

Genistein이 사람 섬유육종 세포주 증식 및 Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) mRNA 발현에 미치는 영향

강진한 · 명 훈 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

THE EFFECT OF THE GENISTEIN ON THE PROLIFERATION OF HT1080 AND EXPRESSION OF MEMBRANE TYPE 1-MATRIX METALLOPROTEINASE (MT1-MMP) mRNA

Jin-Han Kang, Hoon Myoung, Myung-Jin Kim

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University

Matrix metalloproteinases have long been viewed as ideal candidates for proteinases that enables tumor cells to permeated basement membrane defenses and invade surrounding tissue. There is growing evidence that the MMPs have an expanded role, as they are important for the creation and maintenance of a microenvironment that facilitates growth and angiogenesis of tumors at primary and metastatic sites.

MT-MMPs are not secreted but instead remaining attached to cell surfaces. Although not all of the MT-MMPs are fully characterized, MT-MMPs have important role in localizing and activating secreted MMPs. The MMP genes are transcriptionally responsive to a wide variety of oncogene, growth factors, cytokine, and hormones.

Currently, a number of MMP inhibitors are being developed and some have reached clinical trials as anti-metastatic or anti-cancer therapies. MT1-MMP is involved in the activation of proMMP-2. MT1-MMP is significant not only as a tumor marker but as a new target for chemotherapy against cancer.

The purpose of this study was to evaluate the effects of protein kinase C inhibitor(genistein) on the proliferation of HT1080 and expression of MT1-MMP mRNA. Human fibrosarcoma cell line HT1080 was cultured and divided 2 groups. The experimental group was treated with 100 μ M genistein and incubated 12h, 24h for [3 H]-thymidine uptake assay and northern hybridization individually. And the control group was treated with same amount of PBS for the above procedures.

[3 H]-thymidine incorporation was measured with β ray detector. And RT-PCR and northern blotting for MT1-MMP mRNA was performed.

The results were as follows

1. [3 H]-thymidine uptake was reduced in experimental group with statistical significance.
2. MT1-MMP mRNA expression was significantly reduced in experimental group.

These results showed that protein kinase C inhibitor (genistein) inhibited proliferation of HT1080 and almost completely blocked transcription of MT1-MMP mRNA. So, it is possible to use the protein kinase inhibitor (genistein) as anti-metastatic and anti-proliferative agent.

Key words : Invasion, metastasis, MT1-MMP mRNA, tyrosine kinase C inhibitor, genistein

I. 서 론

세포외기질 (extracellular matrix)은 교원질, 단백 당, 당 단백질 등의 구조적 요소로서 구성되어 있으며 정상 세포와 종양 세포가 거주하는 외부적 골격을 형성한다. 조직이 그 형태를 변형시키거나 기능을 변화시킬 때는 세포외기질이 분해되어야만 한다. 세포외기질의 과도한 파괴는 관절염, 심혈관 질환, 궤양, 기종과 암 등의 질환과 관련이 있다¹⁾. 많은 종류의 단백 효소가 세포외기질의 구성요소를 파괴시킬 수 있지만 그 중에서도 기질 파괴

김 명 진

100-744 서울특별시 종로구 연건동 28-2

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Myung-Jin Kim

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

28-2, Yeungun-Dong, Chongro-Ku, Seoul, 100-744, Korea

Tel : 82-2-760-2632 Fax : 82-2-766-4948

E-mail: myungkim@plaza.snu.ac.kr

에 있어 가장 중요한 것으로 보이는 효소 군이 기질금속단백효소들 (Matrix metalloproteinases: MMPs)이다²⁾. 이 금속단백효소들은 오랫동안 종양 세포가 기저막을 통과하고 주변의 조직으로 침습할 수 있게 하는 단백 효소로서 생각되어 왔다. 최초로 복제된 금속단백효소는 종양유전자로부터 유도된 유전자(oncogene-induced gene)로서 발견되었다³⁾. 이후 금속단백효소의 발현은 종양유전자와 종양의 진행에 관계된 여러 성장인자에 의해 조절될 수 있음이 밝혀 졌다. 그리하여 많은 다른 금속단백효소들이 종양원성 세포에서 추출되었고 종양의 시편에서 높은 농도로 관찰되었다. 금속단백효소의 양이 증가함에 따라 종양세포가 인접 조직으로 침습하는 능력을 보이는 초기 발견이 있는 후부터 금속단백효소는 종양세포의 침습과 관련이 있다고 간주되었다. 특정 세포형에서 개별 금속단백효소의 과도한 발현은 침습과 전이 양상의 변화를 가져올 수 있으며 이러한 것은 단일 금속단백효소의 조절만으로도 종양의 진행을 조절할 수 있음을 시사한다⁴⁾.

금속단백 효소의 활성은 세포 외적으로 조절할 수 있으며 자연적인 억제자인 조직 특이성 금속단백효소 억제자 (tissue specific inhibitors of matrix-metalloproteinases: TIMPs)와의 상호작용에 의해 조절될 수 있다⁵⁾. 재조합 TIMPs 단백질을 투여하거나 TIMP 유전자의 이식에 의해 단백질을 과도하게 발현시키면 전이성 종양 세포의 전이와 침습을 방지한다는 보고가 있다⁶⁾.

일반적으로 높은 침습성과 전이성을 가진 종양에서 많은 양과 많은 수의 금속단백 효소가 발현되며 종양 진행의 초기에서 조차 금속단백 효소의 양이 증가할 수 있다고 한다. 금속단백 효소의 유도는 악성 종양 뿐 아니라 양성 종양에서도 발생할 수 있으며 전이가 일어나기 오래 전에도 종양 발생의 전과정을 통해 금속단백 효소가 증가한다⁷⁾. 유전자 변형 쥐에서의 생체 실험을 통해 종양과 종양 간질간의 상호 작용을 설명하였으며 단일 유전자 산물의 조작이 어떻게 종양이 전과정에 영향을 미치는 가에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있었다. 개개의 금속단백 효소를 과발현 하도록 조작된 유전자 변형 쥐에서의 실험은 각각의 금속단백 효소가 초기 종양의 성장과 고착에 어떠한 영향을 주는 가를 밝혔다⁸⁾.

금속단백 효소는 그 구조와 기질 특이성에 따라 다음과 같은 군으로 나뉘어 진다: collagenases, gelatinases, stromelysins 그리고 membrane type (MT)-MMPs. 처음의 3군은 분비되는 반면 MT-MMP는 세포막 부착형의 (transmembrane type) 분자이다⁹⁾.

MT1-MMP (MMP14)는 pro-MMP-2의 활성화에 관여하며 MT1-MMP의 전사는 종양세포보다 간질에서 관찰되었으나¹⁰⁾, 최근의 연구에서는 간질에서 약한 발현을 보이고 침습 변연에서 종양세포가 MT1-MMP를 강하게 발현하는 것을 보였다¹¹⁾. 다른 세포에 의해 생성된 MT-MMPs를 다른 세포가 이용할 수 있는 지는 밝혀져 있지 않으며 MT1-MMP 발현은 분화가 낮을수록 더 많아 지는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

종양 발생은 복합적인 과정으로서 종양의 혈류공급을 포함한 여러 사건의 조화된 조절을 필요로 한다. 혈관세포(내막세포)는 새로운 혈관 공급을 하기 위해서는 기저막을 통과해야 하므로 신혈관 생성의 과정 중의 혈관내피세포의 침습에 MMP가 또한

중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다¹³⁾. 또한 MMP는 종양 발현의 여러 단계에서 관여하며 또한 종양의 침습과 전이에 있어 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 그 중 MMP-2는 특히 type IV collagen을 분해함으로써 basement membrane의 파괴를 통해 종양의 전이와 침습에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Gelatinase A (MMP-2)의 발현에 있어 MT1-MMP의 역할과 기전은 Lin 등¹⁴⁾과 Park 등¹⁵⁾의 연구에서 이미 밝혀져 있다. 그들은 protein kinase C의 활성화에 의한 protein tyrosine phosphorylation의 신호전달 체계를 통해 MMP-2(gelatinase A)의 활성이 이루어 진다고 보고하였다. Monensin, concanavalin A 등의 물질이 MT1-MMP의 합성을 증가 시킴으로서 progelatinase A의 활성을 촉매한다고 하였다. 또한 herbimycin A와 같은 protein tyrosine kinase inhibitor가 MT1-MMP mRNA를 감소시킴을 보였다.

Genistein은 콩에 풍부하게 포함되어 있는 이소플라본(isoflavone)의 일종으로 항암예방효과¹⁶⁾ 및 구강암에서의 혈관형성 억제작용¹⁷⁾ 등이 연구된 바 있다. 현재까지는 genistein의 항암 예방적 효과에 대해 연구가 된 반면 치료적인 면에서 고찰된 연구는 많지 않은 편이다.

최근의 연구에 의하면 genistein이 대장암 세포에서 topoisomerase II 연관 DNA손상을 유발하고 예정된 세포사를 유발하는 것으로 밝혀 졌으며¹⁸⁾ 또한 백혈병 세포주에서 예정된 세포사와 G2 phase 정체를 증가시키는 것으로 알려졌다¹⁹⁾. 그리고 동물실험에서 내장 선암종의 복막 전이를 감소시키는 것을 보였다²⁰⁾. 이러한 결과로 보아 genistein이 항암예방 효과를 가질 뿐 아니라 암의 성장과 전이에 있어 좀 더 다양한 영향을 미칠 것으로 보인다.

본 연구는 대표적인 protein kinase C inhibitor의 하나인 genistein을 MT1-MMP를 많이 발현하는 것으로 알려진 인간 섬유세포육종 세포주인 HT1080에 적용하였을 때 MT1-MMP 발현에 미치는 영향을 mRNA 전사수준에서 알아보고 종양세포의 증식에 미치는 영향을 분석하여 궁극적으로는 genistein의 항암 효과에 대한 평가를 하고자 계획되었다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양과 배양 조건

인간 섬유세포육종 세포주인 HT1080을 각각 10%의 fetal bovine serum, 100 IU/ml의 penicillin, 그리고 250 µg/ml의 amphotericin B를 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)내에서 5%의 이산화탄소를 함유한 37°C의 가습된 대기중에서 유지하고 배지는 3일마다 교체하였다.

2. 실험군 및 대조군의 설정

인간 섬유세포육종 세포주를 6-well plate에 1×10⁶(cells/well)의 밀도로 분주하여 80% confluence에 도달한 후 배지를 제거하고 무혈청 배지로 교체 후 DMSO 용액 (Sigma, St. Louis, MO)에 용해

한 100 μ M genistein(Sigma, St. Louis, MO)을 처리한 군을 실험군으로 설정하였으며 대조군의 경우는 동일 시간동안 genistein대신 동량의 PBS를 넣은 배지에서 동일시간 동안 배양하였다

Genistein 처리 후 12시간 동안 배양한 군은 [³H]-thymidine (Amersham, USA) incorporation assay에 사용하였으며 24시간 처리한 군은 northern hybridization을 위하여 mRNA 추출에 사용하였다.

3. [³H]-thymidine incorporation assay

[³H]-thymidine incorporation assay를 위해 배지를 제거 후 [³H]-thymidine (5 μ Ci/well)을 분주하여 2시간 동안 배양하고 다시 배지를 제거하였으며 세포를 4 $^{\circ}$ C의 얼음처럼 차가운 5% trichloroacetic acid (TCA)로 고정하였다. TCA로 3-4회 세포를 세척하였으며 37 $^{\circ}$ C에서 0.5N NaOH 0.5ml로 30분간 세포를 용해하여 Cocktail용액 (Packard Bioscience, Ulgermaweg, Netherlands)에서 50 μ l의 시료의 방사선 활성도를 β -ray detector (Beckman, USA)를 이용해 측정하였다.

4. Northern blot analysis

1) MT1-MMP의 발현에 대한 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

인간섬유세포육종의 세포 밀도가 1 \times 10⁶cells/well가 되도록 6-well plates에 옮기고, 신선 배지로 교체한 후 실험 조건 하에서 24 시간동안 배양하였다. TRI reagent (Molecular Research Center, USA)를 이용하여 섬유세포육종 세포들의 총 RNA를 추출하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. First strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Tx, USA)를 이용하여 5 μ g의 추출된 RNA를 주형 (template)으로 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 (reverse-transcription)를 시행하고 99 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 종료하였다. cDNA 주형과 특정 시발체 (oligonucleotide primers)를 이용하여 변성 (94 $^{\circ}$ C, 30초)과 연장 (72 $^{\circ}$ C, 90초)의 주기를 40회 진행하여 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 시행하였다. 가열냉각 (annealing)은 MT1-MMP에 대해서 58 $^{\circ}$ C에서 60초, GAPDH에 대해서는 60 $^{\circ}$ C에서 60초간 시행하

였으며 MT1-MMP와 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 시발체의 염기 배열은 기존에 발표된 논문에서와 같이 동일하게 사용하였으며 Table 1과 같았다⁸⁾.

2) Preparation of cDNA probes

PCR 산물은 PCR product purification kit (Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 정제하였으며, DIG-high prime kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용한 random priming방법으로 4 μ l의 labeling mixture와 1 μ g의 PCR 산물을 22시간 동안 부란하여 표지하였다.

3) Northern hybridization

추출된 총 리보핵산 (total RNA) 20 μ g을 1.2% agarose/formaldehyde gel에 적용하여 전기영동 하였다. 20 \times standard saline citrate (SSC)에서 gel을 nylon막 (BM, Germany)에 capillary blotting시켰으며 자외선 (UV) 하에서 교차 결합시켰다. Nylon막을 50% formamides, 5 \times SSC, 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 5 \times Denhardt's solution, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5mM EDTA and 100 μ g salmon testis DNA의 혼합물로 55 $^{\circ}$ C에서 30분간 전처리 후 동일 buffer에 100 $^{\circ}$ C 끓는 물에서 10분간 변성시킨 DNA probe를 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 hybridization을 시행하였다. Nylon막은 2 \times SSC와 0.1% SDS로 55 $^{\circ}$ C에서 20분간 세척하였으며 DIG-detection kit (Boehringer Mannheim, Germany)을 이용한 direct colorimetric detection method에 의해 감지하였으며 각각의 sample에 유사량의 RNA가 loading 및 transfer된 것을 확인하기 위하여 동일한 방법으로 표지된 GAPDH probe를 이용하여 northern blotting을 다시 시행하고 image analyzer (Bio-Rad, Mississauga, ON)에서 densitometric analysis를 시행하여 보정하였다.

III. 결 과

1. 세포증식 지수

인간 섬유세포육종 세포주인 HT 1080의 DNA 합성의 지표로서 사용한 [³H]-thymidine uptake는 실험군에서 유의할 정도로

Table 1. The condition of RT-PCR and sequences of each primer

Primer	MT1-MMP	GAPDH
		Forward: 5' - TATGAATTCGCCGCGGATGAGGGGACTGAG
	Reverse: 5' - ATAGGATCCGAGAGCTCCACAGCCCACCC	Reverse: 5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA
PCR product size(bp)	502 bp	450 bp
Condition for RT-PCR	Reverse transcription temperature/time	37 $^{\circ}$ C/1 hr
	Annealing temperature/time	64 $^{\circ}$ C/45 seconds
	Cycle number	40

MT1-MMP : membrane-type 1 metalloproteinase

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

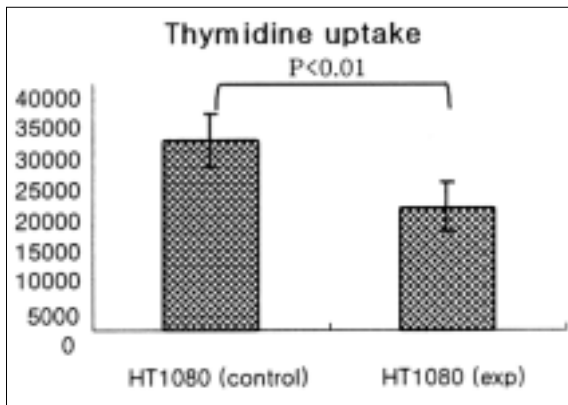


Fig. 1. Thymidine uptakes in experimental and control group.

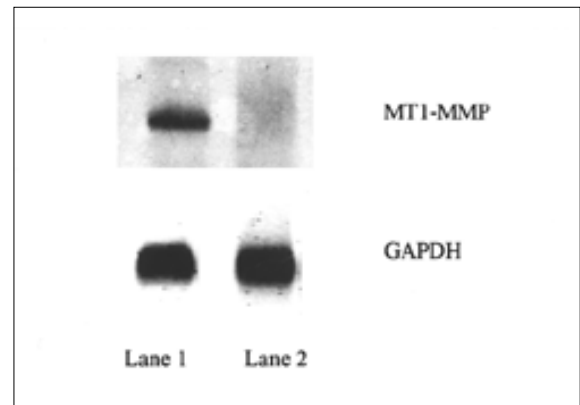


Fig. 2. Northern blot analysis.

Lane 1 (left) : control group

Lane 2 (right) : experimental group

The expression of MT1-MMP mRNA was not expressed in experimental group (lane 2) and expression of GAPDH mRNA was not influenced by genistein.

($p < 0.01$) 적게 나타났으며 두 군의 평균치를 비교하였을 경우 실험군에서 약 64%의 thymidine uptake를 보여 genistein으로 처리하였을 경우 실험군에서 DNA합성이 감소되어 genistein이 인간 섬유육종 세포주의 증식을 유의하게 감소시킨 것으로 나타났다 (Fig. 1).

2. 인간섬유육종 세포주에서의 MT1-MMP mRNA의 발현

Protein kinase C inhibitor인 genistein의 MT1-MMP mRNA의 발현에 미치는 영향을 비교하기 위하여 northern hybridization하였을 경우 대조군에 비해 genistein을 투여한 실험군의 MT1-MMP mRNA의 발현이 뚜렷이 감소한 양상을 보였다. Genistein을 투여하지 않은 인간 섬유육종 세포주 (HT1080)에서 뚜렷한 MT1-MMP mRNA의 발현을 보이고 있으며 실험군에서는 거의 mRNA의 발현을 보이지 않는 것으로 보아 genistein에 의해 MT1-MMP의 발현이 억제되고 있다. 내부 기준으로 삼은 GAPDH에 대해서는 genistein을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군 간에 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

IV. 고 찰

Genistein은 콩에 풍부하게 함유되어 있는 이소플라본(isoflavone)의 일종으로 많은 연구를 통해 암예방 효과^{19,23} 및 다양한 암 세포주에서의 억제 효과^{24,25}가 밝혀져 있다. Genistein에 관련된 다양한 생물학적 활성들은 항산화(antioxidant)와 항염증작용²⁶, phenolic phytoestrogen activity²⁷, ornithine decarboxylase의 억제²⁸, prostaglandin synthetase의 억제²⁹, 혈관생성의 억제³⁰ 등인데, Akiyama 등³¹은 1987년 genistein이 특이적으로 상피성장인자의 tyrosine kinase의 효과를 억제한다는 사실을 체외실험을 통해

밝혔다.

암 발생의 기시 단계를 막거나, 증진, 진행 단계를 막음으로써 암 발생을 예방할 수 있으며, 이런 작용을 할 수 있는 물질을 이용한 암 예방을 암화학 예방요법(chemoprevention)이라고 한다³². 이러한 작용을 할 수 있는 물질로는 retinoid (natural and synthetic analogues of vitamin A), plant phenolics (green and black teas, flavonoids, ellagic acid), 호르몬 길항제 (tamoxifen, finasteride), polyamine 생합성 억제제 (difluoromethylornithine), 항기생충제 (oltipraz, quinacrine), 비스테로이드성 진통제 (aspirin, ibuprofen, sulindac) 등이 알려져 있다³². Genistein은 콩에서 규명되었으며 에스트로젠과 유사한 구조를 가지고 있다³³. Genistein은 여러 동물 실험 모델에서 암예방 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며^{19,21} 또한 다양한 암 세포주에서도 억제 효과가 있는 것으로 밝혀져 있다^{24, 25}. 또한 Lin 등¹¹에 의하면 genistein으로 처리한 경우 섬유아세포에서 MMP-2 mRNA의 증가가 억제 되었다고 보고한 바 있다.

MMP-2를 포함한 MMP 군은 많은 인간 악성 종양에서 발현되며 종양의 침습과정에서 중요한 역할을 한다고 밝혀 졌다³⁴. 몇몇 MMPs는 종양 보다는 종양 주변의 간질(stroma)에서 생산되며 pro-MMP2는 주로 간질세포에서 생산되며 종양 표면에 있는 MT1-MMP에 의해 활성화 된다. 또한 MT1-MMP는 일부의 외세포 간질을 소화하기도 한다³⁵. MMP-2와 MMP-9는 기저막의 파괴를 시작시키고 나아가 세포의 기질의 교원성과 비교원성 부분의 분해를 진행 시키기 때문에 종양의 상피로의 침습에 있어 중요한 역할을 한다고 보인다³⁶. 이러한 견해에 대한 여러 연구가 있어 왔으며 두경부 편평 상피 세포암에서 MMP-2의 활성화에 대한 연구는 경부 임파절 전이와 MMP-2의 활성화와 유의하게 관련이 있음을 밝혔으며³⁷ 이러한 결과는 위암³⁸, 폐암³⁹, 유방암⁴⁰에서의 연구도 일치된 결과를 보였다. 또한 Imanishi 등⁴¹은 두경부 편평상피세포암에서 MT1, 2, 3-MMP와 MMP-2의 mRNA 발현을 관찰하여 MT1-MMP가 MMP-2의 발현에 가장 중요한 역할을 한다고 하

였으며 *in situ* hybridization과 immunohistochemistry를 통해 MT1-MMP와 MMP-2의 발현이 같은 위치에서 나타났음을 밝혔다.

각막세포 (keratinocyte)에서 MMP 유전자의 발현은 Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF)- α 1, Keratinocyte Growth Factor (KGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), TGF- β , Hepatocyte Growth Factor (HGF) 등 여러 성장인자와 cytokine에 의해 유발된다고 밝혀져 있으며 MMP gene의 발현은 세포마다 다른 cytokine과 growth factor에 의해 좌우된다고 알려져 있다³⁰.

Lin 등¹¹은 protein tyrosine kinase inhibitor인 genistein은 gelatinase A (MMP-2)의 활성을 억제시켰으며 protein tyrosine kinase inhibitor는 protein tyrosine phosphorylation을 억제함으로써 MT1-MMP의 감소를 유발하는 것으로 보고하였다. 또한 Uzui 등⁴²은 혈관 평활근 세포에서 vanadate와 PDGF로 처리하였을 경우 thymidine incorporation과 MMP-2의 expression이 증가하였으며 western blotting에 의해 protein tyrosine kinase, extracellular signal-regulated kinases (ERK1, ERK2)와 PDGF 수용체가 증가되었음을 밝혀 MMP-2의 활성은 protein tyrosine kinase의 활성에 기인한다고 하였다. Tyrosine kinase inhibitor인 genistein과 herbimycin A는 MMP-2 protein의 생산을 방해하고 혈관 평활근 세포의 mitogenic activity를 방해하는 것으로 보고하였다⁴².

폐암과 위암에서 MT1-MMP의 발현과 proMMP-2의 활성이 비례한다는 점에서 MT1-MMP에 의한 proMMP-2의 활성은 암의 침습과 전이에 있어 핵심적인 과정이다⁴³. ProMMP-2는 다른 MMP와 유사하게 두 단계의 활성 과정을 통해 활성화 된다. 이러한 과정은 완전히 이해되지는 않았지만 첫번째 과정은 MMP-2의 propeptide domain에 대한 MT1-MMP의 proteolytic activity에 의해 중재되며, 두번째 과정은 autoprolytic cleavage를 포함한다고 한다⁴⁴. 또한 MT1-MMP나 MT2-MMP에 의한 MMP-2의 활성은 TIMP (TIMP-2, TIMP-3)에 의해 조절될 수 있다⁴⁵. Michel 등⁴⁶의 연구에 따르면 녹차의 성분인 catechin (epigallocatechin gallate)에 의해 MT1-MMP에 의한 MMP-2의 활성이 완전히 차단되었으나 proMMP-2의 양과 gelatinolytic activity는 전혀 영향을 받지 않는 것으로 보아 catechin은 proMMP-2의 활성의 과정에 영향을 미치고 proMMP-2에 대한 직접적인 영향은 없는 것으로 보인다고 하였다. 정확한 기전은 알 수 없지만 proMMP-2의 활성의 과정의 어떤 단계에 작용하거나 또는 MT1-MMP의 activity를 방해하는 것으로 생각되었다⁴⁶.

본 연구에서는 protein kinase C inhibitor인 genistein은 인간 섬유세포육종 세포주(HT1080)에서 thymidine uptake를 유의성 있게 감소시켰으며 이것은 종양 세포의 증식을 억제한다고 볼 수 있으며 MT1-MMP의 mRNA의 생성을 감소시킴으로써 MMP2의 활성을 억제함으로써 종양의 전이 기전을 차단할 수 있는 가능성을 보인 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 Park 등¹²에 의해서도 연구 되었는데 인간 뇌종양 세포주 (D54)에서 phorbol ester에 의해 protein kinase C(PKC)를 활성화시켰을 때 MMPs의 발현이 증가되었고 TIMP의 발현이 감소 되어 PKC의 활성이 종양의 침습과 전이에 중요한 역할을 하는 것을 밝혔으며, 또한 PKC inhibitor

인 Go6983을 사용한 경우 이러한 MMPs의 발현을 역전시키는 것을 밝혀 PKC inhibitor가 종양의 치료에 사용될 수 있음을 보고하였다.

최근 여러 종류의 MMP 억제자들이 항 전이, 항암 치료를 위해 개발 되었고 임상적인 실험을 거치고 있는데⁴⁷⁻⁵⁰ phase III 임상실험을 거친 여러 인공 MMP 억제제가 시판되고 있다. 광범위 MMP 억제제인 marimastat (British Biotech, UK)은 수술 불가능한 위암 환자에서 위약에 비교하였을 때 암의 진행을 중단시키고 생존률을 통계학적으로 유의한 정도로 향상시켰다.

종양의 성장에 중요한 역할을 하는 혈관 형성 (angiogenesis)에 있어서도 genistein이 억제적인 역할을 한다는 보고가 있다⁵¹. 이러한 neovascularization의 기전도 역시 MMP-2의 기저막 파괴에 기인하며 MMP-2의 발현을 억제하는 genistein이 neovascularization을 억제함을 알 수 있다⁵¹. 이상에서 살펴본 바와 같이 PKC inhibitor인 genistein은 종양의 고착 및 진행의 여러 단계에 중요한 역할을 하는 MMP에 대해 억제 작용을 함으로써 항암 화학요법제로서의 작용을 할 수 있다는 가능성을 보인 것으로 생각되었다.

V. 결 론

Protein kinase C inhibitor인 genistein을 사용하여 genistein이 종양의 증식에 미치는 영향과 종양 전이에 있어 중요한 역할을 하는 MT1-MMP의 발현에 미치는 영향을 보고자 genistein 투여군 (실험군)과 비투여군 (대조군)으로 나누어 각각의 thymidine uptake와 MT1-MMP mRNA의 발현을 thymidine incorporation assay와 northern blotting을 통해 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Genistein을 투여한 실험군에서 thymidine uptake가 유의성 있게 감소하여 human fibrosarcoma cell의 DNA복제를 감소시켜 종양세포의 증식을 억제하였다 (p<0.01).
2. Genistein을 투여한 실험군에서 MT1-MMP mRNA의 발현을 감소시켰다.

이상의 결과로 protein kinase C inhibitor인 genistein은 human fibrosarcoma cell line (HT1080)에서 종양세포의 증식을 억제하고 MT1-MMP mRNA의 발현을 감소시켜 종양의 증식과 전이를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. McCawley LJ, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6:149-156, 2000.
2. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494, 1999.
3. Matrisian LM, Leroy P, Ruhlmann C, Gesnel MC, Breathnach R: Isolation of the oncogene and epidermal growth factor-induced transin gene: complex control in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6:1679-1686, 1986.
4. Edwards DR, Breaudry PP, Laing TD, Lowal V, Leco KJ, Leco PA,

- Lim MS: The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20:S9-S15, 1996.
5. Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 157:351-358, 1993.
 6. Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z: The stromal proteinases MMP 3/stromelysins-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 98:137-146, 1999.
 7. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.
 8. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P: Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Prac Natl Acad Sci USA* 92:2730-2734, 1995.
 9. Yoshizaki T, Sato H, Maruyama Y, Murono S, Furukawa M, Park CS, Seiki M: Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma. *Cancer* 79: 139-144, 1997.
 10. Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103:1237-1241, 1999.
 11. Lin Li, Arthur ZE, Eric S, Jo LS: Protein tyrosine phosphorylation in signaling pathways leading to the activation of gelatinase A: activation of gelatinase A by treatment with the protein tyrosine phosphorylation inhibitor sodium orthovanadate. *Biochim Biophys Acta* 1405: 110-120, 1998.
 12. Park MJ, Park IC, Hur JH, Rhee CH, Choe TB, Yi DH, Hong SI, Lee SH: Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett* 290: 201-204, 2000.
 13. 김영연: Genistein이 램스터 협낭 구강암 모델에 미치는 암예방 효과. 서울대학교 치과대학 석사학위논문 2000.
 14. 송승일: 7.12-Dimethylbenza(a)nthracene으로 유도된 램스터 협낭 구강암 발암과정에서 genistein의 혈관형성 억제에 관한 연구. 서울대학교 치과대학 석사학위논문 2000.
 15. Salti GI, Grewal S, Mehta RR, Das Gupta TK, Boddie AW, Constantinou AI: Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells. *Eur J Cancer* 36: 796-802, 2000.
 16. Papazisis KT, Zambouli D, Kimoundri OT, Papadakis ES, Vala V, Geromichalos GD, Voyatzis S, Markala D, Destouni E, Boutis L, Kortsaris AH: Protein kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with gamma-irradiation. *Cancer Lett* 160: 107-113, 2000.
 17. Lishi H, Tatsuta M, Baba M, Yano H, Sakai N, Akedo H: Genistein attenuates peritoneal metastasis of azoxymethane-induced intestinal adenocarcinomas in Wistar rats. *Int J Cancer* 89: 416-420, 2000.
 18. Sakamoto A, Oda Y, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M: Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human cartilaginous tumors with special emphasis on mesenchymal and dedifferentiated chondrosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:541-548, 1999.
 19. Sharma OP, Adlercreutz H, Strandberg JD, Zirkin BR, Coffey DS: Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 557-564, 1992.
 20. Mokhtar NM, El-Asser AA, El-Bolkainy MN, Ibrahim HA, El-din NB, Moharram NZ: Effect of soybean feeding on experimental carcinogenesis-III. Carcinogenicity of nitrite and dibutylamine in mice: a histopathological study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24: 403-411, 1988.
 21. Helms JR, Gallaher JJ: The effect of dietary soy protein isolate and genistein on the development of preneoplastic lesions (aberrant crypts) in rats. *J Nutr* 125: S802, 1995.
 22. Troll W, Wiesner R, Belmam S, Shellabarger CJ: Inhibition of carcinogenesis by feeding diets containing soybeans. *Proc Am Assoc Cancer Res* 20:S265, 1979.
 23. Kim JP, Park JG, Lee MD, Han MD, Park ST, Lee BH, Jung SE: Co-carcinogenic effects of several Korean foods on gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Jap J Surg* 15:427-437, 1985.
 24. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH: Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 58: 4851-4857, 1998.
 25. Kuo SM: Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110: 41-48, 1996.
 26. Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowens R, Barnes S: Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20: 1-12, 1993.
 27. Setchell KDR: Naturally occurring nonsteroidal estrogens of dietary origin. In: *Estrogens in the environment* (Mc-Lachlan JA, ed), pp 60-85. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York.
 28. Majumdar APN: Role of tyrosine kinases in gastrin induction of ornithine decarboxylase in colonic mucosa. *Am J Physiol* 259:G626-630, 1990.
 29. Coyne DW, Morrison AR: Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein on interleukin-1 stimulates PGE2 production in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 173:71-74, 1990.
 30. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase Tm, Montensano R, Schweigerer L: Genistein, dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 125: S759-S770, 1995.
 31. Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe SI, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595, 1987.
 32. Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE: Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res* 50:2-9, 1990.
 33. Steele VE, Pereira MA, Sigman CC, Kelloff GJ: Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr* 125:S723-S726, 1995.
 34. Mignatti P, Rifkin DB: Biology and biochemistry of proteinases tumor invasion. *Physiol Rev* 73:161-195, 1993.
 35. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y: Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272:2446-2451, 1997.
 36. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM: Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 35:227-233, 1999.
 37. Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J: Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 150:15-21, 2000.
 38. Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y: Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 69: 9-16, 1996.
 39. Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M: Activation of the precursor of gelatinase A/72kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and lymph node metastasis. *Int J Cancer* 64: 355-359, 1995.
 40. Ueno H, Nakamura H, Inoue M, Imai K, Noguchi M, Sato H, Seiki M, Okada Y: Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2 and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 57: 2055-2060, 1997.
 41. Imanishi Y, Fujii M, Tokumaru Y, Tomita T, Kanke M, Kanzaki J, Kameyama K, Otani Y, Sato H: Clinical significance of expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 31: 895-904, 2000.
 42. Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, Ueda T: The role of protein-

- tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cell. *Atherosclerosis* 149: 51-59, 2000.
43. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y: Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 55:3263-3266, 1995.
 44. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper Y, Atkinson S, Gavrilovic J: Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107:38-44, 1999.
 45. Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem* 273:1216-1222, 1998.
 46. Michel D, Mathieu B, Martini P, Denis G, Richard B: Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochim Biophys Acta* 1478: 51-60, 2000.
 47. Rabbani SA, Harakidas P, Guo Y, Steinman D, Davidsen SK, Morgan DW: Synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases decreases tumor growth and metastases in a syngeneic model of rat prostate cancer in vivo. *Int J Cancer* 87: 276-282, 2000.
 48. Buolamwini JK: Novel anticancer drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 500-509, 1999.
 49. Health EI, Grochow LB: Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors in cancer therapy. *Drugs* 59: 1043-1055, 2000.
 50. Jimenez RE, Hartwig W, Antoniu BA, Compton CC, Warshaw AL, Castillo CF: Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control. *Ann Surg* 231: 644-654, 2000.
 51. Hamby JM, Hollis Showalter HD: Small molecular inhibitors of tumor-promoted angiogenesis, including protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol Ther* 82: 169-193, 1999.