

신세포암에서 금속단백효소  
2, 9형의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

심 호 섭

신세포암에서 금속단백효소  
2, 9형의 발현

지도교수 조 남 훈

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

심 호 섭

# 심효섭의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

## 감사의 글

이 작은 논문이 세상에 나오기까지 참 많은 분들의 은혜를 입었습니다. 먼저 이 논문의 처음부터 끝까지 지도해주신 조남훈 선생님께 감사드립니다. 실험을 할 수 있는 여건을 마련해주시고 많은 가르침을 주신 라선영 선생님, 최영득 선생님께 감사드립니다. 예과때부터 지금까지 늘 변함없이 관심을 가지고 지도해주시는 이진성 선생님께 감사드립니다. 실험을 할 수 있도록 도와주시고 실제적인 방법까지 가르쳐주신 암센터 김태수 선생님께 감사드립니다. 작년부터 늘 도와주셨던 병리학 실험실의 강숙희 선생님과 낮선 실험실 환경에 적응하는데 어려움이 없도록 배려해주신 암연구소 연구원님들에게 감사의 인사를 전하고 싶습니다.

1년차때부터 관심을 가지고 지도해주시는 김세훈, 김성은 선생님과 의국생활을 하는데 있어서 본이 되어주고 서로 돕는 것을 가르쳐준 임범진, 신은아, 구자승, 김혜령 선생님께 고마운 마음을 전하고 싶습니다. 늘 저의 있는 모습 그대로를 받아주는 친구들 훈, (정)승용, 승엽, (송)승용, 정훈이와 CMF 선배님과 후배들에게 이 자리를 빌어 감사의 마음을 전합니다.

지금까지 저를 길러주시고 사랑으로 늘 저의 의견을 존중해주셨던 부모님과 먼 곳에서 저를 응원해주시는 형님, 형수님께도 감사드립니다. 지금까지 인도해주신 하나님 아버지, 앞으로 평생을 동행하게 될 소진에게 감사합니다.

저자 씬

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 대상과 조직학적 분류 .....	6
2. 방법 .....	6
가. mRNA의 분리와 역전사 중합효소연쇄반응 .....	6
나. Zymography에 의한 효소 활성도의 조사 .....	8
다. 면역조직화학 염색 .....	11
라. 통계학적 분석 .....	12
III. 결과 .....	14
1. 임상 및 조직학적 소견 .....	14
2. MMP-2, MMP-9의 RT-PCR을 통한 전사단계에서의 발현 ..	14
3. MMP-2, MMP-9의 Zymography를 통한 단백질 단계에서의 발현 .....	15
가. MMPs의 유형별 발현 .....	15
나. 정상조직과 종양조직에서의 발현 .....	15
다. 신세포암 유형별 MMP-9의 발현 .....	15
라. pT stage별 MMP-9의 발현 .....	16
4. 면역조직화학 염색 결과 .....	17
5. RT-PCR, Zymography와 면역염색간의 상관 관계 .....	17

IV. 고찰 .....	21
V. 결론 .....	25
참고 문헌 .....	26
영문 요약 .....	30

## 표 차례

표 1. 정상 조직과 종양 조직에서 MMP-9의 발현 .....	18
표 2. 신세포암의 유형별 MMP-9의 발현 .....	18
표 3. pT 병기별 MMP-9의 발현 .....	18

## 그림 차례

그림 1. RT-PCR 결과 .....	19
그림 2. Zymography 결과와 해석 .....	19
그림 3. 면역조직화학 염색 결과 .....	20

## 국문요약

### 신세포암에서 금속단백효소 2, 9형의 발현

금속단백효소(Matrix Metalloproteinases, MMPs)는 암의 침윤과 전이뿐 아니라 암의 발생, 성장에도 중요한 역할을 하고 있는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 여러 암종에 대해 MMPs의 발현에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 근래들어 신세포암에 대한 연구 결과들도 보고되고 있다. 그러나 혈청 혹은 세포주를 통한 연구가 대부분으로 조직을 이용한 연구는 많지 않으며, 연구방법에 따라 각기 다른 결과를 보이고 있다. 그 이유는 예후인자로 중요한 요소인 유형분류를 신세포암의 새로운 분류법(1997년)에 의거하지 않았거나, 혹은 MMPs의 발현을 알아보는데 사용한 방법들이 Zymography, RT-PCR, In situ hybridization, 면역조직화학 염색 등으로 모두 다르기 때문인 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 2000-2002년에 신장적출술을 시행받은 신세포암 환자 중에서 25예의 신선동결 조직을 대상으로 신세포암의 새로운 분류와 T 병기에 따른 MMP-2, MMP-9의 발현을 RT-PCR과 Zymography를 이용하여 알아보았다.

MMP-9이 종양조직에서 정상조직에 비하여 높게 발현되었으며( $p < 0.001$ ), 전사단계와 단백 활성화 단계에서의 발현사이에 상관관계가 있었다( $p = 0.014$ ). MMP-9은 신세포암의 유형별로 보았을 때 전통형에서 높게 발현되었으나 통계학적 의의는 없었다( $p = 0.223$ ). 이에 반해 T 병기에서는 T3b에서 의의있게 증가하였다( $p = 0.025$ ). MMP-2는 전사단계에서 비교적 일정하게 발현된 반면 단백 활성화 단계에서 발현되지 않았으며 통계학적 상관 관계 또한 없었다( $p = 0.0563$ ).



본 연구의 결과, 신세포암에서는 MMP-2가 전사이후 단계에서 조절되는 반면, MMP-9는 전사 단계에서 조절되어 신세포암의 침윤과 전이 등 암 진행 과정에서 중심된 역할을 하는 것으로 보이며, 궁극적으로 예후 인자로서의 의미가 있다고 생각된다.

---

핵심되는 말 : 신세포암, 금속단백효소 2, 9형, RT-PCR, zymography

# 신세포암에서 금속단백효소 2, 9형의 발현

<지도교수 조남훈>

연세대학교 대학원 의학과

심 호 섭

## I. 서론

신세포암(renal cell carcinoma)은 전체 암의 약 2%를 차지하고 있고, 전 세계적으로 1년에 100,000명 정도가 신장암으로 사망하는 것으로 추정되고 있다.<sup>1</sup> 과거에 신세포암은 단순히 투명암종(clear cell carcinoma)과 과립암종(granular cell carcinoma)의 두가지 조직학적 유형으로 나누었으나 최근에는 신종양에 대한 형태학적, 세포유전학적, 분자생물학적 연구가 진행되면서 신세포암의 유형이 좀더 세분화되고 구체화되기 시작하였다. 이러한 연구들을 기반으로 1997년에 국제적으로 신종양에 대한 새로운 분류를 도입하게 되었다. 이 분류에 의하면 신세포암을 크게 전통형(conventional), 유두형(papillary), 난염형(chromophobe), 집합관형(collecting duct)의 4가지 유형으로 분류하였으며, 이 4가지 유형에 해당되지 않을 경우를 미분류형(unclassified)으로 분류하였다.<sup>2,3</sup> 신세포암은 다른 암종에 비해 전이가 매우 잘 되어 일반적으로 예후가 불량한 종양으로 알려져 있어 예후 결정인자 및 예측인자를 찾고자하는 많은 연구들이 진행되고 있다. 새 분류 이전에 신세포암의 예후에 가장 결정적으로 중요한 인자는 임상적 병기와 세포의 핵등급(nuclear grading)이었는데, 새로운 분류 이후에는 유형자체가 각기 다른 예후를 보인다고 하여 미분류형, 전통형, 유두형, 난염형 순으로 예후가 나쁜 것으로 보고되고 있다.<sup>4</sup> 그러나 이와같이 현재 임상적으로 사용되

는 예측인자들은 그 정확도가 낮아 추가 검증이 필요하다.

금속단백효소(Matrix metalloproteinase, MMPs)는 최근 들어 종양의 침윤, 전이 및 신생혈관 생성에 이르는 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. MMPs는 아연(zinc)을 포함하고 있는 단백분해효소군으로 세포외 기질의 모든 구성성분을 분해할 수 있다. MMPs는 현재까지 24종류가 밝혀졌으며, 계속해서 새로운 유형이 발견되고 있다. MMPs는 아미노산 배열의 상동성(amino acid sequence homology), 특히 펩타이드 구조(specific peptide structural domains), 기질의 특이성(substrate specificity)에 따라 몇가지 군으로 분류하고 있다. 대표적인 분류에 의하면 type IV collagen을 분해하는 collagenases(MMPs 1, 8, 13), gelatinases(MMPs 2, 9)가 있으며, 그외 stromelysins(MMPs 3, 10, 11)와 membrane-type MMPs(MMPs 14-17, 24, 25)가 있다. MMPs의 조절은 매우 복잡적으로 이루어지고 있으며 엄격히 통제되고 있다. 전사와 전사후의 여러 단계에서 MMPs의 발현과 활성화가 조절되고 있다. 대부분의 MMPs는 불활성화 전구물질로 합성이 되며 N-terminal pro-peptide의 단백분해로 인해 활성화된다.<sup>5</sup>

세포외 기질의 분해는 종양의 침윤과 전이에 중요한 특징이며, 현재는 MMPs가 이러한 과정에 중심된 역할을 하는 것으로 널리 인식되고 있다. 그러나 종양에 있어 MMPs의 새로운 역할이 밝혀지고 있는데, 그것은 세포외 기질을 분해함으로써 종양의 침윤에만 국한된 역할을 하는 것이 아니라, 종양의 미세환경을 조절함으로써 종양의 성장에도 중요한 역할을 한다는 것이다. 즉 암의 발생, 성장, 침윤과 전이에 있어 MMPs는 매우 중요한 인자로 인식되고 있으며, 이러한 역할을 억제하는 것이 암의 새로운 치료법으로까지 등장하게 되었다.<sup>6,7</sup>

이전까지 진행된 많은 연구에서 다양한 암종에서 MMPs와 예후와의 연

관성을 알아보았다. 그중에서 MMPs의 증가와 예후의 상관성이 높은 것으로 보고된 암종으로는 식도,<sup>8</sup> 위,<sup>9</sup> 대장,<sup>10</sup> 유방,<sup>11</sup> 췌장,<sup>12</sup> 전립선,<sup>13</sup> 폐,<sup>14</sup> 난소<sup>15</sup> 등이 있다.

신세포암에 있어서도 몇몇 연구들이 있었지만 결과는 다소 상이하였다. Kugler 등<sup>16</sup>이 RT-PCR 방법을 사용하여 MMPs:TIMPs(Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)의 비율과 암의 진행도와 연관관계가 있다고 보고한 이후, membrane-type MMPs(MT-MMPs)를 포함한 여러 MMPs, TIMPs 에 관한 연구가 진행되어 오고 있다. Lein 등<sup>17</sup>은 BIOTRAK activity assay systems을 이용하여 조직과 혈청에서 MMP-2, MMP-9와 TIMP-1, TIMP-2 의 발현을 측정 한 결과, 암조직에서 MMP-9 과 TIMP-1이, 암환자의 혈청에서 MMP-9이 의미있게 증가해 있었다고 보고하였다. 또한 Kallakury 등<sup>18</sup>은 면역조직화학 염색(immunohistochemical stain)을 이용하여 MMP-2, MMP-9과 TIMP-1, TIMP-2의 발현을 측정 한 결과 MMPs와 TIMPs의 증가가 불량 예후인자임을 제시하였다.

이상의 연구결과들을 종합하여 보면 기존의 암에 대한 연구결과와 유사하게 신세포암에서도 예후와 MMPs와의 상관관계가 있음을 알 수 있다. 그러나 각각의 연구들에 있어 MMPs의 발현정도를 측정하는 방법(methodology)이 상이하고 그에 따라 결과들도 다소 차이가 있었을 뿐 아니라, 유형분류 방법 역시 연구마다 차이가 있었다. 따라서 본 연구에서는 여러 MMPs 중 4형 콜라젠을 분해하는 gelatinase인 MMP-2와 MMP-9을 중심으로 RT-PCR을 이용하여 전사단계에서의 발현과 Zymography를 이용하여 전사후 단백질의 활성화 상태를 동시에 비교하고, 이를 바탕으로 새 분류법에 의한 신세포암의 유형별, 그리고 T 병기별 발현 차이를 알아보 고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상과 조직학적 분류

연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 2000-2002년도에 신장 전적출술을 시행받고 신세포암으로 진단받은 환자 중, 수술당시 신선동결조직 채취가 가능했던 25예를 대상으로 하였다. 조직 채취는 적출된 신장에서 육안검사상 종양성 부위와 비종양성 부위에서 각각 이루어졌으며 액화질소로 급속냉동 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관되었다.

각각의 일반 염색 슬라이드를 조직학적으로 재검색하여, 신세포암의 새로운 분류법을 적용하였다.<sup>2,3</sup> 조직학적 재검색은 통상적인 병리조직학적 검사 과정(포르말린 고정, 파라핀 포매, 헤마톡실린-이오신 염색)을 거친 병리학 교실의 슬라이드를 이용하였다.

### 2. 방법

#### 가. mRNA의 분리와 역전사 증합효소연쇄반응

(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

##### (1) mRNA의 분리

(가) 10ml tube에 신선동결 절편 조직 50mg을 취하여 1ml Ultraspec RNA reagent(Biotex Lab, Houston, Texas, U.S.A)를 혼합후

18G 주사기 바늘로 3회 이하로 분쇄한 후 5분간 얼음위에 방치하였다.

- (나) 0.4ml chloroform을 혼합 후 5분간 얼음위에 방치하고 4℃에서 15분동안 14,000rpm으로 원심분리하였다.
- (다) 상층액을 조심스럽게 취하여 0.5ml 5:1 phenol/chloroform에 혼합 후 다시 4℃에서 15분동안 14,000rpm으로 원심분리하였다.
- (라) 상층액을 취하여 0.5ml isopropanol에 혼합 후 -20℃에서 16시간 incubation하였다.
- (마) 4℃에서 20분동안 14,000rpm으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 100% 에탄올 0.5ml로 세척한 후 4℃에서 15분동안 14,000rpm으로 원심분리하였다.
- (바) 상층액을 버리고 70% 에탄올 0.5ml로 세척한 후 4℃에서 15분동안 14,000rpm으로 원심분리하였다.
- (사) 5분간 공기중에 방치하여 에탄올을 증발시키고 증류수에 용해 후 분광 분석법으로 정량하였다.

## (2) RT-PCR

200ng의 RNA를 cDNA로 전환하여 최종량이 20 $\mu$ l가 되게 하였다. MMP-2, MMP-9의 시발체(primer)는 ENTREZ computer analysis package를 사용하여 선택하였다. 시발체의 염기배열은 다음과 같다.

MMP-2 forward 5'-CCTCTCCACTGCCTTCGATACACC-3'

reverse 5'-AGCATCTATTCTTGGGCACCG-3'

MMP 9 forward 5'-CCCGTCCTGCTTTGCAGT-3'

reverse 5'-ATCCAAGTTTATTAGAAACACTCCA-3'

cDNA와 시발체(primer), 완충액(buffer), MgCl<sub>2</sub>, Taq 중합효소를 넣어 총 100 $\mu$ l를 만들어, 처음 94 $^{\circ}$ C에서 60초간 방치한 후 MMP-2와 MMP-9의 경우 각각 55 $^{\circ}$ C와 57.5 $^{\circ}$ C에서 60초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초로 하여 35회 순환하여 증폭하였으며, 마지막회에서는 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하였다. RT-PCR 분석 산물은 1.2% 아가로스겔(agarose gel)을 이용한 전기영동을 실시하였다.

MMP-2와 MMP-9의 상대적인 발현양을 알아보기 위하여 제조회사(Gibco BRL, Paisley, UK)의 방법에 따라  $\beta$ -globin을 사용하였는데,  $\beta$ -globin은 모든 세포에서 전사되는 유전자 산물로 본 실험에서 양성 RT-PCR 산물 (positive RT-PCR product)로 사용하였다. 사용한  $\beta$ -globin 시발체의 배열은 다음과 같다.

forward (GH20) 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3',

reverse (GH21) 5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3'

발현량은 TINA(Raytest Isotopenmessgerate, GmbH, Germany) version 2.01e 프로그램을 이용하여 측정하였다.

## 나. Zymography에 의한 효소 활성도의 조사

### (1) Cytosol preparation

동결절편조직 0.2mg을 분쇄시킨 후 microcentrifuge tube에서 homogenization buffer(350-450 $\mu$ l)를 혼합 후 homogenizer를 사용하여 homogenization한 후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 14,000rpm으로 원심분

리 시켰다. Cytosol의 상층액을 얼음위에 장치한 시험관내로 이동시킨 다음 실험에 사용하였다.

(2) 용액 준비

(가) Stock buffer

1.211g Tris, 0.588g EDTA, 1.21g sodium molybdate를 800ml의 증류수에 용해시킨 후 실온에서 HCl을 이용하여 pH를 7.5로 맞추고 증류수를 첨가하여 총 용량이 1ℓ가 되게 한 다음 2~8℃에 보관하여 사용하였다.

(나) Homogenization buffer

실험당일 stock buffer에 MTG(monothioglycerol)를 1:10000으로 첨가하여 사용하였다.

(3) Marker 세포주 배양

RPMI-7951 악성흑색종 세포주와 HT-1080 섬유육종 세포주를 37℃의 0.5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 10% 우태아 혈청이 함유된 세포배양배지로 배양하였다. 세포의 건강상태를 유지하기 위해 주 2회 배지를 교환하였다.

(4) Gelatinase marker

RPMI-7951 세포주 배양에서 추출한 conditioned media를 72kD의 표지자로, HT-1080 세포주의 conditioned media는 92kD 와 62kD의 표지자로 사용하였다. 단백질의 총량이 20μg이 되도록 취하고 여기에 증류수와 5μl의 sample buffer를 혼합한 후 20μl가 되도록 하여



검사하였다.

(5) Buffer preparation

(가) Renaturing buffer

Triton X-100를 증류수에 2.5(v/v)으로 용해하여 사용하였다.

(나) Developing buffer

50mM Tris, 0.2M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brji35(w/v)를 최종 농도로 혼합한 후 pH를 7.6으로 조절하여 사용하였다.

(다) Sample buffer(2x)

0.5M Tris-HCl, 10%(w/v) SDS 4ml, 0.1% bromophenol blue 0.5ml, glycerol 2.0ml를 혼합한 후 증류수를 10ml 용량이 되도록 첨가하여 사용하였다.

(라) Running buffer(10x)

Tris-base 29g, glycine 144g, SDS 10g을 증류수에 녹인 후 최종용량이 1ℓ가 되게하여 사용하였다.

(6) Zymography

NOVEX™ Zymogram gel을 사용하여 125V에서 2시간 가량 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel은 renaturing buffer로 20℃에서 30분간 반응시킨 다음, 증류수로 3-4회 세척하였다. Developing buffer에 gel을 담근 후 37℃에서 18시간 반응시키고, 염색액(0.5%(w/v) Coomassie Blue G250, 30% ethanol, 10% acetic acid)에서 2시간 가량 염색한 후 세척하였다. Band의 발현여부는 육안적으로 band의 존재유무를 평가하여 정하고, computer-assisted

image analysis를 이용하여 분석하였다. 활성도는 gel의 영상을 capture software에 연결된 video-camera로 촬영한 후 intensity 및 band area를 측정하여 구하였다. 분석 프로그램은 Bio Profil(Vilber Lourmat, France) version 5.08을 이용하였다.

## 다. 면역조직화학 염색

### (1) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 포르말린 고정된 파라핀 포매 조직을 4 $\mu$ m로 박절하여 코팅 슬라이드에 부착시키고 50 $^{\circ}$ C에서 2시간 건조시켰다. 자일렌으로 10분간 3회에 걸쳐 파라핀을 제거하고 단계적으로 알코올에 처리하여 함수시킨 후 증류수를 사용하여 세척하였다. 항원성 회복을 위해 pH 6.0의 구연산 완충액에 슬라이드를 담근 후 마이크로웨이브 오븐에서 15분간 전처치를 시행하였다. 내인성 과산화효소의 활성화를 억제하기 위하여 0.3% 과산화수소 용액에서 20분간 처리 후 트리스 완충액을 사용하여 3회에 걸쳐 세척하였다. 이후 일차 항체를 도포하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 배양 세척 후, 바이오틴이 결합된 이차항체에 20분 배양과 세척, streptavidin peroxidase에 20분간 배양하였다. 세척과정을 거친 후 3-amino-9 ethylcarbazole(AEC)로 발색하고, 헤마톡실린으로 대조 염색한 다음 글리세롤로 봉합하였다.

일차항체로 MMP-2 / 72KD Collagenase IV/ Gelatinase A (A-Gel VC2, NeoMarkers, Fremont, CA)를 1:200으로, MMP-9 /

95KD Collagenase IV/ Gelatinase B (VIIC2, NeoMarkers, Fremont, CA)를 1:50으로 희석하여 사용하였다.

## (2) 면역 염색 결과 판정

내부 표식자로서 MMP-2는 혈관벽에 양성반응을 보인 경우, 그리고 MMP-9은 원위부 세노관에 양성 반응을 보이는 경우 염색이 된 것으로 판정하였으며 판정은 3단계로 하였다. 즉, 5% 미만의 양성반응은 1점, 5% 이상 50% 미만은 2점, 50% 이상은 3점으로 판정하였다.

## 라. 통계학적 분석

조직학적 등급과 T 병기와 여러 변수들, MMP-2와 MMP-9의 면역 염색 결과는 Chi square (Fisher's exact test)를 이용하였고, RT-PCR 결과와 zymograph 결과의 비교는 Wilcoxon two-sample test를 이용하였다. 조직학적 등급과 T 병기를 두 군으로 분류하여 비교할 경우에는 t-test를 이용하였다. 또한 조직학적 유형별 면역염색결과 비교는 Chi square (Fisher's exact test)를 이용하였고, RT-PCR 결과와 zymogram결과의 비교는 Kruskal-Wallis test를 이용하였다. 변수들간의 상관관계는 Spearman's correlation을 이용하였다. 통계 처리는 SAS (Windows version 8.2) 통계 패키지를 사용하였다. Zymography의 결과만의 통계 처리는 SPSS (Windows version 10.0) 통계 패키지

를 사용하였다. 독립된 두 평균값을 비교하기 위해서 모수적 방법인 Student t-test와 비모수적 방법인 Mann-Whitney test를 시행하였으며, 세 개이상의 평균값을 비교하기 위해서는 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis test를 시행하였다. p-value는 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 하였다.

### III. 결과

#### 1. 임상 및 조직학적 소견

총 25예 환자의 진단 당시 연령은 28세부터 75세였으며 평균은  $54 \pm 11$ 세였다. 연령별로는 20대가 1예, 30대가 0예, 40대가 7예, 50대가 9예, 60대가 6예, 70대가 2예로써, 50대가 가장 많았다. 성별로는 남자가 16예, 여자가 9예였다.

신세포암의 유형별로는 전통형이 14예(56%), 유두형이 5예(20%), 난염형이 6예(24%)였다. T 병기별로는 pT1이 7예(28%), pT2가 6예(24%), pT3a가 5예(20%), pT3b가 7예(28%)였다.

#### 2. MMP-2, MMP-9의 RT-PCR을 통한 전사단계에서의 발현

MMP-2 mRNA (163bp)는 비교적 일정하게 발현된 반면, MMP-9 mRNA (262bp)는 발현정도가 다양하였다(그림 1). 발현정도를 수치로 계산하기 위하여 TINA 프로그램(version 2.01e)을 사용하였으며, MMP-2 또는 9과  $\beta$ -globin과의 비를 구하여 분석하였다. MMP-2 및 MMP-9 전사체는 전통형에서 가장 높은 발현을 보였으나 통계학적 의미는 없었으며 (각각  $p=0.182$ ,  $0.371$ , Kruskal-Wallis test), 조직학적 등급과 병기와의 유의한 차이를 보이지 않았다( $p=0.865$ ,  $p=0.264$ ).

### 3. MMP-2, MMP-9의 Zymography를 통한 단백질 단계에서의 발현

MMP-2, MMP-9이 효소 활성화 단계에서 실질적으로 작용한다는 점을 감안하여 zymography 결과를 유형별 그리고 병기별로 분석하였다(그림 2).

#### 가. MMPs의 유형별 발현

총 21예 중, 비활성형의 MMP-9 (92kD)이 종양조직에서 19예로 가장 많은 수에서 발현되었다. 활성화형의 MMP-9 (82kD)은 5예에서, 비활성형의 MMP-2 (72kD)는 4예에서 발현되었고, 활성화형의 MMP-2 (62kD)는 발현되지 않았다. 이에 반해 정상조직에서는 각각 순서대로 13예, 1예, 1예, 0예에서 발현되었다.

#### 나. 정상조직과 종양조직에서의 발현

가장 많은 수에서 발현된 비활성형 MMP-9(92kD)의 발현량을 수치로 표시하여 그 평균값을 비교해 보았을 때, 종양조직이  $144.2 \pm 44.0$ 로 정상조직  $76.0 \pm 67.7$ 보다 통계학적으로 유의있게 높게 발현되었다( $p < 0.001$ , Student t-test, Mann-Whitney test, 표 1).

#### 다. 신세포암 유형별 MMP-9의 발현

종양 조직에서 발현된 절대량의 평균값을 신세포암의 유형별로 비교해 보면 전통형 158.2±20.0, 유두형 152.6±36.9, 난엽형 140.2±37.4으로 전통형, 유두형, 난엽형 순이었으나 유형간 발현 차이에 대한 통계학적 의의는 없었다(p=0.574, Kruskal-Wallis test, 표 2). 종양에서 발현된 값을 그에 대응하는 정상조직에서 발현된 값을 제한 교정값을 구하여 비교해 보았을 때 순서대로 29.4±26.3, 34.8±36.9, 24.0±24.7로 유두형, 전통형, 난엽형 순이었으나 통계학적 의의는 없었다(p=0.951, Kruskal-Wallis test, 표 2).

#### 라. pT stage별 MMP-9의 발현

종양 조직에서 발현된 절대량의 평균값을 pT 병기별로 비교해 보면 pT1 145.1±31.8, pT2 130.4±15.8, pT3a 159.3±20.6, pT3b 176.4±27.97로 전체적으로 T3 병기로 갈수록 증가하였으나, 네 병기간 통계학적 차이는 없었다(p=0.077, Kruskal-Wallis test). 그러나 이것을 T1, T2와 T3a, T3b 또는 T1, T2, T3a와 T3b의 두 군으로 나누어 비교해 보았을 때 각각 128.3±46.1 대 170.0±25.4, 134.1±43.8 대 176.4±28.0 으로 통계학적 차이를 나타내었다(p=0.010, p=0.019, Mann-Whitney test, 표 3). 정상조직에서 발현된 값을 제한 교정값을 구하여보았을 때 병기별로 26.1±30.3, 18.2±11.8, 20.1±20.1, 52.4±29.2로써 pT3b에서 높은 값을 보였다. 이를 마찬가지로 네 병기를 두 개의 군으로 나누어 비교해 보았을 때 T1, T2와 T3a, T3b 군간에는 23.1±24.4, 39.0±30.7로 통계학적 차이가 없었으나(p=0.210), T1, T2, T3a와 T3b 군간에는 21.9±23.2, 52.4±29.2로 통계학적 차이를 보였다(p=0.025, 표 3).

#### 4. 면역조직화학 염색 결과

MMP-2와 9이 염색되는 부위는 크게 다르지 않았다(그림3). MMP-2는 종양세포 군집이 침윤하는 부위에 주로 국한되어 염색되었다. MMP-9은 군집에 미만성으로 염색되거나 MMP-2와 마찬가지로 침윤하는 부위의 가장자리에 강하게 염색되었다. 유형별로는 전통형이 강하게 염색되었으며, 대부분의 난염형은 염색이 되지 않았다(각각  $p=0.078$ ,  $0.866$ , Fisher's exact test). 조직학적 등급과 병기와 유의한 차이는 없었다( $p=0.074$ ,  $p=0.141$ ).

#### 5. RT-PCR, Zymography와 면역염색간의 상관 관계

MMP-2의 mRNA와 단백질 발현과의 상관관계는 의미있는 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었고(Spearman's correlation coefficient;  $0.38655$ ,  $p=0.0563$ ), MMP-9의 경우에는 전사체 발현과 비활성형, 그리고 활성화형의 MMP-9간에 유의한 상호관계를 보였다 (비활성형 MMP-9: Spearman's correlation coefficient,  $0.49310$ ,  $p=0.0144$ , and  $0.52499$ ,  $p=0.0084$ ). 반면 면역염색 결과와 활성화형 단백질 발현 혹은 전사체 발현과의 상관관계는 통계학적으로 유의하지 않았다 (MMP-2 면역염색 vs. 전사체;  $p=0.0855$ , 면역염색 vs. 활성화형  $p=0.119$ ; MMP-9 면역염색 vs. 전사체;  $p=0.376$ , 면역염색 vs. 활성화형  $p=0.096$ , Kruskal-Wallis test).



표 1. 정상 조직과 종양 조직에서 MMP-9의 발현

	정상 조직	종양 조직	p-value
	평균±표준편차	평균±표준편차	
비활성형	76.0±67.7	144.2±44.0	p<0.01*
활성형	0.00±0.00	40.7±67.4	p=0.09

\*p-value<0.05 (Student T-Test)

표 2. 신세포암의 유형별 MMP-9의 발현

		전통형	유두형	난염형	p-value*
		평균±표준편차	평균±표준편차	평균±표준편차	
비활성형	발현값	158.2±20.0	152.6±36.9,	140.2±37.4	p=0.574
	교정값	29.4±26.3	34.8±36.9	24.0±24.7	p=0.951
활성형	발현값	24.2±51.0	59.2±81.4	52.8±84.5	p=0.572
	교정값	3.4±7.6	12.0±16.4	14.3±26.5	p=0.543

\*p>0.05 (Kruskal-Wallis Test)

표 3. pT 병기별 MMP-9의 발현

		T1, T2, T3a	T3b	p-value*
		평균±표준편차	평균±표준편차	
비활성형	발현값	134.1±43.8	176.4±28.0	p=0.019*
	교정값	21.9±23.2	52.4±29.2	p=0.025*
활성형	발현값	17.6±48.6	114.6±70.3	p=0.025*
	교정값	3.25±9.0	25.6±25.1	p=0.025*

\*p<0.05 (Mann-Whitney Test)

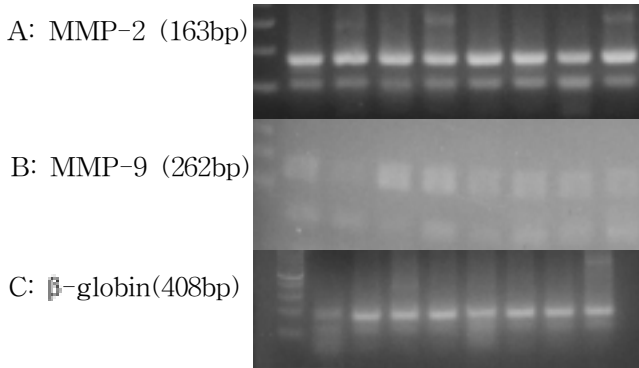


그림 1. RT-PCR 결과. A: MMP-2 (163bp)가 모든 조직에서 비교적 일정하게 발현되는 것을 보여주고 있다. B: MMP-9 (262bp)은 다양한 정도로 발현되는 것을 보여주고 있다. C:  $\beta$ -globin (408bp)은 모든 세포에서 전사되는 유전자 산물로 본 실험에서 양성 RT-PCR 산물로 사용하였다.

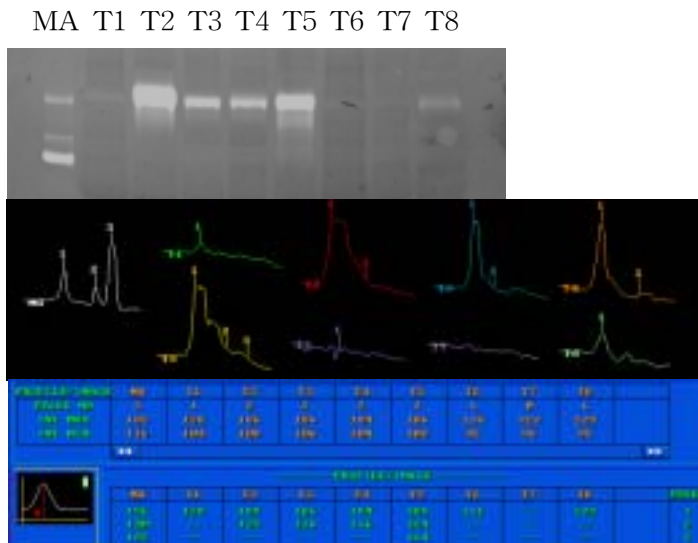


그림 2. Zymography 결과와 해석. Zymogram gel을 사용하여 전기영동 후 gel 영상을 capture software에 연결된 video-camera로 촬영한 후 band area를 그래프와 함께 수치로 표시하였다. MA는 HT-1080 marker, T1은 난염형(pT2), T2는 전통형(pT3b), T3은 전통형(pT1), T4는 유두형(pT1), T5는 전통형(pT2), T6은 중앙세포종(양성중앙), T7은 난염형(pT1), T8은 난염형(pT3b)이었다. T 병기가 높고 전통형인 T2에서 MMP-9이 가장 많이 발현되는 것을 알 수 있다.

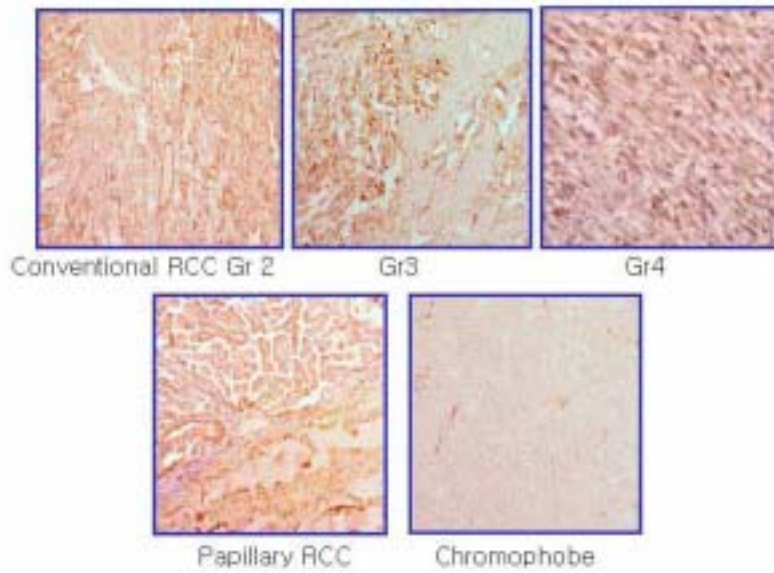


그림 3. 면역조직화학 염색 결과. MMP-2, 9 모두 침윤 부위에서 강하게 염색되었다. 난염형(chromophobe)은 zymography에서는 발현되었지만, 면역조직화학 염색에서는 다른 유형과 달리 음성이었다. (Conventional RCC: 전통형 신세포암, Papillary RCC: 유두형 신세포암, Chromophobe: 난염형, Gr: 조직학적 등급)

#### IV. 고찰

종양의 성장, 침윤과 전이는 복합적이고 여러 단계를 거치는 과정으로서 세포외 기질과 기저막의 단백질 분해가 중요한 단계로 인식되고 있다. 이러한 과정에 MMPs가 핵심적인 역할을 한다는 것은 여러 연구들에 의해 확인되었다.<sup>6,7</sup> 또한 동물 실험과 인체 조직을 통한 연구에서 여러 암종에서 MMPs의 증가가 관찰되었으며, 전이를 동반한 진행성 암에서 그 발현이 증가하여 예후인자로서의 의의도 제기되었다.<sup>8,9,10,11,12,13</sup>

신세포암에서 MMPs 및 TIMPs의 발현에 관한 연구들도 진행되었지만 제한적이었으며, 그 결과들도 다양하였다.<sup>16,17,18,19</sup> 기존의 연구에서는 MMPs의 발현 정도를 알아보는데 있어 한가지 방법을 사용하여 어느 한 단계에서만 발현을 알아보는데 그쳤다. 대신 MMPs의 활성화를 조절하는 것으로 알려진 TIMPs의 발현을 동시에 알아보는 연구가 많았다.<sup>16,17,18</sup> Kugler 등<sup>16</sup>이 RT-PCR 방법을 사용하여 MMPs:TIMPs의 비율과 암의 진행정도와 연관관계가 있다고 보고한 이후, MT-MMP를 포함한 여러 MMPs, TIMPs 에 관한 연구가 진행되어 오고 있다. Lein 등<sup>17</sup>은 BIOTRAK activity assay systems을 이용하여 조직과 혈청에서 MMP-2, MMP-9와 TIMP-1, TIMP-2의 발현을 측정된 결과, 암조직에서 MMP-9과 TIMP-1이, 암환자의 혈청에서 MMP-9이 의미있게 증가해 있었다고 보고하였다. 또한 Kallakury 등<sup>18</sup>은 면역조직화학 염색을 이용하여 MMP-2, MMP-9과 TIMP-1, TIMP-2의 발현을 측정된 결과 MMPs와 TIMPs의 증가가 불량 예후인자임을 제시하였다. 그러나 신세포암의 새로운 분류에 따른 MMPs의 분석을 동일환자의 조직에서 전사체 발현과 활성화단백 및 면역단백발

현을 동시에 시도한 연구는 아직 시행된 바 없었다. 이에 본 연구에서는 신세포암의 새로운 분류와 병기에 따라 MMP-2, MMP-9의 발현정도를 전사 단계와 효소 활성화 단계에서 환자의 조직을 대상으로 조사하였다. 본 연구에서는 다른 연구들과는 달리 전사 단계와 단백질의 활성화 단계를 구별하여 각각의 단계에서 그 발현을 살펴보고 그 결과를 비교해 본 것이 특징이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 정상조직보다는 종양조직에서, 또 병기가 높을수록 MMPs의 발현이 훨씬 증가해 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 이 결과는 일단 모든 연구들에서 공통적으로 제시하였던 MMPs의 증가와 암의 진행 정도와 상관성이 있다는 보고와 일치하는 결과이다.<sup>16,17,18</sup> MMP유형별 분석에 있어서 MMP-2보다는 MMP-9과의 연관성이 두드러졌다. 이 결과는 Lein 등<sup>17</sup>이 조직과 혈청에서 MMP-2, MMP-9와 TIMP-1, TIMP-2의 발현을 측정된 결과, 암조직에서 MMP-9과 TIMP-1이, 혈청에서 MMP-9이 의미있게 증가하여 MMP-9과의 연관성을 제시한 결과와 일치하였다.

또한 본 연구에서는 MMP-2 및 MMP-9의 전사체 및 활성화 단백질의 발현이 전통형 혹은 유두형 암종에서 난염형 암종에 비해 높은 경향을 보였으나 통계학적 의의는 없었다. 현재까지 새로운 분류에 의한 조직학적 유형에 따른 MMP차이를 분석한 연구결과는 매우 적다. 그러나 Kitagawa 등<sup>19</sup>과 Kallakury 등<sup>18</sup>의 연구결과에서 MT3-MMP와 TIMPs의 발현이 신세포암의 유형별로 차이가 있다고 하여 유형별 발생과정에 MMPs와 TIMPs이 관여할 가능성을 제기한 바는 있다.

T 병기 별로 비교해 보았을 때 pT1, pT2, pT3a, pT3b의 네 개의 군을 비교해볼 때 통계학적 차이는 없었으나, pT1, pT2와 pT3a, pT3b 또는 pT1, pT2, pT3a와 pT3b의 두 개의 군으로 나누어 보았을 때 통계학적으로

의의있는 차이를 보였다. 이는 진행성 암에서 MMPs가 높게 발현된다는 이전의 연구결과와 일치한다.<sup>16,17,18</sup> 흥미로운 사실은 T1과 T2는 단지 종양의 크기에 의한 분류이고 T3부터 주변조직이나 혈관으로의 침윤이 있는 경우 임을 염두해 둘 때 MMPs의 기능과 진행성 암의 표지인자로서의 가능성을 다시 한번 제기한다고 볼 수 있다.

MMPs의 발현은 사실 여러 단계에서 조절되며 그 과정 또한 쉽게 단순화 시킬 수 없는 것으로 알려지고 있다. MMPs가 발현되고 그것이 기질내에서 실질적으로 활성화되기까지는 여러 단계를 거쳐야 한다. 이런 이유로 발현 정도를 여러 단계에서 확인해야만 정확한 MMPs의 조절기전을 유추할 수 있게 된다. 기존의 연구들은 이러한 발현을 조절하는 단계 중에서 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현, 즉 전사 단계에서의 발현을 알아보았고, 그 억제제로 알려진 TIMPs의 발현을 동시에 관찰하는데 중점을 두어 왔다.<sup>16,17,18,19</sup> 본 연구에서는 전사 단계와 실질적인 작용을 하는 단백질 활성화 단계를 비교해 봄으로써 기존의 많은 연구들이 제시한 mRNA의 발현이 단백질 활성화로 이어지는 지를 검증하였다. 본 연구 결과 MMP-2와 MMP-9이 서로 상이한 결과를 보였다. 즉, MMP-2가 전사단계에서는 각 경우별로 비교적 일정한 발현을 보였으나 단백질 활성화 단계에서의 발현이 감소한 반면, 신세포암과 상관관계가 있는 것으로 드러난 MMP-9의 경우 전사단계에서부터 그에 상응하는 다양한 발현을 보였고 단백질의 발현단계도 연관성이 있었다. MMP-2, MMP-9이 4형 콜라겐을 분해하는 gelatinase 로써의 역할은 비슷하지만 본 연구 결과를 바탕으로 했을 때 적어도 신세포암에 있어서 MMP-2는 전사이후 단계에서 그 발현이 조절되는 반면, MMP-9는 전사이전 단계에서부터 그 발현이 조절되는 것으로 추정해 볼 수 있다. 이는 MMPs의 발현 조절이 매우 복잡하며 여러 단계에서 조절되고 통제된다는

것을 시사한다고 여겨진다. 이러한 MMPs의 조절을 더 잘 이해하기 위해서는 현재 밝혀진 각 단계뿐만 아니라 전사단계와 단백질 합성의 중간 과정에 대한 조절 및 기전 연구도 진행되어야 할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 MMP-9과 T 병기별 상관관계를 통하여 궁극적으로 예후 인자로서의 가능성을 제시하였다. 본 연구의 대상이 되었던 환자가 2000년 이후에 수술을 받았던 환자로 장기적인 추적관찰이 불가능하여, 궁극적으로 예후 인자임을 밝혀줄 생존율과의 상관관계는 밝혀내지 못하였다. 이후 추적관찰에 따른 생존율에 관한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

## V. 결론

본 연구는 25예의 신세포암 환자에서 신장전적출 후 종양조직과 정상조직에서 채취한 신선동결조직을 이용하여 신세포암의 유형, T 병기와 MMP-2, 9의 전사 단계와 단백질 활성화 단계에서의 발현간의 관계를 알아보았으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MMP-2는 전사발현이 조직학적 유형별, 등급별, 그리고 병기에 따라 큰 차이가 없이 일정하게 발현된 반면, 단백질 활성화 단계에서는 거의 발현되지 않았다.

2. MMP-9은 전사단계와 단백질 활성화 단계에서의 발현간에 상관 관계를 보였다.

3. MMP-9의 발현과 조직학적 유형 혹은 등급간에 상관 관계는 없었으나 T 병기와 상관 관계가 있었으며, 특히 T3b에서 유의있게 증가하였다.

이상의 결과를 종합할 때 신세포암에서는 MMP-2가 전사이후 단계 (post-transcriptional level)에서 조절되는 반면, MMP-9는 전사단계에서 조절되어 활성화형으로 인한 신세포암이 침윤과 전이 등 암 진행 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고, 궁극적으로 예후 인자로서의 의미가 있다고 사료된다.



## 참고 문헌

1. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. N Eng J Med 1996;335:865-75.
2. Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin MB, Blute ML, Bostwick DG, et al. Classification of renal cell carcinoma. Cancer 1997;80:987-9.
3. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, et al. The Heidelberg Classification of Renal Cell Tumors. J Pathol 1997;183:131-3.
4. Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, Venturina MDP, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms. Am J Surg Pathol 2002;26:281-91.
5. Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. J Pathol 2001;195:135-7.
6. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol 1999;189:300-8.
7. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. J Natl Cancer Inst 1997;89:1279-95.

8. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in esophageal cancer. *J Pathol* 1998;185:256-61.
9. Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413-7.
10. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996;2:461-2.
11. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer (Phila.)* 1998;83:1153-62.
12. Bramhall SR, Neoptolemos JR, Stamp GW, Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol* 1997;182:347-55.

13. Stearns M, Stearns ME. Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res* 1996;8:69-75.
14. Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, et al. Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin (ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1997;28:613-22.
15. Young TN, Rodriguez GC, Rinehart AR, Bast RC, Jr., Pizzo SV, Stack MS. Characterization of gelatinases linked to extracellular matrix invasion in ovarian adenocarcinoma: purification of matrix metalloproteinase 2. *Gynecol Oncol* 1996;62:89-99.
16. Kugler A, Hemmerlein B, Thelen P, Kallerhoff M, Radzun HJ, Ringert RH. Expression of metalloproteinase 2 and 9 and their inhibitors in renal cell carcinoma. *J Urol* 1998;160(5):1914-8.
17. Lein M, Jung K, Laube C, Hubner T, Winkelmann B, Stephan C, et al. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000;85(6):801-4.
18. Kallakury BV, Karikhalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross

JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7(10):3113-9.

19. Kitagawa Y, Kunimi K, Uchibayashi T, Sato H, Namiki M. Expression of messenger RNAs for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human renal cell carcinomas. *J Urol*. 1999;162:905-9.

## Abstract

### Expression of Matrix metalloproteinase 2 and 9 in Renal cell carcinoma

Hyo Sup Shim

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Nam Hoon Cho)

Matrix metalloproteinase(MMP)-2 and 9, two gelatinases, are the key regulators in the process of tumor growth, invasion and metastasis. A range of transcriptional and post-transcriptional mechanisms operate to tightly control the expression and activity of individual MMPs. The purpose of this study was to evaluate the correlation between the expression of MMP-2, MMP-9 and subtypes and stages of renal cell carcinoma.

The transcript level and enzymatic activity of MMP-2, MMP-9 were analyzed using RT-PCR and zymography, in 25 paired cases (14 conventional, 5 papillary, 6 chromophobe type) of fresh frozen renal tissues from the tumor and the corresponding normal area in the same kidney.

The enzymatic activity of MMP-9 was strongly associated with its mRNA expression( $p=0.014$ ). Generally, the expression of MMP-9 was higher

in the tumor tissues than their normal tissues( $p < 0.001$ ). The expression of MMP-9 also was higher in conventional type than in others by both zymography and RT-PCR, but it was not statistically significant( $p = 0.223$ ). The expression of MMP-9 was closely related to the higher stage( $p = 0.025$ ), which represents it is dependent on tumor stage, not on subtypes of renal cell carcinoma. The expression level of MMP-2 was not different between tumor and normal tissues.

MMP-9 seems to be a key regulator in renal cell carcinoma, and correlates with the stage of renal cell carcinoma. MMP-9 seems to be regulated at the transcriptional level, by which the active form of MMP-9 seems to play a key role in the process of invasion of renal cell carcinoma, whereas MMP-2 seems to be regulated at the post-transcriptional level in renal cell carcinoma.

---

Key Words : renal cell carcinoma, MMP-2, MMP-9, RT-PCR, zymography