

## 후두암 세포주에서 TGF- $\beta$ 1에 의한 MMP2와 MMP9의 발현 양상

고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실  
권남영 · 김형진 · 우정수 · 권순영 · 정광윤

= Abstract =

### The Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 on Expression of MMP 2 and MMP 9 Cell Lines

Nam Young Kwon, M.D., Hyung Jin Kim, M.D., Jeong Su Woo, M.D.,  
Soon Young Kwon, M.D., Kwang-Yoon Jung, M.D.

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Korea University, College of Medicine, Seoul, Korea*

**Backgrounds and Objectives** : Metastasis is a complex multistep process that requires sequential interactions between the invasive cell and the extra-cellular matrix. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a multifunctional regulator of cellular differentiation, motility and growth. Loss of sensitivity to the growth inhibitory effects by TGF- $\beta$ 1 plays important roles in neoplastic progression. The aim of this study was to investigate the role of TGF- $\beta$ 1 in the neoplastic invasion and metastasis through matrix metalloproteinase (MMP) of laryngeal cancer cell lines.

**Material and Methods** : Two laryngeal cancer cell lines, SNU-899 and SNU-1076 were treated with recombinant TGF- $\beta$ 1, and the expression of MMP-2 and MMP-9 was immunohistochemically evaluated and gelatinase activity was studied by gelatin zymogram.

**Results** : The cell growth inhibition was evident on 4th days after 1ng/ml and 10ng/ml rTGF- $\beta$ 1 treatment. The expressions of MMP-2 and MMP-9, and their gelatinase activities were increased in dose-dependent manner.

**Conclusion** : TGF- $\beta$ 1 treatment in laryngeal cancer cell lines induces the expression of MMP-2 and MMP-9, thus playing a role in the digestion of extracellular matrix gelatin.

**KEY WORDS** : Laryngeal neoplasms · Metastasis · TGF- $\beta$ 1 · MMP2 · MMP9.

## 서 론

인체 조직의 정상적인 항상성 유지를 위해서는 세포와 세포외 기질(extracellular matrix)이라 불리는 세포 주위의 분비 단백질들 상호간의 엄격한 조절 작용이 필요하다. 이러한 상호작용에 있어 세포외 기질(ECM)에 존재하는 cyto-

kine들과 수용체(receptor)들이 요구되고, 세포와 cytokine들과의 비정상적인 상호작용은 암을 비롯한 다양한 질병을 유발하게 된다.

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )는 Bone Morphogenic Protein(BMP)과 Activin의 구조와 유사한 단백질 이합체 구조를 가지고 있다. 많은 세포들은 TGF- $\beta$ 를 생성하고 동시에 그 수용체들을 가지고 있으며, TGF- $\beta$ 는 세포의 성장과 분화를 조절하고 또한 태아 발생, 창상 치유, 그리고 신생혈관형성에 관여한다고 알려져 있다<sup>1)2)</sup>.

TGF- $\beta$ 의 어원은 이 성장인자가 soft agar를 이용한 섬유아세포(fibroblast)의 배양에서 세포의 성장을 촉진할 수

교신저자 : 정광윤, 136-705 서울특별시 성북구 안암동 5가 126-1  
고려대학교 안암병원 이비인후-두경부외과학교실  
전화 : (02) 920-5536 · 전송 : (02) 925-5233  
E-mail : kyjung@kumc.or.kr

있다는 발견에서 유래되었지만 여러 종류의 상피세포에서는 세포 성장을 억제하는 인자로서 작용한다<sup>6)</sup>.

TGF- $\beta$ 의 발암과정에서의 중요성은 지난 10년간의 집중적인 연구를 통하여 밝혀졌다. 즉 암발생 과정에서 TGF- $\beta$ 의 신호전달과정을 담당하는 요소들에 돌연변이가 유발되고, 이러한 TGF- $\beta$ 의 신호전달체계의 결핍으로 인해 세포들이 TGF- $\beta$ 의 정상적인 성장억제 활성화에 저항성을 가지게 되어 계속적으로 증식하게 됨으로써 발암과정에서 기여하는 것으로 보고되었다<sup>3,4)</sup>.

발암과정에서 TGF- $\beta$ 는 oncogenic activity를 가지는 것으로 알려졌지만, 전이과정에서의 분자생물학적 기전은 아직도 잘 밝혀지지 않았다.

일반적으로 TGF- $\beta$ 는 세포성장과 전이에서 중요한 역할을 담당하는 ECM의 생성과 축적에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있다<sup>7-9)</sup>.

종양 세포에서 분비되어 세포기질의 단백질을 분해하는 효소는 serine proteinase, cysteine proteinase, matrix metalloproteinase(MMP) 등이 있고, MMP 계열 중 두 종류의 type IV collagenase인 MMP-2(72kDa)와 MMP-9(92kDa)은 기저막의 주요성분인 type IV collagen gelatin과 fibronectin을 분해하는 것으로 알려져 있다<sup>10,11)</sup>.

TGF- $\beta$ 1은 종양세포와 섬유아 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 분비를 증가시킨다는 사실이 보고되고 있다. 본 연구에서는 후두암 세포주에서 recombinant TGF- $\beta$ 1을 처리 후 암전이에 관여하는 MMP-2와 MMP-9 단백질의 발현과 효소 활성도를 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 재료

후두암 세포주인 SNU-899와 SNU-1076을 한국세포주은행에서 구입하였다. SNU-899는 TGF- $\beta$ RII, exon 4의 codon 389에서 AAC $\rightarrow$ AAT(Asn $\rightarrow$ Asn) 돌연변이가 있는 것이고, SNU-1076은 p16, exon 2의 codon 106에서 CCC $\rightarrow$ CAC(Pro $\rightarrow$ His) 돌연변이가 있는 세포주이다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 세포 성장 억제 실험

SNU-899와 SNU-1076 세포주를 RPMI 1640배지에 10% Fetal bovine serum(FBS)으로 6 well-plate에 분주하고 다음날 serum free media로 교체하였다. 다음날 rTGF- $\beta$ 1을 0.01ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml 농도로 각각 처리한 다음 이를 간격으로 3회 세포 수를 계산하였다.

#### 2) 면역 효소 염색

6-well plate에 소독된 cover slip을 올려놓고 세포를  $1 \times 10^5$  cell/ml로 분주하였다. 4일 후에 TGF- $\beta$ 1을 세포 성장 억제가 뚜렷한 1ng/ml와 10ng/ml로 처리하고 3일 후에 면역 효소 염색을 시행하였다.

세포를 고정하기 위하여 95% 알코올을 6-well plate에 20분간 넣어 두었다. 증류수로 수세 한 후 Tris 완충용액에 담그었다. MMP-2와 MMP-9에 대한 단클론성 1차 항체(1:400 및 1:200, NeoMarkers, USA)를 각각 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Tris 완충용액으로 2회 수세 한 후 LSAB+ kit(DAKO A/S, Denmark)를 이용하여 biotin이 결합된 2항체를 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다.

Tris 완충용액으로 2회 수세한 후 다시 peroxidase-conjugated streptavidin을 가하여 30분간 반응시켰다. Tris 완충용액으로 수세하고 발색제인 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 3,3'-diaminobenzidine(DAB) 혼합액을 가하여 발색 반응을 관찰하면서 5분간 반응시켰다. 물에 수세하여 발색반응을 끝내고 Harris hematoxylin으로 대조염색하고 탈수과정을 거쳐 봉입하였다.

#### 3) Gelatin zymography

세포주를 4일 동안 세포배양한 후 serum-free-media로 2회 세척한 후 이 배지에 rTGF- $\beta$ 1을 처리하지 않은 것과 1ng/ml와 10ng/ml를 각각 처리한 군으로 3일 동안 다시 세포배양 하였다. Minicon CS15를 이용해서 배지를 1:25(v/v)의 농도로 만든 후 단백질을 정량해서 10ug/ml로 준비하였다.

10% SDS-polyacrylamide gel(30% acrylamide/0.8% bis-acrylamide 3.3ml, 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8) 3.75ml, 10% SDS 100ul, 10% APS 50ul, TEMED 10ul, gelatin (10mg/ml) 1ml, D.W 1.95ml)에 정량한 배지와 sample buffer를 1:1로 섞은 후 loading하여 125V 30~40mA/gel로 전기 영동 하였다.

SDS를 제거하기 위해 renaturing buffer(Triton X-100 2.5% in D.W)에 30분 동안 shaker에서 조심스럽게 흔든다. 20 Developing buffer(50mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100)에 넣은 후 37°C에서 12시간 반응시켰다.

0.5% coomassie blue에서 1시간 동안 염색하고, 탈색용액(methanol : acetic acid : D.W=5 : 1 : 4)에 탈색한 다음 투명한 밴드를 확인하였다.

#### 4) Western blot

Zymogram에서의 배지속에 단백질들을 8% SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동을 한 후 nitrocellulose membrane에 transfer 한다.

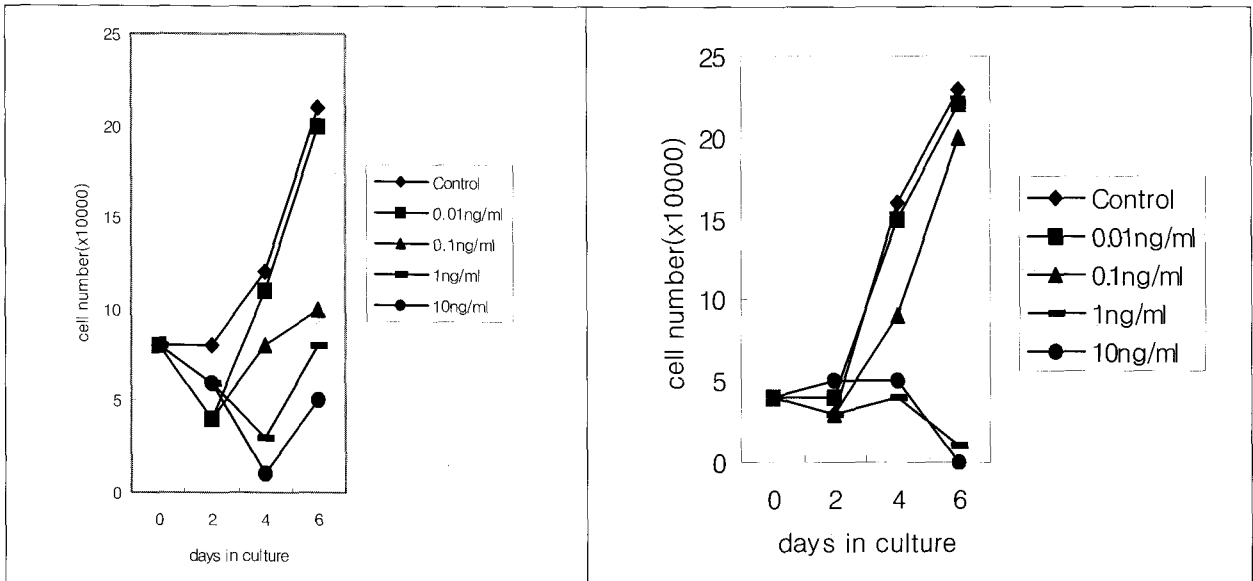


Fig. 1. Effects of rTGF- $\beta$  1 on cell growth in laryngeal cancer cell lines. Dose dependent growth inhibition is seen in both cell lines on 4 days after rTGF- $\beta$  1 treatment.

Transfer가 끝난 막에 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위해 5% blocking solution (5g non-fat dry milk/PBS-T)에 1시간 동안 shaker에 방치한 후 PBS-T (20mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 3회 수세하였다.

MMP-2와 MMP-9에 대한 단클론성 1차항체(1 : 400 및 1 : 200 NeoMarkers, USA)을 각각 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 3번 수세한 다음 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체(DAKO A/S, USA)를 1 : 1000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 3회 수세하였다. 검출용액을(ECL Kit, Amersham Life Science) 막에 충분히 담근 후 2분 동안 반응시킨 다음 필름에 5분 동안 노출하여 현상하였다.

## 결 과

### 1. 세포 억제 실험

SNU-889 세포주에서는 1ng/ml TGF- $\beta$ 1과 10ng/ml TGF- $\beta$ 1에서는 4일 후에 암세포수가 현저히 감소하였다. SNU-1076 세포주에서도 TGF- $\beta$ 1 처리 후 세포수가 감소하였다(Fig. 1).

### 2. 면역 효소 염색

#### 1) MMP-2 발현

SNU-889 세포주는 대조군에서 MMP-2에 약한 세포질 염색을 보였으나 1ng/ml과 10ng/ml 농도에서 점차 강하게 염색되었다(Fig. 2).

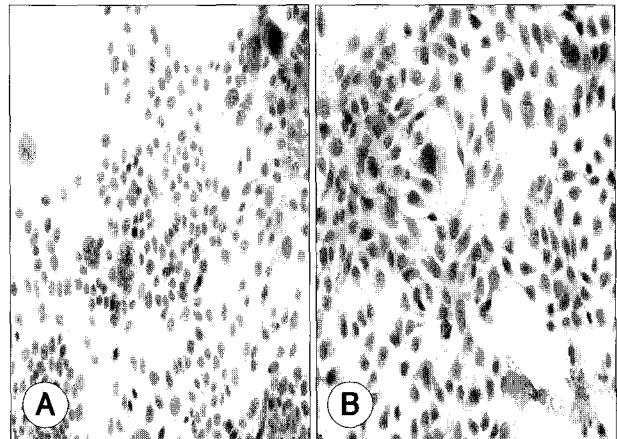


Fig. 2. The cytoplasmic staining of MMP-2 in SNU-889 is increased in 10ng/ml rTGF- $\beta$  1 treatment(B) compared in control(A).

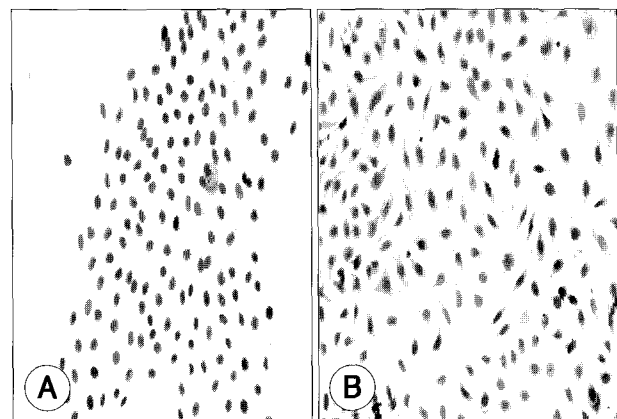


Fig. 3. The expression of MMP-2 in SNU-1076 is weak in control(A) but increased when treated with 10ng/ml rTGF- $\beta$  1(B).

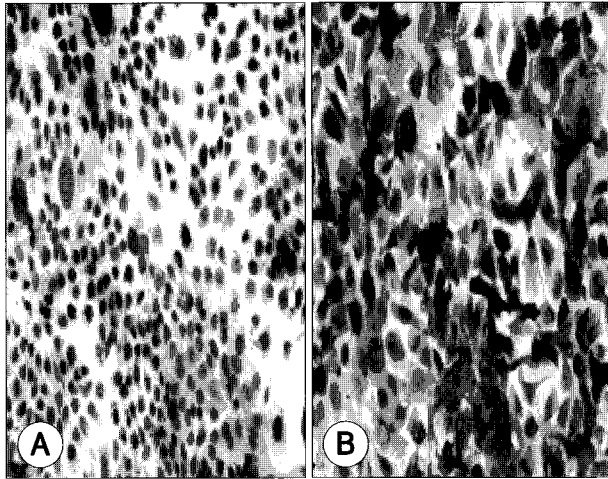


Fig. 4. The MMP-9 expression in SNU-899 is markedly increased in 10ng/ml rTGF- $\beta$  1 treatment(B) than in control(A).

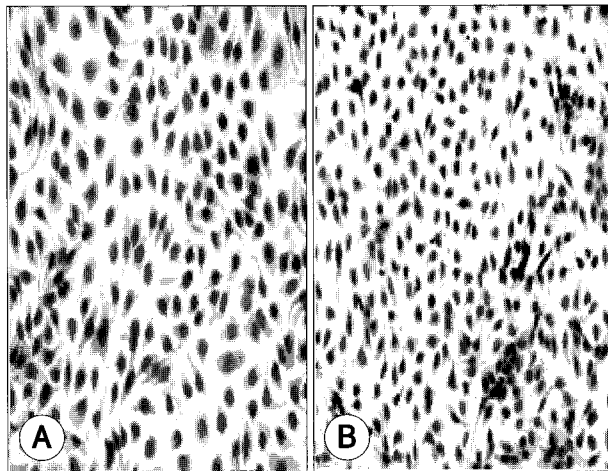


Fig. 5. The expression of MMP-9 in SNU-1076 is increased in 10ng/ml rTGF- $\beta$  1 treatment(B) than in control(A).

SNU-1076 세포주는 대조군에서 매우 약하게 염색되었고 1ng/ml과 10ng/ml rTGF- $\beta$  1 처리시 중등도로 염색되었다(Fig. 3).

## 2) MMP-9 발현

SNU-899 세포주는 대조군에서도 세포질에 중등도 염색을 보였고 1ng/ml과 10ng/ml 처리시 매우 강한 염색을 보였다(Fig. 4).

SNU-1076 세포주도 대조군에서 중등도염색을 보였으나 1ng/ml과 10ng/ml에서 더욱 염색이 강하였다(Fig. 5).

## 3. Gelatin zymography

MMP-2와 MMP-9의 활성도를 확인하기 위하여 zymogram을 실시한 결과 Fig. 6에서와 같이 92kDa에 해당하는 부위에 MMP-9의 비활성형 띠가 관찰되었고 그 아래 MMP-2는 비활성형에 해당하는 72kDa띠와 62kDa에 해당하는 활성형의 두 띠를 관찰할 수 있었다. 띠의 두께는 rTGF- $\beta$  1의 농도 증가에 따라 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

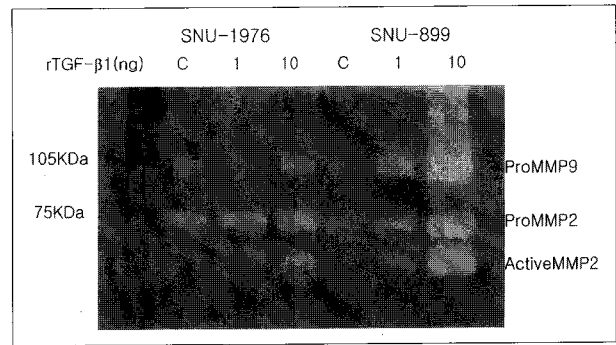


Fig. 6. Zymogram for MMP2 and MMP9 expression by TGF- $\beta$  1. The uppermost bands(92Kda) corresponding to the pro-MMP9 are increased in dose dependent manner and more marked in SNU-899 cell line. The lower bands correspond to the pro-MMP2(72Kda) and active-MMP2(62Kda) are also increased in treatment with 10ng/ml rTGF- $\beta$  1.

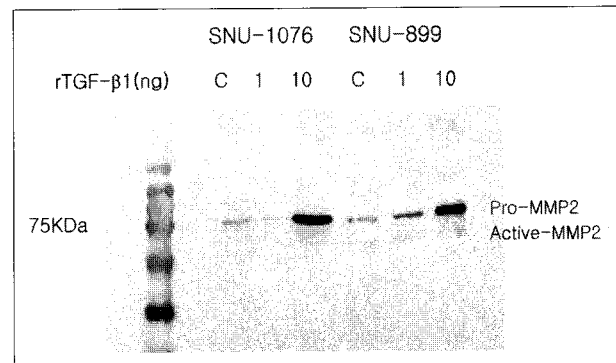


Fig. 7. Western blotting for MMP2 expression induced by rTGF- $\beta$  1. Western blotting for MMP2 in SNU-1076 and SNU-899 treated with 1ng/ml and 10ng/ml rTGF- $\beta$  1. Marked increase in treatment 10ng/ml is seen both cell lines.

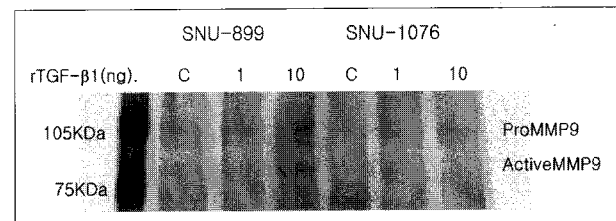


Fig. 8. Western blotting for MMP9 expression induced by rTGF- $\beta$  1.

## 4. Western blot

세포주를 배양한 배지에서 Western blot을 실시한 결과 MMP-9에 대한 띠는 확인할 수 없었다. 반면 MMP-2는 10ng/ml rTGF- $\beta$  1 처리에서 72kDa에 해당하는 두꺼운 띠를 확인할 수 있었다(Fig. 7).

배양한 세포주를 용해하여 MMP-9에 대한 Western blot을 실시한 결과 모두에서 rTGF- $\beta$  1 농도의 증가에 따라 MMP-9의 양이 증가되었다(Fig. 8).

## 고 찰

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )는 TGF-

$\beta 1$ , TGF- $\beta 2$ , TGF- $\beta 3$ 의 3 isoform으로 존재한다. 각각의 isoform은 조직에 따라 그리고 발생단계별로 발현 양상이 특이적으로 조절된다.

TGF- $\beta 1$ 은 내피세포, 조혈세포 그리고 섬유조직 세포에서 발현되고 TGF- $\beta 2$ 는 상피세포와 신경세포에서 발현되는 반면 TGF- $\beta 3$ 의 경우 간질세포에서 발현되어진다.

TGF- $\beta 1$ 과 TGF- $\beta 3$ 는 초기 발생단계에서 발현되어 형태형성에 중요한 역할을 담당하고 TGF- $\beta 2$ 는 후기 발생단계와 상피세포의 분화과정에 관여하는 것으로 알려졌다<sup>1-3,6)</sup>.

TGF- $\beta$ 는 propeptide 형태로 합성된 후 분비되기 전에 단백질 분해 효소에 의해 잘려진 후 extracellular matrix에서 latent TGF- $\beta$  binding protein과 disulfide 결합에 의해 복합체를 형성하여 존재하게 된다.

이 복합체는 Thrombospondin-1에 의해 잘려지면서 TGF- $\beta$ 가 형성되고 이는 세포표면에 존재하는 TGF- $\beta$  수용체에 결합하여 성장억제의 신호를 세포 내로 전달하게 된다<sup>3-5)</sup>.

정상세포에서는 TGF- $\beta 1$ 은 신호전달체계를 통해 세포의 성장억제를 위해 세포주기의 G1단계에 작용하여 세포분열을 억제하고 또한 분화와 세포고사를 촉진한다. 그러나 TGF- $\beta 1$  신호전달체계에서 돌연변이가 일어나면 TGF- $\beta 1$ 의 성장억제기능에 장애가 생기고 암세포로 전환된 세포는 계속하여 TGF- $\beta$ 를 생성한다<sup>1)</sup>.

증가된 TGF- $\beta$ 는 주위의 기질세포, 면역세포, 내피세포 또는 근육세포에 작용하여 면역억제, 신생혈관생성, 암세포의 침윤을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

즉 TGF- $\beta$ 는 정상세포에서는 종양억제 활성을 가짐으로써 세포의 성장을 억제하거나 세포의 분화 혹은 세포고사를 촉진하는 반면, 발암과정에서 수용체 혹은 Smad 유전자의 돌연변이로 인해 TGF- $\beta$ 에 대한 내성을 가진 세포에서는 TGF- $\beta$ 가 발암능력을 가지게 되어 세포의 침윤과 전이에 관여하게 된다<sup>2)</sup>. 따라서 현재까지 TGF- $\beta$ 는 종양억제능력과 발암능력을 동시에 가지고 있는 cytokine으로 널리 받아들여지고 있다.

일반적으로 TGF- $\beta$ 는 세포성장과 전이에서 중요한 역할을 담당하는 extracellular matrix의 생성과 축적에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있다.<sup>6)</sup>

Matrix-metalloproteinase(MMP)는 세포외 기질을 용해하는 효소로 1962년 올챙이 꼬리가 소실되는 과정에서 interstitial collagenase가 최초로 발견된 이후, 현재까지 20여종 이상의 MMP가 발견되었다.

MMPs는 체내에 존재하는 5대 단백질분해효소(serine-, aspartic-, cysteine-, threonone-, metalloproteinase)의 한가지로 다음과 같은 5가지의 공통적 특성을 가진다. (1) 세포외 기질 성분 중 적어도 한가지 이상을 분해시키며 (2) Zn 이온과 결합하는 HEXGH motif를 함유하는 cata-

lytic domain을 공유하므로 chelating 약제에 의해 단백질분해기능이 억제되며 (3) 비활성형(zymogen)으로 분비되어 cysteine을 함유하는 PRCGVDP의 aminoterminal이 분리되는 활성화 과정을 거쳐 단백질분해능을 가지고 (4) TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)에 의해 그 기능이 억제되며 (5) 공통의 아미노산 서열을 함유한다<sup>11-13)</sup>.

이러한 정의에 의해 구분되는 MMPs는 기질의 특이성, 억제제의 결합부위, 기질의 결합부위 그리고 세포막에서의 존재 위치에 따라 크게 fibrillar collagen을 분해하는 collagenase, proteoglycan과 glycoprotein을 분해하는 stromelysins, nonfibrillar denatured collagen(gelatin)을 분해하는 gelatinase, 그리고 matrilysin의 4가지 군으로 구분된다.

최근 발견된 Membrane Type(MT)-MMPs 중 MT1-MMP는 분비되지 않고 세포막에 부착되어 pro-MMP-2를 기질로 하며 특히 비특이적인 억제제로부터 MMPs를 보호하여, 국소적으로 MMPs의 활성 증가를 유도하는 것으로 추정된다.

MMPs의 생성장소는 면역효소염색법과 in situ hybridization 방법에 의해 주로 연구되었다<sup>14)</sup>. MMP-2는 정상조직에서 가장 많이 생성되는 MMPs로 주로 기질세포에서 발현된다. MMP-7은 위장관 혹은 자궁내막의 선형 상피세포에서 주로 발현되는 반면, MMP-9는 혈액세포에서 발현된다. Stromelysin은 간질세포에서 matrilysin은 암세포에서 MT-MMP는 암세포막에서 주로 관찰된다.

MMPs 활성의 조절기전에는 크게 유전자발현에 의한 조절, MMPs 활성화의 조절 및 TIMP에 의한 natural balance 유지로 설명할 수 있다<sup>10,11)</sup>.

MMPs 유전자 발현은 매우 엄격하게 조절되어 정상조직의 기능을 유지시킨다. 그러나 암조직에서는 이러한 조절기능이 상실되어 epidermal growth factor, transforming growth factor  $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1, 암 발생유전자, 호르몬 그리고 tumor promoter의 활성화에 의해 MMPs의 mRNA의 발현이 비정상적으로 증가된다<sup>14,15)</sup>.

MMPs는 MT-MMP를 제외하고는 모두 비활성형으로 분비되기 때문에 세포외기질을 용해시키기 위해서는 활성화 과정이 반드시 필요하며 이 과정이 MMPs의 과발현을 조절한다. 시험관에서 MMPs는 organomercurial compound에 의해 활성화되나, 생체에서 활성화를 유도하는 물질은 확인되지 않았다.

MMP-1과 MMP-9은 serine계 단백질분해효소에 의해 활성화되기도 한다. 활성화된 MMPs는 선택적으로 TIMPs에 의해서 그 작용이 억제된다. TIMPs family는 그 특성과 발현 유형 그리고 비활성형의 MMPs와 반응하는 정도에 따라 크게 4종이 발견되었으며 활성화된 MMPs와 1:1로 강력한 비공유결합을 함으로써 MMPs의 기능을 억제한다.

암조직에서 MMPs가 증가하는 경우 TIMPs도 같이 증가하나 MMPs와 TIMPs의 발현은 서로 독립적으로 일부에서는 상호보완적으로 조절된다.

따라서 암조직에서 MMPs의 활성화와 TIMPs 활성화간의 균형에 의해 세포외기질을 분해하는 능력이 결정됨을 알 수 있다<sup>13)</sup>.

암 세포의 전이를 조절하는 단계는 예전에는 암 세포의 extravasation 단계로 알려졌으나, 현재는 extravasation 된 세포의 증식단계로 확인되었다. 이 단계에서 systemic TIMPs보다는 종양주위 간질의 tumor TIMPs가 전이부위의 증식을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

MMPs와 TIMPs는 종양증식의 시작단계에 관여할 뿐 아니라 지속적인 성장과정에서도 중요한 역할을 하며 이 때는 종양혈관생성 유도가 주된 기전이 된다<sup>14)15)</sup>.

MMP의 임상적 의의는 고형암의 전이나 침윤에 관여함으로 알려졌으나 정상인에서도 상처치유, 임신과 분만, 골재생 및 유방위축과 같은 생리적 작용과 관절염과 다발성 경화증 등의 비종양성 질환의 병인에도 관여함이 확인되었다.

정상조직에서는 MMPs mRNA가 거의 관찰되지 않으나 종양이나 종양주위의 간질조직에서 높게 관찰되며 특히 gelatinase A (MMP-2, 72kDa)는 암조직에서 월등하게 증가되는 것이 확인되었다.

종양에서 MMPs는 암이 진행함에 따라 발현되는 MMPs의 종류와 수가 증가하며 병기가 진행함에 따라 각 MMPs의 발현양이 증가하고 MMPs는 암세포와 주위 정상기질에서 주로 생성된다<sup>17)18)</sup>.

현재까지 밝혀진 여러 가지 MMPs family 중에서 암의 전이와 침윤에 가장 중요한 역할을 하는 MMP에 대해서는 아직 밝혀지지 않아 어느 MMP가 가장 효과적인 치료대상이 될지는 규명되지 않았다. 그러나 유방암, 위암 등에서 많이 발현되고 침윤과 불량한 예후에 관련성이 있다고 보고되는 gelatinase A (MMP-2, 72 kDa)와 gelatinase B (MMP-9, 92 kDa)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>14)15)</sup>.

MMP-2와 MMP-9은 인체에 발생하는 여러 종양에서 발현되며 그 정도는 악성도와 침윤 정도에 비례하는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

두경부종양에서 연구를 보면 후두의 편평 상피 세포는 TGF- $\beta$ 에 의해 성장이 억제된다는 사실과<sup>17)</sup> 암종에서 단백질과 mRNA가 발현하면서 암종에서의 세포외 기질의 재모델링에 관여한다고 하였다<sup>18)</sup>. 또한 최근에는 후두상피가 정상에서 전암병변을 거쳐 침윤성 암종으로 진행되는 과정에 MMP-2의 발현이 증가한다는 사실이 보고되었고<sup>19)</sup>, Ranuncolo 등<sup>20)</sup>은 혈청내에 92kDa MMP-9이 증가하므로 종양의 조기 발견에 이용될 수 있다고 하였다.

본 실험에서 Recombinant TGF- $\beta$ 1을 처리한 세포주에

서 4일째부터 세포성장억제가 있었으며 또한 MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 이는 TGF- $\beta$  II receptor의 돌연변이가 있는 SNU-899에서 보다 p16의 돌연변이가 있었던 SNU-1076세포주에서 더욱 확실하였다. 또한 MMP-2는 배양한 배지로부터 농도에 따라 증가된 것을 확인할 수 있었으나 MMP-9은 세포질에서는 증가되었으나 배지에서는 확인할 수 없었다. 이는 MMP-2의 분비에 관계되는 다른 기전에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

## 결론

종양의 전이과정에서 Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 역할을 알아보기 위해 후두암 세포주인 SNU-899와 SNU-1076에 recombinant TGF- $\beta$ 1 (rTGF- $\beta$ 1)을 처리한 후 MMP-2와 MMP-9 단백질의 발현과 효소 활성도를 연구하였다.

1ng/ml과 10ng/ml rTGF- $\beta$ 1 처리시 두 세포주의 성장억제가 현저하였고, MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가하였으며, gelatinase 활성도 또한 증가하였다. 배지에서의 단백질으로부터 Western blot을 시행한 결과 72kDa MMP-2가 검출되었다.

이상과 같은 결과로부터 TGF- $\beta$ 1은 종양세포로부터 MMP-2와 MMP-9의 증가를 통해 암의 침윤과 전이에 관여하리라는 사실을 알 수 있었다.

## References

- 1) Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF : Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. *N Engl J Med* 2000 ; 342 : 1350-1358
- 2) De Caestecke MP, Roberts P : Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  signaling in cancer. *J Nat Cancer Inst* 2000 ; 92 : 1338-1402
- 3) Lee BI, Park SH, Kim JH : MS-275, a histone deacetylase inhibitor selectively induces transforming growth factor  $\beta$  type II receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 931-934
- 4) Malkowitz S, Wang J, Myeroff L : Inactivation of the type II TGF- $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995 ; 268 : 1336-1338
- 5) Massague J : TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998 ; 67 : 753-791
- 6) Pashe B : Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in cancer. *J Cell Phys* 2001 ; 186 : 153-168
- 7) Takaku K, Oshima M, Miyoshi H : Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Smad4 and APC genes. *Cell* 1998 ; 92 : 645-656

- 8) Tang B, Bottinger EP, Jakowlew S : *Transforming growth factor  $\beta$ 1 is a new form of tumor suppressor with haploid insufficiency.* *Nat Med* 1998 ; 4 : 802-807
- 9) Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F : *Mechanism of activation of TGF- $\beta$  receptor.* *Nature* 1994 ; 370 : 341-347
- 10) Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ : *Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. I : Production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity.* *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 2810-2813
- 11) Adler RR, Brenner CA : *Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinases and metalloproteinases inhibitors is developmentally regulated during endoderm differentiation of embryonal carcinoma cells.* *Development* 1990 ; 110 : 221-220
- 12) Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG : *Quantitative zymography : detection of picogram quantities of gelatinase.* *Anal Biochem* 1994 ; 218 : 325-329
- 13) Stetler-Stevenson WG : *Progelatinase A activation during tumor cell invasion.* *Invasion Metastasis* 1994 ; 14 : 41-48
- 14) Stetler-Stevenson WG, Hewitt R, Corcoran M : *Matrix metalloproteinases and tumor invasion: from correlation and causality to the clinic.* *Sem in Cancer Biol* 1996 ; 7 : 147-154
- 15) Garbett EA, Reed MWT, Brown NJ : *Proteolysis in human cancer.* *Br J Cancer* 1999 ; 81 : 287-293
- 16) Davies B, Miles DW, Balkwill FR : *Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease.* *Br J Cancer* 1993 ; 67 : 1126-1131
- 17) DiLorenzo TP, Steinberg BM : *Laryngeal keratinocytes show variable inhibition of replication by TGF-beta.* *J Cell Sci* 1990 ; 96 : 115-119
- 18) Hagedorn H, Nerlich A : *Expression of TGF-beta 1 protein and mRNA and the effect on the tissue remodeling in laryngeal carcinomas.* *Anticancer Res* 1999 ; 19 : 4265-4272
- 19) Sarioglu S, Pabuccuoglu U : *Matrix metalloproteinase-2 expression in laryngeal preneoplastic and neoplastic lesions.* *Pathol Res Pract* 2001 ; 197 : 483-486
- 20) Ranuncolo SM, Matos E : *Circulating 92kDa matrix metalloproteinase (MMP 9) activity is enhanced in the euglobulin plasma fraction of head and neck squamous cell carcinoma.* *Cancer* 2002 ; 94 : 1483-1491