creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000267372

2019年 8月

석사학위논문

Hispidulin이 유방암 세포주의 epithelial-mesenchymal transition에 미치는 영향

조선대학교 대학원

식품영양학과

김현아

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Hispidulin이 유방암 세포주의 epithelial-mesenchymal transition에 미치는 영향

Effect of hispidulin on epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells

2019年 8月 23日

조선대학교 대학원

식품영양학과

김 현 아

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Hispidulin이 유방암 세포주의 epithelial-mesenchymal transition에 미치는 영향

지도교수 이 주 민

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 4월

조선대학교 대학원

식품영양학과

김 현 아

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김 현 아 의 석사학위논문을 인준함

위원장 조 선 대 학 교 교 수 장 해 춘 (印)

위 원 조 선 대 학 교 교 수 이 재 준 (印)

위 원 조 선 대 학 교 교 수 이 주 민 (印)

2019년 5월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

LIST OF TABLES ····· iii

LIST OF FIGURES ····· iv

ABSTRACT ····· v

제1장 서 론 ····· 1

제2장 연구방법 ····· 5

1. Reagent ····· 5
2. Cell culture ····· 6
3. MTS assay ····· 7
4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ····· 8
5. Western blot ····· 10
6. Confocal microscopy ····· 12
7. Wound healing migration assay ····· 13
8. Transwell migration assay ····· 14
9. 통계처리 ····· 15

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 실험결과 ····· 16

3. 1 Hispidulin이 인체 유방암 세포주에 미치는 영향 ····· 16

3. 1. A. 인체 유방암 세포의 성장에 미치는 영향 ····· 16

3. 1. B. EMT 관련 mRNA 발현 조절에 미치는 영향 ····· 18

3. 1. C. EMT 관련 단백질 발현 조절에 미치는 영향 ····· 20

3. 2. Hispidulin과 TGF-β 처리가 인체 유방암 세포주에 미치는 영향 ····· 22

3. 2. A. Hispidulin과 TGF-β 처리가 세포 성장에 미치는 영향 ····· 22

3. 2. B. Hispidulin과 TGF-β 처리가 EMT 현상에 미치는 영향 ····· 24

3. 2. C. TGF-β 신호전달체계 매개 단백질인 Smad2/3의 인산화에 미치는 영향 ····· 29

3. 3. Hispidulin과 TGF-β 처리에 의한 유방암 세포의 이동성 억제 효과 ····· 31

3. 3. A. 유방암 세포의 이동성에 미치는 영향 ····· 31

제4장 고찰 ····· 36

참 고 문 헌 ····· 41

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF TABLES

Table 1. Sequences of primers used for reverse transcription polymerase chain reaction. ····· 9

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Structure of hispidulin ····· 5
Fig. 2. Cell proliferation of hispidulin in MCF-7 and HCC38 cells ····· 17
Fig. 3. Effect of hispidulin on the EMT-related mRNA in MCF-7 and HCC38 cells ····· 19
Fig. 4. Effect of hispidulin on the EMT-related proteins in MCF-7 and HCC38 cells ····· 21
Fig. 5. Cell proliferation of hispidulin and TGF-β in MCF-7 and HCC38 cells ····· 23
Fig. 6. Effect of hispidulin and TGF-β on EMT-related proteins in MCF-7 and HCC38 cells ····· 26
Fig. 7. Immunofluorescence analysis of E-cadherin expression in MCF-7 cells ····· 27
Fig. 8. Immunofluorescence analysis of E-cadherin expression in HCC38 cells ····· 28
Fig. 9. Effect of hispidulin and TGF-β on phosphorylation of Smad2/3 in MCF-7 and HCC38 cells ····· 30
Fig. 10. Effects of hispidulin and TGF-β on the wound healing migration in MCF-7 cells ····· 32
Fig. 11. Effects of hispidulin and TGF-β on the wound healing migration in HCC38 cells ····· 33
Fig. 12. Effects of hispidulin and TGF-β on the transwell migration in MCF-7 cells ····· 34

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 13. Effects of TGF-β and hispidulin on the transwell migration in HCC38 cells ····· 35

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Effect of hispidulin on epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells.

by. Kim, Hyun a
Advisor : Prof. Lee, Joomin, Ph.D.
Dept. of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University,
Gwangju, Korea

Breast cancer is a leading cause of cancer mortality for women worldwide. However, many anti-cancer drugs have been associated with adverse outcomes. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is the conversion of epithelial cells into mesenchymal cells, which is an important mechanism of epithelial tumor progression, invasion and metastasis. Phytochemicals have been reported to interfere with a specific stage of the carcinogenic process. Herein, we investigated the effect of hispidulin, a polyphenolic flavonoid, on EMT in human breast cancer (MCF-7 and HCC38) cells. Hispidulin inhibited cell proliferation in both MCF-7 and HCC38 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Hispidulin (1.25, 2.5 μM) increased the mRNA and protein expression of E-cadherin and occludin and decreased the mRNA and protein expression of vimentin in both breast cancer cells. In addition. co-treatment with hispidulin and TGF-β up-regulated the protein of expression E-cadherin and occludin against TGF-β-induced in MCF-7 and HCC38 cells. The protein expression of vimentin in HCC38 cells were increased after TGF-β treatment, but these effects were reversed by hispidulin and TGF-β co-treatment. We also showed that hispidulin decreased TGF-β-mediated phosphorylation of Smad2/3 in MCF-7 and HCC38 cells. These results revealed that hispidulin inhibits the TGF-β-induced EMT via down-regulation of Smad2/3 signalling pathways of breast cancer cells. Findings from wound-healing and transwell migration experiments provided that hispidulin inhibits TGF-β-mediated migration in MCF-7 and HCC38 cells. These results suggested that the inhibitory effect of migration by hispidulin may be linked with the inhibition of EMT by suppression of Smad2/3 signalling pathways in breast cancer cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1장 서 론

여성에게 흔히 발병되는 암 중 하나인 유방암은 전 세계 여성의 암 관련 사망의 주요 원인이다(1). 2018년 중앙암등록본부에서 발표된 자료에 의하면 우리나라의 유방암 발병률이 2015년에는 19,301명이었으며 2016년에는 21,839명으로 증가하는 추세를 보였으며, 여성 암 유병률 1위가 2015년 갑상선암에서 2016년 유방암으로 변동되었다(2). 남성에게 유방암이 발생하는 경우도 있지만 대부분 여성에게 발병하기 때문에 유방암은 여성암이라고 할 수 있다(3).

유방암의 발병원인은 명확히 규명되지 않았지만 환경적, 유전적 요인과 그 외의 요인들이 복합적으로 영향을 미치는 것으로 추정되고 있다. 유방암을 발병시키는 입증된 요인으로는 이른 초경, 늦은 폐경, 출산 경험이 없는 경우 등 에스트로겐의 노출기간이 길어지거나, 서구화된 식단으로 인해 비만한 경우 지방세포에서 에스트로겐의 수치가 높아지면 유방암 발생위험도가 증가한다(4-5). 또한 직계가족이 유방암 환자인 경우 유방암에 걸릴 위험이 2배로 증가하였으며, *BRCA1*과 *BRCA2* 유전자의 변이가 유방암 발병을 16% 증가시킨다(6-7). 최근 유방암의 치료는 발생 연령, 암의 병리학적 특성, 환자의 심리 등을 고려하여 수술요법, 방사선치료, 항암화학요법, 내분비치료, 표적치료 등을 적용하게 된다(8). 항암치료가 끝난 유방암 환자들은 대부분 건강한 상태를 유지하며 예전의 삶을 영위할 수 있지만 신체적 후유증, 피로, 성적 장애, 폐경, 인지기능 손상, 신체의 변화로 인한 상실감과 위축, 재발에 대한 공포 등과 같은 신체적·심리적 스트레스를 경험하게 된다(9). 따라서 부작용 없는 새로운 약물의 개발은 유방암의 예방과 치료에 필수적이라고 할 수 있다.

암으로 인한 사망의 90%는 초기 발생 암 부위로부터 멀리 떨어진 곳으로의 전이에 의한 것으로 알려져 있다(10). 전이는 복잡한 과정으로 이루어져 있으며, 원발 종양에서 순환기로의 세포 배출, 혈액 순환 중 세포의 생존, 새로운 기관에서의 적응,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성장의 개시 및 유지, 전이성 종양의 혈관형성 등이 포함된다(11). 종양세포가 원발 종양을 떠나 상피조직의 특징을 상실하고 세포-세포 사이의 연결이 약해지면서 간엽 세포의 특징을 얻어 다른 조직으로 침투하여 혈액 순환을 시작하려는 초기의 단계가 epithelial-mesenchymal transition (EMT)이다(12). 조직에서 EMT는 역할에 따라 3가지로 분류되는데 제 1형은 배아발생 (embryogenesis), 낭배형성 (gastrulation), 신경능 형성 (neural crest formation)에 작용하고, 제 2형은 조직의 재생 (tissue regeneration)과 상처치유 (wound healing)에 관련되어 있으며, 제 3형은 암의 침윤 (invasion)과 전이 (metastasis)에 관여한다(13). 전이의 초기 과정에서는 초기에 발생한 종양에서 다른 조직으로 이동하기 위해 EMT가 일어나고 다른 조직으로 이동 후 분화하기 위해서는 mesenchymal-epithelial transition (MET)이 일어나게 된다(14). EMT는 세포 간의 접합 붕괴, 세포의 극성 상실, 세포의 운동성 증가 등의 특징이 있으며, 암세포가 줄기세포와 유사한 성질을 가지게 된다(15). 또한 E-cadherin, occludin, claudin 등의 epithelial marker가 감소하게 되고 N-cadherin, fibronectin, vimentin 등의 mesenchymal marker가 증가하는 것은 EMT의 기본적인 현상이다(16).

Cadherin은 세포의 표면에 존재하는 당단백질로 세포-세포 간의 유착 (Cell-Cell adhension), 세포의 형태형성 (morphogenesis), 암 등에 중요한 역할을 하며, Ca^{++}에 의존하여 adherens junction (AJs)라는 세포-세포 유착을 형성한다(17). Cadherin은 20여 가지 종류가 있으며, 일반적으로 상피세포에는 E-cadherin이 발현되고 간엽세포에서는 N-cadherin이 발현된다(18). E-cadherin 발현의 감소 또는 N-cadherin 발현의 증가는 세포의 표현형을 변화시키고 세포의 이동이 활발해지며 암세포를 둘러싼 세포 외 기질의 변화를 주어 전이와 침윤을 증가시킨다(19, 20).

종양의 EMT를 유도하는 인자로는 transforming growth factor-β (TGF-β), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF)가 있으며, 저산소

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(hypoxia) 환경에서도 EMT가 유도된다(21). 특히 TGF-β가 EMT 유도 인자로 잘 알려져 있다. TGF-β signaling은 EMT뿐만 아니라 세포분화, 세포자살, 등에도 관여하며, smad-dependent signaling와 smad-independent signaling로 나누어져 있다. Smad-dependent signaling는 Smad2/3이 인산화 되어 Smad4의 도움을 받아 핵으로 들어가 E-cadherin을 조절하고 Smad binding elements (SBE)에 결합하여 EMT를 유도하게 된다(22). Smad-independent signaling는 MAP kinase (MAPK) pathway, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway 등을 포함하며, MAPK pathway에는 ERK/tyrosine phosphorylation pathway과 JNK/p38 pathway이 있다(23).

Hispidulin (4',5,7-trihydroxyl-6-methoxyflavone)은 천연에 존재하는 페놀성 플라보노이드 화합물로, *Grindelia* argentina, *Arrabidaea* chica, *Saussurea* involucrate, *Crossostephium* chinense와 같은 식물들과 쑥속 (*Artemisia*) 그리고 배암차즈기속 (*Salvia*)에 등에 존재한다(24). 여러 연구들에서 hispidulin은 항비만 (anti-obesity), 항산화 (antioxiant), 항돌연변이 (antimutagenic), 항염증 (anti-inflammatory), 항종양 (antineoplastic) 등의 효과를 밝혀냈다(25-29). 또한 중추신경계 관련하여 hispidulin은 혈관-뇌 장벽을 넘나들며 항경련 효과가 있으며, bupivacaine에 의해 유발된 신경독성에 대한 신경보호 효과가 알려져 있다(30-31). 뿐만 아니라 hispidulin은 난소 절제술에 의한 체중 감소와 골수의 손실을 방지하며, 골다공증 방지 효과를 밝혀 골다공증 치료제로서 hispidulin의 가능성을 제시하였다 (32-33).

암세포가 정상세포에 비해 빠른 속도로 증식하는 것은 암세포의 대표적인 특징이다. 항암제 개발 초기 단계에서는 암세포를 제거하는 것이 주요 목적이었으나, 최근에는 암세포의 전이를 저해하는 것으로 변화하였다(34). EMT에 관한 연구가 이루어지면서 EMT 조절로 암의 전이를 억제할 수 있다는 사실이 밝혀졌으며, EMT 현상을 억제하는 항암제 개발의 가능성을 제시하였다.(35). 본 연구에서는 식물성 폴리페놀계

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

화합물의 일종인 hispidulin을 이용하여 인체 유방암 세포주인 MCF-7과 HCC38 세포주의 성장에 미치는 영향을 확인하고 TGF-β 처리로 유도된 EMT 작용에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

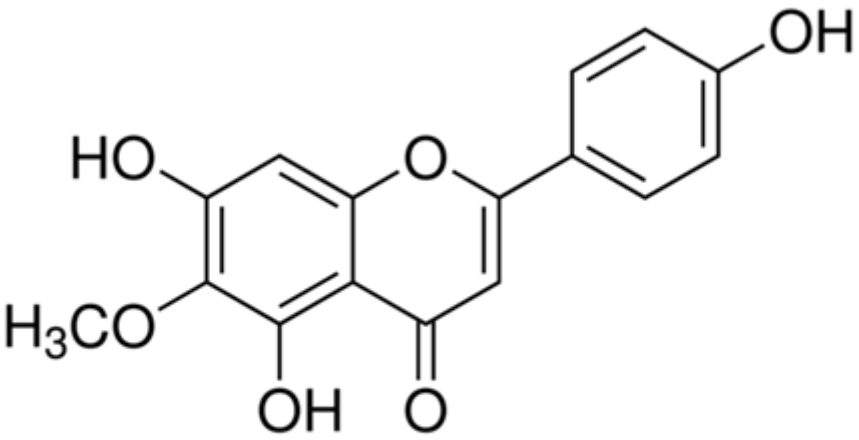
Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2장 연구방법

1. Reagent

본 실험에 사용된 hispidulin은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 40 mM 농도로 stock을 만든 후, 사용 시 농도별로 희석하여 사용하였다. Hispidulin의 구조는 Figure 1과 같다. TGF-β는 Calbiochem-EMD Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였으며 4 μg/mL 농도로 distilled water (D·W)에 녹여 stock을 만든 후 사용하였다.



Hispidulin

Fig. 1. Structure of hispidulin.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. Cell culture

본 연구에 사용된 인체 유방암세포주 estrogen receptor positive (ER+) MCF-7과 estrogen receptor negative (ER-) HCC38은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea) 으로부터 분양받아 본 실험실에서 계대배양하면서 사용하였다. MCF-7과 HCC38은 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)을 포함한 RPMI 1640 배지 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하였으며, 5% CO_2 상태가 유지되는 37℃ incubator (MCO-18AIC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

Cell stock은 액체질소에 보관하면서 사용하였으며, 세포를 배양할 경우 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 stock의 DMSO를 제거하여 배양하였다. 계대배양을 위해 media를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 washing한 뒤에 Trypsin·EDTA (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)를 처리하여 세포를 떨어뜨리고, 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 cell culture plate에 분주하여 배양하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. MTS assay

Hispidulin 처리에 의한 MCF-7과 HCC38의 성장 억제 효과를 측정하기 위하여 MTS assay를 수행하였다.

96 well plate에 MCF-7과 HCC38을 3×10^3 cells/well을 분주하여 24시간 동안 배양시켜 안정화시켰다. Hispidulin을 단독 처리한 경우 10% FBS media에 hispidulin을 농도별 (1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM)로 처리하였으며, TGF-β와 hispidulin을 동시에 처리한 경우에는 serum free media에 TGF-β (10 ng/mL)와 hispidulin (1.25, 2.5 μM)을 24시간 동안 처리하였다. 그 후, 각 well에 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) 용액 (Promega Co., CA, USA) 20 μL를 넣어 4시간 동안 반응시키면서 UV-spectrophotometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 30분 단위로 흡광도를 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Hispidulin 처리에 의한 MCF-7과 HCC38의 EMT 관련 mRNA 발현을 확인하기 위하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하였다.

60 mm dish에 5×10^5 cells/dish의 세포를 분주한 후, hispidulin을 농도별 (1.25, 2.5 μM)로 처리하였다. 24시간 뒤 배양이 끝난 세포는 RNeasy mini kit (QIAGEN, Maryland, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. RNA를 UV-spectrophotometer를 이용해 정량한 후 RNA 1 μg과 oligo dT (Bioneer, Seoul, Korea) 1 μL를 넣고 70℃에서 5분 동안 incubation하였다. 최종 volume이 20 μL가 되도록 diehtyl phosphorocyanidate (DEPC)를 채워 42℃에서 60분, 94℃에서 5분 동안 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 PCR-premix (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용해 증폭한 뒤, 2% agarose gel에서 전기영동하여 유전자의 발현을 확인하였다. House-keeping gene으로 β-actin을 사용하였으며 사용된 Primer는 Table 1과 같다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Sequences of primers used for reverse transcription polymerase chain reaction.

Gene		Primers
E-cadherin	Forward	5′-AAAGGCCCATTTCCTAAAAACCT-3′
	Reverse	5′-TGCGTTCTCTATCCAGAGGCT-3′
occludin	Forward	5′-GCAGGAAGGTCAAAGAGAACAGA-3′
	Reverse	5′-GGACTCGCCGCCAGTTG-3′
vimentin	Forward	5′-CTCTTCCAAACTTTTCCTCCC-3′
	Reverse	5′- AGTTTCGTTGATAACCTGTCC-3′
β-actin	Forward	5′-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3′
	Reverse	5′-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3′

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. Westerm blot

Hispidulin을 처리한 MCF-7과 HCC38의 EMT관련 단백질의 발현을 확인하기 위해 western blot을 실시하였다.

60 mm dish에 5×10^5 cells/well의 cell을 seeding하여 24시간 동안 배양시켰다. Hispidulin만 단독으로 처리한 경우, 24시간 동안 각각의 농도별 (1.25, 2.5 μM)로 처리한 후 사용하였다. TGF-β와 hispidulin을 같이 동시에 처리한 경우에는 각각의 세포주를 16시간 동안 serum free media에서 starvation한 뒤 TGF-β (10 ng/mL)와 hispidulin (1.25, 2.5 μM)을 처리를 하고 24시간 뒤 prep하여 실험에 사용하였다.

회수한 세포에 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor (GenDEPOT, TX, USA)가 포함된 lysis buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, Triton X-100 and 50 mM Tris HCl, pH 8.0)를 넣고 4℃에서 30분 동안 반응시킨 후 14,000rpm에서 25분간 원심분리하여 pellet을 제외한 상층액을 분리하였다. 단백질은 Bradford assay (Bio-rad, CA, USA)를 이용해 정량하였으며 Laemmli's SDS-Sample Buffer (GenDEPOT, TX, USA)에 동일한 양의 단백질을 넣고 5분간 끓여 loading sample로 사용하였다.

8~12%의 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 10~30 μg의 단백질을 2시간 30분 전기영동한 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bedford, MA, USA)에 옮겨 2시간 동안 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane은 Ponseau S solution으로 염색하여 단백질의 size를 확인하고 TBS에 0.1% Tween 20이 포함된 TBST로 washing한 후, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하였다. 5% skim milk에 희

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

석한 primary antibody는 4℃에서 overnight한 뒤에 TBST로 30분 washing하고 secondary antibody를 room temperature에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 30분 washing한 뒤 암실에서 enheanced shemiluminescence (ECL) solution (Amersham Biosciences Co., Buckinghamshire, UK)을 사용하여 X-ray film에 감광시켜 단백질의 발현을 확인하였다.

실험에 사용된 primary antibody인 β-actin, total-Smad2/3은 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnoiogy Inc., CA, USA)에서 구매하였고 phospho-Smad2/3은 Cell signaling (Cell Signaling Technology, MA, USA), vimentin은 Sigma Aldrich (St. Louis, Mo, USA), E-cadherin과 occludin은 BD science (BD, USA, NJ)에서 구매하여 사용하였다. secondary antibody인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse는 Santa Cruz에서, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit은 Cell signaling에서 구입하여 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. Confocal microscopy

Hispidulin이 인체 유방암 세포주인 MCF-7과 HCC38에서 TGF-β로 유도된 EMT 억제 효과 중 E-cadherin의 발현을 형광이미지로 관찰하였다.

12 well plate에 coverslip을 깐 뒤 1×10^5개의 세포를 seeding하고 24시간 뒤 TGF-β 10 ng/mL와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 동시에 처리하였다. 24시간 후, PBS로 2회 washing하고 4% paraformaldehyde (Biosesang, seongnam, Korea)로 1시간 동안 실온에서 고정한 후 0.5% Triton X-100 solution을 첨가해 10분 동안 반응시켰다. 1% bovine serum albumin (BSA) solution으로 1시간동안 실온에서 blocking한 뒤 primary antibody를 1% BSA에 희석하여 4℃에서 overnight하였다. PBS로 2회 washing한 후 secondary antibody를 1% BSA에 희석하여 암소에서 1시간 처리하고 PBS로 washing한 뒤에 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI) staining solution을 실온에서 15분간 처리하여 confocal 현미경 (LSM-700, Carl Zeiss Microimaging Inc., Stockholm, Sweden)을 이용해 400배율로 관찰하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. Wound healing migration assay

Hispidulin에 의한 인체 유방암 세포 (MCF-7과 HCC38)의 이동성의 억제 여부를 확인하기 위해 wound healing assay를 시행하였다.

12 well plate에 4×10^5개의 MCF-7과 HCC38 세포를 seeding하여 90~100% 정도 자라도록한 뒤, media를 제거하고 pipet tip으로 well 가운데를 긁어 wound를 만들었다. 1% FBS가 포함된 media에 TGF-β 10 ng/mL와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 처리하여 24시간 배양하였다. Media를 제거하고 PBS로 2회 washing한 뒤 methanol로 5분 동안 고정시키고 Giemsa stain solution (St. Louis, Mo, USA)으로 1시간 동안 염색하였다. 증류수로 washing하고 건조한 후 광학현미경 (CKX41, OLIMPUS Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 200배율로 관찰하고 촬영하여 Image J program (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용해 분석하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

8. Transwell migration assay

Hispidulin에 의한 인체 유방암 세포 (MCF7과 HCC38)의 이동 억제 효과를 확인하기 위해 Transwell migration assay를 시행하였다.

MCF-7과 HCC38을 serum free media를 이용하여 Transwell plate (Costar, Cambridge, MA, USA)의 upper chamber에 1×10^5 cells, TGF-β (10ng/mL)와 hispidulin (1.25, 2.5μM)을 동시에 처리하였다. Lower chamber에는 5% FBS가 포함된 media를 분주하였다. 24시간 후, 이동하지 않은 transwell chamber 위쪽의 세포들은 면봉으로 제거하고, 메탄올을 이용하여 5분 동안 세포를 고정시켰다. Hematoxylin (St. Louis, Mo, USA)을 이용하여 10분 동안 염색한 뒤 eosin (St. Louis, Mo, USA)으로 5분 염색하였다. 증류수로 washing하여 건조시키고 광학현미경을 이용하여 400배율로 사진을 촬영하여 insert 아래로 이동한 세포를 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

9. 통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 시행하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 SPSS (Statistical Package for Social Science)를 사용하였다. 그 결과를 평균 (mean)과 표준편차 (SD)로 나타내었고 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 통해 실시하였으며, 각 시료간의 통계적 유의성은 $p<0.05$ 수준에서 Tukey의 방법을 이용하여 사후검정을 실시했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 실험결과

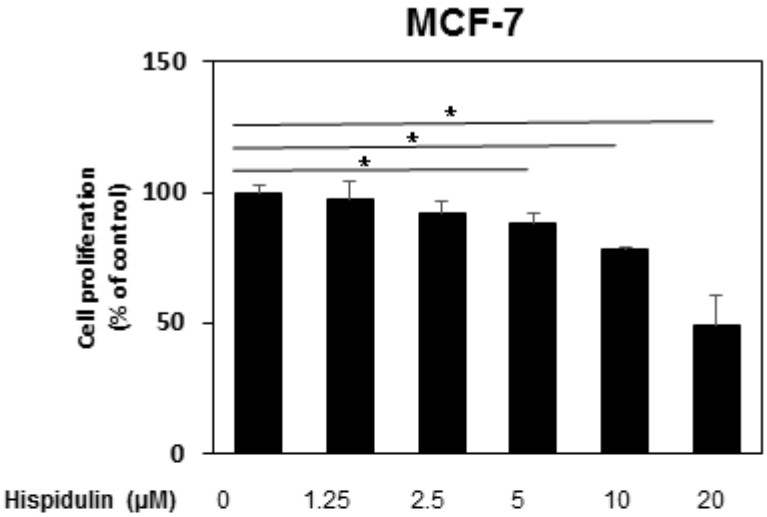
1. Hispidulin이 유방암 세포주에 미치는 영향

3. 1. A. 유방암 세포의 성장에 미치는 영향

Hispidulin이 인체유방암 세포주인 MCF-7과 HCC38에 미치는 영향을 보기위해 먼저 세포독성 유무를 MTS assay로 측정하였다. Hispidulin을 DMSO에 녹여 40 mM stock으로 만든 후 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM로 희석하여 MCF-7과 HCC38 세포주에 24시간 동안 처리하였으며, DMSO를 처리한 control을 100% 기준으로 세포 성장 억제율을 측정하였다. 그 결과는 Figure 2와 같다. MCF-7과 HCC38에 hispidulin을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μM로 처리하였을 때 MCF-7은 각각 2.6%, 7.9%, 12.2%, 21.9%, 50.6%의 세포 성장 억제율을 보였으며, HCC38은 0.9%, 1.9%, 4.9%, 9.5%, 13.2%의 세포 성장 억제율을 보였다. MCF-7과 HCC38 세포주 모두 5 μM 이상의 농도에서 세포의 성장이 유의적으로 억제되는 경향을 보였다. 따라서 약물이 세포의 독성에 영향을 미치지 않는 농도인 1.25, 2.5 μM 농도를 본 연구에 사용하기로 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



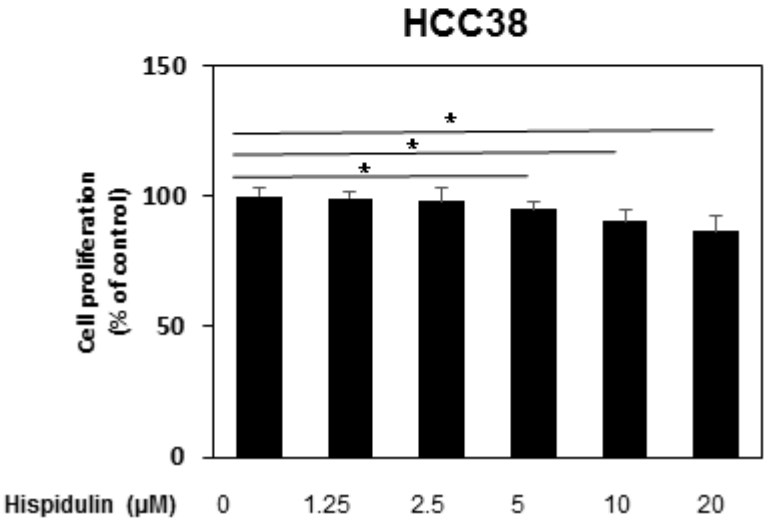


Fig. 2. Cell proliferation of MCF-7 and HCC38 breast cancer cells after treatment with the indicated concentrations of hispidulin for 24 h by a MTS assay. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 1. B. EMT 관련 mRNA 발현 조절에 미치는 영향

암세포에서 EMT 현상이 진행되면서 epithelial marker인 E-cadherin과 occludin은 감소하며, mesenchymal marker인 vimentin은 증가하는 경향을 보이게 된다(36-37). 유방암 세포주에서 hispidulin이 EMT marker의 mRNA 발현에 미치는 영향을 보기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과는 Figure 3과 같다.

MCF-7과 HCC38 유방암 세포주에 hispidulin (1.25, 2.5 μM)을 24시간 동안 처리하였으며, hispidulin을 처리하지 않은 DMSO-control과 비교하여 hispidulin 처리군의 mRNA 발현량을 분석하였다. MCF-7 세포주에 hispidulin (1.25, 2.5 μM)을 24시간 처리하였을 경우, E-cadherin과 Occludin의 mRNA 발현이 DMSO-control에 비해 유의적으로 증가하였다. HCC38 세포주에 동일 조건으로 처리한 경우 E-cadherin은 hispidulin 2.5 μM 농도에서 유의적인 증가를 보였고 occludin은 1.25, 2.5 μM에서 유의적으로 증가하였으며, vimentin은 농도가 높아질수록 유의적으로 감소하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

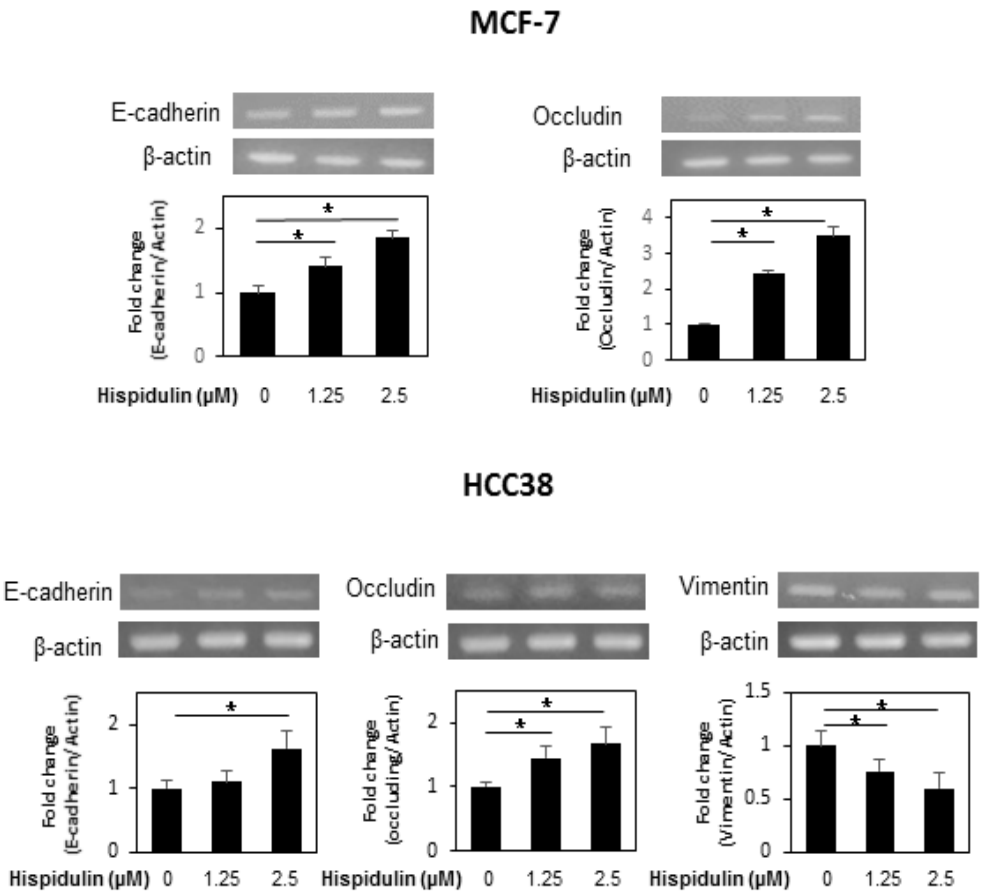


Fig. 3. Effects of hispidulin on EMT-related mRNA expression in breast cancer cells. RT-PCR analysis of E-cadherin (MCF-7 and HCC38 cells), occludin (MCF-7 and HCC38 cells) and vimentin (HCC38 cells) after treatment with 1.25 or 2.5 μM hispidulin for 24 h. Each value was normalized to β-actin as the housekeeping gene. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 2. C. EMT 관련 단백질 발현 조절에 미치는 영향

인체 유방암 세포주인 MCF-7과 HCC38에 hispidulin이 E-cadherin, occludin, vimentin의 단백질 발현에 미치는 영향을 보기 위해 western blot을 실시하였다. MCF-7과 HCC38 세포주에 각각 hispidulin을 1.25, 2.5 μM로 24시간 처리하였으며, hispidulin을 처리하지 않은 DMSO-control과 비교하여 hispidulin 처리군의 단백질 발현량을 비교하였다. 그 결과는 Figure 4와 같다.

MCF-7 세포주에 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 처리하였을 때 E-cadherin 단백질 발현은 2.5 μM 농도에서 유의적인 증가를 보였으며, occludin은 1.25, 2.5 μM에서 유의적으로 단백질 발현이 증가되었다. HCC38 세포주에 hispidulin을 1.25, 2.5 μM 처리한 경우, E-cadherin은 2.5 μM 농도에서 유의적인 증가를 보였고 occludin은 1.25, 2.5 μM 농도 모두에서 유의적인 증가를 보였으나, vimentin은 1.25, 2.5 μM 농도에서 유의적으로 감소하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

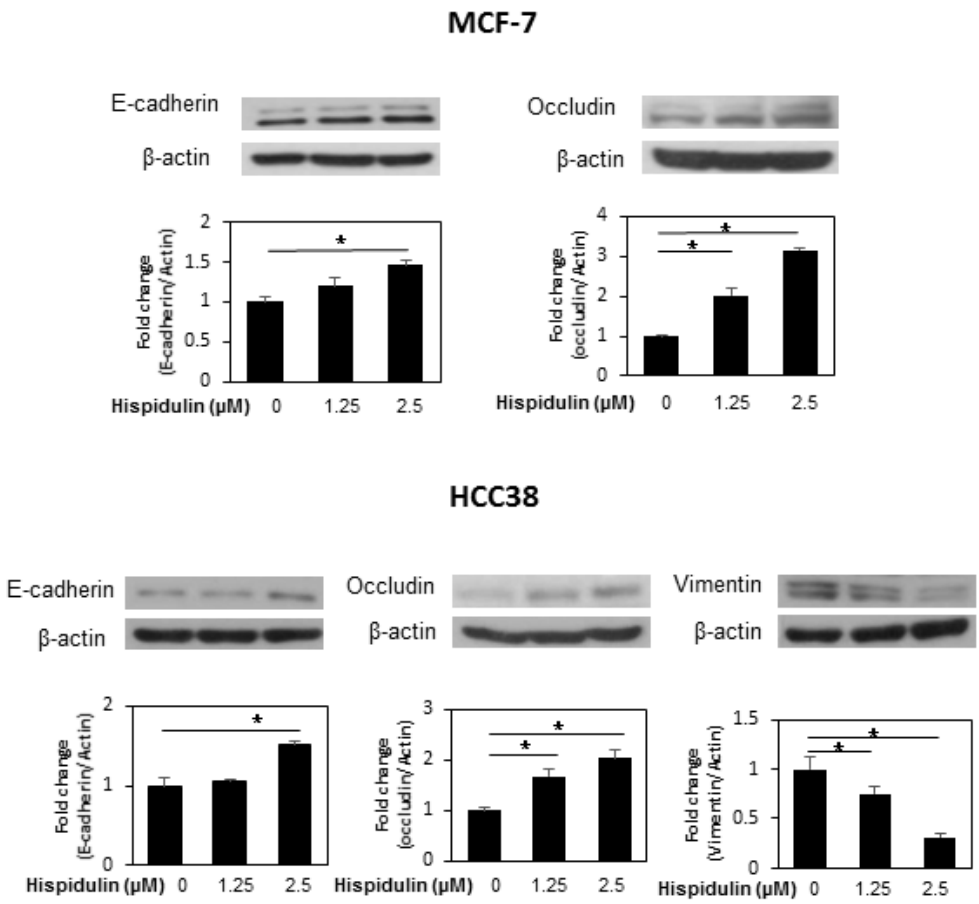


Fig. 4. Effects of hispidulin on EMT-related protein expression in breast cancer cells. Western blot analysis of E-cadherin (MCF-7 and HCC38 cells), occludin (MCF-7 and HCC38 cells) and vimentin (HCC38 cells) after treatment with 1.25 or 2.5 μM hispidulin for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 2. Hispidulin과 TGF-β 처리가 인체 유방암 세포주에 미치는 영향

3. 2. A. Hispidulin과 TGF-β 처리가 세포 성장에 미치는 영향

Hispidulin과 TGF-β를 함께 처리했을 때의 세포 생존률을 확인하기 위해 MTS assay를 시행하였다. 그 결과는 Figure 5와 같다.

MCF-7에 24시간 동안 TGF 10 ng/mL와 DMSO-control 대비 TGF-β 처리군에서 유의적인 세포 생존률의 증가를 보였으며, TGF-β와 hispidulin 2.5 μM을 같이 처리한 경우 TGF-β 단독 처리군에 비교하여 세포 생존률이 유의적으로 감소하였다. HCC38의 경우, DMSO-control 대비하여 TGF-β 처리군에서 세포 생존률이 유의적으로 증가하였다. 또한 TGF-β 단독 처리군에 대비하여 TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM 동시 처리군에서 세포 생존률의 유의적인 증가를 보였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

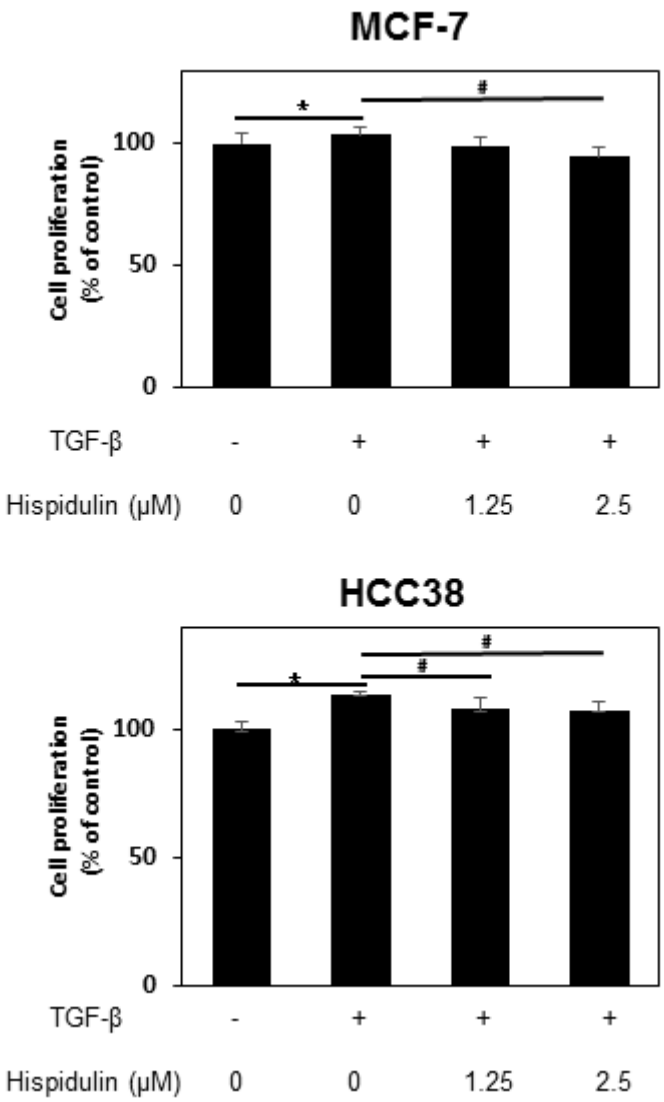


Fig. 5. Cell proliferation of MCF-7 and HCC38 breast cancer cells after treatment with the indicated concentrations of TGF-β (10 ng/mL) and hispidulin for 24 h by a MTS assay. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 2. B. Hispidulin과 TGF-β 처리가 EMT 현상에 미치는 영향

TGF-β는 정상 상피세포에서 세포의 분화와 재생 사이의 균형을 유지하는 역할을 한다(38). 하지만 암이 진행되면 TGF-β는 EMT와 신생혈관 생성을 촉진하며, 면역체계에 작용하여 암의 진행을 촉진시킨다(39).

Hispidulin이 TGF-β에 의해 유도된 EMT 효과에 미치는 영향을 알아보기 위해 TGF-β와 hispidulin (1.25, 2.5 μM)을 동시에 처리한 후 EMT 현상에 관여하는 단백질 발현을 western blot을 통해 관찰하였다. 그 결과는 Figure 6와 같다.

MCF-7 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 DMSO-control과 비교하여 E-cadherin과 occludin의 단백질 발현이 유의적으로 감소하였다. TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 동시에 처리했을 때, E-cadherin은 TGF-β 단독 처리군과 비교하여 hispidulin의 농도가 높아질수록 유의적으로 증가하였다. Occludin은 TGF-β 단독 처리군에 비해 TGF-β와 hispidulin 1.25 μM을 처리하였을 때 유의적인 증가를 보였다.

HCC38 세포주의 경우, DMSO-control과 비교하여 TGF-β를 처리하였을 때 E-cadherin의 단백질 발현이 감소하는 경향을 보였고, occludin은 유의적으로 감소하였다. 또한 TGF-β 단독 처리군에 비해 TGF-β와 hispidulin 동시 처리군에서 E-cadherin과 occludin의 단백질 발현이 모두 유의적인 증가를 보였다. Vimentin의 단백질 발현량은 TGF-β를 처리하면 DMSO-control 대비 유의적인 증가를 보였으며, TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM 동시 처리군에서 유의적으로 감소하였다.

Western blot으로 확인한 E-cadherin의 발현을 시각적으로 확인하기 위해 confocal 현미경을 이용한 형광염색을 진행하여 관찰하였다. 그 결과는 Figure 7, 8과 같다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

MCF-7과 HCC38 세포주에 TGF-β를 처리하였을 때 DMSO-control과 비교하여 E-cadherin이 감소하는 것을 관찰하였다. TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 동시에 한 경우 TGF-β 단독으로 처리한 세포에 비해 TGF-β와 hispidulin을 동시에 처리한 세포의 E-cadherin 발현이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이로 인해 hispidulin은 TGF-β에 의해 유도된 EMT 저해 효과가 있다는 사실을 증명했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

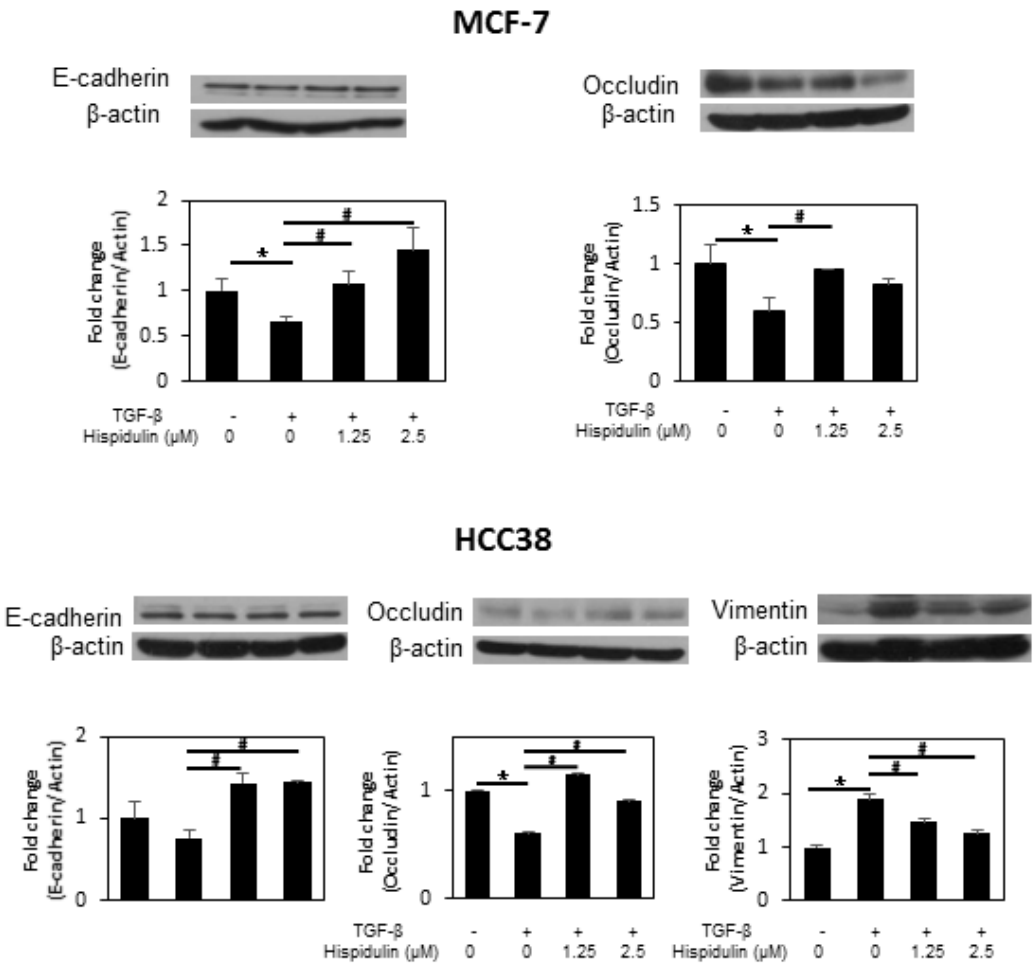


Fig. 6. Effects of hispidulin on EMT-related protein expression in breast cancer cells. Western blot analysis of E-cadherin (MCF-7 and HCC38 cells), occludin (MCF-7 and HCC38 cells) and vimentin (HCC38 cells) after treatment with TGF-β (10 ng/mL) and 1.25 or 2.5 μM hispidulin for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

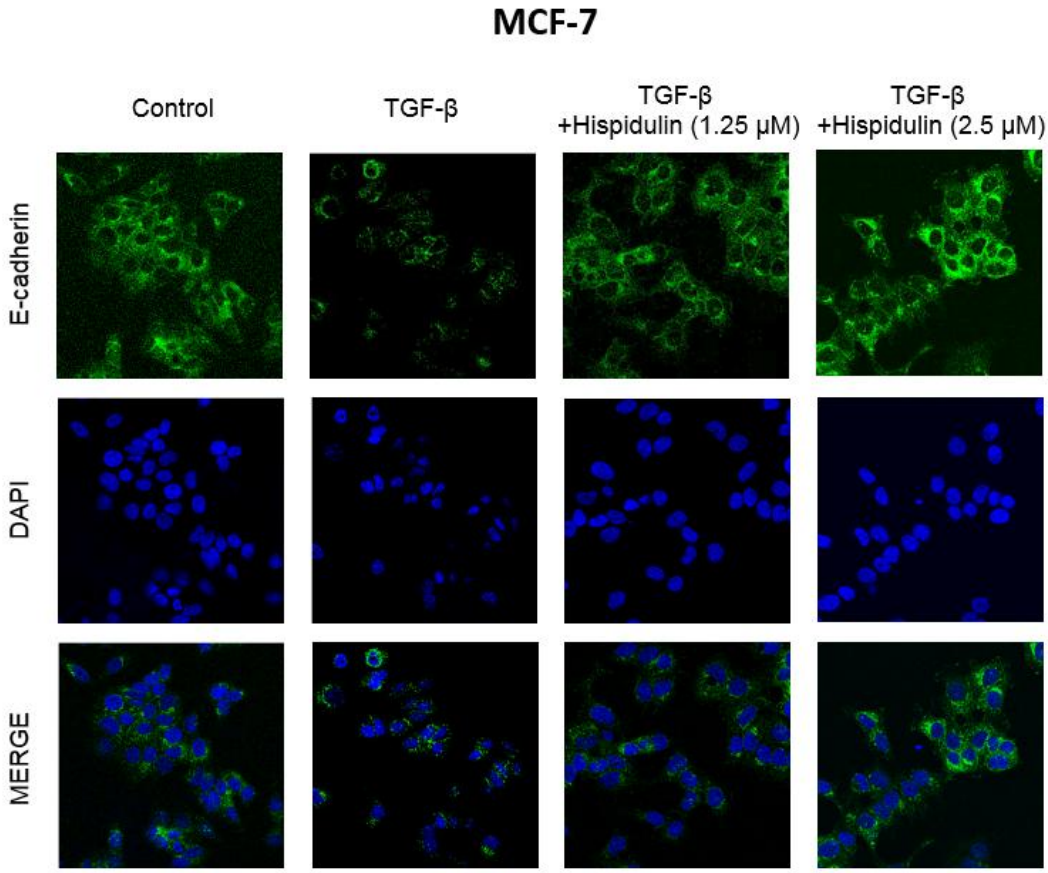


Fig. 7. Immunofluorescence analysis of E-cadherin expression in MCF-7 cells after treatment with hispidulin and TGF-β for 24 h. Similar results were obtained in three independent experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

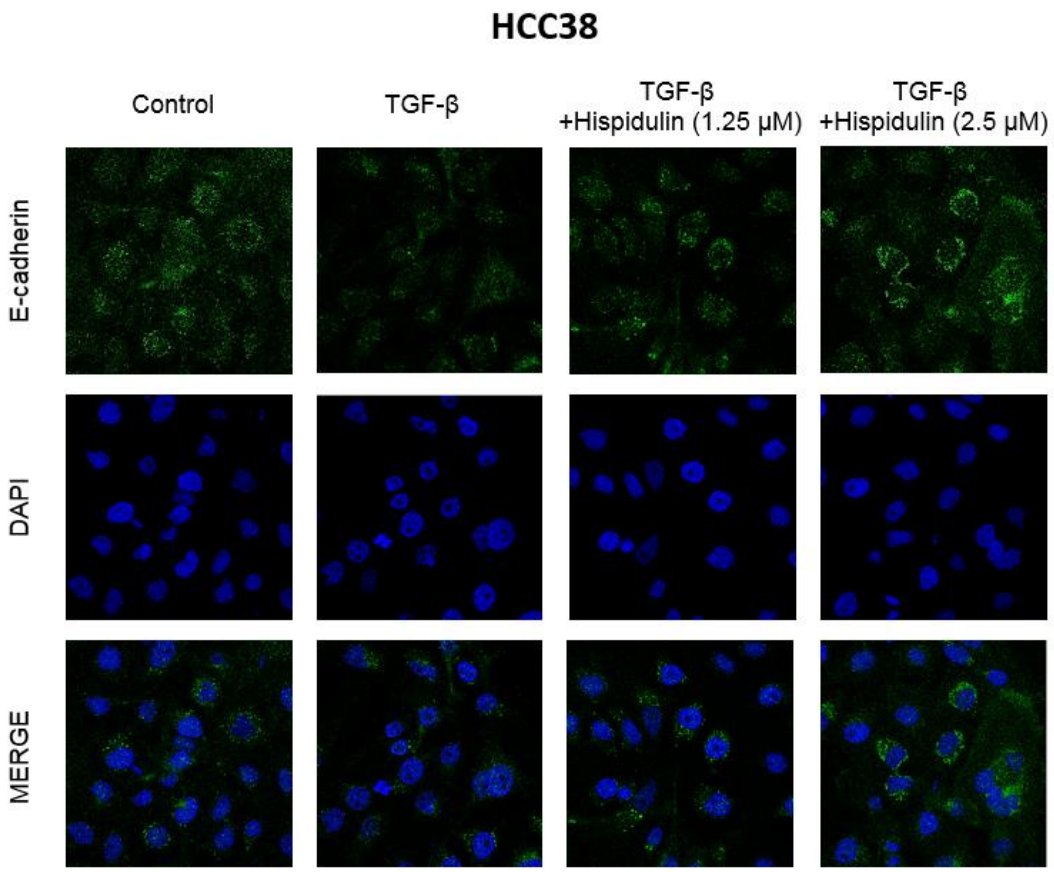


Fig. 8. Immunofluorescence analysis of E-cadherin expression in HCC38 cells after treatment with hispidulin and TGF-β for 24 h. Similar results were obtained in three independent experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 2. C. TGF-β 신호전달체계의 매개 단백질인 Smad2/3의 인산화에 미치는 영향

TGF-β는 상피세포의 EMT를 유도하며, EMT에 의해 세포의 표현형이 공격적으로 바뀌어 암세포의 증식 및 전이를 가능하게 한다(40). TGF-β에 의해 Smad2와 Smad3이 인산화되며, Smad4와 결합하여 Smad 복합체가 형성되어 핵 내로 이동해 TGF-β 관련 전사를 활성 또는 억제시킨다(41). Hispidulin이 TGF-β에 의해 유도된 Smad2/3의 인산화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과는 Figure 9와 같다.

MCF-7 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 DMOS-control과 비교하여 phospho-Smad2/3 단백질 발현량이 유의적으로 증가하였다. TGF-β 단독 처리군에 비해 TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 동시에 처리하였을 때 phospho-Smad2/3이 유의적으로 감소하였다. Total-Smad2/3의 발현량은 모든 처리군에서 비슷하게 나타났으며 유의적인 차이가 없었다.

HCC38 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 DMSO-control에 대비하여 phospho-Smad2/3이 유의적으로 증가했다. TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM 동시 처리군에서의 phospho-Smad2/3의 발현량은 TGF-β 단독 처리군과 비교하여 유의적인 증가를 보였다. Total-Smad2/3의 발현량은 모든 처리군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이로 인해 hispidulin이 TGF-β로 유도된 EMT 현상을 smad-dependent signaling을 통해 억제함을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

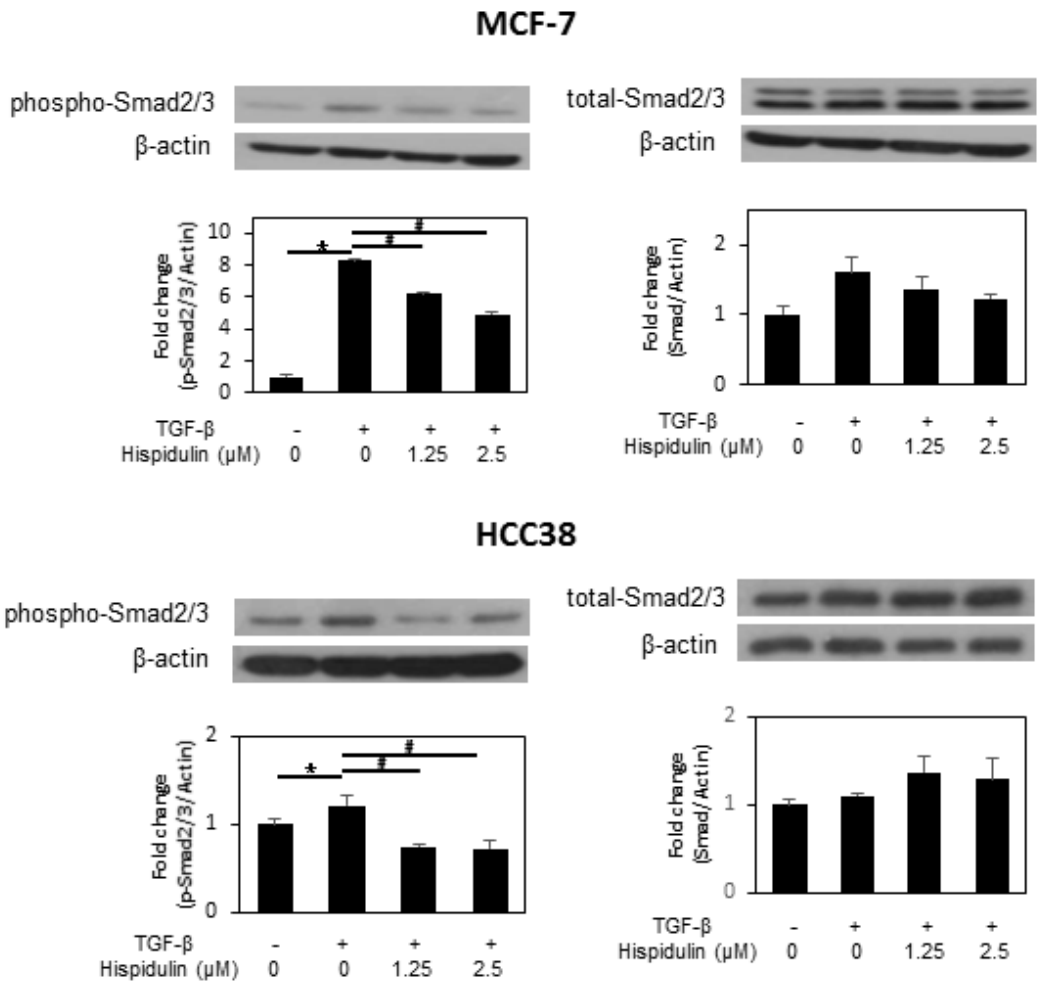


Fig. 9. Effects of hispidulin on Smad2/3 signaling protein expression in breast cancer cells. Western blot analysis of phospho-Smad2/3 and total-Smad2/3 (MCF-7 and HCC38) after treatment with TGF-β (10 ng/mL) and 1.25 or 2.5 μM hispidulin for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 3. Hispidulin의 TGF-β 처리에 의한 유방암 세포의 이동성 억제 효과

3. 3. A. 유방암 세포의 이동성에 미치는 영향

Hispidulin이 인체유방암세포인 MCF-7과 HCC38의 이동성에 미치는 영향을 wound healing assay와 transwell migration assay를 통해 알아보았다.

Hispidulin에 의한 유방암세포에서의 이동을 확인하기 위하여 wound healing assay를 실시하였으며 그 결과는 Figure 10, 11과 같다. Wound healing assay는 12 well plate에 부착시킨 세포를 pipet tip으로 길게 상처를 낸 뒤에 TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 동시에 처리하여 세포의 이동성을 확인하였다. MCF-7과 HCC38에 TGF-β를 처리한 경우 DMSO-control에 비해 wound의 면적이 유의적으로 감소되었으며, TGF-β로 인해 세포의 이동성이 증가되었다. TGF-β와 hispidulin을 농도별로 처리한 경우 TGF-β 단독 처리군에 대비하여 wound의 면적이 hidpidulin 농도 의존적으로 증가하였으며, hispidulin이 TGF-β로 인해 유도된 세포의 이동성을 감소시켰다.

Transwell migration을 수행한 결과는 Figure 12, 13과 같다. Transwell insert 안에 세포를 분주하고 TGF-β와 hispidulin 1.25, 2.5 μM을 처리하여 24시간 뒤 이동한 세포를 counting하였다. MCF-7과 HCC38 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 DMSO-control과 비교하여 이동한 세포의 수가 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있다. TGF-β 단독 처리군과 비교하여 TGF-β와 hispidulin 동시 처리군에서 이동한 세포수가 유의적으로 감소하였으며, 이는 TGF-β에 의해 증가된 세포의 이동성을 hispidulin이 억제한다는 것을 알 수 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

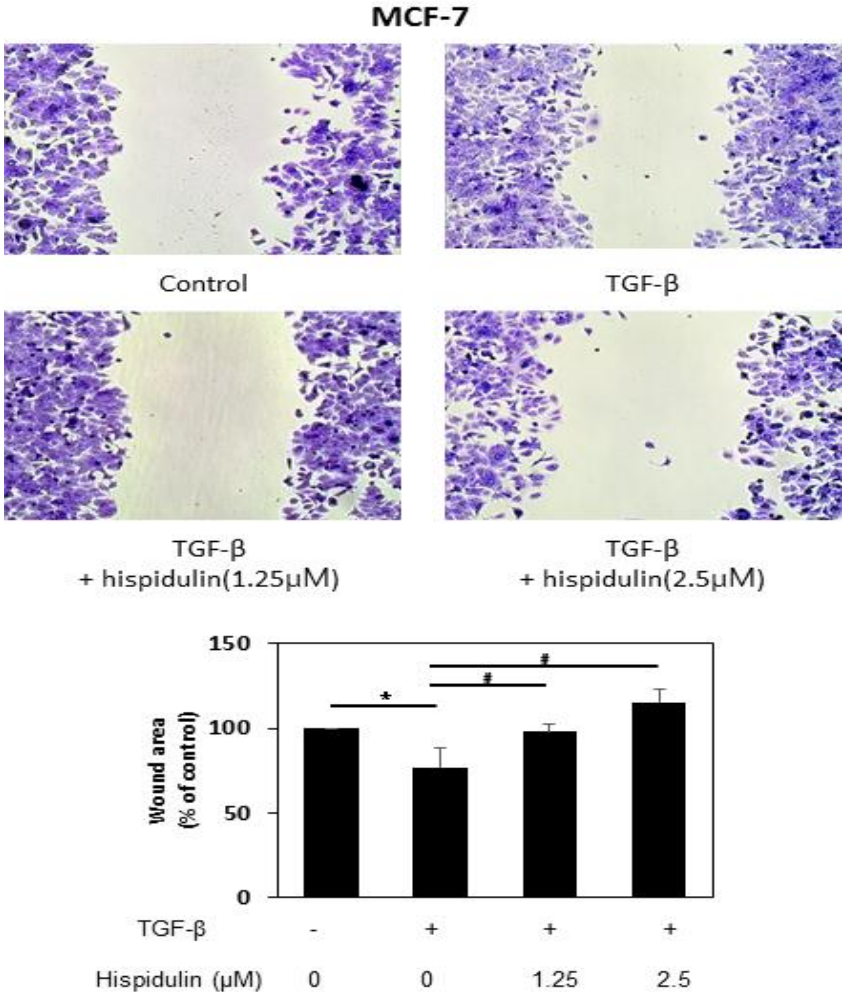


Fig. 10. Effects of hispidulin on the wound healing migration of breast cancer cell. Wound healing assay using confluent monolayers of MCF-7 cells treated with TGF-β (10 ng/mL) and hispidulin 1.25, 2.5 μM for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

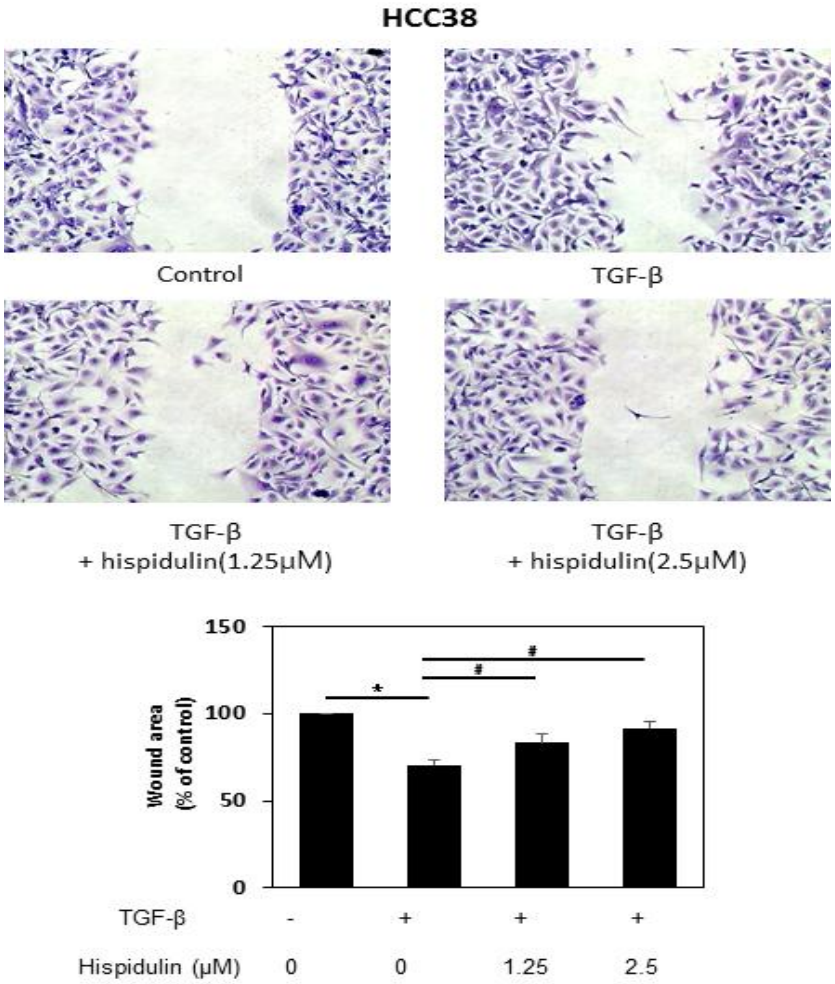


Fig. 11. Effects of hispidulin on the wound healing migration of breast cancer cell. Wound healing assay using confluent monolayers of HCC38 cells treated with TGF-β (10 ng/mL) and hispidulin 1.25, 2.5 μM for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

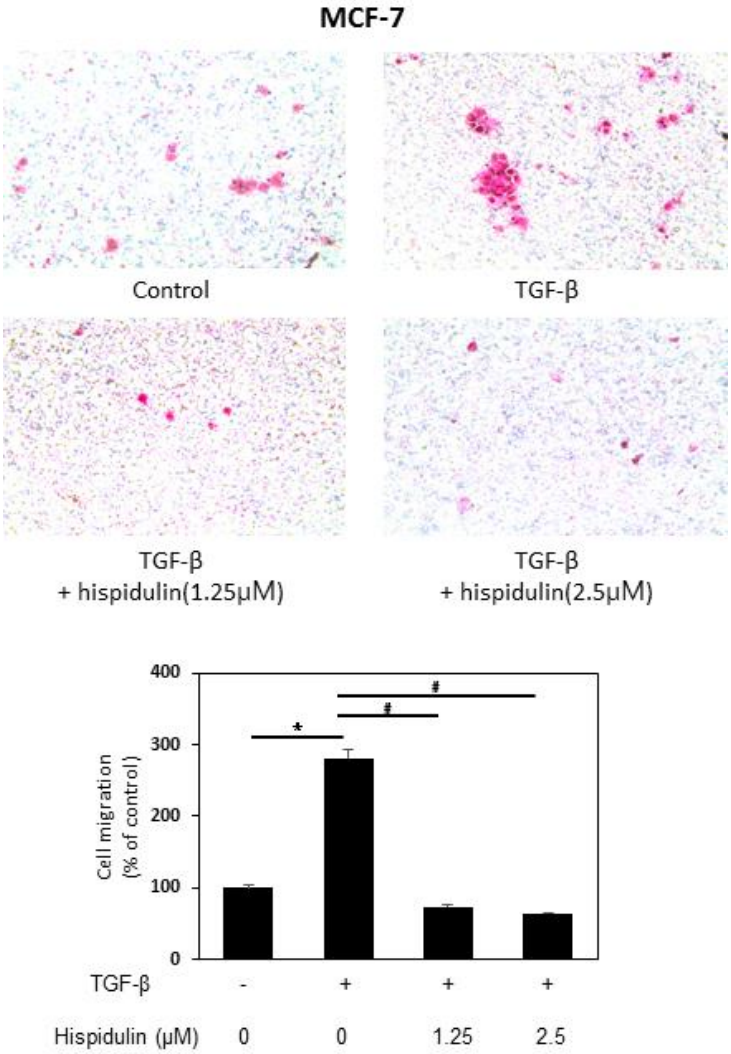


Fig. 12. Effects of hispidulin on the transwell migration of breast cancer cell. Transwell migration assay of MCF-7 cells treated with TGF-β (10 ng/mL) and hispidulin 1.25, 2.5 μM for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

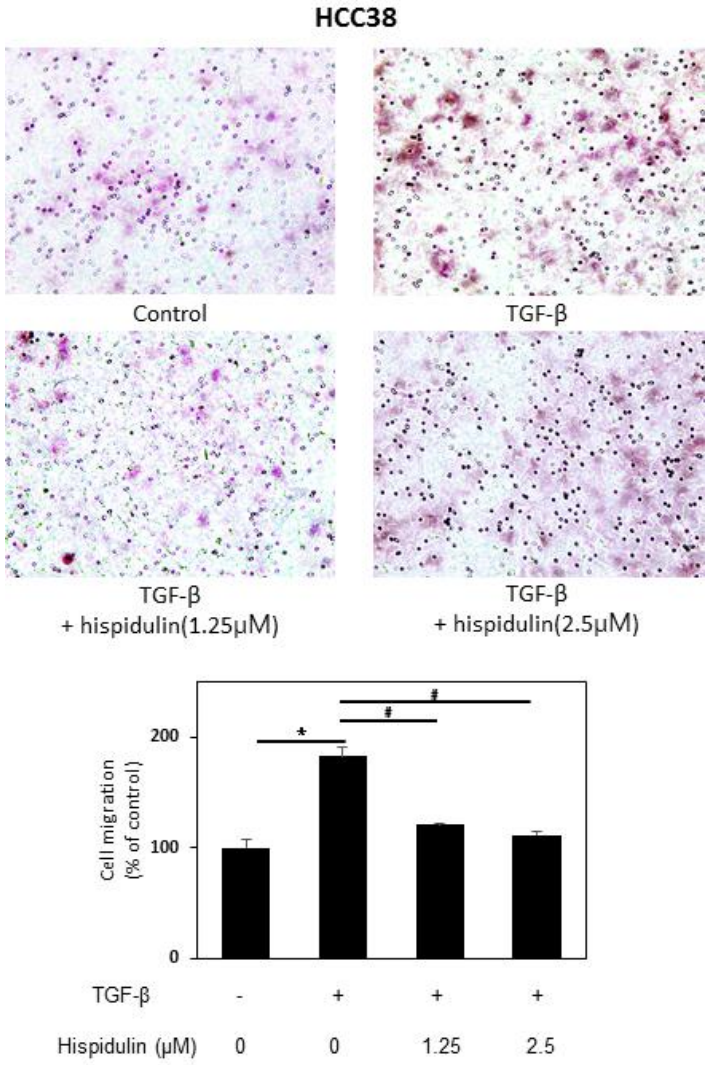


Fig. 13. Effects of hispidulin on the transwell migration of breast cancer cell. Transwell migration assay of HCC38 cells treated with TGF-β (10 ng/mL) and hispidulin 1.25, 2.5 μM for 24 h. All the values are expressed as the mean ± SD of at least three replicate experiments. Significant at $^{*}p < 0.05$ versus DMSO-treated group and $^{\#}p < 0.05$ versus TGF-β-treated group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제4장 고 찰

현대사회는 삶의 질의 향상뿐만 아니라 의학 기술의 발전으로 현대인의 평균 수명이 증가하고 있다. 하지만 암은 현대인의 질병에 의한 주요 사망원인중 하나이며, 아직까지도 명확한 발병원인에 대한 연구와 부작용이 없는 치료방법 개발은 미흡하다. 이러한 상황에서 암 치료의 근본적인 문제를 해결하기 위한 암의 예방과 전이 억제에 관한 연구가 필요하다.

유방암은 전 세계적으로 가장 흔히 발생하는 여성암으로, 우리나라의 경우 2017년 통계청 발표에 따르면 여성 암 발생률 1위에 해당한다. 유방암 치료에 사용하는 대표적인 항암제로 Tamoxifen과 Trastuzumab이 있다. Tamoxifen은 estrogen receptor에 작용하여 치료 효과를 나타내며, 종양의 estrogen receptor가 양성인 유방암 환자들을 대상으로 사용한다(42). 25-30%의 전이성 유방암 환자에서 HER2가 과발현되며, Trastuzumab가 HER2 신호를 차단하여 전이성 유방암 치료에 사용한다(43). 그러나 이러한 항암제들은 폐경, 우울증, 발진, 신장독성 등의 부작용이 나타나 삶의 질이 낮아지며, 치료 후에도 유방암이 재발하거나 전이의 가능성이 있기 때문에 완치가 어렵다(44-45). 유방암은 주로 폐와 뼈로 전이되는 것으로 알려져 있으며, 이에 대한 치료법의 개발에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(46-47).

최근 연구에 의하면 천연물 내에 포함된 생리활성 물질의 항암 작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이러한 식물유래 물질들이 암의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 나타났다(48). 생리활성 물질 중 하나인 플라보노이드는 항산화, 항암 등 다양한 효능이 알려져 있으며, 이 중 hispidulin은 꿀풀과 식물들에서 발견되는 페놀성 플라보노이드 화합물의 일종이다(49-50). Hispidulin은 한국에서 재배되는 곰보배추에 평균적으로 1.13 mg/g이 함유되어 있는 것으로 조사되었으며, 재배한 지역별로 hispidulin의 함량이 다르게 나타났다(51). Hispidulin을 이용하여 췌장암, 난소

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

암, 간암 등 다양한 암세포에서의 암 억제능에 대한 연구가 진행되었다. 그 예로서 hispidulin이 간암의 AMPK signaling과 ERK signaling을 조절하여 전이를 억제시키고 미토콘드리아 기능 장애, PI3K/Akt signaling와 AMPK signaling을 통해 세포의 성장을 억제하며 세포자살 (apoptosis)에 대한 항암작용 연구가 이루어졌다(52-53). 그러나 hispidulin을 이용한 유방암의 항암효과에 대한 연구는 아직 부족하다. 따라서 본 연구에서는 hispidulin이 암 전이 초기 단계인 EMT에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였으며, 이에 대한 작용기전 연구를 시행하였다.

EMT는 배아 발생의 초기 단계에 필수적인 과정이지만, 조절되지 않는 EMT는 종양 유발과 관련되어 있다(54). 정상 세포가 암 세포로 변하고 암세포가 전이되는 과정에서 상피세포의 특성을 잃고 간엽세포의 성질을 얻는 EMT가 일어나며, 암세포가 혈관 또는 림프를 통해 다른 장기로 이동하여 전이와 재발을 유발하게 된다(55). EMT는 세포의 표현형을 변화시키고 이동을 촉진하며 주위의 조직에 침범을 가능하게 한다(56).

본 연구에는 인체 유방암 세포주인 MCF-7과 HCC38을 사용하였다. 유방암 세포는 세포의 표면 및 세포질과 핵에 수용체를 가지고 있으며, 호르몬과 같은 물질이 수용체에 결합하여 세포에 변화가 일어난다. 유방암 세포의 대표적인 수용체로 Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR), Human epidermal grow factor receptor 2 (HER2)가 있으며, 세 가지 수용체의 여부에 따라 Luminal, Basal, Claudin-low, HER2로 분류된다(57). MCF-7은 Luminal A type (ER+, PR+/-, HER2-)에 속하며, HCC38은 Claudin-low type (ER-, PR-, HER2-)에 포함된다. MCF-7과 같은 Luminal type의 세포들은 세포와 세포 사이의 견고한 유착이 있으며 응집된 구조를 가진다. 대조적으로 HCC38과 같은 Claudin-low type의 세포들은 침습적인 형태를 가지고 있으며 세포와 세포 사이의 응집력이 약해 전이성이 높은 특징이 있다(58). 본 연구에서 MCF-7과 HCC38 세포주에 hispidulin을 농도별로 처리하였을 때, hispidulin의 처리농도가 높아질수록 두 세포주 모두의 증식률이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

억제됨을 확인되었다. 이로 인해 hispidulin은 estrogen receptor의 유무에 상관없이 인체 유방암 세포주의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있다.

EMT가 진행되는 동안 epithelial marker는 감소하며 mesenchymal marker는 증가하는 특징이 있다. Hispidulin의 EMT 억제 효과를 보기위해 epithelial marker인 E-cadherin과 occludin, mesenchymal marker인 vimentin의 mRNA 및 단백질 변화를 관찰하였다. MCF-7과 HCC38 세포주에 hispidulin을 처리하였을 경우, 두 세포주 모두에서 E-cadherin과 occludin의 mRNA와 단백질의 발현 모두 증가하였으며, HCC38에서 vimentin의 mRNA와 단백질의 발현은 감소하였다. E-cadherin은 EMT의 초기 단계에서 감소하게 되며, adherens junction에 관여하는 단백질이다(59). 조직을 연결해주는 adherens junction이 감소하면 세포는 자유롭게 이동하게 되는데, 이는 암 전이에 중요한 역할을 한다(60). Occuludin은 tight junctions에 관련된 단백질로 세포와 세포 사이의 유착에 관여하며 물리적으로 세포간의 장벽을 만든다(61). Vimentin은 제 Ⅲ 형 중간 섬유단백질로 mesenchymal 세포에 많이 발현되는 것으로 알려져 있으며, 세포의 접착, 이동, 세포 신호와 관련되어 있다(62). 이로 인해 hispidulin의 EMT 억제 가능성을 보았으며, 이후 TGF-β를 처리하여 EMT를 유도해 hispidulin의 억제 능력을 연구하였다.

TGF-β은 암의 미세환경 내에서 생성되는 사이토카인으로, 암 진행의 주요 신호전달 경로에 속한다. 정상 상피세포에서는 종양 억제 역할을 하지만 악성종양에서는 종양을 촉진시키며, 세포의 침입, 전이, 암 줄기세포 형성, 면역 억제 등의 역할 등의 역할을 한다(63). TGF-β에 의해 EMT가 유도된다는 사실을 세포배양으로 밝혀냈으며, TGF-β가 epithelial marker는 감소시키고 mesenchymal marker는 증가시키며 세포의 운동성을 증가시킨다(64). 본 연구에서 MCF-7과 HCC38 세포주에 TGF-β를 처리한 경우, 세포의 증식은 증가하였고, epithelial marker인 E-cadherin과 occludin의 단백질 발현량은 감소하였으며, mesenchymal marker인 vimentin의 단백질 발현량은 증가하였다. 이를 통해 MCF-7과 HCC38 세포주에서 TGF-β가

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

EMT 현상을 일으킨다는 사실을 알 수 있었다. Hispidulin이 TGF-β로 유도된 EMT에 미치는 영향을 알아보기 위해 TGF-β와 hispidulin을 동시에 처리한 경우, TGF-β를 단독 처리군과 비교하여 세포의 증식이 억제되었으며 e-cadherin과 occludin의 단백질 발현량이 증가하였고 vimentin의 발현량은 감소하였다. 이로 인해 MCF-7과 HCC38 세포주에서 모두 hispidulin이 TGF-β로 인해 유도된 EMT를 억제하였으며, HCC38 세포주보다 MCF-7 세포주에서 억제 효과가 더 큰 것으로 보아 estrogen receptor가 존재하는 세포주에서 hispidulin의 EMT 억제 효과가 더 뛰어난 것을 알 수 있다.

TGF-β는 smad-dependent signaling와 smad-independent signaling이 활성화되며, 주로 smad-dependent signaling에 의해 EMT가 유도된다. TGF-β가 membrane에 존재하는 serine/threonine kinase receptors에 결합하여 smad2/3이 인산화되어 활성을 가지며 EMT를 유도하게 된다(65-68). 본 연구에서는 hispidulin이 MCF-7과 HCC38 세포주에서 TGF-β에 의해 유도된 EMT를 p-Smad2/3과 total-Smad2/3의 단백질 발현을 확인하였다. MCF-7과 HCC38 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 p-Smad2/3의 단백질 발현이 증가하였으며, TGF-β가 smad dependent signaling을 통해 EMT를 유도하게 된다. TGF-β와 hispidulin을 동시에 처리한 경우 TGF-β 단독 처리와 비교하여 p-Smad2/3의 단백질 발현이 감소하였으며, total-Smad2/3의 변화는 없었다. 이로 인해 hispidulin이 MCF-7과 HCC38 세포주에서 smad dependent signaling을 통해 유도된 EMT를 억제함을 알 수 있다. 하지만 PI3K/Akt pathway , ERK/tyrosine phosphorylation pathway와 JNK/p38 MAPK pathway 등과 같은 smad-independent signaling에 대한 연구결과는 부족하며, 추가 실험이 필요한 것으로 사료된다.

암세포의 이동성이 증가하면 다른 세포에 침투하여 전이를 발생시킨다. TGF-β는 정상상피세포에서는 세포의 확산과 분화, 세포의 이동, 혈관 생성 등의 작용을 하여 상처치유 (wound healing)의 기능을 하지만 암세포에서는 세포의 이동성을 증가시

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

켜 전이와 침습을 일으킨다(69). 본 연구에서는 hispidulin이 TGF-β로 인해 증가된 세포의 이동성에 미치는 영향을 wound healing assay와 trasnwell migration assay로 확인하였다. MCF-7과 HCC38 세포주에 TGF-β를 처리한 경우 TGF-β에 의해 세포의 이동성의 증가하였으며, TGF-β와 hispidulin을 동시에 처리한 경우 TGF-β에 의해 유도된 세포의 이동성이 감소하였다. Wound healing assay와 transwell migration assay에서 hispidulin 처리가 TGF-β에 의해 증가된 세포의 이동성을 억제하는 효과는 HCC38 세포주보다 MCF-7 세포주 에서 더 큰 효과를 보이는 것으로 관찰되었다.

현재까지 암세포주에서 여러 생리활성물질을 이용한 연구를 살펴보면, 기존 항암제 사용에 비해 낮은 독성을 보이면서도 효과적인 암 증식 및 분화를 억제 하는 효과를 나타내었다. 하지만 생리활성물질들이 암의 생성과 증식에 관여하는 복잡한 분자생물학적인 신호전달체계를 모두 억제시키는 것은 아니기 때문에, 암의 특성과 발병 시기에 맞는 적절한 선택이 중요하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구는 생리활성물질중의 하나인 hispidulin이 유방암의 세포증식 억제 및 EMT 현상 억제 기전을 관찰하였으며, 이러한 결과들을 통하여 암의 전이 예방 등의 기초자료를 제공하고자 연구하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

1. Torre LA, Islami F, Sieqel RL, Ward EM, Jemal(2017) Global Cancer in Women: Burden and Trends. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 26(4), 444-457
2. National Cancer Information Center(2018) Cancer fact and figures 2018 in Republic in Korea. Available from https://www.cancer.go.kr
3. Erren TC(2001) A meta-analysis of epidemiologic studies of electric and magnetic fields and breast cancer in women and men. Bioelectromagnetics. 5, 105-119
4. Yoo KY, Kang D, Park SK, Kim SU, Shin A, Yoon H, Ahn SH, Noh DY, Choe KJ(2002) Epidemiology of Breast Cancer in Korea: Occurrence, High-Risk Groups, and Prevention. J Korea Med Sci. 17, 1-6
5. Park B, Park S, Shin HR, Shin A, Yeo Y, Choi JY, Jung KW, Kim BG, Kim YM, Noh DY, Ahn SH, Kim JW, Kang S, Kim TJ, Kang D, Yoo KY, Park SK(2016) Population attributable risks of modifiable reproductive factors for breast and ovarian cancers in Korea. BMC Cancer. 16, 5
6. Sattin RW, Rubin GL, Webster LA, Huezo CM, Wingo PA, Ory HW, Layde PM(1985) Family history and the Risk of Breast Cancer. JAMA. 253(13), 1908-1913
7. Irving M, Elmslie F, Berg J(2002) Genetics of breast cancer. Int J Clin Pract. 56(9), 677-682
8. Korea Breast Cancer Sosciety. Breast Cancer Facts & Figures 2018. Seoul : Korean Breast Cancer Society, 2018

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

9. Park JH, Jun EY, Kang MY, Joung YS, Kim GS(2009) Symptom Experience and Quality of Life in Breast Cancer Survivors. Journal of Korean Academy of Nursing. 39(5), 613-621
10. Zeeshan R, Mutahir Z(2018) Cancer metastasis-trics of the trade. Bosn J Basic Med Sci. 17(3), 172-182
11. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC(2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2(8), 563-572
12. Bill R, Christofori G(2015) The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? FEBS Lett. 589(14), 1577-1587
13. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JM(2016) EMT in Breast Carcinoma-A Review. J Clin Med. 5(7), 65
14. Tsai JH, Yang J(2013) Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. Genes Dev. 27(20), 2192-2206
15. Liao TT, Yang MH(2017) Revisiting epithlial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness. Mol Oncol. 11(7), 792-804
16. Yeung KT, Yang J(2017) Epithelial-mesemchymal transition in tumor metastasis. Mol Oncol. 11(1), 28-39
17. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ(2017) A central role for cadherin signaling in cancer. Exp Cell Res. 358(1), 78-85
18. Pal M, Bhattacharya S, Kalyan G, Hazra S(2018) Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis. Exp Cell Res. 368(2), 137-146
19. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA(2008)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Loss of E-cadherin prometes metastasis via meltiple downstream transcriptional pathways. Cancer Res. 68(10), 3645-3654

20. Nagi C, Guttman M, Jaffer S, Quia R, Keren R, Triana A, Li M, Godbold J, Bleiweiss IJ, Hazan RB(2005) N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant-invasive micropapollary carcinoma. Breast Cancer Res Treat. 94(3), 225-235
21. Gloushankova NA, Zhitnyak IY, Rubtsova SN(2018) Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. Biochemistry(Mosc). 83(12), 1469-1476
22. Yu H, Shen Y, Hong J, Xia Q, Zhou F, Liu X(2015) The contribution of TGF-β in Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail. Neoplasma. 62(1), 1-15
23. Zhang YE(2009) Non-Smad pathway in TGF-beta signaling. Cell Res. 19(1), 128-139
24. Parel K, Patel DK(2016) Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. J Trandit Complement Med. 7(3), 360-366
25. Lee SG, Kim JS, Min K, Kwon TK, Nam JO(2018) Hispidulin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipicytes through PPARɣ pathway. Chem Biol Interact. 25, 293, 89-93
26. Dabaghi-Barbosa P, Mariante Rocha A, Franco da Cruz Lima A, Heleno de Oliveira B, Benigna Martinelli de Oliveira M, Gunilla Skare Carnieri E, Cadena SM, Eliane Merlin Rocha M(2005) Hispidulin: antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. Free Radic Res. 39(12), 1305-1315

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

27. Chulasiri M, Bunyapraphatsara N, Moongkarndi P(1992) Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hertensin, the flavonodis from Millingtonia hortensis L. Environ Mol Mutagen. 20(4), 307-312
28. Clavin M, Gorzalczany S, Macho A, Munoz E, Ferraro G, Acevedo C, Martino V(2007) Anti-inflammatory activity of flavonoids from Eupatorium arnottianum. J Ethnopharmacol. 112(3), 585-589
29. Gao H, Xie J, Peng J, Han Y, Jiang Q, Han M, Wang C(2015) Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1α. Exp Cell Res. 332(2), 236-246
30. Walesiuk A, Nazaruk J, Braszko JJ(2010) Pro-cognitive effects of Crisium rivulare extracts in rats. J Ethnopharmacol. 129(2), 261-266
31. Niu X, Chen J, Wang P, Zhou H, Li S, Zhang M(2014) The effects of hispidulin on bupivacaine-induced neurotoxicity: role of AMPK signaling pathway. Cell Biochem Biophys. 70(1), 241-249
32. Zhou R, Wang Z, Ma C(2014) Hispidulin exerts anti-osteoporotic activity in ovariectomized mice via activating AMPK signaling pathway. Cell Biochem Biophys. 69(2), 311-317
33. Yang L, Yu Z, Qu H, Li M(2014) Comparative effects of hispidulin, genistein, and icariim with estrogen on bone tissue in ovariectomized rats. Cell Biochem Biophys. 70(1), 485-490
34. Steeg PS, Theodorescu D(2008) Metastasis: a terapeutic target for cancer. Nat Clin Pract Oncol. 5(4), 206-219
35. Yook JI, Li XY, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, Cha SY, Ryu JK, Choi YJ, Kim J, Fearon ER, Weiss SJ(2006) A Wnt-Axin-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cnacer cells. Nat Cell Biol. 8(12),

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1398-1406

36. Yuan Qin, Dong Zhao, Hong-gang Zhou, Xing-hui Wang, Wei-long Zhong, Sjuang Chen, Wen-guang Gu, Wei Wang, Chun-hong Zhang, Yan-rong Liu, Hui-juan Liu, Qiang Zhang, Yuan-qiang Guo, Tao Sun, Cheng Yang(2016) Apigenin inhibits NF-κB and Snail signaling, EMT and metastasis in human hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 7(27), 41421-41431
37. Ikenouchi J, Marsuda M, Furuse M, Tsukita S(2003) Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchymal transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci. 116(10), 1959-1967
38. Massague J, Chen YG(2000) Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev. 14(6), 627-644
39. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA(1992) Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. Cancer Res. 52(24), 6949-6952
40. MAni SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA(2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 133(4), 704-715
41. Fuxe J, Vicent T, Garcia de Herreros A(2010) Transcriptional crosstalk between TGF-β and stem cell pathway in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. Cell Cycle. 9(12), 2363-2374
42. Osborme CK(1998) Tamoxifen in the treatment of breast cnacer. N Engl

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

J med. 339(22), 1609-1618

43. Park YH(2009) Drug Therapy for Breast Cancer. J Korean Mes Assoc. 52(10), 963-974
44. Moy B, Goss PE(2007) Lapatinib-associated toxicity and practical management recommendations. Oncologist. 12(7), 756-765
45. Kararia PSC, Kendre PP, Patel AA, Bohra MZ, Tahiliani N(2017) Tamoxifen Induced Pancreatitis: An Unusual Complication of Commonly used Drug. J Clin Ciagn Res. 11(8), XD05-XD06
46. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J(2008) TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. Cell. 113(1), 66-77
47. Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massague J(2005) Breast cancer bone matastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(39), 13909-13914
48. Lee KW, Bode AM, Dong Z(2011) Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention. Nat Rev Cancer. 11(3), 211-218
49. Xie J, Gao H, Peng J, Han Y, Chen X, Jijang Q, Wang C(2015) Hispidulin prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. Am J Cancer Res. 5(3), 1047-1061
50. Liu K, Gao H, Wang Q, Wang L, Zhang B, Han Z, Chen X, Han M, Gao M(2018) Hispidulin suppresses cell growth and metastasis by targeting PIM1 through JAK2/STAT3 signaling in colorectal cancer. Cancer Sci. 109(5), 1369-1381
51. Jand HJ, Lee SJ, Kim CY, Hwang JT, Choi JH, Park JH, Lee SW, Rho

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

MC(2017) Effect of Sunlight Radiation on the Growth and Chemical Constituents of Salvia plebeia R.BR. Molecules. 22(8), E1279

52. Gao H, Wang H, Peng J(2014) Hispidulin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3k/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. Cell Biochem Biophys. 69(1), 27-34
53. Han M, Gao H, Xie J, Yuan YP, Yuan Q, Gao MQ, Liu KL, Chen XH, Han YT, Han ZW(2019) Hispidulin induces ER stress-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo by activating AMPK signaling pathway. Acta Pharmacol Sin. 40(5), 666-676
54. Lou Y, Preobrazhenska O, auf dem Keller U, Sutcliffe M, Barclay L, McDonald PC, Roskelley C, Overall CM, Dedhar S(2008) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis. Dev Dyn. 237(10), 2755-2768
55. Wu Y, Zhou BP(2008) New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 40(7), 643-650
56. Kalluri R(2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. J Clin Invest. 119(6), 1417-1419
57. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V(2010) Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol Ther. 10(10), 955-960
58. Holliday DL, Speirs V(2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Caner Res. 13(4), 215
59. Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ(2005) Wnt-dependent

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

regulation of the E-cadherin repressor snail. J Biol Chem. 280(12), 11740-11748

60. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S(2015) EMT and tumor metastasis. Clin Transl Mes. 4, 6
61. Nishimura N, Sasaki T(2008) Cell-sulface biotinylation to study endocytosis and recycling of occludin. Methods Mol Biol. 440, 89-96
62. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD(2009) Introduction intermediate filaments: from discovery to disease. J Clin Invest. 119(7), 1763-1791
63. Ungefroren H(2019) TGF-β Signaling in Cancer: Control by Negative Regulators and Crosstalk with Proinflammatory and Fibrogenic Pathways. Cancers (Basel). 11(3)
64. Xu J, Lamouille S, Derynck R(2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res. 19(2), 156-172
65. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Benug H, Reichmann E(1996) TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. Genes Dev, 10(19), 2462-2477
66. Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG(2000) Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. Kidney Int. 58(2), 587-597
67. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME(2001) Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). J Clin Invest. 108(12), 1853-1863

68. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S(2004) Regulation of E-cadherin expression and bete-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. Biochim Biophys Acta. 1691(1), 1-15

69. Margadant C, Sonnenberg A(2010) Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. EMBO Rep. 11(2), 91-105

Collection @ chosun