

비호지킨림프종에서 아포프토시스 및 세포증식: Bcl-2, P53 단백질발현과의 관계

조선대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 병리학교실†

오윤경* · 이미지† · 전호중†

목적 : 종양의 성장은 세포의 증식과 소실의 순수한 결과이며, 대부분의 종양들에서 아포프토시스는 계속되는 세포 소실의 가장 중요한 부분을 차지하고 있다. 본 연구에서는 비호지킨림프종 환자들을 REAL 분류에 따라 재분류한 다음 면역조직화학 염색을 이용하여 아포프토시스 지수, Ki-67 세포증식지수, Bcl-2 단백질 발현, P53 단백질 발현을 관찰하여 종양의 성장에 영향을 주는 여러 인자들의 관련 양상을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 비호지킨림프종 환자 67명을 대상으로 하였다. Working Formulation을 이용하여 분류하였을 때 저등급이 3명, 중등급이 64명이었다. 세포 표현형은 전체 67명의 환자 중 47명(70%)이 B세포 표현형이었고, 18명(27%)이 T세포 표현형이었으며, 2명에서는 분류할 수 없었다. 환자의 파라핀 포매 조직을 이용하여 면역조직화학 염색을 실시하여 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수, Bcl-2 단백질 발현, P53 단백질 발현을 관찰하였다.

결과 : Bcl-2 단백질 발현은 40% (26/65)에서 양성 반응을 보였다. P53 단백질 발현은 31% (20/65)에서 보였다. 아포프토시스 지수는 0%와 15%사이의 범위에 있었으며 평균은 2.16이고 중앙값은 1.2이었다. 아포프토시스 지수는 세포 표현형이나 P53 단백질 발현 여부에 따라 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, Bcl-2 단백질 발현 여부에 따라서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.005$). Bcl-2 단백질 발현이 양성이면 아포프토시스 지수가 낮았다. Ki-67 세포증식지수는 1%와 91% 사이의 범위에 있었으며 평균은 55.4%이었다. Ki-67 세포증식지수는 세포 표현형이나 Bcl-2 단백질 발현 여부에 따라 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, P53 단백질 발현 여부에 따라서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.000$). 전체 환자군에서는 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수 사이에 관련이 없었으나, Bcl-2 단백질 발현 양성인 환자에서는 아포프토시스 지수가 증가하면 Ki-67 세포증식지수가 증가하는 경향이 있었다($p=0.012$).

결론 : Bcl-2 단백질 발현이 양성이면 아포프토시스 지수가 낮았고, P53 단백질 발현이 양성이면 Ki-67 세포증식지수는 높았다. 또한 Bcl-2 양성인 환자에서는 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수사이의 양성 연관성을 보였는데 이는 아포프토시스가 종양의 성장에 있어서 세포의 증식과 별도로 분리하여 생각할 수 없는 것임을 시사해준다고 본다.

핵심용어 : 비호지킨림프종, 아포프토시스 지수, Ki-67 세포증식지수, Bcl-2, P53

서론

비호지킨림프종에서 자발성 아포프토시스나 Ki-67이 환자의 예후와 관련이 있다는 연구들이 있으나 아직까지는 다양하게 결론을 내리고 있다.¹⁻¹⁵ 종양의 성장은 세포의 증식과 소실의 순수한 결과이며, 대부분의 종양들에서 아포프토시스는 계속되는 세포 소실의 가장 중요한 부분을 차지하고 있다.¹⁶ 세포가 아포프토시스로 유도되는 정도는 *p53*, *bcl-2*, *c-myc*, *interleukin-1 β* converting enzyme (ICE)과 같은 유전자

이 논문은 1998년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

이 논문은 2001년 11월 17일 접수하여 2002년 2월 21일 채택되었음.

책임저자: 오윤경, 조선대학교병원 치료방사선과
Tel: 062)220-3245, Fax: 062)227-7757
E-mail: ykoh@mail.chosun.ac.kr

에 의해서 영향을 받는다.^{6, 17)}

Ki-67 단클론항체는 Go 휴지기를 제외한 세포의 다른 주기들에서 발현되는 핵항원을 인식하므로 세포증식의 간단한 조직학적 지표로 이용될 수 있다.^{1, 2, 5-12)}

p53 유전자는 인체 암에서 가장 흔하게 변환되는 유전자로서 악성 종양의 50%에서 유전자 이상이 발견되고 있다.^{5, 8, 12, 15, 18-20)} *p53* 단백질은 핵에 있으며 DNA의 복제, 세포의 증식, 아포프토시스에 관여한다. *p53* 유전자는 대개 missense mutation을 거쳐 비 활성화되며 이는 면역 조직화학적으로 검출되나 wild-type *p53*은 검출되지 않는다. 돌연변이를 유발하는 상태에 노출되면 *p53* 단백질은 안정화되어 핵에 축적된다. 축적된 wild-type의 *p53* 단백질은 DNA에 결합하여 세포를 G1 상태에 정지시켜 DNA복구가 이루어져 정상세포로 되고 그렇지 않으면 *p53* 단백질은 돌연변이된 세포의 증식을 막기 위해 아포프토시스를 유발시킨다. 그러나 돌연변이된 *p53* 유

전자는 세포의 생존을 촉진시키게 된다.

Bcl-2 단백질은 아포토시스를 방지함으로써 세포의 수명을 연장시켜 종양유전자와 종양억제유전자들의 돌연변이가 축적되게 한다.^{15, 17~19, 21~27)}

본 연구에서는 비호지킨림프종 환자들을 Revised European-American Lymphoma Classification (REAL) 분류에 따라 재분류한 다음 면역조직화학적 염색을 이용하여 아포토시스 지수, Ki-67 세포증식지수, P53, Bcl-2 단백을 관찰하여 종양의 성장에 영향을 주는 여러 인자들이 서로 관련이 있는지 알아보려고 하였다.^{28, 29)}

대상 및 방법

1. 환자의 특성

조선대학교 부속병원에서 1992년 1월부터 1998년 12월까지 생검이나 수술로 절제되어 병리조직검사보고서가 있는 비호지킨림프종 환자 67명을 대상으로 하였다. 같은 기간 중 비호

Table 1. Site of Involvement in 67 Patients of Non-Hodgkin's Lymphoma

Site	No. of cases (%)	
	Our cases	Korea*
Lymph node	33 (49)	538 (37)
Extranodal	34 (51)	926 (63)
Waldeyer's tonsillar ring	5 (7.5)	116 (7.9)
Nasal and PNS†	5 (7.5)	81 (5.5)
Nasopharynx	2 (3.0)	1 (1.5)
Oral cavity	33 (2.3)	43 (2.9)
Gastrointestinal	8 (12.0)	303 (20.7)
Stomach	4 (6.0)	196 (13.4)
Small intestine	4 (6.0)	60 (4.1)
Large intestine	0 (0)	47 (3.2)
Abdomen	3 (4.5)	0 (0)
Orbit	0 (0)	57 (3.9)
Skin	3 (4.5)	58 (4.0)
Soft tissue	1 (1.5)	55 (3.8)
CNS†	1 (1.5)	39 (2.7)
Bone	0 (0)	26 (1.8)
Breast	1 (1.5)	14 (1.0)
Mediastinum	0 (0)	14 (1.0)
Lung	1 (1.5)	12 (0.8)
Salivary gland	1 (1.5)	12 (0.8)
Others	2 (3.0)	63 (4.2)
Total	67 (100)	1464 (100)

*From Ko YH, Kim CW, Park CS, et al. REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea. Cancer 1998;83:806-812

†Abbreviations: PNS, paranasal sinus; CNS, central nervous system

지킨림프종 환자는 총 78명이었으나 조직이 충분하지 않았거나 염색이 제대로 되지 않았던 경우인 11명을 제외하여 67명만 연구에 포함시켰다. 대상 환자들의 외래 및 입원기록지를 확인하여 환자의 연령, 성별, 종양의 발생부위를 조사하였다. 남자 39명, 여자 28명으로 남녀비는 1.4 : 1이었다. 연령분포는 3~82세로 중앙값은 58세였다. 비호지킨림프종은 Kiel분류법과 Working formulation을 이용하여 분류하였을 때 저등급 3명, 중등급 64명이었다. 표현형은 전체 67명의 환자 중 65명에서 결정할 수 있었는데 47명(70%)이 B세포 표현형이었고, 18명(27%)이 T세포 표현형으로 B세포:T세포는 2.6 : 1로 B세포 표현형이 훨씬 많았다. 발생부위에 따른 분포는 Table 1에, REAL 분류에 따른 분포는 Table 2, 대표적 발생부위에 따른 REAL 분류법에 의한 분포는 Table 3에 제시하였다.

Table 2. Histologic Subtypes by REAL Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma

In subtype	Percent (%)	
	Our cases	Korea*
B cell	47 (70)	1,097 (75)
B-lymphoblastic	0 (0)	8 (0.5)
B-CLL	1 (1.5)	33 (2.3)
Lymphoplasmacytoid	0 (0)	11 (0.8)
Mantle cell	1 (1.5)	22 (1.5)
Follicle center	3 (4.5)	91 (6.2)
MZBL	5 (7.5)	252 (17.3)
Plasma cell tumor	0 (0)	17 (1.1)
Diffuse large B-cell	37 (55.2)	634 (43.2)
Mediastinal large B-cell	0 (0)	7 (0.5)
Burkitt's	0 (0)	16 (1.1)
High Grade B-cell	0 (0)	6 (0.4)
T cell	18 (27)	369 (25)
T-lymphoblastic	1 (1.5)	42 (2.9)
T-cell CLL	0 (0)	1 (0.1)
Large granular cell	0 (0)	3 (0.2)
Mycosis fungoides	0 (0)	5 (0.3)
Peripheral T-cell,unspecified	7 (10.4)	138 (9.4)
Subcutaneous T-cell	0 (0)	11 (0.7)
Angioimmunoblastic T-cell	1 (1.5)	15 (1.0)
Angiocentric T-cell	6 (9.0)	129 (8.7)
Intestinal T-cell	0 (0)	1 (0.1)
Adult T-cell leukemia	1 (1.5)	1 (0.1)
Anaplastic large cell	2 (3.0)	22 (1.5)
Anaplastic large cell, HD-like	0 (0)	1 (0.1)
Unclassified	2 (3)	0 (0)
Total	67 (100)	1,466 (100.0)

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; MZBL, marginal zone B-cell lymphoma; HD, Hodgkin's disease

*From Ko YH, Kim CW, Park CS, et al. REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea. Cancer 1998;83:806-812

Table 3. Histologic Subtypes according to Site of Involvement in Non-Hodgkin's Lymphoma

Subtype	LN (n=33)	GI (n=8)	WR (n=5)	Nasal and PNS (n=5)	Skin (n=3)
Small lymphocytic	1				
Mantle cell	1				
Follicle center cell	3				
Marginal Zone	1	4			
Diffuse large B-cell	19	4	1		2
T-lymphoblastic	1				
Peripheral T-cell	4		1	2	
Adult T-cell leukemia					
Angioimmunoblastic T-cell	1				
Angiocentric T-cell			2	3	
Anaplastic large cell	1				1
Unclassified			1		
Total	33	8	5	5	3

Abbreviations: LN, lymph nodes; GI, gastrointestinal tract; WR, Waldeyer's ring; PNS, paranasal sinus

2. 광학현미경적 진단

총 67명을 광학현미경하에서 조직학적 소견을 재검색하고 진단 당시 보조수단으로 시행하였던 면역조직화학염색 결과를 토대로 REAL 분류의 기준에 따라 재분류를 하였다.

3. 면역조직화학염색 및 결과판독

Ki-67, Bcl-2, P53 단백 발현을 보기 위해서 선택한 환자의 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 X-tra 슬라이드(Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하고 xylene에 탈 파라핀 한 후 알코올로 함수과정을 거친 다음 증류수로 세척하였다. 항원성 회복을 위해 citrate 완충용액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담근 후 고압멸균기를 이용하여 121°C에서 10분간 끓였다. 실온에서 20분간 식힌 후 Tris 완충용액에 세척하고 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% 과산화수소를 사용하여 10분간 처리하였다. Tris 완충용액에 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 일차항체를 실온에서 1시간 반응시켰다. 사용한 일차 항체는 Bcl-2 (Neomarkers, 100/D5, 1:100), P53 (Neomarkers, DO-7, 1:50), Ki-67 (Zymed, 7B11, 1:50)에 대한 단클론항체였다. Tris 완충용액에 세척하고 비오틴이 결합된 이차항체를 실온에서 15분간 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 수세하고 peroxidase가 결합된 streptavidin용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충용액으로 세척하고 발색제는 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)를 이용하였으며 hematoxylin으로 대조염색하고 crystal mount로 봉입하였다. 각 항체에 대한 양성 판정 및 평가는 P53 및 Ki-67 단백질은 핵에서

분명한 양성 반응을 보이는 경우를, Bcl-2는 세포막에서 분명한 양성 반응을 보이는 경우를 양성으로 판정하였다. 또한 P53 및 Bcl-2 항체에 대해서는 종양세포의 5% 미만으로 염색되는 경우는 음성, 5% 이상은 양성으로 판정하였다. Ki-67 세포증식지수(KI: Ki-67 proliferative index)의 산출은 염색이 가장 뚜렷한 부위를 선정하여 고배율에서 사진 촬영한 다음 1,000개 이상의 세포를 판독한 후 핵에 뚜렷이 염색이 된 세포를 모두 세어 백분율 평균을 내었다. 아포프토시스를 관찰하기 위해서 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 X-tra 슬라이드(Surgipath, Richmond, U.S.A.)에 부착하고 xylene에 탈파라핀한 후 알코올로 함수과정을 거친 다음 증류수로 세척하였다. Proteinase K로 실온에서 15분간 처리한 다음 증류수로 함수한 후, 내인성 과산화효소 활성을 제거하기 위해 3% 과산화수소용액으로 10분간 처리하여 증류수로 함수하여 PBS (phosphate buffered saline) 완충액으로 세척하였다. 다음의 과정은 ApoTagR Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen, NY, U.S.A.)로 실험하였다. 약 10분간 equilibration buffer로 전처리한 후 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 혼합용액을 슬라이드당 55 μ L씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 Stop buffer로 10분간 효소작용을 비활성화 시킨 후 PBS 완충액으로 세척하였다. 약 30분간 digoxigenin conjugate 용액과 반응시킨 후 PBS 완충액으로 세척하고 diethyl aminobenzidine (DAB)으로 발색 하였다. 대조염색은 methyl green으로 약하게 염색하고 mount로 봉입하고 광학현미경하에서 관찰하였다. 양성 대조표본은 편도선 조직을 사용하였으며 음성 대조표본은 TdT 혼합용액 대신 equilibration buffer로 대체하여 사용하였다. 아포프토시스 지수(AI: apoptotic index)는 염색이 가장 뚜렷한 부위를 선정하여 고배율에서 사진을 촬영한 다음 1,000개 이상의 세포를 판독한 후 핵에 뚜렷이 염색이 된 세포를 모두 세어 백분율 평균을 내었다.

4. 통계학적 분석

통계처리는 SPSS 프로그램을 이용하였다. Bcl-2 단백질발현, P53 단백질발현, 세포 표현형에 따라 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수가 차이가 있는지를 분석하기 위해서는 T-test로 분석하였다. 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수 간 상관관계를 분석하기 위해서는 Pearson correlation analysis를 사용하였다.

결 과

1. Bcl-2 단백질발현

Bcl-2 단백질의 발현은 40% (26/65)에서 양성 반응을 보였다.

Bcl-2 양성 반응인 경우에는 B세포 표현형(89% : 23/26)이 많았고, T세포 표현형인 경우에는 Bcl-2가 음성인 경우(83% : 15/18)가 많았다($p=0.024$).

2. P53 단백질발현

P53 단백질의 발현은 31% (20/65)에서 보였다. P53 양성 반응을 보인 경우에는 B세포 표현형(85% : 17/20)이 많았고, T세포 표현형인 경우에는 P53 발현이 음성인 경우(83% : 15/18)가 많았다($p=0.148$).

3. 아포프토시스 지수(Table 4, Fig. 1)

아포프토시스 지수는 0%와 15% 사이의 범위에 있었으며

Table 4. Apoptotic Indices (AI) and Ki-67 Proliferative Indices in Relation to T, B Cell Classification and Expression of Bcl-2, P53 Protein (T-test)

(N)	AI		Ki-67 proliferative indices	
	Mean ± SE		Mean ± SE	
Type		$p=0.110$		$p=0.458$
B (47)	1.66 ± 0.36		56.91 ± 3.88	
T (18)	3.40 ± 0.98		51.40 ± 6.33	
Bcl-2		$p=0.005^*$		$p=0.571$
Positive (26)	1.05 ± 0.22		53.16 ± 5.05	
Negative (39)	2.90 ± 0.58		56.92 ± 4.21	
P53		$p=0.181$		$p=0.000^*$
Positive (20)	1.59 ± 0.31		71.99 ± 3.92	
Negative (45)	2.40 ± 0.51		48.35 ± 3.86	
Total (65)	2.16 ± 0.37		55.40 ± 3.22	

Abbreviations : N, number; SE, standard error
*statistically significant

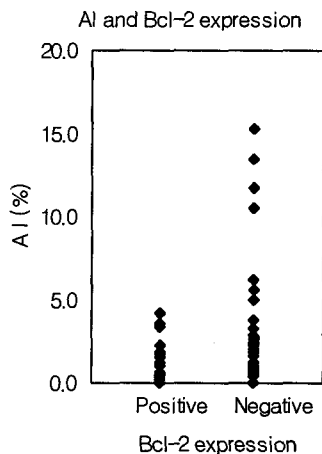


Fig. 1. Apoptotic indices of Bcl-2 positive (N=26) and Bcl-2 negative (N=39) non-Hodgkin's lymphoma were 1.05 ± 0.22 and 2.90 ± 0.58, respectively ($p=0.005$).

평균은 2.16이고 중앙값은 1.2였다. 아포프토시스 지수는 세포 표현형이나 P53 단백질발현 여부에 따라 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, Bcl-2 반응 여부에 따라서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.005$). Bcl-2 단백질발현이 양성이면 아포프토시스 지수가 낮았다. 아포프토시스 지수가 높은 경우는 Bcl-2 음성, P53 음성인 경향을 보였다(Table 4, Fig. 1).

4. Ki-67 세포증식지수(Table 4, Fig. 2)

Ki-67 세포증식지수는 1%와 91% 사이의 범위에 있었으며 평균은 55.4%이었다. Ki-67 세포증식지수는 세포 표현형이나 Bcl-2 반응여부에 따라 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, P53 반응 여부에 따라서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.000$). P53 단백질발현이 양성이면 Ki-67 세포증식지수는 높았다(Table 4, Fig. 2).

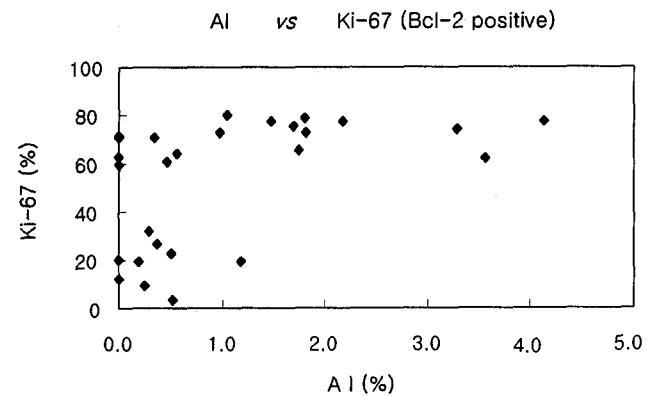


Fig. 3. Correlation between apoptotic indices and Ki-67 proliferative indices in BCL-2 positive patients. The correlation coefficient is 0.475 ($p=0.012$).

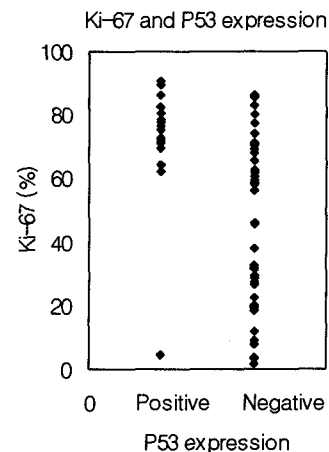


Fig. 2. Ki-67 proliferative indices of P53 positive (N=20) and P53 negative (N=45) non-Hodgkin's lymphoma were 71.99 ± 3.92 and 48.35 ± 3.86, respectively ($p=0.000$).

5. 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수의 관계
(Fig. 3, Table 5)

전체 환자군에서는 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식 지수사이에 관련이 없었으나, Bcl-2 양성인 환자에서는 아포프토시스 지수가 증가하면 Ki-67 세포증식지수가 증가하는 경향이 있었다($p=0.012$).

Table 5. Correlation Among Apoptotic Indices (AI) and Ki-67 Proliferative Indices in Relation to T, B Cell Classification and Expression of Bcl-2, P53 Protein (Pearson's Correlation Analysis)

	AI vs Ki-67 proliferative indices	
	Correlation coefficient	p value
Phenotype		
B	0.182	0.221
T	0.250	0.316
Bcl-2		
Bcl-2 (+)	0.475	0.012*
Bcl-2 (-)	0.114	0.483
P53		
P53 (+)	0.335	0.149
P53 (-)	0.242	0.101
Total	0.174	0.160

*statistically significant

고안 및 결론

아포프토시스 지수는 지금까지의 연구들에서 암의 종류에 따라 다르게 보고된 바, Komaki 등³⁰⁾은 N1 병기의 비소세포성 폐암 환자들의 수술 조직에서 0.2~2.8% (중앙값 1.0%)를 보고하였고, Wheeler 등³¹⁾은 자궁경부선암 Ib병기에서 0.2~0.9% (중앙값 2.0%), Levine 등³²⁾은 자궁경부암에서 0~4% (중앙값 0.71%)를 보고하였다. 또한 Chung 등³³⁾도 자궁경부 편평세포암 IIb병기에서 0.2~4.7% (중앙값 1.1%)로 보고하였다. 그 외 후두암³⁴⁾은 0.41~2.94% (중앙값 0.86%), 전립선암³⁵⁾ 0.12~3.91% (중앙값 0.87%), 악성림프종에서는 각각의 연구^{3, 5)}에서 0~5.2% (중앙값 0.4%) 또는 0.021~10.002%의 범위로 평균값이 세포표현형에 따라 0.03%에서 2.57%이었거나, 대표적인 표현형인 diffuse large B-cell lymphoma에서는 2.57%로 가장 높게 나왔다. 그리고 Gisbertz 등⁷⁾의 연구에서는 범위는 나와 있지 않았으며 세포표현형에 따라 중앙값이 0.06%에서 1.93%의 범위에 있었다. 본 연구에서는 아포프토시스 지수가 0%와 15% 사이의 범위에 있었으며 중앙값은 1.2%, 평균값은 2.16%으로 Korkolopoulou 등의 연구에서와 비슷한 값을 보였다.^{3, 5, 7)}

비호지킨림프종 환자에서 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수에 대해 연구 발표된 내용을 Table 6에 요약하였다. 본 연구에서 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수간의 상관 관계를 보면 전체 환자군에서는 아포프토시스 지수

Table 6. Apoptotic Index and Proliferative Index in the Non-Hodgkin's Lymphoma according to the Literature

Authors	Patients (No. of patients)	Results	
Korkolopoulou, et al (1998) ⁵⁾	NHL (92)	Ki-67 LI (%)	AI (%)
	low grade	12.11 (7.92)	0.30 (0.46)
	intermediate grade	48.09 (25.51)	1.94 (2.26)
	high grade	49.75 (23.97)	1.24 (0.82)
		AI increased with malignancy grade and proliferative activity but was not related to location, cell of origin, clinical stage, BM involvement and p53 expression.	
Du, et al (1996) ⁹⁾	GI MALT lymphoma (40)	A significantly positive association between apoptotic and proliferative indices	
Gisbertz, et al (1997) ⁷⁾	Primary intestinal (51)	Median PI (%): 37.3	Median AI (%): 1.10
	Small B-cell MALT	5.8	0.06
	Large B-cell MALT	52.8	0.24
	Large B-cell	55.85	1.36
	Mantle cell	30.9	1.93
	Small T-cell	18.13	1.25
	Large T-cell	43.4	1.93
Oh, et al (Our study)	B-cell and T-cell (67)	The correlation between AI and Ki-67 proliferative activity was not seen, but positive correlation between AIs and PIs was revealed ($p=0.012$) in Bcl-2 positive patients.	

Abbreviations : NHL, non-Hodgkin's lymphoma; LI, labelling index; AI, apoptotic index; BM, bone marrow; GI MALT, gastrointestinal mucosa-associated lymphoid tumor; PI, proliferative index

와 Ki-67 세포증식지수간에 관련이 없었으나, Bcl-2 단백질발현 양성군에서는 Fig. 3에서와 같이 아포프토시스 지수가 증가하면 Ki-67 세포증식지수가 증가하는 경향이 있었다($p=0.012$). Korkolopoulou 등⁵⁾의 연구와 Du 등⁶⁾의 연구에서도 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수가 서로 관련이 있다고 보고하였다. Korkolopoulou의 연구에서는 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수가 서로 관련이 있는 것에 대해 이러한 현상 뒤에 원인-효과 관계가 있지 않거나 하고 의문을 제기하면서 한가지 가능한 기전으로서 아포프토시스를 겪고 있는 세포들에서 유리되는 뉴클레오솜(nucleosome)의 자극효과로 설명하였다. 한편 Du의 연구에서는 아포프토시스와 세포증식사이의 양성 연관성(positive association)은 비호지킨림프종의 일반적인 현상일수도 있고 아마도 다른 종양에서도 그럴수 있다고 보았다. 아포프토시스는 종양의 성장 기간동안 세포의 증식과 따로 떼어서 생각할 수 없는 것으로 이는 세포의 c-myc 유전자가 세포 주기동안에 세포의 증식과 아포프토시스를 함께 조절하는 기전들을 활성화시킨다는 증거에 의해 뒷받침된다고 하였다. 세포가 증식할 것인가 아니면 아포프토시스로 진행할 것인가는 성장인자들(growth factors)의 상황(availability)에 의존한다고 하였다. Ki-67 세포증식지수는 1%와 91% 사이의 범위에 있었으며 평균은 55.4%이었다. Ki-67 세포증식지수는 세포표현형이나 Bcl-2 반응여부에 따라서는 의미있는 차이를 보이지 않았으나, P53 단백질발현 반응 여부에 따라서 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.000$). P53 단백질발현이 양성이면 Ki-67 세포증식지수는 높았다(Table 4, Fig. 2). 이는 P53 단백질발현 양성 반응은 p-53 유전자의 변이를 의미하므로 p53 변이시 세포 증식이 활발해진다는 것인데 p53변이와 비호지킨림프종 세포의 증식과 관련이 있다고 본다.

아포프토시스 지수는 세포표현형이나 P53 반응여부에 따라 의미 있는 차이를 보이지 않았으나, Bcl-2 반응 여부에 따라 통계학적으로 의미 있는 차이를 보였다($p=0.005$). Bcl-2 단백질발현이 양성이면 아포프토시스 지수가 낮았다. 아포프토시스 지수가 높은 경우는 Bcl-2 음성, P53 음성인 경향을 보였다(Table 4, Fig. 1). 이는 Bcl-2가 아포프토시스를 억제시킬 수 있는 것과 일치되는 소견이었다. bcl-2유전자는 B-cell lymphoma/leukemia-2 gene의 약성어로서 그 이름과 같이 소포성 B세포 비호지킨림프종 환자의 대부분에서 염색체전위가 이 유전자를 활성화시켰다고 하여 B 세포 악성종양과 관련되어서 처음 발견되었다.^{15, 17-19, 21-27} Reciprocal t(14;18) 염색체전위는 bcl-2 유전자가 Ig heavy-chain promotor와 나란히 위치하게 되어 결과적으로 생긴 fusion gene이 bcl-2 deregula-

tion 을 일으켜서 Bcl-2 단백을 표현하게 된다. bcl-2유전자는 생리학적 그리고 병리학적인 배경의 여러 상황에서 예정된 세포사(programmed cell death : PCD) 또는 아포프토시스의 결정적인 조절인자로서 알려져 있다. Bcl-2 단백질의 과생성은 세포증식에 꼭 영향을 주지 않으면서도 세포의 죽음을 막아줄 수 있으므로 bcl-2 유전자는 종양유전자의 한 종류라고 할 수 있겠다. 또한 bcl-2의 과발현은 여러가지의 자극(여러가지 항암제들 또는 방사선조사 등)에 의해 유도되는 세포사를 막아주거나 현저하게 억제시켜 줄 수 있다. Bcl-2 단백질은 손상을 받은 DNA가 아포프토시스에 관련된 유전자들을 활성화시키는 신호로 바뀌는 것을 막을 수 있는데 이런 경로의 매개체의 하나가 종양억제유전자인 p53이다.

결론적으로 본 연구에서는 치료방법이 균등하지 못하여 치료방법에 따른 분석이나 생존기간에 대한 분석을 시행하지 못했지만 비호지킨림프종 환자들의 치료 전 조직상에서 여러 인자들간의 상호관련성을 분석하여서 Bcl-2 단백질 발현에 따라 아포프토시스 지수가 차이가 있고, P53 단백질 발현 여부에 따라 Ki-67 세포증식지수가 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. Bcl-2 단백질발현이 양성이면 아포프토시스 지수가 낮았고, P53 단백질발현이 양성이면 Ki-67 세포증식지수는 높았다. 또한 Bcl-2 양성인 환자에서는 아포프토시스 지수와 Ki-67 세포증식지수사이의 양성 연관성을 보였는데 이는 아포프토시스가 종양의 성장에 있어서 세포의 증식과 별도로 분리하여 생각할 수 없는 것임을 시사해준다고 본다.

참 고 문 헌

1. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988;71:1157-1160
2. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective southwest oncology group trial. *Blood* 1994;83:1460-1466
3. Leoncini L, Vecchio MTD, Megha T, et al. Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1993;142:755-763
4. Leoncini L, Vecchio MTD, Spina D, et al. Presence of the bcl-2 protein and apoptosis in non-Hodgkin lymphomas with diffuse growth pattern. *Int J Cancer* 1995;61:826-831
5. Korkolopoulou P, Angelopoulou MK, Kontopidou F, et al. Prognostic relevance of apoptotic cell death in non-Hodgkin's lymphomas: a multivariate survival analysis including Ki-67 and p53 oncoprotein expression. *Histopathology* 1998;33:240-247

6. **Du M, Singh N, Husseuin A, Isaacson PG and Pan L.** Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *J Pathol* 1996;178:379-384
7. **Gisbertz IAM, Schouten HC, Bot FJ, Arends JW.** Cell turnover parameters in small and large cell varieties of primary intestinal non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1998;83:158-165
8. **Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, and Okayasu I.** Apoptosis and proliferative activity of non-Hodgkin's lymphomas: comparison with expression of bcl-2, p53 and c-myc proteins. *Pathol International* 1997;47:90-94
9. **Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, and Stansfeld AG.** The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 1998;154:223-235
10. **Kalogeraki A, Tzardi M, Panagiotides I, et al.** MIB1 (Ki-67) expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res* 1997;17:487-492
11. **Park SS, Huh JR, Lee SS, Kang YK, Heo DS, and Kim CW.** Correlation between clinical outcome and proliferation index in diffuse large B-Cell lymphoma. *Korean J Pathol* 1999;33:475-482
12. **Han JH, Yang WI, Kim TS.** Prognostic implications of Ki-67 labelling index and p53, bcl-2 protein expression in the primary central nervous system lymphoma. *Korean J Pathol* 2000;34:456-464
13. **Czader M, Mazur J, Pettersson M, et al.** Prognostic significance of proliferative and apoptotic fractions in low grade follicle center cell-derived non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1996;77:1180-1188
14. **Stymen D, Miller TP, Lippman SM, et al.** Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1990;8:986-993
15. **Soini Y, Raunio H, Paakko P.** High-grade malignant non-Hodgkin's lymphomas differ from low-grade lymphomas in the extent of apoptosis and their expression of bcl-2, mcl-1, bax and p53. *Tumor Biol* 1998;19:176-185
16. **Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ.** Cell death via apoptosis and its relationship to growth. Development and differentiation of both tumours and normal cells. *Anticancer Res* 1990;10:1153-1160
17. **Wyllie AH.** Apoptosis *Br J Cancer* 1993;67:205-208
18. **Piris MA, Pezella F, Martinez-z Montero JC, Orradre JL, et al.** P53-and bcl-2 expression in high-grade B-cell lymphomas: correlation with survival time. *Br J Cancer* 1994;69:337-341
19. **Kramer MHH, Hermans J, Parker ADG, et al.** Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 1996;14:2131-2138
20. **Koduru PRK, Raju K, Vadmal V, et al.** Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4078-4091
21. **Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6
22. **Wheaton S, Netser J, Guinee D, Rahn M and Perkins S.** Bcl-2 and Bax protein expression in indolent versus aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Human Pathol* 1998;29:820-825
23. **Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al.** Prognostic significance of Bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996;88:1046-1051
24. **Hermine O, Haouun C, Lepage E, et al.** Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996;87:265-272
25. **Logsdon MD, Meyn RE, Besa PC, et al.** Apoptosis and the bcl-2 gene family - patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;44:19-29
26. **Offit K, Coco FL, Louie DC, et al.** Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994;331:74-80
27. **Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al.** Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-251
28. **Lee MJ, Jeon HJ, Chung CD, Park YH, Kim M.** REAL classification and expression of Cyclin D1, Bcl-2, p53 and Bcl-6 protein in non-Hodgkin's lymphoma. *Med J Chosun Univ* 2001;26:32-39
29. **Ko YH, Kim CW, Park CS, et al.** REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea. *Cancer* 1998;83:806-812
30. **Komaki R, Fujii T, Perkins P, et al.** Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 nonsmall cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:601-605
31. **Wheeler JS, Stephens L, Eifel P, et al.** Apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1487-1493
32. **Levine EL, Davidson SE, Roberts SA, Chadwick CA, Potten CS, West CML.** Apoptosis as predictor of response to radiotherapy in cervical carcinoma. *Lancet* 1994; 344:472
33. **Chung EJ, Seong J, Yang WI, et al.** Spontaneous apoptosis as a predictor of radiotherapy in patients with stage IIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 1999;38:449-454
34. **Lera J, Lara PC, Perez S, Cabrera JL, Santana C.** Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy. *Cancer* 1998;83:2493-2501
35. **Aihara M, Scardino PT, Truong LD, et al.** The frequency elates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1995;75:522-529

Abstract

**Apoptosis and Proliferative Activity of Non-Hodgkin's Lymphoma :
Correlation with Bcl-2 and P53 Protein Expression**

Yoon Kyeong Oh, M.D.*, Mi Ja Lee, M.D.† and Ho Jong Jeon, M.D.†

*Department of Therapeutic Radiology, †Pathology, Chosun University Hospital, Kwangju, Seoul

Purpose : Tumor growth in a given neoplasm is the net result of cell proliferation and cell loss, and apoptosis is the most significant component of continuous cell loss in most tumors. In this study, we examined non-Hodgkin's lymphoma (NHL, n=67) immunohistochemically for the presence of Bcl-2 oncoprotein and P53 protein and compared apoptotic indices (AIs) and Ki-67 proliferative indices (percentages of Ki-67 positive cells).

Materials and Methods : 67 patients with NHL were evaluated : 3 low-grade and 64 intermediate-grade. The phenotype was determined in 65 cases : 47 (70%) were B cell type and 18 (27%) were T cell type. AIs and Ki-67 proliferative indices were determined immunohistochemically and the overexpression of P53 and Bcl-2 protein were also evaluated.

Results : The overexpressions of Bcl-2 protein and P53 protein were found in 40% (26/65) and 31% (20/65). The AI ranged from 0% to 15% (mean 2.16, median 1.2). Cellular Bcl-2, which counteracts apoptosis, was significantly ($p=0.005$) associated with AIs. Ki-67 proliferative indices ranged from 1% to 91% (mean 55.4), and P53 was significantly ($p=0.000$) associated with Ki-67 proliferative indices. A positive correlation between AIs and Ki-67 proliferative indices was revealed ($p=0.012$) in Bcl-2 positive patients.

Conclusion : In NHL, we observed a correlation between AIs and Bcl-2 expression, between Ki-67 proliferative indices and P53 expression, and between AIs and Ki-67 proliferative indices in Bcl-2 positive patients. Our results suggest that cell apoptosis may be inseparable from cell proliferation during tumor growth.

Key Words : Non-Hodgkin's lymphoma, Apoptotic index, Ki-67 proliferative index, Bcl-2, P53