

## ORIGINAL ARTICLE

유방암 환자에서 Survivin, bcl-2, p53 발현이상  
및 세포자멸사에 대한 예후인자로서의 가치손명원 · 우희두 · 손두민 · 배상호 · 이화수 · 강길호 · 김성용 · 백무준 · 임철완 · 이문수 · 이민혁 · 김창호 · 김태윤<sup>1</sup> · 민영가<sup>2</sup> · 오미혜<sup>3</sup> · 김의한<sup>3</sup> · 김창진<sup>3</sup> · 조무식순천향대학교 천안병원 외과학교실, <sup>2</sup>생리학교실, <sup>3</sup>병리학교실, <sup>1</sup>당진푸른병원 외과

## Prognostic Value of Apoptosis and the Survivin, bcl-2, and p53 Expressions in Breast Cancer Patients

Myoung-Won Son, Hee-Doo Woo, Doo-Min Sohn, Sang-Ho Bae, Hwa-Soo Lee, Gil-Ho Kang, Sung-Yong Kim, Moo-Jun Baek, Cheol-Wan Lim, Moon-Soo Lee, Min-Hyuk Lee, Chang-Ho Kim, Tae-Yoon Kim<sup>1</sup>, Young-Gi Min<sup>2</sup>, Mi-Hye Oh<sup>3</sup>, Eui-Han Kim<sup>3</sup>, Chang-Jin Kim<sup>3</sup>, Moo-Sik ChoDepartments of Surgery, <sup>2</sup>Physiology, and <sup>3</sup>Pathology, Soonchunhyang University Cheonan Hospital, College of Medicine, Cheonan;  
<sup>1</sup>Department of Surgery, Dangjin Green Hospital, Dangjin, Korea

**Purpose:** Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) protein family, and it is involved in the regulation of cell division. The over-expression of survivin has been reported to be associated with the parameters for a poor prognosis in most human cancers, including lung, breast, colon, stomach, esophagus, pancreas, etc. In this study, we examined the expression of a member of a novel IAP protein family, survivin, in breast cancer and its association with tumor cell apoptosis and the overall prognosis.

**Methods:** 80 cases of formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissue were immunostained with, using polyclonal *survivin* (Novus Biologicals, Littleton, USA), monoclonal *bcl-2* (DAKO, Carpinteria, USA), and monoclonal *p53* antibodies (DAKO, Carpinteria, USA). The histochemical method used for the analysis of apoptosis was based on ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ OligoLigation (ISOL) Apoptosis Detection Kit (CHEMICON International Inc. Temecula, USA).

**Results:** Immunohistochemical analysis showed that cytoplasmic survivin expression was positive in 43 of 80 cases (53.8%) of breast carcinomas and it was positive for 70% of

the cases that showed a bcl-2 expression tumors. Statistical analysis revealed that the survivin expression was correlated with lymph node metastasis, the tumor stage, and the histological grade. Although the survivin expression was not correlated with p53 mutations, the survivin positive cases were associated with a bcl-2 expression ( $p=0.015$ ) and a reduced apoptotic index ( $p=0.024$ ). On the Cox proportional hazard model analysis, the apoptotic index was not identified as a significant independent predictor of overall survival ( $p=0.072$ ), although the patients with a low apoptotic index ( $<0.2\%$ ) had a worse survival rates than those patient in the group with a high apoptotic index ( $\geq 0.2\%$ ).

**Conclusion:** The results suggest that apoptosis inhibition of apoptosis by survivin may be a prognostic parameter for a worse outcome in breast carcinoma patients. (*J Breast Cancer* 2007;10:19-28)

Key Words : Breast cancer, Apoptosis, Survivin, bcl-2, p53

중심단어 : 유방암, 세포자멸사, Survivin, bcl-2, p53

책임저자 : 김성용

330-721 충남 천안시 병명동 23-20, 순천향대학교 천안병원 외과  
Tel: 041-570-2140, Fax: 041-571-0129

E-mail : sykim@schch.co.kr

접수일 : 2006년 10월 25일 게재승인일 : 2007년 1월 29일

\*본 연구 내용은 2006년 한국유방암학회 춘계 학술대회에서 발표됨.

## 서론

종양조직의 성장은 세포의 조절되지 않는 증식의 결과로서 인식되어 왔고 종양유전자의 과발현 및 억제유전자의 소실 등과의

관련성이 밝혀지고 성장인자와 그 수용체(receptor)의 이상 및 신호 전달체계의 이상에 대한 연구가 활발히 진행되면서 그 중요성이 강조되어 왔다.

세포의 능동적 사멸을 의미하는 세포자멸사(apoptosis)의 개념이 도입되면서, 이것이 발암의 과정과 암의 진행 및 암 치료에 미치는 영향에 대한 연구가 중앙 학자들의 관심을 끌게 되었다. 그 결과 인간의 세포자멸사의 유도 및 조절에는 많은 유전자들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있으며, 대표적인 유전자들로서는 bcl-2 유전자 가계에 속하는 bcl-2, bax, mcl-1 유전자가 있으며, 그 외에 p53, c-myc 및 APO/Fas 등이 세포자멸사 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 최근 세포자멸사를 억제하여 종양의 성장을 촉진하는 몇 종류의 단백질이 발견되고 있는데 이들 세포자멸사 억제(Inhibitor of Apoptosis, IAP) 단백질 중에서 가장 최근에 발견된 것이 survivin이다.

Survivin은 세포주기(cell cycle)의 G2/M기 때 발현되는 16.5 kDa의 단백질로 나비리본 모양의 dimeric 구조로 알려져 있으며, 유사분열시 방추 단백질과 반응을 하여 세포자멸사를 억제하는 한편, 세포자멸사 경로의 다양한 지점인 caspase 9, caspase 3, caspase 7 등에서도 세포자멸사를 억제하는 작용을 가진 것으로 보고된다. (1) 이것은 여타 IAP 단백질과는 다른 조직발현을 보이는데, 분화된 성인조직에서는 발현되지 않고, 태아조직과 암세포에서 주로 발현되어 신생종양의 성장을 촉진하고 항암제에 내성을 일으킨다고 알려져 있다. Survivin이 인체 각 장기의 신생물에서 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구가 최근 수년 사이에 시작되고 있는데, 여러 종류의 암에서 불량한 예후와 연관성이 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 본 저자들도 이미 survivin이 과 발현된 유방암 환자에서 예후가 나쁠 것이라 발표한 바 있다. (2)

정상적인 조직항상성의 유지는 세포증식률과 세포사멸률의 균형에 의해서 이루어지는데 세포자멸사의 억제가 이러한 균형파괴의 한 원인으로 생각되며 세포자멸사의 억제로 인한 세포 수명 연장이 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 세포자멸사와 관련된 대표적 유전물질인 bcl-2, p53 및 survivin 단백질의 발현율과 세포자멸사 지수(apoptotic index)와의 연관성을 비교하여 이들이 유방암의 임상 변수들과의 연관성을 통해 유방암의 예후를 측정할 수 있는 인자로서 가치가 있는지를 알아보기 위해 유방암 환자를 대상으로 본 연구를 시행하였다.

## 방 법

### 1. 연구대상

순천향대학교 천안병원에서 유방암으로 진단 받고 수술 후 외래 추적관찰이 가능했고, 파라핀(paraffin) 포매 조직의 보존상

태가 양호한 80명의 환자를 대상으로 이들의 의무기록을 참조하여 후향적으로 예후인자를 분석하였다.

모든 환자는 여성이었고 대상 환자를 유형별로 보면 침윤성 유관암 72예, 유두상암 1예, 수질성암이 3예, 관상피내암이 4예였다. 이들의 평균연령은  $49.1 \pm 12.39$ 세였고, 평균추적기간은 79개월(범위: 18-95개월)이었다.

Elston-Ellis modification of Scarff-Bloom-Richardson grading system (3)에 의한 조직 등급(Histologic grade)은 I등급이 45예, II등급이 22예, 그리고 III등급이 13예였다. 림프절 전이여부가 확인된 예는 25예였고, 그 외 대상 환자의 임상병리학적 특성은 Table 1에 기술한 바와 같다.

섬유선종으로 진단된 10예를 대조군(control group)으로 선정하였고, 또한 유방암으로 액와림프절 절제술을 시행한 군 중 조직학적으로 암세포가 침범된 림프절 20예 및 유방종물의 절제생검 결과 비정형성 과형성(atypical hyperplasia)을 보인 20예를 추가로 검사하였다.

Table 1. General characteristics of patients

Variable	Number of patients (%)
Age	
<40	9 (11.3)
40-49	29 (36.3)
50-59	21 (26.3)
≥60	21 (26.3)
Menopausal status	
Premenopause	37 (46.3)
Postmenopause	43 (53.8)
Primary tumor	
Tis	4 (5)
T1	23 (28.8)
T2	38 (47.5)
T3	10 (12.5)
T4	5 (6.3)
Nodal status	
Positive	25 (31.2)
Negative	55 (68.8)
Clinical stage	
0	4 (5)
I	16 (20)
II	39 (48.8)
III	19 (23.8)
IV	2 (2.5)
Histologic grade	
I	45 (56.3)
II	22 (27.5)
III	13 (16.3)
ER status	
Positive	40 (50)
Negative	40 (50)

ER=estrogen receptor.

## 2. 면역조직화학적 염색 및 판정

모든 대상 환자 유방암 조직의 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색 표본을 다시 검토하여 종양을 가장 대표할 수 있는 파라핀 포매 조직을 선택 후 파라핀에 포매된 조직은 4  $\mu$ m 두께로 얇게 잘라서 탈 파라핀 과정과 슬라이드에서 고정을 위해 57°C의 oven에서 60분간 가열 후 xylene에서 5분씩 3회 세척 후 100% 알코올(absolute ethanol)에 5분씩 2회 세척 후 95%와 70% 알코올(ethanol)에서 3분씩 각각 세척 후 phosphate buffered saline (PBS)에서 5분간 세척하였다.

일차 항체는 Polyclonal Survivin Antibody SuperNovus Pack (Novus Biologicals, Littleton, USA), Monoclonal anti-Human bcl-2 (DAKO, Carpinteria, USA), Monoclonal anti-Human p53 (DAKO, Carpinteria, USA)을 이용하였다.

항원성 회복을 위하여 pH 6.0의 10 mM citrate 완충용액에 슬라이드를 담근 후, 750 watt의 극초단파(microwave)로 15분간 끓이고 20분간 실온에서 식힌 다음 내부의 과산화효소(peroxidase) 활성도를 억제시키기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 30분간 처리 후 Tris buffered saline (TBS)에 10분간 세척하고, 일차항체를 37.5°C에서 1시간 동안 처리한 후 TBS로 10분 간격으로 세 차례 세척하고 Zymed<sup>®</sup> SuperPicTrue™ Polymer Detection Kit (Invitrogen, San Francisco, USA)으로 20분간 상온에서 작용시켰다.

발색은 Zymed<sup>®</sup> DAB Kit (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride Substrate Kit, Invitrogen, San Francisco, USA)로 substrate-chromogen을 사용했고, Mayer hematoxyline으로 대조염색하고 세척한 후 96% 알코올, 100% 알코올, Xylene을 거쳐 봉입하여 슬라이드를 완성한 후 현미경으로 관찰하였다.

Survivin의 염색정도를 판정할 때 종양세포의 핵과 세포질 그리고 전체적으로 고르게 발현되는 경우를 구분하였고, 세포질에 짙은 갈색으로 염색되지 않은 경우 음성으로, 20% 미만의 염색정도를 보인 경우 1+, 50% 미만의 염색정도를 보일 경우 2+, 그리고 50% 이상의 염색정도를 나타낼 때 3+로 정의하였다. 이때 세 명의 병리의사가 각각 판독한 후 합의된 의견을 결과로 하였다.

bcl-2는 survivin과 같은 방법으로 판정하였으며, p53은 염색된 종양세포가 5% 이상일 때를 양성으로 판정하였다.

## 3. 세포자멸사의 측정

자멸사한 세포의 DNA를 확인하기 위해 ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ OligoLigation (ISOL) Apoptosis Detection Kit (CHEMICON International Inc. Temecula, USA)를 이용하였다. 조직을 통상적인 방법으로 탈 파라핀 후 PBS (pH 7.4)로 5분간 세척하였다. 실온에서 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5분간 작용시킨 후 PBS로 3회

세척 및 증류수로 2분씩 2회 세척하고 Proteinase K solution (50  $\mu$ g/mL)에 실온에서 15분간 부화(incubation)시켰다. PBS 및 증류수로 세척한 후 1배의 equilibration buffer와 실온에서 10초간 작용시키고 물기를 제거 후 Working Strength DNA ligase enzyme을 조직위에 얹은 후 16-22°C에서 10-16시간 부화하였다. Streptavidin-Peroxidase 용액을 조직에 얹은 후 실온에서 30분간 부화하고 Working strength peroxidase substrate를 조직에 얹은 후 실온에서 10분간 부화하였다. Hematoxylin으로 약하게 대조염색 후 탈수 과정을 거쳐 xylene으로 투명화시킨 후 balsam으로 봉입하여 현미경으로 관찰하였다.

세포자멸사에 대한 염색판정은 Kerr 등(4)이 보고한 형태학적 기준을 사용하였으며 세포의 핵에 염색이 전체적으로 일어나고 세포자멸사 소체(apoptotic body)에 갈색의 둥근 소체로 염색이 일어나는 경우를 모두 양성으로 판정하였다. 그리고, 세포자멸사 지수(Apoptotic index, AI)는 200배 시야에서 무작위로 500개의 세포를 관찰하여 양성소견을 보인 세포를 세어 백분율로 환산하여 표시하였다.

## 4. 통계학적 분석

유방암의 조직병리학적 소견에 따른 발현율을 비교검토 하기 위하여 Chi-square method에 의한 *p*-value를 측정하였고, 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 산출하였으며, 생존율에 영향을 미치는 혼란변수를 통제하기 위한 다변량 분석은 Cox proportional hazard model을 이용하여 독립적인 설명변수를 알아보려고 하였다.

모든 통계적 분석은 양측 검정을 이용하였으며 *p* 값이 0.05 이하인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

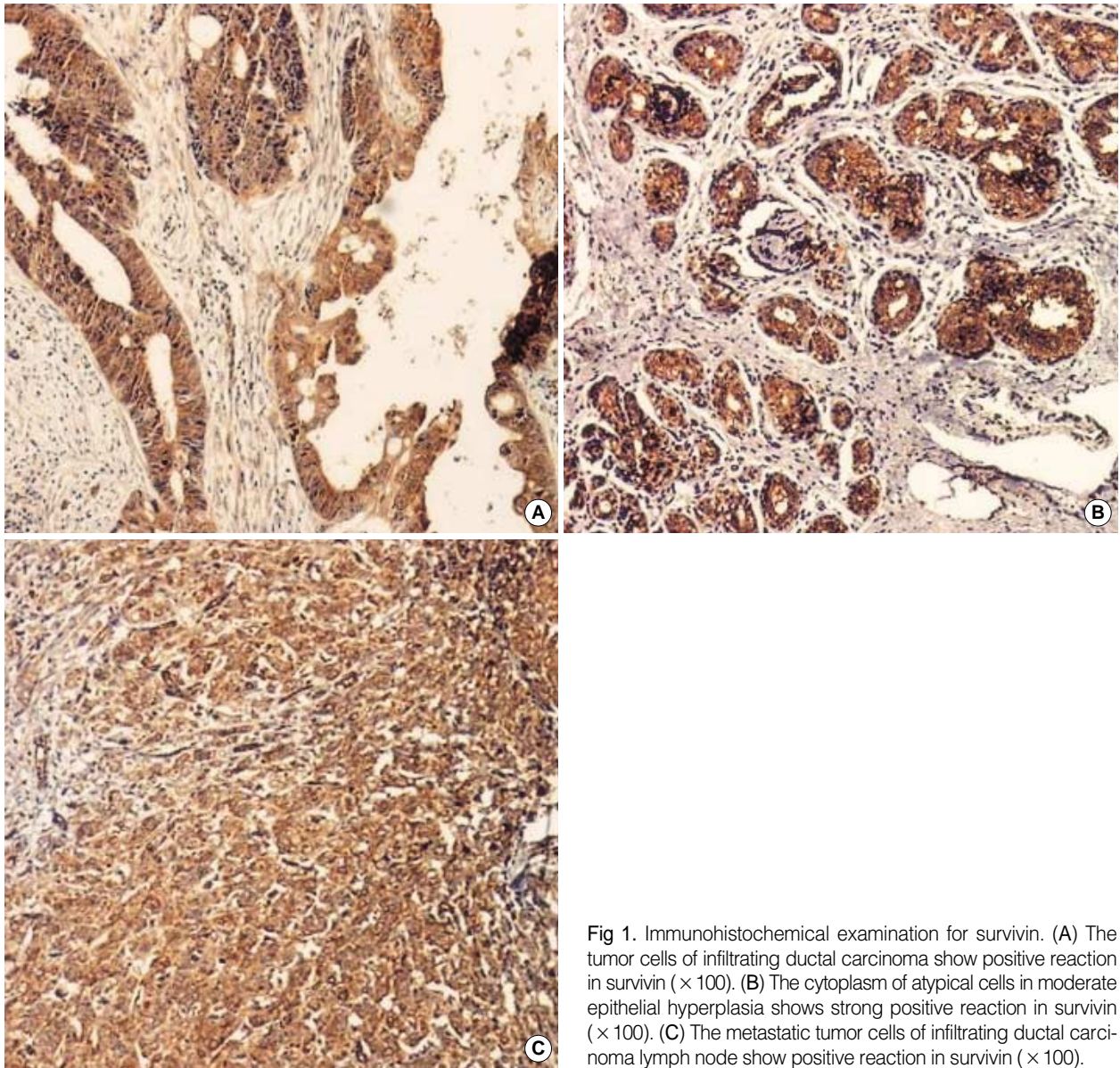
### 1. Survivin 및 bcl-2의 발현

Survivin의 세포질 발현은 유방암환자 80예 중 43예(53.8%)에서 관찰할 수 있었고, 이 중 +가 16예(20%), ++가 17예(21.3%), +++가 10예(12.5%)였다. 또한 대조군으로 선정한 섬유선종 조직 10예 중 2예(20%), 비정형성 과형성(atypical hyperplasia)조직 20예 중 14예(70%) 및 암세포가 침윤된 림프절 20예 중 17예(85%)에서 발현되어 대조군에 비해 유의하게 증가하는 모습을 볼 수 있었다(Table 2, Fig 1). bcl-2는 전체 80예 중 56예(70%)에서 발현이 관찰되었다(Fig 2).

### 2. 유방암의 예후인자와 survivin 및 bcl-2의 발현과의 상관관계

세포질 survivin 발현과 유방암의 각종 조직병리학적 변수와





**Fig 1.** Immunohistochemical examination for survivin. (A) The tumor cells of infiltrating ductal carcinoma show positive reaction in survivin ( $\times 100$ ). (B) The cytoplasm of atypical cells in moderate epithelial hyperplasia shows strong positive reaction in survivin ( $\times 100$ ). (C) The metastatic tumor cells of infiltrating ductal carcinoma lymph node show positive reaction in survivin ( $\times 100$ ).

**Table 2.** Cytoplasmic survivin expression in breast carcinoma

	Survivin expression (%)			Total
	+	++	+++	
Control	1/10 (10.0)	1/10 (10.0)	0	2/10 (20.0)
Atypical hyperplasia*	4/20 (20.0)	9/20 (45.0)	1/20 (5.0)	14/20 (70.0)
Primary cancer*	16/80 (20.0)	17/80 (21.3)	10/80 (12.5)	43/80 (53.8)
Malignant lymph node*	8/20 (40.0)	6/20 (30.0)	3/20 (15.0)	17/20 (85.0)

\*:  $p < 0.05$  (control vs. atypical hyperplasia, primary cancer, malignant lymph node).

의 상관관계를 보면 종양의 병기, 액와 림프절 전이 유무, 조직학적 분화도가 상관관계가 있었으나, bcl-2 발현은 액와 림프절 전이 유무, 종양의 크기, 병기, 조직학적 분화도 등의 각종변수와 상관관계를 찾을 수 없었다(Table 3).

세포질 survivin의 발현과 bcl-2의 발현은 유의한 상관관계를 보였으나( $p=0.015$ ), 핵에 80예 중 18예(22.5%)에서 발현을 보인 p53은 survivin 및 bcl-2의 발현과 상관관계가 없었다(Table 4).

Kaplan-Meier 방법을 이용한 생존곡선에서는 survivin의 세포질 발현여부가 통계적으로 유의하게 생존율의 감소를 볼 수 있었으나( $p=0.048$ , Fig 3), Cox proportional hazard model을 이용한 다변량 분석에서는 survivin 발현 여부가 생존율과 관

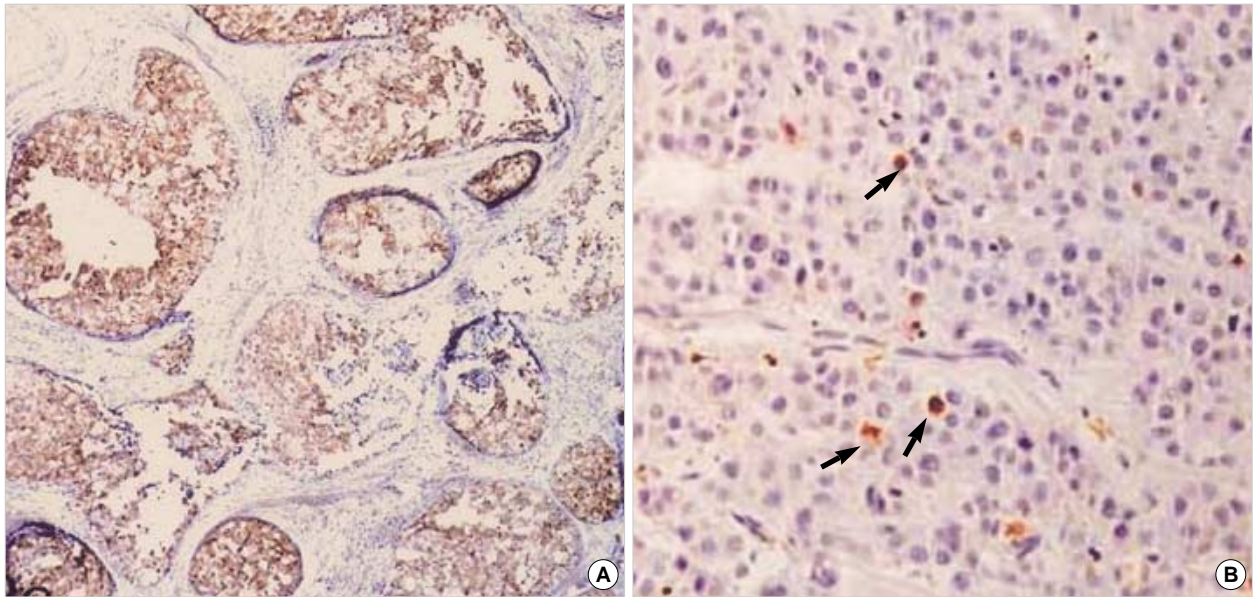


Fig 2. Histochemical staining for bcl-2 and apoptotic tumor cells. (A) bcl-2 expression in breast cancers ( $\times 40$ ). (B) in situ oligigation reaction (ISOL) for apoptosis (arrows:  $\times 200$ ).

Table 3. Correlation between clinicopathological factors and expression of survivin, bcl-2 in breast cancer (n=80)

Characteristics	bcl-2 expression (%)	p-value	Survivin expression (%)	p-value
Menopausal status		0.864		0.960
Premenopause	24/37 (64.9)		20/37 (54.1)	
Postmenopause	32/43 (74.4)		23/43 (53.5)	
Tumor size (cm)		0.216		0.808
<2	18/27 (66.7)		14/27 (51.9)	
>2	38/53 (71.7)		29/53 (54.7)	
Nodal status		0.138		0.001
Positive	18/25 (72.0)		20/25 (80.0)	
Negative	38/55 (69.1)		23/55 (41.8)	
Stage grouping		0.231		0.001
0, I, II	41/59 (69.5)		25/59 (42.4)	
III, IV	15/21 (71.4)		18/21 (85.7)	
Histologic grade		0.152		0.038
I	28/45 (62.2)		22/45 (48.9)	
II	17/22 (77.3)		11/22 (50.0)	
III	11/13 (84.6)		10/13 (76.9)	
ER status		0.952		0.501
Positive	30/40 (75.0)		23/40 (57.5)	
Negative	26/40 (65.0)		20/40 (50.0)	
c-erbB-2 expression		0.069		0.107
Positive	39/55 (70.9)		31/55 (56.4)	
Negative	17/25 (68.0)		12/25 (48.0)	

ER=estrogen receptor.

런이 있는 유의한 독립적 예측인자는 아니었다(Hazard ratio=1.458,  $p=0.168$ , Table 6). 또한, bcl-2의 발현과 생존율과는 상관관계가 없었다.

Table 4. Expression of bcl-2 and p53 in survivin positive breast cancer

	Survivin expression		p-value
	Negative (%)	Positive (%)	
bcl-2 expression			0.015
Positive	23/56 (41.1)	33/56 (58.9)	
Negative	14/24 (58.3)	10/24 (41.7)	
p53 expression			0.271
Positive	8/18 (44.4)	10/18 (55.6)	
Negative	29/62 (46.8)	33/62 (53.2)	

### 3. 세포자멸사와 survivin 및 bcl-2의 발현과의 관계

ISOL방법을 이용하여 측정한 전체 환자군의 평균 세포자멸사 지수는 0.2%이었다(Fig 2). 세포자멸사 지수가 0.2% 이하인 군(61.3%)과 이상인 군(38.8%) 사이에서 액와 림프절 전이유무가 통계학적인 상관관계가 있었으나( $p=0.048$ ), 종양의 크기, 병기, 조직학적 분화도, 여성호르몬 수용체(estrogen receptor) 발현 유무와는 상관관계가 없었다(Table 5).

세포질 survivin 발현이 양성인 군( $n=43$ )에서의 평균 세포자멸사 지수는 세포질 survivin 발현이 음성인 군( $n=37$ )에 비해 통계학적으로 유의하게 세포자멸사 지수가 감소하였다( $p=0.024$ ). 하지만 bcl-2 발현유무에 따른 세포자멸사 지수의 변동은 찾을 수 없었다( $p=0.067$ ).

Kaplan-Meier 방법을 이용한 분석에서는 세포자멸사 지수가 감소할수록 통계적으로 유의하게 생존율의 감소를 볼 수 있었으나( $p=0.032$ , Fig 3), Cox proportional hazard model을 이용



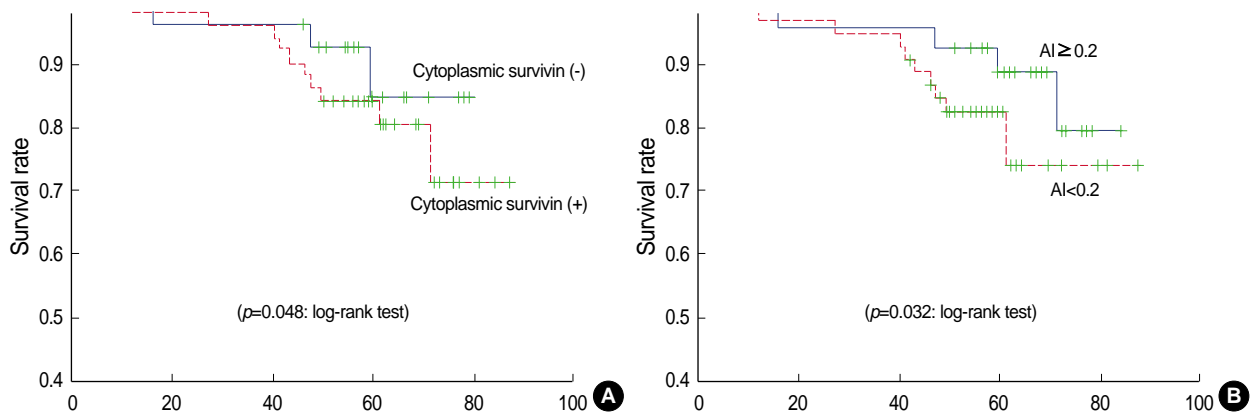


Fig 3. Kaplan-Meier survival curve according to cytoplasmic survivin expression (A) and high vs. low Apoptotic Index (B).

Table 5. Correlation between clinicopathological factors and Apototic Index in breast cancer

Characteristics	AI (%)		p-value
	<0.2	≥ 0.2	
Tumor size (cm)			1.517
<2	14/27 (51.9)	13/27 (48.1)	
>2	35/53 (66.0)	18/53 (34.0)	
Nodal status			0.048
Positive	19/25 (76.0)	6/25 (24.0)	
Negative	30/55 (54.5)	25/55 (45.5)	
Stage grouping			0.283
0, I, II	33/59 (55.9)	26/59 (44.1)	
III, IV	16/21 (76.2)	5/21 (23.8)	
Histologic grade			1.138
I	21/45 (46.7)	24/45 (53.3)	
II	16/22 (72.7)	6/22 (27.3)	
III	12/13 (92.3)	1/13 (7.7)	
ER status			1.531
Positive	25/40 (62.5)	15/40 (37.5)	
Negative	24/40 (60.0)	16/40 (40.0)	
c-erb-2 expression			0.164
Positive	34/55 (61.8)	21/55 (38.2)	
Negative	15/25 (60.0)	10/25 (40.0)	
bcl-2 expression			0.067
Positive	36/56 (64.3)	20/56 (35.7)	
Negative	13/24 (54.2)	11/24 (45.8)	
p53 expression			0.074
Positive	11/18 (61.1)	7/18 (38.9)	
Negative	38/62 (61.3)	24/62 (38.7)	
Survivin expression			0.024
Positive	33/43 (76.7)	10/43 (23.3)	
Negative	16/37 (43.2)	21/37 (56.8)	

AI=apoptotic index; ER=estrogen receptor.

한 다변량 분석에서는 세포자멸사 지수의 감소가(AI<0.2) 생존율과 관련이 있는 유의한 독립적 예측인자는 아닌것으로 나타났다(Hazard ratio=2.243,  $p=0.072$ , Table 6).

Table 6. Cox proportional hazard model analysis

	Risk rate	95% CI	p-value
Menopausal status (pre vs. post)	2.184	0.61-7.79	0.221
Tumor size (cm) (<2 vs. ≥2)	0.131	0.02-1.07	0.030
Nodal status (positive vs. negative)	0.315	0.09-1.07	0.055
Stage (0, I, II vs. III, IV)	0.226	0.07-0.78	0.013
Histologic grade (I, II vs. III)	0.179	0.05-0.71	0.008
ER status (positive vs. negative)	0.832	0.26-2.73	0.762
c-erb-2 expression (positive vs. negative)	0.348	0.03-1.71	0.177
p53 expression (positive vs. negative)	0.504	0.23-2.11	0.426
Cytoplasmic survivin (positive vs. negative)	1.458	0.13-1.71	0.168
bcl-2 expression (positive vs. negative)	1.247	0.52-2.48	0.082
AI (<2 vs. ≥2)	2.243	0.08-4.24	0.072

CI=confidence interval; ER=estrogen receptor; AI=apoptotic index.

## 고찰

유방암은 우리나라의 여성에서 흔히 발생하는 악성 종양 중 하나이며, 임상적 혹은 생물학적으로 매우 다양한 특징을 나타내므로 병인론과 환자의 예후와 관련하여 예후인자 및 암의 발생과 성장, 전이에 관한 다양한 유전자에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

세포자멸사는 계획된 세포 사멸(programmed cell death)로서 발생과정 뿐만 아니라 일생에 걸쳐 일정한 장소에서 일정한 시간에 반복적으로 일어나는 정상적인 생리적 죽음을 말하며, 생체에 해를 끼치는 것이 아니라 생명유지에 필수적인 현상으로 뚜렷한 목적을 가지고 있어 그 과정이 세포 괴사(necrosis)와는 조직학적 및 생화학적으로 차이가 있으며, 이것은 세포분열(mitosis)과 함께 정상조직과의 조절과 유지에 중요한 역할을 한다.(5)

세포자멸사는 세포내 신호체계와 방사선, 화학요법 및 호르몬과 같은 외인성 인자들에 의해 유발되며, 생체의 항상성 조절에

꼭 필요한 생리 기능인 동시에 악성 종양에서 암 세포 수를 조절하여 종양의 크기를 자가 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다.(6)

세포자멸사가 억제되면 클론(clone)의 팽창과 이차적인 유전적 변화 및 악성 전환의 기회를 높임으로써 종양 발생이 일어난다. 암의 예후와 세포자멸사와의 관련성은 여러 종류의 암 중에서 연구되어 왔는데, 유방암이나 폐암 등 대부분의 암 중에서 세포자멸사가 많은 경우 환자의 생존기간이 짧고 종양이 진행되어 있다고 보고 되어왔다.(7, 8)

종양 세포는 세포고사에 저항성을 갖게 하는 단백질들을 발현하는데 이러한 세포자멸사 경로에 작용하여 세포자멸사를 방해하는 단백질로 bcl-2 단백질 군, heat shock protein, IAP 단백질 군이 잘 알려져 있다. bcl-2는 세포자멸사 억제 단백질 중 가장 잘 알려진 것으로 염색체 전좌 t(14; 18)를 갖는 여포성 림프종에서 처음 발견되었는데,(9, 10) 다른 발암 유전자들과 달리 세포 주기 진행이나 세포증식을 촉진시키지 않고 대신 세포자멸사를 억제함으로써 세포의 생존을 증가시키는 것으로 알려져 있다.(11) 또한, bcl-2는 세포자멸사 억제뿐 아니라 myc 유전자나 p53 같은 종양 억제 유전자와 함께 작용하여 세포를 죽지 않게 하고 결국 종양을 형성하는데 기여하는 것으로 보고되었다.(12)

유방암에서의 bcl-2에 대한 연구로 Leek 등(13) 및 Park 등(14)은 bcl-2 발현이 여성호르몬 수용체(estrogen receptor)와 황체호르몬 수용체(progesterone receptor) 의존적이라고 주장하였고, Castiglione 등(15)은 bcl-2 발현과 호르몬 수용체의 유무, wild-type의 p53 발현 및 낮은 증식 지수 등이 유의한 통계학적 유의성을 보인다고 주장하였다. 그 밖의 다른 연구에서도 bcl-2 발현이 호르몬 수용체 발현 여부와 조직학적 분화도와 유의한 상관관계를 가지는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 80예 중 56예에서 bcl-2에 대한 면역조직화학 염색에서 양성반응을 보여 70%의 발현율이 관찰되었는데 이것은 대부분의 유방암 연구에서 bcl-2 발현율이 40-60%인 것에 비해 다소 높은 결과를 보인 것이다. 또한, 액와 림프절 양성 유무가 bcl-2의 발현과 상관관계가 있었으나 조직학적 분화도 및 여성호르몬 수용체 발현 등과의 유의한 관계는 찾을 수 없었다.

대부분의 연구에서 bcl-2가 세포자멸사를 억제하고 세포의 수명을 연장시키며 다른 이차적인 암유전자와 함께 종양 형성에 기여함으로써 bcl-2 발현은 나쁜 예후를 보이는 것으로 보고하나 몇몇 연구에 의하면 bcl-2가 발현된 종양이 오히려 좋은 예후를 보이는 것으로 알려져 있다.(16-18) 이에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 bcl-2 발현에 의해 유사분열 속도가 낮은 클론에서 이차적인 유전자 결함이 더 천천히 생겨 이로써 종양이 서서히 자라기 때문일 것이라 추측되기도 한다.(19)

IAP 단백질은 1992년과 1994년 baculovirus 일종인 *Cydia pomonella granulosis virus* (OpMNPV)를 통해서 발견된 것으로 여러 종류의 세포자멸사 유도물질로부터 세포를 보호하며 이런 세포자멸사의 억제가 암의 형성에 중요한 역할을 하는 것이 알려지면서 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다.(20, 21) IAP 단백질은 구조상 80개의 아미노산으로 이루어진 Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat (BIR) 영역(domain)과 carboxy 말단의 Ring zinc-finger를 가지고 있다. IAP 가족군은 활성화된 caspase 3와 caspase 7을 직접 억제하여 작용할 뿐만 아니라 많은 연구들에서 포유동물의 IAP 단백질 가족군이 caspase의 억제제가 아닌 다른 작용으로도 세포자멸사를 억제하는 것으로 보고되는데 이것은 주로 nuclear factor-kappa B와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.(22)

IAP 단백질 가족군은 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ ), Fas 리간드, cytochrome C, etoposide, cisplatin, paclitaxel 등 여러 종류의 항암제, 방사선 조사, ultraviolet radiation 등의 여러 가지 자극들에 의해 일어나는 세포자멸사를 차단하며 bcl-2 단백질에 의한 세포자멸사 차단부위보다 더 아래쪽에 있는 caspase를 차단하므로 bcl-2 단백질보다 세포자멸사를 억제하는 기능이 더 강한 것으로 보고되어 있다. IAP 단백질 중에서 가장 최근에 Ambrosini 등(23)에 의해 발견된 것이 survivin으로 이것은 bcl-2 단백질과는 다른 기전으로 세포자멸사를 방해하는 것으로 연구되어 있다.

Survivin은 다른 IAP 단백질 가족군과는 달리 단일 BIR domain을 갖고 있으며 두 개의 monomer가 공유결합으로 연결된 구조로 monomer에는 N-terminal Zn<sup>2+</sup> binding BIR 영역과 65 Å amphipathic C-terminal alpha helix 영역으로 구성된 이합체이다.(24) 사람의 survivin 유전자 좌위는 17q25이며 142개의 아미노산으로 이루어져 있고 16.5 kd의 분자량을 가지고 있다.(25) Survivin 단백질의 발현은 세포주기의 조절을 받아 S기에서 발현 증가가 시작되어 주로 세포분열시 mitotic spindle의 microtubule에 작용하여 G1 억제자에 의해 조절되는 G2/M 시기에 발현이 40배 정도 증가되고 세포 주기 정지 후에 빠르게 감소하는 것으로 알려져 있다.(26, 27)

Survivin은 caspase 3, 7, 9에 작용하여 이들 caspase들의 과발현에 의한 세포자멸사를 억제하며 최근 세포 주기 진행에도 관여하는 것으로 알려졌는데 Olie 등(28)의 연구에 의하면 survivin antisense oligonucleotide를 이용하여 survivin mRNA를 하향 조절시킨 결과, 세포내 survivin의 발현이 줄어들고 세포자멸사와 배수성이 증가하며 세포질분열을 완결하지 못하여 다핵성세포가 증가한 것으로 보아 survivin은 세포자멸사를 억제하는 기능만이 아니라 세포의 분화를 조절하는 두 가지의 중요한 역

할을 한다고 하였다.

Survivin은 태아 조직에서는 높은 발현율을 보이다가 정상 분화된 성인 조직에서는 거의 발현이 되지 않고 여러 종류의 암 세포주(cancer cell line)에서 발현되는 것이 알려지면서 주목을 받기 시작했고, 폐암, 대장암, 위암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신경아세포종, 고분화된 림프종 등의 여러 암조직에서 발현되어 새로운 종양 표지자로서의 survivin에 대해 많은 관심이 있어왔다. (23, 26)

Monzo 등(29)은 비소세포폐암 조직에서 RT-PCR을 사용하여 survivin이 종양 조직에서 80% 이상 발현되었고 survivin 발현군에 비해 비발현군에서 생존율이 더 좋은 것으로 보고하였고, Adida 등(30)은 신경아세포종 조직의 60%에서 survivin이 발현되어 survivin이 신경아세포종의 예후 인자로 작용할 수 있다고 주장하였다.

다른 암에 대한 연구에서도 survivin은 유방암, 대장암, 급성 골수성 백혈병, 폐암, 피부 상피세포암, 췌장암, 식도암 등에서 나쁜 예후와 관련 있는 것으로 보고되어 그 임상적 의의가 부각되고 있다. Okada 등(31)은 위암에서 survivin의 발현은 세포질 및 핵에 모두 발현되었으며 특히 핵에 우세하게 발현되는 것이 다변량 검사상 좋은 예후와 관련이 있고, 세포질에 우세하게 발현되는 것은 나쁜 예후와 관련이 있다고 보고하였고, Ito 등(32)은 간세포암의 연구에서 주로 핵에 발현되며 소수가 세포질에 발현된다고 보고하였다. 또한 Kennedy 등(33)에 의하면 유방암에서 survivin의 발현은 대개 핵에 우세하게 발현되며 이것이 유방암의 독립적인 좋은 예후인자로 작용한다고 보고하였다. 저자는 일차적으로 유방암 조직과 정상 유방조직, 비정형성 과형성(atypical hyperplasia)조직 및 암세포가 침윤된 림프절에서 survivin 발현정도를 관찰한 결과 정상조직보다 유방암 조직(53.8%) 및 비정형성 과형성조직(70%)과 암세포가 침윤된 림프절(85%)에서 survivin의 발현이 유의하게 점점 증가하는 모습을 볼 수 있었다.

이러한 결과는 여러 암종의 연구와 마찬가지로 유방암에서 survivin의 발현이 증가됨은 survivin이 유방암 발생에 중요한 역할을 할 것으로 사료되며 환자의 예후와 관련될 가능성을 시사하는 것이다.

저자의 연구에서 나타난 결과는 이전에 보고 된 경우처럼 survivin이 세포내의 세포질과 핵 내에서 모두 발현될 수 있음을 보여주는데 이러한 결과는 survivin 발현이 세포질 또는 핵 내에만 국한되어 나타난다고 하는 보고와는 다른 결과이다. 또한 survivin의 발현정도와 유방암의 여러 예후인자를 연관시켜 비교해 보았을 때, 세포질 survivin 발현이 종양의 암 병기, 액와 림프절 전이 유무, 조직학적 분화도와 상관관계가 있어 신경아세포종, 후두 편평상피 세포 암, 그리고 대장 및 직장암에서의 연구처럼 본 연구에서도 세포질 내에서의 survivin 발현이 환자의 나쁜 예후

와 좀 더 관련이 있었다.

또한, Kawasaki 등(34)은 수술적으로 절제된 대장암 조직에서 면역조직화학 염색을 시행하여 survivin이 대장암 세포에 특이적으로 발현됨을 증명하였고 p53처럼 대장암의 암화 과정 중 선종의 저이형성(low dysplasia)에서 고이형성(high dysplasia)의 선종으로 이행하는 동안 중요한 역할을 할 것이라고 하였으며, survivin의 발현군의 세포자멸사 지수가 비 발현군보다 낮고, bcl-2 발현이 증가되었다고 하였다. 또한 세포자멸사 지수가 낮은 군이 통계적으로 유의하게 생존율이 낮고 survivin 발현군이 비 발현군에 비해 생존율이 낮아 survivin에 의한 세포자멸사의 억제가 나쁜 예후와 관련이 있다고 하였다.

Lu 등(35)도 위암에서의 암세포 특이적인 survivin 발현 및 survivin의 발현 p53, bcl-2의 발현과 관련이 있었으며 survivin 발현군에서 세포자멸사 지수가 감소를 보여 survivin에 의해 암 세포의 세포자멸사가 억제됨을 보고하였다.

본 연구에서는 세포자멸사 지수와 액와 림프절 전이유무, 종양의 크기, 병기, 조직학적 분화도, 여성호르몬 수용체의 발현유무와는 상관관계가 없었다. 또한 세포질 survivin 발현이 양성인 군에서 통계학적으로 유의하게 세포자멸사 지수가 감소하였다. 하지만 bcl-2 발현유무에 따른 세포자멸사 지수의 변동은 찾을 수 없었다.

이는 다른 보고에서처럼 세포자멸사를 조절하는 인자가 bcl-2 이외에도 bcl-XL, Bax, Bad 등 다양한 요인들이 작용하며 bcl-2가 세포자멸사를 조절하는 기전도 단순히 bcl-2 단백질이 존재한다는 것이 중요한 것이 아니라 bcl-2의 phosphorylation이 기능적으로는 더 중요하기 때문인 것으로 생각된다. (36)

또한, 세포자멸사 지수의 감소가(AI<0.2) 생존율과 관련이 있는 유의한 독립적 예측인자는 아니었지만 Kaplan-Meier 방법을 이용한 생존곡선에서는 세포자멸사 지수가 감소할수록 통계적으로 유의하게 생존율의 감소를 볼 수 있었다. 초기의 광학현미경에 의존한 세포자멸사의 검사는 그 크기가 작고 탐식된 림프구와 모양이 비슷한 한계점이 있었으나 분자 생물학의 발달로 DNA의 절편을 확인함으로써 세포자멸사의 검출이 용이하게 되었다.

세포자멸사에 빠진 세포와 배경의 염색 사이에 염색성 차이가 선명하여 비교적 쉽게 정량화할 수 있는 방법으로 in situ end labeling과 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling이 많이 이용되나 이 방법들은 위양성률이 높다는 보고가 있어 본 연구에서는 ISOL reaction 방법을 이용하여 세포자멸사를 검색하였다.

저자의 연구에서는 survivin의 발현이 매우 유용한 예후예측 인자가 될 수 있음을 보여 주었다. 특히 세포질 내에서의 survivin의 발현은 임파절 전이 유무와 환자의 암 병기와 직접적인 상관관



계가 있어 향후 좀더 많은 자료가 축적되면 예후인자로서 사용이 가능할 것으로 기대해 볼 수 있을 것이다.

## 결 론

정상적인 조직항상성의 유지는 세포증식률과 세포사망률의 균형에 의해서 이루어지는데 세포자멸사의 억제가 이러한 균형파괴의 한 원인으로 생각되며 세포자멸사 억제로 인한 세포 수명 연장이 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 유방암 환자 80명을 대상으로 세포자멸사 억제 단백질인 bcl-2, p53 및 survivin 단백질의 발현율과 세포자멸사 지수와의 연관성을 비교하여 이들이 유방암의 임상 변수들과의 연관성을 살펴본 결과 bcl-2 및 survivin에 의한 세포자멸사의 억제가 나쁜 예후와 관련이 있었다.

결론적으로 survivin, bcl-2 등은 항암치료의 효과를 방해하는 세포자멸사 억제 단백질로 이들의 발현을 억제하거나 이들의 세포자멸사 억제 작용을 중화시키는 방법에 대해 많은 연구가 진행되고 있어 이들이 세포자멸사를 억제하는 경로를 선택적으로 차단하는 방법을 개발하고 전통적인 항암치료와 함께 새로운 치료 방법을 결합한다면 유방암치료를 더 나은 발전을 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases, and anti-cancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20.
2. Jang JH, Kim TY, Kim SY, Baek MJ, Oh MH, Kim EH, et al. Expression of survivin in patients with breast cancer. *J Korean Breast Cancer Soc* 2004;7:236-43.
3. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
4. Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 1995;46:1-27.
5. Wyllie AH. Apoptosis: Cell death under homeostatic control. *Arch Toxicol* 1987;11:3-10.
6. Palumbo A, Yeh J. Apoptosis as a basic mechanism in the ovarian cycle: follicular atresia and luteal regression. *J Soc Gynecol Invest* 1995;2:565-73.
7. Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994;30A:2068-73.
8. Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, Vahakangas K, Soini Y, Sormunen R, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5595-602.
9. Jaattela M. Escaping cell death: Survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1992;248:30-43.
10. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-9.
11. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
12. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 1995;13:513-43.
13. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, associated with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994;69:135-9.
14. Park SH, Kim H, Song BJ. Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8:26-30.
15. Castiglione F, Sarotto I, Fontana V, Destefanis M, Venturino A, Ferro S, et al. Bcl2, p53 and clinical outcome in a series of 138 operable breast cancer patients. *Anticancer Res* 1999;19:4555-63.
16. Ritter JH, Dresler GM, Wick MR. Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 1995;26:1227-32.
17. Inada T, Kikuyama S, Ichikawa S. bcl-2 as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:2003-10.
18. Hellemans P, Dam PA, Weyler J, Oosteroma AT, Buytaert P, Marck EV. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995;72:354-60.
19. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tunekar MF, Dunnill Ms, Pierce CB, et al. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *N Eng J Med* 1993;329:690-4.
20. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:2168-74.
21. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 1994;69:2521-8.
22. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is

- a direct inhibitor of cell-death protease. *Nature* 1997;388:300-4.
23. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997;3: 917-21.
  24. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2002;7:620-3.
  25. Hague A, Moorghen M, Hicks D, Champman M, Paraskeva C. Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 1994;9:3367-70.
  26. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackenzie AE. The inhibitor of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17:3247-59.
  27. Deveraux QL, Reed JC. IAP family protease-suppressors of apoptosis. *Gene* 1999;12:239-52.
  28. Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000;60:2805-9.
  29. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-4.
  30. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-3.
  31. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-16.
  32. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-5.
  33. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1077-83.
  34. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-4.
  35. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-12.
  36. Ruvolo PP, Deng X, May WS. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 2001;15:515-22.