

## 종양의 성장 및 전이에 있어서 NF- $\kappa$ B의 역할

<sup>1</sup>전남대학교 자연과학대학 생명과학부, <sup>2</sup>광주여자대학교 식품환경보건학부

고현미<sup>1</sup> · 최정화<sup>1</sup> · 나명석<sup>2</sup> · 임선영<sup>1</sup>

### Role of Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B Activation in Tumor Growth and Metastasis

Hyun-Mi Ko<sup>1</sup>, Jung-Hwa Choi<sup>1</sup>, Myung-Suk Ra<sup>2</sup> and Suhn-Young Im<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, The Institute of Basic Sciences, Chonnam National University,

<sup>2</sup>Department of Food Environment and Health, Kwangju Women's University, Kwangju, Korea

#### ABSTRACT

**Background:** Platelet-activating factor (PAF) induces nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation and angiogenesis and increases tumor growth and pulmonary tumor metastasis *in vivo*. The role of NF- $\kappa$ B activation in PAF-induced angiogenesis in a mouse model of Matrigel implantation, and in PAF-mediated pulmonary tumor metastasis were investigated. **Methods:** Angiogenesis using Matrigel and experimental pulmonary tumor metastasis were tested in a mouse model. Electrophoretic mobility shift assay was done for the assessment of NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus. Expression of angiogenic factors, such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\alpha$ , basic fibroblast growth factor (bFGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were tested by RT-PCR and ELISA. **Results:** PAF induced a dose- and time-dependent angiogenic response. PAF-induced angiogenesis was significantly blocked by PAF antagonist, CV6209, and inhibitors of NF- $\kappa$ B expression or action, including antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF- $\kappa$ B (p65 AS) and antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol and N-acetyl-L-cysteine. *In vitro*, PAF activated the transcription factor, NF- $\kappa$ B and induced mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF, VEGF, and its receptor, KDR. The PAF-induced expression of the above mentioned factors was inhibited by p65 AS or antioxidants. Also, protein synthesis of VEGF was increased by PAF and inhibited by p65 AS or antioxidants. The angiogenic effect of PAF was blocked when anti-VEGF antibodies was treated or antibodies against TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and bFGF was co-administrated, but not by antibodies against TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and bFGF each alone. PAF-augmented pulmonary tumor metastasis was inhibited by p65 AS or antioxidants. **Conclusion:** These data indicate that PAF increases angiogenesis and pulmonary tumor metastasis through NF- $\kappa$ B activation and expression of NF- $\kappa$ B-dependent angiogenic factors. (*Immune Network* 2003;3(1):38-46)

**Key Words:** Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, platelet-activating factor (PAF), angiogenesis vascular endothelial growth factor (VEGF)

#### 서 론

종양 내 혈관형성은 암의 증식 및 침윤, 전이에 필수적으로 수반되는 과정이다(1,2). 따라서 종양의 전이를 차

단하기 위해서는 혈관형성 기작의 이해가 매우 중요하다. 혈관형성에 관여하는 인자들에는 vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), interleukin (IL)-1, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  등이 있으며 이 인자들은 종양세포 혹은 숙주 세포에서 분비되어 autocrine 또는 paracrine 경로를 통해 종양 내 혈관형성을 자극한다(3-7). 이들 중 가장 강력한 인자로 알려진 VEGF는 heparin에 결합된 당단백으로 주로 내피세포에서 발현되는 fms-like tyrosin kinase (flt),

책임저자 : 임선영, 전남대학교 자연과학대학 생명과학부

☎ 500-757, 광주광역시 북구 용봉동 300

Tel: 062-530-3414, Fax: 062-530-0848

E-mail: syim@chonnam.ac.kr

이 논문은 1999년 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

kinase domain receptor (KDR)와 같은 tyrosine kinase 수용체들과 결합하여(8-10) 내피세포를 자극하고 혈관투과성을 증가시킨다(11-13). 또한 혈관형성과정에 관여하는 많은 단백질 분해 효소들의 발현을 증가시켜(14,15) 여러 조직에서 혈관형성능을 나타내며 종양증식에 관여한다(13,16-18). 최근 VEGF를 포함한 혈관형성에 관여하는 인자들이 생체 내 염증반응과 밀접히 관련되어 있음이 보고되고 있는데 즉, 염증 반응에 관여하는 대식세포, 단구세포 등이 VEGF를 비롯하여 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$  및 IL-1 등을 생산하며, 이들이 내피세포를 자극하여 혈관형성을 유도한다(6,19-21).

염증반응의 조절에 중요한 인자로 대두되고 있는 혈소판활성인자(platelet-activating factor, PAF)는 phospholipid로 혈소판, 호중구, 대식세포, 내피세포 및 비만세포 등에서 분비된다. 최근 연구된 바에 의하면 PAF는 종양세포에서 분비되어 종양세포의 증식과 이동을 자극하고 종양 내 혈관형성을 유도하여 종양의 증식 및 전이를 항진시킨다(22,23). 염증반응 시 즉시 분비되어 NF- $\kappa$ B를 활성화하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 등과 같은 염증성 cytokine들의 생산을 유도한다(24). *In vitro*에서, 직접적으로 내피세포를 유인하며 혈관투과성을 증가시키고 혈관형성을 유도하며(25-27), TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 혈관형성의 중요한 매개체로 작용한다(28). 이러한 사실들은 NF- $\kappa$ B가 혈관형성에 필수적이며 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 PAF가 혈관형성에 매우 중요한 요인으로 작용한다는 사실을 시사한다. 그러나 PAF에 의한 혈관형성 항진 여부 및 그 기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

전사인자인 NF- $\kappa$ B는 Rel family에 속하는 heterodimer 단백질로 정상적인 상태에서는 I $\kappa$ Bs라는 억제단백질과 결합되어 세포질에 불활성상태로 존재하다가 성장인자, cytokines 및 산화적 스트레스 등과 같은 자극에 의하여 I $\kappa$ Bs가 인산화되면 NF- $\kappa$ B가 I $\kappa$ Bs로부터 떨어져 나와 핵으로 이동하여 염증반응 및 면역반응에 관여하는 여러 유전자의 발현을 조절한다(29-33). 최근 연구에 의하면 NF- $\kappa$ B는 PAF를 비롯한 여러 성장인자 및 cytokine들에 의해 활성화되고 다양한 염증반응에 관여하며(24,34,35), NF- $\kappa$ B 의존적이며 혈관형성인자로 알려져 있는 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 등 여러 cytokine들의 유전자 발현을 조절하며, 혈관형성 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(36-40). 이러한 결과들은 PAF에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화와 혈관형성의 관련성을 시사해 주고 있다.

본 연구에서는 PAF에 의해 유도되는 혈관형성에 NF- $\kappa$ B 관련성 및 NF- $\kappa$ B-의존성 혈관형성인자들의 역할을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험동물.** 실험동물은 한국화학연구소(대덕)에서 구입

한 20 g 내외로 8~10주 된 암컷 C57BL/6와 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 온도 22°C, 습도 55%의 환경조절 제어장치에서 최소한 사용 2주일 전부터 사육하여 사용하였다.

**시약.** PAF (1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine), N-acetyl-L-cysteine (NAC), (+)- $\alpha$ -tocopherol acid succinate (Vit. E)은 Sigma (St. Louis, MO)로부터, PAF 길항제인 CV6209는 WAKO (Kyoto, Japan)에서 구입하였다. 기저막 단백질 추출물로 구성된 Matrigel은 Collaborative Res. Inc. (Bedford, MA)에서 구입하였고, VEGF와 bFGF의 중화항체와 ELISA kit, VEGF 수용체인 flt-1/Fc과 KDR/Fc의 chimeras 및 goat IgG는 R&D System (Minneapolis, MN)에서, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\alpha$ 의 중화항체와 ELISA kit는 Endogen (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Rabbit IgG는 Sigma 제품을 이용하였다. TansIT In Vivo Gene Delivery System은 Pan Vera사 제품을 사용하였다. Phosphorothiorate oligonucleotides는 NF- $\kappa$ B p65의 전사시작 부위를 포함한 5' 끝부분 19-mer의 antisense oligonucleotide (p65 AS, 5'-GAAACAGATCGTCCATGGT-3')와 nonsense oligonucleotide (p65 NS, 5'-GTACTACTCTGAGCAAGGA-3')를 Peptron (Korea)에서 제작하여 사용하였다.

**세포배양.** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)는 인간의 태줄정맥으로부터 Schleimer & Rutledge(41)의 방법에 따라 분리, 배양하였다. 마우스 내피세포주인 SVEC4-10과 흑색종 B16F10은 10%의 fetal bovine serum (Gibco. Lab. Grand Island, NY)을 함유한 D-MEM과 RPMI1640에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

**혈관형성 실험.** *In vivo* 혈관형성 실험은 액화 Matrigel에 시료를 혼합하여 마우스 배부에 피하 주사한 후 체온에 의해 고체화된 Matrigel을 일정 기간 후 마우스로부터 분리하였다. 분리한 Matrigel을 RBC lysis buffer를 넣고 4°C에서 24시간 방치한 후 Drabkin's reagent (Sigma)를 이용하여 Matrigel 내의 hemoglobin 양을 혈관형성 정도로 측정하였다.

**Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** 핵추출은 Dignam 등(42)의 방법에 따라 추출하고, Igk-chain 결합 부위를 갖는 oligonucleotides ( $\kappa$ B; 5'-CCGG TTAACAGAGGGGGCTTTCCGAG-3')를 probe로 사용하여 oligonucleotide의 상보적인 가닥을 부착시킨 후  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP로 표지하여 핵 추출물과 반응시킨다. 반응 혼합액은 4% polyacrylamide gel에 전기영동하여 건조시킨 후 -70°C에서 autoradiography하였다.

**RT-PCR.** VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF, KDR의 mRNA 발현정도를 분석하기 위하여 0.1 $\mu$ g의 total RNA를 oligo (dT)15와 AMV 역전사 효소를 함유한 역전사반응액 (Promega, Madison, WI)과 혼합하여 42°C에서 30분 동안

반응시켜 cDNA를 합성하였다. 1 $\mu$ l의 cDNA를 증합연쇄 반응액과 혼합하고 ThermoCycler (Perkin-Elmer, 2400, Norwalk, CT)를 이용하여 95°C에서 30초, 62°C에서 30초, 72°C에서 30초를 반응시켜 증폭한 후 1.2% agarose gel에 전기영동하였다. Gel은 ethidium bromide로 염색하고 Fluor -STM imager (Bio-Rad, Munchen Germany)를 이용하여 각 band의 density를 측정 후 각 cytokine에 대한 mRNA 발현 정도는 cytokines/ $\beta$ -actin으로 나타내었다. 이때 사용된 primers는 다음과 같다. VEGF; 5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3' and 5'-GCAACGCGAGTCTGTGTTTT G-3', TNF- $\alpha$ ; 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3' and 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3', IL-1 $\alpha$ ; 5'-GTC TCTGAATCAGAAATCCTTCTATC-3' and 5'-CA TGTC AAATTTCACTGCTTCATCC-3', bFGF; 5'-CAAGCGGC TGTACTGCAAAAAC-3' and 5'-CAGCTCTTAGCAGAC ATTGG-3', KDR; 5'-AGACTTTGAGCATGGAAG-3' and 5'-CCATTCCACCAAAAGATG-3',  $\beta$ -actin; 5'-GGGTCA GAATCCTATG-3' and 5'-GTAACAATGCCATGTTCA AT-3'.

**ELISA.** VEGF는 세포에 200 $\mu$ l의 RIPA 용액(0.1% SDS, 1% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM phenyl-methylsulphonyl fluoride)를 처리하고, 원심분리 후 상층액에서 취하여 ELISA kit (R & D system)를 이용하여 정량하였으며, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\alpha$ , bFGF는 세포 배양액으로부터 ELISA kit (Endogen)를 이용하여 정량하였다.

**NF- $\kappa$ B AS oligonucleotide의 처리.** *In vivo* 생체 내 유전자 전달은 Trans IT In Vivo Gene Delivery System (Pan

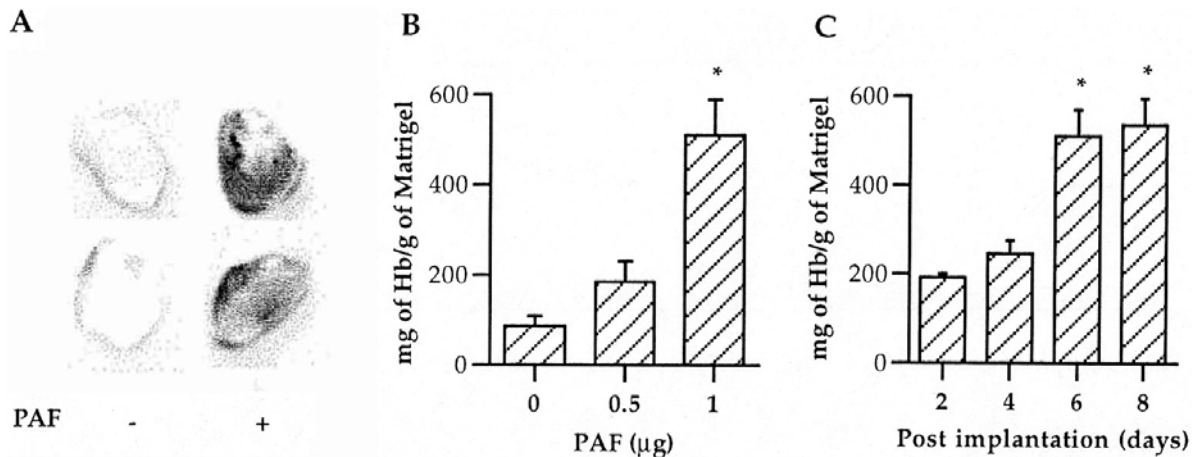
Vera, US)을 이용하였다. Trans IT In Vivo Polymer 용액과 p65 AS 또는 NS oligonucleotides를 섞어 유전자 복합체를 만든 후 흑색종 주사 7일과 4일 전에 마우스 미정맥에 주사하였다. *In vitro* 세포 내 유전자(p65 AS 또는 NS oligonucleotide) 전달은 PAF처리 3일 또는 5일 전에 처리하였다.

**암전이 실험.** 암세포의 전이 실험은  $1.5 \times 10^5$  흑색종 세포를 마우스 미정맥에 주사하고 2주 후에 폐를 적출하여 Bouin's 용액(Sigma, St Louis, Mo)에 고정한 후 폐 표면의 흑색종 집락을 해부현미경을 이용하여 관찰, 계산하였다.

**통계.** 실험결과와 유의성 검증은 2 set의 결과 검증 시에는 student's *t* test로 분석하였으며, 다수의 결과 검증 시에는 ANOVA (StatView, version 4.5)를 실시하였다. 모든 실험은 각각 2회 이상 실시한 실험결과를 토대로 통계, 분석하였다.

## 결과

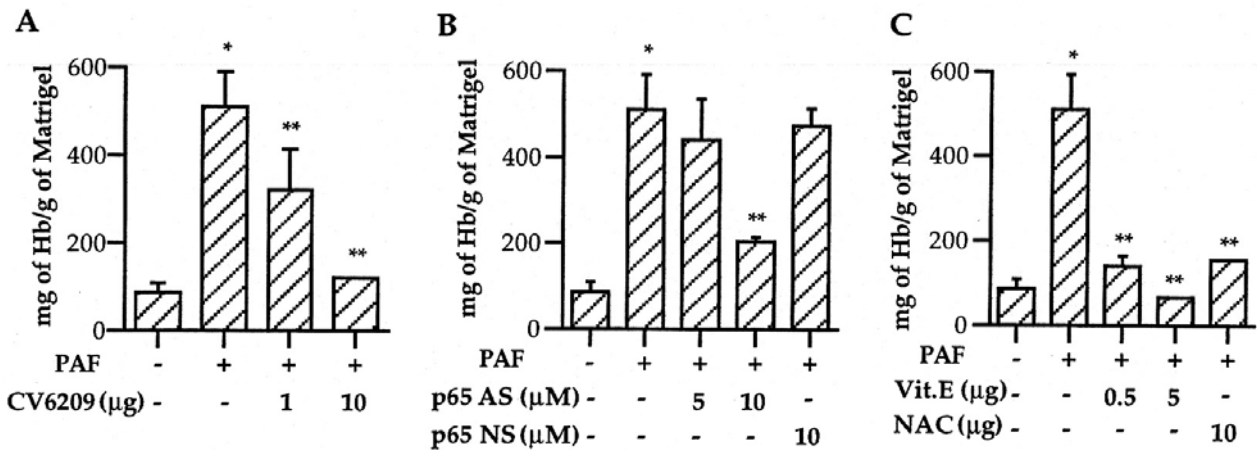
**혈소판활성인자에 의한 혈관형성의 항진.** 염증반응 시 중요한 중개물질로 작용하는 PAF이 혈관형성을 유도하는지 알아보기 위하여, BALB/c 마우스의 배부에 Matrigel을 주사하고 일정시간 후 Matrigel plug 내의 헤모글로빈의 양을 측정하여 혈관형성 정도를 정량하였다. Fig. 1A에서와 같이 PAF에 의해 Matrigel 내에 증가된 혈관형성을 관찰할 수 있었으며, 혈관형성정도는 PAF 1 $\mu$ g/plug 농도에서(Fig. 1B), 그리고 Matrigel 주사 후 6일에 현저히 증가하였다(Fig. 1C).



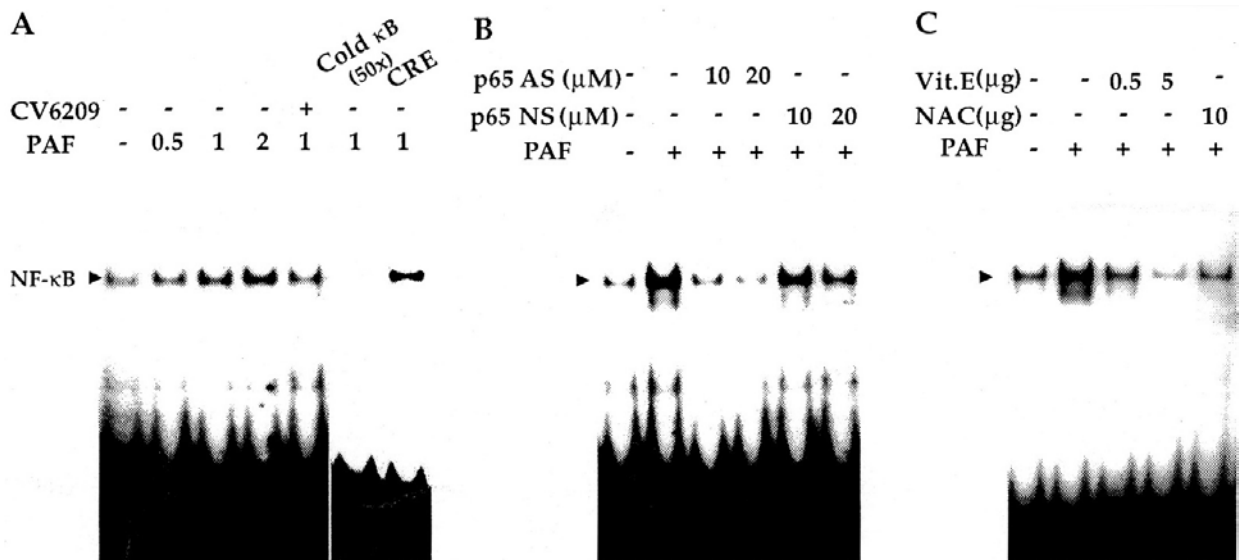
**Figure 1.** PAF augments angiogenesis. (A) The Matrigel plugs mixed with PAF (1 $\mu$ g) were injected s.c.. On day 6, the Matrigel plugs were excised and photographed. (B) Matrigel was mixed with indicated concentrations of PAF and injected s.c.. On day 6, the Matrigel plugs were excised and used for quantification of angiogenesis by measuring the hemoglobin content in the Matrigel matrix. Hemoglobin was measured by using the Drabkin reagent kit 525 as described in the Materials and Methods. Matrigel containing 64 U/ml heparin and the vehicle alone was used as a control. (C) The Matrigel plugs mixed with PAF (1 $\mu$ g) were injected s.c.. At the indicated days, the Matrigel plugs were excised and used for quantification of angiogenesis. The results were expressed as mg of hemoglobin/g of Matrigel pellet. \*:  $P < 0.0001$  compared with control group. Values are expressed as means; bars  $\pm$  S.E.

혈관형성에 있어서 NF- $\kappa$ B의 관련성. PAF이 NF- $\kappa$ B를 직접적으로 활성화시키므로(24) PAF에 의해 유도되는 혈관형성에 있어서 NF- $\kappa$ B가 관여하는지 실험하였다. PAF에 의해 유도된 혈관형성이 PAF 길항제, CV6209에 의해 농도의존적으로 억제되었으며(Fig. 2A), p65 AS 및 NF- $\kappa$ B 활성 억제제로 알려진 항산화제, Vit. E, NAC 처

리에 의해 억제되었다(Fig. 2B, 2C). 혈관내피세포에서 PAF에 의해 NF- $\kappa$ B의 활성이 유도되는지 마우스 내피 세포주인 SVEC4-10 세포에 PAF를 처리한 결과(Fig. 3) 에서와 같이 PAF에 의해 NF- $\kappa$ B 활성이 유도되었으며, PAF 길항제인 CV 6209(Fig. 3A)와 p65 AS 및 Vit. E, NAC에 의해 억제되었다(Fig. 3B, 3C). 이러한 결과는



**Figure 2.** PAF induces angiogenesis via the activation of NF- $\kappa$ B. (A) Matrigel containing 64 U/ml heparin was mixed with PAF (1 $\mu$ g) with or without various concentrations of CV 6209. (B) Matrigel was mixed with PAF (1 $\mu$ g) in the presence or absence of indicated concentrations of p65 AS or NS control oligonucleotide. (C) Matrigel containing 64 U/ml heparin was mixed with PAF (1 $\mu$ g) with or without the addition of Vit. E (5 $\mu$ g) or NAC (10 $\mu$ g). The Matrigel plugs were excised and processed for quantification of angiogenesis by measuring the hemoglobin content on day 6. The results were expressed as mg of hemoglobin/g of Matrigel pellet. \*:  $P < 0.0001$  compared with control group, \*\*:  $0.0001 < P < 0.05$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$ S.E.

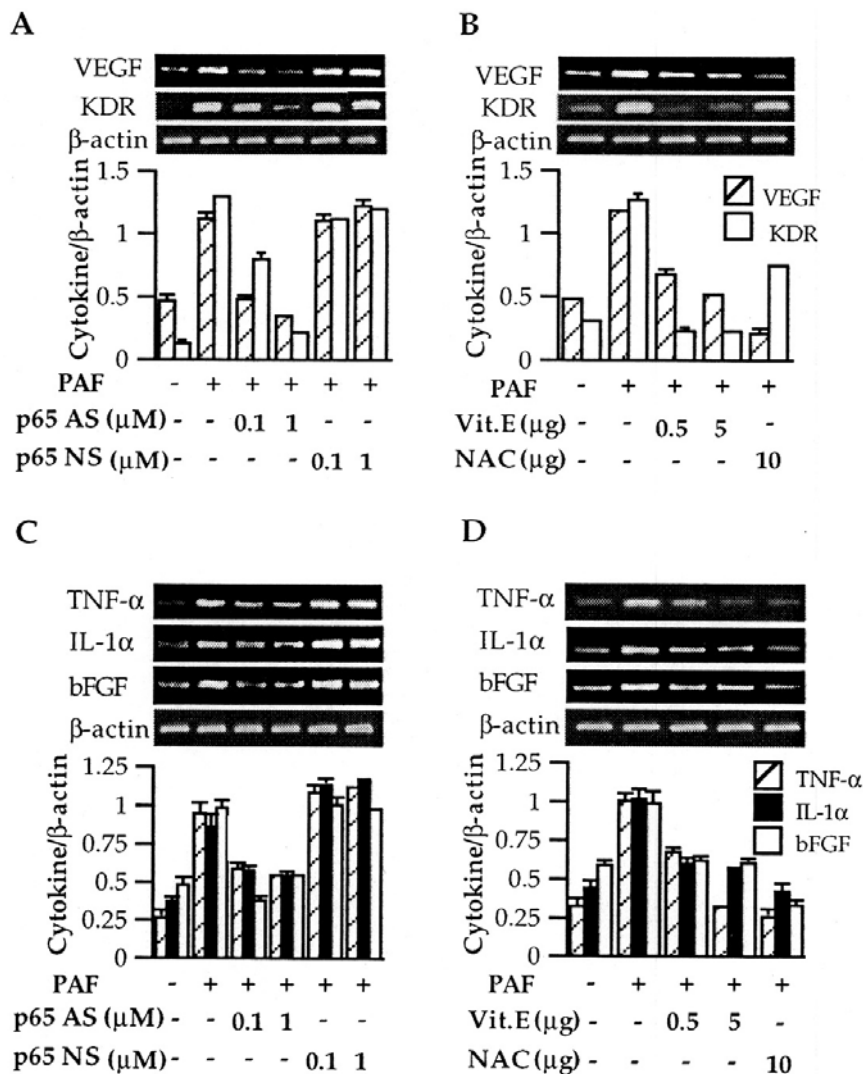


**Figure 3.** PAF-induced NF- $\kappa$ B activation is blocked by PAF antagonist, CV6209 or NF- $\kappa$ B inhibitors, p65 AS oligonucleotide and antioxidants. (A) SVEC4-10 ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were pretreated with CV6209 30 min prior to PAF treatment. (B) SVEC4-10 were plated at  $1 \times 10^5$  cells/dish, and were pretreated with p65 AS or NS control oligonucleotide at indicated concentrations 3 days prior to PAF (0.5 $\mu$ g/ml) treatment. (C) SVEC4-10 ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were pretreated with Vit. E, or NAC at indicated concentrations 30 min prior to PAF treatment. Nuclear extracts were prepared 1 h after PAF treatment, and were incubated with a  $^{32}$ P-labeled  $\kappa$ B and electrophoresed on a 4% polyacrylamide gel.

PAF에 의해 유도되는 혈관형성에 NF- $\kappa$ B 활성이 관여함을 시사한다.

**혈소판활성인자에 의한 혈관형성인자들의 발현.** 상기 결과들로부터 PAF에 의한 혈관형성의 증가에 NF- $\kappa$ B-의 존적으로 발현이 조절되는 혈관형성인자들이 관여함을 예측할 수 있다. 사람 태줄 정맥내피세포(HUVEC)에 PAF를 처리하여 강력한 혈관형성인자로 알려진 VEGF를 비롯하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF 유전자의 발현이 PAF에 의해 증가되는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. VEGF 및 수용체 KDR의 mRNA 발현이 PAF에 의해

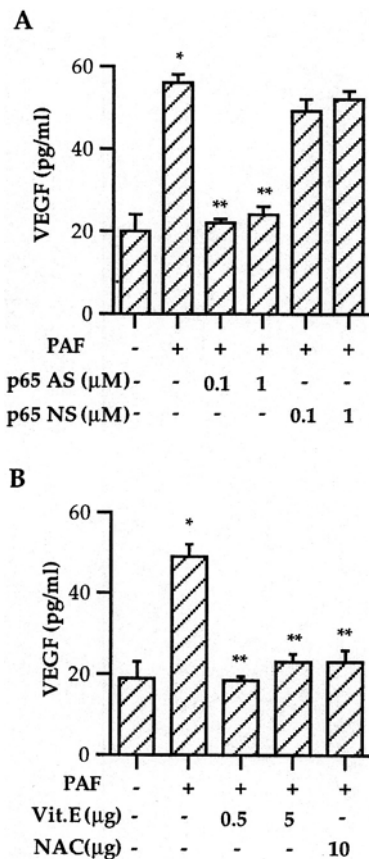
증가하였으며 PAF에 의해 증가된 VEGF와 KDR의 mRNA 발현은 p65 AS(Fig. 4A) 및 NF- $\kappa$ B 활성 저해제인 Vit. E, NAC(Fig. 4B)에 의해 억제되었다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF 유전자 발현도 PAF에 의해 증가되었으며 p65 AS(Fig. 4C) 및 Vit. E, NAC(Fig. 4D)에 의해 억제되었다. HUVEC 내의 VEGF 단백질 생산 역시 PAF에 의해 증가되었으며, p65 AS(Fig. 5A) 및 Vit. E, NAC(Fig. 5B)에 의해 억제되었다. 이러한 결과들은 PAF에 의해 유도된 혈관형성은 PAF에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화에 의해 발현된 VEGF 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF에 의해 이루어짐을 시사한다.



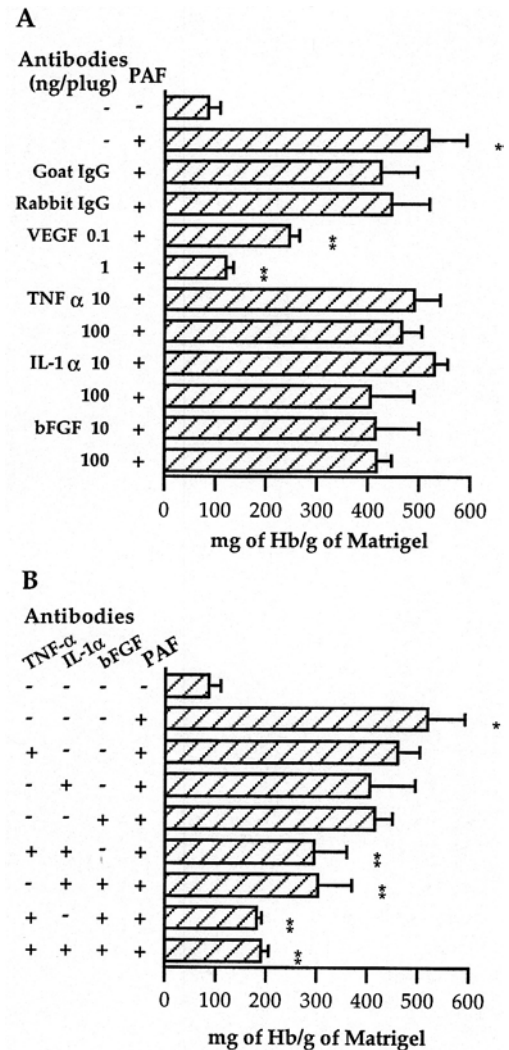
**Figure 4.** Expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF, VEGF, and VEGF receptor, KDR mRNA by PAF is inhibited by p65 AS oligonucleotide and antioxidants. (A, C) HUVEC ( $1 \times 10^5$  cells/dish) were pretreated with p65 AS or NS control oligonucleotide 5 days prior to PAF (0.5  $\mu$ g/ml) treatment. (B, D) HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were pretreated with Vit. E, or NAC 30 min prior to PAF treatment. RNA was prepared 3 h after PAF treatment. cDNA was reverse transcribed from total RNA of the cells (0.01  $\mu$ g) and amplified as described in the Materials & Methods. Signal intensity of these amplified cDNA was analyzed quantitatively using Fluor-STM Imager (Bio-Rad, Munchner, Germany). These results of RT-PCR are shown (upper panels) and quantitated by calculating the ratio of densitometric reading of the bands for cytokines and  $\beta$ -actin (lower panels).

혈소판활성인자에 의해 유도된 혈관형성에 있어서 NF- $\kappa$ B-의존성 혈관형성인자들의 역할. 혈관형성에 있어서 PAF에 의해 유도된 NF- $\kappa$ B-의존성 혈관형성인자들의 작용을 알아보기 위하여 혈관형성인자들의 중화항체를 처리하였다. PAF에 의해 유도된 혈관형성이 VEGF 중화항체에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF 중화항체를 각각 처리하였을 때에는 유의한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 6A). 그러나 PAF에 의한 혈관형성에 영향을 미치지 못한 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\alpha$ , bFGF의 중화항체를 ED<sub>50</sub> 농도(각 cytokine에 의한 혈관형성을 50% 감소시킨 항체의 양, TNF- $\alpha$  90 ng, IL-1 $\alpha$  100 ng, bFGF 80 ng)를 서로 조합하여 처리하였을 때, 각각을 처리한 경우에 비해 혈관형성의 현저한 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 TNF- $\alpha$ 와 bFGF의 중화항체를

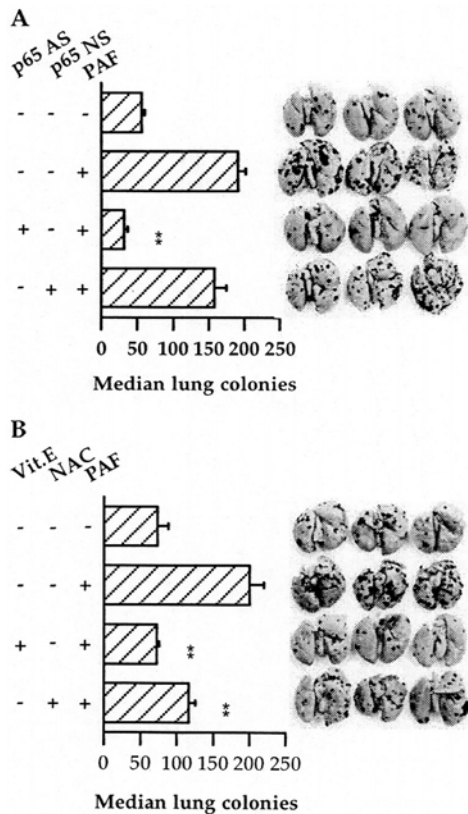
동시에 처리하거나 3종류의 중화항체를 모두 처리한 경우에는 정상 대조군 수준으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 6B). 이러한 성적은 PAF에 의한 혈관형성과정 중 VEGF가 가장 강력한 요인으로 작용하며, PAF에 의해 유도된 여러 가지 혈관형성인자들이 혈관형성에 종합적으로 작용함을 시사한다.



**Figure 5.** PAF-induced production of VEGF is inhibited by 65 AS oligonucleotide or antioxidants. (A) HUVEC ( $1 \times 10^5$  cells/dish) were pretreated with p65 AS or NS control oligonucleotide at the indicated concentrations 5 days prior to PAF (0.5  $\mu$ g/ml) treatment. (B) HUVEC ( $1 \times 10^6$  cells/dish) were pretreated with Vit. E, or NAC 30 min prior to PAF treatment. Cell lysates were prepared 3 h after PAF treatment, and the contents of VEGF was measured by ELISA. \*:  $P < 0.05$  compared with control group, \*\*:  $P < 0.05$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$ S.E.



**Figure 6.** Neutralizing antibodies against NF- $\kappa$ B-dependent angiogenic factors inhibit the angiogenic effect of PAF. (A) Matrigels containing 64 U/ml heparin were mixed with PAF (1  $\mu$ g) in the presence or absence of neutralizing antibodies for VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and bFGF. Isotype-matched rabbit IgG (100 ng) or goat IgG (100 ng) were used as negative controls. (B) Matrigels were mixed with PAF (1  $\mu$ g) in the combinational presence of neutralizing antibodies for TNF- $\alpha$  (90 ng), IL-1 $\alpha$  (100 ng), and bFGF (80 ng) at concentration that resulted in the neutralization of 50% maximal angiogenic effect of each cytokine in Matrigel. The results are expressed as mg of hemoglobin/g of Matrigel pellet. \*:  $P < 0.0001$  compared with control group, \*\*:  $0.0001 < P < 0.05$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$ S.E.



**Figure 7.** NF- $\kappa$ B p65 AS oligonucleotide or antioxidants inhibit PAF-induced enhancement of pulmonary tumor metastasis. PAF was administered (single injection, daily) i.p. for 3 consecutive days (days 0-2) after B16F10 melanoma cell injection on day 0 ( $1.5 \times 10^5$ /mouse, i.v.). (A) p65 AS or NS control oligonucleotide mixed with Trans IT In Vivo Polymer solution was injected i.v. 7 and 4 days prior to B16F10 melanoma cell injection. (B) Each group of mice ( $n=5$ ) was treated with Vit. E (0.5 mg/mouse, i.p.) 2 h prior to each injection of PAF or NAC (2.5 mg/mouse, oral) 30 min prior to each injection of PAF. Lungs were removed on day 14, and the number of surface colonies was counted. \*:  $P < 0.05$  compared with control group, \*\*:  $P < 0.05$  compared with PAF-treated group. Values are expressed as means; bars,  $\pm$ S.E.

혈소판 활성화인자에 의한 폐로의 암전이 향진에 있어서 NF- $\kappa$ B 관련성. PAF에 의한 폐로의 암전이 향진에 있어서 NF- $\kappa$ B 관련성은 마우스 모델로 실험하였다. 마우스에 흑색종 B16F10 세포를 미정맥으로 투여하기 30 분 전, 1일 후, 2일 후에 PAF을 3차례 복강투여하고, 흑색종 주사 2주 후에 폐를 적출하여 폐 표면에 형성된 흑색종 집락을 관찰한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 PAF에 의해 폐로의 암 전이가 현저히 증가하였고, 이러한 암전이 향진 효과는 Trans IT In Vivo Gene Delivery System (Pan Vera)를 이용하여 p65 AS를 전처리하였을 때 차단되었으며 p65 NS에 의해서는 차이가 없었다(Fig. 7A). 또한 NF- $\kappa$ B 활성 저해제인 Vit. E, NAC를 전처리하였을 때 폐로의 흑색종 전이가 현저히 차단되었다

(Fig. 7B). 이러한 결과는 PAF에 의한 암전이 향진에 있어서 NF- $\kappa$ B의 활성이 요구됨을 시사해주고 있다.

## 고찰

암의 증식과 전이에는 종양 내 혈관형성이 필연적으로 수반되어야 한다(1,2). PAF은 다양한 염증반응 및 암의 증식과 전이에 관여하며(22,24), 내피세포를 유인하여 혈관형성을 증진시킨다(27). NF- $\kappa$ B 또한 혈관형성에 중요한 역할을 하며(39,40) 많은 혈관형성인자들이 NF- $\kappa$ B에 의존적으로 발현된다고 보고되고 있다(36-38). 이러한 결과들로 PAF에 의한 암 증식과 전이의 향진에는 PAF에 의해 혈관형성이 유도되며 이 과정에 NF- $\kappa$ B가 관여하리라 추측할 수 있다. 본 연구에서는 PAF에 의한 혈관형성에 있어서 NF- $\kappa$ B 활성화 및 NF- $\kappa$ B 의존적 활성화인자들을 확인하였고 PAF에 의해 향진된 암전이에 있어서 NF- $\kappa$ B의 역할을 실험하였다. PAF의 혈관형성능을 알아보기 위하여 Matrigel을 운반체로 이용하여 혈관형성을 실험한 결과 PAF은 농도 의존적으로 혈관형성을 유도하였으며(Fig. 1), PAF에 의한 혈관형성은 NF- $\kappa$ B 저해제인 p65 AS 및 Vit. E, NAC에 의해 차단되었다(Fig. 2). 혈관형성에 필수적인 세포인 내피세포에 PAF을 처리한 후 NF- $\kappa$ B 활성을 확인한 결과 PAF에 의해 NF- $\kappa$ B 활성이 증가하였으며, p65 AS 및 Vit. E, NAC에 의해 억제되었다(Fig. 3). 이러한 결과들은 PAF에 의한 혈관형성에 있어서 NF- $\kappa$ B 활성의 중요성을 시사해주고 있다.

혈관형성 과정에는 VEGF를 비롯하여 다양한 NF- $\kappa$ B-의존성 혈관형성인자들이 관여한다. 내피세포에 PAF을 처리하고 혈관형성인자들이 유도되는지 RT-PCR과 ELISA를 실시하였다. VEGF, KDR, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , bFGF의 발현이 PAF에 의해 증가하였으며, NF- $\kappa$ B 저해제인 p65 AS 및 Vit. E, NAC에 의해 감소하였다(Fig. 4). 상기 혈관형성 인자들이 PAF에 의한 혈관형성에 직접적으로 작용하는지 알아보기 위하여 각 인자들의 중화항체를 이용하여 PAF에 의해 증가된 혈관형성에 각 인자들의 효과를 실험한 결과, VEGF 중화항체를 처리하였을 경우 PAF에 의한 혈관형성정도를 유의하게 감소시켰다. 이는 PAF에 의한 혈관형성에 있어 VEGF가 가장 강력한 인자로 작용함을 시사해 주고 있다. 그리고 PAF에 의해 증가된 혈관형성에 미비한 효과를 나타낸 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\alpha$ , bFGF 항체들을 조합하여 처리하였을 때 혈관형성을 유의하게 감소시켰다. 이는 PAF에 의해 유도된 혈관형성은 이들 인자들이 종합적으로 작용한 결과임을 시사해 주고 있다(Fig. 6). *In vivo*에서 PAF에 의한 암전이 증진에 있어서 NF- $\kappa$ B의 관련성을 실험한 결과 PAF에 의해 향진된 폐로의 암전이가 NF- $\kappa$ B 저해제인 p65 AS 및 Vit. E, NAC에 의해 저해되었다(Fig. 7). 이러한 성적은 PAF에 의한 암전이에 있어서 NF- $\kappa$ B 활성이 중요함을

시사해준다.

이상의 결과들로 PAF에 의한 혈관형성은 PAF이 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고 이어서 NF- $\kappa$ B 의존적 혈관형성 인자들 중 강력한 VEGF 발현을 유도함으로 일어나는 일련의 결과임을 알 수 있었으며, PAF에 의한 암전이 항진에 있어서 NF- $\kappa$ B의 활성이 반드시 요구됨을 확인할 수 있었다. 그러나 지금까지 밝혀진 바에 의하면 PAF이 어떻게 VEGF의 발현을 유도하는지에 관한 결과들은 아직 충분하지 않다. 실제로 VEGF 프로모터 부위에는 정확한 NF- $\kappa$ B 결합부위가 존재하지 않으나 HUVEC에서 PAF에 의해 증가된 VEGF 발현이 NF- $\kappa$ B 저해제에 의해 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, Chiao 등(43)의 보고에 의하면 VEGF 프로모터 부위에는 NF- $\kappa$ B 유사부위가 존재하여 NF- $\kappa$ B에 의해 VEGF의 유전자 발현이 조절된다고 한다. 그러나 프로모터 조절부위의 NF- $\kappa$ B 결합부위에 관한 연구는 앞으로 더 추구해야 할 과제라고 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Folkman J: How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46;467-473, 1986
2. Liotta L, Kleinerman J, Sadel G: Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 34; 997-1004, 1974
3. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1;27-31, 1995
4. Fidler IJ, Ellis LM: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79;185-188, 1994
5. Claffy KP, Brown LF, del Aguila LF, Tognazzi K, Yeo K, Manseau EJ, Dvorak HK: Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 56;172-181, 1996
6. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M: Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17;4015-4023, 1997
7. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M: Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int J Cancer* 85;182-188, 2000
8. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (Wash. DC)* 255;989-991, 1992
9. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187;1579-1586, 1993
10. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar A, Ferrara N: Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cell in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89;244-253, 1992
11. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84;1470-1478, 1989
12. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, Van De Water L, Senger DR: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 107;233-235, 1995
13. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246;1306-1309, 1989
14. Pepper MS, Ferrara N, Orcil L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181;902-906, 1991
15. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP: Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153; 557-562, 1992
16. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246;1309-1312, 1989
17. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55; 3964-3968, 1995
18. Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP: Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued *in vivo* growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 57; 3924-3928, 1997
19. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N: Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 329;630-632, 1987
20. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK: Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 98;482-489, 1996
21. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M: Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$ . *Int J Cancer* 85;182-188, 2000
22. Im SY, Ko HM, Ko YS, Kim JW, Lee HK, Ha TY, Lee HB, Oh SJ, Bai S, Chung KC, Lee YB, Kang HS, Chun SB: Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor. *Cancer Res* 56;2662-2665, 1996
23. Bussolati B, Biancone L, Cassoni P, Russo S, Rola-Pleszczynski M, Montrucchio G, Camussi G: PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 157;1713-1725, 2000
24. Im SY, Han SJ, Ko HM, Choi JH, Chun SB, Lee DG, Ha TY, Lee HK: Involvement of nuclear factor- $\kappa$ B in platelet-activating factor-mediated tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Eur J Immunol* 27;2800-2804, 1997
25. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM: Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 268;17381-17384, 1996
26. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN: PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest* 69;639-650, 1993
27. Camussi G, Montrucchio G, Lupia E, De Martino A, Perona



- L, Arese M, Vercellone A, Toniolo A, Bussolino F: Platelet-activating factor directly stimulates *in vitro* migration of endothelial cells and promotes *in vivo* angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. *J Immunol* 154;6492-6501, 1995
  28. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Passerini G, Bussolino F, Emanuelli G, Camussi G: Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med* 180;377-382, 1994
  29. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH: Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J Biol Chem* 273;7228-7234, 1998
  30. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10;2247-2258, 1991
  31. Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ: Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 14;5997-6003, 1994
  32. Baeuerle PA, Baltimore D: Activation of DNA-binding activity in a apparently cytoplasmic precursor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Cell* 53;211-217, 1988
  33. Kopp E, Ghosh S: NF- $\kappa$ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58;1-27, 1995
  34. Kravchenko VV, Pan Z, Han J, Herbert JM, Ulevitch RJ, Ye RD: Platelet-activating factor induces NF- $\kappa$ B activation through a G protein-coupled pathway. *J Biol Chem* 270;14928-14934, 1995
  35. Han SJ, Choi JH, Ko HM, Choi IW, Lee HK, Lee OH, Im SY: Glucocorticoids prevent NF- $\kappa$ B activation by inhibiting the early release of platelet-activating factor in response to LPS. *Eur J Immunol* 29;1334-1341, 1999
  36. Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Goulet R Jr, Nakshatri H: NF- $\kappa$ B activation and interleukin 6 production in fibroblasts by estrogen receptor-negative breast cancer cell - derived interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;6971-6976, 1998
  37. Kitajima I, Unoki K, Maruyama I: Phosphorothioate oligodeoxy-nucleotides inhibit basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9;233-239, 1999
  38. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ: Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 60;5334-5339, 2000
  39. Stoltz RA, Abraham NG, Laniado-Schwartzman M: The role of NF- $\kappa$ B in the angiogenic response of coronary microvessel endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93;2832-2837, 1996
  40. Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M: Involvement of the transcription factor NF- $\kappa$ B in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol* 16;4231-4239, 1996
  41. Schleimer RP, Rutledge BK: Cultured human vascular endothelial cells acquired adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 2, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J Immunol* 136;649-654, 1986
  42. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11;1475-1489, 1983
  43. Chiao P, Wang W, Ellis L, Shen D: NF- $\kappa$ B regulates VEGF gene expression in human pancreatic cancers. *Am Assoc Cancer Res Proc* 37;525-532, 1996
-