

침샘 선양낭성암종의 세포학적, 분자생물학적 특성에 관한 연구

박 영 옥

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

CELLULAR AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ADENOID CYSTIC CARCINOMA OF THE SALIVARY GLANDS

Young-Wook Park

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,
Kangnung National University*

Adenoid cystic carcinoma (ACC) of salivary glands has a protracted clinical course with perineural invasion, delayed onset of hematogenous metastasis, and poor responses to classical cytotoxic chemotherapeutic agents. Most deaths from salivary ACC are caused by lung metastases that are resistant to conventional therapy. Therefore, knowledge of cellular properties and tumor-host interactions that influence the dissemination of metastatic cells is important for the design of more effective therapy of salivary cancer. I determined in vitro expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its downstream effectors and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 on a human salivary ACC cell line (ACC2). I also evaluated the expression of EGF and VEGF signaling molecules and metastasis-related proteins on human salivary ACC cells orthotopically growing in nude mice. In Western blot and immunohistochemical analyses, EGFR and VEGFR-2 were presented and phosphorylated in ACC2 cells. In human parotid cancer xenografts in nude mice, EGF and VEGF signaling molecules, IL-8, and MMP-9 were expressed at markedly higher levels than in normal parotid tissues. Moreover, tumor-associated endothelial cells of this orthotopic parotid tumor expressed phosphorylated VEGFR-2 and phosphorylated Akt, which is a cell-survival protein. These data show that those biomarkers can be molecular targets for therapy of salivary ACC, which has a propensity for delayed lung metastasis.

Key words : Salivary adenoid cystic carcinoma, Epidermal growth factor receptor, Vascular endothelial growth factor receptor, Lung metastasis

I. 서 론

선양낭성암종 (adenoid cystic carcinoma)은 점액성유상피암종 (mucoepidermoid carcinoma)에 이어 두 번째로 침샘에 호발하는 악성종양이다¹⁾. 수술과 방사선 치료로

비교적 양호한 5년 생존율을 보이거나²⁾ 신경조직 침투와 특히 폐조직으로의 원위 전이 (distant metastasis)로 인하여 증례에 따라서는 그 임상 경과가 성공적이지 못하다¹⁾. 대부분의 환자 사망은 기존의 항암 요법으로 치료되지 않는 폐전이 병소 때문이며, 대부분의 타액선 암종이 그러하듯이

* 이 논문은 2003년도 강릉대학교 장기해외파견연구 지원에 의하여 수행되었음.

암세포의 분열 주기가 빠르지 않아 기존의 세포주기와 연관된 약물치료에 효과적이지 못하다³⁾. 따라서 개선된 치료 전략이 필요한 실정이나 현재 선양낭성암종의 원위 전이와 연관된 종양 세포학적, 분자 생물학적 기전에 대해서는 밝혀진 바가 많지 않아 이에 대한 지식이 요구되고 있다.

상피성장인자 수용체 (epidermal growth factor receptor; 이하 EGFR)는 erbB군 타이로신 키나제 수용체의 하나로 (erbB1/HER1) 대부분의 상피조직에서 기원된 악성 종양 세포의 성장과 생존에 결정적인 역할을 수행한다. 이 인자는 세포막에 위치하여 상피성장인자 (epidermal growth factor; 이하 EGF)나 전환성장인자 (transforming growth factor; 이하 TGF)- α 와 같은 특정 리간드가 세포의 도메인에 결합됨으로써 활성화되면 암세포의 증식 외에도 혈관형성이나 암세포의 부착과 침윤성, 그리고 단백질 분해효소의 생성과 같은 전이와 연관된 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. EGF 역시 연구된 다양한 암세포들에서 세포 이동성과 침투성을 증가시키고⁵⁾, 대장암 세포에 대한 한 연구에 의하면 전이성이 높은 암세포들이 전이성이 낮은 세포들에 비교하여 EGFR mRNA를 높게 발현한 것으로 보고되었다⁶⁾. 위의 연구 결과들은 EGFR과 그 리간드가 상피성 종양의 증식과 전이에 중요한 역할을 하고 있음을 보여준다. 이들 인자들은 대부분의 두경부 편평상피세포암 세포주에서 과발현되거나^{7,8)} 침샘의 선양낭성암종에 대한 연구는 미미하다.

종양의 성장은 새로운 혈관의 형성을 요하며, 이 혈관형성 (angiogenesis) 과정 역시 전이와 같은 악성종양의 표현형을 유지하는데 필수 요소이다. 최소한 20여 인자가 악성종양의 신생 혈관형성 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이들 중 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor; 이하 VEGF)는 종양과 연관된 혈관내피세포에 대한 유사분열인자 (mitogen)이며, 동시에 혈관 투과성을 증가시킨다⁹⁾. VEGF는 혈관내피세포 상에 존재하는 특정 수용체인 Flt-1 (VEGFR-1)과 flk-1/KDR (VEGFR-2)에 결합하는데 특히 VEGFR-2는 혈관내피세포의 성장, 증식, 이주와 분화를 위한 주 수용체이다¹⁰⁾. 구강 편평상피세포암 환자에서 종양의 진전과 VEGF/VEGFR의 발현정도는 상관관계가 있는 것으로 보고되고¹¹⁾ 있으나, 타액선 암종에 대해서는 연구된 바가 없다.

따라서 저자는 높은 빈도의 혈관성 폐전이 경향을 보이는 침샘의 선양낭성암종에서도 전이와 연관된 인자들이 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 설정하였다. 본 연구를 통하여 수술조직에서 확립된 세포주와 이 세포주를, 종물이 기원된 동일 조직에 이종이식하여 유도된 동물모델을 확립한 후 암세포의 증식과 전이 연관 인자들의 존재 여부와 활성화 상태를 검증하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 세포주는 환자의 이하선 선양낭성암종으로부터 확립된 ACC2로 텍사스 MD Anderson 암센터 두경부외과의 Jeffrey N. Myers 박사로부터 제공받았다. ACC2는 15% FBS, 글루타민, 비타민 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), 페니실린-스트렙토마이신 (Flow Laboratories, Rockville, MD)이 함유된 RPMI-1640 (Gibco, USA)로 37°C, 5% CO₂, 95% 상대습도 하에서 미코플라즈마와 병원성 바이러스 감염이 없는 상태로 배양된 후 실험에 이용되었다. 또한 암세포를 누드 마우스의 이하선에 주입하는 것이 기술적으로 가능한지를 검증하기 위한 예비실험에서는 실험동물에서 강력한 종양 발생능 (tumorigenicity)을 보이는 B16-BL6 흑색종 세포주를 이용하였다. VEGFR-2 단백질의 발현을 검증하기 위하여 양성대조 세포주로 인간의 태줄에서 확립된 혈관내피 세포주인 HUVEC을 사용하였고 이 실험시 타액선도관암종 (salivary ductal carcinoma) 세포주인 SDC1을 같이 사용하였다.

2. 면역조직화학염색을 위한 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: rabbit polyclonal anti-EGF, anti-EGFR, anti-VEGF/VPF, anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rabbit polyclonal anti-phospho-EGFR (pEGFR), anti-interleukin (IL)-8 (Biosource International, Camarillo, CA); rabbit polyclonal anti-phospho-VEGFR-2 (pVEGFR-2), rat monoclonal TGF- α (Oncogene, Boston, MA); rat monoclonal CD31-PECAM-1 (PharMingen, San Diego, CA); rabbit polyclonal anti-Akt, anti-phospho-Akt (pAkt; Cell Signaling Technology, Beverly, MA). 이차항체로는 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA); peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories); streptavidin horseradish peroxidase (Dako, Copenhagen, Denmark); rat anti-mouse IgG2a horseradish peroxidase (Serotec, Indianapolis, IN)이 사용되었으며 형광 이차항체로는 goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, goat anti-rat Alexa Fluor 594 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)을 사용하였다. 그 외에 Hoechst Dye 3342 (Mr

615.9; Hoechst, Warrington, PA): stable 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Research Genetics, Huntsville, AL); 펩신 (Biomed, Foster City, CA); 그리고 Gill's hematoxylin (Sigma, St. Louis, MO) 등이 사용되었다.

3. 면역세포화학염색

배양된 ACC2 세포를 chamber 슬라이드 상에서 차가운 아세톤에 5분, 아세톤/클로로포름 (v/v, 1:1) 용액에 5분, 다시 아세톤에 5분 고정 후 PBS로 수세하였다. 슬라이드를 습기가 유지된 상태에서 5% 말혈청과 1% 양혈청이 포함된 PBS용액으로 20분간 상온에서 비특이 단백질의 결합을 차단한 후, 4°C에서 EGFR (1:200), pEGFR (1:500), VEGFR-2 (1:200), 혹은 pVEGFR-2 (1:100) 일차항체를 밤새 결합시켰다. PBS 수세 후 이차항체로 상온에서 1시간 배양하고 DAB으로 5-10분간 발색시켰다. 음성 대조군은 일차항체 대신 단백질 차단 용액만을 적용하였고, 발현된 양성반응의 결과는 CCD칼라 비디오 카메라 (Model DXC 990, Sony Corp., Tokyo, Japan)가 장착된 Nikon Microphot-FX (Nikon Inc., Garden City, NY) 현미경으로 검사 후 Optimas 영상분석 소프트웨어 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD)를 사용하여 그 발현 정도를 평가하였다.

4. Western Blotting

세포주에서 EGFR, VEGFR-2, Akt, MAP kinase (MAPK)의 발현 유무와 autophosphorylation 상태를 평가하기 위하여 용해완충액 [1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 μM leupeptin, 0.15 units/ml aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate]을 이용하여 총세포단백을 추출하였다. 시료를 샘플완충액 [0.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% sodium dodecyl sulfate, 1M dithiothreitol, 10% glycerol, 1% bromphenol blue]에 희석한 후 웨스턴 블롯팅을 위하여 50 μg의 단백을 10% (VEGFR-2는 7.5%) SDS-PAGE에 전기영동 후, PVDF막으로 옮겼다. 단백질 존재를 평가하기 위하여 블롯을 다음에 열거한 항체들을 이용하여 검색하였다: anti-phospho (Tyr1068)-EGFR antibody (Ab; Cell Signaling Technology); anti-phospho (Tyr1054)-VEGFR-2 Ab (Biosource International); anti-phospho (Ser473)-Akt Ab; anti-phospho (Tyr202/Tyr204)-MAPK (mitogen-activated protein

kinase) Ab (Cell Signaling Technology). 양성반응은 chemiluminescence detection system (Amersham, Inc., Arlington Heights, IL)으로 가시화 하였으며 밴드 제거후 anti-EGFR Ab (Upstate, Lake Placid, NY), anti-VEGFR-2 (Flk-1) mouse MAb (Santa Cruz Biotechnology) anti-Akt Ab, anti-MAPK (p42 MAPK) mouse MAb (Cell Signaling Technology)를 이용하여 재검색 하였다. 마지막으로 단백질 정량의 검증을 위하여 anti-β-actin (Sigma Chemical Co.)을 이용하였다.

5. 암세포의 동위이종이식

실험동물로 C57BL/6 흑색 마우스와 8-10주된 웅성 누드 마우스(NCI-nu, Frederic, USA)를 사용하였다. 종양을 발생시키기 위하여 세포배양용 플라스크에서 암세포가 포화상태에 이르기 전에 트립신 처리 (0.25% trypsin + 0.02% EDTA)하여 암세포를 추출한 후, 95% 이상의 활성을 보이는 세포부유액만을 이종이식에 사용하였다. 쏘디움 펜토바비탈 마취 (50 mg/kg, 복강내 주사) 후, 전이 절개선을 통하여 우측 이하선을 노출하고, 실험동물을 5군 (I-V군, 1군당 5마리)으로 나누어 각 군의 1마리당 5×10^6 , 5×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 개의 암세포를 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어있지 않은 Hanks 용액 (30 μl)에 부유액으로 만들어 30개이지 피하주사침으로 이하선에 주입하였다. 암세포 주입 후 절개선은 1개의 메탈 클립을 이용하여 봉합하였다. 암세포 주입 후, 1주에 2회씩 종양의 발생 유무와 종물의 성장, 그리고 체중의 변화를 조사하였다. 종물의 부피는 (종물의 장경) × (종물의 단경)² × π/6 으로 계산하였다¹²⁾.

6. 실험동물의 희생과 조직학적 검사

실험동물은 폐전이를 유도하기 위한 충분한 기간을 위하여 암세포 주입후 8주간 관찰 하였으며, 이 기간 중 발생된 종양의 장경이 20mm를 초과하거나 체중 감소가 암세포 주입 전의 20%에 이르면 이산화탄소를 이용하여 희생하였다. 8주 경과 후 모든 실험동물을 희생하고 이하선 종물, 경부 임파절, 전체 폐조직, 그리고 간조직을 제거하여 육안적으로 관찰하고 종양의 무게를 측정하였다. 헤마톡실린과 에오신 염색과 면역조직화학검사를 위하여 이하선 종물의 반은 4°C에서 10% 포르말린에 24시간 고정 후 파라핀에 매몰하고, 나머지 반은 면역형광염색을 위하여 OCT 화합물 (Miles, Inc., Elkhart, IN)에 매몰 후 액체질소를 이용하여 급속 냉각 후 -70°C에 보관하였다. 경부 임파절, 폐조직과 간조직 역시 전이 병소의 검색을 위하여 파라핀에 매몰하였다.

7. EGFR/pEGFR, VEGFR-2/pVEGFR-2에 대한 면역형광염색

냉동 조직을 8-10 μm 로 세절하여 슬라이드에 고정 후 공기를 이용하여 30분간 건조시켰다. 전술한 바와 같이 절편을 아세톤에 고정하고 일차항체를 결합시켰다. PBS 수세 후 다시 10분간 단백질 차단용액을 반응시키고 상온에서 빛을 차단한 채로 1시간 동안 Alexa 488 이차항체에 반응시켰다. PBS 수세 후 핵 대조염색을 위하여 2분간 Hoechst 염색 (1mg/ml)하고 다시 PBS 수세하였다. 건조 후 propyl gallate를 이용하여 커버 슬라이드 (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ)에 고정하였다. 면역형광 현미경은 HBO 100 수은램프와 녹, 적, 청 형광을 선택할 수 있는 필터 (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT)가 장착된 Nikon Microphot-FXA (Nikon Inc.) 현미경을 사용하였다. 화상은 CCD 카메라 (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ)와 Optimas 영상분석 소프트웨어를 이용하여 관찰하고 사진은 Adobe 포토샵 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA)으로 처리하였다.

8. EGF, TGF- α , VEGF, IL-8, MMP-9에 대한 면역조직화학염색

파라핀 포매 조직을 4-6 μm 로 세절하여 Superfrost 슬라이드 (Fisher Scientific Co., Houston, TX)에 고정하여 밤새 건조시켰다. 자일렌으로 파라핀을 제거하고 계열알코올로 탈수 후 PBS로 흡수시켰다. 항원성 노출 (antigen retrieval) 위하여 EGF를 위한 절편은 10 mM sodium citrate 완충액 (pH 6.0)에 담가 5분간 가열하였으며, VEGF와 IL-8을 위한 절편은 37°C에서 20분간 펩신 처리하였다. 또한 TGF- α 를 위한 절편은 goat antimouse IgG F(ab')₂ fragment (1:10 dilution in PBS)로 12시간 전처리하였다. 단백질 차단 후 PBS 수세하고 EGF (1:100), TGF- α (1:100), VEGF (1:500), IL-8 (1:50), MMP-9 (1:50) 일차항체를 4°C에서 밤새 결합시켰다. 이차항체의 결합은 간접과산화효소법 (indirect peroxidase technique)을 사용하였고, 양성반응을 가시화하기 위하여 슬라이드를 DAB에 5-10분간 적용 후 증류수로 수세하고, 헤마톡실린 대조염색 후 Universal Mount (Research Genetics)에 고정하였다. 음성대조 샘플은 이차항체만 적용하였다. 양성반응의 강도는 -, no staining; +, weak staining; ++, strong staining의 3단계로 나누어 비교, 분석하였다.

9. 이중 면역형광염색

종양관련 혈관내피세포 (tumor-associated endothelial cell)의 상태를 점검하기 위하여 CD31/VEGFR-2, CD31/pVEGFR-2, CD31/Akt, CD31/pAkt에 대한 이중 면역형광염색을 시행하였다. 먼저 냉동 조직을 이용하여 전술한 바와 같이 처리한 후 4°C에서 CD31 (1:400) 일차항체와 밤새 반응시켰다. PBS 수세 후 슬라이드를 Alexa Fluor 594 (적색 형광)에 결합된 이차항체 (1:600)에 상온에서 빛을 차단한 채로 1시간 반응시켰다. 이어서 PBS 수세 후 4°C에서 VEGFR-2 (1:200), pVEGFR-2 (1:400), Akt (1:100), 혹은 pAkt (1:100) 일차항체를 밤새 결합시켰다. PBS 수세 후 Alexa Fluor 594 (녹색 형광)에 결합된 이차항체 (1:400)에 상온에서 빛을 차단한 채로 1시간 배양하고 핵 대조염색을 위하여 2분간 Hoechst 염색 (1mg/ml) 하였다. 면역형광 현미경 술식은 전술한 바와 같다.

10. 통계적 분석

EGF, TGF- α , VEGF, IL-8, MMP-9에 대한 정상조직과 암조직에서의 면역조직화학염색적 양성반응의 강도에 대한 비교는 unpaired Student t test로 비교하였다.

III. 연구결과

1. 세포주에서 EGFR과 VEGFR-2의 발현

암세포를 chamber 슬라이드에 고정하여 직접 세포염색해 본 결과 인간 타액선 선양낭성암종 세포주는 EGFR과 VEGFR-2를 발현하였으며 또한 이들 인자들은 활성화되어 있었다 (Fig. 1). 웨스턴 블롯팅에서도 선양낭성암종 세포들은 EGFR과 VEGFR-2를 발현하였으며, 신호전달계에서 EGFR의 하부흐름 효과인자 (downstream effector) 들인 Akt와 MAPK를 발현하였고, 이들 인자들 또한 활성화되어 있었다 (Fig. 2).

2. 동위 이종이식시 종양의 유도과 전이

종양발생능이 강력한 B16-BL6 흑색종 세포주를 C57-BL/6 마우스에 주입 (1×10^6)한 결과 이하선 흑색종이 성공적으로 유도되었다 (Fig. 3A). 이후 ACC2를 5가지 희석률로 실험동물의 이하선에 동위 이종이식한 결과 이식 부위에서의 종양 발생률과 전이병소 발생률은 (Table 1)과 같았다. 암세포 주입시 암세포의 누출이 없는 성공적인 이하

Table 1. Tumorigenicity and Incidence of Regional and Distant Metastasis. Groups of 8-10-week Old Nude Mice were Inoculated Orthotopically in the Parotid Gland with the Indicated Numbers of Cells of the Human Parotid Gland Adenoid Cystic Carcinoma Cell Line, ACC2. Mice were Then Observed for Primary Tumor Formation and Metastasis.

group (no. ACC2 cells injected)	% mice with orthotopic tumors	% mice with regional metastasis	% mice with distant metastasis
I (5×10 ⁶)	100%	0	20%
II (5×10 ⁵)	100%	0	40%
III (1×10 ⁵)	60%	0	0
IV (5×10 ⁴)	60%	0	0
V (1×10 ⁴)	0	0	0

선내 주입은 수포 (bleb)의 형성으로 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 실험된 세포농도를 기준으로 5 × 10⁵개 이상의 암세포 주입시 이하선에서 100%의 종양 발생률을 보였다 (Fig. 3C). 세포농도에 따라 종양발생이 빠르게 진행되었으나 대부분의 이하선 종양은 세포주입 7-12일 후 관찰되었다. I군의 1개체에서 암세포 주입 후 7주만에 종양의 크기가 20mm이상으로 종양부하 (tumor burden)가 과도하여 희생하였으며 나머지 실험동물은 모두 8주 시점에서 희생하였다. 관찰기간 중 의미있는 체중의 감소는 감지되지 않아 본 세포주는 폐전이에도 불구하고 전신전인 영향은 그리 크지않은 것으로 추정하였다. 세포농도에 따른 종물의 크기는 희생 시 그 평균무게 (± 표준편차)가 I군 : 2.65 ± 0.82 g, II군 : 1.47 ± 0.54 g, III군 : 0.31 ± 0.25 g, IV군 : 0.34 ± 0.31 g 으로 세포농도가 높은 군 (I, II군)이 낮은 군 (III, IV군)에 비교하여 종양을 크게 형성하였다 (P<0.01, unpaired Student t-test). 세포주입 8주 후, 부검 (necropsy)시 높은 세포농도군 (I, II군)에서 악하임파절의 증식 소견이 관찰되었으나 (Fig. 3D) 조직학적 검사 결과 면역관련 세포들의 침윤만 관찰되었을 뿐 임파절에의 전이성 병소는 발견할 수 없었으며 간전이 병소 역시 관찰되지 않았다 (Fig. 3E). 반면에 폐전이 병소는 I군에서 20% (1/5), II군의 40% (2/5)에서 관찰되었다 (Fig. 3F).

3. 암세포에서 종양발생, 혈관형성, 전이 조절인자들의 발현

인간 선양낭성암종 세포를 누드 마우스에 이종이식하여 발생된 이하선 종물에서 EGF/VEGF 신호전달 물질을 비롯한 전이와 연관된 인자들 (VEGF, IL-8, MMP-9)의 발현을 검색하기 위하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 먼저 EGFR/pEGFR, VEGFR-2/pVEGFR-2 항체를 이용한 면역형광염색 결과 이하선 선세포 (acinar cell)나 분비관 세포 (ductal cell)에서는 EGFR만이 약하게 발현되었

으나 종양세포에서는 특히 EGFR이 강하게 발현되었을 뿐 아니라 활성화되어 있었고, VEGFR-2과 pVEGFR-2도 중등도로 발현되었다 (Fig. 4A). 면역조직화학염색에서 EGFR의 리간드인 EGF와 TGF- α 도 이하선 조직에서는 분비관 세포에서만 약하게 발현되었으나 종양세포의 세포질에서는 중등도 이상의 발현 양상을 보였다. 혈관형성 및 전이와 관련된 VEGF, IL-8, MMP-9이 모두 정상 이하선 세포에 비교하여 종양세포에서 강하게 발현되었다 (P<0.01). 특히 IL-8과 MMP-9이 강하게 발현되었으며, 이들 인자들은 이하선 분비관 세포에서도 강하게 발현되었다 (Fig. 4B).

4. 종양관련 혈관 내피세포의 증식성

실험적으로 유도된 종물 내의 혈관 내피세포의 증식성을 평가하기 위한 이중 면역형광염색 결과 선양암성낭종과 연관된 혈관 내피세포에는 VEGFR-2의 활성이 강하게 발현되었다. 또한 이들 종양관련 혈관 내피세포에는 세포증식 및 생존과 연관된 단백질 Akt가 발현되며 기능적으로도 활성화 되어 있어 이들 세포들이 증식성이 있음을 보여주었다 (Fig. 5).

IV. 총괄 및 고찰

분자 표적 치료 (targeted molecular therapy)란 악성종양의 표현형을 유지하는데 중요한 물질들을 표적으로 하는 치료방식을 말한다. 이같은 치료 접근을 통하여 종양의 성장과 혈관형성, 그리고 전이를 조절하는 성장인자 수용체 신호전달을 차단할 수 있다. 대부분의 상피성 악성종양에서 두가지 중요한 표적은 종양성장과 혈관형성과 연관된 신호전달계이다^{13,14}. 본 연구를 시작하기 위하여 저자는 우선 인간의 이하선 선양낭성암종에서 확립된 세포주에서 혈관형성을 포함한 다양한 기전을 통해 암세포의 생존과 전이성을 증가시키는 EGFR/VEGFR-2의 존재여부를 결정하였다.

면역세포화학 및 웨스턴 블롯팅 결과 선양낭성암종 암세포에 이들 수용체가 모두 발현되며 또한 기능적으로도 활성화되어 있었을 뿐만 아니라 이들 수용체의 신호전달계에서 중요한 인자인^{15,16)} Akt와 MAPK 역시 활성화되어 있었다.

본 연구에서 저자는 인간의 이하선 선양낭성암종에서 확립된 암세포를 실험동물의 같은 장기인 이하선에 주입하여 종물을 유도해 냄으로써 이하선 암종에 대한 동위종양 모델(orthotopic tumor model)을 개발하였다. 효과적인 항암 치료제의 개발과 검증을 위해서는 임상실험 전단계에서 그 치료효과를 객관적으로 평가할 수 있는 적절한 동물모델이 필요하다. 암연구에서 지금까지 대부분의 동물모델은 면역 결핍 마우스에 대한 피하 종양모델이었다. 그러나 피하조직의 미세환경(microenvironment)은 종양이 기원된 조직의 그것과는 완전히 다르다^{17,18)}. 미세환경의 차이는 종양에 대한 생물학적 반응의 차이를 의미하며 실제로 약물반응에 있어 같은 암세포라도 피하종양과 동위종양은 현저한 차이를 보이는 것으로 보고되었다^{19,20)}. 피하종양 모델의 또 다른 문제점은 마우스에서 기관 전이가 매우 드물 뿐 아니라 전이 방식이 인간의 종양과는 다르다는 점이다²¹⁾. 반면에 동위종양 모델에서는 인간종양의 전이과정이 재현 가능할 뿐 아니라 이 과정을 통해서 보다 전이성이 높은 암세포 군을 선택할 수 있다²²⁾.

본 연구에서 대상이 된 이하선 선양낭성암종의 임상적 특징 중 하나는 전이가 주로 혈관성으로 야기되며, 특히 폐전이 빈번하다는 것이다. 임파절 전이는 드물며 존재한다 하여도 혈전성 전이라기 보다는 임파절로의 종양의 직접적인 침투의 결과인 경우가 많다²³⁾. 본 실험에서도 암세포의 이하선 주입 후 8주 시점에서 폐전이는 발생하였으나 임파절에는 면역세포의 대상성 과증식 소견만이 관찰되었으며, 암세포의 직접적인 전이는 없었다. 따라서 인간종양의 파급양상을 생물학적으로 모사한 이 동물모델을 통하여 폐전이 치료전략을 계획, 평가할 수 있을 것이다.

본 실험에 이용된 세포주는 조직학적으로 tubular-cribriform의 복합형 선양낭성암종으로부터 확립 되었으나, 이종이식 후 발생된 종양은 이에 상응하는 조직학적 구조물들을 보이지 않았는데 이는 플라스크에서 계대 배양되는 동안 암세포의 표현형이 변화되었기 때문이라고 추정하였다. 이종이식을 통하여 유도된 동위종양에 대한 면역조직화학염색 결과 암세포에서 EGFR/VEGFR과 함께 이들 수용체의 리간드들이 같이 발현되었다. 대부분의 상피성 악성종양에서 EGF/EGFR의 과발현은 불량한 예후와 연관되어 있어²⁴⁾ 이들 인자들이 상피성 악성종양의 진전에 결정적 요인임을 암시한다. 이는 특히 EGFR 신호전달계가 혈관형성 기전과도 연관이 있기 때문인데, EGF와 TGF- α 가 VEGF의 생성을 증가시키고^{25,26)}, 유방암 환자에서 TGF- α 와 EGFR의 발현과 미세혈관밀도(microvessel density) 사이에 양의 상

관관계가 있음이 보고되었다²⁷⁾. 암세포의 종류에 따라서 VEGF 신호전달 물질들의 발현 역시 종양 전이능의 한 지표인 미세혈관밀도와 밀접한 관련이 있으며, VEGF의 과발현은 종양의 재발과 원위 전이, 그리고 불량한 환자생존율과 연관이 있는 것으로 여겨진다^{28,29)}.

Vered 등은 34례의 선양낭성암종 수술표본에 대한 면역조직화학염색을 통하여 68%의 표본에서 암세포들이 EGFR을 발현함을 보고한 바 있다³⁰⁾. Ishibashi 등은 VEGF와 bFGF(basic fibroblast growth factor)가 타액선 종양의 주 혈관형성 인자라고 하였고³¹⁾, Yu 등은 VEGF의 발현정도와 미세혈관밀도(microvessel density)를 침샘 선양낭성암종의 원위 전이에 대한 예후인자라고 보고하였다³²⁾. 본 실험과 타 연구 결과들을 종합하여 보면 이들 성장인자 수용체 타이로신 키나제들이 암세포와 종양관련 혈관내피세포의 증식을 유도하는 유사분열인자로서 자가분비적으로, 중요한 종양생물학적 역할을 수행함을 알 수 있다. 따라서 EGFR/VEGFR은 침샘 선양낭성암종의 치료 전략상 중요한 표적이 될 수 있는 바, 최근 두경부 편평상피세포암의 치료에는 이미 EGFR 차단제들이 임상적으로 평가되고 있는 단계에 이르렀다^{33,34)}.

악성종양의 신생혈관형성은 VEGF 외에도 IL-8, MMP-9과 같은 양성 조절인자들에 의해서도 증가되는 것으로 알려져 있다^{35,36)}. IL-8은 원래 호중구에 대한 화학적 유인인자로 기술되었으나, 이후의 연구에서 흑색종 등의 악성종양의 상장인자이며 신생혈관을 유도하고, 콜라젠 분해효소의 분비를 조절하는 것이 밝혀졌다³⁷⁾. MMP-9의 발현 역시 혈관내피세포의 기저막을 구성하는 IV형 콜라젠을 포함한 각종 세포외 기질단백을 가수분해하는 기능으로 암세포의 침투성과 연관되어 있다. 또한 MMP-9은 세포외 기질로 혈관형성 전구물질을 분비함으로 최근의 연구에 의하면 혈관이 잠복기에서 혈관형성기로 전환되는 과정에는 MMP-9이 연관됨이 보고되었다³⁸⁾. 이는 IL-8과 이 MMP-9이 종양 환경을 변화시킴을 의미하며, 세포의 증식과 혈관형성, 이주성, 침투성이 모두 악성종양의 전이과정에 중요한 단계임으로 암세포에서 이들 인자들의 발현은 해당 암세포의 전이 능력에 영향을 미칠 수 있다. 본 실험결과 IL-8과 이 MMP-9이 이종이식된 선양낭성암종의 종양세포에서 발현되었다. 이들 인자들과 이중 면역화학염색에서 검증된 종양관련 혈관내피세포의 증식성이 본 실험에서 유도된 선양낭성암종의 폐전이율에 영향을 미쳤음을 추론하였다.

V. 결 론

본 연구에서 저자는 인간 침샘의 선양낭성암종 세포주와 이를 누드 마우스에 이종이식하여 유도된 타액선 종물에서 암세포 증식 및 혈관형성 관련인자인 EGF/VEGF가 발현

되고, EGFR/VEGFR-2가 활성화되어 있음을 보고하는 바이다. 또한 본 연구를 통하여 IL-8과 MMP-9이 타액선 암종의 혈관성 원위 전이에 중요한 역할을 함을 실험적으로 제시하였고 유도된 종물 내의 혈관내피세포의 증식성을 검증하였다. 향후 본 연구에서 확인된, 침샘 선양낭성암종의 성장과 전이에 중요한 인자들을 억제하여 그 효과를 평가하는 치료연구가 이루어져야 할 것이며 동시에 선양낭성암종의 종양생물학적 특징인 폐전이 병소의 동물모델을 개발하기 위해 본 암세포주로부터 연속적인 생체 계대접종 (in vivo passage)을 통해 폐전이 세포주를 확립하는 것이 중요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Spiro RH : Salivary neoplasms, overview of a 35 year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 8 : 177, 1986.
2. Fordice J, Kershaw C, El-Naggar et al : Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125 : 149, 1999.
3. Airoidi M, Fornari G, Pedani F et al : Paclitaxel and carboplatin for recurrent salivary gland malignancies. *Anticancer Res* 20(5C) : 3781, 2000.
4. Rusch V : Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 3 : 515, 1997.
5. Khazaie K, Schirmacher V, Lichtner RB : EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12 : 255, 1993.
6. Radinsky R, Risin S, Fan D et al : Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1 : 19, 1995.
7. Kawashima M : Chemoradiotherapy for head and neck cancer: current status and perspectives. *Int J Clin Oncol* 9 : 421, 2004.
8. Holsinger FC, Doan DD, Jasser SA, et al. Epidermal growth factor receptor blockade potentiates apoptosis mediated by paclitaxel and leads to prolonged survival in a murine model of oral cancer. *Clin Cancer Res* 9 : 3183-9, 2003.
9. Esser S, Wolburg K, Wolburg H et al : Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140 : 947, 1998.
10. Ferrara N, Houck K, Jakeman L et al : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13 : 18, 1992.
11. Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, et al. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 775-82.
12. Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D et al : Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 64 : 7977, 2004.
13. Ang KK, Andratschke NH, Milas L : Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 : 959, 2004.
14. Bowden J, Brennan PA, Umar T et al : Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol* 29 : 585, 2002.
15. Craven RJ, Lightfoot H, Cance WG : A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol* 12 : 39, 2003.
16. Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Mandal M et al : Suppression of epidermal growth factor receptor, mitogen-activated protein kinase, and Pak1 pathway and invasiveness of human cutaneous squamous cancer cells by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Mol Cancer Ther* 2 : 345, 2003.
17. Fidler IJ : Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 5 : 29, 1986.
18. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ : Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metas Rev* 17 : 279, 1999.
19. Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A et al : Modulation of tumor cell reponse to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 13 : 209, 1994.
20. Dong Z, Radinsky R, Fan D et al : Organ-specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon carcinoma cell line. *J Natl Cancer Inst* 86 : 913, 1994.
21. Kubota T : Metastatic models of human cancer xenografted in mice: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 56 : 4, 1994.
22. Fu XY, Theodorescu D, Kerbel RS et al : Extensive multi-organ metastasis following orthotopic implantation of histologically-intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. *Int J Cancer* 49 : 938, 1991.
23. Spiro RH : Salivary neoplasms, overview of a 35 year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 8 : 177, 1986.
24. Herbst RS, Langer CJ : Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol* 29 : 27, 2002.
25. Goldman CK : Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4 : 121, 1993.
26. Gille J, Swerlick RA, Caughman SW : Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *Embo J* 16 : 750, 1997.
27. de Jong JS : Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 184 : 53, 1998.
28. Neuchrist C, Quint C, Pammer A et al : Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol* 119 : 732, 1999.
29. Obermair A, Kohlberger P, Bancher-Todesca D et al : Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 63 : 204, 1996.
30. Vered M, Braunstein E, Buchner A : Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck* 24 :

- 632, 2002.
31. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K et al : Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol* 37 : 77, 2001.
 32. Yu F, Jiang XZ, Chen WT et al : Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 12 : 443, 2003.
 33. Baselga J, Rischin D, Ranson M et al : Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol* 20 : 4292, 2002.
 34. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM et al : Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 21 : 1980, 2003.
 35. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL et al : Interleukin-8 as a macrophage derived mediator of angiogenesis. *Science* 258 : 1798, 1992.
 36. Chang C, Werb Z : The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biol* 11 : S37, 2001.
 37. Luca M, Huang S, Gershenwald JE et al : Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol* 151 : 41, 1997.
 38. Bergers G, Brekken R, McMahon G et al : Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2 : 737, 2000.

저자 연락처

우편번호 210-702
강원도 강릉시 강릉대학교로 120번지
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
박영욱

원고 접수일 2004년 10월 12일
게재 확정일 2005년 2월 2일

Reprint Requests

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University
120 Gangneung Daehangno, Gangneung City Gangwon Province, 210-702, Korea
Tel : +82-33-640-3183 Fax : +82-33-642-6410
E-mail : ywpark@kangnung.ac.kr

Paper received 12 October 2004
Paper accepted 2 February 2005

사진부도 ①

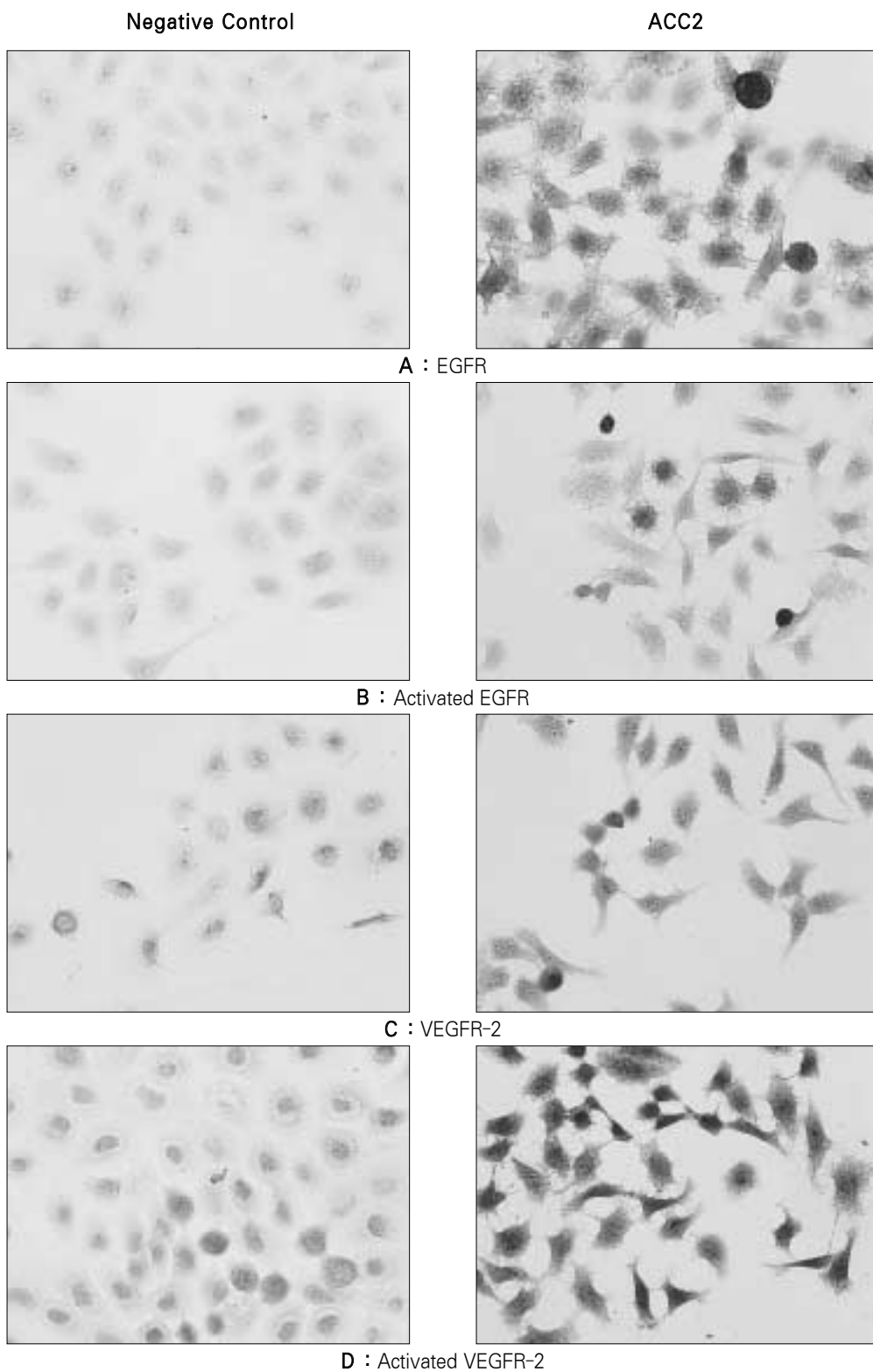


Fig. 1. Immunocytochemical analyses of the chamber slides in human salivary adenoid cystic carcinoma cells. ACC2 cells were immunostained for the expression of EGFR, Activated EGFR, VEGFR-2 and Activated VEGFR-2. Representative results are shown. Original magnification, $\times 200$.

사진부도 ②

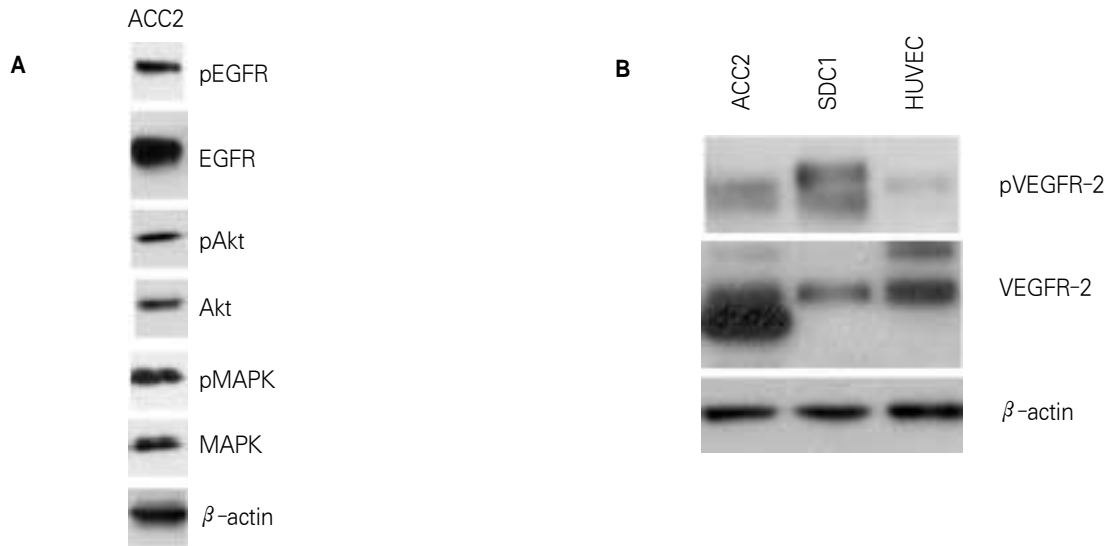


Fig. 2. Protein expression in a human salivary adenoid cystic carcinoma cell line. Whole cell lysates were prepared from subconfluent ACC2 cells. Proteins were resolved on SDS-PAGE (A : 10%, B : 7.5%) gels, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed by Western blotting using anti-phospho-EGFR (Tyr1068), anti-phospho-VEGFR-2 (Tyr1054), anti-phospho-Akt (Ser473), or anti-phospho-MAPK (Thr202/Tyr204) antibody. Membranes were reprobred with anti-EGFR, anti-VEGFR-2, anti-Akt, anti-MAPK, or anti-actin as loading controls. Each assay was performed in triplicate independently with similar results.

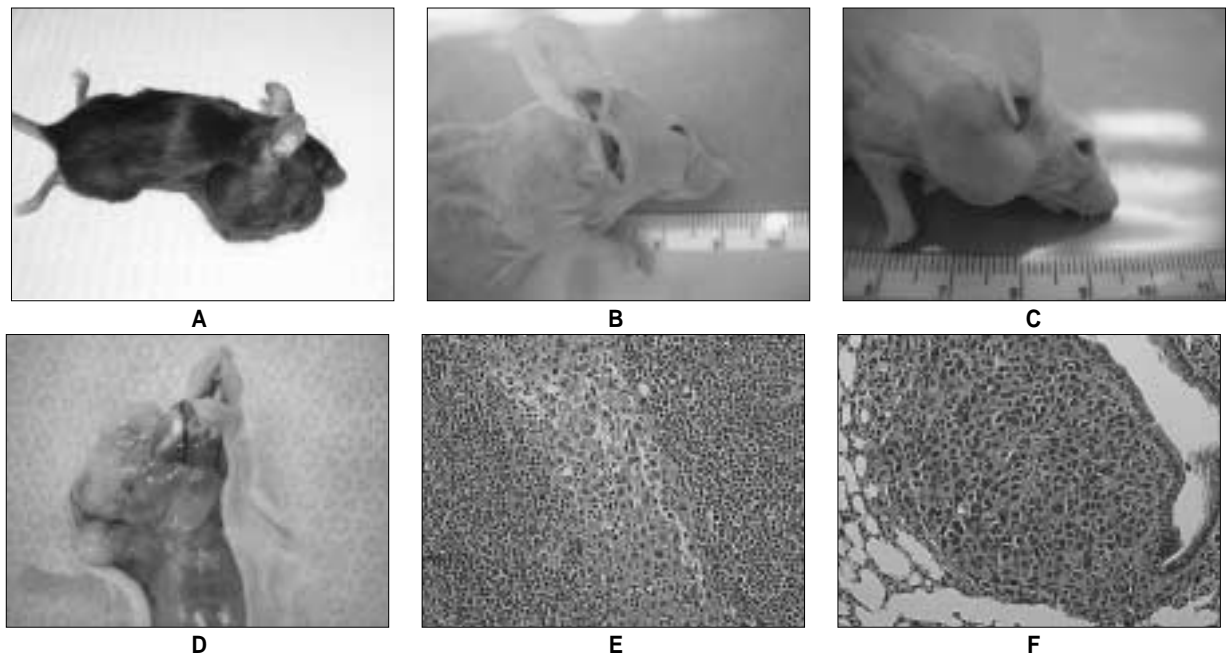


Fig. 3.

- A : Successful induction of B16-BL6 melanoma in the parotid gland of C57BL/6 black mouse.
- B : Orthotopic implantaion of ACC2 cell suspension into the parotid gland. A well-localized bleb confirmed a successful injection without leakage of the tumor cells.
- C : The primary tumor in the parotid gland of nude mouse is readily apparent.
- D : Dissected view of the orthotopic parotid tumor and hyperplasia of cervical lymph nodes.
- E : Microscopic examination revealed immune-related inflammatory cells such as plasma cells and neutrophils were infiltrated into the cervical lymph nodes (H&E, \times 100).
- F : Photomicrograph of a lung from a nude mouse in which the ACC2 cells were grown orthotopically, revealing distant metastatic tumor (H&E, \times 100).

사진부도 ③

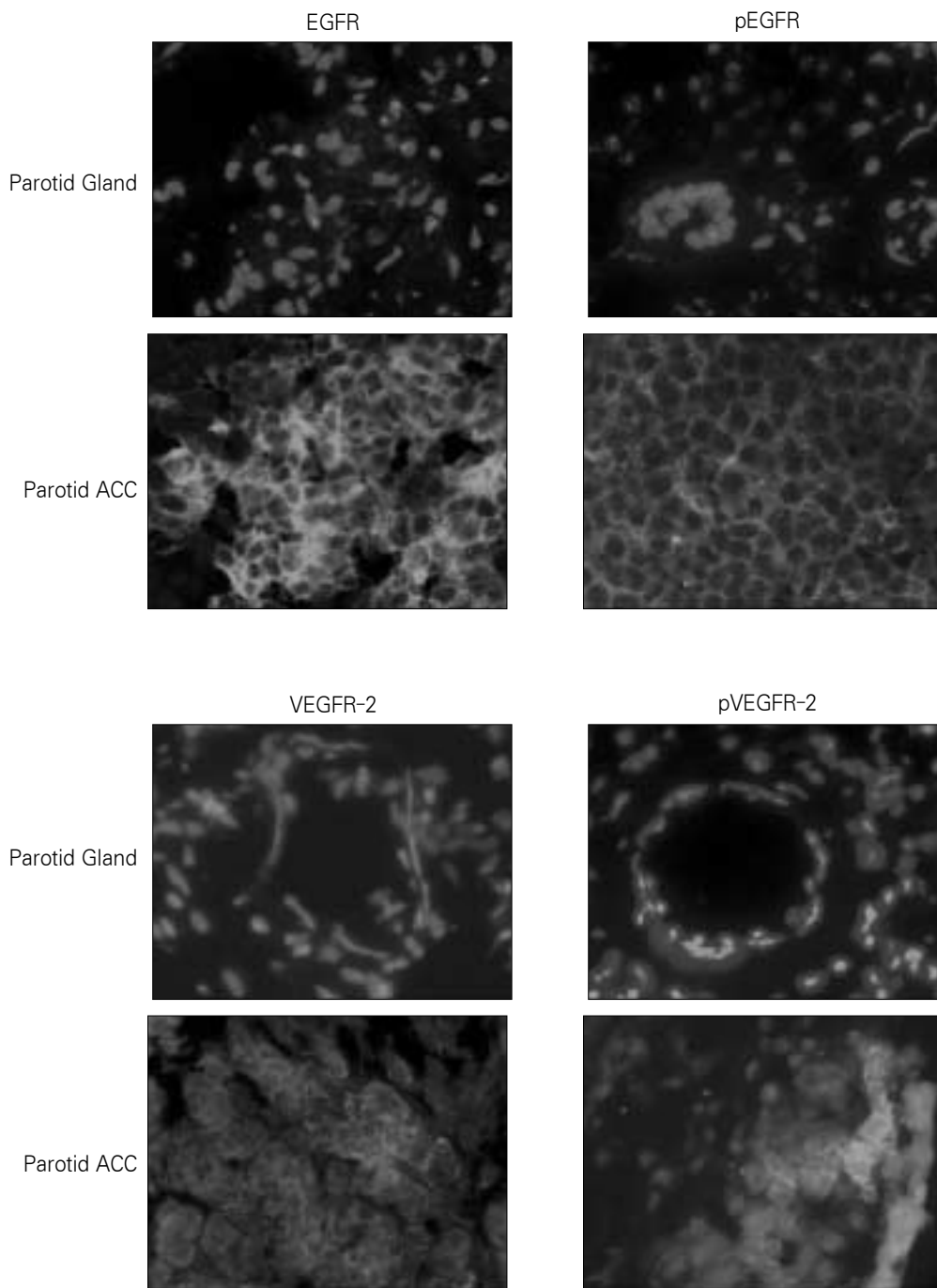


Fig. 4A. Immunofluorescent and immunohistochemical analyses of ACC2 orthotopic parotid tumors. Tumors were harvested and processed for immunohistochemical analysis 64 days after inoculation of tumor cells.

A : Tumor cells expressed EGFR, phosphorylated (indicated as "p") EGFR, VEGFR-2, and pVEGFR-2. However, normal parotid tissues did not express these biomarkers. shown. Original magnification, $\times 200$.

사진부도 ④

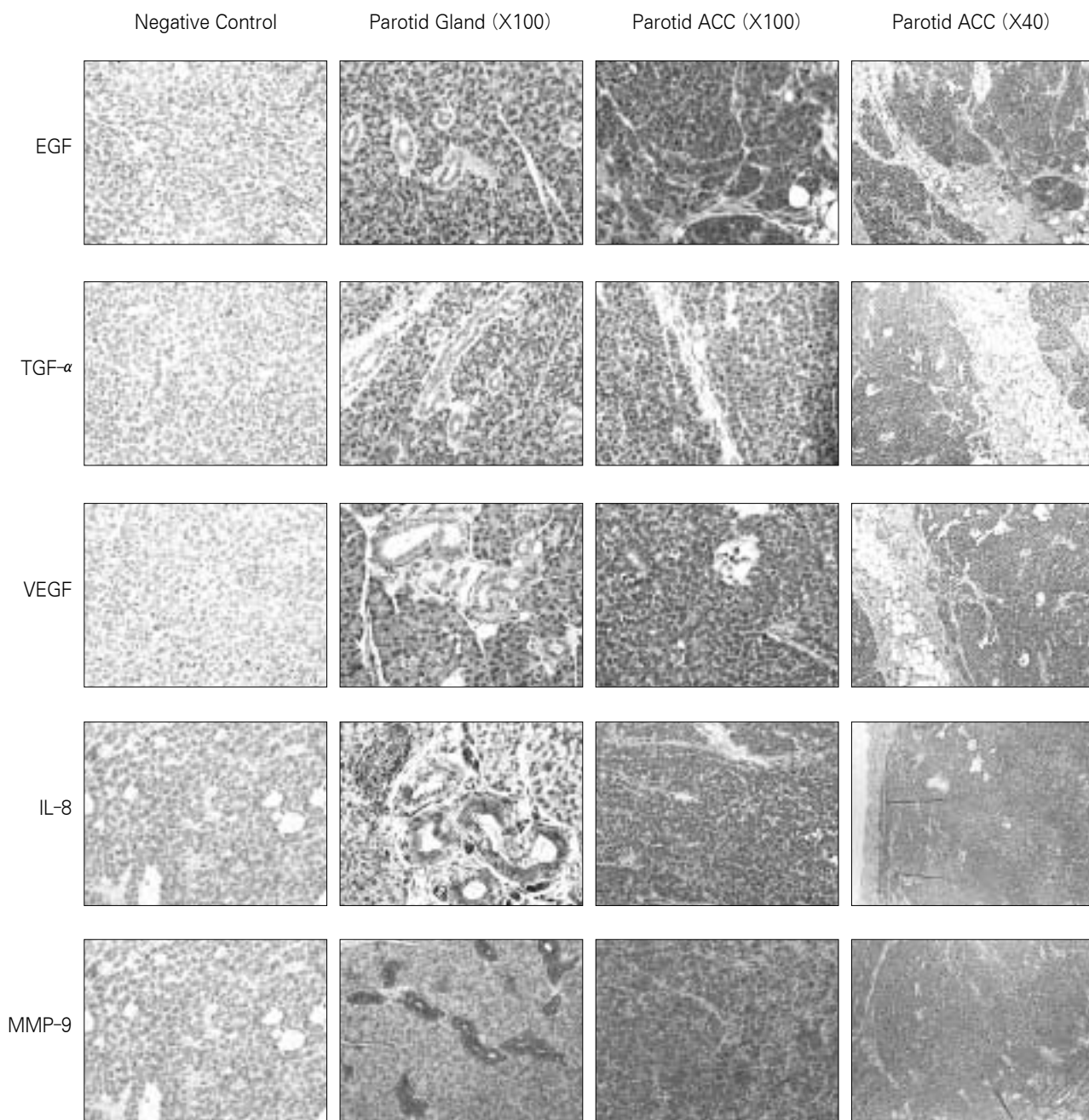


Fig. 4B. Immunofluorescent and immunohistochemical analyses of ACC2 orthotopic parotid tumors. Tumors were harvested and processed for immunohistochemical analysis 64 days after inoculation of tumor cells. B : Sections were immunostained for expression of EGF, TGF- α (ligands of EGFR), VEGF (ligand of VEGFR-2), and IL-8, MMP-9 (angiogenic factors). Compared with acinar cells and ductal cells of the parotid glands, tumor cells showed increased expression of these biomarkers. shown. Original magnification, $\times 100$. Each assay was done twice independently with similar results.

사진부도 ⑤

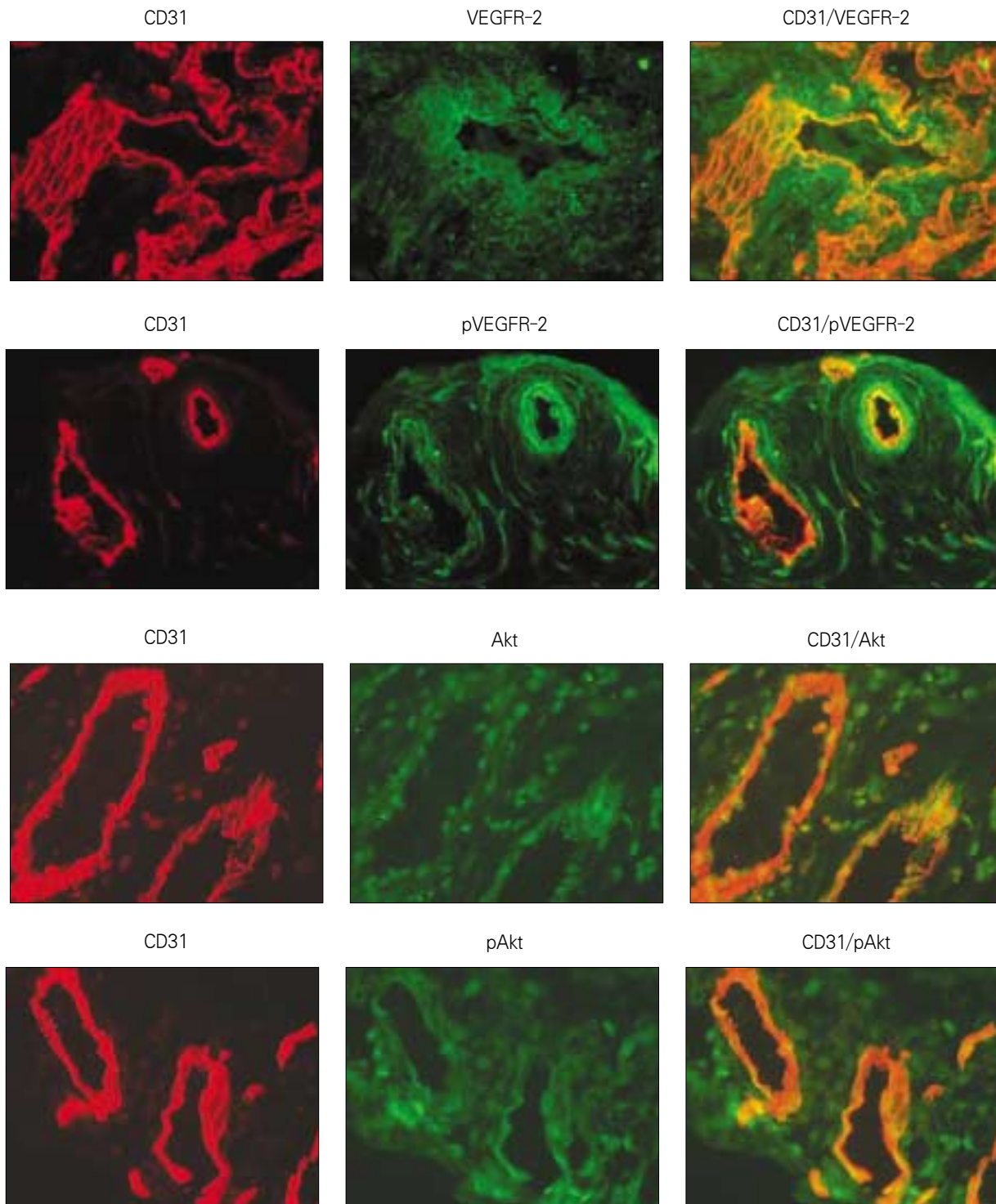


Fig. 5. Immunofluorescent double staining for CD31 (red signal) plus VEGFR-2, phosphorylated (indicated as "p") VEGFR-2, Akt, or pAkt (green signal) was performed. Endothelial cells within the tumors expressed these proteins (yellow). Representative results were shown. Original magnification, $\times 200$.