J. Exp. Biomed. Sci. 2012, 18(2): 104~111
pISSN : 1738-3226

Original Article

Upregulation of MMP is Mediated by MEK1 Activation During Differentiation of Monocyte into Macrophage

Jaewon Lim[1,3], Yoonjung Cho[1,3], Dong Hyun Lee[1], Byung Chul Jung[1], Han Sol Kang[1], Tack-Joong Kim[2], Ki-Jong Rhee[1], Tae Ue Kim[1,†] and Yoon Suk Kim[1,†]

[1]Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea
[2]Division of Biological Science and Technology, College of Science and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases which degrade extracellular matrix (ECM) during embryogenesis, wound healing, and tissue remodeling. Dysregulation of MMP activity is also associated with various pathological inflammatory conditions. In this study, we examined the expression pattern of MMPs during PMA-induced differentiation of THP-1 monocytic cells into macrophages. We found that MMP1, MMP8, MMP3, MMP10, MMP12, MMP19, MMP9, and MMP7 were upregulated during differentiation whereas MMP2 remained unchanged. Expression of MMPs increased in a time-dependent manner; MMP1, MMP8, MMP3, MMP10, and MMP12 increased beginning at 60 hr post PMA treatment whereas MMP19, MMP9, and MMP7 increased beginning at 24 hr post PMA treatment. To identify signal transduction pathways involved in PMA-induced upregulation of MMPs, we treated PMA-differentiated THP-1 cells with specific inhibitors for PKC, MEK1, NF-κB, PI3K, p38 MAPK and PLC. We found that inhibition of the MEK1 pathway blocked PMA-induced upregulation of all MMPs to varying degrees except for MMP-2. In addition, expression of select MMPs was inhibited by PI3K, p38 MAPK and PLC inhibitors. In conclusion, we show that of the MMPs examined, most MMPs were up-regulated during differentiation of monocyte into macrophage via the MEK1 pathway. These results provide basic information for studying MMPs expression during macrophage differentiation.

Key Words: Matrix metalloproteinase (MMP), Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), Macrophage, MEK1

서 론

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 아연-의존적 단백분해효소로서 collagen, proteoglycan, gelatin, elastin 등 다양한 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)을 분해하며, 배발생, 기관형성 또는 상처치유 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Brinckerhoff et al., 2002; Deryugina and Quigley, 2006; Egeblad and Werb, 2002; Pollette et al., 2004). 이러한 MMPs가 비정상적으로 과발현 또는 활성화될 경우 결합조직 등을 파괴시켜 다양한 염증성 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다 (Brinckerhoff and Matriain, 2002). MMPs는 각종 질환 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 암의 발달 및 전이, 관절염 등의 발달에 MMPs가 관여된 것으로 보고되고 있고, 동맥경화증 (atherosclerosis)의 발달에도 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다 (Lendon et al., 1991; Moreno et al., 1994; Vihinen and Kahari, 2002; Westermarck and Kahari, 1999). MMPs는 세포 외 기질 분해 기능과 더불어 세포의 증식 (proliferation) 및 이동 (migration), 세포사멸 (apoptosis) 과도 연관되어 있으며 면역세포에서 각종 사이토카인

*Received: 30 May, 2012 / Revised: 7 June, 2012
Accepted: 8 June, 2012

[3]These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author: Yoon Suk Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea.
Tel: +82-33-760-2860, e-mail: yoonsukkim@yonsei.ac.kr

†Corresponding author: Tae Ue Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea.
Tel: +82-33-760-2424, e-mail: kimtu@yonsei.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

(cytokine)과 그 수용체 (receptor) 또는 세포증식인자 (growth factor)를 활성화 또는 비활성화시키는데 관여하여 염증성 반응 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Hojilla et al., 2003; Parks et al., 2004).

현재까지, 사람에게서 발현하는 MMPs는 23종이 보고되고 있으며, 기질 (substrate)에 대한 특이도 및 단백질을 구성하는 domain 구조에 따라 총 6개의 아형 그룹 (subclass group)으로 분류된다. 6개의 아형 그룹은 각각 Collagenases (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), stromelysins (MMP-3, -10), matrilysins (MMP-7, -26), 세포막 결합 MMPs (MT-MMPs) 그리고 기타 MMPs (MMP-12, -19, -20, -27)으로 구성된다. (Fanjul-Ferna´ndez et al., 2010; Nagase et al., 2006; Santiago et al., 2010; Ugalde et al., 2010). MMPs를 발현하는 세포들은 다양한 세포증식인자, 사이토카인, 케모카인 (chemokines) 및 세포 외 기질과의 직접적인 접촉 등에 의하여 감작되어 MMPs를 발현하며 주로 mRNA 전사 (transcription) 단계에서 MMPs 발현이 조절된다 (Andrea et al., 2010). 이렇게 발현된 MMPs는 pro-peptide domain과 아연 이온이 촉매부위 (catalytic site)에 결합하여 기질과의 결합을 억제하며 비활성화된 상태로 유지되다가 다양한 활성유도 신호에 의해 pro-peptide domain이 제거되면서 활성부위 (active site)가 기질과 결합하게 되어 기질을 분해할 수 있게 된다 (Nagase et al., 2006; Page-McCaw et al., 2007; Stamenkovic, 2003). 이렇게 활성화된 MMPs는 활성억제가 필요할 경우 세포에 존재하는 tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)라 명명되는 억제단백질에 의해 그 활성이 억제된다 (Schafers et al., 2010).

이러한 MMPs는 내피세포 (endothelial cell), 평활근세포 (smooth muscle cell) 뿐 아니라 단핵구 (monocyte), 대식세포 (macrophage)를 포함하는 다양한 면역세포 (immune cell)에서 발현된다 (Schafers et al., 2010). 최근 연구 결과에 의하면 동맥경화증 등을 포함한 각종 염증성 질환의 발달에 MMPs가 관련되어 있으며, 특히 단핵구 및 대식세포에서 발현하는 MMPs가 이러한 염증성 질환 발달과 깊게 연관되어 있는 것으로 생각된다 (Andrew, 2008). 인간 단핵구에서 MMP-8, -11, 17, -23, -25 등의 일부 MMPs 발현이 보고되어 있으며 (Bar-Or et al., 2003), 세포의 체외 배양 시간에 따라 또는 세포 외 기질을 구성하는 성분에 의한 자극이나 다른 세포에 의한 직, 간접적인 자극 등에 의하여 단핵구 내 일부 MMPs 발현이 변화하는 것으로 알려져 있다 (Amorino and Hoover, 1998; Matias-Roman et al., 2005). 이러한 MMPs의 발현은 단핵구가 분화되어 형성되는 대식세포에서도 관찰되는데 MMPs의 발현 양상은 단핵구와 차이가 있는 것으로 보고되고 있다 (Andrew, 2008). 인간 단핵구에 glanulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)를 처리하여 대식세포로 분화시킬 경우 MMP-1, -2, -7, -9, -11, -12, -14의 발현이 증가하는 반면, MMP-8은 변화가 없는 것으로 알려져 있다 (Ardans et al., 2002; Bar-Or et al., 2003; Feinberg et al., 2000; Schonbeck et al., 1999; Welgus et al., 1990; Whatling et al., 2004). THP-1이나 U937과 같은 단핵구 유사 세포주 (monocyte-like cell lines)에 phorbol myristate acetate (PMA)를 처리하게 되면 유사 대식세포 (macrophage-like cells)로 분화되는데 이때 MMPs 발현 양상에 대한 일부 보고는 있으나 (Andrew, 2008; Amorino and Hoover, 1998) 체계적으로 연구된 바는 없는 실정이다.

본 연구에서는 THP-1 세포를 모델 세포로 이용하여 PMA 처리에 의한 단핵구에서 대식세포로 분화 시 세포막 결합 MMPs를 제외한 나머지 아형 그룹에 속하는 MMPs 발현 양상을 확인하고, 각각의 MMPs 발현에 관여하는 신호전달체계 (signal transduction pathway)를 규명하고자 하였다. 대부분의 MMPs 발현이 단핵구의 대식세포로 분화 시 증가하였지만 증가 양상 및 관련 신호전달체계는 아형 그룹 별로 차이를 보였다. 본 연구는 단핵구 및 대식세포에서 발현되는 MMPs와 각종 염증성 질환에 대한 관계 연구에 기초자료를 제시할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

신호전달단백질 억제제

Classical PKC (RO-31-7549), MEK1 (PD 98059), PI3-K (LY 294002), p38 MAPK (SB 203580) 및 cRAF-1 kinase (GW 5074)에 대한 특이적 억제제를 Calbiochem (Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. NF-κB (BAY 11-7085)에 대한 특이적 억제제를 Enzo life science (New York, NY, USA)에서 구매하였다. PLC (U 73122)에 대한 특이적 억제제를 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포 배양 및 처리

10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin

이 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1 세포를 5% CO_2 존재 하에 37℃ 세포배양기에서 배양하였다. THP-1 세포를 대식세포로 분화시키기 위하여 6-well plate에 각 well 당 1.0×10^6개의 세포를 심고 200 nM PMA를 처리하였다. PMA에 대한 농도 의존적 MMPs 발현 변화를 살펴보기 위하여 PMA를 72시간 동안 각각 0, 1, 2, 4, 10, 20, 40 및 100 nM 처리하였다. PMA에 대한 시간 의존적 MMPs 발현 변화를 살펴보기 위하여 200 nM의 PMA를 각각 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 및 72시간 동안 처리하였다. 억제제 처리에 따른 MMPs 발현 변화를 확인하기 위하여 48시간 동안 200 nM의 PMA를 처리한 뒤, 대조군과 비교하여 각각 RO-31-7549 50 nM, PD 98059 50 μM, BAY 11-7085 10 μM, LY 294002 10 μM, SB 203580 20 μM, GW 5074 0.5 μM, U 73122 50 ng/ml를 200 nM PMA와 같이 24시간 동안 처리하였다.

RNA 분리 및 semi-quantitative reverse transcriptase PCR (semi-qRT-PCR)

THP-1 세포 및 PMA에 의해 유도 분화된 (PMA-differentiated) THP-1 세포를 1 ml phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 1 ml의 Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 처리한 뒤 Invitrogen 사에서 제공한 protocol의 지침에 따라 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위하여 2 μg의 total RNA를 정량한 뒤 random hexamer 0.25 μg, Murine Molony Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT; Invitrogen) 200 unit을 가하여 25℃ 10분, 37℃ 50분 및 70℃ 15분 동안 반응시켰다. 역전사된 (reverse-transcribed) cDNA를 희석한 뒤 20 μl PCR 증폭 (PCR amplification)에 이용하였다. PCR 증폭에는 Prime Taq premix PCR kit (Genet Bio, Chungnam, Korea)를 이용하였고 MMP-1, -8, -3, -10, -12, -19, -2, -9, -7 (MMP-1, 5'- GAT GGG AGG CAA GTT GAA AA -3' 및 5'- CCA GGT CCA TCA AAA GGA GA -3'; MMP-8, 5'- GGA AAC CCC AAG TGG GAA CG -3' 및 5'- AGT CCA TAG ATG GCC TGA ATG C -3'; MMP-3, 5'- GGC CAG GGA TTA ATG GAG AT -3' 및 5'- GCT GAC AGC ATC AAA GGA CA -3'; MMP-10, 5'-GTG GAG TTC CTG ACG TTG GT -3' 및 5'- TGC CTG ATG CAT CTT CTG TC -3'; MMP-12, 5'- ACA CCT GAC ATG AAC CGT GA -3' 및 5'- AGC AGA GAG GCG AAA TGT GT -3'; MMP-19, 5'- GGG TCC TGT TCT TCC TAC AT -3' 및 5'- CAA TCC TGC AGT ACT GGT CT -3'; MMP-2, 5'- TTT CCA TTC CGC TTC CAG GGC AC -3' 및 5'- TCG CAC ACC ACA TCT TTC CGT CAC T -3'; MMP-9, 5'- TGG AGA GTC GAA ATC TCT GG -3' 및 5'- ACC AAA CTG GAT GAC GAT GT -3'; MMP-7, 5'- AAC TCC CGC GTC ATA GAA ATA ATG -3' 및 5'- ACC CAA ACA ATG GCC AAG TTC ATG -3')에 대한 MMPs 특이적 프라이머 (primer)를 사용하였다. PCR 증폭은 thermocycler (Applied Biosystems, New York, NY, USA)를 통해 25~40 cycles 동안 수행하였다. MMPs 발현을 비교 확인하기 위하여 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)를 내부 기준 (internal control)로 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.5 μg/ml ethidium bromide (Et-Br)가 첨가된 2.0% (w/v) agarose gels에서 전기영동을 하였으며 100 bp DNA ladder marker (Intron, Gyeonggi, Korea)를 기준으로 증폭된 PCR 산물을 확인하였다. Gel-Doc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 Gel-image를 확인한 뒤 Image Lab (version 2.0, Bio-Rad)을 통하여 GAP-DH에 대한 상대적 MMPs 발현 정도를 정량확인 하였다.

결 과

PMA 처리에 의한 단핵구의 대식세포 분화 과정에서 MMPs 발현 증가

PMA는 단핵구나 단핵구 유사 세포주에 처리 시에 대식세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있으며 이때 일부 MMPs의 세포 외 분비 (secretion)가 촉진되는 것이 보고된 바 있다 (Ardans et al., 2002; Bar-Or et al., 2003; Feinberg et al., 2000; Watanabe et al., 1993; Welgus et al., 1990; Whatling et al., 2004). 본 연구에서는 PMA 처리에 의한 단핵구의 대식세포 분화 과정에서 MMPs의 발현 양상을 확인하기 위해 THP-1 세포에 PMA를 농도 의존적으로 처리한 후 각 MMPs의 mRNA 양을 RT-PCR로 확인하였다. MMP-2는 PMA 처리 이전에도 발현되어 있었다 (Fig. 1). 그러나 MMP-2를 제외한 collagenases (MMP-1, -8), stromelysins (MMP-3, -10), 기타 MMPs (MMP-12, -19), matrilysins (MMP-7), 그리고 gelatinases 중 MMP-9은 PMA 처리 전에는 mRNA 수준에서 발현이 관찰되지 않다가 PMA 처리에 의해 대식세포로 분화되면 발현되는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 확인한 MMP 중에 MMP-10은 다른 MMP에 비해 고농도의 PMA 처리 시에 발현이 증가하는 것이 관찰되었다 (Fig. 1). 특이적으로 MMP-2는 저농도 (1~4 nM)의 PMA 처리 시에는 증가하다 고농도 (20~100

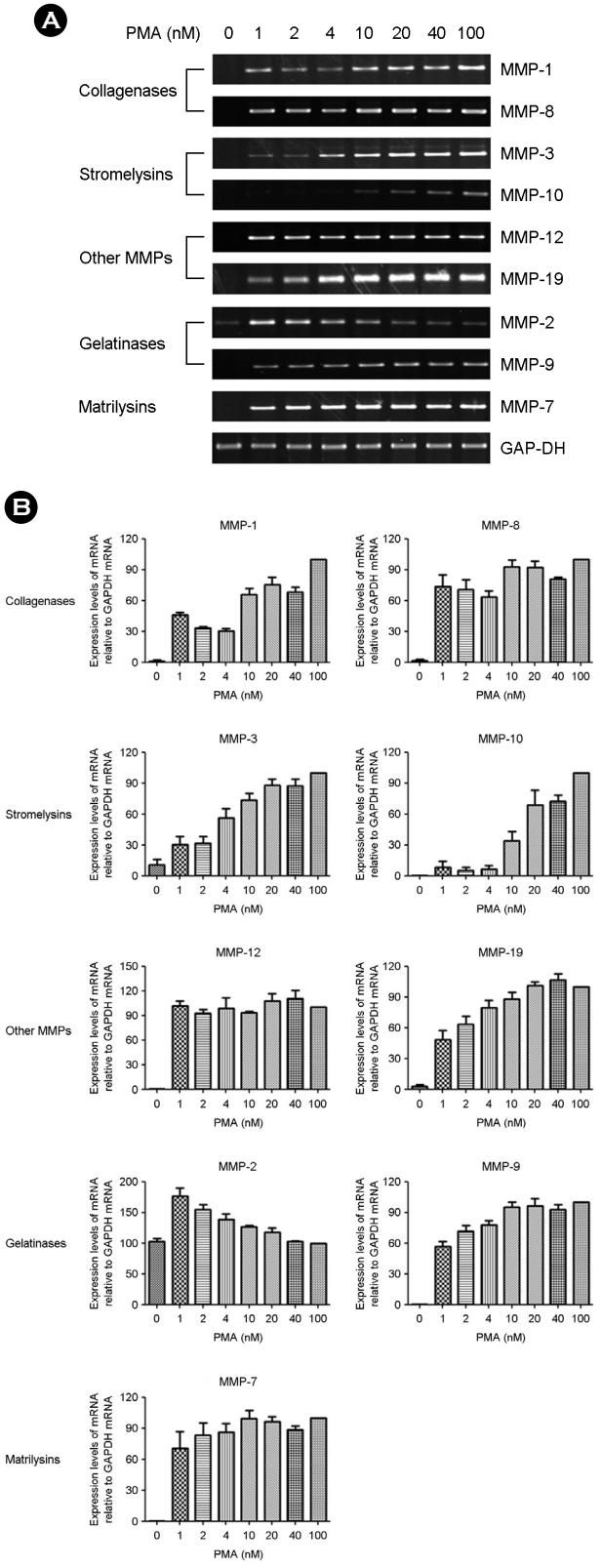

Fig. 1. Dose-dependent expression of MMPs during PMA-induced differentiation of THP-1 cells. (A) THP-1 cells were treated with indicated concentrations of PMA (0, 1, 2, 4, 10, 20, 40 or 100 nM) for 72 hrs. cDNA was prepared from extracted total RNA and subjected to PCR to amplify MMPs. The PCR products were analyzed on a 2% agarose gel and GAP-DH was used as an internal control. (B) Densitometric analysis. Data are expressed as the mean ± SD and are presented as the expression levels of MMPs mRNA relative to GAP-DH mRNA. The mRNA expression level of MMPs relative to GAP-DH in cells treated with 100 nM PMA was set as 100. Data are from three independent experiments.

nM) PMA 처리 시에는 PMA 미처리 시와 비슷한 발현 수준을 보이는 것이 관찰되었다. 본 연구를 통해 실험 대상 MMP 중 MMP-2를 제외한 다른 MMPs는 PMA 처리에 의해 THP-1 세포가 단핵구에서 대식세포로 분화할 때 발현이 감작되는 것을 확인하였다.

단핵구에서 대식세포로의 분화 과정에서 PMA 처리 시간 의존적으로 MMPs 발현 증가

다음으로 PMA를 시간 의존적으로 처리하여 각 MMPs의 발현 양상을 확인한 결과 MMP-2를 제외한 다른 MMPs는 PMA 처리 시간 의존적으로 발현이 증가함을 확인하였다 (Fig. 2). Collagenases 아형 그룹에 속한 MMP-1과 MMP-8, stromelysins 아형 그룹에 속하는 MMP-3과 MMP-10은 각각 PMA 처리에 따른 발현 시간대가 유사한 것을 확인할 수 있다 (Fig. 2). MMP-2는 PMA 처리 후 24시간까지 일시적으로 증가하다가 그 이후에는 시간이 경과함에 따라 그 발현량이 감소하여 PMA 처리 74시간 경과 후에는 PMA 미처리 시 수준의 발현량으로 돌아오는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 Collagenases (MMP-1, -8), stromelysins (MMP-3, -10), 기타 MMP 중 MMP-12는 PMA 처리 후 60시간 경과 후에 발현이 관찰된 반면 MMP-19, MMP-9, MMP-7 등은 PMA 처리 후 24시간 경과 후부터 발현이 관찰되었다 (Fig. 2). 본 연구를 통해 실험 대상 MMP 중 MMP-2를 제외한 다른 MMPs는 PMA 처리에 의해 THP-1 세포가 단핵구에서 대식세포로 분화할 때 시간 의존적으로 발현이 감작되며 MMP 발현의 PMA 시간 의존성은 아형 그룹간에 차이가 있다는 사실을 확인하였다.

PMA 처리에 의한 단핵구에서 대식세포로의 분화 과정에서 Protein kinase C (PKC) 비의존적으로 MMPs 발현 증가

THP-1 세포를 대식세포로 분화시키는데 사용되는 PMA는 PKC를 활성화 하는 물질 (activator)로 알려져 있다 (Van Leeuwen et al., 1994). 따라서 PMA 처리에 따른 MMPs 발현 증가에 PKC가 관여하는지 확인하였다. THP-

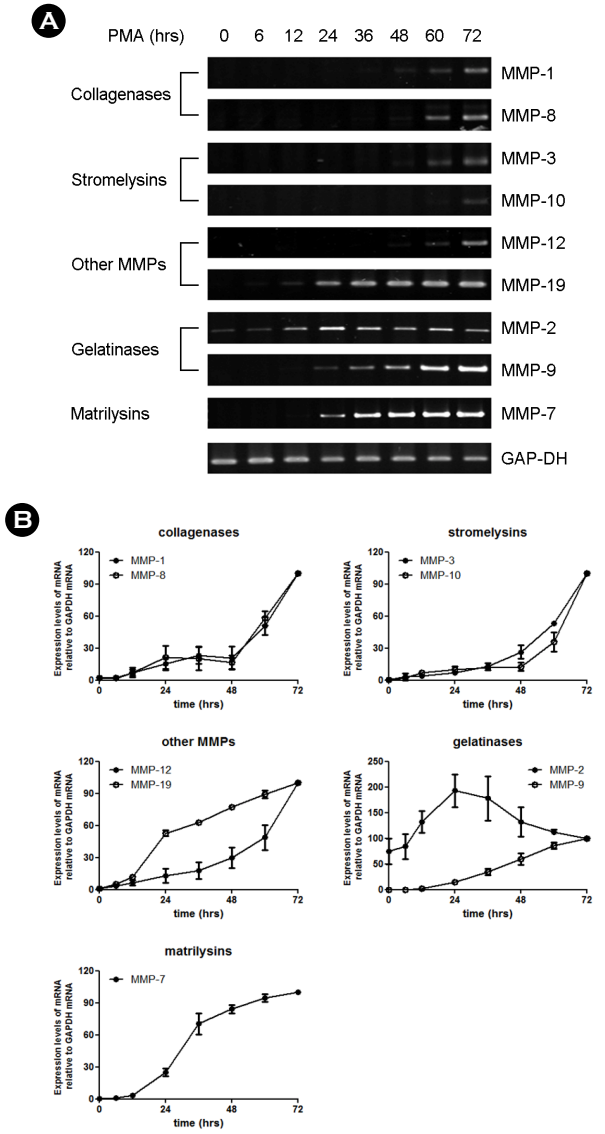

Fig. 2. Time-dependent expression of MMPs during PMA-induced differentiation of THP-1 cells. (A) THP-1 cells were differentiated with PMA (200 nM) for the indicated times (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 or 72 hrs). Total RNA was extracted and cDNA was prepared. PCR analysis was performed using MMP-specific primers. The PCR products were resolved on a 2% agarose gel. GAP-DH was used as an internal control. (B) Densitometric analysis. Data are expressed as the mean ± SD and are presented as the expression levels of MMPs mRNA relative to GAP-DH mRNA. The mRNA expression level of MMPs relative to GAP-DH in THP-1 cells treated with 200 nM PMA for 72 hrs was set as 100. Data are from three independent experiments.

1 세포에 200 nM의 PMA를 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 classical PKC 억제제인 RO-31-7549를 처리하고 24시간 배양한 후 MMPs 발현 변화를 확인하였다. 예상과 다르게 PKC 활성을 억제할 경우에도 PMA에 의한 MMPs 발현에는 아무 변화가 없었다 (Fig. 3). 본 연구 결

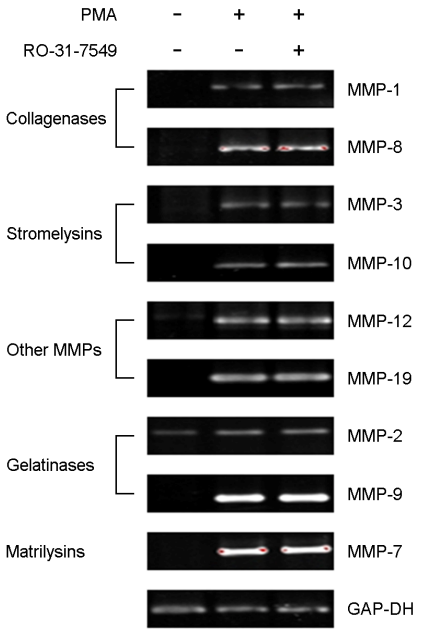

Fig. 3. PKC is not involved in PMA-induced increase of MMPs expression. THP-1 cells were differentiated with PMA (200 nM) for 48 hrs and then treated with 50 nM RO-31-7549 (inhibitor specific for PKC) for another 24 hrs. cDNA was synthesized and PCR performed using MMP-specific primers. The PCR products were resolved on a 2% agarose gel. GAP-DH was used as an internal control.

과를 통해 THP-1 세포의 대식세포로의 분화 과정에서 PMA에 의한 MMPs 발현 증가를 매개하는 신호전달체계에 PKC는 관여하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

PMA 처리에 의한 단핵구 분화 과정에서 MEK-1 의존적 신호전달과정을 통해 MMPs 발현 증가

PMA에 의한 THP-1 세포의 대식세포로의 분화 시 야기되는 MMPs의 발현 증가와 연관된 신호전달체계 단백질을 규명하기 위하여 각종 신호전달물질에 대한 억제제를 이용하여 실험을 진행하였다. THP-1 세포에 200 nM의 PMA를 48시간 동안 처리한 뒤 각종 신호전달물질 특이적 억제제를 처리하고 24시간 배양 후 MMPs 발현 양상을 RT-PCR 방법으로 확인하였다. cRAF-1에 대한 억제제인 GW 5074와 PLC 억제제인 U 73122를 처리 시에는 PMA에 의한 MMPs의 발현 증가에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 하지만 collagenases (MMP-1, -8), stromelysins (MMP-3, -8), 그리고 기타 MMPs 아형 그룹 중 MMP-12와 같은 경우, MEK1에 대한 억제제인 PD 98059를 처리하면 PMA에 의한 발현 증가가 대부분 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 MMP-19, MMP-9,

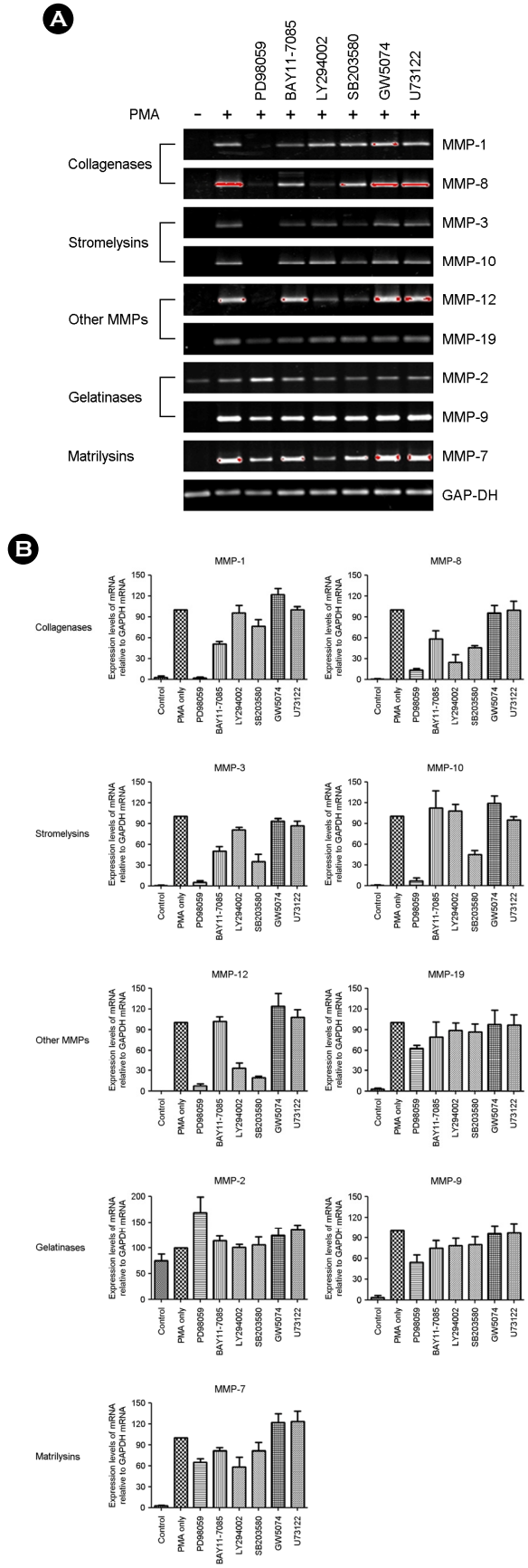

Fig. 4. PMA-induced upregulation of most MMPs is mediated by the MEK-1 pathway. (A) THP-1 cells were incubated with PMA (200 nM) for 48 hrs and then treated with inhibitors PD 98059 (50 μM), BAY 11-7085 (10 μM), Ly 294002 (10 μM), SB 203580 (20 μM), GW 5074 (0.5 μM), or U 73122 (50 ng/ml) for another 24 hrs. cDNA was prepared from total RNA extracts and subjected to PCR to amplify MMPs. The PCR products were resolved on a 2% agarose gel. GAP-DH was used as an internal control. (B) Densitometric analysis. Data are expressed as the mean ± SD and are presented as the expression levels of MMPs mRNA relative to GAP-DH mRNA. The mRNA expression level of MMPs relative to GAP-DH mRNA in PMA-treated cells without treatment with inhibitors was set as 100. The data represent results from three independent experiments.

MMP-7의 경우에도 PD 98059 처리 시 PMA 처리에 의한 발현이 일부 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 이러한 결과를 통하여 MMP-2를 제외한 MMPs은 PMA 처리에 의한 발현 증가가 MEK1 관련 신호전달체계를 통해 이루어짐을 확인할 수 있었다. collagenases (MMP-1, -8)의 경우, NF-κB 특이 억제제인 BAY 11-7085 처리 시 PMA에 의한 MMPs 발현이 일부 감소하는 것이 관찰되었고 stromelysins (MMP-3, -10)은 p38 MAPK 특이 억제제인 SB 203580 처리 시 PMA 처리에 의한 MMP 증가가 억제됨을 확인하였다 (Fig. 4). 또한 MMP-8과 MMP-12는 PI3-K 특이 억제제인 LY 294002 처리 시 PMA에 의한 발현이 억제되는 경향을 확인하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 PMA의 자극에 의한 MMPs 발현이 MEK1 관련 신호전달체계 이외에 NF-κB, p38 MAPK, PI3-K 등의 신호전달물질에 의해 매개 됨을 보여주며 또한 관련된 신호전달물질이 일부 MMPs 아형 그룹에서는 공통적으로 관여함을 보여주고 있다.

고 찰

말초 혈액 내 단핵구에도 일부 MMPs가 낮은 수준으로 발현되며 lipopolysaccharide (LPS)나 염증성 사이토카인 (inflammatory cytokine)에 의한 자극에 의해서 일부 MMPs 발현 양상이 변하는 것이 보고되고 있다 (Andrew, 2008). 이와 더불어 기저막 (basement membrane) 등의 세포 외 기질과 접촉하면 일부 MMPs 발현 및 분비가 더욱 활성화되며 이렇게 분비된 활성 MMPs에 의한 세포 외 기질 분해가 단핵구의 조직 내 이동에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다. 또한 조직으로 이동한 단핵구가 대식세포로 분화되면서 일부 MMPs의 발현 양상이 변한다는 보고도 있다. 본 실험에서는 THP-1 세포에 PMA를 처리

하여 단핵구를 대식세포로 분화시키는 과정에서 세포막 결합 MMP 아형 그룹을 제외한 대부분의 MMP 발현 양상이 어떻게 변하는지 확인하였다.

PMA 처리에 의해 단핵구에서 대식세포로 분화함에 따라 MMP-2를 제외한 대부분의 MMPs 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, 2). collagenases와 stromelysins 등의 아형 그룹에 같이 속해있는 MMPs는 PMA 처리 시간에 따른 발현 증가 양상이 비슷한 패턴을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 PMA 처리 시 조기에 발현 증가를 보이는 MMP (MMP-19, 9, 7)와 더 시간이 경과해야 발현이 증가하는 MMP (MMP-1, 8, 3, 10, 12) 등을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 기초로 MMPs 활성 시에 단계적으로 MMPs가 활성화되어 먼저 활성화된 MMPs가 다른 MMPs를 연쇄적으로 활성화시켜 세포 외 기질의 분해를 촉진시킬 가능성을 추론할 수 있다. MMP-2가 다른 MMPs와는 달리 단핵구 상태에서도 지속적으로 발현 (Fig. 1, 2)되는 것 또한 이러한 가능성을 설명할 수 있는 이유로 사료된다. 이전의 보고에 의하면 MMP-2는 불활성화 상태의 MMP-1, -2, -13 등을 활성화시키는 것으로 알려져 있는데 (Magnus et al., 2010) 단핵구에 발현되어 있는 MMP-2가 대식세포로의 분화 시 먼저 발현된 MMP-19, 9, 7을 활성화하고 이렇게 활성화된 MMP가 나중에 발현되는 MMP-1, 8, 3, 10, 12 등을 활성화 할 가능성도 추론해 볼 수 있다. 보고에 의하면 동맥경화증의 경우, 동맥경화 병변에 침윤된 면역세포에서 MMP-1, MMP-2, MMP-9 등의 발현이 증가된다고 알려져 있으며 (Magnus et al., 2010) 이러한 MMPs 발현의 증가는 collagen과 같은 세포 외 기질을 분해하며 동맥경화증의 발달과 관련된 면역세포의 침윤을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 결과로 유추하면 동맥경화 발달 시 단핵구가 대식세포로 분화하고 분화된 대식세포는 MMPs 발현이 증가하고 이렇게 증가된 MMPs에 의해 동맥경화 병변으로의 이동이 촉진될 가능성을 제시할 수 있다.

본 연구에서는 PKC 활성물질로 알려진 PMA를 이용하여 단핵구를 대식세포로 분화 유도하여 MMPs의 발현 양상을 확인하였다. 따라서 PKC 활성 억제제 처리 시 PMA 처리에 의한 MMPs의 발현에 영향이 있을 것이라 예상을 하였다. 하지만 PKC의 활성을 억제하였음에도 불구하고 MMPs 발현에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 3). 이 결과로 단핵구에서 대식세포로 분화 유도 시 나타나는 MMPs의 발현 증가에 PKC는 관여하지 않으며 따라서 다른 세포신호전달체계의 관여 여부를 확인할 필요성이 제시되었다. 따라서 다양한 신호전달물질에 특이적으로 작용하는 억제제를 사용하여 PMA 처리에 의한 MMPs 발현에 관여하는 신호전달체계를 조사하였으며 그 결과 PMA 처리에 의한 MMPs의 발현과 관련된 신호전달체계가 MMP 별로 다소 차이가 있으나 공통적으로 MEK1을 매개로 신호전달이 이루어짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이것은 대식세포로 분화 시 MEK1을 경유하는 신호전달체계에 의해 MMPs 발현이 증가한다는 것을 보여주는 결과이다. 따라서 대식세포의 MEK1을 선택적으로 억제하는 물질을 발굴, 환자에 처리하면 동맥경화 병변으로의 대식세포 이동을 감소시켜 동맥경화 발달이 억제될 가능성도 추론해 볼 수 있다.

MMPs가 염증성 질환, 종양 발달 등 각종 질환 발병에 관여한다는 사실이 최근 지속적으로 보고되고 있고 따라서 대식세포를 포함한 각종 세포에서 MMPs 발현, 활성화, 기능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구 결과가 염증성 질환 등에 중요한 역할을 하는 단핵구 및 대식세포에서의 MMPs 발현 조절 및 기능 연구에 대한 기초자료로 활용될 것으로 기대한다.

Acknowledgements

이 논문은 2011년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 해외우수연구기관 유치사업 연구임 (2011-00263).

REFERENCES

Amorino GP, Hoover RL. Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. Am J Pathol. 1998. 152: 199-207.

Andrea S, Ulrike K, Michaela K, Johannes D, Sonja F, Jelena A. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. BMC Cancer. 2010. 10: 553 -564.

Andrew CN. Metalloproteinases expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008. 28: 2108 -2114.

Ardans JA, Economou AP, Martinson JM, Zhou M, Wahl LM. Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes. J Leukoc Biol. 2002. 71: 1012-1018.

Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I, Pennington CJ, Bourgoin P, Edwards DR, Yong VW. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. Brain. 2003. 126: 2738-2749.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002. 3: 207-212.

Deryugina EL, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2006. 25: 9-34.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002. 2: 161 -174.

Fanjul-Ferna´ndez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lo´ pez-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. Biochim Biophys Acta. 2010. 1803: 3-19.

Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NES, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. J Biol Chem. 2000. 275: 25766-25773.

Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. Br J Cancer. 2003. 89: 1817-1821.

Lendon CL, Davies MJ, Born GVR, Richardson PD. Atherosclerotic plaque caps are locally weakened when macrophage density is increased. Atherosclerosis. 1991. 87: 87-90.

Magnus B, Daniel FJK, Stefan A. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis. Progress i Cardiovascular Diseases. 2010. 52: 410-428.

Matias-Roman S, Galvez BG, Genis L, Yanez-Mo M, de la Rosa G, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in migration of human monocytes and is regulated through their interaction with fibronectin or endothelium. Blood. 2005. 105: 3956-3964.

Moreno MJ, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. Circulation. 1994. 90: 775-778.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006. 69: 562-573.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007. 8: 211-233.

Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2004. 4: 617-629.

Pollette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Crit Rev Oncol Hematol. 2004. 49: 179-186.

Santiago R, Michel K, Leszek K, Gary AR, Diane MJ. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous physiology. J Neurosci. 2010. 30: 15337-15357.

Schafers M, Schober O, Hermann S. Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques. J Nucl Med. 2010. 51: 663-666.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Atkinson E, Levesque E, Herman M, Graber P, Basset P, Libby P. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: Regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and *in vivo*. J Exp Med. 1999. 189: 843-853.

Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. J Pathol. 2003. 200: 448-464.

Ugalde AP, Ordo'n˜ez GR, Quiro' s PM, Puente XS, Lo' pez-Otín C. Metalloproteases and the degradome. Methods Mol Biol. 2010. 622: 3-29.

Van Leeuwen RL, Dekker SK, Arbiser JL, Vermeer BJ, Bruijn JA, Byers HR. Phorbol ester induced rapid attachment and spreading of melanoma cells and the role of extracellular matrix proteins. J Int du Cancer. 1994. 57: 894-900.

Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer. 2002. 99: 157-163.

Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix Metalloproteinase-9 (92 Kda Gelatinase Type-Iv Collagenase) from U937 Monoblastoid Cells - Correlation with Cellular Invasion. J Cell Sci. 1993. 104: 991-999.

Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM, Goldberg GI. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. J Clin Invest. 1990. 86: 1496-1502.

Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 1999. 13: 781-788.

Whatling C, Bjork H, Gredmark S, Hamsten A, Eriksson P. Effect of macrophage differentiation and exposure to mildly oxidized LDL on the proteolytic repertoire of THP-1 monocytes. J Lipid Res. 2004. 45: 1768-1776.