

위암 조직에서의 염기성 섬유 모세포 성장 인자 m-RNA의 발현

이화여자대학교 의과대학 외과학교실

김 영 우

= Abstract =

The Expression of bFGF m-RNA in the Gastric Cancer Tissues

Young-Woo Kim

Department of Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University

Backgrounds : The production of basic fibroblast growth factor(bFGF), which is known to have strong angiogenic activity in gastric cancer, was evaluated.

Methods : Using Alkaline phosphoatase-labelled, synthetic oligonucleotide probe of bFGF genes, the expression of the gene was evaluated with in situ hybridization method in 9 fresh advanced gastric cancer tissues.

Results : In situ Hybridization of bFGF mRNA showed positive reaction in 8 of 9 patients.

Conclusions : In view of profuse expression of angiogenic growth factor, future therapeutic targeting for angiogenesis could be reasonable in patients with gastric cancer.

KEY WORDS : Gastric cancer · Basic fibroblast growth factor · In situ hybridization · mRNA.

서 론

암 세포가 일정한 크기에 이르게 되면 주위에 대사 산물을 적절히 공급할 수 있는 혈관이 필요하게 되므로 암의 성장, 침윤, 그리고 전이에 혈관의 신생이 필수적인 것으로 많은 연구를 통해 입증 되었다. 종양에 있어서 새로운 혈관의 생성은 종양 세포 자체에서 분비되는 물질에 의해 기존의 내피 세포가 자극을 받아 이루어지게 되며 이 과정은 종양의 성장, 침윤, 그리고 원격 전이에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁾. 현재 혈관 신생 인자로 알려진 물질은 20여 가지로 그 가운데 주로 basic fibroblast growth factor(bFGF)²⁾, vas-

cular endothelial growth factor(VEGF)³⁾, TGF-⁴⁾, platelet derived endothelial growth factor(PDEGF)⁵⁾, pleiotrophin(PTN) 등이 관여되고 있는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

Bennett 등은 1989년 위암 조직에서 TGF- α , EGFR, PDGF 등의 성장 인자들의 mRNA가 발현됨을 증명하고 이러한 인자들이 종양의 변이와 성장에 관여함을 시사한 바 있다⁷⁾. 또한 Chung 등은 1992년 위암 조직에서 PDGF, IGF-I, TGF- α 등의 m-RNA와 그들 수용체의 m-RNA를 in situ hybridization과 면역조직 화학적 염색의 방법으로 발현 유무를 관찰한 바 있는데 위암 조직에서 이러한 성장 인자들이 종양의 성장과 유지에 관여할 것으로 제시한 바 있다⁸⁾.

본 연구는 위암에서 혈관 신생 인자로 알려진 염기성 섬유 모세포 성장 인자가 위암 세포에서 어느 정도 발현되는지를 보고자 하여, 생성된 염기성 섬유모세포 성장 인자가 다른 세포들에 의해 유입된 것이 아니라 위암 세포 자체의 염기성 섬유모세포 성장 인자 mRNA에 의한 생성임을 in situ hybridization 방법을 이용하여 증명하고자 하였다. 이 연구를 통해 궁극적으로는 위암 치료에 있어 혈관 신생이나 혈관 신생 물질이 새로운 생물학적 치료의 표적으로서의 가능성이 있는지를 고찰해 보고자 하였다.

대상 및 방법

수술을 통해 즉시 얻어진 위암 조직을 생리식염수 속에서 병변부위, 병변-정상 이행부위, 정상부위의 3부분으로 구분하여 각각 점막층에서 장막층에 이르는 전층을 포함하는 1cm 넓이, 0.2~0.3cm² 두께의 절편을 얻어 RNase를 억제하기 위해 0.5% DEPC(Diethyl pyrocarbonate)로 처리한 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffered saline(이하 PBS)에 상온에서 하루 동안 고정된 뒤 DEPC로 처리한 PBS로 수세한 뒤 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 5m 두께의 절편을 얻어 염색에 사용하였다.

1. In situ hybridization

조직처리 과정을 통해 얻어진 절편은 DEPC로 처리한 gelatin coated slide에 얹어 상온에서 건조시킨 뒤 prehybridization buffer(500mM sodium chloride, 50mM sodium phosphate pH 7.0, 5.0mM EDTA, 0.02% ficoll, 0.02% bovine serum albumin, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% herring sperm DNA, and 40% formamide)를 조직에 점적한 뒤 50% formamide를 포함하는 wet chamber에 넣어 37°C에 3시간 동안 prehybridization을 시켰다. 반응이 끝난 조직은 PBS에 수세한 뒤 Biotinylated-basic Fibroblast Growth Factor(R & D Co.)를 hybridization buffer에 0.5 μ m/slide의 농도로 희석하여 37°C에서 밤새 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 4xSSC, 2xSSC, 1xSSC buffer에 각각 상온에서 30분씩 세척한 다음 마지막으로 0.5xSSC buffer에 37°C에서 1시간 동안 세척시켰다. 반응이 끝난 조직은 Avidin/Alkalinephosphatase con-

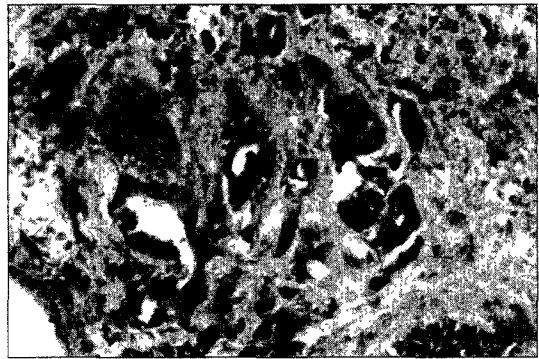


Fig. 1. Using Alkaline phosphatase-labelled, synthetic oligonucleotide probe of bFGF genes, the expression of the bFGF mRNA was positive in neoplastic area ($\times 200$).

jugate를 조직에 점적시키고 1시간 동안 습윤상자 속에서 반응을 시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.1M Tris buffer로 수세한 뒤 NBT/BCIP in Tris buffer를 기질액으로 발색반응을 유발시켰다. 그뒤 hemtoxylin 대조염색을 하고 탈수과정을 거쳐 cover slip을 봉입시켰다.

2. 면역조직화학염색 결과의 판독

b-FGF mRNA를 발현 시킨 슬라이드에 해당하는 H & E 염색 슬라이드를 동시에 보면서 암세포에 해당하는 부위에 발현이 되는지의 여부를 판별하였다. 또한 음성 대조 표본으로 정상 위조직을 사용하여 발현 여부를 판단하였다.

결 과

총 9예의 신선 위암 조직을 얻었다. 모두 진행성 위암 환자였으며 남녀 성비는 6 : 3, 평균연령은 48.6세이었다. 종양의 위치는 antrum 2예, body 6, 위 전체 1예이었다. 모두 8예(88.9%)에서 세포질 내에서 염기성 섬유모세포 성장 인자 mRNA의 활성이 있음을 관찰하였다(Fig. 1).

고 찰

종양의 성장 및 전이에는 혈관의 신생이 필수적이다. 왜냐하면 종양 세포가 어느 정도의 크기에 이르면 대사 요구에 의해 혈관으로부터 영양분을 공급 받아야만 하기 때문이다. 따라서 암 자체의 특성이라 할 수 있는 조

절되지 않는 무한 성장과 다른 조직으로의 전이 및 착상 과정에는 반드시 종양 세포 주변에 미세 혈관의 존재가 동반되어야 한다. 이러한 새로운 혈관의 출현이 어떠한 과정에 의해 이루어지는지에 대한 연구는 암의 성장 및 전이의 과정을 조절할 수 있는 방법을 찾을 수 있는 데에도 도움을 줄 수 있을 것이다.

유암⁸⁾, 간암⁹⁾, 췌장암¹⁰⁾, 난소암¹¹⁾, 전립선암¹²⁾ 등에서 염기성 섬유 모세포 성장 인자의 발현이 종양의 진행도와 연관이 있다는 주장이 보고되고 있다. 위암에서도 이러한 종양내의 혈관 신생과 함께 위암 세포에서 분비되는 혈관 신생 물질도 다양하게 발견되었다. 위암의 경우 같은 위암 조직에서도 많은 암세포의 strain이 공존하며 따라서 하나의 암 조직에서도 다양한 혈관 신생 물질이 발현될 것으로 생각된다. 염기성 섬유모세포 성장 인자 뿐 아니라 PDGF, TGF, insulin like Growth factor, EGF, VEGF, midkine 등이 위암에서 혈관 신생에 관여한다고 알려져 있다.⁴⁾⁵⁾¹³⁾¹⁴⁻¹⁶⁾. 또한 이러한 성장 인자가 위암에서 예후 인자로서 작용할 수 있다는 보고도 있다.¹⁵⁾. 그러나 종양 주위의 혈관 신생은 혈관 신생 인자만 작용하는 것은 아니며 혈관 신생 억제 인자와의 균형에 의한 결과적 현상이라 할 수 있다. 혈관 신생 억제 인자로 알려진 물질들은 angiostatin, platelet factor4, interferon-alpha, interferon inducible protein 10, gro-beta, 16kDa N-terminal fragment of prolactin 등이다.¹⁷⁾.

염기성 섬유 모세포 성장 인자의 경우 다른 몇가지 성장 인자와 함께 위암 세포주에서의 분비가 확인된 바 있으며 종양 혈관의 신생 및 종양 주위의 섬유화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾¹⁹⁾. 염기성 섬유 모세포 성장 인자의 생물학적인 특성은 매우 다양하나 세포를 이형시킬 수 있고 섬유 모세포의 증식 및 혈관 내피 세포의 증식에 강력한 자극 물질이며 암세포의 성장 및 세포 주기의 조절에 관여 한다.²⁰⁾. 저자는 위암에서도 염기성 섬유 모세포 성장 인자가 암세포 이외의 내피 세포와 섬유 모세포에서도 발현되는 것을 확인하였고 따라서 암세포에서 직접 염기성 섬유 모세포 성장 인자가 생산되는 것을 확인하기 위해 mRNA의 전사 과정을 증명 하였다. 같은 절단면의 H&E 염색으로 암세포의 위치와 mRNA가 발현되는 세포를 형태학적으로 보여준 것이다. mRNA의 발현은 비록 다른 환자군 이기는 하나 88.9%(8/9)로 비슷한 정도를 보여주었다.

비록 혈관 신생의 과정이 하나의 혈관 신생 인자만으로 결정되지 않으며 또한 혈관 신생 억제 인자와의 상호작용의 결과로 이루어지기는 해도 이렇게 염기성 섬유 모세포 성장 인자가 비교적 위암에서 발현률이 높은 것으로 볼 때 혈관 신생의 정도와 어느 정도 연관이 있을 것으로 예측할 수도 있을 것이다.

최근 위암에서 염기성 섬유 모세포 성장 인자 mRNA의 활성화와 환자의 예후가 관련성이 있다는 보고가 있으며²¹⁾, 흑색종에서 염기성 섬유 모세포 성장 인자 mRNA의 활성화도와 종양의 진행도와 연관이 있다는 보고가 있으나²²⁾ 다양한 혈관 형성 물질의 발현과 또한 이러한 물질 간의 상호 작용과 그 결과를 완벽히 파악하기도 어렵기 때문에 결국 이러한 혈관 형성 인자들의 작용의 결과라 할 수 있는 혈관 신생의 정도가 암세포의 생물학적 행동을 가장 잘 대변할 수 있다고 하겠다. 또한 암 세포 내에서의 염기성 섬유 모세포 성장 인자의 생산을 확인하기 위해 mRNA를 발현 시켜 볼 수는 있으나 결국 생물학적 작용은 최종 산물인 염기성 섬유 모세포 성장 인자 단백질이 하게 되며 나아가 수용체의 활성이 더욱 중요할 수 있기 때문에 mRNA의 활성화도와 예후와의 관련성을 보고자 하는 것은 큰 의미가 없을 것으로 생각된다.

혈관의 신생 정도가 암의 진행과 성장에 관여한다는 증거가 축적되면서 이러한 혈관의 생성을 억제 함으로써 암을 치료하고자 하는 시도가 계속 이루어지고 있다. 이번 실험을 통해 비록 위암의 종양 성장 및 전이에 있어 혈관 신생의 많고 적음이 유의한 관련성이 없었으나 분명한 것은 위암 주위에 미세 혈관들이 분포하며 종양에서 분비되는 염기성 섬유 모세포 성장 인자를 확인하였으므로 위암에서도 이러한 치료적 시도가 이루어져야 함이 타당할 것으로 생각된다. 최근 혈관 신생에 관여하는 성장 인자를 선택적으로 억제하고자 하는 시도들도 있으나²³⁾ 염기성 섬유 모세포 성장 인자 이외에 다른 다양한 성장 인자가 관여하며 혈관 억제 인자와의 상호 작용이 중요한 것으로 알려져 있어 항 혈관 형성 억제 치료의 방향은 혈관 내피 세포의 증식을 직접적으로 억제 하는 물질을 찾는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

결 론

위암 조직에서 혈관 신생 물질의 하나인 염기성 섬유

모세포 성장 인자가 발현되는 것을 위암 세포에서 이 단백질의 유전자 전사 과정을 확인하여 증명하였으며, 88%의 위암 조직에서 발현되는 것으로 보아 주요 혈관 신생 물질로 생각되며, 위암의 성장 및 전이 과정에 이렇게 암세포 자신이 생성한 혈관 신생 물질이 영향을 줄 것으로 생각된다. 향후 염기성 섬유 모세포 성장 인자를 포함한 다른 혈관 신생 인자 및 이에 대한 길항 인자들의 상호 조절 과정과, 작용 기전에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

References

- 1) Folkman J : *Tumor angiogenesis : Therapeutic implications. N Engl J Med* 1971 ; 285 : 1182-1186
- 2) Ohta T, Yamamoto M, Numata M, Iseki S, Tsukioka Y, Miyashita T, et al : *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in human pancreatic carcinomas. Br J Cancer* 1995 ; 72 : 824-831
- 3) Maeda K, Kang SM, Ogawa M, Onoda N, Sawada T, Nakata B, et al : *Combined analysis of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor expression in gastric carcinoma. Int J Cancer* 1997 ; 74 : 545-550
- 4) Malden LT, Novak U, Burgess AW : *Expression of transforming growth factor alpha messenger RNA in the normal and neoplastic gastro-intestinal tract. Int J Cancer* 1989 ; 43 : 380-384
- 5) Chung CK, Antoniades HN : *Expression of c-sis/platelet-derived growth factor B, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor alpha messenger RNAs and their respective receptor messenger RNAs in primary human gastric carcinomas : In vivo studies with in situ hybridization and immunocytochemistry. Cancer Research* 1992 ; 52 : 3453-3459
- 6) Riegel AT, Wellstein A : *The potential role of the heparin-binding growth factor pleiotrophin in breast cancer. Breast Cancer Res Treat* 1994 ; 31 : 309-314
- 7) Bennett C, Peterson IM, Corbishley CM, Luqmani YA : *Expression of growth factor receptor encoded transcripts in human gastric tissues, 1989 ; 49 : 2104-2111*
- 8) Visscher DW, DeMattia F, Ottosen S, Sarkar FH, Crissman JD : *Biologic and clinical significance of basic fibroblast growth factor immunostaining in breast carcinoma. Mod Pathol* 1995 ; 8 : 665-670
- 9) Hu Z, Everts RP, Fujio K, Omori N, Omori M, Marsden ER, et al : *Expression of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met and acidic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptors during hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis* 1996 ; 17 : 931-938
- 10) Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, et al : *Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. Cancer Res* 1993 ; 53 : 5289-5296
- 11) Di Blasio AM, Cremonesi L, Vigano P, Ferrari M, Gospodarowicz D, Vignali M, et al : *Basic fibroblast growth factor and its receptor messenger ribonucleic acids are expressed in human ovarian epithelial neoplasms. Am J Ob Gyn* 1993 ; 169 : 1517-1523
- 12) Nakamoto T, Chang CS, Li AK, Chodak GW : *Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. Cancer Res* 1992 ; 52 : 571-577
- 13) Durrant LG, Watson SA, Hall A, Morris DL : *Co-stimulation of gastrointestinal tumour cell growth by gastrin, transforming growth factor alpha and insulin like growth factor-I. Br J Cancer* 1991 ; 63 : 67-70
- 14) Yoshida K, Kyo E, Tsuda T, Tsujino T, Ito M, Nimoto M, et al : *EGF and TGF-alpha, the ligands of hyperproduced EGFR in human esophageal carcinoma cells, act as autocrine growth factors. Int J Cancer* 1990 ; 45 : 131-135
- 15) Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al : *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer* 1996 ; 77 : 858-863
- 16) Garver RI Jr, Radford DM, Donis-Keller H, Wick MR, Milner PG : *Midkine and pleiotrophin expression in normal and malignant breast tissue. Cancer* 1994 ; 74 : 1584-1590
- 17) O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al : *Angiostatin : A noble angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell* 1994 ; 79 : 315-328
- 18) Altorki N, Schwartz GK, Blundell M, Davis BM, Kelsen DP, Albino AP : *Characterization of cell lines established from human gastric-esophageal adenocarcinomas. Biologic phenotype and invasion potential. Cancer* 1993 ; 72 : 649-657
- 19) Beranek JT : *Angiogenesis and basic fibroblast growth factor. Br J Plas Surg* 1992 ; 45 : 254
- 20) Thomas KA : *Fibroblast growth factors. FASEB J*

1987 ; 1 : 434-440

- 21) Ueki T, Koji T, Tamiya S, Nakane PK, Tsuneyoshi M : *Expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma. J Path* 1995 ; 177 : 353-361
- 22) Reed JA, McNutt NS, Albino AP : *Differential expression of basic fibroblast growth factor(bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization. Implications for tumor progression. Am J Path* 1994 ; 144 : 329-336
- 23) Harris AL, Fox S, Bicknell R, Leek R, Relf M, LeJeune S, et al : *Gene therapy through signal transduction pathways and angiogenic growth factors as therapeutic targets in breast cancer. Cancer(Suppl)* 1994 ; 74 : 1021-1025