

Effect of Proteases on the Migration and Invasion of U-373-MG Cells Induced by Vascular Endothelial Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor

Hui Young Jeon^{1,2} and Hwan Gyu Kim^{2*}

¹Department of Beauty, Daeduk College, Daejeon 34111, Korea

²Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 54986, Korea

Received May 20, 2016 / Revised August 3, 2016 / Accepted August 8, 2016

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) are potent angiogenic factors that have been used clinically to induce angiogenesis. To enable migration and invasion, cells must proliferate and secrete proteinases, which degrade the surrounding extracellular matrix. The goal of this study was to investigate the cell proliferation; matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, and plasmin secretion; and migration and invasion of glioma-derived U-373-MG cells induced by VEGF and HGF treatment. An additional goal was to test the hypothesis that elevated secretion of MMP-2, MMP-9, and plasmin contributed directly or indirectly to the proliferation, migration, and invasion of U-373-MG cells. Cell proliferation, migration, and invasion and MMP-2, MMP-9, and plasmin secretion were significantly increased in the VEGF and HGF-treated U-373-MG cells. To elucidate the role of the increased secretion of MMP-2, MMP-9, and plasmin in cell proliferation, migration, and invasion of the U-373-MG cells, they were treated with MMPs inhibitor (BB-94) and plasmin inhibitor (α 2AP) prior to VEGF or HGF stimulation. The BB-94 and α 2AP treatment resulted in a significant reduction in the cell proliferation, migration, and invasion of the U-373-MG cells as compared with the VEGF- and HGF-treated groups. The results indicate that inhibition of MMPs and plasmin reduce the cell proliferation, migration, and invasion of U-373-MG cells.

Key words : Invasion, migration, MMPs, plasmin, protease inhibitor

서 론

혈관신생이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정으로 기관의 성장과 상처 치유, 염증과 종양의 성장 및 전이에 필수적이다[7, 8, 31]. 주변조직으로의 종양의 침윤과 전이는 주변에 존재하는 세포외기질(ECM)의 분해를 포함한 다단계 과정을 거쳐 일어난다[24]. 종양세포의 침윤특성은 세포외기질을 분해하는 metallo- 및 세린계 단백질분해효소의 분비 및 활성화 능력에 의한[10, 15]. 특히 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)와 MMP-9이 악성 종양의 침윤과 전이를 촉진한다고 알려져 있다[13, 18]. MMPs는 세포외기질의 구성성분을 선택적으로 분해하는 세포의 endopeptidase로 기저막의 분해 조절을 통해 종양세포의 침윤에 관여한다. MMP-2는 세포의 분열, 이동, 침윤 및 혈관신생을 촉진하는 많은 분자들을 활성화시키며 특히 신경교종 세포에서 높게 발현되어 종양의 전이과정에도 중요한 역할을 수행한다[2]. 또

한 MMP-9 역시 종양세포의 성장, 이동, 침윤 및 전이 등 혈관신생을 증가시킨다고 알려져 있다[3].

인간의 악성신경교종 세포의 두드러진 특징은 침윤성 성장과 활발한 혈관신생 등을 들 수 있다. Wick 등[29]은 hepatocyte growth factor (HGF)에 의해 유도되는 신경교종 세포의 이동과 침윤은 TGF- β 2 발현이 관여한다고 밝힌 바 있다. TGF- β 2는 MMP-2의 발현을 유도하고 tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2)의 발현을 억제한다고 알려져 있다[29]. 종양 세포들의 이러한 침윤 특성은 세포외기질을 분해하는 단백질분해효소의 분비 때문으로 알려져 있다. 한편 Kesanakurt 등[16]은 MMP-2 knockdown에 의해 악성신경교종 세포의 침윤과 이동이 억제된다는 사실과 MMP-2/ α v β 3 상호작용이 종양세포의 성장, 침윤과 혈관신생에 관여한다는 것을 밝혔다. 또한 엘라스틴-라민 수용체(67LR)가 여러 다양한 악성세포의 증식을 증가시켰으며 전이를 증가시키는데 관여한다는 보고가 있으며, 종양 주위 세포외기질의 재구성인 조직 주위의 침윤 및 먼 부위로의 확산과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다[9, 23]. 이 과정에서 핵심적인 역할을 수행하는 물질이 부착분자와 그 수용체 그리고 세포외기질을 분해하는 단백질분해효소 등이다.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)와 HGF는 모두 혈관의 재생 능력을 증가시키고 세포사멸을 방지하는 특성을 가지고 있다[14, 25]. VEGF 신호전달 경로는 내피세포의 증식,

*Corresponding author

Tel : +82-63-270-3352, Fax : +82-63-270-3362

E-mail : hgkim@jbnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이동 및 모세혈관 형성 촉진 등 종양 혈관신생에 중요한 역할을 수행한다[11, 32]. HGF 역시 내피세포의 이동, 증식 및 관형성에 중요한 역할을 수행하나 VEGF와 달리 내피세포에만 제한적이다. *In vitro*에서 VEGF와 HGF의 상호작용에 대한 연구 및 배양세포와 비-허혈성 동물모델을 이용한 혈관신생 연구를 통해 이들 두 혈관신생 유도인자의 병용처리 효과를 밝힌 연구도 있다[22, 28, 30, 33].

본 연구에서는 악성신경교종 세포로부터 유래한 U-373-MG 세포주를 이용하여 VEGF와 HGF에 의해 유도된 세포의 증식, 이동 및 침윤에 미치는 MMPs 억제제와 플라스민 억제제의 효과를 관찰하였다. 연구 결과, MMPs 억제제와 플라스민 억제제 처리에 의해 VEGF와 HGF에 의해 유도된 U-373-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤이 유의할만하게 억제되었다.

재료 및 방법

시약

재조합 hVEGF와 hHGF는 R & D System (Minneapolis, MN, USA) 으로부터 구입하였다. MMP-2와 MMP-9 스탠다드는 Cal-Biochem (La Jolla, CA, USA) 으로부터 구입하였으며 MMP-2와 MMP-9 enzyme immunoassay 키트는 Fuji Chemical Industries (Toyama, Japan) 로부터 구입하였다. BB-94 (batimastat)는 British Biotech Pharmaceuticals Ltd. (Oxford, UK) 로부터, α 2-antiplasmin (α 2AP)는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다. 배지 및 혈청은 Life Technology Inc. (Gaithersburg, MD, USA) 로부터, 그 외 특별히 적시하지 않은 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

U-373-MG 세포주는 한국세포주 은행에서 구입하여 10% FBS (v/v) 첨가 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) 에서 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하였다.

세포증식 효과 조사

U-373-MG 세포를 well 당 1×10^4 세포 밀도로 96-well plate 에 접종하였다. 이후 1~3일 동안 세포를 배양한 다음 CellTiter 96[®] aqueous 세포증식 정량 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 Emax[®] microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 세포증식 효과를 확인하였다.

Zymography

MMPs 및 플라스민의 기질 분해 활성은 젤라틴 및 피브리린 zymography를 행하여 확인하였다[17]. 이를 위해 U-373-MG 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5×10^4 cell/cm²이 되도록

접종한 다음, 10% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후, 새로운 배지로 세척한 다음 confluent한 U-373-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 대조완충 용액 혹은 VEGF (5 ng/ml)와 HGF (5 ng/ml)를 처리한 후 12시간 동안 배양하였다. 젤라틴 zymography는 MMP-2 및 MMP-9의 기질인 젤라틴을 SDS-PAGE의 running gel에 첨가한 후 환원 조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성시킨 후 배양 완충용액(0.05M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02M NaCl, 5mM CaCl₂와 0.02% Brij-35, 37°C)에서 16시간 반응시켰다. 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음, 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다. 플라스민 활성은 분해 기질로 피브리린을 첨가하여 피브리린 zymography를 행하여 확인하였다.

분비된 MMP-2, MMP-9 및 플라스민에 대한 Enzyme Immunoassay

U-373-MG 세포를 24-well plate에 세포밀도가 5×10^4 cell/cm²이 되도록 접종한 다음, 20% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 confluent한 U-373-MG 세포를 무-혈청 및 무-phenol red 배지에서 12시간 배양하였다. 세포를 새로운 배지로 세척한 다음 대조완충용액 혹은 지시된 시약을 지정된 시간만큼 처리하였다. 분비된 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 실재양은 제조회사의 지시에 따라 enzyme immunoassay 키트(Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan)로 측정하였다.

세포의 이동 및 침윤 효과 조사

세포의 이동은 U-373-MG 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 well 당 1×10^5 세포 밀도로 챔버의 위쪽 칸에 접종한 다음, QCM™ 24-well 발색 세포이동 정량 키트(Chemicon, Temecula, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 침윤 효과를 조사하기 위해서 8- μ m 공극을 갖는 여과막이 부착된 Matrigel-coated 챔버(Beckton Dickinson, Bedford, MA, USA)의 상단에 1×10^5 세포를 접종하였다. 이후 여과막을 건조, 염색한 다음 200 μ l의 추출 완충용액이 포함된 well로 옮긴 다음, Emax[®] microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

스크래치 상처 회복 분석

U-373-MG 세포를 24-well plate에 5×10^5 cells/well이 되도록 접종하여 10% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후 PBS로 세척한 다음 무-혈청 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후 95% 이상 confluent하게 자란 세포를 팁으로 긁어 U-373-MG 세포의 단일 층에 스크래치 상처를 만들었다. 이후 2.5% FBS (v/v) 첨가 DMEM 배지에서 대조완충용액 또는 지시된 시약을 처리하여 5% CO₂, 37°C 조건에서

24시간 배양한 다음 스크래치 상처의 간격을 측정하였다.

통계처리

자료는 means ± SD로 나타냈으며, 유의성은 Student-Newman-Keuls test에 의한 one-way ANOVA를 이용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

세포증식에 미치는 단백질분해효소 억제제의 효과

VEGF와 HGF는 내피세포의 이동, 증식과 관-형성의 활성화 등을 통해 혈관신생, 종양성장 및 발생 등에 관여한다고 알려져 있다. 이전의 연구 결과 VEGF와 HGF를 동시에 처리했을 때 각각의 성장인자를 단독으로 처리한 그룹보다 훨씬 강력한 증식 및 주화성 반응을 유도하며, 3D 콜라겐 모델을 사용한 연구에서도 VEGF와 HGF의 병용처리에 의해 관-형성 및 세포생존이 유의할만하게 증가되었다는 보고가 있다[1, 14, 30].

혈관신생이 일어나기 위해서는 세포의 증식이 선행되어야 한다. 본 연구에서는 U-373-MG 세포에 VEGF와 HGF의 단독 또는 병용처리를 통하여 세포의 증식에 미치는 효과를 확인하

였다. 그 결과 VEGF 처리에 의해서 세포의 증식이 약 4.1배 증가되었고(3일째) HGF에 의해서는 약 3.7배 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용처리 시 약 4.7배 증가되었다(Fig. 1). 한편 VEGF와 HGF에 처리에 의한 U-373-MG 세포의 증식 효과가 MMPs와 플라스민의 분비 증가에 의한 것인지를 조사한 결과, 최대 증식 효과를 나타낸 VEGF와 HGF의 병용처리군보다 MMPs의 광범위 억제제인 BB-94 처리(3일째)에 의해 약 12%, 플라스민 억제제인 α 2AP의 처리(3일째)에 의해 약 10% 증식이 억제되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 MMPs 및 플라스민이 종양 미세환경에서 성장신호 및 항-성장신호 사이의 균형을 파괴하여 성장을 조절하는 인자로 작용할 가능성을 시사해 준다.

MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비에 미치는 VEGF와 HGF의 효과

종양 혈관신생 과정에서 세포의 이동에 필수적으로 요구되는 과정은 인접한 세포외기질의 분해이다. 세포외기질을 분해하여 세포가 이동하고 침윤하기 위해서는 단백질분해효소의 발현 및 분비가 요구된다. 이 과정에 주된 역할을 하는 효소로 MMPs 및 세린계 단백질분해효소가 알려져 있다[4]. MMPs는 세포외기질을 분해하여 종양세포의 주변 부위의 침투가 가능하게 하는 중요한 역할을 수행한다[12]. 특히 MMP-2와 MMP-9는 인간의 악성신경교종 세포의 발생과 전이에 연관되어 있다고 알려져 있다[22]. 본 연구에서는 세포외기질의 분해에 관련된 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 활성을 측정하기 위해 zymography를 이용하였다. 이를 위해 U-373-MG 세포에 VEGF 또는 HGF를 처리한 다음 zymography를 행한 결과, MMP-2의 경우 VEGF에 의해 약 1.6배, HGF에 의해 약 1.4배 분비가 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용처리 시 약 3.8배 증가되었다(Fig. 2A). MMP-9의 경우 VEGF에 의해서 약 4.2배 분비가 증가되었고 HGF에 의해서는 약 3.5배 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용처리 시 약 5.6배 증가되었다(Fig. 2A).

MMP-2와 MMP-9의 실제 분비량을 enzyme immunoassay를 통하여 확인한 결과, MMP-2는 VEGF 처리에 의해 분비량이 약 2.1배 증가되었으며, HGF에 의해서는 약 1.8배 증가되었고 VEGF와 HGF의 병용처리에 의해서는 약 4.6배 증가되었다(Fig. 2B). MMP-9의 경우에는 VEGF 처리에 약 2.3배 분비가 증가되었으며 HGF에 의해서는 약 1.8배 증가되었고 VEGF와 HGF의 병용처리 시 약 3.5배 증가되었다(Fig. 2B). 이러한 결과는 VEGF와 HGF가 종양세포로부터 MMPs의 분비를 직접적으로 자극하거나 또는 MMPs 방출에 연관된 인자를 활성화시키는 방법으로 MMPs의 분비증가를 유도한다는 Belotti 등 [4]의 결과와 유사하다.

한편, 혈관신생 유도인자의 자극에 반응하여 세포가 이동하기 위해서는 피브린 분해효소의 분비가 필수적이다[26]. U-373-MG 세포에서 플라스민의 분비에 미치는 VEGF와 HGF의

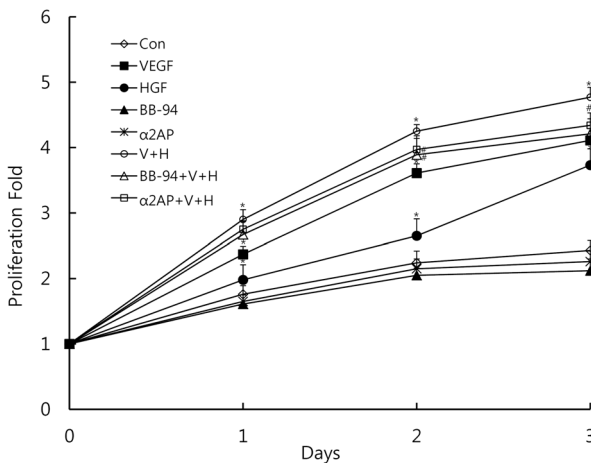


Fig. 1. Effect of inhibitors of MMPs and plasmin on the proliferation of U-373-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 hr. Then, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), BB-94 (4 nM), α 2AP (200 nmol/L), VEGF plus HGF (V+H), 4 nM BB-94 for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (BB-94+V+H), and 200 nmol/L α 2AP for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (α 2AP+V+H). All experiments were performed in triplicate. Data are means ± SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ versus control buffer. # $p < 0.05$ versus VEGF or HGF-treated cells. † $p < 0.05$ versus VEGF plus HGF (V+H) treated cells.

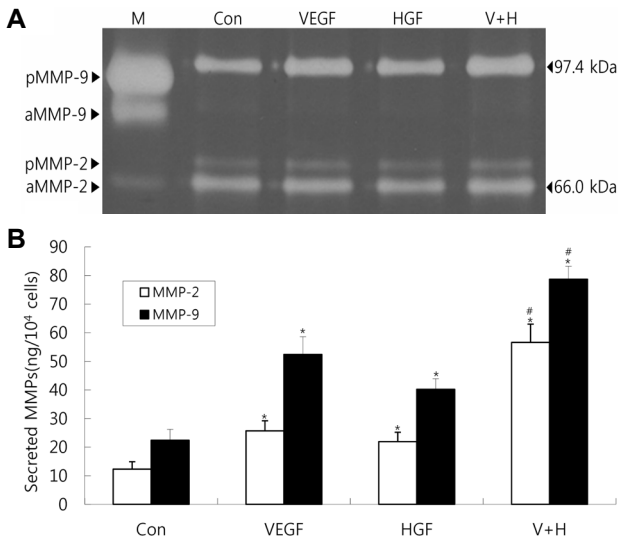


Fig. 2. Effect of VEGF and HGF on the secretion of MMP-2 and MMP-9 of U-373-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 hr. Then, the cells were incubated for 12 hr after addition of control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), and VEGF plus HGF (V+H). (A) Gelatin zymography. Equal amounts of proteins (10 µg/lane) from supernatant were loaded into each lane. M represents MMP-2 and MMP-9 standard. Results were similar in three independent experiments. (B) Media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Data are means ± SD from three independent experiments. **p*<0.05 versus control buffer. #*p*<0.05 versus VEGF or HGF-treated cells.

효과를 피브린 zymography를 행하여 확인한 결과, VEGF 처리에 의해 플라스민의 분비량이 약 4.6배 증가되었고 HGF 처리에 의해서는 약 3.5배 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용 처리에 의해서는 약 6.2배 증가되었다(Fig. 3A). 플라스민의 실제 분비량을 enzyme immunoassay를 통해 측정된 결과, VEGF 처리에 의해 플라스민의 분비량이 약 2.2배 증가되었고 HGF 처리에 의해서는 약 1.7배 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용 처리 시 약 3.3배 증가되었다(Fig. 3B).

세포의 이동 및 침윤에 미치는 단백질분해효소 억제제의 효과

혈관신생 과정의 초기단계에서 세포의 증식과 단백질분해효소의 분비에 따라 생긴 통로를 통해 세포의 이동 및 침윤이 진행되어야 한다. 본 연구 결과, VEGF와 HGF 처리에 U-373-MG 세포의 증식 증가, MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비 증가와 유사하게 세포의 이동이 증가되었다(Fig. 4). U-373-MG 세포에 VEGF를 처리한 결과 세포의 이동이 약 4.9배, HGF 처리에 의해서는 약 3.7배 증가되었으며 VEGF와 HGF의 병용 처리 시 약 6.2배 증가되었다(Fig. 4). 즉 VEGF와 HGF에 의한 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비 증가(Fig. 2~Fig. 3)와

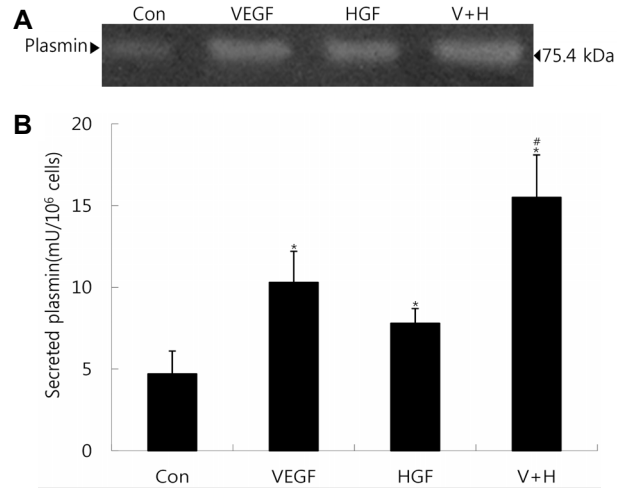


Fig. 3. Effect of VEGF and HGF on the secretion of plasmin of U-373-MG cells. Cells were incubated in serum- and phenol red-free DMEM for 12 hr. Then, the cells were incubated for 12 hr after addition of control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), and VEGF plus HGF (V+H). (A) Fibrin zymography. Equal amounts of proteins (10 µg/lane) from supernatant were loaded into each lane. Results were similar in three independent experiments. (B) Media were quantitatively assayed by enzyme immunoassay. Data are means ± SD from three independent experiments. **p*<0.05 versus control buffer. #*p*<0.05 versus VEGF or HGF-treated cells.

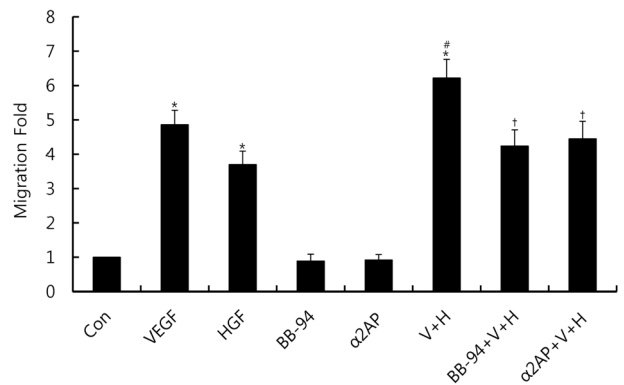


Fig. 4. Effect of inhibitors of MMPs and plasmin on the migration of U-373-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 hr. Then, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), BB-94 (4 nM), α2AP (200 nmol/L), VEGF plus HGF (V+H), 4 nM BB-94 for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (BB-94+V+H), and 200 nmol/L α2AP for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (α2AP+V+H). All experiments were performed in triplicate. Data are means ± SD from three independent experiments. **p*<0.05 versus control buffer. #*p*<0.05 versus VEGF or HGF-treated cells. †*p*<0.05 versus VEGF plus HGF (V+H) treated cells.

U-373-MG 세포의 이동은 비례적으로 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 인간의 악성신경교종 세포에 VEGF와 HGF를 포함한 다양한 수용체가 존재한다는 것을 의미한다[6]. VEGF와 HGF에 의한 U-373-MG 세포의 이동 증가가 단백질분해효소의 분비증가와 연관이 있는지를 확인하고자 광범위 MMPs 억제제인 BB-94를 처리(3일째)한 결과, 최대 이동 효과를 나타낸 HGF와 VEGF의 병용처리군 보다 세포의 이동이 약 32% 억제되었다(Fig. 4). 또한 플라스민 억제제인 α 2AP에 의해서도 세포의 이동이 약 29% 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 VEGF와 HGF에 의한 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비증가가 직접적 또는 간접적으로 U-373-MG 세포의 이동을 촉진시킬 것이라 여겨진다. 즉 MMPs 억제제와 플라스민 억제제는 VEGF와 HGF의 up-regulation을 차단함으로써 U-373-MG 세

포의 이동을 억제하는 것으로 사료된다.

위에서 확인한 VEGF 및 HGF에 의한 U-373-MG 세포의 이동에 미치는 효과를 스크래치 상처회복 분석방법으로 확인하였다. 스크래치 상처를 만든 직후의 간격을 임의의 단위인 1로 설정하여 배양 24시간 및 48시간 후 스크래치 상처의 간격을 비교한 결과, 배양 24시간 후에 대조군의 간격이 14% 채워진 것과 비교하여 VEGF는 10%를 채워 세포의 이동증가를 확인하였다(Fig. 5). VEGF와 HGF를 병용처리한 군과 비교해 볼 때 MMPs 억제제인 BB-94와 플라스민 억제제인 α 2AP에 의해서도 11%가 채워져 유의할만한 세포이동 억제효과를 나타냈다(Fig. 5).

U-373-MG 세포의 침윤에 미치는 VEGF와 HGF의 효과를 조사한 결과 대조군에 비해 VEGF는 약 3.6배, HGF는 약 2.8배 침윤을 증가시켰으며 VEGF와 HGF의 병용처리 시 침윤이 약 4.2배 증가되었다(Fig. 6). 한편 Lu 등[21]은 항-VEGF/VEGFR 제제 처리 후 증가된 침윤 표현형에 HGF/ MET가 관여한다고 보고하였다. 그들은 항-VEGF/VEGFR 제제 처리 시 VEGFR2가 MET와 이형이량체를 형성하고 이 상호작용 결과 MET로부터 단백질 타이로신 phosphatase 1B (PTP1B)의 해리를 일으켜 MET 활성을 증가시키고 악성신경교종 세포의 침윤이 증가된다는 것을 밝혔다. 그간의 연구 결과 MMP-2와 MMP-9은 종양세포의 증식, 이동, 침윤 및 혈관신생 등을 촉진함으로써 암의 진전을 촉진한다고 알려져 있다[19, 20]. 또한 Guo 등[15]은 Angiopoietin-2가 MMP-2의 활성화를 통해

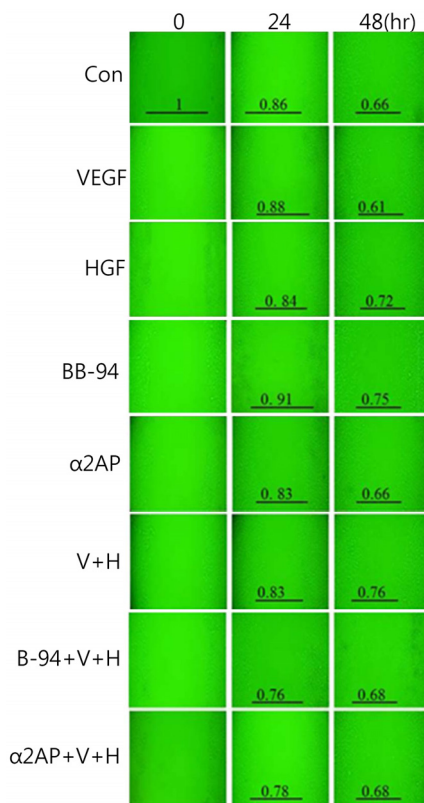


Fig. 5. Evaluation of the migration of U-373-MG cells by scratch wound healing assay. Cells were seeded in 24-well plates and then incubated for 24 hr in serum-free DMEM prior to creating a wound across the cell monolayer with a tip. Then, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), BB-94 (4 nM), α 2AP (200 nmol/L), VEGF plus HGF (V+H), 4 nM BB-94 for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (BB-94+V+H), and 200 nmol/L α 2AP for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (α 2AP+V+H). Cell migration into the wound surface was then monitored by microscopy ($\times 100$) after 24~48 hr.

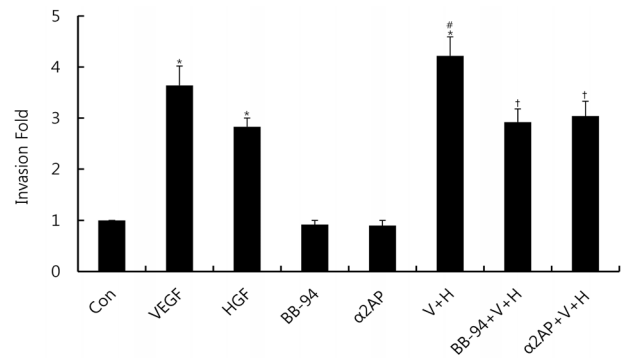


Fig. 6. Effect of inhibitors of MMPs and plasmin on the invasion of U-373-MG cells. Cells were incubated in 10% FBS (v/v) DMEM for 20 hr. Then, the media was changed to serum-free DMEM that was amended with control buffer (Con), VEGF (5 ng/ml), HGF (5 ng/ml), BB-94 (4 nM), α 2AP (200 nmol/L), VEGF plus HGF (V+H), 4 nM BB-94 for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (BB-94+V+H), and 200 nmol/L α 2AP for 1 hr and then stimulated with VEGF plus HGF (α 2AP+V+H). All experiments were performed in triplicate. Data are means \pm SD from three independent experiments. * p <0.05 versus control buffer. # p <0.05 versus VEGF or HGF-treated cells. † p <0.05 versus VEGF plus HGF (V+H) treated cells.

U-38-MG 세포의 침윤을 증가시킨다고 보고하였으며 Choe 등 [10]도 악성신경교종 세포의 침윤 증가와 혈관신생을 유도하는 핵심 분자들을 활성화시키는데 MMP-2가 관여한다고 보고한 바 있다. 본 연구결과 MMPs 억제제인 BB-94와 플라스민 억제제인 α2AP 처리에 의해 U-373-MG 세포의 침윤이 유의할 만하게 억제되었다.

이상의 연구 결과를 요약하면, 인간의 악성신경교종 유래 U-373-MG 세포에서 VEGF와 HGF 처리에 의한 세포의 증식, 이동 및 침윤의 증가는 VEGF와 HGF의 직접적인 신호전달 경로와 함께 부분적으로는 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비증가에 의한 것이라 여겨진다.

References

1. Apoorva, S., Edward, A. S., Archana, V. P., Che, B. P., Brown, M., García, A. J. and Davis, M. E. 2012. Dual delivery of hepatocyte and vascular endothelial growth factors via a protease-degradable hydrogel improves cardiac function in rats. *PLoS One* **7**, e50980.
2. Badiga, A. V., Chetty, C., Kesanakurti, D., Are, D., Gujrati, M., Klopfenstein, J. D., Dinh, D. H. and Rao, J. S. 2011. MMP-2 siRNA inhibits radiation-enhanced invasiveness in glioma cells. *PLoS One* **6**, e20614.
3. Bauvois, B. 2012. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1825**, 29-36.
4. Belotti, D., Paganoni, P., Manenti, L., Garofalo, A., Marchini, S., Tarabozetti, G. and Giavazzi, R. 2003. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res.* **63**, 5224-5229.
5. Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 786-801.
6. Cai, H., Xue, Y., Li, Z., Hu, Y., Wang, Z., Liu, W., Li, Z. and Liu, Y. 2015. Roundabout4 suppresses glioma-induced endothelial cell proliferation, migration and tube formation in vitro by inhibiting VEGFR2-mediated PI3K/AKT and FAK signaling pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 1689-1705.
7. Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **15**, 932-936.
8. Charlesworth, P. J. and Harris, A. L. 2006. Mechanisms of disease: angiogenesis in urologic malignancies. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **3**, 157-169.
9. Chen, F. X., Qian, Y. R., Duan, Y. H., Ren, W. W., Yang, Y., Zhang, C. C., Qiu, Y. M. and Ji, Y. H. 2009. Down-regulation of 67LR reduces the migratory activity of human glioma cells in vitro. *Brain Res. Bull.* **14**, 402-408.
10. Choe, G., Park, J. K., Jouben-Steele, L., Kremen, T. J., Liao, L. M., Vinters, H. V., Cloughesy, T. F. and Mischel, P. S. 2002. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2894-2901.
11. Cimpean, A. M., Seclaman, E., Ceaușu, R., Gaje, P., Feflea, S., Anghel, A., Raica, M. and Ribatti, D. 2009. VEGF-A/HGF induce Prox-1 expression in the chick embryo chorioallantoic membrane lymphatic vasculature. *Clin. Exp. Med.* **10**, 169-172.
12. Dzwonek, J., Rylski, M. and Kaczmarek, L. 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.* **567**, 129-135.
13. Egeblad, M. and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-174.
14. Ferrara, N. 1999. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* **56**, 794-814.
15. Guo, P., Imanishi, Y., Cackowski, F. C., Jarzynka, M. J., Tao, H. Q., Nishikawa, R., Hirose, T., Hu, B. and Cheng, S. Y. 2005. Up-Regulation of angiopoietin-2, matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 metalloproteinase, and laminin 5γ2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am. J. Pathol.* **166**, 877-890.
16. Kesanakurti, D., Chetty, C., Maddirela, D. R., Gujrati, M. and Rao, J. S. 2012. Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma. *Cell Death Dis.* **3**, e445.
17. Klein, S., Giancotti, F. G., Presta, M., Albelda, S. M., Buck, C. A. and Rifkin, D. B. 1993. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **4**, 973-982.
18. Kleiner, D. E. and Stetler-Stevenson, W. G. 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43**, S42-S51.
19. Kondraganti, S., Mohanam, S., Chintala, S. K., Kin, Y., Jasti, S. L., Nirmala, C., Lakka, S. S., Adachi, Y., Kyritsis, A. P., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Fuller, G. N. and Rao, J. S. 2000. Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion. *Cancer Res.* **60**, 6851-6855.
20. Lakka, S. S., Rajan, M., Gondi, C., Yanamandra, N., Chandrasekar, N., Jasti, S. L., Adachi, Y., Siddique, K., Gujrati, M., Olivero, W., Dinh, D. H., Kouraklis, G., Kyritsis, A. P. and Rao, J. S. 2002. Adenovirus-mediated expression of antisense MMP-9 in glioma cells inhibits tumor growth and invasion. *Oncogene* **21**, 8011-8019.
21. Lu, K. V., Chang, J. P., Parachoniak, C. A., Pandika, M. M., Aghi, M. K., Meyronet, D., Isachenko, N., Fouse, S. D., Phillips, J. J., Cheresch, D. A., Park, M. and Bergers, G. 2012. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* **22**, 21-35.
22. Min, J. K., Lee, Y. M., Kim, J. H., Kim, Y. M., Kim, S. W., Lee, S. Y., Gho, Y. S., Oh, G. T. and Kwon, Y. G. 2005. Hepatocyte growth factor suppresses vascular endothelial growth factor-induced expression of endothelial ICAM-1 and VCAM-1 by inhibiting the nuclear factor-kappaB

- pathway. *Circ. Res.* **18**, 300-307.
23. Pupa, S. M., Me'nard, S., Forti, S. and Tagliabue, E. 2002. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell. Physiol.* **192**, 259-267.
 24. Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M. and Niedzwiecki, A. 2010. Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **24**, 747-757.
 25. Rosen, E. M., Lamszus, K., Laterra, J., Polverini, P. J., Rubin, J. S. and Goldberg, I. D. 1997. HGF/SF in angiogenesis. *Ciba Found Symp.* **212**, 215-226.
 26. Roth, D., Piekarek, M., Paulsson, M., Christ, H., Bloch, W., Krieg, T., Davidson, J. M. and Eming, S. A. 2006. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am. J. Pathol.* **168**, 670-684.
 27. Vanmeter, T. E., Rooprai, H. K., Kibble, M. M., Fillmore, H. L., Broadus, W. C. and Pilkington, G. J. 2001. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J. Neuro. Oncol.* **53**, 213-235.
 28. Wang, G. M., Kovalenko, B., Huang, Y. and Moscatelli, D. 2007. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin are required for prostate regeneration. *Prostate* **67**, 485-499.
 29. Wick, W., Platten, M. and Weller, M. 2001. Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *J. Neurooncol.* **53**, 177-185.
 30. Xin, X., Yang, S., Ingle, G., Zlot, C., Rangell, L., Kowalski, J., Schwall, R., Ferrara, N. and Gerritsen, M. E. 2001. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **158**, 1111-1120.
 31. Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P. and Sharma, V. 2015. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, XE01-XE05.
 32. Zachary, I. 2003. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1171-1177.
 33. Zhang, Y. W., Su, Y., Volpert, O. V. and Vande Woude, G. F. 2002. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12718-12723.

초록 : VEGF와 HGF에 의해 유도된 U-373-MG 세포의 이동 및 침윤에 미치는 단백질분해효소의 효과

전희영^{1,2} · 김환규^{2*}

(¹대덕대학교 뷰티과, ²전북대학교 자연과학대학 생명과학과)

Vascular endothelial growth factor (VEGF)와 hepatocyte growth factor (HGF)는 강력한 혈관신생 유도인자로 알려져 있다. 세포가 이동하고 침윤하기 위해서는 세포의 증식과 더불어 주변의 세포외기질을 분해하는 단백질분해효소의 분비가 선행되어야 한다. 본 연구에서는 인간의 악성신경교종 유래 세포주인 U-373-MG 세포에 VEGF와 HGF를 처리하여 세포의 증식, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)와 MMP-9 및 플라스민의 분비, 세포의 이동 및 침윤에 미치는 효과를 조사하였다. 또한 단백질분해효소 억제제 처리를 통하여 세포의 증식, 이동 및 침윤에 미치는 단백질분해효소의 역할을 조사하였다. 연구 결과, VEGF와 HGF의 병용처리 시 VEGF와 HGF의 단독처리 시보다 세포의 증식, MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비, 세포의 이동 및 침윤이 유의할만하게 증가되었다. 한편 VEGF와 HGF 처리에 의한 U-373-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤 증가에 미치는 단백질분해효소의 효과를 MMPs 억제제인 BB-94를 처리하여 조사한 결과 최대 이동 효과를 나타낸 HGF와 VEGF의 병용처리군 보다 세포의 이동이 32% 억제되었고 플라스민 억제제인 α2AP에 의해서도 29% 억제되었다. 또한 U-373-MG 세포의 침윤 역시 BB-94와 α2AP 처리에 의해 유의할 만하게 억제되었다. 이러한 결과는 VEGF와 HGF에 의한 MMP-2, MMP-9 및 플라스민의 분비증가에 의해 직접 또는 간접적인 경로를 통하여 U-373-MG 세포의 증식, 이동 및 침윤을 증가시킨다고 여겨진다.