

Disulfiram에 의한 type IV collagenase 저해효과

신두일 · 박재복* · 박관규 · 조창호 · 오훈규 · 최창혁¹ · 조현지 · 장영체**

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, ¹대구가톨릭대학교 의과대학 정형외과학교실

Received July 10, 2006 / Accepted September 15, 2006

Inhibitory Effects of Type IV Collagenase by Disulfiram. Doo-Il Sin, Jae-Bok Park*, Kwan-Kyu Park, Chang-Ho Cho, Hoon-Kyu Oh, Chang-Hyuk Choi¹, Hyun-Ji Cho and Young-Chae Chang**. Department of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, 705-034, Korea, ¹Department of Orthopedic Surgery, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, 705-034, Korea – The cancer cells, characterized by local invasion and distant metastasis, are very dependant on extracellular matrix. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) has been implicated in the invasion and metastasis of cancer cells. Among the human MMPs, matirx metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) are key enzymes that degrade type IV collagen of the matrix. Here, we studied the effect of disulfiram, an anti-tumor compound, on the suppression of the tumor invasion and the activity of MMP-2, MMP-9 in human osteosarcoma cells (U2OS). Disulfiram had the type IV collagenase inhibitory activity, the effect of inhibition of gene and protein expression, and these inhibitions were responsible for blocking invasion through cell mediated and non-cell mediated pathways. In conclusion, disulfiram inhibited expression of MMP-2 and MMP-9, and regulated the invasion of U2OS, Caki-1 and Caski. These observations raise the possibility of clinical therapeutic applications for disulfiram used as a potential inhibitor of cancer invasion.

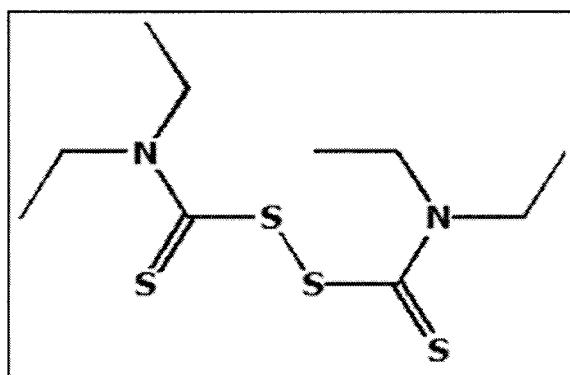
Key words – Disulfiram, PMA, MMP-9, MMP-2, anti-Cancer

서 론

Disulfiram은 장에서 흡수된 알코올이 간에서 대사되는 과정에서 acetic acid로 산화되는 과정을 억제하는 aldehyde dehydrogenase의 억제제로 인체에 오랜 시간 잔류하여 알코올의 분해를 저해한다고 알려져 있다[1]. 또한 disulfiram은 아연 또는 구리를 중앙에 두고 두 개 이상의 리간드와 결합하여 고리형태 구조의 화합물을 이루는 chelation 작용을 하는 물질로 (Fig. 1), 아연 또는 구리와 결합하여 생물체내에서 작용하는 효소의 보조인자 활성을 저해하여 체내 밖으로의 배출을 용이하게 하는 특성을 가지고 있다[13]. Disulfiram과 같은 chelation 작용물질로는 EDTA, vitamin B 등이 잘 알려져 있다[13]. 현재까지 disulfiram에 대한 연구결과로는 anti-retrovirus 작용과 human immunodeficiency virus (HIV) nucleocapside protein의 보조효소인 아연을 chelating 한다고 알려져 있으며, 최근 결장암세포에서 유도된 NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)의 작용 억제와 흑색종 세포의 apoptosis 유도 및 angiogenesis의 억제, 세포막을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성 저해 등의 작용을 함으

로써 암세포의 침입을 억제한다고 보고되고 있다[2,16,17,19, 24,25,27]. 또한 disulfiram은 SOD-1 작용을 억제하여 세포의 산화 스트레스에 의한 세포사를 유도하며, 금속을 chelating 하는 작용을 이용하여 금속이온에 의존적인 항종양작용 유도 및 세포의 침윤과 전이에 관련된 전사인자를 억제한다는 연구결과들이 보고되어 있다[7,24,25,27,30].

조직에서 암세포의 침윤과 전이가 이루어지기 위해서는 세포의 기저막을 형성하고 있는 extracellular matrix (ECM) 가 분해되어야 하는데, 이때 MMPs라는 단백질 분해효소가 관여하게 되며 이것은 암세포의 침윤과 전이에 가장 중요한



Tetraethylthiuram disulfide
 $C_{10}H_{20}N_2S_4$ [MW. 296.54]

Fig. 1. Chemical structure of disulfiram. Chemical structure and molecular weight of disulfiram.

*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4155, Fax : +82-53-650-4834
E-mail : jbpark@cu.ac.kr

**Corresponding author

Tel : +82-53-650-4848, Fax : +82-53-650-4834
E-mail : ycchang@cu.ac.kr

요인 중 하나로 알려져 있다[1,3,18]. MMPs는 아연을 보조효소로 이용하는 endoproteinase로 ECM을 분해하는 효소이며, 구조와 특성에 따라 Collagenases, Gelatinases, Stromelysins, Membrane-type MMP로 나뉘어 진다. 또한 MMPs는 공통적으로 catalytic domain, pro-peptide, signal peptide, zinc-binding site를 가지고 있으며, 각각의 MMPs마다 특징적인 부위를 가지고 있다. 이 중 본 연구에서 확인하고자 한 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2, gelatinase-A, 72-kDa type IV collagenase)과 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9, gelatinase-B, 92-kDa type IV collagenase)은 공통적으로 가지는 결합부위와 fibronectin type II inserts 및 hemopexin domain를 가지고 있으며, 구조적으로 MMP-2와 MMP-9 사이에 구분되지는 않는다[10,24,29]. 이러한 MMPs는 비활성 전구체로 합성되어진 후, 단백질 가수분해에 의해 활성화가 되며, MMPs 활성은 유전자의 발현과 비활성효소의 활성화 과정, 효소활성의 억제 과정에 의해 조절된다고 알려져 있다[4,5,9].

사람에게 발현되는 MMP-2와 MMP-9은 암세포의 침윤과 전이에 가장 결정적인 유전인자로 기저막 구성 성분인 type IV collagen과 fibronectin을 분해하는 효소로 알려져 있으며 특히 다양한 암세포에서 MMP-2와 MMP-9의 발현정도에 따라 암 전이가 깊이 연관되어 있음이 확인되었다[9-12]. 한 예로 대장암 세포와 여러 종류의 상피 세포 암에서 MMP-9의 활성 및 발현 증가가 암세포의 전이와 밀접한 연관이 있음이 보고되었으며[5,22], 또한 MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현은 AP-1, NF-κB, Sp1 등과 같은 전사인자에 의해서 조절되고 있다고 알려져 있다[11]. 그러나 이러한 연구결과에도 불구하고 실지 암세포에서 MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현 기전이 아직 명확하게 규명되어 있지 않다.

본 연구는 암전이 억제 후보물질인 disulfiram을 악성 종양세포주인 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에 처리하여 이를 세포의 침윤과 전이를 유도하는 type IV collagenase의 활성 및 발현 억제에 대한 연구 수행을 통해 disulfiram의 type IV collagenase 억제 효과에 대해 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

세포배양 및 시약

U2OS (human osteosarcoma), Caki-1 (human renal carcinoma), Caski (cervical carcinoma) 세포는 American type culture collection 으로부터 구입하였다. U2OS와 Caki-1 세포는 10% 혈청 (fetal bovine serum, FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT)과 1% Penicillin, Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO)을 함유한 DMEM-High glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 배지에서 배양하였고, Caski (Cervical carcinoma cell) 세포는 10% 혈청과 1% Penicillin, Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO)을 함유

한 RPMI1640 (RPMI Medium 1640) 배지에서 배양 하였다. 연구에 사용한 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하였다. Disulfiram, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) 및 DMSO는 SIGMA로부터 구입하였고, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reagent)는 Roche Molecular Biochemical에서 구입하여 사용하였다. Lipofectamine 2000은 Invitrogen에서 구입했고, anti-MMP-2, anti-MMP-9은 Chemicon (USA)에서 구입하였다. anti-Rabbit과 ECL Western Blot Analysis는 Amersham (UK)에서 구입하여 사용하였다.

MTT

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetra-zolium bromide (Roche Molecular Biochemical) 분석방법에 의해 암세포의 생존율에 따른 disulfiram 의 세포독성을 평가하였다.

Gelatin substrate gel zymography

U2OS, Caki-1 및 Caski 세포를 1×10^5 /60 mm dish에 각각의 배양 배지로 80-90% 정도의 밀도가 되도록 배양하였다. 이후 기존의 배양액을 제거하고 disulfiram과 PMA를 넣은 무혈청 배양액으로 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양세포의 배양액을 회수하여 DTT가 첨가되지 않은 4×SDS-loading buffer[Tris-Cl (pH 6.8) 200 mM, Glycerol 40%, Bromophenol blue 0.4%, SDS 4%]와 섞어 1 mg/ml 농도의 gelatin을 첨가한 10% polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후, gel은 2.5%의 Triton X-100으로 10분 간격으로 3회 정도 실온에서 씻어 주었고, 5 mM의 NaCl과 1 uM의 CaCl₂를 포함한 buffer에 gel을 넣어 37°C에서 24시간동안 반응시켰다. 반응 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue R250 (0.25%)에 1시간 동안 염색하여 텁염색 용액으로 탈염색하였다. 탈염색 후 MMP-2와 MMP-9의 활성 정도를 band로서 확인하였다.

Western blot analysis

U2OS, Caki-1 및 Caski 세포를 1×10^5 /60 mm dish에 각각의 배양 배지로 80-90% 정도의 밀도가 되도록 배양하였다. 기존의 배양액을 제거하고 disulfiram과 PMA를 넣은 배양액으로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 세포를 scraper로 긁어모아 4°C, 12000 RPM으로 5분간 원심분리를 하여 상등액을 제거하고 IPH lysis buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 100 mM PMSF, leupeptin 1 mg/ml, Aprotinin 1 mg/ml and 1 M DTT]로 혼탁 시켰다. 4°C에서 30분 동안 lysis시키고 12,000 RPM에서 20분 동안 원심분리한 후, cell lysate로서 단백질을 분리하였다. 추출한 단백질은 정량하여 DTT가 첨가된 2×SDS-loading buffer [Tris-Cl (pH 6.8) 100 mM, glycerol 20%, bromophenol blue 0.2%, SDS 4%, diethiothreitol 200 mM]와 섞어 98°C에서 5분간 heating 한 후

Table 1. Sequence of the primer pairs employed in the RT-PCR reactions

Studied gene	Sequences of the primer pairs (5'→3')	Annealing Temp(°C)	Linear cycle range	Product size (bp)
MMP-2	Forward: GGCCCTGTCACTCCTGAGAT Reverse: GGCATCCAGGTTATCGGGGA	60	25-29	474
MMP-9	Forward: CGGAGCACGGAGACGGGTAT Reverse: TGAAGGGAAAGACGCCACAGC	60	24-29	537

10% SDS-PAGE gel로 전기 영동하여 Immobilon-P-membrane (Millipore, USA)에 transfer 시켰다. Membrane은 일차 항체 anti-MMP-2, anti-MMP-9 (Chemicon, USA)과 반응시키고 이차 항체 anti-Rabbit과 각각 반응시켰다. 항체들에 대한 발현분석은 Horseradish Peroxidase-Linked 이차항체에 의해 발현되는 ECL Western Blot Analysis 시스템을 이용하여 결과를 분석하였다.

RT-PCR

RNA의 추출은 ZolBee (Life Technology, Grand Island, NY)를 이용하여 분리하였으며 500 ng의 RNA를 사용 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)로 역전사 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 MMP-2와 MMP-9의 Primer를 이용하여 PCR을 수행하였고, 생성된 products는 1% agarose gel로 전기 영동하여 ethidium bromide과 결합 시켜 가시화하여 결과를 확인 하였다. RT-PCR을 위한 primer sequence는 Table 1에 나와 있다.

통계적 분석

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 다양성 분석은 Duncan's test에 의해 분석하였다. 통계처리 후 P값이 0.05 미만일 경우 ($p < 0.05$) 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

암세포의 증식 및 세포사에 대한 disulfiram의 영향

Type IV collagenase를 잘 분비하는 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포를 이용하여 disulfiram에 대한 세포독성과 세포사멸을 확인하고자 MITT assay를 수행하였다. 우선 disulfiram에 대한 암세포의 형태학적 변화를 확인하기 위해 세포배양 배지에 disulfiram을 30 uM 처리하여 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 형태학적 변화와 세포성장 저해 및 세포사멸 유도를 확인하였다 (Fig. 2). 본 실험에 앞서 암세포에 PMA 만 처리한 경우 약간의 형태학적인 변화만을 확인 할 수 있었으며 세포성장 저해 및 세포사멸 유도는 확인 할 수 없었다(data not shown). Disulfiram을 암세포에 처리한 경우 암세포의 형태학적인 변화뿐만 아니라 세포성장 저해 및 세포

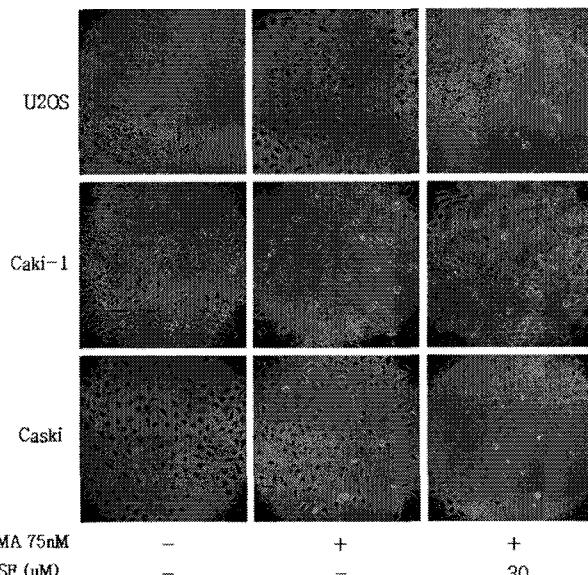


Fig. 2. Effects of disulfiram in various cell lines. U2OS, Caki-1 and Caski cells were treated with PMA 75 nM and disulfiram 30 uM for 24h. Morphology of cells were observed under original magnification $\times 100$.

사멸이 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. (Fig. 2). 또한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에 disulfiram 1, 10, 30, 50 uM 을 처리한 경우 disulfiram을 10 uM 처리 시 암세포의 viability에 큰 영향을 나타내지 않았으며 (Fig. 3), disulfiram의 처리 농도와 처리 시간이 증가함에 따라 세포의 viability가 최대 50% 정도 감소되는 것을 확인 할 수 있어 disulfiram을 고농도로 장시간 처리 시 세포사멸을 유도함과 동시에 세포의 viability를 저해하는 것을 확인 할 수 있었다.

Disulfiram에 의해 PMA로 유도된 암세포의 MMP-9과 MMP-2의 활성 억제

본 연구에서는 Protein kinase C (PKC) 활성유도 물질로 알려진 PMA를 이용하여 MMP-9의 활성을 유도하였으며 [11,22], 세포 배양 배지를 이용한 zymography assay를 통해 MMP-2와 MMP-9의 활성을 확인하였다. 그 결과, PMA의 처리 농도가 증가할수록 MMP-9의 활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 4-A). MMP-2는 기존의 연구 결과와 동일하게 PMA의 농도와 상관없이 활성이 일정한 것을 확인 할 수 있었다. PMA 처리 시간 또한 처리 시간이 길어질수록 MMP-9의 활성이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 (Fig.

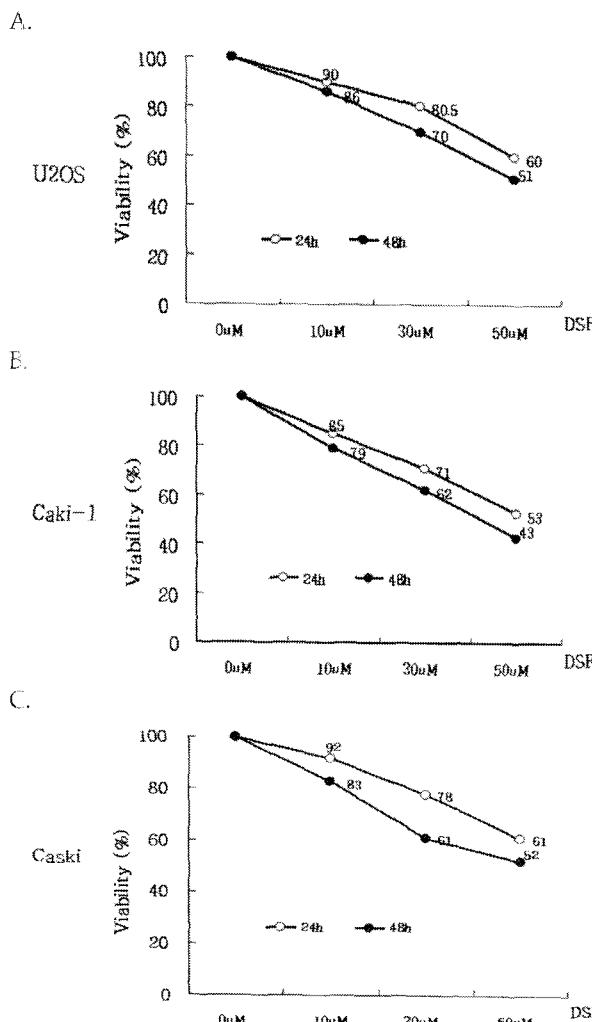


Fig. 3. Effects of disulfiram on viability. U2OS (A), Caki-1 (b) and Caski (C) cells were treated with disulfiram in absence of serum, and cell viability was tested by MTT assay after 24h and 48h.

4-B), MMP-2는 처리 시간과 관계없이 활성이 일정함을 관찰할 수 있어 PMA를 24시간 동안 75 nM로 처리 시 MMP-9의 활성이 가장 높게 나타남을 확인 할 수 있었다. PMA를 처리하여 유도한 MMP-9과 MMP-2의 활성에 disulfiram이 미치는 영향을 확인 하기위해 PMA 75 nM과 disulfiram 20 uM을 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에 처리하여 zymography assay를 통해 MMP-2와 MMP-9의 disulfiram에 대한 저해 활성을 확인하였다. 그 결과, U2OS, Caki-1 및 Caski 세포 모두 disulfiram 20 uM에 의해 MMP-2와 MMP-9의 활성이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었으며, 그 중에서 U2OS 세포의 MMP-2와 MMP-9의 활성이 disulfiram에 의해 가장 많이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 5).

이 결과는 disulfiram을 1, 5, 10, 20 uM로 처리한 zymography assay에서 MMP-2와 MMP-9의 활성이 disulfiram의 농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있어 U2OS,

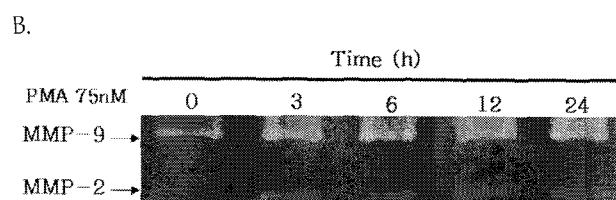
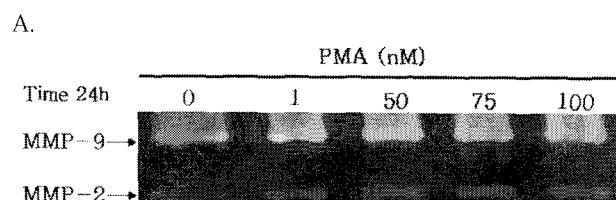


Fig. 4. The MMP-9 activity by PMA. U2OS cells were treated with various concentrations of PMA (A) and various treatment times (B) in the absence of serum. Conditioned medium were collected after 24h and analyzed by gelatin zymography.

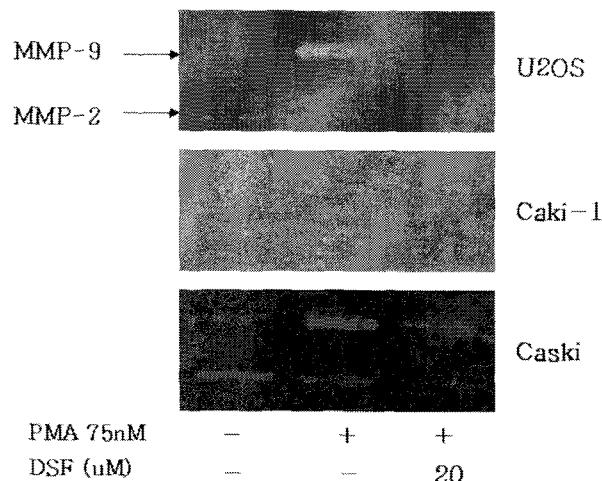


Fig. 5. Effect of disulfiram on MMP-9 and MMP-2 activity. U2OS, Caki-1 and Caski were treated with disulfiram 20 uM and/or PMA 75 nM for 24h. Conditioned medium was collected from cultures after 24h and analyzed by gelatin zymography.

Caki-1 및 Caski 세포의 MMP-2와 MMP-9의 활성을 disulfiram이 저해한다는 사실을 확인 할 수 있다 (Fig. 6).

또한 Fig. 5와 Fig. 6에서 나타나듯 여러 암세포 중 특이적으로 U2OS 세포의 MMP-2, MMP-9의 활성이 disulfiram에 의해 현저하게 저해됨을 확인 할 수 있다.

Disulfiram 처리에 의한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 MMP-2와 MMP-9의 발현 감소

Fig. 6의 zymography assay 결과, disulfiram이 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 MMP-2와 MMP-9의 활성을 농도에 의존적으로 억제시킴을 확인 할 수 있었다. 또한 MMP-2의

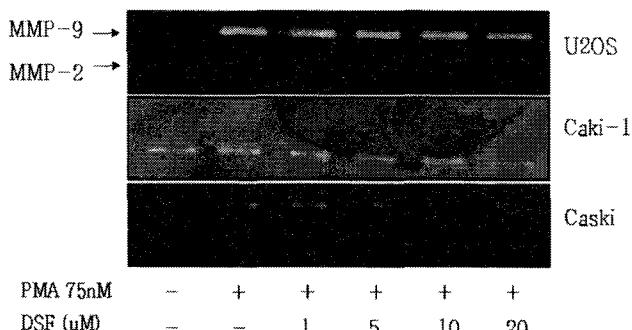


Fig. 6. Effect of disulfiram on MMP-9 and MMP-2 activity. U2OS, Caki-1 and Caski were treated with various concentrations of disulfiram in the presence of PMA 75 nM. Conditioned medium was collected from cultures after 24h and analyzed by gelatin zymography.

활성도 disulfiram의 농도에 의존적으로 감소되어 앞서 관찰된 결과와 동일함을 다시 한번 확인 할 수 있다.

본 연구에서는 disulfiram에 대한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 MMP-2와 MMP-9의 활성 감소가 세포성 경로를 통한 조절인지, 비세포성 경로를 통한 조절인지를 확인하기 위해 anti-MMP-2와 anti-MMP-9를 이용하여 단백질 발현양상을 확인하는 western blot을 실시하였다. U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에 PMA 75 nM과 1, 5, 10, 20 uM의 disulfiram을 처리하여 단백질 발현양상을 확인 한 결과 모든 암세포에서 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현이 disulfiram의 농도에 의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7). 또한 Caki-1 와 Caski 세포에 비해 U2OS 세포에서 disulfiram에 의한 단백질 발현이 가장 많이 저해되는 것을 확인 할 수 있어 앞서 실험한 zymography assay와 동일한 결과임을 확인 할 수 있었다. 따라서 disulfiram이 암세포의 전사단계의 조절을 통해 MMP-2 및 MMP-9 활성저해를 유도하는 것으로 짐작 할 수 있으며, 세포의 종류에 따라 MMP-2와 MMP-9의 활성 및 발현에 다르게 작용함을 알 수 있었다.

Disulfiram 처리에 의한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 mRNA 발현 저해

본 연구에서는 disulfiram 처리에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현 억제 결과를 바탕으로 전사단계에서의 MMP-2와 MMP-9 발현 조절에 대한 disulfiram의 영향에 대해 확인하였다. Disulfiram을 처리한 암세포로부터 RNA를 추출하여 MMP-2와 MMP-9의 primer를 이용 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 disulfiram의 농도에 따라 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, U2OS, Caki-1 및 Caski 세포 중에서 U2OS 세포의 MMP-2, MMP-9 mRNA 발현이 disulfiram에 의해 가장 크게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에서 disulfiram 처리에 의해 MMP-2보다는 MMP-9의 발현을 더 많이 저해되는 것을 관찰 할 수 있어 western blot과 zymography assay 결과와 동일함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 8).

따라서 disulfiram이 암세포의 MMP-2, MMP-9의 발현을 전사단계에서 조절하고 있으며, U2OS, Caki-1 및 Caski 세포 중 U2OS 세포의 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 가장 큰 영향을 끼침을 확인 할 수 있다 (Fig. 8).

고 칠

항암후보물질인 disulfiram은 aldehyde dehydrogenase의 억제제로 발견되었으며, 아연을 chelating 하는 성질을 이용하여 에이즈 바이러스의 작용을 억제 시키거나 종양세포의 apoptosis를 유도하고 angiogenesis의 억제 및 종양 성장을 억제하는 물질로 연구가 활발히 진행되고 있다[2,24,25].

Type IV collagenase인 MMP-2와 MMP-9은 암세포의 전이와 침윤 시 ECM 및 기저막을 분해하여 암세포의 전이와 침윤, angiogenesis를 활성화시켜 암세포 성장에 큰 영향을 주는 효소로, 아연에 의존적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포에 항암후보물

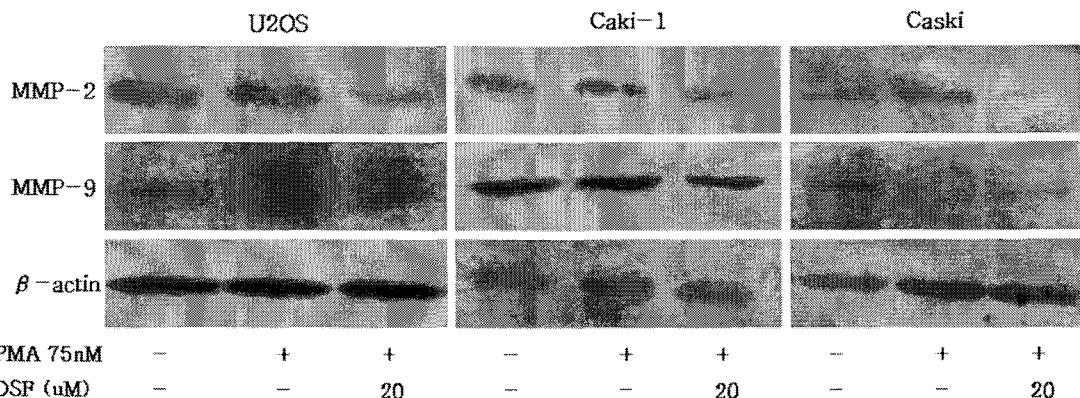


Fig. 7. The MMP-9 and MMP-2 expression by disulfiram. U2OS, Caki-1 and Caski cells were treated with disulfiram 20 uM and/or PMA 75 nM for 24h, was evaluated by western blot analysis using anti-MMP-2 and anti-MMP-9. Expression of β-actin in cell lysates was used as a control.

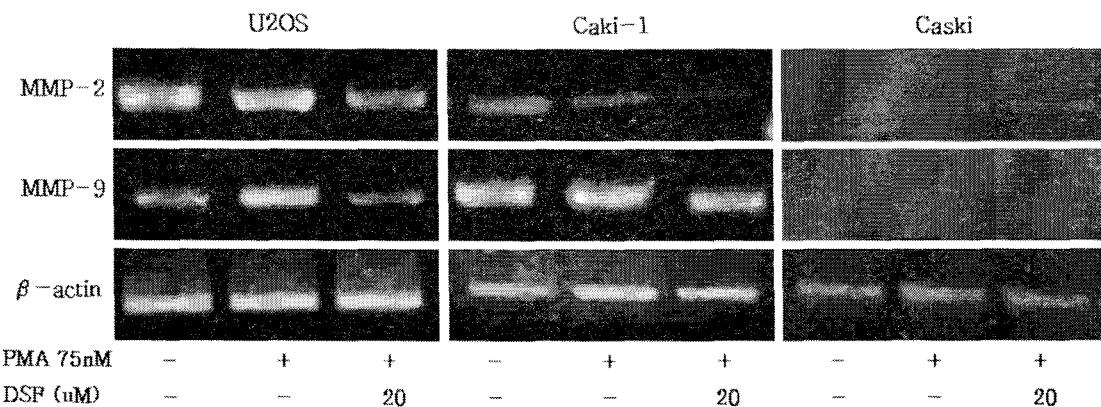


Fig. 8. The MMP-9 and MMP-2 mRNA expression by disulfiram. U2OS, Caki-1 and Caski cells were treated with disulfiram 20 μ M and/or PMA 75 nM for 24h. Total RNA was isolated and RT-PCR analysis was performed. The values below the Figure represent change in mRNA expression of the bands normalized to β -actin.

질인 disulfiram을 처리하여 MMP-2와 MMP-9의 직접적인 효소활성 저해와 발현억제를 통하여 종양 침윤을 억제시킨다는 사실을 확인하였다. 또한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포 중에서 disulfiram에 의한 MMP-2, MMP-9의 활성 및 발현 억제효과가 U2OS 세포에 특이적으로 높게 작용하는 사실을 확인하였다.

또한 disulfiram을 처리한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 형태학적 관찰을 통해 세포사멸이 유도됨을 확인하였다. 이러한 결과는 이전에 mouse macrophage 세포인 Raw 264.7 세포에서 disulfiram이 SOD-1의 작용을 억제시켜 그로인해 유발된 활성산소가 분해되지 못하여 세포사멸이 유도되었던 연구 결과와 동일한 것임을 알 수 있다[2,7].

Western blot과 RT-PCR을 통해 disulfiram에 대한 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 MMP-2 및 MMP-9의 단백질과 mRNA의 발현이 disulfiram 농도에 의존적으로 저해되는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과가 disulfiram이 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 전사 레벨을 조절하여 MMP-2 및 MMP-9 발현을 감소시킨다는 의견을 뒷받침하고 있음을 알 수 있다.

현재 MMP-2와 MMP-9의 발현을 조절하는 전사인자의 발현 기전은 명확하게 밝혀지지는 않았으나 MMPs의 발현을 조절하는 전사인자로 AP-1 (activator protein-1)과 Nuclear factor kappa B (NF-kB)가 있다고 보고되고 있으며[6], 세부적으로 MMP-9의 promoter에 존재하는 cis-acting 조절인자들인 AP-1, NF-kB 및 Sp1 등의 전사인자들이 발현조절에 관여한다고 연구되어 있다[11,21,23,26]. 또한 MMP-2는 암세포의 angiogenesis가 잘 형성도록 하며 Sp1, Sp3, AP1-2 및 NF-kB 등의 전사인자들에 의해 그 발현이 조절된다고 보고되어 있다[14,20,21]. 그리고 Buckmeir과 Lin 등은 disulfiram이 종양세포의 세포사멸을 유도함으로 세포사멸을 조절하는 전사인자로 밝혀진 NF-kB, AP-1 (c-fos/c-jun), p53 proteins이 관여한다는 연구 결과를 보고하고 있다[2,7].

이러한 이전의 연구결과들을 종합해 볼 때 disulfiram이 세포사멸과 MMP-2, MMP-9의 발현에 공통적으로 작용하는 기전인 AP-1, NF-kB와 zinc finger transcription factor로 알려진 Sp1에 영향을 미침으로 이들의 발현을 조절할 가능성이 있음을 추측 할 수 있으며[28], 이러한 추측은 disulfiram이 NF-kB의 작용을 억제한다는 연구결과를 통해서도 다시 한 번 확인 할 수 있었다[8,15,25].

결론적으로 본연구와 이전에 발표되었던 연구결과들로서 항암후보물질인 disulfiram이 U2OS, Caki-1 및 Caski 세포의 세포사멸을 유도하며 MMP-2와 MMP-9의 발현을 억제를 통하여 암세포의 전이와 침윤을 저해함으로 골 육종, 신장암 및 자궁경부암에 대한 새로운 화학적 치료물질로 개발 할 수 있는 가능성을 가진 물질임을 확인 할 수 있었다. 앞으로 disulfiram에 의한 세포사멸 기전 연구 및 전사기전에 관한 세밀한 연구가 이루어진다면 새로운 항암 물질로서의 가능성을 제시 할 수 있으리라 생각되어진다.

요 약

기질의 침윤과 전이를 특징으로 하는 악성종양 세포는 세포외 기질이나 기저막에 의존적으로 작용한다. 세포외 기질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinase (MMP) 계들의 발현 및 활성증가는 대부분의 악성종양세포에서 전이와 침윤을 촉진시킨다. MMP family 가운데 특히 type IV collagenase 활성을 지닌 MMP-2와 MMP-9은 세포외기질의 중요한 구성분인 collagen, fibronectin을 분해하는 특성을 가지며 전이를 용이하게 하는 주요한 효소로 잘 알려져 있다.

본 연구에서는 항암후보물질인 disulfiram이 골 육종 (U2OS), 신장암 (Caki-1) 및 자궁암 (Caski) 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 효소활성 및 발현억제에 대해 조사하였다. MTT assay를 이용하여 disulfiram에 대한 암세포 viability 실험에서는 disulfiram이 암세포의 viability를 저해하였다.

또한 zymography, western blot 및 RT-PCR 등을 이용한 type IV collagenase의 활성 및 발현 실험에서 disulfiram은 type IV collagenase의 활성을 비롯하여 단백질 및 mRNA 발현을 억제시키는 것을 확인하였다.

따라서 disulfiram이 MMP-2와 MMP-9의 활성 및 발현 억제 기전을 통하여 골육종, 신장암 및 자궁경부암 세포의 작용을 억제한다는 연구 결과는 disulfiram이 각종 악성종양의 침윤과 전이를 억제 또는 방지하기 위한 치료물질로서 임상에서 활용할 수 있는 가능성을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 2005학년도 대구가톨릭대학교 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. A. F. Chambers and L. M. Matrisian. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1260-1270.
2. D. Cen, R. I. Gonzalez, J. A. Buckmeier, R. S. Kahlon, N. B. Tohidian and F. L. Meyskens, Jr. 2002. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 197-204.
3. D. E. Kleiner and W. G. Stetler-stevenson. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* **43 Suppl.**, S42-51.
4. E. C. Woodhouse, R. F. Chuaqui and L. A. Liotta. 1997. General mechanism of metastasis. *Cancer* **80**, 1529-1537.
5. E. T. Waas, R. M. Lomme, J. Degroot, T. Wobbes and T. Hendriks. 2002. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and 9 in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **86**, 1876-1883.
6. F. Chen, P. Eriksson, G. K. Hansson, I. Herzerfeld, M. Klein, L. O. Hansson and G. Valen. 2005. Expression of matrix metalloproteinase 9 and its regulators in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Int. J. Mol. Med.* **15**, 57-65.
7. G. Y. Liu, N. Frank, H. Bartsch and J. K. Lin. 1998. Induction of apoptosis by Thiuramdisulfides, the reactive metabolites of dithiocarbamates, through coordinative modulation of NF-kB, c-fos/c-Jun, and p53 proteins. *Mol. Carcinog.* **22**, 235-246.
8. H. Lovborg, F. Oberg, L. Rickardson, J. Gullbo, P. Nygren and R. Larsson. 2006. Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-kappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer* **118**, 1577-1580.
9. H. Nagase and J. F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
10. S. H Hong, K. K. Park, M. Junji, A. Kunio, T. S. Lee, T. K. Kwon, J. Y. Kwak, C. H. Kim and Y. C. Chang. 2005. Ascochlorin Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Expression by Suppressing Activator Protein-1-mediated Gene Expression through the ERK1/2 Signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 25202-25209.
11. H. Sato and M. Seiki. 1993. Regulatory mechanism of 92kDa typeIVcollagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* **8**, 395-405.
12. H. Sato, T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M. Seiki. 1994. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* **370**, 61-65.
13. I. Hininger, R. Waters, M. Osman, C. Garrel, K. Fernholz, A. M. Roussel and R. A. Anderson. 2005. Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1565-70.
14. K. I. Matsumoto, S. Abiko and H. Ariga. 2005. Transcription regulatory complex including YB-1 controls expression of mouse matrix metalloproteinase-2 gene in NIH3T3 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1500-1504.
15. L. H. Wei, K. P. Lai, C. A. Chen, C. H. Cheng, Y. J. Huang, C. H. Chou, M. L. Kuo and c. Y. Hsieh. 2005. Arsenic trioxide prevents radiation-enhanced tumor invasiveness and inhibits matrix metalloproteinase-9 through down regulation of nuclear factor kB. *Oncogene* **24**, 390-398.
16. M. Marikovsky, N. Nevo, E. Vadai and C. H. Cerruti. 2002. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in angiogenesis. *Int. J. Cancer* **97**, 34-41.
17. M. Marikovsky, V. Ziv, N. Nevo, C. H. Cerruti and O. Mahler, 2003. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J. Immunol.* **170**, 2993-3001.
18. M. Takahashi, N. Oka, T. Naroda, M. A. Nishitani, K. Kanda, H. O. Kanayama and S. Kagawa. 2002. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-2 activation ratio in renal cell carcinoma. *Int. J. Urology* **9**, 531-538.
19. N. B. McDonnell, R. N. D. Guzman, W. G. Rice, J. A. Turpin and M. F. Summers. 1997. Zinc ejection as a new rationale for the use of cystamine and related disulfide containing antiviral agents in the treatment of AIDS. *J. Med. Chem.* **40**, 1969-1976.
20. Park, J. H., Chung, J. J., Min, H. Y., Park, E. J., Hong, J. Y., Kim, W. B., Kim, S. H. and Lee, S. K. 2005. Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclineanalog anti-tumor agent, on the invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 21-31.
21. P. K. Vayalil, A. Mital and S. K. Katiyar. 2004. Proanthocyanidins from grape seed inhibit expression of matrix metalloproteinases in human prostate carcinoma cells, which is associated with the inhibition of activation of MAPK and NF-kB. *Carcinogenesis* **25**, 987-995.
22. P. P. H. Lee, J. J. Hwang, G. Murphy and M. M. IP. 2000. Functional significance of MMP-9 in tumor necrosis factor-induced proliferation and branching morphogenesis of

- mammary epithelial cells. *Endocrinology* **141**, 3764-3773.
- 23. S. C. Huang, C. T. Ho, S. Y. L. Shiao and J. K. Lin. 2005. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappaB and c-Jun. *Biochemical Pharmacology* **69**, 221-232.
 - 24. S. G. Shiah, Y. R. Kao, F. Y. H. Wu and C. W. Wu. 2003. Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent Disulfiram. *Molecular Pharmacology* **64**, 1076-1084.
 - 25. S. S. Brar, C. Grigg, K. S. Wilson, W. D. Holder, Jr., D. Dreau, C. Austin, M. Foster, A. J. Ghio, A. R. Whorton, G. W. Wtowell, L. B. Whittall, R. R. Whittle, D. . White and T. P. Kennedy. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1049-1060.
 - 26. W. J. H., Kim, Y. H., Baek, W. K., Suh, S. I., Suh, M. H., Park, J. W. and Kwon, T. K. 2003. Expressional regulation of cancer metastasis related gene, MMP-9, by Resveratrol. *Journal of Bacteriology and Virology* **33** 235-243.
 - 27. W. Wang, H. L. Mcleod and J. Cassidy. 2003. Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **104**, 504-511.
 - 28. X. Wu, N. H. Bishopric, D. J. Discher, B. J. Murphy and K. A. Webster. 1996. Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1035-1046.
 - 29. Y. Soini, J. Satta, M. Maatta and H. A. Harmainen. 2001. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in valvular lesions of the heart. *Journal of Pathology* **194**, 225-231.
 - 30. Z. E. Sauna, Shukla S. and Ambudkar. S. V. 2005. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol. Biosyst.* **1**, 127-134.