

구강점막 편평상피세포암에서 림프관형성 유전자 발현

박영욱 · 김성곤 · 김소희* · 김한석** · 김민근***

강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, *약리학교실, **울산의과대학교 강릉아산병원, ***국군 강릉병원 치과

Abstract

GENE EXPRESSION FOR LYMPHANGIOGENIC FACTORS IN ORAL MUCOSAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Young-Wook Park, Seong-Gon Kim, So-Hee Kim*, Han-Seok Kim**, Min-Keun Kim***

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery and *Department of Pharmacology, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, **Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Gangneung Asan Hospital, University of Ulsan College of Medicine, ***Department of Dentistry, The Armed Forces Gangneung Hospital*

Background and Purpose: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D and their tyrosine kinase receptor, VEGF receptor (VEGFR)-3 are recently known to have lymphangiogenic activities in various tumor types. Oral mucosal squamous cell carcinoma (OMSCC) easily metastasizes to cervical lymph nodes, so we determined the expression levels of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in oral squamous cell carcinoma.

Materials and Methods: We performed Western blot analyses with 4 OMSCC cultured tumor cell lines (SCC9, KB, YD-10B, YD-38), and with 7 surgical specimens of OMSCC for the detection of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 proteins. Expression of VEGF-C mRNA as well as mRNA for VEGFR-3 in 4 OMSCC cell lines (KB, SCC-4, SCC-9, YD-10B) was investigated by RT-PCR. We also measured VEGF-C/VEGF-D protein concentrations in the media and protein concentration of VEGFR-3 in cell lysates of 4 OMSCC cell lines (SCC9, KB, YD-10B, YD-38) using commercial ELISA kits. Finally, we performed immunoprecipitation for the detection of VEGF-C in cell lysates of 4 OMSCC cells (KB, SCC-4, SCC-9, YD-10B) and real-time RT-PCR for the quantification of VEGF-C mRNA.

Results: In the result of Western blotting with cell lysates of 4 OMSCC cells, we could not detect the protein expression of VEGF-C, VEGF-D, and VEGFR-3. But, all tumor tissues demonstrated VEGF-C and VEGFR-3. VEGF-C mRNA was detected at various levels in 4 OMSCC cell lines. Moreover, OMSCC cells secreted VEGF-C, not VEGF-D and VEGFR-3 was also detected in cell lysates of OMSCC by ELISA. Immunoprecipitation and real-time RT-PCR revealed VEGF-C was also expressed in 4 OMSCC cell lines.

Conclusion: Taken together, tumor cells of OMSCC secrete VEGF-C, not VEGF-D. And VEGFR-3 is expressed tumor cells as well as OMSCC tumor tissues, needs further study.

Key words: VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3, Oral mucosal squamous cell carcinoma

I. 서 론

인체내 림프관의 주 기능은 간질액 양 (interstitial fluid volume)의 조절과 식이 지방의 흡수 기능으로 이를 위하여

조직학적으로 통합되어 있으며, 추가적인 림프계의 중요한 기능은 면역능의 보유와 종양세포의 파급에 있어서 중요한 역할을 한다는 것이다.¹⁾ 16세기에 프랑스의 외과의사인 Le Dran은 유방암이 액와 림프절로 파급될 경우 그렇지 않은

* This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (A080293)

경우보다 환자의 수명이 감소함을 처음으로 인식한 바 있으며, 1990년대에는 특정 종양에 있어 lymphatic drainage를 예측할 수 있다는 즉, 림프계 내에서 종양세포의 파급이 순차적으로 이루어진다는 소위 "sentinal lymph nodes"의 개념이 확립되면서²⁾ 악성종물의 종양세포가 림프계를 통해 파급된다는 사실이 입증되었다.

구강점막 편평상피세포암 (oral mucosal squamous cell carcinoma, OMSCC) 역시 타 두경부 편평상피세포암과 마찬가지로 대부분의 임상례들에서 국소 림프절 전이가 잘 되는 것으로 알려져 있다.³⁾ 뿐만 아니라 구강암에 대한 치료실패의 가장 큰 영향을 미치는 인자는 경부임파절 전이병소의 존재로 보고될만큼⁴⁾ 림프절 전이와 환자 생존율과는 역의 상관관계가 인정되고 있다. 즉 수술기법과 방사선 치료학의 비약적인 발전에도 불구하고 경부 임파절 전이병소가 존재하는 3-4기 구강 편평상피세포암에 대한 5년 생존율은 지난 수십년간 50-55%에서 향상되지 않고 있다.⁵⁾ 그러나 OMSCC의 경부 경부 림프절 국소전이의 분자생물학적 기전은 아직도 완전히 밝혀지거나 이해되지 못하고 있어 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

최근 분자생물학의 발달에 따라 림프관을 확인할 수 있는 lymphatic-specific molecular markers가 확인되면서 많은 악성종양의 전이에서 림프계의 역할이 결정적임이 재차 검증되고 있다. 대표적인 림프관 성장 인자는 VEGF (vascular endothelial growth factor)-C, VEGF-D와 VEGF receptor (VEGFR)-3이다. VEGFR-3 (flt-4)는 배아의 혈관 발달에 관여하며, 악성 종물 내에서 종양관련 혈관과 림프관 형성에 모두 관여하는 것으로 알려져 있으나 림프관 내피세포에 우세하게 발현되는 것으로 알려지고 있다.⁶⁾ 즉 세포막 수용체인 VEGFR-3의 주 리간드인 VEGF-C에 의해 활성화된 VEGFR-3는 림프관과 혈관의 성장을 유도하며, 그 결과 종양의 성장과 전이를 유도하는 것으로 밝혀졌다.⁷⁾ 기존의 연구에 의하면 VEGFR-3 경로 (signaling)를 억제할 경우 종양관련 림프관형성 (tumor lymphangiogenesis) 과정이 저하되며 국소림프절 전이가 감소한다고 보고된 바 있다.⁸⁾ 또한 최근의 연구들에 의하면 VEGFR-3의 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D가 종양관련 림프관형성과 림프관성 전이 (lymphatic metastasis)를 촉진한다고 보고되었다.^{9,10)} 많은 연구결과들을 종합하여 볼 때 악성종양 관련 신생 림프관과 림프관형성 성장인자가 난소암, 폐암, 전립선암, 유방암, 위암 등 많은 인간암종에서 prognostic significance가 있고, 악성종양의 전이와 환자의 임상적 결과와 밀접한 관련이 있음은 분명하다.¹¹⁻¹⁵⁾

위와 같은 배경에서 본 연구진은 임상적으로 경부 림프절 전이가 빈번한 구강점막 편평상피세포암에서도 림프관형성 성장인자인 VEGF-C, D와 VEGFR-3가 발현될 것이라는 가설을 설정하였다. 따라서 본 연구의 목적은 OMSCC에서

VEGF-C, VEGF-D, 그리고 그 수용체인 VEGFR-3의 발현여부를 제시하는데 있다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 세포주 및 세포배양

인간 구강 편평상피세포암종으로부터 확립된 세포주 5종 (KB, YD-10B, YD-38, SCC4, SCC9)과 일차배양한 치주인대 세포주 1종 (PDL)이 본 실험에 이용되었다. KB (KCLB No. 10017)와 YD-10B (KCLB No. 60503) 및 YD-38 (KCLB No. 60508) 세포주는 한국세포주 은행 (Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, SCC4, SCC9 및 PDL 세포주는 한림대학교 의과대학의 김성곤 교수로부터 분주받았다. KB와 PDL 세포주는 10% 우태혈청 (fetal bovine albumin, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 100 units/ml penicillin (Invitrogen) 및 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen)을 사용하여 배양하였다. 또한 SCC4와 SCC9 세포주는 DMEM/F-12 HAM 배지 (1:1, v/v, Invitrogen)를 사용하였으며, YD-10B 및 YD-38 세포주는 10% 우태혈청, 1×10^{-5} M chlorea toxin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 mg/ml insulin (Green Cross Corp., Seoul, Korea), 100 units/ml penicillin (Invitrogen) 및 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen)이 함유된 DMEM 배지를 사용하였다. 모든 세포주들은 단일층으로 배양하였고, 세포들은 55% 습도를 유지하면서 5% CO₂, 95% 공기 상태로 37°C에서 유지되었다.

2. 세포주에서의 면역화학적 분석 (Immunoblot Analysis)

SCC9, KB, YD-10B 그리고 YD-38 세포를 solubilization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% (w/v) NP-40, 0.1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 및 10 µg/mL aprotinin)에 용해시킨 후 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 cell debris를 제거하고 상등액만 모아 BCA (Sigma) 시약으로 단백질 정량하였다. 20-30 µg의 단백질을 7.5% (w/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, U.S.A.)에 옮겼다. 5% (w/v) 탈지분유와 0.05% (v/v) Tween-20이 함유된 phosphate-buffered saline (PBST) 용액에 membrane을 담그고 상온에서 2시간 blocking한

후 1차 항체로 polyclonal anti-human VEGFR-3와 VEGF-C, VEGF-D (Abcam, Cambridge, UK)를 5% bovine serum albumin (Sigma)가 함유된 PBST에 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 밤새 결합시켰다. 이때 anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.)를 내부 표준 단백질로 사용하였다. Horseradish peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 결합시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK)를 사용하여 VEGFR-3와 VEGF-C, VEGF-D 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

3. 인간암 종물에서의 면역화학적 분석 (Immunoblot Analysis)

이 실험에 이용된 인간 구강암 종물은 강릉·원주대학교 치과병원에서 절제된 7명의 구강점막 편평상피세포암과 대조 병소로 1명의 타액선 점액성유상피암종 (mucoepidermoid carcinoma), 1명의 범랑아세포종, 그리고 1명의 치성각화낭종으로 이루어져 있다 (Table 1). 대상이 된 모든 환자는 수술 전에 방사선 치료나 항암화학요법에 의한 치료를 받은 적이 없었다. 광범위 절제된 종물의 일부를 떼어

-70°C에 보관되었던 종양조직을 homogenizer (T 10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA KOREA, Germany)를 이용하여 분쇄 후 웨스턴 블롯팅을 전술한 바와 같이 시행하였다. 단, VEGF-C와 β -actin에 대한 일차항체는 Santa Cruz Biotechnology사의 제품을, VEGFR-3에 대한 일차항체는 Novus Biologicals사 제품을 사용하였다. 또한 단백질 분리를 위하여 10% SDS-polyacrylamide gel을 적용하였다.

4. 역전사효소-PCR (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR)

RT-PCR을 위하여 본 실험에 적용된 primer는 문헌을 참고하여^{16,17)} 다음과 같이 디자인하였다 (Table 2).

4종의 구강편평상피암종 세포주 (KB, SCC-4, SCC-9, YD-10B)에서 total RNA를 추출하였고, 양성 대조군으로 VEGF-C를 발현하는 일차배양한 치주인대 세포주를 사용하였다.¹⁸⁾ 추출한 total RNA에서 cDNA를 합성한 다음에 VEGF-C, VEGFR-3 및 GAPDH에 대한 PCR를 시행하였다. 각 실험에 사용된 PCR 조건은 참고문헌과 동일하다. 요약하면 VEGFR-3의 경우 94°C에서 2분간 변성시킨 다음에 60°C에서 2분간 annealing하고 72°C에서 3분간 합성시킨 다음에 94°C에서 1분간 변성시키는 것을 30회 반복하고 맨 마지막 cycle에 72°C에서 7분간 합성시간을 주

Table 1. Patients characteristics

Number (Date of operation)	Age / Sex	Location	Pathology
1 (2004. 10. 1)	29 / F	posterior mandible	ameloblastoma
2 (2000. 9. 18)	64 / M	palate	SCC
3 (2008. 3. 25)	66 / M	tongue	SCC
4 (2006. 7. 20)	74 / M	buccal mucosa	SCC
5 (2008. 6. 2)	63 / F	mouth floor	mucoepidermoid carcinoma
6 (2009. 2. 17)	64 / M	tongue	SCC
7 (2008. 8. 25)	72 / F	gingiva	SCC
8 (2004. 9. 6)	28 / M	anterior maxilla	odontogenic keratocyst
9 (2002. 5. 21)	60 / F	edentulous alveolar mucosa	SCC
10 (2004. 9. 1)	71 / M	edentulous alveolar mucosa	SCC

Table 2. Specific primers for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence	Product size, bp
VEGF-C	forward	TCAAGGACAGAAGAGACTATAAAAATTTGC	137
	reverse	ACTCCAAACTCCTTCCCCACAT	
VEGFR3	forward	CCCACGCAGACATCAAGACG	380
	reverse	TGCAGAACTCCACGATCACC	
GAPDH	forward	AGGACTCATGACCACAGTCCAT	430
	reverse	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT	

었다. VEGF-C의 경우 92°C에서 5분간 초기변성을 시킨 다음에 92°C에서 20초, 62°C에서 1분간 합성하는 것을 30회 돌리고 맨 마지막에 72°C에서 10분간 합성시간을 주었다. GAPDH의 경우 VEGF-C와 동일한 조건에서 PCR을 수행하였다.

5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4종의 구강편평상피암종 세포주 (KB, SCC-9, YD-10B, YD-38) 세포배양 배지에서 VEGF-C와 VEGF-D 분비여부 및 단백 농도를 측정하기 위하여 1×10^6 세포를 6 well plate에 세포배양 배지 1 ml와 함께 24시간 배양 후 배지를 모아 4°C에서 원심분리한 후 상등액을 VEGF-C 및 VEGF-D ELISA 키트 (Quantikine®, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조사 방법에 따라 측정하였다. 또한 VEGF-C와 VEGF-D 측정을 위해 배지를 제거하고 남은 각 세포에 용해 완충액 (solubilization buffer)에 용해시킨 후 15,000 rpm에서 5분간 4°C에서 원심 분리하여 cell debris를 제거하고 상등액을 모아 BCA (Sigma, St. Louis, MO, USA)시약으로 세포내 총 단백질의 양을 정량하였다. VEGFR-3 세포내 단백질 농도를 측정하기 위하여 앞서 측정된 세포내 총 단백질 20-40 µg을 100 µl로 희석하여 VEGFR-3 ELISA 키트 (DuoSet® IC, R&D Systems)를 이용하여 제조사 방법에 따라 측정하였다.

6. 면역침강 (Immunoprecipitation)

VEGF-C에 대한 immunoprecipitation을 위하여 각 종양 세포주를 6-well plates에서 배양하였다. 세포가 충분히 배양되면 PBS/sodium orthovanadate (NaVi 10 mM)로 세척한 후에 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X, 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol, 25 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM NaVi, 및 protease inhibitors (Complete Mini EDTA free, Roche Applied Science)가 포함된 용해 완충액에서 세포를 용해하였다. 용해된 산물은 섭씨 4도에서 14,000 g로 10분간 원심분리를 시행하였다. 침전물을 30 ml의 protein A-Sepharose beads (Amersham Biosciences)에 결합된 VEGF-C의 항체와 반응시킨 후 결합되지 않은 bead를 제거하기 위하여 용해 완충액에서 5회 세척하였다. 남은 산물은 Laemmli sample buffer에 다시 용해시키고, 섭씨 95도에서 6분간 가열한 다음, 15% SDS-PAGE에서 전기영동을 시행하였다. 이후 polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA)으로 분리된 단백질을

옮겨서 발색시킨 후 관찰하였다.

7. Real-time RT-PCR

VEGF-C의 real-time RT-PCR을 위하여 forward primer를 5'-CACGGCTTATGCAAGCAAAGA-3'으로 하고 backward primer를 5'-TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT-3'로 디자인하여 준비한 다음 앞에서 언급한 방법과 동일하게 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 준비된 primer를 이용하여 real-time RT-PCR을 수행하였다. 각각의 시편과 이에 대한 기준치로서 GAPDH의 Ct값을 비교함으로써 처음 PCR이 진행되는 초기값을 relative standard curve 방법과, comparative Ct 방법을 각각의 실험에서 적절하게 사용하여 서로 보정하여 주고, 이 보정된 값을 가지고 발현의 차이를 비교하려고 하는 시편의 유전자 발현 차이를 비교적인 수치를 통하여 나타내었다. 이렇게 얻어진 수치를 실험에 적용하였던 각각의 시편에서 비교하여 VEGF-C의 발현의 변화를 상대적인 정량으로 나타내었다.

III. 연구결과

1. OMSCC 세포주에서 림프관형성 인자 발현

SCC9, KB, YD-10B, YD-38 세포주에서 VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 단백질 발현 여부를 결정하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 시행한 결과 4종 세포주에서 VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 단백질이 탐지되지 않았다 (Fig. 1).

2. 구강암 종물에서 림프관형성 인자 발현

10례의 인간 구강 종양 수술조직에 대한 VEGF-C, VEGFR-3 단백질 발현 여부를 결정하기 위하여 웨스턴 블롯팅을 시행하였다. 그 결과 7례의 OSCC 모두에서 정도의 차이는 있으나 VEGF-C와 VEGFR-3 단백질이 발현되었다. 또한 법랑아세포종 1례와 점액성유상피암종 1례에서도 VEGF-C와 VEGFR-3 단백질이 발현되었으나 치성각화낭에서는 VEGF-C와 VEGFR-3 단백질 발현이 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

3. OMSCC 세포주에서 림프관형성 유전자 발현

KB, SCC-4, SCC-9, YD-10B 세포주에서 VEGF-C와 VEGFR-3 유전자 발현 여부를 결정하기 위하여 RT-PCR을 시행한 결과 4종 세포주 모두에서 VEGF-C mRNA가 발현되었으나 VEGFR-3 mRNA는 감지되지 않았다 (Fig. 3).

4. OMSCC 세포주에서 림프관형성 인자 단백질 수준

SCC9, KB, YD-10B, YD-38 세포배양 배지에서의 VEGF-C와 VEGF-D 분비여부와 세포 용해질 (cell lysate)에서의 총 VEGFR-3 존재여부 및 단백질양을 알아보기 위하여 ELISA를 실시한 결과 VEGF-D는 세포배양 배지에 전혀 분비되지 않았으며 VEGF-C와 VEGFR-3는 검

출되었다 (Fig. 4). 즉 VEGF-C는 YD-10B (1809 ± 1208 pg/ml), SCC9 (669 ± 263 pg/ml), YD-38 (388 ± 196 pg/ml), KB (307 ± 158 pg/ml) 순으로 세포배양 배지에 분비되었으며, VEGFR-3는 KB (81.6 ± 9.89 pg/ μ g protein) YD-10B (72.1 ± 19.9 pg/ μ g protein), SCC9 (69.0 ± 17.7 pg/ μ g protein), YD-38 (41.1 ± 10.5 pg/ μ g protein) 순으로 단백질이 세포 용해질에서 정량되었다.

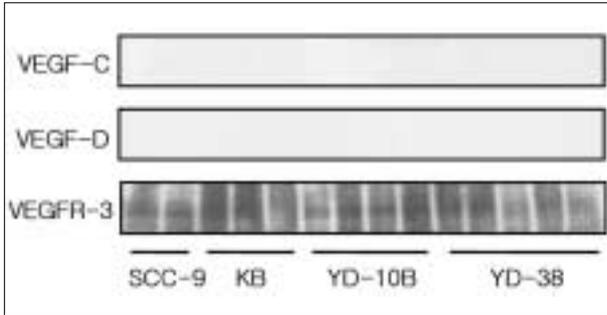


Fig. 1. Lymphangiogenic protein expression in human oral mucosal SCC cell lines. Whole cell lysates were prepared from subconfluent SCC9, KB, YD-10B, and YD-38 cells. Proteins were resolved on 7.5% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membrane, and analyzed by Western blotting using anti-VEGF-C, anti-VEGF-D, or anti-VEGFR-3 antibody. Each assay was done at least twice with similar results.

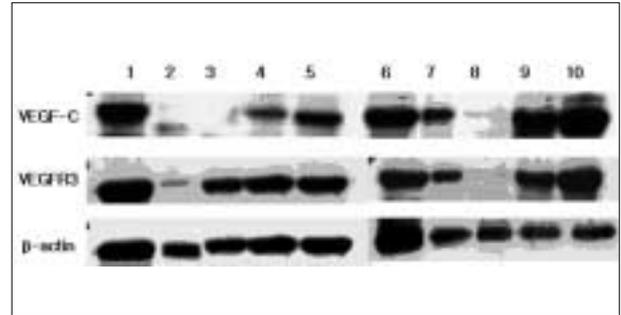


Fig. 2. Lymphangiogenic protein expression in human oral mucosal SCC. Whole tissue lysates were prepared from surgical specimens consisting of 7 SCCs, ameloblastoma (lane 1), mucoepidermoid carcinoma (lane 5), and odontogenic keratocyst (lane 8). Proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gels, transferred to polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed by Western blotting using anti-VEGF-C or anti-VEGFR-3 antibody. β -actin was used as loading control.

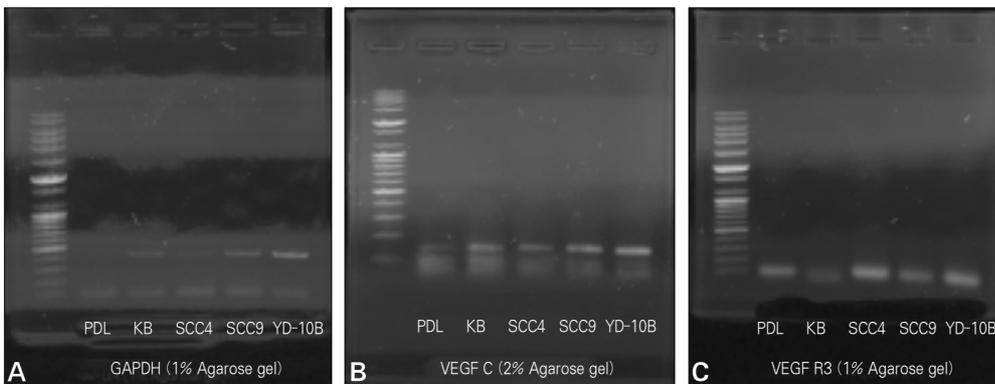


Fig. 3. RT-PCR of VEGFR-3 and its ligand VEGF-C in human oral mucosal SCC cell lines. PDL is a positive control cell line for VEGF-C; left first lane is a size marker; lanes 2-6 display RNA from cultured cell lines. A. GAPDH served as a loading control. B. mRNA expression for VEGF-C and the receptor, VEGFR-3 (C).

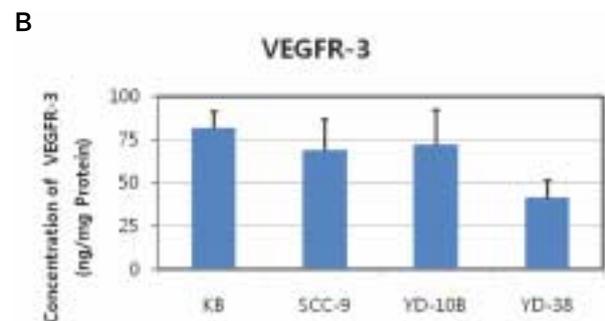
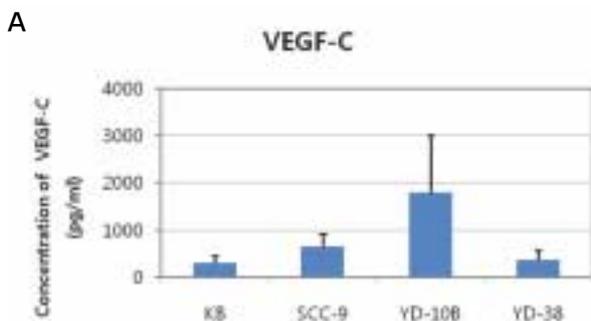


Fig. 4. VEGF-C (A) and VEGFR-3 (B) level in human oral mucosal SCC cell lines, determined by ELISA. Experiments were repeated 4 times under same conditions.

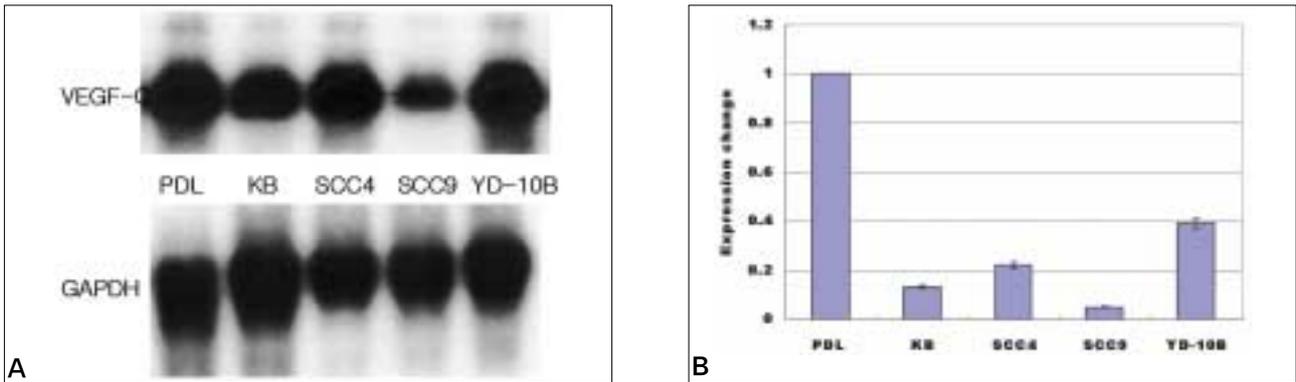


Fig. 5. A. Protein was immunoprecipitated using an anti-VEGF-C antibody. Bands of 47 kDa corresponding to VEGF-C was seen in all samples when probed with anti-VEGF-C. GAPDH was served as control. B. Quantification of VEGF-C mRNA by real-time RT-PCR.

5. OMSCC 세포주에서 VEGF-C 발현

PDL (양성 대조 세포주), SCC9, KB, SCC4, YD-10B 세포에서의 VEGF-C의 발현 여부를 알아보기 위하여 real-time RT-PCR 및 면역침강법을 시행한 결과 5가지 세포에서 모두 VEGF-C가 검출되었다. 면역침강법에서는 PDL과 YD-10B에서 가장 많은 VEGF-C의 발현을 보였다 (Fig. 5A). 실시간 정량을 위한 real-time RT-PCR에서 VEGF-C mRNA의 발현량을 확인한 결과 PDL 세포에서 VEGF-C mRNA가 가장 많이 발현되었고, 그 다음으로는 YD-10B 세포주에서 많이 발현되었다 (Fig. 5B).

IV. 총괄 및 고찰

구강점막으로부터 발생된 편평상피세포암종과 같은 고형종양에 있어서 종양세포의 파급은 국소 림프절을 통해서 이루어진다.¹⁹⁾ 이 과정은 종양 주변의 림프관을 통해서 발생되는데, VEGFR-3는 림프관 내피세포에 발현되는 림프관형성 매개인자 (mediator)이다. 세포 표면 수용체인 VEGFR-3에 높은 친화성을 갖는 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D는 VEGF 성장인자의 lymphangiogenic subfamily로서 종양의 성장과 림프관 성장 그리고 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.²⁰⁾ 즉 VEGF-C와 VEGF-D는 VEGFR-2와 VEGFR-3를 활성화시킴으로써 혈관과 림프관의 성장을 유도한다.^{21,22)} 또한 많은 보고들에 의하면 이들 성장인자들이 종물 주변에서 림프관형성을 유도할 때 국소 림프절 전이가 촉진됨을 보여주었다.²³⁾ Neuchrist는 VEGF-C와 그 수용체인 VEGFR-3가 정상조직에 비교하여 두경부 편평상피세포암 조직에서 upregulation되어 있음을 보고하였다.²⁴⁾

본 연구에서는 임상적으로 림프절 전이가 빈발하는 구강점막 편평상피세포암으로부터 확립된 세포주 5종과 수술조직을 이용하여 고형종양에서 주 림프관형성 인자로 알려진 VEGFR-3와 그 리간드인 VEGF-C와 VEGF-D의 발현 여부를 다양한 방법으로 검증하였다. 그 결과 구강점막 편평상피세포암에서도 림프관형성 관련 유전자가 발현된다는 의미있는 결과를 도출하였으며, 구강점막 편평상피세포암 종양세포에서도 미량이나마 림프관형성 관련 세포표면 수용체인 VEGFR-3가 존재함을 제시하였다.

본 연구를 진행하기 위하여 먼저 구강점막 편평상피세포암으로부터 유래된 세포주 4종 (SCC-9, KB, YD-10B, YD-38)의 세포용해액에서 VEGF-C/VEGF-D와 VEGFR-3 단백을 검출하기 위해 시행된 웨스턴 블롯팅 결과 양성반응이 감지되지 않았다. 그러나 수술시 절제된 7례의 구강점막 편평상피세포암 조직으로부터 시행된 웨스턴 블롯팅에서는 정도의 차이는 있었으나 모두에서 VEGF-C와 VEGFR-3 단백질이 발현되었다. 이는 세포주와 종물의 차이로서 종물에는 종양세포 외에도 다양한 세포들이 존재하는 바 종양관련 혈관/림프관 내피세포와 종물에 유입된 염증, 그리고 면역관련 세포들과 조직 고유의 섬유아세포 등에 발현 가능한 VEGFR-3와 그 리간드인 VEGF-C가 감지된 것으로 추정된다. Saharinen 등은 VEGFR-3가 일반적으로 림프관 내피세포 뿐만 아니라 내분비 기관의 모세혈관과 정맥, 그리고 단핵세포와 마크로파지에 발현된다고 하였다.²⁵⁾ 본 연구에서의 양성반응에 대한 세포조직학적 분포 (distribution)는 추후 수술조직 표본에 대한 면역조직화학 염색을 통하여 이루어져야 할 것이다. 또한 본 연구에서 검색된 대조 종물 중 범랑아세포종과 점액성유상피암종에서도 VEGFR-3와 VEGF-C 단백질이 발현되어 이들 인자들이 혈관과 림프관이 풍부하게 분포하는 두경부에서 발생된 종

양의 진행에 중요한 역할을 할 것임을 암시하였다.

웨스턴 블롯팅 결과 세포주에서 림프관형성 관련 단백질 감지되지 않은 것은 검색대상이 된 단백질의 양이 충분치 못하기 때문일 가능성을 배제하기 위하여 본 연구진은 세포주에서 림프관형성 관련 인자의 유전자 발현 여부를 확인하기 위한 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 정도의 차이는 있었으나 4종의 세포주 (KB, SCC-4, SCC-9, YD-10B) 모두에서 VEGF-C mRNA가 발현되었고, 상대적으로 YD-10B 세포에서 그 발현정도가 가장 강하였다. 그러나 VEGFR-3 mRNA의 발현은 감지되지 않았다. KB, SCC-9, YD-10B, YD-38 세포 배지를 건너서 시행한 ELISA 결과 각 종양세포에서 VEGF-D의 분비는 확인되지 않았으나 VEGF-C는 모든 세포주에서 생산, 분비가 확인되었고, RT-PCR 결과와 일관되게 YD-10B 세포에서 그 농도가 가장 높았다. 세포를 용해하여 확인한 total VEGFR-3 (phosphorylated VEGFR-3 + unphosphorylated VEGFR-3)은 4종의 세포주 모두에서 감지되었고, 그 농도는 전체적으로 30.6-91.5 pg/ μ g protein로 극미량이었다. 참고로 상대적으로 KB와 YD-10B 세포에서 VEGFR-3 농도가 가장 높게 존재하였다.

위의 결과로부터 본 연구진은 구강점막 편평상피세포암 종양세포에는 림프관형성 인자 중 VEGF-D는 발현되지 않고, VEGF-C가 주로 발현되며 VEGFR-3 역시 낮은 수준으로 발현된다고 결론지었다. VEGFR-3는 일반적으로 림프관 내피세포에 발현되는 것으로 여겨지나,²⁶⁾ 최근의 연구에 의하면 종양세포를 포함한 비내피세포 (nonendothelial cell)에도 발현되는 증거가 제시되고 있다.²⁷⁾ 2002년 Witte 등은 56례의 결장직장암종 수술표본에 대한 면역조직화학적 연구에서 모든 표본의 종양세포에서 VEGF-C 양성반응이 관찰되었고, VEGFR-3에 대한 면역반응성이 강한 증례에서 임상적으로 불량한 생존율이 관계됨을 보고하였다.²⁸⁾ 편평상피세포암 세포주에 대한 연구에서 VEGFR-3가 발현됨을 규명한 보고는 아직 확실치 않다. 그러나 2001년 Neuchrist 등은 본 연구에서도 사용된 설암으로부터 확립된 SCC9 세포주를 포함한 4개의 두경부/자궁경부 편평상피세포암 세포주에 대한 연구에서 4개 세포주 중 2개의 세포주에서 VEGFR-3와 밀접한 관련이 있는 VEGFR-2에 대한 면역반응성을, 또한 4개 세포주 모두에서 VEGFR-2 mRNA가 합성됨을 RT-PCR로 규명하였다.²⁹⁾

2003년 Beierle 등은 신경아세포종 세포주를 이용한 연구에서 VEGF 수용체 중 Flt-4(VEGFR-3)와 VEGF에 대한 co-receptor인 NRP(neuropilin)-1과 NRP-2가 종양세포에서 존재함을 검증하고, 그 발현정도가 배지의 조건이 성장촉진성인지 아포토시스 유발적 인지에 따라 달라짐을 보고하고 종양세포에서의 VEGF 수용체의 발현정도는 환경에 따라 바뀔 수 있음을 증명하였다.³⁰⁾ 본 연구의 세포

주 실험에서 VEGFR-3가 미량 발현됨이 관찰되었는데, 종양성장을 촉진시키는 인자들이 작용하는 종양 미세환경 (tumor microenvironment)에서는 종양세포에 더 많은 VEGFR-3가 발현될 가능성이 있으며, 이는 수술표본에 대한 추후 연구를 통하여 규명될 것이다.

세포 내의 수용체의 발현 정도는 세포를 배양하는 조건에 따라서 달라질 수 있다. 특히 혈관이나 림프관의 형성과 관련이 있는 인자의 경우 그 발현 정도는 동일한 세포 내에서도 많은 차이를 보이게 된다. 연골 세포나 치주인대 세포의 경우 정상적인 배양 조건에서도 VEGF의 발현이 많은 세포이나 압축력을 가하면 VEGF의 발현이 더욱 증가된다.¹⁸⁾ 생체 내의 종양의 성장이나 전이의 조건에는 원발 부위의 성장 상태와 관련성이 있다. 종물이 성장함에 따라서 중심부 혈류량이 모자라서 괴사가 되면 종양 주위로 혈관의 생성이 증가되고 이는 종양 세포로 하여금 VEGF의 발현을 증가시킬 것이다. 생체 내와는 달리 세포 배양에서는 충분한 양의 영양분과 산소가 공급되기 때문에 종양 세포 자체에서 VEGFR-3와 같은 VEGF 수용체의 발현은 제한적일 수 있다. 본 연구진의 ELISA결과에서 VEGFR-3은 VEGF-C에 비하여 극히 미량으로 발현되었으며 (Fig. 4), RT-PCR에서는 검출이 되지 않았다 (Fig. 3). 하지만 이에 비하여 VEGF-C는 세포주에서 유전자 수준이나 면역침강법과 같은 단백질 수준에서 모두 검출이 되었다 (Fig. 5). 현재 조건에서 세포 내 미약한 VEGFR-3의 발현이 어떠한 상황에서도 항상 동일한 수준으로 유지된다고 확신할 수는 없으며 산소 공급을 제한시키는 등의 상황에서 세포를 배양한다면 다소 다른 결과가 나올 수도 있을 것으로 추론하고 있어 이러한 부분은 추후 실험을 통하여 검증하여야 할 것이다.

더 고찰해 보면 본 연구결과 VEGFR-3 mRNA가 감지되지 않은 상황에서 ELISA결과 VEGFR-3단백이 검출되었다. 이는 모순적이라고도 생각할 수 있으나 연구방법 자체의 신뢰도를 고려해 보면 반복성 (reproducibility)이 높은 ELISA결과에 비중을 두어야 할 것이다. 특히 유전자에서 단백질이 만들어지는 과정에서 mRNA의 발현 시간은 제한적이며 또한 매우 짧아 유전자가 존재하여도 RT-PCR 상에서 음성반응이 나올 수 있다. 그러나 ELISA의 경우 만들어진 단백질이 있다면 모두 검출이 가능하므로 본 연구진은 시험된 세포주에서 VEGFR-3가 발현된다고 최종적으로 결론지었다. 결론적으로 본 연구결과는 구강점막 편평상피세포암에서 VEGF-C가 발현되어 이 인자가 구강점막 편평상피세포암의 성장과 전이에 중요한 역할을 할 것임을 암시하였다. 또한 구강점막 편평상피세포암 종양세포에서도 VEGF-C에 대한 세포 표면 수용체인 VEGFR-3가 존재함이 밝혀져 VEGF-C의 역할이 자가분비적 자극기전 (autocrine loop)으로 작용할 수 있음을 추정케 하였다.

References

1. Oliver G, Harvey N : A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann NY Acad Sci* 979 : 159, 2002.
2. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL : Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *World J Surg* 16 : 214, 1992.
3. Bilde A, von Buchwald C, Therkildsen MH *et al* : Need for intensive histopathologic analysis to determine lymph node metastases when using sentinel node biopsy in oral cancer. *Laryngoscope* 118(3) : 408, 2008.
4. Grandi C, Alloisio M, Moglia D *et al* : Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: Therapeutic implications. *Head Neck Surg* 8 : 67, 1985.
5. Silverman S Jr : Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Amer Dent Assoc* 132(Suppl) : 7S-11S, 2001.
6. Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME *et al* : Expression of vascular endothelial cell growth factor reseptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10 : 5137, 2004.
7. Shibuya M, Claesson-Welsh L : Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312 : 549, 2006.
8. He Y, Rajantie I, Pajusola K *et al* : Vascular endothelial cell growth factor reseptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 65 : 4739, 2005.
9. Scavelli C, Weber E., Agliano M. *et al* : Lymphatics at the crossroads of angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Anat* 204 : 433, 2004.
10. McGeown JG, McHale NG, Thornbury KD : The role of external compression and movement in lymph propulsion in the sheep hind limb. *J Physiol* 387 : 83, 1987.
11. Yokoyama Y, Chanrnock-Jones DS, Licence D *et al* : Vascular endothelial growth fator-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 88 : 237, 2003.
12. Renvi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J *et al* : Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 : 7344, 2005.
13. Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG *et al* : Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 65 : 222, 2005.
14. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K *et al* : Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 240 : 306, 2004.
15. Kitadai Y, Kodama M, Cho S *et al* : Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 115 : 388, 2005.
16. Shushanov S, Bronstein M, Adelaide J *et al* : VEGF-C and VEGFR3 expression in human thyroid pathologies. *Int J Cancer* 86 : 47, 2000.
17. Bock JM, Sinclair LL, Bedford NS *et al* : Modulation of cellular invasion by VEGF-C expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134(4) : 355, 2008.
18. Ku SJ, Chang YI, Chae CH *et al* : Static tensional forces increase osteogenic gene expression in three-dimensional periodontal ligament cell culture. *BMB reports* 42(7) : 427, 2009.
19. Sleeman JP : The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumours. *Recent Results Cancer Res* 157 : 55, 2000.
20. Stacker SA, Williams RA Achen MG (2004) Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* 112 : 539, 2004.
21. Achen MG, Jeltsch M, Kukkk E *et al* : Vascular endothelial growth fator-D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flk4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 548, 1998.
22. Wigle JT Oliver G : Proxl function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98 : 769, 1999.
23. Cupedo T, Mebius RE : Role of chemokines in the development of secondary and tertiary lymphoid tissues. *Semin Immunol* 15 : 243, 2003.
24. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A *et al* : Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 25(6) : 464, 2003.
25. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ *et al* : Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 25 : 387, 2004.
26. Oliver G, Detmar M : The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 16 : 773, 2002.
27. Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM : Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Onco* 2(1) : 37, 2004.
28. Witte D, Thomas A, Ali N *et al* : Expression of the vascular endothelial growth factor reseptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 22(3) : 1463, 2002.
29. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A *et al* : Vascular endothelial growth factor reseptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 111 : 1834, 2001.
30. Beierle EA, Dai W, Langham MR *et al* : VEGF receptors are differentially expressed by neuroblastoma cells in culture. *J Pediatr Surg* 38(3) : 514, 2003.

저자 연락처

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

원고 접수일 2009년 10월 12일
 게재 확정일 2009년 11월 10일

Reprint Requests

Young-Wook Park
 Dept. OMFS, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University
 Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702, South Korea
 Tel : 82-33-640-3102 Fax : 82-33-640-3103
 E-mail : ywpark@gwnu.ac.kr

Paper received 12 October 2009
 Paper accepted 10 November 2009