

# 구강 편평상피세포암 동위종양 모델에서 내피세포의 수용체 타이로신 인산화효소에 대한 표적치료

박영욱<sup>1</sup> · 김소희<sup>2</sup>

강릉원주대학교 치과대학 <sup>1</sup>구강악안면외과학교실, <sup>2</sup>약리학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2009;35:55-65)

## TARGETING RECEPTOR TYROSINE KINASE ON ENDOTHELIAL CELLS IN AN ORTHOTOPIC TUMOR MODEL OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Young-Wook Park<sup>1</sup>, So-Hee Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral & Maxillofacial Surgery and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, College of Dentistry, Kangnungwonju National University

**Purpose:** We determined the therapeutic effects of blockade of epidermal growth factor (EGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor tyrosine kinases on the growth of oral squamous cell carcinoma (OSCC) xenografted in athymic nude mice.

**Experimental Design:** We investigated the *in vivo* antitumor effects of a tyrosine kinase inhibitor for EGFR and VEGFR-2, AEE788 in a mouth floor (orthotopic) tumor model. Nude mice with orthotopic tumors were randomized to receive AEE788, paclitaxel, a combination of AEE788 and paclitaxel, or control. Antitumor mechanisms of AEE788 were determined by immunohistochemical/immunofluorescent and apoptosis assays.

**Results:** Tumors of mice treated with AEE788 demonstrated down-regulation of phosphorylated EGFR, phosphorylated VEGFR and their downstream mediators (pMAPK and pAkt), decreased proliferative index, decreased microvessel density (MVD). As a result, growth of the primary tumor and nodal metastatic potentials were inhibited by AEE788.

**Conclusion:** These data show that EGFR and VEGFR can be molecular targets for the treatment of OSCC.

**Key words:** Oral squamous cell carcinoma, Epidermal growth factor receptor, Vascular endothelial growth factor receptor, Nodal metastatic potential

### I. 서 론

구강 편평상피세포암은 조기진단이 안될 경우 기존의 치료법인 광범위한 절제술과 방사선 치료로는 치료한계가 있는 대표적인 구강암이다. 특히 주변 근육이나 골조직으로의 침습과 빈번한 경부 림프절 전이는 환자의 예후를 불량하게 하는 임상적 지표이다<sup>1)</sup>. 구강 편평상피세포암의 재발 병소 역시 국소 부위 즉 경부 림프절 내에서 발생하거나 혹은 원격 전이 부위에서 발생하지만 대부분의 재발은 원발성 병소 주위의 국소 부위를 통해서 발생된다<sup>2)</sup>. 따라서

경부 림프절 전이 병소의 발생을 억제하거나 재발된 국소 부위 악성 병소를 조절할 수 있는 새로운 치료법이 요구되고 있다.

분자표적치료 (targeted molecular therapy)에서는 악성종양에 의하여 발현되어 악성 표현형과 종양의 진행 (progression)에 필수적인 역할을 하는 인자들을 치료 표적으로 한다. 즉 주로 지금까지 인지된 종양유전자 (oncogene)들을 억제하는 방식으로 전임상 실험이 이루어지고, 몇몇 약제는 임상연구 및 환자 치료에 적용되고 있다. 특히 타이로신 인산화효소 억제제는 분자표적치료의 원형으로 만성골수성 백혈병 환자의 90% 이상에서 발현되는 BCR-ABL 융합 유전자에 대한 억제제인 imatinib-mesylate (Gleevec®, Novartis Pharmaceuticals)가 만성골수성 백혈병의 치료에 성공적으로 적용된<sup>3)</sup> 이후 다른 타이로신 인산화효소를 억제할 수 있는 소분자 물질에 대한 개발이 이루어졌다. NVP-AEE788 (AEE788: Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland)은 EGFR/ErbB2(HER-2)와 VEGFR-2 타이로신

#### 박영욱

210-702 강원도 강릉시 강릉대학교로 120  
강릉원주대학교 치과대학 구강악안면외과

#### Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnungwonju National University  
Gangneung Daehangno 120, Gangneung, Gangwon-do, 210-702, South Korea  
Tel : 82-33-640-3183, 3100 Fax : 82-33-640-3103  
E-mail : ywpark@kangnung.ac.kr

\*This study was supported by a grant of the Korea Healthcare technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea. (A080293)

인산화효소에 대한 억제능이 있는 소분자 물질로 EGFR을 과발현하는 폐암, 두경부 편평상피세포암, 유방암, 진행된 위암, 결장직장암, 난소암, 전립선암 그리고 뇌신경교종 세포의 증식을 억제하고, 마우스에 이종이식된 폐암과 전립선암 모델에서 항종양 효과를 보였다.<sup>4)</sup> AEE788의 주요 표적물질인 상피성장인자 수용체 (epidermal growth factor receptor; EGFR)는 구강점막 편평상피세포암에서도 종종 과발현되며<sup>5)</sup>, 환자의 악성 예후와도 연관이 있는 것으로 밝혀지고 있는<sup>6)</sup> 성장인자로 수용체 타이로신 인산화효소의 작용에 의하여 활성화된다.

위와 같은 배경에서 본 연구진은 EGFR/VEGFR 동시억제가 구강점막 편평상피세포암의 증식과 전이를 억제할 것이라는 가설을 설정하고, EGFR/VEGFR에 대한 분자표적치료 효과를 생체내 실험을 통하여 결정하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 1. 세포주 및 세포배양

인간 구강 편평상피세포암종으로부터 확립된 세포주 4종이 본 실험에 이용되었다. KB (KCLB No. 10017)와 YD-10B (KCLB No. 60503) 및 YD-38 (KCLB No. 60508) 세포주는 한국세포주 은행 (Seoul, Korea)으로부터 통해 구입하였으며, SCC9은 한림대학의 김성곤 교수로부터 분주받았다. KB 세포주는 10% 우태혈청 (fetal bovine albumin, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), 100 units/ml penicillin (Invitrogen) 및 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen)을 사용하였으며 SCC9 세포주는 DMEM/F-12 HAM 배지 (1:1, v/v, Invitrogen)를 사용하였다. YD-10B 및 YD-38 세포주는 10% 우태혈청,  $1 \times 10^{-5}$  M chlorea toxin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 5 mg/ml insulin (Green Cross Corp., Seoul, Korea), 100 units/ml penicillin (Invitrogen) 및 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen)이 함유된 DMEM 배지를 사용하였으며 모든 세포주들은 단일층으로 배양하였다. 또한 세포들은 55% 습도를 유지하면서 5% CO<sub>2</sub>/95% 공기 상태로 37°C에서 배양하였다.

### 2. 시약

AEE788 (분자량: 440.6)은 7H-pyrrolo[2,3-d] 피리미딘계 화합물로서 경구 투여로 효과를 보이는 소분자 합성 물질로 Novartis Pharmaceuticals로부터 연구목적으로 제공받았다. 생체내 투여를 위해 AEE788을 90% polyethylene glycol 300+10% 1-methyl-2-pyrrolidinone에 녹여 6.25mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다. 탁솔제제인 paclitaxel(팍셀주)은 (주)한미약품에서 제공받아 정주용 생리식염수에 5배로 희석하여 사용하였다.

### 3. Immunoblot Analysis

각 세포를 solubilization buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% (w/v) NP-40, 0.1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 및 10 µg/mL aprotinin)에 lysis시킨 후 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 cell debris를 제거하고 상등액만 모아 BCA (Sigma) 시약으로 단백질 정량 후 20-30 µg의 단백질을 7.5% (w/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 분리된 단백질을 nitorocellulose membrane (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, U.S.A.)에 transfer 하였다. 5% (w/v) 탈지분유와 0.05% (v/v) Tween-20이 함유된 phosphate-buffered saline (PBST) 용액에 membrane을 담그고 상온에서 2시간 blocking한 후 1차 항체로 polyclonal anti-human EGFR과 phosphophorylated EGFR (pEGFR; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.)을 5% bovine serum albumin (Sigma)가 함유된 PBST에 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 밤새 결합시켰다. 이때 anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.)를 내부 표준 단백질로 사용하였다. Horseradish peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, U.S.A.)를 1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 결합시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK)를 사용하여 EGFR 및 pEGFR 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

### 4. 실험동물

생후 6주된 웅성 누드 마우스 (BALB/cAnNCrj)를 업체 (Orient Bio, Seoul, Korea)로부터 구입하여 7주 시점에서 실험에 이용하였다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서 국립 강릉원주대학교 치과대학의 실험동물 관리원칙 (Animal Care and Use Guidelines)에 의거하여 사육하였다.

### 5. 동위종양 유도를 위한 종양세포 이종이식술

생체내 이종이식을 위한 세포 부유액 (cell suspension)을 만들기 위하여 배지에 포화상태에 이르지 않은 KB 세포를 트립신 처리 (0.25% 트립신+0.02% EDTA) 후  $5 \times 10^5$ 개의 종양세포를 70µl의 Ca<sup>2+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>가 함유되지 않은 HBSS (Hanks' balanced salt solution)에 부유시켰다. 마취상태를 유도하기 위하여 zolazepam (Zoletil®, France) 1.5 mg/kg과 xylazine hydrochloride (Rumpun®, Bayer Korea, Korea) 3.5 mg/kg의 혼합액을 대퇴부에 근육주사 하였다. 10분 경과 후, 1ml 시린지와 27게이지의 주사침을 사용하여 40마리의 누드 마우스의 구강저 부위, 즉 피부쪽에서 주사침을 삽입하여 양측 교근사이의 조직공간으로 진행한 후 구강점

막하 조직내에 정해진 종양세포를 이종이식하였다.

## 6. 실험동물의 치료

KB 세포는 마우스에서 종양발생능이 있다고 검증된 세포주로서,  $5 \times 10^6$ 개의 종양세포를 누드 마우스에 이종이식하면 5-7일 경과후 종양결절이 생기는 것을 예비실험을 통하여 알고 있었기에 종양 치료는 종양세포 이종이식 1일 후부터 시작하였다. 40마리의 실험동물을 무작위로 4군 ( $n=10$ )으로 분류하여 1군은 대조군, 2군은 탁솔치료군, 3군은 AEE788 치료군, 그리고 4군은 탁솔과 AEE788의 복합치료군으로 치료실험을 진행하였다. 즉 1군은 AEE788의 용매만을 gavage 니들을 이용하여 1주에 3회 경구투여함과 동시에 탁솔제제의 희석액인 생리식염수를 1주에 2회 복강내 주사하였다. 2군은 종양세포 이식 3일 후부터 paclitaxel을 1마리당 1회에  $100 \mu\text{g}$ 을 생리식염수에 희석하여  $0.2 \text{ mg/dose}$ 로 주 2회 (월, 목) 복강내에 주사하였다. 3군은 AEE788  $50 \text{ mg/kg}$ 를 1-methyl-2-pyrrolidinone과 polyethylene glycol의 복합용매에 녹여  $0.2 \text{ mg/dose}$ 으로 종양세포 이식 다음 날 부터 주 3회 (월,수,금) 경구투여 하였고, 4군의 경우 2군과 3군의 처방을 복합 적용하였으며 대조군과 모든 실험군은 6주간 치료하였다.

## 7. 부검

종양세포 이종이식 후 실험동물은 종양이 인지될 때까지 매일 관찰되었고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 (월, 목요일) 종양의 증식을 기록하였다. 종물의 크기는 캘리퍼를 이용하여 그 장경과 단경을 cephalad-to-caudad/left-to-right 로 측정, 기록한 후 종양의 부피를 다음의 공식으로 산출하였다<sup>8)</sup>; (장경)×(단경)<sup>2</sup>× $\pi/6$ ,  $\pi=3.14$ . 실험동물의 체중 역시 1주에 2회 동일 시점에서 측정, 기록하였다. 희생시에는 Zoletil과 Rumpun을 이용하여 안락사 후, 원발성 종양 부위를 절제하여 그 무게를 측정한 후 종물을 이등분하여 반은 헤마톡실린-에오신 염색을 위하여 포르말린 고정 후 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 신선도를 유지하기 위하여 냉동고 ( $-70^\circ\text{C}$ )에 보관하였다. 원발성 종양외에도 좌,우측 경부 림프절 각각 2개씩 총 4개와 폐조직, 그리고 간조직을 절제하여 전이병소 발생 여부에 대한 조직학적 검사를 시행하였다.

## 8. 면역조직화학염색을 위한 항체 및 시약

면역조직화학염색에는 다음의 일차항체들이 사용되었다: polyclonal rabbit anti-EGFR, anti-VEGFR-2(Flk1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), anti-pEGFR (Try1173; Biosource International, Camarillo, CA, U.S.A.), anti-phospho-VEGFR-2/3 (pVEGFR-2/3; Oncogene, Boston,

MA, U.S.A.), anti-HER2/ErbB2, anti-phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (Thr202/Tyr204, pMAPK), anti-phospho Akt (Ser473, pAkt; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A.), mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) clone PC-10 (DAKO), 그리고 rat anti-mouse CD31-PECAM-1 (PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.). 이차항체로는 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG, peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, U.S.A.), peroxidase-conjugated rat anti-mouse IgG2a (Serotec, Harlan Bioproducts for Science, Inc., Indianapolis, IN, U.S.A.), 그리고 Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.)가 적용되었으며, 면역조직화학염색을 위한 발색시 DAB (3,3'-diaminobenzidine, Research Genetics, Huntsville, U.S.A.)이 사용되었다.

## 9. 면역조직화학/면역형광 염색

HER2, pMAPK, PCNA 염색을 위해서는 파라핀 포매 조직을 이용하였으며, 면역형광염색을 위한 EGFR, pEGFR, VEGFR-2, pVEGFR-2/3, 또한 항체의 민감도를 고려하여 pAkt, 그리고 항체 제조사의 지시대로 CD31 염색을 위해서는 냉동조직을 이용하여 면역조직화학염색과 면역형광염색을 다음과 같이 시행하였다.

파라핀 포매된 조직을  $4-6 \mu\text{m}$ 로 세절하여 생긴 조직절편을 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올려놓고,  $57-60^\circ\text{C}$  정도의 열을 30-40분 정도 가하여 왁스성분의 제거를 용이하게 하였다. 자일렌 용액으로 왁스를 제거하고 계열 알코올 용액으로 재수화시킨 후 PBS (phosphate buffered solution)를 이용하여 마르지 않게 하였다. 항원성 회복(antigen recovery)을 위하여 PCNA 염색의 경우 조직 슬라이드를 물에 담그어 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 5분간 강가열 하였으며, HER2와 pMAPK 염색의 경우 조직 슬라이드를 10mM sodium citrate 완충액(pH6.0)에 담근 상태에서 전자렌지에서 마이크로웨이브를 이용하여 2분 30초간 강가열 후 7분 30초간 약가열 하였다<sup>9)</sup>.

냉동조직의 경우  $8-10 \mu\text{m}$ 로 세절하여 양성 전하를 띤 슬라이드 위에 올리고 30분간 건조시킨 후 차가운 아세톤에 5분, 아세톤/클로로포름 (1:1) 용액에 5분, 그리고 아세톤에 5분간 고정하고 PBS로 수세하였다.

이후 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위하여 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  메탄올 용액에서 12분간 두었다. 조직절편을 다시 PBS로 3분간 3차례 수세 후, 상온에서 비특이 단백질의 결합을 차단하기 위하여 5% 정상 말혈청과 1% 정상 양혈청을 PBS에 섞은 단백질 차단액에 20분간 반응시켰다. 단백질 차단액 제거 후 단백질 차단액에 다음과 같이 일차항체를 희석하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 결합시켰다; EGFR

(1:200), pEGFR (1:100), HER2 (1:50), VEGFR-2 (1:200), pVEGFR-2/3 (1:100), pMAPK (1:100), pAkt (1:200), PCNA (1:200) CD31 (1:400).

PBS로 3분간 3차례 수세하고 단백 차단액을 10분간 적용한 후, 단백 차단액을 제거하고 단백 차단액에 1:500으로 희석시킨 이차항체를 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 3분간 3차례 수세 후 브리지 용액 (50ml PBS에 brij용액 1방울을 떨근 후 pH를 7.6으로 맞춤)으로 린스하고, 발색반응을 위하여 DAB을 적용하였다. 이때 발색반응을 현미경으로 확인해가며 적정시간 적용하되 10분을 넘지 않도록 한다. 증류수로 3분간 3회 수세 후 브리지 용액으로 린스하고, 헤마톡실린 (Gill's hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 대조염색을 10-20초간 시행하였다.

EGFR/pEGFR, VEGFR-2/pVEGFR-2/3 면역형광염색 시 녹색 형광의 적용은 조직절편을 실온에서 1시간 Alexa Fluor 488-conjugated IgG (1:400)에 반응시킨 후 90% glycerol과 10% PBS 혼합액으로 fluorescent bleaching 하였다.

#### 10. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling

종양세포에 대한 아포프토시스 분석을 위하여 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) 키트 (TdT FragEL DNA Fragmentation Detection Kit, EMD Bioscience Inc., San Diego, CA, U.S.A.)를 이용하여 다음과 같이 염색을 시행하였다. 즉 조직표본을 4% paraformaldehyde에서 10분 고정 후 PBS로 5분간 2회 수세하고 0.2% Triton X-100에 15분간 배양하였다. 다시 PBS로 5분간 2회 수세 후 평형완충액 (equilibration buffer)에서 10분간 배양하였다. 평형완충액을 흘려 버리고 44 $\mu$ L 평형완충액과 44 $\mu$ L nucleotide mix, 그리고 1 $\mu$ L terminal deoxynucleotidyl transferase가 함유된 반응완충액을 적용하여 빛을 차단하고 37 °C, 습윤상태에서 1시간 반응시켰다. 조직절편을 2 $\times$ SSC에 15분간 담그어 반응을 중지시키고, 여분의 fluorescein-dUTP를 제거하기 위하여 PBS로 수세하였다.

#### 11. CD31/TUNEL 이중 면역형광염색

종양 내피세포에 대한 아포프토시스 분석을 위하여 다음과 같이 CD31/TUNEL 이중 면역형광염색을 시행하였다. 즉 냉동조직을 이용하여 위에서와 같이 CD31 일차항체 적용 후, 적색형광 적용을 위하여 빛을 차단한 상태에서 Alexa Fluor 594-conjugated IgG (1:600)에 1시간 반응시키고 PBS 수세 후 TUNEL 염색과정을 시행하였다.

#### 12. 면역조직화학/면역형광 염색에 대한 정량분석 및 통계

희생시 치료의 종류에 따른 종양 무게의 비교는 Wilcoxon rank-sum test로 검정하여 역시 유의수준 0.05이하에서 그 차이를 인정하였다. 또한 실험동물에서 치료의 종류에 따른 경부 림프절, 그리고 폐 전이병소 발생에의 영향을 평가하기 위하여 Fisher's exact test을 이용하여 분석하였으며 유의수준 0.05이하에서 그 차이를 인정하였다<sup>9)</sup>.

PCNA 발현과 TUNEL 염색된 종양세포의 정량화를 위해서는 군당 10개의 슬라이드를 무작위로 선택하여  $\times 100$  현미경야에서 조직 표본 1당 주변부의 종양세포가 괴사되지 않은 부위에서 무작위로 0.159 mm<sup>2</sup> 영역을 1군데씩 선택하여 양성 반응을 보인 세포수와 전체 세포수를 계수한 후 그 비율을 백분율로 표시하였다. 각 군간의 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 0.05 이하의 two-tailed P값을 유의성 있는 차이로 인정하였다.

미세혈관밀도 (microvessel density)를 제시하기 위하여 내피세포 표지자인 CD31에 의해 염색된 표본에서 종양관련 내피세포의 농도를 구하였다. 먼저  $\times 40$  현미경야에서 종물의 주변부에서 종양관련 신생혈관이 집중적으로 분포된 부위를 확인한 후, 그 부위에서 100배의 배율로 렌즈를 바꾸었다. 각군별 10 표본에서 조직 슬라이드 1개당 1부위씩 가장 밀도가 높다고 여겨지는 부위를 택하여 0.159 mm<sup>2</sup> 영역에서 CD31 항체에 의해 주변부가 완전히 염색된 혈관의 수를 결정한 후<sup>10)</sup>, 역시 Wilcoxon rank-sum test를 시행하여 군간 비교를 시행하였다.

CD31/TUNEL 이중염색에 양성반응을 보인 세포의 정량화를 위해서는 각군별 10개 영역에서 양성반응을 보인 세포의 수를 계수하였다. 즉  $\times 400$  현미경야하에서 0.011 mm<sup>2</sup> 영역을 택하여<sup>11)</sup> CD31 양성반응인 적색형광과 TUNEL 염색인 녹색형광이 혼재된 노란색 세포의 수를 계수하여 군간 비교는 Wilcoxon rank-sum test를 시행하였다.

### III. 연구결과

#### 1. OSCC 세포주에서 EGFR의 발현과 활성화 상태

세포 분쇄액에 대한 웨스턴 블롯팅 결과 4종의 구강점막 편평상피세포암 세포주에서는 정도의 차이는 있었으나 모두에서 EGFR이 발현되었다. 그러나 phosphorylated EGFR의 경우 SCC9에서는 발현되지 않았으며, KB, YD10B, YD38의 경우 세포주의 상태에 따라 발현이 관찰되기도 하고 관찰되지 않기도 하였다 (Fig. 1).

#### 2. 동위종양 모델에서 AEE788 치료 효과

AEE788의 생체내 항종양 효과를 평가하기 위하여 구강암 세포주 중 EGFR이 과발현되고 활성화되어 있는 KB 세

포를 누드 마우스의 구강저에 이종이식한 후 AEE788과 paclitaxel로 치료하였다. 종양세포 이식 후 5-6주경 식이의 어려움으로 실험동물의 체중이 급격히 감소하여 6주째에 치료를 종결하고 모든 실험동물을 희생하였다. 각 실험군의 종물증식 속도는 종양의 부피로 표현한 종양성장곡선에서 (Fig. 2)와 같았다. 즉 종양세포 이식 후 3주 이후부터 AEE788 치료군과 AEE788과 paclitaxel 복합치료군에서의 종양 부피는 대조군이나 paclitaxel 치료군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 치료실험 5주 이후부터는 paclitaxel 치료군의 종양 부피도 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 희생시점에서 종양의 무게는 1군에서 4군까지 각각  $2.8 \pm 0.3$ ,  $2.3 \pm 0.2$ ,  $1.3 \pm 0.2$ ,  $1.2 \pm 0.3$  g이었다 (Fig. 3). 즉 평균 종양무게 기준으로 대조군과 비교하여 종양세포 이식 후 6주 시점에서 paclitaxel 치료군에서는 18%, AEE788 치료군에서는 54%, 그리고 AEE788과 paclitaxel 복합치료군에서는 57%의 종양증식 억제가 관찰되었다.

실험동물의 희생 시점에서 검색한 전이병소 발생을 살펴보면 먼저 대조군의 경우 경부 림프절 전이병소가 발생한 개체의 비율은 10%였고, 폐전이 병소는 발생되지 않았다. paclitaxel 치료군에 있어서도 20%의 실험동물에서 경부 림프절 전이병소가 발생하였으며 폐전이 병소는 역시 발생되지 않았다. 반면에 AEE788 치료가 이루어진 실험군에 있어서는 경부 림프절 전이병소가 발생되지 않았다. 그러나 대조군과 실험군간의 통계적 유의성은 없었다 (Table 1).

3. AEE788이 수용체 타이로신 인산화효소에 미치는 효과

AEE788이 인간 구강암 이종이식체인 마우스 종물의 종양세포에서 종양관련 신호전달계에 미치는 영향을 평가하기 위하여 대조군과 각 치료군의 종물 조직에서 EGFR/pEGFR, HER-2, VEGFR-2/pVEGFR-2/3, pMAPK, 그리고 pAkt의 발현정도를 파악하였다. 그 결과 EGFR, HER-2, 그리고 VEGFR-2의 발현정도는 대조군과 각 치료군간에 차이가 없었다. 그러나 pEGFR, pVEGFR-2/3, pMAPK, 그리고 pAkt의 발현정도는 AEE788 치료가 된 실험군에서 그 발현이 감소하였다 (Fig. 4).

4. AEE788이 종양세포 증식성에 미치는 효과

AEE788이 종양세포의 증식성에 미치는 효과를 검증하기 위하여 PCNA 염색을 시행한 결과 PCNA 양성세포의 비율은 대조군과 비교하여 AEE788 치료군과 AEE788과 paclitaxel 복합치료군에서 유의하게 감소하였다 ( $P < 0.05$ ; Table 2, Fig. 5).

5. AEE788이 미세혈관밀도에 미치는 효과

AEE788이 미세혈관밀도에 미치는 효과를 알아보기 위하여 CD31 염색을 시행한 결과 CD31에 의하여 염색된 미세혈관/림프관의 수는 대조군과 비교하여 AEE788 치료군과 AEE788과 paclitaxel의 복합치료군에서 유의하게 감소

**Table 1.** *In vivo* effect of therapy with AEE788, paclitaxel, or both for OSCC orthotopic tumors growing in the mouth floor of nude mice.

Treatment group	Incidence of cervical metastasis	Incidence of lung metastasis	Tumor weight (g), Mean $\pm$ SD
Control	1/10	0/10	$2.8 \pm 0.3$
Paclitaxel (100 $\mu$ g/injection, twice weekly)	2/10	0/10	$2.1 \pm 0.3$ †
AEE788 (50mg/kg, thrice weekly)	0/10	0/10	$1.4 \pm 0.4$ †
Paclitaxel + AEE788	0/10	0/10	$1.3 \pm 0.3$ †

†  $P < 0.05$  as compared with control (Wilcoxon rank-sum test)

**Table 2.** Quantitative immunohistochemical and TUNEL analyses

Treatment group	PCNA(%)	MVD*	TUNEL(%)	CD31/TUNEL(%)
Control	$78.9 \pm 7.7$	$12.3 \pm 4.2$	$3.4 \pm 2.3$	0
Paclitaxel (100 $\mu$ g/injection, twice weekly)	$70.3 \pm 8.9$	$11.7 \pm 3.8$	$7.9 \pm 2.2$ †	0
AEE788 (50mg/kg, thrice weekly)	$45.1 \pm 10.2$ †	$2.4 \pm 1.1$ †	$15.7 \pm 4.1$ †	$6.1 \pm 3.3$ †
Paclitaxel + AEE788	$40.3 \pm 9.4$ †	$2.5 \pm 1.3$ †	$17.1 \pm 3.4$ †	$5.7 \pm 4.2$ †

Oral squamous cell carcinoma cells (KB cell) were xenografted into the mouth floor of nude mice. Treatments were performed as described in Materials and Methods. Specimens were processed 6 weeks after xenograft of tumor cells.

Mean  $\pm$  SD labeling index

\*MVD was determined by measuring the number of completely stained blood/lymphatic vessels in 10 random 0.159 mm<sup>2</sup> fields at  $\times 100$  magnification.

†  $P < 0.05$  as compared with control (Wilcoxon rank-sum test)

하였다 ( $P<0.05$ ; Table 2, Fig. 5).

#### 6. AEE788에 의한 종양세포와 종양 내피세포의 아포프토시스

AEE788이 종양세포의 아포프토시스에 미치는 효과를 알아하기 위하여 TUNEL 염색을 시행한 결과 종물 내에서 아포프토시스된 종양세포의 비율은 대조군과 비교하여 paclitaxel 치료군, AEE788 치료군, 그리고 AEE788과 paclitaxel 복합치료군에서 유의하게 증가하였다. 또한 CD31/TUNEL에 이중염색되어 노란색을 양성반응으로 보인 아포프토시스된 종양관련 혈관/림프관 내피세포의 비율은 대조군과 비교하여 AEE788 치료군과 AEE788과 paclitaxel의 복합치료군에서 유의하게 증가하였다 ( $P<0.05$ ; Table 2, Fig. 5).

### IV. 총괄 및 고찰

본 연구를 통하여 저자 등은 구강점막 편평상피세포암종에서 종양 증식과 전이에 대한 종양 생물학적 기전을 차단하여 의미있는 결과를 도출하고, 생체내 반응 결과를 제시하였다. 구강 편평상피세포암의 예후를 평가할 수 있는 인자들 중 단일인자로서 가장 큰 영향을 미치는 것은 경부 림프절 전이 여부이다<sup>12)</sup>. 따라서 본 연구에서는 림프절 전이 성향이 강한 구강 편평상피세포암종의 임상적 특성을 실험동물에서 재현하기 위하여 인간 구강 편평상피세포암으로부터 확립된 세포주를 면역결핍된 마우스의 구강저 부위에 이종이식하여 원발성 종양과 경부 림프절 전이병소를 유도해 낸 구강암 동위종양 (orthotopic tumor) 모델을<sup>6)</sup> 이용하여 EGFR과 VEGFR에 대한 표적치료 효과를 실험적으로 검증하였다.

먼저 본 연구를 시작하기 위하여 유전적으로 불안정하여 종양 생물학적 다양성을 나타내는 악성종양의 특성을 고려하여 4종의 구강 편평상피세포암 세포주에서 주요 치료 표적인 EGFR의 발현 여부와 그 활성화 상태를 결정하였다. 하나의 세포주당 각기 다른 passage에서 시행된 3회의 웨스턴 블롯팅 결과 3종의 세포주에서 EGFR이 세포주의 상태에 따라 활성화되어 있음이 관찰되었다. 정량적 분석은 시행하지 않았으나 육안적 판정에서 비교적 EGFR이 상대적으로 과발현되고 활성화되어 있는 YD10B 세포의 경우 본 연구진의 기존 연구에서 마우스에 이종이식 하였을 때 그 종양 증식능이나 전이능이 강하지 않은 것으로 밝혀졌고<sup>13)</sup>, YD38의 경우 종양 발생능과 전이능에 대한 예비검증이 이루어지지 않아 최종적으로 KB 세포를 실험동물에 이종이식 하였다.

구강저 부위에 제작한 구강암 동위종양은 대조군의 경우 종양세포 이종이식 1주일 후 육안으로 인지 가능한 종양결절을 형성한 후 급속하게 증식하였다. 이 종물의 증식은 약물투여 6주 시점에서 종양세포내 microtubule stabilizer인

paclitaxel에 의하여 18 % 감소하였고, EGFR/VEGFR 타이로신 인산화효소 억제제인 AEE788에 의하여 54 % 감소하였다. 본 연구진의 선행연구에서 EGFR에 대한 단일클론항체인 cetuximab과 paclitaxel을 적용한 결과 치료 후 8주 시점에서 cetuximab에 의한 피하종양 증식억제 효과는 paclitaxel에 의하여 상승되었다<sup>13)</sup>. 그러나 본 연구에서 유사한 EGFR 억제제인 AEE788과 paclitaxel의 복합치료시 AEE788 단독 치료군과 비교하여 부가적인 종양증식 억제 효과는 관찰되지 않았다. 그러나 이는 치료기간에 영향을 받을 수 있을 것으로 생각되어 섭생의 어려움으로 인하여 치료기간이 단축되지 않았다면 AEE788과의 복합치료시에도 상승효과가 나타날 것으로 분석하였다. AEE788에 의한 종양증식 억제효과는 본 연구결과 종양세포에서의 세포증식 표지자인 PCNA에 대한 면역염색 반응정도를 정량적으로 분석한 결과에서도 확인되었다.

본 실험에서 종양세포 이종이식 6주 경과 시점에서 구강저 동위종양은 18-20 mm 까지 성장하여 실험동물들은 섭생불가로 안락사되었다. 이와 같은 이유로 구강저에 유도된 종양세포가 원격 전이병소를 형성할 수 있는 충분한 시간을 확보하지 못한 것으로 판단되며, 추가적으로 본 연구진의 선행연구 결과에서도 KB 세포가 누드 마우스의 구강저에서 폐전이 병소 유도율이 이종이식 13주 후 5 %로 낮았던 결과<sup>6)</sup>를 고려해 볼 때 구강암 세포주의 일종인 KB 세포는 혈행성 전이능이 매우 낮은 것으로 여겨진다. 본 실험에서 경부 림프절 전이율 역시 대조군에서 10 %로 매우 낮은 관계로 유의한 결과는 도출하지 못하였지만 AEE788 치료가 시행된 실험군에서는 국소 림프절 전이 병소가 발생되지 않아 EGFR/VEGFR 동시억제가 종양세포의 림프절 전이능에 영향을 미쳤음을 암시하였다.

EGF/VEGF 수용체 타이로신 인산화효소에 대한 가역적인 억제제인 AEE788의 표적물질들의 활성화 정도에 대한 면역조직화학염색 분석결과 대조군과 각 실험군의 종양조직에서 EGFR과 HER-2가 모두 발현되었으며, 발현정도는 각 실험군간에 비슷한 수준이었다. pEGFR의 경우 EGFR과는 달리 종물내 종양세포 밀집 구역에서도 일부 종양세포에서만 발현이 관찰되었으며, AEE788 치료에 의하여 그 발현정도가 현저히 감소하였다. VEGFR-2의 경우 내피세포뿐만 아니라 종양세포에서도 발현되는 양상이 관찰되었고, 그 활성화된 형태인 pVEGFR-2/3의 발현 역시 AEE788에 의하여 그 정도가 현저히 감소되었다. 위의 결과로부터 본 연구에서 실험적으로 유도된 종양조직에서는 AEE788의 표적인 EGFR, HER-2, VEGFR-2가 모두 발현되어 AEE788의 생체내 치료효과가 강하게 나타난 것으로 여겨진다.

최근의 연구에 의하면 많은 실험적 종양의 종양세포에서 VEGFR이 발현됨을 보고되었는데<sup>14,15)</sup>, 이는 VEGFR이 발현된 종양 시스템에서 종양관련 혈관과 림프관 신형성 과정을 관장하는 VEGF/VEGFR이 자가분비 방식으로 작용함을 의미한다. 본 연구결과 VEGFR-2에 대한 면역형광염색

에서 종양관련 내피세포 외에도 많은 세포형태에서 양성의 형광반응이 관찰되어 세포주에 대한 웨스턴 블롯팅을 시행해본 결과 세포주에서 VEGFR-2는 발현되지 않았다(데이더 제시 생략). 따라서 조직 세포에서의 VEGFR 반응성의 원인에 대해서는 추후 규명을 요한다.

본 연구에서 EGFR과 VEGFR의 주 신호전달계 물질들인 pMAPK와 pAkt 역시 AEE788 치료에 의하여 발현정도가 현저히 감소되는 소견이 관찰되었다. pEGFR에 의해서 활성화되는 다양한 신호전달계 중 종양세포의 증식과 분화 과정을 관장하는 Ras/MAPK 경로와<sup>16)</sup> 종양세포의 침투성과 아포프토시스에 대한 저항성, 그리고 종양관련 혈관형성능에 관여하는 PI3K/Akt 경로는<sup>17)</sup> 종양세포의 악성 표현형을 발현하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험결과 AEE788의 작용에 의하여 EGFR 타이로신 인산화효소의 기능이 억제되면서 EGFR의 cytoplasmic tail에 존재하는 각기 다른 phosphotyrosine residue에 결합하여 종양세포의 악성 기능을 유도하는 단백질들의 기능이 차단되었고, 결과적으로 면역조직화학염색 분석을 통해 관찰되었듯이 종양증식인자인 PCNA 반응성이 감소되고 아포프토시스를 검색하는 TUNEL 염색에 대한 반응성이 증가된 것으로 고찰하였다.

본 연구에서 정량적 면역조직화학염색 분석결과 CD31에 대한 반응성으로 제시된 종물내 종양 주변부의 미세혈관밀도가 AEE788에 의하여 현저하게 감소되었다. 또한 본 연구결과 CD31/TUNEL 이중형광염색에 양성반응을 보인 아포프토시스된 혈관/림프관 내피세포의 비율이 AEE788에 의하여 현저하게 증가되었다. EGFR/pEGFR의 중요한 기능 중 하나는 종양세포의 증식과 생존, 침투와 전이성 뿐만 아니라 다양한 경로를 통하여 혈관형성 과정에도 관여한다는 점이다<sup>18)</sup>. 따라서 본 연구에서 관찰되어진 EGFR/VEGFR 억제제에 의한 발생된 미세혈관밀도의 감소와 종양관련 내피세포의 아포프토시스 현상은 종양세포에서의 EGFR억제 효과에 의하여 혈관형성능이 감소되었음과 EGFR을 발현하는 내피세포에 AEE788이 직접 작용하여 아포프토시스를 유도한 두가지 기전이 모두 작용하였을 것으로 해석할 수 있다.

또한 본 연구에서 pVEGFR-2/3에 대한 반응성이 AEE788에 의하여 감소된 소견이 관찰되었다. VEGFR-2는 일반적으로 혈관형성 과정을 주관하는 것으로 여겨지고<sup>19)</sup> 있는 인자이고 VEGFR-3는 림프관 형성과의 연관성이 강하게 확인되고<sup>20)</sup> 있지만 다양한 연구결과들이 발표되어<sup>21,22)</sup> 두가지 인자 모두 종양관련 혈관형성과 림프관 형성에 관여하는 것으로 추정된다. 특히 VEGFR-3는 관련 항체들이 개발됨에 따라 최근에 그 기능이 규명되고 있는 인자로 림프관 발생과 배아의 초기 혈관 발생, 그리고 종양관련 혈관형성 과정에서 중요한 역할을 하는 인자로 확인되었고<sup>23)</sup>, VEGFR-3 리간드인 VEGF-C/VEGF-D를 과발현하는 종양에서 림프관 신생과 국소 림프절 전이능이 유도된 것으로 보고

되었다<sup>24)</sup>. Rebhun 등은 결장암 동위종양 모델에서 AEE788을 적용한 연구에서 AEE788이 종양 주변의 림프관 수를 효과적으로 감소시켰고, 그 결과 국소 림프절 전이율이 감소하였다고 보고하였다<sup>25)</sup>. 본 연구에서 내피세포 표지자로 적용된 CD31은 혈관 내피세포와 림프관 내피세포에 모두 반응하는 인자임으로<sup>26)</sup> 본 실험에서도 감소된 혈관/림프관 내피세포가 AEE788 치료군에서 제기된 림프절 전이능 감소(통계적 유의성 없음) 현상과 관련이 있을 것으로 추정하였다.

위의 내용들을 종합하면 인간 구강암 세포주를 이중이식하여 유도된 실험적 종양에서 AEE788에 의하여 종양세포와 종양관련 내피세포에 발현되는 EGFR과 VEGFR이 억제되어 종양세포와 종양관련 혈관/림프관 내피세포의 아포프토시스가 유도되어 종물의 증식이 억제되고 림프절 전이능에도 영향을 미쳤을 것으로 결론지었다. 종양관련 림프관 형성인자와 국소 림프절 전이능과의 연관성에 대해서는 추후 연구를 요하는 바이다.

## V. 요약

인간의 구강점막 편평상피세포암 세포주 중 EGFR이 발현되고 활성화되어 있는 세포주를 선택하여 면역결핍 마우스의 구강저 부위에 이중이식함으로써 동위종양을 유도하고, 종양세포내 microtubule stabilizer 인 paclitaxel과 EGFR/VEGFR 억제제인 AEE788을 적용하여 단독으로 혹은 복합으로 치료를 시행하였다. 종양세포 이중이식 6주 후 실험동물에 대한 부검(necropsy)을 통하여 전이병소 발생을 결정하고, 마우스 종물에 대한 면역조직화학염색과 TUNEL 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 요약하였다.

- 1) Paclitaxel, AEE788, paclitaxel/AEE788 치료군은 대조군과 비교하여 종물 증식이 각각 18, 54, 57% 감소하였다.
- 2) AEE788에 의하여 종물내 종양세포와 종양관련 내피세포의 EGFR과 VEGFR 경로가 억제되었을 뿐만 아니라, 그 하부흐름 조절인자인 MAPK와 Akt도 활성이 억제되었다.
- 3) 대조군과 비교하여 AEE788 치료군과 AEE788과 paclitaxel 복합치료군에서 종양세포의 증식성과 미세혈관 밀도가 감소하였다.
- 4) EGFR/VEGFR 동시억제에 의하여 종양세포와 종양관련 혈관/림프관 내피세포의 아포프토시스가 증가하였다.

### \*Acknowledgements

We thank Novartis Pharmaceuticals for kindly providing us with AEE788.

## 참고문헌

1. Kupferman ME, Myers JN: Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 2006 ; 39(2): 229-247.
2. Choi S, Myers JN: Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008; 87(1): 14-32.
3. Maekawa T, Ashihara E, Kimura S: The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor imatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Int J Clin Oncol* 2007; 12(5): 327-340.
4. Traxler P, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D et al: AEE788 : A dual family epidermal growth factor receptor/ ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 2004; 64: 4931-4941.
5. Lopez-Albaitero A, Ferris RL: Immune activation by epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133(12): 1277-1281.
6. Park YW, Lee JW, Kim SH: Expressions of metastasis-related factors in orthotopic tumor models of oral squamous cell carcinoma. *J Kor Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surgeons* 2008; 30(6): 529-539.
7. Park YW, Younes MN, Jasser SA, Yigitbasi OG, Zhou G, Bucana CD et al: AEE788, a dual tyrosine kinase inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1963-1973.
8. Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD et al : Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 2004; 64: 7977-7984.
9. Younes MN, Yigitbasi OG, Park YW, Kim SJ, Jasser SA, Hawthorne VS et al : Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res* 2005; 65: 4716-4727.
10. Schiff BA, Mcmurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG et al: Epidermal growth factor receptor(EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clin cancer res* 2004; 10(24): 8594-602.
11. Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kim SJ, Fans D, Villares GJ et al: Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* 2008; 10(5): 489-500.
12. Sano D, Myers JN: Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 645-662.
13. Park YW: Targeted molecular therapy in a murine model of oral squamous cell carcinoma with an epidermal growth factor receptor inhibitor. *J Kor Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surgeons* 2009; 31(1): 8-17.
14. Yazici S, Kim SJ, Busby JE, He J, Thaker PH, Yokoi K et al: Dual inhibition of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor phosphorylation for antivascular therapy of human prostate cancer in the prostate of nude mice. *Prostate* 2005; 65(3): 203-215.
15. Yokoi K, Kim SJ, Thaker P, Yazici S, Man DH, He J et al: Induction of apoptosis on tumor-associated endothelial cells and therapy of orthotopic human pancreatic carcinoma in nude mice. *Neoplasia* 2005; 7(7): 696-704.
16. Yu C, Friday BB, Lai JP, Mccollum A, Atadja P, Roberts LR et al: Abrogation of MAPK and Akt signaling by AEE788 synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through reactive oxygen species generation. *Clin cancer res* 2007; 13(4): 1140-1148.
17. Sasaki T, Kitadai Y, Nakamura T, Kim JS, Tsan RZ, Kuwai T et al: Inhibition if epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation on tumor-associated endothelial cells leads to treatment of orthotopic human colon cancer in nude mice. *Neoplasia* 2007; 9(12): 1066-1077.
18. Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, Karali K, Theohari I, Bakarakos P et al: Expression of the epidermal growth factor receptor(EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast cancer research* 2008; 10(3): 1-8.
19. Verheul HMW, Hammers H, Erp KV, Wei Y, Sanni T, Salumbides B et al: Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model. *Clin cancer res* 2007; 13(14): 4201-4208.
20. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabska S, persuad K, Wu Y et al: Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer res* 2006; 66(5): 2650-2657.
21. Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, Takahashi T, pytowski B, Steiner P et al: Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer res* 2007; 67(2): 593-599.
22. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S et al: Vascular endothelial growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 2005; 65(11): 4739-4746.
23. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J: Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-949.
24. Yokoi K, Thaker PH, Yazici S, Rebhun RR, Nam DH, He J et al: Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Cancer res* 2005; 65(9): 3716-3725.
25. Rebhun RB, Langley RR, Yokoi K, Fan D, Gershenwald JE, Fidler IJ: Targeting receptor tyrosine kinase on lymphatic endothelial cells for the therapy of colon cancer lymph node metastasis. *Neoplasia* 2006; 8(9): 747-757.
26. Wang D, Stockard CR, Harkins L, Lott P, Salih C, Yuan K et al: Immunohistochemistry for the evaluation of angiogenesis in tumor xenografts. *Biotech Histochem* 2008; 83(3): 179-189.



## Figure Legends

**Fig. 1.** Immunoblot analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) and phosphophorylated EGFR protein levels in KB, SCC9, YD-10B, and YD-38 cells. Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal standard for normalization of protein loading. Protein extracts prepared from the cells were subjected to Immunoblotting as described in "Materials and Methods".

**Fig. 2.** AEE788 inhibits the growth of OSCC xenografts in nude mice. KB cells ( $5 \times 10^5$ ) were injected into the mouth floor of nude mice. After the injection of the tumor cell suspension, the mice (n=10) were treated with per oral gavage of AEE788 50 mg/kg thrice weekly, paclitaxel given via intraperitoneal injection at  $100 \mu\text{g}/\text{injection}$  twice weekly, or both AEE788 and paclitaxel. Ponits, mean tumor volume measured twice per week and expressed once per week. Bars, SD

**Fig. 3.** Representative gross features of the tumors of each group at the time of sacrifice.

A : Control

B : Paclitaxel  $100 \mu\text{g}/\text{injection}$ , twice weekly

C : AEE788 50 mg/kg, thrice weekly

D : Paclitaxel + AEE788

**Fig. 4.** Immunohistochemical/immunofluorescent analyses for degree of tyrosine kinase phosphorylation of EGFR, VEGFR, and their downstream mediators. After 6 weeks of treatment with AEE788, paclitaxel, or paclitaxel + AEE788, OSCC orthotopic tumors were sectioned and immunostained for EGFR, pEGFR, HER-2, VEGFR-2, pVEGFR-2/3, pMAPK and pAkt. Treatment with AEE788 alone or in combination with paclitaxel, inhibited the phosphorylation of EGFR, VEGFR-2, MAPK, and Akt. Representative features are shown. Bars :  $100 \mu\text{m}$

**Fig. 5.** Immunohistochemical and TUNEL analyses for degree of cell proliferation, microvessel density, and apoptosis of tumor and tumor-associated endothelial cells. After 6 weeks of treatment with AEE788, paclitaxel, or paclitaxel + AEE788, OSCC orthotopic tumors were sectioned and immunostained for PCNA, CD31, and stained with TUNEL. We also do the double staining with CD31 and TUNEL. Treatment with AEE788 alone or in combination with paclitaxel, induced apoptosis of tumor-

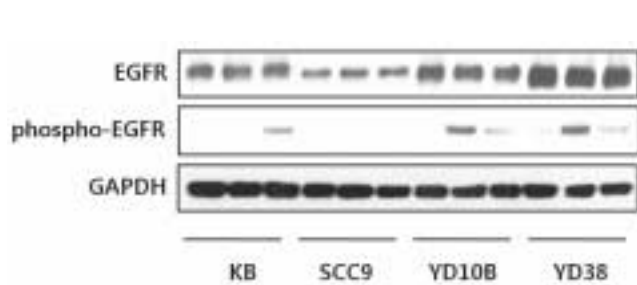


Fig. 1.

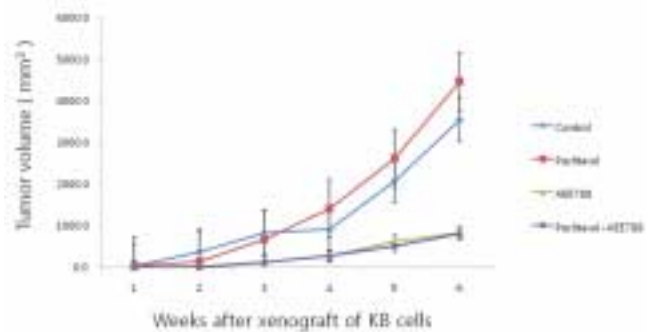


Fig. 2.

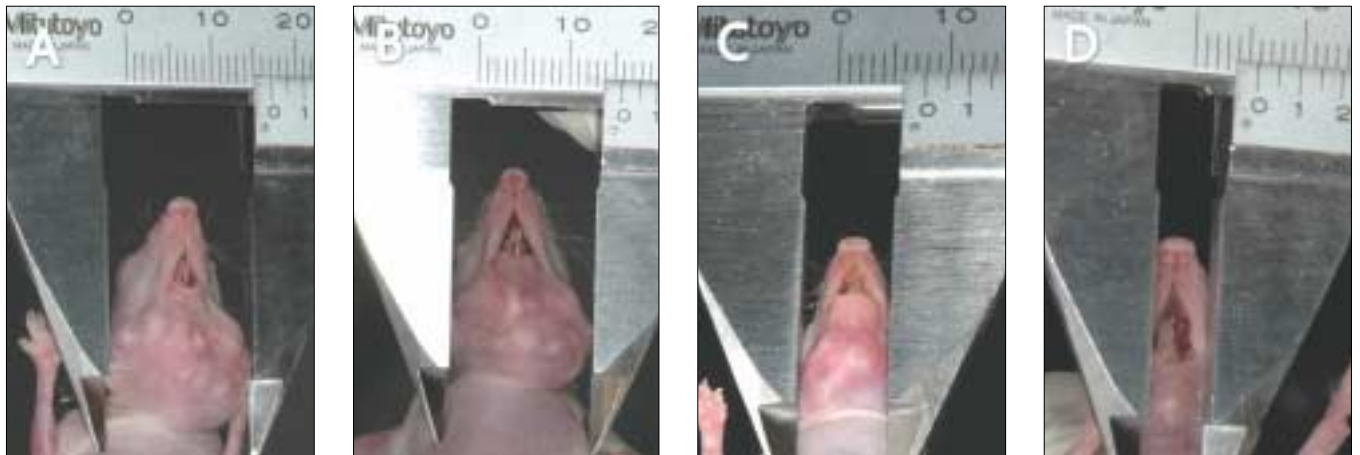


Fig. 3.

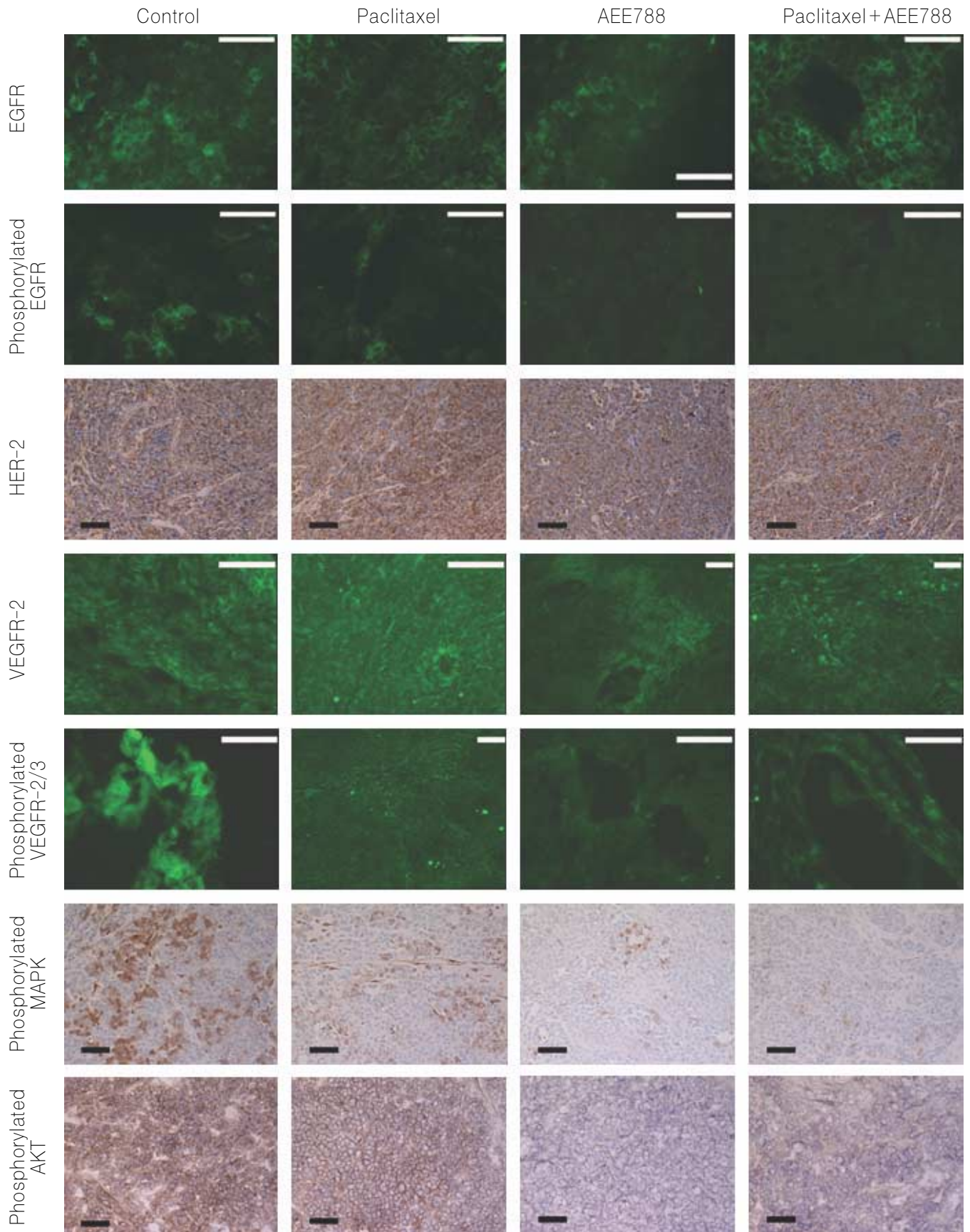


Fig. 4.

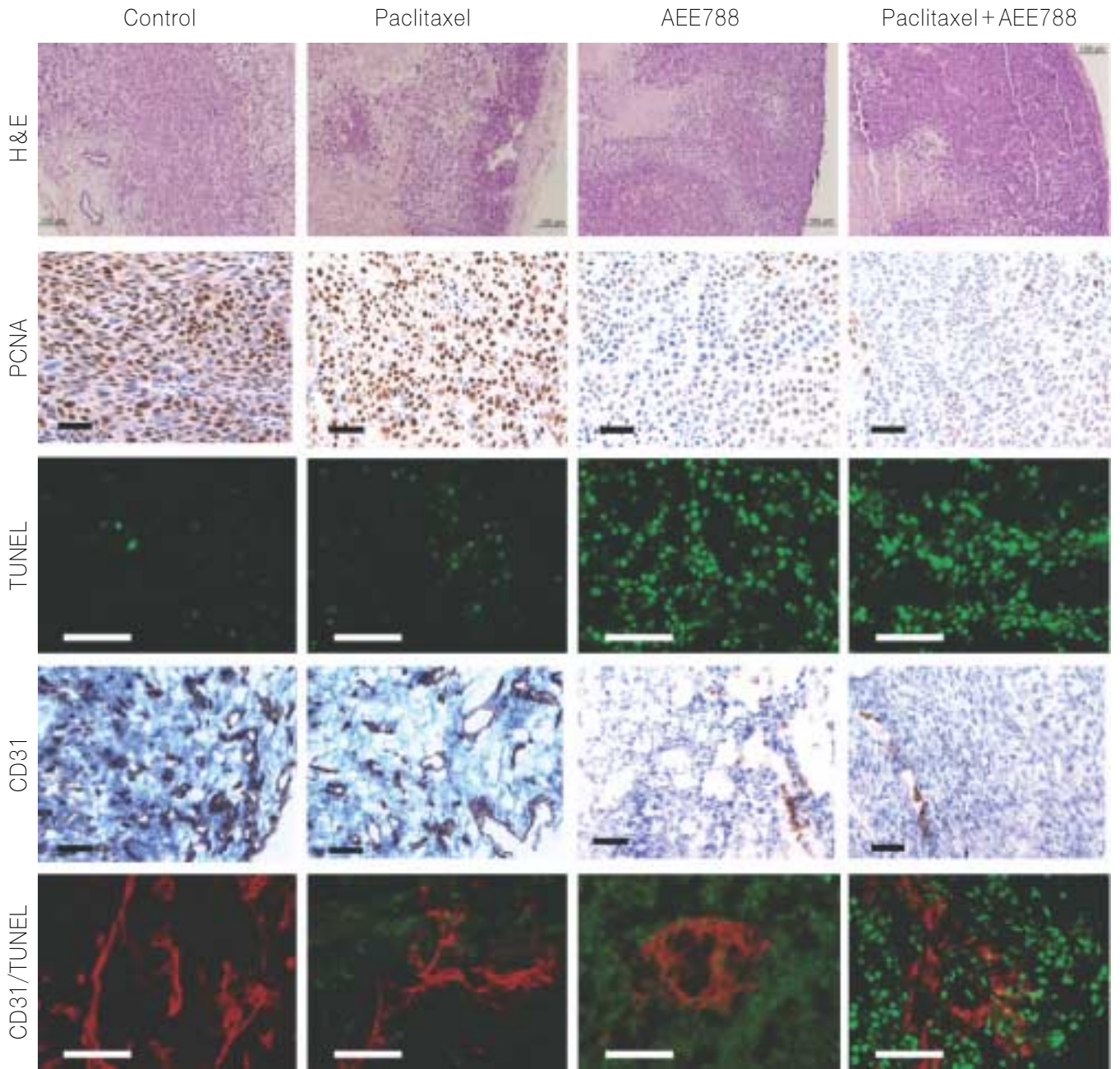


Fig. 5.