

# 인체 방광암에서 Peroxiredoxin I의 발현에 관한 분석

## Analysis of the Expression of Peroxiredoxin I in Human Bladder Cancer

Eun Tak Kim, Hyuk Sagong, Wun-Jae Kim<sup>1</sup>

From the Department of Urology, College of Medicine, Eulji University, Daejeon,  
<sup>1</sup>Department of Urology, College of Medicine, Chungbuk National University,  
Cheongju, Korea

**Purpose:** Peroxiredoxins (PRDXs) are antioxidant enzymes that play an important role on cell differentiation, proliferation and apoptosis. In this study, we investigated if the expression levels of PRDX I were related to bladder cancer.

**Materials and Methods:** The mRNA level of PRDX I was examined via real time polymerase chain reaction (PCR) in 186 cancer specimens from patients with primary bladder cancer, 73 corresponding samples of normal looking bladder mucosae surrounding the cancer and 21 samples of normal bladder mucosae. We investigated the correlation between the expression levels of PRDX I and the clinico-pathological parameters of the 154 patients who could be followed up more than three years.

**Results:** The expression levels of PRDX I in bladder cancer (0.73pg/ml) were significantly higher than that in the normal bladder mucosae (0.04 pg/ml) ( $p < 0.01$ ) or that in the corresponding normal bladder mucosae surrounding the cancer (0.38pg/ml) ( $p < 0.01$ ). The expression level of PRDX I was not significantly enhanced in the non-recurred (0.87pg/ml) superficial bladder tumor patients compared with the recurred superficial bladder tumor patients (0.63pg/ml), but it was significantly enhanced in the non-progressed (0.82pg/ml) patients compared with the progressed (0.50pg/ml) patients ( $p < 0.05$  for each).

**Conclusions:** An enhanced expression of PRDX I is strongly associated with the development of bladder cancer. Moreover, enhanced expressions of PRDX I are also positively associated with a low rate of progression of bladder cancer, and this might be useful as a marker for assessing progression in human bladder cancers. (Korean J Urol 2008;49:300-306)

**Key Words:** Peroxiredoxin I, Bladder tumor

대한비뇨기과학회지  
제 49 권 제 4 호 2008

을지대학교 의과대학  
비뇨기과학교실, <sup>1</sup>충북대학교  
의과대학 비뇨기과학교실

김은택 · 사공혁 · 김원재<sup>1</sup>

접수일자 : 2007년 11월 12일  
채택일자 : 2008년 2월 28일

교신저자: 김원재  
충북대학교병원 비뇨기과  
충북 청주시 흥덕구 개신동  
62번지  
☎ 360-763  
TEL: 043-269-6371  
FAX: 043-269-6129  
E-mail: wjkim@chungbuk.ac.kr

### 서 론

방광암은 여러 생물학적 다양성을 보이며, 현재 임상적인 예후인자로 사용하고 있는 것은 종양의 분화도, 방광 고 유층의 침윤 여부(종양의 병기), 혈관 혹은 림프관 침윤 여부, 상피내암의 존재 여부 등이 있으나 같은 병리학적 특성 내에서도 다른 생물학적 다양성은 아직 완전히 이해되지 않고 있는 실정이다. 표재성 혹은 침윤성 방광암의 내재된 생물학적 특성과 재발 혹은 진행의 위험도를 예측하는 것

이 치료 방침의 결정에 매우 중요하다고 할 수 있다.<sup>1</sup> 그러므로 분자 표지자 (molecular marker)는 방광암의 진단뿐 아니라 재발, 진행 및 전이를 예측하는 데 유용한 도구가 될 수 있다.<sup>2</sup> 이러한 유전자의 기능과 방광암의 분화도, 병기, 재발, 침윤과 전이와의 관련성을 규명함으로써 방광암의 성장과정에서의 재발, 침윤과 전이를 예측할 수 있는 유전자 표지자 연구는 방광암 환자의 예후에 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 또한 이를 이용 방광암의 재발, 진행 예측을 위한 유전자 표지자의 개발에도 응용할 수 있을 것이다.<sup>3</sup>

활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)은 많은 세포의 대사와 신호전달에 관여하고 있고 특히 발암 (carcinogenesis)과 노화에 연관이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>4</sup> 활성산소종과 방광암에 대한 연구로 Kolonel 등<sup>5</sup>의 비타민 A와 ascorbic acid에 대한 연구에서 활성산소종이 방광암 환자에서 조직 손상의 중개자로 관련이 있음이 밝혀졌다. Ohnishi 등<sup>6</sup>은 담배에 함유된 2-naphthylamine의 대사물인 2-nitroso-1-naphthol (NO-naphthol)에 의해 유도된 산화 DNA 손상은 방광암의 발생과 연관이 있다고 보고하였다. Ackay 등<sup>7</sup>도 표재성 방광암 환자 백혈구의 8-hydroxy-2-deoxyguanosine 치가 정상 대조군에 비해 유의하게 높다고 보고하였다. 이들의 결과들은 산화 손상이 방광암의 발생과 강한 연관이 있음을 시사한다.

활성산소종은 정상 호기대사에 의해 생산되는데 흡연, 염증, 오염물질, 화학물질과 암유발물질 등의 여러 가지 스트레스 자극에 의해 증가하며 유리기 (free radical)와 연관된 기전에 의해 DNA 손상을 야기한다.<sup>8,9</sup> DNA와 단백질의 산화 손상은 암, 동맥경화증, 관절염 등의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 제안되어졌다.<sup>10</sup> 활성산소종에 대한 내인성 방어체계는 superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidases, 그리고 최근에 발견된 peroxiredoxin (PRDX) 군과 같은 항산화효소를 포함한다.<sup>8</sup>

PRDX는 촉매적 cysteine 잔기가 포함된 작은 항산화 단백질로 과산화물을 제거하고 활성산소종에 대한 세포의 반응에 관여하는 것으로 생각한다.<sup>11</sup> 현재까지 포유류에서 확인된 PRDX는 6종류로서 PRDX I-VI로 명명되어 있다. 이들 중 포유류의 PRDX I은 Pag 혹은 MSP23로도 알려져 있는데 사람 염색체의 1p34, 쥐의 4번 염색체에 존재하는 단일 유전자에 의해 부호화되어 있는 23K 분자량을 가지는 단백질이다. PRDX I의 생성은 혈장의 자극 혹은 산화 스트레스에 의해 유도된다.<sup>12-16</sup> PRDX군은 고형 장기의 몇몇 암에서 높게 발현되는데<sup>17-19</sup> 이는 고형 장기의 종양형성에 밀접한 연관이 있을 것으로 생각한다.

그러나, 인체 방광암에서 PRDX의 속성과 역할에 대한 연구는 아직 없다. 본 연구에서 저자는 186명의 인체 방광 이행상피세포암 조직에서 real-time polymerase chain reaction (PCR) 방법을 통해 PRDX I의 mRNA 발현치를 정량화하여 정상으로 보이는 종양 주위 조직 그리고 정상 방광 점막과 비교하여 방광암 발생과 연관이 있는지 알아보았고, 또한 방광암 환자의 임상병리학적 인자와 비교함으로써 예후인자로서 가치가 있는지를 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 환자 및 조직 표본

충북대학교병원 비뇨기과에서 방광암으로 진단받고 입원하여 수술을 받은 186명의 원발성 방광암 조직을 본 연구에 이용하였다. 이들 모두는 수술 후 조직학적 검사를 통해 이행상피세포암으로 확진되었다. 3년 이상 추적관찰이 가능하였던 방광암 환자 154명 중 표재성 방광암 환자가 107명이었고, 침윤성 방광암 환자는 47명이었다. 분화도별로는 G1, G2, G3가 각각 31, 71, 52명이었는데, 이들은 경요도방광암절제술 (transurethral resection of the bladder tumor; TUR-BT) 혹은 개복수술 등을 통해 적절한 치료를 받았다. 환자의 임상병리학적 양상은 Table 1에 도식화하였다. 모든 방광암 조직은 수술을 통해 얻어진 것이며, 동시에 수술 중 암 주위 조직에서 정상적인 육안 소견을 보이는 방광점막을 73개 채집하여 사용하였다. 이 조직들 모두에서 암세포가 없는 정상 방광 조직이었음을 조직학적 검사를 통해 확인하였다. 21례의 정상 방광 점막을 정상 대조군으로 사용하였는데 이들은 방광 파열, 전립선비대증 혹은 요실금 수술 시 얻은 조직이었다. 환자로부터 획득한 모든 조직들은 즉시 액체질소로 급속 냉동시키고 RNA가 추출되기 전까지 영하 80°C에서 보관하였다. 조직 검사 시행 전 모든 환자에게 사전 동의를 구하였으며, 본 실험은 충북대학교 의과대학 임상시험위원회에 의해 적절한 승인을 취득한 후 시행하였다 (임상시험결과통지서 2006-1).

**Table 1.** Clinico-pathological features of the 154 primary bladder transitional cell carcinomas

| Parameters                            |                   |    | No. of patients |
|---------------------------------------|-------------------|----|-----------------|
| Sex                                   | Male              |    | 126             |
|                                       | Female            |    | 28              |
| Age (years)                           | 64.77±12.62       |    |                 |
| Stage                                 | Superficial (107) | Ta | 26              |
|                                       |                   | T1 | 81              |
|                                       | Invasive (47)     | T2 | 12              |
|                                       |                   | T3 | 17              |
|                                       |                   | T4 | 18              |
| Grade                                 |                   | G1 | 31              |
|                                       |                   | G2 | 71              |
|                                       |                   | G3 | 52              |
| Recurrence<br>(in superficial tumors) | Non-recurred      |    | 44              |
|                                       | Recurred          |    | 63              |
| Progression                           | Non-progressed    |    | 119             |
|                                       | Progressed        |    | 35              |
| Cancer specific death                 |                   |    | 37              |

3년 이상 추적관찰이 가능하였던 방광암 환자들의 평균 추적관찰 기간은 49.7개월이었다. 본 연구에서 분화도 G1과 G2를 저등급 (low grade), G3를 고등급 (high grade)으로 정의하였고, 병기 T<sub>a</sub>와 T<sub>1</sub>을 표재성 방광암, T<sub>2</sub> 병기 이상을 침윤성 방광암으로 정의하였다. 재발의 정의는 표재성 방광암 환자의 질환이 추적 기간 중 재발을 하였으나 첫 번째 수술 부위에 암이 발생하지 않고 방광의 타 부위에 생겼으면서 병기의 진행이 없는 경우로 하였다. 병기의 진행이란 표재성 혹은 침윤성 방광암 환자의 적절한 치료 후 재발 시 병기가 진행한 경우로 정의하였다.

## 2. 조직에서 RNA 추출 및 cDNA 합성

TRIzol (Life Technologies, USA) 시약을 이용하여 총 RNA를 조직에서 분리하였다. 적당량의 조직을 1ml TRIzol 시약에 넣고 조직분쇄기 (homogenizer)로 분쇄한 후 3분간 상온에서 세워둔 후 200  $\mu$ l의 chloroform을 첨가하여 혼합한 후 10분간 상온에 세워둔 후 4°C에서 10분간 12,000RPM으로 원심분리를 하여 상층액을 모았다. 상층액에 500  $\mu$ l의 isopropanol을 첨가하고 10분 이상 진탕한 다음 4°C에서 20분간 12,000RPM으로 원심분리를 하였고 다시 상층액을 제거한 다음 1ml 70% ethanol로 침전시켰다. 이를 다시 15,000 RPM에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였으며 실온에서 건조하였다. 건조 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) 증류수를 첨가하여 사용할 때까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 추출된 전체 RNA는 분광광도계 (Perkin Elmer, MBA2000, USA)를 이용하여 농도를 측정하고 1.1% RNA gel에서 전기영동을 하여 RNA band를 확인하였다. cDNA를 합성하기 위하여 조직에서 추출한 RNA 0.5  $\mu$ g/  $\mu$ l를 DEPC 증류수로 희석한 후 사용하였다. First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 동일 양의 RNA 2  $\mu$ l에 DEPC 증류수 2  $\mu$ l를 넣고 65°C에서 10분간 처리한 후 얼음에 넣어 두었다. cDNA 합성 용액 3.5  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 한 시간 반응시키고 다시 72°C에 10분간 방치하였다. 반응 산물에 42.5  $\mu$ l의 증류수를 넣고 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

## 3. Real-time PCR

방광암 조직에서 PRDX 1 유전자의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 real-time PCR을 시행하였다. Real-time PCR은 Rotor Gene 3,000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) PCR 기계를 이용하였다. Real-time PCR assay는 SYBR Premix EX Taq (TAKARA BIO INC, Otsu, Japan)를 이용하여 micro reaction tube (Corbett Research, Mortlake, Australia)에

서 수행되었다.

PRDX 1 (284bp)을 증폭시키기 위해서 5'-CCA ACT TCA AAG CCA CAG-3'과 5'-GTC TGA TAC CAA AGG AAT G-3'를 primer로 사용하였다. PCR 반응액은 cDNA 1  $\mu$ l, 2x SYBR Premix EX Taq buffer buffer 7.5  $\mu$ l, 양 방향의 primer 각각 0.5  $\mu$ l를 첨가하여 최종 15  $\mu$ l를 만든 후 PCR을 시행하였다. PRDX 1 유전자의 발현을 정량화하기 위하여 우선 임의의 샘플에서 증폭된 PCR 산물을 이용하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 램프로 band를 확인하였다. 확인된 band를 gel에서 잘라낸 후 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제 과정은 다음과 같다. 절단한 gel을 1.5ml tube에 넣고 약 3배의 gel lysis buffer를 첨가한 후 50°C에서 10분간 처리하여 gel을 완전히 녹였다. 13,000RPM에서 1분간 원심 분리한 후 제조회사에서 제공한 필터로 정제하였다. 이 필터에 washing buffer를 넣고 다시 13,000RPM에서 3분간 원심 분리하여 필터 내의 불순물을 제거하였다. 앞의 과정을 한 번 더 반복한 후 필터에 증류수 30  $\mu$ l를 첨가한 후 15,000RPM으로 원심 분리하여 PCR 산물을 완전히 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 한양대학교 (주) 바이오맥스에 의뢰하여 automated laser fluorescence sequencer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Shelton, USA)를 이용하여 direct sequencing을 시행하였다. 염기서열 결과를 통해서 본 실험의 결과가 염기서열과 일치함을 확인하였다. 또한 정제된 PCR 산물을 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정하고 2pg/  $\mu$ l부터 0.2fg/  $\mu$ l까지 10배씩 연속적으로 희석하여 real-time PCR 정량에 필요한 표준곡선을 작성하는 데 사용하였다. PCR 조건은 96°C에서 1분간 denaturation 후 40주기 동안 96°C에서 denaturation 2초, 60°C에서 annealing 20초 및 72°C에서 extension 20초를 시행하였다. Melting program은 72°C와 95°C 사이에서 45초마다 1°C씩 증가시키면서 실행하였다. Spectral 결과는 Rotor-Gene Real-Time Analysis Software 6.0 Build 14 (Corbett Research, Mortlake, Australia)에 의하여 측정 및 분석하였다.

## 4. 결과 분석 및 통계

방광암과 암 주위의 정상 점막, 그리고 정상 방광 점막의 PRDX 1 발현 정도를 비교하였고, 환자의 임상병리학적 인자에 따른 PRDX 1 발현 정도를 비교하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 (version 11.0, SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하여 independent samples t-test를 시행하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 하였다.

## 결 과

방광암과 암 주위의 정상 점막, 그리고 정상 방광 점막의 PRDX I 발현 정도를 비교하였을 때 방광암 조직에서 정상 방광조직 보다 PRDX I이 의미 있게 높게 발현되었다 ( $p < 0.01$ ) (Table 2). 방광암 주변 정상 점막에 비해서도 방광암 조직에서 PRDX I의 발현이 의미 있게 높았다 ( $p < 0.01$ ). 또한 암 주변 정상 조직의 PRDX I 발현이 정상 방광 조직보다 의미 있게 높았다 ( $p < 0.01$ ).

PRDX I의 발현은 표재성 방광암과 침윤성 방광암 사이에 통계학적 차이는 없었다. 또한 분화도가 좋은 방광암 (G1, 2)에서 PRDX I는 0.95pg/ml로 고등급 (G3)의 방광암에서 0.65pg/ml보다 높게 발현되었지만 통계학적 의의는 없었다 ( $p=0.07$ ). 그러나 Table 3에서 보는 바와 같이 표재성 방광암에서 Ta-1, G1-2 병기 및 분화도의 방광암에 비해 T1, G3 방광암에서 PRDX I의 발현은 증가되어 있었다 (1.33pg/ml

vs 0.68pg/ml,  $p=0.04$ ). 또한, 침윤성 방광암에서 비교적 분화도가 좋은 방광암 방광암에서는 PRDX I의 발현이 0.36 pg/ml, 분화도가 나쁜 방광암에서는 0.79pg/ml로 저등급의 방광암에 비해 고등급의 종양에서 발현이 증가되어 있었다 ( $p < 0.05$ ).

표재성 방광암 환자에서 PRDX I의 발현은 방광암의 재발과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $p=0.14$ ). 또한 T1, G3 병기등급의 방광암에서 PRDX I의 발현은 재발된 환자에서는 0.80pg/ml, 재발이 없었던 환자에서 1.69pg/ml로 재발이 없는 환자에서 더 높게 발현되었지만 통계학적 의미는 없었다 ( $p=0.08$ ) (Table 4).

PRDX I의 발현 정도와 방광암의 병기 진행 유무를 비교한 결과, PRDX I의 발현은 방광암의 병기가 진행된 환자에 비해 진행이 없는 환자에서 의미 있게 높게 발현되었다 ( $p=0.02$ ). 이들을 세분화하여 표재성 방광암 환자에서만 PRDX I의 발현 정도를 비교하였을 때, 병기가 진행된 환자에 비해 진행이 없는 환자에서 PRDX I의 발현이 의미 있게 높게 발현되었고, 특히, T1, G3 병기등급의 방광암에서도 같은 결과를 보였다 (각각  $p < 0.01$ ,  $p=0.01$ ). 그러나 PRDX

**Table 2.** mRNA expression level (pg/ml) among the normal mucosae, the normal looking mucosae surrounding cancer and bladder cancer

|                                 | No. of patients | PRDX I                  |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------|
| Bladder cancer                  | 186             | 0.73±0.88* <sup>†</sup> |
| Normal                          | 21              | 0.04±0.82               |
| Surrounding normal <sup>‡</sup> | 73              | 0.38±0.64 <sup>§</sup>  |

\*: bladder cancer vs. normal mucosa: PRDX I,  $p < 0.01$ , <sup>†</sup>: bladder cancer vs. surrounding normal mucosa: PRDX I,  $p < 0.01$ , <sup>‡</sup>: normal bladder mucosae surrounding cancer, <sup>§</sup>: normal bladder mucosae surrounding cancer vs. normal mucosa: PRDX I,  $p < 0.01$

**Table 3.** The Peroxiredoxin I (PRDX I) expression levels with the stage and grade of bladder cancer

|                            | No. of patients | PRDX I (pg/ml) | p-value |
|----------------------------|-----------------|----------------|---------|
| Stage                      |                 |                |         |
| Superficial                | 107             | 0.77±0.88      | 0.66    |
| Invasive                   | 47              | 0.70±0.92      |         |
| Grade                      |                 |                |         |
| Low grade                  | 102             | 0.65±0.79      | 0.07    |
| High grade                 | 52              | 0.95±1.03      |         |
| Superficial bladder cancer |                 |                |         |
| Low grade (Ta-1, G1-2)     | 92              | 0.68±0.82      | 0.04    |
| High grade (T1, G3)        | 15              | 1.33±1.05      |         |
| Invasive bladder cancer    |                 |                |         |
| Low grade                  | 10              | 0.36±0.44      | < 0.05  |
| High grade                 | 37              | 0.79±0.99      |         |

**Table 4.** mRNA expression levels of peroxiredoxin I (PRDX I) in the superficial bladder cancer with recurrence

|                       | No. of patients | PRDX I (pg/ml) | p-value |
|-----------------------|-----------------|----------------|---------|
| Non-recurrence        | 63              | 0.8703±0.9612  | 0.137   |
| Recurrence            | 44              | 0.6264±0.7233  |         |
| T1, G3 bladder cancer |                 |                |         |
| Non-recurrence        | 9               | 1.6878±1.1303  | 0.079   |
| Recurrence            | 6               | 0.7950±0.6839  |         |

**Table 5.** mRNA expression levels of peroxiredoxin I (PRDX I) in the bladder cancer with progression

|                            | No. of patients | PRDX I (pg/ml) | p-value |
|----------------------------|-----------------|----------------|---------|
| Non-progression            | 119             | 0.82±0.94      | 0.02    |
| Progression                | 35              | 0.50±0.64      |         |
| Superficial bladder cancer |                 |                |         |
| Non-progression            | 94              | 0.83±0.90      | < 0.01  |
| Progression                | 13              | 0.32±0.43      |         |
| T1, G3 bladder cancer      |                 |                |         |
| Non-progression            | 10              | 1.72±1.06      | 0.01    |
| Progression                | 5               | 0.56±0.43      |         |
| Invasive bladder cancer    |                 |                |         |
| Non-progression            | 25              | 0.78±1.07      | 0.53    |
| Progression                | 22              | 0.61±0.73      |         |

I의 발현은 침윤성 방광암에서 진행된 환자와 진행이 없었던 환자 간에 차이를 보이지 않았다 ( $p=0.53$ ) (Table 5).

## 고 찰

방광암은 진단 당시에 대부분 첫 번째 치료로 경요도방광암절제술을 시행하여 가능한 원발성 장기를 보존하여 환자의 삶의 질을 유지시키고자 하기 때문에, 방광암의 재발과 진행 및 전이를 미리 예측할 수 있는 예후 인자를 찾고자 하는 많은 시도가 있어 왔다. 또한, 진단 당시 이미 존재하는 종양의 내재적인 생물학적 특성을 알고 재발과 진행의 위험도를 예측하는 것은 치료 방침을 정하는 데 매우 중요하다. 현재까지 종양의 분화도 (등급), 병기, 다발성 유무, 크기 등 여러 가지 병리학적 혹은 임상적인 인자들이 예후와 연관이 있다는 사실이 밝혀졌지만 그 생물학적 다양성은 매우 복잡하여 정확한 예후의 예측이 힘들다.

재발 및 진행을 예측할 수 있는 분자 표지자로 종양관련 항체 (T138), 혈액군 항체 (ABO), 종양유전자 (*c-H-ras*, *c-myc*, *c-erb-B2*, *mdm-2*), 세포주기 조절인자 (Rb, p53, p21, p27), 증식관련 항체 (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), minichromosome maintenance protein (MCM)), 혈관신생 및 혈관신생 억제인자 (microvessel density, thrombospondin-1), 세포 부착 분자 (cadherins, integrins, Ig-super family), 세포외기질 프로테아제 (laminin-P1, cathepsin D, u-PA, matrix-metalloproteases and -inhibitors) 성장인자 수용체 혹은 펩티드 성장인자 (epidermal growth factor receptor (EGFR), EGF, transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , vascular endothelial growth factor (VEGF), apoptosis 표지자 (Bcl2, Bax, Fas, Fas-L, survivin), CD44 등이 현재 사용되거나 연구 중에 있다. 이 중 어떤 것도 조직학적 병기나 분화도보다 현저히 우수한 것은 아직 없다. 현재까지는 Ki-67 면역반응성이 진행뿐만 아니라 재발을 예측하는 가장 우수한 분자 표지자로 생각되고, p53은 여러 기관의 연구에서 좋은 결과를 보였지만 아직 그 결과에 논란이 있다. 그 이외에도 혈관신생, matrix metalloproteinase (MMP)-tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 비율 등이 유용한 인자로 연구되고 있다.<sup>3</sup>

산화성 스트레스는 내인성과 외인성 원인에서 모두 기인한다. 항산화 방어 기전에도 불구하고, 활성산소종에 의한 세포 손상은 항상 존재한다. 산화성 스트레스는 암 발생에 중요한 위험 인자 중 하나로 고려된다.<sup>10</sup> 산화 손상이 방광암의 발생에 연관성이 있을 것이라는 추측은 이전의 여러 연구로부터 확인되어 왔다.<sup>5-7</sup> 이들 중 PRDX 군은 항산화 효소의 하나로 산화 손상으로부터 포유류 세포를 보호하는 단백질로 소개되었다.<sup>20</sup> 최근 많은 연구에서 정상 조직에 비

해 소포성 갑상선암,<sup>21</sup> 악성 중피종 (mesothelioma),<sup>17</sup> 폐암,<sup>18</sup> 유방암<sup>19</sup> 등의 여러 암에서 PRDX의 발현이 증가한다고 보고되었는데, 이 결과들은 암 조직에서 산화성 DNA 손상의 증가로 인해 PRDX이 증가하고 PRDX의 발현이 종양의 발생과 밀접한 연관이 있음을 시사한다. 본 연구에서 저자들은 방광암 조직과 방광암 주변 정상 점막 그리고 정상 방광에서 PRDX I의 mRNA 발현치를 조사하여 방광암 발생과의 연관성을 알아보았다.

본 연구에서 정상 방광 점막, 방광암 주변 정상 점막, 방광암 순으로 PRDX I이 높게 발현되었다 ( $p<0.01$ ). 이는 방광암 조직에서 활성산소종의 생산이 증가하는데 반응하여 PRDX I이 증가함을 시사하고 더욱이 암 주변 정상 방광점막에서 대조군의 정상 방광점막보다 PRDX I의 증가가 발견되었는데 이는 정상처럼 보이는 암 주변 방광점막에서 조직학적으로 정상일지라도 이미 생화학적 변화가 생겼음을 시사한다. 이는 아마도 방광암 조직에서 증가된 활성산소종에 대한 주변 조직의 방어적 세포 반응을 반영한다. 이런 결과들은 활성산소종에 의하여 유도된 산화 손상이 방광암의 발생에 중요한 기전임을 강력히 시사한다.

비록 본 연구에서는 real-time PCR 방법으로 PRDX I의 mRNA 발현치만 조사하였지만 이런 결과들은 이전의 다른 여러 암에 대한 연구와 일치한다. Kinnula 등<sup>17</sup>은 면역조직화학염색법 (immunohistochemical staining)으로 중피종에서 PRDX의 발현을 연구하였다. PRDX I이 정상 중피 (mesothelium)에 비해 악성 중피종에서 과발현되었다. 또한 폐암에서 면역조직화학 염색법과 quantitative PCR을 동시에 사용하여 비교한 결과, 두 방법 모두에서 PRDX I의 증가가 관찰되었다.<sup>18</sup> 이러한 사실은 PRDX I의 발현은 전사 (transcription) 단계에서 주로 결정됨을 시사한다.

PRDX가 암 환자의 임상 양상과 연관이 있음을 뒷받침하는 여러 증거가 있다. Yanagawa 등<sup>22</sup>은 구강의 편평상피암에서 PRDX I이 적게 발현되는 것은 종양의 크기가 크고, 림프절 전이의 위험도가 높고, 병기가 진행되어 있는 것 그리고 분화가 나쁜 것과 연관이 있다고 보고하였다. 그 결과로서 PRDX I의 발현이 낮다는 점은 종양이 더 빠르게 진행될 가능성이 높다고 예측할 수 있을 것이다. Lehtonen 등<sup>18</sup>은 폐암에서 PRDX I, II, IV 그리고 VI이 높게 발현되었고 특히 PRDX II는 진행된 병기와 PRDX VI는 고등급의 편평상피암과 연관이 있다고 보고하였다. Neumann 등<sup>23</sup>은 PRDX I의 기능을 불활성화시킨 쥐를 만들었는데, PRDX I이 결핍된 쥐는 심한 용혈성 빈혈과 여러 암이 발생하여 수명이 짧아졌다. 림프종, 육종, 상피암을 포함한 악성 종양은 PRDX I 발현의 소실과 흔히 연관되어 있는데 이는 PRDX가 종양억제인자 (tumor suppressor)로 기능함을 시사한다.

본 연구에서 PRDX I의 발현은 고등급의 방광암과 저등급의 방광암 사이에 통계학적 차이는 없었다. 그러나 표재성 방광암에서 Ta-1, G1-2 병기 및 분화도의 방광암에 비해 T1, G3 방광암에서 PRDX I의 발현은 증가되어 있는 것은 표재성 방광암 중 T1, G3 병기등급의 방광암에서는 활성산소종에 의한 세포 손상이 더 많아 고등급의 암이 발생한 것을 시사한다. 그리고 PRDX I의 발현은 표재성 방광암과 침윤성 방광암 사이에 통계학적 차이는 관찰되지 않았는데 저등급의 방광암에서 표재성 방광암과 침윤성 방광암은 PRDX I의 발현이 0.68pg/ml과 0.36pg/ml로 통계적 차이는 없었지만 침윤성 방광암에서 PRDX I가 적게 발현되었고 ( $p=0.06$ ), 고등급의 방광암에서도 침윤성 방광암에서 PRDX I가 적게 발현되었다 (1.33 vs 0.79pg/ml,  $p=0.10$ ). 이는 표재성 방광암이 침윤성 방광암이 진행에 PRDX I이 진행에 방어역할을 하지만 침윤성으로 진단된 암인 경우 고등급의 비율이 많아(표재성 방광암의 14.0%, 침윤성 방광암의 78.7%) 그 효과가 감쇄된 것으로 생각한다.

본 연구에서 원발성 표재성 방광암에서 PRDX I의 발현치는 재발한 환자와 재발하지 않은 환자 사이에 차이를 보이지 않았다. 그러나 T1, G3 병기등급의 방광암에서는 환자군의 수가 적어서 통계학적으로 의미는 없었지만 재발이 없는 환자군에서 재발한 환자군에 비해 PRDX I 발현이 더 높았다. 이는 적어도 T1, G3 병기등급의 방광암에서는 PRDX I이 재발 방지의 역할을 하는 것을 시사한다. 또한 PRDX I의 발현 정도는 병기의 진행과 밀접한 관련이 있었다. 원발성 방광암에서 PRDX I의 발현치는 진행한 경우에 비해 진행이 없는 환자에서 의미 있게 높았다. 그러나 침윤성 방광암의 경우에는 진행과는 관련이 없었다. 이러한 결과들은 PRDX I의 과발현이 방광암의 재발과는 관련이 없지만 방광암 특히 표재성 방광암의 진행에 방어 역할을 하는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 PRDX I의 발현은 표재성 방광암의 진행과 관련이 있었고 특히 T1, G3 병기등급의 방광암의 재발, 진행과 관련이 있었다. T1, G3 병기 등급의 방광암은 조기 근치적 방광암적출술 등 그 치료 방법이 아직까지 논란이 되고 있는 방광암으로 PRDX I가 적게 발현된 경우는 적극적으로 조기 근치적 방광암적출술 등을 고려해 볼 수 있다.

현재까지 인체 방광암 조직에서 PRDX에 대한 연구는 없었다. 그러나 본 연구가 최초의 연구이며 방광암과 PRDX와의 강한 연관성이 있기는 하지만, 앞으로 장기간에 걸친 추적 관찰을 통한 생존 유무 조사와 단백질에 관한 자료가 추가된다면 좀 더 방광암의 본질을 이해하는 데 도움을 줄 뿐 아니라 임상에서도 예후인자로서 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

## 결론

활성산소로 인한 조직 손상을 억제하는 PRDX I의 활성화는 방광암의 발생과 밀접한 연관이 있을 뿐 아니라 방광암의 진행을 억제하는데도 관여하는 것으로 여겨진다. 특히, 표재성 방광암 중 고위험도 군인 T1, G3 병기등급의 방광암 환자에서 PRDX I의 발현치는 방광암의 진행을 예측하는데 도움을 줄 것으로 생각한다. 따라서 고위험도 표재성 방광암 환자로서 PRDX I의 발현치가 낮은 경우에는 조기 근치적방광적출술 등을 적극적으로 고려함으로써 환자의 생명을 연장할 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구 결과는 PRDX I의 발현이 인체 표재성 방광암 진행의 예후인자로 사용될 수 있을 것을 강력히 시사한다.

## REFERENCES

1. Popov Z, Hoznek A, Colombel M, Bastuji-Garin S, Lefrere-Belda MA, Bellot J, et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997;80:1472-81
2. Kausch I, Bohle A. Bladder cancer. II. Molecular aspects and diagnosis. *Eur Urol* 2001;39:498-506
3. Kausch I, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol* 2002;41:15-29
4. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47
5. Kolonel LN, Hinds MW, Nomura AM, Hankin JH, Lee J. Relationship of dietary vitamin A and ascorbic acid intake to the risk for cancers of the lung, bladder, and prostate in Hawaii. *Natl Cancer Inst Monogr* 1985;69:137-42
6. Ohnishi S, Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a metabolite of 2-naphthylamine, a smoking-related bladder carcinogen. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:736-43
7. Akcay T, Saygili I, Andican G, Yalcin V. Increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in peripheral blood leukocytes in bladder cancer. *Urol Int* 2003;71:271-4
8. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:247-54
9. Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 2002;21:7421-34
10. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620
11. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzy-

- mes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7017-21
  12. Prosperi MT, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem* 1993;268:11050-6
  13. Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, et al. Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J Biol Chem* 1993;268:18633-6
  14. Prosperi MT, Apiou F, Dutrillaux B, Goubin G. Organization and chromosomal assignment of two human PAG gene loci: PAGA encoding a functional gene and PAGB a processed pseudogene. *Genomics* 1994;19:236-41
  15. Lyu MS, Rhee SG, Chae HZ, Lee TH, Adamson MC, Kang SW, et al. Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. *Mamm Genome* 1999;10:1017-9
  16. Prosperi MT, Ferbus D, Rouillard D, Goubin G. The pag gene product, a physiological inhibitor of c-abl tyrosine kinase, is overexpressed in cells entering S phase and by contact with agents inducing oxidative stress. *FEBS Lett* 1998;423:39-44
  17. Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R, Kang SW, Rhee SG, et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002;196:316-23
  18. Lehtonen ST, Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hirvikoski P, Kang SW, et al. Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer. *Int J Cancer* 2004;111:514-21
  19. Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2085-90
  20. Fujii J, Ikeda Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 2002;7:123-30
  21. Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S, et al. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* 1999;145:127-32
  22. Yanagawa T, Iwasa S, Ishii T, Tabuchi K, Yusa H, Onizawa K, et al. Peroxiredoxin I expression in oral cancer: a potential new tumor marker. *Cancer Lett* 2000;156:27-35
  23. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003;424:561-5
-