

단삼 예탄올추출물이 유방암 예방 및 전이에 미치는 영향

손윤희 · 조현정 · 김미경 · 정은정¹ · 남경수^{1*}

동국대학교 난치병한양방치료연구소 및 의과대학 약리학교실

Effect of Ethanol Extract from *Salvia miltiorrhiza* on Chemoprevention and Metastasis of Breast Cancer

Yun-Hee Shon, Hyun-Jung Cho, Mee-Kyung Kim, Eun-Jung Jung¹, and Kyung-Soo Nam^{1*}

Intractable Diseases Research Center and ¹Department of Pharmacology,
College of Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract – Ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* (SME) was tested for breast cancer chemoprevention and metastasis by measuring the activities of cytochrome P450 1A1, aromatase, ornithine decarboxylase (ODC), and matrix metalloproteinase (MMP)-9. SME significantly inhibited cytochrome P450 1A1-mediated ethoxresorufin O-deethylase (EROD) activity in a dose-dependent manner in a concentration range of 100~1,200 µg/ml ($p<0.01$). Microsomal aromatase (estrogen synthase) activity was suppressed 54.9%~77.5% by the SME at concentration of 600~1,200 µg/ml. ODC activity induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) was significantly reduced by the SME 900 and 1,200 µg/ml ($p<0.05$) in MCF-7 breast cancer cells. In addition, SME (900 and 1,200 µg/ml) markedly inhibited MMP-9 activity, a key role in cancer metastasis. Therefore, SME is worth further investigation with respect to breast cancer chemoprevention or therapy.

Key words – *Salvia miltiorrhiza*, cytochrome P450 1A1, aromatase, ornithine decarboxylase, matrix metalloproteinase-9

유방암은 전 세계적으로 가장 빈번한 여성 사망원인의 질환 중 하나이며 조기발견과 개선된 보조치료에도 불구하고 매년 약 100만명의 새로운 환자가 발생한다. 우리나라에서도 유방암 환자가 지속적으로 증가하고 있으며 여성암 중에서 자궁암, 위암 다음으로 많은 비중을 차지하고 있다. 최근 암연구는 암의 치료보다는 예방법의 개발에 중점을 두고 있으며, 천연물을 이용한 암예방 및 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다.

발암물질 대사효소는 발암물질이나 성호르몬의 활성에 관여한다. 특히, phase I 효소중의 하나인 cytochrome P450 1A1 효소는 외부의 발암물질을 전자친화적 물질 (electrophilic product), epoxides 또는 매우 독성이 강한 물질로 전환시킨다. 또한 cytochrome P450 효소복합체인 aromatase도 암세포의 증식에 필수요인이 되는 estrogen의 합성 마지막 단계에 관여하므로 종양증식에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다.¹⁾ 사람의 유선상피세포에서 cytochrome P450 1A1, 1B1과 2E1의 활성이 증가되므로²⁾ cytochrome P450 효소의

활성 억제효과는 곧 유방암예방의 효과를 의미할 수 있다.

Ornithine decarboxylase (ODC)는 polyamine 생합성 과정 중 putrescine의 생성에 관여하는 효소로서 정상세포와 종양세포의 증식에 필수적이다. 또한 ODC의 유도는 암촉진단계에도 중요한 기능을 담당하고 있어 생쥐의 여러 조직을 이용한 암촉진 실험에서 ODC 활성 유도와 발암물질의 암촉진 능력간의 밀접한 관계가 보고되었다.³⁾ 특히, 유선조직에서 estradiol이나 peptide growth factor에 의하여 ODC 활성이 증가되고, 세포외에서의 polyamine 이동에 의하여 세포내 polyamine의 증가가 관찰되었다.⁴⁾

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 metalloproteinase, MMP)가 중요한 역할을 한다.⁵⁾ MMP가 과다발현되면 암세포의 증식, 침윤, 전이 및 종양 등을 활성화시키며⁶⁾ 그 중

*교신저자(E-mail): namks@dongguk.ac.kr
(FAX): 054-770-2477

에서도 기저막의 주된 성분인 type IV collagen을 분해하는 MMP-9과 MMP-2가 암전이에 큰 영향을 미치는 것으로 증명되었다.⁷⁾

단삼 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 다년생 약용식물로 뿌리를 채취하여 건조시킨 후 약재로 사용하고 있으며,⁸⁾ 그 뿌리는 특이한 냄새가 나며 약간 쓴맛이 난다. 단삼의 주요성분으로 scatellacin, tanshinone, cypto-tanshinone, hydroxytanshinone, salvian, vitanin A와 E 등⁹⁾이 알려져 있고 최근엔 단삼의 암세포증식 억제 효과에 관한 연구가 보고된 바 있다.¹⁰⁾

본 실험에서는 단삼 에탄올추출물의 유방암 예방 및 전이 억제 효과를 살펴보기 위해 cytochrome P450 1A1, aromatase, ornithine decarboxylase (ODC) 및 matrix metalloproteinase (MMP)-9 활성을 미치는 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

시약 – RPMI-1640 medium, antibiotics, 7,12-dimethylbenz[α]-anthracene (DMBA), potassium phosphate buffer, ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glucose-6-phosphate dehydrogenase, ethoxyresorufin, resveratrol, 1β-³H(N)] androst-4-ene-3,17-dione, progesterone, NADPH, difluoromethylornithine (DFMO), L-[1-¹⁴C] ornithine, EDTA, dithiothreitol, triton X-100, bovine serum albumin (BSA), epigallocatechin gallate (EGCG), Tris-HCl, bicinchoninic acid protein kit는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS)은 JBI사 (Daegu, Korea)제품을 사용하였다. 기타 세포 배양용 시약 및 추출용 유기용매는 특급시약을 사용하였다.

에탄올추출물의 제조 – 실험에 사용한 국내산 단삼은 경주시 소재 건재상에서 구입하였으며, 단삼 1.2 kg은 상온에서 70% 에탄올 (2 l)로 3일간 3회 추출하여 그 추출액을 여과 농축하여 에탄올추출물 222.1 g을 얻었다. 그리고 실험 조건에서 사용되는 배지 및 증류수에 희석시켜 실험에 사용하였다.

세포배양 – 계대 보존증인 MCF-7 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 배지로 하여 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 배양하였고, 배양액은 2~3일 간격으로 교환해 주었다. 세포는 액체질소에 보존해 두었다가 같은 passage 번호를 가진 세포를 녹여서 사용하였으며, 세포의 생존은 trypan blue dye exclusion 방법으로 확인하였다.

Cytochrome P450 1A1의 활성 저해 측정 – DMBA (30 mg/마리)를 처리한 흰쥐의 간조직으로부터 마이크로솜의 분리는 Phol과 Fouts의 방법¹¹⁾을 참고하여 실시하였다. Cytochrome P450 1A1은 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였다.¹²⁾ 즉, 흰쥐로부터 분리한

microsomal protein (2 mg/ml) 200 μl에 640 μl의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5), 100 ml의 BSA (10 mg/ml in Tris-HCl buffer), 20 μl의 0.25 M MgCl₂, 40 μl의 cofactor solution, 2.5 units의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μl의 기질 (1 ml of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol), 10 μl의 단삼 에탄올추출물을 농도별로 첨가하였다. 모든 시약들을 잘 섞은 후 37°C에서 4분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계 (BIO-TEK SFM25, USA)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. 양성대조군은 resveratrol을 사용하였고, 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 이 실험은 3회 반복 실험으로 수행하였으며, 각각의 결과는 control에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 %로 나타내었다.

Aromatase 활성 측정 – Aromatase 활성은 Thompson과 Siiteri의 방법¹³⁾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 mg), 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°C에서 10분간 다시 반응시킨 후 5% TCA로 반응을 중단시켰다. 100 × g에서 10분간 원심분리 후 동량의 chloroform으로 반응시킨 후 그 상층액은 dextran-charcoal 혼합액에 옮긴 후 원심분리하고 상층액의 radioactivity를 측정하였다.

Ornithine decarboxylase (ODC) assay – MCF-7 cell을 6-well tissue culture plate에 well 당 4 × 10⁵ cells/ml 세포를 접종시키고, 18시간 후에 TPA와 시료 또는 양성대조군인 0.01 mM DFMO를 처리하여 6시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 용해하여 Nam 등의 방법¹⁴⁾으로 ODC 활성을 측정하였다. ODC specific activity는 pmol ¹⁴CO₂/h/mg protein으로 나타내며, ODC 활성 억제는 TPA만 처리한 조절군에 대한 각 시료들의 저해도 정도를 %로 나타내었다.

Gelatin zymography – TPA에서 유도되어진 MMP-9 활성을 알아보기 위하여 Overall 등¹⁵⁾의 방법을 이용하여 gelatin zymography를 실시하였다. MCF-7 cells을 5 × 10⁵ cells의 농도로 6 well plate에 분주하고 24시간 후 단삼 에탄올추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 배양시킨 후 상층액을 취하여, 0.1% (w/v) gelatin이 포함된 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% Triton X-100 용액에서 1시간 동안 씻어낸 다음 developing buffer에서 37°C로 24시간 배양시켰다. Coomassie 염색과 탈색을 통해 MMP-9 활성 정도를 확인하였다.

통계학적 처리 – 실험결과는 평균 ± 표준편차 (standard deviation, SD)로 나타내었으며, 실험에 대한 유의성 검정을 위해 student's t-test를 수행하여 결과치는 p 값이 0.05 미만

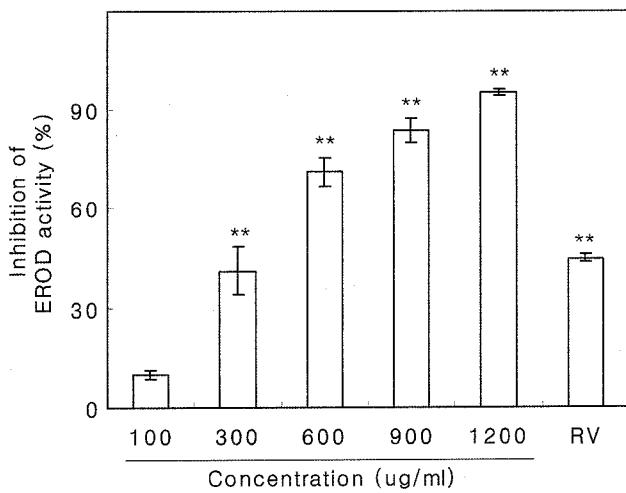


Fig. 1. Inhibition of cytochrome P450 1A1-mediated ethoxresorufin O-deethylase (EROD) activity using liver microsomes derived from 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-treated rats. The EROD activity was assessed with the indicated concentration of ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. RV, 0.05 nmole resveratrol. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean ($n=3$). ** $p<0.01$ compared with the control.

을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

Cytochrome P450 1A1의 활성 저해효과 – 단삼 에탄올추출물이 유방암 유발의 대표적인 발암물질인 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P450 1A1 효소활성 억제율을 측정한 결과, 단삼 에탄올추출물은 100, 300, 600, 900, 1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 10.1, 41.2, 71.0, 83.3과 94.8%의 농도의존적 저해율이 나타났으며 (Fig. 1), 600~1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 양성대조군인 resveratrol (0.05 nmole)의 억제율 44.8%보다 높은 억제효과를 나타내었다. 그리고 단삼 에탄올추출물 300~1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 ($p<0.01$)에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 측정할 수 있었다.

Cytochrome P450 1A1은 phase I 효소중의 하나로서 전발암물질 (procarcinogen)을 발암대사물 (carcinogenic metabolites)로 전환시키기 때문에 암유발 위험인자이다. 사람의 유선상피세포에서 활성이 검정된 cytochrome P450 1A1 효소의 활성억제효과는 곧 유방암예방의 효과를 의미한다. 그러므로 본 연구의 결과에 의하면 단삼 에탄올추출물이 cytochrome P450 1A1 효소활성 저해효과를 나타내었으므로 유선조직에서 발암물질의 활성을 억제시킬 가능성성이 있을 것으로 보인다.

Aromatase의 활성 저해효과 – 사람의 태반에서 분리한 aromatase의 활성에 단삼 에탄올추출물이 미치는 효과를 측정하였다. 그리고 aromatase 저해제의 양성대조군으로는 1 μM

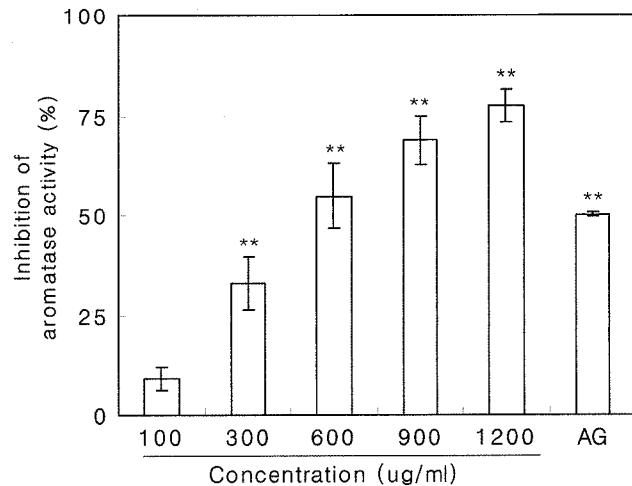


Fig. 2. Effect of ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* on microsomal aromatase activity. AG, 1 mM aminoglutethimide. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean ($n=3$). ** $p<0.01$ compared with the control.

aminoglutethimide를 사용하였다. 그 결과, 단삼 에탄올추출물은 농도의존적으로 aromatase 활성을 저해하였으며, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도 ($p<0.01$)에서 통계적으로 유의적인 억제효과를 측정할 수 있었다. 또한 600, 900과 1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서의 aromatase 활성 저해율은 54.9, 69.1과 77.5%로 양성대조군 (50.2%)보다 더 높은 억제효과를 나타내었다 (Fig. 2).

호르몬 의존성 유방암은 estrogen α 세포분열을 증가시키는 물질로 알려져 있으며, 이 호르몬은 androgen α aromatase에 의한 수산화 반응 후에 생성되며 유방암발생에 중요한 영향을 미친다. 유방암 세포에서 estrogen 합성에 관여하는 aromatase의 과다발현과 활성 증가는 유방암의 진행에 중요한 요인이다. Aromatase 활성저하는 endogenous estrogen의 함량을 감소시키므로 단삼 에탄올추출물은 aromatase 활성 억제효과에 의하여 유방암 유발을 억제할 수 있을 것으로 보인다.

Ornithine decarboxylase (ODC)의 활성 저해효과 – MCF-7 세포에서 단삼 에탄올추출물이 TPA에 의해서 유도된 ODC 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 단삼 에탄올추출물 100~1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 5.2~76.1%의 농도의존적 저해율이 나타났으며, 특히 900과 1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 ($p<0.05$)에서는 통계적으로 유의성 있는 억제효과를 측정할 수 있었다 (Fig. 3). 또한 900과 1,200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 ODC 활성 저해제의 대표적인 물질인 DFMO (41.6%)보다 더 높은 저해효과를 나타내었다.

ODC 단백질 과다발현과 polyamine 함량 증가는 유방암 조직에서 관찰되었고, 유방종양에서도 높은 ODC 발현과 polyamine 함량이 측정되었으므로 ODC 활성이 유방암 발생과 관계가 있음이 증명되었다.¹⁶⁾ 따라서 ODC 활성증가

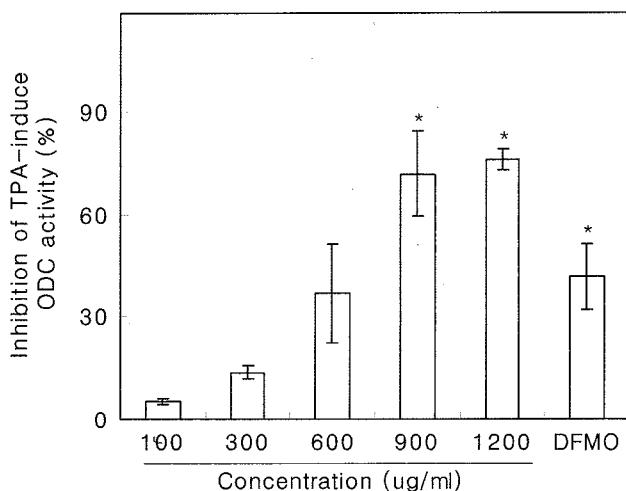


Fig. 3. Effect of ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity in MCF-7 human breast cancer cells. DFMO, 0.01 mM difluoromethylornithine. Data shown are mean values with bars indicating the SD of the mean ($n=3$). * $p<0.05$ compared with the control.

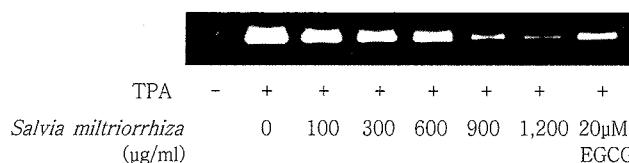


Fig. 4. Effect of ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced matrix metalloproteinase (MMP)-9 activity in MCF-7 human breast cancer cells. Gelatin zymography was used to detect MMP-9 activity in conditioned media obtained from MCF-7 cells grown with 150 nM TPA, TPA plus ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza* (100~1,200 μ g/ml), EGCG, 20 μ M epigallocatechin gallate.

는 종양발생의 촉진단계를 자극하므로, 단삼 에탄올추출물 900과 1,200 μ g/ml 농도에서 DFMO보다 높은 억제효과가 측정되었으므로 단삼이 유방암 발생과정의 증폭억제 (anti-promotion) 작용에 의해 암예방 효과를 나타낼 것으로 보인다.

Matrix metalloproteinase (MMP)-9의 활성 저해효과 – MMP-9은 세포 지지구조체인 기저막의 주성분인 type IV collagen을 분해하는 효소로서 정상세포에서는 발현되지 않는다. MCF-7 세포에서 MMP-9 활성은 단삼 에탄올추출물 100~1,200 μ g/ml에서 농도의존적 저해율이 나타났으며, 특히 900과 1,200 μ g/ml 농도에서는 MMP-9 활성 저해제인 EGCG (20 μ M)보다 더 높은 저해효과를 나타내었다 (Fig. 4).

MMP-9은 세포외기질 단백질의 분해를 통한 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 한다. 특히, 유방암, 결장암, 위암 등의 종양이 진행된 단계뿐만 아니라 초기 단계부터 생성

되어 과발현한다.¹⁷⁾ 유방암의 초기단계인 관상피내암종에서 pro-MMP- 9의 생성이 증가되고 종양이 진행될수록 MMP-9의 활성화가 일어난다.¹⁸⁾ 따라서 단삼 에탄올추출물 900과 1,200 μ g/ml 농도에서 EGCG보다 높은 억제효과가 나타났으므로 단삼이 유방암을 예방하는데 효과가 있을 것으로 보인다.

결 론

단삼 에탄올추출물 (100~1,200 μ g/ml)의 유방암 발생 및 전이 억제효과를 측정한 결과, 유방암의 대표적인 발암물질인 DMBA에 의해 유도된 cytochrome P450 1A1 효소활성 억제효과는 10.1~94.8%로, aromatase 활성 억제효과는 9.3~77.5%로 농도의존적인 억제효과가 있었다. 그리고 유방암 발생에 중요한 요인으로 증명된 ODC 활성이 단삼 에탄올추출물에 의하여 저해되었으며 특히, 900과 1,200 μ g/ml에서 ODC 활성 저해물질인 DFMO의 억제율 41.6%보다 더 높은 71.9와 76.1%의 억제율이 측정되었다. 유방암이 진행될수록 활성이 증가하는 MMP-9도 농도의존적 저해율을 보였다. 그러므로 단삼 에탄올추출물은 유방암 억제기전에 관련된 더 많은 연구를 통하여 유방암 예방물질로서 개발 가능성이 있는 것으로 보인다.

사 사

본 연구는 산업자원부 지역혁신특성화 시범사업의 지원을 받아 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 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.
- Forrester, L. M., Hates, J. D., Millis, R., Barnes, D., Harris, A. L., Schlager, J. J., Powis, G and Wolf, C. R. (1990) Expression of glutathione S-transferases and cytochrome P450 in normal and tumor breast tissue. *Carcinogenesis* **11**: 2163-2170.
- Li, L., Carol, T. and Susan, K. G (2000) Inhibition of ornithine decarboxylase decreases tumor vascularization and reverse spontaneous tumors in ODC/Ras transgenic mice. *Cancer Res.* **60**: 5696-5730.
- Huber, M. and Poulin, R. (1996) Permissive role of polyamines in the cooperative action of estrogens and insulin or insulin-like growth factor I on human breast cancer cell growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 113-123.

5. 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.
6. Chang, C. and Werb, Z. (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**: s37-s42.
7. 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. Korea Surg. Soc.* **62**: 18-25.
8. Mok, J. S., Kim, Y. M., Kim, S. H. and Chang, D. S. (1995) Antimicrobial property of the ethanol extract from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Food Hyg. Safety* **10**: 23-28.
9. Lee, Y. J. and Lee, S. Y. (1992) *Paracognosy*, 131-137, Dong Myeung Sa, Seoul, Korea.
10. Kim, O. H., Chung, S. Y., Park, M. K., Rheu, H. M. and Yang, J. S. (1999) Anticancer activity of natural products including *Salvia miltiorrhiza*. *J. Appl. Pharmacology* **7**: 29-34.
11. Pohl, R. J. and Fouts, J. R. (1980) A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* **107**: 150-155.
12. Rodrigues, A. D. and Prough, R. A. (1991) Induction of cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* **206**: 423-431.
13. Thompson, E. A. 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.
14. Nam, K. S., Son, O. L., Lee, K. H., Cho, H. J. and Shon, Y. H. (2004) Effect of *Cnidii Rhizoma* on proliferation of breast cancer cell, nitric oxide production and ornithine decarboxylase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**: 283-287.
15. Overall, C. M., Wrana, J. L. and Soddek, J. (1989) Independent regulation of collagenase, 72 kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **264**: 1860-1869.
16. Manni, A., Astrow, S. H., Gammon, S., Thompson, J., Mauger, D. and Washington, S. (2001) Immunohistochemical detection of ornithinedecarboxylase in primary and metastatic human breast cancer specimens. *Breast Cancer Res. Treat.* **67**: 147-156.
17. David, L. and Nesland, J. M. (1994) Expression of laminin, collagen, fibronectin, and type clooagenase in gastric carcinoma. *Cancer* **73**: 518-527.
18. 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.

(2007년 1월 17일 접수)