

시스템 약리학적 분석에 의한 절패모의 유방암 억제 작용

김병준 석사과정¹, 김선중 석사과정¹, 윤정민 석사과정¹, 김윤숙 박사과정², 이부균 교수¹, 안원근 교수^{1*}

1. 부산대학교 한의학전문대학원

2. 부산대학교 의학전문대학원

Inhibitory Action of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus on Breast Cancer by Systemic Pharmacological Analysis

Byung Jun Kim¹, Sun Joong Kim¹, Jeong min Yoon¹, Youn Sook Kim², Boo Kyun Lee¹, Won Gun An^{*1}

1. School of Korean Medicine, Pusan National Univ.

2. School of Medicine, Pusan National Univ.

Abstract

Fritillariae Thunbergii Bulbus (FTB) contains alkaloids such as peimisine and peimine, and has traditionally been used to regulate airway inflammation and for antitussive and expectorant applications. According to a recent study, FTB extract has anti-H1N1 virus and anti-oxidant effect and suppresses breast cancer. Despite such diverse efficacy, there is still insufficient research on the specific mechanism of action of the FTB active ingredient for specific diseases. In this study, we confirmed the mechanism of breast cancer suppression of FTB main active ingredient through system pharmacological analysis. We secured 17 potential active compounds of FTB through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) Database and Analysis Platform and screened six active compounds that match the set ADME-related pharmacokinetic parameters. We have identified the information of 62 genes reacting to compounds through the UniProt database and secured 86 biological processes related to the collected genes with David 6.8 Gene Functional Classification Tool. We confirmed multiple interactions of compound-target and process-target through network construction. According to the results of pathway network analysis, FTB targeting genes, BAX, ESR1, ESR2, GSK3B, JUN, NCOA1,

Correspondence: 안원근(Won Gun An)

Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 50612, South Korea

Tel: +82-51-510-8455, E-mail: wgan@pusan.ac.kr

Received 2020-08-11, revised 2020-08-30, accepted 2020-08-31, available online 2020-09-02

doi:10.22674/KHMI-8-2-4



and PGR were found in the breast cancer signaling pathway and were involved in the regulation of cancer cell growth in the pathway. Network-level analysis, including the TCMSP database, which describes the pharmacokinetic profile of active ingredients and drug-target-disease associations, enables a breakthrough *in silico* access to therapeutic candidates. This not only adds accuracy to the selection of research materials but also saves time and money. The secured data will lead to experimental evidence for the effects of FTB extract and each active ingredient and will be presented as a scientific basis for future breast cancer prevention and treatment strategies.

Keywords: Fritillariae Thunbergii Bulbus, Anti-breast cancer activity, Gene ontology analysis, Systems pharmacological analysis

서론

유방암은 전 세계 여성들의 주요 사망 원인 중 하나이다. 2012년 전 세계에서 발생한 신규 여성 암 환자는 약 670만 명이었으며, 이중 유방암 환자는 약 167만 명으로 가장 많았다. 같은 해에 암으로 사망한 여성은 약 350만 명이었으며, 유방암으로 인한 사망자는 약 52만 명으로 또한 가장 많았다¹⁾. 출산, 호르몬제 복용, 음주, 운동 부족 등 에스트로겐 분비에 영향을 미칠 수 있는 활동은 유방암의 위험요인이며, 합성화학물 또한 위험요인으로 작용할 수 있다²⁾. 최근 한국에서는 대기 오염이 유방암의 발생 위험을 증가시킨다는 연구도 보고되어 이에 대한 경각심은 더욱 커지고 있다³⁾.

유방암의 치료법으로는 수술, 호르몬 요법, 화학요법, 방사선 치료 등이 있다. 그러나 치료로 인한 부작용이나 약물에 대한 내성이 유방암 치료의 효과를 비효율적으로 만든다⁴⁾. 유방암은 에스트로겐 수용체의 유무에 따라 분류될 수 있으며, 프로게스테론 수용체(PR)나 HER2 수용체 등의 바이오마커를 활용하여 더욱 세부적으로 구분될 수 있다. 뚜렷하게 구분되는 하위유형에 따라 치료의 반응률이 다른 점은 치료에 또 다른 어려움으로 작용하고 있다⁵⁾.

천연물은 유전자에 직접 작용하거나 대사 경로에 영향을 미치는 결합체에 간접적으로 작용하여 일반 의약품에 비해 독성이나 부작용이 적어 인체에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다⁶⁾. 이소플라본이 풍부한 콩을 많이 섭취하는 극동아시아 여성의 유방암 발생률이 서구 여성보다 낮은 것처럼⁷⁾, 역사적으로 천연물은 항암 작용에 중요한 역할을 담당해왔다⁸⁾. 또한 주목나무에서 추출한 Taxol은 유방암과 난소암에 대하여 사용 승인을 받은 바 있다⁹⁾.

浙貝母(Fritillariae Thunbergii Bulbus)는 백합목(Liliales) 백합과(Liliaceae)에 속하는 중국패모(*Fritillaria thunbergii* Miquel)의 비늘줄기이다. Peimine으로도 알려져 있는 verticine, peimisine 등의 알칼로이드 물질을 함유하고 있으며, 중국 저장성, 장쑤성, 안후이성, 후난성 등에서 널리 재배되고 있다¹⁰⁾. 전통적으로는 기도의 염증을 조절하고 鎮咳祛痰하는 용도로 이용되어 왔으며¹¹⁾, 최근에는 浙貝母 추출물이 가진 항-H1N1 바이러스 효과에 관한 연구가 보고된 바 있다¹²⁾. 그 외에도 浙貝母에서 추출한 다당류에서 항산화 효과가 확인되었다¹³⁾.

그러나 이러한 다양한 효능에도 불구하고 浙貝母의 구성성분이 타깃으로 하는 유전자의 성격과 작용에 대한 연구는 아직 부족하다. 절파모의 구성성분인 peimine와 peiminine이 estrogen receptor (ER) positive MCF-7 cells에서 유방암을 억제한다는 연구가 보고되었다¹⁴⁾. 그리고 verticine, ebeieidine, suchengbeisine이 EGF, PMA, TNF- α 을 통해 MUC5AC 무신 유전자의 발현과 products를



조절한다는 연구 외에는 다양한 활성 성분과 그와 관련된 타깃 유전자에 대한 연구가 거의 수행되지 않았다¹⁵⁾.

다양한 성분으로 구성된 천연물의 단일 타깃을 연구하는 방식은 한계가 많은 접근법이다. 본 연구는 축적된 빅데이터와 네트워크 약리학적 분석을 통하여 浙貝母의 잠재적 활성 성분과 관련된 타깃 유전자를 밝혀내었다. 다음으로 관련 유전자들의 생체 작용을 예측한 후, 그중 유방암 억제 작용에 초점을 맞추어 분석을 진행하였다. 본 연구를 통하여 浙貝母에 대한 생물 정보학적 분석을 기반으로 유방암의 예방과 효율적인 치료를 위한 전략을 제시하고자 한다.

본론

1. 연구 방법

1) 활성 성분의 동정

Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP, <http://tcmospw.com/tcmosp.php>) Database Analysis Platform 을 이용하여 浙貝母의 활성 성분을 스크리닝하였다. 본 연구의 전체적 흐름도는 Fig. 1 에 요약하였다. 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설과 관련된 생리활성도(Oral Bioactivity, OB), 약물 유사성(Drug likeness, DL), 장내 흡수도(Caco-2 permeability, Caco-2) 값을 기준으로 스크리닝하였다(ADME Screening). 생리 활성도는 30% 이상, 약물 유사성은 0.18 이상, 장내 흡수도는 -0.4 이상을 기준으로 활성 성분을 선별하였다.

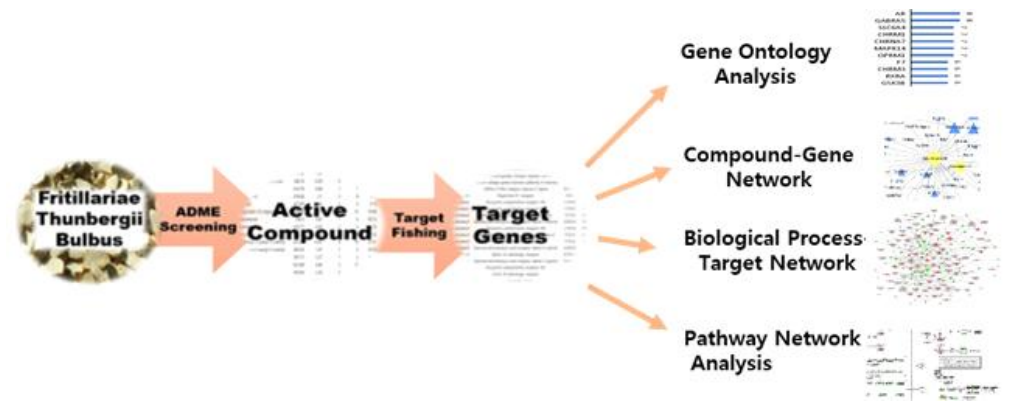


Fig. 1. Workflow: the performance of systems pharmacological network analysis of Fritillariae Thunbergii Bulbus, active compound screening, target fishing, gene ontology analysis, network constructions, and pathway network analysis.

2) 타깃 단백질 수집 및 관련 생체 과정 분석

UniProt database (<http://www.uniprot.org>)를 이용하여 활성 성분과 그 외 함유 성분의 타깃 단백질과 유전자 정보를 확보하였다. 확보한 유전자에 연관된 Biological Process 를 찾기 위해 DAVID 6.8 Gene Functional Classification Tool 을 사용하였다. P값은 0.01 미만으로 설정하였으며, Benjamini-Hochberg 방법으로 P값을 보정하였다. 연관된 Metabolic pathway 를 수집하기 위해

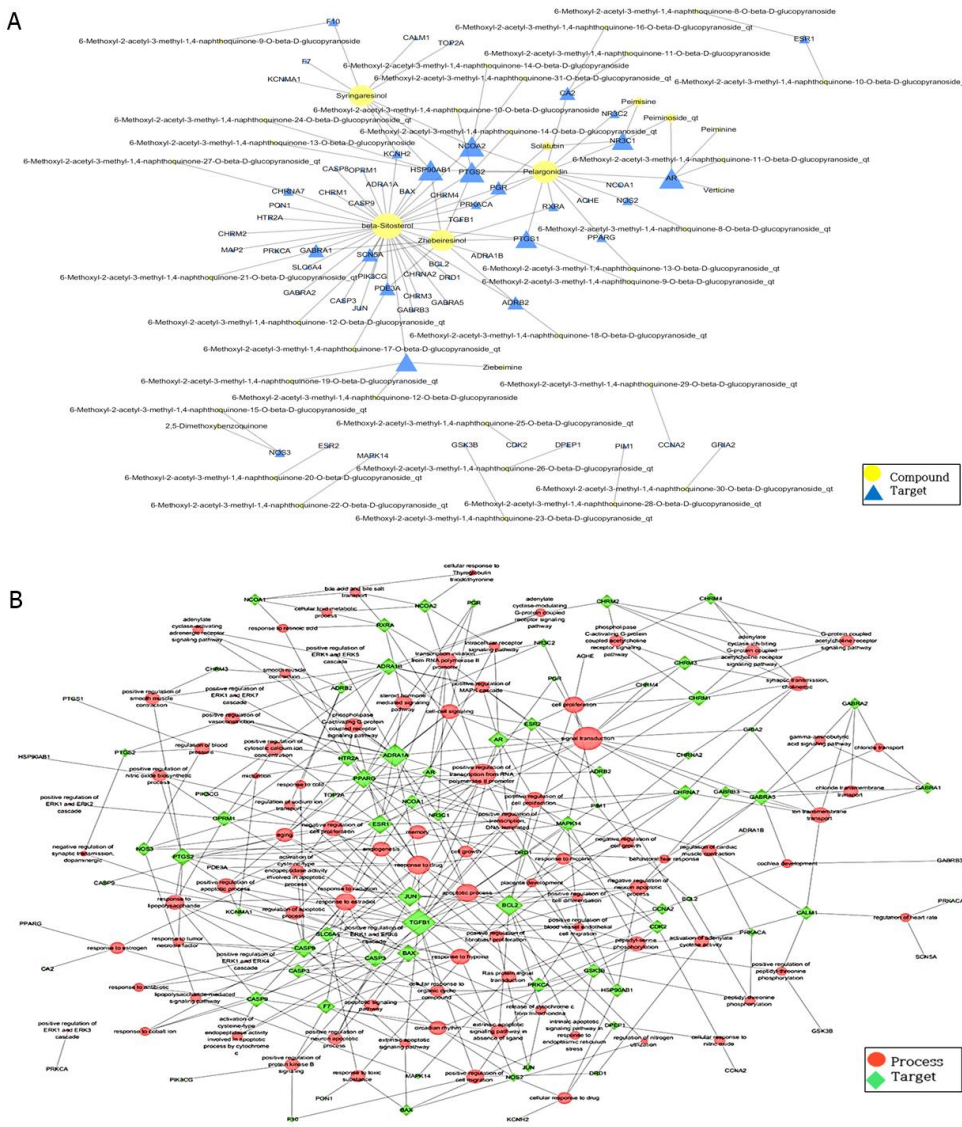


Fig. 2. Compound-target network (A) and bio process-target network (B) of *Fritillariae Thunbergii Bulbus*. The size of the node is large in proportion to the value of the interaction degree in both networks.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>)를 이용하였다.

3) 수집된 타겟에 대한 네트워크 분석

浙貝母的 다양한 성분과 타겟 유전자들 사이의 관련성을 알아보기 위해 성분과 수집된 타겟에 대한



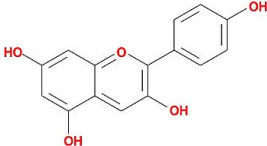
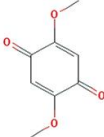
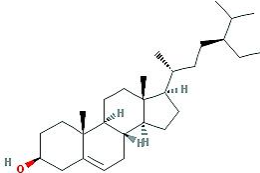
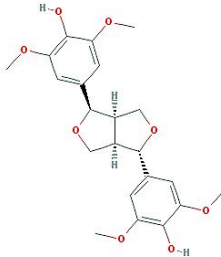
네트워크(Compound-Target network, C-T network)를 Cytoscape 3.7.1 (<https://cytoscape.org/>)를 이용하여 구성하였다. 또한 타깃과 Biological Process 에 대한 네트워크(Process-Target network, P-T network)를 구성하였다(Fig. 2).

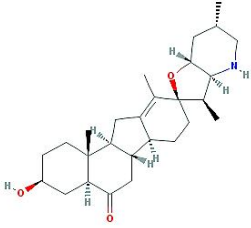
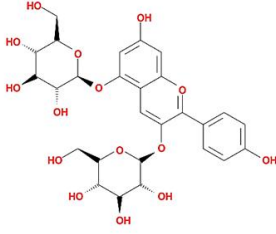
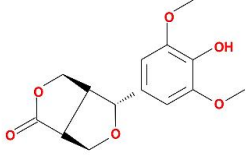
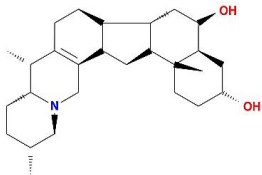
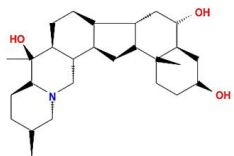
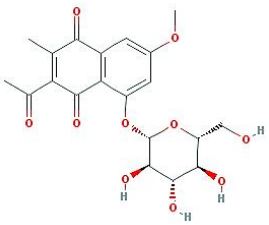
2. 결과

1) 활성 성분의 동정

TCMSP 분석에서 17 개의 잠재적 활성 성분을 찾아내었다(Table 1). 이들 가운데 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$, $Caco-2 \geq -0.4$ 의 조건을 만족하는 6 개의 활성 성분을 동정하였다(Table 2).

Table 1. Potential active compounds of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus

Molecule name	structure	Formula	MW(g/mol)
Pelargonidin		$C_{15}H_{11}O_5$	271.26
2,5-Dimethoxybenzoquinone		$C_8H_8O_4$	168.16
beta-Sitosterol		$C_{29}H_{50}O$	414.79
Syringaresinol		$C_{22}H_{26}O_8$	418.48

Molecule name	structure	Formula	MW(g/mol)
Peimisine		$C_{27}H_{41}NO_3$	427.69
Pelargonidin-3,5-diglucoside		$C_{27}H_{31}O_{15}$	595.58
Zebeiresinol		$C_{14}H_{16}O_6$	280.30
Ziebeimine		$C_{27}H_{43}NO_2$	413.71
Verticine (Peimine)		$C_{27}H_{43}NO_3$	431.73
6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucopyranoside		$C_{20}H_{22}O_{10}$	422.42

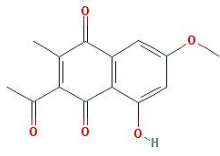
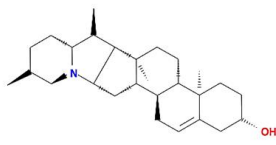
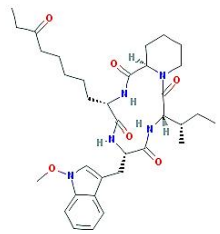
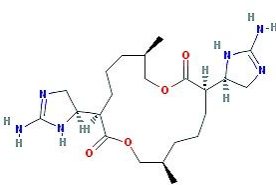
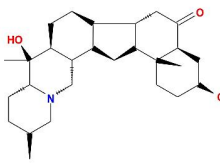
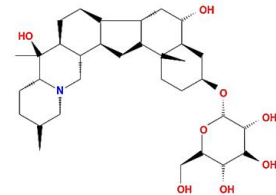
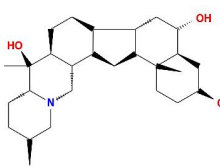
Molecule name	structure	Formula	MW(g/mol)
6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucopyranoside_qt		C ₁₃ H ₁₀ O ₅	260.26
Solatubin		C ₂₇ H ₄₃ NO	397.71
OSI-2040		C ₃₄ H ₄₉ N ₅ O ₆	623.88
Chaksine		C ₂₂ H ₃₈ N ₆ O ₄	450.66
Peiminine		C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	429.71
Peimoside		C ₃₃ H ₅₅ NO ₇	593.89
Peimoside_qt		C ₂₇ H ₃₉ NO ₃	431.73

Table 2. Active compounds of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus

Molecule Name	OB (%)	Caco-2	DL
Pelargonidin	37.99	0.31	0.21
beta-Sitosterol	36.91	1.32	0.75
Zhebeiresinol	58.72	0.53	0.19
Ziebeimine	64.25	0.81	0.7
Chaksine	65.63	-0.01	0.66

2) 타깃 유전자 수집 및 관련 생체대사 분석

17 개의 성분 중 타깃 정보가 있는 13 개의 성분의 중복된 경우를 제외한 62 개의 타깃 유전자를 수집하였다(Table 3). 다음으로 David 6.8 (Gene Functional Classification Tool)을 이용하여 62 개의 유전자가 관여하는 86 개의 생물학적 과정을 확보하였다. 이 중 상대적으로 많은 유전자가 관여하는 생물학적 과정을 그룹화하여, signal transduction (n=17), positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (n=14), response to drug (n=11), apoptotic process (n=10), response to estradiol (n=9), positive regulation of transcription, DNA-templated (n=9), transcription initiation from RNA polymerase II promoter (n=8), cell proliferation (n=8) 순으로 구축하였다.

Table 3. Target proteins of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus

UniProt ID	Target	Gene name
P35228	Nitric oxide synthase, inducible	NOS2
P23219	Prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1
P10275	Androgen receptor	AR
P37231	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPARG
P35354	Prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2
P00918	Carbonic anhydrase II	CA2
P08238	Heat shock protein HSP 90	HSP90AB1
P17612	mRNA of PKA Catalytic Subunit C-alpha	PRKACA
Q15596	Nuclear receptor coactivator 2	NCOA2
P19793	Retinoic acid receptor RXR-alpha	RXRA
P22303	Acetylcholinesterase	ACHE
P06401	Progesterone receptor	PGR
P08235	Mineralocorticoid receptor	NR3C2
P04150	Glucocorticoid receptor	NR3C1
Q15788	Nuclear receptor coactivator 1	NCOA1
P48736	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit, gamma isoform	PIK3CG
Q12809	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	KCNH2
P21728	Dopamine D1 receptor	DRD1
P20309	Muscarinic acetylcholine receptor M3	CHRM3



UniProt ID	Target	Gene name
P11229	Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1
Q14524	Sodium channel protein type 5 subunit alpha	SCN5A
P47869	Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-2 subunit	GABRA2
P08173	Muscarinic acetylcholine receptor M4	CHRM4
Q14432	CGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A	PDE3A
P28223	5-hydroxytryptamine 2A receptor	HTR2A
P31644	Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-5 subunit	GABRA5
P35348	Alpha-1A adrenergic receptor	ADRA1A
P28472	Gamma-aminobutyric-acid receptor alpha-3 subunit	GABRB3
P08172	Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2
P35368	Alpha-1B adrenergic receptor	ADRA1B
P07550	Beta-2 adrenergic receptor	ADRB2
Q15822	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-2	CHRNA2
P31645	Sodium-dependent serotonin transporter	SLC6A4
P35372	Mu-type opioid receptor	OPRM1
P14867	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1	GABRA1
P36544	Neuronal acetylcholine receptor protein, alpha-7 chain	CHRNA7
P10415	Apoptosis regulator Bcl-2	BCL2
Q07812	Apoptosis regulator BAX	BAX
P55211	Caspase-9	CASP9
P05412	Transcription factor AP-1	JUN
P42574	Caspase-3	CASP3
Q14790	Caspase-8	CASP8
P17252	Protein kinase C alpha type	PRKCA
P01137	Transforming growth factor beta-1	TGFB1
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1
P11137	Microtubule-associated protein 2	MAP2
P03372	Estrogen receptor	ESR1
P00742	Coagulation factor Xa	F10
P11388	DNA topoisomerase II-alpha	TOP2A
Q02880	DNA topoisomerase II-beta	TOP2B
P0DP23	Calmodulin	CALM1
P08709	Coagulation factor VII	F7
Q12791	Calcium-activated potassium channel subunit alpha 1	KCNMA1
P29474	Nitric-oxide synthase, endothelial	NOS3
Q92731	Estrogen receptor beta	ESR2
Q16539	Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14

UniProt ID	Target	Gene name
P49841	Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B
P24941	Cell division protein kinase 2	CDK2
P16444	Beta-lactamase	DPEP1
P11309	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1	PIM1
P20248	Cyclin-A2	CCNA2
P42262	Glutamate receptor 2	GRIA2

KEGG database 분석에서 유방암에 관련된 타깃 유전자로 BAX, ESR1, ESR2, GSK3B, JUN, NCOA1, 그리고 PGR 를 선별하였다. 주요 관련 성분은 solatubin, beta-sitosterol, 6-methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucoopyranoside, 6-methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-20-O-beta-D-glucoopyranoside_qt, pelargonidin 이었다(Table 4). 이 중에서 beta-Sitosterol (OB=33.91%, Caco-2=1.32, DL=0.75)와 pelargonidin (OB=37.99%, Caco-2=0.31, DL=0.21)은 유방암을 억제하는 동시에 활성성분의 조건에 부합하는 성분으로 확인되었다.

Table 4. Compounds of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus and target genes in the breast cancer pathway

Compounds	Genes involving in breast cancer pathway
Pelargonidin	NCOA1
beta-Sitosterol	PGR, BAX, JUN
6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucoopyranoside	ESR1
6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucoopyranoside_qt	ESR1, ESR2, GSK3B
Solatubin	PGR

마지막으로 KEGG Mapper (https://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)을 사용하여 절파모 성분이 타깃으로하는 유전자가 관여하는 signaling pathway 를 탐색하였다(Fig. 3).



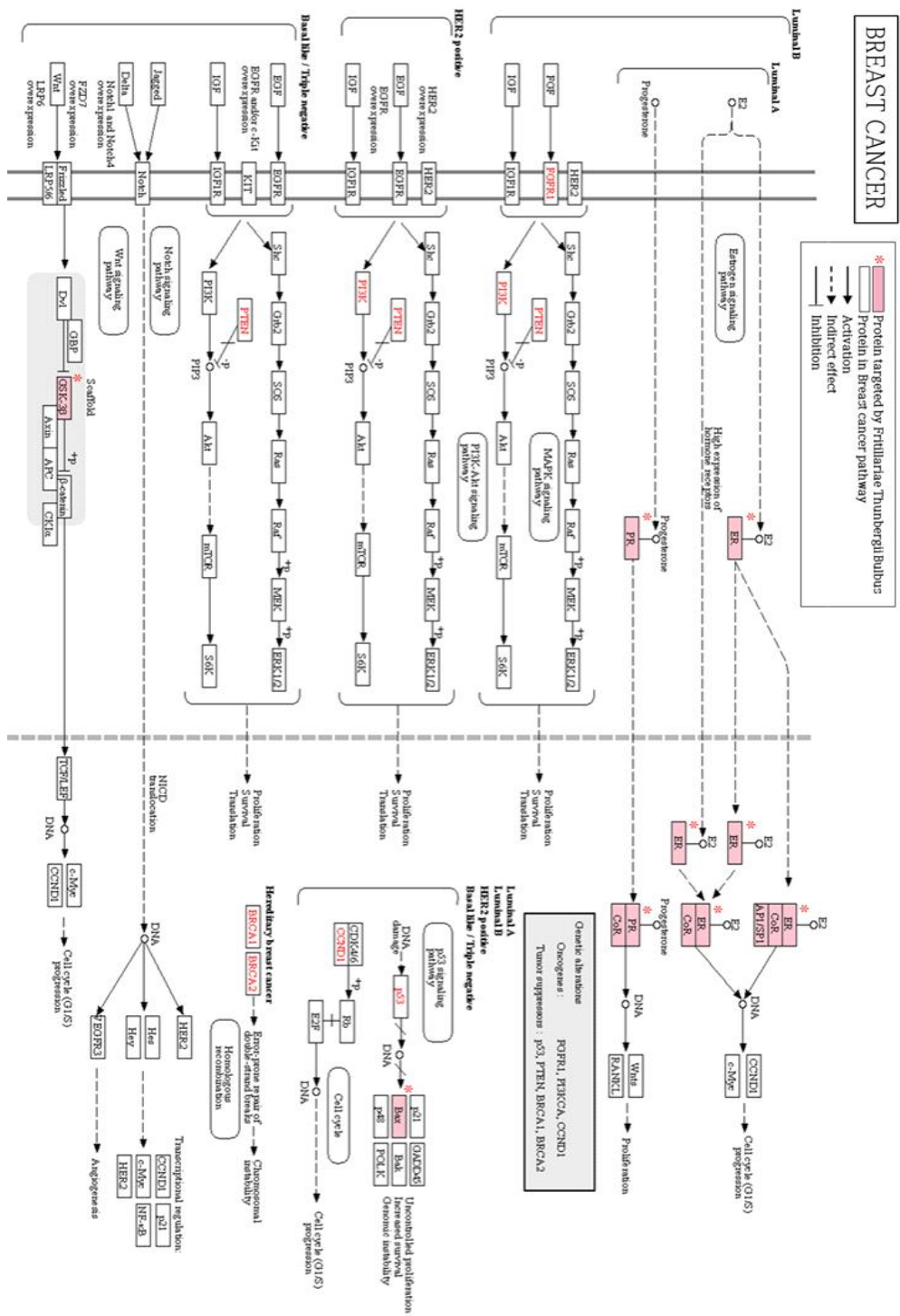


Fig. 3. Network pathway analysis. Target genes of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* were mapped to the breast cancer pathway.

3. 고찰

貝母는 『神農本草經』 中品藥에 傷寒煩熱, 淋瀝邪氣, 疔瘕, 喉痹, 乳難, 金瘡風癩 의 효능을 갖는 약재로 기록되어 있다. 淸 시대(1695 년)의 『本經逢源』에는 패모를 川貝母와 浙貝母로 구분하여 절때모의 효능을 ‘疔瘕 喉痹 乳難 金瘡 風癩 一切癰瘍을 치료한다’고 명시하였다. 본 저자들은 이에 주목하여 浙貝母의 성분을 시스템 약리학적으로 분석하여 유방암 억제와의 연관성을 발견하였다.

한약재의 시스템 약리학적 플랫폼인 TCMS Database and Analysis Platform 은 약물과 표적 물질 및 질병 사이의 상관관계를 보여준다. 데이터베이스에는 화학 물질-표적, 약물-표적 네트워크가 포함되어 있다. 나아가 관련된 약물-표적-질환 네트워크 및 oral bioavailability, drug-likeness, intestinal epithelial permeability 와 같은 천연 화합물의 약동학적 특성이 설정되어 있다. 따라서 시스템 네트워크 수준에서 다양한 한약 중 후보 약물의 검색이 가능한 획기적인 *in silico* 접근법이라고 할 수 있다. 분석 결과 설정한 ADME 관련 기준에 부합되는 약물 후보가 될 수 있는 절때모의 활성성분으로는 pelargonidin, beta-sitosterol, zhebeiresinol, ziebeimine, chaksine 이 스크리닝되었다(Table 2).

Pelargonidin 은 크랜베리, 사스카툰베리, 초크베리, 블루베리, 딸기, 붉은 무, 석류, 강낭콩 등에서 발견되는 식물 안료인 안토시아니딘(anthocyanidin)의 한 유형으로 항산화, 항염, 항혈전 및 항당뇨 등의 다양한 생물학적 활성을 갖는다¹⁶⁾. Pelargonidin 은 CYP1A1 촉매의 활성을 억제하고¹⁷⁾, NRF2-ARE 신호전달경로에서 NRF2 프로모터 영역의 DNA 메틸화를 감소시킨다. 그리고 antioxidant response element 의 전사작용을 활성화하여 세포 형질전환을 감소시키는 항암 기전으로 알려져 있다¹⁶⁾. 특히, 본 연구의 분석 결과 breast cancer pathway 에 관여하는 NCOA1 유전자를 타겟으로 함을 확인하였다.

β -Sitosterol 은 다양한 식물에서 얻을 수 있는 물질로 유방암, 전립선암, 폐암, 위암, 난소암 및 백혈병에 대한 항암 효과가 있다. β -Sitosterol 은 FAS 의 농도 증가, ERK 인산화, caspase-8 의 활성화, 그리고 p53 dependent MAPK 인산화 등을 통해 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis 를 촉진한다¹⁸⁾. Breast cancer pathway 에 관여하는 PGR, BAX, JUN 유전자를 타겟으로 한다. Zhebeiresinol 은 개사철쭉, 티크나무, 먼나무, 좁은잎골담초 등에 포함된 성분이며¹⁹⁻²²⁾, NF- κ B 의 발현을 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다²³⁾. Chaksine 은 phytochemical 의 일종으로 *Streptococcus hemolyticus*에 항균작용이 있으며, 자궁, 장, 방광 및 혈관의 평활근을 수축시킨다. 나아가 심장, 신경 중추 및 호흡작용을 억제하는 효과가 있으며, β -sitosterol 과 함께 phytoprogesteric property 를 가진다²⁴⁾.

분석 결과에 의해 pelargonidin, β -sitosterol 외에 breast cancer pathway 에 작용하는 유전자들을 타겟으로 하는 성분들은 Table 4 에 표시하였다.

浙貝母의 유방암 억제 활성 성분과 관련성이 높은 타겟 유전자로는 BAX, ER1, ER2, GSK3 β , JUN, NCOA1, PGR 가 breast cancer pathway 에 작용하였다. BAX 는 가장 많이 연구된 pro-apoptotic 인자이다. 일반적으로 p53 은 apoptosis 그리고 cell cycle arrest 를 조절하는 중요한 factor 로 잘 알려져 있다. Bcl-2 family 는 p53 의 downstream 인자로 핵심적인 apoptosis 조절 단백질이다²⁵⁾. DNA 손상과 같은 스트레스가 발생하면 Bax 는 미토콘드리아 외막으로 이동하여 투과성을 증가시키고 cytochrome-c 를 통해 apoptosis 를 유도한다²⁶⁾. 다른 유방암 연구에서 p53 단백질은 Bcl-2 와 BAX 인자를 조절하여 apoptosis 를 유도하는 것으로 보고되고 있다²⁷⁾.

JUN 유전자는 세포 유전자 발현을 직접 조절하여 세포증식 및 apoptosis 의 조절에 관여한다²⁸⁾. JUN 은 유전자의 promoter 활성화를 통해 SCF (stem cell factor)와 CCL5 를 증가시키는데, 이는



유방 상피세포 재생 작용을 촉진하여 암전이 활동을 증가시킨다²⁹⁾. 본 연구에서는 breast cancer pathway 에서 절배모의 beta-sitosterol 이 target 으로 하는 JUN 이 작용함을 확인하였다(Fig. 4).

Estrogen Receptor 1 (ER1) 유전자는 8 개의 엑손을 가지고 있으며, 염색체 6 번에 300kb 이상의 크기로 존재하는 유전자이다. 에스트로겐뿐만 아니라 Estrogen Response Element(ERE) DNA 서열에 결합할 수 있는 전사 인자를 암호화한다³⁰⁾. 전이성 유방암에서 흔히 발생하며, 유방암의 호르몬 요법에 대한 반응에 영향을 미치는 유전자이다³¹⁾. 반대로 Estrogen Receptor 2 (ER2)는 항증식 효과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다³²⁾. 유방암에서는 ESR2 유전자 발현이 감소하여 유방암과 ESR2 는 역상관 관계가 있다고 보고되었다³³⁾.

Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3β)는 serine-threonine kinase 유전자로 glycogen synthase 를 인산화 및 억제하는 작용을 한다³⁴⁾. GSK3β는 세포 과정의 다양한 경로에 참여하여 중심적인 역할을 한다³⁵⁾. GSK3β는 정상 유방 세포에 비해서 유방암세포에서 상향 조절(upregulated)되는 것이 관찰되었으며, 유방암 환자의 생존율 저하와 연관이 있는 것으로 보고되었다³⁶⁾.

Progesterone receptor (PR)은 스테로이드 호르몬인 progesterone 에 의해 활성화되는 수용체이다. PR 은 ER 과 함께 유방암에서 가장 중요한 예후 및 예측 면역조직화학(immunohistochemical) 마커 중 하나이다³⁷⁾. NCOA1 는 p160 SRC family 에 속하는 유전자로 nuclear hormone receptors 와 다른 전사인자와의 상호작용을 통해 전사 단백질 복합체의 조립을 촉진하는 역할을 한다. NCOA1 의 과발현은 암과 같은 질병과 연관성이 있는데³⁸⁾, 유방암에서 NCOA1 과발현은 재발과 전이, 내분비 요법에 대한 저항성과 연관이 있는 것으로 알려져 있다³⁹⁾.

浙貝母의 유방암 억제에 관한 이전의 연구에서는 MTT assay 를 통해 peimine 이 MCF-7 의 증식 억제와 apoptosis 유발한다는 것을 보여주었다. Peimine 은 Bcl-2 를 감소시키고, 세포분열 주기에서 G1 기 정지를 유도하였으며, 48 시간 후에는 apoptosis 로 진행되었다⁴⁰⁾. Peiminine 은 혈액, 세포내액, 세포외액에 분포하고 peimine 은 혈장과 세포외액에 분포한다⁴¹⁾.

본 연구에서는 시스템 약리학적 분석을 통해 浙貝母의 성분들은 유방암 세포 signaling pathway 에 작용하는 것을 분석하였고, BAX, ER, PGR 등에 작용하여 세포증식 및 사멸을 조절함으로써 유방암을 억제하는 작용기전을 확인하였다.

본 연구에서 구축된 浙貝母의 유방암 억제 효과에 대한 시스템 약리학적 분석은 기존의 이론과 부합되었다. 특정 천연 약재에 존재하는 활성물질의 핵심 작용기전을 쉽게 찾아내어 질병 극복을 위한 노력, 시간, 그리고 비용을 줄일 수 있다. 활성성분과 반응하는 생명분자의 작용기전을 밝혀 관련 질병

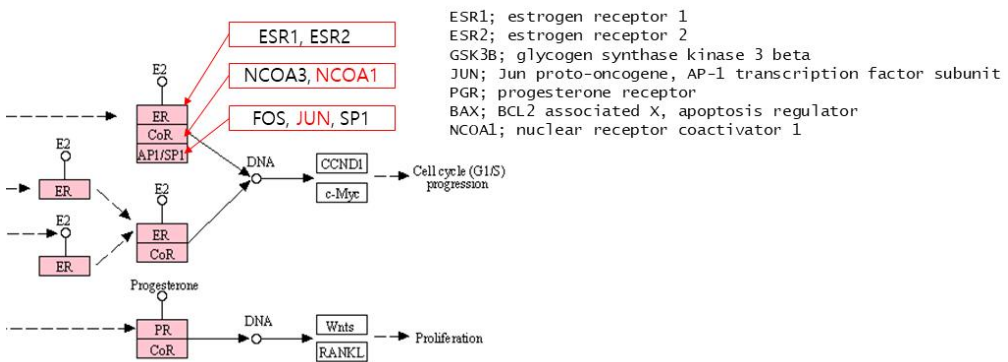


Fig. 4. Fritillariae Thunbergii Bulbus targeting genes encode proteins in the breast cancer pathway.



까지 구축된 데이터는 앞으로 시행될 실험적 검증에 중요한 기반을 제공할 것이다.

결론

본 연구에서는 시스템 약리학적 분석을 사용하여 浙貝母의 유방암 억제 효과에 중점을 두고 활성 화합물, 표적 물질 및 유전자를 분석하였다. 浙貝母의 특정 성분은 TCMSP 데이터베이스 및 분석 플랫폼을 통해 확보하였다. 분석은 활성 화합물 및 관련 약물과 표적 질환 간의 네트워크 약동학적 특성을 포함하며, 이를 통해 네트워크 수준에서의 *in silico* 접근 방식이 가능하다. 표적 유전자 정보를 UnitProt 데이터베이스로부터 수집하고 유전자 온톨로지 분석을 David 6.8 유전자 기능 분류 도구를 사용하여 수행한 결과, 17개의 스크리닝 된 활성 화합물에 상응하는 총 62개의 표적 단백질을 수집하였다. 여기에 7개의 유전자가 유방암 억제와 관련된 생물학적 과정에 작용하는 것으로 밝혀졌다. 유방암 억제에 관여하는 대표적인 활성성분은 pelargonidin, β -sitosterol 이었다. 항암 작용 표적인자로는 BAX, JUN, Estrogen Receptor 1, Estrogen Receptor 2, Glycogen synthase kinase 3 beta, progesterone receptor 및 nuclear receptor coactivator 1 등이 관여하였다. 특히 이들 표적인자는 ESR 을 중심으로 정확한 항암기전을 추 후 실험적으로 규명되어야 할 것이다. 본 연구결과를 토대로 실험적 증거를 제공한다면 유방암 치료 전략에 중요한 데이터를 제공할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2020 년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1D1A3B07049092).

참고문헌

1. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26:444-57.
2. Brody JG, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer. *Environmental health perspectives.* 2003;111(8):1007-19.
3. Hwang JE, et al. Impact of air pollution on breast cancer incidence and mortality: a nationwide analysis in South Korea. *Scientific Reports.* 2020;10(1):1-7.
4. Mitra S, Dash R. Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2018:2018.
5. Chidalu A, Edechi, Nnamdi Ikeogu, Jude E. Uzonna, and Yvonne Myal. Regulation of Immunity in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(8):1080.
6. Kelloff GJ, et al. Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *The Journal of nutrition.* 2000;130(2):467S-471S.
7. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & therapeutics.* 2003;99(1):1-13.
8. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development.



- J Nat Prod. 1997;60(1):52-60.
9. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial biotechnology*. 2011;4(6):687-99.
 10. Kim IJ, et al. Effects proliferation of Seed Bulb on GA3, Temperature and Bed Soil in *Fritillaria thunbergii* MIQ. *Proceedings of the Plant Resources Society of Korea Conference*. 2010:11.
 11. Jang IM. *Treatise on Asian herbal medicines*. Seoul: Haksulpyunsu-kwan in Research institute of natural products of Seoul National University. 2003:2759.
 12. Kim MJ, et al. Antiviral Activity of *Fritillaria thunbergii* Extract against Human Influenza Virus H1N1 (PR8) In Vitro, In Ovo and In Vivo. *J Microbiol Biotechnol*. 2020;30(2):172-7.
 13. Ma W. Antioxidant activity of polysaccharide from *Fritillaria thunbergii* Bulbus in vitro. *Chin Arch Tradit Chin Med*. 2014;32:1191-3.
 14. Tong XL. *Reversing Multi-drug Resistance on Tumour Cells and Pharmacokinetics Study on Ingredients in a Traditional Chinese medicine *Fritillaria thunbergii* Miq*. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine. 2016.
 15. Kim EJ, et al. Verticine, ebeiedine and suchengbeisine isolated from the bulbs of *Fritillaria thunbergii* Miq. inhibited the gene expression and production of MUC5AC mucin from human airway epithelial cells. *Phytomedicine*. 2016;23(2):95-104.
 16. Li S, et al. Pelargonidin reduces the TPA induced transformation of mouse epidermal cells-potential involvement of Nrf2 promoter demethylation. *Chemico-biological interactions*. 2019;309:108701.
 17. Kamenickova A, et al. Pelargonidin activates the AhR and induces CYP1A1 in primary human hepatocytes and human cancer cell lines HepG2 and LS174T. *Toxicology letters*. 2013;218(3):253-9.
 18. Bin Sayeed MS, Ameen SS. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutrition and cancer*. 2015;67(8):1216-22.
 19. Subinuer M, et al. Chemical constituents from roots of *Caragana stenophylla* and their anti-tumor activities. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2017;42(14):2697-703.
 20. Khera N, Bhargava S. Phytochemical and pharmacological evaluation of *Tectona grandis* Lin n. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5(3):923-7.
 21. Nakamura N, Min BS, Hattori M. Triterpenes and lignans from *Artemisia caruifolia* and their cytotoxic effects on Meth-A and LLC tumor cell lines. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2001;49(2):183-7.
 22. Liu WJ, Peng YY, Chen H, Liu XF, Liang JY, Sun JB. Triterpenoid Saponins with Potential Cytotoxic Activities from the Root Bark of *Ilex rotunda* Thunb. *Chemistry & Biodiversity*. 2017;14(2):e1600209.
 23. Zhou M, et al. Comparison and evaluation of antimuscarinic and anti-inflammatory effects of five *Bulbus fritillariae* species based on UPLC-Q/TOF integrated dual-luciferase reporter assay, PCA and ANN analysis. *Journal of Chromatography B*. 2017;1041:60-9.
 24. Hamedi A, et al. Reproductive toxicity of *Cassia absus* seeds in female rats: possible progestogenic properties of chaksine and b-sitosterol. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(4):



- 268-74.
25. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & development*. 2001;15(12):1481-6.
 26. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
 27. Thompson AM, Lane DP. p53 transcriptional pathways in breast cancer: the good, the bad and the complex. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2010;220(4):401-3.
 28. Katiyar S, et al. Mammary gland selective excision of c-jun identifies its role in mRNA splicing. *Cancer research*. 2012;72(4):1023-34.
 29. Jiao X, et al. c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(11):8218-26.
 30. Dunning AM, et al. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Human molecular genetics*. 2009;18(6):1131-9.
 31. Pejerrey SM, et al. The impact of ESR1 mutations on the treatment of metastatic breast cancer. *Hormones and Cancer*. 2018;9(4):215-28.
 32. Hartman J, et al. Tumor repressive functions of estrogen receptor β in SW480 colon cancer cells. *Cancer research*. 2009;69(15):6100-6.
 33. Hartman J, Ström A, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor beta in breast cancer—diagnostic and therapeutic implications. *Steroids*. 2009;74(8):635-41.
 34. McCubrey JA, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014;5(10):2881.
 35. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochemical research*. 2007;32(4-5):577-95.
 36. Vijay GV, et al. GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2019;21(1):1-14.
 37. Kunc M, Biernat W, Senkus-Konefka E. Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer—“Nobody's land” or just an artifact? *Cancer treatment reviews*. 2018;67:78-87.
 38. O'Malley BW. Masters of the genome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(5):311.
 39. Qin L, et al. NCOA1 directly targets M-CSF1 expression to promote breast cancer metastasis. *Cancer research*. 2014;74(13):3477-88.
 40. Chen HY, Chen XY. Effect of peimine on inhibiting the MCF-7/TAM proliferation of human breast cancer cell and its influence on cell apoptosis. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*. 2012;40(4):12-5.
 41. Li H, Hung A, Li M, Yang AWY. *Fritillariae Thunbergii* Bulbus: Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacodynamics, Pharmacokinetics and Toxicity. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1667.

