

## 완전 절제된 원발성 비소세포 폐암에서 Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현과 임상적 예후

조덕곤\* · 조규도\* · 강철웅\* · 조민섭\* · 유진영\*\* · 안명임\*\*\*  
 김치홍\*\*\*\* · 심병용\*\*\*\* · 김성환\*\*\*\*\* · 김훈교\*\*\*\*\*

### The Caspase-3 and c-myc Expressions in Completely Resected Non-small Cell Lung Cancer and Its Prognostic Significance

Deog Gon Cho, M.D.\*, Kyu Do Cho, M.D.\*, Chul Ung Kang, M.D.\*, Min Seop Jo, M.D.\*,  
 Jinyoung Yoo, M.D.\*\*, Myeong Im Ahn, M.D.\*\*\*, Chi Hong Kim, M.D.\*\*\*\*,  
 Byoung Yong Shim, M.D.\*\*\*\*\*, Sung Whan Kim, M.D.\*\*\*\*\*, Hoon Kyo Kim, M.D.\*\*\*\*\*

**Background:** Caspase-3 is a cysteine protease that plays a major role in the process of apoptotic cell death. The dysregulated expression of c-myc contributes to the tumorigenesis in a variety of human cancers. The aim of this study was to investigate the expressions of caspase-3 and c-myc and their significances as prognosis markers in patients with completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC). **Material and Method:** A total 130 consecutive patients who had undergone complete resection without pre-operative radio-therapy or chemotherapy between May 1996 and December 2003 for NSCLC were retrospectively reviewed. The median follow-up period of the patients was 50 months (range: 3~128 months). The expressions of caspase-3 and c-myc were immunohistochemically examined, and these were correlated with the clinico-pathologic data. **Result:** The prevalence of caspase-3 and c-myc expressions in the patients was 68% (88/130) and 59% (77/130), respectively. Significant association was found between the frequency of the expressions of caspase-3 and c-myc ( $p=0.025$ ). The caspase-3 and c-myc expressions were not significantly associated with the prognosis in all the patients. However, according to stages, a positive caspase-3 expression was significantly correlated with a favorable prognosis for patients with stage IIIa disease (median survival period: 35 months vs. 10 months,  $p=0.021$ ). Multivariate analysis showed the pathologic stage to be significantly correlated with a good prognosis in all the patients ( $p=0.024$ ), and with a positive caspase-3 expression, well differentiated tumor and negative neuronal invasion in the patients with stage IIIa disease ( $p=0.005$ ,  $p=0.003$ ,  $p=0.004$ , respectively). **Conclusion:** Caspase-3 and c-myc were frequently expressed in NSCLC, suggesting its possible involvement in tumor development. The caspase-3 expression, as determined with performing immunohistochemical staining, may be a favorable prognostic indicator in patients with completely

\*가톨릭대학교 성빈센트병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

\*\*가톨릭대학교 성빈센트병원 병리학교실

Department of Pathology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

\*\*\*가톨릭대학교 성빈센트병원 영상의학교실

Department of Radiology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

\*\*\*\*가톨릭대학교 성빈센트병원 내과학교실

Department of Internal Medicine, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

\*\*\*\*\*가톨릭대학교 성빈센트병원 방사선종양학교실

Department of Radiation Oncology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea

† 본 논문은 2007년 대한흉부외과학회 제39차 추계학술대회 및 제12차 세계폐암학회에서 발표되었음.

‡ 가톨릭대학교 성빈센트병원 임상의학 연구비의 보조에 의함.

논문접수일 : 2008년 3월 5일, 심사통과일 : 2008년 4월 14일

책임저자 : 조규도 (442-723) 경기도 수원시 팔달구 지동 93-6, 가톨릭대학교 성빈센트병원 흉부외과

(Tel) 031-249-7200, (Fax) 031-251-1755, E-mail: kyudias@cvnet.co.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

resected NSCLC of an advanced stage (IIIA).

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:447-456)

**Key words:** 1. Carcinoma, non-small cell, lung  
2. Prognosis  
3. Neoplasm marker  
4. Enzymes

## 서 론

폐암은 전 세계적으로 암 사망의 주요 원인으로 국내에서도 최근 통계청이 발표한 “2006년 사망 및 사망원인통계” 자료에 의하면, 한국인의 암 중에서 사망률이 인구 10만 명당 28.8명으로 가장 높았으며, 10년 전에 비해 사망률의 증가 숫자가 가장 높은 암으로 보고되고 있다. 최근 폐암의 예후와 관련된 임상적·병리학적인 인자를 규명하기 위한 많은 연구가 시행되어 왔으며, 실제로 예후와 관련된 여러 분자생물학적인 변화 등 임상적으로 유용한 많은 유전자들이 보고되고 있다. 그러나 아직도 여전히 이들 유전자 발현의 임상적 유효성에 대해서는 논란이 되고 있으며 지속적인 연구가 요구되고 있다. 인체에서 암 발생의 주 기전은 세포 안의 신호전달 경로의 이상과 함께 종양 유전자의 활성화 또는 종양억제 유전자의 변이가 생겨 정상세포의 악성변환을 초래한다. 세포의 재편성을 결정하는 중요한 두 가지 요소는 세포 증식(proliferation)과 세포 자멸사(apoptosis)인데, 세포 자멸사 과정에서 조절 이상은 암 발생(tumorigenesis)과 암의 생리학적인 행동을 결정하는 아주 중요한 역할을 한다[1]. Caspase-3은 cysteine 단백분해효소의 일종으로 소위 CPPP32, YAMA, 그리고 apopain으로 불리우기도 하는데, 지금까지 알려진 10여종 이상의 caspase 효소들 중 세포 자멸사 과정의 마지막 단계에서 실행기(effector)로써 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[2,3]. Caspase-3의 작용으로 합성된 불활성 전효소(inactive proenzyme) 상태의 32-kDa caspases-3가 두 활성화된 형태의 17-kDa과 12-kDa의 caspase-3로 분해된 후 세포 자멸사를 매개한다고 한다[4,5]. 많은 악성종양, 특히 백혈병, 악성 림프종 등의 혈액 암과 악성 신경종 등에 대한 caspase-3 발현과 임상적인 예후와의 관계에 대한 많은 연구가 있으나, 폐암, 위암, 식도암 등의 고형암에서의 연구는 비교적 드물다[2,6]. c-myc는 전형적인

proto-oncogene의 하나로 어떠한 외부자극에 의해 세포분열을 촉진시킬 수 있고 그 자극이 없을 때는 세포 자멸사를 유발할 수 있으며, 여러 장기의 암 발생 및 진행과 연관되어 있다고 알려져 있다[7,8]. 원발성 폐암환자에서 암세포의 자멸사와 암세포의 증식 사이의 균형은 임상적인 예후인자로서 중요하다고 보고되고 있다[2,6,9]. 저자들은 이러한 관점에서 세포 자멸사에 관계하는 세포 내 신호전달 경로에 중요하게 작용하는 caspase-3 단백질과 많은 종류의 암에서 세포분열 혹은 세포 자멸사 모두에 관여하는 것으로 알려진 c-myc oncogene 단백질의 발현과 비소세포 폐암과의 연관성을 보고, 근치적 수술을 시행 받은 원발성 비소세포폐암 환자의 폐암조직에서 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현과 임상적인 예후인자로서의 의의를 알아보고자 했다.

## 대상 및 방법

### 1) 연구대상

본 연구는 1996년 5월부터 2003년 12월까지 가톨릭대학교 성빈센트병원 흉부외과에서 원발성 비소세포 폐암으로 근치적인 절제수술을 시행한 130명의 환자를 대상으로 하였다. 연구대상 환자는 수술 전 항암화학요법이나 방사선요법을 시행 받은 경우는 제외하였고, 연구시점에서 최소 3년 전에 수술 받고 추적 조사하던 환자를 대상으로 하였다. 추적 조사는 환자의 사망여부, 폐암종 재발 유무 및 최근의 건강상태 등 각종 임상정보에 대하여 병록지를 중심으로 조사하였고, 빠진 환자에 대해서는 전화연락을 통해 조사하였다. 각 증례의 병리학적인 분석은 병리 보고서를 중심으로 종양의 조직학적인 유형 및 분화의 등급, TNM 병기 등에 따라 분류하였다. 폐암 수술은 표준 방법으로 폐엽 절제술 및 종격동 림프절 제거술을 시행하였으며 폐엽 절제술로 완전 절제가 불가능한 경우 이엽

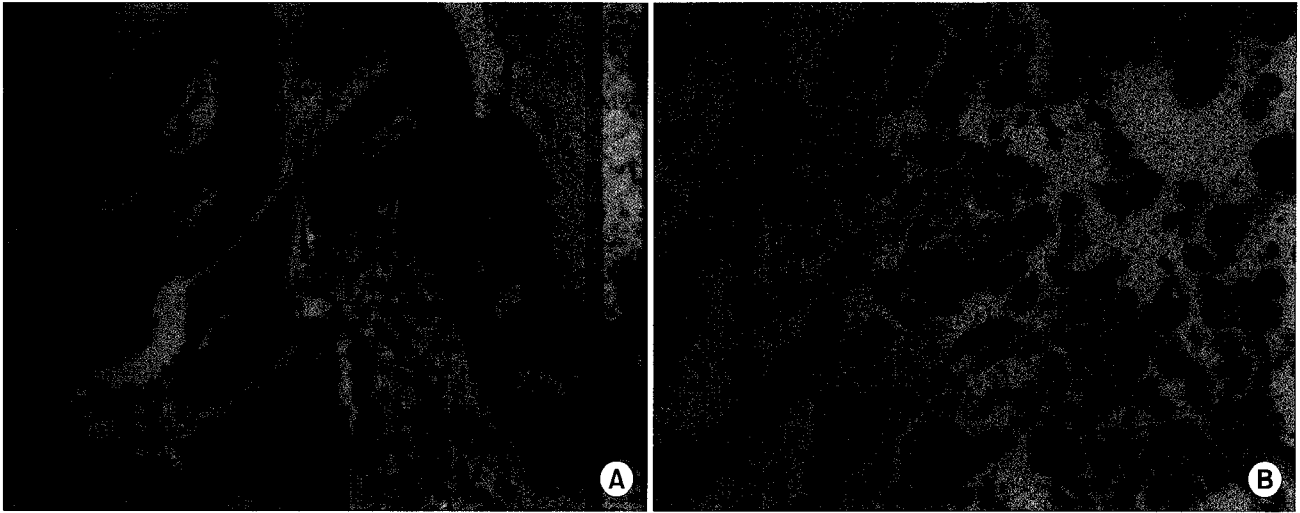


Fig. 1. Immunohistochemical staining of caspase-3 (A) and c-myc (B) in patients of non-small cell lung cancer. The majority of tumor cells show immunoreactivity in their cytoplasm with some nuclear staining (A), and intense nuclear immunostaining (B) (magnification,  $\times 200$ ).

혹은 전폐 절제술을 시행하였다.

## 2) 면역조직화학염색법

폐암 절제 조직은 10% buffered formalin에 고정한 후 파라핀 절편을 만들었다. 파라핀 절편은 H-E 염색 후 세계보건기구(WHO) 폐암 분류를 기준으로 종양의 조직학적인 진단과 분화도 등을 결정하였다. 폐암조직의 면역조직화학염색은 sensitive peroxidase-streptavidin 방법을 사용하였다. 즉, 보관상태가 양호하고 종양의 대표적인 부위를 포함하는 파라핀 블록에서  $4\mu\text{m}$ 의 두께로 절편을 박절하여 유리 슬라이드에 붙여 건조과정을 거친 후 Xylene으로 10분간 탈파라핀 시킨 후 에탄올 액으로 함수과정을 수행하고 완충용액에 담가 처리하였다. 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 활성을 억제하기 위해 45도의 온도에서 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 4분간 처리하였다. 슬라이드는 항원성을 회복하기 위해 citrate buffer (2.1 g/L, pH6.0)에서 15분 동안 120도로 가열하고, protein blocking reagent로 처리하였다. 그 후 1 : 50으로 희석된 일차 항체를 4도 온도에서 밤새 반응시켰다. Caspase-3 단백질의 발현을 보기 위해 항원 염색에 사용된 일차 항체로는 비활성형 32kDa caspase-3와 활성형 17 kDa fragment에 모두 반응하는 polyclonal anti-caspase-3 항체(Pharminogen, San Diego, CA)를 사용하였다. 또한 c-myc 단백질의 발현을 보기 위한 일차 항체로 anti-c-myc (NeoMarkers, Fremont, CA)를 사용하였다. 충분히 슬라이드를 세척한 후에 1 : 20으로 희석한 이차 항체인 biotinylated anti-mouse immunoglobulin (Zymed, San

Francisco, CA)으로 10분 동안 상온에서 반응시키고, 1 : 25로 희석시킨 streptavidin-biotin peroxidase complexes에 적용시켰다. 슬라이드 표본을 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색시키고 최종적으로 hematoxylin 으로 대조염색을 하고 봉입하였다. 모든 표본들은 양성 및 음성 대조군으로 검경하였는데, 제조사의 권장되는 프로토콜에 따라 caspase-3의 양성 대조군으로 편도선 조직을, c-myc은 유방암 조직을 사용하였고 음성 대조군은 일차 항체를 처리하지 않고 희석된 버퍼로 대체하여 면역화학염색을 하였다. 광학현미경상 caspase-3 단백질의 발현은 핵에 일부가 염색되며 주로 세포질이 우세하게 염색된 경우를 양성으로 판정하였고, c-myc 단백질의 발현은 폐암세포의 핵에 면역화학염색 되어 나타나는 경우에 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

## 3) 통계 분석

분석 방법은 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 통계 프로그램을 사용하였다. Caspase-3와 c-myc을 포함한 여러 가지 임상-병리학적인 인자들과의 상관성은 Fisher exact probability test 및 Pearson chi-square test를 이용한 교차분석을 시행하였고, 생존 곡선은 Kaplan-Meier법을 이용하였고 환자의 생존에 여러 인자들 간의 유의한 차이를 보기 위해 log-rank 검사를 이용하였다. 의미 있는 예후인자간의 다변량 분석을 위해 Cox proportional hazards regression 모델을 이용하였다. 모든 통계학적인 분석은 유의수준이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

**Table 1.** Clinico-pathologic features, and caspase-3 and c-myc expression in 130 patients of completely resected non-small cell lung cancer

Variables	Caspase-3			c-myc		
	Positive	Negative	p-value	Positive	Negative	p-value
Age			NS			NS
< 62	61	43		39	22	
≥ 62	69	45		38	31	
Gender			NS			NS
Male	99	72		58	41	
Female	31	16		19	12	
T status			NS			NS
T1	36	22		24	12	
T2	80	59		43	37	
T3	14	7		10	4	
N status			NS			NS
N0	82	53		52	30	
N1	20	17		12	8	
N2	28	18		13	15	
Pathologic stage			NS			NS
I	75	49		47	28	
II	26	20		17	9	
IIIA	29	19		13	16	
Histology			NS			NS
Squamous cell ca	63	41		36	27	
Adenocarcinoma	46	32		31	15	
Large cell ca and others*	21	15		10	11	
Microscopic findings						
Differentiation			NS			NS
Well	27	16		18	9	
Moderate	59	45		37	22	
Poor	41	24		20	21	
Pleural invasion			NS			NS
Yes	28	19		16	12	
No	102	69		61	41	
Lymphatic invasion			NS			0.001
Yes	25	15		7	18	
No	105	73		70	35	
Vascular invasion			NS			NS
Yes	7	3		2	5	
No	123	85		75	48	
Perineural invasion			NS			NS
Yes	9	6		3	6	
No	121	82		74	47	
Necrosis			NS			NS
Yes	61	41		33	28	
No	69	47		44	25	

\*others=4 atypical carcinoid, 1 pleomorphic carcinoma.

## 결 과

### 1) 대상의 특성

대상 환자들의 임상-병리학적인 특성과 면역조직화학염

색법의 결과와의 관련성은 Table 1에서 보여주고 있다. 대상 환자는 130명으로 남자 99명, 여자 31명으로 수술 당시 나이는 34세부터 74세로 평균 중간 연령은 62세였다. AJCC (American Joint Committee on Cancer) 병리조직학적

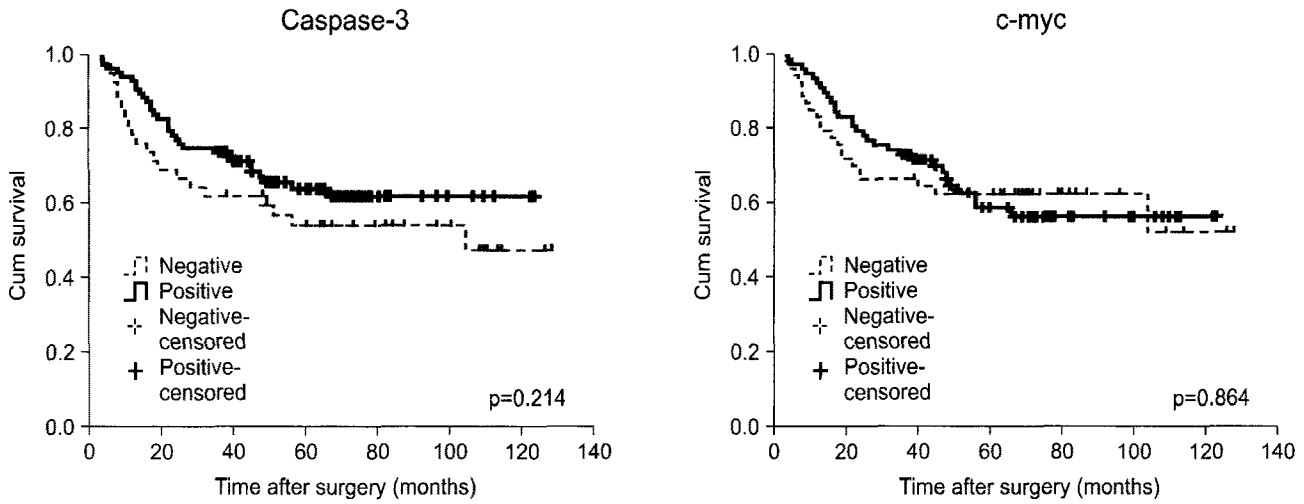


Fig. 2. Survival of total 130 patients with non-small cell lung cancer according to the expression of caspase-3 and c-myc (p=NS) (Kaplan-Meier method).

인 TNM 분류상 Ia 군이 27명, Ib 군이 48명, IIa 군이 5명, IIb 군이 21명, IIIa 군이 29명이었다. T (tumor) 분류상 T1이 36명(28%), T2가 80명(61%), 그리고 T3가 14명(11%)이었으며, N (lymph node) 분류는 N0가 82명(63%), N1이 20명(15%), 그리고 N2가 28명(22%)이었다. 폐암종의 세포형은 편평세포암종이 63명, 선암종이 46명, 대세포암종 등이 21명(4명의 비정형 카시노이드암종, 1명의 pleomorphic carcinoma 포함)이었다. 폐암종의 현미경학적 분화도와 늑막, 림프관, 혈관, 신경침습 여부나 괴사부위의 존재여부는 Table 1에서와 같다.

## 2) Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현

Caspase-3 단백질이 일부는 핵 안에서 발견되지만 대부분은 세포질에 안에서 면역화학염색 됨을 관찰할 수 있고, c-myc 단백질은 거의가 핵 안에 축적되어 있음을 알 수 있다(Fig. 1). 총 130명의 환자에서 암조직에서 caspase-3 단백질의 발현은 88명으로 68%의 발현율을 보였고, c-myc 단백질은 77명으로 59%의 발현율을 보였다. 그러나 환자의 나이, 성별, T분류, N분류, 병리학적인 병기, 폐암의 세포형, 폐암의 현미경학적 분화도, 늑막, 혈관, 신경침습 및 괴사여부에 따라 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현에는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, c-myc 단백질의 발현과 현미경학적으로 폐암조직의 림프관 침습 사이에 유의한 상관관계가 있었다(p=0.001, Table 1).

## 3) Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현과 예후와의 상관성

Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현 여부가 전체 130명 대상

환자 및 제 I, II 병기 대상환자들의 생존률과의 관계에 유의한 차이는 없었지만(Fig. 2), 제 IIIa 병기 환자에서 caspase-3 단백질의 발현과 생존율 간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(중앙생존기간 35 vs. 10개월, 평균 생존 51 vs. 24개월, p=0.021, Fig. 3).

## 4) Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현간 상관관계

전체 130명 대상환자에서 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현 빈도를 교차 분석한 결과 통계적으로 유의한 발현율의 상호 연관성은 있었으나(p=0.025, Table 2), caspase-3과 c-myc 단백질 모두 발현한 군의 평균 생존기간은 84.8개월, caspase-3은 발현하고 c-myc 단백질은 발현하지 않은 군은 79.2개월, caspase-3은 발현하지 않고 c-myc 단백질 발현된 군은 73.1개월, caspase-3과 c-myc 단백질 모두가 발현되지 않은 군은 72.5개월로 이 비교군들 간에 통계학적인 차이는 없었다.

## 5) 다변량 분석에 의한 예후 인자

생존율에 대한 독립적인 예후인자를 보기 위해 전체 130명 대상환자에서 나이, T분류, N분류, 병리조직학적인 병기, 폐암의 세포형, caspase-3와 c-myc 단백질의 발현을 Cox proportional hazards regression 모델에 포함하여 분석하였다. 이 중에서 다변량 분석에 의한 예후인자로 병리조직학적인 병기(p=0.024)가 생존율에 대한 유일한 독립적인 예후인자였다(Table 3). 그리고 대상환자를 병리조직학적인 병기에 따라 분류하여 분석할 때, 제 I, II 병기 환자에서는 통계적으로 의미 있는 예후인자는 없었지만, 제

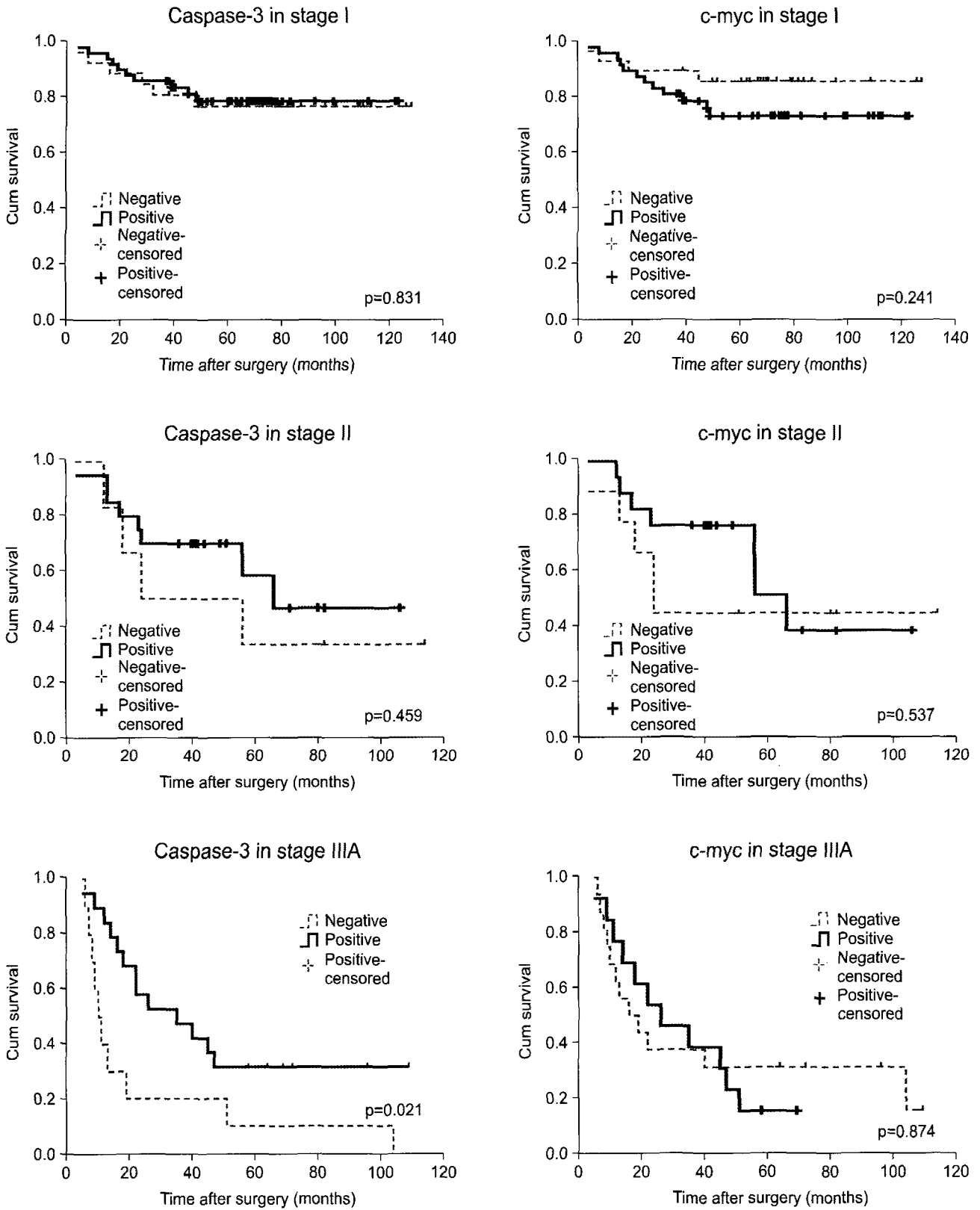


Fig. 3. According to stages, survival of patients associated with caspase-3 and c-myc expression. Caspase-3 expression is significantly correlated with favorable survival in stage IIIA patients ( $p=0.021$ ). However, others do not correlate with prognosis (Kaplan-Meier method).

**Table 2.** Relationship between expression of caspase-3 and c-myc in completely resected non-small cell lung cancer (Pearson chi-square test)

		Caspase-3		Total
		Negative	Positive	
c-myc	Negative	23	30	53
	Positive	19	58	77
Total		42	88	130

p=0.025.

**Table 3.** Multivariate analysis of prognostic factors in total 130 patients by Cox regression

Prognostic factors	Relative hazard	95% CI*	p-value
Age	0.989	0.961~1.027	NS
T Status	1.369	0.756~2.435	NS
N Status	0.782	0.355~1.776	NS
Pathologic stage	3.006	1.228~7.704	0.024
Histology	1.034	0.812~1.732	NS
Caspase-3 expression	0.596	0.353~1.223	NS
c-myc expression	1.185	0.679~2.329	NS

\*CI=Confidence interval.

IIIa 병기 환자에서 caspase-3 단백질발현(p=0.005), 암세포 분화도가 좋은 경우(p=0.003), 그리고 암세포가 현미경학적으로 신경침습이 없는 경우(p=0.004)에 좋은 예후를 보였다(Table 4).

## 고 찰

악성종양의 발생은 세포의 증식과 자멸사 사이에 세포학적인 균형을 유지하는 조절인자들의 비정상적인 발현 및 그들의 작용과 연관되어 있다고 알려져 있다. 이론적으로나 많은 실험실내 연구에 의하면 caspase-3는 세포 자멸사 과정에서 주도적인 역할을 하는 인자로 알려져 있다[4,10,11]. 많은 악성 종양에서 caspase-3 발현과 예후와의 연관성에 관해서 많이 보고되어 왔으나[12-15], 아직까지 caspase-3의 발현과 임상적인 예후에 관한 명백한 연구가 정립되지 않은 실정이다. 즉, 절제된 식도암 환자에서 caspase-3 단백질의 발현은 좋은 예후와 연관된다고 하였고[12], Isobe 등은 절제된 위암 환자에서 위암조직 내 대부분 비활성 상태로 존재하는 inactivated caspase-3가 축적되어 있으면 예후가 나쁘다고 하였는데, 이는 어떠한 외부 요소

**Table 4.** Multivariate analysis of prognostic factors in stage IIIA patients by Cox regression

Prognostic factors	Relative hazard	95% CI*	p-value
Age	1.015	0.950~1.083	NS
Caspase-3 expression	0.122	0.028~0.535	0.005
c-myc expression	0.809	0.259~2.0526	NS
Histology	1.31	0.440~3.900	NS
Microscopic finding			
Differentiation	3.549	1.523~8.270	0.003
Pleural invasion	3.477	0.923~13.098	NS
Lymphatic invasion	1.291	0.218~7.656	NS
Vascular invasion	0.496	0.150~1.642	NS
Neuronal invasion	0.06	0.009~0.398	0.004
Necrosis	0.529	0.094~2.994	NS

\*CI=Confidence interval.

나 caspase-3 자체의 변이 등에 의해 암세포에서 caspase-3의 활성을 억제함으로써 activated caspase-3 mediated-apoptosis를 피하기 때문에 더 쉽게 림프절 전이가 일어나고 예후에 나쁘게 작용한다고 보고하였다[13]. 또한 Glinsky 등은 암 전이는 감소된 caspase-3 단백질의 발현과 연관된다고 하였지만[16], Jonges 등은 대장암에서 높은 caspase-3 활성도는 높은 재발과 관련된다고 보고하였다[17]. Koomagi와 Volm 등은 비록 폐암조직에서 caspase-3 단백질의 발현과 세포 자멸사 정도를 알 수 있는 TUNEL-assay 사이의 연관관계를 직접적으로 관찰 할 수 없었지만, 임상적으로 중등도 이상의 caspase-3 단백질의 발현은 좋은 예후 및 적은 림프절 전이 빈도와 연관되어 있다고 보고하였고[14,18], 최근 저자들은 주로 수술이 불가능했던 환자가 대다수 포함된 비소세포 폐암환자들에서 caspase-3의 발현은 좋은 예후와 연관된다고 보고하였다[6]. 그러나 Takata 등에 의하면 병리조직학적 제 1 병기인 조기 폐암에서 caspase-3 단백질의 발현이 있는 환자의 5년 생존율이 67%로 발현이 없는 환자의 82%에 비해 의미 있게 낮다고 보고하였다[2]. Donoghue 등[19]은 B-cell diffuse large cell lymphoma에서 caspase-3가 면역화학적 염색에서 2가지 다른 양상의 발현을 보일 수 있는데, 즉 불활성 형태의 caspase-3에 대한 항체를 사용한 면역화학염색법에 의해 세포질 안에서 미만성 혹은 반점 형태로 발현되는데, 반점 형태로 염색되는 환자에 비해서 미만성으로 염색되는 환자의 예후가 현저히 불량하다고 보고하였다. 또한 이들은 반점 형태의 염색은 caspase-3가 주로 세포의 미토콘드리아에 국한된 경우이고, 미만형 염색은 세포질과 미토콘드리아 모두에

불활성 caspase-3가 존재하는 경우라고 한다. 이러한 분석에 의한 이들의 결과는 Takata 등[2]의 연구에서와 같이 조기 폐암환자에서 “uncleaved” 즉 불활성 상태의 caspase-3에 대한 면역화학적 염색의 양성 발현은 불량한 예후를 나타내는 관계와 서로 일치한다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 caspase-3의 발현과 임상적인 예후를 해석하는데 혼돈이 있는데, 이는 여기에 사용된 면역화학염색법 시 어떤 항원에 대한 항체를 사용하느냐에 따라 달라질 수 있다고 주장되고 있다[6,13,14]. 즉, caspase-3는 uncleaved proenzyme으로 합성되는데, 이는 궁극적으로 생리학적으로 활성 cystein protease로 전환되면서 작용을 한다. Caspase-3는 inactive 32-kDa caspases-3가 두 활성 형태(17k-Da와 12k-Da)의 caspase-3로 분해 후 세포 자멸사를 매개한다고 하는데[5,6], 대부분의 caspase-3가 비활성 상태로 있기 때문에 uncleaved caspase-3의 높은 발현은 여러 종양에서 나쁜 예후와 연관된다고 주장되고 있다[2,6,19]. 저자들의 연구에서는 위에서 언급한 비활성 상태의 caspase-3에 대한 면역화학염색법과 달리 활성 상태의 17k-Da caspase-3에 대해서도 동시에 면역화학적인 발현을 관찰할 수 있는 polyclonal anti-caspase-3 항체를 사용하였는데, 전체 폐암 환자에서 caspase-3 발현율이 약 68%로 다른 연구의 58~72%와 유사한 발현율을 보였다[2,6,14]. 비록 병기에 관계없이 전체 환자에서 caspase-3의 발현이 있는 경우 생존율이 평균 86개월로 그렇지 않은 경우의 76개월에 비해 더 좋은 예후를 보이는 경향이나 통계적인 의미는 없었다. 그렇지만 병기에 따라 비교하였을 때, caspase-3 단백질 양성발현을 나타낸 IIIa기 환자 군에서만 의미 있게 좋은 생존율을 보였는데, 저자들의 이전 연구 결과와 비교해서 유추해 볼 때 보다 진행성 폐암환자에서 동시에 비활성 그리고 활성 상태의 caspase-3 단백질의 면역화학염색적 발현은 완전 절제수술 후 좋은 예후에 관계된 인자가 될 수 있다고 평가할 수 있다. 하지만 향후 병기에 따른 좀더 많은 수의 환자에서 장기간에 걸친 추적조사로 이 caspase-3 단백질의 발현과 폐암의 예후와의 관계에 대한 추가적인 연구가 필요하고, 새로운 항체를 이용한 연구로 비활성 혹은 활성 caspase-3 단백질 각각의 발현과 임상적인 예후와의 보다 정확한 관계를 밝혀야 될 것이다. transcription factor의 일종으로 Myc gene family의 하나인 c-myc oncogene은 인간에서 세포의 증식, 자멸사 과정 및 종양의 발생 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 비록 Myc 작용 기전이 여전히 완전히 밝혀지지 않았지만 이들은 중요 세포주기 조절인자(key cell cycle regu-

lator)를 자극하거나 억제함으로써 세포의 성장과 세포주기 진행에 있어 주된 역할을 한다고 여겨지고 있다[8,20]. 여러 종양에서 c-myc 단백질의 조절이상이 발견되는데, c-myc 단백질은 cyclin-E/cyclin dependent kinase 2 (cdk2)의 활성작용과 연관해서 G1에서 S 세포주기로의 이행을 촉진시키거나 세포 자멸사를 유도한다고 한다[8,20]. 암의 진행은 수 많은 인자들이 관여하는 일련의 복잡한 과정으로 c-myc oncogene은 인간의 암 진행에 관여하는 중요한 인자들의 하나로 불량한 예후 및 생존을 떨어뜨리는 pro-gressor gene으로써 유방암, 대장암, 난소암, 림프종 및 폐암에서 이 단백질의 활성과 진행성 병기 사이의 연관성이 보고 되어 왔다[21]. c-myc 단백질의 증폭 혹은 과발현은 면역화학염색법, flow cytometry, in situ hybridization (ISH), FISH, PCR 등의 방법에 의해 파악할 수 있는데, 이러한 측정 방법의 차이나 각종 암종 혹은 같은 암종에서 세포의 차이에 의해 그 발현율이 다르게 나타날 수 있다. 비소 세포 폐암에서 면역화학염색법에 의한 c-myc 단백질의 발현율은 10~60% 범위에서 보고되고 있는데[6,18,22,23], 저자들의 연구에서는 비교적 높은 59% (77/130)의 발현을 보인 바, 이는 대상환자에서 폐암종의 세포에 따른 발현의 차이 및 최근에 좀더 예민한 측정이 가능한 항체의 사용에 의한 것이라고 추정된다. 최근의 보고에 의하면 폐암 환자에서 c-myc 단백질의 증폭(amplification)은 림프절 전이[24], p53 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 결손과 연관해서 암의 재발과 전이로 인한 생존율의 저하와 밀접한 관계가 있다고 하였다[25]. 그러나 저자들의 연구에 의하면 전체 환자들 중 약 59%에서 c-myc 단백질의 발현이 있었는데, 현미경학적으로 폐암 조직 안의 림프관내 암 침습이 있었던 25명(19%)의 환자와의 연관성이 관찰되었으나, 이 단백질의 발현 유무에 따른 림프절 전이 여부나 생존율의 차이는 없었고, 또한 병기에 따른 분류상 모두에서도 생존율의 차이는 없었다. 이러한 결과는 c-myc 단백질의 발현을 검출하는 방법의 차이에 의해서거나 c-myc 단백질 단독으로 폐암의 진행에 관여하는 것이 아니라 여러 다른 단백질이나 부가적인 요인들이 작용함으로써 폐암의 진행에 관여할 것 이라고 여겨진다. 그러므로 향후 이 단백질과 연관된 세포주기 경로에 관여하는 다른 암 유발 혹은 억제 유전자에 대한 추가적인 연구가 요구된다. Volm 등[18]의 경우 caspase-3 단백질이 발현되고 c-myc 단백질이 발현되지 않는 경우 가장 좋은 예후를, 그 반대의 경우 가장 나쁜 예후를 보였다고 보고하였으나 저자들의 경우 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현간 서로 연관관계를 보였으나,



실제 생존율에 있어 두 단백질의 발현 사이에 의미 있는 상호 역위 관계는 관찰되지 않았다. 향후 이들 단백질의 발현과 폐암 환자의 예후에 관한 보다 정확한 연관성을 파악하기 위하여 보다 장기간에 걸쳐 모든 병기의 환자를 대상으로 많은 증례에 대한 분석이 요구된다.

## 결론

비소세포 폐암에서 caspase-3와 c-myc 단백질은 비교적 흔히 발현하면서 어느 정도 폐암 발생과정에 관여하는 것으로 추정되며, 완전 절제된 진행성 병기(IIIa 기)의 폐암환자에서 면역조직화학염색법을 이용한 caspase-3 단백질의 발현은 양호한 예후를 나타내는 임상적인 예후의 지표가 될 수 있을 것이다.

## 참고 문헌

- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.* Cancer 1994;73:2013-26.
- Takata T, Tanaka F, Yamada T, et al. *Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I non-small cell lung cancer.* Int J Cancer 2001;96(suppl):54-60.
- Nicholson DW, Thornberry NA. *Caspases: killer proteases.* Trends Biochem Sci 1997;22:299-306.
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, et al. *Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (caspase-3), a cell death protease.* Cancer Res 1997;57:1605-13.
- Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, et al. *Caspase-2 and caspase-3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia.* Blood 1998;92:3090-7.
- Yoo JY, Kim CH, Song SH, et al. *Expression of caspase-3 and c-myc in non-small cell lung cancer.* Cancer Res Treat 2004;36:303-7.
- Garte SJ. *The c-myc oncogene in tumor progression.* Crit Rev Oncog 1993;4:435-49.
- Zajac-Kaye M. *Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer.* Lung Cancer 2001;34(suppl 2):S43-6.
- Tanaka F, Kawano Y, Li M, et al. *Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small cell lung cancer.* J Clin Oncol 1999;17:2728-36.
- Steller H. *Mechanisms and genes of cellular suicide.* Science 1995;267:1445-9.
- Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, et al. *Retroviral transfer of CPP32 beta gene into malignant gliomas in vitro and in vivo.* Cancer Res 1998;58:962-7.
- Hsia JY, Chen CY, Chen JT, et al. *Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma.* Eur J Sur Oncol 2003;29:44-8.
- Isobe N, Onodera H, Shimada Y, et al. *Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance.* Oncology 2004;66:201-9.
- Koomagi R, Volm M. *Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer.* Anticancer Res 2000;20:493-6.
- Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H, et al. *High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1beta converting enzyme (ICE) and CPP32beta gene into malignant gliomas in vitro and in vivo.* Cancer Res 1998;58:962-7.
- Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. *Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms.* Cancer Letters 1998;115:185-93.
- Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, et al. *Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma.* Lab Invest 2001;81:681-8.
- Volm M, Koomagi R. *Prognostic relevance of c-myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer.* Oncol Rep 2000;7:95-8.
- Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. *Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse-cell lymphoma.* Cancer Res 1999;59:5386-91.
- Wyllie AH. *Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture).* Br J Cancer 1993;67:205-8.
- Garte SJ. *The c-myc oncogene in tumor progression.* Crit Rev Oncog 1993;4:435-49.
- Gosney JR, Field JK, Gosney MA, et al. *c-myc oncoprotein in bronchial carcinoma: expression in all major morphological types.* Anticancer Res 1990;10:623-8.
- Rha SJ, Kwack MS. *Microsatellite instability and p53, k-ras, c-myc oncoprotein expression in non-small cell lung carcinoma.* Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2000;33:60-7.
- Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. *Protein expression profile of primary human squamous cell lung carcinomas indicative of the incidence of metastases.* Clin Exp Metastasis 2002;19:385-90.
- Yakut T, Egeli U, Gebitekin C. *Investigation of c-myc and p53 gene alterations in the tumor and surgical borderline tissues of NSCLC and effects on clinicopathologic behavior: by the FISH technique.* Lung 2003;181:245-58.

=국문 초록=

**배경:** 인체에서 세포증식과 세포자멸사(apoptosis) 과정에서의 불균형은 악성 종양의 발생과 그 예후에 중요하게 작용한다. 본 연구는 세포자멸사에 관계하는 세포내 신호전달 경로에 중요하게 작용하는 cysteine protease의 일종인 caspase-3 단백질과 많은 종류의 암에서 세포분열 혹은 세포자멸사 모두에 관여하는 것으로 알려진 c-myc oncogene 단백질의 발현과 폐암과의 연관성을 관찰하고, 완전 절제된 원발성 비소세포 폐암 환자에서 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현과 임상적인 예후 인자로서의 의의를 알아 보고자 했다. **대상 및 방법:** 1996년 5월부터 2003년 12월까지 원발성 비소세포 폐암으로 수술 전 항암화학요법이나 방사선 요법을 시행 받은 환자를 제외하고, 완전 절제술을 시행 받은 총 130명의 환자를 대상으로 하였다. 추적 조사 기간은 중앙값 50개월(3~128개월)로 연구시점에서 수술 후 최소 3년 이상 경과 된 환자를 대상으로 하였다. 폐암조직에서 caspase-3과 c-myc 단백질의 발현은 면역조직화학적으로 염색하여 관찰하고 환자의 임상 및 병리 정보를 후향적으로 조사 비교하였다. **결과:** Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현율은 각각 68% (88/130)과 59% (77/130)으로 caspase-3와 c-myc 단백질의 발현율 사이에 유의한 상관 관계가 있었다( $p=0.025$ ). Caspase-3와 c-myc 단백질의 발현 여부가 전체 수술 환자와의 생존율과의 관계에 유의한 차이는 없었지만, IIIa 군 환자에서 caspase-3 단백질의 발현과 생존율 간에 유의한 차이를 보였다(중앙생존기간 35 vs. 10개월,  $p=0.021$ ). 다변량 분석에 의한 예후인자로 전체 대상환자에서 병리조직학적인 병기( $p=0.024$ ), IIIa 군 환자에서 caspase-3 단백질 발현( $p=0.005$ ), 암세포 분화도가 좋은 경우( $p=0.003$ ), 그리고 암세포가 현미경학적으로 신경침습이 없는 경우( $p=0.004$ )에 좋은 예후를 보였다. **결론:** 비소세포 폐암에서 caspase-3와 c-myc 단백질은 비교적 흔히 발현하고 폐암발생 과정에 관여하는 것으로 추정되며, 완전 절제된 진행성 병기(IIIa 군)의 폐암 환자에서 면역조직화학염색법을 이용한 caspase-3 단백질의 발현은 양호한 예후를 나타내는 임상적인 예후의 지표가 될 수 있다.

- 중심 단어 :** 1. 비소세포폐암  
2. 예후  
3. 종양 표식자  
4. 효소