

길경탕의 치밀결합 강화 및 MMPs의 활성화 억제를 통한 인체방광암세포의 이동성 및 침윤성의 억제

홍수현¹, 최영현^{1,2}

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²동의대학교 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터

Gilgyung-tang Inhibits the Migration and Invasion of Human Bladder Cancer 5637 Cells through the Tightening of Tight Junctions and Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity

Su-hyun Hong¹, Yung-hyun Choi^{1,2}

¹Dept. of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-Eui University

²Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dong-Eui University

ABSTRACT

Objectives: *Gilgyung-tang* (GGT) has been used as one of the main multi-herb formulas to treat "Peo-ong" (lung abscess). In this study, we investigated the inhibitory effects of water extracts of GGT on cell migration and invasion, two critical cellular processes that are often deregulated during metastasis, in human bladder cancer 5637 cells.

Methods: Effects on cell viability were quantified using an MTT assay. To analyze the anti-metastatic effects, we conducted a wound healing migration assay, an in vitro invasiveness assay, and a measurement of the transepithelial electrical resistance (TER). The expression of protein and mRNA were measured by Western blotting and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

Results: GGT markedly inhibited the cell motility and invasiveness of 5637 cells within the concentration range that was not cytotoxic. The inhibitory effects of GGT on cell invasiveness were associated with tightening of the tight junctions (TJs), which was demonstrated by an increase in the TER. The RT-PCR and Western blotting results indicated that GGT decreased the levels of claudin proteins. GGT also inhibited the activity and expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and simultaneously increased the levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2.

Conclusions: Our findings suggest that GGT reduces both the migration and the invasion of 5637 cells by modulating the activity of TJs and MMPs.

Key words: *Gilgyung-tang*, invasion, tight junctions, claudin, matrix metalloproteinase

1. 서론

항암치료를 위한 다양한 치료법의 발달로 암 환자의 수명과 삶의 질이 현저히 개선된 것은 사실

· 투고일: 2016.01.08, 심사일: 2016.03.20, 게재확정일: 2016.04.01
· 교신저자: 최영현 부산광역시 진구 양정 2동 산45-1
동의대학교 한의과대학 408-1호
TEL: 051-850-7413 FAX: 051-853-4036
E-mail: choiyh@deu.ac.kr

이나 아직까지 암에 의한 사망률이 높은 편이며, 이러한 사망의 주된 원인은 암세포의 전이(metastasis)이다. 전이는 암이 발병 부위로부터 인체의 다른 곳으로 이동하여 증식하는 현상으로 암세포의 이동(migration)이나 침윤(invasion)을 억제하는 기전의 규명이나 효과적인 치료 약물 개발이 많은 연구자들의 주된 표적이 되고 있다. 비록 암세포의 침윤과 전이가 매우 복잡적이고 연속적인 분자적

기전들에 의해 유발된다고 알려져 있으나, 암세포에서부터 분비되는 단백질 분해효소에 의해서 빠른 시간 내에 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 파괴가 이루어지는 것이 특징이다^{1,2}. 특히 zinc-dependent endopeptidase family에 속하는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)는 세포외 기질의 분해와 전이 동안 기저막의 붕괴를 촉진함으로써 암세포의 침윤과 전이를 증대시키는 핵심인자들이다. MMPs 중, 특히 gelatinase type에 속하는 MMP-2(gelatinase A)와 MMP-9(gelatinase B)는 암세포의 침윤과 전이에 가장 중요한 요소로서 인식되어져 있으며^{3,4}, MMPs의 활성은 금속단백분해효소 조직억제제(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)와의 stoichiometric 복합체 형성을 통하여 억제되어 진다^{5,6}. 그들은 MMPs에 직접 결합하여 그들의 효소적 활성을 저해하여 ECM의 파괴를 억제하는 것으로 알려져 있다^{6,7}. 따라서 MMPs와 TIMPs 사이의 적절한 균형 조절을 위한 MMP 저해제 및 TIMP 활성화제는 암세포의 전이를 차단할 수 있는 표적 물질이 될 수 있다.

한편 암세포의 이동성이 촉진되기 위해서는 우선적으로 암세포들이 종양 덩어리에서 개개의 세포로 분리가 되어야한다. 이를 위해서는 세포와 세포 사이의 연결 요소들의 해리가 동반되어야 하는데, 세포들 사이에는 gap junction, tight junction(TJ), adherens junction(AJ) 및 desmosome과 같은 몇 가지 종류의 특화된 세포간의 구조를 가지는데, 그 중 TJ는 세포 사이의 치밀한 이음부로서 다양한 분자와 이온의 이동을 차단하는 역할을 한다. 그러나 많은 상피조직 유래 암세포들의 경우, TJ 체계가 무질서해지거나 붕괴되어 상피 전기 저항성(trans epithelial electrical resistance, TER)으로 대변되는 TJ의 전기적 저항이 감소되어 있거나 상피 결세포 투과성(trans epithelial paracellular permeability, TPP)이 증가되어 있다^{8,9}. 이러한 TJ의 견고성 유지하는 TJ를 감싸는 transmembrane 단백질인 claudin

family에 속하는 단백질들의 발현과 직접적인 연관성을 가지는데, 비록 일부 claudin 단백질들이 전이성 암세포에서 그 발현이 저해되어 있지만^{10,11}, 방광암을 포함한 다른 많은 암 조직에서 특히 claudin-3과 claudin-4 발현은 현저히 증가되어 있다¹²⁻¹⁴. 따라서 TJ 단백질의 발현조절은 암 발생 과정의 부가적 결과라기보다 오히려 암의 진행과 전이에 원인적 역할을 하는 것으로 보고되고 있으며¹⁵, TJ 복합체에서 이들 단백질들의 역할 규명은 암의 증식뿐만 아니라 전이를 조절할 수 있는 주요 생물지표(biomarker)로서의 역할 가능성이 높아지고 있다.

최근 암세포의 증식억제나 전이 차단을 위한 많은 항암제들의 개발을 위한 자원으로 천연물에 대한 연구가 증가하고 있는 실정이다¹⁶. 길경탕(桔梗湯, *Gilgyung-tang*, GGT)은 《상한론(傷寒論)》에 길경과 감초로만 구성된 처방으로 처음 기록되었고, 《의학정전(醫學正傳)》, 《방약합편(方藥合編)》 등에서도 길경탕에 대한 기록을 찾아볼 수 있으나, 본 연구에서는 《동의보감(東醫寶鑑)》중 폐옹(肺癰) 부분에 기재되어 약물 구성과 용량을 사용하였다(Table 1)¹⁷⁻²⁰. 길경탕은 임상적으로 폐옹(肺癰), 폐암(肺癌), 인후종통(咽喉腫痛), 기옹(氣壅), 기체(氣滯) 등을 치료를 위해 사용되어 왔다^{17,20,21}. 최근의 여러 실험적 연구를 통하여, 길경탕은 폐암세포의 세포사멸을 유도하여 세포성장을 억제하고²², 면역증강효과를 가지며²³, 항암제인 cisplatin과의 병용투어로 세포독성을 증가시키는 효능²⁴ 등도 있는 것으로 나타났다. 하지만 암 환자의 사망에 큰 영향을 미치는 전이 억제에 관한 연구는 미비하였다.

따라서 본 연구에서는 길경탕 열수 추출물의 암세포 전이 억제 효능에 관한 기전 해석의 일환으로, 폐암 세포의 성장 억제에 효과가 있었던 길경탕이 다른 종류의 고형암인 인체 방광암세포(5637)의 이동성과 침윤성에의 억제 효과와 이와 관련된 기본적인 기전 해석을 시도하였다.

Table 1. Components of *Gilgyung-tang* (GGT) Extract

Herbal name	Drug name	Dosage (g/%)
桔 梗	<i>Platycodi Radix</i>	4.8 (11.2)
貝 母	<i>Fritillariae Cirrosae Bulbus</i>	4.8 (11.2)
當 歸	<i>Angelicae Gigautis Radix</i>	4 (9.3)
瓜 蔞 仁	<i>Trichosanthis Fructus</i>	4 (9.3)
薏 苡 仁	<i>Coicis Semen</i>	4 (9.3)
枳 殼	<i>Aurantii fructus</i>	2.8 (6.5)
桑 白 皮	<i>Mori Cortex</i>	2.8 (6.5)
防 風	<i>Ledebourielae Radix</i>	2.8 (6.5)
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	2.8 (6.5)
杏 仁	<i>Armeniaca Amarum Semen</i>	2 (4.7)
百 合	<i>Lilii Bubus</i>	2 (4.7)
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2 (4.7)
生 薑	<i>Zingiberis Rhzoma Recens</i>	4 (9.3)
Total amount (g)		42.8 (100)

II. 재료 및 방법

1. 길경탕 추출물의 준비

본 연구에 사용된 길경탕의 전체 조성은 Table 1에 나타내었다. 길경, 폐모 등 12종의 한약재는 대한생약(한국)에서 규격품을 구입하여 분량대로 잘 섞은 후 3첩 분량의 길경탕(128.4 g)에 증류수 1.5 L를 넣어 3시간 동안 전탕하였다. 이후 전탕액을 Whatman No2 filter paper(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 여과한 후, 동결건조하여 시료를 준비하였다. 시료는 -20 °C에서 보관하였다가 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

2. 세포배양 및 MTT assay

본 연구를 위하여 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입한 5637 방광암세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 및 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 5637 방광암세포의 증식에 미치는 길경탕 추출물의 영향은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphnyl-2H-tetrazolium bromide(MTT,

Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)가 미토콘드리아 효소에 의하여 MTT-formazan을 형성하는 원리에 기반을 둔 MTT assay를 이용하여 조사하였다.

3. Wound healing migration assay

20 µg/ml의 rat tail collagen이 코팅된 dish(BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에 5637 방광암세포를 적정 시간 동안 배양한 후, pipette tip을 이용한 scraping으로 wounded 영역을 만들고 배지로 2~3회 수세하였다. 다시 1% FBS가 함유된 배지로 교체 후 적정 농도의 길경탕 추출물을 12시간 또는 24시간 처리 후 wounded 영역으로의 세포 이동성의 정도를 40배의 배율로 도립현미경으로 이용하여 비교 관찰하였다.

4. In vitro invasiveness assay

5637 방광암세포의 침윤성에 미치는 길경탕 추출물의 영향을 조사하기 위하여 matrigel invasion assay를 사용하였다. 이를 위하여 정상 조건 및 적정 농도의 길경탕 추출물을 6시간 동안 처리 된 5637 방광암세포를 길경탕 추출물이 함유된 FBS-free 배지로 처리한 Matrigel-coated filter의 apical side에 분주하였다. 이때 basolateral chamber에는 20% FBS가 함유된 배지를 분주하였으며, 24시간 후 filter의 하단부로 이동한 세포를 hematoxylin 및 Eosin Y 염색액(Sigma-Aldrich Chemical Co.)으로 염색하고 계수하였다.

5. TER의 측정

길경탕 추출물 처리에 따른 TER 값은 STX-2 chopstick electrode가 짝으로 형성된 EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter(World Precision Instruments, FL, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 LNCap 세포를 Transwell®(Corning Costar Corp., NY, USA)의 8.0 µm pore size insert(upper chamber)로 seeding한 후 100% confluence를 이룰 때까지 배양하였다. 이후 길경탕 추출물을 24시간 동안 처리하고, upper

및 lower chamber에 electrode를 넣어 전기 저항도를 측정하였다[Utech 2006].

6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

전사 수준에서 길경탕 추출물 처리에 따른 특정 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위하여 적정 농도의 길경탕 추출물이 처리된 조건에서 24시간 배양된 5637 방광암세포를 대상으로 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 claudin-3, claudin-4, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 유전자들의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit(Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

7. Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

번역 수준에서 길경탕 추출물 처리에 따른 claudin-3, claudin-4, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 유전자들의 발현 변화를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 세포에 적당량의 lysis buffer [25 mM Tris-Cl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량 한 다음 동량의 sample을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으

로 분리한 후, nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 적정 항체를 처리하여 4 °C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence (ECL) solution(Amersham Life Science Corp.)을 적용시켜 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. Actin 단백질을 internal control로 사용하였다.

8. Gelatin zymographic analysis를 통한 MMP 활성 측정

적정 농도의 길경탕 추출물을 24시간 처리한 세포 배양액을 수거하여 zymography 용 buffer(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)와 혼합한 후 precast gel(10% polyacrylamide 및 0.1% gelatin)을 이용하여 전기영동 후, gel을 2.5% Triton X-100에 수세하고 buffer(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.02% Na₃N, pH 7.5)에 24시간 침전시켰다. 추가적으로 0.5%(w/v) Coomassie brilliant blue G-250(Bio-Rad)로 염색한 후 methanol/acetic acid/water(3:1:6) 용액을 용하여 탈색시켰다. MMP의 활성에 의해 녹은 젤의 두 부분 중, 위쪽 band로 MMP-9의 활성 정도를, 아래쪽 band로 MMP-2의 활성 정도를 확인하였다.

9. In vitro MMPs 활성 측정

길경탕 추출물 처리에 따른 MMP 활성 변화의 정량적 측정을 위하여 MMP Gelatinase Activity Assay Kit(Checon International Inc., Temecula, CA, USA)를 사용하였다. 이를 위하여 적정량의 세포 배양액을 biotinylated gelatinase 기질과 혼합

하여 세포 배양액에 존재하는 활성형 MMP-2 및 MMP-9에 의한 기질의 분해를 유도하였다. 분절된 기질들을 biotin-binding 96-well plate로 옮겨 biotin이 결합된 기질이 plate에 결합하도록 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 분절되었으나 결합되지 않은 기질은 제거하고, 분절되지 않은 biotin이 결합된 gelatinase에 streptavidin-enzyme complex를 첨가하여 발색 반응을 시킨 후 540 nm 조건에서 활성의 정도를 비교하였다.

10. 통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

III. 결과 및 고찰

1. 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 길경당 추출물의 영향

암세포의 이동과 침윤은 전이과정에 필수적인 현상으로 항암활성을 지니는 물질들의 전이 억제 여부를 평가하는 중요한 기준으로 사용되고 있다. 길경당 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성

및 침윤성 억제 가능성을 조사하기 위한 실험 조건의 설정을 위하여 5637 방광암세포의 증식에 미치는 길경당 추출물의 영향을 먼저 조사하였다. MTT assay의 결과에 의하면, 길경당 추출물이 첨가된 배지에서 24시간 배양된 5637 방광암세포의 생존율이 800 µg/ml 처리군까지는 유의적인 변화가 나타나지 않았으나, 1000 µg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 다소 세포독성 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 따라서 세포독성을 나타내지 않은 800 µg/ml 이하의 조건에서 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 길경당 추출물의 영향을 조사하였다. 길경당 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제 여부를 조사하기 위하여 Wound healing migration 및 matrigel invasion assay를 실시하였다. 먼저 Fig. 1B의 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에 배양된 세포에 비하여 길경당 추출물이 처리된 배지에서 배양된 5637 방광암세포의 이동성이 처리 농도 의존적으로 억제되었다. 또한 이와 유사하게 matrigel을 통한 5637 방광암세포의 침윤성도 길경당 추출물 처리에 따라 현저하게 감소되었다(Fig. 2). 즉 길경당 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성의 억제는 길경당 추출물의 세포독성 효과에 의한 것은 아님을 알 수 있었다.

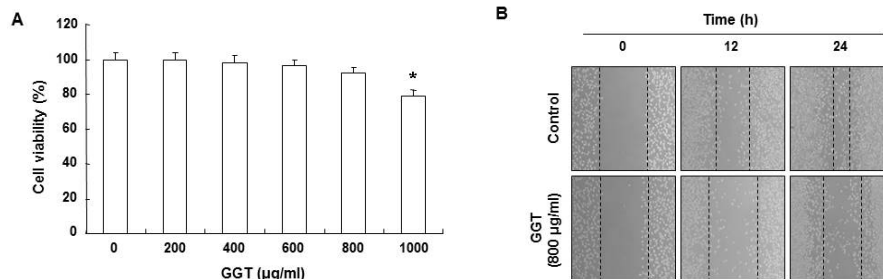


Fig. 1. Effects of GGT on cell viability and motility in human bladder cancer 5637 cells.

(A) Cells were seeded at an initial density of 2.5×10^5 cells per 60-mm plate, incubated for 24 h, and treated with various concentrations of GGT for 24 h. Cell viability was measured using an MTT assay. Each point represents the mean±SD of three independent experiments. A Student's t-test was used for determination of significance (* $p < 0.05$ versus untreated control). (B) Cells were grown to confluency on 30-mm cell culture dishes; a scratch was then made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum free media (to prevent cell proliferation) containing either vehicle or GGT (800 µg/mL) was added for the indicated times. Photographs of the wounded area were taken for evaluation of cell movement into the wounded area.

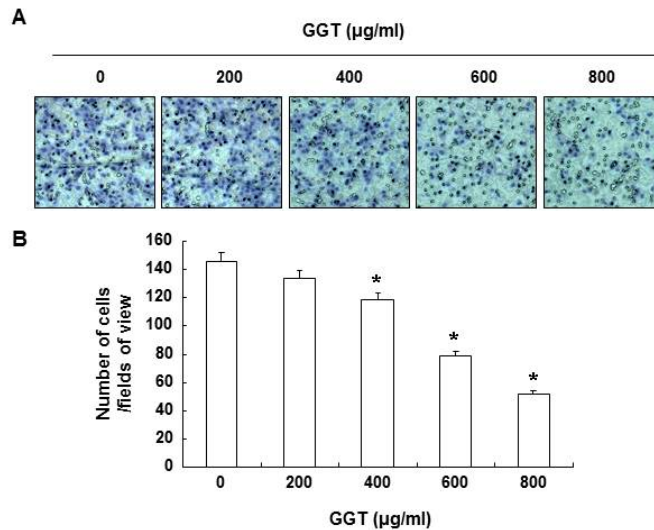


Fig. 2. Decrease of cell invasion by GGT in 5637 cells.

Cells pretreated with the indicated concentration of GGT for 6h were plated onto the apical side of matrigel coated filters in serum-free medium containing either vehicle or GGT. Medium containing 20% FBS was placed in the basolateral chamber to act as a chemoattractant. After 24 h, cells on the apical side were wiped off using a Q-tip. Next, cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and Eosin Y (A), and then counted (B). Data are shown as the mean of triplicate samples and represent invasive cell numbers compared with those of control cells (* $p < 0.05$ versus untreated control).

2. 5637 방광암세포의 TJ 견고성에 미치는 길경탕 추출물의 영향

암세포의 침윤과 전이의 초기 단계에 나타나는 현상중의 하나가 TJ 구성 단백질들의 비정상적인 발현과 수반된 TJ 기능의 붕괴 현상이다^{25,26}. Claudin family에 속하는 단백질들은 상호간에 복합체를 형성을 통하여 TJ를 통한 TPP의 조절뿐 아니라 세포와 세포사이의 접착성 조절에 중요한 인자로 작용한다^{27,28}. 최근 많은 연구 결과에 따르면 어떤 종류의 claudin 발현 증가는 특정 암세포의 증식과 전이의 촉진과 깊은 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다. 예를 들어, 유방암과 난소암을 포함한 다양한 종양조직에서 claudin family 중, claudin-3과 claudin-4가 과발현되어 있으며, 이들 단백질의 발현을 차단하였을 경우 암세포의 침윤성이 억제되었음을 보고된 바 있다²⁹. 또한 간암세포에서 침윤성 획득은 claudin-1의 과발현과 연관성이 있으

며, claudin-1은 MMP-2의 발현 및 활성 증가를 유도하였으며, claudin-1의 발현을 인위적으로 차단할 경우 간암세포의 침윤성이 완벽하게 차단되었음이 밝혀졌다³⁰. 이러한 결과들은 TJ의 견고성과 함께 claudin 단백질들이 암세포의 전이성 획득의 검출과 진단을 위한 biomarker로서의 활용 가능성을 보여주는 것이다. 따라서 길경탕 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성 저해 효과가 TJ의 기능 변화와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 TJ의 견고성을 나타내는 TER의 값³¹에 미치는 길경탕 추출물의 영향을 먼저 조사하였다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이 5637 방광암세포에서 TER 값은 길경탕 추출물 처리 농도 의존적으로 유의적으로 증가되었다. 이러한 결과는 길경탕 추출물이 5637 방광암세포의 TJ의 견고성을 증가시켰음을 의미하는 것이다. 이러한 TJ의 견고성과 claudin family 단백질의 발현과의 연관성을 조사하기 위하여

일반적으로 방광암세포에서 발현의 정도가 매우 높게 나타나는 것으로 보고된 claudin-3 및 claudin-4의 발현¹²⁻¹⁴에 미치는 길경당 추출물의 영향을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 길경당 추출물 처리 농도 의존적으로 조사된 2종류의 claudin family

인자들(claudin-3 및 claudin-4)이 모두 전사 및 번역수준에서 감소하였다(Fig. 3B 및 C). 이는 길경당 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동성 및 침윤성의 억제는 TJ의 견고성 강화와 밀접한 연관성이 있음을 보여주는 결과이다.

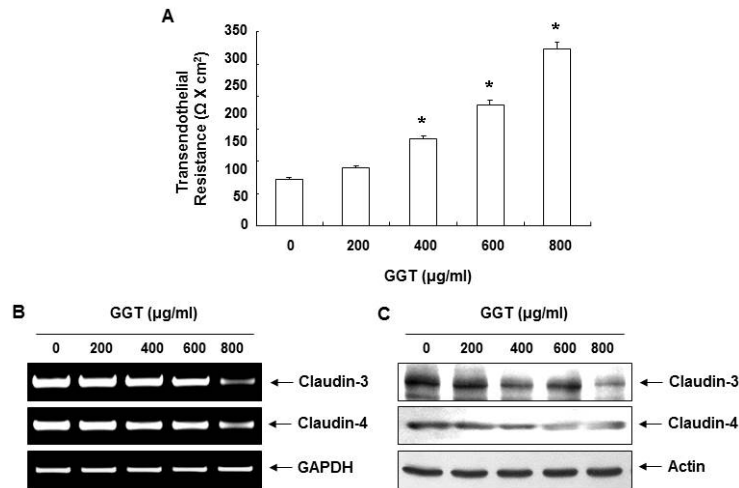


Fig. 3. Effects of GGT on the values of TER and expression of claudins in 5637 cells.

(A) Cells were treated with different concentrations of GGT for 24 h, and TER values were measured using an EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter. Results are shown as the mean±SD of three independent experiments (*, p<0.05 versus untreated control). (B) Cells were treated with the indicated concentrations of GGT for 24h. Total RNA was isolated and reverse-transcribed using the indicated primers. Resulting cDNAs were then subjected to PCR and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (C) Cells grown under the same conditions as (A) were sampled, lysed, and 50 µg of proteins were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels. Western blotting was then performed using the indicated antibodies, and an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

3. 5637 방광암세포의 MMPs 발현 및 활성화에 미치는 길경당 추출물의 영향

ECM의 분해에 결정적인 역할을 하는 MMPs는 정상 기관의 발생과 조직 재생에 필수적인 효소이지만, 암세포의 전이를 위한 침윤성 증대에 핵심적인 역할을 담당하고 있다. MMPs 중, MMP-2와 MMP-9는 대부분의 암세포 침윤과 암조직 주변의 혈관신생에 필수적이므로, 이들의 발현과 활성의 차단은 암세포의 전이 및 증식 억제를 위한 필수적인 방법이다³⁴. 따라서 길경당 추출물에 의한 5637 방광암세포의 침윤성 억제가 이들 효소의 활

성 억제와 연관성을 가지는지를 zymography 방법으로 조사한 결과, 길경당 추출물 처리 농도의 증가에 따라 세포배양액의 MMP-2 및 MMP-9의 활성이 모두 감소하였다(Fig. 4A). 또한 길경당 추출물에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 활성 감소를 정량적으로 평가한 결과에서도 길경당 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 활성이 저하되었음을 확인하였다(Fig. 4B). 한편 MMPs의 활성은 MMPs의 억제자인 TIMPs의 발현 증대에 따라 유의적으로 억제될 수 있으므로 MMPs에 대한 TIMPs의 상대적인 발현 증가는 암세포 침윤성의 억제를 측정하

는 주요 인자로 활용이 가능하다^{5,6}. 따라서 길경탕 추출물 처리에 따른 MMP-2 및 MMP-9의 활성 저하가 그들 유전자들의 감소에 의한 것인지의 여부를 확인한 결과, 길경탕 추출물 처리 농도의 증가에 따라 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 전사 및 번역 수준에서 모두 감소하였으며, 그와 반대로 TIMP-1 및 TIMP-2의 발현은 오히려 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 4C 및 D). 이는 길경탕 추출

물 처리에 따른 MMP-2 및 MMP-9의 효소 활성 저하는 TIMPs의 발현 증가와 동반된 MMP-2 및 MMP-9의 전사활성 억제에 의한 것임을 의미하는 결과이다. 따라서 길경탕 추출물의 TIMPs 발현 증가와 동반된 MMPs의 생성 및 활성 억제는 ECM의 분해를 차단함으로써 5637 방광암세포의 이동성과 침윤성을 억제하였을 것으로 생각된다.

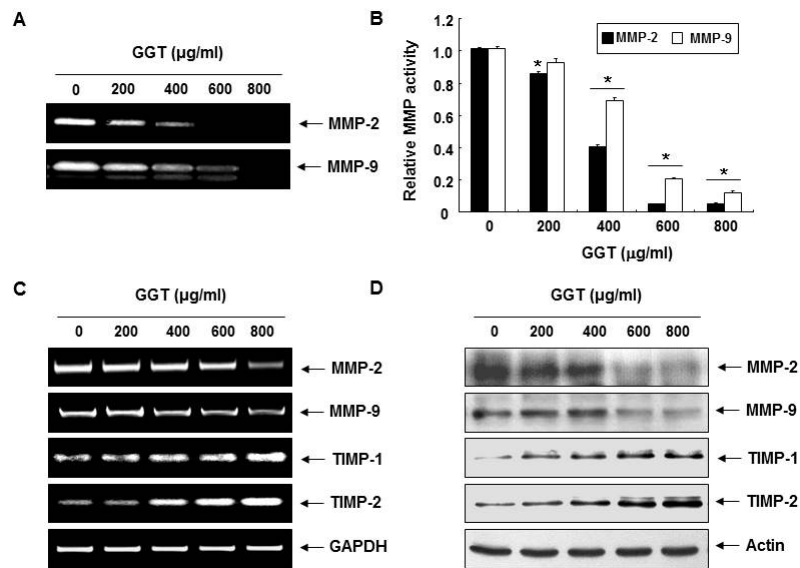


Fig. 4. Inhibition of MMP expression and their activities, and induction of TIMPs expression by GGT in 5637 cells.

(A) After incubation with the indicated concentrations of GGT for 24 h, the medium was collected, and the activities of MMP-2 and -9 were measured by zymography. (B) In vitro activity of MMP-2 and -9 in cell culture supernatant was measured using a MMP-2 and -9 gelatinase activity assay kit. Data are mean±SD from three independent experiments and are presented as fold change compared with vector control (*, $p < 0.05$ versus untreated control). (C) Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (D) The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control.

IV. 결론

길경탕 추출물에 의한 5637 방광암세포의 이동

성과 침윤성의 억제는 TJ의 견고성 유지와 TIMPs의 발현 증가에 의한 MMPs의 발현과 활성 억제에 의한 것임을 이번 연구를 통하여 알 수 있었다.

물론 이러한 결과가 방광암세포 특이적인 현상이라고는 할 수 없으며, 암세포 전이 억제에 핵심적인 역할을 하는 길경탕 추출물의 생리활성 성분 규명과 동물 실험을 포함한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2015R1A2A2A01004633 & 2013R1A1A2065537).

참고문헌

1. Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5(3):203-20.
2. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7(1):14-23.
3. Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(6):1136-44.
4. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705(2):69-89.
5. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* 2005;87(3-4):265-72.
6. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49(3):187-98.
7. Brown GT, Murray G. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 2015;237(3):273-81.
8. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):1213-28.
9. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis* 1999;20(8):1425-31.
10. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 2003;22(13):2021-33.
11. Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem* 2001;276(22):19150-9.
12. Székely E, Törzsök P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Székely T, et al. Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. *J Histochem Cytochem* 2011;59(10):932-41.
13. Törzsök P, Riesz P, Kenessey I, Székely E, Somorácz A, Nyirády P, et al. Claudins and ki-67: potential markers to differentiate low- and high-grade transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *J Histochem Cytochem* 2011;59(11):1022-30.
14. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006;6:186.
15. Mauro L, Bartucci M, Morelli C, Andò S, Surmacz E. IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *J Biol Chem* 2001;

- 276(43):39892-7.
16. Du J, Tang XL. Natural products against cancer: a comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *J Cancer Res Ther* 2014;10(Suppl 1):27-37.
 17. 李珩九. 桔梗湯이 이 人體 肺細胞에 미치는 影響에 關한 分子生物學的 研究. *대한한의학회지* 1999;20(2):88-97.
 18. 虞搏. 醫學正傳. 서울: 성보사; 1986, p. 307-8.
 19. 黃度淵. 對譯 證脈·方藥合編. 서울: 남산당; 1992, p. 259-60.
 20. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 1999, p. 1433.
 21. 차은수, 조일현, 이경기, 조영민, 정희재, 정승기, 등. 폐색성(閉塞性) 폐염(肺炎)을 겸(兼)한 폐암환자(肺癌患者)의 한방(韓方) 치료(治療) 1례(例). *대한암환학회지* 1997;3(1):207-19.
 22. 전종철, 강필구, 박동일, 최원철. 수종의 한약처방이 폐암세포에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2000;21(4):621-31.
 23. 이주희, 정희재, 정승기, 이형구. 桔梗湯과 桔梗湯加味方이 S-180에 대한 抗癌效果 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究. *경희한의대논문집* 1998;21(1):225-50.
 24. 고영철, 이승언, 박병민, 노승석, 조남근, 이시형, 등. 肺癌細胞에서 桔梗湯의 抗癌機轉研究. *대한한정보학회지* 2003;9(2):94-113.
 25. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol* 2010;2010:541957.
 26. Turksen K, Troy TC. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816(1):73-9.
 27. Angelow S, Yu AS. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16(5):459-64.
 28. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005;65(21):9603-6.
 29. Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res* 2005;65(16):7378-85.
 30. Yoon CH, Kim MJ, Park MJ, Park IC, Hwang SG, An S, et al. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCδ) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J Biol Chem* 2010;285(1):226-33.
 31. Grant-Tschudy KS, Wira CR. Effect of oestradiol on mouse uterine epithelial cell tumour necrosis factor-alpha release is mediated through uterine stromal cells. *Immunology* 2005;115(1):99-107.