韓國營養學會誌 38(2) : 104~111, 2005

Epigallocatechin Gallate (EGCG)가 MDA-MB-231 인체 유방암 세포의 부착성, 침윤성과 Matrix Metalloproteinase 활성에 미치는 영향*

방명희 · 김지혜 · 김우경§

단국대학교 식품영양학과

Effects of Epigallocatechin Gallate on Adhesion, Invasion and Matrix Metalloproteinase Activity in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells

Bang, Myung Hee · Kim, Ji Hye · Kim, Woo Kyoung§

Department of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

ABSTRACT

Tumor invasion is composed of four steps: cell adhesion to the extracellular matrix, degradation of the extracellular matrix components, tumor cell motility followed by cell detachment. Matrix metalloproteinases (MMPs) are important proteinases that associated with degradation of matrix component. Epigallocatechin gallate (EGCG) is a major polyphenolic constituent of green tea. In the study, we examined the anti-invasive and MMP activity suppression effects of EGCG in MDA-MB-231 human breast cancer cells. MDA-MB-231 human breast cancer cells were cultured with various concentrations 0 − 100 μM of EGCG. EGCG significantly inhibited the cell adhesion to the fibronectin. Cell motility through gelatin filter and invasion to Matrigel were inhibited dose-dependently by EGCG treatment. EGCG also inhibited the activities of MMP-2, -9 and the amount of MMP-9 ($\alpha = 0.05$). Therefore, EGCG may contribute to the potential beneficial food component to prevent the invasion and metastasis in breast cancer. (*Korean J Nutrition* 38(2) : 104~111, 2005)

KEY WORDS : EGCG, MDA-MB-231, breast cancer, invasion, matrix metalloproteinase.

서 론

우리나라 2002년 통계청 자료에 의하면 우리나라 사람의 사망원인 중 1위가 암으로,[1] 여성의 경우 유방암, 위암, 대장암 순으로 발병률이 높은 것으로 나타났다.[2] 유방암의 경우 초기에는 비교적 치료가 가능하나, 암세포가 전이력을 가지고 진행하게 되면 치료가 어려워 사망에 이를 수 있다.[3] 이에 암의 발생을 막는 것이 가장 중요하지만, 암 발생 이후에 진행 단계를 차단시켜 치료를 용이하게 하는 것 또한 중요하다고 본다.

암의 전이는 1차 조직으로부터 다른 부위나 장기로 이동하면서 일어나는 세포 진행의 한 형태로써,[4] 특히 암세포로부터 분비되는 단백질 분해 효소에 의해 빠른 시간 내에 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)이 파괴되는 것을 특징으로 한다.[5] 전이력이 강한 암세포가 1차 장기로부터 떨어져 나와 장기 주위의 세포외 기질에 부착하게 되고 여러 단백 분해 효소와 숙주세포의 효소 분비를 유도하여 기질과 기저막의 변형을 일으키면서 matrix 성분을 분해하게 된다.[4] 암세포는 파괴된 기질과 기저막 사이를 통과하고 혈관이나 림프절을 이용하여 다른 장기로 이동하게 되며, 2차 목표 조직에 부착하고 성장과 증식을 위해 신생 혈관 생성 등 새로운 환경을 만들어 가며 증식하게 된다.[6] 이 때 주요 기저막 분해효소는 matrix metalloproteinases (MMPs)로 이 효소는 아연 의존적 효소이며 약 23종이 발견되어 있고 ECM 단백질을 분해하는 효소 family를 말한다. MMPs가 과다발현 되면 상처 치료나 조직 형태 형성 등의 생리적 조절이 정상적으로 되지 못하며, 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양

접수일 : 2004년 12월 20일
채택일 : 2005년 1월 24일
*This study was supported by grard No. R04-2003-000-10120-0 from the Basic Research Program of the Korea Science and Engineering Foundation.
§To whom correspondence should be addressed.

© 2005 The Korean Nutrition Society

신생혈관생성등을 활성화시킨다.[7] 그 중에서도 기저막의 주요 성분인 type Ⅳ collagen을 분해하는 MMP-2와 MMP-9이 암전이에 큰 영향을 미치는 것으로 보고 되고 있다.[8]

최근 외과적 수술 및 방사선요법의 발전, 새로운 항암요법의 개발과 여러 치료법의 복합 적용으로 암 환자의 일부 생존율을 향상시켰다.[4] 그러나 지금까지 개발된 대부분의 항암제의 경우 강한 항암 치료 효과는 가지지만 독성으로 인한 부작용이 크며 재발의 위험이 큰 것으로 알려져 있다.[9] 그러므로 부작용이 없거나 적으면서 암의 치료효과가 큰 물질을 찾고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이런 목적으로 천연화합물 (natural occurring organosulfur compounds)의 생리 활성에 대해 국내외적으로 많은 연구들이 많이 진행되고 있다.[10] 과일과 채소류에 들어있는 천연물인 phytochemical은 기전이 확실히 밝혀지지는 않았으나 활성산소의 제거, 면역체계 자극, 세포의 성장, 사멸 조절, 높은 항산화성으로 암의 초기 진행 단계를 억제하는 것으로 보고 되고 있다.[11,12]

그 중 녹차는 역학 조사, 세포 실험, 동물 실험에서 암 예방 효과를 가지는 것으로 보고 되었으며,[13] 정상 세포에는 항산화제로 작용하는 것으로[14] 보고 되었다. 현재까지 알려진 녹차의 주성분인 catechin 류는 (+)catechin, (−)epicatechin, (−)epicatechin gallate, (−)epigallocatechin, (−)epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등이 있다.[15] 이들 성분 중 EGCG는 녹차 2~3 컵안에 0.1~0.3 μM 정도가 들어있다고 하며,[16] 전립선암, 위암, 폐암 세포의 사멸을 유도하여 암세포 성장을 억제[17]하는 것으로 보고 되고 있다. 또한 cyclin-dependent kinases (CDK)와 같은 세포 주기의 G1 조절 효소를 조절하여 암세포의 성장 억제 효과를 보인다고 하였다.[18] 이와 같이 EGCG의 암세포 증식 억제 효과는 널리 알려져 있으나 유방암의 전이 단계에 억제 효과가 있는지는 잘 알려져 있지 않으며 그 기전도 분명하게 알려져 있지 않다.

이에 본 연구는 녹차의 성분인 EGCG가 인체 유방암 세포 MDA-MB-231에서 암의 전이 과정인 세포 부착 (adhesion), 이동성 (motility), 침윤성 (invasion)에 미치는 영향과 전이과정에서 중요한 역할을 하는 MMP-2, MMP-9의 활성 및 양에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 세포 배양

EGCG는 Sigma사 (St. Louis. MO, USA)에서 구입하였으며 0.1 M의 농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 −20℃에 보관하였으며, 배지에 희석하여 사용하였다. DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture Ham's F12), FBS (fetal bovine serum), trypsin-EDTA 등의 세포 배양에 필요한 성분은 Gibco/BRL (Grand Island. NY, USA)에서 구입하였다.

실험에 사용된 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포는 습윤한 5% CO_2, 37℃ incubator에서 DMEM/F12, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin (Gibco/BRL) 포함되도록 배지 용액을 만들어 배양하였다. 세포가 80~90% 정도 confluence해지면 PBS (phosphate buffered saline solution)으로 2번 씻어내고 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모은 후 계대 배양하고 배지는 2~3일마다 교환하였다.

2. 세포의 부착성 측정

세포의 부착성 실험은 Palmieri 등의 방법[19]을 변형하여 실시하였다. 20 μg/ml로 희석된 fibronectin (BD, Bedford, UK)을 96 well non-treated cell culture plate에 분주하여 37℃ incubator에서 1시간 동안 incubation 시킨 후 serum free medium으로 blocking 시킨 후 건조시켰다. 세포는 8×10^5 cells/ml로 만들어 EGCG를 0, 25, 50, 100 μM 농도로 처리하고 미리 fibronectin으로 코팅된 plate에 분주하였다. 1시간 동안 37℃ incubator에서 배양 시킨 후 PBS로 세척하고 MTT assay를 실시하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 세포의 이동성 측정

Gelatin으로 코팅된 filter를 사용한 Boyden chamber motility assay는 Strack 등[20]의 방법을 변형하여 실시하였다. Low chamber에는 attractant로 10% FBS medium을 사용하였다. 세포를 2×10^6 cells/ml로 만들고 각각 EGCG를 처리하여 upper chamber에 분주한 후, 37℃ CO_2 incubator에서 12시간 incubation 하였다. Incubation이 끝난 후 upper chamber를 종이 타월로 닦아내고 filter를 Diff-quick solution (Dade Behring Inc., DE, USA)으로 염색한 후 filter 아래로 이동한 세포를 디지털 카메라로 무작위 5군데를 촬영하여 그 수를 측정하였다.

4. 세포의 침윤성 측정

세포의 침윤성은 Plater 등[21]의 방법을 변형하였으며, matrigel invasion chamber (BD)를 사용하였다. 세포는 1×10^6 cells/ml 농도로 만들어 각각 EGCG를 처리하였다. Attractant로 10% FBS medium을 사용하였으며 EGCG로 처

리된 cell을 upper chamber에 분주하여 37℃ incubator에서 12시간 incubation시켰다. Incubation을 끝낸 후 upper chamber의 matrigel을 통과하지 못한 cell을 면봉으로 닦아내고 통과된 cell을 Diff-Quick stain solution을 이용하여 염색한 후 filter를 유리판에 고정하였다. 현미경으로 관찰한 후 디지털 카메라로 무작위 5군데를 촬영하여 그 세포수를 측정하였다.

5. Matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성과 양 측정

1) MMP-2, MMP-9의 활성 측정

MMPs의 활성을 알아보기 위하여 Huang 등[22]의 방법을 이용하여 gelatin zymography를 실시하였다. 세포는 1×10^6 cells/ml의 농도로 6 well plate에 분주하고 48시간 후 EGCG를 농도별로 처리하였다. 12시간동안 incubation 시킨 후 medium을 얻어 10배 농축하였다. 모아진 시료로 전기영동하고, gel은 renaturing buffer에 반응시킨 후 developing buffer에서 37℃로 48시간 incubation 시켰다. 0.25% commassie blue 용액으로 16시간 염색하고 destain solution (methanol : acetic acid : water = 50 : 10 : 40)으로 세척하였다.

2) MMP-9의 양 측정

EGCG의 첨가로 인해 세포에서 분비된 MMP-9의 양을 알아보기 위해 enzyme-linked immunosorbant assay[23]을 실시하였다. 96 well plate에 MMP-9 antibody (1 : 200)를 분주하고 4℃에서 48시간 방치하였다. Washing buffer로 well을 세척하고, 1% BSA solution으로 blocking 한 후 각각의 시료를 분주하고 3시간 반응시켰다. Mouse antibody (1 : 1000)로 2시간 반응시킨 후 TMB substrate sloution을 처리하여 빛을 차단시킨 상태로 overnight하여 발색시켰다. 1 M H_2SO_4를 첨가하여 반응을 중지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 EGCG를 첨가하지 않은 군을 100% 기준으로 하여 통계 처리하였다.

6. 통계 처리

본 연구의 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다. 실험 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차로 계산되었고 ANOVA 분석 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 처리군간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

암의 진행 단계 중 암의 전이는 세포간의 유착과 기저막의 부착, 기저막의 분해, 세포의 이동 등의 복합적이며 반복적으로 일어나는 과정을 말한다. 암의 전이 억제와 치료를 위해 최근 phytochemical을 이용한 암치료제 개발이 활발한 가운데 녹차의 성분이 여러 암세포 증식 억제 효과가 나타나고 있어 새로운 암치료제로 기대되고 있다. 이에 본 연구는 침윤성과 전이성이 강한 것으로 알려져 있는 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231 cell에서 녹차의 성분인 EGCG가 암세포의 전이 과정과 전이 과정에서 중요한 역할을 하는 단백 분해 효소인 MMP-2, MMP-9의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

1. EGCG에 의한 세포 부착성 (adhesion) 감소 효과

세포외 기질의 성분 중 하나인 fibronectin을 사용하여 암세포가 전이과정 중 기저막에 부착하는 정도를 알아보는 실험을 실시하였다. 실험상에서 fibronectin을 코팅한 plate에 세포를 배양하면 우선 세포의 receptor가 fibronectin을 인식하여 접착하고 다음에 receptor가 세포표면상으로 이동하여 차례로 fibronectin과 결합하게 된다.[24] 본 실험의 결과, EGCG를 첨가하지 않은 대조군에 비해 EGCG를 25, 50, 100 μM로 처리하였을 때 부착성이 96.3%, 70.3%, 59.5%로 50 μM 이상에서 유의적으로 세포의 부착성이 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1).

세포막 부착은 정상 세포에서는 성장과 발달, 살아있는 기관의 형태 형성 등에 중요한 역할을 하게 된다.[25] 하지만 암세포의 전이 과정 중 먼저 fibronectin, laminin, collagen

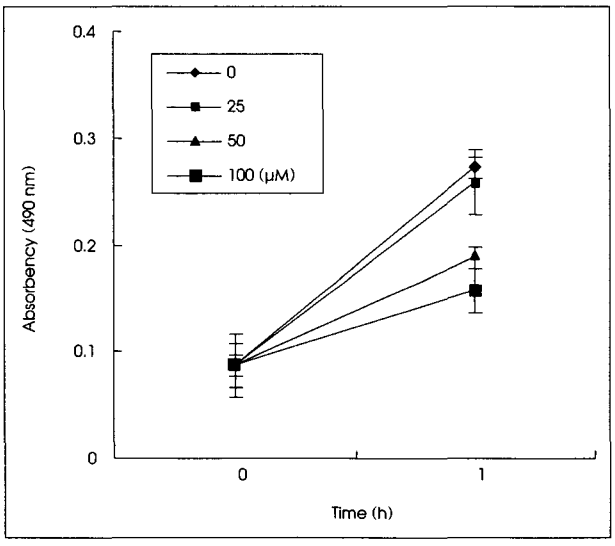

Fig. 1. Effects of EGCG on cell adhesion to fibronectin in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells treated with or without different concentration of EGCG in serum-free DMEM/F12 and placed on the walls coated with fibronectin. After a 1 h incubation at 37℃, the attached cells were assayed MTT assay. Data were expressed as the mean ± S.D. of at least three independent experiments.

등과 같은 ECM 성분과 부착, 또는 다른 세포들 간에 부착이 일어나게 되는데 이는 침윤으로 이어지게 하는 중요 단계로 알려져 있다.

Fibronectin은 murine melanoma cell에서 침윤과 전이 과정을 증개하는 것으로 보고 되었으며,[26] 신경교종 (glioma cell)에서도 침윤에 영향을 미치는 것으로 보고 되었다.[27] Thant 등[28]의 보고에 의하면 fibronectin은 MEK1-MARK와 PI3K-Akt pathway를 통하여 MMP-9을 활성화 시킨다고 하여 fibronectin에 대한 부착성을 감소시키는 것은 MMP 활성 감소로 이어져 전이 단계를 억제 시킬 수 있다고 한다.

Catechin류를 mouse cancer cell인 3LL cell에 처리하였을 때 EGCG가 fibronectin에 대한 부착성을 가장 많이 감소시켰으며, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin은 부착성을 감소시키지 않았다[29]는 보고가 있다. 또한 rat ascites hepatoma cell인 AH109A cell에서도 EGCG가 세포 부착성과 침윤을 억제시킨다[30]고 하였으며, 그 기전으로는 활성 산소 제거로 인한 것이라고 했다. Murine melanoma cell에서 fibronectin이 아닌 laminin에 대해서도 EGCG는 5 μM 이상에서 부착성을 감소시켰으며 vitronectin과 type I과 IV collagen에 대해서는 영향을 미치지 못하였다는 보고도 있어[31] 부착 물질에 따라 부착성에 차이가 생길 수 있음을 알 수 있다. 또한 죽상경화증과 관련한 adhesion 실험에서는 quercetin이 상당한 효과를 보였으나 EGCG의 경우에는 영향을 미치지 않아[32] 본 실험의 암세포 실험과는 다른 양상을 보였다.

2. EGCG에 의한 세포 이동성 (motility) 감소 효과

암의 전이 과정 중 혈관이나 림프절을 통한 세포의 이동을 알아보기 위해 본 실험에서는 암세포가 gelatin으로 코팅된 PVPF filter를 통과하는 정도로 이동성을 측정하였다. 12시간동안 EGCG를 0, 25, 50, 100 μM의 농도로 처리하였을 때 세포가 filter 아래로 이동하여 검게 염색 된 모습은 Fig. 2A에 나타낸바와 같고, 세포의 수를 측정하여 EGCG를 처리하지 않은 대조군에 대한 비율로 나타낸 것은 Fig. 2B와 같으며 그 결과, 50 μM이상에서 유의적 차이를 보이며 세포 이동성은 감소하였다.

세포 이동성은 정상세포나 변형된 세포에서나 모두 기본적인 특징이다.[33] 세포의 이동은 편극 (polarization), 세포 끝 부분의 돌출 형성, 세포 기층 부착, 힘 발생, 끝가장자리에서의 분리 등의 복잡한 변화로 이루어진다.[34] 세포 이동의 기전은 focal adhesion kinase (FAK)가 영향을 미치는데 FAK의 인산화가 저해될 경우 세포의 이동성은 억제되

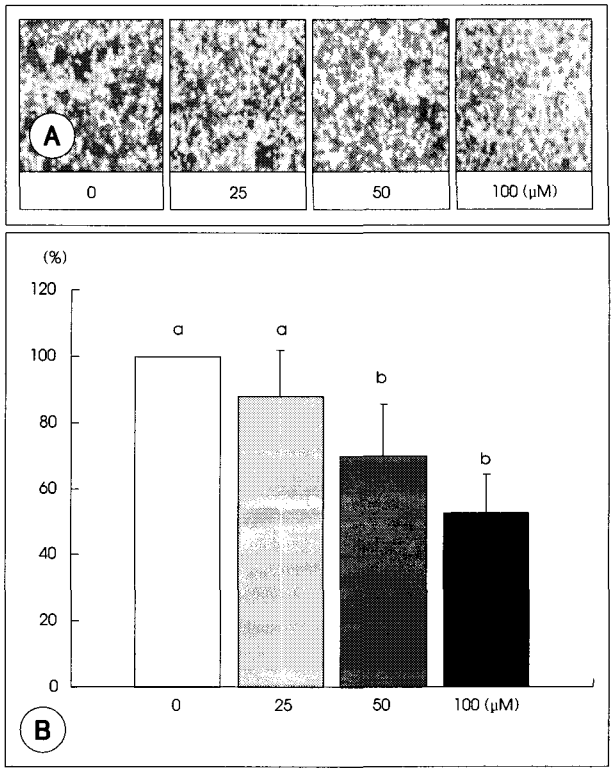

Fig. 2. Effects of EGCG on cell motility in MDA-MB-231 cells. The cells were treated with or without different concentration of EGCG (0 – 100 μM) for 12 h. After 12 h of incubation, the moved cells on the lower surface of gelatin filter were visually counted. A: Photography of moved cell through filter coated with gelatin. B: Quantitative analysis of cell motility. Results were expressed as % control and data were the mean ± S.D. of at least three different experiments. Different alphabet represents the significant differences among groups at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

며, FAK의 과다 발현은 세포의 이동을 증가시켜 전이를 촉진 시킬 수 있다고 한다.[35] 정상세포의 이동성은 태아의 발달과 성인의 면역 체계 발달, 상처 난 조직의 회복 등을 위해 중요하다.[36] 그러나 암세포의 이동성은 침윤과 전이에 필수적인 과정으로 암의 치료에 치명적이다. 그러므로 유방암 세포에 대해 EGCG를 처리하였을 때 세포의 이동성이 감소한 것은 EGCG를 통해 암세포의 침윤과 다른 전이단계 또한 억제할 것으로 생각되어진다.

3. EGCG에 의한 세포 침윤성 (invasion) 감소 효과

실험상에서 단순 gelatin을 코팅한 filter를 통과한 세포수를 측정하는 방법과는 달리 생체의 기저막 성분을 화학적으로 조합한 matrigel을 통과하는 세포를 측정하는 방법으로 침윤성을 관찰하였다. 12시간동안 EGCG를 0, 25, 50, 100 μM의 농도로 처리하였을 때 세포가 matrigel 아래로 이동하여 검게 염색이 된 모습은 Fig. 3A에 나타낸바와 같으며, 세포의 수를 측정하여 EGCG를 처리하지 않은 대조군에 대

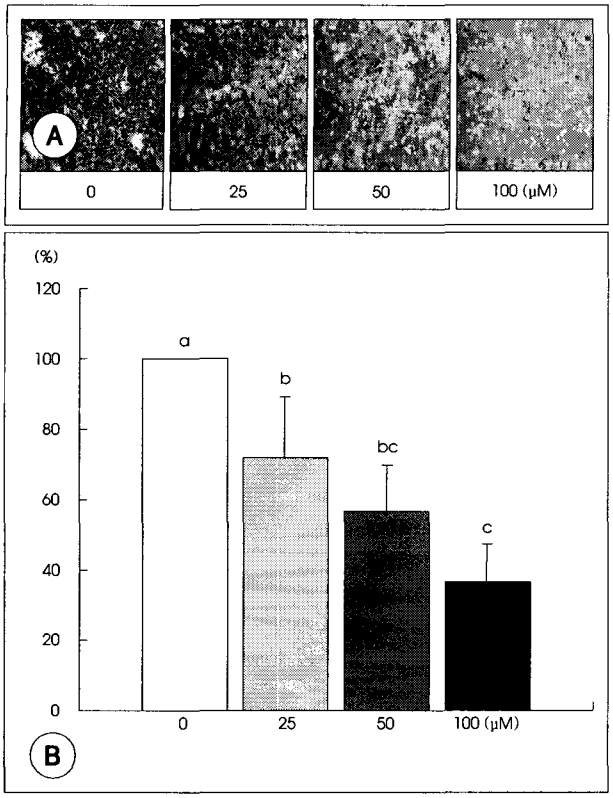

Fig. 3. Effects of EGCG on invasion in MDA-MB-231 cells. The cells were treated with or without different concentration of EGCG (0 – 100 μM) for 12 h. After 12 h of incubation, the invading cells on the lower surface were visually counted. A: Photography of invaded cells through matrigel. B: Quantitative analysis of invasion assay. Results were expressed as % control and data were the mean ± S.D. of at least three different experiments. Different alphabet represents the significant differences among groups at α = 0.05 by Duncan's multiple range test.

한 비율로 나타낸 것은 Fig. 3B와 같다. 그 결과, 25 μM이상에서 유의적 차이를 보이며 세포 침윤성이 감소하였다. 침윤성은 세포 부착과 함께 암 전이에 중요 단계로 기저막과 기질 단백의 변성이 일어나며 단백분해 효소에 의해 진행된다. 본 실험에서 EGCG의 처리로 침윤성이 감소되어 전체 암 전이과정에도 영향을 미칠 것으로 생각된다. EGCG는 pancreatic cancer cell (PANC-1, MIAPaCa-2, BxPC-3)[37] 과 HT-1080 cell[38]에서 invasion과 cell growth를 억제시켰으며, 뇌암 DAOY cell에서는 type I collagen을 통한 invasion 실험에서 (-)epigallocatechin (EGC)보다 EGCG가 invasion 억제 효과가 더 크게 나타났으며, 이는 EGCG의 구조 중 gallate의 구조 차이로 보았다.[39] Murine melanoma cell인 B16-BL6 cell을 이용한 침윤성 실험에서는 EGCG와 quercetin을 처리하였을 때 quercetin은 유의적 침윤 감소를 보였으나 EGCG의 경우 감소 효과가 보이지 않아 본 실험과는 다른 결과를 보이기도 했다.[40]

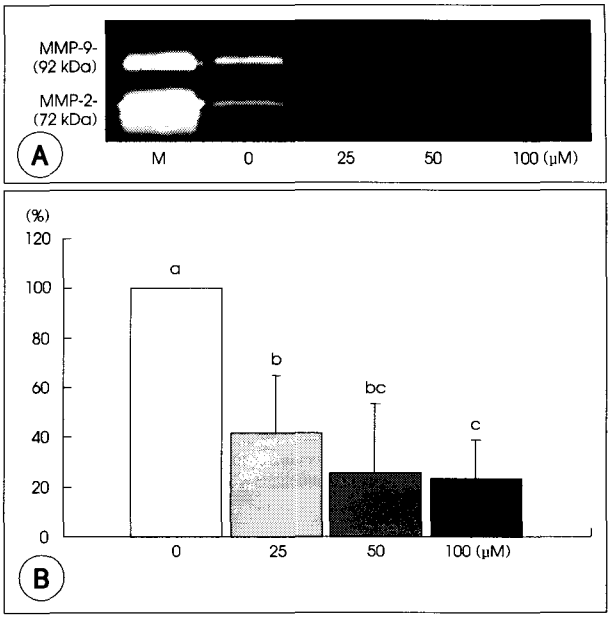

Fig. 4. Effects of EGCG on MMPs activity in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were plated in 6 well plates at a density of 1 × 10^6 cells/well with DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. Cells were treated with or without different concentration of EGCG (0 – 100 μM) for 12 h. Medium was collected and concentrated for electrophoresis on gelatin gels. A: Photography of MMP-2, -9 band. B: Quantitative analysis of MMP-9 band. Results were expressed as % control and data were the mean ± S.D. of at least three different experiments. Different alphabet represents the significant differences among groups at α = 0.05 by Duncan's multiple range test.

4. MMP-2, -9의 활성과 양 측정

1) MMP-2, MMP-9의 활성 측정

EGCG의 처리로 침윤성에서 유의적 차이를 보여 침윤시 작용하는 단백질 분해 효소인 MMP의 활성에도 EGCG가 영향을 미치는지 알아보기 위해 zymography로 gelatinase인 MMP-2와 MMP-9의 활성을 알아보았다. EGCG를 처리하였을 때 MMP-9의 활성은 25 μM이상에서 EGCG를 처리하지 않은 대조군에 비해 41.6%의 감소로 활성이 크게 줄어드는 것으로 관찰 할 수 있었다. 또한 MMP-2의 경우 수치화가 어려웠으나 MMP-9과 같은 경향으로 감소하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

MMP-2는 세포의 기질 분해와 신생혈관 생성에 관여하며, 암세포 및 host cell에 작용하여 암의 침윤을 진행시키므로 MMP-2의 발현 정도는 전이 여부와 상관관계가 있다고 보고 되고 있으며,[41] MMP-9의 경우 정상 세포에서는 발현되지 않으며 조직 재형성과 발달, 상처 회복, 암 전이에 요구된다고 한다.[42] 본 연구에서는 EGCG의 처리로 MMP-2와 MMP-9의 활성이 감소하는 것으로 나타났으며 이것은 기저막 분해 감소로 이어지며 침윤과정이 감소되는 것으로

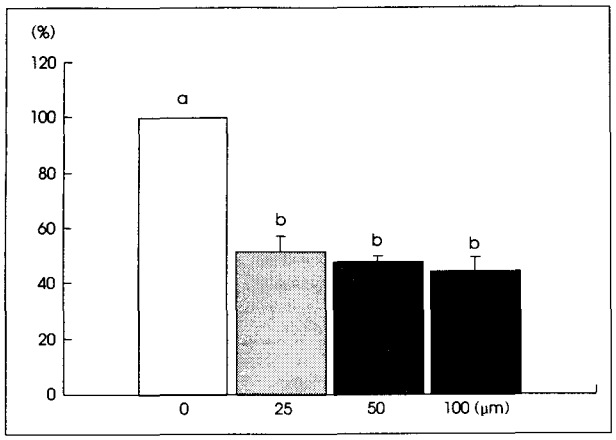

Fig. 5. Effects of EGCG on the amount of MMP-9 in MDA-MB-231 cells. Results were expressed as % control and data were the mean ± S.D. of at least three different experiments. Different alphabet represents the significant differences among groups at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

보여진다.

EGCG는 UM-SCC-1 cell을 이용한 MMP-9 활성 억제 실험에서 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 첨가하여 발현이 증가된 MMP-9을 억제 시키는 결과를 보였다.[43] 인체 위암 세포인 AGS cell도 본 실험과 같은 결과를 보였으며 이는 transcription factor인 AP-1과 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성이 연관되어 MMP-9의 활성이 감소하는 것이라고 하였다.[44] 또한 인체 전립선 암세포인 DU-145를 fibrosblast conditioned medium (FCM)을 이용하여 MMP-2와 MMP-9을 유도 한 후 EGCG를 처리하였을 때 MMP-9의 활성이 감소되었으며 이는 ERK1/2와 p38의 인산화 억제, transcription factor c-jun과 NF κB 억제로 영향을 받는 것으로 보았다.[45] 이는 세포의 종류와 처리하는 물질에 따라 MMP-2와 MMP-9의 억제 기전이 다양할 것으로 보여 본 실험에서도 MMP-2와 MMP-9의 억제 기전 연구가 좀 더 필요할 것으로 생각된다.

2) MMP-9의 양

MMP-9의 활성과 세포외로 분비된 MMP-9의 양의 관계를 알기 위해 ELISA를 통해 MMP-9의 양을 측정하였다. 이는 zymoraphy로 알아본 MMP 활성 억제 정도가 MMP 분비양 감소에 따른 것인지 아니면 MMP의 분비양에는 차이가 없으나 활성 상태에 영향을 미치는 것인지 알아보기 위함이었다. 그 결과 EGCG를 처리한 세포의 medium으로 분비된 MMP-9의 양은 EGCG의 농도가 증가 할수록 감소되었으며 이는 MMP-9의 활성과 같은 경향이었다 (Fig. 5).

MMP는 비활성체로 있다가 proteinase에 의해 활성형의 MMP로 변하게 되며, MMP의 활성 조절은 잠재형 효소 (pro MMP) 생산, 잠재형 효소의 활성화, 조직에 자연적으로 존재하는 내인성 저해제에 의한 활성형 효소 저해 등 세 가지 단계에서 이루어진다.[41] 이에 대해 EGCG에 의한 MMP의 활성과 양에 대해 어떠한 기전으로 인해 일어나는지에 대해 더 연구해야 할 필요가 있다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 녹차 catechin 유도체인 EGCG가 인체 유방암 세포인 MDA-MB-231 cell에 있어서 세포의 전이 과정과 이에 관련된 효소인 MMP-2, MMP-9의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. EGCG의 농도를 0, 25, 50, 100 μM로 처리하여 실험을 진행하였을 때 EGCG는 암의 전이 과정 중 기질 단백질과 부착하는 정도를 알아보는 세포의 부착성과 gelatin filter를 통과하는 이동성, matrigel에 대한 침윤성을 억제시키는 것이 확인되었다. 또 EGCG 처리가 암세포의 침윤시 작용하는 단백분해 효소인 MMP-2와 MMP-9의 활성을 감소시키는 것을 관찰 할 수 있었다. MMP-9의 양 또한 EGCG의 농도에 따라 감소하여 MMP-9 활성과 같은 경향을 보였다. 결론적으로 EGCG는 유방암세포의 전이 과정을 억제하는 효과가 있었으며, MMP-2, MMP-9의 활성과 MMP-9의 양 모두 감소시키는 것으로 나타나 녹차가 암 예방 뿐만 아니라 암의 치료에 효과있는 식품의 성분으로 사용될 수 있는 가능성을 보여주었다. 앞으로 좀 더 자세한 기전 연구가 추가적으로 필요한 것으로 보인다.

Literature cited

1) Annual report on the cause of death statistics. National Statistics Office, 2002
2) Cancer statistics in Korea. National cancer center, 2000
3) Yoon HS, Hong SH, Kang HJ, Xu X, Ahn SH. Survival analysis and its prognostic factors after distant relapse in breast cancer patients. *J Korean Surg Soc* 64: 101-108, 2003
4) Song IH. Cancer metastasis and metastasis supressors. *Korea J Gastron* 43: 1-7, 2004
5) Woodhouew EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisism of metastasis. *Cancer* 80: 1529-1539, 1997
6) Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 266: 34-41, 1992
7) Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11 (11): S37-S42, 2001
8) Hong MK, Cho KY, Oh SJ, Kim KM, Yu SJ. Implication of the activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) on the meta-

stasis in breast cancer. *J Korea Surg Soc* 62(1): 18-25, 2002
9) Nam SH, Yang MS. Isolation of cytotoxic substances from Chrysanthemum Boreele M. *J Korean Soc Appt Biiol Chem* 38(3): 273-277, 1995
10) Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharm Theraputics* 99: 1-13, 2003
11) Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr* 78: 517S-520S, 2003
12) Waladkhani AR, Clemens MR. Effect of phytochemicals on cancer development. *Int J Mol Med* 1: 747-753, 1998
13) Chan D, Daniel KG, Kuhn DJ, Kazi A, Bhuiyan M, Li L, Wang Z, Wan SB, LAm WH, Chan TH, Dou QP. Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Fornt Biosci* 1(9): 2618-2631, 2001
14) Eckert RL, Crish JF, Efimava T, Balasubramanian S. Antioxidants regulate normal human keratinocyte differentiation. *Bio Chem Pham* 68: 1125-1131, 2004
15) Steel VE, Kelloff GJ, Balentine D. Comparative chemopreventive mechanism of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measures by in vitro bioassay. *Canrcinogenesis* 21: 63-67, 2000
16) Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1038-1149, 1993
17) Paschka AG, Butler R, Young CH. Introcusion of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component (−)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett* 130(1-2): 1-7, 1998
18) Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockad. *Biochem Pharmacol* 58: 911-915, 1999
19) Palmieri D, Lee JW, Juliano RL, Church F. Palsminogen activator inhibitor-1 and -3 increase cell adhesion and motility of MDA-MB-435 breast cancer cells. *J Bio Chem* 277(43): 40950-40957, 2002
20) Stracker ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA, Schiffmann E. The Type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Bio Chem* 264(36): 21544-21549,1989.
21) Plater N, Prevostel C, Deroco D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer invasiveness: Corrolation with protein kinase C activity and differential requlation by phobol ester in estrogen receptor- positive and -negative cells. *Int J Cancer* 75: 750-756, 1998
22) Huang Q, Shen HM, Ong CN. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein 1 and nuclear factor - κ B. *Biochem Pharmal* 68: 361-371, 2004
23) Rha SY, Park JO, Gong SJ, Park SH, Yoo NC, Yang WI, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS, Chung HC. Clinical relevance of urokinase-type plasminogen activator, uPA receptor, plasminogen activator inhibitor-1 co expression form tissue and serum of breast cancer as targets of biotheraphy. *J Korean Cancer Assoc* 31(2): 256-266, 1999
24) Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer* 91: 822-832, 2001
25) Johanning GL. Modulation of breast cancer adhesion by unsaturated fatty acids. *Nutrition* 12: 810-816, 1996
26) Humphries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467-470, 1986
27) Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Izumoto S, Fukushima Y, Hayakawa T. Fibronectin-mediated cell migration promotes glima cell invasion through chemokinetic activity. *Clin Exp Metastasis* 15: 538-546, 1997
28) Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Ahang Y, Sein TT, Amin AR, Hamaguchi M. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MARK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 18(5): 423-428, 2000
29) Ogata K, Mukae N, Suzuki Y, Satoh K, Narumi K, Nukiwa T, Isemura M. Effects of catechin on the mouse tumor cell adhesion to fibronectin. *Planta Med* 61(5): 472-474, 1995
30) Zhang G, Miura Y, Yagasaki K. Suppression of adhesion of hepatoma cells in culture by tea compound through antioxidative activity. *Cancer Lett* 31;159(2): 169-173, 2000
31) Suzuki Y, Isemura M. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on adhesion of murine melanoma cells to laminin. *Cancer Lett* 173: 15-20, 2001
32) Choi JS, Choi YJ, Park SH, Lee YJ, Kang YH. Selection of flavonoids inhibiting expression of cell adhesion molecular inducea by tumor necrosis factor- α in human vascular endothelial cells. *J Korea Soc Food Sci Nutr* 31(6): 1134-1141, 2002
33) Wong K, Rubenthiran U, Jothy S. Motility of colon cancer cells: modulation by CD44 isoform expression. *Exp Mole Pathol* 75: 124-130, 2003
34) Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369, 1996
35) Liu JD, Chen SH, Lin CL, Tsai SH, Liang YC. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (−)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem* 83: 631-642, 2001
36) Lee HY, Bae GU, Jung ID, Lee JS, Kim YH, Noh SH, Stracke ML, Park CG, Lee HW, Han JW. Autotaxin promotes motility via G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in human melanoma cells. *FEBS Letters* 515: 137-140, 2002
37) Takada M, Nakamura Y, Kozumi T, Toyama H, Kamigaki T, Suzuki Y, Takeyama Y, Kurodo Y. Suppression of human pancreatic carcimona cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate. *Pancreas* 25(1): 45-48, 2002
38) Maeda-Yamamoto M, Kawahara H, Tahara N, Tsuji K, Hara Y, Isemura M. Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT 1080 cells. *J Agric Food Chem* 47(6): 2350-2354, 1999
39) Pilorget A, Berther V, Luis J, Moghrabi A, Annabi B, Beliveau R. Modulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (−)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem* 90(4): 745-755, 2003
40) Caltagirone S, Ross C, Poqqi A, Ranelletti FO, Natall PG, Brunetti M, Alello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 87: 595-600, 2000
41) Stamenkovic I. Matrix metalloproteinasain tumor invasion and metastasis. *Cancer Biol* 10: 415-433, 2000

42) Wang TN, Albo D, Tuszynski GP. Fibroblasts promote breast cancer cell invasion by upregulating tumor matrix metalloprotinase-9 production. *Surgery* 132: 220-225, 2002
43) Shin M, Kim EH, Min SK. EGCG inhibits tumor growth by inhibiting matrix metalloproteinase-9 induction in UM-SCC-1 cells. *J Korean Assoc Plastic Reconst Surgeons* 23(6): 493-501, 2001
44) Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Ahn BW, Jung YD. EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Res* 2(2B): 747-753, 2004
45) Vaydil PK, Katiyar SK. Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinase-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinase C, c-jun and NF-kappa B in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* 59(1): 33-42, 2004