

암 발생 과정에서 유방암 세포의 TGF- β 에 대한 저항성 획득과 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체의 유전자 변화에 관한 연구

연세대학교 의과대학 ¹연세암센터, ²연세 암연구소, ³내과학교실, ⁴외과학교실

이화영^{1,2,3} · 전성실² · 권현자² · 공수정^{1,2,3} · 라선영^{1,2,3}
안종배^{1,2,3} · 심광룡^{1,2,3} · 유내춘^{1,2,3} · 김주향^{1,2,3} · 노재경^{1,2,3}
민진식^{1,2,4} · 이경식⁴ · 김병수^{1,2} · 정현철^{1,2,3}

Genetic Change in Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Receptor Type I and Type II Genes Correlates with Resistance to TGF- β of Human Breast Cancer Cells

Hwa Young Lee, M.D.^{1,2,3}, Chengshi Quan, M.D.², Hyun Ja Kwon, M.D.²,
Soo Jung Gong, M.D.^{1,2,3}, Sun Young Rha, M.D.^{1,2,3}, Joong Bae Ahn, M.D.^{1,2,3},
Kwang Yong Shim, M.D.^{1,2,3}, Nae Choon Yoo, M.D.^{1,2,3}, Joo Hang Kim, M.D.^{1,2,3},
Jae Kyung Roh, M.D.^{1,2,3}, Jin Sik Min, M.D.^{1,2,4}, Kyong Sik Lee, M.D.⁴,
Byung Soo Kim, M.D.^{1,2} and Hyun Cheol Chung, M.D.^{1,2,3}

¹Yonsei Cancer Center, ²Yonsei Cancer Research Institute,

³Department of Internal Medicine, ⁴General Surgery,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Transforming growth factor- β s (TGF- β s) are prototypic multifunctional negative growth factors that inhibit the growth of many cell types. TGF- β type I and II receptors(RI, RII) are transmembrane receptors containing cytoplasmic serine/ threonine kinase domain and have been implicated in mediating TGF- β activity. Because a heteromeric complex of RI and RII is required for TGF- β signal transduction, cancer cells may reduce the expression of either RI or RII to escape from growth inhibition of TGF- β . We examined the correlation between the growth inhibitory activity of TGF- β_1 and the genetic expression of RI & RII genes in human breast cancer cell lines.

Materials and Methods: We examined the growth inhibitory activity of TGF- β_1 in 5 breast cancer cell lines by incorporation of [³H] thymidine. To investigate the correlation between TGF- β_1 insensitivity and genetic change of TGF- β receptor genes (RI, RII), Southern blot analysis, Northern blot analysis, and Western blot analysis were performed. We also examined whether microsatellite instability(RER) was associated with RII mutation.

Results: We found that 3 breast cancer cell lines (MCF-7, YCC-B101, YCC-B151) were

책임저자 : 정현철, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 연세 암센터, 120-752

이 논문은 1997년도 교육부 학술연구 조성비(유전 공학)에 의하여 연구되었음.

접수일 : 1998년 3월 16일, 게재승인일 : 1998년 6월 18일

resistant to growth inhibitory effect of TGF- β_1 . MCF-7 cell line expressed no detectable RII mRNA and RII protein, but showed normal structure of RII gene and normal expression of RI gene. And we did not find any abnormal expression of mRNA, protein, and genetic structure of RI & RII in YCC-B101 and YCC-B151.

Conclusion: Our results suggest that acquired resistance to the growth inhibitory effect of TGF- β_1 could be transcription regulation system of RII in MCF-7 cell line, and could be postreceptor signal transduction pathway in YCC-B101 and YCC-B151 cell lines.

Key Words: Breast cancer, TGF- β_1 , TGF- β receptors(RI, RII), Resistance to TGF- β_1

서 론

Transforming growth factor-beta(TGF- β)는 대표적인 다기능 성장 인자로 세포 증식과 분화의 조절 및 세포외 기질의 합성에 중요한 역할을 한다. 그 중에서도 특히 TGF- β 의 주된 기능은 세포 증식 억제 작용으로, 대부분의 상피 세포와 림프계 세포의 성장을 억제한다(1~4). TGF- β 는 이중체 단백질로서 사람에서는 TGF- β 1,2,3의 세가지 이형(isoform)이 알려져 있다. 이들 이형간에 70%의 아미노산 서열 유사성이 관찰되며 각각의 발현 양상이 분화 및 발육 과정에서 특징적으로 나타나나 체외에서는 동일한 작용을 함으로 관찰되었다(5). 유방암에서 TGF- β 는 estrogen 의존성과 관계가 있어, estrogen이 TGF- α 의 발현을 증가시키는 반면(6~7), TGF- β 는 anti-estrogen에 의해 그 생성이 촉진됨으로 알려져 있다(8). 임상적으로도 TGF- β_1 mRNA 발현이 높은 유방암에서 무병 생존율이 높음이 관찰되었다(9~10). 이와 같이 다양한 TGF- β 의 생물학적 작용은 TGF- β 에 특이적으로 결합하여 serine/threonine kinase의 기능을 나타내는 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체의 매개에 의해 나타난다. TGF- β 와 그 수용체의 복합체는 TGF- β 가 직접 활성화된 제 2형 수용체에 결합함으로써 형성되며 곧 이어 제 1형 TGF- β 수용체와 heterodimeric complex를 이루고 그 결과 제 1형 TGF- β 수용체가 인산화되어 활성화됨으로써 세포 내 신호 전달이 시작된다(11).

*In vitro*에서 TGF- β 의 가장 주된 작용은 상피 세포의 증식 억제임에도 불구하고 상피 세포에서 유래한 암세포는 TGF- β 의 성장 억제 작용에 저항성을 보이는 바, 이러한 TGF- β 에 대한 저항성 획득은 암화 과정(carcinogenesis)에서 중요한 단계로 인식되고 있다(12). TGF- β 에 대한 저항성 획득의 기전으로는 망막아세포종(retinoblastoma) 세포에서 제 2형 TGF- β 수용체의 결함이 최초로 보고되었으며(13) 그 이후 여러 악성 종양에서 제 2형 TGF- β 수용체 발현 이상이 TGF- β 저항성 출현과 상관이 있다고 알려졌다(14~17). 반면, 제 1형 TGF- β 수용체는 TGF- β 신호 전달 체계상 제 2형 TGF- β 수용체와 마찬가지로 중요한 역할을 함에도 불구하고 제 1형 TGF- β 수용체 결함에 의한 TGF- β 저항성 획득에 관한 보고는 매우 드물다(18). 최근에는 TGF- β / TGF- β 수용체의 복합체를 포함한 TGF- β 신호 전달 체계 전체가 하나의 종양 억제 유전자로 작용함이 밝혀짐으로써(19) TGF- β 에 의한 세포 성장 억제 경로가 발암 예방에도 중요한 역할을 할이 알려졌다.

따라서 본 연구에서는 인체 유방암 세포주에서 TGF- β_1 에 대한 감수성의 차이 및 저항성 획득 여부를 관찰하였다. 아울러 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 유전자의 발현을 조사하여 이들 수용체의 발현 변화에 따른 TGF- β 에 대한 감수성 변화 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1) 유방암 세포주 배양

본 연구에 이용된 유방암 세포주는 연세대학교 의과대학 연세암연구소에서 확립한 세포주 YCC-B101, YCC-B151과 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD)에서 구입한 MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3이다. 실험에 사용된 세포주들은 56°C에서 30분간 불활성화시킨 10% 우태아 혈청(GIBCO, Grand Island, NY)을 함유하는 MEM(GIBCO, Grand Island, NY)을 기본 배양액으로 하여 5% CO₂, 37°C의 항온, 항습 배양기에서 배양하였으며, 주 2~3회 배지를 교환하였다.

2) 유방암 세포주에 대한 TGF- β_1 의 성장 억제 비교

유방암 세포주는 5 × 10⁴ cell/well의 density로 24 well plate에 분주하였다. 각 well에 TGF- β_1 을 5 ng/ml의 농도로 처리하고 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. 다음 각 well을 0.5 μCi의 [³H] thymidine으로 label하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 유방암 세포들을 1 ml의 methanol/acetic acid (3 : 1 vol/vol)로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 1 ml의 80% methanol로 2회 세척하고, 500 μl의 trypsin (0.2 mg/ml)을 37°C에서 30분 간 처리한 후 500 μl의 1% SDS 용액으로 용해시켜서 radioactivity를 측정하였다. Mink Lung Epithelial Cell로부터 확립되었으며 TGF- β_1 에 sensitive한 CCL64 세포주를 대조 세포군으로 실험에 이용하였다.

3) Southern blot analysis

인체 유방암 세포주에서 QIAGEN Blood & Cell Culture DNA kit(QIAGEN, Chartworth, CA)를 사용하여 genomic DNA를 분리한 후 실험을 시행하였다. 10 μg의 DNA를 restriction endonucleases(EcoR1 or HindIII)로 완전 분해한 후, 0.8% agarose gel에 전기 영동한 다음 nylon membrane에 옮기고 UV cross-link하였다. 42°C에서 3시간 동안 pre-hybridization 후 [³²P]dCTP로 label된 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 cDNA probes를 사용하여 hybridization시켰다. 다음 membrane을 세척하여 Kodak XAR-2 film에 노출시켜 현상하였다.

4) Northern blot analysis

인체 유방암 세포주에서 total RNA를 guanidinium isothiocyanate/phenol/chlorform 방법으로 분리한 후 실험을 시행하였다. 10 μg의 RNA를 0.6 M formaldehyde를 함유하는 1% agarose gel에 전기영동하여 Duralone-UV membrane에 옮기고 UV cross-link하였다. 1% bovine serum albumin/7% SDS/0.5 M sodium phosphate/1 mM EDTA로 65°C에서 pre-hybridization한 후 [³²P]dCTP로 label된 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 cDNA probes를 사용하여 hybridization시켰다. 다음 membrane을 0.1% SDS/1 × SSC 용액으로 2회 세척한 다음 Kodak XAR film에 노출시켜 현상하였다.

5) Western blot analysis

인체 유방암 세포들을 PBS로 2번 세척한 후 lysis buffer(25 mM Tris/50 mM NaCl/2% Nonidet P-40/protease inhibitor)로 얼음 위에서 30분간 용해시켜 protein을 분리한 후 실험을 시행하였다. 10 μg의 protein을 4~12% Tris-Glycine gel(NOVEX, San Diego, CA)에 전기 영동하여 nitrocellulose membrane으로 옮기고, human TGF- β 수용체에 대한 rabbit polyclonal antibodies(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 이용하여 ECL kit(Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, Buckinghamshire)로 감광하였다.

6) Microsatellite instability 측정

200 ng/μl의 genomic DNA로서 10 ng의 γ [³²P]ATP로 label된 BAT 26, BAT 40, TA 10의 forward primer와 150 ng의 reverse primer를 primer set으로 하여 Taq polymerase 존재하에 95°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 하는 중합 효소 연쇄반응을 40 cycle 시행하였다. 5 μl의 PCR

산물을 $3 \mu\text{l}$ 의 stop solution과 함께 95°C 에서 4분간 가열한 후 8% denatured polyacryl-amide gel에서 52°C 하에 전기 영동한 다음 X-ray film에 자가 감자시켜 microsatellite의 삽입이나 결손 여부를 확인하였다.

결 과

1) 유방암 세포주에 대한 TGF- β_1 의 성장 억제 비교

5 ng/ml 의 TGF- β_1 을 처리한 후 CCL64 대조 세포주에서는 90%의 성장 억제 효과가 관찰되었으나, MCF-7, YCC-B101, YCC-B151에서는 TGF- β_1 처리 후에도 성장이 억제되지 않는 TGF- β_1 에 대한 저항성을 관찰하였다. MDA-MB-231와 SK-BR-3 세포주에서는 성장이 50% 이상 억제되어 TGF- β_1 에 대한 감수성이 비교적 유지됨을 관찰하였다 (Fig. 1).

2) 유방암 세포주의 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 유전자 발현 측정

유방암 세포주에서 TGF- β_1 에 대한 저항성이 확

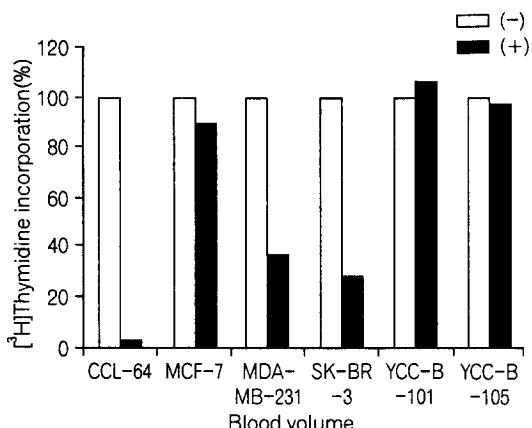


Fig. 1. Inhibition of DNA synthesis by TGF- β : The effect of TGF- β_1 on the growth of five breast cancer cells was measured by incorporation of [^3H]thymidine in the absence(–) or presence(+) of porcine TGF- β_1 (5 ng/ml) for 48 hours. The assay was done in triplicates. Bars represent SD.

인된 바, TGF- β 의 신호 전달 체계에 중요한 역할을 하는 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 유전자 발현을 조사하였다. 5개의 유방암 세포주로부터 genomic DNA를 추출하여 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 cDNA probe로 Southern blot을 시행한 결과 5개 세포주 모두에서 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체의 유전자 이상은 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3) 유방암 세포주에서 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 mRNA의 발현

유방암 세포주에서 TGF- β_1 의 성장 억제 작용에

Fig. 2. Southern blot analysis of the TGF- β receptor gene: $10 \mu\text{g}$ of genomic DNA were digested with EcoRI for TGF- β RII gene & HindIII for TGF- β RI gene and electrophoresed. (A) Hybridization with TGF- β RI cDNA shows normal structure of TGF- β RI gene in 5 human breast cells. (B) Hybridization with TGF- β RII cDNA shows normal structure of TGF- β RII gene in 5 human breast cells.

대한 반응의 차이 기전을 조사하기 위하여 TGF- β 수용체의 mRNA 발현을 확인하였다. 5개 세포주 모두에서 제 1형 TGF- β 수용체 mRNA 발현은 차이가 없었다. 반면 제 2형 TGF- β 수용체의 mRNA

발현은 세포주에 따라 차이가 있음을 관찰할 수 있었다. 즉 TGF- β_1 의 성장 억제 작용에 저항성을 나타내었던 MCF-7 세포주에서는 제 2형 TGF- β 수용체 mRNA 발현을 관찰할 수 없었으나 YCC-B101과 YCC-B151 세포주에서는 제 2형 TGF- β 수용체 mRNA 발현이 정상이었다. 반면 TGF- β_1 에 감수성이 비교적 유지되었던 MDA-MB-231 세포주에서는 제 2형 TGF- β 수용체 mRNA의 과발현 되었고, SK-BR-3 세포주에서는 발현이 감소함을 관찰하였다(Fig. 3).

4) 유방암 세포주에서 제 1형 및 제 2형 TGF- β 수용체 단백질 발현

각 유방암 세포주에서 TGF- β 수용체 mRNA 발

Fig. 3. Northern blot analysis of TGF- β receptor mRNA expression: 10 μ g of total RNA from cells were analyzed for the expression of TGF- β receptors. (A) Hybridization with TGF- β RI cDNA shows normal patterns of TGF- β RI mRNA in MCF-7, YCC-B101, YCC-B151 which are resistant to TGF- β_1 and in MDA-MB-231, SK-BR-3 which are sensitive to TGF- β_1 . (B) Hybridization with TGF- β RII cDNA shows various expression patterns of TGF- β RII mRNA. TGF- β RII mRNA is undetectable in MCF-7 which is resistant to growth inhibition by TGF- β_1 . But YCC-B101 and YCC-B151, resistant to TGF- β_1 , express a full-size TGF- β RII mRNA.

Fig. 4. Western blot analysis of TGF- β receptor protein: (A) The expression of TGF- β RI protein (size in 55kD) shows normal pattern in 5 human breast cells. (B) The expression of TGF- β RII protein (size in 70kD) corresponds with the expression of TGF- β RII mRNA. Note that expression of TGF- β RII was not detectable in MCF-7.

현에 따른 최종 단백 발현을 조사하였다. 제 2형 TGF- β 수용체의 단백 발현은 TGF- β_1 에 대한 저항성 발현과 제 2형 TGF- β 수용체 mRNA 발현 소실을 관찰할 수 있었던 MCF-7 세포주에서 소실되어 있음을 확인하였으나 나머지 유방암 세포주에서는 모두 70 kD의 단백이 발현됨을 확인하였다. 반면 55 kD의 제 1형 TGF- β 수용체 단백은 MCF-7 세포주를 포함한 모든 세포주에서 발현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

종양의 발생과 성장에서 종양 유전자 또는 종양 억제 유전자와 세포 성장 인자와의 관련성이 제시되며 이는 종양 세포가 정상적인 세포 성장 조절 기전을 벗어나 지속적으로 성장하는 여러 기전 중의 하나가 세포 성장 인자의 발현이기 때문이다(20~21). 세포 성장 인자는 혈청 내 존재하는 polypeptide, 조직액, 세포 추출물 등으로부터 분리할 수 있으며 주된 작용은 세포 분열 조절이다. 일부인자는 세포 고유의 형질을 전환할 수 있어서 정상 세포가 암 세포로 형질 전환되는 데 중요한 역할을 한다(22).

대표적인 형질전환 인자인 TGF- β 는 매우 다양한 기능을 가진 homodimeric polypeptide로서 세포 생물학적 작용은 신호 전달 체계의 serine/threonine kinase를 통한 세포의 성장 조절, 세포의 기질의 형성, 세포의 분화, 면역 기능 억제등 다양하다(1~4,23). 특히 TGF- β 는 정상 상피 세포의 성장을 억제하기 때문에 세포들의 악성화 과정에서 TGF- β 의 성장 억제 작용에 대한 저항성을 획득하게 되며 이와 같은 TGF- β 에 대한 감수성 소실은 발암 과정에서 매우 중요한 과정으로 인식되고 있다(12). 실제 TGF- β 의 성장 억제 작용에 대한 저항성 획득은 위암이나 소세포 폐암의 대다수 세포주에서 보고되었으며(15~16), 대장의 양성 종양에서 유래한 세포주는 TGF- β 에 감수성이 유지되고 있으나 대장암 세포주에서는 TGF- β 에 대한 감수성이 소실되었음을 확인되었다(12).

유방암에서는 호르몬 치료시에 TGF- β 의 생성이 증가하여 암세포의 성장을 억제시킴이 보고됨은(9) TGF- β 의 수용체를 통한 신호 전달 체계가 유방암의 발생 및 치료에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서는 먼저 5개의 인체 유방암 세포주(MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3, YCC-B101, YCC-B151)를 대상 세포주로 하고 TGF- β_1 의 종식 억제 작용에 감수성이 있는 CCL64 세포주를 대조 세포주로 하여 각 세포주의 TGF- β_1 의 종식 억제 작용에 대한 감수성의 차이를 조사하였다. 그 결과 3개의 유방암 세포주(MCF-7, YCC-B101, YCC-B151)에서는 저항성이 획득되어 있었으며, 2개의 유방암 세포주(MDA-MB-231, SK-BR-3)에서는 비교적 TGF- β_1 에 대한 감수성이 보존되어 있음을 확인하였다. 이러한 TGF- β_1 에 대한 저항성 획득의 기전이 제 2형 TGF- β 수용체 유전자 변이에 의함이 망막아세포종(retinoblastoma)에서 최초로 보고된 이후(13), 유방암(9), 두경부 편평 상피암(14), 소세포 폐암(15), 위암(16), 대장암(17) 등 여러 악성 종양에서 제 2형 TGF- β 수용체 발현 이상이 TGF- β 에 대한 저항성 획득과 상관이 있다고 보고되었다.

TGF- β 의 생물학적 활성은 TGF- β 가 제 2형 TGF- β 수용체에 결합된 후 제 1형 TGF- β 수용체와 복합체(triplex)를 형성하게 되고 그 결과 제 1형 TGF- β 수용체가 인산화 됨으로써 활성화되어 비로소 세포내 신호 전달 경로가 시작된다(11). 따라서 이론적으로는 TGF- β 신호 전달 체계상 제 1형 TGF- β 수용체는 제 2형 TGF- β 수용체와 마찬가지로 중요한 역할을 함에도 불구하고 실제 암화 과정에서 제 1형 TGF- β 수용체 결합에 의한 TGF- β 저항성 획득에 관한 보고는 드물다(18). 본 연구에서는 먼저 TGF- β_1 에 저항성을 획득한 3개의 유방암 세포주에서 제 2형 및 제 1형 TGF- β 수용체 유전자의 발현과 그에 따른 수용체 단백의 생성 여부를 조사하여 TGF- β_1 에 대한 저항성 획득 기전에서 TGF- β /TGF- β 수용체 복합체의 역할을 조사하였다. TGF- β_1 에 대해 저항성이 있는

MCF-7 세포주에서 제1형 TGF- β 수용체의 DNA, mRNA 및 단백 발현은 정상이었으나 제2형 TGF- β 수용체의 DNA는 존재함에도 불구하고 mRNA와 단백질이 발현되지 않음을 확인하였다. 이 결과는 Sun 등(24)의 보고와 일치하는 것으로 MCF-7 세포주에서 TGF- β_1 에 대한 저항성 획득 기전은 제1형 TGF- β 수용체의 이상에 의함이 아니고 제2형 TGF- β 수용체 결합에 의하며 특히 유전자 자체의 결합이라기보다는 mRNA 발현을 억제하는 전사 조절 기구의 이상에 기인할 가능성을 시사한다 하겠다(25). 이 같은 가정은 최근에 제2형 TGF- β 수용체 유전자의 promoter region 전사 조절 부위중 PRE2 부위를 인지하는 단백인 ERT (*ets-related transcription factor*)의 발현이 감소되면 전사가 억제되어 제2형 TGF- β 수용체 mRNA 발현이 소실됨을 확인한 연구결과로 설명할 수 있다 하겠다(26).

반면, TGF- β_1 에 대한 저항성이 역시 확인되었던 YCC-B101과 YCC-B151 세포주에서는 제1형 수용체 유전자나 mRNA 및 단백의 발현에는 결합을 관찰할 수 없었다. 그리고 제2형 수용체의 경우 유전자에는 이상이 없었으며 mRNA의 발현이 YCC-B101은 미약한 반면, YCC-B151은 강하였다. 그러나 Western blot상의 단백 발현은 동일하게 관찰되었다. 따라서 이들 유방암 세포주에서는 정도의 차이는 있을지언정 유전자 발현은 관찰되므로, TGF- β_1 에 대한 저항성 획득의 기전이 수용체 유전자 자체나 발현에서의 이상 보다는 수용체 이후 신호 전달 경로상에서 작용하는 분자들의 결합 혹은 생성된 수용체가 세포막으로 이동하는 과정에서의 결합등을 고려해볼 수 있겠다. 아직까지 TGF- β 의 신호 전달 경로가 완전히 규명되지는 않았지만 TGF- β 수용체로부터 신호를 전달하는 많은 분자들이 보고되고 있고 그 중 대표적인 것이 *Drosophila*의 발생을 조절하는 MAD 유전자의 사람 homologue인 Smad family 분자들이다. 특히 Smad 2, Smad 3, Smad 4등이 TGF- β 의 신호 전달에 관여한다고 알려져 있으며(19) 체장암 세포에서 Smad 4(DPC4)의 결손이 높은 빈도

로 관찰되면서 이들이 종양 억제 유전자일 가능성이 보고되므로(27~28) 추후 YCC-B101 및 YCC-B151 세포주에서 이들 분자들의 발현 이상에 대한 연구가 필요하다 하겠다. 또한 MCF-7 세포주의 세포막에서는 TGF- β 수용체가 존재하지 않지만 세포질내에는 약간의 수용체가 존재함이 관찰되었으며, 이들 두 수용체는 전체 구조에는 차이가 없고 단지 glycosylation에 차이가 있어 형성된 수용체 단백의 세포막으로의 이동 과정에 이상이 발생하여 TGF- β 에 대한 저항성 획득 가능성이 제시된 바(29), 정상적으로 TGF- β 수용체의 유전자와 그 발현이 관찰되어도 TGF- β 에 대한 저항성이 관찰되는 경우에는 이 같은 기전에 대한 연구가 필요하다 하겠다.

TGF- β_1 에 대한 감수성이 비교적 유지되었던 두 세포주에서는 예상한 대로 제1형 및 제2형 TGF- β 유전자와 그 단백 발현이 정상임을 확인할 수 있었다. 그러나 SKBR-3 세포주의 경우 MDA-MB-231 세포주에 비해 제2형 수용체의 mRNA와 단백의 발현이 미약함에도 불구하고 MDA-MB-231 세포주와 유사한 감수성이 있음을 확인하였다. 따라서 추후 TGF- β_1 수용체의 발현 정도와 TGF- β_1 에 대한 감수성과의 상관성에 관한 연구를 시행함으로써 TGF- β_1 의 암 치료에 대한 응용 가능성을 확인할 수 있겠다. 또한 최근에는 대장암과 위암에서 TGF- β 수용체를 비활성화시키는 돌연변이가 발견됨으로써 TGF- β 에 대한 저항성이 세포주에서만 아니라 인체의 종양에서도 발생함이 확인되었으며, TGF- β 에 대한 저항성이 발암 과정에서 선택되는 일차적 현상일 가능성도 제시되었다(12,16). 따라서 본 연구에서도 마지막 단계로 TGF- β 수용체 유전자가 Southern blot analysis에서 관찰되어도 실제 유전자 구조에 이상이 있을 가능성을 확인하기 위하여 대장암에서 관찰되는 빈도가 가장 높은 marker 등(30~31)을 이용하여 RER 발생 여부를 확인하였으나, 조사한 범위에서는 유전자의 이상을 관찰할 수 없어(data not shown) 전사 과정에는 이상이 없을 가능성을 간접적으로 다시 확인할 수 있었다.

본 연구의 결과를 종합하면 유방암 세포주의 TGF- β_1 에 대한 저항성 획득은 암화 과정에서 매우 중요한 단계이며, 저항성 획득의 기전도 매우 다양함을 알 수 있다. 따라서 TGF- β / TGF- β 수용체 복합체를 포함한 TGF- β 신호 전달 체계 전체가 종양 증식 억제기능 유지에 작용하며 이 구조가 하나의 종양 억제 유전자로 작용함을 시사한다고 하겠다. 이같이 변화된 TGF- β /TGF- β 수용체의 이상을 교정하고자 할때는 정확한 이상 기전을 밝혀 그에 대한 적절한 교정을 시행함으로써 치료 효과를 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

유방암 세포주에서 TGF- β_1 의 성장 억제 작용에 대한 저항성이 있음을 확인하였으며, 저항성 획득의 가능한 기전으로 제 1형 TGF- β 수용체 유전자 발현에는 결함이 없는 반면, 제 2형 TGF- β 수용체 유전자 전사 조절계의 결함과 세포내 신호 전달 체계의 결함 가능성 등을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor β s. In Sporn MB, Roberts AB(eds): Peptide Growth Factors and Their Receptors. Heidelberg, Springer-Verlag, 1990, 419-472.
2. Massague J. The transforming growth factor- β family. Annu Rev Cell Biol 1990; 6: 597-641.
3. Moses H, Yang E, Pietenpol J. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. Cell 1990; 63: 245-7.
4. Brattain M, Howell G, Sun L, Wilson JKV. Growth factor balance and tumor progression. Curr Opin Oncol 1994; 7: 77-81.
5. Roberts AB, Anzano M, Meyers C, Wideman J, Blacher R, Pan YC, Stein S, Lehrman S, Smith J, Lamb L, Sporn MB. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. Biochemistry 1983; 22: 5692-8.
6. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. Autocrine growth stimulation of the MCF-7 breast cancer cell by the estrogen-regulated 52K protein. Endocrinology 1986; 118: 1537.
7. Dickson RB, McManaway ME, Lippman ME. Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. Science 1986; 232: 1540-8.
8. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM. Evidence that transforming growth factor- β is abnormally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. Cell 1987; 48: 417-22.
9. Barret LP, Travers M, Luqmani Y, Coombes RC. Transcripts for transforming growth factors in human breast cancer. clinical correlates. Br J Cancer 1990; 61: 612-7.
10. Murray PA, Barrett LP, Traverse M. The prognostic significance of transforming growth factor expression in humanbreast cancer. Br J Cancer 1993; 67: 1408-15.
11. Wrana JL, Attisano L, Weiser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF- β receptors. Nature(Lond) 1994; 370: 341-7.
12. Manning A, Williams A, Game S, Paraskeva C. Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor (TGF- β): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF- β . Oncogene 1991; 6: 1471-6.
13. Kimchi A, Wang X-F, Weinberg R, Cheifetz S, Massague J. Absence of TGF- β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. Science 1988; 240: 196-9.
14. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M. Missense mutation of the transforming growth factor type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. Cancer Res 1995; 55: 3892-7.
15. Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen H. Expression of transforming growth factor- β (TGF- β) receptors and expression of TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$ in human small cell lung cancer cell lines. Br J Cancer 1993; 67: 1015-21.
16. Park K, Kim S-J, Bang Y-J, Park J-G, Kim NK, Roberts AB, Sporn MB. Genetic changes in the transforming growth factor (TGF- β) type II receptor gene in human gastric cancer cells. correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- β . Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 8772-6.
17. MacKay S, Yaswen L, Tarnuzzer R, Moldawer L, Bland K, Copeland E, Schultz G. Colon cancer cells

- that are not growth inhibited by TGF- β lack functional type I and type II TGF- β receptors. Ann Surg 1995; 221: 767-77.
18. Kim IY, Ahn H-J, Zelner DJ, Shaw JW, Sensibar JA, Kim J-H, Kato M, Lee C. Genetic change in transforming growth factor (TGF- β) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF- β 1 in human prostate cancer cells. Cancer Res 1996; 56: 44-8.
 19. Nakao A, Immamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oseda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin C-H, Miyazono K, Dijke PT. TGF- β receptor-mediated signaling through Smad 2, Smad 3, Smad 4. EMBO J 1997; 16: 5353-62.
 20. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. N E J Med 1980; 303: 878-83.
 21. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. Nature 1985; 313: 747-9.
 22. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. Cancer Res 1981; 41: 2842-51.
 23. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med 1986; 163: 1037-50.
 24. Sun L, Wu G, Wilson JKV, Zborowska E, Yang J, Rajkarumanayake I, Wang J, Gentry LE, Wang X-F, Brattain MG. Expression of transforming growth factor type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. J Biol Chem 1994; 269: 26449-55.
 25. Kim DH, Chang JH, Lee KW, Lee HY, Kim S-J. Mechanism of E1A-induced transforming growth factor- β (TGF- β) resistance in mouse keratinocytes involves repression of TGF- β type II receptor transcription. J Biol Chem 1997; 272: 688-94.
 26. Choi S-G, Yi Y, Kim Y-S, Kato Mariko, Chang J, Chung H-W, Hahm K-B, Yang H-K, Rhee HH, Bang Y-J, Kim S-J. A novel ets-related transcription factor, ERT/ESX/ESE-1, regulates expression of the transforming growth factor- β type II receptor. J Biol Chem 1998; 273: 110-7.
 27. Hahn SA, Seymour AB, Hoque ATMS, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. Cancer Res 1995; 55: 4670-5.
 28. Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozemblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science(Washington DC) 1996; 271: 350-3.
 29. Koli KM, Arteaga CL. Predominant cytosolic localization of type II transforming growth factor receptors in human breast carcinoma cells. Cancer Res 1997; 57: 970-7.
 30. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Wilson JKV. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 1995; 268: 1336-8.
 31. Parsons R, Myeroff L, Liu B, Wilson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor type II receptor gene in colorectal cancer. Cancer Res 1995; 55: 5548-50.