

Harmine의 Notch 신호전달 조절에 의한 유방암세포주 이동 및 침윤 억제 효과

윤지은*

청주대학교 이공대학 제약공학과

Inhibitory Effects of Harmine on Migration and Invasion of Human Breast Cancer Cells by Regulating Notch Signaling

Jieun Yun*

Department of Pharmaceutical Engineering, Cheongju University, 298 Daeseong ro, Cheongwon gu, Cheongju 28503, Korea

Abstract – Harmine, a beta-carboline alkaloid isolated from the seeds of *Peganum harmala* has been reported as a promising drug candidate for cancer therapy. However, the effect of harmine on breast cancer remains still unclear. In this study, the effect of harmine on the cell proliferation, migration, and invasion of breast cancer MDA-MB231 cells and the underlying mechanism were investigated. The results indicated that harmine inhibited the proliferation MDA-MB231 cells in a dose-dependent manner and markedly suppressed migration and invasion of MDA-MB231 cells. The mechanism involved in part through Notch signaling. The Notch activity was significantly inhibited by harmine treatment and harmine suppressed the expression of Jagged1 which is a key ligand to activate Notch signaling. These findings suggest a novel mechanism of harmine on anti-cancer activity and harmine may act as a potential therapeutic drug for breast cancer treatment.

Keywords – Harmine, *Peganum harmala*, Breast cancer, Invasion, Notch signaling

유방암은 전세계적으로 여성에게 있어 폐암에 이어 두 번째로 사망률이 높은 암이다.¹⁾ 유방암연구의 발전으로 다양한 치료제와 치료기법들이 개발되었으나 다른 장기로의 암전이는 환자의 생명을 위협하는 주요 요인을 꼽히고 있어 많은 연구가 필요하다.²⁾ 암전이는 여러 단계로 구성되어 있는데 가장 주된 가설로는 우선 암세포의 특성이 변화되는 epithelial-mesenchymal transition(EMT), 세포 침윤 (invasion), 암세포가 혈관으로 이동(intravasation), 혈액순환, 암세포가 혈관을 빠져 나옴(extravasation), 마침내 특정 장기에 안착하여 2차 암을 형성하는 과정이 알려져 있다.³⁾

*Peganum harmala*의 씨앗에서 분리된 harmine(Fig. 1)은 beta-carboline alkaloid이다. 최근Harmine의 항암효과가 난소암, 위암, 폐암, 갑상선, 유방암 세포주 등에서 밝혀졌으며 harmine과 그의 유도체들이 항암제 후보 물질로 연구가 되고 있다.⁴⁻¹⁰⁾ Harmine의 작용기전으로는 난소암 세포주에서 ERK/CREB 신호전달체계를 조절하여 암세포증식과 이

동을 억제하였고,⁵⁾ 위암 세포주에서 COX-2효소를 저해하여 파클리탁셀과 병용투여 시 암세포의 증식을 억제한다고 보고되었다.⁶⁾ 또한 폐암 세포주에서 harmine이 EMT의 중요한자인 twist 단백질의 dimerization에 관여하여 twist 단백질의 안정화를 억제하여 항암효과를 나타낸다고 밝혀졌다.⁸⁾ 유방암 세포주인 MDA-MB231세포주의 경우 *Peganum harmala* 추출물을 처리하였을 때 세포자멸(apoptosis)을 유도하였고, 그 작용기전으로 Bax, Puma, TRAIL, Caspase8 유전자의 과발현이 작용함을 밝혀냈다.⁹⁾ 또한 Harmine유도체를 폐암(NCI-H460), 유방암(T47D), 대장암(HCT-116) 세포주에 처리하였을 때 암세포 성장 억제 뿐만 아니라 암세포 이동을 저해한다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 이렇듯 다양한 암세포주에서 harmine의 항암효과 및 기전연구가 수행되고 있으나 유방암에서 harmine의 항암효과와 암세포 전이와 관련된 침윤성에 대한 연구는 아직 미흡하고 관련 기전에 대한 더 많은 연구가 필요한 상황이다.

Notch 신호전달은 리간드-수용체 신호체계로써 세포분열, 분화, 세포운명 결정, 세포생존을 조절하는 것으로 알려져

*교신저자(E-mail): jyun@cju.ac.kr
(Tel): +82-43-229-7863

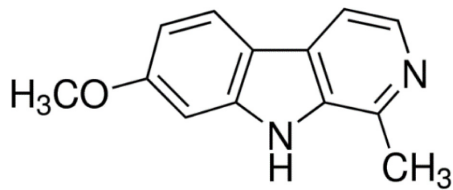


Fig. 1. Chemical structure of harmine.

있다.¹¹⁾ Notch 단백질은 단일 막관통 단백질로 세포표면에서 수용체로 작용을 한다. 포유동물은 4개의 Notch 수용체를(Notch1, 2, 3, 4)를 가지고 있으며 리간드로는 Jagged1, 2와 DLL1, 3, 4가 알려져 있다. 우선적으로 Notch 리간드가 수용체가 결합하면 Notch 수용체는 구조적 변화를 일으켜 순차적인 두 번의 잘림을 거치게 된다. 첫 번째 담당 효소는 TNF- α converting enzyme으로 Notch의 세포밖 도메인이 잘리고 그 후 gamma-secretase 복합체에 의해 transmembrane 도메인에서 두번째 잘림이 일어난다. 세포막에서 분리된 Notch는 세포 핵 안으로 이동하여 타겟 유전자(HES, HEY, CyclinD1, P21/WAF1, c-Myc 등)의 프로모터에 붙어 전사조절의 역할을 한다.¹¹⁾ Notch 신호전달체계는 다양한 고형암(유방암, 자궁경부암, 폐암, 췌장암, 난소암, 전립선암 등)과 혈액암(급성 림프구성 백혈병 등)에서 암 유발을 촉진시킨다는 보고와 함께 암 신생혈관형성을 촉진시킨다고 알려졌다.¹²⁻¹⁴⁾ 또한 Jagged1과 Notch1의 과발현이 유방암의 나쁜 예후와 관련되어 있다고 밝혀졌고,¹⁵⁾ 최근 Notch 신호전달체계가 암전이와 밀접한 관련이 있다는 보고들이 있다. Jagged1이 발현된 유방암 세포주의 경우 골아세포와 상호작용으로 IL6와 TGF β 를 활성화 시키고 그 결과 뼈전이를 촉진시킨다고 보고되었다.¹⁶⁾ 또한 Jagged1을 통한 Notch 신호전달체계 활성화는 EMT 조절인자로 잘 알려진 Snail과 Slug를 활성화 시키고,^{17,18)} 특히 Slug의 경우 Notch1이 직접적으로 프로모터에 붙어 전사를 유도한다는 것이 연구되어 Notch 신호전달체계가 암전이 초기 단계인 EMT를 촉진한다고 밝혀졌다.¹⁹⁾

본 연구에서는 harmine의 MDA-MB231 유방암세포주의 증식 억제, 세포 이동성 및 침윤성 억제 효과를 평가하고 관련된 기전에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

재료 - 본 실험에 사용한 Harmine은 Sigma-Aldrich (Product number: 286044)에서 구입하였고, dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich(Product number: D8418))에 100 mM 농도로 녹여 사용하였다. RPMI 1640 배지와 fetal bovine serum(FBS)은 Invitrogen Life Technologies에서 구입하였다. 항체 Jagged1(C20)와 Notch1(C20)는 Santa Cruz에서 구입

하였고 GAPDH는 Cell Signaling Technology에서 구입하여 사용하였다.

세포배양 - 유방암 세포주인 MDA-MB231은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포주는 10% FBS, 100U/ml의 penicillin과 100 μ g/ml의 streptomycin이 포함된 RPMI1640을 배지로 하여 37°C, 95% humidified air/5% CO₂ incubator에서 배양하였으며 2-3일마다 새로운 배지로 계대 배양하여 세포를 유지하였다.

세포 증식 분석 - 세포생존률 분석을 위해 8,000개의 세포를 96-well 플레이트에 분주하여 RPMI1640에 10% FBS를 첨가한 배지에서 배양하였고 배양 48시간 후에 Cell Proliferation Kit II(XTT assay; Roche)를 사용하여 정량화하였다. 분석방법은 제조회사에서 제시한 실험방법을 준수하였다. 각 실험 당 사용한 well의 개수는 4개 이상을 사용하였다.

세포이동 분석 - 세포이동정도(migration)는 wound healing assay로 Culture Insert, μ -Dish^{35mm, low} (ibidi)를 이용하여 측정하였다. 세포는 5 \times 10⁵ cells/ml로 준비하여 culture insert의 각각의 well에 70 μ l씩 24시간 동안 배양하여 부착시켰다. 세포가 부착된 후에 배양액, Culture Insert를 제거하고, harmine을 농도별로 희석한 2ml의 배양액으로 처리하였다. 이 때 가운데 빈 공간을 현미경으로 사진 촬영하였다. 16시간 후에 같은 곳을 현미경으로 사진 촬영하였고 빈 공간의 면적을 계산하여 정량화하였다.

세포침윤성 분석 - 트랜스웰(24-well 용; Corning Inc.) 필터를 매트릭셀(BD Sciences)로 코팅한 후 50,000개의 세포를 개수하여 RPMI1640 배지에 희석한 후 매트릭셀이 코팅된 트랜스웰의 상부에 분주하였다. 필터를 24-well에 삽입하고 필터 하부가 세포 배양액(RPMI1640+10% FBS)에 잠기도록 하였다. 배양 시작 24시간 후에 필터는 회수하여 먼 봉으로 상부 매트릭셀을 제거한 후 필터 아래 부분으로 이동한 세포들을 현미경을 이용하여 개수하였다. 각 실험 당 트랜스웰은 4개 이상을 사용하였다.

Notch 활성 분석 - 세포주를 24 well plate에 분주한 후 다음 날 Notch binding-luciferase reporter 플라스미드를 Renilla와 함께 Lipofectamine 2000 reagent(Invitrogen Life Technologies)를 이용하여 transfection했다. Transfection 6시간 후에 harmine을 농도별로 희석한 1ml의 배양액을 세포주에 처리하였다. Harmine 처리 48시간 후에 Dual-Luciferase Reporter assay System(Promega)을 이용하여 세포들을 용해하고 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 실험하였다. Luminescence는 GloMax-Multi Detection System(Promega)을 이용하여 측정하였고 측정값들은 luciferase activity를 Renilla activity(internal control)로 나누어 보정하였다. 각 실험 당 사용한 well의 개수는 4개 이상을 사용하였다.

단백질발현 분석 - 세포 단백질은 PMSF와 proteinase

Table I. Sequences of primers used for quantitative real time PCR

| Targets | | Sequences (5' to 3') |
|---------|---------|-----------------------|
| Jagged1 | Forward | TCGCTGTATCTGTCCACCTG |
| | Reverse | AGTCACTGGCACGGTTGTAG |
| Notch1 | Forward | TACTCCTCGCCTGTGGACAA |
| | Reverse | CAGTCGGAGACGTTGGAATG |
| GAPDH | Forward | AAATCAAGTGGGGCGATGCTG |
| | Reverse | GCAGAGATGATGACCCTTTTG |

inhibitor cocktail(Calbiochem)이 포함된 RIPA buffer(50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 사용하여 세포들을 모았고 얼음에서 30분 방치 후 15000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube에 나누어 담았다. 얻어진 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad)를 이용하여 분석하였고 제조회사에서 제시한 실험방법을 준수하였다. 정량 후 20 µg의 전체 단백질을 Protein 5X Sample Buffer(ELPIS BIOTECH)에 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하여 10% SDS-PAGE gel을 이용해서 단백질을 크기 별로 분리하였다. 이후 PVDF막에 트랜스퍼한 후 발현된 단백질량은 enhanced chemiluminescent protein(ECL) detection system (Millipore)을 사용하여 X-ray 필름에 현상하여 분석하였다.

정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(Quantitative Real Time PCR) – RNA 추출은 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 제조사가 제공한 실험방법으로 추출하였다. DEPC-water로 녹인 RNA는 A260/280 ratio(Versa Max microplate reader, Molecular Devices)로 흡광도를 측정해 순도와 농도를 확인하였다. 얻어진 RNA는 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit(TaKaRa, Japan)를 이용하여 역전사 반응시켰고 Real-time PCR 분석은 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)을 활용하여 제조사에서 제공된 실험법에 따라 실험하였다. GAPDH를 internal control로 사용하였고 유전자의 상대적 발현을 $\Delta\Delta Ct$ method로 계산하였다. 실험에 사용한 primer 서열은 Table I에 정리하였다.

통계처리 – 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타냈으며 통계학적 유의성을 평가하기 위해 SigmaPlot 프로그램 (Systat Software, Inc)을 이용하여 two-tailed Student's t-test 방법으로 분석하였다. *p* 값이 0.05 이하 일 때 통계적으로 유의한 차이가 있다고 보았다.

결과 및 고찰

Harmine의 암증식 억제 효과 – 사람 유방암 세포주인 MDA-MB231에서 harmine이 세포증식에 미치는 효과를 조

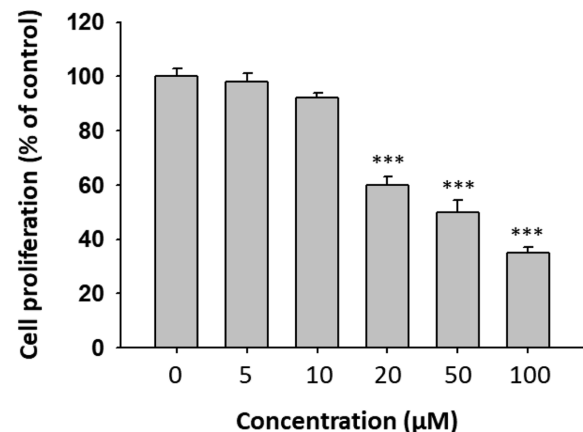


Fig. 2. Effect of harmine on the proliferation of MDA-MB231 human breast cancer cells. Cells were treated with harmine for 48 hours and proliferation was assayed by XTT reagent. Data are presented as the mean±SD (***)*p*<0.001).

사하기 위하여 XTT를 사용하여 평가하였다. MDA-MB231 세포에 harmine을 5, 10, 20, 50, 100 µM의 농도로 48시간 동안 처리하였을 때 20, 50, 100 µM의 농도에서 각각 40%, 50%, 65%의 세포증식억제 효과를 농도 의존적으로 나타내었다(Fig. 2).

Harmine의 암세포 이동 억제 효과 – Harmine이 유방암 세포 이동에 미치는 영향을 평가하기 위해 wound healing 방법으로 실험을 수행하였다. MDA-MB231세포를 culture insert이 있는 상태의 배양플레이트에서 배양을 24시간 동안 한 후 culture insert을 제거하면 wound가 형성이 되었다(Fig. 3A, top left). 이때를 time zero로 설정을 하고(Fig. 3A, top left) 빈 공간의 사진을 확보하였다. 이후 세포들을 harmine 5, 10 µM의 농도로 16시간 동안 처리하였다. 5와 10 µM의 농도는 harmine이 세포증식에 영향을 미치지 않는 농도로 (Fig. 2) harmine이 세포 이동 자체에 미치는 영향을 평가하기 위해 설정하였다. 대조군(vehicle 처리)은 16시간 후에 세포들 간 빈 공간에 세포들이 이동하여 완전히 덮였으나(Fig. 3A, top right), harmine을 5와 10 µM 농도로 각각 처리한 군은 16시간 후에 세포들 간 빈 공간이 남아있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A, bottom). Harmine의 세포이동억제 효과를 정량적으로 평가하기 위해 빈 공간의 면적을 계산하였고 harmine 5, 10 µM 농도 처리 시 각각 36%, 53%의 암세포이동억제 효과를 통계적으로 유의하게 나타내었다 (Fig. 3B). 이러한 결과는 harmine이 암세포 증식억제 뿐만 아니라 암세포 전이와 관련된 암세포 이동(migration)을 조절함을 나타낸다.

Harmine의 암세포 침윤 억제 효과 – Harmine이 유방암 세포 침윤(invasion)에 미치는 영향을 평가하기 위해 매트릭스 젤로 코팅한 트랜스웰을 사용하여 실험을 수행하였다. MDA-

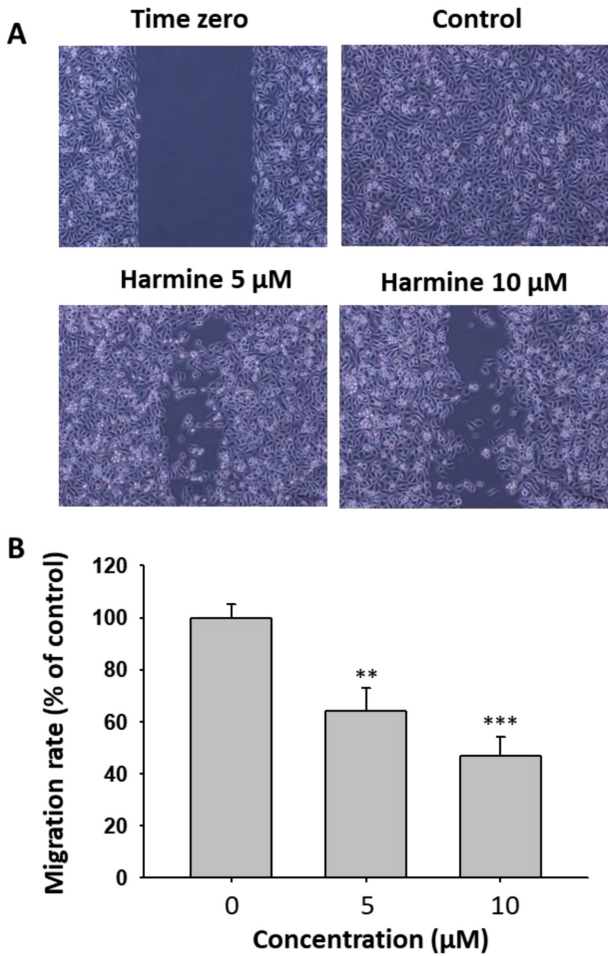


Fig. 3. Effect of harmine on the migration of MDA-MB231 human breast cancer cells. (A) Cells were seeded in low 35-mm dishes with culture inserts and incubated for 24h (top left). Then, the culture inserts were removed and cells were treated with vehicle only (top right) or harmine (bottom) for 16 hours. (B) Quantitative data of a wound healing migration assay. Data are presented as the mean±SD (***p*<0.01, ****p*<0.001).

MB231세포를 개수하여 매트리지엘이 코팅된 트랜스웰 상부에 분주하고 하부는 세포이동을 유도할 수 있게 세포배양 배지에 잠기게 하였다. Harmine을 5, 10 μM 농도로 각각 처리하였고 24시간 후에 매트리지엘을 통과하여 트랜스웰 하부로 침윤한 세포수를 개수하였다. Harmine을 5, 10 μM 농도 처리 시 각각 48%, 63%의 암세포침윤억제 효과를 통계적으로 유의하게 나타내었다(Fig. 4).

Harmine의 Notch 신호전달 억제 효과 - Notch 신호전달 체계는 암유발을 일으킨다고 알려져 있으며 특히 암전이와 관련하여 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. Notch는 세포표면에 존재하는 막관통단백질로 리간드-수용체 결합에 의해 활성화 된다. 리간드로는 Jagged1, 2와 DLL1, 3, 4가

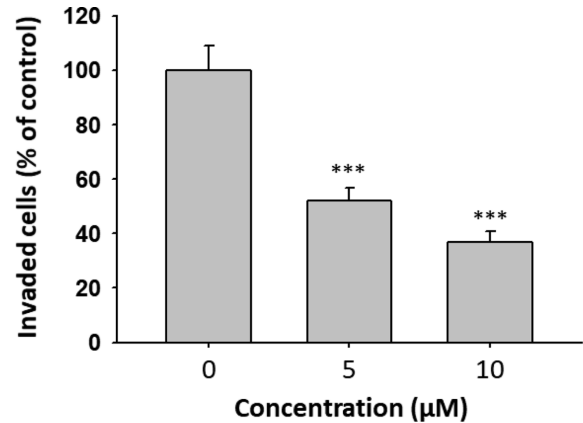


Fig. 4. Effect of harmine on the invasion of MDA-MB231 human breast cancer cells. Cells were seeded on the top side of Transwell filter coated with Matrigel in the top chamber of the 24-well plate and treated with harmine for 24 hours. Invaded cells to the bottom of the Transwell filter were counted. Data are presented as the mean±SD (***p*<0.001).

알려져 있고, 수용체인 Notch는 1, 2, 3, 4로 4가지 형태가 존재한다. Harmine의 세포증식억제 및 세포이동성, 침윤성 억제효과의 기전을 분석하기 위해 harmine이 Notch 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. Notch는 활성화 된 후 세포표면에서 분리되어 핵막으로 이동하여 타겟 유전자의 프로모터에 붙어 전사를 조절한다. 따라서 Notch 단백질이 붙을 수 있는 프로모터 부분과 luciferase발현 유전자를 결합시키면 Notch 활성을 분석할 수 있는 luciferase reporter 실험계를 구축 할 수 있다. MDA-MB231 세포주에 Notch binding-luciferase reporter와 Renilla 플라스미드를 같이 transfection 한 후 6시간 후에 harmine을 2.5, 5, 10 μM 농도로 각각 처리하였다. Harmine 처리 48시간 후에 세포 내 Notch 활성을 Dual-Luciferase Reporter assay System을 이용하여 측정하였다. 처리 조건 마다 플라스미드 transfection 효율이 달라질 수 있으므로 Notch binding-luciferase reporter 플라스미드와 같이 transfection한 Renilla 유전자의 발현을 internal control로 삼아 luciferase 활성을 보정하였다(luciferase activity/Renilla activity). Harmine을 2.5, 5, 10 μM 농도로 처리하였을 때 각각 33%, 59%, 67%의 Notch 활성화 억제 효과를 농도 의존적으로 나타냈다(Fig. 5A). Harmine이 Notch 신호전달체계에 관여하는 주요 단백질들의 발현을 조절하는지를 확인하기 위해 Harmine 처리 후 Jagged1과 Notch1의 단백질 발현을 분석하였다. MDA-MB231 세포주에 harmine 2.5, 5, 10 μM 농도로 48시간 동안 처리하였을 때 harmine이 Jagged1 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고 Notch1의 발현은 10 μM 농도에서 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 이 때 GAPDH 단백질 발현량을 internal control로 사용하였다. Fig. 5B 결과와 Notch 활성

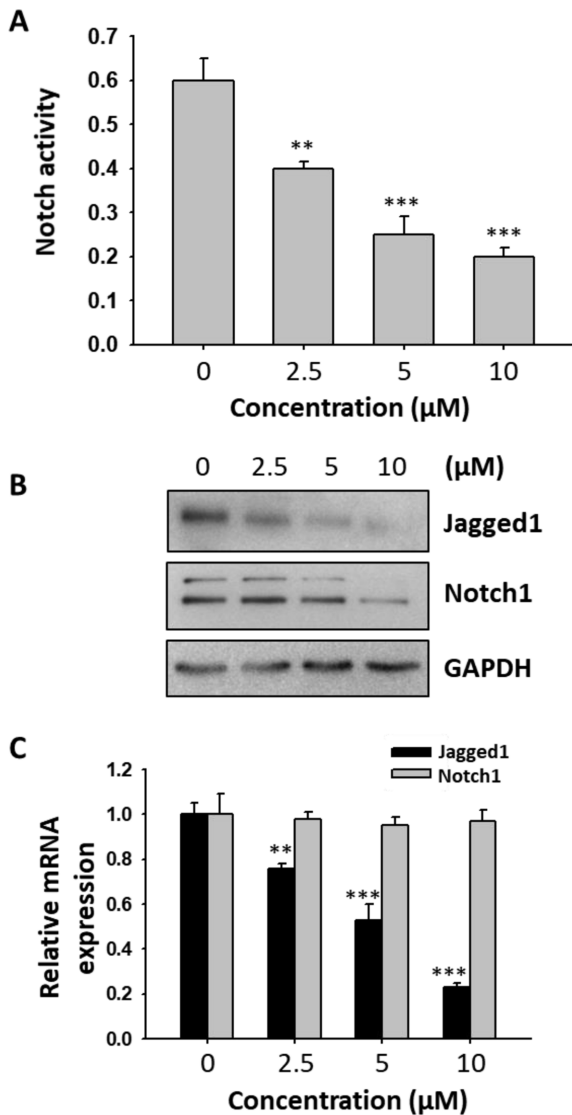


Fig. 5. Effect of harmine on Notch activity and expression of Jagged1 and Notch1 in MDA-MB231 human breast cancer cells. (A) Cells were transfected with Notch binding luciferase reporter plasmid along with Renilla as an internal control and then treated with harmine for 48 hours. Notch transcriptional activity was determined by Dual-Luciferase/Renilla Reporter Assay System. (B) Effect of harmine on the protein expression of Jagged1 and Notch1. Cells were treated with harmine for 48 hours and the level of proteins were determined by Western blotting using indicated antibodies. GAPDH was used as an internal control. (C) Effect of harmine on the mRNA expression of Jagged1 and Notch1. Cells were treated with harmine for 48 hours and mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR. GAPDH was used as an internal control. Data are presented as the mean±SD (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

(Fig. 5A) 결과를 비교하였을 때 harmine의 Notch 활성 억제효과는 Notch 신호전달체계의 리간드인 Jagged1의 발현

을 억제시켜서 전체적인 Notch 활성 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다. 더 나아가 harmine이 Jagged1과 Notch1의 단백질 발현을 전사수준에서 조절하는지 확인하기 위해 Jagged1과 Notch1의 mRNA 발현을 정량적 real time RCR 방법으로 평가하였다. 이 때 GAPDH mRNA 발현량을 internal control로 사용하였다. MDA-MB231 세포주에 harmine 2.5, 5, 10 μM 농도로 48시간 동안 처리하였을 때 harmine이 Jagged1 mRNA 발현을 각각 24%, 47%, 77% 농도 의존적으로 억제하였고, Notch1의 mRNA 발현에는 영향을 끼치지 않았다(Fig. 5C). 따라서 harmine이 나타내는 MDA-MB231 유방암 세포증식억제, 세포 이동성 및 침윤성 억제 효과는 Notch 신호전달체계의 리간드인 Jagged1의 mRNA 수준을 조절하여 결과적으로 단백질 발현이 억제되어 Notch 활성을 저해하는 것으로 보인다. 추후 연구로 harmine이 Jagged1의 유전자 발현에 어떻게 작용하는지, 그리고 harmine이 조절하는 신호전달체계에 대한 보다 정교한 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서 harmine의 MDA-MB231 유방암 세포증식 억제, 세포 이동성 및 침윤성 억제 효과를 분석하였고 그 기전을 조사하였다. Harmine은 MDA-MB231의 암세포증식을 농도 의존적으로 억제하였고, 세포증식에 영향을 없는 농도에서도 세포 이동성 및 침윤성에 대한 억제 효과를 나타냈다. 관련 기전으로 Notch 신호전달체계가 관여하는 것으로 나타났다. Harmine은 농도 의존적으로 Notch 활성을 억제하였으며 Notch 신호전달체계 리간드인 Jagged1의 mRNA 발현을 억제하여 그 작용을 나타냄을 보였다. 종합해 볼 때, harmine은 유방암의 암세포 증식 억제 및 전이억제 효과의 가능성을 제시하였고 유방암 및 전이 치료제 개발에 활용될 것으로 사료된다.

사사

이 논문은 2018학년도에 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었습니다.

인용문헌

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2017) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* **67**: 7-30.
2. Scully, O. J., Bay, B. -H., Yip, G. and Yu, Y. (2012) Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics and Proteomics* **9**: 311-320.
3. Massague, J. (2007) Sorting out breast-cancer gene signatures. *N. Engl. J. Med.* **356**: 294-297.

4. Geng, X., Ren, Y., Wang, F., Tian, D., Yao, X., Zhang, Y. and Tang, J. (2018) Harmines inhibit cancer cell growth through coordinated activation of apoptosis and inhibition of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**: 99-104.
5. Gao, J., Zhu, H., Wan, H., Zou, X., Ma, X. and Gao, G. (2017) Harmine suppresses the proliferation and migration of human ovarian cancer cells through inhibiting ERK/CREB pathway *Oncol. Rep.* **38**: 2927-2934.
6. Yu, X. J., Sun, K., Tang, X. H., Zhou, C. J., Sun, H., Yan, Z., Fang, L., Wu, H. W., Xie, Y. K. and Gu, B. (2016) Harmine combined with paclitaxel inhibits tumor proliferation and induces apoptosis through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *Oncol. Lett.* **12**: 983-988.
7. Ruan, S., Jia, F. and Li, J. (2017) Potential antitumor effect of harmine in the treatment of thyroid cancer. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2017**: 9402615.
8. Yochum, Z. A., Cades, J., Mazzacurati, L., Neumann, N. M., Khetarpal, S. K., Chatterjee, S., Wang, H., Attar, M. A., Huang, E. H., Chatley, S. N., Nugent, K., Somasundaram, A., Engh, J. A., Ewald, A. J., Cho, Y. J., Rudin, C. M., Tran, P. T. and Burns, T. F. (2017) A first-in-class TWIST1 inhibitor with activity in oncogene-driven lung cancer. *Mol. Cancer Res.* **15**: 1764-1776.
9. Hashemi Sheikh Shabani, S., Seyed Hasan Tehrani, S., Rabiei, Z., Tahmasebi Enferadi, S. and Vannozi, G. P. (2015) *Peganum harmala* L.'s anti-growth effect on a breast cancer cell line. *Biotechnol. Rep. (Amst)* **8**: 138-143.
10. Daoud, A., Song, J., Xiao, F. and Shang, J. (2014) B-9-3, a novel β -carboline derivative exhibits anti-cancer activity via induction of apoptosis and inhibition of cell migration in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **724**:219-230.
11. Borggreffe, T. and Oswald, F. (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 1631-1646.
12. Miele, L. (2016) Notch signaling. *Clinical Cancer Research* **12**: 1074-1079.
13. Armstrong, F., Brunet de la Grange, P., Gerby, B., Rouyez, M. C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel A., Landman-Parker, J., Romeo, P. H., Ballerini, P. and Pflumio, F. (2009) NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* **113**: 1730-1740.
14. Garcia, A. and Kandel, J. J. (2012) Notch: A key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol. Histopathol.* **27**: 151-156.
15. Shah, D., Wyatt, D., Baker, A. T., Simms, P., Peiffer, D. S., Fernandez, M., Rakha, E., Green, A., Filipovic, A., Miele, L. and Osipo, C. (2018) Inhibition of HER2 increases JAGGED1-dependent breast cancer stem cells: role for membrane JAGGED1. *Clin. Cancer Res.* **24**: 4566-4578.
16. Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G. and Kang, Y. (2011) Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* **19**: 192-205.
17. Espinoza, I. and Miele, L. (2013) Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells. *Cancer Lett.* **341**: 41-45.
18. Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K. and Miele, L. (2013) Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Onco. Targets Ther.* **6**: 1249-1259.
19. Shao, S., Zhao, X., Zhang, X., Luo, M., Zuo, X., Huang, S., Wang, Y., Gu, S. and Zhao X. (2015) Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Mol. Cancer* **14**: 28.

(2018. 10. 29 접수; 2018. 11. 14 심사;
2018. 11. 26 게재확정)