

육계의 전립선암세포에서 YAP 활성 억제를 통한 전이 저해 효능 연구

정효원^{1#}, 김옥현², 왕조유², 김성은², 박용기^{1*}, 이현정^{2*}

1 : 동국대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 동국대학교 한의과대학 해부학교실

Inhibitory effect of Cinnamomi Cortex extract on motility of prostate cancer cells through reducing YAP activity

Hyo Won Jung^{1#}, Ok-Hyeon Kim², Tsu Yu Wang², Seong Eun Kim²,
Yong-Ki Park^{1*}, Hyun Jung Lee^{2*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University

2 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : Recently, natural bioactive components catch a major attention for their potent anticarcinogenic activity. In this study, the inhibitory effect of Cinnamomi Cortex (CC) was examined in PC3 prostate cancer cells.

Methods : The toxicity of CC extract was evaluated with cell viability and cell morphology. The activity of Yes associated protein (YAP) was tested with qRT-PCR for the target gene expression such as CTGF and AMOTL2. Western blotting was performed for the evaluation of phospho-YAP level. For cell motility analysis, cellular motility was imaged by live imaging system for 6 hr. Successive images were used for the generation of movie file. Using this movie file, cellular migration was manually tracked and analyzed using time-lapse microscope and Fiji software.

Results : Cytotoxicity of CC extract was not detected at 500 $\mu\text{g/ml}$ or below concentration. Although 500 $\mu\text{g/ml}$ of CC extract reduced CTGF and AMOTL2 gene expression as YAP target genes, it was not statistically significant (CTGF expression $P=0.0605$, AMOTL2 expression $P=0.4478$). However, phosphorylated YAP was highly enhanced by CC extract treatment, when normalized with total YAP protein expression, suggesting YAP activation was inhibited. Finally prostate cancer cell motility was markedly reduced by 500 $\mu\text{g/ml}$ of CC extract.

Conclusions : CC extract suppresses cancer cell motility and migration ability through inhibiting YAP activation without prostate cancer cell death, suggesting that this herb might be effective therapeutic drug for prostate cancer metastasis.

Key words : *Cinnamomum cassia*, Cinnamomi Cortex, Prostate cancer cell, YAP, motility

I. 서 론

전립선암은 미국에서 남성암 중 1순위의 암이며, 암으로

인한 사망률 2위에 이르고 있는 암인데¹⁾, 서구화된 식생활습관의 변화로 한국을 포함한 아시아 국가에서도 전립선암의 발병률이 급격하게 증가하는 추세이다. 최근 혈중 전립선 특이

*Corresponding author : Yong-Ki Park, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

Hyun Jung Lee, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2646 · Fax : +82-54-770-2646 · E-mail : hyunjlee@dongguk.ac.kr

#First author : Hyo Won Jung, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju, 38066, South Korea.

· Tel : +82-54-770-2367 · Fax : +82-54-770-2647 · E-mail : tenzing2@hanmail.net

· Received : 11 April 2019 · Revised : 20 May 2019 · Accepted : 25 May 2019

항원을 이용한 진단 방법의 발전에 따라 전립선암 조기진단 비율이 높아졌음에도 불구하고, 국소 전립선암의 10-50%는 진행성 전립선암으로 발전되며²⁻⁴⁾, 결과적으로 연부조직 및 뼈로의 전이가 일어나는 것이 알려져 있다.

현재까지의 전립선암 치료요법은 주로 남성 호르몬 길항약을 포함한 수종의 약물이 전립선암 세포 사멸의 목적으로 응용되고 있으나 낮은 치료율과 항암제 자체 부작용으로 인해 치료에 어려움이 있다. 특히 전이를 동반한 전립선암세포의 경우 남성 호르몬 길항요법에 반응을 보이지만, 점차 반응을 보이는 시간이 짧아지고, 결국 호르몬 비반응성 전립선암으로 발전하게 되어 적절한 치료방법이 없는 실정이다.

최근 전립선암세포의 종양미세환경에서 암세포의 운동성을 조절하여 암전이를 주도하는 바이오마커 Yes associated protein (YAP) 이 보고되었다⁵⁾. YAP은 Hippo signaling 을 매개하는 중요한 인자로 Hippo signaling은 세포 증식 및 조직 항상성에 관여하며, 접촉억제를 통해 세포의 증식과 사멸을 제어하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 조절 기전에 비정상적 변화가 일어날 경우 암을 유발하는 것으로 보고되어 있어 암 치료에 중요한 기전으로 여겨지고 있다⁶⁾.

전립선암의 원인은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 최근 남성호르몬의 과다사용과 고지방 식품 복용이 전립선암에 걸릴 확률을 높인다고 보고되었다⁷⁾. 따라서 전립선암의 위험요인인 지방 축적과 대사장애를 개선시킴으로서 전립선암을 예방하거나 치료할 수 있을 것이라 사료되어 고지방 육류의 소화를 촉진시키고, 에너지대사를 증진시키며, 혈액순환을 촉진하는 효과가 있는 육계를 본 실험에 사용하였다^{8,9)}.

육계(肉桂)는 녹나무과(Lauraceae)에 속한 육계(*Cinnamomum cassia* Presl)의 수피(Cinnamomi Cortex)로 性味는 辛甘, 大熱하고 歸經은 腎, 脾, 膀胱으로 補元陽, 暖脾胃, 除積冷, 通血脈의 效能이 있어 寒疝症에 속하는 전립선암을 치료할 수 있다⁸⁾. 육계는 고지방 육류 소화에 도움을 주는 섬유질을 많이 함유하고 있으며, 정유성분인 신남산(cinnamic acid)과 방향 성분인 쿠마린(coumarin)을 함유하고 있다. 육계 추출물에 대한 약리효능 연구로 비만 마우스에서의 근육 에너지증진을 통한 항비만⁹⁾, 당뇨병성 근위축(muscular dystrophy) 개선¹⁰⁾, 대식세포에서의 항염증¹¹⁾ 및 항산화¹²⁾ 효과가 보고되었다. 또한 최근 육계추출물의 항암활성에 대한 연구로 폐암 세포에서의 증식 억제¹³⁾, 세포사멸 유도¹⁴⁾, 전이 억제¹⁵⁾ 및 구강암¹⁶⁾, 대장암¹⁷⁾ 세포에서의 세포사멸 유도 등이 보고되었으며, 전립선암에 대한 항암효능은 아직까지 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 인체 전립선암세포주인 PC3 세포(PC3 세포)를 이용하여 육계추출물의 전립선암세포 전이에 대한 억제 효능을 확인하였으며, 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용된 육계(Cinnamomi Cortex, CC)는 광명당 제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입한 뒤 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 정선하여 추출물 제조에 사용

하였다.

2. 약재 추출 및 준비

육계추출물(Cinnamomi Cortex, CC)은 육계 200g에 정수된 물 2L를 넣고 95℃에서 3시간동안 1차 추출한 후 같은 비율로 2차 추출을 실시하였다. 추출물은 1호 와트만 거름종이(Whatman paper filter No.1)로 거르고, 회전식 감압농축기(rotary evaporator)를 이용하여 농축한 후 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 이때 수율은 6.7%였다. 육계추출물(CC)은 냉장 보관하면서 실험 전 생리식염수에 적정 농도로 완전 용해시킨 후 주사기용 필터(syringe filter, 0.45 μm)로 필터하여 사용하였다.

3. PC3 세포배양

PC3 세포는 American type culture collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare Life Sciences, Logan, USA), 1% Antibiotic-antimycotic (Thermo, Waltham, USA)이 포함된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Welgene, Gyeongsan, Korea)을 이용하여 37℃의 5% CO₂조건 하에서 배양하였다.

4. 세포생존율 측정 및 형태 관찰

96-웰 플레이트에 2 x 10⁵ cells/ml의 PC3 세포를 100 μl씩 분주하고, 세포가 90% 자랐을 때 육계추출물 250, 500, 1000 μg/ml의 농도로 24시간 또는 48시간 동안 처리하였다. Viability assay kit. (MediFab, Seoul, Korea)을 10 μl를 넣고 1시간 배양한 후 450 nm의 흡광도를 측정하였다. 대조군 그룹과 육계추출물 500 μg/ml를 24시간 처리한 그룹은 위상차 현미경을 이용하여 세포 모양의 변화를 관찰하였다.

5. 실시간유전자분석법(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

세포에 육계추출물 0, 250, 500 μg/ml을 6시간 동안 처리한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Welgene, Gyeongsan, Korea)로 2번 세척하고 RNeasy mini kit. (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RevertAid first strand cDNA synthesis kit. (Thermo, Waltham, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 1μg의 총 RNA와 5X Reaction buffer, RiboLock RNase inhibitor, 10 mM dNTP Mix, RevertAid M-MuLV RT를 섞은 후 Thermal cycler (Bio-rad, Hercules, USA)로 70℃, 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하고 합성된 cDNA를 이용하여 CTGF, AMOTL2, 18sRNA의 mRNA 유전자발현을 LightCycler 96 실시간 PCR기기 (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 확인하였다. 사용한 CTGF, AMOTL2, 18sRNA primer 염기서열은 표1과 같다.

Table 1. The sequences of qRT-PCR primer

	Primers	Sequences (5' → 3')
CTGF	Forward	CA AGG GCC TCT TCT GTG ACT
	Reverse	AC GTG CAC TGG TAC TTG CAG
AMOTL2	Forward	AT TGA GAA GCT GGA AAG CGA
	Reverse	GG TTG AAG TCT TGC AGC CTC
18s	Forward	CTT CCA CAG GAG GCC TAC AC
	Reverse	CTT CGG CCC ACA CCC TTA AT

6. Western blotting

세포에 육계추출물 0, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 12시간 동안 처리한 후 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Welgene, Gyeongsan, Korea)로 2번 세척한 후 RIPA 버퍼 (Thermo, Waltham, USA)를 이용하여 단백질을 분리하고, BCA protein assay reagent (Thermo, Waltham, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질은 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고, Nitrocellulose (NC) membrane으로 옮긴 후, 5% Skim milk와 Tween20이 함유된 Phosphate buffered saline (PBS)로 blocking하였다. 그 후 일차항체인 p-YAP (Cell signaling, Danvers, USA, 1:1000), YAP (Cell signaling, Danvers, USA, 1:1000), β -actin (SantaCruz, Dallas, USA, 1:1000)와 4°C에서 16시간 반응시키고, membrane을 Tween20이 포함된 PBST로 3번 세척한 후, 실온에서 2차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 3번 세척한 후 membrane을 ECL solution (Thermo, Waltham, USA)와 반응시켜 검출하였고, 신호강도는 Fusion solo 2M (Vilber Lourmet, Paris, France)을 이용하여 측정하였다. Phospho-YAP과 YAP의 intensity는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)로 정량하여 그래프로 표시하였다.

7. 세포 운동성 분석 시험

세포 운동성을 분석하는 방법은 본 연구자들이 이전에 발표하였던 저널에 있던 방법을 변형하여 실시하였고⁵⁾, 간단한 방법은 다음과 같다. 운동성을 정량하기 위해 각 실험군과 대조군이 들어있는 세포배양접시를 현미경 (Nikon Ti-2)에 올려놓고 위상차 이미지로 세포의 운동성을 관찰하였다. 배양접시의 특정 위치를 지정하여 이미지를 얻도록 하고, 매 3분마다 이미지를 얻어 총 6시간 관찰하여 얻어진 이미지는 수동 추적 플러그인을 포함하는 Fiji (image J; <https://imagej.net/Fiji/>)로 분석하였다. 한 field에서 얻어지는 세포는 최소 20개로 하고, 겹치지 않는 5개 이상의 독립적인 field를 지정하여 각 세포를 추적하였다. 세포를 수동으로 추적한 결과는 각 세포의 이동한 거리와 속도를 포함하며, 0.42 $\mu\text{m/pixel}$ 로 환산하여 분석하였다. 세포의 평균 이동속도와 이동 트랙은 군당 150개 세포의 결과를 정리하여 그래프화 하였다.

8. 통계처리

모든 데이터는 GraphPad Prism 8으로 통계처리 하였고, meanSEM 으로 표시하였다. 세포 운동성 분석은 unpaired t-test로 분석하였고, 세포 생존율과 유전자발현 분석은 Tukey 비교를 이용한 one-way ANOVA로 분석하였다. $P < 0.05$ 는 single asterisk (*), $P < 0.001$ 는 triple asterisks (***)로 표시하였다. 모든 실험결과는 3번 이상의 독립적인 반복실험을 통해 얻어졌다.

III. 결 과

1. 육계의 세포 독성 여부 확인

PC3 세포에서 육계추출물의 독성을 확인하기 위해 Viability assay kit, (MediFab, Seoul, Korea)를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 육계추출물의 농도는 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 24, 48 시간 동안 처리하였다. 육계추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 24시간과 48시간 모두 대조군에 비해 세포 생존율의 유의한 감소가 일어난 반면 ($p < 0.05$), 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 24시간까지 세포생존율에서 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Figure 1A). 또한 육계추출물에 의한 세포사멸이 유도되는 지 세포 외형을 통해 관찰하기 위해 현미경으로 세포의 모양을 관찰하였다. 어포토시스형 세포 사멸이 유도되는 경우 세포의 분절화 및 세포막의 수포 등이 관찰되는데¹⁸⁾, 육계추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 24시간 처리한 경우 대조군과 비교하여 세포 독성을 일으킨다고 볼 수 있는 변화가 관찰되지 않았다 (Figure 1B). 이러한 결과들로부터 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 육계추출물은 PC3 세포에 세포사멸을 일으키지 않는 것을 확인하였다. 이후 실험에서는 세포 사멸을 유도하지 않는 수준의 육계가 전립선암 운동성 및 전이에 영향을 주는 지 알아보기 위해 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실험을 지속하였다.

2.육계가 YAP 활성화에 미치는 영향

최근 YAP의 발현이 전립선암의 진행과 전이에 중요한 역할을 한다고 알려졌다⁵⁾. YAP의 활성화는 암 형성과 전이를 촉진하는데, 특히 암세포의 이동과 활동성을 크게 증가시켜 암세포 전이에 중요한 작용을 하는 것으로 알려졌다⁵⁾. 따라서 육계추출물이 YAP의 활성을 저해하는 지의 여부를 알아보기 위해 YAP의 하위인자인 CTGF와 AMOTL2 mRNA 발현을 real-time PCR을 이용하여 확인하였다. 육계추출물을 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 6시간 처리한 후 육계추출물 처리군과 대조군을 비교하였다. Figure 2A와 같이, 육계추출물을 각각 250 $\mu\text{g/ml}$ 과 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 군에서 발현되는 CTGF와 AMOTL2 mRNA 수준은 대조군과 유의미한 차이를 보이지 않았다(Figure 2A). 반면 YAP의 인산화는 육계추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리에서 대조군에 비해 1.8배 가량 증가하였고 (* $P < 0.05$), 250 $\mu\text{g/ml}$ 은 대조군에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. YAP의 인산화는 14-3-3 단백질과의 결합을 촉진하여 세포질에서 분해되어 활성화를 감소시키므로¹⁹⁾, 육계에

의한 YAP의 인산화는 YAP 활성화가 억제되었음을 의미한다(Figure 2B).

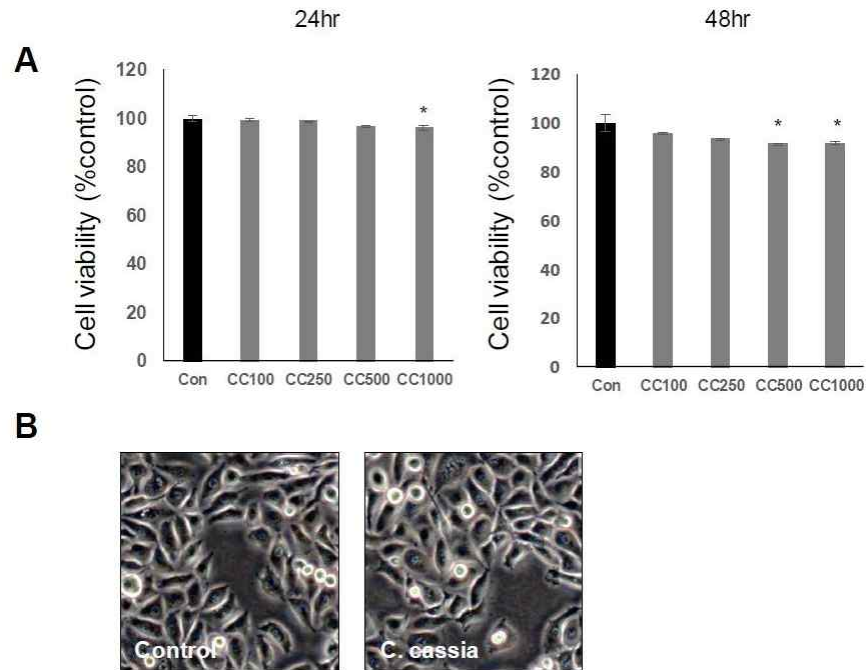


Figure 1. Effect of *C. cassia* on cell viability and morphological change of PC3 cells. (A) Cells are seeded in 96 well plate and added with *C. cassia* of indicated concentration for 24 hr or 48 hr. Cell viability is measured at 450 nm (Tukey's Multiple comparison, * $P < 0.05$). (B) Photos are taken at 24 hr after vehicle or *C. cassia*.

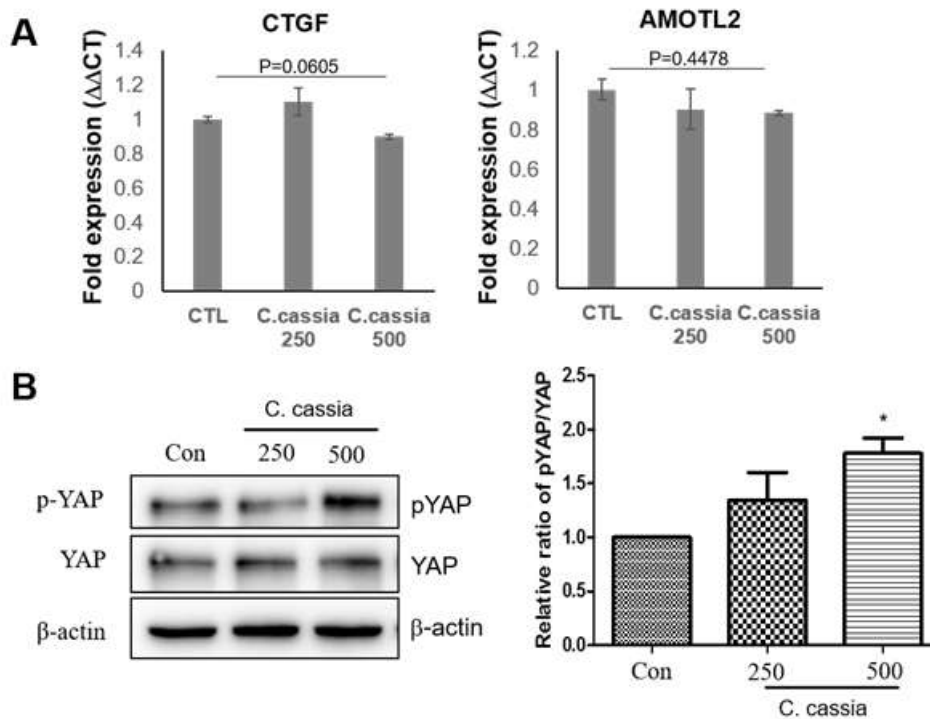


Figure 2. *C. cassia* modulates YAP activity and target genes. (A) YAP target genes, CTGF and AMOTL2 gene expression are not reduced by *C. cassia* treatment. (B) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CC increases phosphorylation of YAP on S127. Intensity of each band was quantified by Image J software (three independent sets of replicates, one way ANOVA-Tukey's, * $P < 0.05$)

3. 육계의 암 전이 운동성 저해 확인

최근 본 연구진의 연구결과에 의하면 YAP의 활성화가 전립선암세포의 전이 운동성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다⁵⁾. 앞선 결과에서 육계추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 처리군의 경우 YAP의 인산화를 통한 YAP 활성 억제가 관찰되었으므로 육계추출물이 PC3 세포의 운동성 저해를 유도할 수 있는 지 확인하였다. 육계추출물 처리군과 대조군을 함께 라이브이미징을

이용하여 실시간 세포 이동을 관찰하고 이동한 거리를 추적하여 비교하였을 때, 대조군의 경우 세포 이동 속도가 평균 1.8 $\mu\text{m}/\text{min}$ 인데 반해 500 $\mu\text{g/ml}$ 육계추출물 처리군의 경우 0.9 $\mu\text{m}/\text{min}$ 으로 큰 폭으로 운동성이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 각 세포의 이동 거리도 육계추출물에 의해 크게 감소한 것으로 보여 육계가 YAP 활성화 억제를 통해 전립선암세포의 활동성 및 이동성을 감소시킬 수 있음을 확인하였다(Figure 3A, B).

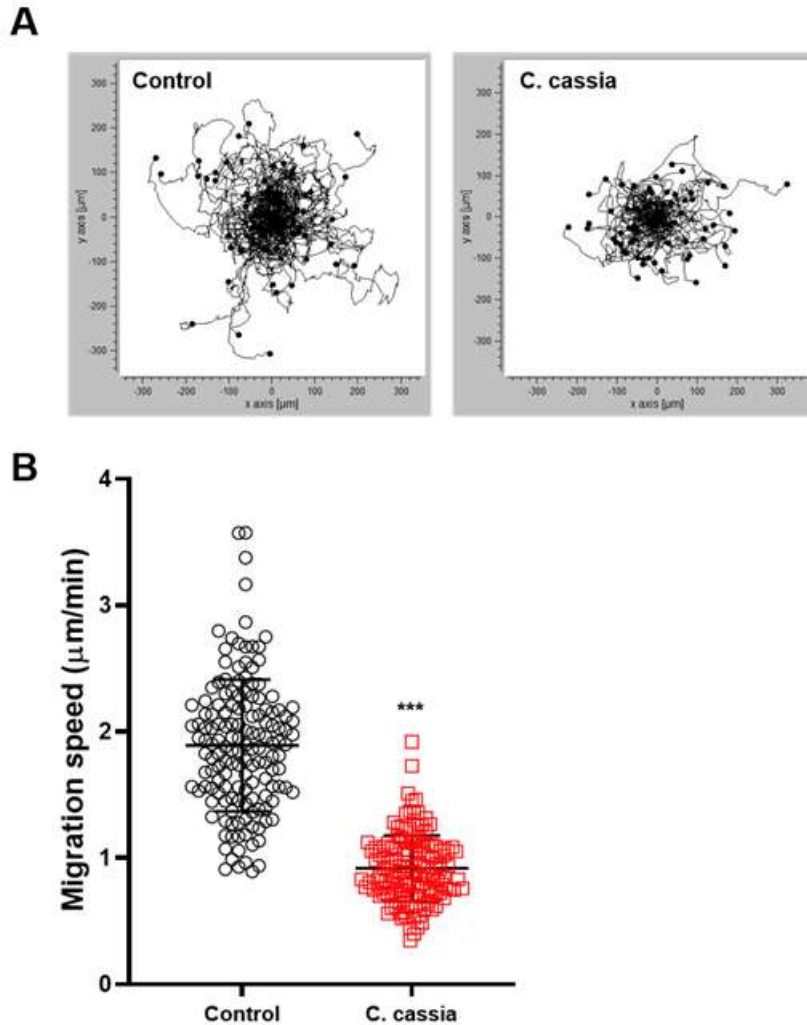


Figure 3. *C.cassia* attenuates the motility of PC3 cells through inhibiting YAP activity. (A) Migration plots depict travel path of individual cells during 6 hr of vehicle or *C.cassia* treatment. (B) Quantification of migration speed indicates that *C.cassia* treatment blocks prostate cancer cell motility (three independent sets of replicates, unpaired t-test, ***P < 0.001).

IV. 고 찰

암 환자의 주된 사망원인은 다른 기관, 조직으로의 전이이다. 특히 전립선암의 뼈와 주변 림프관으로의 전이는 전립선암의 낮은 치료율과 연관되므로 암의 성공적인 치료를 위해서는 암 전이 기전을 억제할 수 있는 약물의 개발이 필요하다²⁰⁾. 전립선암의 원인은 아직 확실하지 않으나 지방이 많이 함유된 식품을 많이 섭취하면 전립선암에 걸릴 확률이 높아진다는 보고가 있으며, 이는 체내 지방축적과 대사장애를 개선시키는 약물을 통해 전립선암을 예방 또는 치료할 수 있음을 의미한다.

암은 한의학에서 積聚으로 전립선암은 冷積 또는 寒疝症에 해당하며 본 연구에서는 除積冷하는 효능이 있는 육계의 PC3 세포에서의 전립선암전이 억제 효능을 확인하였다. 본 연구에서 육계추출물을 농도별로 PC3 세포에 대한 독성을 확인한 결과 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포독성을 보이지 않았고, 세포 외형의 변화도 관찰되지 않았다. 세포 생존율의 결과를 토대로 육계추출물의 농도를 250 $\mu\text{g/ml}$ 과 500 $\mu\text{g/ml}$ 으로 선정하고 암의 진행과 전이에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는²¹⁾ YAP의 활성화 여부에 관해 확인하였다. YAP의 하위 인자로 알려진 CTGF와 AMOTL2 mRNA 발현을 real-time PCR로

확인해보았을 때 육계추출물은 하위 인자의 발현을 억제하지 않았다. 그러나 육계추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 YAP의 인산화는 유도하면서 YAP의 활성을 억제하는 것을 알 수 있었다 (Figure 2A, B). 본 연구에서 확인한 YAP S127 부위의 인산화는 YAP의 안정성과 관련이 큰 것으로 알려져 있다. S127에 인산화가 일어난 YAP은 핵으로 이동하지 못하고 세포질에 존재하는 14-3-3 단백질과 결합을 일으켜 세포질에서 분해가 일어나는 반면 탈인산화가 일어난 YAP은 핵으로 이동하여 하위인자의 발현을 유도한다¹⁹⁾. 따라서 육계추출물에 의한 YAP S127 인산화 증가는 YAP의 핵으로의 이동을 막고, 안정성을 떨어뜨려 결과적으로 YAP 활성화를 억제하고 있음을 보여준다.

본 연구에서 육계추출물에 의해 변화가 크지 않았던 CTGF, AMOTL2의 경우 일반적으로 알려져 있는 YAP의 하위인자이지만^{22,23)}, 최근 YAP을 매개로 일어나는 암세포 운동성에서는 관련이 없는 것으로 보고되었다⁵⁾. 따라서 육계추출물에 의한 YAP의 활성화 억제는 전립선 암세포의 운동성 특이적으로 일어날 것으로 생각되며, 육계추출물에 의해 저해되는 YAP의 하위인자가 무엇인지에 대한 부분은 추후 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

육계추출물은 항염증⁹⁾, 항산화¹⁰⁾, 항비만¹¹⁾, 근육조절^{11,12)} 효능 외 황기와외의 배합을 통한 면역활성 증진²⁴⁾ 및 누에 복합 추출물의 면역활성 증진 효능²⁵⁾이 보고되었다. 또한 최근에는 다양한 항암활성이 보고되고 있으며 항암기전으로 폐암세포들(A549, H1299, BEAS-2B, LLC, 293T)에서의 pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) 활성 억제¹³⁾ 및 Nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) 발현 억제¹⁴⁾, p-focal adhesion kinase (FAK) Tyr397와 p-extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 신호기전 차단에 의한 plasminogen activator (u-PA)/matrix metalloproteinase (MMP)-2 발현 억제¹⁵⁾, 구강암세포(SASVO3)에서의 caspase-3 발현 및 오토파지 조절 유전자 (autophagic markers) 발현 증가¹⁶⁾과 대장암세포들 (HCT116, SW480, LoVo, HT-29)에서의 ROS-dependent NF- κ B/activating transcription factor (ATF3) 활성화 유도¹⁷⁾ 등이 암세포 증식이나 암 전이와 관련된 분자마커들의 조절 작용이 제시되고 있다. 본 연구에서는 육계추출물이 PC3 세포에서 암전이 인자인 YAP의 발현 억제를 통해 전립선암 전이를 막아줄 수 있음을 확인하였다.

본 연구결과에서 육계추출물이 암세포 사멸 유도 없이 암세포의 운동성을 크게 떨어뜨리는 것을 확인하였는데, 향후 관련 메커니즘의 분자적 기전을 확인하고, 동물모델에서의 전립선암 억제 효능연구도 진행하고자 한다. 이를 통해 한의학 기반 신약개발 및 기존 분야 배경 지식의 확장을 포함한 전립선암의 전이를 저해할 수 있는 소재발굴에 도움이 될 수 있을 것으로 기대한다.

V. 결 론

본 연구에서는 육계추출물의 PC3 세포에서의 전이 억제효능을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 육계추출물은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 세포독성을 보이지 않았고, 세포 생존율에 유의미한 변화를 일으키지 않았다.
2. 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 육계추출물은 암세포 운동성과 관련된 YAP의 하위 인자 발현 억제는 유도하지 않았으나 YAP 자체의 활성은 억제되었다.
3. 육계추출물을 처리한 PC3 세포의 이동 거리와 속도는 대조군에 비해 현저하게 낮아졌다.

이상의 결과는 육계추출물이 YAP 활성화 억제를 통해 전립선암세포의 운동성을 저해함으로써 암전이 가능성을 낮추어 출수 있음을 보여주는 것이며, 이는 육계추출물이 전립선암의 예방 및 치료를 위한 약물소재로 활용될 수 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 동국대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 1997 ; 47(1) : 5-27
2. Hong SJ, Chung BH, Kim JS, Lee MJ, Yoon S, Oh HY, Lee EJ, Lim HG, Buxiang S. The effects of GAC on the biochemical profiles and quality of life of metastatic prostate cancer patients. *Inv Clin Urology*. 2006 ; 47(5) : 467-74.
3. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate specific antigen-based screening. *JAMA* 1993 ; 270(8) : 948-54.
4. Epstein JI. Incidence and significance of positive margins in radical prostatectomy specimens. *Urol Clin North Am*. 1996 ; 23(4) : 651-63.
5. Lee HJ, Diaz MF, Price KM, Ozuna JA, Zhang S, Sevic-Muraca EM, Hagan JP, Wenzel PL. Fluid shear stress activates YAP1 to promote cancer cell motility. *Nat Comm*. 2017 ; 8 : 14122.
6. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev*. 2013 ; 13(4) : 246-57.
7. Hori S, Butler E, McLoughlin J. Prostate cancer and diet: food for thought? *BJU Int*. 2011 ; 107(9) : 1348-59.
8. Herbology editorial committee of Korean medicine schools. *Herbology*. Seoul : Yeonglimsa. 2016 : 380.
9. Song MY, Kang SY, Kang A, Hwang JH, Park YK, Jung HW. *Cinnamomum cassia* Prevents High-Fat

- Diet-Induced Obesity in Mice through the Increase of Muscle Energy. *Am J Chin* 2017 ; 45(5) : 1017-31.
10. Ishida T, Iizuka M, Ou Y, Morisawa S, Hirata A, Yagi Y, Jobu K, Morita Y, Miyamura M. Juzentaihoto hot water extract alleviates muscle atrophy and improves motor function in streptozotocin-induced diabetic oxidative stress mice. *J Nat Med*. 2019 ; 73(1) : 202-9.
 11. Kubo M, Ma S, Wu J, Matsuda H. Anti-inflammatory activities of 70% methanolic extract from Cinnamomi Cortex. *Biol Pharm Bull*. 1996 ; 19(8) : 1041-5.
 12. Chung JW, Kim JJ, Kim SJ. Antioxidative effects of cinnamomi cortex: A potential role of iNOS and COX-II. *Pharmacogn Mag*. 2011 ; 7(28) : 314-9.
 13. Ohnuma T, Anzai E, Suzuki Y, Shimoda M, Saito S, Nishiyama T, Ogura K, Hiratsuka A. Selective antagonization of activated Nrf2 and inhibition of cancer cell proliferation by procyanidins from Cinnamomi Cortex extract. *Arch Biochem Biophys*. 2015 ; 585 : 17-24.
 14. Lee EJ, Chung TW, Lee JH, Kim BS, Kim EY, Lee SO, Ha KT. Water-extracted branch of Cinnamomum cassia promotes lung cancer cell apoptosis by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase activity. *J Pharmacol Sci*. 2018 ; 138(2) : 146-54.
 15. Wu HC, Horng CT, Lee YL, Chen PN, Lin CY, Liao CY, Hsieh YS, Chu SC. Cinnamomum Cassia Extracts Suppress Human Lung Cancer Cells Invasion by Reducing u-PA/MMP Expression through the FAK to ERK Pathways. *Int J Med Sci*. 2018 ; 15(2) : 115-23.
 16. Yu CH, Chu SC, Yang SF, Hsieh YS, Lee CY, Chen PN. Induction of apoptotic but not autophagic cell death by Cinnamomum cassia extracts on human oral cancer cells. *J Cell Physiol*. 2019 ; 234(4) : 5289-303.
 17. Park GH, Song HM, Park SB, Son HJ, Um Y, Kim HS, Jeong JB. Cytotoxic activity of the twigs of Cinnamomum cassia through the suppression of cell proliferation and the induction of apoptosis in human colorectal cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018 ; 18(1) : 28.
 18. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Res*. 2000 ; 45(3) : 528-37.
 19. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Gen Dev*. 2007 ; 21(21) : 2747-61.
 20. Quiroz-Munoz M, Izadmehr S, Arumugam D, Wong B, Kirschenbaum A, Levine AC. Mechanisms of Osteoblastic Bone Metastasis in Prostate Cancer: Role of Prostatic Acid Phosphatase. *J Endo Soc*. 2019 ; 3(3) : 655-64.
 21. Warren JSA, Xiao Y, Lamar JM. YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer. *Cancers*. 2018 ; 10(4) : 115.
 22. Artinian N, Cloninger C, Holmes B, Benavides-Serrato A, Bashir T, Gera J. Phosphorylation of the Hippo Pathway Component AMOTL2 by the mTORC2 Kinase Promotes YAP Signaling, Resulting in Enhanced Glioblastoma Growth and Invasiveness. *J Biol Chem*. 2015 ; 290(32) : 19387-401.
 23. Nagasawa-Masuda A, Terai K. Yap/Taz transcriptional activity is essential for vascular regression via Ctgf expression and actin polymerization. *PLoS One*. 2017; 12: e0174633.
 24. Jung DY, Ha H, Lee HY, Lee NHun, Shin H. Comparative analysis on immune response of combination with Astragali Radix and Cinnamomi Cortex. *Kor J Herbol*. 2011 ; 26(4) : 187-94.
 25. Kim KJ, Park HJ, Kim IG, Kim MJ, Shin MR, Roh SS. Evaluation on immunopotential activities of combined extract of silkworm and Cinnamomum cassia in vitro. *Kor J Herbol*. 2018 ; 33 : 19-26.