

방광 이행상피세포암종에서 Clusterin 단백질 발현과 세포고사

Clusterin Expression and Apoptosis in Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

Hyun Jung Park, Ho Jung Lee¹, Yoon Hee Yum², Jeong Yoon Kang, Tag Keun Yoo

From the Departments of Urology and ¹Pathology, ²Life Science Institute, Eulji Medical Center, College of Medicine, Eulji University, Seoul, Korea

Purpose: The clusterin expression has been associated with tumorigenesis of various malignancies, including tumors of the prostate, colon and breast. Furthermore, the expression of clusterin is modulated by many factors that are believed to regulate tumor growth and apoptosis. We studied the clusterin expression in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder and we investigated its correlation with apoptosis.

Materials and Methods: Eighty five bladder tumor specimens from radical cystectomy or transurethral resection were subjected to immunohistochemical clusterin staining with Ig G clusterin Ab. We examined the immunohistochemical localization of clusterin, and this was followed by TUNEL staining to detect the apoptotic cells. After double-staining with Hoechst 33258, we detected the apoptotic cells under a fluorescence microscope and we calculated the apoptotic index.

Results: Invasive TCC showed a stronger positive expression of clusterin as compared with superficial TCC, but the positivity of the clusterin expression was not in proportion to the tumor grade. The apoptotic indices of cancer were $0.52 \pm 0.28\%$, $0.30 \pm 0.16\%$ and $0.17 \pm 0.11\%$ in Grade I, Grade II and Grade III superficial TCC, respectively, and it was $0.23 \pm 0.13\%$ in Grade III invasive TCC. Apoptotic cells were not detected in the cancer cells stained with clusterin. Conversely, clusterin was not expressed in the cells showing apoptosis.

Conclusions: These results suggest that clusterin could be used as a marker to provide prognostic information for the TCC patients. The apoptotic index revealed that apoptosis and the clusterin expression have correlation with transitional cell cancer. Further study will be needed to clarify the role of clusterin as a therapeutic target for cancer treatment. (Korean J Urol 2007;48:402-407)

Key Words: Apoptosis, Clusterin, Transitional cell carcinoma

대한비뇨기과학회지
제 48 권 제 4 호 2007

을지대학교 의과대학 을지병원
비뇨기과학교실, ¹병리학교실,
²의과학연구소

박현정 · 이호정¹ · 염윤희²
강정운 · 유탁근

접수일자 : 2006년 11월 28일
채택일자 : 2007년 3월 8일

교신저자: 강정운
을지대학교 의과대학 을지병원
비뇨기과
서울시 노원구 하계 1동
280-1
☎ 139-711
TEL: 02-970-8308
FAX: 02-970-8305
E-mail: kiy5205@eulji.or.kr

본 논문은 을지대학교 의과대학의 교내연구
비 지원으로 이루어졌음.

서 론

Clusterin (CLU)은 사람에서 apolipoprotein J, 보체분해억제제 (complement lysis inhibitor), SGP-2, SP 40-40, gp80, T54, TRPM2 등의 다양한 이름을 가진 단백질로 세포응집, 보체 억제와 지질의 수송, 면역조절, 정자의 성숙, 상피세포분화 그리고 세포고사 등 여러 생화학적 과정에 관여한다.¹⁻⁴

전립선암에서는 clusterin이 세포고사의 억제자로 tumor necrosis factor-alpha같은 세포고사의 자극에 대해 보호하는 역할이 있고⁵ 유방암의 진행을 예측할 수 있는 인자이다.^{6,7} 또한 방광이행상피세포암종과 관련해서는 clusterin mRNA의 발현이 병리학적 병기 및 조직학적 분화도와 연관성이 있고 발현 정도가 강할수록 환자들의 생존율이 낮아졌다는 보고가 있다.⁸⁻¹⁰

본 연구에서는 방광암 조직에서 clusterin 단백질 발현 양

상이 병리학적 병기 및 조직학적 분화도와 상관관계와 개별 방광이행상피세포암종 세포에서 면역화학염색법 등을 통하여 세포고사와 clusterin 표현과의 관계를 확인하여 방광암에서 세포고사 억제자로서 clusterin의 역할 및 작용기전을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

본원에서 방광암으로 진단받고 경요도적방광절제술 또는 근치적방광절제술을 시행받은 환자 중 표제성 53례, 침윤성 33례의 조직을 재료로 사용하였다.

1. Clusterin 염색

고정된 방광 조직은 탈수 과정을 수행한 후 파라핀으로 포매하였다. 5 μ m 두께로 파라핀 절편을 만든 후 xylene으로 파라핀을 제거한 다음 면역조직화학염색을 시행하였다. 비특이적 염색을 방지하기 위하여 goat normal serum으로 30분간 상온에서 반응시켰다. 일차항체로 mouse monoclonal anti-mouse clusterin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)을 1:100으로 희석시켜 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 5분씩 3회 세척하고 이차항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)에 20분 동안 반응시켰다. Phosphate buffered saline (PBS)로 5분씩 3회 세척 후 peroxidase-conjugated streptavidin (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)을 20분간 반응시키고, PBS에 5분 동안 3회 세척하였다. Amino ethyl carbazol (AEC)로 2분간 발색시킨 다음 물로 세척하였다. Mayer's hematoxylin으로 2분간 대조 염색한 뒤, crystal mount로 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다. Clusterin의 발현 정도는 음성, 25% 미만으로 염색된 경우는 약양성 (1+), 50% 미만인 경우는 중등도 (2+), 50% 이상인 경우는 강양성 (3+)으로 분류하였다. 방광이행상피세포암 조직에서 병리학적 병기와 조직학적 분화도에 따른 clusterin 발현 정도를 비교 조사하였다.

2. TUNEL 염색

방광암 조직에서 세포고사를 확인하기 위하여 *in situ* apoptosis detection kit, fluorescein (ApopTag; Roche)을 사용하여 TUNEL 염색을 시행하였다. 방광암 조직에서 TUNEL 염색을 시행하기 위하여 먼저 파라핀으로 포매된 조직을 5 μ m 두께로 파라핀 절편을 만든 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 알코올로 탈수한 다음 enzyme solution과 label solution을 1:50의 비율로 45분간 형광 발색하였다. 발색이 종료되면 PBS로 세척하고 Hoechst 33258로 2차 염색한 후 counting media로 봉입하고 형광현미경하에서 관찰하였다.

방광암 조직에서 세포고사의 정도를 관찰하고 각각에서 세포고사인자를 구하여 방광암에서 병기와 분화도에 따라 세포고사인자의 차이가 있는지를 조사하였다. 세포고사인자의 측정은 3군데의 고배율 시야에서 측정한 전체 세포수에 대해 TUNEL 염색에 양성인 세포수의 백분율로 하였다.

3. 다중형광염색

방광이행상피세포에서 clusterin과 세포고사의 발현관계를 비교하고자 다중형광염색방법을 시행하였다. 슬라이드에 부착된 세포는 무수알코올로 고정된 후 PBS로 세척하고 비특이적 염색을 방지하기 위하여 protein blocking agent (PBA)로 2% BSA를 상온에서 10분간 처리하였다. 본 실험에서 사용한 일차 항체들은 mouse monoclonal anti-mouse clusterin 항체들로서, 1:100으로 희석시켜 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 5분씩 3회 세척하고 이차항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG를 1:200으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 5분씩 3회 세척하였다. 이후 fluorescence로 30분간 발색하고 세척한 후, mounting medium (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)로 봉입하여 형광 현미경하에서 관찰하였다. 그런 다음 고사세포를 이중으로 염색하기 위해 TUNEL 염색을 시행하였다. 이후 발색이 종료되면 PBS로 세척하고 Hoechst 33258로 3차 염색한 후 counting media로 봉입하고 형광현미경 하에서 관찰하였다.

Hoechst 33258로 염색된 세포를 관찰하기 위하여 형광현미경의 UV filter를 사용하여 조직 전체의 모든 세포를 파란색으로 관찰하고, clusterin이 발현된 세포는 texas red filter로 확인하면 빨간색으로 관찰되며, 조직 내 세포고사가 일어난 세포는 FITC filter에서 초록색으로 관찰되었다. 파랑, 빨강, 초록의 세 가지 색으로 염색된 세포들의 이미지를 합성한 후 clusterin의 발현과 세포고사의 관계를 분석하였다.

4. 통계적 분석

통계학적 방법으로 표제성과 침윤성 방광암의 clusterin 발현의 차이는 Fisher's exact test를 이용하였고, 표제성 방광암에서 분화도에 따른 세포고사 지수의 차이는 Kruskal-Wallis 검정을 사용하였다. 각각의 통계학적 분석은 p값이 0.05 미만인 경우에 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 방광이행상피세포암종 조직에서 Clusterin 발현 (Fig. 1)

표제성 방광암에서는 clusterin 염색의 정도가 17례에서

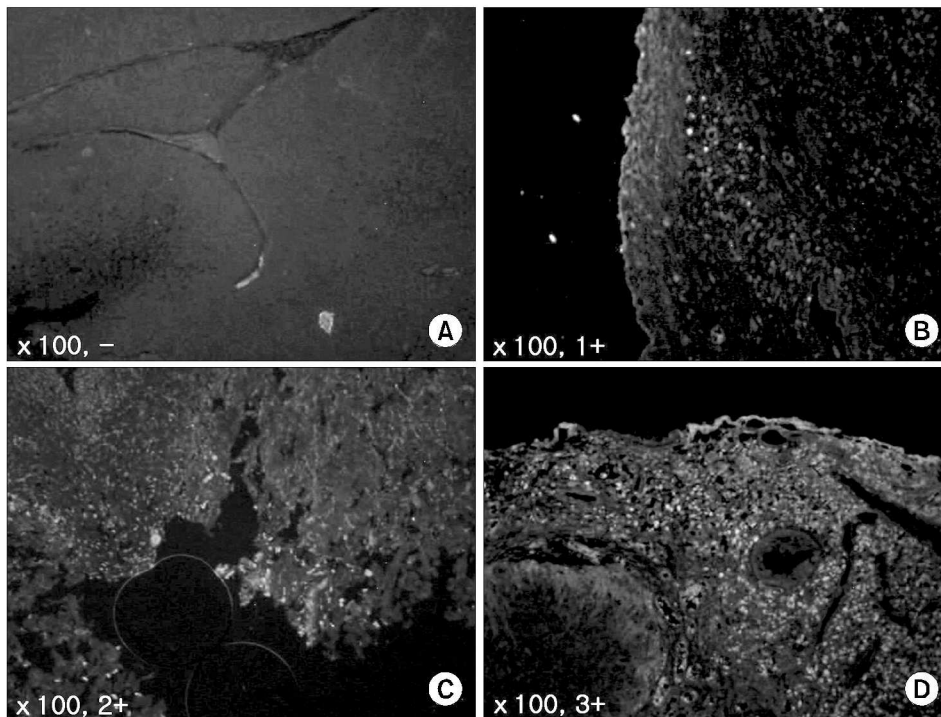


Fig. 1. The expressions of clusterin in bladder cancer specimens with the degree, from negative (A) to 3+ (D).

Table 1. Correlation of the clusterin expression with the tumor grade

	Degree of clusterin expression				p-value
	-	1+	2+	3+	
Superficial (n=53)	17	15	21		0.242
Grade I (n=15)	6	4	5		
Grade II (n=31)	10	10	11		
Grade III (n=7)	1	1	5		
Invasive (n=32)	4	9	11	8	0.590
Grade I (n=1)	0	1	0		
Grade II (n=1)	1	0	0		
Grade III (n=30)	3	8	11	8	

* $p < 0.05$ between superficial and invasive group by Fisher's exact test. 1+: <25% cells stained, 2+: <50% cells stained, 3+: $\geq 50\%$ cells stained

(-), 15례에서 (1+), 21례에서 (2+)로 나타났으나, 침윤성 방광암 조직에서는 4례에서 (-), 9례에서 (1+), 12례에서 (2+), 8례에서 (3+)으로 나타나 병리학적 분류에 따른 표제성과 침윤성 방광암 간에 clusterin의 발현 정도의 차이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Table 1). 표제성 방광암 내에서 조직학적 분화도에 따른 염색의 강도는 통계적으로 유의하지 않았고 ($p = 0.242$), 침윤성 방광암 내에서 grade III가 30례로 다른 분화도에 비해서 상대적으로 그 수가 월등히 많아 통계적인 평가가 어려웠다.

Table 2. Apoptotic indices of transitional cell carcinoma of the bladder

	Apoptotic index	
	Superficial* (n=22)	Invasive (n=15)
Grade I	$0.52 \pm 0.28\%$	
Grade II	$0.30 \pm 0.16\%$	
Grade III	$0.17 \pm 0.11\%$	$0.23 \pm 0.13\%$

Each index is expressed in mean \pm SD. * $p < 0.05$ by Kruskal-Wallis test

2. 방광이행상피세포암 조직에서 세포고사 확인

TUNEL 염색을 통하여 방광이행상피세포암 조직에서 세포고사를 조사한 결과 일부세포에서 세포고사가 일어났다. 세포고사 지수는 총 37명의 방광이행상피세포암 환자의 조직에서 측정이 가능하였다. TUNEL염색의 이중염색의 영향으로 인한 clusterin이나 대조염색의 Hoechst의 영향으로 그 signal이 중복되어 나타나는 경우는 제외하였다. 분화도에 따른 세포고사 지수는 표제성 방광암 조직 22례 중 분화도 I, II, II에서 각각 $0.52 \pm 0.28\%$, $0.30 \pm 0.16\%$, $0.17 \pm 0.11\%$ 로 통계적으로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 침윤성 방광암 조직 15례는 모두 분화도 III였고 세포고사 지수는 $0.23 \pm 0.13\%$ 였으나 다른 조직학적 분화도를 가진 조직이 없어 통

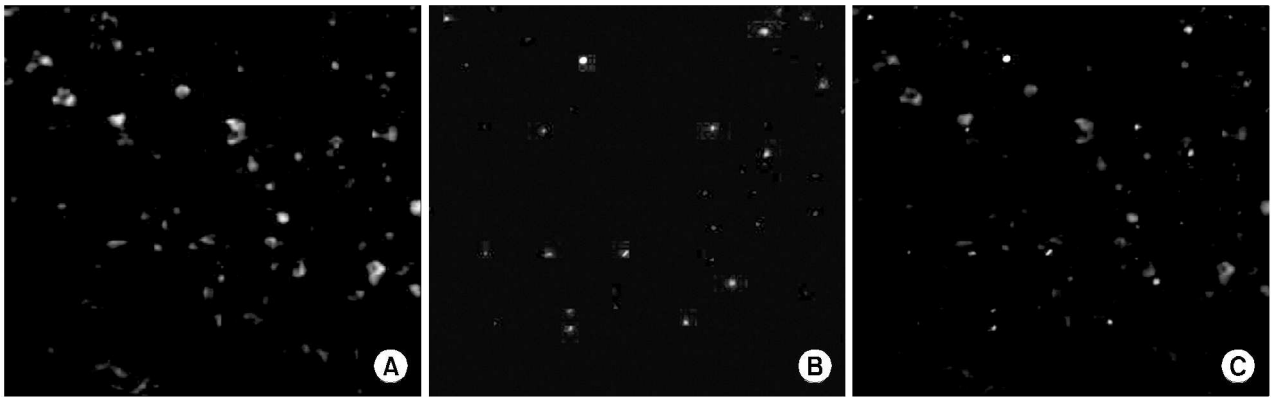


Fig. 2. The clusterin expression is shown (A) and the same slide stained with TUNEL assay (B). Cells stained with clusterin are not stained with TUNEL (C).

계적 분석이 불가능하였다 (Table 2).

3. Clusterin 발현과 세포고사의 관계

Clusterin 발현과 세포고사와의 관계를 알아보기 위하여 이중염색을 시행한 결과 일부 세포에서는 clusterin과 TUNEL에 동시 염색되는 경우도 있었으나 이는 한 clusterin 또는 대조 염색인 Hoechst 염색에 의한 signal이 강하게 나타나 중복염색으로 생각되었다. 명암을 조절하거나 개개세포에서 clusterin 발현이 확실한 세포질염색의 세포들을 기준으로 확인한 결과 clusterin이 발현된 세포들에서는 TUNEL에 의해 염색되지 않았다. 역으로 TUNEL 염색이 양성인 세포고사가 일어난 세포에서는 clusterin 발현이 없었다 (Fig. 2).

고 찰

Clusterin은 449개 아미노산으로 구성된 분비형 heterodimeric 이황화물 결합 당단백 (disulphide-linked glycoprotein)으로 거의 모든 동물의 조직 및 체액에 존재하며 세포고사, 세포주기 조절, DNA 복구, 세포부착, 조직 리모델링, 세포막 재생, 면역 체계 조절 등 다양한 기능이 있다. 하지만 종양과 clusterin의 상관관계는 일정하지 않아 유방암,¹⁰ 폐암,¹¹ 대장암¹²에서는 clusterin의 발현이 증가하고 췌장암¹³에서는 발현이 감소하였으나, 전립선암^{14,16}에서는 상반되는 보고가 있다.

Clusterin은 55kDa의 비당화 (non-glycosylated) 핵형 clusterin인 nuclear clusterin (nCLU)과 40kDa의 당화 분비형 clusterin인 secretory clusterin (sCLU)의 두 아형이 있다. 종양 세포 생존은 sCLU의 과발현과 nCLU의 손실과 관련되어 있고, 분화도가 나쁘고 전이가 될수록 nCLU에서 sCLU로 변화한다는 연구가 있어 앞에서 언급된 clusterin의 상반된 기능을 설명하기도 한다.¹⁷ 그러나 아직 세포 주기에 있어

clusterin의 역할에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

방광암 조직에서는 clusterin의 발현에 관한 연구는 많지 않은데 Kruger 등¹⁰은 132례의 침윤성 방광이행상피암종의 25%에서 clusterin 발현 양성을 보였다고 보고하였고 Miyake 등⁸은 89례의 방광이행상피암종 연구에서 침윤성 암에서 표재성 암보다 clusterin 발현이 4배 이상 높다고 보고하였다. 국내의 연구에서도 침윤성으로 진행될수록 clusterin의 발현이 강하게 나타났다.¹⁸ 본 연구에서도 기존의 보고처럼 침윤성 암에서 clusterin 발현이 표재성 암보다 그 수가 많고 발현 정도도 강하게 나타났다. 그리고 clusterin은 주로 세포질에서 나타나 앞서 설명한 두 아형의 clusterin 중 cytoprotective한 아형인 sCLU의 발현일 것으로 생각한다.

Clusterin 발현의 증가와 방광암의 악성도 증가의 연관성은 대체로 clusterin의 cytoprotective 특성인 항고사효과와 관련 있다고 추정하고 있다. 이 같은 특징은 전립선암이나 유방암 조직에서도 관찰된 바 있다.^{19,20} 현재까지 clusterin이 항고사 작용을 하는 분자단계 (molecular level)에서의 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, clusterin을 전달감염 (transfection) 시킨 인체 신장암 세포에서 clusterin의 과발현이 Fas 관련 세포고사 신호전달체계에 저항한다는 연구가 있고,²¹ 인체방광암 모델 실험에서도 clusterin의 발현이 방광암의 진행이나 림프선 전이와 연관성을 근거로 세포단계의 운동성 (motility)이나 침윤성 (invasive ability)과 관련이 있을 것으로 추정하고 있다.⁹

방광암 조직에서 clusterin의 강한 발현을 보인 경우에 술 후 재발이 많고, 재발하지 않은 생존율이 낮음을 보고하면서 이런 환자에서는 술 후 강력한 (aggressive) 보조적 치료가 필요하다는 보고⁸에서처럼, 향후 더 많은 연구가 이루어지면 clusterin의 발현 정도가 임상적인 예후를 예측하고 치료를 결정하는 중요한 수단 중의 하나가 될 수 있을 것으로

생각한다.

세포고사는 이를 활성화시키는 다양한 인자 (TNF, Fas ligand, p53)와 억제시키는 인자 (growth factors, bcl-2)들의 상호작용에 의해 조절되며 TUNEL염색법으로 측정할 수 있다. 세포고사에서 clusterin이 항세포고사의 역할은 아직 불분명하다. Criswell 등²²은 유방암 세포인 MCF-7과 대장암 세포인 HCT 116에서 p53이 sCLU를 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서도 clusterin과 TUNEL염색을 동시에 시행한 결과 clusterin 발현이 되는 세포들은 TUNEL에 염색되지 않았고 역으로 TUNEL에 염색되는 세포들은 clusterin 염색이 되지 않았다. 이는 곧 clusterin이 항세포고사의 역할을 갖는 것을 간접적으로 보여주는 결과라고 생각한다.

본 연구에서는 세포고사의 정도를 세포고사 지수를 사용하여 조직학적 분화도와와의 관계를 알아보았는데 침윤성 방광암 조직에서는 분화도 I과 분화도 II의 조직이 1레씩이었고 TUNEL염색이 양성으로 나타나지 않아 연관성을 분석할 수 없었다. 그러나 표재성 방광암 조직에서는 조직학적 분화도가 높을 수록 세포고사 지수는 낮아지는 상관관계를 확인하였다.

하지만 sCLU와 nCLU의 cell cycle과 세포고사에서의 명확한 역할에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결 론

Clusterin은 방광 이행상피세포암종에서 침윤성 암종이 표재성 암종에 비해 발현이 유의하게 증가하였다. 조직학적 분화도가 나뉠수록 항고사인자인 clusterin의 발현이 증가하고 또 전체세포 중 세포고사를 일으키고 있는 세포의 백분율은 감소하여 clusterin이 세포고사의 억제자로 작용하고 있을 것으로 생각한다. 앞으로 clusterin의 세포고사의 역할에 대한 더욱 다각적인 연구와 두 아형의 개개의 역할에 대한 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1430-48
2. Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES. Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res* 2004;64:1834-42
3. Cheng CY, Chen CL, Feng ZM, Marshall A, Bardin CW. Rat clusterin isolated from primary Sertoli cell-enriched culture medium is sulfated glycoprotein-2 (SGP-2). *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:398-404
4. Fritz IB, Burdzy K, Setchell B, Blaschuk O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 1983;28:1173-88
5. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 1995;55:2431-7
6. Flanagan L, Van Weelden K, Ammerman C, Ethier SP, Welsh J. SUM-159PT cells: a novel estrogen independent human breast cancer model system. *Breast Cancer Res Treat* 1999;58:193-204
7. Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein *J Biol Chem* 2003;278:11590-600
8. Miyake H, Gleave M, Kamidono S, Hara I. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 2002;59:150-4
9. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME. Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 2001;7:4245-52
10. Kruger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC. Value of clusterin immunoreactivity as a predictive factor in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. *Urology* 2006;67:105-9
11. July LV, Beraldi E, So A, Fazli L, Evans K, English JC, et al. Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2004;3:223-32
12. Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, Torrealba J, Dove WF. Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9530-5
13. Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, et al. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2002;25:234-8
14. Zellweger T, Kiyama S, Chi K, Miyake H, Adomat H, Skov K, et al. Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU Int* 2003;92:463-9
15. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME, Eto H. Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression. *Oncol Rep* 2003;10:469-73
16. Scaltriti M, Brausi M, Amorosi A, Caporali A, D'Arca D, Astancolle S, et al. Clusterin (SGP-2, ApoJ) expression is downregulated in low- and high-grade human prostate cancer. *Int J Cancer* 2004;108:23-30
17. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG.

- Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 2004;23:2298-304
 18. Yoon JH, Lee JH, Yeom BW, Won NH, Yoon DK. Expression of osteopontin and clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder. *Korean J Urol* 2005;46:341-6
 19. Steinberg J, Oyasu R, Lang S, Sintich S, Rademaker A, Lee C, et al. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1707-11
 20. Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157:393-9
 21. Miyake H, Hara S, Zellweger T, Kamidono S, Gleave ME, Hara I. Acquisition of resistance to Fas-mediated apoptosis by overexpression of clusterin in human renal-cell carcinoma cells. *Mol Urol* 2001;5:105-11
 22. Criswell T, Klovov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther* 2003;2:372-80
-