

## 인간 유방암 MDA-MB-231 세포에서 Peptide H에 의한 IL-6 발현 억제효과

성대일 · 박잠언 · 김한복\*

호서대학교 생명공학과, 기초과학연구소

### Peptide H Reduces IL-6 Expression in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

Dae Il Sung, Jameon Park, and Han Bok Kim\*

Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea

(Received August 11, 2014 / Accepted September 23, 2014)

Chronic inflammation is involved in cancers, rheumatoid arthritis, and Crohn's disease. Interleukin-6 (IL-6) plays major roles in inflammation. Chungkookjang, fermented soybean contains diverse peptides produced by cleavage of soybean proteins. The peptides can be bioactive compounds. Peptide (Gly-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr) was purified from Chungkookjang, and modified to be 6mer H, Glu-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr (EVYYMY). Peptide H's activity to suppress IL-6 expression in a human breast cancer cell, MDA-MB-231 was determined. IL-6 Expression was reduced in the cell treated with peptide H 25 times less than controls which were not treated with peptide H. Proliferation of MDA-MB-231 cells was inhibited by peptide H, which is concentration-dependent. Blocking of IL-6 signals is known to be effective in reducing inflammation in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and cancers. Since peptide H can reduce inflammatory IL-6 expression, application of this study will contribute to drug development for diseases which are caused by excessive IL-6.

**Keywords:** breast cancer, IL-6, inflammation, peptide

염증은 인체가 상처를 입거나 병원균의 침입을 받았을 때 면역세포가 관여하는 면역반응이다. 이 때 면역세포는 다양한 cytokine을 분비한다. 손상된 조직이 복구되면 염증반응은 멈춘다. 그러나 조직의 복구에도 불구하고 면역반응이 계속되면 만성염증이 된다. 암, 류마티스, 크론병 등은 만성염증과 관련되어 있다(Lin and Karin, 2007).

Interleukin-6 (IL-6)는 염증의 주요 매개인자이다(Coussens and Werb, 2002; Berghe *et al.*, 2006; Mantovani, 2008; Ndlovu *et al.*, 2009; Grivennikov *et al.*, 2010).

청국장 콩 발효식품으로 대두단백질이 분해되어 다양한 peptide가 생성되면서, 생리활성물질이 될 수 있다(Lee *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2011). 본 연구에서는 청국장에서 분리한 peptide (Gly-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr)를 가공한 6mer H, Glu-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr (EVYYMY)가 유방암세포에서 IL-6 발현을 억제할 수 있는지 여부를 결정하였다.

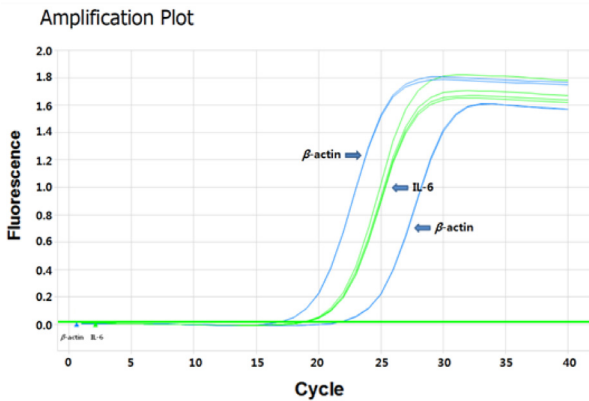
인간 유방암 MDA-MB-231 세포를, DMEM/Highglucose (Hyclone,

USA)을 사용하여 배양하였다. 배지조성으로는 10% FBS (Hyclone), 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Cellgro)이며, cell이 80-90% 자랐을 때 1X DPBS로 2번 씻어준 후, 1X Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 떼어서 계대배양을 실시했다. 계대배양 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

MDA-MB-231 세포를 96 well plate에  $5 \times 10^3$ 으로 seeding하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 24시간 안정화 시켰다. 안정화된 후 세포배양액을 모두 제거하고 peptide H를 1 mM, 100 µM로 녹인 배양액을 100 µl씩 넣어 준 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 24시간 배양하였다. Enhanced Cell Viability Assay Kit (EZ3000, Daeil Lab, Korea) 10 µl씩 각각의 well에 넣어준 후 배양기에 넣어 30분 반응시켜준 후 450 nm에서 측정하였다.

Peptide를 처리한 MDA-MB-231 세포로부터 Ribospin (GenAll)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 순도 측정하여 1.8-2.0이 나온 것을 확인 후 2.5 mM dNTP 6 µl, Oligo-dT 6 µl, DEPC 34 µl, RNA 6 µl, RNA inhibitor 1 µl를 넣고 70°C에서 10분간 반응 시킨 후 Reverse transcriptase (Enzynomics) 1 µl, 10X Reverse transcriptase buffer 5.3 µl를 넣고 43°C에서 90분간 반응 시키고 70°C에서 5분간 반응 시켜주어 cDNA를 합성하

\*For correspondence. E-mail: [hbkim@hoseo.edu](mailto:hbkim@hoseo.edu); Tel.: +82-41-540-5624; Fax: +82-41-548-6231



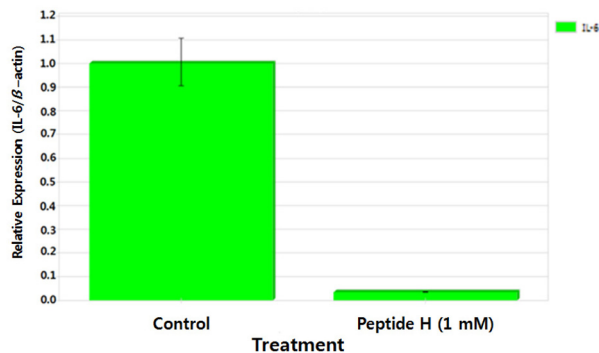
**Fig. 1.** Amplification of IL-6 gene. Realtime PCR for the amplification of IL-6 mRNA in MDA-MB-231 cell was performed.  $\beta$ -actin mRNA was amplified as an internal control.

였다.

Realtime PCR (Eco, Illumina Inc, USA)을 사용하여 mRNA 발현을 측정하였다. Illumina 제품인 2X quanti MIX SYBR 시약을 사용하였고 활성개시를 95°C에서 10분간 실시하였고, denaturation은 95°C에서 15초, annealing은 52°C에서 15초, extension은 72°C에서 15초씩 40 cycle 실시하였으며, Melt curve 온도를 측정하기 위해 95°C에서 15초, 52°C에서 15초, 72°C에서 15초 실시하였다. 사용한 primer로는 IL-6 forward primer 5'-GACAGC CACTCACCTCTTA-3', reverse primer 5'-CGATCCACACGG AGTCTTG-3',  $\beta$ -actin forward primer 5'-GGATGCAGAAGG AGATCACTG-3', reverse primer 5'-CG ATCCACACGGAGT ACTTG-3'를 사용하였다.

Basal level로 발현하는 IL-6양은 유방암 MCF7 세포주에서는 미약했고, 반면에 유방암 MDA-MB-231 세포주에서는 크게 높아서 본 연구에서는 MDA-MB-231 세포주를 사용하였다 (Ndlovu *et al.*, 2009).

IL-6 발현은 peptide H를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포에서 각각  $\beta$ -actin 발현양에 의해 normalization 되었다(Fig. 1). 인간 유방암 MDA-MB-231 세포에 peptide H (EVYYMY)를



**Fig. 2.** IL-6 expression. IL-6 expression in MDA-MB-231 cells treated with 1 mM peptide H and without the peptide was compared after realtime PCR performance. Error bars are shown in control and peptide H treatment.

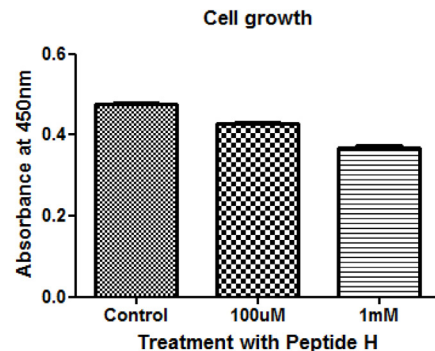
복수의 sample에 대해 처리해 주면, IL-6 발현은 peptide를 처리하지 않은 복수의 control에 비해 25배 억제되었다(Fig. 2). MDA-MB-231 세포주에서 basal level로 발현하는 IL-6양은 IL-6 mRNA 수준이 감소할 경우 단백질 수준에서도 감소가 일어났다(Ndlovu *et al.*, 2009). 전이성 유방암 등에서는 IL-6의 발현이 크게 증가되어 있으며, 반대로 IL-6 유전자를 제거하면 종양의 크기가 뚜렷하게 감소함을 보고하였다(Grivnenkov and Karin, 2011). 이는 IL-6의 종양촉진효과를 시사해 준다. 실제로 악성 유방암 환자의 serum에서는 IL-6의 농도가 증가되어 있다 (Ndlovu *et al.*, 2009). IL-6는 transcription factor STAT3를 활성화시켜 암의 개시, 진행, 전이를 촉진시킨다. Peptide H에 의한 IL-6 발현 감소효과는 유방암 이외의 다른 대장암 관련 대장암, 간염 관련 간암(Grivnenkov and Karin, 2011) 등에서도 종양 감소효과를 기대할 수 있을 것이다.

IL-6가 유방암세포의 증식에 기여한다면, peptide H를 처리하여 IL-6 발현을 감소시키면, 유방암세포 증식은 억제될 것이다. MDA-MB-231 세포에 peptide H (EVYYMY)를 처리해 주면 세포의 성장은 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 3).

암이외에, 류마티스, 크론병 등 만성염증 질환에서 IL-6 신호의 차단은 염증개선에 유효한 것으로 알려져 있다. 인간 IL-6 수용체에 대한 monoclonal antibody, Tocilizumab, Actemra 등이 개발되어 있다(Millán *et al.*, 2012). Herceptin은 표적치료제로서 유용하게 이용되어 왔으나 Herceptin (trastuzumab)에 내성을 가지는 유방암세포가 등장하고 있으며, 이 내성에 IL-6 신호가 관여한다. IL-6 수용체에 대한 Monoclonal antibody로 유방암세포의 IL-6 신호를 차단하면 내성은 사라진다(Korkaya *et al.*, 2013). Peptide H(EVYYMY)는 염증과 관련된 IL-6 발현의 억제효과가 있으므로, IL-6 관련 암, 류마티스, 크론병 등의 치료제 개발로도 응용, 연결될 수 있을 것이다.

**적 요**

암, 류마티스, 크론병 등은 만성염증과 관련되어 있다. Interleukin-6 (IL-6)는 염증의 주요 매개인자이다. 청국장은 콩 발효식품으로 대두단백질이 분해되어 다양한 peptide가 생성되



**Fig. 3.** Proliferation of MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were cultured without peptide H (control) or with peptide H. Its growth was determined. 100  $\mu$ M;  $P=0.0026$ , 1 mM;  $P=0.0003$ .

면서, 생리활성물질이 될 수 있다. 본 연구에서는 청국장에서 분리한 peptide (Gly-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr)를 가공한 6mer H, [(Glu-Val-Tyr-Tyr-Met-Tyr(EVYYMY))]가 유방암세포 MDA-MB-231에서 IL-6 발현을 억제할 수 있는지 여부를 결정하였다. MDA-MB-231 세포에 peptide H를 처리해 주면, IL-6 발현은 peptide를 처리하지 않은 control에 비해, 크게 억제되었으며, 세포의 성장은 농도의존적으로 억제되었다. 암 이외에, 류마티스, 크론병 등 만성염증 질환에서 IL-6 신호의 차단은 염증개선에 유효한 것으로 알려져 있다. Peptide H는 염증과 관련된 IL-6 발현의 감소효과가 있으므로, IL-6 관련 암, 류마티스, 크론병 등의 치료제 개발로 응용, 연결될 수 있을 것이다.

## References

- Berghe, W.V., Dijsselbloem, N., Vermeulen, L., Ndlovu, M.N., Boone, E., and Haegeman, G.** 2006. Attenuation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1-driven nuclear factor- $\kappa$ B gene expression by soy isoflavones does not require estrogenic activity. *Cancer Res.* **66**, 4852-4862.
- Coussens, L.M. and Werb, Z.** 2002. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- Grivennikov, S., Greten, F.R., and Karin, M.** 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883-899.
- Grivennikov, S. and Karin, M.** 2011. Inflammatory cytokines in cancer: tumor necrosis factor and interleukin6 take the stage. *Ann. Rheum. Dis.* **70**(Suppl1), i104-i108.
- Hwang, J.S., Yoo, H.J., Song, H.J., Kim, K.K., Chun, Y.J., Matsui, T., and Kim, H.B.** 2011. Inflammation-related signaling pathways implicating TGF $\beta$  are revealed in the expression profiling of MCF7 cell treated with fermented soybean, Chungkookjang. *Nutr. Cancer* **63**, 645-652.
- Korkaya, H., Kim, G., Davis, A., Malik, F., Henry, N.L., Ithimakin, S., Quraishi, A.A., Tawakkol, N., D'Angelo, R., Zen, Q., and et al.** 2013. Activation of an IL-6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancers by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell* **47**, 570-584.
- Lee, J.J., Lee, D.S., and Kim, H.B.** 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* **35**, 296-301.
- Lin, W.W. and Karin, M.** 2007. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* **117**, 1175-1183.
- Mantovani, A.** 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.
- Matsui, T., Yoo, H.J., Hwang, J.S., Lee, D.S., and Kim, H.B.** 2004. Isolation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 355-358.
- Milán, I.N., Singh, J.A., and Curtis, J.R.** 2012. Systematic review of Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a new biologic agent targeting the inteleukin-6 receptor. *Clinic. Therap.* **34**, 788-802.
- Ndlovu, M.N., Lint, C.V., Wesmael, K.V., Callebert, P., Chalbos, D., Haegeman, G., and Berghe, W.V.** 2009. Hyperactivated NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5488-5504.