

두툽상어 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3)의 혈관 신생 억제 작용

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

김지태 · 정주원 · 손태권 · 김규원

Anti-angiogenic Effect of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP-3) from Shark, *Scyliorhinus torazame*

Ji Tae Kim, Joo-Won Jeong, Tae-Kwon Sohn and Kyu-Won Kim

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Shark cartilage has been reported to strongly inhibit the primary tumor, however, anti-angiogenic substances from this tissue were not elucidated yet. Previously, we cloned the full-length cDNA encoding TIMP-3 known to inhibit the angiogenesis of primary tumor, from the cartilage of *Scyliorhinus torazame*. In order to investigate the anti-angiogenic activity of shark TIMP-3 (sTIMP-3), we initially constructed sTIMP-3 transfected HT1080 human fibrosarcoma cells. *In vitro* invasion and migration assays showed that concentrated conditioned media (CCM) of sTIMP-3 transfectant decreased the invasive activity and migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Also, in *in vitro* tube formation assay, CCM of sTIMP-3 transfected HT1080 decreased the ability of tube formation in HUVECs. To determine whether sTIMP-3 had an effect of anti-angiogenesis *in vivo*, we used chorioallantoic membrane (CAM) assay with CCM of NIH3T3 transfectant. CCM of sTIMP-3 transfected NIH3T3 inhibited new blood vessels of chicken embryo. In addition, to produce recombinant sTIMP-3 protein, prokaryotic sTIMP-3 expression vector was constructed and induced. In CAM assay on recombinant sTIMP-3 fusion protein produced in *E. coli*, formation of new blood vessels was inhibited too. These results suggest that TIMP-3 of *Scyliorhinus torazame* has an anti-angiogenic activity.

Key Words: Shark, TIMP, Angiogenesis

서 론

혈관 신생(angiogenesis)은 기존에 존재하는 혈

관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 과정¹⁾으로 발생 초기부터 성인에 이르기까지 다양한 생리 현상과 관련되어 있다.²⁾ 이러한 혈관 신생은 류마티스 관절염, 당뇨병성 망막증, 건선, 만성염증 및

악성암과 같은 병적인 조건 뿐만 아니라 상처 치유 및 착상, 배의 발생 과정과 같은 정상적인 생리 활동에서도 중요한 역할을 담당한다.^{3~5)} 이러한 현상은 혈관 신생을 촉진하는 혈관 신생 활성인자(angiogenic activator)와 저해인자(angiogenic inhibitor)의 조절에 의해 균형을 이룬다.⁶⁾ 특히 비정상적인 혈관 신생에 의해 발생하는 질병인 악성암의 경우 혈관 신생 저해인자에 의해 암세포의 증식과 전이를 차단할 수 있다.

특히, 혈관 신생 억제 단백질로 알려진 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)는 지금까지 4 가지 family가 동정되어 연구되어지고 있다.^{7~10)} 이러한 TIMP family는 22~30 kDa 단일 polypeptide로서 아미노산 수준에서 서로 40~50% 상동성을 가지고 있으며, 최근 악성 암세포가 이웃하는 세포들로부터 떨어져 나와 주변의 기질을 파괴하고 이동하여 혈관기저세포 안으로 침투하는 암 전이과정에서 세포 외 기질성분들(extracellular matrix, ECM)을 파괴하여 암세포의 전이가 용이하도록 하는데 결정적인 역할을 하는 효소^{11,12)}인 matrix metalloproteinase (MMP)와 1:1로 결합하여 효소활성을 저해하여 혈관 신생의 균형을 조절하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ TIMP의 주요 기능인 MMP와의 결합에 의한 효소활성 저해 이외에도, 세포 성장 촉진 활성,^{14,15)} 계배 섬유아세포의 형질 전환,¹⁵⁾ 혈관내피세포의 증식 억제¹⁶⁾ 및 인간의 양막과 닭의 난황막에서의 혈관 신생을 억제하는 것으로 밝혀져 있으며,^{17,18)} 혈관 신생 활성인자로 알려진 VEGF와 bFGF에 의해 유도되는 혈관내피세포의 이동, collagen gel 전이를 억제하며 암의 성장을 억제한다고 알려져 있다.^{19,20)}

상어를 비롯한 연골어류는 다른 조직에 비해 특이적으로 혈관이 드물게 분포된 조직이며 혈관 신생 억제인자가 합성되어 혈관 신생 억제작용을 나타내는 것으로 알려진^{21,22)} 연골의 양이 다량 존재하고 있다. 또한 상어 연골 추출물에 의한 혈관 신생 억제 활성 또한 매우 높은 것으로 보고되어 있으나,^{23,24)} 아직 그 구체적인 인자의 동정은 이루어지지 않은 상태이다. 그리하여 본 연구팀에서는 우리나라 연근해에 서식하는 두툽상어(*Scyliorhinus torazame*)의 연골 추출물에서 혈관 신생 억

제활성을 확인하였으며,²⁵⁾ 혈관 신생 저해 단백질인 TIMP-3 (Accession number, AF110767) 및 활성 단백질인 MT3-MMP (Accession number, AF244994) 유전자를 연골 및 뇌 조직으로부터 클로닝한 바 있다.

본 연구에서는 두툽상어의 연골에서부터 클로닝된 두툽상어 TIMP-3 유전자 발현 벡터를 구축하여 인간 육종암 세포인 HT1080 세포에 stable transfection시킨 후, 그 concentrated conditioned media (CCM)를 혈관내피세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)에 처리하여 *in vitro*에서 혈관 신생 억제효과를 검색하였다. 또한 쥐의 섬유아세포인 NIH3T3 세포에 transient transfection 시킨 후, 그 CCM으로 *in vivo* CAM assay를 실시하여 혈관 신생 억제능을 조사하였다. 더불어, *E. coli*에서 recombinant protein을 획득하여 *in vivo* CAM assay를 통하여 혈관 신생 억제효과를 검증하였다. 이러한 연구를 토대로 악성암의 혈관 신생 억제 및 항전이에 대한 항암작용을 검증하여 어류로부터 암 예방제 및 항암제, 항 류마티스 관절염 및 혈관 신생 관련 질병에 대한 새로운 의약품의 개발을 위한 기초 연구를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 세포주와 세포의 배양

(1) HT1080, NIH3T3 세포의 배양: 인간 육종암 세포주인 HT1080 세포 및 쥐의 섬유아세포주인 NIH3T3 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco)에 1%의 penicillin-streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2~3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 37°C 포화습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 시행되었다.

(2) 혈관내피세포의 배양: 혈관내피세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)은 20%의 FBS, 3 ng/ml의 bFGF, 100 µg/ml의 heparin 및 1%의 P-S을 첨가한 medium 199 (M199, Gibco)에서 단층 배양되며 2~3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 37°C 포화습도

로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 시행되었다. 실험에서는 passage 19와 23 사이의 세포를 사용하였다.

2) 벡터의 제조

(1) **원핵세포 발현벡터의 제조:** 두툽상어 TIMP-3가 포함되어 있는 pGEMT-easy 벡터에 *XhoI*과 *NotI* 제한효소를 처리한 후 원핵세포 발현벡터인 pGEX-4T-1 (Pharmacia)의 *XhoI/NotI* 부위에 삽입하였다. 이를 대장균에 형질전환시켜 insert가 삽입된 클론을 분리한 후 제한효소 분석을 통하여 두툽상어 TIMP-3 발현벡터(pGEX-4T-1/sTIMP-3)를 제작하였다.

(2) **포유동물 발현벡터의 제조:** 두툽상어 TIMP-3가 포함되어 있는 pGEMT-easy 벡터에 *EcoRI* 제한효소를 처리한 후, 동일한 제한 효소를 처리한 포유동물 발현벡터인 pCDNA3 (Invitrogen)에 처리한 후 gel에서 분리하였다. 분리한 두 product들을 ligation하여 두툽상어 TIMP-3 유전자를 발현할 수 있는 pCDNA3/sTIMP-3 벡터를 제작하였다.

3) Calcium phosphate transfection

Calcium phosphate-DNA coprecipitation은 pCDNA3 및 pCDNA3/sTIMP-3, 각각의 DNA 20 µg (220 µl in TE buffer)과 250 µl의 2X HBS를 섞은 후 31 µl의 2 M CaCl₂를 천천히 섞어 상온에서 25분간 방치하였다. 지름 100 mm 배양접시에서 단층으로 자라고 있는 세포의 배지를 제거한 후 새 배지 10 ml을 가하고 흔들면서 calcium phosphate-DNA 침전액을 한방울씩 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 새배지 10 ml을 가한 후 이틀 동안 더 배양하였다. 그런 다음 NIH3T3 transient transfectant의 경우 CM을 획득하여 농축한 다음 CAM assay를 수행하였으며, HT1080 transfectant의 경우 이때부터 이틀에 한번씩 G418 (geneticin)을 처리하여 stable transfectant인 colony가 나타날 때까지 배양을 계속하였다.

4) *In vitro* invasion assay

Transwell plate (Costar)의 polycarbonate filter의 아래부분에 type IV collagen gel (0.5 mg/ml) 10 µl

를 골고루 분포시킨 후 1시간 동안 말렸다. 그런 다음 filter의 윗부분에 Matrigel (0.5 mg/ml, Collaborative Research, Inc., Waltham, MA) 10 µl를 골고루 분포시켜 완전히 말렸다. 0.1%의 BSA를 함유한 배지 600 µl가 들어있는 24 well plate에 transwell을 올리고 각 HT1080 transfectant의 concentrated conditioned media (CCM) 및 HUVECs (5 × 10⁴ cells/well)를 포함한 배지 100 µl를 transwell에 넣었다. 이것을 37°C, 5% CO₂가 있는 포화 습윤 배양기에 16시간에서 24시간 배양하여 침윤을 유도한 후 polycarbonate filter를 메탄올로 고정하여 hematoxylin/eosin 염색을 하고 400 배율의 광학 현미경으로 침윤한 세포를 계수하였다.

5) Wounding migration assay

HUVECs를 60 mm 배양 접시에 바닥이 보이지 않는 정도가 될 때까지 배양한 후 면도날로 세포에 상처를 내어 reference line을 긋고 일부를 끊어 내었다. 그런 다음 serum free medium으로 3번 씻어내고 동시에 1 mM thymidin과 HT1080 transfectant의 CCM을 첨가하여 24시간 동안 37°C, 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 버리고 PBS로 씻어내고 메탄올로 1분간 고정시키고 Giemsa로 5분간 염색한 후 물로 씻어내었다. 위상차 현미경을 이용하여 40배로 관찰하여 reference line을 넘어 이동한 세포 수를 세었다.

6) *In vitro* tube formation assay

10 mg/ml 농도의 Matrigel 300 µl를 24 well plate에 떨어뜨려 겔화 되도록 37°C에서 30분 동안 두었다. 겔이 형성된 후 바닥이 보이지 않는 정도로 배양된 HUVECs를 trypsinizaion하여 4 × 10⁵ cells/well로 분주하고 HT1080 transfectant의 CCM을 첨가하여 37°C 배양기에서 배양하고 위상차 현미경으로 겔속을 파고 들어가 혈관과 유사한 모양을 형성하는 지를 시간대 별로 관찰하였다.

7) *E. coli*에서 두툽상어 TIMP-3 단백질의 발현 유도 및 추출

pGEX-4T-1/sTIMP-3 원핵세포 발현벡터를 *E.*

coli BL21에 transformation시켜 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 LB media에 15시간 동안 배양한다. 이 culture를 LB media로 1/100로 희석하여 30 및 37°C에서 배양하여 O.D₆₀₀ 값이 0.6, 1.0, 1.5에 도달했을 때 isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG)를 최종농도 1.0 mM로 첨가하고 시간대별로 발현을 유도한다. 이 발현을 유도한 1 ml의 배양액 으로부터 pellet을 얻고, 이 pellet에 200 µl의 sample buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 1% glycerol, 0.1% bromophenol blue)에 현탁시킨 후 90°C에서 5분간 가열 후 10 µl의 샘플을 12%의 acrylamide를 사용하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

상어 TIMP-3의 단백질은 guanidinium buffer (6 M guanidinium-HCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 사용하여 추출하였다.²⁶⁾ 혈관 신생 억제작용을 조사하기 위해 CAM assay에 필요한 농축한 recombinant shark TIMP-3 GST fusion protein과 GST protein을 각기 정량하여 준비하였다.

8) Chorioallantoic membrane (CAM) assay

수정란을 구입하여 45시간 동안 18°C에 놓아둔 다음 90% 습도가 유지되는 37°C 배양기에 넣어 이를 0일배로 하여 배양하였다. 3일배가 되면 계란의 끝부분에 구멍을 내어 주사기로 알부민을 3 ml 뽑아낸 뒤, 계란의 공기 주머니가 있는 쪽을 70% 알코올로 소독한 후, 메스를 이용하여 지름 3 cm 크기의 원형 창문을 만들었다. 공기 주머니의 아래에 있는 막은 핀셋으로 제거한 후 유리테이프를 구멍을 막았다. 혈관 형성 저해제의 검색을 위하여 이것을 계속 배양기에서 키워 4일배가 되면 thermax coverslip에 NIH3T3 transfectant의 CCM 및 PBS에 존재하는 GST 및 GST-shark TIMP-3 recombinant protein을 도포하여 이를 40분 동안 말린 후 다 마른 것을 확인하고 4일배의 유리테이프를 떼어낸 후, 이 coverslip을 발생 중의 embryo CAM 표면에 놓고 다시 유리테이프를 창문을 막았다. 이를 배양기에서 3일 동안 배양시킨 후 10% fat emulsion (Intralipid, 녹십자)을 CAM막 안쪽에 주입하여 해부현미경(magnification, ×8)으로 혈관 신생 억제효과를 관찰하고 CAM의 사진

을 찍었다.

결 과

1) 혈관내피세포의 침윤에 대한 HT1080 상어 TIMP-3 transfectant CCM의 항침윤 활성 조사

먼저 두툽상어 TIMP-3의 활성을 조사하기 위해 HT1080 세포에 empty vector 및 상어 TIMP-3 expression vector를 HT1080 세포에 stable transfection

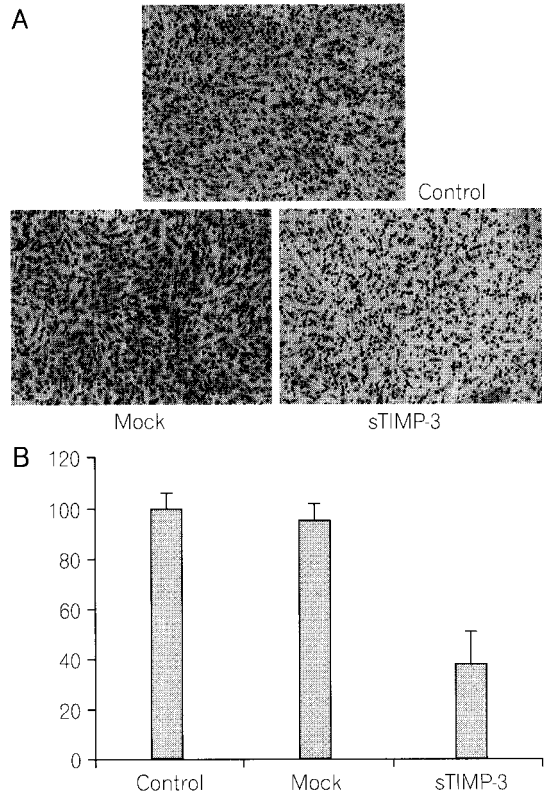


Fig. 1. Effects of CCM from shark TIMP-3 transfected HT1080 on the invasion of HUVECs. (A) Light microscopic examination of the HUVECs treated with CCM (×400). (B) The number of invaded cells was counted and mean values were determined under light microscopy (×400). Control, HUVECs treated with CCM of untransfected HT1080; Mock, HUVECs treated with CCM of empty vector transfected HT1080; sTIMP-3, HUVECs treated with CCM of shark TIMP-3 expression vector transfected HT1080.

하여 그 발현을 northern blot 및 RT-PCR로 확인하였다(결과 생략). 그런 다음 두툽상어 TIMP-3의 침윤 억제 활성을 조사하기 위해 nontransfected HT1080 세포를 포함하는 각각의 세포의 conditioned media를 농축한 다음, 혈관내피세포인 HUVECs에 동량 처리하여 *in vitro* invasion assay를 통하여 항침윤 활성을 조사하였다. 18시간 후 관찰한 결과, 상어 TIMP-3 transfectant의 CCM를 처리한 HUVECs에서 Control 및 Mock의 CCM을 처리한 HUVECs에 비해 약 60% 정도 invasion이

감소함을 확인하였다(Fig. 1).

2) 혈관내피세포의 이동에 대한 HT1080 상어 TIMP-3 transfectant CCM의 영향조사

두툽상어 TIMP-3에 의해 혈관 신생과정 중 초기단계에 발생하는 혈관내피세포의 이동, 즉 혈관 주위의 ECM을 분해하여 세포의 이동에 관여하는 효소들의 활성을 저해하는가를 조사하기 위해 HUVECs를 이용한 wounding migration assay를 실시하였다. 그 결과 TIMP-3 transfectant의 CCM을 처리한 HUVECs에서의 cell migration이 Control에 비해 40%, mock에 비해 약 20% 가량 감소함을 관찰하였다(Fig. 2).

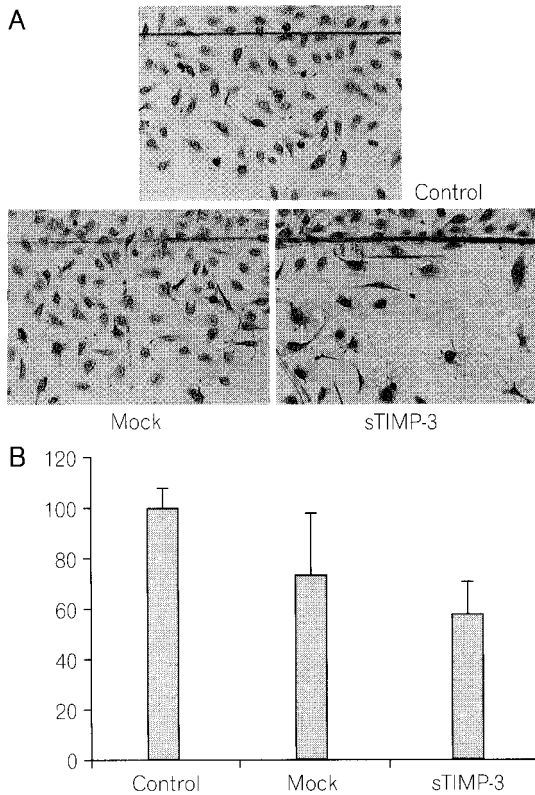


Fig. 2. Effects of CCM from shark TIMP-3 transfectant HT1080 on the migration of HUVECs. At the 90% confluency, the monolayers were wounded with a razor blade. Wounded cells were rinsed with serum free medium and then incubated with same amount of each CCM for 24 h. The number of HUVECs that moved beyond the reference line was counted. (A) Light microscopic examination of the HUVECs treated with CCM ($\times 400$). (B) The number of migrated cells was counted and mean values were determined under light microscopy ($\times 400$).

3) 혈관내피세포의 tube 형성에 대한 HT1080 상어 TIMP-3 transfectant CCM의 영향조사

두툽상어 TIMP-3의 *in vitro* 상에서 혈관 신생 억제정도를 관찰하기 위해 HUVECs를 대상으로 matrigel 상에서 *in vitro* tube formation assay를 실시하였다. 초반의 tube 형성은 nontransfectant 및 mock의 CCM을 처리한 HUVECs와 거의 유사한

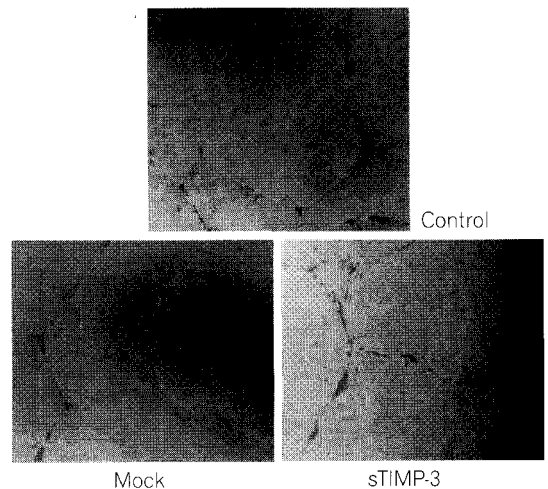
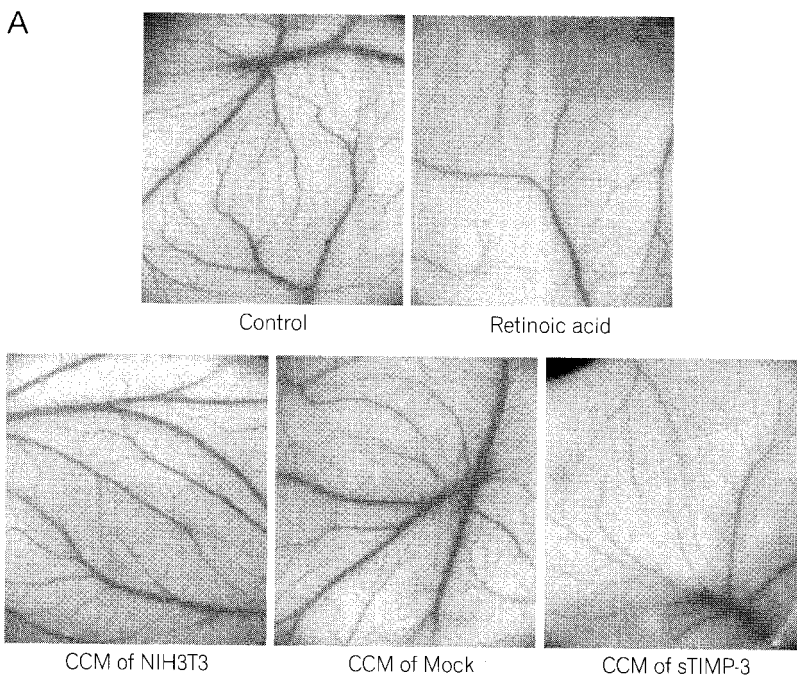


Fig. 3. Effects of CCM from shark TIMP-3 transfectant HT1080 on the tube formation of HUVECs on Matrigel. HUVECs were plated on Matrigel and cultured with M199 containing 5% FBS and same amount of each CCM. The formation of tubular structure was detected by phase-contrast microscopy.

경향이 관찰되었으나, 시간이 지남에 따라, TIMP-3 transfectant의 CCM을 처리한 HUVECs에서의 tubule 형태의 혈관이 HT1080 세포와 mock의 CCM을 처리한 HUVECs에서 보다 빠르게 파괴되어 가는 것을 확인하였다(Fig. 3).

4) *In vivo* CAM assay를 이용한 TIMP-3 transfectant의 CCM의 혈관 신생 억제활성 조사
 두툽상어 TIMP-3의 혈관 신생 억제활성을 *in*

*vivo*에서 조사하기 위하여, NIH3T3 세포에 empty vector 및 상어 TIMP-3 expression vector를 transient transfection하여 그 발현을 RT-PCR로 확인하였다(결과 생략). 그런 다음 각각의 CCM을 대상으로 CAM assay를 실시하였다. 음성 대조군으로 coverslip만을 CAM에 부착시키고 혈관 신생 억제 효과가 있다고 이미 알려진 retinoic acid 1 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 를 양성 대조군으로 처리한 후, 각각의 CCM을 30 μg 처리하여 비교 관찰하였다. Fig. 4A에서 보는 바



B

Compounds	Dose ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	Total No.tested in CAM assay	%positive
Control		4	25
RA	1	4	75
NIH CCM	30	12	25
Mock CCM	30	12	25
sTIMP-3 CCM	30	10	50

Fig. 4. Anti-angiogenic effect of CCM from shark TIMP-3 transfectd NIH3T3 on CAM inhibition assay. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make the vascular network clear. Control CAMs were used to be treated with blank coverslips. Positive responses were seen in the CAMs implanted with coverslips loaded with R.A (1 $\mu\text{g}/\text{egg}$). (A) Photographs of CAM after three day-treatment with R.A and CCM. (B) Anti-angiogenic activity of CCM from each transfectant.

와 같이 상어 TIMP-3의 CCM을 처리한 CAM에서 다른 CCM을 처리한 CAM보다 혈관 신생 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 이를 도표화하면 Fig. 4B와 같으며 nontransfectant 및 mock의 CCM에 비해 25% 혈관 신생 억제활성이 있음을 확인하였다.

5) E. coli에서 두툽상어 TIMP-3 단백질의 발현 유도

pGEX-4T-1/sTIMP-3 발현벡터를 E. coli BL21에 형질전환 시킨 후, 여러 가지 발현 유도 조건을 변화시켜 최적 단백질 발현 조건을 조사하였다. IPTG 첨가시의 O.D₆₀₀ 값이 0.6, 1.0, 1.5에서의 발현 정도와 IPTG 첨가 후 2, 5, 7, 16시간 동안의 배양 시간 및 30, 37°C 배양 온도에서의 단백질의 발현 정도를 각기 조사하였다. 그 결과, OD₆₀₀ 값이 1.0에 도달했을 때 최종농도 1.0 mM IPTG를 첨가하여 30°C에서 5시간 동안 배양하였을 시, 가장 많은 단백질을 획득하였다(Fig. 5).

6) In vivo CAM assay을 이용한 recombinant shark TIMP-3 fusion protein의 혈관 신생 억제활성 조사

Insoluble한 형태로 존재하는 상어 TIMP-3의 단백질을 획득하기 위해 guanidinium buffer (6 M guanidinium-HCl, 0.1 M NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 사용하여 그 단백질을 추출하였다. 혈관 신생 억제작용을 조사하기 위해 CAM assay에 필요한 농축 recombinant shark TIMP-3

GST fusion protein과 GST protein을 준비한 후, 각기 정량하여 CAM에 처리하였다. 소량, 즉 2, 10 µg/egg의 상어 TIMP-3 GST fusion protein을 처리하였을 시, 대조군인 GST protein에 비해 혈관 신생에 큰 영향을 나타내지 아니하였으나, 50 µg/egg로 처리 시 100% 혈관 신생 억제효과를 관찰하였다(Fig. 6).

고 찰

혈관 신생은 착상 및 배의 발생, 상처 치유 등의 정상적인 생리 활동에서 중요한 역할을 담당하지만, 섬유성 혈관종, 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증, 그리고 특히 암조직의 성장 및 전이 등과 같은 병적인 과정을 유도하기도 한다.³⁻⁵⁾

이와 관련하여 연골은 다른 조직에 비해 특이적으로 혈관 신생이 차단된 조직이란 사실에 근거하여, 연골에서의 혈관 신생 억제인자 검색이 진행되고 있다. 포유동물인 소의 연골에서 분리한 collagenase 활성 저해 기능을 가진 cartilage-derived inhibitor (CDI) 및 소의 chondrocyte의 conditioned medium (CM)에서 분리한 chondrocyte-derived inhibitor (ChDI) 등이 지금까지 보고된 대표적인 인자로 보고된 바가 있다.^{27,28)} 특히 연골 어류인 상어는 이러한 연골의 풍부한 공급원이 될 수 있고, 그 연골의 단백질 추출물이 혈관 신생을 차단함으로써 종양의 성장을 억제한다는 사실이 보고되었다.^{23,24)} 더불어 상어의 연골 추출물이 관절염 치료제 또는 항암제 등의 의약품으로 사용되고 있으나, 아직 그 구체적인 인자의 동정 및 특정 유전자의 분리는 이루어지지 않은 실정이다.

또 다른 collagenase 활성 저해 기능을 가진 인자로 TIMP family의 경우 암세포의 전이에 관여한다고 보고된 MMP와 결합하여 그 활성을 저해할 뿐만 아니라,¹³⁾ 혈관내피세포의 증식 억제,¹⁶⁾ 인간의 양막 및 닭의 난황막에서의 혈관 신생 억제,^{17,18)} VEGF와 bFGF 유도성 혈관내피세포의 이동 및 collagen gel 전이를 억제하며 암의 성장을 억제한다고 알려져 있다.^{19,20)}

이전에 본 연구팀에서는 두툽상어의 연골조직에서 추출된 단백질에서 혈관 신생 억제활성을

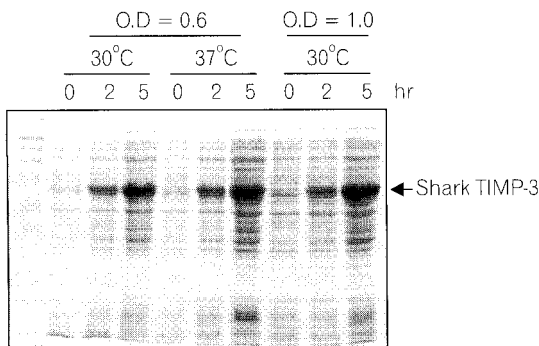
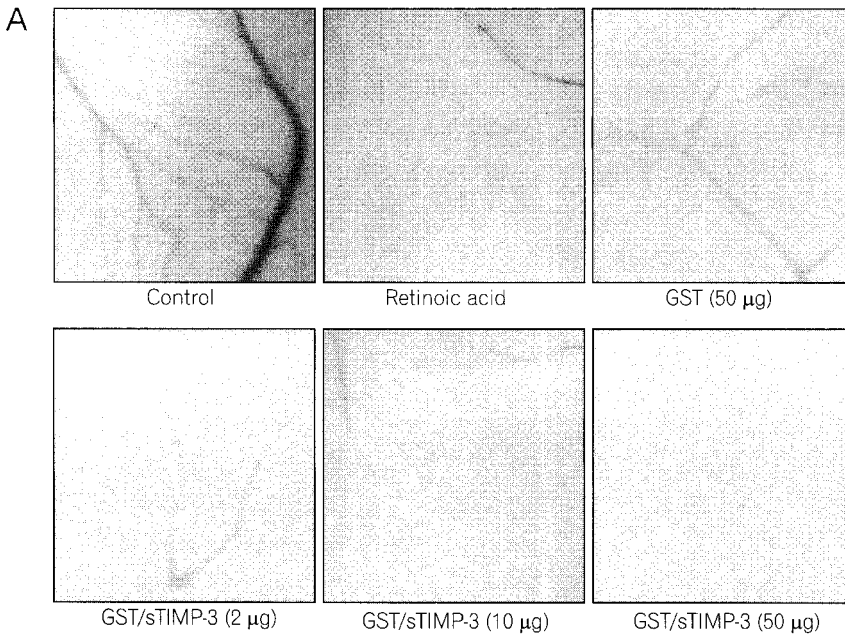


Fig. 5. SDS-PAGE of proteins from induced or without induced bacteria with shark TIMP-3 expression vectors.



B

Compounds	Dose (µg/egg)	Total No. tested in CAM assay	%positive
Control		19	26
RA	1	9	100
GST protein	50	10	40
GST fused	2	14	36
shark TIMP-3	10	10	50
	50	5	100

Fig. 6. Anti-angiogenic effect of recombinant shark TIMP-3 fusion protein on CAM inhibition assay. Fat emulsion (10%) was injected into chorioallantois to make the vascular network clear. Control CAMs were used to be treated with blank coverslips and GST protein. Positive responses were seen in the CAMs implanted with coverslips loaded with R.A (1 µg/egg). (A) Photographs of CAM after three day-treatment with R.A and recombinant shark TIMP-3 fusion protein. (B) Anti-angiogenic activity of recombinant shark's TIMP-3 fusion protein.

CAM assay를 통해 확인하였으며,²⁵⁾ 이들 단백질로부터 MMP 활성 저해기능을 나타내는 인자의 존재를 reverse zymogram assay를 통하여 조사한 바 있다.²⁵⁾ 또한 혈관 신생 억제인자로 알려진 TIMP-3 유전자를 상어 연골 조직으로부터 클로닝 하였으므로, 본 연구팀에서 밝힌 상어 TIMP-3가 혈관 신생 억제에 관여할 것이라 판단되어 그 활성을 조사하였다.

먼저, 두툽상어의 연골 조직에서부터 클로닝한 TIMP-3를 HT1080 세포에 transfection하여 그 CCM을 획득한 후, 혈관내피세포인 HUVECs에 처리하여 침윤 억제 활성 및 혈관내피세포의 이동을 조사한 결과, nontransfectant 및 Mock의 CCM을 처리한 HUVECs에 비해 침윤 및 이동이 현저히 감소함을 관찰하였다. 또한 TIMP-3 transfectant의 CCM을 이용한 *in vitro*상에서의 tube 형성 억제

활성을 조사하였을 시, tube 형성의 속도는 non-transfectant 및 Mock의 CCM을 처리한 HUVECs와 거의 유사하였으나, 시간이 경과함에 따라 tube의 형성이 지속되지 아니하고 파괴됨을 알 수 있었다. 더불어 혈관 신생 억제활성을 *in vivo*에서 조사하기 위하여, 상어 TIMP-3 transfected NIH3T3 세포의 CCM을 이용하여 CAM assay를 실시하였으며, 두툽상어 TIMP-3 recombinant protein을 획득하여 역시 CAM assay를 실시하였다. CCM 및 recombinant protein 모두 혈관 신생 억제 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 결과 이외에, 상어 TIMP-3의 혈관내피 세포 증식에 대한 영향을 조사하기 위해 nontransfected HT1080 세포와 mock, 상어 TIMP-3 transfected의 CM을 농축한 다음, 혈관내피세포인 bovine aortic endothelial cells (BAECs)에 동량 처리하여 그 증식 정도를 조사한 결과, 상어 TIMP-3 CCM을 처리한 혈관세포에의 증식에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다(결과 생략).

결론적으로 본 연구에서는 혈관 신생 억제 활성이 매우 높은 것으로 알려진 상어의 연골에서부터 클로닝된 TIMP-3 유전자의 혈관 신생 억제 효과를 *in vitro* 및 *in vivo* assay를 통해 확인하였다. 이는 기존에 알려진 상어 연골의 혈관 신생 억제활성에 관련된 한 인자로 예상되며, 차후에 악성암의 혈관 신생억제 및 항진이에 대한 항암 작용을 검증하여 어류로부터 난치성 악성암 및 혈관 신생 관련 질병에 대한 새로운 의약품의 개발 가능성을 시사하였다고 판단된다.

결 론

본 연구에서는 두툽상어 TIMP-3의 혈관 신생 억제능을 확인하기 위해 HT1080 세포에 transfection 시킨 다음, transfectant의 CCM을 혈관내피 세포인 HUVECs에 처리하여 *in vitro* 수준에서 *in vitro* invasion assay, *in vitro* angiogenesis assay, wounding migration assay 등의 실험을 수행하여 혈관 신생 억제, 항진이, 항침윤 작용 및 혈관내피세포의 이동성 억제 등을 확인하였다. 또한 *in vivo* 수준에서 상어 TIMP-3 transfected NIH3T3 세포의 CCM 및 *E. coli*에서 생산한 recombinant 상

어 TIMP-3 단백질을 대상으로 CAM assay기법을 이용하여 혈관 신생 억제 활성을 거듭 확인하였다. 이러한 결과, 본 연구에서 밝힌 두툽상어 TIMP-3는 혈관 신생을 저해하여 암세포의 증식과 전이를 차단하는 혈관 신생 억제 치료 및 암 치료의 수단으로 사용되어질 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업과 과학기술부의 국가지정연구실 사업으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971; 133: 275-288.
- 2) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
- 3) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factor. *Science* 1987; 235: 442-447.
- 4) Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Mircovasc Res* 1977; 14: 53-65.
- 5) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
- 6) Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
- 7) Docherty AJ, Lyons A, Smith BJ, Wright EM, Stephens PE, Harris TJ, Murphy G, Reynolds JJ. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985; 318: 66-69.
- 8) Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem* 1990; 265: 13933-13938.
- 9) Wick M, Burger C, Brusselbach S, Lucibello FC, Muller R. A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *J Biol Chem* 1994; 269: 18953-18960.

- 10) Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996; 271: 30375-30380.
- 11) Emonard H, Grim JA. Matrix metalloproteinases. *Cell Mol Biol* 1990; 36: 131-153.
- 12) Docherty AJP, Murphy G. The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 469-479.
- 13) Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81.
- 14) Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A. Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 1994; 107: 2373-2379.
- 15) Yang TT, Hawkes SP. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10676-10680.
- 16) Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 1993; 157: 351-358.
- 17) Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108: 671-682.
- 18) Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 1264-1271.
- 19) Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 853-862.
- 20) Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS, Zetter B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 817-823.
- 21) Brem H, Folkman J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. *J Exp Med* 1975; 141: 427-429.
- 22) Langer R, Conn H, Vacanti J, Haudenschild C, Folkman J. Control of tumor growth in animal's by infusion of an angiogenesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4331-4335.
- 23) Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* 1983; 221: 1185-1187.
- 24) Oikawa T, Ashino-Fuse H, Shimamura M, Koide U, Iwaguchi T. A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis. *Cancer Lett* 1990; 51: 181-186.
- 25) Wee HJ, Bae SK, Lee SJ, Kim YT, Lim WK, Kim YJ, Kim KW. Identification of angiogenic inhibitor derived from Korean Shark Cartilage. *Journal of Korea Association of Cancer Prevention* 1997; 1: 81-89.
- 26) Negro A, Onisto M, Grassato L, Caenazzo C, Garbisa S. Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: synthesis, refolding, physico-chemical and functional insights. *Protein Eng* 1997; 10: 593-599.
- 27) Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 1990; 248: 1408-1410.
- 28) Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J Cell Biol* 1992; 119: 475-482.