



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의과학석사 학위논문

구강편평세포암종의 치료표적으로서
Cripto-1의 역할 및 기전에 관한 연구

2019년 8월

서울대학교 대학원
치의과학과 구강병리학 전공
김 지 훈

**구강편평세포암종의 치료표적으로서
Cripto-1의 역할 및 기전에 관한 연구**

지도교수 윤혜정

이 논문을 치의과학 석사학위논문으로 제출함

2019년 4월

서울대학교 대학원

치의과학과 구강병리학전공

김지훈

김지훈의 석사학위논문을 인준함

2019년 6월

위원장 홍성두 (인)

부위원장 윤혜정 (인)

위원 조성대 (인)

요약(국문초록)

구강편평세포암종의 치료표적으로서 Cripto-1의 역할 및 기전에 관한 연구

김 지 훈

**서울대학교 대학원 치의과학과 구강병리학 전공
(지도교수 윤 혜 정)**

1. 목 적

구강편평세포암종(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)은 경부림프절 전이를 동반하고 침습성이 높은 악성 종양이며, 구강암의 가장 흔한 유형으로 알려져 있다. 구강편평세포암종을 위한 진보된 치료전략에도 불구하고, 구강편평세포암종을 가진 환자의 5년 생존율은 약 50%밖에 되지 않기 때문에 구강암의 진행을 조절할 수 있는 새로운 표적 분자를 찾을 필요가 있다. Cripto-1은 종양유전자로 알려져 있고, epidermal growth factor-Cripto-1/FRL-1/cryptic (EGF - CFC) family의 한 구성원이다. Cripto-1은 유방, 대장, 폐, 자궁경부, 위, 췌장 및 비인두를 포함한 다양한 장기의 암종에서 과발현되는 반면, 정상적인 성인 조직에서는 발현이 없거나 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 상피-간엽전환(epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)은 생리학적으로 발생, 조직재생 및 상처치유에 관여하는 과정이다. 또한, 암의 발생과 진행 과정에서 EMT가 암세포의 이동과 침습을 증가시키는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 Cripto-1의 발현 억제를 통해 OSCC 세포주의 증식과 이동을 억제할 수 있는지 여부와 관련 분자기전을 확인하고 이를 통해 치료 타겟으로서의 가치를 평가하고자 하였다.

2. 방 법

Cripto-1이 높게 발현되는 세포주를 선별하기 위해 13개 OSCC 세포주의 Cripto-1 발현을 western blotting을 통해 확인하였고, Cripto-1의 발현을 억제하기 위해 50nM 농도의 anti-Cripto-1 small interfering RNA(siRNA)를 처리하였다. 억제된 Cripto-1의 발현을 western blotting을 통해 확인하였다. 세포의 증식을 확인하기 위한 WST-1 assay 및 세포 이동을 관찰하기 위한 Transwell migration assay를 수행하였다. 분자기전을 확인하기 위해 HSC-3 세포에서 Cripto-1 발현을 억제시킨 후 western blotting을 통해 하위 신호체계 분자들의 발현 변화를 관찰하였다. 각 실험은 세 번씩 반복하여 수행하였다.

3. 결 과

Cell proliferation assay 결과, HSC-3와 HSC-4 세포주 모두에서 Cripto-1 발현을 억제시킨 실험군의 세포 증식이 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 수준으로 감소하였다 ($p < .001$). Cell migration assay 결과, Cripto-1의 발현을 억제시킨 HSC-3와 HSC-4 세포주에서 48시간 및 72시간 후 세포 이동이 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 수준으로 감소하였다 ($p < .001$). Cripto-1 억제 시, 세포의 생존과 증식, 이동에 관여하는 신호전달 분자들을 확인한 결과, p-Src(Tyr416) 발현은 변화가 없는 반면 p-AKT(Ser473) 및 p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)의 활성은 현저히 감소되었다. Cripto-1 억제 시, EMT 관련 분자들의 발현 변화를 관찰한 결과, nuclear NF- κ B, Slug, Twist 발현은 감소되었고, E-cadherin 발현 증가 및 Vimentin 발현 감소를 확인하였다. 또한, Cripto-1 억제 결과, MMP-2는 발현의 변화가 없는 반면, MMP-9의 발현은 현저히 감소되었다.

4. 결 론

구강편평세포암종에서 Cripto-1은 AKT/MAPK 신호체계, EMT 신호체계, 그리고 MMP-9 발현을 통해 세포 증식과 이동을 조절하는 것으로 여겨진다. 따라서, Cripto-1을 억제 시, 이들 신호전달체계를 차단하여 구강암의 증식과 진행을 억제할 수 있을 것으로 생각되어진다. 결론적으로, Cripto-1 발현의 억제는 OSCC 환자를 위한 새로운 치료 전략이 될 수 있음을 시사한다.

주요어 : 구강편평세포암종, Cripto-1, 세포 증식, 세포 이동, 상피-간엽 전환
학 번 : 2012-21821

구강편평세포암종의 치료표적으로서 Cripto-1의 역할 및 기전에 관한 연구

목 차

| | |
|-------------------|----|
| 국문 초록 | 1 |
| I. 서론 | 4 |
| II. 재료 및 방법 | 7 |
| III. 결과 | 10 |
| IV. 고찰 | 12 |
| V. 결론 | 17 |
| VI. 참고문헌 | 18 |
| 영문 초록 | 28 |

I. 서론

구강 및 구인두암은 전세계적으로 6번째로 높은 발병률을 가졌으며, 구강암의 90% 가량을 차지하는 것은 구강편평세포암종 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC)이다.¹ 지난 수십년 동안 OSCC의 진단 및 치료 방법이 개선되어 왔지만, 구강 영역의 손상으로 인한 환자의 삶의 질 저하는 여전히 존재하며, OSCC 환자의 5년 생존율은 과거 40년간 큰 변화 없이 50-60%에 머물러 있는 실정이다.^{2,3} OSCC는 다양한 유전 및 후생 유전학적 변화가 축적된 종양유전자 및 종양억제유전자가 관련 신호전달 체계의 조절 장애를 유발함으로써 세포주기 또는 세포 증식 및 사멸과의 균형 등을 방해하는 과정을 통해 발생 된다고 알려져 있다.⁴ 그러나 그 기전에 대해서는 여전히 밝혀내야 할 부분이 많이 남아있다. 따라서 OSCC 발생과 진행의 주요한 분자기전을 밝혀내는 것은 그 신호체계를 효과적으로 차단할 수 있는 새로운 표적 분자의 개발을 가능하게 함으로써 구강암 환자의 예후를 개선할 수 있을 것으로 생각되어진다.

Cripto-1은 epidermal growth factor-Cripto-1/FRL-1/cryptic (EGF - CFC) family의 한 구성원이다. Cripto-1 은 modified epidermal growth factor (EGF)-like domain을 포함하여 세포의 분비를 위한 여러 신호서열(signal sequences)로 구성된다.⁵ Cripto-1은 세포막 부착 수용기 형태 또는 부착하지 않는 용해성 리간드 형태로 존재하며, 배아 발달과정 및 암 발생에서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁵ 위, 췌장, 유방, 폐, 자궁경부 등에서의 연구를 보면, Cripto-1은 정상조직에서 발현이 없거나 매우 낮고, 전암 병소에서 정상보다 발현이 증가되고, 암에서 현저히 과발현된다고 보고하고 있으며, 이는 종양 형성(tumorigenesis)과 진행(tumor progression)에 관여함을 시사하였다.⁶

Cripto-1을 통해 활성화되는 대표적인 신호전달경로는 Nodal/ALK4/ALK7/Smad-2 경로와 Glypican-1/c-Src/MAPK/AKT 경로가 알려져 있다.⁶ 그 이후 연구들에 따르면 이러한 경로 이외에도 Cripto-1은 GRP78, Tomoregulin-1, caveolin-1 등과 같은 막투과 단백질들과 직접적으로 작용하여 AKT/MAPK 신호 체계를 활성화시킴으로써 암세포의

증식과 이동을 조절하는 것으로 알려졌다.⁷

Cripto-1은 세포 증식 및 이동과 침습에 중요한 역할을 하여 종양 진행을 촉진하는 것으로 알려져 있는데, 이는 상피-간엽전환(epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)이라는 과정과 관련되어 있다.^{8,9} EMT는 상피세포에서 이동성이 좋은 침습적인 간엽세포로 변환하여, 생리적 과정에서는 배아 발생시 형태형성에 기여한다.¹⁰ 또한 창상 치유, 염증 후 섬유화, 암 등을 포함한 병리적 과정에서도 관찰되는 현상으로, EMT 과정을 통해 서로 부착된 상태의 상피세포가 세포외 기질로 개별적인 이동이 용이하게 되어 특히 암세포 이동의 주요 기전으로 잘 알려져 있다.¹¹ 성인의 장기에서 발생하는 모든 악성 종양의 90 % 이상이 상피에서 기원한 암종이기 때문에 EMT는 인간 악성 종양의 전이 과정에서 특히 중요하다.¹²

암세포의 이동은 세포외기질(extracellular matrix: ECM)을 뚫고 진행되므로 기질단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)들의 활성화가 필수적이며, 특히 기저막(basement membrane: BM)의 주성분인 제4형 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-9 발현의 증가는 다양한 암에서 암세포의 침습과 이동을 촉진해 환자의 예후를 불량하게 만든다고 보고되었다.¹³

최근까지 다양한 암에서 Cripto-1의 역할에 대한 연구가 이루어지고 있지만, 구강암에서는 2011년에 처음으로 OSCC 조직에서의 Cripto-1 발현 평가와 Cripto-1 과발현의 OSCC 세포증식 및 이동에 대한 영향을 보고하였고¹⁴, 2018년에 침샘 조직에서 양성 과 악성 병소에서 Cripto-1 발현을 비교한 연구만 있을 뿐¹⁵, 구강암에서 Cripto-1의 역할과 분자기전에 관한 *in vitro/ in vivo* 연구는 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 OSCC에서 종양유전자로 기능하는 것으로 알려진 Cripto-1의 발현을 small interfering RNA(siRNA)를 이용하여 억제시키는 것이 OSCC 세포주의 생물학적 행동(세포 증식 및 이동)을 조절할 수 있는지 확인하고자 하였고, 관련 분자 기전 분석을 통해 세포 증식 관련 신호전달체계 및 EMT 기전, 그리고 MMP 발현과의 관련성

을 규명하고자 하였다. 이를 통해, 구강편평세포암종의 발생과 진행을 억제할 수 있는 새로운 치료법의 표적 분자로서 Cripto-1의 가치를 평가해보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

Cell lines and Cell culture

SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, HO-1-N-1, HO-1-U-1, KOSCC-11, KOSCC-25B 및 KOSCC-33A 총 13개의 구강편평세포암종 세포주들은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 또는 DMEM, F12 1:1 혼합물 (DMEM/F12) 또는 RPMI 1640에서 배양하였다. 각 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% Antibiotic Antimycotic solution을 첨가하였다. (DMEM, RPMI1640, Antibiotic Antimycotic solution : WELGENE, Seoul, Korea / F-12 : ThermoFisher scientific, MA, USA / FBS : Omega Scientific, CA, USA). 모든 세포는 37°C의 온도와 5% CO₂ 농도가 유지되는 항온·항습 인큐베이터 (SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 모든 실험은 배양 접시 내 부착 세포 면적이 70-80%에 도달했을 때 수행하였다.

Small interfering RNA (siRNA) assay

HSC-3와 HSC-4 세포를 각각 3×10^4 개씩 12-well plate에 seeding 한 뒤, 배양 접시 내 부착 세포 면적이 70%에 도달했을 때 50nM 농도의 anti-Cripto-1 siRNA (si.Cripto-1) (ON-TARGETplus SMART pool siRNA, Dharmacon, Chicago, IL, USA)와, transfection reagent 인 HiPerFect(Qiagen, Valencia, CA)를 6 μ l/ml 농도로 함께 처리하였다. 대조군으로는 scramble sequences small interfering RNA (si.Control)을 사용하였다. Cripto-1 발현 억제는 RT-PCR과 Western blotting을 통해 확인하였다. 사용한 anti-Cripto-1 siRNA 염기서열은 다음과 같다.

5' -GCUGGGCCAUCAGGAAUUU-3', 5' -CAAAGCUACUAUUAUCGA -3',
5' -UCAUGGCCAUUUCUAAAGU-3', 5' -CCGCUUCUCUUACAGUGUG-3'

***In vitro* cell proliferation assay (WST-1 assay)**

세포 증식은 WST-1 assay kit (Roche Diagnostics, GmbH, Germany)를 이용하여 확인하였다. 96-well plate에 HSC-3와 HSC-4 세포를 각각 1×10^3 개씩 seeding 한 뒤 37°C의 온도와 5% CO₂ 농도가 유지되는 항온·항습 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 접시 내 부착 세포 면적이 70%에 도달했을 때, siRNA를 처리하였다. 그 후 24, 48, 72시간 뒤 각 well에 WST-1 10 μ l를 첨가하고 37°C 인큐베이터에서 4시간 동안 반응시켰으며, microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 세 번씩 반복하여 수행하였다.

***In vitro* cell migration assay**

세포 이동은 Transwell inserts (8 μ m pore size, PET membrane) (Corning, NY, USA)를 이용하여 확인하였다. 24-well plate에 chamber를 넣고 HSC-3와 HSC-4 세포를 각각 1×10^5 개씩 upper chamber에 seeding 한 뒤 37°C의 온도와 5% CO₂ 농도가 유지되는 항온·항습 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 siRNA를 처리한 후 24, 48시간 뒤 transwell을 통과하지 않은 세포들이 있는 upper chamber의 안쪽면을 멸균된 면봉으로 닦아주었고, transwell을 통과한 세포들은 Diff-Quick stain set (Fisher, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 염색한 뒤 100배율 현미경 상에서 무작위로 선정한 5개 부위의 세포수를 계수하였다. 각 실험은 세 번씩 반복하여 수행하였다.

Western blotting

세포에서 단백질을 추출하기 위해 radioimmunoprecipitation assay (RIPA, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)와 1.0% mammalian

protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)을 사용하였고, 세포내 단백질은 Nuclear/Cytosol fraction Kit (Biovision, CA, USA)을 이용하여 추출하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 각 샘플당 30 μ g의 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-Rad, CA, USA) 하였고, polyvinylidene difluoride membrane (Pall, Ann Arbor MI, USA)에 transfer 한 뒤 Tris Buffered Saline with Tween 20(pH 7.6, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20)에 5 % fat-free milk를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 blocking 해주었다. TBST buffer로 세 번 세척 후 3 % fat-free milk (BD Bioscience, CA, USA)를 첨가한 TBST buffer에 1차 항체를 희석하여 반응시키고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 하였다. 다시 TBST buffer로 세 번 세척 후 상온에서 2시간 30분 동안 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체에 반응시켰다. 최종적으로 membrane은 chemiluminescence (ECL) 시약(GenDEPOT, Barker, TX, USA)을 사용하여 develop 한 뒤 Ez-Capture MG(ATTO, Tokyo, Japan)로 촬영하였으며, Image Saver 5 (ATTO, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 실험에 사용된 항체 정보는 Table표. 1로 대신하였다.

Statistical analysis

통계학적 분석은 GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, USA)를 사용하였다. 실험 데이터는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, Student's t-test으로 검정하였다. 모든 실험결과는 p 값이 0.05보다 작을 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결과

1. 구강편평세포암종 세포주에서 Cripto-1 발현의 평가

Cripto-1이 높게 발현되는 세포주를 선별하기 위해 총 13개 OSCC 세포주(SCC-4, SCC-9, SCC-15, SCC-25, HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, HO-1-N-1, HO-1-U-1, KOSCC-11, KOSCC-25B 및 KOSCC-33A)에서 Cripto-1 발현을 western blotting을 통해 확인하였다(그림 1). 그 결과 6개 세포주(SCC-4, HSC-2, HSC-3, HSC-4, HO-1-U-1 및 KOSCC-33A)의 Cripto-1 발현이 비교적 높았으며, 그 중 HSC-3와 HSC-4, 총 2개의 세포주를 선별하여 실험에 이용하였다.

2. small interfering RNA(siRNA)를 이용한 Cripto-1 발현 억제

HSC-3 세포주를 50nM 농도의 anti-Cripto-1 siRNA(si.Cripto-1) 또는 대조군 siRNA(si.Control)로 24시간 동안 처리한 뒤 Cripto-1 발현을 mRNA 수준과 단백질 수준으로 확인한 결과 si.Cripto-1로 처리한 세포에서 Cripto-1 발현이 현저히 억제되었다.(그림 2)

3. Cripto-1 발현 억제 시 세포 증식에 대한 효과

HSC-3와 HSC-4 세포주를 50nM 농도의 si.Cripto-1로 처리한 뒤 WST-1 assay를 통해 시간에 따른 생존 세포 수를 확인하였다. 그 결과, 그림 3A 와 그림 3B 와 같이 두 세포주 모두 24, 48, 72시간에서 대조군에 비해 Cripto-1 발현을 억제시킨 실험군의 흡광도(OD) 값이 HSC-3 세포주에서 각각 50, 73, 69 %, 그리고 HSC-4 세포주에서 각각 54, 61, 63 % 현저히 감소되었다. ($p < .001$). 이를 통해 Cripto-1 발현을 억제하면 OSCC의 세포 증식이 감소 된다는 것을 확인하였다.

4. Cripto-1 발현 억제 시 세포 이동에 대한 효과

HSC-3와 HSC-4 세포주를 50nM 농도의 si.Cripto-1 으로 처리한 뒤 Transwell migration assay를 통해 세포 이동을 확인하였다. 그 결과, 그림 4A 와 그림 4B 와 같이 두 세포주 모두 24, 48시간에서 대조군에 비해 Cripto-1 발현을 억제시킨 실험군의 세포 이동이 현저히 감소하였다. HSC-3 세포주에서 각각 92, 61% 그리고 HSC-4 세포주에서 각각 88, 66% 의 감소를 보였다 ($p < .001$). 이를 통해 Cripto-1 발현을 억제하면 OSCC의 세포 이동이 감소 된다는 것을 확인하였다.

5. Cripto-1의 세포 증식 및 세포 이동 조절 기전 분석: AKT/MAPK 발현, EMT 관련 분자들, 그리고 MMPs 발현 평가

HSC-3 세포주를 50nM 농도의 si.Cripto-1 으로 24시간 동안 처리한 뒤 Cripto-1 억제에 따른 하위 신호전달 분자들의 발현의 변화를 western blotting을 통해 확인하였다. 우선, 세포의 증식과 생존에 관여하는 대표적인 상위 조절 분자로 알려진 Src, AKT, MAPK(ERK1/2)의 발현을 평가하였다. HSC-3 세포에서 Cripto-1의 발현을 억제 시, 활성화된 p-Src(Tyr416) 발현은 변화가 없는 반면 p-AKT(ser473) 및 p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)의 발현은 현저히 감소되었다. (그림 5) 이와 더불어, Cripto-1 억제에 따른 세포 이동의 억제 기전을 확인하기 위해, EMT 관련 분자들의 발현 변화 및 MMPs 발현 변화를 평가하였다. 앞선 결과에서의 AKT 및 MAPK 활성화 감소와 함께, EMT와 연관된 하위 신호전달 분자들인 nuclear NF- κ B, Slug, Twist 발현이 현저히 감소되었다. 또한, 상피 표현형(epithelial phenotype)의 표지자인 E-cadherin 발현이 증가하였고, 반대로 간엽 표현형 (mesenchymal phenotype)의 표지자인 Vimentin 발현은 감소하였다. (그림 6A) Cripto-1 억제에 따른 MMPs의 발현의 변화를 확인한 결과, MMP-2는 발현의 변화가 없는 반면, MMP-9의 발현은 현저히 감소되었다. (그림 6B)

IV. 고 찰

Cripto-1의 과발현은 위암, 방광암, 간암 등 다양한 암 환자에서 불량한 임상 결과와 밀접한 연관을 보여왔다. 종양 내 Cripto-1이 과발현된 환자들에서 림프절 전이가 증가하고 높은 임상 병기를 보이거나 재발이 빈번하며, 전체 생존률 또는 무병 생존률이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.¹⁶⁻¹⁸ 따라서, 여러 장기의 암에서 Cripto-1의 발현을 조절하여 환자의 예후를 증진 시키고자 하는 노력으로 Cripto-1 작용의 분자 기전을 밝히려는 다양한 *in vitro* 또는 *in vivo* 연구들이 시도되어왔다. 이러한 연구들을 통해 Cripto-1은 세포 형질전환(*cellular transformation*), 세포 증식, 세포의 이동 및 침습, 종양 신생혈관 형성, 동물 모델에서 종양의 형성 등에서 역할을 함을 알게 되었고,¹⁹⁻²¹ 선행된 OSCC 연구에서도 재조합 단백질을 이용해 Cripto-1을 과발현시켰을 때, OSCC 세포의 증식과 이동이 현저히 증가됨을 확인하여 구강암에서도 Cripto-1이 종양유전자로서의 역할을 함을 확인할 수 있었다.¹⁴ 본 연구에서는 추가적으로 siRNA를 이용하여 OSCC에서 Cripto-1의 발현을 억제시키고, 이를 통해 OSCC 세포주의 생물학적 행동 (세포 증식 및 이동)을 조절할 수 있는지 확인하고자 하였다. 그 결과, Cripto-1 발현이 억제된 HSC-3과 HSC-4 세포주 모두에서 시간별로 세포의 증식과 이동이 현저히 감소되었다. 이는 Cripto-1이 OSCC에서 암발생과 진행에 역할을 할 수 있음을 시사하며, 더불어 구강암의 성장과 진행을 억제하는 방법으로 Cripto-1을 표적화할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

Cripto-1의 이와 같은 종양유전자로서의 기능은 대표적인 두 가지 신호 전달경로를 통해 이루어진다고 알려져 있는데, 이는 Nodal 의존성 경로와 Nodal 비의존성 경로로 나눌 수 있다. Nodal 의존성 경로는 TGF- β 신호전달경로와 관련되어 있으며, 이 경로를 통해 Cripto-1은 세포 증식의 억제자로 알려진 TGF- β 1이나 Activin이 수용체에 결합하지 못하도록 길항작용(*antagonism*)을 나타내 세포 증식 및 종양 형성을 촉진 시킬 수 있다.⁵⁻⁷ 또한, Nodal 비의존성 경로로서 Cripto-1이 세포막에 존재하는 Glypican-1, GRP78, Tomoregulin, 또는 caveolin 등과의 결합을 통해

하위분자인 c-Src/MAPK/AKT 경로를 활성화함으로써 세포의 증식, 생존, 이동을 촉진시켜 암 발생과 진행에 관여할 수 있다.⁷ 더불어, 세포의 증식과 이동의 주요 분자 기전인 Wnt/ β -catenin 신호체계의 활성화도 Cripto-1의 발현을 촉진할 수 있다고 알려졌다.^{7,9} 그럼에도 불구하고, OSCC에서 Cripto-1 분자 기전에 관한 연구는 현재까지 전무하며, 본 연구에서 처음으로 Cripto-1이 OSCC 세포의 증식과 이동을 촉진하는 기전을 밝히고자 하였다. 그 결과, HSC-3 세포에서 Cripto-1을 억제 시, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)와 p-AKT(Ser473)의 발현이 현저히 억제됨을 확인하였으나 예상과 달리 p-Src의 발현은 변화되지 않았다. 따라서, OSCC에서도 Cripto-1이 MAPK/AKT 경로를 통해 세포의 증식과 이동을 조절하는 것으로 생각되어지나, 이들의 상위조절분자인 Src의 활성화에는 변화가 없어서 추가적 실험을 통해 재확인이 필요한 것으로 여겨진다.

기존 여러 종양에서의 연구들은 Cripto-1이 암세포의 이동 및 침습을 촉진하는 기전은 EMT 과정 및 MMPs 작용과 연관되어 있다고 보고하였다.^{8,9,23-25} EMT 동안, 암세포는 세포 간 접촉을 유지시키는 E-cadherin과 같은 단백질의 발현을 잃게 되며, vimentin, fibronectin, N-cadherin과 같은 간엽 성질의 단백질 발현을 증가시키며 종양 진행, 침습 및 전이를 촉진하게 된다. EMT와 관련된 중요한 전사인자는 NF- κ B, Snail, β -catenin, Twist 등이 있고, MMP-9을 포함한 몇몇 MMP는 이러한 전사인자의 타겟 분자로 그 발현이 촉진될 수 있다고 알려져 있다. 다시 말해, 일부 MMP의 발현은 EMT 과정과 밀접히 연관되어 있으며, EMT의 개시 과정 혹은 최종 과정의 일부라고 여겨진다.²⁶ 다형성 신경교모세포종(glioblastoma multiforme) 연구에서는, U87세포에서 Cripto-1을 과발현을 시켰을 때, EMT 표지자인 Vimentin과 Twist 발현이 증가되면서 암세포의 이동 및 침습이 현저히 증가되는 것을 확인하였다.²³ 식도암 연구에서는 shRNA를 이용하여 식도편평세포암종 세포주의 Cripto-1 발현을 억제했을 때 세포 증식, 이동, 침습이 감소하였으며, EMT에서의 상피 표지자인 E-cadherin 발현은 증가, 간엽 표지자인

Vimentin의 발현은 감소 되었다. 더불어 EMT 관련 전사인자인 Snail의 발현 감소를 확인하였고, 기질을 녹여 암세포의 침습과 전이를 촉진시키는 기질 분해효소인 MMP-9 발현의 감소도 확인하였다.²⁴ 또한, 전립선암 연구에서 siRNA를 이용하여 전립선암세포의 Cripto-1 발현을 억제했을 때, E-cadherin 발현은 현저히 증가, N-cadherin, vimentin, fibronectin 발현은 현저히 감소, 또한 MMP-2와 MMP-9의 발현도 현저히 감소하는 것을 확인함으로써 Cripto-1의 분자 기전은 EMT 및 MMPs와 밀접한 관련을 가짐을 시사하였다.²⁵ MMPs는 ECM 및 BM의 구성 요소를 분해할 수 있는 효소로, 활성화 시 암세포의 이동과 침습을 촉진하여 전이 과정에서 중요한 역할을 수행하고 다양한 암조직 내에서 이 효소들의 발현 증가는 환자의 불량한 예후와 밀접한 관련을 보여왔다.¹³ 특히, BM의 주성분인 제4형 교원질을 녹이는 MMP-9의 발현 증가는 OSCC에서 흔히 관찰되고, 이는 OSCC의 빈번한 재발, 림프절 전이, 생존률 저하 등과 밀접한 연관성을 보였다.²⁷ 이처럼 EMT 관련 분자들 및 MMP들은 종양의 진행과 환자의 예후에 중요한 역할을 하고, Cripto-1이 이들과 긴밀히 연관되어 암세포의 행동을 조절한다는 연구 결과들은 OSCC에서 Cripto-1을 지속적으로 연구할 가치를 제안한다. 본 실험에서는 HSC-3 세포의 Cripto-1 발현을 억제 시, p-Akt, p-ERK, nuclear NF- κ B, Slug, Twist, Vimentin, MMP-9 발현의 감소 및 E-cadherin 발현의 증가를 확인할 수 있었다. 이를 통해 Cripto-1은 OSCC에서도 EMT 과정을 촉진하는 기전을 통해 세포 증식과 이동을 증가시키고, 더불어 MMP-9을 활성화시켜 기질분해를 촉진하여 OSCC 세포의 이동을 돕는 것으로 생각되어졌다.

다양한 장기의 암에서 Cripto-1의 관련 분자 기전이 밝혀져 옴에 따라, Cripto-1의 기능을 억제하는 치료제를 개발하고자 *in vitro* 및 *in vivo* 연구들이 시도되었다.^{20,28-30} 대장암과 고환암 xenograft 모델에서 CFC domain에 대한 항체를 이용하여 종양의 성장을 70%까지 억제하는 결과를 얻었고,²⁰ EGF-like domain에 대한 항체는 대장암, 유방암, 폐암 세포 등의 성장을 현저히 억제하였으며, 대장암 xenograft 모델에서 종양의

성장을 80%까지 억제하였다.²⁸ 그리고, 세포막투과단백질 GRP78의 Cripto-1 결합 부위에 부착하는 항체를 만들어 Cripto-1 을 억제시키면, c-Src/AKT/MAPK 및 Smad 2/3 신호 체계를 차단시켜 세포의 증식 및 종양의 형성을 억제할 수 있었다.²⁹ 최근 악성 흑색종 세포를 이용한 연구에서도 CFC domain에 대한 두 가지 항체를 개발하여 GRP78/c-Src/MAPK/AKT 신호전달체계를 차단하여 Cripto-1의 종양 형성 기능을 중화시킬 수 있었고, Cripto-1의 CFC domain과 결합할 수 있는 다른 세포막투과단백질 (Glypican-1, Tomoregulin-1,..)과의 결합도 억제되었을 가능성을 제안하기도 하였다.³⁰ OSCC에서도 siRNA를 이용하여 Cripto-1 을 억제하는 효과는 AKT/ERK/NF- κ B/MMP-9 신호체계를 조절하여 세포의 증식과 이동을 억제할 수 있었기 때문에, 기존의 연구에서 개발된 항체를 이용한 억제 효과도 기대되어 진다.

V. 결론

실험 결과를 종합해보면 Cripto-1은 AKT/MAPK 신호 전달 체계를 통해 OSCC 세포의 증식과 이동을 조절하는 것으로 여겨지며, Cripto-1의 발현 억제는 신호체계 하위 전사인자인 NF- κ B의 발현을 억제할 수 있었고, 이를 통해 암세포 침습과 이동의 중요한 기전인 EMT 유발 전사인자들 (slug, snail, twist)의 발현 억제와 OSCC 세포가 기저막을 뚫고 침습하는데 필수적인 MMP-9의 억제를 유발시킬 수 있음을 확인하였다.

결론적으로 OSCC에서 Cripto-1은 AKT/ERK/NF- κ B/MMP-9 경로를 통해 세포의 증식 및 이동을 촉진시켜 OSCC의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되어졌다. 따라서, Cripto-1의 억제가 OSCC의 성장과 전이를 억제하는데 효과적인 방법이 될 가능성을 확인하였고, OSCC 환자의 새로운 치료 전략이 될 수 있음을 제안하였다. 그러나, 앞으로 추가적인 *in vivo* 연구를 통해 Cripto-1의 억제가 생체 내에서도 OSCC의 성장과 진행을 억제할 수 있는지 확인할 필요가 있다고 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Warnakulasuriya, S., Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 2009. 45(4-5): p. 309-16.
2. Rapidis, A.D., P. Gullane, J.D. Langdon, J.L. Lefebvre, C. Scully, and J.P. Shah, Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol*, 2009. 45(4-5): p. 299-300.
3. Bello, I.O., Y. Soini, and T. Salo, Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol*, 2010. 46(9): p. 636-43.
4. Messadi, D.V. and K. Sato, Oral Cancer Chernoprevention: Current Status and Future Direction. *J Calif Dent Assoc*, 2016. 44(2): p. 101-11.
5. Strizzi, L., C. Bianco, N. Normanno, and D. Salomon, Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene*, 2005. 24(37): p. 5731-41.
6. Bianco, C., L. Strizzi, N. Normanno, N. Khan, and D.S. Salomon, Cripto-1: An Oncofetal Gene with Many Faces. 2005. p. 85-133.
7. Nagaoka, T., H. Karasawa, N.P. Castro, M.C. Rangel, D.S. Salomon, and C. Bianco, An evolving web of signaling networks regulated by Cripto-1. *Growth Factors*, 2012. 30(1): p. 13-21.
8. Strizzi, L., C. Bianco, N. Normanno, M. Seno, C. Wechselberger, B. Wallace-Jones, N.I. Khan, M. Hirota, Y. Sun, M. Sanicola, and

- D.S. Salomon, Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice. *J Cell Physiol*, 2004. 201(2): p. 266-76.
9. Rangel, M.C., H. Karasawa, N.P. Castro, T. Nagaoka, D.S. Salomon, and C. Bianco, Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol*, 2012. 180(6): p. 2188-200.
 10. Acloque, H., M.S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, and M.A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 2009. 119(6): p. 1438-49.
 11. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(2): p. 131-42.
 12. Birchmeier, C., W. Birchmeier, and B. Brand-Saberi, Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)*, 1996. 156(3): p. 217-26.
 13. Bauvois, B., New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1825(1): p. 29-36
 14. Yoon, H.J., J.S. Hong, W.J. Shin, Y.J. Lee, K.O. Hong, J.I. Lee, S.P. Hong, and S.D. Hong, The role of Cripto-1 in the tumorigenesis and progression of oral squamous cell carcinoma.

- Oral Oncol, 2011. 47(11): p. 1023–31.
15. Silva, L.P., L.A.B. da Silva, B.T. Sedassari, S. de Sousa, J. Dos Santos Pereira, L.B. de Souza, and M.C. da Costa Miguel, Cripto-1 is overexpressed in carcinoma ex pleomorphic adenoma of salivary gland. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2018. 275(6): p. 1595–1600.
 16. Zhong, X.Y., L.H. Zhang, S.Q. Jia, T. Shi, Z.J. Niu, H. Du, G.G. Zhang, Y. Hu, A.P. Lu, J.Y. Li, and J.F. Ji, Positive association of up-regulated Cripto-1 and down-regulated E-cadherin with tumour progression and poor prognosis in gastric cancer. *Histopathology*, 2008. 52(5): p. 560–8.
 17. Wei, B., W. Jin, J. Ruan, Z. Xu, Y. Zhou, J. Liang, H. Cheng, K. Jin, X. Huang, P. Lu, and Q. Hu, Cripto-1 expression and its prognostic value in human bladder cancer patients. *Tumour Biol*, 2015. 36(2): p. 1105–13.
 18. Wang, J.H., W. Wei, J. Xu, Z.X. Guo, C.Z. Xiao, Y.F. Zhang, P.E. Jian, X.L. Wu, M. Shi, and R.P. Guo, Elevated expression of Cripto-1 correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2015. 6(33): p. 35116–28.
 19. Ebert, A.D., C. Wechselberger, M. Nees, T. Clair, G. Schaller, I. Martinez-Lacaci, B. Wallace-Jones, C. Bianco, H.K. Weitzel, and D.S. Salomon, Cripto-1-induced increase in vimentin expression is associated with enhanced migration of human Caski cervical carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2000. 257(1): p. 223–9.
 20. Adkins, H.B., C. Bianco, S.G. Schiffer, P. Rayhorn, M. Zafari, A.E. Cheung, O. Orozco, D. Olson, A. De Luca, L.L. Chen, K.

- Miatkowski, C. Benjamin, N. Normanno, K.P. Williams, M. Jarpe, D. LePage, D. Salomon, and M. Sanicola, Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. 112(4): p. 575-587.
21. Bianco, C., L. Strizzi, A. Ebert, C. Chang, A. Rehman, N. Normanno, L. Guedez, R. Salloum, E. Ginsburg, Y. Sun, N. Khan, M. Hirota, B. Wallace-Jones, C. Wechselberger, B.K. Vonderhaar, G. Tosato, W.G. Stetler-Stevenson, M. Sanicola, and D.S. Salomon, Role of human cripto-1 in tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(2): p. 132-41.
 22. Sun Y, S.L., Raafat A, Hirota M, Bianco C, Feigenbaum L, Kenney N, Wechselberger C, Callahan R, Salomon DS, Overexpression of human Cripto-1 in transgenic mice delays mammary gland development and differentiation and induces mammary tumorigenesis. *Am J Pathol*, 2005. 167(2): p. 585-597.
 23. Alowaidi, F., S.M. Hashimi, M. Nguyen, M. Meshram, N. Alqurashi, B.L. Cavanagh, B. Bellette, S. Ivanovski, A. Meedenya, and S.A. Wood, Investigating the role of CRIPTO-1 (TDGF-1) in glioblastoma multiforme U87 cell line. *J Cell Biochem*, 2018.
 24. Liu, Q., X. Cui, X. Yu, B.S. Bian, F. Qian, X.G. Hu, C.D. Ji, L. Yang, Y. Ren, W. Cui, X. Zhang, P. Zhang, J.M. Wang, Y.H. Cui, and X.W. Bian, Cripto-1 acts as a functional marker of cancer stem-like cells and predicts prognosis of the patients in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2017. 16(1): p. 81.
 25. Wu, D., Z. Shi, H. Xu, R. Chen, S. Xue, and X. Sun, Knockdown

- of Cripto-1 inhibits the proliferation, migration, invasion, and angiogenesis in prostate carcinoma cells. *Journal of Biosciences*, 2017. 42(3): p. 405-416.
26. Gilles C, Newgreen DF, Sato H, et al. Matrix Metalloproteinases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis. In: Savagner P, editor. *Rise and Fall of Epithelial Phenotype*: Springer US; 2005. p. 297 - 315.
27. Aparna, M., L. Rao, V. Kunhikatta, and R. Radhakrishnan, The role of MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in the early stages of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2015. 44(5): p. 345-52.
28. Xing, P.X., X.F. Hu, G.A. Pietersz, H.L. Hosick, and I.F. McKenzie, Cripto: a novel target for antibody-based cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 2004. 64(11): p. 4018-23.
29. Kelber, J.A., A.D. Panopoulos, G. Shani, E.C. Booker, J.C. Belmonte, W.W. Vale, and P.C. Gray, Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene*, 2009. 28(24): p. 2324-36.
30. Foca, G., E. Iaccarino, A. Foca, L. Sanguigno, G. Untiveros, M. Cuevas-Nunez, L. Strizzi, A. Leonardi, M. Ruvo, and A. Sandomenico, Development of conformational antibodies targeting Cripto-1 with neutralizing effects in vitro. *Biochimie*, 2019. 158: p. 246-256.

표. 1

| Antibody | Species | Dilution | Company (#Cat.) | Molecular Weight(kDa) |
|-------------------------------------------|----------------------|----------|------------------------------|--------------------------|
| Cripto (V-17) | goat polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-23369) | 24 |
| p-Akt 1/2/3 | Rabbit polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-7985-R) | 56/62/62 |
| Akt1/2 (N-19) | Goat polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-1619) | 60, 56 |
| p-Erk1/2 | Rabbit polyclonal | 1:1000 | Cell Signaling (#9101) | 42, 44 |
| p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) | Rabbit monoclonal | 1:1000 | Cell Signaling (#4695) | 42,44 |
| Phospho-Src Family (Tyr416) | Rabbit polyclonal | 1:500 | Cell Signaling (#2101) | 60 |
| c-Src (B-12) | Mouse monoclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-8056) | 60 |
| twist (H-81) | Rabbit polyclonal | 1:500 | Santa Cruz (#sc-15393) | 28 |
| E-cadherin (H-108) | Rabbit polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-7870) | 135, 120/80 |
| Vimentin (V9) | Mouse monoclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-6260) | 57 |
| NFkB p65 (F-6) | Mouse monoclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-8008) | 65 |
| MMP-2 (H-76) | Rabbit polyclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-10736) | 63, 72 |
| MMP-9 (6-6B) | Mouse monoclonal | 1:1000 | Santa Cruz (#sc-12759) | 92 |
| α Tubulin (B-7) | Mouse monoclonal | 1:3000 | Santa Cruz (#sc-5286) | 55 |

그림.

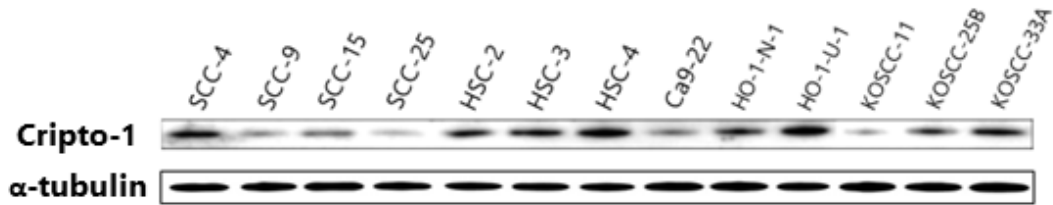


그림 1. Screening of Cripto-1 expression in OSCC cell lines using western blot analysis. Cripto-1 protein expression was detected in all of 13 OSCC cell lines to varying degrees. α -tubulin was used as the loading control.

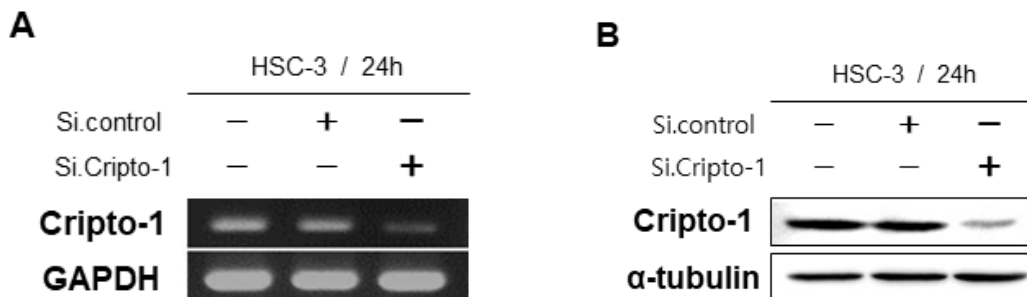


그림 2. Knockdown of Cripto-1 expression by small interfering RNA. After 24h treatment of siRNA, Cripto-1 expression was significantly reduced at both the mRNA (A) and protein (B) levels.

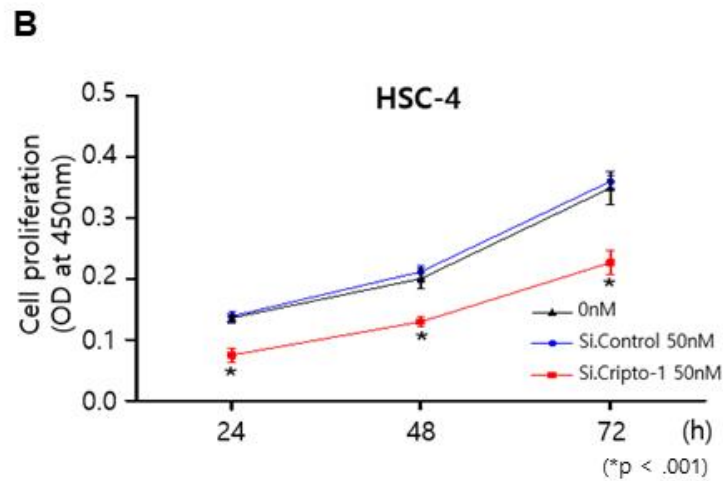
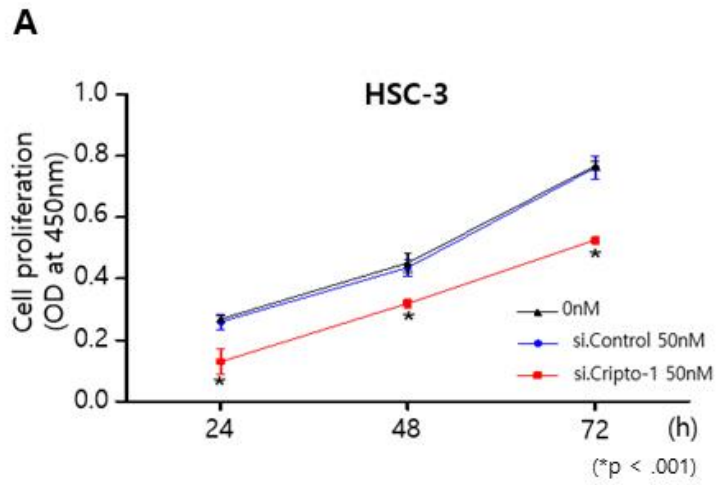


그림 3. Knockdown of Cripto-1 inhibits cell proliferation. The cell proliferation of HSC-3(A) and HSC-4(B) cells were examined by WST-1 assay, cells were transfected with 50nM of si.Control or si.Cripto-1 for 24, 48 and 72 h. respectively. (*p < .001, respectively)

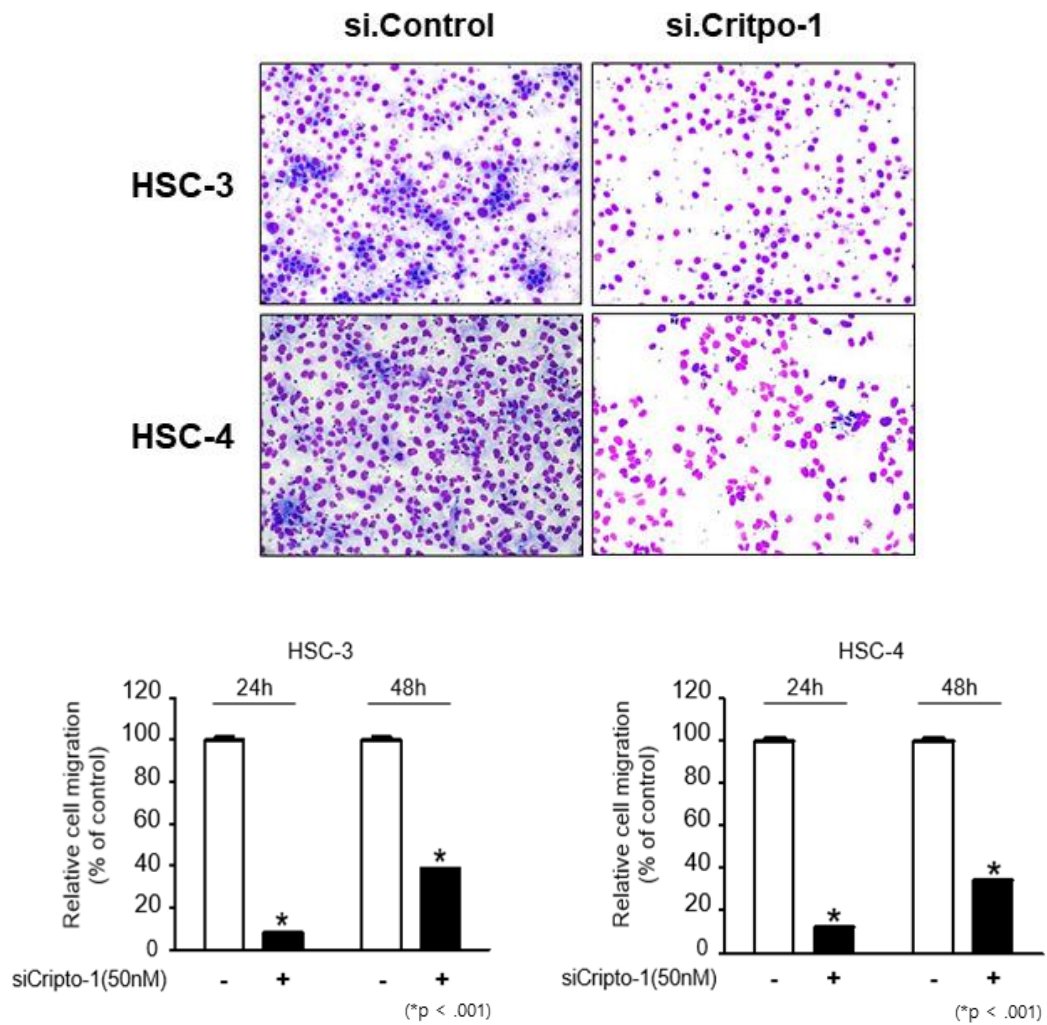


그림 4. Knockdown of Cripto-1 inhibits OSCC cell migration. The abilities of migration in HSC-3 and HSC-4 cells after treatment of siRNA were evaluated in the transwell chambers. There were significant decreases of migration in si.Cripto-1 treated cells of both cell lines. (p < .001, respectively)

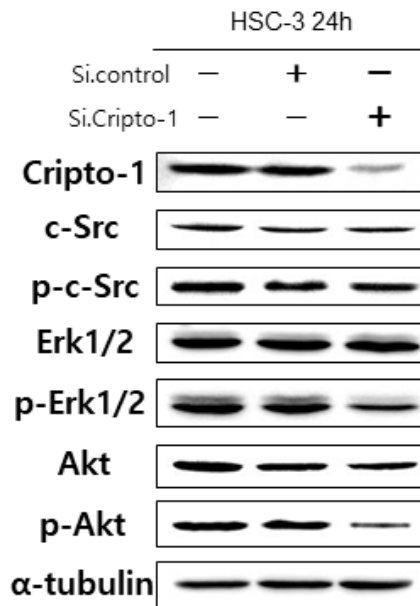


그림 5. Cripto-1 knockdown decreases the expression of AKT and MAPK. After transfection with si.Cripto-1 or si.Control for 24h, the levels of total and phosphorylated proteins were detected by western blot assay. α -tubulin was used as a loading control.

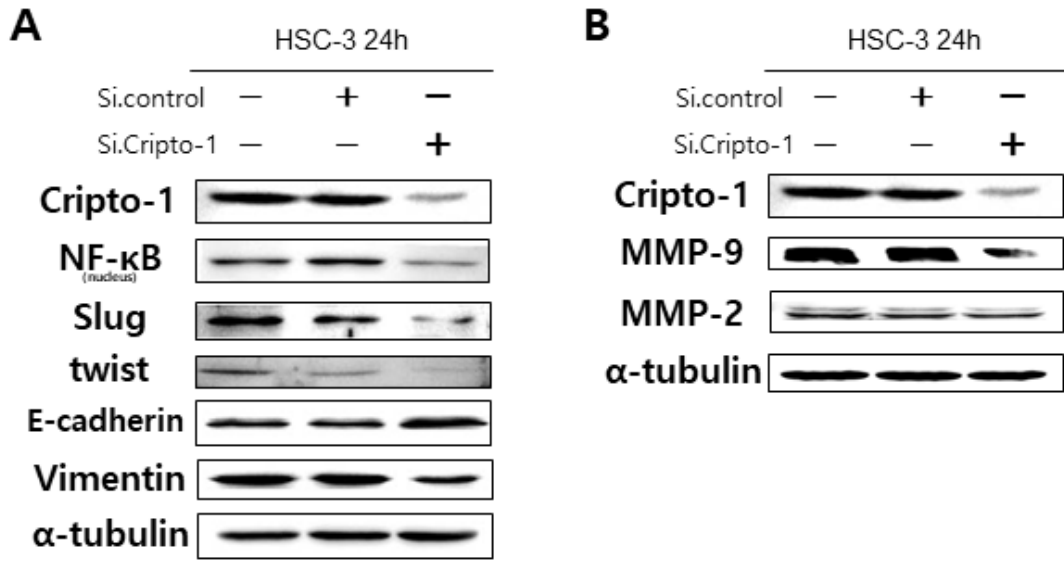


그림 6. Expression of Cripto-1 and EMT-related signaling molecules after Cripto-1 knockdown. Western blot assay showed that Cripto-1 knockdown results in up-regulation of E-cadherin and down-regulation of NF-κB, slug, twist, vimentin and MMP-9 in HSC-3 cells.

Abstract

Cripto-1 as a therapeutic target for oral squamous cell carcinoma: its roles and molecular mechanism

Ji-Hoon Kim

Department of Oral Pathology, Graduate School, Seoul National University

Directed by Professor **Hye-Jung Yoon**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Background/Aims:

The most common type of oral cancer is known as oral squamous cell carcinoma (OSCC) which is a highly invasive malignant tumor with frequent cervical lymph node metastasis. Despite the advanced therapeutic strategies for OSCC, the 5-year survival rate of patients with OSCC is merely 50%. Therefore, it is necessary to find novel prognostic factors and treatment modalities to prevent OSCC progression. Cripto-1 or teratocarcinoma-derived growth factor-1 (TDGF-1) is a member of the epidermal growth factor - Cripto-1/FRL-1/Cryptic (EGF - CFC) family. Cripto-1 has been found to be overexpressed in several human cancers including breast, colon, lung, cervix, stomach, and pancreatic cancer. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is process that is physiologically involved in development, tissue regeneration and wound healing. *In Vitro* and *in vivo* studies have shown that Cripto-1 plays important oncogenic roles during tumorigenesis and tumor progression by promoting cell proliferation, migration, invasion and tumor angiogenesis as well as induction of EMT. In OSCC, EMT is a critical event to enhance the migration and invasion of OSCC cells. Therefore, the aims of this study were to determine whether knockdown of Cripto-1 by siRNA could inhibit cell proliferation and migration in OSCC cell lines, and to identify the molecular mechanism of Cripto-1 to play an oncogenic role in OSCC.

Methods:

Cripto-1 expression in 13 OSCC cell lines was evaluated by western blotting. *In Vitro* Cell proliferation and migration assays were performed using HSC-3 and HSC-4, which showed relatively high expression of Cripto-1. For Cripto-1 knockdown, cells were transfected with 50nM of siRNA. The inhibition of Cripto-1 expression was confirmed by western blotting. WST-1 assay was used to evaluate cell proliferation. Cell migration was assessed using a transwell assay. In order to investigate the molecular mechanism of Cripto-1, Cripto-1 expression was inhibited in HSC-3 cells and the following changes of downstream signaling were examined by western blotting.

Results:

In the cell proliferation assay, transfection with anti-Cripto-1 siRNA (50nM) induced a statistically significant decrease in the proliferation of HSC-3 and HSC-4 ($p < .001$, respectively). In the cell migration assay, after 48h and 72h incubation, there was a statistically significant decrease in migration of both cells transfected with the anti-Cripto-1 siRNA at every time point, respectively. ($p < .001$). After knockdown of Cripto-1, the activities of p-AKT (ser473) and p-ERK1 / 2 (Thr202 / Tyr204) were markedly decreased but the expression of p-Src was not changed. Expression of nucleus NF- κ B, Slug, Twist which are related with EMT, was decreased. E-cadherin expression was increased, but vimentin expression was decreased. In addition, expression of MMP-2 was not changed but expression of MMP-9 was remarkably decreased.

Conclusion:

Knockdown of Cripto-1 could significantly inhibit cell proliferation and migration of OSCC cells through the AKT/MAPK signaling pathway. In addition, Cripto-1 could regulate the cell migration of OSCC by modulating EMT-related molecules and MMP-9. Therefore, suppression of Cripto-1 may be a new therapeutic strategies for the patients with OSCC.

Keywords : oral squamous cell carcinoma, Cripto-1, proliferation, migration, EMT
Student Number : 2012-21821