

테옥시콜릭산에 의한 대장암 세포주
침습성의 변화

연세대학교 대학원

의 학 과

이 용 규

테옥시콜릭산에 의한 대장암 세포주
침습성의 변화

지도교수 김 현 수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 용 규

이용규의 박사 학위논문을 인준함

심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인
심사위원	_____	인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

오랜 기간이 지난 이즈음 지나 온 시간들을 돌아보게 됩니다. 바쁜 일정에도 저의 박사과정 동안 시종 모든 방면에 정성을 다해 지도와 배려를 아끼지 않으신 김현수 지도 교수님께 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 개업의로서 다른 어려움은 차치하고라도 실험의 난관은 자못 큰 문제로 다가왔습니다. 처음 학위 시작 때 찾아 뵈 권상옥 교수님의 자상하신 설명과 격려 그리고 용기를 실어 주신 그 말씀은 가슴 깊이 간직하고 있습니다. 또한, 박사 학위를 권유하시고 흔쾌히 길을 열어 주셨던 이동기 교수님께도 항상 진심으로 존경과 감사를 드립니다. 아울러 전공의 시절부터 내내 옆에서 도움을 주고 이끌어 주신 형님과도 같은 백순구 교수님과 논문이 나오기까지 수고 많으셨던 소화기내과의 김재우 선생님께도 감사드립니다. 이 논문이 완성되기까지 꼼꼼한 검토와 조언해 주신 김대성 교수님, 최재원 교수님, 조미연 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

부족한 저를 끝없는 사랑으로 키워주시고 보살피 주시는 양가 부모님께 다시 한번 깊이 감사를 드립니다. 항상 곁에서 든든히 자리를 지켜주는 무엇보다 소중한 아내와 보고만 있어도 행복한 듄직스런 아들 동건이, 밝고 명랑한 귀엽고 예쁜 딸 유나에게 의미 있는 이 사랑의 선물을 마련하신, 모든 것을 허락하신 분께 기쁨으로 감사드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	4
1. 세포주의 배양과 처리	4
2. 약물의 구입과 처리	4
3. DCA 처리 후 세포의 생존율과 증식능의 측정	5
4. 혈관내피성장인자와 저산소유도인자-1 α mRNA의 역전사 중합효소연쇄반응	6
5. 혈관내피성장인자의 Western blotting	7
6. MMP-9의 Western blotting	8
7. MMP-9의 활성화도 평가를 위한 zymogram assay	8
8. Wound migration assay	9
III. 결과	10
1. 데옥시콜릭산 투여 후 HT-29세포의 생존능 변화	10
2. 데옥시콜릭산 투여 후 혈관내피성장인자 mRNA와 저산소유도인자-1 α mRNA의 발현 변화	11
3. 데옥시콜릭산 투여 후 혈관내피성장인자 단백 발현의 변화	12
4. 데옥시콜릭산 투여 후 MMP-9 단백 발현의 변화	13
5. 데옥시콜릭산 투여 후 MMP-9 효소 활성화도의 변화	14
6. 데옥시콜릭산 투여 후 세포 이동성의 변화	15
IV. 고찰	16
V. 결론	20
참고문헌	22
영문초록	26

그림 차례

그림 1. 테옥시콜릭산 처리 후 HT-29세포의 생존능과 증식능의 변화	10
그림 2. 테옥시콜릭산 처리 후 HT-29세포의 혈관 내피성장 인자와 저산소유도인자-1 α mRNA의 발현 변화	11
그림 3. 테옥시콜릭산 처리 후 혈관내피성장인자 단백질 발현과 특이 신호 전달 물질 억제제의 영향	12
그림 4. 테옥시콜릭산 처리 후 MMP-9 단백질 발현과 특이 신호 전달 물질 억제제의 영향	13
그림 5. 테옥시 콜릭산 처리 후 MMP-9 효소의 활성화도 변화와 특이 신호 전달 물질 억제제의 영향	14
그림 6. 테옥시콜릭산 처리 후 HT-29세포 이동성의 변화와 PKC 억제제의 영향	15

표 차례

표 1. 테옥시콜릭산 처리 후 발현하는 VEGF, MMP-9과 연관된 신호전달 물질과 억제제	5
---	---

국문 요약

데옥시콜릭산에 의한 대장암 세포주 침습성의 변화

고지방식이에 의하여 대장 내 농도가 증가하는 데옥시콜릭산(deoxycholic acid, DCA)은 대장에서 종양 촉진인자로 알려져 있으나, 대장암의 침습과 전이에 미치는 영향에 대하여는 알려진 바가 없다. 본 연구는 HT-29 대장암 세포주를 이용하여 데옥시콜릭산 투여 후 세포의 침습성 변화를 알아보고, 이를 매개하는 신호 전달 경로를 알아보고자 하였다.

HT-29 대장암 세포주에 데옥시콜릭산을 시간 및 농도별(0~80 μ M)로 처리한 후 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α mRNA 발현에 대한 역전사 중합효소 연쇄반응, 혈관내피성장인자 및 MMP-9에 대한 Western blotting, MMP-9의 활성화 여부를 평가하기 위한 zymography, 그리고 세포의 이동성 변화를 확인하기 위한 wound migration assay를 시행하였다. 또한 데옥시콜릭산 매개 대장암 세포주의 침습성 변화에 관여하는 신호 전달 경로를 알아보기 위하여 이전에 알려진 대장암 관련 신호전달 억제물질의 전처리 후 변화를 확인하였다.

데옥시콜릭산은 저산소증유도인자 mRNA의 발현, 혈관내피성장인자 mRNA 및 단백 발현, MMP-9의 단백 발현과 효소 활성화, 세포의 이동성을 농도 의존적으로 증가시켰다. 데옥시콜릭산 자극 후 혈관내피성장인자 단백 발현의 증가는 COX-2의 선택적 억제제인 NS-398, NF- κ B의 억제제인 PDTC, 그리고 TUDC의 전처리로 억제되었다. 데옥시콜릭산 유도 MMP-9의 효소 활성화도는 p38 MAPK 억제제인 SB203580, ERK 억제제인 U0126, 그리고 PDTC의 전처리로 억제 되었으며, 데옥시콜릭산에 의한 세포 이동성 증가는 protein kinase C의 억제제인 GF109203X의 전처리로 감소되었다.

데옥시콜릭산은 대장암 세포주에서 여러가지 신호 전달 경로를 통하여 세포의 침습성과 혈관형성의 잠재능을 의미 있게 증가시킴으로써 대장암의 종양 촉진 뿐만 아니라, 대장암의 침습과 전이를 촉진 할 가능성을 제시하였다.

핵심되는 말: 데옥시콜릭산, HT-29 대장암 세포주, 침습성, 혈관신생

데옥시콜릭산에 의한 대장암 세포주 침습성의 변화

<지도교수 김 현 수>

연세대학교 대학원 의학과

이 용 규

I. 서 론

대장암의 암화 과정에 APC (adenomatous polyposis coli), MMR (mismatch repair) 등의 특정 유전자가 주로 관여하는 유전성 대장암과는 달리 전체 대장암의 75%를 차지하는 산발성(sporadic) 대장암은 일부 유전자의 변이와 더불어 주로 환경 인자가 암 발생에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 특히 식생활의 서구화에 따른 고지방식이 대장암 발생의 가장 중요한 환경 위험인자로 알려져 있다.¹⁻³ 즉, 고지방 식이는 지방의 소화와 흡수에 필요한 담즙산의 간 내 생성과 장 내 분비를 증가시켜 결과적으로 대장 내 세균에 의하여 데옥시콜릭산(deoxycholic acid, DCA)이 주 성분인 이차 담즙산의 생성을 증가시킨다.⁴ 이러한 데옥시콜릭산은 대장 상피세포에서 증식과 변성을 촉진시키고, 인체 역학 연구와 동물모델을 통한 연구에서는 발암물질에 의한 대장종양 발생을 촉진시키는 종양촉진인자(tumor promoter)로 잘 알려져 있다.⁵⁻⁸ 최근 이와 관련되어 대장 종양의 초기 발생 과정에서 데옥시콜릭산의 역할과 관련된 하위 신호 전달 경로가 많이 규명되고 있으나, 이미 형성된 대장암의 진행과 관련하여 세포 이동성이나 혈관신생의 변화를 비롯한 주변 조직으로의 침습과 전이에 있어서 데옥시콜릭산의 역할에 대하여는 연구가 미미한 실정이다.

일반적으로 암의 발생과 진행, 주변 침습이나 전이에는 혈관신생, 주변 기질의 단백질분해효소나 활성도를 조절하는 단백질분해효소 억제 인자의 발현 등이 필수적이다. 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 대장암의 혈관신생에 관여하여 암의 성장과 진행, 전이에 중요한 역할을 한다.^{9,10} 혈관내피성장인자의 발현을 유도하는 상위조절 핵심인자는 저산소증유도 전사인자(hypoxia

inducible factor, HIF)-1으로 이는 저산소증유도인자 1 α 와 저산소증유도인자 1 β -subunit으로 구성된 이질이량체(heterodimer)이다.¹¹ 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 발생하는 종양 내 저산소증은 일부 고형 종양에서 저산소증유도인자 단백질의 지속적인 발현을 유도하여 혈관내피성장인자 발현을 활성화시킴으로써 종양의 진행을 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁴ 대장암의 침습과정에는 세포 부착능의 소실, 세포외 기질(extracellular matrix)이나 기저막의 파괴와 동시에 세포의 이동이 요구된다. 특히 matrix metalloproteinases (MMPs)는 결합조직을 구성하는 세포외 기질 단백을 분해하여 세포의 이동성을 증가시키며, 암세포 주변으로의 이동과 침습에 가장 중요한 역할을 하는 대표적인 단백질분해효소로 대장암에서도 일부 MMPs의 발현이 증가함이 알려져 있다.^{15,16}

본 연구는 HT-29 대장암 세포주에서 테옥시콜릭산의 자극 후 세포 이동성의 변화를 측정하고, 혈관신생에 관여하는 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α 의 발현 변화와 세포기질 단백질분해효소인 MMP-9의 발현 변화를 알아봄으로써 대장암 침습성 변화에 미치는 테옥시콜릭산의 역할을 알아보려고 하였다. 또한 대장암 세포에서 테옥시콜릭산과 연관된 신호 전달 경로로 알려진 다양한 신호 전달 분자들의 억제제와 대장암의 화학예방 약물을 이용하여 관련된 신호전달 경로를 억제함으로써 테옥시콜릭산에 의한 대장암 침습성 변화의 기전을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주의 배양과 처치

인체에서 기원한 대장암 세포주인 HT-29 세포주를 한국 세포주은행(서울, 대한민국)으로부터 분양 받아 T-75 cm² 플라스크에서 10% 우태아 혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 항생제(페니실린 100 U/mL와 스트렙토마이신 100 µg/mL)가 함유된 RPMI 1640 배지(pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO. USA)에서 매주 계대 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% 이산화탄소 농도의 배양기에서 유지하였다. 실험 시작 때마다 지수 성장기의 세포를 0.05%의 트립신과 0.02%의 EDTA용액으로 플라스크에서 제거하여 새로운 T-75 cm² 플라스크에 20,000개/cm²의 밀도로 접종하였다.

2. 약물의 구입과 처리

HT-29 세포주는 10 cm culture petri dish에서 배양한 후 1%의 트립신으로 떼어낸 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리를 하였다. 원심분리한 HT-29 세포를 24-well plate에 재분주(3~5×10⁵개/mL)하여 10% 열 불활성화 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에서 24시간 배양한 후 3회 배지를 갈아 혈청을 제거하였다. 테옥시콜릭산은 최종 농도의 1/50로 RPMI-1640 배지에 희석하여 준비한 후에 10 µL씩 24-well에 첨가하여 주었다. 테옥시콜릭산은 DMSO에 0.1 M로 녹인 후 -20°C에 두고 실험 때마다 사용하였다. 음성 대조군으로 약물을 처리하지 않은 세포주와 양성 대조군으로 테옥시콜릭산 일정 농도를 처리한 세포주, 그리고 테옥시콜릭산을 처리하기 전에 여러 신호전달 분자들에 대한 특이적 활성 억제제들{GF109203X; 3-[1-(dimethylaminopropyl) indol-3-yl]-4-(indol-3-yl) maleimide, classical PKC isotypes (α, β I, βII, γ)억제제, PP1; src kinase family 억제제, SB203580; p38 MAP kinase 억제제, U0126; extracellular signal regulated kinase (ERK) 억제제, PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate); nuclear factor kappa B (NF-κB) 억제제, NS-398; cyclooxygenase-2 (COX-2) 억제제}(Sigma, St. Louis, MO. USA)을 전처리한 세포주를 대상으로 각 조건별 실험을 시행하였다(표 1). 담즙산은 테옥시콜릭산과 타우로테옥시콜릭산(tauroursodeoxycholic acid, TUDC)을, 그리고 calcium chelator는 BAPTA-AM (Sigma, St. Louis, MO. USA)을 사용하였다.

표 1. 데옥시콜릭산 처리 후 발현하는 VEGF, MMP-9과 연관된 신호전달 물질과 이의 억제제

신호전달 물질	억제제	연관된 단백발현
COX-2	NS-398	VEGF
NF-kappa B	PDTC	VEGF, MMP-9
Calcium chelator	BAPTA-AM	
<i>src</i>	PP1	
p38MAPK	SB203580	MMP-9
ERK/MEK	U0126	MMP-9
PKC	GF109203X	

3. DCA 처리 후 세포의 생존율과 증식능의 측정

담즙산 자극 전후 HT-29 세포주에서 세포의 생존율은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay로 증식능은 thymidine incorporation assay를 통하여 정량적으로 측정하였다. 배양된 세포를 수거하여 trypan blue를 처리한 뒤 용적 당 세포수를 계산하여 96 well-plate에 1×10^4 /mL 세포를 분주하여 70~80% 융합상태의 단층세포가 되도록 24시간 배양하였다. DCA를 세포 배양액에 용해시켜 혈청이 없는 배지에 희석하여 2 μ L의 pore size에 여과시키고 각각의 농도로 96 well-plate에 첨가하였다. 시간에 따라 대조군과 DCA 처리한 well의 세포배양액을 버리고 20 μ L의 MTT를 96 well-plate에 첨가하고, 37°C에서 5~6시간 배양 후에 20% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 50% N, N-dimethyl-formamide가 함유된 75 μ L의 lysate buffering solution을 각 well에 첨가하여 37°C에서 overnight하였다. 2~3시간 동안 96 well-plate를 잘 혼합하여 570 nm 파장에서 발광도를 ELISA 판독기(Molecular Devices, Menlo Park, CA)로 정량적으로 측정하였다. Thymidine incorporation assay는 96 well-plate에 각 조건에 맞게 well 당 1 μ Ci의 [3 H]-thymidine (Life science, Boston, MA, USA)을 넣은 뒤 37°C, 10% 이산화탄소 배양기에서 1~2시간 배양한 후 세포 수집기(Harvester)를 이용하여 각 샘플을 여과지에 부착시키고, 여과지를 cocktail solution(Beckman, San Francisco, CA, USA)과 섞은 후에 liquid scintillation counter(Beckman)을 이용하여 측정하였다.

4. 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α 의 역전사 중합효소연쇄 반응

데옥시콜릭산의 농도별(0, 25, 50, 80 μ M)로 24시간 HT-29세포와 배양 후 세포를 수거하여 Trizol법(Life Technologies, c Frederick, MD)으로 세포의 총 RNA를 얻었다. 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α 에 대하여 특이한 구조의 target RNA를 증폭시키기 위한 1차 역전사 중합효소연쇄반응은 Gene RNA PCR reagent kit (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 0.5 μ g의 총 RNA로 시행하였다. 역전사 중합효소연쇄반응의 조건은 45 $^{\circ}$ C에서 12분(역전사반응); 95 $^{\circ}$ C에서 12분(AmpliTaq Gold 활성화) 반응 후 27 cycle 증폭(94 $^{\circ}$ C에서 1분 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 1분 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 primer extension); 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension 반응을 시행하였다. 증폭 사이클의 횟수(15~33회)와 총 RNA 양(0.1~0.9 μ g)에 따른 mRNA의 전사 정도를 그래프 화하여 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α 의 전사 정도를 알기 위한 역전사 중합효소연쇄반응의 최적 조건을 설정하였다. 혈관내피성장인자(320 bp for 206, 300 bp for 189, 230 bp for 165, 100 bp for 121; 50 pM)와 저산소증유도인자-1 α (460 bp, 50 pM)의 유전자와 β -actin(700 bp, 25 pM)의 증폭을 위하여 이용된 프라이머의 염기서열은 아래와 같다.

VEGF sense strand; 5'-CAC ATA GGA GAG ATG AGC TTC-3'

VEGF antisense strand; 5'-CCG CCT CGG CTT GTC ACA T-3'

HIF-1 α sense strand; 5'-CTC AAA GTC GGA CAG CCT CA-3'

HIF-1 α antisense strand; 5'-CCC TGC AGT AGG TTT CTG CT-3'

β -actin sense strand; 5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG-3'

β -actin antisense strand; 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'

중합효소연쇄반응의 결과물은 3% agarose 겔에서 분석하였다. 형성된 밴드는 스캔 후에 Total Lab 소프트웨어 프로그램(Nonlinear Dynamics, Durham, NC)으로 정량 분석하였으며, 내부 대조군을 이용하여 정상화 밀도단위(normalized densito-

metric units, NDU)로 표기하였다. 저산소증 환경에서 혈관내피성장인자와 HIF-1 α 의 발현 변화에 대한 데옥시콜릭산의 영향을 평가하기 위하여 100 μ M의 cobalt chloride (CoCl₂) 유무에 따라 각각 24시간 실험을 시행하였다.

5. 혈관내피성장인자의 Western blotting

데옥시콜릭산을 농도별(0~80 μ M)로 48시간 자극 후 세포의 총 단백 추출물을 얻었다. 세포를 ice-cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척하여 600 g로 5분간 원심분리하여 세포를 모은 후, 0.1 mL의 RIPA 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL pepstatin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1% SDS, 1% Triton X-100)으로 용해시켰다. 이후 10,000 g로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 Bradford 시약으로 정량하였다. 조건별로 50 μ g 단백을 적정량의 완충액과 혼합하여 12% SDS-acrylamide bisacrylamide 겔에서 전기영동을 시행하였다. 크기 별로 분리된 단백질은 전이 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine과 20% methanol)으로 채운 전이탱크에서 50 V에서 2시간 nitrocellulose membrane (BioRad, Hercules, CA)으로 이동시켰다. 항체와 단백질의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 nitrocellulose membrane을 5% 탈지유와 0.1% Tween-20을 함유한 PBS에서 1시간 반응시켰다. 혈관내피성장인자 유전자의 다양한 엑손 스플리싱 결과는 혈관내피성장인자 isoform인 121, 165, 189, 206을 생성하며, 그 중 165가 가장 흔하게 형성된다. 본 연구에서는 혈관내피성장인자 165단백의 발현 정도가 다른 혈관내피성장인자 isoform과 교차반응이 없다는 것을 확인하기 위하여 모든 혈관내피성장인자 단백을 감지하는 항 혈관내피성장인자 단클론항체(Pharmigen, Santa Cruz, CA)로 평가하였고 차이가 없었다. 이후 nitrocellulose membrane을 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 세척한 뒤 peroxidase가 표지된 2차 항체와 반응시켰다. 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피성장인자 단백 발현의 신호 전달 경로를 알기 위하여 NS-398, PDTC 그리고 대장암 화학예방 약물인 TUDC를 2시간 전처리 한 후 혈관내피성장인자 단백 발현의 변화를 확인하였다. 면역복합체는 Amersham사의 ECL법을 이용하여 Hyperfilm ECL으로 측정하였고, 발현 밴드는 스캔 후 소프트웨어 프로그램(Non-linear Dynamics, Durham, NC)으로 정량 분석하였다.

6. MMP-9의 Western blotting

Western blotting은 4°C에서 overnight하면서 gelatin-agarose beads (Sigma-Aldrich)를 이용하여 각 조건별 세포에서 MMP-9을 농축한 후 4% SDS 완충액에서 세척하고 회석시켰다. 각 조건별 모든 샘플은 환원제로서 100 mM dithiothreitol을 처리하여 10% polyacrylamide resolving 겔로 분리하였다. 전기영동 후 조건별로 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 100 V에서 2시간 동안 막과 반응시킨 후 막을 0.1% Tween-20을 함유한 PBS에서 overnight하면서 비특이 결합을 차단하였다. MMP-9 단백질의 발현 정도는 토끼의 항인체 다클론성 MMP-9 항체(Pharmigen, Santa Cruz, CA)를 2시간 동안 막과 반응시킨 후 막을 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 세척하여 peroxidase로 포지된 염소의 항 토끼(Pierce) 2차 항체와 반응하였으며, 이후 방법은 위의 5번 방법과 같다. 테옥시콜릭산에 의한 MMP-9 단백질 발현의 신호 전달 경로를 알기 위하여 BAPTA-AM, PP1, SB203580, U0126을 각각 2시간 전처리 하였고, NS-398, TUDC 그리고 PDTC를 각각 6시간 전처리한 후 MMP-9 단백질 발현의 변화를 확인하였다.

7. MMP-9의 활성화 평가를 위한 zymogram assay

24-well plate에 60~70%로 자란 각 조건별 세포를 PBS로 2회 씻은 후, 무혈청 배양액 0.4 mL를 넣은 다음 48시간 추가 배양하였다. 배양 상층액을 Amicon ultra centrifugal filter (Millipore, Billerica, MS, USA)를 이용하여 농축하여 시료 처리용액(0.1% bromophenol blue, 40% glycerol, 0.25 M Tris HCl, pH 6.8)과 3:1의 비율로 혼합한 후, gelatin type A가 1 mg/mL의 농도로 함유된 8% polyacrylamide 겔에 얹고, 4°C에서 전기영동을 시행하였다. 겔을 2.5% Triton X-100 용액으로 15분간 2회 씻은 후, 반응용액(50 mM Tris HCL, pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃)에 담그고 37°C에서 18~20시간 동안 반응시킨 다음, Coomassie brilliant blue로 겔을 염색하고 탈색하여 MMP-9의 효소 활성화 정도를 비교하였다. 테옥시콜릭산에 의한 MMP-9 효소 활성화에 관여하는 신호 전달 경로를 알기 위하여 PDTC, SB203580, U0126을 각각 6시간 전처리한 후 MMP-9 효소 활성화도의 변화를 확인하였다.

8. Wound migration assay

세포들(5×10^5 cell/mL)을 24-well plate에 넣고 8~10시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들을 끝이 두꺼운 tip으로 긁어내고 PBS로 2회, 무혈청 배양액으로 1회 씻었다. 그 후 테옥시콜릭산의 농도별(25 μ M, 50 μ M), 그리고 classical PKC isotypes (α , β I, β II, γ) 억제제인 GF109203X을 조건별로 무혈청 배양액 0.5 mL에 전처리 한 후 48시간 배양하여 현미경으로 디지털 영상을 찍어 각 세포들의 이동거리를자로 재어 정량화하였다.

III. 결 과

1. 데옥시콜릭산 투여 후 HT-29세포의 생존능 변화

데옥시콜릭산 처리 24시간 후 세포의 생존능은 농도 증가에 따른 차이를 보여 저농도인 50~100 μM 에서는 생존능이 증가하였으나, 200 μM 이상에서는 50%이하로 감소하였고, 400 μM 이상에서는 세포가 거의 생존하지 못하였다(그림 1B). 시간별로는 150~200 μM 의 데옥시콜릭산 처리 후 18시간부터 생존능이 감소하여 72시간까지 지속되었다(그림 1A). 또한 thymidine incorporation을 이용한 세포의 증식능은 200 μM 의 데옥시콜릭산 투여 8시간 후부터 감소하여 24시간 경과 후에는 현저히 감소하였다(그림 1C).

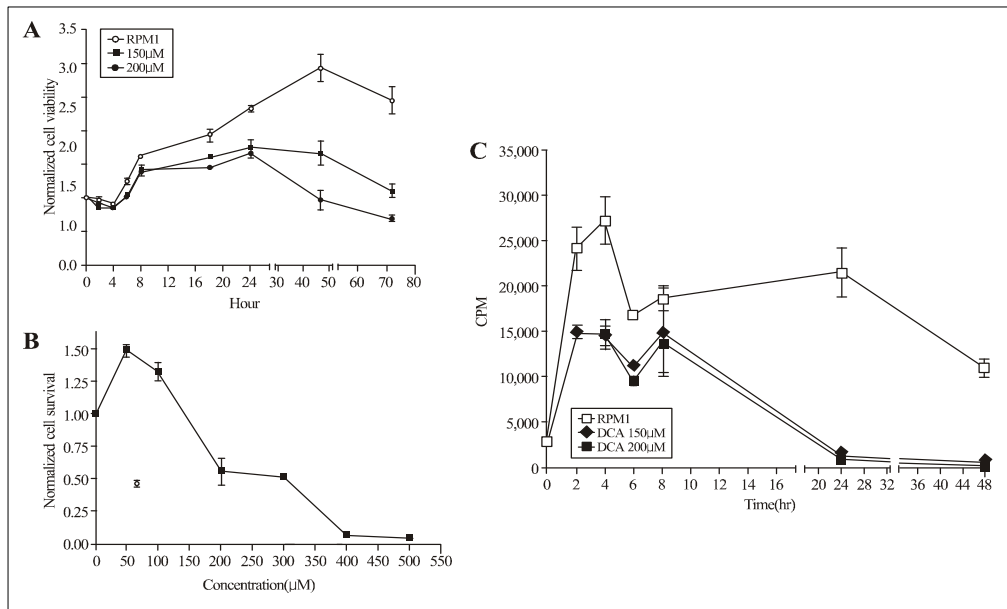


그림 1. 데옥시콜릭산 처리 후 HT-29세포의 생존능과 증식의 변화. 데옥시콜릭산 처리 후 세포의 생존은 시간경과에 따라 억제되었다(A). 데옥시콜릭산 처리 24시간 후 MTT assay를 이용하여 측정된 세포의 생존능은 농도에 따른 차이를 보여 저농도에서는 증가하고 고농도에서는 감소하였다(B). Thymidine incorporation assay를 이용한 세포의 증식은 데옥시콜릭산 200 μM 투여 8시간 후부터 감소하여 24시간 후에 현저히 감소하였다(C).

2. 데옥시콜릭산 투여 후 혈관내피성장인자 mRNA와 저산소증유도인자-1α mRNA의 발현 변화

중양 혈관신생에 핵심적인 혈관내피성장인자와 이의 발현을 조절하는 것으로 알려진 저산소증유도인자-1α의 전사단계에서 mRNA 발현 변화를 데옥시콜릭산 투여 후 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 데옥시콜릭산의 농도별(0~80 μM) 처리 24시간 후 혈관내피성장인자 mRNA isoform 인 185, 165, 121 모두 25 μM 부터 mRNA 발현이 나타나 80 μM에서 최대로 발현하여 농도 의존적으로 mRNA 발현이 증가하였으며, 206 isoform은 저농도에서는 발현이 되지 않았으나, 80 μM에서 mRNA의 발현을 보였다. 또한 저산소증유도인자-1α mRNA도 데옥시콜릭산의 농도 증가에 따라 발현이 증가하였다(그림 2).

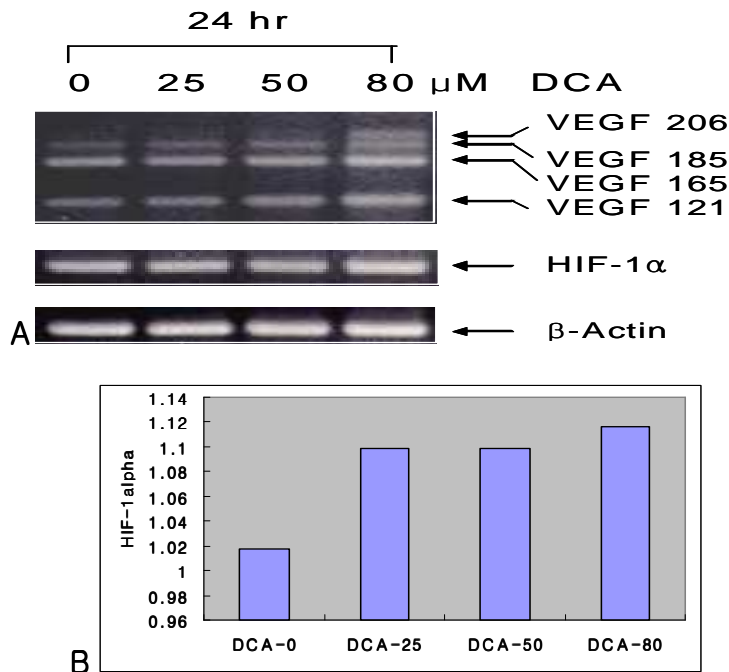


그림 2. 데옥시콜릭산 처리 후 HT-29세포의 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1α의 발현 변화. 배양한 HT-29세포에 데옥시콜릭산을 처리한 후 24시간 뒤 RNA를 분리하였다. 저산소증유도인자와 혈관내피성장인자 mRNA는 역전사 중합효소연쇄 반응으로 확인하였고, 결과물은 3% agarose 겔에서 분석하였다. β-actin(하측)과 비교해 보면 저산소증유도인자-1α와 혈관내피성장인자 isoform(상측) 유전자의 발현은 데옥시콜릭산의 농도(0~80 μM)에 의존하여 증가하였다. β-actin은 loading control로 사용하였다(A). 정량화 그래프에서도 데옥시콜릭산 처리 후 저산소증유도인자-1α의 유전자 발현이 약간 증가 하였다(B).

3. 데옥시콜릭산 투여 후 혈관내피성장인자 단백 발현의 변화

암의 침습에 필요한 혈관신생에 중요한 역할을 하는 혈관내피성장인자의 단백 발현 변화를 데옥시콜릭산 투여 후 Western blotting으로 확인하였다. 데옥시콜릭산의 농도별(0~80 μM) 처리 48시간 후 혈관내피성장인자 165는 25 μM 부터 발현이 나타나 80 μM 에서 최대로 발현하였으며, 농도 증가에 따른 발현양의 증가를 보였다(그림 3). 또한 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피성장인자 165 isoform 발현의 증가는 NS-398 (50~100 μM)이나 PDTC (50~100 μM) 전처리에 의하여 일부 억제되었으며, TUDC (100~200 μM)에 의하여 억제됨을 관찰하였다(그림 3). 따라서 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피 성장인자 단백 발현 증가는 COX-2와 NF- κ B에 의하여 일부 매개되며, 대장암의 화학예방 약물인 TUDC는 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피 성장인자 단백 발현 증가를 억제함을 알 수 있었다.

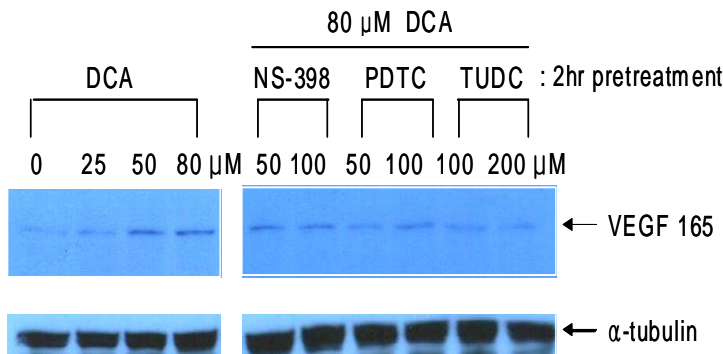


그림 3. 데옥시콜릭산 처리 후 혈관내피성장인자 단백 발현과 특이 신호전달 물질 억제제들의 영향. HT-29세포가 자라 90% 균락을 형성했을 때 데옥시콜릭산(0~80 μM)으로 처리 48시간 후 혈관내피성장인자 단백 발현을 Western blotting으로 확인하였다. 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피성장인자 단백 발현은 농도(0~80 μM) 의존적인 증가를 보였다(좌측). 80 μM 의 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피성장인자 165 isoform 발현의 증가는 NS-398 (50 & 100 μM), PDTC (100 & 200 μM), 또는 TUDC (100 & 200 μM)의 2시간 전처리에 농도 의존적인 발현 감소가 되었다(우측). α -Tubulin은 loading control로 사용하였다.

4. 데옥시콜릭산 투여 후 MMP-9 단백질 발현의 변화

암전이의 초기 단계에서 침습에 관여하는 세포기질 단백질 분해 효소인 MMP-9 단백질 발현의 변화를 데옥시콜릭산 투여 후 Western blotting으로 확인하였다. 데옥시콜릭산(80 μ M) 처리 48시간 후 MMP-9의 단백질 발현이 증가하였다(그림 4). 이러한 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 단백질 발현의 증가는 p38 MAP kinase 억제제인 SB203580 (5~10 μ M), ERK/MEK 억제제인 U0126(1~5 μ M), 그리고 NF- κ B의 억제제인 PDTC (50~100 μ M)에 의하여 농도 의존적인 발현 감소를 나타내어 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 단백질 발현 증가에 이들 경로가 관여함을 간접적으로 알 수 있었다. 하지만, 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 단백질 발현의 증가는 BAPTA-AM, PP1, NS-398 그리고 TUDC의 전처리에 의해서는 억제되지 않아 이 과정에는 칼슘 통로, src kinase, COX-2매개 경로가 관여하지 않음을 알 수 있었다(그림 4).

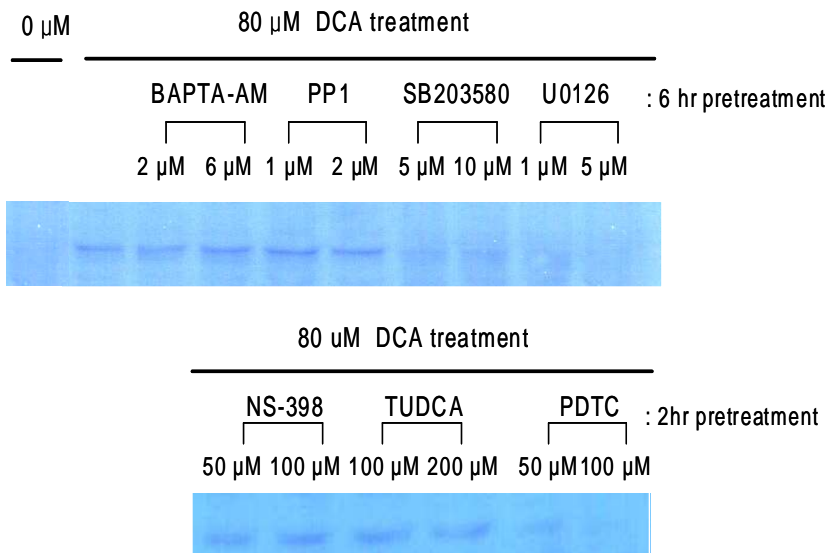


그림 4. 데옥시콜릭산 처리 후 MMP-9 단백질 발현과 특이 신호전달 물질 억제제들의 영향. HT-29세포가 자라 90% 군락을 형성했을 때 데옥시콜릭산(0~80 μ M)으로 처리 48시간 후 MMP-9 단백질 발현을 Western blotting으로 확인하였다. MMP-9 단백질 발현은 80 μ M의 데옥시콜릭산 처리에 의해 증가되었다. 데옥시콜릭산 처리 후 MMP-9 단백질 발현의 증가는 SB203580 (5 & 10 μ M), U0126 (1 & 5 μ M)의 6시간 전처리에 의해(상측), 그리고 PDTC (50~100 μ M)의 2시간 전처리에 의해 의미 있게 감소하였다(하측). 그러나 BAPTA-AM, PP1, NS-398 또는 TUDC의 전처리에 후에는 MMP-9 단백질 발현이 억제되지 않았다.

5. 데옥시콜릭산 투여 후 MMP-9 효소 활성도의 변화

MMP-9 단백 발현 변화와 더불어 데옥시콜릭산 투여 후 효소의 활성도 변화를 알아보기 위하여 zymogram assay를 시행하였다. 데옥시콜릭산을 농도별(0~80 μM)로 처리 한지 48시간 후 관찰결과 MMP-9 효소 활성도는 25 μM 부터 증가하여 80 μM 에서 최대로 증가하는 농도 의존적인 활성도 증가를 보였다(그림 5). 또한 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 효소 활성도의 증가는 NF- κ B의 억제제인 PDTC (50~100 μM), p38 MAP kinase 억제제인 SB203580 (5~10 μM), ERK/MEK 억제제인 U0126 (1~5 μM)의 6시간 전처리에 의하여 활성도가 감소하는 농도 의존적 양상을 보여(그림 5) 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 발현 증가에 이들 경로가 관여하며, 위에서 기술한 결과 3번의 단백 발현 변화와 일치된 결과를 보였다.

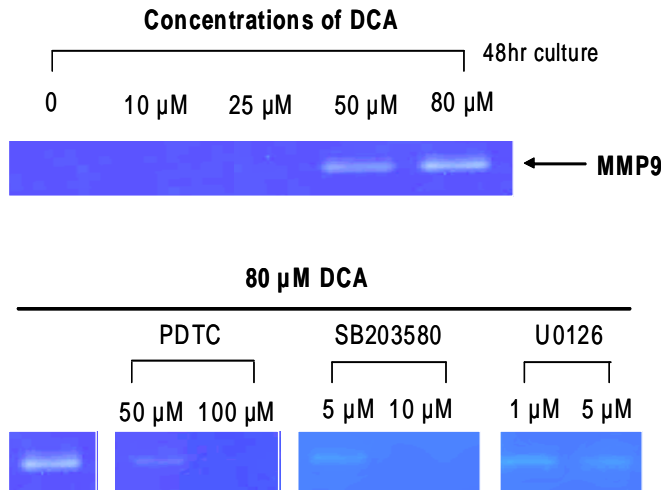


그림 5. 데옥시콜릭산 처리 후 MMP-9 효소의 활성도의 변화와 특이 신호 전달 물질 억제제들의 영향. HT-29세포가 자라 90% 군락을 형성했을 때 데옥시콜릭산(0~80 μM)으로 처리 48시간 후 MMP-9 효소 활성도를 gelatin zymography로 측정을 하였다. 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 효소 활성도는 농도 의존적인(0~80 μM) 증가를 보였다(상측). 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9 효소 활성도의 증가는 SB203580(5~10 μM), U0126(1 & 5 μM), PDTC (50~100 μM)의 6시간 전처리에 의해 활성도가 감소하였다(하측).

6. 테옥시콜릭산 투여 후 세포 이동성의 변화

세포의 침습성을 가늠하는 육안적 지표로서 테옥시콜릭산 투여 후 세포의 이동성을 wound-migration assay로 확인하였다. 테옥시콜릭산 처리(25 μ M, 50 μ M) 후 세포 이동성은 대조군에 비하여 각각 59%(5.4 mm vs. 3.4 mm)와 47%(5 mm vs. 3.4 mm) 증가하였다(그림 6A). 또한 테옥시콜릭산에 의한 세포 이동성 증가는 protein kinase C의 억제제인 GF109203X(2 μ M)의 전처리에 의하여 24%(4.1 mm vs. 5.4 mm)가 감소하여(그림 6B), 테옥시콜릭산에 의한 세포의 이동성 증가에 protein kinase C 신호 전달 경로가 관여함을 알 수 있었다.

A

B

그림 6. 테옥시콜릭산 처리 후 HT-29 세포 이동성의 변화와 PKC 억제제의 영향. 다른 농도의 테옥시콜릭산(0~80 μ M)으로 48시간 처리 후에 wound-migration assay를 이용하여 세포 이동성을 측정하였다. 다른 두 농도(25 μ M & 50 μ M)의 테옥시콜릭산으로 처리 후 HT-29세포의 이동성은 대조군에 비해 각각 59%와 47% 증가하였다(A). 테옥시콜릭산에 의한 세포이동성 증가는 PKC 억제제인 GF109203X (2 μ M)의 6시간 전처리에 의해 감소하였다(B). 실험은 반복적으로 세 번을 하였으며, 통계분석은 two-way analysis of variance와 two-tailed Dunnett's test ($p < 0.05$)를 이용하였다.

IV. 고 찰

암 조직 내 혈관의 신생과 성장은 암세포나 주변 기질세포에 의하여 생산되는 혈관내피성장인자를 비롯한 다양한 친혈관형성 및 반혈관형성 인자에 의하여 조절되는 복잡한 과정을 거친다. 혈관을 통하여 공급되는 산소와 영양소와 무관하게 종양이 성장하기 위해서는 ‘혈관형성 전환’(angiogenic switch)이 필요하며, 이는 저산소증 환경에서 종양세포로부터 유리되는 친혈관형성 인자에 의하여 유도된다.¹⁷ 혈관형성 전환의 과정은 기존 혈관의 확장과 혈관주위세포(pericyte)의 탈락, 신생혈관의 발육과 내피세포의 성장, 신생혈관의 형성, 혈관주위세포의 밀집의 순차적인 다단계 과정을 통하며, 혈관내피성장인자는 모든 단계에서 내피세포의 증식, 이동 및 생존을 촉진시킨다.^{18,19} *In vivo*에서 혈관내피성장인자의 발현과 혈관신생은 대장암의 전 암 병소인 선종에서 조기에 나타나 대장암의 진행과정에서 더욱 뚜렷해 진다.²⁰ 특히 혈관내피성장인자 단백질 발현과 혈관신생의 정도는 대장 선종이나 대장암에서 유의한 상관성을 보여¹⁹ 혈관내피성장인자의 발현이 대장 선종 암화 과정에 핵심적인 역할을 한다.

종양에서 혈관내피성장인자 발현이 증가하는 기전에는 세포 특이적인 신호 전달 체계가 관여한다. 특히 helix-loop-helix구조를 가지는 단백질 저산소증유도인자-1 α 와 저산소증유도인자-1 β 로 구성된 이질이량체 구조의 저산소증유도인자가 주된 역할을 하며, 저산소증유도인자-1 α 단백질은 저산소 환경과 달리 정상 산소농도에서 파괴되는²¹ 반면, 저산소증유도인자-1 β 단백질은 정상과 저산소 환경에서 모두 지속적으로 발현된다. 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 종양 내 상대적으로 발생하는 저산소증은 일부 고형 종양에서 저산소증유도인자 단백질발현과 유전자 활성화를 통하여 혈관내피성장인자 합성 등을 포함하는 저산소증 유도 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 종양의 진행에 관여한다.²²⁻²⁴ 또한 저산소증유도인자는 사이토카인에 의해서도 활성화되는데, 저산소증유도인자를 활성화시키는 사이토카인들은 혈관내피성장인자 등의 다양한 유전자의 발현을 통하여 혈관신생과 확장, 혈관의 투과성, 포도당 섭취를 촉진하여 종양에 영양소 공급을 증가시키게 된다.²⁵ 저산소증유도인자의 활성화 경로에는 저산소증과 더불어 리간드 매개 수용체가 관여하는데, 후자의 하위 신호전달 경로에는 MyD88 단백을 매개로 IL-1 receptor associated kinase (IRAK)를 통한 NF- κ B와 MAPK경로가 서로 교차 결합을 형성함으로써 발현에 영향을 미친다. 특히 대장암에서는 ERK (p42/p44 mitogen activator protein (MAP) kinase)의 활성화가 혈관내피 성장인자 발현 증가에 중요

한 경로가 되는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과 데옥시콜릭산 자극(25~80 μ M)은 대장암 세포주에서 저산소증유도인자-1 α 와 혈관내피성장인자 mRNA의 발현을 농도 의존적으로 활성화시키는 것으로 나타나 데옥시콜릭산이 대장암 세포 및 주변 조직의 혈관형성을 촉진시킴으로써 대장암의 침습과 전이에 중요한 역할을 함을 시사하였다. 또한 단백 수준에서도 데옥시콜릭산은 농도 의존적으로 혈관내피성장인자 단백질의 발현을 증가시켰으며, 이는 PDTC와 NS-398에 의하여 농도 의존적인 발현 억제를 나타내어 위에서 설명한 NF- κ B와 COX-2가 신호전달에 관여함을 간접적으로 알 수 있었다. 대장암화 과정에서 혈관형성이 암세포의 침습과 동시에 시작되며, 혈관신생 억제제가 전암 단계에서 종양의 증식과 진행을 효과적으로 억제 한다는 사실²⁶을 고려할 때 NF- κ B 억제제와 COX-2 억제제는 데옥시콜릭산과 연관된 대장암의 침습을 차단할 수 있는 암 화학 예방 약물로서의 가능성을 제시하였다.

대부분의 암은 암세포의 기질 침습, 원발병소에서 혈관계로의 이동, 혈관에서 이차 병소로의 이동, 이차 종양의 형성이라는 과정을 통하여 원발병소에서 이차 병소로 전이된다. 암세포의 기질 침습에는 단백질 분해 효소에 의한 세포 외 기질의 분해가 요구되는데²⁷, MMPs는 세포 외 기질을 분해하는 가장 핵심적인 효소이다. 다양한 MMPs 중에서 MMP-2 (gelatinase A)와 MMP-9 (gelatinase B)는 각각 72, 92-kDa의 collagenase로서 세포의 기저막을 형성하는 콜라겐을 분해하여 암의 침습과 전이를 촉진하며, 특히 대장암의 발생과 진행에 관여하게 된다. 특히 MMP-9 mRNA의 발현은 간 전이를 동반한 대장암 환자에서 유의하게 발현이 증가하고,²⁸ 나쁜 예후와 관련이 있다.²⁹ 또한 MMP-2와 MMP-9의 활성화는 정상 대장점막보다 대장암 조직에서 뚜렷해지며, 특히 전이를 동반하는 대장암에서 활성화된 MMP-2와 MMP-9의 발현이 현저하다.^{30,31} 본 연구에서 시행한 gelatin zymography는 MMPs의 활성도를 측정하는 방법으로 활성화된 MMPs의 발현 정도를 나타낸다. 본 연구 결과 HT-29 대장암 세포주에서 기저상태에서는 MMP-9의 발현이 없었으나 데옥시콜릭산 자극 후 농도 의존적으로 MMP-9의 단백질 발현과 효소 활성도가 증가하였다. 이는 악성세포에 의한 MMPs 생성 증가가 종양 내 gelatinase의 활성도를 증가시킴으로써 암세포의 전이를 촉진시킨다는 사실³²과 MMP-9의 활성도 증가가 전이능력이 낮은 세포주에 비하여 전이능력이 높은 대장암 세포주에서 뚜렷하다³³는 이전의 연구 결과를 토대로 데옥시콜릭산이 세포 외 기질 분해의 촉진을 통하여 대장암 세포의 침습과 전이를 증가시킬 수 있음을 추론할 수 있다.

MMP-9의 발현을 조절하는 상위 신호전달 기전에는 MAPKs를 포함하는 성장

인자, 싸이토카인, 종양촉진인자 등이 관여한다. 이들 중 p38 kinase와 ERK는 염증성 싸이토카인이나 세포고사 관련신호, 성장인자 등에 의하여 활성화된다. 활성화된 MAPKs는 핵으로 이동하여 MMP 시발체 주변의 전사인자 결합부와 반응하여 다양한 전사인자를 활성화시킴으로써 하위 표적 단백질의 발현을 조절한다. 본 연구에서 데옥시콜릭산에 의한 MMP-9의 활성화는 SB203580과 U0126의 6시간 전처리 후에 농도 의존적인 억제를 보여 p38 kinase와 ERK 신호전달 경로가 모두 이 과정에 관여함을 간접적으로 확인하였으며, 이러한 실험 결과는 데옥시콜릭산에 의하여 유도되는 세포고사 과정에 ERK신호전달이 관여한다는 이전의 연구 결과와 부합된다.³⁴ 아울러 NF- κ B는 산화적 스트레스나 염증성 신호 등의 세포 외 신호에 반응하여 발현되는 다양한 유전자의 활성을 조절하는 Rel계 전사 조절 인자로서 세포의 증식, 형질변환, 종양 발생 등의 발암과정에 관여한다. 본 연구에서 NF- κ B의 억제제인 PDTC의 전처리에 의해서도 MMP-9 효소 활성화가 억제되어 데옥시콜릭산에 의하여 유도되는 MMP-9의 활성화에는 NF- κ B 및 MAPK가 관여하는 다양한 상위 세포 신호 전달 기전이 있음을 보였다.

대장암에서 COX-2의 발현은 프로스타글란딘의 생성을 매개로 혈관내피 성장인자의 발현을 조절하고, 내피세포의 이동을 유도함으로써 종양의 혈관신생과 진행을 촉진하는데 중요한 역할을 한다.³⁵ 또한 COX-2의 선택적 억제제는 간질 세포에서의 혈관내피성장인자 발현 억제를 통하여 진행성 대장 선종의 발생을 감소시켜³⁶ 대장 종양의 중요한 화학예방 약물로 알려져 있다.³⁷ 본 연구 결과에서 COX-2 선택적 억제제인 NS-398은 데옥시콜릭산에 의한 혈관내피 성장인자의 단백질발현은 억제하였으나, MMP-9의 활성화에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 COX-2는 데옥시콜릭산 유도에 의한 세포 외 기질의 분해를 통한 대장암의 침습성 억제보다는 혈관내피 성장인자와 관련된 혈관형성을 억제하는데 주로 관여함을 알 수 있었다.

우루소데옥시콜릭산(Ursodeoxycholic acid, UDCA)은 인체와 동물 모델에서 대장암 예방효과가 있음이 알려져 있다. 또한 우루소데옥시콜릭산은 최근 동물실험을 통하여 전체 장에서 발생하는 장종양의 수를 용량 의존적으로 감소시킴이 보고되었다.³⁸ 이러한 대장암 화학예방 효과의 기전으로 우루소데옥시콜릭산은 대장암 세포주에서 데옥시콜릭산에 의하여 유도되는 NF- κ B의 활성화를 억제하며,³⁹ azoxymethane (AOM) 대장암 모델에서 COX-2의 과발현을 억제함이 최근에 보고되었다.^{40,41} 그러나 대장암에서 우루소데옥시콜릭산의 세포 보호 및 대장암 화학예방 효과에 대한 많은 역학 및 실험 연구에도 불구하고, 이와 연관된 표적

분자와 세포 신호 전달 경로에 대하여는 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 실험 결과 우루소데옥시콜릭산의 수용성 형태인 TUDC는 데옥시콜릭산에 의하여 유도된 혈관내피성장인자 단백질의 발현을 일부 억제함으로써 데옥시콜릭산 매개 대장암 세포의 혈관형성 촉진을 억제 할 가능성을 보였다.

Protein kinase C (PKC) isoenzymes는 대장암 세포와 동물 모델에서 종양 세포의 증식을 관장하는 세포 신호전달 물질로 활성화되면 대장 종양을 촉진시킴이 밝혀져 있다.^{42,43} 특히 PKC는 대장 종양의 강력한 촉진인자로 알려진 phorbol myristate acetate (PMA)의 수용체 역할을 하며, *in vitro* HT-29 세포주에서 데옥시콜릭산은 PMA와 유사한 정도로 PKC를 활성화시킴이 알려져 있다.⁴⁴ 또한 최근에는 대장암 세포주에서 데옥시콜릭산에 의하여 유도된 PKC isoenzymes의 활성화가 우루소데옥시콜릭산에 의하여 억제됨이 보고되어 우루소데옥시콜릭산의 대장암 화학 예방기전 중의 하나로 제시되었다.⁴⁵ 본 연구 결과 인체 대변 내에서 관찰되는 저농도(100 μ M 이하)의 데옥시콜릭산은 대장암 세포의 증식과 이동성을 의미있게 증가시켰으며, PKC의 선택적 억제제인 GF109203X는 이 과정을 차단하여 PKC의 신호전달 억제 물질이 대장암 화학예방 약물로 개발될 가능성을 나타내었다.

결론적으로 데옥시콜릭산은 *in vitro* 대장암 세포주에서 세포의 이동성 증가, 저산소증유도인자-1 α mRNA의 발현 증가, 혈관내피성장인자 mRNA 및 단백질 발현 증가, MMP-9의 단백질 발현과 효소 활성화를 통하여 대장암 세포의 침습성을 증가시키는 것으로 생각된다. 아울러 데옥시콜릭산 매개에 의한 대장암 세포의 침습성 증가는 여러 신호 전달 물질의 억제제를 통하여 차단되어 이러한 신호 전달 억제 물질의 개발이 대장암의 침습억제를 통한 암 화학예방 약물로 작용할 가능성을 제시하였다. 본 연구는 세포 및 조직의 혈관형성과 침습성을 직접적으로 확인하지 못한 점, 세포 신호의 상 하위 조절기전을 트랜스펙션 등의 직접 방법이 아닌 간접 방법으로 확인한 점, 다양한 대장암 세포주를 대상으로 하지 못한 점 등의 제한점이 있어 후속 연구가 필요하나, 데옥시콜릭산이 대장암의 환경적 위험인자로서 대장 종양 촉진 뿐만 아니라, 대장암 침습과 혈관형성도 증가시킨다는 사실을 밝힘에 의미가 크다고 생각된다.

V. 결 론

데옥시콜릭산은 대장에서 종양 촉진인자로 알려져 있으나, 대장암의 침습과 전이에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없어, HT-29 대장암 세포에 데옥시콜릭산을 시간 및 농도별(0~80 μM)로 처리한 후 혈관내피성장인자와 저산소증유도인자-1 α mRNA 발현, 혈관내피성장인자 및 MMP-9의 단백 발현, MMP-9의 활성화 여부 및 세포의 이동성을 확인하였다. 또한 데옥시콜릭산 매개 대장암 세포주의 침습성 변화에 관여하는 신호전달 경로를 알아보기 위하여 이전에 알려진 대장암 관련 신호전달 억제물질의 전처리 후 변화를 확인한 바

1. 데옥시콜릭산 처리 24시간 후 세포의 생존능은 농도 증가에 따른 차이를 보여 저농도인 50~100 μM 에서는 생존능이 증가하였으나, 200 μM 이상에서는 50% 이하로 감소하였고, 400 μM 이상에서는 세포가 거의 생존하지 못하였다.
2. 데옥시콜릭산은 저산소증유도인자-1 α mRNA의 발현, 혈관내피성장인자-1 α mRNA 및 단백 발현을 증가시켰다
3. 데옥시콜릭산은 MMP-9의 단백 발현과 효소 활성화, 세포의 이동성을 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 데옥시콜릭산 자극 후 혈관내피성장인자 단백 발현의 증가는 COX-2의 선택적 억제제인 NS-398, NF- κ B의 억제제인 PDTC, 그리고 TUDC의 전처리로 억제되어 COX-2와 NF- κ B의 신호 전달경로가 관여함을 알 수 있었다.
5. 데옥시콜릭산 처리 후 MMP-9 단백 발현의 증가는 p38 MAP kinase 억제제인 SB203580(5~10 μM), ERK/MEK 억제제인 U0126(1~5 μM), 그리고 NF- κ B의 억제제인 PDTC(50~100 μM)에 의하여 농도 의존적인 발현 감소를 나타내어 이들 경로가 관여함을 간접적으로 알 수 있었다.
6. 데옥시콜릭산 자극 후 MMP-9의 효소 활성화는 p38 MAP kinase 억제제인 SB203580, ERK 억제제인 U0126, 그리고 PDTC의 전처리로 억제되어 이들 경로가 관여함을 간접적으로 알 수 있었다.
7. 데옥시콜릭산에 의해 세포 이동성이 증가하였으며, 이는 protein kinase C의 억제제인 GF109203X의 전처리로 감소되어 세포의 이동성 증가에 protein kinase C 신호 전달경로가 관여함을 간접적으로 알 수 있었다.

이상의 결과로 데옥시콜릭산은 대장암 세포주에서 세포의 이동성 증가, 저산

소증유도인자-1 α mRNA의 발현 증가, 혈관내피성장인자 mRNA 및 단백발현 증가, MMP-9의 단백발현과 효소 활성화를 통하여 대장암의 환경적 위험인자로서 대장 종양 촉진 뿐만 아니라, 대장암 세포의 침습성을 증가시키는 것으로 생각된다. 또한 데옥시쿨릭산 자극 후 대장암 침습성의 증가는 COX-2와 NF- κ B의 신호 전달 억제제나 암화학예방 약물인 TUDC를 통한 혈관내피성장인자 단백 발현의 억제, p38 MAP kinase, ERK/MEK, NF- κ B의 신호전달 억제를 통한 MMP-9의 활성화 억제, protein kinase C의 억제를 통한 세포 이동성 억제를 통하여 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Hill MJ, Drasar BS, Aries V, Crowther JS, Hawksworth G, Williams RE. Bacteria and aetiology of cancer of large bowel. 1971;1:95-100.
2. Reddy BS. Diet and excretion of bile acids. *Cancer Res* 1981;41:3766-3768.
3. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990;323:1664-1672.
4. Almond HR, Vlahcevic ZR, Bell CC Jr, Gregory DH, Swell L. Bile acid pools, kinetics and biliary lipid composition before and after cholecystectomy. *N Engl J Med* 1973;289:1213-1216.
5. McMichael AJ, Potter JD. Host factors in carcinogenesis: Certain bile-acid metabolic profiles that selectively increase the risk of proximal colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1985;75:185-191.
6. Morvay K, Szentleleki K, Torok G, Pinter A, Borzsonyi M. Effect of change of fecal bile acid excretion achieved by operative procedures on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Dis Colon Rectum* 1989;32:860-863.
7. Bayerdörffer E, Mannes GA, Richter WO, et al. Increased serum deoxycholic acid levels in men with colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1993;104:145-151.
8. Kamano T, Mikami Y, Kurasawa T, et al. Ratio of primary and secondary bile acids in feces: Possible marker for colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1999; 42:668-672.
9. Kondo Y, Arai S, Mori A, Furutani M, Chiba T, Imamura M. Enhancement of angiogenesis, tumor growth and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 2000;6: 622-630.
10. Berlin JD. Targeting vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Oncology (Huntingt)* 2002;16:13-15.
11. Ratcliffe PJ, O'Rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen sensing hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 1998;201:1153-1162.
12. Zhong H, De Marzo A, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia inducible

- factor-1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5835.
13. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:309-314.
 14. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 2000;60:6189-6195.
 15. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001;233:786-792.
 16. Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, et al. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinases. *Cancer* 2001;92:2680-2691.
 17. Fassina G, Ferrari N, Brigati C, et al. Tissue inhibitors of metalloproteases: Regulation and biological activities. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:111-120.
 18. Ornstein DL, Cohn KH. Balance between activation and inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is altered in colorectal tumors compared to normal colonic epithelium. *Dig Dis Sci* 2002;47:1821-1830.
 19. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-3968.
 20. Wong MP, Cheung N, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer* 1999;81:845-850.
 21. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999;274:6519-6525.
 22. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16:4604-4613.
 23. Zhong H, De Marzo A, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia inducible factor-1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5835.

24. Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res* 2000;60:6189-6195.
25. Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia-inducible factor (HIF- α) regulation. *Eur J Biochem* 2003;270:791-798.
26. Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 1999;284:808-812.
27. Himelstein BP, Canete-Soler R, Bernhard EJ, Dilks DW, Muschel RJ. Metalloproteinases in tumor progression: The contribution of MMP-9. *Invasion Metastasis* 1994;14:246-258.
28. Koumura H, Sugiyama Y, Kunieda K, Saji S. Significance in gene expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase-type plasminogen activator and tissue inhibitor of metalloproteinase for metastases of gastric and/or colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1997;24(Suppl 2):324-331.
29. Zeng ZS, Guillem JG. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br J Cancer* 1995;72:575-582.
30. Baker EA, Leaper DJ. Measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:24-29.
31. Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999;20:749-755.
32. Holten-Andersen MN, Christensen IJ, Nielsen HJ, et al. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:156-164.
33. Hyuga S, Nishikawa Y, Sakata K, et al. Autocrine factor enhancing the secretion of M(r) 95,000 gelatinase (matrix metalloproteinase 9) in serum free medium conditioned with murine metastatic colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54:3611-3616.
34. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase c and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988;334:661-665.
35. Yamauchi T, Watanabe M, Hasegawa H, et al. The potential for a selective cyclo-

- oxygenase-2 inhibitor in the prevention of liver metastasis in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 2003;23:245-249.
36. Sunayama K, Konno H, Nakamura T, et al. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in two different morphological stages of intestinal polyps in APC (Delta474) knockout mice. *Carcinogenesis* 2002;23:1351-1359.
 37. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Rev Cancer* 2001;1:11-21.
 38. Khare S, Cerda S, Wali RK, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits ras mutations, wild-type ras activation, and cyclooxygenase-2 expression in colon cancer. *Cancer Res* 2003;63:3517-3523.
 39. Shah SA, Volkov Y, Arfin Q, Abdel-Latif MM, Kelleher D. Ursodeoxycholic acid inhibits interleukin beta 1 and deoxycholic acid-induced activation of NF-kappa B and AP-1 in human colon cancer cells. *Int J Cancer* 2005 Aug 16;[Epub ahead of print].
 40. Earnest DL, Holubec H, Wali RK, et al. Chemoprevention of azoxymethane induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. *Cancer Res* 1994;54:5071-5074.
 41. Wali R, Khare S, Tretiakova M, et al. Ursodeoxycholic acid and F6-D3 inhibit aberrant crypt proliferation in the rat azoxymethane model of colon cancer: Roles of cyclin D1 and E-cadherin. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1653-1662.
 42. Doi S, Goldstein D, Hug H, Weinstein IB. Expression of multiple isoforms of protein kinase C in normal human colon mucosa and colon tumours and decreased levels of protein kinase c beta and eta mRNAs in the tumours. *Mol Carcinog* 1994;11:197-203.
 43. Perletti GP, Folini M, Lin HC, Mischak H, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 1996;15:847-854.
 44. Huang XP, Fan XT, Desjeux JF, Castagna M. Bile acids, non phorbol ester-type tumor promoters, stimulate the phosphorylation of protein kinase C substrates in human platelets and colon cell line HT29. *Int J Cancer* 1992;52:444-450.
 45. Shah SA, Looby E, Volkov Y, Long A, Kelleher D. Ursodeoxycholic acid inhibits translocation of protein kinase C in human colonic cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2005;41:2160-2169.

Abstract

Deoxycholic Acid induced Modulation of Colon Cancer Cell Invasiveness

Yong Gyu Lee

*Department of Medical,
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor **Hyun Soo Kim**)

Deoxycholic acid (DCA), a secondary bile acid, has been long implicated to promote colon tumor growth and progression; however, the molecular mechanisms of its action are largely unknown. In this study, we investigated the effects of DCA on colon tumor cells (HT-29) proliferation, migration, and invasiveness. In addition, we assessed the effects of various signal inhibitors on DCA induced modulation of colon tumor cell invasiveness.

HT-29 cells were incubated with either medium only (control) or DCA for 24~48 hr. Time courses of RT-PCR for vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-induced factor (HIF)-1 α mRNA expression, Western blotting for VEGF and matrix metalloproteinase (MMP)-9, zymography for MMP-9 activation, and wound-migration assay were determined after different concentrations of DCA (0~80 μ M) treatment. Moreover, these experiments were reassessed after pretreatments (2~6 hr) of specific inhibitors of various signal pathways.

DCA enhanced HIF-1 α mRNA expression, VEGF mRNA and VEGF protein expression, MMP-9 protein expression/activation, and cell migration ability in a dose-dependent manner. DCA-induced VEGF protein expression was inhibited by pretreatment of NS-398 (COX-2 inhibitor), PDTC (NF- κ B inhibitor), or tauroursodeoxycholic acid (TUDC). DCA-induced cell migration ability was inhibited by pretreatment of GF109203X, a

protein kinase C inhibitor. DCA-induced MMP-9 protein expression/activation was inhibited by pretreatment of SB203580, U0126, or PDTC.

DCA significantly upregulates invasive and angiogenic potentials in human colon cancer cells through multiple signal transduction pathways.

Key Words: Deoxycholic acid, HT-29 colon cancer cells, Invasiveness, Angiogenesis