

위암 세포의 이동에 대한
thymidine phosphorylase 의 역할

연세대학교 대학원
의 과 학 과
유 은 정

위암세포의 이동에 대한
thymidine phosphorylase 의 역할

지도교수 라 선 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

유 은 정

감사의 글

오랜시간 동안 여러가지로 부족한 점이 많은 저를 인내로 가르쳐 주시고, 이끌어 주신 라선영 선생님, 언제나 연구하는 모습으로, 학자로서 나아가야 할 길을 보여주신 정현철 선생님, 바쁘신 시간 내주시어 관심 가져주시며, 조언해주신 양우익 선생님 진심으로 감사 드립니다.

실험의 처음부터 끝까지 함께해 주시고 지도해주신 정희철 선생님, 실험적인 면과 그밖에 여러 가지를 가르쳐 주신 김태수 선생님, 항상 밝게 맞아주시고 힘을 실어주신 박규현 선생님, 실험에 관심 가져주시고 조언해주신 오봉경 선생님, 통계학의 기초를 잡아주신 김기열 박사님, 별 때마다 따뜻한 안부인사 전해주신 양상화 박사님 감사 드립니다.

울 한해 좋은 일 가득한 유근오빠 항상 행복하세요, 사고칠 때마다 뒀수습 해주시는 너무 사랑스러운 그녀, 싸부 정옥언니, 언제나 밝은 모습으로 세심한 배려해주신 태수오빠, 터프함과 섬세함이 함께 하는 우선언니, 2년동안 옆자리에서 온갖 투정을 다 받아준 원주언니, 실험실의 방장 찬희오빠, 엉뚱한 모습의 귀여운 귀연언니, 장난끼 가득한 새신랑 동혁오빠, 언제나 유쾌한, 꿈꾸는 드러머 승희오빠, 카리스마 넘치는 선정언니, 예리한 판단력의 재준오빠, 연구실 생활 열심히 해나가고 있는 막둥이 원석이, 털렁대고, 정신 없는 나를 너무도 잘 챙겨주고, 항상 힘을 준 소중한 친구 명은이, 호흡기 내과 주혜언니, 정희, 실험실 밖에서 사소한 일들을 꼼꼼하게 챙겨주시는 순천언니와 윤정이, 너무나 착하고 예쁜 앞방 아가씨 민주, 먼 곳에서도 언제나 용기를 북돋아준 효영언니 감사 드립니다.

오랜 시간 동안 추억을 함께한 나의 친구들, 새로운 도전을 앞에 둔 미경,

이하영, 석사생활 무사히 마치고 멋지게 변신한 미옥이, 어느새 사회의 일원이 되어 자기 몫을 하고 있는 순희, 박하영, 어리버리하다고 구박하지만 항상 챙겨주는 진호, 같은 길을 걷고 있어서 더욱 맘이 통하는 지희, 동준오빠, 드디어 졸업의 문에 다다른 수다친구 수연이, 언제 만나도 편한 진수씨, 나보다 더 흥분해주며 걱정해주는 아들녀석 자빈이, 어엿한 회사원이 되어버린 만득이 경득오빠, 2년동안 심심찮게 나의 운전기사가 되어주고 간식을 조달해준 승원오빠, 항상 힘내라고 말해주며 의지가 되어준 두원오빠, 경덕오빠, 애기아빠가 된 유철오빠와 아름다운 명진언니, 꿈꾸는 청춘을 만들어준 노부, 부사모, 보스톤 식구들 감사합니다.

무뚝뚝한 동생에게 늘 위로와 격려를 해준 사랑하는 오빠 승혁, 언제나 내 걱정엔 한숨이고 딸이 제일 무섭다는, 세상에서 가장 사랑하는 울 엄마, 편안한 곳에서 쉬고 계실 나의 아빠. 아빠가 지켜주시는 것 같아, 밤길이 무섭지 않았습시다. 언제나 사랑해요.

아무것도 모르고 덤벼든 저의 석사 2년, 많은 분들의 가르침과 인도로 이곳까지 왔습시다. 두려운 마음에 도망가고 싶을 때 의지가 되어주시고, 일어설 힘을 주신 모든 분들께 감사 드립니다. 지금 받은 큰 사랑으로 더 열심히, 그리고 씩씩하게 앞으로 나아가겠습니다.

유 은 정 드림

목 차

국문요약	1
I. 서론	5
II. 재료 및 방법	9
1. 시약 및 재료	9
2. 세포 배양	10
3. TP 과발현 세포주의 확립	10
4. 세포의 이동능 비교를 위한 migration assay	11
5. 세포독성 확인을 위한 MTT assay	12
6. 세포의 부착능 비교를 위한 adhesion assay	13
7. 세포내 actin 의 발현을 관찰하기 위한 면역형광염색	13
8. Immunoblotting	14
9. 결과 분석과 통계처리	16
III. 결과	18
1. TP 의 발현에 따른 세포의 이동능 변화	18
가. 다양한 위암세포주내의 TP 발현과 세포의 이동능과의 연관성	18
나. TP 발현 세포주의 확립 및 세포내 TP 발현 확인	20
다. TP 발현 세포주의 이동능 비교	20
2. 세포의 이동능에 TP 와 2dR 의 투여가 미치는 영향	22

3. 항 TPI 체제에 의한 세포 이동능의 가역성관찰.....	25
가. TPI의 처리에 의한 TP의 역할 억제.....	25
나. 2LR 처리에 의한 2dR의 활성 억제.....	29
4. 세포의 부착능에 대한 TP와 2dR의 영향.....	33
5. TP와 연관된 세포의 이동기작 탐구.....	37
가. TP와 2dR 처리시 세포내 TP의 발현변화.....	37
나. TP와 2dR 처리시 FAK 인산화 비교.....	37
다. TP와 2dR 처리시 PI3K/Akt pathway 인산화 비교.....	41
IV. 고찰.....	44
V. 결론.....	52
참고문헌.....	53
영문요약.....	63

그림 차례

Figure 1. Study scheme·····	13
Figure 2. The correlation between TP expression and cell migration in gastric cancer cell lines·····	16
Figure 3. The effect of thymidine phosphorylase (TP) on tumor cell migration·····	17
Figure 4. Treatment of TP and 2dR induces gastric cancer cell migration·····	19
Figure 5. TPI inhibits TP-mediated cancer cell migration·····	22
Figure 6. 2LR has no influence on the TP-mediated cancer cell migration·····	25
Figure 7. TP and 2dR induced cell adhesion in tumor cells·····	28
Figure 8. TP and 2dR has no effect on FAK phosphorylation·····	30

Figure 9. TP and 2dR induce cell migration via PI3/Akt pathway.....33

Figure 10. Schematic signaling pathway of TP related cancer cell migration in AGS cell lines.....39

국문요약

위암 세포의 이동에 대한 thymidine phosphorylase 의 역할

세포의 이동능의 획득은 암의 전이에 있어 중요한 과정으로 세포가 세포외기질에 부착되는 것으로 시작되며, 이로 인해 세포내의 다양한 신호전달기작이 활성화된다. 이 중 focal adhesion kinase (FAK)는 focal adhesion 의 형성으로 활성화되며 내부 tyrosine 잔기들의 인산화에 의해 활성화되어 다른 세포질, 세포골격 단백질이 세포의 부착부위에 결합되는 것을 유도한다. 또한 성장인자와 integrin 에 의해 활성화 되는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)는 Akt 및 그 하부 단백질들의 인산화를 유도함으로써 여러 세포기능을 조절하며, 세포의 생존, 증식, 이동 등에 영향을 미친다.

Thymidine phosphorylase (TP)는 사람의 platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)와 동일 물질로서 thymidine 을 thymine 과 2-deoxy-D-ribose (2dR)로 전환시킬 뿐 아니라 신생혈관 유도물질로서 작용한다. TP 는 많은 암종에서 주위 정상조직에 비해 높게 발현되며, 신생혈관유도 능력과 상관없이 TP 의 발현은 임상적으로 불량한 예후의 지표로 알려져 있다. 이것은 TP 가 신생혈관유도 능력뿐만 아니라, 그 자체가 암의 진행에 생물학적 연

관이 있을 것 이라는 가능성을 제시한다. 따라서 본 연구에서는 TP 와 이의 효소 작용의 매개체인 2dR 이 위암세포의 이동능에 미치는 영향을 관찰하고, 이와 관련된 신호전달경로를 알아보고자 하였다.

본 실험을 위해 MKN-45 세포주에 TP 를 과발현시킨 세포주 (MKN-45/TP)를 확립하였으며, 세포내 TP 의 발현을 보이는 AGS 세포주를 연구에 함께 사용하였다. 세포의 이동능과 부착능을 각각 matrigel 을 coating 한 상태에서 migration assay 와 adhesion assay 로 평가하였다. TP 와 2dR 의 억제제인 TPI (TP inhibitor)와 2LR (2-deoxy-L-ribose)을 처리하여 TP 와 2dR 이 세포의 이동능에 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, 면역형광염색법을 이용하여 세포내 actin 의 분포를 확인 하였다. 세포의 이동에 관련된 신호 전달기작을 확인하기 위해 FAK, Akt, P70S6K 에 대한 immunoblotting 을 수행하였으며 모든 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타냈다.

1. 세포이동능 조사에서 MKN-45/TP 세포주는, 모세포주와 mock transfection 세포주 (MKN-45/CV)에 비해 이동능이 증가하였으며, 외부에서 TP 나 2dR 을 첨가 하였을 경우 배양액만을 넣었을 때 보다 세포의 이동이 증가하였다. TP 억제제를 처리하였을 때 TP 가 과발현되는 세포주의 이동이 감소하였으며, 2dR 의 억제제인 2LR 을 처리하였을 때는 이동능이 약간 감소되었다. 세포내 TP 를

발현하는 AGS 세포주는 세포외에서 주입된 TP 와 2dR 에 의해 이동능이 증가하였다. TPI 와 2LR 에 의한 이동능의 감소는 미약하게 나타났는데, 이는 세포주내의 TP 발현정도와 연관이 있을것이라 여겨진다.

2. 세포의 부착능을 조사하였을 때 MKN-45 세포주와 AGS 세포주 모두 TP 와 2dR 의 첨가에 의해 세포의 부착능이 증가하였다. AGS 세포주에 대해 형광면역염색을 수행하여 세포내 actin 의 분포를 확인하였을 때 세포내에 actin 의 발현이 증가 하였으며 세포부착면적의 변화에 의해 세포의 부착능이 증가함을 확인하였다.

3. 이와 같은 결과를 바탕으로 TP 와 2dR 에 의해 세포의 이동능이 증가할때 세포이동에 관여하는 신호전달경로의 변화를 확인하였다. FAK 의 인산화를 확인하였을 때, 대조군을 포함한 모든 실험군에서 Tyr397/576 잔기의 인산화가 진행되었으며 시간에 따른 변화 역시 나타나지 않았다. 다른 신호전달 경로인 PI3K/Akt pathway 의 경우, TP 와 2dR 첨가 후 6 시간 부터 Akt 의 인산화가 증가하였으며, Akt 의 하위작동단백질인 p70S6K 역시 인산화가 증가함을 관찰하였다. 이러한 결과는 TP 와 2dR 이 암세포의 이동에 있어 PI3K/Akt 경로에 관여하리라는 것을 제시한다.

본 연구를 통해 세포내 TP 의 발현과 외부에서 주입된 TP 와 2dR 이 세포의 이동능과 세포의 부착능을 증가시킴을 확인하였다. TP 와 2dR 에 관련된 위암 세포의 이동능 향상에 PI3K/Akt 경로가 연관되어 있음을 확인하였으며 이러한 in vitro 실험결과는 TP 의 발현이 일부암에서 불량한 예측인자로 적용될 수 있는 기전을 설명해 줄 수 있다고 사료된다.

핵심되는 말: 위암, 이동능, Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose

위암 세포의 이동에 대한 thymidine phosphorylase 의 역할

<지도교수 라 선 영>

연세대학교 대학원 의과학과

유 은 정

I. 서론

세포의 이동과 이에 동반된 세포외기질 (extracellular matrix)의 재배열은 암의 침윤 및 전이 과정과 신생혈관형성에서 중요한 단계로 인식되어왔다.^{1,2} 암세포의 운동능력은 암세포 자체 또는 세포외기질에서 생성, 분비되는 물질에 의해 제어되며, 이는 암세포와 세포외기질의 상호작용에 의존하고 있다.^{3,4,5} 암세포가 세포외기질에 부착되어 focal adhesion 이 형성되면, 이는 세포의 생존, 증식, 이동 등 여러 생리적 조절에 관여하는 신호의 전달을 매개한다.⁶ 이중 focal adhesion kinase (FAK)는 focal adhesion 에서 활성화되며, actin 을 비롯한 세포질 또는 세포골격을 이루는 여러 단백질들을 focal adhesion 으로 모이게 하여 세포의 부착과 이동을 매개하는 중요한 단백질중 하나이다.^{7,8} 또한 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)는 세포의 부착, 단백질 합성과 세포성장, 분화, 생존 등과

같은 세포의 생리과정을 조절하는 단백질로서 성장인자의 자극 또는 세포와 세포외기질의 부착에 의해서 활성화된다.⁹ 그 하위신호전달 경로인 Akt는 serine/threonine protein kinase로서 PI3K에 의해서 Thr308, Ser473 부분이 인산화됨으로서 활성화 되고 P70S6K는 Akt의 effector로 작용하며, 인산화가 일어나면 actin 섬유의 재배열을 유도하여 세포의 이동을 촉진시킨다.^{10,11,12}

Thymidine phosphorylase (TP)는 pyrimidine nucleoside 대사에 관여하는 효소로서 처음 분리되었으나, 최근 platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)와 동일한 물질임이 밝혀지면서 신생혈관형성인자로서의 역할도 하고 있음이 알려졌다. TP는 thymidine을 thymine과 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate로 가역적으로 변환시키며, 이것은 추가적인 탈인산화과정에 의해 2-deoxy-D-ribose (2dR)로 바뀌어 세포내외로 배출된다. 2dR은 내피세포에서 주화성과 신생혈관생성능을 지니는 것으로 보고되고 있으며, TP의 실제적인 매개체 역할을 한다.^{13,14} TP는 주위의 정상 조직에 비해 암조직에서 높게 발현되고, 이의 발현은 종양의 침윤, 종양내의 혈관밀도, matrix metalloproteinase의 발현과 상관성을 보이며, TP의 발현이 높은 암은 불량한 임상경과를 보이고 있음이 알려져 있어 TP의 암의 진단과 치료에 적용 가능한 생물학적 표지자로서의 역할에 대한 논의가 있어 왔다.^{15,16,17} 하지만, (1) TP의 발

현이 대장암이나 신장암 등 일부 암에서는 신생혈관형성인자로서의 기능과 관계 없이 독립적으로 불량한 예후인자로 작용하며, (2) 위, 대장, 신장, 폐, 자궁, 간암 등에서 원발암에 비해 전이암 조직에서 TP의 발현이 의미있게 상승하며¹⁸⁻²³, (3) TP를 과발현시킨 KB 두경부암 세포주가 대조군에 비하여 간전이율이 높다는 동물모델과 함께²⁴ (4) 최근 TP의 억제제인 TP inhibitor (TPI)에 의해 TP의 주화성과 TP 발현 암세포의 기저막 침윤을 억제할 수 있음을 보여주는 결과는^{25,26,27} TP가 신생혈관형성인자로서의 역할 이외에도 암의 진행과 전이에 관련된 다양한 생물학적 기능을 가지고 있을 가능성을 제시한다.

암의 침윤과 전이에 암세포의 세포외기질에의 접착과 운동능이 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려진 사실이나, 현재까지 TP의 발현과 암세포의 이동능과의 관계에 대한 보고는 극히 미미하며, 특히 암세포에서 TP와 관련된 이동능증가의 기전을 직접적으로 밝힌 연구는 거의 없다. 이러한 원인은 TP의 특성에 의한 연구적 접근의 어려움으로, 다른 신생혈관형성인자와는 달리 TP와 그 매개체로 알려진 2dR에 대한 세포표면의 수용체가 현재까지 발견되지 않았고, TP가 세포외로 분비된다는 보고가 없으며 TP의 단백질 구조에 세포외분비에 필요한 신호서열이 포함되지 않았고, TP의 발현과 관련된 하부의 신호전달체계가 아직 알려져 있지 않기 때문이다.

위암은 우리나라에서 가장 많은 암이며 전세계 암사망의 수위를 차지하는 중요한 암이다. 위암은 진단시에 50% 정도만 절제가 가능하며, 근치적 수술후에도 60%에서 재발하여 지속적인 치료법 개발에도 불구하고 아직까지 그 예후는 만족스럽지 않다. 이는 위암의 진행 초기부터 일어나는 주위조직으로의 침윤과 전이능에 기인하는데, 실험적으로도 위암세포가 높은 이동능과 침윤성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나 이러한 기전은 확실히 밝혀져 있지는 않다. 그러므로 위암의 이동능에 관여하는 물질과 그 기전을 파악하고 이를 억제하려는 시도는 위암의 암화와 전이 과정에 대한 이해는 물론 장래의 생물학적 치료제 개발을 위한 표적선정에도 의미가 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 TP 와 그 매개체인 2dR 이 위암 세포의 이동능에 미치는 영향을 관찰하며 이와 관련된 신호전달경로를 파악하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 재료

TP 의 stable transfectant 세포주 확립을 위한 Human TP 의 cDNA 가 삽입되어 있는 expression vector 는 일본 Kagoshima 대학의 Dr. Akiyama 에게 기증받아 사용하였다. Human recombinant TP 와 anti-hPD-ECGF 는 R&D system (Minneapolis, MN, USA) 에서, 2dR 는 Sigma (St Louis, MS, USA)에서 구입하였고 TP 의 특이적 억제제인 TPI 는 Taiho 제약 (Saitama, Japan)에서 기증받았다. 또한 PI3K 억제제인 wortmannin 과 LY294002 는 각각 Sigma (St Louis, MS, USA)와 Calbiochem (San Diego, CA, USA) 에서 구입하였다. 세포외기질 coating 용으로 사용되는 matrigel 은 BD Science (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다.

TP 에 대한 마우스 단클론 항체는 Novocastra (New Castle, Upon Tyne, UK), pan-FAK 와 FAK 의 tyrosine 397 과 576 부위에 대한 인산화 특이 항체는 BD Science (Franklin Lakes, NJ, USA), 그 외 FAK 에 대한 인산화 특이 항체는 Biosource (Camarillo, CA, USA)에서 구입하였다. Pan-Akt 와 p-Akt (Thr473), p-P70S6K, Pan-P70S6K 는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

본 연구에 사용된 세포주는 미국 세포주은행 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 에서 구입한 AGS (ATCC CRL 1739), MKN-45, NCI-N87 (ATCC CRL 5822)과 함께, 연세대학교 의과대학 암연구소에서 복강내 전이 위암환자의 복수로부터 확립한 YCC (Yonsei Cancer Center, Seoul, Korea)-1, 2, 3, 7, 10, 16 을 사용하였다. 각각의 세포주는 RPMI 1640 (Nissui, Tokyo, Japan)배지에 56 °C 에서 30 분 간 비활성화시킨 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, Omega Scientific, Tarzana, CA, USA), streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 penicilin 100 units (Gibco, Grand island, NY, USA), 2 mM 의 L-glutamine (Gibco)을 첨가하여 만든 배양액으로 5% CO₂, 37 °C 의 배양기에서 배양하고, 배양액은 주 3 회 교체하였다.

3. TP 과발현 세포주의 확립

Full-length human TP cDNA 를 expression vector 인 pBK-RSV (RSV/TP)의 두 restriction site (Nhe I, EcoR)에 삽입하였다. MKN-45 세포를 10% 우태아 혈청이 첨가되지 않은 배양액에 부유시킨 후 일정량의 plasmid DNA 를 함께 처리하여, 얼음위에서 10 분간 배양시킨 후 세포 부유액을 0.5 mm gap electrophoration

cuvette 에 넣어 250 V 에서 BioRad Gene Pulser (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) 를 이용해 electroporation 을 시행 하였다. 세포를 다시 얼음에서 10 분간 놓아두고 10% 우태아혈청 이 첨가된 5 ml의 배양액을 첨가한 후 세포를 5% CO₂ 를 포함한 37°C 배양기에서 이틀동안 배양하였다. 이틀이 지난 후 세포를 1 mg/ml의 G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 배양액에 재부유 시킨 뒤, stable transfection 된 세포를 선택하기 위해 24-well plate 에 분주하였다. 2-4 주가 지난 후 집락을 형성한 well 을 선택 하여 TP 의 발현을 확인하였고 실험에 사용하였다 (MKN-45/TP). 또한 대조군으로서 위의 방법과 동일하게 plasmid 만 transfection 시킨 MKN-45 세포주를 확립하여 실험하였다 (MKN-45/CV).

4. 세포의 이동능 비교를 위한 migration assay

24-well 용 cell culture insert (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 matrigel 로 coating 하여 하룻밤 동안 건조시켰다. 0.1% BSA (Amresco, Solon, OH, USA)가 첨가된 배지에 TP, 2dR, TPI 또는 2LR 을 농도별로 처리하여 아래 chamber 에 채우고 insert 를 조립하였다. Cell dissociation solution (Sigma, St Louis, MS, USA)을 처리하여 세포들을 분리, 수확하여 단일세포 부유액으로 만들어 세포수를 측정하고 상부 chamber 에 0.1% BSA 가 첨가

된 배양액 100 μl 당 1×10^5 개의 세포를 주입하여 37°C 에서 36 시간 배양하였다. 배양이 끝난 insert 를 꺼내 이동이 되지 않은 세포들을 면봉으로 제거하고, 세포가 이동된 면을 0.5% crystal violet 으로 5 분간 염색하였다. 흐르는 물로 세척한 후 면봉을 이용하여 세포가 이동이 되지 않은 부분의 filter 를 다시 세척하고 insert 를 건조시킨 후, 200 배 광학 현미경을 이용하여 하부 chamber 로 이동한 세포의 수를 계수하였다. 실험은 매 회 세 차례 이상 시행하여 평균 \pm 표준편차로 나타냈다.

5. 세포 독성을 확인하기 위한 MTT assay

TPI, 2LR의 세포독성검사는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, Saint Louis, MO, USA) assay를 통하여 측정하였다.²⁸ 각 세포주를 96-well plate에 각 well당 100 μl 의 배양액안에 1×10^4 개의 세포를 분주하여 36 °C에서 24 시간 동안 배양 후, TPI와 2LR을 1, 10, 50, 100 μM 처리하였으며 대조군의 경우 배양액만 처리하였다. 36°C 에서 72 시간 배양 후, 50 μl (400 ug/ml)의 MTT 용액을 넣고 4 시간 더 배양시켰으며, 150 μl DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma, USA)를 첨가하여 MTT-formazan crystal을 용해시켰다. 10분간 추가반응시킨 후에 multi-well ELISA automatic Spectrometer recorder

(Behring ELISA Processor II, Germany)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 결과는 다음의 공식에 근거하여 세포의 생존비율로 표시하였다.

$$\text{세포 생존률(\%)} = \frac{\text{검체의 평균 흡광도} - \text{표준 흡광도}}{\text{대조군의 평균 흡광도} - \text{표준 흡광도}} \times 100$$

6. 세포의 부착능 비교를 위한 adhesion assay

96-well plate 를 matrigel 로 2 시간 coating 한 후 3% BSA 로 비특이적 결합을 차단하였다. $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$ 개의 세포를 분주하고 배양액만 처리한 대조군과 TP 또는 2dR 을 처리한 실험군으로 분류하여 37°C에서 2 시간 배양한 후, 부착이 되지않은 세포를 제거하고 PBS 로 세 번 세척하여 0.5% crystal violet 용액으로 염색하였다. 각 plate well 의 4 부분을 임의적으로 선정하여 부착된 세포를 계수하여 각 각의 평균과 표준편차를 구하였다.

7. 세포내 actin 의 발현을 관찰하기 위한 면역형광염색

Matrigel 로 coating 된 슬라이드에 세포를 분주한 뒤 TP, 2dR 또는 배양액만 처리하고 37°C에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 슬라이드를 4% paraformaldehyde 로 10 분간 고정한 뒤 0.1% Triton X-100 가 첨가된 PBS 로 10 분 동안 처리하였다. 슬라이드

를 1% BSA 가 첨가된 PBS 로 세 번 세척한 후 3% 우태아 혈청이 첨가된 PBS 를 사용하여 90 분 동안 실온에서 blocking 하였다.

Actin filament 의 분포를 관찰하기 위해 mouse monoclonal anti-actin antibody (1:2000, Abcam Ltd. Cambridge, UK)을 4℃ 에서 overnight incubation 하였다. 관찰을 위한 형광염색은 anti-mouse CY3 (1:500, Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, CA, USA)를 사용하였다. 핵염색을 위한 DAPI (1:1000, Vysis, Dounner Grove, IL, USA)는 상온에서 1 분간 처리하며 image 의 수집은 LSM 510 META confocal microscope (Zeiss, North America)를 사용하였다.

8. Immunoblotting

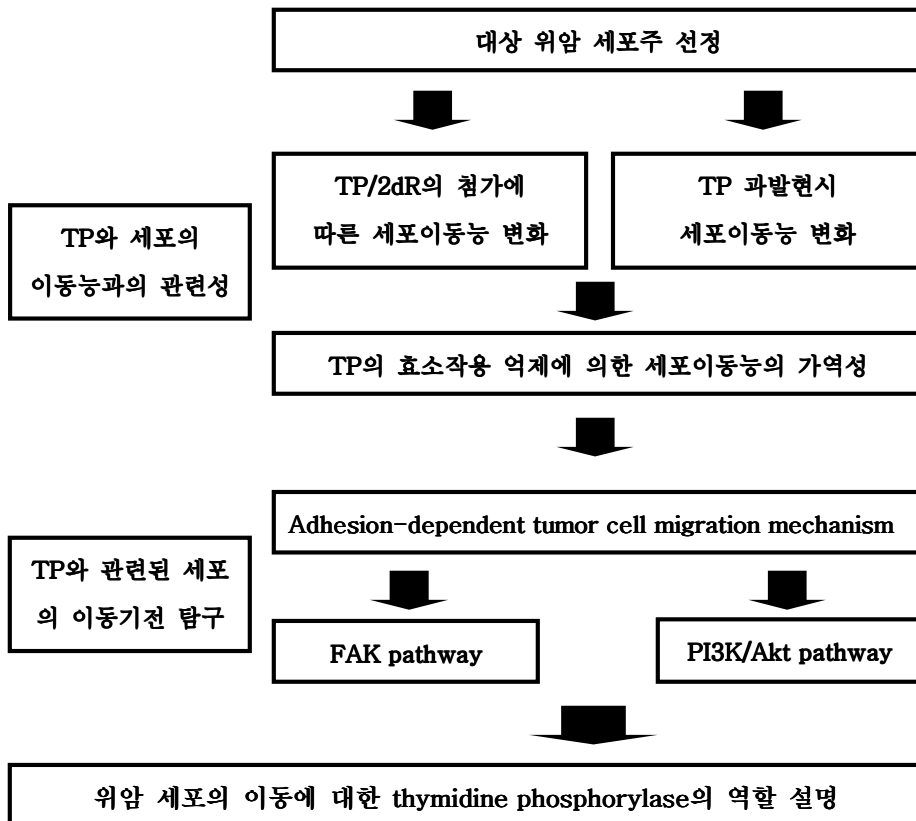
Immunoblotting 을 수행하기 위하여 원하는 조건에서 세포를 처리한 후 PBS 로 세척하여 배지를 제거하고, cell lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 10% Glycerol, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_3), protease inhibitor]를 첨가한 후 scraper 로 긁어 수확하여, cell lysate 를 25 G 바늘로 10-20 회 통과시킨 후 20-40 분 얼음 위에서 incubation 하였다. 12,500 rpm 으로 4 ℃ 에서 15 분간 원심분리하여 상층액만 분리하고 Bradford (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, USA)방법을 이용하여 정량한 후 실험까지 80 °C 에서 보관하였다.

Immunoblotting 은 동량의 단백질을 loading dye 와 섞어 100 °C heat block 에서 5 분 동안 denaturation 시키고 SDS-PAGE gel 에 loading 하였다. Membrane (Polyvinylidene difluoride membrane, Millipore Corporation, USA)에 전기영동한 후, blocking buffer (5% nonfat dry milk 를 함유한 0.1% TBS-tween 20)에 membrane 을 상온에서 1 시간 동안 incubation 시켰다. 일차항체를 희석해서 4°C 에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 TBS-t buffer 로 10 분씩 3 번 세척하였으며, 이차항체로 상온에서 1 시간 동안 incubation 후 TBS-t buffer 로 5 분씩 4 번 세척하였다. Membrane 에 ECL Western blotting reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 1 분간 상온에서 반응시킨 후, X-ray film (Fuji, Tokyo, Japan)에 감광하였다. 일차항체는 phospho-FAK Tyr397 (1:1000), Tyr576 (1:1000), phospho-Akt (1:1000), P70S6K (1:1000)을 사용하였으며 loading control 로서 anti- β -actin (1:10000, Abcam Ltd. Cambridge, UK)을 사용하였다. 이차항체는 ECLTM anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)와 ECLTM anti-rabbit IgG (Amersham)를 1:1000 으로 희석하여 사용하였다.

9. 결과 분석과 통계처리

모든 실험은 최소 세 번씩 수행하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 군간의 통계학적 비교는 Student's t - test 를 사용하였으며, 이들 간의 차이는 p - value 0.05 이하일 때를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.



TP : Thymidine phosphorylase

2dR : 2-deoxy-D-ribose

FAK : Focal adhesion kinase

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

Figure 1. Study Scheme

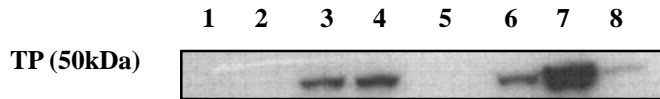
III. 결과

1. TP 의 발현에 따른 위암세포의 이동능 변화

가. 다양한 위암세포주내의 TP 발현과 세포의 이동능과의 연관성

TP 의 발현 정도가 위암 세포의 이동능과 연관성이 있는지를 알아보기 위해 8 개의 위암 세포주에 대한 TP 의 발현을 immunoblotting 을 통해 확인하였으며, migration assay 를 통해 각각의 이동능을 조사하였다. YCC-1, 2, 11 세포주의 경우 TP 가 발현 되지 않았고 다른 5 개의 세포주에서는 TP 의 발현이 다양하게 나타났다. 세포의 이동능을 비교하였을 때, TP 가 발현되는 세포주의 이동능이 상대적으로 높았으며, TP 가 발현되는 세포주내에서 TP 발현과 이동능이 비례하였다. 이와 같은 결과를 통해 TP 의 발현과 세포주의 이동능이 연관성이 있음을 발견하였다 ($R^2=0.4739$) (Figure 2).

A



B

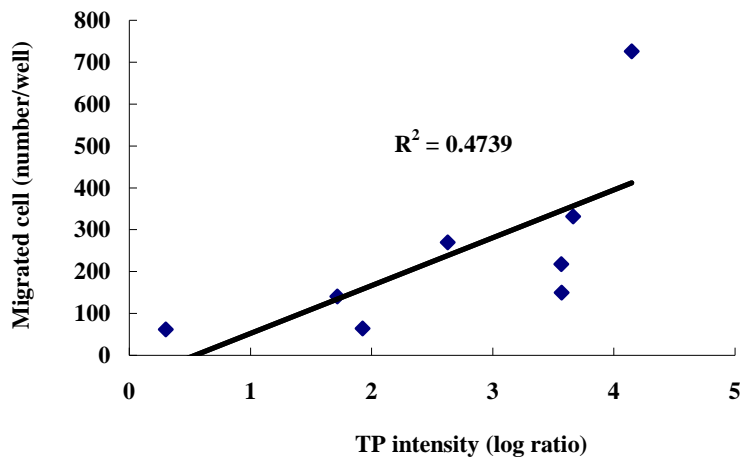


Figure 2. The correlation between TP expression and cell migration in gastric cancer cell lines. (A) TP expression of gastric cancer cell lines. (1: YCC-1, 2: YCC-2, 3: YCC-3, 4: YCC-9, 5: YCC-11, 6: NCI-N87, 7: YCC-16, 8: AGS) (B) The correlation between TP expression and cell migration.

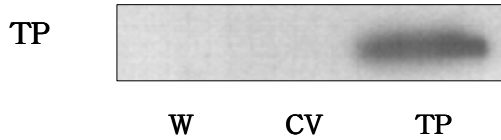
나. TP 발현 세포주의 확립 및 세포내 TP 발현 확인

TP 의 발현이 관찰되지 않는 MKN-45 세포주에 TP expression vector 를 각각 삽입시켜 TP 과발현세포주를 확립하였다 (MKN-45/TP). 또한 대조군으로서 위의 방법과 동일하게 plasmid 만 stable transfection 시킨 MKN-45 세포 (mock transfection)를 확립하여 실험하였다 (MKN-45/CV). TP 에 대해 immunoblotting 을 수행한 결과, 모세포와 CV 세포주에서는 TP 가 발현되지 않았으나, TP 를 삽입한 세포주에서는 현저한 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 3A).

다. TP 발현 세포주의 이동능 비교

TP 의 내재적 발현에 따른 matrigel 에서의 이동능을 알아보기 위해 migration assay 를 수행하였다 (Figure 2B). MKN-45 의 모세포주에 비해 MKN-45/CV 는 1.1 배, MKN-45/TP 는 1.7 배로 TP 과 발현 세포주의 경우 통계적으로 유의하게 이동능이 증가함을 관찰하였다 ($p < 0.001$). 이와 같은 결과로, 내재적 TP 의 발현이 위암 세포의 이동능을 증가시킴을 볼 수 있었다 (Figure 3B).

A



B

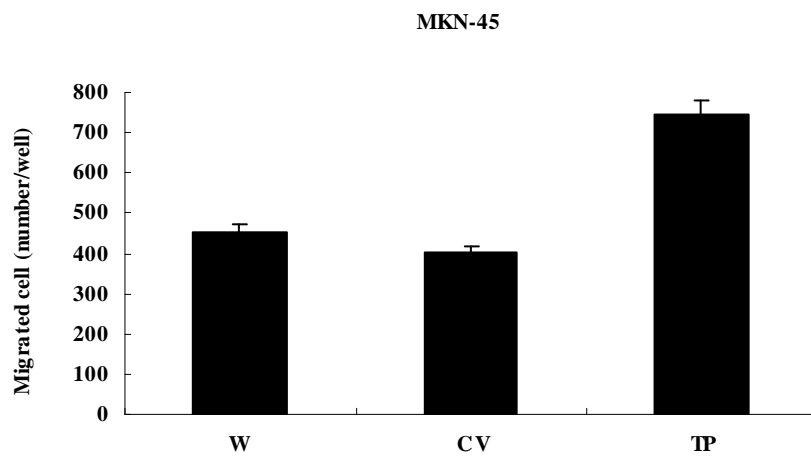


Figure 3. The effect of thymidine phosphorylase (TP) on tumor cell migration. (A) TP expression of MKN-45 cell lines (B) Migration assay of MKN-45 cell lines. Cells were seeded into the upper well of a transwell insert mixed in 0.1% BSA in media. After 36 hr, the number of migrated cells down the underside of transwell was quantitated. ($P < 0.05$, Student's t-test) (W: parent cell line , CV: mock-transfected cell line, TP: TP-transfected cell line)

2. 세포의 이동능에 TP 와 2dR 의 투여가 미치는 영향

TP 와 2dR 의 투여가 위암세포의 이동능에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 먼저 TP 를 내재하는 AGS 세포주를 대상으로 배양액에 일정농도의 TP 와 2dR 을 처리하여 세포의 이동능을 확인한 결과, 배양액만 처리한 대조군에 비해 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 세포의 이동능이 증가함을 관찰하였다. 이는 농도의존적인 경향을 보여 TP 와 2dR 각각 40 μ M 의 농도에서 최고 증가율을 보였으며, 이 때 TP 는 2.6 배 2dR 은 2.4 배로 서로 유사하였고 그 이상의 농도에서는 이동능이 감소하는 양상을 보였다 (Figure 4A). 이러한 결과로 TP 와 2dR 의 투여가 위암세포의 이동능이 증가함을 확인하였다. 그리고 TP 와 2dR 에 의한 이동능의 증가가 가장 높게 나타난 40 μ M 을 다음 실험을 위한 각각의 약제처리농도로 결정하였다.

MKN-45 세포주에 대해서도 TP 와 2dR 의 영향을 평가하였다. TP 가 발현하지 않는 모세포, MKN-45/CV 에서도 TP 와 2dR 에 의해 배지만 처리하였을 때에 비해 모세포주는 TP 와 2dR 에 대해 각각 1.72, 1.57 배, MKN-45/CV 는 1.89, 1.98 배 이동능이 증가함을 볼 수 있었다. 하지만 이러한 이동능의 향상은 MKN-45/TP 세포주 의 경우 상대적으로 현저하여 TP 와 2dR 에 대해 2.20, 2.15 배 증

가하였고, 모세포주에 비해서는 최대 3.7 배 증가하였다 (Figure 4B).

위의 결과로 세포 외부에서 투여한 TP, 2dR 은 위암세포의 이동능에 영향을 주며, 이러한 영향의 정도는 암세포의 내재적 TP 의 발현 정도와도 연관이 있음을 알 수 있다.

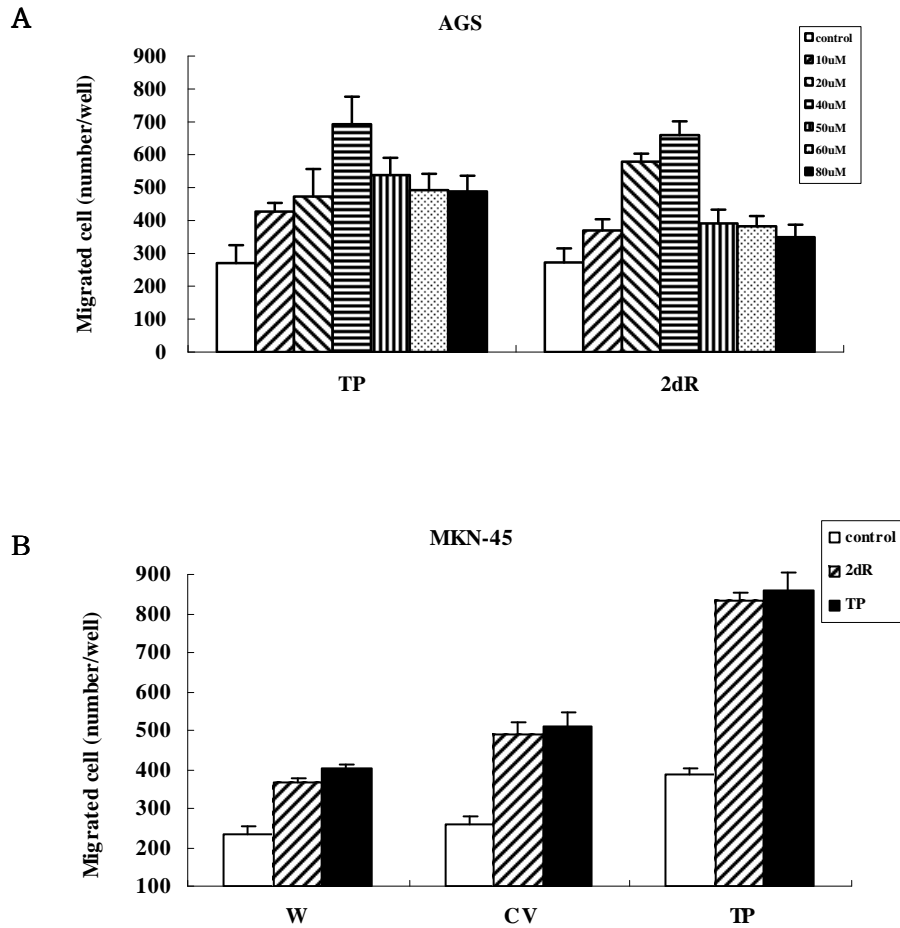


Figure 4. Treatment of TP and 2dR induces gastric cancer cell migration. Chemotaxis was stimulated by the addition of TP or 2dR in lower chambers. Control was stimulated with 0.1% BSA alone. (A) Migration assay with TP or 2dR treatment on AGS, (B) Migration assay with TP or 2dR treatment on MKN-45.

3. 항 TPI 제제에 의한 세포 이동능의 가역성관찰

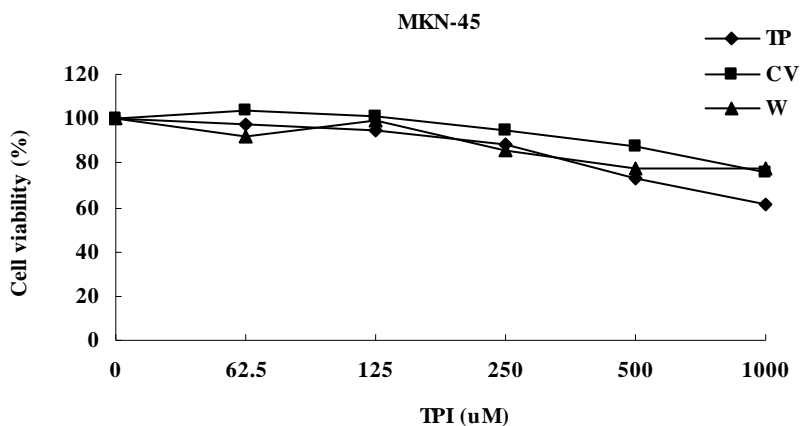
가. TPI 처리에 의한 TP 의 역할 억제

TP 의 선택적 저해제인 TPI 를 처리하여 내재적 TP 의 효과를 억제함으로써 MKN-45 세포주의 이동능에 대한 TP 의 영향을 관찰하였다 (Figure 5). 우선 TPI 가 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay 를 수행한 결과, 최고 125 μ M 에서도 세포의 생존률이 90% 이상으로 나타났으며 그 이하 농도에서는 유의한 독성은 나타나지 않았다 (Figure 5A). 따라서 다음 실험을 위한 TPI 의 최고 농도를 100 μ M 로 정하였다. TPI 를 10, 50, 100 μ M 의 농도별로 처리한 후 앞선 방법과 동일하게 migration assay 를 수행한 결과 MKN-45/TP 세포주는 50 μ M 까지 용량의존적으로 세포의 이동능이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 세포의 이동능은 50 μ M 에서 최고 46%가 감소하였으며 100 μ M 이상의 용량에서는 50 μ M 과 동 동일한 이동능 감소를 관찰하였다. 반면 모세포주와 MKN-45/CV 세포주에서는 모든 농도에서 이동능이 감소하지 않았다 (Figure 5B).

AGS 세포주에 대해 동일한 실험을 수행하였을 때, TPI 의 MTT assay 결과 10 μ M 이상에서 독성을 나타냈다 (Figure 5C). TPI 를

처리한 후 AGS 세포주의 이동능을 비교하였을 때 10 μ M 의 TPI 에서 이동능이 4 %정도 감소하였으며, 50, 100 μ M 에서 이동능이 각각 7%, 15% 감소하였으나 이는 TPI 자체의 독성에 의한 것으로 사료되었다. 즉, AGS 세포주에서 TPI 의 TP 에 의한 이동능을 억제하는 효과는 MKN-45 세포주에 비해 미약하게 나타나는 것을 확인하였다 (Figure 5D).

A



B

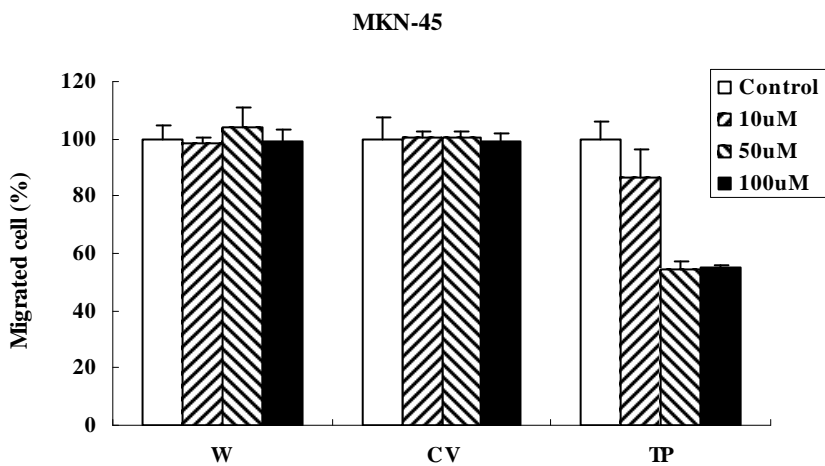


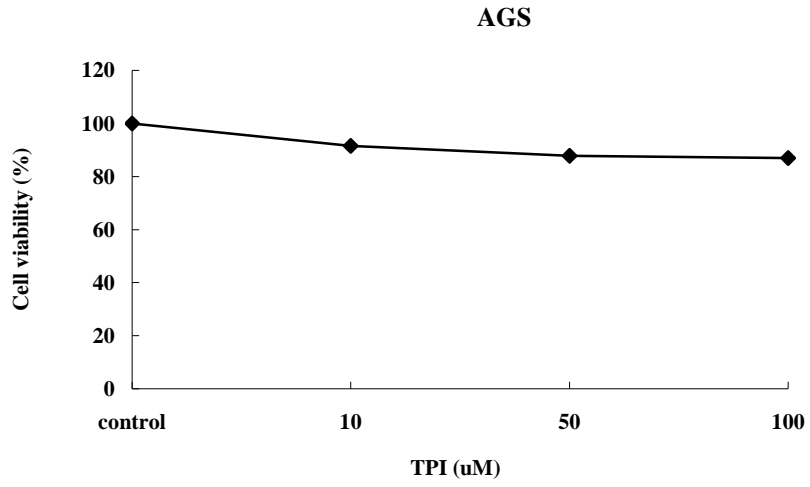
Figure 5. TPI inhibits TP-mediated cancer cell migration. (A)

MTT assay of TPI in MKN-45. (C) MTT assay of TPI in AGS.

(B) Migration assay with TPI treatment on MKN-45. (D)

Migration assay with TPI treatment AGS.

C



D

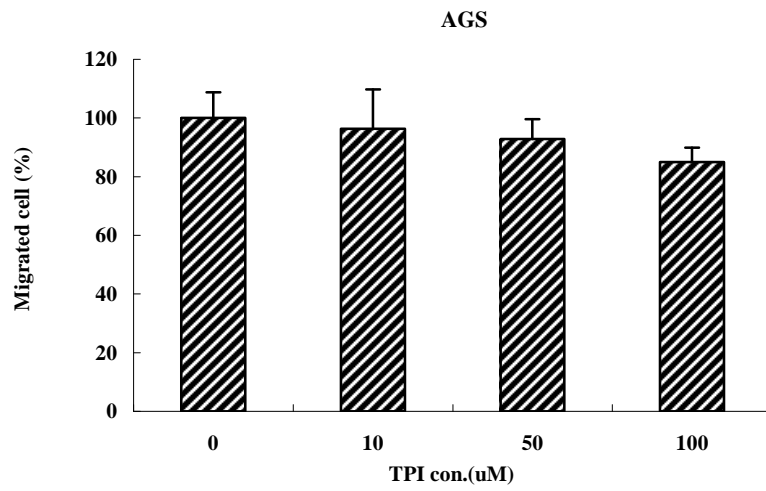


Figure 5. Continued.

나. 2LR 처리에 의한 2dR의 활성 억제

2dR의 활성을 억제함으로써 세포이동능에 대한 2dR의 역할을 재확인하였다 (Figure 6). 2dR의 경우 아직 그 기작이 확실히 알려지지 않았으나 isoform인 2-deoxy-L-ribose (2LR)가 2dR에 의한 신생혈관생성 작용을 억제하는 것으로 알려져 있어 2dR의 생물학적 저해제로 사용하였다. MKN-45 세포주에 대해 MTT assay를 수행하였으며 100 μ M까지의 구간에서 생존률 90% 이상임을 확인하였다 (Figure 6A). 동일한 농도에서 migration assay를 수행하였을 때, MKN-45/TP 세포주의 경우 10 μ M에서는 약 1%만이 감소되었고 최대 100 μ M에서 9%가 감소하였다 (Figure 6B). 반면 모세포주와 MKN-45/CV의 경우 세포의 이동억제 효과는 100 μ M에서도 거의 나타나지 않았다.

AGS의 경우 2LR의 MTT assay 결과 전 구간에서 독성이 나타나지 않았다. 2LR에 의한 세포의 이동능을 비교하였을 때 최대 100 μ M의 농도에서 9%정도 감소하였으며, 그 이하의 농도에서 5% 이하의 감소를 나타냈다. 따라서 2LR이 2dR에 의한 이동능에 미치는 영향이 미약함을 알 수 있었다 (Figure 6C, D).

이상의 결과를 보았을 때 TP와 2dR에 의해 위암세포의 이동능이

항진되고 이는 내재적 또는 외재적 TP 에 모두 영향을 받으며, 부분적으로 TP 의 생물학적 활성화에 연관되어있다고 할 수 있다.

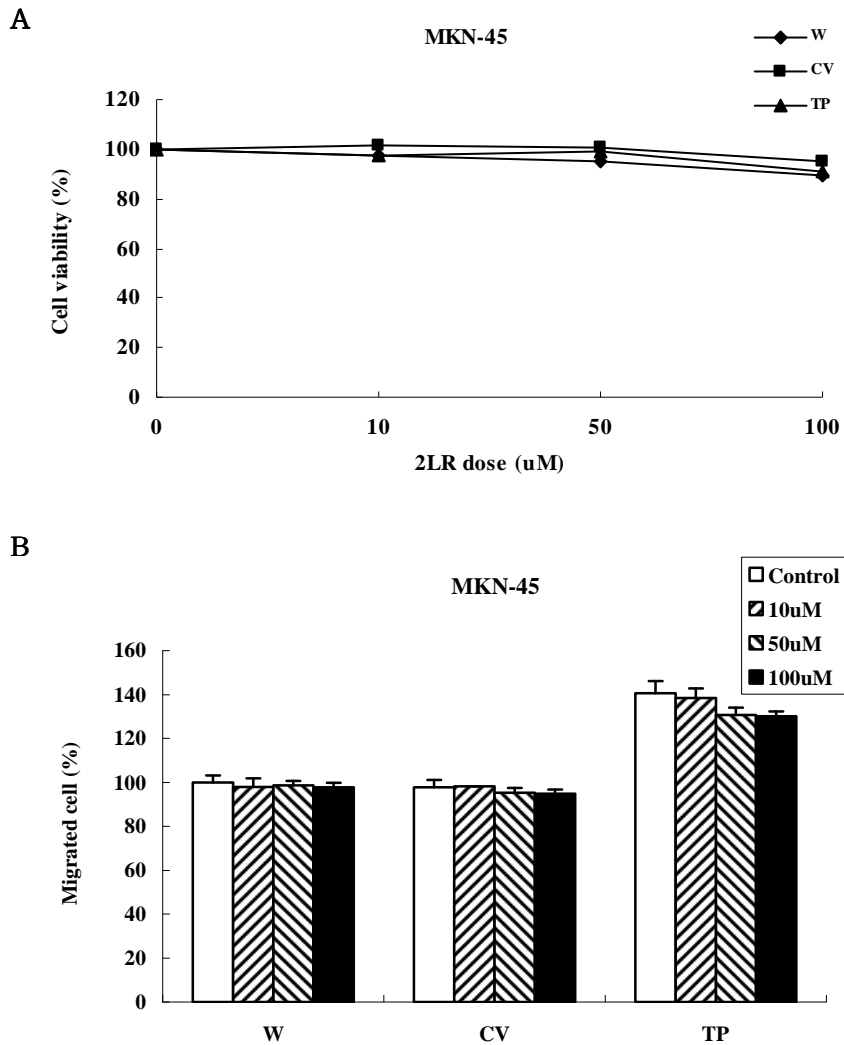
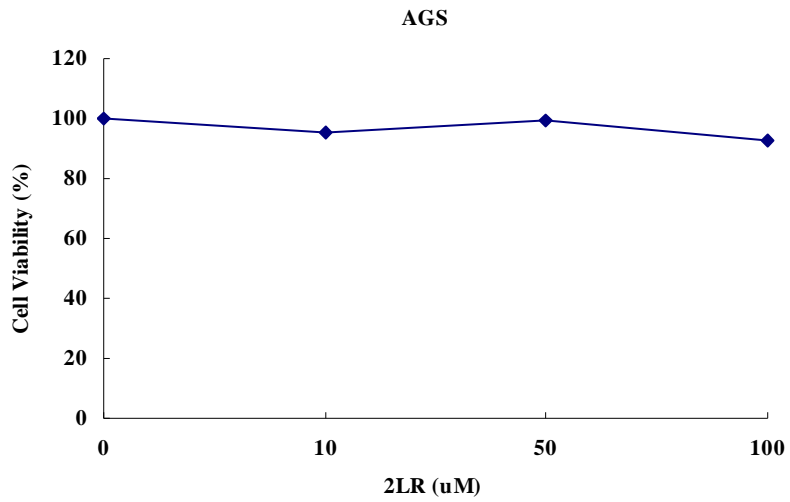


Figure 6. 2LR has no influence on the TP-mediated cancer cell migration. (A) MTT assay of 2LR in MKN-45. (C) MTT assay of 2LR in AGS. (B) Migration assay with 2LR treatment on MKN-45. (D) Migration assay with 2LR treatment on AGS.

C



D

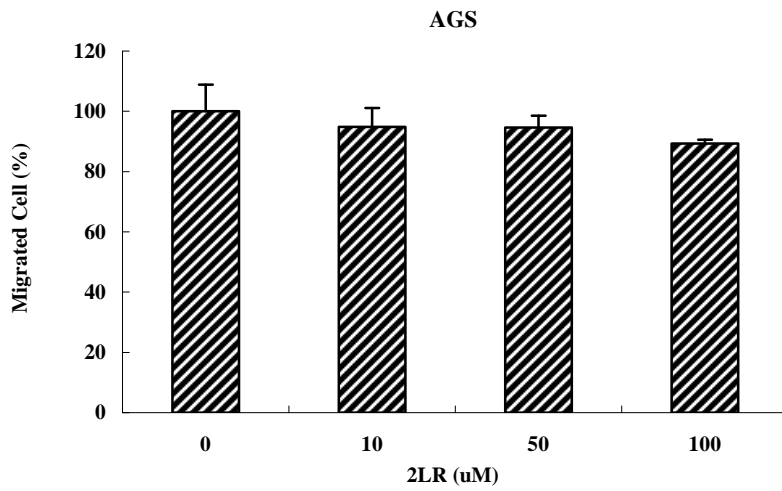


Figure 6. Continued.

4. 세포의 부착능에 대한 TP 와 2dR 의 영향

세포의 이동에서 중요한 것은 세포의 탈, 부착과정으로 세포가 세포외기질에 부착하면 세포의 여러 기능과 관련된 신호전달이 활성화된다. 따라서 TP 와 2dR 이 세포의 부착에 미치는 영향을 확인하기 위해 adhesion assay 를 수행하였다 (Figure 7).

MKN-45 세포주의 경우 TP 와 2dR 을 처리 후 2 시간동안 배양하였을 때, 배양액만 처리한 대조군에서 MKN-45/TP 세포주의 경우 모세포주와 MKN-45/CV 에 비해 부착능이 2 배정도 증가하였으며, 모세포주와 MKN-45/CV 세포주 간의 차이는 없었다 (Figure 7A). 모세포주, MKN-45/CV, TP 세포주에 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 모든 세포주에서 부착능이 증가하였고, TP 와 2dR 에 의해 증가되는 정도는 차이가 있었다. 특히 MKN-45/TP 세포주는 모세포주에 비해 TP 는 3.2 배 2dR 은 4 배 부착능이 증가하였으며, 그에 비하여 TP 가 발현되지 않는 MKN-45 세포주는 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 MKN-45/TP 에 비해 부착능의 증가가 작게 일어났다. AGS 세포주 역시 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 각각 2.33, 2.26 배의 부착능의 증가를 확인하였다 (Figure 7B).

세포의 부착능을 확인하기 위해 actin 에 대해 면역형광염색을 수행하였으며, TP 와 2dR 에 의한 세포부착 면적의 변화를 확인하였다.

대조군에 비해 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 세포의 부착면적이 증가하였으며, 이때 TP 와 2dR 의 경우 세포의 부착형태가 다르게 나타났다. 세포내 actin 은 세포전체에 분포가 증가함을 확인하였으며, 특히 핵내의 actin 발현이 증가하였다 (Figure 7C).

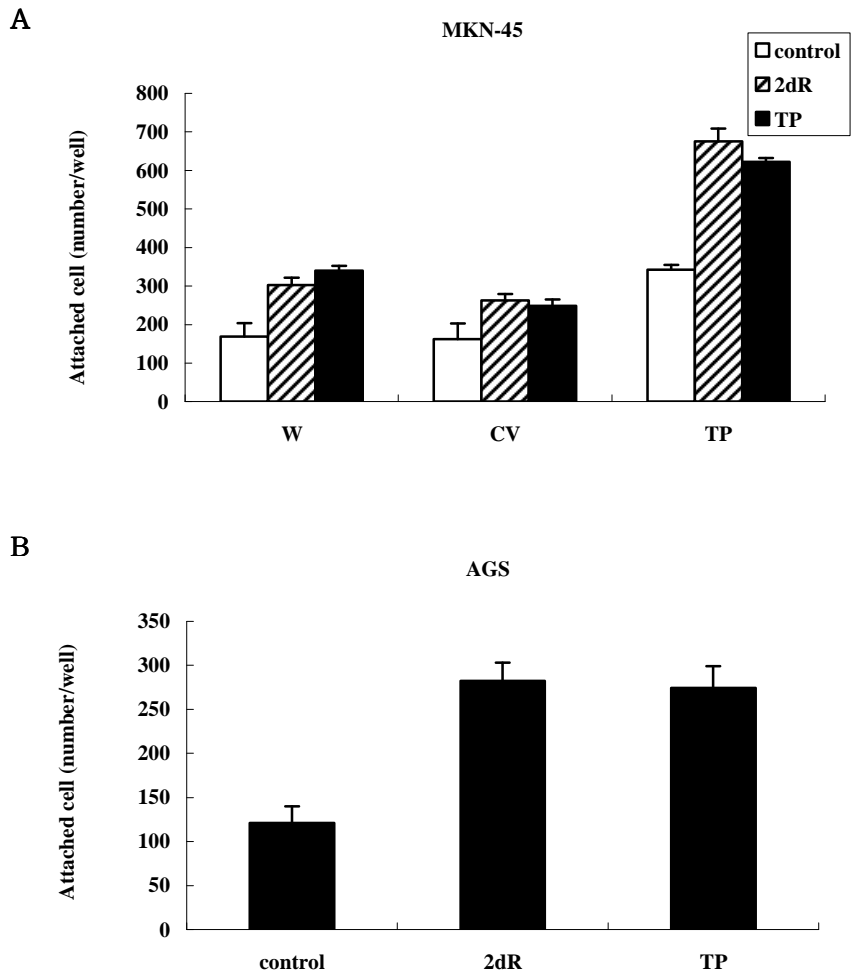


Figure 7. TP and 2dR induced cell adhesion in tumor cells. (A) Adhesion assay with TP or 2dR treatment on MKN-45. (B) Adhesion assay with TP or 2dR treatment on AGS. (C) TP and 2dR increased cell adhesion area in AGS using immunofluorescence staining

C

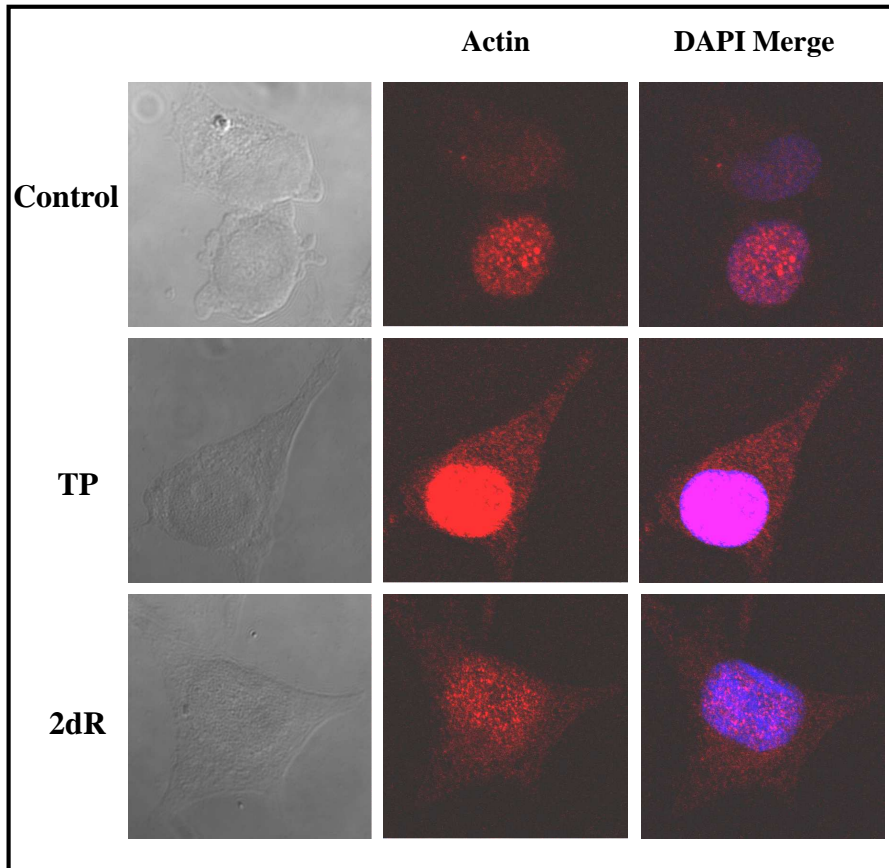


Figure 7. Continued.

5. TP 와 연관된 세포의 이동기작 탐구

가. TP 와 2dR 처리시 세포내 TP 의 발현변화

TP 와 2dR 을 시간별로 처리하였을 때 세포내 TP 의 발현 변화를 확인하였다 (Figure 8A). AGS 의 경우 대조군에 비해 2dR 이나 TP 를 처리한 실험군이 처리 후 6 시간부터 TP 의 발현이 증가하였으며 24 시간 후에는 더이상 증가하지 않았다. MKN-45 세포주는 24 ~36 시간에 이동능이 가장 높게 나타났으므로 TP, 2dR 처리 후 24 시간의 TP 발현을 확인하였으며, 모세포주와 MKN-45/CV,TP 세포주 모두 2dR 또는 TP 의 첨가에 의해 TP 의 발현이 영향받지 않았다.

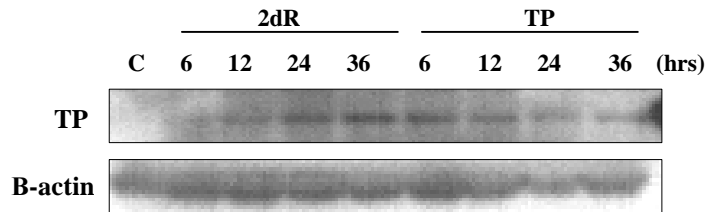
나. TP 와 2dR 처리시 FAK 인산화 비교

TP 와 2dR 에 의해 영향을 받는 신호전달 경로를 확인하기 위해 FAK 의 활성도를 비교하였으며, 이 때 FAK 의 활성도는 Tyr 397/576 잔기의 인산화정도로 판단하였다 (Figure 8B).

FAK 의 autophosphorylation 부위인 Tyr 397 잔기에 대해 immunoblotting 을 수행하였을 때 AGS 세포주는 대조군과 TP 나

2dR 을 처리한 실험군의 발현차이가 없었으며 시간에 따른 변화 역시 나타나지 않았다. MKN-45 세포주에서도 모세포주와 MKN-45/CV, TP 간의 발현차이가 나타나지 않았으며, 2dR 과 TP 를 처리하였을 때 역시 변화가 없었다. Tyr 397 의 인산화에 의한 추가 인산화부위 인 Tyr576 에 대한 인산화 역시 AGS, MKN-45 세포주 모두에서 TP 와 2dR 에 의한 변화가 나타나지 않았다.

A



B

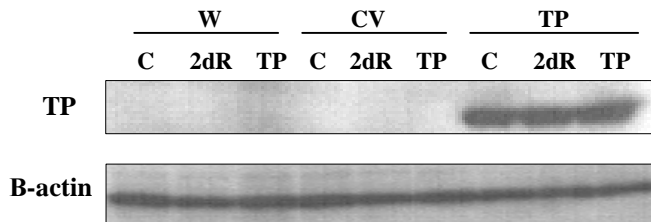


Figure 8. TP and 2dR has no effects on FAK phosphorylation.

(A) TP and 2dR increased endogenous TP expression in AGS.

(B) TP expression is not affected by TP and 2dR in MKN-45.

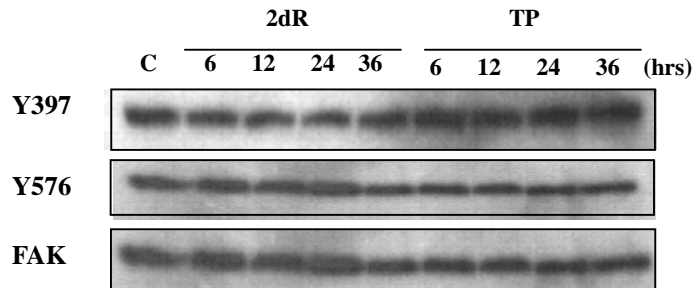
(C) FAK phosphorylation is not affected by TP and 2dR in AGS.

(D) FAK phosphorylation is not affected by TP and 2dR in

MKN-45. FAK is experimental loading control. (TP, 2dR was

treated 40 μ M.)

C



D

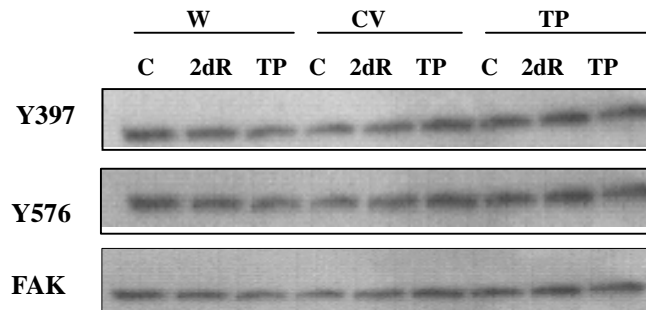


Figure 8. Continued.

다. TP 와 2dR 처리시 PI3K/Akt pathway 비교

세포의 이동에 관여하는 다른 신호 전달경로인 PI3K/Akt pathway의 변화를 평가하고자 AGS 세포주에서 Akt 발현을 관찰하였다. Akt의 Ser473의 경우 대조군에 비해 발현이 증가함을 확인하였고, 이때 시간의 변화에 따른 차이는 나타나지 않았다 (Figure 9A).

Akt의 하위 매개체로서 actin의 재배열에 관여하고 세포의 이동을 조절하는 P70S6K의 인산화를 비교하였다 (Figure 9A). 2dR 처리 후 6시간부터 발현이 증가 하였으며 12시간에 가장 높은 발현을 보였고, 24시간 후에는 발현이 감소하여 처리 후 36시간에는 대조군과 유사한 정도를 보였다. TP 처리군의 경우 6시간부터 발현이 증가하여 12시간에 가장 높게 발현되었으며 24시간부터 감소하였다. 하지만 발현이 지속되는 시간은 2dR 처리군 보다 길었으며, 36시간 후에도 대조군 보다 높은 발현을 보였다. 이와 같은 결과로 TP와 2dR에 의한 세포의 이동이 PI3K/Akt pathway를 경유하며, Akt, P70S6K의 인산화에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

PI3K/Akt pathway와의 연관성을 세포의 이동능을 통해 직접 확인하기 위해 AGS 세포주에 PI3K inhibitor인 LY294002, Wortmannin을 처리하여 이동능의 변화를 관찰하였다 (Figure 9B). LY294002와 wortmannin에 대한 독성은 40 μ M에서 관찰되지 않았으며,

20 μ M, 40 μ M 을 처리농도로 결정하였다²⁹. 그 결과 대조군에 비해 2dR 과 TP 를 처리한 세포의 이동능이 크게 감소하였으며, 대조군 내에서 LY294002 는 최대 9.9%, wortmannin 은 최대 10.8%의 이동능이 감소하였다. 반면 TP 처리군은 LY294002 와 wortmannin 처리 시 각각 30.6%, 32%가 감소하였으며, 2dR 처리군은 각각 31.8%, 34.1% 감소하였다.

이 같은 결과로 TP 와 2dR 은 PI3K/Akt pathway 를 통하여 세포의 이동을 촉진시킨다는 것을 확인하였다. 하지만 LY294002 과 wortmannin 에 의해 감소된 이동능이 배양액만 처리한 대조군에 비해 여전히 2 배 이상 증가된 이동능을 보이고 있다. 이것은 (1) 억제제가 TP 와 2dR 자체를 억제하는 것이 아니므로 TP 와 2dR 의 영향은 남아있으며, (2) TP 와 2dR 에 의해 세포의 이동능이 증가될 때 PI3K/Akt 경로가 아닌 또다른 신호전달 경로가 관여할 것이라는 가능성을 제시한다.

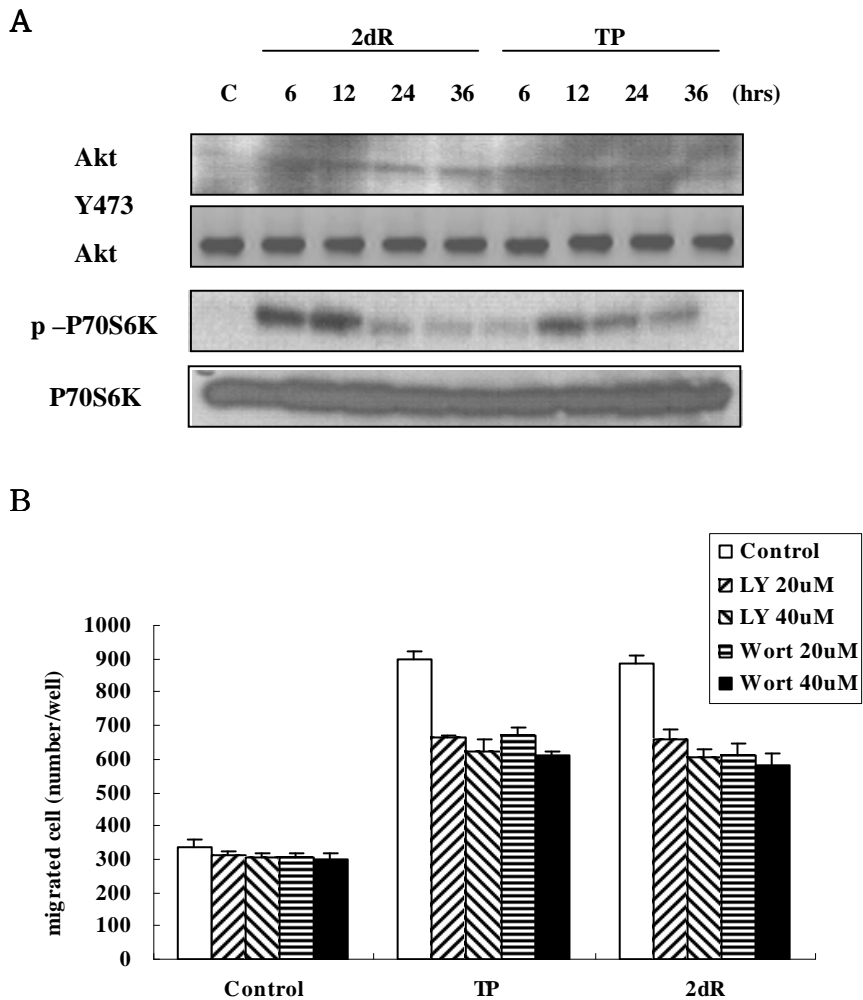


Figure 9. TP and 2dR induce cell migration via PI3K/Akt pathway in AGS cell lines. (A) Akt and p70S6K was phosphorylated by TP/ 2dR in time dependent manner. (B) TP and 2dR mediated migration was decreased by PI3K inhibitors, wortmannin and LY294002. (TP, 2dR was treated 40 μ M.)

IV. 고찰

TP 는 혈관생상인자로 알려져 있으나 TP 의 발현정도가 혈관생상능과 완전히 비례하지는 않고 혈관생상능과 관계없이 불량한 임상적 예후인자로 작용하며, 정상조직보다 암조직에서, 특히 전이성 암조직에서 높게 발현된다는 점은 TP 가 암의 진행에 있어 또다른 생물학적 역할을 할 가능성을 제시한다.²⁹ 현재 TP 의 잘 알려진 기능인 혈관신생에 있어서도 그 정확한 작용기전과 신호전달체계는 알려지지 않았고 TP 가 어떠한 수용체의 리간드로 작용한다는 보고가 없으며, TP 자체는 단백질구조에 세포외분비에 필요한 신호서열을 지니고 있지 않다. 따라서 TP 자체의 역할보다는, thymidine 분해의 부산물인 2-deoxy-D-ribose (2dR)가 세포내외로 자유롭게 출입할 수 있고 그 자체가 혈관신생능을 가지고 있다는 점에 근거하여 TP 의 effector 역할을 하는 것으로 설명하고 있다.¹⁴ 따라서 본 연구에서는 암의 전이에 있어 세포의 이동이 중요한 단계이고, 위암에서 TP 의 발현이 높게 나타나며 이는 침윤과 림프절전이와 상관성을 가지고 있다는 임상적 결과에 근거하여 TP 와 2dR 이 위암세포의 이동능에 미치는 영향을 관찰하며 이와 관련된 신호전달 경로를 알아보고자 하였다.^{30,31}

먼저 여러 위암세포주에서 이동능과 TP 의 발현정도를 보았을 때

중등도의 상관성을 보이는 것을 확인하였다. 세포주 선정을 위해 세포주 각각의 특성을 파악하였을 때, 특히 YCC-16 은 암환자의 혈액내에서 분리된것으로 이동능과 TP 의 발현이 매우 높으며 *in vitro* 와 동물실험상에서 높은 증식속도와 전이능을 보였다. 따라서 실험을 생각할 때 추가적인 TP 와 2dR 의 영향을 받지 않고도, 혹은 이의 영향을 받기 위한 충분한 시간이 지나기 전에 세포 자체가 지닌 TP 와 항진된 이동능으로 인해 TP 와 2dR 에 의한 추가적인 효과를 보기가 어려울 것으로 판단하여 추후 실험 에서 제외하였다. NCI-N87 세포는 TP 의 발현은 중등도 이나 세포의 이동능이 상대적으로 낮았는데 이는 상당히 밀집된 형태로 자라는 이 세포주의 특성과 연관이 있을 것이라 사료된다. 따라서 세포주내에서 TP 가 발현되고, 중간정도의 이동능을 지니는 AGS 를 대상세포주로 선정하여 실험을 진행하였다. 또한 TP 를 과발현시키기 위한 세포주는 TP 의 발현이 확인되지 않은 그룹에서 세포조작의 용이성을 고려하여 MKN-45 를 선정하여 세포주를 확립하였다.

본 실험에서는 우선 TP 과발현 세포주를 통해서 세포내의 TP 의 존재가 세포의 이동능을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 이의 작용기전은 아직 불확실하지만 TP 로 인한 혈관신생기능과 내피세포의 주화성이 2dR 을 경유해서 일어난다는 보고에 근거하여 이동능도 2dR 과 연관이 있을 것으로 가정하였다. 물론 TP 의 발현정도가

thymidine 의 공급제한으로 인해, 꼭 2dR 의 생성량과 비례하는 것은 아니라는 보고가 있으며 본 실험에서도 TP 과발현세포에서 생성되는 2dR 의 양은 기술적 어려움으로 측정하지 않았다.¹⁴ 하지만 본 실험에서는 이를 간접적으로 알아보기 위하여 외부에서 2dR 을 투여하여 이에 대한 암세포의 이동능을 확인하였다.

TP 는 아직 세포외수용체가 밝혀지지 않았으며, 세포외로 배출된다는 보고 또한 없다. 하지만, 암조직에서의 빠른 turn over 로 인한 괴사 및 세포가 파괴될 때 TP 가 밖으로 배출되어 실제 암환자의 혈액내에 TP 가 상승하는 것이 보고되어 있다.³³ 그러므로 이러한 형태의 세포외부 TP 가 암세포에 영향을 미칠 수 있다는 가정하에, 세포외부에서 TP 를 투여하여 그 영향을 함께 확인하였다. 그 결과, 정도는 다르나 외부 처리한 TP 와 2dR 모두 세포의 이동능을 증가시켰으며 이 영향은 TP 가 발현된 세포에서는 상대적으로 더 활발함을 보였다. 하지만 TP 발현이 확인되지 않는 암세포에서도 이러한 영향은 보이는 것으로 나타나 TP 와 2dR 이 공통적으로 위암의 이동능을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

또한, 세포내의 TP 와 세포외부의 TP 가 모두 이동능을 증가시킴에 따라 TP 에 의한 이동능의 증가가 TP 분자 자체의 역할인지, 또는 TP 의 효소작용에 의한 것인지 확인할 필요가 있었다. 본 실험에서는 우선 TP 의 효소활성을 특이적으로 억제하는 TPI 를 처리하

여 TP 가 과발현된 세포의 TP 의 효소 활성도를 억제하였을 때 이동능이 감소함을 관찰하였다. MKN-45 세포주는 TP 과발현세포주에서 이동능의 감소가 일어났으며, AGS 에서는 TPI 의 표적인 내재적 TP 의 발현량이 낮고, TPI 에 대한 세포의 감수성이 예민하여 이동의 감소폭이 낮았다. 결국 이와같은 결과는 세포주간의 TP 발현과 이동능의 관계가 일정부분 TP 의 효소 활성과 연관이 있는 것으로 여겨진다. 하지만 증가된 효소의 활성을 세포가 어떻게 인식하고 반응하는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

2dR 의 이성체인 L-form 의 deoxyribose 가 2dR 에 의해 매개된 신생혈관형성기능을 억제한다는 동물모델이 보고되어 있으므로 이를 이용하여 이동능에 대해 2dR 의 연관성을 확인하였으나 2LR 을 처리하였을 때의 이동능에 미치는 영향은 미약하게 나타났다. 특히, TP 과발현세포주의 이동능이 유의하게 감소할 것이라 예측하였으나 효과가 미약하였는데 이러한 원인으로서는 첫째, 2LR 이 2dR 의 생리작용을 저해하는 효과가 TP 와 TPI 의 관계만큼 명확하지 않다는 보고와, 또한 세포내 발현되는 TP 의 양과 세포외로 배출되는 2dR 의 양이 꼭 비례하지는 않는다는 것으로 설명할 수 있다. 2LR 에 의해 억제될 만큼의 충분한 2dR 이 세포외로 방출 되지 않았다면, 그 효과가 제대로 나타나지 않기에 2LR 에 의한 억제 효과가 낮을 가능성이 있기 때문이다.

암세포가 이동하기 위해서는 세포와 세포외기질의 상호작용이 필수적이다.³⁶ 본 실험에서는 adhesion assay 를 통해 세포의 부착능이 TP 와 2dR 에 의해 증가한다는 것을 확인하였으며, 이는 TP 를 경유한 이동능의 증가에는 세포외기질과의 접촉을 통해 세포의 부착에 영향을 받는 신호전달 경로가 활성화될 가능성을 제시한다. 면역형광염색을 통해 세포내 actin 의 발현을 확인하였을 때, 특히 핵내에 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Actin 은 세포골격을 이루는 구조일 뿐만 아니라, 유전자 전사에 있어 중요한 역할을 한다. 특히 핵내에 존재하는 actin 은 아직 그 기능이 확실하게 알려지지 않았지만 염색질구조의 재배열에 관여하고, 전사단계 초기에 반응하여 mRNA 의 접합 및 수송과정과 연관이 있다고 알려져 있다.^{35,36} 하지만 이 결과에서 핵내 actin 발현의 증가가 어떠한 의미를 갖는지 확인하기 어려웠으며, 또한, 세포가 세포외기질에 부착하는 과정은 세포의 이동과정에 있어 일부분이므로 추후 세포의 탈, 부착 과정과 이동의 방향성을 확인하는 과정이 필요하다.

세포의 부착에 의해 영향을 받는 신호전달경로는 크게 integrin 이 세포의 focal adhesion 에 연결되어 활성화되는 것과, 성장인자와의 접촉을 통한 여러 물질들의 인산화과정에 의한 것으로 나눌 수 있다. 우선 이동능의 변화에 따른 FAK 의 변화를 확인하였을 때 기본 FAK 인산화 부위인 Tyr397 과, 그로인한 추가 인산화 부위인 Tyr

576 역시 TP 발현에 따른, 또는 TP 및 2dR 처리에 따른 변화를 관찰할 수 없었다. 이와 같은 원인으로서는 (1) 암세포의 특성상 세포의 생존과 연관되어 있는 신호들의 대부분이 이미 상당한 수준으로 활성화 되어있기 때문에 대조군과의 비교가 어려웠으며 (2) 2dR 과 TP 에 FAK 가 일차적 표적이 아닐 가능성, 또는 (3) FAK 내에는 여러개의 인산화부위가 존재하므로, 이 실험에서 조사하지 않은 다른 부위에 영향을 줄 수 있다는 것을 들 수 있다.

암세포가 TP 나 2dR 을 암의 진행에 필요한 에너지원으로 인식할 수 있다면 여러 인산화단백질을 활성화시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다.¹⁴ 대표적인 것이 ERK 나 PI3K 와 같은 인산화 단백질 복합체 경로로서 본 실험에서 PI3K/Akt 경로 에 대해 주목을 하였다. 결과 AGS 세포주에 대해서 TP 와 2dR 을 처리하였을 때 Ser473 부위의 인산화와 하위매개체인 P70S6K 의 인산화가 증가하기 시작하였다. P70S6K 의 기본적인 역할이 actin 의 재배열을 유도하는 것이므로, 인산화가 많이 일어났다는 것은 세포의 이동이 증가하는 조건이 될 수 있다. 이는 PI3K 저해제인 wortmannin 과 LY294002 을 처리하였을 때의 이동능이 감소됨으로서 확인할 수 있었으며 이 때 저해제로 인한 가역성이 완전하지는 않다는 결과는 TP 와 2dR 이 관여하는 이동능의 향상에 PI3K/Akt 경로 이외에도 다른 경로가 존재할 가능성을 제시한다.

본 실험에서 제시하는 TP 또는 2dR 이 위암 세포의 이동능에 관여하는 신호전달 경로는 다음과 같다 (Figure 10).

TP 의 발현으로 인한 생리학적인 변화가 PI3K/Akt 경로와 관련이 있을 것이라는 보고는 아직 많지 않다. Seeliger 등은 mTOR 저해제인 rapamycin 을 투여시 2dR 에 의한 신생혈관형성능을 저해할 수 있음을 제시하였고, Hotchikiss 등은 TP 와 2dR 이 $\alpha 5\beta 1$ 와 $\alpha v\beta 3$ integrin 을 특이적으로 활성화함으로써 혈관내피세포의 이동을 증가시키는 것으로 PI3K/Akt 경로와의 연관성을 제시하고 있지만 TP 와 2dR 이 직접 PI3K/Akt 경로를 표적으로 하는지는 현재까지 명확하지 않다.^{37,38} 그러므로 PI3K/Akt 경로가 정말 TP 와 연관된 이동능의 향상에 관여하는가와, TP 의 발현에 따른 PI3K/Akt 경로의 표적이 무엇인가에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

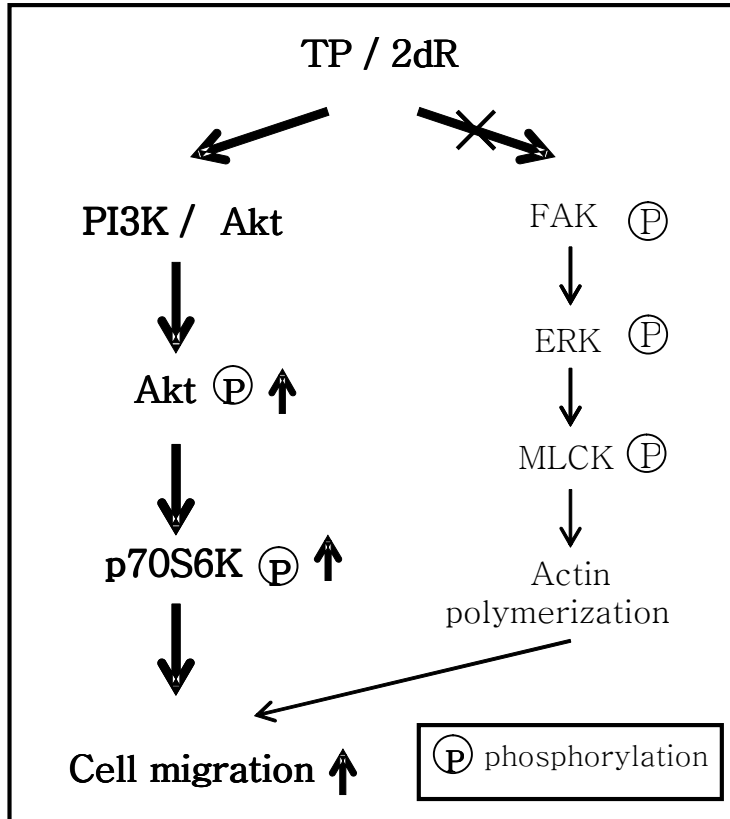


Figure 10. Schematic signaling pathway of TP related cancer cell migration.

V. 결론

결론적으로 본 연구를 통하여 세포내 TP 의 발현은 세포의 이동능을 증가시키며, 세포외에서 투여된 TP 와 2dR 이 세포내 TP 와 같은 역할을 함을 알 수 있었다.

또한 TP 와 2dR 은 세포의 부착능을 증가시켰으며, 이것은 세포 이동과 연관된 세포의 부착에 영향을 받는 신호전달경로가 TP 와 2dR 에 의해 활성화 되는 가능성을 나타낸다. TP 와 2dR 이 세포의 이동에 관여하는 신호전달경로를 관찰하였을 때, FAK 의 인산화에 대해 TP 와 2dR 모두 특이적으로 작용하지는 않았으나, Akt 와 P70S6K 의 인산화가 이동능에 따라 증가함을 관찰하여, TP 와 2dR 에 관련된 위암세포의 운동능의 향상에 PI3K/Akt 경로가 연관되어 있음을 확인하였다.

VI 참고 문헌

1. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359-369.
2. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
4. Nicolson GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 1988;949:175-224.
5. Nicolson GL. Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Semin Cancer Biol* 1992;2:143-54.

6. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:103-119.
7. Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 2000;19:5605-5613.
8. Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 2003;116 (Pt 8):1409-1416.
9. Qian Y, Corum L, Meng Q, Blenis J, Zheng JZ, Shi X, et al. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *AJP-Cell Physiol* 2004;286:C153-163.
10. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*

2001;15:1953-1962.

11. Park BK, Zeng X, Glazer RI. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:7647-7653
12. Berven LA, Willard FS, Crouch MF. Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res* 2004;296:183-195.
13. Toi M, Atiqur Rahma M, Bando H, Chow LW. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005;6:158-166.
14. Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J* 1998;334 (Pt 1):1-8.

15. Akiyama S, Furukawa T, Sumizawa T, Takebayashi, Nakajima Y, Shimaoka, et al. The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression. *Cancer Sci* 2004;95:851-857.
16. Focher F, Spadari S. Thymidine phosphorylase: a two-face Janus in anti cancer chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2001;1:141-153
17. Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, Chow LW. Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005;6:158-166.
18. Konno S, Takebayashi Y, Higashimoto M, Katsube T, Kanzaki A, Kawahara M. Thymidine phosphorylase expression in gastric carcinoma as a marker for metastasis. *Anticancer Res* 2003;6D:5011-5014.

19. Kobayashi M, Okamoto K, Akimori T, Tochika N, Yoshimoto O, Okabayashi T, et al. Localization of thymidine phosphorylase in advanced gastric and colorectal cancer. *J Mol Histol* 2004;35:69-74.
20. Reynolds K, Farzaneh F, Collins WP, Campbell S, Bourne TH, Lawton F, et al. Association of ovarian malignancy with expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1234-1238.
21. Mimidis K, Giatromanolaki A, Sivridis E, Papadopoulos V, Ritis K, Kartalis G. Thymidine phosphorylase expression in patients with chronic viral hepatitis. *Rom J Gastroenterol* 2005;14:27-31.
22. Suzuki K, Morita T, Hashimoto S, Tokue A. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) associated with prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res* 2001;29:7-12.

23. Sato J, Sata M, Nakamura H, Inoue S, Wada T, Takabatake N, et al. Role of thymidine phosphorylase on invasiveness and metastasis in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2003;106:863-870.
24. Hotta T, Kobayashi Y, Taniguchi K, Johata K, Sahara M, Watanabe T, et al. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer. *Oncol Rep* 2004;12:347-351.
25. Takao S, Akiyama SI, Nakajo A, Yoh H, Kitazono M, Natsugoe S, et al. Suppression of metastasis by thymidine phosphorylase inhibitor. *Cancer Res* 2006;60:5345-5348.
26. Yuichi Nakajima, Takenari Gotanda, Hiroshi Uchimiya, Tatsuhiko Furukawa, Misako Haraguchi, Ryuji Ikeda, Inhibition of Metastasis of Tumor Cells Overexpressing Thymidine Phosphorylase by 2-Deoxy-L-Ribose. *Cancer Res* 2004;64:1794-1801.

27. Uchimiya H, Furukawa T, Okamoto M, Nakajima Y, Matsushita S, Ikeda R, et al. Suppression of thymidine phosphorylase-mediated angiogenesis and tumor growth by 2-deoxy-L-ribose. *Cancer Res* 2002;62:2834-2839.
28. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:474-482.
29. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994;269:5241-5248.
30. Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine

phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996;88: 1110-1117.

31. Maeda K, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Sawada T, Nakata B, et al. Combined analysis of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor expression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:545-550.

32. Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, et al. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87:288-295.

33. Pauly JL, Schuller MG, Zelcer AA, Kirss TA, Gore SS, Germain MJ. Identification and comparative analysis of thymidine phosphorylase in the plasma of healthy subjects and cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1587-1590.

34. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:103-119.
35. Rando OJ, Zhao K, Crabtree GR. Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol* 2000;10:92-97.
36. Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleus: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:358-366.
37. Seeliger H, Guba M, Koehl GE, Doenecke A, Steinbauer M, Bruns CJ, et al. Blockage of 2-deoxy-D-ribose-induced angiogenesis with rapamycin counteracts a thymidine phosphorylase-based escape mechanism available for colon cancer under 5-fluorouracil therapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:1843-1852.
38. Hotchkiss KA, Ashton AW, Schwartz EL. Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human

endothelial cell migration by specific activation of the integrins alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3. J Biol Chem 2003;278:19272-19279.

Abstract

Effect of thymidine phosphorylase on the gastric cancer cell migration

Eun Jeong Yu

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sun Young Rha)

The first step of metastatic process is the movement of cancer cells and the cell migration is initiated by cell adhesion to its extracellular matrix (ECM). Focal adhesion is a site where cell attachment and focal adhesion kinase (FAK) is recruited by integrin engagement with ECM. FAK is activated by its own tyrosine-phosphorylation and is accompanied by the recruitment

of other cytoplasmic and cytoskeletal proteins to the focal adhesion.

Thymidine phosphorylase (TP) is identical to human platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), and it is involved both in pyrimidine nucleoside metabolism that catalyzes the reversible conversion of thymidine to thymine and 2-deoxy-D-ribose (2dR), and in angiogenesis. Expression of TP is higher in cancer compared to adjacent non-tumor tissue, and is correlated with angiogenic activity in various tumor types. However, TP has been reported to an independent indicator of unfavorable clinical outcome in renal and colorectal cancer irrespective of its angiogenic activity, suggesting that TP might be involved in cancer progression independent of its angiogenic activity. Hence, I herein investigated the effects of TP and its catalyze, 2dR on the migration of cancer cell in gastric cancer.

The levels of TP expression in various gastric cancer cell lines

were shown to be associated moderately with the movement through matrigel in gastric cancer cell lines ($R^2=0.473$). Then, we established a TP-expressing stable cell line, MKN-45/TP. It showed enhanced migration ability through matrigel compared to parental cells and mock transfectant (MKN-45/CV) in migration assay. Also, the addition of TP or 2dR induced higher chemotaxis compared to media alone in MKN-45/TP and AGS. These suggested that the cancer cells with high expression of TP induced cancer cell migration. Treatment of specific TP inhibitor (TPI) showed suppression of TP-mediated cancer cell migration, confirming the effect of TP on cell migration. In adhesion assay, exogenous TP and 2dR stimulated cell adhesion on matrigel, and TP-transfected cells also enhanced adhesion.

Next, signaling pathways that related to cell migration were investigated. First, the level of phosphorylated FAK showed little difference between MKN-45/TP and MKN-45/CV, because the

baseline phosphorylation level of FAK level was already high in its own residues. Meanwhile, the phosphorylated level of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt and its down-stream effector p70S6K were increased after exposure to TP or 2dR. TP-related cell migratory effect was partially abrogated by the treatment of the PI3K inhibitors. These findings indicate that TP and 2dR is promoting cancer cell adhesion and migration in gastric cancer, at least in part, by regulation of the PI3K/Akt pathway.

Key Words: gastric cancer, motility, thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose