

위암 조직과 정상 조직에서의 표피성장인자 수용체와 변환성장인자의 규명

정 차 권

한림대학교 식품영양학과

Identification of Epidermal Growth Factor Receptor(EGF-R) and Transforming Growth Factor- α (TGF- α) in both Malignant Gastric Adenocarcinoma and Adjacent Non-malignant Gastric Mucosa

Cha-Kwon Chung

Dept. of Food and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Abstract

The specimens used in this study were obtained from patients with primary gastric carcinoma and adjacent non-malignant mucosa from the same patients. Using the techniques of immunocytochemistry and *in situ* hybridization, transforming growth factor- α (TGF- α) and epidermal growth factor receptor (EGF-R) mRNAs were identified. TGF- α was observed in macrophages and dividing tumor cells but, not in normal cells. EGF-R was observed both in malignant and non-malignant gastric tissues. Although normally, TGF- α is not seen in normal gastric tissues, TGF- α was discovered in the adjacent non-malignant tissue of histologically normal, which strongly suggest that TGF- α is involved in the differentiation of cancer cells. Immunocytochemistry using EMB-11 antibody identified the existence of macrophages which express TGF- α and EGF-R mRNA. Protein products of EGF-R was identified using monoclonal antibody. Cancer cells were also identified in the non-malignant normal tissues by the method of immunocytochemistry using carcino embryonic antigen (CEA) antibody. It is considered that the activity of TGF- α increased as tumor cell proliferates. Immunocytochemistry and *in situ* hybridization techniques can be used to diagnose gastric cancer along with the use of α -feto protein and CEA.

Key words ; transforming growth factor- α (TGF- α), epidermal growth factor receptor (EGF-R), stomach cancer, macrophage

서 론

위암은 한국인에 가장 다발하는 암으로서 1989년도 사망원인 통계에 의하면^{1,2)} 남자 38.9%, 여자 23.9%로서 각각 전체 암 중에서 수위를 차지하고 있다. 위암 발생과 위암 사망율은 일본과 한국을 비롯한 아시아 여러 나라 및 중남미 지역의 몇개 국가가 매우 높게 나타나고 있는데, WHO 통계에 의하면 동일연령에 기준한 인구 10만명 당 위암 사망율은 일본이 25명(1988년)이었으나 한국은 36명(1987년)으로서 일본을 앞질러 세계 1위를 기록하고 있다. 그러나 미국은 위암이 차지하는 비율은 전체 암 사망중 2.7%에 불과한 실정이다. 이러한 차이는 근본적으로 식생활 습관에 기인하는 것으로 맵고, 짠음식, 염장식품, 훈제식품의 섭취 등으로 인하

여 이들 식품속의 포함된 발암물질인 nitrosamine, benzo(a)pyrene, quinoline, indole 등의 섭취가 증가되었기 때문이라고 추정된다.

물론 식품에 포함된 각종 발암물질도 우리는 섭취하고 있으나 농약, 제초제, 살충제 등에 의한 잔유 발암물질을 섭취하게 되는 경우도 있다. 그러나 가장 문제가 되는 것은 식품을 인위적으로 짜고 맵게 만드는 결과에 의한 위점막의 손상이다. 자극성의 식품섭취가 위축성 위염과 만성 위염을 발생시키고 결과적으로 위암으로 발전시키는 원인이 된다. 한국인이 지나치게 많이 섭취하는 섬유소도 위점막 손상에 기여하고 있다고 사료되며 이의 가능성에 대한 여러가지 연구 결과들도 보고되고 있다. 숯불구이 쇠고기를 포함한 육류는 가열시 굽는 온도가 상승함에 따라 돌연변이 유발

성물질의 생성이 증가한다³⁴⁾. 많은 양의 nitrosamine 이 우리가 섭취하는 익은, 산도가 높은 김치에서 검출 되는 점 등으로 미루어 한국인의 식생활이 위암 증가의 한 인자로 기여하고 있다고 사료된다.

암의 발생과 함께 성장인자는 암세포의 성장과 분화에 밀접하게 관여하며 특히, epidermal growth factor (EGF)는 tyrosine kinase 활성을 갖고 있는⁶⁻⁸⁾ 특수한 세포 표면 receptor를 통해 세포들의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 위장관에서 EGF의 역할은 turnover 주기가 비교적 짧은 점막 세포들의 기능과 증식을 조절하는 중요한 기능을 수행한다. 특히, transforming growth factor- α (TGF- α), EGF-receptor (EGF-R), EGF 등은 위암조직에서 발견되었으며, 암의 진행과도 연관이 있는 것으로 보고되고 있다^{9,10)}. Peptide 형태로 타액에 존재하는 EGF는 위장의 oxyntic mucosa의 DNA합성을 촉진시키며¹¹⁾ Konturek 등¹²⁾에 의하면 위궤양의 치료효과를 가지고 있다고 한다.

Oncogene들 중에는 growth factor 또는 growth factor 수용체들과 구조적으로 매우 가까운 상동성을 갖고 있는 것이 많다. EGF는 세포막에 결합된 glycoprotein으로서 EGF-R을 통해 다양한 세포들에 있어서 그 성장과 분화를 조절하는 기능을 수행한다.

EGF-R 유전자의 발현은 인체의 편평세포암^{13,14)}, 유방암¹⁵⁾, 신경교 아세포종¹⁶⁻¹⁸⁾ 등에서 고찰된 바 있다. 이것은 EGF-R 유전자의 활성이 발암과 밀접한 연관성을 갖고 있음을 시사해 주는 증거가 된다.

TGF- α 가 분화된 정상조직에서 분비되는 증거는 아직 발견되지 않고 있으나, 태아 분화과정에서 합성되며^{19,20)}, 다양한 암세포에 의해 생산되고 있는 것으로 밝혀지고 있다. 최근 성인의 피부에서 발생한 원발성 keratinocyte에서도 TGF- α 가 분비되는 것이 보고된 바 있다²¹⁾. EGF와 TGF- α 는 동일한 세포표면의 receptor²²⁻²⁴⁾ 즉 EGF-R과 경쟁적으로 결합하는 성질을 가지고 있다. 이러한 상호작용이 receptor와 관련된 tyrosine kinase를 활성화시켜 receptor를 down regulation 하고 유사분열을 일으키는 세포작용을 촉진하는 것으로 사료되고 있다.

생쥐의 태아에서 TGF- α 활성을 가진 펩타이드가 분리된 후²⁵⁾ TGF- α 가 EGF에 속한 태아 성장인자의 일종으로 작용하지 않나 하는 추측이 일고있다. 특히 이런 추측은 EGF와 마찬가지로 TGF- α 또한 갖 태어난 생쥐가 초기에 눈을 뜨게하는 작용이 있음에서 뒷받침되고있다. TGF- α 가 악성 암세포에서는 생산되지만 성장한 정상 세포에서는 생산되지 않는다는 종래의 주

된 이론에 비추어 TGF- α 가 세포의 변형에 기여할 것이라고 간주되고 있다.

본 연구에서는 위암 조직과 비암조직에서의 TGF- α 및 그의 수용체인 EGF-R의 존재유무를 고찰하고, 이에 관련된 단백질과 세포들에 대해 검증함으로써 한국인에 다발하는 위암의 진행과정의 규명에 대해 좀더 접근하고자 시도하였다.

재료 및 방법

조직샘플의 채취 및 처리

실험에 사용된 조직들은 한림대학교 부속 춘천성심 병원에 입원하여 원발성 위암환자로 확진받은 환자들의 조직을 사용하였다. 환자들의 조직을 수술 즉시 액체 질소에 담근 다음, -80°C 에 보관하고 2~4mm 크기로 자른 조직을 얼음같이 찬 4% paraformaldehyde에 2~8시간 담가 조직을 고정시키고 냉동에 따른 조직의 손상을 방지하기 위해 4°C 의 30% sucrose/phosphate buffer에 옮겨 조직을 밤새 가라앉도록 하였다. 가라앉은 조직은 다시 snap frozen시키고 O. C. T로 embed한 다음, cryostat로 $8\mu\text{m}$ 크기로 절편하여 slide에 착상시켰다. 암 조직 주위의 정상 점막조직을 대조군으로 사용하여 암조직과 비교 분석하였다.

슬라이드 준비

슬라이드는 1%의 gelatin과 0.1% CrKSO₄를 포함한 80°C 의 수용액을 만든 후 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후, 다시 40°C 로 냉각한 slide holder에 zigzag 모양으로 넣어 용액에 도포시킨 후 실온건조하고 다시 1% paraformaldehyde용액에 수조간 담근 후 60°C 건조오븐에서 하룻밤 동안 건조 baking 시켰다.

In situ hybridization

슬라이드의 조직절편은 phosphote buffer saline (PB-S)용액에서 5분간 수화시키고, 0.1M glycine/PBS용액에 5분간 담구었다. 그 후 0.3% Triton X-100/PBS에 15분간 처리하였다. PBS에 3분간 2번씩 씻은 후 절편은 1mg/ml의 proteinase K, 0.1M Tris, 50mM EDTA, pH 8용액에 37°C 에서 배양시키고 꺼낸 후 다시 4% paraformaldehyde액에 5분간 담구었다. 3분간 PBS용액에 다시 2번 씻고, 절편을 0.25% acetic anhydride/0.1M triethanolamine, pH 8.0용액에 10분간 처리하였다. 50% formamide와 $2\times\text{SSC}$ (standard saline citrate), (0.15 M NaCl/0.015M trisodium citrate)를 혼합 37°C 로 유

지하고 절편을 15분 이상 prehybridize 시켰다.

Hybridization buffer액은 50% formamide, $2 \times \text{SSC}$, 10% dextran sulfate, 0.25% BSA, 0.25% Ficoll 400, 0.25% PVP 360, 250mM Tris pH 7.5, 0.5% sodium pyrophosphate, 0.5% SDS 및 250mg/ml denatured salmon sperm DNA로 만들었다.

이 buffer와 ^{35}S -antisense-RNA probe (3×10^5 CPM/ $10\mu\text{l}$ buffer/slide)를 포함한 융합 혼합액을 슬라이드 절편에 적용시켰다.

이 절편을 dimethyl dichlorosilane 코팅이 된 22×22 mm 커버 글라스로 덮어서 42°C 의 moist chamber에서 16시간 융합시켰다.

커버 글라스는 $4 \times \text{SSC}$ 액에 담구어 조심스럽게 제거하고, 이어 37°C 의 신선한 $4 \times \text{SSC}$ 의 비이커에 넣어 1시간 간격으로 3번 살며시 shaking시켜 씻어내었다. 융합되지 않은 single strand RNA를 제거하기 위해 RNAse A, $20\mu\text{g/ml}$ 를 0.5M NaCl/10mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA 시액에 혼합시켜 42°C 에서 30분간 천천히 shaking 하였다.

절편은 다시 42°C 의 $2 \times \text{SSC}$ 에서 30분간 2번 씻어내고, $0.1 \times \text{SSC}$ 에서 30분간 1번 씻어내었다. 수분을 제거하기 위해 0.3M의 ammonium acetate (pH 8.0)를 포함한 70%, 95%의 ethanol용액에 5분간씩 처리하고 100% ethanol용액에는 5분간 2회 처리하였으며, autoradiography 실험을 위해 공기 건조시켰다.

Autoradiography

융합시킨 건조 절편은 42°C 의 60mM의 ammonium acetate에 Kodak NTB-2 emulsion을 용해시킨 시액에 암실에서 담근 후, 약 30분간 건조시켰다. 처리된 절편 slide는 먼지 없는 건조상자에 넣어 7일 혹은 14일간 $2\sim 3^\circ\text{C}$ 에 보관한 후, D-19 (Kodak, Eastman), 2% acetic acid와 Kodak fixer를 사용하여 14°C 에서 현상하였다.

절편 슬라이드를 찬물에 30분간 행군다음 hematoxylin과 eosin으로 역염색시키고, ethanol처리, xylene으로 투명화 처리한 후 Permount (Fisher)를 이용해 커버 글라스를 덮어 건조 고정시켰다. 1~2일후 고정된 커버 글라스를 확인하고 광학 현미경으로 조직을 관찰하였다.

면역세포화학 실험

이 실험에서 사용된 조직절편은 *in situ* hybridization에서 사용된 절편과 동일하게 전 처리된 slide 절편을 사용하였다.

Peroxidase를 제거하기 위해 methanol과 0.3% H_2O_2

로 처리하고 avidin-biotin peroxidase 원리를 이용한 Vectastain ABC Kit를 사용하였다.

위암의 marker로서 사용된 antibody는 토끼에서 추출한 anti-CEA (Carcino Embryonic Antigen) antibody이었다. 상피세포와 macrophage 세포의 염색을 위해 Guinea pig anti-keratin antibody와 EMB-11을 각각 사용하였다. 또한 TGF- α , EGF-R와 이에 해당하는 단백질의 탐색을 위해 단클론항체를 반응시켰으며, 이 후 다시, 절편은 hematoxylin으로 역염색시키고 건조시켰다.

면역세포화학적 방법을 결합한 *in situ* hybridization

mRNA를 발현하는 특정세포를 규명하기 위해 *in situ* 융합이 끝난 후 암세포 혹은 macrophage marker를 써서 염색시키고, 다시 hematoxylin으로 역염색시켰다. 이 때 면역세포화학 실험과정에서의 염색에서 생기는 얼룩을 억제하기 위해 dextran sulfate는 hybridization buffer에서 제외하였다.

역시 위암세포에는 Rabbit-anti-CEA antibody를, 상피세포에는 anti-keratin antibody 등을 사용하였다. 융합된 조직은 PBS로 씻어내고, 0.3% H_2O_2 /methanol로 탈색시키고, 해당하는 항체와 반응시킨 다음, Vectastain ABC kit를 사용 biotinylated secondary antibody를 적용시켰다.

절편은 건조 후 Kodak NTB-2 emulsion에 담그고 건조 처리하였으며, 그 외의 방법은 위에 기술한 바와 같다.

in situ hybridization 방법의 대조군 probe는 vector sequence만 갖고 있는 non-complementary sense RNA를 사용하였다. 그러므로 emulsion을 적용하여 현상했을 때 autoradiography에 background 이상의 silver grain이 나타나지 않으며, 이것으로 antisense probe와 비교 가능하였다.

결과 및 고찰

TGF- α 는 위암 조직과 정상조직에서 동시에 고찰되었으나, macrophage cell과 분열하고 있는 암 세포에서만 고찰 되었을 뿐 정상유지하고 있는 세포에서는 발견되지 않았다. Fig. 1 (D)에서 보는 바와 같이 정상조직에서는 전혀 TGF- α mRNA가 발견되지 않았다. EMB-11 항체를 이용한 면역세포화학 실험에서 macrophage를 규명하였는데 (Fig. 1 (A)), macrophage는 정상조직과 암 조직에서 모두 나타났으나 암 조직에서의

macrophage는 TGF- α mRNA의 발현이 비암조직에서 보다 더욱 강하게 나타났다(Table 1).

EGF-R 역시 정상 조직과 위암 조직에서 고찰되었다. 그러나 암 세포에서의 EGF-R mRNA의 발현은 정상조직에서 보다 더욱 강하게 나타났다.

Fig. 1 (C) 및 Fig. 2(A)는 CEA로 강하게 염색된 암 세포를 보여주며, 면역세포화학법과 *in situ* hybridization 방법을 동시에 사용하여 각각 TGF- α mRNA 및 EGF-R mRNA를 검은 색깔의 점으로 나타내었다. 이것은 emulsion속에 포함된 silver grain에 의해 probe가 탐지한 mRNA가 감광되어 나타난 것이다. 한편 단클론 항체를 이용하여 EGF-R 단백질을 규명하였다(Fig. 2(C, D)). 암조직과 정상 점막조직에서 모두 EGF-R에 해당하는 단백질이 나타났으며, 암 조직에서의 EGF-R 해당 단백질의 분포가 강한 것으로 보아 위에서 고찰된 바와 일치되는 일관성 있는 결과를 나타내었다. CEA 항체를 사용한 면역세포화학 실험에서 정상조직에 침입하고 있는 암 세포들을 규명하였다(Fig. 3).

종래 보고된 바에 의하면, TGF- α mRNA는 원발성

결장암에서는 발견된 적이 있으나 정상 장점막 조직에서는 발견되지 않았다^{26,27}. 그러나, 최근 정상 장점막 조직에서 TGF- α mRNA가 존재함이 보고된 바 있다²⁸. 이러한 TGF- α mRNA의 정상조직에서의 존재유무에 대한 조사결과의 차이점은 아직 분명히 밝혀져 있지 않다.

연구 보고서들의 결과에서 이처럼 상이점이 발생하는 이유는 다음의 몇가지로 요약될 수 있다. 첫째, 조직의 상태에 따라 달라질 수 있다는 점이다. 즉, 상피

Table 1. TGF- α and EGF-Receptor mRNA expression *in vivo*

	Malignant tissue		Non-malignant, adjacent tissue		
	Macrophages	Tumor cells	Macrophages	Normal cells	Dividing ¹⁾ tumor cells
TGF- α	++ ²⁾	++	+	-	+
EGF-R	+	++	+	+	+

¹⁾Dividing tumor cells are identified by CEA staining in non-malignant gastric tissue

²⁾++ indicates more intense mRNA expression than + and - indicates negative response

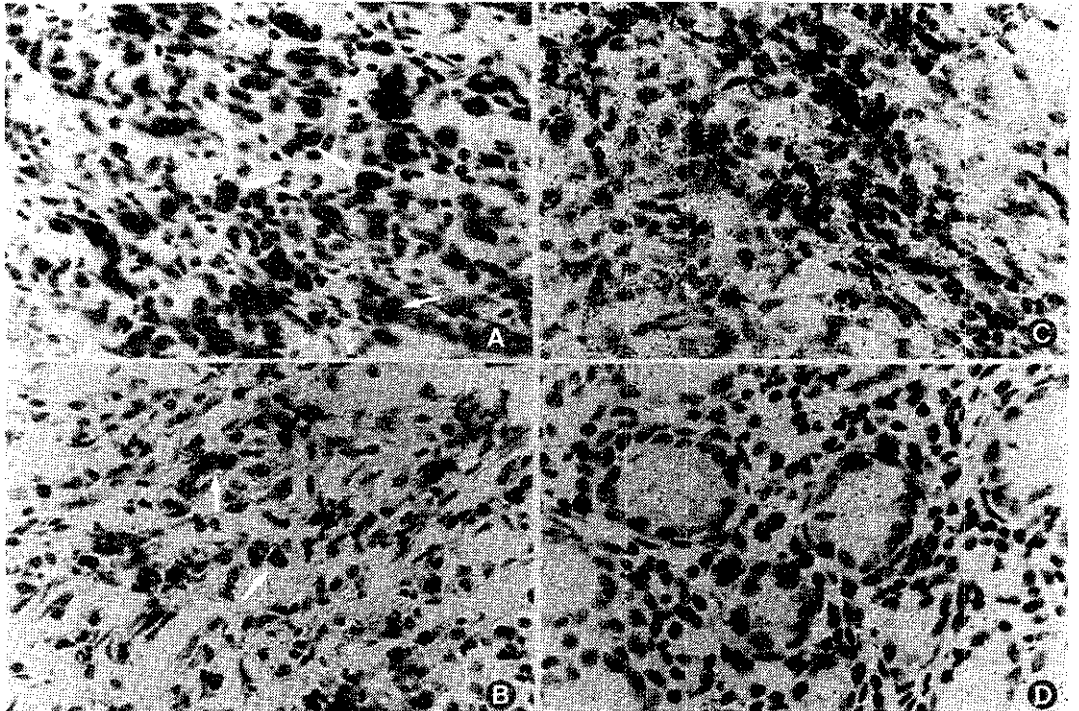


Fig. 1. Immunohistochemistry for macrophage (arrows) stained with EBM-11 antibody (A) and for malignant tumor cells (arrows) stained with CEA (B).

Combined *in situ* hybridization for TGF- α and immunostaining with CEA (C). Note the strong expression of TGF- α mRNA by the tumor cells, but not by the non-malignant cells (D) ($\times 630$).

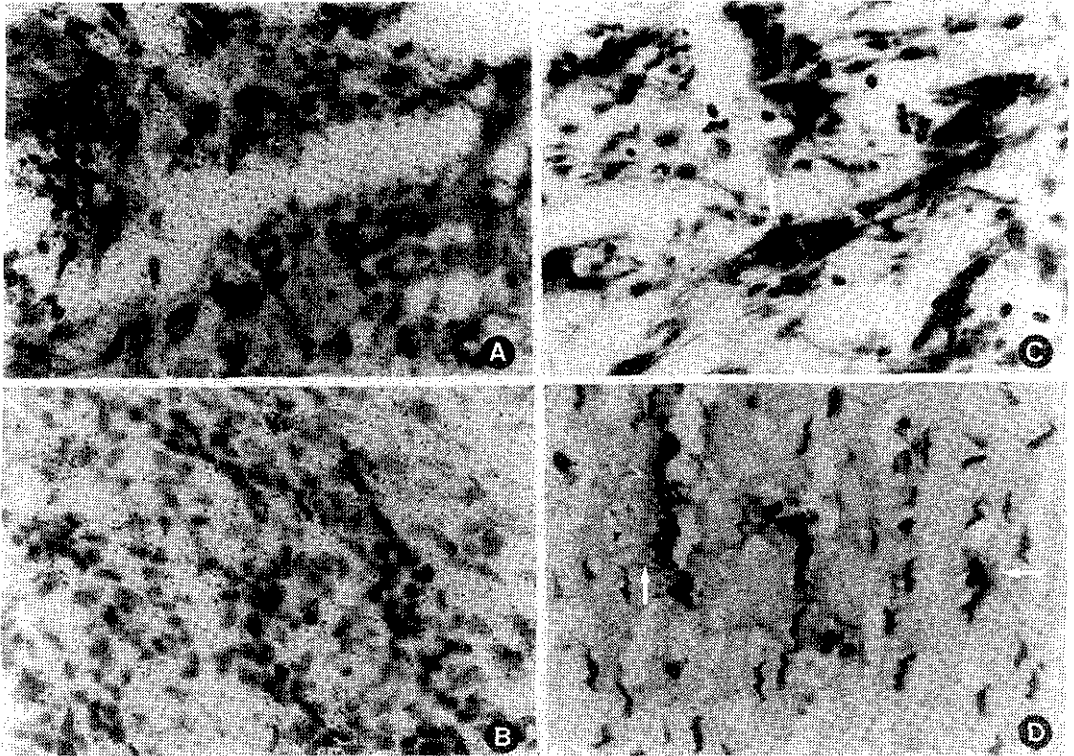


Fig. 2. EGF-Receptor (A) and EGF-Receptor-like protein products (C, D).

(A) shows malignant adenocarcinoma tumor cells with strong CEA staining and EGF-R mRNA. Macrophages (B) in adjacent non-malignant mucosa stained with EMB-11 antibody shows expression of EGF-R. EGF-R-like protein products (arrows) are identified both in the malignant (C) and non-malignant (D) gastric tissues using the techniques of immunocytochemistry ($\times 630$).

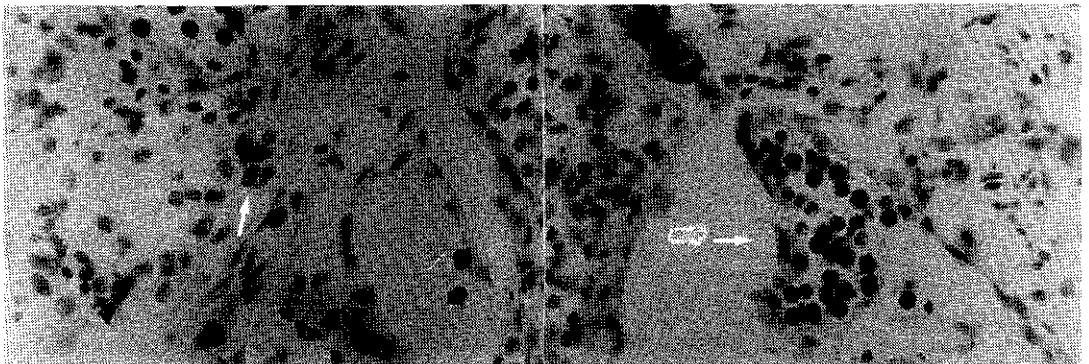


Fig. 3. Immunocytochemistry utilizing carcinoembryonic antigen antibody identified invading cancer cells (arrows) in the adjacent non-malignant gastric tissue ($\times 630$).

세포의 scraping에 의한 방법으로 채취한 조직을 사용하는 경우와 mucosa를 조사대상으로 한 경우를 들 수 있다. 둘째, 환자 개개인의 병리적인 상이성의 존재여부에 따라 결과가 달라질 수 있다. 셋째, mRNA probe를 사용했을 때, 그 특수한 probe의 sensitivity에 따라 mRNA 발현여부가 달라질 수 있다. 넷째, cell type에 따

라 TGF- α mRNA를 발현하는 cell과 그렇지 않은 cell을 구별해야 하는데 특정 cell의 존재여부에 따라 결과가 달라질 수 있다.

본 실험에서는 이러한 TGF- α mRNA가 cell type에 따라 달라질 수 있다는 것을 잘 나타낸다. 특히 연구에서 사용되는 조직 샘플은 환자의 정상조직은 부위별로

채취하기가 힘들기 때문에 암 절제 수술시 얻어진 암 조직과 주위의 정상조직을 사용하는데 따른 차이점이 존재할 수 있다. 본 연구에서도 CEA를 이용한 면역세포화학 실험에서 정상 점막조직에서 암세포를 발견할 수 있었다. 이것은 육안에 의해 또는 형태학적으로 정상 조직이라고 간주할 수 있는 조직이 이미 암세포의 침입에 의해 손상되고 있음을 입증하며, 특히 거식세포의 출현 및 활동이 존재함을 보여주고 있다.

TGF- α 가 cell type과 연관되어 있으리라는 추측은 많으나, 그것이 membrane-bound된 형태인지 아닌지는 알려지지 않았다. 또한 성숙된 형태로 세포내에 존재하는지의 여부, 세포배양시 배양액에 유출되는지의 여부 등도 밝혀지지 않고 있다.²⁹⁾

TGF- α 가 악성 암종에서는 생산되거나 성장한 정상세포에서는 생산되지 않는다는 종래의 보고는 TGF- α 가 polyoma virus, SV 40 simian virus, retrovirus 등의 세포에서 분비되고 있다는 것으로 미루어 알 수 있는데, 이것은 TGF- α 의 발암과의 연관성을 뒷받침해 주는 것이다. 또한 암 환자의 뇨에서 고분자량의 TGF- α 가 발견되었으나 정상인에 대해서는 발견되지 않은 점도^{30,31)} TGF- α 의 발암과의 연관성을 보여주는 증거가 된다. 그러나 동일 개체내의 위 점막 조직이 형태학적으로는 정상적으로 간주되더라도 발암의 직접적인 marker가 되는 TGF- α mRNA가 발견된 점은 이미 발암성을 가진 조직으로 전환되었다는 것을 입증해 주는 결과라고 간주된다.

암조직의 거식세포에서 TGF- α 가 발견된 점으로 보아 autocrine mechanism에 의해 거식세포가 유출하는 mitogen이 PDGF-B, IGF-I, 또는 이와 유사한 mitogen들과의 복합반응으로 세포의 분화를 촉진시키게 될 것이다.

이런 성장인자들은 정상세포에서는 상처회복을 촉진시키지만, 암세포에서는 상호 복합적인 결합에 의한 상승작용을 일으켜 위점막의 식이에 의한 만성적인 손상으로 유래된 위암세포의 증식을 더욱 발전시키게 되는 것으로 사료된다.

우리는 식품속에 자연적으로 포함되어 있는 발암물질 뿐만 아니라 식품의 가공, 저장, 조리 등에 따라 생성되는³²⁾ 발암물질들을 섭취하고 있다. 이를테면, patulin (사과쥬스), solanine (감자), safrole (후추) 이외에 aflatoxin, saccharine, aminotriazole 등 자연적인 발암물질과^{33,34)} 훈제불고기에서 생성되는 nitrosamine, benzo(a) pyrene 및 김치에서 생성되는 nitrosamine³⁵⁻³⁸⁾, 보조 발암 물질인 알코올^{39,40)}, 흡연행위³⁹⁾, 중금속 섭취 등 기타

수 많은 종류의 발암 물질과 돌연변이 유발성 물질⁴¹⁾들을 섭취한다.

우리가 일상으로 섭취하는 절임 야채류와 김치에는 soup과 고형분에 nitrosamine이 존재하는 것이 보고된 바 있으나^{5,42)} 구체적으로 그 위험성에 대해서는 연구된 바 없으며 동물 및 인체를 대상으로 그 전구체가 되는 질산염, 아질산염, 기타 N-nitroso 화합물의 대사에 대해 검증이 필요하다고 사료된다.

아직 발암의 메카니즘이 정확히 규명되어 있지 않으나 우리의 식생활과 가장 연관이 많은 암이 위암이다. 자극성 음식 섭취, 과식, 과다한 섬유소 섭취 등의 식이적인 복합작용에 의해 유발된 위염 상태에서 각종 발암 물질이 만성적인 손상을 입은 위점막에 쉽게 작용하며 동시에 성장인자들의 복합적인 보조작용이 가해지면 쉽게 위암으로 발전하게 될 것으로 추측된다. Tahara 등⁴³⁾에 의하면, TGF- α 와 EGF-R는 위암과 결장암 및 직장암의 성장을 촉진하며, 진행위암인 경우 EGF가 상승함이 고찰된 바 있다⁴⁴⁾.

생검을 통한 위점막 조직을 이용하면 IGF-I, PDGF, TGF- α 및 그 receptor들을 확인함으로써 대대적인 수술없이도 위암의 상태를 확인할 수 있다. 특히, 위염환자가 전체성인의 과반수 이상을 차지하고 있는 한국의 실정에서 위암으로의 전이에 대한 정확한 진단이 필요하다. 조직적 또는 내시경적으로는 확인하기 힘든 경우가 많다.

위암의 검사방법으로서 혈액중의 α -feto protein, carcino embryonic antigen 등을 사용하는 방법이 있으나 non-specific한 결점이 있다. 이에 대해 면역학적 기법과 *in situ* hybridization 방법을 사용하여 성장인자에 대한 검사를 함으로써 정확한 위암의 발생과 진행에 대한 판단이 가능하다고 사료된다. 위에 고찰된 제반 사항을 종합적으로 분석해 볼 때, 암의 진행과정에서 성장인자들이 암세포의 분화와 증식에 매우 중요한 역할을 수행하며, 암의 성장과 유지에 기여하고 있다고 생각된다.

요 약

원발성 위암환자로 확진받은 환자들의 암조직과 암조직 주위의 정상점막 조직을 대조군으로 사용하여, TGF- α 와 이에 대한 결합력을 갖고있는 EGF-Receptor에 대한 mRNA를 면역세포화학적 방법과 *in situ* hybridization 방법을 결합하여 규명하였다. 성장한 세포에서 발견되지 않는 TGF- α 가 위암환자의 조직학적으로

는 정상적으로 간주되는 위점막 조직에서 발견된 점으로 비추어 TGF- α 가 암의 분화에 적극적으로 개입하고 있다는 증거가 된다. EMB-11 항체를 사용한 면역세포화학적 방법에 의해 macrophage를 발견하였고, macrophage cell에서 TGF- α 와 EGF-R mRNA가 발현됨을 규명할 수 있었다. 또한 단클론 항체를 이용해 EGF-R에 해당하는 단백질을 발견하였다. CEA를 이용한 면역세포화학 실험에서 정상으로 간주되는 위점막 조직에서 암 세포를 규명하였다. 특히, macrophage cell의 활동이 암의 증식과 더불어 증가하고 있다는 점을 관찰할 수 있었다. 위암의 검사 방법으로서 본 실험에서 사용된 면역세포화학적 기법과 *in situ* hybridization 방법을 사용하여 생검을 통한 조직을 대상으로 성장인자에 대한 검사를 함으로써 정확한 위암의 발생과 진행에 대한 판단을 내리는데 이용할 수 있고 실용성이 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 한림대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

문헌

1. 통계청 : 사망 원인 통계연감 (1989)
2. World Health Organization : World Health Statistics Annual. Geneve (1989)
3. Miller, A. J. : Processing-induced mutagens in muscle foods. *Food Technol.*, **39**, 75 (1985)
4. Matsumoto, T., Yoshida, D. and Tomita, H. : Determination of mutagens, amino- α -carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. *Cancer Letter*, **12**, 105 (1985)
5. 김제국, 전세열, 이은숙 : HPLC에 대한 발효식품 및 절임 야채류중의 nitrosamine 정량. *인간과학*, **8**, 122 (1984)
6. Carpenter, G. : Epidermal growth factor. *Handbook Exp. Pharmacol.*, **57**, 90 (1981)
7. King, L. E. Jr. and Carpenter, G. F. : Biochemistry and physiology of the skin. In "Epidermal growth factor" Goldsmith, L.(ed.), Oxford University Press, New York, p.269 (1983)
8. Cohen, S., Ushiro, H., Stoccheck, C. and Chinkers, M. A. : Native 170,000 epidermal growth factor receptor kinase complex from shed membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1523 (1982)
9. Yasui, W., Sumiyoshi, M., Hata, J., Kameda, T., Ochiai, A., Ito, H. and Tahara, E. : Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res.*, **48**, 137 (1988)
10. Yasui, W., Hata, J., Yokozaki, H., Ochiai, A., Ito, H. and Tahara, E. : Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int. J. Cancer*, **41**, 211 (1988)
11. Dembinski, A., Gregory, H., Konturek, S. J. and Polanski, M. : Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa in rats. *J. Physiol.*, **325**, 35 (1982)
12. Konturek, S. F., Dembinski, A., Warzecha, Z. and Brzozoski, T. : Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcer in rats. *Gastroenterology*, **94**, 1300 (1988)
13. Xu, Y. M., Ishii, S., Clark, A. J. L., Sullivan, M., Wilson, R. K., Ma, D. P., Roe, B. A., Merlino, G. T. and Pastan, I. : Human epidermal growth factor receptor cDNA is homologous to a variety of RNAs over-produced in A431 carcinoma cells. *Nature*, **309**, 806 (1984)
14. Toyoshima, K., Rikimaru, K., Nomura, N., Ishizaki, R., Pastan, I., Gamou, S. and Shimizu, N. : High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **46**, 414 (1986)
15. Filmus, J., Pollak, M. N., Cailleau, R. and Buick, R. N. : MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth-inhibited by EGF. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **128**, 898 (1985)
16. Liebermann, T. A., Nusbaum, H. R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M. D., Ullrich, A. and Schlessinger, J. : Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF-receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature*, **313**, 144 (1985)
17. Maldien, L. T., Novak, U., Kaye, A. H. and Burgess, A. W. : Selective amplification of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.*, **48**, 2711 (1988)
18. Steck, P. A., Lee, P., Hung, M. C. and Yung, W. K. A. : Expression of an altered epidermal growth factor receptor by human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, **48**, 5433 (1988)
19. Twardzik, D. R., Ranchalis, J. E. and Todaro, G. J. : Mouse embryonic transforming growth factor related to those isolated from tumor cells. *Cancer Res.*, **42**, 590 (1982)
20. Lee, D. C., Rose, T. M., Webb, N. R. and Todaro, G. J. : Cloning and sequence analysis of cDNA for rat transforming growth factor- α . *Nature*, **313**, 489 (1985)
21. Coffey, R. I., Derynck, R., Wilcox, J. N., Bringman, T. S., Goustin, A. S., Moses, H. L. and Pittelkow, M. R. : Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human Keratinocytes. *Nature*, **328**, 817 (1987)
22. Massague, J. : Epidermal growth factor like transforming growth factor. *J. Biol. Chem.*, **258**, 13614 (1983)
23. Derynck, R. : Transforming growth factor- α . *Cell*, **54**, 593 (1988)
24. Tam, J. P., Marquardt, H., Rosberger, D. F., Wong, T.

- W. and Todaro, G. J. : Synthesis of biological active rat transforming growth factor I. *Nature*, **309**, 376 (1984)
25. Twardzik, D. R., Ranchalis, J. E. and Todaro, F. J. : Mouse embryonic transforming growth factors related to those isolated from tumor cells. *Cancer Res.*, **42**, 590 (1982)
 26. Coffy, R. J., Shipley, D. and Moses, L. : Production of transforming growth factors by human colon lines. *Cancer Res.*, **46**, 1164 (1986)
 27. Derynck, R. : Transforming growth factors alpha and beta. In "Oncogenes, genes and growth factors" Gur-off, G. (ed.), Wiley, New York, p.133 (1987)
 28. Malden, L. T., Novak, U. and Burgess, A. W. : Expression of transforming growth factor alpha messenger RNA in the normal and neoplastic gastro-intestinal tract. *Int. J. Cancer*, **43**, 380 (1989)
 29. Derynck, R., Goedde, D. V., Ullrich, A., Gutterman, J. U., Williams, R. D., Bringman, T. S. and Berger, W. H. : Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res.*, **47**, 707 (1987)
 30. Sherwin, S. A., Twardzik, D. R., Bohn, W. H., Cockley, K. D. and Todaro, G. J. : High-molecular-weight transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated cancer. *Cancer Res.*, **43**, 403 (1983)
 31. Twardzik, D. R., Kimball, E. S., Sherwin, S. A., Ranchalis, J. E. and Todaro, G. J. : Comparison of growth factors functionally related to epidermal growth factor in the urine of normal and human tumor-bearing athymic mice. *Cancer Res.*, **45**, 1934 (1985)
 32. Sugimura, T. and Nagao, M. : *Mutagenicity*. New horizons in genetic toxicology. Heddle, J. A. (ed.), Academic Press, New York, p.73 (1982)
 33. Miller, E. C., Miller, J. A., Hirano, I., Sugimura, T. and Takayama, S. : *Naturally occurring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis*. Japan Scientific Societies Press and University Park Press, Tokyo and Baltimore, p.51 (1979)
 34. Tazima, Y. : *Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology*. Jr., Klekowski, E. J. (ed.), Praeger, New York, Vol. 1, p.68 (1982)
 35. Magee, P. N. : *Nitrosamines and Human Cancer*, Banbury report 12. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p.87 (1982)
 36. Hartman, P. E. : *Chemical mutagens*. de Serres, F. J. and Hollaender, A. (eds.), Plenum, New York, Vol. 7, p.211 (1982)
 37. Committee on nitrite and alternative curing agents in food : *The health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds*. Assembly of Sciences, National Academy Press, Washington, D. C., p.92 (1981)
 38. Stich, H. F., Chan, P. K. L. and Rosin, M. P. : Inhibitory effects of phenolics, teas and saliva on the formation of mutagenic nitrosation products of salted fish. *Int. J. Cancer*, **30**, 719 (1982)
 39. Tuyns, A. J., Pequignot, G., Gignoux, M. and Valla, A. : Cancers of the digestive tract, alcohol and tobacco. *Int. J. Cancer*, **30**, 9 (1982)
 40. Stich, H. F. and Rosin, M. P. : Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human mucosa cells. *Int. J. Cancer*, **31**, 305 (1983)
 41. Ames, B. N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**, 1256 (1983)
 42. 박건영, 최홍식 : 김치와 니트로소아민. *한국영양식량학회지*, **21**, 109 (1992)
 43. Tahara, E., Sumiyoshi, H., Hata, J., Yasui, W., Taniyama, K., Hayashi, T., Nagae, S. and Sakamoto, S. : Human epidermal growth factor in gastric carcinoma as a biological marker of high malignancy. *Jap. J. Cancer Res.*, **77**, 145 (1986)
 44. Yasui, W., Sumiyoshi, H., Hata, J., Kameda, T., Ochiai, A., Ito, H. and Tahara, E. : Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res.*, **48**, 137 (1988)

(1994년 1월 28일 접수)