

위암의 침윤과 전이에 관여하는 단백분해 효소 (uPA, PAI-1 및 Type IV Collagenase)에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실, 연세 암연구소, 연세 암센터, 외과학교실, 병리학교실

조재용 · 정현철 · 노성훈 · 김호근 · 박준오 · 이종인
유내춘 · 김주항 · 노재경 · 강진경 · 민진식 · 김병수

서 론

위암은 우리나라의 경우 아직도 악성 종양중 사망율이 가장 높은 질환이다¹⁾. 일본에서는 조기 위암의 진단율이 50%까지 보고되나, 우리나라는 조기암의 진단율이 20% 내외에 불과하며 대부분 진행 위암으로 진단 되고 있다. 절제 가능한 진행 위암의 경우도 조기 위암과는 달리 근처 절제술후에도 재발하는 경우가 많아 5년 생존율이 30-40%에 불과하다. 절제가능 진행위암에서 수술과 보조약물요법(5-fluorouracil, mitomycin-C, doxorubicin, etoposide, methotrexate, cisplatin)병용시 수술 단독군에 비하여 10-20%의 생존율의 증가를 보이고 있으며, 절제 불가능암 또는 전이암의 경우 병용요법에 의한 관해율이 40% 정도 되고 있으나 대부분 부분 관해로 생존율의 향상에 큰 도움을 주지는 못하고 있다²⁾. 위암의 치유율을 보다 높이기 위하여 최근 새로운 약제의 개발, 생물학적 활성 조절 요법, 유전자 요법등 새로운 치료 방법의 도입과 더불어 재발 위험이 높은 고위험도군에서 암의 침윤과 전이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

고형암의 침윤과 전이는 암세포의 확산을 억제하고 있는 세포외 기질(extracellular matrix)로부터 암세포들이 떨어져 나와 내피세포 기저막(subendothelial basement membrane)을 통과하여, 주위 결체 조직 내로 침투하여 혈류 또는 림프관에 도달함으로써 이루어진다. 이 과정은 악성 세포들이 단백 분해효소를 생산하여 세포외 기질과 세포막을 구성하고 있는 단백질

들의 결합을 비가역적으로 파괴하여 이루어 진다³⁻⁷⁾. 암의 침윤과 전이에 관여하는 단백 분해 효소로는 urokinase-type plasminogen 활성화체(urokinase-type plasminogen activator:uPA), plasminogen 활성화체 억제제(plasminogen activator inhibitors: PAIs), 및 type IV collagenase 등이 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾.

uPA는 분자량 52 kD인 serine protease의 일종으로 유방암등의 고형암에서 발현이 증가 되며, 기저막 분해 과정의 중추 역할을 하는것으로 알려지고 있다¹²⁻¹⁶⁾. uPA는 암세포에서 비활성화 형태의 pro-uPA로 분비되어 plasmin등에 의해 활성화 된다. 활성화된 uPA는 plasminogen의 plasmin 전환을 촉진 시키며, 증가된 plasmin은 세포외 기질을 구성하고 있는 fibrin, fibronectin, proteoglycan, laminin등을 파괴하고, type IV collagenase를 활성화 시킨다^{9, 10, 17-20)}.

Plasmin system의 조절에는 uPA 세포막 수용체(membrane uPA receptor: uPA-R)와 plasminogen activator inhibitor type-1(PAI-1)이 관련된다 고 보고되고 있다²¹⁻²⁷⁾. uPA-R은 분자량 약 55-60 kD 정도로써 종양의 침윤이 일어나는 부위에 국소적으로 uPA를 활성화시키고, uPA-PAI 복합체를 비활성화 시켜 종양의 침윤을 조절하는 것으로 보고되고 있다²⁸⁻³⁰⁾.

PAI-1는 serine protease inhibitor군에 속하며 uPA의 작용을 특이하게 억제하는 것으로 알려지고 있다. 최근 유방암, 폐암환자의 조직내에 uPA 뿐만 아니라 PAI-1이 높은 농도로 발현됨이 보고되고 있으나 PAI-1의 작용은 아직도 명확하지 않다. Type IV collagenase는 matrix-metalloproteinase(MMP)중의 하나로 분자량에 따라 92kD(MMP-9)와 72kD

접 수 : 1995년 12월 23일

통 과 : 1996년 2월 27일

* 본연구는 연세대학교 의과대학 1994년도 학술연구비 지원으로 인하여 이루어졌음.

(MMP-2)로 나뉘며 type IV collagen을 파괴하고, type V, VII, X, fibronectin, elastin등도 파괴하여 암의 침윤에 관여 하는것으로 보고되고 있다^{17, 31)}.

이러한 암의 침윤에 관여하는 효소인 uPA, PAI, type IV collagenase 등을 이용하여 유방암, 대장암 등에서는 암침윤 및 전이 모델이 정립되었고 암침윤 관련 효소와 암재발의 상관관계에 대한 연구가 이루어 졌다^{7, 8)}. 또한 암의 침윤과 전이를 방지하기 위하여 uPA, PAI, type IV collagenase등을 억제하려는 연구들이 활발하게 시행되고 있다³²⁾. 그러나 위암에서는 암침윤 관련 효소인 uPA, PAI, type IV collagenase등에 대한 연구는 거의 수행되어 있지 않아, 위암침윤과 전이의 명확한 기전을 설명할수 있는 모델의 확립이 요청되고 있다. 또한 위암에서 암침윤 관련 효소의 임상적 효용성이 확립되어 있지 않다. 저자는 진행위암환자에서 위절제술 시행시 얻어진 종양 및 정상조직을 이용하여 uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성도를 측정하여 위암의 침윤과 전이에 미치는 영향을 알아보고, 이미 알려진 위암의 예후 인자와 비교하여 위암의 침윤과 전이에 관한 모델을 정립하고자 하였으며 나아가서는 재발 및 생존에 영향을 줄수있는 예후인자로서의 임상적 효용성을 연구하였다.

대상 및 방법

1. 대상환자

1990년 1월부터 1994년 5월까지 연세 의료원 및 연세 암센터에 내원하여 조직학적으로 위암으로 진단 받고 위절제술을 시행받고 수술 당시 종양 및 정상 조직을 얻을수 있었던 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자는 2년 이상 추적관찰 되어, 재발 유무의 확인과 무병 생존 기간이 평가가 가능하였던 160예였다. 추적 관찰중 임상적 검사는 수술후 매 3-4개월 간격으로 하였다. 재발은 위조영술, CT, MRI등의 방사선학적 검사 혹은 조직학적검사를 이용하여 확인 하였다. 환자들은 II기 이상의 진행암의 경우 연세 암센터 임상 연구 계획에 의해 보조 화학요법을 시행 받았다. 환자들의 병기는 UICC-AJCC TNM 분류를 기준으로 하였다.

2. 조직의 세포질(Cytosol) 추출과 단백질 정량

종양의 침윤이 없는 정상 조직과 종양 조직을 수술 당시 무균적으로 절제하여 -195℃ 액체 질소 탱크에 보관하였다. 세포질 추출을 위하여 정상 및 종양 조직 250mg을 분쇄시킨후 초원심 분리 시험관에 균질화 완충액(10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 1.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol) 4ml을 첨가하여 10 배로 희석시켰다. 균질화기(IKA, Germany)를 이용하여 5초 가량 조직을 균질화 한후 4℃에서 1 시간 동안 100,000 G로 원심 분리 하였다. 세포질 상층액만을 얻어 얼음위에 장치한 시험관내에서 단백질량을 Bovine serum albumin(fraction V)을 표준 단백질로하여 Lowry법으로 측정하였다³³⁾. 각 시험관에 100 μl의 검체와 100 μl의 2N NaOH를 첨가하여 혼합한 후 100℃에서 10 분간 수화시킨후 실온에서 식혀, 1 ml complex-forming 용액[2%(w/v) Na₂CO₃, 12%(w/v) CuSO₄·5H₂O, 2%(w/v) Sodium potassium tartrate 2N NaOH]을 첨가한후 실온에서 10분간 방치하였다. 100 μl Folin 용액을 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 30-60 분간 방치한뒤, 분광흡도계(Shimadzu, Japan) 750 nm에서 흡광도를 측정 한 후 표준 곡선과 비교하여 정량하였다.

3. uPA 및 PAI-1의 측정

종양 및 정상 조직 세포질 uPA 및 PAI-1의 발현은 ELISA(enzyme linked immunoadsorbent assay) 방법을 이용하였다. 일차 항체는 사람의 uPA, PAI-1 항원에 대한 mouse 단클론항체를 사용하였으며, 이차 항체는 biotynylate 된 사람의 uPA, PAI-1 항원에 대한 mouse 단클론항체를 사용하였다(Monozyme, Denmark). 발색반응은 HRP(horseradish-peroxidase) conjugated streptavidin을, 기질은 OPD(ortho-phenyldiamine)를 이용하였다. uPA 및 PAI-1의 표준 시료는 재조합 human uPA 및 PAI-1을 이용하였다. 일차항체를 10배 희석한후 100 μl씩을 96 well ELISA plate의 각 well에 분주하고 4℃에 밤새 보관하였다. PBS(Phosphate buffered saline)로 3 회 세척후 200 μl의 blocking bovine serum albumin 용액을 20℃에서 30분간 반응시켰다. 100 μl의 세포질을 각 well에 분주하고 이차항체를 10배 희

석하여 100 μ 씩 분주하고 20°C에서 1 시간 반응시킨 후 HRP-conjugate 용액으로 20°C에서 다시 1 시간 반응시켰다. 기질용액을 각 well에 분주하고 빛을 차단한 상태에서 30분간 반응시켰다. 1M H₂SO₄ 100 μ 를 각 well에 분주하여 반응을 정지시키고 multiplate reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. uPA 3 및 PAI-1의 측정 단위는 ng/mg cytosol protein 이며, 각 측정치의 검사 편차는 10% 미만이었다.

정상 조직의 uPA 및 PAI-1의 평균치 + 2배 표준편차 이상인 경우를 양성으로, + 2배 표준 편차 미만인 경우를 음성으로 판정하였다.

4. Type IV Collagenase 활성도 분석

Type IV collagenase 활성도를 측정하기 위하여 type IV collagenase에 대한 기질이 포함된 gel (Novex 10% tris-glycine gel, 0.1% gelatin)을 이용하여 zymogram을 시행하였다. 각 well에 정상 및 종양 조직 세포질 20 μ 를 주입한 후 20 mA로 전기영동을 시행하였다. 전기영동후 gel을 2.5%(v/v) Triton X-100 용액이 함유된 renaturing buffer로 20°C에서 30분간 반응시켰다. Gel을 developing buffer [0.05M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2M NaCl, 5mM CaCl₂, 0.2%(v/v) Brij 35]로 5분간 세척한후 다시 신선한 37°C developing buffer에서 15시간 반응시켰다. 반응후 염색액[0.5%(w/v) Coomassie Blue (G250, 30%(v) ethanol, 10%(v/v) acetic acid)에서 3시간동안 gel을 염색시킨 다음 고정시켰다. Gel 분석기(Biomad, USA)를 이용하여 band 면적 및 band 밀도를 측정하여 활성도를 분석하였다. RPMI-7951 악성흑색종 세포주 배양에서 추출한 조건 배지를 MMP-2의 표지자로 사용하였으며, HT-1080 세포주의 조건 배지는 MMP-9의 표지자로 사용하였다. Type IV collagenase의 발현 빈도(expression rate)는 band가 관찰된 경우로 하였고, 활성도는 band 면적으로 분석하였다. 활성화비는 활성화형 band 면적/비활성화형 + 활성화형 band 면적으로 정의 하였고, MMP-9 및 MMP-2의 활성화 양성군은 활성화비가 0.5 이상인 경우로 정의 하였다.

5. Type-IV Collagenase(MMP-2)의 면역조직 화학 염색

종양 및 주위세포의 type IV collagenase(MMP-2) 발현 여부를 관찰하기 위하여 50예 환자에서 파라핀 포매 조직을 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-2 항체는 사람의 항원에 대한 mouse 단클론 항체(Sigma, USA)를 사용하였다. 먼저 조직표면에 존재하는 비특이 수용체를 제거하기 위하여 blocking액 100 μ 를 파라핀 포매조직이 고정된 슬라이드에 점적한 후, 37°C 가습 항온기에서 20분간 배양하였다. 1:200으로 희석한 일차항체 50 μ 를 점적하고 37°C 가습 항온기에서 30분간 다시 배양후 PBS로 세척하였다. 다시 1:500 2차 항체 100 μ 를 점적한 후, 37°C 가습 항온기에서 30분간 배양하고 PBS로 세척하였다. Avidin-Biotin Peroxidase Complex(Sigma, USA) 용액을 점적 후 실온에서 30분간 배양하고, PBS로 세척 후, Diaminobenzidine(Sigma, USA) 용액으로 발색시킨 후, methyl-green(Sigma, USA)을 이용하여 대조염색을 시행하였다. 결과는 병리의사를 포함한 2인의 판독자가 임상정보를 받지 않은 상태에서 판독하였으며, 세포질이 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하였다.

6. 통계학적 처리

정상과 종양 조직의 uPA 및 PAI-1 발현의 비교는 paired t-test를 이용 two-sided p value < 0.05를 유의하게 판정하였다. uPA, PAI-1 및 type IV collagenase와 기존의 예후 인자들과의 상호 연관성은 χ^2 -test 로 분석하였다.

무병 생존 기간은 수술일로 부터 재발이 확인되거나 최후 추적 관찰일까지로 하였다. 무병 생존기간에 영향을 미치는 각 인자별 유의도 검정은 Kaplan-Meier방식으로 비교하였으며 생존 기간의 유의도 비교는 Log-rank 검정법을 이용하였다. 무병 생존기간에 유의있게 영향을 미치는 인자들로 Cox proportional hazard model에 의한 다중 변수 분석을 시행하여 유의도 및 비교 위험도를 분석하였다.

Table 1. Characteristics of Patients(n=160)

Age	Tumor stage		
Median(Range)	55(27.86)	T1	7
M:F	2.4:1	T2	46
Location		T3	87
		T4	20
Cardia	13	Nodal status	
Fundus	4	N0	44
Body	42	N1	60
Antrum	69	N2	56
Pylorus	32	Metastasis	
Differentiation		M0	133
		M1	27
		Stage	
Well	17	I	28
Moderate	51	II	36
Poor	92	III A	36
Size(cm)		III B	33
		IV	27
		<5	70
		5-10	77
	13		

Table 2. Levels of uPA and PAI-1 in Cytosolic Extracts of Paired Normal and Cancerous Tissue(N=160)

	uPA ¹	PAI-1 ¹
Normal tissue	5.3±3.1 ²	5.8±2.9 ²
Cancer tissue	9.4±8.7 ²	10.9±9.1 ²
P-value	p<0.001	p<0.001

1: Levels of uPA and PAI-1; ng/mg cytosol protein
2: Mean value±S.D.

결 과

1. 대상 환자들의 특징

대상 환자는 총 160명으로 남자 113명, 여자 47명였으며, 중앙 연령은 55세(범위 27-86세)였다. T병기상 T1 7명(4.4%), T2 46명(28.8%), T3 87명(54.3%), T4 20명(12.5%)였으며, 임파절 전이가 없던 예가 44명(27.5%), N1 영역 임파절 전이가 60명(37.5%), N2 영역 임파절 전이가 56명(35.5%)였다. 타장기 전이 혹은 N3 영역 임파절 전이에 의한 M1 예가 27명(16.9%)였다. 병기 I 28명(17.5%), II 36명(22.5%), III 69명(43.1%), IV 27명(16.9%)였다. 연구 수행 당시 환자들의 중앙 추적기간은 24개월이었으며 중앙

의 TNM 병기, 위치, 세포 분화도등은 Table 1과 같았다.

2. uPA 및 PAI-1의 발현과 다른 기존의 예후 인자들과의 연관성

종양조직의 uPA 및 PAI-1 평균치±표준편차는 각각 9.4±8.7, 10.9±9.1 ng/mg protein cytosol였으며, 정상조직은 5.3±3.1, 5.8±2.9 ng/mg protein cytosol로, 종양조직에서 정상에 비해 유의하게 높게 발현되었다(Table 2, p<0.001). 종양의 진행에 따른 uPA 및 PAI-1의 변화는 T1 이나 T2 7.6±4.9, 8.0±4.0 T3 이나 T4 10.2±8.8, 11.1±9.0로 T 병기가 진행될수록 uPA, PAI-1의 발현은 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(p=0.094, p=NS).

임파절 전이가 진행될수록 uPA는 높게 발현되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않은 반면, PAI-1은 N0, N1 및 N2 임파절 전이군 환자의 종양 조직에서 각각 8.4±8.1, 9.1±8.5 15.0±13.8로 임파절 전이가 진행될수록 높게 발현되었다(p=0.003). 원격 전이가 있는 환자들의 종양 조직에서 uPA 및 PAI-1의 발현이 원격전이가 없는 환자들에 비하여 높게 발현되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 병기에 따른 uPA, PAI-1의 발현은 병기 I 이나 II 9.2±4.8, 8.6±7.6 III 이나 IV 9.5±6.6, 12.4±11.9로 uPA의 발현은 차이가 없었고 PAI-1의 발현은 병기 III 이나 IV에서 I 이나 II 에 비하여 높았다(p=0.041).

종양세포의 분화도에 따른 uPA, PAI-1의 발현은 고분화 및 중등도 분화암 7.2±3.8, 7.2±6.5 저분화암 11.2±8.5, 13.3±12.4로 분화가 나쁠수록 uPA 및 PAI-1의 발현이 높았다(각각p=0.041, p=0.004)(Table 3, Fig. 1). 종양 조직의 uPA 및 PAI-1의 발현은 서로 상관관계를 보였다(r=0.57), (Fig. 2)

3. Type IV Collagenase의 발현 및 활성도 비교

Zymography를 이용하여 type IV collagenase (MMP-9, MMP-2)의 발현 및 활성도를 동일 환자의 정상 조직과 종양 조직의 세포질을 이용하여 분석한 결과 MMP-9의 비활성화형(92kD)의 발현 빈도

Table 3. Comparisonm of uPA and PAI-1 in Cytosolic Extracts and Other Variables in Gastric Cancer Patients

Variables	uPA level ¹	p-value	PAI-1 Level ¹	p-value
Differentiation				
Well-Mod	7.2 ± 3.8		7.2 ± 6.5	
Poor	11.2 ± 8.5	0.041	13.3 ± 12.4	0.004
Tumor stage				
T1-T2	7.6 ± 4.9		8.0 ± 4.0	
T3-T4	10.2 ± 8.8	0.094	11.1 ± 9.0	NS
Nodal status				
N0	7.6 ± 4.3		8.4 ± 8.1	
N1	7.7 ± 5.8		9.1 ± 8.5	
N2	9.3 ± 8.9	NS	15.0 ± 13.8	0.003
Metastasis				
M0	9.2 ± 9.92		10.9 ± 10.8	
M1	10.5 ± 6.7	NS	11.3 ± 8.5	NS
Stage				
I - II	9.2 ± 4.8		8.6 ± 7.6	
III-IV	9.5 ± 6.6	NS	12.4 ± 11.9	0.041

1: Levels of uPA and PAI-1; Mean value ± SD (ng/mg cytosol protein)

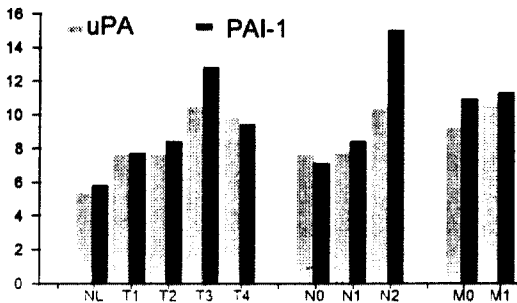


Fig. 1. uPA and PAI-1 expression according to tumor progression.

(expression rate)는 정상과 종양조직 사이에 차이가 없었다(Fig. 3, 4). 그러나 MMP-9의 활성화형(82kD)과 MMP-2의 비활성화(72kD) 및 활성화형(62kD)의 발현 빈도는 종양 조직에서 높았다(Table 4). Type IV collagenase의 활성도(activity) 비교시 MMP-9의 비활성화형의 활성도는 정상과 종양조직에서 차이는 없었다. 그러나 MMP-9의 활성화형과 MMP-2의 활성도는 종양 조직에서 증가되었다(Table 5). 활성화비(활성화형 band 면적/비활성화형 + 활성화형 band 면적)를 측정된 결과 MMP-9 과

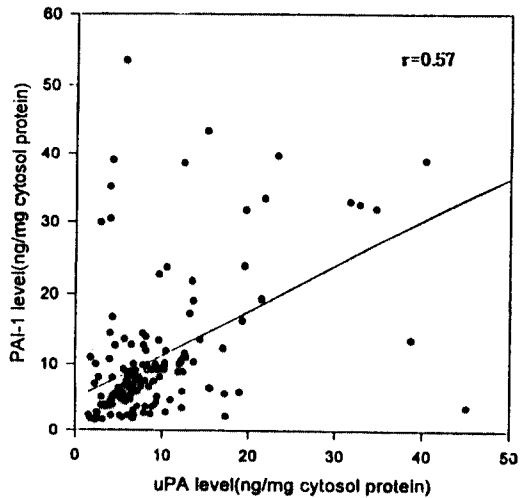


Fig. 2. uPA and PAI-1 levels in cytosolic extracts from 160 primary gastric carcinoma.

MMP-2의 활성화 비는 종양조직에서 각각 0.32 ± 0.25, 0.27 ± 0.34 로 정상조직의 0.19 ± 0.27 와 0.06 ± 0.16에 비하여 높았다(Table 6, p < 0.001).

4. Type IV Collagenase의 활성화와 다른 기존의 예후 인자들과의 상관성

MMP-9 및 MMP-2의 활성화비와 기존의 다른 예후 인자들과의 상관성을 비교시 임파절 전이에 따라 MMP-9의 활성화비는 N0, N1 및 N2 임파절 전이군 환자의 종양조직에서 각각 0.28, 0.30 및 0.36 으로 증가되어 MMP-9의 활성화비는 임파절 전이가 진행 될수록 높았고($p=0.011$), MMP-2는 임파절 전이시 전이가 없는 경우에 비하여 활성화비가 증가하는 경향이였다. 원격전이가 있는 환자들의 종양 조직내 MMP-2 활성화비는 0.34로 원격 전이가 없는 종양 조직의 0.26에 비하여 높았으나($p=0.041$), MMP-9의 활성화비는 원격전이에 따른 차이는 없었다(Fig. 5). 병기에 따른 MMP-9, MMP-2의 활성화비는 병기 I 이나 II 0.28 ± 0.23 , 0.26 ± 0.24 III 이나 IV 0.33 ± 0.27 , 0.27 ± 0.26 으로 MMP-9의 활성화는 병기 III 이나 IV 에서 I 이나 II 인 환자들에 비하여 증가하는 경향을 보였으나($p=0.085$), MMP-2의 활성화는 차이가 없었다(Table 7).

5. 면역조직화학 염색에 의한 Type-IV Collagenase(MMP-2) 발현율

Type IV collagenase(MMP-2)의 면역조직화학 염색결과 50예중 양성반응은 보인경우는 38예(76%) 에서 관찰되었다. MMP-2의 발현은 종양세포에서 강

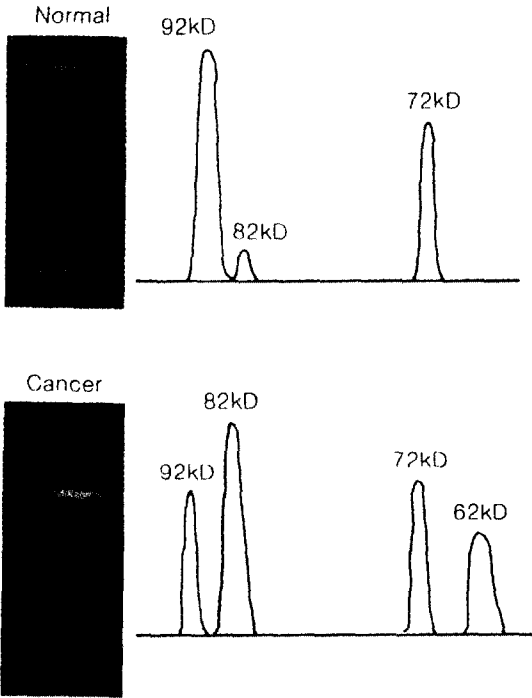


Fig. 3. Gelatin zymography with computer analyzed densitometer. The result of representative normal and cancerous tissue extracts are shown note that the two more bands corresponding to active MMP-9 and MMP-2 are seen in the tumor sample(bot-tom), but only proMMP-9 and MMP-2 in the normal tissue(Top).

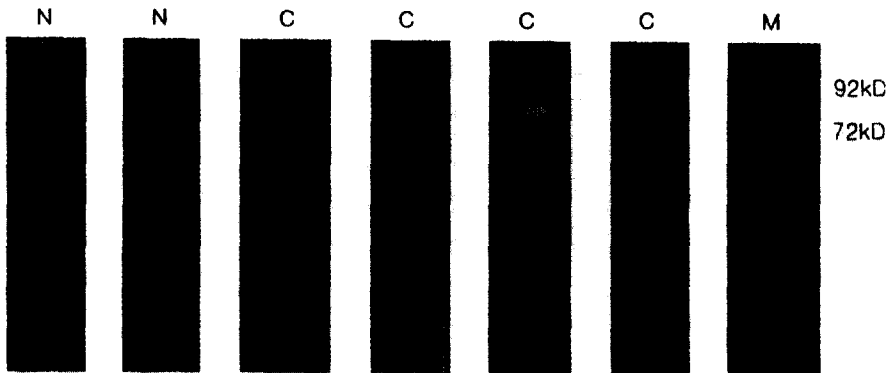


Fig. 4. Gelatin zymography of various gastric tumors. Twenty ul of normal and gastric tumor extracts with gelatinase marker samples were run on 10% SDS-PAGE containing gelatin. Lane N(1 and 2): normal tissue, Lane C(3-6): tumor tissue, Lane M(7): marker

Table 4. Number of Patients with Type IV Collagenases Expression Positive in Cytosolic Extracts of Paired Normal and Cancerous Tissue

N(160)	MMP-9		MMP-2	
	92kD (Inactive)	82kD (Active)	72kD (Inactive)	62kD (Active)
Normal tissue	120(75%)	40(25%)	57(36%)	7(4%)
Cancer tissue	142(89%)	89(56%)	94(59%)	57(36%)
p-value	0.09	0.01	0.03	0.01

Table 5. Activity of Type IV Collagenases Measured by gel Band Area(mm2)

	MMP-9		MMP-2	
	92kD (Inactive)	82kD (Active)	72kD (Inactive)	62kD (Active)
Normal tissue	0.92±0.55	0.34±0.55	0.48±0.57	0.10±0.29
Cancer tissue	1.13±0.53	0.89±0.90	0.55±0.46	0.43±0.56
p-value	0.03	0.001	0.013	0.001

Table 6. Activation Ratio of Type IV Collagenases

	MMP-9 ¹	MMP-2 ²
Normal tissue	0.19±0.27	0.06±0.16
Cancer tissue	0.32±0.25	0.27±0.34
P-value	0.001	0.001

¹. MMP-9 activation ratio: 82kD/(92kD+82kD)

². MMP-2 activation ratio: 62kD/(72kD+62kD)

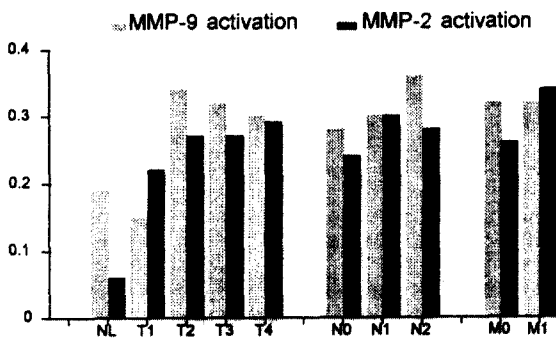


Fig. 5. MMP-9 and MMP-2 activation ratio according to tumor progression.

한 양성 반응을 보였으며, 섬유아세포, 내피세포등에서도 약하게 염색되었다(Fig. 6).

6. 위암의 진행에 따른 uPA, PAI-1 및 Type IV collagenase의 발현

uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성화를 위암의 진행에 따라 비교하였다. MMP-9의 활성화는 T2 병기에 가장 증가되었으며, MMP-2의 활성화는 T 병기가 진행됨에 따라 증가하는 경향이였다. uPA 및 PAI-1은 T3 병기에 가장 높게 발현되었다. 임파절 전이가 양성인 환자군에서 중앙 조직내 PAI-1의 발현 및 MMP-9의 활성도가 증가 되었고, 원격전이가 있는 경우 MMP-2 활성도가 증가되었다 (Fig. 7).

7. uPA, PAI-1, 및 Type IV Collagenase의 고발현 및 활성도가 예후에 미치는 영향

기존의 예후 인자들과 함께 단일 변수 분석을 시행하여 예후에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2년 무병생존율을 비교시 uPA 및 PAI-1 양성군의 2년 무병 생존율이 각각 35% 및 34%로 음성군 65%. 및 69%에 비해 낮았다(각각 p=0.005, p=0.004, Fig. 8, 9).

MMP-9 및 MMP-2의 활성화 양성군은 72예 (45%) 및 54예(34%) 였으며 MMP-9 과 MMP-2 모두가 활성화 양성인 군이 47예(29%)였다. MMP-9 만 활성화 양성인 경우 2년 무병 생존율이 61%로서

Table 7. Association between Activation of MMP-9 and MMP-2 in Cytosolic Extracts and other Variables in Gastric Cancer Patients

Variables	MMP-9	p-value	MMP-2	p-value
Tumor stage				
T1-T2	0.24±0.22		0.25±0.20	
T3-T4	0.31±0.27	NS	0.28±0.26	NS
Nodal status				
N0	0.28±0.23		0.24±0.20	
N1	0.30±0.25		0.30±0.27	
N2	0.36±0.27	0.011	0.28±0.25	NS
Metastasis				
M0	0.32±0.25		0.26±0.25	
M1	0.32±0.25	NS	0.34±0.29	0.041
Stage				
I - II	0.28±0.23		0.26±0.24	
III-IV	0.33±0.27	0.085	0.27±0.26	NS

Table 8. Multivariate Analysis : Relapse-free Survival in Gastric Cancer Patients

Variables	Univariate p-value	Multivariate	Relative Risk Ratio
uPA	0.0051	0.00030	3.6
stage	0.0001	0.0068	2.2
PAI-1	0.0047	0.0207	1.5
MMP ¹	0.0002	0.7640	-

¹: both MMP-9 and MMP-2 activation positive versus negative

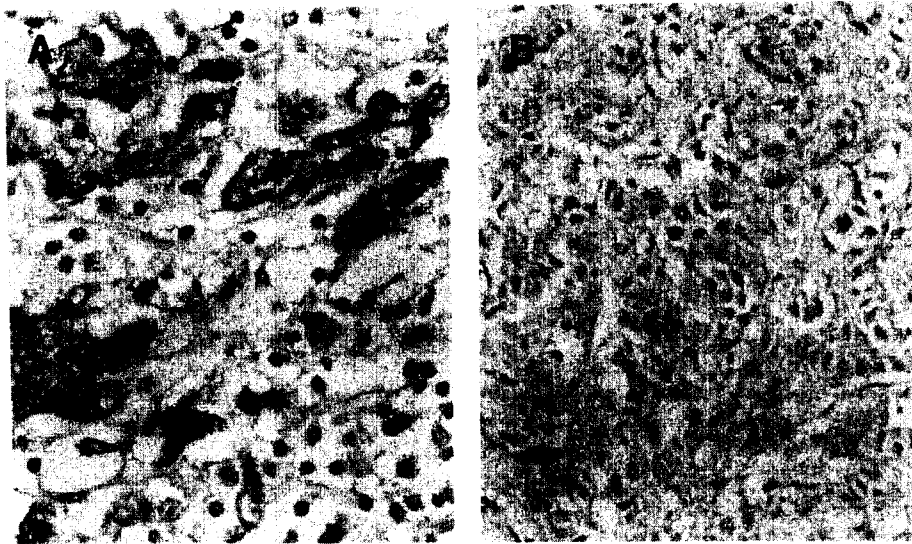


Fig. 6. Immunohistochemical staining of type IV collagenase tumor cells show positive reactivity(brown color cytoplasm) with type IV collagenase(MMP-2) immunohistochemical staining(A), but some tumor cells does not reveal any positive reactivity(B).

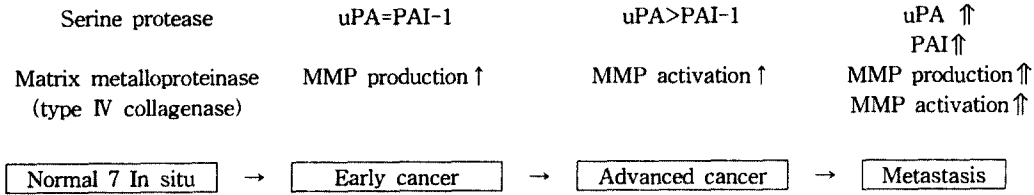


Fig. 7. Sequential change of expression and activation of the proteolytic enzymes according to gastric cancer progression.

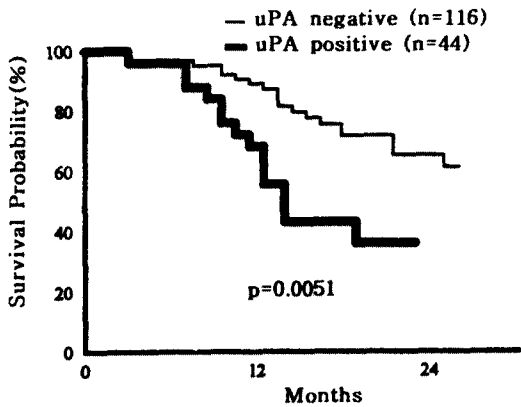


Fig. 8. Relapse free survival of the gastric cancer patients according to uPA positivity.

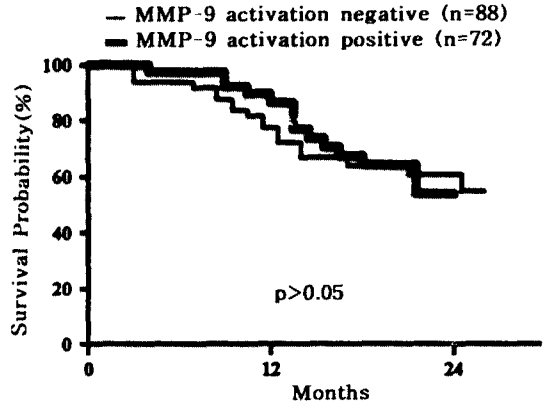


Fig. 10. Relapse-free survival of the gastric cancer patients according to MMP-9 activation.

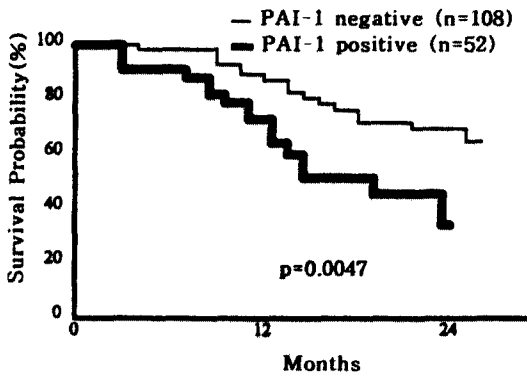


Fig. 9. Relapse free survival of the gastric cancer patients according to PAI-1 positivity.

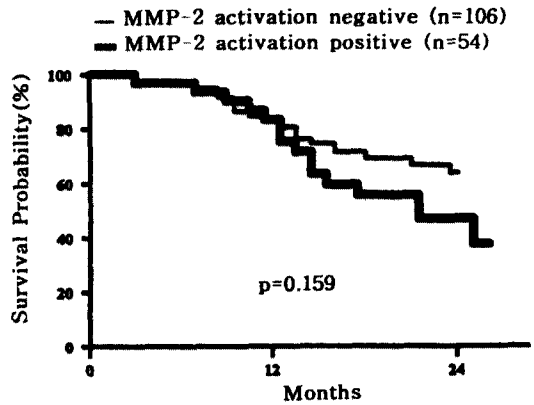


Fig. 11. Relapse-free survival of the gastric cancer patients according to MMP-2 activation.

음성인 경우의 64%에 비하여 생존율의 차이를 보이지 않았으며(Fig. 10), MMP-2만 양성인 경우도 51%로 음성인 경우 69%에 비하여 무병생존율이 낮은

경향만 관찰되었다(Fig. 11). 그러나 MMP-9 및 MMP-2가 모두 활성화 양성군에서는 2년 무병 생존율이 40%로 활성화 모두음성군 72%에 비하여 생존

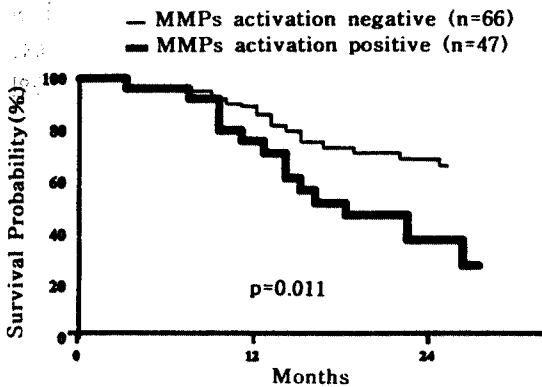


Fig. 12. Relapse-free survival of the gastric cancer patients according to MMPs activation.

율이 낮았다(p=0.011, Fig. 12).

단일 변수 분석에서 2년 무병생존율에 불량한 예후 인자로 분석된 uPA 고발현, PAI-1 고발현, type IV collagenase(MMP-9과 MMP-2) 활성화 양성 및 병기 인자들로 다중 변수 분석을 시행하였다. uPA의 고발현이 다중 변수 분석에서 독립적인 예후인자로 관찰되었고, 비교위험도는 3.6 이었다. 그러나 PAI-1 고발현 및 type IV collagenases(MMP-9 및 MMP-2) 활성화 양성은 병기와 관련한 인자로 관찰되었다(Table 8).

고 안

고형암의 침윤과 전이에 단백분해효소(uPA, PAI-1 및 type IV collagenases)들이 관여하는 사실은 최근 잘 밝혀지고 있으나, 위암에서 이들의 역할은 아직 잘 알려지지 않고 있다. 본 연구는 위암에서 uPA와 PAI-1 및 type IV collagenase의 발현유무를 알아보고, 이들의 발현과 기존의 예후인자들과의 관계 및 무병생존율에 미치는 영향을 분석하여 위암의 진행 모델을 정립하고자 시행하였다. 160예의 위암 환자를 대상으로 수술시 정상 및 종양조직을 얻어, 세포질을 추출하여 uPA와 PAI-1을 ELISA(enzyme-linked immunoadsorbent assay)방법을 이용하여 측정하였고, gelatin zymography 및 면역조직화학염색으로 type IV collagenase의 발현과 활성도를 조사하였다. 그결과 uPA와 PAI-1의 경우 정상조직에

비해 종양조직에서 높게 발현되었으며, 단일 변수분석에서 무병생존율에 불량한 예후 인자로 작용하였다.

이러한 결과는 위암조직에서 uPA가 높게 발현된다는 보고와³⁴⁻³⁶⁾, Nakamura등과 Tanaka등이 위암 조직에서 PAI-1의 발현이 증가되어 있다고 보고한 결과와 동일한 결과로^{37, 38)}, plasmin system이 위암의 진행에 중요한 역할을 함이 제시 된다고 하겠다.

위암 조직에서 uPA와 PAI-1의 발현이 모두 증가 되는 것은 PAI-1의 역할이 uPA 수용체와 결합한 uPA의 활성화를 억제한다고 생각할때 이의 높은 발현이 암의 침윤을 억제해야한다는 일반적인 생각과는 매우 상반된다^{8, 39-41)}. 유방암의 경우에도 종양조직의 세포질내에는 uPA와 PAI-1의 발현이 모두 증가 되어있음이 보고되었다^{42, 43)}. Janicke등은 유방암에서 PAI-1이 불량한 예후 인자임을 보고하면서, 암세포들이 원격지(distant foci)에 재착상(reianplantation) 되기위하여 PAI-1이 중요한 작용을 할수도 있다고 제안하였다. 즉 암의 전이가 일어나기 위해서는 새로운 종양 기질(tumor stroma)의 형성이 필요한데, PAI-1의 증가는 uPA에 의한 세포의 기질의 파괴를 정지시켜 종양 기질의 형성을 촉진할수 있다고 설명하였다. 더욱이 정상조직에서는 내피세포(endothelial cell)와 혈소판에 PAI-1이 존재하므로 PAI-1의 증가는 신생 혈관 생성이 증가되어 있음을 나타내는 인자일 수 있고 따라서 오히려 암의 전이를 촉진할수 있다고 하였다⁴²⁾. 이들은 다중 변수 분석에서 PAI-1의 고 발현이 독립적인 예후 인자임을 제시하였다.

그러나 본연구의 결과 PAI-1 보다는 uPA의 고발현이 독립적으로 무병 생존율에 불량한 예후 인자로 관찰되었고, uPA와 PAI-1의 발현에는 서로 상관성이 있었다. 따라서 uPA의 고발현이 위암의 침윤에 보다 중요하며, PAI-1의 분비가 같이 증가한것은 종양 세포의 침윤을 위하여 높게 발현된 uPA는 종양세포 혹은 종양 기질을 비특이적으로 파괴할수 있으므로, 이를 조절하기 위한것으로 생각할수 있다. 이경우 uPA와 이의 억제제인 PAI-1의 균형이 깨어질때 국소 부위에서 침윤이 시작된다고 생각할 수 있고, PAI-1의 증가는 uPA의 발현과 활성도가 증가되어 침윤이 활발하게 일어나고 있음을 간접적으로 의미하는 지표로 해석할수 있다.

면역 조직화학적 또는 면역형광염색을 이용한 연구

보고에 의하면 uPA는 종양과 인접한 부위 혹은 섬유아세포와 국소적으로 접촉 되는 부위에 염색이 되며, 침윤 과정이 활발하게 일어나는 부위에 국소적으로 uPA가 강하게 활성화되는 것을 알 수 있다고 보고하였고 이부위를 PAI-1 항체로 염색하면 PAI-1의 발현이 감소되어 있음을 관찰하였다⁴⁴⁾. 이러한 결과는 uPA와 PAI-1의 균형이 암침윤에 중요하다는 가정을 지지한다 하겠다.

최근 Heiss등은 203예 위암 환자를 대상으로 uPA와 uPA 수용체, PAI-1 및 PAI-2를 면역조직화학 염색으로 분석하여 PAI-1, uPA 및 uPA 수용체를 새로운 위암환자의 예후인자로 보고하였다. 이들의 연구는 염색된 종양세포만을 분석 하였고 주위의 내피세포, 섬유아세포 혹은 다른 기질 세포에 염색된 것은 분석 하지 않았으며 uPA와 PAI-1이 같은 조직에서 어느 부위에 주로 염색 되는지를 명확하게 밝히지는 않았다. 그러나 종양세포에 uPA 와 PAI-1이 강양성 반응을 보인것은 이들의 활성화가 종양세포에서 활발히 일어나고 있음을 의미하며 종양세포에서 활성화된 PAI-1은 uPA에 의한 종양세포 자체의 파괴를 억제하는 역할을 할것으로 생각된다⁴⁵⁾.

Nekarda등은 76예의 완전 절제술을 시행한 위암 환자의 정상 및 종양조직에서 세포질을 추출하여 uPA, PAI-1을 ELISA 방법으로 측정하여 예후 인자로서의 중요성을 보고하였는데, 이는 본연구의 결과와 잘 일치한다. 이들은 uPA와 PAI-1의 발현이 인환 세포형과 고분화암 그리고 미만형 위암에서 유두형암(papillary cancer), 저분화암 및 장형에 비해서 높게 발현되어 조직형태학적인 인자들(Histomorphologic parameter)과 관계가 있다고 보고하였다⁴⁶⁾. 본연구에서도 uPA와 PAI-1의 발현이 분화가 나쁜 종양세포에서 분화가 좋은 종양세포들에 비하여 높게 나타났다. 그러나 Nakamura등은 uPA, PAI-1의 발현과 세포의 분화도와는 무관함을 보고하였다⁴⁷⁾. 따라서 uPA와 PAI-1의 발현이 종양의 조직 형태학적인 특징과 연관이 있는지는 아직 명확치 않으며, 종양세포의 생물학적 특성과의 관계가 중요할것으로 사료된다.

본연구에서 종양 조직의 uPA의 고발현이 무병생존율에 불량한 예후 인자로 관찰되었으나, 종양의 진행에 따른 uPA의 발현을 비교하였을때 T.N.M 병기의 진행에 따라 비례하여 증가하지는 않았다. 이러한 결

과는 uPA의 발현이 종양의 진행에 따라 서로 다르게 조절되고 있다는 것을 의미하며, 분비되는 uPA의 전체 양 뿐만 아니라 종양세포들이 uPA를 활성화하는 시기 또한 서로 다르다는것을 의미한다. 따라서 동일 병기에서도 uPA의 고발현시 보다 예후가 불량하리라 예측할수 있다. 최근 uPA에 대한 특이 수용체(specific receptor)와 이의 구조가 밝혀져 연구가 진행되고 있으나 위암의 경우는 아직 그 작용기전이 잘 밝혀지지 않았으며, 이에 대한 연구가 uPA의 활성화 기전을 이해 하는데 도움을 주리라 사료된다.

Zymography를 이용하여 type IV collagenase의 발현과 활성화를 측정한 결과 위암조직에서 MMP-9 및 MMP-2 활성화비가 정상조직에 비하여 증가되어 있음을 관찰하였다. MMP-9의 경우 정상조직에서도 이의 발현과 활성화가 관찰되었는데 이는 폐암 환자의 폐조직에서 섬유화, 폐기종, 혹은 기관지염등이 있어 조직의 개형(remodelling)이 일어나고 있어 일시적으로 발현될 수 있다고 보고한것처럼⁴⁸⁾, 위암환자의 정상조직도 만성위염 등에 의함으로 생각된다. 그러나 이의 활성화형의 발현빈도 및 활성도는 종양조직에서 보다 의의 있게 증가되어 있어 MMP-9의 활성3화가 실질적으로 위암의 전이에 관여할 것으로 사료된다. 임파절 전이가 있는 환자에서 MMP-9의 활성화비가 높은점 역시 이를 뒷받침 하는 결과라고 할수 있다.

MMP-2의 경우 이의 발현과 활성도가 종양조직에서 증가되어 있고, 특히 활성화형은 정상조직에서는 거의 발현되지 않고 종양조직에서만 발현되어 MMP-9 보다는 MMP-2가 위암조직에서 특이하게 활성화 되는것으로 사료된다. David등은 87명의 위암 환자를 대상으로 파라핀 포매 조직을 이용하여 MMP-2 면역조직화학 염색을 시행하여 75예(86%)의 양성율과 함께 종양세포와 섬유아세포, 내피세포 뿐아니라 이형성(metaplasia)이 있는 부위에도 MMP-2가 발현됨을 관찰하였다⁴⁹⁾. 이 결과는 본 연구 결과와 잘 일치된다. D'errico등도 세포의 분화가 나쁘거나 진행 위암인 경우에서 세포의 분화가 좋은 경우와 조기위암인 경우에 비하여 MMP-2가 높게 발현 됨을 보고하였다⁵⁰⁾. 정상 조직에서 발현 되는 MMP-2는 zymogram 상 정상 조직에서 발현되는 비활성화 형태로, 이는 단지 생성만의 증가를 의미하며 암의 침윤과는 무관할것으로 사료된다.

Davies등은 방광암에서 zymography를 시행하여 MMP-9과 MMP-2의 활성화 형태가 종양조직 특히 침윤성 종양일수록 이들의 발현이 증가되어 있음을 보고하였다. 특히 in situ hybridization 상 MMP-9과 MMP-2의 mRNA는 종양세포보다는 기질세포들에서 주로 발견됨을 보고하였다⁵¹⁾. 피부의 편평상피암과 기저세포암의 in situ hybridization 결과에서도 MMP-9과 MMP-2 mRNA는 역시 종양의 침윤이 일어나는 부위의 기질세포 즉 섬유아세포 혹은 내피세포등에서 주로 발현되었다^{52, 53)}. 이 결과들은 type IV collagenase가 발현 되고 활성화 되는데에는 종양세포뿐만아니라 종양-기질세포들간의 상호작용기전이 중요하다는 것을 의미하며, 생성되는 세포의 원천 보다는 종양세포에서 특이하게 활성화 되는 기전이 암침윤 과정에 중요한 역할을 한다고 하겠다.

생체의 실험에서 pro-MMPs는 여러 인자들에 의해 활성화 된다고 알려지고있다. 즉 senine protease 인 trypsin이나 plasmin 그리고 elastase등에 의해 활성화 될수 있다⁵⁴⁾. 그러나 아직까지 위암에서 type IV collagenase가 어떻게 활성화 되는지는 보고가 없다. 최근 Nomura등은 위암에서 MMP-2의 활성화를 위해 membrane-type MMP(MT-MMP)의 발현을 보고하면서, MT-MMP가 종양세포에서 선택적으로 발현되면 MMP-2가 활성화 되는것을 관찰하였다. 또한 MMP-2가 활성화된 조직과 MT-MMP의 발현이 면역조직화학염색을 시행하여 본 결과 잘 일치한다고 보고하였다⁵⁵⁾. 이러한 가정은 위암에서 MMP-2의 활성화 기전을 일부 설명할수 있는 결과로 사료된다.

uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성화를 위암의 진행에 따라 비교시 MMP-9의 활성화는 T2 병기에 가장 증가되었으며, MMP-2의 활성화는 T 병기가 진행됨에 따라 증가하였다. uPA 및 PAI-1은 T3 병기에 가장 높게 발현되었다. 임파절 전이가 양성인 환자군에서 종양 조직내 PAI-1의 발현 및 MMP-9의 활성화가 증가 되었고, 원격전이가 있는 경우 MMP-2 활성화가 증가되었다. 이러한 결과들을 종합하면 정상 및 상피내암종 단계에서는 단지 MMP의 생성만이 증가되며, 조기위암에서 진행위암으로 진행되면서 MMP의 활성화가 증가된다. 또한 uPA와 PAI-1의 균형이 침윤에 유리하게 작용하여 이들의 생성과 활성화가 최대한 증가되면 전이가 발생

하는 위암의 침윤 및 전이 모델을 생각할수 있다.

MMP-9과 MMP-2의 활성화에 따른 무병생존율의 변화 조사시 MMP-9과 MMP-2의 활성화 단독으로는 무병생존율에 영향을 미치지 못하였다. 그러나 MMP-9과 MMP-2가 모두 활성화된 환자군에서 활성화 되지 않은 환자군에 비하여 무병생존율이 낮았다. 이러한 결과는 MMP-9과 MMP-2가 위암의 전이에 복합적으로 작용하여 서로 상승작용을 한 결과로 해석할수 있다. uPA, PAI-1의 고발현 및 type IV collagenase의 활성화와 병기 인자를 포함한 다중 변수 분석을 시행한 결과 uPA의 고발현이 독립적으로 무병생존율에 불량한 예후 인자로 관찰되어 uPA의 고발현이 임상적 예후 예측 표지자로서의 가능성이 높다 하겠다.

결론적으로 uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성화는 위암 진행의 서로 다른 시기에 서로 다른 기전으로 관여하고 있음을 알수 있었고, 이들이 동시에 발현되어 활성화되면 예후가 불량하였다. 따라서 같은 병기라도 종양의 생물학적인 특성에 근거한 새로운 치료법의 기본 개념으로 임상 응용될수 있다. 특히 uPA의 고발현은 독립적으로 무병생존율에 불량한 예후인자로 관찰된바 위암 환자의 예후 예측 표지자로서의 가능성이 있으며, 이를 억제하여 위암의 진행을 차단하는 새로운 치료 방법이 필요하다고 사료된다.

요 약

목적: 위암은 우리나라의 경우 아직도 악성 종양 중 사망율이 가장 높은 질환이다. 위암에 의한 사망은 암의 침윤(invasion)과 전이(metastasis)와 밀접한 관계가 있으며, 위암의 침윤과 전이 과정은 종양 세포들이 단백 분해효소를 생산하여 세포의 기질과 세포막을 구성하고 있는 단백질들의 결합을 비가역적으로 파괴하는 다단계 과정으로 이루어진다. 암침윤 관련 단백 분해 효소로는 urokinase형 plasminogen 활성화체(urokinase-type plasminogen activator: uPA), plasminogen 활성화체 억제제(plasminogen activator inhibitors: PAIs) 및 type IV collagenase(MMP-9 및 MMP-2) 등이 알려져 있으며, 유방암, 대장암등에서는 단백분해 효소들의 작용 기전 및 암침

윤과전이 모델이 정립되고 있으나 위암에서는 암침윤 관련 단백질 분해 효소에 대한 연구는 거의 수행되어 있지 않다.

방법 : 진행위암환자에서 위절제술 시행시 얻어진 위암 및 정상조직을 이용하여 uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성도를 분석하여 위암의 침윤과 전이에 미치는 영향을 알아보고, 침윤과 전이에 관한 모델을 정립하고자 하였으며, 재발 및 생존에 영향을 줄수있는 예후인자로서의 임상적 효용성을 연구하였다.

결과 :

1) 종양조직의 uPA 및 PAI-1 값은 각각 9.4 ± 8.7 , 10.9 ± 9.1 ng/mg protein cytosol, 정상조직은 5.3 ± 3.1 , 5.8 ± 2.9 ng/mg protein cytosol로 종양조직에서 정상조직에 비하여 uPA 및 PAI-1이 높게 발현되었다($p < 0.001$). uPA와 PAI-1의 발현은 종양세포의 분화가 나뉠수록 높았고($P = 0.04$, $p = 0.004$), PAI-1의 발현은 병기 및 임파절 전이가 진행될수록 높았다($p = 0.04$, $p = 0.003$). 종양 조직의 uPA 및 PAI-1의 발현은 서로 상관관계를 보였다($r = 0.57$).

2) MMP-9과 MMP-2의 활성화비는 종양조직 0.32 ± 0.25 , 0.27 ± 0.34 로 정상조직 0.19 ± 0.27 , 0.06 ± 0.16 에 비하여 높았다($p < 0.001$). MMP-9의 활성화비는 임파절 전이가 진행될수록 높았으며, MMP-2의 활성화비는 원격 전이가 있는 환자들에서 높았다($p = 0.011$, $p = 0.041$).

3) 단일변수 분석에서 uPA, PAI-1의 고발현 및 type IV collagenase의 활성화는 위암 환자의 무병 생존율에 불량한 예후인자로 관찰되었고, 다중변수 분석 결과 uPA의 고발현이 독립적 예후 인자였다($p = 0.0003$).

결론 : uPA, PAI-1 및 type IV collagenase의 발현과 활성화는 위암 진행의 서로 다른 시기에 서로 다른 기전으로 관여하고 있음을 알수 있었고, 이들의 발현과 활성도가 증가되면 예후가 불량하였다. 따라서 같은 병기라도 종양의 생물학적 특성에 근거한 새로운 치료법의 기본 개념으로 임상 응용될수 있다. 특히 uPA의 고발현은 독립적으로 무병생존율에 불량한 예후인자로 관찰된바 위암 환자의 예후 예측 표지자로서의 가능성이 있으며, 이를 억제하여 위암의 진행을 차단하는 새로운 치료 방법이 필요하다고 사료된다.

= Abstract =

Study on Proteolytic Enzymes (uPA, PAI-1 and Type IV Collagenase) Involved in Invasion and Metastasis of Gastric Carcinoma

Cho J.Y, M.D., Chung H.C, M.D., Noh S.H, M.D.
Kim H.K, M.D., Park J.O, M.D., Lee J.I, M.D.
Yoo N.C, M.D., Kim J.H, M.D., Roh J.K, M.D.
Kang J.K, M.D., Min J.S, M.D.
and Kim B.S, M.D.

*Department of Internal Medicine, Institute for Cancer Research, Yonsei Cancer Center,
Department of General Surgery,
Department of Pathology, Yonsei University
College of Medicine, Seoul, Korea*

Objectives : Prognosis of gastric cancer is related to invasion and metastasis. Evidence has accumulated that invasion and metastasis in solid tumors require the action of tumor associated proteases, which promote the dissolution of the surrounding tumor matrix and the basement membrane. The serine protease [(urokinase-type plasminogen activator(uPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)] and type IV collagenase(MMP-9 and MMP-2) appear to play a key role in these processes. Recent reports have demonstrated that expression of these proteolytic enzymes are elevated in breast and colon cancer and that it can be associated with invasiveness and poor prognosis. We therefore evaluated whether the expression and activation of uPA, PAI-1 and type IV collagenase might be of clinical value in gastric cancer as a tumor/biologically defined risk factor.

Methods : In a consecutive series of 160 gastric cancer patients who were enrolled in the Yonsei Cancer Center Study Group, the expression of uPA, PAI-1 and type IV collagenase was determined by ELISA, zymography and immunohistochemical method. The results were as follows.

Results :

1) Both uPA and PAI-1 levels were significantly higher in cancer tissues than normal(uPA; 9.4 ± 8.7 vs 5.3 ± 3.1 ng/mg protein cytosol, PAI-1; 10.9 ± 9.1 vs 5.8 ± 2.9 ng/mg protein cytosol), ($p < 0.001$ respectively). Both high uPA and PAI-1 levels were associated with differentiation of the tumor($p = 0.04$, $p = 0.004$), and a high PAI-1 level was associated

with lymph nodes metastasis at an advanced stage ($p=0.003$, $p=0.04$). There was a correlation between the levels of uPA and PAI-1 expression in cancer tissues($r=0.57$).

2) The activation ratio of MMP-9 and MMP-2 in cancer tissues 0.32 ± 0.25 , 0.27 ± 0.34 were significantly higher than in normal tissue 0.19 ± 0.27 , 0.06 ± 0.16 ($p<0.001$). The MMP-9 activation was associated with lymphnode metastasis and the MMP-2 activation was associated with distant metastasis($p=0.011$, $p=0.041$).

3) In univariate analysis all of the proteolytic enzymes were associated with short relapse free survival, but in multivariate analysis only the high uPA expression was an independent prognostic parameter for short relapse free survival of the gastric cancer patients.

Conclusion: These data indicate that uPA, PAI-1 and type IV collagenase were involved in the progression of gastric cancer at different points of time by different mechanisms. The combined expression and activation of these proteolytic enzymes were poor prognostic factors in gastric cancer patients, so new therapy based on these biologic behavior of the tumor in the same stage are clinically applicable. In particular, uPA is a new independent variable for the identification of patients at high risk, therefore therapy targetting uPA can be applied as a new treatment modality for gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer, Invasion and metastasis, uPA, PAI-1, Type IV collagenase

REFERENCES

- 1) 보사부 한국인 암등록 조사사업. 1991.7-1992.6, 1993
- 2) Kim JP: *Gastric cancer - Recent advances in therapy. Med Progress* 16:5, 1994
- 3) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart IR, Foltz CM, Shafie S: *Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature* 284:67, 1980
- 4) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: *Tumor invasion and the extracellular matrix. Laboratory Investigation* 49:636, 1983
- 5) Liotta LA: *Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. Cancer Res* 46:1, 1986
- 6) Laiho M, Keski-Oja J: *Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: A Review Cancer Res* 49:2533, 1989
- 7) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG: *Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell* 64:327, 1991
- 8) Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L: *Plasminogen activators, tissue degradation, cancer. Adv Cancer Res* 44:139, 1985
- 9) Cajot JF, Kruihof EKO, Schleuning WD, Sordat B, Bachman F: *Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitors and procoagulant analyzed in twenty human tumor cell lines. Int J Cancer* 38:719, 1986
- 10) Markus G: *The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth. Enzyme* 40:158, 1988
- 11) Sappino AP, Huarte J, Belin D, Vassali JD: *Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. J Cell Biol* 109:2471, 1989
- 12) Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S: *Effect of plasminogen activator(urokinase), Plasmin, Thrombin on glycoprotein and collagenous components of Basement membrane. Cancer Res* 41:4629, 1981
- 13) Stump DC, Lijnen HR, Collen D: *Purification and characterization of single-chain urokinase-type plasminogen activator from human cell cultures. J Biol Chem* 261:1274, 1986a
- 14) Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P: *Urokinase-plasminogen activator, a New and Independent Prognostic Marker in Breast cancer. Cancer Res* 50: 6827, 1990
- 15) Janicke F, Schmitt M, Graeff H: *Clinical relevance of the urokinase-type and the tissue-type plasminogen activators and of their inhibitor PAI-1 in breast cancer. Semin Thromb Hemost* 17:303, 1991
- 16) Hansen JG, Christensen IJ, Rosenquist C, Nils B, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M: *High Levels of Urokinase Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Cytosolic Extracts of Breast CArcinoma Are Associated with Poor Prognosis. Cancer Res* 53:2513, 1993
- 17) Liotta LA, Abe S, Gehrom P, Martin GR: *Preferential digestion of basement membrane col-*

- lagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2268, 1979
- 18) Quigley JP, Goldfarb RH, Scheiner C, O'Donnell-Tormey J, Yeo TK: Plasminogen activator and the membrane of transformed cells. *Prog Clin Biol Res* 41:773, 1980
- 19) Stump DC, Thienpont M, Collen D: Urokinase-related proteins in human urine. Isolation and characterization of single-chain urokinase(pro-urokinase) and urokinase-inhibitor complex. *J Biol Chem* 261:1267, 1986b
- 20) Schelechte W, Murano G, Boyd D: Examination of the role of the Urokinase receptor in human colon cancer mediated laminin degradation. *Cancer Res* 49:6044, 1989
- 21) Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ: Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest* 74:1465, 1984
- 22) Phillips M, Juul AG, Thorsen S: Human endothelial cells produce a plasminogen activator inhibitor and a tissue-type plasminogen activator-inhibitor complex. *Biochem Biophys Acta* 802:99, 1984
- 23) Stoppelli MP, Corti A, Soffientini A, Cassani G, Blasi F, Assoian RK: Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4939, 1985
- 24) Andreasen PA, Nielsen LS, Kristensen P, Grondahl-Hansen J, Skriver L, Dano K: Plasminogen activator inhibitor from human fibrosarcoma cells binds urokinase-type plasminogen activator, but not its proenzyme. *J Biol Chem* 261:7644, 1986
- 25) Fibby G, Dini G, Pasquali F, Pucci M, Del Rosso M: The Mr 17,500 region of the A chain of urokinase is required for interaction with a specific receptor in A431 cells. *Biochem Biophys Acta* 885:301, 1986
- 26) Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K: Cellular receptor for Urokinase plasminogen activator. *J Biol Chem* 266: 1926, 1991
- 27) Blasi F, Stoppelli MP, Cubellis MV: The receptor for urokinase plasminogen activator. *J Cell Biochem* 32:179, 1986
- 28) Appella E, Robinson EA, Ullrich SJ, Stoppelli MP, Corti A, Cassani C, Blasi F: The receptor-binding sequence of urokinase. *J Biol Chem* 262:4437, 1987
- 29) Blasi F, Vassalli JD, and Dano K: Urokinase-type plasminogen activator: Proenzyme, receptor, inhibitors. *J Cell Biol* 104:801, 1987
- 30) Nielsen LS, Kellerman GM, Behrendt N, Picone R, Dano K, and Blasi F: A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. Identification in human tumor cell lines and partial purification. *J Biol Chem* 263: 2358, 1988
- 31) Fessler L, Duncan K, Tryggvason K: Identification of the procollagen IV cleavage products produced by a specific tumor collagenase. *J Biol Chem* 259:9783, 1984
- 32) De Clerck YA, Yean TD, Chan D, Shimada H, Langley KE: Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 51: 2151, 1991
- 33) Waterborg JH, Matthews HR: The lowry method for protein quantitation. *Method Mol Biol* 32:1, 1994
- 34) Harvey SR, Lawrence DD, Madeja JM, Abbey SJ, Markus G: Secretion of plasminogen activators by human colorectal and gastric tumor explants. *Clin Exp Metastasis* 6:431, 1988
- 35) Nishino N, Aoki K, Tokura Y, Sakaguchi S, Takada Y, Takada A: The urokinase type of plasminogen activator in cancer of digestive tracts. *Thromb Res* 50:527, 1988
- 36) Sier CFM, Verspaget HW, Griffioen G, Ganesh S, Vloedgraven HJM, and Lamers CBH: Plasminogen activators in normal tissue and carcinomas of the human esophagus and stomach. *Gut* 34:80, 1993
- 37) Tanaka N, Fukao H, Ueshima S, Okada K, Yasutomi M, Matsuo K: Plasminogen activator inhibitor-1 in human carcinoma tissues. *Int J Cancer* 48:481, 1991
- 38) Nakamura M, Konno H, Tanaka T, Maruo Y, Nishino N, Aoki K, Baba S, Sakaguchi S, Tadada Y, Takada A: Possible role of plasminogen activator inhibitor 2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tissues. *Thromb Res* 65:709, 1992
- 39) Vassalli JD, Baccino D, Belin D: A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol* 100:86, 1985
- 40) Vassalli JD, Sappino AP, Belin D: The plas-

- minogen activator/plasmin system. J Clin Invest* 88:1067, 1991
- 41) Hart IR, Saini A: *Biology of tumor metastasis. Lancet* 339:1453, 1992
- 42) Janike F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H: *Urokinase(uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat* 24:195, 1993
- 43) Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F, Klijn JGM: *Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. Cancer Res* 52:6101, 1994
- 44) Skriver L, Larsson LI, Kielberg V, Nielsen LS, Andresen PB, Kristensen P, Dano K: *Immunocytochemical localization of urokinase-type plasminogen activator in Lewis lung carcinoma. J Cell Biol* 99:752, 1984
- 45) Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Gruetzner KU, Jauch KW, Loers U, Schilderberg FW: *Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase type plasminogen activator system. J Clin Oncol* 13:2084, 1995
- 46) Nekarda H, Schmitt M, Ulm K: *Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. Cancer Res* 54:2900, 1994
- 47) Nakamura M, Konno H, Tanaka T, Maruo Y, Nishino N, Aoki K, Baba S, Sakaguchi S, Tadada Y, Takada A: *Possible role of plasminogen activator inhibitor 2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tissues. Thromb. Res.*, 65:709, 1992
- 48) Soini Y, Paakko P, Autio-Harmainen H: *Genes of laminin B1 chain, alpha 1(IV) chain of type IV collagen, and 72-kD type IV collagenase are mainly expressed by the stromal cells of lung carcinomas. Am J Pathol* 142:1622, 1993
- 49) David L, Nesland M, Holm R, Sobrinho-Simoes M: *Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. Cancer* 73:518, 1994
- 50) D'errico A, Garbisa S, Liotta LA, Castronova V, Stetler-Stevenson WG, Griogioni WG: *Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma. Mod Pathol* 4:239, 1991
- 51) Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, Neal D, Thomas D, Hanby A, Balkwill F: *Levels of matrix metalloproteinase in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res* 53:5365, 1993
- 52) Bauer EA, Uitto J, Walters RC, Eisen AZ: *Enhanced collagenase production by fibroblasts derived from human basal cell carcinomas. Cancer Res* 39:4594, 1979
- 53) Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K: *Localization of messenger RNA for Mr, 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. Cancer Res* 52:1336, 1992
- 54) Hansen JG, Christensen IJ, Rosenquist C, Nils B, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M: *High Levels of Urokinase Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Cytosolic Extracts of Breast Carcinoma Are Associated with Poor Prognosis. Cancer Res* 53:2513, 1993
- 55) Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y: *Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric cancer. Cancer Res* 55:3263, 1995