

## U2OS 골육종 세포주의 세포자멸사에서 MMP억제제와 Doxorubicin 작용의 비교연구

인제대학교 의과대학 서울백병원 정형외과학교실, 고려대학교 의과대학 병리학교실\*

문정석 · 염범우\*

**목적:** wild-type p53 단백질을 가지고 있는 U2OS 인간 골육종 세포주의 세포자멸사에서 MMP억제제와 doxorubicin의 작용을 비교하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 배양한 U2OS 세포주에 Doxorubicin, MMP억제제(MMPI III)를 따로 투여한 것과 두 약물을 동시에 투여한 것을 비교하였다. 또한 Doxorubicin의 작용이 Fas/FasL 경로를 통해 유발되는지 알아보기 위해 Fas 중화항체를 doxorubicin과 함께 투여하였다. 약물을 처리하여 배양한 세포에서 발생한 세포자멸사와 세포괴사를 확인하기 위해서 유세포 검사를 시행하였다.

**결과:** Doxorubicin을 처리한 세포가 처리하지 않은 세포보다 약물 농도에서 더 많은 세포괴사(p=0.000)를 보였다. 이에 반해 MMP III를 처리한 세포는 약물 농도와 반응시간에 따른 세포자멸사 및 세포괴사에서 차이를 보이지 않았다. 두 약물을 동시에 투여한 군은 그렇지 않은 군에 비해 세포자멸사 및 세포괴사에서 차이가 없었다. Doxorubicin에 Fas 중화항체를 추가한 군과 doxorubicin 단독 투여 군 사이에 세포자멸사 및 세포괴사에서 차이가 없었다.

**결론:** Doxorubicin과 같이 MMP 억제제를 골육종 치료에 사용하려면 wild-type p53 뿐만 아니라 wild-type p14를 가지고 있는 골육종 세포에 대한 검사가 필요할 것으로 사료된다.

**색인 단어:** MMP 억제제, Doxorubicin, Fas/FasL 경로, 골육종 세포주

### 서론

골육종은 광범위한 절제와 수술 전 및 수술 후 항암요법에도 불구하고 30~40%에서 재발하는 악성 종양으로 이미 전이가 있거나 술전 항암치료에 반응이 나쁜 경우에는 예후가 좋지 않다<sup>16,35</sup>. 정립된 치료방법 중의 하나가 세포자멸사를 유도하는 것인데

그 중 가장 잘 알려진 연구 분야가 Fas/Fas ligand (FasL) 체계이다<sup>21,23</sup>. 최근 들어 Fas/FasL 체계에 관여하는 약물로서 matrix metalloproteinase (MMP)억제제에 대한 관심이 높아지고 있다. MMP 억제제는 종양의 전이에 관여하는 MMP 작용을 억제할 목적으로 1980년대 초에 batimastat가 개발되었으나 생체 적합성이 떨어져 사용되지 못

\*통신저자: 문 정 석

서울특별시 중구 저동 2가 85번지

인제의대 서울백병원 정형외과학교실

Tel: 02) 2270-0028, Fax: 02) 2270-0032, E-mail: moonbak502@hanmail.net

하였고 그 후 경구용 약제로 marimastat가 개발되어 임상실험 단계에 있다<sup>24,31)</sup>.

Matrix metalloproteinase (MMP)는 세포외 기질을 분해하는 단백효소로서, 인체에서 알려진 MMP 유전자는 23가지이다. 종양 세포에서 분비되는 MMP는 기질 분해와 혈관생성을 통해 종양의 전이에 관여한다<sup>2,3,15,24)</sup>. 기존에 알려진 이런 기능과 함께 FasL에 대한 작용도 밝혀지고 있는데 이 중 MMP-7은 FasL, TNF- $\alpha$ , E-cadherin 같은 세포 표면 단백질의 분할에 관여한다<sup>19,34)</sup>. Ewing's sarcoma에 대한 최근 연구에 의하면 MMP-7에 의해 FasL가 분할된 후 Fas 매개 세포자멸사가 감소했다고 한다<sup>19)</sup>.

Fas ligand (FasL)는 TNF수용체의 일종인 세포막 단백질로 Fas와 결합하여 세포 자멸사를 유도한다. 이것은 림프구, 비장세포, 탐식세포, 망막세포, 신경원 등에 존재하고 림프종, 흑색종, 성상모세포종 등 악성종양 세포에서도 발현된다<sup>26,32)</sup>. 이것은 transmembrane (tm) 형태로 존재하다가 종양 세포에서 분비된 MMP에 의해 분할되면 extracellular domain인 soluble form으로 변화된다<sup>27,33)</sup>. soluble FasL (s-FasL)도 Fas와 결합할 수 있으나 세포 내에서 빠르게 해체되어 세포자멸사를 유도하지 못한다. 결과적으로 세포막에 남아있는 Fas 숫자의 감소로 인해 Fas 매개 세포자멸사가 감소하게 된다<sup>17)</sup>. 한편 Fas 역시 TNF 수용체의 일종인 세포막 단백질로 B&T 림프구, 간세포, 심근세포 등에 존재한다. 이것이 Fas ligand와 결합하면 intracellular domain에 Fas-Associated protein with a Death Domain (FADD)과 caspase-8이 모여들어 death-inducing signaling complex (DISC)를 형성하게 된다<sup>1,14)</sup>. 이 DISC가 일련의 caspase를 활성화시켜 세포자멸사를 유발하는 것이다<sup>8)</sup>. 식도암, 폐암, 림프종 등 여러 종류의 악성종양 세포에서는 Fas가 표현되어 있으나 정상 세포에서보다 그 양이 적어 Fas 매개 세포자멸사에 대한 감수성이 떨어져 있다<sup>9,28,29)</sup>. Fas의 감소는 Fas 단백질 발현의 저하(down-regulation), Fas 유전자의 변이(mutations)나 결실(deletion), soluble decoy receptor의 생산<sup>25)</sup> 등에 의해 발생한다.

Fas/FasL 체계에 있어서 광범위 MMP억제제의 작용은 MMP로 인해 발생하는 s-FasL의 생성을 억

제하고 반대로 tm-FasL의 세포표면 축적을 증가시킨다. 결과적으로 Fas 매개 세포자멸사가 증가하게 된다<sup>18)</sup>. 대표적으로 Ewing's sarcoma에서 광범위 MMP 억제제가 tm-FasL 발현을 증가시켜 세포자멸사가 증가했다는 보고가 있었다<sup>18)</sup>. 그러나 이는 p53 발현에 의해 좌우되는데 p53 발현이 없는 경우에는 Fas/FasL 체계도 발현되지 않기 때문이다<sup>20)</sup>. 골육종에서 MMP억제제에 의한 세포 자멸사 유도가 빈번히 실패하였는데 이것은 대다수의 골육종 세포주에서 p53 발현이 비정상적이었기 때문이다<sup>22)</sup>. 그러나 wild-type p53 단백질을 갖는 골육종 세포주를 대상으로 실험한 보고는 거의 알려져 있지 않다. 따라서 저자는 wild-type p53 단백질을 가지고 있는 인간 골육종 세포주에서 MMP 억제제가 세포자멸사를 유도하는지 확인하고자 본 실험을 하게 되었다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 세포주 및 배양

Wild-type p53을 갖는 U2OS 골육종 세포주를 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 구입한 세포주를 37도, 5% CO<sub>2</sub> 대기 상태로 90% RPMI-1640(ATCC, Rockville, MD, USA), 10% heat inactivated fetal bovine serum (GIBCO, N.Y, USA), antibiotic-antimycotic drug(GIBCO, N.Y, USA)을 섞은 배지에서 배양하였다. 세포들은 flask에 붙어 있는 상태로 logarithmic phase를 유지하였고 trypsin/EDTA 용액을 처리하여 분리한 후 실험을 하기위해 새로운 배지에 재배양 하였다.

### 2. 약물 및 시약

MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-13에 대한 억제작용이 있는 MMP inhibitor III(이하 MMPI III)는 Calbiochem (A Brand of EMD Bioscience, Inc. San Diego, USA)으로부터 구입하였고, Fas 중화항체 ZB4는 Fas 작용을 억제하는 mouse monoclonal antibody로서 Abcam (Cambridge Science Park, Cambridge, UK)에서 구입하였다. Doxorubicin(50 mg)은 항

암제로서 PCH Pharmacheme 제품을 사용하였다.

### 3. 약물을 처리한 U2OS 세포주에서 세포 자멸사와 세포 괴사에 대한 검사

U2OS 세포주에 대한 약물처리는 네 가지 형태로 시행하였다. 첫 번째 군은 세포자멸사 및 세포괴사에 대한 작용을 비교하기 위해 골육종 항암제로 알려진 doxorubicin을 투여하였다. 두 번째 군은 MMPI III를 투여하였다. 세 번째 군은 두 약물의 상호작용을 알아보기 위해 doxorubicin과 MMPI III를 동시에 투여하였다. 네 번째 군은 발생한 세포자멸사가 Fas/FasL 경로를 통해 유발되는지 알아보기 위해 doxorubicin에 Fas 중화항체를 투여하였다. 세포자멸사가 유발된 각각의 내용을 보면 아래와 같다.

#### 1) Doxorubicin에 대한 U2OS 세포의 반응

U2OS 세포에서 doxorubicin 매개 세포자멸사가 발생하는지 알아보기 위해서 doxorubicin을 투여한 후 유세포 검사를 통해 세포자멸사와 세포괴사를 관찰하였다. 투여한 농도와 투여 후 반응시간에 따라 각각의 그룹으로 나누어 알아보았다. 농도는 0ug/ml, 0.1 ug/ml, 0.5 ug/ml, 1.0 ug/ml로 나누었고 시간은 5시간, 24시간, 48시간으로 나누었다.

#### 2) MMPI III에 대한 U2OS 세포의 반응

MMPI III가 U2OS 세포에서 세포자멸사와 세포괴사를 일으키는지 유세포 검사를 통해 알아보았다. 역시 투여한 농도와 투여 후 반응시간을 달리하였다. 농도는 0uM, 20 uM, 40 uM, 80 uM로 나누었고 이들을 각각 5시간, 24시간, 48시간동안 반응시켰다.

#### 3) Doxorubicin과 MMPI III의 상관관계

U2OS 세포에서 doxorubicin과 MMPI III를 동시에 투여하였을 때 세포자멸사에 대한 상승작용이 있는지 알아보았다. MMPI III를 0 uM, 20 uM, 40 uM, 80 uM로 투여할 때 doxorubicin 0.5 ug/ml를 추가로 투여하였고 5시간, 24시간, 48시간동안 반응시켰다. 이들에 대해 유세포 검사를 시행하였다.

#### 4) Doxorubicin과 Fas/FasL 체계의 관계

U2OS 세포에서 doxorubicin에 의한 세포자멸사가 Fas/FasL 체계에 의한 것인지 알아보기 위해 Fas 중화항체를 투여하였다. Doxorubicin을 0ug/ml, 0.1 ug/ml, 0.5 ug/ml, 1.0 ug/ml로 처리할 때 Fas 중화항체 ZB4를 5.0 ug/ml의 농도로 처리하였다. 5시간동안 반응시킨 후 유세포 검사를 시행하였다.

#### 4. 유세포 검사(Flow cytometry)

약물을 처리하여 배양한 세포에서 발생한 세포자멸사와 세포괴사를 확인하기 위해서 유세포 검사를 시행하였다. 세포들을 trypsin으로 처리하고 cold PBS로 두 차례 세척하였다. 그 후 세포를 1xbinding buffer에  $1 \times 10^6$  cells/ml 농도로 담아 두었다.  $1 \times 10^5$  cells에 해당하는 100 ul 용액을 5 ml 배양시험관에 옮겨 담았다. 여기에 세포자멸사를 판별해 내기 위한 5 ul Annexin V-FITC (PharMingen Co., San Diego, CA)와 세포괴사를 판별해 내기 위한 5ul PI (PharMingen Co., San Diego, CA)를 첨가하였다. 시약을 첨가한 세포주를 vortex로 골고루 섞어주었고 암실에서 25도로 15분간 반응시켰다. 여기에 1xbinding buffer 400 ul를 첨가한 후 1시간 이내에 유세포 검사를 시행하였다. 검사는 FASC Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)기기를 이용하였다.

#### 5. 통계학적 검사

위와 같은 실험을 두 차례 시행한 후 평균값을 얻었고 SPSS 10.0통계 프로그램을 이용해 2-way ANOVA분산분석을 시행하였다. 유의수준은 p값 0.05 이하로 하였다.

## 결 과

#### 1. Doxorubicin에 대한 U2OS 세포의 반응

유세포 검사상 doxorubicin을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포간에 세포 자멸사에서 통계적인 차

이는 없었다. 반응 시간별로 보면 반응시간이 긴 경우에 더 많은 세포자멸사를 보였으나 통계학적 유의성은 없었다( $p=0.170$ ). 약물 농도에서는 0.1 ug/ml 보다 0.5 ug/ml 또는 1.0 ug/ml에서 더 많은 세포자멸사를 보였으나 통계학적 유의성은 없었다( $p=0.221$ ). 세포괴사를 살펴본 결과 세포자멸사의 경우와 달리 약물 농도에서는 높은 농도에서 더 많은 세포 괴사를 보였다( $p=0.000$ ). 그러나 반응 시간에서는 큰 차이를 보이지 않았다( $p=0.991$ ). 오히려 1 ug/ml에서는 반응시간이 길수록 세포 괴사가 약간 감소하였다. 이로써 doxorubicin이 세포괴사를 유도한다는 것을 확인하였으며 반응 시간보다는 약물 농도와 더 밀접한 관련이 있었다(Fig. 1).

## 2. U2OS 세포의 MMPI III에 대한 반응

유세포 검사상 MMPI III를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 비교한 결과 반응 시간과 약물 농도에 따른 세포자멸사의 차이는 없었다( $p=0.112$ ,  $p=0.960$ ). 48시간동안 반응시킨 후 확인한 세포자

멸사는 대조군보다 오히려 감소하였다. 세포괴사에서는 반응 시간이 길수록 감소하는 경향을 보였고( $p=0.050$ ) 농도에 따른 의미있는 차이는 관찰되지 않았다( $p=0.595$ )(Fig. 2).

## 3. Doxorubicin과 MMPI III의 상관 관계

U2OS 세포에서 doxorubicin과 MMPI III를 동시에 투여하여 유세포 검사를 시행한 결과 doxorubicin을 단독으로 투여한 것과 두 약물을 동시에 투여한 것 사이에 세포 자멸사와 세포괴사에서 통계학적으로 유의한 차이가 없었다( $p=0.614$ ,  $p=0.879$ )(Fig. 3).

## 4. Doxorubicin과 Fas/FasL 체계의 관계

U2OS 세포에서 doxorubicin에 의한 세포자멸사가 Fas/FasL 체계를 통해 이루어진 것인지 알아보기 위해 Fas중화항체를 투여한 것과 doxorubicin을 단독 투여한 것 사이에 세포자멸사와 세포괴사에서 통계학적으로 유의한 차이가 없었다( $p=0.583$ ,

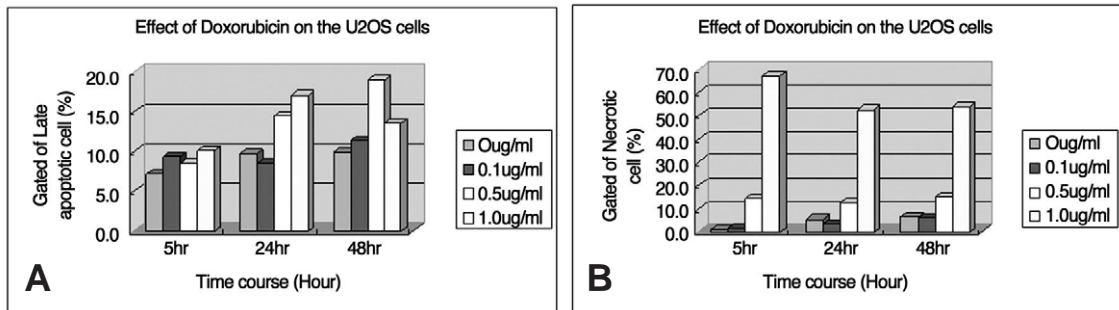


Fig. 1. The results of late apoptosis (A) and cell death (B) after treatment of doxorubicin into U2OS cells.

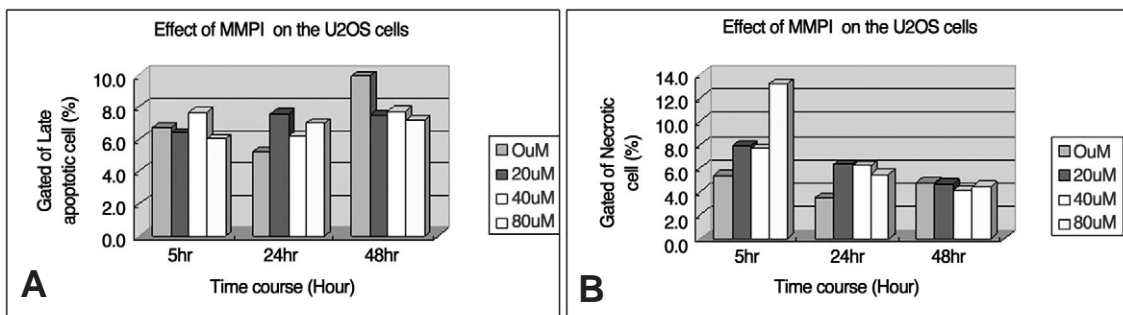
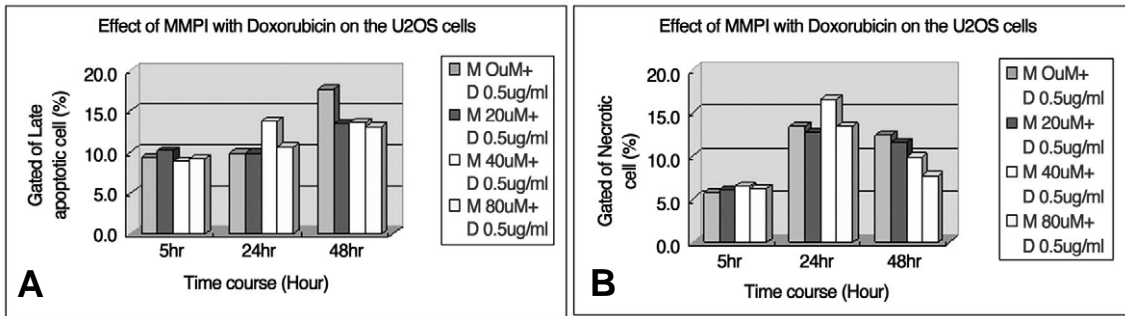
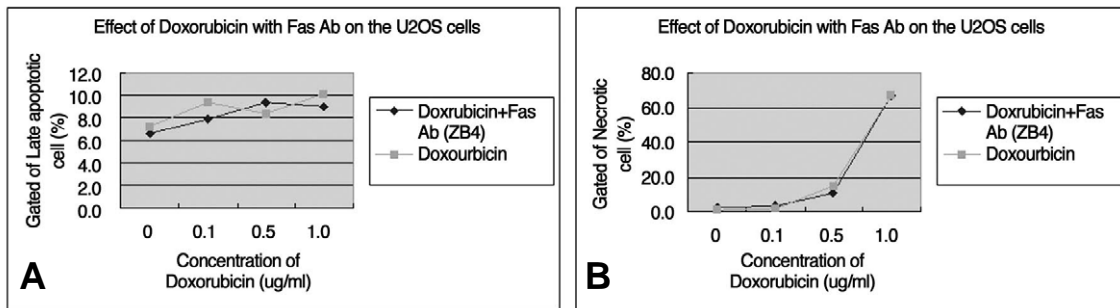


Fig. 2. The results of late apoptosis (A) and cell death (B) after treatment of MMPI III into U2OS cells.



**Fig. 3.** The results of late apoptosis (A) and cell death (B) after simultaneous treatment of doxorubicin and MMPI III into U2OS cells.



**Fig. 4.** The results of late apoptosis (A) and cell death (B) after treatment of doxorubicin alone and doxorubicin with Fas-neutralizing antibody (ZB4) into U2OS cells.

p=0.987)(Fig. 4).

### 고 찰

세포자멸사 기전에 Fas, TNF R1, DR3 등 자멸사 수용체 (death receptor)를 통한 외부경로 (extrinsic pathway)와 미토콘드리아(mitochondria)로부터 cytochrome C를 분비하여 세포자멸사를 야기하는 내부경로 (intrinsic pathway)가 있다<sup>8,30)</sup>. 이 중 외부경로는 wild-type p53 단백질을 가지고 있는 경우에 발현된다. 골육종 세포는 다양한 subclone을 갖고 있고 다양한 항암제 내성을 가지고 있다.

Wild-type p53을 갖는 U2OS세포주는 인간 골육종 세포주로서 mutant p53이나 null p53을 갖는 대부분의 골육종 세포주와는 달리 Fas/FasL 체계를 통해 세포자멸사가 이루어진다<sup>13)</sup>. 이는 Fas/FasL 체계에 작용하는 약물을 항암제로 이용

할 수 있음을 의미한다<sup>23)</sup>. 현재 항암제로 이용되고 있는 doxorubicin은 골육종에서 세포자멸사 및 세포괴사를 유발한다고 알려져 있다.

본 연구에서 doxorubicin을 U2OS세포에 처리한 결과 농도와 반응시간에 비례하여 세포괴사가 유발되는 것을 확인할 수 있었고 세포자멸사도 증가하는 경향을 보였다. 특히 1.0 ug/ml 농도에서의 세포괴사는 최고 67.1%로 매우 높았다. 저자는 doxorubicin이 세포자멸사를 일으키는 기전이 Fas/FasL 경로인지 알아보기 위해 여기에 Fas 중화항체를 투여해 보았다. Fas 중화항체는 Fas의 작용을 억제하는 물질로 doxorubicin이 Fas/FasL 체계를 통해 작용한다면 그 작용이 억제될 것이다. 그러나 실험 결과 doxorubicin에 의한 세포자멸사가 억제되지 않았다. 이는 doxorubicin이 Fas-FasL 경로와 다른 경로<sup>7)</sup>를 통해 세포 자멸사를 유발하고 있음을 시사한다.

한편, 종양 세포 표면에 FasL를 축적시킴으로써

세포자멸사를 유발한다고 알려진 MMPI III를 U2OS세포주에 투여하였다. 그러나 실험결과 세포자멸사는 유발되지 않았다. 그리고 doxorubicin과 MMPI III의 상호작용을 확인하기 위해 두 약물을 동시에 투여하였으나 doxorubicin에 대한 MMPI III의 영향은 없었다.

이로써 U2OS 세포주에서 FasL에 영향을 주는 MMPI III는 세포자멸사를 유도하지 못했고, doxorubicin은 Fas/FasL 경로와 다른 경로를 통해 세포자멸사를 일으킨다는 것을 확인하였다. doxorubicin의 작용에 대해서 Fellenberg 등<sup>5,6)</sup>은 Fas/FasL 체계가 활성화되지 않은 null 또는 mutant p53을 갖는 골육종 세포주에서 doxorubicin이 세포자멸사를 유도했다고 보고하였다. 그는 세포자멸사 과정에서 미토콘드리아의 세포막 투과도가 증가함을 확인하여 세포자멸사가 내부경로를 통해 유발되는 것으로 생각하였다. 저자는 wild-type p53을 갖는 U2OS 세포주에서 MMP억제제 처리시 세포자멸사가 발현되지 않는 경우가 있는지 논문검색을 하였다. Kim 등<sup>13)</sup>은 U2OS 세포가 wild-type p53과 mutant p14<sup>ARF</sup>를 갖는다고 하였다. 정상 세포에서 p53/mdm2/p14<sup>ARF</sup> 연결고리를 보면 mdm2가 p53과 결합하여 p53발현을 억제한다. 또한 p53은 p14 promoter를 억제한다. 그러나 종양 유전자에 의해 p14가 발현되고 이것이 mdm2와 결합함으로써 mdm2의 작용을 억제하고 mdm2로부터 분리된 p53을 활성화시킨다<sup>4,10,11,36)</sup>. 그러나 p14가 mutant type인 경우에는 mdm2와 결합하지 못하기 때문에 p53이 억제되게 된다. Kim 등<sup>13)</sup>은 mutant p14를 갖는 U2OS 세포에 대해서 p14<sup>ARF</sup>cDNA가 포함된 adenovirus를 감염시킨 결과 80% 이상에서 세포괴사가 일어난 반면 p14<sup>ARF</sup>cDNA가 없는 adenovirus를 감염시킨 경우에는 10% 이하의 세포괴사가 발생하였다고 한다. 또한 p14<sup>ARF</sup>cDNA를 새롭게 얻은 세포에서는 Fas와 FasL의 단백질양이 증가되었다고 하였다. 이를 바탕으로 wild-type p53의 발현과 Fas/FasL 체계의 활성화를 위해서는 wild-type p14가 필요하다는 것을 알 수 있다<sup>4,13)</sup>. 따라서 저자는 mutant p14를 갖는 U2OS 세포에서 wild-type p53이 있다 하더라도 mdm2에 의해 그 작용이 억제되어 있으며 MMP억제제를 통한 Fas 매개 세포자멸사도 유발될

수 없다고 생각한다.

## 결 론

Doxorubicin과 같이 MMP 억제제를 골육종 치료에 사용하려면 wild-type p53 뿐만 아니라 wild-type p14를 가지고 있는 골육종 세포에 대한 검사가 필요할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- 1) **Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK and Peter ME:** Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol*, 22(1):207-220, 2002.
- 2) **Bjornland K, Flatmark K, Pettersen S, Aaasen AO, Fodstad O and Maelandsmo GM:** Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J Surg Res*, 127(2):151-156, 2005.
- 3) **Chambers AF and Matrisian LM:** Changing views of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89(17):1260-1270, 1997.
- 4) **El-Deiry WS:** Insights into cancer therapeutic design based on p53 and TRAIL receptor signaling. *Cell Death Differ*, 8(11):1066-1075, 2001.
- 5) **Fellenberg J, Mau H, Nedel S, Ewerbeck V and Debatin KM:** Drug-induced apoptosis in osteosarcoma cell lines is mediated by caspase activation independent of CD95-receptor/ligand interaction. *J Orthop Res*, 18(1):10-17, 2000.
- 6) **Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V and Debatin KM:** Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. *Int J Cancer*, 72(3):536-542, 1997.
- 7) **Garmen S, Anel A and Lasierra P, et al:** Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett*, 417(3):360-364, 1997.
- 8) **Ghobrial IM, Witzig TE and Adjei AA:** Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 55(3):178-194, 2005.
- 9) **Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P and Ohgaki H:** Up-regulation of Fas(APO-1/CD95) ligand and down-regulation of

- Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res*, 58(10):2057-2062, 1998.
- 10) **Harris SL and Levine AJ**: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17):2899-2908, 2005.
  - 11) **Huang Y, Tyler T, Saadatmandi N, Lee C, Borgstrom P and Gjerset RA**: Enhanced tumor suppression by a p14ARF/p53 bicistronic adenovirus through increased p53 protein translation and stability. *Cancer Res*, 63(13):3646-3653, 2003.
  - 12) **Kayagaki N, Kawasaki A and Ebata T, et al**: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, 182(6):1777-83, 1995.
  - 13) **Kim M, Sgagias M and Deng X, et al**: Apoptosis induced by adenovirus-mediated p14ARF expression in U2OS osteosarcoma cells is associated with increased Fas expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(1):138-144, 2004.
  - 14) **Kischkel FC, Hellbardt S and Behrmann I, et al**: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14(22):5579-5588, 1995.
  - 15) **Kohn EC and Liotta LA**: Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res*, 55(9):1856-1862, 1995.
  - 16) **Lafleur EA, Koshkina NV and Stewart J, et al**: Increased Fas expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Clin Cancer Res*, 10(23):8114-8119, 2004.
  - 17) **Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Leone A and Tsokos M**: Fas ligand is present in tumors of the Ewing's sarcoma family and is cleaved into a soluble form by a metalloproteinase. *Am J Pathol*, 153(6):1947-1956, 1998.
  - 18) **Mitsiades N, Poulaki V, Leone A and Tsokos M**: Fas-mediated apoptosis in Ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 91(19):1678-1684, 1999.
  - 19) **Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M and Stamenkovic I**: Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res*, 61(2):577-581, 2001.
  - 20) **Muller M, Wilder S and Bannasch D, et al**: p53 activates the CD95(APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, 188(11):2033-2045, 1998.
  - 21) **Nagarajan R, Clohisy D and Weigel B**: New paradigms for therapy for osteosarcoma. *Curr Oncol Rep*, 7(6):410-4, 2005.
  - 22) **Nyormoi O, Mills L and Bar-Eli M**: An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death Differ*, 10(5):558-569, 2003.
  - 23) **Ozeki N, Mogi M, Nakamura H and Togari A**: Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol*, 47(7):511-517, 2002.
  - 24) **Parsons SL, Watson SA, and Steele RJC**: Phase I/II trial of batimastat, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with malignant ascites. *Eur J Surg Oncol*, 23(6):526-531, 1997.
  - 25) **Pitti RM, Marsters Sa and Lawrence DA, et al**: Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, 396(6712):699-703, 1998.
  - 26) **Poulaki V, Mitsiades CS and Mitsiades N**: The role of Fas and FasL as mediators of anticancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*, 4(4):233-242, 2001.
  - 27) **Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M and Matrisian LM**: The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol*, 9(24):1441-1447, 1999.
  - 28) **Reichmann E**: The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol*, 12(4):309-315, 2002.
  - 29) **Schneider P, Holler N and Bodmer JL, et al**: Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*, 187(8):1205-1213, 1998.
  - 30) **Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S and Peter ME**: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254(3):439-459, 1998.
  - 31) **Steward WP**: Marimastat (BB2516): current status of development. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43 Suppl:S56-60, 1999.
  - 32) **Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S**: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75(6):1169-1178, 1993.
  - 33) **Tanaka M, Itai T, Adachi M and Nagata S**: Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat*

- Med*, 4(1):31-36, 1998.
- 34) **Visse R and Nagase H:** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92(8):827-839, 2003.
- 35) **Wang LL:** Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J*, 11(4):294-305, 2005.
- 36) **Zhang Y, Xiong Y and Yarbrough WG:** ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92(6):725-734, 1998.

## Abstract

### A Comparison Study of MMP Inhibitors' and Doxorubicin's Effects on the Apoptosis of U2OS Osteosarcoma Cell Line

Jeong-Seok Moon, M.D., Bum-Woo Yeom, M.D.\*

*Department of Orthopedic Surgery, Seoul Paik Hospital, Inje University and  
Department of Pathology, Korea University\**

**Purpose:** The purpose of this study was to compare the proapoptotic effects of matrix metalloproteinase inhibitor (MMPI) and doxorubicin on wild-type p53 osteosarcoma cell line, so-called U2OS cell line.

**Materials and Methods:** U2OS cells were treated with MMP inhibitor III (MMPI III) and doxorubicin, either respectively or simultaneously. In cells treated with doxorubicin, Fas-neutralizing antibody so called ZB4 was additionally treated to examine whether the doxorubicin played a role through the Fas/FasL pathway. Cells were analysed regarding to apoptosis and cell death by flow cytometry.

**Results:** U2OS cells incubated with doxorubicin showed significant amount of cell death in dose-dependent manner. However, those incubated with MMPI III mostly remained viable state. In addition, there is no relationship between two drugs. Cells treated with doxorubicin and ZB4 at the same time did not show down regulation of apoptosis through inhibition of Fas/FasL pathway.

**Conclusion:** It is important to re-examine MMP inhibitor's effect on other osteosarcoma cell line with wild-type p14 as well as wild-type p53 to evaluate its proapoptotic effect.

**Key Words:** MMP inhibitor, Doxorubicin, Fas/FasL pathway, Osteosarcoma cell line

#### Address reprint requests to

Jeong-Seok Moon, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Paik Hospital, School of  
Medicine, Inje University, 85, Jeo-dong 2-ga, Jung-ku, Seoul Korea 100-032

TEL: 82-2-2270-0028, FAX: 82-2-2270-0032, E-mail: moonbak502@hanmail.net