

## 유방암 환자에서 종양 표지자로서 혈액내 TGF- $\beta_1$ 의 분포에 관한 연구

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>연세암센터, <sup>2</sup>연세 암연구소,  
<sup>3</sup>내과학교실, <sup>4</sup>외과학교실

이화영<sup>1,2,3</sup> · 라선영<sup>1,2,3</sup> · \*공수정<sup>1,2,3</sup> · 안중배<sup>1,2,3</sup> · 심광용<sup>1,2,3</sup>  
박준오<sup>1,2,3</sup> · 권현자<sup>1</sup> · 유내춘<sup>1,2,3</sup> · 정숙정<sup>2</sup> · 정현철<sup>1,2,3</sup>  
김주향<sup>1,2,3</sup> · 이경식<sup>4</sup> · 민진식<sup>1,2,4</sup>  
김병수<sup>1,2</sup> · 노재경<sup>1,2,3</sup>

### Plasma TGF- $\beta_1$ as a Tumor Marker in Breast Cancer Patients

Hwa Young Lee, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Sun Young Rha, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Soo Jung Gong, M.D.<sup>1,2,3</sup>  
Joong Bae Ahn, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Kwang Yong Shim, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Joon Oh Park, M.D.<sup>1,2,3</sup>  
Hyun Ja Kwon, MSD.<sup>2</sup>, Nae Choon Yoo, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Sook Jung Jeong, Ph.D.<sup>2</sup>  
Hyun Cheol Chung, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Joo Hang Kim, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Kyong Sik Lee, M.D.<sup>4</sup>  
Jin Sik Min, M.D.<sup>1,2,4</sup>, Byung Soo Kim, M.D.<sup>1,2</sup> and Jae Kyung Roh, M.D.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Yonsei Cancer Center, <sup>2</sup>Yonsei Cancer Research Institute,  
<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, <sup>4</sup>General Surgery,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** Transforming Growth Factor- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) is the most potent inhibitor of the progression of normal mammary epithelial cells through the cell cycle. However, advanced breast cancers are mostly refractory to TGF- $\beta$  mediated growth inhibition and produce large amounts of TGF- $\beta$ , which may enhance tumor cell invasion and metastasis by its effects on extracellular matrix. Yet, little is known about the association of TGF- $\beta_1$  with progression of malignant disease in vivo. In this study, we evaluated the preoperative and postoperative plasma level of TGF- $\beta_1$  in breast cancer and analyzed the utility of plasma TGF- $\beta_1$  as possible tumor marker.

**Materials and Methods:** ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) was used to measure plasma TGF- $\beta_1$  level in 45 newly diagnosed breast cancer patients and in 15 normal healthy people, and the results were compared with clinicopathologic characteristics.

**Results:** The mean plasma TGF- $\beta_1$  levels were  $1.73 \pm 0.47$  ng/ml in normal people and  $5.05 \pm 1.41$  ng/ml in breast cancer patients. In 37 operated patients, the preoperative plasma TGF- $\beta_1$  level was  $6.34 \pm 1.34$  ng/ml and decreased to  $4.48 \pm 1.07$  ng/ml in patients with follow-up after surgery and  $4.74 \pm 0.79$  ng/ml in patients with chemotherapy. However, there was no significant correlation between plasma TGF- $\beta_1$  level and known prognostic factors including tumor size, LN involvement, tumor grade, hormone receptor status, and pathology.

책임저자 : 노재경, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 연세 암센터, 120-752  
본 연구는 1997년도 연세대학교 의과대학 일반과제(교수) 연구비에 의하여 이루어 졌음.

\*현 소속기관: 노원 을지병원

접수일 : 1998년 4월 15일, 게재승인일 : 1998년 6월 8일

**Conclusion:** These findings suggest that the plasma TGF- $\beta_1$  level can be a tumor marker in breast cancer patients and the association with progression of breast cancer will be explored in future studies.

**Key Words:** TGF- $\beta$ , Breast cancer, Carcinogenesis, Tumor marker, Prognostic factor

## 서 론

암의 발생과 성장 과정에서 암세포가 정상적인 성장 조절 과정을 벗어나 지속적으로 성장하는 기전으로는 종양 유전자 및 종양 억제 유전자와의 관련성 외에 세포 성장 인자의 관련성에 대한 연구가 보고되었다(1~2). 세포 성장 인자는 혈액 내 존재하는 polypeptide, 조직액, 세포 추출물 등으로부터 분리할 수 있으며 주된 작용은 DNA 합성 과정에서 세포 분열을 조절하며 일부는 정상 세포가 암세포로 형질 전환되는데 중요한 역할을 한다(3). 암세포는 배양 시에 정상 세포에 비해 외부적 성장 인자의 공급을 덜 필요로 하며(4) 이는 암세포가 스스로 성장 인자를 생성하고 있음을 시사하고(1) 이 성장 인자들 중 특히 형질 전환 성장 인자(Transforming growth factor- $\beta$  : TGF- $\beta$ )가 중요한 역할을 한다(5~6).

TGF- $\beta$ 는 매우 다양한 기능을 가진 25 kD의 homodimeric peptide로서(7) 세포의 분화, 성장을 조절할 뿐 아니라 대부분의 상피 세포와 임파계 세포의 성장을 억제하는 강력한 성장 억제 인자로 알려져 있다(8). 그러나 TGF- $\beta$ 의 가장 주된 작용이 상피 세포 증식을 억제하는 작용이지만 상피 세포에서 유래한 암 세포는 TGF- $\beta$ 의 성장 억제 작용에 저항성을 보이는 바, 이러한 TGF- $\beta$ 의 저항성 획득은 암화 과정에서 중요한 단계로 인식되고 있다(9~14). 즉 악성 종양이 증식하기 위해서는 암 세포와 주위 정상 조직 사이에 매우 복잡하고 정교한 전달 체계가 성립되어야 하는데 이 과정에서 TGF- $\beta$ 는 여러 세포의 성장을 억제하는 기능을 보인다(autocrine pathway). 그러나 일단 암 세포가 TGF- $\beta$ 의 성장 억제 작용에 저항성을

나타내는 경우, TGF- $\beta$ 를 과다 발현하게 된다. TGF- $\beta$ 의 성장 억제 작용에 저항성을 획득한 암 세포에서 분비되는 TGF- $\beta$ 는 세포의 성장을 억제하기보다는 오히려 주위 혈관 생성을 촉진하고 면역 감지 기능을 억제하여 종양 증식을 촉진하게 된다(paracrine pathway)(15~17).

암 발생 과정에서 TGF- $\beta$ 의 다양한 작용과 함께 배양된 암세포에서 TGF- $\beta_1$  gene의 mRNA과 발현 및 TGF- $\beta_1$ 의 분비 증가가 보고되었다(18~22). 아울러 TGF- $\beta_1$  mRNA의 과발현이 human renal cancer(23), breast cancer(8), scirrhous gastric cancer(24) 등에서 보고되었으나 아직까지 암 환자 혈액에서 TGF- $\beta_1$  과다 발현의 임상적 의미로서 또는 치료 목표(target)로서의 연구는 거의 시행되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 유방암 환자의 혈액에서 억제성 종양 성장 인자인 TGF- $\beta_1$ 의 발현도와 그 진단적, 치료적 목표로서의 의미를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 대상 환자

대상 환자는 1997년 1월부터 1997년 6월 까지 연세 대학교 의과대학 연세 의료원 및 연세 암 센터에 내원하여 조직학적으로 유방암이 확진되어 수술적 처치 및 항암 약물요법을 시행 받은 환자 45예로 하였다. 정상 대조 군은 여자로서 정기 신체 검사상 정상이며 특이한 자각 증상이 없는 15예를 대상으로 하였다.

### 2) 혈액 채취

혈액 채취는 아침 식전에 시행하였으며, 수술이 시행될 환자는 수술 시행 전에, 수술이 불가능한 환자에서는 방사선 치료나 항암 약물 치료 시

행 전에 혈액을 채취하였다. 수술이 시행된 환자는 수술 후 적어도 2주가 지난 후 혈액을 다시 채취하였다. 모든 채취된 혈액은 EDTA가 포함된 시험관에 보관되었고 채혈 24시간 이내에 혈장을 분리하였다. 혈액은 1500 rpm에서 15분 동안 원심 분리한 후 2~8°C에 보관하였다. 검사가 채혈 24시간 이후 시행될 경우는 -70°C에 냉동 보관하였고, 혈장의 반복적 냉동과 용해는 피하였다.

### 3) 혈중 TGF- $\beta_1$ 측정을 위한 ELISA

Human TGF- $\beta_1$  immunoassay kit(R&D Systems, Minneapolis, MN)을 이용하여 면역 활성도를 측정하였다. 각 검체는 latent TGF- $\beta_1$ 을 활성화시키기 위하여 2.5 N acetic acid/10 M urea로 산성화시키고, 2.7 N NaOH/1M HEPES로 중성화시켰다. 활성화된 각 검체는 200  $\mu$ l의 검체 희석 용액과 함께 TGF- $\beta$  제 2형 수용체가 coating 되어있는 96-well microplate에 투여한 후 뚜껑을 닫고, 실온에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상층 액을 완전히 제거하고 세척 액으로 3회 세척한 후 microplate를 탈지면 위에 거꾸로 하여 남아있는 수분을 완전히 제거하였다. Unbound된 substrate를 제거하기 위하여 200  $\mu$ l의 TGF- $\beta_1$  conjugate를 각 well에 첨가하고 실온에서 1.5시간 동안 배양한 후 상기와 같은 방법으로 3회 세척하였다. 또한 unbound된 antibody-enzyme reagent를 제거하기 위해 200  $\mu$ l의 substrate solution을 각 well에 첨가하고 20분간 배양하였다. 역시 3회 세척한 후 50  $\mu$ l의 정지 액을 각 well에 투여하고 30분 이내에 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4) 혈장 TGF $\beta_1$ 의 정상 범위 결정

정상인 15예의 혈장 TGF 1의 평균+2 x 표준편차를 정상 상한 값으로 정하였다.

### 5) 임상적 인자

Tumor grade는 Bloom & Richardson 방법으로 시행하였으며, 병리학병기는 AJCC 기준(1992)에

의해 정하였다.

### 6) 통계학적 처리

각 군간의 비교는 paired t-test를 이용하여 two-sided p-value 0.05 이하를 유의하게 정하였고 상관성은 Pearson's correlation으로 구하였다. 또한 기존 예후 인자들과의 상관성은 Mann-Whitney 검정을 이용하였다.

## 결 과

### 1) 대상 환자의 임상적 특성

정상 대조군 15예의 중앙 연령은 35세(범위: 22세~50세)였으며, 유방암 환자군 45예의 중앙 연령은 41세(범위: 30세~71세)였다. 수술이 가능하여 유방 절제술을 시행 받은 환자는 37예로 병리학적 병기는 병기I이 2예, 병기II가 23예(IIa 14예, IIb 9예), 병기 III이 12예(IIIa 10예, IIIb 2예)였고, 진단 당시 병기 IV로 수술이 불가능했던 환자는 8예였다. 종양의 크기는 2 cm 미만인 9예, 2~5 cm인 19예였으며, 5 cm 이상인 경우가 17예였다. 액와 임파절 전이가 있었던 예는 30예로 이중 23예에서 4개 이상의 임파절로 전이되었으며, 임파절 전이가 없었던 예는 15예였다. 병리학적 유형은 Infiltrating ductal carcinoma가 42예로 대부분을 차지했고, infiltrating lobular carcinoma 2예, infiltrating papillary carcinoma 1예였다(Table 1).

### 2) 정상 대조군 및 환자 군의 혈장내 TGF- $\beta_1$ 치

정상 대조군 15예의 혈중 TGF- $\beta_1$ 은  $1.73 \pm 0.47$  ng/ml(범위 1.23~3.03)였다. 유방암 환자군 총 45예의 TGF- $\beta_1$ 은  $5.05 \pm 1.41$  ng/ml(범위 3.10~9.23)으로 정상 대조군에 비해 증가하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 정상 상한 값을 정상인의 평균+2 x 표준편차로 하여 이보다 높을 경우 sero-positivity 정의할 때, 상한 값은 2.67 ng/ml이었으며, 유방암 환자 45예 모두 sero-positivity 양성이었다.

Table 1. Patient's characteristics

Characteristics	Number of patient
Age	
<50	9
≥50	36
Stage	
I	2
II	23
III	12
IV	8
Tumor Size	
≤2 cm	9
2~5 cm	19
≥5 cm	17
LN involvement	
Negative	15
Positive 1~3	7
4~9	20
10	3
Estrogen receptors	
Positive	5
Negative	21
Unknown	19
Progesteron receptors	
Positive	10
Negative	16
Unknown	19
Pathology	
Infiltrating ductal cancer	42
Infiltrating papillary cancer	1
Infiltrating lobular cancer	2

3) 수술 전과 후의 혈장 내 TGF-β<sub>1</sub>치의 변화

수술이 가능하여 유방 절제술을 받은 37예의 환자에서 수술 전 혈중 TGF-β<sub>1</sub>은 6.34±1.34 ng/ml였고 수술 후 적어도 2주가 경과한 후 측정된 TGF-β<sub>1</sub>은 4.48±1.07 ng/ml로 감소하였다 (p<0.05). 그러나 수술 후 항암 약물 치료 중인 환자(20예)의 혈중 TGF-β<sub>1</sub>은 4.74±0.79 ng/ml로 수술 후 항암 약물 치료를 받지 않는 환자(17예)에 비해서 증가된 경향이였다(Fig. 2).

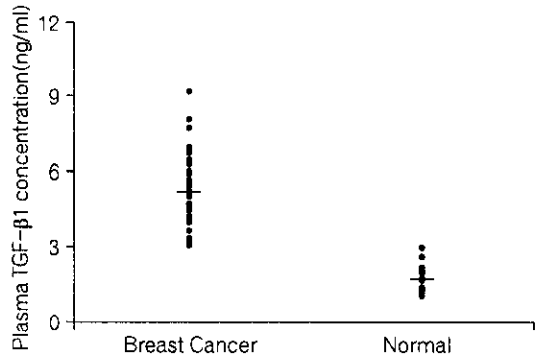


Fig. 1. Specimens were derived from 45 patients with breast cancer and 15 normal controls. Plasma TGF-β<sub>1</sub> was extracted and measured using TGF-β<sub>1</sub> ELISA system. Bars represent mean values.

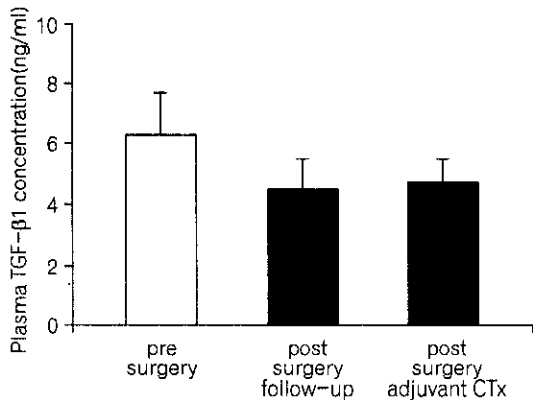


Fig. 2. Plasma TGF-β<sub>1</sub> levels in patients with breast cancer before and after surgical resection of the tumor. Bars represent SD.

4) 유방암 환자의 혈중 TGF-β<sub>1</sub>치와 예후 인자와의 상관성

종양의 병기에 따른 수술 전 혈중 TGF-β<sub>1</sub> 치는 병기가 진행될수록, 액와 임파절 전이가 4개 이상일 경우, 종양의 크기가 5 cm 이상일 경우 증가하는 경향이였으나 유의성은 없었다(Table 2).

고 찰

유방암에서 발견되는 성장 인자는 많이 알려져

**Table 2.** Comparison of plasma TGF- $\beta_1$  level with clinicopathological features

Category	Plasma TGF- $\beta_1$ level
Stage	
I	4.60 $\pm$ 1.07
II	4.69 $\pm$ 1.12
III	5.98 $\pm$ 1.67
IV	4.96 $\pm$ 1.65
Node involvement	
Negative	4.89 $\pm$ 1.11
1~3	4.90 $\pm$ 1.64
$\geq 4$	5.45 $\pm$ 1.53
Tumor size	
$\leq 5$ cm	4.80 $\pm$ 1.31
$> 5$ cm	5.23 $\pm$ 1.43
Steroid receptor	
Positive	4.85 $\pm$ 1.14
Negative	5.20 $\pm$ 0.94
Histologic grade	
Grade 1	5.12 $\pm$ 1.24
Grade 2	4.25 $\pm$ 0.94
Grade 3	5.71 $\pm$ 1.57

있지만 특히 estrogen 의존성인 유방암의 치료에 쓰이는 tamoxifen에 의해 생성이 매우 증가되는 TGF- $\beta$ 에 대한 연구는 활발하다. Estrogen이 TGF- $\alpha$ , insulin-like growth factor(IGF) 및 platelet-derived growth factor(PDGF)의 분비를 증가시키는데 비해 (25~26), TGF- $\beta$ 는 antiestrogen인 tamoxifen에 의해 생성이 촉진된다(27). 이와 같이 유방암에서 호르몬 치료 결과 TGF- $\beta$ 의 생성을 증가시킴으로써 암 세포의 성장 억제를 유도함은 TGF- $\beta$ 의 수용체를 통한 신호 전달 체계가 유방암의 발생 및 치료에 관여됨을 알 수 있다(8).

TGF- $\beta$ 는 분자량이 25 kD인 이중체 단백질로서 사람에게는 TGF- $\beta_{1,2,3}$ 의 3가지 이형(isoform)이 알려져 있다. 이러한 이형 TGF- $\beta$ 들 상호간에는 약 70%의 아미노산 서열 유사성이 관찰되며, 포유류에서 가장 풍부한 이형은 TGF- $\beta_1$ 으로 혈소판, 비장, 골 등에서 다량 분리되었다(7). TGF- $\beta$ 는 대표적인 다기능 성장 인자로 알려져 있으며, 특히 세포

의 증식과 분화 조절 및 세포 외 기질의 합성에 중요한 역할을 한다. 이 중 TGF- $\beta$ 의 주된 기능은 세포 증식 억제 작용으로 대부분의 상피 세포 및 림프계 세포의 성장을 억제하며 그 기전으로는 TGF- $\beta$ 가 세포 주기의 G1 말기에 세포 주기 정지를 유도하거나(28) apoptosis를 유도함으로 알려져 있다(29~31).

그러나 정상 세포에서 오는 달리 세포들이 악성화 하면서 TGF- $\beta$ 에 의한 정상적인 성장 조절을 도피하게 되며(14) 그 가능한 기전 중의 하나가 TGF- $\beta$ 에 대한 저항성 획득이다. 즉, 악성 종양이 증식하기 위해서는 암 세포와 주위 정상 조직 사이에 정교한 전달 체계가 성립되는데, 이 과정에서 TGF- $\beta$ 는 여러 세포의 성장을 억제하나, 일단 암 세포가 TGF- $\beta$ 의 성장 억제 작용에 저항성을 획득한 경우는 TGF- $\beta$ 를 과다 발현하게 된다. 이와 같은 암 세포의 TGF- $\beta_1$ 과 발현 기전으로는 종양 유전자에 의한 transcriptional activation이 증가하여 암 세포 내에서 합성이 증가함으로 알려져 있다(15) 또한 TGF- $\beta_1$ 의 성장 억제 작용으로부터 도피한 암 세포에 있어서는 TGF- $\beta$ 가 오히려 종양 생성을 촉진하기도 하므로 TGF- $\beta$  저항 세포의 positive selection에 의한 결과로 제시되고 있다. 암 세포에서 TGF- $\beta_1$  단백질의 과다 발현 여부가 지금까지는 주로 면역 조직 화학적 염색 법에 의해 시행되어온 바, 그 결과를 얻기까지 상당한 시간이 소요된다는 점이 즉각적인 임상 적용을 어렵게 하였다. 그러나 최근 면역학의 발달로 암 환자의 혈액 내에서 순환하는 여러 가지 종양 표지자의 추적이 가능하여졌으며 특히 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 의한 정량적 분석이 가능하게 되었다(32~33).

본 연구에서는 유방암 환자에서 TGF- $\beta_1$  단백질 항원의 세포막 외부 구조에 대한 단클론 항체를 사용하여 혈액 내 TGF- $\beta_1$ 을 측정하였다. 그 결과 유방암 환자의 혈중 TGF- $\beta_1$ 치는 정상인에 비해 증가함을 관찰함으로써 유방암에서 TGF- $\beta_1$  단백질의 과발현을 확인할 수 있었다. 또한 TGF- $\beta_1$ 의 과발현이 암의 존재를 감지할 수 있는 tumor marker

로서의 가능성을 추정하기 위하여 유방암 환자에서 수술 전과 수술 후 혈액 내 TGF- $\beta_1$ 의 발현 정도를 측정된 결과 수술로써 암세포가 제거된 환자의 혈장 TGF- $\beta_1$ 치는 수술 전에 비해 유의하게 감소하였으나 정상 대조군의 혈장 TGF- $\beta_1$ 치 이하로 감소되지 않았다. Kong등은(34) 수술 후 혈액 내 TGF- $\beta_1$ 가 계속 증가된 예는 잔류 암이 있는 경우와 임파 절 전이가 있는 경우였다고 보고하면서 혈액내 TGF- $\beta_1$ 치가 수술 후에도 계속 증가되어 있다면 잔류 암의 가능성을 시사한다고 하였으나 저자들은 병의 진행 정도와 수술 후 TGF- $\beta_1$ 과의 상관성은 관찰할 수 없었다. 그러나 수술 후 지속적 증가를 보이는 TGF- $\beta_1$ 이 재발의 위험을 반영하는지의 여부를 확인하기 위해서는 보다 많은 실험 대상 및 장기 추적 조사가 요구되어진다고 하였다.

암의 진행에 미치는 TGF- $\beta$ 의 역할에 관한 연구에는 지금까지 주로 면역 조직 화학적 염색법이 이용되었는데, Jassini등(35)은 정상 조직 또는 양성 갑상선 종양에 비해 갑상선 암에서 TGF- $\beta$ 의 과 발현을 보고하였다. 유방암의 진행과 TGF- $\beta$ 와의 상관성에 대한 연구는 Walker등(36)이 정상 유방 조직과 carcinoma in situ와는 대조적으로 침윤성 유방암 조직에서 TGF- $\beta$ 가 강 양성으로 염색됨을 보고하였다. Dalal등(37)은 침윤성 유방암 중에서도 액와 임파 절 전이가 많을수록 TGF- $\beta$ 의 강 양성으로 염색됨을 보고하였으며, McCune 및 Gorsch등도 이와 유사하게 TGF- $\beta$ 단백의 과발현과 유방암 진행과의 상관성을 보고하였다(38~39). 저자들은 수술 전 혈액 내 TGF- $\beta_1$ 도 유방암의 진행 정도를 반영할 수 있는지를 확인하고자 여러 가지 임상 인자와의 상관성을 조사하였으나 면역 조직 화학 염색법을 이용한 보고들에서 관찰할 수 있었던 상관성을 확인할 수 없었다.

이와 같은 상이한 현상은 본 연구에서는 병기 0의 환자가 포함되지 않았으며, 또한 조직에 분포하는 혈관의 차이에 따라 조직에서 혈액 내로 유리되는 TGF- $\beta_1$ 의 차이, 말초 혈액 내로 유리된 TGF- $\beta_1$ 의 반감기 차이 등에 근거할 가능성이 있

어, 추후 조직(immunohistochemical staining assay)과 혈액(ELISA)에서 TGF- $\beta_1$ 의 발현에 대한 동시 추적이 필요하다 생각된다.

## 결 론

유방암 환자의 혈액에서 TGF- $\beta_1$ 은 정상 인에 비해 과다 발현하였으며, 수술적 치료로 유방암 세포를 제거한 후 혈액 내 TGF- $\beta_1$ 이 감소함을 관찰할 수 있었다. 추후 장기 추적 과정에서 재발과의 연관성을 확인함으로써 혈액내 TGF- $\beta_1$ 의 tumor marker로서의 임상적 응용을 기대할 수 있겠다.

## 참 고 문 헌

1. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *New Engl J Med* 1980; 303: 878-80.
2. Sporn MB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 1985; 313: 747-9.
3. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res* 1981; 41: 2842-8.
4. Holley RW. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 1975; 258: 487-90.
5. 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  $\beta$  transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 6264-8.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Kirmchi A, Wang XF, Weinberg R, Cheifetz S, Massague J. Absence of TGF- $\beta$  receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells. *Science* 1988; 240: 196-9.
  10. Garrigue-Antar L, Munoz-Antonia T, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M. Missense mutation of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3892-7.
  11. Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulson H. Expression of transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 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.
  12. Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB, Sporn MB. Genetic changes in the transforming growth factor(TGF- $\beta$ ) type II receptor gene in human gastric cancer cells. correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF- $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8772-6.
  13. MacKay S, Yaswen L, Tarnuzzer R, Moldawer L, Bland K, Copeland E, Schultz G. Colon cancer cells that are not growth inhibited by TGF- $\beta$  lack functional type I and type II TGF- $\beta$  receptors. *Ann Surg* 1995; 221: 767-77.
  14. Manning A, Williams A, Game S, Paraskeva C. Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor (TGF- $\beta$ ): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF- $\beta$ . *Oncogene* 1991; 6: 1471-6.
  15. Birchenall-Roberts M, Ruscetti F, Kasper J, Lee HD, Friedman R, Geiser A, Sporn MB, Roberts AB, Kim SJ. Transcriptional regulation of the transforming growth factor-1 promoter by v-src gene products is mediated through the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4978-83.
  16. Ito N, Kawata S, Tamura S, Takaishi K, Shirai Y, Kiso S, Yabuuchi I, Matsudo Y, Nishioka M, tarui S. Elevated levels of transforming growth factor- $\beta$  messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 4080-3.
  17. Yoo YD, Ueda H, Park K, Flanders KC, Lee YI, Jay G, Kim SJ. Regulation of transforming growth factor- $\beta_1$  expression by the hepatitis B virus(HBV) X transactivator. *J Clin Invest* 1996; 97: 388-95.
  18. Derynck R, Goeddel DV, Ulrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors and  $\beta$  and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 1987; 47: 707-12.
  19. Anzano HA, Roberts AB, De Largo JE, Wakefield LM, Assoian RK, Roche NS, Smith JM, Lazarus JE, Sporn MB. Increased secretion of type  $\beta$  transforming growth factor accompanies viral transformation of cells. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 242-7.
  20. Coffey RJ Jr, Shipley GD, Moses HL. Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res* 1986; 46: 1164-9.
  21. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Cromburghe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- $\beta$ . *J Cell Biol* 1987; 195: 1039-45.
  22. La Rocca RV, Park JG, Danesi R, Tacca MD, Steinberg SM, Gazdar AF. Pattern of growth factor, proto-oncogene and carcinoembryonic antigen gene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Oncology* 1992; 49: 209-14.
  23. Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A. Expression of transforming growth factor and  $\beta_1$  in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49: 6972-5.
  24. Yoshida K, Yokozaki H, Niimoto M, Ito H, Ito M, Tahara E. Expression of TGF- $\beta$  and procollagen type I and type II in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1989; 44: 394-8.
  25. 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: 1537-45.

26. Dickson RB, McManaway ME, Lippman ME. Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science* 1986; 232: 1540-3.
27. Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM. Evidence that transforming growth factor-beta is abnormally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987; 48: 417-28.
28. Howe P, Draetta G, Lof E. Transforming growth factor  $\beta_1$ ; inhibition of p34<sup>cdc2</sup> phosphorylation and histon H1 kinase activity is associated with G/S-phase growth arrest. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1185-94.
29. Lin JK, Chou CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor  $\beta_1$ . *Cancer Res* 1992; 52: 385-8.
30. Wang C, Eshleman J, Wilson J, Markowitz S. TGF- $\beta$  and substrate release are both inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res* 1995; 55: 5101-5.
31. Yanagihara K, Tsumuraya M. Transforming growth factor  $\beta_1$  induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1992; 52: 4042-5.
32. Gatanaga T, Hwang C, Kohr W. Purification and characterization of an inhibitor(soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from thye serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8781-4.
33. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: Biology, function and clinical application. *Ann Intern Med* 1990; 113: 619-27.
34. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor- $\beta_1$  levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995; 222: 155-62.
35. Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemonie NR, Williams ED, Waynford DT. Immunohistochemically detectable transforming growth factor- $\beta$  association with malignancy in thyroid epithelial neoplasm. *Growth factor* 1994; 2: 149-56.
36. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta  $\beta_1$  in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 1992; 28: 641-4.
37. Dalal BI, Keown PA, Greenberg AH. Immunocytochemical localization of secreted transforming growth factor- $\beta_1$  to the advancing edges of primary tumors and to lymph node metastases of human mammary carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 381-9.
38. McCune BK, Mullin BR, Flanders KC, Jaffurs WJ, Mullen LT, Sporn MB. Localization of transforming growth factor-beta isotypes in lesions of the human breast. *Hum Pathol* 1992; 23: 13-20.
39. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor  $\beta_1$  associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6949-52.