

저근백피 추출물이 유선암 세포에서의 신생혈관 형성에 미치는 영향

정지학¹ · 윤용갑² · 전병훈² · 박혜련 · 안원근^{1*}

부산대학교 치과대학 구강병리학교실, 1: 경북대학교 자연과학대학 생물학과, 2: 원광대학교 한의과대학

Effects on Inhibition of Angiogenesis in MCF-7 Cells by the Aqueous Root Extract of *Ailanthus Altissima*

Ji Hak Jeong¹, Young Gab Yun², Byung Hun Jeon², Hae Ryoung Park, Won Gun An^{1*}

Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Pusan National University.

1: Department of Biology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University.

2: Department of Oriental medicine in Wonkwang University

The cellular response to hypoxia is controlled to a large degree by the transcription factor Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1). HIF-1 is a transcription factor that is activated by hypoxia and plays a critical role in the development of the cancer phenotype. HIF-1 regulates transcription of a number of genes crucial for tumor survival under hypoxic conditions, including vascular endothelial growth factor(VEGF), erythropoietin(Epo) and several glycolytic enzymes. Tumors in which hypoxia can not induce HIF-1 transcriptional activity remain small and fail to metastasize. In this study, we examined whether aqueous root extract of *Ailanthus altissima* (REA) downregulate HIF-1, VEGF and p53, and raise the possibility that depletion of these proteins and the antiproliferative activities of REA have any effects on inhibition of angiogenesis in MCF-7 cells. Pharmacologic targeting of specific signal transduction pathways related to oncogenic transformation is a promising approach in cancer treatment. Therefore, REA could be a candidate drug for further clinical development.

Key words : *Ailanthus altissima*, hypoxia, Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1), vascular endothelial growth factor(VEGF), p53, angiogenesis

서 론

저산소 상태는 암세포의 사멸을 유도함과 동시에 사멸에 대한 저항성을 갖게 하는 조건이다. 혈관으로부터 멀리 떨어진 암 조직의 내부는 저산소 상태가 되기 쉬우며, 이 저산소 부위의 암 세포는 저산소 상태에 적응하기 위하여 자신의 대사과정을 바꾸거나, 혹은 신생혈관을 만들어 산소공급을 증가시킨다. 이러한 반응을 통해 암세포는 부족한 에너지를 보충하고 여러 생존인자를 만들어 세포의 생존력을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 고형암세포는 저산소 상태에 적응하기 위해서 약 60여 종의 유전자를 동시에 혹은 신호전달계를 통해 단계적으로 발현시키는

것으로 알려져 있다. 이 저산소 상태에 관여하는 전사인자로는 Activator protein-1(AP-1), Nuclear factor kappa B(NF-κB), Hypoxia-inducible factor(HIF-1)이 알려져 있으며, HIF-1은 glycolytic enzymes, vascular endothelial growth factor(VEGF), erythropoietin(Epo) 등의 유전자를 발현하는 가장 주된 유도 인자이다^{3,5)}.

저근백피(栲根白皮)는 소태나무과(Simaroubaceae)에 속하는 중국 원산의 낙엽교목인 가중나무(혹은 가죽나무, *Ailanthus altissima*) 및 동속의 근연식물의 주피를 제거한 수피 또는 근피이다. 저근(栲), 춘저(椿栲), 호목수(虎目樹), 호안(虎眼), 소백피등(小白皮等)의 이명(異名)을 가지고 있으며 우리나라 전 지역에 분포하고 있다. 실험에 사용된 저근백피에는 merosin, tannin, phlobaphene, ailanthone, amarolide, acetylamarolide, quassin, nigakihemiaceyal B(neoquassin) 등의 성분이 함유되어

* 교신저자 : 안원근, 부산시 서구 아미동 1가 10, 부산대학교 치과대학

· E-mail : wgan@pusan.ac.kr, · Tel : 051-240-7945

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

있으며, 민간 및 한방에서 촌충구제, 고초열, 치질, 적백리(赤白痢) 및 지사 등의 목적으로 사용되었다⁶⁻¹⁷⁾. 뿐만 아니라 저근백피는 아시아권에서 인체의 자궁암(子宮癌), 간암(肝癌), 장암(腸癌)을 치료하는데 응용되고, 우리나라에서도 전통적으로 항암 및 여러 질병치료에 많이 이용되고 있다. 그러나 저근백피의 이러한 효능에 대한 정확한 항암기전은 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 HIF-1 α 유전자를 중심으로 고탄압세포의 전이와 관련하여 저근백피(aqueous root extract of *Ailanthus altissima* (REA))의 항암기전 및 신호기작을 밝히고, 항암제로서의 저근백피의 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

저근백피(樛根白皮, aqueous root extract of *Ailanthus altissima* (REA))는 소태나무과(Simarubaceae)에 속한 낙엽교목인 가중나무(혹은 가죽나무) 및 동속 근연식물의 뿌리(根) 및 줄기(樹幹)의 내피(內皮)를 건조하여 에탄올추출한 후 그 가루를 물로 녹여 사용하였다. Western blot 분석에 사용된 항체 중 anti-HIF-1 α , anti-p21^{Waf1/Cip1}는 BD Transduction Laboratories (San Jose, USA)에서 p53은 Oncogene Research Products (Boston, USA)에서 anti-VEGF는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(California, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2. 세포배양

유선암세포주인 MCF-7세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)에 10% fetal bovine serum (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)과 20mL/L의 antibiotic-antimycotic (GIBCO/BRL, Grand Island, USA)을 첨가하여 3×10^6 cells/mL 세포의 밀도를 유지하면서 37°C, 5% CO₂의 세포배양기에서 배양하였다.

3. 세포 생존률 측정

96-well plate에 2×10^4 cells/well 세포의 밀도로 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 12 시간 이상 세포를 안정화시켰다. CoCl₂, DFX(desferrioxamine), 그리고 REA를 함께 처리하고 16 시간 동안 배양한 후 CellTiter 96® Non Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)의 dye solution을 15 μ L/well씩 첨가하고 4 시간 더 반응시켰다. Stop solution 100 μ L/well을 넣고 1 시간 뒤 570 nm 파장에서 흡광도를 측정했다.

4. 활성산소측정

세포를 6-well plate에 4×10^4 cells/well 세포의 밀도로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. CoCl₂, DFX(desferrioxamine), 그리고 REA를 함께 처리 후, DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate : H₂DCFDA, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)를 10 μ M 농도로 처리하

여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 세포를 ice-cold PBS로 3회 수세 후, lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 mL TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 μ L씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 (VS 15000CF, Vision Scientific Co., LTD, Korea) 하여 상등액을 모았다. 분리된 상등액의 형광측정은 ELISA Reader (Anthos 2020, Austria)을 이용하여 발광과장 504 nm, 흡광과장 524 nm에서 측정하였다.

5. Western blot 분석

세포를 ice-cold PBS로 3회 수세한 다음 lysis buffer (protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Germany) 1 tablet/50 mL TNES buffer (1 M Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl))를 100 μ L씩 첨가하여 단백질을 추출한 다음 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 (VS 15000CF, Vision Scientific Co., LTD, Korea) 하여 상등액을 모았다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, Korea)로 정량하고 동일량의 단백질 (50 μ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 transfer하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk를 함유한 Tris buffered saline-Tween (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 30분간 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응성을 차단한 후 HIF-1 α , VEGF, p53, p21^{Waf1/Cip1}에 대한 항체와 반응시키고, 각 항체들에 대한 2차 항체인 anti-mouse IgG 또는 anti-rabbit IgG 항체로 각각 1 시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회, 30분 동안 수세하였다. 이어서 각 항체에 대한 대응 단백질 band는 enhanced chemiluminescence (ECL) detection 방법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

세포는 저산소 상태에서 Hypoxia-inducible factor 1(HIF-1)에 의해 여러 가지 반응이 조절된다. HIF-1은 저산소 상태에서 외부의 산소 농도의 변화에 적절하게 반응하기 위해 해당과정, 혈관 신생 과정 등을 유도함으로써 세포내의 항상성을 유지시켜 주는 전사 인자이다¹⁸⁻²⁰⁾. HIF-1은 HIF-1 α 와 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator(ARNT, HIF-1 β)로 구성되어 있는 이형이량체의 전사인자이다. HIF- α 는 HIF-1 α , HIF-2 α 그리고 HIF-3 α 의 최소 세 종류의 동형이 존재한다. HIF-1 α 와 HIF-2 α 는 HIF- β 와 이형이량체를 형성할 수 있다.

HIF- β 서브유닛들은 구성성 핵단백질이지만, HIF-1 α 와 HIF-2 α 는 모두 저산소 상태에 의해 유사한 방식으로 강력히 유도된다. HIF-1 α 는 basic helix loop helix - PER ARNT SIM(bHLH - PAS) 도메인을 가지며, 특이적으로 산소 농도에 조절되는 서브유닛이다. 암세포가 저산소 상태에 노출되면 HIF-1 α 가 유도되고, 이 HIF-1 α 는 cis-acting enhancers인 hypoxia responsive element(HRE)와 결합하여, 저산소 상태 그리고 종양

의 혈관신생 및 성장에 암세포가 적응하기위한 표적 유전자들의 전자를 활성화한다²¹⁾.

한편, HIF-1 α 의 안정화는 저산소 상태와 같은 스트레스 활성 인자, 성장인자 그리고 발암인자에 반응하여 PI3K/Akt, Raf-1/MEK/ERK1/2 그리고 p38/JNK 등의 신호전달경로를 통해 이루어지며²²⁾, HIF-1 α 의 지속적인 발현에는 von Hippel-Lindau(VHL)이란 종양억제 유전자가 관여한다²³⁾. HIF-1 α 의 산소농도에 따른 조절 기작은 이런 여러 요소들의 복합적인 관여로 인하여 정확한 조절 기작은 아직 밝혀지지 않았다. 정상적인 산소 상태에서 HIF-1 α 단백질은 ubiquitination 기작에 의해 분해가 일어난다. 그러나 저산소 상태에서는 ubiquitination이 감소하는 정확한 기작은 아직 불분명한 실정이다.

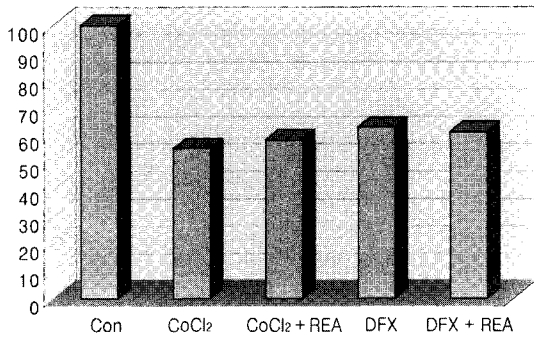


Fig. 1. Measurement of cell viability. MCF-7 cells was exposed to CoCl₂, DFX and REA for 8h. The number of viable cells was examined by MTT assay. Each concentration of treated drugs CoCl₂, DFX and REA is 200 μ M, 200 μ M and 200 μ g/ μ L.

Fig. 2에서 MCF-7 cells에 mimic hypoxia를 유도하는 물질인 CoCl₂를 REA와 함께 처리한 결과 HIF-1 α 단백질의 분해가 일어났다. 또한 HIF-1 α 의 downstream에 위치한 p53, p21 그리고 VEGF의 발현이 저해되었다^{24,25)}. 이는 REA가 HIF-1 α 단백질의 안정화를 저해함을 알 수 있다. 그리고 iron chelator인 desferoxamine (DFX)은 산소농도에 비존적으로 HIF-1 α 단백질을 안정화시키며, 저산소상태 의존적 유전자들의 발현을 유도할 수 있다. Fig. 2에서 DFX를 REA와 함께 처리한 결과 HIF-1 α 단백질의 분해가 일어났다. 또한 HIF-1 α 의 downstream에 위치한 p53, p21 그리고 VEGF의 발현 역시 저해되었다. 이는 전자의 결과와 비교하였을 경우, REA가 HIF-1 α 단백질의 분해에 있어 산소의 농도와는 무관함을 제시한다.

Fig. 3에서 ROS(Reactive Oxygen Species)를 생성하는 CoCl₂와 REA를 함께 처리한 결과 REA의 ROS에 대한 저해효과는 없었다. 이 결과는 REA에 의한 HIF-1 α 의 불안정화는 산소농도에 비존적으로 일어남을 추측할 수 있다.

결론

본 연구에서는 HIF-1 α 유전자를 중심으로 고형암세포의 전이와 관련하여 REA의 항암기전 및 신초기작을 밝히고, 항암제로서의 REA의 가능성을 제시하였다. REA는 산소의 농도와 무관

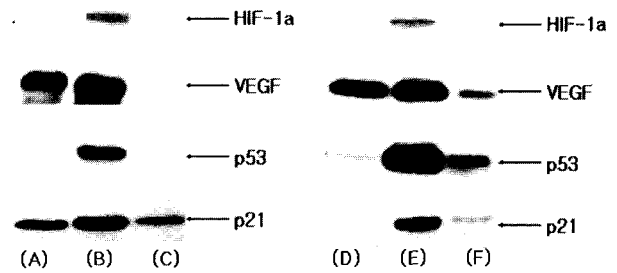


Fig. 2. Western blot analysis. Effects of REA on expression of HIF-1 α , VEGF, p53 and p21. Total or nuclear cellular proteins were prepared and western blot were performed with an antibody specific for corresponding proteins. REA blocks expressions of HIF-1 α , VEGF, p53 and p21 in MCF-7 cells. (A) control (B) CoCl₂ 200 μ M (C) CoCl₂ 200 μ M + REA 200 μ g/ μ L(D) control (E) DFX 200 μ M (F) DFX 200 μ M + REA 200 μ g/ μ L

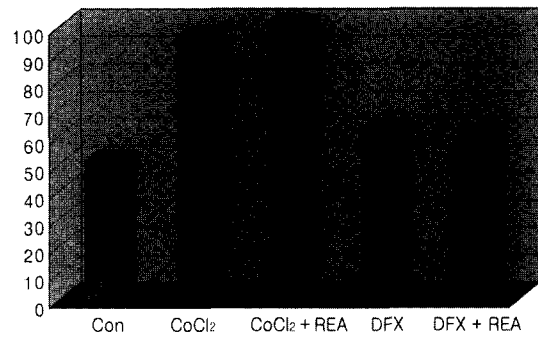


Fig. 3. Effect of REA on intracellular ROS generation. Intracellular peroxide production was reacted to the oxidant-sensitive fluorescent probe DCFH-DA. Cell were lysed and centrifuged to remove debris, and the fluorescence in the supernatant was measured using ELISA reader.

하게 HIF-1 α 단백질의 안정화에 대한 저해 효과를 가지며, HIF-1 α 의 downstream에 위치한 VEGF의 발현 또한 저해함을 알 수 있다. 이는 REA가 HIF-1 α 단백질의 안정화에 대한 저해 작용 경로를 통한 신생혈관작용을 억제함을 알 수 있다. HIF-1 α 단백질 분해에 대한 REA의 효과는 HIF-1 α 단백질을 안정화시키는 표적 유전자들의 저해자로서의 가능성도 배제할 수 없다. 따라서 본 실험은 REA가 HIF-1 α 단백질을 분해시키고(Fig. 4), HIF-1 α 단백질의 조절 하에 있는 유전자들을 저해하여 anti-cancer effect 및 anti-angiogenesis effect를 갖는 항암제로서의 가능성을 시사한다.

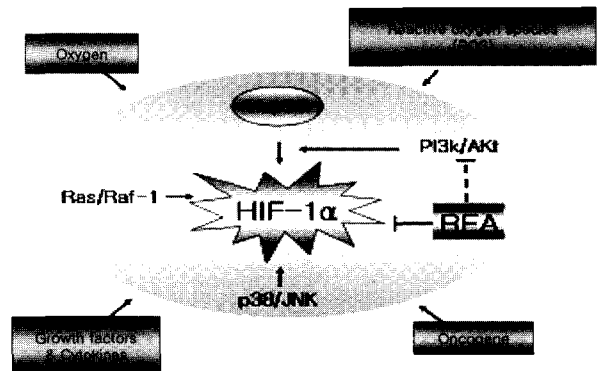


Fig. 4. Schematic representation of the suggested effects of REA on hypoxia. REA degrades HIF-1 α and inhibits angiogenesis.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 한방치료연구기술 개발사업(02-PJ 9-PG1-CO05-0003)에 의한 것임

참고문헌

1. Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. and Wang G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757-23763, 1994.
2. Dachs G.U. and Tozer G.M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer.* 36, 1649-1660, 2000.
3. Semenza G.L. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell.* 107, 43-54, 2001.
4. Wenger R.H. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203, 1253-1263, 2000.
5. Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I. and Plate K.H. p-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene.* 19, 5435-5443, 2000.
6. 李尙仁 修書院, 本草學, 154, 1981.
7. 陸昌洙 外 芙丑社, 韓國本草學, 299, 1981.
8. 전국한의과대학 교수 공저 영립사, 서울, 본초학, 619-620, 2000.
9. 안덕균 교학사, 서울, 본초도감, 138, 1988.
10. 保健社會部 서울, 大韓藥典外韓藥(生藥)規格集, 111, 1984.
11. 陸昌洙 아카데미서적, 서울, 原色韓國藥用植物圖鑑, 제 4 판, 325, 1993.
12. 江蘇新醫學原院(中國) 下冊, 上海, 中藥大辭典, 제 1 판, 2587-2589, 1979.
13. 赤松金芳 醫齒藥出版社, 東京, 新訂和漢藥, 제 1 판, 289-290, 1970.
14. 許鴻源 台北, 行政院衛生署中醫藥委員會, 少用中藥之研究, 제 1 판, 65-66, 1974.
15. Kim J., Choi J.W., Kim H.K., Park S.W. and Lee C.K. Studies on the Biologic Activities of the Constituents of Ailanthi Cortex Radicis(1) - Effects of Methanol Extract and its Chloroform Fraction on Expoxide Hydrolyzing System in Liver -. *Kor. J. Pharmacogn.* 25, 47-50, 1994.
16. Chang Y.S., Moon Y.H. and Woo E.R. Virus-Cell Fusion Inhibitory Compounds from Ailanthus altissima Swingle. *Kor. J. Pharmacogn.* 34, 28-32, 2003.
17. Choo H.K., Kim S.K. and Rho Y.S. Studies on Antibacterial activities in Ailanthus altissima Swingle Tar. *Bull. K H Pharma Sci.* 12, 57-59, 1984.
18. Wenger R.H. and Gassmann M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 378, 609-616, 1997.
19. Semenza G.L. Transcriptional regulation by hypoxia-inducible factor 1: molecular mechanism of oxygen homeostasis. *Trends Cardiovasc. Med.* 6, 151-155, 1996.
20. Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y. and Semenza G.L. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162, 1998.
21. Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H. and Kim K.W. Hypoxia-inducible factor(HIF-1): its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 36, 1-12, 2003.
22. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993-998, 2002.
23. Czyzyk-Krzeska M.F., Meller J. von Hippel-Lindau tumor suppressor: not only HIF's executioner. *Trends Mol. Med.* 10, 146-149, 2004.
24. Liu J., Shibata T., Qu R., Ogura M., Hiraoka M. Influence of the p53 status on hypoxia-induced gene expression. *J. Radiat Res (Tokyo).* 45, 333-339, 2004.
25. An W.G., Kanekal, Simon M.C., Maltepe E., Blagosklonny M.V. and Neckers L.M. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature.* 392, 405-408, 1988.