

Aesculetin Inhibits Cell Invasion through Inhibition of MMP-9 Activity and Antioxidant Activity

Sugyeong Hong and Moon-Moo Kim*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received March 10, 2016 / Revised April 8, 2016 / Accepted April 8, 2016

The development of safe and effective anti-cancer compounds has been seriously required to prevent and treat development of tumor in recent years. Among them, natural compounds derived traditional medicinal stuffs have been paid to attention as an anti-cancer candidate. In this study, aesculetin is a main component of a widely known as a medicinal stuff. It was reported that aesculetin has various biological effects such as anti-inflammatory and anti-bacterial, but its effect related to cell invasion was not discovered. Therefore, in this study, the effect of aesculetin on antioxidant and matrix metalloproteases (MMPs) was investigated in human fibrosarcoma cells, HT1080. First of all, aesculetin showed the scavenging activity of DPPH radical and reducing power in a dose dependent manner. As a result of cytotoxicity, the nontoxic concentration of aesculetin was below 2 μ M in HT1080 cells performed by MTT assay. In addition, aesculetin displayed the inhibitory effect on MMP-9 activity related to cell invasion in experiment carried out by gelatin zymography assay. Furthermore, aesculetin increased the expression level of TIMP-1 but decreased the expression level of MMP-9 stimulated with PMA in western blot assay. Furthermore, aesculetin remarkably inhibited cell invasion related to metastasis a dose dependent manner. Above results suggest that aesculetin could exert chemopreventive effect through inhibition of activity and expression of MMP-9 related to cell invasion.

Key words : Aesculetin, antioxidant, MMP-9, TIMP-1, cell invasion

서 론

현대사회는 경제의 성장과 의료기술의 발전으로 생활은 예전에 비해서 나아졌지만 그에 따른 노인 인구가 급증하면서 심장질환, 동맥경화, 암과 같은 성인병 등의 각종 질병의 발병이 증가되고 있다. 따라서 질병을 예방하고자 항산화 물질에 대한 관심이 급격히 높아지면서 인체에 무해한 천연물에 함유된 항산화제에 대한 조사 및 연구가 급증되고 있다. 체내에 존재하는 항산화 효소는 catalase, glutathione peroxidase, 및 superoxide dismutase (SOD)가 있는데 활성산소는 사람의 나이가 들수록 생성량이 점점 증가하여 효소의 활성을 떨어뜨리고 체내의 세포막 손상, 단백질 분해 및 DNA 등의 손상을 일으켜서 질병의 원인이 될 뿐만 아니라 암이나 다른 질병들의 발병을 증가시키고 있다[2, 18, 23]. 또한 활성산소는 암세포 전이와 연관된 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성 및 발현을 증가시키는데 중요한 역할을 한다고 보고 되고 있다. 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)은 암의 전이, 조직구

축, 창상치료, 생체방어에 중요한 역할을 하며 기저막은 표피와 진피의 경계로 영양공급의 역할을 한다. 암세포에서는 기본적으로 침윤과 전이가 활발하게 일어나는데 암세포는 세포외 기질의 분해와 기저막의 붕괴를 촉진 함으로써 침윤과 전이를 촉진 시킨다[8]. 이러한 세포외 기질과 기저막을 특이적으로 분해하는 효소인 MMPs는 종류에 따라서 기질 특이성을 나타내는데 MMPs의 종류에는 collagenase (MMP-1, -4, -8), stromelysins (MMP-3, -10, -11), 그리고 gelatinases (MMP-2, -9) 등이 있다[12]. MMPs가 활성화 되려면 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)와 복합체를 형성해야지 활성이 이루어 진다. TIMPs는 네 개의 단백질 분해 효소 억제제로서 복합체(TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4)를 이루어 MMPs의 발현을 조절하는데 중요한 역할을 한다[9]. 그 중에서 gelatinase type에 속하는 MMP-2와 MMP-9는 기저막의 주요 성분인 type IV collagen을 분해하는 효소로 기저막 분해 및 암세포의 침윤과 전이에서 가장 중요한 부분으로 알려져 있다[19]. 현재 암 치료에 있어서 가장 큰 문제점은 암 세포의 침윤과 전이이다. 이러한 암세포의 침윤과 전이에 효과적인 억제제의 개발은 아직까지 미흡한 실정이다. 그러므로 MMP-2와 MMP-9의 활성을 억제하는 천연물에 대한 연구가 더욱 구체적이고 활발히 진행되어야만 한다.

천연물 중에서 발굴된 산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*)는 운향과에 속하는 낙엽관목으로 2~3 m의 높이로 자라는 작은 낙엽활엽수이다. 주로 한국(중부 이남), 일본, 중국에 분

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

포되어있으며, 원산지는 한국이고 전국 각지에서 자생하고 있다. 산초나무의 열매 껍질은 약재로 사용되며 항 염증, 항균작용, 혈압강화에 탁월한 효과를 지니고 있다고 보고되고 있다 [3, 6, 20]. 산초나무에는 bergapten, aesculetin, berberine, skimmianine 등의 성분들이 함유되어 있다. 그 중에서 aesculetin 이라는 물질은 6,7-dihydroxy coumarin 이라고도 불리며 coumarin의 유도체이고 배당체의 한 종류이다[4]. 최근에 산초나무의 열매가 생리활성에 효과가 있는 물질로 밝혀지고 있으며 중요성이 점차 증가되고 있다[10, 16]. 따라서 본 연구에서는 산초나무의 주 성분 중 하나인 aesculetin을 사용하여 MMPs의 활성과 암세포의 침윤과 전이에 분비되는 단백질 분해 효소인 MMPs의 활성 및 발현 수준을 조사하여, 보다 효과적이고 안전한 암 치료제 개발로서의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로 부터 구입하였다. HT1080 세포는 American Type of Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약, gelatin, agarose, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

DPPH radical assay

Imai et al. [13] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 aesculetin의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 aesculetin을 DPPH 용액을 가하여 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20 min 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

환원력 assay

Oyaizu [21]의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20 min 동안 반응시켰다. 여기에 10% trichloroacetic acid (TCA)용액을 1 ml 가하여 13,500× g에서 15 min 동안 원심분리 후 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml을 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

세포배양

HT1080 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도가 유지되는 배양기에서 5% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 10,000 U/ml penicillin/10,000 µg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen et al. [11]의 방법에 따라 HT1080 세포에 대한 aesculetin의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

Gelatin zymography

MMP-2 및 MMP-9 활성은 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에서 배양한 HT1080 세포에 aesculetin을 처리하고, MMP의 발현 및 활성을 자극시키는 것으로 알려진 PMA를 1 ng/ml 처리하여 실험을 수행하였다. 50 µg의 총 단백질을 함유하는 세포배양액을 1.5 mg/ml의 gelatin을 포함하는 비환원조건 10% polyacrylamide gels를 이용하여 전기영동하였다. Gelatin이 분해된 bands는 청색배경에 투명한 bands로 나타난다. Bands의 intensity는 MMPs의 활성에 비례하여 나타나는데 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)로 관찰한 후 촬영하였다.

Western blot analysis

Aesculetin을 처리하고 PMA로 자극한 HT1080 세포에 용출 완충용액 (50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 µg의 세포 용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전 처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

Immunofluorescence assay

Slide chamber에 배양된 HT1080 세포에 시험농도의 aesculetin을 24시간 처리하였다. 10% formalin 고정액을 처리하여 상온에서 15분간 세포를 고정시킨 뒤, 0.5% tween 20을 함유하는 PBS로 세포막의 투과성을 높였다. Donkey normal serum으로 전처리 한 뒤 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-MMP-9)를 5% donkey normal serum과 0.1% tween 20을 함

유하는 PBS에 녹여 24시간 처리하였다. 다음으로 0.1% tween 20을 함유한 PBS로 남은 1차 항체를 2회 세척한 뒤, 형광 표지된 2차 항체(donkey anti-rabbit conjugated FITC)를 1차항체와 똑같은 방법으로 1시간 처리하였다. 마지막으로 DAPI를 함유한 형광 shield는 slide를 mounting한 뒤 confocal microscopy를 이용하여 목적 단백질을 관찰하였다.

Invaion assay

세포침윤실험은 Invasion Assay Kit (ECM550) Chemicon®의 방법에 따라 수행하였다. 24well cell culture plate에 cell culture insert를 넣고 insert안에는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지를 넣은 뒤 36°C에서 30분간 배양하였다. Insert안의 배지를 제거한 후, insert밖에는 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 넣고 insert안에는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지와 세포를 넣어 36°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 aesculetin과 VEGF를 처리한 후 36°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24well culture plate안의 배지와 insert안의 배지를 깨끗이 제거한 뒤, 솜면봉을 이용해 insert 안의 남은 세포를 깨끗이 제거하였다. Insert 바닥을 투과한 세포들은 염색을 한 뒤, 10% acetic acid 용액에 용해시켜 96well plate에 옮겨 담아 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's test 한 후 $p<0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

DPPH radical에 대한 aesculetin의 항산화 효능

생체에서 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH radical과 같은 활성산소종에 대한 aesculetin의 소거능력에 대하여 조사하였다. DPPH radical 소거법은 항산화 물질에 의해 DPPH radical의 흡광도 변화의 정도를 지표로 하여 산화억제 정도를 예측할 수 있다. Aesculetin의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 DPPH에 대하여 aesculetin의 소거효과가 우수하게 나타났다. 양성 대조군 vitamin C는 0.01%를 사용하였는데 약 52%의 소거효과를 나타내었고, 최고 농도인 16 μM에서는 vitamin C와 비슷하게 소거효과를 나타내었다.

Reducing power에 대한 aesculetin의 환원 효과

Aesculetin의 환원력을 조사하기 위해 potassium ferricyanide reduction법을 사용하였다. 그 결과 Fig. 2에서 vitamin C는 0.001%의 농도에서 대조군과 비교하여 217%의 환원력을

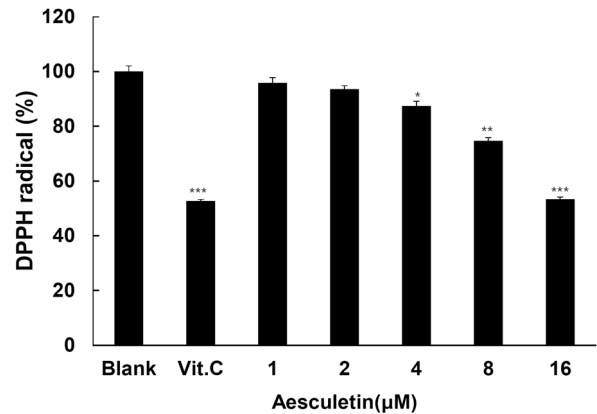


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of aesculetin. Vitamin C (Vit.C) at 100 μg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$) using Student's *t* test.

나타냈다. 그리고 aesculetin은 4 μM이상의 농도에서 환원력이 대조군에 비해 증가하였고 4, 8, 16 μM의 농도에서 각각 25, 68, 115%의 환원력을 나타내었다.

Aesculetin의 HT1080세포에 대한 세포독성 효과

Aesculetin의 HT1080 세포에 독성을 미치지 않는 농도를 결정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 aesculetin은 공시험군과 비교하여 농도가 증가함에 따라 세포독성이 증가하였으나 시험농도인 16 μM 이하의 농도에서 80% 이상의 세포가 생존하였으므로 그 효과는 미미한 것으로 판정되었다. 따라서 본 연구에서는 16 μM 이하의 농도 범위에서 지속적인 실험을 수행하였다.

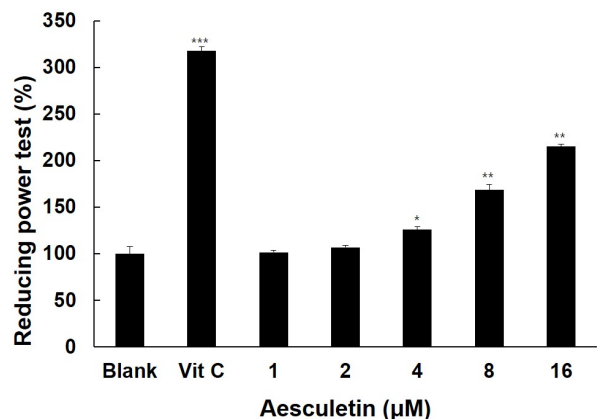


Fig. 2. Reducing power of aesculetin. Vitamin C (Vit. C) at 10 μg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$) using Student's *t* test.

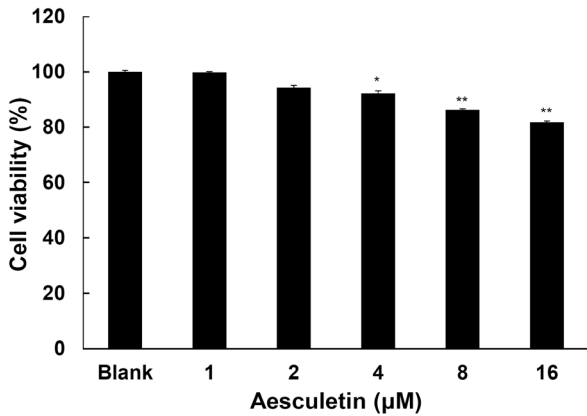


Fig. 3. Effect of aesculetin on viability of HT1080 cells. HT1080 cells were treated with aesculetin at 1, 2, 4, 8, and 16 µM. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$) using Student's *t* test.

PMA로 자극된 HT1080세포에서 aesculetin의 MMP-9 활성 조절 효과

세포의 기질인 gelatin과 fibronectin을 분해한다고 알려져 있는 MMP-9은 암세포의 암 전이 시 침윤과 신생혈관생성에 필수적인 요소임으로, aesculetin의 MMP-9 효소 활성 조절에 미치는 영향을 조사하기 위하여 gelatin zymography를 수행하였다. Fig. 4에서는 HT1080 세포에 aesculetin을 처리 한 후 72시간 동안 배양 한 상등액에서 MMP-9의 효소 활성을 측정 하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, aesculetin은 2 µM 농도에서부터 농도의존적으로 PMA처리군에 비해 MMP-9의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

HT1080세포에서 MMP-9, TIMP-1 단백질의 발현에 대한 aesculetin의 효과

Aesculetin이 세포 외 기질을 분해하는데 가장 중요한 기질 분해단백질인 MMPs의 단백질 발현을 어떻게 조절하는지 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, aesculetin의 8 µM 농도 처리군에서 PMA 처리군과 비교 시 MMP-9의 단백질 발현은 억제되는 것으로 나타났다. 또한 MMP-9을 조절한다고 알려진 TIMP-1의 단백질 발현도 aesculetin에 의하여 증가되는 것으로 관찰되어, aesculetin은 TIMP-1의 발현을 증가시켜 MMP-9의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

HT1080세포 내에서 aesculetin이 MMP-9 단백질 발현 부위의 면역형광 분석결과

HT1080세포에서 암 전이 시에 분비되는 효소인 MMP-9 단백질 발현 부위를 조사하기 위해 항원-항체반응을 이용한 immunofluorescence를 수행하였다. DAPI로 HT1080 세포의 핵

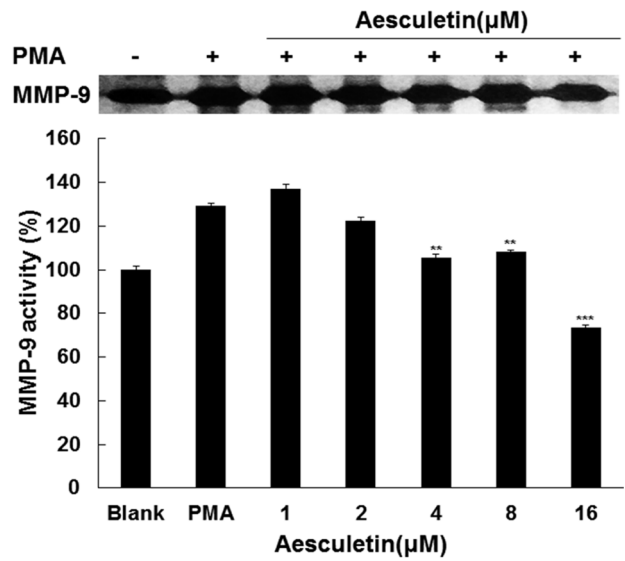


Fig. 4. Effect of aesculetin on activities of MMP-9 in HT1080 cells stimulated with PMA. The cells stimulated with PMA were treated with aesculetin at 1, 2, 4, 8 and 16 µM under serum-free conditions for 72 hr. MMP-9 activity in conditioned media was determined by gelatin zymography. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) using Student's *t* test.

을 파란색으로 표지하고, FITC로 목적단백질인 MMP-9을 녹색으로 표지 하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 공시험군에 비하여 MMPs 효소의 발현을 유도하는 PMA처리군에서는 세포질 부위에서 MMP-9의 발현을 증가시켰다. Aesculetin 처리군은 8 µM 농도에서 PMA로 유도된 대조군과 비교해 MMP-9 단백질 발현을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다.

HT1080세포의 세포침윤에 대한 aesculetin의 효과

암 전이 시에 일어나는 세포침윤에 대한 aesculetin의 억제 효과를 조사하기 위하여 cell invasion assay를 수행하였다. 대조군과 aesculetin처리군에는 혈관포피성장인자 (VEGF)를 처리하여 24시간 배양하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 aescule-

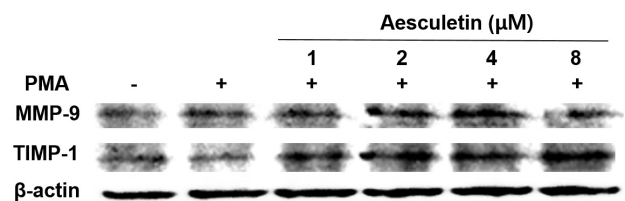


Fig. 5. Effect of aesculetin on protein expressions of MMP-9 and TIMP-1 in HT1080 cells. The cells were treated with aesculetin at 1, 2, 4 and 8 µM prior to stimulation of cells with PMA at 1 ng/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

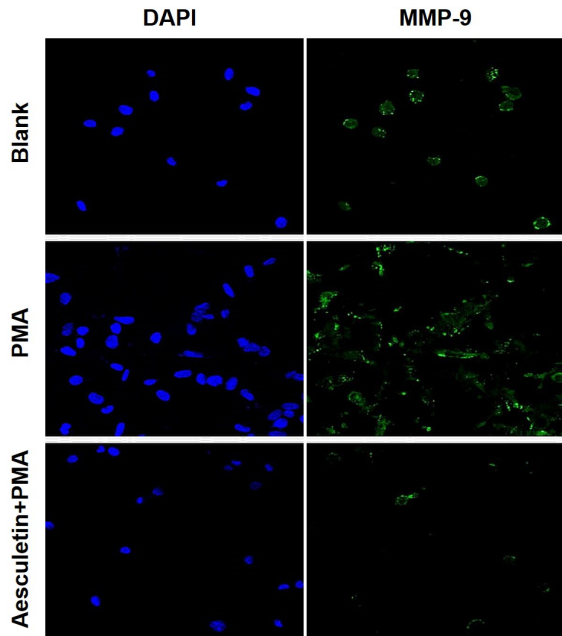


Fig. 6. Immunofluorescence images of MMP-9 in HT1080 cells. The cells were cultured in the presence of aesculetin and detected with a rabbit polyclonal MMP-9 antibody (FITC, green signal). The nuclei are stained with DAPI (DAPI staining).

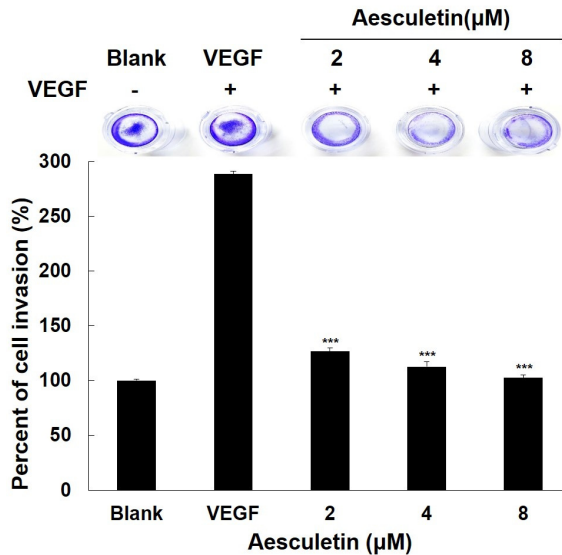


Fig. 7. Inhibitory effect of aesculetin on invasion of HT1080 cells into ECM layer upon polycarbonate membrane. Invasion assay was performed in an invasion chamber, a 24-well tissue culture plate with insert, 8 µm pore size polycarbonate membrane. HT1080 cells were seeded to polycarbonate membrane. Non-invaded cells were removed using cotton-tipped swab and then invaded cells were stained with stain solution. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (***, $p < 0.001$) using Student's t test.

tin처리군은 대조군인 VEGF 처리군과 비교 시 농도의존적으로 세포침윤을 억제하는 것으로 나타났다. Aesculetin은 최고 농도인 8 µM 농도에서 VEGF 처리군과 비교하여 약 60%의 세포침윤을 억제하는 것으로 나타났다.

고 찰

대사과정 중 산화과정에 의해 과량 생성되는 활성산소종 (ROS)들은 체내에 합성된 항산화 효소에 의해 소거 및 조절되어 항상성이 유지된다[7]. 그러나 외부의 산화적 스트레스로 활성산소종이 증가하게 되면 활성산소종이 세포의 구성성분들인 지질, 단백질 및 DNA의 산화적 손상과 효소활성을 변화시켜 노화, 심장질환, 뇌 질환 및 암 등과 같은 질병들의 발병을 유도한다[25]. 그러므로 항산화 활성을 가진 안전한 약물의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 천연물 유래의 aesculetin의 항산화 효과를 조사한 결과 DPPH radical 소거능력에서는 대조군으로 사용된 vitamin C와 유사한 억제효과를 나타냈으며 또한 환원력도 매우 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 aesculetin이 hydroxyl radical의 소거효과를 가진다는 연구결과와 일맥 상통하는 것임으로[24], aesculetin은 생체 내에서 발생하는 활성산소종을 소거함으로써 지질, 단백질 및 DNA의 산화적 손상을 억제하여 암과 같은 질병을 예방하는데 도움을 줄 수 있다는 것을 암시하고 있다.

암은 여러 가지 치료법 및 약물이 개발되었지만, 아직까지 사망률이 높은 질병들 중 하나이다. 이러한 사망 원인은 암세포의 침윤 및 전이 때문이라고 알려져 있다. 암세포는 주위의 가까운 세포 및 미세환경으로부터 산소와 영양분의 결핍이 나타나면, 이를 해결하기 위해 신생혈관을 생성하여 혈관을 타고 다른 조직이나 기관으로 침윤 및 전이하게 된다[15]. 이러한 과정 중 필수적인 과정이 기질금속단백질분해효소(MMPs)에 의한 기저막층과 세포외기질의 분해이다. MMPs는 다양한 생리적 및 병리적 조직 재편성에 중요한 역할을 담당하는 아연 의존성 단백질 분해효소로 약 20여종으로 그 중 MMP-2와 MMP-9이 암의 침윤 및 전이에 중요한 역할을 하고 있다. 그리고 이 MMPs를 억제하는 세포 내에 TIMPs가 있어 세포외기질 분해의 조절을 담당하고 있다[14]. 본 연구에서 연구된 aesculetin은 이전의 암 관련 연구에서 사람의 대장암 세포의 성장을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다[17]. 그러므로 본 연구에서는 HT1080세포에서 분비되는 MMP-9의 효소 활성 및 단백질 발현에 대한 aesculetin의 효능을 조사하였다. Aesculetin은 MMP-9의 활성 및 발현에 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 알려진 aesculetin의 p38 MAPK와 AP-1을 통한 MMP-9의 단백질 발현 억제 효과와 유사한 것으로 사료된다[5]. 뿐만 아니라 연구결과에서 MMPs의 효소 활성을 억제하는 TIMP-1의 단백질 발현을 증가시켰다. 그리고 TIMP-1과 MMP-9의 관계에 대한 연구를 조사하였

을 때 naringin의 효과와 유사하게[1], aesculetin의 암 전이 효과는 TIMP-1의 단백질 발현을 증가시켜 MMP-9의 활성 및 단백질의 발현을 감소시킨 것으로 사료된다. TIMP-1은 생체 내에 존재하는 MMP-9의 직접적인 억제제로 TIMP-1의 생성량이 증가되면 MMP-9의 활성이 억제될 수 있다. 암 전이되기 위해서 신생혈관이 다른 혈관이나 세포에 침투해야 하는데 이와 같은 침윤 정도를 알아보기 위해 혈관표피성장인자(VEGF)로 자극시켜 invasion assay 수행한 결과 aesculetin이 암세포의 침윤을 억제하는 것으로 나타났다. 이와 유사하게 이전 연구에서도 aesculetin이 *in vitro*와 *in vivo*에서 VEGF로 유발된 angiogenesis를 억제한다 연구결과가 보고되었다[22]. 이러한 연구 결과를 통해 aesculetin은 우수한 항산화 효과는 물론 암 전이 시에 분비되는 MMPs를 억제하는 효소인 TIMP-1의 단백질 발현을 증가시켜 MMP-9의 효소 활성과 단백질 발현을 감소시킴으로써 암세포의 침윤 및 전이 억제에 도움을 줄 수 있는 암 전이 치료제로서 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2015R1D1A1A02060011).

References

1. Aroui, S., Najlaoui, F., Chtourou, Y., Meunier, A. C., Laajimi, A., Kenani, A. and Fetoui, H. 2015. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway. *Tumour Biol.* **37**, 3831-3839.
2. Bhattacharya, S. 2015. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. 17-29. *Free Radicals in Human Health and Disease*: Springer.
3. Cao, L. H., Lee, Y. J., Kang, D. G., Kim, J. S. and Lee, H. S. 2009. Effect of Zanthoxylum schinifolium on TNF- α -induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* **50**, 200-207.
4. Cheng, M. J., Yang, C. H., Lin, W. Y., Lin, W. Y., Tsai, I. L. and Chen, I. S. 2002. Chemical constituents from the leaves of Zanthoxylum schinifolium. *J. Chin. Chem. Soc.* **49**, 125-128.
5. Choi, H. J., Chung, T. W., Kim, J. E., Jeong, H. S., Joo, M. S., Cha, J. h., Kim, C. H. and Ha, K. T. 2012. Aesculin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression via p38 mitogen activated protein kinase and activator protein 1 in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **14**, 267-274.
6. Choi, S. I., Chang, K. M., Lee, Y. S. and Kim, G. H. 2008. Antibacterial activity of essential oils from Zanthoxylum piperitum AP DC. and Zanthoxylum schinifolium. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 195-198.
7. D'Autréaux, B. and Toledano, M. B. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 813-824.
8. Egeblad, M. and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
9. Groblewska, M., Siewko, M., Mroczko, B. and Szmitkowski, M. 2012. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 12-19.
10. Han, W. and Wang, M. H. 2010. Radical scavenging and anti-inflammation activities from different extracts of zanthoxylum schinifolium Fruits. *Kor. J. Pharmacognosy* **41**, 250-254.
11. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
12. Hua, H., Li, M., Luo, T., Yin, Y. and Jiang, Y. 2011. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3853-3868.
13. Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* **60**, 417-420.
14. John, A. and Tuszynski, G. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* **7**, 14-23.
15. Khan, N. and Mukhtar, H. 2010. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 435-445.
16. Kim, K. W., Kim, J. S. and Baek, J. K. 2005. Isolation of herbicidal compounds from the fruit of zanthoxylum schinifolium S. et. Z. *Kor. J. Weed Sci.* **3**, 194-201.
17. Lee, S. Y., Lim, T. G., Chen, H., Jung, S. K., Lee, H. J., Lee, M. H., Kim, D. J., Shin, A., Lee, K. W. and Bode, A. M. 2013. Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting β -catenin. *Cancer Prev. Res.* **6**, 1356-1364.
18. Leutner, S., Eckert, A. and Müller, W. 2001. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J. Neural. Transm.* **108**, 955-967.
19. Moss, L. A. S., Jensen-Taubman, S. and Stetler-Stevenson, W. G. 2012. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am. J. Pathol.* **181**, 1895-1899.
20. No, Y. D., Sin, M. G. and Song, H. J. 1997. A herbarological study on the plants of rutaceae grown in Korea. *Kor. J. Herbology* **12**, 135-135.
21. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nut.* **44**, 307-315.
22. Park, S. L., Won, S. Y., Song, J. H., Lee, S. Y., Kim, W. J. and Moon, S. K. 2016. Esculetin inhibits VEGF-induced angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Chin. Med.* **44**,

- 61-76.
23. Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and LLeonart, M. E. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376-390.
24. Thuong, P. T., Hung, T. M., Ngoc, T. M., Ha, D. T., Min, B. S., Kwack, S. J., Kang, T. S., Choi, J. S. and Bae, K. 2010. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure - activity relationships. *Phytother. Res.* **24**, 101-106.
25. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1-40.

초록 : Aesculetin의 항산화 활성과 MMP-9 활성 억제를 통한 암세포 침윤 억제

홍수경 · 김문무*

(동의대학교 화학과)

최근에 종양을 예방하거나 치료하기 위하여 안전하고 효과적인 항암화합물의 개발이 절실하게 요구되고 있다. 그 중에서 전통약재로부터 유래된 천연화합물은 항암후보소재로 관심의 대상이 되어왔다. 본 연구에서 사용된 aesculetin은 약용식물로 널리 알려진 산초나무의 주요 성분이다. Aesculetin은 항염증 및 항균과 같은 다양한 생물학적 효과를 가진다고 보고되었다. 그러나 세포침윤과 관련된 효과는 아직 발견되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 사람섬유아육종세포(HT1080)에서 항산화와 기질금속단백질분해효소(MMPs)에 대한 aesculetin의 효과를 조사하였다. 항산화 효과에 대한 연구에서 aesculetin은 DPPH radical에 대한 소거능뿐 만 아니라 환원력이 우수한 것으로 나타났다. 우선, MTT 실험을 이용하여 HT1080세포에서 aesculetin의 2 μ M 이하의 농도에서 독성이 없는 것으로 나타났다. MMP-2와 MMP-9의 활성과 단백질 발현 수준에 대한 aesculetin의 억제효과는 gelatin zymography와 western blot을 이용하여 조사되었다. Aesculetin은 세포침윤과 관련된 MMP-9의 활성의 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 더욱이, aesculetin은 TIMP-1의 단백질 발현 수준을 증가시켰으나, PMA로 자극된 MMP-9의 단백질 발현 수준을 감소시켰다. 더불어 aesculetin은 농도의존적으로 암전이와 관련된 세포침윤을 현저하게 억제하였다. 위의 결과들을 바탕으로, aesculetin은 세포침윤과 관련된 MMP의 활성과 발현의 억제를 통해 세포침윤을 예방할 수 있는 소재로서 기대된다.