

## 유방암 세포에서 Tamoxifen과 Retinoic Acid가 Transforming Growth Factor- $\beta$ 에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 외과학교실

이희대 · 윤동섭 · 정철운 · 구자윤

= Abstract =

### Transforming Growth Factor-beta(TGF- $\beta$ ) as a Mediator of Tamoxifen and Retinoic Acid in Breast Cancer

Hy De Lee, M.D., Dong Sup Yoon, M.D., Chul Woon Jung, M.D.  
and Ja Yun Koo, M.D.

*Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine*

TGF- $\beta$  is multifunctional regulatory homodimeric polypeptides and regulate cell differentiation, cell growth, cell function and is the most potent growth-inhibitory polypeptides known for a wide variety of cell types including most normal and transformed epithelial, endothelial, fibroblast, lymphoid and hematopoietic cells. The production of TGF- $\beta$  by the estrogen receptor-positive cell line MCF-7 has been reported to be most affected by antiestrogens, and Tamoxifen caused a 5-fold increase in production of TGF- $\beta$  by MCF-7 cells and its regulation of TGF- $\beta$  production was thought to be posttranscriptional. Recent work has shown that the proliferation of both mouse and human keratinocytes was potentially and reversibly inhibited by TGF- $\beta$ , and that retinoic acid induced TGF- $\beta_2$  in cultured keratinocytes and mouse epidermis. These results suggest that the regulation of TGF- $\beta_2$  expression by tamoxifen and retinoic acid may have a important role in control of breast cancer cell growth. To obtain better understanding of how tamoxifen and retinoic acid could regulate growth of breast cancer cells, we carried out this experimental study.

Using phenol red-free medium, we cultured MCF-7 cells and then treated with various dosage of tamoxifen, retinoic acid and tamoxifen with retinoic acid, and then observed MCF-7 cell growth and the production of TGF- $\beta$ . The growth of MCF-7 cell was markedly inhibited by tamoxifen, and synergistic inhibitory effect was discovered when retinoic acid was supplemented with tamoxifen. Both tamoxifen and retinoic acid increased the secretion of TGF- $\beta_1$  & TGF- $\beta_2$ , especially TGF- $\beta_2$ . The mRNA induction of TGF- $\beta_2$  was increased by treatment of retinoic acid and it was more increased by treatment of retinoic acid with tamoxifen.

As these results, we concluded that Tamoxifen and retinoic acid increased the production of the TGF- $\beta$ , retinoic acid may be used as second postoperative adjuvant therapeutic agent of breast cancer.

---

**Key Words:** Breast cancer, TGF- $\beta$ , Retinoic acid, Tamoxifen

\* 본 연구는 1994년 연세대학교 의과대학 일반과제 연구비로 이루어졌음.

## 서 론

암 세포가 정상 세포 기능에 관여하는 mechanism을 벗어나 지속적으로 성장하기 위한 여러 기전이 있는데 이 중 하나가 Growth factor의 관련설이다. Transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ )는 매우 다양한 기능을 가진 homodimeric polypeptides로서 cell differentiation, growth, function을 통제할 뿐만 아니라 여러 종류의 세포(normal cell 및 transformed epithelial, endothelial, fibroblast, lymphoid and hematopoietic cells)에서 가장 강력한 growth-inhibitory polypeptides로 알려져 있으며, 유방암 세포의 성장 및 억제에 있어서의 이의 작용에 많은 관심을 기울이게 되었다.

여성 유암이 호르몬(estrogen, progesterone, prolactin, androgen, thyroid hormone 등)과 연관관계가 있다는 것은 잘 알려진 사실이며 이 중에서도 특히 estrogen을 대표적으로 들 수 있다<sup>1)</sup>. 여성 유암이 내분비 의존성이 있다는 것은 유방암 환자의 50% 이상에서 estrogen receptor(ER)가 관찰되며, ER(+) 환자의 60%, ER(-) 환자의 6%에서 호르몬 치료(tamoxifen)에 반응이 있는 것으로 알 수 있으나 그 정확한 작용기전 및 ER(+) 환자 중 호르몬 치료에 반응을 하지 않는 환자군의 원인에 대하여는 아직 많은 연구가 진행중에 있다. Estrogen이 TGF- $\alpha$ , insulin-like growth factor II 및 platelet-derived growth factor의 분비 및 mitogenic activity를 증가시키는데 비해<sup>2-3)</sup>, 1987년 Knabbe에 의하면 ER(+) MCF-7 cell line에서 TGF- $\beta$ 는 antiestrogen에 의해 가장 잘 생성된다고 하였으며, 또한 Tamoxifen이 ER(+) estrogen-sensitive MCF-7 cell에서는 성장억제 및 TGF- $\beta$ 의 분비를 5 배 이상 현저히 증가시키는데 비해 ER(+) estrogen-resistant LY-2 cell에서는 그렇지 못한 점을 발견하여 이것이 Tamoxifen이 암세포 성장억제 효과를 나타내는 기전일 것이라고 보고하였다<sup>4)</sup>. Retinoids 역시 세포의 성장과 분화에 관여하는 중요 인자로 알려져 왔으나 이의 기전에 관해서는 많이 알려져 있지 않다. 최근 mouse나 사람의 keratinocytes 중식이

TGF- $\beta$ 에 의해 강력하게 억제되고<sup>5)</sup>, cultured keratinocytes와 mouse epidermis에서 TGF- $\beta$ 가 retinoic acid에 의해 induction 됨을 관찰하였으며<sup>6)</sup>. ER(+) cell line에서 retinoic acid와 tamoxifen의 병용이 성장억제 작용의 증가를 촉진한다는 많은 보고들이 있다<sup>7)</sup>.

이에 저자들은 tamoxifen과 retinoic acid가 TGF- $\beta$ 를 생성 할 수 있는지, TGF- $\beta$ 가 tamoxifen과 retinoic acid에 의해 어떠한 기전으로 조절되는지를 실험을 통하여 확인하고, 유방암 환자의 호르몬 치료에 있어 tamoxifen과 retinoic acid의 병용에 대한 이론적 배경을 제시하고자 이 실험 연구를 시행하였다.

## 재료 및 실험방법

### 1) Cell & Cell culture

실험에 사용한 cell은 "American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)"에서 공급받은 MCF-7 cell을 사용하였으며, cell의 유지는 IMEM(improved minimal essential zinc option medium)에 5% FBS(Fetal bovine serum)을 혼합한 용액을 사용하였다.

실험 전날 phenol red의 weak estrogen effect를 제거하기 위하여 phenol red-free RPMI 1640 solution에 Sigma 제품인 1 $\times$ ITS(Insulin, Transferrin, Selenite)를 혼합하여 사용하였으며, passage 100 이하의 세포를 사용하여 실험하였다.

### 2) Growth inhibition assay

MCF-7 cells을 6 well flask에 1 well당 2 ml의  $1.5 \times 10^5$ 개씩 넣은 후 reagents(Tamoxifen, Retinoic acid)로 처치하고, 1 well당  $0.5 \mu\text{Cu H}_3$  Thymidine을 넣고 2시간 동안 incubation한다. Incubation 후 2.0 ml의 Methanol: Acetic acid (3:1)로 1시간 동안 cells을 고정(fixation) 시킨 다음 2 ml의 80% Methanol로 cells을 2회 wash 한 후 0.5 ml Trypsin(0.2 mg/ml Gibco stock)을 넣고 실온에서 1시간 동안 방치한 후 0.5 ml 1% SDS를 넣고 5분 후 beta counter로 세포 수를 측정하였다.

실험 당일(day 0)의 beta-count를 100%로 하고 실험 1(day 1), 3(day 3), 5(day 5)일째 측정된 양을 실험 당일 양의 백분율로 환산하였다.

이상의 방법을 대조군, tamoxifen 투여군, retinoic acid 투여군 및 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서 각각 시행하여 tamoxifen, retinoic acid, tamoxifen+retinoic acid의 MCF-7 cell에 대한 성장 억제 효과를 비교 분석하였다.

### 3) Quantitative radioreceptor assay for TGF- $\beta$

대조군, tamoxifen 투여군, retinoic acid 투여군 및 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서의 TGF- $\beta_1$  및 TGF- $\beta_2$  분비량의 측정은 day 5에 David Danielpour의 Sandwich ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) method 8-9)를 사용하였다. 즉 Reagents로 처리한 각각의 conditioned medium을 binding buffer(DMEM, 25 mM Hepes pH 7.4, 0.1% Bovine serum albumin)로 3번 연속 serial dilution한다. TGF-beta Standard curve를 construction(1~3,000 pM)하여 각 plate 마다 normalization 한 후 Room temperature에서 2시간동안 binding 하도록 한다. Ice-cold wash buffer(Hank's buffered saline with 0.1% Bovine serum albumin)로 2번 씻은 후 50 pM의  $^{125}$ I-TGF-beta(50,000 cpm/well)을 첨가한 다음 다시 ice-cold wash buffer로 씻고 37°C에서 20분 incubation 시킨후 gamma counter로 계산한 다음 Standard Curve와 비교하여 TGF-beta를 quantitation 한다. Solubilization buffer(1% Triton X-100, 10% Glycerol, 20 mM Hepes pH 7.4)를 첨가한다.

### 4) RNA isolation and Northern analysis of TGF- $\beta$

Reagents를 처리하고 일정 기간이 지난 후 각 Sample(Flask)에서 Conditioned medium을 버린 후 GITC(Guonidinium Thiocyanate)-Phenol-Chloroform Extraction 방법을 이용하여 RNA를 추출한다. 즉, T-150 flask를 PBS로 두번 세척한 후 GITC 2 ml를 넣은 후 즉시 cell들을 scrape 한

다. 0.2 ml의 2M Sodium acetate, 2 ml의 Phenol, 0.4 ml의 Chloroform-isoamyl-alcohol(49:1)을 첨가하고 Centrifuge한다.

Aqueous Phase를 fresh tube에 넣은 후 isopropanol 2 ml를 첨가하여 다시 Centrifuge한다. 추출된 Pellet을 0.6 ml의 Solution D를 첨가하여 용해한 후 1 volume의 isopropanol로 precipitation 시킨다. 4°C에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 75% alcohol에 Resuspension 시킨다. 이렇게 얻은 각각의 RNA를 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동시키고 NYTRAN(Schleicher and Schuell)에 transfer 시킨다. 한편 Klenow를 사용하며 random priming한 single strand의 DNA PROBE (TGF-beta 1, TGF-beta 2)를 사용하여 transfer된 RNA Filter에 Hybridization 시킨다. 65°C에서 overnight하여, 익일  $1\times$ SSC와 0.5% SDS로 두번 Washing 한 후 Autoradiography 한다. Autoradiography 한 RNA blot을 densitometer로 측정한다.

이 방법은 Chomczynskin<sup>10)</sup>의 Single method를 사용하였다. TGF- $\beta_1$ 과  $\beta_2$ 의 probe는 각각 미국 National Institute of Health의 Dr. Seong-Jin Kim과 Dr. Michael O'reilly의 gift로 실험을 하였다.

## 결 과

### 1) Tamoxifen, retinoic acid & tamoxifen + retinoic acid의 MCF-7 cells growth inhibition(Fig. 1)

대조군, retinoic acid 투여군, tamoxifen 투여군 및 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서의 day 0를 기준으로 day 1, 3, 5에서의 beta count 비율의 변화는 대조군 100.0%, 103.0%, 121.0%, retinoic acid 투여군 118.5%, 110.0%, 108.5%, tamoxifen 투여군 100.0%, 81.5%, 75.0%, tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군 105.0%, 70.0%, 68.5%로 나타났으며, 이는 tamoxifen 투여군과 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서 MCF-7 cells의 성장 억제효과가 있음을 입증하는 결과이며 통계적으로 유의한 차이는 없으나 tamoxifen과

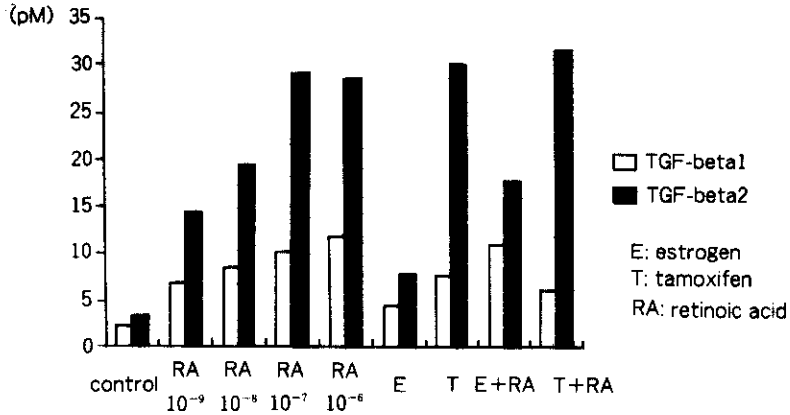


Fig. 1. Growth inhibition assay.

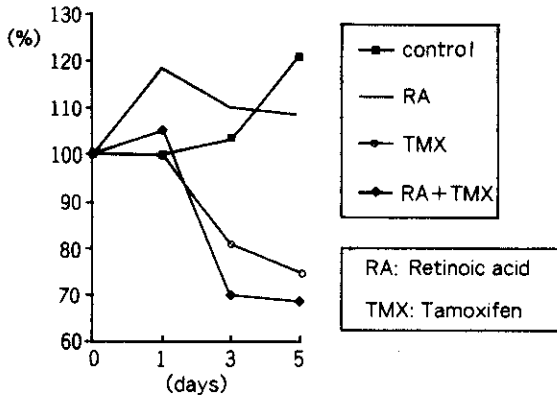


Fig. 2. Secreted TGF-beta 1 and TGF-beta 2 in CM.

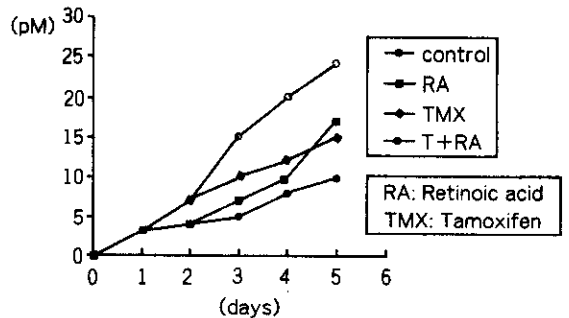


Fig. 3. TMX & RA effect on the TGF-beta 2 in MCF-7 cells.

retinoic acid 병용 투여군에서 tamoxifen 투여군 보다 성장 억제 상승 효과가 있음을 관찰 할 수 있었다.

2) Secreted TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β<sub>2</sub> in CM (Fig. 2)

실험 5일째 대조군, retinoic acid 투여군(10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> M/L), estrogen 투여군, tamoxifen 투여군, estrogen+retinoic acid 투여군 및 tamoxifen+retinoic acid 투여군에서 TGF-β<sub>1</sub>과 TGF-β<sub>2</sub> 분비량을 측정된 결과 TGF-β<sub>1</sub>은 모든 군에서 유의한 증가가 없었으나 TGF-β<sub>2</sub>의 분비는 대조군에서 3.39±0.16 pM인데 비해 retinoic acid(10<sup>-7</sup>

M/L이상) 투여군, tamoxifen 투여군 및 tamoxifen + retinoic acid 투여군에서 각각 29.0 ± 0.5, 30.1 ± 2.0, 31.6 ± 2.5 pM로 유의한 증가가 있었으며, tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서 가장 유의한 증가가 있었다.

3) Tamoxifen & retinoic acid effect on TGF-β<sub>2</sub> in MCF-7 cells(Fig. 3)

대조군, retinoic acid 투여군, tamoxifen 투여군 및 tamoxifen과 retinoic acid 병용투여군에서 day 0, 1, 2, 3, 4, 5의 TGF-β<sub>2</sub> 분비량을 측정된 결과 실험 5일째까지 세군 모두에서 유의하게 증가하였으며 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군에서

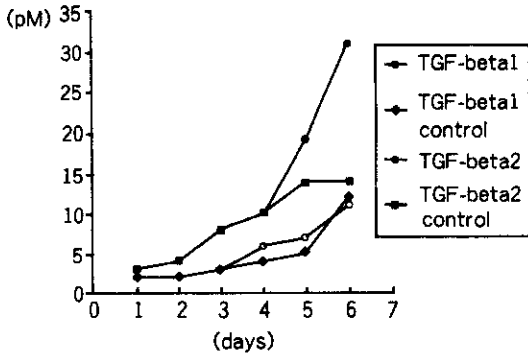


Fig. 4. RA effect on TGF-beta 1 & beta 2 in MCF-7 cells.

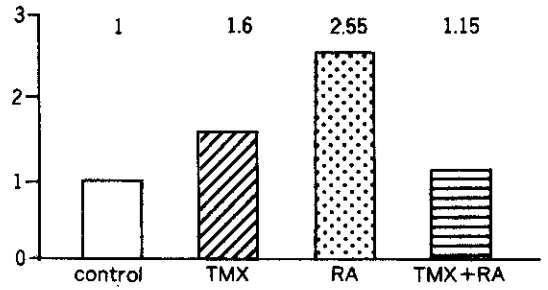


Fig. 6. TGF-beta 2 Densitometry.

여군에서 2.55배로 가장 높은 증가를 나타내었다.

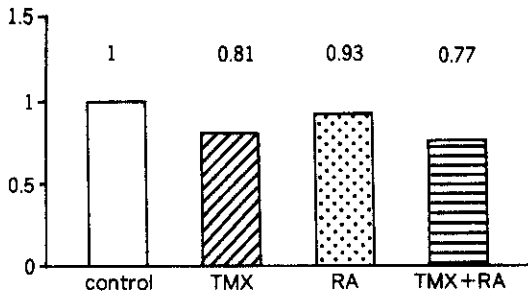


Fig. 5. TGF-beta 1 Densitometry.

가장 유의있게 증가하였다.

4) Retinoic acid effect on TGF- $\beta_1$  & TGF- $\beta_2$  in MCF-7 cells(Fig. 4)

대조군과 retinoic acid 투여군에서 day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6에 TGF- $\beta_1$ 과 TGF- $\beta_2$  분비량을 측정된 결과 TGF- $\beta_1$ 은 양군에서 유의한 차이가 없었으며 TGF- $\beta_2$ 는 retinoic acid 투여군에서 day 5이후 유의한 증가가 있었다.

5) TGF- $\beta_1$  & TGF- $\beta_2$  RNA assay(Fig. 5, 6)

Autoradiography한 필름에서 RNA expression된 것을 densitometer로 측정된 결과, TGF- $\beta_1$  RNA는 대조군, tamoxifen 투여군, retinoic acid 투여군 및 tamoxifen과 retinoic acid 병용 투여군 모두에서 유의한 차이가 없었으나 TGF- $\beta_2$  RNA는 세군 모두에서 증가하였으며 특히 retinoic acid 투

고 찰

유방암은 생활수준의 향상, 건강에 대한 인식도 또는 방송매체에 의한 건강 계몽등으로 상당히 관심도가 높아지는 질환이며, 1993년 보건복지부의 발표에 의하면 전체 여성암 중 유방암이 차지하는 비율이 1987년 9.1%에서 1993년 12.3%로 해마다 증가 추세에 있다. 이에 반하여 유방암의 원인 규명 및 치료효과는 아직 미미하여 현재 이 분야에 대한 많은 연구가 진행 중에 있다

유방암의 생식관계, 호르몬, 식이, 가족력 및 유전인자, 양성 유방질환, 방사선조사 및 virus등과의 연관성에 대해서는 많이 알려져 있고, 이 중 호르몬(estrogen, progesterone, prolactin, androgen, thyroid hormone등)과 연관관계가 있다는 것은 잘 알려진 사실이며 특히 estrogen을 대표적으로 들 수 있다<sup>1)</sup>. 여성 유방암이 내분비 의존성이 있다는 것은 유방암 환자의 50% 이상에서 estrogen receptor (ER)가 관찰되며, ER(+) 환자의 60%, ER(-) 환자의 6%에서 호르몬 치료(tamoxifen)에 반응이 있는 것으로 알수 있으나 그 정확한 작용기전 및 ER(+) 환자 중 호르몬 치료에 반응을 하지 않는 환자군의 원인에 대하여는 아직 많은 연구가 진행중에 있다.

최근 암 세포가 정상 세포 기능에 관여하는 mechanism을 벗어나 지속적으로 성장하기 위한 여러 기전 중 Growth factor의 관련설에 대한 많은 보고들이 이루어지고 있다. 암세포는 배양시 정상 대조군에 비해 외인성 성장요소(exogenous growth fac-

tors)의 공급을 덜 필요로하며<sup>11)</sup>, 이는 변형된 세포가 자기자신의 성장요소를 생성하고 반응하는 성장조절의 자가기전이 있음을 암시하고<sup>12)</sup>, 이 성장요소중 TGF- $\alpha$ 와 TGF- $\beta$ 가 중요한 역할을 한다는 보고들이 많다<sup>13,14)</sup>. 그 중 TGF- $\beta$ 는 매우 다양한 기능을 가진 homodimeric polypeptides로서 cell differentiation, growth, function을 통제할 뿐만 아니라 여러 종류의 세포(normal cell 및 transformed epithelial, endothelial, fibroblast, lymphoid and hematopoietic cells)에서 가장 강력한 growth-inhibitory polypeptides로 알려져 있어<sup>15)</sup>, 유방암 세포의 성장 및 억제에 있어서의 이의 작용에 많은 관심을 기울이게 되었다.

Estrogen이 TGF- $\alpha$ , insulin-like growth factor II 및 platelet-derived growth factor의 분비 및 mitogenic activity를 증가시키는데 비해<sup>2-3)</sup>, 1987년 Knabbe에 의하면 ER(+) MCF-7 cell line에서 TGF- $\beta$ 는 antiestrogen에 의해 가장 잘 생성된다고 하였으며, 또한 Tamoxifen이 ER(+) estrogen-sensitive MCF-7 cell에서는 성장억제 및 TGF- $\beta$ 의 분비를 5배이상 현저히 증가시키는데 비해 ER(+) estrogen-resistant LY-2 cell에서는 그렇지 못한 점과 anti-TGF- $\beta$  antibodies를 투여하면 성장억제 작용이 반전됨을 발견하여 이것이 Tamoxifen의 암세포 성장억제 효과를 나타내는 기전일 것이라고 보고하였다<sup>4)</sup>. 또한 Barrett등과 Murray등은 유방암 조직이 일정하게 TGF- $\beta$ 를 표현하며 TGF- $\beta$  mRNA치가 높은 것이 장기간의 무병생존율과 임파선전이 음성율이 높은 것과 관련이 있다고 발표하였으며<sup>15,16)</sup> Colletta등도 Tamoxifen을 투여한 fibroblasts에서 대조군에 비해 5~25배의 TGF- $\beta$ 를 분비함을 증명하였다<sup>17)</sup>.

Retinoids는 vitamin A와 연관된 물질로서 세포의 성장과 분화에 관여하는 중요한 인자로 알려졌으나 이의 기전에 관해서는 많이 알려져 있지 않다<sup>18)</sup>. 최근 mouse나 사람의 keratinocytes 중식이 TGF- $\beta$ 에 의해 강력하게 억제되고<sup>9)</sup>, cultured keratinocytes와 mouse epidermis에서 TGF- $\beta$ 가 retinoic acid에 의해 induction 됨을 관찰하여 TGF- $\beta$ 가 retinoic acid의 국소 조절인자의 역할을 할 수 있을 것이라고 하였다<sup>6,19-21)</sup>. 또한 이들은 Retinoic

acid가 TGF- $\beta$ 의 분비를 증가시키지 못하나 TGF- $\beta$ 의 분비를 증가시키며, in vivo에서도 active TGF- $\beta$  expression을 induction 하며 retinoic acid의 용량에 의존한다고 보고하였다.

이러한 결과들을 토대로 ER(+) cell line에서 retinoic acid와 tamoxifen의 병용이 성장억제 작용의 증가를 촉진한다는 많은 보고들이 있다<sup>7)</sup>. Glick등은 Retinoic acid와 tamoxifen의 개별투여가 MCF-7 cells의 50~60%의 성장억제 효과가 있는데 비해 이들의 병용 투여는 80~90%의 성장억제 효과가 있다고 보고하였으며, Wetherall등은 이들의 병용 투여가 개별 투여에 비해 2배 이상의 성장억제 효과가 있다고 보고하였다<sup>22)</sup>.

저자들의 실험 결과를 보면 성장억제 효과분석(Fig. 1)에서 tamoxifen 및 tamoxifen과 retinoic acid의 병용 투여가 MCF-7 cells의 현저한 성장억제 효과가 있음을 알 수있었다. TGF- $\beta$ 의 분비에 있어 tamoxifen 투여군 및 tamoxifen+retinoic acid 투여군에서 TGF- $\beta$ 의 분비는 대조군과 차이가 없었으나 TGF- $\beta$ 의 분비는 현저히 증가하였으며 retinoic acid 투여군은  $10^{-7}$  M/L 이상의 농도로 투여한 군에서 TGF- $\beta$  분비의 현저한 증가가 있었다(Fig. 2). 이는 tamoxifen, retinoic acid, tamoxifen+retinoic acid 투여시 MCF-7 cells의 성장억제 효과는 TGF- $\beta$ 의 분비 증가를 통하여 이루어지며 retinoic acid 투여시 TGF- $\beta$  분비의 증가는 투여용량의 농도에 의존성이 있음을 입증하는 결과라 할 수있으며, tamoxifen과 retinoic acid의 병용 투여시 tamoxifen과 retinoic acid의 단독 투여시 보다 TGF- $\beta$  분비 증가의 상승 작용이 있음을 알 수있었다(Fig. 3). TGF- $\beta$  m-RNA의 측정 결과 TGF- $\beta$  m-RNA는 모든 군에서 유의한 차이가 없었으며, TGF- $\beta$  m-RNA는 retinoic acid 투여군에서 대조군보다 2.55배 증가하였으며, tamoxifen과 retinoic acid 투여군에서 1.15배 증가하였다(Fig. 5, 6). 즉 tamoxifen과 retinoic acid 투여에 의한 TGF- $\beta$ 의 증가는 transcriptional pathway를 통하는 기전으로 생각되고 그러나 이것이 posttranscriptional mRNA Stability 인지는 향후 더 연구가 필요하리라 생각된다.

Retinoic acid에 의해 TGF- $\beta$ 가 2.5배 이상 증가

하는 것으로 보아 유방암 수술후 보조적 항암치료제 및 재발성 유방암에서 치료목적으로의 retinoic acid의 임상사용가능성이 이 실험으로 인하여 제기될 수 있으며 향후 ER(+) 환자에서 Tamoxifen 및 retinoic acid의 병용투여 방식에 대한 임상연구가 필요하리라 생각된다.

## 결 론

본 연구는 Phenol red-free medium을 이용하여 MCF-7 cell line을 성장시키고 이에 여러 용량의 Tamoxifen과 Retinoic acid를 투여하므로써 세포의 성장과 TGF- $\beta$ 의 생성을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) MCF-7 cell의 성장은 Tamoxifen에 의해 현저히 억제되었고 Retinoic acid 추가시 상승 억제작용이 있었다.
- 2) Tamoxifen 및 Retinoic acid 공히 TGF- $\beta$  secretion을 증가시켰고 이 중 TGF- $\beta_2$ 의 secretion이 보다 현저하였다.
- 3) Tamoxifen 및 Retinoic acid에 의해 TGF- $\beta_2$ 의 mRNA induction이 증가하였고 이는 Retinoic acid에 의해 보다 뚜렷하였다.
- 4) Retinoic acid의 TGF- $\beta_2$  production 상승작용이 향후 유방암 치료시 보조 요법제로서의 이론적 배경이 될 수 있을 것이라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) 이경식, 이희대: 최신의과학: 571, 1995
- 2) 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* 118: 1537, 1986
- 3) Dickson RB, McManaway ME, Lippman ME: Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science* 232: 1540, 1986
- 4) Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM: Evidence that transforming growth factor-beta is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *cell* 48: 417, 1987

- 5) Coffey RJ, Sipes NJ, Bascom CC, Gasves DR, Pennington CY, Weissman BE, Moses HL: Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. *Cancer Res* 48: 1596, 1988
- 6) Glick AB, Flanders KC, David D, Yuspa SH, Sporn MB: Retinoic acid induces transforming growth factor- $\beta_2$  in cultured keratinocytes and mouse epidermis. *Cell Regulation* 1: 87, 1989
- 7) Fontana JA: Interaction of retinoids and tamoxifen on the inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation. *Exptl Cell Biol* 55: 136, 1987
- 8) Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB: Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$ ) secreted by cells in culture. *J Cell Physiol* 138: 79, 1989a
- 9) Danielpour D, Kim KY, Dart LL, Watanabi S, Roberts A, Sporn MB: Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) quantitate and distinguish two forms of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$ ) in complex biological fluids. *Growth factors* (in press)
- 10) Chomczynskin P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenolchloroform extraction. *Analytical Biochem* 162: 156-159, 1987
- 11) Holley RW: Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* 258: 487, 1975
- 12) Sporn MB, Todaro GJ: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Eng J Med* 303: 878, 1980
- 13) 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 factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6264, 1983
- 14) Kehrl JA, 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* 163: 1037, 1986
- 15) Barrett LP, Travers M, Luqmani Y, Coombes RC: Transcripts for transforming growth factors in human breast cancer: clinical correlates. *Br J*

- Cancer* **61**: 612, 1990
- 16) Murray PA, Barrett LP, Travers M: *The prognostic significance of transforming growth factor expression in human breast cancer. Br J Cancer* **67**: 1408, 1993
- 17) Colletta AA, Wakefield LM, Howell FV: *Anti-estrogens induce the secretion of active transforming growth factor beta from human fetal fibroblasts. Br J Cancer* **62**: 405, 1990
- 18) Sporn MB, Roberts AB: *Retinoids, differentiation and disease. Ciba foundation symposium* **113**: 1, 1985
- 19) Fuchs E, Green H: *Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. Cell* **25**: 617, 1981
- 20) Kopan R, Traska G, Fuchs E: *Retinoids as important regulators of terminal differentiation: examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. J Cell Biol* **105**: 427, 1987
- 21) Valette A, Botanch C: *Transforming growth factor beta(TGF- $\beta$ ) potentiates the inhibitory effect of retinoic acid on human breast carcinoma (MCF-7) cell proliferation. Growth Factors* **2**: 283, 1990
- 22) Wetherall NT, Taylor CM: *The effects of retinoid treatment and antiestrogens on the growth of T47D human breast cancer cells*
-