대한방사선종양학회지 2001;19(2):171 180

이온화 방사선에 의한 TIMP1, TIMP2 유전자 발현 측정

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 방사선종양학과*, 이비인후과†, 아산생명과학연구소 분자유전연구실‡

박건구‡ ·진정선‡ ·박기영‡ ·이연희‡ ·김상윤† ·노영주* ·안승도* ·김종훈* ·최은경* ·장혜숙*

목 적 : Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)는 matrix metalloproteinase (MMP)에 작용하여 암세포의 침윤과 전이를 억제하고 염증, angiogenesis, fibrosis에 중요한 역할을 한다. TIMP 유전자는 여러 cytokine 및 signal molecule에 의하여 조절되는 유전자이므로 방사선에 의한 TIMP의 발현을 측정하고 전사 조절 기전을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법 : 두경부암 환자의 병변에서 유도하여 확립한 두경부암 세포주를 이용하여 방사선에 의한 TIMP 유전자 발현을 측정하였다. 각 세포주의 방사선 민감도를 측정하고 transwell을 이용한 invasion assay로 전이성을 측정하였다. TIMP1, TIMP2 발현은 conditioned medium을 취해 ELISA assay로 측정하였다. 방사선조사는 2 Gy, 10 Gy 군으로 나누어 관찰했고 조사 후 시간 간격은 24, 48시간이었다. MTT assay로 생존세포 수를 측정하여 방사선 세포치사로 인한 발현 변화를 보정하였다. hTIMP1 promoter region을 PCR하여 pGL2-basic luciferase reporter vector에 cloning하여 인간 두경부암 세포주에 이입하여 functional TIMP1 발현이 증가하는지 확인하였고 protein kinase C (PKC) activator인 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)와 Ras에 의한 TIMP1 발현이 유도되는지 확인하였다.

결 과 : HN-1, HN-2, HN-3, HN-5, HN-9 세포주의 D_0는 각각 1.55 Gy, 1.8 Gy, 1.5 Gy, 1.55 Gy, 2.45 Gy 이었다. 각 세포주의 방사선조사 후 MTT assay에 의한 cell viability는 24, 48시간에서 2 Gy인 경우 모두 94% 이상 그리고 10 Gy에서는 73% 이상의 생존 세포를 확인하였다. TIMP1, TIMP2 단백의 basal 농도는 24시간 48시간에서 점점 증가하여 세포에서 계속 합성되어 분비되고 있음을 확인하였다. 2 Gy 조사 후 24시간에서 TIMP2는 HN-1, HN-9 세포주에서 감소하였으나, 10 Gy 조사 후에는 두 세포주에서 모두 증가하여 방사선량에 따라 반응이 달랐고, 방사선조사 후 48시간에는 HN-1세포주에서는 증가하나 HN-9 세포주에서는 감소하여 세포주에 따라 반응이 달랐다. 그러나 방사선에 의한 TIMP1 발현 변화는 미미하였다. TIMP1 reporter gene을 인간 두경부암 세포주에 transfection하고 PMA (100 ng/ml)을 가한 경우 HN-1세포주에서는 유의하게 증가하고 HN-9 세포주에서는 감소하였다. Ras 발현 벡터와 co-transfection한 경우 TIMP1 promoter가 활성화 되었다.

결 론 : 모두 두경부 암에서 유래된 세포주 이지만 방사선에 의한 TIMP의 발현 및 전사조절 기전은 세포주 마다 차이가 있었고 이온화 방사선의 용량에 따라서, 방사선조사 후의 시간 경과에 따라서도 TIMP 발현에 차이가 있었다. 이 결과는 TIMP의 전사 및 발현이 여러 종류의 signal molecule에 의하여 영향을 받고, 이 signal molecule들이 각 세포주 마다 다르기 때문으로 사료된다.

핵심용어 : TIMP, Gene regulation, 두경부암, 방사선

서 론

암치료 방법으로 방사선치료는 수술 및 항암화학요법과 더불어 기본적인 치료법으로 광범위하게 활용되고 있다. 그러나 성공적 방사선 치료에 가장 큰 장애는 조직의 방사선 손상으로 인한 부작용과 암세포의 전이 가능성이다.

최근 방사선에 반응하는 유전자들이 발견되었다. 이 유전자들은 전사인자들과 같이 외부자극에 대한 신호전달에 관여하거나 oncogene과 같이 분화 및 성장에 관여하기도 한다. 그 외에도 matrix metalloproteinase (MMP), TNF, IL-1, TGF-β 유전자 등은 조직의 손상 및 염증반응, 섬유화 등 다양한 세포 및 조직반응에 관여함이 발견되었다.[1-3] 세포의 증식, adhesion, motility, migration 및 분화 등 세포의 remodeling activity는 세포와 extracellular matrix (ECM)와의 상호작용을 통해 조절된다. MMP와 tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)의 균형 및 불균형이 조직 remodeling을 일으키는 생리현상 및 병리현상을 결정한다. MMP 유전자 활성이

이 논문은 1999년 10월 8일 대한방사선종양학회에서 발표하였슴.
이 논문은 1998년 한국학술진흥재단 학술연구조성비(과제번호 : 1998-0325)에 의하여 지원되었음.
이 논문은 2001년 3월 7일 접수하여 2001년 5월 2일 채택되었음.

책임저자 : 장혜숙, 서울중앙병원 방사선종양학과
Tel : 02)2224-4431, Fax : 02)486-7258
E-mail : hschang@www.amc.seoul.kr

암세포의 침윤성 및 전이에 관련되고 TIMP1, TIMP2는 종양의 성장을 억제할 뿐만 아니라 침윤성과 전이성을 억제하고,[4-9] 또한 angiogenesis를 억제함이[10-12] 보고되었다. 방사선에 의한 조직 반응을 발현 시기에 따라 급성 염증과 만성 섬유화로 나누어 볼 때 방사선으로 인한 급성염증을 억제하는데 탁월한 약제인 corticosteroid는 MMP활성을 억제시키는 것으로 알려져있고,[13] 방사선조사 후 쥐 astrocyte에서 MMP gene family 중 gelatinase-A gene의 활성이 증가함이 보고된바 있다.[14] 따라서 MMP 및 TIMP 유전자 활성 및 발현이 암세포의 침윤성 및 전이에 관여할 뿐 아니라 방사선 조직 손상 기전에도 관여할 가능성이 매우 높다.[15] 그러나 방사선치료가 암 치료에 널리 이용되고 있음에도 방사선에 의한 MMP 활성연구는 미진하고 TIMP 유전자 활성 및 표현에 관한 연구는 전무한 실태이다. TIMP 및 MMP 발현 및 활성이 암의 예후에 미치는 연구는 매우 활발하나 암의 진행 및 전이에 관여하는 이 유전자의 전사조절에 관한 연구는 아직 미미하므로 이 유전자 전사조절 연구는 암의 완치 가능성을 높히는 새로운 암치료법의 가능성을 제시할 수 있다는 측면에서 매우 중요한 기초의학 연구이다. TIMP 및 MMP 유전자 발현 및 활성에 방사선이 미치는 영향과 방사선 신호전달경로에 관한 연구는 기존 암치료의 주축인 방사선치료 시 정상 장기의 염증 등 조기조직손상(early tissue damage)과 섬유화로 인한 만성 손상(late tissue damage)을 제어할 수 있는 치료효율을 획기적으로 향상시킬 수 있는 방사선-유전자 치료법 개발에 새로운 영역을 제시할 수 있다는 측면에서 매우 중요한 연구라고 사료된다.

본 연구에서는 방사선 민감도와 침윤능력이 다른 두경부암 환자 종양조직으로부터 유도하여 세포주로 확립한 9가지의 두경부종양 세포주[16]를 실험 대상으로 이온화 방사선과 PKC activator인 PMA에 의한 TIMP1 및 TIMP2 발현 변화를 관찰하고 방사선에 의한 TIMP 단백 발현 변화와 방사선 민감도와 암세포의 침윤성, 전이성과의 관련성을 규명하고, TIMP1 유전자의 regulation region이 cloning된 luciferase reporter vector를 제작하여 target 세포에 transfection하고 reporter gene activity를 측정하여 이온화 방사선에 의해 유도되는 TIMP 유전자의 전사조절 기전을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 세포 배양

두경부 종양 환자 암 조직으로부터 유도하여, 세포주로 확립한 두경부 종양 세포주, AMC-HN-1 HN-9 세포주와 침윤력이 높고 전이를 잘 일으키는 인간 fibrosarcoma 세포주인 HT1080을 실험 대상으로 하였다. AMC-HN 계열 세포주들은 10% FBS, 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, HEPES 완충액 20 mM 등이 첨가된 MEM배지에서 배양하였고 HT1080은 10% FBS, $NaHCO_3$ 24 mM, HEPES 완충액 20 mM등이 첨가된 DMEM배지를 사용하여 5% CO_2, 37℃ 조건에서 세포배양기(NUAIR, water jacket incubator)로 배양하였다. 방사선 세포생존곡선 측정이나 계대 배양을 위해서는 T-25 플라스크를 사용하였다.

TIMP 단백 농도를 측정하기 위해서는 24-well plate에 well당 4×10^4개 세포를 seeding 하여 배양한 후 방사선조사 1시간 전에 FBS-free 배양액으로 바꾸었고 방사선조사 후 24시간, 48시간 경과 후 conditioned medium을 500 μl 취하여 ELISA assay로 측정하였다.

TIMP1 reporter gene의 발현을 측정하기 위해서는 6-well plate에 well당 2×10^5개의 세포를 seeding하며 방사선조사 1시간 전에 FBS-free media로 바꾸며 PMA 노출군은 이때 PMA (5 mg/ml stock) 2 μl씩 각 well에 분주하였다.

2. 방사선조사

방사선조사는 4 MV 선형가속기를 사용하고 실온에서 시행하였다. 세포 생존곡선을 구하기 위해서는 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 Gy 군으로 나누어 시행하였다. Elisa assay와 TIMP reporter gene의 발현을 측정하기 위한 실험을 위해서는 2 Gy, 10 Gy 군으로 나누어 시행하였다.

3. 방사선 민감도 측정

방사선조사 후 세포 집락 형성능력을 기준으로 세포 생존을 판단하였으며 multitarget single hit model에 의한 세포생존곡선을 구하고 D_0를 계산하였다.

방사선조사 후 T-25 플라스크내의 세포를 새로운 배지를 첨가하지 않고 세포배양기 내에서 10 14일 배양하여 세포 집락이 형성되는 것을 확인한 후 배지를 제거하고 플라스크 전체를 0.5% crystal violet/ 20% ethanl 혼합액에 넣어 3분 염색후 혼합액을 제거하고 건조시켜 세포 집락 수를 계측하였다.

4. MTT assay

24 well plate에 세포를 4×10^4개 seeding하고 24시간 후, 세포를 방사선조사 하였다. 그 후 일정 시간이 지난 후 MTT stock solution (8 mg/ml in PBS) 10 μl를 well 당 가하고 37 ℃에서 3시간 배양하였다. 그 후 상등층을 제거하고 1 ml DMSO를 가한 후 15분간 상온에서 shaking하고, 200 μl를

96-well plate에 옮긴 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Invasion assay

세포의 방사선조사 후 invasion activity의 변화를 측정하였다. pore size가 8 μm인 transwell (Costar, St. Louis, UAS)의 안쪽은 matrigel로 coating 하고 바깥 쪽은 collagen 으로 coating 한 후 clean banch에서 완전히 건조 시켰다. 이를 cell culture medium으로 세척하고 4×10^4개의 cell을 seeding하였다. 12 24 시간 배양한 후 invasion 된 cell들을 Hematoxylin-Eosin 염색하고 400배에서 inverted microscopy로 cell 수를 계수하였다. 일정한 면적의 세포수를 무작위로 20군데를 세어서 평균치를 구하였다. 방사선조사군은 transwell에 seeding한 후 3시간 경과 후 2 Gy를 조사하고 21시간 배양 후 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하였다.

6. ELISA assay

세포를 24 well plate에 well당 10^5개를 seeding하고 24시간 후에 방사선을 조사하였다. 24시간과 48시간 후에 conditioned medium 500 μl을 취하여 assay buffer와 1:4 비율로 mix하여 2.5 ml를 만든다. 여기서 100 μl를 취하고 100 μl의 peroxidase conjugate를 가하고 잘 섞어 100 μl씩 96-well에 분주하고 20 27°C의 실온에서 2시간 반응시킨 후 washing하고 물기를 없앤 후 TMB substrate 100 μl을 가하고 30분 반응시켜 노락색에서 stop buffer 100 μl을 가하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 256 ng/μl로 준비된 stock을 assay buffer로 여러 농도로 희석하여 standard curve용 control 시료를 준비하였다(ELISA ssay kit, Amesham Pharmacia biotech, Centenial Ave., USA).

7. TIMP1 promoter cloning

SK-Hep-1 세포에서 genomic DNA를 분리하고, TIMP1 forward primer (5'-CCA TGG CAC ACA GTA GAT GCA CA-3')와 TIMP1 reverse primer (5'-TTC GAA GCA TTT GTG ATA TTA GGG G-3')를 사용하여 709 bp의 hTIMP1 promoter region(염기번호; 1321-2030, 유전자은행 번호; Y09720)을 PCR 하였다. PCR 조건은 다음과 같았다. 94°C에서 1분 동안 반응시키고 94°C 30초, 65°C 30초, 72°C 1분 cycle을 30회 시행하고 72°C에서 5분간 반응시켜 반응을 종료하였다. 이 fragment를 전기영동하여 분리 정제하고, 이를 T-vector (pCR2.1-TOPO)에 ligation하였다. 이 insertion된 clone을 KpnI/XhoI로 cutting하여 insert를 정제하고 이를 pGL2-basic vector (KpnI/XhoI) (Promega, Medison, USA)에 subcloning하여 sequencing하였다(Fig. 1). pGL2-basic vector는 1× universal restriction buffer (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0.1mg/ml BSA)에 가하고, 효소를 가해 20 μl로 한 후 37°C에서 하루 밤 동안 배양하였다. 반응은 5 μl의 5× glycerin probe buffer (1× : 10 mM EDTA pH 8.0, 10% glycerine, 0.1% SDS, 0.02% Bromophenol blue)를 가해 정지시켰다. 9 Mol end 당 0.1 Unit의 T4-DNA ligase (NEB, Beverly, USA)를 가하고, ligation buffer (50 mM tris pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP, 100 μg/ml BSA)를 가해 20 μl로 한 후 15°C에서 하루 밤 동안 배양하였다.

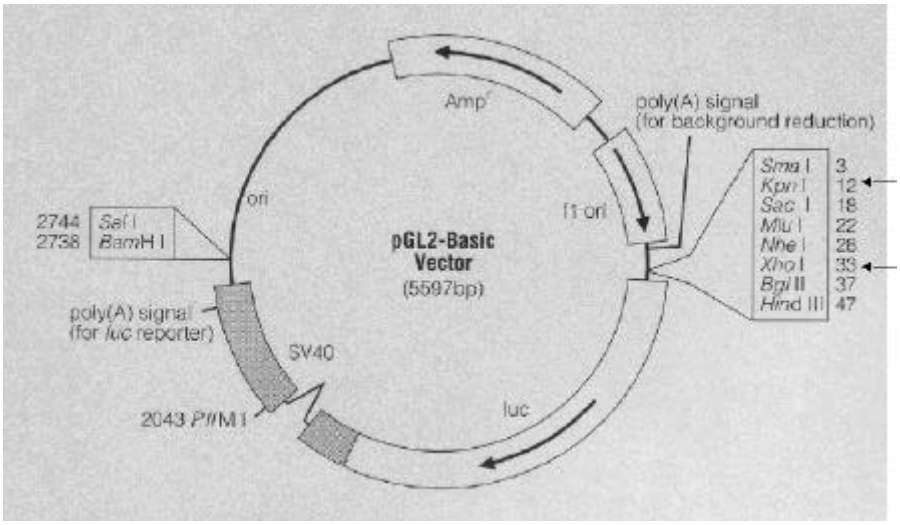

Fig. 1. Reporter gene construct for TIMP1 promoter.

8. Purification and isolation of TIMP1 luciferase reporter vector

Competent bacteria를 제조하기 위하여 E coli strain (DH 5α)를 20 ml LB 배지에 하루 밤 동안 배양하고 다음날 5 ml을 취하여 50 ml의 신선한 LB 배지에 접종하였다. OD600이 0.3 0.6이 되면 4℃, 5000 rpm에서 10분 원심 분리하고 이 bacteria에 5 ml TSB (LB Broth pH 6.1, 10% PEG (MW 3350), 5% DMSO, 20 mM Mg++ ($MgCl_2$/$MgSO_4$)에 현탁시켜 얼음에 10분 방치하였다. 이 bacteria를 dryice / ethanol에 빨리 얼려서 액체 질소에 보관하였다.

형질전환을 위하여는 200 μl의 competent bacteria에 10 100 ng의 plasmid-DNA를 가하고 30분간 얼음에 방치하였다. 그후 3 ml의 SOC medium을 가하고, 37℃에서 1시간 동안 진탕 배양한 후 이 bacteria를 5분간 실온에서 6,700 g로 원심분리하고, 이를 ampicillin (100 μg/ml)이 첨가된 agar plate에 접종, 하루 밤 동안 37℃에서 배양하였다.

이중 1개의 colony를 취하여 200 ml LB 배지에 접종하고 하루 밤 동안 배양한 후 suspension을 10분 4,000g로 원심분리 한 후 10 ml의 lysozym용액 (50 ml glucose, 10 ml EDTA pH7.8, 25 mM Tris pH 8.0, 2 mg/ml lysozym)에 현탁시키고 30분 얼음에 방치하였다. 20 ml의 SDS 용액 (0.2M NaOH, 1% SDS)를 가하고 5분간 얼음에 방치한 후 15 ml 3M NaAcetate용액을 가하고 1시간 동안 얼음에 방치하였다. genomic DNA와 단백질을 원심 분리 (16,800g, 4℃)하고 상등액을 2.5배의 ethanol을 가하여 -20℃에서 2시간 이상 방치하여 침전시켰다. 이 plasmid를 16,800g로 원심분리 시키고, 말린 후 8 ml의 0.1 M NaAcetate, 50 mM Tris pH 8.0에 녹였다. 이를 2.5배의 ethanol로 한번 더 침전시키고, CsCl2를 사용 quickseal tube에 넣고 초원심분리 하였다.

9. Luciferase assay

Cell을 transfection하기 하루 전에 6 well plate에 세포를 2×10^5개 plating하였다. 위의 세포주에서 lipofectamine 방법 (Gibco BRL, Rockville, USA)으로 transfection을 실행하고 이 때 β-galactosidase expression vector도 같이 co-transfection시켰다. transfection 후 24시간 후에 PBS로 세척한 후 medium을 갈아주고 24 36시간 후에 이 cell들을 lysis buffer (Promega, Medison, USA)로 lysis하였다. 이중 일정량을 취하여 substrate인 luciferin을 혼합한 후 발광되는 luminescence를 β-counter로 측정하였다. luciferase assay kit (Promega)를 사용하였고 같은 extract로 β-galactosidase activity를 측정하여 transfection 효율을 보정해 주었다.

10. EMSA (Electromobility shift assay)

각 세포의 nuclear extract를 다음과 같이 prep하였다. 4℃ PBS로 2번 washing한 후 cell-lysis buffer (10 mM Hepes KOH pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) 100 μl를 가하고 얼음에 5분 방치하였다. 1,000g로 원심분리 한 후, 핵을 NP-40이 없는 위의 cell lysis buffer로 씻고, 100 μl nuclear buffer (250 mM Tris pH 7.5, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)를 가한후 dry ice/ethanol bath에 3번 얼리고 녹이는 과정을 반복하여 핵을 깼다. 그 후 13,000g로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하고, Bradford법으로 protein농도를 측정하였다.

Oligonucleotide (SP1; 5'-GAT TCG GGG CGG GGC GAT C-3', -59/-53 element 5'-AGC TTG GAT GAG TAA TGC G-3')는 T4-polynucleotide kinase와 γ-^{32}P-ATP를 사용하여 label하였다. 40,000 cpm의 표지된 위의 oligonucleotide와 5 μg의 nuclear extract를 혼합하여 상온에서 20분간 반응시키고 native 4% polyacrylamide gel에 0.25× TBE buffer로 전기영동하고 건조시킨 후 autoradiography하였다.

결 과

1. 방사선 민감도 및 cytotoxicity 변화

HN-1, HN-2, HN-3, HN-5, HN-9 세포주의 D_0는 각각 1.55 Gy, 1.8 Gy, 1.5 Gy, 1.55 Gy, 2.45 Gy 이었고 HT-1080 세포주의 D0는 1.81 Gy였다.

AMC-HN-9 세포주가 가장 방사선에 저항하는 세포주였고 AMC-HN-1, 3, 5 세포주는 방사선에 민감하였고 D_0는 1.50 1.55 Gy였다. MTT assay로 각 세포주의 방사선조사 후, 세포 독성의 변화를 측정한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 각 세포주의 MTT assay에 의한 cell viability는 24, 48시간에서 2 Gy인 경우 모두 94% 이상 그리고 10 Gy에서는 73% 이상의 생존 세포를 확인하였다. 특히 AMC-HN-1 세포주인 경우 10 Gy를 조사하고 48시간이 지난 후 control에 비하여 73%였고,

Table 1. Effect of Ionizing Radiation on Cytotoxicity (MTT assay %)

	24 hours			48 hours		
cell line	control	2 Gy	10 Gy	control	2 Gy	10 Gy
HN-1	100	124	124	100	94.6	73.0
HN-2	100	123	126	100	97.2	97.2
HN-3	100	101	81.5	100	102	112
HN-5	100	106	112	100	97.1	111
HN-9	100	110	124	100	96.9	100

AMC-HN-9 세포주는 거의 변화가 없었다.

2. **Invasion assay**

전이를 잘 일으키는 HT1080 세포주는 invasion된 세포수가 월등히 많았고 AMC-HN-3 세포주도 invasion된 세포수가 딴 세포주에 비교하여 많았다. Table 2에서 보는 바와 같이 cell invasion에 미치는 방사선의 영향은 방사선에 민감한 AMC-HN-1 세포주에서 높았고 방사선 2 Gy 조사로 invasion되는 세포수는 48%의 감소를 보였다. AMC-HN-9 세포주는 2 Gy 조사로 침윤성이 19%의 감소를 보였고 HT1080 세포주도 24%의 감소를 보였다. 10 Gy 조사후 거의 모든 세포주는 침윤력이 약 절반(42 59%)으로 감소하였다.

3. **방사선조사 후 TIMP1, TIMP2 단백 발현 변화 측정** (ELISA assay)

TIMP1, TIMP2 단백의 basal 농도는 24시간 48시간에서 점점 증가하여 세포에서 계속 합성되어 분비되고 있음을 확인하였다. Table 3-b에서 보는 바와 같이 2 Gy 조사 후 24 시간에서 TIMP2는 HN-1, HN-9 세포주에서 약간 감소하였으나, 10 Gy 조사 후 24시간에서는 모두 증가하여 방사선량에 따라 반응이 달랐다. 방사선조사 후 48시간에서는 HN-1 세포주에서는 2 Gy, 10 Gy에서 모두 증가하였으나 HN-9 세포주에서는 2 Gy, 10 Gy 모두에서 감소하여 세포주에 따라 반응이 달랐다. TIMP1 단백 농도는 방사선조사에 의해 큰 변화가 없는 결과를 얻었다(Table 3-a). 침윤성이 가장 높은 HT1080 세포주에서는 방사선에 의한 TIMP1, 2의 발현 변화가 HN-9 세포주와 비슷한 양상을 보였다 (Table 3-a, 3-b).

4. **TIMP1 reporter gene의 발현 및 전사조절 측정**

TIMP1의 5' flanking regulatory region를 cloning한 reporter plasmid를 제작하였고 이 plasmid를 SK-Hep-1 인간 간암 세포주에 transfection하고 empty vector와 비교한 결과 19.6배의 basal activity가 증가하였다. 이 결과로 미루어 제작한 TIMP1 reporter 유전자가 정상적으로 기능을 하고 있음을 알 수 있었다.

이 reporter plasmid를 인간 두경부암 세포주인 AMC-HN-1, 9 세포에 transfection하고 luciferase activity 변화를 비교한 결과 Fig. 2에서 보는바와 같이 PKC activator인 PMA에 의하여 방사선에 민감한 AMC-HC-1 세포주에서는 TIMP-1 transcription이 증가하였으나 방사선에 저항하는 AMC-HN-9 세포주에서는 반대로 감소하였다. 또한 wild type Ras 발현 유전자와 co-transfection한 결과 강한 발현의 증가를 보여주었다.

Table 2. Effect of Ionizing Radiation on Invasion Rate of Various Cancer Cell Lines

Cell lines	Invasion Assay Results		
	No. of invased cells	Reduction Rate (%)	
	RT 0 Gy (%)	RT 2 Gy	RT 10 Gy
AMC-HN-1	58.0±7.5 (100)	48	59
AMC-HN-2	36.6±3.8 (100)	3	57
AMC-HN-3	149.6±5.5 (100)	26	51
AMC-HN-5	45.5±7.5 (100)	12	54
AMC-HN-9	74.0±4.9 (100)	19	42
HT1080	211.4±7.4 (100)	24	45

Table 3-a. Effect of Ionizing Radiation on TIMP1 Protein Secretion

TIMP1 in conditioned medium after irradiation (ELISA assay)

Cell line	24 hours (%)			48 hours (%)		
	Control	2 Gy	10 Gy	Control	2 Gy	10 Gy
AMC-HN-1	100	94.4	96.5	100	95.0	93.0
AMC-HN-9	100	102	87.7	100	102	95.8
HT1080	100	104.8	110.2	100	102.7	102.2

Table 3-b. Effect of Ionizing Radiation on TIMP2 Protein Secretion

TIMP2 in conditioned medium after irradiation (ELISA assay)

Cell line	24 hours (%)			48 hours (%)		
	Control	2 Gy	10 Gy	Control	2 Gy	10 Gy
AMC-HN-1	100	93	284	100	222	422
AMC-HN-9	100	87	229	100	23.6	43.3
HT1080	100	64.3	107.7	100	7.2	14.4

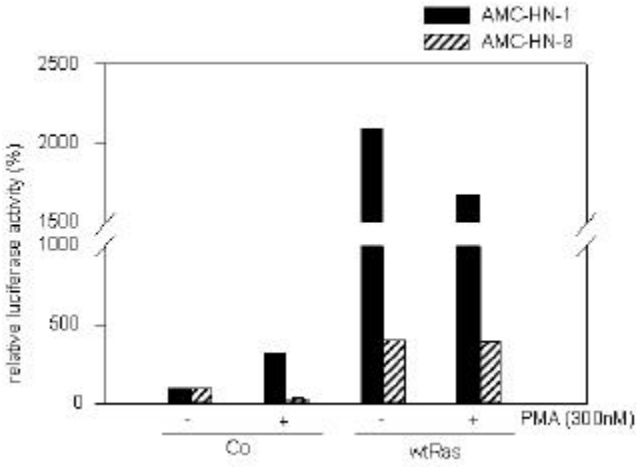

Fig. 2. Effect of Ras and PMA on the transcription of TIMP1 reporter gene.

Table 4. Differential Responses to Ionizing Radiation between AMC-HN-1 and AMC-HN-9 Cell Lines

	AMC-HN-1	AMC-HN-9
D_0	1.55Gy	2.45 Gy
MTT (10 Gy, 48hrs)	73%	100%
TIMP-1 basal level (absolute value)	2.403	2.266
secretion rate btw 24 48hrs	1.4X	1.4X
TIMP-2 basal level (absolute value)	0.302	0.322
secretion rate btw 24 48hrs	1.8X	4.4X
TIMP-1 (2 Gy, 24hrs/48hrs, relative value, %)	94.4/95.0	102/102
(10 Gy, 24hrs/48hrs, relative value, %)	96.5/93.0	87.7/95.8
TIMP-2 (2 Gy, 24hrs/48hrs, relative value, %)	93/222	87/23.6
(10 Gy, 24hrs/48hrs, relative value, %)	284/422	229/43.3
TIMP-1 (PMA)	↑	↓
(Ras)	↑↑↑	↑

↑ : slightly increased, ↑↑↑ : markedly increased, ↓ : slightly decreased

EMSA로 측정한 바에 의하면 (-59/-53) element의 binding activity는 방사선에 민감한 AMC-HC-1 세포주에서만 증가하였고 SP1 binding activity는 AMC-HC-1, AMC-HC-9 양 세포에서 변화가 없었다.

고안 및 결론

TIMPs는 MMPs의 활성 및 작용을 조절하는 내인성 억제인자이다. TIMP1 단백은 184개 아미노산으로 구성된 28.5 kDa의 glycoprotein으로 여러 가지 종류의 세포에서 발현된다.[17] 이것은 latent form과 active form의 MMP에 비공유적(non-covalent)으로 반응한다.[18] TIMP1은 특히 MMP9에 binding하고 이를 억제한다.[19] 반면에 TIMP2 단백은 194개 아미노산으로 구성된 21 kDa unglycosylated protein으로 TIMP1과 43%의 homology를 갖고, 모든 active form의 MMP를 억제한다. 이것은 또한 proMMP2에 binding하여 그것의 활성화를 억제한다.[17] TIMP2와 MMP2의 비율이 암의 진행에서 중요한 역할을 함이 보고되었고,[4, 9] TIMP는 암세포의 전이능을 변화시켜, 동물 모델에서 invasion[20, 21]과 metastasis[22, 23]를 억제하고, 암 조직의 혈관형성[8]을 억제함이 알려져있다. 그러나 방사선에 의하여 TIMPs가 많이 분비 되면 ECM의 주요 성분들의 침착을 증가 시켜 조직의 섬유화를 촉진 시킬 것이다.[24]

TIMP1, TIMP2의 발현이 serum,[25] TPA,[25, 26] growth factor,[27] cytokine,[28, 29] IL-6, Ras,[30] cAMP 등[31]에 의하여 조절 된다는 보고는 있으나 방사선조사에 의한 영향은 알려지고 있지 않다. 특히 위의 TIMP inducer 중 TPA에 의해서 활성화 되는 PKC와 cytokine, growth factor 등은 방사선에 의하여서도 활성화되는 중요 factor들이므로 방사선이 TIMP의 전사에 영향을 미칠 가능성이 매우 크다.[32 35]

본 연구에서는 방사선 민감도와 침윤성이 다른 다양한 암세포주에서 방사선과 PMA에 의한 TIMP1 및 TIMP2 발현 변화를 관찰하고 방사선에 의한 TIMP 단백 발현 변화와 암세포의 방사선 민감도와 침윤성, 전이성과의 상관성을 규명하고자 하였다. 방사선에 의해 유도되는 신호전달 경로를 규명코자 TIMP 유전자의 5' flanking region을 cloning하여 reporter gene에 연결하고 방사선조사에 의한 regulation을 연구하였다.

암의 방사선 치료시 방사선조사 자체가 암세포의 TIMP1, TIMP2 유전자 발현에 영향을 미친다면 이는 임상에서 고려해야 할 중요한 사항이 될 것이다.[36] 예컨데, 방사선이 TIMP1, TIMP2 유전자의 전사를 up-regulation한다면 암세포의 전이를 억제하고, 암조직의 angiogenesis[37]를 억제하여 보다 효율적인 방사선 암치료를 수행 할 수 있을 것이다. 그러나 암조직을 섬유화(fibrosis)시켜 예기치 않은 부작용을 일으킬 수도 있다.[38] 만일 down-regulation 된다면 위와는 반대의 작용이 나타날 것이다. 그러나 현 단계로서는 이러한 연구가 거의 이루어 지고있지 않기 때문에 이러한 가능성들이 임상에서 무시되고 있다.

TIMP1 gene은 TATA-less gene으로 6개의 exon을 갖고 있다. 이 유전자의 5' flanking region에는 TPA-responsive element, AP-1, Ets site 등이 위치하고 있다.[39 41] 그러나 TIMP2 promoter에는 몇개의 SP-1 site와 한개의 AP-1 site가 있고 TATA like element를 갖고 있으며 TIMP1과는 달리 TPA와 Cytokine에는 regulation이 되지 않는다.[42] 그러나 이 두가지 TIMP가 방사선조사에 의하여 어떻게 발현이 조절되는 지는 전혀 알려진 바 없다. 본 연구에서는 암조직을 방사선으로 치료시 방사선 신호전달에 의하여 TIMP1과 TIMP2의 발현에 영향을 줄 것이라는 가정을 세우고 이미 알려진 방사선 신호 전달 경로가 TIMP1, TIMP2의 전사에 어떻게 영향을 미치는 지를 규명하고자 하였다.

방사선에 의한 방사선 민감도는 HN-1, HN-9 두 세포주에서 D0는 각각 1.55 Gy, 2.45 Gy 이었고 HT1080 세포주의 D0는 1.81 Gy였다. AMC-HN-9 세포주가 가장 방사선에 저항하는 세포주였고 AMC-HN-1 세포주는 방사선에 민감하였다. MTT assay로 각 세포주의 방사선조사 후, 세포독성의 변화를 측정한 결과 AMC-HN-1 세포주인 경우 10 Gy를 조사하고 48시간이 지난후 control에 비하여 73%였고, AMC-HN-9

세포주는 거의 변화가 없었다.

Cell invasion에 미치는 방사선의 영향은 방사선에 민감한 AMC-HN-1 세포주에서 높았고 방사선 2 Gy 조사로 invasion 되는 세포수는 48%의 감소를 보였다. AMC-HN-9 세포주는 2 Gy 조사로 침윤성이 19%의 감소를 보였다. MTT assay 결과에서 2 Gy 조사시 세포는 94%이상의 생존율을 보였으므로 방사선에 암세포 침윤성에 미치는 본 실험 결과는 방사선 치사에 의한 영향은 거의 없다고 사려된다.

TIMP는 세포 내에서 합성되어 분비되는 단백이다. 따라서 분비된 방사선조사 전후의 TIMP 단백 농도를 측정함으로써 이 유전자의 방사선에 의한 발현 변화를 알 수 있을 것이다. 본 연구에서 측정한 TIMP1, TIMP2 단백의 basal 농도는 24시간 48시간에서 점점 증가하여 세포에서 계속 합성되어 분비되고 있음을 확인하였다. 2 Gy 조사후 24시간에서 TIMP2는 HN-1, HN-9 세포주에서 약간 감소하였다. 10 Gy 조사후 24시간에서는 모두 증가하여 방사선량에 따라 반응이 달랐고, 48시간 후에는 HN-1 세포주에서는 2 Gy, 10 Gy 모두에서 증가하였으나 HN-9 에서는 모두 감소하여 세포주에 따라 반응이 달랐다. 침윤성이 가장 높은 HT1080에서 방사선에 의한 TIMP2 발현 변화는 AMC-HM-9 세포주와 비슷한 양상을 보였다. 방사선에 더 저항하는 세포주인 -HN-9, HT1080에서 방서선 조사에 의해 침윤성과 TIMP2 발현이 방사선에 민감한 -HN-1 세포주와 비교하여 더 많이 감소한 본 시험결과는 방사선 민감도에 관여하는 signal molecule이 침윤성과 TIMP2 발현에 관여할 가능성을 제시하고있다. TIMP1은 모든 세포주에서 방사선조사에 의해 큰 변화가 없는 결과를 얻은 것은 TIMP2와는 방사선조사에 의한 signal transduction pathway가 달라서 promotor 활성이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 이를 구체적으로 연구하기 위하여 본 연구에서는 우선 TIMP1의 5' flanking regulatory region를 cloning한 reporter plasmid를 제작하여 이 plasmid를 SK-Hep-1 인간 간암 세포주에 transfection하고 empty vector와 비교한 결과 19.6배의 basal activity가 증가하였다 (data not shown). 이 결과로 본 실험에서 제작된 TIMP1 reporter 유전자가 정상적으로 기능을 하고 있음을 알 수 있었다. 이 reporter plasmid를 사람의 두경부암 세포주인 AMC-HN-1, 9 세포에 transfection하고 luciferase activity 변화를 비교한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 방사선에 민감한 AMC-HC-1 세포주에서는 TIMP1 transcription이 증가하였으나 방사선에 저항하는 AMC-HN-9세포주에서는 반대로 감소하였다. 또한 wild type Ras 발현 유전자와 co-transfection한 결과 HN-1세포주에서는 강한 발현의 증가를 보여주었다. 현재 이 reporter gene을 이용하여 방사선에 의한 TIMP1의 전사조절에 관한 실험이 진행 중이다. 우선 EMSA로 측정한 바에 의하면 (-59/-53) element의 binding activity는 방사선에 민감한 AMC-HN-1 세포주에서만 증가하였고 SP1 binding activity는 AMC-HC-1, AMC-HN-9 양 세포에서 변화가 없었다.

두경부 암에서 유래된 세포들이지만 TIMP의 regulation은 세포주 마다 차이가 있었고 이온화 방사선의 용량에 따라서, 방사선조사후의 시간 경과에 따라서도 TIMP 발현에 차이가 있었다. 이 결과를 Table 4에 요약하였다. 본 연구 결과를 종합하면 TIMP의 전사 및 발현이 여러 종류의 signal molecule에 의하여 영향을 받고, 이 signal molecule들이 각 세포주마다 다르기 때문으로 사료된다. 추후 방사선조사 후 TIMP 변화를 in vivo study로 규명하고, TIMP의 발현 조절이 방사선조사 세포의 invasion에 영향을 미치는지의 연구가 필요하다.

본 연구와 같이 방사선 조직손상의 기전과 전이 가능성에 관여하는 유전자 연구는 방사선 치료 효율을 증가시킨다는 측면과 암의 완치 가능성을 높힌다는 측면에서 중요한 기초의학 연구과제이다. 즉 암치료에 방사선 치료를 적용할 때 TIMP 유전자의 발현을 control하여 암세포의 전이 방지, 방사선치료로 초래되는 조직의 섬유화 억제 및 방사선에 의한 염증반응의 감소에 적용 할 수 있는 가장 이상적인 치료 system을 구축하고 TIMP 유전자를 target으로 하는 방사선-유전자 치료개발에 응용 할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. **Fornace AJ Jr.** Mammalian genes induced by radiation. Annual Review of Genetics 1992;26:507
2. **Hallahan DE.** Radiation mediated gene expression in the pathogenesis of the clinical radiation response. Seminars in Radiat Onc. 1996; 6:250
3. **Weichelbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme V.** Biological consequences of gene regulation by ionizing radiation. J Natl Cancer Inst 1991;83:480
4. **Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, et al.** Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. Cancer 1998;82:1359-66
5. **Wagner SN, Ockenfels HM, Wagner C, et al.** Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by cutaneous squamous and basal cell carcinomas. Journal of Investigative Dermatology 1996;106:321-6
6. **Nakano A, Tani E, Miyazaki K, et al.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. Journal of Neurosurgery 1995;83:298-307
7. **Shoji A, Sakamoto Y, Tsuchiya T, et al.** Inhibition of

tumor promoter activity toward mouse fibroblasts and their in vitro transformation by tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). Carcinogenesis 1997;18:2093-100

8. **Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, et al.** Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. Journal of Pathology 1997; 182:347-55
9. **Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, et al.** Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. Annals of Otology, Rhinology & Laryngology 1997;106:271-8
10. **Benelli R, Adatia R, Ensoli B, et al.** Inhibition of AIDS-Kaposi's sarcoma cell induced endothelial cell invasion by TIMP-2 and a synthetic peptide from the metalloproteinase propeptide: implications for an anti-angiogenic therapy. Oncology Research 1994;6:251-7
11. **Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG.** Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991;64:327
12. **Valente P, Ffassina G, Melchiori A, et al.** TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. Int J Cancer 1998;75:246-253
13. **Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al.** Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell 1990;62:1189
14. **Sawqya R, Tofilon PJ, Mohanam S, Ali-Osman F, Liotta LA.** Induction of tissue-type plasminogen activator and 72-kDa type IV collagenase by ionizing in rat astrocytes. Int J Cancer 1994;576:214
15. **Johnston CS, Piedoeuf B, Baggs R, et al.** Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. Radiat Res 1995;142:197
16. **Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE.** Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. Acta Otolaryngol 1997;117:775-784
17. **Gmez DE, Alonso DF, Yoshji H, Thorgeirsson UP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. European Journal of Cell Biology 1997;74:111-122
18. **Kleiner DE Jr, Tuuttila A, Tryggvason K, et al.** Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: the role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). Biochemistry 1993;32:1583-92
19. **Howard EW, Bullen EC, Banda MJ.** Preferential inhibition of 72 kDa and 92 kDa gelatinases by TIMP-2, J Biol Chem 1991;266:13070
20. **DeClerck YA, Perez N, Shimada H, et al.** Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. Cancer Research 1992;52:701-8
21. **Albini A, Melchiori A, Santi L, et al.** Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. J Natl Cancer Invest 1991;82:775
22. **Khokha R, Denhardt DT.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. Invasion & Metastasis 1989;9:391-405
23. **Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA.** Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. J Natl Cancer Inst 1990;82:589
24. **Lafuma C, El Nabout RA, Crechet F, et al.** Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. Journal of Investigative Dermatology 1994;102:945-50
25. **Campbell CE, Flenniken AM, Skup D, et al.** Identification of a serum- and phorbol ester-responsive element in the murine tissue inhibitor of metalloproteinase gene. Journal of Biological Chemistry 1991;266:7199-206
26. **Mackay AR, Ballin M, Pelina MD, et al.** Effect of phorbol ester and cytokines on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in tumor and normal cell lines. Invasion & Metastasis 1992;12(3-4):168-84
27. **Varghese S, Ramsby ML, Jeffrey JJ, et al.** Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells. Endocrinology 1995;136:2156-62
28. **Yao PM, Maitre B, Delacourt C, et al.** Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1beta and TNF-alpha. American Journal of Physiology 1997;273(4 Pt 1):L866-74
29. **Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al.** Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. EMBO J 1987;6:1899
30. **Leco KJ, Hayden LJ, Sharma RR, et al.** Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. Gene 1992; 117:209-17
31. **Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, et al.** Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. Cancer Research 1995;55:2927-35
32. **Chidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al.** Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. Oncogene 1997;15:1191-1197
33. **Balaban N, Moni J, Shannon M, et al.** The effect of ionizing radiation on signal transduction: antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. Biochimica et Biophysica Acta 1996;1314(1-2):147-156
34. **Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, et al.** Induction of transcription of "immediate early genes" by low-dose ionizing radiation. Radiation Research 1995;143:263-272
35. **Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML.** Protein kinase

C mediatesx-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991;88:2156-2160

36. **Jung M, Dritschilo A.** Signal trancduction and cellular responses to ionizing radiation. Seminars in Radiat Onc 1996; 6:268
37. **Lamoreaux WJ, Fitzgerald MEC, Reiner A, et al.** Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. Microvascular research 1998;55:29-42
38. **Johnston CS, Piedoeuf B, Baggs R, Rubin P, et al.** Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. Radiat Res 1995;142:197
39. **Fukunaga N, Burrows HL, Meyers M et al.** Enhanced induction of tissue-type plasminogen activator in normal human cells compared to cancer-prone cells following ionizing radiation. Radiat Onc Biol Phys 1992;24:949
40. **Edwards DR, Rocheleau H, Sharma RR. et al.** Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. Biochimica et Biophysica Acta 1992;1171:41-55
41. **Ponton A, Coulombe B, Steyaert A, et al.** Basal expression of the gene (TIMP) encoding the murine tissue inhibitor of metalloproteinases is mediated through AP1- and CCAAT-binding factors. Gene 1992;116:187-94
42. **Benbow U, Brinckerhoff CE.** The AP-1 Site and MMP gene requlation: What is all the fuss about? Matrix Biology 1997;15:519

Abstract

Expression of TIMP1, TIMP2 Genes by Ionizing Radiation

Kun-Koo Park, Ph.D.[‡], Jung Sun Jin, M.S.[‡], Ki Yong Park, B.S.[‡], Yun Hee Lee, B.S.[‡], Sang Yoon Kim, M.D.[†], Young Ju Noh, M.D.[*], Seung Do Ahn, M.D.[*], Jong Hoon Kim, M.D.[*], Eun Kyung Choi, M.D.[*] and Hyesook Chang, M.D.[*]

[*]Department of Radiation Oncology, Department of [†]Otolaryngology, Asan Medical Center, [‡]Department of Molecular Genetics, Asan Institute for Life Science, College of Medicine, University of Ulsan, Seoul, Korea

Purpose : Expression of TIMP, intrinsic inhibitor of MMP, is regulated by signal transduction in response to genotoxins and is likely to be an important step in metastasis, angiogenesis and wound healing after ionizing radiation. Therefore, we studied radiation mediated TIMP expression and its mechanism in head and neck cancer cell lines.

Materials and Methods : Human head and neck cancer cell lines established at Asan Medical Center were used and radiosensitivity (D_0), radiation cytotoxicity and metastatic potential were measured by clonogenic assay, MTT assay and invasion assay, respectively. The conditioned medium was prepared at 24 hours and 48 hours after 2 Gy and 10 Gy irradiation and expression of TIMP protein was measured by Elisa assay with specific antibodies against human TIMP. hTIMP1 promotor region was cloned and TIMP1 luciferase reporter vector was constructed. The reporter vector was transfected to AMC-HN-1 and -HN-9 cells with or without expression vector Ras, then the cells were exposed to radiation or PMA, PKC activator. EMSA was performed with oligonucleotide (-59/-53 element and SP1) of TIMP1 promotor.

Results : D_0 of HN-1, -2, -3, -5 and -9 cell lines were 1.55 Gy, 1.8 Gy, 1.5 Gt, 1.55 Gy and 2.45 Gy respectively. MTT assay confirmed cell viability, over 94% at 24hrs, 48hrs after 2 Gy irradiation and over 73% after 10 Gy irradiation. Elisa assay confirmed that cells secreted TIMP1, 2 proteins continuously. After 2 Gy irradiation, TIMP2 secretion was decreased at 24hrs in HN-1 and HN-9 cell lines but after 10 Gy irradiation, it was increased in all cell lines. At 48hrs after irradiation, it was increased in HN-1 but decreased in HN-9 cells. But the change in TIMP secretion by RT was mild. The transcription of TIMP1 gene in HN-1 was induced by PMA but in HN-9 cell lines, it was suppressed. Wild type Ras induced the TIMP-1 transcription by 20 fold and 4 fold in HN-1 and HN-9 respectively. The binding activity to -59/-53, AP1 motif was increased by RT, but not to SP1 motif in both cell lines.

Conclusions : We observed the difference of expresson and activity of TIMPs between radiosensitive and radioresistant cell line and the different signal transduction pathway between in these cell lines may contribute the different radiosensitivity. Further research to investigate the radiation response and its signal pathway of TIMPs is needed.

Key Words : TIMP, Gene regulation, Head and neck cancer, Radiation