

## Platelet-Activating Factor Enhances Experimental Pulmonary Metastasis of Murine Sarcoma Cells by Up-regulation of Matrix Metalloproteinases-9 Through NF- $\kappa$ B-Dependent Pathway

Hyun Mi Ko<sup>1†</sup> and Hae-Kyong Back<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Basic Sciences Research Institute, Chonnan National University, Kwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Clinical Laboratory, Kwangju Christian Hospital, Kwangju 503-040, Korea

Matrix metalloproteinases (MMPs) are capable of degrading extracellular matrix, a process that is necessary for angiogenesis, tumor invasion and metastasis. Platelet-activating factor (PAF) increases angiogenesis, tumor growth and metastasis through nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation. Based on these facts, the involvement of MMPs in PAF-induced pulmonary metastasis was investigated in murine sarcoma cells, MMSV-BALB/3T3. Messenger RNA expression and enzymatic activity of MMP-9 were assessed by RT-PCR and zymography, and cell migration and metastasis were done for the detection of MMP-9 functional activity. PAF induced mRNA expression and enzymatic activity of MMP-9, and its effects were either inhibited by the PAF antagonist, WEB 2170 or by the NF- $\kappa$ B inhibitor, parthenolide, or p65 antisense oligonucleotide in a dose-dependent manner. In addition, PAF induced promoter activity of MMP-9, which was inhibited by WEB 2170, phenanthroline, NAC, PDTC. These results indicate that PAF induces mRNA expression and enzymatic activity of MMP-9 in NF- $\kappa$ B dependent manner. Cell migration assay showed that PAF induced MMSV-BALB/3T3 migration, and its effect was significantly inhibited by treatment with phenanthroline. PAF enhanced pulmonary metastasis of murine sarcoma cells, MMSV-BALB/3T3 was also reduced by phenanthroline. These results suggest that PAF-enhanced cell migration and pulmonary metastasis is mediated through the expression of MMP. In conclusion, It is suggested that PAF enhances pulmonary metastasis by inducing MMP-9 expression *via* the activation of NF- $\kappa$ B.

**Key Words:** Matrix metalloproteinases (MMPs), Platelet-activating factor (PAF), Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, Metastasis

### 서 론

암의 전이 (metastasis)는 암환자에게 있어 사망의 주원인이 되며 암의 성공적인 치료에 있어 가장 큰 장애물이다. 암의 전이는 전이능을 갖춘 암세포가 조직을 구분하는 경계선을 이동하여 다른 기관으로 퍼져나가는 복잡한 단계로 이루어진다. 암세포가 먼 거리의 기관에 전이 군락을 형성하기 위해서는 주변 조직과 혈관 및 림프관으로 침윤이 일어나야 하며<sup>33</sup>, 주변 조직으로 침윤이 일어나기 위해서는 먼저 기저막 (basement membrane) 및 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)의 분해가 필수적으로 선행되어야 한다<sup>28</sup>. 이러한 분해

과정에 관여한다고 알려진 단백질 분해효소들 중에는 matrix metalloproteinases (MMPs)가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>2,3,39,48</sup>. MMPs는 아연-의존적 엔도펩티다아제의 구성원으로 이들의 구조와 기질 특이성에 따라 collagenases, gelatinases, stromelysins, stromelysin-like MMPs, metrilysins, membrane type-metalloproteinases (MT-MMPs) 등 서로 다른 5개의 그룹으로 분류된다<sup>35</sup>. 일반적으로 MMPs는 아연 이온과 결합하는 HEXGH를 함유하는 catalytic domain을 공유하고, 비활성 상태의 효소 (zymogenic latent enzyme)로 발현·분비되어 cysteine을 함유하는 PRCGVDP의 amino 말단이 분리되는 활성화 과정을 거쳐 단백 분해능을 가진다<sup>32</sup>. 또한 MMPs는 MMPs의 선택적 억제제인 4개의 단백질 그룹인 tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)에 의해 억제되며, MMPs의 활성화는 TIMP 및 세포 표면의 활성화 효소에 존재하는 분자들의 발현<sup>42</sup> 혹은 MMPs 상호 간의 자가 활성화 (auto-activation)에 의해 조절된다<sup>34</sup>. 최근 MMPs는 혈관형성 및 암세포의 침윤, 암의 전이에 관여한다는 여러 보고가 있는

\*는 문 접수: 2004년 5월 10일

수정접수: 2004년 6월 8일

†별책 요청 저자: 고현미, (우) 500-757 광주광역시 북구 용봉동 300, 전남대학교 자연과학대학 생물학과

Tel: 062-530-3414, Fax: 062-530-0848

e-mail: gusalrh@hanmail.net

데, 그 중에서 gelatinase A (MMP-2: 72 kDa)와 gelatinase B (MMP-9: 92 kDa)는 다양한 암세포에서 발현되어 기저막의 주된 구성성분인 collagen type IV와 V 그리고 gelatin을 분해할 수 있는 유일한 MMPs로 암세포의 침윤 및 전이능과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다<sup>23,28</sup>. 특히 MMP-9은 여러 종류의 세포에서 다양한 자극에 의하여 발현되어<sup>8,13,26</sup> TIMP-1과 1:1 복합체를 형성하여 그 기능이 조절되며, 이들의 발현 정도에 따라 염증반응 및 혈관형성, 암의 침윤 및 전이가 조절된다고 보고되고 있다<sup>16,35,38,46,47</sup>.

Platelet-activating Factor (1-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholine, PAF)는 혈소판, 대식세포, 내피세포 등의 염증반응에 관련된 다양한 세포들로부터 분비되어 강력한 생물학적 활성을 갖는 막 인지질로<sup>6,9,29</sup>, 세포 활성화, 세포 내 신호전달, 수정, 세포사멸, 신경 활성 및 조직의 분화 등과 같은 생리적 과정을 비롯하여<sup>5,14,15,43</sup> 다양한 염증성 질병 및 혈관형성, 암의 전이 등에 관여한다고 알려져 있다<sup>7,10,20,25,31</sup>. 본 연구자들에 의해 발표된 바에 의하면 PAF는 lipopolysaccharides (LPS)에 의한 염증자극시 초기에 분비되어 다양한 염증성 cytokines과 면역조절인자들의 발현을 조절하는 전사인자인 NF-κB를 활성화시키고<sup>17</sup>, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1, IL-8, basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)와 같은 혈관형성인자들의 유전자 발현을 유도하여 혈관형성을 증진시키며<sup>25</sup>, 암의 증식 및 전이를 항진시켰다<sup>20</sup>. 최근, MMP-2나 MMP-9이 결여된 마우스의 경우 암의 경과 및 혈관형성이 감소되고 흑색종의 전이율이 현저하게 감소되며<sup>21,22</sup>, NF-κB 활성화는 MMP의 발현 유도에 필수적으로 작용하는데 특히 MMP-9은 promoter에 NF-κB 결합부위가 존재하여 NF-κB에 의해 그 발현이 조절되며<sup>4,41</sup>, NF-κB의 활성이 저해되면 MMP-9의 발현이 억제되어 혈관형성, 암의 침윤 및 전이가 감소한다는 연구 결과들이 보고되었다<sup>4,19</sup>. 이러한 연구 결과들은 PAF에 의한 암 전이 항진에 NF-κB 의존적인 MMP의 발현과 활성이 요구되어짐을 시사해 주고 있으며 따라서 본 연구에서는 PAF에 의한 암의 전이에 있어서 MMPs의 역할과 이들의 발현 및 활성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 한국화학연구소 (충남 대덕)에서 구입한 20 g 내외로 8~10주 된 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 항온 (26°C), 항습 (55%), 항균 환경조절제어장치 하에서 최소한 사용 2주일 전부터 사육하여 사용하였다.

### 2. 시약

혈소판 활성화인자 (platelet-activating factor, PAF)는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였고, PAF 길항제인 WEB 2170은 단국대 의과대학 이정구 박사로부터 제공받았다. NF-κB 억제제인 parthenolide는 Biomol (PA, USA)에서 구입하였고, N-acetyl-L-cysteine (NAC), PDTTC, cycloheximide (CHX) 및 MMPs 기능 억제제인 phenanthroline은 Sigma에서 구입하였다. 기저막 단백질 추출물로 구성된 Matrigel은 Collaborative Research Inc. (Bedford, MA)에서 구입하였으며, MMP-9 중화항체는 Chemicon (Temecula, CA)에서 구입하였다. MMP-9의 프로모터 부분을 함유한 pGL3-M9Pwt는 연세대 이승택 박사로부터 제공받았으며, phosphorothiorate oligonucleotides는 NF-κB p65의 전사시작부위를 포함한 5' 끝부분 19-mer의 antisense oligonucleotide (AS, 5'-GAAACAGATCGTCCATGGT-3')와 non-sense oligonucleotide (NS, 5'-GTACTACTCTGAGCAAGGA-3')를 바이오니아 (대전, 한국)에서 제작하여 사용하였다.

### 3. 세포배양

마우스 Sarcoma 세포주인 MMSV-BALB/3T3B를 American Type Culture Collection에서 구입하여 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL, Island, NY)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 2~3일 간격으로 계대배양하였으며, 사람 섬유종 세포주, HT-1080은 10% FBS가 함유된 Minimum Essential Medium에서 배양하였다.

### 4. 역전사중합연쇄반응 (RT-PCR)

RNA는 rapid guanidium isothiocyanate 방법<sup>11</sup>으로 추출하였으며 1 µg의 RNA를 0.1 µg의 oligo (dT)<sub>15</sub>와 AMV 역전사효소를 함유한 역전사반응액 (Promega, Madison, WI)과 혼합하여 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA와 중합연쇄반응액을 혼합한 후 thermocycler (Perkin Elmer, 2400, Norwalk, CT)를 이용하여 MMP-2와 TIMP-1은 95°C에서 60초, 60°C에서 60초, 72°C에서 60초 동안 35회, MMP-9은 95°C에서 60초, 67°C에서 60초, 72°C에서 60초 동안 35회, β-actin은 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 27회 실시한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하였다. Gel은 ethidium bromide로 염색하고 Fluor-STM imager (Bio-Rad, Munchen Germany)를 이용하여 각 band의 density를 측정된 후 각 cytokine에 대한 mRNA 발현 정도는 cytokines/β-actin으로 나타내었다. 이 때 사용한 primers는 다음과 같다. MMP-2; 5'-CTCAGATCCGTGGTGGATCT-3'와 5'-CTTTGGTCTCCAGCTTCAGG-3', MMP-9; 5'-ATCCAGTTTGGTGTCCGCGAGC-3'와 5'-GAAGGGGAAGACGCACAGCT-3', TIMP-1; 5'-ACGAATCAACGAGACCACCTTAT-3'와 5'-GCACACCC-

CACAGCCAGCACTAT-3',  $\beta$ -actin; 5'-CTGAAAGTCACCCATT-GAACATGGC-3'와 5'-CAGAGCAGTAATCTCCTTCTGCAT-3'.

### 5. Zymography

MMPs의 효소 활성을 측정하기 위해 PAF으로 암세포를 자극하고 배양액을 모아 amicon Centricon (Millipore Co., Bedford, USA)을 이용하여 5,000 g에서 30배 농축하였다. 농축한 배양액을 동량의 non-reducing sample buffer (0.5 M Tris-Cl (pH 6.8), 1% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)와 혼합하여 1% gelatin (Porcine skin, 300 bloom, Sigma)이 포함된 8.5% SDS-acryamide gel에 전기영동하였다. 세척액 (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 2.5% Triton X-100)으로 1시간 동안 세척한 후 배양 완충액 (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ )에서 37°C, 18~20시간 반응시킨다. 반응이 끝난 gel을 Coomassie Blue R-250 (Sigma)으로 염색한 후 탈색한다. 이때 HT-1080 배양 상층액은 pro-MMP-9, pro-MMP-2, active-MMP-2의 positive control로 사용하였다.

### 6. Western Blotting Analysis

PAF으로 암세포를 자극하고 농축한 배양액을 8.5% SDS-acryamide gel에 전기영동한 후 Protran nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, NH)에 electrotransfer하였다. Membrane을 3% BSA 용액으로 blocking 시킨 후 MMP-9 중화항체를 이용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 0.05% Tween 20을 함유한 PBS로 5분씩 3회 세척 후 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 항체와 1시간 반응시키고, 세척 후 기질을 첨가시켜 발색시켰다.

### 7. Luciferase Assay

암세포 ( $5 \times 10^4$ /well)를 6시간 배양 후, 200 ng의 pGL3-M9Pwt DNA와 LipofectAMINE reagent (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)의 혼합액을 1시간 반응시켜 각 well에 첨가시켜 주었다. 4시간 반응 후 배양액을 교체시키고 14시간 더 배양하여 PAF으로 자극하였다. 8시간 후 세포를 수집하여 100  $\mu$ l의  $1 \times$  reporter lysis buffer (Promega)를 처리하고, Lumat LB9501 luminometer (Berthold, Germany)를 이용하여 20  $\mu$ l의 cell lysate에서 luciferase 활성을 측정하였다.

### 8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

핵 추출물을 Dignam et al<sup>12)</sup>에 의한 방법에 따라 추출하고, Igk-chain 결합부위를 갖는 oligonucleotides ( $\kappa$ B; 5'-CCGGTT-AACAGAGGGGGCTTTCCGAG-3')를 probe로 사용하여 oligonucleotide의 상보적인 가닥을 부착시킨 후  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP로 표지하여 핵 추출물과 반응시킨다. 반응 혼합액은 4% polyacrylamide gel에 전기영동하여 건조시킨 후 -70°C에서 auto-

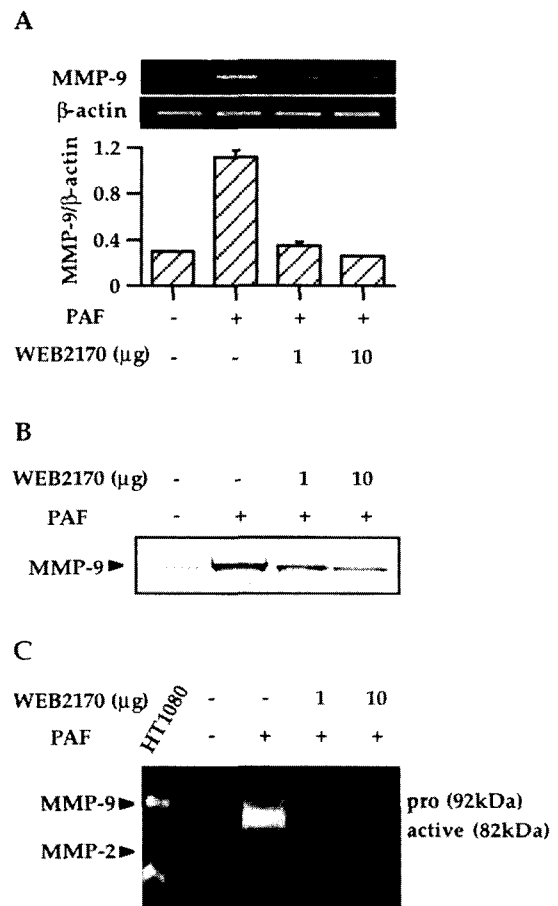
radiography하였다.

### 9. 암세포 이동

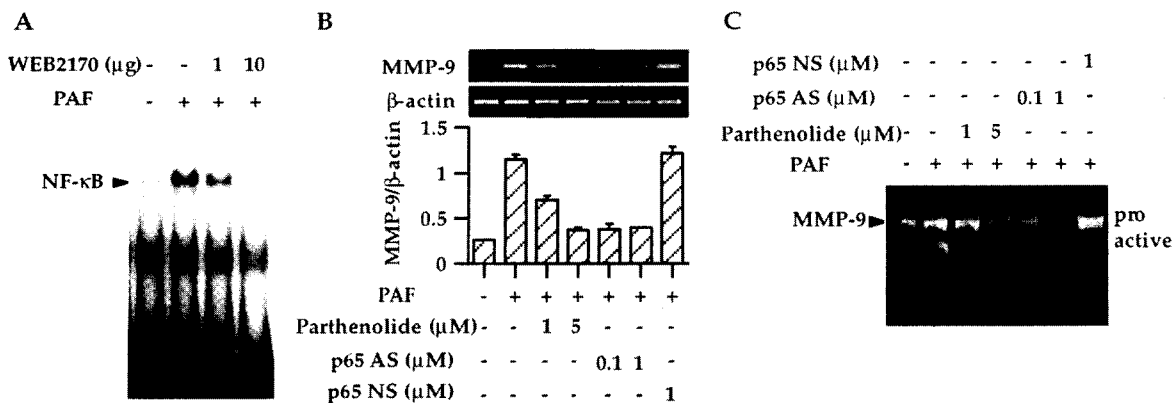
암세포를 multicellular spheroid bead와 혼합하여 24시간 배양하여 bead에 암세포가 coating되면 새로운 plastic dish에 옮긴 후 PAF을 처리하여 배양하였다. 12시간 후 세포가 bead 직경의 2배 이상 거리를 이동한 bead 수를 현미경 하에서 계산하였다.

### 10. 암 전이 실험

$2 \times 10^6$  MMSV-BALB/3T3 암세포를 마우스의 미 정맥 주사한 후 3일 동안 PAF을 복강 주사하고 PAF 주사 2시간 후에 phenanthroline을 주사한다. 3주 후에 마우스의 폐를 적출



**Fig. 1.** PAF induces the mRNA expression and gelatinolytic activity of MMP-9 in MMSV-BALB/3T3. MMSV-BALB/3T3 cells ( $1 \times 10^6$ ) were treated with WEB 2170 30 min prior to 1  $\mu$ g/ml of PAF treatment. For detection of MMP-9 expression, (A) RT-PCR, (B) western blot analysis, and (C) zymography were performed as described in Materials and Methods. Signal intensity of these amplified cDNA was analyzed quantitatively using Fluor-STM Imager (Bio-Rad, Munchen, Germany). Results of RT-PCR are shown and quantitated by calculating the ratio of densitometric reading of the bands for MMP-9 and  $\beta$ -actin.



**Fig. 2.** PAF induces the expression of MMP-9 in a NF-κB-dependent manner. (A) MMSV-BALB/3T3 cells ( $1 \times 10^6$ ) were treated with WEB 2170 at indicated concentrations 30 min prior to 1 μg/ml of PAF treatment. Nuclear extracts were prepared 1 hr after PAF treatment, and were incubated with a  $^{32}$ P-labeled κB and electrophoresed on a 4% polyacrylamide gel. MMSV-BALB/3T3 cells ( $1 \times 10^6$ ) were treated with parthenolide 30 min prior to PAF treatment, or with p65 AS or NS oligonucleotide 3 day prior to PAF treatment at indicated concentrations. For determination of MMP-9 expression, (B) RT-PCR and (C) zymography were performed as described in Materials and Methods.

하여 Bouin's solution (Sigma, St Louis, MO)으로 고정하여 폐의 표면에 존재하는 집락수를 해부현미경 하에서 관찰, 계산하였다.

#### 11. 통계분석

실험 결과의 유의성 검증은 2 set의 결과 검증 시에는 student's t test로 분석하였으며 다수의 결과 검증 시에는 ANOVA (StatView, version 4.5)를 실시하였다. 모든 실험은 2회 이상 실시한 실험 결과를 토대로 통계, 분석하였다.

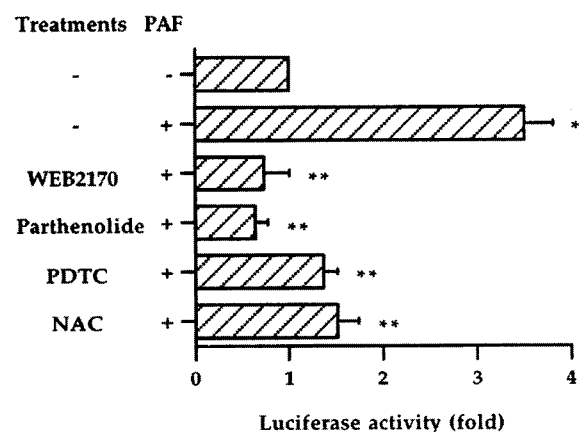
## 결 과

### 1. PAF에 의한 MMP-9 mRNA 발현 및 효소 활성

PAF이 MMP-9의 발현에 관여하는지 알아보기 위하여 마우스 sarcoma 세포주인 MMSV-BALB/3T3에 1 μg/ml의 PAF을 처리하고 24시간 후에 MMP-9의 발현 및 활성을 실험하였다. 그 결과, PAF에 의하여 MMP-9의 mRNA 발현 (Fig. 1A) 및 단백질 합성의 증가와 (Fig. 1B), pro-MMP-9 (92 kDa) 과 active-MMP-9 (82 kDa) 단백질 활성을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1C). PAF에 의해 증가된 MMP-9의 발현 및 효소 활성은 PAF 수용체 길항제인 WEB 2170에 의해 농도 의존적으로 억제되어 PAF이 수용체-의존적으로 MMP-9의 발현 및 활성을 유도함을 알 수 있었다.

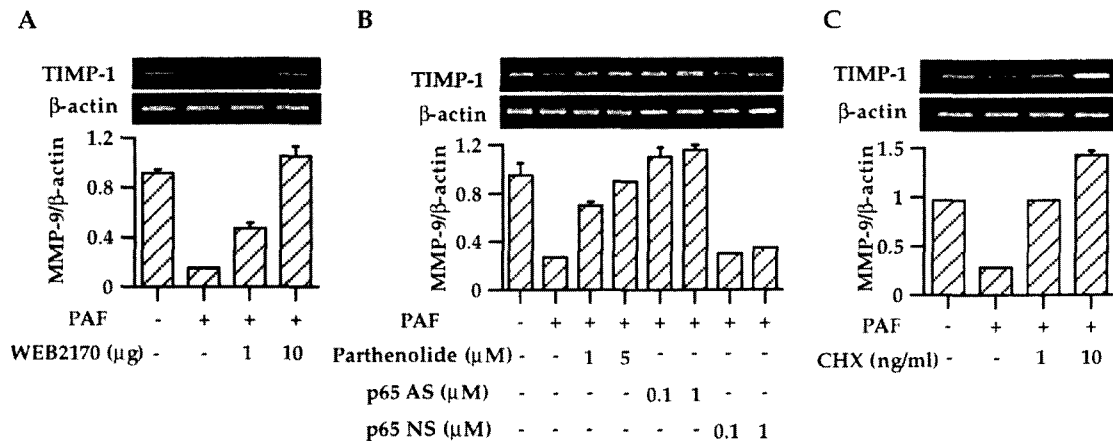
### 2. PAF에 의한 MMP-9의 mRNA 발현 및 효소 활성에 있어서 NF-κB의 역할

PAF에 의해 유도되는 MMP-9의 유전자 발현에 있어서 NF-κB의 관련성을 알아보기 위하여 먼저 PAF에 의한 NF-κB 활성을 electrophoretic mobility shift assay로 확인한 결과,



**Fig. 3.** NF-κB plays an important role in PAF-induced promoter activity of MMP-9. MMSV-BALB/3T3 cells were plated at a density of  $2 \times 10^4$  on 24-well plate and then transfected with MMP-9 luciferase reporter plasmid (0.2 μg/well) and were treated for 8 hr with 1 μg/ml of PAF. Cells were pretreated with WEB 2170 (10 μg/ml), parthenolide (5 μM/ml), NAC (10 μM/ml), or PDTC (10 μM/ml) 30 min prior to PAF treatment. Luciferase activity was shown as fold increase of the PAF or inhibitor-treated sample to the untreated sample. Each sample was assayed in duplicate and the experiment was repeated three times independently. \*,  $P < 0.0001$  compared with control group; \*\*,  $P < 0.0001$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$  S.E.

MMSV-BALB/3T3에 PAF을 처리하였을 때 NF-κB 활성이 증가하였으며 증가된 NF-κB 활성은 PAF 수용체 길항제인 WEB 2170에 의해 감소되었다 (Fig. 2A). 또한 MMSV-BALB/3T3에 NF-κB 억제제인 parthenolide 또는 p65 AS를 전 처리하였을 때 PAF에 의해 증가된 MMP-9 mRNA (Fig. 2B)와 효소활성 (Fig. 2C)이 parthenolide 및 p65 AS에 의하여 농도 의존적으로 감소하였다. PAF에 의한 MMP-9 promoter의 활



**Fig. 4.** PAF downregulates mRNA expression of TIMP-1 through NF- $\kappa$ B dependent new protein synthesis. MMSV-BALB/3T3 cells ( $1 \times 10^6$ ) were treated with (A) WEB 2170, (B) parthenolide 30 min prior to PAF treatment, p65 AS or NS oligonucleotide at indicated concentrations 3 day prior to PAF treatment, or (C) cycloheximide (CHX) 30 min prior to PAF treatment. RNA was prepared 24 hr after PAF treatment, and cDNA was reverse transcribed from total RNA (1  $\mu$ g) and amplified as described in Materials and Methods. Results of RT-PCR are shown and quantitated by calculating the ratio of densitometric reading of the bands for TIMP-1 and  $\beta$ -actin.

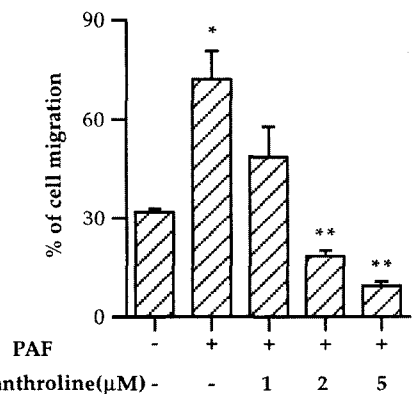
성과 promoter 활성화에 있어 NF- $\kappa$ B 결합부위의 작용 정도를 확인하기 위하여 luciferase assay를 실시한 결과 PAF에 의해 MMP-9 promoter 활성이 증가하였고, 이러한 증가는 WEB 2170과 NF- $\kappa$ B 억제제인 parthenolide, NAC, PDTCC에 의해 유의하게 억제되었다 (Fig. 3). 이상의 결과들은 MMSV-BALB/3T3에서 PAF에 의해 증가된 MMP-9의 발현이 전사 수준에서 조절되며, NF- $\kappa$ B가 매우 중요한 역할을 함을 시사한다.

### 3. PAF에 의한 TIMP-1의 발현 억제

TIMP-1은 MMP-9과 1:1 복합체를 형성함으로써 MMP-9의 활성을 조절하므로 PAF에 의한 MMP-9의 활성화에 TIMP-1의 관련성을 알아보기 위하여 MMSV-BALB/3T3에 PAF를 처리하고 24시간 후 TIMP-1의 발현을 확인한 결과, PAF에 의해 TIMP-1 발현이 억제되었으며 억제된 TIMP-1의 mRNA 발현은 WEB 2170 (Fig. 4A) 및 parthenolide, p65 AS (Fig. 4B)에 의하여 회복되었다. 새로운 단백질 합성을 저해하는 cycloheximide (CHX)를 전 처리하였을 때 PAF에 의해 감소된 TIMP-1의 발현이 정상 수준 또는 약간 증가됨을 확인하였다 (Fig. 4C). 이러한 결과는 PAF은 TIMP-1의 발현을 저해함으로써 MMP-9의 활성을 증가시키며, PAF에 의해 저해되는 TIMP-1의 발현 시 NF- $\kappa$ B 의존적인 새로운 단백질 합성이 요구되어짐을 시사한다.

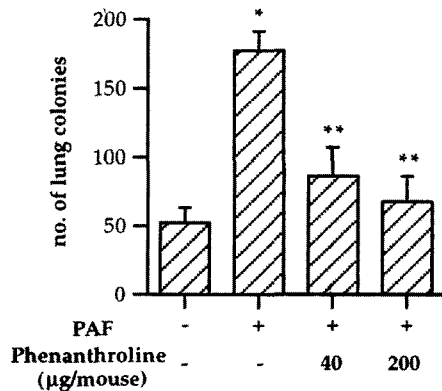
### 4. PAF에 의한 종양세포의 이동 및 전이 증진

MMSV-BALB/3T3에서 PAF이 MMP-9의 유전자 발현 및 효소 활성을 증가시킨 본 연구의 결과들을 보면 PAF이 MMP-9의 발현을 유도하여 암세포의 이동 및 암의 전이를 향진시킬 수 있음을 생각할 수 있다. 따라서 MMSV-BALB/



**Fig. 5.** PAF increases tumor cell migration and its effect is inhibited by MMP inhibitor. MMSV-BALB/3T3 cell-coated beads were treated with PAF with or without MMP inhibitor, phenanthroline at indicated concentrations. Quantification of cell migration was performed 12 hr after PAF treatment as described in the Materials and Methods. The results were expressed as the percent of cell migration in 100 beads. \*,  $P < 0.0001$  compared with control group; \*\*,  $P < 0.0001$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$  S.E.

3T3 multicellular spheroid를 이용하여 PAF에 의한 암세포 이동 정도를 실험하였다. PAF은 spheroid로부터 MMSV-BALB/3T3의 세포이동을 증가시켰으며, 이러한 PAF의 효과는 MMPs 억제제인 phenanthroline에 의해 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 5). 마우스에 MMSV-BALB/3T3을 정맥주사하고 MMPs 억제제인 phenanthroline을 처리하였을 때 PAF에 의해 증가된 폐로의 전이가 phenanthroline 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 6). 이러한 결과들은 PAF에 의해 증가된 MMP-9이 암세포의 이동과 암의 전이에 중요한 역할을 함을 시사한다.



**Fig. 6.** PAF-augmented pulmonary tumor metastasis is inhibited by MMP inhibitor. PAF was administered i.p. for 3 consecutive days (0~2 days) after MMSV-BALB/3T3 cell injection on day 0 ( $2 \times 10^6$ /mouse, i.v.). Phenanthroline was injected i.p. 2 hrs after PAF treatment. Lungs were removed on day 21, and the number of surface colonies was counted. \*,  $P < 0.001$  compared with control group, \*\*,  $P < 0.001$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$  S.E.

## 고찰

PAF은 다양한 생물학적 활성 기능을 가진 인 지질로서 NF- $\kappa$ B 활성화를 통해 여러 가지 성장인자 및 cytokines 등의 유전자 발현을 유도하여 내피세포의 이동, 혈관형성 및 암의 전이를 증가시킨다<sup>19,30</sup>). MMPs는 신생혈관형성 및 암의 전이에 있어 필수 과정인 세포 외 기질의 붕괴에 중요한 역할을 하며, 구강암, 폐암, 자궁경부암 등의 암세포에서 정상 세포보다 높은 발현 및 활성을 보인다<sup>24,36,37,44</sup>)고 보고되고 있다. 이러한 보고들은 PAF에 의해 증진되는 암의 전이에 있어서 이러한 MMPs의 관련가능성을 시사하나 PAF과 이들 간의 관계를 명확하게 밝힌 연구는 아직까지 찾아볼 수 없다. 따라서 본 연구에서는 PAF에 의해 유도되는 암의 전이에 MMPs의 역할을 밝히고 PAF에 의한 이들의 발현을 실험하였다.

마우스 sarcoma 세포주인 MMSV-BALB/3T3에서 PAF에 의한 MMP-9의 mRNA 발현과 효소 활성이 증가되었고, PAF 길항제인 WEB 2170에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 관찰하였다 (Fig. 1). 최근 보고에 의하면 PAF이 인간 뱃줄내피 세포에서 MMP-2의 발현을 항진시킨다고 알려져 있으나<sup>1)</sup>, MMSV-BALB/3T3에서 MMP-2의 mRNA 발현 및 단백질 활성에는 PAF의 어떠한 효과도 확인할 수 없었다 (data not shown). 이상의 결과로 PAF이 수용체 의존적으로 MMP-9의 발현 및 활성을 증가시킬 수 있었다. 또한 PAF에 의한 MMP-9의 발현에 있어서 NF- $\kappa$ B의 관련성을 확인하고자 MMSV-BALB/3T3에 NF- $\kappa$ B 억제제인 parthenolide 혹은 p65

AS를 전 처리하였을 때 MMP-9의 mRNA 발현 및 효소 활성이 현저하게 억제되었다 (Fig. 2). MMP-9의 promoter 활성 역시 PAF에 의해 증가하였으며 PAF 길항제인, WEB 2170과 NF- $\kappa$ B 억제제인 parthenolide 혹은 NAC, PDTC에 의해 감소됨을 확인하였다 (Fig. 3). 이러한 결과들은 PAF이 MMP-9의 발현을 전사수준에서 조절하며, MMP-9의 유전자 발현 및 효소 활성에 NF- $\kappa$ B가 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다.

PAF에 의한 MMP-9의 활성을 zymography로 확인한 결과를 보면 active-MMP-9의 단백질질을 확인할 수 있었는데 이는 PAF이 pro-MMP-9을 active-form으로 전환시키는데도 작용함을 알 수 있다. TIMP-1은 MMP-9과 1:1 복합체를 형성하여 MMP-9의 활성을 저해한다고 알려져 있으며<sup>16,35,38,46</sup>), 최근 사람 미세혈관의 내피세포에서 MMP-2와 MMP-9은 내피세포의 이동, 튜브 형성 (tube formation) 및 신생혈관형성을 촉진하였으며<sup>18,27,40,45</sup>) 천연 억제제인 TIMP-1은 이들의 활성을 저해한다고 보고<sup>47</sup>)되었다. 이러한 보고들을 근거로 PAF에 의한 MMP-9의 활성증가에는 TIMP-1의 발현이 중요한 영향을 미칠 것으로 생각되어 PAF에 의한 TIMP-1의 발현을 확인한 결과, PAF에 의해 TIMP-1의 발현이 현저히 억제됨을 볼 수 있었다 (Fig. 4). TIMP-1의 promoter에는 NF- $\kappa$ B 결합부위가 존재하지 않음에도 불구하고 PAF에 의해 저해되었던 TIMP-1의 발현이 NF- $\kappa$ B 억제제 및 새로운 단백질 합성 억제제인 CHX에 의해 회복된 결과는 PAF에 의한 TIMP-1 발현 조절에 있어 NF- $\kappa$ B 의존적인 새로운 단백질의 합성이 요구되어짐을 시사해 준다. 이상의 결과로 PAF이 TIMP-1의 발현을 저해시켜 MMP-9과의 balance를 조절함으로써 MMP-9의 활성을 더욱 증가시킬 수 확인시켜 주었다. PAF에 의한 MMP-9의 활성에 TIMP-1의 관여 가능성 외에도 serine proteinase, trypsin-2 등을 비롯한 여러 단백질 분해 효소,  $Ca^{2+}$  등의 관여 가능성을 생각할 수 있으나 이는 좀 더 추구하고자 할 과제라고 생각된다.

MMPs에 의한 암세포의 침투 및 전이가 증가한다는 많은 보고들은<sup>8,13,26</sup>) PAF에 의한 암의 전이 항진에 있어서 MMPs가 중요한 역할을 함을 시사한다. 따라서 PAF에 의한 암세포의 이동 및 전이에 있어서 MMPs의 역할을 실험한 결과, PAF에 의해 현저히 증가된 암세포의 이동과 전이를 확인하였고, PAF에 의해 증가된 암세포의 이동 및 전이가 MMP 억제제인 phenanthroline에 의해 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다 (Fig. 5, 6). 이러한 결과는 PAF에 의한 암 전이 증진에 있어 MMPs의 발현이 필수적으로 선행되어야 함을 시사한다.

이상의 결과들을 통해 MMSV-BALB/3T3에서 PAF에 의해 NF- $\kappa$ B 의존적으로 MMP-9의 유전자 발현과 효소 활성이 증진되고 TIMP-1의 발현이 감소되며, 따라서 암세포의 이동

및 전이가 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 복잡한 암 전이의 신호전달 연구 및 항암제로서 암의 전이 억제제 개발 전략에 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

#### 감사의 말

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-075-C00016)

#### 참 고 문 헌

- 1) Axelrad TW, Deo DD, Ottino P, Van Kirk J, Bazan NG, Bazan HE and Hunt JD (2004): Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. *FASEB J*, **18(8)**: 568-570.
- 2) Behrens P, Rothe M, wellmann L, Krischler J and Wernert N (2001): The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP-1 and MMP-9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol*, **194(1)**: 43-50.
- 3) Blinder C, Hagemann T and Einspanier A (2002): Relaxin enhances in vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteinases. *Molecular Human Reproduction*, **8**: 789-796.
- 4) Bond M, Fabunmi RP and Newby AC (1998): Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF- $\kappa$ B. *FEBS Letters*, **435(1)**: 29-34.
- 5) Buttke TM and Sandstrom PA (1995): Redox regulation of programmed cell death in lymphocyte. *Free Radic Res*, **22(5)**: 389-397.
- 6) Camussi G, Aglietta M, Coda R, Bussolino F, Piacibello W and Tetta C (1981): Release of platelet-activating factor (PAF) and histamine. II. The cellular origin of human PAF: monocytes, polymorphonuclear neutrophils and basophils. *Immunology*, **42(2)**: 191-199.
- 7) Casals-Stenzel J (1987): Protective effect of WEB2068, a novel antagonist of platelet-activating factor, in endotoxin shock. *Eur J Pharmacol*, **135(2)**: 117-122.
- 8) Chang C and Werb Z (2001): The many faces of metalloproteinases: cell growth, invasion, angiogenesis, and metastasis. *Trends Cell Biol*, **11(11)**: S37-S43.
- 9) Chignard M, Couedic Le JP, Tence M, Vargaftig BB and Benveniste J (1979): The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature*, **279(5716)**: 799-800.
- 10) Choi IW, Ha TY, Lee DG, Park JS, Lee JH, Park YM and Lee HK (1995): Occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC) in active systemic anaphylaxis: role of platelet-activating factor. *Clin Exp Immunol*, **100(3)**: 390-394.
- 11) Chomczunski P, Sacchit N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156-159.
- 12) Dignam JD, Lebovitz RM and Roeder RG (1983): Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11(5)**: 1475-1489.
- 13) Egeblad M and Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **2(3)**: 161-174.
- 14) Fukuda AI and Breuel KF (1996): Effect of platelet-activating factor on embryonic development and implantation in the mouse. *Hum Reprod*, **11(12)**: 2746-2749.
- 15) Gay JC (1993): Mechanism and regulation of neutrophil priming by platelet-activating factor. *J Cell Physiol*, **156(1)**: 189-197.
- 16) Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT and Marmer BL (1992): Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinase prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*, **267(10)**: 4583-4591.
- 17) Han SJ, Choi JH, Ko HM, Yang HW, Choi IW, Lee HK and Im SY (1999): Glucocorticoids prevent NF- $\kappa$ B activation by inhibiting the early release of platelet-activating factor in response to lipopolysaccharide. *Eur J Immunol*, **29(4)**: 1334-1341.
- 18) Haseneen NA, Vaday GG, Zucker S and Foda HD (2003): Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN. *Am J Physiol*, **284(3)**: L541-L547.
- 19) Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD and Fidler IJ (2001): Blockade of NF- $\kappa$ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*, **20(31)**: 4188-4197.
- 20) Im SY, Ko HM, Ko YS, Kim JW, Lee HK, Ha TY, Lee HB, Oh SJ, Bai S, Chung KC, Lee YB, Kang HS and Chun SB (1996): Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. *Cancer Res*, **56(11)**: 2662-2665.
- 21) Itoh T, Tanioka M and Matsuda H (1999): Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis*, **17(2)**: 177-181.

- 22) Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H and Itohara S (1998): Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, **58(5)**: 1048-1051.
- 23) John A and Tuszynski G (2001): The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, **7(1)**: 14-23.
- 24) Kim YM, Jang JW, Lee OH, Choi EY, Lee ST and Kwon YG (2000): Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res*, **60(19)**: 5410-5413.
- 25) Ko HM, Seo KH, Han SJ, Ahn KY, Choi IH, Koh GY, Lee HK, Ra MS and Im SY (2002): Nuclear factor kappaB dependency of platelet-activating factor-induced angiogenesis. *Cancer Res*, **62(6)**: 1809-1814.
- 26) Liotta LA and Stetler-Stevenson WG (1991): Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Invest*, **9(5)**: 543-551.
- 27) Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM and Clowes AW (1999): Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, **85(12)**: 1179-1185.
- 28) McCawley LJ and Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*, **6(4)**: 149-156.
- 29) Menica-Huerta JM and Benveniste J (1979): Platelet-activating factor and macrophages. I. Evidence for the release from rat and mouse peritoneal macrophages and not from mastocytes. *Eur J Immunol*, **9(5)**: 409-415.
- 30) Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L, Emanuelli G and Camussi G (2000): Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20(1)**: 80-88.
- 31) Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Passerini G, Bussolino F, Emanuelli G and Camussi G (1994): Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med*, **180(1)**: 377-382.
- 32) Moses MA (1997): The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinase and their inhibitors. *Stem Cells*, **15(3)**: 180-189.
- 33) Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y and Sameshima T (2002): Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int*, **52(4)**: 255-264.
- 34) Nagase H (1997): Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, **378(3-4)**: 151-160.
- 35) Nagase H and Woessner JF Jr (1999): Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274(31)**: 21491-21494.
- 36) Naglich JG, Jure-Kunkel M, Gupta E, Fargnoli J, Henderson AJ, Wills R, Kramer RA and Trail PA (2001): Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res*, **61(23)**: 8480-8485.
- 37) Nyberg P, Heikkila P, Sorsa T and Salo T (2003): Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of metalloproteinase-2, -9, -13. *J Biol Chem*, **278(25)**: 22404-22411.
- 38) Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S and Fridman R (1997): Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and 9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. in tumor invasion and metastasis. *J Biol Chem*, **272(47)**: 29975-29983.
- 39) Parks WC (1999): Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen*, **7(6)**: 423-432.
- 40) Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagases H, French DL and Quigley JP (1999): Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem*, **274(19)**: 13066-13076.
- 41) Ricca A, Biroccio A, Bufalo DD, Mackay AR, Santoni A and Cippitelli M (2000): bcl-2 over-expression enhances NF- $\kappa$ B activity and induces MMP-9 transcription in human MCF7<sup>ADR</sup> breast cancer cells. *Int J Cancer*, **86(2)**: 188-196.
- 42) Schnaper HW, Grant DS and Stetler-Stevenson WG (1993): Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro. *J Cell Physiol*, **156(2)**: 235-246.
- 43) Shukla SD (1992): Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanism. *FASEB J*, **6(6)**: 2296-2301.
- 44) Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G and Offidani A (2002): Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanolytic lesions. *Cancer*, **95(9)**: 1963-1970.
- 45) Smola-Hess S, Schnitzler R, Hadaschik D, Smola H, Mauch C, Krieg T and Pfister H (2001): CD40L induces matrix metalloproteinases-1 in cervical carcinoma cells: imbalance between NF- $\kappa$ B and STAT3 activation. *Exp Cell Res*, **267(2)**: 205-215.



- 46) Stamenkovic I (2000): Matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biology*, **10(6)**: 415-433.
- 47) Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, Mai M, Sasaki T and Seiki M (1996): Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer*, **77(8)**: 1676-1680.
- 48) Werb Z (1997): ECM and cell surface proteolysis: regulatory cellular ecology. *Cell*, **91(4)**: 439-442.