

## 침윤성 자궁경부암에서 MT1-MMP와 E-cadherin mRNA 발현에 관한 연구

이화여자 대학교 의과대학 산부인과학 교실, 의과학 연구소  
문혜성 · 최은아 · 정혜원 · 김승철

### The Expression of MT1-MMP and E-cadherin mRNA in Invasive Cervical Cancer

Hye-Sung Moon M.D., Eun-Ah Choi M.S., Hye-Won Chung M.D. Seung-Cheol Kim M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine,  
Ewha Womans University, and Ewha Medical Research Center, Seoul, Korea

**Objectives:** There are adhesion molecules, angiogenetic factors, and proteolytic enzymes such as E-cadherin and MT1-MMP, which are involved in carcinogenesis, cancer invasion and metastasis. The aim of this study was to determine the MT1-MMP and E-cadherin mRNA expression in cervical cancer. And we investigated the relationship between their expression and questioned whether their expression is related to cervical cancer stages and other prognostic factors.

**Methods:** The cervical and cervical cancer tissues were taken from the patients; healthy women(n=14), and the patients with cervical cancer(n=35). The E-cadherin and MT1-MMP mRNA expression were examined by quantitative competitive PCR after polymerase chain reaction amplification of reverse transcriptase copies of RNA transcripts(RT-PCR).

**Results:** E-cadherin mRNA expression in cervical cancer was not lower than that in normal cervix( $p>0.05$ ). MT1-MMP mRNA expression in cervical cancer was higher than that of normal cervix( $p<0.05$ ). MT1-MMP mRNA expression was related to E-cadherin mRNA expression( $p<0.05$ ) and its expression was correlated with the cervical cancer stage and SCC-Ag( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** These results suggested that MT1-MMP mRNA expression is associated with the cervical carcinogenesis and metastasis of cervical cancer and the activity of proteolytic enzyme in cervical cancer is inversely related to that of intercellular adhesion molecule.

**Key Words:** E-cadherin, MT1-MMP, cervical cancer, invasion

## 서 론

암세포의 전이는 세포간 유착과정에서 복잡한 변화를 일으켜 세포간의 결합 및 형태변화를 일으킴으로써 진행되며 이 때 암 세포의 기저막 침윤 및 세포외 기질

(extracellular matrix)과의 반응이 일어난다.<sup>1</sup> 암세포간 결합이 약해져서 암세포의 침윤성이 증가하는 과정에는 세포간 유착물질(cell-to-cell adhesion molecules)이 관여하며 이외에도 단백질 분해효소(protease), 단백질 분해억제효소(protease inhibitors), 운동인자(motility

책임저자 : 문혜성

이 연구는 2000년도 이화여자대학교 교내연구비 지원에 의한 연구임.

factors), 성장인자(growth factor) 등이 관련된다고 한다.<sup>2-4</sup> 유착물질에는 immunoglobulin, integrins, superfamily, cadherins, selectins, CD44 등이 있으며 이중 cadherin은 세포간 유착반응 및 암의 침윤성에 중요한 역할을 한다고 알려졌다.<sup>5,6</sup>

E-cadherin은 주로 상피세포에 발현되는 유착물질로써 세포의 유착성 접합부(adherens junction)에 위치하여 세포내의 tyrosine kinase activity에 관여하고 세포의 신호(signal)를 유도하여 세포 성장과 증식에도 관여하며, 세포간 유착을 유지시켜 세포의 형태 보존 및 분화를 유도한다.<sup>7</sup> E-cadherin은 암의 침윤 및 전이와 관련 있다고 알려졌으며 암세포에서 E-cadherin의 발현이 소실된다고 하였다.<sup>8</sup> 고형성 암에서는 상피세포 분화가 나쁘고 세포간 유착이 감소되면 암세포의 침윤성이 증가되며 E-cadherin 발현의 감소와 관련이 있다는 연구 결과가 위암, 전립선암, 방광암 등에서 보고되었다.<sup>9-11</sup> 자궁경부암의 침윤 및 전이과정에서도 이러한 유착물질의 변화가 선행되는 것으로 사료되나 자궁경부암에서 유착물질의 변화에 대한 연구는 활발하지 않은 실정이다. 침윤성 자궁경부암에서 E-cadherin의 발현이 소실됨을 관찰하였고 E-cadherin 발현의 소실이 암세포의 분화도 및 침윤성과 관계가 있는 것으로 보고하였다.<sup>12</sup> 그러나 침윤성 자궁경부암에서 기원한 자궁경부암 세포주에서는 E-cadherin의 발현이 모두 동일하게 소실되지 않았고 이는 자궁경부암 침윤성에는 E-cadherin의 발현 외에 다른 인자에 의한 상호작용이 관련될 수 있다고 생각되었다.<sup>13</sup>

암 전이는 기저막과 세포의 기질의 파괴를 포함한 다단계 과정을 거치며 이 중 세포의 기질의 분해가 매우 중요하다.<sup>14</sup> 세포의 기질은 생물체 조직의 형태를 유지하게 하고 암세포 침윤에 대한 기계적인 장벽의 역할을 담당하는 것으로 collagen, laminin, fibronectin, elastin, proteoglycans, glycosaminoglycan 등으로 구성된다. 세포의 기질을 분해하는 단백질 분해효소로는 Matrix metalloproteinase (MMP)군, cathepsin, plasminogen activator 등이 존재한다.<sup>15</sup> MMP의 경우 지금까지 23종류 (MMP 1-23)가 발견되었으며 그 중 19개 (MMP 1-13 및 MMP 18-23)는 분비성 단백질인데 비해 나머지 4개 (MMP 14-17; MT-MMP 1-4)는 세포막 부착형인 막성 MMP(Membrane-type MMP; MT-MMP)이다.<sup>16,17</sup>

MMP-2는 Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 & 2에 의하여 그 작용이 억제되며 proMMP-2에서 MMP-2로의 활성화는 TIMP-2가 MT1-MMP에 결합함으로써 가능하다.<sup>17</sup> MMP-2는 암세포를 성장, 증식시키는 인자에 의해 기질세포에서 합성되며 MT1-MMP에 의해 암세포 원형질막에서 활성화되거나 세포표면 수용체/활성화 물질에 의해 활성화된다.<sup>18</sup> MMP-2는 세포의 기질의 분해와 맥관형성(angiogenesis)에 관여하여 암의 침윤을 진행시키며 암세포 및 host cell에 작용하여 암의 진행에 관여한다고 하였다. 또한 악성 종양에 있어서 유사한 양성 종양에 비하여 체액이나 조직에서 MMPs의 발현이 증가하며 특히 MMP-2의 발현 정도는 전이여부와 상관관계가 있다고 하였다.<sup>15</sup> MMP-2 발현은 진행된 난소암에서 나타나며 MMP-2가 음성인 환자보다 양성인 환자는 예후가 나쁘기 때문에 MMP-2 발현은 난소암의 재발과 진행에도 중요하다고 한다.<sup>19</sup> 경계성 종양에 비해 난소암에서 MT1-MMP mRNA 발현이 증가함으로써 암의 악성화에도 관여한다고 하였다.<sup>20</sup>

따라서 본 연구에서는 침윤성 자궁경부암에서 MT1-MMP mRNA 발현을 연구함으로써 자궁경부암에 MT1-MMP mRNA 발현이 중요하게 관여하는 지 알아보고자 하였다. 이미 본 저자는 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 MMP-2 mRNA와 TIMP-2 mRNA의 발현이 증가하며 이는 자궁경부암의 발생에 중요함을 보고하였기 때문에 이러한 MMP-2 활성화에 관여하는 MT1-MMP mRNA 발현을 연구함은 의미 있다고 하겠다.<sup>21</sup> 또한 침윤성 자궁경부암에서 E-cadherin mRNA 발현을 연구함으로써 세포의 기질을 분해하는 단백질 분해효소인 MT1-MMP mRNA 발현과 상호작용하는 지 밝히고자 하였다

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1998년 3월부터 2000년 3월까지 이화의료원 부속 목동병원 산부인과를 내원하여 조직 생검으로 자궁경부암으로 진단 받은 환자 35명을 대상으로 하였으며 조직은 조직 생검 및 원추생검술에 의해 채취하였다. 대조군은

자궁내막증이나 자궁 근종으로 자궁 적출술을 시행 받은 환자 14명으로 자궁경부암 세포진 검사가 정상인 경우로 하였으며 조직은 수술시 채취하였다.

## 2. 자궁경부 및 RNA 추출

자궁경부 및 경부암 생검 조직에서 다음과 같이 total RNA를 분리하였다. 조직의 혈액제거를 위하여 Phosphate buffered saline(이하 PBS)으로 세척한 후 조직 100mg당 1ml의 RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX)를 넣은 후 균질화 하였다. RNA-STAT-60 1ml당 500 $\mu$ l의 chloroform을 넣고 원심분리 후 상층액을 isopropanol 500 $\mu$ l에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기 중에서 말려 diethylpycobarbonate(DEPC)로 처리한 물에

녹였다. RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기로 측정하였다.

## 3. 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오타이드 시발체(Oligonucleotide Primer)의 설계

MT1-MMP, E-cadherin의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Center for Biotechnology Information의 Gene Bank Database에서 얻은 후 OLIGO 5.0 Mac Vacter Analysis Software (National Bioscience, Plymouth, MN)을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체(Oligonucleotide Primer)를 고안하여 사용한다. 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 1과 같다.

Table 1. The Sequences of MT1-MMP and E-cadherin Oligonucleotide Primer

mRNA		5' end to 3' -end	Size(bp)	Position on mRNA
MT1-MMP	Upstream	ATC TGT GAC GGG AAC TTT GAC		952-972
	Downstream	ACC TTC AGC TTC TGG TTG TTG	527	1478-1458
	Competitor	ACC TTC AGC TTC TGG TTG TTG	214	1478-1458, 1144-1125
		TTT CCA TTG GGC ATC CAG		
E-cadherin	Upstream	GCC ATT CTG GGG ATT CTT GGA G		2219-2240
	Downstream	TGA AAA ACC ACC AGC AAC GTG	597	2815-2795
	Competitor	TGA AAA ACC ACC AGC AAC GTG	244	2815-2795, 2462-2442
		TTG GTG CAA CGT CGT TAC GAG		

## 4. 역전사-중합효소연쇄 반응(RT PCR)

역전사 중합효소 연쇄 반응에는 Gen Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 사용한다. 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, IX PCR buffer II, dNTP 1mmol/L, 2.5 $\mu$ l/L Oligo deoxythymidine, 20IU ribonuclease inhibitor, 50IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(이상 Perkin Elmer)을 포함한 역전사용 혼합물 19 $\mu$ l에 1 $\mu$ l당 1 $\mu$ g이 되게 희석한 RNA 1 $\mu$ l를 넣은 후 역전사한다. 역전사는 Perkin-Elmer사의 DNA Thermal Cycler 9600을 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 15분, 99 $^{\circ}$ C에서 5분 반응 후 4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 음성대조는 RNA 1 $\mu$ l 대신 DEPC로 처리한 물 1 $\mu$ l를 넣고 역전사한다.

중합효소 연쇄반응은 2 $\mu$ l의 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 $\mu$ l의 10x PCR buffer, 2.5 unit Taq polymerase 그리고 각각 0.5 $\mu$ l의 upstream 및 down stream primer(100 pmol)을 넣고 RT 생성물 10 $\mu$ l를 넣은 후 DEPC-DW로 최종 부피 50 $\mu$ l를 맞춘다. PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초로 29 cycles를 진행시킨 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 heating하여 반응을 중지시킨다. 얻어진 시료는 6x loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40 % sucrose)를 넣은 후 2% agarose gel에 전기영동하고 전기영동이 끝난 gel은 D.W 100 ml에 ethidium bromide(10 $\mu$ g/ $\mu$ l) 17 $\mu$ l을 섞은 염색 시료에 넣고 10분간 염색하여 UV light로 관찰한다.

## 5. MT1-MMP, E-cadherin competitive 와 target cDNA 의 합성

자궁경부암 조직에서 추출한 RNA로부터 역전사 후 정상 3', 5' 시발체를 넣고 증합효소 연쇄반응을 통하여 527 or 347bp의 MT1-MMP target DNA를 얻은 후 (597bp의 E-cadherin도 같은 방법으로 시행) agarose gel에 전기 영동한 후 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출한다. Competitive cDNA를 만들기 위하여 정상 3', 5' 시발체의 접합부위의 사이의 염기 서열 중에서 3-floating primer를 고안하여 정상 5' 시발체와 함께 반응시켜서 target cDNA와 같은 방법으로 cDNA를 추출한다.

## 6. Standard Curve 작성과 Competitive PCR

MT1-MMP와 E-cadherin의 standard curve는 일정한 양의 competitive cDNA (MT1-MMP 정상 자궁경부 50 fmol, 자궁경부암 5 fmol, E-cadherin 1 fmol)와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭하여 만든다. standard curve는 1.9mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer II, 0.2mM dNTP, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 40μl와 competitive와 target c-DNA를 혼합한 용액 60μl를 넣고, 역전사된 sample에 1.9mM MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer II, 2.5U Taq-polymerase 0.2 mol/L의 시발체를 혼합한 용액 80 μl 넣는다. Perkin Elmer사의 DNA Thermal Cycler

9600으로 95℃ 5분간 모든 단백질을 denaturation 시킨 후 94℃ 1분, 62℃ 1분, 72℃ 1분으로 30주기 반응시키고 72℃ 7분 elongation 후 4℃로 냉각시킨다. Ethidium Bromide (ETB)로 염색한 1% agarose gel에 standard curve 및 sample PCR 산물 25μl 씩을 100 bp DNA ladder와 함께 전기 영동 시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 UV 농도계로 gel blot을 분석한다. standard curve는 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/ competitive cDNA의 gel blot 농도로 얻어졌으며 sample의 cDNA양을 계산한다. 각 환자에서 얻어진 두개이상의 RT sample을 QC PCR 한다.

## 7. 통계분석

통계분석은 SPSS 9.0을 이용하여 t-test와 Univariate Analysis of Variance, Spearman's correlation test를 하였고, p값이 <0.05에서 통계적으로 유의하다고 보았다.

## 결 과

### 1. 정상자궁경부와 자궁경부암에서의 E-cadherin과 MT1-MMP mRNA의 발현

RT-PCR을 한 결과 정상 자궁경부와 자궁경부암 모두에서 597bp 크기의 E-cadherin가 발현되었고 MT1-MMP는 정상 자궁경부에서는 347bp로, 자궁경부암에서는 527bp 크기로 발현되었다(Fig. 1.).



Fig. 1. RT-PCR of MT1-MMP in normal cervix(A) and cervical cancer(B) and of E-cadherin in normal cervix(C, lane 4-6) and cervical cancer(C, lane 1-3).

### 2. E-cadherin과 MT1-MMP mRNA의 정 량 분석

QC PCR 을 한 결과 모든 정상 자궁 경부와 자궁경부암 조직에서 E-cadherin과 MT1-MMP 각각의 target 과 competitive 두개의 band들이 보였다(Fig 2 & 3).

standard curve를 이용하여 mRNA를 정량한 결과 자궁경부암에서의 E-cadherin mRNA 발현이 정상 자궁경부에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었으나( $p>0.05$ , Fig. 4) MT1-MMP mRNA 발현은 정상 자궁경부나 자궁경부암에서 유의한 차이가 있었다( $p<0.05$ , Fig. 5).

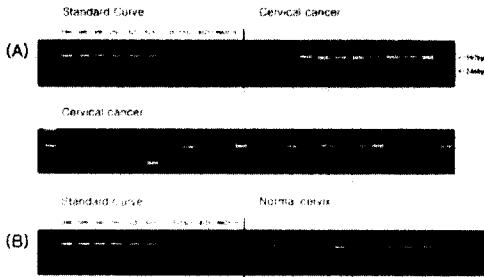


Fig. 2. (A) QC PCR of E-cadherin in cervical cancer. It shows a agarose gel stained with ethium bromide. Declining amounts of target cDNA in standard curve were coamplified with 1fmol of competitive cDNA. (B) QC PCR of E-cadherin in normal cervix

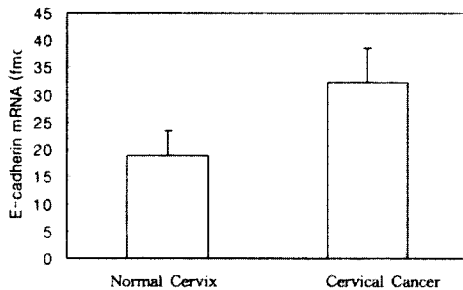


Fig. 4. QC PCR analysis of E-cadherin mRNA from normal cervix and cervical cancer. Samples were coamplified for 30cycles in the presence of a defined amount of internal standard cDNA for 597bp E-cadherin.

### 3. E-cadherin mRNA와 MT1-MMP mRNA ratio

E-cadherin mRNA/MT1-MMP mRNA는 정상 자

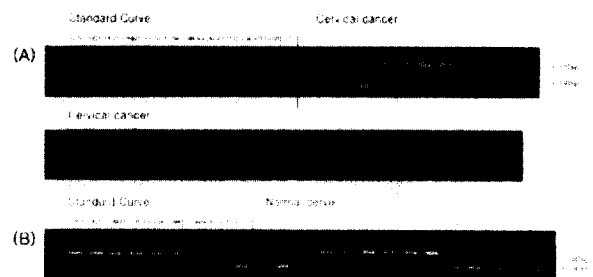


Fig. 3. (A) QC PCR of MT1-MMP in cervical cancer. It shows a agarose gel stained with ethium bromide. Declining amounts of target cDNA in standard curve were coamplified with 1fmol of competitive cDNA. (B) QC PCR of MT1-MMP in normal cervix

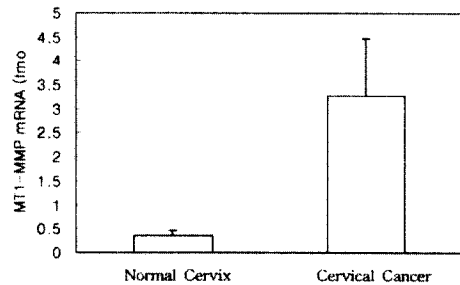


Fig. 5. QC PCR analysis of MT1-MMP mRNA from normal cervix and cervical cancer. Samples were coamplified for 30cycles in the presence of a defined amount of internal standard cDNA for 527bp MT1-MMP in cervical cancer and 347bp MT1-MMP in normal cervix.

궁경부에서  $371.35 \pm 113.84$  인데 반해 자궁경부암에서는  $755.22 \pm 570.33$  으로 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ , Table 2).

Table 2. The expression of MT1-MMP and E-cadherin mRNA in normal cervix and cervical cancer

	normal cervix	cervical cancer	p value
MT1-MMP mRNA	$0.36 \pm 0.40$	$3.26 \pm 6.65$	N.S.
E-cadherin mRNA	$14.57 \pm 3.85$	$32.31 \pm 6.24$	$< 0.05$
E-cadherin mRNA/MT1-MMP mRNA	$371.35 \pm 113.84$	$755.22 \pm 570.33$	N.S.

\* N.S.= non significant by t-test

### 4. 자궁경부암에서의 E-cadherin과 MT1-MMP mRNA 분석

자궁경부암에서 E-cadherin mRNA 발현은 각 병기별로 유의한 차이는 있었으나 조직병리학적 유형별, 분

도에 따라 통계적으로 차이는 없었다(Table 3 & 4,  $p > 0.05$ ). MT1-MMP mRNA 발현도 각 병기별로, SCC-Ag에 따라 유의한 차이는 있었으나 조직병리학적 유형별, 분화도에 따라 통계적으로 차이는 없었다(Table 3 & 4,  $p > 0.05$ ). E-cadherin mRNA 발현과 MT1-

MMP mRNA 발현은 서로 상관관계를 나타내었다 ( $r=0.744$ ,  $p(0.05)$ ).

Table 3. The clinicopathologic findings in cervical cancer

	Finding	Cases(n=35)
Age Stage	I	52.85 $\pm$ 2.0
	II	15
	III	13
	IV	2
Pathology	Squamous, large cell, keratinizing	7
	large cell, nonkeratinizing	24
	small Cell, nonkeratinizing	2
	Adenocarcinoma	2
Tumor size	>4cm	17
	<4cm	18
Lymph node	positive	11
	negative	24
SCC-Ag(ng/ml)	7.54 $\pm$ 2.42	

## 고 찰

암세포의 침윤 및 전이는 세포간 유착 관계의 변화와 세포 형태의 변화가 일어나며 기저막의 침윤 및 세포의 기질과 반응을 일으키게 된다.<sup>1</sup> 이러한 유착에 관여하는 물질의 변화 및 세포의 기질 분해에 관여하는 효소의 변화를 연구하는 것이 필요하다.

본 연구를 통하여 침윤성 자궁경부암에서 MT1-MMP mRNA 발현이 증가하고 E-cadherin mRNA 발현이 감소하는 것을 연구함으로써 이들의 발현이 자궁경부암의 침윤 및 전이에 관여함을 밝히고 자궁경부암의 침윤과 전이에 이들의 발현이 상호작용 함을 밝히고자 하였다.

침윤성 상피암에서 상피세포의 분화가 감소되고 세포간 유착이 약해져 암세포의 침윤성이 증가하며 세포간 유착 물질의 하나인 E-cadherin의 발현이 감소된다고 하였으며 전립선암에서는 E-cadherin의 발현감소가 암세포의 미분화 정도와 암의 침윤성 증가 및 예후와 관련이 있는 것으로 보고되었다.<sup>3,22</sup> 본 저자는 방광암, 간암, 피부 기저세포암, 유방암, 전립선암 등에서 E-cadherin 발현이 감소한 것과 같이 CaSki, ME-180, HT-3 세포주를 제외한 다른 자궁경부암 세포주에서 E-cadherin이 발현되지 않아 침윤성 자궁경부암에도 E-cadherin 발현의 감소가 중요하다고 보고한 바 있다.<sup>10,23-26</sup> 이상과 같이 모든 자궁경부암 세포주에서 동일하게 E-cadherin의 발현이 감소하지 않는 것으로 미루어 보아 E-cadherin의 발

Table 4. The correlation among the prognostic factors of cervical cancer and the expression of MT1-MMP and E-cadherin mRNA

	MT1-MMP mRNA(p value)	E-cadherin mRNA(p value)
Stage	<0.05	<0.05
Pathology	N.S.	N.S.
SCC-Ag	<0.05	N.S.
MT1-MMP mRNA or E-cadherin mRNA	<0.05	<0.05

\* N.S.= non significant by Spearman correlation test

현감소 외에 다른 인자들도 자궁경부암 침윤과정에 관여할 것을 시사한 바 있다.<sup>13</sup>

또한 본 저자들은 정상 자궁경부와 자궁경부 상피내종양에 비해 자궁경부암에서 E-cadherin 발현이 소실되었으며, 분화도가 좋지 않은 비각화성 자궁경부암 조직의 87.5%에서 E-cadherin이 발현되지 않으므로 E-cadherin은 자궁경부 암화과정에 관여하며, 자궁경부암의 분화도와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 그러나 본 연구결과에 의하면 E-cadherin mRNA 발현이 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 E-cadherin mRNA 발현은 E-cadherin 단백질에 비해서 자궁경부암의 암화과정에 중요하게 작용하지는 않으며 오히려 posttranslational modification이나 ubiquitous proteolysis에 차이가 생겨 자궁경부암의 암화과정에 관여하는 것으로 생각된다. 또한 자궁경부암의 E-cadherin mRNA 발현은 자궁경부암의 병기에 따라 유의한 차이를 나타냄으로써 자궁경부암이 진행될수록 E-cadherin mRNA 발현의 감소가 자궁경부암의 전이에 선행요건이 됨을 시사한다고 하겠다. 그러나 다른 예후인자인 임파절 전이나 분화도와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않음으로써 계속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

암의 침윤과 전이에 의해 선행되는 세포의 기질과 기저막의 분해과정은 여러 종류의 단백질 분해효소에 의해 매개된다.<sup>27</sup> 여러가지 단백질 분해효소 중 최근 가장 많이

연구되는 MMP는 일반적으로 세포의 기질을 분해함으로써 암의 침윤과 전이를 일으키는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 암의 성장에 필수적인 맥관형성 과정에도 MMP가 직접적으로 관여한다고 알려져 있다.<sup>28</sup> 암 세포의 침윤과 전이는 MMP와 같은 단백질 분해효소를 전사하는 단계에서 조절되거나 분해효소를 억제하는 TIMP 생성으로 복잡한 다단계 과정을 거쳐서 진행된다.<sup>27</sup> 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 MMP-2 발현이 증가한다는 보고가 있었으며 자궁경부암에서의 MMP가 역할을 한다고 보고되었는데 MMP-2 mRNA 발현은 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 증가하며 특히 진행된 암이나 예후가 나쁜 암에서 증가한다고 하였다.<sup>28</sup> 본 연구자에 의해서도 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 MMP-2 mRNA가 통계적으로 유의하게 발현이 증가되었으나 자궁경부암의 크기나 병기, 조직학적 유형, 예후와는 MMP-2 mRNA 발현이 통계적으로 유의한 차이가 없다고 하였다.<sup>21</sup> 이에 자궁경부암의 진행에는 MMP-2 mRNA의 발현 외에 cofactor의 역할이 중요하게 관여할 것을 시사하였다.

MT-MMP는 세포표면에 존재하는 막성 단백질 분해효소로 MMP군에 속하며 5가지 종류가 알려져 있다. MT-MMP는 MMP-2 활성화에 관여하고 세포의 기질의 고분자 물질, fibronectin, laminin, vitronectin, gelatin, collagen type I 등이 기저막 성분을 분해하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 최근 연구 보고되었다.<sup>29,30</sup> 세포표면에서 MT1-MMP의 catalytic domain 부분이 TIMP-2의 N-terminal domain과 결합한 후 TIMP-2의 C-terminal domain이 proMMP-2의 C-terminal domain에 결합함으로써 3차적인 복합체를 형성하고 MT1-MMP과 작용으로써 proMMP-2의 propeptide domain이 분리되어 MMP-2로 활성화된다고 하였다.<sup>31</sup> 따라서 암 전이에 중요한 MMP-2의 활성화에 관여하는 MT1-MMP도 암 전이과정에서 중요한 역할을 함이 보고되었다.

MT2-MMP와 MT3-MMP는 여러 가지 다양한 조직 세포에서 mRNA가 발현되는 것으로 보고되었고 MT4-MMP도 유방암세포에서 처음으로 발견된 후 최근 들어 단백질 발현이 보고되었다.<sup>32,33</sup> 따라서 MT-MMP는 생체 내 조직의 재구성 및 암세포의 침윤 등에 직접 관여하는 것으로 연구되었다.<sup>34</sup> MT1-MMP mRNA와 단백질이 주로 폐암, 위암, 자궁경부암의 암세포에서 발현되며

결장암, 유방암, 두부암에서는 기질의 섬유아세포에서 MT1-MMP mRNA가 발현된다고 하였다.<sup>35</sup> glioma 세포주에서의 MT1-MMP 발현은 transcription 안정도나 transcription 후 상태에 따라서 조절된다고 하여 MT-MMP 발현은 조직과 암의 유형, mRNA 발현에 따라 다르다고 하겠다.<sup>36</sup> 본 연구에서도 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 MT1-MMP mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 높아 기존의 연구와 같은 결과를 나타내었다. 이는 MT1-MMP mRNA 발현이 자궁경부암의 암화과정과 침윤 및 전이에 중요한 역할을 한다고 하겠다.

그러나 본 연구에서는 정상 자궁경부와 자궁경부암에서 MT1-MMP mRNA의 크기가 달랐으며 이는 정상 자궁경부에서 발현된 MT1-MMP mRNA가 자궁경부암에서 발현되는 MT1-MMP mRNA와는 달리 exon이 일부 소실되어 있기 때문이며 이미 본 저자가 MT1-MMP cDNA를 cloning하고 sequencing하여 확인하였다. 자궁경부암에서의 MT1-MMP mRNA 발현은 정상 자궁경부에서와 차이가 있을 뿐 아니라 MMP-2 활성화에 관여하는 MT1-MMP의 일부분인 hemopexin like domain 내의 exon이 일부 없음으로써 MT1-MMP 작용이 감소하는 것으로 생각된다. 또한 최근 보고에 의하면 MT1-MMP hemopexin like domain의 복합체 형성이 MMP-2 활성화에 중요하다고 하여 MT1-MMP catalytic domain의 작용이외에도 MMP-2 활성화에 hemopexin like domain이 관여한다고 하였다.<sup>37</sup> 따라서 정상 자궁경부와 자궁경부암에서의 MT1-MMP mRNA 발현의 차이 뿐만 아니라 MMP-2 활성화에 관여하는 527bp MT1-MMP mRNA 발현을 확인하는 것이 자궁경부암을 임상적으로 도움이 된다고 하겠다. 난소의 양성 종양에서는 MT1-MMP mRNA가 상피세포에서 발현되지 않으나 경계성 종양에서는 MT1-MMP가 5%, 악성암에서는 42%가 상피세포에서 발현된다고 하였다.<sup>20</sup> MT1-MMP mRNA 발현은 난소종양의 양성, 악성을 감별 진단하는 하나의 지표로 이용될 수 있다고 하였다. 따라서 고형성 암의 종류에 따라 MT1-MMP mRNA 발현을 검사함이 임상적으로 암을 진단할 수 있는 지표로 이용될 수 있다고 할 수 있겠다.

위암의 57%에서 MT1-MMP가 발현되는 것은 임파절 전이 및 복막전이와 관련이 있으며 MT1-MMP가 발현된 암 환자가 MT1-MMP가 발현되지 않은 암 환자보

다 예후가 좋지 않다고 하였다.<sup>38</sup> 따라서 위암에서 MT1-MMP mRNA: MMP-2 mRNA나 MT1-MMP 발현을 검사하는 것이 위암 환자의 치료 전 예후를 평가하는데 도움이 된다고 하였다.<sup>38</sup> 또한 MMP-2 발현이 강하게 증가된 위암환자에서 MT1-MMP가 없거나 약한 경우보다 예후가 좋음을 보고함으로써 MT1-MMP의 발현이 더 중요함을 시사하였다. 그러나 다른 고형성 암의 예후를 예측하는 데 MT1-MMP mRNA 발현정도를 이용할 수 있는지에 대한 연구는 아직은 적다. 본 연구에서는 자궁경부암에서 MT1-MMP mRNA 발현이 암의 병기에 따라 증가하며 자궁경부암의 진행에 관여함을 알 수 있었다. 따라서 계속적으로 연구를 한다면 자궁경부암의 다른 예후인자와 MT1-MMP 발현의 상호 관계를 규명할 수 있겠다.

세포간 유착물질인 E-cadherin mRNA와 단백질 분해효소 중 막성 유형인 MT1-MMP mRNA 발현이 본 연구에서 서로 상관관계가 있음이 나타났다. 아직 E-cadherin과 MT1-MMP mRNA에 대한 연구는 보고된 바 없으나 E-cadherin mRNA 발현과 MMP-2, 9 mRNA 발현은 관계가 있음이 보고되었다. 책장암, 방광암에서 E-cadherin mRNA가 감소하고 MMP-2와 -9 mRNA가 증가함이 보고되었으며 MMP: E-cadherin ratio로써 예후를 예측할 수 있다고 하였다.<sup>39,40</sup> 본 연구에서는 통계적으로 유의하지 않았으나 자궁경부암에서의 E-cadherin mRNA/MT1-MMP mRNA가 정상 자궁경부의 E-cadherin mRNA/MT1-MMP mRNA 보다 높은 경향을 나타내었다. 이는 암의 침윤과 전이에 필요한 여러 인자들이 상호작용을 하고 있다고 할 수 있겠다.

결론적으로 MT1-MMP mRNA 발현은 자궁경부암의 암화과정이나 전이에 중요한 역할을 하며 E-cadherin mRNA 발현과 상호 관련이 되어 있기 때문에 이러한 유착의 감소와 세포외 기질로의 유착증가가 함께 일어나야 암의 진행 및 전이가 이루어진다고 할 수 있겠다. 따라서 계속적으로 MT1-MMP와 E-cadherin mRNA 발현을 연구하여 자궁경부암에서의 역할을 정확히 확립할 수 있다면 앞으로 E-cadherin adhesion system 발현을 조절하고 MT1-MMP 발현을 억제하는 약제의 투여로 자궁경부암 치료에도 도움이 될 수 있다고 하겠다.

## 참고문헌

- 1) Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*. 1985;3:257-79.
- 2) Boller K, Vestweber D, Kemler R. Cell adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 1985;100:97-108.
- 3) Tsukita S, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S. Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J Cell Biol*. 1993;123:1049-53.
- 4) Albeda S. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Cell Mol Biol*. 1991;4: 195-203.
- 5) Albeda S, Buck C. Integrins and other cell adhesion molecule. *FASEB J*. 1990;4:2868-80.
- 6) Bussemaker MJG, Schalken JA. The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. *World J Urol*. 1996;14:151-6.
- 7) Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B. E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991;113:173-85.
- 8) Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cell acquire invasive properties after the loss of uvomorulin mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 1989;108:2435-47.
- 9) Schwartz GK, Wang H, Lampen N. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells. *Cancer*. 1994;73:22-7.
- 10) Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, Amini SB, Pretlow TG. Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *Am J of Path*. 1996;148:1375-9.
- 11) Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*. 1993;53:3241-5.
- 12) Moon HS, Kim JI, Son YS, Kim BK, Park SY. E-cadherin expression in cervical carcinogenesis. *Kor J of Obst & Gyn*. 1997;40:548-57.
- 13) Moon HS, Choi EA, Park HY, Choi JY, Kim JI. The expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin,  $\beta$ -catenin and  $\gamma$ -catenin, and the epidermal growth factor receptor in cervical cancer cells.



- Gynecol Oncol 2001;81:355-9.
- 14) Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin. Cancer Biol*, 1990;1:99-106.
- 15) Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, et al. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene*. 1992;7:77-83.
- 16) Sato H, Seiki M. Membrane-Type Matrix Metalloproteinases (MT-MMPs) in Tumor Metastasis. *J. Biochem*. 1996;119:209-15.
- 17) Nagase H and Woessner JFJ. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491-4.
- 18) Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS*. 1999;107:137-43.
- 19) Westerlund A, Apaja-Sarkkinen M, Hoyhtya M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T. Gelatinase A-Immunoreactive Protein in Ovarian Lesions- Prognostic Value in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol*. 1999;75:91-8.
- 20) Afzal S, EL-Nasir L, Poulosom R, Stubbs A, Rowlinson G, Sato H et al. MT1-MMP and MMP-2 mRNA Expression in Human Ovarian tumors : Possible implications for the Role of Desmoplastic fibroblasts. *Human Path*. 1998;29:155-65.
- 21) Moon HS, Choi EA, Yoo MY, Chung HW. The mRNA expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 in invasive cervical cancer. *Kor J of Obst and Gyn*. 2001;44:532-9.
- 22) Girolodi LA, Schalken JA. Decreased expression of the intercellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev*. 1993;12:29-37.
- 23) Otto T, Birchmeier W, Schmidt U. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res*. 1994;54:3120-3.
- 24) Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett*. 1991;57:131-5.
- 25) Pizzarro A, Benito N, Navarro P. E-cadherin expression in basal cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1993;69:157-62.
- 26) Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Path*. 1993;143:1731-42.
- 27) Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:614-21.
- 28) Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer*. 2000;36:1621-30.
- 29) Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. *J Biol Chem*. 1997;272(4):2446-51.
- 30) Pei D, J. Weiss SJ. Transmembrane-deletion Mutants of the Membrane-type Matrix Metalloproteinase-1 Process Progelatinase A and Express Intrinsic Matrix-degrading Activity. *J Biol Chem*. 1996;271(15):9135-40.
- 31) Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2(TIMP-2) Binds to the Catalytic Domain of the Cell Surface Receptor, Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1(MT1-MMP). *J Biol Chem*. 1998;273(2):1216-22.
- 32) Shofuda K, Yasumitsu H, Nishihashi A, Miki K, Miyazaki K. Expression of three membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in rat vascular smooth muscle cells and characterization of MT3-MMPs with and without transmembrane domain. *J Biol Chem*. 1997;272(15):9749-54.
- 33) Kajita M, Kinoh H, Ito N, Takamura A, Itoh Y, Okada A, et al. Human membrane type-4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) is encoded by a novel major transcript: isolation of complementary DNA clones for human and mouse mt4-mmp transcripts. *FEBS Lett*. 1999;457(3):353-6.
- 34) Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(9):1087-97.
- 35) Sato T, Iwai M, Sakai T, Sato H, Seiki M, Mori Y, et al. Enhancement of membrane-type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) production and sequential activation of progelatinase A on human squamous carcinoma cells co-cultured with human dermal fibroblasts. *Br J Cancer*. 1999;80(8):1137-43.
- 36) Nakada M, Kita D, Futami K, Yamashita J, Fujimoto N, Sato H, et al. Roles of membrane type 1 matrix

- metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in invasion and dissemination of human malignant glioma. *J Neurosurg.* 2001;94(3):464-73.
- 37) Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, et al. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001;20(17):4782-93.
- 38) Caenazzo C, Onisto M, Sartor L, Scalera R, Giraldo A, Nitti D, et al. Augmented Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP): MMP-2 Messenger RNA Ratio in Gastric Carcinomas with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res* 1998;4:2179-86.
- 39) Kuniyasu H, Ellis LM, Evans DB, Abbruzzese JL, Fenoglio CJ, Bucana CD, et al. Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5(1):25-33.
- 40) Slaton JW, Karashima T, Perrotte P, Inoue K, Kim SJ, Izawa J, et al. Treatment with low-dose interferon-alpha restores the balance between matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2840-53.

## ■ 국문 초록 ■

- 목 적:** E-cadherin 등의 유착물질이나 MT1-MMP 등의 단백질 분해효소는 암화과정이나 침윤, 전이에 관여한다. 본 연구에서는 침윤성 자궁경부암에서 MT1-MMP와 E-cadherin mRNA의 발현을 확인하여 이 두 물질의 발현이 상호관련이 있는지와 예후인자들과의 상관관계가 있는지 알아보고자 하였다.
- 연구방법:** 자궁경부암환자 35명과 정상 자궁경부를 가진 여성 14명에서 조직을 채취하여 RNA를 얻은 후 RT-PCR과 QC-PCR로 검사하였다. 자궁경부암 환자의 예후인자는 의무기록으로 확인하였다.
- 결 과:** 자궁경부암과 정상 자궁경부에서의 E-cadherin mRNA 발현은 유의한 차이가 없었으나 MT1-MMP mRNA는 정상 자궁경부에 비해 자궁경부암에서 유의하게 높게 발현되었다. 또한 E-cadherin과 MT1-MMP mRNA 발현은 서로 상관관계가 있었으며 MT1-MMP mRNA 발현은 자궁경부암 병기와 SCC-Ag 수치와 유의한 상관관계가 있었다.
- 결 론:** 이상의 결과로 MT1-MMP mRNA 발현은 자궁경부암의 암화과정과 전이에 관련됨을 알 수 있으며 이때 이 단백질 분해효소는 유착물질의 발현과 상호관련이 된다고 하겠다.

**중심단어 :** 자궁경부암, MT1-MMP, E-cadherin, 전이