

10-Dimethyl-1,2 Benzanthracene (DMBA)로 유발한 흰쥐의 유방종양 발생에서 비만세포와 Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9의 상관관계

이현호¹ · 김애리 · 염범우 · 김인선

고려대학교 의과대학 병리학교실
생명공학원 분자생물학

접 수 : 2001년 2월 10일
게재승인 : 2001년 6월 1일

책임저자 : 김 인 선
우 136-705 서울시 성북구 안암동 5가
126-1
고려대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-920-6373
Fax: 02-923-1340
E-mail: iskim@korea.ac.kr

Mast Cells in 10-Dimethyl-1,2 Benzanthracene (DMBA)-Induced Rat Mammary Carcinomas: Relationship with Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Expression

Hyun Ho Lee¹, Ae Ree Kim, Bum Woo Yeom and Insun Kim

Department of Pathology and Molecular Biology, ¹Graduate School of Biotechnology and Medical College, Korea University, Seoul, Korea

Background : It has been suggested that mast cells are involved in the tumor growth and progression by production of a variety of enzymes and growth factors. They were studied in the 10-dimethyl-1,2 benzanthracene (DMBA)-induced rat mammary tumors, and evaluated in relation with the production of tryptase, chymase, and matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. **Methods :** Preneoplastic and neoplastic breast tissues of Sprague-Dawley female rats were obtained every week after DMBA treatment for 12 weeks. Toluidine blue stain was used for the identification of mast cells. Mast cell tryptase was studied by immunohistochemistry, and chymase by esterase stain. MMP-2 and MMP-9 were measured by Western blotting. **Results :** The numbers of mast cells in breast cancers were higher than in preneoplastic tissues, and there was a positive correlation between the numbers of tryptase-positive cells and the tumor size. MMP-9 quantity was correlated with the numbers of toluidine blue and chymase positive cells, but not with tryptase-positive cells and tumor size. Both active and inactive forms of MMP-2 and MMP-9 were identified in zymogram. **Conclusions :** The mast cells are increased in the DMBA-induced breast cancers, and their tryptase and chymase may play a role in tumor progression with or without participation of MMP-2 and MMP-9.

Key Words : Mast cell, Breast, Tryptase, Chymase, Matrix metalloproteinase

비만세포는 결합조직 중에서도 혈관, 신경, 또는 분비관 등의 주위에 주로 존재하는 세포로서¹ 알러지성 염증이나 섬유화를 일으키는 만성 염증에 관여한다는 사실이 잘 알려져 왔다.² 종양에서 비만세포의 출현은 오래 전부터 기술되었고, 이는 면역반응을 유도함으로써 암세포를 제거하려는 방어 기전으로 해석되었으나 최근 이 세포가 종양의 증식과 침윤과정에 관여하리라는 사실이 제기되었다.³⁻¹²

비만세포는 히스타민, 트립타제, 키마제(chymase), 헤파린, 인터루킨, tumor necrosis factor α (TNF α), transforming growth factor β (TGF β), basic fibroblast growth factor (bFGF) 등 외에도 여러 종류의 염증 매개인자들을 함유하고 있다.¹³⁻¹⁵ 또한 이 세포는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)와¹⁶ matrix metalloproteinase

(MMP)-9을 생성하는 것으로 알려져 있다.¹⁷ 특히 트립타제는 피하조직에 있는 섬유아세포를 활성화하고 1형 콜라겐과 MMP-2 (gelatinase IV)의 합성을 촉진한다고 하며,^{18,19} 신생 혈관형성에도 관계가 있다.²⁰⁻²² 키마제 역시 신생 혈관형성뿐 아니라 MMP-9을 활성화시키는 능력이 있는 것으로 보고되었다.^{15,18,23} 또한 사람에게서 발생하는 종양뿐 아니라 실험적으로 유발된 동물의 종양에서도 비만세포가 MMP의 생성과 신생 혈관형성 등을 촉진시켜 종양의 성장과 진행에 관련이 있다는 사실이 보고되었다.^{3-6,15,19-23}

실험적으로 유방암을 유발시키는 물질로는 10-dimethyl-1,2 benzanthracene (DMBA)과 N-nitroso-N-methylurea (NMU)가 흰쥐에 많이 이용되어 왔다.²⁴ 이들 발암물질을 45일에서 55일 사이의 쥐에 투여하면 유방조직에 있는 terminal end

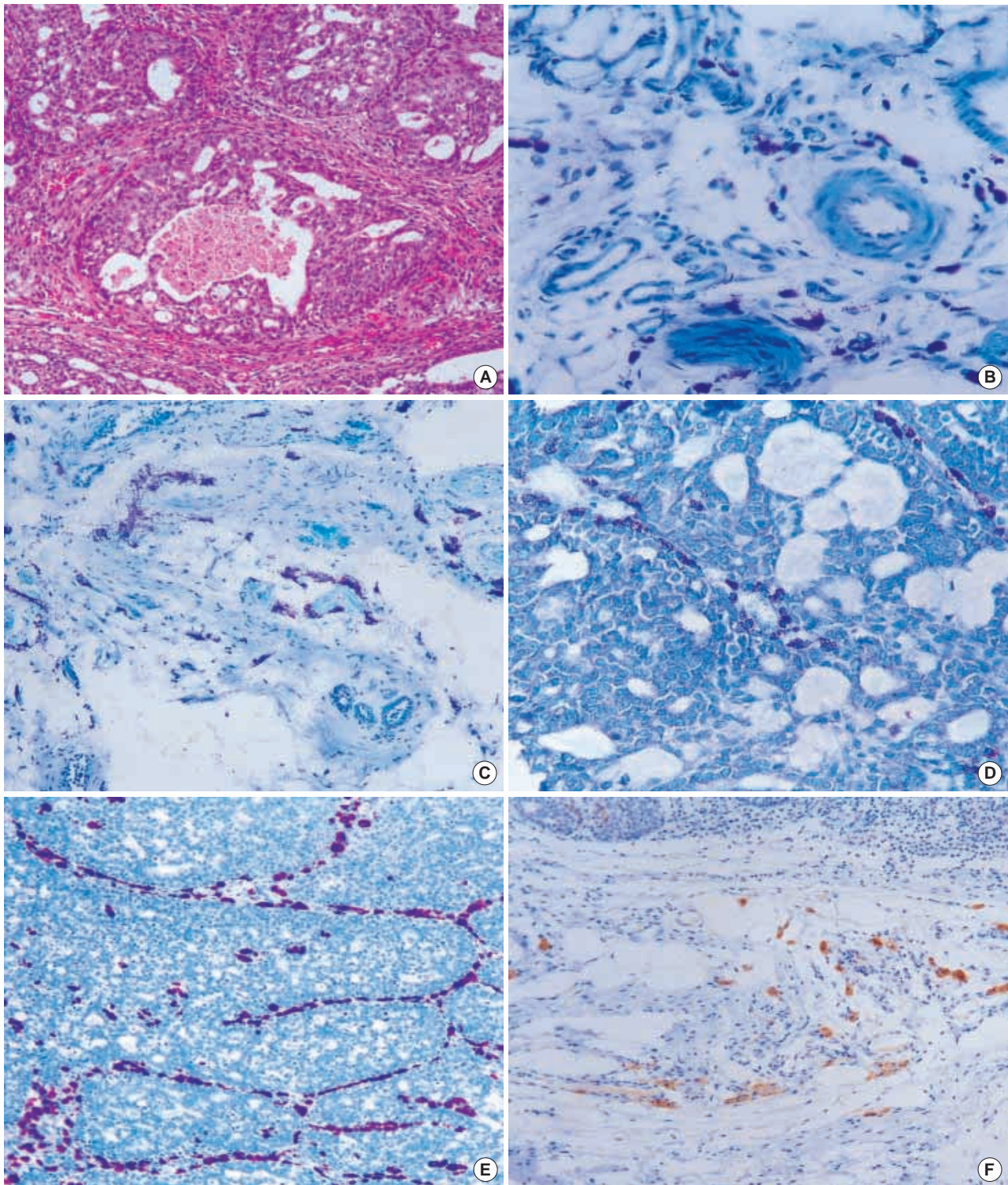


Fig. 1. The 10-dimethyl-1,2 benzanthracene (DMBA)-induced rat breast cancer shows infiltrating ductal carcinoma with central comedonecrosis (A). The mast cells in normal rat breast are found in connective tissue near the peripheral nerve and blood vessels (toluidine blue stain, B). The DMBA-treated rat breast at the 7th week shows the toluidine blue-positive mast cells in the fibrotic stroma (C). The linear infiltrations of the mast cells along the periphery of tumor cell nests are seen in the DMBA-induced rat breast cancer. (toluidine blue stain, D and esterase stain, E). Some of the tryptase positive cells are seen in the stroma of the DMBA-induced rat breast cancer (Immunostain, F).

buds (TEBs)의 상피세포들이 alveolar buds (ABs)로 분화하는 대신 상피세포들이 증식하여 암종을 유발하게 된다.²⁴⁻²⁸

본 연구에서는 흰쥐에 DMBA를 투여하여 실험적으로 유방 종양을 유발시킨 후 종양의 발생과 진행에서 보이는 비만세포의 변화를 관찰하고, 이들이 트립타제와 키마제를 생성하며 종양조직에서의 MMP-2와 MMP-9의 양과 관계가 있는지를 연구하였다.

재료와 방법

흰쥐로부터 실험적 유방암 유발

실험 동물은 생후 6주 된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐로, 한 마리당 올리브 기름에 10 mg/mL 농도로 10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA, Sigma, MO, U.S.A.)을 1주일 간격으로 2회 위장 안에 관을 삽입하여 투여하였다. 정상 대조군은 올리브 기름 1 mL를 같은 방법으로 투여하였다. DMBA 투여 후 8주 이전 종양이 생기기 전에는 경부에 한 쌍, 흉부에 두 쌍, 서혜부에 두 쌍으로 모두 여섯 쌍의 유방 중에 가장 크게 만져지는 유방조직을 절제하였다. 1주부터 3주까지는 6마리, 5, 6주는 3마리, 7주는 5마리를 실험군으로 하였다. 8주 이후는 32마리의 쥐를 12주까지 3일에 한번씩 축지하여 관찰하는 동안 생긴 종양을 절제한 결과, 8주에는 5마리의 쥐로부터 12개, 9주에는 6마리의 쥐로부터 11개, 10주에는 9마리의 쥐로부터 16개, 11주에는 5마리의 쥐로부터 11개, 12주에는 3마리의 쥐로부터 5개의 종양조직을 얻을 수 있었다.

광학현미경 검사

조직의 일부를 절제하여 10% 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법을 거쳐 파라핀 포매 조직을 만든 다음 5 μ m 두께의 조직 절편을 만들었다. 탈 파라핀과 함수과정을 거쳐 HE 염색한 후 관찰하였다. 정상군에서의 조직학적 소견과 DMBA 투여 후의 조직학적 소견은 김 등²⁵의 논문에서 이미 기술한 바와 같이, 양성 또는 악성 종양을 형성하지 않고 TEBs 상피세포들의 증식 소견만 관찰되는 경우를 종양 이전 병변(preneoplastic conditions)으로 구분하였고, 종양이 발생한 경우는 Hanover Consensus Conference의 기준에 따라 분류하였다.²⁶ 그 결과 종양은 모두 침윤성 암종으로 유두상 또는 사상형이 가장 흔하였다(Fig. 1A).

Toluidine blue 염색

탈 파라핀 과정을 위해 슬라이드를 크실렌에 각각 5분씩 2회 처리한 다음 함수과정을 거친 후 물에 수세하고 0.1% 톨루딘

블루를 5분 동안 반응시켰다. 물로 수세하고 탈수한 후 크실렌을 거쳐 봉입하였다.

키마제에 대한 esterase 염색

Naphthol AS-D chloroacetate esterase and α -naphthyl acetate esterase Sigma kit (MO, U.S.A.)를 이용하여 키마제 염색을 실시하였다. Coplin jar에 sodium nitrite (0.1 mol/L) 용액과 fast red violet LB base를 각각 1 mL를 넣고 30초 두었다. 여기에 데워진 증류수 40 mL, trizmal 완충용액 5 mL와 naphthol AS-D chloroacetate 용액(8 mg/mL) 1 mL를 혼합하여 coplin jar에 넣고 탈 파라핀한 슬라이드를 37°C 부란기에 40분 동안 염색하였다. 증류수로 수세한 후 hematoxylin에 2분 염색한 다음 다시 증류수로 수세하고 glycerol jelly로 봉입하였다.

트립타제에 대한 면역효소염색

면역효소염색을 위해 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 60°C의 항온기에 한시간 넣었다가 탈 파라핀과 함수과정을 거쳐 증류수에 수세하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 3% 과산화수소수를 사용하여 20분간 처리한 후 Tris 완충용액에 담갔다. 항원 회복을 위해 citrate 완충용액(pH 6.0)을 압력솥에 채우고 가온하여 끓기 시작할 때 슬라이드를 넣고 압력이 최고(103 kPa)에 도달한 후 2분간 더 끓이고 찬물에 담가 압력을 낮춘 후 슬라이드를 꺼내 Tris 완충용액에 담갔다. 비만세포의 트립타제를 염색하기 위해 트립타제에 대한 단클론성 항체(1:100, NeoMarkers, CA, U.S.A.)를 이용하여 16시간 동안 반응시켰다.

음성 대조군은 일차 항체 대신 생리식염수를 이용하여 동일한 방법으로 염색하였다. 일차 항체 반응 후 Tris 완충용액으로 수세하고 LSAB⁺ kit (DAKO A/S, Denmark)를 이용하여 biotin이 결합된 이차 항체를 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 수세 후 다시 peroxidase-conjugated streptavidin을 가하여 20분간 반응시켰다. Tris 완충용액으로 수세하고 발색제인 H₂O₂와 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 혼합액을 가하여 발색 반응을 관찰하면서 10분간 반응시켰다. 물에 수세하여 발색반응을 끝내고 Harris hematoxylin으로 대조염색하고 탈수과정을 거쳐 봉입하였다.

양성 세포 수 측정

대조 군과 실험 군에서 염색한 세포를 IMT (VT) image analysis version 3.0을 이용하여 현미경 200배, 5개 시야에서 측정 후 합산하였다.

MMP-2와 MMP-9 측정

단백질 추출

80°C에 냉동 보관된 35개의 종양조직을 각각 액체질소와 함께 막자 사발에 놓고 으개어 조직을 가루로 만든 후 10 mM bis-Tris-Hcl (pH 6.1)에 조직을 녹였다. 3분 동안 진탕기에서 섞은 후 혼합액을 16,000 g에 5분 동안 원심 분리한 후 상층액을 모았다.

MMP-2와 MMP-9 Western blotting

단백질 추출물을 12.5% SDS-polyacrylamide 겔에 dithiothreitol이 있는 상태에서 전기영동을 한 후 nitrocellulose막에 electroblotting하였다. 항체와의 비특이적인 결합을 막기 위해 5% blocking reagent에 두었다가 TBS-T로 막을 15분 동안 수세하고 완충용액을 갈아 5분씩 2회 실온에서 수세하였다. MMP-2와 MMP-9에 대한 단클론성 항체(Neomarkers, CA, U.S.A.)를 각각 1:1,000으로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 막에 반응시키고, 수세한 후 horseradish peroxidase가 결합된 이차 항체(DAKO A/S, Denmark)를 1:1,000으로 희석하여 한 시간 동안 반응시킨 다음 15분 동안 수세하고 5분씩 4회 수

세하였다. ECL Kit (Amersham Life Science, U.S.A.)를 이용하여 검출 반응시킨 다음 필름에 15분 동안 노출하여 현상하였다. Immunoblot한 결과를 스캔 후 Lab Works Image Acquisition and Analysis Software (UVP, U.S.A.) 프로그램을 이용하여 양을 측정하였다.

MMP-2와 MMP-9의 zymogram

흰쥐의 유방종양조직으로부터 추출한 단백질 40 µg/µL를 4X non-reducing sample buffer (pH 6.8)에 넣어 10% zymogram 겔에 분주한 다음 20 mA 냉각 시스템에서 전기영동을 실시하였다. 겔을 수세 완충용액에 30분 동안 두 번 수세한 다음 활성화 완충용액에 넣은 후 37°C에 넣어 12시간 반응시켰다. 1% Coomassie blue에 넣어 2시간 동안 염색하고 탈색한 다음 투명한 밴드를 확인하였다.

통계 처리

종양 이전의 대조군과 종양 발생군의 비교는 Sigma Plot 3.0 version (Jandel, U.S.A.)으로 t-test를 시행하였고, MMP-2 및 MMP-9와 비만세포 수와의 상관관계의 r과 p값은 SAS

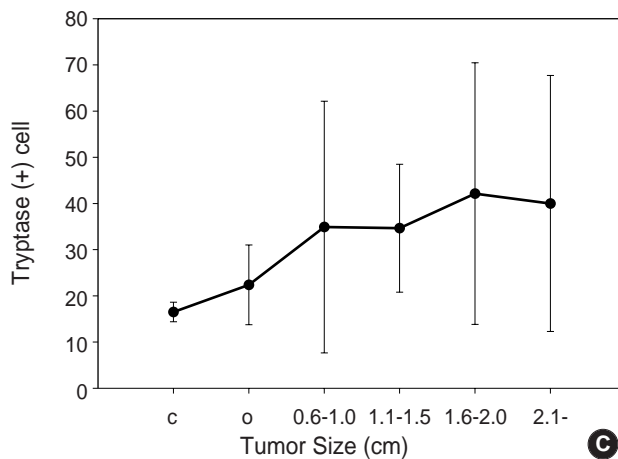
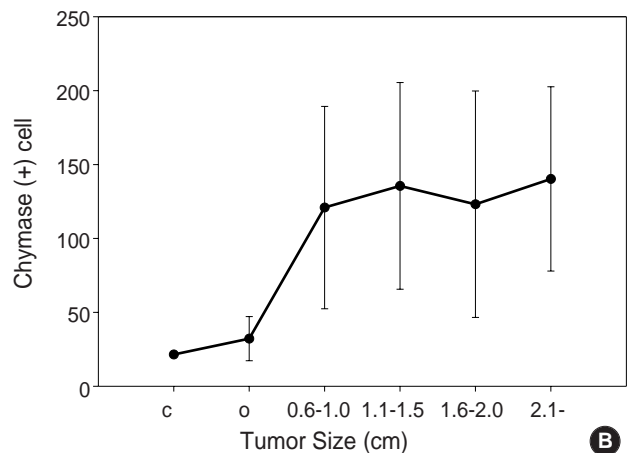
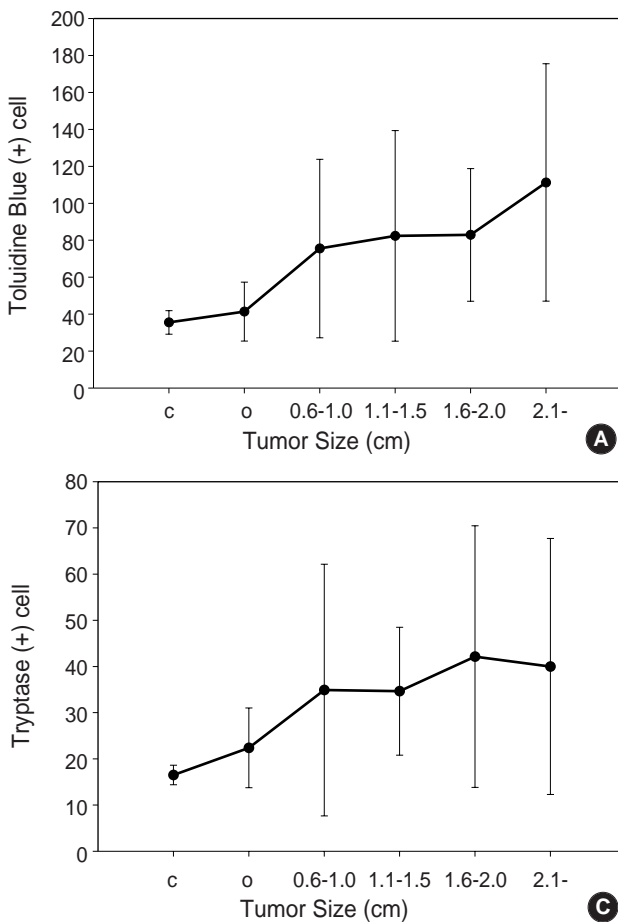


Fig. 2. The toluidine blue (A) and esterase (B) stains, and immunostain for tryptase (C) show the increased numbers of positive cells in the 10-dimethyl-1,2 benzantracene (DMBA)-induced rat breast cancers than in the normal control and pre-neoplastic lesions. The numbers of toluidine blue- and esterase-positive cells are increased with the tumor size. c: control breasts; o: preneoplastic lesions.

version 6.12 (SAS Institute, NC, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하였다.

결 과

Toluidine blue 양성 세포 수의 변화

Toluidine blue 염색에서 비만세포의 과립은 진한 보라색으로 염색되었고, 정상 대조군에서는 주로 신경과 혈관 주변에서 관찰되었다(Fig. 1B). DMBA를 투여하고 종양이 생기기 전의 조직에서는 정상에 비해 비만세포가 증가하였고 결체조직이 증가되어 섬유화를 보이는 곳에서 관찰되었다. 또한 6주와 7주에서

Table 1. The numbers of toluidine blue, chymase, tryptase positive cells in DMBA administered rats (Mean±SD)

Week	No. of rat	Toluidine blue (+)	Chymase (+)	Tryptase (+)
Control	2	35.5±6.36	21.50±0.71	16.50±2.12
1	6	40.00±15.17	25.83±9.95	24.38±2.14
2	6	40.17±21.89	24.00±13.04	12.80±5.54
3	6	38.14±14.12	38.17±17.79	21.17±4.62
5	6	56.33±20.53	29.67±9.50	24.00±0.00
6	3	34.33±5.13	26.00±8.89	ND
7	5	35.80±11.76	47.60±14.08	29.80±13.01
8	6 (12)	81.75±43.89	126.50±56.74	45.27±30.58
9	6 (11)	79.55±54.24	127.00±85.52	43.27±31.74
10	9 (16)	87.63±60.10	136.81±67.61	39.23±15.73
11	5 (11)	74.91±31.49	139.54±84.84	28.55±15.00
12	3 (5)	80.20±72.10	94.20±81.01	42.00±37.55
Preneo-plastic	29	41.34±15.96	32.17±14.93	22.38±8.63
Neoplastic	29 (55)	81.51±50.29	129.27±71.84	35.40±20.21

() : No. of tumors; ND: Not done.

는 과립이 터져 탈 과립화 현상을 보이는 세포가 흔히 관찰되었다(Fig. 1C). 종양에서는 종양 세포 집단의 주변을 따라 비만세포가 침윤하였다(Fig. 1D). DMBA를 투여하지 않은 정상 조직에서는 35.50±6.36개의 toluidine blue 양성 세포가 관찰되었고 DMBA를 투여한 다음 종양이 생기기 전 유방조직에서의 비만세포 수는 41.34±15.96개였으나 종양에서는 81.51±50.29개로 현저히 증가하였다. 또한 종양의 크기가 커질수록 toluidine blue 양성 세포의 수는 증가하였다($p<0.001$, Table 1, Fig. 2A).

키마제 양성 세포 수의 변화

키마제에 대한 esterase 염색의 양성 세포는 비만세포뿐만 아니라 중성구를 포함한 과립구도 양성으로 염색되었기 때문에 toluidine blue 양성세포 수보다 많았으나, 분포 양상은 유사하였다(Fig. 1E). Toluidine blue 염색에서와 같이 종양이 발생되기 전에는 시기에 따른 변화는 없었다. 정상 대조군에서와 DMBA 투여 후 종양이 발생하기 이전의 조직에서의 키마제 양성 세포 수는 각각 21.50±0.71개와 32.17±14.93개인데 비해, 종양에서는 129.27±71.84개로 유의 있게 증가하였다. 그러나 종양의 크기에 따른 증가는 관찰되지 않았다($p<0.001$, Table 1, Fig. 2B).

트립타제 양성 세포 수의 변화

트립타제에 대한 면역 염색에 양성인 세포 수는 toluidine blue 양성 세포 수나 키마제에 대한 염색 양성인 세포 수보다 훨씬 적었지만 분포되는 양상은 유사하였다. 특히 종양의 주변 조직에서 다른 염증세포와 함께 관찰되었다(Fig. 1F). 정상 대조군에서 트립타제 양성 세포 수는 16.50±2.12개였고, 종양 발

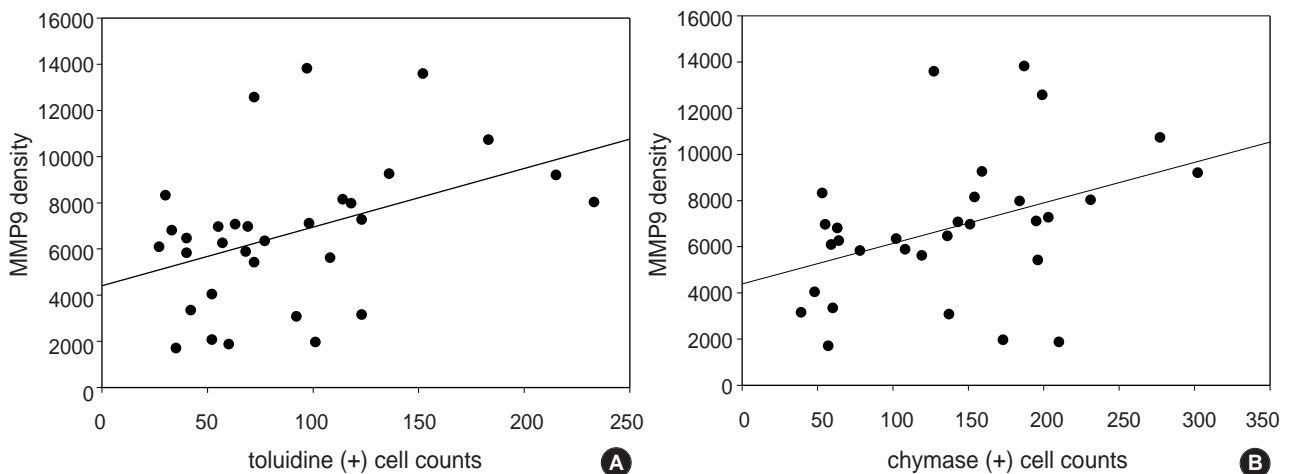


Fig. 3. Scatter and simple regression graphs show the positive correlations of matrix metalloproteinase (MMP)-9 density with toluidine blue-positive cells (A) ($r=0.42$, $p=0.0172$) or chymase-positive cells (B) ($r=0.40$, $p=0.0263$).

생 이전 7주까지의 유방 조직에서는 22.38 ± 8.63 개였던 반면 종양조직에서는 35.40 ± 20.21 개로 증가하였다. 트립타제 양성 세포 수는 DMBA 투여 후 2주부터 점차 증가하였고 종양이 생긴 경우에는 종양의 크기가 증가함에 따라 양성 세포 수가 계속 증가하였다($p < 0.001$, Table 1, Fig. 2C).

종양 조직에서 MMP-2, MMP-9 발현

MMP-2와 MMP-9를 Western blotting한 후 densitometer로 측정된 결과, toluidine blue 양성 세포 수는 MMP-9의 양과 상관관계가 있었으나($p < 0.05$, Fig. 3A), MMP-2와는 상관관계가 없었다. 키마제 양성 세포 수 또한 MMP-9의 양과 상관관계가 있었으나($p < 0.05$, Fig. 3B) MMP-2와는 상관관계가 없었다. 트립타제 양성 세포 수는 MMP-9의 양과 약한 상관관계를 보였고($0.05 < p < 1$) MMP-2와는 상관관계가 없었다. MMP-2와 MMP-9의 양과 종양의 크기와는 상관관계가 없었다.

Zymogram을 이용한 MMP-2와 MMP-9의 활성화 확인

MMP-2와 MMP-9의 실질적인 활성도를 확인하기 위해 zymogram을 실시한 결과, 아래쪽에서 MMP-2의 비활성형과 활성형의 두 띠가 관찰되었고 MMP-9 또한 MMP-2 위쪽에서 비활성형과 활성형의 두 띠로 관찰되었다.

고찰

비만세포는 염증이나 면역 반응에 주로 작용하는 세포로 알려져 있으나 사람이나 동물에 발생하는 종양에서 흔히 관찰된다는 사실이 보고되었다.⁴⁻⁶ 그 후 종양에서 비만세포의 역할이 숙주에게 도움을 주는 것보다는 종양의 성장에 더 관여한다는 사실이 제기되면서 그 기전을 해석하고자 하는 시도들이 이루어지고 있다. 즉 Roche^{3,20}는 실험적으로 비만세포가 이식한 종양의 성장을 조절할 수 있다는 사실과, 특히 비만세포가 함유하고 있는 heparin이 종양세포의 성장을 촉진시킨다는 사실을 보고하였다.²⁰ Ribatti 등²²은 골수종의 성장에 비만세포가 중요하며 이는 비만세포의 신생혈관 형성 능력과 관련이 있다는 사실을 보고하였다. Takanami 등²¹도 폐의 선암에서 비만세포의 침윤 정도가 모세혈관의 밀도와 상관관계가 있다고 하였고, Sawatsubachi 등¹⁵은 후두암에서 비만세포의 역할이 VEGF의 생성과 관계된다는 사실을 보고하여 비만세포와 신생혈관과의 연관성을 제시하였다. Molino 등⁹은 비만세포에 함유된 트립타제가 작용하는 부위인 PAR-2와 thrombin receptor가 혈관 내피세포에 발현한다는 사실을 보고하였다. 또한 Dabbous 등^{19,23}은 실험적으로 유발된 흰쥐의 유방암 종양 주변에서 비만세포가 증가하고, 이로부터 분비된 콜라겐 분해효소가 간질의 기질을 분해함으로써 종양

의 침윤에 관여한다는 사실을 보고하였다.

본 연구에서도 흰쥐에 DMBA를 투여하여 종양을 유발하였는데 종양이 생기기 이전의 조직에 비해 종양이 생긴 경우에 비만세포의 침윤이 증가하였다. 특히 종양과 간질 사이와 종양 주변의 섬유화를 보이는 부위에서 많이 관찰되었다. 또한 종양의 크기가 증가할수록 비만세포의 수가 증가하여 종양의 성장에 비만세포가 관여할 것이라는 사실을 알 수 있었다.

종양의 발생과 진행과정에서 주변 조직으로 침윤하고 혈관을 통해 전이하기 위해서는 기질을 이루고 있는 성분의 파괴가 있어야 하는데 이 과정에 여러 단백질 분해 효소가 작용하게 된다. 이 중에서 gelatinase A (MMP-2)와 gelatinase B (MMP-9)는 비슷한 구조와 기질의 특이성을 공유하는 MMP들로서 조직 손상과 재생 과정에 관여하는데, MMP-9은 초기에 기저막의 재조합에 관여하고 MMP-2는 비교적 오랫동안 기질의 재조합에 관여한다. 이들 효소는 여러 종류의 염색세포에서 생성되며 또한 다른 물질들에 의해 발현이 조절된다. 이들의 활성은 발현 정도뿐 아니라 비활성형을 활성화시키는 활성화 단백질 분해 효소와 효소의 활성을 억제하는 억제제(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)의 상대적 활성도에 영향을 받는다.

비만세포의 세포질에는 아주 다양한 단백질 분해효소가 함유된 것으로 알려졌는데, 비만세포가 함유하고 있는 단백질 분해 효소 중 트립타제와 키마제가 MMP의 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 특히 알파 키마제가 gelatinase B (MMP-9)를 활성화시킨다.²⁹ 또한 사람뿐 아니라 쥐 또는 개 등의 비만세포에서 MMP-2와 MMP-9이 생성된다는 사실이 보고되었는데 이들의 생성은 *c-kit* ligand와 TGF- β 에 의해 조절된다.^{16,29,30} 즉 섬유아세포가 갖고 있는 kit ligand는 비만세포에 있는 mast cell tyrosine kinase (kit)와 결합하여 MMP를 생성하게 하지만 TGF- β 에 의해서는 작용이 억제된다고 한다.

본 연구에서는 비만세포를 통상적인 방법인 toluidine blue로 염색하고 이들이 함유하고 있는 트립타제와 키마제에 대한 염색을 실시하여 비교하였다. 결과는 모두 유사하였으나 toluidine blue 양성 세포보다 키마제 양성 세포수가 많았던 것은 중성구나 호산구들이 양성으로 염색되었기 때문이고, 트립타제 양성 세포 수는 가장 적었는데 이는 트립타제를 생성하는 세포가 비만세포의 일부에 해당하기 때문으로 해석할 수 있겠다. 특히 흥미로운 사실은 DMBA 투여 후 6, 7주에는 많은 비만세포들의 과립이 터져 기질 내에 흩어져 있어 수를 계산하기가 어려웠으나, 과립 주변으로 다양한 정도의 섬유화가 관찰되어 섬유화 과정에서의 이들의 역할을 짐작할 수 있었다.

종양 조직에서 MMP-2와 MMP-9의 양을 비교한 결과, toluidine blue 양성인 비만세포 수와 키마제 양성인 세포 수가 MMP-9의 양과 비례 관계가 있음을 밝혔고 zymogram을 통해서 이들 효소가 젤라틴을 분해하는 효소임을 증명할 수 있었다. 그러나 MMP-2와 MMP-9의 양이 종양의 크기와 상관관계가 없었던 사실은 이들 기질 분해효소의 발현 자체뿐만 아니라 다른 여

러 인자들의 상관관계가 종양의 진행에 중요한 것으로 해석할 수 있겠다.

본 연구를 통해 실험적으로 유발된 유방암의 발생과 진행에 비만세포가 관련이 있음을 알 수 있었고, 이 세포들이 트립타제와 키마제의 생성뿐 아니라 MMP-2와 MMP-9의 생성 및 활성화에 관여하리라는 사실을 증명함으로써 인체에 발생하는 종양의 연구에도 이용될 수 있는 근거를 제시하였다고 생각한다.

참고문헌

1. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77: 1033-79.
2. McNeil HP. The mast cell and inflammation. *Aust NZ J Med* 1996; 26: 216-25.
3. Roche WR. The nature and significance of tumour-associated mast cells. *J Pathol* 1986; 148: 175-82.
4. Harveit F. Mast cells and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequence: a preliminary report. *J Pathol* 1981; 134: 7-11.
5. Mahapatro RC, Bowers HM. Distribution of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 1979; 44: 592-7.
6. Bowers HM, Mahapatro RC, Kennedy JW. Numbers of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. *Cancer* 1979; 43: 568-73.
7. Berton A, Levi-Schaffer F, Emonard H, Garbuzenko E, Gillery P, Maquart FX. Activation of fibroblast in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 485-92.
8. Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, *et al*. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. *Eur J Biochem* 1990; 194: 721-30.
9. Molino M, Barnathan ES, Numerof R, *et al*. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 1997; 272: 4043-9.
10. Brassart B, Randoux A, Hornebeck W, Emonard H. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 489-500.
11. Yamamoto T, Hartmann K, Eckes B, Krieg T. Mast cell enhances contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblast by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit. *Immunology* 2000; 99: 435-9.
12. Levi-Schaffer F, Rubinchik E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblast. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 999-1003.
13. Okayama Y, Bradding P, Tunon-de-Lara JM, Holgate ST, Church MK. Cytokine production by human mast cells. *Chem Immunol* 1995; 61: 114-34.
14. Katz Y, Stav D, Barr J, Passwell JH. IL-13 results in differential regulation of the complement protein C3 and factor B in tumor necrosis factor (TNF)-stimulated fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 150-6.
15. Sawatsubashi M, Yamada T, Fukushima N, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2000; 436: 243-8.
16. Kanbe N, Tanaka A, Kanbe M, Itakura A, Kurosawa M, Matsuda H. Human mast cells produce matrix metalloproteinase 9. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2645-9.
17. Cairns JA, Walls AF. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1997; 99: 1313-21.
18. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, *et al*. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 1382-97.
19. Dabbous MK, Haney L, Nicolson GL, Eckley D, Woolley DE. Mast cell modulation of tumor cell proliferation in rat mammary adenocarcinoma 13762NF. *Br J Cancer* 1991; 63: 873-8.
20. Roche WR. Mast cells and tumors. The specific enhancement of tumor proliferation in vitro. *Am J Pathol* 1985; 119: 57-64.
21. Takanami I, Takeuchi K, Naruke M. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2686-92.
22. Ribatti D, Vacca A, Nico B, *et al*. Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br J Cancer* 1999; 79: 451-5.
23. Dabbous MK, Walker R, Haney L, Carter LM, Nicolson GL, Woolley DE. Mast cells and matrix degradation at sites of tumour invasion in rat mammary adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1986; 54: 459-65.
24. Russo J, Saby J, Isenberg WM, Russo IH. Pathogenesis of mammary carcinomas induced in rats by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 435-45.
25. Kim YH, Cho HD, Kim KI, *et al*. Morphologic changes and Ha-ras mutation in DMBA-treated rat mammary tissues. *J Korean Cancer Assoc* 1999; 31: 1140-50.
26. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Biology of disease. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62: 244-78.
27. Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest* 1987; 57: 112-37.
28. Russo J, Tait L, Russo IH. Susceptibility of the mammary gland to

- carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1983; 113: 50-66.
29. Fang KC, Wolters PJ, Steinhoff M, Bidgol A, Blount JL, Caughey GH. Mast cell expression of gelatinases A and B is regulated by kit ligand and TGF-beta. *J Immunol* 1999; 162: 5528-35.
30. Tanaka A, Arai K, Kitamura Y, Matsuda H. Matrix metalloproteinase-9 production, a newly identified function of mast cell progenitors, is downregulated by c-kit receptor activation. *Blood* 1999; 94: 2390-5.