

별불가사리 단백질추출물이 유방암예방 및 전이억제 효소계에 미치는 영향

남경수 · 김미경 · 조현정 · 손윤희*

동국대학교 난치병한양방치료연구센터 및 의과대학 약리학교실

Effect of *Asterina pectinifera* on Activities of Breast Cancer Chemopreventive and Metastatic Enzymes. Kyung-Soo Nam, Mee-Kyung Kim, Hyun-Jung Cho and Yun-Hee Shon*. *Intractable Diseases Research Center and Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea*

Abstract The effect of protein extract from *Asterina pectinifera* on breast cancer chemopreventive (aromatase and cyclooxygenase-2) and metastatic (matrix metalloproteinase) enzymes was tested. Protein extract from *A. pectinifera* was capable of suppressing aromatase in a human placenta microsomal assay. Cyclooxygenase-2 (COX-2) activity was significantly inhibited by the protein extract from *A. pectinifera* at concentrations of 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The extract markedly reduced 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-stimulated matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity. These results suggest that *A. pectinifera* could be of therapeutic value in preventing human breast cancer.

Key words : *Asterina pectinifera*, aromatase, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase, breast cancer chemoprevention

서 론

유방암은 전 세계적으로 가장 빈번한 여성 사망의 원인 질환중 하나이며, 우리나라에서도 유방암 환자가 수년 동안 지속적으로 증가하여 현재는 여성암 중에서 위암 다음으로 두 번째로 흔한 암이 되었다 [13]. 최근 암예방 연구에서는 유방암의 발병률과 사망률을 줄이기 위한 유방암 예방법의 개발에 중점을 두고 있다. Tamoxifen 같은 호르몬 조절제가 유방암 고위험군 여성의 침입성 및 비침입성 유방암의 발병을 감소시켰지만 [5] 이러한 의약품제재는 부작용이 있으므로 근래에는 천연물을 이용한 유방암 예방 및 치료제 개발이 매우 활발히 진행되고 있다.

Aromatase는 aromatase cytochrome P450 효소복합체로서 androgen에서 estrogen으로 전환시키는 estrogen 합성의 핵심적인 효소이다. 유방종양은 대부분 estrogen 의존성으로 estrogen이 암세포의 증식을 위해 필수요인이며 특히, 폐경이후 estrogen 생성이 유

방암 발병과정에 중요한 생물학적 요인으로 증명되었다 [10,19]. 그러므로 aromatase 표현이 유방종양에서 나타나며 종양 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다 [1]. 그러나 아직까지 그 상세한 반응기전이나 분해에 대해 잘 밝혀지지 않은 상태이다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 전환시키는 주요효소로서 두 개의 isoform이 존재한다. 그 중의 하나인 COX-1은 대부분의 조직에서 발현되어 위점막 상피의 보호, 신장의 혈류유지, 혈소판 응집의 조절에 관여하는 반면 COX-2는 성장인자, 발암유전자, 발암물질과 cytokine과 같은 여러 종류의 자극에 의해 발현되며 종양세포와 염증세포 등에서 생성되는 PGs의 양을 조절하는 역할을 한다 [6]. 또한 COX-2는 유방암, 대장암, 전립선암 등에서 과발현되며 특히, COX-2의 주요 생성물인 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 증가현상은 사람의 유방과 실험동물의 유선종양의 모델에서 증명되었다 [14,16]. 유방암세포에서 합성된 PGE₂는

* Corresponding author

Phone: +82-54-770-2633, Fax: +82-54-770-2477

E-mail: yhshon@dongguk.ac.kr

세포간 cAMP 함량을 증가시키고 cAMP는 aromatase 촉진자를 자극하여 estrogen 생합성이 시작된다. 이와 같이 COX-2와 aromatase의 전사적 관계는 유방암 발생에 중요하게 작용하며, 또한 암세포의 증식, 종양세포의 전이나 암세포 주변의 새로운 혈관신생 (angiogenesis)에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

암의 치료에 있어서 가장 큰 장벽이고 암환자의 주된 사망 요인은 암세포의 전이 (metastasis)에 의한 것이다. 따라서 암 치료를 위한 전이 억제제의 개발을 위해 암세포의 침윤 (invasion)과 전이의 분자적인 기전에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. 암세포는 침윤과 전이를 하기 위해서 많은 종류의 단백분해효소를 분비하는데, 특히 기저막 (basement membrane)과 세포외기질 (extracellular matrix)의 주성분을 분해하는 기질금속단백분해효소 (matrix metalloproteinases, MMPs)가 중요한 역할을 한다 [2]. MMPs는 세포내에서 불활성의 proenzyme의 형태로 합성되지만 세포 밖으로 분비된 후 스스로 혹은 조직 내의 특정한 효소에 의해 또는 아연과 칼슘이온에 의해 활성을 나타내며, 이 효소가 과다발현되어 암세포의 증식, 침윤, 전이, 종양 등을 활성화시킨다 [3]. 그 중에서도 기저막의 주요성분인 type IV collagen을 분해하는 MMP-9이 암전이에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 [8].

불가사리는 극피동물문에 속하는 해양생물로서 전세계에 1,700 여종이 보고되어 있으며 우리나라에는 200여종이 서식하고 있다. 최근 우리나라에서는 불가사리의 대량 번식으로 인하여 해양생태계가 크게 위협받고 있어 어민들이 포획하여 폐기시키고 있을 뿐 산업적으로 유용하게 사용되지 못하고 있는 실정이다. 그래서 최근 우리나라에서는 불가사리를 유효하게 사용하기 위한 일환으로 고부가가치의 식·의약품 소재 이용 가능성을 검토하는 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 논문에서는 불가사리의 고부가가치 의약품 소재 이용 가능성을 검토하고자, 별불가사리 단백추출물이 암예방과 전이억제효소에 미치는 영향을 측정하였다.

재료 및 방법

시료제조

별불가사리는 포항 앞바다에서 채집하여 물로 깨끗이 씻어 -20℃에 보관하였다.

별불가사리 단백추출물은 Kishimura와 Hayashi [9]의 방법에 의하여 준비하였다. 즉, 별불가사리 (500 g)는 작은 조각으로 잘라서 4℃에서 3차 증류수로 추출하여 10,000 ×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액은 0~40% ammonium sulfate로 분리하고 Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 녹여 투석한 후, 투석물은 4℃에서 원심분리 (10,000 ×g, 30분)하였다. 상층액 (단백추출물)은 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량 (3.4 g)을 측정하였다. 냉동건조한 단백추출물은 실험조건에 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

세포배양

계대 보존 중인 사람의 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 RPMI 1640을 배양액으로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37℃)에서 배양하였고, 배양액은 3 또는 4일 간격으로 교환해 주었다. 이들 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 실험에 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

태반의 aromatase 준비

사람의 태반 조직은 1% KCl과 potassium phosphate buffer로 세척한 후, sucrose, potassium phosphate buffer, dithiothreitol과 NADPH가 포함된 용액에서 균질화시킨 후 원심분리하였다 (800 ×g, 15분). 그리고 상층액은 10,000 ×g에서 15분간 다시 원심분리한 후, 그 상층액은 단백질 정량 후 -70℃에 보관하였다.

Aromatase 활성 측정

Aromatase 활성은 Thompson과 Siiteri의 방법 [17]을 변형하여 실시하였다. 즉, 기질 [1β -³H(N)]androst-4-ene-3,17-dione (specific activity 24.7 Ci/mmol) (100 nM), 태반 마이크로솜 (40 μg), progesterone (10 μM), bovine serum albumin (0.1%), potassium phosphate (67 mM, pH 7.4)와 시료를 포함한 반응액 500 μl를 상온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 12 mM NADPH를 반응액에 넣고 37℃에서 10분간 다시 반응시킨 후 5% TCA로 반응을 중단시켰다. 1,000 ×g에서 10분간 원심분리 후 동량의 chloroform으로 반

용시킨 후 그 상층액은 dextran-charcoal 혼합액에 옮긴 후 원심분리하고 상층액의 radioactivity를 측정하였다.

Western blot

세포의 최종수를 3×10^5 cells/ml로 조정하여 12 well plate의 각 well에 24시간 부착시킨 후에 시료를 농도별로 $50 \mu\text{l}$ 씩 가하였다. 이를 37°C CO_2 배양기에서 다시 2시간 배양시킨 후 TPA 150 nM의 농도를 가하여 COX-2를 유도하였다. 이를 30시간 동안 배양한 후 세포의 lysate를 준비하여 Western blot 분석에 사용하였다. 즉 세포 lysate의 단백질을 전기영동으로 분리하고 20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 Ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체와 막을 4시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)을 사용하여 5분 간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 ECL 용액으로 2분간 반응하고 Kodac 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

Gelatin zymography

세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 배양액으로 사용하여 5×10^5 cells/well 로 6-well에 분주하였다. 18시간 배양한 후, 남아있는 FBS를 제거하기 위해 RPMI 1640 배지로 3번 씻어낸 뒤 150 nM TPA와 농도별 시료를 처리하고 RPMI 1640 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 상층액을 회수하여 측정된 세포수로 그 용량을 표준화하여 MMP-9 (gelatinase)의 활성을 측정하였다. 즉, 상층액을 $10 \times$ nonreducing sample buffer [120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 28.8 mM 2-mercaptoethanol 0.2% (w/v) bromophenol blue]와 섞어 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 10% SDS-PAGE gel에 전기영동하였다. 그 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100에서 1시간동안 shaking하면서 SDS를 제거한 후, 마

지막으로 3차증류수로 Triton X-100을 씻어내었다. 그리고 gel을 developing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl_2 , 0.01% NaN_3)와 37°C 에서 18시간 동안 shaking하면서 반응시키고 0.05% coomassie brilliant blue, 45% methanol과 10% acetic acid로 30분 이상 염색시킨 후 10% methanol과 10% acetic acid로 투명 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다.

결과 및 고찰

Aromatase 활성 저해효과

사람의 태반에서 분리한 aromatase의 활성에 별불가사리 (*Asterina pectinifera*) 단백추출물이 미치는 영향을 측정한 결과 별불가사리 단백추출물은 농도의존적으로 aromatase 활성을 저해하였으며, 80 ($p < 0.05$), 120 ($p < 0.01$), 160 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$)에서는 통계적으로 유의적인 억제효과를 측정할 수 있었다. 특히, 160 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 양성대조군인 aminoglutethimide (5 μM)와 유사한 억제효과를 나타내었다 (Fig. 1).

암세포의 증식에 필수요인이 되는 estrogen의 합성 마지막 단계에 관여하는 aromatase의 활성증가는 유방암의 진행에 중요하게 작용한다. 그러므로 aromatase 활성 저해는 endogenous estrogen의 함량을

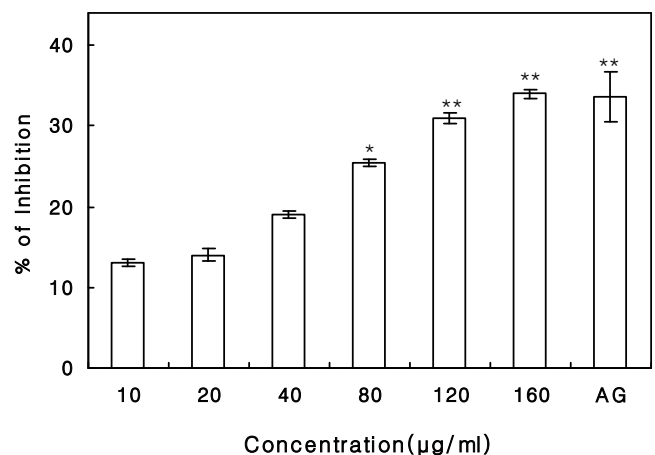


Fig. 1. Inhibition of human placental aromatase activity by protein extract from *Asterina pectinifera*. AG, 5 μM aminoglutethimide. Experimental details are described in Material and Methods. Values represent mean \pm SD ($n=3$). The value of each group statistically significant as compared with control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

감소시키므로 [15] 별불가사리 단백추출물은 aromatase 활성 감소효과에 의하여 유방암 유발을 억제할 수 있을 것이다.

COX-2에 미치는 영향

MDA-MB-231 세포에서 TPA에 의해 유도된 COX-2의 발현에 미치는 별불가사리 단백추출물의 영향을 Western blot 분석으로 살펴본 결과, 별불가사리 단백추출물이 COX-2 단백질의 발현을 농도의존적으로 억제하였다 (Fig. 2). COX-2는 정상조직에서는 거의 발현되지 않고 염증반응과 여러 악성종양에서 발현이 증가되며, 악성종양세포의 성장, 세포자멸사 (apoptosis)의 억제, 혈관신생 (angiogenesis) 등의 발암기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [11,18]. 특히, 침윤성 유방암에서 COX-2의 과발현이 보고되고 있다 [7]. 그러므로 COX-2의 발현을 억제하는 별불가사리 단백추출물은 유방암 발생과정의 축진을 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

MMP-9 활성

세포외기질 단백질의 분해를 통한 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 MMP-9 활성은 별불가사리 단백추출물 20~160 µg/ml에서 농도의존적 저해효과를 나타내었으며, 그 중에서도 120 µg/ml 이상의 농도에서 MMP-9 활성 저해제인 EGCG (20 µM) 보다 더 높은 저해효과를 나타내었다 (Fig. 3).

MMP-9은 세포외기질 단백질의 분해를 통한 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 한다. 특히, 유방암, 결장암, 위암 등의 종양이 진행된 단계에서 과발현한다 [4]. 유방암의 관상피내암종에서 pro-MMP-9의 생성이 증가되고 암화과정이 진행될수록 MMP-9의 활성화가 일어난다 [12]. 따라서 별불가사리 단백추출물 120, 140, 160 µg/ml 농도에서 EGCG보다 높은

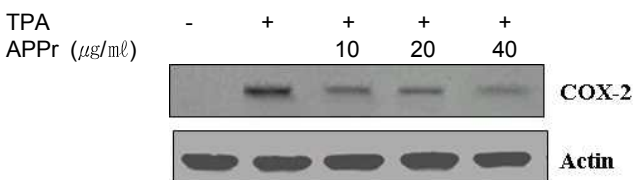


Fig. 2. Effect of protein extract from *Asterina pectinifera* (APPr) on expression of COX-2 protein. Experimental details are described in Material and Methods.

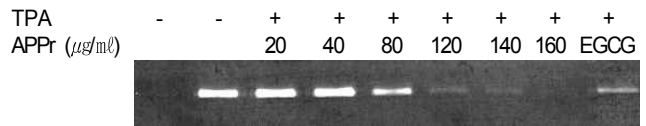


Fig. 3. Effect of protein extract from *Asterina pectinifera* (APPr) on TPA-induced MMP-9 activity in MDA-MB-231 cells. Gelatin zymography was used to detect MMP-9 activity in conditioned media obtained from MDA-MB-231 cells grown TPA (150 nM) alone, TPA plus APPr (0~160 µg/ml) or epigallocatechin gallate (EGCG, 20 µM).

억제효과가 나타났으므로 별불가사리가 유방암전이 억제효과가 있을 것으로 보인다.

요 약

별불가사리 단백추출물을 조제하여 유방암 발생 및 전이억제효과를 측정된 결과 종양세포증식에 관여하는 aromatase 활성이 농도의존적으로 억제효과가 있었으며, 침윤성 유방암에서 과발현하는 COX-2 단백질 발현을 억제하였다. 그리고 유방암이 진행될수록 활성이 증가하는 MMP-9도 농도의존적 저해효과를 보였다. 그러므로 별불가사리 단백추출물은 유방암억제기전에 관련된 더 많은 연구를 통하여 유방암 예방물질로서 개발 가능성이 있는 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스연구단 연구비 지원 (과제관리번호 B-2004-19)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Brodie, A., Qing, L. and Nakamura, J. 1997. Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **61**, 281-286.
2. Chambers, A. F. and Matrisian, L. M. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1260-1270.
3. Chang, C. and Werb, Z. 2001. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**, s37-s42.
4. David, L. and Nesland, J. M. 1994. Expression of laminin, collagen, fibronectin, and type clooxygenase in gastric carcinoma. *Cancer* **73**, 518-527.
5. Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S.,

- Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmaik, N., other National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **18**, 1371-1388.
6. Fosslie, E. 2000. Biochemistry of cyclooxygenase (COX-2) inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **37**, 431-432.
 7. Half, E., Tang, X. M., Gwyn, K., Sahin, A., Wathen, K. and Sinicropo, F. A. 2002. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* **62**, 1676-1681.
 8. Hong, M. K., Cho, K. Y., Oh, S. J., Kim, K. M. and Yu, S. J. 2002. Implication of the activation of matrix metalloproteinase-2 on the metastasis in breast cancer. *J. Kor. Surg. Soc.* **62**, 18-25.
 9. Kishimura, H. and Hayashi, K. 2002. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **132**, 485-490.
 10. Lu, Q., Nakamura, J., Savinov, A., Yue, W., Weisz, J., Dabbs, D. J., Wolz, G. and Brodie, A. 1996. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* **137**, 3061-3077.
 11. Marnett, L. J. 1994. Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 303-308.
 12. Rha, S. Y., Kim, J. M., Roh, J. K., Lee, K. S., Min, J. S., Kim, B. S. and Chung, H. C. 1997. Sequential production and activation of matrix metalloproteinase-9 with breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.* **43**, 175-181.
 13. Ries, L., Wingo, P. A., Miller, S. S., Howe, H., Weir, H. K., Rosenberg, H. M., Vernon, S. W., Cronin, K. and Edwards, B. K. 2000. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* **88**, 2398-2424.
 14. Schrey, M. P. and Patel, K. V. 1995. Prostaglandin E₂ production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br. J. Cancer* **72**, 1412-1419.
 15. Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R. and Michael, M. D. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**, 342-355.
 16. Tan, W. C., Privett, S. and Goldyne, M. E. 1974. Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenzanthracene. *Cancer Res.* **34**, 3229-3231.
 17. Thompson, E. A. Jr. and Siiteri, P. K. 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* **249**, 5364-5372.
 18. Tsujii, M. and DuBios, R. N. 1995. Alternations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase. *Cell* **93**, 705-716.
 19. Zhou, C., Zhou, D., Esteban, J., Murai, J., Sitteri, P. K., Wilczynski, S. and Chen, S. 1996. Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **59**, 163-171.