

# 유방암세포에서 광금전초 추출물의 암전이 억제 효과

황진기 · 안찬근<sup>1</sup> · 김성철<sup>2</sup> · 이수호<sup>2</sup> · 박승혁<sup>2</sup> · 류도곤<sup>2</sup> · 이금산<sup>3</sup> · 이영래<sup>4</sup> · 김병숙<sup>5</sup> · 권강범<sup>2\*</sup>

원광대학교 의과대학 대사질환연구센터, 1: 한의과대학 안이비인후과교실, 2: 한의과대학 한방생리학교실,  
3: 한의과대학 본초학교실, 4: 치과대학 생화학교실, 5: 전북과학대학교 호텔조리영양과

## Extracts of *Desmodii Herba* Inhibits of TPA-induced invasion in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells

Jin Ki Hwang, Chan Gn An<sup>1</sup>, Seong Cheol Kim<sup>2</sup>, Soo Ho Lee<sup>2</sup>, Sueng Hyuk Park<sup>2</sup>, Do Gon Ryu<sup>2</sup>,  
Guem San Lee<sup>3</sup>, Young Rae Lee<sup>4</sup>, Byung Sook Kim<sup>5</sup>, Kang Beom Kwon<sup>2\*</sup>

Center for Metabolic Function Regulation, Wonkwang University School of Medicine,

1: Department of Otolaryngology & Dermatology, School of Korean Medicine,

2: Department of Korean Physiology, School of Korean Medicine,

3: Department of Herbology, School of Korean Medicine,

4: Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Wonkwang University

5: Department of Hotel Culinary Arts & Nutrition, Jeonbuk Science College

It is well known that *Desmodii Herba* (DH) has an effect to eliminate dampness, relieve jaundice and to clear away toxic material, relieve swelling in Korean Medicine. However, the effect of DH on breast cancer invasion is unknown. In this study, we investigated the inhibitory effect of DH extracts (DHE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and cell invasion, as well as the molecular mechanisms involved in MCF-7, human breast cancer cells. DHE inhibits TPA-induced MMP-9 protein and mRNA expressions in a dose-dependent fashion. DHE also inhibited the TPA-induced transcriptional activation of nuclear factor-kappa B (NF-κB). These results indicate that DHE-mediated inhibition of TPA-induced MMP-9 expression and cell invasion involves the suppression of NF-κB pathway in MCF-7 cells.

keywords : *Desmodii Herba*, matrix metalloproteinase-9, MCF-7 human breast cancer cells

### 서 론

광금전초(*Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.)는 콩과의 식물로서 금전초의 가지와 잎을 가르키며, 주산지는 광둥(중국)으로 여름과 가을에 채취하여 사용하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 약리학적으로 심혈관에 작용하여 심근의 수축력을 증가시키거나 또는 간담즙의 분비를 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>1)</sup>. 실험적으로 금전초 약침이 LPS로 유도되는 흰쥐의 신장염을 보호하는 것으로 보고되었으나<sup>2)</sup> 유방암 세포의 전이에 대한 보고는 없었다.

우리나라에서 유방암은 여성에서 발생하는 암 중에서 발생률 2위를 기록하고 있으며 특히 40대에 가장 많이 발생하는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 유방에는 많은 림프관들이 존재하기 때문에

유방암세포가 겨드랑이의 림프절로 쉽게 퍼져 전이가 이뤄지는데 이러한 유방암의 전이를 억제하기 위해 MCF-7 유방암 세포주를 이용한 보고가 많이 이뤄지고 있다<sup>4,5)</sup>.

Matrix metalloproteinase (MMP)에 속하는 효소군은 고도로 유사한 아미노산 서열을 가진 단백질분해효소로서 여러 가지 기질특이성을 가지고 정상적인 조직의 재성형(tissue remodeling) 과정뿐만 아니라 관절염, 종양의 침윤 등과 같은 여러 질환에 관여하는데 특히 72 kDa (MMP-2) 및 92 kDa (MMP-9) type IV collagenase는 세포외기질과 기저막의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 이 중 MMP-9는 MMP-2와 비슷한 구조를 보이고, 생체의 조직 재조합 과정과 악성 종양의 침윤성 성장에 관여한다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 이러한 MMP의 발현을 조절하는 주요 전사인자로 NF-κB로 알려져 있

\* Corresponding author

Kang Beom Kwon, Department of Korean Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

·E-mail : desson@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6917

·Received : 2014/09/05 ·Revised : 2014/10/15 ·Accepted : 2014/10/18

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

다. NF- $\kappa$ B는 세포질에 존재하다 염증 반응 등 자극이 오면 핵 내로 이동하여 다양한 유전자의 발현을 조절한다<sup>6,7</sup>.

이에 저자는 인간 유방암세포에 광금전초 추출물을 처리한 후 유방암 세포의 전이에 대한 억제 효과 및 그 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 재료

인간 유방암 세포주 MCF-7은 한국세포주 은행을 통해 구입하였으며, DMEM 배지에 10% (v/v) 혈청과 1% 항생제를 넣어 5% CO<sub>2</sub>가 든 37°C incubator에서 배양하였다. TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate), Dimethylsulfoxide (DMSO), 그리고 anti- $\beta$ -actin 항체는 SIGMA에서 구입하였다. EZ-cytox viability assay kit는 Daeil Lab Service Co., Ltd, Seoul, Korea 에서 구입하였다.

항체 p-I $\kappa$ B $\alpha$ , 그리고 p-IKK $\alpha$  $\beta$ , IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ 는 cell signaling에서 구입하였다 (Beverly, MA, USA). 항체 MMP-9, p50, p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , 그리고 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 및 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. [ $\alpha$ -32P]dCTP는 Amersham (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. High glucose-containing DMEM, 혈청, 그리고 phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco-BRL (Gaithersburg, ME, USA)에서 구입하였다.

### 2. 광금전초 추출물의 분리

광금전초는 광명당(울산, 대한민국)에서 구입한 후 원광대학교 한의과대학 본초학 교실 이금산 교수한테 검증받았으며, 추출물을 아래와 같이 분리하였다. 광금전초 100 g을 70% 에탄올에 2시간 동안 노출시킨 후 무형광 솜을 이용하여 여과한 후 침전물이 생기지 않도록 45°C에서 Rotary Evaporator (N-1000SWD, EYELA, JAPAN)를 이용하여 농축한 다음 건조하여 12.1 g을 획득하여 -4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 3. EZ-cytox viability assay kit을 이용한 세포 독성 측정

세포는 하루 전날 96 well plate에  $2 \times 10^6$ /well씩 분주한 후 세포가 하루 동안 안정화 시키고, 광금전초 추출물을 농도 조건에 맞게 처리하고 24시간 후에 assay reagent 10  $\mu$ l을 넣어주었다. 30분 정도 배양기 내에서 반응 시킨 후 microplate spectrophotometer (Molecular Device, CA, USA) 로 450nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

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

MCF-7 cells ( $5 \times 10^5$ )에 광금전초 추출물을 1시간 전처리 후에 TPA를 처리하고 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포내 단백질은 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용

하여 분리하였다. 샘플(20  $\mu$ g)은 10% 아크릴아마이드와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) 을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk 를 사용하여 2시간 동안 블로킹 하였고, 일차항체는 1  $\mu$ g/ml of a 1:2000 dilution 하여 4°C 냉장고에서 overnight 처리하였다. 이차항체는 HRP-conjugated IgG(1:2000 dilution) 를 사용하였다. 단백질 발현양은 image analyzer(EZ-Capture ST, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

### 5. Gelatin zymography assay (효소활성 측정)

MMP-9의 활성을 측정하기 위하여 zymography 방법을 이용하였다. 세포를 6-well plate에 분주한 후 serum이 없는 상태에서 시약을 처리하여 세포 배양액을 수확하였다. 세포 배양액을 1 mg/ml gelatin이 함유된 10% polyacrylamide gel로 전기영동한 후 2.5% Triton X-100으로 SDS를 제거하였다. 그 후 developing solution으로 gel을 24시간 동안 반응시킨 후 0.25% coomassie blue로 염색하고 acetic acid와 methanol로 destaining하였다. MMP-9의 proteolytic activity는 gelatin이 분해되어 투명한 band의 세기를 비교하여 측정하였다.

### 6. 실시간 역전사 효소 중합반응(Quantitative real-time polymerase chain reaction)

MMP-9의 발현되는 유전자 발현량을 비교하기 위해 RNA 분리를 RNA Kit (TAKARA PrimeScript™ RT reagent Kit, CAT# RR037A, Tokyo, Japan)를 사용하였고, cDNA를 합성한 다음, Applied Biosystems PRISM 7000 Sequence Detection System을 이용하여 Real time RT-PCR을 수행하였다. 2  $\mu$ l의 합성 cDNA, primer, 10  $\mu$ l의 SYBR Green을 넣은 다음, DEPC-H<sub>2</sub>O로 총 20  $\mu$ l를 맞춘 후, 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 60°C에서 1분 동안 총 45 cycle을 반응시키고 housekeeping gene (GAPDH)과 비교하여 정량화하였다.

### 7. 핵산 추출 (Preparation of nuclear extract)

MCF-7 세포 ( $2 \times 10^6$  cells)에 광금전초 추출물을 1시간 전처리 후 TPA를 4시간 동안 처리하였다. 즉시, PBS로 세척 후 포집된 세포를 1,500g에서 3분 원심분리하고, cytoplasmic과 nuclear 분리는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific Korea Ltd, Seoul, Korea)를 사용하였다.

### 8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용한 NF- $\kappa$ B의 활성도 측정

전사인자의 활성도 측정을 위해 NF- $\kappa$ B consensus binding site를 가진 oligonucleotide probe (5'-CCGGTTAACAGAG GGGGCTTCCGAG-3') oligo를 2  $\mu$ l

씩 사용하였으며, 2  $\mu$ g의 poly (dI-dC)가 들어있는 10mM Tris (pH8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 2M DTT 을 함유, 250  $\mu$ g/ml BSA)에 희석하여 85°C에서 5분간 변성시킨 후 각각의 32P-labelled-probe들 (0.5-1.0ng, 100,000-2,000,000cpm)을 이용하여 32P-ATP 효소를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 20  $\mu$ g의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 6% polyacrylamide gel에 걸어 150V, 10mA로 3시간 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue (BPB)의 염색이 밑으로부터 1-2cm 정도까지 이동하게 되면 전기영동을 멈추었고, 이를 gel dryer에서 약 2시간 건조한 다음, X-ray flim에 노출시켜 감광시켰다.

### 9. Matrigel invasion assay

종양 세포의 조직 내 침투 능력은 8.0  $\mu$ m 크기의 구멍으로 구성된 transwell용 24-well insert system을 사용하였다. Matrigel이 전 처리된 insert에 3 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포를 접종한 후 시약을 처리한 다음, 24시간 후 세포를 고정시키고, crystal violet을 이용하여 아래로 침투한 세포를 염색하여 측정하였다.

### 10. 통계처리

실험 결과는 mean  $\pm$  S.E.M으로 표시하였고, 유의성의 검정은 One-Way Anova test (Microcal Origin: version6.0; Microsoft; USA)에 의하였으며, p < 0.05인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 광금전초 추출물의 세포 독성에 대한 효과

MCF-7세포에서 광금전초 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 96-well culture plate에 MCF-7 cells을 3 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 넣어준 후 24시간 후에 광금전초 추출물을 25, 50, 100  $\mu$ g/ml을 처리 하였다. 24시간 후에 세포독성을 확인한 결과 광금전초 추출물은 세포의 생존률에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

### 2. 광금전초 추출물의 MMP-9 발현에 대한 효과

MCF-7 세포에서 TPA에 의해 유도된 MMP-9 발현의 증가에 대한 광금전초 추출물의 효과를 확인하기 위해 western blot analysis, real-time PCR 그리고 zymography를 시행하였다. 다양한 농도의 광금전초 추출물(25, 50, 100  $\mu$ g/ml)과 TPA(20 nM)를 24시간 처리한 후 세포들을 수집하였다. 그 결과 MCF-7 세포에 TPA를 단독 처리한 군에서 MMP-9의 단백질과 mRNA 발현이 유의하게 증가하였으나 광금전초 추출물을 전처리한 군에서는 TPA에 의한 MMP-9의 발현이 감소하였다(Fig. 2A, 2B). 또한 zymography를 이용하여 MMP-9 효소 활성도를 조사한 결과 광금전초 추출물의 TPA에 의해 증가하는 MMP-9의 활성도를 유의하게 억제하였다(Fig. 2C).

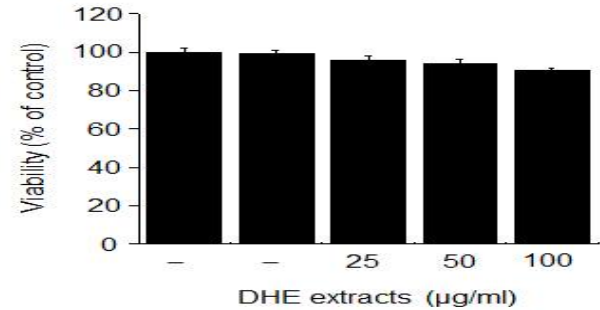


Fig. 1. Effects of DHE on MCF-7 cell viability. To test the cytotoxicity of DHE, cells were cultured in 96-well plates until 70% confluence and various concentrations (0, 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml) of DHE extracts were added to cells for 24h. EZ-CYTOX assay was used to detect the viability of the cells. The optical density value of control was regarded as 100%. Data represents are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

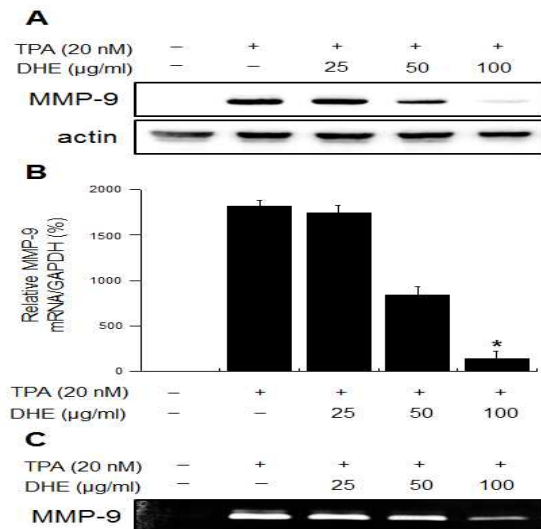


Fig. 2. DHE inhibits TPA-induced MMP-9 expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells in monolayer were treated with the indicated DHE concentrations in the presence of TPA for 24h. The expression of MMP-9 in the cells was analyzed by Western blotting. The blot was reprobed with anti-actin to confirm equal loading (A). MMP-9 mRNA levels were analyzed by real-time PCR and GAPDH was used as an internal control (B). Conditioned medium was prepared and used for gelatin zymography. Effects of DHE on the MMP-9 activity in MCF-7 cells. Cells were pretreated with DHE for 1h followed by TPA stimulation for 24h (C). Each value represents the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*p<0.01 vs. TPA.

### 3. 광금전초 추출물의 NF- $\kappa$ B DNA binding activity에 대한 효과

TPA는 다양한 전사 인자를 활성화 시켜 MMP-9의 발현을 촉진시키는 것으로 알려져 있는데 그중 대표적인 전사인자가 NF- $\kappa$ B로 알려져 있다. 따라서, MCF-7 세포에서 TPA에 의한 MMP-9의 발현이 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 것인지 EMSA를 이용하여 확인하였다. 그 결과 MCF-7 세포는 TPA에 의해 NF- $\kappa$ B의 활성이 증가하였고, 광금전초 추출물을 전처리하였을 때 NF- $\kappa$ B의 활성이 감소하는 것을 확인하였다(Fig 3A). 또한 광금전초 추출물에 의해 NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65와 p50이 감소하는 것을 확인하였다(Fig 3B). 광금전초 추

출물에 의한 NF-κB활성의 감소 기전을 조사한 결과, IKKα와 IKKβ의 발현량에 영향을 주지 않았지만 IKKαβ의 인산화를 억제하였고, IκBα의 경우 TPA를 처리한 MCF-7 세포에서는 분해되었으나 광금전초 추출물을 처리한 군에서는 IκBα의 분해가 일어나지 않았다. 또한 TPA를 처리한 MCF-7 세포는 IκBα의 인산화가 증가하였으나 광금전초 추출물을 처리하였을 경우 IκBα의 인산화가 억제되었다(Fig. 3C).

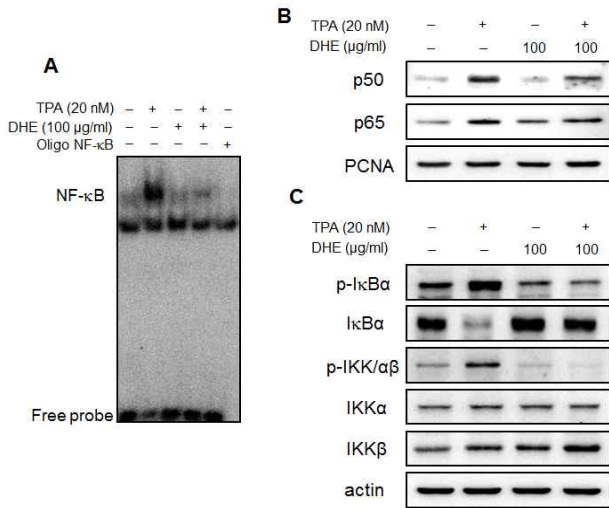


Fig. 3. DHE inhibits TPA-induced NF-κB activation and phosphorylation of IKK/αβ in MCF-7 cells. Cells were treated with DHE in the presence of TPA. Following 4h incubation, nuclear extracts were prepared. NF-κB DNA binding was analyzed by EMSA (A). Western blotting was performed to determine the cytoplasmic levels of p-IKKαβ, IKKα, IKKβ, p-IκBα, and IκBα, as well as the nuclear levels of NF-κB (p50 and p65) (B, C).

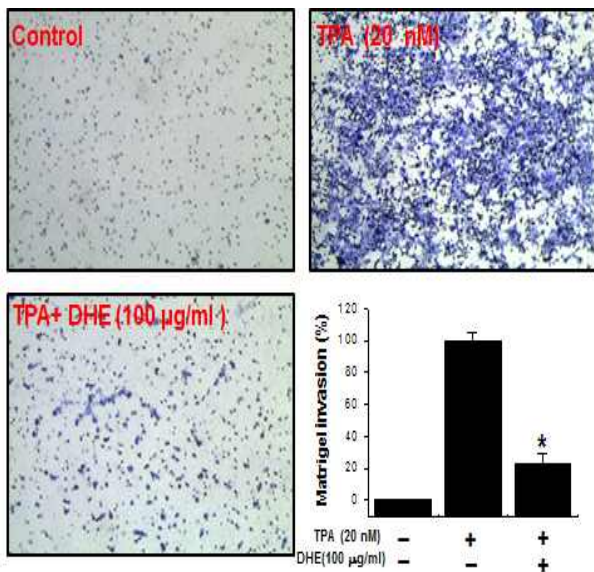


Fig. 4. DHE inhibits TPA-induced Matrigel invasion in MCF-7 cells. Cells were seeded onto the upper chamber and drugs placed in the well. After a 24h incubation, cells on the bottom of filter were fixed, stained, and counted. Each value represents the mean ± SEM of three independent experiments. \*p<0.01 vs. TPA.

4. 광금전초 추출물의 전이 능력에 대한 효과

광금전초 추출물이 TPA 자극에 의한 MCF-7 세포의 침투를 억제하는지를 확인하기 위해 in vitro matrigel invasion assay를 실시하였다. MCF-7 세포를 TPA로 자극 하였을 경우 TPA를 자극하지 않았을 때보다 전이능력이 유의하게 증가 하였으나 광금전초 추출물을 전처리한 군은 TPA에 의한 전이 능력의 증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 4). 그러나 광금전초 추출물을 단독으로 처리한 군에서 유의한 변화는 나타나지 않았다(data not shown).

고 찰

유방암은 선암종의 일종으로 전세계적으로 발생 빈도와 사망률이 증가하고 있는 실정인데, 이는 유방암이 림프절이나 혈관을 따라 다른 곳으로 이동하여 이차성 암을 형성하는 전이 능력과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>8,9</sup>. 암세포의 전이는 세포와 세포간, 세포와 기질간의 부착능력이 감소되어 운동성을 지니게 되는 암세포는 세포 외부를 둘러싸는 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막을 분해시켜 침윤하고 암세포 주위로 새롭게 형성된 혈관을 따라 다른 곳으로 이동하여 이차 전이성 암을 형성하는 것으로 알려져 있다<sup>10</sup>. Matrix metalloproteinase(MMP)는 세포외 기질과 기저막을 분해시키는 효소로서 MMP-2와 MMP-9이 암세포의 침윤성에 주요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다<sup>7</sup>.

본 실험에 사용한 광금전초(*Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr.)는 중약대사전에 나오는 광동금전초(廣東金錢草)를 가르킨다<sup>11</sup>. 최근 우리나라에서 사용하는 금전초는 주로 광동금전초를 광동지방에서 재배되는 광금전초를 대용품으로 쓰고 있다. 본 실험에 사용한 광금전초의 생약명인 *Desmodii Herba*를 추출하여 실험한 보고는 윤 등<sup>2</sup>이 유일한 것으로 보여진다. 이에 본 연구에서는 광금전초 추출물의 유방암세포의 전이에 대한 억제효과 및 기전 연구를 시행하였다.

본 연구에서 광금전초 추출물은 TPA에 의한 MMP-9의 단백질과 mRNA의 발현 증가, 활성도 증가를 유의하게 억제하였다. MMP-9의 발현을 조절하는 주요한 전사 인자는 NF-κB로 알려져 있다<sup>11</sup>. 광금전초 추출물의 MMP-9 발현에 대한 억제 효과 기전에 NF-κB 신호전달 기전과 어떠한 연관이 있는지를 확인하기 위해 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)를 이용하였다(Fig. 3A). 또한 광금전초 추출물의 MMP-9 발현억제 과정에 있어서 NF-κB의 상위신호전달 경로인 IKK 및 IκBα와 관련이 있는지 확인한 결과 광금전초 추출물이 IKK/αβ의 활성을 억제하여 IκBα의 인산화를 억제하는 것을 보여준다(Fig. 3C), 또한 western blot을 통해 NF-κB 신호전달경로의 활성을 측정하기 위한 대표적인 하위단위인 p50 및 p65의 핵내에서의 양을 측정하였다. 그 결과 TPA를 처리한 군은 p50 및 p65의 핵내로의 이동이 증가하였으나, 광금전초 추출물을 처리한 경우 p50과 p65의 핵내에서 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 광금전초 추출물은 TPA에 의한 IKK/αβ의 활성 억제-->IκBα의 인산화를 억제-->p50과

p65의 핵내로의 이동 억제 기전을 통해 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 MMP-9의 발현을 억제하는 것을 시사한다. 또한 광금전초 추출물은 TPA에 의해 유도된 MCF-7 세포의 침습을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과는 김 등이 보고한 괴화 추출물의 전이 억제 효과<sup>4)</sup>, 황 등이 보고한 구절초 추출물의 전이 억제 효과<sup>5)</sup>와 더불어 광금전초 추출물이 유방암 세포의 전이를 억제할 수 있는 후보물질이 될 것으로 사료된다.

## 결 론

광금전초 추출물의 유방암세포주인 MCF-7 세포에 대한 암전이 억제 효과 및 작용기전을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

광금전초 추출물은 TPA에 의한 MMP-9의 발현 및 활성도의 증가를 유의하게 억제하였다. 광금전초 추출물은 TPA에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 IKK $\alpha$  $\beta$ 의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B활성을 감소시켰다. 광금전초 추출물은 TPA로 유도된 MCF-7 세포의 침습을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과로 광금전초 추출물은 TPA에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여, MMP-9의 발현을 억제하였으며, MCF-7 유방암 세포의 전이에도 억제 효과를 보이는 것을 확인하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2013학년도 원광대학교 교비 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Kim, C.M., Shin, M.K., Lee, K.S., Ahn, D.K. Great Dictionary of Chinese Medicine, Seoul, Jeongdam Press pp 369-371, 1999.
2. Yoon, K.S., Kang, J.H., Lee, H. Anti-inflammatory Effect on Desmodii Herba Pharmacopuncture at KI10 on Nephritis in Rats. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society 28(3):43-54, 2011.
3. Korean Breast Cancer Society Policy Committee. Breast Cancer Facts & Figures 2006-2008. Seoul, Korean Breast Cancer Society, 2008.
4. Kim, J.M., Lee, Y.R., Hwang, J.K., et al. Effects of Flos Sophorae ethanol extract on NF- $\kappa$ B dependent MMP-9 expression in human breast cancer cell. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 28(1):22-28, 2014.
5. Hwang, J.K., Kim, J.M., Kim, M.S., et al. Chrysanthemum zawadskii var. latilobum Extracts inhibits of TPA-induced invasion by reducing MMP-9 expression via the suppression of NF- $\kappa$ B activation in MCF-7 human breast carcinoma cells. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 27(6):782-788, 2013.
6. Stetler-Stevenson W.G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metast Rev 9: 289-303, 1990.
7. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 10: 415-433, 2000.
8. Edwards, B.K., Brown, M.L., Wing $\alpha$ , 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.
9. Park, S., Bae, J., Nam, B.H., Yoo, K.Y. Aetiology of cancer in asia. Asian Pac J Cancer Prev 9(3):371-380, 2008.
10. Gupta, G.P., Minn, A.J., Kang, Y., et al. Identifying site-specific metastasis genes and functions. Cold Spring Harb Syrnq Quant Biol 70: 149-158, 2005.
11. Vertegaal, A.C., Kuiperij, H.B., Yamaoka, S., et al. Protein kinase C-alpha is an upstream activator of the I $\kappa$ B kinase complex in the TPA signal transduction pathway to NF-kappaB in U2OS cells. Cell Signal 12: 759-768, 2000.