

U-251-MG 세포에서 PSA 경로에 작용하는 Hepatocyte Growth Factor의 효과

김환규*

전북대학교 생물과학부, 생리활성물질연구소

Effects of Hepatocyte Growth Factor on the PSA Signaling Pathway of U-251-MG Cells

Hwan Gyu Kim*

Division of Biological Sciences, Research Center of Bioactive Materials, Chonbuk National University,
Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

Abstract Hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor play an important role in the formation and progression of glioma. In this study, I investigated the ability of HGF to recover of the PSA siRNA-suppressed cell proliferation, migration and invasion in U-251-MG cells. PSA siRNA-transfected U-251-MG cells showed the reduction of the proliferation, migration and invasion with compared to control. Treatment of HGF on the PSA siRNA-transfected U-251-MG cells recovered the ability of proliferation, migration and invasion. These data suggest that PSA and HGF may use unique and parallel signaling cascade leading to the proliferative, migrative and invasive phenotype of U-251-MG cells. I also showed that PSA cooperated with HGF to a migrative and invasive phenotype via the increased secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9.

Keywords: PSA, HGF, MMP, plasmin

서 론

Hepatocyte growth factor (HGF)는 배 발생, 상처치유, 재생, 혈구생성과정과 조직 항상성 유지 등에 중요하게 작용한다 [1-3]. HGF 신호전달 과정은 종양의 침윤 및 전이능력을 증가시킴으로써 종양의 발생 및 악성 전이에 결정적인 역할을 한다 [4]. HGF는 주로 종양세포에서 발현, 분비되며 종양세포 및 혈관내피세포에서 발현되는 c-Met 수용체에 작용한다. c-Met의 활성화에 의해 종양세포에서 뿐만 아니라 종양 혈관내피세포에서 세포의 증식, 이동 및 침윤을 유도하며 예정사멸을 억제한다. 또한 종양 내피세포의 c-Met 활성화는 *in vivo*에서 세포외기질의 분해, 관 형성 및 혈관신생을 유도한다 [5]. 최근 들어, HGF/c-Met 신호전달 경로는 혈관신생, 종양성장, 침윤 및 전이를 억제하는 방식을

통해 암을 정복하는 주요 표적으로 인식되고 있다 [6].

혈관신생이란 기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정으로 대부분의 종양에서 성장과 악성 전이를 동반하며 종양성장에 필수적이다. 혈관신생은 주변세포 및 세포외기질을 분해하여 증식 및 운동성 있는 세포가 이동할 통로를 형성하는 복잡한 과정이다 [4]. 세포외기질의 분해뿐만 아니라 혈관내피세포의 증식, 이동, 생존 및 관 형성은 혈관신생의 필수적인 기작이다. 많은 연구 결과, HGF가 세포외기질의 분해 및 내피세포의 침윤을 촉진한다고 알려져 있다. 이 효과는 혈관내피세포에서 HGF에 의해 유도된 MMPs와 urokinase의 발현에 의해 조절된다 [7-9]. HGF는 관상동맥 유래 내피세포에서 membrane type 1-MMP (MT1-MMP)의 합성을 증가시키고, MMP-2를 활성화시킨다. 또한 HGF는 MMP-의존 형태로 세포외기질로의 내피세포의 이동 및 침윤을 촉진시킨다 [10-13].

이전의 연구에서 Lee와 Kim (2009)은 PC-3 세포에서 cobalt chloride 처리에 의해 puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)가 down-regulation되며, MMP-9의 조절을 통해 PSA

*Corresponding author

Tel: +82-63-270-3352, Fax: +82-63-270-3362
e-mail: hgkim@jbnu.ac.kr

가 세포의 증식, 이동 및 침윤에 관여한다는 사실을 밝혔다 [14]. 이를 바탕으로 본 연구에서는 인간의 악성신경교종 세포주로서 강력한 성장, 이동 및 침윤 특성을 갖고 있는 U-251-MG 세포를 사용하여 PSA siRNA 처리에 의한 세포의 증식, 이동 및 침윤에 미치는 효과를 확인하고, 또한 혈관신생 유도인자로 알려진 HGF와의 상호작용 효과를 확인하였다. 본 연구 결과, PSA는 U-251-MG 세포의 증식, 이동, 침윤 및 단백질분해효소 발현 및 분비에 관련되어 있으며, PSA siRNA-transfected 세포에 HGF를 처리한 결과 내재적 PSA 억제에 의한 세포의 증식, 이동 및 침윤 억제 등이 효과적으로 극복되었다. 이러한 결과는 PSA와 HGF가 평행한 신호전달 경로를 통하여 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 상호작용하여 상승작용을 일으킨다고 여겨진다.

재료 및 방법

시약

재조합 hHGF, MMP-2와 MMP-9 enzyme immunoassay kits는 R & D System (Minneapolis, MN, USA)으로부터 구입하였다. MMP-2, MMP-9 및 β -액틴 항체와 MMPs 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA, USA)과 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)으로부터 구입하였다. BB-94는 British Biotechnology (Oxford, UK)로부터 구입하였고 배지와 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였으며, 그외 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 사로부터 구입하여 사용하였다.

세포 배양 및 Small Interfering RNAs (siRNA)에 의한 PSA 발현의 억제

U-251-MG 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하여 10% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 5%의 CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다. siRNA transfection을 위해 U-251-MG 세포 (5×10^5)를 멸균 PBS로 세척한 다음 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 그 후 인간의 PSA 유전자를 표적으로 하여 제작된 세 종류의 서로 다른 siRNA oligonucleotide (Bioneer, Seoul, Korea)로 U-251-MG 세포를 transfection시켰다. 본 연구에 사용한 siRNA oligonucleotides는 다음과 같다; 5'-GCUCGAGCUG GAAUCAUATT-3', 5'-TTUAUAGAUUCCAGCUCGAGC-3'; 5'-GCUGCUUGGAAAUCAUAATT-3', 5'-TTUUAU GAAUUUCCAAGCAGC-3'; 5'-GCUAUCAGUUGAGGG AUUUTT-3', 5'-TTAAAUCCCCUACUGAUAGC-3'. 또한 negative control로서 scramble RNA (Scr siRNA)를 다음과 같이 제작하였다; 5'-CCUACGCCACCAUUUCGUTT-3', 5'-TTACGAAAUGGUGGCGUAGG-3'. Transfection은 Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조회사의 지시에 따라 행하였으며, PSA의 농다운은 transfection시킨 후 72시간 뒤에 Western blotting을 행하여 확인하였다.

세포 증식 효과 조사

대조구 U-251-MG 세포와 PSA siRNA-transfected 세포를 well 당 1×10^4 세포 밀도로 96-well culture plate에 접종하였다. 이후 1~3일 동안 세포를 배양한 다음 CellTiter 96® aqueous 세포증식 assay kits (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 Emax® microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 세포 증식 효과를 확인하였다.

세포의 이동 및 침윤 효과 조사

세포의 이동은 U-251-MG 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 well 당 1×10^5 세포 밀도로 챔버의 위쪽 칸에 접종한 다음, QCM™ 24-well colorimetric 세포이동 assay kits (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 침윤 효과를 조사하기 위해서 8- μm 공극을 갖는 여과막이 부착된 Matrigel-coated 챔버 (Beckton Dickinson, Bedford, MA, USA)의 상단에 1×10^5 세포를 접종하였다. 이후 여과막을 건조, 염색한 다음 200 μL 의 추출 완충 용액이 포함된 well로 옮긴 다음, Emax® microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MMP-2 및 MMP-9에 대한 Enzyme Immunoassay

U-251-MG 세포를 24-well plate에 세포 밀도가 5×10^4 이 되도록 접종한 다음, 10% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 confluent한 U-251-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조완충용액 혹은 HGF를 지정된 시간만큼 처리하였다. 분비된 MMP-2 및 MMP-9의 실제양은 제조회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay kits로 측정하였다.

Zymography

MMPs 및 플라스민의 기질 분해 활성을 젤라틴 및 피브린 zymography를 행하여 확인하였다 [15]. U-251-MG 세포를 24-well plate에 세포 밀도가 5×10^4 이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 confluent한 U-251-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조 완충용액 혹은 HGF를 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라틴 zymography는 MMPs의 기질인 젤라틴을 SDS-

PAGE의 running gel에 첨가한 후 환원 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 CaCl₂와 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다 (37°C). 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색 시킨 다음, 10% acetic acid, 30% 메탄올 용액에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다. 플라스민 활성을 기질로서 피브린을 첨가하여 피브린 zymography를 행하였다.

Western Hybridization

단백질분해효소 억제제 (10 µg/mL trypsin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 200 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF)가 포함된 용해 완충용액 (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA)으로 세포를 용해시킨 다음 원심분리 (14,000 g)에 의해 상등액을 얻은 후, BCA protein assay reagents (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 10% SDS-polyacrylamide 젤 상에서 분리한 다음, nitrocellulose 막으로 옮긴 후, 2% skim milk 함유 TBS 완충용액에서 막의 비특이적 부위들을 차단하였다. 완충용액을 제거한 다음 1차 항체와 함께 배양한 후, horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체를 처리한 다음 ECL (Amersham International, Buckingham, England)로 발색시켰다.

통계처리

자료는 평균 ± SD로 나타냈으며, 유의성은 Student-Newman-Keuls test에 의한 one-way ANOVA를 이용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

세포의 증식, 이동 및 침윤에 미치는 PSA 및 HGF의 효과

혈관신생 유도 인자의 자극에 의한 내피세포의 증식 및 이동은 혈관신생의 초기과정에서 중요한 역할을 수행한다. 본 연구에서는 PSA siRNA 처리에 의한 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 미치는 효과 및 HGF의 영향을 조사하였다. 그 결과, PSA siRNA에 의해 세포의 증식이 약 37% 억제되었으나, HGF 처리 (10 ng/mL)에 의해 PSA siRNA에 의해 억제된 세포의 증식이 약 1.4배 증가되어 (3일째) PSA와 HGF가 상승적으로 상호작용할 것으로 여겨진다 (Fig. 1). 한편, 광범위 MMPs 억제제인 BB-94를 처리한 결과 U-251-MG 세포의 증식은 약 19% 억제되었다 (3일째). BB-94를 전처리한 후 HGF를 처리한 결과 U-251-MG 세포의 증식은 약 1.4배 증가되었다 (Fig. 1).

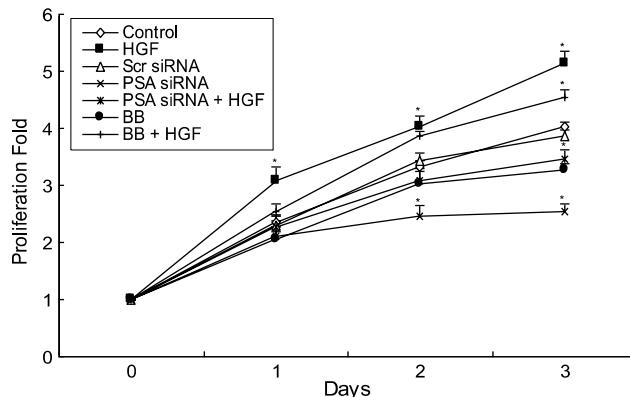


Fig. 1. The effects of PSA siRNA and HGF on the proliferation of U-251-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 h. Next, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF), BB-94 (BB), and BB-94 plus HGF (BB + HGF). Scramble RNAs (Scr siRNA) were used as negative controls. The bars represent the means ± SD of three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by a Students *t* test. * $P < 0.05$ versus control buffer.

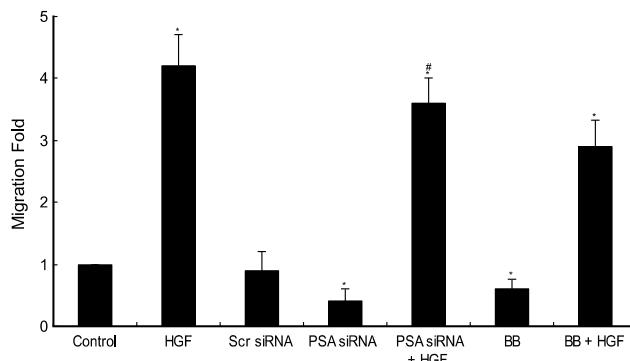


Fig. 2. The effects of PSA siRNA and HGF on the migration of U-251-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 h. Next, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF), BB-94 (BB), and BB-94 plus HGF (BB + HGF). Scramble RNAs (Scr siRNA) were used as negative controls. The bars represent the means ± SD of three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by a Students *t* test. * $P < 0.05$ versus control buffer. # $P < 0.05$ versus PSA siRNA-transfected cells.

이러한 결과는 U-251-MG 세포의 증식에 MMP가 부분적으로 관여한다는 사실을 보여주고 있다. PSA siRNA 처리에 의해 U-251-MG 세포의 이동에 미치는 효과를 확인한 결과, U-251-MG 세포의 이동은 대조군에 비해 약 15% 억제되었으며, HGF를 동시에 처리한 결과 세포의 이동이

약 1.3배 증가되었다 (Fig. 2). U-251-MG 세포에서 PSA siRNA 처리에 의해 세포의 증식과 이동이 유의할만하게 억제되었다는 것은 PSA가 혈관신생 과정에 관여할 것임을 시사하며, 이러한 사실은 혈관내피세포를 이용한 이전의 연구결과에서도 확인되었다 [14]. 또한, 증식 및 이동 억제 효과가 HGF에 의해 극복되었다는 것은 PSA와 HGF가 U-251-MG 세포의 증식 및 이동 과정에 평행한 경로를 통해 상승적으로 상호작용한다는 것을 보여주는 결과이다. PSA siRNA 처리에 의해 세포의 이동이 억제된다는 것은 PSA가 종양세포의 침윤 능력에 영향을 미칠 것이라 생각할 수 있다. 이전의 연구에서 PSA가 세포 침윤 억제제의 표적 분자가 될 수 있을 것이라 결과가 제시된 바 있다 [16,17]. 따라서, PSA siRNA를 이용하여 U-251-MG 세포의 침윤 능력에 미치는 효과를 확인한 결과, PSA siRNA에 의해 세포의 침윤이 약 67% 억제되었다 (Fig. 3). 또한, 이 억제 효과는 HGF (10 ng/mL)에 극복되어 세포의 침윤이 약 4.3배 증가되었다 (Fig. 3). 한편, 광범위 MMPs 억제제인 BB-94를 처리한 결과 U-251-MG 세포의 침윤이 약 46% 억제되었다. 이러한 침윤 억제는 HGF 처리에 의해 회복되어 U-251-MG 세포의 침윤이 약 2.3배 증가되었다. 이상의 결과로 볼 때, PSA는 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 관여하며, 이것은 PSA가 U-251-MG 세포에서 혈관신생에 관여할 것이라 사료된다. 또한 PSA siRNA에 의해 감소된 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤 능력이 HGF (10 ng/mL)에 의해 현저하게 회복되었다는 것은 PSA와 HGF가 혈관신생 과정에서 세포의 증식, 이동 및 침윤에 상승적으로 상호작용한다는 것을 보여주는 결과이다.

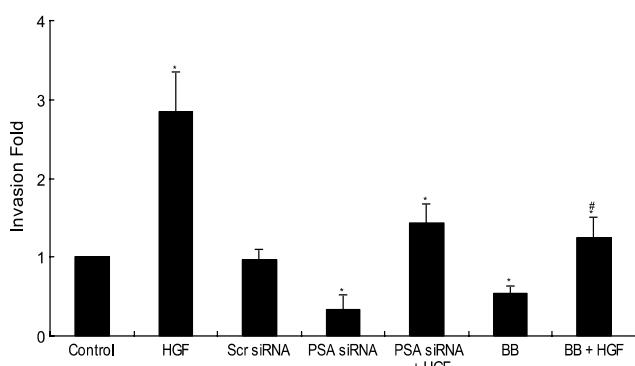


Fig. 3. The effects of PSA siRNA and HGF on the invasion of U-251-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 h. Next, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF), BB-94 (BB), and BB-94 plus HGF (BB + HGF). Scramble RNAs (Scr siRNA) were used as negative controls. The bars represent the means \pm SD of three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by a Students *t* test. **P* < 0.05 versus control buffer. #*P* < 0.05 versus PSA siRNA-transfected cells.

MMP-2와 MMP-9의 분비에 미치는 PSA 및 HGF의 효과

종양 혈관신생 과정에서 세포의 이동에 필수적인 과정은 인접한 세포외기질의 분해이다. 이 과정에 주된 역할을 하는 효소로 세린계 단백질분해효소 및 MMPs가 알려져 있다 [18]. U-251-MG 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 분비에 미치는 PSA의 효과를 확인하고자 PSA siRNA 기법을 이용하였다. 그 결과, PSA siRNA에 의해 MMP-2의 분비는 약 25%, MMP-9의 분비는 약 20% 억제되었다 (Fig. 4). 이것은 PSA가 U-251-MG 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 분비에 관련되어 있다는 것을 보여주는 결과이다. HGF에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 분비에 미치는 효과를 확인한 결과, MMP-2의 분비는 약 4배, MMP-9의 분비는 약 6배 증가되어 U-251-MG 세포에서 HGF가 강력한 단백질분해효소 유도인자라는 것을 알 수 있었다. 한편, PSA siRNA에 의해 억제된 MMP-2 및 MMP-9의 분비에 미치는 HGF (10 ng/mL)의 효과를 확인한 결과, MMP-2는 약 2.8배, MMP-9은 약 3.5배 분비가 증가되었다.

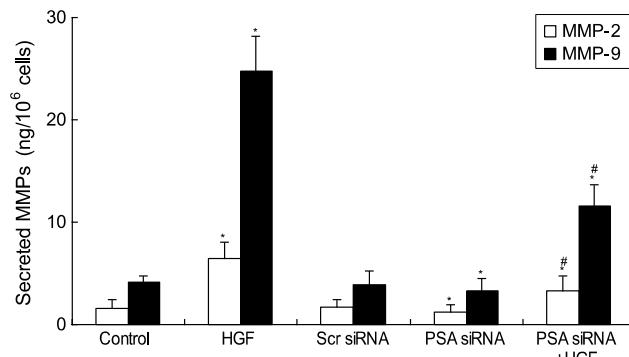


Fig. 4. Effect of PSA siRNA and HGF on the secretion of MMP-2 and MMP-9 in U-251-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 20 h. Then, cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), and PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF), and media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Bars represent the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Students *t* test.

**P* < 0.05 versus control buffer.

#*P* < 0.05 versus PSA siRNA-transfected cells.

Zymographic analysis

세포외기질의 분해에 관련된 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 활성을 측정하기 위해 zymography를 이용하였다. U-251-MG 세포에서 HGF에 의해 MMP-2와 MMP-9은 약 13.5배 및 11.6배의 활성 증가가 관찰되었으나, PSA siRNA에 의한 MMP-2와 MMP-9의 활성에는 유의할만한 변화가

관찰되지 않았다 (Fig. 5(a)). 한편, PSA siRNA-transfected U-251-MG 세포에 HGF를 처리한 결과 MMP-2의 경우 PSA siRNA 처리군에 비해 유의할만한 활성 증가가 나타나지 않았고, MMP-9은 약 2배의 활성 증가가 관찰되었다 (Fig. 5(a)).

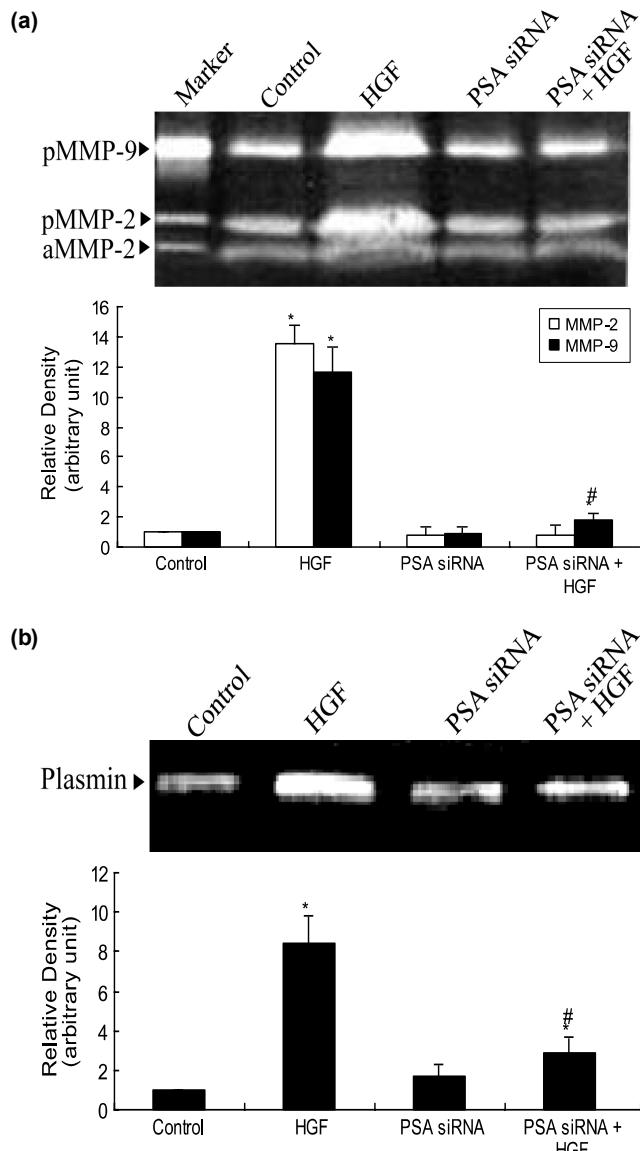


Fig. 5. Zymographies of MMP-2, MMP-9 and plasmin in culture medium of U-251-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), and PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF). Equal amounts of proteins (10 µg/lane) from supernatants were loaded into each lane. Marker represent the standards of MMP-2 and MMP-9. * $P < 0.05$ versus control buffer. # $P < 0.05$ versus PSA siRNA-transfected cells. A representative gelatin zymography (a) and fibrin zymography (b) from three independent experiments is shown.

이것은 HGF가 U-251-MG 세포의 이동에 필수적인 MMP-9의 효과적인 유도인자이며, PSA와 HGF가 MMP-9의 분비에 상승적으로 상호작용하는 신호전달 경로를 갖을 것이라 사료된다. 한편, 혈관신생 유도 인자의 자극에 반응하여 *in vitro*의 피브린 젤 상에서 세포가 이동하기 위해서는 피브린 분해효소의 분비가 필수적이다. 피브린 분해효소의 활성을 조절하는 세포의 능력은 주로 플라스민에 의한다고 알려져 있다. 따라서, 플라스민의 분비 여부를 피브린 zymography를 통하여 확인한 결과, U-251-MG 세포에서 대조군과 비교해 볼 때 HGF 처리 (10 ng/mL)에 의해 플라스민의 분비량이 약 14배 증가되었다. 또한 PSA를 억제한 U-251-MG 세포에 HGF를 처리한 결과, 플라스민의 분비가 약 1.6배 증가하였다 (Fig. 5(b)). 이것은 플라스민의 분비 경로 역시 PSA와 HGF가 상승적으로 상호작용한다는 것을 보여주는 결과이다.

MMP-2와 MMP-9의 발현에 미치는 PSA 및 HGF의 효과

U-251-MG 세포내에서 MMP-2 및 MMP-9 발현 양상을 확인한 결과, PSA siRNA로 PSA를 억제한 경우 MMP-2의 발현에는 유의할만한 변화가 없었으나, MMP-9의 발현은 약 85% 억제되었다 (Fig. 6).

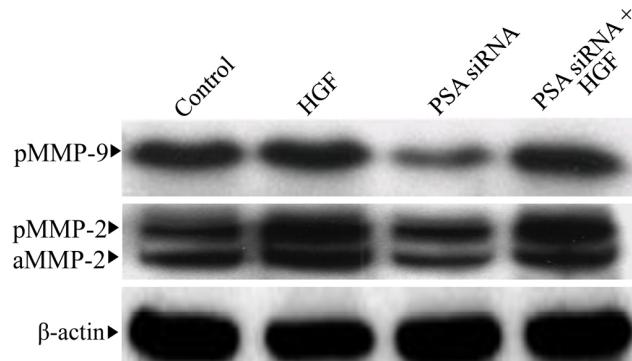


Fig. 6. Effect of PSA siRNA and HGF on the expression of MMP-2 and MMP-9 in U-251-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 h. Then, the cells were incubated for 12 h after addition of a control buffer (Control), HGF (10 ng/mL), PSA siRNA-transfected cells (PSA siRNA), and PSA siRNA-transfected cells treated with HGF (PSA siRNA + HGF). Fifteen microgram of protein was used for western blot. The protein was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with MMP-2 and MMP-9 specific antibodies. Protein expression levels of β-actin in cell lysates were used as a control.

PSA를 억제시킨 U-251-MG 세포에 HGF를 처리한 결과, MMP-9의 발현이 약 6.3배 증가되었고 MMP-2의 발현은 약 4.7배 증가되어 enzyme immunoassay (Fig. 4) 및 zymography

결과 (Fig. 5)와 유사하였다. 세포외기질 및 기저막 단백질을 뚫고 세포가 이동하고 침윤하기 위해서는 이들을 분해할 수 있는 효소의 발현 및 분비가 요구된다. 따라서, 본 연구에서 PSA 및 HGF에 의해 유도된 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤은 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비 증가가 직접적 또는 간접적 요인으로 작용할 것이라 여겨진다. MMPs의 광범위 억제제인 BB-94 처리에 의해 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤이 억제된 결과 (Figs. 1~3)로부터 MMP-2 및 MMP-9이 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 부분적으로 관여할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면, PSA는 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 관여하며, HGF 역시 이 경로에 평행하게 관여할 것이라 사료된다. 또한, PSA는 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비에 관여하며, PSA의 억제에 의한 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비 억제는 HGF에 의해 극복되어 분비가 증가되었다. 따라서, U-251-MG 세포에서 PSA 및 HGF에 의한 세포의 증식, 이동 및 침윤 향상 효과는 부분적으로 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비 증가에 의한 것이라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 U-251-MG 세포를 이용하여 증식, 이동, 침윤 및 단백질분해효소의 분비에 미치는 PSA와 HGF의 효과를 확인하였다. 그 결과, PSA siRNA에 의해 U-251-MG 세포의 증식은 약 37% 억제되었으나, HGF 처리 (10 ng/mL)에 의해 증식이 약 1.4배 증가되었다. PSA siRNA에 의한 U-251-MG 세포의 이동은 약 60%가 억제되었으나, HGF 처리에 의해 이동이 약 1.3배 증가되었다. 또한, PSA siRNA에 의해 U-251-MG 세포의 침윤이 약 67% 억제되었으나 HGF 처리에 의해 세포의 침윤이 약 4.3배 증가되었다. PSA siRNA처리에 의해 MMP-2의 분비는 약 25%, MMP-9의 분비는 약 20% 억제되었으며, HGF에 의해 PSA siRNA에 의해 억제된 MMP-2 및 MMP-9의 분비가 약 2.8배 및 3.5배 증가되었다. HGF 처리에 의해 플라스민의 분비량은 약 14배 증가되었고, PSA를 억제한 U-251-MG 세포에 HGF를 처리한 결과, 플라스민의 분비가 약 1.6배 증가하였다. 또한, PSA siRNA에 의해 MMP-2의 발현은 유의할만한 변화가 없었으나, MMP-9의 발현은 약 85% 억제되었다. PSA를 억제시킨 U-251-MG 세포에 HGF를 처리한 결과, MMP-2의 발현은 약 5.7배, MMP-9의 발현은 약 6.3배 증가되었다. 한편, MMPs의 광범위 억제제인 BB-94 처리에 의해 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤이 유의할만하게 억제된 것은 MMP-2 및 MMP-9이 U-251-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤에 관여할 것임을 시사해준다.

REFERENCES

- Boccaccio, C. and P. M. Comoglio (2006) Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6: 637-645.
- Tu, H., Z. Zhou, Q. Liang, Z. Li, D. Li, J. Qing, H. Wang, and L. Zhang (2009) CXCR4 and SDF-1 production are stimulated by hepatocyte growth factor and promote glioma cell invasion. *Onkologie* 32: 331-336.
- Buchstein, N., D. Hoffmann, H. Smola, S. Lang, M. Paulsson, C. Niemann, T. Krieg, and S. A. Eming (2009) Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. *Am. J. Pathol.* 174: 2116-2128.
- Knowles, L. M., L. P. Stabile, A. M. Egloff, M. E. Rothstein, S. M. Thomas, C. T. Gubish, E. C. Lerner, R. R. Seethala, S. Suzuki, K. M. Quesnelle, S. Morgan, R. L. Ferris, J. R. Grandis, and J. M. Siegfried (2009) HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin. Cancer Res.* 15: 3740-3750.
- Abounader, R. and J. Laterra (2005) Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro. Oncol.* 7: 436-451.
- You, W. K. and D. M. McDonald (2008) The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep.* 41: 833-839.
- Kim, H. G. and G. Y. Koh (2000) Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF- κ B-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 401-405.
- Oh, I. S., S. S. So, K. Y. Jahng, and H. G. Kim (2002) Hepatocyte growth factor upregulates thymosin β 4 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 401-405.
- Oh, I. S., S. S. So, and H. G. Kim (2003) Effect of hepatocyte growth factor on the migration of human umbilical vein endothelial cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 485-489.
- Grant, D. S., H. K. Kleinman, I. D. Goldberg, M. M. Bhargava, B. J. Nickoloff, J. L. Kinsella, P. Polverini, and E. M. Rosen (1993) Scatter factor induces blood vessel formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1937-1941.
- Koontongkaew, S., P. Amornphimoltham, and B. Yapong (2009) Tumor-stroma interactions influence cytokine expression and matrix metalloproteinase activities in paired primary and metastatic head and neck cancer cells. *Cell Biol. Int.* 33: 165-173.
- Wang, H. and J. A. Keiser (2000) Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 900-905.

13. Lamszus, K., N. O. Schmidt, L. Jin, J. Laterra, D. Zagzag, D. Way, M. Witte, M. Weinand, I. D. Goldberg, M. Westphal, and E. M. Rosen (1998) Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int. J. Cancer* 75: 19-28.
14. Lee, S. H. and H. G. Kim (2009) Cobalt chloride-induced downregulation of puromycin-sensitive aminopeptidase suppresses the migration and invasion of PC-3 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 530-536.
15. Klein, S., F. G. Giancotti, M. Presta, S. A. Albelda, C. A. Buck, and D. B. Rifkin (1993) Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 4: 973-982.
16. Kakuta, H., A. Tanatani, K. Nagasawa, and Y. Hashimoto (2003) Specific nonpeptide inhibitors of puromycin-sensitive aminopeptidase with a 2,4 (1H, 3H)-quinazolinedione skeleton. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 1273-1282.
17. Komoda, M., H. Kakuta, H. Takahashi, Y. Fujimoto, S. Kadoya, F. Kato, and Y. Hashimoto (2001) Specific inhibitor of puromycin-sensitive aminopeptidase with a homophthalimide skeleton: identification of the target molecule and a structure-activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem.* 9: 121-131.
18. Pepper, M. S. (2001) Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 86: 346-355.