

TGF-β 1에 의한 구강 편평 세포 암종의 증식억제 효과

이근형, 배경진, 최정희, 김은정, 이은주, 김진*

연세대학교 치과대학 구강병리학 교실, 구강종양연구소

<ABSTRACT>

The Inhibitory Effect of TGF-β 1 in Oral Squamous Cell Carcinoma Proliferation

Geun Hyung Lee, Jung Hee Choi, Eun Jung Kim, Eun Ju Lee, Jin Kim*

Department of Oral Pathology, Oral Cancer Research Institute, Yonsei University College of Dentistry

Epithelium maintains homeostasis by the signaling balance of growth stimulation and inhibition. Recently, loss of growth inhibitory effects of transforming growth factor-β (TGF-β) on epithelial cells is regarded as a possible mechanism of cancer. Although the genomic mutation in type I and type II receptors of TGF-β is considered one of important mechanism of these inactivation, there might be another inactivation mechanism because the mutation rate is relatively low and inhibitory effect is not associated with the mutation. The purpose of this study is evaluating controlling mechanism type II receptor of TGF-β by detecting effects of TGF-β on growth inhibition and on expression of cell cycle regulatory protein p21^{CIP1}. Eight cancer cell lines derived from oral squamous cell carcinoma(OSCC) were examined. There was no growth inhibition effects by TGF-β except YD-8 cells. YD-8 cells which showed growth inhibition expresses p21^{CIP1} by TGF-β whether refractory cell lines, YD-9, did not. All of the tumor cells express mRNA of type II receptor by RT-PCR and northern blot analysis, especially on YD-8 and YD-17M. From these results, most of oral cancer cell lines might lose the growth inhibitory effects by TGF-β, and the growth inhibition on YD-8 cells was mediated by expression of p21^{CIP1}.

Key words : Oral squamous cell carcinoma, YD cell lines, TGF-β type II receptor, p21^{CIP1}

I. 서 론

구강 및 두경부 암은 전체 암종의 3~5%이며 이중 구강 점막에서 발생하는 종양을 포함하여 두경부에 발생하는 악성 종양의 대부분은 편평세포암종이다¹⁾. 편평세포암종은 6대 암종에 속하고 전 세계적으로 매년 약 40만 명이 발병하고 있다²⁾. 두경부 암에 있어 지금까지 임상 및 병리학적 진단 요소가 중요하였지만, 최근의 분자 생물학 및 암 유전자

연구 발달은 암 발생 및 전이 기전을 이해하는데 있어 많은 도움을 주고 있다. 하지만 다단계 발암과정을 특징으로 하는 두경부 및 구강 점막에서 발생하는 편평세포암종에 대한 분자 생물학적 연구는 많지 않다^{3,4)}.

구강 점막의 편평세포암종의 발생은 특징적인 전암병소가 관찰되며, 이는 field cancerization과 다단계 발암과정으로 설명된다³⁾. 즉, 발암요인에 의한 유전적 손상이 불멸화 (immortalization)를 동반하는 암세포로의 전환을 유도하고, 정상 상피의 이형성과 상피 내암(carcinoma in situ) 단계를 거쳐 침윤성 암종으로 발전하게 된다. 구강점막을 구성하는 중층편평상피는 외부 자극으로 탈락되며 기저세포층에서 지속적인 세포분열을 하여 각화세포로의 분화를 반복하는 조직으로서, 세포의 성장과 분화를 조절하는 인자들, 즉 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 그

* Correspondence : Jin Kim, Department of Oral Pathology, Oral Cancer Research Institute Yonsei University, College of Dentistry, 134 Shinchon-Dong, Sudaemun-Ku Seoul, Korea, 120-752 Tel : 82-2-2228-3031, Fax : 82-2-392-2959, E-mail : jink@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업(02-PJ1-PG3-20801-0015)과 2005년 정부지원(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-005-J059 01)을 받아 수행된 연구임

수용체, 억제인자(transforming growth factor, TGF- β)와 그 수용체등에 의해 항상성이 유지된다. 따라서 이들 상피세포 성장인자와 억제인자간의 불균형과 조절 이상은 구강 점막의 다단계 발암과정을 이해하는 중요한 요소라 할 수 있다^{5,6}. 실제로 전암 병소 단계에서 EGFR의 증가와 함께 기저세포층의 TGF- β type II 수용체의 발현이 감소함이 보고 되어 있고 이러한 결과는 EGFR와 TGF- β 수용체간의 불균형이 전암 병소 및 암발생 기전에 관여하리라는 점을 암시한다⁷.

이중 TGF- β 신호전달 체계는 다양한 세포 현상, 즉 증식, 분화, 인지, 세포사멸을 조절한다. TGF- β 는 상피세포에서 cyclin-cdk 복합체의 활성을 억제하여 세포 주기를 정지시킴으로서 세포 성장을 억제한다⁸. 그러나 TGF- β 는 간엽 조직에서는 증식을 촉진하는 이중적 성질을 가지고, 섬유 세포의 교원질 합성을 조절하고, 발생기 때는 척추, 팔, 다리, 치아, 안면골, 심장판막 등의 개조에 관여하며, 단백질 용해 효소의 기능을 억제함으로써 새로운 육아조직 형성을 촉진하여 상처치유를 돕는다⁹. 이들 TGF- β 가 조절하는 과정들이 비정상적으로 활성화되거나 억제되면 종양 발생에 관련 있을 것으로 생각되며¹⁰, 최근에는 TGF- β 가 암억제 유전자로서의 기능을 갖는다고 보고되었다^{5,11}. TGF- β ligand는 세포 표면에 존재하는 type I, type II 수용체에 결합하고 이들의 serine/threonine kinases 활성을 유도한다^{12,13}. 이들 수용체 단말기의 인산화는 Smad 단백질의 연속적인 인산화 과정에 의해 세포내 신호가 핵으로 전달된다. 지금까지 8개의 Smad 단백질이 알려져 있고 이들은 receptor-regulated Smad(R-Smad), co-mediator Smad(Co-Smad), inhibitory Smad (I-Smad)등으로 분류된다. 이중 R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5, and 8)는 type I 수용체 kinase에 의해 직접 인산화 됨으로써 활성화되고, 이들은 homotrimerization을 형성하여 Co-Smad, Smad4와 heteromeric 복합체를 형성한다^{14,15}. 이들 복합체는 핵 내부로 이동하여 다른 핵 전사 보조 인자와 함께 target 유전자의 전사를 조절하게 된다. I-Smad로 알려진 Smad-6와 Smad7은 R-Smad와 경쟁하여 수용체의 활성을 저지하거나, Co-Smad와 결합하여 수용체의 proteasomal degradation을 촉진함으로써 TGF- β 의 활성을 억제한다^{15,16}. TGF- β 신호 전달체계는 전술한 바와 같이 상피세포의 성장을 억제하므로, 이 신호 전달체계의 이상이 종양 형성과정과 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되고 있다. TGF- β 유전자군 이나 Smad 단백질 유전자의 돌연변이가 다양한 암종에서 이미 보고 되어 있다¹⁶⁻²⁰. 특히 TGF- β type II 수

용체의 돌연변이에 의한 이상은 대부분의 소화기 종양에서 microsatellite instability와 함께 관찰되며^{21,22}, 췌장암종에서는 Smad4의 돌연변이가 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라, 많은 유전성 질환에서 TGF- β 신호 전달체계의 중요성이 보고 되어 있다. 최근에는 이들 돌연 변이가 신호 전달과 관련된 단백질 구조의 다양한 변화를 초래하는 것으로 보고 되어 돌연변이가 악성 종양과 같은 다양한 질환의 원인 인자임이 규명되고 있다^{23,24}. 그러나 TGF- β 유전자의 돌연 변이나 Smad를 통한 신호 전달 과정과는 달리 세포 내에서 TGF- β 수용체의 발현 조절 과정은 지금까지 거의 알려져 있지 않아 이의 중요성과 역할을 규명하는 것은 발암과정을 이해하는데 있어 많은 도움을 줄 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 우리나라 사람에서 확립된 구강 편평 세포 암종 세포주에서 TGF- β 수용체의 전사 조절에 의한 mRNA 발현을 알아봄으로써 구강 암종 및 전암 병소 발생과정에서 TGF- β 수용체의 발현 조절이 갖는 역할을 규명하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

가. 연구 재료

이 연구는 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 구강 편평세포암종 환자로부터 확립한 8 예의 암종세포주를 대상으로 하였으며, 확립된 암세포주들의 병리학적 특징은 Table 1에 정리하였다²⁵. 구강 편평세포암종 세포주는 5% CO₂가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, UT, USA)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Ham's의 F-12 배지 (3:1)를 사용하여 배양하였다.

나. Growth inhibition assay

8 예의 구강 편평세포암종 세포주의 TGF- β 1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 각각의 구강 편평세포암종 세포를 96well plate에 200 μ l당 3 X 10³개의 세포를 뿌리고 24시간동안 배양한 후, TGF- β 1 단백질(R&D system, Minneapolis, MN, USA)을 5ng/ml의 농도로 처리하여 37°C에서 48시간동안 반응 시킨 후 세포성장 억제효과를 N-methyl-thiotetrazole (MTT, Sigma, ST. Louis, MI, USA) 검사로 측정하였다. MTT 검사는 각 세포주에 MTT 용

액을 37°C에서 3시간 처리한 후, 배양액을 버리고 Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, ST. Louis, MI, USA)로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. TGF-β1 수용체 mRNA 추출과 RT-PCR

구강 편평세포암종 세포주로부터 RNeasy™ kit(QIAGEN, Maryland, Germany)를 이용하여, total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 1 μg의 RNA를 reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)와 oligod(T) primer(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 42°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 반응시키고 4°C에서 반응을 중지시켰다. 합성된 cDNA를 대상으로 β-actin과 TGF-β type II 수용체를 PCR하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 둔 후, 변성반응을 94°C에서 1분, 결합반응을 58°C에서 1분, 중합 반응은 72°C에서 1분간 35주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. RT-PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

라. TGF-β1 수용체 Northern blotting

구강편평세포암종으로부터 total RNA를 분리한 후, 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후, membrane으로 total

RNA를 capillary transfer 방법을 이용하여 옮긴 후, 32P isotope으로 label된 TGF-β type II receptor probe를 사용하여 Northern blotting을 시행하였다.

마. Cell cycle regulatory protein Western blotting

TGF-β1에 대해 세포성장억제효과를 보인 YD-8 구강 편평암종 세포주와 그렇지 않은 YD-9 세포주를 대상으로 세포성장 조절 단백질의 발현을 조사하기 위해 6 well plate에 5 × 10⁴ 개의 세포를 뿌려 배양한 후, TGF-β1(R&D System, Minneapolis, MN, USA)을 5 ng/ml의 농도로 각 시간별로 0, 24, 48 시간동안 처리하여 단백질을 분리한 후, 20 ug의 단백질을 전기영동하여 세포성장조절단백질인 p16과 p21(Santa cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 항체를 사용하여 확인하였다.

III. 연구 결과

가. TGF-β1에 의한 세포성장 억제 효과

구강 편평세포암종 세포주의 TGF-β1에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해, 8 개의 구강 편평세포암종 세포주를 대상으로 MTT assay를 시행하였다. TGF-β1 단백질을 5 ng/ml 농도로 구강 편평세포암종 세포주에 대해 투여하여 MTT 검사를 시행한 결과, YD-8 세포주에서는 세포성

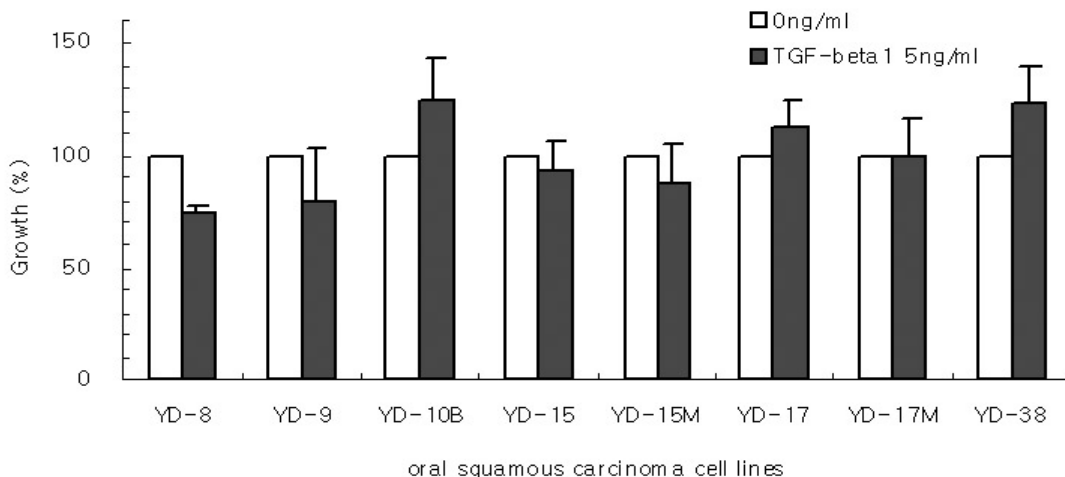


Fig. 1. The effects of TGF-β1 on oral squamous carcinoma cell growth. Oral squamous carcinoma cell lines(OSCCs) were incubated without or with 5ng/ml TGF-β1 for 48hrs and then analyzed by MTT assay. All OSCCs were resistant to TGF-β1 except YD-8.

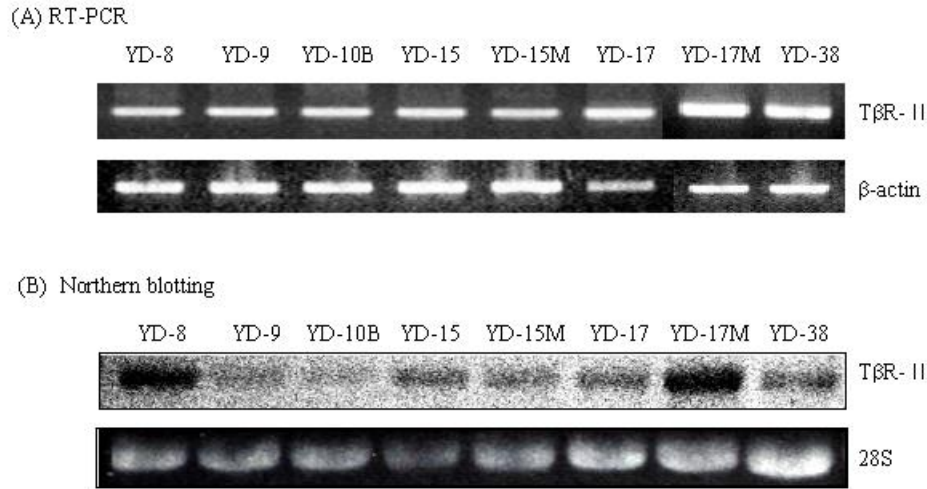


Fig. 2. mRNA expression analysis by RT-PCR of TGF- β 1 type II receptor(T β R-II) genes in OSCCs. Constitutively expressing β -actin gene used as an internal control for each reaction. The expression of T β R-II was detectable in all OSCCs by RT-PCR(A). Northern blot analysis of expression of TGF- β 1 type II receptor in OSCCs(B).

장 억제제를 관찰할 수 있었으나, 다른 구강편평세포암종 세포주에서는 세포성장 억제정도의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 1).

나. TGF- β 1 수용체의 mRNA 발현

구강 편평세포암종 세포주에서 TGF- β 1 type II 수용체의 mRNA의 발현을 알아보기 위해, TGF- β 1 type II 발현 정도를 RT-PCR과 Northern blotting으로 관찰한 결과, 모든 세포주에서 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig 2).

다. cell cycle regulatory protein 발현

TGF- β 1에 의한 세포성장 억제 효과를 보인 YD-8 세포주와 세포성장 억제효과를 보이지 않은 YD-9 세포주를 대상으로 TGF- β 1을 5 ng/ml을 처리한 후 세포주기 조절 단백질인 p16 단백질과 p21 단백질 발현을 조사한 결과, p16 단백질의 발현은 관찰되지 않았으나(data not shown), p21 단백질의 발현이 24시간에서 증가하여 48시간까지 유지되었다(Fig. 3).

IV. 총괄 및 고찰

TGF- β 는 발생, 창상 치유, 발암과정에서 다양한 기능을 수행하며, 상피세포, 혈관 내피세포의 증식을 억제하고 간염

기원의 세포 증식과 세포외 기질(extracellular matrix)의 합성을 자극한다. 상피세포에 있어 TGF- β 는 세포 성장 감소, 세포사멸, 세포노화(cellular senescence), genomic stability의 증가를 유도한다^{9,26}. 이러한 효과는 암 발생 기전과 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되기 때문에 종양 발생과 TGF- β 신호전달(signaling)은 관심의 대상이 되어 왔다. 실제로 정상 상피세포, 선 세포(decidual epithelium)등에

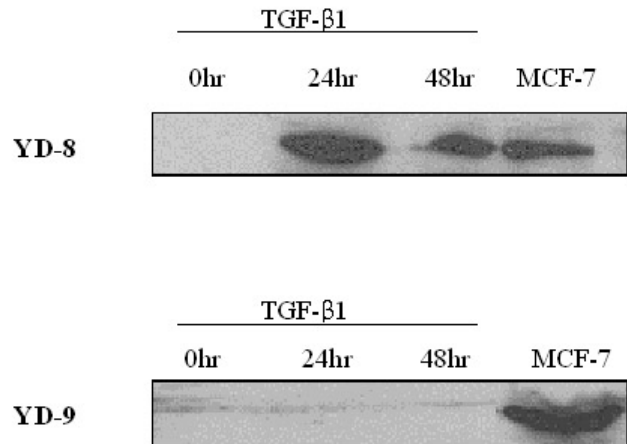


Fig. 3. The expression of cell cycle regulatory protein(p21) on TGF- β 1 in YD-8 and YD-9 cell line. YD-8 and YD-9 cell lines were treated for 0, 24, 48hr with 5 ng/ml TGF- β 1. Cell lysates were prepared and p16 and p21 expression was measured by western blotting. MCF-7 cell lines used as positive control.

TGF- β 수용체가 발현되고, 특히 MCF-7과 같은 유방암 세포에서 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 특징적이거나 세포주마다 다양한 반응성을 보인다. 본 연구에서는 한국인의 구강 점막에서 발생한 암종 세포주를 대상으로 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과 YD-8 세포주에서는 대조군에 비해 약 30%의 세포 증식 억제 효과를 보였으며, 그 외의 세포주에서는 효과가 없거나 오히려 증식을 유도하였다. YD-8에서 관찰된 증식 억제 효과는 다른 화학 약제를 사용 하였을 때 나타나는 효과에 비해 다소 적었으나 이는 TGF- β 는 생체 내에 존재하는 성장인자라는 관점에서 볼 때 분명히 성장 억제 효과가 있으리라 생각하였다. 아울러 TGF- β 에 의한 암종 세포주의 성장 억제 효과가 수일내의 apoptosis 유도에 의한 것 이라기보다는 세포 증식 주기를 조절함으로써 성장 정지(growth arrest)에 의한 것으로 알려져 있고²⁷⁾, 본 연구에서도 강력한 세포 증식 주기 정지 단백질인 p21^{CIP1}의 발현이 TGF- β 에 의해 강력히 유도됨을 보여주어 이러한 설명을 뒷받침 하고 있다. TGF- β 에 의한 세포 증식 억제와 성장 정지(growth arrest)는 상피 세포뿐만 아니라 혈관 내피 세포, 혈액 세포(hematopoietic), 신경 세포와 일부의 간엽 기원 세포에서 관찰된다. TGF- β 에 의한 성장 억제 효과는 크게 두가지 요인에 의해 유도되는데, 첫째, c-myc의 발현 감소에 의한 증식 관련 유전자의 전사 억제가 유도되며²³⁾, 둘째, 세포 증식 주기의 조절에 의한 성장 정지(growth arrest)이다²⁷⁾. 외인성 TGF- β 처리는 세포 증식 주기의 대부분 단계에 영향을 미치지만, G1 주기에서의 정지가 가장 특징적인 것으로 알려져 있다. TGF- β 처리는 Rb(retinoblastoma protein)가 과인산화 되는 것을 방지하고, 또한 cyclin E의 발현을 억제함으로써 G1 phase arrest를 유도한다⁸⁾. Cyclin E가 발현된 경우에도 활성화된 cyclin-cdk 복합체의 형성을 방해하여, Rb의 과인산화를 억제함으로써 G1 phase에서 S phase로의 진행을 막아서 세포 성장 억제효과를 나타내게 된다²⁷⁾. 상피기원의 세포에서는 TGF- β 처리가 p21^{CIP1}의 발현을 유도하며, 이는 cyclin D-cdk4-p27과 cyclin E-cdk2를 강력한 억제함으로써 상피 세포의 성장 정지를 유도한다. 본 연구에서 TGF- β 에 의해 세포 증식 억제 효과를 보였던 YD-8 세포주에서는 p21^{CIP1}의 발현이 강력하게 유도되었으나 TGF- β 의 효과를 관찰할 수 없었던 YD-9 세포주에서는 p21^{CIP1}의 발현이 유도되지 않았다. 이는 구강암종 세포주에서 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 p21^{CIP1}을 경유하는 세포 증식 주기 조절 과정과 밀접한 관련이 있음을 시사하는 것이다. 따라서 구강암종에서 TGF- β 의 역할을 규명하기 위해서는 p21^{CIP1}에 의

해 조절되는 cdk4와 cdk2에 초점을 맞춘 연구가 필요할 것으로 생각된다. TGF- β 은 세포막에 존재하는 I 형 수용체 (type I receptor)와 II 형 수용체 (type II receptor)를 통해 핵으로 신호를 전달한다. TGF- β 1의 세포성장 억제효과에 대한 저항력이 인체 암 발생의 원인으로 알려져 있으며, 이러한 저항력을 얻게 되는 기전의 하나로 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이가 다양한 암종 세포주에서 알려져 있다^{12,20,28-31)}. 식도암, 위암, 췌장암에서 TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 돌연변이와 같은 유전적 이상이 보고 되어 수용체 이상이 상피 세포기원의 발암과정에서 중요한 기전으로 작용할 것으로 제시한 바 있다³²⁾. 위장관계의 암종과는 달리 두경부 암종에서는 TGF- β 1 type II 수용체 유전자 변이는 연구가 많지 않아 결론적이지는 못하지만 그 빈도는 25% 내외로 알려져 있으며, 이들 돌연 변이에 의한 TGF- β signaling의 이상은 두가지 기전으로 설명된다. 첫째, 암종 세포주의 돌연변이가 serine/threonine kinase domain에 집중되어 있어 돌연 변이가 Smad 유전자 군의 인산화 과정을 방해함으로써 암 발생 과정에 기여하리라고 추측되고³³⁾, 둘째, TGF- β 1 type II 수용체 유전자의 mis-sense 변이가 아미노산의 극성변화를 유발하여 단백질의 구조적인 folding이 영향을 주거나 catalytic 활성이 변함으로써 TGF- β 1 type I 수용체를 인지하는 능력에 장애가 생겨서 세포내 신호전달체계에 이상이 생겼을 것으로 추정하였다¹⁸⁾. 하지만 이들 수용체의 돌연 변이 빈도가 높지 않고, 돌연 변이와 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 일치하지 않아¹⁾, 유전적 돌연 변이 이외의 기전이 있을 것으로 추측된다.

정상 상피 세포가 암종 세포로 전환되는 과정에서 TGF- β 1의 세포성장 억제효과가 소실되는 다른 기전으로 type I 수용체와 type II 수용체의 다양한 빈도의 발현 감소가 알려져 있다. 실제로 많은 빈도의 위암 세포주에서 TGF- β 1 type I 수용체의 감소가³⁴⁾, 만성 골수성 백혈병에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 발현 감소가 보고되었다³⁵⁾. 나아가 대장암 세포주에서 세포성장 억제효과가 소실된 원인으로 TGF- β 1 수용체의 발현 감소가 이미 지적된 바 있다³⁶⁾. 그러나 일부 학자들의 보고에 의하면 두경부 편평세포암종에서 85%의 세포주에서 TGF- β 1 type I 수용체의 발현을 관찰할 수 없었고, 92%의 세포주에서는 TGF- β 1 type II 수용체의 발현을 관찰할 수 없다고 하였다. 최근 두경부 및 식도 암종에서 type II 수용체의 발현 감소가 보고 되어 있고³⁷⁾, 본 연구에서 사용한 구강암종 세포주에서는 모두 type I 수용체의 발현이 관찰되었으나, type II 수용체의 발

현은 전혀 관찰되지 않았다.³⁸⁾ 본 연구에서 사용한 암종 세포주는 모두 상피 세포 분화를 보여 이들의 TGF- β 반응성 감소가 type II 수용체의 발현 감소와 관련이 있을 것으로 생각된다. 세포에 의한 단백질의 발현은 전사 조절(transcriptional control)과 전사후 조절(postranscriptional control)에 의존한다. 본 연구에서 관찰한 type II 수용체의 발현 감소 원인을 파악하기 위해 mRNA에 대한 RT-PCR과 Northern blotting을 수행하였다. 흥미롭게도 RT-PCR에서 세포내의 TGF- β type II 수용체 mRNA 발현이 관찰되었다. 특히 Northern blotting을 이용하여 정량적인 분석을 하였을 때 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과가 뚜렷하였던 YD-8에서 가장 뚜렷한 발현을 관찰하였다. 또한 일차 편평 세포 암종에서 기원한 YD-17과 임파절에 전이된 YD-17M은 두 세포주 간의 유사한 형태학적, 생물학적 특징에도 불구하고 type II 수용체의 발현에 차이가 있어 TGF- β 신호 전달 체계와 임상적인 전이간에 연관성을 암시하고 있어 이에 대한 관심이 필요하리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 두경부 점막에서 발생하는 다단계 암종 발생과정 중 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 소실 기전을 파악하기 위하여 8예의 구강 편평 세포 암종 세포주를 대상으로 TGF- β 에 의한 성장 억제 효과, 세포 주기 단백질 p21^{CIP1} 발현을 검색하였고, 나아가 type II TGF- β 수용체의 전사 조절과 전사 후 조절을 검색함으로써 TGF- β 수용체의 발현 조절 과정을 규명하고자 하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

YD-8을 제외한 다른 구강 암종 세포주에서 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 보이지 않았다. TGF- β 에 의한 성장 억제 효과를 보였던 YD-8에서는 TGF- β 투여후 p21^{CIP1}의 발현 증가를 관찰할 수 있었고, TGF- β 에 의한 성장 억제 효과가 없었던 YD-9에서는 p21^{CIP1}의 발현이 관찰되지 않았다. RT-PCR과 Northern blotting에서 대부분의 세포주에서 Type II TGF- β receptor mRNA 발현이 관찰되었고, YD-8과 YD-17M 세포주에서 가장 많이 발현되었다. 이상의 결과로 대부분의 구강 암종 세포주는 TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 효과를 상실하는 것으로 판단되며, 세포 성장 억제 효과를 보였던 세포주에서는 p21^{CIP1}을 경유하는 세포 증식 주기 조절을 통하여 세포 성장 억제 효과를 보일 것으로 판단되었다.

VI. 참고문헌

1. Paterson IC, Matthews JB, Huntly S, et al. Decreased expression of TGF- β cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 193: 458-467.
2. Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancer in 1980; 41: 184-97.
3. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. *Cancer* 1953; 963-968.
4. Farber E. The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res* 1984; 44: 4217-4223.
5. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985; 313(28): 745-747.
6. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, Matsuya T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor(EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. *Virch Arch Path Anat* 1991; 418: 349-353.
7. 김태연, 육종인, 김진. 구강점막의 백반증과 편평상피세포암종에서 Epidermal Growth Factor Receptor 및 Transforming Growth Factor- β 1 수용체의 발현. *대한 구강병리학회지* 1997; 31: 1247-1255.
8. Geng Y, Weinberg RA. Transforming Growth Factor β effects on expression of G1 Cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 10315-10319.
9. Sporn MB, Roberts AB. Transforming Growth Factor- β , Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *J Am Med Assoc* 1989; 262: 938-941.
10. Wieser R, Attisano L, Wrana JL, Massague J. Signaling Activity of Transforming Growth factor β Type II Receptors Lacking Specific Domains in the Cytoplasmic Region. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7239-7247.
11. Brattain MG, Markowitz SD, Willson JKV. The

- type II transforming growth factor- β receptor as a tumor-suppressor gene. *Cur Opin Oncol*, 1996;8: 49–53.
12. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, et al. TGF β Signals through a Heteromeric Protein Kinase Receptor Complex. *Cell* 1992; 71: 1003–1014.
 13. Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin & Dev* 2002; 12: 22–29.
 14. Attisano L, Wrana JL. Mads and Smads in TGF β signaling. *Cur Opin Biol* 1998; 10: 188–194.
 15. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. T β RI Phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 Is Required for Smad2–Smad4 Complex Formation and Signaling. *J Biol Chem* 1997; 272: 27678–27685.
 16. Zhang F, Laiho M. On and off: proteasome and TGF- β signaling. *Exp Cell Res* 2003; 291: 275–281.
 17. Zhu HJ, Burgess AW. Regulation of transforming growth factor- β signaling. *Mol Cell Biol Res Comm* 2001; 4: 321–330.
 18. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M. Missense Mutations of the Transforming Growth factor β Type II Receptor in Human Head and Neck Squamous Carcinoma Cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3982–3987.
 19. Wang D, Kanuma T, Mizunuma H, et al. Analysis of specific gene mutations in the Transforming Growth factor- β signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4507–4512.
 20. Munoz-Antonia T, Li X, Reiss M, Jackson R, Antonia S. A Mutation in the Transforming Growth Factor Type II Receptor Gene Promoter Associated with Loss of Gene Expression. *Cancer Res* 1996; 56: 4831–4835.
 21. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, et al. A Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene Mutation Common in Colon and Gastric but Rare in Endometrial Cancers with Microsatellite Instability. *Cancer Res* 1995; 55: 5545–5547.
 22. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, et al. Microsatellite Instability and Mutations of the Transforming Growth Factor β Type II Receptor Gene in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5548–5550.
 23. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J. Growth Inhibition by TGF- β Linked to Suppression of Rstinoblastoma rotein Phosphorylation. *Cell* 1990; 62: 175–185.
 24. Kavsak P, et al. Smad7 binds to smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365–1375.
 25. Lee EJ, Kim J, Lee SA, Kim E, Chun Y, Ryu MH, Yool J. Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma. *Exp. Mol. Med.* 2005; 37(5):379–390
 26. Ignatz RA, Massague J. Transforming Growth Factor- β Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4377–4345.
 27. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685–700.
 28. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, et al. Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science* 1995; 268: 1336–1338.
 29. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al. Mutational Inactivation of Transforming Growth Factor β Receptor Type II in Microsatellite Stable Colon Cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 320–324.
 30. Wang J, Sun L, Myeroff L, et al. Demonstration That Mutation of the Type II Transforming Growth Factor β Receptor Inactivates Its Tumor Suppressor Activity in Replication Error-positive Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem* 1995;

- 270: 22044-22049.
31. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
 32. Park K, Kim SJ, Bang YJ, et al. Genetic changes in the transforming growth factor β (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells: Correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 8772-8776.
 33. Wang D, Song H, Evans JA, Lang JC, Schuller DE, Weghorst CM. Mutation and downregulation of the transforming growth factor β type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis* 1997; 18: 2285-2290.
 34. Ito M, Yasui W, Nakayama H, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Reduced Levels of Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor in Human Gastric Carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 86-92.
 35. Rooke HM, Vitas MR, Crosier PS, Crosier KE. The TGF- β type II receptor in chronic myeloid leukemia: analysis of microsatellite regions and gene expression. *Leukemia* 1999; 13: 535-541.
 36. MacKay SLD, Yaswen LR, Tarnuzzer RW, et al. Colon Cancer Cells That Are Not Growth Inhibited by TGF- β Lack Functional Type I and II TGF- β Receptors. *Ann Surg* 1995; 221: 767-777.
 37. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J, Munoz-Antonia T. Expression of Transforming Growth Factor β Type II Receptors In Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1243-1248.
 38. 배경진, 최정희, 김은정, 이은주, 김진. 구강편평세포 암종 세포주에서 TGF- β 1 Type II 수용체발현, 대한구강악안면병리학회지 2003; 27(1) : 25-35.