

## HT1080 세포주에서 naringenin의 MMP-2, -9 효소 활성 및 발현 억제 효과

채 수 철\*

전남대학교 생물학과

### Inhibitory Effect of Naringenin on MMP-2, -9 Activity and Expression in HT-1080 Cells

Soo-Chul Chae\*

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

#### ABSTRACT

Naringenin, major one of the citrus flavonoids, have been identified that exert antioxidative, anticancer effects. The present study investigated the effects of naringenin on tumor invasion and matrix metalloproteinases (MMPs) activities. Naringenin inhibited cell invasion of HT-1080 fibrosarcoma cells in a dose-dependent manner. The activities of MMP-2 and MMP-9 were inhibited by naringenin as demonstrated by gelatin zymography assay. Furthermore, the amounts of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP mRNA were analyzed in the cells. MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP mRNA expression were suppressed by naringenin with time and dose-dependent. These results demonstrate that anti-metastatic activities of naringenin resulted from blocking of invasion of the HT-1080 cells. Taken together, the results of this studies provide evidence that naringenin possess an anti-metastatic activity.

**Key words :** naringenin, MMP-2, MMP-9

#### 서 론

종양 세포와 기저막간의 상호작용은 암전이를 개시하는 침윤의 주요한 단계이다. 기저막은 콜라겐, 라민 등의 물질로 구성된다. 종양 세포의 침윤은 종양세포가 기저막에 부착하고, 기저막에 단백질 가수분해로 인한 간격을 형성하고, 이 간격으로 종양 세포가 이동하는 세 가지 단계를 거쳐 이루어진다(Lamszus *et al.*, 2003). 이 때 matrix metalloproteinases (MMPs)와 같은 기질분해효소가 종양 세포의 침윤과 원발 병소 부위로부터 전이하는데 있어서 중요한 역할을 한다(Liao *et al.*, 2003). 특히 MMP-2와 MMP-9는 기저막의 분해에 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Stetler-Stevenson, 1990). 따라서 MMP-2와 MMP-9을 억제하는 것이 암 세포의 침윤을 매개하는 세포외기질의 파괴를 막기 위해 필수적이라고 할 수 있다.

최근 종양 단백질분해효소 발현의 변화를 연구함으로써 종양 세포의 생물학적 특징 및 예후 추측에 관한 연구가 시도되고 있다. 특히 MMPs는

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-62-530-3395, Fax: +82-62-530-3309  
E-mail: soochul@jnu.ac.kr

중양의 침윤과 전이 과정 중에서 중요한 역할을 하며, 이들의 억제인자인 tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs)는 MMPs에 의한 기저막 파괴 및 세포외기질 분해 작용을 조절한다(Curry *et al.*, 2001). 특히 MMP-2 및 MMP-9는 기저막의 중요한 구성 성분인 gelatin을 분해하고 신생혈관 형성에도 관여하여 중양의 침윤을 유도하는 것으로 알려져 있다(Duffy *et al.*, 2000).

현재 생활환경 속에는 많은 발암물질들이 존재하는데 이러한 발암물질이 악성세포로 변화하는 것을 억제시키는 물질을 찾는 연구가 최근 많이 이루어지고 있다. 이러한 범주에 속하는 것으로는 암유전자활성 억제제, 분열억제제 등이 있는데 현재 사용하고 있는 약물 등은 부작용의 우려가 있으므로 자연계에 존재하는 성분 중에서 이러한 효과를 가지는 플라보노이드 계열의 천연 물질에 대한 연구에 초점이 맞추어지고 있다.

최근 들어 다양한 생리 활성을 지님으로 각광받고 있는 naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon)은 노란색의 결정형 분말로 naringin이 생체에서 흡수된 후 신속히 대사되어 naringenin으로 변한다(Ameer *et al.*, 1996). 플라보노이드의 일종인 플라바논(flavonone) 무배당체로서 벤젠 고리를 2개 가지고 있으며 포도와 오렌지, 유자 등의 감귤류에 많이 들어 있다. Naringenin은 cytochrome P450 효소들을 억제하며(Doostdar *et al.*, 2000; Dupuy *et al.*, 2003), 항증식(Ruh *et al.*, 1995), 항산화제(Van Acker *et al.*, 2000) 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), 췌장암과 위암, 간암 세포의 악성세포의 성장을 중지시키는 작용과 발암 물질에 의해 손상되어진 세포를 보호하는 항암작용을 하며(Kanno *et al.*, 2005) 암 세포에서 손상된 DNA를 복구하는데 도움을 주며 사람의 전립선암 세포주에 DNA 복구 효과가 있다고 보고되고 있다(Gao *et al.*, 2006). 그러나 암 전이와 관련된 MMP-2, -9 발현과 조절기전에 대한 연구는 아직 보고되지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 naringenin이 MMPs 활성화와 침윤능이 높은 인체 섬유육종 세포주인 HT1080에서 세포의 증식과 사멸, 전이 과정인 침윤성과 침윤시 분비되는 단백질분해효소인 MMPs와 억제유전자인 TIMPs의 효소 활성과 유전자 발현에 미

치는 영향을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

본 실험에 사용된 세포는 인체 섬유육종 세포(human fibrosarcoma cell : HT-1080)로 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 세포주 배양용 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM : GibcoBRL, NY, USA) 배양액에 10%의 fetal bovine serum (FBS : GibcoBRL)과 3  $\mu$ L/mL의 fungizone (GibcoBRL) 및 10  $\mu$ L/mL의 antibiotics (GibcoBRL)를 첨가해 사용하였다. 세포 배양은 75 cm<sup>2</sup>의 배양용 flask (Corning Inc, Corning, NY, USA)에 일정량의 배양액을 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA로 부유 시킨 후 혈구계산기로 세포수를 산정하였다. 세포독성시험은 배양된 세포를 96 well plate에 5  $\times$  10<sup>3</sup> cells/well이 되도록 세포 부유액을 200  $\mu$ L씩 분주하여 배양한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 세포독성 측정

MTT assay는 Mosmann (1983) 방법에 따라 시행하였다. HT1080 세포를 5  $\times$  10<sup>3</sup> cells/mL 세포 수로 계수한 다음 24 well plate (Corning)에 200  $\mu$ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하고 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도의 naringenin (1  $\mu$ L, 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO : Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA))이 포함된 배양액으로 교환하고 24시간 추가 배양하였다. 배양액을 MTT 200  $\mu$ g/mL가 포함된 배양액으로 교환하고 3시간 반응시켰다. 3시간 후 배양액을 버리고 DMSO를 200  $\mu$ L/well씩을 넣어 5분간 실온 방치하여 푸른색 결정인 formazan을 용해시킨 후 분광광도계(microplate spectrophotometer : Bio-Rad, California, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) release activity는 세포막 손상에 따라 배지로 유출된 LDH량을 측정하여 세포독성을 확인하는 방법으로 LDH Kit (Wako Pure, Osaka, Japan)을 이용하였다. HT1080 세포주를 각

각  $5 \times 10^3$  cells/mL가 되도록 24 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 이들 세포를 여러 농도의 naringenin이 포함된 배양액에서 24시간 배양하였다. 기질액과 정색시약은 동량으로 혼합하여 미리 상온에서 5분간 방치한 후  $40 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 처리하고 다시 상온에서 10분간 방치하였다. 그 후 반응 정지액을  $120 \mu\text{L}/\text{well}$ 씩 처리하여 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 3. 세포의 침윤능 측정

*In vitro* invasion assay는 Moon and Kim (2000)의 방법으로 시행하였다. 6.5 mm 직경의  $8 \mu\text{m}$  pores를 가진 polycarbonate filter를 내장한 trans-well culture chamber (Corning)를 이용하여 HT1080 세포의 침윤능을 검사하였다. 침윤능 측정을 위하여 필터 위에  $10 \mu\text{L}$ 의 matrigel을 도포 시킨 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 반응시켜 코팅 되도록 한 후 세포부유액  $200 \mu\text{L}$  ( $5 \times 10^4$  cells)을 upper chamber에 넣고 lower chamber에는 serum이 함유되지 않은 DMEM을 넣은 후 naringenin을 chamber에 처리하고 24시간 배양시켰다. 배양을 끝낸 후 upper chamber의 matrigel을 통과하지 못한 세포를 면봉으로 닦아내고 통과된 세포를 0.25% crystal violet (Sigma)으로 10분 동안 염색하였다. Xylen (Merck, Darmstadt, Germany)에 넣어서 불순물을 제거하고 슬라이드 글라스에 놓고 histomount를 한 방울 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮어서 필터를 통과하여 필터 하방에 붙어있는 세포수를 200 배율의 현미경 (TS-100: Nikon, Tokyo, Japan)으로 사진 촬영하였다.

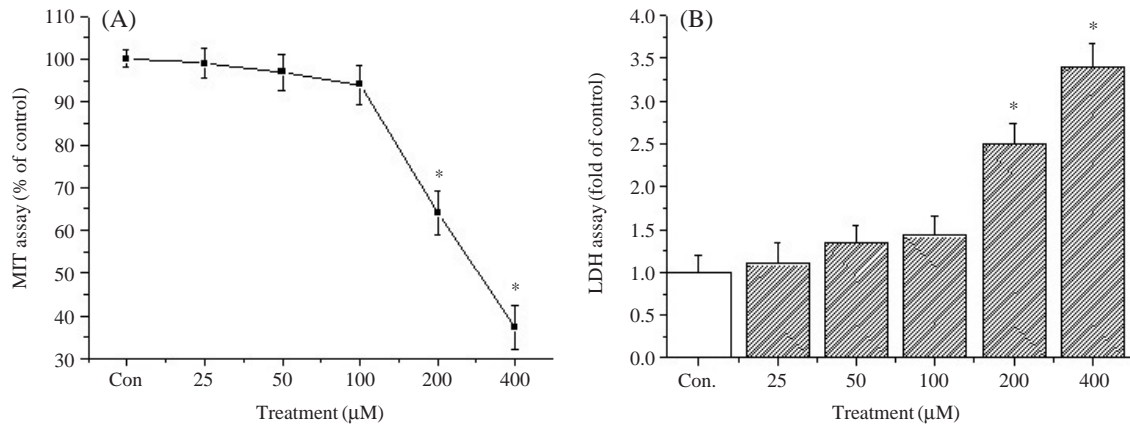
### 4. MMP-9, -2 효소 활성화 측정

6 well plate에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 이용하여 세포를  $1 \times 10^6$  cells/well의 농도로 24시간 동안 부착시킨 후 FBS가 없는 무혈청 배양액으로 갈아준 다음 naringenin을 처리하였다. 24시간 후 무혈청 배양액을 효소액으로 하여 1 mg/mL의 gelatin이 함유된 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용하여 전기영동 하였다. 상온에서 120 V로 2시간 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  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 7.9)에 18시간 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 반응시켜 기질분해를 유도하였다. Gel을 0.25% Coomassie brilliant blue G (Richmond, CA, USA) 용액으로 1시간 염색하고 5% methanol과 8% acetic acid로 탈색하면, 전체적인 background는 푸른색이고 분해된 부분은 흰색 band로 나타난다.

### 5. 유전자 발현 측정

HT1080 세포를  $5 \times 10^4$  cells/mL 이 되도록 10% FBS가 함유된 DMEM으로 희석하여 100 mm dish에 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 90% 이상 차도록 배양하였다. 배양된 세포를 phosphate buffer saline (PBS)로 2회 세척하고 serum이 함유되지 않은 DMEM과 naringenin을 넣어 24시간 동안 다시 배양하였다. 각 dish를 PBS로 2회 세척하고 TRIzol reagent™ (Sigma-Aldrich Chemical)를 1 mL씩 처리하여 세포를 lysis 시킨 다음 chloroform을 100 mL 처리하여 세포 내의 RNA를 분리하였다. 그 다음 isopropanol을 처리하여 RNA를 침전시키고 75% 에탄올로 세척해 준 다음, 가라앉은 RNA pellet을 nuclease-free water에 녹였다. 역전사 반응은 avian myeloblastosis virus (AMV)의 역전사효소 (Promega, Madison, WI, USA) 및 oligo dT primer (Promega)를 이용하여  $42^\circ\text{C}$ 에서 60분간 반응 후  $99^\circ\text{C}$ 에서 5분간 가열하였다. 생성된 cDNA ( $10\text{-}50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )를 이용하여 표적 유전자에 선택적인 primer ( $10 \text{ pmol}$ ) 및 Taq polymerase ( $5 \text{ Units}/\mu\text{L}$ ; Promega)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR: Corbett Research, Sydney, Australia)을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 primer들의 염기서열은 MMP-2 (5'-GTGCTGAGGACACACTAAAGA-3', 3'-GGATGTTGAACTCTTCCTACC-5'); MMP-9 (5'-CACTGTCCACCCTCAGAGC-3', 3'-GGAATAGCGGCTGTTCACCG-5'); TIMP-1 (5'-TGCACCTGTGTCCCACCACCC-3', 3'-TGGACCGTCAGGGACGCCAGGGT-5'); TIMP-2 (5'-CCGAATTCTGCAGCTGCTCCCCGGTG-3', 3'-GAGCTGTAGCTCCTGGGTATT-5'); MT1-MMP (5'-CGCTACGCCATCCAGGTCTC-3', 3'-ACACGACGGGCTACTACTGGC-5'); GAPDH (5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3', 3'-CCAGTAGGTACTGTTGAA-5')를 합성하였다. PCR 반응 조건은 cycle 시작 전  $94^\circ\text{C}$ 에서 5분



**Fig. 1.** Effect of naringenin on cytotoxicity of HT-1080 cells. The cells ( $5 \times 10^3$  cells/mL) were plated in a 24-well plate with DMEM supplemented with 10% FBS and various concentrations of naringenin (25, 50, 100, 200 or 400  $\mu$ M) were treated for 24 h. Cell viability were estimated by the MTT assay (A), LDH activity (B). 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. \*Significantly different from control at  $p < 0.05$ .

간 가열한 뒤 매 cycle마다 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 과정을 25회 반복하였다. PCR 반응이 끝난 후에는 증폭된 DNA를 1.2% agarose gel을 이용하여 90 V에서 45분 동안 전기영동하였고 10,000배 희석한 SYBR Gold staining solution (Perkin Elmer, Massachusetts, USA)으로 1시간 동안 염색한 다음 Alpha Imager™ (Alpha Innotech Corp, CA, USA)을 이용하여 염색된 DNA를 확인하였다.

## 6. 통계분석

실험 결과의 유의성 검증은 Tukey-Kramer test 방법에 따라 실시하였으며,  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험은 3회 이상 실시한 실험 결과를 토대로 분석하였다.

## 결 과

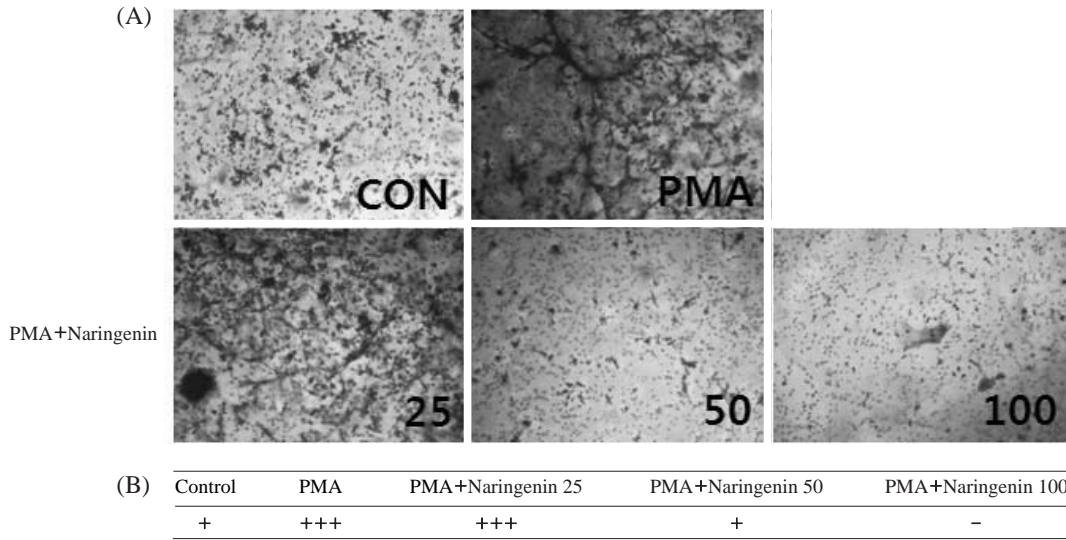
### 1. 세포독성 평가

Naringenin이 암세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고, 세포 사멸로 인해 침윤에 영향을 미치지 않도록 실험 조건을 정하기 위해 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도로 첨가하여 24시간 배양 후

MTT assay에 의해 세포 독성 실험을 하였다. 그 결과, naringenin을 HT1080세포에 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도로 24 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 처리하여 대조군과 비교한 결과 100  $\mu$ M 이하의 naringenin 농도에서는 약 90%의 높은 세포 생존율을 보였고, 200  $\mu$ M에서는 64%의 세포 생존율을, 400  $\mu$ M에서는 37%의 세포 생존율을 나타냈다. 이 결과를 통해 naringenin의 처리 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소되었다. 따라서 이후 실험에서는 세포독성에 영향을 미치지 않는 25, 50, 100  $\mu$ M 농도의 naringenin을 처리하여 실험하였다(Fig. 1A). 또한 naringenin을 HT1080 세포주에 25, 50, 100, 200, 400  $\mu$ M 농도로 첨가하여 24시간 배양 후 유출된 LDH량에 의해 세포 증식 실험을 평가해 보았다. 그 결과, 25, 50, 100  $\mu$ M의 naringenin 농도에서는 LDH 유출정도가 대조군과 유사하였으나, 200  $\mu$ M의 naringenin 농도에서는 LDH 유출량이 2.4배로 유의적으로 증가되었고, 400  $\mu$ M의 naringenin 농도에서는 LDH 유출량이 3.4배로 농도 의존적으로 증가되었다(Fig. 1B).

### 2. 세포의 침윤능 측정

HT1080 세포를 trans-well culture chamber에 25, 50, 100  $\mu$ M의 naringenin을 처리하고 24시간 후에 matrigel을 도포한 필터를 통해 이동한 세포를 관



**Fig. 2.** Effects of naringenin on invasion of HT-1080 cells. The cells ( $5 \times 10^4$  cells) were cultured in the presence of various concentrations of naringenin (25, 50 or 100  $\mu\text{M}$ ) for 24 h and treated with 100 nM PMA within a matrigel invasion chamber. After 24 h, cells on the bottom side of the filter were fixed with methanol and stained with crystal violet. Cell invasion was observed with light microscope (A). Quantitative analysis of the invasion assay are shown (B).

찰하였다. 그 결과, 종양 촉진제인 phorbol myristate acetate (PMA) 100 nM 단독 처리한 군에서는 암세포의 침윤율이 증가된 것에 반하여 naringenin 처리 농도에 의해 암세포의 침윤율이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

### 3. MMP-2, -9 효소 활성도 측정

Naringenin이 MMP-2, -9 효소 활성이 있는지 PMA로 종양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-2, -9 활성을 억제되는지를 gelatin zymography를 이용해 확인해 보았다. 그 결과, PMA 처리군에서는 많은 양의 MMP-2, -9 효소의 활성이 나타남을 관찰할 수 있으며 24시간 동안 naringenin 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 로 처리한 결과 MMP-2, -9 효소의 활성은 농도의존적인 저해 활성을 보였으며 특히 MMP-9 효소의 활성을 강하게 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

### 4. MMP-2, -9과 MT1-MMP 및 TIMP-1, -2의 유전자 발현 측정

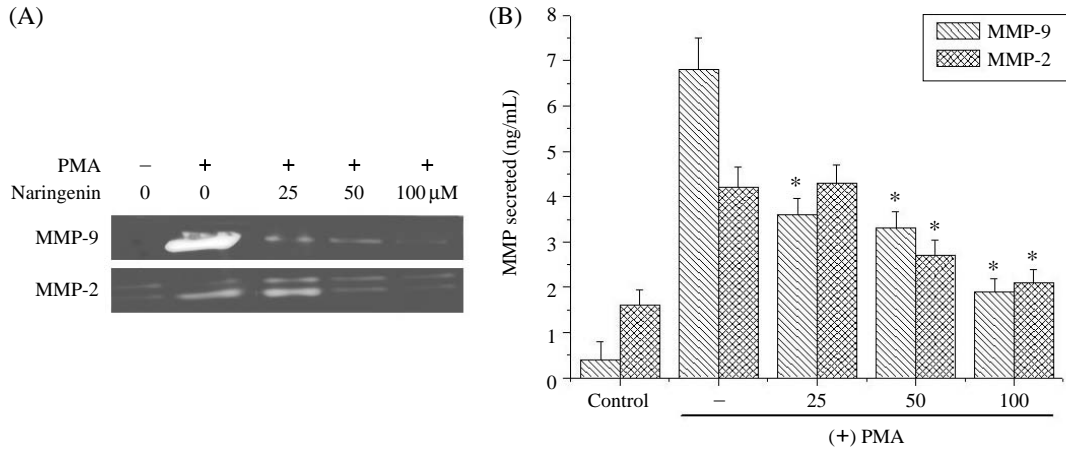
Naringenin에 의해 MMP-2, -9 효소의 활성을 억제하였는데 naringenin이 MMPs와 TIMPs 유전자

발현에 저해 활성이 있는지 PMA로 종양을 촉진시켜 상승 발현된 MMP-2, -9, MT1-MMP, TIMP-1, -2 활성을 억제하는지 알아보았다. 그 결과, naringenin의 처리농도가 증가함에 따라 MMP-2, -9, MT1-MMP의 발현이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 25  $\mu\text{M}$  이상에서 MMP-2, -9, MT1-MMP의 발현이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 MMP-2, -9의 내인성 저해제인 TIMP-1, -2의 발현이 PMA에 의해 증가되었으나 naringenin의 처리에 따른 변화는 없는 것으로 나타났다(Fig. 4).

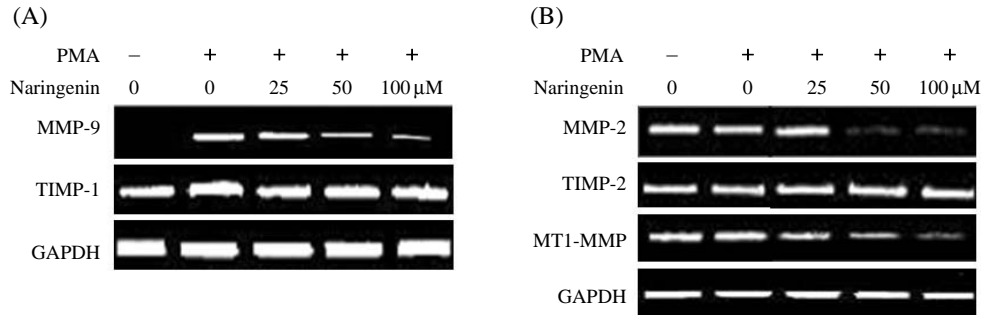
## 고 찰

본 연구에서는 HT1080 세포에서 naringenin을 이용하여 MMP-2, -9와 MT1-MMP 및 TIMP-1, -2의 유전자 발현 정도를 연구함으로써 이들의 발현 저해가 암의 전이억제와 관련됨을 밝히고 이들 발현의 상호 작용을 규명하고자 하였으며 또한 여러 가지 bioassay를 통하여 실제 암세포의 침윤성에 대한 억제효능을 평가하고자 하였다.

본 연구는 naringenin이 암세포 이동 관련 유전자에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 먼저, 세



**Fig. 3.** Effect of naringenin on activities of MMP-2 and MMP-9. HT-1080 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were treated with 25, 50 or 100  $\mu$ M concentration of naringenin for 24 h and treated with 100 nM PMA. Each conditioned media was collected, and then was analyzed for secretion MMP-2 (72 kDa) and MMP-9 (92 kDa) by gelatin zymography (A) and for MMP-2, -9 activities by ELISA assay (B). Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background. All experiments were taken to three independent experiments. \*Significantly different from control at  $p < 0.05$ .



**Fig. 4.** Effects of naringenin on expressions of MMP-2, -9, MT1-MMP and TIMP-1, -2. Analysis of MMP-9 and TIMP-1 (A), MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP (B) mRNA expression in HT-1080 cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) treated with 25, 50 or 100  $\mu$ M concentration of naringenin in the absence and presence of PMA (100 nM) using RT-PCR. After incubation for 24 h, cells were lysed, and total RNA (1  $\mu$ g) was used in the RT-PCR. PCR products were separated on a 1.2% agarose gel, stained with SYBR Gold, and visualized under UV illumination. GAPDH was used as an internal standard. All experiments were taken to three independent experiments.

포독성에 영향을 주지 않는 처리 범위를 정하기 위해 naringenin을 처리 후, 24시간 후에 100  $\mu$ M 이하 농도에서 HT1080 세포의 독성에 영향이 없음을 알 수 있었다. 이러한 암세포에 어떠한 영향도 미치지 않는 범위인 100  $\mu$ M 이하 농도에서 naringenin이 암세포인 HT1080 세포의 침윤성을 감소시켰다.

MMP-2, -9 효소 활성은 유전자 발현 및 효소의

활성화 정도에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Chambers and Matrisian, 1997). 먼저 PMA에 의해 유발된 MMP-2, -9의 효소 활성을 naringenin이 억제 시키는지 알아본 결과, naringenin의 처리농도의존적으로 MMP-2, -9의 효소의 활성은 저해됨을 확인하였다. 이러한 결과는 naringenin이 암세포주인 HT1080 세포에서 MMP-2, -9 효소 활성을 억제하는 데 효과가 있음을 확인하였다.

이러한 naringenin의 MMP-2, -9의 효소 활성 억제가 유전자 발현에 의해 억제되는지를 RT-PCR를 이용해 확인해 본 결과, naringenin 모두에서 MMP-2, -9 유전자 발현을 농도 의존적으로 저해효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

선행연구에서 암세포 전이에 MMPs와 TIMPs의 발현은 상호 조절되고, 이들의 불균형은 암세포 전이 현상에 중요한 영향을 미친다(Jiang *et al.*, 2002). 또한 MMP-2, -9과 TIMP-1, -2의 발현은 생체 실험과 세포수준의 실험에서 다르게 조절된다고 보고하였다(De Clerck, 1994). 본 실험에서도 MMP-9의 효소 활성이 TIMP-1에 의해 조절되는지 확인하기 위해 조사해 본 결과, naringenin이 처리 농도별로 MMP-9의 유전자 발현을 억제하는 효과를 나타내었으나, TIMP-1의 유전자 발현에서는 변화가 없었다. 이는 MMP-9의 효소 활성화는 유전자 발현의 감소에 의한 결과이며, TIMP-1에 의한 효소 활성도의 조절이 아님을 시사하였다.

MT-MMP는 세포표면에 존재하는 단백질분해효소로 세포표면에서 MT1-MMP가 TIMP-2와 결합한 후 TIMP-2가 proMMP-2에 결합하여 3차적인 복합체를 형성하고 MT1-MMP와 작용함으로써 proMMP-2의 propeptide domain이 분리되어 MMP-2로 활성화된다고 하였다(Zucker *et al.*, 1989). 따라서 암전이에 중요한 MMP-2의 활성화에 관여하는 MT1-MMP와 TIMP-2도 암 전이과정에서 중요한 역할을 한다. TIMP-2는 MMP-2의 내인성 저해제이지만 MMP-2와 TIMP-2의 비율에 따라 즉, 매우 적당량의 TIMP-2가 존재할 때 MMP-2를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Yoon *et al.*, 2002). 본 연구에서는 MMP-2, MT1-MMP 및 TIMP-2의 유전자 발현에 미치는 naringenin의 영향을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 MMP-2와 MT1-MMP는 유전자 발현을 억제했지만, TIMP-2의 유전자 발현에서는 변화가 없었다. 이는 MMP-2의 활성화는 TIMP-2에 의한 것이 아님을 시사하였다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, naringenin은 전이에 관여하는 인자인 MMP-2, -9 및 MT1-MMP의 발현을 저해함으로써 전이억제 효과를 나타낼 가능성을 보여주었다. 현재 임상적으로 사용되는 효과적인 전이 억제 약물이 부족한 실정이고 대부분이 생명을 위협하는 부작용을 가지고 있다. 따라서 naringenin을 이용한 암전이 억제 및 예방물질의

개발이 기대되며 향후 보다 폭넓은 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 요 약

Naringenin은 flavonoid 구조의 감귤류 과피에 다량 함유되어 있으며 항암 및 항산화 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고되었다. 이에 본 연구에서는 HT-1080 섬유육종세포의 침윤에 대한 영향을 조사하였다. 먼저 naringenin이 암세포의 침윤에 미치는 영향을 알아보기 위해 invasion assay를 한 결과, naringenin이 암세포의 침윤을 농도 의존적으로 억제시켰다. 암의 침윤에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 단백질분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성도를 측정하기 위해 gelatin zymography를 한 결과, naringenin이 MMP-9, -2의 효소 활성도를 농도 의존적으로 감소시켰다. 또한 MMP-9, -2, MT1-MMP의 유전자 발현에 대한 naringenin의 영향을 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법으로 조사한 결과, naringenin이 MMP-9, -2와 MT1-MMP의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 결론적으로 naringenin의 암전이 억제는 단백질분해효소인 MMPs의 mRNA 발현 및 효소 활성을 억제함으로써 암세포의 침윤을 저해함으로써 나타난 결과로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA and Rouseff RL, Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration, *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 34-40.
- Chambers AF and Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1260-1270.
- Curry JD, Glaser MC and Smith MT. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection and quantification of t(1;19)(E2A-PBX1) fusion genes associated with leukaemia, *Br J Haematol* 2001; 115: 826-830.
- De Clerck YA, Darville MI, Eeckhout Y and Rousseau GG. Characterization of the promoter of the gene encoding

- human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2), *Gene* 1994; 139: 185-191.
- Doostdar H, Burke MD and Mayer RT. Bioflavonoids: Selective substrated and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1, *Toxicology* 2000; 144: 31-38.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E and O'Higgins N. Metalloproteinases:role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis, *Breast Cancer Res* 2000; 2: 252-257.
- Dupuy J, Larrieu JF, Sutra A and Alvinerie M. Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: Quercetin, *Vet Parasitol* 2003; 112: 337-347.
- Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seeram NP, Xu A and Heber D. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells, *J Nutr Biochem* 2006; 17: 89-95.
- Jiang Y, Goldberg ID and Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer, *Oncogene* 2002; 21: 2245-2252.
- Kanno SI, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K and Ishikawa M. Inhibitory Effects of Naringenin on Tumor Growth in Human Cancer Cell Lines and Sarcoma S-180-Implanted Mice, *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 527-530.
- Kwon OS, Kim BY, Kim KA, Kim MS, Oh HC, Kim BS, Kim YH and Ahn JS. Effect of the Hesperetin and Naringenin on pp60<sup>v-src</sup>-induced NF- $\kappa$ B Activation, *Kor J Pharmacogn* 2004; 35: 244-249.
- Lamszus K, Kunkel P and Westphal M. Invasion as limitation to antiangiogenic glioma therapy, *Acta Neurochir Suppl* 2003; 88: 169-177.
- Liao HF, Chen YY, Liu JJ, Hsu ML, Shieh HJ, Liao HJ, Shieh CJ, Shiao MS and Chen YJ. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion and metastasis, *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7907-7912.
- Moon A and Kim MS. H-ras but not N-ras induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype, *Int J Cancer* 2000; 85: 176-181.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application of proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Ruh MF, Zacharewski T, Connor K, Howell J, Chen I and Sage S. Naringenin: A weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity, *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1485-1493.
- Stetler-Stevenson WG. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis, *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 289-303.
- Van Acker FA, Schouten O, Haenen GR, Van der Vijgh WJ and Bast A. Flavonoids can replace a-tocopherol as an antioxidant, *FEBS Lett* 2000; 473: 145-148.
- Yoon SO, Park SJ, Yoon SY, Yun CH and Chung AS. Sustained production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway, *J Biol Chem* 2002; 277: 30271-30282.
- Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ and 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* 1998; 273: 1216-1222.