

구강 편평 상피 암종에서 TGF-β1과 MMP-2의 발현과 경부 임파절 전이 간의 상관 관계에 관한 연구

김좌영¹ · Horatiu Rotaru² · 김성곤¹

¹한림대학교 성심병원 구강악안면외과

²Department of Craniomaxillofacial Surgery, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy,
Cluj-Napocca, Romania

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:199-203)

THE CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE EXPRESSION OF TGF-β1 AND MMP-2 RELATED TO THE REGIONAL LYMPH NODE METASTASIS IN THE ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Jwa-Young Kim¹, Horatiu Rotaru², Seong-Gon Kim¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sacred Heart Hospital, Hallym University, Kyoungki-do, Korea

²Department of Craniomaxillofacial Surgery, "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napocca, Romania

Several matrix metalloproteinases (MMPs) have been shown to play an important role in the invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The members of the TGF-β signaling pathway are being considered as predictive biomarkers for progressive tumorigenesis and molecular targets for the prevention and the treatment of cancer and metastasis. The aim of the present study was to find the clinical significance of the expression of TGF-β1 and MMP-2 related to the regional lymph node metastasis in OSCC. This study included 76 cases of primary OSCC, of which 42 cases showed regional lymph node metastases. Immunohistochemistry was used for the localization of protein. The relation between the expression of each protein and clinical variables was statistically evaluated. In results, the expression of TGF-β1 both main mass with lymph node metastasis and without lymph node metastasis was found not to be statistically significant (p>0.05). The expression of MMP-2 was found to be statistically significant related to regional lymph node metastasis (p<0.05). When compared the expression in the metastatic lymph node, TGF-β1 was significantly highly expressed than MMP-2 (p<0.05). In conclusion, the expression of MMP-2 was significantly elevated in patients with lymph node metastasis as compared to the patients without lymph node metastasis, which could be useful in predicting the risk of lymph node metastasis in OSCC.

Key words: Oral squamous cell carcinoma(OSCC), Matrix metalloproteinase-2(MMP-2), TGF-β1, Metastasis

I. 서 론

구강 편평 상피 암종은 세계적으로 여섯 번째로 흔한 악성 종양이다¹⁾. 주변조직의 침윤과 전이가 이 종양의 치료에서 가장 중요한 부분이며 이해하기 어렵고 논란이 많은 부분이다. 경부 임파절로의 전이는 구강암에서 환자의 생존에 주요한 영향을 주지만, 그것이 일어나게 하는 기여 인자는 아직까지 불확실하다.

기존의 연구에 의하면 다양한 종류의 인자들이 구강암에서 발현되는 것으로 밝혀져 있고 그 중에 일부는 치료의 예후와 연관하여 관련이 깊은 것으로 보고되어있다. 특히 종양의 전이와 관계하여서는 matrix metalloproteinase (MMP) 계통의 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어왔고²⁾ 세포 간 결합에 관여하는 integrin 계통의 단백질도 역시 중요하다고 보고되어왔다. Matrix metalloproteinase (MMP) 계통의 효소들은 위장관의 종양에서 전이에 관여하는 것으로 보고되어있다³⁾. 구강암의 예후와 연관하여서는 MMP-2과 MMP-9가 중요하다고 보고된 바 있다⁴⁾. MMP-2는 다른 장기에서는 일부 종양의 전이와 관련하여 통계적으로 유의한 결과를 보여준 바 있다⁵⁾. MMP-2는 종양의 전이, 창상 치유, 염증과 같은 여러 생물학적 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 보고된 바 있다⁶⁾. 하지만 MMP-2의 역할에 대하여는 여전히 논란이 되고 있다.

TGF-β1의 발현에 대하여도 많은 논란이 있다. 일부 논문에서는 두경부 악성 신생물의 증식, 침윤 및 전이와 연관이 있다고

김성곤

431-070 경기도 안양시 동안구 평촌동 896번지
한림대학교 성심병원 구강악안면외과

Seong-Gon Kim

Dept. of OMFS, Sacred Heart Hospital, Hallym University,
#896, Pyungchon-Dong, Dongan-Gu, Anyang city, Kyoungkido, 431-070
Republic of Korea

Tel: +82-31-380-3870 Fax: +82-31-387-2475

E-mail: epker@chollian.net

보고되고 있다⁹⁾. 또한 TGF- β 1이 종양 증식의 각기 다른 단계에서 여러 MMP계통의 효소들과 함께 전이과정에 연관이 있을 것이라고도 하였다¹⁰⁾. 하지만 다른 논문에서는 두경부 종양의 예후와 아무런 연관 관계가 없다는 보고도 있었다¹¹⁾. 이러한 모순되는 결과는 TGF- β 1의 기능이 정상 세포에서는 세포의 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하지만 종양에서는 신생혈관의 형성을 돕고 MMP의 발현을 유도하여 종양의 전이에 관여하기 때문으로 믿어진다.

이번 연구에서는 면역조직화학적 방법을 통하여 구강 편평상피암종에서 TGF- β 1 과 MMP-2 의 발현과 경부 임파절 전이 간의 상관 관계에 대해 조사하였다. 이를 통하여 임파절 전이와 TGF- β 1 과 MMP-2의 발현이 관련이 있는지를 밝히고, 기존의 문헌을 고찰하여 이들의 발현과 경부 임파절 전이 사이의 상관관계에 대하여 토의해 보고자 한다.

II. 환자 및 방법

1. 환 자

1998년 1월에서 2003년 12월까지 한림대 부속병원 및 "Tuliu Hatieganu" 대학병원 구강악안면외과에 편평상피암종으로 내원한 76명의 환자를 대상으로 하였다. 연령은 27세에서 82세까지였다 (Table 1). 남자 환자가 52명이었고 여자 환자가 24명이었다. 평균 연령은 남자가 61.50 ± 12.90세였고, 여자가 59.94 ± 11.89세였으며 independent sample t-test로 두 군을 비교한 결과 두 군 사이에 차이가 없었다 (P>0.05). 34명의 환자에서는 경부 임파절 전이가 없었고, 42명의 환자에서는 경부 임파절 전이가 있었다. 수술 중에 얻어진 주 종괴와 암종이 전이된 경부 임파절 조직은 추후 이루어질 면역화학염색법을 위하여 포르말린에 고정된 후에 파라핀에 포매하였다.

2. 면역조직화학적 검사

사람의 유전자를 기반으로 얻어진 TGF- β 1 과 MMP-2의 단백질에서 peptide mapping을 시행하여 염소에 주입한 후 얻어진 polyclonal antibody를 사용하였으며, 이는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 면역화학검사를 위해 표본을 4 μ m 두께로 절단하였다. 배양을 제외한 모든 과정은 실온에서 행해졌다. 면역화학 염색법은 Universal LSAB[®]+ Kits (Dako, Glostrup, Denmark)를 이용하여

시행하였는데, 방법은 제조사에서 제공한 지침서에 따라서 시행하였고 다음과 같다.

표본에서 파라핀을 제거하고 합수시킨 후 메탄올에서 7분간 3% 과산화수소로 처리하여 내재성 peroxidase를 차단하였다. 표본을 PBS로 세척한 후 10% 정상 가토 혈청에서 30분간 전배양을 시행하였다. 이 표본을 1차 항체와 함께 4°C에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 표본을 phosphate buffered saline (PBS)로 5분간 3회 세척한 후 2차 항체로 15분간 배양하였으며, 이것을 다시 PBS로 5분간 3회 세척한 후 streptavidine에서 15분간 배양하였다. 이를 PBS로 5분간 3회 세척한 후에 0.05% 3,3-diaminobenzine과 0.03% hydrogen peroxide의 50mM Tris-HCl 완충액에 3분 동안 담구어 발색시켰다. 역 염색은 Mayer hematoxylin으로 시행하였다.

완성된 시편을 이중맹(二重盲)의 방법으로 두 사람의 시험자가 독립적으로 검사하여 DAB 발색이 암종에서 보이는 경우를 양성으로 판정하고 보이지 않는 경우를 음성으로 판정하였다. 경부 임파절 전이가 있는 군과 없는 군 사이의 발현 차이는 Chi-square test를 이용하여 검증하였으며 통계적인 유의수준은 P<0.05로 하였다. 또한 전이된 암종을 함유하고 있는 임파절 시편에서도 TGF- β 1과 MMP-2의 발현차이를 비교하였으며 이는 paired samples t-test로 검증하였고 역시 유의수준은 P<0.05로 하였다.

III. 결 과

면역조직화학적 검사 결과 TGF- β 1는 임파절 전이가 있는 군과 임파절 전이가 없는 군 모두에서 관찰되었는데, 발현 정도에 통계적으로 유의할만한 차이는 관찰되지 않았다 (p>0.05; Table 2). MMP-2는 두 집단 모두에서 관찰되었는데, 발현 정도에 통계적으로 유의할만한 차이가 인정되었다 (p<0.05; Table 2). 전이된 암종을 함유하고 있는 임파절 시편에서도 TGF- β 1과 MMP-2가 관찰이 되었는데, 발현 정도를 서로 비교한 결과 TGF- β 1이 MMP-2에 비하여 통계적으로 유의할만한 수준으로 과도하게 발현되었다 (p<0.05; Table 3). 성별, 나이, 종양의 진행 단계, 종양의 분화 정도, 흡연 습관 등의 임상-병리적 차이간에는 TGF- β 1과 MMP-2의 발현 정도에 유의할 만한 차이를 관찰하지 못했다 (p>0.05).

한편, TGF- β 1의 발현비율은 임파절 전이가 있는 주 종괴에서 88.1% 발현되었으며, 전이된 암종을 함유하고 있는 임파절 시편에서는 75.0% 발현되어, 임파절 전이가 있는 주 종괴보다 전이된 임파절 상의 종양세포에서 발현이 감소되었고, MMP-2의 경우에도 주 종괴에서 69.0%가 발현되었고, 전이된 임파절 상의 종양세포에서는 53.6%가 발현되어 발현이 줄어든 양상으로 보였다 (Table 2, 3). 하지만 이것을 전체적으로 비교하면 TGF- β 1의 경우 주 종괴에서 82.9% 발현 대비 전이된 임파절에서 75.0%로 다소 감소되나 MMP-2의 경우 주 종괴에서 52.6% 대비 전이된 임파절에서 53.6%로 큰 차이를 보이지 않는다

Table 1. Summary of patients

	Male	Female
Number of patients	52	24
Age	61.50 ± 12.90	59.94 ± 11.89

Table 2. The expression of TGF- β 1 and MMP-2 in the main mass

	TGF- β 1			MMP-2		
	positive	negative	p-value	positive	negative	p-value
Main Mass without lymph node metastasis	26	8	0.227	11	23	0.002
Main Mass with lymph node metastasis	37	5		29	13	

Table 3. The expression of TGF- β 1 and MMP-2 in the metastatic lymph node

	TGF- β 1	MMP-2	P-value
Positive	21 (75.0%)	15 (53.6%)	0.015
Negative	7 (25.0%)	13 (46.4%)	

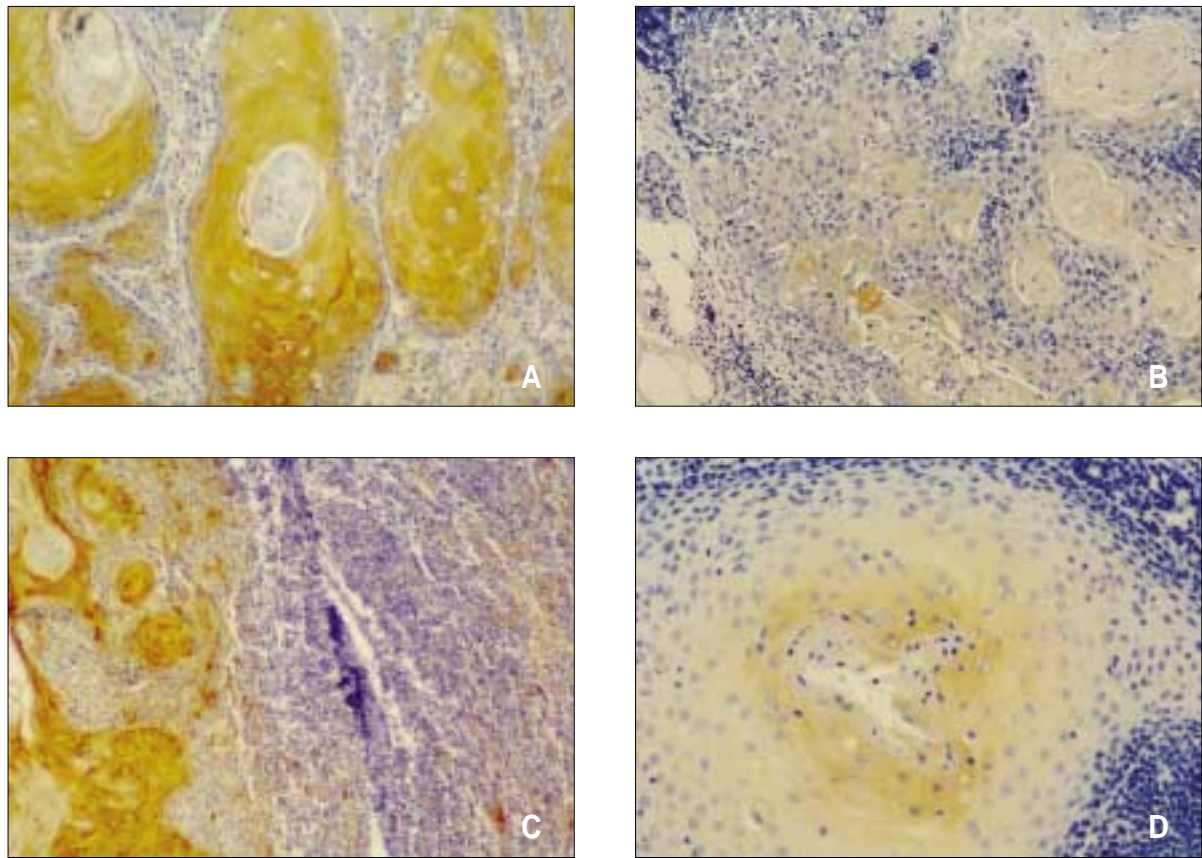


Fig. 1. Immunohistochemical findings.

A. The expression of TGF- β 1 in the main mass. B. The expression of MMP-2 in the main mass. C. The expression of TGF- β 1 in lymph node. D. The expression of MMP-2 in lymph node. The original magnification was $\times 100$.

(Table 2, 3). 전이된 임파절에서 TGF- β 1과 MMP-2의 발현 정도를 비교한 결과는 TGF- β 1의 발현이 MMP-2의 발현에 비하여 통계적으로 유의할 수준으로 높았다 ($p < 0.05$; Table 3).

IV. 고 찰

본 연구에서는 구강편평상피암종에서 TGF- β 1과 MMP-2의 발현 정도를 연구하여 MMP-2의 발현이 경부 임파절 전이와

통계적으로 유의할만한 상관관계가 있음을 보였고 (p<0.05; Table 2), 전이된 임파절 상의 종양세포에서는 TGF-β1가 MMP-2에 비하여 더 많이 발현됨을 보였다 (p<0.05; Table 3).

Nakagawa 등은 임파절 전이가 없는 악성 조직과 비교해서 임파절 전이가 있는 악성 조직에서 MMP-2의 활성 비율이 유의하게 상승되어 있음을 보여주었으며, MMP-2와 MMP-9의 작용은 종양세포의 전이 잠재력과 밀접한 관련이 있음을 보여 주었다^{12,13}. Patel 등도¹⁴ 인접 정상 조직과 비교하여 악성 조직에서 MMP-2와 MMP-9의 총 활성도가 뚜렷하게 증가하는 것을 발견하였다. 또한 Tokumaru 등은 정상 조직과 비교해서 두경부 편평상피암종의 조직에서 활동성 MMP-2의 뚜렷한 증가를 발견하였다¹⁵. Sutinen 등은¹⁶ 구강 편평상피암종의 임파절 전이에서 MMP-2의 mRNA 발현을 관찰하였으며 이것이 종양 침윤에 독립적인 역할을 할 것이라고 확신했으며, Liu 등은¹⁷ 구강 편평상피암종에서 MMP-2의 발현은 구강 편평상피암종의 임파절 전이를 판단하는 지수로 고려될 수 있을 것이라고 했다.

한편 Katayama 등은¹⁸ 임파절 전이나 원격전이 그리고 안 좋은 예후등과 MMP-9 발현이 뚜렷하게 관련이 있다고 하였으나¹⁹, 두경부 편평상피암종에서 MMP-2와 MT1-MMP (Membrane type 1-MMP)의 예후적 가치와 임상적 관련은 여전히 논란이 많다고 하였다. 본 연구에서는 원발부위에서 MMP-2의 발현이 경부임파절 전이가 있는 경우가 경부임파절 전이가 없는 경우에 비하여 통계적으로 유의할만큼 높게 나타났다 (p<0.05; Table 2). 따라서 경부임파절 전이와 MMP-2의 발현 사이에는 밀접한 연관관계가 있는 것으로 보인다. 따라서 MMP-2를 구강 편평상피암종의 항-전이 치료의 선택적 분자 목표로 고려할 수 있을 것이며, 더 나아가 이런 환자들의 조절에 아주 유용하게 이용할 수 있을 것으로 생각되며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Jin 등은²⁰ TGF-β가 구강 편평상피암종의 증식과 전이에서 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였지만, Paterson 등은¹¹ 정상 구강상피, 원발성 종양 및 임파절 전이가 있는 종양간에 TGF-β의 발현 정도에 유의할 만한 차이는 없다고 하였다. 본 논문에서도 TGF-β1의 발현 정도는 임파절 전이가 있는 군에서나 없는 군에서 큰 차이를 보이지 않았다 (p>0.05; Table 2).

TGF-β1의 발현비율은 임파절 전이가 있는 주 종괴와 전이된 암종을 함유하고 있는 임파절 시편에서 그 비율이 감소되었고, MMP-2의 경우에도 마찬가지였다. (Table 2, 3). 하지만 이것을 전체적으로 비교하면 TGF-β1의 경우 주 종괴에서 82.9% 발현 대비 전이된 임파절에서 75.0%로 다소 감소되나 MMP-2의 경우 주 종괴에서 52.6% 대비 전이된 임파절에서 53.6%로 큰 차이를 보이지 않는다 (Table 2, 3). 전이된 임파절에서 TGF-β1과 MMP-2의 발현 정도를 비교한 결과는 TGF-β1의 발현이 MMP-2의 발현에 비하여 통계적으로 유의할 수준으로 높았다 (p<0.05; Table 3). 만약 종양의 전이가 주로 주 종괴로부터 일어난다면 임파절 전이가 있는 주종괴에서 전이와 관련이 있는 MMP-2의 발현이 임파절 내의 MMP-2의 발현보다 높게 나타날 것으로 예상된다. 반대로 주종괴보다는 전이된 임파절에서 또

다른 임파절로 전이가 주로 일어난다면 MMP-2의 발현은 전이된 임파절에서 훨씬 높은 빈도로 나타날 것이다. 이번 실험에서 MMP-2의 발현 정도를 보면 임파절 전이가 있는 주 종괴에서 69.0%가 발현되었고, 전이된 임파절 상의 종양세포에서는 53.6%가 발현되어 발현이 다소 줄어든 양상으로 보였다 (Table 2, 3). 따라서 두경부 종양의 전이는 전이된 임파절 간에 이루어지기 보다는 주 종괴로부터 재차 또 다른 임파절로 전이될 가능성이 높을 것으로 사료된다. 따라서 구강 편평상피암종의 전이를 예방하기 위해서는 주 종괴의 완전한 절제 및 조절이 중요하리라 생각된다.

결론적으로 TGF-β1의 발현은 구강 편평상피암종에서 경부 임파절 전이와 연관관계를 찾을 수 없었고 (p>0.05), MMP-2의 경우 경부임파절 전이가 있는 경우에 통계적으로 유의할 만큼 높은 빈도로 발현되었다 (p<0.05). MMP-2의 경우 이미 전이된 임파절에서보다 주 종괴에서 높은 발현을 유지하는 것으로 보아 새로운 임파절로의 전이를 막는 것에는 주 종괴에 대한 근치적 처치가 중요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Dang D, Yang Y, Li X, Atakilit A, Regezi J, Eiseke D, et al: Matrix metalloproteinases and TGF- beta1 modulate oral tumor cell matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:937-942.
- Parkin DM, Laara E, Muir CS: Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41:184-197.
- Gorogh T, Beier UH, Baumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, et al: Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *HEAD NECK* 2006;28:31-39.
- Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, et al: Tissue level of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:413-417.
- Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol* 2000;36:207-213.
- Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E: Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:1911-1917
- Kylmaniemi M, Oikarinen A, Oikarinen K, Salo T: Effects of dexamethasone and cell proliferation on the expression of matrix metalloproteinases in human mucosal normal and malignant cells. *J Dent Res* 1996;75:919-926.
- Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, Furukawa M: Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95:44-50.
- Li Q, Zhou XJ, Zhang ZY, Patima, Chen WT: Evaluation of TGF-beta1 expressed by oral and maxillofacial malignant neoplasm. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2002;11:233-236.
- Dasgupta S, Bhattacharya-Chatterjee M, O' Malley BW, Chatterjee SK: Tumor metastasis in an orthotopic murine model of head and neck cancer: possible role of TGF-beta1 secreted by the tumor cells. *J Cell Biochem* 2006;1:1036-1051.
- Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, et al: Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;193:458-467.
- Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Fujimoto N, Okada Y: Secretion

- of matrix metalloproteinase-2 (72 kDa gelatinase/type IV collagenase = gelatinase A) by malignant human glioma cell lines: implications for the growth and cellular invasion of the extracellular matrix. *J Neurooncol* 1996;28:13-24.
13. Lengyel E, Gum R, Juarez J, Clayman G, Seiki M, Sato H, et al : Induction of M(r) 92,000 type IV collagenase expression in a squamous cell carcinoma cell line by fibroblasts. *Cancer Res* 1995; 55:963-967.
 14. Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, et al: Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005;90:81-88.
 15. Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, et al: Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: Studies of clinical sample and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. *Cancer Lett* 2000;150:15-21.
 16. Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, Vesterlund E, Alexander JP, Overall CM, et al.: Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2 and -3) in oral lichen planus, dysplasia, squamous cell carcinoma and lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1998;77:2239-2245.
 17. Liu LK, Li YN, Jiang HB, He ZX, Yi XZ : The correlation between neck lymph node metastasis and matrix metalloproteinase-2 expression at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinomas. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2004;22:106-108.
 18. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, et al : Expressions of Matrix Metalloproteinases in Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma as Predictive Indicators for Tumor Metastases and Prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:634-640.
 19. Kato K, Hara A, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H, et al: Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:340-346.
 20. Jin X, Li J, Li z, Li Y: Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta) subtypes in oral squamous cell carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2001;19:377-379.