

위선암 조직에서 Transforming Growth Factor- β 발현에 관한 면역조직화학적 분석

한림대학교 의과대학 병리학교실

최영희 · 채승완 · 이민철 · 심정원 · 안혜경
박혜립 · 강 구 · 신형식 · 박영의

Immunohistochemical Analysis of Transforming Growth Factor- β Expression in Gastric Adenocarcinoma

Young Hee Choi, M.D., Seoung Wan Chae, M.D., Min Chul Lee, M.D., Jung Weon Shim, M.D.
Hye Kyung Ahn, M.D., Hye Rim Park, M.D., Gu Kang, M.D.
Hyung Sik Shin, M.D. and Young Euy Park, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University

Thirty cases of gastric adenocarcinoma were examined immunohistochemically for expression of transforming growth factor- β (TGF- β) in order to analyze significant correlation with clinical stage and pathologic grade of gastric adenocarcinoma. Specific immunostaining was clearly detected in the cytoplasm of the neoplastic cells. The TGF- β expression in the gastric adenocarcinoma is closely related to the depth of invasion, the degree of invasiveness and the presence of metastasis. Thus, we observed the stronger immunohistochemical expression of TGF- β in the deeper portion of invasion and in the invasive gastric adenocarcinomas with the lymph nodal metastasis than in the superficial portion of invasion and in those without the lymph nodal metastasis.

These results suggest that the transforming growth factor- β expression in carcinoma cells may play an important role in the carcinomatous invasion resulting in metastasis. (**Korean J Pathol 1994; 28: 272~281**)

Key Words: Gastric Adenocarcinoma, TGF- β , Invasion, Metastasis

서 론

1978년 DeLarco와 Todaro는 retrovirus에 의해 형질 전환된(transformed) 섬유모세포 배양시 세포 외 배지에서 형질 전환을 발현시킬 수 있는 polypeptide가 있음을 발견하였고¹⁾, 그 peptide를 형질 전환 성장인자(transforming growth factor; TGF)라 명하였다²⁻⁵⁾. Anzano 등⁶⁾은 그 인자를 두 개의 poly-

peptide, 즉 7 kDa의 단일사슬로 표피성장인자 수용체에 반응하는 TGF- α 와 독특한 수용체에 반응하는 25 kDa의 분자량을 가지는 동일 이합체(homodimer)로 구성 되어 있는 TGF- β 로 분류하였으며, 이 두 물질은 다른 염기배열을 하고 있다고 하였다⁷⁾. TGF- β 과(科, family)에는 TGF- β 1, β 2, β 3, β 4, β 5 군(君)의 유전자가 있는데 이들 서로간에 64~82%의 유전자를 공유하며, 포유류와 조류에서는 97%이상의 동일한 유전자를 갖고 있음을 보고하고 있다⁸⁾. Assoian 등⁹⁾이 TGF- β 를 사람과 돼지 혈소판에서 분리한 후 사람 태반³⁾과 소의 신장⁵⁾에서도 과량 추출하였으며, 그 밖에 간, 심장, 뇌, 그리고 근육 등⁴⁾ 정상 세포 뿐만 아니라 암세포에서도 발견되었다.

접 수: 1993년 8월 6일, 게재승인: 1994년 1월 18일
주 소: 강원도 춘천시 옥천동 1번지, 우편번호 200-702
한림대학교 의과대학 병리학교실, 박영의

TGF- β 의 표현과 활성도는 TGF- β 유전자와 전사과정(transcription)에서의 조절, 비활성화된 형태로의 TGF- β 의 생성, 그리고 활성화된 TGF- β 가 세포외기질이나 혈청 단백질에 의해 격리되는 기전에 의해 조절이 된다⁶⁾. TGF- β 는 비활성화 형태로 거의 모든 세포에서 분비되며, 활성화된 후 수용체(receptor)에 결합될 수 있다⁹⁾. In vivo에서는 활성화되는 기전이 알려져 있지 않지만 in vitro에서는 단백질 분해효소, glycosidase, 염기나 산 및 분해물질(chaotropic agent)에 의해 활성화될 수 있다. 수용체는 I형, II형 수용체 그리고 betaglycan으로 분류되며, 대표적인 것은 53kDa의 glycoprotein으로 구성되어 있는 I형 수용체로 대부분의 세포에서 존재하며 TGF- β 1과 β 3과 친화력이 있고, 세포성장과 세포외기질의 조절을 중재한다⁸⁾. TGF- β 는 세포배양에서는 세포성장을 촉진시키기도 하고 억제시키기도 한다. 또한 세포 종류에 따라 각기 다르게 반응하며, 동일한 세포라도 다른 실험 조건에서는 서로 상반되는 반응을 나타내기도 한다⁷⁾. TGF- β 에 대한 많은 연구에서 in vivo와 in vitro의 결과가 상반되는 점이 많아 in vivo에서의 TGF- β 의 역할을 명확히 이해하기 위해서는 TGF- β 를 조직에서 발현시키는 연구가 필요하다고 보고하였다^{10,11)}.

암과의 관계에 대한 연구도 많이 진행되고 있어서 세포배양실험을 통해 망막세포종¹²⁾, A549 폐암세포계¹³⁾에서 TGF- β 가 암을 유발시킨다고 보고하고 있으며 일부에서는 암을 유발하기 보다는 암의 증식과 침윤을 유발하게 하므로 암의 악성도와 예후를 예견하는 지표로 보고하였다¹⁴⁾.

위암에서는 TGF- β 에 관한 연구를 살펴보면, 대부분 위암의 세포배양에서 TGF- β 의 기능에 대한 실험이다. TGF- β 가 위암 주위의 결합조직 형성을 촉진시킨다는 보고도 있고¹⁵⁾, 종양세포에서 TGF- β 에 대한 수용체가 소실되어 성장조절이 되지 않아서 종양이 생긴다는 보고도 있다¹⁶⁾. 유방암이나, 갑상선종 등의 조직에서 TGF- β 의 발현에 관한 연구는 드물게 보고되고 있으나^{14,17)} 위암 조직에서 TGF- β 의 발현에 관한 연구는 미비한 상태이다.

따라서 본 연구는 한국인에게 가장 빈도가 높은 악성 종양인 위암 조직에 TGF- β 에 대한 면역 조직화학적 염색을 시행하여 정상 위조직과 선암에서 TGF- β 의 부위별 분포 및 발현 양상을 점수화하여 위암의 조직학적 분화도, 침습깊이, 전이 유무 및 병기에 따라 비교분석함으로써 TGF- β 발현과 위암의 침윤 및 전이에 상관관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

연구대상은 1991년 1월부터 1992년 12월까지 한림

의대부속 춘천성심병원에서 위절제술을 받은 위선암 환자 61예의 Hematoxylin-Eosin(H-E)염색표본을 재검색하여, 종괴내에 출혈, 괴사 또는 염증과 같은 이차적 변화가 초래되어 있는 예들을 제외한 30예를 선정하였고, 이들을 다시 병기별로 구분하였다. 대조군으로는 위체양으로 위 절제술을 받은 조직(3예)을 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 임상기록: 환자의 임상기록으로부터 나이 및 성별을 검토하고 병기는 종양의 침습깊이, 림프절의 전이 여부 그리고 원격전이 여부를 기준으로 하여 미국 암학회의 결정에 따라 구분하였다^{18,19)}.

2) 광학현미경적 검색: 광학현미경적 검색을 위하여 10% 중성 포르말린에 고정, 파라핀에 포매된 조직과 이미 제작되어 있는 H-E 염색표본을 이용하였다. 먼저 종양의 분화 정도를 WHO 및 대한 병리학회의 위암 취급규정안의 방법에 따라 유두선암종, 관상선암종, 점액선암종과 인환세포암종으로 분류하였다^{20,21)}. 관상선암종은 분화도에 따라 선의 구조나 세포의 모양이 장형화생(intestinal metaplasia)시의 상피와 유사할 때 고분화 선암종, 선의 구조를 간혹 보이는 선암종을 저분화, 그리고 그 중간의 분화를 보일 때 중분화 선암종이라 하였다. 또한 종양의 침습 깊이를 조사하여 분류(T1~T4)하였다. 즉 종양의 침습 깊이가 점막이나 점막하 조직에 국한된 경우를 T1, 종양이 근육층을 침습하나 장막을 완전히 침습하지 않은 경우를 T2, 종양이 장막을 완전히 침습하였으나, 장막을 넘어 주위 조직으로의 침습이 없는 경우를 T3, 그리고 종양이 장막을 완전히 침습하고 주위 대망이나 소망으로 침습한 경우를 T4로 각각 구분하였다.

3) 면역조직화학적 염색 및 판독:

(1) 일차항체: Anogen(monoclonal murine anti-human TGF- β , IgG1, Anogen, Code No. M4041, USA)에서 공급된 것으로 사람 혈소판에서 추출한 TGF- β 로 BALB/c mouse에 면역시켜 얻은 monoclonal antibody를 사용하였다.

(2) 일차 항체의 적정 역가 평가를 위한 예비실험: TGF- β 에 양성인 태반 2예를 선택하여 일차 항체를 종류수로 연속 희석하여(1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:100) 반응 정도를 판별한 결과 1:50배 희석이 적정배수로 판단되었다(Fig. 4).

(3) 면역조직화학적 염색: 조직 절편을 항온기에 56~58°C로 30분 가온시킨 후 실온에서 탈파라핀화와 탈수를 시켰다. 내인성 과산화효소 활성을 억제시키기 위하여 methanol에 0.3% 과산화수소를 사용하여 30분간 처리한 후 5분 동안 phosphate완충액(pH 7.4)에 2~3회 세척하고 다시 37°C의 항온기에 0.1% Trypsin 용액에 30분간 처리한 후 phosphate 완충액에 세척하였다. 그 후 정상 차단 양 혈

청(DAKO kit, USA)으로 처리하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 일차 항체인 백서 단클론성 항체인 TGF- β 를 1:50배 희석하여 20 μ g/ml의 농도로 하룻밤 4°C에서 반응시켰으며, 음성 대조군은 일차 항체 대신 정상 양 혈청을 처치하였다. Goat anti-mouse antibody, Biotin 결합 이차 항체, Avidin-Biotin 복합체 등을 각각 1시간씩 반응시켰다. 과산화수소(oxidase)의 기질로서 AEC chromogen solution(3-amino-9-ethyl-carbazole in N, N-dimethyl formamide)에 20분간 발색 반응을 거쳐 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 Glycerol mounting medium(DAKOPATTS)으로 봉입하여 광학 현미경하에서 관찰하였다.

(4) 면역조직화학적 염색 결과의 판정; 우선 각 병변을 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 혹은 특정 부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율상 TGF- β 가 세포의 어느 부위에 양성으로 나타나는지를 관찰하였다. 정상 위조직을 점막, 점막하 조직, 근육 조직, 장막하 조직으로 나누어 염색성을 비교하였고, 위암조직에서는 암조직 표층부, 심층부로 나누어 고배율에서 염색의 강도를 비교 분석하였다. 반정량적 비교 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 10곳을 선택하여 최고 염색정도(intensity)를 0에서 +++까지 4단계로 구분하였다(0: 염색성이 없는 경우, +: 약양성, ++: 중등도 양성, +++: 강양성). T1은 표층부와 심층부의 구별이 힘들

어 염색성이 강한 부위 20곳을 택하였다. 각 부위에서 임의로 약 100내지 300개의 세포를 세어 양성세포의 백분율(positive %)을 산출하였다. 또한 최고 염색 정도 X양성세포 백분율로 염색 강도 지수(staining index)를 산출하여 비교 분석하였다^{17,22-25}).

4) 통계처리 방법: 본 연구에 포함된 각 지수는 평균±표준편차로 표시하였으며 통계학적 처리는 SAS (Statistical Analysis Software)의 personal computer용 Version 6.03을 이용하였다. SAS/STAT의 ANOVA, t-test, Correlation 분석을 이용하여 p 값이 0.05 이하일 경우만 유의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상 및 병리조직학적 소견

대상환자 30예의 연령분포는 30세부터 77세였으며 평균연령은 56.6세였다. 성별은 남자가 25예(83.3%), 여자가 5예(16.7%)였다.

임상병기는 제 I 병기가 9예(30%), 제 II 병기가 4예(13.3%), 제 III 병기가 9예(30%), 제 IV 병기가 8예(26.7%)였다. 위암을 침습깊이에 따라 분류한 결과 T1은 7예(23.3%), T2, 6예(20%), T3, 8예(26.7%) 및 T4, 9예(30%)로 각각 나타났다.

분화 정도에 따른 결과는 선관암종이 24예(80%)로 고분화는 6예, 중분화는 11예, 그리고 저분화는 7예였

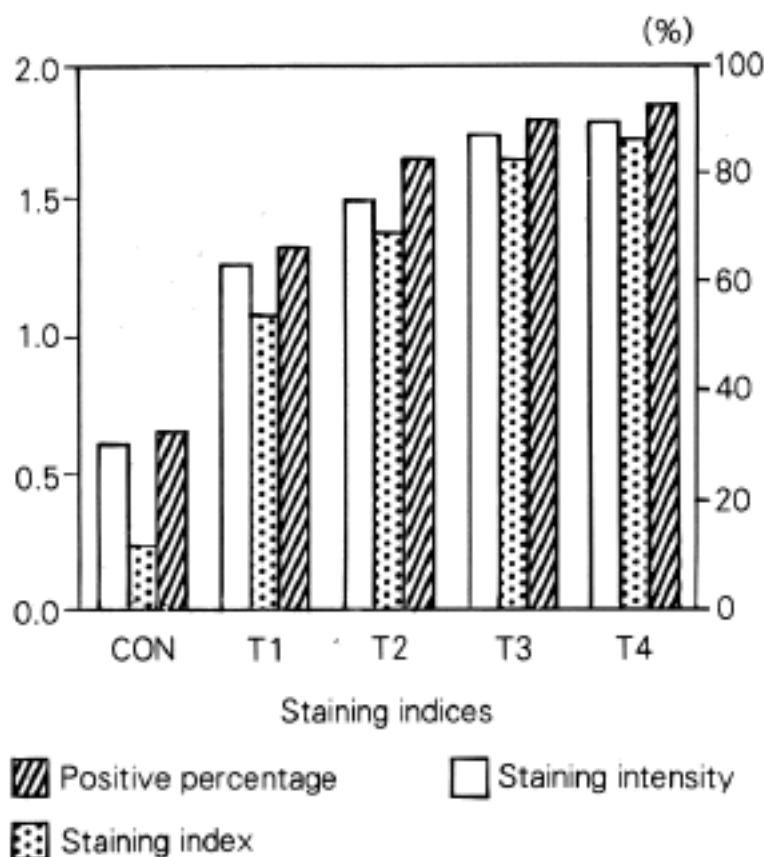


Fig. 1. Staining indices of TGF-beta in adenocarcinoma according to the depth of invasion.

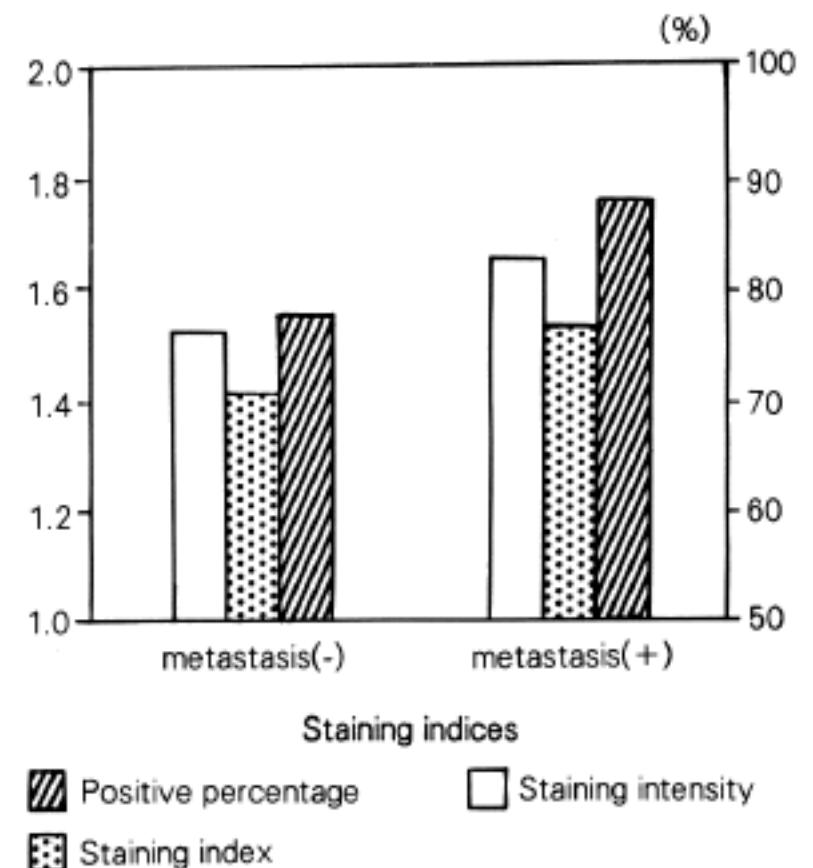


Fig. 2. Staining indices of TGF-beta in adenocarcinoma according to the presence of metastasis.

다. 또한 점액선암종 1예(3.3%), 인환세포암종 5예(16.7%)였다.

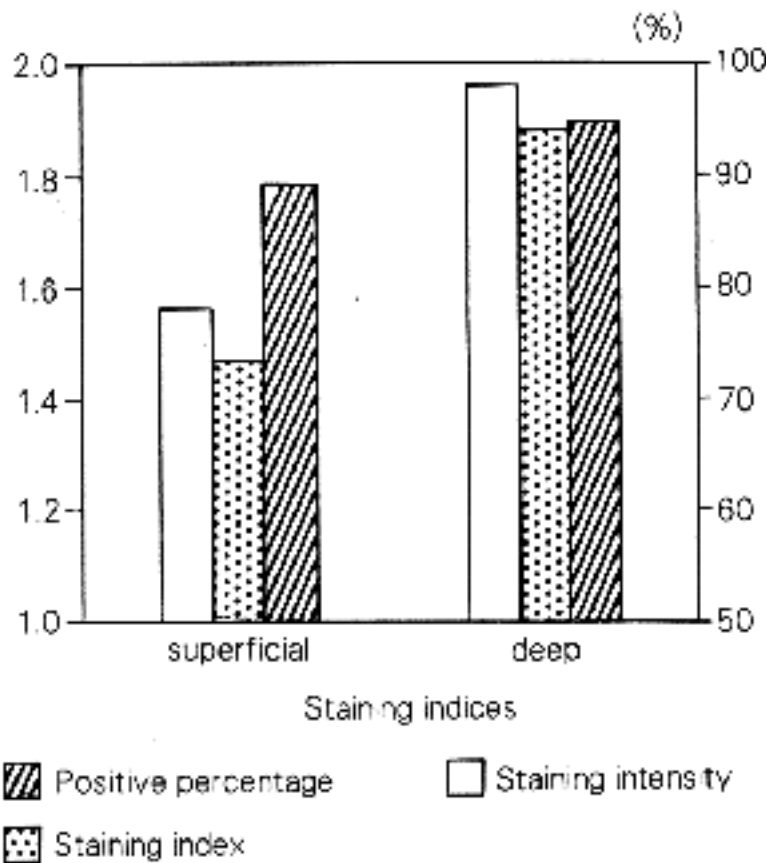


Fig. 3. Staining indices of TGF-beta in adenocarcinoma according to the localization in same tumor.

2. 전반적인 TGF- β 의 염색성

정상조직에서 TGF- β 에 대한 면역조직화학적 염색에서 위오목 부위의 침단에 있는 세포, 교유판의 림프구, 그리고 혈관 내피 세포가 TGF- β 에 양성 반응을 보였고, 백세포는 대부분 중등도 양성 반응을 보였다 (Fig. 5). 선관암종에서는 미만성으로 양성반응을 보였는데, 종양의 표층부보다 심층부에서 더 강한 양성으로 반응하고 있었으며 (Fig. 6, 7) 종양 주위의 림프소절 등도 중등도의 양성반응을 나타내었다. 그러나, 점액선암종과 인환세포암종에서는 전혀 염색이 되지 않았으나 간혹 점액공포가 적은 경우 주위 세포질에 양성 반응을 보였다.

한편 교배울상 양성인 세포들은 주로 세포질에 갈색의 과립으로 관찰되었고 일부에서는 핵내에도 양성과립이 나타났다. 근육이나, 장막하부에서는 약한 비특이적 배경염색을 제외하면 음성이었다.

3. 위암조직과 정상 위 조직의 TGF- β 에 대한 염색성 비교

위궤양환자 3예와 위암환자 30예에서 TGF- β 에 대한 양성세포 백분율, 인식 지수 및 최고 염색정도를 비교하면 (Table 1), 최고 염색정도의 평균은 위궤양환자 0.61, 위암환자 1.61로 위궤양보다 위암환자에서 강하게 염색되었으며 (Fig. 5, 6, 7), 두 군에서 양성세포 백분율은 각각 32.75, 84.14이고 염색지수는 각각 0.24, 1.49로 위암환자에서 확연한 증가를 보였다 ($p < 0.05$)

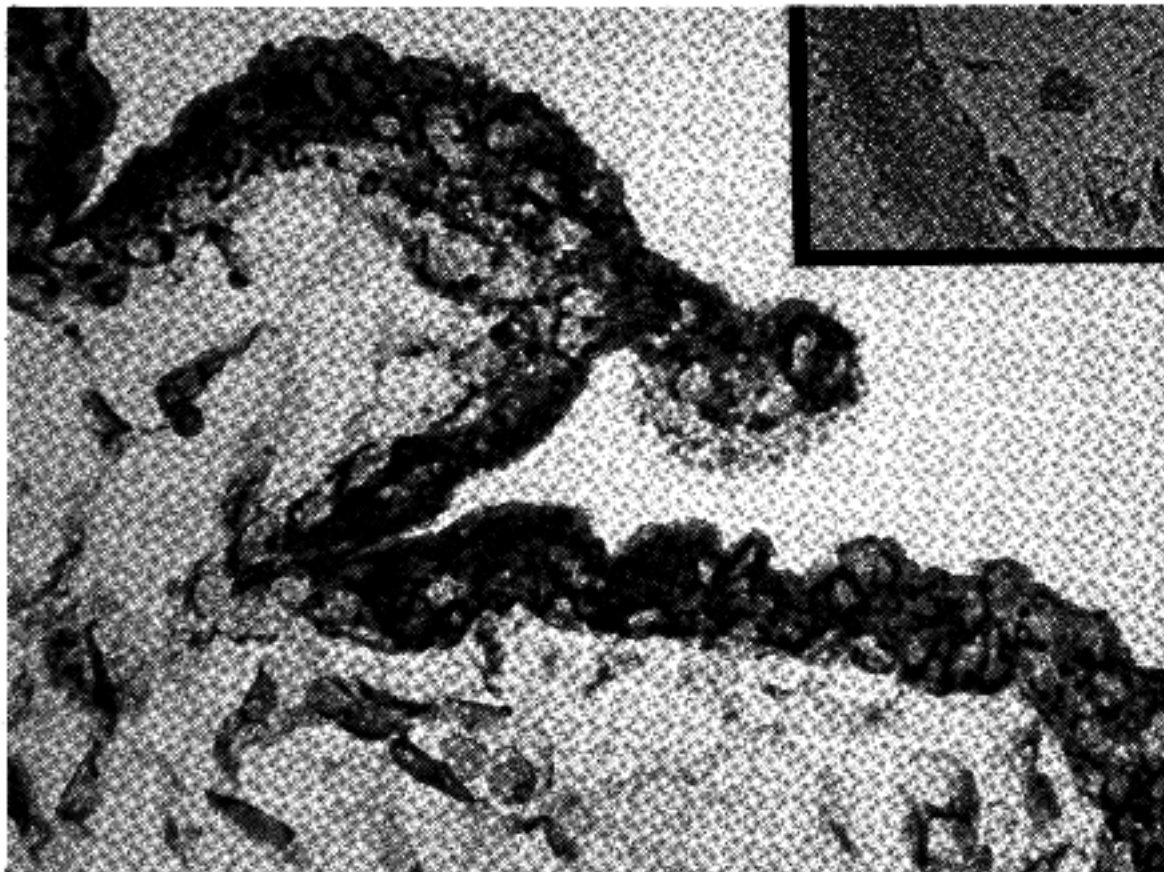


Fig. 4. Immunoperoxidase staining for TGF- β in normal trophoblastic cells of chorionic villi. Inset; Trophoblastic cells reveal negativity for a negative TGF- β stain control

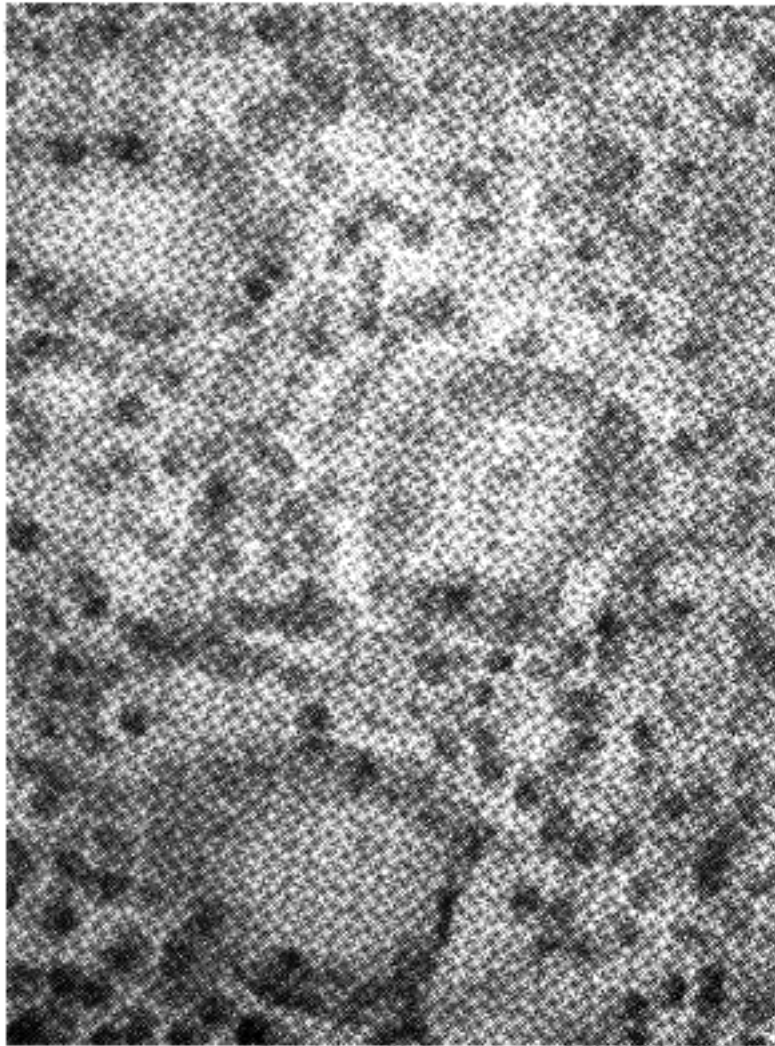


Fig. 5. Immunoperoxidase staining for TGF- β in normal gastric mucosa shows positivity with spot-like pattern.

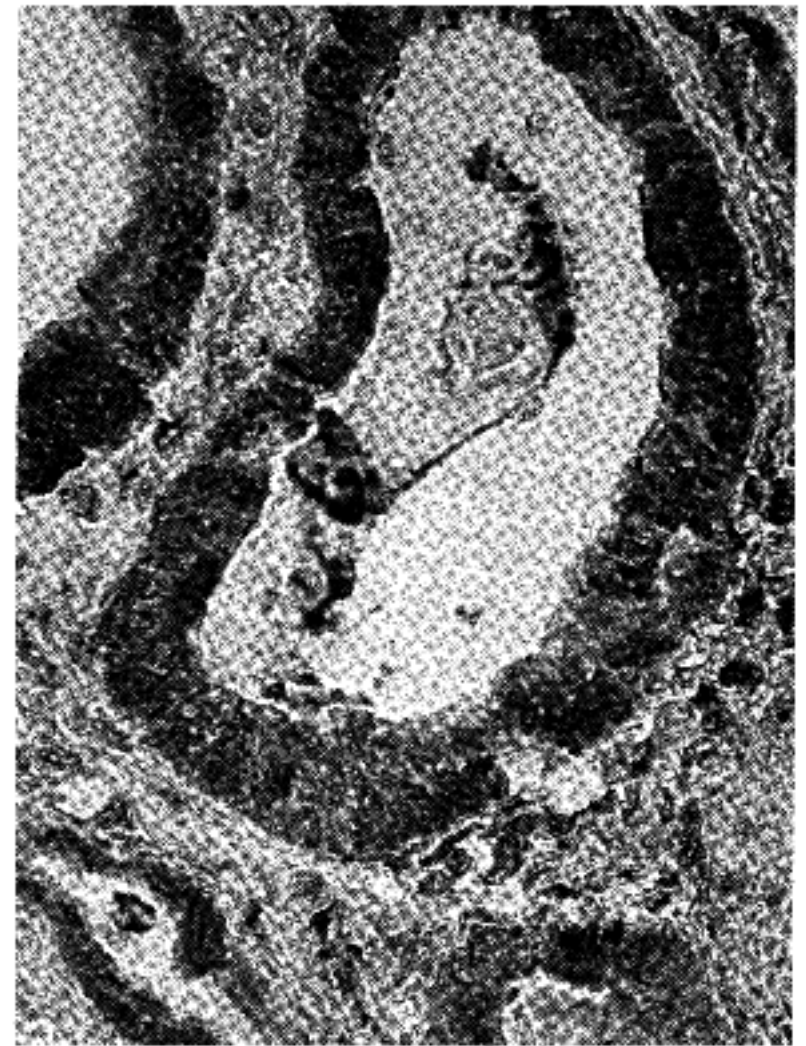


Fig. 6. Immunoperoxidase staining for TGF- β in carcinomatous glands shows strong positivity at the deep infiltrating portion.

Table 1. Staining indices of TGF- β in normal and cancer group

	Intensity	positive %	Staining index
Normal	0.61 \pm 0.32	32.75 \pm 15.30	0.24 \pm 0.20
Cancer	1.61 \pm 0.66*	84.14 \pm 25.54*	1.49 \pm 0.79*

*P < 0.05

Data; Mean \pm S.D.

Table 2. Staining indices of TGF- β in each stage of cancer

	Intensity	Positive %	Staining index
Stage I	1.28 \pm 0.77	69.30 \pm 34.14	1.12 \pm 0.83
Stage II	1.73 \pm 0.70	87.03 \pm 23.91	1.64 \pm 0.78
Stage III	1.79 \pm 0.55	91.13 \pm 18.08	1.71 \pm 0.82
Stage IV	1.66 \pm 0.49	89.89 \pm 15.04	1.54 \pm 0.56

4. 위암 환자의 병기에 따른 TGF- β 의 염색성 비교

최고 염색정도와 염색지수는 병기 I, IV, II, III의 순으로 병기 III에서 가장 높았으나 병기 II, III, IV간에는 통계학적인 차이가 없었고, 병기 I만이 다른 병기들과 통계학적으로 차이가 있었다(P < 0.05). 양성세포 백분율에서는 병기 I, II, IV, 그리고 III의 순으로 그 수치가 높았으며 통계학적으로 병기 I만이 다른 병기들과 차이가 있었다(Table 2).

1) 위암의 침습깊이에 따른 비교: T1, T2, T3, T4의 최고 염색정도, 양성세포 백분율 및 염색지수는 모두 침습 깊이가 깊을수록 증가하였고, T1과 T2, T1과 T3, T1과 T4, T2와 T3간의 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(p < 0.05, Table 3, Fig. 1).

2) 위암의 전이 여부에 따른 비교: 암의 전이가 있는 경우는 암의 전이가 없는 경우보다 최고 염색정도, 양성세포 백분율, 그리고 염색 지수가 높았으며 최고 염색정도와 양성 세포 백분율에서는 통계학적으로 의미가 있었다(p < 0.05, Table 4, Fig. 2).

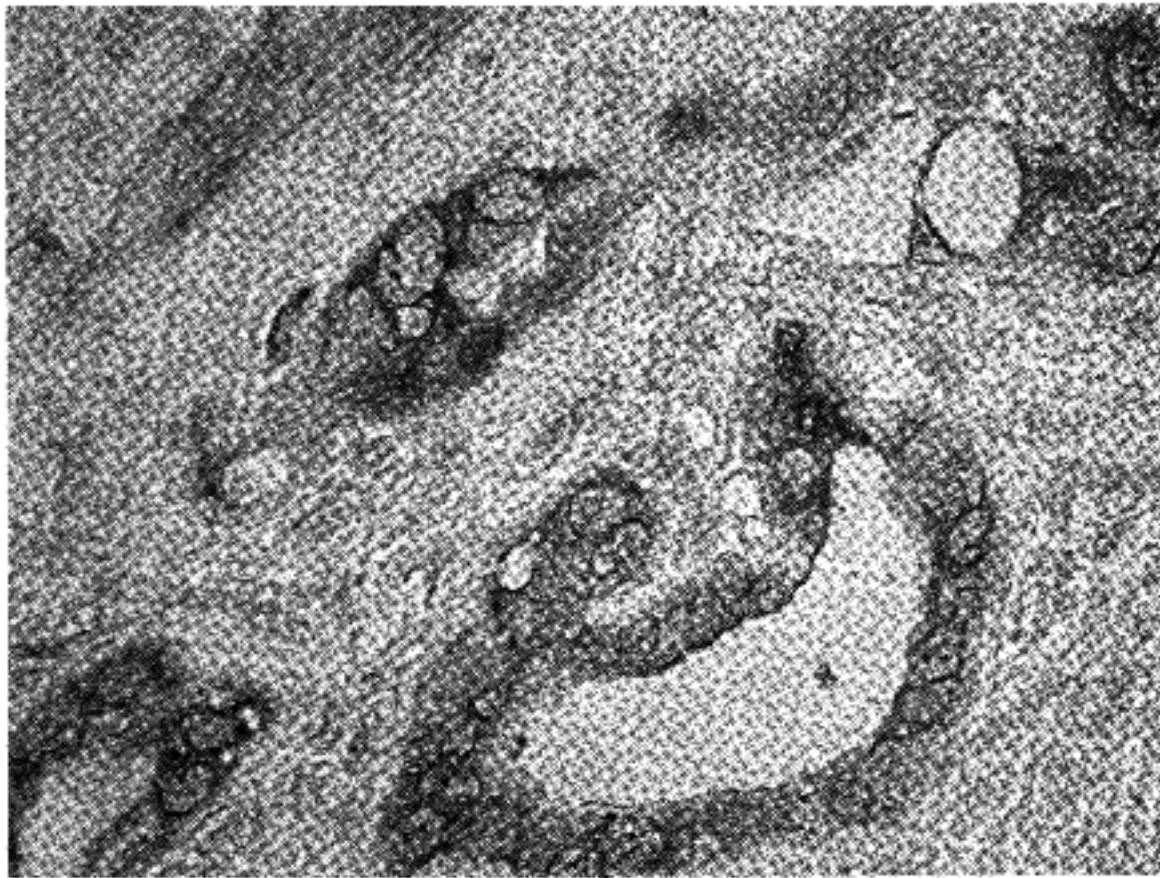


Fig. 7. Immunoperoxidase staining for TGF-β in carcinoma glands shows weak positivity at the superficial portion.

Table 3. Staining indices of TGF-β in adenocarcinoma according to the depth of invasion

	Intensity	Positive %	Staining index
T1	1.26±0.81	66.28±33.64	1.08±0.89
T2	1.50±0.64	82.87±26.70	1.38±0.67
T3	1.75±0.55	90.16±16.60	1.65±0.73
T4	1.79±0.51	92.41±16.92	1.72±0.72

Table 5. Staining indices of TGF-β according to the histologic differentiation of cancer

	Intensity	Positive %	Staining index
Tubular adenocarcinoma			
Well	1.87±0.52	91.65±12.34	1.76±0.67
Moderately	1.74±0.45	91.73±12.70	1.63±0.64
Poorly	1.57±0.70	81.33±27.38	1.43±0.90
Mucinous	1.12±0.81	63.03±38.53	0.97±0.87
Signet	0.92±0.78	56.57±40.20	0.81±0.78

5. 위암의 분화도에 따른 TGF-β의 염색성 비교

선관암, 점액선암종, 인화세포암종의 순으로 최고 염색정도, 양성세포 백분율 그리고 염색지수가 각각 낮았으며, 선관암과 점액선암종, 선관암과 인화세포암종

Table 4. Staining indices of TGF-β in adenocarcinoma according to the presence of metastasis

	Intensity	Positive %	Staining index
Metastasis(-)	1.53±0.78	77.95±32.86	1.42±0.95
Metastasis(+)	1.66±0.56*	88.10±18.47*	1.54±0.67

*p<0.05

Table 6. Staining indices of TGF-β according to the degree of invasiveness (superficial or deep) in the same tumor

	Intensity	Positive %	Staining index
Superficial	1.56±0.46	89.28±18.37	1.47±0.74
Deep	1.96±0.48	94.76±7.07*	1.88±0.53*

*p<0.05

간에는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다(p<0.05). 선관암에서 분화에 따른 비교를 보면, 최고 염색정도와 염색지수에서는 저분화로 될수록 낮아졌지만 양성세포 백분율은 중분화, 고분화, 저분화의 순으로 감소하였고 고분화와 중분화 각각에 대한 저분화간의 차이는 통계학적으로 의미가 있었다(p<0.05, Table 5).

6. 동일한 위암에서 표층과 심층의 TGF- β 의 염색성 비교

최고 염색 정도, 양성세포 백분율 및 염색지수들은 모두 통계학적으로 표층과 비교하여 심층에서 증가된 양상을 보였다($p < 0.05$, Table 6, Fig. 3, 6, 7).

고 찰

In vivo에서 규칙적인 세포성장 및 분화는 물리적 지표, 세포의 기질 구성성분, 세포 유착분자, 막 연결 복합체 등의 다양한 조절 기능에 의해 이루어진다. 그러나, 가장 중요한 역할은 성장인자로 알려진 polypeptide가 한다. 성장인자의 기능, 수용체, 신호 전달 도입(signal transduction) 등은 대부분이 in vitro에서 조직 배양을 통해 알게 되었다. 조직 배양은 배지에 있는 혈청이나 조직 추출물의 유무에 따라 조절 받는 점을 이용하여, 성장인자를 분리, 정제, 분석하므로 그 존재를 증명하였다. 또한, 암유전자가 화학성 발암물질, 방사에너지, 종양성 바이러스 등의 영향으로 변화되므로 암이 유발되는데 이러한 과정에 성장인자 중 혈소판 유래 성장인자(platelet derived growth factor; PDGF), 상피 성장인자(epithelial growth factor; EGF), 집락 자극 인자(colony stimulating factor) 등이 영향을 준다고 하며 그 중에도 발암 기전 연구에 성장 인자가 주목받고 있으며, 이 중 TGF- β 도 연구되고 있다²⁶⁾.

TGF- β 는 세포 종류와 배양 조건에 따라 세포 성장에 다양한 영향을 준다. 예를 들면 정상 쥐 신장 섬유모세포나 사람의 표피(prepuce) 섬유모세포, 그리고 AKR-2B 생쥐 배아 세포 등의 간엽 조직들은 TGF- β 에 의해 성장이 촉진되나, 생쥐나 사람의 각화세포, 쥐의 간세포, 사람의 기관지 상피세포, 소여포(crypt) 세포, 소의 내피세포, 사람의 암종과 흑색종세포계(cell line) 등 상피 세포들은 성장이 억제되고, TGF- β 는 말단분화, 교원질, fibronectin, proteoglycan 등의 세포외 기질의 생산 및 침착을 유도한다는 보고도 있다²⁷⁾.

In vivo와 in vitro에서도 TGF- β 의 작용양상이 다르다. In vivo를 살펴보면, Roberts 등²⁸⁾은 신생쥐에 TGF- β 를 피하주사하면 육아조직이 신속히 생산됨을 확인하였으며, 손상된 부위에서 활성화된 대식세포, T 림프구와 B 림프구에서도 TGF- β 가 생산되어 신속한 창상 치유를 유도한다고 하였다. 반면 in vitro에서는 섬유모세포에서 세포외기질 단백질인 collagens (제 I, III 그리고 IV형)와 fibronectin의 합성을 촉진시키며²⁹⁾, 기질 단백질을 분해시키는 단백분해효소의 합성을 감소시키고, 단백분해효소의 억제요소를 생산하여 세포외기질의 축적을 돕는다고 보고하였다³⁰⁾.

면역조절에도 관여하는데, 단핵세포의 화학주성, cytokine 생산의 변화, T 림프구와 B 림프구의 증식 억제, 자연살세포(natural killer cell)의 기능 억제, 그리고 B 림프구의 면역글로블린의 생산을 억제하여 창상 치유에서 염증유발을 억제시킨다고 보고하고 있다³¹⁾.

상기한 보고와 같이 TGF- β 는 다양한 기능을 갖고 있어서 기능적인 다양성을 형태학적으로 증명하고 분석하는 작업이 필요되며 하나의 연구 수단으로 면역조직화학적 염색이 사용된다. 면역조직화학적 검색은 in vivo 실험에서 관찰하고자 하는 인자가 어느 부위에 있는지를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 주위 조직의 형태학적 변화를 관찰할 수 있어서 그 연관성을 확인할 수 있다. 양성 및 악성 병변, 그리고 암의 전구성 병변 등을 동일한 조건하에서 paraffin 조직 절편을 이용하여 후향적으로 연구할 수 있고, 암 병소 주위의 정상적인 조직의 변화를 검색할 수 있으며 특히 동일한 환자의 전구성 병변이 악성 전환을 한 경우에는 그 연관성을 같이 관찰할 수 있다. 또한 개개의 세포 단위로 여러 조직병리학적 소견과 항원 표현과 관계를 연구할 수 있다는 장점이 있다^{32,33)}. Flanders 등¹¹⁾은 세포내에 염색되는 TGF- β 는 TGF- β 가 만들어지는 위치를 가리키며 세포 밖에 염색되는 것은 기질 단백질에 붙는 것을 의미한다고 하여 in vivo에서의 TGF- β 의 기능을 이해하려면 여러 종류의 세포에서 TGF- β 의 존재를 확인하는 연구가 필요하다고 하였다.

TGF- β 의 면역조직화학적 염색을 가장 처음 시도한 연구자는 Ellingsworth 등¹⁰⁾이며 그 후 Casscells 등³⁴⁾은 정상 쥐의 심장을 염색하여 세포질내에서 선 모양이나 점상모양으로 염색되는 것을 관찰하여 TGF- β 가 수축성 세사나 사립체에 존재하는 것이 아닌가 하는 제안을 하였다. Johnson 등³⁵⁾은 수막종을 염색한 결과 세포질에 염색된 양상을 보아 골치체에 분포되어 있리라 제안하였다. 본 연구에서는 정상위점막에서 위오목 부위 침단에 있는 세포질에서 관찰되었는데 이는 Sergio 등³⁶⁾이 정상 장점막에서 TGF- β 가 주로 소여포 침단에 있는 세포에서 관찰되었다고 하는 결과와 유사하다. 위점막의 상피세포의 생성은 위오목 저부의 미분화 세포에서 기원하여 위오목 부위 침단으로 이주하므로 위오목 침단에 고도로 분화된 세포를 관찰할 수 있다. 그래서 위오목 침단에서 발견되는 TGF- β 는 성장을 일시 억제하므로 분화를 돕는 것으로 생각하였다.

본 연구에서는 정상 위조직과 비교하여 위암 조직에서 TGF- β 의 발현이 증가되어 있었으며 통계학적으로 최고 염색 정도, 양성 세포 백분율 및 염색 지수에서 의미있는 차이를 볼 수 있었다(Table 1, $p < 0.05$). Jasani 등¹⁷⁾도 갑상선 종양의 여러 단계별 면역조직화학적 염색에서 양성 종양과 정상 갑상선 상피 세포에

는 TGF- β 가 존재하지 않았지만 악성 종양에서는 TGF- β 가 확인되었다고 보고하였으며, 종양세포내에서 염색되는 TGF- β 는 활성화되어 있다고 하였다³⁷⁾. Knabbe등³⁸⁾도 호르몬 영향을 받는 유방암 세포를 배양하여 종양세포에서 활성화된 TGF- β 가 생산됨을 보고하였다. 종양세포의 세포질에 염색되는 경우 TGF- β 의 합성 증가와 분비가 감소된 경우의 두가지로 생각할 수 있지만 Schilling등³⁹⁾은 세포질내에서 염색되는 TGF- β 양상과 mRNA의 발현이 일치하므로 세포질내에서 합성되는 TGF- β 는 합성되는 위치를 가리킨다고 하였으며 TGF- β 의 합성과 분비가 증가됨을 의미한다고 하였다. 본 실험에서도 종양 세포내에서 TGF- β 가 염색되었기 때문에 TGF- β 가 종양세포에서 합성된 것으로 생각하였다. 종양세포에서 분비되는 TGF- β 는 주위 정상 조직에 다양한 영향을 미치는데 Arteaga등⁴⁰⁾은 유방암에서 TGF- β 가 호르몬의 영향을 피하게 하고, 종양세포의 증식을 촉진하고, 종양세포의 단백질 분해능을 항진시키므로 전이를 더욱 쉽게 한다고 하였다. 주위조직에도 영향을 주어 면역 억제, 즉 자연살세포의 기능을 억제하여 종양증식을 촉진시켰으며 혈관증식, 결합조직 형성, 세포주위의 단백질 분해를 촉진하므로 암세포의 성장을 유도한다고 보고하고 있는데, Laiho등⁴¹⁾도 위암 세포배양에서 유사한 결과를 관찰하였다. Sporn등⁴²⁾도 종양세포에서 분비되는 TGF- β 가 자연살 세포, T와 B림프구의 기능을 억제시켜 면역기능이 감소되므로 세포증식이 촉진된다고 보고하였으며, Yoshida등¹⁵⁾은 위암 세포를 배양한 실험에서 위암세포가 분비하는 TGF- β 가 종양세포와 섬유모세포를 자극하여 procollagen I과 III의 합성을 촉진시켜 섬유화를 유도한다고 하였다. Ura등⁴³⁾은 위경성암(gastric scirrhous carcinoma) 세포 배양에서 분비되는 활성화된 TGF- β 가 위암의 collagen기질에 수축이 일어나게 한다고 하였다.

본 연구에서 침습 깊이에 따른 비교(Table 3, Fig. 1)에서 최고 염색 정도, 양성세포 백분율, 염색지수 모두 침습 깊이가 깊을수록 증가하는 소견을 보였으며, 표층보다 침윤이 일어나는 심층에서 TGF- β 의 염색성이 강하였고($p < 0.05$, Table 6, Fig. 3, 6, 7), 전이 여부에 따른 비교(Table 4, Fig. 2)에서도 최고 염색 정도와 양성세포 백분율의 경우 암의 전이가 있는 군에서 증가되었다. Oda등¹⁷⁾은 침윤성 유방암조직에서 fibronectin과 fibronectin 수용체 및 TGF- β 의 면역 조직화학적 염색에서 그들의 발현이 TGF- β 발현과 유사하여 TGF- β 가 fibronectin과 fibronectin 수용체의 합성을 촉진시키므로 유방암의 침윤 및 림프절 전이를 도와준다고 하였다. Heino등⁴⁴⁾은 사람의 골육종 배양에서 TGF- β 를 넣으면 TGF- β 가 세포외기질의 결합체의 일종인 integrin을 변화시키므로 종양세포의 집착력을 변화시킨다고 보고하였다. Laiho등⁴¹⁾은 폐암 세포에서 분비되는 TGF- β 가 plasminogen

을 활성화시키므로 종양의 침윤과 악성 성장에 도움을 준다고 하였다. 따라서 상기 결과들은 위암 조직에서 TGF- β 의 발현이 침윤 및 전이의 잠재성등 악성 정도와 관계가 있으리라 생각되었다.

본 연구에서는 침습 깊이에 따른 분류와 병기별 분류에서 침윤이 일어나지 않은 T1군과 병기 I군에서 다른 군과의 비교시 최고 염색 정도, 양성 세포 백분율 및 염색 지수가 통계학적으로 의미있게($p < 0.05$) 낮은 결과를 보여 종양에서 분비되는 TGF- β 가 위암의 유발에 관여하기 보다는 위암의 증식과 유지에 관여하리라 생각된다. 과거 여러 저자들도 TGF- β 가 암을 유발시키는 작용이 있는가에 관심이 많았는데 외인성 TGF- β 에 암세포가 반응을 하지 않는 것, 외인성 TGF- β 가 활성화되지 않는 것, 그리고 TGF- β 가 분비되지 않는 것 등으로 미루어 TGF- β 가 암의 유발과 관련되었다고 설명하였으며¹⁷⁾, Kimch등¹²⁾은 정상 태아 망막 세포가 외인성 TGF- β 에 의해 세포성장이 억제되었으나 망막모세포종에서는 외인성 TGF- β 와 관계없이 계속 증식이 있어 TGF- β 의 수용체를 조사한 결과 망막모세포종에서 TGF- β 의 수용체가 없었다고 한다. 이외에 여러 보고^{9, 45)}에서 암종 세포배양에서 외인성 TGF- β 에 대하여 반응하지 않았다고 하였으나, 외인성 TGF- β 의 영향을 받지 않는 시기는 암의 유발과정중 후기부터인 것으로 보고⁴⁶⁾하고 있어 암의 유발에는 관여하지 않는다고 하였다. 유방암에서도 in vivo에서 TGF- β 가 암의 유지 및 증식에 큰 역할을 하는 것으로 보는데 그 이유로는 TGF- β mRNA 발현과 분비 증가, 호르몬 의존성 이탈현상등이 TGF- β 의 영향을 받고 있는데, 정상 유방조직보다는 고도로 증식하는 유방암조직에서 TGF- β mRNA 전사가 활발히 일어나며, 유방암에서 TGF- β 는 단백질분해능과 전이능을 증가시킬 뿐만 아니라, 직접적으로 고도의 전이암의 증식을 촉진시킨다는 점이다. 또한, 사람의 유방암 조직이 이식된 nude mouse에 TGF- β 를 주입하여도 암의 증식이 억제되지 않는다는 점이다⁴⁰⁾.

분화도에 따른 비교(Table 5)에서는 점액선암종과 인환세포암종보다 선관암종에서 통계학적으로 유의하게($p < 0.05$) TGF- β 의 발현이 증가함을 보이고 있는데 본 연구에 포함되었던 종례들은 점액선암종과 인환세포암종은 모두 T1이었으므로 위암유발시에는 TGF- β 가 합성되지 않았을 가능성이 있어서 다양한 침습 깊이별 종례의 추가 연구가 있어야 되리라 본다. 선관암에서는 분화도에 따른 일관성 있는 결과를 얻지 못하고 있어서 종례의 추가연구가 있어야 되리라 생각한다.

본 실험은 면역 조직화학적 방법으로 TGF- β 를 염색하여 반정량적인 방법을 이용하여 위암에서 TGF- β 의 역할을 규명하였으나, 좀 더 정확한 정량적인 방법의 개발과 다른 암유전인자, 여러 기질과의 상관관계 및 면역 세포와의 관계를 밝히는 연구가 장차 진행되

어서 더 명확한 TGF-β의 역할을 규명하여야 하리라 생각된다.

결 론

본 연구는 30예의 위암 조직을 대상으로 항 TGF-β 단세포군 항체를 이용한 면역 조직화학적 염색을 시행하여 여러가지 임상적 그리고 병리학적 상관 관계를 비교 분석함으로써 다음과 같은 결론을 얻었다.

TGF-β는 미만성으로 분포하였고 위암 상피세포의 세포질에서 관찰되었으며, 정상 위 조직보다 위암 조직에서 TGF-β의 염색성이 증가되었다. 침윤의 깊이가 깊은 위암일수록 TGF-β에 대한 염색성은 증가되었고, 동일한 위암에서 심층부의 종양세포의 TGF-β 발현이 표층부의 종양세포의 TGF-β 발현보다 강하였으며, 전이가 없는 위암 환자의 위암 조직보다 전이된 병소를 가진 위암환자의 위암 조직에서 TGF-β의 발현이 강함을 증명하므로써 TGF-β가 위암의 침윤 및 전이에 중요한 역할을 한다는 사실을 규명하였다. TGF-β 발현을 통하여 위암의 악성도를 예견할 수 있으며, 항 TGF-β 항체의 이용으로 TGF-β에 의한 암의 증식과 침윤을 제지할 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) DeLarco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 4001-5.
- 2) Assoian RK, Komoriaya A, Meyers CA, Miller PJ, Sporn MB. TGF-β in human platelets. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155-60.
- 3) Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta TGF from human human placenta. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 3676-80.
- 4) Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of TGFs potentiated by EGF: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 5339-43.
- 5) Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Wideman J, Blacher R, Pan YCE, Stein S, Lehrman R, Smith JM, Lamb LC, Sporn MB. Purification and properties of a type beta TGF from bovine kidney. *Biochemistry* 1983; 22: 5692-8.
- 6) 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 TGFs. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 6364-8.
- 7) Tucker RF, Branum EL, Shipley GD, Ryan RJ, Moses HL. Specific binding to cultured cells of ¹²⁵I-labeled transforming growth factor beta from human platelets. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 6157-61.
- 8) Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597.
- 9) Wakefield LM, Smith DM, Masui T, Harris CC, Sporn MB. Distribution and modulation of the cellular receptor for TGF-β. *J Cell Biol* 1987; 105: 965-75.
- 10) Ellingsworth LR, Brennan JE, For K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA, Seyedin SM. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and TGF-β. *J Biol Chem* 1986; 261: 12362-7
- 11) Flanders KC, Thompson NL, Cissel DS, Oberghen-Schilling EV, Baker CC, Kass ME, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. TGF-β: Histochemical localization with antibodies to different epitopes. *J Cell Biol* 1989; 108: 653-60.
- 12) Kimch A, Wang XF, Weinberg RA, Cheifetz S, Massague J. Absence of TGF-β receptors and growth inhibiting responses in retinoblastoma cells. *Science* 1988; 240: 196-9
- 13) Roberts AB, Sporn MB. TGF-β. *Adv Cancer Res* 1988; 51: 107-45.
- 14) Ode K, Hori S, Itoh H, Osamura RY, Tokuda Y, Kubota M, Tajima T. Immunohistochemical study of TGF-β, fibronectin, and fibronectin receptor in invasive mammary carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 1992; 42: 645-50.
- 15) Yoshida K, Yokozaki H, Nimoto M, Ito M, Tahara E. Expression of TGF-β and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1989; 44: 394-8.
- 16) Ito M, Yasui W, Nakayama H, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Reduced levels of TGF-β type I receptor in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 259-300.
- 17) Jasani B, Wyllie FS, Wright PA, Lemoine NR, Williams ED, Waynford DT. Immunocytochemically detectable TGF-β associated with malignancy in thyroid epithelial neoplasia. *Growth factors* 1990; 2: 149-55.
- 18) Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Meyers MH. *Manual for Staging of Cancer 3rd ed.*, Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1988; 69-74.
- 19) Fenoglio-Preiser CM, Lantz PE, Listrom MB, Davis M, Rilke FO. *Gastrointestinal pathology 1st ed*, New York, Raven Press, 1989.
- 20) Jass JR, Sobin LH, Watanabe H. The world organization's histologic classification of gastrointestinal tumors. *Cancer* 1990; 66: 2162-7.
- 21) 대한병리학회 소화기병리학 연구회. 위암의 병리학적 취급규정 시안. *대한병리학회지* 1992; 26: 154-63

- 22) Thor A, Hand H, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R, Schlom J. *Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. Nature* 1984; 11: 562-5.
- 23) Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. *ras p21 expression in the progression of breast cancer. Hum Pathol* 1987; 18: 1268.
- 24) 박혜림. 대장 종양에서 ras 암유전자산물의 발현과 Nucleolar Organizer Regions에 관한 연구. 고려대학교 대학원 박사학위논문 1992
- 25) Silvano B, Arthur KC, Ronald AD, Brian DW, Gerald JH, Mark IS. *Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum Pathol* 1992; 23: 755-61.
- 26) Deuel TF. *Polypeptide growth factors; roles in normal and abnormal cell growth. Annu Rev Cell Biol* 1987; 3: 443.
- 27) Hebert CD, Birnbaum LS. *Lack of correlation between sensitivity to growth inhibition and receptor number for TGF-β in human squamous cell carcinoma cell lines. Cancer Research* 1989; 49: 3196-202.
- 28) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. *TGF-β: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 4167-71.
- 29) Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA. *TGF-β causes a persistent increase in steady state amounts of type I and type-III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. Biochem J* 1987; 247: 597-604
- 30) Laiho M, Sakesela O, Andreassen PA, Keski-Oja J. *Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by TGF-β. J Cell Biol* 1986; 103: 2403-10.
- 31) Sporn MB, Roberts AB. *TGF-β: Multiple actions and potential clinical applications. JAMA* 1989; 262: 938-41.
- 32) 남종희, 이종현, 박창수, 조규혁. 유방의 양성 및 악성 병변의 ras oncogene 표현에 관한 연구. 대한병리학회지 1989; 23: 85.
- 33) Horan P, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J. *Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 5227.
- 34) Casscells W, Bazoberry F, Speir E, Thompson, Flanders K, Kondaiiah P, Ferrans VJ, Epstein SE, Sporn M. *TGF-β in normal heart and in myocardial infarction. Annals of N. Y. Acad Sci* 1990; 593: 148-60.
- 35) Johnson MD, Federspiel CF, Gold LI, Moses HL. *TGF-β and TGF-β receptor expression in human meningioma cells. Am J Pathol* 1992; 141: 633-42.
- 36) Sergio AL, Bertha S, Ami G. *TGF-β in intestinal epithelial differentiation and neoplasia. Anti-cancer Research* 1989; 9: 1877-82.
- 37) Hiral R, Yamaoka K. *Autocrine of active TGF and growth properties of tumor cells 47th Annual meeting of the Japanese Cancer Association, p.317, Jpn J Cancer Res. Tokyo* 1988.
- 38) Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, Flanders KC, Kasid A, Derynck R, Dickson RB. *Evidence that TGF-β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. Cell* 1987; 48: 417-28.
- 39) Schilling EV, Thompson NL, Flanders KC, Sporn MB, Lambert PF, Baker CC. *TGF-β expression in fibropapillomas induced by Bovine Papillomavirus type I in normal Bovine skin and in BPV-I transformed cells. Growth factors* 1990; 2: 111-21.
- 40) Arteaga CL, Coffey RJ. *TGF-β isoforms in mammary neoplasia. Hum Pathol* 1992; 23: 1-3.
- 41) Laiho M, Keski-Oja J. *Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis; A review. Cancer Res* 1989; 49: 2533-53.
- 42) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. *TGF-β: biological function and chemical structure. Science* 1986; 233: 532-4.
- 43) Ura H, Obara T, Yokota K, Shibata Y, Okamura K, Namiki M. *Effects of TGF-β released from gastric carcinoma cells on the contraction of Collagen-Matrix gels containing fibroblasts. Cancer Res* 1991; 51: 3550-4.
- 44) Heino J, Massague J. *TGF-β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 Human Osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. J Biol Chem* 1989; 264: 21806-11.
- 45) Reiss M, Sartorelli AC. *Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by type beta TGF and EGF. Cancer Res* 1987; 47: 6705-9.
- 46) Haddow S, Fowles DJ, Parkinson K, Akhurst RJ, Balmain A. *Loss of growth control by TGF-β occurs at a late stage of mouse skin carcinogenesis and is independent of ras gene activation. Oncogene* 1991; 6: 1465-70.