

자궁 경부암 세포주에서 EGF, TGF- α 자극에 의한 E-cadherin, β -, γ -catenin과 EGF 수용체의 발현변화 및 인산화

이화여자대학교 의과대학 산부인과학 교실, 생화학 교실*

문혜성 · 최은아 · 박혜영*

=Abstract=

The expression and tyrosine phosphorylation of E-cadherin, β , γ -catenin and EGFR after treatment of EGF and TGF- α in Cervical Cancer Cell Lines

Hye-Sung Moon, M.D., Eun Ah Choi, M.D., Hye-Young Park, M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Biochemistry.*

College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Objectives: Cadherin/catenin adhesion complex is fundamentally involved in epithelial cancer invasion and metastasis. E-cadherin and EGFR colocalize on the basolateral membrane of epithelial cell and EGF down-regulate E-cadherin expression. In the invasion and metastasis of cancer, E-cadherin expression is decreased and growth factors receptor is overexpressed. The present study was aimed to find the role of E-cadherin, β - and γ -catenin, growth factors and its receptors in cervical cancer cell lines.

Methods: The cervical cancer cell cultures were treated with different time duration of EGF 30 ng/ml and TGF- α 10 ng/ml(0, 10 min, 20 min, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 8 hr, 24 hr). The change in cancer cell morphology and the changes in E-cadherin, β - and γ -catenin, EGFR and activated EGFR expression were studied with a western blot analysis and an immunoprecipitation.

Results: Through a western blot analysis, E-cadherin 120 kDa band and EGFR 170 kDa band were expressed in CaSki, HT-3 and ME-180 cell line, which showed epithelial contact growth. In these 3 cell lines, expression of E-cadherin did not decrease with time dependent manner. after the treatment of EGF and TGF- α . The expression of EGFR decreased and activated EGFR expression increased in 30 minutes to 1 hour but decreased subsequently. When the cells treated with EGF, there were no change in β - and γ -catenin expression with there dependent manner. The tyrosine phosphorylation of β - and γ -catenin increased in 30 minutes to 1 hour but decreased subsequently with activated EGFR.

Conclusion: This study showed that an activated EGFR which has involved with tyrosine phosphorylation of β - and γ -catenin influenced by growth factors rather than expression of E-cadherin, has a role in the invasion and metastasis of the cervical cancer.

Key Words: cervical cancer, E-cadherin, β - and γ -catenin, EGFR

서 론

암세포가 침윤하기 위해서는 세포간 유착성(adhesive interaction)의 변화가 선행되며¹⁾ 이러한 변화에는 세포간 유착물질(cell adhesion molecules), 단백질 분해효소, 단백질 분해억제요소(protease inhibitors), motility factors, 성장인자 등이 관련된다.²⁾

세포간 유착물질로는 integrin, adhesion molecules of the Ig superfamily, LEC-CAMS(leukocyte cell adhesion molecules), cadherin 등이 있으며³⁾ Ca^{2+} 의존성 세포간 유착을 조절하는 물질인 cadherin은 120 kDa의 당단백질로 E-cadherin, P-cadherin, N-cadherin 등이 속한다⁴⁾. 이중 E-cadherin은 주로 상피세포에 발현되는 것으로 세포의 유착성 접합부(adherens junction)에 위치하면서 세포내의 tyrosine kinase activity에 관여하고 세포의 신호(signal)를 유도하여 세포 성장과 증식에도 관여하며, 세포간 유착을 유지시켜 세포의 형태 보존, 분화 등에 관여한다.⁵⁾ E-cadherin은 세포의 부분, 막 부분, 세포질 부분의 3가지 구조로 나뉘어지며 세포질 부분은 cadherin 결합 단백질인 α -catenin, β -catenin 및 γ -catenin 등과 결합하여 작용한다.⁶⁾

E-cadherin은 암의 침윤 및 전이와 관련되어 고형성 암에서는 상피세포 분화가 나쁘고 세포간 유착이 감소가 될 때 암세포의 침윤성이 증가된다고 하며 이는 E-cadherin 발현의 감소와 관계가 있다고 보고되었다.^{7,8,9)} 또한 E-cadherin의 발현변화에 결합 단백질인 α -catenin, β -catenin 및 γ -catenin이 영향을 미치며 고형성 암에서도 cadherin 기능소실에 α -catenin, β -catenin 소실이 관계되며 이 과정도 암세포의 침윤과 관련이 있다고 보고되었다.¹⁰⁾

성장 촉진인자인 EGF는 상피세포 및 조직 등에서 다양한 생물학적 효과를 가지며 주로 세포의 형태발생에 주요 역할을 하며¹¹⁾ 상피세포의 증식을 유도한다. EGF는 integrin 등과 같은 유착물질의 수용체 기능과 발현에 관계하고 EGFR 기능을 조절한다.¹²⁾ TGF- α 는 EGF와 구조적으로 비슷하여 EGF와 관련된 단백질 군에 속하며 EGFR에 부착하여 역할을 수행한다.

EGFR 수용체는 170 kDa의 당단백질이며 EGF에 의해 세포의 인산화(phosphorylation)가 자극되어 세

포내로 신호를 전달하는 작용을 한다. 따라서 EGF에 의한 EGFR 활성화는 세포증식이나 성장과정에 매우 중요한 역할을 한다. EGFR의 변이와 결손 등이 침윤성 암에서 관찰되었으며 난소암, 방광암, 유방암에서 EGFR 과발현이 보고되었다.^{13,14,15)} EGFR은 tyrosine kinase 작용에 의해 유사분열 신호(mitogenic signal)를 전달하여 EGFR가 활성화됨으로써 암세포의 표현형(phenotypic properties)을 촉진하고 암세포 증식을 자극하여 단백질 분해를 촉진시켜 암세포의 침윤 및 전이를 유발한다고 하였다.¹⁶⁾

E-cadherin과 EGFR은 정상 세포나 암세포에서 같은 세포부위에 존재하며¹⁷⁾ EGFR의 tyrosine kinase 작용으로 cadherin 결합단백질인 catenin 기능에 영향을 주어 catenin과 cadherin 결합체의 결합을 해체시킴으로써 E-cadherin의 작용을 감소시킨다고 하였다.¹⁸⁾ 이러한 tyrosine phosphorylation 매개에 의한 기능조절은 cadherin 외에 다른 유착물질, 수용체, 종양유전자 등 여러 물질이 가능하며 tyrosine phosphorylation 자체의 변화가 암세포의 침윤에 영향을 줄 수도 있다고 하였다.¹⁸⁾

이에 본 저자는 자궁경부암 세포주에서 EGF와 TGF- α 의 성장인자로 처리 후에 E-cadherin, β -, 및 γ -catenin, 성장인자의 수용체인 EGFR의 발현변화를 관찰함으로써 침윤 및 전이할 수 있는 자궁경부암에서 유착 물질이 변화하는데 결합 단백질의 변화 및 성장 인자 수용체가 중요한 역할을 수행함을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

연구 재료 및 방법

A. 자궁경부암 세포주 배양

자궁경부암 세포주는 squamous cell carcinoma인 CaSki, ME-180, HT-3 SiHa, HeLa와 C-33A 세포주를 ATCC(American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다.

자궁경부암 세포주는 10% heat-inactivated FBS(Biowhittaker, Walkersville, MD, USA), 2 mM L-glutamine(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 unit/ml penicillin과 100 μ l/ml streptomycin(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)이 포함된 DMEM/F12 배지에서 배양하였다.

B. 성장인자와 항체

성장인자는 유전자재조합 EGF(R&D, Mineapolis, MN, USA) 30 ng/ml, 유전자재조합 TGF- α (R&D, Mineapolis, MN, USA) 10 ng/ml 등을 3종류의 세포주, CaSki, ME-180, HT-3 세포주에 처리하였는데 처리 후 시간별로 0 분, 10분, 20 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간 동안 자란 각각의 세포주를 가지고 연구하였다.

일차항체는 E-cadherin(Zymed, San Francisco, CA, USA), EGFR(Transduction laboratory, Lexington, KY, USA), activated EGFR(Transduction laboratory, Lexington, KY, USA), β -와 γ -catenin(Transduction laboratory, Lexington, KY, USA) 등을 이용하였으며 E-cadherin 이차항체는 protein A-HRP(Santa-Cruz, Santa Cruz, CA, USA), EGFR과 activated EGFR, β -과 γ -catenin 이차항체는 goat anti-mouse IgG(Transduction laboratory, Lexington, KY, USA) 등을 이용하였다.

C. Protein lysate 준비와 단백질 농도측정

3종류의 세포주에 다양한 농도에서, 혹은 정해진 시간 동안 EGF와 TGF- α 를 처리한 다음 단백질을 추출하였다. 배지를 제거하고 PBS 용액으로 2번 세척한 후에 lysis 완충제(lysis buffer, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.25 M PMSF) 300 μ l를 첨가한 후 30 분 동안 4°C에서 반응시켰다. 세포 scraper로 배양접시 안의 용액을 긁어 모아 eppendorf tube에 넣고 10 분 동안 4°C에서 방치한 후 4°C, 12,000 xg에서 10 분간 원심 분리하였다. 위의 상층액을 모아 Bicinchoninic acid (BCA) 방법(Pierce, Rockford, IL, USA)으로 단백질 양을 측정하였다.

단백질 측정은 시험관에 다양한 농도의 표준용액 100 μ l 또는 소 혈청단백질(bovine serum albumin)과 검체액, 즉 3종류의 세포주의 단백질 추출액을 30 μ l씩을 각각 넣고 증류수를 첨가하여 100 μ l가 되게 한 후 BCA 용액 2 ml를 넣고 혼합하여 37°C에서 30 분간 방치하였다. 562 nm 분광광도계로 흡광도를 측정하여 단백질 농도를 산출하였다.

D. Western blotting

6종류의 세포주에서 E-cadherin과 EGFR의 western blotting을 시행하였고 EGF, TGF- α 를 처리한 3

종류의 세포주, CaSki, ME-180, HT-3 세포주에서 E-cadherin, EGFR, activated EGFR β - and γ -catenin의 western blotting을 시행하였다.

각각의 세포주로부터 얻은 protein lysate(E-cadherin protein lysate 10 μ g, EGFR protein lysate 50 μ g, activated EGFR protein lysate 50 μ g, β - and γ -catenin 15 μ g)에 검체량과 동량의 2X sample buffer(100 mM Tris HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)를 첨가하였다.

검체를 7% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였는데 stacking gel에서는 50 mA로 2 시간, separating gel에서는 100 mA로 2 시간 시행하였다. 전기영동 후에 젤을 PVDF membrane에 붙인 후 50 mA에서 단백질을 밤새 이전(transfer)시켰다.

PVDF membrane을 차단 완충제(2% nonfat dry milk, 0.05% Triton X-100 in PBS) 6 ml에 담근 후 실온에서 2 시간 흔들면서 반응시킨 후 각각의 희석된 일차항체(anti-E-cadherin, 1:3,000; anti-EGFR, 1:1,000; anti-activated EGFR, 1:200 희석, β - and γ -catenin 1:1,500 희석) 6 ml에 넣고 같은 방법으로 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 완충제 용액(PBS/0.05% Tween 20)으로 5 분 이상 3 번 흔들면서 세척한 후 희석된 이차항체(E-cadherin인 경우 protein A-HRP 1:2,000; EGFR과 activated EGFR인 경우 goat anti-mouse IgG 1:2,000 희석, β - and γ -catenin 1:5,000 희석) 6 ml에 같은 방법으로 1 시간 반응시켰다. 완충제 용액으로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하였다. 암실에서 ECL kit속에 용액 A, B를 1:1로 섞어 membrane에 부어준다. 잠시 후 membrane에 남은 여분의 용액을 paper로 닦아낸다. wrap으로 싸서 cassette에 넣고 암실에서 20 초에서 2 분간 감광시킨다.

E. Immunoprecipitation

각각의 세포주로부터 얻은 protein lysate 50 μ g에 normal mouse serum 20 μ l과 protein G sepharose 50 μ l (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 4시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 상층액을 분리한 후 protein 50 μ g당 E-cadherin 2 μ g이나 PY-20 5 μ g를 혼합하여 2시간 동안 4°C에서 반응시킨 후 protein G sepharose 50 μ l

- 자궁 경부암 세포주에서 EGF, TGF- α 자극에 의한 E-cadherin, β -, γ -catenin과 EGF 수용체의 발현변화 및 인산화 -

를 다시 첨가한 후 2시간동안 반응시켰다.

원심분리하여 상층액을 제거하고 lysis 완충제로 sepharose 50 μ l를 2번 세척한 후 20 μ l loading buffer(20% glycerol, 4% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.02% xylene cyanol)와 10% 2-mercaptoethanol를 첨가한 후 3분동안 끓였다.

검체를 7% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였는데 stacking gel에서는 50 mA로 2 시간, separating gel에서는 100 mA로 2 시간 시행하였다. 전기영동 후에 젤을 PVDF membrane에 붙이기 위해 50 mA에서 단백질을 밤새 이전(transfer)시켰다.

이전된 PVDF membrane을 2% skim milk가 포함된 PBST(PBS/0.05% Tween 20)에서 2시간동안 차단하고(blocking) 일차항체 (β - and γ -catenin 1:1,500 희

석) 6 ml을 반응시키고 PBST로 3번 세척한 후 이차항체 goat anti mouse IgG(1:5000 희석)로 1시간 반응시켰다. PBST로 3번 세척한 후 ECL kit를 이용하여 암실에서 20 초에서 2 분간 감광시킨다.

결 과

A. 자궁경부암 세포주의 형태학적 특성

자궁경부암 세포주 중 CaSki 세포주는 상피성 세포형태로 세포끼리 접촉하며 서서히 자라는 양상을 보였다(Fig. 1-A). ME -180, HT-3 세포주도 CaSki 세포주와 유사하게 세포끼리 접촉하며 자라는 양상을 보였다.(Fig. 1-D, G)

Fig 1. The effect of EGF and TGF- α on cell morphology in cervical cancer cell lines. CaSki(A, B, C), ME-180(D, E, F) and HT-3(G, H, I) cells were cultured in the absence(A, D, G) or presence of 30 ng/ml EGF(B, E, H) or 10 ng/ml TGF- α (C, F, I) for 24 hr. Photographs are at a magnification of X100.

B. 자궁경부암 세포주의 E-cadherin와 EGFR 발현

E-cadherin western blotting에서 CaSki, ME-180, HT-3 세포주에서 120 kDa E-cadherin band가 관찰되었다(Fig. 2). E-cadherin band가 관찰된 CaSki, ME-180, HT-3 등 3종류의 세포주에서 170 kDa EGFR band가 같이 관찰되었다.(Fig. 2)

C. EGF, TGF- α 등 성장인자 처리 후 자궁경부암 세포주 배양과 E-cadherin 발현 변화

EGF, TGF- α 등을 시간별로 처리시 24시간째에 세포형태가 섬유모세포 형태로 변화하였으며(Fig. 1) CaSki 세포주에서 EGF를 0 분, 10 분, 20 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간 간격으

로 시간별 처리한 결과 E-cadherin band 감소가 거의 관찰되지 않았으며 오히려 TGF- α 를 시간별 처리한 결과 1 시간내에 약간 증가하는 듯한 경향을 보였다(Fig. 3). ME-180 세포주와 HT-3 세포주에서도 시간에 따른 E-cadherin 감소의 차이는 약간 있으나 CaSki 세포주에서와 같은 양상을 보였다.(Fig. 3)

D. EGF, TGF- α 성장인자 처리 후의 EGFR과 activated EGFR 발현변화

CaSki 세포주에서 EGF, TGF- α 를 시간별로 처리하였을 때 시간이 증가함에 따라 EGFR의 발현이 감소하였고 EGF 처리시가 TGF- α 처리시보다 더 급격히 감소하였다(Fig. 4). activated EGFR의 시간에 따른 변화는 30 분에서 1 시간내에 급격히 증가하였다가 시간이 증가할수록 감소하였고 EGF 처리시가 TGF- α 처리시보다 더 짧은 시간내에 급격히 감소하였다(Fig. 5). ME-180 세포주와 HT-3 세포주에서도 비슷하게 시간이 증가할수록 EGFR의 발현은 감소하였고 activated EGFR은 짧은 시간내에 증가하였다가 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4, 5). 그러나 CaSki 세포주에서와는 달리 ME-180 세포주와 HT-3 세포주에서는 EGFR이 24 시간내에 다시 약간 증가하는 양상을 나타내었다.(Fig. 4, 5)

E. EGF 성장인자 처리 후의 β -와 γ -catenin과 phosphorylated β -와 γ -catenin 발현변화

CaSki 세포주와 ME-180 세포주에서는 EGF를 시간별로 처리한 후 관찰되는 β -와 γ -catenin은 별다른 차이가 없었으며 HT-3 세포주에서는 약간 감소하지

Fig 2. Expression of E-cadherin and EGFR in cervical cancer cell lines. The basal level of expression of the E-cadherin and EGFR proteins was examined by western blot analysis using an anti-human E-cadherin antibody(Zymed) and an anti-human EGFR antibody(Transduction), respectively. A. CaSki;B. SiHa;C. ME-180;D. HeLa;E. HT-3;F. C-33A cell line.

Fig 3. Time dependent effects of EGF and TGF- α on E-cadherin expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) or TGF- α (10 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of E-cadherin proteins were examined by western blot analysis using an anti-human E-cadherin antibody(Zymed). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

Fig 4. Time dependent effects of EGF and TGF- α on EGFR expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) or TGF- α (10 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of EGFR proteins were examined by western blot analysis using an anti-human EGFR antibody(Transduction). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

Fig 5. Time dependent effects of EGF and TGF- α on activated EGFR expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) or TGF- α (10 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of activated EGFR proteins were examined by western blot analysis using an anti-human activated EGFR antibody(Transduction). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

만 CaSki 세포주와 동일한 양상을 나타내었다.(Fig. 6, 8)

CaSki 세포주에서 EGF를 시간별로 처리한 후 관찰되는 phosphorylated β -와 γ -catenin은 30분에 급격히 증가하였다가 감소하였으며 ME-180과 HT-3 세포주에서도 1시간에 급격히 증가하였다가 감소하는 동일한 양상을 나타내었다.(Fig. 7, 9)

고 찰

암세포의 침윤 및 전이는 세포간 유착 관계의 변화와 세포 형태의 변화가 나타나며 기저막의 침윤

및 세포외 기질과 반응을 일으키게 된다.¹⁹⁾ 침윤성 상피암에서 상피세포의 분화가 감소되고 세포간 유착이 약해져 암세포의 침윤성이 증가하며 세포간 유착 물질의 하나인 E-cadherin의 발현이 감소된다고 하였으며²⁰⁾ 전립선암에서는 E-cadherin의 발현감소가 암세포의 미분화 정도와 암의 침윤성 증가 및 예후와 관련이 있는 것으로 보고되었다.²¹⁾

이에 본 저자는 자궁 경부암 세포주를 배양하여 성장인자를 처리함으로써 암세포의 침윤성을 증가시켜 세포간 유착물질 E-cadherin의 발현변화 및 결합 단백질의 변화를 관찰, 성장인자 수용체의 변화와 비교함으로써 세포간 유착변화에 여러 단계의 변화가 중요함을 규명하고자 하였다.

Fig 6. Time dependent effects of EGF on β -catenin expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of β -catenin proteins were examined by blot analysis of a anti β -catenin antibody (Transduction) using an anti human E-cadherin antibody(Zymed). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

본 저자는 방광암,¹⁴⁾ 간암,²²⁾ 피부 기저세포암,²³⁾ 유방암,¹⁵⁾ 전립선암⁸⁾ 등에서 E-cadherin 발현이 감소한 것과 같이 CaSki, ME-180, HT-3 세포주를 제외한 다른 자궁경부암 세포주에서 E-cadherin이 발현되지 않아 침윤성 자궁경부암에도 E-cadherin 발현의 감소가 중요하다고 보고한 바 있다. 이상과 같이 모든 자궁경부암 세포주에서 동일하게 E-cadherin의 발현이 감소하지 않는 것으로 미루어 보아 E-cadherin의 발현감소 외에 다른 인자들도 자궁경부암 침윤과정에 관여할 것으로 생각되었다.

세포의 성장에 관여하는 인자로는 성장 촉진인자인 EGF는 세포의 형태결정에 주요 역할을 하며¹¹⁾ TGF- α 도 EGF와 구조적으로 비슷한 성장인자로 EGF의 수용체인 EGFR에 부착하여 EGF와 거의 비슷한 기능을 한다. TGF- α 가 대장암의 진행에 주요 역할을 한다고 밝혀졌으며²⁴⁾ EGF 수용체가 침윤성 폐암,²⁵⁾ 식도암,²⁶⁾ 난소암¹³⁾ 등에서 과발현되어 EGFR의 과발현이 암세포의 침윤과 질병의 진행, 예후

Fig 7. Time dependent effects of EGF on phosphorylated β -catenin expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of phosphorylated β -catenin proteins were examined by blot analysis of a anti β -catenin antibody(Transduction) after immunoprecipitation using an anti PY-20 antibody(Transduction). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

와 관련이 있다고 보고되었다.¹⁶⁾

성장인자에 의해 세포형태가 원형에서 섬유모세포형으로 변형되며, 밀접한 세포형태에서 분산되어 자라는 것이 식도의 미분화된 상피성세포주 TE-2R에서 관찰되었으며 이러한 양상은 E-cadherin의 발현 감소에 의한 것이 아니고 E-cadherin의 위치가 세포막 외측 유착 부위에서 세포표면으로 이동한 것과 EGF에 의해 E-cadherin의 기능이 억제되어 생긴 것으로 보고되었다.²⁶⁾ 또한 EGFR도 세포 접합부에 위치하여 EGF에 의해 강하게 autophosphorylation 되며²⁷⁾ E-cadherin과 같은 상피세포의 유착 접합부에 존재하는 것으로 밝혀졌다.¹⁷⁾ 본 연구에서도 CaSki, ME-180, HT-3의 세포주에서 120kDa의 E-cadherin과 170 kDa의 EGFR가 동일하게 관찰되어 E-cadherin과 EGFR이 서로 관련이 있다는 것이 입증되었다.

CaSki, HT-3, ME-180 세포주에서 성장인자인

Fig 8. Time dependent effects of EGF on γ -catenin expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of γ -catenin proteins were examined by blot analysis of a anti γ -catenin antibody (Transduction) using an anti human E-cadherin antibody(Zymed). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

EGF와 TGF- α 를 시간별(0 분, 10 분, 20 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 24 시간) 차이를 두고 처리한 후 세포주를 관찰하였고 E-cadherin과 EGFR, activated EGFR 및 β -와 γ -catenin의 발현 양상을 관찰하였다.

3 세포주에서 EGF와 TGF- α 로 시간별로 처리한 24 시간 후에 세포가 섬유모세포 형태로 변화되었으며 이는 침윤성 암세포는 상피성 세포 형태를 잃고 방추형이나 섬유모세포형으로 변형되며 세포간 유착이 감소된다고 보고한 바와 같으며²⁸⁾ 성장인자가 암세포의 침윤성에 중요한 작용을 하는 것으로 생각된다. 또한 3 세포주에 EGF와 TGF- α 를 시간별 처리한 결과 E-cadherin band 감소가 거의 관찰되지 않았으며 이는 자궁경부암의 침윤성 변화에는 E-cadherin 발현감소 외에 다른 변화도 중요함을 알 수 있다.

CaSki 세포주에서 EGF, TGF- α 를 시간별로 처리하였을 때 시간이 경과함에 따라 EGFR의 발현이

Fig 9. Time dependent effects of EGF on phosphorylated γ -catenin expression in cervical cancer cell lines. Cells were treated with EGF(30 ng/ml) for the indicated period. The level of expression of phosphorylated γ -catenin proteins were examined by blot analysis of a anti γ -catenin antibody(Transduction) after immunoprecipitation using an anti PY-20 antibody(Transduction). A. CaSki; B. ME-180; C. HT-3 cell line.

감소하였고 activated EGFR은 30 분-1 시간내에 급격히 증가하였다가 시간이 경과할수록 감소하였으며 EGF 처리시가 TGF- α 로 처리시보다 더 짧은 시간내에 급격히 감소하였다. ME-180 세포주와 HT-3 세포주에서도 비슷하게 시간이 증가할수록 EGFR의 발현은 감소하였고 activated EGFR은 짧은 시간내에 증가하였다가 감소하는 양상을 보였다. 그러나 ME-180 세포주와 HT-3 세포주에서는 EGFR이 24시간내에 다시 약간 증가하는 양상을 나타내었다. 따라서 암의 침윤성 변화에는 E-cadherin의 발현변화 외에 EGFR 수용체의 감소가 중요하며 실제적으로 E-cadherin 기능에 관계하는 activated EGFR의 변화가 더욱 중요함을 알 수 있었다.

E-cadherin과 결합하는 단백질인 catenin은 폴리펩타이드이며 102 kDa의 α -catenin, 88 kDa의 β -catenin, 82 kDa의 γ -catenin 등이 있으며⁶⁾ E-cadherin과 세포체질과의 사이에 작용하여 세포간 연결을 유지하고

signal transduction과 암세포의 침윤성을 조절한다.²⁹⁾ 이중 α -catenin은 E-cadherin과 세포세포질사이의 결합을 제공하기 때문에 E-cadherin의 정상적인 세포간 유착기능에 α -catenin이 필수적이다. β -catenin의 역할은 아직 논란의 여지가 많으며 다른 catenin과 결합 없이도 직접 E-cadherin 세포질 부분과의 결합이 가능하지만 α -catenin은 β -catenin과 결합한 후에 E-cadherin에 결합할 수 있다고 한다.⁶⁾ 아직 γ -catenin에 대해 정확히 알려진 바 없다. 따라서 β -와 γ -catenin 등과 E-cadherin의 결합은 세포간 유착에 중요한 역할을 담당하게 된다.

식도암의 침윤과 전이에 α -catenin이 E-cadherin보다 더 관계되고³⁰⁾ 방광암에서는 α -catenin, β -catenin 등이 예후와 관계가 있다고 보고되었다.³¹⁾ E-cadherin 기능부전은 세포질 부분이 없는 truncated E-cadherin이 catenin과 반응할 수 없어 세포간 유착기능을 수행할 수 없거나,³²⁾ 세포외 부분이 없는 E-cadherin이 정상 E-cadherin과 결합할 수 없어 상피세포간 유착이 불가능한 것 외에도³³⁾ β -catenin 유전자의 null mutation이나 catenin의 tyrosine phosphorylation으로 유착복합체 기능이 소실되어 세포간 유착이 상실된다고 한다.³⁴⁾ 최근 연구에 의하면 EGFR이 cadherin의 결합단백질인 catenin을 tyrosine phosphorylation시켜 catenin과 cadherin 사이의 기능적 결합을 차단하여 세포 사이의 유착이 감소되어 세포의 침윤성과 전이가 되는 것으로 알려졌다.^{27,35,34)} 성장인자는 β -catenin의 tyrosine phosphorylation을 유도하여 E-cadherin의 기능을 감소시킴으로써 E-cadherin의 발현을 억제하는 것을 보고되었다.²⁶⁾ 이 때 EGFR가 활성화되고 세포 운동성과 단백질 분해가 증가되어 E-cadherin의 세포간 연결 기능을 파괴하여 암의 침윤성이 나타난다고 하였다.³⁶⁾ 본 연구에서도 EGF 처리 후 β -catenin과 γ -catenin의 tyrosine phosphorylation이 증가하는 것이 activated EGFR 발현 시간과 같이 증가하였다가 감소하였으며 이는 자궁경부암 침윤에 catenin의 tyrosine phosphorylation이 관련됨을 시사하였다. 성장인자 등이 β -catenin을 tyrosine phosphorylation시킴으로써 다른 부위로 E-cadherin을 이동시켜 세포간의 분리 및 침윤을 유발한다고 보고된 것과 일치하며³²⁾ EGFR 및 E-cadherin과 β -catenin사이의 관련성은 EGF가 EGFR을 통해 catenin 복합체를 tyrosine phosphorylation시

키고 이로 인해 E-cadherin의 기능이 감소하게 된다고 보고된 바와도 일치하였다.³⁷⁾

본 연구에서 EGFR의 변화가 EGF, TGF- α 처리 후 짧은 시간내에 나타나는 것으로 보아 성장인자 촉진에 의한 수용체의 작용은 초기의 암세포 침윤성 변화에 관여함을 시사함을 알 수 있다. 또한 EGF, TGF- α 시간별로 처리시 EGFR, activated EGFR 변화에서 EGF 처리시가 TGF- α 처리시보다 EGFR, activated EGFR의 급격한 감소를 보인 것으로 보아 EGF에 의한 EGFR 작용이 더 강함을 시사한다. 또한 CaSki, ME-180, HT-3 세포주마다 다르지만 특히 HT-3 세포주에서 EGFR 발현이 감소하였다가 24시간내에 다시 증가하는 양상을 나타내어 EGFR 작용 시간이 각각 차이가 있음을 알 수 있었고 이는 같은 자궁경부암 세포라 할지라도 생물학적 성격이 다르기 때문에 침윤성이 다를 수 있다고 생각되는 바이다. 이는 다른 종류의 암에서 연구된 바 없기 때문에 계속적인 연구에 의해 밝혀지리라 생각된다.

이상의 연구 결과 자궁경부암의 침윤 및 전이 과정에는 E-cadherin의 감소보다는 E-cadherin의 기능 변화가 중요하며 EGF, TGF- α 등의 성장인자 자극에 의한 EGF 수용체의 변화, 특히 β - and γ -catenin의 tyrosine phosphorylation에 관여하는 activated EGFR의 작용이 자궁경부암의 침윤을 유도하는 신호 전달에 중요하다고 생각된다. 앞으로 자궁경부암의 침윤 및 전이에 중요한 역할을 할 것으로 예측되는 E-cadherin 외에 다른 유착인자나 catenin의 mutation 등에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

결론

CaSki, ME-180, HT-3 자궁경부암 세포주를 배양하여 EGF, TGF- α 등의 성장인자를 처리하기전과 시간별로 처리한 후 암세포의 형태를 관찰하였으며 western blotting 방법에 의하여 E-cadherin과 β -와 γ -catenin의 발현변화, EGFR과 activated EGFR의 발현변화 및 immunoprecipitation 방법에 의하여 β - and γ -catenin phosphorylation을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

E-cadherin band가 발현된 CaSki, ME-180, HT-3

세포주에서 170 kDa EGFR band가 같이 관찰되어 E-cadherin과 EGFR의 작용이 서로 연관이 있음을 알 수 있었다. EGF, TGF- α 처리시 24시간내에 암세포의 형태가 섬유모세포형인 침윤형태로 변화하였고 농도 증가시 계속 섬유모세포형을 유지하여 자궁경부암의 침윤성에 성장인자가 작용함을 알 수 있었다. 또한 이 3 세포주에서 EGF, TGF- α 처리 후 E-cadherin이 거의 감소하지 않았으나 EGFR 발현이 감소하였으며 activated EGFR이 짧은 시간내에 증가하였다가 감소하는 것으로 보아 암세포의 침윤성 변화에 E-cadherin 발현변화외에 EGF 수용체의 감소가 중요하며 실제로 E-cadherin 기능에 관계되는 activated EGFR의 변화가 더욱 중요함을 알 수 있었다. EGF, TGF- α 시간별 처리시 activated EGFR이 짧은 시간내에 증가하였다가 감소하는 것과 같이 β -와 γ -catenin의 tyrosine phosphorylation이 증가하였다가 감소하였으며 이는 activated EGFR과 β -와 γ -catenin의 tyrosine phosphorylation이 서로 관계가 있으며 또한 자궁경부암의 침윤과정에 관여하는 것으로 생각된다.

이상의 결과에 의해 자궁경부암의 침윤과 전이과정에는 E-cadherin의 발현소실보다 E-cadherin 기능을 매개하는 EGFR의 역할이 중요하며 이는 β -와 γ -catenin의 tyrosine phosphorylation에 의해 신호를 전달하는 activated EGFR이 자궁경부암의 침윤성에 중요한 영향이 미치는 것으로 생각된다.

- 참고문헌 -

1. Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastases. JAMA 1990;263:1123-1126.
2. Albeda S. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. Am J Cell Mol Biol 1991;4:195-203.
3. Albeda S, Buck C. Integrins and other cell adhesion molecule. FASEB J 1990;2868-2880.
4. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. Science 1991;251:1251-1455.
5. Bussemaker MJG, Schalken JA. The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. World J Urol 1996;14:151-156.
6. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. EMBO J 1998;8: 1711-1717.
7. Schwartz GK, Wang H, Lampen N. Defining the invasive phenotype of proximal gastric cancer cells, Cancer 1994;73:22-27.
8. Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, Amini SB, Pretlow TG. Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. Am J of Pathology 1996; 148:1375-1379.
9. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. Cancer Research 1993;53: 3241-3245.
10. Davies BR, Worsley SD, Ponder BAJ. Expression of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. Histo-pathology 1998;32:69-80.
11. Salomon DS, Kim N, Saeki T, Cadiello F. Transforming growth factor- α ; an onco developmental growth factor. Cancer Cell 1990;2:389-397.
12. Liu D, Gagliardi G, Nasim MM, Alison MR, Oates T, Lalani EN, Stamp WH, Pignatelli M. TGF- α can act as morphogen and/or mitogen in a colon cancer cell line. Int J Cancer 1994;56:603-608.
13. Sorscher SM, Green MR, Feramisco JR. Enhanced E-cadherin expression in epidermal growth factor receptor expressing cells. Biochem and Biophysical Research Communications 1995;206:518-524.
14. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as prognostic factor in patients with bladder carcinomas. Cancer Res 1994;54:3120-3123.
15. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. Am J Path 1993;143: 1731-1742.
16. Carpenter G. Receptor for epidermal growth factor and other polypeptide mitogen. Ann Rev Biochem 1987; 56:881-914.
17. Fukuyama R, Simizu N. Detection of epidermal growth factor receptors and E-cadherin in the basolateral membrane of A431 cells by laser scanning fluorescence microscopy. Jpn J Cancer Res. 1991;82:8-11.
18. Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium dependent cell adhesion molecules. Current Opinion in cell biology 1993;5:797-805.
19. Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. Clin Exp Metastasis 1985;3:257-279.

20. Tsukita S, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S. Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J Cell Biol* 1993;123:1049-1053.
21. Girolidi LA, Schalken JA. Decreased expression of the intercellular adhesion molecule E-cadherin in prostate cancer: biological significance and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12: 29-37.
22. Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 1991;57:131-135.
23. Pizzarro A, Benito N, Navarro P. E-cadherin expression in basal cell carcinomas. *Br J Cancer* 1993;69:157-162.
24. Coffey RJ, Goustin AS, Soderquist AM, Shipley GD, Wolfshohl J, Carpenter G, Moses HL. Transforming growth factor- α in human colon cancer lines; implications for an autocrine model. *Cancer Res* 1987; 47:4590-4594.
25. Bohm M, Totzeck B, Birchmeier W, Weiland I. Difference of E-cadherin expression levels and patterns in primary and metastatic human lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 1993;12:56-62.
26. Shiozaki H, Kadowaki T, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M, Mori T. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human esophageal cancer cell line. *Br J of Cancer* 1995;71:250-258.
27. Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Cadherin mediated cell-cell adhesion is perturbed tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 1992;118: 703-714.
28. Valles AM, Boyerm B, Thiery JP. Cell motility factors (Goldberg, I.D., ed) Birkhauser Verlag, Basel. 1991; p17-34.
29. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J of Surgery* 1996;83:437-446.
30. Kadowaki T, Shiozaki H, Inoue M. E-cadherin and α -catenin expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1994;54:291-296.
31. Shimazui T, Schalken JA, Girolidi LA, Jansen CFJ, Akaza H, Koiso K, Debruyne FMJ, Bringuier PP. Prognostic value of cadherin associated molecules(α -, β -, and γ -catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996;56:4154-4158.
32. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4246-4250.
33. Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:9078-9084.
34. Hamaguchi M, Matsuyoshi N, Ohnishi Y, Gotoh B, Takeichi M, Nagai Y. p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J* 1993;12:307-314.
35. Fujimori T, Takeichi M. Disruption of epithelial cell-cell adhesion by exogenous expression of a mutated nonfunctional N-cadherin. *Mol Biol Cell* 1993;4:37-47.
36. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Lihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991;139:17-23.
37. Behrens JL, Vakaet R, Friis E, Winterhager E, Van Roy F, Mareel M, Takeichi M. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/catenin complex in cells transformed with a temperature sensitive v-src gene. *J Cell Biol* 1993;120:757-766.