

## 알로에 배지에서 재배한 표고버섯 추출물의 종양괴사인자로 유도된 유방암세포 MDA-MB231에 대한 전이 저해 활성

서석종<sup>1</sup> · 김철호<sup>1</sup> · 백진홍<sup>2</sup> · 이경혜<sup>3</sup> · 신동범<sup>4</sup> · 박성수<sup>4</sup>

<sup>1</sup>성균관대학교 생명과학과, <sup>2</sup>(주)김정문알로에 생명과학연구소  
<sup>3</sup>동남보건대학교 식품생명과학과, <sup>4</sup>제주대학교 식품영양학과

### Inhibitory Effect of Shiitake Mushroom Extracts Cultured in Aloe-Supplement on Invasion/Migration of TNF- $\alpha$ -Induced MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

Seok-Jong Suh<sup>1</sup>, Cheorl-Ho Kim<sup>1</sup>, Jin-Hong Baek<sup>2</sup>, Kyoung-Hae Lee<sup>3</sup>,  
Dong-Bum Shin<sup>4</sup>, and Sung-Soo Park<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Science, Sungkyunkwan University

<sup>2</sup>R&D Center, KJM Aloe

<sup>3</sup>Department of Food Science & Biotechnology, Dongnam Health College

<sup>4</sup>Department of Food Science and Nutrition, Jeju National University

**ABSTRACT** To investigate the anti-cancer effect of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) cultured in aloe-supplement, we treated extract of shiitake mushroom cultured in aloe-supplement (ESA) to MDA-MB-231 human breast cancer cells. ESA-treated MDA-MB-231 cells showed decreased growth rate in XTT assay. In addition migration/invasion was noticeably inhibited by ESA in TNF- $\alpha$ -treated MDA-MB-231 cells. Western blot analysis showed that the molecular mechanism of cell migration/invasion was mediated by reduced intercellular adhesion molecule-1 expression via p-ERK signal transduction pathways. We found ESA had inhibition activity against cellular growth and migration/invasion. Taken together, ESA has putative anti-cancer activity against human breast cancer.

**Key words:** migration, invasion, breast cancer, aloe, shiitake mushroom

## 서 론

한국에서의 유방암 발생 추이는 2008년 보건복지부 발표 기준 인구 10만 명당 18.7건이며 대부분 여성에게 발병하고 있다. 또한 발병인구는 더욱 빠른 속도로 증가 추세에 있어 발병률이 높은 유럽과 북미의 여성들뿐만 아니라 우리나라에서도 매우 시급한 현안이라고 볼 수 있다(1). 유방암의 70~80%는 호르몬 의존적인 양상을 보이며 이는 에스트로겐 리셉터(estrogen receptor) 혹은 프로게스테론 리셉터(progesterone receptor)를 가지고 있기 때문에 추측되고 있다. 이러한 종류의 유방암은 전이된 암의 80% 이상이 림프절에서 발견되며 상대적으로 좋은 예후를 보인다(2). 유방암세포인 MCF-1은 ER 포지티브 세포주로서 누드마우스에 이종 이식 후 estradiol에 의해 유선에서 종양으로 증식하나 전이능이 상대적으로 약하다. 하지만 에스트로겐 리셉터가 결핍된 유방암 세포주 MDA-MB-231은 MCF-1보다

공격적인 cancer marker들을 가지고 있으며, 누드마우스에서 전이됨을 관찰할 수 있고 또한 antiestrogen 처리에 대해 반응을 보이지 않는 특징을 지닌다(2-5).

Cell adhesion molecule(CAM)은 종양세포 등에서 세포 간의 또는 세포와 extracellular matrix(ECM) 간의 상호작용에 관여하는 단백질로 알려져 있다(6-10). 종양의 진행은 다단계로 진행되며 세포접합단백질(CAM) 등이 종양의 전이에서 재발과 이동, 침윤 등의 과정에 중요한 역할을 하게 된다. 이들 세포접합단백질들은 인간혈관내피세포(vascular endothelial cells), 림프구(lymphocytes), 섬유아세포(fibroblasts), 조혈세포(hematopoietic cells), 종양세포(tumor cells) 등의 다양한 세포에서 발견되고 있으며, intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1, CD54), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1, CD106), endothelial leukocyte adhesion molecule-1(E-selectin, CD62E) 등의 세포접합단백질들은 종양의 증식과 전이에 관계된다는 것이 밝혀져 있다.

제주에서 대량 생산되고 있는 알로에는 백합과 알로에 속의 속하는 다년생초이며 생리활성을 지니는 고분자 다당체인 acetylated mannan, glucomannan 등을 가지고 있다

(11,12). 본 연구에서는 알로에 추출물 저분자획분 및 알로에 총 추출물을 포함하는 고체 배지에 표고버섯의 담자균을 배양하여 알로에 및 버섯의 유용성분이 포함된 건강식품을 개발하고자 연구를 진행하였다. 본 실험에서는 표고버섯 배양배지에 알로에 저분자획분 및 총 추출물을 첨가하여 자실체를 발생시켰으며, 그 추출물을 사용하여 유방암세포에서의 억제작용을 확인하였다. 알로에의 생리활성물질 및 그의 효과에 대해서는 이미 상당히 연구되어 있으며(13,14) 표고버섯의 활성물질 등도 많이 연구되어 있으나(15,16) 알로에를 사용하여 재배한 버섯의 추출물 사용은 최초로 연구되었다.

## 재료 및 방법

### 세포 및 시약

대식기 유방암세포 MDA-MB-231 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였고, DMEM high glucose medium, fetal bovine serum(FBS)과 penicillin/streptomycin은 WelGENE(Daegu, Korea)에서 구입하였다. Cell Proliferation kit II (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide; XTT)는 Roche Molecular Biochemicals(Mannheim, Germany)에서 구입하였고, TNF- $\alpha$ 는 R&D systems(Boston, MA, USA), primary antibody(I-CAM, P-ERK)와 secondary antibody(HRP-conjugated anti-mouse)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

### Migration/invasion assay

Gelatin invasion assay는 transwell system(Corning Inc., Rochester, NY, USA)을 사용하여 실시하였다. 8  $\mu$ m pore filter insert에 gelatin으로 coating 하여 사용하고, 혈관평활근세포는 조직배양기에서 떼어내어  $5 \times 10^4$  cells/well로 처리하였다. 각각의 well에 TNF- $\alpha$  처리구, TNF- $\alpha$  + ABE 처리구, 무처리구의 조건으로 24시간 동안 배양하고, 배양이 끝난 후 filter를 통과한 세포를 fixation 한 후 hematoxylin과 eosin Y로 염색하였다. 염색이 끝난 후 현미경으로 염색된 세포의 개수를 측정하여 migration 된 세포의 수를 대조구와 비교 분석하였다.

### 세포배양

한국세포주은행에서 분양받은 murine macrophage cell line RAW 264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) high glucose medium 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 세포독성 측정

ESA에 대한 세포독성은 Roche Molecular Biochemicals(17)의 방법에 준하여 측정하였다. MMDA-MB-231

세포를 96-well plate(SPL, Seoul, Korea)에 세포수가  $5 \times 10^3$  cells/well이 되게 분주하고 80% confluence로 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다(24시간, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 배양 후 serum free media로 세척하고, ESA를 농도별로 각각 처리하여 37°C에서 72시간 배양하였다. Well당 XTT 시약을 50  $\mu$ L 처리하여 4시간 반응시킨 후 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 세포의 생육 억제율을 백분율로 나타내었다.

### 웨스턴 블롯

면역학적 방법으로 시그널 단백질을 검출하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시하여 시그널을 분석하였다. 단백질 추출을 위하여 RIPA buffer(Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; NP-40 1%, Na-deoxycholate 0.25%; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM; aprotinin, leupeptin, pepstatin, 1  $\mu$ g/mL each; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM)를 사용하였다. 시료가 처리된 세포는 phosphate buffered saline(PBS; NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM)으로 2회 wash 하고 RIPA buffer에 용해한 후 단백질 정량을 하였다. 정량된 샘플은 Nitrocellulose membrane(Amersham Co., Arlington Height, IL, USA)을 사용하여 블롯한 후 실험에 사용하였다.

### 통계분석

모든 실험 결과는 최소 3회 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었고, 그 결과는 SPSS software(Ver. 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 실험 결과 자료의 통계분석은 one-way ANOVA 분석 후 사후검정으로 Tukey HSD post-hoc test로 시료 간의 유의성 검정은  $P < 0.05$  수준에서 실시하였다.

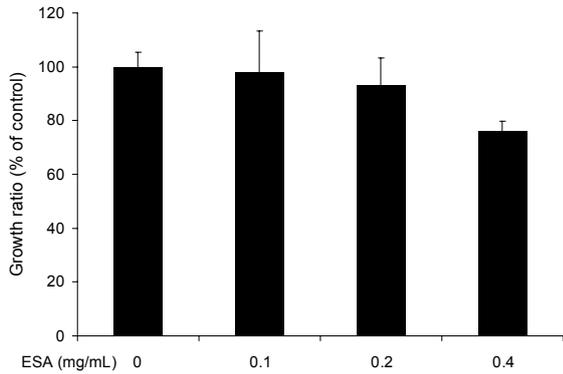
## 결과 및 고찰

### ESA의 유방암세포에 대한 생육저해 활성

MDA MB231 세포주는 악성 유방암의 특징을 가지고 있는 세포로서 이 세포에 ESA를 처리하고 생육도의 변화를 XTT 방법으로 확인하였다. 96 well plate에 well당  $5 \times 10^3$ 의 세포를 처리한 후 24시간 동안 37°C 배양기에서 CO<sub>2</sub> gas를 주입하면서 배양하였고, serum-free 배지로 교환한 후 농도별로 알로에를 처리하고 72시간 후 세포의 생육도를 확인하였다(Fig. 1). 400  $\mu$ g/mL 농도에서 control에 비교해 76%의 생육도를 나타내었으며, 결론적으로 400  $\mu$ g/mL 이상의 농도에서 유방암세포에 약간의 생육저해 활성을 가지는 것으로 보인다.

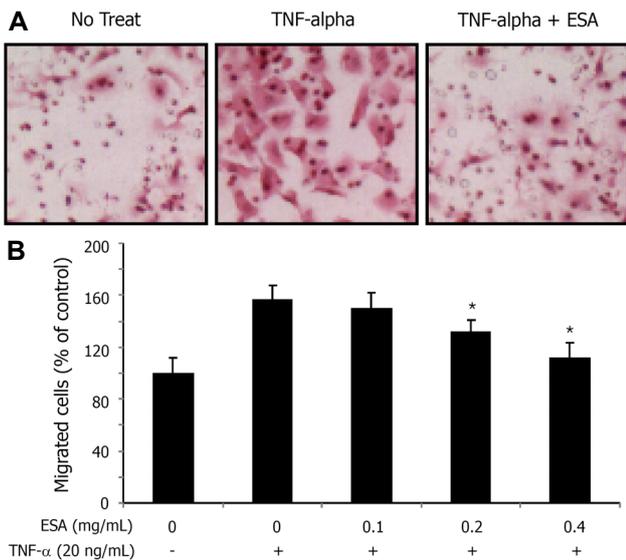
### ESA의 유방암세포의 세포 이동 억제 효과

Gelatin으로 코팅된 transwell을 이용하여 TNF- $\alpha$ 와



**Fig. 1.** Growth inhibition ratio of ESA on MDA-MB-231 cells. Values are expressed as mean±SD of three independent experiments.

ESA 처리 시의 유방암세포의 invasion/migration의 변화를 검증하였다. MDA MB231 세포주는 낮은 농도의 TNF- $\alpha$  처리 시에 invasion/migration이 증가한다는 것이 알려져 있으며(18), Fig. 2와 같이 증가된 invasion/migration은 ESA에 의해 억제되었다. Gelatin으로 코팅된 transwell을 이용하여 TNF- $\alpha$ 와 ESA 처리 시 유방암세포의 invasion/migration의 변화를 검증하였으며, 이때 이동된 세포는 transwell의 membrane을 hematoxylin과 eosin Y로 염색하여 나타내었다(Fig. 2). 그림과 같이 TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 유방암세포의 invasion/migration은 ESA에 의해 억제되었다. 이 결과에서 TNF- $\alpha$ 를 처리하였을 때 세포의 이동(전이)도가 증가함을 확인하였는데, 이는 ESA의 처리에 의해



**Fig. 2.** Effect of ESA on the migration/invasion ratio of TNF- $\alpha$  treated MDA-MB-231 cells. Values are expressed as mean±SD of three independent experiments. Statistical significance was considered at  $P < 0.05$ . (A) In transwell, migrated or invaded cells were stained with hematoxylin and eosin Y. (B) ESA inhibited the migration/invasion of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner.

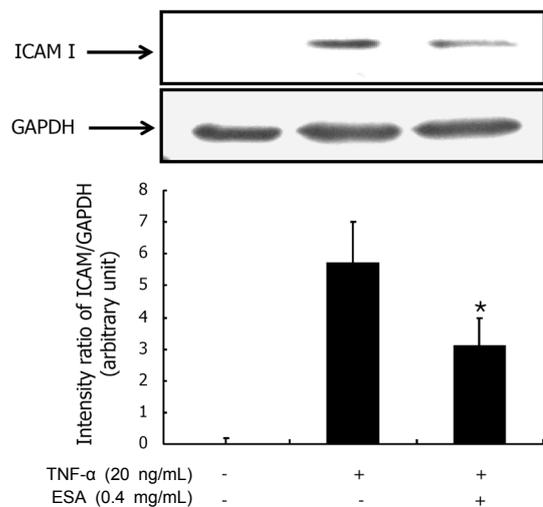
농도 의존적으로 감소한다는 것을 확인할 수 있었다.

**ESA 처리에 의한 ICAM-1 단백질의 감소**

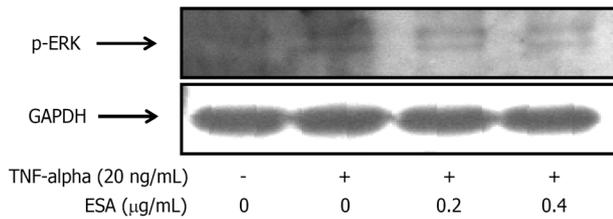
일반적으로 ICAM-1의 활성화에 의해 세포의 migration/invasion이 영향을 받는다는 것이 잘 알려져 있으므로 ICAM-1 분자의 세포 발현량을 알로에 처리 세포에 TNF- $\alpha$ 를 24시간 동안 처리한 후 세포를 harvest 하여 검증하였다. 웨스턴 블롯 시그널을 분석하였으며, ESA의 세포 처리에 의해 ICAM-1 분자의 발현이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이 결과에서 ESA의 세포 이동(전이)도 저해 효과에 대한 작용기작을 조사하기 위해 세포접합에 관련된 단백질인 ICAM-1의 ESA 처리에 따른 변화를 조사한 결과 단백질의 감소를 확인하였다.

**ESA에 의한 p-ERK MAPK의 신호전달 억제**

유방암세포의 migration/invasion의 저해작용은 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 signal transduction 과정의 일부를 방해함으로써 일어난다는 예가 여러 가지 알려져 있으며 따라서 그중의 하나로 TNF- $\alpha$ 에 의해서 주로 활성을 가지는 p-ERK의 세포 내의 활성이 저해되는지 여부를 웨스턴 블롯에 의해 검증하였다. TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 p-ERK의 활성을 ESA가 저해함을 확인하기 위해 ABE를 먼저 처리한 뒤 TNF- $\alpha$ 를 처리하여 p-ERK를 유도한 세포를 harvest 하고 웨스턴 블롯으로 p-ERK의 단백질량을 확인한 결과, ESA의 농도에 의존적으로 p-ERK 시그널이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 결과에서 ICAM-1의 발현과 세포 이동(전이)에 영향을 줄 수 있는 MAPK인 ERK의 인산화 정도를 측정한 결과, TNF- $\alpha$ 에 의해 증가된 ERK 단백질의 인산화



**Fig. 3.** Inhibitory effect of ESA on the ICAM-1 protein levels in TNF- $\alpha$  induced MDA-MB-231 cells. ESA inhibited ICAM-1 significantly. Total proteins were collected at 24 h after TNF- $\alpha$  treatment and transferred nitrocellulose membrane. Values are expressed as mean±SD of three independent experiments. Statistical significance was considered at  $P < 0.05$ .



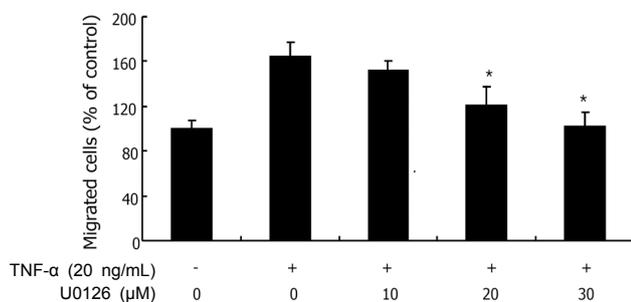
**Fig. 4.** Inhibitory effect of ESA on the p-ERK protein levels in TNF- $\alpha$  induced MDA-MB-231 cells. ESA inhibited p-ERK gradually. Total proteins were collected at 15 min after TNF- $\alpha$  treatment and transferred nitrocellulose membrane.

는 ESA 처리구에서 감소됨을 알 수 있었다.

#### U0126에 의한 유방암세포의 migration/invasion 감소

MAPKinase의 하나인 ERK의 활성을 저해함으로써 migration/invasion이 감소함을 증명하기 위해 유방암세포에 p-ERK의 inhibitor인 U0126을 처리한 후 TNF- $\alpha$ 를 사용하여 migration/invasion을 유도하였으며, Fig. 5와 같이 유방암세포의 migration/invasion이 U0126의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있다. 따라서 p-ERK에 의한 신호전달 과정은 유방암세포인 MDA-MB-231의 이동(전이)에 직접적인 관련이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 p-ERK의 감소에 따른 세포 이동(전이)도의 감소 현상을 확인하기 위해 p-ERK의 inhibitor인 U0126을 처리하여 세포 이동(전이)도를 측정한 결과로서 U0126의 처리량에 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었고, 따라서 유방암세포인 MDA-MB-231의 이동(전이)은 p-ERK의 직접적인 조절을 받는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 ICAM-1의 발현은 p-ERK 신호전달계의 조절을 받는다는 것이 보고되어 있으므로(19), ICAM-1의 발현조절과 유방암세포의 이동(전이)에 MAPK인 ERK의 신호전달계가 작용한다는 것을 추측할 수 있다.

알로에 추출물은 오랜 기간 많은 연구자들에 의해 항암활



**Fig. 5.** U0126 (p-ERK inhibitor) suppressed the migration/invasion of TNF- $\alpha$  stimulated MDA-MB-231 cells. To confirm the significance of p-ERK signal in MDA-MB-231 cell's migration/invasion, U0126 was treated on the MDA-MB231 cells with TNF- $\alpha$  and counted the migrated/invaded cells. Values are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance was considered at  $P < 0.05$ .

성, 면역증강활성 등의 효능이 있음이 보고되었으며 버섯에서도 마찬가지로 항암활성과 면역증강활성이 있음이 보고되어 있다. 하지만 알로에와 버섯류의 동시 처리에 의한 항암활성은 전무한 실정이다. 이번 실험에서는 최초로 담자균류를 배양하여 자실체를 형성하는 과정에서 알로에 추출물을 처리하여 배양하였으며, 그 추출물에서 유방암세포인 MDA-MB-231의 세포 이동(전이) 저해작용이 있음을 확인하였고 저해 기작은 p-ERK의 신호전달 감소로 인한 ICAM-1의 발현 억제로 일어남을 알 수 있었다.

## 요 약

알로에를 첨가한 표고버섯 배양 추출물(ESA)의 항암효과를 검증하기 위하여 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 ESA를 처리하여 생육저해 활성과 세포 이동 억제 효과를 확인하였다. MDA-MB-231 세포에 ESA를 처리하여 72시간 후 관찰한 결과 약간의 생육저해 활성을 나타내었으며, 또한 transwell에서 TNF- $\alpha$ 가 처리된 세포에 ESA를 처리해 본 결과 migration/invasion 정도를 상당히 저해함을 알 수 있었다. 이러한 세포 이동능의 저해 기작은 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인해 본 결과 p-ERK 신호를 통해 일어나며, ICAM-1 단백질의 발현을 억제함으로써 나타나는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 알로에 첨가 담자균 배양 추출물(ESA)은 인간 유방암세포에 대해 잠재적인 항암효과가 있음을 확인하였다. 이후 표고버섯 외 꽃송이버섯과 상향버섯에서의 알로에 배양액에 대한 항암효과에 대한 연구를 수행하고 있어 그 결과를 보고하고자 한다.

## 감사의 글

본 사업은 지식경제부 광역경제권연계협력사업(과제번호 R0000697)지원에 의하여 수행된 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. 2001. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 375-392.
- Anandappa SY, Sibson R, Platt-Higgins A, Winstanley JH, Rudland PS, Barraclough R. 2000. Variant estrogen receptor alpha mRNAs in human breast cancer specimens. *Int J Cancer* 88: 209-216.
- Bange J, Zwick E, Ullrich A. 2001. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med* 7: 548-552.
- Mukhopadhyay R, Theriault RL, Price JE. 1999. Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17: 325-332.
- Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. 2005. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein ex-

- pression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther* 4: 81-90.
6. Christiansen I, Sundstrom C, Enblad G, Totterman TH. 1998. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) is an independent prognostic marker in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 102: 701-709.
  7. Christiansen I, Sundstrom C, Totterman TH. 1998. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) closely reflect tumour burden in chronic B-lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 103: 1129-1137.
  8. Fox SB, Turner GD, Gatter KC, Harris AL. 1995. The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J Pathol* 177: 369-376.
  9. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa-YS Chung K. 2002. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 9: 511-514.
  10. Wang X, Clowes C, Duarte R, Pu QQ. 2000. Serum ICAM-1 concentrations following conventional dose consolidation chemotherapy for acute myeloid leukemia and after high dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell rescue. *Int J Oncol* 17: 591-595.
  11. Manna S, McAnalley BH. 1993. Determination of the position of the O-acetyl group in a beta-(1→4)-mannan (acemannan) from *Aloe barbardensis* Miller. *Carbohydr Res* 241: 317-319.
  12. Eshun K, He Q. 2004. Aloe vera: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 91-96.
  13. Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A, Crescenzi E, Pollice A, Tudisco R, Infascelli F, Calabrò V. 2013. A biochemical and cellular approach to explore the antiproliferative and prodifferentiative activity of *Aloe arborescens* leaf extract. *Phytother Res* 27: 1819-1828.
  14. Boonyagul S, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. 2014. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. *Odontology* 102: 310-317.
  15. Nunes RG, da Luz JM, Freitas Rde B, Higuchi A, Kasuya MC, Vanetti MC. 2012. Selenium bioaccumulation in shiitake mushrooms: a nutritional alternative source of this element. *J Food Sci* 77: C983-986.
  16. Cao X, Liu R, Liu J, Huo Y, Yang W, Zeng M, Yang C. 2013. A novel polysaccharide from *Lentinus edodes* Mycelia exhibits potential antitumor activity on laryngeal squamous cancer cell line Hep-2. *Appl Biochem Biotechnol* 171: 1444-1453.
  17. Roche Molecular Biochemicals. 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*. 4th ed. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany. p 62.
  18. Choi YK, Cho SG, Woo SM, Yun YJ, Jo J, Kim W, Shin YC, Ko SG. 2013. *Saussurea lappa* Clarke-derived costunolide prevents TNF $\alpha$ -induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- $\kappa$ B activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 936257.
  19. Zhong X, Li X, Liu F, Tan H, Shang D. 2012. Omentin inhibits TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF- $\kappa$ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 401-406.