

## 위암의 BAD 단백질의 발현

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

유남진 · 이종우 · 박원상 · 이정용 · 이석형

### Immunohistochemical Analysis of BAD Protein Expression in Gastric Carcinomas

Nam Jin Yoo, M.D., Jong Woo Lee, Won Sang Park, M.D.,  
Jung Young Lee, M.D. and Sug Hyung Lee, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic  
University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose:** Evidence exists that dysregulation of apoptosis is involved in the pathogenesis of cancer development. The Bcl-X<sub>L</sub>/Bcl-2-associated death promoter (BAD), a member of the Bcl-2 family, is a critical regulatory component of the intrinsic cell-death pathway that exerts its pro-apoptotic effect upon heterodimerization with anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. Expression of the BAD protein has been reported in several cancer types, but not in stomach cancer. The aim of this study was to explore the expression status of the BAD protein in gastric carcinomas.

**Materials and Methods:** In the current study, we analyzed the expression of the BAD protein in 60 advanced gastric adenocarcinomas by using immunohistochemistry and a tissue microarray approach.

**Results:** Immunopositivity (defined as  $\geq 30\%$ ) was observed for the BAD protein in 57 (95%) of the 60 cancers. Normal gastric mucosal cells showed weaker expressions of the BAD protein than gastric carcinomas.

**Conclusion:** Taken together, these results suggest that stomach cancer cells *in vivo* may need BAD protein expression for apoptosis. Also, the higher expression of the BAD protein in stomach cancer cells than in normal gastric mucosal cells suggests that apoptosis might be easily triggered in susceptible stomach cancer cells, thereby producing selective pressure to make more apoptosis-resistant cells

during tumor development. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:75-79)

**Key Words:** Stomach cancer, Gastric carcinoma, BAD, Apoptosis

**중심 단어:** 위암, 위선암, BAD, 고사

## 서 론

고사(apoptosis)는 세포사(cell death)의 주된 발생기전으로 조직의 항상성, 세포분화 및 발생에 중요한 역할을 한다.(1, 2) 고사조절의 이상은 사람에서 퇴행성 질환, 종양, 에이즈 등 여러 질병을 유발시킨다.(1,2) 정상세포에 비하여 암세포는 일반적으로 생리적 자극에 대해 고사가 잘 유발되지 않는 특성이 있으며, 이런 특성은 종양발생, 종양의 성장 및 전이에도 중요한 역할을 한다.(3)

고사를 유발하는 여러 경로는 많지만, intrinsic pathway와 extrinsic pathway로 나누는 것이 가장 흔한 분류이다.(1) Extrinsic pathway는 Fas, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor같은 tumor necrosis factor family에 의해서 유발된다. Intrinsic pathway는 Bcl-2 family에 의해서 조절되는데, Bcl-2 family는 크게 고사유발성(proapoptotic)과 항고사성(antiapoptotic)으로 나뉜다.(1) 이들 Bcl-2 family 구성원은 서로 결합하여 homodimer 및 heterodimer로서 복잡한 조절 체계를 구성하며, Bcl-2 family 단백질들의 상대적 비율에 따라서 고사의 반응정도가 결정된다.(1) Intrinsic pathway는 성장인자의 소실, 저산소증, 방사선 조사, 항암제 등에 의해서 유발된다.(1)

포유동물의 Bcl-2 family 단백질은 약 20종류가 밝혀져 있고, 이들 모두는 Bcl-2 homology (BH) domain을 가진다.(1) 이 중 BH3 domain은 고사를 유발하는데 필요 충분한 domain이다. 여러 BH domain 중 BH3 domain만을 가지고 있는 단백질들은 BAD, PUMA, Hrk, Bcl-G, Noxa 등이 있으며, 이들은 고사유발의 성질을 가지고 있다.(4-8) 이들이 어느 정도의 고사유발성을 갖느냐는 다른 항고사성 Bcl-2 family member 단백질과의 결합정도가 좌우한다. BAD (Bcl-X<sub>L</sub>/

책임저자 : 이석형, 서울특별시 서초구 반포동 505번지  
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701  
Tel: 02-590-1188, Fax: 02-537-6586  
E-mail: suhulee@catholic.ac.kr

접수일 : 2003년 2월 4일, 게재승인일 : 2003년 2월 17일  
본 연구는 2002년도 대한암학회 한국림리학회연구비 지원으로 이루어진 것임.

Bcl-2-associated death promoter)는 고사유발성 단백질로 BH3 domain 만을 가지고 있고, 인산화(phosphorylation)에 의해 단백질 결합과 세포 내 위치가 결정되고, 결과적으로 인산화된 BAD는 고사유발성을 소실한다.(4,9)

고사기전에 관여하는 물질의 이상이 발암과정에 중요한 역할을 한다는 증거들이 제시되고 있으며, Bcl-2 family member 단백질의 이상 역시 이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.(10,11) Bcl-2, Bax, Bak의 돌연변이가 또한 암 발생과 연관이 있는 것으로 알려지고 있다.(12-14) BAD는 고사기전을 조절하는 중요한 단백질이므로 중앙조직에서 이 단백질의 발현을 조사하는 것은 중앙의 고사를 예측하는데 중요하다고 생각된다. BAD 단백질의 발현에 관해서는 정상조직과 세포주에서의 연구가 있었지만(15) 중앙조직에서는 연구가 거의 없고 특히 위암에서는 전혀 연구가 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 면역조직화학법을 이용하여 BAD단백질의 발현을 정상 위 조직 및 위암 조직에서 연구하고자 한다.

## 방 법

### 1) Tissue microarray 제작

1999년 이후 서울, 부천 및 수원에 위치하고 있는 병원에서 근치적 위 절제술을 받은 60명의 진행성 위암 환자를 대상으로 하였다. 위암 환자의 파라핀 포매 조직을 5µm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 염색을 실시한 후 3명의 진단병리 의사가 독립적으로 Lauren 분류에 따라 분류하였다. 장형(intestinal-type)이 34예였으며 미만형(diffuse-type)이 26예였다. 10% 포르마린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직을 서로 다른 중앙 부위에서 0.6 mm 지름의 실린더로 3회 천공한 후 떼어서 다른 recipient 파라핀 블록으로 옮겨 심었다. 이 때 각 시료간의 간격은 0.8 mm였고, Tissue Arrayer (Beecher Instrument, 미국)를 이용하였다. 또한, 정상 위 조직에 대해서도 1회 천공하여 옮겨 심었으므로, 한 개의 recipient block에는 240개의 시료가 심어졌다. Tissue microarray block을 4 µm의 두께로 자르고 hematoxylin & eosin 염색하여 tissue microarray가 적절하게 만들어졌는지 확인하였다.

### 2) 면역조직화학법

Tissue microarray로부터 박절된 조직절편을 이용하여 BAD 단백질에 대한 면역조직화학법 검사를 시행하였다. BAD 단백질에 대한 단클론 항체(Pharmingen, 미국, 희석농도 1/50)가 일차 항체로 사용되었다. 면역조직화학검사의 결과를 극대화시키기 위하여 전자레인지에 이용한 항원 복원 (antigen retrieval)과 biotinylated tyramide를 이용한 신호증폭이 시행되었으며 자세한 방법은 이전의 논문에서 자세히 기술되었다.(16) 일차항체를 4°C에서 15시간, 2차 항체는 37°C에서 40분, Straptavidin-peroxidase는 실온에서 30분,

biotinylated tyramide는 실온에서 7분, 2차 Straptavidin-peroxidase는 실온에서 30분을 각각 처리한 후, diaminobenzidine으로 반응산물을 현상하고 hematoxylin으로 염색하였다. 결과는 30% 이상의 세포가 양성이면 양성으로 판정하였다. 양성을 발현 강도에 따라서 +, ++, +++의 세 단계로 나누었다. 결과는 3명의 진단병리 의사가 독립적으로 판독하였다.

## 결 과

조사한 60예의 위암에서 BAD 단백질의 발현은 57예(95%)에서 양성이었다(Table 1, Fig. 1). 26예의 미만형 위암에서는 24예(92%), 34예의 장형 위암에서는 33예(97%)가 BAD 발현이 양성이었다. 하지만, BAD 발현은 미만형 및 장형 위암에서 발현의 통계학적 차이는 없었다(Fisher's exact test, two tails  $P > 0.05$ ). 또한, 위암의 침습 정도에 따른 BAD 발현의 차이도 관찰할 수 없었다. BAD의 면역조직화학 염색은 양성의 경우에는 세포질 내에 나타났다(Fig. 1A). 양성을 보인 위암 57예 중 10예가 +, 24예가 ++, 23예가 +++를 나타냈다(Table 1). Table 1은 위암의 BAD 면역조직화학 검사 결과를 요약한 것이다.

정상 위 조직에서 표면점막세포(surface mucous cell), 주세포(chief cell), 벽세포(parietal cell)는 모두 +의 양성을 나타냈다(Fig. 1B). 섬유모세포는 BAD 면역염색이 되지 않아서 내부 음성 대조(internal negative control) 세포로 사용되었다. 일차항체 대신 마우스 혈청을 사용한 음성 대조군은 BAD 면역염색에 대해 음성을 보였다(Fig. 1C).

## 고 찰

본 연구의 목적은 두 가지였다. 첫째는 고사조절에 중요한 역할을 하는 Bcl-2 family member인 BAD가 위암 조직에서 발현하는지 여부를 판명하는 것이었고, 둘째는 정상 위 세포와 위암 세포에서 BAD의 발현이 차이가 있는지를 밝히는 것이었다. BAD는 위암에서 높은 발현도(95%)를 나타냈

Table 1. Summary of BAD expression in stomach cancers

Histologic types	BAD expression*			
	-	+	++	+++
Intestinal	1	5	15	13
Diffuse	2	5	9	10
Total (%)	3 (5)	10 (17)	24 (40)	23 (38)

\*Intensity of expression is described as - (negative), + (weak positive), ++ (moderate positive) and +++ (strong positive).

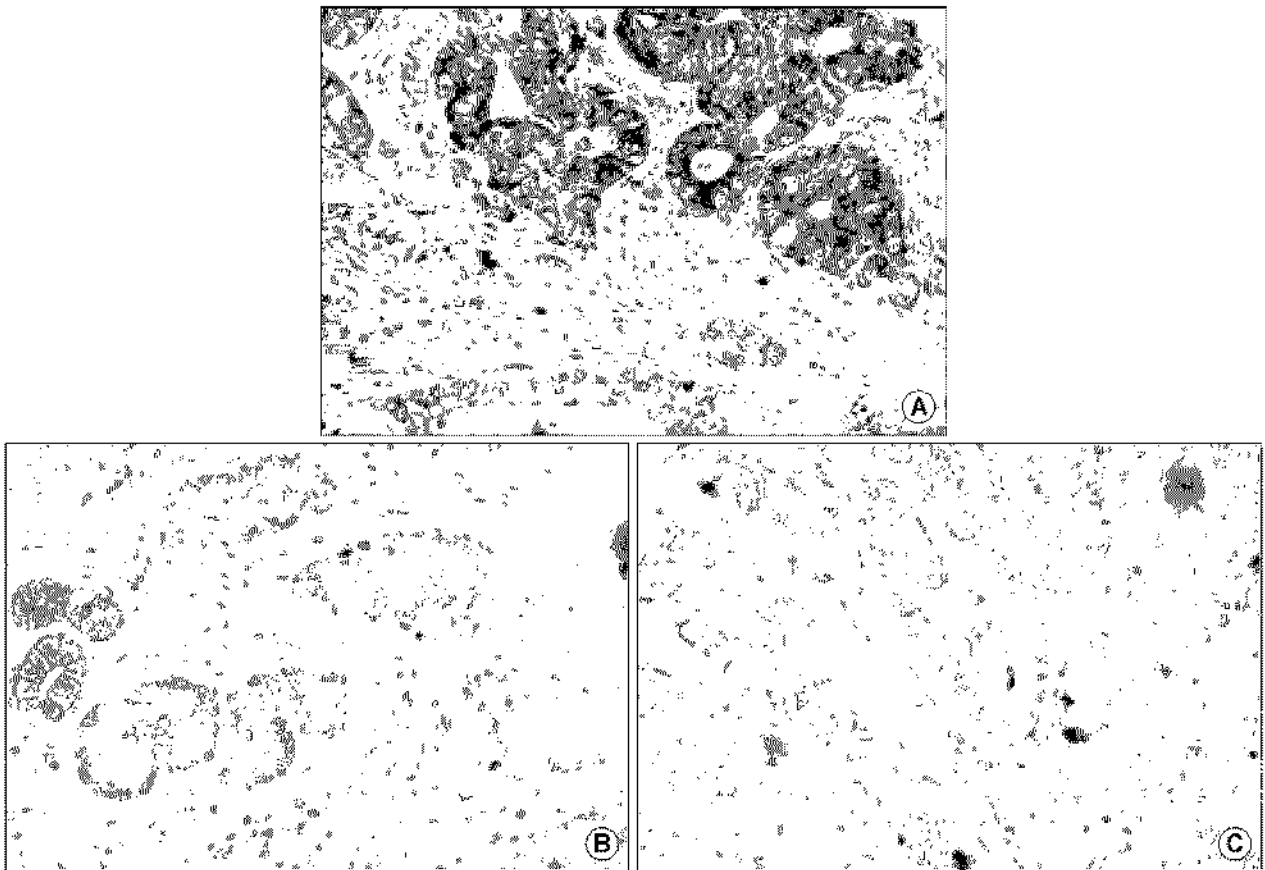


Fig. 1. Visualization of BAD protein in stomach carcinomas by immunohistochemistry. Antibodies were detected by a diaminobenzidine method that produces a brown color. Counterstaining of nuclei was done with hematoxylin (blue). A: Carcinoma cells shows immunoreactivity for BAD in the cytosol. Fibroblasts between the tumor nests are negative for the immunostaining. B: Normal mucosal cells show BAD expression in cytosol. C: Negative control of BAD immunostaining (original magnification A, B, C:  $\times 200$ ).

으며, 이는 침습정도 및 조직학적 아형과 무관하게 나타났다. BAD가 위암세포에서 강하게 발현하는 것(10예가 +, 24예가 ++, 23예가 +++)과는 대조적으로 정상 위 세포는 +으로 약하게 발현하였다. 이런 결과는 대부분의 위암 세포가 생체 내에서 고사를 위해 BAD의 발현을 필요로 한다는 것을 보여준다고 하겠다.

고사 조절 유전자의 이상, 단백질 발현의 변화 등은 여러 종양에서 밝혀졌으며, 일부는 종양의 예후와 직접적 연관이 있어서 임상적 의의를 갖는 것으로 알려져 있다. Death receptor의 돌연변이, caspase의 돌연변이가 보고된 바 있으며, (16,17) Bcl-2 family member에서의 단백질 변화는 종양의 진행과 연관이 높은 것으로 알려져 있다. (10,11) Bcl-2의 발현증가는 종양의 진행 비례하고, Bid의 발현증가는 종양 수술 후 재발까지의 시간과 비례한다. (10,11) BAD에 관해서는 이런 연구가 미약한데, Kitada 등(15)은 최초로 BAD의 발현을 정상사람조직 및 60개의 세포주에서 조사하였는

데, 조직의 종류에 따라서 다양한 강도의 BAD 단백질 발현을 관찰 하였다. 위장에서는 표면점막세포, 주세포, 벽세포 모두 양성을 보였는데, (15) 이는 본 연구 결과와 일치하는 것이었다. 위장관 내에서도 대장, 위장의 점막세포는 BAD가 발현하는 반면, 소장과 식도의 점막세포는 BAD를 발현하지 않아서 BAD가 위장관 점막세포의 위치에 따라서 고사조절에 다른 정도의 영향력을 갖는다는 것을 보여 주었다. (15) 또한 60개 종양세포주중 32개의 세포주가 BAD를 발현하지만, 이 역시 종양의 종류에 따라서 상이하여 백혈병/림프종 세포주는 BAD를 거의 발현하지 않고 대장암 세포주는 대부분 BAD를 발현하는 차이를 보였다. 하지만, 이 조사에서는 위암 세포주는 조사가 되지 않아서 BAD 발현 여부를 알 수 없었으므로, 본 연구는 위암에서 최초로 BAD의 발현을 조사했다는 의의를 갖는다.

종양의 발생 및 진행과정에서 종양세포는 고사를 피할 수 있는 능력을 획득하게 되고 이를 통해 다양한 고사의

자극으로부터 자신을 보호하게 된다.(3) 종양세포에서 고사의 억제는 종양세포의 생존을 연장시키고 이를 통해서 더욱 유전자 손상을 받을 기회는 높은 것이다. 역으로, 이런 능력이 없는 종양세포는 발생 및 진행단계에서 없어질 가능성이 높다. 본 연구에서 정상 위 세포보다는 위암세포가 더 강하게 BAD를 발현하는 것으로 나타났다(Table 1). 위암세포의 증가된 BAD 발현은 고사를 촉진시켜, 다단계의 종양발생에서 좀 더 고사에 잘 견디는 암세포를 만들어 낼 수 있을 것으로 생각된다. 이런 과정을 거친 위암 세포는 고사에 대해서 강한 내성을 갖게 되어서 암 발생 및 진행에서 끊임 없이 맞이하게 될 저산소증, 항암제 등의 강력한 고사자극에 대해 살아 남을 수 있을 것이다.

이제까지 가장 잘 알려진 BAD의 불활성화 기전은 BAD의 인산화이다.(9) 하지만, 적절한 항체의 부족으로 암 조직에서 이를 조사할 수 있는 방법이 부족하기 때문에 실제 암세포가 생체 내에서 어느 정도 인산화된 BAD를 가지고 있는지는 알려진 바가 없다. 그 이외에 다른 불활성화 기전은 BAD 유전자의 돌연변이가 있을 수 있는데, 저자 들은 50예의 위암에서 BAD의 돌연변이를 검색한 결과 돌연변이를 발견하지 못 하였다(미발표 자료, 유남진과 이석형). 본 연구에서 5%의 위암은 BAD 단백질을 발현하지 않았는데, 이는 일부 위암이 BAD의 불활성화를 단백질 발현 감소를 통해 나타내고, 이를 통해 위암의 고사를 감소시킬 가능성이 높은 것임을 알 수 있다.

위암에 대한 많은 지식의 축적과 조기 발견 방법의 개발에도 불구하고, 많은 위암환자 들이 매년 사망한다. 최근에는 고사조절을 통한 많은 암 치료 연구가 시도되고 있다. (1) Bcl-2 family member를 small molecule drug과 결합시켜서 종양의 고사를 유도하는 방법이 한가지 예이다.(18) 하지만, 이런 시도를 하기 위해서는 생체에서 암 세포가 표적단백질을 어느 정도 생성하는 지를 아는 것이 중요하다. 이런 관점에서 본 연구는 향후의 위암 고사조절 연구를 위한 중요한 자료라고 생각된다.

## 결 론

우리나라에서 악성 종양의 수위를 차지하고 있는 위암에서 BAD 단백질의 발현을 알아보고 그 발현 정도가 정상 위장 점막세포와 차이가 있는 지를 알아보고자 BAD의 발현을 면역조직화학법을 이용하여 60예의 진행성 위암에서 조사하였다.

95%의 위암은 BAD를 발현하였으며, 10예가 +, 24예가 ++, 23예가 +++의 발현 강도를 보였다. 정상 위 점막세포는 +의 BAD 발현을 보여서 암세포에 비해 낮은 BAD 발현 정도를 나타냈다. 이 결과를 통하여 위암은 대부분 BAD 단백질을 발현하고, 이를 통해 위암세포의 고사를 조절하는 것을 예측할 수 있었다.

## REFERENCES

1. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;39:1415-1430.
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
4. Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-291.
5. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-395.
6. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 1997;16:1686-1694.
7. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 2001;276:2780-2785.
8. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-1058.
9. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000;6:41-51.
10. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2003;97:545-553.
11. Krajewska M, Zapata JM, Meinhold-Heerlein I, Hedayat H, Monks A, Bettendorf H, Shabaik A, Bubendorf L, Kallioniemi OP, Kim H, Reifemberger G, Reed JC, Krajewski S. Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 2002;4:129-140.
12. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989;57:79-88.
13. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-969.
14. Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, Kiyohara T, Tsutsui S, Kitamura S, Nagasawa Y, Nakahara M, Kanayama S, Matsuzawa Y. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000;60:4328-4330.
15. Kitada S, Krajewska M, Zhang X, Scudiero D, Zapata JM, Wang HG, Shabaik A, Tudor G, Krajewski S, Myers TG, Johnson GS, Sausville EA, Reed JC. Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human

- tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 1998;152:51-61.
16. Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of *Fas (Apo-1/CD95)* gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999;154:1785-1791.
17. Shin MS, Kim HS, Kang CS, Park WS, Kim SY, Lee SN, Lee JH, Park JY, Jang JJ, Kim CW, Kim SH, Lee JY, Lee SH. Inactivating mutations of *CASP10* gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2002;99:4094-4099.
18. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 2003;3:17-22.
-