

Expressions of Tumor-Related Proteins and TGF- β 1 in Colon Cancer

Tai-Jeon Kim¹ and Tae-Geun Kim^{2,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Eulji University, Sungnam 461-713, Korea.

²Department of Pathology, Hanyang University Guri Hospital, Guri 471-701, Korea

This study was designed to investigate the correlation between the expression rate of p53 and p21 proteins, c-erbB-2 oncoprotein and TGF- β 1 and tumor prognostic factors in colon cancer including the tumor size, histological differentiation and Dukes' stage. The expression rate of p53 protein was 11.4% (4 cases) at well differentiation, 48.6% (17 cases) at moderately differentiation, and 17.1% (6 cases) at poorly differentiation. In other words, the poorer differentiation, the higher the expression rate of p53 protein ($P < 0.05$). The expression rate of p21 protein was 17.1% (6 cases) at well differentiation, 40.0% (14 cases) at moderately differentiation, and 8.6% (3 cases) at poorly differentiation, indicating that, as the histological malignant degeneration progressed, the expression rate of p21 protein decreased distinctively ($P < 0.05$). However, the correlation of the above mentioned proteins with tumor size and Dukes' stage was not recognized. The expression rate of c-erbB-2 oncoprotein was 11.4% (4 cases) at well differentiation, 54.3% (19 cases) at moderately differentiation, and 17.1% (6 cases) at poorly differentiation, indicating that the poorer differentiation, the higher expression rate of c-erbB-2 oncoprotein ($P < 0.05$). The expression rate of TGF- β 1 was 17.1% (6 cases) at well differentiation, 48.6% (17 cases) at moderately differentiation, and 11.4% (4 cases) at poorly differentiation. As Dukes' stage progressed, the expression rate of TGF- β 1 was 8.6% (3 cases) in stage A, 20.0% (7 cases) in stage B, 37.1% (13 cases) in stage C, and 11.4% (4 cases) in stage D. There was a difference in expression rates between Dukes' stages ($P < 0.05$). In 10 cases, p53 protein was positive while p21 protein was negative, and in 6 cases, p53 protein was negative whereas p21 was positive ($P < 0.05$). Therefore, a statistically significant inverse correlation between the expression rate of p53 protein and that of p21 protein was observed. In conclusion, since there was a significant correlation between histological differentiation of colon cancer and the expressions of p53 and p21 proteins and c-erbB-2 oncoprotein, and between Dukes' stage and the expression of TGF- β 1, it was confirmed that the overexpression of p53 and p21 proteins, c-erbB-2 oncoprotein, and TGF- β 1 is closely associated with the occurrence of colon cancer and its progress. Accordingly, this study may be greatly beneficial to the presumption of diagnosis, treatment and prognosis of colon cancer patients.

Key Words: Prognostic factors, p53 protein, p21 protein, c-erbB-2 oncoprotein, TGF- β 1, Histological differentiation, Dukes' stage

서 론

대장암의 발생이나 치료에 관련된 병리학적 예후인자와 이러한 예후인자에 영향을 주는 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 (Elkablawy et al., 2001), 특히 세포의 분열에 관련된 p53 및 p21 종양 유전자, 세포의

성장에 관련된 c-erbB-2 종양 유전자 그리고 세포의 변이 성장 유전자인 TGF- β 에 대한 관심이 높아지고 있다.

p53 유전자는 세포의 증식을 억제하며 손상된 DNA의 복구를 유도하지만, 복구가 불가능한 경우 세포자멸사를 유도하게 된다 (Kerr et al., 1994). 그러나 정상 p53 유전자에 변이가 나타나면 세포는 증식 억제와 세포자멸사 유발기능의 장애가 발생하고 손상된 DNA를 가진 세포는 계속적으로 분열하므로 암화과정의 일어날 수 있다.

p21 단백질은 CDK의 보편적인 억제인자로 알려져 있으며 정상 p53 단백질에 의해 유도된다. 이러한 p21 단백질은 cyclin/CDK 복합체의 활성화를 억제하여 Rb (Retinoblast)

*논문 접수: 2007년 8월 2일

수정제접수: 2007년 9월 5일

†교신저자: 김태근, (우)471-701 경기도 구리시 교문동 249-1, 한양대학교 구리병원 병리과

Tel: 031-560-2648, e-mail: blueyaya@hanmail.net

의 인산화를 제어함으로써 S기로 진입이 차단되고 세포 자연사를 유도하는 등 정상 p53 단백질의 기능을 간접적으로 반영한다. 그러나 대장암 세포주 (cell line)를 이용한 연구에서 TGF- β 1이 p53과 독립된 경로를 통하여 p21을 활성화시켜 세포자연사를 유도하는 것으로 알려져 (Yamamoto et al., 1996; Akagi et al., 1996) p21 단백질이 p53 의존성 경로 이외에 여러 가지 다른 비의존성 경로로도 유도되는 것으로 사료된다. 또한 다양한 암종에서도 p21 단백질은 예후인자와 연관되어 상관관계가 있음이 인정되고 (Yasui et al., 1996; Ferrandina et al., 2000), 대장암에서도 p21 단백질의 소실은 조직의 악성화의 진행과 관련성이 있고, 예후인자로서 인정되고 있다 (Zirbes et al., 2000).

c-erbB-2 종양단백질은 tyrosine kinase 활성을 갖는 원형질막성의 당단백질로 EGFR (epidermal growth factor receptor)과 구조적으로 상동성이 있어서 표피성장인자와 결합하여 세포의 증식과 성장에 관여한다. c-erbB-2 종양 유전자는 특히 상피에서 기원하는 악성종양 중 선암종에서 높게 관찰된다 (Hall et al., 1990; Slamon et al., 1989). 그리고 유방암과 난소암에서 c-erbB-2 종양 유전자의 활성화는 암종의 발육속도와 항암제에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Slamon et al., 1989). 그러나 대장암에서 c-erbB-2 종양단백질이 발현되는 원인 및 기전은 분명히 규명되어 있지 않은 실정이다.

TGF- β (transforming growth factor- β)는 세포의 성장과 분화, 세포의 기질의 축적, 혈관 형성 및 면역 조절에 관여하며 비정상적인 상피세포의 증식을 억제하는 사이토카인 (cytokine)으로 TGF- β 1, β 2 및 β 3의 이성체들이 존재한다. 그들 중 TGF- β 1이 우세한 형태이다. Newman et al. (1993)과 Freiss et al. (1993)은 TGF- β 1이 정상세포 이외에 대부분의 암에서 그 발현이 증가하고, 동일 종류의 암 세포 내에서도 그 발육억제 작용이 다른 것을 보고하였다. 그리고 인체의 대장암과 관련하여 Robson et al. (1996)은 TGF- β 1의 과발현은 환자의 예후를 좋지 않게 하는 독립적인 예후인자로 보고하였고, Manning et al. (1991)은 TGF- β 1 발현이 높으면 대장암 발생이 높은 것으로 보고하여 TGF- β 1이 대장암의 예후인자와 관련성이 있음을 제시하였다.

본 연구는 대장암에서 p53 단백질, p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 및 TGF- β 1의 발현을 보기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하여 종양의 예후인자들 중 종양의 크기, 조직학적 분화도, 그리고 Dukes' stage와의 상관성을 조사하여 대장암 환자의 진단, 치료 및 예후 추정에 필요

한 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

대장암으로 진단받고 외과적 대장절제술을 시행하기 전 방사선요법이나 약물요법 등의 보조적 치료를 받지 않은 환자들의 슬라이드 조직표본을 검색하여 비교적 고 정도 보존이 잘된 파라핀 블록들을 선정하였다. 그리고 그들 중 병리학적 자료검색이 가능한 검체 35예를 선택하여 본 연구 대상으로 하였다. 대조군으로는 선암종으로부터 5 cm 이상의 거리에 있는 정상 조직 5예를 선택 사용하였다.

2. 방 법

1) 병리학적 분석

환자들의 병리 보고서를 재검토 하여 나이 및 종양의 크기를 확인하였고, Harris hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하여 조직학적 분화도와 병기를 각각 World Health Organization (WHO)과 modified Dukes' stage의 분류법에 따라 분류하였다.

2) 면역조직화학적 염색

4 μ m 두께로 박절한 조직절편을 3-Aminopropyl triethoxy-silane (Sigma)용액이 코팅된 슬라이드에 부착시킨 후 ABC 염색법을 이용해 p53와 p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 및 TGF- β 1을 검색하기 위한 면역조직화학적 염색을 아래와 같이 실시하였다.

p53과 p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 및 TGF- β 1의 항원복구를 위해 탈 파라핀과 함수된 각각의 슬라이드 절편을 pH 6.0 10 mM 구연산 완충액에 담가 p53과 p21 단백질은 고압증기멸균기 (121 $^{\circ}$ C)에서, c-erbB-2 종양단백질과 TGF- β 1은 의료용 전자렌지 (microwave oven)에서 10분간씩 처리하였고, 10% H₂O₂ - methanol을 사용하여 내인성 인자의 활성을 억제시킨 다음 Tris 완충액으로 10분간 수세하였다. 그리고 일차항체인 p53 (DAKO, USA, clone DO-7 mouse monoclonal antibody, 1:100), p21 (DAKO, USA, clone SX53G8 mouse monoclonal antibody, 1:100), c-erbB-2 (DAKO, USA, rabbit polyclonal antibody, 1:200) 그리고 TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology, USA, rabbit polyclonal IgG, 1:100)를 각각의 슬라이드 절편에 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시키고, 여기에 biotin이 결합된 이차항체 (Anti - Mouse and Anti-Rabbit Ig)인 LSAB 2kit

Table 1. Distribution of age and tumor size in 35 cases diagnosed with colon cancer

Parameter	Classification	No. of patient (%)	Mean
Age (year)	≤ 60	19 (54.3)	57.7
	≥ 60	16 (45.7)	
Total		35 (100)	
Tumor size	< 7.3	20 (57.1)	06.5
	≥ 7.3	15 (42.9)	
Total		35 (100)	

(DAKO, USA)를 사용하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 다음으로 Tris 완충액으로 10분간 수세하고 Avidin Biotin Conjugate (ABC)을 떨어뜨려 실온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 Tris 완충액으로 10분간 수세하고 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB)를 사용하여 발색한 후 Mayer's hematoxylin 용액으로 대조염색을 실시한 슬라이드를 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 염색의 평가 및 통계처리

p53과 p21 단백질 발현의 판정은 핵에 갈색의 과립 상으로 염색되면 양성으로 판정하였다. c-erbB-2는 세포막을 따라 염색되면 양성으로 판정하였고, TGF-β1은 세포질에 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판정하였다.

평가는 통계처리를 위해 다섯 군으로 나누어 반정량적인 방법을 사용하여 종양세포 중 양성으로 염색된 세포의 백분율이 0~10%인 경우 group I, 11~30%인 경우 group II, 31~50%인 경우 group III, 51~75%인 경우 group IV 그리고 76% 이상인 경우 group V로 구분하였다. 통계 처리는 SPSS (Statistical Package Service Solution software) Windows version 8.0 프로그램을 이용하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

1. 병리학적 분석

대장암 35예의 연령 범위는 36~83세로 60세 미만인 경우는 19예였고 60세 이상인 경우는 16예였으며 평균 나이는 57.7세로 노년층에서 높게 나타났고, 종양의 크기 범위는 1.5~13 cm로 중간 수치인 7.3 cm 이하인 경우는 20예였고 7.3 cm 초과인 경우는 15예였다. 그리고 종양의 평균 크기는 6.5 cm으로 나타났다 (Table 1). 조직학적 분화도는 고분화도 8예 (22.9%), 중분화도 21예 (60.0%) 저분화도 6예 (17.1%)로 고분화일수록 형성된 세관이 많았고 핵의 다형성이 적게 관찰되었으며 저분화일수록 형

Table 2. Distribution of histologic differentiation and Dukes' stage in 35 cases diagnosed with colon cancer

Prognostic factors	Grade	No. of patient (%)
HD*	well	8 (22.9)
	moderately	21 (60.0)
	poorly	6 (17.1)
Total		35 (100)
modified Dukes' stage	A	5 (14.3)
	B	10 (28.6)
	C	15 (42.8)
	D	5 (14.3)
Total		35 (100)

*: Histologic differentiation

성된 세관이 적었고 핵의 다형성이 많이 관찰되었다 (Table 2). 병기에 있어 stage A인 경우 5예 (14.3%), stage B인 경우 10예 (28.6%), stage C인 경우 15예 (42.8%) 그리고 stage D인 경우 5예 (14.3%)로 stage B와 stage C인 예가 25예로 다수를 차지하였다. 따라서 대장암의 발견은 조기보다 암이 진행된 후에 발견되는 확률이 높은 것으로 나타났다 (Table 2).

2. 면역조직화학적 분석

1) p53 단백질 발현과 병리학적 예후인자들과의 상관관계
p53 단백질의 발현은 전체 35예 중 77.1%인 27예 (group II 11예, group III 11예, group IV 3예 및 group V 2예)가 양성이었다, 22.9%인 8예 (group I)가 음성으로 나타났다. 양성자 중 22예에서는 핵에 강하게 염색되었으나 5예에서는 세포질에도 약간 과염색되는 경향을 보였다 (Fig. 1. A&B).

조직학적 분화도에 따른 p53 단백질 발현은 고분화도에서 4예 (11.4%), 중등도분화도에서 17예 (48.6%) 그리고 저분화도에서 6예 (17.1%)가 양성을 보여 저분화일수록 p53 단백질의 발현율이 높았다 ($P < 0.05$, Table 3). 그러나 다른 예후인자인 종양의 크기 및 Dukes' stage의 병기 간 양성율과의 비교에서는 p53 단백질 발현율과는 통계학적 상관성이 없는 것으로 나타났다 (Table 3).

2) p21 단백질 발현과 병리학적 예후인자들과의 상관관계
p21 단백질의 발현은 전체 35예 중 65.7%인 23예 (group II 9예, group III 6예, group IV 7예 및 group V 1예)가 양성으로, 34.3%인 12예 (group I)가 음성으로 나타났다 (Table 3). p21 단백질 염색은 주로 핵에 강하게 발현되었다 (Fig. 1. C&D).

조직학적 분화도에 따른 p21 단백질 발현은 고분화도

Table 3. Correlation between the expression of tumor-related proteins, TGF-β1 and prognostic factors in 35 colon cancer cases

Prognostic factors	p53		p21		c-erbB-2		TGF-β1	
	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)
Tumor size								
> 6.5 cm	12 (34.3)	6 (17.1)	11 (31.4)	7 (20.0)	15 (42.9)	3 (8.6)	13 (37.1)	5 (14.3)
≤ 6.5 cm	15 (42.9)	2 (5.7)	12 (34.3)	5 (14.3)	14 (40.0)	3 (8.6)	14 (40.0)	3 (8.6)
P value	0.527		0.421		0.517		0.867	
HD**								
well	4 (11.4)	4 (11.4)	6 (17.1)	2 (5.7)	4 (11.4)	4 (11.4)	6 (17.1)	2 (5.7)
moderately	17 (48.6)	4 (11.4)	14 (40.0)	7 (20.0)	19 (54.3)	2 (5.7)	17 (48.6)	4 (11.4)
poorly	6 (17.1)	0 (0)	3 (8.6)	3 (8.6)	6 (17.1)	0 (0)	4 (11.4)	2 (5.7)
P value	0.045*		0.039*		0.027*		0.33	
modified Dukes' stage								
A	3 (8.6)	2 (5.7)	3 (8.6)	2 (5.7)	3 (8.6)	2 (5.7)	3 (8.6)	2 (5.7)
B	8 (22.9)	2 (5.7)	8 (22.9)	2 (5.7)	7 (20.0)	3 (8.6)	7 (20.0)	3 (8.6)
C	11 (31.4)	4 (11.4)	9 (25.7)	6 (17.1)	14 (40.0)	1 (2.9)	13 (37.1)	2 (5.7)
D	5 (14.3)	0 (0)	3 (8.6)	2 (5.7)	5 (14.3)	0 (0)	4 (11.4)	1 (2.9)
P value	0.796		0.597		0.632		0.024*	
Total	27 (77.1)	8 (22.9)	23 (65.7)	12 (34.3)	29 (82.9)	6 (17.1)	27 (77.1)	8 (22.9)

*: Correlation is significant at the 0.05 level ($P < 0.05$), **: Histologic differentiation

에서 6예 (17.1%), 중분화도에서 14예 (40.0%), 저분화도에서 3예 (8.6%)로 조직의 악성화가 진행될수록 p21 단백질 발현율이 현저히 낮았다 ($P < 0.05$, Table 3). 그러나 종양의 크기 및 Dukes' stage의 병기간과 p21 단백질 발현율과는 통계학적 상관성이 없는 것으로 나타났다 (Table 3).

3) c-erbB-2 종양단백질 발현과 병리학적 예후인자들과의 상관관계

c-erbB-2 종양단백질의 발현은 전체 35예 중 82.9%인 29예 (group II 7예, group III 8예, group IV 11예 및 group V 3예)가 양성으로, 17.1%인 6예 (group I)가 음성 (negative)으로 나타났다 (Table 3). c-erbB-2 종양단백질은 암세포의 세포질막을 따라 염색되는 양상을 보였고, 암종의 침윤이 관찰되는 부분에 더 강하게 염색되었으며 세포질에도 약하게 염색되는 과염색 양상을 보였다 (Fig. 1. E&F).

조직학적 분화도에 따른 c-erbB-2 종양단백질 발현은 고분화도에서 4예 (11.4%), 중분화도에서 19예 (54.3%), 저분화도에서 6예 (17.1%)로 저분화일수록 c-erbB-2 종양단백질의 발현율이 높았다 ($P < 0.05$, Table 3). 그러나 종양의 크기 및 Dukes' stage의 병기간과 c-erbB-2 종양단백질 발현율과는 통계학적 상관성이 없는 것으로 나타났다 (Table 3).

4) TGF-β1 발현과 병리학적 예후인자들과의 상관관계

TGF-β1의 발현은 전체 35예 중 77.1%인 27예 (group II 11예, group III 11예, group IV 3예 및 group V 2예)가 양성으로, 22.9%인 8예 (group I)가 음성 (negative)으로 나타났다 (Table 3). TGF-β1의 염색은 세포질에 강하게 염색되었으나 암세포 이외의 정상 상피의 세포질에도 염색되는 경향을 보였다 (Fig. 1. G&H).

조직학적 분화도에 따른 TGF-β1의 발현은 고분화도에서 6예 (17.1%), 중분화도에서 17예 (48.6%), 저분화도에서 4예 (11.4%)로 통계학적인 유의성을 보인 p53과 p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 발현과 다르게 통계학적인 유의성이 인정되지 않았고, 또한 종양의 크기와도 유의성이 없었다 (Table 3). 그러나 Dukes' stage의 병기간 TGF-β1의 발현율은 stage A인 경우 8.6% (3예), stage B인 경우 20% (7예), stage C인 경우 37.1% (13예) 그리고 stage D인 경우 11.4% (4예)를 나타내 병기가 높아짐에 따라 TGF-β1의 발현율도 증가하는 것으로 나타났다 ($P < 0.05$, Table 3).

5) p53과 p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 및 TGF-β1 발현의 상관관계

대장암 35예를 대상으로 p53과 p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질 및 TGF-β1에 대한 면역조직화학적 염색을 실시한 결과 p53과 p21 단백질 발현에 있어 10예 (28.6%)

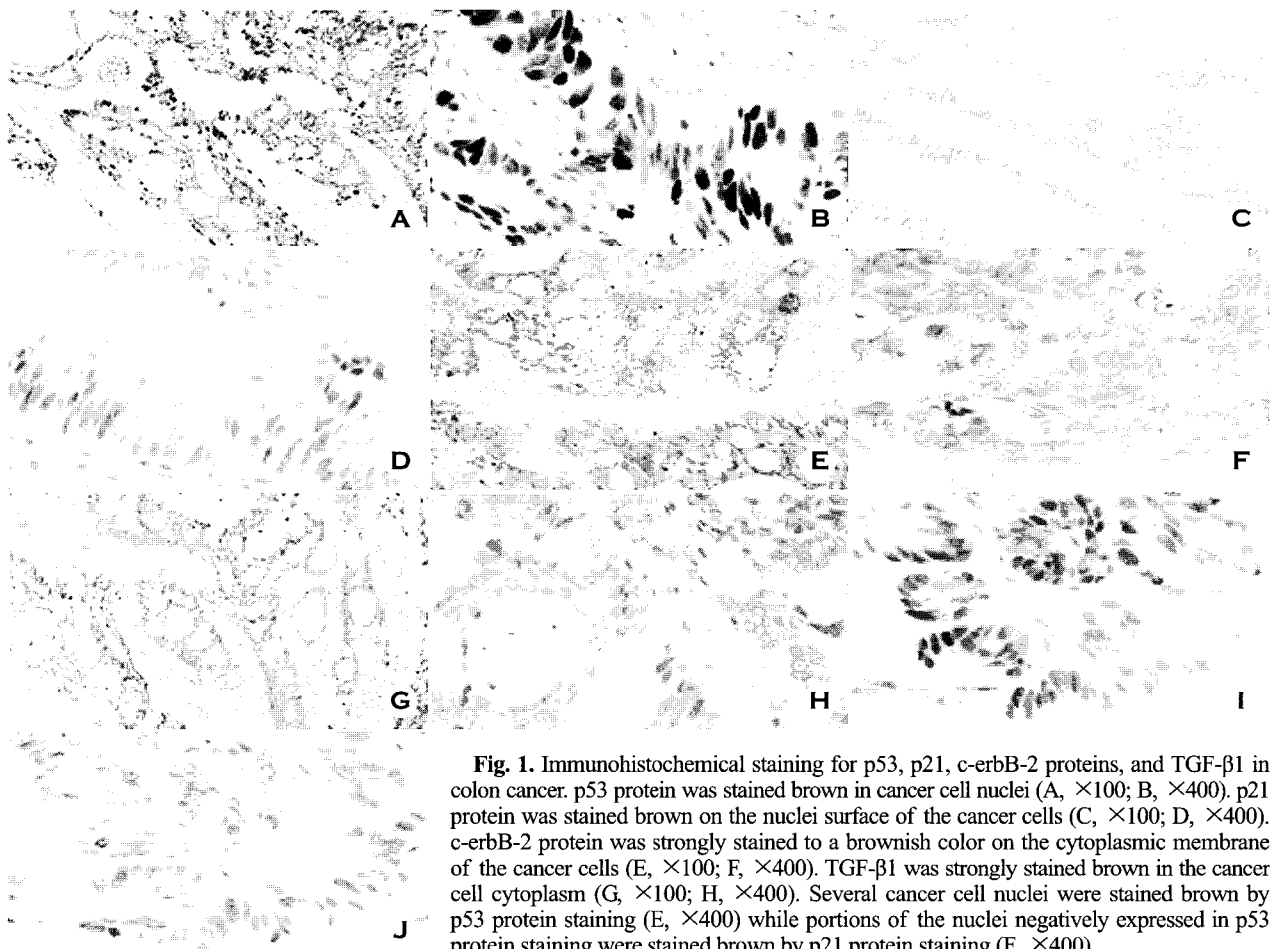


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53, p21, c-erbB-2 proteins, and TGF- β 1 in colon cancer. p53 protein was stained brown in cancer cell nuclei (A, $\times 100$; B, $\times 400$). p21 protein was stained brown on the nuclei surface of the cancer cells (C, $\times 100$; D, $\times 400$). c-erbB-2 protein was strongly stained to a brownish color on the cytoplasmic membrane of the cancer cells (E, $\times 100$; F, $\times 400$). TGF- β 1 was strongly stained brown in the cancer cell cytoplasm (G, $\times 100$; H, $\times 400$). Several cancer cell nuclei were stained brown by p53 protein staining (E, $\times 400$) while portions of the nuclei negatively expressed in p53 protein staining were stained brown by p21 protein staining (F, $\times 400$).

Table 4. Correlation among the expression rate of p53 protein, p21 protein, c-erbB-2 oncoprotein and TGF- β 1 in 35 colon cancer cases

	p53		p21		c-erbB-2		TGF- β 1	
	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)	No. of Positive (%)	No. of Negative (%)
p53								
Positive (%)	-	-	17 (48.6)	10 (28.6)	22 (62.9)	5 (14.3)	21 (60.0)	6 (17.1)
Negative (%)	-	-	6 (17.1)	2 (5.7)	7 (20.0)	1 (2.9)	6 (17.1)	2 (5.7)
P value		-		0.012*		0.346		0.796
p21								
Positive (%)	17 (48.6)	6 (17.1)	-	-	17 (48.6)	6 (17.1)	18 (51.4)	5 (14.3)
Negative (%)	10 (28.6)	2 (5.7)	-	-	12 (34.3)	0 (0)	9 (25.7)	3 (8.6)
P value		0.012*		-		0.357		0.597
c-erbB-2								
Positive (%)	22 (62.9)	5 (14.3)	17 (48.6)	6 (17.1)	-	-	24 (68.6)	3 (8.6)
Negative (%)	7 (20.0)	1 (2.9)	12 (34.3)	0 (0)	-	-	5 (14.3)	3 (8.6)
P value		0.346		0.357		-		0.631
TGF-β1								
Positive (%)	21 (60.0)	6 (17.1)	18 (51.4)	5 (14.3)	24 (68.6)	3 (8.6)		
Negative (%)	6 (22.9)	2 (5.7)	9 (25.7)	3 (8.6)	5 (14.3)	3 (8.6)		
P value		0.796		0.597		0.631		-

의 경우가 p53 단백질 발현 양성인 반면 p21 단백질 발현 음성으로 나타났고, 6예 (17.1%)의 경우에서 p21 단백질 발현 양성인 반면 p53 단백질 발현이 음성을 나타내는 역의 상관관계가 관찰되었다 ($P < 0.05$, Table 4, Fig. 1. I&J).

다른 단백질들의 상호간 비교에서 보면 p53 단백질의 발현이 증가할수록 c-erbB-2 종양단백질의 발현도 증가하는 경향은 있지만 통계학적으로 유의하지는 않았다. p53 단백질과 TGF- β 1 발현, TGF- β 1과 p21 단백질 발현, p21 단백질과 c-erbB-2 종양단백질 발현 및 TGF- β 1과 c-erbB-2 종양단백질 발현은 유의한 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (Table 4).

고 찰

대장암 환자의 예후 추정에 중요한 영향을 미치는 재발과 가장 밀접한 예후인자로는 Dukes' stage, 림프절전이 등이 있고 이외에도 환자의 연령, 종양의 크기, 병소의 조직학적 분화도, 종양 유전자의 발현 정도 그리고 혈관 및 신경조직 침윤 등이 있다 (Kawasaki et al., 1992). 대장암과 관련된 예후인자 중 재발에 가장 밀접한 관련이 있다고 사료되는 종양의 크기, 조직학적 분화도 및 Dukes' stage를 대장암과 관련된 단백질들 중 p53과 p21 및 c-erbB-2 종양단백질 그리고 TGF- β 1의 발현율과 상호 비교하여 상관관계 여부를 알아보려고 한 본 연구 결과 p53 단백질 발현율과 병리학적 예후인자들인 종양의 크기 및 Dukes' stage를 비교하였지만 통계학적으로 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 조직의 분화도와 비교에서는 악성도가 증가할수록 높은 양성율을 보여 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 나타나 ($P < 0.05$, Table 3) p53 단백질 발현이 종양의 조직학적 분화도와 관련이 있음을 간접적으로 제시하였다. 이 결과는 정상 p53 단백질은 보통 반감기가 짧고 그 양도 적어서 면역조직화학적 염색으로 관찰되지 않지만 p53 유전자가 변이된 경우 p53 단백질에도 변이가 생겨 반감기가 길어지면서 조직 내에 축적되어 면역조직화학적 염색으로 관찰된다는 보고 (Greenblatt et al., 1994), p53 유전자 돌연변이가 여러 장기의 암에서 종양의 악성도 및 예후와 연관되어 있다는 보고 (Mehregan et al., 1996), 그리고 대장암에서 p53 유전자의 돌연변이가 있는 경우 종양의 악성도가 증가하고 예후도 불량하다는 보고들 (Yamaguchi et al., 1993; Pricolo et al., 1997)과 일치하였다. 따라서 정상 p53 유전

자는 종양억제 유전자로 세포주기 및 세포사멸을 조절하여 세포를 정상적으로 유지시키는 역할을 하지만 변이된 p53 유전자는 조절자로서의 기능을 상실하고 오히려 종양의 증식을 초래하여 대장암의 발생 및 악성화와 연관이 있는 것으로 사료된다.

p21 단백질은 세포주기의 역조절자로 p53 단백질과 더불어 세포사멸과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. p21 단백질의 발현율과 병리학적 예후인자들인 종양의 크기 및 Dukes' stage와의 상관관계를 조사한 결과 유의성이 인정되지 않았다. 그러나 조직학적 분화도는 악성도가 증가할수록 p21 단백질의 발현율이 낮아 통계학적인 유의성이 있는 것으로 나타났다 ($P < 0.05$, Table 3). 이 결과는 암종이 진행되면 p21 단백질이 소실되기 때문에 예후인자로서 가치가 있다는 보고 (Yasui et al., 1996)와 일치하는 결과라 하겠다. 따라서 p21 단백질의 과발현은 대장암에서 암종을 억제하는 역할을 하며 환자의 예후와도 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 또한 본 연구에서 p53 단백질 발현 양성과 p21 단백질 발현 음성 10예, p53 단백질 발현 음성과 p21 단백질 발현 양성 6예로 p53과 p21 단백질 발현에서 역의 상관관계가 관찰되었다 ($P < 0.05$, Table 4). Diguseppe et al. (1995)은 p21 단백질의 활성이 손상된 DNA에 대한 p53 단백질의 활성화 혹은 여러 가지 성장인자에 의한 활성화 등 서로 다른 두 가지 경로에 의해서 유도되는 것으로 보고하였다. 그리고 Pasz-walczak et al. (2001)은 대장암에서 p53 단백질과 p21 단백질 발현에서 역의 상관관계를 보여 p53 의존성 경로와 유관하다고 보고하였고, Yamamoto et al. (1996)은 TGF- β 1이 p21 유전자를 활성화시켜 p53 유전자의 의존성 경로와 무관하게 세포자연사를 유발한다고 보고하는 등 보고자마다 차이를 보이고 있다. 만약 p53 유전자의 의존성 경로를 따른다면 p53 단백질과 p21 단백질의 발현은 역 상관관계가 되어야 하고, p53 유전자의 비의존성 경로를 따른다면 p53 단백질과 p21 단백질은 유의한 상관관계가 인정되지 않아야 한다. 이 결과는 p21 단백질이 p53 단백질 의존성 경로를 따른 것으로 인정되며 (Pasz-walczak et al., 2001), Giraldo et al. (1999)의 결과와도 일치하는 결과였다. 그러나 p53과 p21 단백질 발현 양성 17예, p53과 p21 단백질 발현 모두 음성 2예 등, 19예에서는 통계학적으로 유의성은 없었지만 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났고, p53 단백질 발현 음성과 p21 단백질 양성으로 발현된 6예에서 3예는 TGF- β 1이 양성으로 염색되어 Yamamoto et al. (1996)과 Akagi et al. (1996)이 보고한 p53

유전자의 비의존성 경로에서 TGF- β 1이 p21 단백질 발현과 유관하다는 보고와 일부 일치하나 대장암에서 p21 단백질의 발현에 관여하는 것으로 p53 유전자 이외에도 TGF- β 1 및 많은 요인들이 작용하는 것을 시사하는 것이라 하겠다.

c-erbB-2 종양단백질의 과발현은 편평상피 암에서 자주 관찰되며 최근에는 대장암에서도 c-erbB-2 종양단백질 발현이 보고되고 있다 (McCann et al., 1990). 그러나 병리학적 예후인자인 조직학적 분화도와 c-erbB-2 종양단백질과의 상관성을 조사한 Berger et al. (1988)은 상관성이 있는 것으로 보고하였고, Tsuda et al. (1992)은 상관성이 없는 것으로 보고하여 보고자마다 차이를 나타내고 있는 실정이다. 본 연구 결과에서는 조직학적 분화도가 증가할수록 c-erbB-2 종양단백질의 발현율이 높은 것으로 나타났다 ($P < 0.05$, Table 3). 이는 Kim et al. (2001)이 제시한 담낭암에서 조직의 악성도가 증가할수록 c-erbB-2 종양단백질이 과발현 된다는 결과와 일치하였다. 따라서 대장암에서 c-erbB-2 종양단백질의 과발현은 세포의 증식과 밀접한 관련이 있음은 사실이나 다른 예후인자들과의 연관성을 더 조사해 봐야 할 것으로 생각된다. 한편 Dukes' stage가 높을수록 c-erbB-2 종양단백질에 발현율이 통계학적인 유의성은 없었으나 높은 경향을 보이는 것으로 나타났다. 이는 c-erbB-2 종양단백질 발현의 양성율과 Dukes' stage 및 림프절 전이와의 상관성을 보고한 Kim et al. (1993)의 결과와 전이 빈도가 낮은 대장암에서 증식된 암세포에 활성화된 c-erbB-2 유전자를 형질전환시켰을 때 형질전환된 세포의 전이성이 높아져 c-erbB-2 유전자가 림프절 전이에 관여한다는 것을 보고한 Yusa et al. (1990)의 결과와 일부 일치하는 결과로서 대장암에서의 c-erbB-2 종양단백질 발현은 종양의 크기와는 무관하지만 조직학적 분화도와 Dukes' stage와는 밀접한 관계가 있음을 시사하는 바라 하겠다. 특히 c-erbB-2 종양단백질의 검출을 위한 면역조직화학 염색에서 c-erbB-2 종양단백질이 세포막에 국한되어 과립상으로 발현되는 것은 c-erbB-2 종양단백질이 EGFR과 구조적으로 상동성을 가지고 있기 때문으로 판단된다. 그리고 일부 암세포에서 세포막뿐만 아니라 세포질 내에서도 양성반응을 보인 것은 암유전자 산물과 결합된 성장인자의 세포내 이주 또는 생성운반 중에 발현되어 관찰된 것이라 여겨진다 (Kim et al., 1993). 지금까지 대장암에서 c-erbB-2 종양단백질의 과발현에 대한 정확한 원인과 반응기전은 아직까지 입증되지 않았으므로 향후 지속적인 연구와 대상

의 예를 늘려 c-erbB-2 종양단백질의 발현을 연구한다면 대장암의 중요한 예후인자로서 검토해볼 가치가 있다고 본다.

TGF- β 1은 장상피세포를 포함한 정상 상피세포에 성장 억제 기능을 가지고 있으나 암세포로의 변형이 TGF- β 1의 이러한 억제 작용을 소실시켜 암세포 증식 및 전이에 기여한다 (Uhm et al., 1993). 그리고 TGF- β 1의 종양 증식능력은 종양으로 공급되는 혈류량을 증가시키고 종양에 대한 면역억제능력을 저하시키며 유착물질과 세포외 기질성분이 증가하여 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Maehara et al., 1999). 최근 많은 연구 결과 암세포와 악성종양에서 TGF- β 1의 과발현이 나타남을 보고하였다 (Friedman et al., 1995; Li et al., 1996). 본 연구에서는 Dukes' stage가 높아짐에 따라 TGF- β 1의 발현율이 통계학적으로 유의성이 있게 높은 것으로 나타났다 ($P < 0.05$, Table 3). 이는 대장암 환자에서 TGF- β 1의 농도가 높을수록 병기 진행과 관련되어 있고, 림프절 전이와 상관성이 있으며, 재발을 예측할 수 있는 인자로 작용한다는 보고 (Friedman et al., 1995)와 일치하는 결과라 하겠다. 그러나 종양의 크기와 조직학적 분화도는 TGF- β 1과 어떠한 상관관계도 인정되지 않았다. 이들 결과로서 TGF- β 1의 과발현이 종양세포의 빠른 증식을 유도하고 광범위한 전이를 일으키는 불량한 예후와 밀접한 관계가 있는 예후인자로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

이런 실험결과 조직학적 분화도가 저분화일수록 p53 단백질의 발현율은 증가하였고, p21 단백질의 발현율은 감소하였다 ($P < 0.05$). 그러나 이들 단백질과 종양의 크기 및 Dukes' stage와는 상관성이 인정되지 않았다. C-erbB-2 종양단백질의 발현율은 조직학적 분화도가 저분화일수록 높게 발현되었다 ($P < 0.05$). 그리고 Dukes' stage에서 병기가 높을수록 과발현 되었지만 통계학적으로 유의하지는 않았다. TGF- β 1 발현율은 Dukes' stage가 높아짐에 따라 증가하였다 ($P < 0.05$). 결론적으로 대장암의 조직학적 분화도는 p53 단백질, p21 단백질, c-erbB-2 종양단백질의 발현과 Dukes' stage의 병기는 TGF- β 1의 발현과 유의한 상관관계가 있고, p53 단백질 발현율과 p21 단백질 발현율 사이에는 역상관관계가 있음을 알 수 있었다. 또한 p53과 p21 단백질 그리고 c-erbB-2 종양단백질 및 TGF- β 1의 과발현이 대장암의 발생 및 진행에 관여함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구가 대장암 환자의 진단, 치료 및 예후 추정에 도움이 될 것으로 본다. 그러나 예후인자들과 대장암과 관련된 단백질들과 TGF- β 1의 발현

과의 상관관계를 분명히 규명하기 위해서는 더 많은 예의 연구가 필요하다고 사료된다.

REFERENCES

- Akagi M, Yasui W, Akama Y, Yokizaki H, Tahara H, Haruma K, Kajiyama G, Tahara E. Inhibition of cell growth by transforming growth factor 1 in associated with p53-independent induction of p21 in gastric carcinoma cells. *J Cancer Res.* 1996. 87: 377-384.
- Barger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ. Correlation of c-erbB-2 gene amplication and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. *Cancer Res.* 1988. 48: 1238-1240.
- Digiuseppe JA, Redston NS, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. p53-independent expression of the cyclin dependent kinase in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1995. 147: 884-888.
- Elkablawy MA, Maxwell P, Williamson K, Anderson N, Hamilton PW. Apoptosis and cell cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumor stage and patient survival. *J Pathol.* 2001. 194: 436-443.
- Ferrandina G, Stoler A, Fagotti A, Fanfani F, Sacco R, De Pasqua A, Mancuso S, Scambia G. p21WAF/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *Int Oncol.* 2000. 17: 1231-1235.
- Freiss H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI. Enhanced expression of transforming growth factor- β isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993. 105: 1846-1856.
- Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor- β 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995. 4: 549-554.
- Girlando S, Slomp P, Caffo O, Amichetti M, Togni R, Dvornik G, Tomio L, Galligioni E, Dalla Palma P, Barbarreschi MI. p21 expression in colorectal carcinomas: a study on 103 cases with analysis of p53 gene mutation/expression and clinicopathological correlations. *Virchows Arch.* 1999. 435: 559-565.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994. 54: 4855-4878.
- Hall PA, Hughes CM, Staddon SL, Richman PI, Gullick WJ, Lemoine NR. The c-erbB-2 proto-oncogene on human pancreatic cancer. *J Pathol.* 1990. 161: 195-200.
- Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of p53 expression in Microwave-fixed, paraffin embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol.* 1992. 97: 244-249.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994. 83: 2013-2026.
- Kim Kee Hwan, Choi Seong Ho, Ahn Chang Hyeok, Kim Jeong Soo, Jeon Hae Myung, Lee Eun Jung, Lim Keun Woo. The Clinical Value of p53, c-erbB-2 and Ki-67 Expression in Gallbladder Carcinoma. *J Korean Surg.* 2001. 60: 649-655.
- Kim Wan, Choi Hong Ran, Lee Ji Shin, Park Jong Tae, Park Chang Soo, Cho Kyu Hyuk. Correlation between Expression of c-erbB-2 Oncogene and Various Prognostic Factors in the Colorectal Carcinoma. *Korean J Pathol.* 1993. 27(3): 217-225.
- Li CY, suardet L, Little JB. Potential role of WAF1/CIP1/p21 as a mediator of TGF- β cytoinhibitory effect. *J Biol Chem.* 1995. 270: 4971-4974.
- Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S, Sugimachi K. Role of transforming growth factor- β 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999. 17: 607-614.
- Manning AM, Williams AC, Game SM, Raraskeva C. Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor β (TGF- β): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF- β . *Oncogene* 1991. 6: 1471-1476.
- Mccann A, Dervan PA, Johnston PA, Gullick WJ, Carney DN. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990. 65: 88-92.
- Mehregan D, Mehregan D. Immunohistochemistry: a prognostic as well as diagnostic tool. *Semin Cutan Med Surg.* 1996. 15: 317-325.
- Newman MJ. Transforming growth factor beta and the cell surface in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1993. 12: 239-254.
- Pasz-walczak G, Kordek R, Faflik M. p21 (WIF1) expression in colorectal cancer: correlation with p53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract.* 2001. 197: 683-689.
- Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI. Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg.* 1997. 132: 371-374.
- Robson H, Anderson E, James RD, Schofield PF. Transforming growth factor beta 1 expression in human colorectal tumors:

- an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. *Br J Cancer* 1996. 74: 753-758.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER/neu proto-oncogene on human breast and ovarian cancer. *Science* 1989. 244 : 707-712.
- Tsuda H, Tsugane S, Fukutomi T, Nanasawa T. Prognostic factors for recurrent breast cancer: univariate and multivariate analysis including histologic grade and amplification of the c-erbB-2 proto-oncogene. *Jpn J Clin Oncol*. 1992. 22: 244-246.
- Uhm JR, Kettering JD, Gridley DS. Modulation of transforming growth factor- β 1 effects by cytokines. *Immunol Invest*. 1993. 22: 375-388.
- Yamaguchi A, Nakagawara G, Kurosaka Y, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I. p53 immunoreaction in endoscopic biopsy specimens of colorectal cancer and its prognostic significance. *Br J Cancer* 1999. 1993. 68: 399-402.
- Yamamoto M, Machara Y, Sakaguchi Y, Jusumoto T, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Transforming growth factor β 1 induces apoptosis in gastric cancer cells through a p53-independent pathway. *Cancer* 1996. 77: 1628-1633.
- Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol*. 1996. 180: 122-128.
- Yusa K, Sugimoto Y, Yamori T, Yamamoto T, Toyoshima K, Tsuruo T. Low metastatic potential of clone from murine colon adenocarcinoma 26 itransfection of activated c-erbB-2 gene. *J Natl Cancer Inst*. 1990. 82: 1633-1636.
- Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizaden ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP. Prognostic impact of p21WAF/CIP1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000. 89: 14-18.
-