

Dicumarol Inhibits PMA-Induced MMP-9 Expression through NQO1-independent manner in Human Renal Carcinoma Caki Cells

Eun Jung Park and Taeg Kyu Kwon*

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

Received January 23, 2016 / Revised February 11, 2016 / Accepted February 17, 2016

Dicumarol is a coumarin derivative isolated from sweet clover (*Melilotus alba*), and has anti-coagulant activity with the inhibitory activity of NAD(P)H quinone oxidoreductase1 (NQO1). NQO1 catalyzes the two-electron reduction of quinones to hydroquinones. Dicumarol competes with NAD(P)H for binding to NQO1, resulting in the inhibition of NQO1 enzymatic activity. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) has been implicated in the invasion and metastasis of cancer cells. The expression of MMPs is regulated by cytokines and signal transduction pathways, including those activated by phorbol myristate acetate (PMA). However, the effects of dicumarol on metalloproteinase (MMP)-9 expression and activity are not investigated here. This study investigated whether dicumarol inhibits MMP-9 expression and activity in PMA-treated human renal carcinoma Caki cells. Dicumarol markedly inhibited the PMA-induced MMP-9 mRNA expression and MMP-9 activity. NF- κ B and AP1 promoter activity, which is important in MMP-9 expression, also decreased in dicumarol-treated cells. Furthermore, dicumarol markedly suppressed the ability of PMA-mediated migration in Caki cells. When the relevance of NQO1 in the dicumarol-mediated inhibitory effect on PMA-induced MMP9 activity was elucidated, knock-down of NQO1 with siRNA was found to have no effect on PMA-induced MMP9 activity, suggesting that the stimulating effect of dicumarol on PMA-induced MMP9 activity is independent of NQO1 activity. Taken together, the present studies suggested that dicumarol may inhibit PMA-induced migration via down-regulation of MMP-9 expression and activity.

Key words : Caki cells, Dicumarol, Matrix metalloproteinase-9, NF- κ B, NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase1)

서 론

암에 의한 사망의 주요 원인은 암세포 전이 때문이다. 암 전이는 여러 단계를 거쳐서 일어나며, 원발병 부위에서 분리, 이동, 주변 조직으로 침투한다. 전이가 일어나는 과정 동안 암세포는 세포를 둘러싸고 있는 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)의 분해가 필수적으로 요구된다[13]. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 암세포의 전이가 일어나는 과정에서 세포 외 기질을 분해시키는 중요한 효소이고 아연/칼슘의존성으로 30 종류가 있으며 기질의 특성에 따라 구분된다[9, 18]. MMP는 기질의 형태에 따라서 1) collagenase, 2) gelatinase, 3) stromelysins, 4) matrilysins, 5) membrane type-MMP, 6) 그 외의 MMP가 있다[3, 21]. 이 중에서, 특히 gelatinase에 속하는 MMP-2와 MMP-9가 다양한 암세포에서

비정상적으로 활성이 높으며, 암세포의 침윤과 전이에 밀접한 관련이 있다[6, 17]. 한편 MMPs의 세포 내 자연적으로 발생된 내생적 억제인자로 알려진 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)에 의해 효소적 활성을 저해함으로써 ECM의 파괴를 억제하는 것으로 알려져 있다[10, 19].

Dicumarol은 전동싸리(*Melilotus alba*) 식물에서 추출한 coumarin 유도체로 vitamin K 의존적으로 항응고 작용을 한다[14]. Dicumarol의 또 다른 주기능은 NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)의 효소 저해제로 알려져 있다[4, 14]. NQO1은 flavoprotein 계통의 2개 전자 환원 효소이며 NADH 또는 NADPH를 보조인자로 quinone 계통의 화합물을 hydroquinone으로 환원 한다[20]. 암에서 NQO1은 그에 상응하는 정상 조직과 비교하였을 때 비교적 높은 발현을 나타낸다[15]. Dicumarol은 췌장암 세포주에서 NQO1저해 과정에서 superoxide 생성에 의해서 세포의 증식 억제를 유도한다[5]. 신장암 세포에서 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)과 dicumarol을 병합 처리 시 세포사멸을 증가시킨다고 알려져 있다[16]. 또한, dicumarol은 liver epithelial 세포에서 connexin-43 의존적인 gap junction을 억제한다[1]. 하지만, dicumarol에 의한 암세포의 전이 및 침투 억제에 대한 기전 연구는 아직 미흡하다.

*Corresponding author

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

E-mail : kwontk@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.

본 연구에서는 인간 신장암 세포인 Caki에서 protein kinase C (PKC) 활성 물질인 phorbol myristate acetate (PMA)에 의해 유도되는 MMP-9의 활성화 조절에 대한 dicumarol의 영향을 연구하였다. 또한 dicumarol에 의한 활성화 조절 기전을 규명하기 위하여, MMP-9의 발현 억제기전을 확인하고, 세포 이동에 영향을 주는지에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

본 연구에 사용한 인간 자궁경부암 세포주인 Caki 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 구입하였다. Dicumarol (Fig. 1A)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

MTT assay

Hansen [7]의 방법에 따라 Caki세포에 대한 dicumarol의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

Gelatin substrate gel zymography

PMA에 의해 유도되는 MMP-9의 활성화에 dicumarol가 미치는 영향을 알아보기 위하여 Caki세포에 dicumarol를 전처리 후 PMA를 처리하여 gelatin zymography를 시행하였다. 6-well plate에 0.4×10⁶의 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 제거

한 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 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, dicumarol를 30분 전 처리한 후 PMA를 24시간 처리하여, luciferase 활성을 측정하였다. 또한 AP-1과 NF-κB reporter construct는 Clontech (Palo Alto, CA, USA)으로부터 구입하여 위와 같은 방법으로 활성을 측정하였다. GFP (control)와 NQO1 small-interfering RNA (siRNA)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)으로부터 구입하여 lipofectamine™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 방법에 따라 transfection 하였다.

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

PMA에 의해 증가한 MMP-9의 mRNA발현이 dicumarol에 의해 억제되는지를 알아보기 위해서 RT-PCR을 이용하여 MMP-9의 mRNA 발현을 분석하였다. 시료를 처리한 세포에 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 total RNA를 분리 한 후, M-MLV 역전사효소(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성 하였다. 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, actin 의 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 bro-

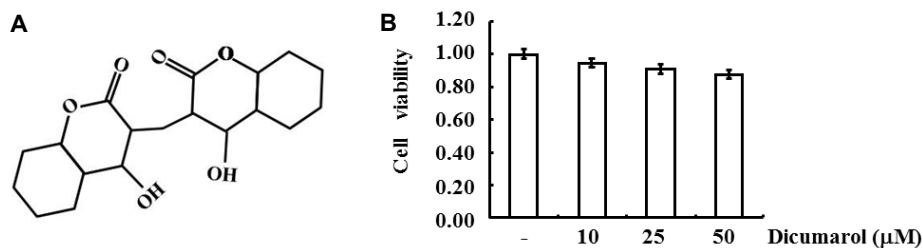


Fig. 1. Effect of dicumarol on viability of Caki cells. (A) Chemical structure of dicumarol. (B) Caki cells were treated with dicumarol at the indicated concentrations and cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically ($p < 0.05$) compared with blank group using Student's t test.

mide (EtBr)로 염색 한 후 UV 상에서 발현의 정도를 확인하였다.

Western Blotting

PMA치리에 의해 증가하는 MMP-9단백질 발현에 대한 dicumarol의 효과를 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 세포를 0.4×10^6 cells/well로 12시간 배양 후에, FBS를 첨가하지 않은 무혈청 배지로 교체하여 dicumarol을 30분 전 처리하고, PMA를 12시간 처리하여, 세포를 모아 40 μ l 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 사용

하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였으며, 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.

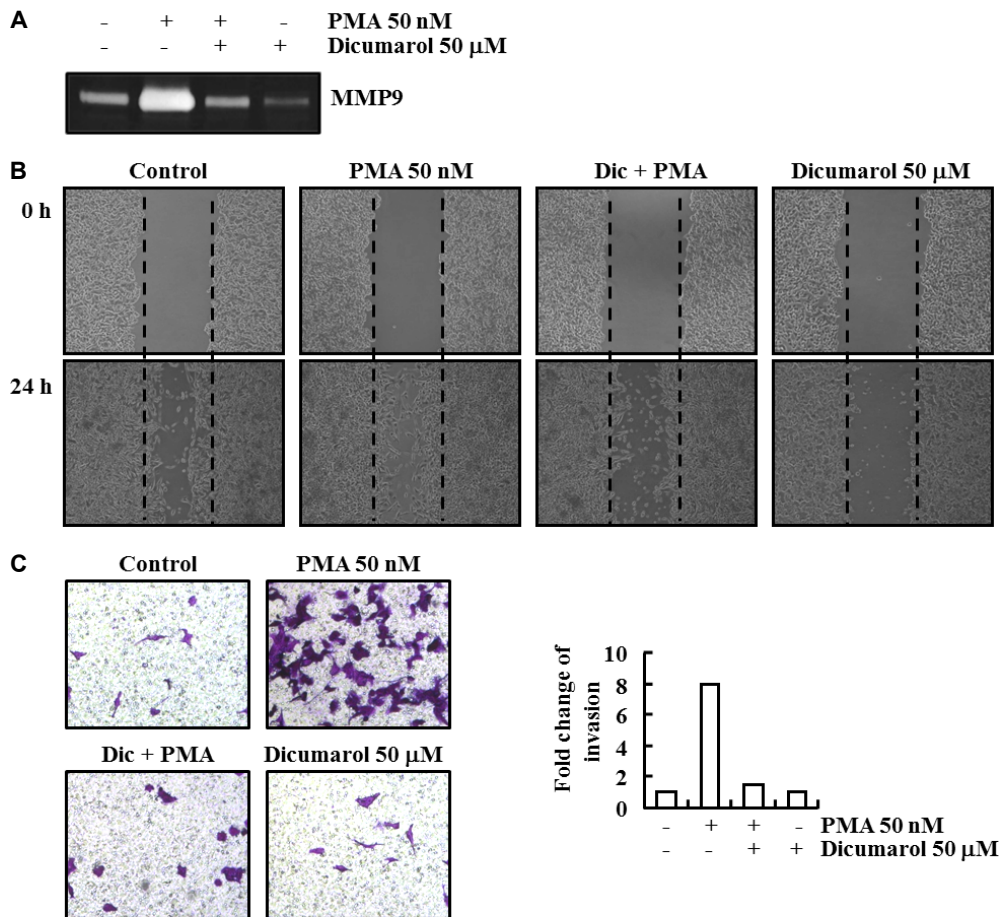


Fig. 2. Effect of dicumarol on PMA-induced MMP-9 activity and cell invasion. (A) Caki cells were pretreated with the indicated concentrations of dicumarol for 30 min, and then added 50 nM PMA for 24 hr. Conditioned media were collected, and MMP-9 activity was analyzed using gelatin zymography. The data represent three independent experiments. (B) Confluent monolayer of Caki cells was wounded and images were taken immediately (control-0 hr). After washing with PBS, Caki cells were pretreated with the indicated concentrations of dicumarol for 30 min, and then treated with 50 nM PMA for 24 hr. Wound gap was observed and cells were photographed using a Carl Zeiss microscope. The data represent three independent experiments. (C) Caki cells were pretreated with dicumarol (50 μ M) for 30 min followed by treatment with 50 nM PMA for 24 hr and the migrating cells were counted. Cell invasion was determined using Boyden Chamber.

Invasion Assay

Caki세포의 침투 분석은 Boyden chambers (6.5 mm diameter filters, 8 μm pore size)를 사용하여 측정하였다. Chamber 바깥쪽 바닥에는 세포 배양액 200 μl에 dicumarol 또는 PMA를 넣고, 위쪽에는 세포(5×10⁴/well) 200 μl 분주하였다. 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 1분간 고정시킨 후 crystal violet으로 염색한 후 현미경으로 관찰 하였다.

Wound healing assay

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

결 과

Dicumarol의 세포 독성 조사

본 실험에서는 dicumarol이 신장암 세포주 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포 독성 유무를 조사하였다. MTT assay를 이용하여 dicumarol의 세포독성 효과를 조사하였다. Caki 세포에서 50 μM 이하의 dicumarol 농도에서 blank군과 비교하여 어떠한 독성 효과도 없었다(Fig. 1B). 따라서, 50 μM 이하의 농도에서 dicumarol은 본 연구에서 사용된 Caki세포에 대하여 안전하다는 것을 나타낸다.

신장암세포인 Caki 세포에서 PMA유도 MMP-9 활성화에 dicumarol의 효과 확인

PMA는 다양한 세포에서 MMP-9의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다[22]. 신장암 세포인 Caki 세포에서도 PMA를 24시간 처리하면 MMP-9의 활성도가 증가하고, 이 때 50 μM dicumarol를 처리하면 PMA에 의한 MMP-9의 활성화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A).

본 연구에서는 PMA 유도에 의한 신장암 Caki 세포 이동성과 침윤과정에 dicumarol의 억제효과를 조사하기 위하여 wound healing migration 및 invasion assay를 실시하였다. Fig. 2B 및 2C의 결과 에서 알 수 있듯이 PMA 처리 세포에 비하여 dicumarol를 동시에 처리된 세포에서 Caki 세포의 이동성이 현저하게 억제되었다(Fig. 2B). 또한 PMA 처리에 의해 증가된 암세포 침윤이 dicumarol 처리에 의해 침윤율이 75% 감소하였다(Fig. 2C).

PMA 유도에 의한 MMP-9 mRNA 발현에 dicumarol의 영향

Dicumarol에 의한 PMA유도 MMP-9 활성화 조절 기전을 규명하기 위하여, 먼저, dicumarol에 의한 PMA유도 MMP-9의 mRNA 발현을 확인하였다. PMA는 MMP-9의 mRNA 발현이 12시간 처리 시 증가하였다. Dicumarol 50 μM 전처리 시 PMA 유도의 MMP-9 mRNA 발현이 억제 되었다(Fig. 3A). 또한 PMA는 MMP-9의 promoter활성화를 유의적으로 증가시켰고, 50 μM dicumarol를 전처리 하였을 경우 PMA유도 MMP-9 promoter 활성이 감소하였다(Fig. 3B). Dicumarol에 의하여 PMA유도 MMP-9의 발현이 전사단계에서 조절되는

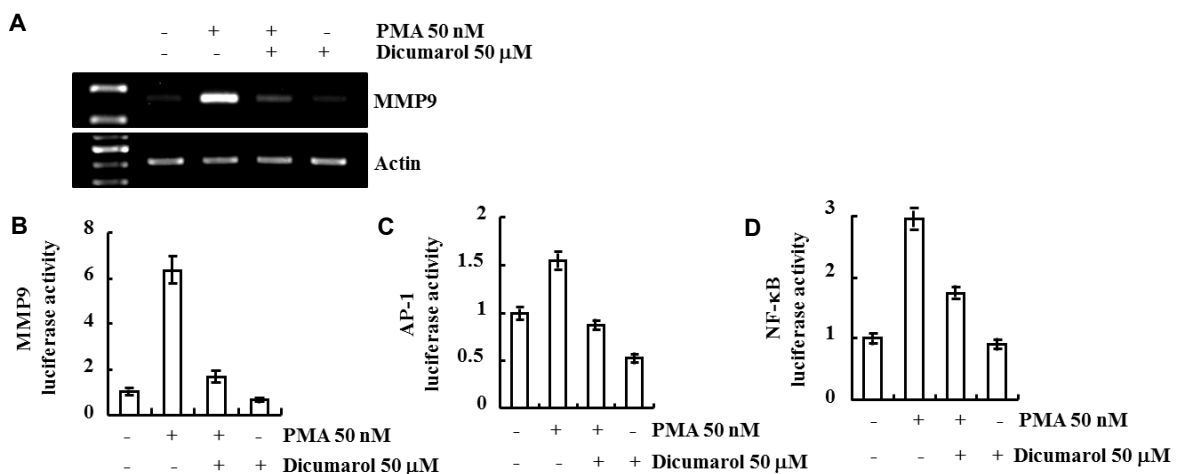


Fig. 3. Dicumarol inhibits PMA-induced MMP-9 mRNA and MMP-9 promoter activity and mRNA expression. (A) Caki cells were pretreated with the indicated concentrations of dicumarol for 30 min, and then added with 50 nM PMA for 24 hr. MMP-9 mRNA expression was determined using RT-PCR. (B-D) Caki cells were transfected with a MMP-9 promoter(B), NF-κB (C) and AP-1(D) -luciferase construct. After incubating for overnight, cells were pretreated with the 50 μM dicumarol for 30 min, and then treated with 50 nM PMA for 24 hr. Cells were lysed and assayed for luciferase activity. Values in (A) are mean±S.D. of three samples.

것을 확인하였다. 따라서, MMP-9 전사조절에 중요한 기능을 하는 NF-κB와 AP-1 전사인자의 활성화에 dicumarol의 영향을 조사하였다. PMA는 신장암 Caki세포에서 유의적으로 NF-κB와 AP-1의 promoter 활성을 증가시켰다(Fig. 3C, Fig. 3D). Dicumarol는 PMA유도 NF-κB와 AP-1의 promoter 활성을 억제할 야기하였다. 따라서, 이 실험을 통하여, dicumarol는 PMA유도 NF-κB와 AP-1의 promoter 활성을 특이적으로 억제시킨다는 것을 확인하였다.

Dicumarol에 의한 PMA 유도 MMP-9 발현 억제에 NQO1 관련성 조사

Dicumarol은 NQO1의 효소 활성 저해제를 잘 알려져 있다 [4, 14]. 따라서 dicumarol의 PMA 유도 MMP-9 활성 억제에 NQO1의 관련성을 확인하기 위하여 NQO1의 siRNA 처리에 의한 knock-down 시 PMA 유도 MMP-9 발현 및 wound healing migration 및 invasion assay를 실시하였다. NQO1 knock-down 하였을 때 PMA 유도 MMP-9 mRNA 발현 변화를 확인할 수가 없었다(Fig. 4A). 또한 PMA 처리에 의한 Caki세포의

이동 및 침윤이 NQO1 knock-down에 의하여 영향을 받지 않았다(Fig. 4B, Fig. 4C). 따라서, 이 실험을 통하여, dicumarol는 PMA 유도 MMP-9 활성 억제에 NQO1의 효소 활성 저해하고 무관함을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 신장암세포인 Caki세포에서 암세포의 전이 및 침윤에 중요하게 작용하는 단백질 분해효소인 MMP-9의 활성화 억제에 있어서, 다양한 항암효과를 가지는 dicumarol의 작용을 확인하였다.

PMA는 MMP-9의 활성을 유의적으로 증가시키고, 이러한 증가는 전사단계에서 조절되어 증가된다. Dicumarol는 PMA에 의해 증가한 MMP-9의 활성화를 억제하고(Fig. 2), 이러한 억제는 MMP-9의 전사단계에서의 조절에 의한 것이라는 것을 RT-PCR 및 promoter 활성 측정을 통하여 확인하였다(Fig. 2). PKC 활성화자로 알려진 PMA는 mitogen-activated protein kinase (MAPKs), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 신

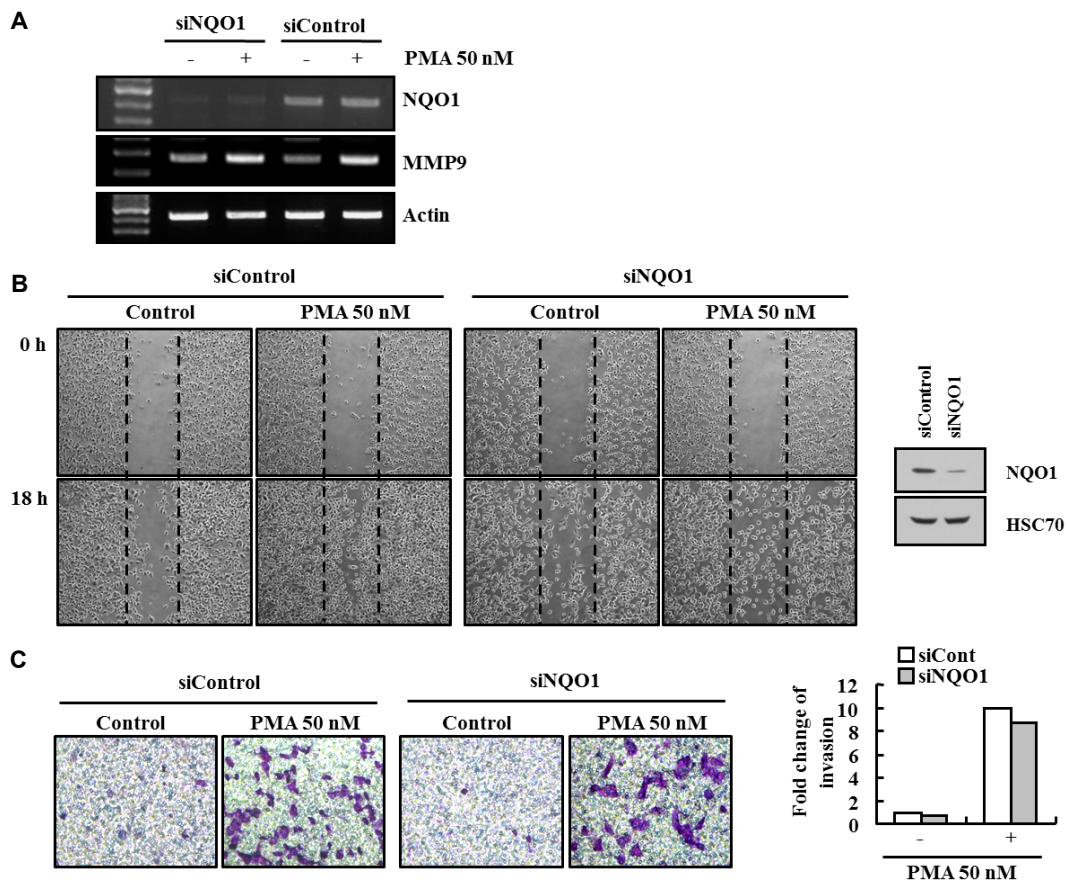


Fig. 4. Suppression of MMP-9 expression by dicumarol was not associated with inhibition of NQO1. (A) Caki cells transfected with either control siRNA or NQO1siRNA were treated with 50 nM PMA for 24 hr. NQO1 mRNA and MMP-9 mRNA expression were determined using RT-PCR. (B) Wound gap was observed and cells were photographed using a Carl Zeiss microscope. (C) Cell invasion was determined using Boyden Chamber.

호 전달계를 통하여 AP-1과 NF- κ B같은 전사인자의 활성화를 유도함으로써 MMP-9 mRNA 발현을 조절한다[8, 12]. Dicumarol 유도 MMP-9의 전사를 조절한다고 알려진 전사조절인자 중 NF- κ B와 AP1을 억제함으로써 PMA 유도의 MMP-9 활성을 억제한다. Dicumarol은 피부암 세포에서 TNF- α 매개의 apoptosis를 JNK 및 NF- κ B 신호 전달계의 저해를 통하여 증진한다[2]. PMA에 의한 MMP-9의 활성억제의 의미는 PMA 유도 세포이동이 dicumarol에 의해 감소되는 것을 확인함으로써(Fig. 2), dicumarol가 세포의 이동 및 침윤을 조절할 수 있는 가능성을 확인하였다.

이전 보고에서 dicumarol은 vitamin K 의존적으로 혈액응고를 저해하는 anticoagulant 기능이 잘 알려져 있다[14]. 또한 NQO1효소의 NAD(P) 결합을 경쟁적으로 작용하므로 NQO1 효소 저해제 작용을 한다[4]. 최근 인간 혈관 평활근세포에서 TNF- α 에 의한 MMP-9 발현 및 분비에 NQO1의 관련성을 NQO-1 siRNA 실험을 통하여 제시하였다[11]. Dicumarol에 의한 NQO1의 저해는 환원된 quinone의 생성 감소에 기인된다고 제시하고 있다[11]. 본 연구에서는 NQO1 siRNA를 이용한 knock-down 실험에서 dicumarol이 PMA유도의 MMP-9 활성 억제에 NQO1의 관련성을 확인 할 수 없었다(Fig. 4). 본 연구진에서 최근 dicumarol과 TRAIL 병합 처리에 의한 세포 사멸 민감화 과정에서 dicumarol의 작용기전에 NQO1이 관련하지 않음을 보고하였다[16]. 이상의 상반된 차이점은 MMP-9 유도 물질, 세포주, siRNA에 의한 knock-down 정도의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서, dicumarol에 의한 신장암 세포에서 MMP-9 활성화 억제가 NF- κ B와 AP1을 억제와 다른 작용 기전에 대한 추가적인 실험이 필요하다.

최근 국내외에서도 NQO1 저해제를 이용한 연구가 진행 중이며, 그 중에서도 새로운 NQO1 저해제 개발 연구가 활발히 수행되고 있다. 그러나 dicumarol을 이용하여 암세포 침윤과 전이에 주요한 인자인 MMP-9에 대한 억제 효과는 아직 일반적으로 확인되지 않아 이 연구결과의 의미가 더욱 중요할 것이라 판단된다.

References

1. Abdelmohsen, K., Stuhlmann, D., Daubrawa, F. and Klotz, L. O. 2005. Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Arch. Biochem. Biophys.* **434**, 241-247.
2. Ahn, K. S., Sethi, G., Jain, A. K., Jaiswal, A. K. and Aggarwal, B. B. 2006. Genetic deletion of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 abrogates activation of nuclear factor-kappa B, Ikappa B alpha kinase, c-Jun N-terminal kinase, Akt, p38, and p44/42 mitogen-activated protein kinases and potentiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 19798-19808.
3. Amalinei, C., Caruntu, I. D. and Balan, R. A. 2007. *Biology of metalloproteinases. Rom. J. Morphol. Embryol.* **48**, 323-334.
4. Asher, G., Dym, O., Tsvetkov, P., Adler, J. and Shaul, Y. 2006. The crystal structure of NAD(P)H quinone oxidoreductase1in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry* **45**, 6372-6378.
5. Cullen, J. J., Hinkhouse, M. M., Grady, M., Gaut, A.W., Liu, J., Zhang, Y. P., Weydert, C. J., Domann, F. E. and Oberley, L.W. 2003. Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase 1 induces growth inhibition of pancreatic cancer via a superoxide-mediated mechanism. *Cancer Res.* **63**, 5513-5520.
6. Festuccia, C., Giunciuglio, D., Guerra, F., Villanova, I., Angelucci, A., Manduca, P., Teti, A., Albin, 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.
7. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
8. Jung, J. S., Jung, K., Kim, D. H. and Kim, H. S. 2012. Selective inhibition of MMP-9 gene expression by mangiferin in PMA-stimulated human astrogloma cells: involvement of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Pharmacol. Res.* **66**, 95-103.
9. Kato, Y., Yamashita, T. and Ishikawa, M. 2002. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol. Rep.* **9**, 565-569.
10. Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. and Petitfrere, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 187-198.
11. Lee, S. O., Chang, Y. C., Whang, K., Kim, C. H. and Lee, I. S. 2007. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 on tumor necrosis factor-alpha-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **76**, 331-339.
12. Ling, H., Zhang, Y., Ng, K. Y. and Chew, E. H. 2011. Pachymic acid impairs breast cancer cell invasion by suppressing nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Breast Cancer Res. Treat.* **126**, 609-620.
13. Matsunaga, Y., Koda, M. and Murawaki, Y. 2004. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in hepatocellular carcinoma tissue, compared with the surrounding non-tumor tissue. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **115**, 143-150.
14. Nolan, K. A., Scott, K. A., Barnes, J., Doncaster, J., Whitehead, R. C. and Stratford, I. J. 2010. Pharmacological inhibitors of NAD(P)Hquinone oxidoreductase, NQO1: structure /activity relationships and functional activity in tumour cells, *Biochem.Pharmacol.* **80**, 977-981.
15. Park, E. J., Choi, K. S. and Kwon, T. K. 2011. β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. *Chem. Biol. Interact.* **189**, 37-44.
16. Park, E. J., Min, K. J., Choi, K. S. and Kwon, T. K. 2014. Dicoumarol sensitizes renal cell carcinoma Caki cells to

- TRAIL-induced apoptosis through down-regulation of Bcl-2, Mcl-1 and c-FLIP in a NQO1-independent manner. *Exp. Cell Res.* **323**, 144-154.
17. 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.
 18. Soreide, K., Janssen, E. A., Korner, H. and Baak, J. P. 2006. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J. Pathol.* **209**, 147-156.
 19. Uzui, H., Harpf, A., Liu, M., Doherty, T. M., Shukla, A. and Chai, N. 2002. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* **106**, 3024-3030.
 20. Vasiliou, V., Ross, D. and Nebert, D. W. 2006. Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum. Genomics* **2**, 329-335.
 21. Visse, R. and Nagase, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827-839.
 22. 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.

초록 : 인간 신장암 Caki세포에서 dicumarol에 의한 PMA 매개 matrix metalloproteinase-9의 발현 억제 효과

박은정 · 권택규*

(계명대학교 의과대학 면역학교실)

Dicumarol은 전동싸리 식물에서 추출한 coumarin 유도체로 vitamin K 의존적으로 항응고 작용을 한다. 그러나, dicumarol에 의한 MMP-9의 발현 및 활성화 조절에 대한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서 dicumarol이 인간 신장암 Caki세포에서 PMA 매개의 MMP-9의 발현과 활성화를 조절 할 수 있는지 확인하였다. Dicumarol은 PMA유도 MMP-9의 활성을 억제하였고, MMP-9의 mRNA RT-PCR 및 promoter assay를 통하여 전사단계에서 조절됨을 확인하였다. Dicumarol에 의한 MMP-9 발현 조절에 NF- κ B와 AP1 전사인자의 전사 활성 저해에 의하여 야기됨을 확인하였다. NQO1 siRNA를 이용한 knock-down 실험에서 dicumarol이 PMA유도의 MMP-9 활성 억제에 NQO1의 관련성을 확인 할 수 없었다. Dicumarol은 PMA에 의한 세포이동 및 침윤을 억제하였는데, 이러한 현상은 MMP-9의 발현 및 활성을 조절함으로써 일어날 수 있음을 확인하였다.