

위암세포주에서 간세포성장인자가 E-cadherin의 발현에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 ¹외과학교실 및 ²생화학교실
³성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단병리과학교실
⁴서울대학교 의과대학 외과학교실

한상욱¹ · 이원홍¹ · 김옥환¹ · 김명욱¹
이재호² · 송상용³ · 이건욱⁴

Effect of Hepatocyte Growth Factor on the Expression of E-cadherin in Gastric Carcinoma Cell Lines

Sang-Uk Han, M.D.¹, Won-Hung Lee, M.D.¹, Wook-Hwan Kim, M.D.¹, Myung-Wook Kim, M.D.¹
Jae-Ho Lee, M.D.², Sang-Yong Song, M.D.³ and Kuhn Uk Lee, M.D.⁴

Departments of ¹Surgery and ²Biochemistry, School of Medicine, Ajou University, Suwon;
³Department of Diagnostic Pathology, School of Medicine, Sung Kyun Kwan University, Samsung Medical Center, Seoul, ⁴Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Previously, we reported that the expression of E-cadherin was significantly decreased according to the increase of the level of hepatocyte growth factor (HGF) in gastric cancer tissue. In this work, the effect of HGF on the cell-cell adhesion and intracellular distribution of E-cadherin in the gastric carcinoma cell lines were studied.

Materials and Methods: Western blot analysis was performed to confirm the presence or absence of c-Met and E-cadherin in SNU-1, 5, and 16 cells. Tyrosine phosphorylation of c-Met, E-cadherin, α -, β -, γ -catenins was checked by immunoprecipitation. The morphologic changes induced by HGF were studied with immunocytochemical staining. Functional proportion of E-cadherin was estimated by cell fractionation. The effect of HGF on cell proliferation and invasion was also assessed.

Results: Among SNU-1, 5, and 16 cell lines, only SNU-16 cells expressed both E-cadherin and c-Met. A morphological change from epithelial shape to fibroblastic one was observed in the SNU-16 cells after treatment with HGF. In addition, E-cadherin expression of the SNU-16 cells was shifted from the membrane and to the cytoplasm, and the functional fraction of E-cadherin was decreased in the SNU-16 cells treated with HGF. On the other hand, HGF increased the proliferation and invasion of the SNU-16 cells.

Conclusion: These results suggest that HGF may regulate cell adhesion in gastric carcinomas via the cellular redistribution and functional change of E-cadherin.

Key Words: Stomach neoplasm, Hepatocyte growth factor, c-Met gene, E-cadherin, Invasion

서 론

암이 진행되어 전이되기까지는 여러 과정을 거치게 되고, 이러한 과정에서 가장 초기에 발생하는 현상은 원발 병소에 존재하는 암세포간의 결합이 소실되는 과정이다. 상호 결합이 소실된 암세포는 이동을 하게 되고 주변조직으로의 침윤을 거쳐 원격전이를 하게 된다. 세포간의 결합이 소실된 암세포는 아무 방향으로나 이동하거나, 일정한 방향으로 이동하게 되는데 이 때 관련된 인자로 autocrine motility factor, hepatocyte growth factor, tumor necrosis factor 등이 알려져 있다(1). 그 중 간세포성장인자(hepatocyte growth factor, 이하 HGF)는 최초 발견시에는 간세포의 증식을 촉진하는 인자로 알려졌으나(2), 이후에 간세포뿐만 아니라 위장관 상피세포, 각질세포 등을 위시한 여러 상피세포의 증식을 촉진하는 능력이 있음이 알려졌으며, 일부 암세포에 있어서는 세포의 증식을 촉진하고 세포의 이동을 촉진하며 혈관생성을 촉진하는 등 다양한 기능이 있음이 밝혀졌다(3,4). 그리고 HGF의 중요한 기능 중 세포의 분산을 촉진하는 기능이 있어 HGF를 일명 분산인자(scatter factor)라고도 부른다(5). HGF가 세포에 작용을 하기 위해서는 수용체에 결합하여야 하는데 그 수용체는 분자량이 170 kd인 c-Met으로 밝혀졌고 이는 *c-met* protooncogene의 산물이며 이 protooncogene은 다양한 암종에서 과표현됨이 알려져 있고(6), 특히 위암의 진행과 상관성이 높다(7). HGF와 c-Met간의 상호관계를 설명하는 기전으로 c-Met을 발현하는 암세포는 주변의 기질조직에서 HGF를 발생케 하여 그 HGF가 암세포에 신호를 주는 소위 paracrine 기전이 잘 알려져 있는데, HGF를 처음으로 발견하고 처음으로 cloning을 했던 일본의 Nakamura 실험실에서는 담낭암세포주인 GBd1 세포와 섬유아세포간에 paracrine 기전이 작동하면 GBd1 세포의 이동능과 침윤능이 현저히 증가함을 보여주었다(8).

한편, E-cadherin은 세포표면에 존재하는 칼슘의

존형 세포 유착물질(Calcium dependent intercellular Adhesion Molecule, CAM)의 일종인데, 분자량이 120 kd으로 거의 대부분의 상피세포에서 정상적으로 발현되며, 세포간의 유착을 매개하여 세포의 모양을 유지하고 조직의 구조를 형성하게 하는 역할을 한다(9). 종양세포에서의 E-cadherin은 종양의 침윤을 억제하는 기능이 있고(10), 위암에 있어서도 E-cadherin의 발현에 이상이 오면 분화도가 나빠지고 예후도 불량하다는 보고가 알려져 있다(11). E-cadherin의 기능은 세포내의 α -, β -, γ -catenin들과 밀접한 관계가 있는데, E-cadherin은 이러한 catenin들과 복합체를 형성하여 세포내의 actin과 결합하여야 세포의 골격을 유지하며 세포간의 결합을 유지할 수 있다(12). 한편, HGF가 E-cadherin의 발현을 조절하는 기능이 있음을 위암세포에서 Shibamoto등이 최초로 발견한 바 있는데(13), 그들은 HGF에 의한 β -catenin의 tyrosine phosphorylation이 E-cadherin의 기능을 억제하여 암세포의 침윤성이 높아졌다고 하였다.

본 연구자들은 과거 위암환자들의 혈청 HGF 농도를 측정된 결과 종양이 진행함에 따라 유의하게 혈청 HGF 농도가 상승함을 관찰하였고, 종양을 제거할 경우 혈청 HGF 농도가 감소함도 관찰하였으며 위암의 재발시 다시 상승함을 관찰한 바 있는데(14,15), 이를 통하여 위암의 진행에 HGF가 중요한 역할을 함을 시사하였다. 또한 조직내 HGF의 농도가 증가할수록 E-cadherin의 발현이 감소되는 경향을 관찰한 바 있어 HGF가 E-cadherin의 발현에 영향을 미칠 가능성이 있음을 보고한 바도 있다(16).

이에 본 연구자들은 위암조직에서 관찰된 HGF와 E-cadherin의 상관성을 *in vitro*에서 확인하기 위해, HGF가 E-cadherin의 발현에 영향을 미치는지 또한 위암세포의 증식 및 침윤에 영향을 주는지를 알아 보고자 위암세포주를 이용하여 연구하여 보았다.

재료 및 방법

1) 세포배양

SNU-1, SNU-5, 그리고 SNU-16 등의 위암세포

주들을 한국암세포은행에서 분양받아 12 mM glucose와 10% fetal bovine serum을 보유한 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. SNU-1세포는 원발성 위암, SNU-5와 SNU-16 세포는 복수에서 배양한 세포로 모두 저분화암이다.

2) 실험에 사용한 항체

c-Met에 대한 항체로 rabbit polyclonal antibody (C-28, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA)를 이용하였고 E-cadherin에 대한 항체는 mouse monoclonal anti-E-cadherin (HECD-1, Zymed Lab. Inc., San Francisco, CA)을 이용하였다. Human recombinant HGF는 R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)에서 구입하여 이용하였다. Phosphotyrosine에 대한 항체는 mouse monoclonal antibody (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)를 이용하였으며, α , β , γ -catenin에 대한 항체는 mouse monoclonal antibody (Transduction Lab., Lexington, KY)를 이용하였다.

3) Western blotting을 이용한 c-Met, E-cadherin, 그리고 catenin의 발현 확인

위암세포주를 phosphate buffered saline (PBS)에서 세척한 다음 단백질을 분해 억제제(100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin)가 첨가된 buffer (120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 40 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 분해하였다. 이 추출액을 10,000 \times g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 Western blot analysis에 이용하였으며 단백질의 양은 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다. 20 μ g의 단백질을 분리하기 위해 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)에 사용하였으며, nitrocellulose filter (Amersham, Arlington Heights, IL)에 옮긴 다음 4°C에서 하루 밤동안 항 c-Met 항체와 항 E-cadherin 항체로 배양하였다. 다음날 filter를 0.1% Tween-20이 함유된 Tris buffered saline (TBS) 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Amersham, Arlington

Heights, IL)와 donkey anti-mouse antibody (Amersham, Arlington Heights, IL)로 각각 배양하여 enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL)을 이용하여 X-ray film으로 확인하였다.

4) RNA 추출 및 northern analysis

Guanidine thiocyanate를 이용하여 total RNA를 추출하여 20 μ g의 RNA를 1.4% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 Nylon membrane (Amersham, Arlington Heights, IL)에 옮겼다. Blot을 standard hybridization solution (50% formamide, 4 \times Denhardt's solution, 0.25 \times SSC (0.3 mol/L NaCl, 0.03 mol/L sodium citrate), 0.1 mg/ml sheared herring testes DNA, 1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM NaH₂PO₄)에 옮긴 후 4시간동안 42°C에서 prehybridize하였다. ³²P-labeled probe를 nick translation method (Nick Translation Kit; GIBCO, Grand Island, NY)로 준비하여 standard solution에서 42°C에서 24시간 동안 섞은 후 hybridize를 수행한 후, membrane은 실온에서 15분간 2 \times SSC/0.1% SDS, 0.5 \times SSC/0.1% SDS, 0.1 \times SSC/0.1% SDS 순서로 세척하였다.

5) 면역침전법(Immunoprecipitation)

SNU-16 세포를 24시간 동안 serum free로 배양한 다음, HGF 10 ng/ml을 추가하여 1시간 배양하였다. 배양액을 찬 PBS로 세 번 세척 후 extraction buffer (0.15 M NaCl, 10 mM Tris [pH 8.0], 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 0.1 M of phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% aprotinin, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate)로 30분 동안 분해한 다음, 4°C에서 14,000 \times g로 10분간 원심분리 후 상층액을 얻어 단백질을 정량하였다. 이후 시료당 단백질량이 500 μ g (500 μ l 용액내에서)이 되도록 희석한 후 5 μ l의 c-Met, E-cadherin, 그리고 α -, β -, γ -catenin에 대한 항체로 4°C에서 하루 밤동안 배양하였다. immunocomplex를 30 μ l (50% v/v) protein A-Sepharose (Life Technologies, Gaithersburg, MD)와 반응시킨 후

extraction buffer로 3번 세척한 후 6% SDS-PAGE에 분리하여 nitrocellulose membrane에 옮겼다. 이 membrane을 2% Bovine serum albumin (BSA)로 block한 후 anti-c-Met antibody (1 μ g/ml)와 anti-phosphotyrosine antibody (2 μ g/ml)로 반응 후 anti-rabbit, anti-mouse 이차 항체로 1시간 동안 배양한 다음 ECL로 확인하였다.

6) 면역세포화학염색

세포를 계대하면서 cover slide에 부착시켰다. 이후 HGF 40 ng/ml로 처리 후 다시 3일간 배양한 다음 methanol/acetone 혼합액에 10분간 고정한 다음 0.075% Triton으로 막의 투과성을 증가시켰다. 고정된 세포들은 하루 밤동안 항 E-cadherin 항체로 4°C에서 배양한 다음 LSAB kit (DAKO Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 biotinylated anti-mouse IgG와 avidin-biotin-peroxidase conjugate로 각각 20분간 처리하여 이차항체염색 및 표지항체염색을 한 후 aminoethylcarbazole로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

7) 세포분획법(Cell fractionation)

세포막과 세포질을 분리하기 위해 SNU-16 세포를 HGF (40 ng/ml)로 처리한 후 37°C에서 3일간 배양하여 PBS로 세 번 세척한 후 scraping buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 2 mM EGTA, 0.25 M sucrose, mixture of protease inhibitor: 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin)에 모은 다음, 즉시 초음파로 분쇄한 후 4°C에서 1시간 동안 100,000 \times g로 원심 분리하였다. 세포질 분획인 상층액은 냉장보관하였고, 세포막 분획인 침전물은 NP-40 buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM EGTA, protease inhibitor)를 처리한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액으로 Western blot을 시행하였다. E-cadherin의 기능성 분획과 비기능성 분획은 Triton X-100에 대한 용해도에 따라 구분하였다. 즉 세포막 분획을 CSK buffer (50 mM NaCl, 10

mM Pipes, pH 6.8, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, 300 mM sucrose)에 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride과 10 μ g/ml leupeptin을 추가하여 4°C에서 10분간 균질화한 다음 원심분리 후 상층액을 Triton-soluble form (비기능성 분획)이라고 하였다. 이 때의 침전물은 Triton-insoluble form (기능성 분획)으로서 같은 부피의 SDS buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1% SDS)에서 100°C에서 10분간 끓인 후 원심분리하여 상층액으로 Western blot을 시행하였다.

8) 종양세포의 증식 분석

HGF의 자극에 의한 세포의 증식도를 평가하기 위해 CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI)를 사용하였다. HGF 10 ng/ml로 처리한 SNU-16 세포를 96 well에 100, 500, 50,000/well의 농도로 하루에서 7일까지 배양하였다. 100 μ l 부피의 세포액을 포함하고 있는 각 well당 20 μ l의 dimethylthiazol carboxymethoxyphenyl sulfophenyl tetrazolium (MTS)과 1 μ l의 phenazine methosulfate (PMS) 혼합용액을 첨가한 다음 37°C에서 4시간동안 5% CO₂에서 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 ELISA plate reader (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)로 측정하였다.

9) HGF 투여 후 종양세포의 침윤성 분석

HGF의 투여에 의해 실제 invasion 정도가 달라지는지를 확인하기 위해 Boyden chamber (Neuroprobe, Cabin John, MD)를 사용하였다. 먼저 polyethylene filter, 8 μ m pore-sized, 6.25 mm diameter (Becton Dickinson, Bedford, MA)의 윗면을 laminin, collagen IV, heparan sulfate가 포함된 matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA)로 coating하여 하루 밤동안 laminar flow hood에 두었다. Chamber의 하부 well에 0, 3, 10, 30 ng/ml 농도의 HGF가 첨가된 RPMI 1640 배지를 준비한 후, 준비된 filter를 위치시켰다. SNU-16 세포를 0.1% BSA가 첨가된 RPMI 1640 배지에 2 \times 10⁵ cell/(200 μ l RPMI +

Fig. 1. Western blot analysis of c-Met (A) and E-cadherin (C) and Northern blot of c-Met (B) in several gastric carcinoma cell lines. Only SNU-16 cells express both c-Met and E-cadherin.

0.1% BSA)의 농도로 만들어 상부 well에 부었다. 이 chamber를 37°C, 5% CO₂에서 5시간 배양한 다음 상층액을 제거한 후 filter를 분리하여 pore를 통과하여 아랫면에 부착된 세포를 hematoxylin으로 염색한 후 광학현미경을 통하여 그 숫자를 세었다.

10) 통계적 분석

증식 분석과 침윤 분석에서의 숫자들의 비교는 Student *t* test를 이용하였다. 모든 통계는 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) 위암세포주에서의 E-cadherin의 발현 및 HGF와의 관련

SNU-1, SNU-5, SNU-16 세포들의 c-Met, E-cadherin 단백질을 Western blot으로 확인한 결과 SNU-5와 SNU-16 세포들은 c-Met을 발현하였으나 SNU-1 세포는 c-Met의 발현이 없었다(Fig. 1A). Northern blot 결과에서도 SNU-1 세포는 c-Met에 대한 mRNA를 발현하지 못함을 알 수 있었고,

Fig. 2. Tyrosine phosphorylation of c-Met in SNU 16 cells after treatment with HGF (10 ng/ml, 1 hour). c-Met immunoprecipitates obtained from these cells were resolved by SDS-PAGE, and subjected to immunoblot analysis for detection of phosphotyrosine. Upon addition of HGF, tyrosine phosphorylation was apparent.

SNU-5와 SNU-16 세포들은 발현함을 알 수 있었다(Fig. 1B). 반면 E-cadherin의 경우 SNU-1 세포에서는 약하게 발현하였고 SNU-5 세포에서는 발현이 없었으며 SNU-16 세포에서는 강하게 발현하

Fig. 3. Immunocytochemical staining for E-cadherin. Following HGF (40 ng/ml) treatment for 3 days, SNU-16 cells exhibited a fibroblastic and the sharp immunoreactive lines became blunted (A: $\times 400$, B, C: $\times 200$, LSAB).

였다(Fig. 1C). 따라서 SNU-16 세포만이 c-Met과 E-cadherin을 모두 발현하였으므로 HGF와 E-cadherin의 상호 작용을 관찰하기 위해 이후 실험은 SNU-16 세포를 이용하였는데, SNU-16 세포는 HGF에 의해 c-Met에서 tyrosine phosphorylation이 활성화됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 각종 세포들을 배양한 결과 모두 배양액에서 부유한 상태로 자랐으나 SNU-16 세포는 바닥에 붙어 자라는 세포가 일부 관찰되었다. 세포내에서 E-cadherin의 발현장소를 확인하기 위해 항 E-cadherin 항체를 이용하여 면역세포화학염색을 시행한 결과 HGF를 처리하기 전 SNU-1 세포는 E-cadherin이 세포질의 한 쪽에 치우쳐 염색이 되었고 SNU-5 세포는 염색이 되지 않았으며, SNU-16 세포는 E-cadherin이 주로 세포막에 염색이 되었다(Fig. 3). HGF 처리 후 SNU-1 세포의 E-cadherin의 염색 장소 및 형태학적인 변화는 전혀 달라지지 않았다. SNU-5 세포는 HGF 처리 전과 동일하게 E-cadherin이 발현되지 않았고, HGF에 의한 형태학적 변화도 발생하지 않았다. 그러나 SNU-16 세포의 경우 HGF를 처리하지 않은 세포는 모양이 둥글고 자갈을 모

Fig. 4. Changes of location of E-cadherin in SNU-16 cells after treatment with HGF (40 ng/ml) for 3 days (s: soluble, i: insoluble). In untreated SNU-16 cells, E-cadherin was mainly located in membrane and was found as only Triton X insoluble form. After treatment with HGF, E-cadherin was slightly decreased in membrane and increased in cytosol, and Triton X soluble form was increased.

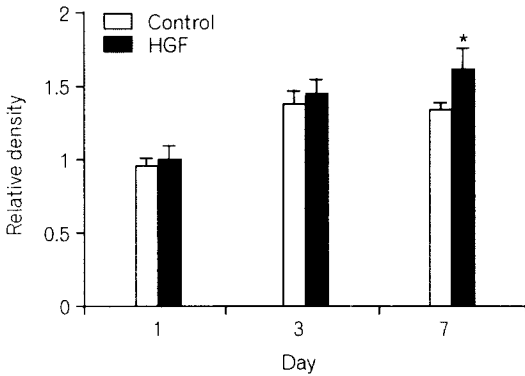


Fig. 5. Proliferation assay of SNU-16 cells after treatment with HGF (10 ng/ml) for 7 days. HGF significantly increased the proliferation of SNU-16 cells. *; $P < 0.05$ vs. 1 day, 3 day HGF, $P < 0.05$ vs. 7 day control.

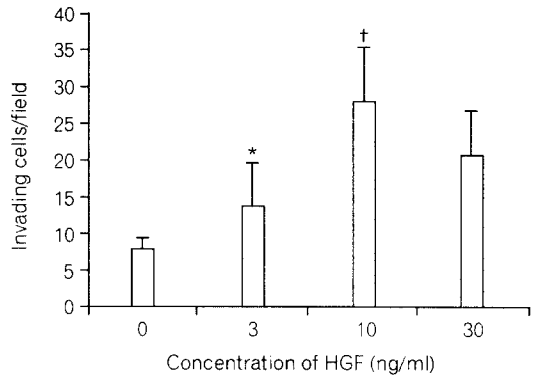


Fig. 6. Invasion assay of SNU-16 cells using Boyden chamber after treatment with HGF for 5 hours. HGF significantly promoted the invasion ability of SNU-16 cells in a dose dependent manner. * $P < 0.05$ vs. 0 ng/ml, † $P < 0.05$ vs 0 and 3 ng/ml.

아 놓은 것 같은 colony를 보였으나 HGF를 처리한 경우 4시간만에 섬유아세포 모양으로 길쭉한 모양을 보이기 시작하여 3일 동안 진행되었다. 특히 E-cadherin의 발현장소를 보면 HGF 처리 전에는 세포간의 결합 부위의 세포막에 선명한 선 (sharp line)으로 주로 발현되었으나 HGF를 처리할 경우 보다 세포막 염색이 감소되어 발현장소 및 발현양상이 달라짐을 알 수 있었다. 이러한 현상을 정량적인 분석으로 확인하기 위해 세포분획 방법으로 세포질과 세포막을 분리한 다음 E-cadherin의 양을 Western blot으로 분석한 결과 HGF 처리 후 세포질내의 E-cadherin의 양은 증가하였고 세포막내의 E-cadherin은 감소하였으며, 세포막의 E-cadherin을 Triton X-100으로 처리하여 세포막의 E-cadherin을 기능성(insoluble)과 비기능성(soluble) 분획으로 분리하였을 때 HGF 처리하지 않은 SNU-16 세포의 세포막 E-cadherin은 모두 기능성 분획만 존재하였으나 HGF 처리시 기능성 분획은 감소하였고 대신 비기능성 분획이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4).

2) HGF에 의한 위암세포의 증식과 침윤의 변화

10 ng/ml 농도의 HGF의 자극을 준 SUN-16 세

포의 경우 대조세포에 비해 3일, 7일째 모두 유의한 세포증식의 증가를 보였으며 7일의 경우 대조 세포에 비해 약 20%의 상승이 있었다(Fig. 5, $p < 0.05$). 또한 Boyden chamber를 이용한 침윤분석의 결과 세포의 침윤도는 HGF의 농도가 증가할수록 유의하게 침윤된 세포의 숫자가 증가하였으며 특히 10 ng/ml 농도에서는 대조세포에 비해 약 4배의 상승효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 6, $p < 0.05$).

3) HGF에 의한 위암세포의 E-cadherin, α -, β - 및 γ -catenin의 양적인 변화와 tyrosine phosphorylation의 변화(Fig. 7)

SNU-16 세포를 HGF 10 ng/ml로 자극하여 자극 전과 자극 24시간 후의 E-cadherin, α -, β - 및 γ -catenin의 단백질량의 변화를 Western blot으로 관찰한 결과 SNU-16 세포는 E-cadherin 외에 α -, β - 및 γ -catenin을 모두 발현함을 알 수 있었고 HGF 자극에 의한 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 7A). 그리고 항 E-cadherin 항체를 이용하여 E-cadherin-catenin complex를 면역침전시킨 후 tyrosine phosphorylation을 관찰한 결과, α -, β catenin은 HGF 처리 전에도 이미 tyrosine phosphorylation이 되고 있었고 HGF 자극 후에도 tyrosine phosphorylation의 양이 변하지 않았으며 E-cadherin과 γ -

Fig. 7. Protein expression (A) and tyrosine phosphorylation (B) of E-cadherin, α -, β -, and γ -catenins in SNU-16 cells after treatment with HGF (10 ng/ml, 1 hour). Immunoprecipitation was done using anti-E-cadherin antibody. HGF did not induce tyrosine phosphorylation of α -, or β -catenins. WB: Western blot, IP: immunoprecipitation.

catenin의 tyrosine phosphorylation은 새로 유도되지 않았다(Fig. 7B).

고 찰

HGF가 암세포에 미치는 역할에 대해서는 많은 결과들이 알려져 있고 위암세포의 경우도 주변의 섬유아세포에서 분비되어 암세포의 침윤을 돕는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(17). 암세포가 주변 기질로 침윤을 하자면 가장 첫 단계로 서로 간의 결합이 붕괴되어야 하는데 세포간 결합에 가장 중요한 인자로 알려진 E-cadherin에 대한 HGF의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않다. Tannapfel등(18)은 HGF의 자극으로 위암세포주의 분산이 초래되고 이때 E-cadherin의 감소가 동반됨을 관찰하였고, Balkovetz등(19)은 MDCK 세포주를 HGF로 처리한 결과 세포의 극성(polarity)이 소실되면서 E-cadherin이 세포막에서 세포질로 이동하고 또한 E-cadherin의 생산감소가 동반함을 관찰하였으며, Shibamoto등(13)은 위암세포주 MKN7, MKN74 등을 HGF로 처리한 결과 세포의 분산이 증가하면서 E-cadherin의 농도가 감소하는 현상을 보고하였는데 이러한 변화는 cadherin과 관련된 단백질들의 tyrosine phosphorylation을 통해 발생

한다고 하였다. 따라서 HGF는 E-cadherin의 변화에 직접 또는 간접적인 영향을 미쳐 세포간의 유착을 소실시킴을 알 수 있다. E-cadherin은 catenin과 complex를 이루어 세포 골격을 이루는 actin과 강력한 결합을 하고 이 결합에 이상이 올 때 암이 진행되기도 하므로 이 complex를 종양 억제자라고도 한다(12). 위암에서도 E-cadherin/catenin complex의 발현이 감소할수록 진행이 나쁘고 예후가 불량하므로 위암의 진행에 있어서도 E-cadherin은 종양억제자 역할을 한다고 추측된다(11). 본 연구자들은 종양의 HGF 농도가 증가할수록 E-cadherin의 발현이 감소하는 현상을 관찰한 바 있는데(16), 암조직에서의 연구로서는 HGF의 농도의 상승이 E-cadherin의 발현 장소의 이동을 초래하였는지 아니면 그 반대인지를 확인할 수는 없으므로 이러한 인과 관계를 확인하여보고자 위암세포주를 이용하여 HGF가 E-cadherin의 발현에 영향을 미치는지를 확인하여 보았다.

SNU-1, 5, 16 등 한국세포주 은행의 대표적 위암세포주를 선택하여 HGF의 수용체인 c-Met과 E-cadherin의 발현을 Western blot으로 관찰한 결과 SNU-16 세포만이 두 단백질을 모두 발현하였으므로 E-cadherin에 미치는 HGF의 역할을 알아보기 위해 본 연구에서는 SNU-16 세포를 이용하여

in vitro 연구를 진행하였다. SNU-16 세포의 c-Met은 mRNA도 발현하였고, 10 ng/ml의 외부 HGF에 의해 활성화가 잘 되었으므로(Fig. 1), 이 세포는 HGF에 의한 E-cadherin의 변화를 관찰하기에 적합하다고 할 수 있다. 본 실험에서 c-Met의 tyrosine phosphorylation은 적은 농도(10 ng/ml)의 HGF에 의해서도 1시간만에 유도되었지만 이 농도와 시간에서는 E-cadherin의 변화나 세포모양의 변화가 저명하지 않았으므로(data not shown), 보다 높은 농도인 40 ng/ml의 HGF로 3일간 배양 후 실험하였다. 3일 동안의 HGF 40 ng/ml의 자극으로 SNU-16 세포는 세포모양에 변화가 생겨 둥근 모양에서 길쭉한 섬유아세포모양으로 변화하였는데 이러한 모양의 변화는 SNU-1과 SNU-5 세포들에서는 관찰할 수 없었다. E-cadherin은 일반적으로 분화가 좋은 암에서 발현되는 것으로 알려져 있는데(11), 본 실험에 사용된 SNU-1, 5, 16 세포들은 모두 저분화암에서 유래한 세포들이지만, SNU-1, 5 세포들은 E-cadherin의 발현이 없거나 약하였고 SNU-16 세포는 E-cadherin이 강하게 발현되었다. HGF를 처리하였을 때 SNU-16 세포의 모양이 변한 이유는 SNU-16 세포만이 HGF의 수용체인 c-Met과 E-cadherin을 모두 발현하여 HGF에 의해 활성화된 신호가 E-cadherin의 변성을 유도하였기 때문일 것으로 추측된다. HGF 처리 전에는 E-cadherin의 발현이 세포막에서 가늘고 선명한 발현을 하였으나 HGF 처리 후에는 세포막에서 분산된 발현을 한 점(Fig. 3)과 세포막의 E-cadherin 양이 감소하고 특히 세포막의 E-cadherin의 기능이 약화된 점(Fig. 4) 등이 이를 뒷받침한다. 세포 분획법으로는 E-cadherin의 양이 HGF의 자극에 의해 세포막에서는 감소하였고 세포질에서는 그 양이 증가하였으나, 면역세포화학염색으로는 세포질에서의 E-cadherin의 발현이 뚜렷히 관찰되지 않았는데, 그 이유로 전자현미경으로 관찰한 결과 SNU-16 세포의 경우 핵이 세포에서 차지하는 비율이 너무 커서 세포막과 세포질이 일관현미경으로는 구별이 되지 못하였기 때문으로 추측하였다(data not shown).

본 연구에서 Triton X-100에 용해되지 않는 분획은 기능성 E-cadherin, 용해되는 분획은 비기능성 E-cadherin이라고 정의하였는데 이러한 개념은 Hirano등(20)이 증명한 바 있으며 그들은 비용해성 분획만이 세포간의 결합에 관여한다고 하였다. 즉 비용해성 분획은 각종 catenin들과 결합한 상태의 E-cadherin이며 용해성 분획은 이들과의 결합이 파괴된 상태의 E-cadherin을 의미한다. 비용해성 E-cadherin은 환경의 변화에 의해 용해성 분획으로 가역적으로 변할 수 있는데, 본 연구에서 세포막에서의 E-cadherin의 비용해성 분획이 HGF에 의해 감소하면서 용해성 분획이 증가한 것은 HGF가 이러한 환경을 제공하였다는 점을 시사한다. 또한 HGF 처리 후 SNU-16 세포의 세포막에 존재하는 E-cadherin의 양은 감소하고 세포질내 E-cadherin의 양은 증가하였는데, 이는 E-cadherin의 안정화에 중요한 역할을 하는 calcium을 고갈시킬 경우 세포막의 Zonula adherens (ZA)에 존재하는 E-cadherin이 ZA의 분해물과 결합한 채 세포질내로 즉시 이동하여 더 이상 세포결합의 기능을 유지하지 못하였던 실험(21)처럼 HGF도 ZA에 존재하는 E-cadherin의 endocytotic internalization을 유도하는 기능이 있다고 추측하였다. Kamei등(22)의 보고에서도 E-cadherin과 c-Met는 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포막의 같은 장소에 존재하며 HGF의 자극에 의해 두 물질 모두 endocytotic internalization이 발생하였다고 한다. 따라서 본 실험을 통하여 HGF가 c-Met을 활성화함과 동시에 c-Met와 같은 장소에 있는 세포결합물질인 E-cadherin을 세포내로 유입함으로써 세포간의 결합을 방해하는 기능이 SNU-16 세포에도 있음을 알 수 있었다. 궁극적으로 HGF에 의한 E-cadherin의 이러한 변화가 암세포에서 지니는 의미는 transgenic mouse를 이용하여 E-cadherin을 발현시키면 정상세포가 전암단계인 선종에서 더 이상 진행이 되지 않았으나 E-cadherin의 발현을 억제하면 암으로 진행되었다는 실험(23)을 통하여 알 수 있듯이 E-cadherin의 정상 기능 파괴는 암세포의 악성화를 유발한다고 할 수 있다. 특히 과거

자료(16)에서 HGF 농도가 높았던 환자의 위암세포의 E-cadherin은 주로 세포질 속에 분포하였던 점은 HGF에 의한 SNU-16 세포의 E-cadherin이 세포막에서 세포질로의 장소 이동으로 설명될 수 있고 SNU-16 세포는 HGF에 반응하여 세포의 증식이 증가하였고 침윤도가 증가하였는데(Fig. 5, Fig. 6), 이러한 점은 모두 HGF가 위암세포의 진행을 촉진한다는 결론을 의미한다.

β -catenin은 E-cadherin의 기능 조절에 필수적인 물질이다. 가령 β -catenin이 결합하는 E-cadherin의 세포내 domain을 제거할 경우 형질내세막에서 생산된 E-cadherin은 세포막으로 이동이 되지 못한다(24). 따라서 만일 HGF가 이 β -catenin의 변형을 유도하는 기능이 있다면 E-cadherin의 기능에 장애가 올 수 있다. Shibamoto등(13)은 HGF에 의해 MKN7과 MKN74 등의 위암세포에서 β -catenin의 tyrosine phosphorylation이 증가되는 현상을 관찰하였는데 이 때 E-cadherin의 변형이 유도되어 암세포간의 결합이 붕괴됨을 관찰하였다. 그러나 본 연구에서 같은 방법으로 실험한 결과, SNU-16 세포에서는 HGF에 의해 E-cadherin의 발현 장소 이동 및 기능 변화가 관찰되었으나 여러 유착인자 중 α -catenin과 β -catenin만이 tyrosine phosphorylation이 있었으며 HGF를 처리한 결과 그 활성도가 전혀 증가하지 않았다. 따라서 본 실험 결과로는 HGF에 의한 E-cadherin의 변화가 β -catenin의 tyrosine phosphorylation에 따르지 않은 않는다는 점을 시사하고, 따라서 다른 경로로 E-cadherin의 변성이 유도될 수도 있다는 점을 암시한다. SNU-16 세포에서 β -catenin의 tyrosine phosphorylation이 증가되지 못한 이유 중 하나로 이 세포의 기원이 분화가 나쁜 암이었다는 점을 들 수 있다. 즉 Shibamoto등의 실험에 사용한 MKN7과 MKN74 세포의 기원은 모두 분화가 좋은 암이었고, HGF의 자극으로 모두 분화가 나빠진데 반해, 본 연구에서 사용한 SNU-16 세포의 기원은 이미 분화가 나쁜 암이었기 때문에 더 이상의 β -catenin의 tyrosine phosphorylation이 유도되지 못했다고 생각하며 분화가 좋은 암세포를

이용한 추가 실험이 필요하다고 생각한다.

본 연구는 HGF 단독으로도 E-cadherin의 변형을 유도하였고 또한 SNU-16의 세포증식을 촉진하였으며 기질로의 침윤도 촉진할 수 있음을 확인하였으므로, HGF가 암세포에 미치는 중요한 영향은 암세포간의 분리를 유도하며 암의 성장과 침윤 등 암의 진행의 촉진인자라는 점을 간접적으로 보여준다.

결 론

이 연구를 통하여 일부 위암세포에서는 HGF가 E-cadherin의 발현 장소를 세포막에서 세포질로 이동하게 할 뿐만 아니라 세포막의 기능성 E-cadherin을 감소시키는 역할을 하는 것을 알 수 있었으므로, 저자들은 HGF가 E-cadherin의 발현에 영향을 미쳐 암세포의 결합을 방해하여 암 침윤을 유도하는 기능이 있다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Roy FV, Mareel M. Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol* 1992;2:163-169
2. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:1450-1459.
3. Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W. Scatter factor. Molecular characteristics and effect on the invasiveness of epithelial cells. *J Cell Biol* 1990;111:2097-2105.
4. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nichkoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1937-1941.
5. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daiokuhara Y, Birchmeier W. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7001-7005
6. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AML, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA.

- Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251:802-804.
7. Taniguchi K, Yonemura Y, Nojima N, Hirono Y, Fushida S, Miwa K, Endo Y, Yamamoto H, Watanabe H. The relation between the growth patterns of gastric carcinoma and the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-met), autocrine motility factor receptor, and urokinase-type plasminogen activator receptor. *Cancer* 1998;82:2112-2122.
 8. Shimura H, Date K, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M. Induction of invasive growth in a gallbladder cancer cell line by hepatocyte growth factor *in vitro*. *Jpn J Cancer Res* 1995;86:662-669.
 9. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptor as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-1453.
 10. Berhens J, Mareel MM, Van Roy FM, Virchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989;108:2435-2440.
 11. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, Meier S, Moll R, Birchmeier W, Hommel G. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69:184-189.
 12. Hinck L, Nathke IS, Papkoff J, Nelson WJ. Dynamics of cadherin/catenin complex formation. Novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol* 1994;125:1327-1340.
 13. Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F. Tyrosine phosphorylation of β -catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1994;1:295-305.
 14. Han SU, Lee JH, Kim WH, Wang HJ, Cho YK, Kim MW. Significant correlation of hepatocyte growth factor level with progression of gastric adenocarcinoma. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29:367-374.
 15. Han SU, Lee JH, Kim WH, Cho YK, Kim MW. Significant correlation between serum level of hepatocyte growth factor and progression of gastric carcinoma. *World J Surg* 1999;23:1176-1180.
 16. Han SU, Joo HJ, Lee JH, Kim WH, Cho YK, Kim MW. Role of hepatocyte growth factor, Met, and E-cadherin in the progression of gastric carcinomas. *J Korean Surg Soc* 1998;55:53-64.
 17. Inoue T, Sowa M. Transforming growth factor and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gastric cells. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:152-163.
 18. Tannapfel A, Yasui W, Yokozaki H, Wittekind C, Tahara E. Effect of hepatocyte growth factor on the expression of E- and P-cadherin in gastric carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 1994;425:139-144.
 19. Balkovetz DF, Pollack AL, Mostov KE. Hepatocyte growth factor alters the polarity of Madin-Darby canine kidney cell monolayers. *J Biol Chem* 1997; 272:3471-3477.
 20. Hirano S, Nose A, Hatta K, Kawakami A, Takeichi M. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol* 1987;105:2501-2510.
 21. Kartenbeck J, Schmelz M, Frankle WW, Geiger B. Endocytosis of junctional cadherins in bovine kidney epithelial (MDBK) cells cultured in low Ca^{2+} ion medium. *J Cell Biol* 1991;113:881-892.
 22. Kamei T, Matozaki T, Sakisaka T, Kodama A, Yokoyama S, Peng YF, Nakano K, Takaishi K, Takai Y. Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells-regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* 1999;18:6776-6784.
 23. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-193.
 24. Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ. Coupling assembly of the E-cadherin/ β -catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 1999;144:687-699.