

Effect of Sulforaphane on LPS-Induced Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Expression

Jung Tae Lee, Kyung Jin Woo and Taeg Kyu Kwon*

Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldae-ro, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea

Received January 5, 2010 / Accepted February 22, 2010

Sulforaphane is a naturally occurring member of the isothiocyanate family, which reveals chemopreventive capacities including anti-cancer, anti-inflammation and inhibition of MMP-9 activities. In this study, we investigated the effect of sulforaphane on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in lipopolysaccharide (LPS)-induced Raw 264.7 cells. Sulforaphane strikingly suppressed the LPS-induced MMP-9 activity and mRNA expression in a dose-dependent manner. In addition, sulforaphane inhibited not only the LPS-induced MMP-9 promoter activity but also LPS-mediated activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) promoter activity. Transient transfection by MMP-9 constructs, in which specific transcriptional factors were mutagenized, indicated that the effects of LPS and sulforaphane were mediated via AP-1 and NF- κ B response elements. We found that sulforaphane had the ability to suppress LPS-induced invasion *in vitro*. Taken together, these results demonstrated that sulforaphane effectively suppressed LPS-induced MMP-9 expression via modulation of promoter elements (AP-1 and NF- κ B) in MMP-9 transcriptional activation.

Key words : Sulforaphane, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), lipopolysaccharide (LPS), nuclear factor- κ B (NF- κ B), Raw 264.7 cells

서 론

암세포의 전이는 세포의 이동, 부착, 침범 등 일련의 복잡한 과정을 통해 이루어진다. 이러한 과정 중, 초기 단계에서 일어나는 필수적인 현상이 바로 collagens, proteoglycans 및 당단백질 등의 구조 단백질로 구성된 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)의 분해이다[3]. Serine 단백질 분해효소, cysteine 단백질 분해효소, matrix metalloproteinases (MMPs) 등이 이에 관련되어 있으며, 특히 matrixins이라고도 불리는 MMPs는 collagen, fibronectin, laminin 등과 같은 ECM의 구성성분을 분해함으로써, 전이 뿐 만 아니라 암세포의 성장, 혈관생성에도 중요한 기능을 한다고 알려져 있다[11]. 현재 human MMPs로 20종류가 동정되어 있고, 분해 기질에 따라 네 분류로 나누어져 있다. Collagenases, gelatinases, stromelysins, membrane-associated MMPs [7]. Human MMPs 중, 기저막의 주요 성분인 type IV collagen을 분해하는데 중요한 역할을 하는 효소인 MMP-2와 MMP-9는 여러 종류의 암세포 전이 뿐 만 아니라 혈관생성에도 관여하고 있음이 밝혀져 있다[11]. 최근 breast, lung, colon, prostate 등의 조직에서 형성되는 종양에서 MMP-9의 과발현이 알려졌고[9,15], 이는 전이 또는 종양 형성 과정에서 MMP-9가 기능적으로 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. Human 암세포에서 MMP-9 발현 조절 기전은

아직 규명되지 않았지만, MMP-9의 프로모터에는 전사조절인자인 AP-1 (-533 bp, -71 bp), NF- κ B (-600 bp), Sp-1 (-588 bp)의 결합 부위가 존재하고, 이러한 전사조절인자들이 MMP-9 발현 조절에 관여한다고 알려져 있다[12].

Sulforaphane [1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane]은 십자화과 채소에 존재하는 isothiocyanate family에 속하는 화합물로서, detoxification에 관여하는 phase II enzyme을 활성화 시켜 세포내 항산화 능력을 촉진시킨다고 알려져 있다 [4]. 뿐만 아니라, sulforaphane은 세포사멸을 증가시키거나, 세포주기 진행의 억제, 항염증 반응 등의 효과가 관찰됨으로써, chemopreventive agent로 각광 받고 있다[6]. 최근 다양한 암 세포주에서 sulforaphane에 의한 암세포주의 invasion, 전이 및 MMPs 활성 억제 효과가 보고되어 지고 있지만[2,6,16], 명확한 기전을 밝혀지지 않고 있다.

본 연구에서는 대식세포에 LPS에 의해서 유도되는 MMP-9의 활성증가에 sulforaphane이 미치는 영향에 대해서 조사를 하였다. 아울러 sulforaphane에 의한 MMP-9 활성 억제 효과가 세포 invasion 능력과 어떠한 연관성이 있는지도 연구하였으며, sulforaphane이 MMP-9 활성을 조절하는데 관여하는 기전에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

세포 배양 및 재료

대식세포주인 Raw 264.7세포는 American Type Culture

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-3882, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : kwontk@dsmc.or.kr

Collection (Rockville, MD)에서 구입한 것을 분양 받았으며, 세포 배양을 위해 RPMI 1640에 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum을 첨가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 일주일에 두 번씩 계대배양을 하였고, 배양 중인 세포를 6-well plate에 1×10⁶의 세포수로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 안정화 시킨 후 시료를 처리하였다. LPS를 비롯한 본 실험에서 사용된 재료는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Sulforaphane은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)을 이용하여 20 mM의 stock solution을 만든 다음 적정 농도로 배지에 희석하여 사용하였다.

Gelatin substrate gel zymography

LPS에 의해 유도되는 MMP-9의 활성에 sulforaphane이 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포에 LPS를 전처리 후 sulforaphane을 처리하여 gelatin zymography를 시행하였다. 6-well plate에 적당량의 세포를 분주 한 후 시약을 처리하여 24시간 배양 한 후 세포 배양액을 거두어 2% gelatin이 함유된 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 2.5% Triton X-100으로 1시간 동안 Gel을 세척하여 SDS를 제거한 다음, 5 mM CaCl₂과 ZnCl₂가 포함된 완충액에 넣고 37°C에서 24-48시간 동안 배양하였다. 0.25% Coomassie blue를 이용하여 30분 동안 Gel을 염색한 후, acetic acid와 methanol이 포함된 탈색 완충액을 처리하여 흰색 밴드를 관찰하였다.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Sulforaphane에 의해 억제되는 LPS 유도 MMP-9 활성이 MMP-9의 mRNA levels에 어떠한 결과를 초래하는 알아보기 위해서 RT-PCR을 이용하여 MMP-9의 mRNA 발현을 분석하였다. 시료를 처리한 세포에 Trizol reagent (Life Technologies)를 처리하여 total RNA를 분리 한 후, M-MLV 역전사효소(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 MMP-9 특이적 primer와 함께 반응 시켜서 유전자를 증폭 시켰다. 그 양적 차이를 비교하기 위해서 1% agarose gel에 각각의 PCR 산물을 loading 하여 전기영동을 한 다음 EtBr로 염색 한 후 UV 상에서 발현의 정도를 확인하였다. PCR에 사용한 MMP-9 primer sequence는 forward: 5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3', reverse: 5'-GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG-3'이다.

Plasmids, transfections and luciferase gene assays

LPS 유도 시 MMP-9 유전자의 전사제어에 대한 영향을 분석하기 위하여 MMP-9-Luc (human MMP-9 promoter construct) 및 각종 전사인자의 binding site에 대한 point mutant promoter construct를 사용하였다[18]. 6-well plate에 24시간

배양한 세포에 human MMP-9-Luc 및 각종 promoter construct를 lipofectamine 방법에 따라 transfection을 하였고, LPS와 sulforaphane이 처리된 배지에서 24시간 더 배양을 한 후, luciferase 활성을 측정하였다. 또한 AP-1, NF-κB reporter construct는 Clontech (Palo Alto, CA, USA)으로부터 구입하여 위와 같은 방법으로 활성을 측정하였다.

Invasion assay

sulforaphane이 세포 침투력에 미치는 영향을 관찰하기 위해서 membrane filter (8 µm pore-size)가 부착된 12 well boyden chamber를 사용하여 invasion assay를 실행하였다. 5×10⁴의 Raw 264.7 세포를 아무것도 처리 안한 배지, LPS 단독 또는 LPS와 sulforaphane을 함께 처리한 배지에 각각 현탁하여, transwell의 upper chamber에 넣고, 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. Filter의 위쪽에 위치한 이동하지 않은 세포를 면봉으로 제거하고, filter 아래쪽으로 이동한 세포는 고정 시킨 후 methanol, acetic acid, 물이 45:10:45로 혼합된 0.125% Coomassie Blue로 염색하여 광학 현미경으로 transwell을 통과한 세포의 수를 세었다.

결 과

Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해서 유도된 MMP-9의 활성에 미치는 sulforaphane의 영향

Sulforaphane이 LPS에 의해 증가된 MMP-9 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Sulforaphane을 농도별로 30분 전처리 한 후 LPS를 24시간 동안 처리하여 세포 배양액을 분리하여 gelatin zymography를 하였다. MMP-9 활성은 LPS 처리에 의하여 높은 활성을 보였다. LPS에 의해서 유도된 MMP-9 활성이 sulforaphane에 의해서 농도 의존적으로 억제됨을 알 수 있었다. Sulforaphane의 MMP-9 활성 억제 효과를 다양한 염증 매개체의 cytokine인 IL-1β 나 TNF-α를 처리하여 확인 하였다. IL-1β와 TNF-α에 의한 MMP-9 활성 증가는 LPS에 비하여 약하지만 gelatin zymography에서 확인할 수 있었다. 또한 sulforaphane은 IL-1β와 TNF-α에 의한 MMP-9 활성 증가를 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 1B and 1C).

LPS에 의해 유도된 MMP-9의 mRNA 발현과 promoter 활성 증가에 미치는 sulforaphane의 영향

Sulforaphane에 의한 LPS 유도 MMP-9의 활성을 감소의 원인인 MMP-9 단백질 발현의 전사 단계의 조절에 기인되는지를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법으로 mRNA 발현 정도를 측정하였다. Sulforaphane을 농도별로 30분 동안 전 처리한 후, 50 ng/ml LPS를 처리하여 MMP-9의 mRNA 발현 변화를 관찰한 결과, LPS에 의해 증가했던 MMP-9의 mRNA 발현이 sulforaphane 농도 의존적으로 현저히 감소되는 것을 알 수

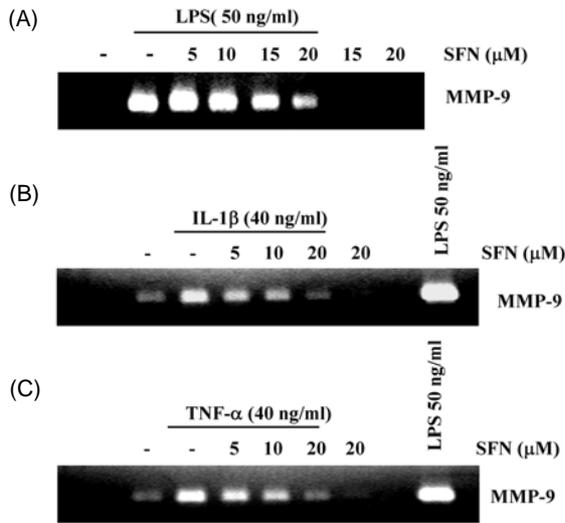


Fig. 1. Effect of sulforaphane on MMP-9 activity. (A) Raw 264.7 cells were treated with or without various concentrations of sulforaphane in presence of LPS (50 ng/ml) for 24 hr. Conditional media were collected and LPS-induced MMP-9 activity was analyzed using gelatin zymography. (B and C) Cells were pretreated with varying concentration of sulforaphane for 30 min and then treated with IL-1 β (40 ng/ml) and TNF- α (40 ng/ml), respectively. Conditional media were collected after 24 hr followed by gelatin zymography.

있었다(Fig. 2A). Sulforaphane에 의한 LPS 유도 MMP-9의 mRNA 발현 감소가 MMP-9 mRNA 안정성 조절에 의하여 야기 되는지를 확인하였다. Raw 264.7 세포를 LPS (50 ng/ml)가 함유된 배지에 12시간 동안 배양한 후 RNA 합성 억제제인 actinomycin D (Act.D) 단독과 Act.D와 sulforaphane을 처리하였다. Sulforaphane의 영향에 따른 MMP-9 mRNA 안정성을 시간별로 조사해 본 결과, Act.D 단독과 Act.D와 sulforaphane이 혼합 처리된 시료 사이에 뚜렷한 차이점은 관찰할 수가 없었다(Fig. 2B). 이 결과는 sulforaphane의 MMP-9 mRNA 발현 조절에 있어서 mRNA 안정성에는 영향을 미치지 않음을 의미하는 것이다. Sulforaphane이 LPS로 유도된 MMP-9 발현을 promoter 활성화 저해를 통한 발현조절을 확인하기 위하여 reporter gene assay를 수행하였다. Raw 264.7 세포에 MMP-9-Luc reporter gene을 transfection 시킨 후 LPS 처리구와 무처리구, LPS+sulforaphane 처리구로 나누어 실험하였다. LPS만 처리한 경우 luciferase 활성이 무처리구와 비교하여 3.2배 정도 증가하였으며, sulforaphane과 함께 처리한 경우에는 LPS 처리구와 비교하여 논도 의존적으로 luciferase 활성이 감소하였다 (Fig. 2C). 이상의 결과로부터 sulforaphane이 LPS 유도에 의한 MMP-9의 mRNA 발현 및 promoter 활성을 억제시킴을 알 수 있으며, MMP-9 promoter 부위에 sulforaphane에 의해 조절되는 반응 성분(response element)이 존재함을 유추할 수 있다.

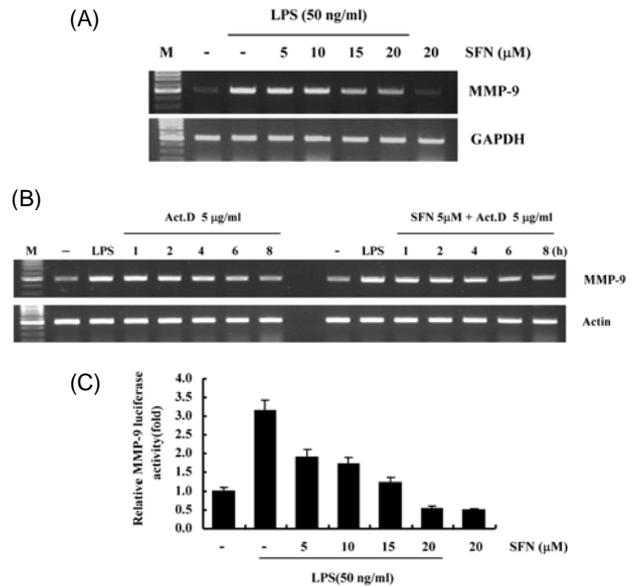


Fig. 2. Repression of LPS-induced MMP-9 mRNA levels and promoter activity by sulforaphane treatment. (A) Raw 264.7 cells were treated with or without various concentrations of sulforaphane in presence of LPS (50 ng/ml) for 24 hr. Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed using specific primer of MMP-9. (B) Cells were incubated with 50 ng/ml LPS for 12 h and then washed out. LPS-treated cells were treated with or without 5 μ M sulforaphane in presence 5 μ g/ml actinomycin D (Act.D) for indicated times. Total RNA isolated and RT-PCR analysis was performed. (C) WT-MMP-9 promoter-containing reporter vector was transfected, and treated with varying concentrations of sulforaphane in the absence or presence of LPS (50 ng/ml) for 24 hr. The cells were lysed and luciferase activity measured. Data represent the mean \pm SD from at least 3 independent experiments.

Sulforaphane이 전사조절 인자 NF- κ B와 AP-1 활성화에 미치는 영향

Sulforaphane이 LPS에 의해 증가하는 MMP-9 활성을 억제하는 조절 기전을 명확히 규명하기 위해서 MMP-9 promoter에 존재하는 전사조절유전자들(NF- κ B, AP-1)의 결합부위를 돌연변이 시킨 promoter를 사용하여 luciferase 활성정도를 조사하였다. 정상 MMP-9-Luc vector (WT-MMP-9)와 다양한 돌연변이 MMP-9-Luc vector를 각각 transfection 한 후 LPS (50 ng/ml)을 24시간 동안 처리 한 후 luciferase 활성을 측정하였다(Fig. 3A). Fig. 3A에서 나타낸 결과에서 알 수 있듯이 LPS를 처리한 후 정상 MMP-9 프로모터 활성이 증가한 것에 비해서 전사조절유전자들의 결합부위가 변이된 MMP-9 프로모터 활성은 확연히 감소하였다. 이 결과는 LPS 유도에 의해 증가하는 MMP-9의 프로모터 활성화에 전사조절유전자인 NF- κ B와 AP-1이 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다. Sulforaphane에 의한 MMP-9 promoter 활성 억제효과에 NF- κ B와 AP-1의 관

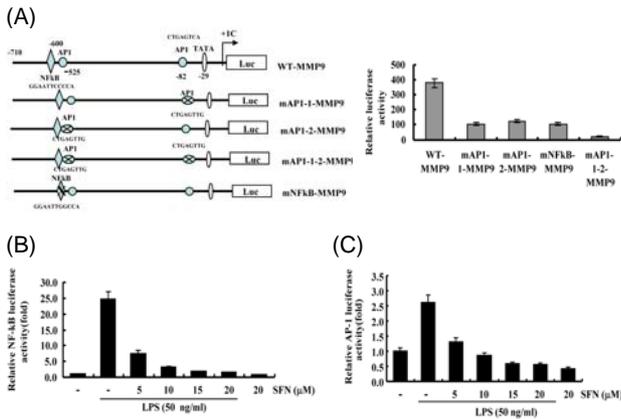


Fig. 3. Effect of sulforaphane on the activities of AP-1 and NF-κB. (A) Schematic structure of MMP-9 promoter constructs used for luciferase assay. Mutations were introduced into the AP-1 or NF-κB binding sites of WT-MMP-9. WT-MMP-9 promoter or mutant MMP-9 promoters were transfected and incubated with 50 ng/ml LPS for 24 hr. The cells were lysed and luciferase activity measured. (B, C) To elucidate the effects of sulforaphane on the AP-1 and NF-κB activities, a reporter vector that has AP-1 (B) or NF-κB (C) binding sites was transfected. The cells were treated with or without various concentrations of sulforaphane in presence of LPS (50 ng/ml). Luciferase activity was measured. Data represent the mean±SD from at least 3 independent experiments.

련성을 더 확인하기 위하여 NF-κB와 AP-1 basal element를 함유한 각각의 luciferase vector를 transfection 한 후 sulforaphane과 LPS를 앞선 조건과 동일하게 처리하였다. 그 결과, LPS에 의해서 NF-κB와 AP-1의 promoter 활성이 증가함을 확인 할 수 있었다. NF-κB와 AP-1의 promoter 활성 증가는 sulforaphane 농도 의존적으로 억제됨을 알 수 있었다. 이상의 결과는 sulforaphane이 LPS에 의한 MMP-9 활성 증가에 중요한 역할을 하는 전사조절요소인 NF-κB와 AP-1을 효과적으로 억제함으로써 MMP-9의 활성을 조절함을 의미하는 것이다.

In vitro 상태에서 Raw 264.7 세포의 침투력에 sulforaphane이 미치는 영향

Invasion assay를 이용하여 sulforaphane이 Raw 264.7의 세포 침투력에 미치는 영향을 알아보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 invasion 능력이 2.5배 증가하였으며, sulforaphane을 전처리 시 급격한 감소를 확인 할 수 있었다. 이러한 sulforaphane의 invasion 억제효과는 MMP-9 활성 억제효과와 밀접한 관련이 있을 것이라 생각된다.

고 찰

Type IV collagenase인 MMP-2와 MMP-9은 암세포의 전이와 침윤 시 ECM 및 기저막을 분해하여 암세포의 전이, 침윤,

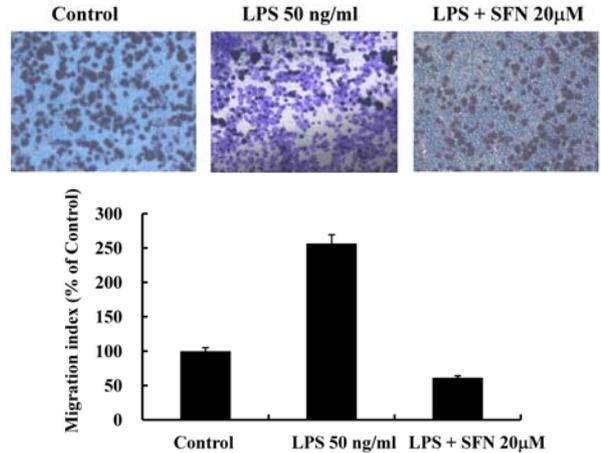


Fig. 4. Effect of sulforaphane on matrigel invasion by Raw 264.7 cells. For invasion assay, the lower and upper parts of Transwells were coated with matrigel. Raw 264.7 cells were incubated with in the presence or absence of either LPS (50 ng/ml) or sulforaphane (20 μM) in the upper well. After 24 hr, invasiveness of the cells on the upper side of the filter were removed and the cells on the bottom side of the filter were fixed, stained with 0.125% Comassie blue, and counted. Data represent the mean±SD from at least 3 independent experiments.

angiogenesis를 활성화시켜 암세포 성장에 중요한 역할을 하는 금속이온을 cofactor로 요구하는 효소이다[12]. MMP-9 단백질 분해효소의 발현은 다양한 성장인자, cytokine, 그리고 12-myristate 13-acetate (PMA)와 같은 xenobiotics에 의해 조절되어 진다[8,11,13].

본 연구에서는 대식세포에서 LPS에 의해 증가하는 MMP-9 활성에 sulforaphane이 미치는 영향과 sulforaphane의 처리에 의한 세포 invasion 능력 억제 여부에 대해서 조사하였다. 먼저 LPS 유도에 의한 MMP-9 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 대식 세포에 sulforaphane을 전처리 한 후 LPS를 처리하여 zymography를 실시하였다. LPS에 의해 증가하였던 MMP-9 활성이 sulforaphane의 농도 의존적으로 억제가 됨을 확인 할 수 있었고, LPS 뿐 아니라 다른 종류의 cytokine (IL-1β와 TNF-α)에 의한 MMP-9 활성 증가 역시 sulforaphane이 효과적으로 억제시킴을 관찰 할 수 있었다. Sulforaphane의 MMP-9 활성 억제 기전을 조사하기 위해서 RT-PCR 및 MMP-9 luciferase reporter assay를 통해서 조사한 결과 sulforaphane의 MMP-9의 활성을 억제는 MMP-9의 전사단계에서 조절됨을 알 수 있었다. mRNA stability 실험을 통해서 sulforaphane이 mRNA 안정성을 조절과는 무관함을 확인 하였다. MMP-9 발현 조절에 mitogen- activating protein kinase (MAPK)의 신호전달계가 관련되어 있으며 이중에 ERK와 JNK 활성이 MMP-9 발현의 증가를 유도 한다[5]. Simon et al.는 p38 MAPK의 억제가 12-myristate 13-acetate (PMA)에 의해 증가되는 MMP-9의 발현을 감소시킨다는 결과를 보고하

였다[14]. MMP-9의 발현을 조절하는 전사인자의 발현 기전은 명확하게 밝혀지지는 않았으나, 최근 chemopreventive agent로 잘 알려진 resveratrol이 PMA에 의해 증가하는 MMP-9의 활성을 억제하는데 있어서 전사조절인자 AP-1, NF- κ B 활성 조절이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[17]. Sulforaphane의 MMP-9 활성 억제에 전사조절인자들의 관련 여부를 확인하기 위해서 MMP-9의 promoter 활성을 wild type과 mutant AP-1 및 mutant NF- κ B 비교 분석한 결과 mutant에서 현저히 감소됨을 확인 하였다. 이는 MMP-9의 promoter 활성에 AP-1과 NF- κ B 전사인자의 결합이 매우 중요한 요소임을 시사한다. LPS와 sulforaphane을 혼합 처리하였을 때 AP-1과 NF- κ B의 basal 활성도를 확인해 본 실험에서도 LPS에 의해서 증가한 AP-1과 NF- κ B의 luciferase 활성이 sulforaphane에 의해서 현저히 감소되었다. 이는 sulforaphane이 전사조절 인자인 AP-1과 NF- κ B의 활성 억제를 통해서 LPS 유도에 의한 MMP-9의 활성 증가를 감소시킴을 의미하는 결과이다. Sulforaphane이 LPS 유도에 의해 증가하는 MMP-9 활성 억제 효과에 관련하여 세포 invasion 또한 감소시킴을 확인하였다. Human brain microvascular endothelial cell과 human breast cancer cell에서 sulforaphane이 MMP-9 억제를 통해 세포 이동과 tubulogenesis, 세포 침윤을 방해하는 데 유의한 효과가 있음이 밝혀지고 있지만[1,10] 그 기전을 명확히 제시하지는 못하였다. 이상의 결과에서 sulforaphane이 MMP-9의 활성을 억제하고 세포 침윤 능력을 억제하는 기전에 대해 설명하였고, 이는 더 나아가 암세포의 전이 억제를 통한 암치료제 개발에 중요한 근거를 제시하는 바이다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 MRC(R13-2002-028-03001-0) 지원에 의하여 이루어진 결과입니다.

References

- Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, M. Laroche, M. P. Lachambre, R. Moumdjian, and R. Béliveau. 2008. The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 692-700.
- Asakage, M., N. H. Tsuno, J. Kitayama, T. Tsuchiya, S. Yoneyama, J. Yamada, Y. Okaji, S. Kaisaki, T. Osada, K. Takahashi, and H. Nagawa. 2006. Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Angiogenesis* **9**, 83-91.
- Basset, P., A. Okada, M. P. Chenard, R. Kannan, I. Stoll, P. Anglard, J. P. Bellocq, and M. C. Rio. 1997. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* **15**, 535-541.
- Brooks, J. D., V. G. Paton, and G. Vidanes. 2001. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 949-954.
- Gum, R., H. Wang, E. Lengyel, J. Juarez, and D. Boyd. 1997. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* **14**, 1481-1493.
- Juge, N., R. F. Mithen, and M. Traka. 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 1105-1127.
- Kerkelä, E., and U. Saarialho-Kere. 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.* **12**, 109-125.
- Lee, P. P., J. J. Hwang, G. Murphy, and M. M. Ip. 2000. Functional significance of MMP-9 in tumor necrosis factor-induced proliferation and branching morphogenesis of mammary epithelial cells. *Endocrinology* **141**, 3764-3773.
- Nelson, A. R., B. Fingleton, M. L. Rothenberg, and L. M. Matrisian. 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* **18**, 1135-1149.
- Rose, P., Q. Huang, C. N. Ong, and M. Whiteman. 2005. Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **209**, 105-113.
- Roy, R., J. Yang, and M. A. Moses. 2009. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5287-5297.
- Sato, H. and M. Seiki. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**, 395-405.
- Sato, H., M. Kita, and M. Seiki. 1993. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **268**, 23460-23468.
- Simon, C., H. Goepfert, and D. Boyd. 1998. Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res.* **58**, 1135-1139.
- Stetler-Stevenson, W. G. and A. E. Yu. 2001. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin. Cancer Biol.* **11**, 143-152.
- Thejass, P. and G. Kuttan. 2006. Antimetastatic activity of Sulforaphane. *Life Sci.* **78**, 3043-3050.
- Woo, J. H., J. H. Lim, Y. H. Kim, S. I. Suh, D. S. Min, J. S. Chang, Y. H. Lee, J. W. Park, and T. K. Kwon. 2004. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* **23**, 1845-1853.
- Woo, J. H., J. W. Park, S. H. Lee, Y. H. Kim, I. K. Lee, E. Gabrielson, S. H. Lee, H. J. Lee, Y. H. Kho, and T. K. Kwon. 2003. Dykellid acid inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting nuclear factor kappa B transcriptional activity. *Cancer Res.* **63**, 3430-3434.

초록 : Sulforaphane이 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 발현에 미치는 영향

이정태 · 우경진 · 권택규*

(계명대학교 의과대학 면역학 교실)

Sulforaphane은 십자가화 채소에 존재하는 화합물로 항염증, 항암 및 신생혈관 생성의 억제 효과가 알려짐으로써 최근 많은 연구가 활발히 이루어지고 있으나, LPS에 의한 MMP-9 활성 조절에 대한 연구는 매우 미흡한 편이다. 따라서 본 연구에서 sulforaphane이 LPS 유도에 의한 MMP-9 활성에 미치는 영향에 대해서 조사해 보았다. Raw 264.7 세포에 sulforaphane을 전처리 한 후 LPS를 처리하여 gelatin zymography를 실시해 본 결과, LPS에 의해 유도된 MMP-9 활성 증가가 sulforaphane 농도 의존적으로 감소됨을 확인 하였다. 또한 RT-PCR과 MMP-9의 luciferase assay를 통한 실험에서 sulforaphane의 MMP-9 억제효과가 전사단계에서 조절됨을 추측 할 수 있었다. MMP-9 promoter 부위에 여러 가지의 전사조절인자 결합부위가 존재한다. 특히 AP-1과 NF- κ B가 중요 전사조절인자로 작용하여 MMP-9 발현조절에 관여한다. 본 실험에서 sulforaphane에 의한 MMP-9 억제효과 기전에 이들 전사조절인자들의 중요한 역할을 조사하였다. AP-1과 NF- κ B 결합부위를 변형 시킨 vector를 transfection 하여 MMP-9의 promoter 활성을 측정한 결과, 정상 vector에 비해 그 활성도가 현저히 떨어짐을 확인하였고, LPS에 의해 증가되는 AP-1과 NF- κ B의 basal promoter 활성 또한 sulforaphane에 의해 감소됨을 관찰 할 수 있었다. 이상의 결과에서 sulforaphane의 MMP-9 활성억제효과는 AP-1과 NF- κ B와 같은 전사인자들이 MMP-9의 전사를 조절함으로써 일어나는 것임을 알 수 있었다. 그리고 sulforaphane은 세포의 invasion능력 또한 효과적으로 억제시킴을 관찰 할 수 있었는데 이는 MMP-9 활성억제효과와 밀접한 관련이 있음을 추측 할 수 있었다.