

COX-2 억제제가 누드마우스에 이식된 위암세포주에서 종양의 성장과 전이에 미치는 영향

중앙대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹병리학교실

오정식 · 심우정 · 차성재 · 지경천 · 박성준 · 임현묵 · 박성일 · 이태진¹ · 박언섭¹

The Effect of COX-2 Inhibitor on the Growth and Metastasis of Gastric Cancer Xenograft

Joung-Sik Oh, M.D., Woo Jung Sim, M.D., Sung Jae Cha, M.D., Kyong Choun Chi, M.D., Sung Jun Park, M.D., Hyun Muck Lim, M.D., Sung Il Park, M.D., Tae Jin Lee, M.D.¹ and Eon Sub Park, M.D.¹

Purpose: Tumor invasion and metastasis are known to be extremely important factors in the prognosis of cancer patients. Although recent studies have demonstrated that cyclooxygenase-2 (COX-2) is overexpressed in various cancers including gastric cancer, the mechanisms underlying the contribution of COX-2 to tumorigenesis and tumor promotion remain unclear.

Methods: In order to determine the role of COX-2 in tumor growth and metastasis, we investigated COX-2 expression, apoptosis and the expression of E-cadherin, CD44v6, MMP-2 and TIMP-2 in gastric cancer xenografts treated with meloxicam (a selective COX-2 inhibitor).

Results: Cells from the MKN45 gastric cancer cell line that overexpress COX-2 were inoculated subcutaneously into athymic mice. Oral administration with meloxicam reduced the tumor volume ($P < 0.01$), induced apoptosis of cancer cells ($P < 0.01$), suppressed the proliferation rates ($P < 0.01$), increased the expression of E-cadherin ($P < 0.05$) and reduced the expression of MMP-2 and TIMP-2.

Conclusion: The above data showed that COX-2 inhibitors can inhibit tumor growth and suppress metastatic potential by expression of adhesion molecules and suppression of metalloproteinases, suggesting that this inhibitor can be used as an additive anti-cancer drug in cases of stomach cancer with radical resection, although further evaluation is required. (J Korean Surg Soc 2002;62:95-102)

Key Words: COX-2, Gastric cancer, Tumor growth, Metastasis

중심 단어: COX-2, 위암, 종양의 성장, 전이

Departments of General Surgery and ¹Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

서 론

위암의 예후에 있어서 전이의 유무는 환자의 예후에 결정적인 역할을 한다. 이러한 전이는 암세포가 원발부위에서 떨어져 전신으로 퍼져 그 종양의 발생조직과는 다른 장기에서 새로운 병소를 형성하는 현상으로 일련의 생화학 및 유전학적인 요소들이 복합적으로 작용한다.(1) 우선 일차종양에서 종양세포 성장의 다양화 및 신생혈관이 형성된 후 전이성 subclone이 기저막에 부착되고 이를 침습하여 세포의 기질을 통과하게 되며 혈관벽을 침습하여 순환계로 들어가게 되고 다시 혈관벽을 뚫고 이차 병소를 형성한다. 이러한 과정에서 일차종양을 둘러싸고 있는 간질조직의 침윤이나 혈관과 림프관으로의 침습은 전이 전체 현상의 중심이라고 할 수 있다. 그런데 이러한 현상이 나타나기 위해서는 우선적으로 종양세포 간의 견고한 부착이 소실되어야 하고, 여기에는 상피세포의 세포 간 부착에 작용을 하는 다양한 부착인자들이 있다. 상피세포에서 세포 대 세포 접촉의 소실은 E-cadherin 발현의 하향조절과 연관이 있다고 알려져 있고, 분화가 잘된 상피암종은 인접 정상 상피세포에서와 같이 높은 수준의 E-cadherin mRNA를 나타내는데 반하여 분화가 좋지 않은 상피암종은 그렇지 못하다는 보고가 있다.(2) 일단 종양세포가 일차 병소로부터 떨어져 나오면 이것들은 숙주의 실질을 침범하고 나서 림프관이나 혈관 내로 침습하게 되는데 그렇게 되기 위해서 종양세포는 주위 혈관의 기저막을 침습해야만 한다.(2) 또한 원격 장기에 종양 색전이 붙잡힌 후에도 이차적인 성장이 성립되기 위해서 종양 세포의 혈관 벽 침습과 주위 실질로의 침윤이 뒤따라야만 한다. 이 과정에서 종양세포는 스스로 혹은 간

책임저자 : 오정식, 서울시 중구 필동 2가 82-1
☎ 100-272, 중앙대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-2260-2159, Fax: 02-2275-7869
E-mail: simon411@netsgo.com

접수일 : 2001년 10월 13일, 게재승인일 : 2001년 12월 28일

질 섬유모세포나 침윤한 대식세포를 자극하여 단백질 분해 효소를 분비하게 되고 이 단백질 분해효소의 활성은 항단백질 분해효소의 조절을 받게 된다. 단백질 분해효소의 군에는 serine, aspartic, cystein, threonine과 matrix metalloproteinases (이하 MMPs)가 있다. 현재까지 MMPs는 16가지가 알려져 있는데 이 중 MMP-2 (gelatinase A)가 상피세포와 혈관 기저막의 주요성분인 type IV와 V collagen과 fibronectin을 분해하는 역할을 하며 이 MMP-2의 활성을 선택적으로 억제하는 것이 TIMP-2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2)로 알려져 있다.(3)

한편 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid의 대사 과정 중에 속도제한효소로 작용하고 이 때 생성된 prostaglandins과 thromboxanes 등은 세포들의 부착, 성장, 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.(4) COX는 현재까지 두 개의 아형(COX-1, COX-2)이 있는데 COX-1은 대부분의 조직에서 외부 자극과 상관없이 지속적으로 발현되고 COX-2는 정상적으로는 발현되지 않고 여러 가지의 세포외적인 자극에 의해서 발현된다.(5) 그중 악성종양에서 COX-2의 과발현이 많이 보고되고 있고 특히 대장암과 위암의 경우 종양세포에서 주변의 정상세포보다 COX-2가 과발현된다고 한다.(6) 또한 종양세포에서의 COX-2 과발현이 종양형성뿐만 아니라 신생혈관형성이나 전이능(metastatic potential)의 증가와 관련이 있다는 연구가 계속되고 있다.(7,8) 그러나 그 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않다. 비스테로이드성 소염제(NSIADs)는 이러한 COX를 비선택적으로 억제하여 prostaglandin의 생성을 감소시키는 약물로서 설치류를 이용한 동물실험에서 대장암의 억제 효과가 입증되었고,(9) 사람의 경우 이를 장기 복용한 환자군에서 대장암의 발생 빈도가 감소한 결과로,(10) 이러한 COX의 억제가 어느 정도 항암효과가 있는 것으로 생각된다. 그러나 기존에 사용되던 비스테로이드성 소염제들은 위장의 COX-1을 억제함으로써 해서 위장 출혈과 같은 부작용이 있어 그 사용에 제한점이 있었다. COX-2의 과발현이 악성종양의 전이능의 증가와 연관성이 있다면 선택적 COX-2 억제제를 투여한 경우에 그 전이능의 감소를 예측할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 전이의 여러 과정 중 COX-2의 발현이 어느 단계에 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 선택적 COX-2 억제제인 meloxicam (COX-1 IC₅₀ 3.27 μM, COX-2 IC₅₀ 0.25 μM)(11)을 사람의 저분화 위선암에서 배양된 세포주로서(12) COX-2가 과발현되는 것으로 알려져 있는 MKN 45(13)를 접종시킨 누드마우스(nude mouse)에 경구 투여하여 이러한 COX-2 억제가 세포 부착분자인 E-cadherin과 CD44v6 및 단백질 분해효소인 MMP-2와 단백질 분해 억제 효소인 TIMP-2의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

방 법

1) 연구 재료

(1) 세포주: 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank)에서 사람의 위암 세포주 MKN45를 분양받아 계대 배양하였다. 기본배지는 RPMI 1640 (GIBCO, New York, USA) 우태혈청(fetal bovine serum)이 10%가 되도록 제조하여 사용하였으며 배양용기에는 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 적절한 습도와 36.5°C의 온도가 유지되도록 하였다. 배지는 3일 간격으로 교체하였다.

(2) 실험동물: 암컷 누드마우스(BALB/c, nu/nu), 5주령, 몸무게 평균 18 gm을 중앙실험동물에서 구입하였으며 원구 입처는 SLC (Shizuoka laboratory animal center, Shizuoka Japan)였다. 실험은 서울대학병원 전임상의학 연구소에서 일주일간의 적응기간을 거친 후 실시하였다.

(3) 사용약물: Meloxicam (Mobic[®], Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ingelheim, Germany)에서 제작 생산되며 분자식은 4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazolyl)-2H-1, 2-benzothiazine-3-carboxamide-1, 1-dioxide, UH-AC 62 XX으로서 DMF (dimethylformamide)에 녹여서 사용하였다.

2) 실험 방법

(1) 세포주의 이식 및 약물처리: 각각의 누드마우스에 MKN45 위암세포주를 5 × 10⁷/ml RPMI의 농도로 0.2 ml (1 × 10⁷ cells)을 등쪽 피하지방층에 접종하고 대조군(12마리), 투여군(23마리)으로 분리하여 투여군에게는 24시간 후부터 3주간(21일) meloxicam을 30 mg/kg의 농도로 하루에 두 차례 존대를 사용하여 경구 투여하였다.

(2) 조직표본 작성: 실험 시작 3주 후 경추분리하여 쥐를 도살한 후 조직을 떼어내고 이등 분할하여 냉동 질소에 보관하고 나머지는 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 블록을 제작하고 Hematoxylin & Eosin 염색을 시행하여 형태학적인 소견을 관찰하였다.

(3) 종양의 성장 측정: 각각의 누드마우스에서 떼어낸 종양 조직의 장경과 단경을 측정하여 평균종양용적(mean tumor volume)=(장경 × 단경²)/2로 표시하였다.

(4) 면역조직화학 염색: 포르말린에 고정한 후 제작된 파라핀 포매조직을 5 μm 두께로 박절하여 탈파라핀시킨 후 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% H₂O₂에 20분간 처리하고 0.05 M TBS (Tris buffered saline) 완충용액으로 세척한 다음, 조직의 항원발현을 증가시키기 위해 0.01 M citrate 완충용액으로 5분씩 3회 microwave로 고열처리하였다. 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% skim milk로 5분간 처리한 후 TBS 완충용액으로 세척 후 차단용액으로 30분간 반응시켰다. 일차항체인 E-cadherin (1 : 50, Zymed

laboratories, South San Francisco, USA), CD44v6 (1 : 50, Zymed laboratories, South San Francisco, USA), MMP-2 (1 : 50, Neomarkers, Fremount, USA), TIMP-2 (1 : 50, Neomarkers, Fremount, USA) Ki-67 (1 : 50, Zymed laboratories, South San Francisco, USA)를 각각 실온에서 1시간 반응시킨 후 TBS 완충용액으로 3회 세척하고 biotin과 결합된 이차항체 (labeled streptoavidin biotin kit, DAKO Corporation, Carpinteria, USA)를 30분간 반응시켰다. 완충용액으로 세척한 후 streptoavidin-horseradish peroxidase를 가하고 10분간 반응시켜 충분히 세척한 다음 AEC (Acetyethyl carbazol)로 2분간 반응시킨 다음, 수세 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(5) COX-2 발현

① 역전사 증합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR); 대조군과 투여군에서 채취한 종양조직을 Tissue culture plate에 놓고 RNAsol B (Genomed, Oeynhausen, Germany) 1 ml를 혼합하고 10번 수술도(blade)를 이용하여 조직을 잘게 썰어 간 후 부유액을 피펫을 이용하여 멸균 소독된 Eppendorf관에 옮겼다. 그 후 Chloroform 100 μ l를 첨가하고 역회전 혼합과 진탕(vortexing)하고 얼음 위에서 15분간 반응시킨 후, 4°C, 15,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하고 상층액 300 μ l를 취하여 동량의 isopropanol을 넣어주고 역회전 혼합(inverted mixing) 후 4°C에서 20분간 반응시킨 후 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전을 70% ethanol용액으로 세척한 후 다시 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 ethanol을 버리고 남은 ethanol은 진공 건조하여 제거 후 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 처리수로 녹여 분광기(spectrophotometer) (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 RNA 농도를 측정하였다. 분리한 RNA를 가지고 cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas #K1612)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 각각의 세포와 조직에서 분리한 RNA 3 μ g에 DEPC 처리수를 첨가하여 부피를 32 μ l로 만든 후 70°C 항온 수조에서 10분간 변성시킨 후 RNase inhibitor 1 μ l, BSA (Bovine Serum Albumin) 1 μ l, 5X RT-buffer 10 μ l, 10 mM dNTP 5 μ l, Oligo dT₁₈ (Promega, Madison, USA) 0.5 μ l 혼합하여 37°C 항온기에서 10분간 유지하여 primer를 annealing시킨 후, 역전사 효소 0.5 μ l를 첨가하여 다시 37°C 항온기에서 1시간 동안 유지하여 cDNA를 합성하였다. House keeping 유전자는 β -actin을 이용하였다. 역전사로 합성한 cDNA 5 μ l, sense primer 1 μ l, antisense primer 1 μ l, dNTP (2.5 mM) 2 μ l, 10x PCR buffer 2 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l, 증류수 8.5 μ l를 혼합하여 총 20 μ l를 만들어 Thermocycler (Perkin Elmer 2400, Perkin Elmer Instruments, Shelton, USA)를 이용하여 PCR을 시행하였다. COX-2 Primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

② Western blotting; 조직을 배양관에 올려놓고 Pro-Prep

Table 1. COX-2 primer sequence

Sense	5'-TTAGCCTTGTGCACTGCAGA-3'
Antisense	5'-AGGAACAGCATGCAGGTAGC-3'

용액(iNtron, Seoul, Korea) 600 μ l를 넣은 후 15번 수술도를 사용하여 조직을 분쇄하였다. -20°C의 냉창고에 30분간 배양하여 세포용해를 일으킨다. 13,000 rpm (4°C)에서 5분간 원심분리하여 상층액을 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 후 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다. 100 μ g의 단백질을 10%의 SDS-polyacrylamide gel상에서 전기 영동하였다. 전기 영동한 단백질을 PVDF (polyvinyl difluoride) transfer membrane (WESTRAN, Schleicher & Schuell, Keene, USA)을 씌운 뒤 transfer 완충용액(20 μ M Tris, 190 mM Glycine, 20% Methanol) 안에서 Transphore transfer unit (Hoefler, USA)를 이용하여 400 mA로 1시간 동안 4°C에서 실시하였다. Transfer 된 membrane은 5%의 skim milk (Difco)를 포함한 TBS-t (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6) 완충용액과 1시간 동안 반응시킨 후 goat-항-PARP 항체(Santa Cruse, USA)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음 membrane을 horseradish peroxidase가 부착된 이차항체(Zymed laboratories, South San Francisco, USA)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Enhanced chemiluminescence (ECL) 방법으로 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

3) 성적평가방법

(1) 면역조직화학염색: 면역화학염색에 의한 E-cadherin, CD44v6, MMP2, TIMP2의 발현의 발현은 세포막이나 세포질에 갈색으로 염색이 되는 세포가 전체 종양세포 중 5% 이상이면 양성으로 판정하였고 염색 강도에 따라 0, 1+, 2++의 3단계로 나누어 판정하였다.

(2) Apoptosis와 세포증식지수(cell proliferative index): Apoptosis는 Hematoxylin & Eosin 염색 슬라이드를 이용하여 관찰하였으며 저배율상 apoptpsis가 가장 활발한 부위를 선택한 후 400배 시야에서 1,000개의 세포 중 apoptosis를 보이는 세포 수를 세어 백분율(%)로 나타냈고 괴사 부위는 피하였다. Hematoxylin & Eosin 염색 슬라이드에서 핵이 절단되기 전에 핵의 변연부로 염색질이 몰려있는 경우나 진한 호산성 세포질을 갖는 작고 진한 핵절편을 apoptosis로 정의하였다. 세포증식지수는 400배 시야에서 1,000개의 세포 중 Ki-67에 대한 면역조직화학 염색에서 핵에 강양성 반응을 나타내는 세포를 세어 백분율(%)로 나타냈다.

4) 통계분석

두 군 간의 각 결과를 SPSS를 이용하여 비교 분석하였으며 P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 의미가 있는 것으

로 간주하였다.

결 과

1) 종양의 성장

대조군과 투여군에서 평균종양용적(mean tumor volume) 평균 치는 각각 $14.2 \pm 4.0 \text{ cm}^3$, $10.6 \pm 2.6 \text{ cm}^3$ 으로 meloxicam 을 경구투여한 군에서 종양의 성장은 통계적으로 유의하게 억제되었다($P < 0.01$).

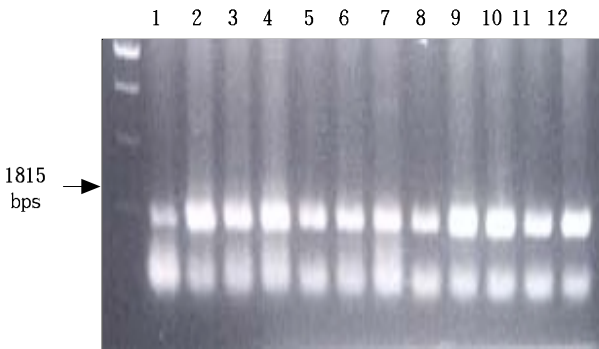


Fig. 1. RT-PCR for COX-2 expression. 1~4 control, 5~12 Meloxicam treated.

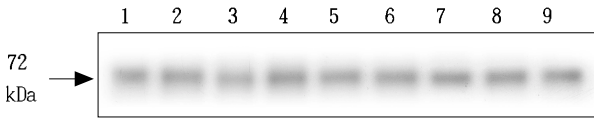


Fig. 2. Western blotting analysis for COX-2 expression. 1~4 control, 5~9 Meloxicam treated.

2) COX-2의 발현

Meloxicam을 투여한 군과 대조군에서의 COX-2 발현을 mRNA level (RT-PCR)과 protein level (western blotting)에서 비교하였으나 두 군 간의 COX-2 발현의 차이는 없었다(Fig. 1).

Table 2. Apoptosis and proliferative index

	Apoptotic index (%)	Proliferative index (%)
Control group	0.33 ± 0.21	41.33 ± 3.78
COX-2 group	$0.52 \pm 0.17^*$	$29.52 \pm 7.9^*$

Data are expressed as mean \pm standard deviation. * $P < 0.01$

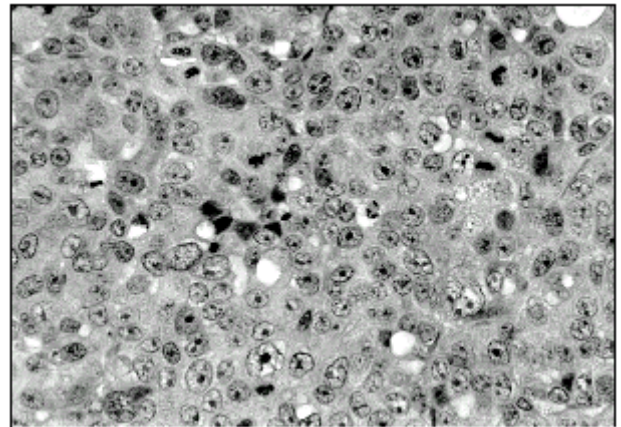


Fig. 3. Poorly differentiated adenocarcinoma is formed by implantation of MKN45 stomach cancer cell line in mice and shows many mitosis and apoptotic cells.

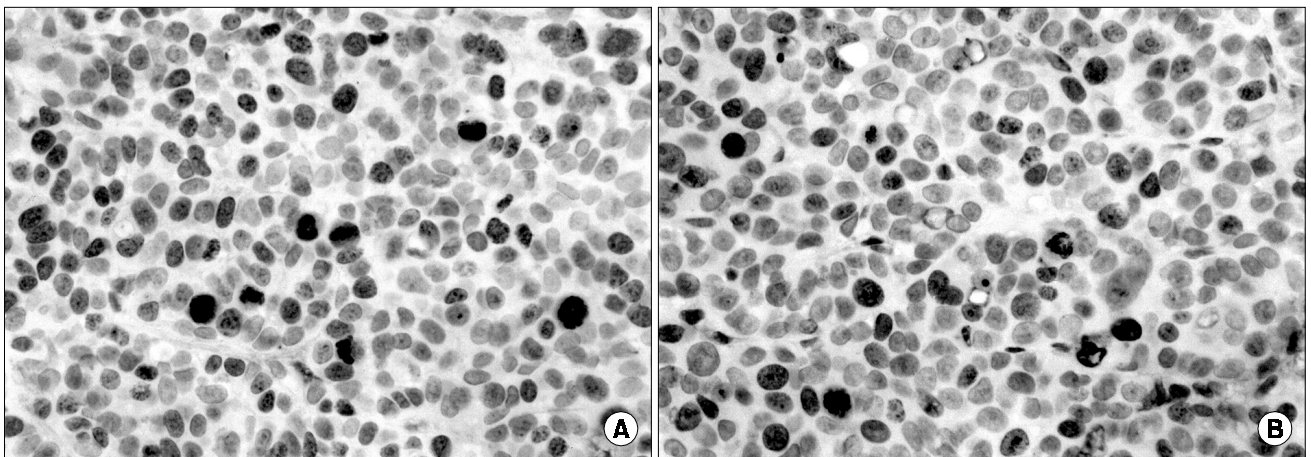


Fig. 4. Immunohistochemical staining of Ki-67 for proliferatin index shows decrease of positive cells in treated group. (A) control (B) treated (ABC, $\times 400$).

3) Apoptosis와 세포증식지수

Apoptotic index는 대조군에서 0.33% 투여군에서 0.53%로

투여군에서 유의하게($P < 0.01$) 증가되어 있었고(Fig. 3) 세포증식지수는 대조군 41.33%, 투여군 29.52%로 투여군에서 유의하게 감소되었다(Fig. 4)(Table 2).

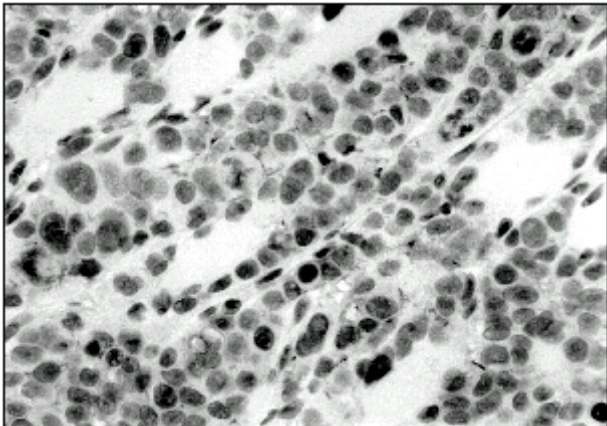


Fig. 5. Immunohistochemical staining of E-cadherin shows linear membrane expression in the treated tumor cells (ABC, $\times 400$).

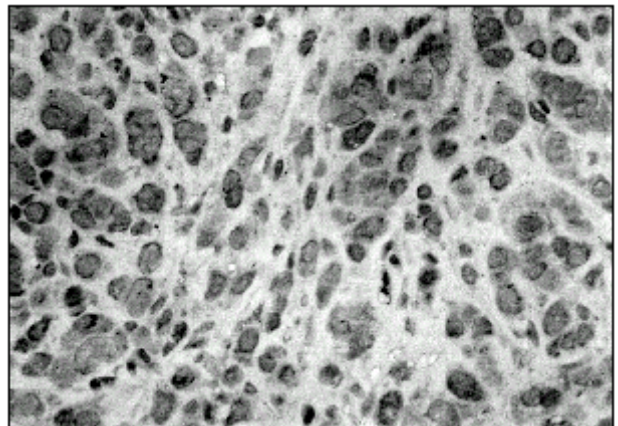


Fig. 7. Immunohistochemical staining of MMP-2 shows cytoplasmic expression in the treated tumor cells (ABC, $\times 400$).

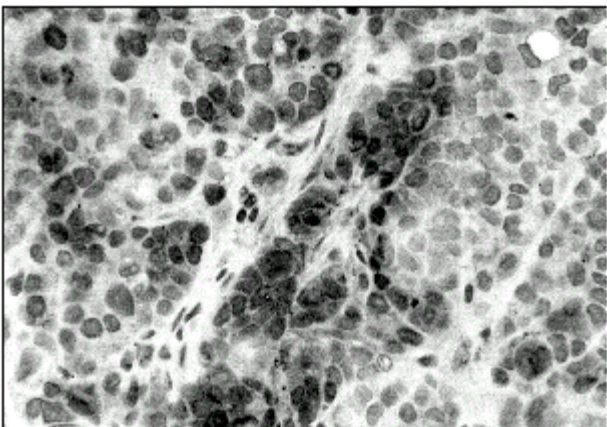


Fig. 6. Immunohistochemical staining of CD44v6 shows membranous and cytoplasmic expression in the treated tumor cells (ABC, $\times 400$).

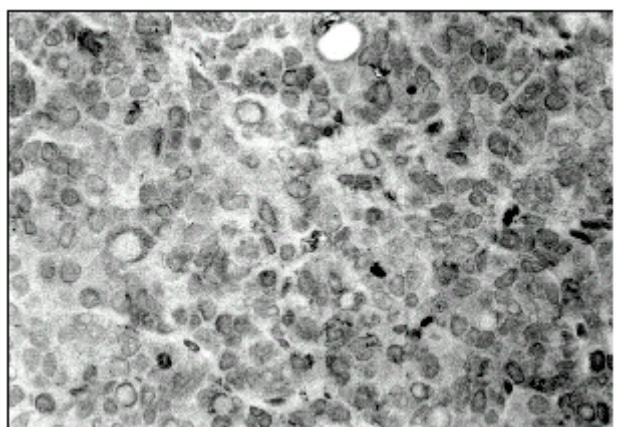


Fig. 8. Immunohistochemical staining of TIMP-2 shows cytoplasmic expression in the treated tumor cells (ABC, $\times 400$).

Table 3. The expression of E-cadherin, CD44v6, MMP2, and TIMP2

	발현 강도	E-cadherin*	CD44v6	MMP-2*	TIMP-2*
Control group	0	10/12 (83.3%)	1/12 (8.3%)	4/12 (33.3%)	4/12 (33.3%)
	1	2/12 (16.7%)	6/12 (50.0%)	8/12 (66.7%)	8/12 (66.7%)
	2		5/12 (41.7%)		
COX-2 group	0	11/23 (47.8%)	1/23 (4.3%)	16/23 (69.6%)	16/23 (69.6%)
	1	12/23 (52.2%)	12/23 (52.2%)	7/23 (30.4%)	7/23 (30.4%)
	2		10/23 (43.5%)		

* $P < 0.05$

4) E-cadherin, CD44v6, MMP2, TIMP2의 발현

E-cadherin은 대조군에서 발현이 안 된 경우가 12예 중에 10예(83.3%), (+)가 2예(16.7%)였고 투여군에서는 23예 중 11예(47.8%)에서 발현이 되지 않았으며, (+)는 12예(52.2%)로 투여군에서 통계적으로 유의하게 발현의 증가를 보였다 ($P < 0.01$)(Fig. 5). CD44v6의 발현은 두 군 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

종양세포의 전이과정 중 주위기질의 분해에 필수적인 MMP-2는 발현이 안 된 경우가 12예 중에 4예(33.3%), (+)는 8예(66.7%)였다. 투여군에서는 발현이 안 된 경우가 23예 중 16예(69.6%), (+)가 7예(30.4%)로 대조군에 비해 투여군에서 유의하게 감소되었다($P < 0.05$)(Fig. 7). TIMP-2는 MMP-2와 동일한 결과를 보였다(Table 3)(Fig. 8).

고 찰

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid가 prostaglandin으로 전환되는 과정에 필수적인 효소로서 COX-1과 COX-2의 두 가지 isoform을 갖는데 COX-1은 구성효소이지만 COX-2는 세포외적인 자극에 의해서만 발현된다.(5) 소화기계 종양세포에서 COX-1의 발현은 증가하지 않으나 COX-2는 정상세포에서는 없던 발현이 종양세포에서는 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다.(6,14) 이러한 COX-2의 과발현은 장관 내 상피세포에서 탈분화(dedifferentiation), 세포 외 기질(extracellular matrix)로의 부착, 장관 세포의 apoptosis의 억제와 관련이 있으며 사람의 대장암 세포에서 전이능의 증가를 보였으며,(7) 또한 대장암에서 신생혈관형성에도 관여하는 것으로 알려져 있어(8) COX-2의 발현은 종양의 형성과 증식 및 전이에 관계가 있는 것으로 생각되고 있다.

기존의 NSAIDs는 비선택적인 COX의 억제제로서 항암 효과가 어느 정도 있는 것으로 알려져 있는 바 설치류를 이용한 동물 실험에서 대장암의 발생을 억제하였고(9) 아스피린(aspirin)을 장기 복용한 사람들과서 이를 복용하지 않은 사람들에 비해 대장암의 발생빈도가 감소하였다는 보고가 있다.(10) 그러나 NSAIDs는 위장에서 위염, 위궤양, 위장관 출혈과 같은 위장장애를 보이는데 이것은 위장의 COX-1 효소의 억제로 인한 것으로(27) 이러한 부작용을 극복하기 위하여 선택적 COX-2 억제제가 개발되었고 현재 류마티스 관절염 등에 널리 쓰이고 있다. 또한 상기 기술한 COX-2 발현과 소화기계 악성 종양의 상관관계를 기초로 하여 이러한 선택적 COX-2 억제가 종양 발생 및 증식과정에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 현재까지 알려진 COX-2 억제의 항암 효과는 정확히 어떤 기전에 의한 것인지 아직 알 수 없다.(8)

본 연구에서 누드마우스에서 배양된 종양조직은 meloxicam을 투여한 군에서 그 성장이 억제되는 것을 알 수 있었

다. 이 종양 성장억제가 어떠한 기전에 의한 것인지 그 정확한 기전은 알 수 없으나 본 연구의 meloxicam 투여군에서 apoptosis의 증가와 종양세포의 증식능의 감소가 관찰되었다.

종양세포의 전이과정은 모든 종양에서 공통적으로 일어나며 첫 단계로 종양세포가 원발병소로부터 이탈하여야 하고, 둘째로 기저막 등 주위 간질조직을 통과하여 순환기계로 침투하여, 셋째로 원격장기로 가서 그곳에 부착하여 모세혈관을 뚫고 주위 장기의 실질로 침범하여 종양으로서 증식하는 과정을 거친다.(1)

종양세포들 사이의 서로간의 이탈은 세포와 세포 사이 혹은 세포와 기질 사이의 접촉에 관여하는 세포부착 물질의 하향조절(down-regulation)에 의해서 이루어지는데(15) 이에 관여하는 세포부착 물질로는 크게 Cadherins, Selectin, Integrins, Immunoglobulin superfamily의 4종류가 있고 그 외에 주요 조직항원(MHC, major histocompatibility complex) 분자와 CD44와 같은 분자들이 있다.(16) 이 중 Cadherin은 세포 상호 간의 인식과 조직의 형태유지에 중요한 역할을 하는 물질로서 N-type, P-type, E-type이 있다. 이 중 E-cadherin이 가장 중요하며 여러 고형 종양에서 하향조절되는 것으로 알려져 있다.(17) 또한 종양의 부분적 침범과 밀접한 관계가 있으며(18), 이것은 종양의 형성단계에 중요한 역할을 한다. Masahiko 등(13)은 쥐의 장관 상피세포에서 COX-2의 발현이 증가하면 세포와 기질 사이의 부착 능력이 감소한다고 하였는데 본 연구에서 meloxicam 투여군에서 E-cadherin의 발현증가를 보였다. CD44는 거의 모든 상피세포에서 발현되며(19) 림프구가 혈관 내피세포와 결합하는데 주역할을 하고 종양의 전이와도 관련이 있는 물질로서(20) 본 연구에서는 대조군과 투여군에서 발현의 차이가 없었다. 이것은 COX-2 억제가 종양의 성장 및 증식의 초기단계에서 필수적인 세포부착 물질의 작용에 관여할 수 있음을 보여준 것으로 향후 다른 세포부착 물질들과의 연구가 필요하겠다.

MMPs (matrix metalloproteinases)는 extracellular matrix (ECM)을 분해하는 단백질 효소로서(21) 이러한 MMPs 생성의 증가 시 여러 종류의 암에서 침윤도와 전이가 증가하는 것으로 알려져 있다.(22)

종양의 전이과정 중 혈관 기저막의 가장 중요한 구조물인 collagen type IV의 분해가 이루어져야 비로소 체내 혈류로의 전이가 가능하며(23) 이러한 collagen type IV의 분해는 MMPs 중에서 주로 MMP-2 (72 kD gelatinase A)와 MMP-9 (92 kD gelatinase B)에 의해서 이루어진다.(23) 이러한 MMP의 활성도는 전단계효소의 활성화와 TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases)라는 억제물질에 의해서 결정된다.(24) TIMPs에는 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4의 4가지 종류가 알려져 있고(25) 그중에서 TIMP-1은 대부분의 간질 collagenase와 MMP-9을 주로 억제하고 TIMP-2는 MMP-2를 주로 억제한다.(26)

본 연구에서 MMP-2와 TIMP-2가 모두 그 발현이 대조군에 비하여 투여군에서 간질 및 세포질 내에서 의미있게 감소하였다. MMP-2의 활성도는 두 가지 기전에 의해서 결정되는데 첫째는 전구효소의 활성화에 의한 것이고, 둘째는 TIMP에 의한 억제이다. 면역조직화학적 염색으로는 비활성형인 전단계 효소와 활성형 효소를 구별하지 못하는 단점이 있다. 그러나 일반적으로 암에서는 활성형이 많기 때문에 본 연구에서 관찰된 mRNA 발현과 면역조직화학적 염색 소견은 암세포에서의 활성형 MMP의 감소라고 추정할 수 있겠다. 대장암 세포를 이용한 in vitro 실험에서 COX-2의 과발현 시 MT-MMP1 (membrane type-MMP1)의 증가로 인하여 MMP-2 활성도가 증가하는 것으로 나타났고 sulindac sulfide를 투여한 결과 이 MT-MMP1의 억제를 통하여 MMP-2의 활성도가 억제되었다.(7) 본 연구에서도 MMP-2의 활성을 억제하는 TIMP-2의 발현이 상대적으로 증가하지 않고 감소하면서 MMP-2의 발현이 감소한 것으로 비추어 meloxicam도 sulindac sulfide와 같은 작용을 하거나 또는 MMP2의 합성을 억제할 것으로 추측된다. TIMP-2는 MMP-2의 억제뿐만 아니라 MMP-2와 결합체를 이룬 후에는 오히려 MMP-2의 분해를 억제하는 효과도 있으며,(27) TIMP-2가 독립적으로 대장암의 성장을 촉진시키는 효과가 있다는 보고가 있다.(28) MMP는 또한 신생혈관형성에서 혈관 내피세포의 이동과 발아에 필요한 물질로 인식되고 있다.(29) 본 연구에서 COX-2 억제제를 사용함으로써 위암세포에서 MMP-2의 발현이 억제되었으나 위암에서는 MMP-9이 MMP-2보다 더 발현이 높다고 알려져 있어 앞으로 COX-2에 의한 MMP-9의 발현억제 정도에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

COX-2의 발현은 meloxicam 투여군과 대조군에서 mRNA와 단백질 level 모두에서 차이가 없었다. 이것은 meloxicam이 COX-2의 발현 자체에는 영향을 미치지 않고 발현된 효소의 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 다른 연구자들도 이와 같은 결과를 보고하였다.(30)

결론적으로 COX-2는 종양의 성장, 증식과 전이능에 관여하는 여러 인자의 활성도에 영향을 미치는 것으로 생각되고 이러한 COX-2의 억제는 종양성장과 전이능의 억제 효과가 있을 것으로 기대된다. 특히 MMPs와 TIMPs는 기저막의 기질을 용해함으로써 전이의 전 과정에 걸쳐서 관여하는 것으로 알려진 바 COX-2 억제의 항암작용과 긴밀한 연관성이 있다고 하겠다.

결 론

COX-2 과발현 위종양 세포주인 MKN45를 누드마우스에 이식하여 발생한 종양조직에서 COX-2 억제제인 meloxicam을 투여하여 종양의 성장과 전이에 미치는 영향을 알아보기 위해 암세포에서의 apoptosis 지수, Ki-67, MMP-2와

TIMP-2에 대한 면역조직화학적 염색 그리고 COX-2 발현에 대한 RT-PCR과 Western blotting을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

이식된 종양의 용적이 감소하여 종양성장을 억제하였다 ($P < 0.01$). 또 종양조직의 apoptosis가 유의하게 증가하였고 ($P < 0.01$), Ki-67에 의한 세포증식지수는 유의하게 감소하였다 ($P < 0.01$). 그러나 COX-2의 mRNA와 단백질의 발현은 투여군과 대조군에서 차이가 없었다 ($P > 0.01$). 세포 간 접착분자인 E-cadherin의 발현은 투여군에서 통계적으로 유의한 증가를 보였고 ($P < 0.05$), CD44v6의 발현은 유의한 차이가 없었으며 MMP-2와 TIMP-2는 유의한 감소를 보였다 ($P < 0.05$).

이상과 같은 결과는 COX-2 억제제가 위종양조직에서 종양의 성장을 억제하였고 특히 종양의 전이에 관계된 접착분자인 E-cadherin 발현은 증가시키며 반면에 간질조직 내로 침습을 용이하게 하는 MMP-2와 TIMP-2의 발현을 억제하는 것으로 보아 앞으로 위암의 근본 절제술 후에 시행하는 항암요법의 보조 약물로서 효과가 있을 것으로 판단되며 이에 대한 추가적 연구가 필요하다고 생각한다.

REFERENCES

- 1) Fidler IJ, Hart IP. Biological diversity in metastatic neoplasm-origins and implications. *Science* 1982;217:998-1002.
- 2) Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis. twenty-eight G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130-8.
- 3) Fidler IJ, Hart IR. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1982;38:2651-60.
- 4) Brostein J, Bull A. The correlation between 13-hydroxyoctadecadienoate dehydrogenase (13-HODE dehydrogenase) and intestinal cell differentiation. *Prostaglandins* 1993;46:387-95.
- 5) Hla T, Nelson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7384-88.
- 6) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhicka A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1994;107:1183-88.
- 7) Masahiko T, Sunao K, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-40.
- 8) Masahiko T, Sunao K, Shingo T, Hitoshi S, Masatsugu H, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-16.
- 9) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in APC 716 knockout mice by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-9.
- 10) Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory

- drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:355-8.
- 11) Pairet M, Van Ryn J, Schierok H, Mauz A, Trummlitz G, Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflamm Res* 1998;47:270-6.
 - 12) Motoyama T, Hojo H, Watanabe H. Comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 1986;36:65-83.
 - 13) Tsuji S, Kawano S, Sawaoka H, Takei Y, Kobayashi I, Nagano K, et al. Evidence for involvement of cyclooxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandin Leukotri Ess Fatty Acids* 1996;55:179-83.
 - 14) Smalley W, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997;39:1-20.
 - 15) MacCarthy JB, Basara ML, Palm SL, Sas DF, Furcht LT. The role of cell-adhesion protein-laminin and fibronectin in the movement of malignant and metastatic cells. *Cancer Metastasis Rev* 1994;4:99-106.
 - 16) Pignatelli N, Vessey CJ. Adhesion molecules: Novel molecular tools in tumor pathology. *Human Pathol* 1994;25:849-56.
 - 17) Mayer B, Johnson JP, Leiti F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, et al. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* 1993;53:1690-5.
 - 18) Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemier R, Gelmann EP, Byers SW. Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ* 1991;2:365-72.
 - 19) Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989;109:929-37.
 - 20) Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44 A Molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989;10:423-28.
 - 21) Matrisan LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 1990;6:121-5.
 - 22) Stearns MA, Wang M. Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 1993;53:878-83.
 - 23) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980;284:67-8.
 - 24) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327-36.
 - 25) Sellers A, Murphy G, Meickle MC, Reynolds JJ. Rabbit bone collagenase inhibitor blocks the activity of other neutral metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;87:581-7.
 - 26) Stetler-stevenson WG, Krutzsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989;264:17374-8.
 - 27) Emonard HP, Remacle AG, Noel AC, Grimaud JA, Stetler-stevenson WG, Foidart JM. Tumor cell surface-associated binding site for the Mr 72,000 type IV collagenase. *Cancer Res* 1992;52:5845-8.
 - 28) Joo YE, Seok KS, Kim J, Kim HS, Rew JS, Park CS, et al. Role of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 1999;14:417-23.
 - 29) Fisher C, Gilbertson-beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Devel Biol* 1994;162:499-510.
 - 30) Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Hori M. Effect of NSAID on proliferation of gastric cancer cells in vitro. Possible implication of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development. *J Clinical Gastroenterol* 1998;27:S48-S53.