creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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

약학석사학위논문

천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisine 의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

2014 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 천연물과학전공

정 은 주

천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisine 의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

지도교수 이 상 국

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014 년 7 월

서울대학교 대학원

약학과 천연물과학전공

정 은 주

정은주의 석사학위논문을 인준함

2014 년 7 월

위 원 장 _____ 김 영 식 (인)

부위원장 _____ 박 성 혁 (인)

위 원 _____ 이 상 국 (인)

초 록

천연물 유래 Alkaloid계 Coptisine의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

정은주
서울대학교 약학대학 대학원
천연물과학전공

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)은 상피세포 (epithelial cell)가 고유의 특성과 cell-cell junction을 잃고 간엽세포 (mesenchymal cell)의 형태와 성질을 획득하는 과정으로 암의 침윤, 전이의 중요한 특징이다. 본 연구에서는 사람 폐암 세포주인 A549를 이용하여 황련 (*Coptis japonica*)에서 분리된 isoquinoline alkaloid계 물질인 coptisine의 EMT 억제 효능을 확인하고 그 작용기전을 연구하였다. A549세포에 대한 세포 증식 억제 효능을 평가한 결과, coptisine에 의해 세포의 증식이 시간 및 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다 (IC_{50}; 42.7 μM (24h), 15.9 μM (48h), 8.4 μM (72h)). EMT와 관련한 작용기전을 알아본 결과, coptisine은 암의 진행을 억제하고 세포간 연결을 유지하여 이동성을 감소시키는 E-cadherin의

유전자와 단백질의 발현을 모두 증가시켰다. 또한 E-cadherin의 내인성 억제제로 작용하는 Snail에도 영향을 미쳐 유전자와 단백질의 발현을 억제하였다. 그 외에 EMT에서 특이적으로 변화하는 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), vimentin, N-cadherin 등에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 wound healing assay, colony dispersion assay, invasion assay 등을 통해 coptisine이 A549 세포의 이동성, 침윤성을 저해함을 밝혔다. 더욱 구체적인 EMT 저해 기전을 알아보기 위해 transforming growth factor β1 (TGF β1)를 처리한 A549 세포에서 coptisine의 효과를 살펴본 결과 Extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2, Akt, glycogen synthase kinase3β (GSK3β) 의 인산화를 억제하였으며 Smad 신호전달체계도 억제하였다. 이로인해 coptisine이 Snail의 상위 신호전달체계에 영향을 미쳐 Snail의 발현을 저해하는 것을 알 수 있으며, 이러한 coptisine의 Snail 억제와 E-cadherin 증가 작용을 통해 EMT가 효과적으로 저해되는 것으로 여겨진다. 따라서 coptisine은 암 전이 치료의 천연 후보 물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

골 항상성 (bone homeostasis)은 파골세포 (osteoblast)의 골 흡수 (bone resorption)와 조골세포 (osteoblast)의 골 형성 (bone formation)에 의해 유지되며 항상성이 파괴될 경우 골다공증과 같은 골 관련 질환이 발생한다. 조골세포는 Wnt 신호전달체계에 의해 분화가 촉진되어 extracellular matrix (ECM) 단백질의 발현과 무기질화 (mineralization)가 일어나며 이러한 이유로 Wnt 신호전달체계의 활성화는 골다공증 치료제의 새로운 표적으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 천연물 중 바디나물 (*Angelica decursiva*)에서 분리한 furano-coumarin계열의 nodakenetin이 Wnt 신호전달체계를 활성화시켜 조골세포의 분화에 영향을 미치는지 살펴보았다. Nodakenetin은 인간 신장 배아 세포주인 HEK293 세포와 쥐 전조골세포주인 CM3T3-E1 세포에서 T-cell factor/Lymphoid-enhancing factor (TCF/Lef)의 전사활성을 크게

증가시켰다. Wnt 신호전달체계의 저해자인 Dickkopf1 (DKK1)을 감소시키고 반대로 β-catenin은 크게 증가시켰다. Wnt 신호전달체계의 표적 유전자의 발현을 증가 시켰으며 그 중 조골세포 분화와 관련된 runt-related transcription factor2 (Runx2)의 유전자와 bone morphogenetic protein (BMP)의 발현을 증가시켰다. MC3T3-E1 세포에서 Alizarin red S staining과 alkaline phosphatase (ALP) activity를 수행한바, 무기질화가 증가하고, ALP가 활성화되어 조골세포의 분화를 촉진하는 것을 확인하였다. 결과적으로 nodakenetin은 조골세포의 분화를 촉진하는 골다공증의 치료에 유효한 선도물질로 사료된다.

주요어 : coptisine, EMT, E-cadherin, Snail, nodakenetin, osteoblast differentiation, Wnt signaling

학번 : 2011-21770

목 차

초 록 i
목 차 iv
그 림 목 차 vii
표 목 차 x

Part 1. 천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisne 의 Epithelial-to- Mesenchymal Transition 억제 연구 1

I. 서 론 2
II. 실험 재료 및 방법 6
A. 실험 재료 6
1. 시약 6
2. 시험물질 7
3. 세포 배양 7
B. 실험 방법 9
1. 세포 독성 실험 (SRB assay) 9
2. Transfection and luciferase reporter gene assay 10
3. Western blot analysis 10

4. Reverse transcription real-time PCR 11
5. Wound healing assay 13
6. Colony dispersion assay 13
7. Invasion assay 13
III. 실험 결과 16
1. Coptisine 의 사람 폐암 세포에 대한 증식 억제 효과 16
2. E-cadherin promoter 에 미치는 효과 18
3. EMT 관련 단백질과 mRNA 의 발현에 미치는 효과 20
4. 세포의 이동성에 미치는 효과 23
5. 세포의 침윤성에 미치는 효과 26
6. ERK 와 Akt 의 인산화에 미치는 효과 28
7. TGFβ를 처리한 A549 에서 ERK 와 Akt 의 인산화, E-cadherin 과 Snail 의 발현에 미치는 효과 30
8. TGFβ관련 단백질인 Smad 에 미치는 효과 32
IV. 고 찰 34

Part 2. 천연물 유래 Coumarin 계 Nodakenetin 의 조골세포 분화 연구 36

I. 서 론 37
II. 실험 재료 및 방법 41
A. 실험 재료 41

1. 시약 41
2. 시험물질 42
3. 세포 배양 42
B. 실험 방법 44
1. 세포 독성 실험 (MTT assay) 44
2. Transfection and luciferase reporter gene assay 44
3. Western blot analysis 45
4. Reverse transcription real-time PCR 46
5. Measurement of Alkaline phosphatase (ALP) activity 47
6. Measurement of extracellular matrix (ECM) calcium deposits 47
III. 실험 결과 50
1. Nodakenetin 의 β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity 에 미치는 효과 50
2. Wnt signaling pathway 에 관련된 단백질에 미치는 효과 53
3. 조골세포에서 Wnt signaling pathway 에 관련된 단백질에 미치는 효과 56
4. 조골세포 분화에 미치는 효과 59
5. BMPs 와 Runx2 에 미치는 효과 62
IV. 고 찰 64
참 고 문 헌 66
Abstract 70

그 림 목 차

Figure 1. Overview of EMT 5

Figure 2. Chemical structure of coptisine. 8

Figure 3. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells 17

Figure 4. Effect of coptisine on E-cadherin promoter activities in HEK293 cells 19

Figure 5. Effect of coptisine on the EMT related protein in A549 cells 21

Figure 6. Effect of coptisine on E-cadherin and Snail mRNA expression in A549 cells 22

Figure 7. Inhibitory effect of coptisine on the migration in A549 cells 24

Figure 8. Inhibitory effect of coptisine on the activities of colony dispersion assays in A549 cells 25

Figure 9. Inhibitory effect of coptisine on the activities of invasion assays in A549 cells 27

Figure 10. Effect of coptisine on phosphorylation of Akt, ERK1/2 and GSK3β in A549 cells 29

Figure 11. Effect of coptisine on TGFβ1 - induced

phosphorylation of Akt or ERK1/2 and expression of snail, E−cadherin in A549 cells 31
Figure 12. Effect of coptisine on phosphorylation of Smad2/3 and Smad7 in A549 cells 33
Figure 13. Overview of Wnt signaling pathway and differentiation in osteoblast 40
Figure 14. Chemical structure of nodakenetin 43
Figure 15. β−catenin/TCF responsive transcription by nodakenetin in HEK293 cells 51
Figure 16. Cytotoxicity effect of nodakenetin in HEK293 cells 52
Figure 17. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling components in HEK293 cells 54
Figure 18. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling target genes in HEK293 cells 55
Figure 19. Cytotoxicity effect of nodakenetin in MC3T3−E1 cells 57
Figure 20. Effect of nodakenetin on Wnt signaling components and targets in MC3T3−E1 cells 58
Figure 21. Enhancement of matrix mineralization in MC3T3−E1 cells by nodakenetin 60
Figure 22. Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity

in MC3T3-E1 cells by nodakenetin.....61

Figure 23. Elevation of BMPs and Runx2 by nodakenetin in MC3T3-E1 cells.....63

표 목 차

Table 1. Sequences of EMT related primers used in real-time RT-PCR 15
Table 2. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells 17
Table 3. Sequences of osteoblast differentiation related primers used in real-time RT-PCR 49

Part 1. 천연물 유래 Alkaloid계 Coptisine의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

I. 서 론

Epithelial- to - mesenchymal transition (EMT)은 상피세포 (epithelial cell)가 고유의 특성과 cell-cell junction을 잃고 간엽세포 (mesenchymal cell)의 세포의 형태와 성질을 회득하는 과정이다. 간엽세포의 특성을 가지면 세포는 침윤 (invasion)과 전이 (migration)가 증가한다[1]. EMT는 조직에서의 역할에 따라 3가지로 분류된다. 제1형은 배아의 착상, 낭배형성 (gastrulation), 신경능선세포 (neural crest cell)의 이동에 작용하는 EMT, 제2형은 상처의 치유, 조직의 재생, 염증반응과 관련된 EMT, 제3형은 암세포가 상피세포에서 전이성 간엽세포로 전환되는 EMT를 나타낸다. 제3형 EMT는 암과 밀접한 관련이 있으며 암세포의 분화에 반대작용을 하며 침윤, EMT와 MET이 반복과 유사한 전이, 재발에 관여한다[2].

EMT 과정에는 epithelial marker의 감소와 mesenchymal marker의 증가가 특징적으로 나타난다. Epithelial marker로는 tight junction에 관여하는 단백질인 claudins 등과 adherens junction에 관여하는 E-cadherin, α/β-catenin 등이 있다. 반대작용을 하게 되는 mesenchymal marker로는 N-cadherin, vimentin, matrix metalloproteinase (MMPs) 등이 있다[3].

E-cadherin은 세포간 연결을 유지하여 세포의 이동이나 침윤, 전이를 예방하여 tumor progression을 억제하는 역할을 한다. 대부분의 암세포에서 E-cadherin 유전자가 감소되어 있으며[4], 이는 E-cadherin의 transcriptional repressor인 Snail-1/2, Zeb-1/2, Twist

에 의해 조절된다. Zinc finger transcription factor인 Snail은 E-cadherin의 억제제로 단독 또는 Wnt/β-catenin/TCF와의 작용으로 EMT를 유도한다. Snail은 β-catenin과 같이 glycogen synthase kinase3β (GSK3β) 의존적 인산화를 통해 β-TrCP에 의한 ubiquitination과 proteasomal degradation 과정을 거친다[5].

Transforming growth factor β (TGFβ)는 암의 진행 단계에 따라 종양을 억제하기도 하고 진행을 촉진시키기도 하는 이중적인 역할을 한다. 암의 초기 단계에서는 세포의 주기와 apoptosis를 유도하고 유전체의 완전성을 유지하여 종양의 성장을 억제하지만 암이 일정 크기 이상으로 성장한 후기 단계에서는 암세포가 TGFβ에 의한 성장 저해에 저항성을 가지게 되고 TGFβ가 EMT를 유도하고 암의 성장과 전이, 신혈류 생성, 면역 기전의 회피 등에 기여함으로써 도리어 암으로의 진행을 촉진한다[6-7].

TGFβ는 Smad signaling pathway를 통해 EMT의 중요한 매개자로서 작용한다. TGFβ는 type Ⅰ과 type Ⅱ 두 개의 serine/threonine kinases receptor의 complex 형성에 의해 작용하는데 이 complex는 Smad2, Smad3을 인산화하여 Smad signaling pathway를 활성화한다[8]. 또한 TGFβ는 EMT에서 세포의 분화단계에 영향을 미치는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p38 Mitogen-activated protein (MAP) kinase에도 작용한다[9].

황련 (*Coptis japonica* Makino)은 미나리아제비과 (Ranunculaceae)에 속하는 약용식물로 중국, 일본, 한국 등에 분포되어

있다. 소염작용과 항균작용, 중추신경작용이 알려져 있으며 전통적으로 위염, 장염, 복통, 이질, 불안 등에 쓰였다. 황련의 함유 성분으로는 isoquinoline alkaloid, phenolic compound, lignan, coumarinoligan, sesquilignan 계열의 물질이 있다[10]. 이 중 coptisine은 isoquinoline alkaloid계 물질로서 berberine과 구조적 유사성을 가지며 항진균 효과가 있는 것으로 알려져 있고[11] berberine과 함께 osteosarcoma에서의 항암 작용이 보고되었다[12].

본 연구에서는 coptisine이 비소폐암세포주 (non-small lung cancer cell line)인 A549의 성장 억제효능과 TGFβ를 처리하여 EMT를 유도한 A549 세포에서 EMT 관련 biomarker를 확인하여 TGFβ에 의해 유도된 EMT 상태에서의 EMT 관련 작용기전의 조절 효능을 확인하고자 하였다.

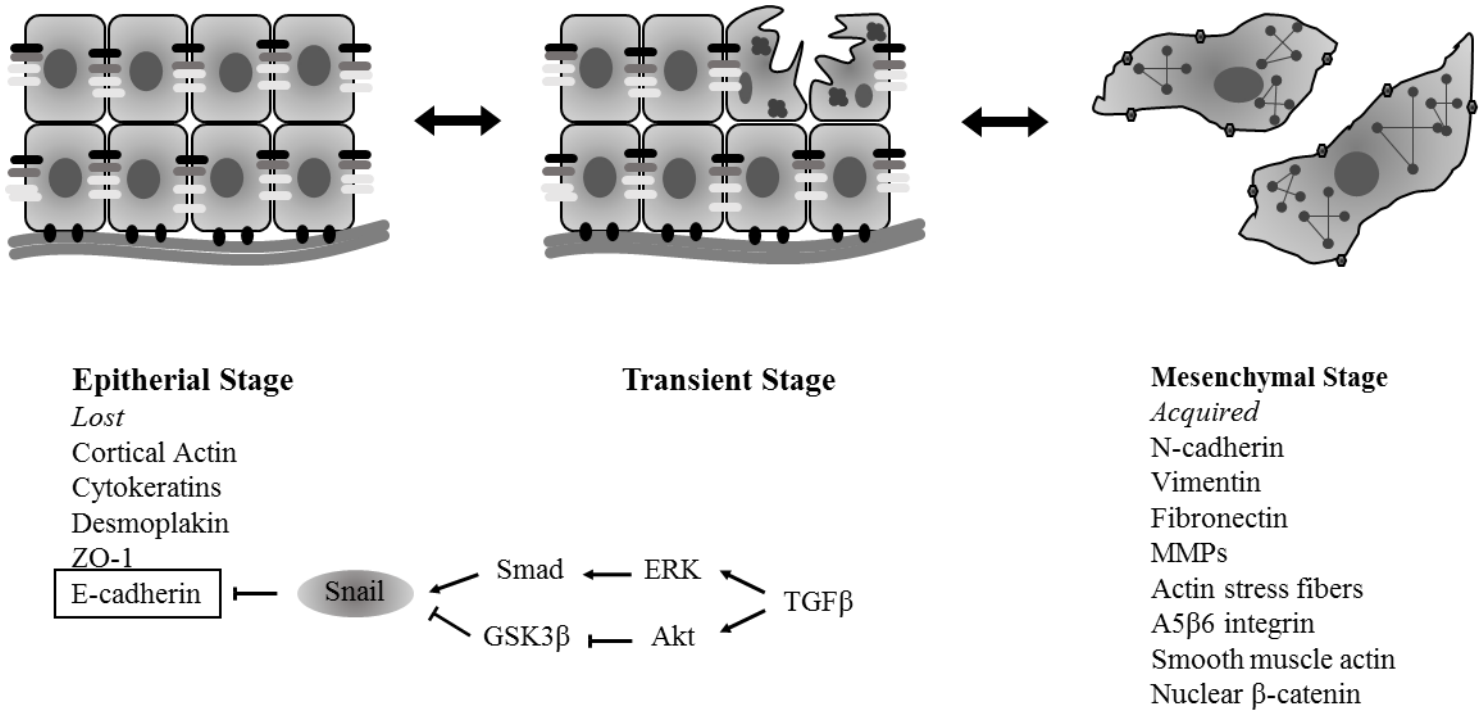


Figure 1. Overview of EMT.

II. 실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), antibiotics-antimycotics solution 및 trypsin-EDTA 은 Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA) 에서 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP, goat anti-goat IgG-HRP, survivin, Smad7, β-actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p-β-catenin, ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt (T308) snail, E-cadherin, MMP2, vimentim, p-Smad2, p-GSK3α/β (S21/9) 및 GSK3β antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 c-Myc, cyclin D1, β-catenin, p-GSK3β (Y216), Smad2/3 antibody는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. PCR primer로 이용한 oligonucleotide는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였다. AMV reverse transcriptase, dNTP mixture, random primer, RNasin 및 Taq polymerase와 Dual Luciferase® Reporter Assay System Kit는 Promega (Madison, WI, USA) 에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), trichloroacetic acid (TCA), L-ascorbic acid, β-glycerophosphate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 이외 명시되어 있지 않은 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 시험 물질

시험에 사용한 coptisine은 식약처 한약재품질표준화사업단으로부터 제공받아 DMSO를 사용하여 stock solution을 만들어 −20℃에서 저장한 후 필요시 희석하여 사용하였다 (Figure 2).

3. 세포 배양

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포와 human lung cancer cell line인 A549 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. HEK293 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics (100 U/mL penicillin G sodium, 100 μg/mL streptomycin sulfate 및 0.25 μg/ml amphotericin B)를 포함하는 DMEM에서 배양하고, A549 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics를 포함하는 RPMI에서 배양하였다. 모든 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 1주일에 3회 계대 배양하였다.

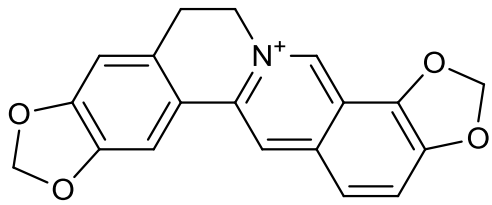


Figure 2. Chemical structure of coptisine.

B. 실험 방법

1. 세포 독성 실험 (SRB assay)

10% DMSO 에 녹아 있는 시료를 96-well plate의 각 well 에 10 μl 씩 triplicate로 loading하여 test plate를 만든 후 10% FBS 가 포함된 배지에 5.0×10^4cells/ml 이 되게 희석한 세포를 190 μl씩 가해 총 양이 200 μl가 되게 하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 시간 별로 배양하였다. 그와 동시에 coptisine를 넣지 않은 96well plate에 동일한 세포 현탁액 190 μl씩 16well 이상을 넣고 같은 조건에서 30분간 배양하여 zero-day로 하였다. 24-36 시간 배양 후 50% trichloroacetic acid (TCA)를 50 μl씩 가한 후 4℃ 에서 30분 배양시켜 세포를 고정하였다. 이후 수돗물로 5회 세척하고 건조시켰다. 각 well에 0.4% sulforhodamine B (SRB) 를 포함하는 1% acetic acid 용액을 80 μl씩 넣어 상온에서 한 시간 방치하여 세포를 염색하였다. 1%acetic acid와 수돗물로 5회 세척하여 충분히 건조시킨 후 각 well에 10mM Tris-base(pH10.0) 200 μl을 가하여 염색 dye를 용해한 후 ELISA microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. Vehicle (DMSO) 을 처리한 control과 흡광도를 비교하여 검색 시료의 각 농도 별 % of cell viability을 계산하였고, Tablecurve ver. 10 program을 이용한 non-linear regression analysis를 통하여 50%의 세포 증식 억제 효능을 나타내는 농도인 IC_{50}를 구하였다.

$$\text{Cell survival (\%)} = \frac{\text{OD 515nm(sample)} - \text{OD 515nm(zero day)}}{\text{OD 515nm(control)} - \text{OD 515nm(zero day)}} \times 100$$

2. Transfection and luciferase reporter gene assay

48-well plate에 HEK293 세포 (1.5×10^4cells/well)를 24시간 배양 후 luciferase reporter plasmid (E-cadherin wild type promoter) 0.032 μg과 *Renilla* gene 0.001 μg, pc-snail 0.004 μg 혹은 PC3.1 vector 0.004 μg 등을 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen)을 사용하여 형질주입하였다. 24시간 배양 후 시료 혹은 용매 control을 처리하였다. 24시간 배양 후 세포를 녹여 얻은 lysates를 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega®)을 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

3. Western blot analysis

A549 세포 (7×10^4 cells/ml)를 100 mm dish에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 24시간 배양하였다. Dish를 PBS로 1회 세척하고 coptisine이 포함한 배지로 지시된 시간에 따라 배양하였다.

배양 후 cold PBS로 1회 세척하고 끓고 있는 cell lysis buffer를 넣고 scraper로 긁어 모아 이를 100℃에 5분간 두었다. 식힌 후 -20℃에서 보관하였고 사용 직전에 37℃에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동 하였다. 단백질 정량은 BCA법을 이용하였고 10-40 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서 2시간 30분 동안 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane (Millipore,

Bedford, MA, USA)으로 transfer 하였다. Membrane을 blocking buffer(5% BSA in TBST)로 실온에서 shaker에 두어 1시간 동안 배양하였다. 이후 primary antibody를 1:1,000-1:2,000 정도가 되도록 2.5% BSA가 포함된 TBST에 희석하여 membrane과 함께 4℃에서 12시간 배양하였다. Membrane을 TBST로 5분씩 2-3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:1,500-1:2,000으로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 2시간 배양하였다. 이를 TBST로 5분간 3-4회 세척한 후 ECL Western blotting detection reagents (LabFrontier, Suwon, Korea)를 처리하여 생성된 luminescence를 LAS 4000 (Fuji Film Corp, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

* Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 정량법

Cell lysate 10 μl를 microcentrifuge tube에 넣은 후 각 tube에 10% TCA solution을 1 ml씩 첨가하여, 10분간 4℃에서 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. TCA solution을 제거하고 bicinchoninic acid (BCA)와 copper sulfate의 비가 40대 1이 되도록 섞은 BCA solution을 1 ml씩 첨가하였다. 60℃에서 1시간 방치 후 각각의 용액을 96-well plate에 200 μl씩 옮겨 595 nm에서 흡광도를 측정하여 BSA에 의한 standard curve를 통해서 단백질을 정량하였다.

4. Reverse transcription real-time PCR

A549 세포 (7×10^4 cells/mL)를 60 mm dish에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 24시간 후 PBS로 1회 세척하고 coptisine를

포함한 배지를 처리하였다. 12시간 동안 배양한 후 Chomczynski and Sachhi의 제안 방법[13-14]으로 RNA를 분리하였다. 각 dish를 PBS로 1회 세척한 다음 TRI reagent (Invirogen) 1 ml를 가하여 세포를 모은 후 chloroform을 처리하고 원심 분리해 세포 내의 RNA가 추출된 상등액만 따내었다. Isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시키고 75% ethanol로 세척하고, 후드에서 건조시킨 후 RNA pellet을 nuclease-free water에 녹였다. 이를 55℃에서 10분간 가열하여 RNA의 용해도를 증가시킨 다음 바로 얼음에 5분 이상 방치하여 RNA가 single strand 상태로 존재하도록 하였다.

Nano drop을 이용하여 정량 후 1 μg/μl로 희석하고 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 oligo dT primer를 가하여 RT-PCR 기기 (Amp PCR gene system)에서 42℃에서 60분, 99℃에서 5분을 유지하는 조건으로 cDNA를 linear strand 상태로 합성하였다. 50배 희석시킨 cDNA 용액 5 μL에 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)와 Table 1. 에 제시된 primer를 넣어 총 부피를 20 μl로 만들었다. 이를 MiniOpticon system (Bio-Rad)을 이용하여 PCR 반응을 진행하였다. C_T 값은 증폭된 target gene의 양이 역치에 도달하였을 때의 cycle 값을 의미하므로 각 수치는 Threshold Cycle (C_T)값으로 나타내며, 각 시료에서의 C_T 값을 MJ Opticon Monitor software를 이용하여 comperative C_T Method(⊿⊿C_T Method)에 의해 계산하여 분석하였다.

5. Wound healing assay

A549 세포 (5 × 10^4 cells/ml)를 12-well plate에 1ml씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 plate 면적의 90%로 찰 때까지 배양하였다. 그 후 yellow tip을 이용하여 well 가운데에 직선으로 상처를 낸 뒤 1% FBS contained RPMI로 처리하고 1시간 후 현미경에서 사진 촬영을 하여 control로 하였다. 1% FBS contained RPMI에 coptisine을 희석하여 처리하여 일정 시간이 지난 후 현미경으로 사진촬영을 하였다.

6. Colony dispersion assay

A549 세포 (5 × 10^5 cells/ml)를 24-well plate의 정 중앙에 20 μl씩 loading 하고 37℃, 5% CO_2 조건에서 세포가 well 표면에 부착하도록 6시간 정도 배양하였다. 1% FBS contained RPMI를 1 ml씩 조심스럽게 넣어주고 2시간 동안 안정화시킨 후 배지를 덜어내고 다시 1% FBS contained RPMI에 coptisine을 희석하여 1 ml씩 넣어주고 필요한 시간만큼 배양하였다. PBS로 세척 후 고정하기 위하여 4% p-formaldehyde를 250 μl씩 넣고 20분 동안 방치하였다. PBS로 2회 세척하고 hematoxylin 와 Eosin Y solution을 250 μl씩 순서대로 10분간 처리하여 염색하였다. 마지막으로 PBS로 세척하고 사진 촬영을 하였다.

7. Invasion assay

Transwell을 핀셋을 이용하여 거꾸로 놓고 15 μl의 0.2% gelatin을

membrane 바깥의 중앙에 떨어뜨리고 tip을 이용해 고르게 분포하도록 잘 펴발랐다. 1시간 동안 건조시킨 후 뒤집어 원래 상태로 놓고 10 μl의 3.3% metrigel (in PBS)로 transwell 안쪽 membrane을 coating 하여 1시간 동안 건조시켰다. 24-well plate에 10% FBS contained RPMI을 600 μl을 넣고, transwell에 coptisine을 처리한 A549 세포 (2×10^4 cells/ml)를 100 μl씩 넣어 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 배양하였다. 이후 transwell 안의 배지를 완전히 제거하고 PBS로 1회 세척하고 transwell의 안쪽을 면봉을 이용해 닦아낸 후 4% p-formaldehyde에 10분간 두어 고정하였다. PBS와 증류수로 세척하고 1% crystal violet으로 15분간 염색했다. 수돗물로 세척하고 현미경으로 사진촬영 하였다.

Table 1. Sequences of EMT related primers used in real-time RT-PCR.

Target genes		Sequences
Human E-cadherin	Sense	5' -GTTATTCCTCCCATCAGCTGCCCA-3'
	Anti-sense	5' -CTTGGCTGAGGATGGTGTAAGCG-3'
Human Snail	Sense	5' -AGCCTAACTACAGCGAGC-3'
	Anti-sense	5' -GGTGGGGTTGAGGATCTC-3'
Human β-actin	Sense	5' -CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
	Anti-sense	5' -CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

III. 실험 결과

1. Coptisine 의 사람 폐암 세포에 대한 증식 억제 효과

Coptisine을 사람 폐암 세포주인 A549세포에 시간 및 농도별로 처리한 후 SRB 실험법을 통해 폐암 세포에 대한 증식 저해 효능을 확인하였다. 그 결과 Figure 3에서 나타낸 바와 같이, coptisine의 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 효과가 더욱 뚜렷하게 나타났고, 처리시간이 길어질수록 세포 증식 억제 효과가 높게 나타났으며 처리 시간별로 IC_{50} 값의 차이가 큰 특징을 보였다 (IC_{50}; 42.7 μM (24h), 15.9 μM (48h), 8.4 μM (72h)).

A

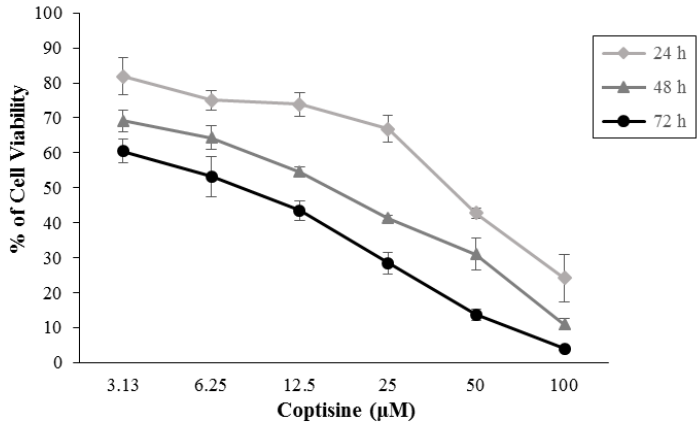


Figure 3. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells

A549 cells were treated indicated concentrations of coptisine for 24, 48 and 72 h. Cell proliferation was measured using the SRB assay.

Table 2. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells

Time (h)	24	48	72
IC_{50} (μM)	42.7	15.9	8.4

2. E-cadherin promoter에 미치는 효과

Epithelial marker인 E-cadherin의 감소는 EMT의 진행과 관련된 큰 특징으로 알려져 있어 coptisine 처리에 의한 E-cadherin promoter activity의 변화를 살펴보았다.

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포에 E-cadherin promoter gene을 형질주입 한 뒤 coptisine을 농도별로 처리한 결과, coptisine의 농도가 증가할수록 E-cadherin의 발현이 증가하였다 (Figure 4). E-cadherin의 내인성 억제자인 Snail이 존재할 때에도 coptisine이 E-cadherin의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 E-cadherin promoter gene과 함께 PCR3.1 vector 또는 Snail gene을 형질주입하여 결과를 비교해보았다. E-cadherin promoter gene과 vector를 형질주입한 결과는 E-cadherin promoter gene만 형질주입한 결과와 유사하게 나타났으며 coptisine 처리에 의해 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다. E-cadherin promoter gene과 Snail gene을 함께 형질주입하였을 때는 E-cadherin promoter가 Snail에 의해 억제되어 전체적으로 relative luciferase unit이 감소하였으며 coptisine에 의해 농도 의존적으로 E-cadherin의 발현이 증가하였다.

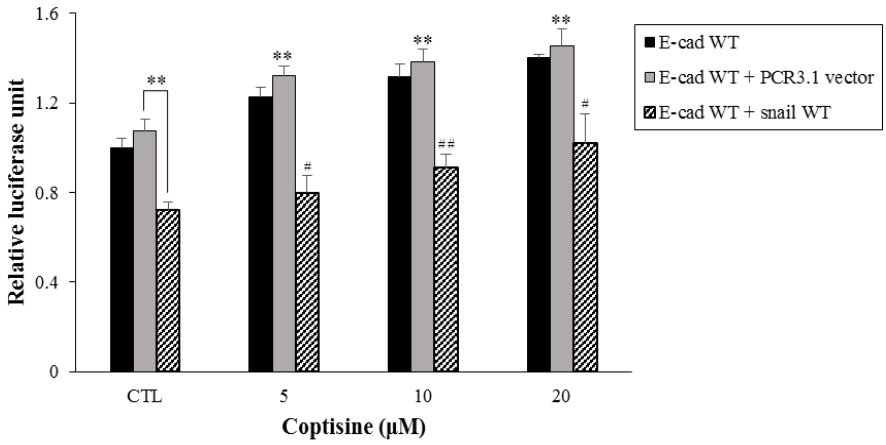


Figure 4. Effect of coptisine on E-cadherin promoter activities in HEK293 cells

HEK293 cells were transiently transfected with E-cadherin wild type promoter, Snail wild type plasmid and PCR3.1 vector for 24 h and treated with coptisine (5, 10 and 20 μM) for 24 h. Luciferase activity was estimated using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and expressed as relative units. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ was considered statistically significant compared to PCR3.1 verctor-treated control. $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ was considered statistically significant compared to Snail wild type plasmid-treated control.)

3. EMT관련 단백질과 mRNA의 발현에 미치는 효과

Coptisine에 의한 EMT관련 단백질 및 유전자의 변화를 살펴보기 위하여 대표적인 epithelial marker인 E-cadherin과 이를 억제하는 Snail, 그리고 mesenchymal marker인 MMP-2, N-cadherin, vimentin의 변화를 확인하였다.

A549 세포에 coptisine을 24시간 동안 처리한 후 cell lysate를 모아 Western blot 법을 수행하였다. 그 결과 Snail의 발현이 coptisine에 의해 감소하고, 반대로 E-cadherin의 발현은 증가하였다 (Figure 5). MMP-2, N-cadherin, vimentin은 농도 의존적이지 않았지만 고농도로 처리시약간의 감소를 보였다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 12시간 처리한 후 real-time RT-PCR 법을 이용하여 mRNA의 발현 변화를 확인하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 coptisine의 농도가 증가할수록 E-cadherin의 mRNA level이 증가하였다. 이와 반대로 Snail의 mRNA 발현은 coptisine의 농도가 증가할수록 감소되었다. 결과적으로 coptisine은 EMT에 중요한 역할을 하는 Snail과 E-cadherin의 단백질 및 mRNA의 발현을 조절하여 EMT를 억제하는 것으로 여겨진다.

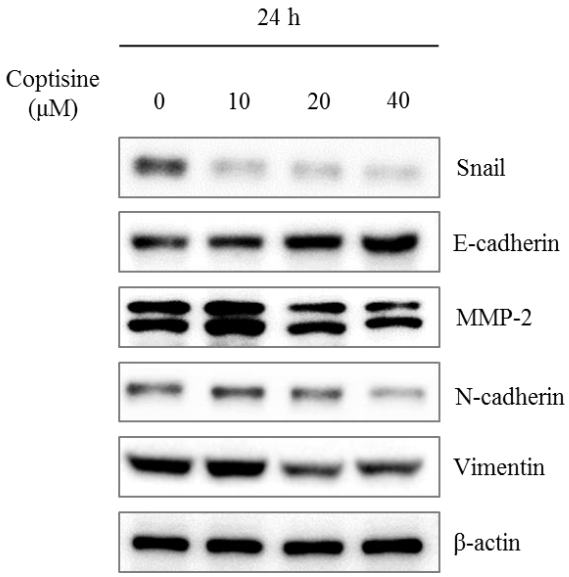
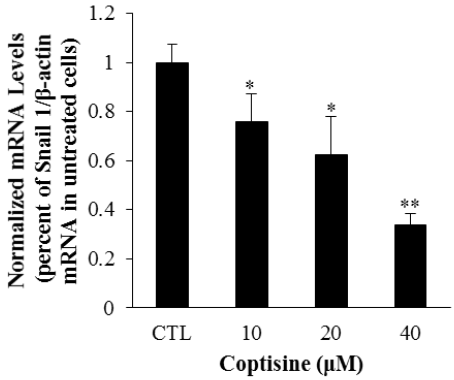


Figure 5. Effect of coptisine on the EMT related protein in A549 cells

Western blot of snail, E-cadherin, MMP-2, N-cadherin, Vimentin in A549 cells after 24 h of treatment with indicated concentration (10, 20 and 40 μM) of coptisine.

A



B

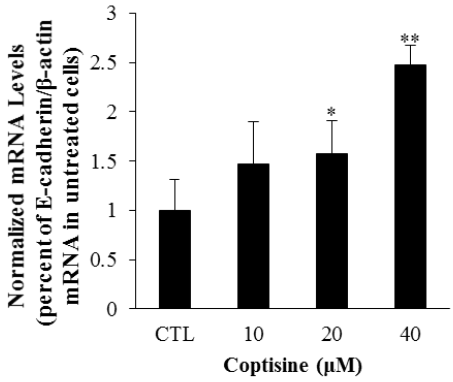


Figure 6. Effect of coptisine on E-cadherin and Snail mRNA expression in A549 cells

A549 cells were treated of indicated concentration coptisine for 12 h. The expression level of E-cadherin (A) and Snail (B) were examined using real-time RT-PCR. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

4. 세포의 이동성에 미치는 효과

세포의 이동성 증가는 암이 진행되어 전이성이 증가했음을 알게 해주는 중요한 요소이다. 이러한 이동성에 coptisine이 미치는 효과를 알아보기 위하여 Wound healing assay와 colony dispersion assay를 수행하였다.

Wound healing assay에서는 12well plate에 부착시킨 세포를 white tip으로 길게 상처를 낸 뒤 DMSO를 처리한 control과 IC_{50}보다 낮은 농도인 5, 10, 20 μM의 coptisine을 36시간 처리하여 이동성을 확인하였다. 그 결과 coptisine을 처리시 농도의존적으로 세포의 이동성이 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 7).

Colony dispersion assay에서는 A549 세포 (5×10^5 cells/ml)를 24 well plate 가운데에 20 μl을 점적하여 배양 후 DMSO를 처리한 control과 IC_{50}보다 낮은 농도의 2.5, 5, 10 μM의 coptisine을 처리하여 colony의 퍼짐성을 확인하였다. 그 결과 coptisine의 농도가 증가하고 처리시간이 길어질수록 colony의 크기가 작아졌다.

이 두 결과를 통하여 coptisine이 암세포의 전이와 관련된 A549 세포의 이동성을 감소시킴을 알 수 있다.

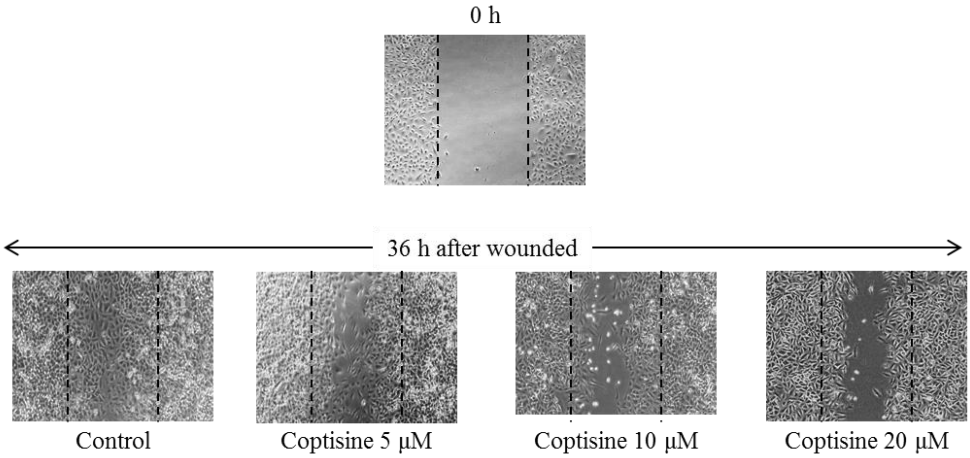


Figure 7. Inhibitory effect of coptisine on the migration in A549 cells

The cells (7×10^4 cells/ml) were incubated in 12 well plate for 1 day, and then wounded with a white tip (10 μl) and treated with the indicated concentrations of coptisine. After 36 h incubation, cells were photographed (×40).

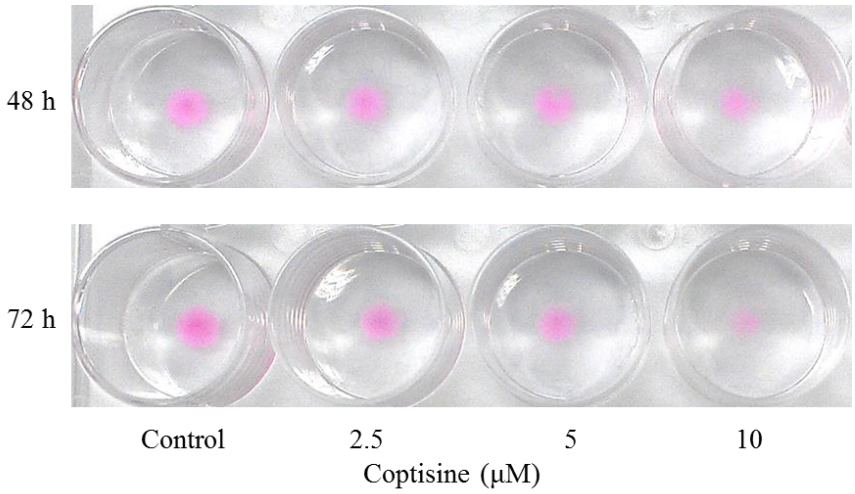


Figure 8. Inhibitory effect of coptisine on the activities of colony dispersion assays in A549 cells

The cells (5×10^5 cells/ml) were loaded on the center of 24 well plate. After incubation for 6 h, cells were treated with the indicated concentrations of coptisine for 48 and 72 h. The cells were stained and photographed.

5. 세포의 침윤성에 미치는 효과

암세포가 암이 발생한 조직에서 떨어져 나와 다른 조직으로 전이 시, 혈관을 통해 이동하므로 암세포의 혈관에 대한 침윤성 증가 역시 전이성의 증가에 중요한 요소이다. 따라서 coptisine이 세포의 침윤성을 억제시키는지 확인하기 위해 invasion assay를 실시하였다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 처리하여 upper chamber에 넣고 lower chamber에는 10% FBS가 포함된 배지를 넣고 48시간 동안 배양하여 pore를 통해 membrane을 통과한 세포의 양을 확인하였다. Membrane를 통과한 세포가 많을수록 침윤성이 크다고 할 수 있으며, figure 9에 나타낸 바와같이 control에 비해 coptisine을 처리시 농도 의존적으로 membrane을 통과한 세포의 양이 줄어들었다. 이로써 coptisine이 침윤력을 억제한다는 것을 알 수 있다.

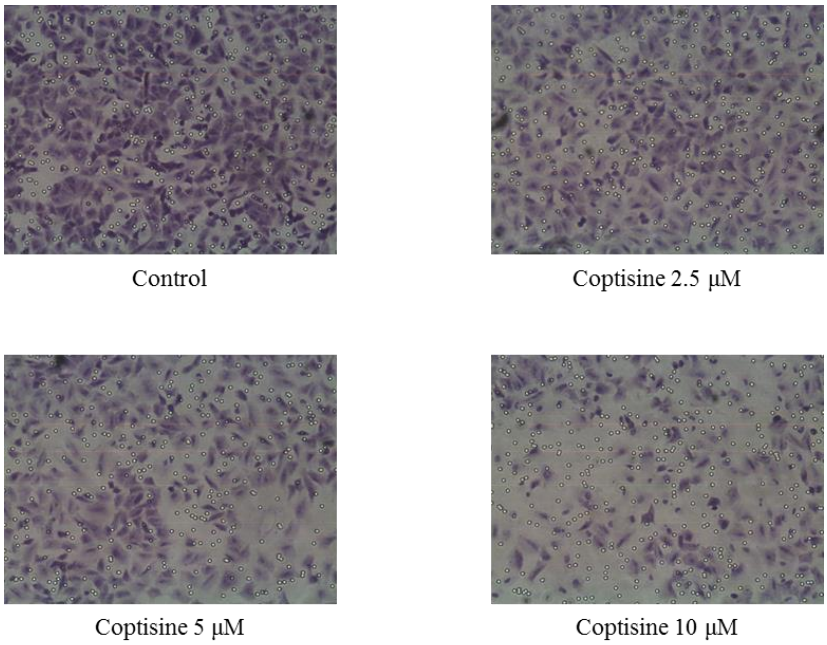


Figure 9. Inhibitory effect of coptisine on the activities of invasion assays in A549 cells

0.2% gelatin was coated on the lower parts of transwell membrane, and matrigel on the upper parts of transwell membrane. 10% FBS was added to the medium of lower chambers. A549 cells (2×10^5 cells/ml) were plated on the upper transwell chamber with the indicated concentrations of coptisine and then incubation for 48 h. The cells that had invaded the lower surface of the membrane were fixed and stained with crystalviolet, and photographed (×40).

6. ERK와 Akt의 인산화에 미치는 효과

앞에서 확인한 Snail의 감소와 E-cadherin의 증가와 관련된 작용기전을 확인하기 위하여 Snail을 활성화하는 것으로 알려진 ERK, GSK3β, Akt의 단백질 발현 변화를 살펴보았다.

A549 세포에 coptisine을 24시간 처리한 후 Western blot을 이용한 단백질 발현을 확인한 결과 Total ERK1의 발현은 변화가 없었다. 그러나 활성화 형태인 인산화된 ERK1의 발현이 coptisine의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure10). Akt의 발현은 coptisine의 처리에 의해 소량 감소하는 것으로 나타났으며 308번 threonine기가 인산화된 Akt의 발현 또한 coptisine의 처리에 의해 감소하였다. GSK3β는 Akt에 의해 9번 serine기의 인산화가 일어나게되면 분해되는 것으로 알려져있다[15]. 즉 Akt에 의해 GSK3β의 활성이 감소하게 되는데 본 연구 결과 인산화된 GSK3β가 감소하였으며 이로 인해 GSK3β의 분해 억제에 의한 세포 내의 GSK3β가 Snail을 인산화하여 β-TrCP에 의한 ubiquitination과 proteasomal degradation을 유도할 것으로 여겨진다.

따라서 coptisine이 Snail을 활성화시키는 ERK, GSK3β를 분해시키는 Akt, GSK3β의 인산화를 저해하여 Snail의 발현을 억제하는 것으로 여겨진다.

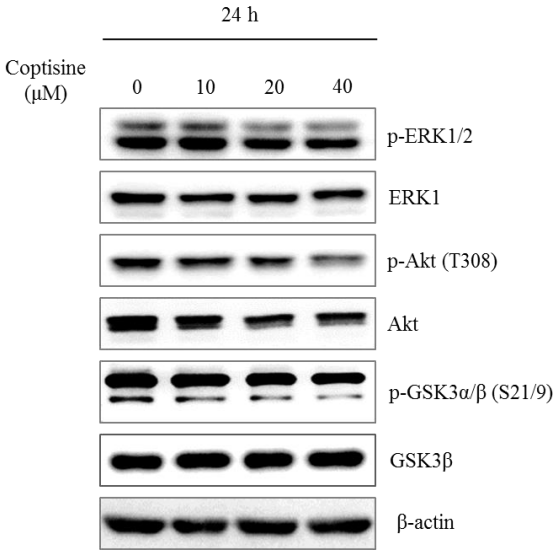


Figure 10. Effect of coptisine on phosphorylation of Akt, ERK1/2 and GSK3β in A549 cells

Western blot of phosphorylation of ERK1/2, Akt and GSK3β in A549 cells after 24 h of treatment with indicated concentration (10, 20, and 40 μM) of coptisine. β-actin was used as an internal standard.

7. TGFβ를 처리한 A549에서 ERK와 Akt의 인산화, E-cadherin과 Snail의 발현에 미치는 효과

TGFβ는 암의 전이와 밀접한 관련이 있으며 특히 EMT에서 나타나는 특성인 E-cadherin의 감소와 Snail의 증가와 관련된 ERK 및 Akt의 신호전달체계와 관련이 있다고 알려져있다. 따라서 TGFβ는 암세포의 EMT를 연구하는데 중요한 도구로 널리 사용되고 있다[16].

Coptisine이 EMT의 특성을 지닌 세포에 작용하는지 확인하기 위하여 A549 세포에 TGFβ1를 1시간 전처리하여 간엽세포의 성격을 갖도록 한 후 coptisine을 농도별로 24시간 처리하였다.

A549 세포에 TGFβ1을 처리시 세포의 형태가 길쭉하고 뾰족해지는 간엽세포의 특성을 나타내었다. Coptisine을 처리한 경우 TGFβ1에 의한 세포 형태의 변화가 억제된 것을 볼 수 있었다 (Figure 11. A).

구체적인 TGFβ관련 작용기전을 확인한 결과 TGFβ1과 관련된 대표적 하위 신호전달체계인 ERK와 Akt의 발현이 TGFβ1를 처리시 증가하는 것으로 나타났으며 Snail의 발현이 증가하고 E-cadherin의 발현이 감소하였다. 이는 EMT가 진행되는 암세포의 특성을 나타내는 것으로, Coptisine을 처리시 인산화된 ERK, Akt, 인산화된 Akt의 발현이 감소하였다. 그리고 TGFβ1에 의해 증가한 Snail의 발현이 coptisine을 처리시 농도의존적으로 감소하였으며 E-cadherin의 발현은 coptisine에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (Figure 11. B).

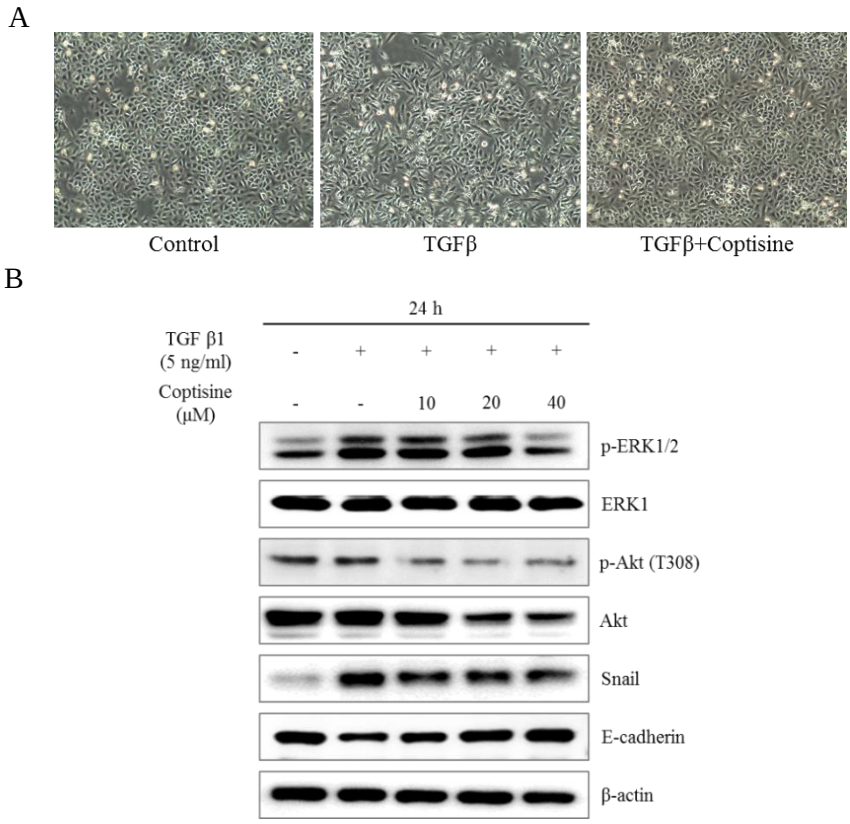


Figure 11. Effect of coptisine on TGFβ1- induced phosphorylation of Akt or ERK1/2 and expression of Snail, E-cadherin in A549 cells

A. Effect of coptisine on TGFβ1-induced cell morphological change in A549 cells. Cells were pretreated with TGFβ1 (5 ng/ml) for 1 h and then treated with coptisine for 24h and photographed (×40). **B.** Western blot of ERK1/2, Akt, Snail and E-cadherin in A549 cells. Cells were pretreated with TGFβ1 (5 ng/ml) for 1 h and then treated with indicated concentrations of coptisine for 24h.

8. TGFβ관련 단백질인 Smad에 미치는 효과

TGFβ가 결합하여 Type Ⅰ receptor와 type Ⅱ receptor가 complex를 이루면 serine/ threonine kinase의 역할을 하게 되어 Smad2/3을 인산화 하게 되어 Smad 신호전달체계를 활성화시킨다. 반대로 Smad7은 이 인산화 과정을 억제함으로써 Smad signaling을 억제하는 것으로 알려져 있다[8]. 따라서 TGFβ에 의해 진행된 EMT가 coptisine에 의해 억제되는지, 더욱 구체척으로 확인하기 위하여 TGFβ 관련 신호전달체계의 하위관련 단백질인 Smad의 발현 변화를 확인해 보았다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 24시간 처리한 결과, 단백질 수준에서 Smad7과 인산화된 Smad2의 발현을 확인하였다. Smad 신호전달체계에서 억제자로써 역할을 하는 Smad7의 발현이 coptisine에 의해 증가하였으며, Smad 2/3을 감소 및 인산화된 Smad2의 발현이 감소되어 coptisine이 TGFβ signaling에 영향을 미침을 알 수 있었다.

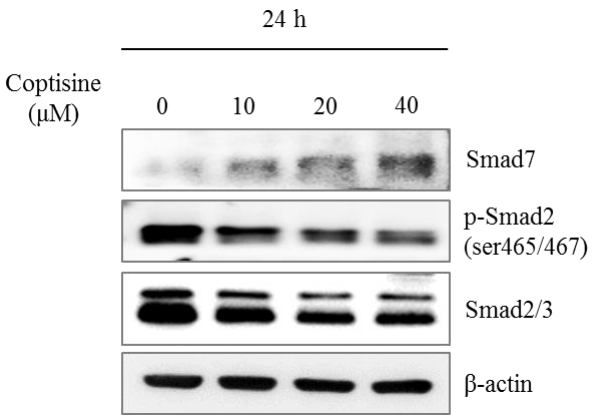


Figure 12. Effect of coptisine on phosphorylation of Smad2/3 and Smad7 in A549 cells

Western blot of Smad7, Smad2/3 and phosphorylated Smad2 in A549 cells. Cells were treated with indicated concentrations of coptisine (10, 20, and 40 μM) for 24 h. β-actin was used as an internal standard.

IV. 고 찰

암은 인간의 수명이 증가하면서 그 발병이 증가하고 있으며 연구가 진행되고 있는 지금까지도 꾸준히 증가하고 있다. 한국에서 암은 사망의 4분의 1정도를 차지할 정도로 많으며 통계가 시작된 1983년 이래로 중요한 사망원인이다[17]. 이러한 암은 초기 발병뿐 아니라 치료 후에도 재발하거나 다른 장기로 전이가 가능하다는 특성 때문에 치료하기 어려운 질병이다. 정상 세포가 암 세포로 변화하고 암 세포가 변이되는 과정에서 상피세포의 특성을 잃고 간엽세포의 성질을 획득하는 EMT가 이뤄지기 때문에 암세포가 혈관이나 림프관으로 침투하고 다른 장기로 이동하는 능력을 갖게 되어 전이와 재발을 유발한다. 그러므로 EMT는 암 연구에서 대표적인 연구 주제이다.

본 연구에서 coptisine은 E-cadherin promoter activity를 증가시키고 E-cadherin의 mRNA와 단백질을 모두 증가시켰다. 반대로 Snail은 mRNA와 단백질 수준에서 감소시켰다. E-cadherin은 adherens junction에 관여하는 단백질이며 EMT의 초기 단계에서 down-regulation되는 것으로 알려져 있다[18]. 이러한 E-cadherin은 Snail에 의해 조절되며 Snail은 E-cadherin의 promoter에 결합하여 E-cadherin의 발현을 억제한다[19]. 따라서 coptisine이 Snail을 억제함으로써 E-cadherin을 증가시키거나 혹은 E-cadherin의 유전자에 직접 영향을 미쳐 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이에 대하여 Snail을 제거한 세포에서의 연구가 추가적으로 필요하다고 여겨진다.

그 외에 EMT 관련된 단백질인 MMP-2, N-cadherin, Vimentin의 발현을 살펴보았고 모두 coptisine에 의해 감소되었다. MMP는 세포 밖 단백질의 분해를 매개함으로써 암세포의 침윤성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. N-cadherin은 cadherin gene family로 단백질로 발현되며 칼슘이온 의존적 adhesion을 이룬다. 암에서 N-cadherin은 EMT시 증가 하여 혈관신생(angiogenesis)에 관여한다[20]. Vimentin은 제 III 형 중간 섬유(intermediate filament, IF) 단백질로 mesenchymal 세포에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있다[21].

Snail의 활성을 억제 하는 기전으로서 ERK와 Akt, GSK3β를 확인해본 결과 coptisine이 ERK, Akt, GSK3β의 인산화를 억제하였다. ERK signaling 과 Akt signaling은 TGFβ의 하위 단계로 TGFβ에 의해 활성화 된다. TGFβ를 처리하였을 경우에도 coptisine이 ERk, Akt를 억제하였으며 TGFβ에 의해 증가한 Snail을 감소시키고 감소된 E-cadherin은 증가시켰다.

결론적으로 coptisine은 TGFβ에 의해 유도된 Snail을 감소시키고 E-cadherin을 증가시킴으로써 암 전이를 억제한다고 생각된다.

이러한 coptisine의 EMT 억제 효능은 천연물 유래 물질의 항암제 개발에 있어 선도물질로서 가능성이 있다고 여겨진다.

Part 2. 천연물 유래 Coumarin계 Nodakenetin의 조골세포 분화 연구

I. 서 론

인체에서는 오래된 골을 흡수하고 새로운 골을 형성하는 과정이 지속적으로 진행되고, 성인의 경우에 골은 1년에 약 10% 정도가 재생성이 되므로 정상적인 골 리모델링에서 약 10년이 경과되면 완전히 새로운 골을 형성하게 된다[22].

골다공증은 노화, 호르몬 이상 (여성의 경우 폐경), 염증성 류마티스 관절염, 골 전이성 암과 같은 다양한 질환에 의해 발병한다. 그리고 심각한 통증 유발과 보행의 어려움으로 질 높은 삶을 유지하기가 어렵다. 이러한 골다공증은 조골세포 활성의 감소 혹은 파골 세포의 상대적 활성 증가로 골 항상성의 파괴에 의해 야기된다[23].

골 항상성 (bone homeostasis)은 파골세포 (osteoblast)의 골 흡수 (bone resorption)과 조골세포 (osteoblast)의 골 형성 (bone formation)으로 인해 유지된다[24]. 골 형성은 조골세포의 분화 (differentiation), 매트릭스 성숙 (matrix maturation), 매트릭스 무기질화 (matrix mineralization)의 기본적인 3단계를 거치며, 골 특이적 세포외 기질 (extacellular matrix, ECM) 단백질의 발현과 무기질화 (mineralization)란 두 가지 특성을 가지고 있다. ECM 단백질은 조골세포에서 합성되며 collagen type I, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) 등을 포함하고 있다. 또한 ECM 단백질의 양은 칼슘이 축적되는 matrix mineralization과 비례한다. 조골세포는 osteogenic factor인 parathyroid hormone, TNF-α, IL-1, IL-11,

thyroid hormone, vitamin D_3, prostaglandin E_2와 같은 요소에 의해서 파골세포 분화를 매개할 수 있는 사이토카인인 RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand)을 발현한다. 파골세포에 의해서 유도된 산성화와 분비된 단백질 분해효소들은 각각 미네랄을 녹이고 골의 구성성분인 단백질을 분해함으로써 골 흡수과정이 진행된다[25].

과거 골다공증관련 연구는 파골세포의 억제에 초점을 맞추고 있었으며 이러한 골 소실을 늦추는 치료법으로 에스트로겐, 비스포스포네이트 등의 투여가 있다. 그러나 이러한 약물의 경우 성숙한 파골세포의 활성과 연관되어있어 장기간 투여에 따른 문제점이 있다. 그리하여 최근에는 조골세포의 분화와 활성화에 관한 연구로 전환되고 있다[26].

Wnt/β-catenin signaling pathway는 골 형성에 중요한 역할을 하며 최근에 주목 받고 있다[27]. Wnt signaling이 활성화 되면 pluripotent mesenchymal cells이 osteoblast progenitors로 분화가 촉진되고 osteoblast가 된다[28]. Canonical Wnt signaling에서 Wnt ligand가 세포막에 존재하는 frizzled receptors와 co-receptor인 low-lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6에 결합하여 disheveled 단백질을 인산화 시키고 이는 하위 단계인 glycogen synthase kinase3β (GSK3β), Axin, Adenomatous polypoaia coli (ACP) complex를 이뤄 β-catenin을 인산화하는 것을 억제한다[29]. β-catenin는 canonical Wnt signaling에서 중요한 구성요소이며 T-cell factor (TCF), lymphoid enhancer factor (Lef)단백질과 결합하여 transcriptional co-activator로 역할을 한다[30]. 골 세포에서는 Wnt signaling이 활성화시 골 특이적 runt-related transcription factor 2

(Runx2)와 bone morphogenetic protein2 (BMP2)의 발현을 촉진한다[31]. BMP2는 Smad1/5/8을 통해 Runx2의 발현을 조절한다[32].

바디나물 (*Angelica decursiva* = *Peucedanum decursivum*)은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 약용식물로 중국, 일본, 한국 등에 분포한다. 거담작용[33]과 관상동맥 혈류량 증가작용[34], 항알러지 작용[35], 항암작용[36] 등이 알려져 있으며 전통적으로 가래, 기침, 발열 등에 쓰였다. 바디나물의 함유 성분으로는 pyrano-coumarin, furano-coumarin, lignan 계열의 물질이 있다[37]. 이 중 nodakenetin은 furano-coumarin계 물질로서 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다[38].

본 연구에서는 nodakenetin의 Wnt/β-catenin signaling pathway 활성화를 통한 조골세포의 분화 유도 효능을 mouse pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 밝히고자 하였다.

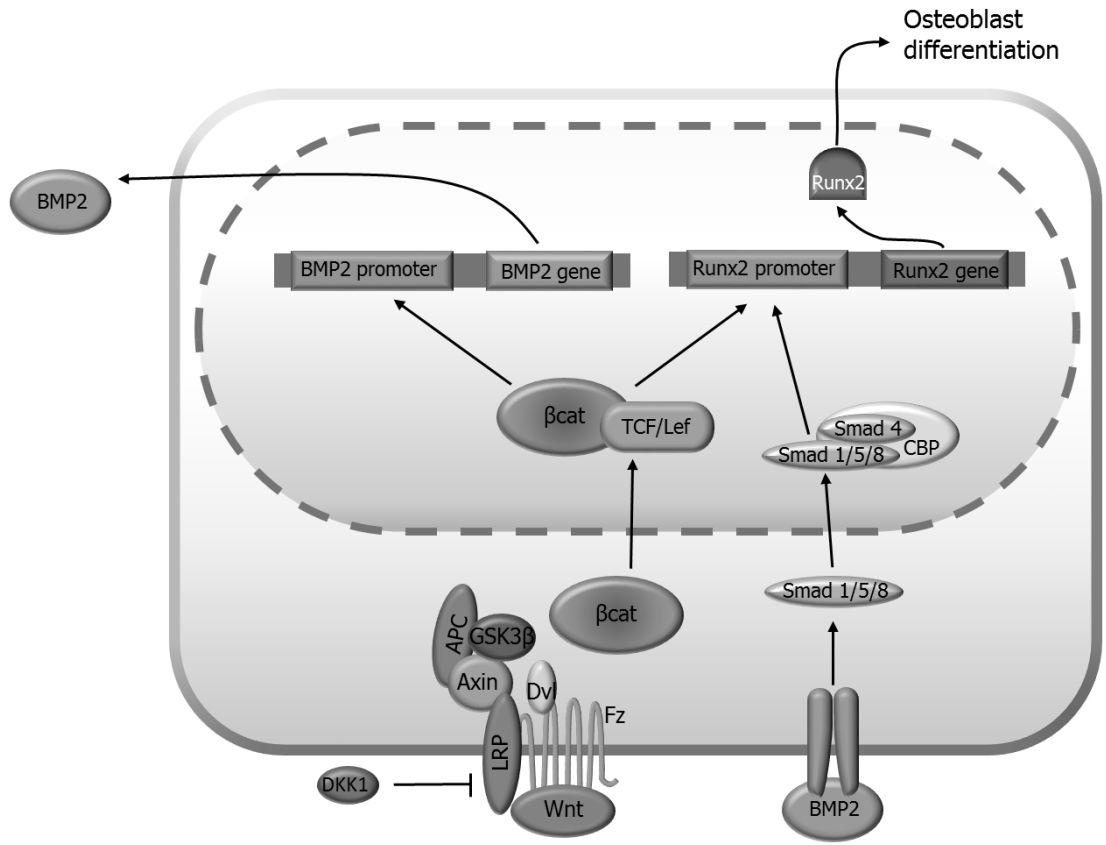


Figure 13. Overview of Wnt signaling pathway and differentiation in osteoblast

II. 실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), minium essential medium alpha (MEM-α, GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001), fetal bovine serum (FBS), antibiotics-antimycotics solution 및 trypsin-EDTA 은 Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA) 에서 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP, goat anti-goat IgG-HRP, cyclin D1, survivin, BMP2, β-actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p-β-catenin, ERK1/2, p-ERK1/2, DKK1, p-GSK3β(Y216), p-GSK3α/β(S21/9) 및 GSK3β antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 c-Myc, cyclin D1, β-catenin antibody는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. PCR primer로 이용한 oligonucleotide는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였다. AMV reverse transcriptase, dNTP mixture, random primer, RNasin 및 Taq polymerase와 Dual Luciferase® Reporter Assay System Kit는 Promega (Madison, WI, USA) 에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), trichloroacetic acid (TCA), L-ascorbic acid, β-glycerophosphate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 이외 명시되어 있지 않은 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 시험 물질

시험에 사용한 nodakenetin은 식약처 한약재품질표준화 사업단으로부터 제공 받아 DMSO를 사용하여 stock solution을 만들어 −20℃에서 저장한 후 필요시 희석하여 사용하였다 (Figure 14).

3. 세포 배양

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포와 mouse preosteoblast cell line인 MC3T3−E1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. HEK293 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics (100 U/mL penicillin G sodium, 100 μg/mL streptomycin sulfate 및 0.25 μg/ml amphotericin B)를 포함하는 DMEM에서 배양하고, MC3T3−E1 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics를 포함하며 ascorbic acid를 함유하지 않은 MEM−α에서 배양하였다. MC3T3−E1 세포를 분화시킬 때에는 50 μg/ml ascorbic acid와 10mM β−glycerophosphate를 포함한 MEM−α를 사용하였다. 모든 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 1주일에 3회 계대 배양하였다.

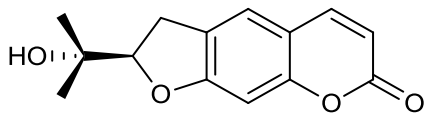


Figure 14. Chemical structure of nodakenetin

B. 실험 방법

1. 세포 독성 실험 (MTT assay)

시료의 세포독성을 확인하기 위하여, 96-well plate에 MC3T3-E1 세포 (1.5×10^4cells/well) 혹은 HEK293 세포 (0.7×10^4cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지를 180 μl 넣어 72시간 동안 배양하였다. 그 후에 5 mg/mL MTT 용액을 20 μL처리하여 MTT의 최종농도가 500 μg/mL이 되도록 한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 이후 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 200 μl씩 가하여 well 바닥에 생성된 formazan crystal을 녹이고 DMSO를 blank로 하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 DMSO만 처리한 군의 흡광도 평균에 대한 nodakenetin 처리군의 흡광도 평균의 비율을 구하여 % of survival을 계산하였다.

2. Transfection and luciferase reporter gene assay

48-well plate에 HEK293 세포 (1.5×10^4cells/well)를 넣어 24시간 배양 후 luciferase reporter plasmid (TOPflash 또는 FOPflash) 0.1 μg과 *Renilla* gene 0.005 μg, pcDNA β-catenin 0.008 μg, TCF4 expression vector 0.005 μg 등을 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen)을 사용하여 형질주입하여 24시간 배양하였다. 이후 nodakenetin 혹은 용매를 처리하여 배양하였다. 24시간 이후 세포를

녹여 얻은 lysates를 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega®)을 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

3. Western blot analysis

MC3T3-E1 (8×10^4 cells/ml)세포를 100 mm dish에 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 그 다음 dish를 PBS로 1회 세척하고 nodakenetin을 포함한 배지를 넣은 후 지시된 시간에 따라 배양하였다.

배양 후 cold PBS로 1회 세척하고 끓고 있는 cell lysis buffer를 넣어 scraper로 긁어 모아 이를 100℃에 5분간 두었다. 식힌 후 -20℃에서 보관하였고, 사용 직전에 37℃에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동 하였다. 단백질 정량은 BCA법을 이용하여 수행하였으며 10-40 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서 2시간 30분 동안 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 transfer 하였다. Membrane을 blocking buffer(5% BSA in TBST)에 넣어 실온에서 shaker 상에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 primary antibody를 1:1,000-1:2,000 정도가 되도록 2.5% BSA가 포함된 TBST에 희석하여 membrane과 함께 4℃에서 12시간 배양하였다. Membrane을 TBST로 5분씩 2-3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:1,500-1:2,000으로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 2시간 배양하였다. 이를 TBST로 5분간 3-4회 세척하고 ECL Western blotting detection reagents (LabFrontier, Suwon, Korea)를 처리하여 생성된 luminescence를

LAS 4000 (Fuji Film Corp., Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

4. Reverse transcription real-time PCR

MC3T3-E1 (8×10^4 cells/ml)세포를 60 mm dish에 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 PBS로 1회 세척하고 nodakenetin을 포함한 배지를 처리하였다. 12시간 동안 배양한 후 Chomczynski and Sachhi의 제안 방법[13-14]으로 RNA를 분리하였다. 각 dish를 PBS로 1회 세척한 다음 TRI reagent (Invirogen) 1 ml를 가하여 세포를 모은 후 chloroform을 처리하여 세포 내의 RNA를 추출하였다. Isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시키고 75% ethanol로 세척해 준 다음, 후드에서 ethanol을 건조시키고 RNA pellet을 nuclease-free water에 녹였다. 이를 55℃에서 10분간 가열하여 RNA의 용해도를 증가시킨 후 바로 얼음에 5분 이상 방치하여 RNA가 single strand 상태로 존재하도록 하였다.

Nano drop을 이용하여 정량 후 1 μg/μl로 희석하고 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 oligo dT primer를 가하여 RT-PCR 기기 (Amp PCR gene system)에서 42℃에서 60분, 99℃에서 5분을 유지하는 조건으로 cDNA를 linear strand 상태로 합성하였다. 50배 희석시킨 cDNA 용액 5 μl에 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)와 Table 3. 에 제시된 primer를 넣어 총 부피를 20 μL로 만들었다. 이를 MiniOpticon system (Bio-Rad)을 이용하여 PCR 반응을 진행하였다. C_T 값은 증폭된 target gene의 양이 역치에 도달하였을 때의 cycle 값을 의미하므로 각 수치는

Threshold Cycle (C_T)값으로 나타내고, 각 시료에서의 C_T 값을 MJ Opticon Monitor software를 이용하여 comperative C_T Method(⊿⊿ C_T Method)에 의해 계산하여 분석하였다.

5. Measurement of Alkaline phosphatase (ALP) activity

48-well plate에 MC3T3-E1 세포 (0.6 × 10^4 cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지로 3일마다 갈아주었다. 분화를 유도할 경우 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 포함한 MEM-α를 사용하였다. 6일 후, passive lysis buffer로 세포를 녹인 후 lysates 10 μl와 6 mM p-nitrophenyl phosphate 와 1 mM $MgCl_2$가 포함된 0.5 M Tris-HCl (pH 9.9) buffer 190 μl를 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 효소반응에 의해 생성된 p-nitrophenol (PNP)은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 PNP 표준곡선을 이용하여 정량하였으며, 단백질은 Bradford 법을 이용하여 정량하였다. ALP activity는 PNP produced/min/mg protein으로 그래프를 나타내었다.

6. Measurement of extracellular matrix (ECM) calcium deposits

48-well plate에 MC3T3-E1 세포 (0.6 × 10^4 cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지로 3일마다 갈아주었다. 분화를 유도할 경우 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 포함한 MEM-α를 사용하였다. 10일 후 PBS로 1회 세척하고 4% formaldehyde로 10분간

고정시킨 후 40 mM Alizarin red S (pH 4.2)로 상온에서 30분간 염색하였다. 3차 증류수로 세척하고 10% cetylpyridinium chloride(in 10 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 넣어 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 그래프로 나타내었다.

Table 3. Sequences of osteoblast differentiation related primers used in real-time RT-PCR

Target genes		Sequences
Mouse β-catenin	Sense	5' -TGCAGATCTTGGACTGGACA-3'
	Anti sense	5' -AAGAACGGTAGCTGGGATCA-3'
Mouse BMP2	Sense	5' -TGAGGATTAGCAGGTCTTTG-3'
	Anti sense	5' -CACAACCATGTCCTGATAAT-3'
Mouse Runx2	Sense	5' -AAGTGCGGTGCAAACTTTCT-3'
	Anti sense	5' -TCTCGGTGGCTGGTAGTGA-3'
Mouse β-actin	Sense	5' -ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
	Anti sense	5' -CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'

III. 실험 결과

1. Nodakenetin의 β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity에 미치는 효과

전조골세포가 조골세포로 분화하기 위해서는Wnt signaling pathway가 활성화되어야 한다. 따라서 본 연구에서는

Wnt signaling pathway의 transcriptional activity를 확인하기 위하여 HEK293세포에 TOPflash reporter plasmid를 형질주입하여 실험하였다. 실험 결과 TCF4 gene과 β-catenin gene을 형질주입시 transcription activity이 활성화되며 nodakenetin을 농도별로 처리하였을 때 transcription activity가 증가됨을 확인하였다. TCF/Lef binding site가 변형되어 있는 FOPflash reporter plasmid는 negative control로서 nodakenetin에 의한 활성을 나타내지 않아 nodakenetin이 특이적으로 β-catenin에 의한 transcriptional activity를 증가시키는 것으로 보인다 (Figure 15).

HEK 293 세포에서 SRB assay 결과 nodakenetin은 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였으며 이후 진행된 실험에서 농도를 설정하는데 참고하였다 (Figure 16).

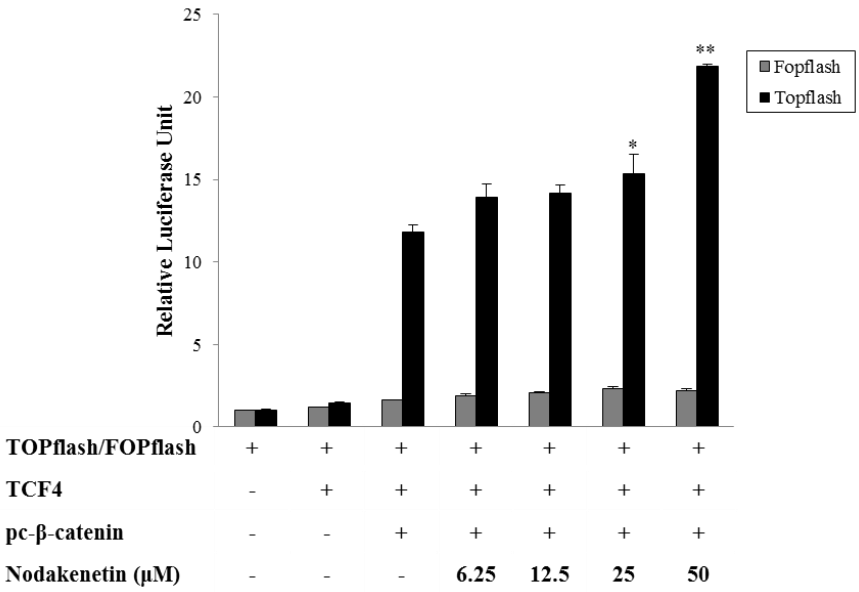


Figure 15. β−catenin/TCF responsive transcription by nodakenetin in HEK293 cells

HEK293 cells were transiently transfected with β−catenin, TCF4, TOPflash and *Renilla* for 24 h and treated with nodakenetin (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 24 h. Luciferase activity was estimated using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and expressed as relative units. Transfection efficiency was normalized by *Renilla*. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

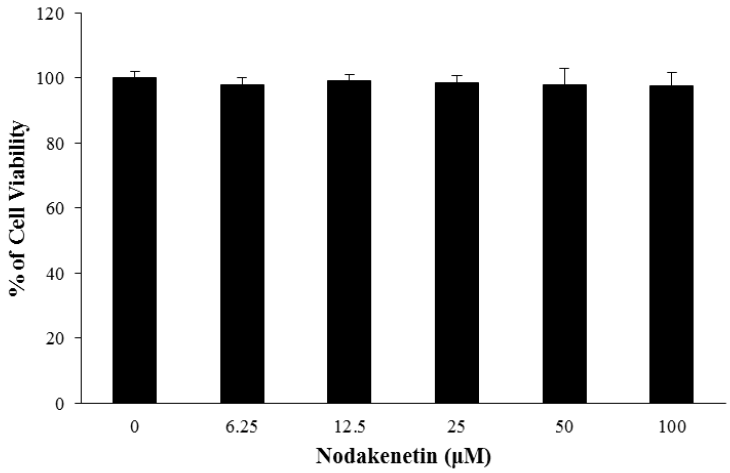


Figure 16. Cytotoxicity effect of nodakenetin in HEK293 cells

HEK293 cells were treated indicated concentrations of nodakenetin for 72 h. Cell viability was measured using the SRB assay.

2. Wnt signaling pathway에 관련된 단백질에 미치는 효과

Nodakenetin을 HEK293 세포에 각각 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도로 24시간 처리하고 Western blot 법을 이용하여 Wnt signaling pathway와 관련된 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, Wnt signaling pathway의 co-receptor인 LRP5/6에 결합하여 Wnt와 receptor의 결합을 억제하여 Wnt signaling을 저하시키는 DKK1이 감소하였고, 신호를 전달하는 중요한 요소인 β-catenin이 증가하였다. 이와 반대로 인산화된 β-catenin는 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이를 통해 β-catenin의 분해가 줄어들 것으로 여겨진다 (Figure 17).

또한 Wnt signaling의 타겟 유전자인 c-myc, cyclin D1, survivin의 단백질 발현이 증가하였다 (Figure 18).

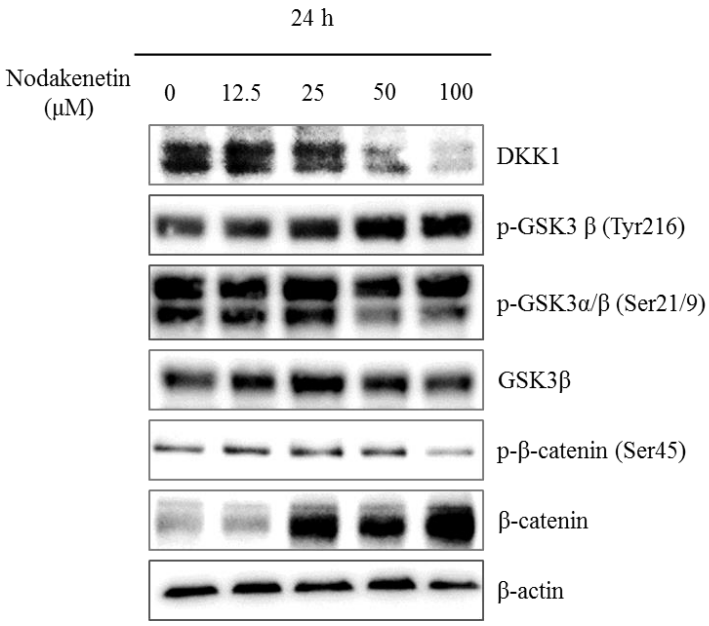


Figure 17. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling components in HEK293 cells

HEK293 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the expressions of Wnt signaling components were determined by Western blot analysis. β-actin was used as an internal standard.

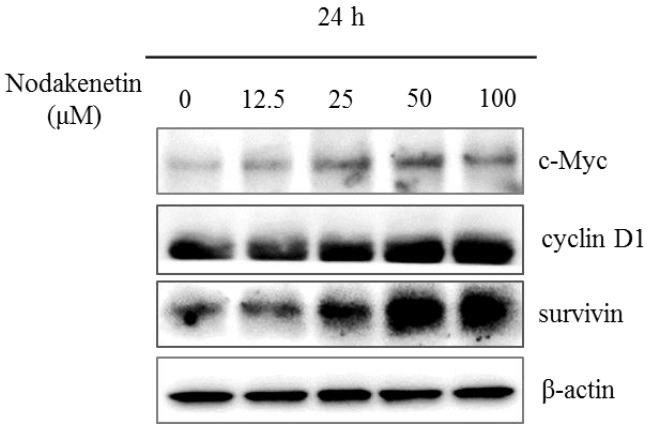


Figure 18. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling target genes in HEK293 cells

HEK293 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the expressions of c-Myc, cyclin D1 and survivin were determined by Western blot analysis. β-actin was used as an internal standard.

3. 조골세포에서 Wnt signaling pathway에 관련된 단백질에 미치는 효과

Pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포에서 독성을 확인한 결과 최고 농도인 100 μM에서도 독성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 19). 이를 토대로 100 μM부터 농도를 내려 Western blot으로 nodakeneti에 의한 단백질의 변화를 살펴보았다.

HEK293 세포에서와 마찬가지로 nodakenetin을 MC3T3-E1 세포에 처리하였을 때 DKK1이 감소하였고, 신호를 전달하는 중요한 요소인 β-catenin이 증가하였다 (Figure 20. A). 이와 반대로 인산화된 β-catenin는 감소하였으며 mRNA수준에서도 β-catenin의 발현이 증가하였다 (Figure 20. B).

Wnt signaling pathway의 타겟 유전자인 c-myc, cyclin D1, survivin의 단백질이 증가하였다. 즉 nodakenetin이 MC3T3-E1 세포에서도 Wnt signaling pathway를 활성화 한다는 것을 알 수 있다.

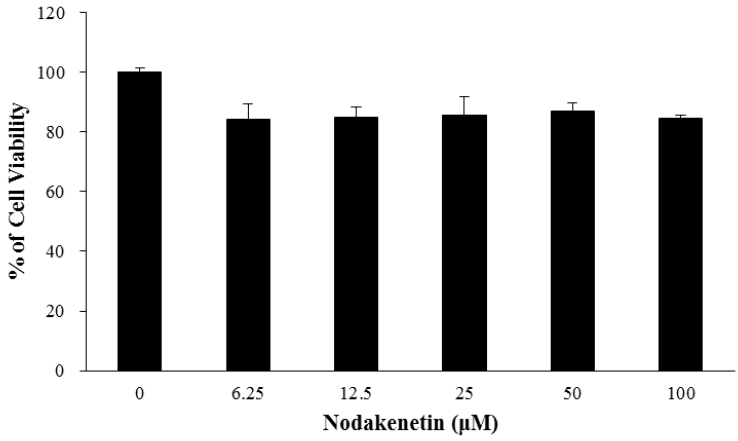


Figure 19. Cytotoxicity effect of nodakenetin in MC3T3-E1 cells

MC3T3-E1 cells were treated indicated concentrations of nodakenetin for 72 h. Cell viability was measured using the MTT assay.

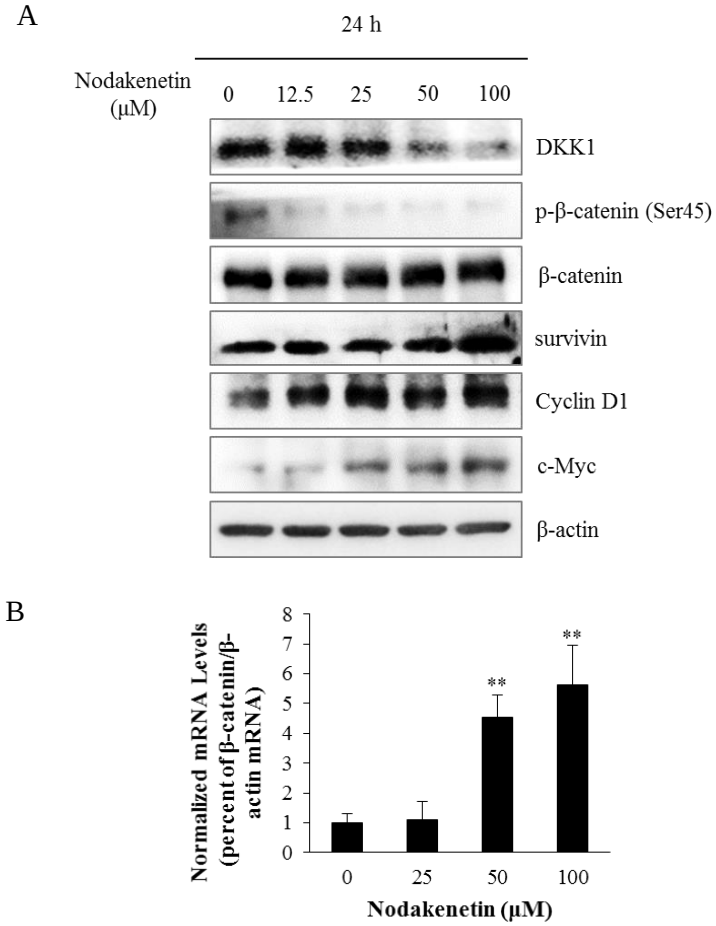


Figure 20. Effect of nodakenetin on Wnt signaling components and targets in MC3T3-E1 cells

A. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the protein expressions of Wnt signaling components and targets were determined by Western blot analysis. B. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 12 h, and the mRNA expressions of β-catenin were determined by real-time RT-PCR. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

4. 조골세포 분화에 미치는 효과

Nodakenetin이 조골세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여Alinzarin red S staining법을 이용하여 무기질화의 변화를 측정하고, alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 확인하였다.

분화를 유도하기 위하여 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate가 포함된 배지를 사용하였으며, 무기질화 실험시 10일간 배양하였으며 ALP 활성 측정시 6일간 배양하였다.

Nodakenetin을 처리하자 무기질화가 진행됨을 알 수 있었으며 양성대조군인 17β-estradiol과 다르게 조골세포의 분화에 기본적인 요소로 알려져 있는 ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 처리하지 않은 미분화 상태에서도 무기질화가 진행된 것을 확인하였다 (Figure 21).

ALP 활성 측정시에도 분화를 유도한 세포와 분화를 유도하지 않은 세포에서 모두 nodakenetin에 의해 ALP의 활성이 증가되었다. (Figure 22).

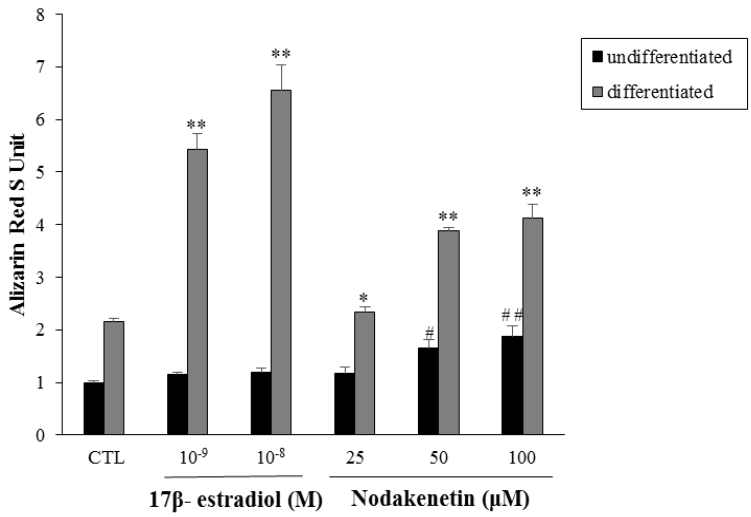


Figure 21. Enhancement of matrix mineralization in MC3T3-E1 cells by nodakenetin

Extracellular matrix (ECM) calcium deposits (bone nodule formation) for matrix mineralization were measured by Alizarin red S staining. Cells were cultured in 48-well plate for 10 days. For the osteoblast differentiation, the culture medium was changed to a fresh osteogenic medium containing 10 mM β-glycerophosphate and 50 μg/ml ascorbic acid to initiate matrix mineralization. (*p < 0.05, **p < 0.01 was considered statistically significant compared to differentiated MC3T3-E1 cells control. #p < 0.05, ##p < 0.01 was considered statistically significant compared to undifferentiated MC3T3-E1 cells control.)

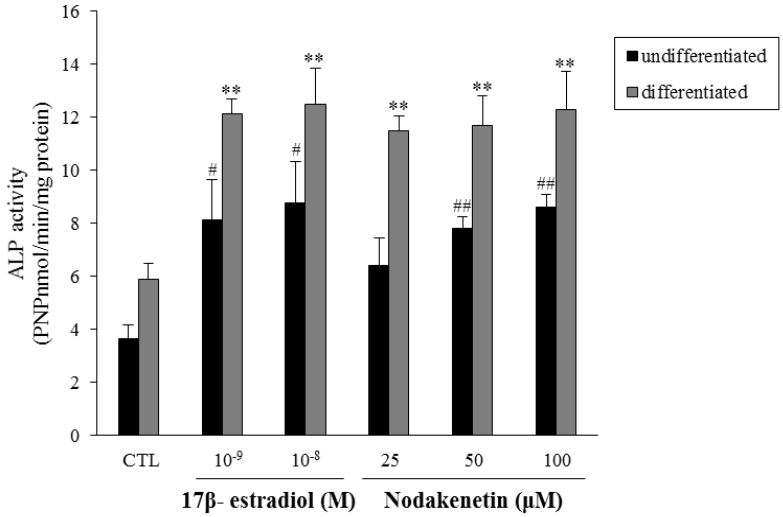


Figure 22. Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells by nodakenetin

To detect activity of ALP enzyme in media, a colorimetric enzyme assay was used. Increasing effects of indicated concentration nodakenetin on ALP activity were examined in MC3T3-E1 cells on 6 days. Asorbance was measured at λ = 405 nm and compared with p-nitrophenol (PNP) standard. The ALP enzyme activity was expressed as nmol PNP/min/mg protein. The protein contents of lysates were determined by the Bradford method. (*p < 0.05, **p < 0.01 was considered statistically significant compared to differentiated MC3T3-E1 cells control. #p < 0.05, ##p < 0.01 was considered statistically significant compared to undifferentiated MC3T3-E1 cells control.)

5. BMPs와 Runx2에 미치는 효과

조골세포의분화와 관련된 더욱 구체적인 작용기전을 확인하기 위하여 조골세포에서 Wnt signaling pathway의 타겟 유전자이자 조골세포의 분화를 유도하는 단백질인 bone morphogenetic proteins (BMPs)[39] 와 osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), type Ⅰ collagen등 간엽세포에서 조골세포로의 분화에 필요한 여러 유전자를 전사하는 역할인 runt-related transcriptional factor (Runx2)[40]의 발현을 살펴 보았다.

Figure 23에 나타낸 바와 같이 nodakenetin을 처리시 BMP2와 BMP4의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며 BMP2의 mRNA 발현도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Runx2의 mRNA level도 증가하는 것으로 나타나 이들 단백질 및 유전자의 변화가 조골세포의 분화에 관여하는 것으로 여겨진다.

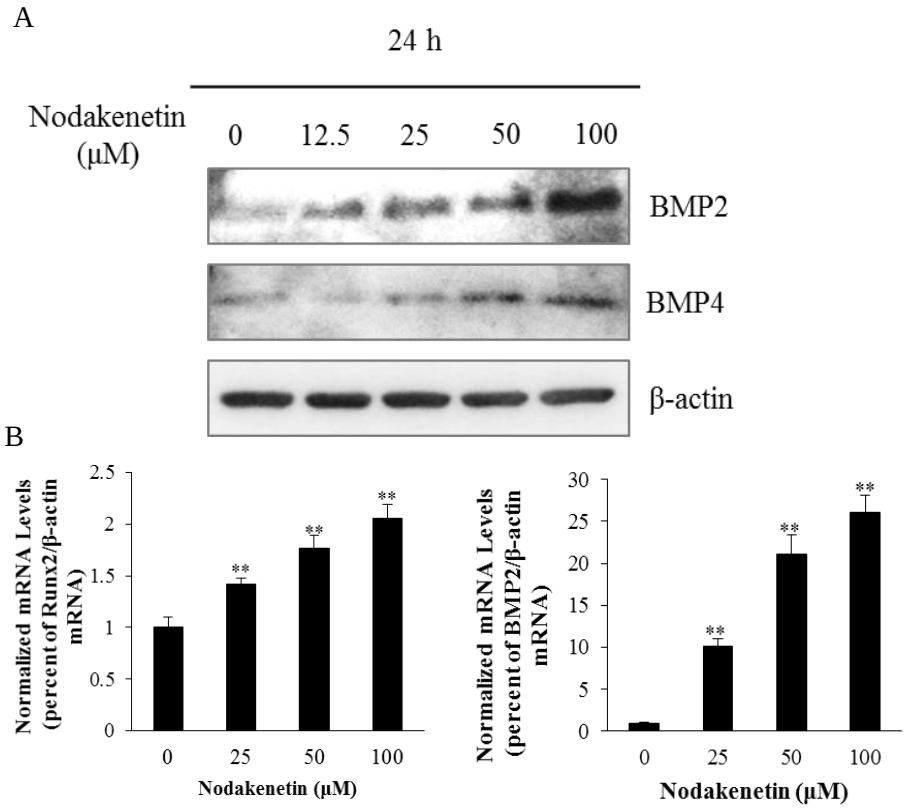


Figure 23. Elevation of BMPs and Runx2 by nodakenetin in MC3T3-E1 cells

A. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the protein expressions of Wnt signaling components and targets were determined by Western blot analysis. B. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 12 h, and the mRNA expressions of β-catenin and Runx2 were determined by real-time RT-PCR.

IV. 고 찰

현대사회는 평균 수명이 증가하고 있으며 삶의 질 향상에 대한 관심이 높다. 그러나 골다공증의 발병시 심각한 통증을 유발하게되고 골절 위험이 증가하며 보행의 어려움으로 질 높은 삶을 유지하기 어렵다. 현재 골다공증의 치료는 성숙한 파골세포의 활성을 억제하는 방법으로 이루어지며 이는 질병의 진행을 늦출 뿐 완벽한 치료로 보기 힘들고 세포의 파괴라는 심각한 부작용이 있다. 따라서 골다공증 치료를 위한 부작용이 없고 효과적인 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 조골세포가 분화될 때 Wnt signaling pathway가 활성화 된다는 사실에 착안하여 천연물 유래 물질을 이용하여 Wnt signaling pathway를 활성화시키는 물질을 스크리닝 하였으며 그 중 가장 효능이 높은 nodakenetin을 이용하여 조골세포의 분화에 관한 연구를 진행하였다.

Nodakenetin은 HEK293 세포 및 MC3T3-E1 세포에서 모두 80% 이상의 cell viability를 보였으므로 세포 독성을 보이지 않았다. 그러나 HEK293 세포와 달리 MC3T3-E1 세포에서는 nodakenetin을 처리시 상대적으로 낮은 cell viability를 보였는데 이는 nodakenetin에 의해 특이적으로 MC3T3-E1 세포가 분화 (differentiation)되면서 증식 (proriferation)이 감소한 것으로 여겨진다.

TOPflash reporter gene assay 실험결과 HEK293 세포에서 nodakenetin이 β-catenin/TCF transcriptional activity를 활성화

시켰으며 단백질 수준에서도 DKK1의 감소와 β-catenin의 증가, Wnt signaling의 타겟 유전자의 발현이 증가하였다. Pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포에서도 단백질 수준에서 같은 결과가 나왔으며 mRNA 수준에서도 β-catenin 이 증가하였다. 이를 통해 nodakenetin은 DKK1과 β-catenin을 조절하여 전사 활성에 영향을 미치고 최종적으로 Wnt signaling pathway를 활성화시킨다는 것을 알 수 있다.

또한 nodakenetin은 조골세포에서 Wnt signaling pathway의 주 타겟 유전자이자 조골세포 분화에 중요한 역할을 하는 BMPs와 Runx2를 증가시켰다. 즉 nodakenetin은 조골세포에서 Wnt signaling pathway를 활성화시킴으로써 조골세포의 분화를 촉진함을 예측할 수 있었고, 무기질화와 ALP activity를 확인함으로써 분화가 일어나는 것을 증명하였다.

골다공증뿐 아니라 골 관련 여러 질병들이 Wnt signaling pathway의 변이에 의해 발병한다는 것이 알려져 있으며[41], 최근에는 골다공증 환자의 혈액에서 주로 DKK1이증가되어 있다는 사실이 밝혀졌다[42]. Nodakenetin은 DKK1을 억제하면서 Wnt signaling pathway을 활성화시키므로 Wnt signaling pathway를 타겟으로 하 는효율적인 골다공증의 표적 치료제로서 가능성이 있다 사료된다.

참 고 문 헌

1. Neha Tiwari.; Alexander Gheldof, C.; Marianthi Tatari, C.; Gerhard Christofori. Seminars in Cancer Biology. 2012, 22, 194-207.
2. Kalluri R.; Weinberg RA. The Journal of clinical investigation. 2009, 119, 1420-1428.
3. Thiery JP.; Sleeman JP. Nature reviews. Molecular cell biology. 2006, 7, 131-142.
4. Vleminckx K.; Vakaet Jr L.; Mareel M.; Fiers W.; van Roy F. Cell. 1991, 66, 107-119.
5. Peinado H.; Olmeda D.; Cano A.; Nature reviews. Cancer. 2007, 7, 415-428.
6. Jakowlew S. Cancer metastasis reviews. 2006, 25, 435-457.
7. Massagué J. Cell. 2008, 134, 215-30.
8. Derynck R.; Zhang YE. Nature. 2003, 425, 577-584.
9. Jae Ho Choi; Yong Pil Hwang; Hyung Gyun Kim; Tilak Khanal. Nutrition and Cancer. 2014, 66, 140-151.
10. Jae Youl Cho1; Ae Ra Kim; Myung Hwan Park. Planta medica. 2001, 67, 312-316.
11. Kong WJ; Zhao YL; Xiao XH; Li ZL; Jin C; Li HB. Journal of applied microbiology. 2009, 107, 1072-1080.
12. Di Yu1; Shilong Fu; Zhifei Cao; Meimei Bao; Gaochuan Zhang; Yanyan Pan; Wenming Liu; Quansheng Zhou. Toxicology Letters.

2014, 26, 328-336.

13. Chomczynski P. BioTechniques. 1993, 15, 532-537.

14. Chomczynski P.; Sacchi N. Analytical Biochemistry. 1987, 162, 156-159.

15. Park EJ; Choi SJ; Kim YC; Lee SH; Park SW; Lee SK. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2009, 19, 2282-2284.

16. Calone I; Souchelnytskyi S. Experimental oncology. 2012, 34, 9-16.

17. Young-Joo Won; Hyun-Joo Kong; Chang-Mo Oh; Duk Hyoung Lee; Jin Soo Lee. Cancer research and treatment. 2014, 46, 109-123.

18. Jong In Yook; Xiao-Yan Li; Ichiro Ota; Eric. The Journal of biological chemistry. 2005, 280, 11740-11748.

19. Nieto, M. A. Nature reviews. Molecular cell biology. 2002, 3, 155-166.

20. Nakashima T; Huang C; Liu D; Kameyama K; Masuya D; Kobayashi S; Kinoshita M; Yokomise H. British journal of cancer. 2003, 88, 1727-1733.

21. Eriksson JE; Dechat T; Grin B; Helfand B; Mendez M; Pallari HM; Goldman RD. The Journal of clinical investigation. 2009, 119, 1763-1771.

22. Matsuo K; Irie N. Archives of biochemistry and biophysics. 2008, 473, 201-209.

23. Del Fattore A; Cappariello A; Teti A. Bone. 2008, 42, 19-29.

24. Harada S; Rodan GA. Nature. 2003, 423, 349-55.

25. Novack DV; Teitelbaum SL. Annual review of pathology. 2008, 3, 457-84.

26. Tang DZ; Hou W; Zhou Q; Zhang M; Holz J; Sheu TJ; Li TF; Cheng SD; Shi Q; Harris SE; Chen D; Wang YJ. Journal of bone and mineral research. 2010, 25, 1234-1245.

27. Maria P. Yavropoulou; John G. Yovos. HORMONES. 2007, 6, 279-294.

28. Hill TP; Spater D; Taketo MM; Birchmeier W; Hartmann C. Developmental cell. 2005, 8, 727-738.

29. Ikeda S; Kishida S; Yamamoto H; Murai H; Koyama S; Kikuchi A. The EMBO journal. 1998, 17, 1371-1384.

30. Day TF; Guo X; Garrett-Beal L; Yang Y. Developmental cell. 2005, 8, 739-750.

31. Yan Y; Tang D; Chen M; Huang J; Xie R; Jonason JH; Tan X; Hou W; Reynolds D; Hsu W; Harris SE; Puzas JE; Awad H; O'Keefe R; Boyce BF; Chen D. Journal of cell science. 2009, 122, 3566-3578.

32. Lo YC; Chang YH; Wei BL; Huang YL; Chiou WF. Journal of agricultural and food chemistry. 2010, 58, 6643-6649.

33. Jin X; Zhang XH; Zhao NC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1994, 19, 365-367, 384.

34. Chang TH; Adachi H; Okuyama T; Zhang KY. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1994, 15, 388-391.
35. Aida Y; Kasama T; Takeuchi N; Tobinaga S. Chemical & pharmaceutical bulletin. 1995, 43, 859-867.
36. Zhang JX; Fong WF; Wu JY; Yang M; Cheung HY. Planta medica. 2003, 69, 223-229.
37. Xu JF; Kong LY. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2001, 26, 178-180.
38. He L; Yang S; Wu D; Cui T; Wei D; Ding Z. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2012, 37, 811-813.
39. Yavropoulou MP; Yovos JG. Hormones (Athens). 2007, 6, 279-294.
40. Grace L. Lin; Kurt D. Hankenson. Journal of cellular biochemistry. 2011, 112, 3491-3501.
41. James J. Mason; Bart O. Williams. Journal of Osteoporosis. 2010, 2010, 460120-460129.
42. Rossini M; Gatti D; Adami S. Calcified tissue international. 2013, 93, 121-132.

Abstract

Inhibitory Effect of coptisine on Epithelial-to-Mesenchymal Transition

Eun Ju Jeong
Natural Products Science Major
College of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Coptisine, an isoquinoline alkaloid, is a component of *Coptis japonica* Makino (Ranunculaceae). *C. japonica* has been used as a traditional medicine for the treatment of fungal infection and inflammation. The present study was designed to investigate the inhibitory effect of coptisne on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells. EMT is a differentiation switch in which polarized epithelial cells differentiate into contractile and motile mesenchymal cells. Coptisine showed a

potential growth inhibitory activity in human lung cancer A549 cells (IC_{50}= 8.4 μM for 72 h). Coptisine increased E-cadherin promoter activity and the expressions of E-cadherin protein and mRNA level. In addition, coptisine down regulated the EMT-related protein expressions including Snail, MMP-2, vimentin, and N-cadherin. Coptisine also suppressed the expressions of phosphorylated ERK1, Akt and GSK3β in TGFβ-treated or untreated A549 cells. These results indicated that coptisine inhibited upstream signaling of Snail. Further study revealed that coptisine inhibited cell migration in the wound healing and colony dispersion assays. Cell invasion was also mediated by coptisine in the matrigel invasion assay. Coptisine might have a potential anti-metastatic activity, and thus will be a lead candidate as an anti-cancer agent.

Nodakenetin, a furanocoumarin compound, is a component of *Angelica decursiva* (Umbelliferae). *A. decursiva* is used as a traditional medicine to relive the symptoms associated with allergy and skin whitening. In the present study, the effect of nodakenetin anti-osteoporosis activity was evaluated. The Wnt signaling pathway is an evolutionarily conserved pathway involved in various biological events, including stem cell differentiation, cell motility, and cell proliferation. Activation of the Wnt signaling is known to contribute to differentiation in

osteoblast. Nodakenetin was found to have an activation effect β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity in HEK293 cells. The activation sequentially stimulated of Wnt signaling target genes and β-catenin in both HEK293 cells and MC3T3-E1 cells. In addition, nodakenetin surppressed the expression of DKK1, a Wnt inhibitor. Nodakenetin is considered a potent Wnt activator. Nodakenetin markedly increased alkaline phosphatase (ALP) activity and extracellular matrix (ECM) calcium deposits in osteoblast cells. These data demonstrated that nodakenetin activated the Wnt signaling, which increased BMPs and Runx2 expressions, and stimulated osteoblast differentiation. Therefore, the activation of Wnt signaling by nodakenetin is considered to be associated with the anti-osteoporotic activity.

Key words : Coptisine, EMT, E-cadherin, Snail, Nodakenetin, Wnt signaling, osteoblast

Student number : 2011-21770

creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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

약학석사학위논문

천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisine 의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

2014 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 천연물과학전공

정 은 주

천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisine 의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

지도교수 이 상 국

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014 년 7 월

서울대학교 대학원

약학과 천연물과학전공

정 은 주

정은주의 석사학위논문을 인준함

2014 년 7 월

위 원 장 _____ 김 영 식 (인)

부위원장 _____ 박 성 혁 (인)

위 원 _____ 이 상 국 (인)

초 록

천연물 유래 Alkaloid계 Coptisine의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

정은주
서울대학교 약학대학 대학원
천연물과학전공

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)은 상피세포 (epithelial cell)가 고유의 특성과 cell-cell junction을 잃고 간엽세포 (mesenchymal cell)의 형태와 성질을 획득하는 과정으로 암의 침윤, 전이의 중요한 특징이다. 본 연구에서는 사람 폐암 세포주인 A549를 이용하여 황련 (*Coptis japonica*)에서 분리된 isoquinoline alkaloid계 물질인 coptisine의 EMT 억제 효능을 확인하고 그 작용기전을 연구하였다. A549세포에 대한 세포 증식 억제 효능을 평가한 결과, coptisine에 의해 세포의 증식이 시간 및 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다 (IC_{50}; 42.7 μM (24h), 15.9 μM (48h), 8.4 μM (72h)). EMT와 관련한 작용기전을 알아본 결과, coptisine은 암의 진행을 억제하고 세포간 연결을 유지하여 이동성을 감소시키는 E-cadherin의

유전자와 단백질의 발현을 모두 증가시켰다. 또한 E-cadherin의 내인성 억제제로 작용하는 Snail에도 영향을 미쳐 유전자와 단백질의 발현을 억제하였다. 그 외에 EMT에서 특이적으로 변화하는 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), vimentin, N-cadherin 등에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 wound healing assay, colony dispersion assay, invasion assay 등을 통해 coptisine이 A549 세포의 이동성, 침윤성을 저해함을 밝혔다. 더욱 구체적인 EMT 저해 기전을 알아보기 위해 transforming growth factor β1 (TGF β1)를 처리한 A549 세포에서 coptisine의 효과를 살펴본 결과 Extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2, Akt, glycogen synthase kinase3β (GSK3β) 의 인산화를 억제하였으며 Smad 신호전달체계도 억제하였다. 이로인해 coptisine이 Snail의 상위 신호전달체계에 영향을 미쳐 Snail의 발현을 저해하는 것을 알 수 있으며, 이러한 coptisine의 Snail 억제와 E-cadherin 증가 작용을 통해 EMT가 효과적으로 저해되는 것으로 여겨진다. 따라서 coptisine은 암 전이 치료의 천연 후보 물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

골 항상성 (bone homeostasis)은 파골세포 (osteoblast)의 골 흡수 (bone resorption)와 조골세포 (osteoblast)의 골 형성 (bone formation)에 의해 유지되며 항상성이 파괴될 경우 골다공증과 같은 골 관련 질환이 발생한다. 조골세포는 Wnt 신호전달체계에 의해 분화가 촉진되어 extracellular matrix (ECM) 단백질의 발현과 무기질화 (mineralization)가 일어나며 이러한 이유로 Wnt 신호전달체계의 활성화는 골다공증 치료제의 새로운 표적으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 천연물 중 바디나물 (*Angelica decursiva*)에서 분리한 furano-coumarin계열의 nodakenetin이 Wnt 신호전달체계를 활성화시켜 조골세포의 분화에 영향을 미치는지 살펴보았다. Nodakenetin은 인간 신장 배아 세포주인 HEK293 세포와 쥐 전조골세포주인 CM3T3-E1 세포에서 T-cell factor/Lymphoid-enhancing factor (TCF/Lef)의 전사활성을 크게

증가시켰다. Wnt 신호전달체계의 저해자인 Dickkopf1 (DKK1)을 감소시키고 반대로 β-catenin은 크게 증가시켰다. Wnt 신호전달체계의 표적 유전자의 발현을 증가 시켰으며 그 중 조골세포 분화와 관련된 runt-related transcription factor2 (Runx2)의 유전자와 bone morphogenetic protein (BMP)의 발현을 증가시켰다. MC3T3-E1 세포에서 Alizarin red S staining과 alkaline phosphatase (ALP) activity를 수행한바, 무기질화가 증가하고, ALP가 활성화되어 조골세포의 분화를 촉진하는 것을 확인하였다. 결과적으로 nodakenetin은 조골세포의 분화를 촉진하는 골다공증의 치료에 유효한 선도물질로 사료된다.

주요어 : coptisine, EMT, E-cadherin, Snail, nodakenetin, osteoblast differentiation, Wnt signaling

학번 : 2011-21770

목 차

초 록 i
목 차 iv
그 림 목 차 vii
표 목 차 x

Part 1. 천연물 유래 Alkaloid 계 Coptisne 의 Epithelial-to- Mesenchymal Transition 억제 연구 1

I. 서 론 2
II. 실험 재료 및 방법 6
A. 실험 재료 6
1. 시약 6
2. 시험물질 7
3. 세포 배양 7
B. 실험 방법 9
1. 세포 독성 실험 (SRB assay) 9
2. Transfection and luciferase reporter gene assay 10
3. Western blot analysis 10

4. Reverse transcription real-time PCR 11
5. Wound healing assay 13
6. Colony dispersion assay 13
7. Invasion assay 13
III. 실험 결과 16
1. Coptisine 의 사람 폐암 세포에 대한 증식 억제 효과 16
2. E-cadherin promoter 에 미치는 효과 18
3. EMT 관련 단백질과 mRNA 의 발현에 미치는 효과 20
4. 세포의 이동성에 미치는 효과 23
5. 세포의 침윤성에 미치는 효과 26
6. ERK 와 Akt 의 인산화에 미치는 효과 28
7. TGFβ를 처리한 A549 에서 ERK 와 Akt 의 인산화, E-cadherin 과 Snail 의 발현에 미치는 효과 30
8. TGFβ관련 단백질인 Smad 에 미치는 효과 32
IV. 고 찰 34

Part 2. 천연물 유래 Coumarin 계 Nodakenetin 의 조골세포 분화 연구 36

I. 서 론 37
II. 실험 재료 및 방법 41
A. 실험 재료 41

1. 시약 41
2. 시험물질 42
3. 세포 배양 42
B. 실험 방법 44
1. 세포 독성 실험 (MTT assay) 44
2. Transfection and luciferase reporter gene assay 44
3. Western blot analysis 45
4. Reverse transcription real-time PCR 46
5. Measurement of Alkaline phosphatase (ALP) activity 47
6. Measurement of extracellular matrix (ECM) calcium deposits 47
III. 실험 결과 50
1. Nodakenetin 의 β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity 에 미치는 효과 50
2. Wnt signaling pathway 에 관련된 단백질에 미치는 효과 53
3. 조골세포에서 Wnt signaling pathway 에 관련된 단백질에 미치는 효과 56
4. 조골세포 분화에 미치는 효과 59
5. BMPs 와 Runx2 에 미치는 효과 62
IV. 고 찰 64
참 고 문 헌 66
Abstract 70

그 림 목 차

Figure 1. Overview of EMT 5

Figure 2. Chemical structure of coptisine. 8

Figure 3. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells 17

Figure 4. Effect of coptisine on E-cadherin promoter activities in HEK293 cells 19

Figure 5. Effect of coptisine on the EMT related protein in A549 cells 21

Figure 6. Effect of coptisine on E-cadherin and Snail mRNA expression in A549 cells 22

Figure 7. Inhibitory effect of coptisine on the migration in A549 cells 24

Figure 8. Inhibitory effect of coptisine on the activities of colony dispersion assays in A549 cells 25

Figure 9. Inhibitory effect of coptisine on the activities of invasion assays in A549 cells 27

Figure 10. Effect of coptisine on phosphorylation of Akt, ERK1/2 and GSK3β in A549 cells 29

Figure 11. Effect of coptisine on TGFβ1 - induced

phosphorylation of Akt or ERK1/2 and expression of snail, E−cadherin in A549 cells 31
Figure 12. Effect of coptisine on phosphorylation of Smad2/3 and Smad7 in A549 cells 33
Figure 13. Overview of Wnt signaling pathway and differentiation in osteoblast 40
Figure 14. Chemical structure of nodakenetin 43
Figure 15. β−catenin/TCF responsive transcription by nodakenetin in HEK293 cells 51
Figure 16. Cytotoxicity effect of nodakenetin in HEK293 cells 52
Figure 17. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling components in HEK293 cells 54
Figure 18. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling target genes in HEK293 cells 55
Figure 19. Cytotoxicity effect of nodakenetin in MC3T3−E1 cells 57
Figure 20. Effect of nodakenetin on Wnt signaling components and targets in MC3T3−E1 cells 58
Figure 21. Enhancement of matrix mineralization in MC3T3−E1 cells by nodakenetin 60
Figure 22. Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity

in MC3T3-E1 cells by nodakenetin.....61

Figure 23. Elevation of BMPs and Runx2 by nodakenetin in MC3T3-E1 cells.....63

표 목 차

Table 1. Sequences of EMT related primers used in real-time RT-PCR 15
Table 2. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells 17
Table 3. Sequences of osteoblast differentiation related primers used in real-time RT-PCR 49

Part 1. 천연물 유래 Alkaloid계 Coptisine의 Epithelial-to-Mesenchymal Transition 억제 연구

I. 서 론

Epithelial- to - mesenchymal transition (EMT)은 상피세포 (epithelial cell)가 고유의 특성과 cell-cell junction을 잃고 간엽세포 (mesenchymal cell)의 세포의 형태와 성질을 회득하는 과정이다. 간엽세포의 특성을 가지면 세포는 침윤 (invasion)과 전이 (migration)가 증가한다[1]. EMT는 조직에서의 역할에 따라 3가지로 분류된다. 제1형은 배아의 착상, 낭배형성 (gastrulation), 신경능선세포 (neural crest cell)의 이동에 작용하는 EMT, 제2형은 상처의 치유, 조직의 재생, 염증반응과 관련된 EMT, 제3형은 암세포가 상피세포에서 전이성 간엽세포로 전환되는 EMT를 나타낸다. 제3형 EMT는 암과 밀접한 관련이 있으며 암세포의 분화에 반대작용을 하며 침윤, EMT와 MET이 반복과 유사한 전이, 재발에 관여한다[2].

EMT 과정에는 epithelial marker의 감소와 mesenchymal marker의 증가가 특징적으로 나타난다. Epithelial marker로는 tight junction에 관여하는 단백질인 claudins 등과 adherens junction에 관여하는 E-cadherin, α/β-catenin 등이 있다. 반대작용을 하게 되는 mesenchymal marker로는 N-cadherin, vimentin, matrix metalloproteinase (MMPs) 등이 있다[3].

E-cadherin은 세포간 연결을 유지하여 세포의 이동이나 침윤, 전이를 예방하여 tumor progression을 억제하는 역할을 한다. 대부분의 암세포에서 E-cadherin 유전자가 감소되어 있으며[4], 이는 E-cadherin의 transcriptional repressor인 Snail-1/2, Zeb-1/2, Twist

에 의해 조절된다. Zinc finger transcription factor인 Snail은 E-cadherin의 억제제로 단독 또는 Wnt/β-catenin/TCF와의 작용으로 EMT를 유도한다. Snail은 β-catenin과 같이 glycogen synthase kinase3β (GSK3β) 의존적 인산화를 통해 β-TrCP에 의한 ubiquitination과 proteasomal degradation 과정을 거친다[5].

Transforming growth factor β (TGFβ)는 암의 진행 단계에 따라 종양을 억제하기도 하고 진행을 촉진시키기도 하는 이중적인 역할을 한다. 암의 초기 단계에서는 세포의 주기와 apoptosis를 유도하고 유전체의 완전성을 유지하여 종양의 성장을 억제하지만 암이 일정 크기 이상으로 성장한 후기 단계에서는 암세포가 TGFβ에 의한 성장 저해에 저항성을 가지게 되고 TGFβ가 EMT를 유도하고 암의 성장과 전이, 신혈류 생성, 면역 기전의 회피 등에 기여함으로써 도리어 암으로의 진행을 촉진한다[6-7].

TGFβ는 Smad signaling pathway를 통해 EMT의 중요한 매개자로서 작용한다. TGFβ는 type Ⅰ과 type Ⅱ 두 개의 serine/threonine kinases receptor의 complex 형성에 의해 작용하는데 이 complex는 Smad2, Smad3을 인산화하여 Smad signaling pathway를 활성화한다[8]. 또한 TGFβ는 EMT에서 세포의 분화단계에 영향을 미치는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p38 Mitogen-activated protein (MAP) kinase에도 작용한다[9].

황련 (*Coptis japonica* Makino)은 미나리아제비과 (Ranunculaceae)에 속하는 약용식물로 중국, 일본, 한국 등에 분포되어

있다. 소염작용과 항균작용, 중추신경작용이 알려져 있으며 전통적으로 위염, 장염, 복통, 이질, 불안 등에 쓰였다. 황련의 함유 성분으로는 isoquinoline alkaloid, phenolic compound, lignan, coumarinoligan, sesquilignan 계열의 물질이 있다[10]. 이 중 coptisine은 isoquinoline alkaloid계 물질로서 berberine과 구조적 유사성을 가지며 항진균 효과가 있는 것으로 알려져 있고[11] berberine과 함께 osteosarcoma에서의 항암 작용이 보고되었다[12].

본 연구에서는 coptisine이 비소폐암세포주 (non-small lung cancer cell line)인 A549의 성장 억제효능과 TGFβ를 처리하여 EMT를 유도한 A549 세포에서 EMT 관련 biomarker를 확인하여 TGFβ에 의해 유도된 EMT 상태에서의 EMT 관련 작용기전의 조절 효능을 확인하고자 하였다.

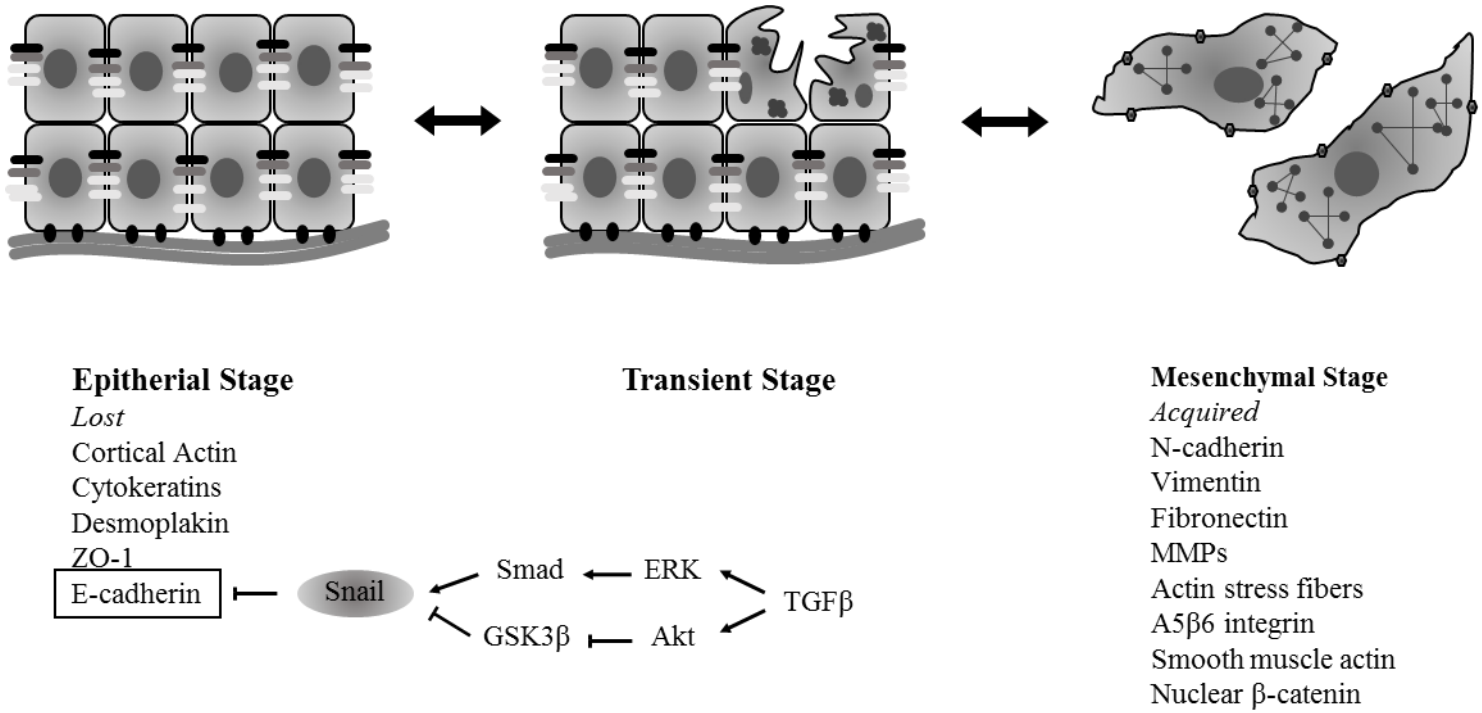


Figure 1. Overview of EMT.

II. 실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), antibiotics-antimycotics solution 및 trypsin-EDTA 은 Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA) 에서 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP, goat anti-goat IgG-HRP, survivin, Smad7, β-actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p-β-catenin, ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt (T308) snail, E-cadherin, MMP2, vimentim, p-Smad2, p-GSK3α/β (S21/9) 및 GSK3β antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 c-Myc, cyclin D1, β-catenin, p-GSK3β (Y216), Smad2/3 antibody는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. PCR primer로 이용한 oligonucleotide는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였다. AMV reverse transcriptase, dNTP mixture, random primer, RNasin 및 Taq polymerase와 Dual Luciferase® Reporter Assay System Kit는 Promega (Madison, WI, USA) 에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), trichloroacetic acid (TCA), L-ascorbic acid, β-glycerophosphate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 이외 명시되어 있지 않은 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 시험 물질

시험에 사용한 coptisine은 식약처 한약재품질표준화사업단으로부터 제공받아 DMSO를 사용하여 stock solution을 만들어 −20℃에서 저장한 후 필요시 희석하여 사용하였다 (Figure 2).

3. 세포 배양

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포와 human lung cancer cell line인 A549 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. HEK293 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics (100 U/mL penicillin G sodium, 100 μg/mL streptomycin sulfate 및 0.25 μg/ml amphotericin B)를 포함하는 DMEM에서 배양하고, A549 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics를 포함하는 RPMI에서 배양하였다. 모든 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 1주일에 3회 계대 배양하였다.

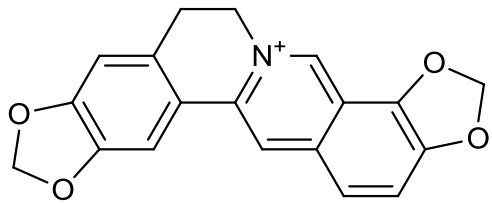


Figure 2. Chemical structure of coptisine.

B. 실험 방법

1. 세포 독성 실험 (SRB assay)

10% DMSO 에 녹아 있는 시료를 96-well plate의 각 well 에 10 μl 씩 triplicate로 loading하여 test plate를 만든 후 10% FBS 가 포함된 배지에 5.0×10^4cells/ml 이 되게 희석한 세포를 190 μl씩 가해 총 양이 200 μl가 되게 하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 시간 별로 배양하였다. 그와 동시에 coptisine를 넣지 않은 96well plate에 동일한 세포 현탁액 190 μl씩 16well 이상을 넣고 같은 조건에서 30분간 배양하여 zero-day로 하였다. 24-36 시간 배양 후 50% trichloroacetic acid (TCA)를 50 μl씩 가한 후 4℃ 에서 30분 배양시켜 세포를 고정하였다. 이후 수돗물로 5회 세척하고 건조시켰다. 각 well에 0.4% sulforhodamine B (SRB) 를 포함하는 1% acetic acid 용액을 80 μl씩 넣어 상온에서 한 시간 방치하여 세포를 염색하였다. 1%acetic acid와 수돗물로 5회 세척하여 충분히 건조시킨 후 각 well에 10mM Tris-base(pH10.0) 200 μl을 가하여 염색 dye를 용해한 후 ELISA microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. Vehicle (DMSO) 을 처리한 control과 흡광도를 비교하여 검색 시료의 각 농도 별 % of cell viability을 계산하였고, Tablecurve ver. 10 program을 이용한 non-linear regression analysis를 통하여 50%의 세포 증식 억제 효능을 나타내는 농도인 IC_{50}를 구하였다.

$$\text{Cell survival (\%)} = \frac{\text{OD 515nm(sample)} - \text{OD 515nm(zero day)}}{\text{OD 515nm(control)} - \text{OD 515nm(zero day)}} \times 100$$

2. Transfection and luciferase reporter gene assay

48-well plate에 HEK293 세포 (1.5×10^4cells/well)를 24시간 배양 후 luciferase reporter plasmid (E-cadherin wild type promoter) 0.032 μg과 *Renilla* gene 0.001 μg, pc-snail 0.004 μg 혹은 PC3.1 vector 0.004 μg 등을 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen)을 사용하여 형질주입하였다. 24시간 배양 후 시료 혹은 용매 control을 처리하였다. 24시간 배양 후 세포를 녹여 얻은 lysates를 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega®)을 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

3. Western blot analysis

A549 세포 (7×10^4 cells/ml)를 100 mm dish에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 24시간 배양하였다. Dish를 PBS로 1회 세척하고 coptisine이 포함한 배지로 지시된 시간에 따라 배양하였다.

배양 후 cold PBS로 1회 세척하고 끓고 있는 cell lysis buffer를 넣고 scraper로 긁어 모아 이를 100℃에 5분간 두었다. 식힌 후 -20℃에서 보관하였고 사용 직전에 37℃에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동 하였다. 단백질 정량은 BCA법을 이용하였고 10-40 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서 2시간 30분 동안 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane (Millipore,

Bedford, MA, USA)으로 transfer 하였다. Membrane을 blocking buffer(5% BSA in TBST)로 실온에서 shaker에 두어 1시간 동안 배양하였다. 이후 primary antibody를 1:1,000-1:2,000 정도가 되도록 2.5% BSA가 포함된 TBST에 희석하여 membrane과 함께 4℃에서 12시간 배양하였다. Membrane을 TBST로 5분씩 2-3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:1,500-1:2,000으로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 2시간 배양하였다. 이를 TBST로 5분간 3-4회 세척한 후 ECL Western blotting detection reagents (LabFrontier, Suwon, Korea)를 처리하여 생성된 luminescence를 LAS 4000 (Fuji Film Corp, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

* Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 정량법

Cell lysate 10 μl를 microcentrifuge tube에 넣은 후 각 tube에 10% TCA solution을 1 ml씩 첨가하여, 10분간 4℃에서 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. TCA solution을 제거하고 bicinchoninic acid (BCA)와 copper sulfate의 비가 40대 1이 되도록 섞은 BCA solution을 1 ml씩 첨가하였다. 60℃에서 1시간 방치 후 각각의 용액을 96-well plate에 200 μl씩 옮겨 595 nm에서 흡광도를 측정하여 BSA에 의한 standard curve를 통해서 단백질을 정량하였다.

4. Reverse transcription real-time PCR

A549 세포 (7×10^4 cells/mL)를 60 mm dish에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 24시간 후 PBS로 1회 세척하고 coptisine를

포함한 배지를 처리하였다. 12시간 동안 배양한 후 Chomczynski and Sachhi의 제안 방법[13-14]으로 RNA를 분리하였다. 각 dish를 PBS로 1회 세척한 다음 TRI reagent (Invirogen) 1 ml를 가하여 세포를 모은 후 chloroform을 처리하고 원심 분리해 세포 내의 RNA가 추출된 상등액만 따내었다. Isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시키고 75% ethanol로 세척하고, 후드에서 건조시킨 후 RNA pellet을 nuclease-free water에 녹였다. 이를 55℃에서 10분간 가열하여 RNA의 용해도를 증가시킨 다음 바로 얼음에 5분 이상 방치하여 RNA가 single strand 상태로 존재하도록 하였다.

Nano drop을 이용하여 정량 후 1 μg/μl로 희석하고 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 oligo dT primer를 가하여 RT-PCR 기기 (Amp PCR gene system)에서 42℃에서 60분, 99℃에서 5분을 유지하는 조건으로 cDNA를 linear strand 상태로 합성하였다. 50배 희석시킨 cDNA 용액 5 μL에 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)와 Table 1. 에 제시된 primer를 넣어 총 부피를 20 μl로 만들었다. 이를 MiniOpticon system (Bio-Rad)을 이용하여 PCR 반응을 진행하였다. C_T 값은 증폭된 target gene의 양이 역치에 도달하였을 때의 cycle 값을 의미하므로 각 수치는 Threshold Cycle (C_T)값으로 나타내며, 각 시료에서의 C_T 값을 MJ Opticon Monitor software를 이용하여 comperative C_T Method(⊿⊿C_T Method)에 의해 계산하여 분석하였다.

5. Wound healing assay

A549 세포 (5 × 10^4 cells/ml)를 12-well plate에 1ml씩 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 plate 면적의 90%로 찰 때까지 배양하였다. 그 후 yellow tip을 이용하여 well 가운데에 직선으로 상처를 낸 뒤 1% FBS contained RPMI로 처리하고 1시간 후 현미경에서 사진 촬영을 하여 control로 하였다. 1% FBS contained RPMI에 coptisine을 희석하여 처리하여 일정 시간이 지난 후 현미경으로 사진촬영을 하였다.

6. Colony dispersion assay

A549 세포 (5 × 10^5 cells/ml)를 24-well plate의 정 중앙에 20 μl씩 loading 하고 37℃, 5% CO_2 조건에서 세포가 well 표면에 부착하도록 6시간 정도 배양하였다. 1% FBS contained RPMI를 1 ml씩 조심스럽게 넣어주고 2시간 동안 안정화시킨 후 배지를 덜어내고 다시 1% FBS contained RPMI에 coptisine을 희석하여 1 ml씩 넣어주고 필요한 시간만큼 배양하였다. PBS로 세척 후 고정하기 위하여 4% p-formaldehyde를 250 μl씩 넣고 20분 동안 방치하였다. PBS로 2회 세척하고 hematoxylin 와 Eosin Y solution을 250 μl씩 순서대로 10분간 처리하여 염색하였다. 마지막으로 PBS로 세척하고 사진 촬영을 하였다.

7. Invasion assay

Transwell을 핀셋을 이용하여 거꾸로 놓고 15 μl의 0.2% gelatin을

membrane 바깥의 중앙에 떨어뜨리고 tip을 이용해 고르게 분포하도록 잘 펴발랐다. 1시간 동안 건조시킨 후 뒤집어 원래 상태로 놓고 10 μl의 3.3% metrigel (in PBS)로 transwell 안쪽 membrane을 coating 하여 1시간 동안 건조시켰다. 24-well plate에 10% FBS contained RPMI을 600 μl을 넣고, transwell에 coptisine을 처리한 A549 세포 (2×10^4 cells/ml)를 100 μl씩 넣어 37℃, 5% CO_2 incubator에서 48시간 배양하였다. 이후 transwell 안의 배지를 완전히 제거하고 PBS로 1회 세척하고 transwell의 안쪽을 면봉을 이용해 닦아낸 후 4% p-formaldehyde에 10분간 두어 고정하였다. PBS와 증류수로 세척하고 1% crystal violet으로 15분간 염색했다. 수돗물로 세척하고 현미경으로 사진촬영 하였다.

Table 1. Sequences of EMT related primers used in real-time RT-PCR.

Target genes		Sequences
Human E-cadherin	Sense	5' -GTTATTCCTCCCATCAGCTGCCCA-3'
	Anti-sense	5' -CTTGGCTGAGGATGGTGTAAGCG-3'
Human Snail	Sense	5' -AGCCTAACTACAGCGAGC-3'
	Anti-sense	5' -GGTGGGGTTGAGGATCTC-3'
Human β-actin	Sense	5' -CCAACCGCGAGAAGATGA-3'
	Anti-sense	5' -CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'

III. 실험 결과

1. Coptisine 의 사람 폐암 세포에 대한 증식 억제 효과

Coptisine을 사람 폐암 세포주인 A549세포에 시간 및 농도별로 처리한 후 SRB 실험법을 통해 폐암 세포에 대한 증식 저해 효능을 확인하였다. 그 결과 Figure 3에서 나타낸 바와 같이, coptisine의 농도가 증가할수록 세포 증식 억제 효과가 더욱 뚜렷하게 나타났고, 처리시간이 길어질수록 세포 증식 억제 효과가 높게 나타났으며 처리 시간별로 IC_{50} 값의 차이가 큰 특징을 보였다 (IC_{50}; 42.7 μM (24h), 15.9 μM (48h), 8.4 μM (72h)).

A

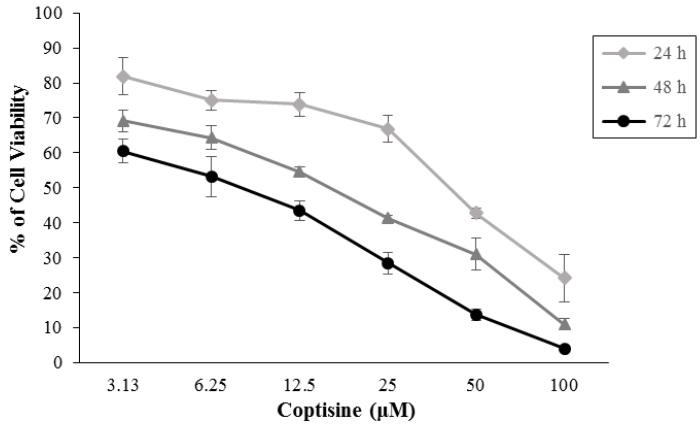


Figure 3. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells

A549 cells were treated indicated concentrations of coptisine for 24, 48 and 72 h. Cell proliferation was measured using the SRB assay.

Table 2. Effect of coptisine on cell viability in A549 cells

Time (h)	24	48	72
IC_{50} (μM)	42.7	15.9	8.4

2. E-cadherin promoter에 미치는 효과

Epithelial marker인 E-cadherin의 감소는 EMT의 진행과 관련된 큰 특징으로 알려져 있어 coptisine 처리에 의한 E-cadherin promoter activity의 변화를 살펴보았다.

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포에 E-cadherin promoter gene을 형질주입 한 뒤 coptisine을 농도별로 처리한 결과, coptisine의 농도가 증가할수록 E-cadherin의 발현이 증가하였다 (Figure 4). E-cadherin의 내인성 억제자인 Snail이 존재할 때에도 coptisine이 E-cadherin의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 E-cadherin promoter gene과 함께 PCR3.1 vector 또는 Snail gene을 형질주입하여 결과를 비교해보았다. E-cadherin promoter gene과 vector를 형질주입한 결과는 E-cadherin promoter gene만 형질주입한 결과와 유사하게 나타났으며 coptisine 처리에 의해 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다. E-cadherin promoter gene과 Snail gene을 함께 형질주입하였을 때는 E-cadherin promoter가 Snail에 의해 억제되어 전체적으로 relative luciferase unit이 감소하였으며 coptisine에 의해 농도 의존적으로 E-cadherin의 발현이 증가하였다.

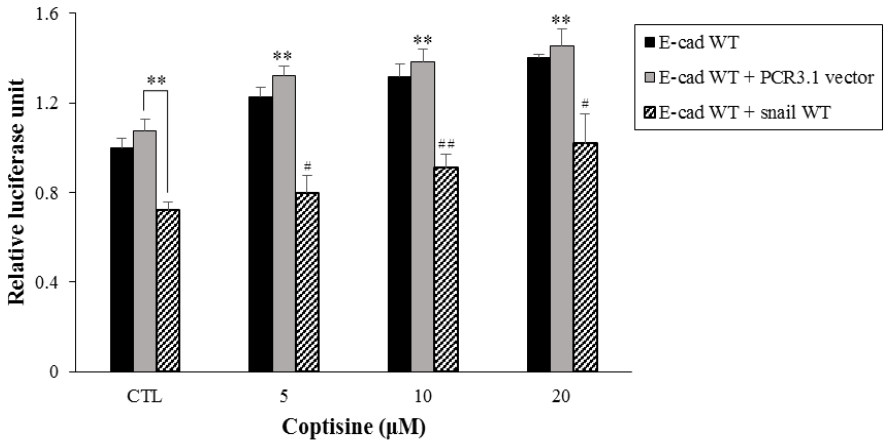


Figure 4. Effect of coptisine on E-cadherin promoter activities in HEK293 cells

HEK293 cells were transiently transfected with E-cadherin wild type promoter, Snail wild type plasmid and PCR3.1 vector for 24 h and treated with coptisine (5, 10 and 20 μM) for 24 h. Luciferase activity was estimated using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and expressed as relative units. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$ was considered statistically significant compared to PCR3.1 verctor-treated control. $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ was considered statistically significant compared to Snail wild type plasmid-treated control.)

3. EMT관련 단백질과 mRNA의 발현에 미치는 효과

Coptisine에 의한 EMT관련 단백질 및 유전자의 변화를 살펴보기 위하여 대표적인 epithelial marker인 E-cadherin과 이를 억제하는 Snail, 그리고 mesenchymal marker인 MMP-2, N-cadherin, vimentin의 변화를 확인하였다.

A549 세포에 coptisine을 24시간 동안 처리한 후 cell lysate를 모아 Western blot 법을 수행하였다. 그 결과 Snail의 발현이 coptisine에 의해 감소하고, 반대로 E-cadherin의 발현은 증가하였다 (Figure 5). MMP-2, N-cadherin, vimentin은 농도 의존적이지 않았지만 고농도로 처리시약간의 감소를 보였다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 12시간 처리한 후 real-time RT-PCR 법을 이용하여 mRNA의 발현 변화를 확인하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 coptisine의 농도가 증가할수록 E-cadherin의 mRNA level이 증가하였다. 이와 반대로 Snail의 mRNA 발현은 coptisine의 농도가 증가할수록 감소되었다. 결과적으로 coptisine은 EMT에 중요한 역할을 하는 Snail과 E-cadherin의 단백질 및 mRNA의 발현을 조절하여 EMT를 억제하는 것으로 여겨진다.

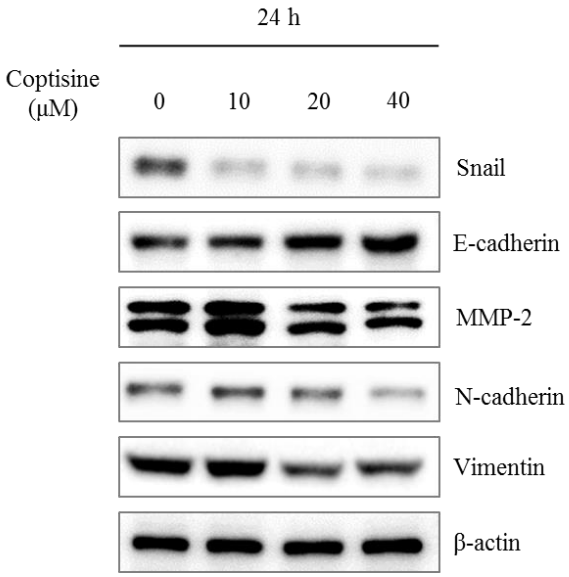
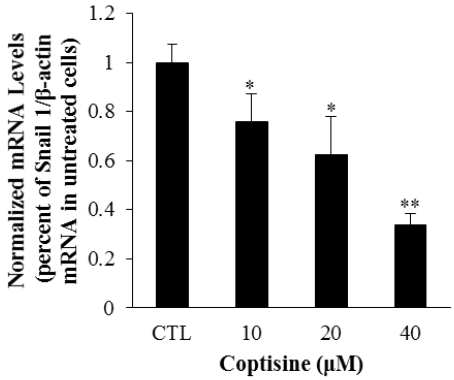


Figure 5. Effect of coptisine on the EMT related protein in A549 cells

Western blot of snail, E-cadherin, MMP-2, N-cadherin, Vimentin in A549 cells after 24 h of treatment with indicated concentration (10, 20 and 40 μM) of coptisine.

A



B

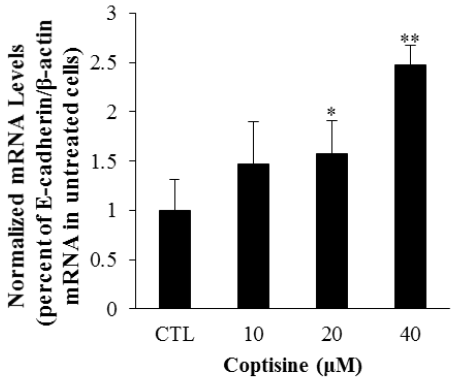


Figure 6. Effect of coptisine on E-cadherin and Snail mRNA expression in A549 cells

A549 cells were treated of indicated concentration coptisine for 12 h. The expression level of E-cadherin (A) and Snail (B) were examined using real-time RT-PCR. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

4. 세포의 이동성에 미치는 효과

세포의 이동성 증가는 암이 진행되어 전이성이 증가했음을 알게 해주는 중요한 요소이다. 이러한 이동성에 coptisine이 미치는 효과를 알아보기 위하여 Wound healing assay와 colony dispersion assay를 수행하였다.

Wound healing assay에서는 12well plate에 부착시킨 세포를 white tip으로 길게 상처를 낸 뒤 DMSO를 처리한 control과 IC_{50}보다 낮은 농도인 5, 10, 20 μM의 coptisine을 36시간 처리하여 이동성을 확인하였다. 그 결과 coptisine을 처리시 농도의존적으로 세포의 이동성이 감소하는 것으로 나타났다 (Figure 7).

Colony dispersion assay에서는 A549 세포 (5×10^5 cells/ml)를 24 well plate 가운데에 20 μl을 점적하여 배양 후 DMSO를 처리한 control과 IC_{50}보다 낮은 농도의 2.5, 5, 10 μM의 coptisine을 처리하여 colony의 퍼짐성을 확인하였다. 그 결과 coptisine의 농도가 증가하고 처리시간이 길어질수록 colony의 크기가 작아졌다.

이 두 결과를 통하여 coptisine이 암세포의 전이와 관련된 A549 세포의 이동성을 감소시킴을 알 수 있다.

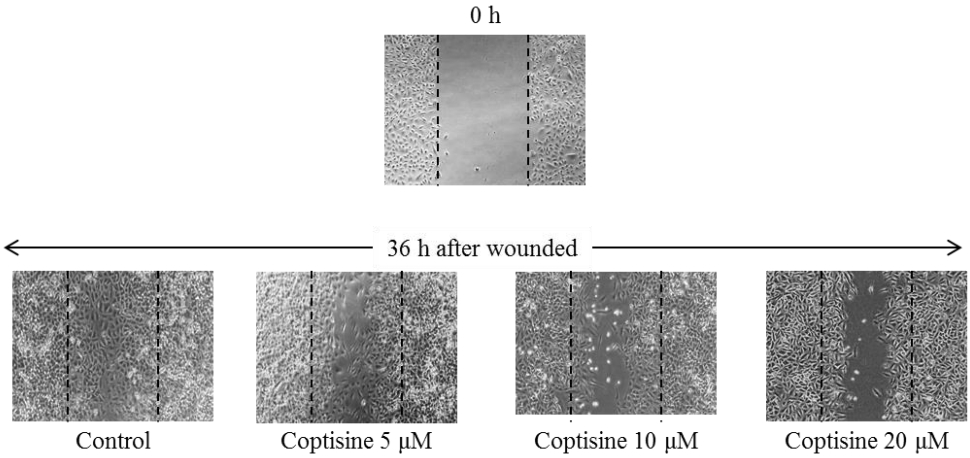


Figure 7. Inhibitory effect of coptisine on the migration in A549 cells

The cells (7×10^4 cells/ml) were incubated in 12 well plate for 1 day, and then wounded with a white tip (10 μl) and treated with the indicated concentrations of coptisine. After 36 h incubation, cells were photographed (×40).

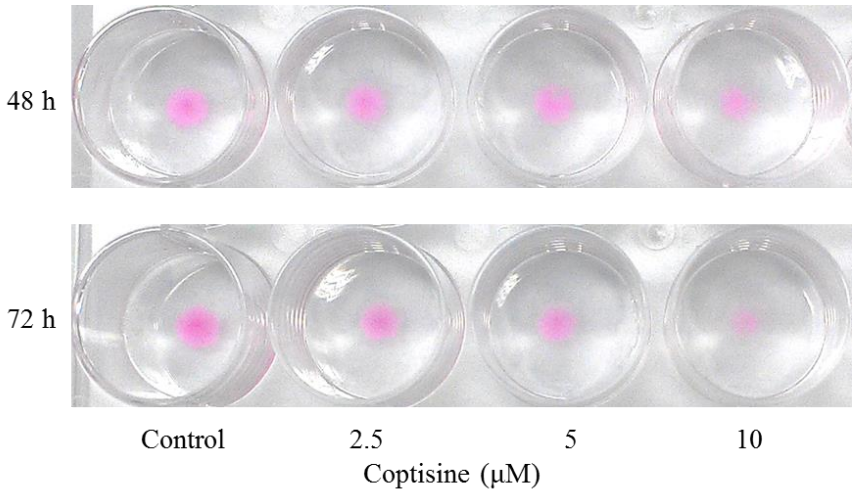


Figure 8. Inhibitory effect of coptisine on the activities of colony dispersion assays in A549 cells

The cells (5×10^5 cells/ml) were loaded on the center of 24 well plate. After incubation for 6 h, cells were treated with the indicated concentrations of coptisine for 48 and 72 h. The cells were stained and photographed.

5. 세포의 침윤성에 미치는 효과

암세포가 암이 발생한 조직에서 떨어져 나와 다른 조직으로 전이 시, 혈관을 통해 이동하므로 암세포의 혈관에 대한 침윤성 증가 역시 전이성의 증가에 중요한 요소이다. 따라서 coptisine이 세포의 침윤성을 억제시키는지 확인하기 위해 invasion assay를 실시하였다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 처리하여 upper chamber에 넣고 lower chamber에는 10% FBS가 포함된 배지를 넣고 48시간 동안 배양하여 pore를 통해 membrane을 통과한 세포의 양을 확인하였다. Membrane를 통과한 세포가 많을수록 침윤성이 크다고 할 수 있으며, figure 9에 나타낸 바와같이 control에 비해 coptisine을 처리시 농도 의존적으로 membrane을 통과한 세포의 양이 줄어들었다. 이로써 coptisine이 침윤력을 억제한다는 것을 알 수 있다.

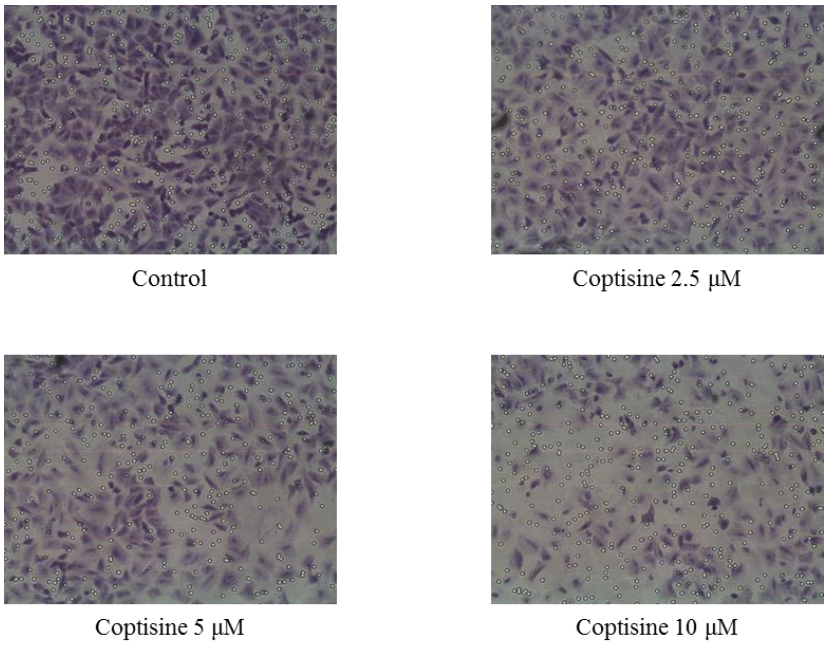


Figure 9. Inhibitory effect of coptisine on the activities of invasion assays in A549 cells

0.2% gelatin was coated on the lower parts of transwell membrane, and matrigel on the upper parts of transwell membrane. 10% FBS was added to the medium of lower chambers. A549 cells (2×10^5 cells/ml) were plated on the upper transwell chamber with the indicated concentrations of coptisine and then incubation for 48 h. The cells that had invaded the lower surface of the membrane were fixed and stained with crystalviolet, and photographed (×40).

6. ERK와 Akt의 인산화에 미치는 효과

앞에서 확인한 Snail의 감소와 E-cadherin의 증가와 관련된 작용기전을 확인하기 위하여 Snail을 활성화하는 것으로 알려진 ERK, GSK3β, Akt의 단백질 발현 변화를 살펴보았다.

A549 세포에 coptisine을 24시간 처리한 후 Western blot을 이용한 단백질 발현을 확인한 결과 Total ERK1의 발현은 변화가 없었다. 그러나 활성화 형태인 인산화된 ERK1의 발현이 coptisine의 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure10). Akt의 발현은 coptisine의 처리에 의해 소량 감소하는 것으로 나타났으며 308번 threonine기가 인산화된 Akt의 발현 또한 coptisine의 처리에 의해 감소하였다. GSK3β는 Akt에 의해 9번 serine기의 인산화가 일어나게되면 분해되는 것으로 알려져있다[15]. 즉 Akt에 의해 GSK3β의 활성이 감소하게 되는데 본 연구 결과 인산화된 GSK3β가 감소하였으며 이로 인해 GSK3β의 분해 억제에 의한 세포 내의 GSK3β가 Snail을 인산화하여 β-TrCP에 의한 ubiquitination과 proteasomal degradation을 유도할 것으로 여겨진다.

따라서 coptisine이 Snail을 활성화시키는 ERK, GSK3β를 분해시키는 Akt, GSK3β의 인산화를 저해하여 Snail의 발현을 억제하는 것으로 여겨진다.

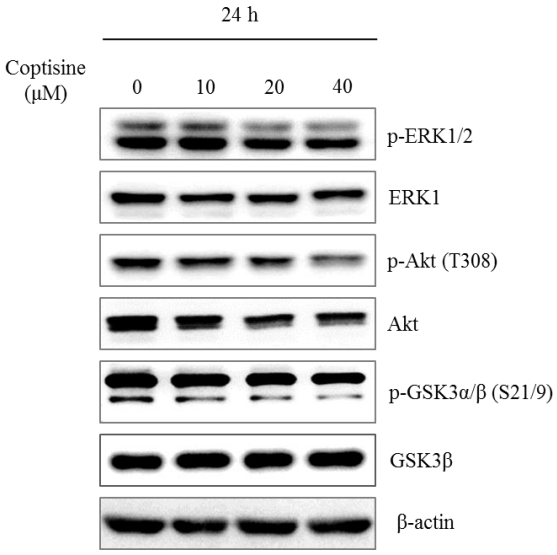


Figure 10. Effect of coptisine on phosphorylation of Akt, ERK1/2 and GSK3β in A549 cells

Western blot of phosphorylation of ERK1/2, Akt and GSK3β in A549 cells after 24 h of treatment with indicated concentration (10, 20, and 40 μM) of coptisine. β-actin was used as an internal standard.

7. TGFβ를 처리한 A549에서 ERK와 Akt의 인산화, E-cadherin과 Snail의 발현에 미치는 효과

TGFβ는 암의 전이와 밀접한 관련이 있으며 특히 EMT에서 나타나는 특성인 E-cadherin의 감소와 Snail의 증가와 관련된 ERK 및 Akt의 신호전달체계와 관련이 있다고 알려져있다. 따라서 TGFβ는 암세포의 EMT를 연구하는데 중요한 도구로 널리 사용되고 있다[16].

Coptisine이 EMT의 특성을 지닌 세포에 작용하는지 확인하기 위하여 A549 세포에 TGFβ1를 1시간 전처리하여 간엽세포의 성격을 갖도록 한 후 coptisine을 농도별로 24시간 처리하였다.

A549 세포에 TGFβ1을 처리시 세포의 형태가 길쭉하고 뾰족해지는 간엽세포의 특성을 나타내었다. Coptisine을 처리한 경우 TGFβ1에 의한 세포 형태의 변화가 억제된 것을 볼 수 있었다 (Figure 11. A).

구체적인 TGFβ관련 작용기전을 확인한 결과 TGFβ1과 관련된 대표적 하위 신호전달체계인 ERK와 Akt의 발현이 TGFβ1를 처리시 증가하는 것으로 나타났으며 Snail의 발현이 증가하고 E-cadherin의 발현이 감소하였다. 이는 EMT가 진행되는 암세포의 특성을 나타내는 것으로, Coptisine을 처리시 인산화된 ERK, Akt, 인산화된 Akt의 발현이 감소하였다. 그리고 TGFβ1에 의해 증가한 Snail의 발현이 coptisine을 처리시 농도의존적으로 감소하였으며 E-cadherin의 발현은 coptisine에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (Figure 11. B).

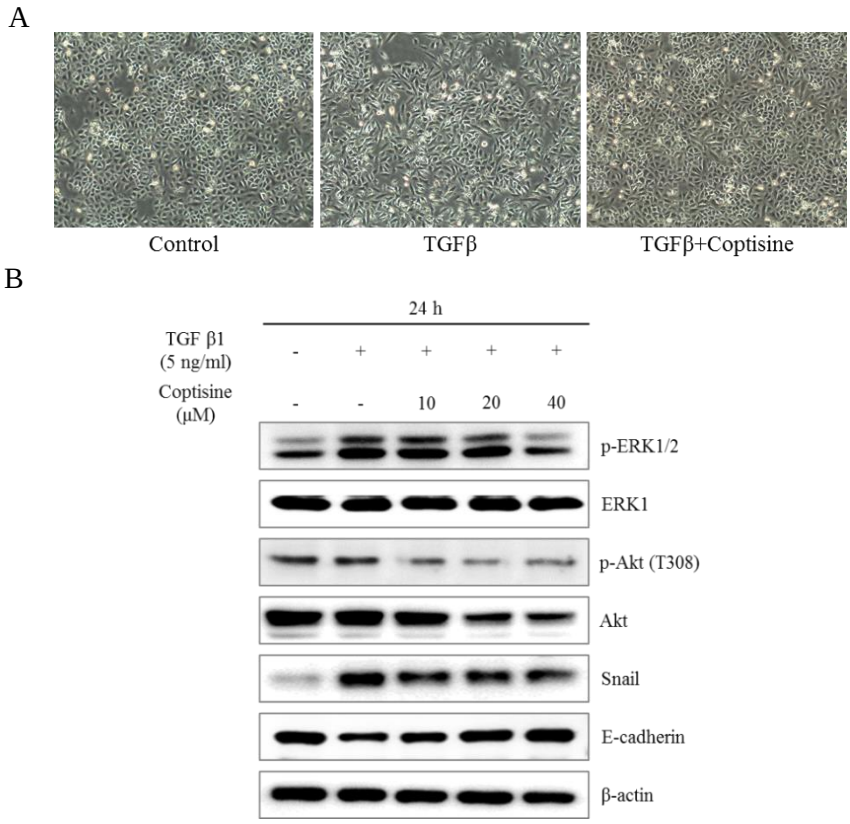


Figure 11. Effect of coptisine on TGFβ1- induced phosphorylation of Akt or ERK1/2 and expression of Snail, E-cadherin in A549 cells

A. Effect of coptisine on TGFβ1-induced cell morphological change in A549 cells. Cells were pretreated with TGFβ1 (5 ng/ml) for 1 h and then treated with coptisine for 24h and photographed (×40). **B.** Western blot of ERK1/2, Akt, Snail and E-cadherin in A549 cells. Cells were pretreated with TGFβ1 (5 ng/ml) for 1 h and then treated with indicated concentrations of coptisine for 24h.

8. TGFβ관련 단백질인 Smad에 미치는 효과

TGFβ가 결합하여 Type Ⅰ receptor와 type Ⅱ receptor가 complex를 이루면 serine/ threonine kinase의 역할을 하게 되어 Smad2/3을 인산화 하게 되어 Smad 신호전달체계를 활성화시킨다. 반대로 Smad7은 이 인산화 과정을 억제함으로써 Smad signaling을 억제하는 것으로 알려져 있다[8]. 따라서 TGFβ에 의해 진행된 EMT가 coptisine에 의해 억제되는지, 더욱 구체척으로 확인하기 위하여 TGFβ 관련 신호전달체계의 하위관련 단백질인 Smad의 발현 변화를 확인해 보았다.

A549 세포에 coptisine을 농도별로 24시간 처리한 결과, 단백질 수준에서 Smad7과 인산화된 Smad2의 발현을 확인하였다. Smad 신호전달체계에서 억제자로써 역할을 하는 Smad7의 발현이 coptisine에 의해 증가하였으며, Smad 2/3을 감소 및 인산화된 Smad2의 발현이 감소되어 coptisine이 TGFβ signaling에 영향을 미침을 알 수 있었다.

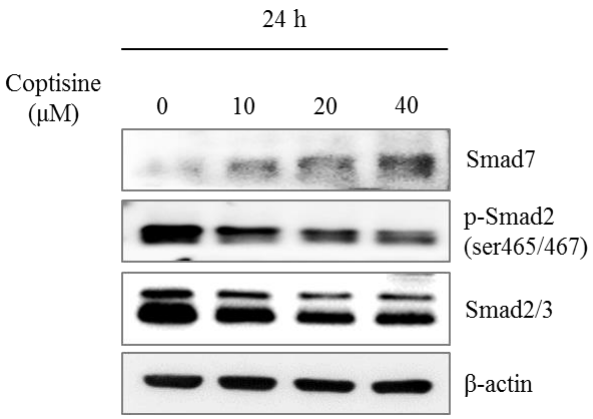


Figure 12. Effect of coptisine on phosphorylation of Smad2/3 and Smad7 in A549 cells

Western blot of Smad7, Smad2/3 and phosphorylated Smad2 in A549 cells. Cells were treated with indicated concentrations of coptisine (10, 20, and 40 μM) for 24 h. β-actin was used as an internal standard.

IV. 고 찰

암은 인간의 수명이 증가하면서 그 발병이 증가하고 있으며 연구가 진행되고 있는 지금까지도 꾸준히 증가하고 있다. 한국에서 암은 사망의 4분의 1정도를 차지할 정도로 많으며 통계가 시작된 1983년 이래로 중요한 사망원인이다[17]. 이러한 암은 초기 발병뿐 아니라 치료 후에도 재발하거나 다른 장기로 전이가 가능하다는 특성 때문에 치료하기 어려운 질병이다. 정상 세포가 암 세포로 변화하고 암 세포가 변이되는 과정에서 상피세포의 특성을 잃고 간엽세포의 성질을 획득하는 EMT가 이뤄지기 때문에 암세포가 혈관이나 림프관으로 침투하고 다른 장기로 이동하는 능력을 갖게 되어 전이와 재발을 유발한다. 그러므로 EMT는 암 연구에서 대표적인 연구 주제이다.

본 연구에서 coptisine은 E-cadherin promoter activity를 증가시키고 E-cadherin의 mRNA와 단백질을 모두 증가시켰다. 반대로 Snail은 mRNA와 단백질 수준에서 감소시켰다. E-cadherin은 adherens junction에 관여하는 단백질이며 EMT의 초기 단계에서 down-regulation되는 것으로 알려져 있다[18]. 이러한 E-cadherin은 Snail에 의해 조절되며 Snail은 E-cadherin의 promoter에 결합하여 E-cadherin의 발현을 억제한다[19]. 따라서 coptisine이 Snail을 억제함으로써 E-cadherin을 증가시키거나 혹은 E-cadherin의 유전자에 직접 영향을 미쳐 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이에 대하여 Snail을 제거한 세포에서의 연구가 추가적으로 필요하다고 여겨진다.

그 외에 EMT 관련된 단백질인 MMP-2, N-cadherin, Vimentin의 발현을 살펴보았고 모두 coptisine에 의해 감소되었다. MMP는 세포 밖 단백질의 분해를 매개함으로써 암세포의 침윤성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. N-cadherin은 cadherin gene family로 단백질로 발현되며 칼슘이온 의존적 adhesion을 이룬다. 암에서 N-cadherin은 EMT시 증가 하여 혈관신생(angiogenesis)에 관여한다[20]. Vimentin은 제 III 형 중간 섬유(intermediate filament, IF) 단백질로 mesenchymal 세포에서 많이 발현되는 것으로 알려져 있다[21].

Snail의 활성을 억제 하는 기전으로서 ERK와 Akt, GSK3β를 확인해본 결과 coptisine이 ERK, Akt, GSK3β의 인산화를 억제하였다. ERK signaling 과 Akt signaling은 TGFβ의 하위 단계로 TGFβ에 의해 활성화 된다. TGFβ를 처리하였을 경우에도 coptisine이 ERk, Akt를 억제하였으며 TGFβ에 의해 증가한 Snail을 감소시키고 감소된 E-cadherin은 증가시켰다.

결론적으로 coptisine은 TGFβ에 의해 유도된 Snail을 감소시키고 E-cadherin을 증가시킴으로써 암 전이를 억제한다고 생각된다.

이러한 coptisine의 EMT 억제 효능은 천연물 유래 물질의 항암제 개발에 있어 선도물질로서 가능성이 있다고 여겨진다.

Part 2. 천연물 유래 Coumarin계 Nodakenetin의 조골세포 분화 연구

I. 서 론

인체에서는 오래된 골을 흡수하고 새로운 골을 형성하는 과정이 지속적으로 진행되고, 성인의 경우에 골은 1년에 약 10% 정도가 재생성이 되므로 정상적인 골 리모델링에서 약 10년이 경과되면 완전히 새로운 골을 형성하게 된다[22].

골다공증은 노화, 호르몬 이상 (여성의 경우 폐경), 염증성 류마티스 관절염, 골 전이성 암과 같은 다양한 질환에 의해 발병한다. 그리고 심각한 통증 유발과 보행의 어려움으로 질 높은 삶을 유지하기가 어렵다. 이러한 골다공증은 조골세포 활성의 감소 혹은 파골 세포의 상대적 활성 증가로 골 항상성의 파괴에 의해 야기된다[23].

골 항상성 (bone homeostasis)은 파골세포 (osteoblast)의 골 흡수 (bone resorption)과 조골세포 (osteoblast)의 골 형성 (bone formation)으로 인해 유지된다[24]. 골 형성은 조골세포의 분화 (differentiation), 매트릭스 성숙 (matrix maturation), 매트릭스 무기질화 (matrix mineralization)의 기본적인 3단계를 거치며, 골 특이적 세포외 기질 (extacellular matrix, ECM) 단백질의 발현과 무기질화 (mineralization)란 두 가지 특성을 가지고 있다. ECM 단백질은 조골세포에서 합성되며 collagen type I, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) 등을 포함하고 있다. 또한 ECM 단백질의 양은 칼슘이 축적되는 matrix mineralization과 비례한다. 조골세포는 osteogenic factor인 parathyroid hormone, TNF-α, IL-1, IL-11,

thyroid hormone, vitamin D_3, prostaglandin E_2와 같은 요소에 의해서 파골세포 분화를 매개할 수 있는 사이토카인인 RANKL (receptor activator of nuclear factor-κB ligand)을 발현한다. 파골세포에 의해서 유도된 산성화와 분비된 단백질 분해효소들은 각각 미네랄을 녹이고 골의 구성성분인 단백질을 분해함으로써 골 흡수과정이 진행된다[25].

과거 골다공증관련 연구는 파골세포의 억제에 초점을 맞추고 있었으며 이러한 골 소실을 늦추는 치료법으로 에스트로겐, 비스포스포네이트 등의 투여가 있다. 그러나 이러한 약물의 경우 성숙한 파골세포의 활성과 연관되어있어 장기간 투여에 따른 문제점이 있다. 그리하여 최근에는 조골세포의 분화와 활성화에 관한 연구로 전환되고 있다[26].

Wnt/β-catenin signaling pathway는 골 형성에 중요한 역할을 하며 최근에 주목 받고 있다[27]. Wnt signaling이 활성화 되면 pluripotent mesenchymal cells이 osteoblast progenitors로 분화가 촉진되고 osteoblast가 된다[28]. Canonical Wnt signaling에서 Wnt ligand가 세포막에 존재하는 frizzled receptors와 co-receptor인 low-lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6에 결합하여 disheveled 단백질을 인산화 시키고 이는 하위 단계인 glycogen synthase kinase3β (GSK3β), Axin, Adenomatous polypoaia coli (ACP) complex를 이뤄 β-catenin을 인산화하는 것을 억제한다[29]. β-catenin는 canonical Wnt signaling에서 중요한 구성요소이며 T-cell factor (TCF), lymphoid enhancer factor (Lef)단백질과 결합하여 transcriptional co-activator로 역할을 한다[30]. 골 세포에서는 Wnt signaling이 활성화시 골 특이적 runt-related transcription factor 2

(Runx2)와 bone morphogenetic protein2 (BMP2)의 발현을 촉진한다[31]. BMP2는 Smad1/5/8을 통해 Runx2의 발현을 조절한다[32].

바디나물 (*Angelica decursiva* = *Peucedanum decursivum*)은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 약용식물로 중국, 일본, 한국 등에 분포한다. 거담작용[33]과 관상동맥 혈류량 증가작용[34], 항알러지 작용[35], 항암작용[36] 등이 알려져 있으며 전통적으로 가래, 기침, 발열 등에 쓰였다. 바디나물의 함유 성분으로는 pyrano-coumarin, furano-coumarin, lignan 계열의 물질이 있다[37]. 이 중 nodakenetin은 furano-coumarin계 물질로서 항염증 효과가 있는 것으로 알려져 있다[38].

본 연구에서는 nodakenetin의 Wnt/β-catenin signaling pathway 활성화를 통한 조골세포의 분화 유도 효능을 mouse pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포를 이용하여 밝히고자 하였다.

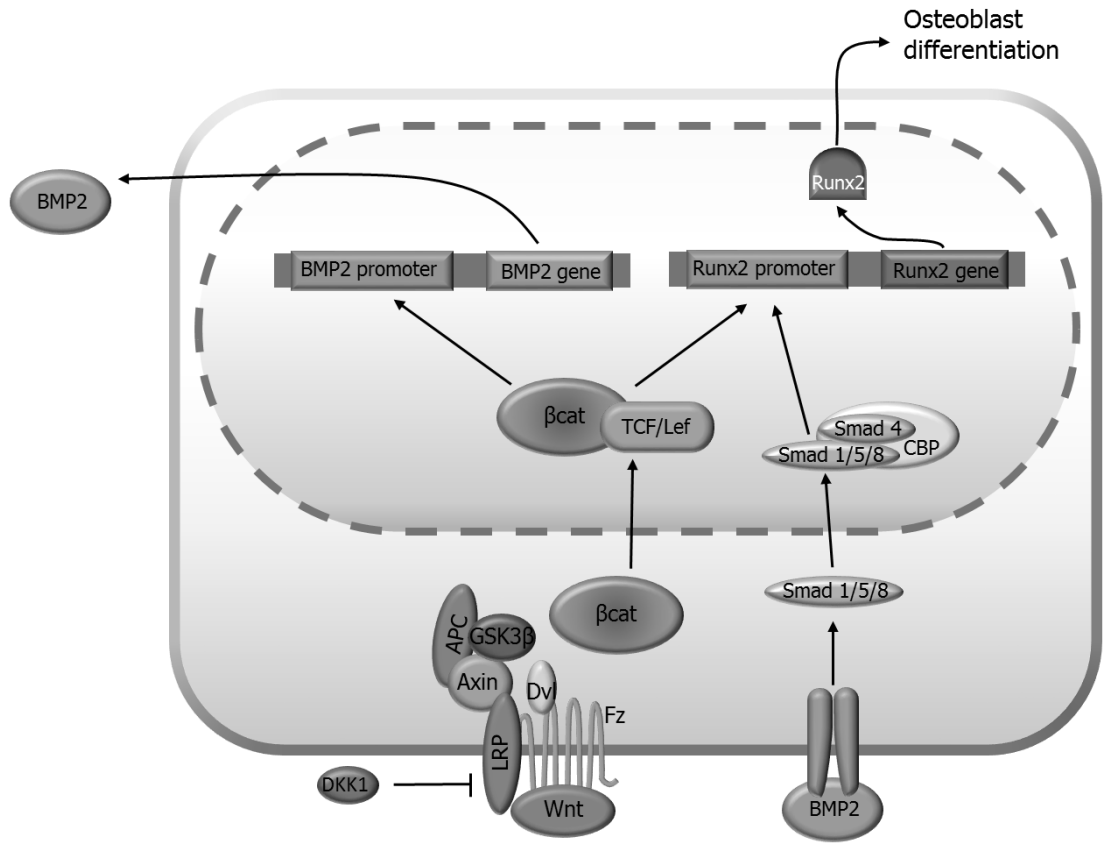


Figure 13. Overview of Wnt signaling pathway and differentiation in osteoblast

II. 실험 재료 및 방법

A. 실험 재료

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), minium essential medium alpha (MEM-α, GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001), fetal bovine serum (FBS), antibiotics-antimycotics solution 및 trypsin-EDTA 은 Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA) 에서 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP, goat anti-mouse IgG-HRP, goat anti-goat IgG-HRP, cyclin D1, survivin, BMP2, β-actin antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, p-β-catenin, ERK1/2, p-ERK1/2, DKK1, p-GSK3β(Y216), p-GSK3α/β(S21/9) 및 GSK3β antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 c-Myc, cyclin D1, β-catenin antibody는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. PCR primer로 이용한 oligonucleotide는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성하였다. AMV reverse transcriptase, dNTP mixture, random primer, RNasin 및 Taq polymerase와 Dual Luciferase® Reporter Assay System Kit는 Promega (Madison, WI, USA) 에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), trichloroacetic acid (TCA), L-ascorbic acid, β-glycerophosphate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 이외 명시되어 있지 않은 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 시험 물질

시험에 사용한 nodakenetin은 식약처 한약재품질표준화 사업단으로부터 제공 받아 DMSO를 사용하여 stock solution을 만들어 −20℃에서 저장한 후 필요시 희석하여 사용하였다 (Figure 14).

3. 세포 배양

Human embryonic kidney cell line인 HEK293 세포와 mouse preosteoblast cell line인 MC3T3−E1 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받았다. HEK293 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics (100 U/mL penicillin G sodium, 100 μg/mL streptomycin sulfate 및 0.25 μg/ml amphotericin B)를 포함하는 DMEM에서 배양하고, MC3T3−E1 세포는 10% FBS와 antibiotics−antimycotics를 포함하며 ascorbic acid를 함유하지 않은 MEM−α에서 배양하였다. MC3T3−E1 세포를 분화시킬 때에는 50 μg/ml ascorbic acid와 10mM β−glycerophosphate를 포함한 MEM−α를 사용하였다. 모든 세포들은 37℃, 5% CO_2 조건에서 1주일에 3회 계대 배양하였다.

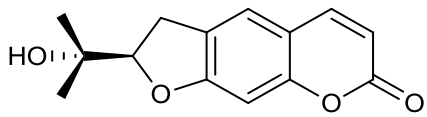


Figure 14. Chemical structure of nodakenetin

B. 실험 방법

1. 세포 독성 실험 (MTT assay)

시료의 세포독성을 확인하기 위하여, 96-well plate에 MC3T3-E1 세포 (1.5×10^4cells/well) 혹은 HEK293 세포 (0.7×10^4cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지를 180 μl 넣어 72시간 동안 배양하였다. 그 후에 5 mg/mL MTT 용액을 20 μL처리하여 MTT의 최종농도가 500 μg/mL이 되도록 한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양하였다. 이후 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 200 μl씩 가하여 well 바닥에 생성된 formazan crystal을 녹이고 DMSO를 blank로 하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 DMSO만 처리한 군의 흡광도 평균에 대한 nodakenetin 처리군의 흡광도 평균의 비율을 구하여 % of survival을 계산하였다.

2. Transfection and luciferase reporter gene assay

48-well plate에 HEK293 세포 (1.5×10^4cells/well)를 넣어 24시간 배양 후 luciferase reporter plasmid (TOPflash 또는 FOPflash) 0.1 μg과 *Renilla* gene 0.005 μg, pcDNA β-catenin 0.008 μg, TCF4 expression vector 0.005 μg 등을 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen)을 사용하여 형질주입하여 24시간 배양하였다. 이후 nodakenetin 혹은 용매를 처리하여 배양하였다. 24시간 이후 세포를

녹여 얻은 lysates를 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega®)을 이용하여 luciferase activity를 측정하였다.

3. Western blot analysis

MC3T3-E1 (8×10^4 cells/ml)세포를 100 mm dish에 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 그 다음 dish를 PBS로 1회 세척하고 nodakenetin을 포함한 배지를 넣은 후 지시된 시간에 따라 배양하였다.

배양 후 cold PBS로 1회 세척하고 끓고 있는 cell lysis buffer를 넣어 scraper로 긁어 모아 이를 100℃에 5분간 두었다. 식힌 후 -20℃에서 보관하였고, 사용 직전에 37℃에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동 하였다. 단백질 정량은 BCA법을 이용하여 수행하였으며 10-40 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 100 V에서 2시간 30분 동안 전기영동 하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 transfer 하였다. Membrane을 blocking buffer(5% BSA in TBST)에 넣어 실온에서 shaker 상에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 primary antibody를 1:1,000-1:2,000 정도가 되도록 2.5% BSA가 포함된 TBST에 희석하여 membrane과 함께 4℃에서 12시간 배양하였다. Membrane을 TBST로 5분씩 2-3회 세척한 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1:1,500-1:2,000으로 희석하여 membrane과 함께 상온에서 2시간 배양하였다. 이를 TBST로 5분간 3-4회 세척하고 ECL Western blotting detection reagents (LabFrontier, Suwon, Korea)를 처리하여 생성된 luminescence를

LAS 4000 (Fuji Film Corp., Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

4. Reverse transcription real-time PCR

MC3T3-E1 (8×10^4 cells/ml)세포를 60 mm dish에 넣고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 24시간 후 PBS로 1회 세척하고 nodakenetin을 포함한 배지를 처리하였다. 12시간 동안 배양한 후 Chomczynski and Sachhi의 제안 방법[13-14]으로 RNA를 분리하였다. 각 dish를 PBS로 1회 세척한 다음 TRI reagent (Invirogen) 1 ml를 가하여 세포를 모은 후 chloroform을 처리하여 세포 내의 RNA를 추출하였다. Isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시키고 75% ethanol로 세척해 준 다음, 후드에서 ethanol을 건조시키고 RNA pellet을 nuclease-free water에 녹였다. 이를 55℃에서 10분간 가열하여 RNA의 용해도를 증가시킨 후 바로 얼음에 5분 이상 방치하여 RNA가 single strand 상태로 존재하도록 하였다.

Nano drop을 이용하여 정량 후 1 μg/μl로 희석하고 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사 효소 (reverse transcriptase) 및 oligo dT primer를 가하여 RT-PCR 기기 (Amp PCR gene system)에서 42℃에서 60분, 99℃에서 5분을 유지하는 조건으로 cDNA를 linear strand 상태로 합성하였다. 50배 희석시킨 cDNA 용액 5 μl에 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)와 Table 3. 에 제시된 primer를 넣어 총 부피를 20 μL로 만들었다. 이를 MiniOpticon system (Bio-Rad)을 이용하여 PCR 반응을 진행하였다. C_T 값은 증폭된 target gene의 양이 역치에 도달하였을 때의 cycle 값을 의미하므로 각 수치는

Threshold Cycle (C_T)값으로 나타내고, 각 시료에서의 C_T 값을 MJ Opticon Monitor software를 이용하여 comperative C_T Method(⊿⊿ C_T Method)에 의해 계산하여 분석하였다.

5. Measurement of Alkaline phosphatase (ALP) activity

48-well plate에 MC3T3-E1 세포 (0.6 × 10^4 cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지로 3일마다 갈아주었다. 분화를 유도할 경우 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 포함한 MEM-α를 사용하였다. 6일 후, passive lysis buffer로 세포를 녹인 후 lysates 10 μl와 6 mM p-nitrophenyl phosphate 와 1 mM $MgCl_2$가 포함된 0.5 M Tris-HCl (pH 9.9) buffer 190 μl를 함께 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 효소반응에 의해 생성된 p-nitrophenol (PNP)은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 PNP 표준곡선을 이용하여 정량하였으며, 단백질은 Bradford 법을 이용하여 정량하였다. ALP activity는 PNP produced/min/mg protein으로 그래프를 나타내었다.

6. Measurement of extracellular matrix (ECM) calcium deposits

48-well plate에 MC3T3-E1 세포 (0.6 × 10^4 cells/well)를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 nodakenetin이 포함된 배지로 3일마다 갈아주었다. 분화를 유도할 경우 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate를 포함한 MEM-α를 사용하였다. 10일 후 PBS로 1회 세척하고 4% formaldehyde로 10분간

고정시킨 후 40 mM Alizarin red S (pH 4.2)로 상온에서 30분간 염색하였다. 3차 증류수로 세척하고 10% cetylpyridinium chloride(in 10 mM sodium phosphate, pH 7.0)을 넣어 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 그래프로 나타내었다.

Table 3. Sequences of osteoblast differentiation related primers used in real-time RT-PCR

Target genes		Sequences
Mouse β-catenin	Sense	5' -TGCAGATCTTGGACTGGACA-3'
	Anti sense	5' -AAGAACGGTAGCTGGGATCA-3'
Mouse BMP2	Sense	5' -TGAGGATTAGCAGGTCTTTG-3'
	Anti sense	5' -CACAACCATGTCCTGATAAT-3'
Mouse Runx2	Sense	5' -AAGTGCGGTGCAAACTTTCT-3'
	Anti sense	5' -TCTCGGTGGCTGGTAGTGA-3'
Mouse β-actin	Sense	5' -ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
	Anti sense	5' -CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'

III. 실험 결과

1. Nodakenetin의 β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity에 미치는 효과

전조골세포가 조골세포로 분화하기 위해서는Wnt signaling pathway가 활성화되어야 한다. 따라서 본 연구에서는

Wnt signaling pathway의 transcriptional activity를 확인하기 위하여 HEK293세포에 TOPflash reporter plasmid를 형질주입하여 실험하였다. 실험 결과 TCF4 gene과 β-catenin gene을 형질주입시 transcription activity이 활성화되며 nodakenetin을 농도별로 처리하였을 때 transcription activity가 증가됨을 확인하였다. TCF/Lef binding site가 변형되어 있는 FOPflash reporter plasmid는 negative control로서 nodakenetin에 의한 활성을 나타내지 않아 nodakenetin이 특이적으로 β-catenin에 의한 transcriptional activity를 증가시키는 것으로 보인다 (Figure 15).

HEK 293 세포에서 SRB assay 결과 nodakenetin은 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였으며 이후 진행된 실험에서 농도를 설정하는데 참고하였다 (Figure 16).

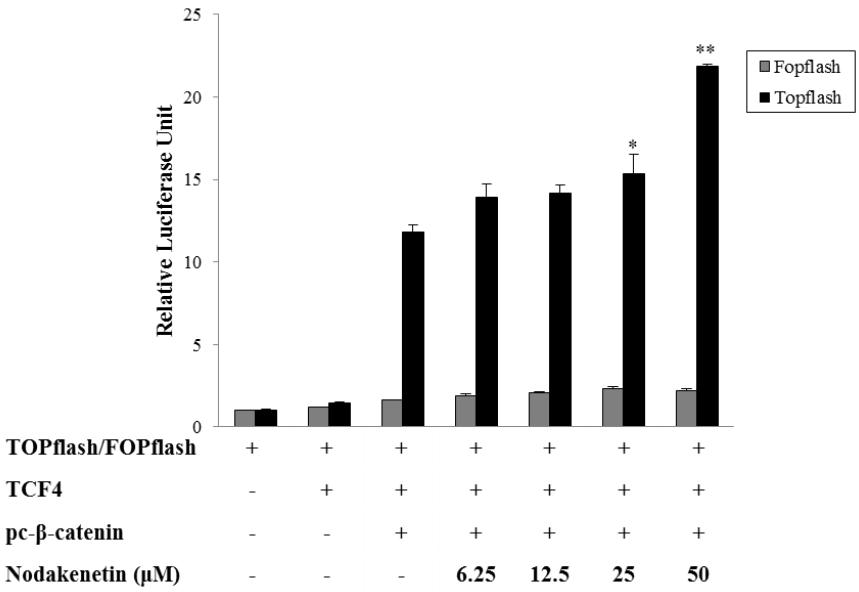


Figure 15. β−catenin/TCF responsive transcription by nodakenetin in HEK293 cells

HEK293 cells were transiently transfected with β−catenin, TCF4, TOPflash and *Renilla* for 24 h and treated with nodakenetin (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 24 h. Luciferase activity was estimated using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and expressed as relative units. Transfection efficiency was normalized by *Renilla*. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

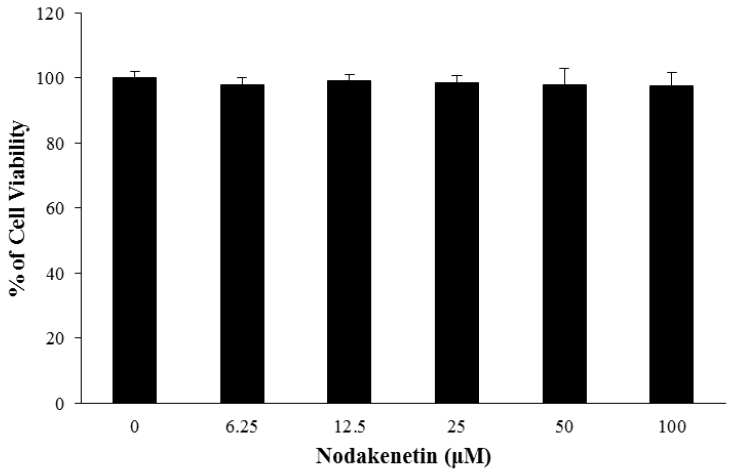


Figure 16. Cytotoxicity effect of nodakenetin in HEK293 cells

HEK293 cells were treated indicated concentrations of nodakenetin for 72 h. Cell viability was measured using the SRB assay.

2. Wnt signaling pathway에 관련된 단백질에 미치는 효과

Nodakenetin을 HEK293 세포에 각각 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도로 24시간 처리하고 Western blot 법을 이용하여 Wnt signaling pathway와 관련된 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, Wnt signaling pathway의 co-receptor인 LRP5/6에 결합하여 Wnt와 receptor의 결합을 억제하여 Wnt signaling을 저하시키는 DKK1이 감소하였고, 신호를 전달하는 중요한 요소인 β-catenin이 증가하였다. 이와 반대로 인산화된 β-catenin는 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이를 통해 β-catenin의 분해가 줄어들 것으로 여겨진다 (Figure 17).

또한 Wnt signaling의 타겟 유전자인 c-myc, cyclin D1, survivin의 단백질 발현이 증가하였다 (Figure 18).

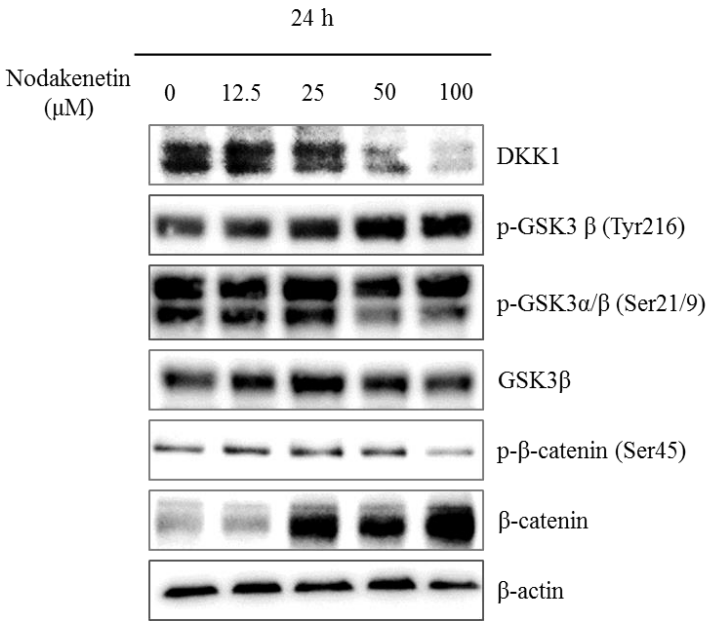


Figure 17. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling components in HEK293 cells

HEK293 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the expressions of Wnt signaling components were determined by Western blot analysis. β-actin was used as an internal standard.

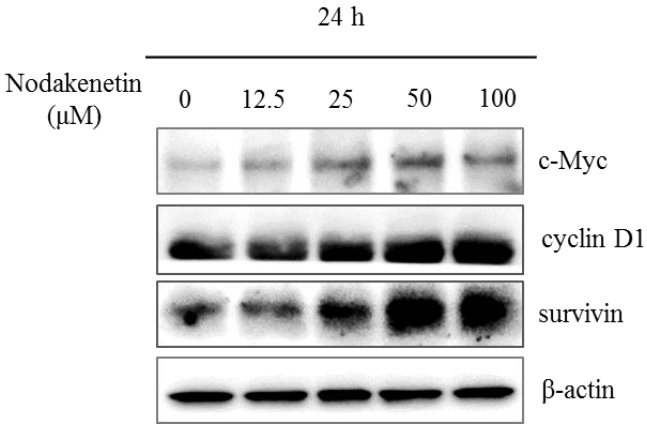


Figure 18. Effect of nodakenetin on the protein expressions of Wnt signaling target genes in HEK293 cells

HEK293 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the expressions of c-Myc, cyclin D1 and survivin were determined by Western blot analysis. β-actin was used as an internal standard.

3. 조골세포에서 Wnt signaling pathway에 관련된 단백질에 미치는 효과

Pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포에서 독성을 확인한 결과 최고 농도인 100 μM에서도 독성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 19). 이를 토대로 100 μM부터 농도를 내려 Western blot으로 nodakeneti에 의한 단백질의 변화를 살펴보았다.

HEK293 세포에서와 마찬가지로 nodakenetin을 MC3T3-E1 세포에 처리하였을 때 DKK1이 감소하였고, 신호를 전달하는 중요한 요소인 β-catenin이 증가하였다 (Figure 20. A). 이와 반대로 인산화된 β-catenin는 감소하였으며 mRNA수준에서도 β-catenin의 발현이 증가하였다 (Figure 20. B).

Wnt signaling pathway의 타겟 유전자인 c-myc, cyclin D1, survivin의 단백질이 증가하였다. 즉 nodakenetin이 MC3T3-E1 세포에서도 Wnt signaling pathway를 활성화 한다는 것을 알 수 있다.

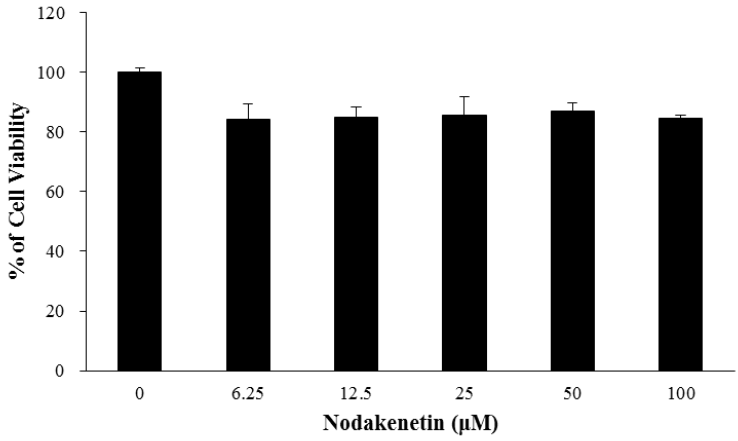


Figure 19. Cytotoxicity effect of nodakenetin in MC3T3-E1 cells

MC3T3-E1 cells were treated indicated concentrations of nodakenetin for 72 h. Cell viability was measured using the MTT assay.

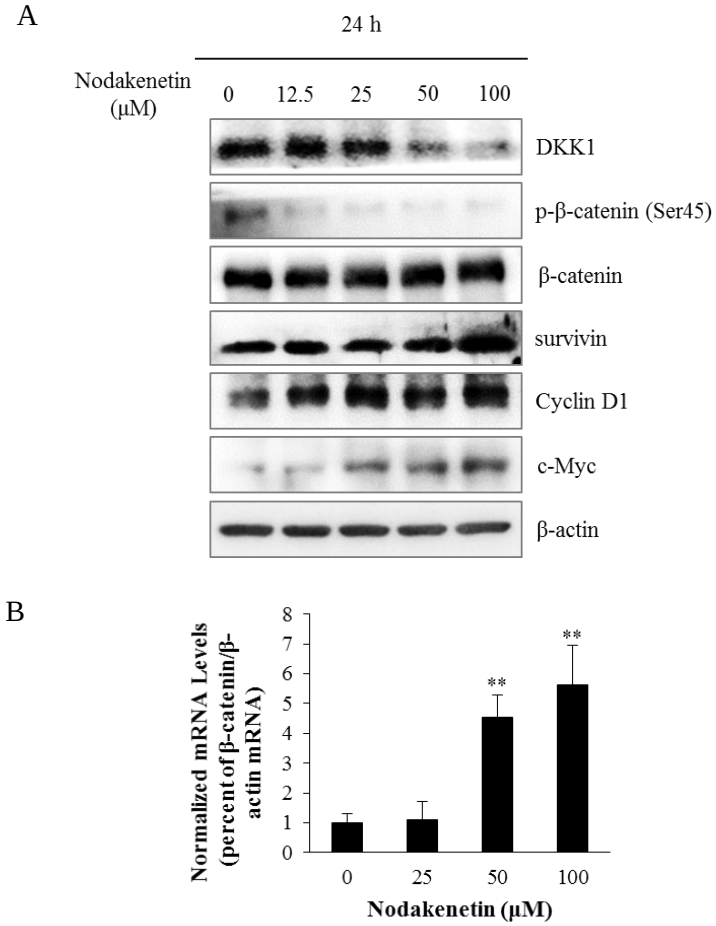


Figure 20. Effect of nodakenetin on Wnt signaling components and targets in MC3T3-E1 cells

A. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the protein expressions of Wnt signaling components and targets were determined by Western blot analysis. B. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 12 h, and the mRNA expressions of β-catenin were determined by real-time RT-PCR. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

4. 조골세포 분화에 미치는 효과

Nodakenetin이 조골세포의 분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여Alinzarin red S staining법을 이용하여 무기질화의 변화를 측정하고, alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 확인하였다.

분화를 유도하기 위하여 50 μg/ml ascorbic acid와 10 mM β-glycerophosphate가 포함된 배지를 사용하였으며, 무기질화 실험시 10일간 배양하였으며 ALP 활성 측정시 6일간 배양하였다.

Nodakenetin을 처리하자 무기질화가 진행됨을 알 수 있었으며 양성대조군인 17β-estradiol과 다르게 조골세포의 분화에 기본적인 요소로 알려져 있는 ascorbic acid와 β-glycerophosphate를 처리하지 않은 미분화 상태에서도 무기질화가 진행된 것을 확인하였다 (Figure 21).

ALP 활성 측정시에도 분화를 유도한 세포와 분화를 유도하지 않은 세포에서 모두 nodakenetin에 의해 ALP의 활성이 증가되었다. (Figure 22).

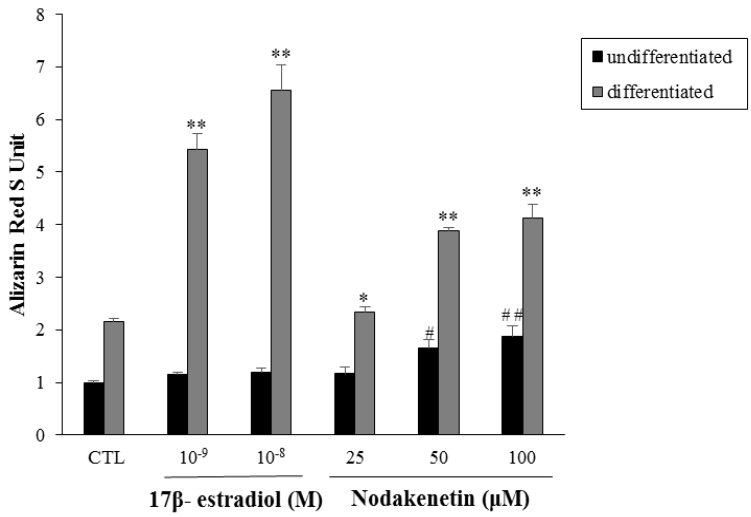


Figure 21. Enhancement of matrix mineralization in MC3T3-E1 cells by nodakenetin

Extracellular matrix (ECM) calcium deposits (bone nodule formation) for matrix mineralization were measured by Alizarin red S staining. Cells were cultured in 48-well plate for 10 days. For the osteoblast differentiation, the culture medium was changed to a fresh osteogenic medium containing 10 mM β-glycerophosphate and 50 μg/ml ascorbic acid to initiate matrix mineralization. (*p < 0.05, **p < 0.01 was considered statistically significant compared to differentiated MC3T3-E1 cells control. #p < 0.05, ##p < 0.01 was considered statistically significant compared to undifferentiated MC3T3-E1 cells control.)

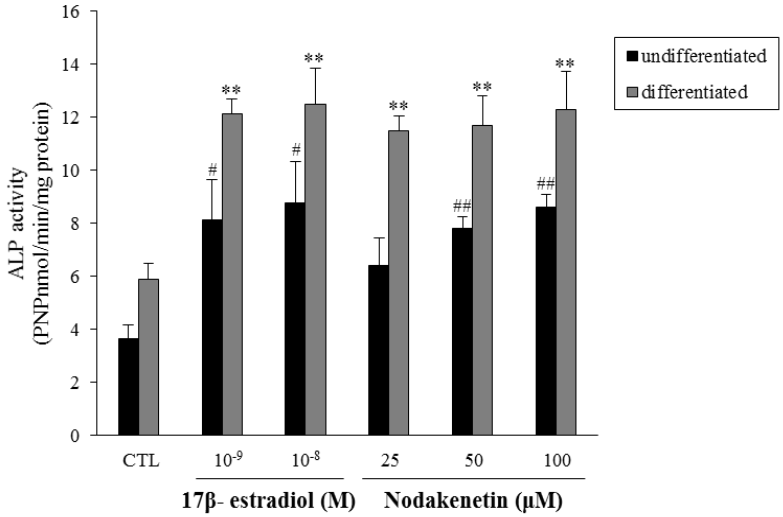


Figure 22. Enhancement of alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells by nodakenetin

To detect activity of ALP enzyme in media, a colorimetric enzyme assay was used. Increasing effects of indicated concentration nodakenetin on ALP activity were examined in MC3T3-E1 cells on 6 days. Asorbance was measured at λ = 405 nm and compared with p-nitrophenol (PNP) standard. The ALP enzyme activity was expressed as nmol PNP/min/mg protein. The protein contents of lysates were determined by the Bradford method. (*p < 0.05, **p < 0.01 was considered statistically significant compared to differentiated MC3T3-E1 cells control. #p < 0.05, ##p < 0.01 was considered statistically significant compared to undifferentiated MC3T3-E1 cells control.)

5. BMPs와 Runx2에 미치는 효과

조골세포의분화와 관련된 더욱 구체적인 작용기전을 확인하기 위하여 조골세포에서 Wnt signaling pathway의 타겟 유전자이자 조골세포의 분화를 유도하는 단백질인 bone morphogenetic proteins (BMPs)[39] 와 osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), type Ⅰ collagen등 간엽세포에서 조골세포로의 분화에 필요한 여러 유전자를 전사하는 역할인 runt-related transcriptional factor (Runx2)[40]의 발현을 살펴 보았다.

Figure 23에 나타낸 바와 같이 nodakenetin을 처리시 BMP2와 BMP4의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며 BMP2의 mRNA 발현도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Runx2의 mRNA level도 증가하는 것으로 나타나 이들 단백질 및 유전자의 변화가 조골세포의 분화에 관여하는 것으로 여겨진다.

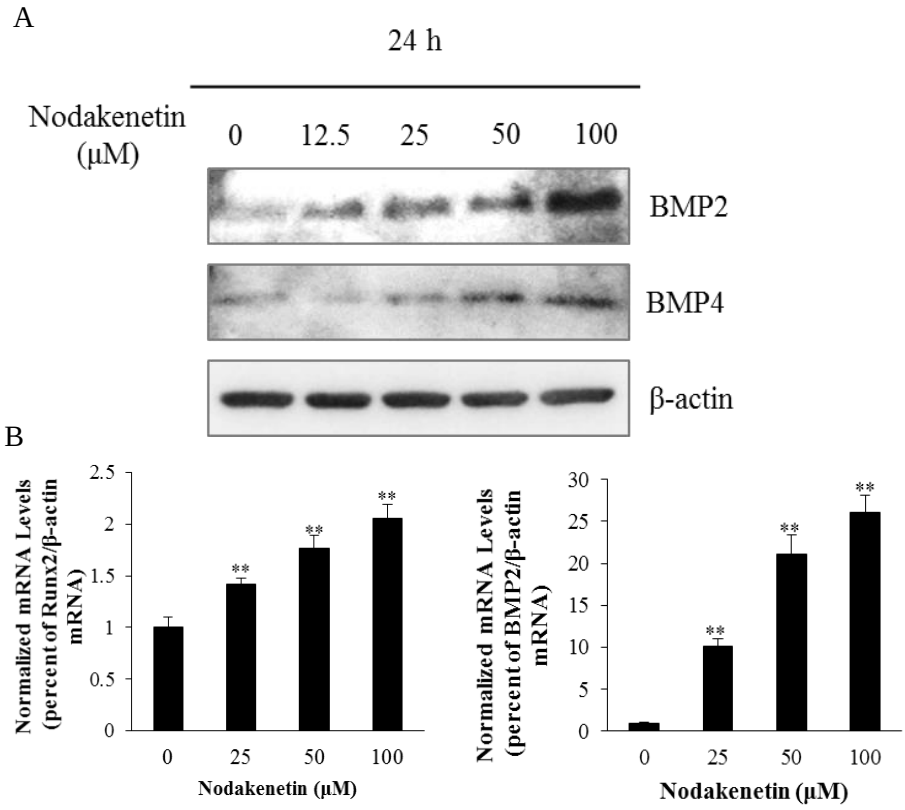


Figure 23. Elevation of BMPs and Runx2 by nodakenetin in MC3T3-E1 cells

A. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 24 h, and the protein expressions of Wnt signaling components and targets were determined by Western blot analysis. B. MC3T3-E1 cells were treated with indicated concentrations of nodakenetin for 12 h, and the mRNA expressions of β-catenin and Runx2 were determined by real-time RT-PCR.

IV. 고 찰

현대사회는 평균 수명이 증가하고 있으며 삶의 질 향상에 대한 관심이 높다. 그러나 골다공증의 발병시 심각한 통증을 유발하게되고 골절 위험이 증가하며 보행의 어려움으로 질 높은 삶을 유지하기 어렵다. 현재 골다공증의 치료는 성숙한 파골세포의 활성을 억제하는 방법으로 이루어지며 이는 질병의 진행을 늦출 뿐 완벽한 치료로 보기 힘들고 세포의 파괴라는 심각한 부작용이 있다. 따라서 골다공증 치료를 위한 부작용이 없고 효과적인 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 조골세포가 분화될 때 Wnt signaling pathway가 활성화 된다는 사실에 착안하여 천연물 유래 물질을 이용하여 Wnt signaling pathway를 활성화시키는 물질을 스크리닝 하였으며 그 중 가장 효능이 높은 nodakenetin을 이용하여 조골세포의 분화에 관한 연구를 진행하였다.

Nodakenetin은 HEK293 세포 및 MC3T3-E1 세포에서 모두 80% 이상의 cell viability를 보였으므로 세포 독성을 보이지 않았다. 그러나 HEK293 세포와 달리 MC3T3-E1 세포에서는 nodakenetin을 처리시 상대적으로 낮은 cell viability를 보였는데 이는 nodakenetin에 의해 특이적으로 MC3T3-E1 세포가 분화 (differentiation)되면서 증식 (proriferation)이 감소한 것으로 여겨진다.

TOPflash reporter gene assay 실험결과 HEK293 세포에서 nodakenetin이 β-catenin/TCF transcriptional activity를 활성화

시켰으며 단백질 수준에서도 DKK1의 감소와 β-catenin의 증가, Wnt signaling의 타겟 유전자의 발현이 증가하였다. Pre-osteoblast인 MC3T3-E1 세포에서도 단백질 수준에서 같은 결과가 나왔으며 mRNA 수준에서도 β-catenin 이 증가하였다. 이를 통해 nodakenetin은 DKK1과 β-catenin을 조절하여 전사 활성에 영향을 미치고 최종적으로 Wnt signaling pathway를 활성화시킨다는 것을 알 수 있다.

또한 nodakenetin은 조골세포에서 Wnt signaling pathway의 주 타겟 유전자이자 조골세포 분화에 중요한 역할을 하는 BMPs와 Runx2를 증가시켰다. 즉 nodakenetin은 조골세포에서 Wnt signaling pathway를 활성화시킴으로써 조골세포의 분화를 촉진함을 예측할 수 있었고, 무기질화와 ALP activity를 확인함으로써 분화가 일어나는 것을 증명하였다.

골다공증뿐 아니라 골 관련 여러 질병들이 Wnt signaling pathway의 변이에 의해 발병한다는 것이 알려져 있으며[41], 최근에는 골다공증 환자의 혈액에서 주로 DKK1이증가되어 있다는 사실이 밝혀졌다[42]. Nodakenetin은 DKK1을 억제하면서 Wnt signaling pathway을 활성화시키므로 Wnt signaling pathway를 타겟으로 하 는효율적인 골다공증의 표적 치료제로서 가능성이 있다 사료된다.

참 고 문 헌

1. Neha Tiwari.; Alexander Gheldof, C.; Marianthi Tatari, C.; Gerhard Christofori. Seminars in Cancer Biology. 2012, 22, 194-207.
2. Kalluri R.; Weinberg RA. The Journal of clinical investigation. 2009, 119, 1420-1428.
3. Thiery JP.; Sleeman JP. Nature reviews. Molecular cell biology. 2006, 7, 131-142.
4. Vleminckx K.; Vakaet Jr L.; Mareel M.; Fiers W.; van Roy F. Cell. 1991, 66, 107-119.
5. Peinado H.; Olmeda D.; Cano A.; Nature reviews. Cancer. 2007, 7, 415-428.
6. Jakowlew S. Cancer metastasis reviews. 2006, 25, 435-457.
7. Massagué J. Cell. 2008, 134, 215-30.
8. Derynck R.; Zhang YE. Nature. 2003, 425, 577-584.
9. Jae Ho Choi; Yong Pil Hwang; Hyung Gyun Kim; Tilak Khanal. Nutrition and Cancer. 2014, 66, 140-151.
10. Jae Youl Cho1; Ae Ra Kim; Myung Hwan Park. Planta medica. 2001, 67, 312-316.
11. Kong WJ; Zhao YL; Xiao XH; Li ZL; Jin C; Li HB. Journal of applied microbiology. 2009, 107, 1072-1080.
12. Di Yu1; Shilong Fu; Zhifei Cao; Meimei Bao; Gaochuan Zhang; Yanyan Pan; Wenming Liu; Quansheng Zhou. Toxicology Letters.

2014, 26, 328-336.

13. Chomczynski P. BioTechniques. 1993, 15, 532-537.

14. Chomczynski P.; Sacchi N. Analytical Biochemistry. 1987, 162, 156-159.

15. Park EJ; Choi SJ; Kim YC; Lee SH; Park SW; Lee SK. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2009, 19, 2282-2284.

16. Calone I; Souchelnytskyi S. Experimental oncology. 2012, 34, 9-16.

17. Young-Joo Won; Hyun-Joo Kong; Chang-Mo Oh; Duk Hyoung Lee; Jin Soo Lee. Cancer research and treatment. 2014, 46, 109-123.

18. Jong In Yook; Xiao-Yan Li; Ichiro Ota; Eric. The Journal of biological chemistry. 2005, 280, 11740-11748.

19. Nieto, M. A. Nature reviews. Molecular cell biology. 2002, 3, 155-166.

20. Nakashima T; Huang C; Liu D; Kameyama K; Masuya D; Kobayashi S; Kinoshita M; Yokomise H. British journal of cancer. 2003, 88, 1727-1733.

21. Eriksson JE; Dechat T; Grin B; Helfand B; Mendez M; Pallari HM; Goldman RD. The Journal of clinical investigation. 2009, 119, 1763-1771.

22. Matsuo K; Irie N. Archives of biochemistry and biophysics. 2008, 473, 201-209.

23. Del Fattore A; Cappariello A; Teti A. Bone. 2008, 42, 19-29.

24. Harada S; Rodan GA. Nature. 2003, 423, 349-55.

25. Novack DV; Teitelbaum SL. Annual review of pathology. 2008, 3, 457-84.

26. Tang DZ; Hou W; Zhou Q; Zhang M; Holz J; Sheu TJ; Li TF; Cheng SD; Shi Q; Harris SE; Chen D; Wang YJ. Journal of bone and mineral research. 2010, 25, 1234-1245.

27. Maria P. Yavropoulou; John G. Yovos. HORMONES. 2007, 6, 279-294.

28. Hill TP; Spater D; Taketo MM; Birchmeier W; Hartmann C. Developmental cell. 2005, 8, 727-738.

29. Ikeda S; Kishida S; Yamamoto H; Murai H; Koyama S; Kikuchi A. The EMBO journal. 1998, 17, 1371-1384.

30. Day TF; Guo X; Garrett-Beal L; Yang Y. Developmental cell. 2005, 8, 739-750.

31. Yan Y; Tang D; Chen M; Huang J; Xie R; Jonason JH; Tan X; Hou W; Reynolds D; Hsu W; Harris SE; Puzas JE; Awad H; O'Keefe R; Boyce BF; Chen D. Journal of cell science. 2009, 122, 3566-3578.

32. Lo YC; Chang YH; Wei BL; Huang YL; Chiou WF. Journal of agricultural and food chemistry. 2010, 58, 6643-6649.

33. Jin X; Zhang XH; Zhao NC. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1994, 19, 365-367, 384.

34. Chang TH; Adachi H; Okuyama T; Zhang KY. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1994, 15, 388-391.
35. Aida Y; Kasama T; Takeuchi N; Tobinaga S. Chemical & pharmaceutical bulletin. 1995, 43, 859-867.
36. Zhang JX; Fong WF; Wu JY; Yang M; Cheung HY. Planta medica. 2003, 69, 223-229.
37. Xu JF; Kong LY. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2001, 26, 178-180.
38. He L; Yang S; Wu D; Cui T; Wei D; Ding Z. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2012, 37, 811-813.
39. Yavropoulou MP; Yovos JG. Hormones (Athens). 2007, 6, 279-294.
40. Grace L. Lin; Kurt D. Hankenson. Journal of cellular biochemistry. 2011, 112, 3491-3501.
41. James J. Mason; Bart O. Williams. Journal of Osteoporosis. 2010, 2010, 460120-460129.
42. Rossini M; Gatti D; Adami S. Calcified tissue international. 2013, 93, 121-132.

Abstract

Inhibitory Effect of coptisine on Epithelial-to-Mesenchymal Transition

Eun Ju Jeong
Natural Products Science Major
College of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Coptisine, an isoquinoline alkaloid, is a component of *Coptis japonica* Makino (Ranunculaceae). *C. japonica* has been used as a traditional medicine for the treatment of fungal infection and inflammation. The present study was designed to investigate the inhibitory effect of coptisne on epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer cells. EMT is a differentiation switch in which polarized epithelial cells differentiate into contractile and motile mesenchymal cells. Coptisine showed a

potential growth inhibitory activity in human lung cancer A549 cells (IC_{50}= 8.4 μM for 72 h). Coptisine increased E-cadherin promoter activity and the expressions of E-cadherin protein and mRNA level. In addition, coptisine down regulated the EMT-related protein expressions including Snail, MMP-2, vimentin, and N-cadherin. Coptisine also suppressed the expressions of phosphorylated ERK1, Akt and GSK3β in TGFβ-treated or untreated A549 cells. These results indicated that coptisine inhibited upstream signaling of Snail. Further study revealed that coptisine inhibited cell migration in the wound healing and colony dispersion assays. Cell invasion was also mediated by coptisine in the matrigel invasion assay. Coptisine might have a potential anti-metastatic activity, and thus will be a lead candidate as an anti-cancer agent.

Nodakenetin, a furanocoumarin compound, is a component of *Angelica decursiva* (Umbelliferae). *A. decursiva* is used as a traditional medicine to relive the symptoms associated with allergy and skin whitening. In the present study, the effect of nodakenetin anti-osteoporosis activity was evaluated. The Wnt signaling pathway is an evolutionarily conserved pathway involved in various biological events, including stem cell differentiation, cell motility, and cell proliferation. Activation of the Wnt signaling is known to contribute to differentiation in

osteoblast. Nodakenetin was found to have an activation effect β-catenin/T-cell factor (TCF) transcriptional activity in HEK293 cells. The activation sequentially stimulated of Wnt signaling target genes and β-catenin in both HEK293 cells and MC3T3-E1 cells. In addition, nodakenetin surppressed the expression of DKK1, a Wnt inhibitor. Nodakenetin is considered a potent Wnt activator. Nodakenetin markedly increased alkaline phosphatase (ALP) activity and extracellular matrix (ECM) calcium deposits in osteoblast cells. These data demonstrated that nodakenetin activated the Wnt signaling, which increased BMPs and Runx2 expressions, and stimulated osteoblast differentiation. Therefore, the activation of Wnt signaling by nodakenetin is considered to be associated with the anti-osteoporotic activity.

Key words : Coptisine, EMT, E-cadherin, Snail, Nodakenetin, Wnt signaling, osteoblast

Student number : 2011-21770