

비소세포폐암에서 아포프토시스 억제 단백질 Survivin 발현에 관한 면역조직학적 분석

단국대학교 의과대학 내과학교실, 해부병리학 교실¹

고미혜, 명나혜¹, 이재환¹, 조은미, 박재석, 김건열, 이계영

= Abstract =

The Immunohistochemical Analysis for the Expression of Survivin,
an Inhibitor of Apoptosis Protein, in Non-small Cell Lung Cancer

Mi Hye Ko, M.D., Na Hye Myoung, M.D.¹, Jae Whan Lee, M.S.¹, Eun Mi Cho, B.A.,
Jae Seuk Park, M.D., Keun Youl Kim, M.D., and Kye Young Lee, M.D.

Department of Internal Medicine and Pathology¹, Dankook University Medical School, Chonan, Korea

Background : Defects in apoptotic signaling pathways play important role in tumor initiation, progression, metastasis and resistance to treatment. Several proteins which may promote tumorigenesis by inhibiting apoptosis were identified. The survivin protein is the member of inhibitor of apoptosis protein(IAPs) family which inhibits apoptosis. Unlike other IAPs, it is expressed in during the fetal period but not in adult differentiated tissues. Many reports have stated that survivin is selectively expressed in many cancer cell lines and cancer tissues. We performed immunohistochemical analysis for survivin expression in non-small cell lung cancer to get evaluate its clinical implication.

Methods : Twenty nine surgically resected lung cancers were examined. Immunohistochemical staining were performed by immuno-peroxidase technique using avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex in the formalin-fixed, paraffin-embedded tissue 4 μ m section. Anti-survivin polyclonal antibody was used for primary antibody and anti-p53 monoclonal antibody was also used to analyze the correlation between survivin and p53 expression. The survivin expression scores were determined by as the sum of the stained area and intensity.

Results : Immunohistochemical analysis showed cancer specific expression of survivin in 20 of 29 cases (69.0

Address for correspondence :

Kye Young Lee, M.D.&Ph.D.

Division of Pulmonary Medicine, Dankook University Medical Center

16-5 Anseo-dong, Chonan, Choongnam, 330-715, Korea

Phone : 0417-550-3916 Fax : 0417-556-3256 E-mail : kyleemd@anseo.dankook.ac.kr

%). Western blot analysis also showed the selective survivin expression in tumor tissue. There was no correlation between survivin expression and clinicopathological parameters and prognosis. We analyzed the correlation between survivin expression and p53 expression, but found none.

Conclusion : We confirmed the tumor specific expression of survivin in non-small cell lung cancer. But this expression was not correlated with clinical parameters as well as histology, tumor stage, recurrence, and survival rate. Also it was not statistically correlated with the expression of p53. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 909-921)

Key words : Survivin, Apoptosis, Immunohistochemistry, Lung Cancer, IAP, p53.

서 론

암 발생의 기전은 오랜 동안 세포증식의 증가에 의한 것이라고 설명되어져 왔으나 세포증식의 증가 이외에도 세포사멸, 즉 아포프토시스가 중요한 역할을 하리라는 의견이 최근 주목받고 있다¹. 아포프토시스 신호 전달체계의 장애는 암세포에서 흔히 발견되며 아포프토시스는 DNA의 손상이 있거나 세포주기 조절의 장애가 있어 암세포로의 전환 가능성이 있는 세포들을 제거하기 때문에 암의 발생 시초에 중요한 작용을 한다고 볼 수 있다. 또한 아포프토시스에 대한 저항, 즉 세포사로부터의 탈출(escaping cell death)은 암의 형성(tumorigenesis) 뿐 아니라 암의 진행을 가속화시키며, 암세포가 혈류 속에서 살아남아 다른 부위의 조직에서 자라나게 하여 암의 전이를 용이하게 하고 치료적인 면에서도 아포프토시스의 역치를 올려 암 치료에 대한 내성 유발에 중요한 역할을 한다². 최근 아포프토시스에 대한 활발한 연구로 아포프토시스를 억제하여 암발생에 관여하는 몇몇 단백질군들이 발견되었다. 이들에는 bcl-2 단백질군중 항아포프토시스 효과를 가지고 있는 것들과 heat shock protein인 Hsp70, Hsp27 및 IAP 가족군(inhibitor of apoptosis protein family)이 있다.

Bcl-2는 아포프토시스의 억제 단백질들 중 가장 먼저 밝혀진 것으로 여포성 B 세포 림프종(follicular B cell lymphoma)의 t(14 : 18) 염색체 전위 부위에서 발견되었다³. Bcl-2는 성장을 자극하는 능력은 전혀 없고 세포의 주기를(cell cycle) 연장시켜 아포

프토시스를 억제하는 것이^{4,5} 알려졌으며 여포성 B 세포 림프종뿐 아니라 혈액종양(hematopoietic malignancies)⁶, 유방암⁷, 전립선암⁸, 난소암⁹, 대장암¹⁰, 폐암¹¹ 등에서도 과발현(overexpression) 되는 것이 보고되었다. 또한 bcl-2의 과발현이 항암제, 방사선 조사 등의 여러 가지 아포프토시스 자극인자로부터 세포를 보호한다는 것이 알려짐으로써 아포프토시스의 억제가 암 발생의 시초에 중요한 역할을 할 것이라는 가설이 제기되게 되었다. 그러나 백혈병의 일부⁶, 전립선암⁸등에서는 암세포에서의 bcl-2의 과발현이 나쁜 예후와 관련이 있었으나 유방암⁷, 대장암¹², 위암¹³ 등에서는 오히려 bcl-2 과발현이 양성 예후 인자로 관여한다는 결과가 나와 있어 그 예후적 가치에 대해서는 아직 확실하지가 않은 실정이다.

Bcl-2 단백 이외에 아포프토시스 억제 단백질로 heat shock protein이 있다. Heat shock protein은 원핵세포(prokaryocyte)와 진핵세포(eukaryocyte) 모두에서 온도가 올라가면 합성되는 단백질로 이들은 세포를 열로부터 보호하는 것으로 알려져 있는데 이들 중 Hsp70과 Hsp27은 여러가지 아포프토시스 자극인자로부터 세포를 보호하는 항아포프토시스 작용도 가지고 있다는² 보고들이 있다. Heat shock protein의 이런 항아포프토시스 작용은 암발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Hsp70은 유방암¹⁴에서 과발현되어 있고 Hsp70의 과발현이 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고가 있으며 이외에도 여러 종류의 암에서 과발현되어 있음이 알려져 있다.

이러한 아포프토시스 억제 단백질들 중 최근에 발견되

어 많은 연구가 이루어진 IAP 가족군¹⁵이 있다. Crook 등¹⁶과 Birnbaum 등¹⁷은 baculovirus에 감염되었을 때 감염된 숙주세포의 아포프토시스가 억제되는 것에 착안하여 baculovirus중 *Cydia pomonella* granulosus virus(CpGV)와 *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus (OpMN-PV)에서 처음으로 IAP 가족군을 증명하였다. 이후로 지금까지 다섯 종류의 포유동물 IAP homologues가 클론(clone)되었다. 이들은 NAIP, cIAP1/HIAP2, cIAP2/HIAP1, hILP/XIAP, 그리고 survivin 등으로서 이들 모두는 세포의 아포프토시스를 억제하는 것으로 밝혀졌다^{18,19}. 이중 NAIP를 제외한 다른 IAP 가족군들은 활성화된 effector caspases인 caspase-3, caspase-7을 직접 억제하는 것으로 보고되었다²⁰⁻²². 따라서 이런 아포프토시스 신호전달계의 한 가운데에 있는 caspases의 차단에 의하여 암세포를 항암제나 다른 아포프토시스를 유발하는 물질들로부터 보호하는 것이다.

이런 IAP 가족군 중 survivin은 다른 IAPs와는 달리 태아 시기에는 높은 발현율을 보이다가 생후 정상 분화된 조직에서는 거의 발현이 되지 않다가 암세포로 변환이 되면 그 발현이 다시 증가하는 것으로 보고되고 있다. 특히 survivin은 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 고등급림프종, 신경아세포종, 위암 등 대부분의 암조직에서 발현되는²³ 것이 밝혀졌다.

위암조직을 대상으로 한 연구²⁴에서 survivin의 암세포 특이적 발현 및 survivin 발현군의 아포프토시스 지수(apoptosis index)가 비발현군보다 낮고 survivin 발현군에서 bcl-2의 발현과 p53의 발현정도가 높다고 보고하였다. 또한 대장암조직을 대상으로 한 연구²⁵에서도 암세포 특이적인 survivin의 발현 및 survivin 발현군의 아포프토시스 지수가 비발현군보다 낮았으며 생존율도 비발현군에 비해 통계적으로 유의하지는 않으나 낮았다고 보고하였다. 그러나 아직까지 폐암조직을 대상으로 한 survivin 단백질 발현에 관한 연구결과는 보고되지 않고 있어서 수술적 절제된 비소세포폐암조직에서 survivin 발현을 면역조직화학

염색과 Western blot을 이용하여 분석함으로써 survivin의 폐암 특이적 발현과 그 임상적 의의 그리고 예후인자로서의 가치 등에 대한 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 대상

1997년 1월부터 1998년 12월까지 단국대학교 병원에 내원하여 비소세포폐암으로 진단 받고 수술한 29례를 대상으로 하였다. 이들은 수술 이전에 항암치료나 방사선치료를 받지 않았으며 수술은 근치적 폐엽절제술 및 전폐 적출술을 시행하였다. 환자의 평균연령은 57.7 ± 10.8 세였으며 연령분포는 최소 31세에서 71세까지였다. 성별은 남자가 25명 여자가 4명이였다. 병기 설정은 1997년 새로 개정된 American Joint of Committee on Cancer (AJCC)의 TNM 병기기준을 따랐으며 제 I A 병기 5례, I B 병기 6례, II A 병기 1례, II B 병기 3례, III A 병기 12례, III B 병기 1례, IV 병기 1례였다. 폐암의 조직학적 진단은 hematoxylin & eosin 염색 슬라이드를 판독하여 결정하였다. 조직학적 분류는 편평상피암 16례, 선암 11례, 거대세포암 2례 였다(Table 1).

2. 폐암 조직의 Western blot

사용된 anti-survivin antibody의 특이성 및 암특이적 발현을 확인하기 위하여 액체 질소 탱크에 폐암 조직부위와 주변 정상 폐 조직 부위로 분리되어 보존되어 있는 신선동결조직을 이용하여 Western blot을 시행하였다. 신선동결조직을 homogenizer로 균일하게 분쇄한 후 lysis 용액(1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10mM Tris-HCL pH 7.4)으로 whole cell lysate를 획득한 후 5분간 4℃ 14,000rpm에서 원심분리 하여 단백 추출을 얻었다. Bradford assay로 단백질농도를 측정하고 3분간 가열하여 변성(dena-

Table 1. Clinical characteristics of 29 non-small cell lung cancer cases

Age	T stage
31-71 years old	T1 : 8
mean age : 57.7 ± 10.8	T2 : 9
	T3 : 11
	T4 : 1
Sex	N stage
M : 25	N0 : 13
F : 4	N1 : 7
	N2 : 9
Histology	Follow-up
SCC : 16	3-31 months
AC : 11	16.5 ± 8
LCC : 2	
Disease stage	Recurrence
Stage I : 11	+ : 14
Stage II : 4	- : 14
Stage IIIA : 12	
Stage IIIB : 1	Survival
Stage IV : 1	+ : 15
	- : 13

turation)시킨 후 15% SDS-PAGE gel로 전기영동하여 nitrocellulose에 전이(transfer)시켰다. Blot을 blocking buffer (4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 배양(incubation)한 후 anti-survivin polyclonal antibody (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX)를 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1 : 1000 희석하여 1시간동안 실온에서 배양하고 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG 1 : 5000 희석된 blocking buffer로 2차 항체

반응을 1시간 거친 후 역시 3회 세척한 후 ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL)로 검출하였다.

3. 조직 처리 및 면역조직화학 염색

1) 조직 처리

각 예의 Hematoxylin-Eosin 염색 슬라이드를 판독하여 중앙세포가 풍부하게 함유된 파라핀 블록을 선택한 뒤 조직을 4 마이크로미터 두께로 절편을 만들고, 이 조직을 슬라이드 위에 올려놓고 하루 밤 동안 공기 건조 시켰다. 이후 60℃ 이하의 건조기에서 60분간 건조시킨 후 Xylene에 5분간 3회씩 잠기게 하여 파라핀을 제거하였다. 다음에 알코올에 100%, 90%, 80%, 70%의 순서로 각 2회씩 2분간 처리하여 합수화 시켰다. Endogenous peroxidase의 작용을 방해하기 위하여 3% H₂O₂ 용액으로 15분간 처리하고 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 5분씩 2회 세척하였다. 비특이적 항체결합을 억제하기 위해 bovine blocking serum으로 30분간 처리하였다.

2) 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Dako LSAB kit, Los Angeles, CA)를 이용한 immuno-peroxidase 방법으로 시행하였다. 신선 동결된 정상 폐조직과 폐암조직을 먼저 이용하여 일차항체의 특이도와 적정농도를 결정하였다. 1차 항체로 anti-survivin polyclonal antibody (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX)를 이용하였고 1 : 20으로 희석한 용액을 1시간 동안 반응시켰다. 이후 PBS로 5분간 세척하고 이차항체를 30분간 반응시킨 뒤 다시 PBS로 5분간 세척하였다. Streptavidin-biotin complex peroxidase와 30분간 반응시킨 후 PBS로 5분간 세척하고 diaminobenzidine과 5분간 반응시킨 뒤 PBS로 5분간 세척하였다. p53과의 관련성을 분석하기 위해 시행한 anti-p53 monoclonal antibody (DO-7, Novocastra,

Table 2. Profiles of survivin scores in 29 non-small cell lung cancer cases

Case No	Pathology	Stage	Survivin expression		
			Area	Intensity	Survivin score
1	Squamous cell Ca	II A	1	1	2
2	Adeno Ca	III A	4	1	5
3	Squamous cell Ca	III A	1	1	2
4	Squamous cell Ca	I B	1	1	2
5	Squamous cell Ca	I B	1	1	2
6	Large cell Ca	III A	0	1	1
7	Squamous cell Ca	II B	0	1	1
8	Squamous cell Ca	III B	0	1	1
9	Squamous cell Ca	I B	1	1	2
10	Squamous cell Ca	III A	0	0	0
11	Squamous cell Ca	III A	1	1	2
12	Squamous cell Ca	I B	1	1	2
13	Adeno Ca	I A	0	0	0
14	Squamous cell Ca	I B	2	2	4
15	Adeno Ca	III A	1	1	2
16	Squamous cell Ca	III A	2	2	4
17	Squamous cell Ca	III A	1	2	3
18	Squamous cell Ca	I B	1	2	3
19	Squamous cell Ca	II B	3	1	4
20	Large cell Ca	II B	2	1	3
21	Adeno Ca	III A	0	1	1
22	Adeno Ca	IV	0	1	1
23	Adeno Ca	III A	0	0	0
24	Adeno Ca	III A	0	1	1
25	Adeno Ca	I A	3	2	5
26	Adeno Ca	I A	2	1	3
27	Squamous cell Ca	I A	3	1	4
28	Adeno Ca	III A	1	1	2
29	Adeno Ca	I A	4	2	6

Inc, Manhasset, NY)를 이용한 면역조직화학 염색도 동일한 방법으로 시행하였다.

4. 면역조직화학 염색의 판정

면역조직화학 염색의 Survivin 발현 정도는 다음과 같이 판정하였다. 광학현미경 시야 400배에서 적어도 5군데 이상을 검사하여 양성으로 염색된 종양세포 면

적의 비율에 따라 다음과 같이 구분하였다: 0, <5%; 1, 5-25%; 2, 25-50%; 3, 50-75%; 4, >75%. 면역염색의 강도에 따라서는 다음과 같이 구분하였다: none, 0; weak, 1+; moderate, 2+; strong, 3+. 최종 판정은 면적점수와 강도점수를 합산하여 0-1: negativity, 2-3: low positivity, 4-5: intermediate positivity, 6-7: high positivity로 판정하였다.



Fig. 1. Immunohistochemical staining for survivin. Tumor selective expression of survivin in lung cancer tissue. No expression of survivin was observed in neighboring normal lung tissues. Survivin expression was confined to the cytoplasm of tumor cells.

p53 발현 정도에 따른 p53 wild type과 mutant type의 구분은 wild type의 경우 강양성으로 나오는 경우가 드물기 때문에 강양성인 3+의 경우를 mutant type으로 판정하였고, 나머지 0, 1+, 2+ 발현은 wild type p53으로 판정하였다.

5. 결과분석 및 통계처리

Survivin의 발현 여부에 따른 연령, 조직학적 분류, 병기, 재발율 등의 임상적 지표들간의 상관관계는 chi-square test를 이용하였다. Survivin 발현군과 비발현군간의 생존분석은 Kaplan-Meier 법으로 누적생존율 및 생존곡선을 얻었고 두 군간의 생존함수의 차이가 있는지의 비교는 generalized Wilcoxon test를 이용하였다. p53 wild type군과 p53 mutant

type군간의 survivin score의 비교는 chi-square test를 이용하였고 통계적 처리는 SPSS version 7.0을 이용하여 시행하였으며 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 폐암조직에서의 Western blot

액체 질소 탱크에 폐암 조직부위와 주변 정상 폐 조직 부위로 분리되어 보존되어 있는 신선동결조직을 이용하여 Western blot을 시행한 결과 정상 폐조직과 비교하여 폐암조직에서 16.5 kDa의 survivin 단백질의 발현을 관찰할 수 있어 폐암세포에 특이적으로 survivin이 발현됨을 볼 수 있었다(Fig. 2). Anti-

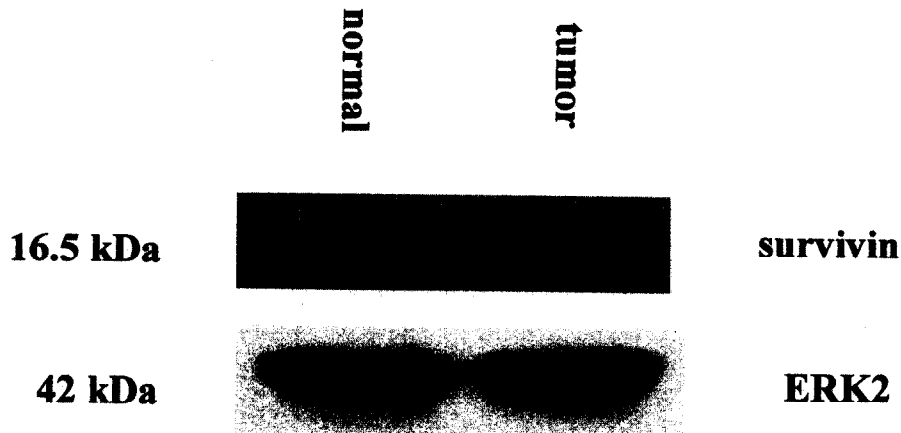


Fig. 2. Western blot for tumor specific survivin expression in lung cancer tissue. Fresh normal lung (Lane 1) and lung cancer (Lane 2) tissues were analyzed on the 15% SDS PAGE gel. Anti survivin polyclonal antibody(Alpha Diagnostic, San Antonio, Tx) was used to detect survivin protein. Molecular weight standards are indicated on the left. Lung cancer tissue shows survivin protein (16.k kDa) expression. No survivin expression was observed in normal lung tissue.

ERK2 anti body를 이용하여 reprobing 함으로써 정상폐세포와 폐암세포 두 조직 모두에서 동량의 단백질이 사용되었음을 확인 하였다.

2. 비소세포폐암에서 survivin의 면역조직화학적 발현 및 임상적 지표와의 관련성

면역조직화학 염색을 시행한 29례 중 20례(69.0%)에서 암세포 특이적 survivin의 발현을 관찰할 수 있었다. 암세포에서 anti-survivin antibody의 염색은 세포질에서 관찰되었으며 주변의 정상세포들과 명확히 구분되었다(Fig. 1). 일부 폐포 탐식세포(alveolar macrophage)와 기관지 상피세포에서 비 특이적인 survivin 염색이 관찰되었다. 각 예에서 survivin 염색정도는 비교적 균일하였고 암세포의 세포질에만 국한되게 염색되었다. Survivin score는 0점에서 6점까지 관찰되었으며 총 29례 중 negativity(0-1점) 9명, low positivity(2-3점) 13명, intermedi-

ate positivity(4-5점) 6명, high positivity(6-7점) 1명이었다.

Survivin의 발현과 여러 임상적 지표 및 병리학적 분류와의 관계(Table 3)를 분석해 보면 우선 환자의 연령과 survivin 발현과의 관계에서는 60세 이상인 군과 60세 미만인 군의 survivin 발현은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.1006$). 조직학적 분류에서도 편평상피암, 선암, 거대세포암 간의 survivin 발현의 차이는 보이지 않았다($p=0.2818$). 암의 T-병기($p=0.427$), 임파선 전이정도($p=0.133$) 및 종양의 병기분류($p=0.106$)에 따른 survivin의 발현도 유의한 차이가 없었다. 또한 종양의 재발유무와도 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.094$).

3. Survivin 발현과 생존함수와의 관계

Kaplan-Meier법을 이용하여 survivin 발현군과 비발현군의 누적생존율을 구하고 생존곡선을 그렸다

Table 3. The correlation of survivin expression with clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer

	Cases	Survivin(+)	p-value
Age(year)			
<60	16	9	0.1006
≥60	13	11	
Histology			
SCC	16	13	0.2818
AC	11	6	
LCC	2	1	
T stage			
T1	8	5	0.427
T2	9	7	
T3	11	8	
T4	1	0	
N stage			
N0	13	11	0.133
N1	7	5	
N2	9	4	
Disease stage			
I	11	10	0.1065
II	4	3	
IIIA	12	7	
IIIB	1	0	
IV	1	0	
Recurrence			
+	14	8	0.094
-	14	12	

SCC : suamous cell carcinoma

AC : adenocarcinoma

LCC : large cell carcinoma

Survivin(+) : the number of survivin positive cases

(Fig. 3). 또한 두 군간의 생존함수의 비교는 generalized Wilcoxon test로 하였는데 survivin 발현군과 비발현군의 생존율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.080$).

4. Survivin 발현과 p53 발현과의 관련성

아포프토시스에 중요한 역할을 하는 p53과의 관련성을 분석하기 위하여 각 29예에서 anti-p53 monoclonal antibody를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하여 survivin 발현정도와 비교하였다. 면역조직화학 염색의 판정은 양성으로 염색된 종양세포면적의 비율과 염색의 강도에 따른 점수를 합산하여 0점부터 2점까지는 p53 wild type 군으로 분류하고 강양성을 보인 3점 이상은 mutant type 군으로 나누어 survivin score를 비교하였다. 그 결과 p53 wild type 군과 mutant type 군 사이에서 survivin 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서 비소세포폐암에서 면역조직화학 염색과 Western blot 분석을 이용하여 survivin이 폐암세포에 선택적으로 발현함을 확인하였다. 면역조직화학 염색결과 총 29례 중 20례(69.0%)에서 암세포에 선택적인 survivin 발현을 볼 수 있었다. 면역조직화학 염색의 Survivin 발현 정도는 Lu 등²⁴과 Kawasaki 등²⁵이 판독한 방법과 같이 광학현미경 시야 400배에서 적어도 5군데 이상을 검사하여 양성으로 염색된 종양세포 면적의 비율과 면역염색의 강도에 따른 점수를 합산하여 판정하였다. survivin의 발현이 환자의 연령, 조직학적 분류, 암의 병기, 임파절 전이 유무, 암의 재발 유무 등의 여러 임상적 지표들과의 관련은 없었으며 survivin 발현 유무와 환자의 생존율에도 유의한 차이가 없었다. 또한 p53 wild type군과 mutant type군에서의 survivin 점수를 비교한 결과 이들간의 상관성 역시 없었다.

Kawasaki 등²⁵은 수술적 절제된 대장암 조직에서 면역조직화학 염색을 시행하여 survivin이 대장암세포에 특이적으로 발현됨을 증명하였고 survivin의 발현군의 아포프토시스 지수가 비발현군보다 낮다고 보고하였고 survivin발현군에서 bcl-2 발현이 증가되

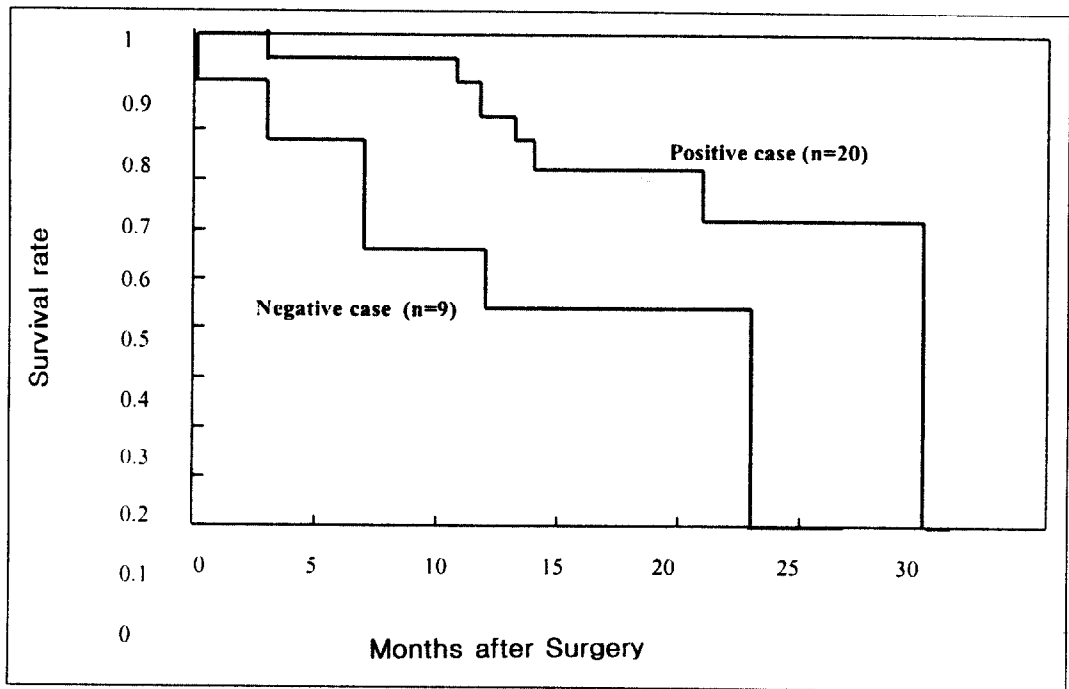


Fig. 3. Kaplan-Meier curves for overall survival rates of patients with NSCLC categorized according to survivin expression. No statistical significance was noted between two groups ($p=0.080$).

었다고 보고하였다. 또한 아포프토시스 지수가 낮은 군이 통계적으로 유의하게 생존율이 낮았다고 하였다. Survivin 발현군과 비발현군의 생존율도 비교하였는데 survivin 발현군에서 통계적 유의성은 없었으나($p=0.103$) 비발현군에 비해 생존율이 낮았다고 보고하였고 survivin에 의한 아포프토시스의 억제가 나쁜 예후와 관련이 있다고 하였다. Lu 등²⁴도 위암에서의 암세포 특이적인 survivin 발현 및 survivin의 발현이 p53, bcl-2의 발현과 관련이 있었으며 survivin 발현군에서 아포프토시스 지수가 감소를 보여 survivin에 의해 암세포의 아포프토시스가 억제됨을 보고하였다. 본 연구에서 Kawasaki 등과 달리 survivin의 발현의 폐암특이적 발현은 확인하였지만 여러 임상 지표들과의 상관성을 확인할 수 없었던 것은 대상환자들이 29례로 표본크기가 작았으며 추적기간(3-31개월)이 충분하지 않았기 때문으로 생각되며

향후 좀더 추적관찰이 필요할 것으로 생각된다.

IAP (Inhibitors of apoptosis protein) 가족군은 1993년 처음 발견된 이후 이들이 여러 종류의 아포프토시스 유도물질로부터 세포를 보호하며 이런 아포프토시스의 억제가 암의 형성에 중요한 역할을 하는 것이 알려지면서 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 지금까지 바이러스, 선충류(nematode), 이스트, 초파리, 쥐(murine), 돼지, 닭 등의 포유류와 사람의 IAPs가 밝혀졌다. IAP는 구조상 80개의 아미노산으로 이루어진 BIR(Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repart) domain과 carboxy 말단의 Ring zinc-finger¹⁷를 가지고 있다. IAP 가족군은 활성화된 caspase 3와 caspase 7을 직접 억제하는 것으로 밝혀졌다²⁰⁻²². 또한 pro-caspase 9의 활성화를 억제한다는 것도 밝혀졌고 caspase 1과 caspase 2를 간접적으로 억제한다는 증거도 일부 있다. 또한 IAP가족

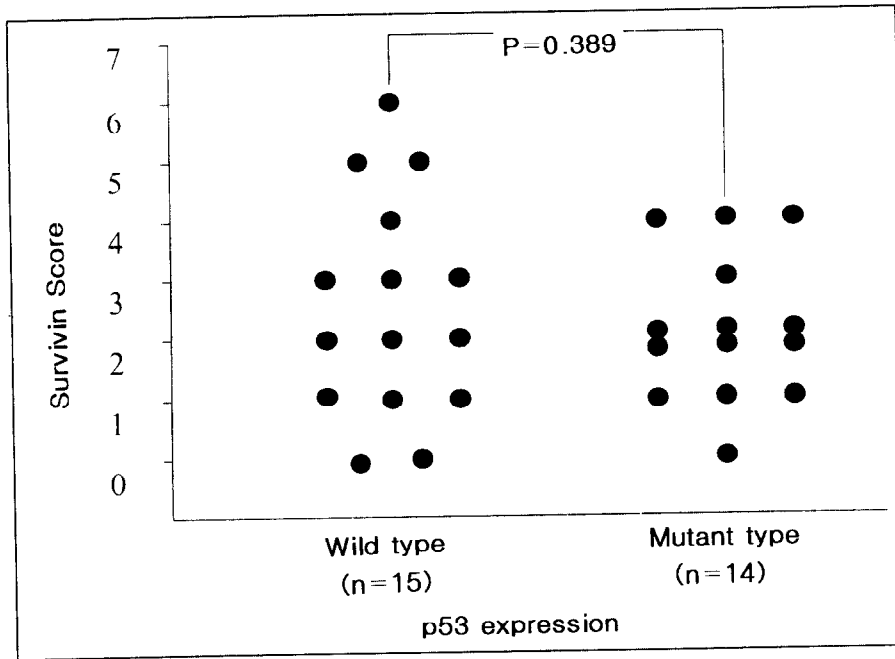


Fig. 4. The survivin expression was not statistically correlated with the expression of p53. (Chi-square test was used to analyze the correlation between survivin expression and p53 status.)

군이 caspase가 아닌 다른 기전을 통해 아포프토시스를 억제한다는 것이 초파리에서 밝혀졌고²⁶ baculovirus와 사람의 IAP가 초파리의 아포프토시스 유도 단백질과 상호 반응한다는 것이 알려져 있다. 많은 연구들에서 포유동물의 IAP 가족군이 caspase의 억제가 아닌 다른 작용으로 아포프토시스를 억제하는 것은 주로 NF- κ B와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. IAP 가족군은 TNF- α , Fas 리간드, 성장인자 단절 (growth factor withdrawal), cytochrome c, etoposide, cisplatin, taxol 등 여러 종류의 항암제, 방사선 조사, UV radiation 등의 여러 가지 자극들에 의해 일어나는 아포프토시스를 차단하며 bcl-2 단백질에 의한 아포프토시스 차단부위보다 보다 더 아래쪽에 있는 caspase를 차단하므로 bcl-2 보다 더 많은 범위에서 아포프토시스를 차단한다².

IAP 가족군중 survivin은 가장 최근에 발견되었으며 현재까지 클론된 IAP 가족군중 가장 크기가 작다.

Survivin은 다른 IAP 가족군과는 달리 단일 BIR domain를 갖고 있으며 carboxy 말단의 ring zinc-finger가 부족하다. 사람의 survivin 유전자 좌위는 17q25이며 142개의 아미노산으로 이루어져 있고 16.5 kd의 분자량을 가지고 있다¹⁰. Survivin은 태아 시기에는 높은 발현율을 보이다가 생후 정상 분화된 조직에서는 거의 발현이 되지 않고 여러 종류의 암세포주(cancer cell line)에서 발현되는 것이 알려지면서 각광을 받기 시작했고¹⁵ 폐암, 대장암, 위암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 신경아세포종, 고분화된 림프종(high grade lymphoma) 등의 여러 암조직에서 발현되는 것이 밝혀졌다²³.

Survivin의 암의 진행 및 억제 내성에서의 역할에 대해서는 의견이 분분하나 지금까지 알려진 바로는 survivin은 IL-3 의존성에 있는 전구 B세포에서 IL-3 결핍에 의한 아포프토시스, NIH3T3 세포의 taxol에 의한 아포프토시스, 293 세포에서 Fas,

Bax, etoposide에 의한 아포프토시스로부터 보호하는 것이 알려져 있다²⁷⁻²⁸. Survivin antisense를 이용하면 아포프토시스가 증가하고 세포의 증식을 억제하는 것이 밝혀졌다.

신경아세포종 조직에서²⁹ 면역조직화학 염색을 시행한 결과 3-4 병기의 60%에서 survivin 발현을 보였다. 위암 및 대장암에서도 survivin의 발현을 보였으며 survivin 발현군에서 아포프토시스 지수가 감소되었고 bcl-2 발현과도 관련이 있었다. 방광암³⁰조직으로 면역조직화학 염색 연구결과 survivin의 발현군에서 암의 재발이 높았으며 아포프토시스 지수도 감소한다고 하였다.

폐암은 우리 나라에서 암 발생 중 2위를 차지할 정도로 높은 발생빈도를 보이고 있으며, 진단과 치료방법의 개선에도 불구하고 5년 생존율은 크게 향상되지 않고 있는 실정이다. 비소세포폐암의 경우 아직까지 근치적 수술만이 최선의 방법이라고 할 수 있으나 진단 당시 이미 III 병기로 진단되는 경우가 70-80%를 차지하고 있다. 근치적 수술이 불가능한 경우 방사선 치료 및 항암 치료를 하나 치료성적은 매우 불량하여 보다 효과적인 새로운 치료방법의 개발이 필요한 실정이다. Survivin은 정상세포에는 발현되지 않고 암세포에만 특이적으로 발현되므로 앞으로 survivin이 아포프토시스를 억제하는 경로를 선택 차단하는 기법을 개발한다면 암세포의 증식억제는 물론 치료에 대한 반응을 증가시켜 폐암 치료에 좀더 나은 발전의 기반을 마련할 수 있을 것으로 사려된다.

요 약

연구배경 : 최근 아포프토시스를 억제하는 단백질들에 대한 관심이 증가하고 있다. 이 중 IAP(inhibitor of apoptosis protein) 가족군의 일원인 survivin은 태아 시기에는 높은 발현율을 보이지만 생후 정상 분화된 조직에서는 거의 발현이 되지 않고 암세포로 변환이 되면 그 발현이 증가하는 것이 보고되고 있다. 대장암 및 위암을 대상으로 한 연구에서 survivin의 발

현이 아포프토시스 지수의 감소와 연관이 있으며 대장암에서 survivin의 과발현이 나쁜 예후와 연관성이 있다고 보고한 바 있으나 추후 보완 연구가 필요한 상황이며, 폐암을 대상으로 한 연구결과는 아직 보고되지 않고 있다. 이에 수술적으로 절제된 비소세포폐암 병리조직 29예를 대상으로 survivin에 대한 면역조직화학적 연구를 시행하여 survivin의 종양특이적 발현 및 임상적 의의에 대한 분석을 시행하였다.

방 법 : 수술절제된 29예의 비소세포폐암의 포르말린 고정조직을 파라핀 포매한후 4 μ m 절편으로 잘라 면역조직화학 염색을 시행하였다. 일차항체로 anti-survivin polyclonal antibody를 이용하였고, 아포프토시스에 중요한 역할을 하는 p53과의 관련성을 분석하기 위하여 anti-p53 monoclonal antibody를 이용한 면역조직화학 염색도 병행 시행하였다. 발현 정도는 양성염색부위의 면적과 염색 강도에 따라 점수화한 뒤 합산한 점수로 판정하였다. 사용된 anti-survivin antibody의 특이성 및 암특이적 발현을 확인하기 위하여 폐암부위와 주변 정상 폐부위로 분리되어 보존되어 있는 신선동결조직에서 단백질을 추출하여 Western blot을 시행하였다. 각각의 임상적 지표들과 survivin 발현과의 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였고 Kaplan-Meier 방법으로 생존 곡선을 얻었으며 이 두 군간의 생존함수의 통계적 분석은 generalized Wilcoxon test로 하였다.

결 과 : 면역조직화학 염색을 시행한 29예 중 20예(69.0%)에서 암세포 특이적 survivin의 발현이 관찰되었다. 폐암 조직과 정상 폐 조직으로 시행한 Western blot으로 암특이적 survivin의 발현을 확인하였다. 그러나 survivin의 발현 여부에 따른 연령, 조직학적 분류, 병기, 재발을 등과는 유의한 차이가 없었으며 생존 곡선에서도 통계적 유의성은 없었다. p53 발현과 survivin 발현 정도와도 통계적 유의성을 확인할 수 없었다.

결 론 : 면역조직화학적 분석과 Western blot을 이용하여 비소세포폐암에서 survivin의 암 특이적 발현을 확인할 수 있었지만 survivin의 발현정도와 조직

학적 분류, 병기, 재발율, 생존율 등 임상지표들과는 통계적 유의성을 관찰할 수 없었으며 p53 발현과도 유의한 상관성이 없었다.

참 고 문 헌

1. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
2. Jäätelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 1999;248:30-43.
3. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-3.
4. Vaux DL, Cory S, and Adams JM. Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-2.
5. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
6. Campos L, Ruault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; 81:3091-6.
7. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994;69:135-9.
8. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Campbell ML. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:6940-4.
9. Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Neidobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2178-84.
10. Hague A, Moorghe M, Hicks D, Champman M, Paraskeva C. Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 1994;9: 3367-70.
11. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB et al. Bcl-2 protein in non small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329:690-4.
12. Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN, Anderson E, Becciolini A et al. Evidence of reciprocity of Bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Br J Cancer* 1996;3:889-95.
13. Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinomas. *Anticancer Res* 1998;18:2003-10.
14. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp 70 in patients with axillary lymph node negative breast cancer: Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-4.
15. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59.
16. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc-finger like motif. *J Virol* 1994;67:2168-74.
17. 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;68:2521-8.
18. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. In-

- duction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-82.
19. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-Suppressors of apoptosis. *Gene Dev* 1999;13:239-52.
20. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death protease. *Nature* 1997;388:300-4.
21. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-25.
22. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero D A, Vigna N, Oltsersdorf 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.
23. Ambrosini G, Adida C Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
24. 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.
25. 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.
26. Hay BA, Wassarman DA Rubin GM. Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell* 1995;83:1253-62.
27. Martinez-Lorenzo MJ, Gamen S, Etxeberria J, Laserra P, Larrad L, Pineiro A et al. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP 32 (caspase-3) expression in human leukemic cells. *Int J Cancer* 1998;75:473-81.
28. Eichholtz-Wirth H, Stoetzer O, Marx K. Reduced expression of the ICE-related protease CPP32 is associated with radiation-induced cisplatin resistance in HeLa cells. *Br J Cancer* 1997;76:1322-7.
29. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri D C. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-3.
30. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-3.