

가시오가피 열매 추출물이 유방암 세포주에 미치는 영향

황종현*, 김승만*, 황귀서, 전찬용#, 강기성#
가천대학교 한의과대학

Effect of Extract of *Acanthopanax Senticosus* Fruit on Breast Cancer Cells

Jong-hyun Hwang*, Seung-man Kim*, Gwi-seo Hwang, Chan-yong Jeon#, Ki-sung Kang#
College of Korean Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objectives: *Acanthopanax senticosus* is a tree used in traditional medicine for various diseases. In this study, we investigated the anti-cancer effects of a water extract of *Acanthopanax senticosus* fruit (ASF) on 2 human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231).

Methods: The MTT assay was used to assess cell proliferation. The expression of apoptosis-related genes was assessed by quantitative real-time PCR.

Results: ASF treatment caused a dose-dependent inhibition of cell growth in both estrogen-independent MDA-MB-231 and estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells. ASF decreased mRNA expression of the apoptotic suppressor gene Bcl-xL, and increased mRNA expression of proapoptotic genes. ASF increased the mRNA expression of p21 and RIP-1 in both cell types. ASF decreased the mRNA expression of survivin in the MCF-7 cell line.

Conclusions: ASF exhibits anti-cancer activity involving apoptotic cell death.

Key words: *Acanthopanax senticosus*, breast cancer, MCF-7, MDA-MB-231

1. 서 론

유방암은 우리나라를 비롯하여 거의 모든 나라에서 여성암 중 가장 발병률이 높은 질병으로 발생률과 사망률이 급격히 증가하고 있다. 다양한 원

인들이 유방암의 원인으로 지목되고 있지만 생활 습관 등 환경적인 요인과 유전적인 요인이 큰 것으로 알려져 있다¹. 유방암은 유전자 발현 양태에 따라 일반적으로 4가지 형태로 분류되는데, 여성 호르몬인 estrogen 수용체 의존성 암(ER type)이 대부분을 차지하며, estrogen 비의존성 암으로 progesterone receptor(PR type), human epidermal growth factor receptor 2(HER2 type), 이들 3종류와 관련이 없는 triple negative breast cancer(TNBC type)이 10% 정도로 발병하는 것으로 알려져 있다². 일반적인 유방암의 치료법으로는 외과적 수술법, 화학 요법, 방사선 치료, 내분비 치료, 표적 치료 등이 표준 치료법으로 선택되고 있다. 대표적인 약물치료 선택

- 투고일: 2022.07.18, 심사일: 2022.09.29, 게재확정일: 2022.09.29
· 교신저자: 전찬용 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342
가천대학교 한의과대학
TEL: 032-770-1300 FAX: 032-764-9990
E-mail: joney@gachon.ac.kr
· 교신저자: 강기성 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342
가천대학교 한의과대학
TEL: 031-750-5402 FAX: 031-750-5424
E-mail: kkang@gachon.ac.kr
· # 공동 교신저자, * 공동 제1저자

법으로는 tamoxifen 등을 이용한 호르몬 요법³, trastuzumab 등의 표적 치료 등이 시행되고 있다⁴. 또한 TNBC 에서는 poly-ADP-ribose polymerase (PARP)에 작용하는 표적치료 약물이 개발되었다⁵.

최근 천연물 성분을 이용한 유방암 타겟 항암제 개발을 위해 apigenin, genistein, icaritin 등의 flavonoid 류와 berberine, oxymatrine 등의 alkaloid류, curcumol 등과 같은 terpenoid류, curcumin, ursolic acid, luteolin 등과 같은 polyphenol 화합물 및 유도체에 대한 항암 기전 등이 연구되고 있다⁶⁻⁹. 이는 독성이 적은 천연물 성분들의 암 세포독성 효능뿐만 아니라 면역체계 및 면역세포 활성화, 유독성 산화물질 제거, 세포 신호전달인자 조절과 암세포의 세포자사멸 (apoptosis) 유도와 관련된 유전자조절 효능 등에 대한 연구 성과와 관련이 있다고 보여진다¹⁰.

오가피는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽성 관목인 오갈피(*Acanthopanax sessiliflorum* Seem.) 또는 동속 식물의 뿌리와 줄기의 껍질을 지칭한다. 오가피와 동속 식물로 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*), 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*), 털오갈피(*Acanthopanax rufinerve*), 흰털오갈피(*Acanthopanax divaricatus*), 서울오갈피(*Acanthopanax seoulense*), 지리산오갈피(*Acanthopanax chiisanensis*) 등 14종 이상이 전국에 분포하는 것으로 보고 되었다¹¹. 오가피는辛苦溫 하여 補肝과 補腎의 효능이 있어서, 주로 뼈와 힘줄을 강건하게 하며, 사지마비, 입술경련, 척추 약화와 무릎 쇠약, 하지 무력감, 뼈 손상, 타박상, 부종 등의 치료에 주로 사용되었다¹². 오가피의 성분으로는 syringaresinol, acanthoside B, eleuthroside B, E, I, K, L, M, syringaresinoldiglucoiside, sesamin, antoside, kaempferitin, isoquercetin, kaempferol-7-rhamnoside, quercetin-7-rhamnoside, syringin, coniferin 등이 존재한다고 알려져 있다¹³. 최근 오갈피(*Acanthopanax sessiliflorus*)의 줄기와 열매에서 항암 및 면역 촉진 효능이 보고되었다^{14,15}. 가시오가피(刺五加, *Acanthopanax senticosus*)는 우리나라의 강원 일부 고산지대와 이북 지방에 자

생하며, 열매의 성분으로 eleutheroside A, B, E와 coumarin류, stigmasterol, rutin, flavonoid류 및 anthocyanin 등이 보고되었다¹⁶. 가시오가피 열매 추출물의 효능으로는 면역 증강, insulin 저항성 개선, 간의 지방 축적 억제, 혈압 강하 효능이 보고되었다^{17,18}, 암과 관련성이 있는 연구로는 항돌연변이 원성과 몇 가지 암에 대해 세포독성을 나타낸다는 결과가 있다^{19,20}.

본 논문에서는 가시오가피열매의 추출물이 estrogen 비의존성 유방암세포(MDA-MB-231)와 estrogen 의존성 유방암세포(MCF-7)의 증식 또는 사멸에 미치는 영향과 apoptosis 기전에 미치는 영향을 평가하기 위하여 관련 인자의 유전자 발현을 측정하였다.

II. 방법

1. 실험 재료

1) 시약 및 배지

DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), RPMI1640, trypan blue, Fetal Bovine Serum (FBS), Trypsin-EDTA, 및 모든 세포배양 시약은 Life Technology(Rockville, MD, USA) 회사로부터 구입해서 사용하였다. 3-4-5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), DMSO, GRIESS reagent 는 Sigma(St. Louis, MO, USA) 회사에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 세포배양용 또는 분석용 특급시약을 사용하였다.

2) 시료 제조

본 실험에 사용한 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 열매는 강원도 평창에서 2020년 9월 말에 직접 채취하여 열풍 건조시킨 후 분쇄하고, 121 °C에서 45분 간 증기 고압으로 처리하였다. 다시 건조 후 20배(w/v)의 3차 증류수를 가하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 추출된 용액은 whatman No. 1 disc paper 을 이용하여 여과하였다. 추출 여액을 rotary vacuum evaporator(Eyela, N-1000, Tokyo, Japan)로 감압

농축한 후 동결건조(EYELA, FDU-1000, Tokyo, Japan)하여 분말 시료(이하 'ASF'라고 함)를 얻었다.

2. 실험 방법

1) 세포 배양

본 실험에 사용한 인체에서 유래된 유방암 세포주인 MDA-MB-231과 MCF-7 세포와 마우스 유래 단핵구인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. MDA-MB-231과 MCF-7 세포는 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하였으며, 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 배양하였다. 세포가 배양하는 접시의 70~80% 정도를 차지할 정도로 증식되면 1 X phosphate buffered saline(PBS, PH 7.4)로 잘 세척한 다음, 0.025% Trypsin-EDTA (Life Technology, USA) 용액을 처리하고 조심스럽게 흔들어 단일 세포로 분리하고, 분리한 세포를 1×10⁶ cells/mL가 되도록 배양액에 현탁시킨 후 계대 배양하였다. 실험을 위해 세포를 seeding 한 배양용 plate well에 가시오가피 열매 추출물(ASF)를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 10 mg/mL의 농도로 미리 만든 후, 실험 시에 배양액으로 적절한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) MCF-7 및 MDA-MB-231의 proliferative activity에 미치는 영향 측정

가시오가피 열매 추출물(ASF) 처리에 따른 세포 사멸효과를 측정하기 위해서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT assay) 분석법을 이용하였다. 이는 사멸되지 않고 살아있는 세포에서 활성을 나타내는 mitochondria dehydrogenase의 작용으로 노란색 수용성 기질인 MTT가 보라색을 띠는 비수용성 formazan으로 변환되어 생성되는 formazan의 양을 측정하는 방법으로 살아있는 세포수에 비례하여 흡광도가 증가한다.

위에 기술한 대로 유방암 세포(MCF-7, MDA-MB-231)

를 plate의 well에 seeding하고 24시간 동안 5% CO₂, 37 °C 조건하에서 배양하였으며, 각 농도별로 시험물질인 ASF를 첨가하였다. ASF를 처리하고 72시간 배양한 다음, 배양된 세포에 MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시키고 생성되는 보라색 formazan을 DMSO를 첨가하는 방법으로 용해시키고, 유출된 색소를 Tecan(Austria)사의 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험물질이 포함되지 않은 희석용 배지만을 첨가한 균을 대조군으로 하고, ASF를 첨가한 시험군의 세포 증식에 미치는 효과를 대조군에 대한 %로 계산하여 표시하였다.

3) Real-time Quantitative PCR에 의한 세포사멸 관련 유전자 분석

Apoptosis를 유발하는 세포 내인성 경로는 mitochondria 막에 존재하는 Bcl-2 계열의 단백질에 의해 조절된다. 그 중 bcl-2, Bcl-xL 단백질은 apoptosis를 억제하는 기능을 나타내며, 반대로 apoptosis를 유도하는 pro-apoptotic Bcl-2 단백질은 Bax, Bad 등이 있다. Bax나 Bad의 증가는 caspase-8의 활성화를 통해 caspase-9과 caspase-3를 차례로 활성화 시켜 apoptosis를 유발한다. 이와는 별도로 세포 주기에 관련된 p53이나 p21의 발현 증가도 세포주기를 억제하여 apoptosis를 일으킨다. 또한, RIP-1은 apoptosis를 촉진하고, survivin은 caspase 불활성화를 통해 apoptosis를 억제한다. 세포 사멸유도에 관여하는 유전자의 발현을 관찰하기 위해 가시오가피 열매 추출물(ASF)을 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 세포로부터 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA로부터 포적유전자의 mRNA를 역전사시켜 cDNA를 합성하고 SYBR-green Ex Taq(TAKARA Bio INC, Japan)에 세포사멸에 관여하는 유전자인 caspase-3, -8, -9, Bcl-2, Bcl-xL, Bad, Bax 및 p53, p21, survivin, RIP-1을 첨가하여 qPCR을 수행하였다. 모든 반응 실험은 3회 시행하였으며, 본 실험에 사용한 primer는 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Primer Sequence Used for PCR

p53	Sense	GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC
	Anti-Sense	CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG
p21	Sense	CTC AGA GGA GGC GCC ATG
	Anti-Sense	GGG CGG ATT AGG GCT TCC
Survivin	Sense	GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG
	Anti-Sense	GCT CCG GCC AGA GGC CTCA A
Rip1	Sense	TTT TGC ACA GCA AAG ACC TTA C
	Anti-Sense	AGC TGC TCA GAA GGT CGA TCC
Caspase-3	Sense	ATG GAG AAC ACT GAA AAC TCA
	Anti-Sense	GCT GTT TAC AAG ACC CAC GTG G
Caspase-8	Sense	GCC TGC TGA AGA TAA TCA ACG ACT AT
	Anti-Sense	TTG ATG ATC AGA CAG TAT CCC CG
Caspase-9	Sense	TGG CTT CGT TTC TGC GAA CTA
	Anti-Sense	GTT ACT GCC AGG GGA CTC GTC
Bcl-2	Sense	GCC TTT GTG GAA CTG TAC GGC
	Anti-Sense	GGC AGT AAA TAG CTG ATT CGA CGT T
Bcl-xL	Sense	CTT TGC CTA AGG CGG ATT TGA A
	Anti-Sense	AAT AGG GAT GGG CTC AAC CAG TC
Bad	Sense	GTT CCA GAT CCC AGA GTT TGA GC
	Anti-Sense	TTA AAG GAG TCC ACA AAC TCG TCA CT
Bax	Sense	GCG AGT GTC TCA AGC GCA TC
	Anti-Sense	CCA GTT GAA GTT GCC GTC AGA A

3. 통계 처리

실험 결과는 SPSS(v 12.0)을 이용하여 mean± standard deviation으로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 p<0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. ASF의 유방암 세포주의 Proliferative Activity에 미치는 영향

본 연구에서는 ER-positive 세포 종류인 MCF-7 과 ER-negative 세포 종류인 MDA-MB-231 세포에 대한 ASF의 증식에 미치는 효과를 판정하였다.

먼저 MCF-7의 세포 증식능을 12시간 간격으로 96시간까지 측정된 결과, 24시간 후 1.72배, 48시간

후 3.49배, 72시간 후 6.39배, 96시간 후 9.84배 각각 증가하였다(Fig. 1(A)). ASF를 첨가하고 72시간 후 MCF-7 세포 증식에 미치는 효과를 측정된 결과, 50 ug/ml에서 약 17%, 100 ug/ml에서 약 26%, 250 ug/ml에서 약 39% 억제 효과를 나타냈다(Fig. 1(B)).

또한, MDA-MB-231의 세포 증식능을 12시간 간격으로 96시간까지 측정된 결과는 24시간 후 2.18배, 48시간 후 5.28배, 72시간 후 10.28배, 96시간 후 11.26배 각각 증가하였다(Fig. 2(A)). ASF를 첨가하고 72시간 후 MDA-MB-231 세포 증식에 미치는 효과를 측정된 결과, 50 ug/ml에서 약 10%, 100 ug/ml에서 약 18%, 250 ug/ml에서 약 33%, 500 ug/ml에서 약 49% 억제 효과를 나타냈다(Fig. 2 (B)).

이 결과는 에스트로겐 호르몬 수용체 존재 여부와 상관없이 ASF가 유방암 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다.

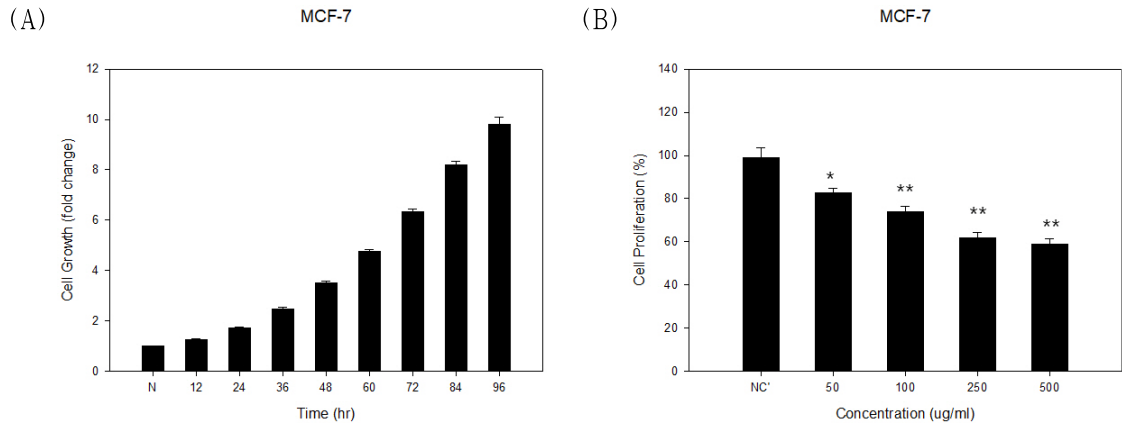


Fig. 1. Effect of ASF on cell proliferation of MCF-7 cells.

NC : normal control, 50 : 50 ug/ml of ASF, 100 : 100 ug/ml of ASF, 250 : 250 ug/ml of ASF, 500 : 500 ug/ml of ASF

* p<0.05 vs NC, ** p<0.01 vs NC

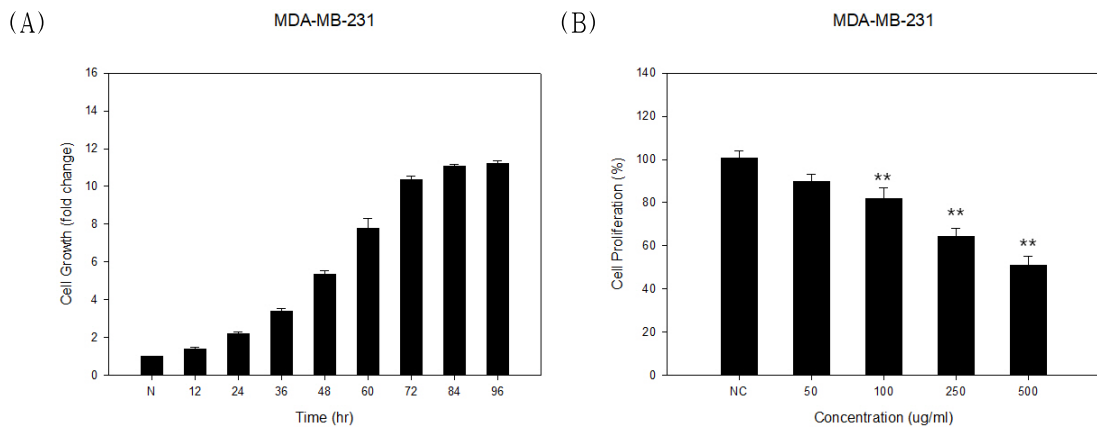


Fig. 2. Effect of ASF on cell proliferation of MDA-MB-231 Cells.

NC : normal control, 50 : 50 ug/ml of ASF, 100 : 100 ug/ml of ASF, 250 : 250 ug/ml of ASF, 500 : 500 ug/ml of ASF

** p<0.01 vs NC

가시오가피 열매 추출물이 유방암 세포주에 미치는 영향

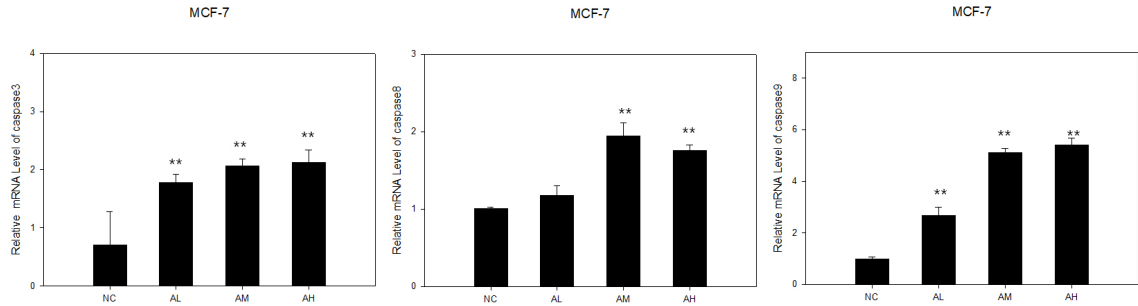


Fig. 3. Effect of ASF on caspases gene expression of MCF-7 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 50 ug/ml of ASF, AM : 150 ug/ml of ASF, AH : 300 ug/ml of ASF
 **p<0.01 vs NC

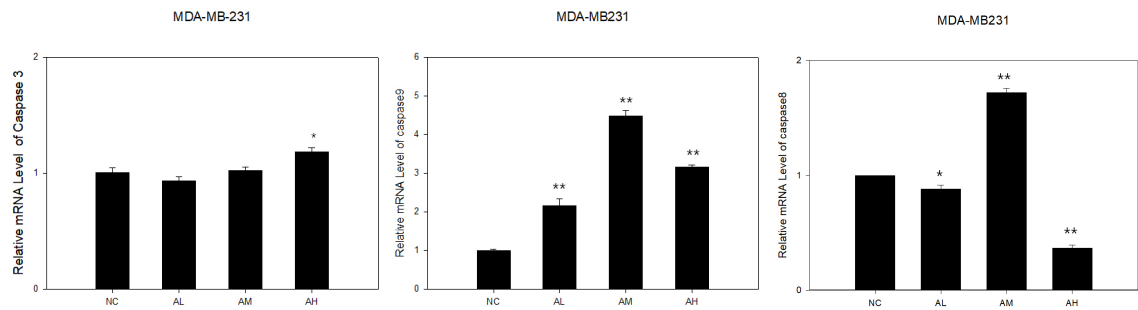


Fig. 4. Effect of ASF on caspase family gene expression of MDA-MB-231 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 100 ug/ml of ASF, AM : 200 ug/ml of ASF, AH : 400 ug/ml of ASF
 * p<0.05 vs NC, ** p<0.01 vs NC

2. ASF가 유방암 세포주 세포사멸 관련 유전자 발현에 미치는 영향

실험 결과, Fig. 5와 6에 표시된 바와 같이 ASF는 MCF-7, MDA-MB-231의 세포 사멸을 촉진하는 Bax와 Bad 유전자를 증가시켰으며, 세포사멸을 억제시키는 사멸 억제 인자인 Bcl-2나 Bcl-xL의 발현을 감소시켰다. 또한 apoptosis의 마지막 단계에서 활성화되는 caspase의 유전자 발현량을 측정

결과, Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 ASF를 처리한 MCF-7 유방암세포와 MDA-MB-231 유방암 세포의 caspase-3, caspase-8, caspase-9 유전자 발현을 증가시켰다. 또한, MCF-7에서는 survivin의 발현을 감소시키고, p21과 RIP-1을 증가시켰으며, MDA-MB-231에서 p53과 p21, RIP-1의 발현을 증가시켰다(Fig. 7, 8).

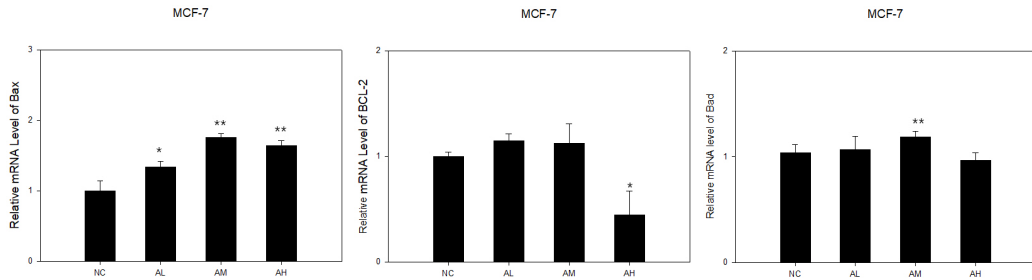


Fig. 5. Effect of ASF on Bcl family gene expression of MCF-7 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 50 µg/ml of ASF, AM : 150 µg/ml of ASF, AH : 300 µg/ml of ASF
 * p<0.05 vs NC, ** p<0.01 vs NC

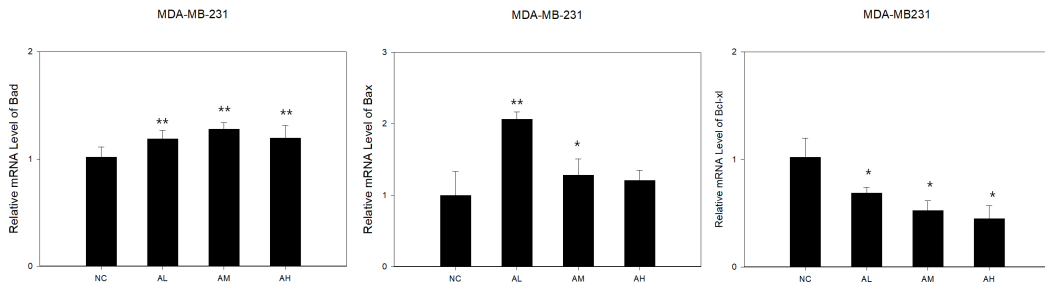


Fig. 6. Effect of ASF on Bcl family gene expression of MDA-MB-231 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 100 µg/ml of ASF, AM : 200 µg/ml of ASF, AH : 400 µg/ml of ASF
 *p<0.05, **p<0.01

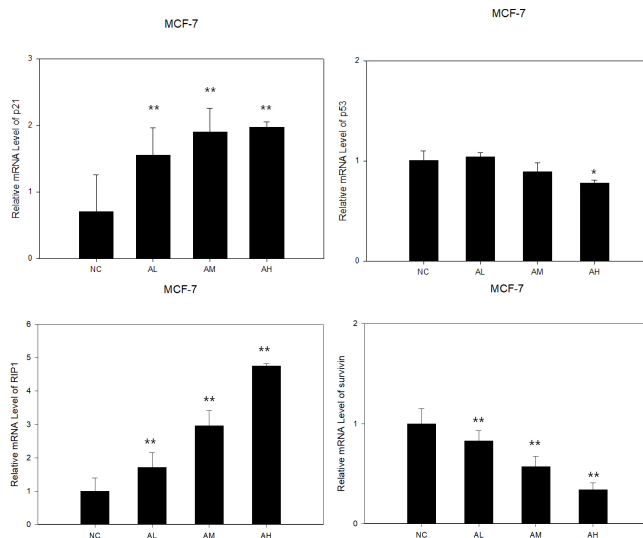


Fig. 7. Effect of ASF on apoptosis related gene expression of MCF-7 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 50 µg/ml of ASF, AM : 150 µg/ml of ASF, AH : 300 µg/ml of ASF
 *p<0.05, **p<0.01

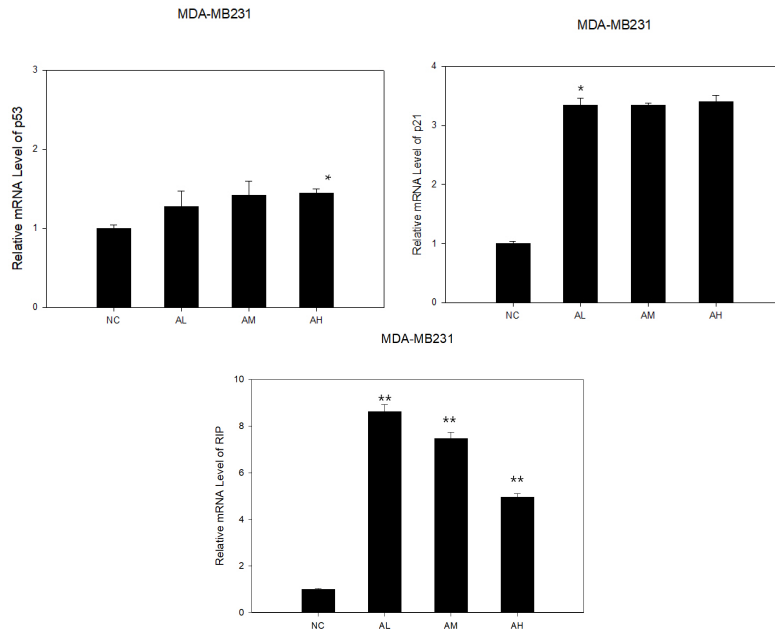


Fig. 8. Effect of ASF on apoptosis related gene expression of MDA-MB-231 breast cancer cells.

NC : normal control, AL : 100 ug/ml of ASF, AM : 200 ug/ml of ASF, AH : 400 ug/ml of ASF
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

IV. 고찰

천연물로부터 분리된 성분에서 부작용이 적으면 서도 면역 세포의 활성 증가나 직접적인 암세포 공격을 통하여 항암 효능을 나타내는 것들이 알려져 있다. 특히, 유방암 세포의 RAPP 등 특이한 부위에 작용하는 타겟 항암제로 개발된 치료제와 유사한 작용 기전을 가지는 물질들에 대한 많은 관심이 집중되고 있다. 예를 들면, 콩류와 그로부터 분리된 genistein, daidzein 등의 isoflavone 같은 구성 성분은 estrogen receptor(ER) 의존성 신호전달 체계 및 Bcl-2 계열 단백질에 영향을 주어 유방암의 증식 및 세포주기를 차단하여 억제 효과를 나타내는데 콩의 발효식품인 된장의 물 추출물에서도 같은 작용이 보고되었다²¹⁻²³. Genistein의 경우 MCF-7에서 IGF-1R/p-Akt 신호전달 과정을 불활성화시키며, Bcl-2/Bax mRNA와 단백질 발현 비

율을 감소시켜 apoptosis를 유발시키며, daidzein의 대사산물인 6,7,40-trihydroxyisoflavone은 사멸성 수용체인 DR4 발현을 증가시키고 XIAP 발현을 억제하여 PARP 분해를 유도하며, 이를 통해 cyclins과 cyclin-dependent kinases(CDKs)를 조절하여 세포주기를 S-phase와 G2/M phase에 붙잡혀 있도록 만들어 apoptosis를 유도하는 것으로 보고되었다^{22,23}. 과일류에는 flavonoid류, anthocyanin류와 같은 polyphenol 성분이 다량 함유되어 있고, 이들의 항산화작용 때문에 과일 섭취가 암 발생 위험 감소 및 환자의 생존율 증가와 상관성이 있는 것으로 알려져 있다^{24,25}. 또한, 채소류에서 검출되는 Sulforaphane(SFN), Benzyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, Indole-3-Carbinol 성분들도 유방암 세포 증식을 억제하는 것으로 알려졌다^{26,27}. 그 밖에 생강의 gingerols과 shogaols 성분, 마늘의 allicin과 유도체인 diallyl disulfide, diallyl trisulfide, S-allyl mercaptocysteine

와 black cumin의 thymoquinone 성분^{28,29}, 동충하초 추출물 및 주성분인 cordycepin 등도 실험적 유방암 세포에 효과가 있는 것으로 보고되었다³⁰.

유방암은 주로 유선 조직에 발생하는 선암의 일종으로 발병 양태에 따라 수많은 종류가 알려져 있지만, 일반적으로 유전자 발현 양태에 따라 estrogen receptor(ER), progesterone receptor(PR), human epidermal growth factor receptor 2(HER2) 의존형 형태와 이들 3종류와 관련이 없는 triple negative breast cancer(TNBC)의 4가지의 주요한 아류로 나누어진다². 따라서, 약물 치료에는 정확한 진단을 바탕으로 각기 다른 치료 약물이 적용될 필요성이 있다. 암세포의 자가사멸에는 세포 수용체 매개를 통한 신호전달계의 활성화로 발생하는 외인성 경로, 혈청 성장 인자들의 결핍이나 바이러스와 화학물질의 침투 등에 의해 발생하는 미토콘드리아에 존재하는 단백질의 작용으로 발생하는 세포 내인성 경로, ROS나 포도당 부족 또는 칼슘 항상성 파탄으로 인해 발생하는 Endoplasmic reticulum 매개형 사멸 기전으로 나눌 수 있다³¹. 세포 외인성 인자들에 의한 기전에는 세포 표면에 존재하는 수용체에 의해 촉진되는 과정으로, 포유류 세포 표면에는 최소 8종류의 세포 사멸 관련 수용체의 존재가 알려져 있다. 이들은 TNFR1, TNFR2, DcR1, DcR2, DR3, DR4, DR5 및 Fas 수용체 등이다. 이중 Fas는 APO-1이라고도 불리는 가장 잘 알려진 외인성 세포막 수용체 단백질로 apoptotic 반응에 중요한 세포 신호전달 과정에 관여하는데, 이를 활성화시키는 Fas-ligand(FasL)로는 TRAIL, TNF α , anti-APO-1 등이 있다³². FasL에 의해 자극된 Fas는 Fas-related death domain structure protein(FADD) 형성을 통해 만들어지는 FasL-Fas-FADD death-inducing signaling complex(DISC)를 형성한다. DISC는 세포질에서 pro-caspase-8를 활성화시키고, 연이어 발생하는 caspase-9, caspase-3 등의 연속적인 활성화를 통해 apoptosis를 유발한다³³. 내인성 경로는 세포내 미토콘드리아 막에 존재하는 Bcl-2 계열의 단백질의

상호 작용의 결과로 미토콘드리아 cytochrome C의 유출로 시작되는 caspase 계열의 활성화를 통하여 나타나는 apoptosis 과정이다. 이는 각종 cytokine 수용체의 PI3K 억제, akt 활성 억제, Bcl-xL과 Bcl-2의 작용 억제와 주로 DNA 상해로부터 시작되는 p53에 의해 Bax 활성이 촉진되어 유출되는 cytochrome C에 의해 생성되는 Apaf-1 복합체에 의해 pro-caspase-9이 가수분해되어 활성화된 caspase-9으로 변화하고, 연이어 활성화되는 caspase-3의 작용을 통해 apoptosis가 이루어진다(34). 이와는 별도로 p53의 활성화는 p21의 활성증가를 통해 cyclin E, CDK2 등 세포 주기에 관여하는 단백질의 작용을 억제한다. 이를 통해 S phase에서 G2 phase 넘어가는 과정을 차단하여 암세포의 증식이 억제된다³⁵.

오가피는 Acanthopanax 속명에 속하는 식물의 껍질로 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 오래전부터 한약으로 사용되었다. 오가피 줄기 껍질 추출물의 유방암 억제 보고들이 있다. 특히, 한국에서 오가피로 약전에 등재된 오가피의 열매에서 유방암 세포를 억제하는 anthocyanin 성분이 분리되었으며¹⁵, 가시오가피 열매에서는 항암성분이 분리 보고된 바 있다²⁰. 따라서, 연구자는 가시오가피 열매 추출물도 유방암 세포 증식을 억제할 가능성이 있을 것으로 추정하였다.

실험 결과, 오가피 열매 추출물(ASF)는 estrogen 수용체 의존형 유방암 세포주인 MCF-7의 증식을 억제하였으며(Fig. 1), estrogen 수용체 비의존형 유방암 세포주인 MDA-MB-231의 증식도 함께 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이는 ASF가 estrogen 수용체 활성화 여부와 관계없이 apoptosis를 유발할 가능성을 시사한다. 따라서, ASF의 작용기전을 밝히기 위하여 유방암의 apoptosis에 관여하는 인자들의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

P53은 단백질의 phosphorylation, acetylation 및 ubiquitination와 같은 단백질 번역 후 수식과정의 주용한 타겟으로 알려져 있다. 이러한 신호는 UV

나 저산소증, 유전자 전사 차단 같은 요인에 의해 활성화될 수 있으며, 활성화된 p53에 의해 P21의 활성화와 이에 수반되는 cyclin E, CDK 2 등의 작용으로 세포 주기가 멈춰 apoptosis를 유도하거나 혈관신생이 억제되는 결과를 나타낸다³⁶. 따라서, p53과 p21의 활성 증가는 apoptosis를 유발하여 암세포 사멸을 증가시킬 수 있는 유력한 수단이 될 수 있다. ASF를 유방암 세포주에 24시간 처리한 후 측정된 실험 결과, ASF는 MCF-7 유방암 세포에서 p53 유전자 발현을 약간 억제하고 p21의 유전자 발현을 증가시켰다(Fig. 7). 또한, MDA-MB-231 유방암 세포에서는 ASF 처리에 의해 p53 및 p21 단백질의 유전자 발현을 모두 증가시켰다. 이는 p53이 p21의 활성 증가를 통해 세포주기를 억제하는 작용을 나타내며(Fig. 8). 이와는 별도로 미토콘드리아에 존재하는 proapoptotic 단백질 인자인 Bax와 Bad 활성화에 관여하여 유발되는 일련의 caspase 효소의 활성화를 통해 apoptosis를 유발할 수 있다는 보고와 일치하는 결과로 판단된다. 실제로, MCF-7 세포에서 ASF는 Bax 발현을 증가시키고 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2의 유전자 발현을 감소시킴으로써 미토콘드리아 의존적인 내인성 apoptosis 유도에도 관여하는 것으로 판단되었다(Fig. 5). 또한, MDA-MB-231 유방암 세포에서는 ASF에 의해 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-xL 발현이 억제되고 Bax 발현이 촉진되어 apoptosis가 유발되는 것으로 판단되었다(Fig. 6).

Survivin은 mitotic spindle을 조절하고 혈관 신생을 증가시켜 암세포의 화학적 내성을 키우는 대표적인 apoptosis 단백질 억제인자로 알려져 있다³⁷. 이와는 반대로 receptor interacting protein-1(RIP-1)은 apoptosis를 촉진하는 세포사멸 수용체에 결합된 serine/threonine kinase로서 외인성 신호전달을 통하여 세포 사멸을 촉진한다³⁸. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors(TRAIL-Rs or DR4/5)의 활성화를 통한 Pro-apoptotic 신호가 전달되거나 DNA를 공격하여 파괴하는 화학요법의 침투 등이 있는 경우, 암세포는 미토콘드리아에 존재하는

survivin을 유리하여 HBXIP와 XIAP를 활성화하며, 이들과 survivin이 형성한 복합체에 의해 caspase-3를 활성화시키는 caspase-9의 발현이나 활성화를 억제하여 anti-apoptotic 효과를 나타낸다³⁷. 또한, p53의 기능을 상실하게 하여 암세포의 apoptosis를 억제하기 때문에 survivin 억제제 개발은 암세포 치료의 주요한 전략이 될 수 있다. 실험 결과, ASF는 MCF-7 암세포주의 survivin 발현을 억제하여 ASF에 의해 효과적인 apoptosis를 유발하는 것으로 판단되었으나(Fig. 7), MDA-MB-231 세포주에서는 이러한 효과가 나타나지 않았다(Fig. 8). Fas(Apo-1 or CD95), TRAIL-Rs, TNFR1, DR3, DR4/5와 DR6 등의 세포 사멸 수용체에 결합한 RIP-1은 Survivin과는 반대로 NF- κ B 활성화와 caspase-8 활성화를 유발하여 일련의 caspase-9과 caspase-3의 활성을 촉진한다³⁸. 실험 결과, ASF는 MCF-7세포와 MDA-MB-231 세포에서 모두 RIP-1의 발현을 증가시켜(Fig. 7, 8), 세포 증식을 억제하는 Fig. 1 및 Fig. 2 결과와 일치하는 현상을 나타내었다. 일반적으로 세포 사멸 기전은 위에서 설명한대로 caspase-3의 작용으로 결정되는데, caspase-8과 caspase-9의 작용으로 세포 분해를 담당하는 caspase-3의 활성이 증폭된다. 실험결과, ASF는 MCF-7 유방암 세포에서 caspase-8, caspase-9, caspase-3 유전자 발현을 증가시켜 apoptosis를 증가시키는 다른 결과와 일관성을 보였다(Fig. 3). 또한, MDA-MB-231 세포에서도 MCF-7 세포에서와 같이 apoptosis에 핵심적인 역할을 하는 일련의 caspase 효소들의 유전자 발현을 증가시켜 상호 의존적인 결과를 나타내었다(Fig. 4).

이상의 결과를 바탕으로, 가시오가피 열매 추출물(ASF)은 암세포의 apoptosis에 관여하는 인자인 p53, p21, survivin, RIP-1 유전자 및 Bcl-2 계열의 단백질과 caspase-3, caspase-8, caspase-9의 유전자 발현을 조절하여 유방암 세포인 MCF-7과 MDA-MB-231의 세포 증식을 억제하는 것으로 판단된다.

V. 결 론

가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 열매 추출물(ASF)이 에스트로겐 수용체 의존성 유방암 세포주 MCF-7과 비의존성 유방암 세포주 MDA-MB-231의 증식에 미치는 영향과 apoptosis와 관련된 인자의 유전자 발현을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ASF는 유방암 세포인 MCF-7과 MDA-MB-231의 세포 증식을 억제하였다.
2. ASF는 MCF-7 세포에서 caspase-3, -8, -9의 유전자 발현을 증가시켰다.
3. ASF는 MCF-7 세포에서 Bcl-2 발현을 억제하고, Bax의 발현을 증가시켰다.
4. ASF는 MCF-7 세포에서 P21과 RIP-1의 발현을 증가시키고 survivin의 발현을 감소시켰다.
5. ASF는 MDA-MB-231 세포에서 caspase-3와 caspase-9의 발현을 증가시켰다.
6. ASF는 MDA-MB-231 세포에서 Bcl-xL의 발현을 억제시키고, Bax 발현을 증가시켰다.
7. ASF는 MDA-MB-231 세포에서 p53과 p21의 발현과 RIP-1의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 ASF는 유방암 세포인 MCF-7와 MDA-MB-231의 Apoptosis를 유도하는 인자들의 발현을 조절하여 세포 증식을 억제하는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Ataollahi MR, Sharifi J, Paknahad MR, Paknahad A. Breast cancer and associated factors: a review. *J Med Life* 2015;8(Spec Iss 4):6-11.
2. Chen JQ, Russo J. ERα-Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796(2):162-75.
3. Johnston SR. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: selective oestrogen receptor modulators and downregulators for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(3):119-30.
4. Watanabe S, Yonesaka K, Tanizaki J, Nonagase Y, Takegawa N, Haratani K, et al. Targeting of the HER2/HER3 signaling axis overcomes ligand-mediated resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Cancer Med* 2019; 8(3):1258-68.
5. Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The Landscape of Targeted Therapies in TNBC. *Cancers(Basel)* 2020;12(4):916.
6. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother* 2019;112:108612.
7. Sudhakaran M, Sardesai S, Doseff AI. Flavonoids: New Frontier for Immuno-Regulation and Breast Cancer Control. *Antioxidants (Basel)* 2019;8(4):103.
8. Dandawate PR, Subramaniam D, Jensen RA, Anant S. Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2016;40-41:192-208.
9. Jeong YS, You DE, Kang HG, Yu JH, Kim SW, Nam SJ, et al. Berberine Suppresses Fibronectin Expression through Inhibition of c-Jun Phosphorylation in Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer* 2018; 21(1):21-7.
10. Ko EY, Moon A. Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer. *J Cancer Prev* 2015;20(4):223-31.
11. Kim SY, Lee DY, Seo KH, Rho YD, Kim GW, Baek NI. Isolation and Identification of Lipids from the Fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *J*

- Appl Biol Chem* 2012;55(2):103-7.
12. 본초학편집위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2005.
 13. Huang L, Zhao H, Huang B, Zheng C, Peng W, Qin L. *Acanthopanax senticosus*: review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie* 2011;66(2):83-97.
 14. Thamizhiniyan V, Choi YW, Kim YK. The cytotoxic nature of *Acanthopanax sessiliflorus* stem bark extracts in human breast cancer cells. *Saudi J Biol Sci* 2015;22(6):752-9.
 15. Lee SJ, Hong S, Yoo SH, Kim GW. Cyanidin-3-O-sambubioside from *Acanthopanax sessiliflorus* fruit inhibits metastasis by downregulating MMP-9 in breast cancer cells MDA-MB-231. *Planta Med* 2013;79(17):1636-40.
 16. Yan Z, Liu J, Lu D, Narlawar R, Groundwater P, Li P. Two new ceramides from the fruit pulp of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms. *Nat Prod Res* 2014;28(3):144-9.
 17. Jun YY, Cui CB, Lee HJ, Moon SY, Lee DS, Ham SS. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of Extracts of *Eleutherococcus senticosus* Maxim fruits. *Korean J Food Preserv* 2003;10(3):394-400.
 18. Saito T, Nishida M, Saito M, Tanabe A, Eitsuka T, Yuan SH, et al. The fruit of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation by modulation of liver adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and lipogenic gene expression in high-fat diet-fed obese mice. *Nutr Res* 2016; 36(10):1090-7.
 19. Oh EK, Kim YJ, Park SY, Lim YN, Shin JY, Kim JY, et al. The fruit of *Acanthopanax senticosus* Harms improves arterial stiffness and blood pressure: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr Res Pract* 2020;14(4):322-33.
 20. Zhang ML, Sun YP, Liu Y, Pan J, Guan W, Li XM, et al. Five new sesquiterpenoids from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. & Maxim.) Harms. *Fitoterapia* 2021;149:104827.
 21. Seol JY, Youn YN, Koo M, Kim HJ, Choi SY. Influence of water-soluble extracts of long-term fermented doenjang on bone metabolism bioactivity and breast cancer suppression. *Food Sci Biotechnol* 2016;25(2):517-24.
 22. Chen J, Duan Y, Zhang X, Ye Y, Ge B, Chen J. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Funct* 2015;6(3):995-1000.
 23. Lee JH, Lee HJ. A daidzein metabolite, 6,7,40-trihydroxyisoflavone inhibits cellular proliferation through cell cycle arrest and apoptosis induction in MCF10CA1a human breast cancer cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2013;56:695-700.
 24. Li Y, Zhang JJ, Xu DP, Zhou T, Zhou Y, Li S, et al. Bioactivities and health benefits of wild fruits. *Int J Mol Sci* 2016;17(8):1258.
 25. Shirode AB, Kovvuru P, Chittur SV, Henning SM, Heber D, Reliene R. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks. *Mol Carcinog* 2014;53(6):458-70.
 26. Jo EH, Kim SH, Ahn NS, Park JS, Hwang JW, Lee YS, et al. Efficacy of sulfuraphane is mediated by p38 MAP kinase and caspase-7 activations in ER-positive and COX-2-expressed human breast cancer cells. *Eur J Cancer Prev* 2007;16(6):505-10.
 27. Kim SH, Sehrawat A, Singh SV. Dietary

- chemopreventative benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer stem cells in vitro and in vivo. *Cancer Prev Res* 2013;6(8):782-90.
28. Hahm ER, Singh SV. Bim contributes to phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol Carcinog* 2012;51(6):465-74.
 29. Lee CG, Lee HW, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. Allicin inhibits invasion and migration of breast cancer cells through the suppression of VCAM-1: Regulation of association between p65 and ER-alpha. *J Funct Foods* 2015;15:172-85.
 30. Lee D, Lee WY, Jung K, Kwon YS, Kim D, Hwang GS, et al. The Inhibitory Effect of Cordycepin on the Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells, and its Mechanism: An Investigation Using Network Pharmacology-Based Analysis. *Biomolecules* 2019;9(9):407.
 31. Zhang YS, Shen Q, Li J. Traditional Chinese medicine targeting apoptotic mechanisms for esophageal cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2016;37(3):295-302.
 32. Qadir AS, Stults AM, Murmann AE, Peter ME. The mechanism of how CD95/Fas activates the Type I IFN/STAT1 axis, driving cancer stemness in breast cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):1310.
 33. Stegh AH, Barnhart BC, Volkland J, Algeciras-Schimmich A, Ke N, Reed JC, et al. Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem* 2002;277(6):4351-60.
 34. Xue M, Ge Y, Yu C, Zheng Z, He X, Zhao J. Apoptosis is induced by docosahexaenoic acid in breast cancer cells via death receptor and mitochondria-mediated pathways. *Mol Med Rep* 2017;16(1):978-82.
 35. Praveenkumar E, Gurrupu N, Kolluri PK, Shivaraj, Subhashini NJP, Dokala A. Selective CDK4/6 inhibition of novel 1,2,3-triazole tethered acridinedione derivatives induces G1/S cell cycle transition arrest via Rb phosphorylation blockade in breast cancer models. *Bioorg Chem* 2021;116:105377.
 36. Du J, Sun Y, Lu YY, Lau E, Zhao M, Zhou QM, et al. Berberine and Evodiamine Act Synergistically Against Human Breast Cancer MCF-7 Cells by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Anticancer Res* 2017;37(11):6141-51.
 37. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 2008;14(16):5000-5.
 38. Zhang J, Zhang H, Li J, Rosenberg S, Zhang EC, Zhou X, et al. RIP1-mediated regulation of lymphocyte survival and death responses. *Immunol Res* 2011;51(2-3):227-36.