

위선암종의 예후인자로서 p53, CD44v6과 VEGF 단백질 발현

중앙대학교 의과대학 병리학교실

박언섭 · 이창영 · 이태진 · 김미경 · 유재형

Expression of p53, CD44v6 and VEGF in Gastric Adenocarcinomas

Eon Sub Park, M.D., Chang Young Lee, M.D., Tae Jin Lee, M.D., Mi Kyung Kim, M.D. and Jae Hyung Yoo, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Purpose: The p53 protein is a tumor suppressor gene, and its mutation is associated with biologic aggressiveness. CD44v6, one of the CD44 family, is a cell surface glycoprotein that plays a role in cancer invasion and metastasis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is another recently identified growth factor with significant angiogenic properties. The purpose of this study was to investigate p53, CD44v6, and VEGF expressions to determine whether degree of expression was related to pathological parameters such as Lauren's classification, depth of invasion, and lymph node metastasis.

Materials and Methods: Immunohistochemical stains of p53, CD44v6, and VEGF in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of 125 gastric adenocarcinomas were done.

Results: The overall expression rates of p53, CD44v6, and VEGF were 54.4% (68/125), 36.8% (46/125), and 48.0% (60/125), respectively. The p53, not CD44v6 and VEGF was higher in intestinal-type gastric carcinomas by Lauren's classification. The expressions of p53, CD44v6, and VEGF were statistically correlated with depth of tumor invasion. The expression of CD44v6 was higher in the lymph node metastatic group than in the negative group. The p53 expression was significantly associated with VEGF expression.

Conclusions: These data suggest that the expressions of p53, CD44v6, and VEGF are biologically related to malignancy. The p53 and CD44v6 expressions are independent; however, p53 gene mutation is one of the contributing factors to VEGF expression in gastric adenocarcinoma. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2001;1:10-16)

Key Words: Gastric adenocarcinoma, Immunohistochemistry, p53, CD44v6, VEGF

중심 단어: 위선암종, p53, CD44v6, VEGF

서 론

p53 유전자는 17번 염색체 단완의 13 band에 위치하며, 유전자 산물인 야생형 p53 단백질은 여러 가지 원인에 의하여 손상된 세포의 DNA에 부착하여 손상된 세포의 DNA를 복구할 시간을 부여하며, 유전적 손상이 심할 경우 apoptosis를 유도시켜 손상된 DNA의 증폭을 방지한다.(1) 따라서 p53 유전자에 돌연변이가 일어나면 인체에서는 돌연변이형 p53 단백질이 생성되는데 이 단백질은 p53 단백질의 고유기능을 상실하여 세포 복제 중 다른 유전자 돌연변이의 기회를 증가시켜 발암과정에 관여한다. 실제로 p53 유전자의 돌연변이는 위선암종을 비롯한 인체의 각종 악성 종양에서 가장 흔하게 관찰되며, 이러한 p53 유전자 이상을 검색하는 데는 유전자 산물인 p53 단백질의 면역조직화학적 검출이 효율면에서 간단히 사용될 수 있다. 즉, 야생형 p53 단백질은 반감기가 15~20분 정도로 짧아 검출하기가 불가능 하지만 돌연변이형은 화학적으로 안정되어 수 시간 정도의 반감기를 가지고 핵내에 축적되므로 면역조직화학적 염색으로 쉽게 검출이 가능하다.(2)

CD44분자는 세포표면 부착분자로 세포와 세포사이, 세포와 기질의 부착에 중요한 역할을 하며 거의 모든 상피세포에서 발현된다.(3) 인체에서 발현되는 CD44 분자는 약 60Kb의 길이에 20개의 exon으로 구성되어 있는 기본형(Standard, CD44S)과, 세포의 형질전환 과정에서 나타나는 mRNA의 선택적인 재조합에 의해 10개 이상의 이형체(Variant, CD44v)가 만들어진다.(4) 이러한 CD44v는 인체의 여러 종양세포주와 암조직에서 검출되고, 특히 위선암종에서는 CD44v5와 CD44v6의 발현이 높으며 종양의 진행과 전이에 관련이 있다고 알려져 있다.(5,6)

한편 고형성 종양에서 신생혈관 형성이 많을수록 악성도가 높고 예후가 나쁜 종양으로 알려져 있다. 이러한 증거로서 종양자체에 혈관형성이 없는 경우에, 종양은 생체

책임저자 : 유재형, 서울시 동작구 흑석동 221
중앙대학교 의과대학 병리학교실, 156-756
Tel: 02-820-5657

접수일 : 2000년 9월 1일, 게재승인일 : 2001년 2월 17일

내에서 장경 1~2 mm까지 증식하며 더 이상 자라지 않는다.(7) 신생혈관형성을 유발할 수 있는 물질은 현재 10개 이상의 인자가 보고되어 있으나.(8,9) 그 중에서 종양세포에서 분비하는 혈관내피 성장인자(vascular endothelial cell growth factor, 이하 VEGF)가 종양의 성장과 진행에 주 작용을 하며,(10,11) 실험적으로 VEGF에 대한 단일 세포항체로 치료하였을 경우 종양의 성장이 감소하는 것으로 알려져 있다.(12) 종양조직에서 신생혈관형성과 p53 유전자의 관계는 정상형의 p53 유전자는 혈관형성 억제 인자를 자극하여 혈관 형성이 억제되는데, p53 유전자에 돌연변이가 일어날 경우 혈관형성 억제 기능에 장애가 생겨 신생혈관 형성이 증가한다.(13)

한국인에서 발생하는 악성 종양 중 그 발생빈도가 가장 높은 위선암종은 조기위암인 경우 근치적 절제술만으로도 완치가 가능하나 암세포가 진행되어 주변으로 침윤하거나 주위 림프절에 전이가 있는 경우 그 예후는 불량하다. 따라서 종양 내에서 전이 위험 인자 군을 예측할 수 있는 종양생물학적 표지 인자의 가치는 환자의 예후 추정과 수술 후 항암 요법의 선택 등에 중요한 의미를 부여한다.

본 연구는 한국인에서 제일 많은 위선암종에서 종양의 발생에 관여하는 대표적인 종양억제 유전자인 p53 유전자 단백질, 종양의 침습과 전이에 관여한다고 알려진 세포표면 부착분자인 CD44v6, 그리고 신생혈관 성장인자인 VEGF의 발현정도를 조사하였다. 또한 이들 3개의 인자들과 기존의 예후 결정 인자로 알려진 림프절 전이와 암세포의 위벽내 침윤 정도에 따른 발현율의 변화와 더불어 각 인자 상호간의 관련성을 확인하여 이들의 예후인자로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

방 법

1. 연구대상

연구대상은 1985년 1월부터 1992년 12월까지 중앙대학교 부속병원에서 위암종으로 위절제술을 받은 조직의 염색표본을 재 검색하여 종괴 내에 출혈, 괴사 등 이차적 변화가 초래되어 있는 조직을 제외한 125예를 선택하여 p53, CD44v6, 그리고 VEGF 항원에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

2. 연구방법

(1) 임상 기록 검토: 환자의 임상기록을 토대로 성별, 연령, 림프절 전이 유무 및 종양의 침윤도 등을 조사하였다.

(2) 병리학적 검색: H-E염색된 위선암종의 조직학적 분류는 Lauren의 분류법(14)에 따라 종양세포가 분명한 선구조를 형성하는 장형(intestinal type)과 종양세포가 작고 둥근 모양이며 날개로 흩어져 선구조를 형성하지 않고, 경계가 불분명한 미만형(diffuse type)으로 분류하였다. 종양

의 침윤에 따른 분류는 UICC에서 정한 분류방식을 적용하였다. 즉 종양의 침윤이 점막이나 점막하층에 국한된 경우 T1, 종양이 고유 근육층을 침범하나 장막을 완전히 침윤하지 않은 경우를 T2, 종양이 장막을 완전히 침윤하였으나 장막을 넘어 주위조직으로 침윤이 없는 경우를 T3, 그리고 장막을 완전히 침윤하고 인접 주위장기를 침윤한 경우를 T4라 하였다.

(3) 면역조직화학적 염색: 위선암종에서 p53, CD44v6, 그리고 VEGF 단백질 발현을 보기 위하여 Avidin-biotin complex를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 일차항체로는 p53 (monoclonal, clone DO7, 1:50, Dako Co, USA), CD44v6 (monoclonal, 1:100, Chemicon Co, USA), VEGF (monoclonal, 1:50, Neo Markers Co, USA)을 사용하였다. 선택된 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께의 절편을 만들어 크실렌과 알코올에 처리하여 파라핀을 제거한 다음 증류수로 함수 시킨 후, 3% 과산화수소에 10분간 처리해 내인성 과산화 효소(endogenous peroxidase) 활성을 억제시켰다. 그후 0.1M Tris buffered saline(이하 TBS, pH 7.6)으로 10분간 3회 세척하였다. 1차 및 2차 항체에 대한 비특이적 결합을 억제하기 위하여 protein blocking agent (Lipshaw Co, USA)에 20분간 작용시킨 다음 여분의 용액을 제거한 후 일차항체를 증류수에 1:50으로 희석하여, 항온기에서 각각의 조직에 1시간 동안 반응시킨 후 TBS로 수세하였다. 그후 biotin 결합 이차항체(anti-rabbit IgG antibody)를 30분간 반응시킨 다음 TBS로 수세하고 과산화효소가 결합된 Streptavidin 용액을 다시 30분간 반응시켜 수세하고 DAB solution을 가하여 발색시킨 후 Harris-hematoxylin으로 대조 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) 면역조직화학적 염색의 평가 및 통계: Avidin-biotin complex (ABC)를 이용한 면역조직화학적 염색의 평가는 염색대상 조직의 주변 배경보다 분명하게 핵 또는 세포질에 적갈색의 색소침착이 있는 경우를 양성으로 간주하였다. 양성도의 평가는 p53 단백질은 핵에, CD44v6와 VEGF는 세포질에 전체 종양세포의 10% 이상에서 반응이 있을 경우 양성으로 평가하였다.

통계학적 유의성은 SPSS 프로그램을 통해 Chi-square test로 분석하여 P<0.05인 것을 유의 있는 것으로 하였다.

결 과

1) 임상 및 병리학적 소견

총 125예 중 남자가 84예(67.2%), 여자가 41예(32.8%)로 남녀 비는 2.05 : 1이었다. 연령분포는 22세에서 74세까지로 평균 연령은 54.8세이었으며, 남자가 55.4세, 여자가 53.6세이었다. 환자의 연령 분포는, 50세 미만이 39예(31.2%), 50세 이상이 86예(68.8%)이었다(Table 1). 종양의 유형별로는 장형 선암종이 55예(44%), 미만형이 70예(56%)

Table 1. Age and sex distribution of gastric adenocarcinoma

Age and sex	No of cases
Age (mean=54.8)	
<39	14 (11.2%)
40~49	25 (20.0%)
50~59	40 (32.0%)
60~69	31 (24.8%)
>70	15 (12.0%)
Sex	
Male	84 (67.2%)
Female	41 (32.8%)

Table 2. Expression of p53, CD44v6, and VEGF protein according to type of gastric adenocarcinoma by Lauren classification

Lauren classification	(n)	p53 (+)*	CD44v6 (+)	VEGF
Intestinal type	55	69.1%	49.0%	45.4%
Diffuse type	70	42.9%	47.1%	30.0%

(n) = number of cases, *: statically P<0.05

이었다. 조기위암은 27예 진행성 위암은 98예 이었다. 종양의 침습 깊이에 따른 분류는 T1이 27예(21.6%), T2가 36예(28.8%), T3가 59예(47.2%), 그리고 T4가 3예(2.4%)이었다(Table 2). 종양의 주변 림프절 전이는 총 125예 중 81예(64.8%)에서 관찰되었다.

2) 면역조직화학적 염색소견

(1) 위선암종에서 조직학적 유형에 따른 p53, CD44v6, 그리고 VEGF 발현(Table 2): 위선암종에서 p53 단백질 발현은 전체 125예 중 68예(54.4%)에서 양성반응을 보였다(Fig. 1). Lauren의 분류법중 장형 선암종에서는 69.1% (38/55), 미만형에서는 42.9% (30/70)에서 양성 반응을 보여 장형 선암종에서 통계적으로 유의하게 발현이 높았다(P<0.05).

CD44v6는 48.0% (60/125)에서 양성반응을 보였는데, 장형에서는 49.0% (27/55예), 미만형 선암종에서는 47.1% (33/70)에서 양성 반응을 나타냈으나 통계적인 유의성은 없었다(P>0.05). VEGF 발현은 전체 125예 중 46예(36.8%)에서 양성 반응을 보였고, 종양의 유형별로는 장형 선암종에서 45.4% (25/55), 그리고 미만형에서는 30.0% (21/70)에서 양성반응을 보여 장형에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다(P>0.05, Fig. 2).

(2) 위선암종의 림프절 전이에 따른 p53, CD44v6, 그리고 VEGF 발현(Table 3): 림프절 전이 여부에 따른 p53 발

Table 3. Expression of p53, CD44v6, and VEGF proteins according to nodal metastasis

Lymph node metastasis	(n)	p53 (+)	CD44v6 (+)*	VEGF
Positive	81	55.6%	58.0%	38.2%
Negative	44	52.2%	29.9%	34.1%

(n) = number of cases, *: statically P<0.05

Table 4. Expression of p53, CD44v6, and VEGF proteins according to serosal involvement

T-stage	(n)	p53*	CD44v6*	VEGF*
T ₁ & T ₂	63	37.9%	38.1%	24.2%
T ₃ & T ₄	62	69.3%	58.0%	50.0%

(n) = number of cases, *: statically P<0.05

Table 5. Association between p53, CD44v6 and VEGF proteins

	CD44v6 (+)	CD44v6 (-)	VEGF (+)*	VEGF (-)*
p53 (+), n=68	37 (54.4%)	31 (45.6%)	35 (51.5%)	33 (48.5%)
p53 (-), n=57	23 (40.3%)	34 (59.6%)	11 (19.2%)	46 (80.7%)

n = number of cases, *: statically P<0.05

현은 림프절 전이가 있는 81예 중 55.6% (45/81)에서 양성을 보였고, 림프절 전이가 없는 군에서는 52.2% (23/44)의 발현을 보여 림프절 전이에 따른 차이는 없었다(P>0.05). CD44v6는 림프절 전이 양성 군에서 58.0% (47/81), 음성 군에서 29.9% (13/44)로 림프절 전이 군에서 통계적으로 유의하게 발현이 높았다(P=0.031). VEGF는 림프절 전이가 있는 군에서 38.2% (31/81), 림프절 전이가 없는 군에서는 34.1% (15/44)의 발현을 보여 림프절 전이에 따른 발현 차이는 없었다.

(3) 위선암종의 침습 정도에 따른 p53, CD44v6, 그리고 VEGF 발현(Table 4): 위선암종을 침습 깊이에 따라 분류하여 장막 침습이 없는 군(T₁ & T₂)은 전체 125예 중 63예 이었고 장막 침습이 있는 군(T₃ & T₄)은 62예이었다. 장막 침습에 따른 p53 단백질 발현은 장막 침습이 있는 군에서는 69.3% (43/62), 장막 침습이 없는 군에서는 39.7% (25/63)의 발현을 보였고, CD44v6는 장막 침습이 있는 군에서는

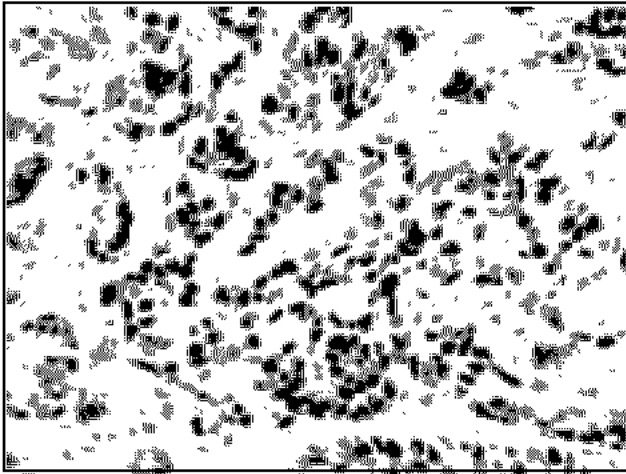


Fig. 1. Expression of p53 in the gastric carcinoma. Strong immunoreactivity for p53 is observed in the nuclei of adenocarcinoma cells (ABC, $\times 400$).

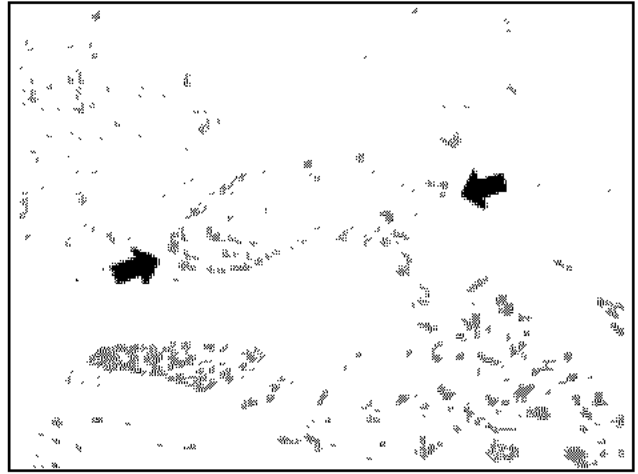


Fig. 3. Expression of CD44v6 in the gastric carcinoma. Strong immunoreactivity of CD44v6 is observed in the cytoplasm of adenocarcinoma cells and lymphatic tumor emboli (arrows) (ABC, $\times 100$).

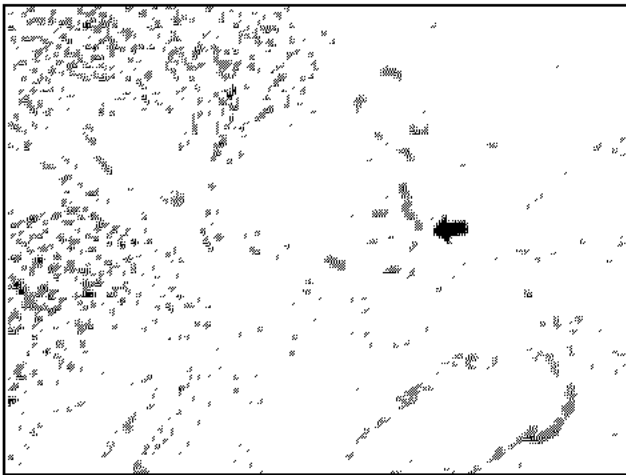


Fig. 2. Expression of VEGF in the gastric carcinoma. Strong immunoreactivity for VEGF is observed in the cytoplasm of tubular adenocarcinoma cells and vascular endothelial cells (arrow) (ABC, $\times 200$).

58.0% (36/62), 장막 침습이 없는 군에서는 38.1% (24/63)의 발현을 보였다(Fig. 3). VEGF는 장막 침습이 있는 군에서는 50.0% (31/62), 없는 군에서는 24.2% (15/62)의 발현을 보여 장막 침습이 있는 경우 p53, CD44v6과 마찬가지로 통계적으로 유의하게 발현이 높았다($P < 0.05$).

(4) 위선암종에서 p53 발현에 따른 CD44v6와 VEGF 발현 양상(Table 5): 위선암종에서 p53 발현과 CD44v6, 그리고 VEGF의 상관관계는 전체 125예 중 p53 단백질 양성인 68예에서 CD44v6 양성률은 54.4%, CD44v6 음성인 경우는 45.6%이었다. 또한 p53 발현이 음성인 57예 중 CD44v6 양

성은 40.3%이었고, 음성은 59.6%로 p53 발현에 따른 CD44v6 발현은 통계적으로 유의한 상관성은 없었다($P > 0.05$). 그렇지만 VEGF 단백질의 경우에 p53 양성인 경우 VEGF 양성률은 51.5%, 음성률은 48.5%이었고, p53 단백질 음성일 경우 VEGF 양성률은 19.2%이었지만 VEGF 발현 음성률은 80.7%로 p53가 양성일 경우 통계적으로 유의하게 VEGF 발현이 양성으로 나타났다($P = 0.001$).

고 찰

진행성 위암의 예후에 미치는 영향은 종양세포의 위벽 침윤정도, 주변 림프절 침범 및 원격 전이로 구분한 임상적 병기가 가장 중요하다. 그렇지만 임상적 병기가 같더라도 환자의 예후가 일치하지 않는 경우가 있는데, 이러한 이유에는 환자의 면역상태, 연령, 건강 등 항암요법에 대한 활동도의 차이에 기인할 수도 있지만 종양세포 자체의 생물학적 특성의 차이에 의해서도 발생할 수 있다. 따라서 종양세포의 생물학적 악성도를 예측하는 것은 종양 연구에 도움이 된다.

본 연구는 위암수술 후 추적 조사된 125예에서 종양의 성장과 진행에 관여한다고 알려진 p53, CD44v6와 혈관내피세포 성장인자(VEGF)의 발현을 기존의 예후 결정인자인 림프절 전이, 종양세포의 위벽내 침윤정도와 비교 분석하여 이들 인자들이 과연 생물학적 악성도를 반영하는 지표로서의 가치가 있는지를 알아보았다.

p53 유전자는 대표적인 종양억제 유전자로 인체에 발생하는 종양의 50%에서 발견되는 점으로 보아 p53 유전자 변이는 종양발생에 중요한 단계임을 시사한다.(15) 또한 p53 단백질의 과발현은 폐, 대장, 유방, 위암 등 많은 인체암

에서 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있는 경우가 많아서 각 종양의 예후인자의 하나로 사용되고 있다.(16,17) 본 연구에서 p53 단백질은 Lauren의 분류에 의한 장형 위선암종에서 69.1%, 미만형 위선암종에서는 42.9% 발현을 보였다. 이러한 발현율은 Fukugana등(18)이 보고한 장형에서 56%, 미만형에서 27%의 발현보다는 미만형에서 조금 높았다. 이렇게 장형에서 발현이 높은 것은 대부분 위선암종은 정상 위점막-장형화생-암종의 연속적인 과정 중에 p53 유전자의 돌연변이가 발생할 가능성이 상대적으로 높다고 생각되었다. 암의 진행에 따른 p53 단백질 발현은 본 연구에서 장막 침윤이 없는 군보다 장막 침윤이 있는 군에서 p53 발현이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.05$). 이러한 사실은 p53 유전자의 돌연변이가 종양의 발생단계부터 일어나며 종양이 진행할수록 유전적 돌연변이가 누적되는 것으로 생각할 수 있었다. 본 연구에서 림프절 전이에 따른 p53 단백질의 발현차이는 통계적 유의성이 없었다. 따라서 종양세포의 림프절 전이는 p53 돌연변이가 직접적으로 관여하지 않는다고 생각되었다.

신생혈관은 인체의 성장과 분화, 창상치유 등의 생리적 기능뿐만 아니라 악성종양의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다.(19) 따라서 혈관이 새로 형성되어 재분포 되지 않는 한 종양의 성장은 제한적일 수 밖에 없다.(7) 종양에서의 신생혈관형성은 크게 종양세포에서 직접 유도되는 인자와, 종양세포에서 생성된 인자에 의해 유도된 대식세포 등에서 유래된 인자에 의해 간접적으로 발생된다.(20) 이들 인자들에 의해 정상혈관의 내피세포가 자극 받아 내피세포의 증식과 화학주성이 일어나며 부수적으로 내피세포에서 protease와 matrix metalloprotease 등이 분비되어 기저막의 파괴와 간질의 분해가 일어나고, 궁극적으로 모세혈관 발아와 더불어 관상구조로 팽창되어 신생혈관의 기능을 한다.(21) 신생혈관에서 종양세포의 전이는 종양의 원발부위에 혈관형성이 활발할수록 종양세포가 혈관 내로 들어갈 기회가 증가하며, 신생혈관은 기존의 혈관과는 달리 기저막이 불완전하고 혈관내피세포에서 collagenase와 plasminogen activator를 분비하기 때문에 암세포의 전이가 용이하게 된다.(22) 현재까지 알려진 신생혈관을 형성할 수 있는 물질은 VEGF, bFGF, TNF- α 를 비롯한 여러 개의 성장인자가 보고되어 있으나,(8) 이 중에서 특히 VEGF는 수용성 성장인자로 VEGF의 수용체(*Vit*)가 혈관내피세포에 존재하며, 또한 실험동물에서 anti-VEGF를 처리하면 혈관밀도가 감소하고 종양의 성장이 억제하는 점으로 보아 종양의 신생혈관형성에 관여하는 것으로는 VEGF가 대표적이다.(23)

각종 종양에서 VEGF 발현은 자궁경부암,(10) 유방암,(24) 대장암,(11) 방광암,(25) 등을 비롯한 여러 악성 종양에서 과발현되며, 일부 종양에서는 VEGF의 과발현이 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있다고 알려져 있다.(23,25)

본 연구에서 VEGF는 주로 종양세포의 세포질과 혈관

내피세포, 그리고 일부 염증세포에서 과립상으로 염색되었다. 종양주변의 혈관내피세포에서 VEGF의 발현은 내피세포에 있는 수용체인 *Vit-1*과 *Vit-2/KDR*이 VEGF와 친화력이 있기 때문에(26) 종양세포에서 분비된 VEGF가 내피세포의 수용체와 결합되어 있는 상태라고 생각되었다. 위선암종에서 발현은 전체 125예 중 46예에서 발현되어 36.8%의 양성율을 보여 Maeda등(27)이 보고한 43.4%와 유사하였다. 종양의 유형별 발현은 장형 선암종에서 45.4%, 그리고 미만형 선암종에서 30%의 발현을 보여 종양의 유형별 발현차이는 없었고, 또한 VEGF 발현율이 종양의 위벽 침윤정도, 림프절 전이와 VEGF 발현의 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 위선암종(27)과 식도암(28) 등에서 VEGF 발현이 환자의 예후와 관련이 있다는 기존의 연구와 달랐다. 그렇지만 진행성 위암환자 중 VEGF 과발현되는 종양에서 오히려 항암요법에 좋은 반응을 보이며,(29) 신생혈관 형성이 유방암에서 전이와 관련이 없다는 보고도 있어(30) VEGF 발현과 예후와의 관계에 대해서는 추가적인 검증이 필요하다고 생각된다.

CD44 단백질은 세포와 세포, 세포와 세포의 기질간의 결합에 관여하는 막성 당단백으로 생체내 결정 유전자는 11번 염색체의 단완에 위치하며 20개의 exon으로 구성되어 있는데 그중 10개의 exon에서 mRNA의 교대성 접합(alternative splicing)과정을 거쳐 다양한 변형체(CD44 variant, CD44v)가 만들어진다. 이러한 교대성 접합은 생리적으로는 초파리의 성(sex)결정 과정에서 일어나며(31) 병적으로는 악성화 과정에서 교대성 접합을 조절하는 기전에 이상이 오거나 CD44 유전자에 돌연변이가 생겨 CD44 전사에 이상이 초래되어 CD44v가 만들어진다.(4) 악성종양에서 CD44v의 기능은 잘 알려져 있지 않지만 아마도 세포와 기질간의 결합력이 떨어져 종양세포가 쉽게 탈락되어 침윤과 전이가 용이할 것으로 추측된다.(32) 이러한 증거로는 실험적으로 비전이성 췌장암 세포주에서 전이성 표현형을 나타내기 위해서는 교대접합으로 CD44v6과 CD44v7 변형체가 발현되고,(33) 역으로 전이성 세포주에 CD44v6 항체를 처리하면 전이가 억제된다는 사실을 들 수 있다.(34) 실제로 유방암,(35) 대장암,(36) 위암종(37,38) 등 인체의 각종 악성 종양에서 CD44v 단백질 발현은 종양의 전이 및 생물학적 악성도와 밀접한 관계가 있어 예후 결정인자로 이용될 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구에서 시행한 위선암종에서 CD44v6의 발현은 47%의 양성반응을 보였는데, 그중 조기 위암종에서 26% 그리고 진행성 위암종에서 53%의 양성율을 보였다. 이러한 결과는 CD44v6는 조기 위암종에서 22%, 그리고 진행형 위선암종에서 42%의 발현을 보였다는 Castella등(6)의 발현과 약간의 차이를 보였다. 이렇게 면역조직화학 염색에서 발현율의 차이를 보이는 것은 본 연구와는 달리 Castella등(6)은 전체 종양세포의 5% 이상과 염색양상이

세포막에 염색된 것을 양성으로 간주하는 등 면역조직화학 염색의 평가에 절대적인 기준치가 없기 때문에 연구결과와의 비교분석은 어려운 점이 있다고 생각되었다. 또한 본 연구에서는 염색양상이 세포질에 염색되는 것과 세포막에 염색되는 것을 구분하여 판정하지 않았다. 그 이유는 대부분 종양에서 세포막과 세포질에 혼재해서 발현되었고, 또한 세포질에 염색되는 경우는 암세포에서 세포막에 모두 결합할 수 없을 만큼 많은 양의 CD44를 만들어 내기 때문에 세포질로 발현되며, (37) 위암종의 CD44 면역염색에서 세포막 염색보다 세포질 염색이 대부분이고, 세포막 염색은 생물학적 활성과 무관하며 일시적인 현상이라는 Mirecka 등(39)의 연구보고를 고려하였기 때문이다.

위선암종의 조직학적 유형에 따른 CD44v6 단백질 발현은 장형 위선암종에서는 49.0%의 발현을 보였고, 미만형에서는 47.1%의 발현을 보여 Lauren 분류에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 Ham 등(40)의 결과와 일치하였다. 종양세포의 위벽 침윤에 따른 발현은 침윤도가 깊을수록(T1 < T2 < T3) 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였는데(P < 0.05), 이러한 결과는 종양의 침윤과정에서 세포의 기질과의 작용에 CD44v6 과발현군이 더욱 쉽게 침윤한다는 Washington 등(37)과 Hong 등(38)의 보고와 일치하였다. 림프절 전이 여부에 따른 CD44v6는 림프절 전이가 있는 군에서 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였다(P < 0.05). 이러한 결과는 장형의 위선암종에서 림프절 전이시 CD44v6 발현이 증가한다는 Heider 등(5)과 Castella 등(6)의 보고와 일치하였다. 이러한 근거로는 CD44v가 발현되면 세포의 기질과 유착이 증가하여 종양세포의 침윤이 용이하게 되고, 또한 종양세포에서 CD44v가 발현되면 정상적인 림프구로 위장되기 때문에 면역회피 과정이 일어나고 혈관내피세포에 부착을 강하게 해주기 때문에 전이가 용이하게 된다는 사실로 보아(41) 어느 정도 타당성 있는 결과로 생각되었다.

결론적으로 본 연구의 기본 배경 중의 하나인 종양세포의 생물학적 악성도 평가로서 p53, VEGF, 그리고 CD44v6는 기존의 예후인자인 종양세포의 림프절 전이에 CD44v6 이외에는 상관관계가 없었으나, 종양세포의 장막침윤에는 p53, VEGF, 그리고 CD44v6 발현정도와 관련이 있는 것으로 나타났다. 한편 p53 유전적 변이에 따른 VEGF와 CD44v6 발현과의 상관성은 VEGF에서 통계적으로 유의하게 관련이 있었다. 이러한 사실로 보아 VEGF는 종양억제 유전자의 비활성화에 따른 VEGF 발현 억제인자의 소실로 인하여 활성화되어 결국 종양세포에서 발현될 수 있을 것으로 생각되었다.

결 론

본 연구는 125예의 위선암종에서 p53, VEGF와 CD44v6에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 그 발현 양상과

위선암종의 병리학적 소견과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 위선암종에서 p53의 발현은 54.4%에서 발현되었고, 종양세포의 침윤도가 깊을수록 발현이 증가하였으나(P < 0.05), 림프절 전이와는 상관관계가 없었다(P > 0.05).

2) VEGF의 발현은 36.8%에서 발현되었고 종양세포의 침윤도가 깊을수록 발현이 증가하였으나(P < 0.05), 림프절 전이와는 상관관계가 없었다(P > 0.05).

3) CD44v6는 48.0%에서 발현되었고, 종양세포의 침윤도가 깊거나, 림프절 전이가 있는 군에서 통계적으로 유의하게 발현이 높았다(P < 0.05).

4) p53 양성군에서 통계적으로 유의하게 VEGF 발현이 양성인 것으로 나타났다(P < 0.05), 반면에 CD44v6 발현은 차이가 없었다.

이상의 결과를 종합하면 위선암종의 예후 결정에 기존의 예후인자인 종양의 위벽침윤 정도, 림프절 전이와 더불어 종양세포에서 p53, VEGF와 CD44v6 발현이 예후인자로 가능성이 있다고 생각되었고, p53 유전적 변이는 VEGF 발현에 관여하는 것으로 나타났다.

REFERENCES

1. Marrechai V, Elenbaas B, Taneyhill L, Piette J, Mechali M, Nicolas JC, Levine AJ, Miller C, Mohandas T, Wolf D. Human p53 gene localized to short arm to chromosome 17. *Nature* 1986;319:738-784.
2. Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biologic activities of wild type and mutant p53. *FASEB J* 1993;7:855-862.
3. Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989; 109:927-937.
4. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12160-12164.
5. Heider KH, Dammrich J, Skroh-Angel P. Differential expression of CD44 splices variants in intestinal and diffuse type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993;53:4197-4203.
6. Castell, EM, Ariza A, Pellicer I, Fernandez-Vasalo I, Ojanguren I. Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1998;51:134-137.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974;34: 2109-2113.
8. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267: 10931-10934.
9. Nauyen M, Watranabe H, Budson AE. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine

- of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:356-361.
10. Guid AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jacksman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:3964-3968.
 11. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964-3968.
 12. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993;362:841-844.
 13. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1582-1584.
 14. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
 15. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-526.
 16. Hallis AL. Mutant p53- the commonest genetic abnormality in human cancer? *J Pathol* 1990;24:162-167.
 17. Grewal H, Guillem JG, Klimstra DS, Cohen AM. p53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995;38:1176-1181.
 18. Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H. Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1994;50:859-862.
 19. Folkman J, Sato S, Ingber D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
 20. Leibovich SJ, Polverin PJ, Shepard MH, Wiseman DM, Shivery V, Nureddin N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor-alpha. *Nature* 1987;329:630-632.
 21. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1311.
 22. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.
 23. Senger DR, Van De Water L, Brown LF. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1993;12:303-324.
 24. Brown LE, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression of vascular permeability factor and its receptors in breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995;26:86-91.
 25. O'Brein T, Granston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. Different angiogenic pathways characterized superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995;55:510-513.
 26. Millauer B, Witzmann-Voese S, Schnurch H. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest FLT-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-846.
 27. Maed K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77:856-863.
 28. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;79:206-213.
 29. Boku N, Chin K, Hosokawa K, Ohtsua A, Tajiri H, Yoshida S, Yamao T, Kondo H, Shirao K, Shimada Y, Saito D, Hasebe T, Mukai K, Sweki S, Saito H, Johnston PG. Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-FU and Cis-platinum. *Clinical Cancer Res* 1998;4:1469-1474.
 30. Hall NR, Fish DE, Hunt N. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992;1:223-229.
 31. Baker BS. Sex in flies: the splice of life. *Nature* 1989;340:521-524.
 32. Pignatelli M, Vessey CJ. Adhesion molecules: Novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol* 1994;25:849-856.
 33. Gunhart U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haußmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
 34. Seite S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hoffman M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zoller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993;177:443-445.
 35. Joensuu H, Kleimi P, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1993;143:867-874.
 36. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993;341:725-726.
 37. Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994;25:1043-1049.
 38. Hong RL, Lee WJ, Shun CT, Chu JS, Chen YC. Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse and intestinal type gastric adenocarcinoma. *Oncology* 1995;52:334-339.
 39. Mirecka J, Marx D, Schauer A. Immunohistochemical localization of CD44 variants 5 and 6 in human gastric mucosa and gastric cancer. *Anticancer Res* 1995;15:1459-1466.
 40. Ham HJ, Ho LI, Chang JY, Wu CW, Jiang SY, Lee HS, Lee WH. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44V in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995;75:1065-1071.
 41. Rudzki Z, Jothy S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *J Pathol Mol Pathol* 1997;50:57-71.