

사람위암세포주에서 생물학적  
활성억제제 geldanamycin과  
항세포골격제제 vincristine의  
침윤억제 효과

연세대학교 대학원  
의 학 과  
정 재 호

사람위암세포주에서 생물학적  
활성억제제 geldanamycin과  
항세포골격제제 vincristine의  
침윤억제 효과

지도 노 성 훈 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2005 년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

정 재 호

# 정재호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2005 년 12월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 변함없는 자상함으로 학문적 지도 편달과 격려를 아끼지 않으신 노성훈 지도교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 학문적으로 미완의 연구계획 자문에 흔쾌히 응해주시고 2년여의 연구 진행 과정에서 학문적 역량을 함양할 수 있도록 조언을 해주신 조상호 교수님, 정현철 교수님과 최승호 교수님께도 심심한 감사를 드립니다. 특히 바쁘신 중에도 시간을 할애하여 학문적 충고와 논문의 세밀한 부분까지도 신경을 써주신 박전한 교수님께 부끄러운 마음과 더불어 감사를 드립니다.

실험을 계획하고 진행하는데 있어 실질적인 도움이 되어준 홍성이 연구원과 매주 실험모임을 통해 실험의 논리적 측면과 과정에 조언을 해준 절강대학교의 셴지안구오, 뉴욕 성빈세트병원의 김준억 선생, 외과학교실 송창수 선생과 이면희 연구원에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 언제나 관심을 갖고 고독한 학문의 여정에 의지가 되어 주시고 용기를 주신 김유선 교수님과 김경식 교수님께도 이 자리를 빌어 심심한 감사의 마음을 전합니다.

본인의 학업과 연구 그리고 존재의 근원이 되시는 부모님들, 연구의 전 과정을 통해 깊은 신뢰와 이해를 보여준 아내와 우리의 미래가 되는 해맑은 현주와 택훈이, 그리고 이 모든 것을 준비하고 여기까지 인도해주신 하나님께 감사드리며 이 작은 기쁨을 함께 나누고 싶습니다.

저자 씀

## 차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 세포주 및 세포배양	7
2. 사용 약제	7
3. Conditioned media의 추출 및 농축	8
4. Total cell lysate 추출	8
5. MTT assay (세포독성검사)	8
6. Western blot assay	9
7. Matrigel invasion assay	10
8. Gelatinase zymography	10
9. 통계 분석	11
III. 결과	12
1. 사람위암세포주에서 c-met 단백질의 발현 양상	12
2. 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 세포독성	14
3. 대조군과 약물 처리군에서 c-met 단백질의 발현 양상	15
4. 정상산소 및 저산소상태에서 약물 처리에 따른 세포 침윤 능의 변화	17
5. 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 MKN-45 세포에서의 기질분해효소(MMPs) 발현에 미치는 효과	18
6. 정상산소 및 저산소상태에서 각 약제의 PI3K 및 Src 단백 질의 발현 억제 효과 비교	19
IV. 고찰	21
V. 결론	27
참고문헌	29
영문요약	38

## 그림 차례

- Fig. 1. 정상산소상태에서 배양한 사람위암세포주의 c-met 단백질 발현 양상 . . . . . 12
- Fig. 2. 저산소상태에서 배양한 사람위암세포주의 c-met 단백질 발현 양상 . . . . . 13
- Fig. 3. 배양산소농도에 따른 사람 위암세포주에서 c-met 단백질의 발현정도 비교 . . . . . 14
- Fig. 4. 대조군(MKN-45)과 약물처리군(GA 및 VCR)에서 정상산소 및 저산소배양에 따른 세포독성 비교 . . . . . 15
- Fig. 5. 생물학적활성억제제 GA와 항세포골격제제 VCR 처리에 따른 c-met 단백질의 발현 변화 . . . . . 16
- Fig. 6. 배양산소농도 및 약물처리에 따른 matrigel invasion assay 결과 . . . . . 17
- Fig. 7. 정상산소 및 저산소상태에서 각 약제 처리에 따른 gelatinase zymography 결과 . . . . . 18
- Fig. 8. 정상산소 및 저산소상태에서 PI3K와 Src 단백질의 발현 및 약물처리에 의한 발현 양상의 변화 . . . . . 20

## 국문 요약

### 사람위암세포주에서 생물학적 활성억제제 geldanamycin과 항세포골격제제 vincristine의 침윤억제 효과

최근 종양내 저산소증에 의해 유도되는 oncogene kinase의 일종인 c-met이 암세포 침윤과 전이의 핵심적인 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 실제로 암의 침윤이 일어나기 위해서는 암세포가 이동성을 가져야하는데 세포골격을 구성하는 단백질중의 하나인 microtubule의 역동적인 기능이 암세포의 이동을 위한 필수적인 요건으로 밝혀졌다. 본 연구의 주목적은 침윤의 실제적인 기전에 근거하여 사람위암세포주에서 c-met 단백질을 발현을 선택적으로 억제하는 생물학적 활성억제제인 geldanamycin (GA)과 항세포골격제제로 microtubule의 기능을 저해하는 vincristine (VCR)의 항침윤작용의 생물학적 효능을 검증하고자 하였다.

사람위암세포주인 MKN-45, MKN-28, Kato-III, AGS, SNU 216, SNU 638 및 SNU 719를 사용하여 정상산소 및 저산소상태에서 세포배양 후 Western blot을 시행하여 c-met 단백질의 발현 양상을 관찰하였다. c-met의 과발현이 알려진 MKN-45를 선정하여 c-met 단백질을 선택적으로 억제하는 GA와 microtubule 특이적 억제제인 VCR을 처리한 후 MTT assay를 통해 각 약제의 세포독성을 알아보았다. 위암세포의 이동과 침윤능에 미치는 각 약제의 효과를 알아보기 위해 matrigel invasion assay를 시행하여 대조군과 약제 처리군에서 침윤세포의 수를 비교하였다. 또한 침윤과정에서 중요한 세포외기질을 분해하는 MMP-2와 MMP-9의 발현 및 약제 처리에 의한 발현 양상의 변화를 알아보기 위해 gelatinase zymography를 시행하였다. 마지막으로 GA의 침윤억제 효능의 생물학적 기전이 c-met 매개 침윤기전의 주요 신호전달중계물질들을 경유하여 나타나는지 알아보기 위해 약제 처리 전후 c-met 단백질 및 c-met 신호전달계의 downstream에 위치한 PI3K와 Src의 발현양상의 변화를 Western blot으로 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 모든 위암세포주에서 정도의 차이는 있었으나 c-met 단백질의 발현이 관찰되었으며 저산소상태에서 c-met 단백질의 발현이 증가되었다.
2. c-met 단백질을 과발현하는 MKN-45 세포에서 1  $\mu$ M GA 처리시 증등도(15-35.5%)의 세포독성을 나타내었다. VCR의 경우 100 nM 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 저산소상태에서 배양시 약물 처리와는 무관하게 고도의 세포독성과 세포사멸이 발생하였다.
3. 1  $\mu$ M GA 처리시 MKN-45 세포에서 c-met 단백질의 발현이 억제되었다. 반면 VCR은 50 nM, 100 nM 및 250 nM 의 농도에서 c-met 단백질의 발현에 아무 영향을 주지 않았다.
4. Matrigel invasion assay 결과 정상산소상태에서 1  $\mu$ M GA 처리시 대조군에 비해 15.3%로 침윤세포가 감소하였으며, VCR을 처리한 경우 100 nM에서 정상 대조군의 4.2%로 침윤세포수가 감소하였다. 저산소상태에서 같은 농도의 GA는 대조군의 38.9%로, VCR은 대조군의 11.1%로 침윤세포수를 감소시켰다.
5. Gelatinase zymography 결과 MKN-45 세포는 정상산소에서 MMP-2의 발현만 미약하게 관찰되었으나 저산소상태에서 MMP-9의 발현 및 MMP-2의 활성형이 발현되었으며, 1  $\mu$ M GA 와 100 nM VCR 처리시 MMPs의 발현은 효과적으로 억제되었다.
6. c-met 신호체계의 주요 신호전달중계물질인 PI3K와 Src의 경우 저산소상태에서 1  $\mu$ M GA와 100 nM 및 250 nM VCR 처리시 유의하게 발현이 억제되었다.

결론적으로 위암세포주의 침윤 및 전이와 연관된 c-met 단백질 및 c-met 신호체계를 표적으로 하는 생물학적 활성억제제와 세포의 이동에 필수적인 세포골격단백질을 표적으로 하는 항세포골격제제는 효



과적으로 c-met 발현 위암세포의 침윤능을 억제함을 알 수 있었으며, 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 침윤억제 기전에 차이가 있음이 새로이 제시되었다. 암세포의 생물학적 특성과 이를 결정하는 표적 분자의 발현을 억제하는 생물학적 활성 억제제 및 작용기전에 근거한 약제를 사용하는 표적치료(targeted therapy)가 항침윤 및 항전이 치료로서 실제 임상적용이 가능할 것으로 생각된다.

---

핵심되는 말 : 위암, 침윤, 전이, 저산소증, c-met, 생물학적 억제제, 항세포 골격제, 항침윤요법

사람위암세포주에서 생물학적 활성억제제 geldanamycin과  
항세포골격제제 vincristine의 침윤억제 효과

<지도교수 노 성 훈>

연세대학교 대학원 의학과

정 제 호

I. 서론

침윤(invasion)과 전이(metastasis)는 악성암세포의 지표로, 암환자의 사망을 초래하는 직접적인 원인이며 성공적인 암치료에 가장 큰 방해 인자로 알려져 있다.<sup>1</sup> 암의 침윤과 전이는 형질 전환과 이에 따른 세포의 생물학적인 기능 및 형태학적 변화 그리고 주변 기질과의 생화학적인 상호 작용에 의한 매우 복잡한 기전이다.<sup>2</sup>

위암은 우리나라에서 가장 흔한 암이며, 국민 건강을 위협하는 대표적인 질환이다. 최근 조기진단의 증가로 생존율이 향상되고는 있으나, 여전히 전체 위암의 50% 이상은 진행위암으로 발견되며 근처적 수술 후에도 불량한 예후를 보인다. 특히 항암화학요법의 발달에도 불구하고 진행위암에서 항암제 치료 성적은 만족스럽지 못하며 대부분의 환자들은 치료 후에도 많은 예에서 재발을 경험하고, 결국 암의 전이에 의해 사망하게 된다.

최근 암의 효과적인 치료를 위한 “specific molecular targeted therapy”의 일환으로 다양한 생물학적 제제(biological agent)들이 일부 고형암에서 유의한 효과가 있음이 보고되고 있다.<sup>3-8</sup> 그러나 아직 위암에서 이러한 시도는 보고된 바가 없으며 또한 생물학적 제제 단독 사용만으로 효과적인 경우는 드물다. 따라서 최근에 항암제와 생물학적 제제를 병용하는 치료법이 시도되고 있으나 이러한 병용요법이 각각의 약제 독성을 증가시키는 반면, 효과는 불확실한 것으로 밝

혀지면서<sup>9</sup> 종양 세포의 생물학적 특성에 근거한 적응증을 찾고자 하는 노력이 활발히 진행 중이다.

현재 사용 중인 대부분의 생물학적 치료제들은 암세포의 증식이나 신생 혈관 생성과 관련된 신호전달체계를 매개하는 단백질들을 억제하여 항암효과를 나타낸다.<sup>10-14</sup> 그러나 암의 초기 발생 단계를 벗어난 진행위암에서 단지 종양의 성장과 증식을 억제하는 것은 효과적이지 못하며 오히려 항신생혈관 치료가 항암치료의 효과를 감소시키고 일부 암세포의 전이를 조장할 수 있다는 보고도 있다.<sup>9,15</sup> 또한 침윤과 전이에 관여하는 세포내 신호전달체계는 매우 복잡하며, 더구나 세포의 정상적인 생리기능과 관련된 다양한 신호전달 체계들이 서로 유사한 경로를 공유하고 있고 아직 그 정확한 기작이 밝혀지지 않고 있어 신호전달과 관련된 단지 하나의 특정한 molecule을 표적으로 하는 치료는 안전성과 효능면에서 추가적인 연구가 필요하다.

침윤이 실제로 발생하기 위해서는 암세포의 유전형 변화(genotypic alteration)에 수반하는 표현형 변화(phenotypical change)가 일어나야 한다. 즉, 상피세포에서 기원한 암세포가 중간엽세포(mesenchymal cell)의 특징인 ‘이동성(motility)’을 획득하여야 하는데 이러한 세포의 이동성을 위해서는 세포골격(cytoskeleton)의 재구성(remodeling)이 필수적이다.<sup>16-19</sup>

최근의 연구결과 암의 침윤과 관련한 일련의 과정들이 종양내 저산소증(tumor hypoxia)에 의해 유도되는 proto-oncogene인 c-met에 의해 조절될 가능성이 제시되고 있다.<sup>20</sup> c-met은 세포막에 위치하는 receptor tyrosine kinase의 일종으로 여러 악성종양에서 과발현되거나 변이가 있는 것으로 알려져 있으며, 일부 위암에서도 과발현과 변이가 보고되고 있다.<sup>21-30</sup> c-met의 ligand인 HGF/SF에 의해 c-met 신호전달계가 활성화되면 침윤에 관련된 다양한 세포 생물학적 행동이 변화되고 동시에 세포골격을 구성하는 단백질들의 재조합 및 재구성에 의해 세포의 이동성이 나타난다.<sup>31,32</sup>

따라서 세포골격을 구성하는 단백질중에서 세포의 이동에 필요한 핵심 단백질을 표적으로 하는 제제와 c-met 매개 신호전달 체계의 생물학적 활성을 저해하는 제제를 사용한다면 효과적으로 암의 침윤을

억제할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구의 주목적은 사람위암세포주를 사용하여 암의 침윤 과정에서 핵심적인 기능을 하는 것으로 밝혀진 c-met의 발현양상을 알아보고 c-met과 관련된 신호전달의 최종 결과인 침윤과 세포의 이동성-phenotypical alteration-을 목표로 하는 항세포골격제제 vincristine(VCR)과 c-met 매개 신호전달계의 활성을 억제하는 생물학적 제제 geldanamycin(GA)을 사용하는 새로운 항침윤/항전이 치료의 생물학적 효능을 *in vitro*에서 알아보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 위암세포주(MKN-45, MKN-28, AGS, Kato III, SNU 216, SNU 638, SNU 668, SNU 719)는 모두 연세대학교 의과대학 암전이연구센터에서 분양받았으며, 실험에 사용한 모든 세포주들은 56°C에서 불활성화시킨 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 penicillin 100 Unit/ml 및 streptomycin 0.1 mg/ml (GIBCO)가 함유된 세포배양용 배지 RPMI 1640 (GIBCO)에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 항온 항습기에서 배양하였고, 주 2-3회 배지를 교환하였다. 저산소배양(hypoxic culture)의 경우 상기와 같은 조건에서 BBL GasPack pouch system (BD Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 사용하였다. BBL GasPack을 개봉한 후 사용자 매뉴얼에 따라서 액상의 활성화 시약을 외부 패킷에 주입 후 culture dish를 GasPack 내부에 위치시키고 입구를 밀봉하였다. 35°C에서 약 2시간 정도 배양하면 산소농도 2% 미만 (> 4% CO<sub>2</sub>)의 저산소상태에 도달하게 되며, 이는 GasPack 외부에 부착된 indicator를 통해 확인할 수 있었다.

### 2. 사용약제

본 연구를 위하여 사용한 생물학적 활성억제제로는 HSP 90의 N-terminal specific ATPase에 작용하여 c-met 단백질의 발현을 억제하는 Geldanamycin (GA, InvivoGen, San Diego, CA, USA)을 사용하였으며, 항세포골격제제는 microtubule의 저해제인 vincristine (Laboratories Lilly France, Fegersheim, France)을 사용하였다. GA는 1mg/ml을 유기용매인 DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 희석하여 용해 후 -20°C에서 냉동보관하였으며, vincristine은 냉장보관하였다. GA는 1μmol/L, vincristine은 100 nM의 농도로 MKN-45 세포에 처리하여 16시간 배양 후 PBS로 2차례 세척 후 실험을 진행하였다.

### 3. Conditioned media의 추출 및 농축

75 cm<sup>2</sup> flask에 세포가 80% 정도 자라면 배양액을 opti-media (GIBCO)로 두 번 세척한 후 opti-media 20 ml을 넣어 48시간 동안 추가로 배양하였다. 48시간 후 배양액만을 모아 가볍게 원심분리하여 잔여 세포를 침전시킨 후 centriprep centrifugal filter device (Millipore, Beverly, MA, USA)를 이용하여 60배까지 농축하였다. Bradford 법으로 단백질 정량 후 분주하여 실험때까지 -80℃에 보관하였다.

### 4. Total cell lysate 추출

75 cm<sup>2</sup> flask에 세포가 80% 정도 자라면 PBS로 3차례 세척 후 scraping하여 NP-40 lysis buffer (50mM Tris-Cl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 2 µg/ml, leupeptin, 1mg/ml 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride]에 넣었다. 이를 얼음위에서 45분간 incubation 후 4℃에서 4,500 x g로 20분간 원심분리하여 상층액을 취하고 단백질을 정량 후 분주하여 -80℃에 보관하였다.

### 5. MTT assay (세포독성검사)

MTT 검사는 살아있는 세포의 경우 cytochrome b 및 cytochrome c 부위에 있는 미토콘드리아의 효소인 succinate dehydrogenase가 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)의 tetrazolium환을 분절시켜 황색조의 MTT salt를 자주색의 formazan으로 환원시키는데 그 원리를 두고 있으며, 죽은 세포나 조직 배양액에서는 이러한 변화가 일어나지 않고, 살아있는 세포에서만 선택적으로 일어나는 이 색조 반응을 분광흡도계로 측정하여 살아있는 세포의 수를 알 수 있는 검사법이다. 본 연구에서는 Carmichael등의 방법에 따라 MTT 검사를 시행하였다.<sup>33</sup> 각각의 배양된 암세포주

에서 성장곡선을 그려, 지수성장을 보이는 세포수를 결정 한 후 세포 성장곡선상 지수성장기에 해당하는 세포수를 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 단일 부유 암세포로 만든후, 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 3회 세척하고, trypan blue (GIBCO) 염색으로 세포수를 세어 180 $\mu$ l의 배양액에 지수성장기에 해당하는 세포수를 부유하여 96 well plate (Corning Costar, Cambridge, MA, USA)에 분주하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양 한 후 여러 농도의 약제를 단독 또는 조합하여 20  $\mu$ l의 10% FBS가 포함된 MEM배지에 용해시켜 96 well plate에 투여하였다. 이때 대조군의 well에는 약제 대신 동량의 10% FBS가 포함된 MEM배지를 사용하고, 배지 자체의 색소흡수율을 측정하기 위해서 10% FBS가 포함된 MEM배지만 동량으로 분주하였다. 이후 microplate를 96시간 추가 배양한 후 MTT 50  $\mu$ l (2 mg/ml)를 각 well에 첨가하고 이를 4시간 더 추가 배양하였다. 배양이 끝난 microplate는 450 g에서 10분간 원심분리한 후, 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서, 30  $\mu$ l 정도의 배양액이 남도록 digital multichannel pipette (Flow Titertck, Biohit, Helsinki, Finland)을 사용하여 상층액을 제거하였다. 여기에 다시 150  $\mu$ l의 DMSO를 각 well에 첨가하고 진탕기(plate shaker)에서 formazan결정이 용해될 때까지 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 진탕한 후 multi-well ELISA automatic spectrometer recorder (Behring ELISA Processor II, Hamburg, Germany)를 이용하여 540 nm의 파장에서 판독한 실험군의 색소흡수율(absorbance, optical density)을 구하였다.

## 6. Western blot assay

동량의 시료를 5 x buffer [1M Tris-HCl, pH 6.8, 10%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS), 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue, 50% glycerol] 와 섞어 10% SDS-PAGE acrylamide gel에 전압이 100 V로 4시간동안 전기영동을 시행한 후, nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 4 $^{\circ}$ C에서 140 V에서 1시간 동안 transfer하였다. Transfer된 membrane은 TBS-T

(10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Tween20)에 5% non-fat milk (DIFCO, Detroit, MI, USA)가 포함된 용액을 이용하여 4°C에서 하루 동안 blocking한 후, TBS-T로 5분씩 두 번 세척하고 일차항체 rabbit anti-human polyclonal met (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 5% skim milk가 첨가된 TBS-T로 1:400 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T로 10분씩 세 번 세척한 후 이차 항체 horseradish peroxidase anti-rabbit immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology)를 5% non-fat milk가 첨가된 TBS-T로 2,000배로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난면 TBS-T로 10분씩 세 번 세척 후 ECL plus kit (Amersham Pharmacia Biotechnology, Upsala, Sweden)로 반응시켜 X-ray film에 감광 후 현상하여 비교 분석하였다.

## 7. Matrigel invasion assay

*In vitro* invasion assay는 polycarbonate filter가 장착된 24-well Transwell unit (Corning Costar, Cambridge, MA, USA)을 사용하여 시행하였다. Lower chamber에는 시험 약제와 1% BSA를 함유한 serum free media를 채우고 upper chamber에는 1% BSA를 함유한 RPMI 1640 배지를 채운다. MKN-45 세포가 들어있는 1% BSA를 함유한 500  $\mu$ l의 serum free media를 transwell plate의 상부에 채우고 normoxia와 hypoxic condition에서 16시간 배양 후 methanol로 고정하고 0.5% crystal violet으로 3분간 염색한다. Filter의 아랫면으로 이동한 세포수를 200배율의 광학현미경하에서 관찰하여 기록하였다. 각 실험은 독립적으로 3회 시행 후 평균을 구하였다.

## 8. Gelatinase zymography

세포주와 conditioned media에서 gelatinase의 활성을 관찰하기 위해서 gelatinase zymography를 Laemmli 방법에 따라서 시행하였다.<sup>34</sup> 동량의 sample에 4 x의 non-reducing sample buffer (0.5 M



Tris-HCl, 10% (w/v) SDS 4 ml, 0.1% bromophenol blue 0.5ml, glycerol 2.0 ml, 증류수 첨가하여 총량 10 ml)를 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 0.1%의 gelatin이 주입된 precast 10% (w/v) acrylamide gel (Novex, San Diego, CA, USA)의 각 well에 주입하고 4°C에서 20 mA(125 V, 3 시간)으로 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel을 꺼내어 2.5% (v/v)의 triton X-100의 renaturing buffer로 실온에서 30분간 반응하여 SDS를 제거한 다음, developing buffer (50 mM Tris-base, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.6, 0.02% Brij)에 넣어 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 0.5% (w/v) Coomassie brilliant blue로 염색한 후 methanol:acetic acid:water (50:10:40)에서 탈색하여 gelatin이 녹아 밝게 나타나는 band를 관찰하였다. Computer-assisted image analyzer (Bioprofile, Vilber-Lourmat biotechnology, Marne La Vallee, Cedex, France)를 이용하여 band의 면적과 밀도를 측정하여 활성을 비교분석하였다.

## 9. 통계 분석

모든 통계 내용은 3회의 독립적인 실험에 의한 평균값으로 나타내었으며, 필요한 경우 Mann-Whitney U test 및 Kruskal-Wallis test를 이용하여 두 군 혹은 세 군간의 통계적 유의성을 검증하였다.  $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있다고 하였다.

### III. 결과

#### 1. 사람위암세포주에서 c-met 단백질의 발현 양상

##### 가. 정상산소상태에서 c-met 단백질의 발현 양상

정상 산소농도에서 배양한 사람위암세포주에서 c-met 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해 Western blotting을 시행하였다. 실험에 사용한 8 종류의 세포주 모두에서 다양한 정도의 c-met 단백질의 발현이 관찰되었다. c-met oncogene의 amplification이 알려진 MKN-45의 경우, c-met status가 정상인 MKN-28에 비해 c-met 단백질의 발현이 현저히 증가되어 있었으며, AGS의 경우 가장 낮은 c-met 단백질의 발현을 보였다(Fig. 1).



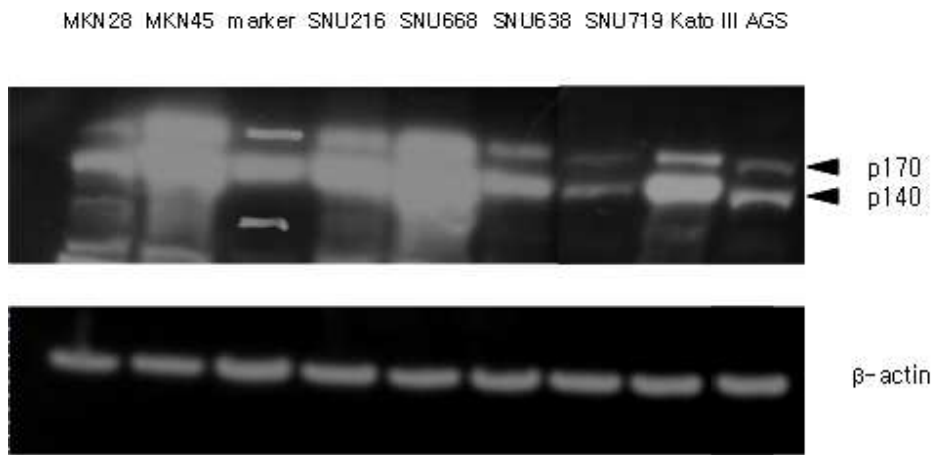
**Fig. 1.** 정상산소상태에서 배양한 사람위암세포주의 c-met 단백질 발현 양상.

각 세포주에 따라 발현 정도에 차이가 있으나, 모든 세포주에서 c-met 단백질의 발현이 관찰된다. Amplification에 의한 과발현이 알려진 MKN-45에서 가장 높은 발현을 보이며 AGS에서 가장 낮은 발현을 보였다.

##### 나. 저산소상태에서 c-met 단백질의 발현 양상

저산소증에 의해 c-met 단백질의 발현이 증가되는지 알아보기 위해

서 동일한 위암세포주를 BBL GasPack pouch system을 사용하여 산소농도 2% 미만에서 저산소배양을 한 후, c-met 단백질의 발현양상을 알아보았다. 모든 세포주에서 정상산소배양을 한 경우에 비해 c-met 단백질의 발현이 증가하는 소견을 보였다(Fig. 2). 또한 저산소배양시 c-met 단백질 발현이 유도되는 정도를 정량적으로 확인한 결과 정상산소배양시 met 단백질의 발현과 비교하였을 때 세포주에 따라서 1.2배에서 8.5배의 발현증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3).



**Fig. 2.** 저산소상태에서 배양한 사람위암세포주의 c-met 단백질 발현 양상. 세포주에 따른 발현정도의 변화에 차이는 있으나 저산소배양시 모든 세포주에서 c-met 단백질의 발현이 정상산소배양에 비해 증가되었다.

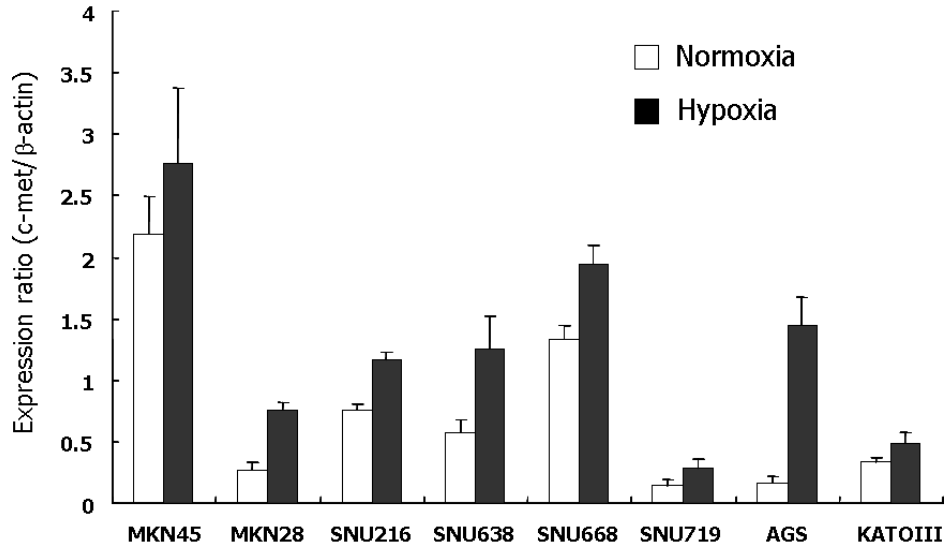


Fig. 3. 배양산소농도에 따른 사람 위암세포주에서 c-met 단백질의 발현정도 비교. 단백질 loading control인  $\beta$ -actin과 c-met 단백질의 발현정도의 비(ratio)를 정상 산소와 저산소배양한 경우 비교하였다. 각 세포주에 따라서 hypoxia에 의해 유도되는 c-met 단백질의 발현정도에 차이는 있으나 모든 세포주에서 normoxia에 비해 hypoxia 상태에서 c-met 단백질의 발현이 증가되었다.

## 2. 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 세포독성

c-met 단백질의 과발현을 보이는 MKN-45 세포주를 선정하여 산소 농도에 따른 GA와 VCR의 세포독성능을 알아보기 위해 다음의 실험을 진행하였다. MKN-45 세포 ( $5 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ )를 준비하여 96 well plate에서 12시간 배양 후 배지에 각 농도의 약물을 처리하고 16시간 동안 정상산소 및 저산소배양을 시행하였다. 이 후 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간에 세포성장을 관찰하였다. 정상산소농도에서 GA는  $1 \mu\text{M}$  농도에서 c-met 과발현 위암세포주인 MKN-45 세포에 대해 중등도의 세포독성을 나타내었으며 통계적으로 유의하였다(실험군 vs 대조군의 O.D.값:  $2.07 \pm 0.48$  vs  $2.78 \pm 0.35$ ,  $P=0.003$ ).

반면 항세포골격제제인 VCR의 경우,  $100 \text{ nM}$  농도에서 MKN-45 세포에 대해 대조군에 비해 통계적으로 유의한 세포독성을 나타내지 않

았다(실험군 vs 대조군의 O.D.값:  $2.78 \pm 0.35$  vs  $2.47 \pm 0.35$ ,  $P=0.08$ ).

한편, 저산소농도에서 실험한 결과 대조군(MKN-45 단독군)이나 약물처리군(GA 처리군 및 VCR 처리군)모두에서 약제의 효과와는 무관하게 고도의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 4).

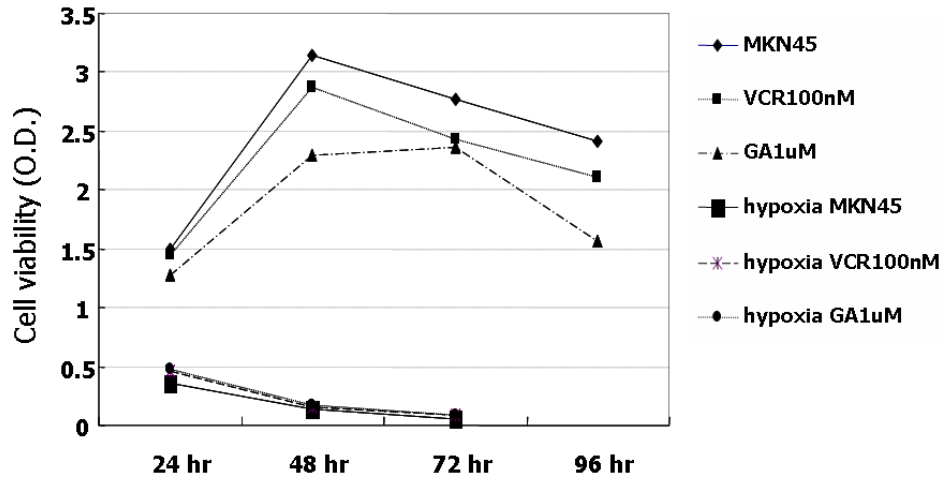


Fig.4. 대조군(MKN-45)과 약물처리군(GA 및 VCR)에서 정상산소 및 저산소배양에 따른 세포독성 비교.

정상산소배양시 대조군(MKN-45)에 비해 GA 1  $\mu$ M 처리시 유의한 세포독성이 관찰된 반면, VCR 100 nM 처리군에서 유의한 세포독성은 관찰되지 않았다. 한편, 저산소배양시에는 약물처리와 무관하게 고도의 세포독성이 관찰되었다.

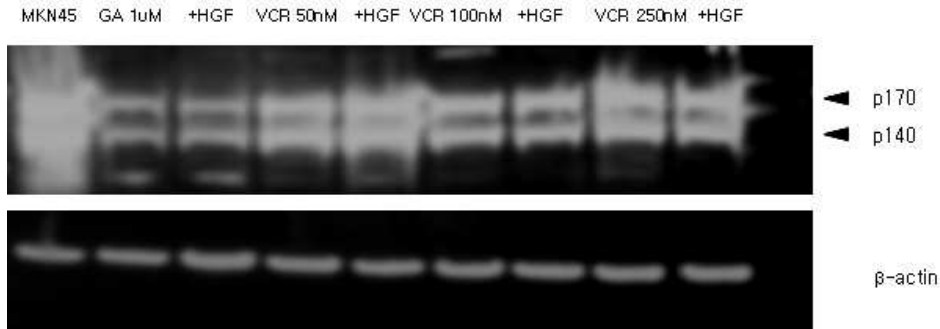
### 3. 대조군과 약물처리군에서 c-met 단백질의 발현 양상

MKN-45 세포를 1  $\mu$ M 농도의 GA 및 50, 100, 250 nM 농도의 VCR로 16시간 처리한 후 Western blot을 시행하여 c-met 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. 실험결과 1  $\mu$ M의 GA를 처리한 경우, c-met 단백질의 발현이 대조군에 비해 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 각 50, 100 및 250 nM 농도의 VCR을 처리한 경우 c-met 단백질의 발현에는 아무런 영향을 주지 않았다(Fig. 5).

한편 c-met의 ligand로 알려진 HGF (40 nM)를 처리하더라도 GA에

의한 c-met 단백질의 발현 억제 효과에 변화는 없었다.

A.



B.

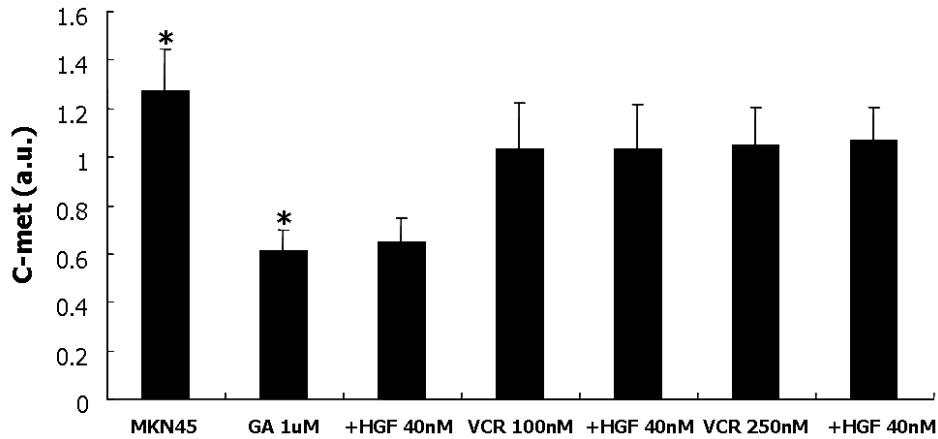


Fig. 5. 생물학적활성억제제 GA와 항세포골격제제 VCR 처리에 따른 c-met 단백질의 발현 변화.

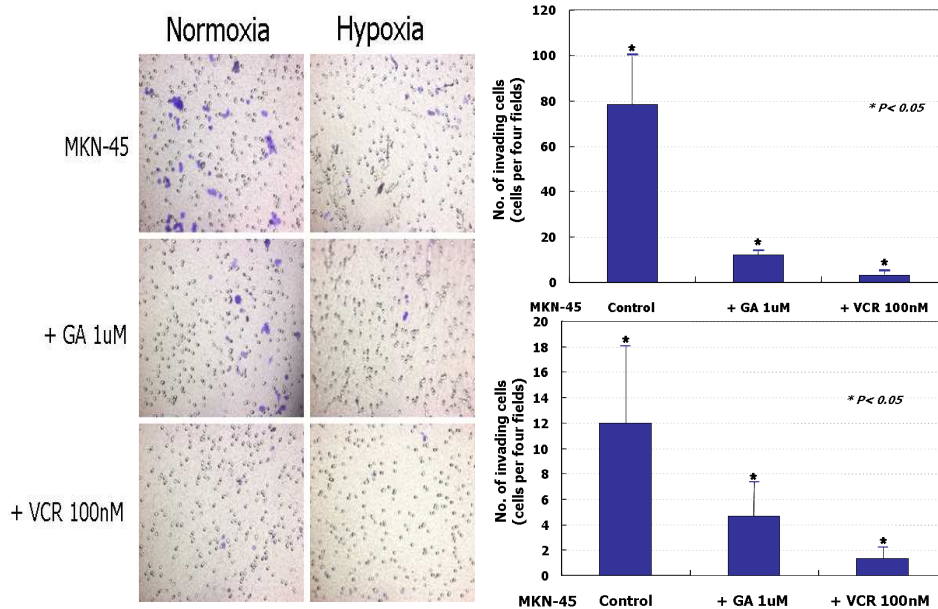
A. GA 1 μM 및 VCR 각 50 nM, 100 nM 및 250 nM 처리 후 배양한 MKN-45 세포주에서 c-met 단백질의 발현 양상.

B. GA 1 μM 처리시 대조군 및 각 농도의 VCR 처리군에 비해 유의한 c-met 단백질의 발현 감소가 관찰되었다. 이러한 발현의 감소는 c-met ligand 인 HGF 40 nM 을 첨가해도 변화가 없었다. 한편 항세포골격제제인 VCR은 100 nM 및 250 nM 처리시 c-met 단백질의 발현에 아무런 영향을 주지 않았다. 각 bar의 값은 절대값이며 3회의 독자적 실험의 평균치이다(a.u., arbitrary unit, \*  $p < 0.05$ ).

#### 4. 정상산소 및 저산소상태에서 약물 처리에 따른 세포 침윤능의 변화

c-met 단백질 과발현 MKN-45 위암세포주의 침윤능 및 이동능과 이에 미치는 각 약제의 생물학적 효능을 matrigel invasion assay로 조사해본 결과, GA 1  $\mu$ M 처리군에서 약제를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의한 중앙세포의 침윤능 감소가 관찰되었다. 또한 VCR 100 nM 처리군에서도 침윤중앙세포 수가 현저하게 감소하였으며, 침윤억제효과는 GA에 비해 우수함을 알 수 있었다.

저산소농도에서 matrigel invasion assay를 시행한 경우 저산소증에 의해 세포들이 많이 사멸하여 절대적인 침윤세포의 숫자는 오히려 정상 산소 농도에 비해 적었으나 각 약제에 의한 침윤세포수의 감소는 정상산소배양시와 비슷한 양상을 보였다(Fig. 6).

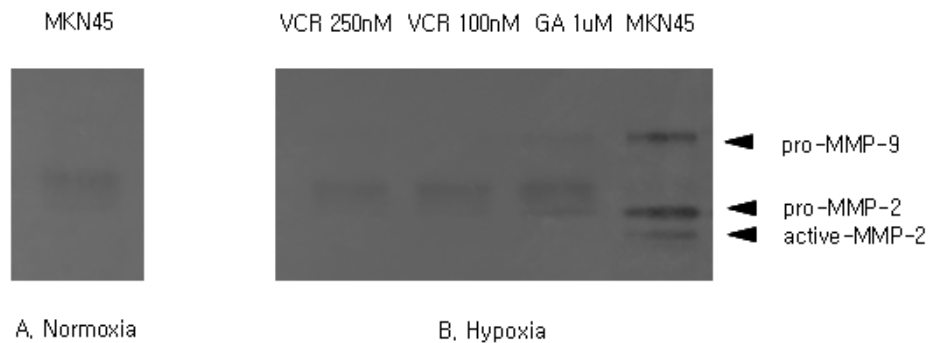


**Fig. 6. 배양산소농도 및 약물처리에 따른 Matrigel invasion assay 결과.** 정상산소배양 및 저산소배양 모두에서 대조군(MKN-45)에 비해 GA 1  $\mu$ M 및 VCR 100 nM 처리군에서 침윤세포의 수가 유의하게 감소하였다. 특히 VCR 100 nM을 처리한 경우 GA 1  $\mu$ M 처리군에 비해 더 효과적인 침윤세포수의 감소를 관찰할 수 있었다.

## 5. 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 MKN-45 세포에서의 기질분해효소(MMPs) 발현에 미치는 효과

암세포의 침윤 과정에서 중요한 기능을 하는 기질분해효소 발현에 대한 GA의 효과를 알아보기 위해 conditioned media로 gelatinase zymography를 시행하였다. 정상산소상태에서 MKN-45 세포는 매우 낮은 기저 MMP-2의 발현을 보였으며, 산소농도를 낮추어 저산소상태에서 실험을 한 경우 MMP-2의 기저 발현의 증가와 더불어 활성형의 MMP-2의 발현이 나타났으며, 새로이 MMP-9의 발현이 관찰되었다.

또한 MMP의 발현이 증가된 저산소상태에서 GA 처리시 1  $\mu$ M 농도에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현이 현저히 감소되었으며 활성형의 MMP-2의 경우 발현이 완전히 억제되었다. 한편 GA의 효과에 대한 대조약물로 사용한 VCR의 경우 예상외로 100 nM 및 250 nM에서 GA와 유사한 MMP-2 및 MMP-9에 대한 억제 효과가 관찰되었다 (Fig. 7).



**Fig. 7. 정상산소 및 저산소상태에서 각 약제 처리에 따른 Gelatinase zymography 결과.**

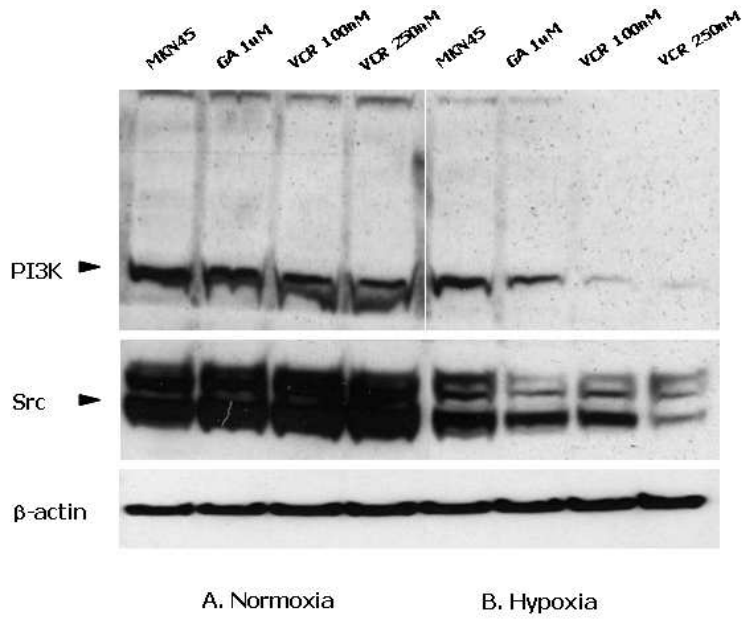
정상산소상태에서는 pro-MMP-2의 발현만이 미약하게 관찰되었다. 저산소배양한 경우 pro-MMP-9 및 활성형의 MMP-2의 발현이 관찰되었으며, GA 1  $\mu$ M 및 VCR 100 nM 처리시 pro-MMP-9 및 active-MMP-2의 발현이 거의 관찰되지 않았으며 pro-MMP-2의 발현도 뚜렷이 감소하였다.



## 6. 정상산소 및 저산소상태에서 각 약제의 PI3K 및 Src 단백질의 발현 억제 효과 비교

GA에 의한 항침윤효과가 c-met 신호체계의 비활성화를 통해 나타나는지 알아 보기위해 다음의 실험을 진행하였다.

약제처리를 하지 않은 MKN-45 대조군, 1  $\mu$ M 농도의 GA를 처리한 군 및 control 약제로서 VCR 100 nM 및 250 nM을 각각 처리한 군을 정상산소 및 저산소배양 후 Western blot assay를 시행하여 c-met 신호전달경로의 잘 알려진 downstream molecule인 PI3K와 Src의 발현을 알아보았다. 정상 산소농도에서 배양한 세포주에서는 GA와 VCR이 c-met 신호전달경로의 downstream에 위치하는 핵심 단백질인 PI3K와 Src의 발현에 아무런 영향을 주지 못했으나 저산소 농도에서 실험한 결과 GA 1  $\mu$ M 과 VCR 100 nM 및 250 nM에서 각각 PI3K 및 Src 발현이 억제되는 것이 관찰되었다. 특히, 100 nM 과 250 nM의 두 가지 농도를 처리한 VCR의 경우 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).



**Fig. 8. 정상산소 및 저산소상태에서 PI3K와 Src 단백질의 발현 및 약물처리에 의한 발현 양상의 변화.** 정상산소농도에서 c-met 신호전달계의 중요한 downstream signal molecule인 PI3K와 Src 단백질의 발현은 GA 및 VCR 처리에 의해 변화가 없었다. 그러나 저산소배양을 한 경우 GA와 VCR 처리에 의해 PI3K와 Src 단백질의 발현이 현저히 감소하였다. 특히 VCR의 경우 농도의존적인 단백질발현의 감소가 관찰되었다.

#### IV. 고찰

암의 전이는 세포의 성장, 생존, 이동성, 세포간 접촉과 세포-기질간의 상호작용 등 매우 복잡한 과정을 거치며, 각 단계에서 다양한 신호전달경로와 수많은 molecule들이 관여하는 생화학적인 반응이다.<sup>1,2,14,35</sup>

일반적으로 세포로부터 산소공급을 차단하면 대부분의 세포는 사멸한다. 최근의 항암 표적치료의 주된 목표중 하나는 신생혈관 생성을 억제하여 종양으로 가는 산소공급을 차단함으로써 암세포를 사멸시키는 것이다. 그러나 주요 임상 관찰 및 연구결과 종양내 저산소증이 불량한 예후와 관련이 있으며 다양한 항암치료에도 불구하고 원격전이의 위험도를 증가시키는 것으로 알려졌다.<sup>14,15,36-38</sup> 이러한 임상 관찰의 원인으로 저산소증이 암세포의 악성도를 증가시켜 침윤과 전이능을 획득하여 주변 조직으로 침윤하고 결국 원격장기로의 전이를 가능하게 하기 때문인 것으로 밝혀졌다<sup>15,16</sup>. 최근 Pennacchietti 등은 저산소증에 의해 유도되는 c-met 단백질의 과발현이 HGF에 대한 감수성을 증가시키며 낮은 산소 장력 (low oxygen tension)과 HGF가 시너지효과를 나타내어 세포의 이동성 및 침윤능을 유도한다고 보고 하였다.<sup>20</sup>

c-met은 세포막에 위치하는 receptor tyrosine kinase로 여러 악성종양과 일부 위암에서 과발현되거나 변이가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>21-30,39</sup> c-met 신호체계가 활성화되면 downstream에 위치하는 PI3K, Ras 및 Src 등의 주요 신호전달매개물질들에 의해 다양한 생물학적 기능의 변화가 초래되어 세포이동성 증가, 세포비산 (scattering), 세포 증식 및 세포고사의 감소, 신생혈관 생성, 침윤 및 궁극적인 전이가 발생하게 된다.<sup>40,41</sup> 이러한 연구결과는 암초기 발생단계에서 종양조직내에 야기되는 저산소증이 일부 암세포의 악성도를 증가시켜 침윤능과 전이능을 획득하게 되는데, c-met oncogene kinase가 이러한 초기 malignant behaviour의 획득 즉, 암세포의 침윤능에 깊게 관여하다는 것을 시사한다.

한편, 궁극적인 암의 침윤이 발생하기 위해서는 암세포가 실제로 기

적막을 뚫고 주변조직으로 이동해 가야하는데, 이러한 세포의 이동을 위해서는 세포골격(cytoskeleton)을 구성하는 단백질들의 재구성과 기질분해효소의 존재가 필수적이다.<sup>16-19</sup>

본 연구에서는 암의 침윤과정에 중요한 역할을 하는 c-met 단백질의 발현을 억제하는 생물학적 제제인 GA와 세포의 실질적인 이동에 관여하는 세포골격단백질인 microtubule을 저해하는 항세포골격제제 VCR의 항침윤기전의 생물학적 효능을 알아보았다. 먼저 사람위암세포주를 정상산소와 저산소농도에서 세포배양을 하고 c-met 단백질의 발현양상을 살펴본 결과, 실험에 사용한 모든 세포주 (MKN-45, MKN-28, Kato-III, AGS, SNU 216, SNU 638 및 SNU 719)에서 정도의 차이는 있으나 met 단백질의 발현이 관찰되었으며, 저산소배양시 모든 세포주에서 정상산소배양에 비해 c-met 단백질의 발현이 증가함을 알 수 있었다. 한편 정상산소와 저산소배양시 각 약제의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 시행한 결과 정상산소배양시 1  $\mu$ M 농도의 GA는 경미한 세포독성을 나타내었으나 100 nM의 VCR의 경우 세포독성을 나타내지 않았다. 그러나 저산소배양을 한 경우 약제의 효과와는 무관하게 세포사멸이 발생하였다. 일반적으로 저산소증에 대한 *in vivo*에서 종양세포의 반응은 크게 두 가지 양상으로 나타난다. 저산소증은 대부분의 종양세포에서 p53 단백질을 유도하여 세포고사를 일으킨다.<sup>42</sup> 반면, 일부 종양세포는 저산소증에 의해 특정한 유전자들의 전사가 유도되어 세포생존경로가 활성화되는데, 이러한 저산소증 유도 전사인자로서 c-met oncogene의 전사를 활성화하는 것으로 알려진 것이 HIF-1이다.<sup>20,43,44</sup> 최근에는 HIF-1 이외에도 CREB (cyclic AMP-response-element binding protein),<sup>45</sup> AP-1 (activator protein-1), NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B)<sup>46,47</sup> 및 Egr-1 (early growth response-1 protein)<sup>48</sup>등이 저산소증에 의해 유도되는 전사인자로 밝혀졌다. 본 실험에서도 위암세포주(MKN-45)의 경우 hypoxic stress에 의해 세포사멸이 증가하는 것을 MTT assay를 통해 관찰할 수 있었으나, 동시에 저산소증에 의해 유도되는 것으로 알려진 c-met 단백질의 발현이 증가되어 위암세포주에서도 hypoxic 자극에 의한 malignant phenotypic change에 c-met 단백질이 연관되어 있음을 시

사하였다. 물론 더 나아가 여러 hypoxia 반응성 전사인자들 중 어떤 것이 위암세포에서 c-met 단백질의 발현 증가를 직접적으로 야기하는지에 대한 고찰과 저산소증에 세포사멸의 기전에 관한 추가 연구가 필요할 것이다.

c-met 과발현을 보인 MKN-45 세포주에서 GA와 VCR의 항침윤효과와 작용기전을 알아본 결과, c-met 단백질의 발현억제와 MKN-45 세포의 침윤능 감소와는 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 이러한 관찰은 임상적으로 c-met 과발현을 보이는 위암조직에서 c-met 특이적 억제제와 항세포골격제제의 사용으로 침윤을 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다. GA는 ansamycin 계열의 benzoquinone 화합물로 처음에는 항진균효과(anti-fungal activity)를 갖는 천연화합물로서 동정되었다.<sup>49</sup> 이후 v-Src 와 같은 oncogene kinase를 transfection 한 종양세포에서 항증식효과가 입증되었으며 c-met tyrosine kinase의 선택적 억제제로서 소개가 되었다.<sup>50,51</sup> 본 연구에서 1  $\mu$ M 농도의 GA를 처리한 경우 대조군이나 VCR을 처리한 군과 비교하여 현저한 c-met 단백질의 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 GA의 c-met 단백질 억제효과는 HGF에 의해 반전되지 않았는데 문헌보고마다 세포 특이적인 c-met 활성화 기전이 조금씩 차이를 보이며 Shinomiya 등은 RNA 간섭을 이용한 연구결과 위암세포주(MKN-45)를 포함한 다양한 암세포주에서 ligand의 존재유무에 의존하지 않는 c-met 신호전달체계의 활성화를 관찰하였으며 c-met mRNA 간섭에 의해 c-met 기능을 억제하면 세포고사가 촉발되는 것을 보고하였다.<sup>52</sup> 본 연구결과 역시 c-met 단백질을 과발현하는 위암세포주인 MKN-45의 경우 HGF와는 무관한 c-met signaling 활성화경로를 통해 암세포의 성장과 침윤에 중요한 생물학적 기능이 조절되는 것을 알 수 있었다.

궁극적으로 침윤과 전이가 발생하기 위해서는 암세포의 이동성 획득이 중요하며 실제로 이동이 일어나야 한다. c-met 신호체계가 세포의 malignant behavior와 연관되어 다양한 생물학적 기능을 변화시켜도 실제로 세포자체의 이동성이 없다면 효과적인 침윤 및 전이가 발생하기 어렵다. 이동능을 갖는 암세포의 경우 cytoskeletal remodeling이란

고유한 기전을 통해 directed locomotion이 가능하다.<sup>16,53</sup> 이러한 cytoskeletal remodeling을 조절하는 기전으로 세포골격을 구성하는 단백질 중에서도 특히 microtubule의 dynamics가 중요한 것으로 보고되고 있다.<sup>17-19</sup> Directed locomotion을 위해서는 세포극성(polarity)과 이동방향의 세포막첨단에서의 lamellipodia 형성이 중요한데 lamellipodia는 세포골격을 구성하는 단백질들 중 특히 actin filament가 중요한 성분으로 실제 lamellipodia는 actin을 근간으로 구성된다. 이러한 lamellipodia는 microtubule-dependent cytoskeletal dynamic remodelling을 통해 형성되는 것으로 알려져 있다.<sup>54</sup> 따라서 microtubule을 억제하는 항세포골격제제를 사용하면 침윤을 위한 실질적인 기계적인 세포이동과정이 봉쇄되어 효과적인 침윤억제 현상을 기대할 수 있을 것이다. 본 실험에서 사용한 VCR은 다른 microtubule 저해제인 colchicine이나 taxane과는 다른 독특한 특성을 갖는다. VCR은 낮은 농도(0.1  $\mu\text{M}$ )에서는 주로 microtubule의 선단에 결합하여 "treadmilling-dynamics"를 억제하는 반면, microtubule의 중합 과정에는 영향을 미치지 않는다. 또한 저농도의 VCR은 'end-dependent' dynamic instability에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 반면 고농도로 사용하게 되면 microtubule의 polymerization을 억제한다.<sup>55</sup>

본 실험에서 사용한 VCR의 농도는 100 nM 및 250 nM이었으며 두 농도간의 생물학적 효능의 차이를 뚜렷이 감별하기는 어려웠으나, 약물약동학적으로 저농도의 용량으로 microtubule의 depolymerization을 유발하지는 않았을 것으로 사료된다. VCR과 유사한 작용기전을 갖는 nocodazole이나 taxol의 경우에도 microtubule 중합체(polymer)형성에 영향을 주지 않는 200 nM 이하의 비교적 낮은 농도에서 효과적으로 NRK 세포의 이동성을 60%이상 감소시키는 것으로 보고되었다.<sup>56</sup>

본 연구에서 VCR을 처리한 경우 MKN-45 세포의 c-met 단백질 발현에는 아무런 영향을 주지 않았다. 또한 matrigel invasion assay 결과 세포독성을 나타내지 않는 농도(100 nM)에서 효과적으로 암세포의 침윤을 억제하였다(Fig. 6). c-met 단백질 발현을 억제하는 농도(1  $\mu\text{M}$ )의 GA를 처리하였을 때에도 침윤하는 암세포의 수가 대조군

에 비해 평균 15.4%로 유의하게 감소하였으나, VCR 처리군의 경우 대조군 대비 평균 4.2%의 침윤능 감소로 GA에 비해 우수한 항침윤효과가 관찰되었다. 따라서 VCR의 경우 GA와는 다른 기전으로 즉, microtubule의 dynamics를 억제함으로써 보다 효과적으로 암세포의 침윤을 억제하는 것으로 이해할 수 있다.

실제로 암세포가 주변 조직으로 침윤하기 위해서는 세포의 이동성과 더불어 주변 기질을 분해하는 생화학적인 반응이 일어나야한다. 암세포-주변기질의 경계면에서 암세포에 의한 기질의 분해에 필요한 기질 단백질분해효소인 MMP-2와 MMP-9 등의 발현이 관찰되는데 MKN-45 위암세포의 경우 저산소증에 의해서 MMP-9의 발현 및 MMP-2의 활성화가 이루어지는 것으로 사료되었다. 정상산소배양 후 conditioned medium을 추출하여 시행한 gelatinase zymography에서는 미약한 pro-MMP-2의 기저발현만이 관찰되었으나, 저산소상태에서는 active-MMP-2와 MMP-9의 발현이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 7). 물론 이러한 관찰결과만으로 저산소증과 침윤능과의 관계를 직접적으로 연관 지어 설명하기는 힘들지만, 저산소증 상태에서 세포의 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 MMPs의 발현이 나타나는 것으로 미루어 저산소증으로 인해 일부 종양 세포들은 침윤능을 획득하는 것으로 사료되었다.

이상의 실험결과를 종합해보면 일반적으로 저산소증은 위암세포의 세포사멸을 초래하여 절대적인 세포수는 감소하지만 일부 세포가 저산소증에 대한 반응으로 특정한 유전자발현을 통해 불리한 주변 환경을 극복하고 생존하여 좀 더 malignant한 생물학적 표현형을 획득하는 것으로 사료된다. 이 과정에서 저산소증으로 인해 c-met 단백질의 발현이 증가되고 이와 연관되어 혹은 다른 알려지지 않은 경로를 통해 기질분해효소인 MMP-2와 MMP-9의 발현이 증가하는 것으로 생각되었다.

GA에 의한 항침윤효과가 c-met 신호체계의 신호전달경로에 영향을 주어 나타나는지 알아보기 위해 c-met 시스템의 중추적인 신호전달 단백질의 하나인 PI3K와 Src의 발현 양상과 GA 및 VCR 처리 후 발현 변화를 알아보았다. 흥미롭게도 저산소배양시 GA의 효과와 비교

하기 위해 대조약제로 사용한 VCR에 의해 뚜렷한 PI3K와 Src의 발현 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 8). GA 처리군에서 PI3K와 Src 단백질의 발현억제효과는 c-met 단백질 억제로 인해 c-met 시스템의 downstream에 위치하는 signaling molecule의 순차적인 인산화에 의한 활성화가 억제되어 혹은 단백질의 3차원적 안정성이 소실되어 발현이 감소하였다고 추정할 수 있으나<sup>57,58</sup> 전통적으로 microtubule의 기능을 억제하는 것으로 알려진 VCR이 PI3K와 Src의 발현을 억제하는 효과는 아직까지 문헌에 보고되지 않은 새로운 사실이다. Gelatinase zymography 결과와 비교해 볼 때 VCR이 저산소증 상태에서 MMP-2와 MMP-9의 발현을 억제한 효과는 아마도 PI3K의 신호전달 경로와 연관되어 있을 것으로 추측할 수 있으나 인과관계를 규명할 수는 없었다.

최근 중앙내 야기되는 저산소증을 오히려 항암치료의 표적으로 활용하고자 하는 선구적인 연구 결과가 보고되고 있다.<sup>59</sup> 특히 저산소증 반응성 약물의 개발과 적응증 확립이 항암약물치료의 새로운 영역으로 떠오르고 있는 시점에서<sup>60</sup> 저산소증 상태에서 일어나는 종양세포의 생물학적 행동의 변화와 항암약제의 새로운 작용 기전을 규명하여 새로운 적응증을 수립하고자 하는 노력은 매우 중요한 일이 될 것이다.

본 연구결과를 요약하면 사람위암세포주인 MKN-45의 경우 저산소증에 의해 종양세포의 성장과 이동, 궁극적인 침윤능을 조절하는 c-met 단백질의 발현이 증가되어 있었으며, c-met 단백질을 억제하는 생물학적인 제제인 GA를 사용하면 효과적으로 암세포의 성장과 침윤능이 억제됨을 알 수 있었다. 또한 항세포골격제제인 VCR을 처리하면 세포독성을 유발하지 않는 낮은 농도에서 효과적으로 세포의 이동과 침윤이 억제되는 것을 관찰하였으며, 산소농도에 의존적인 동일 약제의 상이한 작용기전이 있음을 알 수 있었다. 따라서 작용 기전에 근거한 약제들을 암의 생물학적 특성 및 이와 연관되어 발현되는 표적 분자를 목표로 사용하는 targeted therapy가 항침윤 및 항전이 치료로서 실제 임상적 적용이 가능할 것으로 생각한다.



## V. 결론

사람 위암세포주에서 침윤의 실제적인 기전에 근거하여 c-met 단백질 발현을 선택적으로 억제하는 생물학적 활성 억제제인 geldanamycin(GA)과 항세포골격제제인 vincristine(VCR)의 항침윤작용의 생물학적 효능을 검증하고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 모든 위암세포주에서 정도의 차이는 있었으나 c-met 단백질의 발현이 관찰되었으며 저산소상태에서 c-met 단백질의 발현이 증가되었다.
2. c-met 단백질을 과발현하는 MKN-45 세포에서 1  $\mu$ M GA 처리시 증등도(15-35.5%)의 세포독성을 나타내었다. VCR의 경우 100 nM 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 저산소상태에서 배양시 약물 처리와는 무관하게 고도의 세포독성과 세포사멸이 발생하였다.
3. 1  $\mu$ M GA 처리시 MKN-45 세포에서 c-met 단백질의 발현이 억제되었다. 반면 VCR은 50 nM, 100 nM 및 250 nM 의 농도에서 c-met 단백질의 발현에 아무 영향을 주지 않았다.
4. Matrigel invasion assay 결과 정상산소상태에서 1  $\mu$ M GA 처리시 대조군에 비해 15.3%로 침윤세포가 감소하였으며, VCR을 처리한 경우 100 nM에서 정상 대조군의 4.2%로 침윤세포수가 감소하였다. 저산소상태에서 같은 농도의 GA는 대조군의 38.9%로, VCR은 대조군의 11.1%로 침윤세포수를 감소시켰다.
5. Gelatinase zymography 결과 MKN-45 세포는 정상산소에서 MMP-2의 발현만 미약하게 관찰되었으나 저산소상태에서 MMP-9의 발현 및 MMP-2의 활성형이 발현되었으며, 1  $\mu$ M GA 와 100 nM VCR 처리시 MMPs의 발현은 효과적으로 억제되었다.
6. c-met 신호체계의 주요 신호전달중계물질인 PI3K와 Src의 경우 저산소상태에서 1  $\mu$ M GA와 100 nM 및 250 nM VCR 처리시 유의하게 발현이 억제되었다.

결론적으로 위암세포주의 침윤 및 전이와 연관된 c-met 단백질 및 c-met 신호체계를 표적으로 하는 생물학적 활성억제제와 세포의 이동에 필수적인 세포골격단백질을 표적으로 하는 항세포골격제제는 효과적으로 c-met 발현 위암세포의 침윤능을 억제함을 알 수 있었으며, 세포배양 산소농도에 따른 각 약제의 침윤억제 기전에 차이가 있음이 새로이 제시되었다. 암세포의 생물학적 특성과 이를 결정하는 표적 분자의 발현을 억제하는 생물학적 활성 억제제 및 작용기전에 근거한 약제를 사용하는 표적치료(targeted therapy)가 항침윤 및 항전이 치료로서 실제 임상적용이 가능할 것으로 생각된다.

## 참고 문헌

1. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
2. Mareel M and Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2002;83:337-76.
3. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:328-35.
4. Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, Hurwitz HI, Bergsland E, Sarkar S. Combined analysis of efficacy: The addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3706-12.
5. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: An active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:3502-8.
6. Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, Carbone DP, Henderson T, Kim ES, et al. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2544-55.
7. Franson PJ, Lapka DV. Antivascular endothelial growth factor

monoclonal antibody therapy: A promising paradigm in colorectal cancer. *Clin J Oncol Nurs* 2005;9:55-60.

8. Nakamura H, Takamori S, Fujii T, Ono M, Yamana H, Kuwano M, et al. Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (iressa) and trastuzumab (herceptin) in non-small-cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005;230:33-46.

9. Murata R, Nishimura Y, Hiraoka M. An antiangiogenic agent (TNP-470) inhibited reoxygenation during fractionated radiotherapy of murine mammary carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:1107-13.

10. Sudo T, Aruga A. Cancer cell therapy with HER2-specific monoclonal antibody. *Biotherapy* 2005;19:430-4.

11. Peyromaure M, Scotté F, Amsellem-Ouazana D, Vieillefond A, Oudard S, Beuzeboc P. Trastuzumab (herceptin™) in metastatic transitional cell carcinoma of the urinary tract: Report on six patients. *Eur Urol* 2005;48:771-5.

12. Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005;23:391-409.

13. Wang C-, Koay DC, Edwards A, Lu Z, Mor G, Ocal IT, et al. In vitro and in vivo effects of combination of trastuzumab (herceptin) and tamoxifen in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;92:251-63.

14. Saeki H. Enhanced cytotoxic effect by combination of herceptin

(trastuzumab) and 5-FU (5-fluorouracil) for HER2 overexpressing pancreatic cancer. *Yokohama Med J* 2005;56:111-9.

15. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae S-, Booth MF, Garkavtsev I, et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 2004;6:553-63.

16. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003;3:921-30

17. Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Hinz B, Imhof BA. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell* 2000;11:2999-3012.

18. Waterman-Storer CM, WorthyLake RA, Liu BP, Burridge K, Salmon ED. Microtubule growth activates Rac 1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* 1999;1:45-50.

19. Mikhailov A, Gunderson GG. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998;41:325-40.

20. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003;3:347-61.

21. Galeazzi E, Olivero M, Gervasio FC, De Stefani A, Valente G, Comoglio PM, et al. Detection of MET oncogene/hepatocyte growth factor receptor in lymph node metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol* 1997;254:S138-43.
22. Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, et al. Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:1862-8.
23. Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, et al. Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69:212-7.
24. Di Renzo MF, Poulsom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1995;55:1129-38.
25. Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992;7:2549-53.
26. Inoue T, Kataoka H, Goto K, Nagaike K, Igami K, Naka D, et al. Activation of c-met (hepatocyte growth factor receptor) in human gastric cancer tissue. *Cancer Sci* 2004;95:803-8.
27. Kubicka S, Claas C, Staab S, Kühnel F, Zender L, Trautwein C, et al. p53 mutation pattern and expression of c-erbB2 and c-met in gastric cancer: Relation to histological subtypes, Helicobacter pylori infection, and prognosis. *Dig Dis Sci*

2002;47:114-21.

28. Kijima Y, Hokita S, Yoshinaka H, Itoh T, Koriyama C, Eizuru Y, et al. Amplification and overexpression of c-met gene in epstein-barr virus-associated gastric carcinomas. *Oncology* 2002 ;62:60-5.

29. Huang T-, Wang J-, Lin S-, Lian S-, Hsieh J-. Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma: Correlation to clinical features. *Acta Oncologica* 2001 ;40:638-43.

30. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF. A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 2000;19:4947-53.

31. Louvard RAD, Robine S. Villin enhances hepatocyte growth factor-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2003;14:4641-53.

32. Vadnais J, Nault G, Daher Z, Amraei M, Dodier Y, Nabi IR, et al. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/Met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* 2002;277:48342-50.

33. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-42.

34. Laemmle UK. Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.

35. Fidler IJ, Radinsky R. Search for genes that suppress cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1700-3.

36. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989;49:6449-65.

37. Bottaro DP, Liotta LA. Out of air is not out of action. *Nature* 2003;423:593-5.

38. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:266-76.

39. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Met Rev* 2003;22:309-25.

40. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adaptor proteins. *Oncogene* 2000;19:5582-9.

41. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Met Rev* 2002;22:395-403.

42. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis, and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000;36:1649-60.



43. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5.
44. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8104-9.
45. Taylor CT, Furuta GT, Synnestvedt G, Colgan SP. Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12091-6.
46. Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:601-8.
47. Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, et al. Hypoxia-associated Induction of Early Growth Response-1 Gene Expression. *J Biol Chem* 1999;274:15030-40.
48. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:74-84.
49. Miyata Y. Hsp 90 inhibitor geldanamycin and its derivatives as novel cancer chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Des* 2005;11:1131-8.

50. Wang X, Le P, Liang C, Chan J, Kiewlich D, Miller T, et al. Potent and selective inhibitors of the Met[hepatocyte growth factor/scatter factor(HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1085-92.
51. Sawyers CL. Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev* 2003;17:2998-3010.
52. Shinomiya N. RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signalling and survival. *Cancer Res* 2004;64:7962-70.
53. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001;23:912-23.
54. Dugina VB, Alexandrova AY, Lane K, Bulanova E, Vasiliev JM. The role of the microtubular system in the cell response to HGF/SF. *J Cell Sci* 1995;108:1659-67.
55. Rowinsky EK, Tolcher AW. Antimicrotubule agents. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. editors. *Cancer: Principles and practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 390-416.
56. Liao G, Nagasaki T, Gundersen GG. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* 1995;108:3473-83.

57. Royal I, Park M. Hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1995;270:27780-7.
58. Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* 1999;17:361-73.
59. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumor hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:437-47.
60. Denny WA. The role of hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy. *Lancet Oncol* 2000;1:25-9.

## **Abstract**

The inhibitory effect of the biological agent geldanamycin and the anti-cytoskeletal agent vincristine on invasion in a human gastric cancer cell line

Jae-Ho Cheong

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Sung Hoon Noh)

Recent reports indicate that the oncogene kinase c-met is involved in the crucial steps of invasion and metastasis of cancer cells. Microtubule, one of the cytoskeletal proteins, is reported to play an important role in cancer cell motility and migration by dynamic rearrangements, thereby gives rise to an actual tumor invasion. The aim of this study was to test the biological efficacy of c-met inhibitor geldanamycin (GA) and anti-microtubule agent vincristine (VCR) in suppression of human gastric cancer cell invasion based on the mechanism of invasion. Using human gastric cancer cell lines of MKN-45, MKN-28, Kato-III, AGC, SNU 216, SNU 638 and SNU 719, we conducted normoxic and hypoxic cultures and examined the expression of c-met protein by Western blot assay. MKN-45 known for c-met overexpression was chosen for the following experiments. GA, a biological inhibitor of c-met and an anti-microtubule agent VCR were treated on MKN-45 cells. The cytotoxic effects of these agents were determined by means of the colorimetric MTT assay. In order to test the inhibitory effect of two agents on cell migration and invasion,

matrigel invasion assay was performed and the number of invading cells were counted and compared with the control group. In addition, we conducted gelatinase zymography to evaluate the expression of MMP-2 and MMP-9 by GA and VCR. Lastly, to confirm the mechanism of invasion inhibition of GA, we performed Western blot assay for PI3K and Src which are the two most important downstream molecules of c-met signaling system.

1. c-met protein was expressed on all cell lines tested with various expression levels. The expression level of c-met was increased in all cell lines by hypoxia.

2. GA at 1  $\mu$ M displayed moderate cytotoxicity (15-35.5%) when treated on MKN-45 cells. In contrast, VCR at 100 nM concentration did not cause cytotoxicity. However, in hypoxic culture, severe cell death was noticed regardless of drug treatments.

3. The treatment of 1  $\mu$ M of GA on MKN-45 cells inhibited c-met expression. However, VCR at various concentration of 50 nM, 100 nM and 250 nM did not affect the expression of c-met on MKN-45 cells.

4. On matrigel invasion assay, 1  $\mu$ M of GA reduced the number of invading cells by 15.3% of normal control and 100 nM of VCR by 4.2% in normoxic condition. In hypoxic condition, the same concentration of agents produced the similar results with normoxic condition: 38.9% of control by GA and 11.1% by VCR, respectively.

5. MKN-45 cells express weak baseline pro-MMP-2 in normoxia. However, in hypoxia, the expression of MMP-9 was newly observed and active-MMP-2 was evident. GA at 1  $\mu$ M and 100 nM of VCR suppressed the both MMP-2 and MMP-9 in hypoxia.

6. The expressions of PI3K and Src, the important downstream molecules of c-met signaling system, were effectively suppressed by 1  $\mu$ M of GA and 100 nM of VCR in hypoxia.

In conclusion, GA, the biological inhibitor of c-met, and the anti-microtubule agent VCR could display anti-invasion effects on met-expressing gastric cancer cells. Furthermore, we observed the different mechanism of anti-invasion effects according to the oxygen concentrations. Based on the mechanisms of drugs and by targeting cancer cell biology and molecules affecting biological phenotypes of cancer, targeted therapy of cancer invasion and metastasis could be applied to the clinical settings in near future.

---

Key Words : c-met, hypoxia, geldanamycin, vincristine, invasion, anti-invasive/anti-metastatic therapy, human gastric cancer cell line