확인했는데, 진행세포는 증식을 하기 위해 G1기 → S기 → G2기 → M기를 통해 DNA를 복제하고 세포분열을 한다. 분열된 각각의 세포들은 다시 G1기를 거쳐 세포주기를 순환하게 되는데 세포들은 각각 G1, G2기의 checkpoint를 가짐으로써 중간 중간 이상이 있는지를 확인하게 되고, 만약 이상이 발견되면 세포주기를 정지시켜 다음 단계로의 이행을 막고 결과 세포 분열이 억제된다^{6,7}. Costunolide가 세포주기에 미치는 영향을 유세포 분석기를 통해 확인한 결과 G2/M기 및 S기에 영향을 주어 세포증식을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 다음으로 세포주기와 관련된 단백질을 확인하였다. 각각의 세포주기(G1, S, G2, M)마다 그들을 조절하는 단백질 (Cyclin, CDK, CKI)의 종류는 다르다고 알려져 있는데 cyclin과 CDK의 결합으로 세포주기는 조절된다. 특히 이 중에서도 Cyclin D와 Cdk4/6 복합체 형성은 G1 세포주기의 이행을 조절하고, Cyclin E와 CDK2는 S 세포주기, 마지막으로 CDC2 (CDK1)와 Cyclin B1은 G2 세포주기의 이행을 조절한다고 알려져 있다⁸. 결과 Costunolide가 농도 의존적으로 G2기, S기에 관련된 단백질 중에서도 특히 Cyclin (Cyclin B1, Cyclin E)에 영향을 주어 세포주기의 이행을 조절한다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 결과적으로 Costunolide는 G2/M기, S기의 세포주기 조절을 통하여 에스트로젠 양성 MCF-7 유방암 세포주의 증식을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로는 종양형성 관련 신호에 미치는 Costunolide의 영향을 확인하였다. ERK는 포유류의 MAPK 중 가장 중요하다고 밝혀진 Ras와 Raf의 하위신호로 세포증식, 세포분화, 세포이동 및 종양세포의 침윤과 전이를 조절한다. 또한 이들은 암의 예후와도 관련되어 있으며 특히 유방암, 위암, 식도암, 신장암 등에서 과도하게 활성화 되어 있다고 알려져 있다^{34,35}. ERK의 활성화에 미치는 Costunolide의 영향을 확인하기 위해 Costunolide를 처리한 실험군과 대조군에서 인산화된 ERK의 단백질 발현 정도를 비교하였다. 결과 농도 의존적으로 ERK의 인산화 및 하위 신호 전달인자인 p90RSK의 인산화도 억제되었다(Fig. 4).

마지막으로 Costunolide가 제 2형 세포계획사 (Type II programmed cell death)라고 불리는 자가포식 (autophagy)에 미치는 영향을 확인하였다. 항암치료 (방사선치료 및 약물치료) 후에 자가포식이 활성화되어 있다는 몇몇 보고를 통해 자가포식 유도가 암세포의 증식을 억제시킨다는 가능성이 제기되었다^{36,37}. 자가포식의 과정은 분해하고자 하는 단백질 및 세포소기관 등을 이중막으로 이루어진 소포 (vesicle)인 자가포식체

(autophagosome)안에 격리시키고, 이 후에 가수분해 효소를 포함하고 있는 리소좀 (lysosome)과 결합하여 자가포식용해소체 (autophagylysosome)를 형성 한 후 분해시킨다¹¹⁾. 자가포식도 여러 분자들의 작용에 의해 조절되어 있는데 특히 TSC2, Raptor, Atg13은 자가포식 개시에 중요하다고 알려져 있다³⁸⁾. Costunolide와 자가포식과의 관련성을 확인하기 위하여 아무것도 처리하지 않은 대조군과 Costunolide를 처리한 실험군을 비교하여 자가포식 관련 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 결과 Costunolide를 처리하였을 때, 농도의존적으로 자가포식 개시에 관련된 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 5a, b). 다음으로는 Costunolide에 의해 유도되는 자가포식이 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암 세포주의 증식에 영향을 미치는 것인지 확인하기 위하여 자가포식 억제제를 Costunolide와 같이 처리하여 세포 생존율을 비교하였다. 결과 Costunolide에 의해서 감소되었던 세포 생존률이 자가포식을 억제함으로써 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 Costunolide가 자가포식을 유도함으로써 유방암 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 알 수 있다(Fig. 5c).

결 론

본 연구는 많은 식물 중에 포함되어 있는 Costunolide가 에스트로겐 양성 유방암 세포주에서 항암효과를 나타내는지에 대한 기전연구로써, 대조군과 Costunolide를 농도별로 처리한 실험군을 비교하여 다음과 같은 결론을 내렸다.

Costunolide는 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암 세포주의 증식을 농도 의존적으로 억제시켰다. 이러한 Costunolide의 증식억제는 G1 세포주기에는 영향을 미치지 않고, S기 및 G2/M 세포주기에 영향을 미침으로써 다음 주기로의 이행을 막아 결국 세포의 증식을 억제 시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로는 Costunolide가 종양세포의 증식에 중요하다고 알려진 ERK 경로의 활성화 즉, ERK의 인산화 정도를 감소시킴으로써 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암의 세포증식을 억제시키는 것을 확인하였다.

마지막으로 Costunolide가 제 2형 세포계획사로 알려진 자가포식 (autophagy)을 유도함으로써 에스트로겐 양성 MCF-7 유방암 세포증식을 억제시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 본 저자는 Costunolide에 의한 에스트로겐 양성 유방암 세포의 증식억제 기전을 확인함으로써 에스트로겐 양성 유방암의 항암효과에 대한 가능성을 발견하였다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(No. 2012-0005755).

참고문헌

1. Edwards, B.K., Brown, M.L., Wingo, P.A., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002,

featuring population-based trends in cancer treatment, J Natl Cancer Inst 97(19):1407-1427, 2005.

2. Park, S., Bae, J., Nam, B.H., et al. Aetiology of cancer in Asia, Asian Pac J Cancer Prev 9(3):371-380, 2008.

3. Ziegler, R.G., Anderson, W.F., Gail, M.H. Increasing breast cancer incidence in China: the numbers add up, J Natl Cancer Ins 100(19):1339-1341, 2008.

4. Hanahan, D., Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation, Cell 144(5):646-674, 2011.

5. Lopez-Saez, J.F., de la, Torre, C., et al. Cell proliferation and cancer, Histol Histopathol 13(4):1197-1214, 1998.

6. Nasmyth, K., Viewpoint: putting the cell cycle in order, Science 274(5293):1643-1645, 1996.

7. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, Cell Prolif 36(3):131-149, 2003.

8. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints, Annu Rev Biochem 73: 39-85, 2004.

9. Ruas, M., Peters, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, Biochim Biophys Acta 1378(2):F115-177, 1998.

10. Sherr, C.J., Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, Genes Dev 13(12):1501-1512, 1999.

11. Edinger, A.L., Thompson, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, Curr Opin Cell Biol 16(6):663-669, 2004.

12. Meijer, A.J., Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells, Int J Biochem Cell Biol 36(12):2445-2462, 2004.

13. Gozuacik, D., Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, Oncogene 23(16):2891-2906, 2004.

14. Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., et al. Potential therapeutic applications of autophagy, Nat Rev Drug Discov 6(4):304-312, 2007.

15. Tolkovsky, A.M. Autophagy thwarts muscle disease, Nat Med 16(11):1188-1190, 2010.

16. Deretic, V. Autophagy in infection, Curr Opin Cell Biol 22(2):252-262, 2010.

17. Rubinsztein, D.C., Marino, G., Kroemer, G. Autophagy and aging, Cell 146(5):682-695, 2011.

18. Cao, X., Liu, B., Cao, W., et al. Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells, Chin J Cancer Res 25(2):212-222, 2013.

19. Yim, N.H., Jung, Y.P., Kim, A., et al. Oyakungisan, a Traditional Herbal Formula, Inhibits Cell Proliferation by

- Induction of Autophagy via JNK Activation in Human Colon Cancer Cells, *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 231874, 2013.
20. Lee, M.G., Lee, K.T., Chi, S.G., et al. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release, *Biol Pharm Bull* 24(3):303-306, 2001.
 21. Mondranondra, I.O., Che, C.T., Rimando, A.M., et al. Sesquiterpene lactones and other constituents from a cytotoxic extract of *Michelia floribunda*, *Pharm Res* 7(12):1269-1272, 1990.
 22. el-Ferally, F.S., Chan, Y.M., Isolation and characterization of the sesquiterpene lactones costunolide, parthenolide, costunolide diepoxide, santamarine, and reynosin from *Magnolia grandiflora* L, *J Pharm Sci* 67(3):347-350, 1978.
 23. Park, H.J., Kwon, S.H., Han, Y.N., et al. Apoptosis-Inducing costunolide and a novel acyclic monoterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*, *Arch Pharm Res* 24(4):342-348, 2001.
 24. De, Marino, S., Borbone, N., Zollo, F., et al. New sesquiterpene lactones from *Laurus nobilis* leaves as inhibitors of nitric oxide production, *Planta Med* 71(8):706-710, 2005.
 25. Kassuya, C.A., Cremonese, A., Barros, L.F., et al. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), *J Ethnopharmacol* 124(3):369-376, 2009.
 26. Chen, H.C., Chou, C.K., Lee, S.D., et al. Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells, *Antiviral Res* 27(1-2):99-109, 1995.
 27. Wedge, D.E., Galindo, J.C., Macias, F.A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs, *Phytochemistry* 53(7):747-757, 2000.
 28. Chen, C.N., Huang, H.H., Wu, C.L., et al. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells, *Cancer Lett* 246(1-2):237-252, 2007.
 29. Mori, H., Kawamori, T., Tanaka, T., et al. Chemopreventive effect of costunolide, a constituent of oriental medicine, on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats, *ancer Lett* 83(1-2):171-175, 1994.
 30. Choi, J.H., Ha, J., Park, J.H., et al. Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols, *Jpn J Cancer Res* 93(12):1327-1333, 2002.
 31. Hsu, J.L., Pan, S.L., Ho, Y.F., et al. Costunolide induces apoptosis through nuclear calcium²⁺ overload and DNA damage response in human prostate cancer, *J Urol* 185(5):1967-1974, 2011.
 32. Choi, Y.K., Seo, H.S., Choi, H.S., et al. Induction of Fas-mediated extrinsic apoptosis, p21WAF1-related G2/M cell cycle arrest and ROS generation by costunolide in estrogen receptor-negative breast cancer cells, MDA-MB-231, *Mol Cell Biochem* 363(1-2):119-128, 2012.
 33. Jeong, S.J., Itokawa, T., Shibuya, M., et al. Costunolide, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*, inhibits the VEGFR KDR/Flk-1 signaling pathway, *Cancer Lett* 187(1-2):129-133, 2002.
 34. Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors, *Oncogene*, 18(3):813-822, 1999.
 35. Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinase cascades, *Adv Cancer Res* 74: 49-139, 1998.
 36. Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles, *Cancer Res* 61(2):439-444, 2001.
 37. Kanzawa, T., Kondo, Y., Ito, H., et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide, *Cancer Res* 63(9):2103-2018, 2003.
 38. Pyo, J.O., Nah, J., Jung, Y.K. Molecules and their functions in autophagy, *Exp Mol Med* 44(2):73-80, 2012.