

글루타민 결핍에 따른 Tight Junction 및 MMPs 활성 조절을 통한 전립선 암세포의 침윤 억제 현상

신동역¹ · 최영현^{2*}

¹동남권원자력의학원

²동의대학교 한의과대학 생화학교실, 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터

Glutamine Deprivation Inhibits Invasion of Human Prostate Carcinoma LnCap Cells through Inactivation of Matrix Metalloproteinases and Modulation of Tight Junctions

Dong Yeok Shin¹ and Yung Hyun Choi^{2*}

¹Dongnam Institute of Radiological & Medicine Sciences, Busan 619-953, Korea

²Dept. of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Donggeui University, Busan 614-052, and Anti-Aging Research Center and Blue-Bio Industry RIC, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

ABSTRACT Cancer cells exhibit increased demand for glutamine-derived carbons to support anabolic processes. Indeed, the spectrum of glutamine-dependent tumors and the mechanisms through which glutamine supports cancer metabolism remain areas of active investigation. In the present study, we investigated the effects of glutamine deprivation on the correlation between tightening of tight junctions (TJs) and anti-invasive activity in human prostate carcinoma LnCap cells. Glutamine deprivation markedly inhibited cell motility and invasiveness in a time-dependent manner. The anti-invasive activity of glutamine deprivation was associated with an increased tightness of the TJ, which was demonstrated by an increase in transepithelial electrical resistance (TER). The activities of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were inhibited in a time-dependent fashion by glutamine deprivation, which was correlated with a decrease in expression of their mRNA and proteins and up-regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) expression. Furthermore, glutamine deprivation repressed the levels of the claudin family members, which are major components of TJs that play a key role in the control and selectivity of paracellular transport. Moreover, the levels of E-cadherin, a type I transmembrane glycoprotein, and snail, an epithelial to mesenchymal transition regulator and zinc finger transcription factor, were markedly modulated by glutamine deprivation. Taken together, these findings suggest that TJs and MMPs are critical targets of glutamine deprivation-induced anti-invasion in human prostate carcinoma LnCap cells.

Key words: glutamine deprivation, LnCap, invasion, tight junction, matrix metalloproteinase

서 론

항암치료 적용을 위한 방사선 및 약물 요법의 발달로 암 환자의 수명과 삶의 질이 현저히 개선된 것은 사실이나 아직까지 암에 의한 사망률이 높은 편이며, 이러한 사망의 주된 원인은 암세포의 전이(metastasis)이다. 따라서 암세포 전이의 가장 기본적인 단계인 암세포의 이동(migration)이나 침윤(invasion)을 억제하는 기전의 규명이나 효과적인 치료 약물 개발이 많은 연구자들의 주된 표적이 되고 있다. 암세포의 침윤과 전이는 매우 복잡적이고 연속적인 분자적 기전들에 의해 유발된다고 알려져 있으며, 특히 암세포에서부터 분비되는 단백질 분해효소에 의해서 빠른 시간 내에 세포의

기질(extracellular matrix)의 파괴가 이루어지는 것이 특징이다(1). 대표적인 기질 단백질 분해효소에는 serine protease, cystein protease 그리고 matrix metalloproteinases(MMPs) 등이 알려져 있으며, 이들은 암세포의 침윤과 전이뿐만 아니라 신생혈관 형성 등에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2,3). 특히 암의 전이에서 암세포의 기질로의 침윤은 전이 초기에 가장 중요한 단계로 인식되어지고 있다(4).

세포와 세포사이의 연결 요소 중 tight junction(TJ)은 apical intercellular junction으로써 상피세포의 극성(epithelial polarity)과 세포막의 선택적 투과 기능의 유지에 매우 중요한 역할을 한다(5). 특히 초기 암의 진행과 전이에서 TJ의 변화와 소실이 동반되는데, 예를 들면 TJ을 감싸는 transmembrane 단백질인 claudins-1과 -7은 어떤 전이성 암세포에서 그 발현이 저해되지만 반대로 유방암을 포

Received 17 April 2013; Accepted 8 May 2013

*Corresponding author.

E-mail: choiyh@deu.ac.kr, Phone: 82-51-850-7413

함한 다른 많은 암 조직에서 claudin-3과 -4 발현은 현저히 증가되어 있다(6,7). 그러나 이러한 TJ 단백질의 발현조절은 암 발생 과정의 부가적 결과라기보다 오히려 암의 진행과 전이에 원인적 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(8).

한편 MMPs는 활성 부위에 아연을 포함하는 구조적으로 유사한 일군의 단백질분해효소로서 세포외 기질을 분해하는 기능을 나타내며 정상적인 상태에서는 상처 치유나 조직재생 과정에 관여한다. 이들은 모두 전구효소(proenzyme)의 형태로 발현된 후 일부분의 단백질이 잘려나가면서 활성화되고 각각의 MMPs는 종류에 따라 기질특이성을 나타낸다. 또한 MMPs의 생성은 유전자발현 단계에서 엄격히 조절되며, 일단 활성화되면 비특이적 단백질분해효소 저해제나 조직 특이적 MMP 저해제에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다(9,10). MMPs 중 특히 gelatinase type에 속하는 MMP-2와 MMP-9는 암세포의 침윤과 전이에 가장 중요한 요소로서 인식되어져 있으며(11,12), MMPs의 활성화는 inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)와의 stoichiometric 복합체 형성을 통하여 억제되어진다(9,13).

다양한 체내 아미노산 중 가장 풍부하게 존재하는 비필수 아미노산으로 blood-brain 장벽을 관통할 수 있는 글루타민(L-glutamine)은 질소의 교환과 pH 항상성을 유지에 중요한 기질로서 작용한다(14). 흥미롭게도 많은 암환자의 혈액 내에서 글루타민의 함량이 상대적으로 급격히 저하되어 있는 것으로 보고되어지고 있는데, 이는 글루타민의 보충은 암 치료에 간접적으로 사용될 수 있음을 의미하여 주며, 세포 내 미토콘드리아 tricarboxylic acid 회로의 기능 회복에 결정적인 영향을 미칠 것으로 기대되고 있다(15,16). 예를 들어 글루타민이 결핍된 조건 하에서 Fas는 암세포의 apoptosis를 유도하지만, 글루타민의 존재 하에서는 세포의 사멸을 강력히 저해하였음이 보고된 바 있으며(17), 암화학요법이나 방사선에 의해 상처를 받은 대장이나 소장 치료에 글루타민이 이용되기도 하며 다양한 고형암에서도 암세포 성장저해효과가 확인된 바 있다(18). 그러나 글루타민의 세포 내 존재 여부에 따른 세포 내 신호전달과정이 암세포의 종류 및 genetic background에 따라 다르게 나타나고 있으며, 특히 암세포의 전이과정에 미치는 글루타민의 역할에 대해서는 잘 알려진 바 없으므로 이에 관한 연구가 절실히 요구되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 글루타민 결핍이 인체 전립선 암세포의 이동성과 침윤성에 미치는 영향을 조사하였으며, 침윤성 억제 효과에 대한 생화학적 기전의 해석을 TJs의 기능과 MMPs의 활성 조절 중심으로 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

세포 배양

본 실험에 사용한 LnCaP 인체 전립선암세포는 Amer-

ican Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 분주 받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)에 1%의 penicillin 및 streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

글루타민 결핍이 LnCaP 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 6-well plate에 LnCaP 세포를 1×10⁵ cells/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음, 글루타민이 결핍된 RPMI-1640 배지로 교체하였다. 적정 시간 경과 후 상층액을 제거하고 0.05% trypsin-EDTA(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline(PBS)과 0.5% trypan blue solution(Gibco BRL)을 각 well 당 1 mL 씩을 동량으로 첨가하여 2분 간 처리하였다. 처리된 sample을 hemocytometer에 적용한 후 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 살아있는 세포를 계수하여 상대적 수치로 비교하였다.

유세포 분석기를 이용한 세포주기 분석

적정 시간 글루타민이 결핍된 배지에서 배양된 LnCaP 세포들을 원심 분리하여 모은 후, Cycletest™ Plus DNA Reagent kit(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하고 4°C, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry(BD Bioscience)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT(BD Bioscience) 프로그램으로 분석하였다.

암세포 이동성 억제 여부조사

글루타민 결핍이 LnCaP 세포의 이동성을 억제하는지의 여부를 조사하기 위하여 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 razor blade를 이용하여 5 mm 정도의 폭으로 세포를 제거하고 PBS 용액으로 수세한 다음 글루타민이 결핍된 배지로 교체하여 적정 시간 배양하였다. 준비된 세포들을 도립 현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

Trans-endothelial resistance(TER)의 측정

글루타민 결핍 조건에서 배양된 LnCaP 세포들의 TER은 EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter(World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 invasion assay kit(BD Biosciences, Bedford, MA, USA)에서 측정하였으며, upper chamber에는 current-passing electrodes를 넣고, lower chamber에는 current-passing electrodes를 넣은 후 EVOM 2000 Ω에서 측정하였다(19).

세포 침윤 억제 여부 조사

글루타민 결핍에 의한 LnCaP 세포의 침윤성 변화를 확인

하기 위하여 3.5 mm 직경의 8 µm pores를 가진 poly-carbonate filter를 내장한 trans-well culture chamber (BD Bioscience, Heidelberg, Germany)를 사용하였다. 침윤성 측정을 위하여 필터 위에 50 µL의 matrigel을 도포시킨 다음 37°C에서 2시간 반응시켜 코팅 되도록 하였다. Serum free된 세포 부유액을 upper chamber에 넣고 lower chamber에는 20% serum이 함유된 배지를 넣은 후 글루타민 결핍 배지를 chamber에 처리하였다. 적정 시간 후 upper chamber의 matrigel을 통과하지 못한 세포를 면봉으로 닦아내고 통과된 세포를 100% 메탄올에 2분 동안 고정한 다음 hematoxylin(Sigma-Aldrich)을 이용하여 4분 동안 염색하였다. 염색이 끝난 후 filter를 떼어내어 슬라이드 글라스에 놓고 말린 다음 crystal mount solution(Sigma-Aldrich)을 처리하고 도립현미경을 이용하여 200배의 배율로 관찰하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

적정 시간 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 LnCaP 세포를 대상으로 TRIzol® reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 해당 유전자들의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR Premix kit(iNtRon, Seongnam, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물

들의 양적 차이를 확인하기 위하여 1× TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각 primer(Table 1)에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

동일 조건에서 배양된 세포에 적당량의 lysis buffer[25 mM tris-Cl pH 7.5, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 원심분리하여 상층액에 있는 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량 한 다음 동량의 sample을 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 각각의 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA,

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequences
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
MMP-2	Sense	5'-CTT CTT CAA GGA CCG GTT CAT-3'
	Antisense	5'-GCT GGC TGA GTA GAT CCA GTA-3'
MMP-9	Sense	5'-TGG GCT ACG TGA CCT ATG ACC AT-3'
	Antisense	5'-GCC CAG CCC ACC TCC ACT CCT C-3'
TIMP-1	Sense	5'-TGG GGA CAC CAG AAG TCA AC-3'
	Antisense	5'-TTT TCA GAG CCT TGG AGG AG-3'
TIMP-2	Sense	5'-GTC AGT GAG AAG GAA GTG GAC TCT-3'
	Antisense	5'-ATG TTC TTC TCT GTG ACC CAG TC-3'
Snail	Sense	5'-TAT GCT GCC TTC CCA GGC TTG-3'
	Antisense	5'-ATG TGC ATC TTG AGG GCA CCC-3'
E-cadherin	Sense	5'-GAA CAG CAC GTA CAC AGC CCT-3'
	Antisense	5'-GCA GAA GTG TCC CTG TTC CAG-3'
Claudin-1	Sense	5'-TCA GCA CTG CCC TGC CCC AGT-3'
	Antisense	5'-TGG TGT TGG GTA AGA GGT TGT-3'
Claudin-2	Sense	5'-ACA CAC AGC ACA GGC ATC AC-3'
	Antisense	5'-TCT CCA ATC TCA AAT TTC ATG C-3'
Claudin-3	Sense	5'-AAG GCC AAG ATC ACC ATC GTG-3'
	Antisense	5'-AGA CGT AGT CCT TGC GGT CGT-3'
Claudin-4	Sense	5'-TGG ATG AAC TGC GTG GTG CAG-3'
	Antisense	5'-GAG GCG GCC CAG CCG ACG TA-3'

USA)를 처리하여 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 enhanced chemiluminescence(ECL) solution(Amersham Life Science Corp.)을 적용시켜 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양을 분석하였다.

In vitro MMP 활성 측정

글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 세포들의 MMP 활성을 MMP Gelatinase Activity Assay kit(Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA)를 사용하여 조사하였다. 이를 위하여 적정량의 세포 배양액을 biotinylated gelatinase 기질과 혼합하여 세포 배양액에 존재하는 활성형 MMP-2 및 MMP-9에 의한 기질의 분해를 유도하였다. 분절된 기질들을 biotin-binding 96-well plate로 옮겨 biotin이 결합된 기질이 plate에 결합하도록 37°C에서 30분간 반응시켰다. 분절되었으나 결합되지 않은 기질은 제거하고, 분절되지 않은 biotin이 결합된 gelatinase에 streptavidin-enzyme complex를 첨가하여 발색 반응을 시킨 후 540 nm 조건에서 활성의 정도를 비교하였다(20).

통계 처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot을 이용하여 Student's *t*-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다.

결 과

글루타민 결핍에 의한 LnCaP 세포의 증식 억제

LnCaP 인체 전립선암세포의 증식에 미치는 글루타민의 존재 여부를 조사하기 위하여 정상배지에서 24시간 배양된 LnCaP 세포의 배지를 글루타민이 결핍된 배지로 교체하여 적정 시간 동안 처리한 후 hemocytometer를 사용하여 살아있는 세포의 수를 비교하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 글루타민이 결핍된 배지에서 배양된 시간의 경과에 따라 생존된 상대적인 세포의 수가 유의적으로 감소되어 72시간 후에는 약 60% 이상의 증식 억제 효과를 보였다. 이러한 증식의 억제 효과가 세포주기 변화에 미치는 영향을 조사해 본 결과, 글루타민 결핍에 따른 sub-G1기에 해당되는 세포의 빈도, 즉 apoptosis가 유발된 세포의 빈도가 현저하게 증가되었으며, G1기 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 상대적으로 감소되었다(Fig. 2A).

글루타민 결핍에 의한 LnCaP 세포의 이동성 억제

글루타민 결핍 조건에서 생존된 세포들의 이동성 변화 여부를 조사하기 위하여 wound healing assay를 실시하였다.

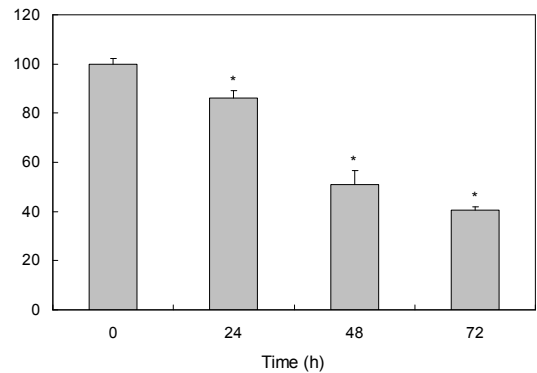


Fig. 1. Glutamine deprivation inhibits cell proliferation in human prostate carcinoma LnCap cells. Cells were seeded into 6-well plate at 1×10^5 cells/mL and incubated in the normal medium. After 24 h incubation, the media was changed to glutamine-free media and the cells were collected at the indicated times, and then the cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. The data shown are means±SD of three independent experiments. Significance was determined using a Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

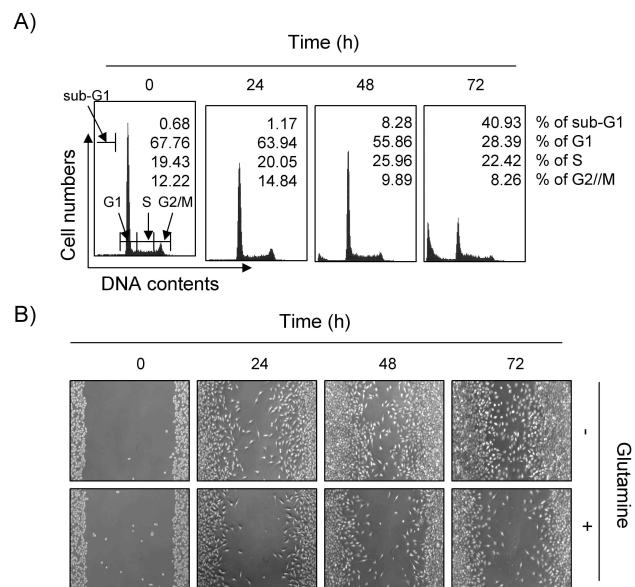


Fig. 2. Glutamine deprivation induces apoptosis and inhibits cell motility in LnCaP cells. (A) Cells were incubated in glutamine-free medium for the indicated times as indicated Fig. 1. To quantify the degree of apoptosis induced by glutamine deprivation, the cells were evaluated for sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, using a flow cytometer. Results are given as mean of two independent experiments. (B) Cells were grown to confluency on 30-mm cell culture dishes a scratch was then made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, glutamine- and serum-free medium (to prevent cell proliferation) was added for the indicated times. Photographs of the wounded area were taken for evaluation of cell movement into the wounded area.

Fig. 2B의 결과에서 알 수 있듯이 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 LnCaP 세포들은 대조군에 비하여 시간이 경과할수록 세포의 이동성이 현저하게 억제되었다.

글루타민 결핍에 의한 LnCap 세포의 TER 증가 및 침윤성의 억제

이상에서 관찰된 LnCaP 세포의 이동성 억제와 TER 값의 변화와의 상관성을 조사하기 위하여 TER 값을 측정 결과, Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이 글루타민이 결핍된 조건에 배양된 시간이 증가함에 따라서 TER의 값은 유의적으로 증가되었다. 또한 글루타민 결핍에 의한 LnCaP 세포의 침윤성 억제 여부를 확인한 결과, 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 시간이 증가할수록 침윤성이 유의적으로 억제되었다(Fig. 3B). 이상의 결과에서 글루타민 결핍에 의한 LnCaP 세포의 이동성 억제는 침윤성 억제와 연관성이 있었으며, 이는 TER 값의 증가, 즉 LnCaP 세포들의 TJ의 tightening의 증가와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

TIMPs 및 MMPs의 발현 및 MMPs의 활성화에 미치는 글루타민 결핍의 영향

암세포의 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MMPs와 그들의 발현을 억제하는 것으로 알려진 TIMPs

유전자의 발현에 미치는 글루타민 결핍의 영향을 RT-PCR 및 Western blotting 방법으로 조사하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 LnCaP 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현은 전사 및 번역 수준에서 글루타민 결핍 시간의 경과에 따라 매우 억제되었으나, TIMP-1 및 TIMP-2의 발현은 반대로 매우 증가되었다. 이러한 글루타민 결핍에 따른 MMPs 및 TIMPs의 발현 변화가 MMPs 효소 활성화에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 MMP gelatinase 활성을 조사한 결과, 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 시간이 증가할수록 두 단백질의 효소 활성이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과를 살펴볼 때 TIMPs의 발현 증가에 따른 MMPs 발현 및 효소활성의 억제가 글루타민이 결핍에 의한 LnCaP 세포의 침윤성 억제에 중요한 역할을 한 것으로 생각되어진다.

글루타민 결핍이 claudins의 발현에 미치는 영향

암세포의 전이와 관련한 다양한 생체 반응에 있어서 세포의 adhesion과 junction 관련 단백질의 변화에서 특히 TJ 관련 claudins 유전자의 변화가 중요하게 작용할 것으로 추정되어 글루타민 결핍 조건에서 이들 유전자들의 발현 변화

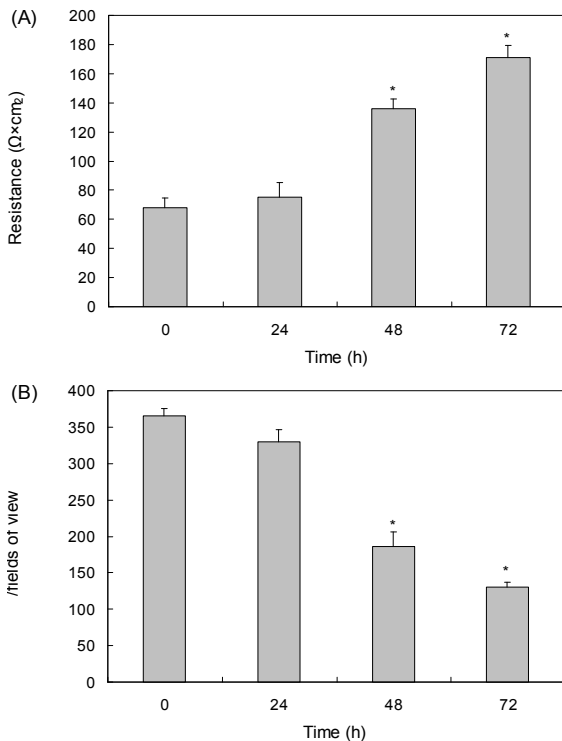


Fig. 3. Glutamine deprivation increases TER values and inhibits cell invasion in LnCap cells. (A) Cells were incubated in glutamine-free medium for the indicated times. TER values were measured using an EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter as described in Materials and Methods. (B) A matrigel invasion assay was carried out in order to determine the effects of glutamine-free on cell invasion. After incubation in glutamine-free medium for the indicated times, cells on the bottom of the membranes were fixed, stained hematoxylin and Eosin Y, and counted. Each value represents the mean±SD of the results from three independent experiments. Significance was determined using a Student's *t*-test (**P*<0.05).

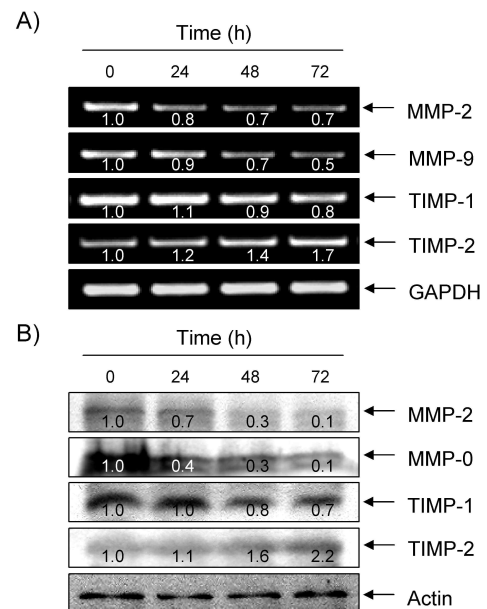


Fig. 4. Effects of glutamine deprivation on the levels of MMPs and TIMPs in LnCap cells. (A) Cells were incubated in glutamine-free media for the indicated times. Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. The numbers represent the relative densitometric analyses as compared with GAPDH (A) or actin (B) in, at a minimum, two or three different experiments.

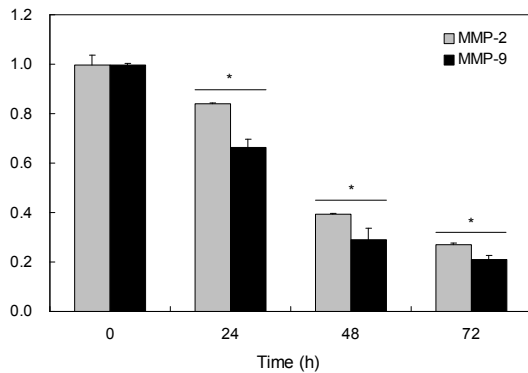


Fig. 5. Effects of glutamine deprivation on MMPs activity in LnCaP cells. After incubation in glutamine-free medium for the indicated times, *in vitro* activity of MMP-2 and MMP-9 in cell culture supernatant was measured using a MMP-2 and MMP-9 gelatinase activity assay kit. The biotinylated gelatinase substrates were cleaved by active MMPs in the samples and the fragments were added to a biotin-binding plate. The digested but unbound fragments were removed by washing. Data are mean±SD from three independent experiments and are presented as the fold change compared with vector control ($^*P<0.05$).

여부를 조사하였다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 LnCaP 세포가 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 경우, 조사된 claudin 유전자들(claudin-1, -2, -3 및 -4)의 발현양이 전사 및 번역 수준에서 모두에서 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 글루타민 결핍에 노출된 LnCaP 세포는 claudin의 발현 양을 감소시킴으로써 세포들 사이의 adhesion 및 junction의 증가를 통하여 침윤을 억제시켰을 것이라고 추측되어진다.

글루타민 결핍이 E-cadherin 및 snail의 발현에 미치는 영향

다음은 암세포의 전이에 관여하는 주요 유전자들의 전사 조절인자로서 잘 알려져 있는 snail 및 세포 골격 구성요소와 함께 세포들 사이의 유착 접합부 형성에 중요한 역할을 하는 E-cadherin의 발현에 글루타민 결핍이 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. Fig. 6에서 알 수 있듯이 글루타민 결핍 시간이 증가함에 따라서 E-cadherin의 억제자로 알려져 있는 snail의 발현이 전사 및 번역 수준에서 감소하였지만 E-cadherin의 발현은 증가되었다. 비록 이 두 유전자들이 암세포의 전이에 미치는 영향에 대하여서는 여전히 논란이 많지만, 글루타민 결핍에 노출된 LnCaP 세포에서의 상반된 발현 양상은 매우 흥미로운 결과로서 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

고찰

본 연구에서는 글루타민 결핍에 의한 암세포의 이동성 및 침윤능의 억제 유발 여부를 인체 전립선 LnCaP 세포에서 조사하였다. 특히 전립선 암세포를 사용한 이유는 다른 종류의 암세포에 비하여 글루타민의 양적 차이에 따른 침윤능의

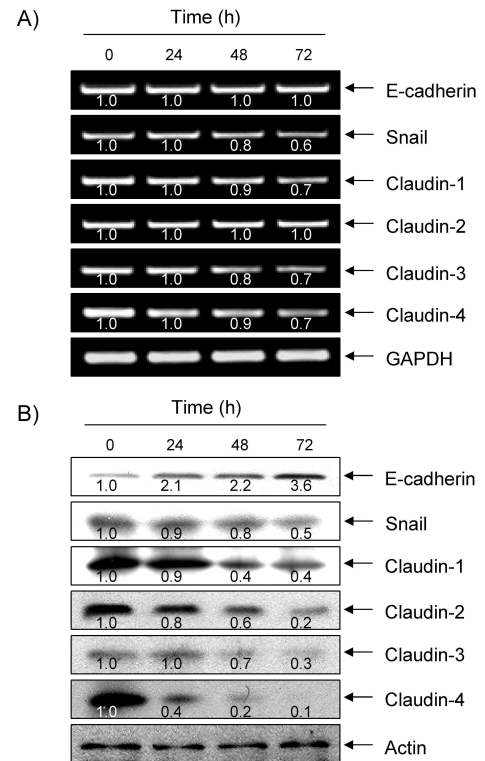


Fig. 6. Effects of glutamine deprivation on the levels of E-cadherin, snail and claudins in LnCaP cells. (A) Cells were incubated in glutamine-free media for the indicated times. Total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) The cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system. Actin was used as an internal control. The numbers represent the relative densitometric analyses as compared with GAPDH (A) or actin (B) in, at a minimum, two or three different experiments.

반응이 다양하며, 글루타민 결핍과 연관된 전립선 암세포증식 억제에서도 전립선 암세포의 종류에 따라 apoptosis 유발 반응이 현저하게 차이가 나기 때문이다(21-23). 그럼에도 불구하고 글루타민 결핍에 따른 전립선 암세포의 증식과 침윤능에 관한 기전 연구는 거의 이루어진 바가 없기 때문에 이에 관한 체계적인 자료의 제시가 절실히 요구되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 글루타민이 결핍된 조건에서 LnCaP 세포의 증식억제 여부를 확인하였으며, 이는 apoptosis 유발 빈도를 의미하는 세포주기 sub-G1기 빈도의 증가와 연관성이 있었다. 아울러 글루타민 결핍 조건에서 생존된 LnCaP 세포의 이동성과 침윤능이 억제되었으며, 이는 TJ의 tightening 증가 및 MMPs 활성 억제와 연관성이 있었다. 이를 위하여 글루타민이 결핍된 조건에서 LnCaP 세포의 증식억제 여부를 확인하였으며, 이는 apoptosis 유발 빈도를 의미하는 세포주기 sub-G1기 빈도의 증가와 연관성이

있었다. 아울러 글루타민 결핍 조건에서 생존된 LnCaP 세포의 이동성과 침윤능이 억제되었으며, 이는 TJ의 tightening 증가 및 MMPs 활성 억제와 연관성이 있었다.

세포 외 기질의 항상성은 MMPs로 알려진 단백분해효소와 그와 관련된 내분비 억제인자 TIMPs의 작용에 의해 유지된다. MMPs는 신체의 결합조직의 항상성을 섬세하게 조절하지만, 종양, 관절염 및 심혈관 질환과 같은 병적인 상태에서는 MMPs의 미세한 조절기능이 붕괴되어 광범위한 세포 외 기질의 분해 및 재구성이 발생하는 것으로 알려져 있다(11,13). 정상조직에서는 MMPs와 TIMPs의 발현이 균형을 이루고 있어 기저막의 분해 대사가 적절히 조절되고 있지만 종양세포에서는 MMPs의 증가와 함께 TIMPs의 감소가 유발되어지고, 이러한 불균형에 의하여 암세포의 전이에 중요한 영향을 미친다(3,12). 그중 TIMP-1은 활성형의 interstitial collagenases, stromelysins, gelatinases인 MMP-2 및 MMP-9와 복합체를 형성함으로써 MMP-2 및 -9의 분해능을 억제하며, TIMP-2는 TIMP-1과 밀접한 연관성을 가지며 활성형의 MMP-2와 가장 강력한 결합력을 보인다(24,25). 일반적으로 MMPs는 대부분의 악성 종양에서 높게 발현되며 종양의 침윤과정에서 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있으며, 특히 Type IV collagenase인 MMP-2 및 MMP-9는 금속이온을 cofactor로 요구하는 효소로서 암세포의 전이와 침윤이 유발될 경우 기저막을 분해하여 암세포의 전이, 침윤 및 신생혈관 형성을 활성화시킴으로써 암세포 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(12,25,26). 따라서 글루타민 결핍 조건에서 암세포의 전이와 침윤에 중요하게 작용을 하는 MMPs와 TIMPs가 어떠한 변화가 유발되는지를 확인한 결과, LnCaP 세포에서 글루타민 결핍의 조건이 길어질수록 전사 및 번역수준에서 TIMP-1 및 TIMP-2의 발현 증가와 함께 MMP-2 및 MMP-9의 발현 감소가 증가하였으며, MMP-2 및 MMP-9의 효소활성 또한 감소되었다(Fig. 4, 5). 이는 글루타민의 결핍된 조건에서 배양된 LnCaP 세포는 이들 발현의 변화를 유도하여 세포의 이동과 침윤을 억제하였을 것이라 추측된다.

또한 다양한 세포 간 결합인자들 중, 상피조직의 apical side에 형성되는 TJs는 혈액-조직 사이의 확산 장벽을 형성하여 조직 특이적 특수 환경 조성에 중요한 역할을 한다. Claudin family에 속하는 단백질들은 TJs의 integral membrane protein의 일종으로 paracellular permeability barrier 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다(5,27). 암세포의 전이와 관련한 다양한 생체 반응 중 세포의 adhesion과 junction 관련 단백질의 변화에서 특히 TJs와 관련된 claudins 단백질의 변화가 중요하게 작용할 것으로 추정되어 글루타민의 결핍이 이들 유전자들의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 글루타민 결핍 조건 하에서 배양된 LnCaP 세포의 claudins의 발현 양이 시간 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 이는 글루타민 결핍이 종양세포의 TJs와 밀접한 연관성이 있는 claudins의 발현을 억제함으로써

TJs의 치밀성을 높인 것으로 생각되어진다. 한편 snail family는 4~6개의 zinc-finger 구조를 가지며, 전사인자 단백질질을 암호화하는 유전자로서 좌우 축 형성에 관여하고 배아초기에 표피세포에서 중배엽으로의 전이, 신경발생 및 세포의 운동성 조절 등과 같은 형태 형성과 분화과정에 관여한다(28,29). 또한 많은 암세포에서 snail이 과발현 되어 있기 때문에 snail family의 암 악성화에 대한 중요성이 주목받고 있는데, snail family 단백질은 전사억제인자로 알려져 있으며, 상피성 암세포에서 부착에 관여하는 E-cadherin이나 occludin 등의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다(30, 31). E-cadherin은 세포질에 존재하는 catenin 단백질과 복합체를 형성하는데, 이 복합체 역시 세포 골격 구성요소와 함께 세포간 유착 접합부 형성에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 암세포의 침윤 조절의 핵심인자로 알려져 있다(32, 33). 따라서 글루타민 결핍 조건이 snail 및 E-cadherin의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 결과, 전사 및 번역수준에서 글루타민의 결핍 조건에서 배양된 시간이 증가함에 따라 E-cadherin의 발현은 전사 및 번역 수준에서 감소하였으나, snail의 발현은 점차 감소되었다(Fig. 6). 이는 LnCaP 세포에서 글루타민 결핍이 E-cadherin 및 snail의 발현을 상반되게 조절함으로써 이동성과 침윤능을 억제하는 것으로 생각되어지지만 이에 대한 구체적인 상관관계에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

암세포를 포함한 생체 내 빠른 분열을 요구하는 세포 집단에서 세포 내 구성요소 및 에너지원으로서 글루타민의 요구량이 증대되지만, 종양세포의 글루타민 의존적 대사작용에 관한 기전은 여전히 잘 알려지지 않았다. 본 연구에서는 LnCaP 전립선 암세포의 이동성 및 침윤성에 미치는 글루타민 결핍 효능을 조사하였다. 본 연구의 결과에 의하면 LnCaP 세포에서 글루타민 결핍에 의하여 세포의 이동성 및 세포의 침윤성이 현저하게 억제되었으며, 이러한 이동성 및 침윤성 억제는 TIMPs의 발현 증대에 의한 MMPs의 발현 감소 및 그들의 효소적 활성 저하와 연관성이 있었다. 또한 글루타민이 결핍된 조건에서 배양된 LnCaP 세포에서 TER의 현저한 증가가 관찰되었는데, 이는 TJs의 조절인자인 claudin family 발현의 차단에 의한 것으로 생각되어진다. 본 연구의 결과에 의하면 암세포의 증식에서 글루타민의 결핍은 TJ의 결합력 증대와 MMPs의 활성을 저하시킴으로써 암세포 전이에 가장 기본적인 과정인 암세포의 이동성과 침윤성을 억제시킬 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(2010-0008843, 2012-0000476)의 지원으로

이루어졌습니다.

REFERENCES

- Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80: S1529-S1537.
- Chambers AF, Matrisian LM. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89: 1260-1270.
- Roeb E, Matern S. 2001. Matrix metalloproteinases: Promoters of tumor invasion and metastasis—A review with focus on gastrointestinal tumors. *Z Gastroenterol* 39: 807-813.
- Leber MF, Efferth T. 2009. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 34: 881-895.
- Morin PJ. 2005. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 65: 9603-9606.
- Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA. 2001. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem* 276: 19150-19159.
- Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. 2003. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene* 22: 2021-2033.
- Mauro L, Bartucci M, Morelli C, Andò S, Surmacz E. 2001. IGF-I receptor-induced cell-cell adhesion of MCF-7 breast cancer cells requires the expression of junction protein ZO-1. *J Biol Chem* 276: 39892-39897.
- Lombard C, Saulnier J, Wallach J. 2005. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie* 87: 265-272.
- Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. 2009. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 9: 188.
- Gibbs DF, Warner RL, Weiss SJ, Johnson KJ, Varani J. 1999. Characterization of matrix metalloproteinases produced by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 1136-1144.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. 2004. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705: 69-89.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 187-198.
- Lee WJ, Hawkins RA, Wina JR, Peterson DR. 1998. Glutamine transport by the blood-brain barrier: a possible mechanism for nitrogen removal. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C1101-C1107.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
- Weinberg F, Chandel NS. 2009. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann NY Acad Sci* 1177: 66-73.
- Ko YG, Kim EK, Kim T, Park H, Park HS, Choi EJ, Kim S. 2001. Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 276: 6030-6036.
- Rosenthal DI, Trotti A. 2009. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol* 19: 29-34.
- Martin TA, Das T, Mansel RE, Jiang WG. 2006. Synergistic regulation of endothelial tight junctions by antioxidant (Se) and polyunsaturated lipid (GLA) via Claudin-5 modulation. *J Cell Biochem* 98: 1308-1319.
- Wen G, Partridge MA, Li B, Hong M, Liao W, Cheng SK, Zhao Y, Calaf GM, Liu T, Zhou J, Zhang Z, Hei TK. 2011. TGFBI expression reduces *in vitro* and *in vivo* metastatic potential of lung and breast tumor cells. *Cancer Lett* 308: 23-32.
- Koochekpour S, Majumdar S, Azabdaftari G, Attwood K, Scioneaux R, Subramani D, Manhardt C, Lorusso GD, Willard SS, Thompson H, Shourideh M, Rezaei K, Sartor O, Mohler JL, Vessella RL. 2012. Serum glutamate levels correlate with Gleason score and glutamate blockade decreases proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 18: 5888-5901.
- Fu YM, Yu ZX, Lin H, Fu X, Meadows GG. 2008. Selective amino acid restriction differentially affects the motility and directionality of DU145 and PC3 prostate cancer cells. *Cell Physiol* 217: 184-193.
- Fu YM, Yu ZX, Li YQ, Ge X, Sanchez PJ, Fu X, Meadows GG. 2003. Specific amino acid dependency regulates invasiveness and viability of androgen-independent prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 45: 60-73.
- Visse R, Nagase H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839.
- Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. 2002. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21: 2245-2252.
- Mignatti P, Rifkin DB. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73: 161-195.
- Van Itallie CM, Anderson JM. 2004. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 19: 331-338.
- Boutet A, Esteban MA, Maxwell PH, Nieto MA. 2007. Re-activation of snail genes in renal fibrosis and carcinomas: a process of reversed embryogenesis? *Cell Cycle* 6: 638-642.
- Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, Abemayor E, Dubinett SM, St John MA. 2012. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* 33: 6-13.
- Kajita M, McClinic KN, Wade PA. 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24: 7559-7566.
- Li H, Wang H, Wang F, Gu Q, Xu X. 2011. Snail involves in the transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells. *PLoS One* 6: e23322.
- Hirohashi S, Kanai Y. 2003. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 94: 575-581.
- Hsu HP, Shan YS, Jin YT, Lai MD, Lin PW. 2010. Loss of E-cadherin and beta-catenin is correlated with poor prognosis of ampullary neoplasms. *J Surg Oncol* 101: 356-362.