

## Naringenin이 NF-κB, AP-1 억제를 통한 MMP-9 활성 및 발현 억제 효과

채수철 · 고은경\* · 서은선 · 유근창<sup>1</sup> · 나명석<sup>2</sup> · 김인숙<sup>3</sup> · 이종빈

전남대학교 생물학과, <sup>1</sup>동신대학교 안경광학과,  
<sup>2</sup>광주여자대학교 미용과학과, <sup>3</sup>초당대학교 안경광학과

## Inhibitory Effect of Naringenin on MMP-9 Activity and Expression in HT-1080 Cells

Soo Chul Chae, Eun Gyeong Kho\*, Eun Sun Seo, Geun Chang Ryu<sup>1</sup>,  
Myung Suk Na<sup>2</sup>, In Suk Kim<sup>3</sup> and Jong Bin Lee

Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Ophthalmic Optics, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Beauty & Science, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, Korea

<sup>3</sup>Department of Ophthalmic Optics of Chodang University

**Abstract** - The chemopreventive effects of naringenin derived from citrus on tumor migration and the possible mechanisms involved in this protection were investigated in HT-1080 tumor cells. In this study, we found that naringenin reduced phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-enhanced matrix metalloproteinases (MMP)-9 activation in a dose-dependant manner and further inhibited HT-1080 cell migration. In addition, naringenin suppressed PMA-enhanced expression of MMP-9 protein, mRNA and transcription activity levels through suppression of nuclear factor κB (NF-κB) activation and activator protein-1 (AP-1) translocation without changing tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 level. Therefore, our results suggested that the inhibitory effects of naringenin on MMP-9 activation, relation of tumor migration *in vitro* possibly involve mechanisms related to its ability to suppress PMA-enhanced MMP-9 gene and protein expression through NF-κB activation and AP-1 translocation. Overall, naringenin may be a valuable anti-invasive drug candidate for cancer therapy.

**Key words** : AP-1, MMP-9, Naringenin, NF-κB, TIMP-1

### 서 론

우리나라에서는 인구 5명중 1명이 암으로 사망하고 암은 전체 사망률의 가장 큰 원인 중의 하나로 지적되

고 있다. 암으로 인한 사망률이 해마다 증가하는 것은 인간의 수명연장, 스트레스의 증가, 환경오염, 식생활 양식의 변화 등에 기인한다. 20세기에 들어서 암에 대한 관심이 높아지면서 암의 치료나 약물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 현재 대부분의 암 치료는 방사선을 이용하거나 합성화학약품으로 대사길항물질, 항생물질 등을 이용하며 이들은 대부분 강한 독성을 나

\* Corresponding author: Eun Gyeong Kho, Tel. 062-530-3395, Fax. 062-530-0405, E-mail. Juba07@naver.com

타낸다. 이러한 물질 중에는 면역 기능과 조절 기능에 심각한 이상을 초래하는 것으로 알려져 있어 효과적인 치료에 많은 문제점을 보이고 있다(Jang *et al.* 1982). 또한 이들 항암제에 대한 암세포의 내성이 발현되거나 재발의 경우도 빈번해 부작용이 적은 천연 항암제를 개발하는 것이 필요하며, 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연 항암제를 생약재로부터 개발하기 위한 연구가 수행되고 있다(Cassady *et al.* 1990; Fujiki 2005).

최근 이러한 후보물질로 다양한 생리 활성을 지니므로 각광받고 있는 Naringenin은 Naringin이 생체에서 흡수된 후 신속히 대사되어 Naringenin으로 변한다(Ameer *et al.* 1996). Flavonoid의 일종인 플라바논(flavanone) 무배당체로서 벤젠 고리를 2개 가지고 있으며 포도와 오렌지, 유자 등의 감귤류에 많이 들어 있다. Naringenin은 cytochrome P450 효소들을 억제하며(Hodek *et al.* 2002; Dupuy *et al.* 2003), 항산화제(Van Acker *et al.* 2000), 항암(So *et al.* 1997) 작용을 한다고 보고되어 있다. 최근 연구에서 발암유전자 단백질인 pp60<sup>v-src</sup>에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 저해하였으며(Kwon *et al.* 2004), 위암과 췌장암, 간암 세포의 악성세포의 성장을 중지시키는 작용과 발암 물질에 의해 손상되어진 세포를 보호하는 항암작용을 한다고 알려져 있다(Kanno *et al.* 2005).

초기 암의 치료는 가능하지만 전이가 일단 발생되면 성공적인 치료가 어렵고 치료과정 중 합병증으로 인한 사망률이 높아진다. 그러므로 암 치료에 있어서 암의 전이를 예방하는 것은 매우 중요한 연구 분야이나 천연물질과 암의 전이에 대한 연구는 미미한 실정이다.

최근 기저막과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 주성분을 분해하는 matrix metalloproteinase (MMPs)가 암의 전이에 있어 중요한 역할을 하기 때문에 천연물 유래의 MMPs 저해제는 암의 침윤과 전이를 효과적으로 막을 수 있는 새로운 표적으로 기대되고 있다.

MMP 활성은 침윤에 작용하는 중요한 단백질분해효소로 ECM 단백질을 분해하여 세포가 다른 기관으로 이동하는 데 중요한 역할을 한다(John and Tuszynski 2001). MMPs는 ECM의 구성성분인 collagen, gelatin, fibronectin 등을 분해하는 효소로 17 종류가 알려져 있으며 MMP-2 (gelatinase-A)와 MMP-9 (gelatinase-B)는 기저막의 주요 성분인 type IV collagen을 분해하는 효소로 전이성이 큰 암 조직과 그 주변 조직에서 활성이 활발한 것으로 보고되어져 있다(Liabakk *et al.* 1996). 그러므로 MMPs 활성 억제물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)는 MMPs 활성을 억제하는 유전자로 MMPs와 균형을 맞추어 준

재하며, 그 균형이 깨어지면 암과 류머티스와 같은 임상적인 현상이 나타난다. 그러나 암 전이와 관련된 MMPs 발현과 조절기전에 대한 연구는 아직 보고되지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 HT1080 세포에서 Naringenin을 이용하여 세포의 전이 과정인 이동성과 침윤성 그리고 전이 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질분해효소인 MMP-9 활성과 발현 그리고 억제 유전자인 TIMP-1 발현에 미치는 영향 그리고 세포내 신호전달 기전에 관여하는 NF- $\kappa$ B와 AP-1 유전자 발현에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용한 인체 섬유육종 세포인 HT-1080 세포는 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10%의 fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 DMEM (Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. Naringenin (Sigma, USA)은 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 녹여 10 mM의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하여 적정 농도로 배지에 희석하여 실험하였다.

### 2. 세포독성 측정

HT1080 세포를  $5 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup> 세포 수로 계수한 다음 24 well plate (Nunc, Denmark)에 200  $\mu$ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하고 여러 농도의 Naringenin이 포함된 배양액으로 교환하고 24시간 추가 배양하였다. 배양액을 MTT 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>가 포함된 배양액으로 교환하고 3시간 반응시켰다. 3시간 후 배양액을 버리고 DMSO를 200  $\mu$ L well<sup>-1</sup>씩을 넣어 5분간 실온 방치하여 푸른색 결정인 formazan을 용해시킨 후 microplate spectrophotometer (Bio-Tech, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 3. 세포의 이동성 측정

HT1080 세포를  $5 \times 10^4$  cells well<sup>-1</sup>이 되도록 10% FBS가 함유된 DMEM으로 희석하여 6 well plate에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양하였다. 배양 후 조심스럽게 배지를 제거하고 serum이 함유되지 않은 DMEM으로 세척한

후 1% FBS가 함유된 DMEM을 첨가하여 1시간 동안 안정화를 시키고 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 Naringenin을 24시간 동안 처리하였다. 이후 PBS로 세척하고 4% formaldehyde (Sigma, USA)를 이용하여 세포를 고정시킨 다음 다시 PBS로 세척하고 Hematoxylin-Eosin (Sigma, USA) 용액을 10분간 처리하여 염색한 후 마지막으로 PBS로 세척하고 실온에서 건조한 뒤 현미경 (Nikon TS-100, Japan)을 이용하여 관찰하며 임의로 5곳을 지정하여 세포 수를 측정하였다.

#### 4. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 활성

MMP-9 활성을 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. 6 well plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 세포를  $1 \times 10^6$  cell well<sup>-1</sup>의 농도로 24시간 동안 부착시킨 후 FBS가 없는 무혈청 배양액으로 갈아준 다음 Naringenin을 처리하였다. 24시간 후 무혈청 배양액을 효소액으로 하여 1 mg mL<sup>-1</sup>의 gelatin이 함유된 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 하였다. 4°C에서 60 V로 12시간 전기영동이 끝난 후에 gel은 SDS를 제거하기 위해 washing buffer (2.5% Triton-X 100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9) 용액으로 30분간 2회 세척한 후 반응액 (5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9)에 18시간 동안 37°C에 반응시켜 기질분해를 유도 하였다. Gel을 0.25% Coomassie brilliant blue G (Richmond, USA) 용액으로 1시간 염색하고 5% methanol과 8% acetic acid로 탈색하면, 전체적인 background는 푸른 색이고 분해된 부분은 흰색 band로 나타난다.

#### 5. 유전자 발현

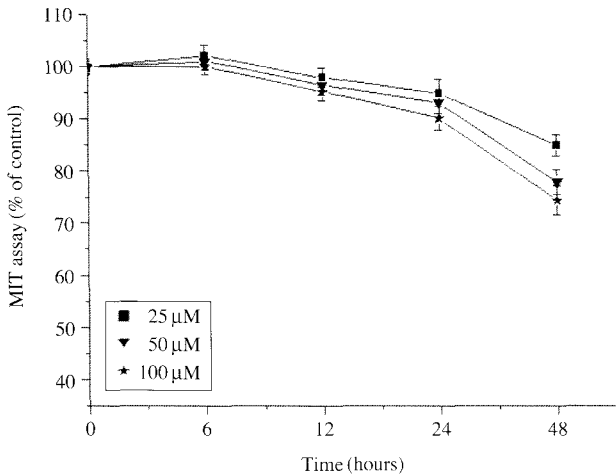
상기와 동일한 조건에서 준비된 세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent™ (Invitrogen, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase (RT)를 이용하여 2  $\mu\text{g}$ 의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mm dNTP, 10X buffer, DEPC water, premixed primer (Geno-Tech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 polymerase chain reaction (PCR : Corbett Research, Australia)을 수행 하였다. PCR 반응이 끝난 후에는 증폭된 DNA를 1.2% agarose gel을 이용하여 전기 영동하였고 ethidium bromide (EtBr : Sigma, USA)으로 염색한 다음 Alpha Imager™ (Alpha Innotech Corp, CA)을 이용하여 염색된 DNA를 확인하였다.

#### 6. Promoter assay

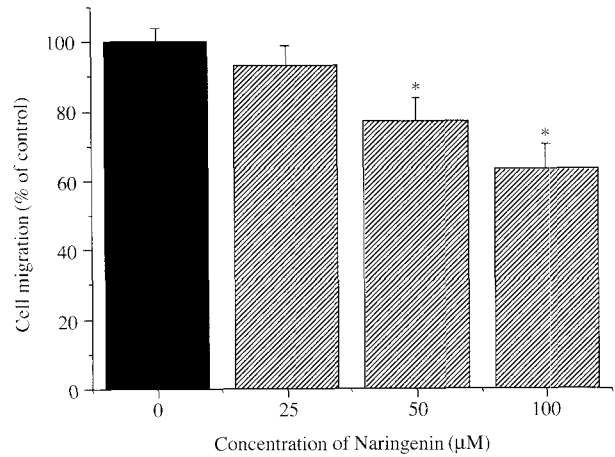
Naringenin에 의해 MMP-9 및 NF- $\kappa$ B, AP-1 promoter의 활성 또는 저해되는지 관찰하기 위해 MMP-9 및 NF- $\kappa$ B, AP-1 gene promoter luciferase assay system (Promega, USA)를 이용하여 실시하였다. MMP-9 및 NF- $\kappa$ B, AP-1 promoter들의 transient transfection은 LipofectAMINE kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 실행하였다. 먼저 HT1080 세포를 6 well plate에 각각  $5 \times 10^5$  cells well<sup>-1</sup>로 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 배양하였다. 12시간 후 LipofectAMINE reagent와 각각의 DNA를 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 LipofectAMINE reagent를 무혈청 DMEM 배지에 희석한 용액과 다시 상온에서 15분간 반응시켜 각각의 well에 넣어주었다. 5시간 동안 37°C에서 배양한 후 유전자 주입용 배지를 조심스럽게 제거하고 10% FBS를 포함한 DMEM 배지로 교환하여 안정화시켰다. 4시간 후, Naringenin 및 phorbol myristate acetate (PMA)를 처리하여 12시간 동안 반응시켰다. Luciferase 활성 분석을 위하여 transfection한 세포들을 PBS로 2번 세척한 후 50  $\mu\text{L}$  lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 100  $\mu\text{M}$  AEBSF, 5  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> leupeptin, 5  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> aprotinin)로 lysis시켜 4°C, 15,000 rpm에서 1분간 원심분리 (Eppendorf, Germany)하여 상층액을 효소액으로 하였다. 효소액 20  $\mu\text{L}$ 를 96 well plate에 분주한 뒤 100  $\mu\text{L}$  luciferase assay substrate (Promega, USA)를 luciferase 측정 직전에 반응시키고 luminometer (Lumat LB 9507 : Berthold, Germany)를 이용하여 1초와 30초 값의 차이를 계산하여 luciferase 활성을 측정하였다. 각각의 luciferase 활성은 cotransfection 해준 *Renilla* luciferase reporter vector 수치를 기준으로 보정하였다.

#### 7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

HT1080 세포를  $5 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>이 되도록 10% FBS가 함유된 DMEM으로 희석하여 100 mm dish에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 80~90% 이상 찰 때까지 배양한 후 PBS로 2회 세척하고 무혈청 DMEM을 넣고 Naringenin을 24시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 각 dish 당 trypsin 1 mL을 처리하여 세포를 모아 원심분리 하였다. PBS로 1회 세척해 준 다음 lysis buffer를 1 mL씩 가하고 vortexing한 다음 5분간 얼음 속에 방치하여 세포를 lysis시켰다. 원심분리 후 생성된 pellet을 Nonidet P-40 (NP-40 : Sigma, USA)을 함유하지 않은 lysis buffer로 세척해 준 다음 nuclear extract buffer를 가하고 손으로 튜브를 tapping한 후 얼음 속에



**Fig. 1.** Effect of Naringenin on cytotoxicity of HT-1080 cells. The cells were seeded at an initial density of  $5 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Cells were treated with various concentrations of Naringenin (25, 50 or 100  $\mu\text{M}$ ) were treated for 6, 12, 24, 48 h. Cell viability were estimated by the MTT assay, as described in Materials and Methods. The cytotoxicity was determined by relative absorbance normalized to the control cells. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. calculated from three independent experiments.



**Fig. 2.** Quantitative analysis of Naringenin on cell migration of HT-1080 cells. After being treated with various concentrations Naringenin of for 24 h, cell migration assay were then performed as described in Section 2. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. calculated from three independent experiments. \*Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

넣어 10분간 방치하였다. Vortexing 후 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 다음 상층액을 원심분리 튜브에 분주한 후 액체질소로 재빨리 얼려 사용 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고 (Forma Science, USA)에 보관하였다. Bradford solution (Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질을 정량한 다음 5  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 poly [dI-dC] 2  $\mu\text{g}$  및 5'에  $^{32}\text{P}$ 로 labeling된 NF- $\kappa\text{B}$ , AP-1 (100,000 cpm)과 상온에서 20분 동안 반응시켜 DNA-protein complex를 형성시켰다. 생성된 complex를 5% polyacrylamide gel을 이용하여 180 V에서 1시간 20분 동안 전기영동하여 분리하였고 slab gel dryer (Thermo, USA)를 이용하여  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 gel을 건조시킨 다음  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 X-ray film에 감광시켜서 확인하였다.

**8. 통계분석**

실험 결과의 유의성 검증은 ANOVA Student's *t* test 방법에 따라 실시하였으며,  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 3회 이상 실시한 실험 결과를 토대로 분석하였다.

**결 과**

**1. 세포독성 평가**

Naringenin이 암세포 증식에 미치는 영향을 알아보기

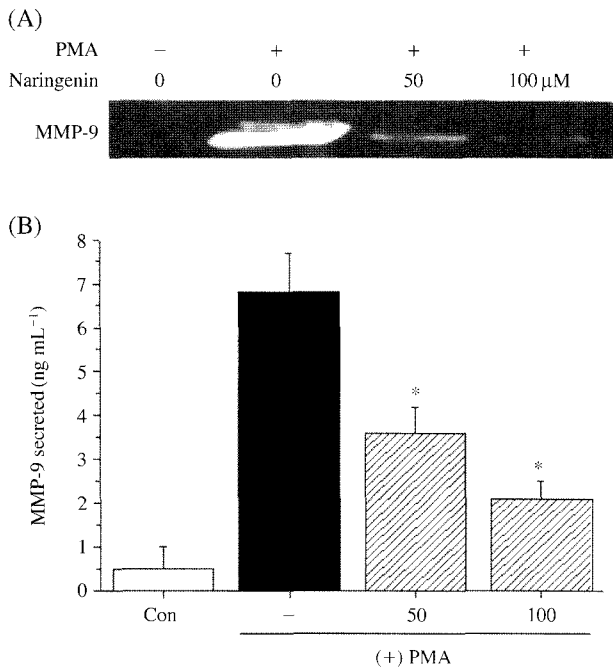
위해 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  농도로 각각 첨가하여 6, 12, 24, 48시간 배양 후 MTT assay로 알아본 세포 증식실험으로 생존 세포 수를 측정하였다. 그 결과, Naringenin을 HT1080 세포에 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  농도로 24 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 처리하여 대조군과 비교한 결과 Naringenin 모든 농도에서는 약 90% 이상의 세포생존율을 나타냈다 (Fig. 1). 따라서 차후 실험에서는 세포사멸에 영향을 미치지 않는 24시간과 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  농도의 Naringenin을 처리하여 실험하였다

**2. 세포의 이동성 측정**

암세포의 이동성만을 관찰하기 위해 세포 증식에 영향이 없는 24시간과 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  농도의 Naringenin을 처리하여 실험을 실시하였다. 필터 윗부분에 분주한 세포가 이동하여 필터 아랫부분에 부착되어 있는 상태로 H-E stain 용액으로 세포를 염색하여 실온에서 건조시켜 관찰한 결과, Naringenin은 대조군과 비교하여 50, 100  $\mu\text{M}$ 에서 유의적인 ( $p < 0.05$ ) 감소를 보였다 (Fig. 2).

**3. MMP-9 활성도 측정**

Naringenin이 MMP-9 효소활성이 있는지 PMA로 증양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-9 활성이 억제되는지를 gelatin zymography를 이용해 확인해 보았다. 그 결과, 종양 촉진제인 PMA 처리군에서는 많은 양의 MMP-9 효소의 활성이 나타남을 관찰할 수 있으며 24시간 동안 Naringenin 50, 100  $\mu\text{M}$ 로 처리한 결과 MMP-9 효소의



**Fig. 3.** Effect of Naringenin on activities and expressions of MMP-9. The cells were treated with Naringenin for 24 h in the presence of PMA. Each conditioned media was collected, and then was analyzed for the gelatinolytic activities by zymography (A) and for MMP-9 activities by ELISA assay (B). \*Significantly different from PMA at  $p < 0.05$ .

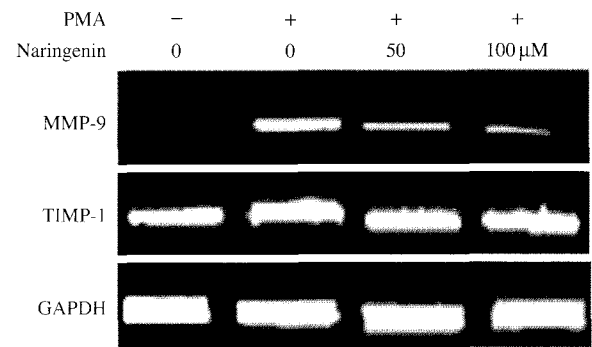
활성이 농도 의존적으로 억제되었다 (Fig. 3).

#### 4. MMP-9의 유전자 발현 측정

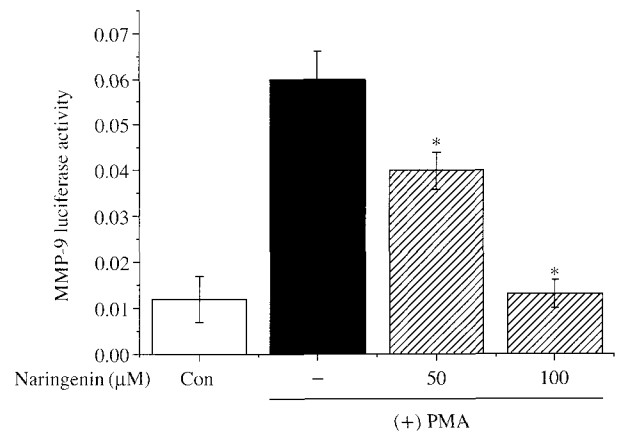
Naringenin에 의해 MMP-9 효소의 활성을 억제하였는데 이러한 효소활성이 유전자 발현 조절에 의한 것인지 확인하기 위해 Naringenin이 MMP-9와 TIMP-1 유전자 발현에 저해 활성이 있는지 PMA로 종양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-9, TIMP-1 활성을 억제하는지 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과, Naringenin의 처리농도가 증가함에 따라 MMP-9의 발현이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 50, 100 μM에서 MMP-9의 발현이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 MMP-9의 내인성 저해제인 TIMP-1의 발현이 PMA에 의해 증가되었으나 Naringenin의 처리에 따른 변화는 없었다 (Fig. 4).

#### 5. MMP-9 promoter assay

Naringenin 처리에 의한 MMP-9의 전사조절 여부를 관찰하기 위해 promoter assay를 실시하였다. 그 결과, MMP-9 luciferase 활성도가 PMA를 단독 처리하였을 때 대조군에 비해 약 5배 증가하였으나 50, 100 μM의 Nari-



**Fig. 4.** Effect of Naringenin on expressions of MMP-9 and TIMP-1. Analysis of MMP-9, TIMP-1 mRNA expression in HT-1080 cells treated with 50, 100 μM concentration of Naringenin in the absence and presence of PMA (100 nM) using RT-PCR. \*Significantly different from PMA at  $p < 0.05$ .

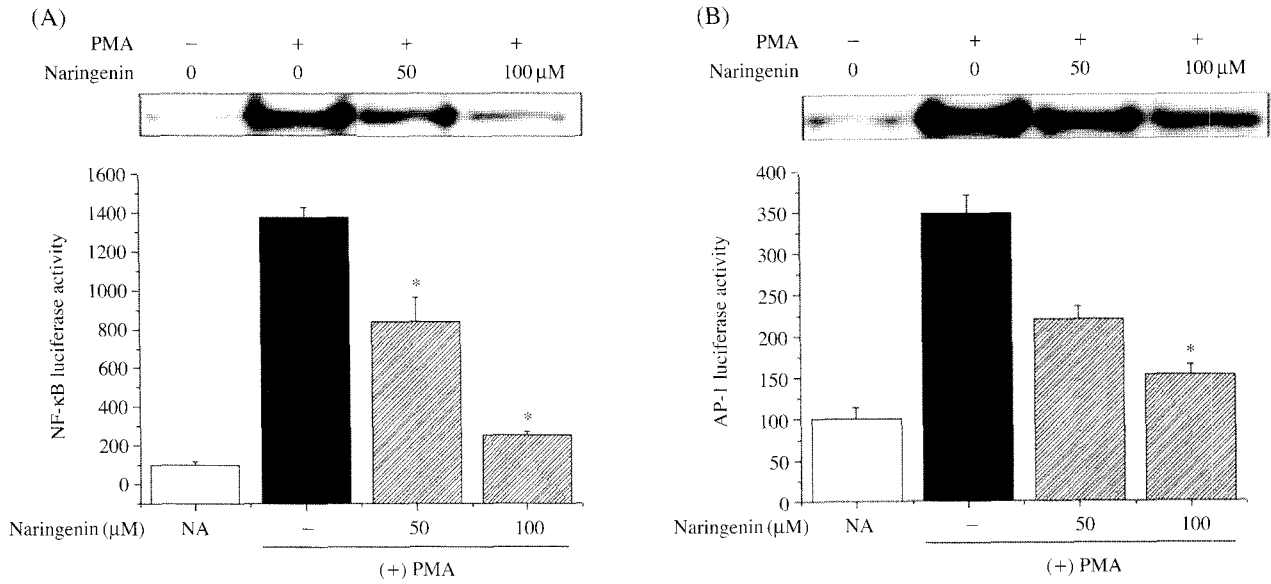


**Fig. 5.** Effect of Naringenin on MMP-9 promoter activity. HT-1080 cells were transiently co-transfected with pGL3-MMP-9-Luc and phRG-TK-*Renilla*. After 4 h, cells were treated with the indicated concentrations of Naringenin (50, 100 μM) and PMA (100 nM) for 12 h. phRG-TK-*Renilla* was co-transfected in each sample as an internal control. Each bar shows the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. \*Significantly different from PMA ( $p < 0.05$ ).

genin을 농도별로 전 처리군에서는 농도 의존적으로 MMP-9 활성이 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

#### 6. 전사조절인자 조사

더 나아가 Naringenin에 의한 MMP-9의 전사조절관련 인자들을 조사하기 위해 MMP-9 프로모터 상에 존재하는 NF-κB, AP-1의 promoter assay를 실시하였다. 그 결과, NF-κB luciferase 활성도를 살펴보면 PMA를 단독 처리하였을 때 대조군에 비해 약 14배 증가하였으나 50, 100 μM의 Naringenin 전 처리군에서는 luciferase 활성도



**Fig. 6.** Effects of Naringenin on activities of NF-κB and AP-1. HT-1080 cells were transiently co-transfected with pGL3-4κB-Luc (A) or pGL3-AP-1-Luc (B) and phRG-TK-*Renilla*. After 4 h, the cells were pretreated with Naringenin for 3 h, and then stimulated with PMA (100 nM). After 24 h of transfection, NF-κB and AP-1 promoter activities were measured. Luciferase activities were determined from cell lysates as described in Section 2. DNA binding activity of NF-κB and AP-1 by EMSA. After incubation, cells were lysed and nuclear extracts were isolated and used in a EMSA with <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide as a probe. DNA-protein complexes were separated on 4% polyacrylamide gel. After 1.5 h, the gel was vacuum-dried and autographed at -70°C for 18 ~ 20 h. Each bar shows the mean ± S.D. of three independent experiments, performed in triplicate. \*Significantly different from PMA (p < 0.05).

가 농도 의존적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 또한 AP-1 luciferase 활성도를 살펴보면, PMA를 단독 처리하였을 때 대조군에 비해 약 3.5배 증가하였으나 50 μM의 Naringenin을 농도별로 전 처리하면 luciferase 활성도가 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 특히 100 μM Naringenin 전 처리군에서는 유의하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 이러한 프로모터 결과들과 일치하게 핵단백질과 DNA 결합 활성을 EMSA를 이용하여 NF-κB, AP-1의 binding assay 측정된 결과 Naringenin을 전처리한 경우 PMA에 의해 유도된 NF-κB와 AP-1의 결합 활성이 처리농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 6A, B).

**고 찰**

본 연구에서는 HT1080 세포에서 Naringenin을 이용하여 여러 가지 bioassay를 통하여 실제 암세포의 이동성에 대한 억제효능을 평가하고자 하였으며, 또한 MMP-9 활성과 발현 그리고 억제 유전자인 TIMP-1 유전자 발현 정도를 연구함으로써 이들의 발현저해가 암의 전이억제와 관련됨을 밝히고 세포내 신호전달 기전에 관여하는 NF-κB와 AP-1 유전자 발현이 상호 작용함을 규명하고

자 하였다.

먼저, 본 실험결과 세포에서는 24시간 후에 100 μM 이하 농도에서 HT1080 세포의 성장에 전혀 영향이 없음을 알 수 있었다. 이후 실험에서는 세포의 사멸에 영향을 미치지 않는 24시간과 100 μM 이하 농도의 Naringenin을 처리하여 실험하였다. 이러한 암세포에 어떠한 영향도 미치지 않는 범위인 100 μM 이하 농도에서 Naringenin이 실제로 암세포의 이동에는 어떤 영향을 미치는지 실험해 보았다. 그 결과, Naringenin이 상처를 낸 후 24시간 동안 처리시 HT1080 세포의 이동성이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.

MMPs의 활성은 유전자 발현, 비활성효소의 활성화 과정 그리고 효소활성의 억제에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(Chambers and Matrisian 1997). Naringenin에 PMA로 증양을 촉진시켜 상승 발현된 효소 활성을 억제시키는지 알아본 결과, Naringenin의 처리농도가 증가함에 따라 MMP-9의 효소의 활성은 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Naringenin이 HT-1080 세포의 MMP-9 효소 활성을 억제하는 데 효과가 있음을 보여준다.

HT1080 세포에서 Naringenin의 항전이 효과는 세포 성장의 억제를 통해 나타내고 있다. 그리고 Naringenin에 의해 MMP-9 효소 활성이 억제되었는데 이를 통해 유전

자 발현도 억제되는지를 RT-PCR를 이용해 확인해 본 결과, Naringenin 모두에서 MMP-9 유전자 발현을 농도 의존적으로 저해효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

암 세포 전이에서 MMPs와 TIMPs의 발현은 상호 조절되고 이들의 불균형은 암세포 전이 현상에 중요한 영향을 미친다. 정확한 기전은 알려져 있지 않지만 MMP-9와 TIMP-1의 발현은 생체 실험과 세포수준의 실험에서 다르게 조절된다고 한다(De Clerck 1994). TIMP-1이 MMP-9의 억제제로 작용하므로 TIMP-1에 대해서도 실험해 본 결과 Naringenin이 처리 농도별로 MMP-9의 유전자 발현을 억제하는 효과를 나타내었으나, TIMP-1의 유전자 발현에서는 변화가 없었다. 이는 MMP-9의 활성화는 유전자 발현의 감소에 의한 결과이며, TIMP-1에 의한 효소 활성도의 조절이 아님을 시사하였다.

NF- $\kappa$ B와 AP-1은 중요한 전사조절인자 중 하나이며, 이의 억제는 종양 증식을 억제한다고 알려져 있다(Garg and Aggarwal 2002; Ghosh and Karin 2002; Moynagh 2005). NF- $\kappa$ B와 AP-1은 활성산소, 염증, 사이토카인, 발암 물질 등에 의해 활성화되며, 활성화된 NF- $\kappa$ B는 세포핵으로 이동해 200여 종 이상의 유전자의 활성화에 관여한다. 본 연구에서도 Naringenin의 농도가 증가됨에 따라 PMA에 의해 증가된 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성이 감소하는 것으로 나타나 MMP-9의 유전자 발현이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과 NF- $\kappa$ B와 AP-1 활성은 여러 암전이 억제물질들에 의하여 저해되어 단백질분해효소인 MMP-9 활성화와 발현이 저해 받는 것으로 사료된다.

## 적 요

Naringenin은 flavonoid 구조의 감귤류 과피에 다량 함유되어 있으며 항암 및 항산화 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되었다. 이에 본 연구에서는 HT-1080 섬유육종세포의 전이에 대한 영향을 조사하였다. 먼저 Naringenin이 암세포의 이동에 미치는 영향을 알아보기 위해 migration assay를 한 결과, Naringenin이 암세포의 이동을 농도 의존적으로 억제시켰다. 암의 전이에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 단백질분해효소인 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)의 활성도를 측정하기 위해 gelatin zymography를 한 결과, Naringenin이 PMA에 의해 증가된 MMP-9의 효소 활성도를 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 MMP-9와 TIMP-1의 유전자 발현에 대한 Naringenin의 영향을 RT-PCR 방법으로 조사한 결과, Naringenin이 PMA에 의해 증가된 MMP-9의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰으나 TIMP-1

의 mRNA 발현에는 변화가 없었다. MMP-9 발현 감소에 관여하는 전사조절인자를 확인하기 위해 promoter assay를 한 결과, Naringenin이 PMA에 의해 증가된 MMP-9 및 NF- $\kappa$ B, AP-1의 promoter 활성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 MMP-9의 전사조절인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 결합 활성도를 electrophoretic mobility shift assay로 확인한 결과 Naringenin이 PMA에 의해 증가된 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 결합 활성도를 농도 의존적으로 감소시켰다. 결론적으로 Naringenin이 전사조절인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 활성을 억제함으로써 MMP-9의 유전자 발현 및 효소 활성을 억제하고 그 결과 암세포의 이동과 침윤을 억제하는 것을 알 수 있다.

## 사 사

본 연구는 중소기업청의 실험실창업 지원사업에 의하여 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Ameer B, RA Weintraub, JV Johnson, RA Yost and RL Rousseff. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60:34-40.
- Cassady JM, WM Baird and CJ Chang. 1990. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *J. Nat. Prod.* 53:23-41.
- Chambers AF and LM Matrisian. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1260-1270.
- De Clerck YA, MI Darville, Y Eeckhout and GG Rousseau. 1994. Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene* 139:185-191.
- Dupuy J, JF Larrieu, A Sutra and M Alvinerie. 2003. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: Quercetin. *Vet. Parasitol.* 112:337-347.
- Fujiki H. 2005. Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. *Chem. Rec.* 5:119-132.
- Garg A and BB Aggarwal. 2002. Nuclear transcription factor- $\kappa$ B as a target for cancer drug development. *Leukemia* 16: 1053-1068.
- Ghosh S and M Karin. 2002. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 109:81-96.
- Hodek P, P Trefil and M Stiborova. 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 139:1-21.

- Jang IM, JH Kim and DS Han. 1982. Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (IV), Acute toxicity and antitumor activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 13:62-69.
- John A and G Tuszynski. 2001. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 7:14-23.
- Kanno SI, A Tomizawa, T Hiura, Y Osanai, A Shouji, M Ujibe, T Ohtake, K Kimura and M Ishikawa. 2005. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28:527-530.
- Kwon OS, BY Kim, KA Kim, MS Kim, HC Oh, BS Kim, YH Kim and JS Ahn. 2004. Effect of the hesperetin and naringenin on pp60<sup>v-src</sup>-induced NF- $\kappa$ B activation. *Kor. J. Pharmacogn.* 35:244-249.
- Liabakk NB, I Talbot, RA Smith, K Wikinson and F Balkwill. 1996. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and metalloproteinases 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* 56:190-196.
- Moynagh PN. 2005. NF- $\kappa$ B pathway. *Cell Sci.* 118:4582-4659.
- So FV, A Guthrie, AF Chambers and KK Carroll. 1997. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human. *Cancer Lett.* 112:127-133.
- Van Acker FA, O Schouten, GR Haenen, WJ Van der Vijgh and A Bast. 2000. Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. *FEBS. Lett.* 473:145-148.

Manuscript Received: December 19, 2008

Revision Accepted: February 18, 2009

Responsible Editor: Kyung Jin Lee