

진행된 자궁경부암 환자에서 5-fluorouracil과 cisplatin을 이용한 선행화학요법 중 연속적으로 시행한 자궁경부 생검 조직에서의 광학현미경적 종양세포 변화 및 apoptotic index (AI) 변화에 관한 연구

울산대학교 의과대학 강릉아산병원 산부인과학교실¹, 이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실², 해부병리과교실³
박한희¹ · 신은경² · 김미경² · 성순희³ · 한운섭³ · 주 웅² · 김승철²

목적 : 본 연구는 국소적으로 진행된 자궁경부암 환자에서 Cisplatin과 5-FU를 이용한 선행화학요법을 시행하면서 연속적으로 채취한 자궁경부암 조직에서의 광학현미경적 세포 변화와 apoptotic index (AI) 변화를 관찰하여 분석하고자 하였다.

연구 방법 : 1995년 1월부터 1997년 1월까지 방사선 단독 치료를 받기 전에 cisplatin과 5-fluorouracil로 선행화학요법을 시행 받은 5명의 진행된 자궁경부암 환자(stage IIb~IIIb)를 대상으로 하였다. Cisplatin은 치료 제1일에 체표면적당 60 mg/m² 정맥 주입하였으며, 5-FU는 1,000 mg/m²을 치료 제1일부터 5일간 정맥 주입하였다. 각각의 환자에서 선행화학요법은 매 21일 간격으로 총 3주기 시행하였다. 선행화학요법 매 주기 시작 1-7일 전에 자궁경부암 조직 채취를 각각의 환자에서 3회 연속적으로 시행하였으며, H&E 염색 및 광학 현미경을 이용한 암세포의 변화와 apoptotic index (AI)를 관찰하였다.

결과 : 일차 선행화학요법 시행 이후, 모든 환자에서 치료 전에 비교하여 현저한 AI의 증가 소견이 관찰되었다. 그러나 이차 선행화학요법 시행 후에는 단지 1명의 환자에서만 일차 선행화학요법 후의 AI에 비하여 약 1.2배의 AI의 지속적인 증가를 보였으며, 나머지 4명의 환자에서는 일차 선행화학요법 후 관찰되었던 현저한 AI의 증가는 보이지 않고, 오히려 AI가 감소하는 경향을 보였다. 선행화학요법 후에 특징적으로 보이는 광학현미경적 종양 세포의 변화로는 종양세포의 공포화와 세포핵 염색질의 퇴행성 변화(nuclear smudging, chromatin condensation)가 현저하였고, 이차 선행화학요법 후에는 부분적으로 종양세포들이 분화가 잘 된 편평상피세포들로 대체되기 시작하는 소견을 관찰할 수 있었다.

결론 : 일차 선행화학요법 후에 비하여 이차 선행화학요법 시행 후에는 AI가 오히려 감소하고, 광학현미경 소견에서도 종양세포의 퇴행성 변화가 둔화되는 소견을 볼 때, cisplatin과 5-FU를 이용한 선행화학요법 시, 자궁경부암 세포의 항암제 내성은 선행화학요법 시행 초기부터 발생함을 추측할 수 있었다. 이는 진행된 자궁경부암 치료로서 선행화학요법 시 고려되어야 할 문제점으로 생각된다.

중심단어 : 자궁경부암, 선행화학요법, 현미경적 세포변화, Apoptotic index (AI)

서론

자궁경부암은 우리나라 여성암 중 3번째로 흔한 암으로써 국내에서는 연간 4,124명의 신환이 발생하고 있다.¹ 전 세계적으로도 연간 371,000명의 신환이 발생하고, 190,000명이 자궁경부암으로 사망하는 것으로 보고되고

있다.² 더욱이 자궁경부암 선별 검사가 널리 시행되고 있는 미국에서도 매년 4,600명의 여성이 자궁경부암으로 사망하고 있어,³ 자궁경부암은 아직도 전 세계 여성의 건강을 위협하는 심각한 문제로 남아있다.

침윤성 자궁경부암의 전암 단계에서 조기 진단 및 치료를 위한 노력이 지속되어 왔고, 침윤성 자궁경부암에서도 수술 치료와 방사선요법 이외에 보조적 방사선요법과 항암화학요법 및 최근에는 동시 항암방사선요법 등이 도입되어 자궁경부암의 생존율은 지속적으로 향상되어왔다.^{4,6} 침윤성 자궁경부암에서 5-fluorouracil (5-FU)과 cisplatin의 복합요법이 표준치료로 이용되고 있으며,

논문접수일 : 2006년 10월 20일 채택일 : 2006년 11월 23일
교신저자 : 김승철, 158-710 서울시 양천구 목동 911-1
이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실
전화 : (02) 2650-5587 · 전송 : (02) 2647-9860
E-mail : onco@ewha.ac.kr

대부분 방사선요법과 병행되고 있어 항암화학 단독요법에 대한 연구는 부족한 편이다. Cisplatin의 항암화학요법은 G1 혹은 G2/M phase에서 세포주기를 정지시키고 DNA의 파괴로 인한 apoptotic cell death와 관련되어 있다.⁷ 또한 5-FU는 세포 내에서 uracil과 경쟁적으로 작용하여 DNA 생합성을 저해하는데, 종양세포의 합성 경로 중 deoxyuridyl산으로부터 thymidyl산이 되는 과정에서 methylation을 저해하여 DNA 생합성을 억제시킴으로써 apoptotic cell death를 유도하는 것으로 알려져 있다.⁸

국소적으로 진행된 자궁경부암은 수술과 방사선 단독 혹은 병합요법에도 불구하고 예후가 불량하여 국소적인 재발이나 전이를 잘 일으킨다. 이를 극복하기 위한 보다 효과적인 치료 방법의 필요성이 제기되어, cisplatin을 중심으로 하는 복합 선행화학요법(combined neoadjuvant chemotherapy; NAC)에 대한 관심이 모아졌다. 선행화학요법의 이론적인 근거는 수술 치료나 방사선요법으로 조직 손상이나, 혈관 분포 이상을 초래하기 전에 항암제를 투여하여 암세포의 항암제에 대한 반응을 극대화시킴으로써, 림프절 전이를 감소시키고, 재발률을 낮추어 생존율을 향상시킬 수 있다는 것이다.^{9,10} 그러나 이러한 장점과는 별도로 선행화학요법의 제한점으로는 항암제와 방사선요법 사이의 교차 저항성 및 민감도의 저하가 문제될 수 있으며, 방사선 치료의 지연, 치료의 연장으로 인한 경제적인 손실, 항암화학요법에 의한 독성 및 항암제 내성세포의 출현 등이 제한점으로 생각된다.¹¹

항암화학요법은 최소 3차 이상 시행하는 것이 일반적이며 약제에 대한 내성은 항암화학요법이 반복될수록 증가하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 항암화학요법의 효과 판정은 치료가 종결된 후에 방사선학적인 검사를 시행하여 종양의 형태학적인 변화를 확인하거나, relapse free interval 등의 임상적인 지표를 통해 판정하는 것이 일반적이었다. 그러나 항암제에 대한 내성이 재발성 자궁경부암에서 심각한 문제로 제기되면서, 내성의 기전과 함께 항암화학요법에 대한 민감도나 내성을 예측할 수 있는 지표의 개발이 요구되었다. 항암화학요법 효과에 대한 지표로 apoptosis의 증가, 암세포 성장의 감소, 신호전달체계(signal transduction pathway)와 관련된 단백질 발현의 변화 등이 고려되고 있다.¹²⁻¹⁴ 특히 apoptosis는 유방암에서 일차 복합항암화학요법을 시행한 이후에 24시간 경과 후부터 apoptotic rate가 증가하

며,¹⁵ 유방암에 대한 선행화학요법 후에 세포 합성률(Ki-67)이 감소된 환자에서 치료 반응률과 생존율이 향상되었음이 보고되었다.^{16,17} 항암화학요법으로 유도되는 종양세포의 변화나 apoptosis를 관찰함은 치료효과와 판정이나 환자의 예후를 예측하는 데 도움이 될 것으로 생각되며, 또한 새로운 치료약제의 개발, 기존의 항암화학 약제들의 단독 혹은 병용 사용을 결정하는 데에도 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구는 진행된 자궁경부암 환자에서 5-FU와 Cisplatin을 이용한 선행화학요법 시, 선행화학요법 매 주기(cycle) 직전에 연속적으로 자궁경부 조직검사를 실시하여, 5-FU와 cisplatin을 이용한 선행화학요법이 자궁경부암 세포에 미치는 형태학적 변화와 apoptotic index의 변화를 확인하고 분석해 보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 선행화학요법의 시행과 연속적 자궁경부 조직생검

1995년 1월부터 1997년 1월까지 침윤성 자궁경부 편평상피암으로 진단받은 5명의 환자(FIGO stage IIb-IIIb)를 대상으로 후향적 연구를 시행하였다. 모든 환자는 일차 방사선 치료를 받기 전에 cisplatin과 5-fluorouracil로 선행화학요법을 시행 받았다. 선행화학요법으로 cisplatin은 치료 제1일에 체표면적당 60 mg을 5% D/S 500 ml에 혼합하여 30분간 점적 정맥 주입하였으며 5-fluorouracil은 체표면적당 1,000 mg을 5% D/S 2,000 ml에 혼합하여 치료 제1일부터 5일간 점적 정맥 주입하였다. 선행화학요법은 총 3주기(cycle)를 원칙으로 하였으며 매 21일 간격으로 반복 시행하였다. 선행화학요법 매 주기(cycle) 시작 1-7일 전에 자궁경부 종양의 조직검사를 각각의 환자에서 연속적으로 3회 시행하였다.

2. 광학현미경을 통한 암세포의 관찰

조직검사를 통해 얻은 각각의 암조직은 10% 중성 포르말린에 고정하여 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후, 4μm의 박절편을 만들어 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경하에 암세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

Table 1. Characteristics of patients

Patient	Age (year)	FIGO stage	Cell type	Tumor size (cm)	Tumor shape	Parametrium invasion
Patient 1	39	IIB	LCNK	7	Exophytic	Left
Patient 2	42	IIB	LCNK	6	Exophytic	Right
Patient 3	54	IIIB	LCNK	4	Infiltrative	Left
Patient 4	63	IIIA	LCNK	2	Infiltrative	Left
Patient 5	54	IIIA	LCNK	4	Infiltrative	Both

LCNK; squamous large cell nonkeratinizing type

3. Apoptotic index (AI)의 측정

AI를 측정하기 위하여 Olympus BH2 현미경을 통해 얻은 digital 영상을 이용하였다. Hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 시행한 암조직 표본을 대상으로 각 환자에 대한 임상 정보는 전혀 알지 못하는 상황에서 조직의 분화도를 판독하였으며, 400배 배율에서 한 시야당 종양세포를 최소 100-150개 정도 확인하고, 이 중 apoptotic body의 수를 세었다. 이런 방법으로 최소 10개 이상의 무작위로 선택된 시야에서 최소 1,000-1,500개 이상의 종양세포를 세어 apoptotic body의 수를 관찰한 후, 평균 1,000개의 종양세포당 apoptosis가 발생한 세포의 수를 측정하여 apoptosis의 빈도를 계산하였다. 이러한 과정을 한 환자의 절편당 3회 이상 시행하여 오차를 최소화하였다. Apoptosis가 발생한 세포로 판단하기 위한 기준으로는 핵의 원형질의 둥근 언저리(rim of cytoplasm)에 의해 둘러싸인 pyknosis가 일어난 염색질(chromatin)의 덩어리가 관찰되거나, 혹은 투명한 공간 내에 다양한 작은 핵의 조각들(nuclear fragments)이나, 잘 경계가 지어지는 초생 달 모양의 염색질의 형태로 보이는 것으로 apoptosis를 판단하였다.¹⁵ 관찰자간의 오차를 배제하기 위하여 AI의 판정은 한 사람의 병리 전문의에 의하여 측정되었다. 범주변수의 통계처리는 Fisher's exact test (two-tailed)를 이용하였으며 p-value가 0.05 이하인 경우를 의한 것으로 평가하였다.

결 과

1. 대상 환자의 임상적 특징

대상 환자의 연령은 39-69세로 중간값은 63세이었으며 이전에 방사선 치료나 항암화학요법을 시행 받은 과거력은 없었다. 모든 환자의 조직학적 검사는 동일한 병

리전문의에게 의뢰되었으며 연구 대상 환자들의 의무 기록과 병리 보고서를 참고하였다. 자궁경부 종양의 크기는 2-7 cm이었으며, 2명의 환자는 돌출형(exophytic type)이었으며 나머지 3명은 침습형(infiltrative type)이었다. 진찰 상 한쪽 자궁방조직(parametrium)의 침범이 4명의 환자에서 발견되었으며 1명의 환자에서는 양측 자궁방조직 침범이 의심되어 모두 stage IIb 이상이었다. 조직학적인 유형은 5명 모두 대세포 편평상피암(large, nonkeratinizing squamous cell carcinoma)이었으며 분화도는 모두 중등도 이상이었다. 임상 병기 결정 시 시행한 복부 및 골반 컴퓨터 촬영 소견상 골반 림프절이나 부대 동맥 림프절 종대를 보인 환자는 없었다(Table 1).

2. 5-fluorouracil과 cisplatin을 이용한 선행화학요법으로 인한 자궁경부 편평상피암 세포의 광학현미경적 변화

선행화학요법을 시행하기 전에 채취한 자궁 경부암 조직 표본에서는 전형적인 침윤성 자궁경부 편평세포암으로 기질 내로 침윤하는 종양 세포들을 볼 수 있었으며, 이들 종양 세포는 크고 불규칙한 핵을 특징으로 하였다.

일차 선행화학요법 후, 이차 선행화학요법 직전에 채취한 자궁 경부암 조직에서는 종양 세포 내 공포화(vacuolar change)가 현저하게 관찰되었으며, 일부 종양 세포의 핵에서는 염색질의 퇴행성 변화(nuclear smudging, chromatin condensation)를 보였다(Fig. 1A). 또한 종양세포 주위에 존재하는 간질 조직의 부종과 혈관벽의 경화(sclerosis)가 동반되었으며, 간질 조직 내 포말상 탐식구(foam macrophage)의 침윤을 보였다(Fig. 1B,C). 또한 종양 세포의 괴사(necrosis)가 평균 10% 정도의 종양 세포에서 관찰되었다.

이차 선행화학요법 시행 후, 삼차 선행화학요법 시행

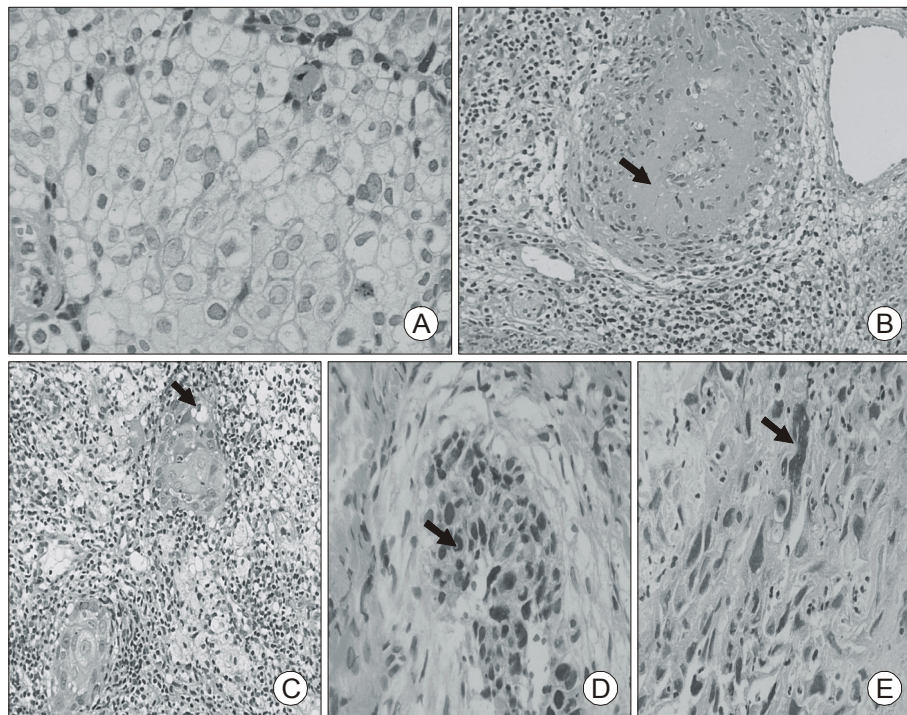


Fig. 1. (A) The nuclear smudging and condensation. Severe stromal edema around the tumor cell and multifocal foreign body granuloma were noted and cytoplasmic and nuclear shrinkage and condensation were seen after the first neoadjuvant chemotherapy (Patient 2, H&E, $\times 400$). (B) The formation of sclerosis of vascular wall (arrow). Marked vascular sclerosis with proliferation of fibroblasts was seen after the first neoadjuvant chemotherapy (Patient 2, H&E, $\times 100$). (C) The formation of foam cells surrounded by macrophage (arrow). Fibrosis and infiltration of inflammatory cells were noted around the tumor cell nests after the first neoadjuvant chemotherapy (Patient 3, H&E, $\times 100$). (D) The formation of vacuolar change (arrow). Very high degree of cytoplasmic and nuclear shrinkage with a phase separation of cytoplasmic water in clear vacuoles. Vacuoles have never been seen in the nucleus, before the second neoadjuvant chemotherapy (Patient 4, H&E, $\times 400$). (E) The anaplastic change of nucleus in tumor cells (arrow). The number of severe bizarre cells with amorphous change of nucleus was increased in the tumor cells, just before third neoadjuvant chemotherapy (Patient 1, H&E, $\times 400$).

직전에 채취한 자궁경부암 조직에서는 종양세포 내의 공포화가 더욱 심화됨을 보였으며(Fig. 1D), 종양세포의 역형성(anaplastic change)도 빈번히 관찰되었다(Fig. 1E). 또한 종양소(tumor nest)의 수가 현저히 감소되며, 종양 주위의 간질 조직에서 림프구, 호산구, 호중구 및 형질 세포 등의 염증 세포 침윤이 일차 선행화학요법 이후에 비교하여 이차 선행화학요법 후에 증가됨을 볼 수 있었으며, 특히 중성구의 침윤이 현저하게 보였다. 종양 중심부의 괴사도 진행되었으며 일부에서는 종양세포들이 분화가 잘 된 편평상피세포들로 채워지기 시작하는 소견을 관찰할 수 있었다.

3. 5-fluorouracil과 cisplatin을 이용한 선행화학요법으로 인한 Apoptotic Index (AI)의 변화

일차 선행화학요법을 시행한 이후에는 5-FU와 cisplatin에 의한 종양세포의 핵 원형질의 광범위한 손상이 일어났음을 시사하는 병리학적인 소견으로 핵 내 karyorrhexis, karyolysis 그리고 핵의 파편(nuclear fragment) 등이 관찰되어 apoptosis의 과정을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 선행화학요법을 시행하기 전의 AI는 7-21로 평균 AI는 16.4이었다. 일차 선행화학요법 시행 후의 AI는 36-74로 평균 54.2를 보였다. 따라서 치료 전과 비교하여 일차 선행화학요법 시행 후 5명의 모든 환자에서 2배에서 최대 8배까지 AI의 증가가 관찰되었으나 통계학적으로는 의의가 없었다($p=0.214$). 그러나 이차 선행화학요법의 AI는 46-51로 평균 46을 보였는데, 5명의 환자 중에서 1명

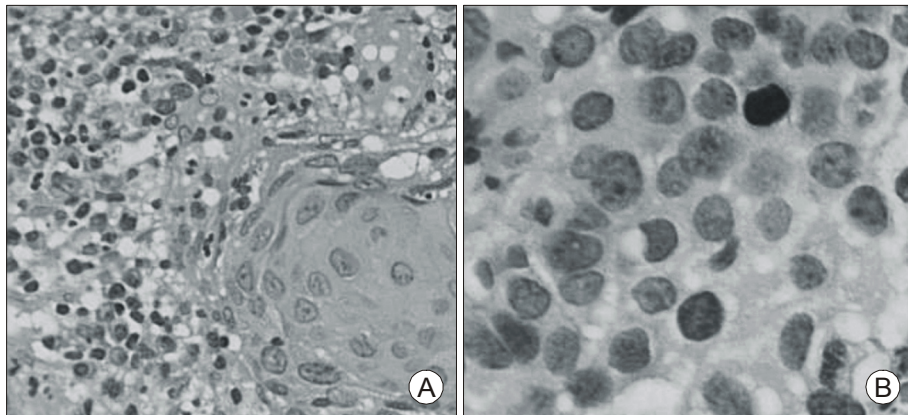


Fig. 2. Detection of apoptosis in a patient who received neoadjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil. In pre-chemotherapy status (A, H&E, ×100), well subscribed tumor cells and sharply demarcated nucleus have been left in cervical cancer tissue, But After neoadjuvant chemotherapy (B, H&E, ×400), arrow show typical apoptotic cells, Apoptotic index after neoadjuvant chemotherapy (74 in B) was significantly higher than that of pre-neoadjuvant chemotherapy (21 in A) (Patient 5, 60 year-old, Squamous cell carcinoma of cervix, stage IIIA).

만이 일차 선행화학요법 후에 관찰된 AI와 비교하여 약 1.2배의 증가율을 유지하였고, 나머지 4명의 환자에서는 일차 선행화학요법 후에 관찰되던 현저한 AI의 증가율은 볼 수 없었으며, 오히려 AI가 감소하는 경향을 보였다. 치료 전과 이차 선행화학요법 시행 후 AI의 증가도 통계학적으로는 의의가 없었다($p=0.241$) (Fig. 3).

고 찰

암 발생은 암유전자의 활성화나 암억제유전자의 불활성화와 같은 유전적 변화에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며,¹⁶ 많은 고형암에서는 이러한 두 가지 변화가 모두 관찰되고 있어, 결국 암의 발생은 다양한 유전자의 증폭, 돌연변이, 재배열 및 결손 등의 변이가 축적되어 발생하는 다단계 과정으로 생각된다. 암 조직은 물론 정상 조직에서도 전체 세포 수의 조절은 세포 증식, 세포 분화 그리고 세포 사멸의 균형에 의해서 결정되며, 이 중 어느 한 부분에서라도 문제가 발생하면 조절되지 않은(uncontrolled) 세포 증식이나 세포 사멸의 결과를 초래하게 된다.⁸

최근에는 적어도 6가지 이상의 세포의 생리적 기능에 변화가 발생해야 세포의 악성 증식(malignant growth)이 진행된다는 주장이 제기되었는데, 이는 (1) 성장 신호의 자가 충족(self-sufficiency in growth signal), (2) 성장 억제 신호에 대한 민감도 상실(insensitivity to growth inhibitory

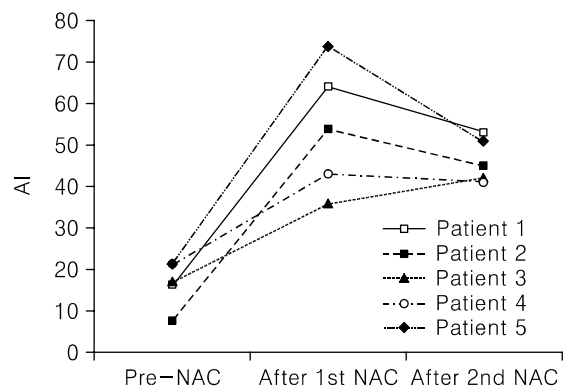


Fig. 3. The consecutive changes of apoptotic index (AI). NAC; neoadjuvant chemotherapy.

signals), (3) 세포 사멸의 회피(evasion of cell death), (4) 무제한적 증식력(limitless of replicative potential), (5) 지속적인 혈관생성(sustained angiogenesis), (6) 조직의 침윤성과 전이성 등을 말한다.¹⁷

그러나 1972년 Kerr 등이 apoptosis라는 예정된 세포 사멸(programmed cell death)에 의하여 끊임없이 재생되는 조직의 평형을 유지한다고 주장한¹⁵ 이래 30여 년이 지나도록 세포 증식과 세포 사멸의 균형이 어느 정도로 암 발생에 기여하는지에 대해서는 아직도 정확히 밝혀지지 않고 있다. 정상 세포에서의 apoptosis는 배의 형성이나 조직의 항상성, 신생물의 발생에 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 암의 발생을 억제하

는 보호 기전으로써 유전적 변이가 발생한 세포를 선택적으로 제거하는 기능을 갖는다. Apoptosis는 종양의 발생에서뿐만 아니라 항암화학요법 시 발생하는 생물학적 변화 과정 중에서도 관찰되고 있으며, 특히 최근에는 암 발생의 기전을 밝히는 단서일 뿐 아니라 암의 진단 및 치료 등의 임상적 측면에서도 중요한 단서가 될 것으로 기대된다. Apoptosis는 세포 괴사(necrosis)와는 달리 에너지를 필요로 하는 능동적인 세포 사멸으로써, 조절이 가능하고, 그 조절에는 apoptosis를 조정하는 유전자가 관련되고 있다. 그러한 유전자로서 지금까지 밝혀진 가장 중요한 유전자는 p53과 bcl-2이며, 이외에도 c-myc, ras 등 여러 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁸ Apoptosis는 내인성으로 특정한 세포에서 호르몬이나 국소적으로 작용하는 화학물질 등과 같은 조직 특이성 인자에 의하여 유발되거나, 외인성으로는 방사선, 화학물질, 바이러스와 같은 외부 자극에 의한 세포손상에 의해 유발된다. 항암화학요법이나 방사선 치료에 대한 종양 세포의 DNA 손상은 독립적으로 또는 p53에 의한 apoptosis 과정을 통해 세포 주기를 정지시켜 치료 효과를 나타내는 동시에 c-myc, ras 등의 종양유전자는 활성화시켜 apoptosis와 p53의 작용을 억제하는 결과를 초래한다.¹⁹ 따라서 apoptosis는 종양 세포의 치료 반응을 결정하는 중심적인 역할을 하게 된다.

Apoptosis를 확인하는 방법은 전자현미경 관찰, DNA 염색 및 hematoxylin-eosin (H-E) 염색 후 광학 현미경 관찰을 통해 측정할 수 있으며, 그 외 DNA 절편을 검출하는 방법으로 전기 영동, cell fraction에 의한 DNA fragments의 정량화 및 filtration assay에 의한 DNA fragmentation의 검출 등이 있다. 또한 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP (TUNEL) 및 flow cytometry 등 여러 방법이 있는데 본 연구에서 시행한 H-E 염색 후 광학 현미경에 의한 검색은 많은 수의 세포를 관찰할 수 있고 비용이 저렴하며, 기술적으로 용이한 장점이 있다. 그러나 관찰자간의 오차를 배제하기 위하여 AI의 판정은 한 사람의 병리 전문의에 의하여 측정되므로 장기간의 연구 기간과 주관적인 판단의 가능성 등이 객관적인 AI의 측정함에 있어 광학적 현미경 관찰을 통한 AI 측정의 취약점으로 여겨진다.²⁰⁻²²

높은 AI는 비호지킨 림프종,¹² 유방암,²³ 방광암,²⁴ 전립선암²⁵ 등에서 진단의 지표로 이용되기도 하고 환자의

생존율과도 관계가 있음이 밝혀졌다. 자궁경부의 편평상피 병변에서는 자궁경부 상피내종양의 등급이 증가할수록, 그리고 자궁경부암으로 진행될수록 AI가 증가한다는 보고가 있었으며, 이러한 소견은 과도한 세포 증식 과정에서 부적절하게 발생한 세포들 혹은 심한 유전적 손상을 받은 세포들을 효과적으로 제거하려는 과정으로 생각된다.²⁶

Apoptosis와 방사선에 대한 암세포 반응 사이의 상관관계²⁷는 비교적 잘 알려져 있어 전립선암,²⁵ 소세포폐암,²⁸ 자궁경부암²⁹ 등에서 치료를 시행하기 전에 측정된 spontaneous apoptotic index (SAI)가 방사선요법에 대한 반응을 예측하는 데 유용하다는 결과가 보고되었으며, 직장암 환자에서도 동시 방사선화학요법을 시행하는 경우 apoptosis와 치료 반응도와 관련이 있음이 보고되었다.³⁰ 또한 국내에서도 단독 방사선 치료를 시행한 자궁경부암 환자를 대상으로 한 연구에서 치료 전 SAI와 p53의 방사선 반응에 대한 예측인자로서의 가능성을 보고한 바 있다.³¹

방사선요법이나 항암화학요법을 시행하는 중에 연속적으로 AI의 변화를 관찰한 연구는 아직까지 없으며, 항암화학요법이나 방사선요법의 효과를 좌우하는 치료 내성 발생에 대한 다양한 가설이 제기되고 있다. 항암화학요법에 중에 apoptosis의 연속적인 상태를 파악하는 것은 자궁경부암에서 방사선 치료 및 항암화학요법 그리고 동시 항암방사선요법에 대한 치료 내성 발생을 이해하는 데 매우 유용할 것으로 생각된다. 그러나 자궁경부암에서는 항암화학요법의 시행이 제한되어 있고, 매번 침습적인 조직 검사를 시행하는 데 어려움이 따르기 때문에 이에 대한 연구가 없었던 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 방사선 치료를 시행하기 전 cisplatin과 5-FU를 이용한 선행 화학요법을 시행한 환자 5명을 대상으로 매 치료 직전 자궁경부 조직검사를 시행하여 AI의 연속적인 변화를 관찰하였다. 일차 선행화학요법 시행 이후 5명의 모든 환자에서 치료 전과 비교하여 현저한 AI의 증가 소견이 관찰되었다. 그러나 이차 선행화학요법 시행 후에는 1명의 환자에서만 일차 선행화학요법 직후에 관찰된 AI와 비교하여 약 1.2배의 지속적인 증가율을 보였고, 나머지 4명의 환자에서는 일차 선행화학요법 후에 비하여 AI의 증가율이 감소하는 경향을 보였다. 즉, 항암화학요법 시행 초기에는 apoptosis

가 급격히 증가하지만 점차 apoptosis가 둔화됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 항암제에 의한 종양세포의 DNA 손상에 대해서 종양유전자가 처음에는 apoptotic threshold를 낮춤으로써 오히려 종양 세포의 항암제 감수성을 증가시키지만, 점차 다양한 유전자 신호를 통해 apoptosis를 저해하고 세포 주기의 재활성화를 유도한다는 “fail- safe program” 이론에¹⁹ 부합되는 결과라고 하겠다.

자궁경부암 중에서 IB기와 IIA기에서 림프절 전이의 증거가 없는 자궁경부암의 경우에는 치료 후 재발률이 10-20%에 불과한 반면,³² III기에서는 23-65%로 높은 국소 재발률을 보이고 있으며, 진행된 자궁경부암 IIB, IIIB 및 IVA의 5년 생존율은 각각 60-65%, 25-48%, <20% 극히 저조하다.³³ 또한 IB2 및 IIA기로서 종양의 장경이 4 cm 이상인 거대 자궁경부암이나 자궁방 결합조직 침윤이 있는 경우에는 치료의 실패 위험도와 재발의 가능성이 높으므로 이를 극복하고 치료 효과의 증진 및 생존율의 향상을 위한 효과적인 치료법이 절실하여 cisplatin을 기초로 한 선행화학요법에 대해 관심이 모이게 되었다.

항암화학요법은 기본적으로 항암제에 대한 정상 세포와 암세포의 감수성의 차이를 이용해서 암을 치료하는 것으로서 대부분의 암세포는 퇴행성 변화를 일으킨다. 편평상피암에 대한 항암화학요법 후의 현미경적 변화에 대한 연구가 두경부암을 대상으로 하여 소수 보고된 바 있으며, 자궁경부암에서 cisplatin과 5-FU로 항암화학요법 시에 발생하는 암세포의 변화에 대한 연구는 다른 고형암에 비해서 미미한 실정이다. 고농도의 cisplatin을 투여할 경우에는 초기부터 DNA 단편화(fragmentation)가 진행되는 반면, 저농도에서는 G2-block을 거쳐 48시간 이후에 apoptosis가 일어난다.³⁴ 5-FU로 유도된 apoptosis에서 발생하는 DNA 단편화는 다른 항암제에 의해 유도된 DNA 단편화에 비해 단편(fragment) 크기가 큰 것으로 보고되었다.³⁵

두경부암에서 cisplatin과 bleomycin을 처리한 후에 나타나는 특이한 소견으로 암세포의 분화가 보고된 바 있다. 이는 항암제가 암세포의 분화를 유발시키거나 촉진 시킴을 뒷받침하며, 이질성(heterogeneity)을 특징으로 하는 암 조직의 특성상 항암제 치료 시 미분화된 종양 세포만을 사멸시킨다는 가설도 제기되고 있다.³⁶

본 연구에서도 일차 선행화학요법 이후에 특징적으로

종양 세포 내 공포화와 종양 세포핵의 염색질에 퇴행성 변화(nuclear smudging, chromatin condensation)가 현저히 나타났고, 종양 세포 주위의 간질 부종과 혈관벽의 경화, 간질 조직 내 포말상 탐식구(foam macrophage)의 침윤 및 종양세포의 괴사가 현저히 나타났다. 이차 선행화학요법 시행 후에는 종양 중심부의 괴사가 진행되는 소견 뿐 아니라, 일부에서는 종양세포들이 분화가 잘 된 편평상피세포들로 채워지기 시작함을 관찰할 수 있었는데, 이는 항암제가 종양 세포의 분화를 유발하고 촉진한 결과라고 해석할 수 있다.

본 연구의 소견으로 볼 때, 자궁경부암의 치료에 cisplatin과 5-FU를 이용한 선행화학요법은 종양 세포에 대한 세포질 및 핵에 광범위한 세포 상해를 초래하며, apoptosis를 유도함을 알 수 있었다. 그러나 항암화학요법 주기가 반복됨에 따라 치료 초기에 비해 암세포의 항암제에 대한 치료 반응은 점차 둔화됨을 알 수 있다.

본 연구의 시행 시, 3주기 이상의 선행화학요법을 시행했던 환자의 수가 적고 연속적으로 조직검사를 시행하는 것이 임상적으로 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서 대상 환자의 수가 부족한 것이 큰 제한점이라고 하겠다. 그러나 현재 수술적 치료가 어려운 거대 자궁경부암 환자에서 선행화학요법의 효용성에 대한 대규모 임상 실험(EORTC 55994)이 진행되고 있는 만큼, 자궁경부암 치료에 선행화학요법의 사용 가능성을 뒷받침하는 이론적 근거도 필요할 것으로 생각된다. 현재 apoptosis를 표적으로 하는 항암치료의 연구가 진행되고 있으나 apoptosis와 관련된 유전자가 대부분 생리적으로 중요한 역할을 동시에 수행하고 있어 이를 단독으로 차단하는 방법에는 제한점이 많은 것으로 알려져 있다.³⁷ 또한 apoptosis의 기전과 항암치료에 의한 apoptosis의 변화에 대해서도 아직 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 진행된 유방암에서 선행화학요법 이후의 암세포의 변화나^{38,39} 두경부 편평상피암의 방사선요법에 의한 암세포의 광학 및 전자현미경적 변화는 보고된 바 있으나,⁴⁰ 침윤성 자궁경부 편평상피암에서 항암 화학치료에 의한 암세포의 형태학적인 변화와 선행화학요법 중 연속적으로 조직검사를 시행하여 apoptosis의 변화를 보고한 연구는 아직 없는 상태로 이에 대한 연구가 필요하다. 따라서 선행화학요법을 시행하면서 종양 조직의 apoptosis 양상을 연속적으로 관찰한 본 연구는 이를 위한 최초의 예비 연구

(preliminary study)로써의 의의가 있다고 하겠다.

또한 향후 추가 연구를 통하여, 선행화학요법 시행 과정에서, 종양 조직의 apoptosis의 증가율이 최저점에 이르는 시점을 규명함으로써, 최대의 치료 효과를 얻을 수 있는 최소한의 선행화학요법의 시행 주기 횟수를 결정하는 데에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

- Annual Report of Gynecologic Cancer Registry Program in Korea (1999.1-1999.12). 2001.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64.
- Grenlee RT, Murrey T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 507: 7-33.
- Morris M, Eifel PJ, Lu J. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high risk cervical cancer. *N Eng J Med* 1999; 340: 1137-43.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Eng J Med* 1999; 340: 1144-53.
- FIGO. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *J Epi and Biostat* 1998; 3: 5-34.
- Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L. Kinetics of cisplatin induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1995; 60: 725-9.
- Madder RM, Steger MM, Steger G. Resistance to 5-fluorouracil. *Gen Pharmac* 1998; 31: 661-6.
- Sardi J, Sananes C, Giaroli A. Neoadjuvant chemotherapy in locally advanced carcinoma of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 486-93.
- Sardi J, Sananes C, Giaroli A. Long term follow-up of the first randomized trial using neoadjuvant chemotherapy on stage Ib squamous carcinoma of the cervix: The final results *Gynecol Oncol* 1997;67: 61-9.
- Kirsten F, Atkinson KH, Coppleson JVM, Elliott PM, Gren D, Houghton R, et al. Combination chemotherapy followed by surgery or radiotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Br J Obstet Gynecol* 1987; 94: 583-8.
- Leoncini L, Del Vecchio MT, Megha T, Barbini P, Gherlinzoni F, Tosi P, et al. Correlation between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1993; 142: 755-63.
- Sagarra RM, Andrade LA, Martinez E, Pintos G, Syrjanen K, Derchain S, et al. P53 and bcl-2 as predictors in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 720-5.
- Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30: 2068-71.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
- Sager R. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-46.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Lin XS, Denmeade S, Isaacs J. The genetics of programmed (apoptotic) cell death. *Cancer Surv* 1996; 25: 173-94.
- Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *J Mol Med* 2002; 80: 137-46.
- Fumio Y, Osamu T, Hajimi S. Apoptotic index in ovarian carcinoma: Correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Gyn Oncology* 1997; 66: 439-55.
- Koss LG. Diagnostic cytology and Its histologic Bases, 4th ed. Philadelphia: Lippincott;1992.
- Martin DS, Stolfi RL, Colofiore JR, Nord LD, Sternberg S. Biochemical modulation of tumor cell energy in vivo: A lower dose of adriamycin is required and a greater antitumor activity is induced when cellular energy is depressed. *Cancer Invest* 1994; 12: 296-307.
- Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30: 2068-73.
- Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-9.
- Aihara M, Scardino PT, Trong LD, Wheeler TM, Goad JR, Yang G, et al. The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma on the prostate. *Cancer* 1995; 75: 522-9.
- Isacson C, Kessis TD, Hedrick L, Cho KR. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 1996; 56: 669-74.
- Blank KR, Rudoltz MS, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. The molecular regulation of apoptosis and implication for radiation oncology. *Int J Radiat Biol* 1997; 71: 455-66.
- Komaki R, Milas L, Ro JY, Fujii T, Perkins P, Allen P, et al. Prognostic biomarker study in pathologically staged N1 non small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 787-96.
- Levine EL, Renahan A, Gossiel R, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick C, et al. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995; 37: 1-9.
- Scott N, Jale A, Deakin M. A histological assessment of the response of rectal adenocarcinoma to combination chemotherapy; Relationship to apoptotic activity, P53 and Bcl-2 expression. *Eur J Surg Oncol* 1998; 24: 169-73.
- Chung EJ, Kim GE, Seong JS, Yang WI, Kim YT, Suh CO. Clinical significance of apoptosis and p53 protein expression in stage IIb squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy alone. *J Korean Cancer Assoc* 2000; 32: 638-46.
- Disaia PJ. Surgical aspects of cervical carcinoma. *Cancer* 1981; 48: 548-59.
- Perez CA, Kurman RJ, Stehman FB. Uterine cervix in principles and practice of gynecologic oncology. Philadelphia:

- Lippincott;1992.p.591-662.
34. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharma* 1990; 262: 8235-41.
35. Yoshika A, Tanaka S, Hiraoka D. Deoxyribonucleotide triphosphate imbalance. 5-fluoro- deoxyuridine induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 1987; 262: 8235-41.
36. Shapshay SM, Hong WK, Incze JS. Histopathologic findings after cis-platinum, bleomycin therapy in advanced previously untreated head and neck. *Am J Surg* 1978; 136: 534-8.
37. Zhivotovsky B, Orrenius S. Apoptosis and cancer. *Sem Cancer Bio* 2003; 13: 93-5.
38. Vered S, Baljit S, Theodore T, Jeanette GC, Antomella N, Mathew JE, et al. A prospective pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 124-33.
39. Fisher B, Manounas E. Preoperative chemotherapy; A model for studying the biology and therapy on primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 537-40.
40. Kellokumpu-Lehtinen P, Soderstrom KO, Kortekangas A. Ultrastructural effects of irradiation on squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1989; 63: 1108-18.

Study on consecutive light microscopic changes of tumor cells and apoptotic index observed in serial cervical biopsies during neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in locally advanced cervical cancer

Han Moie Park¹, Eun Kyung Shin², Mee Kyung Kim², Soon Hee Sung³,
Woon Sup Han³, Woong Ju², Seung Cheol Kim²

*Department of Obstetrics and Gynecology, Gangneung Asan Hospital, Ulsan University College of Medicine¹,
Departments of Obstetrics and Gynecology², Pathology³, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective : To determine the effects of neoadjuvant chemotherapy (5-fluorouracil plus cisplatin) on tumor cell morphology and apoptosis by analyzing the consecutive changes of apoptotic index (AI) and histology observed in the serially obtained cervical cancer tissues during the chemotherapy.

Methods : Cervical cancer tissues were obtained by punch biopsy just before starting the each cycle of neoadjuvant chemotherapy from five patients with locally advanced disease (stage IIb-IIIb), but previously untreated squamous cell carcinoma of uterine cervix. All patients were treated with three cycles of 5-fluorouracil (1,000 mg/m² at day #1-5) and cisplatin (60 mg/m² at day #1) at 3 weeks interval. All H & E stained cervical cancer tissue slides were scored for apoptotic index and observed for microscopic changes of tumor cells by a pathologist.

Results : After the first cycle of chemotherapy, AI was significantly increased (from 2 times to 8 times). And widespread injury to cytoplasm was observed and followed by karyorrhexis and karyolysis of nucleus of tumor cells. The size of tumor nests was reduced and it was also noted that fibrosis and infiltration of inflammatory cells were increased. The parts of tumor nests were replaced by mature squamous cells and the changes in nuclear morphologic features pointing in a more differentiated direction. But after the second cycle of chemotherapy, only one patient showed an increase in AI by 1.2 times over that after the first cycle of chemotherapy. The rest showed slight decreases in AI compared to that after the first cycle of chemotherapy. In addition, fewer microscopic morphologic changes of tumor cells induced by chemotherapy were observed after the second cycle of chemotherapy compared to those after the first cycle of chemotherapy.

Conclusion : We found that AI hardly increased or rather decreased, and that microscopic changes of tumor cells were fewer after the second cycle of neoadjuvant chemotherapy compared to the situation after the first cycle of chemotherapy. Thus, we could deduce that chemoresistance might rapidly develop in cervical cancer cells after the first cycle of neoadjuvant chemotherapy using 5-fluorouracil and cisplatin. So we need to consider this problem when we treat the locally advanced cervical cancer patients with neoadjuvant chemotherapy using 5-fluorouracil and cisplatin.

Key Words : Cervical cancer, Neoadjuvant chemotherapy, Microscopic changes, Apoptotic index (AI)
