

구강암 발생 과정에서 TGF- α 및 TGF- β 발현에 관한 연구

원광대학교 치과대학 구강악안면외과학교실¹

원광대학교 치과대학 구강병리학교실²

양희창¹ · 이동근¹ · 김은철²

- Abstract -

EXPRESSION OF TGF- α AND TGF- β

Hee-Chang Yang¹, Dong-Keun Lee¹, Eun-Cheol Kim²

Department of Oral and Maxillofacial Surgery¹, Department of Oral Pathology²,
School of Dentistry, Wonkwang University

Though many genetic and epigenetic alterations have been identified in hamster oral carcinogenesis model, there is no information about the possible role of transforming growth factor related with oral cancer. The purpose of this paper was to find the expression patterns of transforming growth factor alpha and beta during the stages of complete oral carcinogenesis model in hamster.

0.5% 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(DMBA) in mineral oil was topically applied to the buccal pouch of 75 hamster three times a week during the experimental periods. The experimental animals were subdivided into two groups of control and experiment. Only the mineral oil was applied to the control group. 0.5% DMBA in mineral oil was applied to the experimental groups of 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 weeks. The expression of the TGF- α and TGF- β protein were evaluated by the distribution and intensity of positive cells during the carcinogenesis using the immunohistochemical study.

The following results were obtained :

- 1. The buccal pouch epithelium of hamster was histologically changed to the dysplasia at 6, 8, 10 weeks, carcinoma in situ at 12 weeks, and squamous cell carcinoma at 14 weeks.*
- 2. The expression of the TGF- α was restricted to the parabasal and basal layers of the normal and dysplastic mucosa, but those positive cells were extended to the spinous layers of the epithelium in the carcinoma.*
- 3. The degree of TGF- α expression was markedly decreased in the carcinoma at 16, 18, 20. The strong positive staining in the center of cancer islands and weak positive staining in periphery of tumor were seen at the stage of squamous cell carcinoma.*

4. The positive index of the TGF- α had a tendency to increase with DMBA- applied time. There was a statistically significant difference between 12, 18, 20 experimental group and control group ($p < 0.05$).
5. The expression of the TGF- β was shown at the cytoplasm of all control and experimental groups, and the parabasal and basal layers of the normal and dyslastic mucosa, but it was shown at the basal layers of the epithelium in the carcinoma.
6. TGF- β was expressed diffusely at 16, 18, 20 experimental group. The strong positive staining in the center of cancer islands and positive staining in periphery of tumor were seen at the stage of squamous cell carcinoma.

From the above findings, the expression of TGF- α and β in oral carcinogenesis model seems to have two formal stages, the first being an overexpression step as reaction to uncontrolled growth and the second being one in which external protein accumulate in the surrounding stroma and intracytoplasm. Overexpression of TGF- α and β may have important cooperative roles for the promotion of cancer and factor of prognosis.

Key words : hamster, oral carcinogenesis, TGF- α , TGF- β , expression.

I. 서 론

최근 악성 종양에 대한 연구는 종양 유전자와 각종 성장 인자의 발견으로 치료와 예후 판정 뿐만 아니라 종양 발생 기전을 규명하는데 중요한 자료를 제공하고 있다. 또한 세포의 성장과 분화에 관여하는 성장 인자는 암의 발생, 진행 및 예후 조절 인자로서 다각적인 연구가 활발히 이루어지고 있다¹⁾. 성장 인자는 특정 세포 수용기와 결합하여 세포분열을 촉진하는 폴리펩티드(polypeptide)로 호르몬과 유사하며, 성장 인자의 역할은 다양하여 세포분열의 촉진뿐 아니라 세포 분화의 조절, 세포 운동과 세포내 구조의 변화, 세포 증식 속도의 조절 등의 여러가지의 생물학적 반응에 관여한다. 이러한 성장 인자는 세포 표면에 존재하는 수용기와 결합함으로써 활성화되는데, 현재까지 20여 종류의 성장 인자가 발견 되었다. 최초의 발견으로는 1978년 DeLarco와 Todaro가 형질전환(transformed)되는 섬유모세포 배양시 retrovirus에 의하여 세포 배지에서 형질 전환을 발현시킬 수 있는 폴리펩티드가 있음을 발견하였다²⁾. 그 후 여러 학자들은 이 폴리펩티드를

형질전환성장인자(transforming growth factor, TGF)라 명명하였다³⁻⁶⁾. Anzano등⁷⁾은 형질 전환 성장 인자를 두 개의 폴리펩티드로 하나는 7 kDa의 단일 사슬로 표피 성장인자 수용기에 반응하는 TGF- α 로 다른 하나는 독특한 수용기에 반응하는 25 kDa의 분자량을 가지며 동일 이상체(homodimer)로 구성되어 있는 TGF- β 로 구분하였다^{7,8)}.

TGF- α 는 정상 조직, 특히 인체 배아기 세포 바이러스에 의하여 형질 전환된 세포와 간암 등을 비롯한 여러 가지의 종양성 병변에서 발현되며, 세포의 종양성 전환뿐만 아니라 정상 생리학적인 기능에도 관여한다⁹⁻¹¹⁾. 또한 TGF- α 는 세포분열의 유도 인자로 자가 분비형 기전에 의하여 분비되는 50여개의 아미노산으로 구성되며¹²⁾, 이 유전자 단백질은 주변세포들의 성장을 자극하는 효과가 있다¹³⁾.

TGF- α 는 상피성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 마찬가지로 상피성장인자 수용기(EGF receptor, EGFR)에 경쟁적으로 결합하여 상피성장인자 수용기의 tyrosine kinase를 자극하고 세포내 인산화를 초래함으로써 DNA 합성과 세포분열을 촉진시킨다¹⁴⁾. 따라서 바이

러스 감염 세포나 종양 세포에서 TGF- α 의 과다 분비는 세포의 형질 전환을 일으킬 뿐 아니라 이들 세포에 autocrine effect를 가져 표적 세포에 계속적으로 자극을 주는 것으로 보고되고 있다¹⁵. 또한 TGF- α 는 종양 세포 성장에 필수적인 신생 혈관 형성 기능도 갖고 있으며 종양 환자의 소변으로 배설 되므로 종양 진단에 유용하게 이용되기도 한다¹⁵⁻²⁰. 특히 종양 전환 과정에서의 TGF- α 의 기능은 아직까지 분명하게 밝혀져 있지는 않지만, 발암 유전자의 활성화에 의한 이차적인 결과라는 견해도 있다²¹. TGF- α 의 다양한 역할 중에서 악성종양과 관련되어 TGF- α 발현에 관한 연구는 간암²², 난소암²³, 폐암²⁴, 위암²⁵, 갑상선암²⁶ 등에서 보고된 바 있으나 구강암 영역에서는 연구된 바가 거의 없다. 따라서 TGF- α 발현이 종양성 전환에 관여하는 부분은 구강 악안면 외과학적 관심의 대상인 것이다.

TGF- β 는 인체의 정상 세포와 종양 세포에서 분비되는 인자이며 일종의 성장 억제인자로 작용한다. TGF- β 기능이 조절되지 않을 경우에는 전신 경화증²⁷, 안구내 섬유화²⁸, 사구체 신염²⁹ 등의 질병 발생과 연관이 있다고 하며, TGF- β 의 신호화(signalization)가 안되는 경우에는 망막아세포종(retinoblastoma)이 발생된다는 보고가 있다³⁰.

TGF- β 는 암의 발생과 진행에 관여한다고 알려져 있으며, 이 과정에서 TGF- β 는 암 세포의 증식과 분화, 세포 기질 단백질의 조절과 세포 부착에 관여하는 intergrin의 합성³¹⁻³³, 면역 반응의 조절³⁴, 침윤과 운동성의 조절³⁵ 및 전이³⁶ 등에 영향을 미친다. TGF- β 와 임상적으로 빈발하는 암과의 관계에 대하여 Johnson 등³⁷은 수막종에서 TGF- β 1, β 2, β 3 모두가 발현됨을 보고하였고, Kimch 등³⁸은 TGF- β 가 망막아세포종을 유발한다고 하였다. 또한 Jasani 등³⁹도 갑상선에서의 면역조직화학적 염색을 통하여 정상 갑상선 상피세포와 양성종양에서는 TGF- β 가 발현을 하지 않지만 악성 종양에서는 발현된다고 보고하였다.

TGF- β 와 암과의 관계에 대한 생체의 연구도 많이 진행되고 있다. 암 세포 배양 실험을 통하여

망막아세포⁴⁰, A549 폐암 세포⁴¹에서 TGF- β 가 암을 유발하기보다는 암의 증식과 침윤을 유발시키므로 암의 악성도와 예후를 예견하는 지표가 된다고 보고하였다⁴². 그러나 구강암에서 세포 배양 실험은 연구가 미흡하며, TGF- β 에 대한 많은 연구에서 생체외와 생체내 연구 결과가 상반되는 점이 많아 암에 대한 연구는 임상과 비슷한 환경을 가진 생체내 실험을 통하여 TGF- β 의 역할을 명확히 이해하여야 할 필요성이 강조되고 있다^{43,44}.

두경부 암종의 약 90%를 차지하는 편평상피세포암종의 발생 원인으로는 다른 암종과 마찬가지로 유전적, 환경적, 정신적 등 원인이 다양하게 제시되고 있으며 니코틴을 포함한 화학적 발암물도 큰 역할을 한다고 보고되었다⁴⁵. 실험적으로 화학적 인자가 구강점막 및 두경부 암종의 원인으로 나타나기 때문에 발암 화학물질을 동물 모델에서 발암 기전을 연구하는데 주로 이용되고 있다^{46,47}. 구강 점막에서 실험적 발암에 관한 연구는 Salley⁴⁸가 최초로 햄스터 협낭에서 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(DMBA)를 이용하여 편평상피세포암종을 발생시켰으며, 이 방법은 장점을 가지고 있어 구강암 연구에 많이 이용되고 있다^{48,49}.

본 연구는 햄스터 협낭에 DMBA를 이용한 구강암 실험 모델에서 정상 상피군(대조군), 전암 단계인 상피이형성 및 상피내암과 구강암의 발생 단계에 따라 면역 조직화학적 염색을 통하여 조직내의 TGF- α 와 TGF- β 의 존재와 분포의 특성을 밝힘으로써 구강암의 발암 단계에 기준이 될 수 있는 정보를 얻어 발암 시기를 예측하고, 구강암의 진단과 치료에 도움이 되고자 함에 목적을 두었다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구에 사용된 실험 동물은 체중 100g 이상 200g 이내의 75마리 웅성 golden Syrian hamster를 동일 조건하에서 사육용 고형 사료를 이용하여 사육하였다. 이들은 실험군과 대조군으

로 구분하여 대조군은 9군(0, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20주)으로 각 군당 3마리, 실험군은 8군(6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20주)으로 각 군당 6마리씩을 배정하였다.

발암을 위한 약제로는 대조군에서는 mineral oil을 실험군에서는 9, 10-dime-thyl-1, 2-benzanthracene (DMBA : Sigma Co., USA)을 mineral oil에 용해하여 0.5%의 농도로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 발암 유도 및 표본 채취

대조군은 mineral oil을 실험군은 0.5% DMBA를 면봉을 이용하여 20주동안 험낭에 주 3회 도포하여 발암을 유도하였다. 실험동물의 희생은 발암 유도 후 6주, 8주, 10주, 12주, 14주, 16주, 18주 및 20주에 시행하고 표본 제작을 위하여 험낭을 적출하였다.

2) 조직병리학적 관찰

발암 유무를 확인하기 위하여 적출된 험낭은 중성 포르말린에 고정하고 통상적인 방법에 의한 파라핀 포매와 표본 제작 및 Hematoxylin & Eosin 증염색을 시행하여 조직병리학적으로 악성도를 비교 검경하였다.

3) 면역 조직화학적 염색

조직이 부착된 슬라이드를 탈 파라핀 과정을 시행한 후 각 단계의 알코올을 이용하여 함수시켰다. 면역 조직화학적 염색을 위하여 조직 절편은 3% 과산화수소수 용액에서 20분, blocking serum으로 30분간 처리하여 내인성 과산화효소(peroxidase)의 활성을 제거하였다. 일차 항체로는 TGF- α (Chembiochem, USA)와 TGF- β (Santa Cruz, USA)를 사용하였고, 이차 항체로는 생쥐의 혈청에서 추출한 anti-mouse IgG (Dako Co., USA)를 실온에서 60분간 부란시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 반복 세척하였다. 발색을 위하여 Steptoavidine으로 30분간 반응시키고 PBS 3번 세척한 후 발색제인 Aminoethyl carbazole (AEC) 용

액을 이용하였으며, hematoxylin으로 대조 염색을 하였다. 탈수 과정을 통하여 봉입(mounting)하여 TGF- α 와 TGF- β 의 발현 양상을 관찰하였다.

4) 면역 조직화학적 염색 결과의 판정

종양 발생 단계별로 고배율상에서 TGF- α 와 TGF- β 가 상피층에서 어느 세포층에 양성으로 나타나는지를 관찰하고, 발암 중심부, 발암 변연부와 발암이 없는 부위로 나누어 판정하였다. 반 정량적 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 10곳을 선택하여 염색 정도를 음성(-), 경미(\pm), 약양성(+), 중등도 양성(++), 강양성(+++)의 5단계로 구분하였다.

5. TGF- α 양성 지수 및 통계 처리

대조군과 모든 실험군에서 비교적 TGF- α 의 발현이 명확한 조직 절편에서 촬영한 광학 현미경 사진을 3인의 연구자가 관찰하여, 전체 세포에 대한 TGF- α 양성 세포의 백분률과 이에 대한 평균 및 표준편차를 구하고 t-Test로 통계 처리 하였다.

III. 연구성적

1. 조직병리학적 소견

1) 대조군

대조군은 전 과정에서 정상적인 햄스터 험낭 점막을 보이며 망상 융선의 발달이 미약하고 상피의 두께가 전체적으로 몇 개의 세포층을 가지는 균일한 양상을 보였다. 결합 조직에는 특기할 만한 소견은 없었다.

2) 실험군

실험 6주 경과군에서 정상 상피층의 증식과 비대와 경도의 기저세포 증식이 관찰되며, 각 화층이 대조군에 비하여 뚜렷하고 이형성의 초기 증후가 관찰되었다. 8주 경과군에서는 상피 기저층에 핵 농축, 과색소증과 중도의 이형성이 보였다. 10주에서는 8주와 유사한 양상으로 고

Table 1. Histopathologic Changes of Buccal Pouch Mucosa in Hamster During Oral Carcinogenesis

Time	Histopathologic Findings
Control	Normal
6 Weeks	Basal cell hyperplasia, Mild dysplasia
8 Weeks	Moderate dysplasia
10 Weeks	Severe dysplasia
12 Weeks	Carcinoma in situ
14 Weeks	Squamous cell carcinoma
16 Weeks	Squamous cell carcinoma
18 Weeks	Squamous cell carcinoma
20 Weeks	Squamous cell carcinoma

도의 이형성 단계에 해당하는 세포 증식이 보였고 극세포 증식증과 과각화증이 관찰되었다. 12주에서는 상피층의 비대와 이형성 상피세포의 출현이 불규칙한 배열을 보이며, 기저막은 명료하여 결합 조직내로 침투가 없는 상피내암의 소견을 볼 수 있었다.

14주 이후에는 이형성 상피세포가 결합 조직으로 침투하여 분화도가 좋은 편평상피 세포암종이 관찰되기 시작하였다. 16주와 18주에서는 종괴가 কে양상을 보이는 침투성 편평상피세포암종을 보이며 부분적으로는 암도(cancer island)가 형성되었다. 20주에서는 분화가 잘된 편평상피세포암종의 소견을 보였고 부분적인 괴사의 소견도 관찰할 수 있었다, 이상의 조직병리학적 소견을 요약하면 Table 1과 같다.

2. 구강 발암 발생에 따른 TGF- α 의 발현

TGF- α 의 염색은 모든 실험군 및 대조군에서 세포질보다는 주로 핵에 적색으로 염색됨을 보였고 대조군에서 각질층에는 약양성, 기저층에는 경미한 발현을 관찰할 수 있었다(사진부도 1).

실험 6주 경과시 기저층 주위에 국한되어 경미한 발현 양상을 띄며, 8주, 10주에는 기저층에는 중중도 양성, 상기저층에는 약양성, 유극층에는 경미한 발현으로 발현대가 상기저층과

유극층으로 이동되었으며 결합조직과 상피 조직과의 경계 부위에서 강양성으로 발현되었다(사진부도 2). 12주 및 14주 경과 후 상기저층과 유극층에서 TGF- α 의 양성 발현이 많이 관찰되었고 종양 경계 부위가 종양 중심부보다 많은 발현을 볼 수 있었다(사진부도 3)

16주 후에는 암세포에서 발현 정도가 크게 감소되었는데(사진부도 4). 편평상피세포암종 세포의 각화 진주를 따라 변연부에서는 미약한 발현을 보였으나, 오히려 암진주 중심부에서 약양성의 발현을 보이며 정상조직과의 경계부에서 TGF- α 의 발현이 약간 높았다. 18주 이후 종양 세포 자체에서는 TGF- α 의 발현이 미약했지만, 발암이 안된 정상조직 경계부에서 상대적으로 많은 양성 반응을 보였으며, 종양 상피도의 중심부가 변연부의 종양 세포보다 많은 발현을 볼 수 있었다(사진부도 5, 6). 상기의 TGF- α 발현정도를 요약하면 Table 2, Table 3과 같다.

3. 구강 발암 발생에 따른 TGF- α 의 발현 지수

대조군의 TGF- α 지수는 $1.92 \pm 0.91\%$ 이었고 실험군 6주의 경우 $4.43 \pm 1.25\%$ 로 대조군에 비하여 크게 증가되었으며 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$). 8주에서는 $6.69 \pm 1.20\%$ 를 나

Table 2. Degree of TGF- α Immunoactivity According to Epithelial Layer Distribution & Hamster Oral Carcinogenesis

Time	Layer	Basal	Suprabasal	Spinosous	Outer
Control		±	-	-	+
6 Weeks		±	±	-	+
8 Weeks		++	+	±	+
10 Weeks		++	+	±	±
12 Weeks		+	++	+	+
14 Weeks		±	±	+	+
16 Weeks		±	+	±	+
18 Weeks		±	+	±	+
20 Weeks		±	+	±	+

- : Negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

Table 3. Degree of TGF- α Immunoactivity According to Cancer histologic facus Distribution & Hamster Oral Carcinogenesis Layer

Time	Layer	Cancer free area	Cancer center	Cancer peripheyr
Control		±	±	±
6 Weeks		±	±	±
8 Weeks		+	+	+
10 Weeks		+	+	+
12 Weeks		++	+	+
14 Weeks		+	+	+
16 Weeks		++	+	+
18 Weeks		++	+	+
20 Weeks		+++	+	+

- : Negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

타내었으며 10주에선 $6.51 \pm 1.80\%$ 으로 8주와 큰 차이가 없었고, 12주에서는 $8.58 \pm 1.56\%$ 로 10주와 유사하였고 통계학적으로 대조군과 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 14주에선 $6.74 \pm 1.51\%$ 으로 대조군보다 증가되었으나 12주보다 오히려 감소되었고 16주에선 약간 감소하여 $6.47 \pm 2.01\%$, 18주에선 $12.07 \pm 1.71\%$ 를 나타내었으며 20주에서 다시 증가하여 $13.76 \pm 2.15\%$ 의 지수를 나타내었고 대조군과 통계학적으로 유의하였다($p < 0.05$) (Table 4, Fig. 1).

4. 구강 발암 단계에 따른 TGF- β 의 발현 분포

TGF- β 의 염색은 모든 실험군 및 대조군에서 핵보다 세포질에 주로 발현되었는데 양성인 세포들은 주로 세포질에 적색의 과립으로 관찰되었으며, 드물게 핵내에서도 관찰되었다. 대조군에서는 각질층에 TGF- β 약양성을 볼 수 있으며 기저층에서는 발현을 관찰할 수 없었고 상피층 및 유극층에서도 경미한 발현이 있

Table 4. Positive Index of TGF- α According to Hamster Oral Carcinogenesis

Time	Positive Index(%)
Control	1.92 \pm 0.91
6 Weeks	4.43 \pm 1.25*
8 Weeks	6.69 \pm 1.20
10 Weeks	6.51 \pm 1.80
12 Weeks	8.58 \pm 1.56*
14 Weeks	6.74 \pm 1.51
16 Weeks	6.47 \pm 2.01
18 Weeks	12.07 \pm 1.71*
20 Weeks	13.7 \pm 2.15*

* : Significantly different from control (P<0.05)

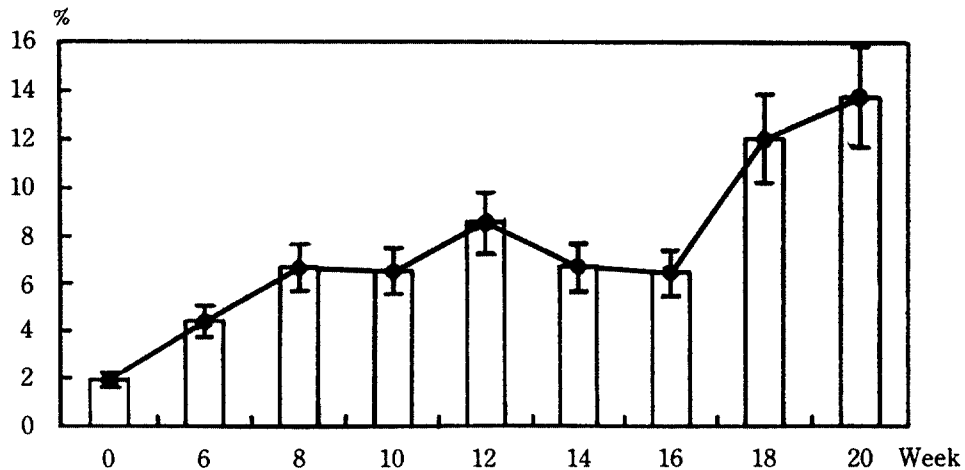


Fig. 1. Positive Index Ratio (%) of TGF- α According to Hamster Oral Carcinogenesis

었다(사진부도 7).

실험 6주 경과시 기저층과 상기저층에서는 거의 발현이 안된 반면 특이하게 유극층에 국한되어 약양성으로 발현을 보였고(사진부도 8), 8주, 10주에는 6주와 큰 차이를 보이지 않았으며 결합 조직과 상피 조직과의 경계 부위에서도 거의 발현되지 않았다. 12주 및 14주 경과 후 기저층에서 TGF- β 양성 발현은 경미하였으나 상기저층에서는 약양성으로, 유극층에서는 중중도 양성으로 관찰되었다(사진부도 9, 10). 16주 이후에는 기저층에서는 경미한 발현이 있

으나 대부분의 종양세포에서 미만성으로 약양성 발현이 나타났다(사진부도 11). 상피도 중심부가 변연부의 종양세포에서보다 뚜렷한 발현을 볼 수 있으며, 종양의 중심부보다는 종양의 진행성 변연부에서 더 강한 양성 반응을 보였다(사진부도 12). 상기의 TGF- β 의 발현 정도를 요약하면 Table 5, 6와 같다.

IV. 총괄 및 고찰

생체내에서 규칙적인 세포 성장 및 분화는

Table 5. Degree of TGF- β Immunoactivity According to Epithelial Layer Distribution & Hamster Oral Carcinogenesis

Time	Layer	Basal	Suprabasal	Spinosous	Outer
Control		-	±	±	+
6 Weeks		±	±	+	+
8 Weeks		±	±	+	+
10 Weeks		±	+	+	+
12 Weeks		±	+	++	+
14 Weeks		±	+	++	+
16 Weeks		±	+	+	+
18 Weeks		±	+	+	+
20 Weeks		±	+	+	+

- : Negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

Table 6. Degree of TGF- β Immunoactivity According to Cancer histologic facus Distribution & Hamster Oral Carcinogenesis

Time	Layer	Cancer free area	Cancer center	Cancer peripheyr
Control		±	±	±
6 Weeks		±	±	±
8 Weeks		+	+	+
10 Weeks		+	+	+
12 Weeks		++	+	+
14 Weeks		+	+	+
16 Weeks		++	+	++
18 Weeks		++	+	++
20 Weeks		+++	+	++

- : Negative, ± : rare, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

물리적 지표, 세포의 기질 구성 성분, 세포 유착분자, 막 연결 복합체, 성장 인자 등과 연관된 다양한 조절 기능에 의하여 이루어진다. 이중 가장 중요한 역할은 성장 인자가 하는 것으로 알려져 있다. 성장 인자의 기능, 수용기, 신호 전달 도입(signal transduction) 등에 관한 사실은 대부분이 생체의 연구를 통하여 알게 되었다. 또한 암유전자가 화학성 발암 물질, 방사에너지, 종양성 바이러스 등의 영향으로 변화되므로 암이 유발되는데 이러한 과정에 성장 인자중

형질 전환 성장 인자(transforming growth factor, TGF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor, PDGF), 상피 성장 인자(epidermal growth factor, EGF) 집락 자극인자(colony stimulating factor) 등이 영향을 준다고 하며 그 중에서도 발암 기전 연구에 다양한 성장 인자가 주목받고 있으며, 특히 TGF가 관심의 대상이 되고 있다⁵¹⁾.

육종 바이러스에 의하여 변형된 세포에서 처음으로 분리된 TGF- α 는 50여개의 아미노산

으로 구성된 저분자량의 폴리펩티드로 그 생물학적 의의에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다^{10-12, 51, 52}. TGF- α 는 시상하부, 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선 및 부신 등의 정상 조직에서 생화학적으로 안정적이며¹⁰, 이런 조직의 양성 및 악성 종양 그리고 간, 난소, 폐 및 위의 악성 종양에서도 관찰되는 것으로 보고되었다^{10, 22-26, 51}.

TGF- α 의 발현과 종양성 전환 사이에 밀접한 연관성에 대한 연구는 이미 여러 학자들에 의하여 많이 보고되었다. Samuel등¹¹은 대부분의 악성 신경교종 세포주에서 4.6kb TGF- α mRNA가 표현되나 정상 뇌조직 또는 양성 종양에서는 관찰되지 않는다고 하며, TGF- α 와 세포의 종양성 전환 사이에 명확한 연관성이 있다는 사실을 보여주고 있다. 그러나 Derynck등⁵³에 의하면 TGF- α 는 다양한 정상 세포계, 특히 상피 세포와 표피 각화 세포에서 생성되는 인자이므로 상피 성장 인자 수용기와 리간드(ligand)로 생각되어야 한다고 하여 TGF- α 를 특이한 종양 성장 인자로 생각해서는 안한다고 하였으며, 프로테인키나제 C경로의 활성화에 의하여 피부 양성 증식 및 일부의 피부 악성 종양에서 TGF- α 가 발현된다고 설명하고 있다. 이와 같이 최근 TGF- α 에 대한 많은 연구에서 다양한 주장과 가설이 발표되고 있다^{11, 53-55}.

그러나, 최근 인체 종양을 대상으로 TGF- α 에 대한 면역 조직화학적 방법을 시행한 Samuel등¹¹과 Schelegel등⁵¹의 보고에 따르면 악성 종양의 분화도와 TGF- α 사이로 분명한 연관성이 있다고 한다. 이들의 연구 결과와 본 연구 결과를 비교하여 보면 유사한 측면을 관찰할 수 있다. 즉 본 연구에서 TGF- α 양성지수는 DMBA 투여 기간에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며, 특히 12주와 18주 이후에서 통계학적으로 유의성이 있게 관찰되어 양성 종양 보다 악성 종양에서 TGF- α 의 발현 양상이 증가되며, 이 현상을 이용하여 TGF- α 가 양성 및 악성 종양의 진단 및 예후 인자 중의 하나가 될 수 있다고 생각되며, 이러한 견해의 타당성을 뒷받침한다고 사려된다. 또한 이와 같은 의견은 최근 이들 폴리펩티드에 대하여 알려져 있는 생물학 및 생리학적 정보와 일치한다고 할 수 있다^{11, 51, 53-55}.

Bauknecht등⁹의 최초로 EGF와 유사한 물질이 난소 암종의 37% 정도에서 발현되는 것으로 보고한 이래로, Morishige등¹³은 TGF- α 는 자가 분비형 기전에 의하여 난소의 모든 악성 종양에서 EGFR과 동시에 발현된다고 하였다. Owens와 Leake⁵⁶에 의하면 난소 여포 상피 세포 및 간질 세포 등의 정상 난소 조직 및 경계성 병변의 상피성 종양에서 EGFR의 발현율은 각각 84.5% 및 84.1%, 악성 난소 종양에서는 88.5%로 발현되어 악성도에 따른 차이는 보이지 않는다고 하였다. 또한 TGF- α 의 발현과 종양의 분화도 및 TGF- α mRNA의 농도와 임상 병기 사이에도 상관성은 없다고 하였다. Bauknecht등⁹은 TGF- α 의 발현이 EGFR과는 달리 c-myc의 발현과 깊이 연관되어 있으며, 임상적으로 진행성인 병변에서 c-myc의 과발현이 있다고 하였다. 그러나 Kommos등⁵⁷은 TGF- α /EGFR과 c-myc/c-jun의 발현에는 상호 관련성이 없으며, 정상 조직에서의 TGF- α mRNA는 거의 없거나 낮으며, 약 20%의 악성 난소 종양에서는 높은 발현을 보인다고 하였다. 반면에 임상 시기가 치료 효과와 연관된 연구에서 항암제에 잘 반응하는 난소 종양이 반응을 안하는 난소 종양에 비하여 높은 TGF- α mRNA나 c-myc의 높은 발현을 보인다고 하였다. 이와 같이 TGF- α 와 c-myc의 발현사이에 일관된 일치성을 보이지 않는 점은 TGF- α /c-myc 신호전달 체계 외에 또 다른 신호전달 체계의 존재가 있다고 여겨지며 이에 대하여 구강암에서 암 유전자와 성장 인자와의 상호 연구가 이루어져야 된다고 생각된다. 본 실험에서는 발암 과정에 따른 TGF- α 의 발현 검사를 하여 임상 병기에 따른 발현을 볼 수 없었는데 DMBA에 의하여 발생하는 구강암은 모두 분화가 잘된 상태를 보이기 때문이다. 따라서 이러한 관점에서 구강암 환자에 대하여 조직의 분화 정도에 따른 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

또한 성장 인자는 autocrine, paracrine 및 호르몬 조절 기능을 모두 가지고 있어 자신뿐만 아니라 먼 표적 장기의 세포도 증식을 유도한다¹⁹. 따라서 인체의 거의 모든 세포는 EGF를

생성하며 종양 세포가 혈장이 없음에도 증식을 계속하는 것은 자체 내에서 생성하는 autocrine effect 때문으로 생각된다. 그러므로 종양 유전자중 가장 먼저 발견된 EGF는 표적세포의 EGFR을 자극하여 DNA 합성을 촉진시키고 세포 분열에 의한 세포증식을 초래시킨다고 한다⁵⁸. Lundy등⁵⁹은 악성 종양을 대상으로 황체 호르몬 수용기(ER)와 TGF- α 를 면역 조직화학적으로 염색한 결과 조직의 분화도가 좋을수록 ER와 TGF- α 에 대한 양성율이 증가한다고 하였다. 이러한 보고는 ER에 양성인 종양은 예후가 좋으며 재발이 적다는 일반적인 보고와 일치되는 소견이며 따라서 TGF- α 도 암의 예후 판정에 이용할 수 있다고 할 수 있다.

발암 과정에 대한 연구에서 Christensen등⁶⁰은 TGF- α 와 EGF를 이용하여 40예의 구강 편평상피암 세포에 면역 조직화학적 염색을 시도한 결과 각각 TGF- α 는 34예(87%), EGF는 26예(65%)에서 양성 반응을 보임을 보고하여 Lundy등⁵⁹이 유방암에서 보고한 결과와 비슷하였다. 본 연구에서는 TGF- α 발현 유무를 중심으로 관찰한 것이 아니라 암발생동안 분포양상을 관찰하고자 하였으므로 직접적으로 비교할 수는 없지만 정상 상피, 전암 상피 및 암 세포 모두에서 TGF- α 가 대부분 관찰되었다.

본 연구에서 TGF- α 는 대조군 및 전암 단계의 기저층과 상기저층에서 양성 반응을 보이고 암종 발생 이후에 유극층을 중심으로 발현되어 발현 부위의 이동이 관찰되었다. 이러한 기저층을 중심으로 발현되는 소견은 TGF- α 가 바로 EGFR에 경쟁적으로 붙는다는 것을 의미하며 세포 증식과도 밀접히 관련된다고 여겨진다. 전암 단계에서는 TGF- α 의 발현이 크게 증가하다가 16주 이후의 암종 세포에서 발현 정도가 크게 감소되었으며, 암종 중심부 보다 정상 경계부에서 발현이 약간 높았고, 상피도의 중심부가 변형부의 종양세포보다 많은 발현을 보였는데 이러한 소견은 TGF- α 는 정상 세포가 악성으로 전환될 때 분비되며, 종양 세포에서도 생성, 분비되어 주위 정상 세포의 종양성 전환에 영향을 미치고 주위 종양 세포들에는 성장을 자극하는 효과가 있을 것으로 추측되고 있다.

이러한 성장 인자의 분비는 전환 과정중의 세포 변화에 의한 것이라기 보다는 발암 유전자 활성화의 결과로 생각되어지고 있다^{11, 51}.

또한 악성 종양의 조직학적 분화도와 TGF- α 의 발현 양상 사이에 분명한 연관성이 있는 것으로 미루어 종양에서 TGF- α 의 발현 양상이 유용한 예후 측정 인자가 될수 있을 것으로 사려되며, 구강 암종의 병리학적 발생에도 시사하는 바가 있을 것으로 생각되어 앞으로 이 분야에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것 같다.

TGF- β superfamily member는 세포의 성장, 분화 및 기능 등을 조절하는 정밀한 조절자로 이미 알려져 있다⁶¹⁻⁶³. Sporn등⁶⁴이 종양세포에서 분비되는 TGF- α 가 자연 살해 세포(natural killer cell), T와 B 림프구의 기능을 억제하여 면역 기능을 감소되므로 세포 증식이 촉진된다고 보고하였으며, Yoshida등⁶⁷은 위암 세포를 배양한 실험에서 위암 세포가 분비되는 TGF- β 가 종양 세포와 섬유모세포를 자극하여 전구교원질(procollagen) I과 III의 합성을 촉진시켜 섬유화를 유도한다고 하였다. Ura등⁶⁸은 위 경성 암종(gastric cirrhous carcinoma) 세포 배양에서 분비되는 활성화된 TGF- β 가 위암의 교원질기질에 수축이 일어나게 한다고 하였다.

이러한 TGF- β 는 세포의 종류나 실험 형태에 따라 세포 성장을 촉진하거나 방해하며, 정상 세포와 암 세포에서 발현되는 것으로 보고되고 있다⁶⁹⁻⁷¹. 유방암에서도 TGF- β 가 암의 유지 및 증식에 큰 역할을 하는 것으로 보는데, TGF- β mRNA 발현과 분비 증가, 호르몬 의존성 이탈 현상 등이 TGF- β 의 영향을 받고 있으며, 정상 유방 조직보다는 고도로 증식하는 유방암 조직에서 TGF- β mRNA 전사가 활발히 일어나며, 유방암에서 TGF- β 는 단백 분해능과 전이능을 증가시킬 뿐만 아니라 직접적으로 고도의 전이암의 증식을 촉진시킨다고 하였다⁶⁶. 일반적으로 상피 증식의 중요한 조절인자로 TGF- β 를 알고 있으나, 대부분의 연구에서는 정상 세포와 암 세포의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며⁷², 암종의 침윤과 전이를 결정하는 인자로 추정되고 있다^{36, 74, 75}. 또한 TGF- β 는 생체의 실험

에서 혈관 내피 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려졌지만 생체내 실험에서는 새로운 모세혈관의 형성을 증가시키는 것으로 보고 되었다⁷⁶⁾. 실제적으로 맥관 형성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 신생 혈관의 증가를 Fator 8 연관 항원을 이용한 면역 조직화학적 방법으로 수치화 함으로써 맥관 형성과 전이와의 연관성에 대한 연구가 유방암⁷⁷⁾과 전립선암⁷⁸⁾등에서 연구되었다.

이와 같이 TGF- β 는 다양한 기능을 가지고 있어서 기능적인 다양성을 형태학적으로 증명하고 분석하는 작업이 필요하며, 하나의 연구 수단으로 면역 조직화학적 염색 방법이 사용된다. 면역 조직화학적 염색은 생체내 실험에서 관찰하고자 하는 인자가 어느 부위에 있는지를 확인 할 수 있을 뿐만 아니라 주위 조직의 형태학적 변화를 관찰 할 수 있어서 그 연관성을 확인이 가능하다. 다른 장점으로는 양성 및 악성 병소 그리고 전구성 암 등을 파라핀 조직 절편을 이용하여 동일 조건하에서 후향성 연구가 용이하며, 특히 주위의 정상적인 조직의 변화와 저극성 병소가 악성전환을 한경우에는 그 연관성을 관찰 할 수 있다. 또한 개개의 세포 단위로 여러 병리학적 소견과 항원 표현과 관계를 연구 할 수 있다는 장점이 있다^{79,80)}.

TGF- β 의 면역 조직화학적 염색을 가장 처음 시도한 학자는 Ellingsworth등⁴³⁾이며, 그후 많은 연구자들에 의하여 시도 되었다. Casscells등⁸¹⁾은 정상 쥐의 심장을 염색하여 세포질내에서 선 모양이나 점상 모양으로 염색되는것을 관찰하여 TGF- β 가 수축성 세사나 사립체에 존재한다고 하였으며, Johnson등⁸²⁾은 수막종을 염색하여 세포질에 염색된 양상을 보아 골지체에 분포되어 있다고 보고하였다. 종양 세포의 세포질에 염색되는 경우 TGF- β 의 합성 증가와 분비가 감소된 경우의 두 가지로 생각할 수 있지만, Schilling등⁸³⁾은 세포질내에서 염색되는 TGF- β 의 양상과 mRNA의 발현이 일치하므로 세포질내에서 합성되는 TGF- β 는 합성되는 위치를 가리킨다고 하였으며, TGF- β 의 합성과 분비가 증가됨을 의미한다고 하였다. 본 실험에서도 종양 세포 세포질내에서 주로 TGF- β 가

염색되었기 때문에 TGF- β 가 종양 세포에서 합성된 것으로 생각하였다.

종양 세포에서 분비되는 TGF- β 는 주위 정상 조직에 다양한 영향을 미치는데 Arteaga등⁸⁴⁾은 유방암에서 TGF- β 가 호르몬의 영향을 피하게 되고 종양 세포의 증식을 촉진하고, 종양 세포의 단백질 분해능을 향진시키므로 전이를 더욱 쉽게 한다고 하였다. 주위 조직에도 영향을 주어 면역 억제 즉 자연 살해 세포의 기능을 억제하여 종양 증식을 촉진시켰으며, 혈관 증식, 결합 조직형성, 세포 주위의 단백질 분해를 촉진하므로 암 세포의 성장을 유도한다고 보고하였는데, Laiho등⁸⁵⁾도 위암 세포 배양에서 유사한 결과를 관찰하였다.

암의 유발과 연관된 TGF- β 의 연구를 살펴 보면 생체의 실험인 암종 세포 배양 연구에서 외인성 TGF- β 에 대하여 반응하지 않는다고 하였으나, 외인성 TGF- β 의 영향을 받지 않는 시기는 암의 유발 과정 중 후기부터인 것으로 보고하고 있어 암의 초기 유발에는 관여하지 않는다고 하였다⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Jasani등⁸⁹⁾도 갑상선 종양의 여러 단계별 면역 조직화학적 염색에서 양성 종양과 정상 갑상선 상피 세포에는 TGF- β 가 존재하지 않았지만, 악성 종양에서는 TGF- β 가 발현된다고 하였으며, 종양 세포내에서 염색되는 TGF- β 는 활성화되어 있다고 보고하였다. 본 연구에서 TGF- β 발현은 대조군 및 전암 단계에서는 상기저층과 유극층에서 경미한 양성반응을 보이고 암종 발생 이후에 상기저층을 중심으로 전층에 발현되어 차이를 보여주었다. 그러나 본 연구에서는 정상과 상피 이행성 및 암세포의 세포질에서 TGF- β 의 발현을 볼 수가 있어 양성 지수의 정량화가 어려웠으며, 특히 16주 이후의 암종 단계에서는 사진부도 11에서처럼 세포외에서도 관찰되었다. 이러한 현상에 대하여 Flanders등⁴⁴⁾은 세포내에 염색되는 TGF- β 는 TGF- β 가 만들어지는 위치를 가리키며 세포밖에 염색되는 것은 기질 단백질에 붙는것을 의미한다고 하여 생체내에서 TGF- β 의 기능을 이해하려면 여러 종류의 세포에서 TGF- β 의 존재를 확인하는 연구가 필요하다고 하였다. Rosemary등TGF- β 36)은 원발성 종양에서

TGF- β 의 발현성과 림프절 전이간에 연관성이 있다는 연구 결과를 발표하면서 TGF- β 가 성장의 조절보다는 침윤에 역할을 한다고 보고하였다. 유방암에서 Arteaga등⁹⁰⁾은 TGF- β 가 종양 세포의 증식을 촉진시키고 종양 세포의 단백질 분해능을 증진시킴으로써 전이에 역할을 한다고 보고하였다. 또한 조직주위에 영향을 주어 면역 억제와 맥관 증식, 결합 조직 형성, 세포 주위의 단백질 분해를 촉진시켜 암세포의 성장을 돕는다고 하였다. 본 연구에서 TGF- β 발현은 16주 이후의 암종 세포에서 미만성으로 양성 발현이 나타났으며, 상피도 중심부가 변연부의 종양 세포보다 명확한 발현을 보이며 종양의 중심부보다는 종양의 진행성 변연부에서 더 강한 양성 반응을 보였다. 이러한 사실은 종양 조직의 중심부 보다 진행성 변연부에서 분비형 TGF- β 가 많이 존재하고 있으며 TGF- β 가 종양의 침윤성에 관여할 것으로 생각된다. 따라서 임파절에 전이된 암세포에서도 분비형 TGF- β 가 높은 증가를 보인다는 Bakul등⁷¹⁾의 보고와 일치하여, 항 후 TGF- β 와 암종의 전이에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Berchuck등⁹⁰⁾은 상피성 종양의 발생은 TGF- β 에 의한 상피 성장 인자 억제 기능이 조절되지 않아 상피 세포가 종양화 된다고 주장하였으며, Stefan등⁹¹⁾은 TGF- β 만이 암의 진행과 관계 있음을 보고하였다. 그러나 Boente등⁹²⁾은 암세포가 간질 조직의 세포의 기질로 침습과 주위 조직의 파괴 등과 같은 종양의 확장성 성향은 TGF- β 뿐만 아니라 HER2/neu, c-myc 및 p53 등의 암 유전자도 관여 한다고 하였으며, Walker등⁹³⁾도 TGF- β 1의 발현이 림프절 전이와 fibronectin, tenascin증가, CD 4와 CD 8 림프구의 분포가 달라져 CD 8이 증가하는 것, 종양과 연관된 대식구의 침윤에 상관성이 있다고 보고하였다.

본 실험에서는 TGF- β 1, 2, 3를 사용하여 TGF- β 1을 이용한 상피 저자들과 유사한 결과를 얻었으나 세 가지의 isoform을 동시에 각각 염색하여 비교하여 보는 연구가 필요하며 항 후 c-myc 및 p53과의 상호 관련성에 대하여 연구되어야 한다고 사려된다. 구강암 발생 단계에서

TGF 발현은 두단계의 발생 양상을 보여 전암 단계에서는 성장 조절이 안되어 과발현되는 시기와, 암 발생 후에는 주위 간질 조직내로 TGF 단백질 축적으로 인하여 발현이 증가되는 시기가 출현된다고 생각되어, 이러한 성장 인자의 과발현이 종양 관련 항원들과 단독 혹은 공동으로 작용하여 암의 예후에 영향을 미칠 수 있는 인자중의 하나가 될 수 있다고 여겨진다. 본 실험은 구강암에서 TGF- β 의 역할을 반정량적으로 규명하였으나, 좀더 명확한 TGF- β 의 역할을 규명하기 위하여 정확한 정량적인 방법의 개발과 다른 암 유전 인자, 여러 세포 기질 및 면역 세포와의 관계를 밝히는 연구와 발암 과정과 암세포에서 TGF- β 합성, 분비, 활성화 및 다른 성장 인자나 호르몬의 역할 등에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

V. 결 론

DMBA유도 햄스터 구강암 모델에서 TGF- α 및 TGF- β 의 발현 정도와 출현 시기를 비교 관찰하고자 DMBA 투여 후 6주, 8주, 10주, 12주, 14주, 16주, 18주, 20주에 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DMBA 도포 6, 8, 10주에는 상피 이형성, 12주는 상피내암, 14주부터는 침습성 편평 세포암종의 소견을 보였다.
2. TGF- α 는 대조군 및 암 발생 이전 단계의 기저층과 상기저층에서 양성 반응을 보이고 암종 발생 이후에 유극층을 중심으로 발현되어 발현 부위의 이동이 관찰되었다.
3. TGF- α 는 16주 이후의 암세포에서 발현 정도가 크게 감소되었으며, 암 중심부 보다 정상 조직과의 경계부에서 발현이 약간 높았고, 상피도의 중심부가 변연부의 종양 세포보다 많은 발현을 보였다.
4. TGF- α 양성 지수는 DMBA 투여 기간에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며, 12주와 18주이후에 통계학적으로 유의성이 있었다 ($P < 0.05$).
5. TGF- β 발현은 모든 실험군 및 대조군의 세

포질에 주로 나타났으며, 대조군 및 전암 단계에서는 상기저층과 유극층에서 경미한 양성 반응을 보이고 암종 발생 이후에 상기저층을 중심으로 전층에 발현되었다.

6. TGF- β 발현은 6주 이후의 암세포에서 미만성으로 양성 발현이 나타났으며, 상피도 중심부가 변연부의 종양 세포에서 보다 뚜렷한 발현을 볼 수 있었고, 종양의 중심부보다는 종양의 진행성 변연부에서 더 강한 양성 반응을 보였다.

이상과 같은 소견으로 구강암 발생 단계에서 TGF 발현은 두단계의 발생 양상을 보여 전암 단계에서는 성장 조절이 안되어 과발현되는 시기와, 암 발생 후 시기에는 주위 간질 조직내로 TGF 단백질 축적으로 인하여 발현이 증가되는 시기가 출현된다고 사려되며 이러한 성장 인자의 과발현이 예후인자중의 하나가 될 수 있다고 여겨진다.

참 고 문 헌

1. Roberts AB, thompson NL, Heine U, flanders C, Spoon MB : Transforming growth factor- β : Possible roles in carcinogenesis. Br J Cancer 57 : 594, 1988.
2. DeLarco JE, Todaroo GJ : Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75 : 4001, 1978.
3. Assion RK, Komoriaya A, Meyers CA, Miller PJ, Sporn MB : TGF- β in human platelets. J Biol chem 258 : 7155, 1983.
4. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB : Purifixation and initial characterization of a type beta TGF from human placenta. Proc Natl Acad Sci USA 80 : 3676, 1983.
5. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of TGFs potentiated by EGF : isolation from non-neoplastic tissues. Proc Natl Acad Sci USA 78 : 5339, 1981.
6. Roberts AB, Anzano MA, Meyers Ca, Widedamam J, Blacher R, Pan YCE, Stein S, Lehrmam R, Smith JM, Lamb LC, Sporn MB : Purification and properties of type beta TGF from bovine kidney. biochemistry 22 : 562, 1983.
7. Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, DeLarco JE : Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta TGFs. Proc Natl Acad Sci USA 80 : 6364, 1983.
8. Tucker RF, Shipley GD, Ryan RJ, Moses HL : Specific bindig to cultured cells of 125I-labeled transforming growth factor beta from human platelts. Proc Natl Acad Sci USA 81 : 6157, 1984.
9. Bauknecht T, Janz I, Kohler M, Pfliederer A : Human overian carcinomas : corelations of malignancy and survival with the expression of epidermal growth factor receptor and EGF like factor. Med Oncol tumor Pharmacother 6 : 121, 1989.
10. Driman DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Asa SI : Transforming growth factor- α in normal and neolastic human endocrine tissues. Human Pathology 23 : 1360, 1992.
11. Samuels V, Baret JM, Bockman S, Pantazis CG, Aen JR MB : Immunocytochemical study of transforming grwoth factor-alpha expression in benign and malignant gliomas. Am J Pathol. 134 : 895, 1989.
12. Sandgren EP, Luetteke NC, Qiu TH, Palmiter RD, Brinster RL, lee DC : Transforming growth facotr alpha dramatically enhancesd oncogene-induced carcinogenesis in transgenic mous pancreas and liver. Mol Cell biol 13 : 320, 1993.
13. Morishige K, Kurachi H, Amemiya K : Evidence of the involvement of transforming growth facotr- α and epidermal gor-

- with factor receptor autocrine growth mechanism in primary human ovarian cancers in vitro. *Cancer Res* 15 : 5322, 1991.
14. Reynolds FH, Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR : Human transforming growth factors induced tyrosine phosphorylation of EGF receptor. *Nature* 292 : 259, 1981.
 15. Kaplan PL, Topp WC, Ozanne B : Simian virus 50 induces the production of a polypeptide transforming factor(s). *Virology* 108 : 484, 1981.
 16. Kaplan P, Ozanne B : Polyoma virus-transformed cells produce transforming growth factor(s) and grow in serum-free medium. *Virology* 12 : 372, 1980.
 17. Coffey RJ, Derynck R, Wilcoxon JM : production and autoinduction of transforming growth factor- α in human keratinocytes. *Nature* 328 : 817, 1987.
 18. Zajchowski D, Band V, Pazdie N, Tager A, Stampfer M, Sager R : Expression of growth factors and oncogenes in normal and tumor derived human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 48 : 7041, 1988.
 19. Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A : Expression of transforming growth factors in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 49 : 6972, 1989.
 20. Sherwin SA, Twardzik DR, Bohn WH, Cockley KD, Todaro GJ : High-molecular-weight transforming growth factor activity in the urine of patients with disseminated cancer. *Cancer Res* 43 : 403, 1983.
 21. Samnules V, Barrett JM, Bockman S : Immunohistochemical study of transforming growth factor- α expression in benign and malignant gliomas. *Am J Pathol* 134 : 895, 1985.
 22. Hsia CC, Aciotis CA, DeBisceglie AM, Tabor E : Transforming growth factor- α in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* 70 : 1049, 1992.
 23. Bauknecht T : Clinical significance of oncogenes and growth factors in ovarian carcinoma. *J Steroid Bio Mol Biol* 37 : 855, 1990.
 24. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K : Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 50 : 7077, 1990.
 25. Yamamoto T, Hattori T, Tahara E : Interaction between transforming growth factor- α and c-Ha-ras p21 in progression of human gastric carcinoma. *Path Res Pract* 183 : 663, 1988.
 26. Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulos C, Karameris A, Kanavaros P, Spandidos DA : Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in thyroid tumor. *In vivo* 6 : 291, 1992.
 27. Kulozik MA, Hogg B, Krieg T : Colocalization of transforming growth factor β 2 with α 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 86 : 917, 1990.
 28. Connor TB, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, DeBustros S, Enger C, Kato H, Lansing M : Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 level in the eye. *J Clin Invest* 83 : 1661, 1989.
 29. Okuda SLR, Languino E, Border WA : Elevated expression of transforming growth factor-beta and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis : Possible role in expansion of mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86

- : 453, 1990.
30. Weinberg RA, Kimch A, Cheifetz S : Transforming growth factor- β and growth inhibiting response in retinoblastoma cells. *Science* 241 : 234, 1988.
 31. 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* 261 : 4337, 1986.
 32. Ignatz RA, Endo T, Masague J : Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J Biol* 262 : 6443, 1987.
 33. Muller G, Behrens J, Mussbaumer U, Behlen P, Birchmeier W : Inhibitory action of transforming growth factor- β on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 5600, 1987.
 34. Kehrl JH, Roberts AB, Wakerfield LM, Jakowlew SB, Sporn MB, Fauci AS : Transforming growth factor- β is an important immuno-modulatory protein for human B-lymphocytes. *J Immunol* 137 : 3855, 1986.
 35. Coffey RJ, Shipley GD, Moses HL : Production of transforming growth factor- β by human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 46 : 1164, 1986.
 36. Rosemary A, Walker and Sheila J : Transforming growth factor- β 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 28 : 641, 1992.
 37. Jonson MD, Federspiel CF, Gold LI, Moses HL : Transforming growth factor- β and transforming growth factor- β receptor expression in human meningioma cells. *Am J Pathol* 141 : 633, 1992.
 38. Kimch A, Wang XF, Weinberg RA, Cheifetz S, Massague J : Absence of transforming growth factor- β receptor and growth inhibiting response in retinoblastoma cells. *Science* 240 : 196, 1988.
 39. Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemonie NR, Williams ED, Waynford DT : Immunocytochemically detectable transforming growth factor- β association with malignancy in thyroid epithelial neoplasm. *Growth Factor* 2 : 149, 1990.
 40. Gehron RP, Young MF, Falanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD,
 41. Roberts AB, Sporn MB : TGF- β . *Adv Cancer Res* 51 : 107, 1987.
 42. Ode K, Hori S, Itoh H, Osamura RY, Tokuda Y, Kubota M, Tajima T : Immunohistochemical study of TGF- β , fibronectin, and fibronectin receptor in invasive mammary carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 42 : 645, 1992.
 43. Ellingsworth LR, Brennan JE, Fort K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA, Seyedin SM : Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing Factor A and TGF- β . *J Biol Chem* 261 : 12362, 1986.
 44. Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, Oberghen-Schilling EV, Baker CC, Kass ME, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB : TGF- β : Histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 108 : 653, 1989.
 45. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE : Oral and maxillofacial pathology. WB Saunders Co, Philadelphia, 1st ed., 1995, pp259.
 46. Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R : Tobacco, alcohol, asbestos, and nickel in the etiology of cancer of the larynx : A case-control study. *Cancer* 61 : 203, 1988.
 47. Martin PS : Evaluation of the evidence that tobacco-specific nitrosamines (TSNA) cause cancer in humans. *Crit Rev Toxicol* 21 : 295, 1991.
 48. Salley JJ : Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster.

- J Dent Res 33 : 253, 1954.
49. Odukoya O, Shklar G : Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg* 58 : 315, 1984.
 50. Deuel TF : Polypeptide growth factors : role in normal and abnormal cell growth. *Annu Rev Cell Biol* 3 : 443, 1987.
 51. Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, Furneaux HM : Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene* 5 : 1839, 1990.
 52. DeLarco JE, Todaro GJ : Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 67 : 4001, 1970.
 53. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Guttermann JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH : Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Research* 47 : 707, 1987.
 54. Nister M, Libermann TA, Betsholtz C, Pettersson M, Claesson WL, Heldin CH, Schlessinger J, Westermark B : Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- α and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Research* 48 : 3910, 1988.
 55. Derynck R, Lindquist PB, Bringman TS, Wilcox JN, Elder FT, Fisher GL, Voorhees JJ, Moses HL, Pittelkow MR, Coffey RJ : Expression of the transforming growth factor- α gene in tumor cells and normal cells. *Cancer Cell 7/Molecular diagnostics of human cancer. Cancer Research* 47 : 297, 1987.
 56. Owens OJ, Leake RE : Growth factor content in normal and benign ovarian tumors. *Eur J Obst Gynecol Repor Bio* 47 : 223, 1992.
 57. Kommoss F, Wintzer HO, Von Kleis AS : In situ distribution of transforming growth factor alpha (TGF- α) in normal human tissues and in malignant tumors of the ovary. *J Pathol* 162 : 223, 1990.
 58. Carpenter C, Cohen S : Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 48 : 193, 1979.
 59. Lundy J, Schuss A, Stanick O, McCormack ES, Kramer S, Villi JM : Expression of new protein, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in breast carcinoma. *Am J Path* 138 : 1527, 1991.
 60. Christensen ME, Therkildsen MH, Poulsen SS, Bretlau P : Immunoreactive transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in oral squamous cell carcinomas. *J Path* 169 : 323, 1993.
 61. Mercola M, Stiles CD : Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 102 : 451, 1988.
 62. Akhurst RJ, Lehnert SA, Gatherer D, Duffie E : The role of TGF- β in mouse development. *Ann NY Acad Sci* 593 : 259, 1990.
 63. Roberts AB, Sporn MB : The transforming growth factor- β s. In "Peptide Growth Factors and Their Receptors" (MB Sporn and AB Roberts, Eds.), Vol 95, pp. 419, Handbook of Experimental Pathology. Springer-Verlag, Heidelberg, 1990.
 64. Pelton R, Saxena B, Jones M, Moses HS, Gold LI : Immunohistochemical localization of TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 in the mouse embryo : Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 115 : 1091, 1991.
 65. Massague J : The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* 6 : 597, 1990.
 66. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK : TGF- β : biological function

- and chemical structure. *Science* 233 : 532, 1986.
67. Yoshida A, Hand H, Wunderlich D, Caruso A, Muroaro R, Schom J : Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. *Nature* 11 : 562, 1984.
 68. Ura H, Obara T, Yokota K, Shibata Y, Okamura K, Namiki M : Effects of TGF- β released from gastric carcinoma cells on the contraction of Collagen-Matrix gels containing fibroblasts. *Cancer Res* 51 : 3550, 1991.
 69. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, De Crombrughe B : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105 : 1039, 1987.
 70. Maureen TT, Peter JB, Uta B, Yunus AL, Jean CG, Trevor JP : Growth factor expression in normal, benign, and malignant breast tissue. *Br MJ* 296 : 1621, 1988.
 71. Deuel TF : Polypeptide growth factor : roles in normal and abnormal cells. *Ann Rev Cell Biol* 3 : 443, 1987.
 72. Sliberstein GB, Daniel CW : Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor- β . *Science* 237 : 291, 1987.
 73. Valverius EM, Walker JD, Bates SE, Stampfer MR, Clark R, Macormick F, Dickson RB, Lippman ME : Production and responsiveness to transforming growth factor- β in normal and oncogene-transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 49 : 6269, 1989.
 74. Bakul ID, Paul AK, Arnold HG : Immunohistochemical localization of secreted transforming growth factor- β 1 to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastasis of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 143 : 381, 1993.
 75. MacCallum J, Bartlett JMS, Thompson AM, Keen JC, Dixon JM, Miller WR : Expression of transforming growth factor- β mRNA isoform in human breast cancer. *Br J Cancer* 69 : 1006, 1994.
 76. Judah F, Michael K : Angiogenic factor. *Science* 235 : 442, 1987.
 77. Noei W, Joseph PS, William R, Weich MD, Judah F : Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engle JM* 324 : 1, 1991.
 78. Noel W, Peter RC, Jonathan F, Walter B, Judah F : Tumor angiogenesis correlated with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143 : 401, 1993.
 79. 남종희, 이종현, 박창수, 조규혁 : 유방의 양성 및 악성 병변의 ras oncogene 표현에 관한 연구. *대한병리학회지* 23 : 85, 1989.
 80. Horan P, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J : Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* 81 : 5227, 1984.
 81. Casscells W, Bazoberry F, Speir E, Thompson, Flanders K, Kondaiah P, Ferrans VJ, Epstein SE, Sporn M. TGF- β in normal heart and in myocardial infarction. *Ann NY Acad Sci* 593 : 148, 1990.
 82. Johnson MD, Federspiel CF, Gold LI, Moses HL. TGF- β and TGF- β receptor expression in human meningioma cells. *Am J Pathol* 141 : 633, 1992.
 83. Schilling EV, Thompson NL, Flanders KC, Sporn MB, Lambert PF, Baker CC : TGF- β expression in fibropapillomas induced by Bovine Papillomavirus type I in normal Bovine skin and in BPV-I transformed cells. *Growth factors* 2 : 111, 1990.
 84. Arteaga CL, Caffey RJ : Transforming growth factor- β isoform in mammary neoplasia. *Human Pathol* 23 : 1, 1992.

85. Laiho M, Keski-Oja J : Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis ; A review. *Cancer Res* 49 : 2533, 1989.
86. Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC, Sporn MB : Distribution and modulation of the cellular receptor for TGF- β . *J Cell Biol* 105 : 965, 1987.
87. Reiss M, Sartorelli AC : Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type beta TGF and EGF. *Cancer Res* 47 : 6705, 1987.
88. Haddiw S, Fowles DJ, Parkinson K, Akhurst RJ, Balmain A : Loss of growth control by TGF- β occurs at a late stage of mouse skin carcinogenesis and independent of ras gene activation. *Oncogene* 6 : 1465, 1991.
89. Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemoine NR, Williams ED, Waynford DT : Immunocytochemically detectable epithelial neoplasia. *Growth factors* 2 : 149, 1990.
90. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 50 : 4087, 1990.
91. Boente MP, Hurteau T, Rodriguez GC, Bast RC, Berchuck A : The biology of ovarian cancer. *Curr Opin Oncol* 5 : 900, 1993.
92. Stefan MG, Vincent AM, Therese AS, Leslie IG, Bradley AA : Immunohistochemical staining for transforming growth factor- β 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52 : 6949, 1992.
93. Walker RA, Dearing SJ, Gallacher B : Relation of transforming growth factor- β 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 69 : 1160, 1994.

논문 사진부도 설명

- 사진 1. Microphotography of control mucosa showing rare reaction in epithelium at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 40$)
- 사진 2. Microphotography of DMBA treated 8 weeks mucosa showing moderate reaction in suprabasal and basal cell layer at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 100$)
- 사진 3. Microphotography of DMBA treated 12 weeks mucosa showing moderate reaction in spinous layer of normal appearing epithelium and carcinoma in situ cells at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 100$)
- 사진 4. Microphotography of DMBA treated 16 weeks mucosa showing mild reaction in suprabasal and spinous cell layer at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 100$)
- 사진 5. Microphotography of DMBA treated 18 weeks mucosa showing active reaction in all layer of adjacent cancer free epithelium at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 200$)
- 사진 6. Microphotography of DMBA treated 18 weeks mucosa showing mild reaction in cancer center cells at TGF- α (Immuostain of TGF- α , $\times 100$)
- 사진 7. Microphotography of control oral mucosa showing moderate rare specificity in epithelium at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 100$)
- 사진 8. Microphotography of DMBA treated 6 weeks mucosa showing mild specificity in spinous layer at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 200$)
- 사진 9. Microphotography of DMBA treated 12 weeks mucosa showing enhanced immunoreactivity in spinous layer at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 200$)
- 사진 10. Microphotography of DMBA treated 14 weeks mucosa showing mild specificity in spinous layer at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 100$)
- 사진 11. Microphotography of DMBA treated 16 weeks mucosa showing mild specificity in suprabasilar layer of surface epithelium and invasive islands of squamous cell carcinoma at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 100$)
- 사진 12. Microphotography of DMBA treated 20 weeks mucosa showing severe positive reaction in cancer cells at TGF- β (Immuostain of TGF- β , $\times 200$)

사진부도 1



사진 1



사진 2



사진 3



사진 4



사진 5



사진 6

사진부도 2



사진 7



사진 8



사진 9



사진 10



사진 11



사진 12