

# 구강편평세포암종에서 신생혈관화와 기저막침습에 미치는 제니스타인의 효과

김용훈 · 윤필영 · 명 훈 · 김명진  
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2002;28:434-439)

## THE EFFECT OF GENISTEIN IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA WITH RESPECT TO THE ANGIOGENESIS AND BASEMENT MEMBRANE INVASION

Yong-Hun Kim, Pil-Young Yun, Hoon Myoung, Myung-Jin Kim  
*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University*

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common head and neck cancers. OSCC generally has a poor prognosis due to its tendency towards a local invasion and subsequent metastasis, which is mediated by multiple proteolytic enzymes and angiogenesis. Soy products contain high levels of isoflavonoids, including the tyrosine kinase inhibitor, genistein, which has been identified as a potent inhibitor of cell proliferation and in vitro angiogenesis. The purpose of this in vitro study is to evaluate the anti-cancer effect of genistein with respect to the angiogenesis and basement membrane invasion in OSCC.

The highly invasive OSCC cell line, HSC-3 cells were cultured in the presence of 10  $\mu$ M genistein for 24h. To evaluate the effects of genistein on the invasiveness and the gelatinolytic activity, in vitro invasion assay and zymography were performed. In order to evaluate the effect on the VEGF and bFGF mRNA expression, RT-PCR and northern hybridization reaction, and chemiluminescence detection were applied.

The in vitro invasion assay showed that the genistein treatment reduced the cellular invasion through the artificial basement membrane and significant difference between the control group and the genistein treated group was shown in MMP-2 activity. Especially, the 62 kDa activated form of MMP-2 in the control group was 1.8 times higher than that in the genistein treated group. The results of the northern blot analyses indicated that VEGF mRNA expression in the genistein treated group was significantly down regulated.

This study showed that genistein inhibits angiogenesis and reduces basement membrane invasion in OSCC. It seems to support the possibility of genistein as an anti-cancer agent.

### I. 서 론

구강 편평세포암종은 인접조직으로의 침투 및 임파선으로의 전이 빈도가 높아 예후가 불량한 암종으로, 구강 악안면 영역의 암종 가운데 가장 발생빈도가 높은 암종이다<sup>1)</sup>. 종양의 전이 및 인접조직으로의 침습은 여러 가지 단백분해효소(proteolytic enzyme)와 신생혈관화(angiogenesis)에 의해 중재되는 기저막과 세포의 기질의 파괴를 동반한다<sup>2,3)</sup>. 많은 종류의 단백분해

효소가 세포의 기질의 파괴에 관여하나, 그 중에서도 특히 matrix metallo-proteinases(MMPs) 효소군이 기질의 파괴에 있어 가장 중요한 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>. 또한 신생혈관화의 과정 중 혈관내피세포의 침습에 MMPs가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>5)</sup>. 특히 MMP-2는 typeIV collagen을 분해하여 기저막의 파괴를 통해 종양의 전이와 침습에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

신생혈관화는 기존의 혈관으로부터 새로운 미세혈관이 형성되는 것을 말하며 이는 발생, 치유 등의 생리학적 기전과 종양의 전이 및 침습과 같은 병리학적 기전 전반에 걸쳐 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>3,7-10)</sup>. 특히 종양의 신생혈관화는 종양의 성장과 전이에 반드시 필요한 과정으로 알려져 있는데 종양세포의 성장을 위한 영양분과 산소의 공급은 물론 형성된 혈관을 통한 침습과 전이에 있어서도 매우 중요한 인자로 볼 수 있다<sup>3)</sup>. 이론적

**김 명 진**  
110-744, 서울시 중로구 연건동 28번지  
서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실  
**Myung-Jin Kim**  
Dept. of OMFs, College of Dentistry, Seoul National University  
28, Yeongun-Dong, Chongro-Gu, Seoul, 110-744, Korea  
Tel : 82-2-760-2631 Fax : 82-2-766-4948  
E-mail : myungkim@plaza.snu.ac.kr

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (01-PJ5-PG3-20507-0029).

으로 종양에 영양을 공급하는 영양혈관을 차단하면 종양의 위축과 괴사를 유발할 수 있다. 따라서 혈관형성 억제제는 암증을 치료하거나 최소한 암증의 성장을 억제한다고 추정할 수가 있어, 혈관형성 억제제를 이용한 종양의 치료는 전도 유망한 치료방법이라고 할 수가 있다<sup>10-15</sup>. 현재까지 여러 가지의 혈관형성억제제, 예를 들면, fumagillin 유사체인 TNP470, 상어연골에서 유래된 억제제인 squalamine, v3 integrin에 대한 항체인 Vitaxin, vascular endothelial growth factor(VEGF)에 대한 단클론 항체 및 콩의 주성분인 genistein등이 연구되었다<sup>16,17</sup>. 그러나 현재까지 구강 편평세포암종에 있어서는 이러한 주제 혹은 적합한 혈관형성 억제제에 관해 알려진 바가 적다.

콩은 강력한 tyrosine kinase inhibitor인 genistein을 비롯하여 많은 종류의 isoflavonoid를 함유한 식품으로서 특히 genistein은 세포의 분열능을 억제하고 항산화효과를 가지고 있으며 세포수준에서의 신생혈관화를 억제하여 종양의 발생을 예방하는 것으로 보고되었다<sup>18-20</sup>. 최근 들어 이러한 암 예방효과(chemoprevention) 외에도 genistein이 암증의 침습과 전이 단계로의 진행을 차단한다는 주장이 제기되었다<sup>21</sup>. 또한 genistein은 콩에서 추출된 천연 isoflavonoid이기 때문에 다른 항암화학제들에 비해 그 독성이 매우 낮다는 장점이 있으며, 200 $\mu$ M의 고농도에서도 포유류 세포의 조직배양시에 독성이 없다는 보고가 있다<sup>17</sup>. 이러한 사실들은 genistein을 치료목적의 항암제제로 이용하는 경우에 예상되는 부작용이 적을 것이라는 추정을 가능케 한다.

본 연구는 genistein을 침습성이 높은 것으로 알려진 구강 편평세포암종 세포주인 HSC-3에 적용하여, Matrigel<sup>®</sup> matrix를 이용한 인공 기저막에 대한 침습성에 미치는 영향과 gelatinase-A(matrix metalloproteinase-2: MMP-2)의 용해능(gelatinolytic activity)에 미치는 영향을 각각 in vitro invasion assay와 gelatin zymography를 통해 알아보고, 신생혈관화 인자인 VEGF와 bFGF의 mRNA발현에 미치는 영향을 Northern blot analysis를 통해 알아보아, 궁극적으로 genistein의 구강 편평세포암종에 대한 항암효과를 평가하고자 계획하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양

침습성이 강하다고 알려진 구강 편평세포암종 세포주 HSC-3 (JCRB, Japan)를 이용하였다. 세포는 37°C에서 습도를 유지하면서 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 배양을 하였고, 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco, USA)에 10 % fetal bovine serum (Gibco, USA)과 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco, USA)을 첨가하여 사용하였다. 계대배양은 0.1 % trypsin-EDTA를 이용하여 시행하였고 5~7회 계대배양세포를 실험에 사용하였다.

### 2. in vitro invasion assay

Matrigel<sup>®</sup> matrix가 도포된 9 mm 세포배양 삽입판(cell culture inserts: pore size, 8  $\mu$ m; Becton Dickinson, USA)을 24-well plate (Costar, USA)에 장착하고, well 당 5 $\times$ 10<sup>3</sup>개의 HSC-3 세포를 삽입판의 상층에 상정하여, 비혈장(serum free) DMEM에서 10  $\mu$ M의 genistein농도로 24시간동안 부란하였다. 대조군은 genistein 첨가없이 같은 배지에서 배양하였다. 인간 섬유세포육종 세포주 HT1080의 배지 0.5 ml를 삽입판의 하층에 채워 화학주성제(chemoattractant)로 사용하였다.

24 시간 부란 후, 상층에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고, 하층으로 통과한 세포의 수를 측정하기 위하여 5 % glutaraldehyde로 고정하고 hematoxylin으로 염색하여, 삽입판의 Matrigel<sup>®</sup> matrix와 각각의 8  $\mu$ m 미세 소공을 통과한 세포의 총 수를 광학현미경(x100)으로 관찰하였다.

### 3. Gelatin zymography 및 젤라틴용해능(gelatinolytic activity)의 평가

10 % polyacrylamide separating gel에 젤라틴을 첨가하여 최종농도가 0.1 mg/ml가 되도록 하였다. Genistein 처리군은 10  $\mu$ M의 genistein 농도로 24시간동안 비혈장(serum free) DMEM에서 부란 후, 10 ml의 배지를 택하여 0.22  $\mu$ m filter로 여과하였으며, Amicon사의 spin concentrators를 이용하여 1ml로 농축하였다. 이와 같이 준비한 배지 12  $\mu$ l를 sample buffer(10 % SDS, 50 % glycerol, 25 mM Tris-HCl, pH 6.8 및 0.1 % bromophenol blue)와 혼합하여 겔에 적용하고 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 겔은 2.5 % Triton X-100에서 30분간 2 회 세척하여 SDS를 제거하였으며, 37°C의 50 mM Tris-HCl과 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 substrate buffer(pH 8.0)에서 하룻밤 동안 부란하여 효소반응을 유도하였다. 이후 겔을 상온에서 50 % methanol과 10 % glacial acetic acid에 담긴 0.15 % Coomassie blue R250으로 20분간 염색하고, 염색약이 없는 동일한 용액으로 탈색하였다. HT1080의 배지를 양성 대조군(positive control)으로 사용하였으며, 같은 양의 genistein을 포함한 신선한 비혈장(serum free) DMEM을 내부 음성 대조군(internal negative control)으로 사용하였다.

MMP-2의 비활성 상태(72 kDa)와 활성 상태(62 kDa)의 젤라틴용해능은 이전 연구<sup>22</sup>에 따라 분석하였다. 최초 배양된 정상 구강점막 섬유아세포의 배지 10  $\mu$ l(총 단백질 0.5  $\mu$ g) 중 MMP-2 비활성 상태의 용해능을 MMP-2의 10 상대단위(arbitrary unit: U)로 정의하였다. 비활성 상태와 활성 상태의 용해능 및 총 효소 용해능은 TINA 2.0 software(Raytest Isotopenmessgeraete GmbH, Germany)를 이용한 2-dimensional densitometric analysis로 측정하였다.

### 4. Northern blotting

Vascular endothelial cell growth factor(VEGF)와 basic fibroblast growth factor(bFGF) mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 역전사 증합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)으로 VEGF와 bFGF 유전자(gene)를 제작하였다. 5 µg의 RNA 견본(sample)을 주형으로 42°C 에서 50분간 역전사를 시행하였고, cDNA와 10 pmol의 특정 시발체(specific oligonucleotide primer), 200 µM dNTP, 그리고 0.5 U의 Taq DNA polymerase (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 증합효소 연쇄반응을 시행하였다. 증합효소 연쇄반응은 automated thermal cycler (Perkin Elmer, USA)에서 94°C 에서 30초간 변성, 58°C 에서 30초간 가열냉각, 그리고 72°C 에서 60초간 연장을 주기로 30회 시행하였다. VEGF와 bFGF의 시발체(oligonucleotide primer)의 염기배열은 기존에 발표된 논문<sup>23)</sup>에서와 같이 동일하게 사용하였으며, 5'-CGCGGATCCCTTTC-TGCTGTCTTGGGTGC-3' 및 5'-CGGAATTCCT GTAGGAAGCT-CATCTCTC-3' (384 bp fragments)를 VEGF에 대해 사용하였으며, 5'-GAGTGTGTGCTAACCGTTA-3' 및 5'-TAGCTTTCT-GCCCAGGTCCT-3' (211 bp fragments)를 bFGF에 대해 사용하였다.

PCR 산물은 PCR product purification kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 정제하였다. 획득한 cDNA는 PCR II -TOPO TA vector(Invitrogene, USA)에 삽입하였다. ABI Prism Genetic Analyzer(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 sequencing reaction을 시행하였다. DIG-high prime kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용한 random priming 방법으로 4µl의 labeling mixture와 1µg의 PCR 산물을 22시간 동안 부란하여 표지하였다. 이와 같이 확정된 fragments를 northern blot analysis의 probe로 이용하였다.

HSC-3 세포주에 genistein을 10 µM 의 농도로 투여한 실험군

및 HSC-3세포주의 대조군에서 TRI reagent (Molecular Research Center, USA)를 이용하여 총 리보핵산(total cellular RNA)을 추출하였다. 변성 후에 RNA sample 10 µg을 1% agarose - 2.2 M formaldehyde 겔에 적용하여 전기영동하였다. 20x standard saline citrate (SSC)에서 겔을 nylon 막 (nylon membrane: Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, UK)에 capillary blotting 시켰으며, 자외선(UV) 하에서 교차결합시켰다. Nylon 막을 50%(v/v) deionized formaldehyde와 4x SSC의 prehybridization buffer에서 65°C에서 1시간동안 전처리 후, DIG로 표지된 probe(DIG-labeled probes)와 함께 동일 buffer에서 65°C로 하룻밤 동안 hybridization을 시행하였다. 보합종료 후 nylon 막은 2x SSC와 1x SSC로 2회 세척하였다. DIG-detection을 위해, sheep anti-DIG-AP(Fab fragment)와 CSPD® (Boehringer Mannheim, Germany)를 적용하고, 어둡고 습한 상자에서 2시간 동안 부란하였다.

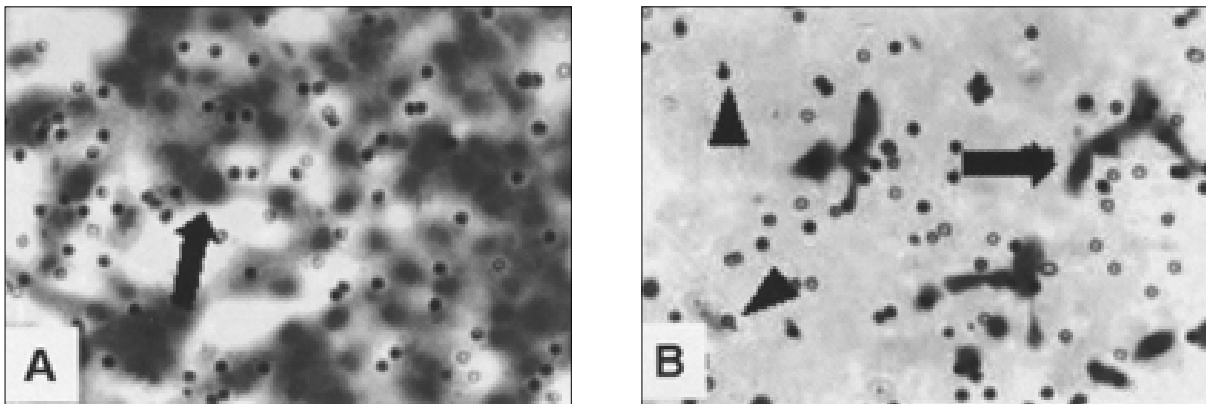
Chemiluminescence의 감지는 Kodak BioMax MS film(Kodak, Japan)과 intensifying screen을 이용하여 상온에서 2 내지 4 시간동안 시행하였다. 동일한 조건으로 β-actin mRNA에 대해 northern blotting을 시행하여 VEGF와 bFGF의 신호(signals)를 β-actin signal level로 보정하였다.

### 5. 통계분석

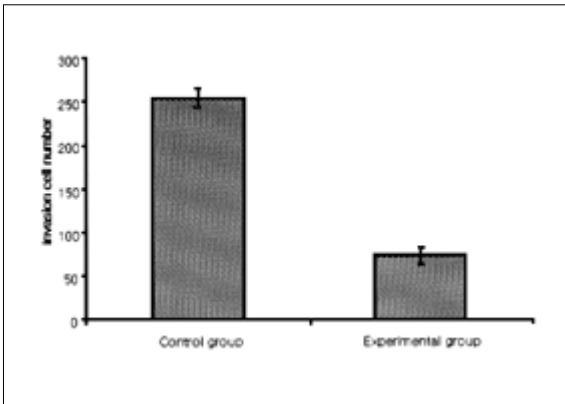
모든 실험은 최소한 3회 이상 반복하였으며, 실험군 및 대조군 간의 통계적 유의성은 Mann-Whitney U test를 이용하여 유의수준 95%로 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. *in vitro* invasion assay



**Fig. 1.** The anti-invasive effect of genistein on HSC-3 cells in *in vitro* invasion assay. A(control group, x200) and B(genistein treated group, x200) show the significant decrease of *in vitro* invasion in the genistein treated group (arrow: penetrating cells, arrow head: 8(m pore in the culture insert).

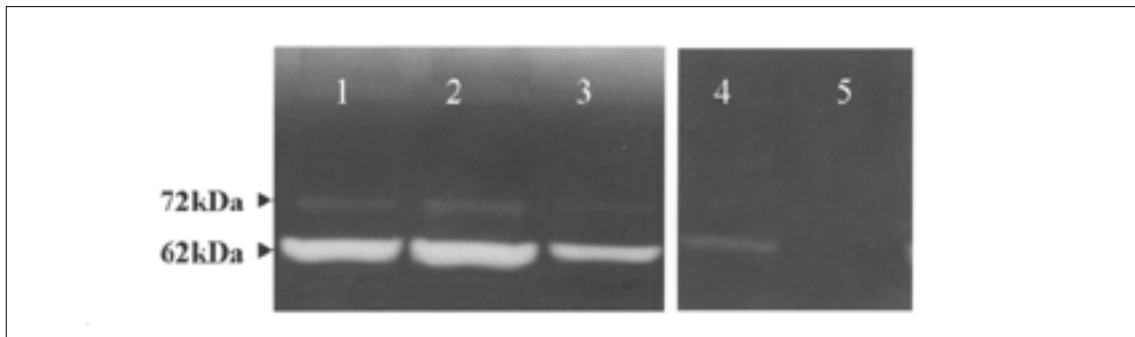


**Fig. 2.** The anti-invasive effect of genistein on HSC-3 cells in *in vitro* invasion assay. Genistein reduced cellular invasion through the artificial basement membrane significantly ( $p < 0.05$ ). Each error bar represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  using Mann-Whitney U test.

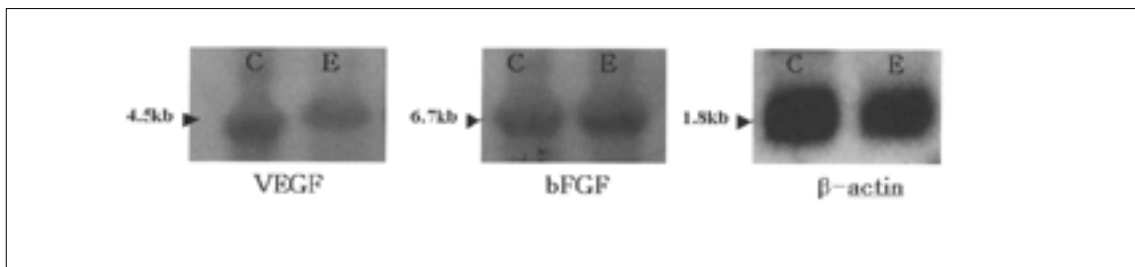
**Table 1.** The effect of genistein on the gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in gelatin zymography.

	Mean gelatinolytic activity (units/(g))		
	Control group	76.1 $\pm$ 9.7	69.5 $\pm$ 8.4
Genistein treated group	68.4 $\pm$ 12.1	38.9 $\pm$ 10.7*	107.3 $\pm$ 22.2*

\* significantly lower than the control group ( $p < 0.05$ )



**Fig. 3.** The effect of genistein on the gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in gelatin zymography. Gelatin zymography shows markedly reduced gelatinolytic activity in genistein treated group. Lane 1: positive control (HT1080) Lane 2: control group Lane 3: genistein treated experimental group Lane 4: normal oral mucosal fibroblast Lane 5: negative control



**Fig. 4.** The inhibition effect of genistein on VEGF mRNA expression in northern hybridization analysis. Note that the mRNA(4.5kb) corresponding to VEGF was significantly reduced in the genistein treated group. In bFGF mRNA(6.7kb), no significant difference was detected between the groups. No densitometric difference among loading lanes was seen for the signal of the 1.8kb  $\beta$ -actin mRNA. C: control group E: genistein treated experimental group

in vitro invasion assay에서 genistein을 투여한 실험군은 인공 기저막에 대한 세포수준의 침습이 감소하였다(Fig. 1). Genistein 투여군에서 침습세포가  $72.3 \pm 8.7$ 개에 비하여, 대조군에서는 침습 세포가  $253.7 \pm 10.4$ 개로 나타났다( $p < 0.05$ )(Fig. 2).

## 2. Gelatin zymography

MMP-2의 비활성 상태 및 활성 상태는 각각 72 kDa과 62 Kda의 위치에서 관찰되었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군의 젤라틴용해능은 정상 점막 섬유아세포군의 젤라틴용해능 보다 높았다. MMP-2의 용해능은 대조군과 genistein 투여군 사이에 유의한 차이를 보였다. Genistein 투여군의 총 용해능은  $107.3 \pm 22.2$  U였으며, 대조군의 총 용해능은  $145.6 \pm 16.7$  U로 나타났다( $p < 0.05$ ). 72 kDa인 MMP-2의 비활성 상태에서 두 군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 62 kDa인 MMP-2의 활성 상태에서는 대조군이 genistein 투여군에 비해 1.8 배 높게 나타났다( $p < 0.05$ )(Table 1).

## 3. Northern blotting

Northern blot analysis의 결과, VEGF mRNA의 발현은 genistein 투여군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 4). Densitometric analysis의 결과, VEGF에 관련된 4.5 kb mRNA가 genistein 투여군에서 3.5 배 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 이와 다르게, bFGF의 densitometric analysis에서는 두 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ).  $\beta$ -actin mRNA는 두 군 모두에서 정상적으로 관찰되었다.

## IV. 고 찰

아시아인이 미국인에 비하여 20 내지 50 배의 콩을 섭취한다는 점과 아시아인이 미국인에 비하여 유방암, 대장암, 또는 전립선암의 발생빈도가 낮다는 점에 착안하여, genistein에 대한 많은 연구가 시행되었으며, genistein 이 강력한 tyrosine kinase inhibitor로, 암 예방효과를 갖는다는 점이 밝혀져 있다<sup>24-26</sup>. 최근에는 genistein이 몇 종의 암종에 대해 암 화학예방효과(chemopreventive effect) 뿐만 아니라, 신생혈관화 억제효과(anti-angiogenic effect) 및 전이 억제효과(anti-metastatic effect)를 갖는, 잠재력이 큰 항암치료약제라는 주장이 제기되었다<sup>27,28</sup>. 현재까지 정확한 생물학적 기전이 규명되지는 않았으나, genistein이 실험상 전립선암과 방광암의 성장을 종양세포에 대한 직접 효과와 중앙 신생혈관화에 대한 간접효과로 억제한다고 보고되었다<sup>29,30</sup>. 다른 암종의 경우와 동일하게, 암종의 성장과 MMP-2에 의한 국소 침습, 그리고 신생혈관화가 구강 편평세포암종의 예후를 결정하는 주된 인자로 알려져 있다. 이러한 사실들을 바탕으로 genistein의 구강암에 대한 항암 예방효과<sup>31</sup> 및 구강암에서의 혈관형성 억제작용<sup>30</sup> 등에 대한 동물

실험연구가 있었으며, genistein이 인간 섬유세포종 세포주인 HT-1080에서 종양세포의 증식을 억제하고 MT1-MMP(MMP-14) mRNA의 발현을 감소시켜 중앙의 증식과 전이를 억제하는 효과가 있다는 보고도 있었다<sup>35</sup>.

본 연구에서는 genistein이 구강 편평세포암종 세포주 HSC-3에 대해서도 항암효과를 갖는지 평가하기 위하여, in vitro invasion assay, gelatin zymography 및 Northern blot analysis를 시행하였다.

in vitro invasion assay에서, genistein은 인공 기저막(artificial basement membrane: Matrigel<sup>®</sup>)에 대한 세포수준의 침습을 크게 억제하였다. 또한, gelatin zymography에서도 genistein을 투여한 군과 그렇지 않은 군 사이에는 젤라틴 용해능(gelatinolytic activity)에 유의한 차이가 관찰되었다. 72 Kda의 MMP-2 비활성 상태에서는 두 군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 62 kDa의 MMP-2 활성 상태에서는 genistein을 투여한 군이 훨씬 낮은 젤라틴 용해능을 보였다. 현재까지 정확한 생물학적 기전이 규명되지는 않았으나, 이러한 결과들은 genistein이 침습 억제효과(anti-invasive activity)를 가지고 있으며, 젤라틴 용해능의 억제가 세포외(extracellular)에서 MMP-2의 분비 이후(post-secretory)에 일어남을 의미하였다.

고형 암종(solid tumors)의 성장과 전이에는 신생혈관화(angiogenesis)의 역할이 중요하며<sup>3,10</sup>, 구강편평세포암종의 경우에도 암종의 혈류분포와 진행 사이에 밀접한 관계가 있음이 보고되었다<sup>31,32</sup>. 구강 편평세포암종의 성장과 신생혈관화에 대한 genistein의 효과를 평가하기 위해, 대표적인 신생혈관화 인자인 VEGF와 bFGF의 mRNA 발현에 대해 northern blot analysis를 시행한 결과, VEGF mRNA의 발현은 genistein 투여군에서 대조군 보다 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 tyrosine kinase pathway가 구강 편평세포암종의 신생혈관화를 조절하는 역할이 있음을 시사하였다.

본 실험에서 genistein 투여군은 10  $\mu$ M의 genistein 농도로 24시간 동안 부란하였는데, genistein이 여러 종류의 정상세포와 종양세포 세포주에 대해 10 내지 45  $\mu$ M의 농도에서 half-maximal concentration을 보인다는 보고가 있었다<sup>36</sup>. 또한 genistein이 저밀도의 증식 내피세포(proliferating endothelial cells) 배양시에 25  $\mu$ M 이하의 농도에서 성장정지(growth arrest)의 소견을 보이며, 25  $\mu$ M 이상의 농도에서는 세포사(cell death)의 소견을 보이며, 따라서 genistein이 약 25  $\mu$ M 이하의 농도에서는 cytostatic하며 그 이상의 농도에서는 cytotoxic하지만, 이와 다르게 정지 내피세포(quiescent endothelial cells)에서는 genistein이 100  $\mu$ M의 농도에서도 세포 독성이 나타나지 않았다는 보고도 있었다<sup>37</sup>. 이러한 사실들을 바탕으로, genistein을 항암제제로 사용하는 경우에 다른 경우에 비하여 부작용이 적을 것으로 예상할 수 있으며, 이는 본 실험에서 사용된 genistein의 농도 10  $\mu$ M에도 적용할 수 있다. 이러한 점은 genistein을 치료 목적으로 사용할 수 있는지를 고려할 때 중요하다 하겠다.

Genistein은 구강 편평세포암종에 대한 시험관내 실험에서 VEGF mRNA의 발현을 억제하고 젤라틴 용해능을 감소시키는 항암효과를 보였다. 이상과 같은 사실만으로는 genistein을 구강 편평세포암종에 대한 단일한 항암치료 수단으로 인정하기는 어려우나, 적어도 genistein을 구강 편평세포암종에 대한 부가 치료수단(adjunct treatment modality)이나 병용요법 제제(combination therapy agent)로 이용할 수 있는 가능성을 확인하였기에, genistein의 구강 편평세포암종에 대한 항암효과에 대해 생체내 실험을 포함하는 추가적인 연구가 요망된다.

## V. 결 론

Genistein은 구강 편평세포암종 세포주인 HSC-3에 대한 시험관내 실험에서 인공 기저막에 대한 세포 수준의 침습을 억제하였고, MMP-2의 젤라틴용해능, 특히 활성 상태의 젤라틴 용해능을 저하시켰으며, VEGF mRNA의 발현을 억제하였다. 본 실험의 결과만으로 genistein이 구강 편평세포암종에 대한 항암약제로서 유용하다 할 수는 없으나, genistein이 구강 편평세포암종에 대해 신생혈관화 억제효과와 젤라틴 용해능 억제 효과, 즉 침습 억제효과를 통해 항암효과가 있는 것으로 사료되었다.

## 참고문헌

1. Spiro RH, Alfonso AE, Farr HW, Strong EW: Cervical node metastasis from epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. A critical assessment of current staging. *Am J Surg* 1974;128: 562-567.
2. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH et al: Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887.
3. Fox SB: Tumor angiogenesis and prognosis. *Histopathol* 1997; 30:294-301.
4. Nagase H, Wossner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
5. Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103:1237-1241.
6. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM: Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999;35:227-233.
7. Folkman J: Introduction: Angiogenesis and cancer. *Semin Cancer Biol* 1992;3:47-48.
8. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-10934.
9. Gasparini G, Harris AL: Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995;13:765-782.
10. Battegay: Angiogenesis: mechanic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995;73:333-346.
11. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI: Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111:417-422.
12. Barinaga M: Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science*. 1997;275:482-484.
13. Coleman KR, Braden GA, Willingham MC, Sane DC: Sane, Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (alpha $\nu$ beta3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterlemic rabbits. *Circ Res* 1999;84:1268-1276.
14. Matsumoto K, Ninomiya Y, Inoue M, Tomioka T: Intra-tumor injection of an angiogenesis inhibitor, TNP-470, in rabbits bearing VX2 carcinoma of the tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999;28:118-124.
15. Ueda N, Kamata N, Hayashi E, Yokoyama K, Hoteiya T, Nagayama M: Effects of an anti-angiogenic agent, TNP-470, on the growth of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999;35:554-560.
16. Giavazzi R, Albini A, Bussolino F, DeBraud F, Presta M, Ziche M et al: The biological basis for antiangiogenic therapy. *Eur J Cancer* 2000;36:1913-1918.
17. Fotsis T, Pepper M S, Montesano R, Aktas E, Breit S, Schweigerer L et al: Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12:649-666.
18. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L: Genistein, a dietary ingestional isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 1995;125:790-797.
19. Cai Q, Wei H: Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer* 1996;25:1-7.
20. Zhou Y, Lee AS: Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:381-388.
21. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH: Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Research* 1998;18:1435-1440.
22. Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinoma with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36:207-213.
23. Furumatsu T, Nishida K, Kawai A, Namba M, Inoue H, Ninomiya Y: Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth. *Int J Cancer* 2002;97:313-322.
24. Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S: Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 1994;21:113-131.