

위암 세포주에 대한 성장인자 억제제와 항 전이제의 항 종양 효과에 관한 연구

¹연세 암센터, ²암 연구소, 연세대학교 의과대학 ³내과학교실, ⁴외과학교실

라선영^{1,2,3} · 정희철^{1,2,3} · 공수정^{1,2,3} · 정현철^{1,2,3}
김주향^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3} · 민진식^{1,2,4} · 김병수^{1,2}

Anti-tumor Effects of Growth Factor Inhibitors and Anti-metastatic Agents in Human Gastric Cancer Cell Lines

Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}, Hee Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}, Soo Jung Gong, M.D.^{1,2,3}
Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}, Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3}, Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}
Jin Sik Min, M.D.^{1,2,4} and Byung Soo Kim, M.D.^{1,2}

¹Yonsei Cancer Center, ²Institute for Cancer Research,
Department of ³Internal Medicine, ⁴General Surgery
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: For tumor growth, invasion and metastasis, a cascade of linked sequential biological events is essential; overproduction of growth factors, activation of proteolytic enzymes, induction of tumor angiogenesis, and enhanced tumor cell motility and attachment. We tried to test whether the biological therapy against the biological targets can modulate the specific biological characteristics, and furthermore increased anti-tumor effects can be induced when the biological therapy and cytotoxic chemotherapy were combined.

Materials and Methods: YCC-1, 2, 3, 7, and AGS human gastric cancer cell lines were used in these studies. Pentosan polysulfate(PPS) as a heparin-binding growth factor(HBGF) inhibitor, Tranexamic acid as a plasmin inhibitor, Adriamycin as a chemotherapeutic agent, were selected. The methods were Northern blot analysis for the detection of Midkine(MK) expression, soft agar assay for autocrine tumorigenicity. The expression of uPA, PAI-1 was determined by ELISA, while the MMPs activities were evaluated by zymography. The effects of each drug on tumorigenicity and tumor cell proliferation were evaluated by soft agar assay and cell proliferation assay, respectively.

Results: YCC-3, 7, AGS cell lines expressed MK mRNA, whereas YCC-1, 2 did not. YCC-2 cell line showed increased expression of uPA and MMP activities. Only MK expressing YCC-3 and 7 cell lines showed the tumorigenicity. PPS suppressed the colony forming activities as much as Adriamycin did(PPS; 8~24%, Adriamycin; 12~40%), but it showed only cytostatic effects in cell proliferation assay(PPS; 60~103%, Adriamycin;

22~97%). When PPS was combined with Adriamycin on the Adriamycin resistant, MK expressing YCC-7 cell line, the growth inhibition rate increased up to 84%, while that of PPS or Adriamycin single treatment was 40%, 22%, respectively(p=0.001).

Conclusion: The modulation of specific biological targets can induce the anti-tumor effects. This suggests the possible clinical application of biological therapy in gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer, Biological therapy, Chemo-sensitization effect

서 론

암세포 증식에 필요한 성장인자는 신체의 모든 조직에 존재하며, 특정 유전자(master gene)에 의해 그 발현이 조절되어 각 장기의 성장과 분화가 유도된다(1). 그러나 악성 종양에서는 이들 성장인자 및 그 수용체의 발현이 비정상적으로 조절되어 오토크린 경로를 통한 종양 세포의 증식유도나(2), 파라크린 경로를 통한 주위 섬유아세포나 내피 세포의 성장 유도로 암의 증식과 침윤 및 전이를 촉진시키거나 종양 혈관 형성을 증가시킨다(3).

위암 세포주에서는 성장 인자의 일종인 Midkine (MK)이 관찰되었으며(4), MK 발현과 위종양 크기와 상관성도 관찰되어(5), MK가 위암의 증식과 관계 있을 것으로 제시되었다. 암세포에서 분비되는 대부분의 종양 성장 인자 혹은 혈관생성 인자는 heparin과 결합하여 활성화되므로(6), 이들 heparin결합 성장인자(heparin-binding growth factor, HBGF)들의 활성화 및 기능을 억제하는 heparin analogue로 암세포 증식을 억제하려는(7,8) 생물학적 치료(biological therapy)가 새로운 암치료 개념으로 제시되고 있다.

암의 침윤과 전이 과정에 필수적인 기저막 용해에 중추적 역할을 하는 serine protease(9,10)와 MMPs(11,12)의 실제 인체 여러 암종에서의 발현 증가가 보고되었다. Serine protease의 일종인 urokinase-type plasminogen activator(uPA)는 plasminogen에서 plasmin으로의 전환을 증가시키며, plasmin은

종양 주위의 기질을 구성하고 있는 fibrin, fibronectin, proteoglycan, laminin 등을 직접 파괴할 뿐 아니라, type IV collagenase를 활성화시켜 type IV collagen을 간접적으로 파괴시킨다. uPA는 생리적 억제 물질인 plasminogen activator inhibitor(PAI-1)에 의해 선택적으로 억제된다(13). 또한 MMPs는 암세포 혹은 기질 세포에서 생성되며 기저막의 주성분인 type IV collagen을 파괴하고, 92 kD (MMP-9) 형과 72 kD(MMP-2) 형이 있다(14). MMP-9은 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), MMP-2는 TIMP-2에 의해 그 활성이 억제된다(15). 따라서 암조직에서 관찰되는 이들 단백질분해효소와 그 억제제의 불균형을 조절함으로써 암 침윤을 억제할 수 있다(16).

이에 저자들은 인체의 위암 세포주를 이용하여 각 세포주별 생물학적 활성의 차이를 비교하고, 성장인자를 목표로 하는 생물학적 치료의 가능성을 조사해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1) 연구 재료

(1) **사용 세포주:** 연세대학교 의과대학 암연구소에서 복강 내 전이 위암으로부터 확립한 YCC (Yonsei Cancer Center, Seoul)-1, 2, 3, 7, ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)에서 구입한 AGS(ATCC CRL 1739)와 HT-1080 섬유육종 세포주(ATCC CCL 121)를 사용하였다.

실험에 사용된 세포주들은 56°C에서 30분간 불

활성화시킨 10% 우태아 혈청과, penicillin 100 Unit/ml와 streptomycin 0.1 mg/ml이 함유된 세포배양용 배지로 37°C, 5% CO₂의 항온 항습 배양기에서 배양하였고, 주 2~3회 배지를 교환하였다.

(2) **사용 약제:** Polysulfated sugar로서 헤파린과 경쟁적으로 성장인자에 결합하여 성장 인자의 활성화를 억제시키는 약제인(8) Pentosan polysulfate, uPA에 의해 증가된 plasmin을 억제하는 plasmin inhibitor인 Transamin, 단일 제제로는 위암에서 가장 효과가 높은 Adriamycin을 선택하였다. Adriamycin (10 mg/5ml, 주사제, 일동제약, 서울), Transamin (Tranexamic acid, 250 mg/5ml 주사제, 제일약품, 서울)과 Pentosan polysulfate(PPS, a gift from GmbH, Munich, Germany)는 냉장 보관하면서 실험시마다 세포배양액에 희석하여 사용하였다.

2. 연구 방법

(1) **MK mRNA 발현 관찰을 위한 Northern blot analysis:** 각 세포주에서 total RNA extraction system(Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 총 RNA 추출 후, 15~20 µg으로 Northern blotting을 시행하였다(17). 1% formaldehyde agarose gel상에서 RNA를 전기영동 한 후 gel을 ethidium bromide로 염색하여 RNA의 보존성(integrity)을 확인하고, hybrid nylon membrane으로 이동 흡착시켰다. Membrane을 기존의 방법대로 prehybridization 후 random oligonucleotide primer(Prime-It II, Stratagene)를 이용하여 만든 [³²P]-dCTP labeled probe로 42°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. 이때 487-base pair human MK cDNA(Dr. Anton Wellstein 제공, Lombardi Cancer Center, Washington D.C., U.S.A.)를 template DNA로 사용하였고, GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase)로 대조하였다. Membrane을 2X SSC와 0.1% SDS로 세척 후 -70°C에서 24시간 감광하고서 현상하였다.

(2) **단백분해효소인 uPA 및 PAI-1 의 측정:** Shi 등(18)의 방법으로 각 위암 세포주에서 추출한 cytosolic extracts를 이용하여 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법에 의해 uPA와

PAI-1를 측정하였다. 일차 항체는 사람 uPA 및 PAI-1에 대한 mouse 단클론항체(Monozyme)를 사용하였으며, 이차 항체는 biotinylated된 단클론항체(Monozyme)를 사용하였다. 발색 반응은 HRP (horse-raddish-peroxidase) conjugated streptavidin을 사용하였고 기질은 OPD(ortho-phenyldiamine)를 사용하였다. 표준 시료는 재조합 사람 uPA 및 사람 혈장 PAI-1(Monozyme)을 사용하였다.

먼저 일차 항체를 coating buffer로 2배 희석한 후 50 µl를 96 well ELISA plate의 각 well에 분주하고 4°C에서 밤새 방치하였다. Washing buffer로 씻고나서 200 µl의 dilution buffer로 20°C에서 30분간 반응시켰다. 3회 세척후 100 µl의 검체를 각 well에 분주하고 20°C에서 1시간 반응시켰다. 3회 세척후 HRP-conjugate 용액으로 20°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 3회 세척후 substrate 용액을 각 well에 분주하고 빛을 차단하고 30분간 반응시켰다. 1M H₂SO₄ 100 µl를 각 well에 분주하여 반응을 정지시키고 automated EIA reader를 이용하여 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(3) **단백 분해효소인 type IV collagenase 활성도 비교:** 각 세포주에서 Shi 등(18)의 방법으로 conditioned media를 추출한 다음 type IV collagenase의 활성도를 기존의 방법대로(19) zymography에 의해 비교하였다. Conditioned media 10 µl를 동량의 non-reducing sample buffer와 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, 10%의 type IV collagen이 포함된 gel의 각 well에 주입한 후 20mA(130V, 90분)로 전기영동을 시행하였다. 12 µg/ml 농도의 concanavalin A 를 처리한 HT-1080 세포주의 conditioned media를 표지자로 사용하였다. 전기영동 후 gel을 renaturing buffer로 실온에서 30분간 반응시킨 뒤, 37°C의 developing buffer에서 16시간 동안 반응시켰다. Developing buffer를 버린 뒤 0.5% Coomassie blue로 4시간 염색한 후 gel을 고정시켰다. Computer-assisted image analysis(Bio-Profil, Vilber Lourmat Biotechnology, Marne La Vallee, Cedex, France)을 이용하여 gel내 band의 면적 및 밀도를 측정하여 활성도를 비교 분석하였다. Col-

lagenase의 활성이 없는 gel의 density를 arbitrary 1 unit로 하여 각 band의 image를 computerized analysis하여 band unit를 측정하였다.

(4) 생체의 종양형성능 비교를 위한 soft agar assay: 생체의 세포집락형성능 측정과 각 약제의 항 집락형성 효과를 조사하기 위해 soft agar assay를 Wellstein 등(20)의 방법으로 시행하였다. 먼저 agar 1.2g을 50 ml의 증류수에 용해시켜 멸균 소독하였다. 하층 agar는 50 ml의 우태아혈청이 함유된 배지, 25 ml의 2배 농축배지, 50 ml의 agar를 혼합하여 42°C 항온수조에 보관하면서, agar용액 1 ml을 35mm dish에 투여하고 고형화시켜 준비하였다. 위암 세포주를 trypsin-EDTA로 처리하여 단세포를 만들어 세포수를 센 다음, 각 dish마다 2×10^4 개의 세포를 배양하였다. 세포는 agar 용액과 혼합하여 2.5 ml의 용량으로 만든 다음 0.8 ml씩 각 dish에 넣고 고형화시켰다. 각 약제는 농도별로(PPS 1, 10, 100 μ g/ml, Transamin 1, 10, 100 μ g/ml, Adriamycin 1, 10, 50 ng/ml) 세포 및 agar와 함께 분주하여 항 집락형성능을 평가하였다. 3개의 dish를 1개의 point로 하여 매일 세포집락의 수를 세었고, 세포집락은 평균 \pm 표준 편차로 도식화하였다.

(5) 약제별 세포증식 억제 효과 비교를 위한 약제 감수성 검사: 각 세포주에 대한 약제 감수성을 검사하기 위해, 24 well plate의 각 well 당 위암 세포주를 1×10^4 개씩을 분주하고 24시간 배양 후, 계획된 농도대로 각각의 약제를 투여하였다. 약제투여 24시간 후부터 6일간 Coulter Counter (Coulter Z1, Hialeah, IL, U.S.A.)를 이용하여 세포수를 측정하고 다음 세포 성장곡선에 의해 약제 감수성을 평가하였다. 세포 성장곡선은 각 농도마다 3 well의 세포수를 세어 그 평균 \pm 표준 편차치로 도식화하였다. Adriamycin은 1, 10, 50 ng/ml의 농도로, Transamin과 PPS는 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 실험을 시행하였다. 약제 병용투여시 효과를 판정하기 위하여 Adriamycin 10, 50 ng/ml에 Transamin과 PPS는 1, 10, 100 μ g/ml의 농도를 병용 투여하여 세포 성장곡선을 비교하였다. 약제

투여후 세포수가 대조군에 비해 50% 이상 감소한 group을 sensitive group, 10% 이하인 경우는 resistant group, 10~50% 사이는 intermediate group으로 정하였다(21). 두 가지 약제를 동시 투여시 각각의 약제 투여 효과보다 증가한 경우를 상승 효과로 정하였다(22).

결 과

1) 각 세포주의 생물학적 활성도 비교

(1) 증식기 표지 인자인 MK 발현 및 오토크린 활성에 의한 세포 집락 형성능 비교: 9개의 위암 세포주에서 시행한 Northern blot analysis 결과, 6개의 세포주에서 MK mRNA의 발현이 관찰되었다(Fig. 1A). 이중 MK를 발현하는 YCC-3, YCC-7, AGS 세포주와 발현하지 않는 YCC-1, YCC-2 세포주를 선택하여 다음 연구를 진행하였다.

Soft agar assay에 의한 생체의 종양 형성능 비교는 2×10^4 개의 세포를 분주하고 21일째 집락수를 세어 시행하였다. MK를 발현하는 YCC-3과 YCC-7 세포주는 세포집락을 형성하였으며 YCC-3 세포주가 YCC-7 세포주에 비해 3배의 집락형성능이 관찰되었다. 그러나 MK를 발현하지 않는 YCC-1 세포주는 세포집락을 형성하지 않았으며 YCC-2 세포주는 관찰기간 동안 미약하게 세포집락을 형성하였다(Fig. 1B, 1C).

(2) 침윤기 활성 인자인 단백분해효소의 발현 비교: 위암 세포주별로 단백분해효소인 uPA와 그 억제 물질인 PAI-1의 발현도를 조사하여 O.D. 값을 비교하였다. PAI-1 발현은 5가지 세포주 모두 HT 1080의 발현도 750 ± 42 의 50%인 375 이하로 낮았으며($p < 0.05$) 세포주간의 차이는 관찰되지 않았다. 반면 uPA 발현은 HT 1080(O.D. 536 ± 3.6)의 발현도와 비교시 YCC-1 세포주 520 ± 25 , YCC-7 세포주는 534 ± 4 로 차이가 없었으나, YCC-2 세포주는 749 ± 30 로 높게 발현되었으며($p = 0.005$), YCC-3 세포주는 354 ± 19.4 ($p = 0.009$), AGS 세포주는 288 ± 20 ($p = 0.018$) 으로 낮았다(Fig. 2).

C

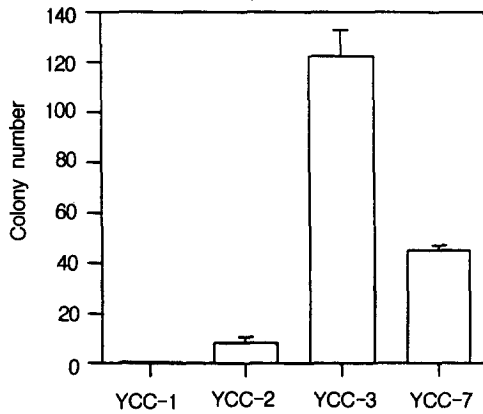


Fig. 1. Comparison of biological characteristics of gastric cancer cell lines based on MK gene expression. A: Detection of MK mRNA by Northern blot analysis. B: Colonies of YCC-3 and YCC-7 cell lines. C: Comparison of colony forming activities by soft agar assay.

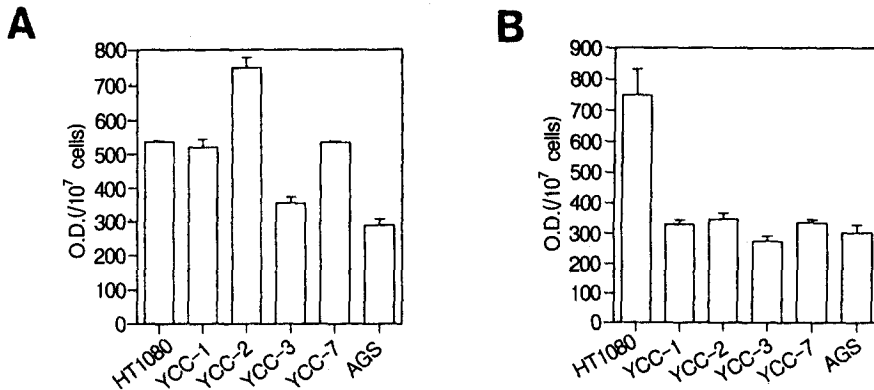


Fig. 2. Comparison of uPA and PAI-1 expression from cytosolic extracts of gastric cancer lines by ELISA. A: uPA, B: PAI-1

Fig. 3. Comparison of MMPs' activities by zymography: MMP-2 & MMP-9 expression in the conditioned media from gastric cancer cell lines.

MMPs의 발현은 YCC-2 세포주에서 MMP-9가 74 unit, MMP-2이 7 unit 이었으며, YCC-3과 YCC-7 세포주는 MMP-9(각각 13 unit, 20 unit)와 MMP-2(각각 1 unit, 11 unit)를 발현하였다. 그러나 uPA 발현이 가장 낮은 AGS 세포주에서는 MMPs의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 3).

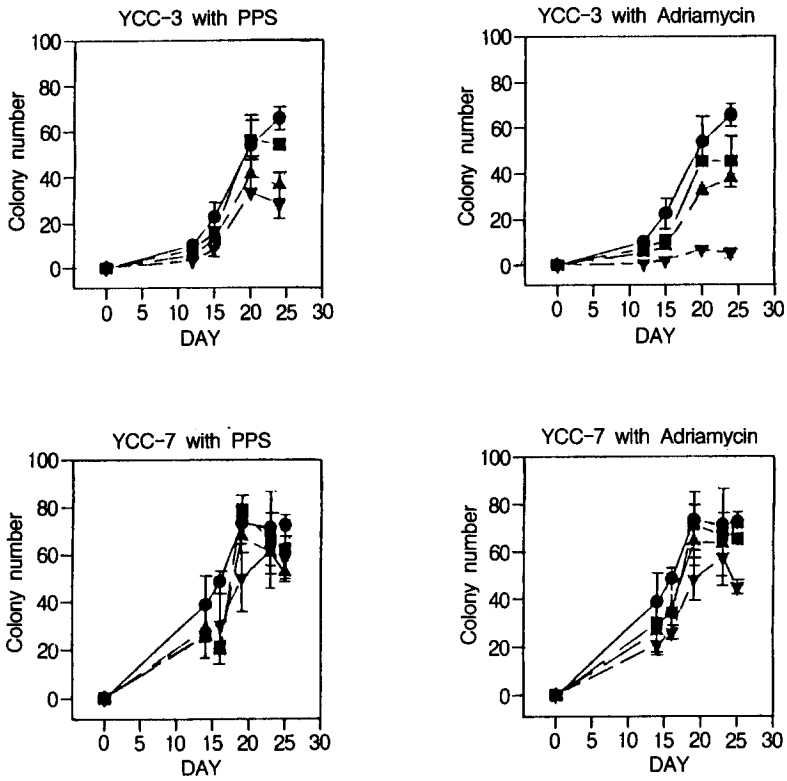
2. 생물학적 활성 억제에 의한 생물학적 활성 변화 유도

(1) 분비된 헤파린결합 성장 인자의 활성 억제:

집락형성능이 있는 YCC-3와 YCC-7 세포주에서 soft agar assay에 의한 PPS의 집락형성 억제능력을 Adriamycin에 의한 결과와 비교하였다. 두 세포주 모두 Adriamycin과 PPS에 용량 비례 곡선을 나타내었으며, YCC-3과 YCC-7을 비교시 Adriamycin과 PPS 두 약제에 대한 감수성이 YCC-3 세포주에서 높은 경향이었다(p=0.09, p=0.16)(Fig. 4A). 인체 투여 가능 농도인 Adriamycin 10 ng/ml, PPS 10 µg/ml에서 집락형성 억제능을 비교하였을 때, Adriamycin과 PPS의 억제능은 각각 YCC-3 세포주에서는 40%, 24%, YCC-7 세포주에서는 12%, 8%로, 동일한 세포주내에서 두 약제는 유사한 억제능을 나타내었다(Fig. 4B).

(2) 분비 및 비분비 헤파린결합 성장 인자의 억제: Adriamycin에 의한 anchorage-dependent growth 억제는 모든 세포주에서 용량 비례 곡선이 관찰되었다. 인체 투여 농도에서 각 세포주의 adriamycin에 대한 감수성 비교시, 10 ng/ml의 농도에서 AGS와 YCC-2 세포주는 sensitive group, YCC-3 세포주는 intermediate group, YCC-1과 YCC-7 세포주는 resistant group으로 분류할 수 있었다. 반면 생물학적 제제인 PPS, Transamin, Lovastatin 등에서 용량비례 성장억제 효과는 관찰되지 않았으나 세포주에 따라 각 약제에 대한 감수성 정도에는 차이가 관찰되었다(Fig. 5).

A



B

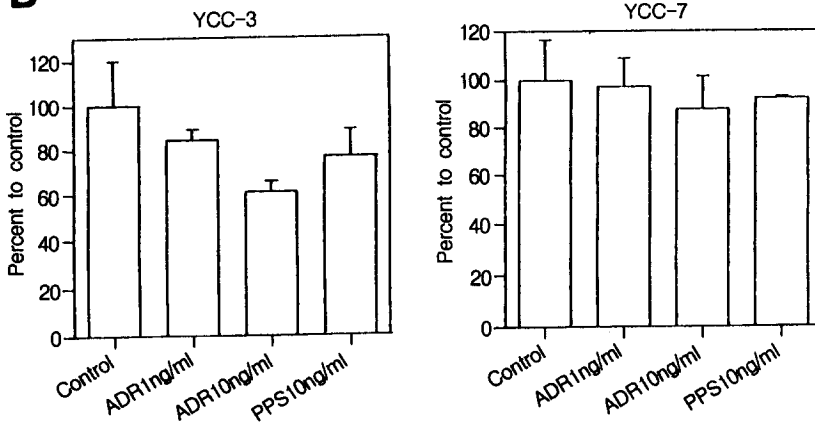


Fig. 4. Comparison of anti-colony forming activity of PPS and adriamycin. A: Dose response curves of PPS and Adriamycin in YCC-3 and YCC-7 cell lines. ●: control without drug treatment, ■: Adriamycin 1 ng/ml, PPS 1 μ g/ml, ▲: Adriamycin 10 ng/ml, PPS 10 μ g/ml, ▼: Adriamycin 50 ng/ml, PPS 100 μ g/ml. B: Comparison of PPS and Adriamycin effects in YCC-3 and YCC-7 cell lines. ADR: Adriamycin, PPS: Pentosan polysulfate

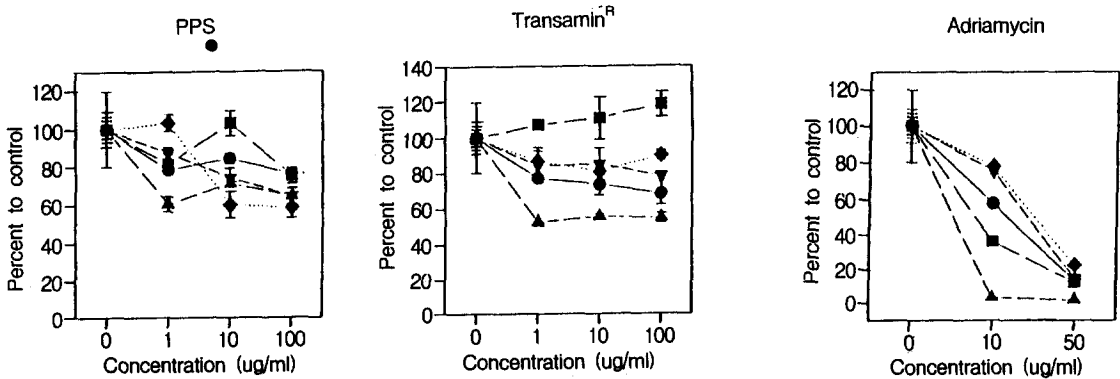


Fig. 5. Growth inhibition of each drugs on each gastric cancer cell-lines in anchorage dependent growth model. ▼: YCC-1, ■: YCC-2, ●: YCC-3, ◆: YCC-7, ▲: AGS, PPS: Pentosan polysulfate

3. 병용요법(Bio-chemotherapy)에 의한 항암 감작 효과 비교

생물학적 치료제를 항암제와 병용하였을 때 세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. YCC-2 세포주와 AGS 세포주는 Adriamycin에 매우 민감하여 PPS의 병용에 따른 추가 효과가 없었다. 반면 Adriamycin에 intermediate response를 보인 YCC-3는 PPS를 병용함으로써 부가 효과가 관찰되었다. Adriamycin에 resistant한 YCC-1과 YCC-7을 비교시 PPS의 대상 목표인 MK를 발현하지 않는 YCC-1은 병용투여에 따른 추가적 성장 억제 효과가 없었으나, PPS의 대상 목표인 MK가 발현되는 YCC-7의 경우 상승 효과가 관찰되었으며 (p=0.001), 그 효과는 Adriamycin 50 ng/ml의 효과와 동일하였다(Fig. 6).

고 찰

세포생물학 및 분자생물학의 발달로 암의 증식과 침윤 및 전이의 단계적 과정이 밝혀지면서(2), 이 과정의 억제에 대한 연구가 최근 급속히 증가하고 있다. 우리나라에 가장 많은 위암에서 이러한 단계적 과정을 억제하는 생물학적 치료 가능성을 보고자 본 연구를 진행하였다. 암의 증식에는 성장인자에 의해 암세포의 증식이 발생하는

오토크린 성장 자극뿐 아니라 파라크린 경로를 통한 종양혈관형성이 필수적이므로, 종양성장인자를 생물학적 조절 목표의 하나로 정하였다. 암세포주에서 분비되는 대부분의 성장인자들은 헤파린과 결합하여 활성화되므로(1,8) 이 활성화 과정의 억제제는 생물학적 치료의 한 예가 될 수 있다.

헤파린결합 성장 인자의 하나인 MK는 위암세포주를 포함한 여러 세포주에서 과발현될 뿐 아니라(4), 이의 발현과 임상양상과의 상관성은 위암(5)과 방광암(23)에서 보고되어, MK가 위암의 증식과 관계있음이 제시되었다(5). 따라서 본 연구에서는 MK를 위암증식능을 나타내는 생물학적 활성과 생물학적 치료의 특정 목표(specific target)로 선정하여 실험을 진행하였다.

단백분해효소중 uPA는 위암이 진행함에 따라 조직에서 그 생성이 증가할 뿐 아니라 이의 생리적 억제인자인 PAI-1와의 불균형이 유발됨을 관찰할 수 있었다(24). MMPs는 위암의 초기에는 생성만 증가하고, 진행됨에 따라 활성도가 증가하여, 전이 발생 시기에는 생성과 활성이 모두 증가함으로 보고되었다(12,25). 이와 같이 위암에서 관찰되는 uPA와 MMPs를 침윤 시기에 발현되는 특이적인 생물학적 활성으로 선정하여 위암세포주의 특성을 비교하고자 하였다.

위암 세포주들의 증식능 비교는 MK 발현에 따른 집락형성능으로 하였다. 먼저 오토크린 경로

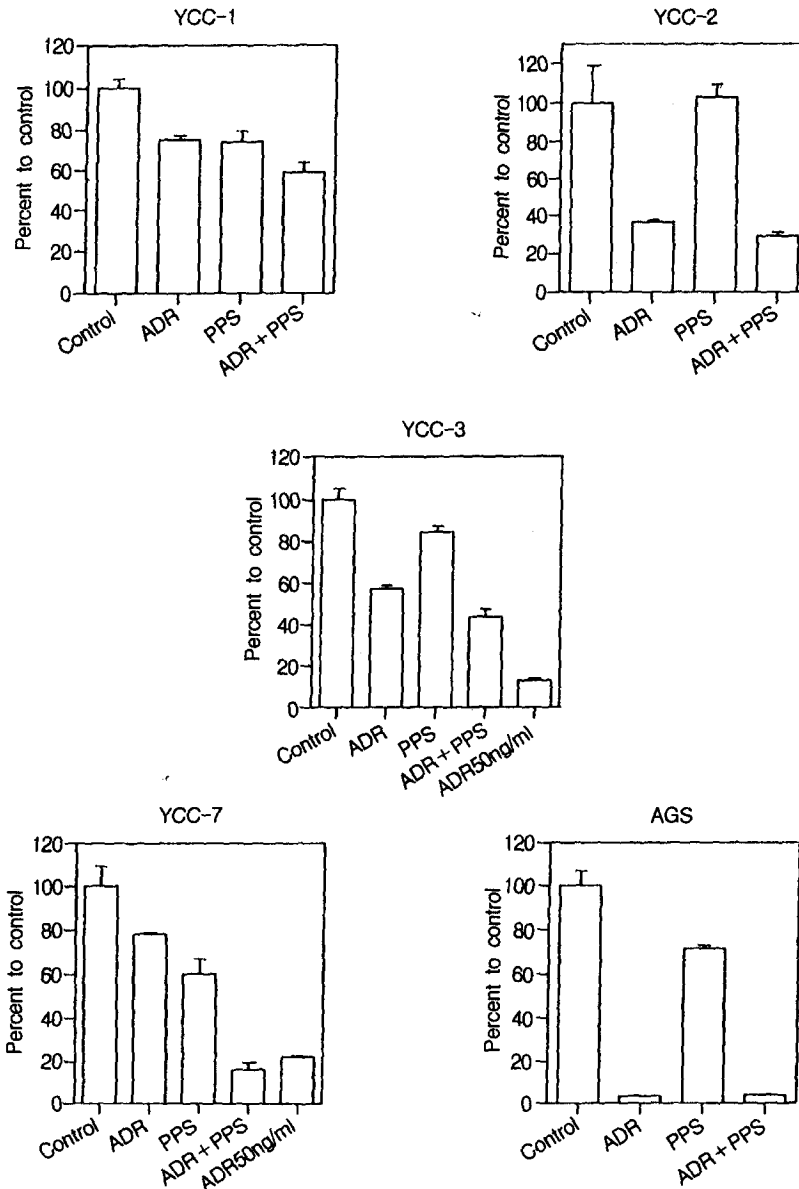


Fig. 6. Combined effects of bio-chemotherapy on the cell proliferation of gastric cancer cell lines with adriamycin 10 ng/ml(ADR) and pentosan polysulfate 10 μ g/ml(PPS).

에 의한 집락형성능 비교시, 연구에서 사용한 5개 세포주 중 MK를 발현하는 세포주에서 보다 증가된 세포집락형성을 관찰하여 MK가 위암 세포주에서 생성과 함께 분비되고 있음을 확인하였다. 즉, bFGF를 생성하나 분비하지 못하는 SW-13 세

포주에 Kaposi's sarcoma derived growth factor (kFGF)와 같은 분비가 가능한 FGF 유전자를 형질 도입시 집락형성 뿐 아니라 누누 생쥐에서 종양이 형성된 연구결과(20), 그리고 SW-13 세포주에 bFGF의 운반 물질(carrier molecule)로 생각되

는 결합 단백질(binding protein) 유전자의 형질 도입 시에 bFGF가 분비되어 집락을 형성한 연구결과(26) 등이 치료 목표로서 분비능이 중요함을 제시한 연구결과들이다. 이와 같이 분비능이 강조되는 이유는 종양성장인자가 오토크린과 파라크린 경로 모두에서 작용할 수 있음을 의미하는 것으로, 본 연구에서도 이 분비경로(secreted pathway)가 위암의 매우 특이적인 생물학적 치료 목표로 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

MMP-2의 활성화는 uPA에 의해 유도되며(27), MMP-9의 활성화는 MMP-2에 의해 유도되므로(28), 이들 단백질분해효소의 활성화는 연속적이면서 단계적이다. 본 연구에서도 uPA가 가장 많이 발현하였던 YCC-2 세포주에서 주로 MMP-9와 MMP-2가 발현되는 이같은 단계적 활성화 과정이 YCC-2 세포주에 존재하며, uPA의 억제가 기본적인 치료법이 될 수 있음을 제시하였다. 또한 uPA의 활성화에 의한 단백질분해의 증가는 생리적 억제자인 PAI-1과의 불균형 발생시에 초래된다(2,9). PAI-1 자체가 종양진행에 관계가 있다는 보고들도 나오고 있으나 아직까지 PAI-1은 uPA의 생리적 억제인자로서 uPA의 증가에 따른 이차적 증가로 생각된다. 또한 종양의 침윤 및 전이에는 uPA나 PAI-1의 절대적 증가보다 두 인자간의 불균형이 주된 역할을 하리라고 생각된다. 생물학적 치료 목표를 정하기 위해 시행된 본 연구결과, 위암 세포주들에서 uPA의 발현에는 차이가 있으나 PAI-1의 발현에는 차이가 없어, 증가된 uPA의 억제가 보다 효과적이라 생각되었다.

이상의 결과를 종합하여 종양의 성장, 침윤 및 전이 과정에 중요한 역할을 하는 서로 다른 생물학적 활성의 발현에 따라 위암 세포주들을 특성별로 세분할 수 있었다. 본 연구에서 비교한 각각의 활성을 목표로 하는 생물학적 치료의 가능성을 다음 단계의 연구에서 시행하였다.

암세포의 활성을 변환시킬 수 있는 약제에 대한 연구는 아직 많지 않아, 본 연구에서 밝혀진 생물학적 활성을 특이적으로 억제시킬 것으로 예측되는 약제들을 선택하였다. MK를 목표로 하는

생물학적 치료제로 선택한 PPS는 헤파린과 경쟁적으로 성장인자에 결합하여 활성화를 억제시킨다(9). 따라서 헤파린결합 성장인자들을 모두 억제할 수가 있어 그 작용범위가 매우 선택적이며 비특이적(specifically non-specific)이다. uPA를 억제하는 단클론 항체나 약제를 투여하여 uPA에 의한 세포막의 기질 분해를 억제시키는 보고도 있으나(29), 본 연구에서는 실제 침윤에 중요한 단백질분해와 MMP 활성화에 중요한 역할을 하는 plasmin을 직접 억제하여, uPA 작용 결과 증가된 plasmin에 의한 세포막의 기질 분해와 MMPs의 활성화(27)를 억제시키는 개념을 검증하기 위해 Transamin을 선택하였다. Adriamycin은 실제 임상에서 널리 쓰이는 항암제로 단일 제제로는 위암에서 가장 효과가 높으며, 본 연구에 사용된 위암 세포주에 대한 IC₅₀가 결정되어 있는 약제이다(30). 또한 세포살상제가 아닌 Interferon 등과 병용시에 부가 효과가 관찰되어(30), 본 연구에서 생물학적 제제로 선택한 약제들과 병용시에도 항암 효과의 상승을 기대할 수 있어 선택하였다.

PPS에 의한 분비경로 억제는 soft agar assay에 의한 집락형성 억제 비교로 하였다. 집락형성 억제 정도는 세포주에 따라 서로 상이하였으나, 각 세포주 모두 투여된 PPS의 용량에 비례하여 성장이 억제되어, PPS가 MK의 활성을 경쟁적으로 억제하며 다른 세포주에서와 같이(8,21,30) 위암 세포주의 오토크린 경로를 억제함을 의미하였다. PPS와는 달리 Adriamycin의 직접적인 세포살상 효과도 위암 세포주의 집락형성 억제를 유도하였으며, 세포주에 따라 서로 다른 용량비례 성장억제 효과를 관찰하였다. 특이할 점은 암세포를 직접 목표로 하지 않는 증식억제제인 PPS가 Adriamycin과 동일한 집락형성 억제효과를 나타내어, 이는 생물학적 치료가 항암 치료에 효과적일 가능성을 제시하였다. 종양 성장인자의 작용기전에는 분비 경로와 비분비 경로가 모두 존재하므로(26), 이 기전이 모두 발현되는 anchorage-dependent proliferation assay model을 이용하여 PPS의 암세포 증식 억제 효과를 다시 비교하였다. 그 결과

PPS의 인체 최대 허용농도 이상인 100 µg/ml에서도 단지 20~30% 정도의 성장억제 효과만 나타났다. 그러나 MK의 발현 유무에 따라 각 세포주들의 PPS에 대한 약제 민감도를 세분할 수가 있어, MK의 증식능 지표로서 가능성을 다시 확인하였다. 이와같이 soft agar assay에서의 집락형성 억제 효과와 proliferation assay에서의 세포증식 억제 효과와의 상이함은, 예측한 대로 proliferation assay에서는 PPS가 분비 및 비분비 헤파린결합 성장인자 모두와 경쟁적으로 작용하여 오토크린과 파라크린에 의한 효과를 모두 억제하기 때문이다(20).

침윤기 활성의 조절을 위해 선택하였던 Transamin도 본 연구에 사용된 5개의 위암세포주의 성장을 40% 억제시키는 세포성장 억제효과를 나타내었으며, 세포주를 약제 민감도에 따라 세분할 수 있었다. 즉, 종양의 증식과정은 MK에 의해 uPA가 활성화되고, uPA에 의해 세포 증식이 유도되므로(27), MK를 발현하는 AGS, YCC-3 세포주에서 주로 성장 억제 정도가 높음은 Transamin에 의해 이 경로가 파괴되어 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 일부 세포주에서는 uPA 및 MMPs의 발현과 증식 억제와의 상관성이 없어, 이 약제에 의한 세포성장 억제에는 이들 생물학적 활성과는 다른 경로가 관여할 수 있을 것으로 생각한다(32).

생물학적 제제들은 그 작용기전이 기존의 세포살상 항암제와 다르므로 이 약제들을 병용하여 항암제의 효과를 상승시키기 위한 연구가 계속되었다(30,33,34). 본 연구에서는 세포 증식 억제에 대한 생물학 제제(PPS)와 세포주마다 서로 다른 약제 감수성을 나타내는 항암제(Adriamycin)의 병용효과를 조사하였다. Adriamycin에 민감한 YCC-2, AGS 세포주에서는 PPS의 추가적 효과가 없었다. 그러나 Adriamycin에 intermediate response를 나타낸 YCC-3 세포주는 PPS에 의해 부가 효과가 관찰되었다. 특히 Adriamycin에 대해 약제 저항성이 있으면서 PPS의 억제목표인 MK를 발현하지 않는 YCC-1은 병용투여에 따른 효과가 없었으나,

MK를 발현하는 YCC-7은 상승 효과가 있었고, 그 효과는 Adriamycin의 인체 투여 농도 이상인 50 ng/ml의 효과와 동일하였다. 이는 성장인자 억제제에 의해 종양 세포들이 세포 주기중 Adriamycin에 효과적 시기에 정지되어 항암제에 의한 세포독성이 증가하거나, apoptosis(세포 사멸)가 유발된 결과로 생각할 수 있다. 본 연구에서 관찰된 결과는 임상적으로 항암제에 저항성이 있을 때, 특이적인 생물학적 대상을 목표로 하는 생물학적 치료를 병용함으로써 항암 감작 효과(chemo-sensitization effect)를 유도하여 치료 효과를 극대화할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

우리나라에 많은 인체 위암세포주를 대상으로 조사한 암의 증식, 침윤 및 전이시기에 발현되는 생물학적 활성은 각 세포주에서 서로 다르게 나타나 이를 근거로 세포주를 분류할 수 있었다. 이들 생물학적 활성 중 성장인자를 목표로 하는 활성 특이억제제(target specific agent)로 활성 발현의 조절이 가능하며, 이들 생물학적 활성이 항암 치료의 특이 목표가 될 수 있음을 관찰하였다. 특히 항암제에 저항성이 있는 세포주에서 항암제와 생물학적 활성 특이 억제제를 병용시에 항암 감작 효과를 유도할 수 있었다. 본 연구 결과 위암 세포주에서 생물학적 활성을 조절하여 항종양 효과를 유도할 수 있어, 이를 생체내 모델에서 확인함으로써 임상 적용을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. Cell 1991; 64: 271-280.
2. Liotta LA, Steeg P, Stetler-Stevenson W. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64: 327-336.
3. Nicolson GL. Cancer progression and growth: Rela-

- tionship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference metastasis. *Exp Cell Res* 1993; 204: 171-180.
4. Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, Shimata N, Ohi Y, Muramatsu T. A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilm's tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 1281-1285.
 5. 라선영, 공수정, 조재용, 유내춘, 정현철, 노성훈, 김주향, 노재경, 민진식, 김병수. Evaluation of biological phenotypes by Mid-kine gene in gastric cancer cell lines. *대한 암학회 초록집* 1996; 22: 19.
 6. Kojima S, Inui T, Muramatsu H, Kimura T, Sakakibara S, Muramatsu T. Midkine is a heat and acid stable polypeptide capable of enhancing plasminogen activator activity and neuritic growth extension. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 574-581.
 7. Myers C, Trepel J, Sartor O, Cooper M, Ranson M, Toko T, Linehan MW. Antigrowth factor strategies. *Cancer* 1993; 71: 1172-1178.
 8. Parker BW, Swain SM, Zugmaier G, Lippman ME, Wellstein A. Detectable inhibition of heparin-binding growth factor activity in sera from patients treated with pentosanpolysulfate. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1068-1073.
 9. Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1993; 53: 2513-2521.
 10. Nelcarda M, Siewert JR, Schmi HM, Ulm S. Tumor-associated proteolytic factor uPA and PAI-1 and survival in totally resected gastric cancer. *Lancet* 1994; 343: 117-118.
 11. Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 183-189.
 12. 노성훈, 조재용, 라선영, 정현철, 박준오, 이종인, 유내춘, 김주향, 노재경, 최진섭, 민진식, 김병수. 위암에서 침윤과 전이의 새로운 생물학적 표지자로서 Urokinase-type plasminogen activator(uPA)의 발현. *대한암학회지* 1996; 28: 226-234.
 13. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 68: 1-19.
 14. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61-65.
 15. Stetler-Stevenson WG, Krutzsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP-2). *J Biol Chem* 1989; 264: 17374-17378.
 16. Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, Mai M, Sasaki T, Seiki M. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer(suppl)* 1996; 77: 1676-1680.
 17. Fang WJ, Hartman N, Chow DT, Riegel AT, Wellstein A. A pleiotrophin stimulates fibroblasts and endothelial and epithelial cells and expressed in human cancer. *J Biol Chem* 1992; 267: 25889-25897.
 18. Shi YE, Torri J, Tieh L, Wellstein A, Lippman ME, Dickson RB. Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from Hormone-dependent human cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1409-1415.
 19. Kleiner DE and Stetler-Stevenson WG. Quantitative Zymography; Detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218: 325-329.
 20. Wellstein A, Lupu R, Zugmaier G. Autocrine growth stimulation by secreted Kaposi's fibroblast growth factor but not by endogenous basic fibroblast growth factor. *Growth Diff* 1990; 1: 63-71.
 21. Kern DH and Weisenthal LM. Highly specific prediction of antineoplastic drug resistance with an in vitro assay using suprapharmacologic drug exposure. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 582-588.
 22. Chang TT, Gulati S, Chou TC, Colvin M, Clarkson B. Comparative Cytotoxicity of various drug combinations for human leukemic cells and normal hematopoietic precursors. *Cancer Res* 1987; 47: 119-122.
 23. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor Midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996; 56: 2515-2518.
 24. Cho JY, Rha SY, Ahn JB, Lee HR, Lee KH, Lee JJ, Chung HC, Kim JH, Roh JK, Noh SH, Min JS, Kim BS. High levels of urokinase-type plasminogen activator(uPA) and its inhibitor PAI-1 are poor prognostic factors in gastric cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1995; 36: 96.
 25. 정현철, 조재용, 라선영, 박준오, 안중배, 이종인, 유내춘, 김주향, 노재경, 노성훈, 민진식, 김병수, 임호영, 최

- 진혁. 인체 위암 조직에서 새로운 생물학적 치료목표로서 기저막 단백질분해효소(Matrix-metalloproteinase-2, -9)의 발현. 대한암학회지 1996; 27: 897-906.
26. Czubayko F, Smith BV, Chung HC, Wellstein A. Tumor growth and angiogenesis induced by a secreted binding protein for fibroblast growth factors. *J Biol Chem* 1994; 269: 28243-28248.
 27. Kojima S, Muramatsu H, Amanuma H, Muramatsu T. Midkine enhances fibrinolytic activity of bovine endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9590-9596.
 28. Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B(MMP-9) by gelatinase A(MMP-2). *Cancer Res* 1995; 55: 2548-2555.
 29. Ossowski L, Russo-Payne H, Wilson EL. Inhibition of urokinase type plasminogen activator by antibodies: The effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. *Cancer Res* 1991; 51: 274-281.
 30. 노재경, 정현철, 고은희, 이원영, 한지숙, 김병수. 단기 배양된 위선암 세포군의 각종 항암제에 대한 체외 세포 독성에 관한 연구. 대한암학회지 1991; 23: 495-517.
 31. Wellstein A, Fang W, Khatri A, Lu Y, Swain SS, Dickson RB, Seasse J, Riegel AT, Lippman ME. A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. *J Biol Chem* 1992; 267: 2582-2587.
 32. Keski-Oja J, Koli K, Lohi J, Laiho M. Growth factors in the regulation of plasminogen-plasmin system in tumor cells. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17: 231-239.
 33. Drewinko B, Loo TL, Brown B, Gottlieb JA, Freireich EJ. Combination chemotherapy in vitro with adriamycin; Observations of additive, antagonistic and synergistic effects when used in the drug combinations on cultured human lymphoma cells. *Cancer Biochem Biophys* 1976; 1: 187-195.
 34. Teicher BA, Holden SA, Ara G, Sotomayor EA, Huang ZD, Chen YN, Brem H. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer* 1994; 57: 920-925.