

## Keratinocytes 세포의 MMP-2 및 plasmin 분비에 미치는 VEGF의 영향

김 환 구·오 인 숙·소 상 섭·박 종 완\*  
전북대학교 생물과학부, <sup>1</sup>정인대학 피부미용과  
(접수 : 2001. 1. 22., 게재승인 : 2001. 5. 2.)

## Effect of VEGF on the Secretion of MMP-2 and Plasmin from Human Keratinocyte Cells

Hwan-Gyu Kim, In-Suk Oh, Sang-Sup So, and Chong-Wan Park\*<sup>1</sup>

Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

<sup>1</sup>Department of Esthetics, Chongin College, Jungup, Chonbuk 580-060, Korea

(Received : 2001. 1. 22., Accepted : 2001. 5. 2.)

Epithelial cell migration plays an important role in many physiological processes such as morphogenesis and wound healing, and cell mobility requires the release of the cell from its adhesion site. This is directed, at least in part, by limited proteolysis of matrix molecules by matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs are zinc-dependent proteases produced by a variety of cell types, and have a fundamental role in tissue remodelling, tumour invasion and metastasis. In addition, the ability of cells to mediate fibrinolytic activity is largely attributed to the powerful fibrinolytic agent, plasmin. The purpose of this study was to test if vascular endothelial growth factor (VEGF) can regulate the production of MMPs and plasmin by keratinocyte cells. Supernatants from a human keratinocyte cell line grown in the presence or absence of VEGF, were analysed using gelatin and fibrin zymography. Compared with the addition of control buffer, VEGF (10ng/mL) produced  $\approx 2.5$  fold increases in cell proliferation, and  $\approx 3.0$  fold increases in MMP-2 and plasmin levels. Our results suggest that VEGF may modulate keratinocyte cell proliferating activity by increasing the abundance of MMP-2 and plasmin, and indicates a role for VEGF in the regulation of keratinocyte behaviour in wound healing and tissue remodelling.

**Key Words** : keratinocytes, MMP-2, plasmin, VEGF

### 서 론

상피세포의 이동은 형태형성 및 상처치유 같은 생리적인 과정에 중요한 역할을 하며 만성염증 및 종양전이 같은 여러 병적인 과정에도 필수적이다(1-3). 세포의 이동에는 부착 부위로부터 세포의 분리가 요구되는데(4), 이러한 작용은 부분적으로 matrix metalloproteinases (MMPs)의 단백질 분해작용에 의해 이루어진다(5). MMPs는  $Zn^{2+}$ -의존성 endopeptidase로서 세포의 기질을 분해하는 능력을 갖고 있다(6,7). MMPs는 지금까지 20여 종류가 알려져 있으나 세포의 기질의 재구성 과정에 중요한 역할을 하는 MMPs로는 MMP-1 (interstitial collagenase, type I collagenase), MMP-2 (72 kDa gelatinase A; EC 3.4.24.24), MMP-9 (92 kDa gelatinase B)과 MMP-3

(stromelysin) 등이다(8,9). 이 중에서 MMP-2는 gelatin과 fibronectin 같은 세포외 기질을 분해한다고 알려져 있다(10). MMP-2 mRNA는 종양이나 종양 주위의 간질조직에서 높게 나타나나 정상인에서도 상처치유, 임신과 분만, 골재생 같은 생리적 작용에도 관여한다고 알려져 있다(11). 한편 MMP-2는 내재성 억제제인 tissue inhibitors of metalloproteinase-2 (TIMP-2)와 1:1의 복합체를 형성하는 방법으로 활성이 조절된다(12,13). TIMP-2는 proMMP-2의 단백질분해 활성을 억제하거나 matureMMP-2의 효소활성을 억제한다고 알려져 있다(14). 지금까지의 연구 결과를 보면 MMP-2와 TIMP-2 사이의 양적 균형이 이동하는 세포에 의한 결합조직의 붕괴를 조절하는데 중요할 것이라 여겨진다(15). 한편 plasmin은 serine계 단백질 분해효소로서 MMPs와 마찬가지로 세포외 기질을 분해하는데 관여한다고 알려져 있다(16). 그러나 아직까지도 MMP-2 및 plasmin의 생성 및 활성화에 대한 자료가 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생체 내에서의 MMP-2와 plasmin의 역할을 구명하기 위한 첫 단계로 keratinocytes 세포를 이용해 VEGF가 MMP-2 및 plasmin의 분비에 미치는

\*Corresponding Author : Department of Esthetics, Chongin College, San 9-28, Sigi-Dong, Jungup, Chonbuk 580-060, Korea.  
Tel : +82-63-530-9265, Fax : +82-63-532-3768  
E-mail : chongwan@chongin.ac.kr

영향을 조사하였다. 그 결과 VEGF는 keratinocytes 세포를 자극하여 MMP-2 및 plasmin의 분비를 촉진한다는 것을 밝혔으며 이것은 VEGF가 세포이동, 상처치유 및 조직재생 같은 세포의 성장에 밀접하게 관여하고 있음을 나타내준다.

## 재료 및 방법

### 시 약

제조합 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF<sub>165</sub>)는 R & D system (Minneapolis, MN)로부터 구입하였으며 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다. 그 외 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma (St. Louis, MO) 사로부터 구입하였다.

### 세포배양

Keratinocytes 세포(SCC-4)는 ATCC (Rockville, MD)로부터 구입하였으며 열로 불활성화시킨 fetal bovine 혈청이 20% (v/v) 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### DNA 합성, 세포 수 측정

DNA의 양은 PicoGreen fluorescent reagent (Molecular Probes)를 사용하여 Singer 등(17)의 방법에 따라 측정하였다. 세포 수는 트립신 처리 후 Coulter Counter System을 사용하여 계수하였다.

### 분비된 MMPs의 측정

Keratinocytes 세포를 24-well plate에 세포밀도가  $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>이 되도록 접종한 다음 20% 혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 confluent한 keratinocytes 세포를 무혈청, 무-phenol red 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조 완충용액 혹은 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리하였다. MMP-2의 실제양은 제조 회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay (FUJI Chemical Industries, Toyama, Japan)로 측정하였다.

### Gelatin & fibrin zymography

MMPs의 기질 분해 활성은 gelatin 및 fibrin zymography를 행하여 확인하였다. Gelatin zymography는 MMPs의 기질인 gelatin을 SDS-PAGE의 running gel에 첨가한 후 reducing 조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 후 배양 완충용액 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>와 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다 (37°C). 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다. Plasmin 활성은 fibrin zymography를 행하여 확인했으며 기질로서 fibrin을 첨가하였다.

## 결과 및 고찰

### VEGF의 세포증식에 미치는 효과

Keratinocytes 세포의 증식에 미치는 VEGF의 효과를 확인

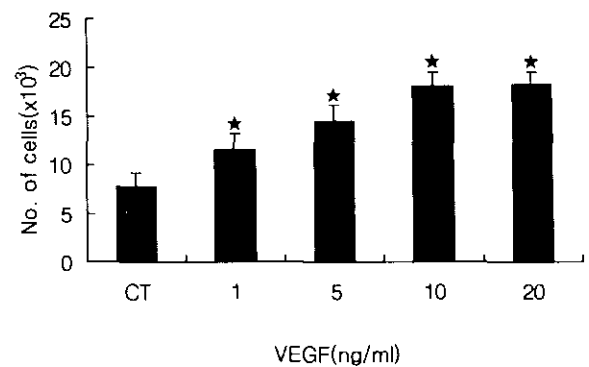


Figure 1. Effect of VEGF on the proliferation of keratinocyte cells. Cells were counted with a Coulter system after trypsinization. To measure cell number, the cells were grown to confluence in gelatinized 24-well plates in medium containing 2% serum and various amounts of VEGF and incubated for 20 hours. Data are mean  $\pm$  SD from three experiments. \* $P < 0.05$  vs control buffer.

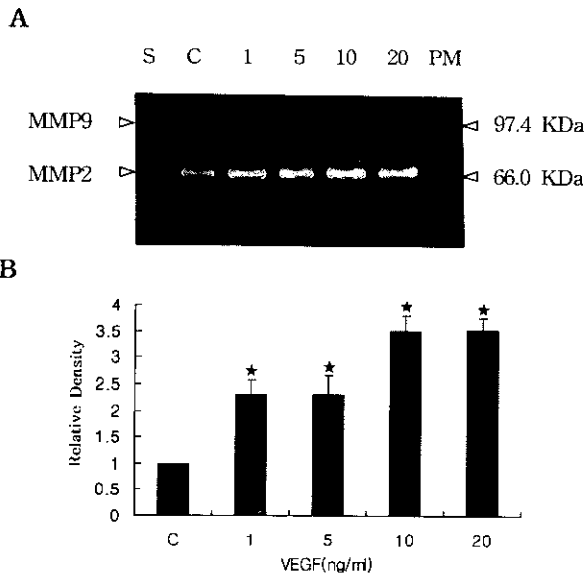
한 결과 세포수 증가가 농도에 의존적으로 이루어졌다 (Figure 1). 이러한 결과는 Ferrara & Davis-Smyth(18)와 Chae 등(19)의 결과와 일치하는 것으로 VEGF가 내피세포 뿐만 아니라 keratinocytes 세포에서도 강력한 mitogen임을 확인하였다. 또한 DNA 합성 능력에서도 세포수의 증가와 유사한 결과를 보여 주었다 (자료 미제시). 이후의 실험에서는 submaximal effect를 보이는 농도인 10 ng/mL을 사용하였다.

### MMP-2의 분비에 미치는 VEGF의 효과

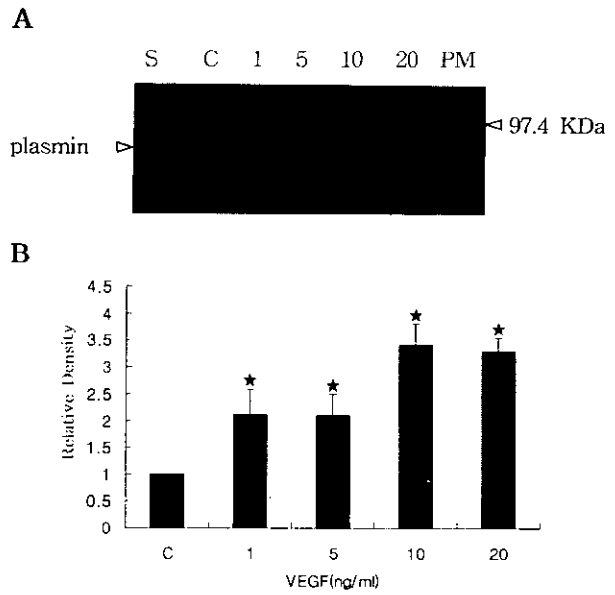
VEGF의 농도 증가에 따른 MMP-2의 분비에 미치는 효과를 확인한 결과 (Figure 2), 10 ng/mL에서 최대 효과가 나타났으며 그 이상은 증가 효과가 없었다. 한편 VEGF (10 ng/mL)의 MMP-2 분비에 미치는 영향을 조사한 결과 1시간만에 확인 가능한 밴드가 나타났으며 (Figure 3), 계속 배양한 결과 12시간까지 시간 의존적으로 MMP-2의 분비가 증가되었다. 대조군으로서 무처리 군과의 비교를 통해 VEGF가 MMP-2의 분비에 효과적으로 작용한다는 것을 확인했다. 이 결과는 human umbilical-vein endothelial cells 및 porcine coronary artery endothelial cells 등의 내피세포를 이용한 실험 결과와 일치하는 것으로(7,20) 상피세포에서도 세포의 이동, 상처 치유 및 조직 재생 같은 세포의 성장에 MMP-2가 밀접하게 관여할 것임을 시사하고 있다. 또한 이 결과는 MMP-2가 정상 조직에서 가장 많이 생성된다는 결과(2,21)와 일치하는 것으로 종양 증식 뿐만 아니라 정상 조직의 지속적인 성장 과정에도 MMP-2가 중요한 역할을 할 것임을 의미한다. 한편 VEGF 처리 후 1시간만에 MMP-2가 분비된다는 것은, 이미 생성된 MMP-2가 세포막에 결합되어 있다가 VEGF의 자극으로 세포외로 방출될 것으로 여겨진다(7,22). 이러한 개념은 northern hybridization을 통하여 추후 확인할 계획이다.

### Plasmin의 유도

세포가 증식하거나 조직이 재생되기 위해서는 세포가 fibrin gel을 투과하여야만 한다. 이러한 과정에 관여한다고 알려진 MMP-2는 막-결합성 MMP (MT-MMP) 또는 plasmin, kallikrein과 트립신-유사 단백질 분해효소 같은 serine계 단백



**Figure 2.** Zymographic analysis of the secretion of MMP-2 in culture medium of keratinocyte cells. Cells were incubated in serum-free and phenol red-free DMEM for 24 hours. Control buffer (C) and VEGF (1,5,10, and 20 ng/mL, respectively) were added to 0.5 mL of same culture medium and incubated for 24 hours. Ten microliters were loaded. Lane S contains MMP standards and PM contains protein markers. (A) Gelatin zymography. (B) Densitometric analysis of graph is presented as the relative ratio of induction of MMP-2 by the addition of control buffer for 24 hours is arbitrarily presented as 1. Data are mean  $\pm$  SD from three experiments. \* $P$ <0.05 vs control buffer.



**Figure 4.** Fibrin zymography of plasmin secretion in culture medium of keratinocyte cells. Cells were incubated in serum-free and phenol red-free DMEM for 24 hours. Control buffer (C) and VEGF (1,5,10, and 20 ng/mL, respectively) were added to 0.5 mL of same culture medium and incubated for 24 hours. Ten microliters were loaded. Lane S contains standards of plasmin and PM contains protein markers. (A) Fibrin zymography. (B) Densitometric analysis of graph is presented as the relative ratio of induction of plasmin by the addition of control buffer for 24 hours is arbitrarily presented as 1. Data are mean  $\pm$  SD from three experiments. \* $P$ <0.05 vs control buffer.

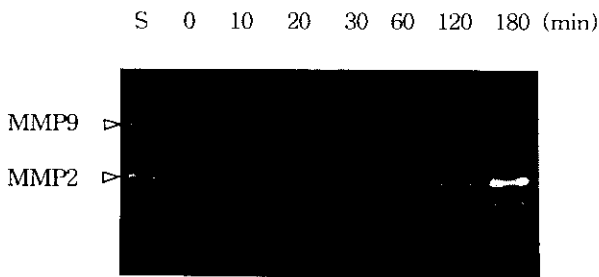
결과는 keratinocytes 세포의 이동과 성장에 MMP-2와 plasmin이 부분적으로 관여할 것임을 시사하고 있다.

**요약**

본 연구에서는 keratinocytes 세포를 이용하여 VEGF가 세포의 증식, MMP-2 및 plasmin 분비에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 VEGF는 keratinocytes의 세포증식을 약 2.5배 상승시켜 내피세포 뿐만 아니라 상피세포에서도 강력한 mitogen임을 확인하였으며 submaximal effect를 보이는 농도는 10 ng/mL이었다. VEGF의 농도 증가에 따른 MMP-2의 분비에 미치는 효과 역시 10 ng/mL에서 최대 효과를 나타냈으며 VEGF 처리 후 1시간만에 확인 가능한 MMP-2 밴드가 나타났다. 한편, MMP-2의 분비 증가와 함께 plasmin의 분비 증가가 수반되는지를 확인한 결과 VEGF를 첨가했을 때 약 3배 정도 plasmin의 분비량이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 VEGF의 성장촉진 효과와 관련지어 볼 때 MMP-2와 plasmin이 keratinocytes 세포의 성장과 이동에 부분적으로 관여할 것임을 시사하고 있다.

**REFERENCES**

1. Marja M., Larjava H., Pirila E., Maisi P., Salo T., Sorsa T., and Uitto V.J (1999), Matrix metalloproteinase 2 (Gelatinase A) is related to migration of keratinocytes,



**Figure 3.** Gelatin zymography of MMP-2 secretion in culture medium of keratinocyte cells treated with VEGF. VEGF (10 ng/mL) was added to culture medium and media were collected at indicated times and ten microliters of sample were loaded into each lane.

질 분해효소에 의해 활성화된다고 알려져 있으므로(23), 앞에서 확인한 MMP-2의 증가와 함께 plasmin의 증가가 수반되는지를 확인하였다. 즉, VEGF가 keratinocytes 세포로부터 plasmin의 분비를 유도하는지를 확인한 결과 VEGF를 첨가했을 때 약 3배 정도 plasmin의 분비량이 증가함을 알 수 있었다 (Figure 4). 완충용액만을 첨가한 대조군과 비교해 볼 때 VEGF 처리시 약 85 KDa의 fibrinolytic 밴드의 뚜렷한 증가가 관찰되었다. 즉, submaximal 농도 (10 ng/mL)를 이용하여 plasmin의 분비 효과를 측정할 결과 plasmin 역시 MMP-2와 마찬가지로 VEGF 처리 후 1시간만에 검출되었으며 처리 후 24시간까지도 분비 효과가 지속되었다 (자료 미제시). 이러한

- Exp Cell Res*, **251**, 67-78.
2. Agren, M. S (1994), Gelatinase activity during wound healing, *Br J Dermatol*, **131**, 634-640.
  3. Pepper, J. S., Montesano, R., Mandriota, S. J., Orci, L., and Vassalli, J. D (1996), Angiogenesis : a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis, *Enzyme Protein*, **49**, 138-162.
  4. Huttenlocher, A., Sandborg, R. R., and Horwitz, A.F (1995), Adhesion in cell migration, *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 697-706.
  5. Heino, J (1996), Biology of tumour cell invasion : Interplay of cell adhesion and matrix degradation, *Int J Cancer*, **65**, 717-722.
  6. Woessner, J. F., Jr (1994), The family of matrix metalloproteinase, *Ann N Y Acad Sci*, **732**, 11-21.
  7. Lamoreaux, W. J., Fitzgerald, M. E. C., Reiner, A., Hasty, K. A and Chares, S. T (1998), Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decrease of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells *in vitro*, *Microvas Res*, **55**, 29-42.
  8. Frederick, J., and Woessner, J. F Jr (1998), The matrix metalloproteinase family, *In Matrix metalloproteinase* (Parks, W. C., and Mecham, R. P., Eds), pp. 1-14. Academic Press, London.
  9. Matrisian, L. M (1992), The matrix-degrading metalloproteinases, *BioAssays*, **14**, 455-463.
  10. Anita, E. Y., Murphy, A. N and Stetler-Stevenson, W. G (1998), 72 kDa gelatinase (gelatinase A) : structure, activation, regulation, and substrate specificity, *In Matrix metalloproteinase* (Parks, W. C., and Mecham, R. P., Eds), 85-113. Academic Press, London.
  11. Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler-Stevenson. W. G (1991), Cancer metastasis and angiogenesis : An imbalance of positive and negative regulation, *Cell*, **64**, 327-336.
  12. Stetler-Stevenson. W. G., Azanvoorian, S., and Liotta, A (1993), Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis, *Ann Rev Cell Biol*, **9**, 541-573.
  13. Nagase, H, (1997), Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *J Biol Chem*, **378**, 151-160.
  14. Ward, R. V., Atkinson, S. J., Slocombe, P. M., Docherty, A. J., Reynolds, J. J., and Murphy, G (1991), Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits the activation of 72 kDa progelatinase by fibroblast membranes, *Biochem Biophys Acta*, **1079**, 242-246.
  15. Kim, H. G. and Koh, G. Y (2000), Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- $\kappa$ B-dependent pathway, *Biochem Biophys Res Commu*, **269**, 401-405.
  16. Mazar P., Henkin J., and Goldfarb R.H (1999), The urokinase plasminogen activator system in cancer : Implication for tumor angiogenesis and metastasis, *Angiogenesis*, **3**, 15-32.
  17. Singer, V. L., Jones, L. J., Yu S. T., and Haugland, R. P (1997), Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double stranded DNA quantitation, *Anal Biochem*, **249**, 228-238.
  18. Ferrara, N. and Davis-Smyth, T (1997), The biology of vascular endothelial cell growth factor, *Endocr Rev*, **18**, 4-25.
  19. Chae J. K., Kim, I., Lim, S. T., Chung, M. J., Kim, W. H., Kim, H. G., Ko, J. K., and Koh, G. Y (2000), Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization, *Arter Throm Vas Biol*, **20**, 2573-2578.
  20. Kim, I., Moon S. O., Koh, K. N., Kim, H., Uhm C. S., Kwak, H. J, Kim, N. G., and Koh G. Y (1999), Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting, *J Biol Chem*, **274**, 26523-26528.
  21. Herrera-Velit, P. and Reiner, N. E (1996), Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56 and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes, *J Immunol*, **156**, 1157-1165.
  22. Arditi, M., Zhou, J., Torres, M., Durden, D. L., Stins, M., and Kim, K. S (1995), Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells, *J Immunol*, **155**, 3994-4003.
  23. Sorsa, T., Salo, T., Koivune, E., Tynnela, T., Kontinen, Y. T., Bergman, U., Tuuttila, A., Niemi, E., Teronen, O., Heikkila, P., Tschesche, H., Leinonen, T., Osman, S., and Stenman, U. H (1994), Activation of type IV procollagenase by human tumor-associated trypsin-2, *J Biol Chem*, **272**, 21067-21074.