

비소세포 폐암에서 단클론항체 M30을 이용한 세포자멸사 측정

김광일* · 이헌재** · 이 건** · 임창영**

Detection of Apoptosis by M30 Monoclonal Antibody in Non-small Cell Lung Carcinomas

Gwang Il Kim, M.D.*, Hyeon Jae Lee, M.D.**, Gun Lee, M.D.**, Chang Young Lim, M.D.**

Background: Apoptosis plays a crucial role in carcinogenesis, as well as in development and tissue homeostasis. Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated nick end labelling (TUNEL) and *in situ* nick end labelling (ISEL) have been used to investigate the apoptosis in tissues. Since the introduction of the M30 monoclonal antibody to overcome drawbacks of TUNEL and ISEL, the apoptosis in various tumors, with the exception of pulmonary carcinomas, has been studied. In this study, attempts were made to examine the correlation of apoptosis in non-small cell carcinomas, using both M30 and the expression of p53 protein, with the clinicopathological factors.

Material and Method: Forty five patients with surgically resected non-small cell carcinomas were included. Immunohistochemical staining with M30 and p53 monoclonal antibody were performed, and their expressions compared with the clinicopathological features. The overall survival time and recurrence-free survival time were calculated, and the factors influencing the survival time analyzed using a univariate analysis. The effects of the expression status of M30 and p53 on the risks of cancer related to both death and recurrence were evaluated using a multivariate analysis. **Result:** The p53 positive group had many more M30 positive cells than the p53 negative group (p53 positive group; 61.7 ± 26.8 cells vs. p53 negative group; 45.6 ± 29.6 cells, $p=0.005$) and significantly more p53 positive patients showing at least 10 positive cells (apoptotic index, $AI \geq 1$) on M30 staining (p53 positive group; 52.4% [11/21] vs. p53 negative group 16.7% [4/24], $p=0.025$). In the univariate analysis, the survival times in relation to smoking (pack-year), performance status (PS) and AI showed significant differences. The multivariate analysis demonstrated the relative risk (R.R) of cancer death increased almost 7.5-fold (R.R 7.482; 95% CI 1.886 ~ 29.678; $p=0.004$) and the risk of recurrence almost 3.8-fold (R.R 3.795; 95% CI; 1.184 ~ 12.158; $p=0.025$) in the high AI (≥ 1) compared to the low AI (< 1) group. There was no prognostic effect of p53 expression on the survival time or risk of cancer death and recurrence. **Conclusion:** In non-small cell lung carcinomas, M30 immunohistochemistry was an excellent method for analyzing apoptosis; the high apoptotic index could be an adverse prognostic predictive factor.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2007;40:114-121)

Key words: 1. Lung neoplasms
2. Cell death
3. Genes, suppressor, tumor

*포천중문의과대학교 분당차병원 병리과

Department of Pathology, CHA General Hospital, CHA University

**포천중문의과대학교 분당차병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Bundang CHA General Hospital, CHA University

논문접수일 : 2006년 12월 12일, 심사통과일 : 2006년 12월 22일

책임저자 : 이헌재 (463-712) 경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지, 포천중문의과대학교 분당차병원 흉부외과

(Tel) 031-780-5856, (Fax) 031-780-5857, E-mail: hjlee@cha.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

서 론

생명체는 항상성 유지를 위해 세포의 분열과 더불어 세포사(Cell death)가 적절히 균형을 이루어야 한다. 세포사 중 특히 세포자멸사(Apoptosis)는 태아 발달이나 월경 등과 같은 정상적인 생리적 현상으로 나타나기도 하지만, 어떤 경우는 전신적 혹은 국소적으로 증가하거나 감소하여 질병을 유발하기도 한다[1].

종양 발생기전에 관한 연구를 통해 세포자멸사에 관련된 많은 유전물질들이 보고되었으며, 특히 세포주기의 핵심 조절자인 p53은, DNA 손상 및 돌연변이에 대한 반응으로 세포주기 진행을 저지하거나 세포자멸사를 유발한다[2]. p53 유전자가 돌연변이이나 이형접합성 소실 등에 의해 비정상 p53 단백질을 생산하게 되면, 체내 다른 유전자의 돌연변이를 잘 발견할 수 없고, 비정상 유전정보를 가진 세포의 이상 분열을 막지 못하게 되어 결국 종양에 이르게 된다[3]. 이와 같이 p53은 다양한 종양의 발생에 관여할 뿐 아니라 종양의 예후인자 및 치료 표적물질로 연구되고 있다[4].

조직 내의 세포자멸사를 측정하는 방법으로 전통적으로는 TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated nick end labelling)법이나 ISEL (*in situ* nick end labelling)법 등이 이용되었으나, 반응세포의 비특이성 및 결과 판독의 주관성 등으로 인해 논란의 대상이 되고 있다. 최근 이러한 단점을 보완할 수 있는 단클론항체 M30이 소개되어 많은 상피세포암에서 세포자멸사 연구가 진행되었다[5]. M30은 caspase의해 분해된 cytokeratin 18의 생산물을 표적으로 하는 항체로서, 세포자멸사 초기에 상피세포의 세포질에만 국한되어 발현된다. M30을 이용한 면역조직화학염색은 방법이 용이하고 판독이 비교적 명확하여 상피세포암의 세포자멸사 연구에서 TUNEL법을 대체할 수 있는 방법으로 주목받고 있다[6].

현재까지 인체 조직에서는 대장암, 가슴샘종, 유방암, 자궁내막암 등에서 M30을 이용한 세포자멸사 연구가 진행되어 왔으나 인체 폐암에 대한 연구는 전무하였다[7-10].

따라서 저자들은 단클론항체 M30을 이용해 인체 폐암의 세포자멸사 양상을 살펴보고, 관찰된 세포자멸사 양상이 세포자멸사 경로의 핵심 물질이라고 할 수 있는 p53의 면역염색 발현양상 및 임상 병리양상과 갖는 연관성을 살펴 보고자 하였다. 본 연구는 폐암에서 M30을 이용한 세포자멸사 측정과 분석을 통한 임상양상의 연관성 규명

에 관한 첫 번째 보고이다.

대상 및 방법

1) 대상

1995년 10월부터 2006년 5월까지 비소세포폐암으로 진단받고, 근치적 목적으로 폐엽절제술 이상의 수술을 받은 환자 중, 수술 전에 항암 화학요법이나 방사선 치료를 실시하지 않은 환자 45명을 대상으로 하였다. 폐암의 분류는 2003년 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 분류를 따랐고, 각 종양의 조직학적 분화도를 판독, 기록하였다. 종양을 대표할 수 있는 수술 조직의 파라핀 블록을 선택하여 M30, p53 면역조직화학염색을 실시하였다. 수술소견과 조직병리소견을 통해 종양이 완전 절제된 것으로 판정된 환자 41명을 대상으로 술 후 생존기간을 구하였다. 환자의 최종 추적관찰시점은 2006년 11월말로 하였다.

2) 면역조직화학염색

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작된 파라핀 포매 블록을 5 μ m 두께로 잘라 유리슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 탈 파라핀 과정과 합수과정을 거친 파라핀 절편은 조직 내의 peroxidase가 활성화되지 않도록 3% 과산화수소에 10분간 처리하고, 10 mM citrate buffer (pH 6.0)를 넣고 전자레인지에서 10분간 끓였다. Phosphate-buffered saline (PBS)으로 2분씩 3회 세척한 후, 배경의 비특이적 결합을 방지하기 위해서 blocking solution으로 10분간 전처리하였다. 그런 다음 일차항체 M30 CytoDEATH (1 : 150, Roche, Mannheim, Germany) 및 p53 (1 : 500, Dako, Copenhagen, Denmark)을 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 tris buffer로 씻어냈다. Biotinylated secondary antibody와 streptavidin-HRP conjugate (Dako LSAB Kit, K0675, Carpinteria, CA, USA)를 각 10분간 처리하여 tris buffer로 수세하였다. 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)로 발색하여 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

3) 면역조직화학염색 결과의 판독

M30 면역염색은 현미경하에서 1,000개의 종양세포를 세어 형태학적으로 세포자멸사에 합당하고 M30에 양성인 세포 수를 세어 기록한 후, 백분율을 계산하여 세포자멸사 지수(Apoptotic Index, AI)로 삼았다. 대상 환자는 AI에

따라 Low AI 군(AI<1)과 High AI 군(AI≥1)으로 분류하였다. p53 단백질 발현 정도는 점수화하여 염색 강도(0; 무염색, 1; 약염색, 2; 중등도 염색, 3; 강염색)와 염색된 세포의 비율(0; 0%, 1; 0~10%, 2; 11~50%, 3; >50%)을 기록하였다. 이 중 염색 강도가 2점 이상이고 염색된 세포의 비율의 점수가 2점 이상인 경우를 양성으로 판정하였다.

4) 통계학적 분석

M30 염색과 p53 염색의 발현 정도의 상관관계는 카이제곱 검정과 Mann-Whitney test를, 그리고 각 염색의 발현 정도와 임상 특성 및 조직병리소견과의 상관관계는 카이제곱 검정을 이용하여 분석하였다.

술 후 생존기간과 무재발 생존기간은 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 구하였고, Log-rank test를 실시하여 M30 염색과 p53 염색 발현 정도에 따른 기간의 차이를 비교하였다. M30 염색과 p53 염색의 발현 정도가 술 후 사망 및 재발위험에 미치는 영향을 알아보기 위해 다변량 분석으로 Cox proportional hazard regression을 실시하였다. p값이 0.05 이하일 경우 통계적 유의성이 있다고 판정하였다

결 과

1) 대상 환자의 임상적 특성

환자는 45명이었고 연령 분포는 43세에서 78세까지로 평균 연령은 58.6±8.9세였다. 남자가 37명으로 더 많았고 남녀 구성비는 4.6 : 1이었다. 폐암의 조직학적 분류에 따른 분포는 편평세포암이 20예, 세엽형 샘암종이 22예, 기타 조직형이 3예였다. 조직학적 분화도는 고분화 11예, 중등도분화 22예, 저분화 12예였다. TNM병기는 I기 17예, II기 18예, III기 10예였다. 수술의 종류는 단일 폐엽절제술 32명, 이엽 폐절제술 3명, 전폐절제술 10명이었고, 종양의 완전절제가 41명, 불완전 절제가 4명이었다(Table 1).

2) 면역조직화학염색상과 임상병리학적 특성

M30 양성세포는 hematoxylin 대조염색에서 세포자멸사의 특징인 농축된 염색질과 분절 핵을 가진 세포의 세포질에 강염색상을 보였다(Fig. 1A, B). 종양주변의 정상 폐 실질에서는 매우 드물게 양성인 세포자멸사 세포가 관찰되었다. 전체 환자 45명에서 보인 M30 양성세포 수는 평균 53.2±133.8개(최소 0~최대 624)로 매우 불균질한 분포를 보였다. 1,000개의 종양세포 중 M30 양성세포가 10개 미만(AI<1)인 환자가 30명, 10개 이상(AI≥1)인 환자가 15

Table 1. Clinico-pathological features of patients

Variables	M30		p53		p-value
	AI*1	AI≥1	(-)	(+)	
Sex					0.095
Male (n=37)	27	10	21	16	0.443
Female (n=8)	3	5	3	5	
Age (yr)					1.000
<60 (n=23)	15	8	13	10	0.768
≥60 (n=22)	15	7	11	11	
Histology					0.750
Squamous (n=20)	14	6	13	7	0.232
Adeno (n=22)	14	8	10	12	
Performance Status					0.492
0+1 (n=32)	20	12	17	15	1.000
2 (n=13)	10	3	7	6	
Smoking (pack-year)					0.732
<40 (n=32)	22	10	15	17	0.205
≥40 (n=13)	8	5	9	4	
Differentiation					0.070
Well (n=11)	10	1	9	2	0.040
Non-well (n=34)	20	14	15	19	
Stage					0.710
I+II (n=35)	24	11	18	17	0.729
III (n=10)	6	4	6	4	
Lymphatic invasion					0.095
(-)(n=37)	27	10	21	16	0.443
(+)(n=8)	3	5	3	5	
Vascular invasion					0.234
(-)(n=36)	22	14	19	17	1.000
(+)(n=9)	8	1	5	4	
Operation type					0.134
Lobectomy (n=32)	20	12	15	17	0.284
Pneumonectomy (n=10)	9	1	7	3	
Op result					0.545
Complete R† (n=43)	28	15	23	20	1.000
Incomplete R (n=2)	1	1	1	1	

*AI=Apoptotic index; †p-value=Chi-square test; †R=Resection.

명이었다. 두 환자군은 술 전 환자특성과 종양특성, 조직병리학적 특성에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1).

p53 양성세포는 종양세포의 핵에서 강 염색상을 보였다(Fig. 1C, D). 전체 환자 45명 중 면역염색상 p53 양성 환자가 21명(p53 양성군), p53 음성 환자가 24명(p53 음성군)이었다. p53 양성군은 p53 음성군에 비해 종양세포의 분화도가 좋지 않아 조직병리소견상 고분화도의 비율이 유

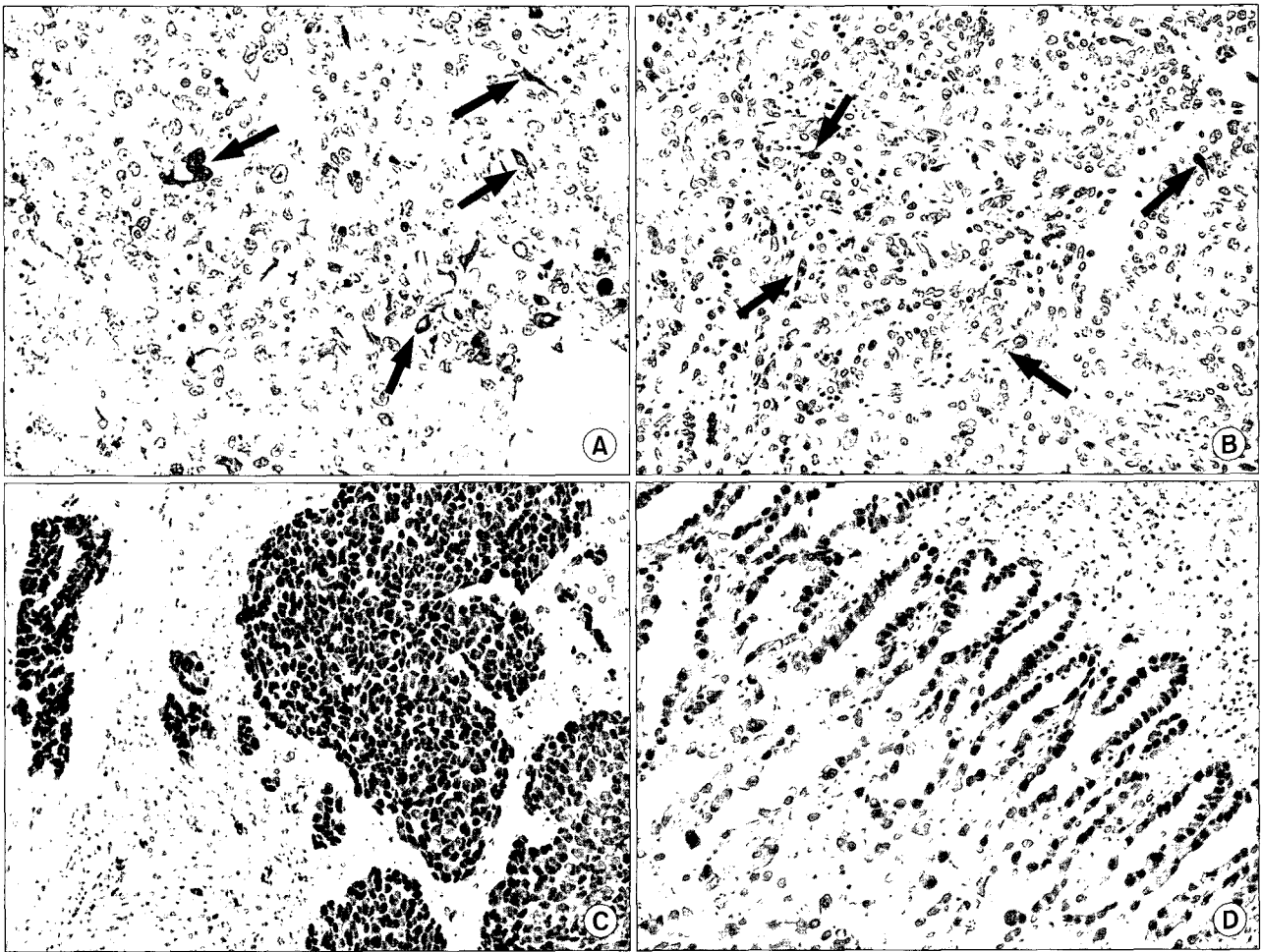


Fig. 1. Immunohistochemical staining for M30 (A, B) and p53 (C, D) in squamous cell carcinomas (A, C) and adenocarcinomas (B, D). The M30 positive cells (arrows) are randomly scattered ($\times 200$).

의하게 적었다(p53 양성군; 9.5% [2/21] vs. p53 음성군 37.5% [9/24], $p=0.040$). 그 외의 술 전 환자특성과 종양특성, 조직병리학적 특성에서는 두 군 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). M30과 p53 발현 정도를 비교해보면, M30 양성세포 수는 p53 양성군이 p53 음성군보다 유의하게 많았다(p53 양성군; 61.7 ± 26.8 개 vs. p53 음성군; 45.6 ± 29.6 개, $p=0.005$). 또한 M30 양성세포 수가 10개 이상인 환자 수도 p53 양성군이 p53 음성군보다 유의하게 많았다(p53 양성군 52.4% [11/21] vs. p53 음성군 16.7% [4/24], $p=0.025$)(Table 2).

3) 생존기간 분석

수술소견과 조직병리소견에서 완전절제로 판정된 43명의 환자를 대상으로 술 후 재발과 사망여부를 추적조사하

였다. 추적기간 중 17명에서 폐암이 재발하였고, 15명이 폐암으로 사망하였다. 추적기간은 평균 36.5 ± 29.4 개월(범위; 4~98개월)이었다. 환자의 술 후 생존기간은 평균 66.2 ± 6.5 개월이었고 무병생존기간은 평균 64.9 ± 7.2 개월이었다.

술 전 환자특성과 종양특성, 조직병리학적 특성별로 생존기간과 무병생존기간을 구하였고 각 특성의 수준에 따라 생존기간에 차이가 있는지 비교하였다(Table 3). 단변량 분석에서는 흡연량, 활동도, 그리고 AI 수준에 따라 술 후 생존기간에 유의한 차이를 나타냈고, PS와 AI 수준에 따라 무병생존기간에 유의한 차이를 나타냈다. p53 발현 양상은 술 후 생존기간과 무병생존기간에 영향을 미치지 않았다.

다변량 분석을 통해 M30과 p53이 술 후 사망과 재발 위

Table 2. Comparison of the expression of M30 and p53

Variables	p53		p-value
	(-)	(+)	
AI < 1	20	10	0.025 [†]
AI ≥ 1	4	11	
M30*	45.6 ± 29.6	61.7 ± 26.8	0.005 [‡]

*=Mean number ± S.E of M30 positive cells; [†]=Chi-square test; [‡]=Mann-whitney test.

험도에 미치는 영향을 분석하였다(Table 4). Cox proportional hazard regression을 실시하여 교란변수의 영향을 제거한 결과, M30 양성세포 수가 10개 이상일 때 수술 후 암사망 위험도(R.R 7.482; 95% CI 1.886~29.678; p=0.004)와 재발 위험도(R.R 3.795; 95% CI 1.184~12.158; p=0.025)가 유의하게 증가하는 결과를 나타냈다(Fig. 2, 3). p53 발현 양상은 수술 후 암사망 위험도와 재발 위험도에 영향을 미치지 않았다.

고 찰

인체조직의 세포자멸사 과정에서 caspase에 의해 분해된 cytokeratin 18이 상피세포에 광범위하게 존재하는 점에 착안하여 cytokeratin 18에 대한 단클론항체 M30이 소개되었다. Leers 등[5]은 비소세포폐암 세포주와 인체 대장암 파라핀 조직에서 세포자멸사 측정의 전통적 기법인 TUNEL 법, annexin V를 이용한 형질외막 내 포스파티딜 세린 검출법 등의 방법과 M30 항체에 대한 면역조직화학 염색을 비교함으로써, M30 항체에 대한 염색이 세포자멸사 연속 단계 중 더 초기에 관찰됨을 보고하였다. 이후 대장암 등을 포함한 다양한 종양에서 M30 항체를 이용한 세포자멸사 연구가 수행되었으나 폐암에서는 아직 그 보고가 없었다. Cytokeratin 18을 표적으로 한 M30 면역염색의 장점은 HE 염색에서 관찰되는 세포자멸사의 형태학적 특징을 보이는 세포에만 선택적으로 염색된다는 점이다[11]. 본 연구에서 사용된 비소세포암의 증례들에서도 주변 정상조직의 정상세포나 온전한 형태를 유지하고 있는 종양세포, 그리고 세포자멸사가 아닌 괴사조직 등에서는 양성 반응을 보이지 않아 세포자멸사 세포를 비교적 쉽게 감별할 수 있었다.

Table 3. Univariate analysis of overall and recurrence-free survival

Variables	Overall survival*	p-value [†]	Recurrence-free survival	p-value
Sex		0.832		0.381
Male (n=35)	66.6 ± 7.2		57.5 ± 7.6	
Female (n=8)	62.8 ± 10.4		68.1 ± 12.1	
Age (yr)		0.959		0.640
< 60 (n=23)	60.5 ± 7.8		58.1 ± 8.8	
≥ 60 (n=20)	63.7 ± 9.8		56.5 ± 10.0	
Histology		0.560		0.710
Squamous (n=18)	69.5 ± 9.9		62.7 ± 10.1	
Adeno (n=22)	58.9 ± 8.2		55.6 ± 9.1	
Performance Status		0.022		0.029
0 + 1 (n=31)	72.2 ± 7.3		69.4 ± 7.8	
2 (n=12)	41.17 ± 12.3		33.1 ± 9.1	
Smoking (pack-year)		0.049		0.056
< 40 (n=31)	71.1 ± 6.8		65.2 ± 7.6	
≥ 40 (n=12)	30.2 ± 5.3		26.4 ± 5.5	
Differentiation		0.708		0.323
Well (n=11)	65.0 ± 9.3		65.1 ± 10.0	
Non-well (n=32)	63.6 ± 8.2		55.3 ± 8.5	
Stage		0.717		0.267
I + II (n=33)	66.7 ± 7.3		63.6 ± 7.6	
III (n=10)	41.2 ± 4.3		30.1 ± 6.4	
Lymphatic invasion		0.752		0.970
(-)(n=36)	64.0 ± 6.8		59.5 ± 7.3	
(+)(n=7)	35.9 ± 4.8		30.4 ± 6.3	
Vascular invasion		0.667		0.977
(-)(n=35)	63.8 ± 7.4		59.6 ± 7.6	
(+)(n=8)	56.6 ± 5.6		34.6 ± 7.3	
P53		0.874		0.910
(-)(n=23)	63.7 ± 8.8		57.6 ± 9.1	
(+)(n=20)	66.1 ± 10.4		60.2 ± 9.7	
M30		0.004		0.051
AI [‡] < 1 (n=28)	74.9 ± 6.8		66.8 ± 7.7	
AI ≥ 1 (n=15)	30.5 ± 5.5		26.8 ± 5.3	

*=Months, Kaplan-meier method; [†]=Log-rank test; [‡]=Apoptotic index.

p53 단백질은 비소세포 폐암의 약 50%, 소세포 폐암의 약 70% 정도에서 돌연변이를 보인다[12]. 정상적으로 p53은 세포자멸사의 주요 경로인 외인성 경로와 내인성 경로 모두에 관여함으로써 세포자멸사를 유발하는 중심인자로 잘 알려졌다[13]. 면역염색에 이용되는 p53 항체는 정상 p53 단백질은 물론 반감기가 더 긴 돌연변이 p53 단백질

Table 4. Multivariate analysis of overall and recurrence free-survival

	Overall survival			Recurrent-free survival		
	R.R*	95% CI [†]	p-value [‡]	R.R	95% CI	p-value
Smoking (≥40 py)	2.633	0.646~10.727	0.177	1.278	0.402~4.058	0.678
PS (2)	5.269	1.524~18.221	0.009	3.795	1.308~11.011	0.014
AI (≥1)	7.482	1.886~29.678	0.004	3.795	1.184~12.158	0.025
P53 (+)	0.539	0.151~1.924	0.342	0.478	0.144~1.588	0.228
Non-well diff	1.012	0.266~3.856	0.986	1.860	0.531~6.514	0.332
Age (≥60)	0.917	0.298~3.163	0.961	1.311	0.461~3.724	0.611

*=Relative risk; [†]=Confidence interval; [‡]=Cox proportional hazard regression ^{||}=Differentiation.

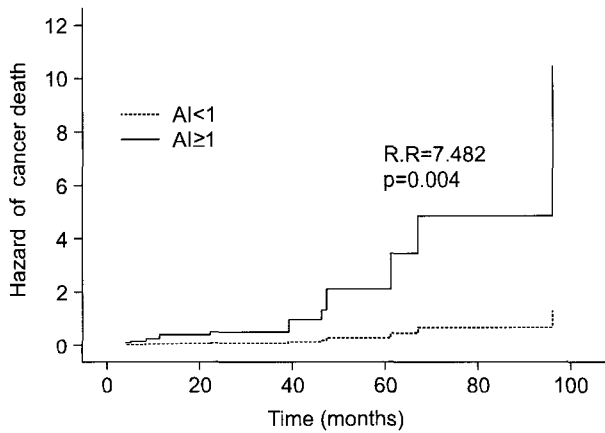


Fig. 2. Hazard of survival according to apoptosis index (AI). R.R=Relative risk; AI=Apoptosis Index.

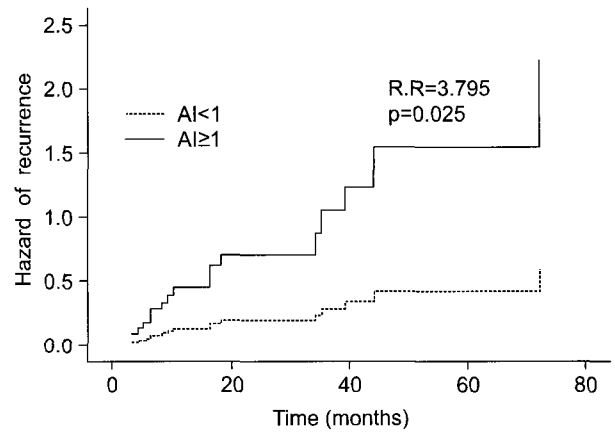


Fig. 3. Hazard of recurrence according to apoptosis index (AI). R.R=Relative risk; AI=Apoptosis Index.

에도 반응하게 된다. 따라서 p53 면역염색에 광범위한 양성을 보이는 종양의 경우 돌연변이에 의한 이상 p53 단백질이 많아졌고, 때문에 세포자멸사 기전의 일부가 손상되어 있다고 볼 수 있다. 종양의 세포자멸사 연구에서 세포자멸사 정도와 p53이나 bcl-2와 같은 관련 단백질 발현의 상관관계에 대해서는 종양의 종류 및 연구 방법에 따라 차이가 있다[14,15]. 본 연구결과에서는 p53 발현율이 높은 종양일수록 세포자멸사 지수도 높았다. p53 단백질의 이상은 DNA 손상을 걸러내어 자멸사에 이르게 하는 과정을 수행하지 못하므로 악성화될수록 세포는 자멸사 과정을 회피하게 된다[16]. 하지만 역설적으로 악성 종양의 경우 손상된 유전자를 가진 종양세포가 많아짐에 따라, 이를 제거하려는 기전이 활성화됨으로써 오히려 세포자멸사가 많아진다고 예측할 수 있다[17,18]. 연구자에 따라서는 악성 종양의 초기 단계인 이형성 과정에서부터 세포자

멸사가 증가하기 시작하여, 진행성 암에서는 오히려 감소한다는 보고도 있다[19]. 본 연구 결과에서 M30 양성세포 수가 많은 환자군, 즉 세포자멸사가 많이 발생한 환자군에서 유의하게 높은 사망위험도와 재발위험도를 보였다. 이는 비소세포폐암에서 세포자멸사 정도가 환자의 예후 예측인자로 이용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 더 많은 증례의 비소세포폐암에서 M30 항체를 이용한 세포자멸사 연구를 통해 더욱 면밀한 예후인자로서의 검증이 뒤따라야 할 것이며, 세포자멸사 경로에 관여하는 p53 이외의 다른 물질과의 관계 또한 규명하는 것이 필요하다고 판단된다. 비소세포폐암 중 편평세포암, 샘암종 등은 전암단계의 병변이 잘 알려져 있으므로 이에 대한 연구를 병행함으로써, 세포자멸사가 비소세포 폐암 발생의 전 과정에 관여하는 기전을 이해하는 데 도움을 얻을 수 있을 것이다.

결 론

이상의 연구에서 단클론항체 M30을 이용한 면역조직화학염색이 비소세포폐암의 세포자멸사를 관찰하는 데 매우 유용한 방법임을 확인하였으며, 근치적 폐절제술을 실시한 환자의 예후를 예측하는 데 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다. p53 단백질 발현 정도가 높을수록 세포자멸사 지수가 높게 나온 것은 비소세포암에서의 세포자멸사가 p53과는 독립적으로 발생하며, 세포자멸사 경로의 다른 핵심 물질이 조절에 관여하고 있을 가능성을 제시하였다.

참 고 문 헌

1. Grimsley C, Ravichandran KS. *Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals.* Trends Cell Biol 2003;13:648-56.
2. Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, et al. *The p53 tumour suppressor gene.* Br J Surg 1998;85:1460-7.
3. Valerie K, Povirk LF. *Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair.* Oncogene 2003;22:5792-812.
4. Vousden KH, Prives C. *p53 and prognosis: new insights and further complexity.* Cell 2005;120:7-10.
5. Leers MP, Kölgen W, Björklund V, et al. *Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis.* J Pathol 1999;187:567-72.
6. Walker JA, Quirke P. *Viewing apoptosis through a 'TUNEL'.* J Pathol 2001;195:275-6.
7. Backus HHJ, Van Groeningen CJ, Vos W, et al. *Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastases.* J Clin Pathol 2002;55:206-11.
8. Park SH, Kim HK, Kim H, Ro JY. *Apoptosis in thymic epithelial tumors.* Pathol Res Pract 2002;198:461-7.
9. Fehm T, Becker S, Pergola-Becker G, et al. *Presence of apoptotic and non apoptotic disseminated tumor cells reflect response to neoadjuvant systemic therapy (NST) in breast cancer.* 2006;8(5):R60 [Epub ahead of print].
10. Pijnenborg JMA, van de Broek L, Dam de Veen GC, et al. *TP53 overexpression in recurrent endometrial carcinoma.* Gynecol Oncol 2006;100:397-404.
11. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. *Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis.* J Cell Biol 1997;138:1379-94.
12. Zochbauer-Muller S, Gazdar AF. *Molecular pathogenesis of lung cancer.* Annu Rev Physiol 2002;64:681-708.
13. Vousden KH, Lu X. *Live or let die: the cell's response to p53.* Nat Rev Cancer 2002;2:594-604.
14. Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, Gazdar AF. *Apoptosis and lung cancer: a review.* J Cell Biochem 2003;88:885-98.
15. Törmänen U, Nuorva K, Soini Y, Pääkkö P. *Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium.* Br J Cancer 1999;79:996-1002.
16. Hanahan D, Weinber RA. *The hallmarks of cancer.* Cell 2000;100:57-70.
17. Townson JL, Naumov GN, Chambers AF. *The role of apoptosis in tumor progression and metastasis.* Curr Mol Med 2003;3:631-42.
18. Koornstra JJ, Rijcken FEM, de Jong S, Hollema H, de Vries EGE, Kleibeuker JH. *Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the correlation with morphological criteria in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas.* Histopathol 2004;44:9-17.
19. Chen Y, Sato M, Fujimura S, et al. *Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in carcinogenesis of squamous cell lung cancer.* Anticancer Res 1999;19:1351-6.

=국문 초록=

배경: 종양 발생기전에 있어서 세포자멸사가 중요한 역할을 한다. 조직 내의 세포자멸사 측정은 TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated nick end labelling), ISEL (*in situ* nick end labelling) 등의 방법을 쓰지만, 반응 세포의 비특이성 및 결과 판독의 주관성 등이 논란의 대상이 되어왔다. 최근 이러한 단점을 보완할 수 있는 단클론항체 M30이 소개되어, 인체 조직의 대장암, 가슴샘종, 유방암, 자궁내막암 등에서 M30 면역염색을 이용한 세포자멸사 연구가 있었으나 폐암에 대한 연구는 없었다. 저자들은 비소세포 폐암에서 M30 면역염색에 의해 발현되는 세포자멸사 양상이 세포주기 핵심조절자인 p53 면역염색 발현양상 및 임상양상과 갖는 연관성을 살펴보고자 하였다. **대상 및 방법:** 비소세포 폐암으로 근치적 절제수술을 받은 환자 45명을 대상으로 하였다. M30과 p53 면역조직화학염색에 실시하여 각 항체의 발현양상과 임상 병리학적 특성을 비교 분석하였다. 술 후 생존기간과 무병 생존기간을 구하였고, 단변량 분석을 실시하여 생존기간에 영향을 미치는 인자를 알아보았다. 다변량 분석을 실시하여 M30과 p53 발현양상이 술 후 사망위험도 및 재발위험도에 미치는 영향을 알아보았다. **결과:** M30 양성세포 수는 p53 양성군이 p53 음성군보다 유의하게 많았고(p53 양성군 61.7 ± 26.8 개 vs. p53 음성군 45.6 ± 29.6 개, $p=0.005$), 세포자멸사 지수가 1 이상(Apoptosis Index, $AI \geq 1$)인 환자 수도 p53 양성군에서 유의하게 많았다(p53 양성군 52.4% [11/21] vs. p53 음성군 16.7% [4/24], $p=0.025$). 단변량 분석에서는 흡연량, 활동도(Performance Status, PS), 그리고 AI가 술 후 생존기간에 유의한 차이를 보였다. 다변량 분석에서는 AI가 높은 군에서 수술 후 암사망 위험도(Relative risk, R.R 7.482; 95% Confidence Interval, CI 1.886~29.678; $p=0.004$)와 재발 위험도(R.R 3.795; 95% CI 1.184~12.158; $p=0.025$)가 유의하게 증가하였다. p53 발현양상은 수술 후 생존기간과 암사망 위험도 및 재발 위험도에 영향을 미치지 않았다. **결론:** 이상의 연구에서 단클론 항체 M30을 이용한 면역조직화학염색이 비소세포 폐암의 세포자멸사를 관찰하는 데 매우 유용한 방법임을 확인하였으며, 환자의 예후를 예측하는 데에도 도움이 될 수 있음을 알 수 있었다.

- 중심 단어 : 1. 폐암
2. 세포자멸사
3. 종양억제인자