

폐암 환자의 말초혈액에서 Matrix metalloproteinase-9 및 Stromelysin-3의 발현

성균관대학교 의과대학 내과학교실, 삼성서울병원 호흡기내과, 삼성생명과학연구소*,
마산삼성병원 호흡기내과†, 강북삼성병원 호흡기내과‡

임성용, 고원중, 김철홍, 안영미, 권영미*, 강경우†,
김호철‡, 서지영, 정만표, 임시영‡, 김호중, 권오정

= Abstract =

Expression of Matrix Metalloproteinases-9 and Stromelysin-3 in Peripheral Blood in Patients with Lung Cancer

Seong Yong Lim, M.D., Won-Jung Koh, M.D., Cheol Hong Kim, M.D.,
Young Mee Ahn, M.D., Young Mee Kwon, M.S.*, Kyeong Woo Kang, M.D.†,
Ho Cheol Kim, M.D.‡, Gee Young Suh, M.D., Man Pyo Chung, M.D.,
Si Young Lim, M.D.‡, Hojoong Kim, M.D., O Jung Kwon, M.D.

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine,
Department of Medicine, Samsung Medical Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea,
Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea*,
Masan Samsung Hospital, Masan, Korea†,
Kangbuk Samsung Hospital, Seoul, Korea‡*

Background : Matrix metalloproteinases(MMP) are essential enzymes for tumor invasion and metastasis. Among the MMP family, elevated MMP-9 and stromelysin-3(STR-3) expression have been reported to be poor prognostic factors in lung cancer patients. To evaluate the possibility of a molecular diagnosis of lung cancer using peripheral blood, the mRNA expression level of MMP-9 and STR-3 was measured using a reverse

Address for correspondence :

Hojoong Kim, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Medicine, Samsung Medical Center
50, Ilwon-Dong, Kangnam-Ku, Seoul, 135-710, Korea

Phone : 02-3410-3429 Fax : 02-3410-3849 E-mail : hjkim@smc.samsung.co.kr

transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) in patients with lung cancer.

Methods : Ninety six patients(44 patients with lung cancer, 19 pulmonary infection, and 33 control) were included. To detect MMP-9 and STR-3 mRNA expression, RT-PCR was performed in peripheral blood mononuclear cells. ELISA was also used to measure the serum level of MMP-9.

Results : MMP-9 was expressed more frequently in patients with a pulmonary infection(18/19, 94.7%) compared to lung cancer patients(26/44, 59.1%) or the controls (23/33, 69.7%) ($p=0.018$). On the other hand, STR-3 expression was observed more frequently in patients with lung cancer(37/44, 84.1%) compared to the lung infection patients(8/19, 42.1%) or control(20/33, 60.6%) ($p=0.003$). Among the lung cancer patients, MMP-9 was expressed more frequently when a tumor invaded the lymph nodes(17/24, 70.8%) compared to when a tumor did not(3/13, 23.1%) ($p=0.005$). The MMP-9 and STR-3 expression levels had no relationship with age, sex, tumor size, distant metastasis, or tumor histology. The serum MMP-9 concentration was not higher in lung cancer patients compared to patients with a pulmonary infection or the control subjects.

Conclusion : STR-3 may be used as a diagnostic marker in the peripheral blood of lung cancer patients using RT-PCR. Further studies to evaluate the clinical significance of elevated STR-3 expression in lung cancer patients is recommended. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 107-116)

Key words : Matrix metalloproteinases, Bronchogenic carcinoma, Reverse transcriptase polymerase chain reaction

서론

폐암은 빠르게 증가하여 한국에서도 남성 암 사망자 수 1위를 기록하고 있다. 폐암은 수십 년에 걸친 노력에도 불구하고 아직 치료 성적이 좋지 못하여 5년 생존율이 14%에 불과하며 조기 진단이 중요하나 이를 위한 방법도 확실한 것이 없는 실정이다. 최근 분자생물학의 발달로 폐암의 새로운 진단 표지자를 찾기 위한 노력이 계속되고 있다.

Matrix metalloproteinase(MMP)는 세포외 기질을 용해하는 효소로서 처음에는 암의 전이와 관련하여 주로 기저막을 용해시켜 암세포의 확산에 관여할 것으로 생각되었으나, 최근에는 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성에 직접 관여하여 전이에 미치는 영향이 광범위하다는 개념이 세워지고 있다¹. MMP family는 collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type metalloproteinase 등으로 구분되며 인체에서 지금까지 26가지가 보고되었다^{2,3}.

다양한 암에서 면역조직화학적 염색법 혹은 in situ hybridization 방법에 의해 특히 MMP-2와 MMP-9의 발현이 연구되었고, 이중 MMP-9는 폐암에서 발현된 경우 예후가 나쁘다고 알려져 왔다^{4,5}. MMP 발현의 일반적인 원칙은 첫째, 암이 진행함에 따라 발현되는 MMP의 종류와 수가 증가하며 둘째, 병기가 진행됨에 따라 각 MMP의 발현양이 증가하고 셋째, MMP는 암세포와 주위 정상기질에서 주로 생성된다는 것이다.

MMP-9는 일반적으로 비활성형인 zymogen형의 procollagenase(92kDa)로 생성되며, 82kD의 활성형으로 변환 후 단백분해능을 나타내게 된다. 따라서 면역조직화학적 염색법 혹은 in situ hybridization 방법을 사용 시에는 비활성형과 활성형을 구분할 수가 없는 단점이 있다. 이와 같은 단점으로 인하여 MMP 발현과 암 진행과의 상관성을 조사한 임상연구에서 공통된 연구결과가 유도되지 못하였다.

최근 폐암조직에서 stromelysin-3(STR-3, MMP

-11)가 과발현됨이 보고되었다^{6,7}. STR-3는 비소세포폐암의 기저세포와 편평상피세포암의 상피세포에서 발현되며, 한 연구에서 이의 발현 정도는 폐암의 크기와 림프절 전이 유무와 관련이 있었다⁷.

이러한 진단 표지자로서 유효성 연구는 지금까지 환자의 혈장⁸이나 혈청^{5,9}, 체액¹⁰을 이용하여 면역조직화학적 염색법, in situ hybridization 방법, zymography 등의 방법으로 시행된 것이었다. 본 연구에서는 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction : RT-PCR)을 이용하여 폐암환자의 혈액에서 messenger ribonucleic acid(mRNA) 수준에서 MMP-9와 STR-3의 발현을 측정하고 혈청내 MMP-9 단백질을 정량하여 비교함으로써 말초혈액에서 MMP-9와 STR-3의 발현이 폐암의 진단 표지자로 사용될 수 있는지를 평가하고자 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상

2001년 3월부터 8월까지 삼성서울병원에서 폐암으로 확진된 환자 44명을 대상으로 하였고, 대조군으로는 폐암으로 진단되지 않은 감염성 폐질환 환자 19명과 정상인 33명을 포함하였다. 모든 대상 환자는 인적사항과 진단명, 폐암 환자인 경우 임상적 및 병리학적 병기, 병리학적 분류를 기록하였으며, 치료 전에 혈액 20 ml를 채취하여 실험에 사용하였다.

2. RT-PCR

1) 말초 혈액 내 단핵세포의 분리

EDTA 처리된 환자의 혈액 10 ml를 2% EDTA 함유 PBS 10 ml로 희석하여 동량의 ficllo-hypaque (NYCOMED, Oslo, Norway)용액에 서서히 첨가시킨 다음 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 단핵

세포를 얻었다. 분리한 단핵세포를 PBS로 다시 씻은 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단핵세포를 모아 실험에 사용하였다.

2) RNA 분리

분리한 단핵세포를 1 ml의 trizol(GIBCOBRL, NY, USA)을 넣어 잘 섞은 후 200 μ l의 chloroform을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상층액만을 조심스럽게 새 tube로 옮겨 담은 후 상층액의 1/10 분량의 3M sodium acetate 50 μ l, 1 ml의 isopropanol을 넣고 상온에 20분간 둔 다음 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 침전물은 건조하여 50-100 μ l의 DEPC 처리 DW에 녹여 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

3) cDNA의 제조

cDNA를 제조하기 위해 2 μ l의 RNA(2 μ g)과 2 μ l의 oligo(dT)(0.5 μ g), 14 μ l DW를 넣고 70℃에서 10분간 반응시킨 후 곧바로 ice에 넣어 방치시킨 후 5x transcriptase buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) 8 μ l, 10 mM DTT 4 μ l, 2.5 mM dNTP mixture 8 μ l을 넣고 25℃에서 10분간 방치시킨 후 42℃에서 2분간 반응시켰다. Superscript II reverse transcriptase (GIBCOBRL, Gattitheberg, USA)를 2 μ l 첨가 후 42℃에서 50분간 반응 시켰으며 70℃에서 15분간 비활성화시킨 후 -20℃에 저장하였다.

4) PCR

위와 같은 방법에 의해 합성된 cDNA를 대상으로 HYBAID PCR 기기를 이용하여 PCR를 시행하였다. PCR 반응에 사용된 primer와 반응 조건은 Table 1과 같다. 양성 대조군으로 A549 폐암세포주를 이용하였다. 매 sample 마다 GAPDH의 발현을 검사하여 RNA의 추출과 역전사 반응이 적절한지를 확인하였다.

Table 1. Primers used in PCR amplification

mRNA	Primer sequence	Annealing Temp (°C)	Product size (bp)
GAPDH Sense	5'ATTGGGAAGGTGAAGGTCGG	55	450
Anti	5'ATGATCTTGAGGCTGTTGTC		
MMP-9 Sense	5'ACACCTCTGCCCTCACCATGA	60	2158
Anti	5'AAAGCAGGACGGGAGCCCTAG		
IN-Sense	5'CGTGGCCCAGGTGACCGGGGC	60	298
IN-Anti	5'CTAGTCCTCAGGGCACTGCAG		
STR-3 Sense	5'CTAAAGGTATGGAGCGATCT	55	1439
Anti	5'ACCTCACAACAGGGATACAG		
IN-Sense	5'CTACTGGAAGTTTGACCCCTG	55	354
IN-Anti	5'ACTGCCCTTCCTCTTAAGTC		

Definition of abbreviations : GAPDH =glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; MMP-9=matrix metalloproteinase-9 ; STR-3=stromelysin-3

3. MMP-9 ELISA

1) 혈청분리

혈액을 4℃에 두어 응고시킨 뒤 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

2) ELISA

혈청 내 MMP-9의 정량은 Human MMP-9 Immunoassay(R&D systems, Minneapolis, USA) ELISA kit을 사용하여 측정하였다.

4. 통계학적 분석

통계분석은 SPSS (version 10.0)을 이용하여 실시하였다. 각 군간 혈청 MMP-9 농도 측정값은 평균 ± 표준편차로 요약하였다. 세 군간 RT-PCR을 이용하여 측정한 MMP-9과 STR-3의 발현율의 차이 그리고 폐암환자군내에서 병기, 병리학적 소견, 연령, 성별에 따른 발현율의 차이는 chi-square test 또는 Fisher's exact test로 분석하였고, 세 군간 혈청내

MMP-9 농도의 차이는 ANOVA test로 분석하였다. MMP-9 mRNA 발현유무에 따른 혈청 MMP-9 농도의 차이는 Student t-test로 분석하였다. 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

1. RT-PCR을 이용한 MMP-9과 STR-3의 발현을

RT-PCR후 특이 band의 유무를 육안적으로 확인할 수 있는 경우 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

44명의 폐암 환자중에서 MMP-9은 26명(59.1%), STR-3은 37명(84.1%)이 PCR 양성으로 판정되었고, 33명의 정상인에서는 MMP-9 23명(69.7%), STR-3 20명(60.6%)이 양성으로, 19명의 호흡기 감염환자의 경우 MMP-9 18명(94.7%), STR-3 8명(42.1%)이 양성으로 판정되었다. 폐암 환자와 감염환자 그리고 정상인 간의 MMP-9과 STR-3 mRNA 발현과의 관계는 MMP-9은 감염환자에서 유의하게 높게 발현되며(p=0.018, chi-square test), STR-3은 폐암환자에서 유의하게 높게

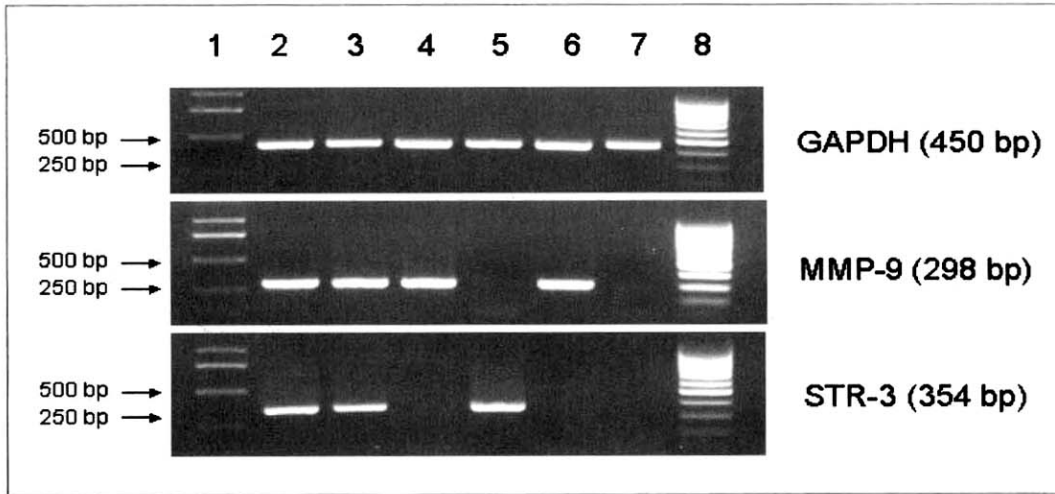


Fig. 1. Detection of mRNA in peripheral blood mononuclear cells that expressed MMP-9 and STR-3 by RT-PCR. Lane 1:1kb ladder; Lane 2:A549 cell line; Lane 3:lung cancer (adenocarcinoma); Lane 4:lung cancer(squamous cell carcinoma); Lane 5:lung cancer(squamous cell carcinoma); Lane 6:normal control; Lane 7:normal control; Lane 8: 100bp ladder

Table 2. Overall positive expression rate of MMP-9 and STR-3 mRNA on peripheral blood mononuclear cells

	Lung cancer (n=44)	Pulmonary infection (n=19)	Control (n=33)	P value*
MMP-9	26 (59.1%)	18 (94.7%)	23 (69.7%)	0.018
STR-3	37 (84.1%)	8 (42.1%)	20 (60.6%)	0.003

Definition of abbreviations : MMP-9=matrix metalloproteinase-9 ; STR-3=Stromelysin-3

*calculated by chi-square test

발현되었다($p=0.003$, chi-square test) (Table 2).

2. 폐암 환자들간의 MMP-9과 STR-3 mRNA의 발현을 비교

폐암 환자들간에 MMP-9과 STR-3 mRNA의 발현율을 비교한 결과는, MMP-9의 경우 림프절 전이가 있는 군에서 70.8%(17/24)로 림프절 전이가 없는 군 23.1%(3/13)보다 통계적으로 유의하게 높게 나타났다($p=0.005$, chi-square test). 그 이외에 T

병기, 원격전이 유무, 종양의 병리소견, 연령, 성별에 따른 MMP-9과 STR-3 mRNA의 발현은 의미있는 차이를 보이지 않았다(Table 3).

3. 혈청내의 MMP-9 농도

ELISA로 측정된 대상 환자 혈청내의 MMP-9의 농도는 정상인 대조군에서 311 ± 281 ng/ml, 감염성 폐질환군에서 400 ± 534 ng/ml, 폐암 환자군에서 237 ± 146 ng/ml로 세 군간에 의미있는 차이는 없

Table 3. Positive expression rate of MMP-9 and STR-3 mRNA on peripheral blood mononuclear cells in patients with lung cancer according to the stage, tumor histology, age, and sex

	Subgroup	MMP-9 positive	p value*	STR-3 positive	p value*
T stage	T1-2	15/25 (60.0%)	0.295	20/25 (80.0%)	0.367
	T3-4	5/12 (41.7%)		11/12 (91.7%)	
N stage	N0	3/13 (23.1%)	0.005	12/13 (92.3%)	0.301
	N1-3	17/24 (70.8%)		19/24 (79.2%)	
M stage	M0	12/25 (48.0%)	0.286	22/25 (88.0%)	0.315
	M1	8/12 (66.7%)		9/12 (75.0%)	
Histology	SQ	8/16 (50.0%)	0.388	14/16 (87.5%)	0.793
	AD	9/18 (50.0%)		15/18 (83.3%)	
	SC	2/2 (100%)		2/2 (100%)	
Age	<50 years	7/10 (70.0%)	0.425	8/10 (80.0%)	0.687
	≥50 years	19/34 (55.9%)		29/34 (85.3%)	
Sex	male	20/34 (76.9%)	0.947	27/34 (73.0%)	0.177
	female	6/10 (60.0%)		10/10 (100%)	

Definition of abbreviations : MMP-9=matrix metalloproteinase-9 ; STR-3=stromelysin-3 ; SQ=squamous cell carcinoma ; AD=adenocarcinoma ; SC=small cell carcinoma

*calculated by chi-square test or Fishers exact test

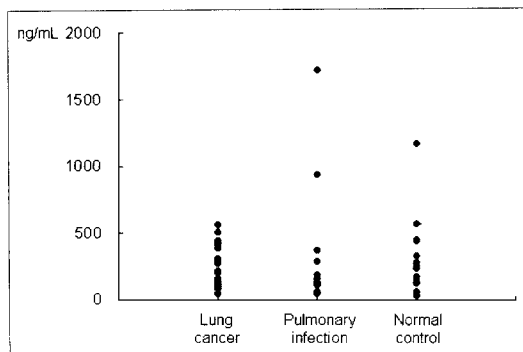


Fig. 2. Serum concentration of MMP-9 measured by ELISA. Serum MMP-9 concentration was not increased in lung cancer patients compared to patients with pulmonary infection or control subjects ($p=0.382$, ANOVA test).

었다($p=0.382$, ANOVA test) (Fig. 2). 또한 MMP-9 mRNA의 발현 유무에 따른 혈청내 MMP-9 농도도 차이가 없었다(MMP-9 mRNA 발현 양성

군 ; 312 ± 339 ng/ml, MMP-9 RNA 발현 음성군 ; 240 ± 174 ng/ml) ($p=0.372$, Student t-test).

고 찰

암세포의 생물학적 특성을 예측할 수 있는 연관된 표지자의 발견은 임상적으로 매우 중요하다. 이론적으로 특히 암세포의 침습과 전이 시에 유리되는 특이 단백질을 비침습적으로 혈액에서 측정할 수 있다면 암 전이의 조기 진단을 통한 보조 항암요법 또는 생물학적 치료로 예후를 향상시키는 역할을 하게 될 것으로 기대되어 다양한 암종에서 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

Liotta 등¹¹이 암 전이의 과정에서 암세포의 기저막에의 부착, 단백질분해 효소의 분비, 용해된 기저막을 통한 혈관 내로의 전이의 3단계 가설을 제시한 후, Fidler 등¹²은 전이의 단계적인 과정이 모든 암종류에서 유사하며 암세포의 증식, 신생혈관의 생성, 세포의 기질의 용해, 혈관 내로의 이동과 증식, 전이부위에서

의 혈관의 유출과 증식의 단계를 밟는다고 하였다.

정상 조직 및 혈관 내피세포의 기저막은 암 전이의 기계적 장벽 역할을 하는데, MMP는 이름이 의미하듯이 세포의 기질의 기저막의 구성 성분 중 type IV collagen, laminin, proteoglycan 등의 단백 분해를 통해 전이 과정에 관여할 뿐만 아니라 최근에는 암 발생부와 전이부위에서 암세포의 성장과 혈관생성과 같은 증식 환경의 조절을 담당하는 등 역할이 확대되어 알려지고 있다².

MMP family 중 폐암과 연관되어 Gelatinase A (MMP-2), Gelatinase B (MMP-9), Stromelysin-1 (MMP-3), Matrilysin (MMP-7), Stromelysin-3 (MMP-11), MT1-MMP (MMP-14) 등의 발현이 보고되었는데, 그 중 MMP-2, MMP-3, MMP-9가 기저막 type IV collagen의 분해와 연관되어 암 전이에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다^{2,13}.

본 연구에서 사용된 RT-PCR 기법은 mRNA 수준에서 조직에 특이한 항원을 검출할 수 있고, $1:10^6-10^7$ 의 민감도를 보여 기존의 면역조직화학 검사보다 민감도가 100배정도 높은 것으로 알려져 있다¹⁴. 면역조직화학 검사는 비활성형 효소까지 포함하여 발현이 되므로 활성형의 MMP를 반영한다고 볼 수 없고, 시간이 오래 걸리며 암 전이의 일상적인 검사로 적용하기 어려워 암 전이의 조기 표지자로서의 검사 방법이 될 수 없으므로 본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 결과를 살펴보고자 하였다.

RT-PCR은 적은 양의 mRNA라도 증폭을 통하여 검출할 수 있는 민감도가 높은 방법이지만 혈액내의 암세포의 검출에는 몇 가지 문제점이 있을 수 있다. 첫째, 암세포가 혈액 내로 계속해서 나오지 않고 간헐적으로 나오기 때문에 1회의 혈액채취로는 위음성의 가능성이 크다는 점이다. 둘째, 실험실 오염이 있는 경우나 mRNA 표지자가 정상 세포에서도 발현이 되는 경우 위양성으로 인해 특이도가 떨어질 수 있으며, 암 이외의 세포에서 저농도로 발현되는 경우와 암세포에서 고농도로 발현되는 경우를 구분할 수 없는 단점이 있다^{15,16}.

본 연구에서는 폐암 진단의 표지자로서 MMP-9, STR-3를 선택하여 그 유용성을 살펴보았는데, 이의 유용성을 평가하려면 폐암세포에서 특이적인 mRNA 발현에 대한 규명이 먼저 선행되어야 한다. 비소세포 폐암에서의 면역조직화학적 검사 등을 이용한 MMP 발현에 대한 이제까지의 연구를 보면, Thomas 등¹⁷은 MMP-1, -2, -9, -11, -13, -14를 이용한 면역조직화학적 검사 결과 40-70%의 범위에서 발현을 관찰하였고, Nawrocki 등¹⁸도 MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11, -14에 대한 Northern blot 결과 14-64%의 범위에서 발현이 되며 특히 MMP-1, -3, -7, -9, -11이 과발현됨을 보고하였다. 이렇게 여러 종류의 MMP가 발현되어 특이 mRNA 발현을 관찰하기 어렵고, MMP-9, STR-3가 비교적 과발현되며 예후와 연관이 있다는 기존의 결과 등을 토대로 이번 연구에서는 두 표지자를 선택하였다.

폐암조직에서 MMP-9 발현이 증가되어 있는 경우 예후가 좋지 않다는 보고가 있지만, 혈장이나 혈청에서의 MMP-9 농도와 폐암조직에서의 MMP-9 합성이나 종양기(tumor stage)간에는 연관성이 없다는 연구 결과¹⁹로 볼 때 혈액에서의 MMP-9이 암세포에서 유래된 것인지 확실치 않고 예후 인자 및 전이의 표지자로서의 유용성에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

또한 감염성 폐질환 군에서 MMP-9이 높은 발현을 보인 이유는 확실치 않지만 MMP가 폐기종, 기관지 확장증, 간질성 폐섬유화증 등과 같은 염증 및 조직 손상과 연관된 다양한 폐질환에서 증가한다는 O'Connor 등²⁰의 보고와, MMP-9가 주로 호중구와 대식세포, 호산구, 림프구와 같은 염증세포에서 만들어 진다는 사실²⁰로 볼 때 감염 질환에서의 급성병기 단백질(acute phase protein)로 작용하여 높은 발현을 보였을 가능성이 있을 것으로 생각되며 추후 이에 대하여 혈액에서의 백혈구수, 호중구수 등과의 연관성에 대한 검정이 필요할 것으로 생각된다.

림프절 전이시 MMP-9 발현이 증가된 결과로 보아 폐암 환자에 있어서는 MMP-9의 발현이 림프절 전이

의 가능성을 암시할 수 있다고 생각되며 암세포의 MMP-9 발현과 림프절에서의 MMP-9 발현에 대한 상관성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

혈청내의 ELISA로 측정된 MMP-9 농도는 연구 결과 세 군간에 차이가 없었다. 폐암 환자의 혈청이나 혈장에서 MMP-9 농도를 측정하는 연구는 많지 않으면서 증가되어 있다는 보고와 차이가 없다는 보고가 있어 일률적인 결론을 내릴 수는 없다고 생각된다.

말초혈액에서 STR-3 mRNA 발현을 측정한 보고는 아직까지 없는데, 본 연구에서는 폐암 환자에서 유의하게 높은 발현을 보였다. 면역조직화학 검사를 이용한 기존 연구에서 STR-3의 과발현은 주로 미분화 암세포의 침습과 전이와 상관관계를 보였으며, Karameris 등⁶은 STR-3가 상피세포가 비정형(atypia) 단계에서 암으로 진행할수록 발현이 증가함을 보고 미분화 암종의 림프절 전이에서 유용한 표지자라고 하였다.

STR-3는 세포외 기질에 대한 단백 분해 역할이 없고 $\alpha 1$ -protease inhibitor, $\alpha 2$ -antiplasmin과 같은 serine protease inhibitor를 기질로 하므로 $\alpha 1$ -protease inhibitor, $\alpha 2$ -antiplasmin의 결핍을 초래하여 각각 neutrophil elastase, plasmin을 증가시켜 폐포 구조, 세포외 기질의 파괴 및 다른 proMMPs들을 활성화 시키는 역할을 통해 전이를 일으키는 것으로 여겨지고 있다⁷.

이와 같이 STR-3가 폐암의 침습과 전이에 중요한 역할을 담당하며, 말초혈액에서 높게 발현되는 결과로 볼 때, 폐암 진단의 유용한 표지자 역할을 할 가능성을 시사한다고 생각되며 추후 연구에서 이러한 역할이 확립이 되면 암 치료에 있어 중요한 치료 목표로도 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 지금까지 보고된 여러 논문들에서 혈청, 암조직, 림프절, 소변 등에서 MMP-9이 유의한 폐암 진단 표지자로 알려졌지만, 본 연구에서 말초혈액 단핵세포를 대상으로 MMP-9 mRNA 발현율을 RT-PCR을 이용하여 정성적으로 측정한 결과와 혈청내 MMP-9 단백질을 ELISA를 이용하여 정량적으로

측정한 결과 정상인과 폐감염질환과 폐암을 구별할 수 있는 진단 표지자로 사용하기에는 제한점이 있음을 알 수 있었다. 하지만 말초혈액 단핵세포에서 RT-PCR로 측정된 STR-3 mRNA 발현율은 정상인이나 폐감염질환 환자에 비해 폐암 환자에서 유의하게 높아 STR-3는 폐암의 진단 표지자로서 사용될 가능성이 있다고 판단된다.

요 약

연구배경 :

Matrix metalloproteinase(MMP)는 세포외 기질중 기저막의 용해 및 혈관 생성에 관여하여 전이를 일으키며, 이중 MMP-9과 STR-3가 폐암에서 발현된 경우 예후가 나빠지며 림프절 전이와 연관이 있다는 보고가 있다. 말초혈액에서 MMP-9와 STR-3의 발현이 폐암의 진단 표지자로 사용될 수 있는지를 평가하고자 하였다.

방 법 :

44명의 폐암 환자, 19명의 감염성 폐질환 환자, 33명의 정상인의 혈액을 채취하여 단핵구를 분리하여 MMP-9과 STR-3의 RT-PCR을 시행하였고, 혈청내 MMP-9 단백질을 ELISA로 측정하여 비교 분석하였다.

결 과 :

MMP-9은 폐암환자(26/44, 59.1%)와 정상 대조군(23/33, 69.7%)에 비해 폐감염환자(18/19, 94.7%)에서 유의하게 높게 발현되며($p=0.018$), STR-3은 폐감염환자(8/19, 42.1%)와 정상 대조군(20/33, 60.6%)에 비해 폐암환자(37/44, 84.1%)에서 유의하게 높게 발현되었다($p=0.003$). MMP-9는 폐암 환자들 사이에서 림프절 전이가 있는 군(17/24, 70.8%)에서 없는 군(3/13, 23.1%)보다 유의하게 높게 발현되었으며($p=0.005$), 그 이외에 T 병기, 원격전이 유무, 종양의 병리소견, 연령, 성별에 따른 MMP-9과 STR-3 mRNA의 발현차이는 관찰되지 않았다. 세 군간 혈청내 MMP-9 농도의 차이는 관찰

되지 않았다.

결 론 :

RT-PCR을 이용한 말초혈액 단핵세포에서의 STR-3 mRNA 발현 측정은 폐암의 진단 표지자로 사용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 문용화, 양훈, 정희철, 라선영, 김태수, 유내춘 등. 위암에서 ex vivo Model을 이용한 MMP-9에 대한 Gabexate Mesylate IC50의 응용 : 예후인자 및 치료대상 선정기준. 대한암학회지 2000;32:7-18
2. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases : biologic activity and clinical implications. J Clin Oncol 2000;18:1135-49
3. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase. J Biol Chem 1999;274:21491-4
4. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase(gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. Pathol Int 1997;47:461-9
5. Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer TIMP-1 as a prognostic marker. Anticancer Res 2000;20:1311-6
6. Karameris A, Panagou P, Tsilalis T, Bouros D. Association of expression of metalloproteinases and their inhibitors with the metastatic potential of squamous-cell lung carcinomas : a molecular and immunohistochemical study. Am J Respir Crit Care Med 1997;156:1930-6
7. Delebecq TJ, Porte H, Zerimech F, Copin MC, Gouyer V, Dacquembronne E, et al. Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2000;6:1086-92
8. Farias E, Ranuncolo S, Cresta C, Specterman S, Armanasco E, Varela M, et al. Plasma metalloproteinase activity is enhanced in the euglobulin fraction of breast and lung cancer patients. Int J Cancer 2000;89:389-94
9. Baker T, Tickle S, Wasan H, Docherty A, Isenbrg D, Waxman J. Serum metalloproteinases and their inhibitors : markers for malignant potential. Br J Cancer 1994;70:506-12
10. Yonemura Y, Fujimura T, Ninomiya I, Kim BS, Bandou E, Sawa T, et al. Prediction of peritoneal micrometastasis by peritoneal lavaged cytology and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for matrix metalloprotenase-7 mRNA. Clin Cancer Res 2001;7:1647-53
11. Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix : Rhoads Memorial Award lecture. Cancer Res 1986;46:1-7
12. Fidler IJ. Chapter 7. Molecular biology of cancer : Invasion and metastasis. In : DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer : Principles and practice of oncology. 5th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, Inc ; 1997.p.135-52
13. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. Cancer Res 1993;53:140-6
14. De Luca A, Pignata S, Casamassimi A, D'Antonio A, Gridelli C, Rossi A, et al. Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay. Clin Cancer Res 2000;6:1439-44
15. 김 혁, 이영열, 정태준, 최일영, 김인순, 한동수 등. 위암에서 역전사-중합효소 연쇄반응을 이용한

- 말초혈액 내 미세암 전이의 검출. 대한암학회지 2000;32:304-11
16. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:2632-40
17. Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, Feld R, Tsao MS. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000;190:150-6
18. Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, gallery P, Tournier JM et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas : quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer* 1997;72:556-64
19. Lisaza T, Fujisawa T, Suzuki M, Motohashi S, Yasufuku K, Yasukawa T, Baba M, Shiba M. Elevated levels of circulating plasma matrix metalloproteinase 9 in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999;5:149-53
20. O, Connor CM, FitzGerald MX. Matrix metalloproteases and lung disease. *Thorax* 1994;49:602-9
-