대한외과학회지 : 제60권 제1호
Vol. 60, No. 1, January, 2001

□ 원 저 □

위암에서 Cyclooxygenase와 Nitric Oxide Synthase 발현과 혈관신생 인자와의 관계에 대한 연구

동아대학교 의과대학 외과학교실, [1]생화학교실

이익룡 · 김민찬 · 김형호 · 최홍조 · 김영훈 · 조세헌 · 정갑중 · 김상순 · 김원진[1] · 곽종영[1]

Study in the Relationship between Angiogenic Factor and Expression of Cyclooxygenase and Nitric Oxide Synthase in Gastric Cancer

Ik Ryong Lee, M.D., **Min Chan Kim,** M.D., **Hyung Ho Kim,** M.D., **Hong Jo Choi,** M.D., **Young Hoon Kim,** M.D., **Se Heon Cho,** M.D., **Ghap Joong Jung,** M.D., **Sang Soon Kim,** M.D., **Won Jin Kim,** M.S.[1] and **Jong Young Kwak,** M.D.[1]

Purpose: Secretion of angiogenic factors from tumor cells is know to play an important role in neo-vascularization and metastasis. However, which angiogenic factor is related with the formation of neo-vasculature in gastric carcinomas is not well known. This study was performed to observe changes in the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase (COX), and nitric-oxide synthase (NOS).

Methods: Expressions of VEGF, COX, and NOS in thirty specimens resected from patients with a gastric carcinoma were investigated using the western blot method. Cultured MKN28 gastric cancer cells were treated with 100 ng/ml VEGF, and changes in the expression of COX and NOS were examined. Changes in VEGF expression were also investigated after treatment of the cells with inhibitors of COX and NOS.

Results: Expressions of VEGF, COX, and eNOS were increased up to 10, 60, and 30%, respectively, in tumors compared to surrounding normal tissues. VEGF-positive tumors showed a higher expression of COX-2. Human recombinant VEGF induced the expression of COX-2, but not eNOS, in the cultured MKN28 cells. The increase in expression was blocked with actinomycin D, the VEGF antibody, and anti-VEGF peptide. VEGF-induced expression of COX-2 was also blocked by pretreatment of cells with aspirin and indomethacin, suggesting that these anti-inflammatory drugs inhibit VEGF. The expression of eNOS was decreased by indomethacin in VEGF-treated cells, but COX-2 expression was not affected by inhibitors of NO production, N-arginine methylester (NAME). However, the protein level of VEGF was increased by indomethacin and NAME.

Conclusion: This study showed that COX-2 and eNOS in gastric carcinomas seem to play an important role in the production of VEGF and that their expressions may also be affected by VEGF. **(J Korean Surg Soc 2001;60:47-54)**

Key Words: Gastric cancer, Angiogenesis, Cyclooxygenase, Vascular endothelial growth factor, Nitric oxide synthase

중심 단어: 위암, 혈관신생, 사이크로옥시제나아제, 혈관내피세포성장인자, 아산화질소 합성효소

Departments of Surgery and [1]Biochemistry, Dong-A University College of Medicine, Pusan, Korea

서 론

한국인 암 환자에서 위암은 그 빈도가 매우 높을 뿐 아니라 위암에 의한 사망이 제 1위를 차지하고 있다.*(1)* 종양의 성장과 전이에 관한 연구보고에서 혈관신생이 종양의 성장, 전이 및 예후에 중요한 역할을 한다.*(2)* 위암에 대한 최근의 연구에 의하면 혈관신생의 정도와 종양의 재발과 예후에는 상관관계가 있다고 한다.*(3)*

종양에서 혈관신생을 일으키는 인자로서 현재까지 basic fibroblast growth factor (bFGF)와 vascular endothelial growth factor (VEGF)가 가장 유력하게 거론되고 있다.*(4,5)* 그러나 혈관생성을 촉진하는 혈관신생인자의 역할은 종양의 혈관형성 표현형(angiogenic phenotype)으로 이행되기 위한 필요 조건이나 충분 조건은 될 수 없다. 따라서 혈관신생에 관여하는 또 다른 인자들이 관여하거나 이들 인자들간에 상호작용으로 혈관생성이 촉진되리라고 추측할 수 있다.

Prostaglandin의 생성은 arachidonic acid에서 cyclooxyge-

책임저자 : 김상순, 부산시 서구 동대신동 3가 1
㉾ 602-715, 동아대학교병원 일반외과학교실
Tel: 051-240-5146, 5147, Fax: 051-247-9316
E-mail: sskim@daunet.donga.ac.kr

접수일 : 2000년 11월 21일, 게재승인일 : 2000년 12월 4일

nase (COX)의 작용에 의해 이루어지는데 두 종류의 COX가 클론되었다. COX-1은 어떠한 자극도 받지 않는 상태에서도 존재하여 효소 작용을 나타내나 COX-2는 그 발현이 매우 빠르며(immediate-early gene) 발암촉진제인 phorbol ester 등에 의하여 유도된다.*(6)* COX-1에 의하여 생성된 프로스타노이드는 위의 점막세포 방어, 신장의 혈관확장과 혈소판에서 트롬복산 생성에 관여하고 COX-2는 염증반응, 배란 및 발암과 관계가 있다고 알려져 있다.*(6)* COX-2가 암의 성장에 관여하는 기전으로 제기되는 것은 생성된 프로스타노이드가 성장과 분화, 면역억제 및 혈관신생에 관여하는 것과 관련이 있는 것이다.*(7,8)* 그러나 위암의 발생에 프로스타글란딘의 생성이 중요하다는 것은 제시하고 있으나 COX-2의 발현 증가가 위암 발생과 어떠한 관계가 있는가는 설명하지 못하였다. 최근 암의 진행에 대한 혈관신생인자의 증가와 관계하여 새로운 흥미로운 사실이 발견되었는데 Dubois 연구진은 COX-2를 발현시킨 대장암세포 중에서 혈관신생인자가 분비되고 혈관내피세포를 증식시킨다고 하였다.*(9)*

Nitric oxide synthase (NOS)에 의하여 기질인 L-arginine에서 생성된 nitric oxide (NO)는 신경전달 물질로 작용하거나 혈관 확장 및 점막의 면역에 관여하는 물질이다. 최근 위점막 세포에서 NOS가 발현된다는 것이 밝혀졌고 NOS는 상부 위점막보다 하부 1/3에서 주로 발현되었다.*(10)* 종양의 생성과 성장에서 NO의 역할은 아직 명확하지는 않으나 위암의 경우에는 유익하거나 유해한 영향을 모두 나타내는 것으로 보고 있다.*(11)* 즉 NO가 종양세포를 파괴시켜서 인체 면역 능력을 증가시키기도 하고 세포의 증식을 억제하고 분화를 유도하기도 한다. 또한 NO는 혈관 신생을 유도함으로써 종양성장을 촉진하기도 한다. 그러나 위암에서 NO가 혈관생성 및 그 인자들의 발현에 어떠한 영향을 주는 가에 대하여는 알려진 바가 거의 없다.

위암에서 VEGF의 발현은 대부분 암세포 내에서 증가한다.*(12)* VEGF 발현이나 VEGF에 의한 영향을 조사하는 방법으로는 분리된 암세포를 이용하여 연구하는 것이 가장 이상적일 것이다. 본 연구에서는 동아대학교 병원 일반외과에서 위암으로 진단을 받고 수술한 환자 30예에서 종양조직을 채취하여 혈관신생에 관여한다고 알려진 VEGF, COX 및 NOS의 발현 정도를 측정하고 이들의 상관관계를 알기 위하여 위선암 세포주인 MKN28 세포에서 이들의 발현을 연구하였으며 항염증 약물에 의한 VEGF, COX 및 NOS의 발현을 연구하였다.

방 법

1998년 6월부터 1999년 6월까지 진행성 위암으로 동아대학교병원 일반외과에서 근치적 위절제술을 받는 30예의 환자로부터 채취한 조직을 이용하였다. 모든 연구 대상의 종양 조직은 우선 Hematoxylin-Eosin로 염색된 조직표본을 재검토하여 선암임을 다시 확인하였다.*(13)*

1) 수술 후 조직의 처리

암 조직 부위와 정상 주위 조직을 각각 같은 환자에서 적출하여 즉시 −70°C에서 냉각 보관하고 일부는 병리조직 검사를 시행하였다.

2) 조직의 처리

적출한 뒤 냉동 보관한 정상 및 암 조직 (1 g)은 단백질 분해효소 억제제(1 μg leupeptin, 1 μg pepstatin A, 1 μg aprotinin 및 1 mM PMSF)가 첨가된 0.5 ml의 세포용해 완충액(1% Triton X-100, 1% cholic acid, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에서 조직분쇄기(Ultra-Turrax T25, IKA-Labor Technik사)를 이용하여 30초간 3회 분쇄하였다. 이하 모든 조직의 처리는 4°C 하에서 시행하였다. 분쇄 후 다시 호모게나이저를 이용하여 4~5회 처리한 다음 1시간 동안 방치하였다. 파괴된 조직 및 세포를 함유하는 용액을 4°C 상태에서 Eppendorf microfuge를 이용하여 16,000×g로 10분간 원심분리하여 핵 성분, 파괴되지 되지 않은 세포 및 조직성분 등을 침전시키고 상층액을 얻었다. 이 시료들의 단백질 양을 측정한 다음 전기영동에 이용하였다. 단백질 측정은 소혈청 알부민을 기준시료로 하여 BCA방법으로 측정하였다.

3) MKN28 세포배양

위암세포주 MKN28 세포는 한국세포주 은행(KTCC)으로 부터 구입하여 배양하였다. Dulbeco's modified eagles medium (DMEM)에 10% 소혈청, 100 U/ml 페니실린, 100 U/ml 스트렙토마이신 및 10 mM sodium bicarbonate를 첨가하였다. 100 mm 원형플라스크에 2.5×10^5 cells/cm^2의 세포를 분주하고 상기의 DMEM 배양액에 실험에 필요한 시약을 첨가한 다음 5% CO_2와 37°C 하에서 배양하였다. 세포는 3~4일 마다 계대 배양하고 계대 배양 5일 후에 VEGF (100 ng/ml) 등의 약물을 처리하였다. 약물을 투여한 다음 2시간 후부터 24시간 동안 배양하였다. 일부 실험에서는 약물처리 12시간 전에 소혈청이 들어 있지 않은 배양액으로 처리한 다음 약물을 처리하였다. 배양된 세포가 들어 있는 플라스크는 인산염 완충액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 및 1.4 mM KH_2PO_4, pH 7.3)으로 3회 세척하고 2 ml의 trypsin/EDTA를 넣고 5분간 처리하여 세포를 분리한 다음 여기에 10 ml의 인산염 완충액을 넣고 800×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 분리하였다.

4) 세포의 처리

약물 처리한 세포를 인산염 완충액으로 세척한 다음 단백질 분해효소 억제제가 첨가된 세포용해 완충액(1% Tri-

ton X-100, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)에서 초음파 세포분쇄기(setting 4, 50% duty, W380 Ultrasonic processing)를 이용하여 10초간 분쇄하고 4°C에서 1시간 동안 방치하였다. 파괴된 세포를 함유하는 용액을 4°C 상태에서 Eppendorf microfuge를 이용하여 16,000×g로 10분간 원심분리하여 핵 성분 및 파괴되지 않은 세포 등을 침전시키고 상층액을 얻어서 단백질 양을 측정한 다음 전기영동에 이용하였다.

5) 효소 단백질 발현의 측정: 전기영동 및 western blot

VEGF, COX 및 NOS의 발현을 보기 위하여 전기영동을 한 다음 western blot을 시행하였다. 전기영동은 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 조사하고자 하는 단백질의 분자량에 대한 적당한 이동도에 맞는 농도를 이용하였는데 NOS의 경우는 7.5%, COX의 경우는 10%의 겔 농도를 사용하였고 VEGF의 경우에는 15% 겔을 사용하였다.*(14)* 30 mA에서 1시간 동안 전기영동 후 겔의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 전이 후 nitrocellulose membrane을 10 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% 탈지분유를 포함하는 블록 완충액으로 1시간 처리하였다. 1차 항원-항체결합에 사용하는 항체는 1 : 1000으로 블록완충액에 희석하여 실온에서 12시간 이상 반응시켰다. Santa-Cruz사 (California USA)에서 제작한 VEGF에 대한 토끼항체, eNOS에 대한 토끼항체, 사람의 iNOS에 대한 토끼항체, COX-1에 대한 염소항체 및 COX-2에 대한 염소항체를 1차 항원으로 본 실험에서 사용하였다. 위의 모든 일차 항체들은 각각 사람의 단백질에 대한 항체이다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase가 결합된 항체를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응을 시키고 블록완충액으로 15분간 3회 세척한 다음 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) 발색방법으로 전개시켰다.*(15)*

결 과

1) 암 조직에서 혈관생성인자의 발현변화

혈관신생이 활발한 위암은 림프절 전이 및 재발이 많고, 재발 위치도 중요 장기에서 일어나고 있어 저혈관신생 위암에 비해 임상적, 병리학적으로 훨씬 공격적이어서 좋지 않은 예후를 보일 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이러한 연구들에서 얻은 결과는 암의 변연부가 혈관신생을 관찰하는데 이상적인 부분이나 조직을 종양의 변연부에서 계획적으로 채취할 수 없다는 점이다. 따라서 이 연구에서는 변연부를 포함한 암 조직 전체와 그 주위 정상 조직을 부분 채취하여 혈관신생에 관여하는 인자들의 발현을 조사하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 종양조직에서

Table 1. Expression of angiogenesis-associated proteins in gastric carcinomas

Protein	Case No.	No. of increased expression	%
COX-1	30	0	0
COX-2	30	18	60
iNOS	30	1	3
eNOS	30	9	30
VEGF	30	3	10

COX-1 = cyclooxygenase-1; COX-2 = cyclooxygenase-2; iNOS = induced nitric oxide synthase; eNOS = endothelial nitric oxide synthase; VEGF = vascular endothelial growth factor.

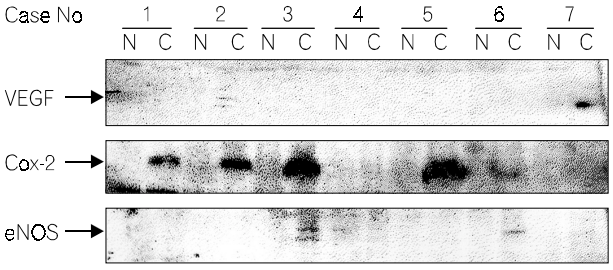

Fig. 1. Changes of expression of VEGF, COX-2 and eNOS in gastric carcinomas. Paired samples from resected stomach were taken from the tumor masses (C) and surrounding tissues (N). The tissue samples were prepared as describe in "Materials and Methods". Proteins (35 μg) were separated by SDS-PAGE and transferred into nitrocellulose membrane. The blots from 7 cases are representatives of 30 cases and three independent experiments.

혈관생성에 관여하는 것으로 알려진 VEGF의 발현을 조사하였을 때 정상 주위 조직에서는 VEGF가 western blot으로는 측정되지 않았으나 30예 중에서 3예의 종양조직에서 현저히 증가하였다(Fig. 1). COX의 발현을 비교하였을 때 COX-1의 발현은 변화가 없었으나 COX-2는 60%에서 증가하였다. COX-2를 발현하지 않는 주위조직(Fig. 1의 N)에 비하여 종양조직에서 현저히 증가함을 알 수 있다. NOS의 발현은 내피세포형 eNOS가 30%에서 증가하였으나 유도형인 iNOS는 1예에서만 증가하였다. 특히 VEGF가 증가된 3예에서는 모두 COX-2의 발현 또한 크게 증가됨을 나타내었다. 이러한 결과는 위암에서 VEGF의 발현은 많은 경우에서 증가되지 않고 COX-2 및 eNOS의 발현이 증가됨을 보여 주고 있다.

2) 위암세포주 MKN28 세포에서 VEGF에 의한 COX-2와 eNOS 발현의 변화

본 연구에서 나타난 결과와 같이 위암 조직에서 혈관신

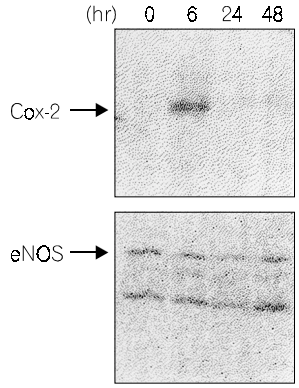

Fig. 2. Effects of VEGF on the expression of COX-2 and eNOS in MKN28 cells. MKN28 cells (1×10^6 cells) were subcultured in the presence of 10% fetal calf serum and after 5 days 100 ng/ml human recombinant VEGF was added. The cells were harvested after treatment for indicated times and washed with phosphate buffered saline three times. Proteins (15 μg) were separated and transferred into nitrocellulose membrane as described under "Materials and Methods". The blots are representatives of three independent experiments.

생에 관여하는 VEGF의 발현보다는 COX-2나 eNOS의 발현이 증가한다는 사실로 위암의 진행과 전이에 이 두 가지 물질이 중요 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 물질들의 관계를 보고자 위암세포주에서 이들의 발현을 비교 조사하였다. MKN28 세포는 세포배양액에 10% 소혈청을 첨가하더라도 어떠한 자극을 가하지 않은 경우에는 COX-2를 발현하지 않았고 VEGF 또한 발현하지 않으므로 본 연구에서는 좋은 연구 대상이라는 것을 알 수 있다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 MKN28 세포에 유전자 재조합을 이용하여 생산된 VEGF를 투여한 경우 처리 6시간 후에 COX-2의 발현이 증가하였다. COX-2는 자극 후 매우 빠른 시간에 발현되는 단백질로 알려진 것과 같이 자극 2시간 후부터 증가하였다(미발표 결과). 그러나 VEGF로 24시간 이상 자극하였을 때 COX-2 발현은 감소하였다. 이에 비교하여 MKN28 세포에서 eNOS 발현은 VEGF에 의하여 영향을 받지 않았다(Fig. 2).

VEGF에 의한 COX-2의 발현은 전사 억제제인 actinomycin D에 의하여 완전히 억제됨으로써 그 발현은 전사단계에서 증가함을 알 수 있다. COX-2 발현의 증가가 VEGF에 의한 것인 가를 알아보기 위하여 VEGF에 대한 항체를 VEGF와 같이 처리하였을 때 그 발현은 증가되지 않았다. VEGF가 세포막 수용체에 결합하는 것을 억제하는 것으로 알려진 VEGF 길항제를 사용하였을 때도 COX-2의 발현 증가는 관찰되지 않으므로 VEGF에 의한 작용에 의하여 발현이 증가되었다는 것을 확인하였다.

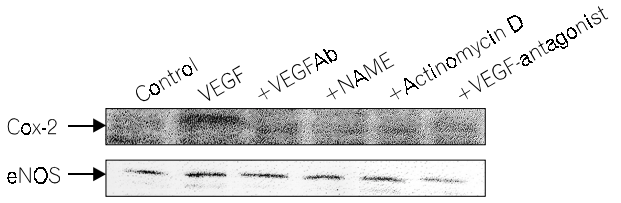

Fig. 3. Inhibition of VEGF-induced expression of COX-2 by VEGF antagonist and NOS inhibitor, NAME. MKN28 cells were pre-treated with 1 μg VEGF antibody, 500 μM NAME, 1 μM actinomycin D, and 5 μM VEGF antagonist peptide for 1 hr before addition of 100 ng/ml human recombinant VEGF. Western blot was performed as describe in Fig. 2.

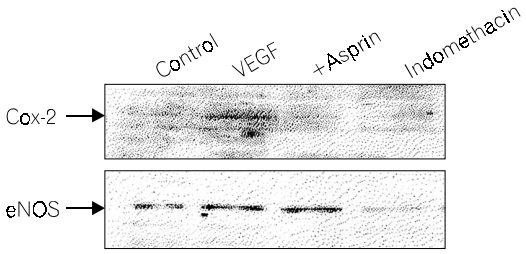

Fig. 4. Effects of anti-inflammatory drugs on VEGF-induced expression of COX-2 and expression of eNOS in MKN28 cells. Cells were incubated with 10^{-4} M of aspirin and indomethacin for 1 hr. 100 ng/ml human recombinant VEGF was used for induction of Cox-2 as in Fig. 2. The transferred proteins on nitrocellulose were reacted against COX-2 and eNOS antibodies, respectively. The blots are representatives of three independent experiments.

3) 위암세포주 MKN28 세포에서 항염증 약물에 의한 VEGF, COX-2 및 eNOS 발현의 변화

COX에 의한 프로스타글란딘 생성을 억제하는 항염증 약물은 위암 환자의 예후에 영향을 준다고 알려져 있으나 약물의 효과 기전에 대하여는 알려져 있지 않다.*(16,17)* 최근 COX가 혈관생성과 관계가 있다고 알려짐으로써 이러한 COX의 활성을 억제하는 항염증 약물의 영향을 조사하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 VEGF에 의한 COX-2의 발현은 aspirin이나 indomethacin에 의하여 억제됨을 알 수 있는데 같은 농도를 투여한 경우에서 indomethacin의 억제 효과가 컸다. 그러나 이들 약물을 단독으로 투여하였을 때 자극받지 않은 MKN28 세포에서 COX-2가 현저히 증가하였다. 특히 indomethacin을 투여한 경우는 aspirin보다 3배 이상의 발현 증가를 보였다(Fig. 5). VEGF를 처리한 MKN28 세포에서 eNOS 발현은 aspirin에 의하여 아무런 변화가 없었으나 indomethacin에 의하여 현저히 감소하였다. COX-2와는 다르게 eNOS의 발현은 aspirin의 단독 처

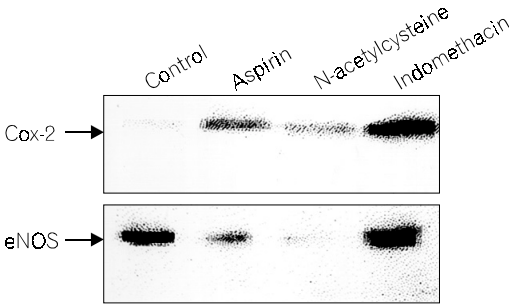

Fig. 5. Changes of COX-2 and eNOS protein level by anti-inflammatory drugs and antioxidant, N-acetylcysteine in MKN-28 cells. Cultured cells were treated with 10^{-4} M anti-inflammatory compounds and N-acetylcysteine for 6 hr. The cells were lysed and proteins were separated as described under "Materials and Methods". The blots are representatives of three independent experiments.

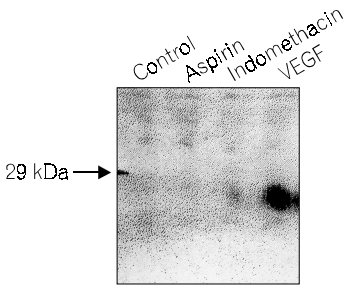

Fig. 6. Increased expression of VEGF by indomethacin in MKN28 cells. MKN28 cells (1×10^{6} cells) were subcultured in the presence of 10% fetal calf serum and cultured for 1 hr with 10^{-4} M aspirin and indomethacin. Proteins (15 μg) were separated and transferred into nitrocellulose membrane as described under "Materials and Methods". Human recombinant VEGF (1 ng) was used as positive control. The blots are representatives of two independent experiments.

리에 의하여 감소하였으나 indomethacin 투여 후에는 크게 증가하였다(Fig. 5). 항산화제로서 혈관신생을 억제하는 것으로 알려진 N-acetylcysteine(*18*)을 비교하여 관찰하였을 때도 COX-2와 eNOS의 반응은 각각 다르게 나타났다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 N-acetylcysteine의 단독 처리에 의하여 COX-2는 큰 영향이 없었으나 eNOS의 발현은 현저히 감소하였다. 그러나 eNOS의 발현은 indomethacin을 VEGF와 동시에 투여한 경우에는 COX-2에서와 같이 현저히 감소하였다. 위의 변화를 iNOS나 COX-1에 대하여 조사하였을 때 발현의 변화는 없었다. MKN28 세포에서 VEGF 발현은 혈청이나 protein kinase C 활성화 물질인 phorbol ester에 의하여 증가되지 않았으나 Fig. 6에서와 같이 N-acetylcysteine은 그 발현을 증가시켰다. 이러한 증가는 indomethacin을 처리하였을 때도 관찰되었으나 aspirin은

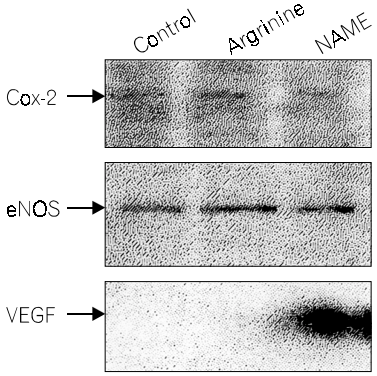

Fig. 7. Effects of L-arginine and NAME on expression of COX-2 and VEGF in MKN28 cells. Cultured cells treated with 500 μM L-arginine and 500 μM NAME for 6 hr. The blots are representatives of two independent experiments.

그 영향이 없었다. 위의 결과들에서 보면 항염증 약물은 다른 인자들과 병용하여 투여하였을 때만 그 발현을 억제시킬 수 있는 점으로 보아 혈관생성인자들에 의한 상승작용에는 매우 효과적일 것으로 추측할 수 있다.

4) 위암세포주 MKN28 세포에서 nitric oxide (NO) 생성에 관여하는 물질에 의한 VEGF, COX-2 및 eNOS 발현의 변화

NOS에 의한 NO 생성은 그 기질인 L-arginine에 대한 길항제인 N-arginine methyl ester (NAME)를 투여할 경우 억제된다.*(19)* NO생성이 MKN28 세포에 어떠한 영향을 주는 가를 보기 위하여 이 약물을 처리하였을 때 eNOS의 발현은 변화가 없었다. COX-2는 L-arginine에 의하여 증가하였으나 NAME에 의하여 아무런 영향을 받지 않았다. VEGF의 발현은 NAME를 처리한 경우 오히려 증가하였다(Fig. 7). 이러한 결과를 Fig. 3에서와 나타난 결과인 VEGF를 투여한 다음 증가된 COX-2에 대하여 NAME는 억제시키는 효과를 나타내는 결과(Fig. 3)와 비교하여 볼 때 이들의 발현은 서로 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

고 찰

본 연구에서는 30예의 위암 환자에서 분리한 종양 조직에서 정상 주위 조직과 비교하여 혈관신생에 관여하는 인자들의 발현을 조사하였다. 종양 조직 전체에서 발현되는 VEGF의 양은 3예에서 증가되었다. 이 결과와는 다르게 다른 연구자들의 면역조직학적인 연구에 따르면 위암에서 VEGF의 발현이 증가하는 경우는 20~40% 정도로 나타났다.*(3,20)* 이와 같은 차이는 면역조직학적으로 나타나는 VEGF 양성 세포는 그 발현이 혈관생성이나 예후에 영향을 미칠 정도보다도 적은 수준에서도 측정이 가능하나

이번 연구에서 발현의 변화를 보기 위한 western blot방법으로는 종양 조직 내 많은 양의 VEGF의 발현이 있는 경우이어야 가능하다. 이러한 방법을 이용한 실험에서 종양조직에서는 주위 정상 조직보다 COX-2나 eNOS의 발현은 각각 60%와 30%에서 그 발현이 증가됨을 나타내었다. 다른 연구자들의 보고에서도 western blot법을 사용하여 위암에서는 COX-2의 발현이 80%에서 증가된다는 것을 보고하였다.*(21)* 이는 VEGF 이외 이러한 물질이 혈관신생과 연관이 있다면 위암에서 이들 인자가 중요한 역할을 하리라고 추측할 수 있다.

한편으로는 위암에서 혈관신생에는 VEGF가 직접적으로 큰 영향을 미치지 못할 것으로도 볼 수 있다. VEGF 이외 암의 혈관신생에 관여한다고 알려진 인자들로는 bFGF, platelet-derived endothelial cell growth factor, angiogenin, epidermal growth factor, transforming growth factor α와 β 등이 있다.*(22)* 위암에서 이들의 발현정도를 비교 분석함으로써 이들이 위암의 혈관신생에 얼마나 관여하는가를 밝히는 것과 더불어 이들과 COX-2 및 eNOS와의 관계는 앞으로 더욱 연구하여야 할 과제이다. VEGF는 vascular permeability factor라고도 하며 분자량은 40 kDa으로 이중 복합체로서 구성되어 있다. 현재까지 혈관신생에 직접적으로 영향을 준다고 보고된 VEGF는 위암조직 전체에서는 큰 변화를 나타내지 않음으로써 다른 조직과는 다르게 위암발생에서는 큰 역할이 없음을 보였다. 소화기계의 선형암에서 VEGF나 VEGF의 수용체인 flt-1과 kdr의 mRNA가 증가되어 있다는 것이 보고되었다.*(23)* 위암 환자에서 나타난 VEGF의 발현이 증가된 경우에는 또한 COX-2의 발현 증가도 있었고 VEGF보다는 COX-2의 발현 빈도가 높게 나왔다. 그러나 아직까지 위암에서 COX와 혈관신생 인자의 발현과는 어떠한 관계가 있는가는 밝혀지지 않고 있다.

이번 결과에서 나타난 바와 같이 본 연구에 사용한 MKN28 세포는 COX-2 및 VEGF의 발현이 자극 받지 않은 배양 상태에서는 측정되지 않았으므로 이들의 관계를 연구하기에 적합한 세포 모델이라는 것을 알 수 있다. 또한 MKN28 세포는 *Helicobacter Pylori (H. pylori)*에 의하여 감염될 경우 세포 내 COX-2의 발현이 증가한다는 보고가 있다.*(24,25)* 이러한 위암세포를 대상으로 COX-2가 발현하는 것을 연구하는 것은 위암의 원인 중 하나인 *H. pylori*의 감염에 의한 COX-2의 발현이 혈관신생과 관련이 있는가를 밝힐 수 있다. 위암세포주에서 *E. coli*에 비하여 *H. pylori*의 감염 때 COX-2의 발현의 증가가 있다는 사실은 단순한 염증 반응에 의한 COX의 발현에 의한 것이 아니라 세포 내 발현되는 COX-2에 의한 프로스타글란딘의 양적 변화가 암의 발생과 진행에 관여한다는 것을 시사하고 있다.*(25)* VEGF를 처리한 세포에서 처리 2시간 후부터 COX-2의 발현이 증가됨을 관찰하였으나 역으로 COX-2의 발현이 증가되는 경우 VEGF가 직접적으로 증가하는 것은 보지 못하였다. 이번 연구에서 VEGF의 발현을 증가시키기 위하여 COX-2 발현의 자극제로 알려진 lipopolysaccharide나 phorbol ester 등을 MKN28 세포에 처리하였으나 그 발현은 증가되지 않았다. 그러나 COX를 억제하여 프로스타글란딘의 생성을 감소시키는 indomethacin에 의하여 VEGF의 발현이 오히려 증가한다는 사실로서 암세포 내 프로스타글란딘의 양적 변화가 혈관생성인자의 발현에 영향을 준다는 것을 간접적으로 알 수 있다. VEGF에 의한 COX-2의 발현은 VEGF에 대한 항체나 길항 펩타이드로 억제됨으로써 이러한 발현은 VEGF의 작용에 의한다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 사용한 VEGF의 길항 펩타이드는 hexapeptide library에서 VEGF와 VEGF 수용체의 결합을 억제하는 염기성 hexapeptide로서 IC_{50}이 2 μM 정도로 VEGF 결합을 특이적으로 억제하는 것으로 보고되었다.*(26)*

항염증 약물은 여러 암에서 예후를 좋게 한다는 보고가 있으나 그 기전은 밝혀져 있지 않다.*(7,8)* 위장관의 암세포주에서 COX-2의 억제제를 투여하면 COX-2 발현이 높은 세포주에서만 세포의 증식이 억제된다는 실험 결과는 이 단백질에서 생성되는 물질이 암세포의 증식에 관여한다는 것을 시사한다.*(27)* 실험 동물에서 aspirin, indomethacin 및 sulindac과 같은 항염증 약물은 화학물질에 의한 대장암의 발생을 억제하였다.*(28)* 이와 유사하게 식도나 위암에서도 aspirin의 사용은 치사율을 줄이지만 위장관 이외의 암에서는 큰 효과가 없다고 보고함으로써 위장관의 암의 발생에 prostaglandin의 생성이 중요하다는 것이 제시되고 있다.*(16)* Aspirin은 COX의 활성을 억제할 뿐만 아니라 그 발현도 억제한다고 알려져 있으며 NF-κB에 의한 전사를 억제하여 cytokine 등의 발현도 억제한다.*(29,30)* 이번 연구에서 처음으로 VEGF에 의한 COX-2의 발현증가가 aspirin이나 indomethacin에 의하여 억제된다는 것을 보였다. 이러한 결과는 aspirin 등의 항염증 약물이 혈관생성에 관여하는 인자들의 발현을 억제한다는 것을 시사하고 있다. 그러나 이들 약물을 단독으로 투여하였을 때는 오히려 COX-2의 발현이 증가됨으로써 어떠한 자극이 없는 세포 내 프로스타글란딘의 생성이 억제될 경우 유도형의 COX-2가 발현되기 때문이라고 추측된다. 이와 같은 결과는 영양막 세포에서 aspirin이 COX-2의 발현을 증가시킨다는 결과와 유사하다.*(31)* MKN28 세포에서 indomethacin은 VEGF의 발현을 증가시켰는데 이는 항염증 약물의 일반적인 현상인지 혹은 VEGF 발현에 대한 특이적인 반응인지는 앞으로 더욱 연구하여야 할 것이다. Aspirin에 의하여 증가된 COX-2나 VEGF 발현은 indomethacin에 의한 것보다 크지 않았다. 이는 aspirin에 의한 치료 농도가 훨씬 높기 때문으로 생각된다.*(32)* 그러나 VEGF를 첨가한 경우에는 0.1 mM의 aspirin에 의하여 COX-2의 발현이 억

제되었는데 이러한 반응은 매우 낮은 농도의 aspirin에 의하여 영향받는다는 것을 알 수 있다. NO는 신경전달, 혈압조절, 혈소판 응집 및 세균살상 등의 여러 생리작용을 가지는 물질이다.*(33)* NOS의 발현은 TGF-β나 저산소증과 같은 여러 자극에 의해 조절된다. 위암조직을 이용한 이번 연구에서 유도형 NOS인 iNOS의 발현은 30예 중 1예에서 발현이 증가되어 나타났으나 eNOS의 경우에는 30%에서 정상 조직보다도 발현의 증가를 보였다. 이러한 결과는 *H. pylori*의 자극이나 COX-2의 발현 증가와 비교하여 매우 흥미로운 것이다. 면역 세포나 섬유아 세포 및 혈관내피 세포 등에서는 주로 iNOS에 의한 NO생성이 프로스타글란딘의 생성과 관계가 있고 또한 iNOS의 작용이 항염증 약물에 의하여 억제된다고 하였다.*(32-34)* 그러나 이번 연구로서 위암에서는 iNOS보다는 eNOS에서 생성되는 NO가 더욱 관계됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 MKN28 세포에서도 indomethacin에 의하여 eNOS의 발현은 증가하였으나 iNOS의 발현은 나타나지 않은 것으로도 확인되었다. NO생성에 의한 작용은 비특이적으로 산화화합물을 생성하여 나타나는 효과를 배제할 수 없다. 따라서 항산화제로서 혈관신생에 관여한다고 알려진 N-acetylcysteine을 처리하여 단백질들의 발현 변화를 비교하였다. 이 경우 eNOS의 발현은 감소함으로써 세포 내 산화물질에 의하여 eNOS의 발현은 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. H_2O_2 등의 산화제가 강력한 VEGF의 분비를 증가시킨다고 알려져 있는데*(35)* 본 연구에서는 항산화제 처리에 의하여는 영향이 없었고 오히려 NAME에 의하여 발현이 증가함으로써 NO가 특이적으로 작용한다는 것을 보여주고 있으나 산화물의 생성과 VEGF 발현이 연관되어 있을 가능성도 또한 고려해야 할 것이다.

결 론

이상의 결과에서 본 연구자는 위암 조직에서 VEGF, COX-2 및 eNOS의 발현 변화를 western blot법으로 조사하였고 이들의 상관관계를 위암세포주 MKN28 세포를 이용하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 위암 환자 30예에서 채취한 종양 조직에서 주위 정상 조직에 비하여 VEGF, COX-2 및 eNOS의 발현이 각각 10, 60, 30% 증가하였다.

2) 배양된 MKN28 세포에 VEGF를 투여한 결과 COX-2의 발현은 증가하였으나 eNOS는 큰 변화가 없었다. COX-2 발현에 대한 VEGF의 영향은 VEGF 항체 및 길항펩타이드에 의하여 억제되었다.

3) Aspirin이나 indomethacin을 전처리 한 세포에서 VEGF에 의한 COX-2의 발현 증가는 억제되었다.

4) VEGF를 처리한 세포에서 indomethacin에 의하여 eNOS의 발현은 감소되었다.

5) COX-2 발현은 NO생성 억제제인 N-arginine methyl ester에 의하여 영향을 받지 않았다.

이러한 연구 결과는 위암의 생성과 전이에 관여하는 혈관생성인자인 VEGF의 발현에 COX-2와 eNOS가 연관되어 있다는 것을 보여 주었고 위암의 치료제로서 항염증 약물이나 NO생성 억제제를 사용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

REFERENCES

1) 보건복지부: 한국인 암등록 조사자료 보고서(1995. 1. 1~1995. 12. 31), 1997.
2) Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. Semin Cancer Biol 1992;3:65-71.
3) Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer 1996;77:858-63.
4) Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. J Natl Cancer Inst 1993;85:241-2.
5) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability fact or/vascular endohtelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol 1995;146:1029-39.
6) DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063-73.
7) Shiff SJ, Rigas B. Nonsteriodal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. Gastroenterology 1997;113:1992-8.
8) Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti- inflammatory drugs. Adv Pharmacol 1997;39:1-20.
9) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93:705-16.
10) Rajnakova A, Goh PM, Chan ST, Ngoi SS, Alponat A, Moochhala S. Expression of different nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. Carcinogenesis 1997;18:1841-5.
11) Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming growth factorβ1 stimulated capillary organization in vitro. Am J Pathol 1997;150:1835-44.
12) Yamamoto S, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Haruma K, Kajiyama G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas. Pathol Int 1998;48:499-506.
13) Lee BM, Jang JJ, Kim JS, You YC, Chun SA, Kim HS, et al. Association of Helicobacter pylori infection with gastric

adenocarcinoma. Jpn J Cancer Res 1998;89:597-603.
14) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227: 680-5.
15) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, et al. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
16) Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. Cancer Res 1993;53:1322-7.
17) Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998;7:97-102.
18) Cai T, Fassina G, Morini M, Aluigi MG, Masiello L, Fontanini G, et al. N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis. Lab Invest 1999;79:1151-9.
19) Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: propeties and catalytic mechanism. Ann Rev Physiol 1995;57:707-36.
20) Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. Oncology 1998;55:594-9.
21) Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. J Surg Oncol 1998;69:168-72.
22) Klagsbrun M, D'Amore P. Regulators of angiogenesis. Ann Rev Physiol 1991;53:217-39.
23) Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinoams of the gastrointestinal tract. Cancer Res 1993;53:4727-35.
24) Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, et al. Helicobacter pylori up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN28 gastric mucosal cells in vitro. J Biol Chem 1998; 273:28560-3.
25) Jass JR, Sobin LH. World Health Organization international histological classification of tumors: histological typing of intestinal tumors. 2nd edition. New York: Springer-Verlag, 1989.
26) Bae DG, Gho YS, Yoon WH, Chae CB. Basic peptides that inhibit the action of vascular endothelial growth factor. Int J Cancer Res In press, 1999.
27) Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, Takei Y, Kobayashi I, Nagano K, et al. Evidences for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. Prostaglandins leukot Essent Fatty Acids 1996;55:179-83.
28) Giardiello FA, Offerhaus GJ, DuBois RN. The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. Eur J Cancer 1995;31A:1071-6.
29) Wu KK, Sanduja R, Tsai AL, Ferhanoglu B, Loose-Mitchell DS. Aspirin inhibits interleukin 1-induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2384-7.
30) Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. Science 1994;265:956-9.
31) Johnson RD, Polakoski K, Everson WV, Nelson DM. Aspirin induces increased expression of both prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 in cultured human placental trophoblast. Am J Obstet Gynecol 1997;177:78-85.
32) Amin AR, Vyas P, Attur M, Leszczynska-Piziak J, Patel IR, Weissmann G, et al. The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:7926-30.
33) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysioloy, and pharmacology. Pharm Rev 1991;43:109-42.
34) Farivar RS, Chobanian AV, Brecher P. Salicylate or aspirin inhibits the induction of the inducible nitric oxide synthase in rat cardiac fibroblasts. Circ Res 1996;78:759-68.
35) Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H_2O_2 in rat heart endothelial cells. Free Radic Biol Med 1998;25:891-7.