

유방암에서 활성화된 Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)가 암전이에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹임상병리학교실

홍민광 · 조규열 · 오세정 · 김경미¹ · 유승진 · 정상설

Implications of the Activation of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) on the Metastasis in Breast Cancer

Min Kwang Hong, M.D., Kyu Youl Cho, M.D., Se Jeong Oh, M.D., Kyoung Mi Kim, M.D.¹, Seung Jin Yu, M.D. and Sang Seol Jung, M.D.

Departments of Surgery and ¹Clinical Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: The expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by cancer cells has been implicated in metastasis through cancer cell invasion of the basement membranes mediated by a degradation of collagen IV. However, the MMP-2 pro-enzyme requires proteolytic activation for its physiologic or pathologic role. We tried to 1) compare expression and activation of MMP-2 in breast cancers with benign tumors, 2) determine the correlation between the activation of MMP-2 in breast cancer and established prognostic factors, 3) observe whether MMP-2 is expressed and activated in axillary lymph nodes as well, and 4) determine the degree of correlation between MMP-2 activity in lymph nodes and metastatic status, if MMP-2 is expressed in lymph node.

Methods: The specimens came from 11 fibroadenomas, 32 invasive ductal carcinoma and 129 axillary lymph nodes from cancer cases. Pro-MMP-2 cDNA transfected MDA-MB-231 cells were cultured and the conditioned media from them was used for a control. Zymography was used to monitor MMP-2 activation through the detection of the inactive pro-enzyme form (72 kDa) and the active form (62 kDa). Immunohistochemical staining was also performed for the localization of MMP-2 expression in tissues.

Results: 1) 72 kDa was expressed in all fibroadenomas and

cancers, while 62 kDa was expressed in only 10 cases of fibroadenomas and all cancers. MMP-2 activity (62 kDa/72 kDa +62 kDa) was significantly higher in cancers than in fibroadenomas (P=0.014). 2) MMP-2 activity in cancers was significantly correlated with nodal metastasis (P=0.040). 3) The expression of MMP-2 in lymph nodes was very low and MMP-2 activity was not correlated with metastatic status. However, the immunohistochemical staining showed different staining patterns between the metastatic and non-metastatic nodes.

Conclusion: We suggest that a measurement of the activation of MMP-2 could be useful as a prognostic marker representing metastatic potential in breast cancer. However, the low expression of MMP-2 in lymph nodes is an interesting subject for further study. (**Journal of Korean Breast Cancer Society 2002;5:19-26**)

Key Words: MMP-2, metastasis, breast cancer

중심 단어: 메탈로프로테이나제-2, 전이, 유방암

서 론

정상적인 선조직(glandular tissue)에서 상피세포는 기저막에 의해 조직의 기질과 격리되어 있다. 상피세포에서 발생하는 선암(adenocarcinoma)의 경우 암세포가 전이하기 위해서는 암조직으로부터 이탈하여 주위 기질로 침투하고 혈관 또는 림프관에 침습한 뒤 전이장소로 이동하는데 이를 위해서는 이러한 기저막의 파괴가 선행되어야 한다. 또한 이러한 기저막의 파괴과정은 암세포가 전이장소에도달해서도 필요하다.(1) 임상적으로 양성 유방 질환 및 상피내암의 경우에는 기저막이 보존되어 있으나, 침습성 유방암에서는 부분적으로 또는 완전히 기저막이 파괴되어 있는 것이 관찰된다.(2) 기저막은 주로 laminin, fibronectin, heparan sulphate, proteoglycan 및 type IV collagen 등으로 구성되는데 전이를 위한 기저막의 파괴를 위해서는 기저막의 주성분을 이루는 type IV collagen의 분해가 필수

책임저자 : 오세정, 인천광역시 부평구 부평 6동 665
☎ 403-720, 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 외과
Tel: 032-510-5691, Fax: 032-510-5816
접수일 : 2001년 11월 21일, 게재승인일 : 2001년 12월 24일
본 논문은 성모자애병원 학술연구비 지원에 의한 것임.

적이다.(3) Matrix metalloproteinase (MMP)에 속하는 효소군은 고도로 유사한 아미노산 서열을 가진 단백분해효소로서 여러 가지 기질특이성을 가지고 정상적인 조직의 재형성(tissue remodeling) 과정뿐만 아니라 관절염, 종양의 침윤 등과 같은 여러 질환에 관여하는데 특히 72 kDa (MMP-2) 및 92 kDa (MMP-9) type IV collagenase는 기저막의 분해에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(4) 그러나 type IV collagenase는 세포에서 잠재형(latent form)으로 분비되고 활성화되기 위해서는 질소말단(N-terminal)으로부터 약 80번째 아미노산 서열 부위에서 단백분해에 의한 분열(proteolytic cleavage)이 일어나야 하는데, 실험실적으로는 trypsin, collagen, concanavalin A, 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate (TPA), transforming growth factor- β (TGF- β) 등 여러 물질들이 이러한 분열을 일으키는 것으로 알려져 있다.(5-7) 그러나 생체 내 기작에 대해서는 아직까지 명확히 규명되어 있지는 않은데, 최근에 분리된 membrane type MMP(MT-MMP)가 MMP의 생체 내 활성화 기작에 관여할 것으로 추정하고 있다.(8,9)

본 연구에서는 유방암조직을 대상으로 암조직에서 MMP-2의 활성화도(activity), 즉 잠재형인 72 kDa type IV collagenase (이하 72 kDa)와 활성형인 62 kDa type IV collagenase (이하 62 kDa)의 발현을 알아보기 위해 gelatin zymography를 이용하였다. 이와 함께 원발병소와 림프절에서 MMP-2가 발현되는 위치와 전이와의 상관관계를 알아보기 위하여 면역조직화학염색도 병행하였다.

방 법

1) 조직 표본

침습성 유방암으로 진단받은 환자 32명에서 근치적 수술 시 각각의 원발병소와 비대되어 있는 액와부 림프절 4~5개, 그리고 유방의 섬유선종으로 진단된 조직 11예들을 채취하여 0.5×0.5×0.5 cm 크기의 조직절편으로 만들어 -70°C 냉동고에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 단, 액와부 림프절의 경우에는 수술 시야에서 전이유무를 판단할 수 없었기 때문에 절취한 림프절마다 표식을 달아 수술 후에 병리조직학적 소견을 참조할 수 있도록 하였다.

2) MMP-2 표지자의 준비

Zymogram상에서 MMP-2의 72 kDa 및 62 kDa의 띠(band)를 확인하기 위해 pro-MMP-2 c-DNA를 이입(transfection)시킨 MDA-MB-231 세포주(호주 Melbourne대학 유방암 전이 연구실의 Dr. Thompson으로부터 분주 받음)를 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), sodium bicarbonate 2.3 g/L가 포함된 RPMI (Gibco, USA) media를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건으로 CO₂ incubator (Napco, USA)에서 4회 계대배양한 뒤, 5×10⁵개의 세포를 세어 12 well

plate에 옮기고 RPMI media 1 ml를 채워 배양하였다. 24시간 배양한 뒤, serum free media [100 mM sodium pyruvate, 100× ITS 10 ml, 100× non-essential amino acid 1 ml (Biofluids, USA), 100× vitamins 1 ml, 0.1% bovine serum albumin in IMEM (Gibco, USA)] 1 ml로 갈아주고, MMP-2를 활성화시키기 위해 concanavalin A 25 μ g/ml (Sigma, USA)을 투여하였다. 다시 24시간 배양한 뒤, 배양액(conditioned media)를 채취하여 -20°C에 보관하여 zymography에 대비하였다.(6,7)

3) 시료의 준비

동결된 조직절편을 해동한 뒤, 차게 한 1×TBS buffer [pH 7.70, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl] 내에서 잘게 썰어 10 mL의 찬 1× TBS buffer를 넣은 후 4°C에서 3,000 rpm의 속도로 15분간 원침하여 조직 내 세포성 혈액성분을 씻어내었다. 침전된 조직의 5배 분량의 찬 homogenization buffer [2.5% Triton X-100, 0.036% sodium azide in TBS]를 넣고, 조직 분쇄기(tissue homogenizer)로 거품이 생기지 않도록 조심스럽게 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 들어있는 homogenization buffer를 1.5 ml Eppendorf tube에 옮기고 4°C에서 회전형 진탕기(rotatory shaker)에 24시간 동안 두어 세포를 용해시킨 후, 4°C에서 15,000 rpm의 속도로 15분간 원침하여 조직 찌꺼기를 제거하고, 상층액을 얻어 -20°C에 보관하여 zymography에 대비하였다.

4) Gelatin zymography

Gelatin zymography는 소량의 파쇄된 조직(homogenized tissue)을 gelatin을 함유한 polyacrylamide gel상에서 전기영동하면 조직에 포함된 단백분해효소에 의해 gel 내의 gelatin이 분해되어 gel의 염색 후에는 투명한 띠로 남게되는 현상을 이용한 기법으로, MMP-2의 경우 72 kDa와 62 kDa를 동시에 gel상에서 확인할 수 있기 때문에 MMP-2의 활성화 여부를 알 수 있다.(3) 1% gelatin (Sigma, USA)이 포함된 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (8×10 cm)을 만들어 대조군과 함께 시료 10 μ l에 3× loading buffer [pH 6.8, 62 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.05% bromphenol blue] 5 μ l를 혼합한 시료 15 μ l를 gel에 적재하고 vertical electrophoresis unit (Hoefer, USA)에서 100 V로 4시간 동안 전기영동하였다. Gel을 2.5% Triton X-100 용액으로 30분간 2회 세척한 뒤, collagenase buffer [50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 1% Triton X-100]를 넣고 37°C에서 진탕기에 두어 반응시켰다. 24시간 후, gel을 2.5% Triton X-100 용액으로 1회 세척한 뒤, Coomassie Blue 용액[1% Coomassie brilliant blue R250, 30% methanol, 10% acetic acid]으로 2시간 염색하고, 탈색용액[30% methanol, 10% acetic acid]으로 30분간 2회 탈색시켜 gel을 관찰하였다.(10)

5) MMP-2의 활성화 정도 계측 및 기존 유방암 예후 인자

염색 후 gel을 디지털 카메라를 이용하여 동일한 배율로 촬영하고 화상 파일을 얻은 다음, 화상분석 소프트웨어인 Quantity One[®] v4.2 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 띠가 차지하는 넓이(mm²)를 계측하였다. MMP-2의 활성화 정도는 72 kDa의 띠의 넓이와 62 kDa 띠의 넓이 합에 대한 62 kDa 띠의 넓이의 비율(62 kDa/62 kDa+72 kDa)로 측정하였다. 기존의 유방암 예후인자로서 종양의 크기는 종양의 실제 크기로, 림프절 전이는 전이된 림프절의 수로 하였으며, 핵의 이형성 등급(nuclear grade)은 modified Bloom-Richardson classification(11)을 적용하였고, 에스트로젠 및 프로게스테론 수용체와 c-erbB-2는 면역조직화학 염색을 시행하여 각각 핵 및 세포질에 염색되는 종양세포의 백분율 및 염색의 강도에 따라 음성(-), 약양성(+), 중등도 양성(++), 강양성(+++)의 4등급으로 구분하여(12) MMP-2의 활성화 정도와 비교하였다.

6) 면역조직화학염색

유방암 원발병소, 전이되지 않은 림프절, 전이된 림프절 가운데 각각 10예에 대해 면역조직화학염색을 시행하였다. 파라핀 포매된 조직을 5µm 두께로 절편하여 Probe-on-Slide[®] (Fisher Scientific, USA)에 부착하여 실험에 이용하였다. 조직 절편을 1 : 3 비율로 혼합된 Xylene과 Histoclear[®] (National Diagnostics, USA) 용액에 1분간 3회 담가서 파라핀을 제거한 후 무수알코올에서 조직을 완전히 탈수시켰다. 염색과정에서 발생하는 조직 내 비특이적 반응을 최소화하기 위하여 3% acid alcohol로 처리한 후 1× PBS로 2회 세척하였다. Mouse anti-human MMP-2 monoclonal antibody (Fuji Chemical, Japan) 4µg/ml의 농도로 antibody diluent (DAKO, USA)에 희석하여 40°C에서 1시간 면역반응을 시키고 1× PBS로 3회 세척한 후 biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin (DAKO, USA)으로 40°C에서 30분간 면역반응을 시킨 다음 세척하였다. 면역반응 결과를 확인하기 위하여 streptavidin conjugated alkaline phosphatase (DAKO, USA)로 45°C에서 15분간 biotin과 결

합케 한 후 naphthol AS-MX phosphate (Sigma, USA)와 fast red TR salt (Amresco, USA)로 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

7) 통계 검정

SPSS v8.0 프로그램을 이용하여 악성 종양과 양성 종양 간에 MMP-2 활성화의 차이와 림프절 전이 여부와 MMP-2 활성화 정도 간의 상관관계는 Student t-test로, MMP-2 활성화와 기존의 예후인자들 간의 상관관계는 각각에 대하여 단순회귀분석으로 검정하였으며, 유의수준은 P < 0.05로 하였다.

결 과

1) 원발병소 및 액와부 림프절에서 MMP-2의 발현 및 활성화 정도

Pro-MMP-2 c-DNA를 이입시킨 MDA-MB-231 세포주를 concanavalin A로 활성화시켜 얻은 conditioned media를 사용하여 gel상에 나타나는 72 kDa의 띠와 62 kDa의 띠로 시료에서 나타나는 띠들을 구분할 수 있었다(Fig. 1A). 악성종양 32예 및 양성종양 11예의 모든 원발병소에서 MMP-2의 발현을 관찰할 수 있었고, MMP-2의 활성화는 32예의 모든 악성종양과 양성종양 11예 가운데 10예에서 관찰할 수 있었다. 72 kDa 및 62 kDa의 발현은 악성과 양성종양 사이에 차이가 없었으나, MMP-2의 활성화 정도(62 kDa/62 kDa+72 kDa)는 악성종양이 양성종양에 비해 유의하게 높았다(P=0.007). 림프절 129예 가운데 전체적으로 78예(60.5%)에서 MMP-2가 발현되었으며(Fig. 1B), 이중 28예(35.9%)에서 MMP-2의 활성화가 관찰되었는데 림프절에서 MMP-2의 발현 및 활성화 정도는 원발병소와 비교해서 현저히 낮았다(Table 1).

2) 유방암의 원발병소에서 MMP-2의 활성화 정도와 기존 유방암 예후인자와의 관계

원발병소에서 MMP-2의 활성화 정도와 기존의 예후인자, 즉 핵의 이형성 등급, 종양의 크기, 전이된 림프절의 수, 에스트로젠 및 프로게스테론 수용체, c-erbB-2 등과 비

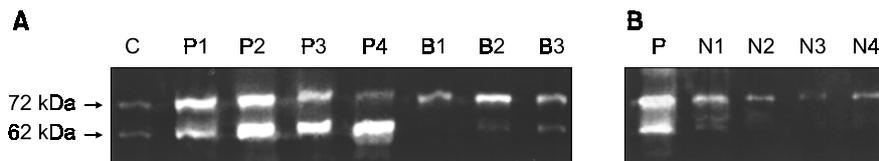


Fig. 1. Zymograms of fibroadenomas, breast cancers and lymph nodes. (A) C = Control from pro-MMP-2 c-DNA transfected MDA-MB-321 cell line; P1-P2 = Primary tumors of breast cancer without node metastasis; P3-P4 = Primary tumors of breast cancer with node metastasis; B1-B3 = fibroadenomas. (B) P = Primary tumor of breast cancer; N1-N4 = Lymph nodes matched with primary tumor.

Table 1. Expression and activation of MMP-2 in benign and malignant breast tumors and lymph nodes

	Expression of MMP-2 (mm ²)			
	72 kDa	62 kDa	72+62 kDa	62/72+62 kDa
Benign (n=11)	65.31±38.06	30.15±37.30	96.38±68.02	0.27±0.15
Malignant (n=32)	62.79±45.77	52.93±51.49	114.52±91.96	0.43±0.19
Lymph node (n=78)	16.81±15.66	3.56±10.74	20.38±24.59	0.10±0.16
P*	0.871	0.186	0.553	0.014

*Comparison between benign and malignant breast tumors.

Table 2. Expression and activation of MMP-2 based on established prognostic factors

	Expression of MMP-2 (mm ²)			
	72 kDa	62 kDa	72+62 kDa	62/72+62 kDa
Nuclear grade				
Low	47.23±12.36	29.98±21.02	74.43±30.63	0.36±0.12
Intermediate	64.27±49.28	64.95±55.74	129.27±99.16	0.48±0.18
High	68.47±51.87	42.21±51.36	107.30±91.96	0.37±0.21
Tumor size				
<2.0 cm	47.62±31.04	25.22±19.31	72.73±38.89	0.34±0.19
2~5 cm	66.85±54.82	64.44±60.87	129.21±111.24	0.48±0.19
>5 cm	75.47±27.36	61.41±40.50	136.87±66.34	0.41±0.14
No. of metastatic lymph node				
0	52.39±32.07	33.50±25.91	85.89±49.54	0.38±0.21
1~3	54.38±37.87	45.17±37.10	95.41±73.17	0.48±0.16
4~9	86.29±47.71	77.65±59.45	162.08±107.63	0.45±0.10
≥10	102.17±102.57	139.97±90.65	242.14±184.10	0.60±0.16
Estrogen receptor				
-	83.51±58.87	79.09±64.75	162.60±115.88	0.46±0.18
+	61.12±32.30	37.21±16.54	92.65±42.82	0.45±0.24
++	42.55±19.50	30.19±32.76	71.50±48.51	0.37±0.19
+++	38.79±14.90	31.83±21.83	70.63±33.91	0.42±0.17
Progesterone receptor				
-	58.22±22.48	34.19±20.17	91.77±43.32	0.38±0.19
+	73.12±63.96	81.46±69.44	152.13±130.62	0.53±0.16
++	80.15±38.54	48.80±53.03	128.95±91.57	0.32±0.19
+++	42.92±20.48	34.87±36.93	77.67±56.33	0.39±0.17
c-erbB-2				
-	49.89±31.94	36.32±27.80	86.33±48.21	0.41±0.20
+	34.26±20.97	32.03±25.64	63.19±39.89	0.50±0.15
++	75.04±49.56	58.24±57.86	129.61±107.32	0.43±0.17
+++	75.74±57.28	73.23±67.51	148.87±117.79	0.44±0.21

교하였다(Table 2). 이들 가운데 MMP-2의 활성화 정도와 상관관계가 있는 예후인자로써 전이된 림프절의 수로서 MMP-2의 활성화 정도가 높을수록 전이된 림프절의 수가 증가하였다($R=0.364$, $P=0.040$)(Fig. 2).

3) 전이 유무에 따른 액와부 림프절에서의 MMP-2의 발현 및 활성화 정도

전이되지 않은 림프절 97예 가운데 51예(52.6%)에서 MMP-2가 발현되었고 이 가운데 12예(23.5%)에서 MMP-2의 활성화가 관찰되었으며, 전이된 림프절 32예 가운데 27예(73.5%)에서 MMP-2가 발현되었고 이 가운데 15예(55.6%)에서 MMP-2의 활성화가 관찰되었다. 72 kDa 및 62 kDa의 발현은 전이된 림프절에서 유의하게 높았으나 MMP-2의 활성화 정도에는 차이가 없었다(Table 3).

4) 면역조직화학염색

MMP-2는 일부의 종양세포 및 종양 주변의 증식된 혈관, 혈관벽, 섬유모세포 등에서 염색이 되었으며, 세포질에 과립상으로 염색이 되는 양상이었다(Fig. 3A). 일부의 종양에서는 혈관 내 종양 색전(tumor emboli)에서 염색이

강하고, 전반적으로 염색되는 양상을 보였다(Fig. 3B). 악성 상피세포 외에 주변의 정상 잔류 관에서도 염색이 되었는데 대부분의 근상피세포(myoepithelial cell)와 일부의 관상피세포(ductal epithelial cell)에서 양성이었다(Fig. 3C, arrow). 림프절은 크게 전이된 림프절과 전이되지 않은 림프절로 분리하여 관찰하였다. 전이되지 않은 림프절의 경우 MMP-2는 림프절의 피질 내에 존재하는 혈관 및 동(sinusoid) 주변의 소수의 기질세포에서 양성이었으나(Fig. 4A), 전이된 림프절의 경우 전이성 암세포 및 주변에 이차적으로 형성된 기질성 섬유화를 보이는 부위에 있는 섬유모세포에서 주로 발현이 관찰되어 전이되지 않은 림프절과 다른 양상을 보였다(Fig. 4B).

고 찰

MMP-2의 발현은 면역조직화학염색이나 m-RNA 동소보합법에 의해 피부암, 결장암, 전립선암, 방광암 및 유방암 등 인류의 여러 암종에서 보고되어 있으며,(13-17) 최근에는 유방암에서 MMP-2의 발현이 생존율을 감소시킨다는 보고가 있다.(18,19) 그러나 MMP는 정상적인 조직이나 양성 질환에서도 발현되며,(1,3,20) 오직 악성 세포에서만 침습적이기 때문에(21) 단순히 MMP-2의 발현만으로 세포형질(phenotype)의 변화가 일어난다고 말할 수는 없고, 악성 세포의 침습성은 MMP-2의 활성화와 관련이 있다고 보는 것이 타당하다. 그러나 면역조직화학염색이나 m-RNA 동소보합법과 같은 방법은 MMP-2가 발현되는 조직 내 위치의 확인에는 도움이 되지만, MMP-2의 활성화, 즉 MMP-2의 잠재형과 활성형의 발현은 구분할 수가 없기 때문에(22,23) zymography와 같은 방법을 필요로 한다.

동물모델에서는 MMP-2의 활성형의 발현 증가와 암세포의 전이능(metastatic potential) 간의 상관관계가 보고되어 있고,(24,25) Davies 등(16)은 gelatin zymography를 이용하여 유방암에서 암세포의 핵의 이형성 등급이 증가함에 따라 MMP-2 및 MMP-9의 활성화가 증가하는 것을 보여준 바 있다. 그러나 이 등(20)은 동일한 방법에 의해 MMP-2의 활성화는 정상 유방조직과 양성 유방 종양에 비

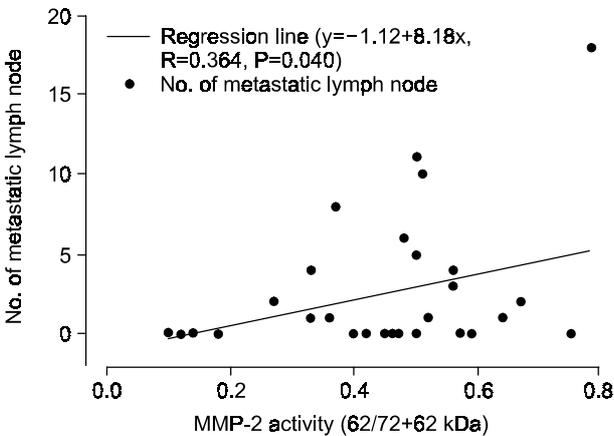


Fig. 2. Simple linear regression MMP-2 activity and metastatic lymph node.

Table 3. Activation of MMP-2 according to nodal status

Nodal status	Expression of MMP-2 (mm ²)			
	72 kDa	62 kDa	72+62 kDa	62/72+62 kDa
No metastasis (n=51)	12.51±6.54	1.45±2.62	14.01±8.24	0.07±0.12
Metastasis (n=27)	24.92±23.23	7.54±17.41	32.40±37.83	0.15±0.21
P	0.011	0.082	0.019	0.087

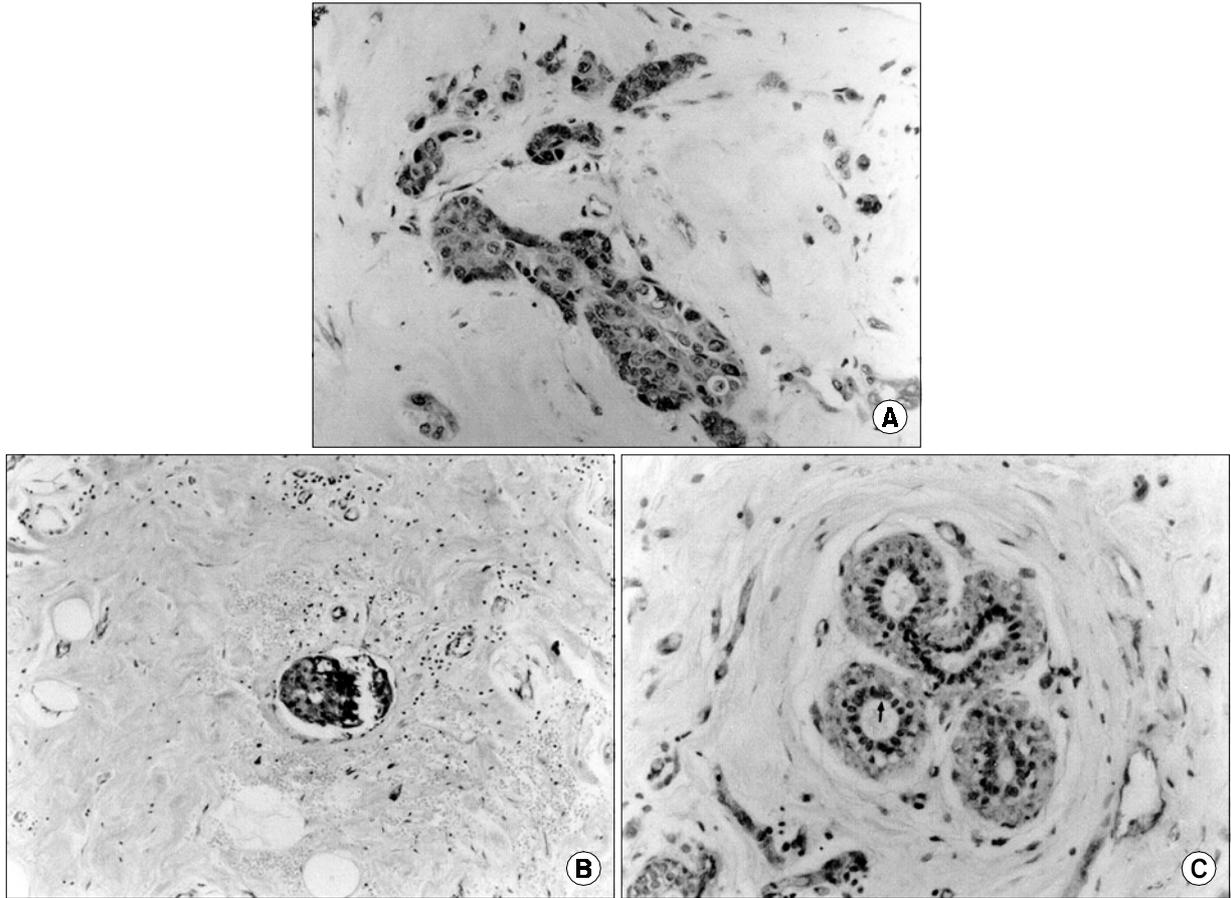


Fig. 3. (A) Immunohistochemical staining of MMP-2 in the primary tumor of breast cancer. MMP-2 were immunostained within the cytoplasm of tumor cells, showing granular pattern (Immunohistochemical stain, $\times 200$). (B) The tumor cell emboli in the vascular spaces showed diffuse and strong MMP-2 positivity (Immunohistochemical stain, $\times 100$). (C) The remaining normal ducts and vessels were also positive for MMP-2. Of these, myoepithelial cells showed diffuse pattern, while ductal epithelial cells showed focal pattern (arrow) (Immunohistochemical stain, $\times 200$).

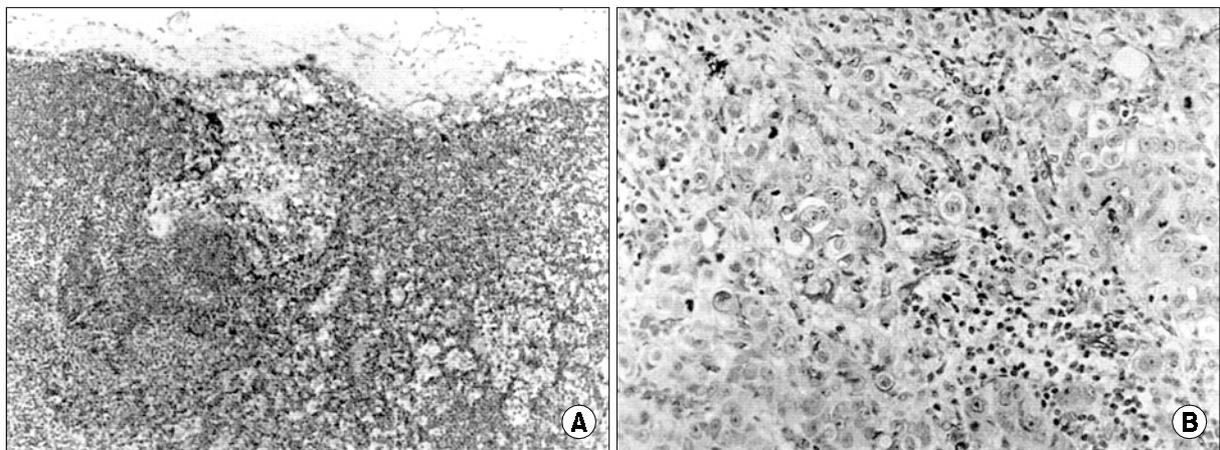


Fig. 4. (A) Immunohistochemical staining of axillary lymph nodes. In the non-metastatic node, MMP-2 were positive in the vessels and stromal cells around sinusoid (Immunohistochemical stain, $\times 100$). (B) In the metastatic node, MMP-2 were immunostained within the stromal fibroblastic cells around cancer cells (Immunohistochemical stain, $\times 200$).

해 악성 종양에서 현저히 증가되어 있으나, 악성 종양의 경우 핵의 이형성 등급이 높아짐에 따라 MMP-2의 활성화가 증가되는 경향을 보이기는 했지만 통계적으로 유의한 수준은 아니었고, 액와 림프절의 전이유무, 병기, 호르몬 수용체 양성 여부와 MMP-2의 활성화 간의 연관성은 보여 주지 못했다. 그러나 본 연구에서 MMP-2는 기존의 연구 결과와 마찬가지로(16,20) 악성 및 양성종양 모두에서 발현되고, MMP-2의 활성화 정도는 양성종양에 비해 악성종양에서 유의하게 증가되어 있었으나, 악성종양의 경우 MMP-2의 활성화 정도가 증가할수록 전이된 림프절의 수가 증가하는 것으로 나타났다. 면역조직화학염색에서도 혈관 내 종양 색전에서 발견된 종양세포는 강하고, 전반적으로 염색되는 양상이어서(Fig. 3B) MMP-2가 종양세포의 혈관 내 침습과 연관이 있음을 시사하였다. 비록 본 연구의 관측례가 충분치 못하고, 편차가 심하기는 하나 MMP-2의 활성화 정도가 증가할수록 전이된 림프절의 수가 증가한다는 사실은 MMP-2가 전이의 초기 단계인 기저막의 파괴에 관여한다는 점과 부합되는 소견이다.

그러나 림프절에 대한 zymogram은 관찰 가능하였던 129예 가운데 78예(60.5%)에서만 MMP-2가 발현되었으며, 악성종양의 원발병소뿐만 아니라 심지어 양성종양에 비해서도 현저히 적은 양이 발현되는 것을 보여준다(Table 1, P=0.000). 본 연구에서는 비록 전이된 림프절에 비해 전이되지 않은 림프절에서 MMP-2의 발현이 현저히 낮았으나, MMP-2의 활성화 정도는 전이되지 않은 림프절에서 $0.07 \pm 0.12 \text{ mm}^2$, 전이된 림프절에서 $0.15 \pm 0.21 \text{ mm}^2$ 로서 전반적으로 낮게 나타나고 있으며, 전이된 림프절과 전이되지 않은 림프절 간의 차이도 통계적으로 유의하지 않았다(Table 2)(P=0.087). 따라서 MMP-2의 발현과 활성화는 기질세포가 적은 림프절에서는 그 의의를 찾을 수 없다고 판단된다. 그러나 비록 림프절 내에 기질세포가 희박하기는 하나 면역조직화학 염색을 통해 전이되지 않은 림프절에서도 정상 혈관 및 동을 따라 MMP-2가 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 4A), 전이된 림프절에서는 전이성 암세포와 주변에 이차적으로 형성된 기질성 섬유화된 부위의 섬유모세포에서 MMP-2가 발현되어(Fig. 4B) 전이되지 않은 림프절과는 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있었다. 그러나 이러한 면역조직화학염색 결과에도 불구하고 림프절에 대한 zymography의 결과는 MMP-2의 활성화가 병리조직학적 전이와는 상관관계가 없음을 보여주는데 이는 전이 암세포가 전이 장소에 도달한 후 혈관이나 림프관의 기저막을 파괴시키고 침습함으로써 전이병소를 형성할 것이라는 가설과 배치되는 것이다. 따라서 향후로 국소 림프절 외에 원격 전이된 조직에 대해서도 gelatin zymography를 시행해 볼 필요가 있다고 생각되며, 이렇듯 MMP-2의 발현과 활성화 정도가 각 종양이나 조직에 따라 다르게 나타나는 것은 그 과정이 복잡하기 때문

인 것으로 생각된다. MMP-2는 본 연구에서도 보듯이 암세포 자체보다는 암세포와 인접한 섬유모세포나 근상피세포와 같은 기질세포에서 발현되고 있어 기질세포가 암세포의 침윤을 돕기 위해 암세포로부터 신호를 전달받아 MMP-2를 분비하는 것으로 추정되기 때문에(3,13,17) 조직 내 기질세포의 구성에 따라 MMP-2의 발현 및 활성화가 영향을 받을 수 있다. 또한 MMP-2의 활성화는 아직까지 그 기작이 정확히 알려져 있지 않을 뿐만 아니라 MMP는 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)와 결합된 상태로 존재하기 때문에 이들의 상호작용이 활성화에 영향을 미친다.(26) 따라서 MMP-2의 활성화가 암세포의 침윤에 있어 필수적인 요건을 구성하는 것은 사실이나 앞으로 MMP-2의 활성화의 기전에 대한 연구가 더 필요하다고 생각된다. 그러나 MMP-2의 활성화는 앞으로 유방암 예후인자로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

암 전이의 초기단계인 기저막의 파괴에 중요한 역할을 하는 MMP-2는 그 발현보다는 활성화 과정에 더 의의가 있다. 따라서 MMP-2의 활성화를 관찰하기 위해서는 기존의 면역조직화학염색이나 m-RNA 동소포합법에 의한 MMP-2 발현의 검출보다는 MMP-2의 잠재형과 활성형을 동시에 관찰할 수 있는 gelatin zymography가 필요하다. 본 연구에서는 gelatin zymography를 이용하여 MMP-2의 활성화 정도가 높을수록 전이된 림프절의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 MMP-2의 활성화는 유방암 예후인자로 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 이 점에 착안하여 암치료, 특히 전이암에 있어서 그 활성화 과정을 차단시키는 새로운 치료방법을 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 림프절에서 MMP-2의 발현 및 활성화는 그 의의를 찾을 수 없었기 때문에 림프절을 비롯한 전이 병소에 있어 MMP-2의 발현에 관한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

REFERENCES

- 1) Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 1991;5:2145-54.
- 2) Siegal GP, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA. Stages of neoplastic transformation of human breast tissue as monitored by dissolution of the basement membrane components. *Invasion Metastasis* 1981;1:54-70.
- 3) Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer* 1993;67: 1126-31.
- 4) Stetler-Stevenson WG. Type IV collagenases in tumor invasion

- and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1990;9:289-303.
- 5) Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wachter MP, Marguiles IMK, Liotta LA. The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem* 1989;264:1353-6.
 - 6) Azzam HS, Thompson EW. Collagen-induced activation of the Mr 72,000 type IV collagenase in normal and malignant human fibroblastoid cells. *Cancer Res* 1992;52:4540-4.
 - 7) Azzam HS, Arand GA, Lippman ME, Thompson EW. MMP-2 activation potential associates with metastatic progression in human breast cancer cell lines, and is independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1758-64.
 - 8) Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix-metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994;370:61-5.
 - 9) Okada A, Belloc JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2730-4.
 - 10) Thompson EW, Brunner N, Torri J, Johnson MD, Boulay V, Wright A, et al. The invasive and metastatic properties of hormone-independent but hormone-responsive variants of MCF-7 human breast cancer cells. *Clin Exp Metast* 1993;11:15-26.
 - 11) Page DL, Anderson TJ. Grading of invasive carcinoma of the breast. In: Elston CW editors. *Diagnostic histopathology of the breast*. New York: Churchill Livingstone; 1987. p.300-11.
 - 12) Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, Gaskill HV, Cruz AB J. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. *Arch Surg* 1990;125:10713.
 - 13) Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992;52:1336-41.
 - 14) Pyke C, Ralfkiaer E, Tryggvason K, Dano K. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in non-malignant stromal cells in human colon cancer. *Am J Pathol* 1993;142:359-65.
 - 15) Stearns ME, Wang M. Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. *Cancer Res* 1993;53:878-83.
 - 16) Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, et al. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 1993;53:5365-9.
 - 17) Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Immunohistochemical distribution and type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 1990;136:585-92.
 - 18) Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Höyhty M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein. *Cancer* 1998;83:1153-62.
 - 19) Pacheco MM, Mourao M, Mantovani EB, Nishimoto IN, Brentani MM. Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinicopathological correlations. *Clin Exp Metast* 1998;16:577-85.
 - 20) Lee KS, Rha SY, Kim SJ, Kim JH, Roh JK, Kim BS, et al. Sequential activation and production of matrix metalloproteinase-2 breast cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:512-9.
 - 21) Alexander CM, Werb Z. Targeted disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinases gene increases the invasive behavior of primitive mesenchymal cells derived from embryonic stem cells in vitro. *J Cell Biol* 1992;118:727-39.
 - 22) Visscher DW, Hoyhtya M, Ottosen SK, Liang C-M, Sarkar FH, Crissman JD, et al. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer* 1994;59:339-44.
 - 23) Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Progelatinase B activation by gelatinase A. *Cancer Res* 1995;55:2548-55.
 - 24) Garbisa S, Negro A, Kalebic T, Pozzatti R, Muschel R, Saffiotti U, et al. Type IV collagenolytic activity linkage with the metastatic phenotype induced by ras transfection. *Adv Exp Med Biol* 1988;233:179-86.
 - 25) Nakajima M, Welch Dr, Wynn DM, Tsuruo T, Nicolson GL. Serum and plasma Mr 92,000 progelatinase levels correlate with spontaneous metastasis of rat 13762NF mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:5802-7.
 - 26) Strongin AY, Marmor BL, Grant GA, Goldberg GI. Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem* 1993;268:14033-9.