

단 보

인간유방암 MDA-MB-231세포에서 peptide H에 의한 TNF α 발현 억제

성대일¹ · 박잠언¹ · 강충경² · 김한복^{1*}

¹호서대학교 생명공학과 기초과학연구소, ²호서대학교 나노바이오트로닉스학과 바이오융합연구소

Peptide H reduces IL-6 expression in human breast cancer MDA-MB-231 cells

Dae Il Sung¹, Jameon Park¹, Choong Kyung Kang², and Han Bok Kim^{1*}

¹Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

²Department of Nanobionics, Bioconvergence Lab, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

(Received July 28, 2015; Accepted September 12, 2015)

ABSTRACT: Chungkookjang (fermented soybeans) contains diverse peptides. Human breast cancer MDA-MB-231 cells were treated with peptide H derived from Chungkookjang, and TNF α expression in the cells was conspicuously repressed, suggesting peptide H's regulation of IL6 since IL6 is induced by TNF α . The structure of peptide H was different from those of glucocorticoid and dexamethasone, suggesting different mechanisms of TNF α expression suppression. Peptide H which reduces TNF α expression can be developed as drugs for cancer, rheumatoid arthritis and Crohn's disease, after more investigation.

Key words: breast cancer, inflammation, peptide, TNF α

청국장에는 다양한 펩타이드가 들어 있다. *B. licheniformis* B1으로 제조한 대두 발효 청국장에는 펩타이드 Ala-Phe-Pro-Gly (Lee *et al.*, 2014) Gly-Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr (Lee *et al.*, 2014), Lys-Pro (Matsui *et al.*, 2004), Gln-Lys (Matsui *et al.*, 2004) 등이 존재한다. 펩타이드 H Glu-Val-Trp-Trp-Met-Tyr (Sung *et al.*, 2014)는 이 중 Gly-Val-Ala-Trp-Trp-Met-Tyr에서 유래했다.

청국장 유래 peptide H는 유방암 세포에서 염증 유전자 IL6의 발현을 억제했다(Sung *et al.*, 2014). 만성 염증은 암과 연결된다(Hwang *et al.*, 2011; Landskron *et al.*, 2014). Peptide H가 유방암세포에서 또 다른 대표적 염증 유전자 TNF α 의 발현을 억제할 수 있는지를 알아보는 것은 흥미로운 일이다.

인간 유방암 MDA-MB-231 세포를, DMEM/High glucose (Hyclone)을 사용하여 배양하였다. 배지조성으로는 10% FBS (Hyclone), 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Cellgro)이며, 세포가 80-90% 자랐을 때 1 × DPBS로 2번 씻어준 후, 1 ×

Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 분리하여 계대배양을 실시했다. 계대배양 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. MDA-MB-231 세포를 96 well plate에 well당 5 × 10³씩 seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 안정화시켰다. 안정화된 후 세포배양액을 모두 제거하고 1 mM peptide H를 배양액에 녹였다. 녹인 배양액을 100 μ l씩 넣어 준 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포성장은 enhanced cell viability assay kit (EZ3000, Daeil Lab)를 이용, 450 nm에서 측정하였다.

Peptide를 처리한 MDA-MB-231 세포로부터 Ribospin (GenAll)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 순도 측정하여 OD 1.8-2.0이 나온 것을 확인 후 2.5 mM dNTP 6 μ l, Oligo-dT 6 μ l, DEPC 34 μ l, RNA 6 μ l, RNase inhibitor 1 μ l를 넣고 70°C에서 10분간 반응 시킨 후 Reverse transcriptase (Enzymomics) 1 μ l, 10× Reverse transcriptase buffer 5.3 μ l를 넣고 43°C에서 90분간 반응 시키고 70°C에서 5분간 반응 시켜주어 cDNA를 합성하였다.

Realtime PCR (CFX 96 Touch Real time PCR)을 사용하여

*For correspondence. E-mail: hbkim@hoseo.edu;
Tel.: +82-41-540-5624; Fax: +82-41-548-6231

mRNA 발현을 측정하였다. Illumina 제품인 2 X quanti MIX SYBR 시약을 사용하였고 활성개시를 95°C에서 10분간 실시하였고, denaturation은 95°C에서 15초, annealing은 52°C에서 15초, extension은 72°C에서 15초씩 40 cycle을 실시하였다. 사용한 primer로는 TNF- α forward primer 5'-GCCTGCTGCACTTTGGAGTG-3', reverse primer 5'-TCGGGGTTCGAGAAGATGAT-3', β -actin forward primer 5'-GGATGCAGAAAGGAGATCACTG-3', reverse primer 5'-CGATCCACACGGAGTACTTG-3'를 사용했다. 데이터 분석은 CFX Manager version 3.1에 의해 이루어졌다.

Peptide H 구조를 바탕으로 그 기능을 유추하기 위해, peptide 구조 제작 프로그램 amber 14 (forcefield ver ff03)와 분자 가시화 프로그램 VMD 1.9.1을 이용해서 Peptide H 구조를 결정했다. LOX2와의 interaction을 PepSite (Trabuco *et al.*, 2012)를 사용하여 예측하였다. PepSite는 웹서버 기반의 계산 tool로서 spatial position-specific scoring matrices (S-PSSM)을 사용하여 가장 유력한 아미노산의 binding point (hot spots)를 계산한다. 본 연구에서는 LOX2의 RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb/) (Berman *et al.*, 2000)의 ID인 '4NRE'와 청국장 유래 peptide H 시퀀스 EVYYMY를 입력하여 계산을 하였으며 가장 높은 matching score를 가지는 예측 결과를 시각화하였고(Fig. 3), p값을 구하였다.

Peptide H를 인간 유방암 MDA-MB-231 세포(Ndlovu *et al.*, 2009)에 처리하면 IL6 발현이 감소되었다(Sung *et al.*, 2014). TNF α 는 IL6 발현을 유도한다고 알려져 있다(Sawada *et al.*, 1992; Tanabe *et al.*, 2010). Peptide H를 MDA-MB-231 세포에 처리하여 TNF α 발현의 변화를 결정하였다. MDA-MB-231 세포에서는 TNF α 발현이 지속적으로 일어난다(자료 미제시). Peptide H를 MDA-MB-231 세포에 처리했을 때, TNF α 발현은 뚜렷하게 억제되었다(Fig. 1). TNF α 에 의해 활성화 내지 유도되는 IL6 발현도 MDA-MB-231 세포에서 감소되었을 것이다.

TNF α 발현은 유전자 promoter에 NF κ B가 부착하여 전사단계에서 조절되거나, mRNA 3' UTR에 repressor가 부착하여 번역을 막을 수도 있다. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 체계는 TNF α 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Swantek *et al.*, 1997). Peptide H는 3' UTR에서 repressor가 떨어지는 것을 방해하거나 MAPK 발현체계의 특정단계를 방해하여 TNF α 발현을 억제할 수도 있을 것이다. 이를 뒷받침하는 추후 연구가 진행되어야 된다.

만성염증은 암의 발생과 밀접한 관련이 있다(Lee *et al.*, 1999; Landskron *et al.*, 2014). 따라서 peptide H에 의한 항염

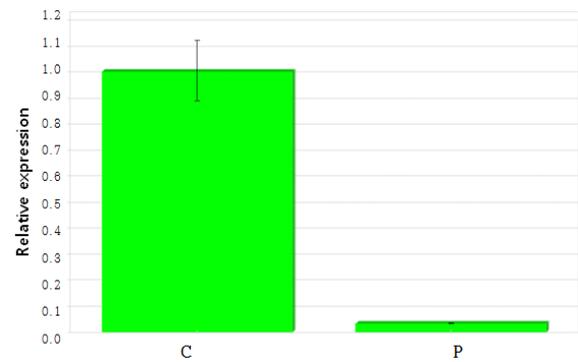


Fig. 1. TNF α expression. Realtime PCR for the amplification of TNF α mRNA in MDA-MB-231 cells was performed. β -Actin mRNA was amplified as an internal control. TNF α expression in MDA-MB-231 cells treated with 1 mM peptide H(P) and without the peptide(C) was compared after the realtime PCR performance. Error bars are shown in control(C) and the peptide H(P) treatment.

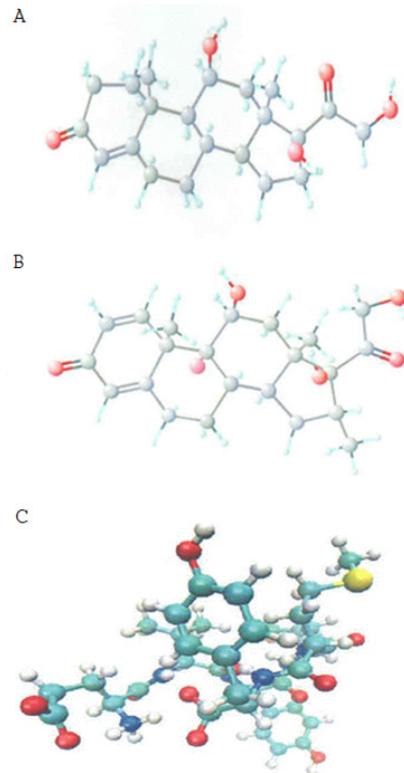


Fig. 2. (A) Structure of glucocorticoid, (B) Structure of dexamethasone, (C) Structure of peptide H.

효과는 항암효과로 연결될 수 있을 것이다.

Peptide H 구조를 바탕으로 그 기능을 유추하기 위해 Peptide H 구조를 결정했다(Fig. 2C). Peptide H 구조는 기존의 대표적인 항염증제, glucocorticoid, dexamethasone과 전혀 유사하지 않아(Fig. 2), 그들과 다른 기작으로 TNF α 발현억제에

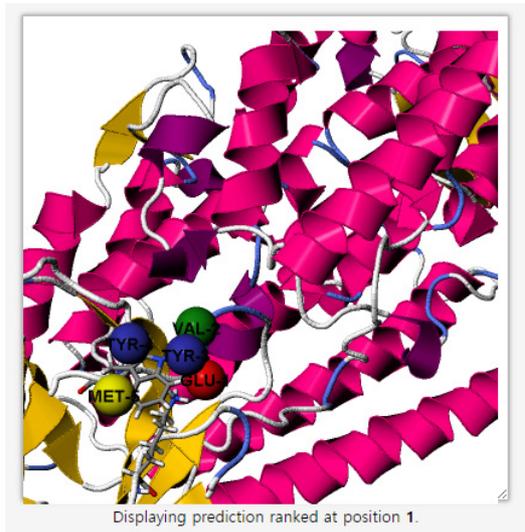


Fig. 3. Interaction between peptide H and LOX2. The model is predicted using PepSite.

작용할 것으로 사료된다.

Lipoxygenase는 TNF α 와 IL6 발현의 유도과 관련이 있으며, lipoxygenase 활성의 억제제는 TNF α 와 IL6 발현의 감소로 연결된다는 보고가 있어서(Somvanshi *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2014), Peptide H가 lipoxygenase 저해제로서 역할을 할 가능성을 고려해 보았다. Peptide H가 lipoxygenase와 상호작용할 수 있는지 여부를 먼저 알아 보았다. Peptide H와 lipoxygenase LOX2와의 interaction을 PepSite (Trabuco *et al.*, 2012)를 사용하여 예측하였다. 본 연구에서는 LOX2와 peptide H의 interaction에서, 가장 높은 matching score를 가지는 예측 결과를 시각화하여 모델을 구하였고(Fig. 3), p값을 구하였다. 모델은 구했지만, 이 모델의 p값이 0.26으로 Peptide H와 LOX2가 실제로 상호작용한다고 보기는 어려울 것이다. 지금까지는 peptide H와 유사한 물질은 찾을 수 없었으며 신규물질로 사료된다. 양이온과 소수성 아미노산을 가지는 hexamer peptide가 막단백질과 상호작용하는 것이 알려져 있다(Wenzel *et al.*, 2014). 음이온과 다수의 소수성 아미노산을 가지는 peptide H도 막단백질과 상호작용하면서 세포내부로 들어와 TNF α 발현에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있으며 이를 확인하는 연구가 필요할 것이다.

한편 TNF 차단제 휴미라(Humira[®])는 류마티스관절염, 건선, 강직성 척수염, 궤양성 대장염, 크론병(Van Dullemen *et al.*, 1995; McInners *et al.*, 1997)에 효과가 있는 치료제로 개발되어 있다. Peptide H도 TNF α 발현 억제 효과가 있으므로 심도있는 연구를 바탕으로, 이들 질환의 치료제로 개발될 수 있기를 기대해 본다.

적 요

청국장은 다양한 peptide류를 포함한다. 청국장 유래의 peptide H를 인간유방암 MDA-MB-231 세포에 처리했을 때, TNF α 발현은 뚜렷하게 억제되었다. TNF α 에 의해 유도되는 IL6 발현 역시, peptide H에 의해 감소될 수 있음을 시사해 준다. Peptide H구조는 glucocorticoid, dexamethasone과 전혀 유사하지 않아 그들과 다른 기작으로 TNF α 발현억제에 작용할 것을 시사해 준다. Peptide H는 TNF α 발현 억제 효과가 있으므로 보다 깊이 있는 연구를 바탕으로, 류마티스 관절염, 크론병 등의 치료제로 개발될 수 있기를 기대해 본다.

References

- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, L.N., and Bourne, P.E. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.
- Hwang, J.S., Yoo, H.J., Song, H.J., Kim, K.K., Chun, Y.J., Matsui, T., and Kim, H.B. 2011. Inflammation-related signaling pathways implicating TGF β are revealed in the expression profiling of MCF7 cell treated with fermented soybean, Chungkookjang. *Nutr. Cancer* **63**, 645-652.
- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/149185>.
- Lee, J.J., Lee, D.S., and Kim, H.B. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* **35**, 296-301.
- Lee, W.H., Wu, H.M., Lee, C.G., Sung, D.I., Song, H.J., Matsui, T., Kim, H.B., and Kim, S.G. 2014. Specific oligopeptides in fermented soybean extract inhibit NF- κ B-dependent iNOS and cytokine induction by toll like receptor ligands. *J. Med. Food* **17**, 1239-1246.
- Lin, H., Lin, T., Wu, M., Chiu, Y., Tang, C., Hour, M., Liou, H., Tu, H., Yang, R., and Fu, W. 2014. 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate TNF- α -induced inflammation in human synovial fibroblasts. *PLoS One* **9**, e107890.
- Matsui, T., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Lee, D.S., and Kim, H.B. 2004. Isolation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 355-358.
- McInners, I.B., Leung, B.P., Sturock, R.D., Field, M., and Liew, F.Y. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nature Med.* **3**, 189-195.
- Ndlovu, M.N., Lint, C.V., Wesmael, K.V., Callebert, P., Chalbos, D., Haegeman, G., and Berghe, W.V. 2009. Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible

- chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells. *Mol. Cell Biol.* **29**, 5488–5504.
- Sawada, M., Suzumura, A., and Marunouchi, T.** 1992. TNF α induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res.* **583**, 296–299.
- Somvanshi, R.K., Singh, A.K., Saxena, M., Mishra, B., and Dey, S.** 2008. Development of novel peptide inhibitor of lipoyxygenase based on biochemical and BIAcore evidences. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1812–1817.
- Sung, D.I., Park, J., and Kim, H.B.** 2014. Peptide H reduces IL-6 expression in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Kor. J. Microbiol.* **50**, 261–263.
- Swanek, J.L., Cobb, M.H., and Geppert, T.D.** 1997. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF α) translation: glucocorticoids inhibit TNF α translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6274–6282.
- Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi S., Iida, H., Dohi, S., and Kozawa, O.** 2010. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J. Neuroinflam.* **7**, 16.
- Trabuco, L.G., Lise, S., Petsalaki, E., and Russell, R.B.** 2012. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, 423–427.
- Van Dullemen, H.M., Deventer, S.J.H., Homes, D.W., Bijl, H.A., Jansen, J., Tytgat, G.N.J., and Woody, J.** 1995. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterol.* **109**, 129–135.
- Wenzel, M., Chiriac, A.L., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., Gust, R., Albada, B., Penkova, M., Krämer U., et al.** 2014. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 1409–1418.