

□ 원 저 □

비소세포폐암에서 Survivin, HSP 및 Bcl-2 발현에 관한 면역조직화학적 분석

서울대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실¹ 및 의학연구원 폐연구소,
단국대학교 의과대학 내과학교실²

홍현주, 홍석균², 이계영², 김우호¹, 이춘택,
유철규, 한성구, 심영수, 김영환

= Abstract =

The Immunohistochemical Analysis for the Expression of Survivin, HSP,
and Bcl-2 in Non-small Cell Lung Carcinoma

Hyun Ju Hong, M.D., Seok Gyun Hong, M.D.², Kye Young Lee, M.D.²,
Woo Ho Kim, M.D.¹, Choon Taek Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D., and Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Pathology¹, Lung Institute of Medical Research Center,
Seoul National University College of Medicine, Seoul and Department of Internal Medicine,
Dankook University College of Medicine², Chonan, Korea

Background : Anti-apoptotic proteins may be involved in tumor development, progression and the response to treatment. Bcl-2 is by far the most studied anti-apoptotic protein. A novel inhibitor of apoptosis, designated survivin, and the heat shock proteins (HSPs) have recently been found in many human cancers. Immunohistochemical methods were used to determine the expression level of survivin, HSP70 and bcl-2 in non-small cell lung cancer (NSCLC) to evaluate their clinical significance.

Methods : Tissue array slides were obtained from 99 surgically resected NSCLCs. Immunohistochemical staining was performed by an immuno-peroxidase technique using an avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex. Anti-survivin rabbit polyclonal antibodies, anti-HSP70 mouse monoclonal antibodies and anti-bcl-2 mouse monoclonal antibodies were used as the primary antibodies.

Address for correspondence :

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute, Seoul National University College of Medicine

28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul, 110-744, Korea

Phone : 02-760-2856 Fax : 02-761-3356 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

Results : Positive staining of survivin was detected in 33.3% of the cases. Survivin positivity is associated with to females and recurrence. A nonstatistically significant trend toward increased survivin expression was observed in non-smokers, and its expression inversely correlated with the number of cigarettes smoked in smokers. HSP70 was detected in 84.8% but this did not correlated with the clinicopathologic characteristics. Bcl-2 was detected in 18.2% and its expression correlated to tumor recurrence. No significant difference in the median survival time was noted in a comparison of all cases with survivin expression and those without. There was no association between HSP70 or bcl-2 expression and survival.

Conclusions : Survivin expression was significantly associated with females and tumor recurrence. In addition its expression was inversely associated with the number of cigarettes smoked. However, HSP70 and bcl-2 expression were not associated with the clinical parameters or survival. This suggests that measuring the survivin levels may be useful in identifying patients at high risk for disease recurrence. Therefore, survivin might be a new diagnostic/therapeutic target in cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 52 : 441-452)

Key words : Non-small cell lung cancer, Apoptosis, Immunohistochemistry, Survivin, HSP, Bcl-2

서 론

폐암은 세계적으로 암으로 인한 사망 원인 중 주요한 원인으로 특히 비소세포암은 전체 폐암의 75%를 차지하며 지난 20여년 동안 암 치료에 있어 많은 발전이 있었음에도 불구하고 폐암 환자의 예후는 그다지 향상 되지 않아 전체 폐암 환자의 5년 생존률은 15% 이하이며 수술 절제 가능한 비소세포폐암의 경우에도 장기간 생존률은 25-30%에 불과하다^{1,2}. 폐암에서 TNM 병기가 가장 의미 있는 예후 인자이나 같은 병기 환자들 에서도 생존률은 차이를 보여 예후에 영향을 미치는 다른 인자를 찾으려는 시도가 이루어지고 있다¹.

암의 증식은 세포의 증식과 사멸에 의존하며 세포사멸은 괴사와 아포프토시스라는 두 가지 기전에 의해 발생하는데 아포프토시스는 세포내 기전에 의해 조절되고 연속적인 생화학적 단계를 거쳐 이루어지는 계획된 과정이며, 또한 아포프토시스는 외부 신호 즉 항암 치료나 방사선치료 등에 의해서도 유도될 수 있다³⁻⁵. 암세포는 아포프토시스에 내성을 갖게 하는 여러 단백질들을 발현하는데 여기에는 bcl-2 단백질군 중 항아포프토시스 작용을 갖는 군과 IAP군(inhibitor of

apoptosis protein) 및 heat shock protein인 HSP70, HSP27 등이 속하며 이들이 활성화될 경우 암은 급격히 증가하고 치료에 내성을 갖게 된다³. IAP군 중 survivin은 태아시기에 발현되다가 분화된 성인 조직에서는 발현되지 않으나 변형된 세포와 대부분의 암, 특히 폐암, 대장암, 췌장암, 전립선암, 유방암 등에서 발현되고 고등급 림프종의 약 50%에서 발현된다⁶.

세포가 고온에 노출될 때 세포는 heat shock protein (HSP)이라 불리는 단백질을 합성함으로써 반응하고 또한 HSP는 속, 허혈, 그리고 다른 자극에 의해서도 합성된다^{7,8}. HSP 중 가장 알려진 것은 HSP70으로 이는 actinomycin, etoposide 등의 항암제와 방사선에 의해 유도되는 아포프토시스를 완화시키고 또한 괴사로 인한 손상과 아포프토시스로부터 뇌세포를 보호한다^{7,8}. HSP70은 암이 없는 폐조직에 비해 폐암 조직에서 과발현되고, HSP70이 과발현된 유방암 환자가 짧은 생존기간을 보인다는 보고가 있다^{9,10}.

bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) 유전자는 염색체 14번과 18번 사이의 전좌 결과로서 처음 발견되었으며 대부분의 여포성 림프종에서 발현된다¹¹. bcl-2가 과발현될 경우 많은 자극으로 인한 아포프토

시스로부터 세포를 보호하며 bcl-2 발현은 전립선암, 대장암, 그리고 신경아세포종에서 나쁜 예후와 관계가 있다⁵. 한편 기전을 알 수는 없으나 bcl-2 양성인 폐암이 더 좋은 예후를 보인다는 주장이 있고 또한 일부 보고에서는 bcl-2 발현이 임상적인 예후와는 별다른 관계가 없다는 보고도 있다¹².

이에 저자들은 수술적 절제된 비소세포폐암 조직에서 survivin, HSP70, 그리고 bcl-2의 발현을 면역조직화학 염색법으로 확인하고 이들의 발현과 폐암의 임상적 인자들과의 관계를 알아보고자 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1996년 6월부터 2000년 8월까지 서울대병원에 내원하여 비소세포폐암으로 진단된 후 수술을 받은 99예로부터 조직을 얻었고 대상 환자의 임상적 특징 및 암의 특징은 Table 1로 나타내었다. 암의 조직학적 분류는 편평상피암, 선암, 대세포암, 기관지세포암 등으로 분류하였으며 조직병리학적 병기 판정은 새로운 TNM 병기 판정 기준에 따라 IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, 그리고 IV로 구분하였다.

2. 방 법

저자들은 면역조직화학 염색의 효율적인 관찰을 위하여 tissue array 슬라이드를 이용하였다. 이 tissue array 슬라이드 제작 방법을 요약하면 원래의 파라핀에 보관된 조직들을 직경 2mm 정도의 원주 모양으로 잘라 각각의 원주 모양의 조직을 60개의 구멍이 있는 새로운 파라핀에 넣는다. 그리고 나서 이것을 4 μ m 두께로 잘라 여러 개의 슬라이드를 얻는데 각 tissue array 슬라이드에 60개의 검체가 같이 있어 관찰하기에 용이하고 또한 각 검체를 따로 염색할 때 생기는 차이를 최소화할 수 있다. 각 검체는 직경 2mm의 원

형이고 조직병리 분석을 하기에 충분한 10,000개 정도의 세포를 포함하고 있다.

조직에서 survivin, HSP70, 그리고 bcl-2의 발현 양상을 보기 위한 면역조직화학 염색은 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex를 이용한 immuno-peroxidase 방법으로 시행하였다. 일차 항체로는 anti-survivin rabbit polyclonal antibody (Alpha Diagnostic), anti-HSP70 mouse monoclonal antibody (Santa Cruz), 그리고 anti-bcl-2 mouse monoclonal antibody (Oncogene Research)를 사용하였다.

면역조직화학 염색 후 발현 정도의 판정은 염색된 종양 세포에서 염색 강도에 따라 none, 0; weak, 1; moderate, 2; strong, 3으로 구분하였다. 최종적으로 0,1을 발현 음성으로, 2,3을 발현 양성으로 구분하여 판정하였다.

3. 통계학적 분석

Survivin, HSP70, 그리고 bcl-2의 발현 여부에 따른 여러 임상 지표들간의 상관관계는 Chi-square test를 이용하였고 각각의 발현군과 비발현군 사이의 생존률은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 비교하였고 모든 통계적 처리는 SPSS software를 이용하여 시행하였으며 모든 결과의 분석에서 p값이 0.05미만인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. 임상적 특징

대상 환자의 평균 연령은 56.1세였고 남자가 78명, 여자가 21명이었으며 흡연력이 있는 72명의 평균 흡연량은 37.76 ± 17.72 pack · years이었다.

각각의 조직형은 편평상피암 42예, 선암 26예, 대세포암 8예, 기관지세포암 9예로 편평상피암이 가장 많았고, 분화도를 알 수 없었던 경우를 제외하고는

Table 1. Characteristics of 99 patients

	Variables	No. of cases
Age	mean \pm S.D. (years)	56.1 \pm 9.5
Sex	male/female	78/21
Smoking Hx	Yes/No	72/20
	Unknown	7
Histology	SCC (Squamous cell Ca.)	42
	AC (AdenoCa.)	26
	LCC (Large cell Ca.)	8
	BAC (Bronchoalveolar Ca.)	9
	Others	14
Differentiation	Well	17
	Moderately	29
	Poorly	17
	Undifferentiated	3
	Unknown	33
Nodal stage	N0	48
	N1	29
	N2	19
	N3	2
	Unknown	1
Pathologic stage	I A	11
	I B	30
	II A	3
	II B	24
	III A	22
	III B	6
	IV	3
Recurrence	Yes/No	48/44
	Unknown	7
Survival	Yes/No	49/46
	Unknown	4

중등도의 분화도를 보이는 경우가 29예로 가장 많았다. 병리학 적 병기로는 총 99예 중 IB기가 30예로 가장 많았다.

대상 환자의 평균 추적기간은 46개월이었고 99명

중 48명이 재발하였고 수술 후 재발할 때까지의 평균 기간은 20개월이었고 추적기간동안 46명이 사망하였고 49명이 생존하였으며 나머지 4명은 생존여부를 확인할 수 없었다(Table 1).

Table 2. Relationship between survivin, HSP70 or bcl-2 expression and clinicopathologic factors

Variables		No.	survivin(+) No. (%)	P	HSP70(+) No. (%)	P	bcl-2(+) No. (%)	P
Age	<60 yr	59	20(33.9)	0.531	49(83.1)	0.379	11(18.6)	0.552
	≥60 yr	40	13(32.5)		35(87.5)		7(17.5)	
Sex	male	78	21(26.9)	0.011	65(83.3)	0.335	15(19.2)	0.436
	female	21	12(57.1)		19(90.5)		3(14.3)	
Smoking	Yes	72	20(27.8)	0.071	61(84.7)	0.997	14(19.4)	0.476
	No	20	11(55.0)		17(85.0)		2(10.0)	
pack-year	<35	30	12(40.0)	0.046	27(90.0)	0.239	9(30.0)	0.054
	≥35	42	8(19.0)		34(81.0)		5(11.9)	
Histology	SCC	42	8(19.0)	0.098	38(90.5)	0.412	7(16.7)	0.452
	AC	26	11(42.3)		20(76.9)		6(23.1)	
	LCC	8	4(50.0)		6(75.0)		1(12.5)	
	BAC	9	5(55.6)		7(77.8)		-	
Different.	Well	17	2(11.8)	0.037	15(88.2)	0.191	3(17.6)	0.785
	Moderate	29	10(34.5)		26(89.7)		6(20.7)	
	Poor	17	5(29.4)		16(94.1)		4(23.5)	
	Undifferentiated	3	3(100.0)		3(100.0)		1(33.3)	
N stage	N0	48	18(37.5)	0.776	38(79.2)	0.380	6(12.5)	0.443
	N1	29	9(31.0)		27(93.1)		6(20.7)	
	N2	19	5(26.3)		16(84.2)		4(21.1)	
	N3	2	1(50.0)		2(100.0)		1(50.0)	
P stage	I A	11	4(36.4)	0.979	10(90.9)	0.216	1(9.1)	0.601
	I B	30	10(33.3)		22(73.3)		3(10.0)	
	IIA	3	1(33.3)		2(66.7)		1(33.3)	
	IIB	24	8(33.3)		23(95.8)		6(25.0)	
	IIIA	22	6(27.3)		19(86.4)		4(18.2)	
	IIIB	6	3(50.0)		6(100.0)		2(33.3)	
	IV	3	1(33.3)		2(66.7)		1(33.3)	
	Recurrence							
Survival	Yes	48	23(47.9)	0.006	42(87.5)	0.532	15(31.3)	0.004
	No	44	10(22.7)		37(84.1)		3(6.8)	
	Yes	49	13(26.5)	0.330	41(83.7)	0.681	9(18.4)	0.930
	No	46	18(39.1)		39(84.8)		8(17.4)	

2. Survivin의 발현과 임상 지표와의 관련성

Survivin은 총 99예 중 33예 (33.3%)에서 발현되었

으며 60세 미만인 군 과 60세 이상인 군 사이에 발현
률 차이는 없었고($p=0.531$), 여성에서의 발현률이
유의하게 높았다($p=0.011$). 흡연력에 따른 차이를

Table 3. Survival rate of lung cancer according to survivin, HSP70 and bcl-2 expression

	survivin		HSP70		bcl-2	
	(-) n=36	(+) n=13	(-) n=8	(+) n=41	(-) n=40	(+) n=9
median survival time (days)	1690	2206	2205	1690	2016	1612

(Kaplan-Meier, Log-rank) $p > 0.05$

비교했을 때 비흡연자에서 발현률이 높은 경향을 보였고($p=0.071$), 흡연양이 증가할수록 survivin의 발현은 유의하게 감소하였다($p=0.046$). 조직학적 분류에서 편평상피암에서의 발현률이 다른 세포 유형보다 낮은 경향을 보였고($p=0.098$), 분화도가 높을수록 발현률은 유의한 감소를 보였다($p=0.037$). 림프절 전이정도($p=0.776$) 및 병기분류($p=0.979$)에 따른 survivin의 발현은 유의한 차이가 없었다.

수술 후 재발된 환자군에서 survivin 발현률은 유의하게 높았고($p=0.006$) survivin 발현군과 비발현군 사이에 생존한 환자 수는 차이가 없었다($p=0.330$) (Table 2).

3. HSP70의 발현과 임상 지표와의 관련성

HSP70의 발현률은 99예 중 84예(84.8%)로 3가지 단백질 중 가장 높았으나 연령, 성별, 흡연력 등에 따른 차이를 보이지 않았다. 편평상피암에서의 발현률이 다른 조직 유형에 비해 높긴 하였으나 유의한 차이를 보이지 않았고($p=0.412$), 조직분화도($p=0.191$)나 림프절 전이($p=0.380$) 및 병기분류($p=0.216$)에 따른 차이는 없었다. 또한 발현군과 비발현군 사이에 재발여부($p=0.532$)나 생존환자수($p=0.681$)의 차이는 없었다(Table 2).

4. bcl-2의 발현과 임상 지표와의 관련성

bcl-2는 99예 중 18예(18.2%)에서 발현되었고 bcl-2 발현군에서의 재발률이 유의하게 높았고($p=$

0.004) 흡연양이 많을수록 발현률은 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다($p=0.054$). 그 외에 다른 임상 지표와는 관련성을 보이지 않았다(Table 2).

5. 생존 분석

생존한 49명 중 survivin 발현군은 13명, 비발현군은 36명, HSP70 발현군은 41명, 비발현군은 8명 그리고 bcl-2 발현군은 9명, 비발현군은 40명 이었다. 각 군의 중간 생존기간은 survivin 발현군이 2206일, 비발현군이 1690일로 발현군의 생존기간이 길었으나 유의한 차이는 없었고($p=0.4091$) HSP70 발현군이 1690일, 비발현군이 2205일이었으나 유의한 차이를 보이지 않았으며($p=0.1715$), bcl-2 발현군이 1612일, 비발현군이 2016일이었으나 두 군간의 차이에 통계적 유의성은 없었다($p=0.2760$) (Table 3).

고 찰

종양의 성장에는 많은 요인들이 영향을 미치고 지금까지 종양 세포의 증식에 대해 광범위하게 연구되어졌으며 정상 조직에서의 세포증식이나 재생과 세포사멸 사이의 균형에 의해 이루어지는 항상성이 깨질 경우 종양 세포수가 증가하게 되는데 이처럼 종양의 증가는 세포생산과 세포손실이라는 두 가지 과정의 결과라는 것이 종양의 성장역학에 대해 잘 알려진 개념이다^{13,14}. 세포사멸은 괴사와 아포토시스에 의해서 발생하고

특히 아포프토시스는 내적 원인 뿐 아니라 외적 원인에 의해서도 유도되는데 여러 원인들에 의한 다양한 신호전달 체계는 결국 공통적인 아포프토시스 경로를 거치게 된다^{3,5}. 종양 세포는 아포프토시스에 저항성을 갖게 하는 단백질들을 발현하는데 여기에는 bcl-2 단백질군 중 항아포프토시스를 갖는 단백질과, IAP군, 그리고 HSP 군인 HSP70, HSP27 등이 속하며 이러한 아포프토시스의 억제인자들은 돌연변이를 용이하게 하고 치료에 대한 저항성을 촉진시킴으로써 종양 세포의 생존 능력을 연장시킨다⁶.

IAP는 amino 말단의 BIR (Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat) domain과 carboxy 말단의 Ring Zn finger를 가지며 대부분의 IAP는 cysteine protease라는 caspase를 억제하는데 특히 XIAP, c-IAP1과 c-IAP2는 caspase 3과 caspase 7에 결합하여 직접 억제하고 또한 pro-caspase 9에 직접 결합하여 cytochrome c에 의한 caspase 9 활성화를 억제한다^{3,15,16}. caspase 는 대부분의 아포프토시스 경로의 중심이기 때문에 IAP가 아포프토시스의 다른 유도 인자뿐 아니라 여러 가지 항암제에 의한 아포프토시스로부터 세포를 보호하는 것은 그다지 놀라운 일이 아니다³.

암에서 survivin 발현은 다른 IAP 군의 발현에 비해 더 많이 알려져있는데 survivin은 Ring finger를 가지고 있지 않으며 단지 BIR domain을 갖는 142개의 아미노산으로 구성되어 있는 가장 작은 IAP로 분자량이 약 16.5kD에 불과하며 이들은 대개 종양 세포의 세포질에서 발현된다^{6,15,16}. survivin은 caspase 3, 7, 9에 작용하여 이들 caspase들의 과발현에 의한 아포프토시스를 억제하는 것으로 알려졌고 최근 세포 주기 진행에도 관여하는 것으로 알려졌는데 survivin promoter에 G1 억제인자 부위가 포함되어 G1 억제자에 의해 조절되는 G2/M 시기에 survivin이 40배 정도 증가되고 세포 주기 정지 후에 survivin은 빠르게 감소하는 것으로 알려져 있다^{3,15,16}.

survivin은 태아 조직에서는 발현되나 정상 분화된 성인 조직에서는 발현되지 않고 대부분의 원발성암,

즉 유방암, 폐암, 전립선암, 대장암, 췌장암, 위암, 신경아세포종, 고등급 림프종 등에서 발현되므로 새로운 종양 표지자로서의 survivin에 대한 많은 관심이 있어왔다^{3,6,16}. Monzo 등¹⁷은 수술로 절제된 비소세포폐암 조직에서 RT-PCR을 사용하여 survivin이 종양 조직에서 80% 이상 발현되었고 survivin 발현군에 비해 비발현군에서 생존율이 더 좋은 것으로 보고하였다($p=0.01$). 한편 본 연구에 의하면 survivin은 여성에서 발현률이 유의하게 높았고, 흡연력이 있는 환자에서 흡연력이 없는 환자에서 발현률이 높은 경향을 보였으며 흡연양이 증가할수록 survivin의 발현은 유의하게 감소하였다. 또한 조직학적 분류에서 다른 세포 유형에 비해 편평상피암에서 발현률이 낮은 경향을 보였고 분화도가 높을수록 survivin의 발현률은 유의한 감소를 보였으며 기존의 보고와 달리 survivin이 발현된 경우 비발현군보다 생존기간이 더 길었지만 통계적 유의성은 없었다.

Kawasaki 등¹⁸은 대장암 조직의 53.2%에서 survivin이 발현되었고 survivin 발현군에서 감소된 아포프토시스 지수를 보이며 이처럼 아포프토시스 지수가 감소된 환자들에서 낮은 생존율을 보인다고 주장하였고 Adida 등¹⁹은 신경아세포종에서 3-4병기 조직의 60%에서 survivin이 발현되었고 자연적으로 퇴화된 2예에서는 survivin이 발현되지 않아 survivin이 신경아세포종의 예후 인자로 작용할 수 있다고 주장하였다. 이처럼 survivin이 악성 세포에서 더 발현되고 여러 항암제뿐 아니라 성장인자 결여, anti-Fas에 의해 유도되는 아포프토시스를 억제하는 기능 때문에 앞으로 항암치료에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

다양한 종류의 자극에 대해 세포는 HSP라 불리는 단백질을 합성하여 반응하는데 이는 거의 모든 유기체에서 발견되어 병태생리적 그리고 면역학적인 반응뿐 아니라 열내성, 세포대사와 분화에 있어서도 중요한 역할을 한다고 알려져있다²⁰. 5가지 주요 HSP군은 저분자 HSP, HSP65, HSP70, HSP90 그리고 HSP100으로 이 중 HSP27과 HSP70이 암과 관련

이 있으며 특히 HSP27에 비해 HSP70은 거의 악성 종양에서 발현된다^{3, 20}.

HSP70은 70kD의 분자량을 가진 단백질로 bcl-2 결합 단백질이며 항아포프토시스 단백질인 BAG-1에 결합하는데 HSP70 또는 HSP70-BAG-1 결합체는 세포분해에 중요한 마지막 단계인 활성화된 세포 사멸 기질에 결합하여 이를 중화시킨다^{3, 8}. 또한 HSP70은 자극에 의해 변성된 단백질의 독작용을 중화시켜 아포프토시스 경로 초기에 신호를 차단시키는 한편 cytochrome c가 방출되어 있고 effector caspase가 활성화되어 있는 세포에서 세포를 보호하는 역할을 하지만 이에 대한 기전은 정확히 밝혀지지 않았다³.

HSP70은 정상적으로 세포 주기 후에 다양하게 세포에서 발현될 수 있고 또한 위암, 방광암, 유방암, 난소암, 폐암, 뇌종양, 피부암 등에서 발현된다²¹. 본 연구에서는 HSP70이 전체 폐암의 84.8%에 발현되어 3가지 단백질 중 가장 높은 발현률을 보였으나 HSP70의 발현이 여러 임상 지표들과 관련이 없으며 환자의 생존률에도 유의한 차이가 없었다. 106예의 비소세포폐암 조직을 대상으로 시행한 연구에 의하면 실험 대상의 모든 예에서 HSP70이 발현되었고 다른 세포 유형에 비해 편평상피암에서의 발현률이 유의하게 높았으며($p=0.001$) 흡연과 HSP70 발현 사이에 유의한 관계는 없었다²². 반면 Volm 등²³은 53명의 환자에서 얻은 폐의 선암 조직에서 HSP70의 발현이 비흡연자 조직에서 57%, 흡연자조직에서 75%로 흡연과 HSP70 발현 사이에 상관관계가 있으며 흡연량이 많을수록 HSP70의 발현도 높다고 보고하였다.

Richard 등²⁴은 유방암에서 p53과 HSP70의 관계를 보고자하는 연구에서 HSP70 발현과 p53 사이에는 상관관계가 없으나 p53 음성인 환자군 중에서 HSP70 양성인 군이 음성인 군에 비해 더 좋은 생존율을 보인다고 하였고 자궁경부암에서 HSP70 발현은 초기 병기에서 흔히 볼 수 있고 p53이나 에스트로겐 수용체 여부와는 무관하다는 보고가 있는 반면²⁵ 자궁내막암의 경우에는 에스트로겐 수용체가 음성인

경우에 HSP70의 발현률이 높다고 하였다²⁶.

bcl-2는 항아포프토시스 단백질 중 가장 잘 알려진 것으로 염색체 전좌 t(14;18)를 갖는 여포성 림프종에서 처음 발견되었는데 이 전좌에 의해 염색체 18번에 있는 bcl-2 유전자가 14번에 위치한 면역글로불린 heavy chain과 나란히 위치하게 되는데 이는 B세포에서 과다 발현된다^{3, 11, 27}. 일반적으로 bcl-2는 신경계와 골수, 위장관과 피부의 상피세포, 그리고 유방, 갑상선, 전립선 등 호르몬에 반응하는 선 조직의 상피세포 등에서 흔히 발현된다²⁸.

다른 발암 유전자와 달리 bcl-2는 세포 주기 진행이나 세포증식을 촉진시키지 않고 대신 아포프토시스를 억제함으로써 세포의 생존을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{3, 5, 29}. 또한 bcl-2는 아포프토시스 억제뿐 아니라 myc 유전자나 p53 같은 종양 억제 유전자와 함께 작용하여 세포를 죽지 않게 하고 결국 종양을 형성하는데 기여한다^{28, 30}. bcl-2가 과발현되어 B세포의 수명이 연장될 경우 고등급의 종양이 발생하는데 이는 세포 수명이 길어짐으로 인해 이차적인 유전자 변형이 생길 가능성이 높아지기 때문일 것으로 생각되고 결국 bcl-2를 발현하는 많은 조직들에서 암의 발생 빈도가 높다고 알려져 있다²⁷.

bcl-2 발현은 B세포 림프종에만 국한되지 않고 다른 혈액암 및 유방암, 전립선암, 난소암, 대장암 그리고 폐암 등에서도 발현되고³ 여러 암에서 bcl-2 발현이 예후에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 의견이 분분하고 계속적인 연구가 필요하였다. bcl-2가 아포프토시스를 억제하고 세포의 수명을 연장시키고 다른 이차적인 암유전자와 함께 종양 형성에 기여함으로써 bcl-2 발현은 나쁜 예후를 보일 것으로 생각되나 반면 몇몇 연구에 의하면 bcl-2가 발현된 종양이 좋은 예후를 보이는 것으로 알려져있다³¹⁻³⁴. 이에 대해 정확히 알려져 있지는 않으나 bcl-2 발현에 의해 유사분열 속도가 낮은 클론에서 이차적인 유전자 결합이 더 천천히 생겨 이로써 종양이 서서히 자라기 때문일 것이라 추측된다¹².

비소세포폐암에서의 bcl-2 발현에 대해 많은 연구

들이 이루어져왔는데 Higashiyama 등³⁴은 182예의 비소세포폐암의 19.8%에서 bcl-2가 발현되었고 조직 유형별로는 편평상피암에서의 발현률이 가장 높았으며 병기가 진행될수록 bcl-2의 발현은 낮으며 bcl-2 발현군의 생존률이 양호하며 bcl-2는 종양의 진행이나 예후를 결정하는데 중요한 인자라고 주장하였다. 본 연구의 경우 bcl-2 발현률은 전체 비소세포폐암 중 18.2%로 외국의 보고와 유사한 결과를 보였고 편평상피암에서 16.7%, 선암에서 23.1%로 발현되었으나 조직 유형별 사이에 의미있는 차이는 없었으며 bcl-2 발현군과 비발현군 사이에 생존률 또한 유의한 차이를 보이지 않았다. Pezzela 등¹²은 bcl-2가 비소세포폐암의 20%에서 발현되었고 편평상피암의 25%, 선암의 25%에서 발현되었으며 5년 생존률이 bcl-2 발현군에서 더 높았으나 유의한 차이는 보이지 않았으며 편평상피암군 내에서 bcl-2와 생존률 사이에는 유의한 상관관계를 보였다($p < 0.05$). Higashiyama 등³⁴은 비소세포폐암에서 bcl-2 발현군인 경우 타장기로의 재발률이 낮다고 하였으나 이와 달리 본 연구에서는 bcl-2 발현군에서의 재발률이 비발현군에 비해 유의하게 높았다.

폐암은 아직까지 세계적으로 높은 발생률을 보이는 암으로 특히 전체 폐암의 70% 이상을 차지하는 비소세포폐암의 경우 수술만이 최선의 치료방법이며 수술이 불가능한 경우 항암치료나 방사선치료를 고려하게 되는데 최근 암 치료에 있어 많은 발전이 있었으나 폐암 환자의 생존률은 그다지 향상되지 않은 실정이다. 위에서 언급된 survivin, HSP 그리고 bcl-2는 항암치료의 효과를 방해하는 항아포프토시스 단백질로 이들의 발현을 억제하거나 이들의 항아포프토시스 작용을 중화시키는 방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 이 단백질들의 수치가 감소될 경우 암세포들이 항암제에 더 민감할 수 있고 특히 HSP와 survivin이 억제될 경우 어떤 경우에는 암세포가 저절로 아포프토시스를 일으키게 된다. 이들 생존 단백질이 암의 예후에 미치는 영향에 대해 앞으로 더욱 연구되어야 하고 이들이 아포프토시스를 억제하는 경로를 선택적으

로 차단하는 방법을 개발해야 하여 전통적인 항암치료와 함께 이러한 새로운 치료 방법을 결합한다면 치료에 대한 효과를 더욱 증가시킬 수 있고 또한 폐암치료를 더 나은 발전을 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

연구배경 :

아포프토시스를 억제하는 단백질들은 암의 발생, 진행 및 치료 반응에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. bcl-2는 지금까지 가장 잘 알려진 항아포프토시스 단백질이고 최근에 survivin이라 하는 IAP군과 HSP 등이 새롭게 밝혀졌고 이들은 많은 암종에서 발현되었다. 이에 저자들은 비소세포폐암을 대상으로 survivin, HSP70, 그리고 bcl-2의 발현에 대해서 면역조직화학적 분석을 시행함으로써 임상적 특성과의 관련성을 알아보려고 하였다.

방 법 :

99예의 비소세포폐암 조직으로 면역조직화학적 염색을 시행하였으며 일차 항체로 anti-survivin rabbit polyclonal antibody, anti-HSP70 mouse monoclonal antibody, anti-Bcl-2 mouse monoclonal antibody를 이용하였다. 각각의 단백질 발현과 여러 임상적, 조직학적 지표들과의 연관성은 Chi-square test를 이용하여 비교하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS software를 이용하였다.

결 과 :

99예 중 남녀 비는 78 : 21이었으며 평균 연령은 56.1세였으며 조직학적 분류는 편평상피암이 42예로 가장 많았고, 병리학적 병기로는 IB기가 30예로 가장 많았다. Survivin은 33예(33.3%)에서 발현되었고 여성에서 발현률이 유의하게 높았고 비흡연자에서 발현률이 높은 경향을 보였으며 흡연자 중 흡연량이 증가할수록 발현률은 유의하게 감소하였다. 또한 재발된 환자군에서 survivin은 유의하게 높은 발현률을 보였다. HSP70은 총 99예 중 84예(84.8%)에서 발현되어 3가지 단백질 중 가장 높은 빈도를 보였으나 유

의한 관련성을 보이는 임상 지표는 없었다. bcl-2는 18예 (18.2%)에서 발현되었고 bcl-2 발현군에서의 재발률이 유의하게 높았고 흡연양이 많을수록 발현률이 감소하는 경향을 보였으나 다른 임상 지표와는 관련성이 없었다. 각 단백질의 발현군과 비발현군 사이에 중간 생존기간을 비교하였으나 통계적 유의성은 없었다.

결 론 :

본 연구에서 survivin 발현은 비흡연자에서 높은 경향을 보이고 여성과 종양이 재발한 군에서 유의하게 높은 발현률을 보이고 bcl-2 발현군에서 재발률이 유의하게 높은 반면 HSP70의 발현은 임상적, 조직학적 지표들과 관련성이 없었다. 결론적으로 발암과정에 중요한 아포프토시스에 관여하는 survivin, HSP 그리고 bcl-2에 대한 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Niklinski J, Niklinska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34:S53-8.
2. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, Piantadosi S, Rusch V, Nowak JA, et al. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. *Chest* 1994; 106:S377-81.
3. Jaattela M. Escaping cell death: Survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:30-43.
4. 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.
5. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62.
6. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
7. Maehara Y, Oki E, Abe T, Tokunaga E, Shibahara K, Kakeji Y, et al. Overexpression of the heat shock proteins HSP70 family and p53 protein and prognosis for patients with gastric cancer. *Oncology* 2000;58:144-51.
8. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci* 1999;22:97-9.
9. Michils A, Redivo M, Beyl VZ, Maertelaer V, Jacobovitz D, Rocmans P, et al. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer* 2001;33:59-67.
10. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: Prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-4.
11. 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.
12. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *N Eng J Med* 1993; 329:690-4.
13. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. The bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:499-504.
14. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992;

- 80:879-86.
15. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitor of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59.
16. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Gene Dev* 1999;13:239-52.
17. 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.
18. 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.
19. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-3.
20. Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, et al. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:1649-57.
21. Lambot M-A, Peny M-O, Fayt I, Haot J, Noel J-C. Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2000;36:326-30.
22. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Krawczyk Z. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study. *Anticancer Res* 2001;21:1015-22.
23. Volm M, Mattern J, Stammers G. Up-regulation of heat shock protein 70 in adnocarcinomas of the lung in smokers. *Anticancer Res* 1995;15:2607-10.
24. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, Yu Y, Allred DC. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: Relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:3752-7.
25. Park CS, Joo IS, Song SY, Kim DS, Bae DS, Lee JH. An immunohistochemical analysis of heat shock protein 70, p53, and estrogen receptor status in carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1999;74:53-60.
26. Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, et al. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer* 1996;77:330-8.
27. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6961-5.
28. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 1995;13:513-43.
29. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
30. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-2.
31. Ritter JH, Dresler CM, Wick MR. Expression of bcl-2 protein in stage T1N0M0 non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26:1227-32.
32. Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res*

+1998;18:2003-10.

33. Hellemans P, Dam PA, Weyler J, Oosterom AT, Buytaert P, Marck EV. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 1995;72:354-60.
34. Higshiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H,

Nakamori S, Tateishi R. Bcl-2 oncoprotein in surgically resected nonsmall cell lung cancer : Possibly favorable prognostic factor in association with low incidence of distant metastasis. *J Surg Oncol* 1997;64:48- 54.