

Transforming Growth Factor- β 1 및 수용체가 인체방광암의 발생, 재발 및 진행에 미치는 영향

Effects of Transforming Growth Factor- β 1 and Its Receptor on the Development, Recurrence and Progression of Human Bladder Cancer

Changyi Quan, Moon-Seon Park, Sung-Whan Jo, Sang-Cheol Lee, Wun-Jae Kim

From the Department of Urology, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea University, Cheongju, Korea

Purpose: We investigated whether the expression levels of Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and its receptors were related to the development, recurrence, progression and disease-free survival in the patients with bladder cancer.

Materials and Methods: The mRNA levels of TGF- β 1 and its receptors were examined in 102 tumor specimens from patients with primary bladder cancer, 29 corresponding normal bladder mucosae specimens surrounding these tumors and 15 normal bladder mucosae specimens by performing quantitative competitive PCR (QC-PCR). The protein levels of TGF- β 1 and its receptors were investigated by performing immunohistochemical staining on sections cut from 86 archival bladder tissue paraffin blocks.

Results: QC-PCR analysis showed that expressions of TGF- β 1, TGF- β receptor I (TGF- β RI) and receptor II (TGF- β RII) in the superficial and low-grade bladder cancers were significantly higher than those in both the corresponding normal bladder mucosae surrounding the cancer ($p=0.0069$, 0.0022 and 0.0046 , respectively) and the control's normal bladder mucosae ($p=0.0014$, 0.0125 and 0.0089 , respectively). Expressions of TGF- β 1 and its receptors were enhanced in the non-recurred and non-progressed patients compared to the recurred cases ($p=0.0022$, 0.0003 and 0.0001 , respectively) and the progressed cases ($p=0.0002$, <0.0001 and <0.0001 , respectively). Patients with high expression of TGF- β 1 and its receptors had a significantly higher disease-free survival rate than those patients with low expressions ($p=0.0129$, 0.0121 and 0.0132 , respectively).

Conclusions: The enhanced expression of TGF- β 1 and its receptors was correlated not only with superficial and low-grade bladder cancer, but also with enhanced patient survival. In conclusion, our findings suggest that the expressions of TGF- β 1 and its receptors are useful prognostic markers for a patient's resistance to disease recurrence and/or progression. (Korean J Urol 2006;47:426-435)

Key Words: Transforming growth factor- β 1, TGF beta Receptor, Bladder cancer

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 4 호 2006

충북대학교 의과대학
비뇨기과학교실

권창익 · 박문선 · 조성환
이상철 · 김원재

접수일자 : 2005년 10월 25일
채택일자 : 2005년 12월 8일

교신저자: 김원재
충북대학병원 비뇨기과
충북 청주시 흥덕구 개신동
산 62번지
☎ 360-763
TEL: 043-269-6371
FAX: 043-271-7716
E-mail: wjkim@chungbuk.ac.kr

본 논문은 2005년학년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

서론

방광암의 90% 이상은 이행세포암이며, 그 가운데 60%

정도는 저등급 분화도의 표재성 방광암이다. 하지만 경요도절제술만을 시행한 경우 재발이 빈번하며 16-25% 정도는 고등급 분화도의 암으로 진행하고 또한 10%의 경우에는 병기의 진행 및 종양의 전이가 발생한다. 뿐만 아니라 처음

방광암으로 진단된 환자 중 25% 정도는 침윤성 방광암으로써 대부분 분화등급이 높고 이들 중 약 50%에서 잠재적인 원격 전이를 가지고 있다.¹ 따라서 경요도 방광종양 절제술 후 표재성 방광암의 잦은 재발과 병기의 진행은 환자 및 비뇨기과 의사들에게 자주 제기되는 문제점이다.

Transforming growth factor β (TGF- β)는 다양한 기능을 지닌 cytokine으로서 세포의 분화, 증식 및 세포고사 등 여러 가지 생명활동에 관여하며 종양과의 관련성에 대하여 많은 주목을 받아 왔다.^{2,4} 비록 TGF- β 는 정상 상피세포에서는 세포의 성장억제 인자로 작용을 하지만 종양형성과정에서는 암의 촉진 혹은 억제라는 두 가지 작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{2,4,5} TGF- β 에 대한 저항성 획득이 종양 발생과정의 중요한 단계라는 여러 보고들이 있는데^{6,8} 실제로 악성도가 높은 여러 인체 상피암들에서 TGF- β 의 기능 상실이 관찰되며 이는 TGF- β receptorII (TGF- β RII)와 Smad의 선천적인 돌연변이와 촉진자 부위의 과메틸화에 의한 것으로 보고되고 있다.^{6,9-11} 반면에 TGF- β 는 실험적인 조건에서 종양세포의 악성도를 증진시키며 인체 상피암에서 TGF- β 의 높은 발현과 종양의 높은 병기와는 관련이 있다는 연구 결과가 발표되고 있다.¹² 때문에 TGF- β 는 그 신호전달체계의 악화뿐만 아니라 증진 모두 종양의 발생이나 종양 악성도의 획득에 관여하는 것으로 알려지고 있다.⁷

TGF- β 1 및 그 수용체와 방광암과의 관련성을 규명하기 위한 연구 역시 많이 이루어지고 있다. 반정량적인 polymerase chain reaction (PCR) 방법을 사용한 연구에서는 낮은 병기 및 저등급 분화도의 방광암에서 TGF- β 1 mRNA의 높은 발현이 관찰되었다는 보고들이 있으며,^{13,14} 면역화학염색법 혹은 in situ hybridization 방법으로 측정된 연구에서는 TGF- β 1 mRNA이 발현이 높긴 하나 TGF- β RI 및 RII는 오히려 낮은 발현을 보인다는 보고도 있다.^{15,16} 따라서 지금까지의 결과들만으로는 방광암에서 TGF- β 1의 역할을 단정하기에는 아직 미흡한 실정이다. 물론 연구계획이나 실험 방법, 혹은 연구대상의 크기에 의한 결과의 차이가 있을 수 있겠으나 중요한 것은 mRNA의 정량방법에 있어서의 차이가 크다고 생각한다. 앞서 언급한 보고들에서 시행된 방법들은 대개 비정량적 혹은 반정량적인 것으로 주로 목적 유전자 발현 위치를 판정할 때 주로 이용하는 방법이다. 반면 quantitative competitive PCR (QC-PCR)은 그 민감성 및 정확성 때문에 mRNA의 정량에 널리 사용되고 있는 방법으로,¹⁷⁻¹⁹ 본 연구에서도 QC-PCR법을 이용하여 방광암 조직에서 TGF- β 1 및 그 수용체 mRNA 발현 양을 보다 정량적으로 측정하였다. 나아가 면역화학염색방법을 이용한 단백질 발현과의 관계도 함께 조사하여 이들 발현과 방광암의 여러 인자들과의 비교 분석을 시행함으로써 방광암에서

TGF- β 1의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1995년부터 2002년까지 경요도절제술이나 방광절제술을 시행한 후 이행상피암으로 확진된 방광암 조직 102례와 종양주변 정상 방광 조직 29례 및 종양 이외의 병변으로 수술할 때 얻은 정상 방광 조직 15례를 대상으로 QC-PCR을 시행하였다. 방광암 환자의 평균 나이는 62.3세 (31-78), 성별로는 남자 84례, 여자 18례였으며, 대조군의 평균 나이는 61.9세 (46-76)였으며 남자 12례, 여자 3례였다. 방광암의 병기는 표재성 방광암이 74례 (Ta 16례, T1 58례), 침윤성 방광암이 28례 (T2 6례, T3 15례, T4 7례)였으며, 분화도는 등급 I이 20례, 등급 II가 50례, 등급 III이 32례였다. 각 조직들은 즉시 동결시키고 분자생물학적 검사를 시행할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 표재성 방광암에서 수술 후 병기의 진행 없이 반복하여 종양이 재발한 경우를 '재발'로 정의하였고, 적절한 치료 후에도 표재성 방광암이 침윤성 방광암으로 또는 전이성 방광암으로 되거나 침윤성 방광암이 전이성 방광암으로 되는 경우를 병기의 '진행'으로 정의하였다. 또한 본원의 병리학교실에 보관되어 있는 상기 환자의 조직 중 사용 가능한 70개의 방광암 파라핀 블록 및 16개의 정상방광 파라핀 블록을 이용하여 면역화학염색을 시행하였다. 70례 방광암의 병기는 표재성 방광암이 30례, 침윤성 방광암이 40례였으며, 분화도는 등급 I이 21례, 등급 II가 12례, 등급 III이 37례였다.

2. 조직에서의 RNA 추출 및 cDNA 합성

적당량의 조직을 1ml의 TRIzol (Life Technologies, USA)에 넣고 조직분쇄기 (homogenizer)로 분쇄한 후 200 μ l의 chloroform을 첨가하였고, 12,000rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상층액을 모았다. 상층액에 500 μ l의 isopropanol을 첨가하고 10분 이상 진탕한 다음 12,000rpm에서 20분간 원심분리하였고 다시 상층액을 제거한 다음 70% ethanol로 침전시켰다. 이를 다시 15,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였으며 실온에서 건조하였다. 건조 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) 증류수를 첨가하여 사용할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 추출된 전체 RNA는 분광광도계 (Perkin Elmer, MBA2000, USA)를 이용하여 농도를 측정 한 후 1.1% RNA 젤에서 전기영동을 하여 RNA 밴드 (band)를 확인하였다. cDNA를 합성하기 위하여 조직에서 추출한 RNA 0.5 μ g/ μ l를 DEPC 증류수로 희석한 후 사용하였다. First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences Euro-

Table 1. Primer sequences of TGF- β 1, TGF- β RI and TGF- β RII for QC-PCR

Gene		Primer sequences
TGF- β 1	P1	5'-GACTATCCACCTGCAAGACT-3'
	P2	5'-TCTCGGAGCTCTGATGTGTT-3'
	P3	5'-TCGCCCTGTACAACAGCAGGATCCTACTACGCCAAGGAGGTC-3'
	P4	5'-GACCTCCTTGCGCTAGTAGGATCCTGCTGTTGTACAGGGCGA-3'
TGF- β RI	P5	5'-AAGCCAGCCATTGCTCATAG-3'
	P6	5'-GAACTTCAGGGGCCATGTAC-3'
	P7	5'-GAACTTCAGGGGCCATGTACCATGTCTTACTGCCAGTCCT-3'
TGF- β RII	P8	5'-GACATCTCGCTGTAATGCAG-3'
	P9	5'-TCTGGATGCCCTGGTGGTTG-3'
	P10	5'-GACATCTCGCTGTAATGCAGACCCCTGTGTCGAAAGCATG-3'

TGF- β 1: transforming growth factor β 1, TGF- β R: transforming growth factor β receptor, QC-PCR: quantitative competitive polymerase chain reaction

pe GmbH, Freiburg, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 동일 양의 RNA 2 μ l에 DEPC 증류수 2 μ l를 넣고 65°C에서 10분간 처리한 후 얼음에 넣어 두었다. cDNA 합성 용액 3.5 μ l를 첨가하여 37°C에서 한 시간 반응시키고 다시 72°C에 10분간 방치하였다. 반응 산물에 42.5 μ l의 증류수를 넣고 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

3. QC-PCR

mRNA 발현 정도를 정량화하기 위하여 본 연구에서는 Gilliland 등²⁰이 고안한 QC-PCR 방법으로 정량화하였다. 이는 이미 농도를 알고 있는 인위적인 DNA인 경쟁자 (competitor)와 농도를 모르는 cDNA를 동시에 증폭시키는 방법으로 양자 간의 증폭률이 같다면 경쟁자와 cDNA의 PCR 산물의 농도비를 측정함으로써 cDNA의 농도를 계산할 수 있다. QC-PCR에 사용된 primer는 Table 1에 나타났다. 각각의 경쟁자와 PCR 산물에 대해서는 direct DNA sequencing (ABI prism 377XL, Perkin Elmer, USA)을 시행하여 염기서열을 확인함으로써 증폭된 산물의 정확성을 확인하였으며 Recombinant PCR 방법을 이용하여 TGF- β 1 유전자의 경쟁자를 만들었다. 우선 primer P1과 P2를 이용하여 증폭된 산물을 전기영동한 후 gel로부터 PCR 산물을 추출하였다. 이 산물을 각각 primer set P1과 P4, P2와 P3를 이용하여 PCR을 진행하였으며 증폭된 산물을 각각 정제 후 이들을 섞어서 primer P1과 P2를 이용하여 PCR을 재차 시행하여 TGF- β 1의 경쟁자를 만들었다. PCR 반응액은 cDNA 1 μ l, 10x buffer 2.5 μ l, 2.5mM dNTP 2 μ l, primer 1 μ l, Taq polymerase (바 이오니아, 충북, 한국) 0.1 μ l를 첨가하여 최종 25 μ l를 만든 후 PCR을 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 denatu-

ration 후 40주기 동안 95°C에서 denaturation 30초, 57°C에서 annealing 60초 및 72°C에서 extension 60초를 시행하고 72°C에서 10분간의 extension을 추가하였다.

TGF- β RI 및 RII 유전자의 경쟁자는 internal deletion PCR 방법을 이용하여 만들어졌다.¹⁷ 우선 TGF- β RI는 primer P5와 P6, TGF- β RII는 primer P8과 P9를 이용하여 1차 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 후 primer P5와 P7, P9와 P10을 이용하여 PCR을 시행하였고 다시 primer P5와 P6, P8과 P9를 이용하여 재차 PCR을 시행하여 TGF- β RI과 RII의 경쟁자를 만들었다. PCR 반응액의 구성과 반응조건은 TGF- β 1과 거의 동일하다.

최적의 경쟁자 농도를 결정하기 위하여 TGF- β 1, TGF- β RI 및 TGF- β RII cDNA와 연속적으로 희석한 각각의 경쟁자를 같이 PCR하여 같은 비율로 증폭되는 경쟁자의 농도를 추후 QC-PCR에 사용하였다 (Fig. 1). 이미 정량적으로 농도를 알고 있는 경쟁자 (1 μ l)와 측정하고자 하는 조직의 cDNA (1 μ l)를 같이 혼합하고 sense와 antisense primer를 이용하여 위와 동일한 조건으로 PCR을 시행하였다. 최종 PCR 산물에서 5 μ l를 취하여 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 후 자외선램프로 두 띠를 확인하였고 imaging analysis system version 2.00 TotalLab (Nonlinear USA Inc, USA)을 이용하여 경쟁자 및 TGF- β 1, TGF- β RI 및 TGF- β RII mRNA의 양을 측정하여 정량화하였다.

4. 면역화학염색

본원 병리과에 보관되어 있는 방광암 파라핀 블록을 이용하여 tissue microarray를 제작하였으며 4 μ m의 두께로 절

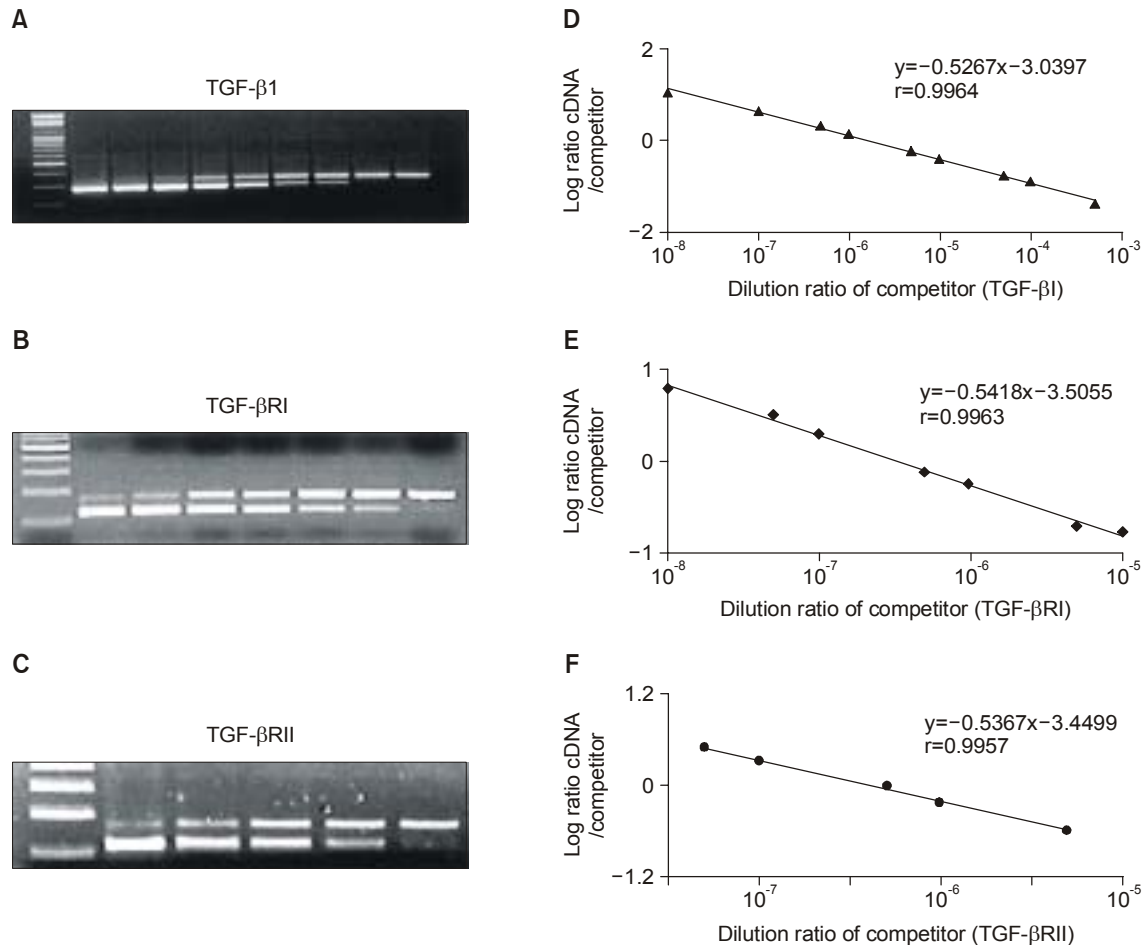


Fig. 1. A-C, Each serially diluted competitor (1 μ l) is co-amplified with a 1 μ l sample of cDNA. The PCR products are separated on 2% agarose gel and then visualized by ultraviolet light after ethidium bromide staining, and the density of each band is quantified. D-F, The ratio of target cDNA to its competitor is log transformed and plotted against the amount of competitor cDNA initially added to each PCR reaction to produce the standard curves. When the competitor is diluted to 10^{-6} (50pg/ml), the ratio of TGF- β 1 to competitor approaches 1. When the competitor is diluted to 5×10^{-7} for TGF- β RI (3pg/ml) and TGF- β RII (25pg/ml), the ratio of the target to competitor reaches 1. Therefore, we perform QC-PCR using the competitor at the above concentrations for quantifying TGF- β 1 and its receptor expression levels (PCR: polymerase chain reaction, TGF- β 1: transforming growth factor β 1, TGF- β R: transforming growth factor β receptor).

편하여 면역화학염색을 시행하였다. 면역화학염색은 Dako-Cytomation Immunostaining kit (Glostrup, Denmark)를 사용하였고 1차 항체는 Santa cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, USA) 제품 (TGF- β 1 sc-146, TGF- β RI sc-398, TGF- β RII sc-17792)을 1 : 100으로 희석하여 사용하였다. 조직 슬라이드는 60°C에서 1시간 동안 가온 후 100% xylene으로 7분씩 4번 deparaffin하였고 100%, 100%, 95%, 75% 알코올로 hydration시킨 다음 3% H₂O₂ 용액에 10분간 유치하였다. 조직 슬라이드를 10mM Borate buffer (pH 8.0)²¹에 넣고 전자레이저로 15분간 끓인 후 1차 항체로 60분간 처리하고 0.1% Tween 20²²으로 세척한 다음 Envision detection system (anti-mouse/anti-rabbit)으로 20분간 반응시켰다. 다시 충분히 세척

후 3, 3'-diaminobenzidine (DiNonA, 서울, 한국)으로 5분간 염색한 후 Meyer's hematoxylin으로 3분간 재차 염색하였다.

면역화학염색 결과 판정은 Sinicrope 등²³이 보고한 방법을 사용하였다. 염색의 강도에 따라 약(1점), 중(2점), 강(3점)으로 평점하였으며 염색된 세포의 면적에 따라 5개로 분류하였다. 5% 미만은 0점, 5-25%는 1점, 26-50%는 2점, 51-75%는 3점, 75% 이상은 4점으로 하였다. 염색 강도의 평점과 염색 면적 평점의 값을 곱하여 최종 염색을 평가하는 기준으로 삼았다.

5. 통계분석

Version 8.1 SAS statistical analysis program을 이용하여

Table 2. mRNA expression levels of TGF- β 1 and its receptors in bladder cancers and the corresponding normal bladder mucosae surrounding cancer (n=29)

	TGF- β 1	TGF- β RI	TGF- β RII
Superficial (26)	47.09 \pm 14.47	2.32 \pm 0.55	24.62 \pm 6.22
Corresponding normal (26)	4.41 \pm 1.09	0.45 \pm 0.05	5.09 \pm 1.10
p-value	0.0069	0.0022	0.0046
Invasive (3)	17.79 \pm 8.93	1.58 \pm 0.72	14.25 \pm 7.61
Corresponding normal (3)	6.89 \pm 2.53	0.90 \pm 0.34	10.25 \pm 5.14
p-value	0.3052	0.4420	0.6855
Low-grade (22)	52.47 \pm 16.62	2.09 \pm 0.48	27.08 \pm 7.17
Corresponding normal (22)	3.29 \pm 0.72	0.45 \pm 0.06	4.89 \pm 1.13
p-value	0.0075	0.0026	0.0058
High-grade (7)	17.64 \pm 10.87	2.74 \pm 1.48	12.42 \pm 4.48
Corresponding normal (7)	8.99 \pm 3.13	0.65 \pm 0.19	7.93 \pm 2.99
p-value	0.4692	0.2083	0.4198

TGF- β 1: transforming growth factor β 1

Student's t-test, Pearson's correlation-test, Kaplan-Meier life-test를 시행하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. TGF- β 1 및 수용체 mRNA 발현정도의 정량

29례의 방광암 조직과 이에 대응되는 종양주변 정상 조직에서 TGF- β 1 및 수용체 mRNA 발현을 비교할 때 저등급 분화도 및 표재성 방광암에서 대응되는 종양주변 정상 조직에 비하여 높게 발현되었으나 고등급 분화도 및 침윤성 방광암조직과 종양주변 정상 조직 사이에는 유의한 차이가 없었다 (Table 2). 또한 TGF- β 1 및 수용체 mRNA 발현은 정상 방광 조직과 종양주변 정상 조직에서 비슷하게 발현되었으며 유의한 차이를 보이지 않았다. 전체 102례의 방광암 조직과 15례의 정상조직과의 비교에서도 TGF- β 1 및 수용체 mRNA 발현은 저등급 분화도 및 표재성 방광암에서 정상 조직에 비해 의미 있게 높게 발현되었으며 정상 조직과 고등급 분화도 및 침윤성 방광암 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Table 3).

2. 방광암에서 TGF- β 1 및 수용체 발현 사이의 상관관계

본 연구에서는 방광암 조직에서 TGF- β 1 및 그 수용체 발현 사이의 상관관계에 대하여 조사하였다. 방광암에서 TGF- β 1과 TGF- β RI 및 TGF- β RII의 발현 사이에는 피어슨 상관관계수 (Pearson's correlation coefficient)가 각각 $r=0.7468$ 및 $r=$

Table 3. TGF- β 1 and its receptors' expression levels with stage, grade, recurrence and progression in bladder cancers, and TGF- β 1 and its receptors' expression levels in the normal bladder mucosae (n=102)

	TGF- β 1	TGF- β RI	TGF- β RII
Superficial (n=74)	23.21 \pm 5.62	1.19 \pm 0.22	13.80 \pm 2.56
Invasive (n=28)	2.97 \pm 1.19	0.48 \pm 0.17	2.62 \pm 1.11
p-value	0.0007	0.0119	0.0001
Low-grade (n=70)	23.85 \pm 5.93	1.13 \pm 0.23	13.73 \pm 2.70
High-grade (n=32)	4.09 \pm 1.30	0.69 \pm 0.18	4.16 \pm 1.37
p-value	0.0017	0.1390	0.0021
Superficial recurrence			
Non-recurrence (n=45)	34.61 \pm 8.80	1.73 \pm 0.34	20.26 \pm 3.89
Recurrence (n=29)	5.51 \pm 1.75	0.36 \pm 0.08	3.78 \pm 0.98
p-value	0.0022	0.0003	0.0001
Progression			
Non-progression (n=76)	23.18 \pm 5.48	1.25 \pm 0.22	13.98 \pm 2.50
Progression (n=26)	1.49 \pm 0.51	0.26 \pm 0.08	1.24 \pm 0.47
p-value	0.0002	<0.0001	<0.0001
Normal (n=15)	3.84 \pm 1.56	0.58 \pm 0.09	5.13 \pm 1.94

Superficial vs normal: TGF- β 1, $p=0.0014$; TGF- β RI, $p=0.0125$; TGF- β RII, $p=0.0089$. Low-grade vs normal: TGF- β 1, $p=0.0016$; TGF- β RI, $p=0.0298$; TGF- β RII, $p=0.0118$

0.8780으로 매우 밀접한 상관관계를 보였다 ($p<0.0001$). 또한 TGF- β RI과 TGF- β RII 발현 사이에도 유의한 상관성이 관찰되었다 ($r=0.7672$, $p<0.0001$) (Fig. 2).

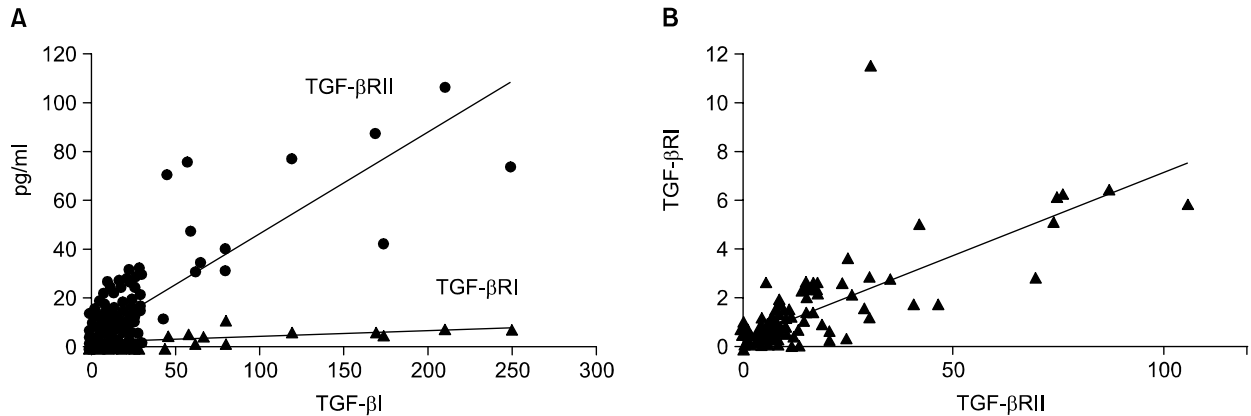


Fig. 2. Positive correlation among the mRNA expression levels of TGF- β 1, TGF- β RI and RII in bladder cancer. A: TGF- β 1 vs TGF- β RII ($r=0.8780$, $p<0.0001$), TGF- β 1 vs TGF- β RI ($r=0.7468$, $p<0.0001$), B: TGF- β RI vs TGF- β RII ($r=0.7672$, $p<0.0001$).

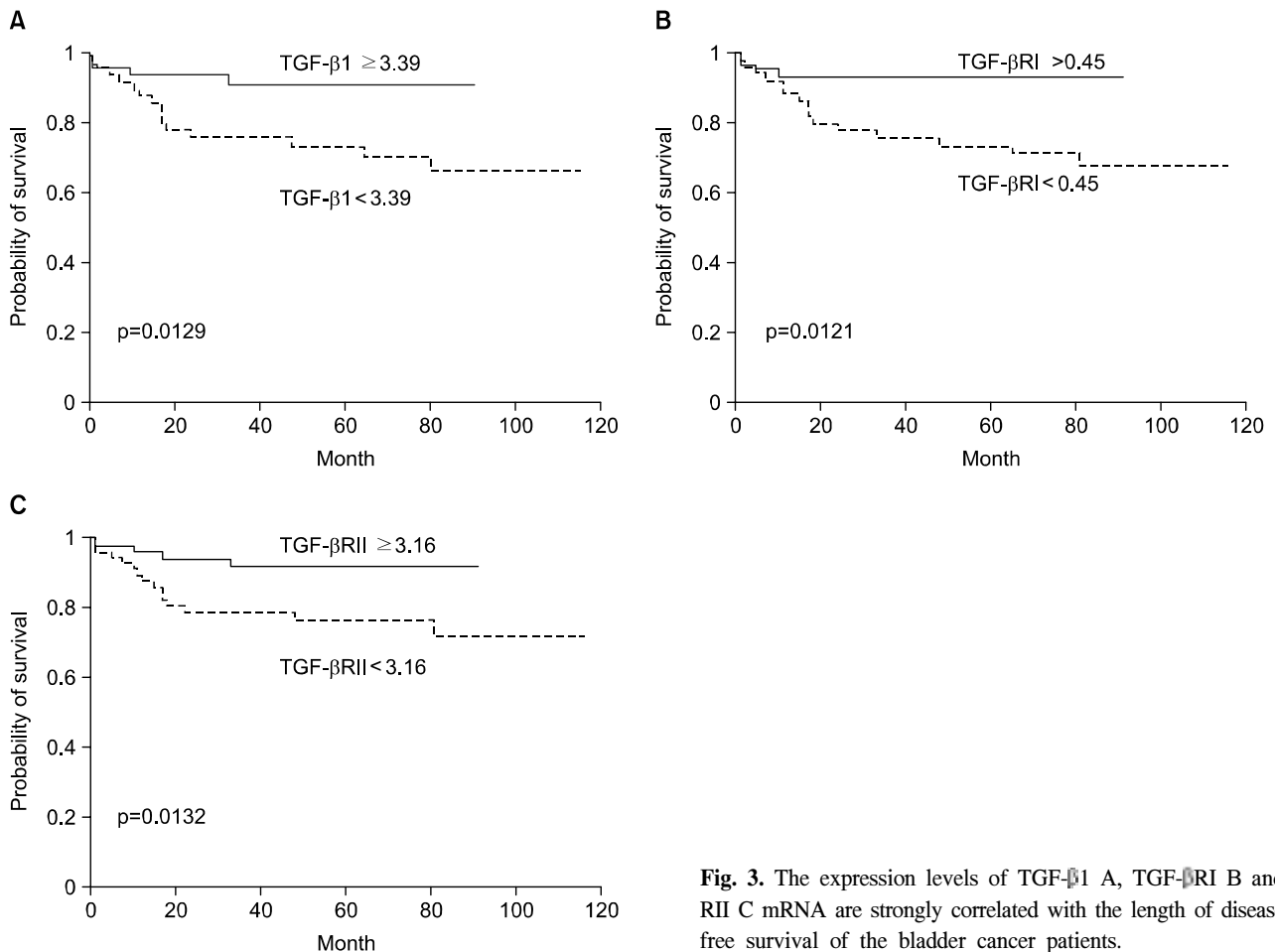


Fig. 3. The expression levels of TGF- β 1 A, TGF- β RI B and RII C mRNA are strongly correlated with the length of disease free survival of the bladder cancer patients.

3. TGF- β 1 및 수용체의 발현이 방광암의 분화도와 병기 및 재발과 진행에 미치는 영향

TGF- β 1 및 TGF- β RII mRNA 발현은 저등급 분화도 및 표재성 방광암에서 고등급 분화도 및 침윤성 방광암에 비

해 높게 발현되었으며 TGF- β RI의 발현도 표재성 방광암에서 침윤성 방광암에 비해 높게 발현되었다. 또한 이들 유전자의 발현은 방광암의 재발 및 병기의 진행과도 아주 밀접한 연관이 있었는데, 표재성 방광암에서 재발하지 않은 환자군에서 재발된 환자군에 비하여 TGF- β 1 및 그 수용체의

높은 발현이 관찰되었다 ($p=0.0022$, 0.0003 , 0.0001). 또한 병기가 진행되지 않은 환자군에서 병기가 진행된 환자군에 비하여 세 유전자 모두 의미 있게 높은 발현을 나타냈다 ($p=0.0002$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) (Table 3).

4. TGF- β I 및 수용체의 발현이 방광암 환자의 생존율에 미치는 영향

TGF- β I 및 그 수용체 발현정도의 cut-off value를 구하기 위하여 아래와 같은 모델에서 simple logistic regression analysis를 시행하였다. $0.1959 \times \text{TGF-}\beta\text{I} + 0.7232 = \text{logit}$ ($p<0.0001$), $1.0355 \times \text{TGF-}\beta\text{RI} + 0.9230 = \text{logit}$ ($p=0.0050$), $0.1804 \times \text{TGF-}\beta\text{RII} + 0.8158 = \text{logit}$ ($p<0.0001$). 환자들의 생존확률이 80%일 때 위 모델에서 계산된 cut-off value는 각각 TGF- β I는 3.39pg/ml , TGF- β RI는 0.45pg/ml , TGF- β RII는 3.16pg/ml

이었다. TGF- β I의 발현 양이 3.39pg/ml 보다 높을 경우 환자의 생존율이 더욱 높은 것이 관찰되었다 ($p=0.0129$). 또한 TGF- β RI의 발현 양이 0.45pg/ml 보다 높을 경우 및 TGF- β RII의 발현 양이 3.16pg/ml 보다 높게 발현될 경우 그렇지 않은 그룹에 비하여 더욱 높은 환자의 생존율이 관찰되었다 ($p<0.0121$, $p<0.0132$) (Fig. 3).

5. 방광암에서 TGF- β I 및 그 수용체 단백질의 발현

TGF- β I 및 수용체 mRNA와 단백질의 발현을 비교하기 위하여 면역화학염색법으로 단백질 발현정도를 측정하였다. TGF- β I 및 수용체 단백질의 발현은 세포질의 염색으로 관찰되었으며 방광암에서 TGF- β I 및 수용체 mRNA의 발현양상과 거의 동일하게 관찰되었다 (Fig. 4). TGF- β I 및 수용체 단백질은 저등급 분화도 및 표재성 방광암에서 고

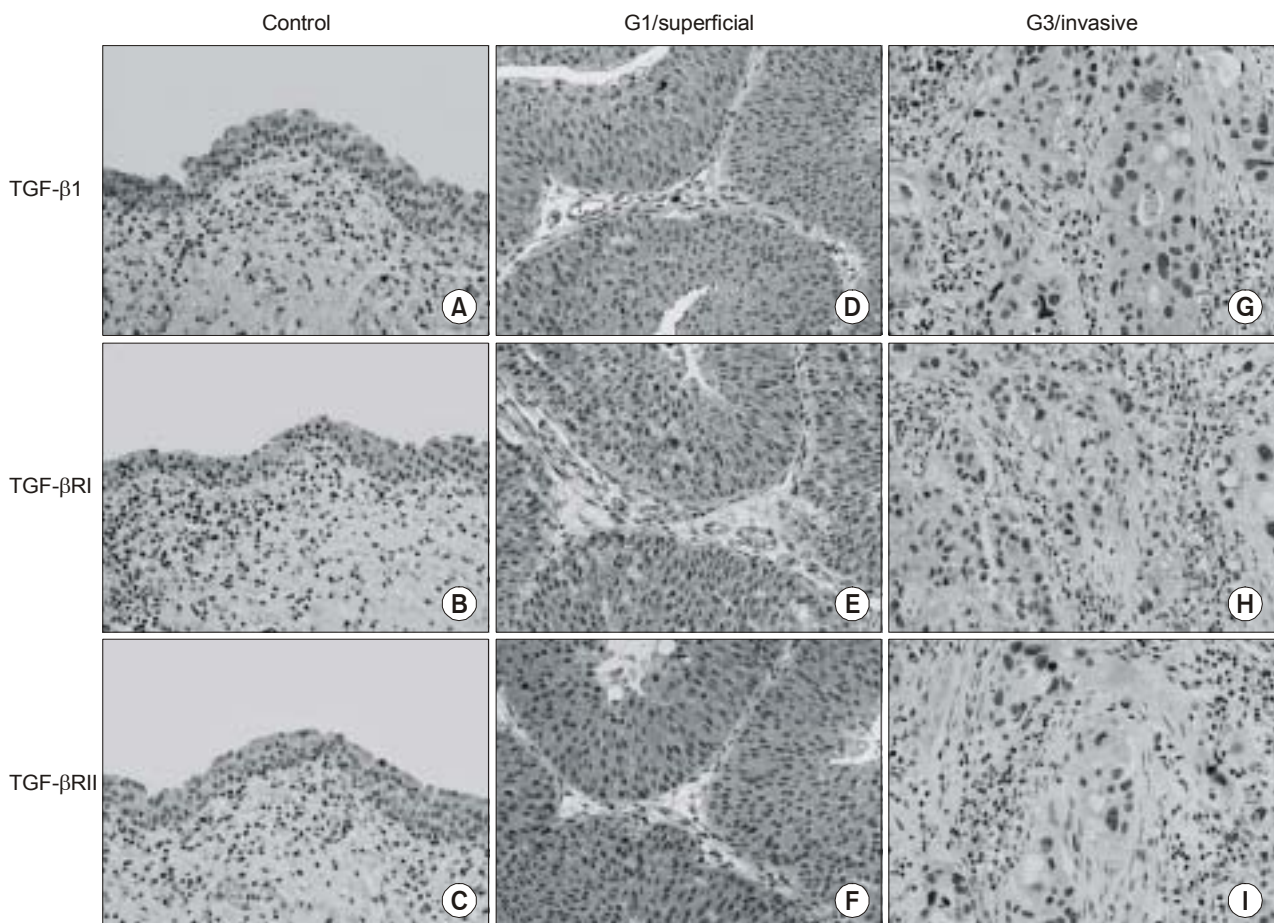


Fig. 4. Immunostaining of TGF- β I, TGF- β RI and TGF- β RII in normal and cancerous bladder tissues. Each column shows sections from the same tissue sample that were stained for the different antigens. The left column shows similar levels of the three proteins in normal bladder mucosa (A: TGF- β I, B: TGF- β RI, C: TGF- β RII). The middle column shows elevated levels of the three proteins in grade 1/superficial bladder cancer (D: TGF- β I, E: TGF- β RI, F: TGF- β RII). The right column shows similar low levels of the three proteins in grade 3/invasive bladder cancer (G: TGF- β I, H: TGF- β RI, I: TGF- β RII).

Table 4. Protein expression levels of TGF- β 1 and its receptors in bladder cancers and the normal bladder tissues (n=70)

	TGF- β 1	TGF- β RI	TGF- β RII
Superficial (n=30)	6.25 \pm 0.47	6.57 \pm 0.40	4.62 \pm 0.28
Invasive (n=40)	3.39 \pm 0.25	4.73 \pm 0.40	3.60 \pm 0.29
p-value	<0.0001	0.0022	0.0165
Low-grade (n=33)	6.29 \pm 0.36	6.95 \pm 0.37	4.92 \pm 0.22
High-grade (n=37)	3.12 \pm 0.30	4.23 \pm 0.36	3.24 \pm 0.29
p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Normal (n=16)	3.69 \pm 0.38	4.50 \pm 0.45	3.50 \pm 0.42

Superficial vs normal: TGF- β 1, p=0.0001; TGF- β RI, p=0.0023; TGF- β RII, p=0.0287. Low-grade vs normal: TGF- β 1, p<0.0001; TGF- β RI, p=0.0003; TGF- β RII, p=0.0017

등급 분화도 및 침윤성 방광암보다 높게 발현되었으며 정상 방광 조직에 비해서도 유의하게 높았다 (Table 4). 또한 이 세 가지 단백질의 발현 사이에도 아주 밀접한 상관관계가 관찰되었다. TGF- β 1과 TGF- β RI 및 II를 비교할 때 피어슨 상관계수는 각각 $r=0.5020$ 및 0.4407 이었으며 ($p=0.0001$), TGF- β RI과 TGF- β RII를 비교할 때 $r=0.4805$ 였다 ($p<0.0001$).

고 찰

최근의 연구결과에 따르면 TGF- β 1은 세포의 종류 및 생물학적인 특성에 따라 종양 억제인자 혹은 종양 촉진자로서의 이중 작용을 수행하는 것으로 알려져 있다.^{2,4,24,25} 일부 인체종양 중에서 TGF- β RII 유전자의 유전적인 돌연변이와 TGF- β RI 유전자 촉진자부위의 과메틸화가 관찰되고 있으며 이는 TGF- β 1의 작용에 저항하는 원인으로 여겨지기도 한다.^{9,11,26,27} 이와 반대로 일부 종양에서는 TGF- β 1 mRNA 및 단백질의 과발현은 종양의 혈관생성, 전이 그리고 증식에 관여한다는 것이 관찰되기도 하였다.^{2,28,29} 따라서 TGF- β 1 및 그 수용체 발현 사이의 상관성의 조사하고 이들과 종양의 병리학적 특징 사이의 관계를 규명하는 것은 종양의 재발, 병기의 진행 등을 예측하는 데 있어서 매우 중요하다고 생각한다.

방광암에서 TGF- β 1의 역할에 관한 연구는 많이 진행되어 있는 반면에 서로 상이한 결과들이 보고되고 있다. Eder 등³⁰은 57명의 방광암 환자와 18명의 대조군에서 혈청과 조직 중 TGF- β 1 단백질의 발현정도를 조사하였다. 이들의 결과에 따르면 혈청 중 TGF- β 1의 발현 양은 침윤성 방광암환자 (61.5 ng/ml)에서 대조군 (36.3 ng/ml)에 비해 높았지만 표재성 방광암 환자에서는 33.4ng/ml로 대조군과 큰 차이가

없었다. 또한 TGF- β 1 mRNA 발현 양은 방광암 조직에서 정상 방광 조직에 비해 낮게 발현되지만 반대로 단백질의 발현양은 방광암 조직에서 정상 방광 조직에 비해 높게 관찰되었다.¹³ 반면 Miyamoto 등¹⁴은 TGF- β 1 mRNA의 발현 양은 저등급 분화도 혹은 표재성 방광암 조직에서 대조군에 비하여 높게 발현된다는 상반되는 결과를 보고하였다.

TGF- β 1 과 수용체의 상관관계에 관한 연구들 중에도 서로 모순되는 결과들이 보고되고 있다. Kim 등¹⁵은 침윤성 방광암에서 TGF- β 1이 높게 발현된 반면에 수용체 발현의 상실이 관찰되었다고 하였으며 반면 Izadifar 등¹⁶은 악성도가 높은 방광암에서 TGF- β 1 및 수용체 단백질의 발현이 모두 증가하는 것을 관찰하였다.

TGF- β 1과 수용체 발현 사이의 상관관계 및 이들이 방광암에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 연구에서는 QC-PCR 방법과 면역화학염색법을 이용하여 mRNA 및 단백질의 발현을 조사하였다. 본 연구 결과로 볼 때 TGF- β 1과 수용체 mRNA 및 단백질의 발현은 저등급 분화도 및 표재성 방광암에서 대조군 및 고등급 분화도와 침윤성 방광암에 비해 높게 발현되었으며 고등급 분화도 및 침윤성 방광암과 대조군 사이에는 유의한 차이를 보이지 못했다. 이 결과는 Miyamoto 등¹⁴의 결과와 동일하며 TGF- β 1 및 수용체의 높은 발현은 저등급 분화도 혹은 표재성 방광암의 발생과 아주 밀접한 연관이 있음을 다시 한 번 증명해 주고 있다. 또한 방광암에서 TGF- β 1 발현의 증가와 반대로 수용체의 발현이 감소된다는 보고와는 달리 본 연구결과에서는 이 세 가지 유전자 발현 사이에 아주 밀접한 연관성이 존재하였다. 또한 면역화학염색을 통하여 측정된 TGF- β 1 및 수용체 단백질 발현수준에 관한 결과에서도 mRNA 측정결과와 거의 비슷한 양상이 관찰되었다. 이는 TGF- β 1 및 수용체 단백질의 발현이 mRNA 전사수준에 의해 결정됨을 의미한다. 또한 QC-PCR 방법의 민감도 및 정확도로 미루어 볼 때 QC-PCR 방법으로 측정된 정량적인 결과가 면역화학염색법에 의해 측정된 반정량적인 결과에 비하여 TGF- β 1 및 수용체의 발현과 방광암과의 관계를 더욱 정확히 나타낼 것으로 생각한다.

TGF- β 1 및 수용체의 발현이 방광암의 재발 및 병기의 진행에 미치는 영향으로 볼 때 재발하지 않은 표재성 방광암에서 재발한 표재성 방광암에 비하여 TGF- β 1 및 수용체의 높은 발현이 관찰되었으며 병기가 진행되지 않은 방광암에서 병기가 진행된 군에 비하여 TGF- β 1 및 수용체의 높은 발현이 관찰되었다. 이는 TGF- β 1 및 수용체가 높게 발현된 환자에서는 보다 낮은 방광암의 재발률과 병기의 진행률을 잠재하고 있음을 의미한다 하겠다. 또한 TGF- β 1 및 수용체가 높게 발현된 환자에서 적게 발현된 환자들에

비하여 보다 높은 생존율을 보였다. 이는 TGF- β 1 및 수용체의 높은 발현은 방광암의 재발, 병기의 진행뿐만 아니라 환자의 생존율과도 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있으며, 높은 TGF- β 1 및 수용체의 발현을 가지는 환자에서는 보다 좋은 예후를 갖고 있음을 짐작할 수 있다.

결 론

TGF- β 1 및 수용체의 과 발현은 저등급 분화도 혹은 표제성 방광암의 발생에 관여하며 방광암의 재발, 병기의 진행 및 환자의 생존율과도 아주 밀접한 관계가 있다. 따라서 방광암에서 TGF- β 1 및 그 수용체의 측정은 암의 재발 및 병기의 진행 그리고 환자의 생존율에 대한 중요한 예측인자의 하나로 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

REFERENCES

- Messing EM. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, editors. Campbell's urology. 8th ed. Pennsylvania: Saunders; 2002;2750-1
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117-29
- Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer-a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001;11:S44-51
- Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:22-9
- Akhurst RJ. TGF- β antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest* 2002;109:1533-6
- Zhang HT, Chen XF, Wang MH, Wang JC, Qi QY, Zhang RM, et al. Defective expression of transforming growth factor β receptor type II is associated with CpG methylated promoter in primary non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2359-67
- Kaklamani VG, Pasche B. Role of TGF- β in cancer and the potential for therapy and prevention. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:649-61
- Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309
- Pinto M, Oliveira C, Cirnes L, Carlos Machado J, Ramires M, Nogueira A, et al. Promoter methylation of TGF- β receptor I and mutation of TGF- β receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas. *J Pathol* 2003;200:32-8
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, et al. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999;18:3098-103
- Derynck R, Feng XH. TGF- β receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F105-50
- Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF- β) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 1999;10:303-60
- Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Expression of transforming growth factors beta-1, beta-2 and beta-3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer* 1997;75:1753-60
- Miyamoto H, Kubota Y, Shuin T, Torigoe S, Dobashi Y, Hosaka M. Expression of transforming growth factors beta-1 in human bladder cancer. *Cancer* 1995;75:2565-70
- Kim JH, Shariat SF, Kim IY, Menesses-Diaz A, Tokunaga H, Wheeler TM, et al. Predictive value of expression of transforming growth factor- β (1) and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer* 2001;92:1475-83
- Izadifar V, de Boer WI, Muscatelli-Groux B, Maille P, van der Kwast TH, Chopin D. Expression of transforming growth factor β 1 and its receptors in normal human urothelium and human transitional cell carcinomas. *Hum Pathol* 1999;30:372-7
- Celi FS, Zenilman ME, Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 1993;21:1047
- Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9717-21
- Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATY). *Nucleic Acids Res* 1989;17:9437-46
- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2725-9
- Kim SH, Kook MC, Shin YK, Park SH, Song HG. Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol* 2004;35:409-16
- Kim SH, Shin YK, Lee KM, Lee JS, Yun JH, Lee SM. An improved protocol of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *J Histochem Cytochem* 2003;51:129-32
- Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KB, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41
- Saji H, Nakamura H, Awut I, Kawasaki N, Hagiwara M, Ogata A, et al. Significance of expression of TGF- β in pulmonary metastasis in non-small cell lung cancer tissues. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2003;9:295-300
- Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, et al. TGF- β switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2003;112:1116-24
- Kang SH, Bang YJ, Im YH, Yang HK, Lee DA, Lee HY, et al. Transcriptional repression of the transforming growth

- factor- β type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF- β resistance in human gastric cancer. *Oncogene* 1999;18:7280-6
27. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor β receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:5329-32
28. Bello-DeOcampo D, Tindall DJ. TGF- β 1/Smad signaling in prostate cancer. *Curr Drug Targets* 2003;4:197-207
29. Lee C, Sintich SM, Mathews EP, Shah AH, Kundu SD, Perry KT, et al. Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. *Prostate* 1999;39:285-90
30. Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Transforming growth factors beta-1 and beta-2 in serum and urine from patients with bladder cancer. *J Urol* 1996;156: 953-7
-