

교모세포종 세포주에서 육산화사비소의
기질금속단백분해효소 분비 억제 및 단백질키나아제 B
인산화 저해를 통한
항침습 효과

지도교수 정 희 원

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함.

2003년 10월

서울대학교 대학원

의학과 신경외과학 전공

곽 호 신

곽호신의 의학박사 학위논문을 인준함.

2003년 12월

위원장 장 기 현 (인)

부위원장 정 희 원 (인)

위원 김 동 규 (인)

위원 최 기 영 (인)

위원 이 승 훈 (인)

The anti-invasive effect of tetraarsenic oxide via
inhibition of matrix metalloproteinase secretion and
suppression of protein kinase B phosphorylation in
human glioblastoma cell lines

by Ho-Shin Gwak, M.D.

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Doctor of Philosophy in Medicine
(Neurosurgery)

In the Seoul National University, Seoul, Korea
December, 2003

Doctoral Committee

Professor Kee-Hyun Chang Chairman

Professor Hee-Won Jung Vice Chairman

Professor Dong Gyu Kim

Professor Gheeyoung Choe

Professor Seung Hoon Lee

국문 초록

교모세포종 세포주에서 육산화사비소의 기질금속단백효소 분비 억제 및 단백질кина아제 B 인산화 저해를 통한 항침습 효과

서울대학교 대학원
의학과 신경외과학 전공
곽 호 신

목 적: 악성 신경교종은 수술 및 방사선치료를 하여도 주위 뇌조직으로의 침습(invasion)으로 인하여 근치가 불가능하여, 침습억제 기술의 개발은 악성 교종치료의 최대과제가 되었다. 저자는 일부 암 세포주에서 항암 및 항혈관신생 효과가 입증된 육산화사비소(tetraarsenic oxide: As_4O_6)가 교모세포종 세포주에서 항침습 효과를 나타내는 것을 확인하고 그 작용 기전을 밝혀 향후 침습 억제제로서의 개발 가능성을 알아보하고자 하였다.

연구방법: 교모세포종 세포주는 phosphatase and tensin homolog(PTEN) 유전자 및 p53 단백질발현 상태가 각기 다른 U87MG, U251MG, U373MG 및 LN428을 대상으로 하였다. As_4O_6 의 세포독성은 3-[4,5-dimethylthiazol -2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 측정법으로 세포생존곡선을 구하여 알아보았다. 세포의 침습성은 세포주 부유액을 Matrigel[®]이 도포된 Transwell[®]을 통과시켜 측정하였으며, 같은 조건에서 annexin 표지 세포흐름측정

법(flow cytometry)으로 As_4O_6 에 의한 아포프토시스의 영향을 측정하였다. 침습성에 관여하는 지표물질 중 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase: MMP)의 분비를 세포배양 상층액의 젤라틴 효소분해영동법(zymogram)으로, 세포내 발현정도를 Western blot으로 각각 측정하여 As_4O_6 의 영향을 알아보았다. 세포의 이동성 조절에 관여하는 것으로 알려진 단백질키나아제 B (protein kinase B: PKB/Akt)를 면역영동법(immunoblot)으로 검출하여 그 활성도를 측정하였다.

결 과: 세포독성 실험결과 $2 \mu M$ 이하에서는 유의한 세포독성이 나타나지 않았으며 $10 \mu M$ 이상의 농도에서 50% 이상의 증식 저해효과가 나타났다. 각각의 세포주에서 정중성장억제농도(median inhibitory concentration: IC_{50})는 U373MG에서 $12.2 \pm 1.1 \mu M$, U251MG에서 $7.0 \pm 0.3 \mu M$, LN428은 $6.4 \pm 0.5 \mu M$, U87MG는 $6.3 \pm 0.3 \mu M$ 의 순이었다. 침습능 측정에서 Matrigel을 통과한 세포수는 대조군의 평균값이 U373MG에서 1264 ± 115 cells/HPF, U251MG에서 1109 ± 312 cells/HPF, U87MG에서 915 ± 229 cells/HPF, LN428에서 232 ± 80 cells/HPF의 순으로 나타났으며, LN428 세포주에서의 침습능이 다른 세포주에 비하여 30%이하 값을 나타내어 유의하게 작았다($p < 0.001$). As_4O_6 를 처리한 경우 세포독성이 없는 $1 \mu M$ 에서도 모든 세포주에서 7-37% 범위로 침습능이 감소되어 U251MG 세포주의 경우를 제외하고 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 동일 세포주내에서는 $5 \mu M$ 및 $10 \mu M$ 로 As_4O_6 의 농도가 증가함에 따라 이에 반비례하여 침습능이 감소함이 관찰

되었다. 또한 같은 조건에서 실시한 annexin 표지 세포흐름측정에서 세포괴사나 아포프토시스의 영향을 받지 않았음이 확인되었다. MMP-2의 분비정도의 지표인 젤라틴 효소분해띠(digestion band)는 As_4O_6 를 첨가한 경우 4가지 세포주 모두에서 대조군에 비하여 약화되었으며 As_4O_6 농도에 반비례하여 감소하였다. 세포 내 MT1-MMP 발현 정도를 Western blot으로 측정하였을 때, 4가지 세포주 모두 As_4O_6 를 첨가하여 배양한 군에서 대조군에 비하여 투여 시간 및 농도에 반비례하여 발현 정도가 감소하였다. 면역영동법을 사용하여 Akt 및 그 활성형인 인산화 단백질키나아제 B (p-Akt)를 측정한 결과 모든 세포주에서 As_4O_6 로 처리한 경우 Akt의 농도는 유의하게 감소하지 않으면서 p-Akt가 As_4O_6 농도에 반비례하여 감소되는 것이 관찰되었다.

결론: As_4O_6 는 일정 농도이상에서는 교모세포종 세포주의 증식을 억제하나 세포독성이 없는 농도 및 조건에서도 침습능을 감소시켰다. 이러한 항침습 효과의 기전으로는 As_4O_6 가 MMP-2의 분비를 억제하고 세포내 MT1-MMP의 발현을 감소시키며, Akt의 인산화를 저해하는 것이 관찰되었다. 따라서 향후 동물모델을 포함한 추가적인 실험을 통하여 항침습제로 개발할 가능성이 있다고 판단된다.

주요어: 교모세포종, 육산화사비소, 침습성, 기질금속단백분해효소, 단백질키나아제 B

학 번: 99801-808

List of Tables

Table 1. Genetic characteristics of glioblastoma cell lines
and median inhibitory concentration of tetraarsenic oxide

..... 17

List of Figures

- Fig. 1. Schematic diagram of cell-mediated activation and collagenolysis of matrix metalloproteinase 2 6
- Fig. 2. Conceptual diagram of protein kinase B functions in cell survival and invasion 7
- Fig. 3. Structure and chemical composition of tetraarsenic oxide 8
- Fig. 4. Relative cell survival under the influence of tetraarsenic oxide in glioblastoma cell lines 16
- Fig. 5. Photomicrograph of Matrigel-coated Transwell invasion assay 19
- Fig. 6. Bar graph representing decreased invasiveness of glioblastoma cell lines under the influence of tetraarsenic oxide 20
- Fig. 7. FACS flow cytometry of U87MG at the same condition with invasion assay 22

Fig. 8. Gelatin zymography reflecting decreased matrix metalloproteinase secretion 24

Fig. 9. Western blot of membranous type 1-matrix metalloproteinase under the influence of tetraarsenic oxide 28

Fig. 10. Immunoblot analysis for protein kinase B and phosphorylated protein kinase B 29

목 차

I. 서론 및 연구 목적	1
II. 대상 및 방법	9
III. 결과	15
IV. 고찰	30
V. 결론	41
VI. 참고 문헌	42
VI. 영문 초록	53

서론 및 연구 목적

교모세포종(glioblastoma)은 가장 흔한 원발성 뇌종양으로서 신경교세포종의 50%를 차지하며 현재까지도 치료가 불가능한 암종으로 알려져 있다. 치료를 하지 않는 경우 생존기간은 4-6개월 미만³⁹, 수술로 제거한 경우는 10개월 미만이며⁵⁴, 방사선 병합 치료에도 불구하고 평균 생존기간이 12개월 정도이다. 최근 각종 화학요법이 시도되고 있으나 뚜렷한 생존율의 향상을 보고하고 있는 연구는 드물다. 주목할 점은 교모세포종 치료 실패양상의 변화이다. 수술 이외에는 별다른 치료 방법이 없었던 1960년대까지는 사망 환자의 부검 예를 근거로^{8,23} 뇌백질 경로를 따른 두개강 내 원격 전이가 치료 실패의 주 원인으로 인정되어 국소 치료의 효과가 없는 암종으로 생각되었다. 그러나 Wallner 등은⁵⁵ 수술 및 전뇌 방사선 치료 후 재발한 예의 분석에서 78%가 최초 종양부위의 2 cm 이내에서 재발하여 현재의 치료 방법에서는 원격전이를 치료 실패의 주원인으로 볼 수 없다고 하였고, Bashir 등은³ 수술, 방사선 및 항암 치료를 한 예의 분석에서 5%만이 원격전이를 하였음을 보고하여 최근에는 국소 침습에 의한 재발이 치료 실패의 주원인으로 인정되고 있다. 교모세포종은 다른 암종과는 달리 다른 장기로의 원격전이가 발견되지 않는 반면 Kelly 등이¹³ 정위적 생검술로 입증한 바 종양주위 부종 영역(T2 강조 자기공명영상에서 고신호강도로 관찰되는 영역)의 90%이상에서 종양세포가 발견될 정도로 국소 침습성이 강하다. 이러한 국소 침습성의 분자생물학적 여러 원인 인자 중 기질금속단백 분해효소(MMP's)는 세포외기질(extracellular matrix: ECM)의 분해

를 통한 종양의 침윤 및 전이에 중요한 효소로써 신경 교종의 경우 제 4 형 아교질분해효소인 MMP-2, MMP-9 등의 아형의 발현이 알려져 있다. Nakagawa 등은²⁷ 젤라틴 효소분해영동법을 이용하여, 수술로 얻은 뇌종양 조직에서 MMP의 활성도와 침습성의 상호 관계를 양적으로 측정하여 종양의 악성도와 비례관계가 있음을 보고하였고, Nakano 등은²⁸ MMP-2가 악성 교종에서 특이적으로 높게 존재하며 이 인자의 활성이 표피성장인자(epidermal growth factor: EGF) 및 조직괴사인자(tissue necrosis factor: TNF)등에 의하여 상향조절 됨을 증명하였다. 이중 MMP-2는 다른 MMP 계열과는 달리 성장인자에 의해 전사를 유도하는 AP-1 조절 단위가 없이 풋효소(proenzyme) 상태로 구조적으로 존재하며 막영역(membranous domain)을 가진 MT-MMP에 의해 활성화되어 세포표면에 고농도로 위치하게 되는 특성을 갖는다⁴⁴ (Fig. 1). 이러한 특성 때문에 유전자치료와 같은 상위 수준보다는 단백질키나아제 C(protein kinase C: PKC)의 억제나 직접 중화와 같은 하위 수준에서의 억제방법이 더 적절한 치료법으로 제시되고 있다⁵³. MMP 억제제는 암증이 존재하는 동안 계속적으로 작용하여 전이나 침습을 억제하여야 하므로 세포독성제(cytotoxic agent)보다는 세포성장 및 분열억제제(cytostatic agent)로써 경구 투여가 가능하며 생체이용율이 좋은 것이 이상적이며 최대내약용량(maximum tolerance dose)보다는 최대억제용량(maximum target inhibiting dose)을 이용하는 것이 유리하다¹⁵. 그러나 현재까지 개발된 MMP 억제제 들은 모두 제 3상에서 생존을 향상에 유의한 차이가 없으면서 장기, 고용량 투여 시 부작용이 증가하여 모두 중단되었다³².

단백질키나아제 B(PKB/Akt)는 여러 암종에서 활성이 증가되어

나타나는 세포내 키나아제로써 phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)의 신호전달 체계의 중요한 목표 물질로 인산화 되어 활성화형이 되면 그 하류에 있는 BAD, caspase-9 등을 인산화하여 아포프토시스를 억제하며, glucose synthase kinase 3을 억제하여 세포주기에 관여하는 cyclin D를 안정화시켜 암세포의 증식 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁴⁶. 악성신경교종에서 가장 흔히 나타나는 10q23 염색체의 PTEN 유전자 결핍이 그 하류에 있는 PI 3-K의 비조절성 과발현과 관련되어 주목받고 있으며, Kubiakowski 등은¹⁶ Akt의 특이 억제제인 LY294002나 wortmannin등이 신경교종 세포주에서 세포의 침습성 및 MMP 발현을 감소시킴을 보고하였으며 integrin의 발현 유도 및 세포골격의 합성에 관여하는 etoposide와 같은 약물과의 상승작용 등이 증명되어⁴⁶ 암세포의 침습과정 중 특히 이동에 관여하는 물질로 중요시 되고 있다 (Fig 2).

비소와 비소 유도 화합물은 이미 2000여 년 전부터 약품으로 쓰여 왔다. 고대 중국에서는 비소함유 연고를 건선, 매독 및 류마티스 질환 등의 치료제로서 사용해 왔으며 18세기 이후 근대 서양의학에서도 영국의 내과 의사인 Thomas Fowler가 만든 Fowler's solution (탄산염 형태의 삼산화비소)이 전간, 궤양, 소화불량 등에 사용되었으며 1900년대에 들어서서는 악성빈혈, 천식, 건선 및 천포창 등의 치료제로 사용되었다. 또 다른 유기 비소화합물인 malarsoprol은 중추신경계를 침범한 파동편모충증(trypansomiasis)에 아직도 치료제로 사용되고 있다. 그러다가 각종 항암제 및 항생물질이 등장함에 따라 비소의 사용이 점차 줄어들게 되었고 장기복용시의 독성으로 인하여 1970년대 초반에 미국에서 발암물질로 판정되어 사용이 금지되었다^{11,43}. 그러나 삼산화비소(arsenic trioxide, diarsenic oxide:

As₂O₃) 형태의 화합물이 1970년대 후반 중국에서의 임상실험이후 기존의 항암치료에 저항성을 가지는 급성전골수구백혈병 (acute promyelocytic leukemia: APL)에서 기존의 요법을 능가하는 놀라운 만한 치료효과가 보고 되면서 1990년대 들어 항암제로서 다시 전 세계적인 주목을 받기 시작하였으며, 특히 기존 항암치료의 최대 약점인 골수억제나 중증의 이상반응이 관찰되지 않았다^{17,18,22,31,45,50,51}. 작용기전에 관한 활발한 연구가 병행되어 시험관 내 실험에서 삼산화비소는 APL 세포주인 NB4 세포주에서 아포프토시스를 유도하고 분화를 촉진하는 것이 밝혀졌으며 이외에 다발성 골수종, 전이성 신세포암 등 각종 고형암에 대한 임상 2상 연구가 현재 활발히 진행 중에 있다^{5,26,30,50,56}. Kanazawa 등은¹² 삼산화비소가 U373MG, U251MG, GB1 등의 각종 악성신경교종 세포주에 대해 낮은 농도에서 제 2형 세포예정사인 자가포식현상(autophagy)을 일으켜 항종양 효과를 나타내었음을 보고하였는데 이는 비산화합물이 악성 신경교종의 치료에 사용될 수 있음을 시사하는 것이다. 이번 실험에 사용된 육산화사비소(tetraarsenic oxide: As₄O₆)는 경구투여가 가능한 3가(trivalent)의 안정된 무기비소산화물로서 (Fig. 3), 삼산화비소와는 다른 물리, 화학적인 성질을 갖고 있으며 기존의 As₂O₃의 독성을 크게 완화시켜 백서를 이용한 동물실험에서 50 mg/kg/day까지 투여하여 아무런 부작용이 관찰되지 않았고 정중치사농도(median lethal dose: LD₅₀)는 120-180 mg/Kg로 나타났다. 또한 기존의 밝혀진 As₂O₃의 암세포주에서의 아포프토시스 유도가 더욱 낮은 농도에서 고효율로 유도되며 소모세혈관내피(bovine capillary endothelium)를 이용한 실험에서 강력한 항혈관신생 효과를 나타내며 MMP-2의 분비가 억제됨이 입증되었다³⁶.

따라서 이번 연구에서는 As_4O_6 가 세포독성 및 아포프토시스를 유도하는 이하의 농도 또는 이외의 조건에서 교모세포종 세포주의 침습작용을 저해하는지를 관찰하고 또한 가능한 작용기전을 밝힘으로써 향후 항침습 치료보조제로서의 개발 가능성을 알아보고자 하였다.

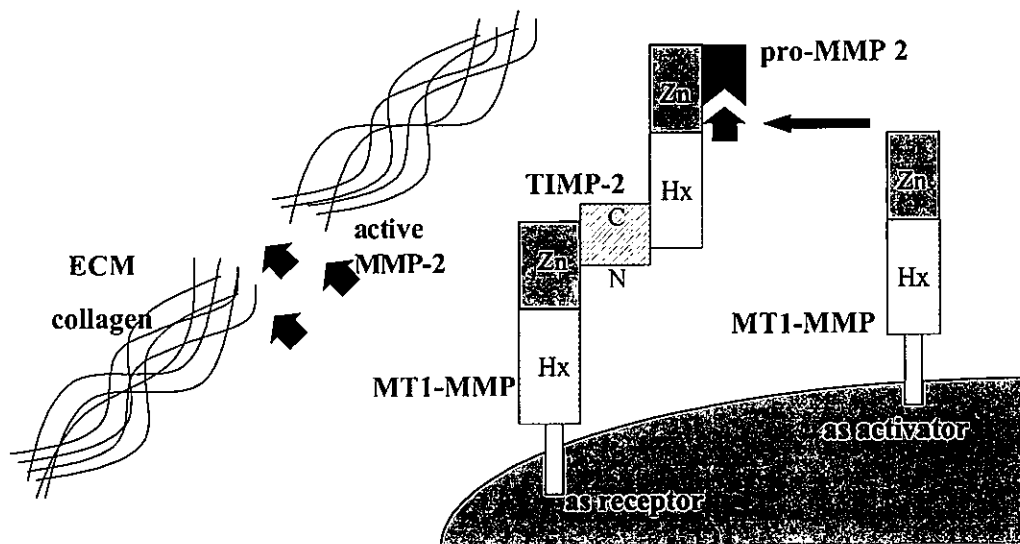


Figure 1. Diagram representing a mechanism of the cell-mediated activation of pro-gelatinase A (pro-MMP 2) and collagenolysis in extracellular matrix (ECM). Membrane bound MT1-MMP plays dual role as both receptor and activator of pro-MMP 2. (Zn; zinc atom at the catalytic site, Hx; hemopexin-like domain, C; carboxy-terminal domain, N; amino terminal domain)

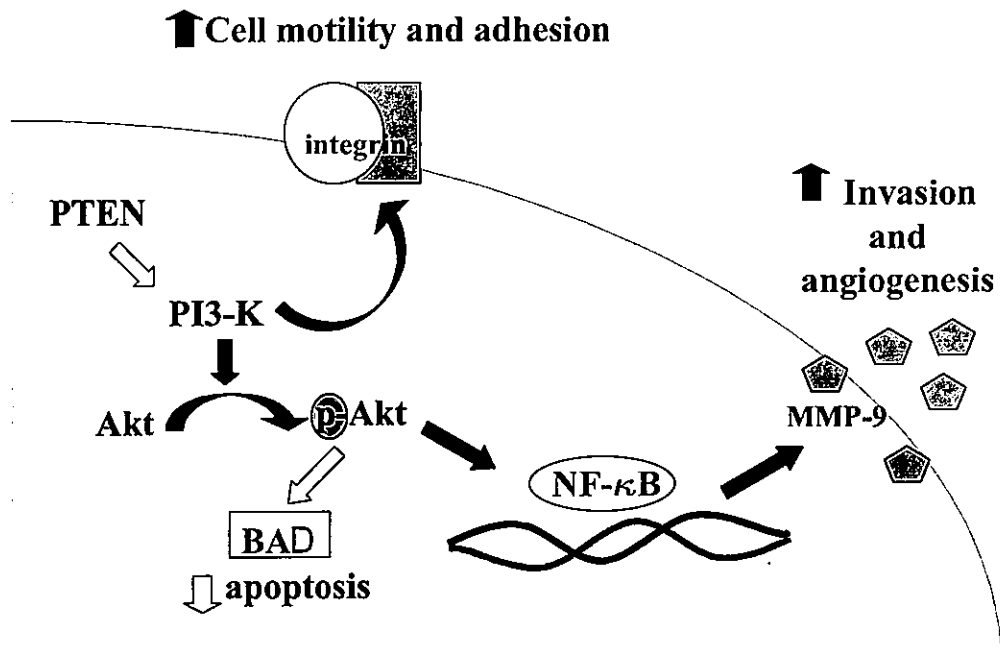


Figure 2. Conceptual diagram of Akt functions in cancer cell survival and invasion. Deficiency of PTEN suppressor gene causes uncontrolled PI 3-K activity. Akt, a core downstream component of PI 3-K signaling pathway, is excessively activated to its phosphorylated form.

(note; Black arrow represents positive effect and white arrow means inhibitory action)

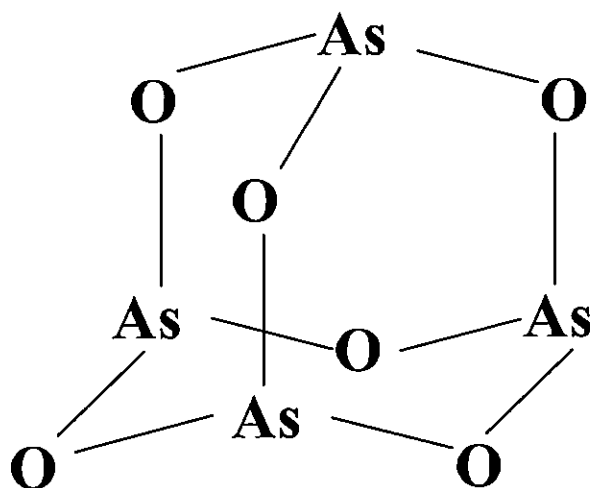


Figure 3. Chemical structure of tetraarsenic oxide (2,4,6,8,9,10-Hexaoxa-1,3,5,7-tetraarsatricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane, tetraarsenic oxide; As_4O_6).

대 상 및 방 법

1. 교모세포종 세포주 및 시약들

교모세포종 세포주 U87MG, U251MG 및 U373MG는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입한 것을 사용하고 LN428 세포주는 Ludwig Institute for Cancer Research (La Jolla, CA)의 Frank Funari 박사로부터 기증 받아 사용하였다. 세포 배양액은 Dulbecco's modified Eagles Medium(DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY)을 기본으로 하여 조건배지는 10% 열 비활성화 소태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Gibco BRL) 및 1% Penicillin-Streptomycin(Gibco BRL) 용액을 첨가하여 배양기에서 5% CO₂ 분압과 37°C 온도를 유지하여 배양하였다. Bovine serum albumin 과 gelatin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 에서, LY294002는 Calbiochem (La Jolla, CA)에서 구입하여 사용하였다. As₄O₆는 주식회사 천지산 (Seoul, Korea)에서 기증받아 1 N NaOH 에 녹여 0.05M stock solution을 만들고 이에 적당량의 DMEM 배지를 첨가하여 필요한 농도로 조절한 후 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다. 침습성 측정실험에서 사용한 Matrigel은 Becton Dickinson (Bedford, MA)사의 것을 구입하여 -20°C에 냉동보관 하여 사용하였다.

2. 교모세포종 세포주에서 As₄O₆의 세포독성 효과 측정

As₄O₆의 교모세포종 세포주에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 Cell-Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit

(Promega, Madison, WI)을 이용하였다. 우선 As_4O_6 를 200 μM /100 μl 가 되게 하여 첫 번째 열에 넣은 후 50 μl 의 조건배지 또는 무혈청배지가 담긴 열에 계단희석 시켜 최종농도를 100 μM 에서 0.1 μM 까지로 만든 후 각각의 배양된 교모세포종 세포주를 세포 현탁액을 만들어 well 당 5×10^3 세포수가 되게 하여 분주하였다. 이후 48시간에서 72시간 정도 배양하여 세포 증만도가 70-80% 정도에 도달한 것을 확인하여 MTT 용액 15 μl 를 첨가하여 4시간 동안 다시 배양하였다. 이와 같이하여 생존세포에 MTT가 흡수되게 한 후 stop solution 100 μl 을 첨가한 상태로 실온에 방치하여 formazan으로 전환시켜 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 생존세포의 농도를 구하였다. 각각의 well의 대조군에 대한 상대적 생존세포 농도로 세포생존 곡선을 구하고 IC_{50} (inhibitory concentration of 50%)의 As_4O_6 농도 값을 얻었다 (Prizm software, GraphPad, San Diego, CA). 각각의 세포주에 대하여 3회 반복 실험하여 평균값 및 표준오차를 구하였다.

3. Transwell을 이용한 As_4O_6 영향 하에서 세포 침습능의 측정

각각의 세포주에서 대조군 및 As_4O_6 의 농도를 달리하여 (1, 5, 10 μM) 동일한 수의 세포를 세포외기질이 함유된 Matrigel coated chamber에 투과시켜 침습 정도를 비교하였다. Pore size가 8 μm 인 직경 6.5 mm의 Boyden chamber with polycarbonate nucleopore membrane Transwell (Corning, Corning, NY) 윗면에 무혈청배지에 15배로 희석한 Matrigel 50 μl 를 고루 뿌려 미리 도포하여 상온에 2시간 정도 방치하였다가 마르지 않고 남아있는 상층액은 흡입하였다. 각각의 세포주는 지름 30 mm의 6-well plate에서 60-70%의 충

만도로 배양한 후 x1 Trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) 용액 1 ml을 첨가하여 배양 접시에서 떼어내어 무혈청배지 10 ml로 희석하고 1,200 g에서 원심하여 상층액은 따라낸 후 다시 무혈청배지를 적당량 첨가하여 1×10^6 /ml이 되게 세포현탁액으로 만들었다. 여기에 미리 정해진 농도가 되도록 As_4O_6 를 첨가하여 $100 \mu\text{l}$ 을 Transwell 상단 면에 얹고, 0.1% BSA를 화학유인물질 (chemoattractant)로 첨가한 무혈청배지 1 ml을 채운 24 well plate에 담가 37°C 에서 6시간 정도 배양하였다. Matrigel coated membrane filter를 통과한 세포는 Transwell을 꺼내어 Diff-Quick kit (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania)으로 고정시킨 후 증류수에 행구고 면봉으로 투과막 위쪽 표면의 통과하지 못한 세포를 걷어낸 후 상온에서 건조시켜, 통과한 세포의 수를 현미경을 이용하여 10개의 고배율시야 ($\times 150$)에서 측정하여 평균값을 구하여 비교하였다.

4. Annexin 형광표지세포검출법을 이용한 아포프토시스의 측정

침습능 측정을 시행할 때와 같은 조건으로 U87MG 세포주를 배양한 후 무혈청배지로 갈아주고 정해진 농도의 As_4O_6 을 첨가하여 6시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 따라 내고 PBS 완충액 2 ml로 2회 행균 뒤 x1 trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) 용액 1 ml을 첨가하여 5분간 배양기에 두어 배양 접시에서 떼어내어 행균액 및 무혈청배지 5 ml을 첨가하여 1,200 g에서 원심하였다. 상층액은 따라낸 후 binding buffer [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$]를 적당량($300-400 \mu\text{l}$) 첨가하여 1×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 세포현탁액으로 만든 후 annexin V-FITC

(PharMingen, San Diego, CA) 5 μl 과 propidium iodide(PI) 10 μl 을 각각 첨가하여 실온에서 차광한 상태로 30분간 반응시켜 형광표 지세포검출(fluorescence-activated cell sorter: FACS) 흐름세포측정 기법(flow cytometry) (Becton-Dickson)으로 아포프토시스세포 (annexin V-FITC 표지세포) 및 괴사세포(annexin V-FITC 및 PI 표지세포)를 측정하였다.

5. 젤라틴 효소분해영동법을 이용한 MMP 효소 활성도의 측정

세포주에 의하여 분비된 MMP의 발현도를 젤라틴이 함유된 SDS-PAGE에서의 효소분해띠로 측정하였다. 세포주를 6 well plate 에서 조건배지로 배양하여 세포 충만도가 70-80%가 되었을 때 배양액을 걷어 내고 As_4O_6 을 무혈청배지 500 μl 에 대조군 및 1, 2, 5, 10 μM 의 정해진 농도로 첨가한 후 다시 12-18시간 정도 배양하여 상층액만을 걷어 표본으로 사용하였다. 이렇게 준비한 세포주 상층액 10 μl 를 동량의 표본 완충액과 혼합하여 0.1% 젤라틴을 포함한 10% SDS-polyacrylamide gel에서 125 V로 전기영동 시켜 분리하였다. 전기영동이 끝난 겔을 2.5% Triton X-100에서 1.5시간 이상 반응시킨 다음 현상 완충액(50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ZnCl_2 and 0.1% NaN_2)에 담가 37 $^\circ\text{C}$ 에서 16시간 이상 충분히 반응시켰다. 현상이 끝난 겔은 염색 용액(0.5% Coomassie brilliant blue, 30% methanol and 10% acetic acid)에 담구어 2시간 정도 염색하고 다시 탈색 용액(5% methanol, 7.5% acetic acid)에서 탈색시켜 젤라틴이 분해된 투명대를 확인 하였다. 세포주의 특성 및 배양 충만도에 따라 As_4O_6 의 영향 하에서 5 μM 이상에서는 18시간을 경과하면서 세포독성에 의한 소량의 용해가 관찰되어 MMP-2의 분

비가 역으로 증가하기도 하여 As_4O_6 를 처리한 후 12-18시간 이내에 현미경상 세포괴사가 없는 것을 확인하고 배양 상층액을 얻었다.

6. Western blot을 이용한 MT1-MMP의 발현 정도에 대한 As_4O_6 의 영향의 측정

각각의 세포주를 60-70% 정도 증만하여질 때 까지 자라게 하여 일단 상층액을 걷어내고 조건배지에 As_4O_6 을 정해진 농도(1, 2.5, 5, 10 μ M)로 첨가한 후 다시 24시간을 배양하였다. As_4O_6 를 첨가하지 않은 대조군을 포함하여 농도별로 각각의 상층액을 걷어내고 PBS buffer로 헹구어 낸 후 RIPA lysis buffer (20 mM Tris ,pH 7.4, 1% triton X-100, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 1 μ g/ml leupeptin, and 1 mM PMSF)를 150 μ l정도 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 10분 이상 반응시킨 후 찰과표본(scraping)하여 세포 용해질(cell lysate)을 취하였다. 이를 15,000g, 4 $^{\circ}$ C에 15분간 원심분리하여 상층액에서 단백질을 분획만을 분리하였다. 각각의 단백질 용액 5 μ l를 protein assay kit (BioRAD, Hercules, CA)의 프로토콜에 따라 처리한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 결정하여 50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동 한 후 니트로셀룰로스막(Amersham, Arlington Heights, IL)으로 50 mA에서 12시간 동안 transfer하였다. Blocking buffer(5% skim milk in 0.01 M TBS with 0.1% Tween 20)에서 1시간 정도 반응시킨 후 MT1-MMP (63 kDa)의 단클론항체인 IM39L-100UG (Calbiochem., San Diego, CA)을 일차항체로 하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 12시간 이상 반응시켜 당근과산화효소표지 항-마우스 이차항체로 처리한 후

Enhanced Chemiluminescence System (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)에 반응시키고 필름에 감광하여 63 kDa의 band를 확인하였다.

7. Immunoblot assay을 이용한 As_4O_6 의 Akt 및 그 인산화 형의 발현에 대한 영향의 측정

조건배지에서 아충만 정도로 자란 세포주에 As_4O_6 을 정해진 농도로 (1, 2.5, 5, 10 μ M) 첨가하여 전 처리한 후 시간별(2.5 μ M 기준 농도) 및 농도별(24시간 기준)로 세포용해질을 준비하였다. 이전과 동일한 방법으로 단백질을 용액을 추출하여 protein assay kit로 단백질 농도를 측정하여 20 μ g(Akt) 및 40 μ g(p-Akt)이 되게 하여 10% SDS-PAGE에서 전기 영동시킨 다음 이전과 같은 방법으로 니트로셀룰로스막에 transfer하였다. 단백질이 흡착된 니트로셀룰로스막을 5% skin milk로 상온에서 45분간 차단시킨 후 일차항체는 anti-Akt (N-19; Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) 및 anti-phospho-Akt (Ser473; New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 각각 5% skin milk solution에 1:1000으로 희석하여 4°C 냉장고에서 12시간 이상 결합시켰다. 당근과산화효소표지 항-토끼 이차항체를 상온에서 1시간 동안 결합시킨 후 Enhanced Chemiluminescence System 프로토콜에 따라 반응시킨 후 필름에 감광시켜 판독하였다. Akt 인산화의 차단을 확인하기 위하여 동일 조건의 세포주에 PI 3-K 특이 억제제인 LY294002를 20 μ M의 농도로 처리한 후 1시간 후에 세포 용해질을 얻어 양성 대조군으로 하였다.

결 과

1. 교모세포종 세포주에서 As_4O_6 세포독성 농도 측정

As_4O_6 가 교모세포종 세포주의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 p53 및 PTEN 유전자 형태가 다른 U87MG, U251MG, U373MG 및 LN428 세포주를 (Table 1.) 대상으로 세포생존곡선을 구하였다. 또한 이후 실험 시 세포독성의 영향을 알아보기로 조건 배지와 무혈장배지 배지에서 각각 관찰하였다. 조건 배지에서는 70-80% 증만 하여질 때까지 48시간에서 72시간 정도 배양하였을 때 $2 \mu M$ 이하에서는 유의한 세포독성이 나타나지 않았으며 $10 \mu M$ 이상의 농도에서는 50% 이상의 증식 저해효과가 나타났다 (Fig. 4. A). 각각의 세포주에서의 IC_{50} 값은 U373MG는 $12.2 \pm 1.1 \mu M$, U251MG는 $7.0 \pm 0.3 \mu M$, LN428은 $6.4 \pm 0.5 \mu M$, U87MG는 $6.3 \pm 0.3 \mu M$ 의 순으로 U373MG 세포주에서 다른 세포주에 비해 유의하게 높았으나 (unpaired t-test, $P < 0.05$) p53 및 PTEN 유전자 상태에 따른 차이는 없었다 (Table 1). 그러나 무혈장배지 배지에서는 세포성장인자의 부족으로 인하여 세포증만이 이루어지지 않아 실험에 사용한 것과 같은 조건에서의 세포독성을 알아보기 위하여 1×10^4 세포를 분주 후 24시간 후에 측정하였으며 (Fig. 4. B) 그 결과는 조건 혈장에서의 값과 거의 일치하였다 (Table 1). 다만 LN428 세포주의 경우에는 24시간 내에 세포주의 성장이 거의 없어 유의하지 않은 값이 산출되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 As_4O_6 의 농도를 $10 \mu M$ 미만으로 제한하고 As_4O_6 에의 노출 시간을 조건 배지에서는 24시간으로, 무혈청배지에서는 6시간에서 18시간이내로 제한하였다.

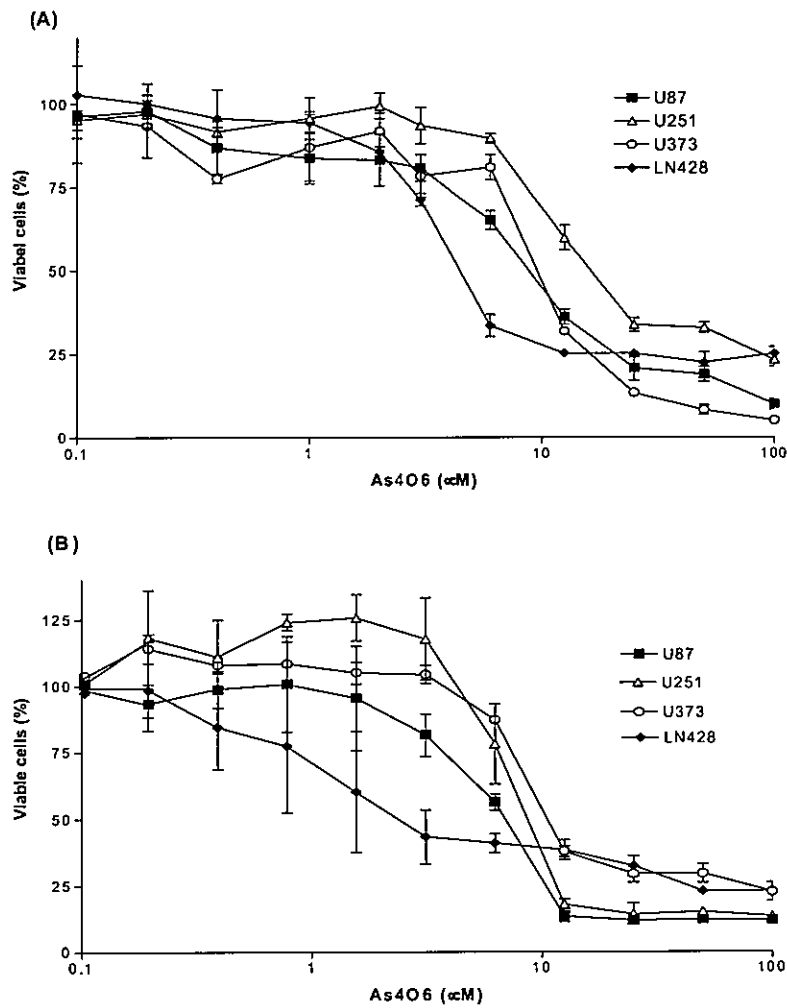


Figure 4. Graph demonstrating the effect of As₄O₆ on proliferation of glioblastoma cell lines. The relative number of viable cells was determined using MTT assay. (A): MTT assay was performed when cells were cultured on conditioned media with the indicated concentration of As₄O₆ for 48 -72 hours, and (B): on the serum-free media for 24 hours. Each bars represent the standard deviation of three independent experiments. (note: the concentration of As₄O₆ in x-axis is plotted on log scale for viewing convenience.)

Table 1. As₄O₆ induced growth inhibition in human glioblastoma cell lines.

Cell line	p53	PTEN	IC ₅₀ (μM)	
			serum (+)	serum (-)
U87MG	wt	mt	6.3 ± 0.3	6.0 ± 0.1
U251MG	mt	mt	7.0 ± 0.3	6.5 ± 0.2
U373MG	mt	mt	12.2 ± 1.1	11.8 ± 0.1
LN428	mt	wt	6.4 ± 0.5	*0.9 ± 0.3

* The relative number of viable cells was determined using MTT at 48-72 hours in conditioned media and 24 hours in serum-free media as described in Material and Methods 1. Values are expressed as mean IC₅₀ values ± SDs. Data are means of three independent experiments.

Abbreviations: mt = mutant; wt = wild-type; (+) = present; (-) = absent; * = invalidate result.

2. As₄O₆에 의한 세포 침습능의 감소

As₄O₆가 교묘세포종 세포주에서 세포이동 및 세포외기질의 분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 무혈장배지에 부유된 세포주를 As₄O₆의 농도를 달리하여 Matrigel이 도포된 Transwell의 막을 통과시켜 아랫면에 부착된 세포수를 현미경으로 계측하였다 (Fig. 5). 막을 통과하는 세포 수는 분주 세포 수 및 통과시간에 비례하므로 대조군에서의 사전 실험을 통하여 분주 세포수를 1×10^5 개로, 통과시간은 6시간으로 조절하였다. As₄O₆를 첨가하지 않은 무혈장배지 배지의 대조군에서 각 세포주의 침습능을 계측한 결과 각각의 평균값이 U373MG에서 1264 ± 115 cells/HPF, U251MG에서 1109 ± 312 cells/HPF, U87MG에서 915 ± 229 cells/HPF, LN428에서 232 ± 80 cells/HPF의 순으로 나타났으며 LN428 세포주에서의 침습능이 다른 세포주에 비하여 30%이하 값을 나타내어 유의하게 작았다(ANOVA, $P < 0.001$). 각각의 세포주에서 As₄O₆를 농도별로 첨가하여 침습능의 저해 여부 및 농도에 따른 차이를 관찰하였다. 세포독성이 전혀 없는 $1 \mu\text{M}$ 농도의 As₄O₆를 첨가한 경우에도 U251MG 세포주(- Δ 7%)를 제외한 3가지 세포주 모두에서 대조군에 비하여 13-37%의 유의한 감소가 있었다(unpaired t-test, $p < 0.05$). $5 \mu\text{M}$ 농도에서는 4가지 세포주 모두에서 대조군에 비하여 40%-91%까지 감소되었고 $10 \mu\text{M}$ 에서는 72%-94%로 감소되었다 ($p < 0.001$). 동일 세포주내에서는 배지내의 As₄O₆의 농도에 따른 의존적 감소가 관찰되었는데 (One-way ANOVA, $p < 0.001$) LN428 세포주에서는 $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ 및 $10 \mu\text{M}$ 에서의 감소가 각각 대조군의 37%, 91% 및 94%로 감소 정도가 가장 컸다. (Fig. 6).

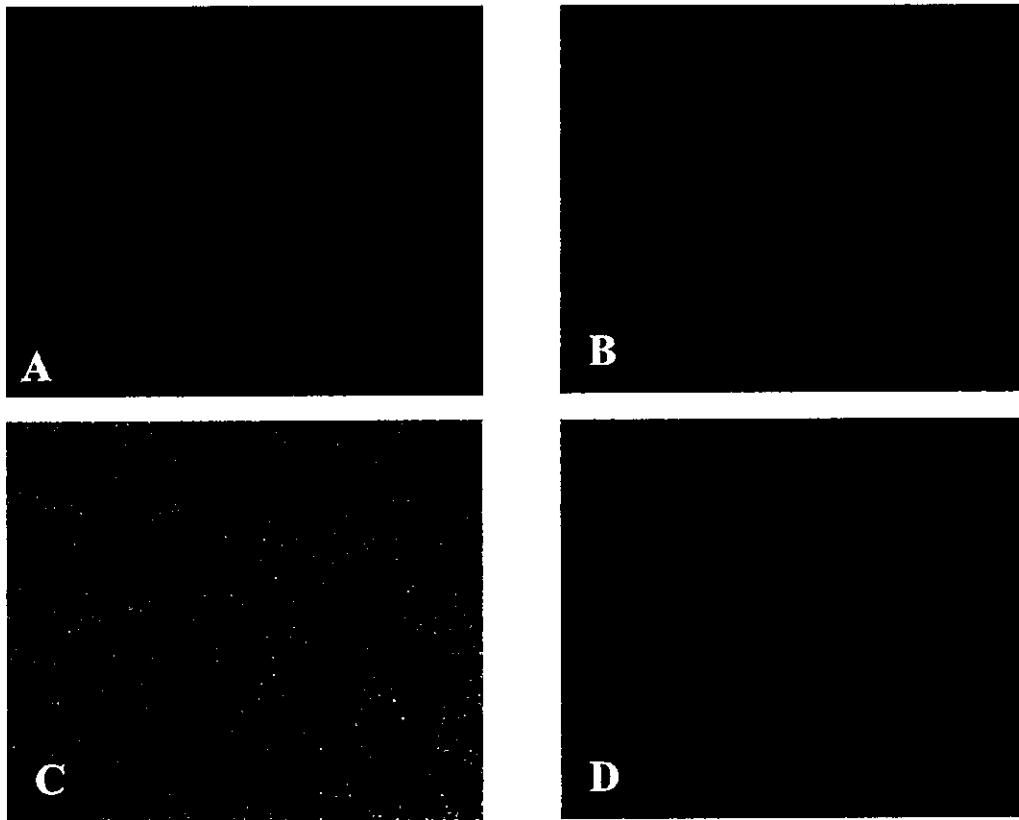


Figure 5. Photomicrograph showing U373MG cells on the Transwell membrane, which invaded through Matrigel barrier for 6 hours in serum-free condition (x 150). The number of cells decreases under influence of As_4O_6 in a dose-dependent manner (A: control, B: 1 μM , C: 5 μM , D: 10 μM of As_4O_6).

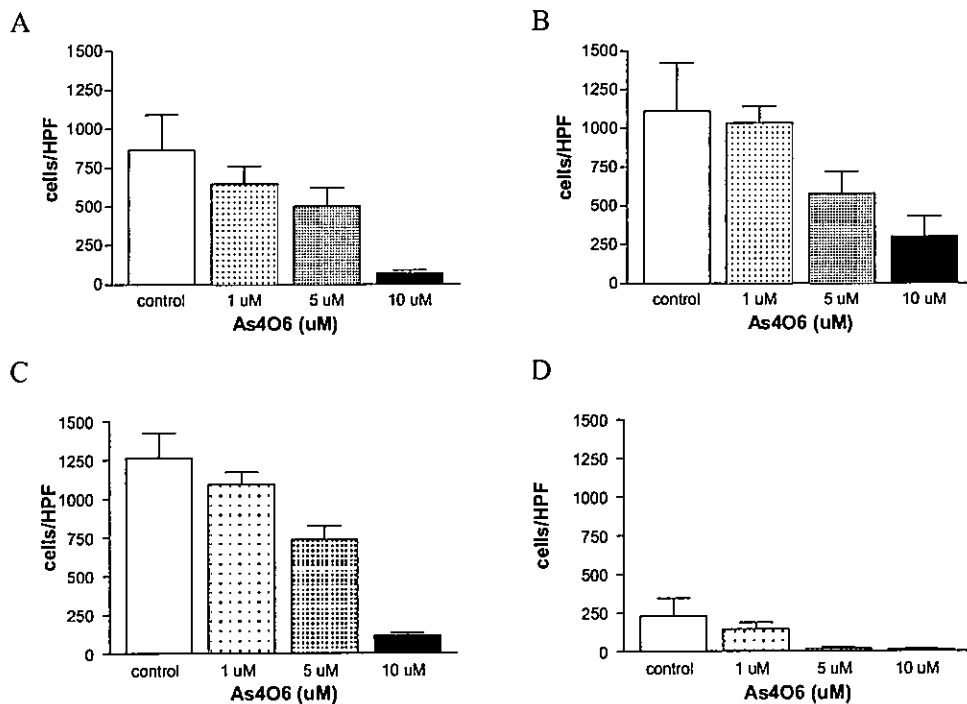


Figure 6. Bar graphs showing inhibited invasiveness of four glioblastoma cell lines under influence of As₄O₆ (A: U87MG, B: U251MG, C: U373MG, D: LN428). Each bar represents the mean number of cells that migrated through Matrigel coated milipore membrane during 6 hours in serum-free media. Each value of given As₄O₆ concentration was compared to the control value and significantly affected except 1 μ M of U251MG (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). Also, the values of given cell line show dose-dependent decrease according to As₄O₆ concentration (One-way ANOVA, $p < 0.001$) in all four cell lines. Error bars indicate standard deviations of observed cell numbers from separated ten high power field (x 150).

3. 침습능 측정실험에서 As_4O_6 에 의한 아포프토시스의 영향

세포독성 실험에서 As_4O_6 5 μM 및 10 μM 농도에서는 유의한 세포독성이 있었으므로 투여시간이 6시간으로 짧고 현미경 시야에서 세포괴사가 없었더라도 아포프토시스가 진행하여 침습능 측정에 영향을 주었는지를 확인하기 위하여 PI 및 annexin V-FITC를 첨가하여 흐름세포분석법으로 알아보았다. 아포프토시스 지수(전체 세포 중 annexin 표지세포의 비율)는 대조군에서 2.2 %, 1 μM 농도에서 2.6 %, 5 μM 2.9 % 및 10 μM 에서 1.7 %로 유의한 차이가 없었다. 세포괴사지수(전체 세포 중 annexin 및 PI에 모두 표지된 세포비율)도 대조군에서 6.0 %, 1 μM 농도에서 3.9 %, 5 μM 6.0 % 및 10 μM 에서 3.1 %로 As_4O_6 농도와 유의한 상관관계가 없었다 (Fig. 7). 따라서 침습능 측정에서의 As_4O_6 농도 및 노출시간에서는 세포괴사나 아포프토시스에 의한 영향을 배제할 수 있었다.



Fig 7. FACS analysis of U87MG cells in a given concentration of As_4O_6 at the same condition with invasion assay as described in Material and Method 2. The numbers of both apoptotic cells (right upper quadrant; annexin V-FITC positive) and necrotic cells (left upper quadrant; both annexin V-FITC and propidium iodide positive) remain constant in spite of As_4O_6 of given concentration.

4. As₄O₆에 의한 MMP-2 분비의 감소

As₄O₆가 교모세포종 세포주의 침습능을 감소시키는 것을 확인하고 이에 관여하는 물질로 기질금속단백분해효소인 MMP-2(68 kDa)의 세포 상층액으로의 분비 정도를 효소분해영동법으로 관찰하였다. 교모세포종 세포주에서는 MMP-2의 경우 구조적으로 분비됨으로 측정이 용이하였으나 조건배지에서는 분비가 과도할 뿐 아니라 여러 성장인자의 영향으로 As₄O₆농도에 따른 차이를 관찰하기 어려워 (자료는 제시하지 않음) 무혈청배지에 As₄O₆를 농도별로 첨가하고 세포의 용해가 일어나기 이전인 12시간에서 18시간 사이에 측정하였다. 각각의 세포주에서 나타나는 효소분해띠는 대조군에 비하여 1 μM에서는 확실하지 않으나 2.5 μM에서부터는 유의한 감소가 관찰되었고 5 μM 및 10 μM으로 농도가 증가함에 따라 농도-의존적으로 감소됨이 관찰되었다. U251MG와 같은 세포주에서는 대조군에서 2개의 띠가 분리되어 나타나 하단의 것이 활성형(active form) MMP-2(62 kDa)임을 확인할 수 있었는데 이 경우에는 활성형도 농도에 비례하여 감소되었다 (Fig. 8). 다른 세포주에서도 활성형이 분리되어 관찰되기도 하였으나 양이 적어 농도에 따른 차이를 구분할 수 없을 정도로 효소분해띠가 약해지는 경향이 있었고 시료의 양을 늘리는 경우에는 활성형이 분리되지 않았다. 효소분해영동법의 경우 시료의 양, 세포충만도 및 As₄O₆처리 후 시간에 따른 최소의 세포용해 등의 조건에 따라 효소분해띠 크기의 변화가 심하였으며 따라서 세포주에 따른 MMP-2 분비량의 비교는 적절하지 않았다.

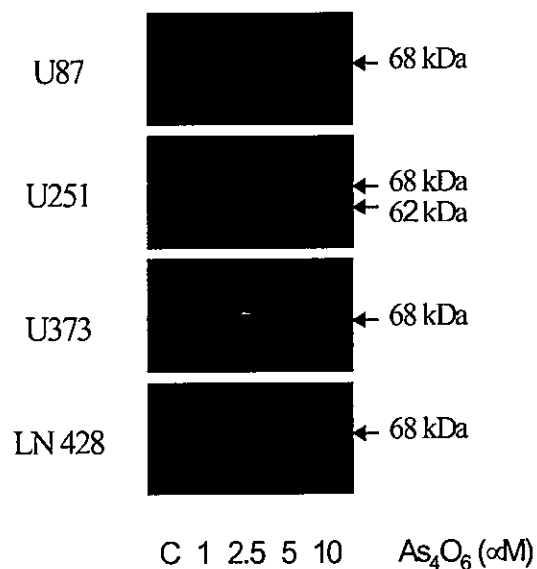


Figure 8. Effect of As_4O_6 on MMP-2 secretion of glioblastoma cell lines. Clear bands represents gelatinolytic activity of pro-MMP-2 (68 kDa) and active MMP-2 (62 kDa) secreted by each glioblastoma cell line into culture supernatant. The supernatant was collected after incubation with given concentration of As_4O_6 in serum-free media for 18 hours. A dose-dependent inhibition of gelatinolysis in response to As_4O_6 is observed. All images are representative data of three repeated experiments. (C: control)

5. As₄O₆에 의한 세포내 MT1-MMP 발현의 감소

As₄O₆에 의한 교모세포종 세포주의 침습능 감소 및 세포 상층액으로의 MMP-2 분비의 감소를 확인하고 생체 내 침습 과정에서 MMP-2의 조절 물질로 알려진 MT1-MMP의 발현에 대한 As₄O₆의 영향을 확인하기 위하여 세포 용해질 내 단백질 분획의 MT1-MMP를 Western blot으로 측정하였다. 10 μ M의 As₄O₆의 영향 하에서는 48시간이 경과하면 세포용해가 나타나므로 세포용해가 발생하지 않는 24시간에 세포용해액을 취하였다. 모든 세포주에서 MT1-MMP의 발현정도가 비교적 많지 않았으며 5 μ M과 10 μ M에서는 As₄O₆의 영향 하에 MT1-MMP의 뚜렷한 감소가 관찰되는 반면에 1 μ M과 2.5 μ M에서는 대조군에 비하여 뚜렷한 감소를 구별하기 어려웠다 (Fig 9. A). 세포주에 따른 대조군에서의 발현을 보면 U373MG 세포주에서 발현이 가장 뚜렷하였고 LN428 세포주에서 가장 적어 침습능 실험의 결과와 일치하는 소견을 보였다. 특히 LN428 세포주의 경우에는 MT1-MMP의 발현도가 미미하여 농도에 따른 변화를 관찰하기 어려웠다. 그러나 2.5 μ M 농도에서의 시간대별 감소를 보면 LN428 세포주를 포함한 모든 세포주에서 시간이 경과함에 따라 대조군에 비하여 뚜렷한 감소가 관찰되었다 (Fig. 9. B). 따라서 최소한 2.5 μ M 농도에서는 실질적으로 감소가 있었음을 유추할 수 있었다.

6. As₄O₆에 의한 Akt phosphorylation의 저해

앞선 실험에서 As₄O₆에 의한 교모세포종 세포주의 침습능 및 MT1-MMP의 발현의 변화가 Akt의 발현 및 인산화와 관련이 있는지 또한 PTEN 유전자 결핍 세포주인 U87MG, U251MG 및 U373MG에 비하여 PTEN 유전자가 야생형인 LN428 세포주에서 침

습능이 감소하여 있는 것이 PI 3-K의 조절되지 않은 활성화에 의한 Akt의 과도한 인산화 때문인지를 확인하고자 하였다. As₄O₆를 첨가하지 않은 대조군에서 Akt의 발현정도는 세포주에 따른 차이가 없었으며 (자료는 제시하지 않음) p-Akt의 발현정도도 PTEN 유전자 결핍여부에 따른 차이가 없이 LN428 세포주에서도 잘 발현되었고 이전 실험에서 관찰된 침습능 또는 MT1-MMP 발현정도와의 상관관계가 없었다(Fig. 10. A and B). 따라서 교모세포종 세포주에서의 Akt 인산화를 조절하는 PI 3-K의 활성도는 PTEN 유전자 결핍여부 및 침습능과 직접적인 상관관계가 없다고 판단되었다. 그러나 4가지 세포주 모두에서 As₄O₆를 농도별로 처리한 후 24시간 배양하여 p-Akt의 발현을 관찰한 결과 대조군에 비하여 뚜렷하게 감소되었고 농도 의존적인 경향을 보였으나 같은 조건에서 Akt의 발현정도는 변화가 없어 As₄O₆가 Akt의 인산화 저해효과를 나타냄이 관찰되었다 (Fig. 9. A). 양성 대조군으로 사용한 PI 3-K 특이 억제제인 LY294002의 경우에는 20 μ M 농도로 1시간 처리하여 Akt의 인산화가 완전히 차단되었는데 As₄O₆의 경우에도 10 μ M 농도에서는 상당한 인산화차단 효과가 나타났으나 이는 24시간 이후의 결과로 사전 실험에서 6시간이내에는 변화를 관찰할 수 없었으며 (자료는 제시하지 않음) PTEN 유전자 야생형 세포주인 LN428 세포주에서는 농도에 따른 억제효과가 다른 세포주에 비하여 적게 나타나 (Fig. 10. A) As₄O₆에 의한 Akt 인산화저해는 PI 3-K에 특이성을 가지지는 않는 것으로 판단되었다. 따라서 As₄O₆에 의한 Akt의 인산화 저해가 직접적인 세포독성에 의한 것이 아닌지 구별하기 위하여 2.5 μ M의 농도에서 12시간 간격으로 시간별로 관찰하였다 (Fig. 10. B). p-Akt의 경우 12시간부터 대조군에 의한 감소가 관찰되었으며 Akt

의 발현 정도는 24시간까지 변화가 없다가 36시간 이후부터 감소하는 경향을 보였다. 따라서 As_4O_6 에 의한 Akt의 인산화 저해효과는 세포독성의 직접 영향에 의한 것은 아니라고 판단되었으나 전반적인 세포활성 저하나 단백질 전사 저하에 의한 영향을 완전히 배제할 수는 없었다.

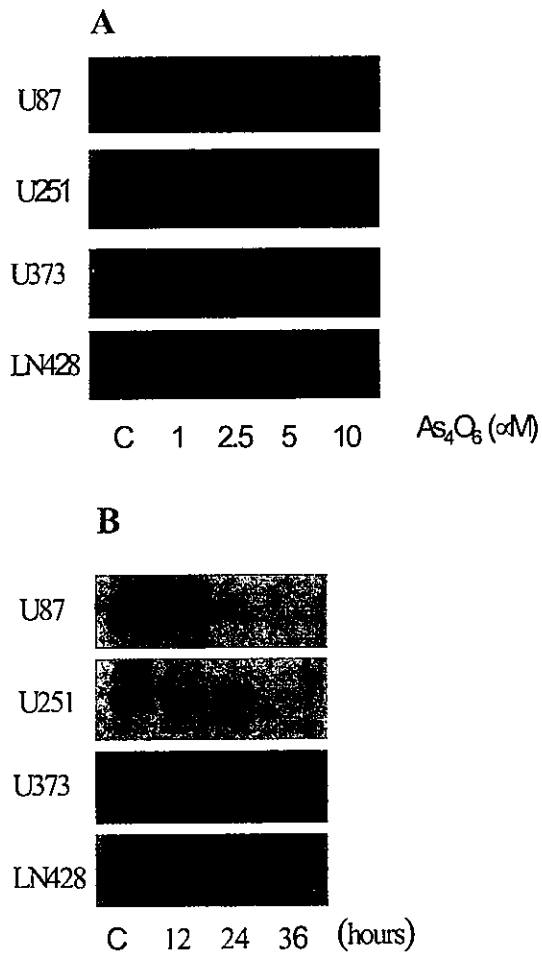


Figure 9. Western blots showing MT1-MMP expression in glioblastoma cell lines under influence of As_4O_6 in conditioned serum. A: Suppression of MT1-MMP expression shows dose-dependent reduction after incubation with given As_4O_6 concentration for 24 hours. B: Expression of MT1-MMP after addition of $2.5 \mu M$ of As_4O_6 decreases with time. (C: control)

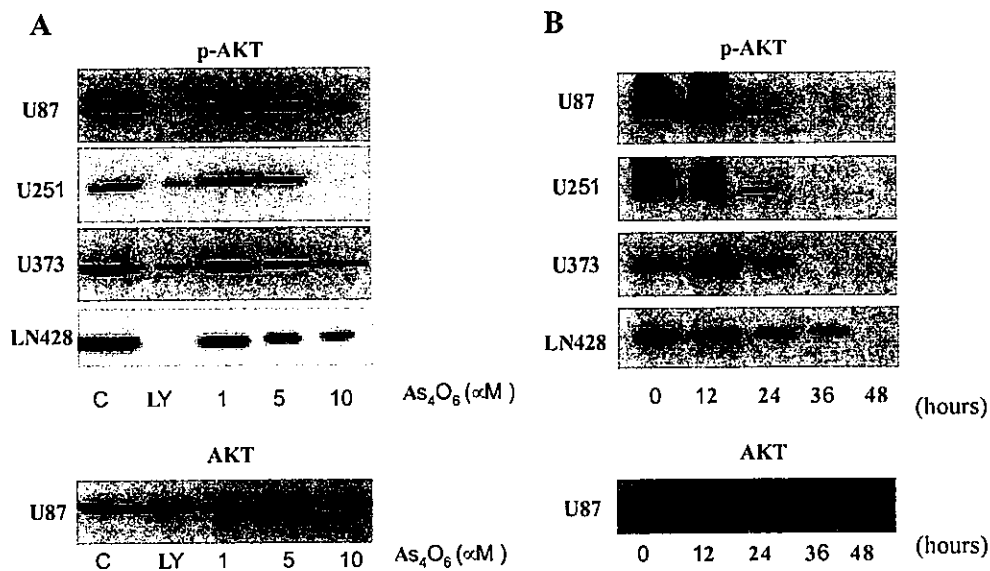


Figure 10. Immunoblots showing Akt and phosphorylated Akt (p-Akt) expression under influence of As_4O_6 in glioblastoma cell lines. A: Akt phosphorylation is reduced by As_4O_6 of given concentration in a dose-dependent manner after 24 hours of incubation, while Akt remains constant. B: p-Akt decreases with time in all four cell lines after incubated with 2.5 μM of As_4O_6 from 12 hours, when there is no cytotoxic influence. Akt remains relatively constant until 24 hours in U87MG cell line.

(note: LY represents LY294002, a specific inhibitor of PI 3-K, totally inhibits Akt phosphorylation after one hour of incubation at a concentration of 20 μM ; C: control)

고 찰

1. 교모세포종에서의 MMP의 발현과 침습성

교모세포종의 침습성을 억제하는 것은 악성교종의 치료에 있어 최대의 목표라고 할 수 있다. 침습과정은 첫째, 세포외기질의 유착, 둘째, 단백질분해효소에 의한 단백질분해작용, 셋째, 분해된 구조물을 따른 이동의 3단계로 나누어 볼 수 있다. 악성교종의 경우는 해부학적 구조인 뇌백질 경로(white matter tract)를 따라 침습 및 전이가 잘 되기 때문에 특히 주위 기질의 분해가 가장 중요한 역할을 하며 그런 의미에서 단백질분해효소는 침습과정의 "최종 효과기(final effector)"라고 할 수 있다⁴⁴. 신경교세포종에서 MMP의 발현 및 악성도에 따른 분포 변화는 이미 많은 연구가 이루어져 있다^{25,40,41,42,50,60}. 악성교종의 경우 MMP-2와 MMP-9의 발현이 잘 알려져 있는데 이중 MMP-9은 AP-1 promotor unit을 가지고 있어 fos/jun과 같은 종양유전자에 의하여 유도되며 plasmin에 의하여 활성화되고 주로 혈관내피 세포에 존재하여 신경교종의 침습성보다는 혈관신생에 관여하는 것으로 보인다. 반면 MMP-2는 종양 기질 내에 구조적으로 존재하며 plasmin이 아닌 MT1-MMP에 의한 활성화만이 가능하고 혈관내피 세포 보다는 교종세포 표면에 주로 발현되어 침습성을 나타내는 주 효과기라고 여겨지며 AP-1 unit이 없기 때문에 전사를 유도-증폭하기가 어려워 여러 가지 성장인자나 종양유전자의 활성화에 의한 영향을 비교적 적게 받는다. 따라서 종양세포자체의 조절인자에 의한 효소농도의 불균형이 전체 MMP의 활성도를 결정한다고 보이며 이는 교모세포종의 임상양상의 다양성과도 잘 일치하고 있다. Uhm 등⁵³은 여러 교모세포종 세포주의 침습성을 측정하여 세포주에 따라 많은 차이가 있음을 보고하고 MMP-2의 활성도와 일치한다고 주장하였다. 이번 연구

에서 MMP-2의 분비 정도는 세포주의 총만도, As₄O₆에의 노출시간 등의 실험적 요소와 세포주에 따라 차이를 보였으나 침습성 실험에서의 침습능과 일치하지는 않았다. 효소분해영동법에 의한 MMP-2의 활성도가 세포주의 침습성을 모두 나타내는 것은 아니나 Matrigel barrier를 이용한 침습능 측정에서도 역시 As₄O₆에 의하여 농도 의존적으로 침습성이 감소되는 것이 확인되었으므로 MMP-2의 분비 감소에 의하여 Matrigel 내의 아교질 분해능이 감소한 것도 침습성 감소의 주요 원인 중에 하나라고 생각할 수 있었다. 또한 MMP-2의 세포 내 조절인자인 MT1-MMP가 As₄O₆의 영향 하에 감소되는 것이 세포용해질을 이용한 Western blot에서 확인되어 As₄O₆는 교모세포종 세포주의 기질 분해능을 감소시킬 수 있다고 판정할 수 있었다. 대부분의 경우 조절인자인 MT1-MMP의 발현과 MMP-2의 발현율은 일치하며¹⁰ 종양의 경계부나 혈관주위에서 더욱 강하게 발현되는 양상을 보인다¹⁶. 따라서 생체 내에서 MMP-2의 활성을 조절하기 위해서는 악성교종의 주 침습경로인 뇌백질에서 MT-MMP가 발현되어야 하는데 이전까지는 혈관내피세포에만 존재하는 것으로 알려졌으나 Yamada 등에⁵⁹ 의하여 뇌백질 내의 미세아교세포(microglia)에 주로 존재함이 밝혀져 악성교종세포에 의해 분비된 pro-MMP-2가 미세아교세포의 MT-MMP에 의해 활성화되어 악성교종세포의 침습에 허용성(permissive)이 된다는 가설을 뒷받침해주고 있다.

이번 연구에 사용된 모든 세포주에서 MMP-2가 쉽게 검출되었고 모두 As₄O₆에 의하여 그 분비가 감소됨이 관찰되었다. As₄O₆가 MMP-2의 세포 상층액으로의 분비를 감소시키는 기전은 명확하지는 않으나 사전 실험을 통하여 확인한 바 6시간 정도의 일정 시간이 경과한 이후에 감소하는 것으로 보아 직접적인 중화작용을 하지는 않는 것으로 판단된다. MMP의 생체 내 조절기전은 단계별로 유전자 전사, 선별적 단백질분해에

의한 풋효소의 활성화 및 조직내인자에 의한 활성저해 등으로 나누어 볼 수 있다. 생체 내에서는 비활성형인 pro-MMP-2는 아교질분해 활성이 없는 것으로 되어 있으나 시험관 내 실험 조건에서는 젤라틴 분해가 가능하여 활성화 여부에 상관없이 효소활성영동에서 효소분해띠를 형성하였다. 따라서 이번 실험에서 측정된 MMP-2는 대부분이 pro-MMP-2의 비활성 형태일 수 있어 가능한 활성형을 분리하고자 하였으나 배양 조건 하에서는 활성형의 발현이 상대적으로 적으며 비활성형과 활성형의 분자량의 차이가 적어 시료의 양을 많이 하여 효소분해띠를 크게 하면 분리가 되지 않아 활성형만을 따로 보기는 어려웠다. 그러나 일부 세포주에서 활성형이 관찰되는 경우 역시 활성형도 감소되어 있었다. 따라서 As_4O_6 에 의한 MMP-2의 분비 감소가 풋효소의 활성화 저해에 일부 의존한다고 하더라도 주된 감소기전은 세포 전체의 분비기능 감소 및 침습능 저하에 의한 세포내 발현 감소라고 판단되었다.

2. 침습성에 영향을 미치는 세포내 인자들

1990년대 초반 MMP의 작용기전에 관한 연구가 활발히 이루어지던 시기에는 여러 가지 성장인자와의 관계가 연구되어 표피성장인자, 혈소판기원성장인자(platelet-derived growth factor: PDGF)에 의하여 MMP의 활성이 증강된다는 보고들이 있었다. 그러나 1990년대 중반 이후 MMP-2의 활성화 및 억제가 pro-MMP-2, MT1-MMP, 및 TIMP-2의 3분자 복합체(trimolecular complex)에 의해 결정된다는 것이 알려진 이후 성장인자에 의한 유전자 수준에서의 전사 증강가설은 쇠퇴하였다⁴⁴. 이후로는 주로 제2전령사(secondary messenger)라 불리는 단백질키나아제들이 MMP의 활성을 유도할 것으로 추정되었다. 실제로 PKC나 분열제활성단백키나아제(mitogen activated protein kinase; MAPK)를 증강시키면 악성교종 세포

주에서 MMP의 활성화 및 침습성이 증가된다는 것이 시험관 내 실험으로 확인되기도 하였다^{35,48}. 그러나 PKC가 c-fos/jun과 같은 세포내 전사인자(transcription factor)를 증강시키더라도 MMP-2는 AP-1 unit이 없어 직접적으로 작용할 수는 없었다. Park MJ 등³¹은 D54 교모세포종 세포주에서 phorbol ester로 PKC의 활성화를 증강시키면 MT-MMP 및 MMP-9의 발현이 증가하고 TIMP의 발현이 억제되나 MMP-2는 직접 증가시킬 수 없었고 pro-MMP-2의 활성화만을 증강시킨다고 하였으며 이러한 pro-MMP-2의 활성화 증가는 세포접촉이 없는 환경에서는 불가능한 점으로 미루어 MT-MMP 및 TIMP와의 세포표면에서의 복합작용에 의한 간접효과라고 보았다. Uhm 등⁵³은 PKC 억제제를 첨가할 경우 MMP-2의 발현은 변화하지 않으면서 MT-MMP의 mRNA 발현이 50% 이상 감소하는 사실을 관측하여 PKC에 의한 MMP 활성화 증가는 MT-MMP의 전사유도에 의한 간접 효과일 것으로 보고하였다. 이론적으로는 PKC 억제제에 의한 MMP 활성화의 감소가 가능할 것으로 생각되나 실험적으로 관측된 것은 신경교종 세포주에서의 아포프토시스의 유도이며 직접 작용에 의한 MMP 활성화 및 침습성의 감소에 대한 보고는 아직 없다. 따라서 이번 연구에서는 MMP-2의 직접 조절작용이 없다고 밝혀진 PKC 외에 PKB/Akt를 측정하였다. Akt는 악성교종의 유전자 변화 중 가장 높은 빈도로 발견되는 유전자 변화가 10q23 유전자의 이형접합성상실(loss of heterozygosity)에 의한 PTEN 유전자결핍이라고 보고 되면서 최근 주목 받고 있는 인산화효소이다. Smith등⁴⁹에 의하여 PTEN 돌연변이가 악성교종 환자의 생존기간과 유의한 상관관계가 있다는 주장이 제기되었을 뿐 아니라 Li 등²⁰은 PTEN 결핍세포주인 U87MG 세포주에서 PTEN 유전자를 발현시켜 G₁ cyclin dependent kinase의 활성화감소에 의한 세포주기 정지를 촉진하고 PI 3-K/Akt 전달 체계를 억제하여 종양생성 및 성장을 억

제할 수 있음을 보고하였다. Kim 등¹⁴은 HT1080 섬유육종 세포주를 다양한 변이를 가지는 Akt를 유전자전달감염으로 형질전환 시켜서 세포주가 이동할 때 선두 가장자리(leading edge)에 Akt가 국소집결 됨을 동일초점 현미경(confocal microscopy)으로 직접 관찰하였고 PI 3-K 의존 경로로 세포이동 및 침습성을 증강시키고 전사인자인 NF- κ B의 발현을 증강시켜 MMP-9의 생산을 증가시킴을 보고하였다. Kubiakowski 등¹⁶은 시험관 내 실험 및 C6 신경교종 세포주를 이용한 생체 내 실험에서 PTEN 종양억제유전자의 결손이 있을 경우 PI 3-K signaling이 억제되지 않은 채 활성화되어 Akt의 인산화를 증강시키고 이로 인하여 종양의 주변부에서 MMP-2의 활성화가 일어나는 것을 증명하였으며 또한 PI 3-K 특이성 억제제로 억제되는 것을 보였다. Shingu 등⁴⁶은 악성교종 세포주 중 PTEN 결손 세포주와 PTEN 정상 세포주를 각각 PTEN의 하위 표적물질인 PI 3-K의 특이성 억제제인 LY294003을 이용하여 Akt 인산화의 차이와 세포성장 억제 정도의 차이를 보았는데 PTEN 결손 여부에 따른 유의한 차이가 없이 모두 인산화가 차단되어 PTEN이 Akt의 단독 조절인자는 아니지만 치료의 표적 물질이 될 수 있다고 주장하였다. 이번 연구에서 사용된 세포주의 경우 U87MG, U251MG 및 U373MG는 PTEN 결핍 세포주이고 LN428은 PTEN 정상 세포주였는데 LN428의 경우 침습능 측정실험에서 다른 세포주에 비하여 현저히 감소된 침습성이 관찰되었으나 마찬가지로 As₄O₆에 농도 의존적으로 침습성이 감소되었다. LN428 세포주의 경우 이번 실험에서 정량적 측정에 어려움은 있으나 MMP-2의 분비 및 Akt/p-Akt의 발현은 다른 세포주와 유의한 차이가 없었고 MT1-MMP 발현 정도는 다른 세포주에 비해 미약하여 침습능의 감소는 Akt 전달체계에 의한 이동능의 감소보다는 MT1-MMP의 전

달체계에 관계된 분해능의 감소일 것이라고 추정 할 수 있었다. 또한 LN428 세포주는 As_4O_6 에 의한 인산화 억제실험에서 다른 세포주에 비해 비교적 그 억제 정도가 약하였는데 이는 상대적으로 PTEN 결손에 의한 PI 3-K의 과발현이 적기 때문이며 다른 조절인자에 의해 정상적인 활성화도 유지가 이루어지기 때문으로 사료되었다. PTEN 유전자 결핍여부에 상관없이 모든 세포주에서 As_4O_6 에 의한 Akt의 인산화의 저해가 관찰된 점과 36시간 이상 노출하였을 때 Akt의 발현도 감소하는 것으로 보아 As_4O_6 는 PI 3-K 억제 이외의 다른 경로로도 Akt의 발현 및 인산화를 억제하는 것으로 생각되었다.

3. As_4O_6 의 작용기전

삼산화비소(As_2O_3)가 일반 항암치료에 불응하는 급성전골수구백혈병의 치료제로 사용되었을 때의 작용기전은 레티노인산(retinoic acid)에 불응하는 아클론(subclone)에서의 PML-RAR α 단백질의 하향조절 및 Bcl-2의 하향조절에 의한 아포프토시스의 유도였다³¹. 그러나 최근 들어 이외에도 세포내 환원효소인 glutathione-S-transferase의 작용을 억제하여 세포내 활성산소체(reactive oxygen species: ROS)를 유리시킴으로서 caspase-3를 활성화시켜 사립체의 막 전위압이 상실되는 기전이 추가로 발견되었으며 이러한 기전은 항-산화제의 일종으로 ROS 청소제(scavenger)로 작용하는 N-acetyl-L-cystein(NAC)에 의해 차단됨이 입증되었다. 이러한 아포프토시스 유도는 백혈병 세포주 이외에 HeLa cell과 같은 고형암 및 p53 결핍 세포주에서도 작동되고 있음이 입증되어 있다³⁸. Park IC 등³³은 As_2O_3 에 저항성을 갖는 U937 백혈병 세포주에서 As_4O_6 가 As_2O_3 보다 훨씬 낮은 농도에서 아포프토시스를 유발하

며 이는 훨씬 강력한 ROS 유도 작용 때문일 것으로 추정하였다. Lew 등¹⁹은 마우스의 고형종양에서 As_2O_3 가 혈관 폐색에 의한 괴사를 일으킴을 관찰하였고, Roboz 등³⁸은 혈관내피세포에서 농도에 비례하여 아포프토시스를 유도함을 관찰하고 항혈관신생 효과의 일부일 수 있다고 보고하였다. 이러한 항혈관신생 효과는 모든 암종의 성장과 전이의 필수조건으로써 Park MJ 등³⁶은 As_4O_6 를 이용하여 소모세혈관내피의 아포프토시스를 시키지 않는 농도($1 \mu M$)에서 MMP-2의 발현 억제, G2/M phase에서의 세포주기 정지 및 침습성의 감소를 통하여 항혈관신생 효과를 발생시킴을 시험관 내 실험으로 입증하였다. 이들은 또한 생체 내 실험에서 토끼의 각막에서 기본섬유모세포성장인자 (basic fibroblast growth factor: bFGF)의 자극에 의한 혈관신생의 억제 및 누드마우스에서 흑색종 세포주를 이용한 폐전이 결절의 생성억제를 증명하였다. 비소화합물은 직접 아포프토시스를 유도하기도 하지만 방사선 치료와 병행하였을 때 상승효과를 나타내는 것으로 보고 되고 있으며⁷, SNB75 교모세포종 세포주를 대상으로 한 생체 외 및 생체 내 이종이식 실험에서 삼산화비소가 방사선감작제(radiation sensitizer)로서의 효과를 나타내어 효과적으로 교모세포종을 억제하는 것으로 보고되었다²⁹. 이번 실험에서는 다양한 유전형질을 가진 악성교종 세포주에서 MMP-2의 분비를 감소시키고 세포내의 MT1-MMP의 발현도 억제시킴이 관찰되었는데 이는 교모세포종 세포주에서의 As_4O_6 작용에 대한 최초의 보고이다. 그 작용기전을 명확히 알 수는 없었으나 작용시간으로 볼 때 직접 중화나 기질경쟁(substrate competition) 보다는 세포 성장 및 증식에 요구되는 단백질 키나아제들의 전반적인 활성 억제 또는 전사 유도 관련물질의 억제와 관련이 있다고 보인다. Akt의 인산화 저해작용의 경우에도 24시간 이내에서는 Akt 발현의 감소 없이 인산화의 감소가

초래되어 PI 3-K를 억제하는 작용이 있다고 보이나 이는 PI 3-K보다 상위에 있는 조절물질에 대한 억제 작용일 수 있으며 36시간 이후에 Akt의 발현이 감소하는 것으로 보아 어느 정도는 전반적인 Akt 발현의 감소에 의한 측면도 있다고 보인다. Shingu 등⁴⁷은 교모세포종 세포주에서 PI 3-K 특이 억제제인 LY294002가 세포골격계에 작용하는 항암 약물과 상승작용(synergy)이 생기는 것을 관찰하고 caspase-3의 작용증강에 의한 아포프토시스 유도 기전이 있을 것으로 추정하였는데 향후 As₄O₆에 의한 아포프토시스의 유도 정도와 Akt의 인산화 억제에 대한 정량적 실험으로 확인 할 필요가 있다고 판단되었다.

4. 향후 연구의 방향

악성교종은 현재 수술과 방사선 치료를 기본으로, 경우에 따라서는 항암치료를 병합하는 다중요법을 실시하고 있으나 방사선치료 이외에는 뚜렷하고 일정한 생존율의 향상을 가져오지 못하고 있다. 그 이유를 임상적인 면과 분자생물학적인 측면으로 나누어보면 임상적으로는 주위 뇌조직으로의 잠행성 침윤으로 인한 국소재발이 전체 치료 실패의 90%를 차지하고 있다²¹. 실제 악성교종의 진단 시 다발성(multicentric)인 경우는 5% 미만이며 재발하여 다발성으로 진행되더라도 실제로는 해부학적 연속성이 있는 다초점성(multi-focal)인 경우가 대부분이며 이것은 침윤의 실제적인 내용은 세포 기저막의 파괴나 혈관 또는 뇌척수액을 경유하는 전이보다는 주위 뇌실질로의 침윤이 대부분이라는 것을 시사해준다. 뇌의 세포외기질의 성분에 관한 연구결과를 보면⁴⁹ type IV, V 아교질과 섬유결합소(fibronectin), laminin 등은 혈관벽이나 기저막에 존재하고 세포외기질에는 약간의 섬유결합소와 type V 아교질만이 있었으며 이러한 다른 암종들과는 다른 뇌조직의 세포외기질 조성은 이러한 단백질

들이 비-허용 기질(non-permissive substrate)로 작용할 가능성은 적고 아교질은 혈관신생을 위해 필요할 것이라는 것을 시사하여 준다. 비-허용 단백질로 가장 역할이 큰 것은 말이집(myelin)으로써 이는 생리학적으로도 유아기가 지나 말이집형성이 완성되면 신경세포 이주(neural cell migration)가 중단되는 것과는 잘 일치하고 있다. Amberger 등은^{1,2} 이러한 신경 전구 세포(neural precursor cell)의 말이집에서의 이동이 특이성 MMP 차단제나 말이집 성분에 대한 단클론항체로 중화됨을 입증하였고 또한 악성교종과는 달리 상의세포종이나 수모세포종이 주위 뇌조직으로의 침윤은 적고 뇌척수액을 따른 중추신경 내에서의 원격전이가 흔한 것을, 확산(spreading) 및 이주 활성도는 활발하나 말이집 도포 슬라이드에서의 이주는 저해되는 것으로 설명하였으며 말이집을 허용성으로 중화하는 것이 MT-MMP임을 특이성 억제제를 사용하여 증명하였다. 따라서 향후 침습성에 관한 연구는 MMP-2의 활성도만으로는 부족하며 MT-MMP의 활성여부가 같이 연구되어야 하며 또한 교원질이 주성분인 Matrigel이 아닌 말이집을 도포한 Transwell에서의 침습능 측정 실험을 통한 증명이 요구된다고 사료된다. 또한 가능한 생체 내 실험에서 침습성의 억제를 증명할 것이 요구되는데 C6 백서 교종모델의 경우 인간 MT-MMP와 구조가 유사하여 인간 항체로 중화될 수 있는 특징을 가지고 있어² 이를 이용한 생체 내 실험 증명이 가능할 것으로 사료된다.

다음으로 분자생물학적인 측면에서는 악성교종이 가지는 유전적 다형성(genetic heterogeneity)이 가장 문제라고 할 수 있다. 교모세포종은 대부분의 다른 암종이 비교적 일정한 종양발생 경로를 가지는 것과 반대로 여러 가지 다발성 유전경로(multiple genetic pathway)를 거

쳐 옴으로써 하나의 분자 생물학적 지표로는 도저히 규정지어질 수 없다는 것이 특징이다²¹. 교모세포종의 분자생물학적인 연구의 초기에는 p53 변이 및 각종 성장인자의 발현여부에 따른 생존율 및 예후에 관한 여러 보고가 있었으나 일정한 결과가 인정된 바 없이 연구자마다 상이한 결과를 보고하였고, 이후에 이러한 인자와 이차 전령물질의 활성화 또는 세포증식 표지자수 등을 같이 묶어 의미 있는 생존율의 차이를 보고하고 있으나 뚜렷한 차이를 보였다고 하기에 부족하였다^{37,52}. 따라서 성장인자의 전사 조절이나 유전자전달감염과 같은 상류조절법은 아직 실용화에 많은 문제점을 가지고 있을 뿐 아니라 근본적으로 악성교종의 치료에는 적합하지 않다고 보여지며 효과기에 해당하는 물질의 작용을 저해시키는 하류조절법 형태의 치료가 중요시 되어야 한다. 이러한 관점에서 MMP는 악성교종 치료의 최대 난제인 주위 뇌조직으로의 침윤의 효과기로 지목되어 MMP 억제제에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다. Chung 등⁶이 이제까지의 MMP 억제제의 작용기전 및 임상실험 결과를 분석한 논문에 의하면 MMP의 아연이온(Zn^{2+}) 부분을 킬레이트화 하는 약물의 경우 임상적용 농도에서 효과적이지 못하거나 독성을 나타내어 실패하였고 아교질 기질과 경쟁 기질로 작용하는 약물의 경우는 악성교종이 시간이 지나면서 내성을 가지게 되어 실패하였다고 하였다. 또한 대부분의 악성교종이 이미 침윤이 이루어진 상태이므로 다른 치료방법과 병행이 가능하여야 하며 장기간 투여가 요망되어 약물학적으로 경구투여가 가능하고 생체이용율이 좋은 약물일 것, 단백질키나아제와 같은 다른 경로의 2차 효과기를 저해시킬 수 있는 것이 유리하며 이상적으로는 MT-MMP의 전사를 저해하거나 활성화를 중화시킬 수 있는 등의 조건을 제시하였다.

이번 연구에서 As_4O_6 는 MT-MMP의 발현 감소 및 Akt의 인산화 저해를 가져올 수 있음이 입증되어 향후 MMP 억제제로서의 활용이 가능하다고 판단된다. 이 가능성을 뒷받침하기 위하여서는 제 1상 임상실험에서의 독성 및 생체이용율의 안정성이 선결요건이 되며 방사선이나 항암제와의 동시 투여시의 효과에 대한 검증 또한 필요하다고 판단된다. Wilde-Bode 등⁵⁷은 3 Gy이하의 준치사방사선 조사(sublethal radiation)시 악성교종 세포주에서 MMP 계열의 활성이 증가되며 Bcl-2의 상향조절에 의하여 아포프토시스로부터 보호가 되는 것을 시험관내 실험으로 관찰하였는데 이는 실제 임상에서 방사선 치료계획 수립 시 임상 치료 용적(clinical target volume)을 자기공명영상에서 보이는 신호강도 변화 영역까지 포함함에도 불구하고 그 외곽영역에서의 재발이 빈번한 사실에 대하여 하나의 가능한 설명이 되고 있다. Ning 등²⁹이 교모세포종 세포주에서 삼삼화비소를 방사선감작제로 사용하여 종양살상 효과의 증강을 관찰한 것은 뇌종양모델이 아닌 마우스 복막강내의 이종접합 실험이기는 하나 장기적인 투여를 전제로 준치사 방사선조사에 의한 회피기전을 억제할 수 있을 지에 대한 선도적 실험으로 볼 수 있으며 향후 As_4O_6 를 이용한 C6 백서 뇌종양 모델을 통한 실험적 검증 및 감작기전에 대한 분자생물학적 연구가 필요하다고 사료되었다.

결론

저자는 새로 개발된 무기비소화합물인 As_4O_6 가 세포독성이 없고 임상적용이 가능한 농도 내에서 교모세포종 세포주의 침습성을 감소시키는 것을 Matrigel barrier를 이용한 침습능 측정 실험으로 확인하였다. 이러한 침습성 감소의 기전을 설명하기 위하여 교모세포종 세포주의 배양액에 As_4O_6 를 첨가한 후 MMP-2의 세포 상층액으로의 분비 및 MT1-MMP의 세포내 발현이 농도에 반비례하여 감소되는 것을 각각 효소분해영동법 및 Western blot으로 확인하였다. 또한 면역영동법으로 As_4O_6 가 Akt의 발현을 억제하지 않은 상태에서 Akt의 인산화를 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 향후 동물 뇌종양모델 실험 및 생체이용율에 대한 검증을 거쳐 As_4O_6 를 교모세포종의 항침습제로 개발할 가능성이 있다고 판단된다.

참고문헌

1. Amberger VR, Avellana-Adalid V, Hensel T, et al: A oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor use a metalloendoprotease to spread and migrate on CNS myelin. **Eur J Neurosci** 9: 151-162. 1997
2. Amberger VR, Hensel T, Ogata N, et al: Spreading and migration of human glioma and rat C6 cells on central nervous system myelin in vitro is correlated with tumor malignancy and involves a metalloproteolytic activity. **Cancer Res** 58:149-158, 1998
3. Bashir R, Hochberg F, Oot R: Regrowth patterns of glioblastoma multiforme related to planning of interstitial brachytherapy radiation fields. **Neurosurgery** 23:27-30, 1988
4. Bellon G, Caulet T, Cam Y, et al: Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. **Acta Neuropathol** 66: 245-252, 1985
5. Chen GQ, Shi XQ, Tang W, et al: Use of arsenic trioxide(As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia(APL): I. As_2O_3 experts dose-dependent dual effects on APL cells. **Blood** 89:3345-3353, 1997

6. Chung HC: Matrix-metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. **Exp Mol Med** 34 (Suppl): 147-167, 2002
7. Chun YJ, Park IC, Park MJ, et al: Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As₂O₃). **FEBS Lett** 22:195-200, 2002
8. Concannon JP, Kramer S, Berry R: The extent of intracranial gliomata at autopsy and its relationship to techniques used in radiation therapy of brain tumors. **Am J Roentgenol** 84:99-107, 1960
9. Giese A, Loo M, Rief MD, et al: Substrates for astrocytoma invasion. **Neurosurgery** 37: 294-301, 1995
10. Hur JH, Park MJ, Park IC, et al: Matrix Metalloproteinase in Human Gliomas : Activation of Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) May be Correlated with membrane-Type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) Expression. **J Korean Med Sci** 15:309-314, 2000
11. Jolliffe DM, A history of the use of arsenicals in man. **J R Soc Med** 86: 287-289, 1993
12. Kanazawa T, Kondo Y, Ito H, et al: Induction of autophagic

cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. **Cancer Res** **63**: 2103-8. 2003

13. Kelly PJ, Daumas-Duport C, Kispert DB, et al: Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms. **J Neurosurg** **66**:865-874, 1987

14. Kim D, Kim S, Koh H, et al: Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. **FASEB J** **15**:1953-1962, 2001

15. Kohn EC, Liotta LA: Molecular Insights into Cancer Invasion: Strategies for Prevention and Intervention. **Cancer Res** **55**:1856-1862, 1995

16. Kumana CR, Au WY, Lee NS, et al: Systemic availability of arsenic from oral arsenic-trioxide used to treat patients with hematological malignancies. **Eur J Clin Pharmacol** **58**:521-526, 2002

17. Kubiawski T, Jang T, Lachyankar MB, et al: Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. **J Neurosurg** **95**:480-488, 2001

18. Kwong YL, Todd D: Delicious poison: arsenic trioxide for the

treatment of leukemia. **Blood** 89:3487-3488, 1997

19. Lew YS, Brown SL, Griffin RJ, et al: Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid tumors by vascular shutdown. **Cancer Res** 59:6033-6037, 1999

20. Li DM, Sun H: PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:15406-15411, 1998

21. Louis DN, Gusellar JF: A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. **Trends Genet** 11: 412-415, 1995

22. Mathews V, Balasubramanian P, Shaji RV, et al: Arsenic Trioxide in the treatment of newly diagnosed Acute promyelocytic leukemia: a single center experience, **Am J Hematol** 70: 292-299, 2002

23. Matsukado Y, MacCarty CS, Kernohan JW: The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grade 3 and 4) in neurological practice. **J Neurosurg** 18: 636-644, 1961

24. Mikkelsen T, Rosenblum ML: Tumor Invasiveness. In Berger MS, Wilson CB (eds): **Gliomas**, Philadelphia, WB Saunders, 1999, pp76-86

25. Mohanam S, Wang SW, Rayford A, et al: Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases; negative regulators of human glioblastoma invasion in vivo. **Clin Exp Metastasis** 13:57-62, 1995
26. Murgu AJ: Clinical trial of arsenic Trioxide in hematologic and solid tumors: Overview of the national cancer institute cooperative research and development studies, **The Oncologist** 6 (suppl 2):22-28, 2001
27. Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, et al: Production of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by human brain tumors. **J Neurosurg** 81:69-77, 1994
28. Nakano A, Tani E, Miyazaki K, et al: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. **J Neurosurg** 83:298-307, 1995
29. Ning S, Knox SJ: Increased cure rate of glioblastoma using concurrent therapy with high dose radiation and arsenic trioxide. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 57 (Suppl 2):S257, 2003
30. Niu C, Yan H, Yu T, et al: Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission, induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and

47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients, **Blood** **94**:3315-3324, 1999

31. Novick SC, Warrell Jr RP: Arsenicals in hematologic cancers. **Semin Oncol** **27**:495-501, 2000

32. Overall CM, Lopez-Otin C: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nature Reviews** **2**:657-672, 2002

33. Park IC, Park MJ, Woo SH, et al: Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. **Int J Oncol** **23**:943-948 , 2003

34. Park MJ, Park IC, Hur JH, et al: Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinase/ tissue inhibitors of metalloproteinase system in D54 human glioblastoma cells. **Neurosci Lett** **290**:201-204, 2000

35. Park MJ, Park IC, Hur JH, et al: Modulation of phorbol ester induced regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. **J Neurosurg** **97**:112-118, 2002

36. Park MJ, Park IC, Bae IJ, et al: Tetraarsenic oxide, a novel orally administrable angiogenesis inhibitor. **Int J Oncol** 22:1271-1276, 2003
37. Rainov NG, Dobberstein KU, Bahn H, et al: Prognostic factors in malignant glioma: Influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. **J Neurooncol** 35:13-28, 1997
38. Roboz GJ, Dias S, Lam G, et al: Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an anti-leukemic effect via inhibition of angiogenesis. **Blood** 96:1525-1530, 2000
39. Roth JG, Elvidge AR: Glioblastoma multiforme: A clinical survey. **J Neurosurg** 17:736-750, 1960
40. Rutka JT, Matsuzawa K, Hubbard SL, et al: Expression of TIMP-1, TIMP-2, 72- and 92-kDa type IV collagenase transcripts in human astrocytoma cell lines: Correlation with astrocytoma cell invasiveness. **Int J Oncol** 6:877-884, 1995
41. Sato H, Takino T, Okada Y, et al: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. letters. **Nature** 370:61-65, 1994

42. Saxena A, Robertson JT, Kufta C, et al: Increased expression of gelatinase A and TIMP-2 in primary human glioblastomas. **Int J Oncol** 7:469-473, 1995
43. Sears DA: History of the treatment of chronic myelocytic leukemia. **Am J Med Sci** 296:85-86, 1988
44. Seiki M: Membrane-type matrix metalloproteinases; Review article. **APMIS** 107:137-43, 1999
45. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH et al: Use of Arsenic Trioxide(As_2O_3) in the treatment of Acute Promyelocytic Leukemia(APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients, **Blood** 89: 3354-3360, 1997
46. Shingu T, Yamada K, Hara N, et al: Growth inhibition of human malignant glioma cells induced by the PI3-K-specific inhibitor. **J Neurosurg** 98:154-161, 2003
47. Shingu T, Yamada K, Hara N, et al: Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells. **Cancer Res** 63:4044-4047, 2003
48. Simon C, Goepfert H, Boyd D: Inhibition of the p38 mitogen-activated Protein Kinase by SB 203580 Blocks

PMA-induced Mr 92,000 Type IV Collagenase Secretion and in Vitro Invasion. **Cancer Res** 58:1135-1139, 1998

49. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al: PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst** 93:1246-1256, 2001

50. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, et al: Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide, **N Eng J Med** 339:1341-1348, 1998

51. Soignet SL: Clinical experience of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia, **The Oncologist** 6 (Suppl.2):11-16, 2001

52. Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN: Histopathologic and immunohistochemical prognostic factors in malignant gliomas. **Curr Opin Oncol** 9:230-234, 1997

53. Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, et al: Mechanisms of glioma invasion: role of matrix-metalloproteinase (review article). **Can J Neurol Sci** 24: 3-15, 1997

54. Walker MD: **Brain and peripheral nervous system tumors.** In: Holland J, F, E, I Frei (eds): Cancer medicine. Lea &

Febinger, Philadelphia 1973, pp 1385-1407

55. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, et al: Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 16:1405-1409, 1989

56. Westervelt P, Brown RA, Adkins DR, et al: Sudden death among patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide, **Blood** 98:266-271, 2001

57. Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, et al: Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implication for radiotherapy of human glioblastoma. **Cancer Res** 61:2744-2750, 2001

58. Woo SH, Park IC, Park MJ, et al: Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. **Int J Oncol** 21:57-63, 2002

59. Yamada T, Yoshiyama Y, Sato H, et al: White matter microglia produce membrane-type matrix metalloprotease, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. **Acta Neuropathol** 90: 421-424, 1995

60. Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, et al: Differential Expression of Membrane-Type matrix metalloproteinase and its Correlation with Gelatinase A Activation in Human Malignant Brain Tumors in Vivo and in Vitro. **Cancer Res** 56:384-392, 1996

Abstract

The anti-invasive effect of As_4O_6 via inhibition of matrix metalloproteinase secretion and protein kinase B phosphorylation in human glioblastoma cell lines

Ho-Shin Gwak, M.D.

(directed by Professor Hee-Won Jung, M.D., Ph.D.)

Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Object: Malignant glioma is incurable due to its invasiveness in spite of current multi-modality treatment. Tetraarsenic oxide (As_4O_6) is a newly developed trivalent arsenic compound and it was reported that As_4O_6 induces apoptosis in certain cancer cell lines and inhibits angiogenesis. Thus the author conducted in vitro study to evaluate the anti-invasive effect of As_4O_6 on glioblastoma cell lines along with its influence on matrix metalloproteinases (MMP's) secretion and protein kinase B (PKB/Akt) activation. The possibility of developing As_4O_6 as anti-invasive agent is also considered.

Methods: The human glioblastoma cell lines, which have various phosphatase and tensin homolog (PTEN) suppressor gene and p53 status, U87MG, U251MG, U373MG and LN428 were included. The MTT assay was performed at various concentrations of As_4O_6 to observe inhibitory effect on cell proliferation. Matrigel coated Transwell was used to assess the invasiveness of cell lines with or without As_4O_6 . And annexin V-FITC labelled flow cytometry was performed to estimate the possible apoptotic effect on invasiveness at the same time. Gelatin zymography was adopted to evaluate the inhibitory effect of As_4O_6 on the secretion of MMP-2, together with Western blotting of membranous type 1-MMP (MT1-MMP). In addition, Akt and its phosphorylated form, p-Akt, was measured separately by immunoblot method.

Results: In MTT assay, As_4O_6 significantly inhibits proliferation of all four glioblastoma cell lines at the concentration of 10 μM and above. The median inhibitory concentration (IC_{50}) is $12.2 \pm 1.1 \mu M$ in U373MG, $7.0 \pm 0.3 \mu M$ in U251MG, $6.4 \pm 0.5 \mu M$ in LN428, and $6.3 \pm 0.3 \mu M$ in U87MG. Matrigel invasion assay reveals that As_4O_6 significantly inhibits invasion of glioblastoma cells even at 1 μM of concentration in a range of 13-37% of control group ($p < 0.05$ except 7% of U251MG). The invasiveness of each

cell line decreases further to 40–91% and 72–94% each as the concentration of As_4O_6 elevates to 5 μM and 10 μM . Annexin labelled flow cytometric analysis shows no significant change of apoptotic cell index at the same condition with invasion assay. After incubation with As_4O_6 , gelatinolytic activity MMP-2 was reduced in a dose-dependent manner in all four cell lines. As_4O_6 also dose- and time-dependently inhibited the expression of MT1-MMP. The amount of p-Akt was significantly decreased under influence of As_4O_6 , while Akt expression was preserved.

Conclusion: The As_4O_6 inhibits invasion of glioblastoma cell lines even at a low concentration, which shows no cytotoxicity. The possible mechanisms of inhibiting invasion are both reduction of MMP-2 secretion and inhibition of Akt phosphorylation. From the above results, As_4O_6 deserves further evaluation as potential anti-invasive agent.

Key words: glioblastoma, tetraarsenic oxide (As_4O_6), invasion, matrix metalloproteinase, protein kinase B.

Student Number: 99801-808

