

## 방사선 조사가 인체 대장암세포주 HM7의 동종 세포 및 세포-기질 간 접착 특성과 Matrix Metalloproteinases 분비에 미치는 영향

충남대학교 의과대학 외과학교실

김혜경 · 김태동 · 리 혁 · 윤완희

### Effect of Ionizing Radiation on Homotypic Cell Adhesion, Cell-Matrix Adhesion, Matrix Metalloproteinases Excretion of High Mucin Producing HM7 Colon Cancer Cells

Hye-Gyong Kim, M.D., Tae-Dong Kim, Ph.D., Ge Li, M.D., Wan-Hee Yoon, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, Chungnam National University and Hospital, Daejeon, Korea

**Purpose:** To investigate the effect of ionizing radiation on high mucin-producing colon cancer cells, we evaluated homotypic cell adhesion, cell-matrix adhesion, and matrix metalloproteinases (MMPs) on HM7 cells. **Methods:** After an irradiation of 60 Gy for 48 hours on HM7 cells, we evaluated cellular proliferation, colony-forming ability, homotypic adhesion, cell-matrix binding, and integrin subunit expressions. Also, alterations of MMPs expression were analyzed by using zymography. **Results:** Cell proliferation of HM7 colon cancer cells was not remarkably affected even after high doses of radiation; however, clonogenic cell growth was significantly affected. Homotypic cell-cell adhesion and cell adhesion to ECM components and basement membrane protein matrigel were significantly increased after irradiation. Radiation induced expressions of cell surface integrin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\beta 1$  subunits of HM7 cells. The activities of secreted MMPs (MMP-9 and MMP-2) were remarkably inhibited by radiation. **Conclusions:** These findings suggest the biologic characteristics of high-mucin-producing colorectal carcinomas. Even though the radiation-associated cellular alterations of HM7 cells with or without matrix proteins were not remarkably different from other cancer cell types studied, the radio-resistant behavior of high mucin producing HM7 cells may explain the aggressive

characteristics of mucinous colorectal carcinomas. *J Korean Soc Coloproctol* 2006;22:153-161

**Key Words:** Colon cancer, Radiation, Adhesion molecule, MMPs

대장암, 방사선, 접착분자, MMPs

### 서 론

방사선요법은 직장암을 위시한 여러 고형종양의 근치적 또는 고식적 치료에 있어 매우 중요한 부분을 차지하고 있다. 방사선은 세포핵의 염색질에 영향을 미치고 세포 내 수분의 이온화를 통하여 탈수소화 효소를 생성하여 DNA의 손상을 유도해 그 치료효과를 보이게 된다. 만약 DNA 손상이 심각해 복구가 불가능하면 세포는 사멸에 이르게 되고 손상이 경미하다면 세포는 신속히 복구된다.<sup>1</sup>

경미한 세포 손상을 야기할 수 있는 저용량의 방사선은 세포 표면의 생화학적 변화를 유도해 integrin과 같은 접착분자의 발현을 증가시키며 세포와 세포외기질의 결합을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되어 있으며, 세포와 세포외기질과의 결합은 방사선에 의한 세포 생존을 증가시키는데 매우 중요하다고 알려져 있다.<sup>1-9</sup>

Integrin을 포함한 세포 표면 접착분자들은 세포골격

접수: 2005년 11월 24일, 승인: 2006년 6월 2일  
책임저자: 윤완희, 301-721, 대전시 중구 대사동 640번지  
충남대학교병원 외과  
Tel: 042-220-7180, Fax: 042-257-8024  
E-mail: whyoon@cnu.ac.kr

본 논문의 요지는 2004년 대한외과학회 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

Received November 24, 2005, Accepted June 2, 2006  
Correspondence to: Wan-Hee Yoon, Department of Surgery, Chungnam National University College of Medicine, 640 Daesa-dong, Jung-gu, Daejeon 301-721, Korea.  
Tel: +82-42-440-7180, Fax: +82-42-257-8024  
E-mail: whyoon@cnu.ac.kr

섬유(cytoskeletal filament), 세포 내부의 신호전달 분자(signal molecule), 기저막의 접착분자(adhesion molecule), 세포의 기질과 이웃한 세포 등과 밀접하게 연관되어 있고 세포 간의 상호작용, 의사소통, 신호전달, 세포이동, 단백질분해효소의 조절 등의 다양한 생물학적 변화의 조절에 중추적인 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.<sup>2,3</sup>

현재까지 여러 암세포들에서 방사선에 의한 접착 특성과 integrin 수용체 발현 등에 대해 많은 연구가 이루어져 왔으나 점액암과 같이 세포 표면에 매우 다양한 특성을 가지며 종양 내 간질 압력 등에 큰 영향을 미칠 수 있는 대장암 세포들에 대해서는 알려진 바가 거의 없는 실정이다.<sup>4,8</sup>

따라서 본 연구에서는 점액을 많이 분비하는 인체 대장암세포 HM7을 이용해 방사선 조사가 동종 세포 간 세포 결합, 세포와 기질 단백질과의 결합, 세포 표면의 integrin subunits의 발현, matrix metalloproteinases (MMPs) 분비 등에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

## 방 법

### 1) 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용된 HM7 세포주(미국 캘리포니아대학, 샌프란시스코, 위장관연구소 제공)는 분화된 인체 대장암세포에서 배양된 점액분비 세포주인 LS174T를 모세포로 하여 replica plating, immuno-screening 방법으로 다량의 점액을 분비하는 세포를 선택해 수립한 것으로 모세포에 비해 약 2배의 점액을 생성, 분비하는 것으로 알려져 있으며 nude mice에 피하 주사 시 종양을 형성한다.

HM7 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100µg/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건의 배양기에서 배양하였다.

### 2) 방사선조사 및 세포 증식을 분석

96 well plate에 배양된 HM7 세포 10<sup>3</sup> cells을 각 well에 첨가한 뒤 <sup>137</sup>Cs laboratory irradiator (model 143; J. L. Shepherd & Associates, San Fernando, CA)를 이용하여 분당 5 Gy의 용량으로 하루에 30 Gy씩 2일간 조사해 총 60 Gy의 방사선을 조사한 후 실험에 사용하였다.

방사선에 의한 HM7 세포의 생존율과 증식 억제율을 알아보기 위해 MTS 기법을 이용하여 방사선을

조사한 3일째, 5일째, 7일째 490 nm에서의 흡수율을 읽어 세포수를 측정하였으며 방사선을 조사하지 않은 세포를 대조군으로 하였다.

### 3) MTS 분석

MTS 분석법은 살아있는 세포를 정량화하는 방법으로 Promega사(Madison, WI)의 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Assay를 이용하였으며 이는 novel tetrazolium compound인 MTS와 electron coupling reagent인 phenazine methosulfate (PMS)를 사용하는 것으로 용해성의 formazan 산물로 최종 환원된 것을 490 nm 파장의 분광비색계로 측정하였다.

### 4) Matrigel 집락 형성 분석

Colonogenic cell growth를 살펴보기 위해 방사선 조사 후의 HM7 세포를 이용해 matrigel 위에서 집락 형성 정도를 살펴 보았다.

Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA)은 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse 육종에서 추출한 수용성 기저막제제로 주성분은 laminin, collagen type IV, heparan sulfate, proteoglycan, entactin, nidogen 등이다.

4°C 용해된 Matrigel 200µl를 12-well plate의 각각의 well에 넣은 후 각각의 plate는 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. HM7 세포를 10<sup>4</sup> cells/well로 첨가하고 37°C에서 6일간 배양한 후 각각의 plate에서 diameter가 0.25 mm보다 큰 집락을 선택해 100 mm<sup>2</sup> 이내에서의 집락의 수를 검경 계수하였다.

### 5) 동종 세포간 응집력 분석

지수기에 있는 세포들을 trypsin에 수분동안 노출시켜 탈락시킨 후 10% FBS가 함유된 배양액으로 세척한 후 무혈청 배양액을 사용하여 10<sup>6</sup> cells/ml의 현탁액을 만들고 6-well plate의 각 well에 1 ml의 세포 현탁액을 첨가해 30분간 배양한 후 광학현미경을 이용해 단일 세포와 응집된 세포의 수를 비교 관찰하였다.

### 6) 세포-기질 결합능 분석

결합능 분석을 위하여 96-well plate의 각 well을 8µg/well의 fibronectin, collagen type I, collagen type IV, laminin으로 전처리하였다. 전처리한 well에 방사선을 조사한 실험군과 방사선을 조사하지 않은 대조군의 HM7 세포를 2시간 배양하였다. 배양 후 각 well은 무혈청 배지로 조심스럽게 세척하고 각 기질 단백질에 부착한 세포의 수를 MTT 분석법으로 판독하였다.

**7) MTT (tetrazolium-based semiautomated colorimetric) 분석**

MTT 분석법은 살아있는 세포의 미토콘드리아의 탈수소효소에 의해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, St. Louis, MO]가 세포 내에서 청색의 formazan 결정으로 환원되고 이의 광학농도를 측정하여 세포의 수를 정량화하는 방법이다. 96-well plate의 각 well에 25µg의 MTT를 첨가하여 37°C에서 3시간 배양한 후 상층액을 흡인하고 각 well에 dimethyl-sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 약 20분간 진탕해 용해시키고 이를 540 nm 파장에서 ELISA 분광비색계로 측정하였다.

**8) Matrigel 결합능 분석**

96-well plate의 각각의 well에 matrigel 6µg, 또는 1% BSA/PBS 20µl를 첨가하고 37°C에서 2시간 배양한 후 무혈청 배양액으로 세척하고 100µl (10<sup>6</sup> cells/ml)의 세포 현탁액을 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 배양 후 각 well은 무혈청 배지로 조심스럽게 세척하고 matrigel에 부착된 세포의 수를 MTT 분석법으로 판독하였다. 결과는 matrigel과 특이결합을 한 세포양에 대한 흡광도에서 1% BSA/PBS에 비특이 결합을 한 세포의 흡광도를 뺀 값을 세척하지 않은 well (10<sup>6</sup> 세포)의

흡광도로 나누어 %로서 결합능을 표시하였다.

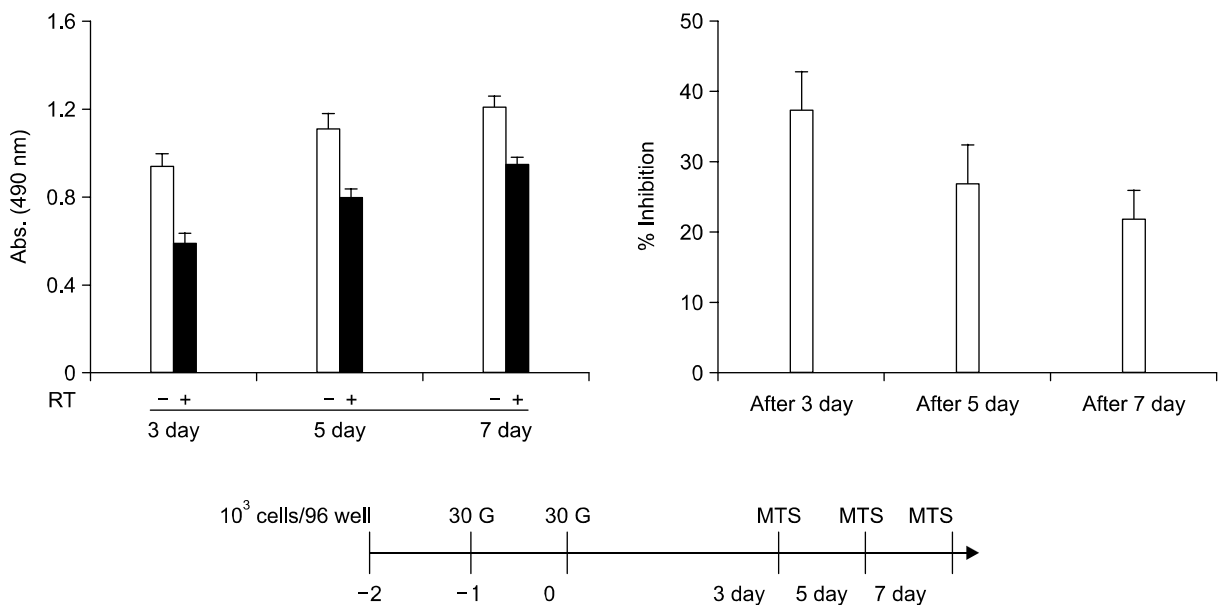
**9) Flow cytometry**

접착분자 중 세포와 세포의 기질사이의 결합에 중요한 역할을 하는 세포 표면의 integrin의 특성을 규명하기 위해 실험군과 대조군의 세포를 각각 trypsinize 한 뒤 PBS로 세척하고 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA)의 α, β integrin subunit에 대한 단클론항체[anti-human antibody α2 (PIH5), α3 (PIB5), α5 (SC-13547), β1 (P5D2)]를 이용하여 CellQuest software를 사용한 FACSCalibur flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA)로 integrin α2, α3, α5, β1의 발현의 차이를 분석하였다.

**10) MMP-2, MMP-9의 분석**

실험군과 대조군에서의 MMP-2와 MMP-9의 활성은 gelatin zymography를 이용하여 분석하였다.

세포를 제거한 무혈청 배양액(conditioned medium)을 Centricon-10 concentration device (Amicon Corp., Beverly, MA)로 10배 농축시키고 농축된 배양액 속의 단백질은 1 mg/ml의 gelatin (Fisher Chemical Co., Fair Lawn, NJ)이 함유된 10% polyacrylamide gel에서 분리시켰다. 전기영동이 끝나면 2.5% triton-X 100으로 세척하고 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 8.0의 반응액에 3일 반응시켰다. 농축된 배양액 속의



**Fig. 1.** Effect of radiation on the proliferation of HM7 colon cancer cell. 10<sup>3</sup> cells of HM7 were plated in 96 well containing DMEM with 10% FBS. After irradiation with 60 Gy, cell viability was assessed at the indicated time by the MTS assay. Results are presented as mean±SD of three independent experiments. RT = radiation; - = control group; + = radiation group; Abs. = Absorbance.

gelatin 분해효소는 각각의 특징적인 분자량에서 gelatin을 용해하여 gel을 coomassie brilliant blue R250으로 염색하였을 때 탈색되어 나타나게 된다.<sup>10</sup>

MMP-2, MMP-9 활성이 증가되어 있는 HT1080 섬유육종 세포를 이용하여 MMP-2, MMP-9 활성을 대조하였다.

11) 통계 분석

결과는 평균±표준편차로 표시하였고 유의성 검증은 Student's t test로 하였으며 P<0.05 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1) 방사선조사가 HM7 세포증식에 미치는 영향

HM7 대장암세포는 30 Gy 이하의 방사선 조사로는 세포 증식에 거의 영향을 받지 않았다. 반면 60 Gy의 방사선을 조사하고 배양한 후 3일째의 세포수는 대조군에 비해 62%로 현저히 감소되었다. 그러나 시간이 지남에 따라 세포 증식능이 점차 회복되었으며, 증식 억제율은

배양 3일째 대조군의 38%, 5일째 27%, 7일째 22%로 시간이 지남에 따라 세포 증식 억제율이 점차 감소되어 방사선 손상으로부터 회복되는 양상을 보였다(Fig. 1).

2) 방사선조사가 HM7의 Matrigel 집락형성에 미치는 영향

6일 배양한 후 직경 0.25 mm 이상이 되는 집락의 수를 면적 200 mm<sup>2</sup> 내에서 검경 계수한 결과 대조군의 집락수는 20.5개였으며 방사선 조사군은 4.9개로 대조군에 비해 76.1%가 감소되어 매우 의미있는 변화를 보였다(P<0.0001). 따라서 방사선 조사는 HM7 세포의 시험관 내 증식률보다 세포 집락 형성을 더욱 억제시키는 것으로 판단되었다(Fig. 2).

3) 동종 세포간 응집력 분석

세포 증식 실험에는 배양 용기 내에 세포의 기질성분을 첨가하지 않았으나 colony 형성 실험에는 기질단백인 matrigel을 포매하였으며 따라서 동종세포간 접촉 뿐 아니라 세포와 기질단백간의 결합이 colony 성장에 중요한 요소로 작용할 수 있다고 판단되어 동종

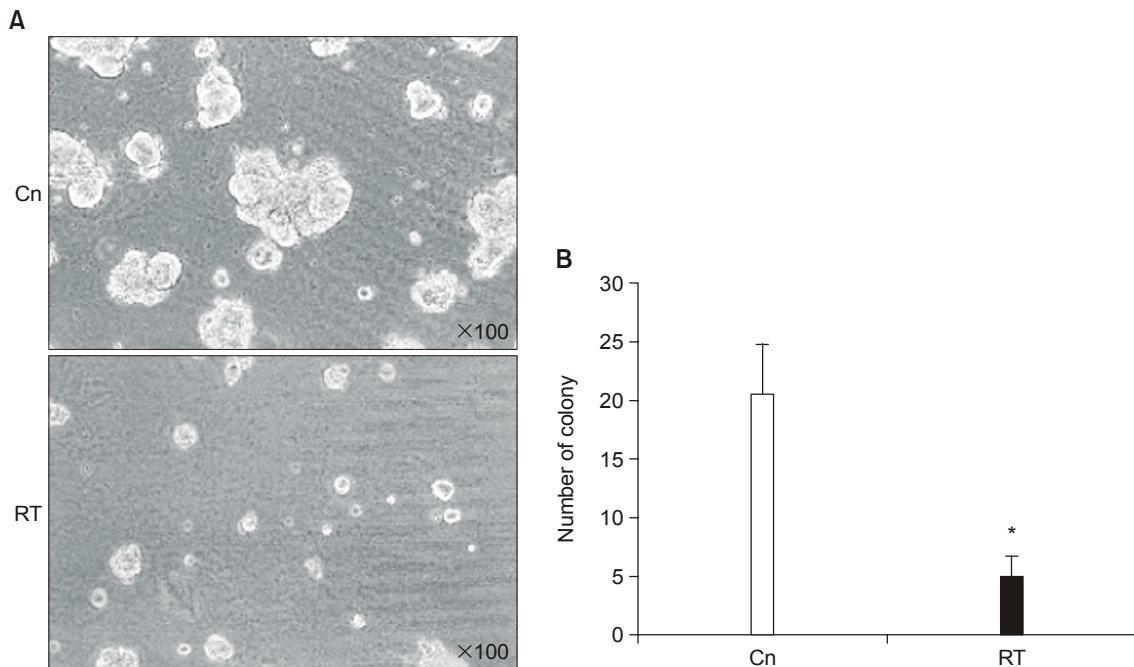


Fig. 2. Effect of radiation on colony formation of HM7 colon cancer cell in Matrigel. HM7 colon cancer cells were treated with (RT) or without 60 Gy of irradiation (Cn). Thereafter the cells were trypsinized and seeded at a density of 10<sup>4</sup> cell/well in 12 well plates coated with matrigel. After 6 days of culture, colonies were seen with microscope and counted. (A) Representative photographs of colony were shown. (B) The number of colonies in the plates, which were larger than 0.25 mm in diameter, was counted. The counting was done in five randomly selected areas per well, and the total number of colonies in a well was determined. \*P<0.0001.

세포간 접촉과 세포 기질단백과의 결합에 대한 영향을 살펴보았다.

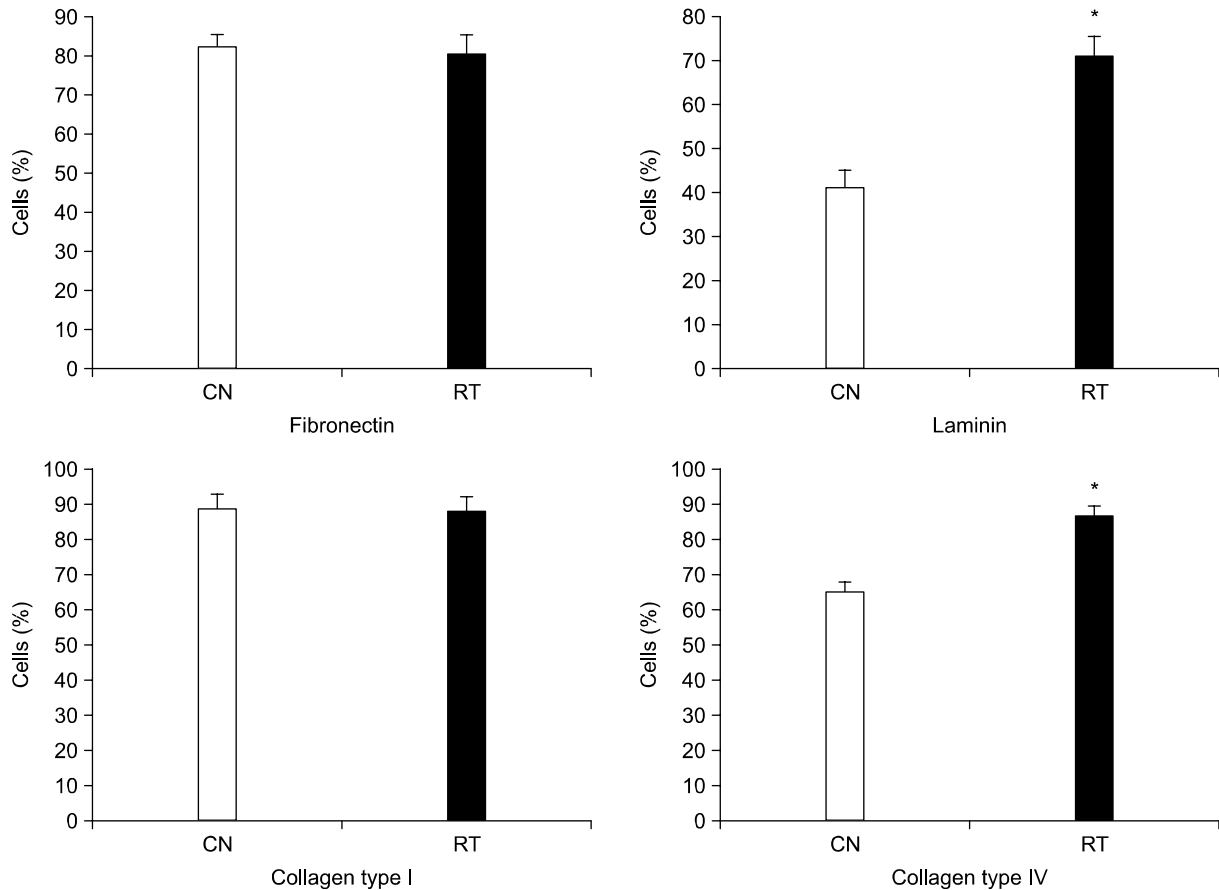
먼저 HM7 동종 세포간 결합능을 알아보기 위해 6-well plate를 이용한 응집력 분석을 시행하였다. Trypsinize한 후 조사군에서 단일세포 수는 36.5±6.0, 2개는 24.4±5.9, 3개는 11.3±4.3, 4개는 8.3±1.7, 5개 이상은 19.5

±4.1로 나타나 대조군의 64.9±6.7, 17.4±6.2, 7.7±3.9, 3.6±1.9, 6.4±2.9과 비교해 단일 세포수는 0.56배 (P<0.0001), 2개의 세포 응집은 1.40배, 3개는 1.47배, 4개는 2.31배(P<0.01), 5개 이상은 3.05배(P<0.0001)로 대조군에 비하여 응집세포수가 조사군에서 의미있게 증가하였음을 알 수 있었다(Table 1).

**Table 1.** Aggregation assay of HM7 colon cancer cells with or without radiation (30 G, twice)

HM7 cell	Aggregated cell number				
	1	2	3	4	5 or more
Control	64.9±6.7	17.4±6.2	7.7±3.9	3.6±1.9	6.4±2.9
RT	36.5±6.0*	24.4±5.9	11.3±4.3	8.3±1.7 <sup>†</sup>	19.5±4.1 <sup>‡</sup>

The amount of aggregation was represented by the % of each cell in high power microscopic field (number of each cell/total number of cells in HPF ×100). Data are mean±SD of one representative three repeat experiments. \*P<0.0001; <sup>†</sup> P<0.01; <sup>‡</sup> P<0.0001.



**Fig. 3.** Cell-matrix protein binding assay. HM7 colon cancer cells were treated with (RT) or without 60 Gy of irradiation (CN). The cells were trypsinized and seeded at a density of 10<sup>6</sup> cell/ml in 96 well plates coated with fibronectin, laminin, collagen type I and collagen type IV. Cell-matrix protein binding was determined by MTT assay. The amount of adhesion was represented by the % of each cell in high power microscopic field [number of each cell/total number of cells in HPF (×100)]. Results of representative experiments are given as mean±SD. \*P<0.0001.

4) 세포의 기질단백에 대한 세포 접착의 변화

세포와 세포의 기질 단백질과의 결합에 대한 방사선의 영향을 알아보기 위해 방사선 조사 후 세포와 세포의 기질 단백질과의 결합 실험을 하였다.

Fibronectin에 대한 접착의 경우에는 대조군과 방사선 조사군에서 각각 82.3%, 80.6%으로 유의한 차이가 없었으며 collagen type I도 88.4%, 88.2%로 유의한 차이가 없었다.

그러나 laminin에 대한 접착의 경우에는 대조군과 방사선 조사군에서 각각 41.4%, 70.8%로 방사선 조사군에서 1.72배 의미있게 증가하였다( $P < 0.0001$ ). 또한 collagen type IV도 대조군과 방사선 조사군에서 각각 65.1%, 86.4%로 대조군에 비해 방사선 조사군에서 발현이 1.33배 높은 것으로 나타났다( $P < 0.001$ , Fig. 3).

기저막의 혼합성분인 matrigel에 대한 결합은 대조군이 59.7%, 실험군이 85.1%로 역시 방사선 조사군에서 의미있게 증가하였다( $P < 0.0001$ , Fig. 4).

5) Integrin subunits의 분석

세포의 기질에 대한 암세포의 결합은 암세포 표면에 존재하는 integrin에 의하여 integrin  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits의 조합에 의하여 기질성분을 인지하고 특이적 접착을 하는 것으로 알려져 있다.

앞서 실험한 결과에 의하면 방사선 조사는 기질 단

백 중 laminin, collagen type IV에 대한 결합은 증가시키며, 반면 fibronectin, collagen type I에 대한 결합에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었으며 이러한 차이는 방사선에 의한 integrin  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits의 변화일 수 있기 때문에 각각의 항체를 이용하여 flow cytometry를 이용하여 분석하였다.

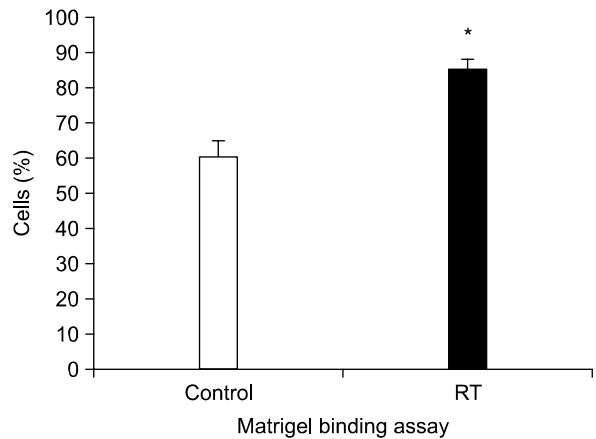


Fig. 4. Matrigel binding assay. HM7 colon cancer cells were treated with (RT) or without 60 Gy of irradiation (Control). The cells were trypsinized and seeded at a density of  $10^6$  cell/ml in 96 well plates coated with matrigel. Cell-matrigel binding were determined by MTT assay. The amount of adhesion were represented by the %. Results are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments. \* $P < 0.0001$ .

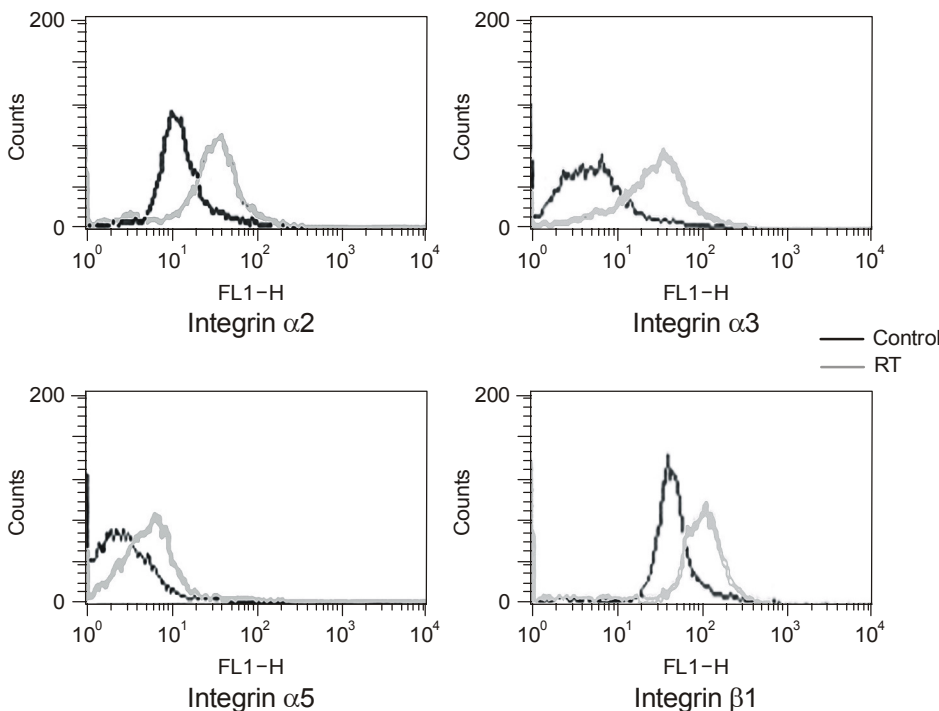
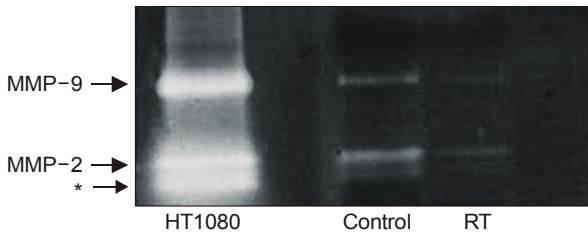


Fig. 5. Effects of RT on integrin subclass of HM7 cells. HM7 colon cancer cells were treated with (RT) or without 60 Gy of irradiation (Control). Thereafter the cells were incubated for 24 hours. After being dissociated and stained with antibodies of anti-integrin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  and then with second FITC antibody. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde. Flow cytometry measurements were performed by flow cytometer.



**Fig. 6.** Effect of radiation on MMP activities of tumor cells gelatin zymography. HM7 cells ( $2 \times 10^6$  cells) were plated in 100 mm<sup>2</sup> dishes. After 24 hours, cells were washed and changed with serum-free media and then irradiated with 60 Gy (RT) or non-irradiated (Control). Conditioned media were collected. Proteins in the conditioned media were separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gel impregnated with 1 mg/ml gelatin under nonreducing conditions. After electrophoresis, gels were cut and washed twice in 2.5% Triton X-100 for 30 min and then incubated for 72 hours at 37°C to allow proteolysis. Gels were then stained with Coomassie Blue G-250. Activities of MMP-2 and MMP-9 were decreased by irradiation in HM7 colon cancer cell. HT1080 cells were used as positive control for MMP-2 and MMP-9. \*Activated form of MMP-2 were also seen in HT1080 and control HM7 conditioned media just below the pro-MMP-2.

실험 결과 대조군에 비해 방사선 조사군에서 integrin α2, α3, β1의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

### 6) MMP-2, MMP-9 활성 분석

방사선 조사가 HM7 세포에서 분비되는 MMP-2, MMP-9 효소활성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 gelatin zymography를 시행하였다.

60 Gy의 방사선을 조사한 후 HM7 세포의 무혈청 배지를 생존 세포수로 보정하고 zymography를 시행하였는데 대조군에 비해 방사선 조사군에서 MMP-9와 MMP-2의 효소활성이 모두 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

## 고 찰

방사선요법은 직장암을 위시한 여러 고형종양의 근치적 또는 고식적 치료에 중요한 부분을 담당하고 있다. 방사선은 세포 표면의 생화학적 변화를 유도해 integrin과 같은 접착분자의 발현을 증가시키며 세포와 기질의 결합을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되고 있으며 세포와 세포의 기질과의 결합은 방사선에 대한 세포 생존을 증가시키는데 매우 중요하다고 알려져

있고 또한 세포의 증식, 이동, 단백질분해효소의 조절 등 다양한 생물학적 변화의 조절에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>1-9</sup>

본 연구에서는 다량의 점액을 분비하는 인체 대장암세포 HM7에서 방사선 조사에 의한 동종 세포간 및 세포-기질 단백질간의 접착 특성의 변화와 integrin의 변화를 검색하고, matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) 등에 미치는 영향을 알아보았다.

HM7 대장암세포는 많은 방사선 조사량에도 불구하고 세포 증식은 큰 영향을 받지 않고 시간이 지남에 따라 방사선 손상에서 회복되었으나 집락 형성능은 대조군에 비해 76.1%가 감소되어 현저한 영향을 받았다. 세포 증식 실험에서는 배양 용기 내에 세포의 기질 성분을 첨가하지 않았으나 집락 형성 실험에는 기질 단백질인 matrigel을 포매하였으므로 동종세포간 접착 뿐 아니라 세포와 기질단백간의 결합이 집락 성장에 중요한 요소로 작용할 수 있다고 판단되어 동종세포간 접착과 세포 기질단백과의 결합에 대한 영향을 살펴보았다. 방사선 조사군에서 동종 세포간 응집이 대조군에 비해 증가하였으며 기저막 성분인 matrigel과 laminin, collagen type IV에 대한 접착도 유의하게 증가한 것을 볼 수 있었다.

이러한 세포의 기질에 대한 암세포의 결합은 주로 암세포 표면에 존재하는 접착분자에 의한다. 접착 분자에는 integrin, cadherin, selectin, Ig superfamily 등이 있으며 세포 기질간의 결합에 관여하는 것은 주로 integrin이다. Integrin은 16개의 α subunits과 8개의 β subunits으로 구성된 결합단백이며 세포와 기질, 세포와 세포의 접착에 관여한다. β subunits이 기질이 결합되는 부위이며 α, β의 조합에 따라서 기질 성분을 인지하고 특이적 접착을 하는 것으로 알려져 왔다. β1, β3는 주로 세포와 기질의 상호작용에 관여하며 β2는 세포와 세포간의 접착에 관여하고 β1은 fibronectin, von Willebrand factor, thrombospondin, vitronectin과 같은 결합조직 거대분자와의 접착에 관여한다. Integrin의 몇몇은 기질 단백질이나 세포 표면의 짧은 아미노산 서열을 인지하는 데 필요한데 예를 들어 α5β1은 fibronectin의 arginine-glycine-aspartate-serine tetrapeptide에 접착한다. α, β의 조합에 따라서 α2β1, α3β1은 collagen, fibronectin, laminin에 접착하고 α5β1은 fibronectin에 주로 결합한다(Table 2).<sup>2,3</sup> 따라서 방사선 조사군에서 동종 세포간 응집이 대조군에 비해 증가하고 기저막 성분인 matrigel과 laminin, collagen type IV에 대한 접착도 유의하게 증가한 것은 방사선에 의한 integrin

Table 2. Ligand of integrin heterodimers

Ligand	$\beta$ subunit	$\alpha$ subunit
Collagen I	1	1, 2, 3
Collagen IV	1	1, 2
Laminin	1	1, 2, 3, 6
Fibronectin	1	3, 5, V
	3	IIb
Vitronectin	3	IIb, V
	5	V
Basement membrane	4	6

Integrin adhesion molecules are heterodimers, each integrin consists of one  $\alpha$  and one  $\beta$  component.

$\alpha$ ,  $\beta$  subunits의 변화일 수 있기 때문에 각각의 항체를 이용하여 flow cytometry로 분석하였고 integrin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ 의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

Handschel 등<sup>5</sup>과 Hilderandt 등<sup>7</sup>도 방사선이 포유류 세포에서 E-selectin과 ICAM, integrin의 발현을 증가시킨다고 보고한 바 있으며 Meineke 등<sup>6</sup>은 방사선을 받은 COLO-320 세포에서 integrin의 발현이 증가된다고 보고하였고 Gaugler 등<sup>8</sup>은 방사선이 인체 상피 세포에서 접착 분자의 발현을 증가시킨다고 하였다. 또한 Kennemann 등<sup>9</sup>도 Ewing 종양에서 방사선에 의한 접착 분자의 발현에 대해 보고한 바 있다.

암세포가 전이와 침투의 복잡한 과정을 이루기 위해서는 기저막에 접착해야하고 혈관생성을 이루어져야 한다. 이 과정에서 기저막 침투는 가장 중요한 단계 중의 하나이며 이 과정에는 단백 분해효소가 필요하다. 혈관 생성은 종양의 성장과 성공적인 침투, 전이에 필수적이며 혈관 생성을 위해서는 기존의 혈관으로부터 혈관내피의 증식이나 세포의 기질의 파괴, 내피의 이동이 필요하다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 이러한 모든 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. MMPs 중 전이와 침투에 가장 관련있다고 알려진 효소로는 MMP-2와 MMP-9이다.<sup>10</sup> 다른 연구에서 MMP-2는 대장직장암의 전이와 관한 mouse model에서 실험적으로 전이에 기여한다고 보고하였으며 대장암 세포에서 발현이 증가되어 있다고 알려져 있다. 또한 MMP-9는 대장암 세포의 전이능, 재발, 생존율 감소와 연관되어 있다고 알려져 있다.<sup>11</sup> 본 실험에서 방사선이 MMP-2, MMP-9의 발현을 모두 감소시키는 것을 알 수 있었다.

## 결 론

다량의 점액을 분비하는 인체 대장암세포 HM7은 많은 방사선 조사량에도 불구하고 세포 증식은 큰 영향을 받지 않았고 시간이 지남에 따라 방사선 손상에서 점차 회복되나 colony 형성능은 현저한 영향을 받았으며 이는 방사선에 의한 HM7 동종 세포간 결합력의 증가와 세포와 기질단백인 matrigel, laminin, collagen type IV과의 결합력 증가가 한가지 원인이 될 수 있으리라 추정되었고 또한 방사선에 의한 세포와 matrigel, laminin, collagen type IV 등 기질 단백질과의 결합 증가의 원인은 세포 표면의 integrin  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  subunits의 증가가 관여되리라 추정되었다. 한편 방사선 조사는 HM7 세포에서 분비되는 MMP-2, MMP-9 효소 활성을 현저히 억제시켰다.

이러한 결과들은 점액성 대장암의 방사선 생물학적 특성을 일부 규명한 것이다. 비록 HM7의 방사선과 연관된 세포학적인 변화가 이미 연구된 다른 암종류와 크게 다르지 않게 나타났지만 점액성 대장암세포의 침습적인 특성을 일부 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Meyn RE. Apoptosis and response to radiation: implications for radiation therapy. *Oncology* 1997;11:349-56.
- Lukas Z, Dvorak K. Review article adhesion molecules in biology and oncology. *Acta Vet Brno* 2004;73:93-104.
- Saiki I. Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:215-42.
- Behrens J, Birchmeier W. Cell-cell adhesion in invasion and metastasis of carcinoma. *Cancer Treat Res* 1994; 71:251-66.
- Handschel J, Prott FJ, Sunderkotter C, Metze D, Meyer U, Joos U. Irradiation induce increase of adhesion molecule and accumulation of  $\beta 2$ -integrin-expressing cells in humans. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:475-81.
- Meineke V, Gilbertz KP, Schilperoord K, Cordes N, Sandler A, Moede T, et al. Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression and adhesion of COLO-320 cells to collagen and fibronectin in vitro. *Strahlenther Onkol* 2002;178:709-14.
- Hildebrandt G, Maggiorella L, Rodel F, Rodel V, Willis D, Trott KR. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2002;78:315-



- 25.
8. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, Mouthon MA. Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 1997;72:201-9.
9. Konemann S, Bolling T, Schuck A, Malath J, Kolkmeier A, Horn K, et al. Effect of radiation on Ewing tumour subpopulations characterized on a single-cell level: intracellular cytokine, immunophenotypic, DNA and apoptotic profile. *Int J Radiat Biol* 2003;79:181-92.
10. Yoon WH, Jung YJ, Kim TD, Li G, Park BJ, Kim JY, et al. Gabexate mesilate inhibits colon cancer growth, invasion, and metastasis by reducing matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10:4517-26.
11. Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:119-35.
-