동의생리병리학회지 제 28권 2호
Korean J. Oriental Physiology & Pathology 28(2):162~168, 2014

ISSN(Print) 1738-7698
ISSN(Online) 2288-2529

오미자의 유방암 세포사멸과 TRPM7 관련성에 관한 연구

김정남 · 채 한 · 권영규 · 김병주*

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부

Effects of Schisandra Chinensis on Human Breast Cancer Cells

Jung Nam Kim, Han Chae, Young Kyu Kwon, Byung Joo Kim*

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, College of Korean Medicine, Pusan National University

Fruits of Schisandra chinensis (SC) Baill are considered a traditional herbal medicine for the treatment and alleviation of various diseases. The purpose of this study was to investigate the anti-cancer effects of SC extract in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7). We used human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells. We examined cell death by MTT assay and caspase 3 and 9 assay with SC extract. To examine the inhibitory effects of SC extract, cell cycle (sub G1) analysis and mitochondrial membrane depolarization was done the MCF-7 cells after one day with SC extract. In addition, to investigate the transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) currents, we used the whole cell patch clamp techniques. Furthermore, TRPM7 channels were overexpressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells to identify the role of TRPM7 channels in MCF-7 cell growth and survival. SC extract inhibited the growth of MCF-7 cells in a dose-dependent fashion. Also we showed that SC extract induced apoptosis in MCF-7 cells by MTT assay, caspase 3 and 9 assay, sub-G1 analysis and mitochondrial membrane depolarization. SC extract inhibited the TRPM7 currents in MCF-7 cells and in TRPM7 overexpressed HEK 293 cells. Furthermore, TRPM7 channel overexpression in HEK 293 cells exacerbated SC extract-induced cell death. Our findings provide insight into unraveling the effects of SC extract in human breast adenocarcinoma cells and developing therapeutic agents against breast cancer.

Key words : Schisandra chinensis, Human Breast Adenocarcinoma Cell, MCF-7, TRPM7 channel

서 론

유방암은 전 세계적으로 여성들에게 가장 흔히 발병되는 질병으로 발생률이 꾸준히 증가하고 있으며, 이에 따른 사망률 또한 점차 증가하고 있다. 2012년에 발표된 중앙 암 등록 본부 자료에 의하면 2010년에 우리나라에서는 연 202,053건의 암이 발생되었는데, 그 중 유방암은 남녀를 합쳐서 연 14,277건으로 전체 암 발생의 7.1%로 6위를 차지하였다. 발생건수는 남자가 연 69건 발생하였고, 여자는 연 14,208건으로 여성의 암 중에서 2위를 차지하여 남녀의 성비는 0.004 : 1로 여자에게서 더 많이 발생하였다. 연령대별로는 40대가 36.2%로 가장 많고 , 50대가 28.4%, 60대가 13.7%의 순이었다[1]. 유방암은 모든 암 중에서 가장 연구가 많이 된 암 중 하나인데도 아직 확실하게 유방암의 발생기전이라고 밝혀진 것은 없고 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의해서 발생한다고 알려지고 있으며, 환경적인 요인으로는 비만, 음주, 출산 및 수유요인, 에스트로겐 등의 영향을 받는 것으로 알려지고 있다[2].

항암제를 이용한 암 치료는 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 영향을 미치고, 내성을 가지게 된다는 문제점을 야기 시키기 때문에 이를 대체할 수 있는 물질을 찾아내는 것이 중요한 과제로 여겨지고 있다. 최근에 천연물 자체의 효능에 대한 관심이 늘어나면서 천연추출물에 의한 세포 신호분자들의 조절과 암세포의 apoptosis 유도 효과에 관한 연구가 주목을 받고 있다[3-7]. Apoptosis는 프로그램된 세포사멸 (programmed cell death) 과정으로 일반적으로 외적으로 또는 내적으로 작용하는 기전에 의해서 이루어지고 있다[3,4]. 또한 apoptosis는 면역방어기전의 하나로 다양한 외적인 요소에 의한 손상된 세포 및 비정상적인 세포

* To whom correspondence should be addressed at : Byung Joo Kim, colleage of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

· E-mail : vision@pusan.ac.kr, · Tel : 051-510-8469

· Received : 2014/02/14 · Revised : 2014/03/03 · Accepted : 2014/03/10

를 제거하는 기능을 하고 있다[5-7]. 많은 연구에 의해서 apoptosis가 암세포 제거의 가장 중요한 기전중 하나라는 사실이 밝혀지고 있으며, 따라서 어떤 화학치료제나 천연물 등에 의한 apoptosis 유도가 중요한 암세포 제거 기전임이 밝혀지고 있다. 홍화 (Carthami Flos)에 의한 인체 대장암세포 (HT-29, WiDr) 및 인체 위암세포 (AGS, MKN45)에서 caspase pathway를 통한 apoptosis가 일어나고 cisplatin과의 병용투여로 효과가 좋음을 보였고[8,9], ginsenoside Rg3에 의한 AGS세포에서 TRPM7이란 이온통로 기전을 통한 apoptosis가 발생함이 밝혀졌다[10]. 또한 고삼(Sophorae Radix)에 의한 인체 유방암세포 (MCF-7) 및 위암세포 (AGS)에서 caspase 3 assay와 sub-G1 analysis를 통한 apoptosis가 일어나고 doxorubicin과의 병용투여로 효과가 좋음이 밝혀졌다[11,12].

오미자(五味子, Schisandra chinensis)는 5가지의 맛이 다양하게 조화를 이룬다는 뜻에서 불리어진 이름으로 비타민 C, 유기산 뿐만 아니라, 페놀 화합물이나 테르펜 등의 향기성분과 안토시아닌 색소에 의한 붉은 색을 지닌 식물체이다[13]. 또한, 이들 성분에 의해 항산화[14,15], 신경보호[16], 간보호[17], 혈관보호[18], 혈당강하[19], 혈압강하[20], 항고지혈증[21]과 항암 작용[22] 등과 같은 생리활성이 발휘되는 것으로 알려져 있다. 특히 오미자 성분 중 gomicin N 에 의한 human leukemia U937 cells 의 세포사멸 및 항암작용 특징이 잘 알려져 있다[23].

Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) 이온통로는 다양한 세포에서 세포의 apoptosis에 관여함이 밝혀지고 있어 항암 효과의 중요한 기전중 하나로 알려지고 있다[24,25]. Wykes 등[26]은 human mast cell survival에 TRPM7이 중요한 역할을 한다고 하였고, Jiang 등[27]은 TRPM7이 human head and neck carcinoma cells에서 세포의 성장과 증식에 관여함을 밝혔다. 또한 Also, Abed 등[28]은 human osteoblast-like cell에서 TRPM7이 성장에 관여함을 밝혔다.

하지만 지금까지 항암제로서의 오미자 효과와 그 기전에 관한 연구는 활발히 이루어지지 않고 있고 TRPM7이온통로와의 관련성에 대한 연구도 전혀 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 오미자추출물을 이용하여 현재 발생비율이 꾸준히 증가하고 있어 사회적인 문제가 되고 있는 유방암세포에서의 항암효과를 알아보고 TRPM7 이라는 이온통로가 관여하고 있음을 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 오미자는 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행(Plant Extract Bank)에서 구입한 후 사용하였다.

2) 대상 세포주

이 실험에 사용한 인체 유방암세포는 서울대학교 암세포주은행에서 구입한 유방암 세포주 MCF-7이며, adenocarcinoma의 histopathology 특징을 나타내고 있다.

2. 방법

1) 암세포의 배양

암세포주는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, MD, USA), 1% broad-spectrum antibiotics (Gibco BRL, MD, USA)가 함유된 RPMI-1640 (Gibco BRL, MD, USA) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 incubator (Precision Scientific Inc. NY, USA)에서 배양하였고, 세포는 0.1% Trypsin-EDTA (Sigma, MD, USA)를 이용하여 37℃에서 5분간 처리한 후 회수하였다.

2) MTT assay

세포 생존율 측정은 세포 배양판 (12-well)에 암세포를 1 ml씩 분주하여 24시간 이상 배양 후 오미자 추출물을 다양한 농도로 처리한 다음, 37℃, 5% CO_2 하에서 48시간 또는 72시간 배양한 후, MTT용액 (5 mg/ml)을 배양액 최종 부피의 1/10되게 첨가 하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan 침전물을 dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 ml로 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Caspase 3과 9 assay 측정

Caspase 3 과 9 assay kits를 BioMol (Plymouth, PA, USA)에서 구입하여 측정하였다. 405 nm의 흡광도에서 여러 번 측정하였다.

4) Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

오미자 추출물이 MCF-7세포의 증식을 억제하는데 있어서 세포주기의 어느 단계를 지연시키는지 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. 오미자 추출물을 첨가한 배지에서 3일간 배양된 MCF-7세포를 PBS용액으로 세척한 후, 4℃에서 30분간 70% ethanol로 고정하였다. 고정후 propidium iodide (Sigma, MD, USA)로 DNA를 염색하여 Becton Dickinson FACStar Flow Cytometry를 이용하여 세포주기를 비교 분석하였다.

5) Mitochondrial membrane depolarization 측정

Mitochondrial membrane depolarization 은 JC-1 fluorescence probe (Molecular Probes, OR, USA)를 이용하여 측정하였다. MCF-7 세포에 JC-1을 37℃ 에서 30분 동안 labeling 한 후에 flow cytometry를 이용해서 488-nm excitation과 530/30 또는 585/42 nm bypass emission filters에서 측정하였다. Red fluorescence를 나타내지 않는 세포는 mitochondrial membrane 이 depolarization된 것으로 간주하였다.

6) 전기생리학적 막전류 측정

세포들을 도립현미경 (inverted microscope) 위에 설치되어 있는 작은 실험용(300 μl)로 옮긴 후 분당 2-3 ml 속도로 세포외 용액을 관류시켰다. 유리전극의 저항은 3-5 MΩ의 것을 사용하였다. Patch clamp 증폭기 (Axon Instruments, CA, USA)를 통하여 나오는 신호는 digital oscilloscope (Hitachi, Japan), 생리기록기 (Recorder 220, Gould, CA, USA)를 통해서 관찰하였고, 고정전압과 자극전압의 조정 및 전류의 기록은 pClamp software v 6.0 (Axon Instruments, CA, USA)와 IBM-compatible computer를 사용하였다. TRPM7 전류를 관찰하기 위해서 세포외 관류용액은 NaCl 135, KCI 5, $CaCl_2$ 1.8, glucose5, $MgCl_2$ 1.2, HEPES 10 mM을 사용하였으며 tris를 사용하여 pH를 7.4로 교정하였다. 전

극내 용액은 NaCl 10, KCl 102, $CaCl_2$ 1, ATP 5, GTP 1, $MgCl_2$ 1, EGTA (ethyleneglycolbis-(β-aminoethylether) N,N,N′,N′-tetra-acetic acid) 10 mM, pH 7.2 (KOH로 교정)인 용액을 사용하였다.

7) 통계 분석

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 SPSS 16.0 (SPSS Inc, IL, USA)의 Independent t-test를 사용하였으며 유의수준 $p<0.05$를 사용하였다. 실험결과는 mean ± SD 또는 빈도(%)로 기재하였다.

결 과

1. 암세포 살상 효과

암세포 살상 효과를 측정하기 위하여 100, 200, 300, 400, 500 ㎍/ml의 농도로 각각 4회씩 시험한 결과 오미자 추출물에 의한 MCF-7에서의 효과 1일후에서는 200 ㎍/ml 이상에서 암세포 살상 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1). MTT assay로 100 ㎍/ml에서 96.2 ± 2.1%, 200 ㎍/ml에서 67.4 ± 6.0% ($P<0.01$), 300 ㎍/ml에서 43.3 ± 8.2% ($P<0.01$), 400 ㎍/ml에서 25.2 ± 6.1% ($P<0.01$), 500 ㎍/ml에서 12.1 ± 4.3% ($P<0.01$)의 세포 생존 결과를 보였다. 이러한 결과는 통계적으로 유의하게 암세포 살상 효과가 있다는 것을 확인한 결과로 MCF-7에서는 오미자 추출물에 의해서 1일후에 200 ㎍/ml이상 농도에서 뚜렷한 항암작용이 있음을 의미한다.

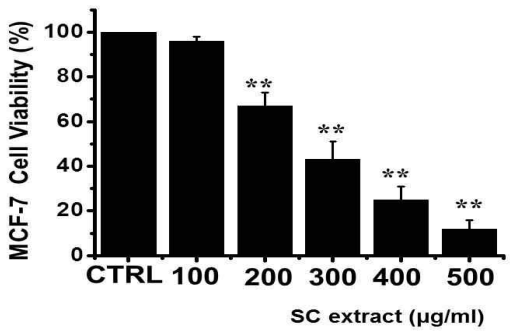

Fig. 1. Effect of Schisandra Chinensis extract on cytotoxicity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated with Schisandra Chinensis extract as indicated dose (㎍/ml). After 1 days, cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. **P<0.01. CTRL: untreated MCF-7 cells.

2. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

오미자 추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 flow cytometry를 이용한 세포주기 sub-G1분석을 실시하였다. Apoptosis가 일어나면 기존의 fluorescence peak가 왼쪽으로 이동해 새로운 sub-G1 fluorescence peak가 만들어 진다. 오미자 추출물에 의한 Sub-G1 분석 결과 오미자 추출물 농도에 비례해서 sub-G1 peak가 증가함을 알 수 있다(Fig. 2).

3. mitochondrial membrane depolarization 확인

오미자 추출물에 의한 apoptosis 기전을 확인하기 위해서 mitochondrial membrane depolarization assay를 실행하였다. Mitochondrial membrane depolarization은 세포내 intrinsic apoptosis signaling 단계에서 나타나는 현상으로 오미자 추출물에 의해 mitochondrial membrane depolarization을 증가시킴을 알 수 있다(Fig. 3).

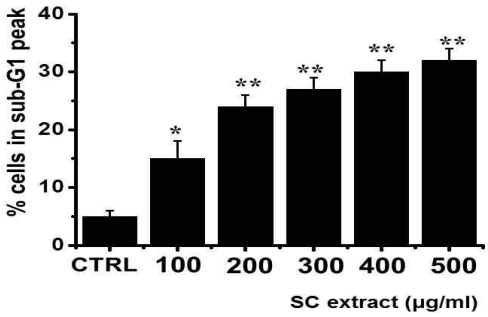

Fig. 2. Schisandra Chinensis extract leads to increase apoptosis in MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated with Schisandra Chinensis extract as indicated dose (㎍/ml). After 1 days, sub-G1 peak was measured by FACScan as described in materials and methods. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. *P<0.05. **P<0.01. CTRL: untreated MCF-7 cells.

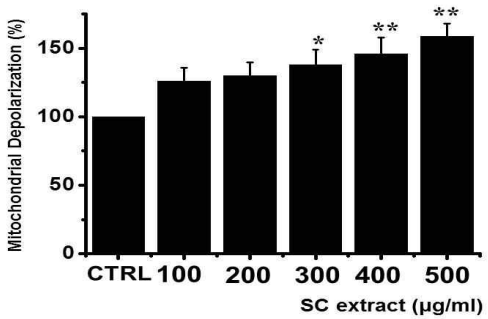

Fig. 3. Schisandra Chinensis extract leads to increase the mitochondrial membrane depolarization in MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated with Schisandra Chinensis extract as indicated dose (㎍/ml). After 1 days, mitochondrial membrane depolarization was measured by FACScan as described in materials and methods. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. *P<0.05. **P<0.01. CTRL: untreated MCF-7 cells.

4. Caspase 3 과 9 를 통한 암세포 사멸 확인

오미자 추출물에 의한 세포사가 apoptosis에 의한 것인지 확인하기 위하여 농도별로 세포사멸의 진행 정도를 알아보았다. Caspase는 cystinyl aspartate-specific protease로 세포질에서 pro-form으로 존재하고 특정 위치의 proteolytic 과정에 의해 활성화된다. 이로 인해 세포의 DNA 복제 및 유전자 발현과 관련된 단백질 및 핵의 구조 유지, 세포의 항상성 유지 등과 관련된 단백질들을 파괴시키거나 관련된 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다. Caspase 3 과 9 activity를 측정한 결과 오미자 추출물에 의해 caspase 3과 9 activity가 농도에 의존적으로 증가함을 알 수 있다. 또 caspase 3과 9 activity증가는 pan-caspase inhibitor인 zVAD-fmk에 의해 억제됨을 알 수 있다(Fig. 4).

5. 오미자 추출물에 의한 apoptosis에 c-Jun N-terminal Kinase

(JNK) and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)의 관련성 확인

오미자 추출물에 의한 apoptosis에 JNK와 p38 MAPK 관련성을 확인하기 위해 JNK II inhibitor와 SB203580 (a p38 MAPK inhibitor)를 이용해서 MTT assay를 측정하였다. JNK II inhibitor와 SB203580 처치시에 오미자 추출물에 의한 apoptosis가 현저히 감소되었다. MTT assay로 JNK II inhibitor 처치시 100 ㎍/ml에서 98.1 ± 1.4%, 200 ㎍/ml에서 83.5 ± 2.3 %, 300 ㎍/ml에서 65.3 ± 2.2 % (P<0.01), 400 ㎍/ml에서 50.1 ± 3.2 % (P<0.01), 500 ㎍/ml에서 40.3 ± 3.3 % (P<0.01) 의 세포 생존 결과를 보였다. 또한 SB203580 처치시에는 100 ㎍/ml에서 98.2 ± 2.2 %, 200 ㎍/ml에서 85.4 ± 5.1 %, 300 ㎍/ml에서 65.1 ± 6.3 % (P<0.01), 400 ㎍/ml에서 45.2 ± 3.2 % (P<0.01), 500 ㎍/ml에서 31.1 ± 4.2 % (P<0.01)의 세포 생존 결과를 보였다(Fig. 5). 이러한 결과는 통계적으로 유의하게 JNK 와 p38 MAPK 기전이 오미자 추출물에 의한 apoptosis에 관여함을 알 수 있다.

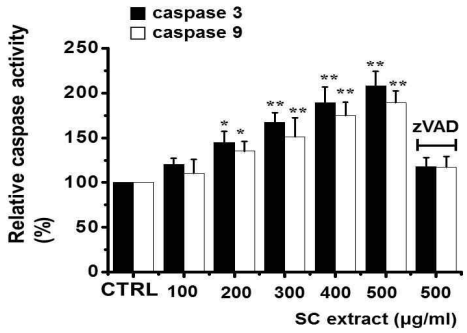

Fig. 4. Schisandra Chinensis extract increases caspase 3 and 9 activity in MCF-7 cells. Caspase 3 and 9 activities measured by enzyme assays. The caspase activity of untreated cells was taken to be 100%. Pan-caspase inhibitor, zVAD-fmk, (zVAD) at 20 ㎛M was treated to validate the analytical method. The specific activity was obtained from three samples per group. *P<0.05. **P<0.01. CTRL: untreated MCF-7 cells.

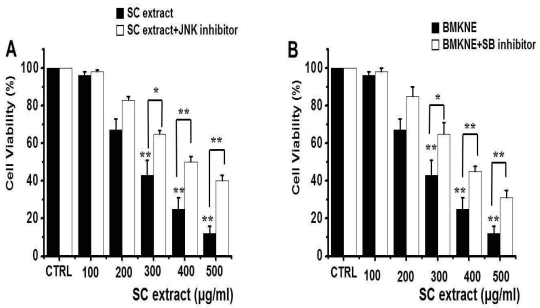

Fig. 5. The effect of Schisandra Chinensis extract on the MAPK signaling pathway in MCF-7 cells. MTT assays were used to determine cell viabilities in the presence of (A) JNK II inhibitor or (B) SB203580 (a p38 MAPK inhibitor). Cells were treated with the indicated concentrations of Schisandra Chinensis extract with JNK II inhibitor or SB203580 (both at 10 ㎛M) for 24 hours. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. *P<0.05. **P<0.01. CTRL: untreated MCF-7 cells.

6. 세포사멸에 TRPM7 이온통로의 관련성 확인

오미자 추출물에 의한 세포 사멸에 어떤 이온통로가 관련되어 있는지를 확인해 보았다. 최근 Guilbert연구 그룹에서 유방암 세포주인 MCF-7에서 유방암세포의 세포 사멸에 일과성 수용체 전압 (Transient Receptor Potential, TRP) melastatin 7 (TRPM7) 이온통로가 관여하고 있음이 밝혀졌다[25]. 따라서 오미자 추출물에 의한 MCF-7세포 사멸에 TRPM7 이온통로의 관련성을 알아보았다. 먼저 MCF-7 세포에서 TRPM7 전류를 측정한 후 이곳에 오미자 추출물을 투여 했을 때 TRPM7 억제를 확인 할 수 있었고, 또한 TRPM7을 HEK293세포에 과발현 시킨 후 오미자 추출물을 투여해 보니 TRPM7 이온통로 역시 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 6A 와 6B).

오미자 추출물에 의한 apoptosis에 TRPM7 관련성을 확인하기 위해서 HEK293세포에 TRPM7 발현을 변화 시킨 후 오미자 추출물에 의한 반응을 조사해 보았다. Tetracycline-inducible TRPM7 발현 시스템을 이용하였으며 발현감소를 위해서는 tetracycline을 투여하지 않았고 (tet(-)), 과발현 시키기 위해서는 tetracycline을 투여 하였다 (tet(+)). 실험결과 TRPM7이 과발현된 tet(+)인 경우에 오미자 추출물에 의한 apoptosis가 잘 일어났으며 (P<0.01, Fig. 6C), 따라서 TRPM7이 오미자 추출물에 의한 MCF-7세포의 apoptosis에 관여함을 알 수 있었다.

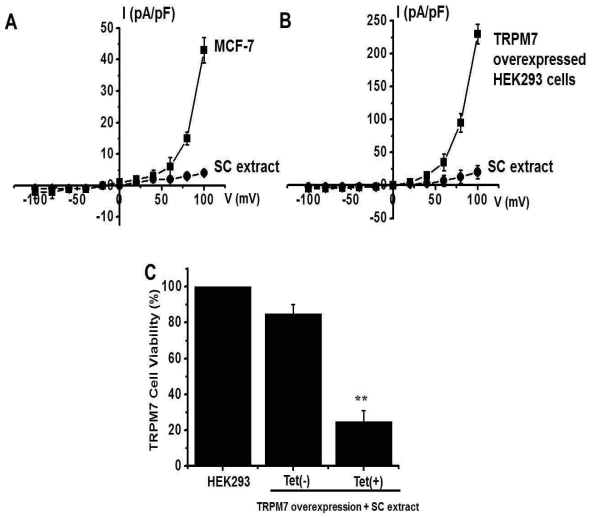

Fig. 6. The effect of Schisandra Chinensis extract on transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel overexpression in human embryonic kidney (HEK) cells. TRPM7 cells were treated or not treated with tetracycline for 1 day. Cells were incubated with Schisandra Chinensis extract, followed by MTT assay. **P<0.01. The values are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean ± S.D. **P<0.01.

고 찰

우리나라의 경우 최근 10년간 암에 의한 사망률이 점차 증가하고 있는 추세이며, 그중에서도 유방암은 여성에게 발병률이 높은 암으로 보고되고 있다[29]. 유방암의 발병률이 증가하고 있는 원인으로 유전적인 원인이 있으며 고지방, 고칼로리로 대변되는 서구화된 식생활과 채소·과일 섭취 부족 등의 변화로 인한 환경적인 원인을 생각 할 수 있다[30-32]. 처음의 증상은 무통의 작은 덩어리, 두껍거나 움푹 들어간 피부, 유두가 퇴축되는 경우 등의

자가 검진에서 대부분 발견되고 병변이 발달함에 따라 유두에서 분비물이 나오며, 아프고 궤양화 되어 액와선으로 확대된다[33]. 양방에서 외과적 절제술, 방사선요법, 화학요법, 호르몬요법 등의 치료법 개발로 사망률은 감소하였으나[33] 대부분의 항암제가 독성과 부작용이 크고, 전이와 재발의 위험도 크므로 부작용은 적으면서 암의 치료효과가 큰 한의학적인 약물 치료방법이 필요한 실정이다[34].

오미자는 Schisandraceae(오미자과)에 속한 덩굴식물 열매로, 학명은 Schisandra chinensis Baillon이다. 주요 성분인 Schisandrin은 오미자의 열매로부터 분리한 lignan으로, 기름, 정유, 색소등 다양한 성분이 함유되어 있다고 보고되어 있다[35]. 오미자의 실험 연구로는 함염증 효과, 항산화 효과, 항균효과, 항노화, 주름개선 효과등 다양한 생리적 기능에 대한 보고가 되어 있다[36]. 하지만 다른 작용보다 항암에 대한 연구는 거의 되어 있지 않고 있다.

현재 유방암은 급증하고 있다. 갑상선암 다음으로 빈도수가 높은 암으로 2012년 1년간 유방암으로 진료받은 환자는 2005년보다 세 배 가까이 늘었다[37]. 한국을 비롯한 아시아 각국에서 근래에는 식생활이 점차 서구화 되고 여성의 결혼 연령이 높아지고 출산율이 감소함에 따라 유방암의 발생율이 증가하고 있다[38]. 따라서 유방암의 치료 및 예방에 많은 연구가 진행중에 있으며 본 연구에서도 오미자에 의한 유방암 세포에서의 효과를 알아보았다.

TRP 통로는 90년대 중반에 초파리의 시각계에 존재하는 광수용체 (photoreceptor)로 처음 발견되었으며[39], 이후 사람을 포함한 고등동물의 세포에도 존재함이 알려지면서 연구가 가속화되고 있다. TRP superfamily에 속하는 TRP 통로들은 현재까지 30여가지가 알려져 있으며 생리적 기능도 각각 다르지만 종류에 관계없이 두 가지의 유사성을 가지고 있다. 첫째, TRP 통로는 비특이적 양이온 통로이면서 주로 칼슘이온에 대한 세포 내 통로로 작용한다. 칼슘이온의 세포내 유입은 해당 세포들의 탈분극 및 활성화를 유도하게 된다. 둘째, TRP 통로를 활성화시킬 수 있는 자극의 종류가 작용제 (agonist)로서의 전달자 물질 이외에 광자극, 진동이나 접촉 등의 기계적 자극, 온도자극, 화학자극, 삼투압의 변화 등으로 매우 다양하며, 한 가지 종류의 TRP 통로가 여러 가지 종류의 자극에 반응을 할 수 있기도 하다[4]. TRP 통로 단백질의 기본 골격은 6개의 막횡단 영역(transmembrane domain)을 가지는 펩티드 사슬 (peptide chain) 이다. 아미노말단 (N-terminal)과 카르복시말단(Cterminal)이 모두 세포 내측에 위치하고 있으며, 아미노말단으로부터 다섯 번째(TM5)와 여섯 번째(TM6) 막횡단 영역을 연결하는 소수성(hydrophobic) 펩티드 사슬이 양이온이 통과하는 pore loop를 형성하는 것으로 추정된다[40]. 막횡단 영역은 단독 또는 다른 TRP 분자들과 함께 일정한 입체구조를 형성하는 데 기여하는 것으로 밝혀졌다[41]. TRPM7은 많은 종류의 세포막에 존재하고 있고 다양한 기능을 가지고 있다. 세포내 Mg^{2+} 농도 조절에 관여하고[42], 신경세포의 어혈손상에 관여하며[43], zebrafish의 골격형성에 관여하고 있음이 밝혀졌다[44]. 또한 꼬마선충에 서의 배변리듬을 조절하고[45] 림프구의 phosphoinositide-3-kinase 조절에 관여하며[46], 위장관에서의 운동조절에 관여하고 있다고 알려지고 있다[47]. 세포사멸에도 관여함이 잘 알려져 많은 연구실에서 TRPM7의 역할에 관한 연구가 진행되고 있다[24,25].

본 연구에서는 오미자 추출물에 의한 유방암 세포인 MCF-7 세포에서의 항암작용을 조사해 보았다. 1일후에 농도에 의존적으로 오미자 추출물에 의해 MCF-7세포가 사멸되는 효과를 보았고, sub-G1 analysis, mitochondrial membrane depolarization과 caspase 3 또는 9를 통해서 세포 사멸에 apoptosis가 관여함을 알 수 있었다. 또 오미자 추출물에 의한 세포사멸에 JNK와 p38 MAPK 기전이 관여함을 확인하였고, TRPM7 이온통로조절로 오미자 추출물에 의한 세포사멸을 조절할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 오미자에 의한 인체 유방암세포에서의 효과를 확인할 수 있었고, 이런 결과를 바탕으로 한의학에서 사용하는 오미자 효능에 대한 적응증을 확대시킬 수 있는 좋은 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 오미자 추출물에 의한 유방암 세포인 MCF-7 세포에서의 항암작용과 TRPM7의 관련성을 알아보았는데, TRPM7 이온통로의 관련성에 대한 연구는 현재 많은 실험실에서 연구되고 있는 주제로 상당한 의미가 있는 발견이라 생각된다. 하지만 유방암세포에서 TRPM7 이외의 다른 많은 이온통로가 발견되고 있기 때문에 다양한 K^+ 이온통로나 Ca^{2+} 이온통로의 가능성도 앞으로 연구해야 할 것으로 생각된다. 또한 최근 식생활의 변화는 순환기계 질환, 암, 뇌졸중 등 다양한 성인병의 증가를 초래하게 되었으며, 이러한 성인병의 치료에 기존의 약물이나 치료방법보다는 식생활의 조절에 의한 예방의학(preventive medicine)에 관심이 높아지고 있다. 따라서 최근 이러한 관심에 천연물 식품 및 신약의 개발이 급속히 증가하고 있으며, 오미자와 같은 천연물을 이용한 항암효과에 대한 체계적인 연구가 이루어진다면, 많은 암환자들의 삶의 질 향상에 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (HI12C1886;B120008).

References

1. 보건복지부 중앙암등록본부. www.ncc.re.kr
2. www.cancer.go.kr
3. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J 17: 1675-1687, 1998.

4. Lawen, A. Apoptosis - an introduction. Bioessays 25: 888-896, 2003.
5. Jin, Z., El-Deiry, W.S. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther 4: 139-163, 2005.
6. Kroemer, G., Reed, J.C. Mitochondrial control of cell death. Nat Med 6: 513-519, 2000.
7. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86: 147-157, 1996.
8. 한송이, 김정아, 송호준, 채한, 권영규, 김병주. 홍화가 인체 대장암세포에 미치는 효과. 동의병리생리학회지 17(2):129-134, 2011.
9. 김정아, 한송이, 송호준, 채한, 권영규, 김병주. 홍화가 인체 위암세포에 미치는 효과. 동의병리생리학회지 25(3):466-470, 2011.
10. Kim, B.J., Nah, S.Y., Jeon, J.H., So, I., Kim, S.J. Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channels are Involved in Ginsenoside Rg3-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 109: 233-239, 2011.
11. 이희정, 김민철, 임보라, 배고은, 김형우, 권영규, 김병주. 고삼의 인체 유방암세포에 미치는 효과. 한국한의학연구원논문집 18(1):75-84, 2012.
12. 임보라, 이희정, 김민철, 김형우, 김병주. 인체 위암세포에서 고삼의 세포사멸효과. 한국한의학연구원논문집 18(1):85-92, 2012.
13. Sung, K.C. A study on the pharmaceutical & chemical characteristics and analysis of natural omija extract. J Korean Oil Chemists' Soc 28: 290-298, 2011.
14. Cho, Y.J., Ju, I.S., Kim, B.C., Lee, W.S., Kim, M.J., Lee, B.G., An, B.J., Kim, J.H., Kwon, O.J. Biological activity of Omija (Schisandra chinensis Baillon) extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem 50: 198-203, 2007.
15. Kim, H.K., Na, G.M., Ye, S.H., Han, H.S. Extraction characteristics and antioxidative activity of Schisandra chinensis extracts. Korean J Food Culture 19: 484-490, 2004.
16. Lee, M.S., Chao, J., Yen, J.C., Lin, L.W., Tsai, F.S., Hsieh, M.T., Peng, W.H., Cheng, H.Y. Schizandrin protects primary rat cortical cell cultures from glutamate-induced apoptosis by inhibiting activation of the MAPK family and the mitochondria dependent pathway. Molecules 18: 354-372, 2012.
17. Melhem, A., Stern, M., Shibolet, O., Israeli, E., Ackerman, Z., Pappo, O., Hemed, N., Rowe, M., Ohana, H., Zabrecky, G., Cohen, R., Ilan, Y. Treatment of chronic hepatitis C virus infection via antioxidants: results of a phase I clinical trial. J Clin Gastroenterol 39: 737-742, 2005.
18. Park, E.J., Chun, J.N., Kim, S.H., Kim, C.Y., Lee, H.J., Kim, H.K., Park, J.K., Lee, S.W., So, I., Jeon, J.H. Schisandrin B suppresses TGFβ1 signaling by inhibiting Smad2/3 and MAPK pathways. Biochem Pharmacol 83: 378-384, 2012.
19. Jo, S.H., Ha, K.S., Moon, K.S., Lee, O.H., Jang, H.D., Kwon, Y.I. In vitro and in vivo anti-hyperglycemic effects of Omija (Schizandra chinensis) fruit. Int J Mol Sci 12: 1359-1370, 2011.
20. Park, S.H., Han, J.H. A study of medicinal plants for applications in functional foods. 1. Effects of Schisandra fructus on the regional cerebral blood flow and blood pressure in rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 33: 34-40, 2004.
21. Lee, S.H., Lee, H. A study on the effect of herbal -acupuncture with Schisandra fructus solution on hyperlipidemia in rats induced by high fat diet. The J Korean Acupuncture & Moxibustion Society 28: 143-153, 2011.
22. Gnabre, J., Unlu, I., Chang, T.C., Lisseck, P., Bourne, B., Scolnik, R., Jacobsen, N.E., Bates, R., Huang, R.C. Isolation of lignans from Schisandra chinensis with anti-proliferative activity in human colorectal carcinoma: Structure-activity relationships. Analyt Technol 878: 2693-2700, 2010.
23. Kim, J.H., Choi, Y.W., Park, C., Jin, C.Y., Lee, Y.J., Park, da. J., Kim, S.G., Kim, G.Y., Choi, I.W., Hwang, W.D., Jeong, Y.K., Kim, S.K., Choi, Y.H. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from Schizandra chinensis Baill. Food Chem Toxicol 48(3):807-813, 2010.
24. Kim, B.J., Park, E.J., Lee, J.H., Jeon, J.H., Kim, S.J., So, I. Suppression of transient receptor potential melastatin 7 channel induces cell death in gastric cancer. Cancer Sci 99(12):2502-2509, 2008.
25. Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., Ouadid-Ahidouch, H. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. Am J Physiol Cell Physiol 297(3):C493-502, 2009.
26. Wykes, R.C., Lee, M., Duffy, S.M., Yang, W., Seward, E.P., Bradding, P. Functional transient receptor potential melastatin 7 channels are critical for human mast cell survival. J Immunol 179(6):4045-4052, 2007.
27. Jiang, J., Li, M.H., Inoue, K., Chu, X.P., Seeds, J., Xiong, Z.G. Transient receptor potential melastatin 7-like current in human head and neck carcinoma cells: role in cell proliferation. Cancer Res 67(22):10929-10938, 2007.
28. Abed, E., Moreau, R. Importance of melastatin-like tran\-sient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. Cell

Prolif 40(6):849-865, 2007.
29. Ministry of Health and Welfare. National survey of cancer patients; Analysis of national cancer survey. Seoul, Korea, 2008.
30. Kelsey, J.L., Berowitz, G.S. Breast cancer epidemiology. Cancer Res 48: 5615-5623, 1988.
31. Nkondjock, A., Ghadirian, P. Risk factors and risk reduction of breast cancer. Med Sci (Paris) 21: 175-180, 2005.
32. Dorai, T., Aggarwal, B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer Lett 215: 129-140, 2004.
33. 대한내과학회편, Harrison's 내과학, 16th, 서울, 도서출판 MIP, pp 559-567, 2006.
34. 권은미, 정의민, 김경석, 이수경, 최원철, 윤성우. 알러젠 제거 옻나무 추출물 위주의 한방치료와 항암화학요법을 병용한 폐암 환자 2례. 대한암한의학회지 14(1):13-20, 2009.
35. Kim, O.C., Jang, H.J. Volatile components of Schizandra chinensis Baillon. Kor J Agric Chem Biotech 39:30-36, 1994.
36. Panossian, A., Wikman, G. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine. J Ethnopharmacol 118(2):183-212, 2008.
37. 국민건강보험공단, http://www.nhic.or.kr/portal/site/main/
38. 이석준, 박성식, 함유근. 환자들의 정보요구가 e-Health 시스템 사용과 성과에 미치는 영향에 관한 연구: 유방암환자대상 수요자의료정보시스템을 중심으로. The Journal of information systems 22(2):105-129, 2013.
39. Clapham, D.E. TRP channels as cellular sensors. Nature 426(6966):517-524, 2003.
40. Vannier, B., Zhu, X., Brown, D., Birnbaumer, L. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. J Biol Chem 273(15):8675-8679, 1998.
41. Pedersen, S.F., Owsianik, G., Nilius, B. TRP channels: an overview. Cell Calcium 38(3-4):233-252, 2005.
42. Schmitz, C., Perraud, A.L., Johnson, C.O., Inabe, K., Smith, M.K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A., Scharenberg, A.M. Regulation of vertebrate cellular Mg2+ homeostasis by TRPM7. Cell 114: 191-200, 2003.
43. Aarts, M., Iihara, K., Wei, W.L., Xiong, Z.G., Arundine, M., Cerwinski, W., MacDonald, J.F., Tymianski, M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. Cell 115: 863-877, 2003.
44. Elizondo, M.R., Arduini, B.L., Paulsen, J., MacDonald, E.L., Sabel, J.L., Henion, P.D., Cornell, R.A., Parichy, D.M. Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for trpm7. Curr Biol 15: 667-671, 2005.
45. Vriens, J., Owsianik, G., Voets, T., Droogmans, G., Nilius, B. Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. Pflugers Arch 449: 213-226, 2004.
46. Sahni, J., Scharenberg, A.M. TRPM7 ion channels are required for sustained phosphoinositide 3-kinase signaling in lymphocytes. Cell Metab 8: 84-93, 2008.
47. Kim, B.J., Lim, H.H., Yang, D.K., Jun, J.Y., Chang, I.Y., Park, C.S., So, I., Stanfield, P.R., Kim, K.W. Gastroenterology 129: 1504-1517, 2005.