

인체 위암조직에서 새로운 생물학적 치료목표로서 기저막 단백분해효소(Matrix-metalloproteinase-2, -9)의 발현

연세대학교 의과대학 연세 암연구소, 연세 암센터, 내과학교실 및 외과학교실
아주대학교 의과대학 내과학교실¹ 및 이화대학교 의과대학 내과학교실²

정현철 · 조재용 · 라선영 · 박준오 · 안중배
이종인 · 유내춘 · 김주항 · 노재경 · 노성훈
민진식 · 김병수 · 임호영¹ · 최진혁²

= Abstract =

Expression of Matrix-Metalloproteinases(MMP-2, MMP-9) in Gastric Cancer as New Targets for Biotherapy

Hyun Cheol Chung, M.D., Jae Yong Cho, M.D., Sun Young Rha, M.D., Joon Oh Park, M.D.
Joong Bae Ahn, M.D., Choong In Lee, M.D., Nae Choon Yoo, M.D., Joo Hang Kim, M.D.
Jae Kyung Roh, M.D., Sung Hoon Noh, M.D., Jin Sik Min, M.D., Byung Soo Kim, M.D.
Ho Yeong Lim, M.D.¹, and Jin Hyuk Choi, M.D.²

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

¹Department of Internal Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

²Department of Internal Medicine, Ewha Women's University College of Medicine, Seoul, Korea

The proteolytic processes are thought to be the critical point in tumor invasion and metastasis, mainly by matrix-metalloproteinases (MMPs) and serine proteases. We measured the activities of MMP-9 and MMP-2 in the 120 normal and cancer tissue samples from the same patients using gelatin zymography. Inactive MMP-9 (92 kD) was expressed in 73.3% of the normal and 87.5% of the cancer tissues, respectively ($p=0.009$), while active MMP-9 (82 kD) was expressed in 24.2% and 53.3%, respectively ($p=0.0001$). Inactive MMP-2 (72 kD) was expressed in 33.3% of the normal and 55.0% of the cancer tissues, respectively ($p=0.001$), while active MMP-2 (62 kD) was expressed in 4.2% and 31.7%, respectively ($p=0.0001$).

In T1 state, only frequency of expression and enzymatic activity of the active MMP-2 (62 kD) were increased, while from T2 stage, the expression and the activation of the both MMP-9 and MMP-2 were increased as the cancer progressed. The expression frequency of the MMP-9 was more common than of the MMP-2. The co-expression rate of the active forms (82 kD, 62 kD), activities of 82 kD and 62 kD, and the activation rates of the both MMPs were increased as the cancer invades and metastasizes to distant lymph node areas.

In conclusion, MMP-2 activation was the main causes of the increased MMPs activity during the T1 phase of the gastric cancer, while production and activation of the both MMP-9 and MMP-2 were increased as the cancer progressed. Therefore, we suggest that the different expression and activation of the MMPs in the gastric cancer progression can be a potential therapeutic target in gastric cancer biotherapy.

Key Words: MMP-9, MMP-2, Gastric cancer, Invasion, Metastasis

서 론

암의 침윤, 진행 및 전이는 몇가지 단계적 과정이 연속적으로 발생하면서 일어나는 현상이다¹⁾ 이들 단계 중 신생혈관생성(angiogenesis)은 태아의 발생, 분화, 여성의 생리기 및 상처치유시 필수적으로 나타나는 과정으로^{2~5)}, 동물실험을 통해서 신생혈관생성은 암의 성장과 침윤 및 진행에서 중요한 역할을 함이 증명되었다^{5,6)}. 즉 종양조직이 pre-vascular phase에서 vascular phase로 전환하면서 종양조직은 암세포의 증식에 필요한 산소와 영양분을 공급받기 위해 새로운 혈관의 생성을 촉진한다^{2~5)}. 전이병소에서 발생하는 종양혈관생성은 원발병소에서와 같은 기전으로 발생함도 확인되었다⁷⁾.

종양세포생물학이 발달함에 따라 암의 침윤 및 전이 과정이 점차 밝혀지고 그 결과 신생혈관 생성의 첫 단계인 기저막 용해단계가 침윤과 전이의 중요한 과정으로 제시되었다. 따라서 기저막 단백분해효소(matrix-metalloproteinase: MMP)가 매우 중요한 물질임이 실험적으로도 제시되었다^{8~11)}. 그러나 현재까지의 연구 결과, 이 MMP가 종양세포에서 직접 분비되는지 아니면 주위 섬유아세포나 내피세포에서 분비되는지는 확실하지 않다. 또한 많은 암조직에서 type IV collagenase가 관찰되었으나 어떠한 기전으로 72 kD 비활성형에서 62 kD의 활성형으로, 92 kD의 비활성형에서 82 kD의 활성형으로 전환되는지는 알려져 있지 않다. 현재까지 알려진 바로는 암 조직에서 아직 기전이 밝혀지지 않은 어떠한 자극에 의해 matrix-metalloproteinase의 활성화 및 그 생성이 증가하거나, 아니면 tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase(TIMP)의 활성도가 감소시에 그 균형이 무너져 기저막 용해가 발생하면서 암의 침윤이나 종양신생혈관 생성이 시작됨으로 실험실에서 관찰되었

다^{12~16)}. 아울러 단백분해효소의 분비는 암의 악성도와 관련이 있다고 가정하여 이를 암의 예후를 예측하는 새로운 생물학적 인자로 사용하려는 시도도 시작되었 다¹⁷⁾.

우리나라 성인 남녀에서 가장 흔한 위암은 조기 위암의 경우 근치적 절제술만으로도 5년 생존율이 80~90%이나 국소적으로 진행되어 암세포가 위의 장관막에 침윤하거나 주위 임파절에 전이가 된 경우 그 예후는 매우 불량하여 5년생존율이 20~30%에 불과하다. 이들 환자에서 생존율 및 완치율을 높이기 위해 근치적 수술후 보조약물 치료와 면역치료를 시행함으로써 5년생존율을 50~60%까지 증가시킬 수 있었으나¹⁸⁾, 아직도 치료결과가 만족할 만하지 못하다. 따라서 현재 사용하는 치료외에 암의 전이 및 침윤을 억제시키려는 생물학적치료를 병용하거나 혹은 기존의 치료에 효과를 보지 못하는 고위험도군을 종양생물학적 표지자에 의해 분리하려는 노력이 시도되고 있다.

본 연구에서는 type IV collagenase 중 대표적인 92 kD(MMP-9)와 72 kD(MMP-2)의 발현빈도, 효소활성도 및 활성율을 동일 환자의 위 정상조직과 위 암조직에서 비교하여 ① 특이하게 증가하는 유형을 찾고자 한다. ② 그리고 비활성형에서 활성형으로 이행되는 활성율을 조사하여 암의 침윤 및 전이 정도와 비교하고자 한다. ③ 최종적으로 type IV collagenase의 활성도와 임상적 인자들과의 상관성을 조사함으로써 암의 단계적 진행과정에서 MMPs의 역할 및 발현변화 유무를 임상적으로 확인하고, 이들의 생물학적 치료목표로서의 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법

1) 대상

조직학적으로 위선암이 확진되고 위절제술이 시행된 환자 120예를 대상으로 하였다. 동일 환자에서 정상

및 암 조직은 수술적 제거후 고정시키기전에 추출하여 -70°C 에 냉동보관하였다. 일정 시기마다 조직을 pulverize시켜 cytosol을 만들고 -70°C 에 냉동보관 하면서 검사를 시행하였다.

2) 방법

(1) Zymography에 의한 type IV collagenase 활성도 조사:

① **Cytosol preparation;** 조직 200 mg을 분쇄시킨 후 ultracentrifuge 시험관에서 homogenization buffer(2 ml)를 사용하여 10 volume으로 회석시켰다. Homogenizer를 사용하여 5초 이내로 조직을 homogenizer한 다음 4°C 에서 1시간동안 100,000 g로 원심분리 시켰다. Cytosol의 상층액을 얼음 위에 장치한 시험관내로 이동시킨 다음 실험에 사용하였다.

② 용액준비;

가) **stock buffer;** 1.211 g Tris, 0.588 g EDTA, 1.21 g sodium molybdate를 800 ml의 증류수에 용해시킨 후 실온에서 HCl을 이용하여 pH를 7.5로 맞추고 증류수를 첨가하여 총 용량이 1L가 되게 한 다음 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

나) **homogenization buffer;** 실험당일 stock buffer에 MTG(monothioglycerol)를 stock buffer에 첨가하여 최종농도가 1mM이 되게한 후 사용하였다. 먼저 농축된 MTG를 증류수로 1:10으로 희석시킨후, 50 ml의 stock buffer에 희석된 MTG 50 ml를 첨가하고 잘 혼합하여 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 사용하였다.

③ **Marker 세포주 배양;** RPMI-7951 악성흑색종 세포주와 HT-1080 세포주를 37°C 의 0.5% CO_2 세포 배양기에서 10% 우태아 혈청이 함유된 세포배양 배지로 배양하였다. 세포의 건강상태를 유지하기 위해 주 2회 배지를 교환하였다.

④ **Gelatinase marker;** RPMI-7951 악성흑색종 세포주 배양에서 추출한 conditioned media를 72 kD의 표지자로 사용하였다. HT-1080 세포주의 conditioned media는 92 kD와 62 kD의 표지자로 사용하였다. 20 μl 의 conditioned media를 5 μl 의 5x의 겔제 완충액에 혼합한 후, 이 중 10 μl 를 취하여 검사하였다.

⑤ Buffer preparation;

가) **renaturing buffer;** Triton X-100를 증류수에 용해하여 2.5(v/v)으로 하여 사용하였다.

나) **developing buffer;** 50 mM Tris, 0.2M NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.02% Brji 35(w/v)를 최종 농도로 혼합한 후 HCl를 이용하여 pH를 7.6으로 조절하여 사용하였다.

다) **sample buffer(2x);** 0.5M Tris-HCl, 10% (w/v) SDS 4 ml, 0.1% bromophenol blue 0.5 ml, glycerol 2.0 ml를 혼합한 후 증류수를 10 ml 용량이 되도록 첨가하여 사용하였다.

라) **running buffer(10x);** Tris-base 29 g, glycine 144 g, SDS 10 g을 증류수에 녹인후 최종용량이 1L가 되게 하여 사용하였다.

⑥ **Zymography;** Type IV collagenase의 기질이 포함된 gel을 사용하여 20 mA에서 전기영동을 시행하였다¹⁹⁾. 전기영동후 gel은 renaturing buffer로 20°C 에서 30분간 반응시킨 다음, 5분간 metalloproteinase developing buffer(0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl_2 0.2% Brij 35)로 세척하였다. 다시 신선한 metalloproteinase developing buffer에 gel을 담근 후 37°C 에서 15시간 반응시키고, 염색액(0.5%(w/v) Coomassie Blue G250, 30% ethanol, 10% acetic acid)에서 3시간 동안 염색한 후 세척하였다. 다음 gel을 고정액(30% methanol, 0.01% glycerol)으로 고정시킨후 computer-assisted image analyser를 이용하여 분석하였다. Band의 발현여부(발현도)는 육안적으로 band의 존재유무를 평가하여 정하였다. Activity는 gel의 영상을 capture software에 연결된 video-camera로 촬영한 후 band area를 측정하여 구하였다. 각각의 gel은 3회 image 촬영후 band 면적을 계산하고, 그 평균치를 사용하였다(Fig. 1)¹⁹⁾. MMP-9 및 MMP-2의 총활성도는 92 kD+82 kD, 72 kD+62 kD로 하였고, 활성율은 각각 82 kD/(92 kD+82 kD), 62 kD/(72 kD+62 kD)로 정하여 비교하였다.

(2) **조직의 병리학적 병기설정;** 수술로 제거한 환자의 조직을 formalin에 고정후, paraffin block을 만들고 H & E 염색을 시행하였다. 병기는 AJCC 기준에 의해 정하였다.

(3) **통계적 처리;** 각 군간의 비교는 Pearson's

Fig. 1. Detection of MMP-9 and MMP-2 activities as shown as shown by zymography; A. Different expression of MMP-9 and MMP-2 activities between normal(N), cancer(C) and metastatic(M) tissues, B. Capturing of a band image using computer-assisted image analysis. Four band (92 kD, 82 kD, 72 kD, 62 kD) are translated into measurable curves.

chi-square test, Fisher's exact test와 Mantel-Haenszel test를 사용하였다. 각 인자별 유의도 검정은 SPSS법을 사용하여 Student t-test ANOVA test등을 시행하였다.

결 과

1) 대상 환자의 임상적 특성

대상환자는 총 120명으로 남자 91명, 여자 29명였으며, 중앙연령은 55세(범위; 24~79세)였다. T 병기상

Table 1. Patients characteristics

| | |
|-----------------------------|-------|
| Number of enrolled patients | 120 |
| Sex male:female | 91:29 |
| Age(years) | |
| Median | 55 |
| Range | 24-79 |
| Tumor location | |
| Fundus | 3 |
| Body | 47 |
| Antrum | 55 |
| Pylorus | 12 |
| Diffuse | 3 |
| Tumor differentiation | |
| Well | 5 |
| Moderate | 31 |
| Poor | 50 |
| Mucinous | 4 |
| Signet ring cell | 24 |
| Undifferentiated | 6 |
| Operation | |
| Subtotal gastrectomy | 79 |
| Total gastrectomy | 41 |
| T stage | |
| T1 | 8 |
| T2 | 25 |
| T3 | 78 |
| T4 | 9 |
| N stage | |
| N0 | 34 |
| N1 | 36 |
| N2 | 37 |
| N3 | 12 |
| unknown | 1 |
| Stage | |
| I | 20 |
| II | 24 |
| III | 52 |
| IV | 24 |

T1 8예(6.7%), T2 25예(20.8%), T3 78예(65.0%), T4 9예(7.5%)였다. 임파절 전이가 없던 예가 34예(28.4%), N1 영역 임파절 전이가 36예(30.0%), N2 영역 임파절 전이가 37예(30.8%), N3 영역 임파절 전이가 12예(10.0%), 전이 영역이 불확실한 예가 1예(0.8%)였다. 병기 I 20예(16.7%), II 24예(20.0%),

Table 2. Comparison of MMP's expression rate between normal and cancer tissues (n=120)

| | Normal(%) | Cancer(%) | p value |
|-------|------------|------------|---------|
| MMP-9 | | | |
| 92 kD | 88(73.3)* | 105(87.5)* | 0.009 |
| 82 kD | 29(24.2)** | 64(53.3)* | 0.0001 |
| MMP-2 | | | |
| 72 kD | 40(33.3)* | 66(55.0)* | 0.001 |
| 62 kD | 5(4.2)** | 38(31.7)** | 0.0001 |

+: p = 0.00001, + +: p = 0.0002, *: p = 0.00001, **: p=0.001

MMP: matrix-metalloproteinase

III 52예(43.3%), IV 24예(20.0%)였다. 복막, 난소 및 간전이(M1)가 관찰되어 절제를 시행한 예가 15예(12.5%)였으며, 수술후 거시적 잔존암이 남은예가 14예(11.7%), 미시적 잔존암이 남은 예가 2예(1.7%)였다. 그의 임상적 소견은 Table 1과 같다.

2) 정상 및 위암 조직에서 MMP-9와 MMP-2의 발현도 비교

MMP-9의 비활성형인 92 kD와 활성형인 82 kD는 모두 암조직에서 그 발현도가 정상위조직보다 높았으며 (92 kD; 87.5% versus 73.3%, 82 kD; 53.3% versus 24.2%). MMP-2도 비활성형(72 kD)과 활성형(62 kD) 모두 암조직에서 발현빈도가 높았다(72 kD; 55.0% versus 33.3%, 62 kD; 31.7% versus 4.2%). 정상조직과 위암조직에서 MMP-9의 비활성형과 활성형의 발현빈도가 MMP-2의 활성형, 비활성형 발현빈도보다 높았다(Table 2).

암 조직에서는 정상조직에 비해 MMPs들을 전혀 발현하지 않거나, 비활성형만 발현되는 빈도가 낮은 반면, 활성형과 비활성형을 모두 발현하는 빈도는 높았다(Table 3).

3) MMP-9 및 MMP-2 활성형의 동시발현과 위암 진행과의 상관성

침윤도에 따른 MMPs의 발현빈도를 조사한 바, T1에서는 활성형인 82 kD와 62 kD 모두를 발현한 예는 없었다. T2 병기에서부터 두가지 활성형이 동시

에 발현하지 시작하였다. 임파절 전이가 없는 군에 비해 영역 임파절로의 전이가 증가할수록 두가지 MMPs의 활성형을 동시에 발현하는 예가 증가하였다. 병기가 진행함에 따라 62 kD 혹은 82 kD중 한가지만을 발현하는 예는 감소하였으며, 두 가지 활성형을 동시에 발현하는 빈도는 증가하였다(Table 4).

Table 3. Patterns of MMP's activation between normal and cancer tissues(n=120)

| | Normal(%) | Cancer(%) | p value |
|--------------|-----------|-----------|---------|
| MMP-9 | | | |
| 92 kD alone | 62(51.7) | 43(35.8) | 0.02 |
| 82 kD alone | 3(2.5) | 2(1.7) | |
| 92 kD+82 kD | 26(21.7) | 62(51.7) | 0.00001 |
| none | 29(24.1) | 13(10.8) | 0.01 |
| MMP-2 | | | |
| 72 kD alone | 35(29.2) | 34(28.3) | 1.00 |
| 62 kD alone | 0(0.0) | 6(5.0) | |
| 72 kD+62 kD | 5(4.2) | 32(26.7) | 0.00001 |
| none | 80(66.6) | 48(40.0) | 0.00001 |

4) 정상조직과 위암조직의 MMPs 효소 활성도 비교

MMP-9는 위암 조직에서 정상 위조직에 비해 비활성형의 활성도, 활성형의 활성도 및 총효소활성도(92 kD+82 kD)가 증가하였으며, 활성율(82 kD/92 kD+82 kD)도 증가하였다. MMP-2는 비활성형의 증가는 없으면서 활성형, 총활성도(72 kD+62 kD)가 위암조직에서 정상 위조직에 비해 증가하였으며, 특히 활성율(62 kD/72 kD+62 kD)은 7배 증가하였다(Table 5).

5) 위암의 진행에 따른 MMP-9, MMP-2의 활성도의 변화

침윤도에 따른 MMPs 활성도의 변화를 비교한 바, T1의 경우 MMP-9는 정상 위조직에 비해 92 kD, 82 kD 및 총활성도는 차이가 없었으나, MMP-2의 경우 활성율이 증가하고(p=0.0001), 그 결과 62 kD의 활성형이 증가하는 경향이 있었다(0.07±0.25 versus 0.26±0.50, p=0.06). T2 병기부터는 MMP-9의 총활성도와 활성율 모두 정상에 비해 증가하였으며, 그

Table 4. Changing patterns of co-expression of active forms with the cancer progression

| | 82 kD and 62 kD(%) | | p value | 82 kD or 62 kD | | p value | None | | p value |
|----------------|--------------------|----------|---------|----------------|----------|---------|----------|----------|---------|
| | N | C | | N | C | | N | C | |
| T-stage | | | | | | | | | |
| T1(n=8) | 0(0.0) | 0(0.0) | | 0(0.0) | 3(37.5) | 0.10 | 8(100) | 5(62.5) | 0.10 |
| T2(n=25) | 0(0.0) | 6(24.0) | 0.01 | 9(36.0) | 9(36.0) | 0.62 | 16(64.0) | 10(40.0) | 0.07 |
| T3(n=78) | 2(2.6) | 25(32.1) | 0.001 | 19(24.4) | 22(28.2) | 0.36 | 57(73.1) | 31(39.7) | 0.002 |
| T4(n=9) | 0(0.0) | 2(22.2) | 0.2 | 2(22.2) | 2(22.2) | 0.71 | 7(77.8) | 5(55.6) | 0.31 |
| N-stage | | | | | | | | | |
| N0(n=34) | 0(0.0) | 6(17.6) | 0.01 | 12(35.3) | 11(32.4) | 0.50 | 22(64.7) | 17(50.0) | 0.16 |
| N1(n=36) | 2(5.6) | 8(22.2) | 0.04 | 8(22.2) | 14(38.9) | 0.10 | 26(72.2) | 14(38.9) | 0.004 |
| N2(n=37) | 0(0.0) | 13(35.1) | 0.001 | 6(16.2) | 8(21.6) | 0.38 | 31(83.8) | 16(43.2) | 0.001 |
| N3(n=12) | 0(0.0) | 6(50.0) | 0.006 | 4(33.3) | 3(25.0) | 0.50 | 8(66.7) | 3(25.0) | 0.04 |
| Stage | | | | | | | | | |
| I(n=20) | 0(0.0) | 2(10.0) | 0.24 | 7(35.0) | 8(40.0) | 0.50 | 13(65.0) | 10(50.0) | 0.26 |
| II(n=24) | 0(0.0) | 6(25.0) | 0.01 | 7(29.2) | 7(29.2) | 0.62 | 17(70.8) | 11(45.8) | 0.07 |
| III(n=52) | 2(3.8) | 17(32.6) | 0.001 | 12(23.1) | 16(30.8) | 0.25 | 38(73.1) | 19(36.5) | 0.001 |
| IV(n=24) | 0(0.0) | 8(33.3) | 0.001 | 4(16.7) | 5(20.8) | 0.50 | 20(83.3) | 11(45.8) | 0.007 |

N: normal tissue, C: cancer tissue

결과 활성형인 82 kD가 증가하였다. MMP-2는 활성율이 보다 높아, 전체 생성율인 총활성도가 증가하였음에도 활성율의 증가로 72 kD의 활성도는 정상과 차이가 없었고, 활성형인 62 kD만 그 활성도가 증가하였다. 영역 임파절 전이별 비교시, N3 영역 임파절 전

이가 발생한 환자에서 MMP-9의 총활성도, 활성율 및 활성형이 증가하였다. 반면, MMP-2는 비활성형은 변화가 없으면서 활성형과 활성율만 증가하였다. 각 병기별 비교시 병기 I에서는 MMP-2의 생성 및 활성율의 증가로 62 kD 활성형의 MMP-2가 증가하였으며, 병기 II부터는 MMP-2, MMP-9 모두 전체 활성도, 활성율 및 활성형이 증가하였다(Table 6).

Table 5. Comparison of MMPs activities between normal and cancer tissues(n=120)

| | Normal (mm ²) | Cancer (mm ²) | p value |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| MMP-9 | | | |
| 92 kD | 0.90±0.56 | 1.11±0.55 | 0.001 |
| 82 kD | 0.33±0.52 | 0.88±0.52 | 0.0001 |
| 92 kD+82 kD | 1.23±0.88 | 2.00±1.31 | 0.0001 |
| 82/(92+82)ratio | 0.19±0.28 | 0.32±0.26 | 0.0001 |
| MMP-2 | | | |
| 72 kD | 0.45±0.56 | 0.56±0.52 | 0.08 |
| 62 kD | 0.08±0.25 | 0.41±0.56 | 0.0001 |
| 72 kD+62 kD | 0.53±0.72 | 0.97±0.91 | 0.0001 |
| 62/(72+62) ratio | 0.04±0.12 | 0.28±0.36 | 0.0001 |

고 찰

다양한 압중에서 면역 조직화학적 염색법 혹은 in situ hybridization법에 의해 matrix-metalloproteinases(MMPs)의 발현이 보고되었다^{10,11)}. MMP-9와 MMP-2는 일반적으로 비활성형인 zymogen형의 pro-collagenase (92 kD, 72 kD)로 생성되며, 활성화 과정에 의해 활성형인 82 kD, 62 kD로 변환후 실제 단백 분해능을 나타내게 된다. 따라서 면역조직화학적 염색이나 in situ hybridization 방법을 사용시 비활성형과 활성형을 구분할 수가 없는 단점이 있다. 그 결과 MMPs 발현과 암의 진행과의 상관성을 조사

Table 6. Comparison of MMPs activities with the stomach cancer progression

| | 92 kD | 82 kD | 92 kD+82 kD | ratio | 72 kD | 62 kD | 72 kD+62 kD | ratio |
|----------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|
| Normal(n=120) | 0.90±0.56 | 0.33±0.52 | 1.23±0.88 | 0.19±0.28 | 0.45±0.56 | 0.07±0.25 | 0.53±0.72 | 0.04±0.12 |
| T stage | | | | | | | | |
| T1(n=8) | 1.00±0.00 | 0.34±0.55 | 1.38±0.74 | 0.17±0.24 | 0.50±0.54 | 0.26±0.50* | 0.76±0.89 | 0.24±0.38* |
| T2(n=25) | 1.22±0.37* | 0.78±0.73* | 2.16±1.21* | 0.30±0.23* | 0.56±0.51 | 0.47±0.60* | 1.03±0.92* | 0.32±0.39* |
| T3(n=78) | 1.11±0.04* | 0.99±0.99* | 2.17±1.62* | 0.34±0.26* | 0.56±0.52 | 0.43±0.56* | 1.00±0.93* | 0.28±0.35* |
| T4(n=9) | 0.92±0.34 | 0.59±0.61 | 1.56±1.01 | 0.30±0.26 | 0.56±0.53 | 0.19±0.35 | 0.74±0.73 | 0.20±0.35* |
| N stage | | | | | | | | |
| N0(n=34) | 1.13±0.41 | 0.75±0.77* | 1.94±1.30* | 0.31±0.23* | 0.50±0.51 | 0.32±0.47* | 0.82±0.82* | 0.28±0.37* |
| N1(n=36) | 1.03±0.47 | 0.81±0.91* | 1.89±1.43* | 0.30±0.26* | 0.61±0.49 | 0.40±0.59* | 1.01±0.90* | 0.27±0.36* |
| N2(n=37) | 1.02±0.60 | 0.92±0.94* | 2.05±1.47* | 0.34±0.28* | 0.51±0.56 | 0.41±0.56* | 0.92±0.94* | 0.25±0.35* |
| N3(n=12) | 1.63±0.74* | 1.37±1.10* | 3.08±1.83* | 0.35±0.24* | 0.75±0.45* | 0.74±0.63* | 1.49±0.96* | 0.49±0.32* |
| Stage | | | | | | | | |
| I(n=20) | 1.07±0.26 | 0.59±0.61* | 1.65±0.97 | 0.27±0.23 | 0.55±0.51 | 0.34±0.53* | 0.89±0.87 | 0.28±0.38* |
| II(n=24) | 1.20±0.49* | 0.80±0.87* | 2.08±1.47* | 0.28±0.25 | 0.50±0.51 | 0.43±0.59* | 0.93±0.98* | 0.26±0.33* |
| III(n=52) | 1.04±0.58 | 0.98±0.95* | 2.08±1.52* | 0.36±0.26* | 0.56±0.54 | 0.40±0.53* | 0.96±0.88* | 0.29±0.37* |
| IV(n=24) | 1.22±0.70* | 0.97±1.00* | 2.29±1.70* | 0.30±0.20 | 0.63±0.50 | 0.48±0.62* | 1.10±0.98* | 0.29±0.34* |

*p<0.06

한 임상연구에서 공통된 결과가 유도되지 못하였다²¹⁻³⁰⁾. 최근들어 암의 침윤과 전이 과정에서 MMPs의 생물학적 기능 및 역할을 보다 확실하게 규명하기 위하여 MMPs의 효소 활성도를 직접 측정하는 방법이 개발되었으며, 실제 방광암, 유방암, 폐암등에서 그 결과가 보고되었다^{8,20,22,31,32)}. 이러한 효소활성도를 측정하는 zymography 방법을 사용함으로써, 비활성형의 pre-collagenases(92 kD, 72 kD)와 활성형의 collagenases(82 kD, 62 kD)들의 효소 활성도(enzymatic activity)를 직접 구별하여 정량화 할 수 있으며, 총활성도 혹은 총생산량(92 kD+82 kD, 72 kD+62 kD)을 computer-assisted image analyser를 이용하여 객관적으로 정량할 수가 있다. 아울러 생산된 zymogen의 활성율(activation rate) 즉, pre-collagenases에서 collagenases로의 전환율을 정량할 수 있어, 암조직의 침윤도 혹은 전이능과 비교할 수 있는 장점이 있다.

먼저 MMP-9와 MMP-2의 발현 빈도를 정상 위조직과 위암조직에서 비교하였다. MMP-9의 활성형(82 kD)과 비활성형(92 kD), MMP-2의 활성형(62 kD)과 비활성형(72 kD) 모두 정상 위조직에서 관찰되었으며, 위암조직에서는 그 빈도가 모두 증가하였다. 정상 조직에서도 MMPs가 발현됨은 ① MMP-2는 섬유아세포에서, MMP-9는 macrophage에서 주로 생성되며, ② 정상 폐조직이나³⁾, 양성 유방 종양에서도 관찰되는점²²⁾, ③ 비활성형은 존재하여도 실제 단백질 분해능이 없는점 등을 종합할때 특이한 소견은 아니었다. 위암 조직에서는 MMP-9와 MMP-2의 발현빈도가 정상 조직에 비해 증가하였으며, 특히 활성형인 82 kD와 62 kD의 발현이 현저하게 증가함을 확인하였다. 특이한 점은 비활성형과 활성형 모두 MMP-9의 발현이 MMP-2의 발현에 비해 높았다(Table 1). 이러한 소견은 뇌의 glioblastoma multiforme에서는 92 kD, 82 kD는 다량 존재하나, 72 kD는 약간, 62 kD는 거의 존재하지 않는 점²³⁾, 방광암²⁰⁾, 유방암^{8,31,33)}에서는 MMP-2가 주로 발현되는 보고와는 일치하지 않는 소견으로, 위조직에는 폐양등의 염증성 소견이 많아 macrophage가 보다 많이 조직내에 분포하여 유발되는 결과일 가능성이 높다 하겠다. 즉 원발 장기에 따라 MMPs의 발현 종류가 서로 다르며, 이는 주위 미세환경(microenvironment)과 암병소

와의 paracrine pathway가 암의 진행과정 형성에 중요함을 제시한다 하겠다.

정상 위조직에서는 MMP-9와 MMP-2의 발현이 관찰되지 않거나 관찰되어도 주로 비활성형이었으나, 위암조직에서는 활성형과 비활성형이 모두 관찰되는 경우가 증가하였다(Table 3). 이는 위암조직에서 pro-collagenase가 collagenase로의 변환이 왕성하게 발생하고 있음을 의미한다 하겠다. 따라서 본 연구에서는 MMP-9와 MMP-2의 활성형이 모두 존재하는 경우와 위암의 진행도와의 관계를 조사하였다. 그 결과 T1에서는 주로 MMP-2의 활성형만 관찰된 반면, T2에서부터는 MMP-9와 MMP-2의 두가지 활성형이 동시에 발생하기 시작하였다. 이는 type IV collagen이 주로 분포하는 기저막을 용해시키는 과정¹⁷⁾에서는 주로 MMP-2가 관여하며, 그 이후 암세포의 실제 이동에 필요한 과정인 기질 용해시에는 두가지 MMPs가 모두 발현되기 시작하는 것으로 생각된다. 또한 임파절 전이 영역이 증가할수록 두가지 MMPs가 동시에 발현하는 빈도가 증가하는 반면, MMPs를 전혀 발현하지 않는 예는 감소하였다. 그 결과 병기가 증가할수록 MMP-9와 MMP-2의 동시발현율은 증가하였다. 즉 침윤의 초기단계에는 MMP-2의 활성화만 증가한 반면, 여러가지 MMPs가 동시에 생성 및 활성화될수록 암의 전이 및 진행이 증가함을 위암조직에서 확인하였다(Table 4).

MMPs의 효소 활성도를 직접 비교하기 위하여 band를 image analysis 방법에 의해 측정하였다. 현재까지 보고된 대부분의 연구결과는 서로 다른 환자들의 정상 및 암조직으로부터 MMPs들의 활성도와 활성율의 비교가 시행되었으나, 본 연구에서는 120예 모두 동일 환자에서 MMP-9와 MMP-2의 생성 및 활성율을 비교하였다. MMP-9는 위암조직에서 정상 조직에 비해 비활성형(92 kD), 활성형(82 kD), 총활성도(92 kD+82 kD) 및 활성율(82 kD/92 kD+82 kD) 모두가 증가하였다. 반면 MMP-2는 비활성형(72 kD)은 정상과 유사한 수준이었으나 활성율(62 kD/72 kD+62 kD)이 매우 높고 총활성도(72 kD+62 kD)와 활성형(62 kD)이 증가하였으며 이는 방광암²⁰⁾, 폐암²²⁾의 결과와 동일하였다. 즉, 종양조직에서 생성이 증가된 72 kD가 대부분 활성화되어 62 kD로 변환함에 따라 총활성도의 증가 부분은 대부분 활성형(62 kD)이

었다. 위암의 침윤과 전이에 따른 MMP-9, MMP-2의 활성도 변화를 정상조직과 비교시, T1에서는 72 kD로부터 62 kD로의 활성율과 62 kD 활성도가 증가하였다. 이는 활성빈도 비교에서의 결과를 뒷받침하는 자료로 암 침윤의 첫단계인 기저막용해시에는 MMP-2의 활성화가 주기전이며 첫 과정을 임상적으로 확인하였다. 이 결과는 방광암²⁰⁾, 폐암²²⁾에서 62 kD 활성율의 증가가 암의 침윤과 상관성이 있다는 보고와 일치하는 결과였다. T 병기부터는 MMP-9와 MMP-2의 생성 및 활성화가 모두 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 영역 임파절로의 전이가 증가할수록 원발병소내의 MMP-2, MMP-9의 활성도가 꾸준히 증가하여 N3 영역 임파절 전이시 가장 증가하였다. 그 결과 MMP-9 및 MMP-2의 활성형은 3배까지 증가하였다. 즉 원발병소의 MMPs 활성도가 증가할수록, 다시말하면 MMPs의 생성과 활성화가 증가할수록 임파절 전이 범위가 증가함을 의미 한다고 하겠다. 따라서 병기 I에서는 주로 MMP-2의 활성도 증가에 따른 62 kD 활성형의 증가가 전체 MMPs 활성도 증가의 주 기전이었으며, 병기 II부터는 MMP-9와 MMP-2의 생성 및 활성도 증가가 전체 MMPs 활성도 증가의 주 기전으로 관찰되었다(Table 6).

난소, 간 및 복막전이 발생한(M1) 16예와 전이가 없는 104예에서 MMP-9와 MMP-2의 활성도를 비교한 바, 전이 발생예에서 MMP-9와 MMP-2의 총 활성도, 활성율 및 92 kD, 82 kD, 72 kD, 62 kD 활성도가 모두 증가하는 경향이었으나, 예수가 작아 유의성은 관찰되지 않았다(data not shown).

결 론

위암에서 MMP-9와 MMP-2의 발현유형을 조사한 바, T1에서는 기저막 용해를 위해 MMP-2의 활성형(62 kD)이 주로 증가하였으며, T2 부터는 MMP-9와 MMP-2의 생성과 활성이 모두 증가하였다. 특히 MMP-9의 발현빈도가 MMP-2보다 높았다. 그리고 원발병소에서 MMP-9와 MMP-2의 활성도가 증가할수록, 동시에 두가지 MMPs가 발현될수록, 영역임파절로의 전이가 증가하였다. 즉, MMPs의 생성 및 활성율은 위암의 침윤과 전이에 관계가 깊으며, 이들이 위암의 침윤과 전이를 억제시킬 수 있는 생물학적 치

료의 목표가 될 가능성을 임상적으로 제시하였다. 따라서 추후 MMPs의 발현에 따른 임상경과, MMPs와 TIMP (tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases)의 균형 및 기타 단백질효소의 발현(protases)과 위암의 진행과의 상관성을 조사함으로써 생물학적 치료 목표를 보다 구체적으로 설정할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Liotta LA, Stetler-Stevenson G: *Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res* **51**: 5054, 1991
- 2) Gospodarowicz D, Thakral KK: *Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 847, 1978
- 3) Folkman J, Shing T: *Angiogenesis. J Biol Chem* **267**: 10931, 1992
- 4) Folkman J, Klagsbrum M: *Angiogenic factors. Science* **235**: 442, 1987
- 5) Folkman J: *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst* **82**: 4, 1990
- 6) Folkman J, Watson K, Ingber D: *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature* **339**: 58, 1989
- 7) Hart IR, Saini A: *Biology of tumor metastasis. Lancet* **339**: 1453, 1992
- 8) Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A: *Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. Clin Exp Metastasis* **11**: 183, 1993
- 9) Tryggvason K, Hojhtya A, Pyke C: *Type IV collagenases in invasive tumors. Breast Cancer Res Treat* **24**: 209, 1993
- 10) Stearns ME, Wang M: *Type IV collagenase(Mr 72,000) expression in human prostate benign and malignant tissue. Cancer Res* **53**: 878, 1993
- 11) Moll UM, Youngleib GL, Rosinski KB, Onigley JP: *Tumor promoter-stimulated Mr 92,000 gelatinase secreted by normal malignant human cells; Isolation and characterization of the enzyme from HT 1080 tumor cells: Cancer Res* **50**: 6162, 1990
- 12) Hujanen ES, Vaisanen A, Zheng A, Tryggvason

- K, Hujanen T: *Modulation of Mr 72,000 and Mr 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. Int J Cancer 58: 582, 1994*
- 13) Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M: *Heparin affinity purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. Science 223: 1296, 1984*
 - 14) Ferrara N, Henzel WJ: *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161: 851, 1989*
 - 15) Nishino T, Kaise N, Shindo Y, Sishino N, Nishida T, Yasuda S, Masui Y: *Promyelocytic leukemia cell line, HL-60, produces human hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun 181: 323, 1991*
 - 16) Wellstein A, Fang W, Khatri A, Lu Y, Swain SS, Dickson RB, Seasse J, d Riegel AT, Lippman ME: *A heparin-binding growth factor secreted from breast cancer cells homologous to a developmentally regulated cytokine. J Biol Chem 267: 2582, 1992*
 - 17) Folkman J: *Antiangiogenesis In: biologic therapy of cancer (DedVita, VT Jr., Helmans, Rosenberg SA), Philadelphia, Lippincott, 1991, pp 743-753*
 - 18) Kim BS, Chung HC, Roh JK, Park YJ, Koh EH, Kim JH, Min JS, Lee KS, Lee KB, Youn JK: *A controlled trial of 5-FU, doxorubicine (FA) chemotherapy vs FA: polyadenylic, polyuridylic acid (poly AU) chemoimmunotherapy for locally advanced gastric cancer after curative resection: an interim report. Proc Am Soc Clin Oncol. 10: 402, 1991*
 - 19) Birkedal-Hansen H, Taylor RE: *Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. Biochem Biophys Res Commun 107: 1173, 1982*
 - 20) Davis B, Wzxman J, Wasan H, Abel P, Williams G: *Levels of matrix-metalloproteinase in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. Cancer Res 53: 5365, 1993*
 - 21) Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Garbisu S: *Increased expression of the Mr. 72000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. Cancer Res 51: 439, 1991*
 - 22) Brown PD, Bloxidge RE, Stuart N SA, Gatter KC, Carmichael J: *Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst 85: 574, 1993*
 - 23) Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Sawaya R: *Elevated elvels of Mr 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. Cancer Res 53: 2208, 1993*
 - 24) 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 370: 61, 1994*
 - 25) Pyke C, Ralkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K: *Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenase in human skin cancers by in situ hybridization. Cancer Res 52: 1336, 1992*
 - 26) Pyke C, Ralfkaier E, Tryggvason K, Dano K: *Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. Am J Pathol 142: 359, 1993*
 - 27) Boag AH, Young ID: *Increased expression of the 72-kd type IV collagenase in prostatic adenocarcinoma. Demonstration by immunohistochemistry and in situ hybridization. Am J Pathol 144: 585, 1994*
 - 28) Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetlet-Stevenson WG: *Immunohistochemical distribution and type IV collagenase in normal benign and malignant breast tissue. Am J Pathol 136: 585, 1990*
 - 29) David L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simoes M: *Expression of laminin, collagenase IV, fibronectin, and IV collagenase in gastric carcinoma. Cancer 73: 518, 1994*
 - 30) Daidone MG, Silvestrini R, Derrico A: *Laminin receptors collagenase IV and prognosis in node negative brest cancers. Int J Cancer 48: 529, 1991*
 - 31) Davies B, Miles DW, Happerfield LC: *Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. Br J Cancer 67: 1126, 1993*
 - 32) Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: *Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinase. Anal Biochem 218: 325, 1994*
 - 33) Lee KS, Rha SY, Kim SJ, Chung HC, Kim JH, Roh JK, Kim BS: *Sequential activation and production of matrix-metalloproteinase-2 as breast cancer progresses. Breast Cancer Res Treat, submitted*