

pp60^{v-src}에 의한 NF-κB 활성화에 대한 헤스페레틴과 나린제닌의 저해 효과

권오송 · 김보연 · 김경아 · 김민수 · 오현철 · 김범석 · 김영호¹ · 안종석*
한국생명공학연구원 세포신호조절연구실, ¹충남대학교 제약학과

Effect of the Hesperetin and Naringenin on pp60^{v-src}-induced NF-κB Activation

O Song Kwon, Bo Yeon Kim, Kyoung A Kim, Min Soo Kim, HyunCheol Oh,
Beom Seok Kim, Young Ho Kim¹, and Jong Seog Ahn*

Laboratory of Cellular Signaling Modulators, Korea Research Institute of
Bioscience and Biotechnology, Yusong, Daejeon, 305-333 Korea

¹Department of Manufacturing Pharmacy, Chungnam National University, Yusong, Daejeon, 305-333 Korea

Abstract – The effects of hesperetin and naringenin on NF-κB activation were investigated in normal rat kidney cells transformed by temperature sensitive Rous Sarcoma Virus (tsNRK). The flavonoids, naringenin and hesperetin, significantly reduced v-Src-induced NF-κB activation as well as phosphorylation of Akt and GSK-3 in tsNRK cells, whereas these compounds did not effect on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced NF-κB activation in NIH3T3γ1 cells. In addition, the DNA binding activity of SP-1 was also reduced but that of AP-1 was not affected by the compounds. Our study suggests that Src-induced NF-κB activation could occur via Akt-GSK-3 pathway without IκBα degradation and that naringenin and hesperetin could be used in the treatment of cancer through the inhibition of NF-κB activation.

Key words – Naringenin, Hesperetin, Flavonoid, NF-κB, Akt, GSK-3, v-Src, IκBα

서 론

폴리페놀(Polyphenol)류에 속하는 가장 포괄적인 생리활성 물질인 플라보노이드류는 수많은 약용식물과 채소류에서 5000여종 이상 발견되었다. 생물학적 기능과 관련하여, 플라보노이드는 세포증식 조절¹⁾과 항산화제, 피토에스트로겐(phytoestrogen) 기능,^{2,4)} 티로신키나제(tyrosine kinases),^{5,6)} 포스포다이에스터라제(phosphodiesterase) 그리고 DNA 토포이소머라제(topoisomerases)⁷⁾ 활성을 변화시킨다고 보고되었다. 특히 naringenin과 hesperetin은 감귤류의 과피에 많이 존재하고 최근에 이들의 건강 기능 증진 효과가 알려지면서 이들 플라보노이드류의 생리활성기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, naringenin은 cytochrome P450 효소들을 억제하며, 항증식,⁸⁾ 항산화제,⁹⁾ 지방감소¹⁰⁾

결과를 보였다. 또한 Acker 등에 의하면 naringenin이 간의 마이크로솜(microsomal membranes)에서 항산화제와 같은 α-tocopherol과 유사한 역할을 하는 것으로 평가되었다.⁹⁾ 뿐만 아니라 naringenin과 hesperetin은 최근 Sindbis 바이러스에 대한 항 Sindbis 활성을 보였으며,¹¹⁾ 3T3-L1 지방전구 세포(pre-adipocyte)에서 포도당 흡수(glucose uptake)와 포스포이노시티드 3-키나제(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)가 naringenin에 의해 억제됨이 보고되었다.¹²⁾

포스포이노시티드 3-키나제는 포스포이노시티드 의존 키나제-1(phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK-1)의 촉매인자로, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리포스페이트(phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP₃) 형성을 활성화시키는데, Akt는 PDK-1의 표적단백질이며, PDK-1로 인한 Akt 인산화는 글리코겐 합성효소-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 인산화를 증가시킨다.^{13,14)} 더욱이, Akt와 GSK-3는 NF-κB 활성화를 유도하는 신호체계의 다양한 범위에 포함되어 있다고 보고되었다.¹⁵⁾

*교신저자(E-mail) : jsahn@kribb.re.kr
(FAX) : 042-860-4595

NF- κ B는 p65와 p50 두 단백질의 이질 (hetero)- 또는 동질 (homo)-dimer로 구성되었으며, 저해역할을 하는 I κ Bs와의 상호작용으로 인해 비활성형태로 세포질에 존재한다. 다양한 자극에 의해 I κ Bs는 상위조절 인산화효소 I κ B kinase/ β (IKK α / β)로 인해 아미노산 32/36번의 세린(serine)이 인산화 되며, 이후 26S proteasome으로 인해 I κ B α 는 분해되고 NF- κ B는 활성화되어 핵으로 이동한다.¹⁶⁾ 진핵세포 내에서 자극으로부터 시작된 다양한 NF- κ B 활성화가 일어나는 신호체계 가운데, Src 티로신키나제(tyrosine kinase) 단백질은 I κ B^{17,18)} 또는 IKK complex^{19,20)}의 인산화를 유도하여 NF- κ B 활성화를 이끈다고 보고되었다. 또한 최근 단백질 키나제 D(protein kinase D, PKD)가 oxidative stress에 의한 Src kinase 활성화로 인해 티로신기가 인산화되어 NF- κ B 활성화를 유도한다고 보고되었다.²¹⁾

온도민감성의 변이(temperature-sensitive) *v-src* 암유전자 단백질(pp60^{v-src})이 과다 발현되는 temperature sensitive normal rat kidney(tsNRK) 세포에서는 온도변화에 따른 pp60^{v-src} 단백질 활성의 변화가 일어나는데,²²⁾ 39°C에서 32°C로 전환되었을 경우, NF- κ B 활성화도 증가됨을 보였다. 이 세포는 32°C로 온도변화 이후, 오랜 시간 안정함을 보임으로써 시간변화에 의존한 생물학적 생리활성 관찰과 NF- κ B 활성화에 관련된 신호전달과정 탐색, 시간에 따른 생리학적 변화관찰에 유용하다.

최근에 naringenin은 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocyte) 세포성장 억제 활성을 가지며, 인슐린의 자극으로 인한 Akt의 인산화를 저해한다고 보고되었다.¹²⁾ 그러므로, naringenin은 GSK-3 인산화를 저해하여 NF- κ B 활성화를 조절할 것으로 예상되어, 본 실험에서는 감귤류의 과피에 많이 존재하는 naringenin 및 이와 구조가 유사한 hesperetin이 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다.

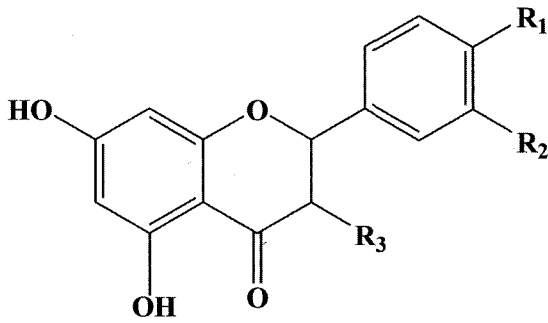
재료 및 방법

시약 - Hesperetin과 naringenin은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NF- κ B, SP-1, AP-1, CRE, SRF oligonucleotides와 EMSA에 사용된 모든 시약은 Promega사(Madison, USA)에서 구입하였다. pNF- κ B-Luc와 pCMV/ β -galactosidase plasmid는 Stratagene사(California, USA)에서 구입하였다. Phospho-Akt1와 phospho-GSK-3 antibody는 Cell Signaling사(Charlottesville, Virginia, USA)에서 구입하였다. Akt, GSK-3, p65와 I κ B α antibody는 Santa Cruz사(California, USA)에서 구입하였다.

세포 배양, transfection, and luciferase reporter assay - Heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, 10%)이 포함된 DMEM 배지에서 90% 정도 배양한 tsNRK 세포를 실험 전 24시간 동안 serum이 없는 배지에서 배양하였다. Transfection을 위해 세포를 6 well plate(2 \times 10⁵ cells/ml)에 이식한 후 39°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. Lipofectin 또는 lipofectamine plus를 사용하여 0.5 μ g pCMV/ β -galactosidase와 0.5 μ g 혹은 1 μ g pNF- κ B-Luc를 transfection하였고 4시간 후, serum이 제거된 새로운 DMEM으로 교체하여 필요에 따라 32°C로의 온도변화를 주었고, 적당한 농도의 화합물을 처리하였다. 24시간 후에 luciferase와 β -galactosidase activity를 측정하였다.

세포분획, 면역침전법 및 immunoblot 분석 - 세포를 4°C 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 씻어주고 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 100 μ M Na₃VO₄, and 1 mM dithiothreitol (DTT)를 포함하는 용액으로 세포를 긁어 모은다. 15분 후 NP-40을 최종 농도 0.1%로 추가하였다. 세포 용해물은 4°C, 12,000 \times g에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액인 세포질 분획을 준비한 후, 남은 침전물에 nuclear lysis buffer [50 mM Hepes-NaOH (pH7.9), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinin, 0.4 mM PMSF, 100 μ M Na₃VO₄, 1 mM DTT, 10% glycerol]로 재현탁시키고 얼음 안에서 30분 방치한다. Immunoblot 방법은 각 단백질에 대한 특이항체를 이용하여 수행되었으며, 면역침전 결과는 chemiluminescence reagents(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)로 확인하였다.

EMSA analysis - T4 polynucleotide (5 U)으로 [γ -³²P] ATP (10 μ Ci)와 함께 표지된 NF- κ B oligonucleotide (3.5 pmol; Promega)는 kinase buffer 10 μ l와 함께 37°C, 30분 동안 반응시켰다. 반응은 50 mM EDTA를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 표지되지 않은 ³²P를 제거하기 위해 Sephadex G-25 column으로 원심분리하였다. EMSA 반응을 위해 nuclear protein extract (5 to 10 μ g)를 0.03 pmol ³²P로 표지된 NF- κ B oligonucleotide, 40 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, 1 μ g poly(dI-dC)와 함께 실온에서 30분 동안 10 μ g에서 반응시켰다. EMSA 반응은 염색시료를 첨가하여 중지시켰다. 반응시킨 sample은 autoradiography에 의해 0.5% Tris-borate-EDTA(TBE)가 포함된 nondenaturing 5% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다.



Naringenin

R₁=OH; R₂=H; R₃=H

Hesperetin

R₁=OCH₃; R₂=OH; R₃=H

Fig. 1. Chemical structures of naringenin and hesperetin.

결 과

Hesperetin과 naringenin에 의한 NF-κB 활성억제 - 39°C에서 90%정도 배양한 tsNRK세포에서 혈청을 제거하고 포도당 uptake 감소효과를 보이는 100 μM농도의 naringenin과 hesperetin (Fig. 1)을 처리하였다.¹²⁾ 24시간 배양 후 luciferase 활성 측정결과, 39°C에 비해 32°C에서 NF-κB 활성이 15배 정도 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 2A). 그러나, 두 화합물을 세포에 각각 처리하였을 경우 NF-κB 활성이 뚜렷이 감소하였다. Gel mobility shift assay (EMSA)에서도 NF-κB DNA binding 활성이 100 μM의 hesperetin과 naringenin으로 인해 감소하였는데, DNA에 binding하는 NF-κB 확인은 표지 되지 않은 NF-κB oligonucleotide를 처리하여 competitor (com)로 확인하였다(Fig. 2B).

Hesperetin과 naringenin에 의한 GSK-3 인산화 억제 - NF-κB 활성화는 IκBα 분해 후 NF-κB complex의 핵 이동에 의한 경로나 혹은 Akt-GSK-3의 인산화에 의한 활성화 과정을 거치는 두 경로를 통해 이루어질 수 있다.¹⁴⁾ 따라서 naringenin과 hesperetin을 처리하거나 혹은 처리하지 않은 tsNRK 세포의 IκBα와 p65의 변화, 그리고 Akt-GSK-3 인산화를 조사하였다. 32°C에서 naringenin과 hesperetin은 세포질 내의 IκBα의 양에 아무런 변화도 주지 않았으며(Fig. 3A), 세포질과 핵내의 p65 양에도 아무런 변화를 보이지 않았으나 (테이터 생략) 두 화합물 모두 Akt1의 인산화를 감소시켰다(Fig. 3B). 뿐만 아니라 GSK-3는 Akt kinase의 표적단백질 중 하나이므로, GSK-3 인산화

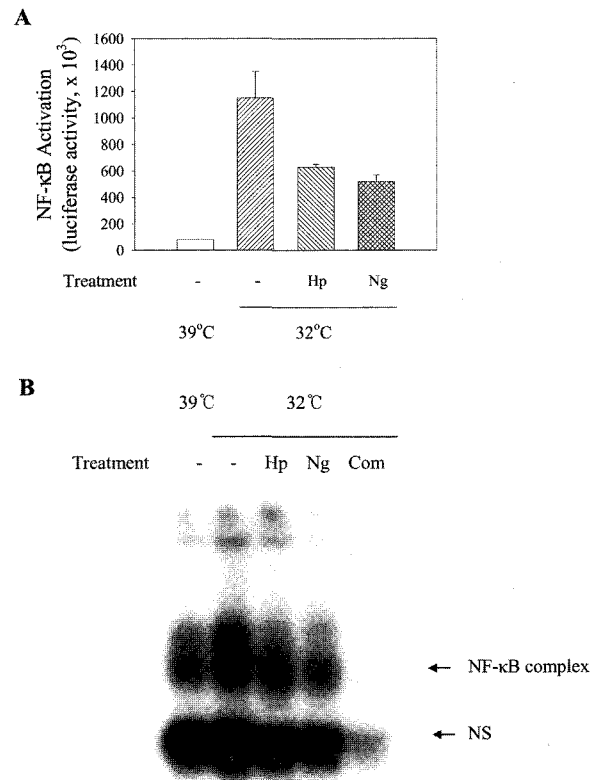


Fig. 2. Inhibition of v-Src-induced NF-κB activation by hesperetin and naringenin. (A), Luciferase reporter gene assay. Semi-confluent growth of tsNRK cells grown at 39°C in 33 mm dishes were refreshed with a new DMEM without fetal bovine serum and remained at the same temperature or shifted to 32°C in the presence of either 100 μM hesperetin (Hp) or naringenin (Ng) for 24 hr. Cells were lysed for the determination of luciferase activity as described in "Materials and Methods". The results are determined by 95% confidence test from triplicate experiments. (B), EMSA assay. Cells grown at 39°C in 100 mm dishes were refreshed with a new DMEM without fetal bovine serum and remained at the same temperature or shifted to 32°C in the presence of 100 μM of hesperetin or naringenin for 24 hr. Cells were lysed and fractionated for preparation of nuclear lysate. Ten microgram of each of the lysates were used for EMSA assay. All the procedures were described in detail in "Materials and Methods".

가 두 화합물에 의해 저해 받을 것이라 예측되어졌는데, Fig. 3C에 나타난 바와 같이 GSK-3 인산화는 두 화합물로 인해 감소되었다. 따라서 이들 결과들은 tsNRK 세포에서 v-src에 의한 NF-κB 활성화가 Akt와 GSK-3 경로를 통해 이루어짐을 보여주고 있다.

Hesperetin과 naringenin의 agonist- 또는 target에 대한 특이성 - Hesperetin과 naringenin 두 화합물이 NF-κB와 다른 전사활성화 인자에도 영향을 주는 지 알아보기 위하여 tsNRK 세포에 두 화합물을 처리한 후 SP-1과 AP-1의

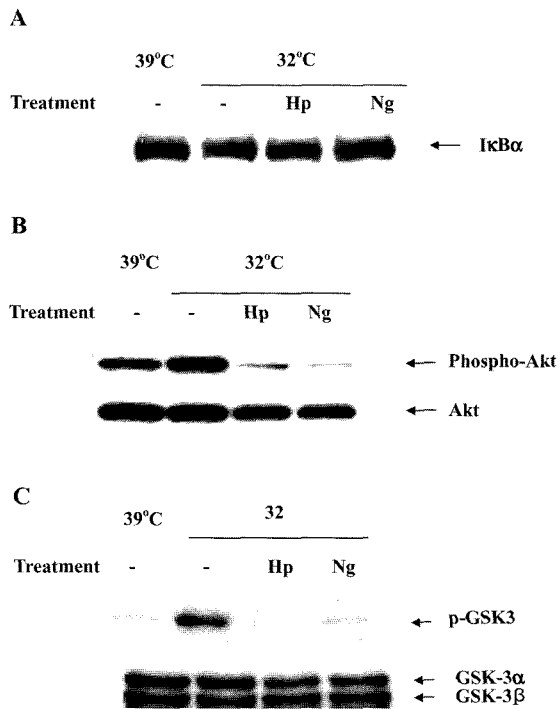


Fig. 3. Inhibition of v-Src-induced phosphorylation of Akt and GSK-3 by hesperetin and naringenin. Cells grown at 39°C in 100 mm dishes were remained further at the same temperature or challenged with 100 μM of hesperetin or naringenin in a fresh, serum-free DMEM for 24 hr at 32°C. Cytosolic fraction (50 μg) prepared after cell lysis was applied to Western blotting with an antibody to IκBα (A), phospho-Akt (B), phospho-GSK-3 (C) and detected by enhanced chemiluminescence solution (Amersham Pharmacia Biotech). The membrane was stripped off and reblotted with an antibody to Akt or GSK-3.

DNA 결합을 EMSA assay로 확인하였다. Fig. 4A는 SP-1의 DNA 결합이 hesperetin과 naringenin으로 인해 현저히 억제됨을 보였다. 그러나, AP-1의 DNA 결합에는 영향을 미치지 않았으며 (Fig. 4B) 또한 CREB과 SRF의 promoter 결합에도 아무런 영향을 주지 않았다(데이터 생략).

Phospholipase Cγ1이 과다 발현하는 NIH3T3γ1 세포에서 platelet-derived growth factor (PDGF)를 처리할 경우 NF-κB의 활성이 증가함이 입증되었다.²³⁾ 따라서 두 화합물이 v-Src 외에 다른 유도인자로 인한 NF-κB 활성 증가에서도 억제효과를 보이는 지 알아보기 위해 NIH3T3γ1 세포에서 hesperetin과 naringenin을 처리한 후 PDGF를 처리하고 NF-κB의 활성화를 비교하였다. 그 결과 PDGF로 인한 NF-κB 활성화에는 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 hesperetin과 naringenin은 NF-κB 활성화에 있어서 agonist- 또는 target-specific한 저해활성이 있음을 제시한다.

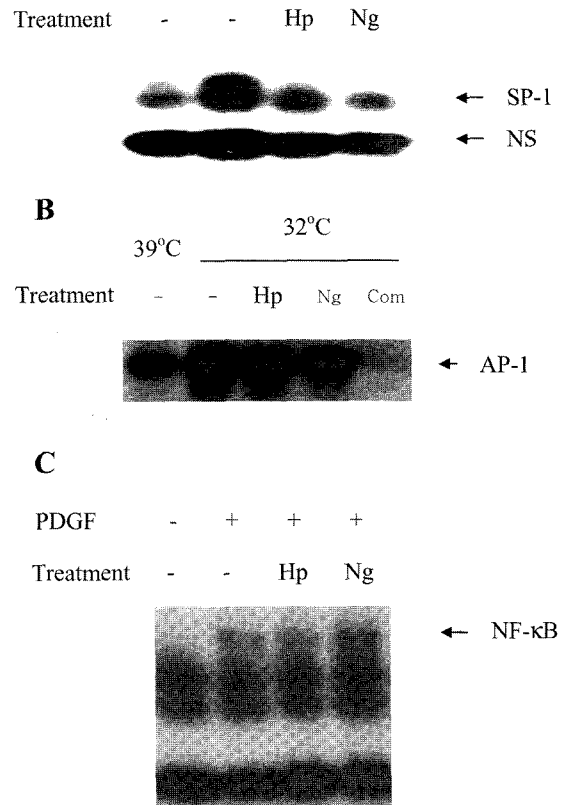


Fig. 4. Specificity of hesperetin and naringenin on SP-1 DNA binding activity. The nuclear lysates (10 μg) prepared as in Fig. 2 was subjected to EMSA analysis using the ³²P-labeled oligonucleotide for SP-1 (A) or for AP-1 (B). As a control, 100-fold excess nonlabeled oligonucleotide for SP-1 or AP-1 was added to the EMSA reaction mixture (com). C, NIH3T3γ1 cells in 100 mm dishes were challenged to 100 μM of hesperetin and naringenin for 24 hr in serum-free DMEM. PDGF was treated to the cells for 15 min before cell lysis. The nuclear lysate was prepared as done for tsNRK cells and subjected to EMSA analysis with a ³²P-labeled NF-κB oligonucleotide.

고찰

Flavonoid는 많은 약용식물과 채소에서 발견되고 있는데, 이러한 polyphenolic 화합물은 *in vitro*와 *in vivo*에서 다양한 생물학적 작용을 나타낸다.⁸⁻¹⁰⁾ 식물에 존재하는 flavonoid 류는 경우에 따라 aglycones으로 발견되지만, 대부분은 당과 함께 존재한다. Naringenin은 naringin의 aglycon 형태로, PI3K 활성을 억제하여 3T3-L1 preadipocytes에서 glucose uptake를 억제하는 것으로 보고되었다.¹²⁾ Glucose uptake는 GSK-3 활성화와 연관되며, Akt kinase의 표적 단백질 중 하나가 GSK-3이므로 naringenin에 의한 Akt 활성억제는 GSK-3 인산화를 억제할 수 있음을 예상하였다. 이러한 추정은 Fig.

3에서 확인되었는데, naringenin이 pp60^{v-src}로 유도된 GSK-3 인산화뿐만 아니라 Akt 인산화도 뚜렷이 억제하였다(Fig. 3B, 3C). 더구나, flavanone의 다른 구성원인 hesperetin 또한 GSK-3와 Akt 인산화 모두를 억제하였다. 결과적으로, 두 화합물로 억제된 NF- κ B 활성은 reporter gene assay와 gel mobility shift assay (Fig. 2)로 확인되었다. 그러나, 세포질 내 I κ B α (Fig. 3A)와 p65 (데이터 생략)의 세포질 및 핵내 변화는 보이지 않았다. NF- κ B 활성화의 주요한 두 경로는 I κ B α 분해 후 NF- κ B complex의 핵 이동에 의한 경로나 혹은 Akt 및 GSK-3의 인산화에 의한 활성화 과정으로, 이 결과는 tsNRK 세포에서는 pp60^{v-src}에서 시작된 NF- κ B 활성화는 Akt 및 GSK-3 인산화에 의한 경로를 거쳐서 이루어지고 있음을 시사해 주고 있다.

c-Src 또는 v-Src로 유도되는 NF- κ B 활성화에 관해서는 몇몇 보고들이 있어왔다.¹⁷⁻¹⁹⁾ IKK β 내 두개의 tyrosine 잔기, Tyr¹⁸⁸과 Tyr¹⁹⁹에서의 인산화는 TNF- α 로 시작하여 c-Src로 이어지는 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)¹⁹⁾과 v-Src로 이어지는 cyclooxygenase-2 (Cox-2)¹⁸⁾ 발현에 영향을 준다고 알려졌다. 이런 인산화는 I κ B α 의 serine 인산화와 분해로 이어져, 결국 NF- κ B 활성화를 유도하였다. Abu-Amer 등은 TNF- α 로 인한 NF- κ B 활성화는 c-Src로부터 I κ B α 의 tyrosine 42 인산화와 연관되어 있다고 보고하였다.¹⁷⁾ 최근, oxidative stress에 의한 NF- κ B 활성화는 protein kinase D에 의한 pleckstrin homology (PH) domain 내 Tyr⁴⁶³ 인산화와 Src tyrosine에 의한 인산화를 통해 IKK β 와 I κ B α 분해로 이어짐이 밝혀졌다.¹⁹⁾ 그러나 본 연구결과에 의하여 v-Src에서 시작된 NF- κ B 활성화는 Akt와 GSK-3 인산화를 통해 이루어진다는 새로운 신호체계를 보여주고 있다. v-Src-transformed fibroblasts에서의 지속적인 RelB 활성화와 I κ B α 분해로 인해 세포내 RelB/p50 heterodimer 형성 또한 배제할 수는 없으나,¹⁷⁾ 본 실험은 hesperetin과 naringenin이 Akt와 그에 수반되는 GSK-3 인산화를 억제함으로써, NF- κ B 활성이 감소하는 결과를 보여주고 있다.

RelA, RelB, 그리고 c-Rel NF- κ B complex는 DNA binding, nuclear translocation, dimerization과 연관되어 300개 아미노산으로 이루어진 Rel homology domain을 포함한다. 비록 I κ B α 분해와 NF- κ B translocation에 대한 저해활성을 보이진 않았지만, hesperetin과 naringenin은 Akt와 GSK-3을 조절하여 NF- κ B 활성을 억제할 수 있음을 보여주고 있다. 또한 PDGF로 인한 NF- κ B 활성화는 Ras/PI3K/Akt/IKK/I κ B α 신호체계에 의해 일어남이 알려져 있으나²⁴⁾ 본 연구결과에 의하면 naringenin과 hesperetin이 PDGF에 의한 NF- κ B 활성화는 억제하지 못한 것으로 보아 (Fig. 4C) hesperetin과 naringenin은 v-Src으로 인한 Akt-GSK-3 활성화

의 신호체계와 그 이후의 NF- κ B 활성화에 대한 특이적 억제효과를 보이는 것으로 추정된다.

따라서 지금까지의 본 실험결과에서 두 flavonoid인 hesperetin과 naringenin에 의한 NF- κ B 활성화의 억제가 Akt및 GSK-3를 통해 부분적으로 이루어짐을 보였으며, 이는 이들 화합물들이 항암 및 항산화 효과를 가지는 성질들을 부분적으로 설명해주고 있다.²⁾

결 론

감귤류의 과피에 풍부하게 존재하는 flavonoid인 hesperetin과 naringenin에 의한 온도민감성 변이 라우스 살코마 바이러스(Rous Sarcoma Virus)에 의해 형질 전환된 백서 정상 세포(normal rat kidney cell)에서 NF- κ B의 활성화 과정의 신호전달조절 작용을 조사하였다. Hesperetin과 naringenin은 모두 발암유전자 단백질인 pp60^{v-src}에 의해 유도되는 NF- κ B 활성화를 저해하였으며 이러한 저해작용은 I κ B α 의 분해과정에 대한 영향은 주지 않으며 Akt와 GSK-3의 인산화 저해를 통해 이루어지는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험 결과는 hesperetin과 naringenin이 가지는 항암, 항산화 활성의 작용 기작을 일부 설명해 주고 있어 질병치료와 관련하여 flavonoid의 유용성을 시사해준다.

인용문헌

1. Kuo, S. M. (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **110**: 41-48.
2. Robak, J. and Gryflewski, R. J. (1998) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 837-841.
3. Miksicek, R. J. (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* **44**: 37-43.
4. Le Bail, J. C., Varnat, F., Nicolas, J. C. and Habrioux, G. (1998) Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett.* **130**: 209-216.
5. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**: 5592-5595.
6. Hagiwara, M., Inoue, S., Tanaka, T., Nunoki, K., Ito, M. and Hidaka, H. (1998) Differential effects of flavonoids inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2987-2992.
7. Yamashita, Y., Kawada, S. and Nakano, H. (1990) Induction of mammalian topoisomeraseII dependent DNA cleavage by

- nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* **39**: 737-744.
8. Ruh, M. F., Zacharewski, T., Connor, K., Howell, J., Chen, I. and Safe, S. (1995) Naringenin: A weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1485-1493.
 9. van Acker, F. A., Schouten, O., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J. and Bast, A. (2000) Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. *FEBS. Lett.* **473**: 145-148.
 10. Santos, K. F., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., Pinto, A. S. and Oliveira, M. G. (1999) Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacol. Res.* **40**: 493-496.
 11. Paredes, A., Alzuru, M., Mendez, J. and Rodriguez-Ortega, M. (2003) Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 108-109.
 12. Harmon, A. W. and Patel, Y. M. (2003) Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**: 229-234.
 13. Schwabe, R. F. and Brenner, D. A. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF- α -induced NF- κ B activation and apoptosis in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**: G204-G211.
 14. Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O. and Woodgett, J. R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* **406**: 86-90.
 15. Neri, L. M., Borgatti, P., Capitani, S. and Marteli, A. M. (2002) The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway : a new second messenger system. *Biochim. Biophys. Acta.* **1584**: 73-80.
 16. Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* **109** Suppl: S81-96.
 17. Abu-Amer, Y., Ross, F. P., McHugh, K. P., Livolsi, A., Peyron, J. F. and Teitelbaum, S. L. (1998) Tumor necrosis factor- α activation of nuclear transcription phosphorylation of I κ B α . *J. Biol. Chem.* **273**: 29417-29423.
 18. Shain, K. H., Jove, R. and Olashaw, N. E. (1999) Constitutive RelB activation in v-Src-transformed fibroblasts : Requirement for I κ B degradation. *J. Cell. Biochem.* **73**: 237-247.
 19. Huang, W. C., Chen, J. J. and Chen, C. C. (2003) c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKK β is involved in tumor necrosis factor- α induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem.* **278**: 9944-9952.
 20. Huang, W. C., Chen, J. J., Inoue, H. and Chen, C. C. (2003) Tyrosine phosphorylation of I κ B kinase α/β by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF- α -induced cyclooxygenase-2 expression. *J. Immunol.* **170**: 4767-4775.
 21. Storz, P. and Toker, A. (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF- κ B activation and survival pathway. *EMBO. J.* **22**: 109-120.
 22. Kim, B. Y., Kim, J. H., Han, Y. J., Ahn, S. C., Kang, D. O., Oh, W. K., Ko, H. R., Lee, H. S., Mheen, T. I. and Ahn, J. S. (1999) pp60^{v-src} reactivation inhibits serum-induced accumulation of inositol phosphates and phosphatidylethanol in tsNRK. *IUBMB Life.* **48**: 85-89.
 23. Kim, B. Y., Kang, D. O., Oh, W. K., Kim, J. H., Choi, Y. K., Jang, J. S., Suh, P. G., Ryu, S. H., Mheen, T. I., And Ahn, J. S. (2000) Involvement of SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C γ 1 in NF- κ B signaling. *FEBS. Lett.* **472**: 45-49.
 24. Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. (1999) NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **4** 1: 86-90.

(2004년 7월 28일 접수)