

Research Article



유방암세포에서 세포외 소포체 분비 감소를 통한 glabridin의 항암효과

최상현 ¹, 황진현 ¹, 백문창 ², 조영은 ¹

¹안동대학교 식품영양학과
²경북대학교 의과대학 분자의학교실

OPEN ACCESS

Received: Feb 11, 2022
Revised: Mar 13, 2022
Accepted: Mar 18, 2022
Published online: Apr 5, 2022

Correspondence to Young-Eun Cho

Department of Food Science and Nutrition,
Andong National University, 1375 Kyungdong
Road, Andong 36729, Korea.
Tel: +82-54-820-5484
Email: yecho@andong.ac.kr

© 2022 The Korean Nutrition Society
This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)
which permits unrestricted non-commercial
use, distribution, and reproduction in any
medium, provided the original work is properly
cited.

ORCID iDs

Sang-Hun Choi
<https://orcid.org/0000-0001-9907-3549>
Jin-Hyeon Hwang
<https://orcid.org/0000-0002-5469-1877>
Moon-Chang Baek
<https://orcid.org/0000-0002-4266-1048>
Young-Eun Cho
<https://orcid.org/0000-0001-9864-0265>

Funding

This work was supported by a Research Grant
of Andong Nation University.

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that
might lead to conflict of interest.

Anti-cancer effect of glabridin by reduction of extracellular vesicles secretion in MDA-MB-231 human breast cancer cells

Sang-Hun Choi ¹, Jin-Hyeon Hwang ¹, Moon-Chang Baek ², and Young-Eun Cho ¹

¹Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea
²Department of Molecular Medicine, CMRI, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41944, Korea

ABSTRACT

Purpose: Glabridin (GD) is a bio-available isoflavane isolated from the root extract of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). It exhibits a variety of pharmacological activities such as anti-inflammatory and anti-oxidant activities. However, extracellular vesicles (EVs) secretion and the anti-cancer mechanism of action remains largely unknown. The present study investigates the anticancer effects of GD by determining the inhibition of EVs secretion in the human breast cancer cell line, MDA-MB-231.

Methods: Cell viability, reactive oxygen species (ROS) production, migration, invasion rate, and vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration were assessed in MDA-MB-231 cells treated with increasing concentrations of GD (0.1, 1, 5, 10, 20 μM). Subsequently, EV secretion and exosomal DEL-1 protein expression were evaluated to determine the anticancer effects of GD.

Results: The results showed that GD significantly inhibited the cell proliferation of MDA-MB-231 cells in a dose- or time-dependent manner. Also, ROS production and apoptosis marker protein cleaved caspase-3 were significantly increased in GD-treated MDA-MB-231, compared to control. Furthermore, GD exposure resulted in significantly decreased not only migration and invasion rates but also the VEGF concentration, thereby contributing to a reduction in angiogenesis. Interestingly, the concentration and number of EVs as well as EV marker proteins, such as CD63 and TSG101, were decreased in GD-treated MDA-MB-231 cells. Markedly, extracellular matrix protein DEL-1 as angiogenesis factor was decreased in EVs from GD-treated MDA-MB-231 cells.

Conclusion: This study identifies that the anti-cancer molecular mechanism of GD is exerted via inhibition of angiogenesis and EVs secretion, indicating the potential of GD as a chemotherapeutic agent for breast cancer.

Keywords: glabridin; extracellular vesicles; apoptosis; breast cancer

서론

한국인 사망원인 중 가장 높은 비율을 차지하는 암은 여전히 주요한 보건 문제가 되고 있다. 그 중에서도 유방암은 국내 여성 암 발생 유형 중 전체 117,165명 중 25,452명 (24.7%)으로 그 비율이 가장 높으며, 사망률 또한 31,262명 중 2,748명 (8.8%)으로 높게 보고된 바 있다 [1]. 그 원인으로 유방암은 자궁암, 전립선암과 같은 호르몬과 관련된 암으로 비만, 음주, 고지방 섭취 등 식요소인과 생활습관이 암 발병의 중요한 위험인자로 지목되고 있다 [2]. 또한 유방암은 원발 부위로부터 림프절이나 혈관을 타고 다른 조직으로 쉽게 이동하여 2차성 암을 형성하는 전이능력을 가진다. 그 중 특히 선택적으로 뼈나 폐로 전이가 잘 된다고 알려져 있는데, 이러한 전이성 유방암 환자들은 수술과 여러 치료요법으로도 개선되기 힘들다 [3,4]. 따라서 유방암은 치료나 수술보다는 예방이 중요한 요점으로 제시되고 있다.

Glabridin (GD)은 감초 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 뿌리 추출물로부터 분리된 생물로 이용 가능한 이소플라빈 (isoflavin)이다. GD는 염증성장 질환 (inflammatory bowel disease)에 대한 효과 [5], 항산화 [6], 항염증 [7], tyrosinase 활성 억제 [8], 그리고 선택적 에스트로겐 조절기 역할 [9] 등 다양한 약리학적 효과를 보인다고 보고되었다.

Extracellular vesicles (EVs)는 대표적인 세포외 소포체 vesicle로 30–150 nm 사이즈로 알려져 있다 [10]. 모세포의 ‘Avatar’처럼 세포의 주요 핵산, 단백질, 지질들을 가지고 세포-세포 사이의 커뮤니케이션을 하는 것으로 알려져 있다 [11]. 최근 보고에 의하면, 암세포에서 유래된 EVs는 pre-metastatic niche를 형성하여 암 전이를 유발시킨다고 알려져 있다 [12]. 이러한 암세포 유래 EVs 분비 억제가 암 제어 타겟으로 주목받고 있다 [13]. 하지만 천연물을 이용한 EVs 분비 억제를 통한 항암 효과에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구의 목적은 인간 유방암 세포 라인인 MDA-MB-231 세포에서 GD에 의한 EVs의 분비 억제 및 혈관 생성 억제 기전을 통해 유방암에 대한 감초 유래 GD의 항암효과를 확인하고자 하였다.

연구방법

시료준비

본 실험에서 사용된 GD는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)에 100 mM 농도로 용해한 뒤 4°C에 보관하였다. Western blot에 사용한 항체는 p-JNK, Bax, GAPDH, TSG101, CD63는 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA, USA)에서, DEL-1은 Abcam Biotechnology (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였고, mouse, rabbit 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구입하였다.

유방암 세포주의 배양

본 실험에 사용한 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium/high Glucose (Gibco, Rockville, MD, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (Gibco)을 첨가한 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포의 배양액은 2-3일에 한 번씩 새로운 배지로 교환하였다.

EVs 분리

본 실험에서 측정된 EVs는 인간 유방암 세포 MDA-MB-231 세포에 GD 10 µM을 24시간 처리한 후 ExoQuick-TC (System Biosciences, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 세포와 세포 잔해를 제거하기 위하여 세포배양액을 원심분리 (3,000 × g, 15 minutes)하고, ExoQuick-TC을 적당량 넣고 잘 섞은 후 4°C에서 overnight하였다. 그 후 원심분리 (1,500 × g, 30 minutes)하여 상층액을 제거하고 EVs를 분리하였다.

MTT assay

MDA-MB-231 세포를 96-well plate의 각 well당 1 × 10⁴ cells/100 µL가 되도록 분주한 후 plate에 붙을 수 있도록 세포성장배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 GD를 농도별로 (0.1, 1, 5, 10, 20 µM) 처리하고 24시간 및 48시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich)용액을 5 mg/mL 농도로 10 µL씩 각 well마다 분주하고 배양기에서 3시간 배양한 뒤, 배지와 MTT 용액을 제거하고 100 µL의 DMSO를 넣어 생성된 formazan을 용해시켜 microplate reader (Infinite m200pro; Tecan, Grödig, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DCF, cleaved caspase-3 염색

GD가 MDA-MB-231 세포의 apoptosis와 관련이 있는지를 시각화 하기위해 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)염색을 실시했다. 8-chamber slides에 각 well당 1 × 10³ cells/300 µL가 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 GD를 농도별로 (0, 1, 5, 10 µM) 처리하고 24시간 배양하였다. 다음으로 PBS로 세척하고, 4% paraformaldehyde solution으로 15분간 고정 후 DAPI용액으로 염색하였다. 핵의 상태 변화를 형광현미경 (Zeiss fluorescence microscope; Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA)으로 관찰하였다.

Western blot 분석

MDA-MB-231 세포에 24시간 동안 GD를 처리한 후 배지를 제거하고, RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 사용하여 분리하고 원심분리 (2,000 rpm, 4°C, 10 minutes) 후 단백질을 얻었다. 추출한 동일한 양의 단백질을 LDS sample buffer (4×)와 4:1로 혼합하여 dry bath (100°C, 10 minutes)로 가열한 후 시료를 만들었다. 그 후 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동으로 단백질을 gel상에 분리하고 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20)에 희석한 5% skim milk로 2시간 이상 blocking한 후, p-JNK, Bax, GAPDH, TSG101, CD63 및 DEL-1 각각의 1차 항체를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 처리하였다. Overnight한 후 TBS-T buffer로 10분간 3회 세척하고 2차항체를 2시간 동안

상온에서 반응시켰다. 반응 후, TBS-T buffer로 10분간 3회 세척하고 FUSION SOLO X (VIBER, Paris, France)를 사용하여 단백질 밴드를 확인하였다.

Wound healing assay에 의한 cell migration 관찰

6 well plate에 MDA-MB-231 세포를 분주하고 세포성장배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포가 가득 찼을 때 pipette tip을 이용해 cell monolayer 가운데 물리적인 상처를 내고 부유한 세포를 제거하기 위해 PBS로 세척한 후 GD 10 µM를 처리했다. 처리 후 현미경을 이용해 0시간 및 24시간마다 관찰하였다.

Transwell assay에 의한 cell invasion 관찰

Trans well assay는 cell culture insert (Falcon® Cell Culture Inserts, pore size, 8 µm; Corning Inc., Corning, NY, USA)를 이용해 실험하였다. MDA-MB-231 세포를 serum free medium에 1 × 10⁵ cells/mL 농도로 chamber 안쪽에 300 µL를 넣고, chamber 바깥쪽에는 10% FBS 함유한 medium 700 µL를 넣고 GD를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 후 chamber를 제거하고 cell stain solution으로 세포를 염색하고 세포 수를 측정하였다.

VEGF 농도 측정

상업적 ELISA kit (Quantikine Human VEGF immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 450 nm파장에서 microplate reader (Infinite m200pro; Tecan)로 VEGF 농도를 흡광도를 이용하여 측정하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS Statistics (ver. 27.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였고, 모든 실험결과는 평균과 표준오차를 사용하여 나타내었고 각 군간 비교는 t-test를 실시하였다. 대조군과 비교하여 p 값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과

GD의 세포 생존능력과 형태학적 변화에 미치는 영향

GD의 구조는 Fig. 1에 나타내었다. GD를 각각 0, 0.1, 1, 5, 10, 그리고 20 µM 농도로 24시간 처리했을 때 각각 농도 별 세포의 증식률은 100%, 102%, 100%, 98%, 97%, 68%로 대조군과 비교하여 20 µM의 농도에서 유의적으로 세포 증식률이 감소하였다 (Fig. 2A). 그리고 동등한 조건으로 GD를 48시간 처리했을 때 각각 농도 별 세포의 성장률은 100%, 96%, 100%, 99%, 90%,

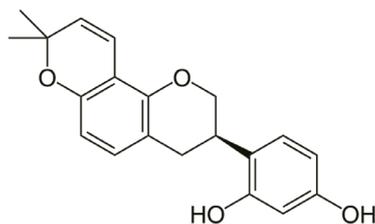


Fig. 1. The chemical structure of glabridin.

68%로 대조군과 비교하여 10, 20 μM 의 농도에서만 세포증식률이 유의적으로 감소하였다. 따라서 GD가 MDA-MB-231세포에 10, 20 μM 이상의 높은 농도에서 세포의 증식률을 억제하는 것으로 확인하였다. 본 연구에서는 10 μM 농도를 처리하여 다양한 기전 연구를 하였다.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 촉발된 신호전달경로를 통해 세포사멸 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 세포내 ROS를 측정하는 방법 중 DCF-DA 염색법을 가장 많이 사용하므로, 이 방법을 통해서 MDA-MB-231세포에 GD를 1, 5, 10 μM 의 농도로 24시간 동안 처리한 후 ROS 발현을 확인하였다 (Fig. 2B). 그 결과 10 μM 의 농도에서 ROS 발현이 가장 높은 것을 확인하였다.

세포의 증식률 억제가 apoptosis에 의해 유도된 결과인지 확인하기 위해 cleaved caspase-3 stain 및 apoptosis marker 단백질의 변화를 확인하였다. MDA-MB-231세포에 GD를 1, 5, 10 μM 의 농도로 24시간 동안 처리한 후 DAPI 염색을 하여 형광 현미경으로 관찰하였다 (Fig. 2C). 그 결과 농도 별로 GD를 처리한 세포에서 농도 의존적으로 cleaved caspase-3 발현이 증가하는 것을 형광 염색법을 통해 확인할 수 있었다. Apoptosis marker 단백질인 p-JNK의 발현 또한 10 μM 의 GD를 처리한 군에서 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2D). 하지만, Bax

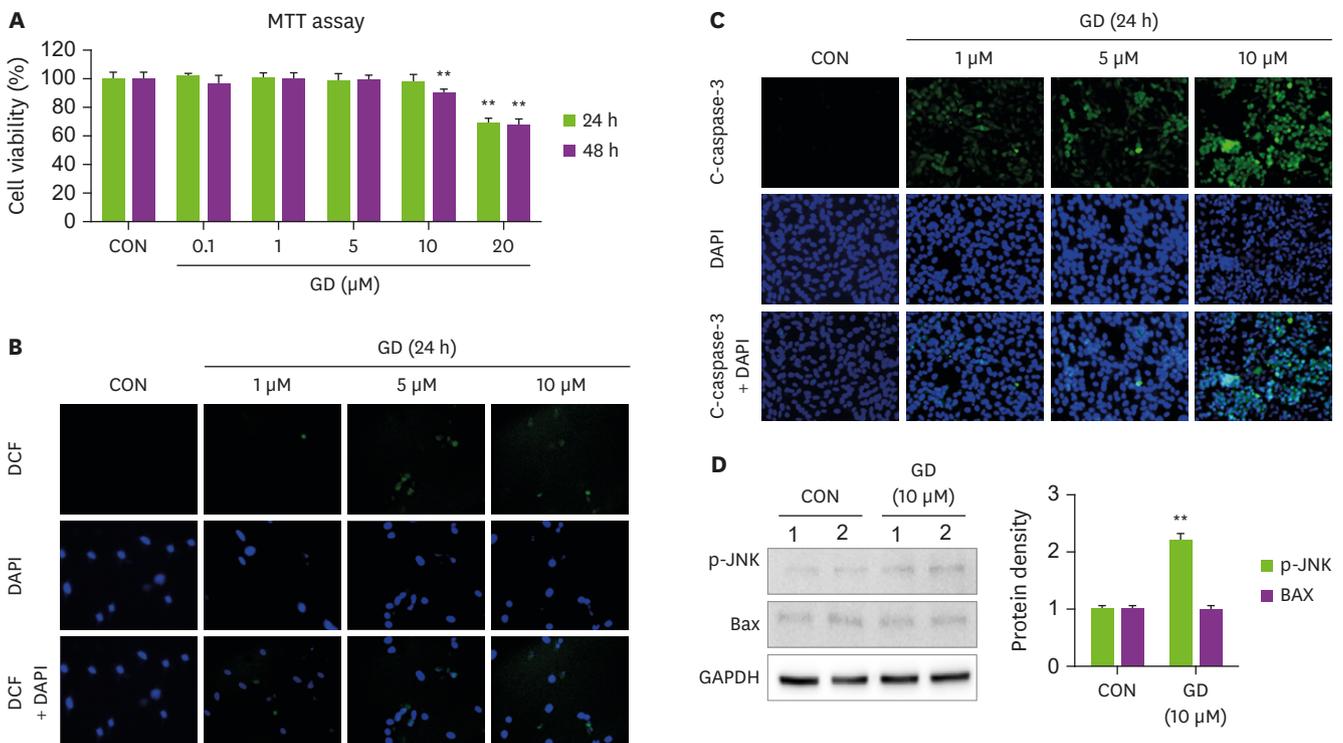


Fig. 2. Effect of GD on the cell viability and the morphological changes.

(A) Cell viability in MDA-MB-231 cells treated with GD (0.1, 1, 5, 10, and 20 μM) compared with CON (only growth media) (n = 8/sample). (B) Confocal images showing relative ROS in MDA-MB-231 cells treated with GD (1, 5 and 10 μM) compared with CON (only growth media) (n = 4/sample). MDA-MB-231 cells were counterstained with DAPI to stain the cell nuclei. (C) Confocal images showing relative apoptosis using cleaved caspase-3 in MDA-MB-231 cells treated with GD (1, 5, 10 μM) compared to CON (n = 4/sample). MDA-MB-231 cells were counterstained with DAPI to stain the cell nuclei. (D) Representative levels of apoptosis marker proteins p-JNK and Bax in the indicated groups are shown. The data represent mean \pm SD.

MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; GD, glabridin; CON, control; ROS, reactive oxygen species; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein.

**p < 0.01.

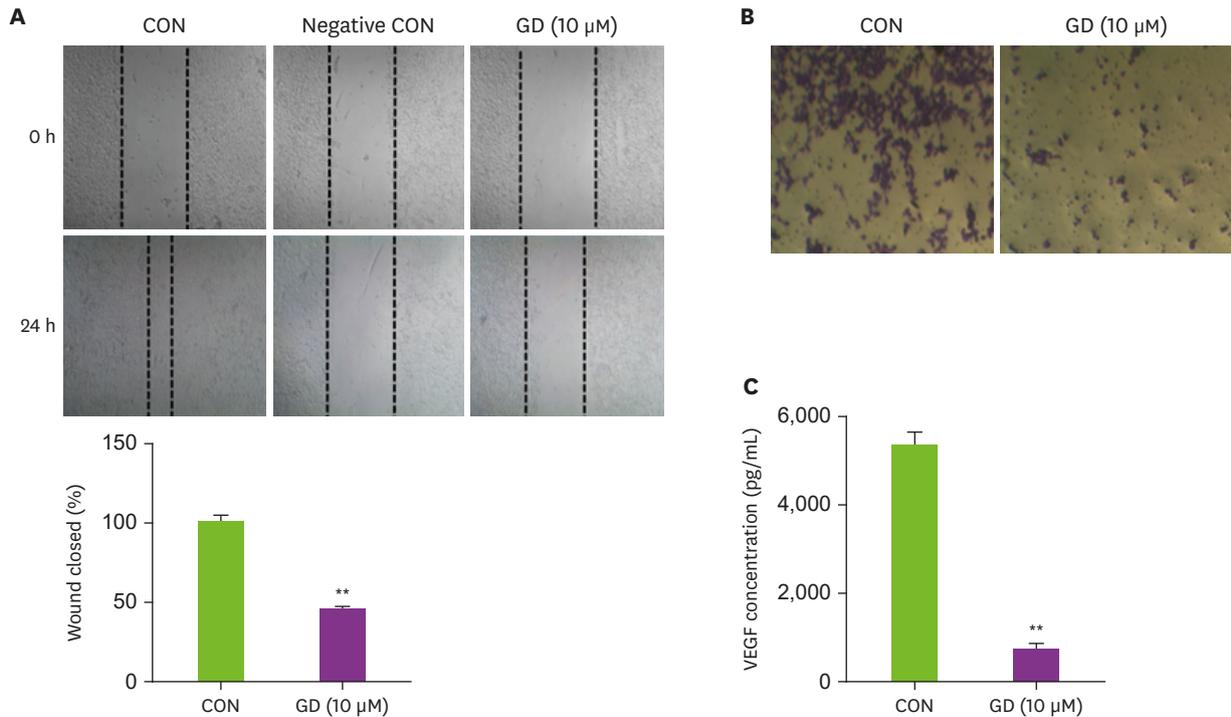


Fig. 3. Effect of GD on the MDA-MB-231 cell migration and invasion.

(A) Images of wound healing assays (100× magnification). Scratch wound healing assays were performed using conditioned media (control), serum free media (negative control), and GD (10 μM) for 24 hours. Images were obtained at 0 and 24 hours. (B) Transwell chamber was performed for the migration assay (200× magnification). MDA-MB-231 cells were treated with GD (10 μM) for 24 hours. (C) Representative levels of VEGF in the indicated groups are shown (n = 4/sample). GD, glabridin; CON, control; VEGF, vascular endothelial growth factor.

**p < 0.01.

단백질의 변화는 차이가 없었다. 본 연구 결과를 통해 GD에 의한 암세포의 증식 억제 효과가 세포사멸 증가에 의한 것으로 사료된다.

GD가 MDA-MB-231 세포 이동과 침입에 미치는 영향

GD가 MDA-MB-231 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 wound-healing assay를 실시하여 관찰하였다. GD를 10 μM의 농도로 24시간 동안 처리한 실험군과 GD를 처리하지 않은 대조군으로 healing 정도를 비교하였다. 그 결과 GD를 처리한 실험군에서 상처의 healing이 상당히 억제되었음을 보여주었다 (Fig. 3A). 따라서 GD가 MDA-MB-231 세포의 이동을 억제하는 것으로 사료된다.

또한 GD가 MDA-MB-231 세포의 전이에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포 침윤 및 VEGF 농도를 측정하였다. 그 결과 침윤 능력은 GD를 처리한 후 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3B). Vascular endothelial growth factor (VEGF) 농도 결과도 침윤 결과와 같이 GD를 처리한 군에서 유의적인 감소를 확인하였다 (Fig. 3C). 본 연구 결과를 통해 GD가 유방암 세포의 침윤 억제 및 VEGF 발현을 감소시켜 유방암 세포의 전이 능력을 억제하는 것으로 사료된다.

GD가 MDA-MB-231 세포 EVs 분비에 미치는 영향

GD를 처리한 MDA-MB-231 세포에서 분비된 EVs와 GD를 처리하지 않은 MDA-MB-231 세포 (CON)에서 분비된 EVs의 평균 직경 크기 분포 분석을 nanoparticle tracking analysis (NTA)를 통해 확인하였다 (Fig. 4A). CON과 GD 처리한 그룹에서 EVs를 분리하였을 때 100 nm 전 후의 사

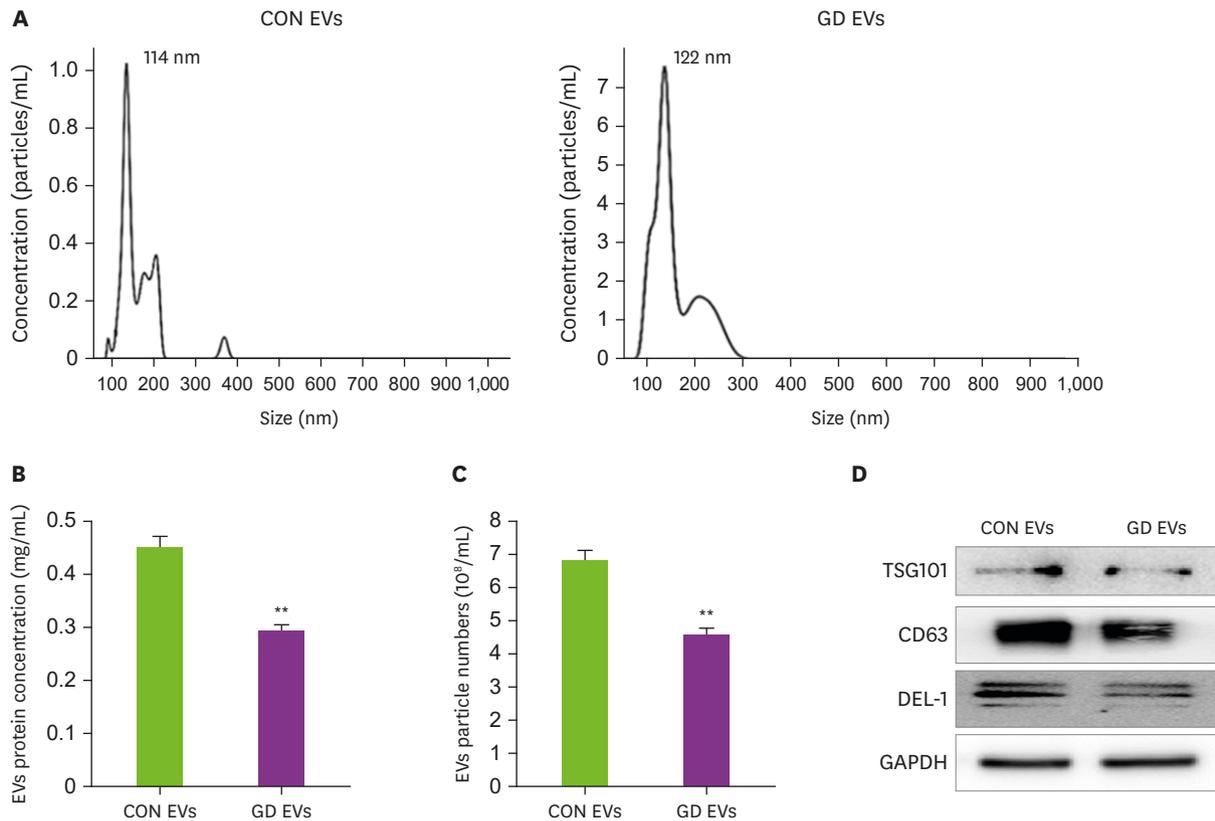


Fig. 4. Effect of GD on the EVs release of MDA-MB-231 cells.

(A) Analysis of the size distribution of EVs from CON- or GD-treated MDA-MB-231 cells with average diameters by Nanosight analysis. (B) The protein concentration of EVs in each group was measured by BCA analysis. (C) The concentration of EVs in GD compared to CON group by Nanosight analysis. (D) Representatives immunoblot images of angiogenesis marker (DEL-1), exosome markers (TSG101 and CD63), and housekeeping gene (GAPDH).

GD, glabridin; EV, extracellular vesicle; CON, control; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

**p < 0.01.

이므로 그룹 간의 큰 차이는 없는 것을 확인하였다. 각 그룹에서 분리한 EVs의 단백질 농도는 BCA 분석에 의해 측정되었다 (Fig. 4B). 그 결과 GD를 처리한 MDA-MB-231 세포에서 분리된 EVs의 단백질 농도가 대조군에 비해 낮은 것을 확인할 수 있었다. EVs는 핵산뿐만 아니라 단백질을 포함하고 있기 때문에 EVs의 단백질 농도는 곧 EVs의 농도와 같은 의미이다. 또한 NTA 분석을 통해서 EVs의 particle 수가 대조군에 비해 GD 처리한 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4C). 본 결과를 통해 대조군에 비해 GD 처리한 군에서 분리되는 EVs의 수와 그 안에 포함되는 단백질 양도 적을 것을 알 수 있었다. 흥미롭게도 GD에서 분리되는 EVs에서 대표적인 angiogenesis marker인 DEL-1과 exosome marker인 TSG101와 CD63의 단백질 발현이 감소되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4D). 따라서 GD를 처리한 MDA-MB-231 세포에서 EVs안에 DEL-1을 적게 분비시켜서 유방암 세포의 전이 능력을 억제한 것으로 사료된다.

고찰

GD의 처리가 유방암의 세포증식, 세포사멸, 전이에 미치는 영향을 조사하기 위해 인간의 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포주를 이용하여 세포의 증식, 세포사멸, ROS 생성, 세포이동 및 전이에 미치는 영향을 in vitro 수준에서 평가를 하였다.

다양한 농도의 GD가 인간 유래 유방암세포인 MDA-MB-231 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 GD 10 μ M 처리군부터 농도 의존적으로 세포 증식률을 억제하는 것으로 나타났다.

Apoptosis (세포사멸)는 인간의 질병에 있어 다양한 생물학적 과정에 관여하며, 세포의 비증감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체라는 포낭을 형성하면서 식세포작용을 거친다 [14]. 활성산소종 (ROS)은 세포사멸과의 관계에서 2차 전달자 (secondary messenger)로 사용되어 신호전달체계를 구축하며 다양한 전사인자를 조절하고 염증반응과 면역반응에 관여한다고 알려져 있다 [15]. 본 연구 결과에서 기존에 세포사멸을 일으키는 세포 형태와 같은 양상으로 GD를 농도 별로 처리한 MDA-MB-231 세포에서 유의적으로 ROS 발현 증가 및 apoptosis가 일어나는 것을 확인하였다.

최근 세포가 이동하는 것은 배아 발달, 상처 조직의 회복, 면역 반응 등에 필수적인 성질이나 암 세포의 이동은 우리 몸의 여러 기관에 전이를 촉진시키므로 암을 치료하는 과정에서 억제해야 한다고 할 수 있다. 이러한, 암전이는 암세포의 세포외 기질 (extracellular matrix) 분해, 이동 및 혈관 내 이동, 암세포의 원격 부위 착상 과정을 통해 이루어진다 [16]. GD가 MDA-MB-231 세포의 전이에 미치는 영향을 조사하기 위하여 cell wound healing 및 transwell assay를 이용하여 세포의 이동 및 침윤에 미치는 영향을 조사하였다. VEGF는 가장 강력한 specific tumor-angiogenic factor로써 신생혈관생성을 유도하는 가장 중요한 인자이며, 암세포의 성장에 필수적인 과정으로서 인식되고 있다 [17]. 신장암, 폐암, 유방암, 난소암 등의 종양조직에서 발현되는데 종양세포뿐만 아니라 종양기질세포 (tumor stromal cell)에서도 분비된다. 최근 연구에서 유방암 치료와 VEGF 농도 감소 능력과의 관계에 대한 보고에 기인해서 VEGF 농도 감소 능력이 우수한 소재를 유방암 치료제로 사용가능 하다는 보고가 있었다 [18]. 본 연구 결과에서 GD를 처리했을 때 VEGF 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인을 할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 유방암세포인 MDA-MB-231세포에 GD처리하였을 때 유방암 세포의 이동 및 침윤을 억제함으로써 GD가 유방암 전이 억제를 위한 우수한 소재가 될 것으로 사료된다.

EVs는 세포 (donor cell)에서 분비되는 100 nm 전 후 크기의 생체 나노 입자로 단백질, mRNA와 miRNA를 포함하고, 이를 자가분비 (autocrine) 및 측분비 (paracrine)를 통해 여러 가지 정보를 전달해 주는 역할을 한다고 보고되었다 [10,11]. 최근에 Sulfisoxazole이라는 FDA 승인된 항생제 약물이 EVs 분비 억제를 통하여 유방암에 대한 항암효과를 보이는 것으로 보고 하였다 [12]. 본 연구에 사용한 약물이 아닌 천연물인 GD를 처리했을 때 EVs의 분비 억제를 통한 항암 효과를 보여주었다. 기존에 EVs에 포함되어 있는 DEL-1과 exosome marker인 TSG101, CD63의 발현도 감소되었음을 확인할 수 있었다 [12,13].

본 연구 결과에서 GD를 처리했을 때 일어나는 세포의 사멸과, 성장 및 전이 억제 효과는 기존의 보고와 비슷한 양상을 보였다. GD에 의한 EVs분비 억제 및 전이 단백질인 exosomal DEL-1의 발현 감소를 통해서 유방암 세포 주에서 엑소좀 분비 억제 천연물을 이용한 항암 소재로의 보고를 처음으로 확인하였다.

요약

본 연구에서는 인간 유방암 세포 라인인 MDA-MB-231 세포에서 GD에 의해 EVs 분비 억제에 의한 항암효과를 처음으로 확인하고자 하였다. MDA-MB-231 세포에 GD를 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포의 증식률을 억제하는 것을 MTT assay를 통해 확인할 수 있었으며, ROS 염색과 apoptosis marker 단백질인 p-JNK 단백질의 증가를 통해 GD에 의한 세포의 증식 억제 효과가 세포사멸에 의한 것임을 유추할 수 있었다. 또한 wound-healing assay, 세포 침윤 및 VEGF 농도를 측정 한 결과 GD가 암세포의 이동, 전이 능력을 억제하는 것을 확인하였다. Nanosight를 통해서 MDA-MB-231 세포에서 분비되는 대조군 EVs 및 GD에 의해 변화된 EVs의 크기를 확인하였다. 마지막으로 GD를 처리한 MDA-MB-231 세포에서 분비된 EVs보다 GD를 처리하지 않은 대조군에서 분비된 EVs의 단백질 및 particles 수가 유의적으로 감소하는 것을 확인을 하였다. 그리고 GD가 MDA-MB-231 세포에서 EVs 분비를 감소시키는 것을 대표적인 exosome marker인 TSG101, CD63의 발현 감소로 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 인해 GD가 암세포의 EVs 분비를 감소시켜 암세포의 성장 및 전이를 억제하였음을 확인하였다. 본 연구는 GD가 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포의 EVs 분비를 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있다. 따라서 GD가 유방암의 화학요법 약물로 작용할 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

1. Jung KW, Won YJ, Hong S, Kong HJ, Lee ES. Prediction of cancer incidence and mortality in Korea, 2020. *Cancer Res Treat* 2020; 52(2): 351-358.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Chu SK, Seo EY, Kim WK, Kang NE. Effect of cyanidin on cell motility and invasion in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Korean J Nutr* 2008; 41(8): 711-717.
3. Block KI, Gyllenhaal C, Tripathy D, Freels S, Mead MN, Block PB, et al. Survival impact of integrative cancer care in advanced metastatic breast cancer. *Breast J* 2009; 15(4): 357-366.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
4. Gupta GP, Minn AJ, Kang Y, Siegel PM, Serganova I, Cordon-Cardo C, et al. Identifying site-specific metastasis genes and functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 149-158.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
5. Kwon HS, Oh SM, Kim JK. Glabridin, a functional compound of licorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2008; 151(1): 165-173.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Carmeli E, Fogelman Y. Antioxidant effect of polyphenolic glabridin on LDL oxidation. *Toxicol Ind Health* 2009; 25(4-5): 321-324.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Liu K, Pi F, Zhang H, Ji J, Xia S, Cui F, et al. Metabolomics analysis to evaluate the anti-inflammatory effects of polyphenols: glabridin reversed metabolism change caused by LPS in RAW 264.7 cells. *J Agric Food Chem* 2017; 65(29): 6070-6079.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res* 1998; 11(6): 355-361.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Simmler C, Pauli GF, Chen SN. Phytochemistry and biological properties of glabridin. *Fitoterapia* 2013; 90: 160-184.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(10): 617-638.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

11. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* 2016; 30(6): 836-848.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Im EJ, Lee CH, Moon PG, Rangaswamy GG, Lee B, Lee JM, et al. Sulfisoxazole inhibits the secretion of small extracellular vesicles by targeting the endothelin receptor A. *Nat Commun* 2019; 10(1): 1387.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Lee SJ, Lee J, Jung JH, Park HY, Moon PG, Chae YS, et al. Exosomal Del-1 as a potent diagnostic marker for breast cancer: prospective cohort study. *Clin Breast Cancer* 2021; 21(6): e748-e756.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
14. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 2008; 44(3): 200-204.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Kang SW. Role of reactive oxygen species in cell death pathways. *Hanyang Med Rev* 2013; 33(2): 77-82.
[CROSSREF](#)
16. Liotta LA, Kleinerman J, Catanzaro P, Rynbrandt D. Degradation of basement membrane by murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58(5): 1427-1431.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Goh PP, Sze DM, Roufogalis BD. Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7(8): 743-758.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Ju J, Zhu AJ, Yuan P. Progress in targeted therapy for breast cancer. *Chronic Dis Transl Med* 2018; 4(3): 164-175.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)