

□ 원 저 □

수술로 절제된 비소세포폐암에서 세포주기와 관련된 p27, CDK4, Uteroglobin의 발현에 관한 면역조직학적 분석

서울대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실¹ 및 의학연구원 폐연구소

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

=Abstract=

Immunohistochemical Analysis for the Expression of p27, CDK4, and Uteroglobin in Resected Non-small Cell Lung Cancer

Man Sun Baek, M.D., Seok Gyun Hong, M.D.², Hyun Ju Hong M.D.,
Sang Won Um, M.D., 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 : It has been reported that the expression of protein which influences on the cell cycle is significantly involved in the development, progress, treatment response, and survival of cancer, and also that the degree of expression of p27 and CDK4 is related to the prognosis. Recent research has revealed that uteroglobin, tumor suppressor gene, is related to cell cycle. This study is focused on the relations between expression of proteins related to cell cycle and clinical index of and survival of NSCLC.

Methods : We examined immunohistochemically specimens of 110 surgically resected NSCLCs for expression of p27, CDK, Uteroglobin. Tissue array slide were obtained from 110 surgically resected NSCLCs. Immunohistochemical staining was performed by immuno-peroxidase technique using avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex.

* 본 연구는 2001년도 보건 의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.

Address for correspondence :

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine and Lung Institute,

Seoul National University College of Medicine

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

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

Results : In 110 patients with resected NSCLCs, the ratio of male to female was 87:13, the median age was 56.43 ± 9.41 yrs. The positive staining of p27 was detected in 75% of the cases. A non-statistically significant trend toward increased p27 expression was observed in smoker and squamous cell cancer. The positive staining of CDK4 was detected in 89%, which was the highest expression of protein among 3 types. The survival ratio of CDK4 negative staining group was higher than that of positive staining group, which was significant difference ($P < 0.05$). There was no association between p27 or uteroglobin expression and survival.

Conclusions : The expression degree of CDK4 is related to the prognosis. This findings suggests that the measurement of CDK4 may be useful in identifying patient at high risk for disease recurrence and survival. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2002, 53:253-264)

Key words : non-small cell lung cance, cell cycle, p27 CDK4, uteroglobin.

서 론

최근 미국과 유럽등 선진국의 폐암 발생률은 감소하고 있으나 우리나라의 경우 남녀 모두 흡연 인구가 늘어나면서 폐암의 발생 빈도는 점점 증가하는 추세이다¹. 폐암 중에 대부분을 차지하는 비소세포암의 2/3정도는 발견 당시 수술적 절제가 불가능한 상태이다². 대부분의 비소세포 폐암 환자는 항암요법 또는 방사선 치료를 받고 있다. 그러나 불행히도 치료에 대한 반응은 빈약하고, 그 예후조차도 불분명한 상태이다.

최근 보고에 의하면, 세포 주기에 영향을 주는 단백질들의 발현이 암의 발생, 진행, 치료 반응 및 생존에 중요하게 관련되어 있다³

p27은 cyclin-dependent kinase inhibitor로 강력한 종양억제 인자이다⁴. 포유세포에서 p27의 과발현이 세포주기의 G1 block을 유발하여 결과적으로 세포주기 arrest를 일으킨다^{5,6}. 정상 폐에서 p27의 발현은 기관지와 말초 폐기질 세포, 내피세포, 섬유아세포, 림파구에서 볼 수 있다⁷. 최근 보고에 의하면 p27의 발현 정도가 비소세포암을 포함한 폐암과 마찬가지로 유방암, 대장암, 위암에서

도 환자의 예후 및 종양의 정도와 밀접하게 관련되어 있다고 한다^{7,8,11}

Cyclin dependent kinase 4(CDK4)은 cyclin-dependent kinases중의 하나이고 세포 주기 중 G 주기에 중요한 역할을 한다¹². 이것은 cyclin D1과 합성되어 인합유 기질의 복합체를 형성하여 DNA 복제와 관련되고 세포 주기의 진행을 증진시키는 역할을 한다. 폐암의 70%에서 CDK4는 양성이고, CDK4의 발현은 비소세포암중에서 상피세포암의 분화도와 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다¹³.

Uteroglobin은 스테로이드에 의해 유도된 단백질로 자궁, 폐, 유선, 전립선 등 여러 장기의 점막 세포에서 분비되어, 염증 매개체들을 생성하는데 중요한 phospholipase A2를 억제하여 강력한 항염 효과와 면역조절기능을 하는 것으로 알려졌다¹⁴. 최근에는 세포가 암으로 변하면서 uteroglobin의 발현이 감소 또는 소실되며 이를 다시 발현시키는 경우 암세포로서의 특성이 사라지는 흥미로운 결과들이 보고되어 항암효과에 대해 관심이 모아지고 있다. 또한 uteroglobin이 세포 주기 중 G2/M 주기에 관련되어 있다고 알려져 있으나^{15,16}, 이의 발현 여부와 예후와의 관련성에 대한 보고는 아직

없는 실정이다.

그래서 본 저자들은 세포 주기와 관련된 단백질의 발현 정도가 비소세포암의 임상 지표와 생존율과의 관련성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1996년 6월부터 2000년 8월까지 서울대학교병원에 내원하여 비소세포암으로 진단된 후 수술적 절제 치료를 받은 110예를 대상으로 하여 조직을 얻었고, 대상 환자의 임상적 특징과 암의 특징은 Table 1에 나타내었다. 암의 조직학적 분류는 편평상피암, 선암, 대세포암, 기관지 폐포암 등으로 분류하였으며 조직 병리학적 병기 판정은 새로운 TNM 병기 판정 기준에 따라 IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, 그리고 IV로 구분하였다.

2. 방 법

면역 조직화학 염색의 효율적인 관찰을 위하여 tissue array 슬라이드를 이용하였다. 이 tissue array는 파라핀에 보관된 조직들을 직경 2mm 정도의 원주 모양으로 잘라 각각의 원주 모양의 조직은 60개의 구멍이 있는 새로운 파라핀에 넣고 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 원형이고, 조직병리 분석을 하기에 충분한 10,000개 정도의 세포를 포함하고 있다.

조직에서 p27, CDK4, uteroglobin의 발현 정도를 보기 위한 면역 조직학적 염색은 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex를 이용

한 immuno-peroxidase 방법으로 시행하였다.

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

3. 통계학적 분석

p27, CDK4, uteroglobin의 발현 여부에 따른 여러 임상 지표들간의 상관 관계는 Chi-square test를 이용하였고, 각각의 발현군과 비발현군 사이의 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 비교하였고, 모든 통계 처리는 SPSS software를 이용하여 시행하여 모든 결과 분석에서 P값이 0.05미만인 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. 임상적 특징

대상 환자의 평균 연령은 56.4세였고, 남자가 87명, 여자가 23명이었다. 흡연력이 있는 78명의 평균 흡연량은 37.76 \pm 17.72 pack.year이었다. 각각의 조직형은 편평 상피암 43예, 선암 30예, 대세포암 9예, 기관지폐포암 10예로 편평 상피암이 가장 많았다. 병리학적 병기로는 총 110예 중 IB기가 34예로 가장 많았다.

대상 환자의 평균 추적기간은 46개월이었고 110명 중 53명이 재발되었고 수술 후 재발까지의 평균 기간은 20개월이었고 추적기간 동안 49명이 사망하였고 56명이 생존하였으며 나머지 5명은 생존 여부를 확인할 수 없었다(Table 1).

2. p27의 발현과 임상 지표와의 관련성

p27은 총 110예 중 83예(75.4%)에서 발현되었으며

Table 1. Clinical characteristics

| | Variable | No. of case |
|------------------|-------------------------|------------------|
| Age | mean \pm S.D. (Years) | 56.43 \pm 9.63 |
| Sex | Male/Female | 87/23 |
| Smoking Hx | Yes/No | 78/24 |
| | Unknown | 8 |
| Histology | Squamous cell ca. | 43 |
| | AdenoCa | 30 |
| | Large cell ca | 9 |
| | Bronchoalveolar Ca | 10 |
| | Others | 18 |
| Differentiation | Well | 21 |
| | Moderately | 31 |
| | Poorly | 17 |
| | Undifferentiated | 4 |
| | Unknown | 37 |
| Nodal stage | N0 | 54 |
| | N1 | 31 |
| | N2 | 21 |
| | N3 | 2 |
| | Unknown | 2 |
| Pathologic stage | IA | 12 |
| | IB | 34 |
| | IIA | 3 |
| | IIB | 26 |
| | IIIA | 25 |
| | IIIB | 7 |
| | IV | 3 |
| Recurrence | Yes/No | 53/49 |
| | Unknown | 8 |
| Survival | Yes/No | 56/49 |
| | Unknown | 5 |

60세 미만인 군과 60세 이상인 군 사이에 발현률 차이는 없었고($P>0.05$), 성별에서도 발현률 차이는 없었다($P>0.05$). 또한 흡연자와 비흡연자 사이의 발현률은 차이가 없었다($P>0.05$)(Table 2). 조직학적 분류에서 기관지 폐포암 환자 10명 중 9명에서 발현(90%)하여 가장 높은 발현률을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 림프절 전이정도 및 병기 분류에 따른 p27의 발현은 유의한 차이가 없었다(Table 2). p27은 비발현군에서 생존 기간이 다소 높았으나 유의한 차이는 없었다.(Table 3.)

3. CDK4의 발현과 임상 지표와의 관련성

CDK4은 총 110예 중 98예(89%)로 3가지 단백질 중 발현률이 가장 높았으며, 연령별 차이는 없었고, 여성에서 발현률이 다소 높은 경향을 보였으나 유의하지 않았다. 또한 조직학적 분류상 편평상피암에서 발현률이 다소 높았으나 유의한 차이는 없었다(Table 2). 림프절 전이 및 병기 분류에 따른 발현률의 차이는 없었다(Table 2). 그러나 발현군과 비발현군 사이의 생존율에서는 비발현군에서

Table 2. The relationship between the clinical characteristics and the expression of proteins in resected NSCLC

| | Variable | No | p27(+) No. (%) | CDK4(+) No. (%) | Uteroglobin(+) No. (%) |
|--------------------|-------------------|----|-------------------|--------------------|---------------------------|
| Age | <60 Yr | 64 | 49(76.6) | 57(89.1) | 8(12.5) |
| | ≥ 60 yr | 46 | 34(73.9) | 41((89.1) | 5(10.9) |
| Sex | Male | 87 | 62(71.3) | 77(88.5) | 10(11.5) |
| | femal | 23 | 21(91.3) | 21(91.3) | 3(13.0) |
| Smoking | Yes | 78 | 56(71.8) | 69(88.5) | 8(10.3) |
| | No | 24 | 20(83.3) | 21(87.5) | 3(12.5) |
| Histology | SCC* ¹ | 43 | 29(67.4) | 40(93.0) | 5(11.6) |
| | AC* ² | 30 | 23(76.7) | 26(86.7) | 4(13.3) |
| | LCC* ³ | 9 | 7(77.8) | 8(88.9) | 1(11.1) |
| | BAC* ⁴ | 10 | 9(90) | 9(90) | 1(10) |
| Different. | Other | 18 | 15(83.3) | 16(88.9) | 2(11.1) |
| | Well | 21 | 14(66.7) | 15(71.4) | 2(9.5) |
| | Moderate | 31 | 21(67.7) | 25(80.6) | 8(25.8) |
| | poor | 17 | 11(64.7) | 13(76.5) | 1(5.8) |
| Nodal stage | Undifferentiate | 4 | 4(100) | 4(100) | 1(25) |
| | N0 | 54 | 39(72.2) | 41(75.9) | 5(9.3) |
| | N1 | 31 | 19(61.3) | 24(77.4) | 6(19.4) |
| | N2 | 21 | 16(76.2) | 18(85.7) | 2(9.5) |
| Pathological stage | N3 | 2 | 2(100) | 2(100) | 0(0) |
| | IA | 12 | 9(75) | 11(91.7) | 1(8.3) |
| | IB | 34 | 23(67.6) | 29(85.3) | 3(8.8) |
| | IIA | 3 | 2(66.7) | 3(100) | 1(33.3) |
| | IIB | 25 | 16(64) | 24(96) | 4(16) |
| | IIIA | 25 | 19(76) | 22(88) | 3(12) |
| | IIIB | 7 | 6(85.7) | 6(85.9) | 1(14.3) |
| | IV | 3 | 2(66.7) | 3(100) | 0(0) |
| Recurrence | Yes | 53 | 43(81.3) | 49(92.5) | 7(13.2) |
| | No | 49 | 34(69.3) | 41(83.7) | 5(10.2) |
| Survival | Yes | 56 | 39(69.6) | 40(71.4) | 3(5.3) |
| | No | 49 | 34(69.4) | 42(85.7) | 7(14.3) |

*¹: Squamous cell ca, *²: Adenocarcinoma *³: Large cell ca *⁴: Bronchioalveolar cell ca

Table 3. Survival rate of NSCLC according to p27, CDK4 and uteroglobin

| | p27 | | CDK4* | | Uteroglobin | |
|----------------------------|------|--------|-------|------|-------------|------|
| | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| | n=83 | n=27 | n=98 | n=12 | n=11 | n=99 |
| Median survival time(days) | 1614 | 2186.5 | 1673 | 2319 | 1901 | 2205 |

Chi-Square, * : p<0.05

유의하게 높았다(Table 3).

4. Uteroglobin의 발현과 임상 지표와의 관련성

Uteroglobin은 총 110예 중 11예(10%)로 3가지 단백질 중 발현률이 가장 낮았고, 연령별, 성별, 조직학적 분류상 차이가 없었다. 또한 림프절 전이 및 병기 분류에 따른 발현률의 차이는 없었다(Table 2). 또한 발현군과 비발현군 사이의 생존율에서도 유의한 차이가 없었다(Table 3).

고 찰

비소세포폐암 환자에서, 치료의 계획과 예후 판단에는 조직 병리학적 소견, TMN의 해부 병리학적 병기, performance status scale(PS scale)의 생리적 병기가 주로 사용되어 왔다¹⁷. 최근에는 종양 세포의 생물학적 특성을 반영하는 여러 인자를 사용하여 예후 추정에 이용하려는 시도가 이루어지고 있다.

폐암의 발암 과정은 다단계, 즉 DNA의 재생, 세포의 성장, 신호 전달과 세포 주기를 조절하면서 발생된다¹⁸. 세포 주기는 G1주기, S주기, G2주기, M주기로 나누어진다. 여기에는 세포 스스로가 분석할 수 있는 능력과 세포 주기의 다음 단계 진행을 결정할 수 있는 checkpoint가 있다. 이러한 checkpoint는 음성과 양성 조절자에 영향을 받는다. 만약 음성 조절자의 기능을 잃어 버리거나 양성 조절자가 과발현을 했을 경우, 세포는 부적절한 시기에 다음 과정으로 진행을 하게 된다. 아마도 가장 중요한 checkpoint는 G1에서 S로의 전이이다. 이 시기에 세포가 복제하기 전에 DNA의 통합을 결정해야 한다. 만약 이러한 checkpoint의 조절능을 잃어 버리면, 변이 또는 통제되지 않은 세포 성장이 이루어진다¹⁹.

세포 주기는 cycline dependent kinases(cdk)에

의해 조절된다. 이것의 활성화는 양성 조절자에 결합함으로 조절된다. cdk는 분열촉진과 성장 억제 신호를 통합하고 세포 주기 전환을 조절한다^{20, 21}.

p27은 cdk inhibitor의 cip/kip 종류 중의 하나이고, cdk4/6-cyclin D1과 cdk20 cyclin E를 억제함으로써 G1에서 S주기까지 세포 주기를 조절하는 중요한 역할을 한다²². p27은 정지기 세포에 다량 존재하고 성장 인자와 cytokines과 같은 분열 신호에 반응하여 세포가 증식할 때 감소한다^{23, 24}. 이렇게, p27의 소실은 종양 발생과 진행시키는데 관여한다. 전통적인 종양 억제 단백질과 다르게 p27은 드물게 동형 결손과 점상 변이가 존재한다²⁵. 최근 비소세포폐암 뿐만 아니라 유방암, 식도암, 대장암에서 마찬가지로 p27의 발현이 없을 때 나쁜 예후 인자로 알려져 왔다^{10, 26, 27}.

비소세포암은 전체 폐암 중에서 75%이상을 차지하고 있다. 폐암의 전체적인 예후는 5년 생존률이 15%에 불과할 정도로 좋지 않다. 비록 1기라 할지라도 완전 절제 후에도 생존률이 60-70% 정도이고, 2기에서는 생존율이 40-50%로 급격히 감소한다^{28, 29}. 수술적 절제된 폐암 환자에서 재발과 생존률을 예측할 수 있는 유전적/분자 생물학적 인자로 세포 주기에 작용하는 p27 비소세포암에서 이 단백질이 비정상적인 양상을 보인다. 이 단백질의 발현이 없거나 부족할 때 종양으로 바뀐다는 보고도 있다³⁰. 최근 V 등과 Y 등의 보고에 의하면 p27의 발현도가 높으면 수술적 절제를 시행한 비소세포암 환자에서 좋은 예후를 보인다고 했다^{7, 8}. 또한 Ishihara 등의 보고에 의하면 조직 검사를 통해 진단된 진행된 비소세포암 환자에서 초기에 p27의 발현 정도가 생존률과 명백히 관련이 있는 것으로 보고 되었으나 연령, 성별, 조직의 분화도와는 유의성이 없는 것으로 보고 하였다³¹.

Hommura 등이 발표한 논문에서도 p27의 발현이 부족한 비소세포암에서 낮은 생존율으로 보여 이 단백질의 발현이 없을 경우 좋지 않은 예후를

보이는 경향이 있다고 했다³². Yasui 등의 보고에 의하면 p27의 발현률이 위암에서 이른 병기에는 높게 나타나고 진행된 병기, 림프절 전이 등이 있는 경우 낮은 경향이 있다고 했다. 그래서 p27의 감소된 발현률과 종양 병기, 림프절 병기와 침투 정도사이에 유의한 상관 관계($P<0.05$)가 있다고 했다³³. 한편 본 연구에서는 p27의 발현률이 남성이 여성에서 보다 높았고, 흡연력이 있는 군에서 흡연력이 없는 군에서 보다 발현률이 높은 경향을 보였다. 또한 조직학적 분류에서 다른 조직 유형에 비해 편평 상피암에서 발현률이 높은 경향을 보였다. 그 외에 연령, 성별, 림프절 전이 정도, 병기 분류와 발현률과의 관계는 유의하지 않았다. 그러나 본 연구에서는 그전의 결과에 다르게 p27의 발현률이 낮은 환자군에서 다소 생존률이 낮은 경향을 보였으나 유의하지 않았다.

CDK4은 cyclin-dependent kinases중의 하나이고 세포 주기중 G1 주기 진행을 조절하는데 중요한 역할을 한다¹². 이것은 cyclin D1과 합성되어 인함유의 기질로 복합체를 형성하여 DNA복제와 관련되고 세포 주기의 진행을 증진시키는 역할을 한다. 폐암의 70%에서 CDK4는 양성이고, CDK4의 발현은 비소세포암중에서 상피세포암의 분화도와 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다¹³. 최근 cyclin D1과 CDK4 변이에 관한 보고에 의하면, p16-cyclin D1-CDK4 pathway의 폐기는 이 pathway에 참여하는 다른 단백질의 이탈이 폐암의 발암과정과 밀접하게 연관되어 있다고 한다^{12,34-35}. Lingfei 등은 수술적 절제한 비소세포암 104예 중에서 CDK4의 발현률이 편평상피암과 선암에서 90%이상을 보였고, 조직의 분화도가 감소 할수록 발현률이 높아진다고 보고하였다. 편평 상피암에서, 고분화 종양에서는 77.8%의 발현률을 보이고, 분화가 나쁜 종양에서는 100%의 발현률을 보여 유의한 차이를 나타내었다³⁶. 본 연구에서 편평 상피암에서 93%, 선암에서 77%의 발현률을 보였고 조직 분화도 사이에서 발현률의 차이는 유의하지

않았다. 또한 CDK4의 발현률은 남성 보다 여성에서 높았고, 연령별 차이는 없었다. M 등은 104예의 편평 상피암에서 CDK4의 발현률과 예후와의 관련성이 없다고 보고하였다³⁷. Y 등에 의하면 CDK4의 과발현이 후두 상피 세포암에서는 종양의 크기와 진행된 병기와 관계는 유의한 차이를 보였다고 보고 했다³⁸. 본 연구에서는 CDK4의 발현이 TNM 병기와 유의한 차이가 없었고, 종양의 크기에 따른 CDK4의 발현률을 조사하지 않았다. 그러나 본 연구에서 CDK4의 비발현군에서 생존률이 유의하게 높게 나와 앞으로 예후 인자로서 가치가 있을 것으로 생각된다.

Uterogloblin은 처음 토끼의 자궁에서 발견되었고³⁹, 이후 자궁의 조직인 흉선, 뇌하수체, 호홉기, 위장관, 췌장, 유선 전립선 등에서도 발견되었다⁴⁰. uterogloblin은 분비되는 조직이 다양하고 다기능적 기질 때문에, 여러 개의 다른 이름인 Progesteron-binding 단백질⁴¹, clara cell 10 kDa(CC10 kDa) 단백질⁴², urine 단백질-1⁴³, poly-chlorinated biphenyl-binding단백질⁴⁴ 그리고 retinol-binding단백질⁴⁵로 알려져 왔다.

Uterogloblin은 염색체 11q12.2-13.1에 위치하고 3개의 exon, 2개의 intron, 1개의 5'-flanking region으로 구성되어 있다. 5'-flanking region은 몇 개의 스테로이드 호르몬 반응 개체를 가지고 있어 uterogloblin이 분화하고, 조직에서 발현하는 것을 조절한다⁴⁶. 흥미롭게, 11번 염색체의 전위 또는 결손이 인간의 종양과 관련 있다고 알려져 있다⁴⁷⁻⁴⁸. 최근 보고에서 uterogloblin은 많은 장기(예, 폐, 유선, 자궁, 전립선)의 점막 세포에서 구조적으로 높게 발현하여, 이러한 장기의 선암 조직에서 uterogloblin이 완전히 감소되어 있거나 전반적으로 결손 되어 있다고 했다¹⁵⁻¹⁶. Z 등에 의한 논문에서 인간의 선암 세포(폐, 전립선, 유방, 자궁)를 가지고 실험한 결과 uterogloblin은 종양 억제와 같은 효과를 가진 단백질이라고 보고 하였다⁴⁹. 이미 유방암에서는 예후, 재발 여부, 치료에 대한 계획 등

에 많은 연구와 결과들이 나와 있고, AT 등은 전립선 암에서 uteroglobin 발현의 결손이 진행된 병기와 관련이 있다는 것을 밝혀 예후 인자로 사용할 수 있다고 발표 하였다⁵⁰ 그러나 폐암에서는 uteroglobin의 발현 정도와 임상 지표와의 관련성, 예후 등에 대해서는 보고되지 않고 있다. 연구에서 uteroglobin의 발현은 총 110예에서 11예에서 발현되었다. uteroglobin의 비발현군에서 여성 보다 남성이 더 많았고, 연령별 차이는 없었다. 조직학적 분류에서 uteroglobin의 발현률은 상피세포암과 선암에서 낮았다. uteroglobin과 생존율과의 관계에서 발현군과 비발현군 사이에 유의성은 없었다.

폐암으로 인한 사망률은 점점 증가하고 있고, 치료에 대한 발전은 많이 이루어 지고 있지만 생존율에 대한 향상은 미비한 실정이다. 세포 주기에 관련된 p27, CDK4, uteroglobin 등을 이용하여 이들의 발현을 억제시키거나 향상 시켜 치료에 접목시키려는 연구들이 현재 활발히 진행되고 있고, 이러한 단백질을 검사하여 암을 진단하고, 진행 정도 파악 등에 대한 연구도 이루어지고 있다. 앞으로 세포 주기에 관련된 단백질을 이용하여 비소세포 폐암에서 방사선 치료, 항암 치료와 함께 새로운 치료법을 개발하고, 이러한 단백질을 이용하여 치료에 대한 계획, 생존율을 예측하는 인자로 사용할 수 있을 것으로 기대 된다.

결론적으로 본 연구를 통해 세포 주기에 관련된 단백질 중 p27과 uteroglobin은 비소세포암의 재발 여부, 임상 지표와의 관계, 생존율 등의 예후를 알아보는 지표로는 아직 유효성이 없고, CDK4의 경우는 예후 인자로서 가치가 있다는 결과를 얻었다.

요 약

연구 배경 :

세포 주기에 영향을 주는 단백질들의 발현이 암의 발생, 진행, 치료 반응 및 생존에 중요하게 관련되어 있다는 보고가 있다. 세포 분열을 촉진하는

CDK4와 이를 억제하는 p27의 발현 정도가 예후와 관련이 있다는 보고가 있고, 최근 새롭게 암억제 유전자로 밝혀진 uteroglobin과 세포 주기와의 관련성이 있는 것으로 생각되며, 이의 발현 여부와 예후와의 관련성에 대한 보고는 아직 없는 실정이다. 그래서 세포 주기와 관련된 단백질의 발현 정도가 비소세포암의 임상 지표와 생존율과의 관련성을 알아 보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

수술적 절제를 시행한 110예의 비소세포암 조직을 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue 4 μ m section에서 avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex를 이용한 immuno-peroxidase를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 발현 정도는 양성 염색부위의 면적과 염색 강도에 따라 0:none, 1:weak, 2: moderate, 3:strong로 구분하여 점수로 판정하였다. 염색의 정도에 따라 0,1을 음성군으로, 2와 3을 양성군으로 나누었다. 단백질 각각의 발현과 여러 가지 임상적, 조직학적 지표들과 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였다. 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였다.

결 과 :

대상군은 수술 후 비소세포암 환자로 전체 110명으로, 성별은 남녀비가 87:23이다. 평균 연령은 56.43 \pm 9.41, 조직학적 형태별로는 상피세포암이 43명, 선암이 30명, 대세포암이 9명이고 그 외 다른 암은 28명이다. 세포주기 관련 단백질의 발현율은 p27가 110예 중 83예(75%), CDK4는 110예 중 98예(89%), uteroglobin은 110예 중 11예(10%)로 CDK4가 가장 높았고 uteroglobin이 가장 적었다. 각 세포주기 관련 단백질 발현율의 세포형에 따른 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 수술적 절제된 비소세포암에서 시행한 면역 조직학적 염색에서 CDK4 발현이 음성인 군에서 생존기간이 유의하게 높았다(P<0.05)

결 론 :

비소세포폐암에서 세포 주기에 관련된 단백질의

발현을 분석한 결과 CDK4 발현 정도가 환자의 예후와 관련되어 있어, 수술 후 치료 계획 및 생존기간을 예측하는데 좋은 지표로 사용 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 오희철, 이강희, 이상욱, 김희욱. 폐암발생의 역학적 특징:강화암등록사업. 제 24회 대한 암학회 학술 대회 초록집 1998;30:60.
2. Shottenfeld D. Epidemiology of lung cancer. In:Pass H, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, editors, Lung Cancer:Principles and Practice. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers 1996.
3. Sherr, C. J. G1 Phase progression: cycling on cue. Cell. 1994;79:515-55.
4. Takeuchi S, Mori N, Koike M, Slater J, Park S, Miller CW, Miyoshi I, koeffler HP. Frequent loss of heterozygosity in region of the KIP 1 locus in non-small cell lung cancer:evidence for a new tumor suppressor gene on the short arm of chromosome 12. Cancer Res 1996;56:738-40.
5. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J, Cloning of p27/Kip 1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 1994; 77:59-66.
6. Toyoshima T, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell 1994;78:67-74.
7. Yatabe Y, Masuda A, Koshikawa T, Nakamura S, Kuroishi T, Osada H, Takahashi T, Mitsudomi T, Takahashi T. p27KIP1 in human lung cancers: differential changes in small cell and non-small cell carcinoma. Cancer Res 1998;58:1042-7.
8. Esposito V, Baldi A, Luca AD, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. Cancer Res 1997; 57:3381-5.
9. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27kip1 protein:prognostic implications in primary breast cancer. Nat Med 1997;3: 227-30.
10. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, Royds JA, peston D, Hall PA, Hanby AM, Barnes DM, Shousha S, O'hare MJ, Lu X. High level expression of p27Kip1 and cyclin D1 in some humanbreast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27Kip1 and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6380-5.
11. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nat Med 1997;3:231-4
12. Y. Li, M.A. Nichols, J.W. Shay et al., Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the

- retinoblastoma susceptibility gene product pRb, *Cancer Res.* 1994;54:6075-82.
13. Kong Lingfei, Ying Pingzhang, Liu Zheng-guo, Gen Jianhua, Zhao Yaowu. A study on p16, pRb, CDK4 and cyclinD1 expression in non-small cell lung cancers. *Cancer letters* 1998;130:93-101.
14. Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Singh G, Katyal SL, Mukherjee AB Human clara cell 1-kDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem* 1993;268:20343-51
15. Linnoila RI, Jensen SM, Steinberg SM, Mulshine JL, Eggleston JC, Gazdar AF. Peripheral airway cell marker expression in non-small cell lung carcinoma. Association with distinct clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol.* 1992 ;97(2):233-43.
16. Broers JL, Jensen SM, Travis WD, Pass H, Whitsett JA, Singh G, Katyal SL, Gazdar AF, Minna JD, Linnoila RI. Expression of surfactant associated protein-A and Clara cell 10 kilodalton mRNA in neoplastic and non-neoplastic human lung tissue as detected by in situ hybridization. *Lab Invest.* 1992; 66(3):337-46.
17. Minna JD, Ginsberg RJ, Inde DC. Chapter 30, Cancer of lung, In Devita VD(Ed.) cancer, 5th Ed., 849, Philadelphia, TB Lippincott 1997
18. Goyette MC, Cho K, Fasching CL. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accompanied by correction of single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol* 1992;12:1387-95.
19. Alfred P. Fishman, Jack A. Elias, Jay A. Fishman, Michael A. Grippi, Larry R. Kaiser, Robert M. Senior. Chapter107, Pulmonary Disease and disorders, In Fishman VD(Ed). 1998; 3thEd.:1703.
20. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature(Lond.)* 1995;374:131-4.
21. Sherr, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-5.
22. Sherr, CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995;9:1149-63.
23. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269:682-5.
24. Hengst L, Reed SI. Transitional control of p27^{kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-4.
25. Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzie KW, Rowley JD, Vogelstein B. Assignment of the human p27^{kip1} gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer re* 1995;55:1206-10.
26. Doki Y, Imoto M, Han E, K-H, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of the p27^{kip1} protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin D1. *Carcinogenesis(Lond).* 1997;18:1139-48.
27. Ciaparrone M, Yamamoto H, Yao Y, Sgambato A, Cattoretti G, Tomita N, Monden T, Rotterdam H, Weinstein IB. Localization and expression of p27^{kip1} in multistage colorectal

- carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999; 58:114-22.
28. Mountain CF. New prognostic factors in lung cancer. *Biologic prophets of cancer cell aggression.* *Chest* 1995;108:246-54
29. Moore J. D.F, Lee JS. Staging and prognostic factors:non-small cell lung cancer. In: HI, Pass JB, Mitchell DH, Johnson, AT. Turrisi(eds.), *Lung Cancer: Principles and Practice*, pp. 481-494. Philadelphia:Lippinott-Raven publishers, 1996
30. Vincenzo Esposito, Alfonso Baldi, Antonio De Luca, Angela M. Groger, Massimo Loda, Giovan Giacomo Giordano, Mario Caputi, Feliciano Baldi, Michele Pagano, Antonio Giordano. Prognostic Role of the Cyclin-dependent kinase Inhibitor p27 in Non-small cell Lung Cancer. *Cancer reserch* 1997;57: 3381-5.
31. Shinichi Ishihara, Koichi Minato, Hideki Hoshino, Ryusei saito, Futoshi hara, Takashi Nakajima, Masatomo Mori. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer:its immunohistochemical evaluation using biopsy specimens. *Lung cancer* 1999;26: 187-94.
32. Furnihiro Hommura, Hirotoshi Dosaka-Akita, Takayuki Mishina, Motoi Nishi, Tetsuya Kojima, Hiromitsu Hiroumi, Shigeaki Ogura, Michio shimizu, Hiroyuki Katoh, and Yoshikazu Kawakami. Prognostic significance of p27kip1 protein and Ki-67 Growth Fraction in Non-small cell Lung Cancers. *Clinical Cancer reserch* 2000; 6:4073-81.
33. Wataru Yasui, Yasusei Kudo, Shuho Semba, Hiroshi Yokozaki, Eiichi Tahara. Reduced Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p27kip1 is Associated with Advanced stage and Invasiveness of Gastric carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 1997;88:625-9.
34. M. Serrano, G.J. Hannon, D. Beach. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK. *Nature* 1993;366:704-7.
35. T. Wolfel, M. hauser, J. Schneider. A p16 insensitivie CDK4 mutant targeted by cttolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995; 269:1281-4.
36. Kong Lingfei, Ying Pingzhang, Liu Zhengguo, Gen Jianhua, Zhao Yaowu. A study on p16, pRb, cdk4 and cyclin D1 expression in non-small cell lung cancers. *Cancer letters* 1998;130:93-101.
37. Volum M, Koomagi R, Rittgen W. Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:294-9.
38. Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. Cyclin-CDK complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;95:209-15.
39. Krishnan RS, Daniel JC Jr. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science.* 1967;158: 490-2.
40. Peri A, Cordella-Miele E, Miele L, Mukherjee AB. Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10-kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein. *J Clin Invest.* 1993;92:2099-109.
41. Beato M. Binding of steroids to uteroglobin.

- J Steroid Biochem. 1976;7:327-34.
42. Singh G, Katyal SL. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(2):141-3.
43. Bernard AM, Lauwerys RR, Noel A, Vandeleene B, Lambert A. Urine protein 1: a sex-dependent marker of tubular or glomerular dysfunction. *Clin Chem.* 1989;35(10):2141-2.
44. Gillner M, Lund J, Cambillau C, Alexandersson M, Hurtig U, Bergman A, Klasson-Wehler E, Gustafsson J. The binding of methylsulfonyl-polychloro-biphenyls to uteroglobin. *J Steroid Biochem.* 1988;31(1):27-33.
45. Loopez de haro MS, Perez Martinez M, Garcia C, Nieto A. Binding of retinoids to uteroglobin. *FEBS Lett.* 1994;349(2):249-251.
46. Chilton BS, Mani SK, Bullock DW. Servomechanism of prolactin and progesterone in regulating uterine gene expression. *Mol Endocrinol.* 1988;2(12):1169-75.
47. Misra BC, Srivatsan ES. Localization of HeLa cell tumor-suppressor gene to the long arm of chromosome II. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):565-77.
48. Jesudasan RA, Rahman RA, Chandrashekarappa S, Evans GA, Srivatsan ES. Deletion and translocation of chromosome 11q13 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Am J Hum Genet.* 1995;56(3):705-15.
49. Zhongjian Zhang, Gopal C. Kundu, Dibyendu Panda, Asim K. Mannsal, Giuditta Mantile-selvaggi, Alessandro peri, Chiun-Jye Yuan, and Anil B. Mukherjee. Loss of transformed phenotype in cancer cells by overexpression of the uteroglobin gene. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:3963-8.
50. Weeraratna AT, Cajigas JA, Schwartz A, Enquist EG, Manyak MJ, Patierno SR. Loss of uteroglobin expression in prostate cancer: relationship to advancing grade. *Clin Cancer Res* 1997;3:2295-300.
-