

Conjugated Linoleic Acid (CLA)가 인체 대장암 세포주에서 Matrix Metalloproteinase (MMP) 활성과 세포이동성에 미치는 영향*

설소미** · 방명희** · 최옥숙** · 윤정한*** · 김우경***§

단국대학교 식품영양학과, ** 한림대학교 생명과학부 식품영양학전공***

Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity and Cell Motility in Human Colon Cancer Cell Lines*

Seol, So Mi** · Bang, Myung Hee** · Choi, Ok Suk**
Park, Jung Han Yoon*** · Kim, Woo Kyoung***§

Department of Food Science and Nutrition, ** Dankook University, Seoul, 140-714, Korea

Division of Life Sciences, *** Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) consists of several geometric isomers of linoleic acid. CLA is found in foods derived from ruminants and exhibits strong anticarcinogenic effects in a variety of animal models. Matrix metalloproteinases (MMPs) play a key role in cancer progression. Specifically, MMP-2 and -9, which hydrolyze the basal membrane type IV collagen, are involved in the initial breakdown of collagen and basement membrane components during tumor growth and invasion. However, the effects of CLA on cancer cell motility and MMP expression and activity are not currently well known. Therefore, the present study examined whether CLA reduces the activity of MMP and cell motility in SW480 and SW620 cells, the human colon cancer cell lines. Gelatin zymography and Western blot analysis revealed that phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induced the activity and protein expression of Mr 92,000 MMP-9 in both cell lines. To examine whether CLA inhibits the MMP activity, cells were incubated with 100 ng/mL PMA in the presence of various concentrations of CLA. PMA-induced MMP-9 activity was decreased by 20 μ M CLA in SW480 cells, and by 10 μ M and 20 μ M CLA in SW620 cells. Results from the Boyden chamber assay showed that cell motility was increased by PMA and that PMA-induced cell motility was significantly decreased by 20 μ M CLA in SW480 cells. These results indicate that CLA may reduce the motility and MMP activity in human colon cancer cells. (Korean J Nutrition 36(3): 280~286, 2003)

KEY WORDS : conjugated linoleic acid (CLA), matrix metalloproteinase (MMP), cell motility, zymography, colon cancer cells.

서 론

경제가 발달하고, 식생활이 서구화, 풍부해짐에 따라 우리 국민의 건강문제에서 암은 큰 비중을 갖고 있다. 우리나라 사망원인별 통계를 살펴보면, 암으로 인한 사망률이 1위를 차지하고 있고, 종류로는 남녀 모두 위암, 간암, 폐암, 대장암의 순위이다.¹⁾ 1999년에 발표된 사망원인 조사에서

1990년에 비해 위암 (-23.8%), 간암 (-14.1%), 자궁암 (-28.2%) 사망률은 감소한 반면에, 대장암 (75.6%), 췌장암 (63.6%), 폐암 (53.5%), 유방암 (37.1%), 전립선암 (12.5%)의 사망률은 증가하였고, 특히 대장암은 급격한 증가추세에 있다.¹⁾

원발성암은 초기에 발견되면 치료가 가능하지만 전이 (metastasis)가 일단 발생하면, 성공적인 치료가 어려우며 전이를 치료하는 과정에서 합병증으로 사망하게 된다. 대장암의 경우도 외과적으로 병灶의 근치적절제가 원칙이지만 대장벽을 통한 주변 조직으로의 직접 침윤 (invasion) 및 혈관, 임파관을 통한 원격전이, 특히 간 전이를 잘 일으키고, 침윤성이 높기 때문에 암이 국소적인 경우 80%이상의 장기 생존율을 기대할 수 있지만 전이가 있는 경우 생존율은

접수일 : 2003년 2월 13일

채택일 : 2003년 3월 27일

*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (02-PJ1-PG10-22003-0001)

§To whom correspondence should be addressed.

5%미만이라고 한다.²⁾ 그러므로 대장암의 치료에 있어서 암의 전이를 예방하는 것은 매우 중요한 연구 분야이나 식이성분과 대장암의 전이에 대한 연구는 국내에서는 전혀 연구되어 있지 않으며, 국외에서도 미미하게 이루어지고 있다.

암의 침윤과 전이에는 cell adhesion과 extracellular matrix (ECM)를 분해하는 것이 필요하다.³⁾ Matrix metalloproteinase (MMP)와 urokinase plasminogen activator (uPA)는 침윤에 작용하는 주요 proteinase로 특히 MMP는 ECM 단백질을 분해하여 세포가 다른 기관으로 이동하는데 중요한 역할을 한다.⁴⁾ MMP는 ECM의 구성성분인 collagen, gelatin, fibronectin 등을 분해하는 효소로, 17개 정도가 알려져 있으며, 세포 밖으로 분비되는 형과 세포막에 붙어있는 형태가 있다.⁵⁾ 분비되는 MMP들은 proenzyme의 형태를 가지고 있으며, 특정한 enzyme에 의해 분해되어 그 활성을 나타내며, embryonic development, normal tissue remodeling, growth, wound healing과 관련이 있다.⁶⁾ 또한 MMP는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs)와 균형을 맞추어 존재하며, MMP와 TIMP 사이의 균형이 파괴되면 암과 류마チ스와 같은 임상적인 현상이 나타난다.⁷⁾ 이와 같이 암의 침윤과 전이에 있어서 MMP의 역할이 밝혀짐에 따라 MMP 저해제를 탐색하는 연구들이 진행되고 있다. 인체 대장암 세포인 HT-29 cell을 이용한 lymph node 전이 실험에서 MMP-2와 MMP-9의 inhibitor인 matlystatin (R-94138)은 전이를 억제하였고, *in vitro* 침윤실험에서도 암세포의 이동을 억제하였다.⁸⁾ 또한 TK4 대장암세포에서도 MMP의 inhibitor인 MMI-166은 MMP-2의 활성과 발현을 감소시켰고, 실험동물에서 간 전이를 감소시켰다고 보고하고 있다.⁹⁾ 그러므로 MMP 활성을 억제시키는 식이성분을 탐색하는 것은 매우 중요한 의의를 가진다고 사료된다.

Conjugated linoleic acid (CLA)는 유지방이나 육류에 포함되어 있으며,¹⁰⁾ linoleic acid로부터 알카리이성화 방법으로 합성된 CLA는 *cis*-9, *cis*-11, *cis*-9, *trans*-11, *trans*-9, *cis*-11, *trans*-9, *trans*-11, *cis*-10, *cis*-12, *cis*-10, *trans*-12, *trans*-10, *cis*-12, *trans*-10, *trans*-12 CLA의 8개 이성체를 함유하고 있으며 그 중 *cis*-9, *trans*-11 CLA와 *trans*-10, *cis*-12 CLA 이성체가 각각 약 48%를 차지하고 있고 나머지 6개의 CLA 이성체는 미량으로 존재한다.¹¹⁾ CLA는 전립선암세포¹²⁾와 대장암세포¹³⁾ 등 세포수준에서와 발암물질을 투여한 동물에서 여러가지 암의 발생을 억제시키는 항암작용이 아주 뛰어난 물질이다.¹⁴⁾ Female BALB/cAnN 생쥐에게 mouse mammary tumor cell line 4526를 꼬리의 정맥을 통해 주사하여 폐

전이를 유도하였을 때, CLA 섭취 (식이무게에 0.1%, 0.5%, 1.0%)는 pulmonary nodule 수와 tumor burden을 감소시켰다는 보고가 있었다.¹⁵⁾ 그러나 CLA가 대장암세포에서의 MMP활성과 세포이동성에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 이루어지고 있지 않다.

그러므로 본 연구는 인체 대장암 세포인 SW480 cell과 SW620 cell에서 CLA가 세포이동성과 MMP 활성에 미치는 영향을 알아보기 시도되었다. 또한 본 연구에서 사용된 SW480 cell은 primary adenocarcinoma cell이고 SW620 cell은 SW480 cell이 유래한 환자의 lymph node로 전이된 대장암으로부터 유래한 것¹⁶⁾으로 전이 전과 후의 세포에서의 영향을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

인체 대장암 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 일반 세포배양액으로는 Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture Ham's F12 (DMEM/F12, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco/BRL)을 첨가하고, 항생제로는 100 units/mL penicillin (Gibco/BRL)과 100 µg/mL streptomycine (Gibco/BRL)을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80~90% confluence 해지면 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대배양 하였으며, 배지는 2일 마다 교환하였다. 세포는 37°C 습윤한 incubator (5%, CO₂)에서 배양하였다.

2. MMP 활성 및 발현

1) MMP 활성 측정을 위한 시료준비

SW480 cell과 SW620 cell을 일반세포배양액으로 세포수가 1×10^6 cells/well 되도록 하여 6 well plate에 plating 한 후 48시간을 배양하였다. Phosphate buffered saline solution (PBS)로 한 번 씻고, serum free medium (SFM, DMEM/F12, transferrein 5 µg/mL, selenium 5 ng/mL, ascorbic acid 50 ng/mL, α -tocopherol 20 ng/mL)으로 두 번 더 씻었다. SFM에 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 0, 10, 50, 100 ng/mL로 첨가된 medium으로 바꾸어 주고, 48시간을 더 배양한 후 배양액을 얻었다. 얻은 배양액은 3000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거하고 centrifugal filter device인 centricon (Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 10배 농축하여 MMP 활성을 측정

하는 zymography의 시료로 사용하였다. PMA는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹았으며, 모든 well에는 같은 양의 DMSO가 들어가도록 첨가시켰다.

2) CLA가 MMP 활성에 미치는 효과 측정을 위한 시료 준비

SW480 cell과 SW620 cell을 일반세포배양액으로 세포 수가 1×10^6 cells/well이 되도록 6 well plate에 plating하고, 48시간 배양한 후 PBS와 SFM으로 각기 두 번씩 씻었다. SFM에 PMA (100 ng/mL) 와 CLA mixture (Sigma) 를 0, 5, 10, 20 μM 가 되도록 첨가한 medium으로 바꾼 후 48시간을 더 배양하여, 배양액을 얻어 10배 농축하여 zymography를 실시하였다. CLA mixture는 fatty acid-free bovine serum albumin (BSA, Sigma)과 4 : 1의 몰비로 결합시킨 것을 사용하였다. 모든 well에는 BSA와 DMSO가 같은 양 들어가도록 첨가하였다.

3) Zymography

0.1% gelatin (Sigma)을 함유한 10% sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel을 만들어 위에서 언급한 방법으로 얻은 시료를 lane 당 50 μl 씩 넣어 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 renaturing buffer (25% Triton X-100)로 30분간 두 번씩 shaking 하면서 실온에서 incubation 하였다. 그리고 developing buffer (50 mM Trisbase, 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij)로 30분간 실온에서 incubation한 후에 37°C에서 16시간 incubation 하였다. 0.5% coomassie brilliant blue-250 (Sigma)로 30분간 염색을 한 후 destaining solution (methanol : acetic acid : water = 50 : 10 : 40)으로 de-stain 하여 관찰하였다. Positive control로는 HT-1080 cell을 같은 조건으로 배양한 배양액을 사용하였다.

4) Immunoblot analysis

MMP 단백질을 확인하기 위해 같은 시료를 이용하여 immunoblot analysis를 실시하였다. 4~20% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel을 만들어 lane 당 50 μl 의 시료를 넣은 후 전기영동하였다. 전기영동 후 Immobilon™-P membrane (Millipore)에 transfer 하였다. Membrane은 5% milk-TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 incubation 한 후 monoclonal MMP-9 antibody/5% milk-TBST (1 : 1,000 dilution, SantaCruz, USA)로 1시간 incubation 하였다. TBST로 씻은 후 anti-mouse Ig horseradish peroxidase/5% milk-TBST (1 : 10,000 dilution, Amersham Buckinghamshire, England)로 1시간 더 incubation

하였다. TBST로 씻어낸 후 Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, IL, USA)를 사용하여 탐색하였다. 분자량은 미리 착색시킨 molecular weight standard (Amersham)와 비교하였다.

3. Boyden chamber assay

세포의 이동성은 Boyden chamber (Neuro Probe Inc., MD, USA)를 이용하였다. SW480 cell을 배양하다가 80% 정도 confluence 해지면 SFM에 PMA가 0, 10, 50, 100 ng/mL이 들어가도록 만든 medium에 세포수가 2×10^6 cells/mL 되도록 resuspend 시켰다. Boyden chamber의 lower chamber에는 FBS를 10% 함유하고 있는 일반 배양액을 첨가하고 gelatin으로 미리 coating 되어 있는 filter (Osmomics Inc., USA)를 덮고, upper chamber에는 미리 준비해 놓은 cell suspension을 첨가하였다. 16시간 동안 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양을 한 후에 Diff-Quick solution (Dade Behring Inc., USA)으로 염색을 하였다. CLA가 암세포의 이동성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 PMA (100 ng/mL)와 함께 CLA를 0, 5, 10, 20 μM 로 첨가한 medium을 사용하였다. 모든 medium에는 DMSO와 BSA양이 동일하게 포함되도록 하였다. Gelatin coating한 filter를 통하여 upper chamber에서 lower chamber로 이동한 세포의 수는 10배율의 현미경상에서 디지털카메라로 사진을 찍은 후 처리 군당 10군데의 일정한 범위에 있는 이동된 수를 세었고 독립된 실험을 3회 반복하였다.

4. 통계처리

세포의 이동성에 대한 자료는 SAS program을 이용하여 각 군의 평균과 표준 오차를 구하고, ANOVA 분석을 한 후 그룹간의 평균차이 비교는 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. MMP 활성 및 발현

인체의 대장암 세포주인 SW480 cell과 SW620 cell의 MMP 활성은 분자량이 92,000인 단백질이 gel에 첨가된 gelatin을 분해시키는 능력을 측정하는 zymography를 이용하였고, 그 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 제시되었다. SW480 cell과 SW620 cell은 serum-free medium에서 PMA를 첨가하지 않고 배양했을 때에는 MMP의 활성이 나타나지 않았다 (Fig. 1-A, 2-A). PMA의 농도를 증가시켰을 때 SW480 cell은 PMA 농도가 50 ng/mL 이상에서 MMP-9의 활성이 나타났으며, SW620 cell은 10 ng/mL 일 때부

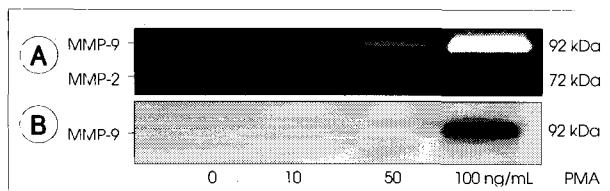


Fig. 1. Effects of PMA on the activity and protein expression of MMP in SW480 cells. SW480 cells were plated in 6-well plates at 1×10^6 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum. Two days later, the monolayers were rinsed three times with PBS and serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ transferrin, 0.1 mg/mL BSA, and 5 ng/mL selenium. Cells were then incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of PMA. Forty eight-hour conditioned media were collected and concentrated for zymography to detect MMP activity (A) and immunoblot analysis with a monoclonal antibody against MMP-9 (B).

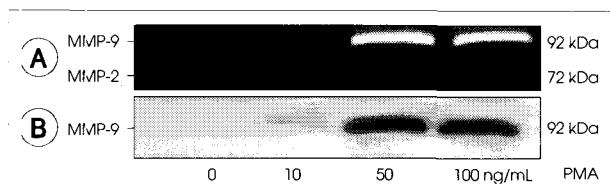


Fig. 2. Effects of PMA on the activity and protein expression of MMP in SW620 cells. SW620 cells were plated, cultured, and treated with PMA as described in Fig. 1. Forty eight-hour conditioned media were collected and concentrated for zymography to detect MMP activity (A) and immunoblot analysis with a monoclonal antibody against MMP-9 (B).

터 MMP-9의 활성이 나타났다 (Fig. 1-A, 2-A). SW480 cell과 SW620 cell을 비교해 보면, SW480 cell에서 MMP-9의 활성이 더 큰 것으로 나타났다. 92 kDa 단백질이 MMP-9임을 확인하기 위해서 MMP-9에 반응하는 monoclonal antibody를 이용해서 같은 배양액에 포함된 단백질을 immunoblotting 방법으로 분석한 결과 분자량이 92 kDa인 단백질이 MMP-9임을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-B, 2-B).

PMA와 함께 CLA를 medium에 첨가하였을 때는 SW480 cell에서는 CLA 농도가 20 μM 일 때 MMP-9의 활성이 감소하였고, SW620 cell에서는 10 μM 이상 일 때 MMP-9의 활성이 감소하였다 (Fig. 3-A, 4-A). 그러나 immunoblotting 결과에 의하면 CLA는 SW480 cell에서는 MMP-9의 단백질 발현을 억제하지 않았으나 SW620 cell에서는 이 단백질의 감소가 나타났다 (Fig. 3-B, 4-B).

2. 세포의 이동성

Boyden chamber assay에 의해 SW480 cell의 이동성을 측정하였다. Fig. 5-A는 filter를 통한 세포의 이동을 보여주고 있으며 이를 대조군에 대한 비율로 나타낸 것이 Fig. 5-B로 PMA로 자극하였을 때 dose dependent하게 이동하는 세포가 증가하였다. 100 ng/mL PMA와 CLA

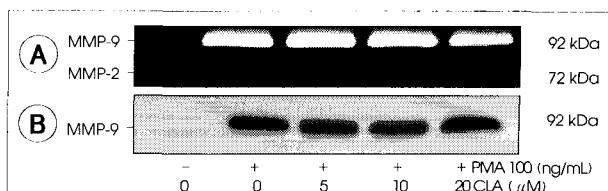


Fig. 3. Effects of CLA on PMA-induced MMP in SW480 cells. SW480 cells were plated, and cultured as described in Fig. 1. Cells were then incubated in serum-free medium with or without 100 ng/mL PMA in the absence or presence of various concentrations of CLA. Forty eight-hour conditioned media were collected and concentrated for zymography to detect MMP activity (A) and immunoblot analysis with a monoclonal antibody against MMP-9 (B).

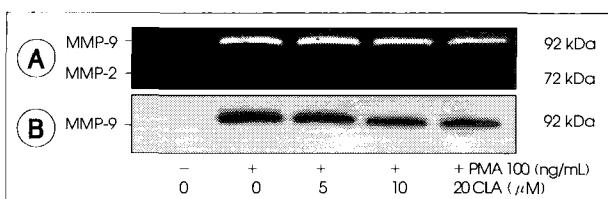


Fig. 4. Effects of CLA on PMA-induced MMP in SW620 cells. SW620 cells were plated, and cultured as described in Fig. 1. Cells were then incubated in serum-free medium with or without 100 ng/mL PMA in the absence or presence of various concentrations of CLA. Forty eight-hour conditioned media were collected and concentrated for zymography to detect MMP activity (A) and immunoblot analysis with a monoclonal antibody against MMP-9 (B).

를 0, 5, 10, 20 μM 로 함께 첨가하였을 때는 CLA를 넣지 않은 군에 비해 CLA첨가에 의해 이동하는 세포의 비율이 감소하였고, 20 μM 에서는 유의적인 차이가 있었다 (Fig. 6).

고찰

대장암 환자의 치료와 생존에 가장 큰 문제는 초기종양이 아니라 암세포가 다른 조직으로 전이되는 것이다²⁾. 따라서 전이를 방지하고 암 환자들을 성공적으로 치료하기 위해 암세포의 이동과 침윤, 전이의 분자적인 기작에 대해 이해가 필요하다. 암세포의 침윤과 전이과정에서 중요한 것은 ECM과 기저막 (basement membrane)을 분해하는 것이다.¹⁾ 이를 위해 암세포는 여러 가지 단백질분해효소, 즉 MMP를 분비하게 된다. MMP는 4개의 group으로 이루어져 있는데, 1) MMP-1을 포함한 collagenase, 2) MMP-2과 MMP-9을 포함한 gelatinase, 3) stromelysin, 4) membrane type MMP이다.¹⁷⁾ 암의 침윤과 전이에서 ECM과 기저막 파괴의 중요한 인자는 MMP-2, MMP-9로 이들의 과발현은 유방암과 대장암에서 전이와 관련이 있다고 보고되었다.¹⁸⁾ 그러므로 암의 전이를 막기 위해서 MMP를 억제하는 물질을 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

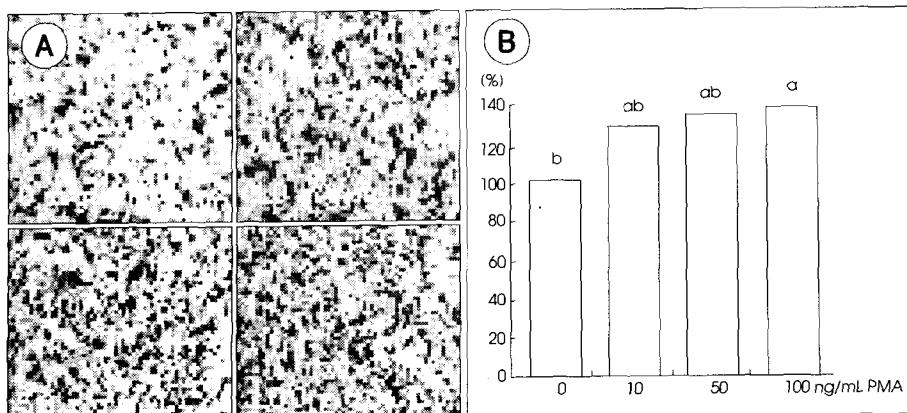


Fig. 5. Effect of PMA on the motility of SW480 cells. Cells were grown in a Boyden chamber using FBS as a chemoattractant in the presence of various concentrations of PMA. Cells migrated through the gelatin coated filter was counted. (A) Photographs of filters. (B) The migrated cells are expressed as a percentage of migrated cells cultured in the absence of PMA. Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar (e.g., a vs. b, b vs. c, etc.).

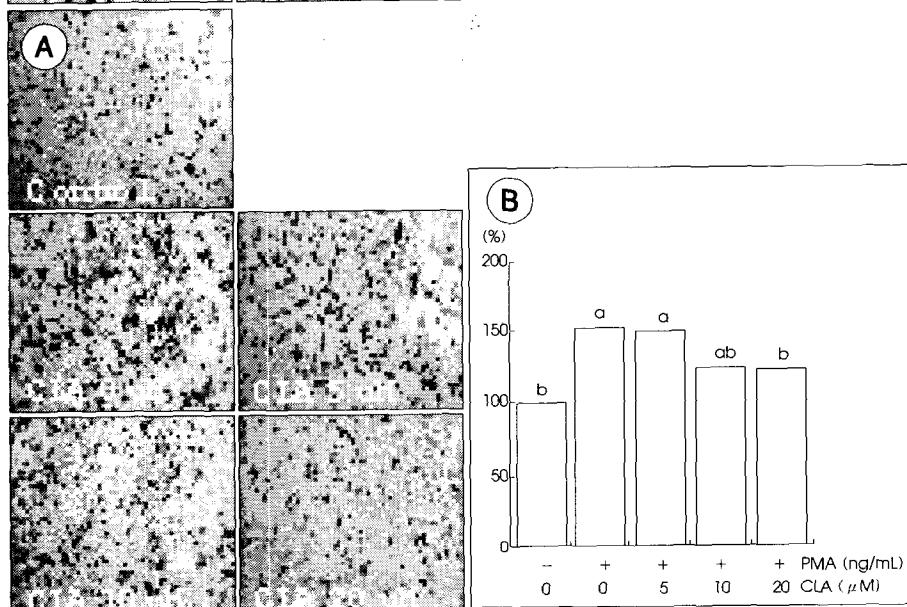


Fig. 6. Effect of CLA on the PMA-induced motility of SW480 cells. Cells were grown in a Boyden chamber using FBS as chemoattractant in the presence of various concentrations of CLA with or without 100 ng/mL PMA. Cells migrated through the gelatin coated filter was counted. (A) Photographs of filters. (B) The migrated cells are expressed as a percentage of migrated cells cultured in the absence of PMA. Comparisons between groups that yielded significant differences ($p < 0.05$) are indicated by different letters above each bar (e.g., a vs. b, b vs. c, etc.).

본 연구에서 인체 대장암세포인 SW480 cell과 SW620 cell에 PMA를 첨가하였을 때 MMP-9의 활성과 발현이 증가하였다 (Fig. 1~4). McDonnell 등¹⁹⁾은 SW480 cell과 SW620 cell은 일반상태에서 MMP를 발현하지 않는다고 하였고, Bellone 등²⁰⁾은 PMA에 의한 MMP-9의 발현 증가를 인체 대장암세포인 DLD-1 cell에서 관찰하였다. 본 연구에서 SW480 cell과 SW620 cell을 비교해 보면 SW480 cell에서의 MMP-9의 활성이 높아 전이 이전상태에서의 MMP-9의 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 PMA로 활성화시킨 후 CLA를 첨가하였을 때는 MMP-9의 활성은 SW480 cell의 경우 CLA 농도가 20 μ M에서 활성이 감소하였고, SW620 cell의 경우는 10, 20 μ M에서 MMP-9활성이 감소하여 세포에 따라 CLA에 대한 다른 반응을 보였다 (Fig. 3-A, 4-A). 그리고 SW480 cell에서 CLA에 의해 MMP-9의 발현이 감소하지 않았으나 SW620 cell에서는 CLA에 의해 MMP-9의

발현이 감소한 것에 대해서는 앞으로 많은 연구가 필요하다고 생각된다. MMP의 발현이나 활성을 조절하는 물질에 대한 연구는 많이 되어 있지 않은데, Harris 등²¹⁾은 임신 한 쥐에게 n-6 : n-3 지방산의 비율을 7 : 1, 34 : 1로 조절하면서 CLA를 1.1%, DHA를 0.3%로 식이에 첨가하여 주었을 때, CLA와 DHA의 첨가는 MMP-2와 MMP-9의 생산을 감소시켰다고 보고하였다. 그리고 Emenaker 등²²⁾이 SW1116 대장암세포에서 MMP-2는 단쇄지방산에 의해 조절되지 않으나 MMP-1은 butyrate, MMP-3은 propionate에 의해 조절되며, Adachi 등²³⁾은 all-trans retinoic acid가 HT-29 cell에서 MMP-7의 발현을 억제하였다고 보고하였으나 식이성분과 MMP와의 관계는 그 연구가 매우 제한적으로 이루어지고 있다. 그러므로 식이 성분에 의한 MMP 활성조절에 대한 연구는 앞으로 활발히 수행되어야 할 분야로 생각한다.

Boyden chamber assay는 암세포의 전이와 이동을 연

구하는데 사용되는 일반적인 방법으로 암의 침윤에 많이 작용하는 MMP-2와 MMP-9가 gelatin과 collagen을 분해하는 gelatinase라는 특징¹⁷⁾을 이용하여 gelatin으로 coating 한 filter를 통하여 암세포들이 이동하는 정도를 측정하는 실험방법이다. 본 연구에서 10% FBS를 포함한 일반 세포배양액을 attractant로 이용하여 암세포의 이동을 유도하였는데 배양액을 SFM으로 하였을 때는 SW480 cell의 이동성이 높지 않았으나 PMA를 첨가하였을 때 첨가하는 농도에 따라 이동하는 세포의 수가 증가하였는데 (Fig. 5) 이는 MMP-9의 활성증가와 일치하였다. PMA는 protein kinase C (PKC)의 stimulator로 알려져 있으며, PKC는 serine/threonine kinase로 세포의 성장과 분화, 암세포증식, 전이에서 중요한 역할을 한다.²⁴⁾ Masur 등²⁵⁾은 PMA를 50 ng/mL의 농도로 첨가하였을 때 SW480 cell의 이동성이 증가하였다고 하여 본 연구와 일치하였다. PMA의 처리는 HT-29D4 cell의 spreading 속도를 증가시키고, Boyden chamber assay에서 migration을 유도하였는데 PKC는 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway를 활성화시키기 때문이라고 보고하고 있다.²⁶⁾ 따라서 본 실험에서 100 ng/mL PMA를 첨가하여 세포의 이동을 유도하고 CLA를 첨가하였을 때, CLA의 농도에 따라 이동하는 세포의 수가 감소하였는데 이는 CLA가 PKC와 관련된 기전으로 세포의 이동을 감소시키는 것으로 사료된다. 다른 식이성분과 암세포의 이동성에 대한 연구로는 all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, 13-cis retinoic acid가 대장암세포인 BM314 cell에서 세포의 이동성을 감소시켰다는 보고가 있다.²³⁾ Tan 등²⁷⁾은 sodium hyaluronate가 SW480 cell, SW620 cell, SW707 cell의 motility를 감소시켰으며, 이러한 motility 감소에 CD44 receptor가 관여한다고 하였다. 또한 대장암세포인 Lim1215 cell, Caco-2 cell, LIM2405 cell에서 wound healing을 24시간 관찰하였을 때 2 mM butyrate, 8 mM propionate, 16 mM acetic acid가 migration을 증가시켰다는 보고도 되고 있다.²⁸⁾

요약 및 결론

본 연구는 인간 대장암세포인 SW480 cell과 SW620 cell을 이용하여 CLA가 세포의 이동성과 MMP-9 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Zymography 방법에 의하면 두 세포에서 PMA의 농도가 증가함에 따라, 분자량이 92,000인 물질에 의한 gelatin 분해가 증가하였다. 세포배양액의 단백질을 MMP-9 antibody를 이용하여 immunoblotting을 수행한 결과 분자량이 92,000인 MMP-9 단백

질이 PMA에 의해 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이 두 결과로 PMA가 이 세포들에서 MMP-9의 발현과 활성을 증가시킨다는 결론을 내릴 수 있다. PMA (100 ng/mL)와 CLA를 같이 첨가하였을 때 SW480 cell의 경우는 20 μM에서, SW620 cell은 10, 20 μM에서 MMP-9의 활성이 감소하였고, 단백질 발현은 SW620 cell에서만 감소하는 것이 관찰되었다. Boyden chamber assay에 의해 SW480 cell의 세포이동성을 측정하였을 때 PMA (100 ng/mL)에 의해 이동하는 세포가 유의적으로 증가하였고, PMA (100 ng/mL)와 CLA를 함께 첨가하였을 때 CLA 농도가 20 μM 일 때 이동성이 유의적으로 감소하였고, 이 농도에서 MMP-9 활성이 감소한 것과 일치하였다. 이 결과로부터 CLA가 MMP-9의 활성을 감소시킴으로서 인간의 대장암세포의 이동성을 감소시켜 암의 전이를 감소시킨다는 가설을 세울 수가 있다.

Literature cited

- 1) Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea, Ministry of Health and welfare, Seoul, 1998
- 2) Sul JY, Song OS, Chang ES, Bae JS, Yoon WH. Metastatic potential of human colon cancer cell lines, LoVo, SW480. *J Kor Cancer* 27 (2) : 209-222, 1995
- 3) Lee HJ, KO YH. Matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor for prevention of cancer metastasis. *Bio Industry* 11 (4) : 41-48, 1998
- 4) Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJM, Lehy T. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3K kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 22 (7) : 1035-1042, 2001
- 5) Jimenez RE, Antoniu BA, Compton CC, Warshaw AL, Castillo CF. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis. An additive strategy for cancer control. *Annals of Surg* 231 (5) : 644-654, 2000
- 6) Wossner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5 : 2145-2154, 1991
- 7) Douglas DA, Shi YE, Sang QA. Computational sequence analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J Prot Chem* 16 : 237-255, 1997
- 8) Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ohira M, Chung KH. Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 20 (6B) : 4331-4338, 2000
- 9) Oba K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Ohta M, Kaneko K, Shouji T, Igarashi A, Nakamura S. Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett* 175 : 45-51, 2002
- 10) Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8 : 1881-1887, 1987

- 11) Praza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 8-13, 2000
- 12) Oh YS, Kim EJ, Kim JW, Kim WK, Lee HS, Yoon JH. The effect of conjugated linoleic acid and its isomers on the proliferation of prostate TSU-Pr1 cancer. *Kor J Nutr* 35(2): 192-200, 2002
- 13) Kim EJ, Cho HJ, Kim SJ, Kang YH, HA YL, Yoon JH. Conjugated linoleic acid on the proliferation of the human colon cancer cell line, HT-29. *Kor J Nutr* 34(8): 896-904, 2001
- 14) Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J Nutr* 132: 2995-2998, 2002
- 15) Hubbard NE, Lim D, Summers L, Erickson KL. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Lett* 150: 93-100, 2000
- 16) Lombardi DP, Geraerts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 59: 5724-5731, 1999
- 17) Johnson LL, Dyer R, Hupe DJ. Matrix metalloproteinase. *Curr Opin Chem Biol* 2: 466-471, 1998
- 18) Lou J, Miller MW. Ethanol enhances erbB-mediated migration of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 63: 61-69, 2000
- 19) McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metastasis* 17(4): 1341-1349, 1999
- 20) Bellone G, Carbone A, Sibona N, Bosco O, Tibaudi D, Smirne C, Martone T, Gramigni C, Camandona M, Emanuelli G, Rodeck U. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 61: 2200-2206, 2001
- 21) Harris HA, Hansen RA, Vidsudhiphan P, Koslo JL, Thomas JB, Atkins BA, Allen KG. Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostagladins and matrix metalloproteinase production. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids* 65(1): 23-29, 2001
- 22) Emenaker NJ, Basson MD. Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulation TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation. *J Surg Res* 76: 41-46, 1998
- 23) Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, Lku S, Matsuno K, Arimura Y and Imai K. Retinoic acids reduce matrilysin (matrix metalloproteinase7) and inhibit tumor cell invasion in human colon cancer. *Tumour Biol* 22(4): 247-253, 2001
- 24) Hoffman J. The potential for isoenzyme selective modulation protein kinase C. *FASEB J* 11: 649-669, 1997
- 25) Masur K, Lang K, Niggemann B, Zanker KS, Entschladen F. High PKC α and low E-Cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Molecular Biol Cell* 12: 1973-1982, 2001
- 26) Rigot V, Lehmann M, Andre F, Daemi N, Marvaldi J. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *J Cell Science* 111: 3119-3127, 1998
- 27) Tan B, Eang JH, Wu QD, Kirwan WO, Redmond HP. Sodium hyaluronate enhances colorectal tumor cell metastatic potential in vitro and in vivo. *Br J Surg* 88(2): 246-250, 2001
- 28) Wilson AJ, Gibson PR. Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro. *Gastroenterology* 113(2): 487-496, 1997