

저등급 표재성 방광암의 재발에서
MMP의 분석과 전사체 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

안 현 수

저등급 표재성 방광암의 재발에서
MMP의 분석과 전사체 발현

지도 이 무 상 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004년 6월 1일

연세대학교 대학원

의 학 과

안 현 수

안현수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

년 월 일

감사의 글

대학원 입학부터 어려움이 있을 때마다 걱정해 주시고 어려움 속에서도 본 논문이 완성될 수 있도록 세심한 배려와 지도로 이끌어 주신 이 무상 교수님께 먼저 진심으로 감사를 드립니다.

실험과 논문 작성에 많은 도움을 주신 노 재경 교수님과 정 현철 교수님께 깊이 감사드립니다. 연구계획서부터 꼼꼼히 도움을 주시고 실험과 논문 작성에 크나큰 도움을 주신 최 영득 교수님과 조 남훈 교수님께 깊이 감사드립니다.

실험이 가능하도록 도움을 주신 이 미경께 깊이 감사드립니다. 무사히 학위를 마치도록 도움과 격려를 주신 양 승철 교수님을 비롯한 교실 여러분께도 깊이 감사를 드립니다.

본 논문이 잘 마무리 되기를 바라며 배려와 기원을 주었던 가족들에게 이 결실을 바칩니다.

2004. 6.

저자 씀

<차례>

그림 및 표 차례	· · · · ·	
국문요약	· · · · ·	1
I. 서론	· · · · ·	3
II. 재료 및 방법	· · · · ·	8
1. 실험재료	· · · · ·	8
2. 실험방법		
가. 0.12K cDNA array	· · · · ·	8
(1) 0.12K cDNA array 구조	· · · · ·	8
(2) RNA 추출	· · · · ·	9
(3) cDNA 합성	· · · · ·	9
(4) 0.12K cDNA array	· · · · ·	9
나. mRNA 발현 변화 측정	· · · · ·	10
다. 단백질 발현 측정	· · · · ·	11
3. 자료 분석 및 통계 방법	· · · · ·	11
III. 결과	· · · · ·	16
1. 임상 결과	· · · · ·	16
2. cDNA array에 의한 유전자 발현	· · · · ·	16
3. Real-time RT PCR를 이용한 유전자 발현	· · · · ·	16
4. Western blot 결과	· · · · ·	17
IV. 고찰	· · · · ·	26
V. 결론	· · · · ·	31
참고문헌	· · · · ·	32
영문요약	· · · · ·	40

그림 차례

그림 1. Pathology of bladder tumor	12
그림 2. Construction of 0.12K cDNA array	13
그림 3. Analysis of real-time RT PCR	15
그림 4. Image displaying 120 genes and cDNA array data of the representative superficial bladder cancer.	19
그림 5. Results of MMP quantified by microarray	20
그림 6. Representative results of real-time RT PCR of MMP-1, MMP-12, TGF β 1, and VEGF	21
그림 7. Results of real-time RT PCR	23
그림 8. Results of Western blots	24
그림 9. Graphic illustrating the comparative densitometric data for Western blot analysis	25
그림 10. MMP regulation in superficial low grade bladder cancer	30

표 차례

표 1. Classification of matrix metalloproteinases (MMPs) 7

표 2. Primer and probe oligonucleotide sequences used 14

표 3. Clinical summary of patients with superficial bladder tumor 18

국문요약

저등급 표재성 방광암의 재발에서 MMP의 분석과 전사체 발현

방광암은 전 세계적으로 남성암 중 4위, 여성암 중 8위를 차지하고, 국내에서는 남성암 중 5위를 차지할 정도로 흔한 종양이다. 방광암은 진단시 80%가 표재성 암으로 경요도절제술 및 방광내 항암요법 등의 보존적 요법으로 치유가능하며, 5년 생존율도 약 90%로서 예후가 비교적 양호하다. 그러나 표재성 방광암은 경요도절제술 및 방광내 항암요법 등의 보존적 요법에도 불구하고 장기 추적관찰시에 50-90%는 재발하고, 재발 시 20-30%는 침윤성이나 분화도가 더 나쁜 암으로 악성 진행된다. 임상적으로 표재성 방광암의 재발위험도가 높은 경우는 종양이 3개 이상의 다발성이거나, 3cm 이상으로 큰 경우, 분화도가 나쁜 경우, 상피내암이 존재하는 경우를 들고 있다. 실험적으로 방광암의 재발 및 악성진행의 위험도를 예측할 수 있는 방법으로는 암종의 유세포측정 (flow cytometry)과, Ki67, PCNA, ras gene 계열, p21, H-ras, K-ras, c-myc, c-ERF-2, EGF, EGF-R, p53, Rb 등의 인자에 대한 발현 관찰 등이 있다. 그러나 이러한 인자들은 대부분 저등급 분화도의 표재성 방광암에 비해 고등급 분화도나 침윤성에서의 의의있게 발현되며, 표재성 방광암에서 이들 인자들이 발현되는 경우 재발 및 악성진행에 관여하고 예후가 나쁜 것으로 보고되고 있다. 한편 저등급 분화도의 표재성 방광암의 경우 악성진행이나 전이되는 경우는 적으나 50%정도에서는 지속적 재발이 이루어지고 있다. 그러나 이러한 저등급 분화도 표재성 방광암의 재발 기전에 관한 연구는 미비하다.

이에 본 연구에서는 저등급 분화도의 표재성 방광암에서 재발에 관여하는 분자생물학적 인자를 밝히고자 하였다.

본 연구는 저등급 표재성 방광암의 재발군과 미-재발군의 환자 15명씩을 대상으로 하였다. 저등급 표재성 방광암으로 경요도절제술을 시행 후 6개월 이상의 추적 방광경검사서 종물이 보이며, 경요도절제술로 다시 병리조직학적으로 방광암이 진단된 경우를 재발군으로

분류하였고, 1년 이상 추적 방광경검사나 요세포검사에서 암의 증거가 없는 경우를 미-재발군으로 분류하였다.

저등급 표재성 방광암의 재발에 관여하는 전사체 발현을 규명하기 위하여 재발군과 미-재발군의 조직에서 MMP 및 종양유전자와 세포주기 조절유전자를 포함하는 0.12K cDNA array를 시행하여 의미있는 인자를 선택하였다. 재발군에서 의의있게 발현된 인자에 대해 mRNA 발현변화를 측정하고자 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; real-time RT PCR)을 시행하였으며, 단백 발현의 변화를 관찰하고자 Western blot을 시행하였다.

저등급 표재성 방광암 조직에서 0.12K cDNA array 결과를 분석한 결과 MMP-1, 2, 9, 12, 15, TGF β 1, VEGF와 fos 유전자가 미-재발군에 비해 재발군에서 유의있게 발현이 증가되었다.

이들 인자들에 대해 재발균과 미-재발균의 조직에서 real-time RT-PCR를 시행하여 mRNA 발현변화를 관찰한 결과 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF와 fos가 미-재발균에 비하여 재발균에서 유의있게 발현이 증가되었다. MMP-2, 9, 15는 재발균에서 발현이 증가되어 있는 경향을 보이나 통계적으로 의미는 없었다.

재발균과 미-재발균의 조직에서 Western blot을 시행하여 단백 발현을 관찰한 결과 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF와 fos가 미-재발균에 비해 재발균에서 유의있게 증가되었다

연구 결과 저등급 표재성 방광암에서 미-재발군에 비하여 재발군에서 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF 및 fos의 발현이 유의있게 증가하였으며, 저등급 표재성 방광암의 재발에는 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF 및 fos가 연관이 있는 것으로 여겨진다.

핵심되는 말 : 방광암, 표재성, 재발, cDNA, real-time RT PCR, MMP

저등급 표재성 방광암의 재발에서 MMP의 분석과 전사체 발현

<지도교수 이무상>

연세대학교 대학원 의학과

안 현 수

I. 서 론

방광암은 세계적으로 남성암 중 4위, 여성암 중 8위로 비교적 흔하다. 원인은 지역에 따라 차이가 있으나, 매년 수백만 명의 방광암이 발생하며, 평생 방광암 발생 위험은 남성 2.8%, 여성 1% 정도로 추정되고 있다.¹ 흡연, 주혈흡충 (schistosome) 감염, 염료 등의 화학물질, cyclophosphamide 등의 항암제, benzidine, phenacetin 등이 방광암 발생과 관련이 있다. 흡연시 형성되는 β -naphthylamine은 방광암 발생 주요 발암물질이며² 비흡연자에 비해 흡연자에서 방광암 발생이 4배 정도 증가하며,³ 여러 아민들에 노출되는 산업 종사자들도 방광암 발생이 높다.⁴

방광암은 조직학적으로 여러 형태가 있으나 이행상피세포암이 90%를 차지한다. 이행상피세포암은 조직병리학적 양상에 따라 암이 방광 근육에 침범되지 않은 경우를 표재성 방광암, 침범된 경우를 침윤성 방광암으로 구분하며, 임상 양상과 예후에 차이가 많다. 일반적으로 방광암은 진단시 80%정도가 표재성 방광암 (pTa 또는 pT1)이며, 20%정도는 침윤성 방광암 (T2-T4)이다. 침윤성 암의 경우 근치적 방광적출술이나 적절한 항암요법에도 불구하고 표재성에 비하여 빨리 악성진행하며 예후가 나쁘다.

표재성 방광암은 경요도절제술과 방광내에 항암제나 BCG (bacillus Calmette-Guerin)를 주입하는 보존적 요법으로 치유가능하며, 5년 생존율도 약 90%로 예후는 양호하다. 그러나 표재성 방광암은 적절한

경요도절제술 및 방광내 항암제나 BCG 주입에도 불구하고 장기 추적 관찰시 50-90%는 재발하고, 재발시 20-30%는 침윤성이나 분화도가 더 나쁜 암으로 악성 진행된다.

임상적으로 표재성 방광암에서 재발위험도가 높은 경우는 종양이 3개 이상의 다발성이거나, 3cm 이상으로 큰 경우, 분화도가 나쁜 경우, 상피내암이 존재하는 경우 등이며, 이러한 경우는 재발시 암의 악성 진행에도 유의한 영향을 미친다.^{5,6}

표재성 방광암에서 재발과 악성진행은 밀접한 관계를 보여 암의 재발시에 침윤과 전이가 나타나기도 한다. 표재성 방광암의 재발과 침윤 및 전이 등의 악성진행에 영향을 미치는 중요한 인자로 조직학적 분화도를 들 수 있다. 분화도에 따른 방광암의 재발 및 악성진행 정도는 분화도 I의 경우 10-20%, 분화도 II 19-37%, 분화도 III 33-64%로써 분화도가 증가할수록 방광암의 재발과 악성진행이 많다.^{7,8} 즉 고등급 분화도 (분화도 III)는 저등급 분화도 (분화도 I, II)에 비해 재발이나, 침윤 및 전이 등의 악성진행이 의의있게 많다.^{9,10} 임상 경험으로 고등급 분화도의 표재성 방광암에서는 적절한 경요도절제술과 방광내 항암제나 BCG 등의 투여에도 불구하고 80% 이상에서 재발하며, 재발시에 50% 이상이 침윤성으로 악성 진행된다. 그러나 저등급 분화도 표재성 방광암에서는 적절한 경요도절제술과 방광내 항암제나 BCG 등의 투여로 재발은 50% 정도로 나타나나, 악성 진행되는 경우는 단지 2-11%에 불과하다. 즉 저등급 표재성 방광암은 악성 진행없이 재발되는 경우가 많다.

실험적으로 방광암의 재발 및 침윤, 악성진행의 위험도를 예측할 수 있는 방법으로는 유세포측정 (flow cytometry)과 Ki67, PCNA, ras gene 계열, p21, H-ras, K-ras, c-myc, c-ERF-2, EGF, EGF-R, p53, Rb 등의 조직학적 발현 관찰 등이 있다.¹¹⁻¹⁸ 이외에 일부 T 항원, ABO 항원 등의 세포표면항원검사들도 알려져 있다.¹⁹⁻²¹ 현재 방광암의 재발과 악성진행 및 예후 척도로 보편적으로 활발히 시행되는 방법은 종양억제유전자로 알려진 p53에 대한 연구이다. 방광암과 p53의 연구결과를 종합하면 표재성에 비해 침윤성에서 p53 변이 발생빈도가 높고, 저등급 분화도 암에 비해 고등급 분화도 암에서 p53 변이 발생

빈도가 높다. 따라서 p53의 변이가 나타나는 경우 재발과 악성진행의 빈도가 높고, 예후가 나쁘다. p53 외의 상기 많은 인자들도 대부분 저등급 표재성 방광암에 비해 고등급이나, 침윤성 방광암에서 의의있게 발현됨이 보고되고 있다. 즉 방광암의 예후 및 재발, 악성진행에 관하여 연구된 많은 인자들은 대부분 저등급 분화도의 표재성 방광암에 비해 고등급 분화도나 침윤성에서 의의있게 발현됨이 보고되며, 발현 관찰시 재발 및 악성진행에 관여하고 예후가 나쁜 것으로 보고되고 있다. 따라서 현재까지 연구된 방광암의 재발과 악성진행에 관여하리라 여겨지는 많은 인자들은 저등급 분화도의 표재성 방광암에서는 발현이 적거나 없다. 이에 악성 진행이나 전이되는 경우는 적으나 50% 정도에서는 재발이 이루어지는 저등급 분화도의 표재성 방광암에서 악성 진행없이 발생하는 재발에 관한 기전은 알려져 있지 않다.

암의 재발, 침윤 및 전이는 정상 세포의 기저막과 세포외 간질에 대한 암세포의 파괴능력과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.²²⁻²⁵ 세포외 간질 단백질로는 proteoglycan, fibronectin, laminin, type IV collagen 등이 있으며, 이들은 세포의 유착에 관여한다. Matrix metalloproteinases (MMPs) family는 세포외 간질 단백 분해효소로 현재까지 23종류가 밝혀져 있고, 외부 신호에 의해 유전자가 발현되는 유도 유전자로도 알려져 있다 (Table 1).²³ 이러한 MMPs는 조직 특이적이며, 기질파괴 작용에서 세포간에 상대적인 매개체 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.²²⁻²⁵ 종양과 관련하여 MMPs는 재발에 관여하고, 기저막 용해, 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성 관여 등으로 전이에 관여하는 것으로 알려지고 있다.^{22,26,27}

MMPs와 종양관련 연구에서 Collagenase-1 (MMP-1), 2 (MMP-8), 3 (MMP-13)의 collagenase군과, gelatinase A (MMP-2), B (MMP-9)의 gelatinase군, matrilysin (MMP-7), stromelysin-3 (MMP-11), MT1-MMP (MMP-14) 등이 유방암,^{28,29} 대장암,³⁰ 난소암,³¹ 전립선암,³² 방광암³³⁻⁴² 등의 다양한 암에서 연구되고 있다. 방광암의 경우 MMP-2, TIMP-1, 2 등이 표재성 방광암의 재발과 관련이 있다는 보고^{33,41,42}와 MMP-2, 7, 9 등이 고등급 분화도 방광암에서 침윤이나 전이에 관여한다는 보고가 있다.³⁷⁻⁴¹ 즉 표재성 방광암의 재발

에 MMP가 관여하리라 여겨지나 현재까지의 연구는 침윤성 혹은 고등급 분화도의 방광암 재발과 악성진행에 관여한다는 보고뿐이다.

이에 본 연구에서는 악성진행이나 전이되는 경우는 적으나 재발이 잦은 저등급 분화도 표재성 방광암에서 초기 재발을 유도하는 전사체 발현을 관찰하여 저등급 분화도의 표재성 방광암의 재발 기전을 규명하고자 하였다. 저등급 분화도 표재성 방광암 조직을 이용하여 MMP와 일부 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등을 포함하는 cDNA microarray를 시행하여 재발에 관여하리라 여겨지는 의미있는 인자를 선택하고, 재발군에서 의의있게 발현된 인자에 대해 mRNA 발현과 단백질 발현의 변화를 확인하고자 하였다.

Table 1. Classification of matrix metalloproteinases (MMPs)

MMP subfamily	MMP number	MMP name
Collagenases	1	Interstitial collagenase
	8	Neutrophil collagenase
	13	Collagenase-3
Gellatinases	2	72KDa Type IV gellatinase
	9	92KDa Type IV gellatinase
Stromelysins	3	Stromelysin-1
	10	Stromelysin-2
	11	Stromelysin-3
	18	Putative MMP
Membrane type MMP	14	MT1-MMP
	15	MT2-MMP
	16	MT3-MMP
	17	MT4-MMP
	24	MT5-MMP
	25	MT6-MMP
Other MMPs	7	Metrilysin (PUMP-1)
	26	Metrilysin-2, Endometase
	12	Macrophge elastase
	19	Rheumatoid arthritis associated MMP
	20	Enamelysin
	21	Recent cloned MMP
	22	Recent cloned MMP
	23	Recent cloned MMP

Modified from Curran S, Murray GL: Eur J Cancer. 2000;36:1621-1630

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

2001년 3월부터 표재성 방광암으로 진단된 환자에서 경요도적방광종양절제술을 시행한 조직을 대상으로 하였다. 대상은 조직학적으로 재차 확인하여 이행상피세포암으로 저등급 분화도인 것만을 사용하였으며 (Fig. 1), 15명의 재발군과 15명의 미-재발군으로 분류하였고, 절제된 방광암 조직은 즉시 동결시킨 후 영하 80℃에 보관하여 실험에 사용하였다

재발군은 경요도방광종양절제 조직에서 조직학적으로 이행상피세포암으로 진단되고 6개월 이상의 추적관찰 방광경에서 조직학적으로 이행상피세포암이 관찰된 경우로 하였다. 미-재발군은 경요도방광종양절제 조직에서 조직학적으로 이행상피세포암으로 진단되고 1년 이상의 추적 관찰에서 방광경 및 요세포검사에서 암의 증거가 없는 경우로 하였다. 흉부단순촬영, 복부 골반 전산화 단층촬영, 자기공명촬영, 골주사검사 등에서 침윤이나 전이가 있는 암의 경우나, 조직학적으로 침윤성으로 진단된 경우는 본 연구에서 제외하였다. 방광암의 추적관찰은 경요도방광종양절제술로 진단 후 요검사, 요세포검사, 방광내시경검사를 3-6개월 간격으로 시행하였다.

대상 환자의 종양 병기 및 분화도는 UICC (Union Internacional Contra la Cancrum) 국제기준에 따라 분류하였으며, 임상 결과는 임상 기록을 분석하였다. 임상적인 인자로 성별, 연령, 조직학적 소견, 재발, 무병기간, 생존기간 등을 재발군과 미-재발군으로 나누어 비교하였다.

2. 실험방법

가. 0.12K cDNA array

(1) 0.12K cDNA array 구조

전사체 발현을 규명하기 위하여 MMP 1, 2, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 19와 TIMP1, 3의 MMP와 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등 120개의 유전자가 포함된 DNA 칩 (Digital Genomics, Seoul, Korea; <http://www.digital-Genomics.co.kr>)을 사용하였다 (Fig. 2).

(2) RNA 추출

방광암 환자의 동결 보관된 조직으로부터 Chirgwin 등⁴³이 사용한 방법으로 Ultraspec II (Biotecx Lab., Houston, TX, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 260nm 흡광도에서 정량하였고, 일부는 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 'Lab On a Chip' (developed by Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, in co-operation with Caliper Technologies, Mountain View, California, USA) 법으로 정량 분석을 하여 RNA 비율이 1 이상인 mRNA 만을 취하여 microarray에 사용하였다.

(3) cDNA 합성

cDNA 합성은 Kotewicz 등⁴⁴이 사용한 방법을 이용하여 Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. 80pmol random primer 1 μ l, 400ng total RNA 2 μ l, 2.5mM dNTP mix 4 μ l, 증류수 5 μ l를 넣어 섞은 후, 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 둔 다음에 얼음에 방치하였다. 여기에 5x First-Strand buffer 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 두었다. 이후 Superscript II Reverse Transcriptase 1 μ l를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 두어 cDNA를 합성하였다.

(4) 0.12K cDNA array

cDNA microarray는 Genisphere 3DNA kit (Genisphere Inc., Hatfield, PA, USA)를 이용하였다. Iyer 등⁴⁵이 사용한 방법을 이용하여 약 5 μ g의 total RNA를 Amino allyl cDNA labeling kit (Ambion, Austine, TX, USA)를 사용하여 암조직은 Cy3-dUTP로, 정상 조직은 Cy5-dUTP로 표식하고, cDNA를 합성하였다. 추출한 RNA (1 μ g/1 μ l) 5 μ l에, Random Primer 2.5 μ l, Neclease Free Water 3.5 μ l로 섞어 8

0℃에서 10분간 반응시키고 얼음에서 1 μ l Suprase-In RNase inhibitor와 reaction mix (5x SuperScript II First Strand Buffer 4 μ l, dNTP mix 1 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, Superscript II enzyme 1 μ l)를 첨가하여 42℃에서 1.5-2시간 반응시켰다. 0.5M NaOH/50mM EDTA 3.5 μ l로 반응을 멈춰준 후, 65℃에서 10분간 반응시키고 1M Tris-HCl, pH7.5 5 μ l로 중화시킨 뒤 10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA 21.5 μ l를 첨가하였다.

Qiagen QIAquick PCR purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)로 cDNA를 정제하고 denature된 cDNA 50 μ l, 6x Ligation Mix (green=Cy3 or red=Cy5) 10 μ l, T4 DNA Ligase 2.5 μ l를 섞어 15-25℃에서 1.5-2시간 반응시키고, 0.5M EDTA 7 μ l로 반응을 멈춘 뒤, 65℃에서 10분간 반응시키고, 전체 부피 150 μ l가 되게 하였다.

Microconcentrators (Millipore Microcon YM-30; Millipore Corp., Bedford, MA, USA)로 cDNA를 농축하고 농축된 cDNA가 10 μ l가 되도록 Nuclease Free Water로 맞춰준 후 65℃에서 10분간 반응 후 2x SDS-Based Buffer 12.5 μ l, Array 350RP DT Blocker 2 μ l를 섞고, humidified chamber에 넣어 65℃에서 16시간 방치하였다.

65℃ 2x SSC, 0.2% SDS로 15분, 2x SSC로 10-15분, 0.2x SSC로 10-15분간, 95% ethanol에서 2분간 수세 건조 후 2x Hybridization buffer 12.5 μ l, 50-55℃에서 10분간 가온시켜 놓은 3DNA Captur Reagent 5.0 μ l, Nuclease Free water를 섞어 75-80℃에서 10분, 55-60℃에서 15-20분간 반응시켜주고 microarray에 도말 후 coverslip을 덮었다. 60℃에서 3시간 융합반응을 시킨 후 45-50℃ 2x SSC, 0.2% SDS 15분, 2x SSC 10-15분, 0.2x SSC 10-15분 수세하였다.

Scan array (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA, USA)을 이용하여 해독한 후, Quantarray (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA, USA) 프로그램으로 데이터를 분석하였다.

나. mRNA 발현 변화 측정 (real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction 방법; real-time RT PCR)

Real-time RT PCR은 Liss 등⁴⁶이 제시한 방법을 사용하여

TaqMan Mastermix (Applied Biosystems, Forester City, CA, USA) 10 μ l, primer 1 μ l, cDNA 2 μ l, 증류수 7 μ l를 혼합하여, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)을 사용하여 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분간 증폭하였다.

본 실험에 사용된 primer는 FAM이 부착되어있으며 (Table 2), 모든 자료들은 3중 분석하여 최종 CT값을 산출하였으며, 각 샘플에 대한 18s mRNA의 CT값으로 보정하여 데이터를 분석하였다. (Fig. 2)

다. 단백 발현 측정 (Western blot 방법)

대상 조직을 단백질 분해 효소 억제제인 pepstatin (0.7mg/ml)이 첨가된 용해 완충액 (1M tris-Cl, 0.5M NaCl, 0.5M EDTA) 500 μ l에 넣어 4℃에 30분 동안 반응시켜 세포를 용해시켰다. 이후 14,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 Smith 등⁴⁷이 사용한 BCA법에 의하여 정량한 후 NuPAGE Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 각 lane에 20 μ g의 단백질을 넣어 전기영동을 시행하고, 이를 NC membrane에 전이시켰다. 모든 항체반응은 비특이적인 반응차단용액 (5% skim milk, in 1% Tween-20 in Tris-buffered saline)에서 시행하였다. 단백질이 이전된 membrane을 먼저 차단용액에 담가 상온에서 1-2시간 반응시키고 각각의 일차 항체를 1:200으로 희석하여 37℃에서 30분간 반응 후 세척과정을 거치고 이차항체를 이용하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 Chemoluminescent (ECL detection reagent, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 단백 발현을 측정하였다.

발현된 단백질의 상대적 정량을 위하여 TINA program (v 2.1)을 이용한 Densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 산출하였다.

3. 자료 분석 및 통계 방법

통계 분석으로는 비교분석을 위하여 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였다. 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였고, 단변량 분석은 SAS Windows의 log-rank test를 이용하였다.

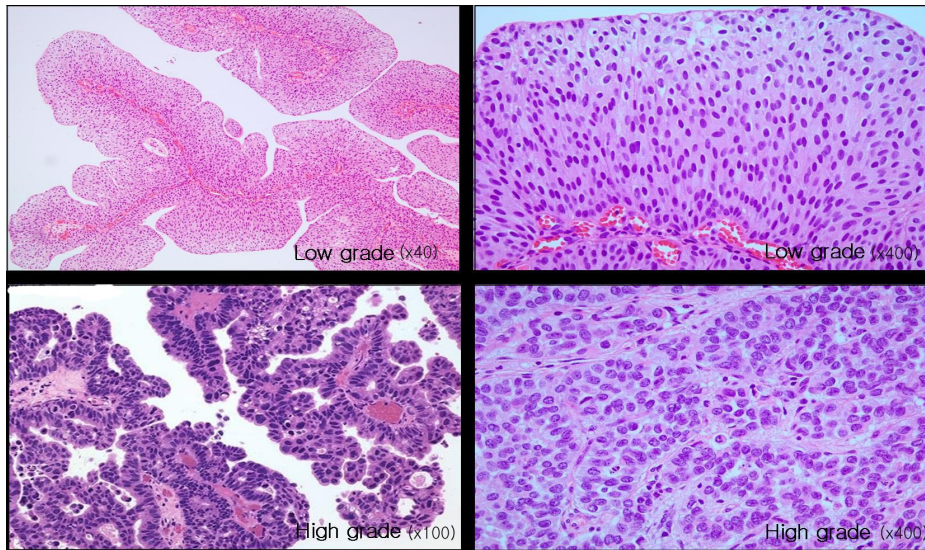


Fig. 1. Pathology of bladder tumor (H&E stain)

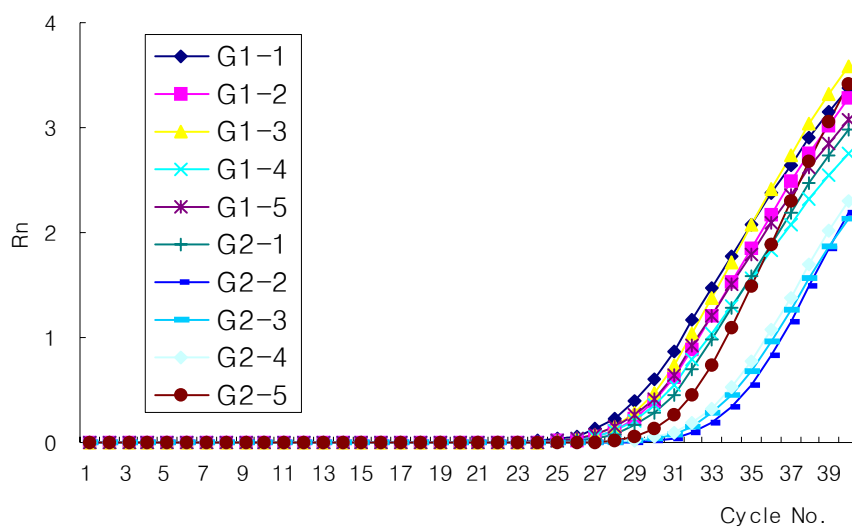
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	MMP1	MMP2	MMP7	MMP9	MMP10	MMP10	MMP11	MMP11	MMP12	MMP13	MMP14	MMP15
2	MMP16	MMP16	MMP19	TIMP1	TIMP3	ECGF1	FGFR4	FGFR2	p53R2	DDA3	REPRIMO	PA26
3	PIG1	TP53	MDM2	TP63	Rb1	RPA2	IL12A	CDKN1A	PAK4	ACK1	CDKN1B	CDKN1C
4	CDKN2A	CDKN2D	PCNA	CD44	BAP1	BRAP	BARD1	BRCA1	--	--	PTEN	FOS
5	FOSL2	FOSB	FIGF	JUNB	JUN	MYBL2	DMTF1	MYBL1	MYB	DDX18	RCL	NDRG1
6	MAZ	MYCN	MYCBP	PVT1	DDX18	CCNA1	CCNB1	CCNB2	CCNB3	CCND1	CCND2	CCND3
7	CCNE1	CCNE2	CCNG1	CCNG2	CGH1	CCNH	E2F1	E2F2	E2F3	E2F5	CDK2	CDK3
8	CDK5R1	CDK5R1	CDK7	CDK8	CDK9	TERT	TGFBR2	TGFBR3	TGIF	TGIF2	TGFB3	TIEG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	TIAF1	TGFB1	TGFB2	TRAP-1	TGF α	TIEG2	TGFBR1	NFK-B	NFK-B	VHL	WT1	VEGF
2	VEGFB	VEGFB	VEGFC	EGFR	ACTB	PKD2	UBC	YWHAZ	RPL13A	Yeast9-1	Yeast2-2	Yeast3-1
3	Yeast4-1	pR-luc										

Fig. 2. Construction of 0.12K cDNA array. Mainly composed of MMPs, oncogenes and cell-cycle-related genes (Digital Genomics, Seoul, Korea; <http://www.digital-Genomics.co.kr>).

Table 2. Primer and probe oligonucleotide sequences used

Gene Name	TaqMan Primers Cat. No.
MMP-1	Hs00176481_m1
MMP-2	Hs00234422_m1
MMP-9	Hs00234579_m1
MMP-12	Hs00159178_m1
MMP-15	Hs00233997_m1
TGF β 1	Hs00610319_m1
VEGF	Hs00173634_m1
fos	Hs00170630_m1

MMP-1



	CT	18S mRNA	Δ CT	$\Delta \Delta$ CT	$2^{-\Delta \Delta CT}$
5	25.98	7.54	18.44	0.00	1.00
1	23.60	6.32	17.48	-0.96	1.94
2	24.84	7.05	18.36	-0.08	1.06
3	24.94	5.92	18.96	0.52	0.69
4	27.12	5.64	21.49	3.05	0.12
5	26.02	8.07	18.44	0.00	1.00
6	28.79	8.22	20.57	2.14	0.23

Fig. 3. Analysis of real-time RT PCR. Analysis of TaqMan assays to determine optimum primer and TaqMan probe concentration. CT values was calculated (defined as the cycle at which a statistically significant increase in ΔR_n is first detected).

CT: threshold cycle, Δ CT: $C_{T.X} - C_{T.R}$, $\Delta \Delta$ CT: $\Delta CT.q - CT.cb$

Relative: $2^{-\Delta \Delta CT}$

III. 결과

1. 임상 결과

15명씩의 재발군과 미-재발군의 표재성 방광암은 모두 이행상피세포암이며, 저등급 분화도였다. 재발군의 경우 남성 12명 여성 3명이었고, 미-재발군의 경우 남성 13명, 여성 2명이었으며, 이들의 평균 연령은 재발군이 68.0세, 미-재발군이 54.4세 이었다 (Table 3).

미-재발군의 추적관찰기간은 평균 27.2개월 (16.8-41.6개월)이었으며, 재발군의 재발 기간은 평균 11.2 개월 (6.0-20.6개월)이었다.

2. cDNA array에 의한 유전자 발현

저등급 분화도 표재성 방광암의 재발에 관여하는 전사체 발현을 규명하기 위하여 MMP-1, 2, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19와 TIMP1, 3의 MMP와 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등 120개의 유전자가 포함된 DNA 칩을 사용하여 재발군과 미-재발군을 비교하였다. 0.12K cDNA array의 분석에서 각 군 15개 조직의 평균값을 비교하면, MMP-1은 normalized ratio가 재발군에서 5.163 ± 1.374 로 미-재발군의 1.993 ± 0.478 보다 유의있게 발현이 증가되어 있었고, MMP-2, 9, 12, 15 및 TGF β 1, VEGF, fos의 발현도 미-재발군에 비해 재발군에서 유의있게 증가하였다 (Fig. 4, 5).

3. Real-time RT PCR를 이용한 유전자 발현

상기의 0.12K cDNA array 분석결과 재발군에서 유의있게 발현 증가가 관찰된 인자 MMP-1, 2, 9, 12, 15 및 TGF β 1, VEGF, fos에 대해 real-time RT PCR을 시행하여, 18s mRNA에 대한 상대적인 비율을 측정하여 비교하였다. 각 군 15개 조직의 평균값을 비교하면, MMP-1은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값이 재발군에서 0.971 ± 0.473 으로 미-재발군의 0.181 ± 0.008 보다 유의있게 높아 mRNA의 발현이 증가되어 있었고, MMP-12, TGF β 1, VEGF 및 fos에서도 미-재발군에 비해 재발군에서 유의있게 높았다 (Fig. 6, 7). 한편 MMP-2의 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값이 재발군에서 0.219 ± 0.436 으로 미-재발군의 0.007 ± 0.008 과 비교하여 비율이 증가하

였으나, 의미있는 차이를 보이지 않았고, MMP-9, 15의 경우도 18s mRNA에 대한 상대적인 비율이 증가하였으나 통계적 유의성은 없어, MMP-2, 9, 15의 mRNA의 발현은 재발군에서 미-재발군과 비교하여 의미있는 증가가 없었다 (Fig. 7)..

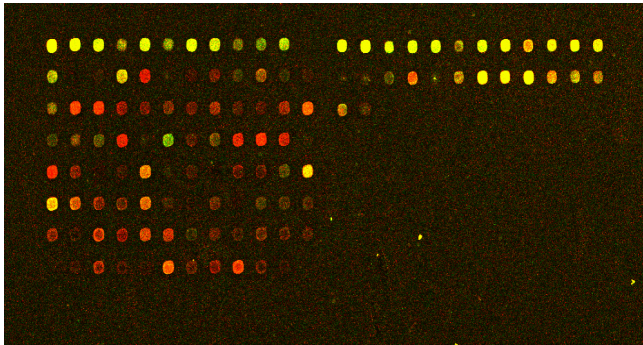
4. Western blot 결과

Real-time RT PCR 에서 재발군에서 mRNA 발현이 의미 있게 증가한 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF 및 fos에 대해 재발군과 미-재발군의 조직에서 Western blot을 시행하여 이들 인자들의 단백질 발현변화를 관찰하였다. 단백 발현밀도를 동일 조건의 배경농도로 보정하여 밀도분석을 통해 정량분석을 시행한 결과 각 군 15개 조직의 평균값을 비교하면, MMP-1의 경우 Densitometer로 구한 값이 재발군에서 34.871 ± 4.688 로 미-재발군의 30.841 ± 2.192 보다 유의있게 높아 단백 발현이 증가되어 있었고, MMP-12, TGF β 1, VEGF 및 fos도 Densitometer로 구한 값이 유의있게 높아, 5개 인자가 Western blot에서도 단백 발현이 유의있게 증가되었다 (Fig. 8, 9).

Table 3. Clinical summary of patients with superficial bladder tumor

	Recurrence (n=15)	No recurrence (n=15)
Sex		
Male/Female	12/3	13/2
Age (mean±SD)(year)	68.0±4.7	54.4±10.8
Follow up		
DFT (mean±SD)(month)	11.2±3.7	27.2±4.3

DFT; disease free time



Item	Recurred/Ctl	Non recurred/Ctl
MMP-1	6.3528	1.333831842
MMP-2	4.4633	1.406863031
MMP-9	4.8189	1.154281897
MMP-12	4.0328	1.073182842
MMP-15	7.0309	0.562364877
TGFβ1	3.9411	0.68515266
VEGF	10.0881	1.041406594
fos	8.3395	0.913929129

Fig. 4. Image displaying 120 genes and cDNA array data of the representative superficial bladder cancer. When labeled with Cy3-dUTP in the cancer samples and Cy5-dUTP in the normal samples, upregulated genes in the cancer samples are seen in green fluorescence (Cy-3) and downregulated genes in red fluorescence (Cy-5). The blanks filled with green color represent upregulated genes more than 2.0 of threshold value in the cancer. MMP-1, 2, 9, 12, TGFβ1, fos and VEGF are upregulated in the recurrent samples when compared with the nonrecurrent samples.

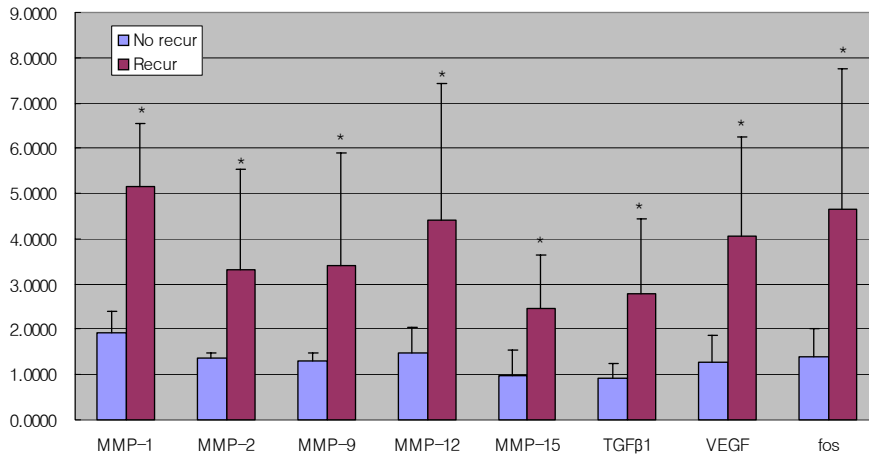


Fig. 5. Results of MMP quantified by microarray. Intensity of relative signal for each sample was calculated and presented. Expressions of MMP-1, 2, 9, 12 and 15 with TGFβ1, VEGF and fos were upregulated in recurrent superficial low grade urothelial cancer as compared with non-recurrent superficial low grade urothelial cancer. Columns and bars represent mean and SD, respectively. * $p < 0.05$

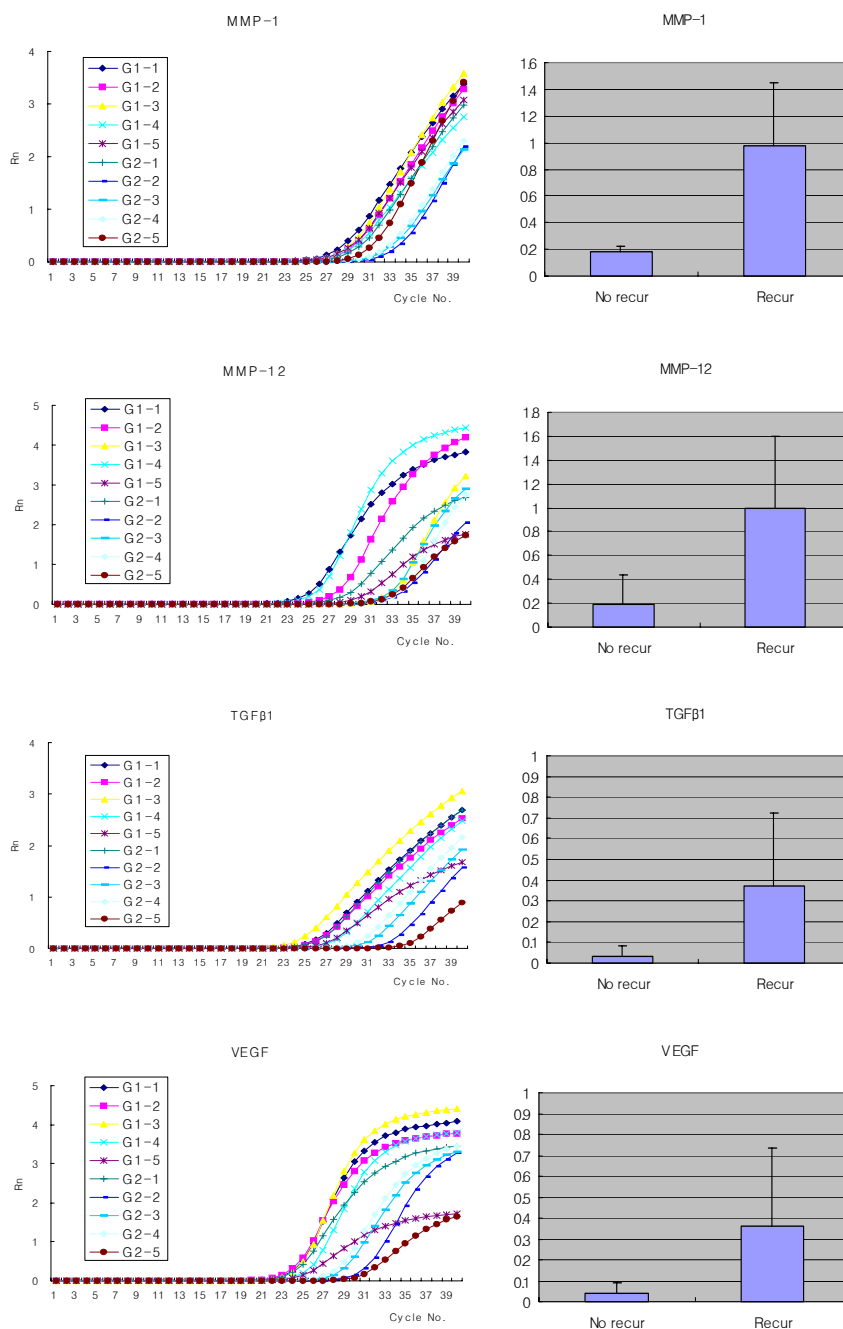


Fig. 6. Representative results of real-time RT-PCR of MMP-1, MMP-12, TGFβ1, and VEGF. Results of TaqMan assays to

determine optimum primer and TaqMan probe concentration. Normalized fluorescence values (ΔR_n) on the X-axis. Amplification plot for RT-PCR of MMP-1, MMP-12, TGF β 1, and VEGF is shown as a calibration curve, depicting normalized fluorescence values (ΔR_n) plotted against the number of amplification cycles. Lanes G2 (1-5) show a tendency toward higher CT and lower ΔR_n than lanes G1 (1-5) (lanes G1, recurrent samples; lanes G2, norecurrent samples). Columns and bars represent mean and SD of $2^{-\Delta \Delta CT}$, respectively.

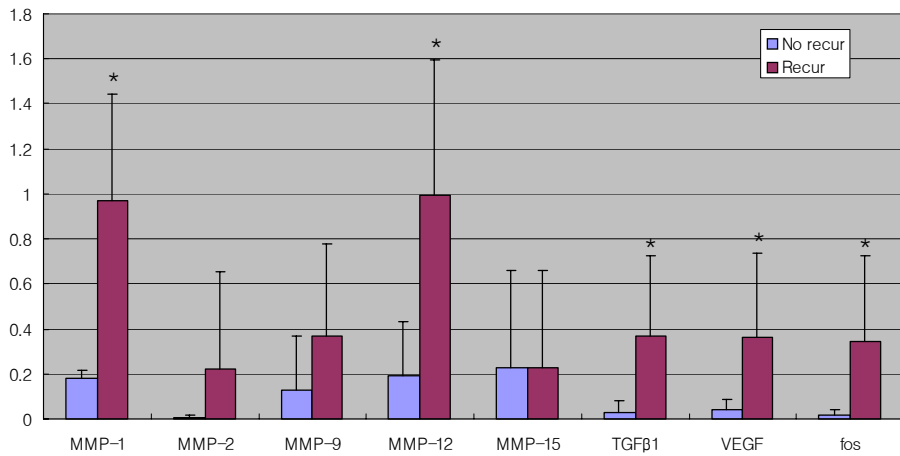


Fig. 7. Results of real-time RT PCR. The transcripts of MMP-1, 12, TGFβ1, VEGF and fos were significantly overexpressed in recurred samples than in the nonrecurred samples. The expression of MMP-2, 9, and 15 were overexpressed, but not statistical significant. Columns and bars represent mean and SD of $2^{-\Delta\Delta CT}$, respectively. * $p < 0.05$

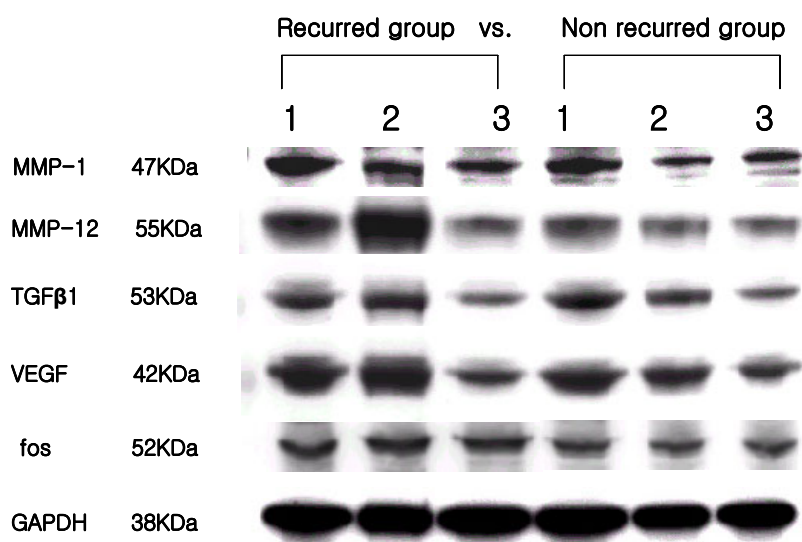


Fig. 8. Results of Western blot. Note the upregulated expression of MMP-1, MMP-12, TGFβ1, VEGF and fos in the recurrent samples vs nonrecurrent samples.

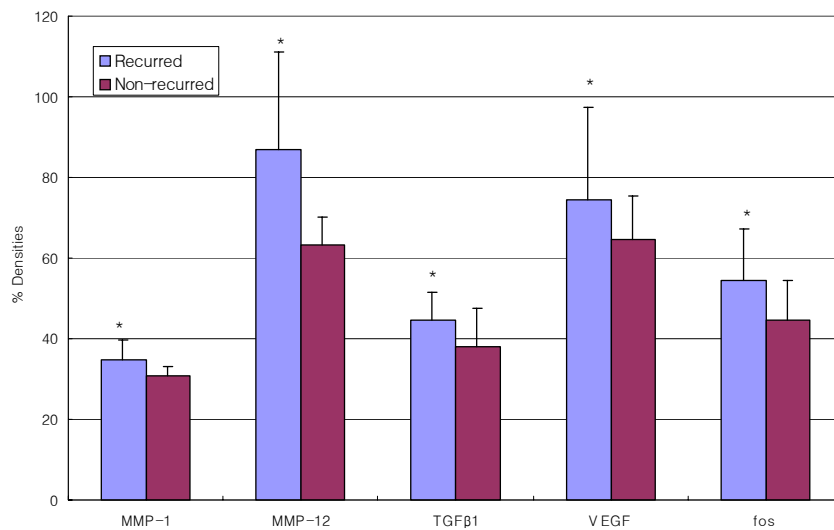


Fig. 9. Graphic illustrating the comparative densitometric data for Western blot analysis, detected with antibodies to MMP-1, 12, TGFβ1, VEGF and fos. Comparative bands shows mean±SD determined by densitometry, respectively, * $p < 0.05$

IV. 고찰

MMP는 세포외 간질을 용해하는 효소로 일반적으로 암조직에서 발현이 증가되며 특히 암과 정상 조직과의 경계 부위에서 발현이 많이 나타나는 것으로 알려져 있다.²⁴ 암의 전이와 관련하여 초기에는 기저막 용해 등 삼출에 관여하는 것으로 여겨졌으며,²⁶ 최근에는 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성에 직접 관여하여 전이에 미치는 영향이 있는 것으로 보고되고 있다.²² 이러한 MMPs에서 MMP-1, 2, 7, 8, 9, 11, 13, 14 등이 유방암,^{28,29} 대장암,³⁰ 난소암,³¹ 전립선암,³² 방광암³³⁻⁴² 등의 다양한 암에서 연구되고 있으며, 특히 MMP-2와 9는 기저막의 주요 구성인 type IV collagen을 분해하여 암의 침윤과 전이를 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁸ 그러나 이러한 MMPs들은 주로 고병기 및 악성 진행암에서 발현이 증가되어 있는 것으로 보고되고 저병기, 저등급에서는 발현이 적은 것으로 보고되고 있다.

MMP-1은 interstitial collagenase로, 원섬유성 교원질 I, II, III, 및 X형에 작용한다. MMP-1은 Ewing 육종에서 발현이 증가된다는 보고⁴⁸와 대장암에서 발현이 증가되었다는 보고⁴⁹가 있었으며, Nagata 등⁵⁰은 구강내 편평상피암에서 임파선 전이의 지표가 될 수 있다고 주장하였다. 방광암에서는 Nakopoulou 등³⁴이 저등급, 저병기 방광암에 비하여 고등급, 고병기의 경우에 발현이 됨을 보고하였다.

MMP-12는 macrophage elastase로, 주로 큰 대식세포에서 분비되어 탄력소를 분해하는 작용을 가지고 있다. Kerkela⁵¹ 등은 피부암에서 MMP-12의 mRNA 및 단백 발현이 되나, 전암성 병변에서 발현되지 않아 역분화와 관련이 있을 것이라고 제시하였고, 여성외음부 편평상피암에서 암세포의 MMP-12 발현은 종양의 침습도와 연관이 있으나, 한편 큰 대식세포에서 발현되는 MMP-12는 좋은 예후와 관련이 있다는 보고도 하였다.⁵² MMP-12와 혈관생성과의 연구로 간세포암에서 MMP-12는 VEGF와 연관되어 혈관형성과의 관련이 있다는 보고도 있고,²⁷ 일부 실험에서는 MMP-12가 혈관생성을 억제시킨다는 보고도 있다.⁵³

방광암과 MMP에 대한 연구로서 Nakopoulou 등³⁴은 MMP-1과

MMP-3을 관찰한 결과 MMP-3에 비하여 MMP-1이 발현되는 경우 방광암의 악성진행이 나타나고, 특히 MMP-1은 고분화도 방광암에서 발현이 의의있게 나타남을 보고하고 있다. Sumi 등³⁵도 방광암에서 MMP-2는 고등급 분화도와 병기가 높을 때 발현이 증가함을 보고하였고, MMP-7은 고등급 분화도의 경우 발현이 증가하나, 저등급 분화도의 경우는 병기에 관계없이 발현이 증가되지 않음을 보고하였다. Xu 등³⁶도 MMP-2는 고등급 분화도 및 고병기 방광암에서 발현이 증가됨을 관찰하였으며, MMP-2/TIMP-2의 비가 정상 조직에 비해 방광암 조직에서 증가되어 있음을 보고하고 있다. Papathoma 등³³은 고등급 분화도 및 고병기의 방광암에서 MMP-2와 MMP-9의 발현이 의의있게 증가됨을 보고하고 있고, Gerhard 등⁴⁰은 방광암 환자의 소변에서 MMP-2와 MMP-9를 측정된 결과 고등급 분화도 및 고병기의 방광암에서 소변내 MMP-2 및 MMP-9가 증가됨을 보고하였다.

한편 방광암의 재발과 관련된 MMPs의 연구로 Hara 등⁴¹은 표재성 방광암에서 MMP-2와 9, MT1-MMP, TIMP-1과 2의 발현을 측정하여 재발군이 미-재발군에 비하여 MMP-9와 TIMP-2의 발현이 증가되어 있음을 보고하여 표재성 방광암의 재발에 MMP-9가 관여함을 제시하였다. 그러나 이 경우에도 표재성방광암에서 MMP-9의 발현증가는 고등급 분화도의 암과 관련이 있었다.

방광암과 MMPs와의 보고들을 종합해보면 MMP-1, 2, 7, 9등이 고등급 분화도 및 고병기 방광암에서 발현이 의의있게 증가되어 재발과 악성진행에 관여함을 알 수 있다. 그러나 저등급 분화도의 표재성 방광암의 재발이나 악성진행에 관한 MMPs의 연구결과는 미비하다.

본 연구에서 저등급 표재성 방광암의 조직에서 0.12K cDNA array를 시행한 결과 미-재발군에 비해 재발군에서 MMP-1, 2, 9, 12 등의 발현이 높았다. 따라서 저등급 표재성 방광암의 재발에서도 MMP가 관여함을 알 수 있었다. 이들 인자들에 대해 저등급 표재성 방광암의 조직에서 mRNA 발현변화와 단백 발현의 변화를 관찰한 결과 MMP-1 및 12가 미-재발군에 비해 재발군에서 의의있는 발현 증가를 보였다. 이에 따라서 저등급 분화도의 표재성 방광암의 재발에 MMP-1 및 MMP-12가 관여함을 알 수 있다. 대부분의 종양과 방광

암의 보고에서 관찰되었던 MMP-2, 9는 mRNA 발현변화와 단백 발현의 변화 관찰에서 재발군에서 발현증가를 보였으나 미-재발군에 비해 통계학적 의의는 없었다.

MMPs는 여러 자극에 의하여 활성화되는데, MMPs 활성화에 fos 등의 종양유전자들이 관여될 수 있고, interleukins, interferons, VEGF, TGF β , EGF, KGF, NGF, β FGF, PDGF와 TNF 등의 growth factor와 사이토카인 등이 MMPs를 조절한다.⁵⁴

본 연구결과 저등급 분화도 표재성 방광암의 재발군의 경우 0.12K cDNA array에서 MMP-1, 12외에 TGF β 1, VEGF, fos 등의 발현 증가가 관찰되었으며, mRNA 발현변화와 단백 발현의 변화를 관찰한 결과 TGF β 1, VEGF, fos 등이 저등급 분화도의 표재성 방광암의 재발에 의의있게 발현이 증가되었다. 따라서 저등급 분화도의 표재성 방광암의 재발에 MMP-1 및 12외에 TGF β 1, VEGF, fos가 관여함을 알 수 있었다.

MMP의 활성화에 영향을 미치는 인자들에 대해 종양과 관련된 보고로, fos는 발암유전자로 암발생 과정의 초기 단계에서 중요한 역할을 하여 MMP-1을 활성화시킨다는 보고가 있다.^{23,55,56} MMP-1은 MMP-2에 대한 효과적인 활성화 물질로 작용할 수 있으며 암세포의 감수성을 증가시키고,^{23,57} MMP-9는 배양세포에서 VEGF를 유리시킨다는 보고가 있으며,⁵⁸ MMP-9가 VEGF 유리에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 또한 MMP-12는 혈관생성을 억제시킨다는 보고가 있었다.⁵³ TGF β 1은 MMP-1의 전사를 일부 억제하고, MMP-2와 MMP-9를 활성화 시킨다는 보고가 있다.^{59,60}

이상의 보고들과 본 연구 결과를 토대로 저등급 분화도 표재성 방광암의 재발에서 MMP-1, 12, fos, TGF β 1, VEGF 등과의 관계를 도식적으로 유추해보면 (Fig. 10), 증가된 초기 fos는 MMP-1의 발현에 작용하고 MMP-1에 의하여 MMP-2, 9의 활성화가 이루어져 VEGF의 발현이 증가되나 이러한 VEGF의 작용은 MMP-12에 의하여 억제당하여 악성진행이나 전이가 약화되는 것으로 여겨진다. 한편 활성화된 MMP-2, 9에 의해 TGF β 1 발현이 증가되고 이에 의해 MMP-1의 작용 억제로 재차 MMP-2, 9의 조절이 억제되어 MMP-2, 9의 암의

악성진행기전이 약화되는 것으로 유추된다. 즉 fos에 의해 유도된 MMP-1과 이후의 MMP-2, 9, VEGF, TGF β 1 들의 작용이 서로 상호 보완작용하며, MMP-12에 의해 암의 악성진행기전이 억제당하여 재발이 이루어지는 것으로 유추할 수 있다. 그러나 본 연구의 악성 진행없이 나타나는 재발에 있어 MMP-1 및 MMP-12, TGF β 1, VEGF 등의 작용 등에 대해 보완적 연구가 요구된다.

저등급 분화도 표재성 방광암의 재발과 관련하여 본 연구 결과 외에 다른 인자들도 물론 관여하리라 여겨진다. 본 연구에서도 저등급 분화도 표재성 방광암에서 재발군과 미-재발군으로 분류하여 0.12K cDNA array를 시행하여 유전자 발현을 관찰한 결과, 본 연구 결과에 명시하지는 않았으나 미-재발군에 비하여 재발군에서 발현이 증가된 인자로 CDKN2D, CDK5R1 등이 관찰되었으며, 또한 CDKN1A, BRCA1, PTEN, Jun, Myc-N, CCND2 등은 미-재발군에 비하여 재발군에서 발현이 감소되었다. 본 연구에서는 MMP 및 일부 인자에 관하여 연구를 시행하였을 뿐이기에, 0.12K cDNA array결과 재발군에서 발현 증가된 인자뿐만 아니라 발현 감소된 인자에 대해서도 저등급 분화도 표재성 방광암의 재발에도 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각되나 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

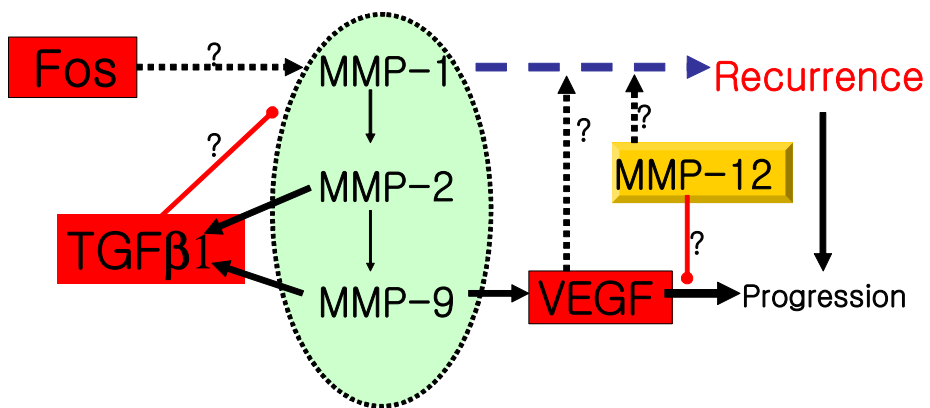


Fig. 10. MMP regulation in superficial low grade urothelial bladder cancer

V. 결 론

악성진행이나 전이되는 경우는 적으나 재발이 잦은 저등급 분화도 표재성 방광암에서 초기의 변화로 재발을 유도하는 전사체 발현을 규명하고자 저등급 분화도 표재성 방광암에서 MMP와 일부 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등을 포함하는 0.12K cDNA array를 시행하고, mRNA 발현과 단백 발현의 변화를 관찰한 결과, 저등급 표재성 방광암의 재발군에서 미-재발군에 비하여 재발군에서 MMP-1, 12, TGF β 1, VEGF와 fos의 발현이 유의있게 증가하여, 이는 저등급 표재성 방광암의 재발과 깊은 연관이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Frades Y. Epidemiology of bladder cancer. In: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, editors. Comprehensive textbook of genitourinary oncology. 1st ed. Houston: Williams & Wilkins: 1996. p.298-304
2. Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL. Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. Nature 1968;221:255-256
3. Clavel J, Cordier S, Boccon-Gibod L, Hemon D. Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. Int J Cancer 1989;44:605-610
4. Rubben H, Otto T. Harnblasenkarzinome. In: Rubben H, editor. Uro-Onkologie. 1st ed. BASEL: S. Karger Publishing: 1993. p.79-147
5. Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann MD, et al. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. J Urol 1983;130:1083-1086
6. Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K. Urothelial dysplasia concomitant with bladder tumours: a determinant for future new occurrences in patients treated by full-course radiotherapy. Lancet. 1985;4:1005-1008
7. Torti FM, Lum BL. Superficial bladder cancer. Risk of recurrence and potential role for interferon therapy. Cancer. 1987;59:613-616
8. Lutzeyer W, Rubben H, Dahm H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. J Urol. 1982;127:250-252
9. Cookson MS, Sarosdy MF. Management of stage T1 superficial bladder cancer with intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. J Urol. 1992;148:797-801

10. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, et al. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology*. 1995;45:387-396
11. Norming U, Tribukait B, Nyman CR, Nilsson B, Wang N. Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 grade 3 carcinoma of the bladder. *J Urol* 1992;148:1420-1427
12. Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, et al. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res*. 2002;22:3759-3764
13. Kilicli-Camur N, Kilicaslan I, Gulluoglu MG, Esen T, Uysal V. Impact of p53 and Ki-67 in predicting recurrence and progression of superficial (pTa and pT1) urothelial cell carcinomas of urinary bladder. *Pathol Int*. 2002;52:463-469
14. Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, Yaman O, Elhan AH, Tulunay O, et al. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol*. 2002;33:59-66
15. Rabbani F, Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 2000;27:83-102
16. Yan Y, Andriole GL, Humphrey PA, Kibel AS. Patterns of multiple recurrences of superficial (Ta/T1) transitional cell carcinoma of bladder and effects of clinicopathologic and biochemical factors. *Cancer*. 2002;95:1239-1246
17. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29:74-80

18. Pfister C, Moore L, Allard P, Larue H, Lacombe L, Tetu B, et al. Predictive value of cell cycle markers p53, MDM2, p21, and Ki-67 in superficial bladder tumor recurrence. *Clin Cancer Res.* 1999;5:4079-4084
19. Kausch I, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;41:15-29
20. Miyake H, Hara I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Kamidono S. Urinary cytology and competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of a specific CD44 variant to detect and monitor bladder cancer. *J Urol.* 1998;160:2004-2008
21. Newman AJ Jr, Carlton CE Jr, Johnson S. Cell surface A, B, or O(H) blood group antigens as an indicator of malignant potential in stage A bladder carcinoma. *J Urol.* 1980;124:27-29
22. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Natl Cancer Inst.* 1997;89:1260-1270
23. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer.* 2000;36:1621-1630
24. Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. *J Pathol.* 2001;195:135-137
25. Bernhard EJ, Gruber SB, Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9(92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:4293-4297
26. Moses MA. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases & their inhibitors. *Stem Cells* 1997;89:180-189

27. Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS. The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol.* 2004;10:62-72

28. Moon A, Kim MS, Kim TG, Kim SH, Kim HE, Chen YQ, et al. H-ras, but N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras induced invasive phenotype. *Int J Cancer* 2000;85:176-181

29. Rocca GL, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer.* 2004;90:1414-1421

30. Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, et al. Expression of gelatinase-A (MMP-2) in human colon cancer and normal colon mucosa. *Tumour Biol.* 2001;22:383-389

31. Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 2003;39:2499-2505

32. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res.* 2003;63:8511-8515

33. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, Papakonstantinou H, Karavana V, Stefanakis S, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res.* 2000;20:2009-2013

34. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, Giannopoulou I, Constantinides C, Lazaris AC, et al. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2001;9:130-137

35. Sumi T, Yoshida H, Hyun Y, Yasui T, Matsumoto Y, Hattori K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol Rep.* 2003;10:345-349
36. Xu K, Hou S, Du Z. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 2002;115:743-745
37. Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Karashima T, Czerniak B, Shen Y, et al. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol.* 2004;171:570-574
38. Durkan GC, Nutt JE, Rajjayabun PH, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in voided urine samples from patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2001;7:3450-3456
39. Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, Mavrommatis I, Panayotopoulou EG, Tsirmpa I, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5573-5581
40. Gerhards S, Jung K, Koenig F, Daniltchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, et al. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology.* 2001;57:675-679
41. Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidimo S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001;165:1769-1772
42. Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC,

Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. Clin Cancer Res. 2003;9:2576-2582

43. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry. 1979;18:5294-5299

44. Kotewicz ML, Sampson CM, D'Alessio JM, Gerard GF. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. Nucleic Acids Res. 1988;16:265-277

45. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, et al. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science. 1999;283:83-87

46. Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. EMBO J. 2001;20:5715-5724

47. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150:76-85

48. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300. FEBS Lett. 2003;553:104-108

49. Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, et al. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. Int J Cancer. 2003;107:183-188

50. Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al.

Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer*. 2003;106:683-689

51. Kerkela E, Ala-Aho R, Jeskanen L, Rechardt O, Grenman R, Shapiro SD, et al. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1113-1119

52. Kerkela E, Ala-aho R, Klemi P, Grenman S, Shapiro SD, Kahari VM, et al. Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J Pathol*. 2002;198:258-269

53. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, et al. Matrix metalloproteinases generate angiotatin: effects on neovascularization. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161:6845-6852

54. Ito A, Nose T, Takahashi S, Mori Y. Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett*. 1995 Feb 20;360:75-79

55. Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Seiki M. Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator is a negative regulator of Jun. *J Virol*. 1992;66:4732-4736

56. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*. 1993;53:288-295

57. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 1997;378:151-160

58. Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grosso JF, Lopez DM. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. *J Immunol*.

2003;171:4340-4351

59. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. Clin Exp Metastasis. 1999;17:27-34

60. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev. 2000;14:163-176

Abstract

MMP Expression Profiling in the Recurrence of Superficial Low Grade Urothelial Bladder Cancer

Hyun Soo Ahn

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Moo Sang Lee)

Bladder cancer is 5th most common cancer in Korean men. Superficial bladder cancer is curable with transurethral resection of tumor and BCG instillation. But majority of these patients develop tumor recurrences following endoscopic resection. Clinical risk factors of recurrences are high grade, multiplicity, large size and association with carcinoma in situ. Molecular prognostic markers are p53 expression, retinoblastoma gene, Ki 67 and proliferating cell nuclear antigen. But, these molecular prognostic markers are commonly associated with high grade and tumor progression. However 50% of superficial low grade urothelial bladder cancer is recurred without progression. Thus, the current clinicopathologic study for evaluation of superficial low grade urothelial bladder cancer still has limitations in predicting the true behavior of recurrence. We aimed to clarify the prime role of recurrence in superficial low grade urothelial bladder cancer.

Thirty cases of low grade superficial bladder cancer diagnosed with transurethral resection were analyzed. Fifteen cases were recurred case and 15 cases were non-recurred case. Recurrence was defined as visible mass during cystoscopy at least 6 months later after transurethral resection, and no-recurrence defined as there was no evidence of tumor with cystoscopy and urine

