

Withaferin A Inhibits PMA-Induced MMP-9 Expression in Human Cervical Carcinoma Caski Cells

Dong Eun Kim*

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received March 4, 2013 / Revised March 19, 2013 / Accepted March 26, 2013

Withaferin A is an active component of *Withania somnifera*, and has anti-inflammatory, anti-tumor, and immune modulatory effects. However, the effects of withaferin A on metalloproteinase (MMP)-9 expression and activity have not been investigated. In this study, we investigated the ability of withaferin A to inhibit MMP-9 expression and activity in PMA-treated human cervical carcinoma Caski cells. Withaferin A markedly inhibited the PMA-induced MMP-9 activity in a dose-dependent manner. Withaferin A decreased not only PMA-induced MMP-9 promoter activity but also PMA-mediated MMP-9 mRNA and protein expression in Caski cells. NF- κ B promoter activity, which is important in MMP-9 expression, was also decreased in combined treatment with withaferin A and PMA. Furthermore, withaferin A markedly suppressed the ability of PMA-mediated migration in Caski cells. Our findings suggest that withaferin A might inhibit PMA-induced migration through the down-regulation of MMP-9 expression and activity.

Key words : Caski cells, matrix metalloproteinase-9, migration, NF- κ B, withaferin A

서 론

암세포의 전이는 많은 단계를 거쳐서 일어나게 된다. 암세포는 일차종양(primary tumor)에서 이차 조직(secondary tissue)까지 이동하기 위해서는 일차 종양에서 분리되어, 이동하고, 주변 조직으로 침투하여야 한다. 그 후에는 주변의 혈관으로 들어가 혈류를 타고 흐르다가, 혈관벽을 뚫고 이차조직으로 들어감으로써 전이(metastasis)가 된다. 전이가 일어나는 과정 동안 암세포는 세포를 둘러싸고 있는 세포 외 기질(extracellular matrix)과 접하게 된다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 암세포의 전이가 일어나는 과정에서 세포 외 기질을 분해시키는 중요한 효소로 알려져 있다. MMP가 암세포에서 분비되어 세포 외 기질을 분해함으로써 세포의 침투(invasion)를 가능하게 하고, MMP 억제제를 사용하면 암세포의 전이와 이동이 감소한다. MMP는 기질의 형태에 따라서 1) collagenase, 2) gelatinase, 3) stromelysines, 4) matrilysins, 5) membrane type-MMP, 그리고 6) 그 외의 MMP가 있다[1, 22]. 이 중에서, 특히 gelatinase에 속하는 MMP-2와 MMP-9이 암세포의 전이와 밀접한 관련이 있다[3, 16]. 예를

들어, 악성 keratinocyte에서, MMP-2와 MMP-9가 없는 경우 암세포의 침투가 억제되고[10], MMP-2와 MMP-9의 활성화에 의해 방광암세포의 침투가 조절된다[7]. 이 외에도, 신경교종[8], 전립선암[12], 유방암[2], 폐암[5]와 악성흑색종[18]에서도 MMP가 세포의 침투에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 암세포의 전이를 조절하는데 중요한 MMP 발현 및 활성화 조절은 항암타겟이 될 수 있다.

Withaferin A는 *Withania somnifera*라는 식물에서 추출한 스테로이드 락톤으로 암세포에서 다양한 기전을 통하여 암세포 사멸을 유도한다. 신장 암세포, 백혈병세포와 대장암세포에서 withaferin A는 암세포의 생존에 중요한 신호전달체계인 STAT3, Akt의 인산화를 억제하거나 Notch-1의 신호전달을 억제함으로써 각각 세포사멸을 유도하고[6, 14, 21], 신장암세포에서 radiation 및 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)에 의한 세포사멸을 증가시킨다고 알려져 있다[9, 24]. 또한, withaferin A는 human umbilical vein endothelial 세포에서 angiogenesis 및 세포의 증식을 줄인다[11]. 이 외에도, 유방암세포에서 vimentin의 기능을 억제함으로써 암세포의 전이를 억제한다[20]. 하지만, withaferin A에 의한 암세포의 전이 및 침투억제기전에 대한 기전 연구는 아직 미흡하다.

본 연구에서는 인간 자궁 경부암 세포인 Caski에서 PMA에 의해 유도되는 MMP-9의 활성화 조절에 대한 withaferin A의 영향을 연구하였다. 또한 withaferin A에 의한 활성화 조절 기전을 규명하기 위하여, MMP-9의 발현 억제기전을 확인하고, 세포 이동에 영향을 주는지에 대해 연구하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-250-7757, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : entkde@dsmc.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

본 연구에 사용한 인간 자궁경부암 세포주인 Caski 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양을 위한 배지는 10% 태아 우혈청(fetal bovine serum, Hyclone laboratories, Lagan, Utah, USA)과 1% antibiotics, 0.2% Gentamycin을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였으며 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기를 이용하여 배양하였다. 실험에 사용된 약제인 PMA는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, Withaferin A는 Biomol (Biomol Research Laboratories, Inc., PA, USA)에서 구입하였다.

Gelatin substrate gel zymography

PMA에 의해 유도되는 MMP-9의 활성에 withaferin A가 미치는 영향을 알아보기 위하여 Caski세포에 withaferin A를 전처리 후 PMA를 처리하여 gelatin zymography를 시행하였다. 6-well plate에 0.4x10⁶의 세포를 분주 한 후 시약을 처리하여 24시간 배양 한 후 세포 배양액을 거두어 2% geletin이 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 24시간 동안 배양하였다. 0.25% Coomassie blue를 이용하여 30분 동안 Gel을 염색한 후, acetic acid와 methanol이 포함된 탈색 완충액을 처리하여 흰색 밴드를 관찰하였다.

Plasmids, transfections and luciferase gene assays

PMA에 의한 MMP-9 유전자의 전사제어에 대한 withaferin A에의 영향을 분석하기 위하여 MMP-9-Luc (human MMP-9 promoter construct)을 사용하였다. 6-well plate에 12시간 배양한 세포에 human MMP-9-Luc을 lipofectamine 방법에 따라 transfection을 하였고, withaferin A를 30분 전 처리한 후 PMA를 12 시간 처리하여, luciferase 활성을 측정하였다. 또한 AP-1과 NF-κB reporter construct는 Clontech (Palo Alto, CA, USA)으로부터 구입하여 위와 같은 방법으로 활성을 측정하였다.

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

PMA에 의해 증가한 MMP-9의 mRNA발현이 withaferin A에 의해 억제되는지를 알아보기 위해서 RT-PCR을 이용하여 MMP-9의 mRNA 발현을 분석하였다. 시료를 처리한 세포에 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처

리하여 total RNA를 분리 한 후, M-MLV 역전사효소 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 MMP-9 primer를 이용하여 유전자를 증폭시켰다. 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'이고, actin의 primer sequence는 forward: 5'- GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC -3', reverse: 5'- CGA TTT CCC GCT CG GCC GTG G -3'이다. 그 양적 차이를 비교하기 위해서 1.5% agarose gel에 각각의 PCR 산물을 loading 하여 전기영동을 한 다음 ethidium bromide (EtBr)로 염색 한 후 UV 상에서 발현의 정도를 확인하였다.

Western Blotting

PMA처리에 의해 증가하는 MMP-9 단백질 발현에 대한 withaferin A의 효과를 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 세포를 0.4x10⁶ cells/well로 12시간 배양 후에, FBS를 첨가하지 않은 무혈청 배지로 교체하여 withaferin A를 30분 전 처리하고, PMA를 12시간 처리하여, 세포를 모아 40 μl lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mM leupeptin, pH 7.2)를 첨가하고 5분 간격으로 15초 동안 3번 vortex하여 세포를 파쇄한 후 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하여 시료를 준비하였다. 시료는 BCA 단백질 정량 kit를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후, immobilon membrane (Milipore, Bedford, MA)으로 transfer하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCL, 137 mM NaCl, 0.1%Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 유지한 후, MMP-9 (Santa Cruz, CA, USA)과 actin (Sigma, Louis, MO)을 희석한 5% milk/TBST로 실온에서 12시간 유지하였다. Anti-mouse 또는 rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST (Amersham Buckinghamshire, England)로 1시간 반응 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Pierce, IL, USA)용액을 가하여 발색시켜서 단백질을 확인하였다.

Migration assay

PMA에 의한 Caski 세포의 이동에 withaferin A의 효과를 확인하기 위하여, Caski 세포를 12 well plate에 12시간 동안 배양한 후, white tip을 이용하여 세포에 wound를 준다. 무혈청 배지로 교체하여 withaferin A를 30분 전 처리하고, PMA를 12시간 처리하여, 현미경을 이용하여 확인한다(Carl Zeiss microscope, Jena, Germany).

결 과

자궁 경부암세포인 Caski 세포에서 PMA유도 MMP-9 활성화에 withaferin A의 효과 확인

PMA는 다양한 세포에서 MMP-9의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다[15, 23]. 자궁경부암 세포인 Caski 세포에서도 PMA를 12시간 처리하면 MMP-9의 활성화를 증가시키고, 이 때 withaferin A를 농도 별로 처리하게 되면 PMA에 의한 MMP-9의 활성화에는 아무런 영향이 없지만, MMP-9의 활성화를 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한, withaferin A는 세포에 기본적으로 존재하는 MMP-9의 활성화도 억제한다(Fig. 1). 본 연구 결과로 withaferin A는

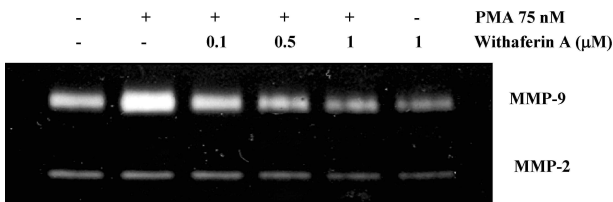


Fig. 1. Effect of withaferin A on PMA-induced MMP-9 activity. Caski cells were pretreated with the indicated concentrations of withaferin A for 30 min, and then added 75 nM PMA for 12 hr. Conditioned media were collected, and MMP-9 activity was analyzed using gelatin zymography. The data represent three independent experiments.

자궁경부암세포인 Caski 세포에서 PMA의 의해 증가되는 MMP-9의 활성화 억제를 확인하였다.

PMA에 의한 MMP-9의 발현에 withaferin A의 영향

Withaferin A에 의한 PMA유도 MMP-9 활성화 조절 기전을 규명하기 위하여, 먼저, MMP-9의 promoter 활성화를 확인하였다. PMA는 MMP-9의 promoter 활성화를 유의적으로 증가시켰고, withaferin A를 농도 별로 전처리 하였을 경우 PMA 유도 MMP-9 promoter 활성화가 감소되었다(Fig. 2A). 또한, withaferin A에 의한 PMA유도 MMP-9의 mRNA와 단백질의 발현을 확인하였다. PMA는 MMP-9의 mRNA 발현과 단백질 발현을 12시간에 증가시키고 withaferin A는 농도 의존적으로 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 2B, Fig. 2C). 이상의 결과로부터 withaferin A는 PMA에 의해 증가하는 MMP-9의 promoter 활성을 억제함으로써, mRNA와 단백질의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.

Withaferin A의 PMA유도 NF-κB와 AP-1의 활성화에 미치는 영향

Withaferin A에 의하여 PMA유도 MMP-9의 발현이 전사단계에서 조절되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서, 전사조절에 관여하는 조절유전자들을 규명하기 위하여 다음 실험을 수행하였다. 기존에 PMA는 NF-κB와 AP-1의 활성화를 증가시켜 MMP-9의 발현을 증가시킨다는 보고가 있다[4, 17]. 따라서,

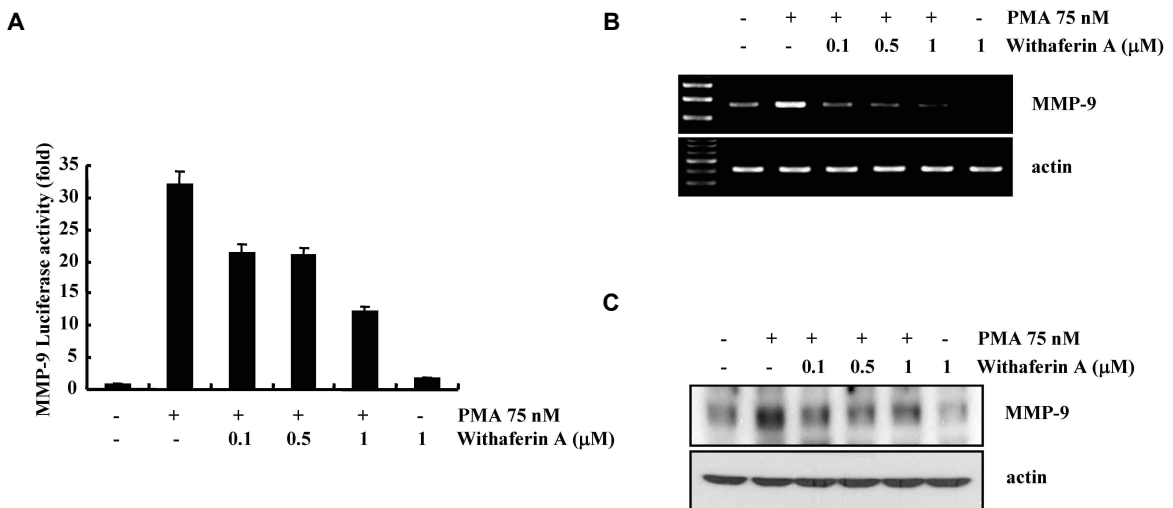


Fig. 2. Withaferin A inhibits PMA-induced MMP-9 promoter activity, MMP-9 mRNA and MMP-9 protein expression. (A) Caski cells were transfected with a MMP-9 promoter containing luciferase construct. After incubating for overnight, cells were pretreated with the indicated concentrations of withaferin A for 30 min, and then treated with 75 nM PMA for 12 hr. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Values in (A) are mean±S.D. of three samples. (B and C). Caski cells were pretreated with the indicated concentrations of withaferin A for 30 min, and then added with 75 nM PMA for 12 hr. MMP-9 mRNA expression and protein expression was determined using RT-PCR (B) or Western blotting (C). The data represent three independent experiments.

withaferin A가 PMA에 의해 증가된 NF-κB와 AP-1의 활성을 조절할 수 있는지 확인하였다. PMA는 자궁 경부암 Caski세포에서 유의적으로 NF-κB와 AP-1의 활성을 증가시켰다(Fig. 3A, Fig. 3B). Withaferin A는 농도의존적으로 PMA유도 NF-κB promoter 활성을 억제시키는 반면, AP-1의 promoter 활성은 줄이지 않았다(Fig. 3A, Fig. 3B). 따라서, 이 실험을 통하여, withaferin A는 PMA유도 NF-κB promoter 활성을 특이적으로 억제시킨다는 것을 확인하였다.

Withaferin A에 의한 PMA유도 세포이동에 대한 영향

MMP-9은 세포의 이동 및 invasion에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다[2, 5, 8, 12]. 따라서, withaferin A에 의한 MMP-9의 발현 및 활성화 억제가 세포의 이동을 억제할 수 있는지 확인하였다. PMA는 자궁 경부암 Caski세포의 이동을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었고, withaferin A는 PMA에 의한 세포의 이동을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 4). 따라서, withaferin A는 MMP-9의 발현 및 활성을 조절함으로써 암세포의 이동을 조절할 수 있을 것이라 생각된다.

고 찰

본 연구에서는 자궁경부암세포인 Caski세포에서 암세포의 전이 및 침투에 중요한 MMP-9의 활성화에 있어서, 다양한 항암효과를 가지는 withaferin A의 작용을 확인하였다. PMA는 MMP-9의 활성을 유의적으로 증가시키고, 이러한 증가는 전사단계에서 조절되어 증가된다. Withaferin A는 PMA에 의해 증가한 MMP-9의 활성화를 농도 의존적으로 억제하고(Fig. 1), 이러한 억제는 MMP-9의 전사단계에서의 조절에 의한 것이라는 것을 확인하였다(Fig. 2). PMA 유도 MMP-9의 전사를 조절한다고 알려진 전사조절인자 중 NF-κB가 PMA에 의하여 억제됨을 확인함으로써 NF-κB 활성 조절을 통한 withaferin A의 MMP-9조절 가능성을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 with-

aferin A의 PMA에 의한 MMP-9의 활성억제의 의미는 PMA 유도 세포이동이 withaferin A에 의해 감소되는 것을 확인함으로써(Fig. 4), withaferin A가 세포의 이동 및 침투를 조절할 수 있는 가능성을 확인하였다.

Withaferin A에 의한 MMP-9의 활성화 억제는 유의적으로 전사단계에서 조절함을 확인하였다. 이러한 Withaferin A에 의한 MMP-9활성화 조절은 PMA에 의해 증가한 MMP-9의 활성을 억제하기도 하지만, 기존에 존재하는(basal levels) MMP-9의 활성화 역시 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한, 기존 MMP-9의 활성화 역시 전사 단계에서 조절된다는 것을, Fig. 2에서 control MMP-9 mRNA 발현을 withaferin A가 억제 하는 것을 통하여 확인하였다. 단백질 발현 역시 withaferin A에 의하여 세포가 가진 control MMP-9발현을 억제하는 것을 확인함으로써 withaferin A는 PMA 유도 MMP-9의 발현과 활성화를 조절 할 뿐 아니라, 세포에서 기본적으로 가지고 있는 MMP-9의 활성화와 발현을 조절 할 수 있는 강력한 MMP-9 억제제로서의 작용가능성을 확인하였다. 하지만, PMA에 의한 세포 이동은 withaferin A가 억제하였으나, 세포가 원래 가진 이동능력은 withaferin A에 의해 억제되는 것을 확인할 수 없었다(Fig. 4). 이는 비록 기본적으로 가지고 있는 세포의 MMP-9의 발현은 withaferin A에 의하여 억제되지만, 세포의 이동에는 MMP-9 이 외 다양한 요소가 관여할 수 있기 때문에 이러한 결과를 초래할 가능성이 있다.

기존 연구에서, PMA에 의한 MMP-9의 발현에는 NF-κB와 AP-1이 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 PMA가 NF-κB와 AP-1의 활성을 증가시키는 것을 확인하였지만, withaferin A에 의한 억제효과는 NF-κB에 특이적으로 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이전 보고에서 withaferin A는 human mononuclear 세포에서 LPS에 의한 NF-κB와 AP-1의 활성을 억제한다고 알려져 있고[19], 유방암세포인 MDA-MB231에서 TNF-α에 의해 증가한 NF-κB와 AP-1의 활성을 억제한다고 알려져 있다[13]. 하지만, 우리의 실험에서

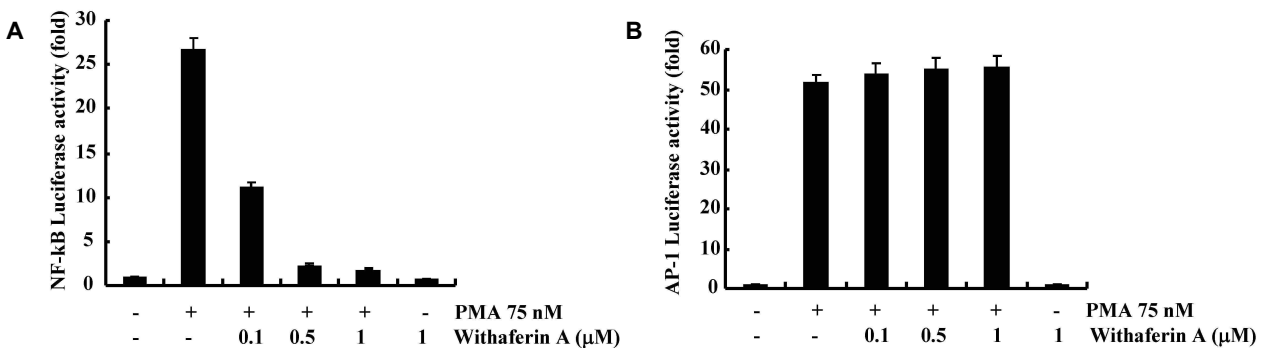


Fig. 3 Effect of withaferin A on PMA-induced NF-κB and AP-1 promoter activity. Caski cells were transfected with a NF-κB (A) or AP-1 (B) -luciferase construct. After incubating for overnight, cells were pretreated with the indicated concentrations of withaferin A for 30 min, and then treated with 75 nM PMA for 12 hr. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Values in (A and B) are mean±S.D. of three samples. The data represent three independent experiments.

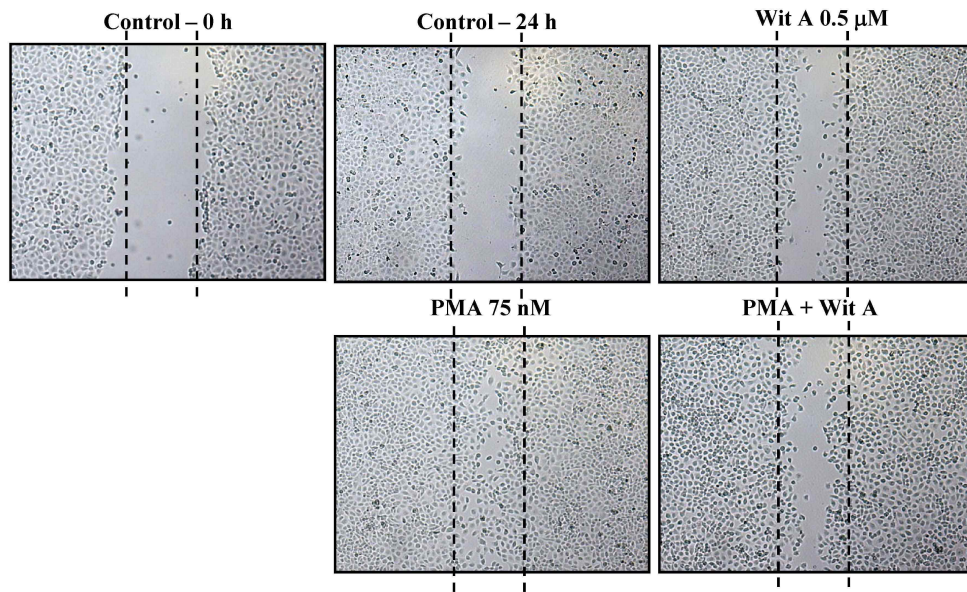


Fig. 4 Withaferin A inhibits PMA-mediated cell migration. Confluent monolayer of Caski cells was wounded and images were taken immediately (control-0 hr). After washing with PBS, Caski cells were pretreated with the indicated concentrations of withaferin A for 30 min, and then treated with 75 nM PMA for 12 hr. Wound gap was observed and cells were photographed using a Carl Zeiss microscope. The data represent three independent experiments.

PMA에 의한 AP-1의 활성화는 withaferin A에 의해서 전혀 감소 되지 않았다(Fig. 3B). 이 결과는 AP-1 promoter 활성화를 증가시키는 인자가 다르기 때문에 야기되어질 수 있고, 세포 의존적으로 나타나는 효과일 수도 있다. 따라서, withaferin A에 의한 자궁경부암세포에서 AP-1의 활성화 억제가 되지 않는 이유를 규명하기 위해서는 추가적인 실험이 필요하다.

감사의 글

이 논문은 계명대학교 비사신진연구비(2009, 김동은) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Amalinei, C., Caruntu, I. D. and Balan, R. A. 2007. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* **48**, 323-334.
- Farabegoli, F., Papi, A. and Orlandi, M. 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate down-regulates EGFR, MMP-2, MMP-9 and EMMPRIN and inhibits the invasion of MCF-7 tamoxifen-resistant cells. *Biosci Rep* **31**, 99-108.
- Festuccia, C., Giunciuglio, D., Guerra, F., Villanova, I., Angelucci, A., Manduca, P., Teti, A., Albini, A. and Bologna, M. 1999. Osteoblasts modulate secretion of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human prostate cancer cells promoting migration and matrigel invasion. *Oncol Res* **11**, 17-31.
- Hah, N. and Lee, S. T. 2003. An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 428-433.
- Hung, W. C., Tseng, W. L., Shiea, J. and Chang, H. C. 2010. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells. *Cancer Lett* **288**, 156-161.
- Koduru, S., Kumar, R., Srinivasan, S., Evers, M. B. and Damodaran, C. 2010. Notch-1 inhibition by Withaferin-A: a therapeutic target against colon carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* **9**, 202-210.
- Kumar, B., Koul, S., Petersen, J., Khandrika, L., Hwa, J. S., Meacham, R. B., Wilson, S. and Koul, H. K. 2010. p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res* **70**, 832-841.
- Lee, E. J., Kim, S. Y., Hyun, J. W., Min, S. W., Kim, D. H. and Kim, H. S. 2010. Glycitein inhibits glioma cell invasion through down-regulation of MMP-3 and MMP-9 gene expression. *Chem Biol Interact* **185**, 18-24.
- Lee, T. J., Um, H. J., Min do, S., Park, J. W., Choi, K. S. and Kwon, T. K. 2009. Withaferin A sensitizes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP. *Free Radic Biol Med* **46**, 1639-1649.
- Masson, V., de la Ballina, L. R., Munaut, C., Wielockx, B., Jost, M., Maillard, C., Blacher, S., Bajou, K., Itoh, T., Itohara, S., Werb, Z., Libert, C., Foidart, J. M. and Noel, A. 2005. Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J* **19**, 234-236.
- Mohan, R., Hammers, H. J., Bargagna-Mohan, P., Zhan, X.

- H., Herbstritt, C. J., Ruiz, A., Zhang, L., Hanson, A. D., Conner, B. P., Rougas, J. and Pribluda, V. S. 2004. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* **7**, 115-122.
12. Nalla, A. K., Gorantla, B., Gondi, C. S., Lakka, S. S. and Rao, J. S. 2010. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* **17**, 599-613.
13. Ndlovu, M. N., Van Lint, C., Van Wesemael, K., Callebert, P., Chalbos, D., Haegeman, G. and Vanden Berghe, W. 2009. Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **29**, 5488-5504.
14. Oh, J. H., Lee, T. J., Kim, S. H., Choi, Y. H., Lee, S. H., Lee, J. M., Kim, Y. H., Park, J. W. and Kwon, T. K. 2008. Induction of apoptosis by withaferin A in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation. *Apoptosis* **13**, 1494-1504.
15. Park, M. J., Park, I. C., Lee, H. C., Woo, S. H., Lee, J. Y., Hong, Y. J., Rhee, C. H., Lee, Y. S., Lee, S. H., Shim, B. S., Kuroki, T. and Hong, S. I. 2003. Protein kinase C- α activation by phorbol ester induces secretion of gelatinase B/MMP-9 through ERK 1/2 pathway in capillary endothelial cells. *Int J Oncol* **22**, 137-143.
16. Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L. and Quigley, J. P. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-13076.
17. Shin, M., Yan, C. and Boyd, D. 2002. An inhibitor of c-jun aminoterminal kinase (SP600125) represses c-Jun activation, DNA-binding and PMA-inducible 92-kDa type IV collagenase expression. *Biochim Biophys Acta* **1589**, 311-316.
18. Sil, H., Sen, T. and Chatterjee, A. 2011. Fibronectin-integrin (α 5 β 1) modulates migration and invasion of murine melanoma cell line B16F10 by involving MMP-9. *Oncol Res* **19**, 335-348.
19. Singh, D., Aggarwal, A., Maurya, R. and Naik, S. 2007. Withania somnifera inhibits NF- κ B and AP-1 transcription factors in human peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells. *Phytother Res* **21**, 905-913.
20. Thaiparambil, J. T., Bender, L., Ganesh, T., Kline, E., Patel, P., Liu, Y., Tighiouart, M., Vertino, P. M., Harvey, R. D., Garcia, A. and Marcus, A. I. 2011. Withaferin A inhibits breast cancer invasion and metastasis at sub-cytotoxic doses by inducing vimentin disassembly and serine 56 phosphorylation. *Int J Cancer* **129**, 2744-2755.
21. Um, H. J., Min, K. J., Kim, D. E. and Kwon, T. K. 2012. Withaferin A inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human renal carcinoma Caki cells. *Biochem Biophys Res Commun* **427**, 24-29.
22. Visse, R. and Nagase, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839.
23. Woo, J. H., Lim, J. H., Kim, Y. H., Suh, S. I., Min, D. S., Chang, J. S., Lee, Y. H., Park, J. W. and Kwon, T. K. 2004. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* **23**, 1845-1853.
24. Yang, E. S., Choi, M. J., Kim, J. H., Choi, K. S. and Kwon, T. K. 2011. Withaferin A enhances radiation-induced apoptosis in Caki cells through induction of reactive oxygen species, Bcl-2 downregulation and Akt inhibition. *Chem Biol Interact* **190**, 9-15.

초록 : 인간 자궁경부암세포인 Caski세포에서 withaferin A에 의한 PMA 매개 matrix metalloproteinase-9의 발현 억제 효과

김동은*

(계명대학교 의과대학 이비인후과)

Withaferin A는 *Withania somnifera*라는 식물에서 추출한 스테로이드 락톤으로 항염증, 항암, 그리고 면역증대 작용과 같은 다양한 역할을 한다. 그러나, withaferin A에 의한 MMP-9의 발현 및 활성화 조절에 대한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서 우리는 withaferin A가 인간 자궁경부암세포인 Caski세포에서 PMA 매개의 MMP-9의 발현과 활성화를 조절 할 수 있는지 확인하였다. Withaferin A는 농도의존적으로 PMA유도 MMP-9의 활성을 억제하였고, MMP-9의 promoter assay를 통하여 전사단계에서 조절됨을 확인하였다. 또한, Withaferin A에 의한 PMA 유도 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다. 이러한, withaferin A에 의한 MMP-9 발현 조절 전사인자로는 NF- κ B가 관여함을 확인하였다. Withaferin A는 PMA에 의한 세포이동을 억제하였는데, 이러한 현상은 MMP-9의 발현 및 활성을 조절함으로써 일어날 수 있음을 확인하였다.