

TGF- β 가 HPV-16의 인체 세포 발암화에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 산부인과학교실, 대구효성가톨릭대학교 의과대학 약리학교실*
박일수 · 이윤순 · 양재호*

= Abstract =

Effects of TGF- β on the HPV-16-induced Neoplastic Transformation of Human Cells

Il-Soo Park, M.D., Yoon-Soon Lee, M.D., Chun-Hee Lee, M.D., Sam-Sik Kim, M.D.,
Dae-Han Kim, M.D., Kwang-Soo Kim, M.D., Jae-Ho Yang, Ph.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kyungpook National University
*Department of Pharmacology, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung**

Human epithelial cell line immortalized with Ad12-SV40 hybrid virus was transfected with plasmid containing HPV-16 gene. Among these clones, clone-3 and clone-6 showed neoplastic transformation properties of contact inhibition, anchorage independence and cellular adhesion after 7 subcultures.

The results suggest that SV40 gene in the immortalized human cell system be in concert with HPV-16 in the process of neoplastic transformation of human cells. While TGF- β_1 (5ng/ml) inhibited growth of control cells and clone-1 cells which did not show transformation, there was no significant change on the growth of clone-3 cells with transformation properties. When transcriptional level of fibronectin on control cells and clone-3 cells were analyzed with northern blot technique, transcription of fibronectin on clone-3 cells were higher, as compared with control cells.

RNA hybridization techniques were performed to compare transcriptional levels of TGF- β_1 between control cells and clone-3 cells. RNA level on clone-3 cells with transformation properties was higher than on control cells.

These studies indicate that TGF- β_1 is associated with increases of fibronectin, which may lend to changes of TGF- β receptor and loss of its inhibitory action on the transformed cells.

Thus, it seems that loss of inhibitory action of TGF- β which is mediated by changes of fibronectin may account for a possible mechanism of action in the HPV-16 induced transformation of human cells.

Keywords: HPV-16, TGF-b, Human cell

* 이 연구는 1994년도 경북대학교병원 의학연구소연구비의 지원으로 이루어졌음.

I. 서 론

Human Papillomavirus(HPV)는 자궁경부암의 생체조직에서 끊임없이 발견되고 있어서 자궁경부암을 일으킬 수 있는 강력한 생물학적 발암물질로 알려져 있다.¹⁾ 자궁경부암의 경우 최초의 감염에서 암의 발생까지 오랜 잠복기를 가지고 있으며 HPV의 성기 감염은 그 type에 관계없이 널리 퍼져 있어서 적어도 정상 인구의 10~30%가 HPV에 감염되었을 것으로 추정된다.²⁾ 또한 Human Papillomavirus(HPV) 16 DNA는 인체 상피 세포를 불멸화시키는 작용이 있고 세포외기질(Extracellular matrix)의 변화를 유도하며 세포분화에도 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁾ HPV의 발암화 기전은 다단계 발암화로서 일반적으로 인체 세포에서는 HPV 만으로는 발암현상을 나타내지 못하며 이차적인 또 다른 발암인자의 노출이 요구된다.⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 HPV-16의 발암 잠재력을 관찰하기 위하여 SV-40 virus로 불멸화된 인체세포를 이용하였다. 본 연구에 사용된 인체세포 모델은 Ad12-SV40 hybrid virus에 의해 불멸화된 세포주로서 장기간의 관찰을 요구하는 발암현상을 연구하는데 적합하여 화학적 발암물질, X선, Oncogene 등의 발암화 과정을 연구하는 데 효과적으로 사용되어 왔다.^{5,6)}

많은 종류의 성장인자가 인체세포의 발암화에 관여되어 있으며 이들 중 TGF- β 는 암세포의 이동 및 침윤성을 증가시켜 전이를 촉진시키며, 세포외기질에 영향을 주어 정상 세포의 변형을 일으킨다.⁷⁾ 또한 TGF- β 는 정상적인 상피세포의 성장을 억제하지만 암세포에서는 성장 억제 기능을 상실한다. 따라서 암조직에서 나타나는 높은 TGF- β 의 발현은 정상 세포의 성장을 억제하고 암세포의 특성을 향상시켜 발암화 현상과 밀접한 관계가 있다.^{7,8)}

그러므로 본 연구는 HPV-16을 SV-40 유전자에 의해 불멸화된 인체상피세포에 투여하여 HPV-16의 다단계 발암과정을 확인하고 HPV-16에 의한 세포의 발암화에 TGF- β 가 미치는 영향을 세포 및 분자 생물학적 방법으로 분석하여 HPV-16의 발암화 기전을 이해하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

MOPS, agarose, DEPC 및 Northern blot analysis에 사용된 시약들은 sigma사 제품을 사용하였으며 DMEM, Radiolabelling kit는 BRL 및 Pharmacia 제품을 사용하였다. Fibronectin c-DNA probe는 Oncogene science, P³²-dCTP는 Amersham사 제품을 사용하였다. TGF- β_1 probe와 TGF- β_1 은 미국 국립 보건원 김성진 박사로부터 제공받았다.

2. 세포배양

일차상피세포로부터 Ad12-SV40에 의해 불멸화된 세포의 Passage-35단계의 세포를 배양하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO₂ Humidified Incubator에서 배양되었으며 세포가 confluent를 이루는 시점을 기준으로 1:4로 subculture하였다. 배양액의 구성은 DMEM(Dulbecco's Minimal Essential Medium)에 Fetal bovine serum 10%, Hydrocortison(5 μ g/ml), Penicillin G(50 μ g/ml), Sterptomycin(50 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다. 세포의 subculture는 PBS로 세척한 후 1X Trypsin-EDTA를 넣고 5분간 처리한 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수확하고 새로운 용기에 배양하였으며, 지속적인 관찰을 통하여 세포의 변형 및 성장상태를 기록하였다.

3. TGF- β 의 처리

passage-35 단계의 인체상피 세포주 2 \times 10⁵세포를 25mm petridish에 넣은 후 배양액의 serum 용량을 1%로 낮추어 밤새 배양한 후 0, 0.2, 1, 5ng/ml의 TGF- β 를 4일간 처리하였다. 세포성장 억제현상은 Hemacytometer를 이용해 측정 하였다.

4. HPV-16 DNA 투입

50% 정도의 confluency를 보이는 일차세포에 Ca-PO₄ 방법으로 HPV-16 DNA를 함유하는 pMHPV16d를 Ca-PO₄ 방법으로 투입하였다. 간단히 서술하면 4개의 100mm petri dish를 기준으로 할 때 32 μ g의 투입하고자 하는 DNA를 2ml의 water에 녹이고 0.5M CaCl₂를 같은 tube에 넣는다. 4개의 polypropylene tube에 각각 1ml의 Hepes

NaCl, NaH_2PO_4 (40:1) 혼합물을 넣은 다음 air bubble하에서 천천히 1ml의 CaCl_2 와 DNA의 혼합물을 섞는다. 30분에서 1시간 정도 방치한 다음 세포가 있는 petri dish에 2ml씩 넣는다. 37°C CO_2 incubator에 넣은 후 24시간 후 media를 갈아주고 G418(Geneticin)을 함유하는 media를 넣고 control petri dish에 세포가 모두 죽을 때까지 G418 처리를 한다. G418에 resistant한 cell colony를 cloning ring을 사용하여 분리한 다음 지속적으로 배양한다.

5. Cell aggregation assay(CA)

Soft agar assay와 같은 방법으로 Base agar를 만들어 5ml씩 Petri dish에 넣는다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10^5 cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액상에 성장하는 1mm 이상 크기의 colony의 숫자를 측정한다.

6. Soft Agar colony formation(SA)

Noble agar 1.2g에 dH_2O 35ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15ml의 dH_2O 와 FBS 25ml, 2X EMEM 50ml을 넣어 0.9% agar base를 만든다. 5ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 둔다. 0.9g Noble agar에 dH_2O 50ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH_2O 7.2ml, FBS 7.2ml 2XEMEM 14.4ml을 넣어 0.36% top agar를 만든다. 준비된 base agar에 1×10^4 cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2ml씩 petri dish에 넣는다. 그 후 colony 형성의 크기가 0.3mm 이상인 colony 수를 측정한다.

7. Saturation Density(SD)

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5×10^3 cells/ cm^2 를 용기에 넣고 배양한다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluent한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 측정한다.

8. RNA 분리

control cell, clonal cell-3 및 clonal cell-6로부터 total RNA를 분리하기 위하여 RNAzol 방법을 사용하였다.⁹⁾ 세포를 PBS로 세척한 후 80%

confluent한 dish에 RNAzol 용액을 넣고 여러 차례 pipetting으로 세포를 분쇄하고 분쇄된 물질 1ml당 0.1ml의 chloroform을 투여한다. 15초간 섞은 뒤 15분간 얼음에 둔다. 4°C 에서 $12,000 \times g$ 로 15분간 원심 분리한 다음 상층액을 조심스럽게 새로운 튜브로 옮긴다. 같은 양 만큼의 isopropanol을 넣고 -20°C 에서 45분간 둔다. 15분간 4°C 에서 $12,000g$ 로 다시 원심분리하고 상층액은 버리고 RNA를 함유하는 흰색침전물을 75% Ethanol로 2회 세척한다. DEPC처리 물에 녹여 -20°C 에 보관한다.

9. Northern blot analysis

세포에서 추출된 RNA를 분석하기 위하여 Formaldehyde agarose gel을 사용한다. agarose, formaldehyde와 MOPS를 이용하여 1% agarose gel을 만들고 total RNA sample을 well당 $10 \mu\text{g}$ 씩 넣는다. RNA sample의 상태를 점검하기 위하여 RNA sample buffer에 미량의 Ethidium Bromide를 넣는다. 1X MOPS를 running buffer로 하여 60V로 4시간 정도 전기영동한다. Formaldehyde gel에서 Formaldehyde를 제거하기 위해 $10 \times \text{SSC}$ 용액에 20분간 둔 다음 nitrocellulose paper에 밤새도록 RNA blotting 실시한다. RNA를 함유하는 nitrocellulose paper에 RNA를 고정하기 위하여 Vacuum oven에서 80°C 로 2시간 동안 굽는다. 50% Formamide로 3시간 동안 prehybridization한 다음 밤새도록 DNA-probe를 함유한 hybridization 용액으로 반응시킨다. Nitrocellulose paper를 꺼낸 다음 방사능 제거를 위한 수차례 세척을 거친 후 X-ray film이 있는 카세트에 넣고 -72°C 에서 12시간 반응시킨다.

10. 성적 검정

유의성 검정은 Student's t-test로 하였다.

III. 결 과

1. HPV-16 transfection에 의한 세포의 특성 변화
AD12-SV40에 의해 불멸화된 인체 상피세포에 HPV-16을 transfection 하고 Geneticin으로 2주간 처리한 뒤 6개의 Clonal cell을 선별하였으며 8번

passage를 한 후 세포의 특성 변화를 측정하였다. 이들 Clonal cell 중 Clone-3(C-3)와 Clone -6(C-6)는 Saturation Density(SD)에서 Control cell에 비해 2.9배 및 2.2배씩 각각 증가하였으며 Soft Agar Colony Formation Assay(SA)에서는 Clone-3(C-3), Clone-5(C-5), 및 Clone-6(C-6)는 control에 비해 4.6배, 2.3배, 4.0배씩 각각 증가하였다.

Cell aggregation assay(CA)에서는 C-3 및 C-6에서 지름의 크기가 1mm 이상인 Colony가 5개 이상 각각 발견되었다(Table 1). 현미경하에서 세포를 관찰한 결과 passage-6(52일 후)를 거친후 C-3와 C-6에서 foci를 나타내기 시작한 반면 Control Cell 및 Clonal Cell 에서는 passage-8을 지난 후에도 foci의 출현이 없었다.

Table 1. Properties of Human Cells Transfected with HPV-16

Clone	SD($\times 10^5/\text{cm}^2$)	SA(%)	CA(1>mm ^{**})
Control	2.4 \pm 0.02	0.03 \pm 0.004	.
C - 1	2.3 \pm 0.04	0.03 \pm 0.014	.
C - 2	2.0 \pm 0.03	0.02 \pm 0.006	.
C - 3	6.9 \pm 0.22*	0.14 \pm 0.032*	+
C - 4	3.4 \pm 0.05	0.05 \pm 0.021	.
C - 5	3.8 \pm 0.04	0.07 \pm 0.008*	.
C - 6	5.2 \pm 0.08*	0.12 \pm 0.005*	+

* : P < 0.05 as compared to Control Cells.

** : . ; < 5 clones, + ; \geq 5 clones.

The data are mean \pm SD with 3 different counts.

2. TGF- β_1 이 Clonal Cell의 성장에 미치는 영향

TGF- β_1 이 HPV-16에 의해 변형된 인체세포에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Control Cell, C-1, 및 C-3을 대상으로 하여 TGF- β_1 을 4일간 처리한 후 세포의 성장을 측정하였다. TGF- β_1 의 농도 1ng/ml에서는 모든 세포에서 성장의 변화가 나타나지 않았으나 5ng/ml에서는 세포의 변형이 나타나지 않은 Control Cell과 C-1에서 40% 및 60%씩 각각 성장 억제 효과를 보였다. 그러나 HPV-16에 의해 변형을 보인 C-3에서는 TGF- β_1 의 어느 농도에서도 성장에 영향을 주지 않았다(Table 2)

Table 2. Effects of TGF- β_1 on Cell Growth($\times 10^5$ cells/culture)

	TGF - β_1 (ng / ml)			
	0	0.2	1	5
Control	8.3 \pm 0.3	9.1 \pm 0.7	6.9 \pm 0.5	4.8 \pm 0.2
C - 1	8.0 \pm 0.1	7.8 \pm 0.4	6.5 \pm 0.3	5.0 \pm 0.4
C - 3	11.6 \pm 0.7	12.8 \pm 0.6	12.5 \pm 0.5	11.4 \pm 0.2

Initial Plating Cells ; 2×10^5 / culture

Cells were counted after 4 day treatment of TGF- β_1

The data are mean \pm SD with 3 different counts.

3. TGF- β_1 의 전사 변화

HPV-16에 의한 인체세포의 발암화 현상과 TGF- β_1 전사와의 관련성을 관찰하기 위해 Control Cell과 가장 많은 발암 특성을 보인 C-3에서 TGF- β_1 의 전사 수준을 비교하였다. Control Cell에 비해 HPV-16에 의해 발암 특성을 나타낸 C-3에서 TGF- β_1 의 RNA 전사가 더 높게 나타났다.(Fig. 1)

Fig. 1. Northern blot analysis of TGF- β_1 on control cells and human cells transfected with HPV-16 DNA

4. HPV-16에 의한 fibronectin의 전사 변화

세포외기질은 상피세포의 분화 및 접착 등에 관여하고 있으며 이들 중 fibronectin은 Keratinocyte의 최종 분화의 기전에 밀접한 관계를 가지고 있다. Control Cell에 비해 C-3에서 fibronectin의 RAN 전사가 높게 나타났다.(Fig. 2)

Fig. 2. Transcriptional analysis of fibronectin RNA extracted from control cells and clone-3 cells.

IV. 고 찰

Human papillomavirus는 여러 종류의 악성종양에 관여하며 특히 이들 중 HPV-16, 18, 31, 33 등은 자궁경부암을 일으키는 병소로 알려져 있다.⁴⁾ 본 연구는 대부분의 악성종양을 일으키는 원인 세포형태인 인체상피세포 모델을 사용하여 HPV-16의 발암성 및 세포 변형에 따른 세포외기질 변화와 성장인자의 영향을 분석하였다. HPV-16을 transfection한 결과 C-3 및 C-6에서 SD, SA, CA의 값이 높게 나타나 6개 중 2개의 Clonal Cell이 Contact Inhibition, Anchorage-Independence, Cellular Adhesion 등의 세포 발암화 특성을 획득하였다. 또한 이들 2개의 Clonal Cell은 세포의 발암화를 현미경으로 확인할 수 있는 척도인 foci의 출현이 있으며, foci의 형태는 새롭게 증식하는 budding 현상을 보여 HPV-16에 의한 인체 상피세포의 발암화를 확인할 수 있었다.

HPV-16에 의한 발암화 현상이 52일이 지난 후에 나타나기 시작한 것은 HPV-16 DNA가 염색체에 삽입되어 발암 현상이 정착되는 데는 여러 차례의 세포분열이 요구됨을 알 수 있고 SV40에 의하여 불멸화된 세포에 이차적으로 HPV-16 DNA를 투여하여 나타나는 발암현상은 이들 유전자가 발암화 과정에서 상호 협력하고 있음을 암시한다. 이러한 세포의 발암화 현상에 2가지 이상의 유전자의 역할이 요구되는 경우는 *v-fos*와 *v-ras*의 협력에서도 잘 알려져 있다.¹⁰⁾

TGF- β_1 은 세포 배양 상태에서 많은 상피세포

의 성장을 억제하는 역할을 하는 반면 fibroblast에서는 성장을 촉진하는 이중적인 기능을 갖는 성장 단백질이다.¹¹⁾ 본 연구에서는 TGF- β_1 을 Control Cell과 변형된 Clonal Cell에 투여한 결과 5ng/ml에서 정상 형태의 세포는 성장 억제 현상을 보인 반면 종양화 특성을 보인 세포는 성장 억제 작용이 나타나지 않아 세포가 종양화 되는 과정에서 세포 형태의 변형 등에 의해 상피세포가 TGF- β_1 에 대한 반응을 상실한 것으로 추정된다. 따라서 HPV-16에 의한 종양화 기전으로서 TGF- β_1 이 상피세포에 대한 성장 억제 기능을 상실함에 따라 일어나는 세포증식의 불균형 현상을 제시할 수 있다. TGF- β_1 에 대한 상피세포의 성장 억제 능력 감소와 함께 HPV-16에 의해 종양 특성을 보인 인체세포는 높은 수준의 TGF- β 전사를 보였다. 이는 많은 종양 조직에서 나타나는 TGF- β 의 증가와 일치하는 현상으로 HPV-16의 종양화에 TGF- β 의 관련성을 의미한다.¹²⁾ TGF- β 는 세포의 이동뿐만 아니라 세포와 세포외기질과의 접착력에 변화를 주어 좀더 침윤성이 강하고 도전적인 세포의 성질을 야기시켜 전위를 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾ 따라서 HPV-16에 의한 TGF- β 의 증가 현상은 발암현상의 촉진을 의미하며 세포 변형에 따른 TGF- β 의 발암 세포에 대한 성장 억제 감소 현상은 발암세포의 선택적인 성장의 기회를 제공할 것으로 생각된다.

세포외기질(Extracellular Matrix)은 세포의 접착력, 이동, 증식 및 분화의 조절에 관여하며 세포외기질의 조절은 조직의 특성에 따라 서로 다르다.¹⁴⁾ 세포외기질은 세포의 형태에 영향을 미치며 이러한 형태 변화는 세포막에 자리잡은 많은 수용체의 변화를 가져와 성장 인자 등 외부의 신호 전달물질의 결합에 이상을 초래한다. Gospodarowicz 등은 배양세포에서 성장 인자의 감수성은 세포의 형태에 의해 결정되며 이러한 세포 형태의 변화는 세포가 접촉하고 있는 세포외기질에 의해 조정된다고 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 또한 세포의 기질은 성장인자에 의해서도 조절되며 특히 fibronectin은 TGF- β 의 영향을 받는다.¹⁶⁾

본 연구에서 HPV-16에 의해 발암 특성을 보인 C-3 세포는 Control Cell에 비해 높은 fibronectin의 전사 수준을 나타내었다. 이는 HPV-16에 의한

세포 변형에 fibronectin 이 관련되어 있음을 보이는 또 하나의 증거이며 TGF- β 의 증가와 함께 fibronectin이 증가한 점은 발암화 과정에 TGF- β 와 fibronectin과 서로 관련성이 있음을 나타낸다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, HPV-16에 의한 인체 상피 세포의 발암화 기전은 HPV-16의 투입 후 TGF- β 가 증가하고 TGF- β 는 세포외기질에 영향을 주어 세포 형태의 변형을 일으키며 이러한 세포 형태의 변화는 세포막에 존재하는 성장인자 수용체의 이상을 초래하여 나타나는 TGF- β 에 의한 성장 억제 기능의 소멸과 관련성이 있는 것으로 생각된다.

따라서 발암성을 보인 세포에서 TGF- β 의 생성 증가는 변형 세포에 대해서는 성장억제기능을 보이지 못하고 정상적인 세포에만 성장억제기능을 나타내 선택적으로 변형 세포가 더 잘 증식할 수 있는 환경을 만들고 TGF- β 의 전위촉진기능 등에 의해 HPV-16에 의한 발암화 현상을 가속화시킬 것으로 생각된다.

HPV-16에 의한 변형 세포에서 TGF- β 수용체의 변화 현상의 확인은 앞으로 연구되어야 할 과제이다.

V. 요 약

HPV-16 유전자를 Ad12-SV40 hybrid virus에 의해 불멸화된 인체상피세포에 투입한 결과 7회의 subculture 후 발암세포의 특성인 Contact Inhibition, Anchorage Independence, Cellular Adhesion의 증가를 나타내었다. 발암 특성을 나타낸 세포군을 TGF- β 1(0, 0.2, 1, 5ng/ml)으로 4일간 처리한 뒤 세포 성장을 관찰한 결과 대조군 세포와 발암 특성이 없는 세포군은 성장의 억제가 5ng/ml에서 나타난 반면 발암성 세포군은 어느 용량에서도 성장 억제 효과가 나타나지 않았다. 대조군과 발암성 세포군의 TGF- β 및 fibronectin의 전사를 Northern blot으로 측정한 결과 발암성 세포군에서 TGF- β 과 fibronectin의 전사 수준이 각각 높게 나타났다. 따라서 HPV-16의 발암 현상은 인체 상피 세포에서 SV40 유전자와 협력 관계에 있으며 TGF- β 은 세포외기질인 fibronectin을 증가시켜

세포의 변형을 일으킴을 알 수 있다. 또한 세포의 변형에 따른 TGF- β 의 성장억제기능의 감소는 발암세포의 선택적인 성장 효과를 일으켜 TGF- β 가 HPV-16에 의한 발암화를 촉진시킴을 암시한다.

- References -

1. zur Hausen H: Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 1986;2:489-491.
2. Schneider A, Hotz M, Gissman L: Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int. J. Cancer* 1987;40:198-201.
3. Sheibani N, Rhim JS, Allen-Hoffman BL: Malignant human papillomavirus type-16-transformed human keratinocytes exhibit altered expression of extracellular matrix glycoproteins. *Cancer Res* 1991;51:5967-5975.
4. zur Hausen H: Papillomaviruses as carcinomaviruses. *Adv. Viral Onc* 1989;8:1-26.
5. Rhim JS, Fujita J, Arnstein P et al.: Neoplastic conversion of human epidermal keratinocytes by Ad12-SV40 virus and chemical carcinogens. *Science* 1986;232:385-388.
6. Rhim JS: Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. *Anticancer Res* 1989;9:1345-1366.
7. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA: TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation; new mechanistic insights, *cell* 1990;63:245-247.
8. Welch DY, Fabra A, Nakajima M: Transforming growth factor β stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:7678-7682.
9. Chomzynski P, Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
10. Greenhalgh DA, Welty DJ, Yuspa SH: Two oncogenes, v-fos and v-ras, cooperate to convert normal keratinocytes to squamous cell carcinoma. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 1990;87:643-647.
11. Moses HL, Coffey RJ, Leof EB: Transforming growth factor β regulation of cell proliferation. J cell Physiol 1987;5:1-7.
 12. Steiner MS, Barrack ER: Transforming growth factor β_1 overproduction; effects of growth in vivo and in vitro. Mol Endocrinol 1992;6:15-25.
 13. Steiner MS: Role of peptide growth factors in the prostate. Urol 1993;42:99-110.
 14. Fujita M, Spray DC, Choi H: Extracellular matrix of cell-cell communication and tissue-specific gene expression in primary liver culture. Prog Clin Biol Res 1986;226:333-360.
 15. Gospodarowicz D, Greenberg G, Birdwell CR: Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. Cancer Res 1978;38:4155-4171.
 - 16) Igotz RA, Massague J: Transforming growth factor β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. I Biol Chem 1986;261:4337-4345.
-