

MMP-9/SEAP 벡터를 이용한 새로운 암전이 억제제 검색법의 개발

부산대학교 분자생물학과 ¹일본 동경대학교 의과학연구소 암세포연구부
²국립식품의약품안전청 독성연구소 세포병리과

차희재 · 정주원 · 이유미 · Motoharu Seiki¹
김옥희² · 김규원

A New Assay System for Analysing the Inhibitors of Tumor Invasion and Metastasis Using MMP-9/SEAP Vector

Hee-Jae Cha, Joo-Won Jeong, You Mie Lee, Motoharu Seiki¹,
Ok Hee Kim² and Kyu-Won Kim

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan, Korea;

¹*Department of Cancer Cell Research, Institute of Medical Science,*

University of Tokyo, Japan; ²Pathology Department, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea

During the steps of tumor metastasis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is one of the most important enzymes and acts a key role to degrade the extracellular matrix. Therefore suppressing the expression of MMP-9 may inhibit the tumor invasion and metastasis. In this study, we developed the assay system to analyze the expression of MMP-9 by constructing the MMP-9 reporter vector and confirming the action of reporter protein by SEAP assay. Furthermore, we confirmed the expression pattern of MMP-9 is similar to that of Northern blot and gelatin zymogram assay. This assay system enables to detect the expression of MMP-9 by treating only simple methods. Therefore, we can apply this system to screen the MMP-9 inhibitors in various candidate compounds and factors.

Key Words: MMP-9, SEAP vector, Invasion, Metastasis

서 론

암전이 현상은 1차 종양 부위에서 전이성을 가지게 된 악성 암세포가 이탈되어 주위의 세포의 기질을 침윤하여 혈관이나 림프관내로 유입되어 순환계를 돌다가 다른 부위에서 순환계를 빠져나

와 2차 종양을 형성하는 일련의 과정으로 이루어진다. 이러한 암전이의 과정중 세포외 기질을 분해하여 혈관까지 도달하는 침윤(invasion) 현상은 암전이 현상중 매우 중요한 과정중의 하나이다. 침윤 현상은 이동성을 갖게 된 악성 암 세포가 세포외 기질의 가장 많은 부분을 차지하는 성분인 기저막을 분해하는 여러 효소를 분비함으로써 가능한데 이러한 기저막의 성분을 분해하는 능력의 여부가 암전이 능력과 관련이 있다는 보고들이 있다.^{1,2)}

기저막은 type IV, V 콜라겐, 라미닌, 몇 종류의 당단백질, 그리고 heparin sulfate proteoglycan 등으로 이루어져 있으며^{3,4)} 이러한 성분중 최근 암전이와 관련되어 활발한 연구가 이루어지고 있는 것이 type IV 콜라겐이다. Type IV 콜라겐을 분해하는 효소로는 interstitial collagenase (MMP-1), stromelysin 1 (MMP-3), 72KDa Gelatinase/type IV collagenase (MMP-2), 92KDa Gelatinase/type IV collagenase (MMP-9) 등이 보고되어 있으며^{5,6,7)} 이들 중 특히 MMP-2와 MMP-9이 암세포의 전이 현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. MMP-2의 경우 위암 및 자궁암에 있어서 그 발현 정도가 정상인 조직에서 보다 훨씬 높아져 있음이 보고되었고,^{8,9)} MMP-9의 경우 osteosarcoma로부터 유래된 OST에서 전이 능력과 비례하여 발현 정도가 증가되는 것으로 관찰되었다.¹⁰⁾ 또한 몇몇 악성 종양 세포에서 MMP-9의 높은 발현이 전이 현상을 유도한다고 보고된 바 있다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구에서는 암전이 현상에 중요한 역할을 하는 MMP-9의 upstream promoter 유전자를 secreted alkaline phosphatase (SEAP) 리포터 벡터에 클로닝하여 MMP-9단백질의 발현을 억제하는 물질을 스크리닝하는데 이용하였다. SEAP 리포터 벡터는 그 assay 방법이 용이하고 실험비용이 저렴하여 MMP-9 promoter의 활성에 영향을 주는 물질을 대량으로 스크리닝하기에 매우 적합한 이점이 있다. 따라서 본 연구에서는 MMP-9 promoter 부분을 SEAP 리포터 벡터의 cloning site에 넣어 리포터 벡터를 제조하였으며, 그런 다음 HT1080 인간 fibrosarcoma 세포에서 그 발현을 조사함으로써 항전이 억제제를 스크리닝할 수 있는 assay 방법을 확립하였다. 이와 더불어 MMP-2 및 MMP-9 유전자가 HT1080 세포에서 발현되고 있음을 Northern blot 방법을 통해 확인하였고 이러한 MMP-2와 MMP-9이 단백질 형태로 분비되어 효소 활성이 있음을 gelatin-based zymography를 통해 조사하였다.

이러한 assay 방법을 토대로 대량의 항전이 약제를 스크리닝할 수 있으며 항전이제에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 수준에서의 발현 및 단백질 수준에서의 발현, 활성정도를 Northern 및 zymogram assay로 확인할 수 있는 시스템을 구축

하였다.

재료 및 방법

1) 벡터의 제조

제한 효소의 절단은 특정 양의 DNA에 10X 제한 효소용매와 적당량의 제한 효소를 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 일부를 취하여 1% 한천 겔을 통해 절단 여부를 확인하였다. 절단된 DNA를 1% 한천겔에 전기영동한 후 필요한 부분의 겔을 잘라 dialysis bag에 넣은 후 일정시간 전기영동 하였다. 이렇게 겔로부터 dialysis bag으로 이동한 DNA를 농축한 후 이중 일부분을 재차 한천겔에 전기영동하여 제대로 얻어졌는지를 조사하였다. 순수하게 분리된 DNA를 벡터와 삽입체를 1 : 5의 비율로 넣고 self-ligation을 막아주는 calf intestinal phosphatase와 T4 ligase buffer, T4 ligase를 첨가하여 16°C에 18시간 동안 반응시켰다. Ligation 여부는 일부를 취하여 한천겔에 전기영동하여 확인하였다.

2) Northern blot analysis

먼저 인간의 fibrosarcoma 세포주인 HT1080 세포를 T75 배양용기에 배양하고 이 세포주로부터 total RNA를 acid-guanidium-phenol-chloroform 추출 방법으로 분리하였다. 추출한 RNA를 멸균 증류수에 녹인 후 260 nm 파장에서 흡광도 측정에 의해 정량한 다음, 30 μ g의 RNA를 1.2% agarose-formaldehyde 겔상에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 transfer하여 UV-cross linking시킨다. 위에서 제작한 nitrocellulose membrane을 polyethylene 주머니에 넣어 42°C에서 prehybridization한 다음 ³²P로 label된 MMP-2 또는 MMP-9 유전자 probe를 넣어 42°C에서 24시간 hybridization하였다. 이 filter를 세척한 다음 X-ray 필름에 노출시켜 유전자 발현에 대한 northern 분석을 실시하였다.

3) Gelatin-based zymography

하루동안 배양한 HT1080 세포의 conditioned 배지를 모은 후 1 mg/ml의 젤라틴을 포함하는 10% SDS-polyacrylamide 겔을 사용하여 전기영동하였다. 전기영동에 적용하는 conditioned 배지의 양은

1~2×10³개의 세포에 해당하는 배지를 기준으로 사용하였다. 배지를 겔에 loading한 후 130 volt로 약 3시간 정도 전기영동을 실시하였다. 단백질의 분리가 끝나면 겔을 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 2.5% Triton X-100, 1 μM ZnCl₂로 구성된 washing buffer로 상온에서 30분 정도 두 번 씻었다. Matrix metalloproteinase의 활성을 조사하기 위하여 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.15 NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃를 포함하는 반응용액에 겔을 담그고 37°C 배양기에 넣어 18시간 반응시켰다. 그후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. Matrix metalloproteinase가 있는 부분은 젤라틴 분해가 일어나서 Coomassie brilliant blue로 염색되지 않고 투명하게 보였다.

4) Calcium phosphate transfection

Calcium phosphate-DNA coprecipitation은 20 μg의 DNA (220 μl in TE buffer)와 250 μl의 2X HBS를 섞은 후 31 μl의 2M CaCl₂를 천천히 섞어 상온에서 25분간 방치하였다. 지름 60 mm 배양접시에서 단층으로 자라고 있는 세포의 배지를 제거한 후 새 배지 5 ml을 가하고 흔들면서 calcium phosphate-DNA 침전액을 한방울 씩 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 새 배지 5 ml을 가한 후 이틀동안 더 배양하였다.

5) SEAP assay

HT1080 세포에 MMP-9 SEAP 리포터 벡터를 calcium phosphate 침전 방법으로 transfection 시킨

후 48시간 뒤 250 μl의 배양한 배지를 취하였다. 이때 모든 조건을 동일하게 하고 벡터만 넣지 않고 transfection한 HT1080 세포를 음성 대조군으로 하였다. 배지나 세포에 포함된 endogeneous alkaline phosphatase를 불활성화 시키기 위해 배지를 65°C 5분간 둔 후 15,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 취한 상등액 중 100 μl를 취하여 96 well plate로 옮긴 후 여기에 2 M diethanolamine, 1 mM MgCl₂, 20 mM L-homoarginine이 포함된 2X SEAP buffer를 100 μl 첨가하여 37°C에 10분간 반응시킨다. 10분간 반응시킨 sample에 32 mg의 p-Nitrophenol phosphate를 1X SEAP buffer에 녹인 기질을 각 μl씩 첨가하여 0시간에서 24시간까지 37°C에서 반응 후 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

결 과

1) 인간 HT1080 세포에서 MMP-9 유전자의 발현 및 단백질의 활성조사

세포외 기질의 분해 능력이 뛰어난 MMP-9의 발현 여부를 전이성이 강한 인간의 HT1080 세포에서 확인하기 위하여 Northern blot analysis를 실시하였다. ³²P로 label 된 MMP-9을 probe로 사용하여 hybridization을 실시한 결과, Fig. 1-A와 같이 HT1080 세포에서 MMP-9이 발현되는 것을 관찰하였다. HT1080 세포에서 발현되는 MMP-9 유전자가 실제로 단백질로 합성이 되는지 그리고 그 활성이 존재하는지를 조사하기 위하여 gelatin-

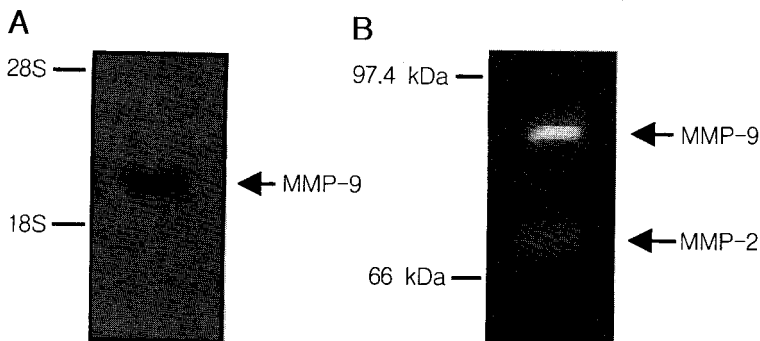


Fig. 1. HT1080 세포에서의 MMP-9 발현. A, Northern blot을 통한 MMP-9 mRNA의 발현 조사 B, Gelatin-based zymography를 통한 MMP-9 단백질 발현 및 활성조사.

based zymography를 실시한 결과 Fig. 1-B와 같이 HT1080 세포에서 92KDa의 MMP-9이 단백질로써 발현이 되고 있으며 젤라틴의 분해 활성도 역시 관찰되었다.

2) Secreted alkaline phosphatase (SEAP) 유전자를 이용한 MMP-9 리포터 벡터의 제조

본 연구에서 항전이제 검색에 사용할 pMMP9P-SEAP 벡터의 제조방법은 Fig. 2와 같다. pGEM4 plasmid에 포함된 MMP-9 promoter 유전자를 XbaI

으로 잘라낸 후 중간단계로 pGEMtzf 벡터에 ligation 시켰다. MMP-9 promoter 유전자에는 SEAP vector의 multiple cloning site (MCS)에 cloning 할 수 있는 제한효소 자리가 없으므로 제한 효소 자리를 만들어주기 위하여 pGEM7zf 벡터를 중간단계로 사용하였다. pGEM7zf 벡터에 클로닝하기 전 MMP-9과 pGEM7zf 벡터를 XbaI으로 자른 뒤 크기 및 양을 확인하였다. MMP-9 promoter와 pGEM7zf 벡터를 ligation 후 벡터가 바로 들어갔는지를 ligation 결과로 얻은 벡터를 pGEM7zf 벡터내에 포함된 EcoRI 효소로 절단하여 확인하였다. pGEM7zf 벡터의 MCS에 포함된 HindIII, SphI을 이용하여 중간단계 벡터를 이중으로 절단하여 SEAP 벡터에 ligation하여 pMMP9p-SEAP 벡터를 완성하였다. 완성된 pMMP9p-SEAP 벡터를 MMP-9 promoter가 바른 위치에 들어갔는지를 확인하기 위하여 SEAP 벡터에 포함된 XhoI과 MMP-9 promoter에 포함된 HindIII 자리를 각각 제한 효소로 절단하여 확인하여(Fig. 3-A) 완성된 SEAP 벡터의 모식도는 Fig. 3-B와 같다.

3) HT1080 세포에서 SEAP assay를 통한 MMP-9 유전자 발현 여부의 조사

본 연구에서 제조한 pMMP9P-SEAP 벡터가 리포터 벡터로써 그 작용을 수행할 수 있는지를 조사하기 위하여 pMMP9P-SEAP 벡터를 HT1080 세포에 transfection한 후 SEAP 활성을 다음과 같이 측정하였다. Fig. 4와 같이 SEAP 리포터 벡터를 transfection 시킨 세포에서는 시간이 지남에 따라 높은 흡광도 값을 나타내어 SEAP 활성을 나타내는 반면, 대조군으로 벡터를 첨가하지 않고 transfection 시킨 세포에서는 시간이 경과하더라도 흡광도 값이 증가하지 않아서 SEAP 활성을 나타내지 않았다. 따라서 pMMP9P-SEAP 벡터를 HT1080 세포내에서 MMP-9의 발현을 조사할 수 있는 리포터 벡터로써 사용할 수 있음이 확인되었다.

4) SEAP assay를 통한 Ursolic Acid의 MMP-9 유전자 발현 감소 조사

본 연구에서 확립된 MMP-9의 발현을 조사할 수 있는 리포터 벡터를 이용하여 MMP-9의 발현을 억제시키는 물질을 검색하는데 응용하기 위하

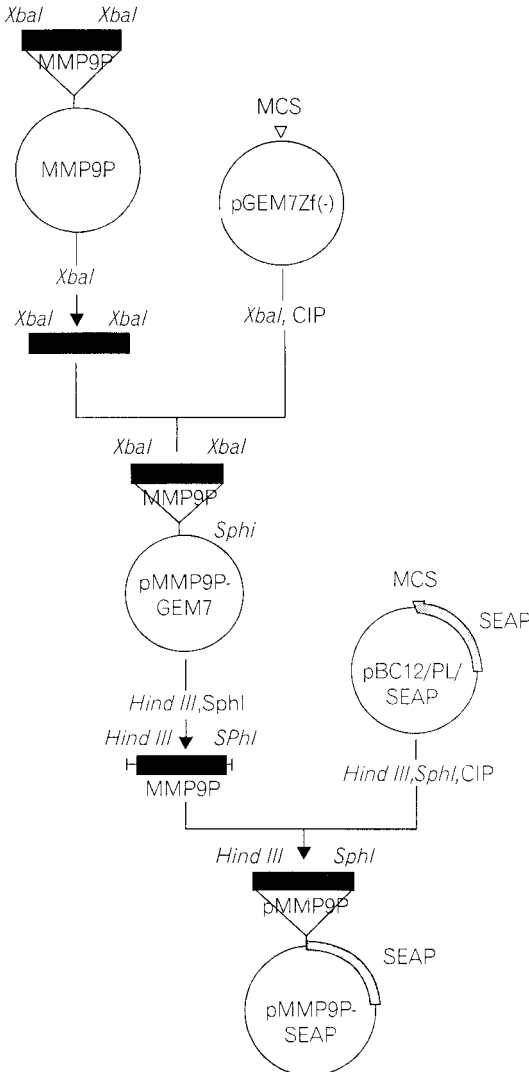


Fig. 2. pMMP9P-SEAP 벡터의 제조방법.

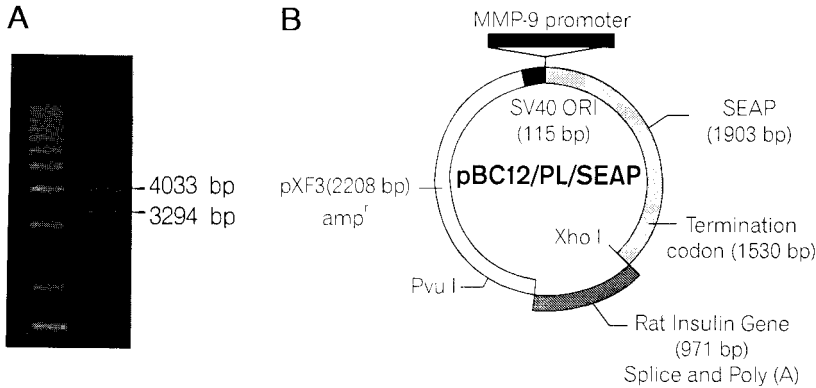


Fig. 3. pMMP9P-SEAP 벡터의 제한효소 지도와 구조. A, 제한효소 Xho I, BamHI를 이용한 완성된 벡터의 확인, 완성된 pMMP9P-SEAP 벡터 구조.

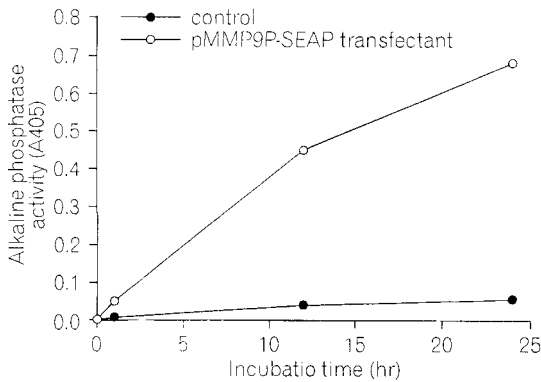


Fig. 4. MMP-9 리포터 벡터인 pMMP9P-SEAP 벡터를 transfection 시킨 HT1080 세포에서의 SEAP 활성.

여 Ursolic Acid (UA)를 사용하였다. UA는 HT1080 세포에서 MMP-9의 발현을 감소시키는 물질로 이미 보고된 바가 있다.¹⁴⁾ pMMP9p-SEAP 리포터 벡터를 transfection 시킨 HT1080 세포에 UA를 3일 혹은 6일 처리하였다. 그 결과 UA 7.5 μ M, 10 μ M 을 처리한 경우 3일, 6일 모두에서 SEAP 활성이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5-A). 이러한 SEAP 활성은 세포수에 의해 변할 수 있기 때문에 MTT assay를 통하여 UA 처리시 살아 있는 세포수를 측정 한 결과 Fig. 5-B와 같이 UA가 세포수에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

고 찰

암세포의 침윤(invasion) 현상은 암전이에 있어

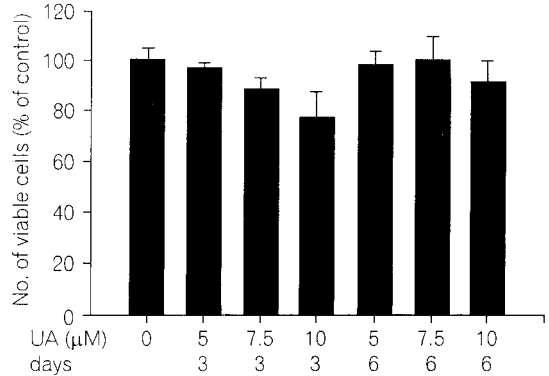
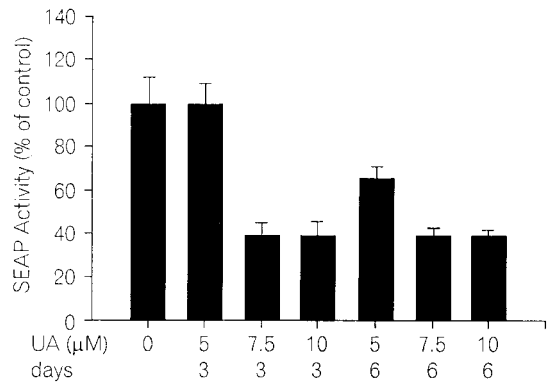


Fig. 5. pMMP9P-SEAP 벡터를 이용한 Ursolic Acid의 MMP-9 발현 억제효과 검색.

서 가장 중요한 단계중의 하나이며²⁾ 또한 침윤 현상을 억제할 수 있다면 암전이 과정의 차단도 가능하다. 이러한 암세포 침윤 현상에 가장 중요하게 작용하는 단백질 중의 하나가 MMP-9이며,

MMP-9의 과다발현에 의한 암전이 능력의 상승 또한 이미 보고된 바가 많다.^{8,9)} 따라서 MMP-9을 효과적으로 억제할 수 있다면 암세포의 침윤현상을 저하시킬 수 있으며 나아가서는 암전이를 억제할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 암전이 과정에 세포외 기질의 분해에 관여하는 MMP-9 유전자의 발현을 조사할 수 있는 리포터 벡터를 개발하여 이 리포터 벡터가 실제로 세포내에서 제대로 작동하는지를 SEAP assay에 의해 확인함으로써 MMP-9의 발현을 조사할 수 있는 새로운 assay system을 개발하였다. 이러한 assay system은 MMP-9 유전자의 억제 여부를 복잡한 실험과정을 거치지 않고 검색하고자 하는 물질을 처리후 간단한 assay 만으로 그 효과를 검색할 수 있다. 그러므로 MMP-9의 발현을 억제할 것으로 예상되는 여러 물질들을 단시간에 대량으로 저렴하게 검사할 수 있다는 잇점을 지녔다.

전이성이 강한 인간 섬유육종암세포인 HT1080에서 MMP-9의 발현을 조사한 결과 유전자와 단백질 수준 모두에서 과량 발현되고 있음을 확인하였다(Fig. 1). 이러한 MMP-9의 발현을 본 연구에서 확립한 MMP9-SEAP 리포터 벡터를 HT1080 세포에 transfection 시켜 확인한 결과 SEAP activity가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). MMP-9의 발현을 억제시키는 물질을 스크리닝 하는데 본 assay system을 활용하기 위해서 이미 MMP-9의 발현을 억제시킨다고 보고된 UA를 사용하여 SEAP assay를 실시하였다. 그 결과 MMP9-SEAP 리포터 벡터를 transfection 시킨 HT1080 세포가 UA에 의해 SEAP activity가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 앞으로 이러한 과정을 거쳐 MMP-9 발현 억제물질을 검색할 수 있으며, 검색된 MMP-9 억제물질은 항전이제로써의 개발이 가능할 것으로 추정된다.

결 론

암세포의 침윤과 전이단계는 세포외 기질의 분해를 반드시 수반한다. MMP-9은 세포외 기질을 분해시키는 단백질로서 MMP-9 유전자 발현을 검색할 수 있는 방법으로 이 유전자의 promoter를

이용한 리포터 벡터를 제작하였다. 이러한 assay system은 특정 유전자의 발현 여부를 보고자 할 때, 복잡한 실험과정을 거치지 않고도 검색하고자 하는 물질을 처리한 후 간단한 assay의 수행만으로 그 효과를 단시간에 대량으로 검색할 수 있다는 잇점을 지닌다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 선도기술개발사업(G7 project, 과제번호: 1541-211) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Liotta LA. Tumor invasion and metastases-Role of the extracellular matrix : Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7.
- 2) Nakajima M, Welch D, Belloni PN. Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 1987; 47: 4869-4876.
- 3) Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S. Role of collagenase in tumor cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 1982; 1: 277-288.
- 4) Goldfarb RH, Liotta LA. Proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Semin Thromb Hemost* 1986; 12: 294-307.
- 5) Collier IE, Smith J, Konberg A. The structure of the human skin fibroblast collagenase gene. *J Biol Chem* 1989; 263: 10711-10713.
- 6) Chin JR, Murphy G, Werb Z. Stromlysin, a connective tissue degrading metalloproteinases secreted rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 1985; 260: 47-52.
- 7) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ. H-ras oncogene transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 6579-6587.
- 8) Levy AT, Ciocco V, Sibel ME. Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 439-444.
- 9) Harmainen HA, Karttunen T, Hurskainen T. Expression of 72 KDa Type IV collagenase (gelatinase A) in benign and malignant ovarian tumors. *Lab Invest* 1993; 69: 312-321.
- 10) Nakajima M, Morikawa K, Fabra A. Influence of

- organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human coloncarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1890-1898.
- 11) Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type-IV collagenases in human skin cancer by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992; 52: 1336-1341.
- 12) Sato H, Kida Y, Mai M, Seiki M. Expression of gene encoding type-IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 1992; 7: 77-85.
- 13) Sato H, Kita Y, Seiki M. v-Src activates the expression of 92-KDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. *J Biol Chem* 1993; 268: 23460-23468.
- 14) Cha HJ, Bae SK, Lee HY, Lee OK, Sato H, Seiki M, Park BC, Kim KW. Anti-invasive activity of Ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 2281-2284.
-