

## 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 影響

李眞華 · 沈範相 · 安圭錫 · 崔昇勳

### Anti-metastatic Effects of Xuefuzhuyutang

Jin-Hwa Lee, Bum-Sang Shim, Kyoo-Seok Ahn, Seung-Hoon Choi

*Dept. of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea*

To examine the effect of Xuefuzhuyutang on the metastasis of cancer, the following experiments were carried out. Before the main experiments, the cytotoxicity was measured by putting Xuefuzhuyutang sample in HT1080. Then zymography was made to examine the change of gelatinolytic activity. Western blotting was carried out to examine the changes of Fos, Jun, Ets, Erk, and JNK. In vitro invasion assay with transwells coated by collagen and matrigel was carried out. From the above results the following conclusions were obtained.

1. The experimental result about cytotoxicity of Xuefuzhuyutang against HT1080 was as below. The stained cell count after being treated by Xuefuzhuyutang sample  $400\mu\text{g/ml}$  for 24 hours was 0.9% of total cells, and the stained cell count by Xuefuzhuyutang sample  $100\mu\text{g/ml}$  was 1.5% of total cells. Both were near the level of control group which showed 0.6% stained.
2. The result of collagenase assay was as below. In Xuefuzhuyutang sample  $400\mu\text{g/ml}$ , MMP-2 was reduced as compared with TPA control group, and the band of MMP-9 induced by TPA disappeared. In Xuefuzhuyutang sample  $800\mu\text{g/ml}$ , both bands of MMP-2 and MMP-9 disappeared.
3. The results of western blots for Jun, Fos, Ets, Erk, JNK were as below. In Xuefuzhuyutang sample  $200\mu\text{g/ml}$ , Ets was reduced, and Jun, Fos were increased.
4. The result of invasion assay was as below. The number of cells which migrated across transwell membrane in Xuefuzhuyutang -treated group was less than that of control(+TPA) group.

From the above results, it was concluded that Xuefuzhuyutang might inhibit the activity of collagenase not by the MMP-2, MMP-9 promoter but by the other way.

## I. 緒 論

암은 조직의 자율적인 과잉 성장이며, 개체에 대하여 意義가 없거나 이롭지 않을 뿐더러 정상조직에 대해 파괴적인 것<sup>3)</sup>이라고 정의된다. 암은 일종의 전신성 질환으로 국부에서 침윤성장을 하거나 다른 부위로 확산과 전이를 일으켜 정상적인 조직기관을 파괴할 뿐만 아니라 壓迫, 硬阻, 感染, 出血 등을 야기하며, 숙주에게 일련의 대사장애와 영양장애 등을 일으켜 항병력을 약화시키고, 결국에는 사망케 하는 질병이다<sup>5)</sup>.

경제성장과 더불어 위생환경이 개선되고 각종 예방법과 치료법이 발달됨에 따라 세균성 전염병은 점차 퇴치되어 가고 있으나, 암은 그 발생원인과 성장기전이 자세히 밝혀져 있지 않아서 치료가 매우 어려운 실정이다. 세계적으로 매년 암에 의해 사망하는 사람은 700만 명에 이르고, 우리 나라의 경우도 암으로 인한 사망률은 해마다 높아져 1995년 10월 통계청 발표에 따르면 전체 사망자중 21.3%가 암으로 사망한 것으로 나타났다<sup>6)</sup>.

암세포의 특징은 정상세포에 비해 암세포 혈관주위에 있는 기저막이 현저히 감소되고 투과성 및 간질액압이 증가되는 것으로, 그 결과 암세포 혈관의 내부가 폐쇄되어 암의 중앙부에서 허혈 및 괴사가 일어나 암세포가 일차 종괴로부터 탈출하여 혈관이나 주위의 조직으로 가도록 촉진한다. 암세포의 혈관형성은 암세포의 성장과 전이에 결정적 기여를 하게 된다<sup>17)</sup>.

암의 轉移는 주로 임파성, 혈행성, 파종성의 세가지 방식으로 이루어지는데 임파관은 결국 혈관과 연결되어 있기 때문에 암종과 육종은 주로 혈관을 통해서 전이된다고 할 수 있다. 파종성 전이는 암이 복강이나 흉막강 같은 체내의 자연적인 공간부위를 관통하였을 때 일어나

며 복강내 장기에서는 주로 위장관이나 간장 특히 난소에서 빈번히 관찰된다<sup>4)</sup>.

혈행성 전이의 과정은 암세포의 세포외 기질(extracellular matrix; ECM) 분해·이동, 혈관내 이동, 암세포의 원격 부위 착상으로 나누어지는데, 암세포가 ECM을 분해하기 위해서는 ① 암세포간의 부착이 느슨해져서 유동성이 증가한 후 ② 암세포가 ECM에 부착되고 ③ ECM을 분해하여 ④ ECM을 관통하여 이동해야 한다<sup>25)</sup>. ECM의 분해는 암 전이의 공통적인 기전이므로 암세포의 ECM 분해를 억제하는 것이 암의 전이를 억제하는 이상적인 방법이 될 수 있다.

한의학에서는 암의 原發性 病因으로 정신적인자와 과식, 자극성 음식 및 음주 등의 내상성인자를 강조하는 한편, 續發性 病因으로서 痰飲과 瘀血을 중시하였다. 또한 암의 病機는 氣滯血瘀, 痰結濕聚, 熱毒內蘊, 氣血虧虛, 經絡瘀阻 등으로 나누어 설명되고 있다<sup>8)</sup>.

본 연구에서는 活血祛瘀를 목적으로 주로 사용되고 있는 血府逐瘀湯의 癌轉移 抑制效果를 확인하므로써 암에 대한 血府逐瘀湯의 치료효과와 活血祛瘀法의 역할을 검증하고자 하였다.

血府逐瘀湯은 王清任의 『醫林改錯』에 나오는 처방으로 '胸中血府血瘀之症'을 치료하는데, 血府血瘀의 病症에는 頭痛, 胸痛, 膈, 不寐, 多夢, 逆, 心悸 등 19종의 症이 해당된다<sup>10)</sup>.

血府逐瘀湯이 癌轉移에 미치는 영향을 규명하기 위하여 血府逐瘀湯 농축액을 HT1080에 투여하여 세포독성을 측정 한 후, gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 zymography를, MMP-2와 MMP-9의 promoter element인 AP-1 site에 binding하는 Fos, Jun, Ets 및 AP-1의 signal transduction pathway 상의 Erk1, JNK1의 변화를 측정하기 위하여 western blotting을 하였고, transwell을 이용한 in vitro invasion assay를 시행하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 이

에 報告하는 바이다.

## II. 實驗方法

### 1. 檢液 準備 및 投與

切片한 血府逐瘀湯의 構成藥物 17貼 분량, 1343 g 을 유리로 된 抽出瓶에 넣고 80% methanol을 試料가 잠기도록 충분히(4L) 넣은 후 還流冷却裝置를 하고 60℃ 水浴槽에서 4시간 동안씩 2회 추출하여 솜과 거즈로 濾過한 후 濾過液을 濃縮器로 減壓濃縮하여 濃縮液을 얻었다. 이 濃縮液에 66% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 용액이 가장 잘 녹은 상태가 되도록 한 후 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 濃度로 맞추어 실험에 사용하였다.

**Table I.** Composition of Xuefuzhuyutang (血府逐瘀湯)

Xuefuzhuyutang (血府逐瘀湯)		
桃 仁	Persicae Semen	12g
當 歸	Angelica Gignatis Radix	9g
生地黄	Rehmanniae Radix	9g
紅 花	Carthami Flos	9g
牛 膝	Achyranthis Radix	9g
枳 殼	Ponciri Fructus	6g
赤芍藥	Paeoniae Radix	6g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	6g
川 芎	Cnidii Rhizoma	5g
桔 梗	Platycodi Radix	5g
柴 胡	Bupleuri Radix	3g
Total amount		79g

### 2. 細胞 培養

HT1080 (human fibrosarcoma cells, 한국세포주 은행)을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL)에 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), 10 ml/l penicillin streptomycin (penicillin 10,000units/ml, streptomycin 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 보충한 배양액으로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다.

### 3. Cytotoxicity

HT1080을 24well plate에서 세포수가 3.3 × 10<sup>4</sup>cells/well이 되도록 seeding하여 1ml 10% FBS DMEM과 함께 48시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 세포가 90%의 밀도가 되도록 배양한 후 PBS 1ml로 well을 세척한 후 1ml의 serum free DMEM으로 medium을 교체하고 여기에 血府逐瘀湯 濃縮液(100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 1~2 $\mu\text{l}$ 를 투여하여 최종 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였으며 control well에는 2 $\mu\text{l}$  66% DMSO를 가하였다.

6, 12, 24시간이 경과한 후 medium을 suction해 내고 0.4% Trypan blue (GIBCO BRL) 100 $\mu\text{l}$ 를 well에 가한 후 상온에서 20분간 방치하여 염색하였다. 20분 후 trypan blue를 제거하고 역상현미경 (Olympus CK2, Japan)으로 400배율에서 관찰하여 세포 수를 측정하였다. 세포 수의 측정은 무작위로 13곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적(62.5 × 10<sup>4</sup> $\mu\text{m}^2$ )의 총 세포의 수와 염색된 세포의 수를 세어 cytotoxicity를 측정하였다.

$$\% \text{ (cytotoxicity)} = \frac{\text{Trypan blue stained cells}}{\text{Total cells}} \times 100$$

#### 4. Collagenase assay

HT1080을 6well plate에서  $1 \times 10^6$  cells/well로 seeding하여 2ml 10% FBS DMEM과 함께 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 배양한 후 1ml PBS로 1회 세척하고 1ml serum free DMEM으로 교체한 후 血府逐瘀湯 濃縮液(100 $\mu$ g/ $\mu$ l, 200 $\mu$ g/ $\mu$ l)을 1 $\mu$ l~4 $\mu$ l 투여하여 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml, 400 $\mu$ g/ml, 800 $\mu$ g/ml의 농도가 되도록 하였으며 control well에는 4 $\mu$ l 66% DMSO를 투여하여 세포배양기에서 배양하였다. 약물을 투여하고 12시간이 경과한 후에 50 $\mu$ g/ml의 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)를 2 $\mu$ l 투여하여 100ng/ml의 농도가 되도록 하였으며 control well에는 2 $\mu$ l DMSO를 투여하였다. 12시간 동안 배양한 후 medium 100 $\mu$ l를 취하여 1000 $\times$  g, 4°C, 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상등액을 취하여 4°C에 보관하였다가 gelatin zymography를 시행하였다.

Gelatin zymography는 Heussen과 Dowdle의 방법<sup>21)</sup>에 따라 시행하였다. Medium을 sample buffer (10% SDS, 4% sucrose, 0.25M Tris·HCl (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue)와 3:1로 섞은 후 단백질을 가열하여 변성시키거나 환원시키지 않은 채 25 $\mu$ l를 0.4mg/ml gelatin(덕산)을 포함한 8% (w/v) acrylamide gel에 가하여 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% (v/v) Triton X-100 (Sigma, USA)에 15분 씩 2회 세척하여 gel 속의 SDS를 세척한 후 reaction buffer (0.05M Tris·HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.01M CaCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)에 담긴 채 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 10% 메탄올/10% 빙초산/0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, USA)에 30분간 염색시킨 후 10% 메탄올/10% 빙초산에 3시간 동안 탈 염색시켰다.

Collagenase에 의한 gelatinolytic activity는 전체가 청색으로 염색된 gel에서 깨끗한 무색의帶域이 검출되는 것으로 증명된다.

#### 5. Western blots

HT1080을 95mm 배양접시에  $1 \times 10^6$  cells로 seeding하여 10ml 10% FBS DMEM과 함께 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 세포가 90%의 밀도로 성장하면 1ml PBS로 1회 세척한 후 10ml serum free DMEM으로 medium을 교체하고 여기에 血府逐瘀湯 농축액 100 $\mu$ g/ $\mu$ l를 1 $\mu$ l, 2 $\mu$ l 투여하여 최종 농도가 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml이 되도록 하여 24시간 동안 배양하였다.

24시간 후 HT1080의 total protein을 채취하였는데 모든 과정은 얼음 위에서 진행하여 4°C를 유지하였다. 우선 배양접시를 얼음 위에 올려 놓고 5ml cold PBS로 2회 세척하였다. PBS의 물기를 제거한 후 배양접시에 500 $\mu$ l cold RIPA buffer (1% Nonidet P-40, 0.5% Na·deoxycholate, 0.1% SDS in PBS 50ml and add PMSF 10 $\mu$ l/ml, aprotinin 3 $\mu$ l/ml before use)를 넣고 scraper를 이용해 세포를 배양접시에서 벗겨낸 후 1.5ml tube에 옮겨 담고서 21G 바늘을 꽂은 주사기로 세포 용액을 6회 흡입, 배출한 후 10 $\mu$ l PMSF를 첨가하여 tube를 30분간 얼음 속에 방치하였다. Tube를 12000 $\times$  g, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 DNA를 침전시킨 후 상등액을 취하여 단백질 농도를 측정하였다.

단백질 농도는 400 $\mu$ l의 3차 증류수에 5 $\mu$ l의 세포 단백질 용액을 가한 후 100 $\mu$ l Bradford assay reagent (Bio-rad, England)를 가하여 혼합시켜준 후 20분 이내에 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)로 OD<sub>595</sub>를 측정하고 단백질 용액을 -80°C에 보관하였다.

HT1080의 단백질 용액에서 각각의 단백질을 분자량에 따라 분리하기 위하여 먼저 Laemli system<sup>24)</sup>에 의한 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. Mimi vertical gel system (E-C apparatus Co., USA)의 유리판 2장을 60% 알콜로 닦고 space bar를 유리판 양 끝에 끼워서 조립한 후 3.2ml 10% separating gel (10% acrylamide:bis-acrylamide (29:1), 1.5M Tris (pH 8.8), 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% ammonium persulfate, TEMED) 용액을 주사기를 이용하여 유리판 사이로 붓고 0.1% SDS 용액을 200 $\mu$ l 넣어 뚜렷한 경계선이 나타날 때까지 gel을 중합시켰다. Nm23-H1은 분자량이 작으므로 14% gel을 사용하였다. 30분 후 중합된 gel의 표면을 증류수로 3회 세척하고 Watman 3MM paper로 물기를 제거한 후 2ml 5% stacking gel (5% acrylamide:bis-acrylamide (29:1), 0.5M Tris (pH 6.8), 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1% ammonium persulfate, TEMED) 용액을 붓고 comb을 꽂은 채 stacking gel이 굳도록 30분간 방치하였다. Gel이 모두 굳으면 comb을 제거하고 electrophoresis buffer (25mM Tris, 250mM Glycine (pH 8.3), 0.1% SDS)를 용기에 가득 채운 후 주사기로 comb에 의해 생겨난 well을 electrophoresis buffer로 세척하고 같은 용액으로 채워둔 후, 단백질 시료 10 $\mu$ g, 30 $\mu$ g, 50 $\mu$ g을 2X sample buffer와 섞은 후 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 끓여서 변성시킨 후 Hamilton syringe (Hamilton Co., USA)를 이용하여 well에 가하였다. 또한 단백질의 분자량을 알기 위하여 molecular weight marker (Bio-rad, USA)를 gel의 좌측 well에 가하여 함께 전기영동하였다. 전기영동기를 완전히 장치한 후 전압은 stacking gel에서 100V로 30분간, separating gel에서는 200V로 1시간 동안 전기영동을 실시하였으며, sample

buffer 내의 tracking dye인 bromophenol blue가 바닥에서 0.5~1cm에 도달한 후 전기영동을 중지시켰다. 전기영동은 처음부터 끝까지 4 $^{\circ}$ C가 유지되도록 하였다.

Western blot은 Burnette에 의한 electroblotting<sup>15)</sup>과 Harlow에 의한 enhanced chemiluminescence (ECL) 검정법<sup>17)</sup>을 사용하였다.

우선 polymer-based membrane인 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, pore size; 0.45  $\mu$ m, Boehringer Mannheim, Germany)을 메탄올과 증류수에 2분씩 번갈아 담갔다가 electro-transfer buffer에 적셔서 사용했다. 또한 다공성 패드와 whatman 3MM paper를 electrotransfer buffer에 10분 이상 담가 공기방울을 제거한 후 사용하였다. SDS를 제거하기 위하여 gel을 10분간 증류수에攪拌하여 세척한 후 다시 electrotransfer buffer에 10분간 교반 세척하였다.

단백질의 전기이동을 위하여 우선 전기이동 장치의 바닥에 cold electrotransfer buffer를 붓고, buffer에 적셔진 다공성 패드를 1장 깔고 그 위에 buffer에 적셔진 whatman 3MM paper 2장을 깔고 그 위에 gel을, 그 위에 buffer에 적셔진 PVDF membrane을 깔고, 그 위에 whatman 3MM paper 2장, 다공성 패드 2장을 대었다. gel과 PVDF membrane의 위치를 기준으로 gel은 음극 (-) 방향, PVDF membrane은 양극 (+) 방향이 되도록 하였다. 이와 같이 전기이동 준비를 마치고 4 $^{\circ}$ C에서 200mA, 2시간 동안 전기이동하였다. 전기이동을 끝낸 후 PVDF membrane을 꺼내어 blocking solution에 담긴 채 상온에서 30분간 교반한 후 1차 항체가 섞인 TBS-T 용액 8ml에 담가 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 항원 항체 반응을 시켰다. 1차 항체로는 Erk1(rabbit polyclonal Ig G, Santa Cruz Biotechnology, USA: 이하 동일), JNK1, Jun/AP-1, Fos, Ets-1을 사용하였고, Erk1, nm23-H1, JNK1은 TBS-T와

1:1000의 비율로, Jun/AP-1, Fos, Ets-1은 TBS-T와 1:500의 비율로 희석하여 사용하였다. PVDF membrane에 1차 항체가 결합한 후 membrane을 TBS-T에 간단히 2번 헹군 후 10분 씩 2회 교반 세척하여 1차 항체의 불특정 결합을 제거하였다. 2차 항체 (Goat anti-rabbit Ig G, HRP conjugated, Santa Cruz Biotechnology, USA)가 1:5000의 비율로 희석된 TBS-T 용액 10ml에 PVDF membrane을 담고 상온에서 30분간 교반한 후 membrane을 TBS-T에 간단히 2번 헹군 후 10분 씩 2회 교반 세척하고 다시 TBS에 5분간 세척하였다. Membrane의 20cm<sup>2</sup> 면적 당 ECL 용액 2ml의 비율로 membrane을 ECL 용액에 1분간 적신 후 플라스틱 비닐에 membrane을 밀봉하고서 10분 이내에 Hyperfilm ECL (Amersham, England)에 30초~5분간 노출하여 사진을 얻었다.

## 6. Invasion assay

HT1080의 invasion activity의 측정은 Transwell cell culture chamber를 이용하였다. 우선 HT1080을 6well에서  $1 \times 10^6$  cells/well의 세포수로 seeding하여 2ml 10% FBS DMEM과 함께 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 well을 1ml PBS로 1회 세척한 후 배지를 1ml의 serum free DMEM으로 교체하고, 여기에 血府逐瘀湯 濃縮液(100 $\mu$ g/ $\mu$ l) 2 $\mu$ l를 투여하여 최종 농도가 400 $\mu$ g/ml이 되도록 하였으며 control well에는 2 $\mu$ l 66% DMSO를 가하여 12시간 동안 배양하였다.

12시간 후 well을 다시 1ml PBS로 세척하고서 100 $\mu$ l 0.25% (w/v) trypsin-PBS로 세포 표면을 충분히 적서준 후 세포배양기에서 5분간 배양하여 세포가 배양접시에서 박리되도록 하였다. 여기에 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml과 TPA

100n g/ml이 들어 있는 1ml serum free DMEM을 넣어 세포를 균일하게 현탁시켰으며 control well(-TPA)에는 4 $\mu$ l 66% DMSO, control well(+TPA)에는 2 $\mu$ l 66% DMSO, 2 $\mu$ l TPA(50 $\mu$ g/ml)를 넣은 1ml serum free DMEM을 넣어 세포를 균일하게 현탁시켰다. 세포 현탁액 20 $\mu$ l를 취하여 hemocytometer를 이용해 세포 수를 측정해서 세포수가  $5 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ l가 되도록 약물이 들어있는 serum free DMEM으로 seeding한 후 membrane filter가 부착된 transwell chamber (pore size 8.0 $\mu$ m, Costar, USA)로 옮겨서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 24시간을 배양하였다. Transwell의 membrane은 10 $\mu$ l matrigel과 10 $\mu$ l collagen으로 위와 아래를 코팅하여 공기 중에서 건조시킨 후 PBS에 담겼다. 다시 공기 중에서 건조시킨 후 실험에 사용하였다.

Transwell chamber에서 24시간 동안 배양한 후 transwell의 upper chamber에 있는 media를 제거하고 transwell의 lower chamber를 70% 메탄올에 5분간 담가서 membrane을 통과한 세포를 고정시킨 후 1분간 증류수에 담가 메탄올을 세척하였다. 다시 Hematoxylin solution (Sigma, USA)에 5분간 담근 후 증류수에 1.5분 씩 2회 세척하고 0.5% (w/v) eosin에 30초 담근 후 증류수에 1분간 담근 후 95% 에탄올에 2분간 2회 담가서 탈수시켰다. 이후 면봉을 이용하여 transwell의 upper chamber에 남아있는 세포를 닦아내고 역상현미경을 이용하여 400배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다.

세포수의 측정은 무작위로 12곳을 선정하여 집안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적(62.5 $\mu$ m<sup>2</sup>)의 염색된 세포의 수를 세었으며 동일한 실험을 2회 반복하여 그 평균값을 각 실험군과 비교하였다.

### Ⅲ. 實驗結果

#### 1. Cytotoxicity

血府逐瘀湯 濃縮液의 세포독성을 알아보기 위하여 HT1080을 24well plate에서 48시간 동안 배양한 후 여기에 血府逐瘀湯 濃縮液(100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )을 투여하였다.

6, 12, 24시간이 경과한 후 0.4% trypan blue 100  $\mu\text{l}$ 를 well에 가하여 상온에서 20분간 염색하였다. 세포 수의 측정은 무작위로 13곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적(62.5 $\mu\text{m}^2$ )의 총 세포 수와 염색된 세포의 수를 세어 cytotoxicity를 측정하였다.

측정 결과 trypan blue에 염색된 세포의 수는 血府逐瘀湯 농축액이 작용한 시간과 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 보이고는 있으나 control과 비교하면 거의 비슷한 수준이다.

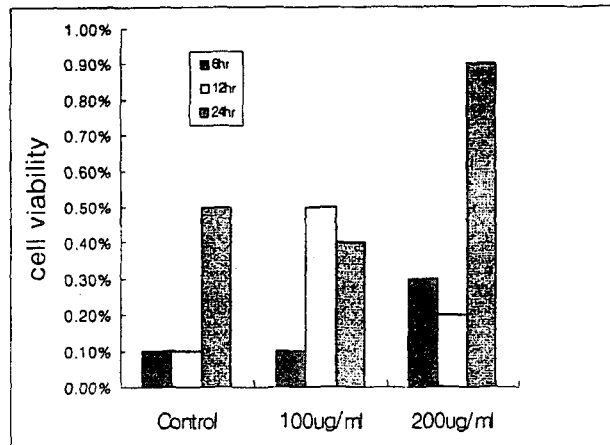
#### 2. Collagenase assay

HT1080을 6well plate에서 24시간 동안 배양한 후 血府逐瘀湯 濃縮液(100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )을 투여하여 12시간이 경과한 후에 TPA를 100ng/ml의 농도가 되도록 투여하였다. 12시간 동안 배양한 후 medium 100 $\mu\text{l}$ 를 취하여 1000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5분간 원심 분리하여 세포와 세포 조각을 침전시킨 후 상등액을 취하여 gelatin

**Table 2.** Cytotoxicity of Xuefuzhuyutang (XFZYT) on HT1080

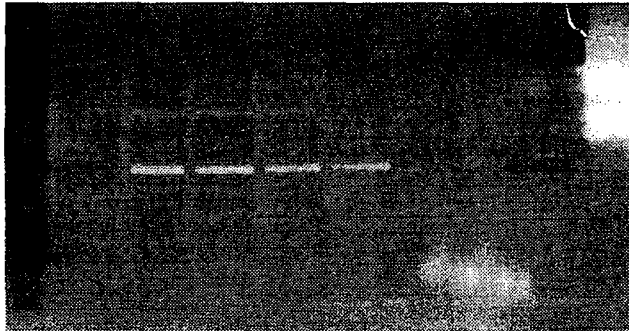
Treatment time	control		XFZYT			
			100 $\mu\text{g}/\text{ml}$		200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
6 hr	0.1/93.1a	(0.1%)	0.1/105.4	(0.1%)	0.3/100.8	(0.3%)
12 hr	0.1/75.4	(0.1%)	0.5/ 86.9	(0.5%)	0.2/100.8	(0.2%)
24 hr	0.5/90.0	(0.5%)	0.4/99.2	(0.4%)	0.8/95.4	(0.9%)

a) : count of trypan blue stained cells / count of total cells / 62.5 $\mu\text{m}^2$



**Fig. 1.** Cytotoxicity of XFZYT on HT1080

Control	Control	XFZYT	XFZYT	XFZYT	XFZYT	Positive Marker
	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	800 $\mu\text{g/ml}$		TPA (100ng/ml)
-	+	+	+	+	+	



**Fig. 2.** Gelatinolytic activity inhibition effect of XFZYT on TPA induced HT1080

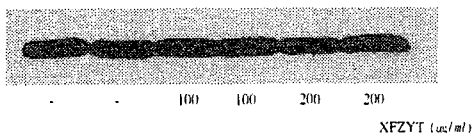
zymography를 시행하였다.

실험 결과 92kDa Type IV collagenase (gelatinase B 또는 MMP-9)는 血府逐瘀湯 농축액 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대역이 감소하고 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 사라지며 72kDa Type IV collagenase (gelatinase A 또는 MMP-2)는 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대역이 감소하고 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대역이 사라지는 것으로 나타났다.

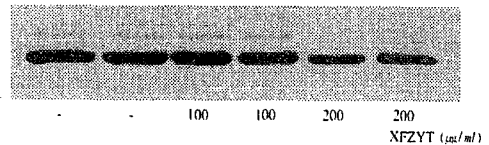
### 3. Western blots

HT1080을 95mm 배양접시에 48시간 동안 배양한 후 血府逐瘀湯 濃縮液을 투여하여 최종 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ , 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하여 24시간 동안 배양하였다.

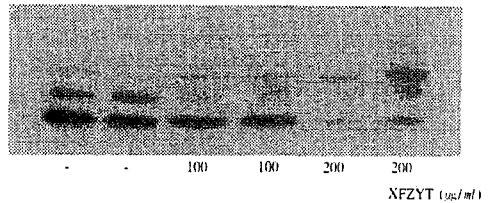
HT1080의 total protein을 채취하여 SDS-PAGE를 시행한 후 Western blot과 ECL 검정법



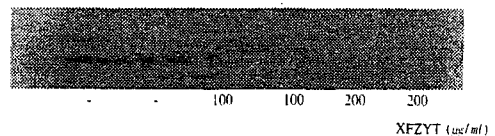
**Fig. 3.** Western blots of Erk1 level in HT1080 cells treated by XFZYT



**Fig. 4.** Western blots of JNK level in HT1080 cells treated by XFZYT

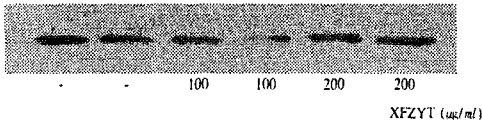


**Fig. 5.** Western blots of Jun/AP-1 level in HT1080 cells treated by XFZYT



**Fig. 6.** Western blots of Fos level in HT1080 cells treated by XFZYT





**Fig. 7.** Western blots of Ets level in HT1080 cells treated by XФЗYT

을 사용하여 Erk1, JNK1, Jun/AP-1, Fos, Ets1에 대한 사진을 얻었다.

실험결과 血府逐瘀湯 농축액은 200µg/ml의 농도에서 Erk1이 증가하며, 같은 농도에서 Ets, Jun, Fos, JNK1가 감소하는 것으로 나타났다.

#### 4. Invasion assay

HT1080을 6well-plate에서 24시간 동안 배양 후, 血府逐瘀湯 濃縮液을 투여하여 최종 농도가 400µg/ml이 되도록 하여 12시간 동안 배양하였다.

12시간 후 세포수가  $5 \times 10^4$  cells/100µl가 되도록 혈부축어탕 농축액 400µg/mg과 TPA 100ng/ml이 들어있는 serum free DMEM에 현탁

시킨후 transwell chamber로 옮겨서 24시간을 배양하였다.

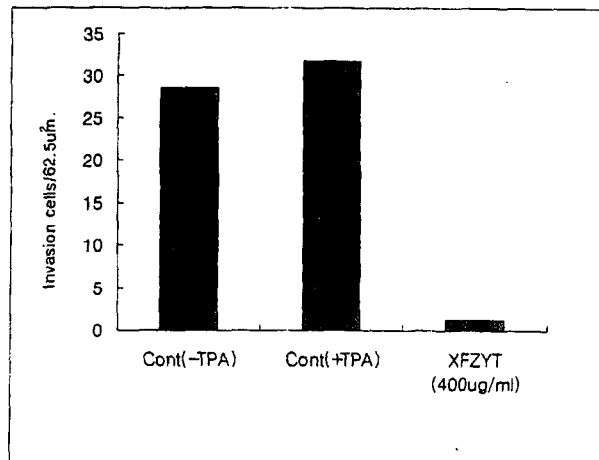
배양이 끝난 후 transwell을 hematoxyline/eosin으로 염색한 후 면봉을 이용하여 transwell의 upper chamber에 남아있는 세포를 닦아내고 역상현미경을 이용하여 400배율에서 염색된 세포의 숫자를 세었다.

세포수의 측정은 무작위로 12곳을 선정하여 접안렌즈의 격자 눈금을 기준으로 삼아 동일한 면적(62.5µm<sup>2</sup>)의 염색된 세포의 수를 세어 그 평균값을 각 실험군과 비교하였으며 동일한 실험을 2회 실시하였다.

실험결과 혈부축어탕은 400µg/ml 농도에서 HT1080의 침윤을 유의성있게 감소시켰다 <Fig. 8>.

## IV. 考 察

암은 일종의 복잡한 질환군이며, 정상세포가 암세포가 되는 발암현상(carcinogenesis)은 여러 단계의 복잡한 과정을 거친다. 임상적으로 암



**Fig. 8.** Anti-metastatic effect of XФЗYT on TPA induced HT1080 in vitro invasion assay

은 백가지가 넘는 질환들의 거대한 집단으로 발병 연령, 성장 속도, 세포분화의 정도, 진단 가능성, 침범 정도, 전이 잠재성, 치료의 반응 그리고 예후 등에 따라 다양한 양상을 나타낸다. 하지만 분자생물학적 관점에서 본다면, 암은 세포기능을 담당하는 분자들의 손상에 의해서 세포 유전자에 비교적 일정한 양상의 변화를 일으키는 질환이다. 결국 암은 비정상적 유전자 발현으로 야기되는 질환이다.<sup>29)</sup>

암의 주된 전이 방식인 혈행성 전이가 이루어지기 위해서는 여러 단계의 복잡한 과정을 거쳐야 하는데 이 과정은 다음과 같은 순서로 이루어진다.<sup>19)</sup> ①암세포로 형질전환, 성장 ②기저막 침투, 신생혈관 형성 ③혈관벽 침투 및 관통 ④혈관내에서 혈류압과 면역세포로부터 생존 ⑤혈소판과 결합, 기저막에 부착 ⑥혈관벽 침투 ⑦원격 부위에서 성장. 이러한 여러 단계에서 한가지라도 실패하면 전이는 이루어질 수 없다. 이들 여러 단계는 곧 암세포의 ECM 분해·이동, 혈관내 파종, 암세포의 원격 부위 착상으로 대별된다.

암세포가 ECM에 침투하려면 먼저 암세포사이의 부착이 느슨해진 뒤 암세포가 기저막에 부착되고 기저막을 분해하여 통과해야 한다. 암세포 사이의 부착력의 상실은 cell-cell adhesion 분자인 E-cadherin의 발현 감소에 의존하고 기저막을 뚫는 것은 ECM을 붕괴시키기 위한 단백질 분해 효소인 collagenase의 생산에 의존한다. 암세포는 laminin 수용체로 작용할 수 있는 integrin을 가지고 있으며, 이 laminin 수용체는 기저막의 laminin과 결합하여 암세포가 기저막에 부착하는 것을 가능하게 한다. 그 다음에 암세포는 표면에 있던 type-IV collagenase를 이용하여 기저막을 이루는 주요한 구성성분인 type-IV collagen을 분해한다.<sup>14)</sup> Type-IV collagenase는 암세포에서 먼저 proenzyme으로

분비되었다가 다른 단백질 분해 효소에 의해 아미노 말단으로부터 82개의 아미노산 잔기가 제거된 후 활성화되어 type-IV collagen을 분해할 수 있게 된다.

ECM은 어떤 조직에서든지 용적의 상당 부분을 차지하고 있는데 불용성이며 연속적으로 되어 있어 큰 단백질이 통과할 수 없는 연성구조로 되어 있다. Fibrous structural protein (collagen, elastin), adhesive glycoprotein, proteoglycan으로 나뉘며, 이중 adhesive glycoprotein은 ECM 구성성분간의 연결 및 ECM과 세포간을 연결하는 역할을 한다. Adhesive glycoprotein에는 fibronectin, laminin, thrombospondin, tenascin 등이 있는데, 이중 fibronectin에는 integrin receptor가 있어 세포의 부착에 중요한 역할을 하며, 이 때문에 세포의 부착과 확산 및 이동에 직접적으로 관여되는 것으로 이해되고 있다. 또한 laminin은 기저막을 구성하는 단백질로서 type IV collagen, heparin sulfate, proteoglycan 및 세포와 결합하며 내막세포의 재배열을 일으키고 모세혈관망을 구성하므로써 신생 혈관의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다.<sup>18)</sup>

암세포가 ECM을 분해하여 관통하는 기전은 유전자 변이에 의한 자극을 받아<sup>31)</sup>, 그 주변 조직을 향해 matrix metalloproteinase (MMP)를 분비<sup>27)</sup>하여 ECM의 구성 성분을 절단, 분해하면 그 빈자리에 암세포가 침윤성장하여 관통하게 되는 것이다. 이러한 MMP의 분비는 암세포가 모세혈관이나 임파관을 만날 때까지 계속된다<sup>20)</sup>.

MMP에는 14개의 종류가 알려져 있는데 있는데 이들은 모두 Zn<sup>++</sup>를 갖고 있고, activation되기 위해서는 Ca<sup>++</sup>이 필요하며, 세포에서 proenzyme 형태로 분비되었다가 N-terminal domain의 아미노산 잔기 일부가 잘려 나가면서

activation된다. 주로 작용하는 substrate의 종류에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysine, membrane bound type 및 기타의 5가지로 분류된다<sup>12)</sup>.

실험에 사용한 암세포주 human fibrosarcoma cell, HT1080에서는 주로 gelatinase가 발현된다. Gelatinase는 72-kDa (MMP-2), 92-kDa (MMP-9)의 두가지 type이 있으며, MMP-2는 gelatin, collagen type IV, V, VII, X, XI, elastin, proteoglycan core protein을 substrate로 하며, MMP-9은 gelatin, collagen type IV, V, elastin, proteoglycan core protein을 substrate로 한다. MMP-2와 MMP-9은 melanoma, 피부암, 대장암, 유방암, 폐암, 전립선암 그리고 방광암 등에서 증가되며, 이는 종양의 악성정도와 관계가 있다.

Gelatinase의 분비는 cell type specific하여 MMP-9은 monocyte, macrophage 및 fibroblast에서 분비되며, MMP-2는 normal human skin fibroblast에서 분비된다<sup>33)</sup>. HT1080과 같은 cultured cell line에서 MMP-2의 expression은 일정하며 PMA에 의해 변화되지 않지만 MMP-9은 소량으로 분비되며 PMA에 의해 induction된다<sup>22)</sup>. PMA, EGF, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ 는 MMP-9의 expression을 증가시키고<sup>26,29)</sup>, TGF- $\beta$ 는 대부분의 MMP를 downregulation하지만 MMP-2와 MMP-9의 expression을 증가시킨다<sup>32)</sup>. MMP-2와 MMP-9을 downregulation하는 것으로는 RA, dexamethasone, INF- $\beta$ ,  $\gamma$ , vitamin D<sub>3</sub>가 보고되었다<sup>13,18,23)</sup>. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)는 MMP의 강력한 억제제로서 활성형 뿐만 아니라, 불활성형의 type IV collagenase와도 결합<sup>30)</sup>하여 그 gelatinolytic activity를 억제한다. TIMP는 연골이나 뼈와 같은 정상조직에서 만들어질 뿐만 아니라 많은 암세포에 의해서도 형성된다<sup>30)</sup>. 따라서 암세포의 ECM 침투는 활

성형 type IV collagenase와 TIMP간의 평형을 의해 조절되는 것으로 이해되고 있다.

MMP-2의 transcription factor로는 Ets-1, CREB, AP-1, -2, PEA3, c-myc, GCN4가 있으며<sup>11)</sup>, MMP-9의 transcription factor로는 NF $\kappa$ B, Sp1, PEA3, AP-1, GT, TTAAA가 있다<sup>22)</sup>.

王清任은 '肚腹結塊 必有形之血'라 하여 복부의 腫物은 대개 瘀血로 인한 것이므로 活血化瘀法이 종양을 치료하는 주요 법칙 가운데 하나라고 보았다. 종양에 따라 氣血과의 관련정도가 달라지는데, 경우에 따라서는 氣의 기능문란이나 혹은 瘀血의 형성에 편중되지만, 임상적으로 보아 악성종양 환자의 대부분은 氣血이 실조되어 있으며, 그 중에서도 瘀血證이 많은 것으로 나타났다.<sup>7)</sup> 이와같이 瘀血은 종양 발생의 대표적인 병인에 해당하며, 活血祛瘀法은 종양치법의 중요한 부분을 차지한다.

活血祛瘀劑가 종양치료에 미치는 영향에 관한 기존의 연구로 金<sup>1)</sup> 등은 抗癌 및 癌轉移 抑制效果를 확인하였고, 羅<sup>2)</sup>, 李<sup>4)</sup> 등은 angiogenesis 억제효과를 확인하였다. 본 연구에서는 대표적인 活血祛瘀劑인 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制效果가 있는지 확인하므로써 암에 대한 血府逐瘀湯의 치료효과와 活血祛瘀法의 역할을 검증하고자 하였다.

血府逐瘀湯의 구성약물 및 그 효능에 관하여 살펴보면, 當歸는 心·肝·脾經에 入하여 補血和血·調經止痛·破惡血·養新血하므로써 일체의 血症을 治하며, 生地黃은 心·肝·腎經에 入하여 滋陰·涼血·消瘀·通經하므로써 陰虛發熱·吐衄崩中·瘀血留血·折跌絕筋 등증을 治하고, 桃仁은 心·肝·大腸經에 入하여 活血·破血·祛瘀하므로써 血滯經閉·痛經·產後瘀滯腹痛·積聚·跌打損傷 등의 瘀血症을 治하며 紅花는 心·肝經에 入하여 活血·祛瘀·通經하므로써 血滯經閉·痛經·積聚·

跌撲損傷 등의 瘀滯作痛을 다스리고, 枳殼은 肺·胃經에 入하여 破氣·行痰·消積하므로써 胸痺結胸·脘腹悶脹滿·心腹結氣 등을 다스리며, 赤芍藥은 肝·脾經에 入하여 清熱涼血·活血散瘀하므로써 經閉·跌打損傷·疝積聚 등 氣血瘀滯의 症을 다스리고, 柴胡는 肝·膽經에 入하여 退熱·疏肝解鬱·升舉陽氣하고 血凝氣滯를 散하므로써 肝氣鬱結·脇肋疼痛·月經不調 등을 다스리며, 甘草는 肝·脾經에 入하여 補中益氣·通經脈·利血氣·瀉火解毒하므로써 十二經을 通行시키고 諸藥을 協和하며, 桔梗은 肺·胃經에 入하여 開宣肺氣하므로써 開胸膈滯氣하여 胸膈刺痛·脇痛·咽喉腫痛, 腹滿 등을 다스리며, 川芎은 肝·膽經에 入하여 行氣開鬱, 活血止痛, 消瘀血하므로써 月經不調, 經閉, 痛經, 産後瘀滯腹痛, 跌打損傷, 癰疽瘡瘍 등을 다스리고, 牛膝은 肝·腎經에 入하여 散惡血, 破結, 通經하므로써 婦女血滯經閉, 痛經, 月經不調, 跌打損傷 등의 瘀滯作痛症을 다스린다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 血府逐瘀湯이 암전이에 미치는 영향을 규명하기 위하여 血府逐瘀湯 농축액을 HT1080에 투여하여 세포독성을 측정 한 후, gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 zymography를 시행하였으며, MMP-2와 MMP-9의 promoter element인 AP-1 site에 binding하는 Fos, Jun, Ets 및 AP-1의 signal transduction pathway 상의 Erk1, JNK1의 변화를 측정하기 위하여 western blotting을 하였고, collagen과 matrigel을 coating한 transwell을 이용하여 in vitro invasion assay를 시행하였다.

血府逐瘀湯의 세포독성 측정 결과 trypan blue에 염색된 세포의 수는 血府逐瘀湯 농축액이 작용한 시간과 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 보이고는 있으나 모두 50% 억제 농도 이하로서 control과 비교하면 거의 비슷한 수준

이다. 예비 실험에서 血府逐瘀湯 800 $\mu$ g/ml에서는 HT1080이 100% 염색되었다. 따라서 血府逐瘀湯은 400 $\mu$ g/ml과 800 $\mu$ g/ml의 농도 사이에서 50% 억제 농도를 갖는 것으로 생각된다. 그러나 이후의 실험이 모두 암세포주의 활성도와 관련있는 data들로서 항암효과가 지나치게 발현되는 농도는 HT1080의 enzyme activity, protein 양, invasion activity 등을 왜곡시킬 수 있으므로 오히려 바람직하지 못하다. 따라서 본 실험에서는 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml의 농도 이하로 사용하였다.

Collagenase assay에서는 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml 농도에서 MMP-2가 control(+TPA)에 비해 감소하였으며, MMP-9은 TPA에 의해 induction된 band가 사라졌고, 800 $\mu$ g/ml 농도에서는 MMP-2, MMP-9이 모두 사라졌다. 800 $\mu$ g/ml 농도에서의 결과는 血府逐瘀湯의 암전이 억제 효과인지 혹은 세포 독성의 결과로 collagenase가 검출되지 않은 것인지 분명치 않다.

in vitro invasion assay에서는 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml 투여군이 control(+TPA)에 비해 감소(P=0.03045)하여 collagenase assay에서의 결과와 일치하고 있으며 血府逐瘀湯이 HT1080의 전이를 억제시킬 수 있음을 보여주고 있다.

Collagenase assay의 실험결과를 해석하기 위하여 MMP-2, MMP-9의 transcription factor에 대한 western blot을 시행하였다. TPA response element (TRE)와 AP-1 site가 같으므로 western blot에서 AP-1의 heterodimer인 Jun과 Fos가 증가하는 것으로 나타난 것이 collagenase assay에서 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml 농도에서 MMP-9이 TPA에 의해 induction된 band가 사라진 것과 관련이 있을 지도 모르겠으나 TPA에 의해서든 AP-1에 의해서든 MMP-2, MMP-9의 발현은 증가되어야 한다. 그러나 collagenase assay와 in vitro invasion assay의 결과를 보면 血

血府逐瘀湯은 MMP-2, MMP-9의 promoter를 통하지 않고 다른 경로를 통해 collagenase의 발현을 조절하는 것으로 사료된다.

## V. 結 論

血府逐瘀湯이 암전이에 미치는 영향을 규명하기 위하여 血府逐瘀湯 농축액을 HT1080에 투여하여 세포독성을 측정 한 후, gelatinolytic activity의 변화를 측정하기 위하여 zymography를 시행하였으며, MMP-2와 MMP-9의 promoter element인 AP-1 site에 binding하는 Fos, Jun, Ets 및 AP-1의 signal transduction pathway 상의 Erk1, JNK1의 변화를 측정하기 위하여 western blotting을 하였고, collagen과 matrigel을 coating한 transwell을 이용하여 in vitro invasion assay를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 血府逐瘀湯의 HT1080에 대한 세포독성을 알아본 결과 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml을 24시간 동안 처리한 후 염색된 세포는 전체 세포의 0.9%이며, 100 $\mu$ g/ml에서는 1.5%로서 대조군의 0.6%와 거의 같은 수준이었다.
2. Collagenase assay에서는 血府逐瘀湯 농축액 400 $\mu$ g/ml 농도에서 MMP-2가 control(+TPA)에 비해 감소하였으며, MMP-9은 TPA에 의해 induction된 band가 사라졌고, 800 $\mu$ g/ml 농도에서는 MMP-2, MMP-9이 모두 사라졌다.
3. Jun, Fos, Ets, Erk, JNK 등에 대한 western blot에서는 血府逐瘀湯 농축액 200 $\mu$ g/ml 농도에서 Ets는 감소하고 Jun과 Fos는 증가하는 것으로 나타났다.
4. Invasion assay에서는 血府逐瘀湯 투여군

이 control(+TPA)에 비해 감소하였다.

이상의 결과로 보아, 血府逐瘀湯은 MMP-2, MMP-9의 promoter를 통하지 않고 다른 경로를 통해 collagenase의 발현을 조절하는 것으로 사료된다.

## VI. 參考文獻

1. 김성훈, 김동희 수종어혈약물의 배합에 의한 항암 및 암전이 효과에 대한 연구, 97국 제어혈심포지움 논문집, pp105-134, 1997.
2. 나기환, 활락효령단이 Angiogenesis억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
3. 서울대학교 의과대학 편, 개정판 종양학, 서울, 서울대학교 출판부, pp.1-2, 19-22, 1992.
4. 이기룡, 입안산이 Angiogenesis억제기전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1998.
5. 전승훈 외, 죽엽석고탕가감방이 항암화학요법제의 세포독성과 종양세포의 라이소좀에 미치는 영향, 제 4회 한중 학술세미나 발표논문집, pp. 237-258, 1998.
6. 전영수 · 최승훈 · 안규석, 가미자도환의 항암 및 면역증강효과에 관한 실험적 연구, 제 4회 한중 학술대회 발표논문집, pp41-68, 1998.
7. 최승훈, 동의종양학, 서울, 행림출판, pp.37-38, 1995.
8. 최승훈, 한의학의 종양에 대한 인식과 병리론, 대한한방종양학회지, 1(1): 11-28, 1995
9. 최승훈, 혈부축어탕이 혈전증과 피하혈종에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1986
10. 협서성증의연구소학회, 의림개착평주,

- 인민위생출판사, pp 75-84, 1976.
11. Bian J., Sun Y., Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (Gelatinase A or Matrix metalloproteinase 2) promoter, *Molecular and cellular biology*, 17:6330-6338, 1997.
  12. Boren P, Heller R.A., Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 7(1&2):159-178, 1997.
  13. Braunhut SJ, Moses MA, Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem* 269:13472-13479, 1994.
  14. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*, 3rd ed. Garland Publishing, 1994.
  15. Burnette, W. H., Western Blotting, *Anal. Biochem.* 112: 195-203, 1981.
  16. Cotran, R.S., Robbins, S.L., Kumar, V., Robbins pathologic basis of disease. 5th ed., W.B. Saunders Company, pp. 276-280, 1994.
  17. Folkman, J., Cotran, R. : *International Review of Experimental Pathology*. vol. 16, (G.W. Richter and M.A. Epstein, eds.). New York, Academic Press, 1976, pp. 207-248.
  18. Gohji K, et al, Human recombinant interferons-beta and -gamma decrease gelatinase production and invasion by human KG-s renal-carcinoma cells. *Int J Cancer* 58:380-384, 1994.
  19. Hart. I.R., Saini. A., Biology of tumor metastasis, *Lancet* 339: 1453, 1992.
  20. Hashimoto K, Yamanishi Y, Maeyens E, Dabbous M.K., Kanzaki T., Collagenolytic activities of squamous-cell carcinoma of skin, *Cancer Res.*, 33:2790-2801, 1973.
  21. Heussen, C., Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, 102: 196-202, 1980.
  22. Huhtala P, Tuutila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K, Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase, *J. Biol. Chem.* 266: 16485-16490, 1991.
  23. Lacraz S, et al, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 dissociates production of interstitial collagenase and 92-kDa gelatinase in human mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 269:6485-6490, 1994.
  24. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, 1970.
  25. Liotta, L. A., et al., Cancer metastasis and angiogenesis; An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327, 1991.
  26. Lyons JG, Birkedal-Hansen B, Pierson MC, Whitelock JM, Birkedal-Hansen H, Interleukin-1 $\beta$  and transforming growth factor- $\alpha$ /epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 268:19143-

- 19151, 1993.
27. Ogilvie D.J., Hailey J.A., Juacaba S.F., Lee E.C.G., Tarin D., Collagenase secretion by human breast neoplasm: A clinicopathologic investigation, *JNCI*, 74:19-27, 1985.
  28. RAYMOND W. RUDDON, *Cancer Biology* third edition, Oxford University Press, 1995
  29. Sato H, Seiki M, Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression. *Oncogene* 8:395-405, 1992.
  30. Stetler-Stevenson, et al., *JBC*, 264: 1353-1356, 1989.
  31. Thorgeirsson, et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:259-262, 1985.
  32. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE, Transforming growth factor  $\beta$  enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4577-4581, 1993.
  33. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI, SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J. Biol. Chem.* 264: 17213-17221, 1989.