

대장암 조직에서 Survivin 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹해부병리학교실

이령아 · 김광호 · 심강섭 · 구혜수¹ · 박응범

Expression of Survivin in Human Colorectal Cancer Tissues

Ryung Ah Lee, M.D., Kwang-Ho Kim, M.D., Kang-Sup Shim, M.D.,
Heasoo Koo, M.D.¹ and Eung-Bum Park, M.D.

Departments of Surgery and ¹Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose: Survivin, the recently discovered apoptosis inhibitor of inhibitor of apoptosis (IAP) family is located in chromosome 17q25. It is found only in fetal tissue and transformed tissue but is never found in normal adult tissue. Several authors reported survivin expression in various cancer tissues, which suggested the role of survivin in cancer development. This study intended to find the degree of survivin expression making use of RT-PCR technology and to compare the expression pattern of survivin, caspase 3, and PARP. **Methods:** The cell lines known to have survivin expression such as HL60, Daudi, THP1, and colon cancer cell lines such as COLO 201, WiDr and breast cancer cell line ZR-75-1 were used for the positive control. For the negative control, normal colon tissues were included. The total RNAs from the frozen tissue of 6 normal colon, 36 specimens of colorectal cancer, and cell lines were used in RT-PCR. The 20 paraffin embedded tissues were used in immunohistochemical study in order to find out the degree of protein expression of caspase 3 and PARP. Western blotting was conducted on same tissues for caspase 3 as usual manners. **Results:** The survivin expression by RT-PCR techniques was found in the 22 cases (61.1%). As a result of the immunohistochemical staining, 13 cases (65%) in caspase 3, 17 cases (85%) in PARP showed reduced staining. In western blotting, 32 kDa inactive form of caspase 3 was expressed in 16 cases (80%), but the band of active split form was not found. No significant relationship was found between survivin expression and clinicopathologic data of colorectal carcinomas, and expression of caspase 3 and PARP. **Conclusions:** These result suggest that apoptosis mechanism is depressed in colorectal cancer tissues and survivin plays a role in the inhibition of apoptosis of colorectal cancer. More profound study could confirm the apoptosis mechanism in tumorigenesis. (JKSCP 2000;16:131-138)

Key Words: Survivin, Caspase 3, PARP, Colorectal cancer

서 론

대장암은 세계적으로 점차 증가하는 추세를 보이고 있으며 우리나라에서도 생활습관이 서구화되어감에 따라 점차 증가하는 암종 중의 하나이다. 대장암은 특히 bcl-2¹나 p53²과 같은 세포자멸사(apoptosis)의 관련 유

전자가 발병에 연관되어 있는 것으로 보고된 암종이다.³⁻⁵ 세포자멸사는 계획된 세포사로 괴사(necrosis)와는 구별되는 세포 사멸의 한 형태이다.⁶ 이 과정은 모든 종류의 세포에서 일어날 수 있는 기전으로 특히 태생기의 조직분화과정에 결정적인 역할을 하여 정상적인 성인의 개체를 형성하도록 한다.⁷ 세포자멸사가 일어나지 못하게 되면 해로운 자극을 받은 세포들이 죽지 않고 축적되어 결과적으로 비정상적인 세포들이 지속적으로 생존하여 유해한 효과를 내게 되는데 이런 상태 중에서 가장 대표적인 것이 종양이다.⁸ 따라서 종양의 발병기전에서 세포자멸사의 역할은 매우 결정적이며 이러한 연구 배경의 발전에 따라 종양에 관련된 세포자멸사의 기전

책임저자 : 김광호, 서울시 종로구 종로 6가 70번지
이대동대문병원 외과학교실(우편번호: 110-126)
(Tel: 02-760-5165, Fax: 02-765-5681)

본 논문의 요지는 외과학회 1999년 제 51 차 추계학술대회에서 포스터 발표하였음.

을 변화시키는 여러 유전자와 단백질, 세포 신호에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{9,10}

Survivin은 최근에 밝혀진 IAP (inhibitor of apoptosis) family에 속하는 인간의 IAP 동질형 중의 하나이다.¹¹ 이 구조는 독특하게 하나의 BIR (Baculovirus IAP Repeat) 영역을 갖고 다른 IAP군과는 달리 RING finger 를 갖지 않는다. 이 물질의 염색체는 염색체 17q25에 위치하고 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있다. Survivin은 정상적인 성인의 조직에서는 발현이 되지 않는 것으로 보고되나 태생기의 조직이나 특히 암으로 변형된 세포나 여러 종류의 암종에서는 발현한다고 하여 인간의 암종에서 세포자멸사 억제 효과로 인한 암화과정의 조절물질로서의 중요성이 부각되고 있다.¹²

저자들은 인간의 대장암 조직을 대상으로 하여 여러 종양에서 그 단백질의 존재가 보고된 survivin의 발현 양상을 mRNA 단계에서 확인해 보고 실제로 세포자멸사의 최종 효과자로 알려진 caspase 3¹³와 caspase 3의 기질인 PARP¹⁴ (poly (ADP-ribose)yl polymerase)의 발현도와는 어떠한 연관성을 갖고 있는지 확인하고자 본 연구를 실시하였다.

방 법

1) 연구 대상

이화여자대학교 의과대학 외과학교실에서 1998년 10월에서 1999년 2월 사이에 대장암으로 진단받고 수술받은 36명의 환자를 연구대상으로 하였다. 본 환자들의 신선 종양 조직을 -70°C 냉동고에 보관하였다가 돌로 나누어 하나는 역전사 연쇄 증합효소반응에, 다른 하나는 웨스턴 영동에 사용하였다. 이들은 수술 전에 항암 치료나 방사선 치료 등을 받은 적이 없었던 환자들로서 절제수술을 받았던 환자 중에 동결조직의 확보가 가능하였던 환자를 대상으로 한 것이다.

양성 대조군으로 기존에 survivin의 발현이 알려져 있는 종양 세포주 중에서 THP1, Daudi, HL60 등을 사용하였고¹² 대장암 세포주 COLO201과 WiDr, 그리고 유방암 세포주 ZR-75-1을 사용하였다. 음성 대조군으로는 6예의 정상 대장조직을 사용하였다. 환자들의 임상소견과 병리소견은 환자의 의무기록지와 병리보고서를 통해 조사하였다.

2) 연구 방법

연구 방법으로는 survivin의 mRNA 발현을 확인하기 위해 36예의 대장암 동결조직에서 역전사 연쇄증합효

소반응을 실시하였다. Caspase 3의 발현도를 확인하기 위해 역전사 연쇄증합효소 반응과 면역조직화학 염색, 웨스턴 영동을 실시하였고 PARP의 활성화 정도를 알아 보기 위해 면역조직화학 염색을 시행하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

(1) 역전사 연쇄증합효소 반응:

① 세포주 확립 및 RNA 추출; 양성 대조군인 6가지 세포주는 ATCC 안내서에 따라 각각의 배지조건에서 배양하였다. 배양한 각각의 세포주들을 PBS 5 ml로 세척하고, trypsin-EDTA 2 ml로 처리하여 15 ml tube에 넣었다. 3,000 rpm, 4°C 에서 5분 동안 원심 분리하여 상층액은 버리고, 각각의 세포주 pellet을 얻은 후 다시 PBS 1 ml를 넣은 후 Eppendorf tube에 옮겨 넣고 3,000 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 세포주 pellet을 얻었다. 각각의 pellet에 TRIzol[®] (Gibco-BRL, Co.) 시약을 1 ml 넣고, 4°C 에서 10분 동안 반응시킨 다음 chloroform 을 200 μl 씩 첨가하여 vortex한 후에 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 500 μl 를 떠서 새로운 Eppendorf tube에 넣고 500 μl 의 isopropyl alcohol을 첨가하였다. -20°C 에서 약 10분간 방치 후에 15,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 남아있는 pellet에 75% ethanol을 500 μl 넣어 잘 씻어준 다음, 14,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 조심스럽게 버린 후 10분 정도 상온에서 잘 건조시키고 DEPC (diethylpyrocarbonate) water를 넣어 녹인 후에 분광광도계를 사용하여 RNA를 정량하고 -20°C 냉동고에 보관하였다.

② 대장암 조직의 RNA 추출; 대장암 조직의 냉동절편을 반으로 잘라 일부는 RNA 추출용으로 사용하고 일부는 단백질 추출용으로 보관하였다. 냉동 조직을 막자사발에 넣고 액체질소를 부으면서 잘게 조직을 분쇄한 다음 이 가루를 Eppendorf tube에 모으고 TRIzol[®] 1 ml를 첨가하고 흔들어 준 후 상온에 약 5분간 방치하였다. 상층액 600 μl 를 걷어 새 tube에 모은 후 chloroform 200 μl 첨가하고 14,000 rpm, 4°C 도에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 600 μl 을 걷어서 새 tube로 옮기고 isopropyl alcohol을 동량 넣고 얼음에 15분 정도 방치한 후 다시 14,000 rpm에서 10분 정도 원심분리하여 pellet을 확인하고 상층액을 제거하였다. 75% ethanol을 300 μl 넣고 3분간 원심분리하여 씻어준 후 ethanol을 제거하였다. 20~30 μl 의 DEPC water를 넣고 분리된 RNA를 잘 용해시켰다. 세포주와 같은 방법으로 추출된 RNA를 정량하였다.

③ 역전사; 정량한 RNA를 random primer를 사용하

여 역전사하였다. 우선 RNA 정량결과에 따라 3 μ g을 정량하여 template로 사용하고 random primer 2 μ l, dNTP mixture 1 μ l, 5 \times PCR 완충액 3 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, RNase inhibitor 1.0 μ l과 MMLV-reverse transcriptase 0.1 μ l을 넣고 잘 섞은 후 37°C에서 60분, 99°C에서 5분 동안 반응시킨 후 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

이렇게 얻어진 cDNA는 phenol : chloroform : isoamyl alcohol 25 : 24 : 1 용액을 동량 넣어 정제하고 이것을 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 다시 Eppendorf tube에 넣고 동량의 99.9% ethanol을 넣어서 -20°C에서 10분간 침전시켰다. 다시 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 70% ethanol로 잘 씻어준 다음, 15,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 pellet을 상온에서 말린 후에 3차 증류수 20 μ l을 넣어 녹인 후 4°C에 보관하였다.

④ 연쇄증합효소 반응; Tamm등¹⁵이 보고한 바 있는 시발체 서열을 확인하고 제작하여(Table 1) survivin과 caspase 3에 대한 연쇄 증합효소 반응을 실시하였다. cDNA는 3 μ g을 사용하였고 10 \times PCR 완충액 2.5 μ l, dNTP 혼합물 2 μ l를 사용하고, 시발체는 전진형과 역행형을 각각 10 pmol씩 사용하였다. Takara사의 taq polymerase를 0.1 μ l (5 units/ μ l)씩 첨가하였고 thermal cycler (MJ Biomedica Co.)를 사용하여 증폭하였다. 비교군으로 β -actin에 대한 시발체를 제작하여 연쇄증합효소반응을 수행하였다. 이렇게 시행된 연쇄증합효소반응 결과 얻어진 산물은 6 \times loading dye를 첨가하여 2% agarose gel에서 50 V로 전기영동한 후 Ethidium Bromide로 염색하였다. 이것을 자외선 투시기하에서 띠를 확인하였다.

(2) 면역조직화학 염색: 면역조직화학 염색은 기존에 알려진 통상의 방법으로 파라핀 포매조직의 확보가 가

능하였던 20예의 대장암 조직을 대상으로 실시하였다. 항체는 anti-CPP32, anti-PARP (Santa Cruz Biotechnology, Inc)를 사용하였다. 파라핀 포매조직을 4 μ m 두께로 박절하고 유리슬라이드 위에 놓은 뒤 xylene으로 탈파라핀화한 다음 0.3% H₂O₂ 용액으로 재가수화하였다. 10⁻³ M sodium citrate buffer에 담근 뒤 pressure cooker에 1시간 동안 두었다가 식히고 PBS로 세척하였다. 1 : 200으로 희석한 일차항체를 붙이고 4°C에서 밤새도록 반응시킨 후 세척하였다. Biotylated anti-mouse immunoglobulin과 streptavidin을 상온에서 30분간 반응시킨 후 마지막으로 발색을 위해 AEC (Alkaline phosphatase Enzyme Conjugates)로 염색하고 헤마톡실린으로 대조염색을 실시하였다. 진한 적색으로 발색된 부위가 전체의 5% 이상인 경우를 양성으로 판정하였고 그 이하의 경우를 음성으로 판정하였다.

(3) 웨스턴 영동(Western immunoblotting): 면역조직화학 염색을 실시하였던 환자 20명의 조직에서 단백질을 추출하여 그 중 200 mg을 4°C의 1 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 150 mM NaCl)를 첨가한 다음, 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고 상층액을 eppendorf tube에 옮겼다. 단백질 정량은 BCA 방법을 이용하였다. 각각의 시료로부터 추출한 단백질은 1 μ l당 1 μ g이 되도록 하였다. 전기 영동시 단백질 시료는 5 \times gel loading sample buffer (1 M Tris-HCl pH 8.0, 10% SDS, 200 mM DTT, 50% sucrose, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol)을 시료의 1/5배로 넣고 5분 동안 100°C에서 끓인 후 상온에서 식힌 다음, 실온에서 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 이 시료를 10% SDS gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 이중 한장은 염색용 완충액 (methanol 450 ml, DW 100 ml, acetic acid 450 ml, comassie brilliant blue R-250 5 g/l)을 gel이 잠길 수 있는 적당량을 첨가하여 30분 동안 염색한 후에 탈색용 완충액(methanol 450 ml, W 100 ml, acetic acid 450 ml/l)으로 여러 번 바꾸어 탈색시키는 방법으로 단백질의 띠를 확인하였다. 다른 판은 영동분석을 위해 mini-protein transfer kit (Bio-rad)를 사용하여 NC (nitrocellulose) membrane으로 전사하였다. 전사용액은 1 l당 Tris 3 g, glycine 14.4 g, 20% methanol을 넣고 만들었으며, 4°C, 100 V에서 1시간 동안 수행하였다.

전사된 NC membrane을 TTBS (1 \times TBS, 0.3% Tween 20)으로 씻어준 다음 5% 무지방유가 포함된 TTBS에서 2시간 동안 반응을 정지시켰다. TTBS로 5분

Table 1. Primer sequences for RT-PCR amplification

mRNA	Product size (bp)	Primer sequences 5'-3'
β -actin	154	ACTGTGTCTGGCGTACAGGT TCATCACCATTGGCAATGAG
Survivin	445	GGGAATTCATGGGTGCCCCGACGTTGCC CTCTCGAGTCAATCCATGGCAGCCAGCT

에 1회씩 6회 세척한 후에 1차 anti-CPP32 항체와 anti-PARP 항체를 1 : 200으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 5분에 1회씩 6회 세척한 후에 horseradish phosphatase가 표지된 2차 항체를 1 : 10,000으로 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TTBS로 5분에 1회씩 6회를 세척한 다음, ECL (Enhanced ChemiLuminescence) 용액을 1 : 1로 잘 섞어서 NC membrane위에 부어서 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 다음 자동 현상기로 현상하였다.

(4) 통계 분석: 통계 분석은 Chi-square test로 검증하

Table 2. Clinicopathologic characteristics according to survivin expression (n=36)

Clinical parameters	Number	Survivin expression by RT-PCR n (%)	p value
Age			
≤60	16	8 (50)	0.22
>61	20	14 (70)	
Sex			
M	19	12 (63.2)	0.78
F	17	10 (58.8)	
Dukes' stage			
A	3	2 (66.7)	0.75
B	19	13 (68.4)	
C	12	6 (50)	
D	2	1 (50)	
Differentiation			
WD	10	8 (80)	0.55
MD	22	12 (54.5)	
PD	2	1 (50)	
Mucinous	2	1 (50)	
LN metastasis			
positive	19	13 (68.4)	0.34
negative	17	9 (52.9)	
Tumor size			
≤5 cm	21	13 (61.9)	0.90
>5 cm	15	9 (60)	
Tumor location			
Right colon	9	6 (66.7)	0.71
Transverse colon	4	2 (50)	
Sigmoid colon	4	2 (50)	
Rectum	21	13 (61.9)	

WD = well differentiated tumor; MD = moderately well differentiated tumor; PD = poorly differentiated tumor.

였고 p값이 0.05 이하일 때 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1) 대장암 환자의 임상소견 및 병리소견의 분석

성별 분포는 남자가 19명, 여자가 17명으로 성비는 1.12 : 1이었다. 연령분포는 34세에서 77세로 평균연령은 57.0세였다. Dukes 분류법에 따른 병기분류에 의하면 A가 3명, B가 19명, C가 12명이었고 D가 2명이었다. 림프절 침윤여부에 따라 분류하면 침윤이 없었던 경우가 17예, 침윤이 있었던 경우가 19예였고, 종양의 위치는 우측결장암이 9예, 횡행결장암이 2예, S자형결장암이 4예였고 직장암이 21예였으며 전 대장의 용종증이었던 환자에서 우측결장암이 있었던 경우가 1예 있었다. 종양세포의 분화도에 따라 분류하면 고분화암이 10예였고 중등도 분화암이 22예로 가장 많았으며 저분화암이 2예였고 점액성종양이 2예 있었다. 종양의 크기는 5 cm 이하가 21예였고 5 cm 이상이 15예였다(Table 2).

2) 대장암 조직에서 Survivin의 발현 양상

양성 대조군인 종양 세포주에서 역전사 연쇄증합효소 반응을 시행한 결과 survivin의 경우 모두 띠를 형성하였으며 대장암 세포주인 COLO201에서 특히 진한 띠를 형성한 것을 관찰할 수 있었다. 음성대조군인 정상대장 조직에서는 띠를 확인할 수 없었다. 대장암 조직의 경우 36예 중 22예(61.1%)에서 띠를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 결과를 기존의 임상병리 지표에 따라 분류한 결과 통계적 유의성은 없었다(Table 3).

3) Caspase 3의 발현 결과

Caspase 3의 역전사 연쇄증합효소반응 결과 세포주

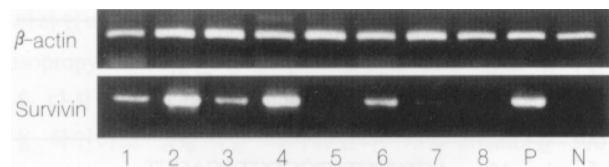


Fig. 1. RT-PCR results of survivin. The bands of survivin were found in 22 cases (61.1%) among the 36 colorectal cancers. In cases of caspase 3, bands were found in 27 cases (75%). P = positive control; N = negative control.

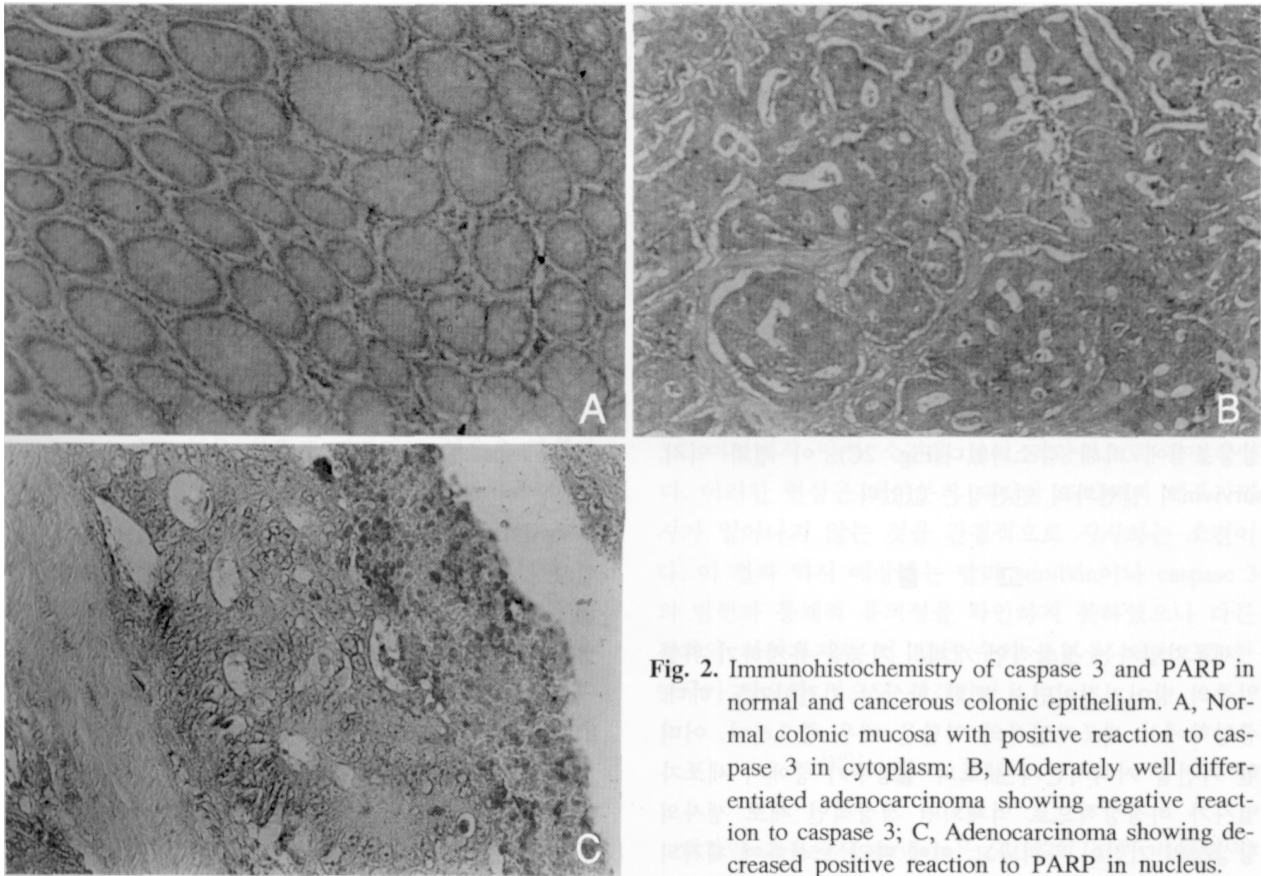


Fig. 2. Immunohistochemistry of caspase 3 and PARP in normal and cancerous colonic epithelium. A, Normal colonic mucosa with positive reaction to caspase 3 in cytoplasm; B, Moderately well differentiated adenocarcinoma showing negative reaction to caspase 3; C, Adenocarcinoma showing decreased positive reaction to PARP in nucleus.

Table 3. Correlations of survivin, caspase 3 and PARP (n=20)

	Survivin expression (n)		p value
	Positive	Negative	
Caspase 3 (IHC*)			0.63
Positive	6	1	
Negative	10	3	
PARP [†] (IHC)			0.35
Positive	3	0	
Negative	13	4	
Caspase 3 (western blotting)			0.26
Over-expression	12	4	
No over-expression	4	0	

*IHC = immunohistochemical reaction; [†]PARP = poly (ADP-ribose)yl polymerase.

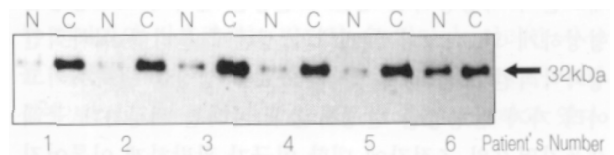


Fig. 3. Western immunoblotting of caspase 3. The bands of caspase 3 at 32 kDa. Inactive form of caspase 3 are over-expressed in cancer tissues relative to normal tissues, but active split form were not found neither in the cancer nor normal tissues.

중에서는 WiDr, THP1, ZR-75-1, HL60에서 띠를 확인할 수 있었고 음성 대조군인 정상 대장 조직에서는 6예 중 4예에서 caspase 3의 띠를 확인하였다. 대장암 조직의 경우 27예(75%)에서 띠를 형성하였으나 survivin의 발현양상과 통계적인 유의성은 없었다. 면역조직화학 염색 결과 정상 대장 조직에서는 세포질이 양성이었고 (Fig. 2A) 암조직에서는 양성반응이 현저히 감소되어 나타났다(Fig. 2B). 염색을 실시한 20예 중 13예(65%)에서 발색이 감소되어 나타났으며 이 결과도 survivin의

발현과 연관성이 없었다. 웨스턴 영동의 결과 16예의 경우 정상조직에서보다 매우 과발현된 32 kDa의 띠형성이 확인되었고 다른 4예에서는 정상과 유사하거나 미미한 띠형성을 보였으며 활성형으로 알려진 20 kDa과 12 kDa의 분리형은 확인되지 않았다(Fig. 3). 이 결과도 survivin의 발현여부와는 연관성이 없었다.

4) PARP의 염색 결과

PARP에 대한 항체로 면역조직화학 염색의 결과 정상조직의 경우 핵에 진한 적색의 발색 부위를 확인할 수 있었는데 대장암 조직의 경우 17예(75%)에서 반응이 정상조직에 비해 감소되었다(Fig. 2C). 이 결과 역시 survivin의 발현과의 연관성은 없었다.

고 찰

세포자멸사는 정상적인 개체의 기능을 유지하기 위한 일종의 방어기전이면서 또한 항상성 기전이기도 하다. 종양학에서 세포자멸사의 역할은 매우 중요하다. 어떠한 기전을 거쳐서든지 세포의 생명주기 중에서 세포자멸사가 비정상적으로 억제되면 정상적인 세포 생사의 항상성의 기전이 파괴되고, 이에 따라 노쇠하여 제거되어야 할 세포나 비정상적인 세포들의 생존이 지속되어 결과적으로는 유해한 세포의 증식이 초래된다. 이러한 세포들의 비정상적인 생존의 연장은 일차적으로 종양을 형성하게 되고 그외에 개체의 생존에 불리한 이차적인 생화학적 효과를 파생시킴으로써 생명을 단축시키고 여러 가지 합병증을 발생시킨다. 이러한 배경하에 근래 세포자멸사의 조절자에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데 그 중에서 최근에 중요성이 부각되고 있는 것이 IAP 단백질이다.

IAP는 지금까지 약 20여종이 보고되어 있으며 그 중에서 인간에서는 NAIP, HIAP1, HIAP2, XIAP, TIAP와 survivin 등 6종의 IAP가 보고되어 있다.¹⁶ 이들의 유전자는 각각 다른 염색체에 위치하는데 survivin의 유전자는 염색체 17q25에 위치하는 것으로 알려져 있다.¹⁷ IAP는 세포종류에 따라 특이성을 가지고 있어 조직에 따라 발현율에 차이가 있기는 하나 baculovirus로부터 인간에 이르기까지 보존적인 형태로 존재하므로 세포자멸사 기전에 이들이 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 생각되며 이러한 가설을 뒷받침하는 여러 보고가 있다.

IAP에 의한 세포자멸사 억제 기전은 크게 2가지 기전으로 나눌 수 있는데 그 첫째는 caspase 관련 기전이고 두 번째는 caspase 비관련 기전이다.¹⁶ 우선 IAP는 세포

자멸사 기전의 최종 효과자인 caspase를 억제한다고 한다.¹⁸ 여러 연구보고에 의하면 caspase 3는 32 kDa의 pro-caspase (CPP 32)상태로 세포질 내에 존재하고 있다가 세포자멸사를 유발하는 자극이 주어지면 20 kDa과 12kDa으로 분해되어 활성형으로 변화한다고 한다.¹⁹ 이렇게 caspase 3가 활성화하면 여러 종류의 기질단백을 분해하는데 PARP도 그 중 한 가지이다.¹⁴ PARP는 비가역적인 스트레스가 세포에 가해질 때 DNA구조와 유전자의 발현을 조절하는 효과를 나타내므로 PARP의 분해도는 caspase 3의 활성도를 측정하는데 효과적인 지표이며 세포자멸사가 일어나는지 확인할 수 있는 지표이다.²⁰ Caspase를 억제하는 효과는 여러 종류의 IAP에서 보고된 바 있다.²¹

Survivin은 인간에서 태생기의 분화과정에 직접적인 영향을 끼침으로써 분화에 의해 사멸하는 조직과 잔존하는 조직을 결정짓는 역할을 하는 것으로 기대되는 물질이다. 특이하게도 이 유전자는 혈액응고 기전 중 Xa 인자의 세포막 수용체인 EPR-1 (effector protease receptor-1)에 역 구조를 갖고 있다고 한다. EPR-1은 Xa 인자가 혈관의 평활근 세포에 대한 증식효과를 갖도록 유도하는 역할을 한다고 알려졌다.²² EPR-1이 survivin의 역 구조를 형성하고 있는 것은 자연적인 상태에서 survivin에 대한 antisense가 존재하는 것으로 생각되며 이 antisense는 정상적인 성인의 조직에서는 survivin이 발현되지 않도록 억제하는 조절자로서의 역할을 하는 것으로 생각한다.¹⁷

Survivin도 다른 IAP들과 같이 *in vitro* 실험에서 caspase를 억제하는 효과가 있다.¹² Tamm등¹⁵은 survivin이 세포자멸사를 억제하는 효과를 내는 것을 확인하였으며 caspase 3, caspase 7과 반응하며 caspase 중에서도 활성형에만 결합한다는 사실을 발표하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 XIAP가 bcl-x와 cytochrome C의 다음 단계에서 세포자멸사를 억제하는 것처럼²³ survivin도 cytochrome C의 하위 단계의 XIAP와 유사한 위치에서 작용할 것이라고 추측하고 있다.

Survivin의 발현은 암종에서 특징적이어서 더욱 그 중요성이 부각되고 있으며 인간의 암종에서 survivin 단백질의 발현에 대해서 몇몇 보고가 있다. Ambrosini등¹¹은 1997년에 폐, 대장, 유방, 췌장, 및 전립선 등의 여러 장기의 선암과 고등급 림프종에서 웨스턴 영동법을 이용하여 보고한 바 있고 Adida등¹²이 신경아세포종에서 면역조직화학 염색의 시행 결과 72예 중 34예(47%)가 양성이었다고 보고하였다. 이 연구에 따르면 조직분화도가 나쁜 경우 염색된 경우가 많아 survivin이 불량한 예

후인자라고 하였다. 또한 Lu 등²⁴은 위선암 174예에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 34%가 양성이라고 보고하였고 p53의 발현과 bcl-2의 발현과는 각각 56% 및 69%의 일치율을 보인다고 하였다. 이들은 병기가 높아질수록 survivin의 발현 정도도 감소한다고 하였으나 통계적인 유의성을 확인하지는 못하였다. 최근 Kawasaki 등²⁵이 대장암에서 survivin에 대한 면역조직화학 염색 결과를 발표하였는데 171예 중 91예(53%)에서 양성 이었고 bcl-2의 발현과 높은 연관성을 가지며 생존율의 저하와 관련이 있다고 하였다.

본 연구의 결과 대장암 조직에서 survivin의 유전자가 61.1%라는 매우 높은 비율로 전사되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Kawasaki 등²⁵의 survivin의 면역조직화학 염색의 결과보다도 높은 비율로서 survivin이 암종의 조직에서 매우 높은 비율로 발현한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 임상조건이나 병리조건과의 통계적인 연관성은 확인하지 못하였는데 이는 연구의 표본 수가 작아서 이 결과에 의의를 부여하기는 어려우므로 앞으로 보다 많은 수의 대장암을 대상으로 한 연구가 필요할 것이다. Caspase 3는 일단 모든 조직에서 형성되어 비활성형의 전구체 형태로 세포질에 존재하고 있다. 외부에서 세포자멸사를 유발하는 자극이 주어지면 활성화형으로 분해되면서 활성화되는 물질로, 전구체 형태로 완성되어 있는 상태에서 자극의 유무에 따라 그 활성이 결정되므로 실제 전사단계에서는 조직간 차이를 판별하기 어렵다고 한다.²⁶ 본 연구의 결과에서도 mRNA 발현의 차이를 확인하기는 어려웠으며 이는 caspase 3가 전사단계에서 활성화도가 조절되지 않는다는 기존의 연구결과와 부합된다. 또한 웨스턴 영동의 결과 caspase 3의 비활성형인 32 kDa의 띠가 암조직에서 과발현되어 있음을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 암종에서 caspase 3가 활성화되지 못한 형태로 남아 있는 것이 정상 조직에서보다 많다는 것을 의미하며 이는 암종에 caspase 3의 활성도를 조절하는 조절자가 있어 세포자멸사를 방해하고 있는 것으로 생각할 수 있다. 단, 본 연구 결과 정상 조직에서도 활성화 형태의 caspase 3의 띠는 확인하지 못하였는데 이런 결과가 기술적인 문제로 인한 것인지 아니면 활성화 형태의 caspase 3가 확인되기 어려울 정도로 적은 양인지 또는 활성화되었다가 바로 비활성화되어버려 관찰되지 않는 것인지에 대해서는 확인하지 못하였다. 분명한 것은 대장암 조직에서 caspase 3의 비활성형이 현격하게 증가되어 있다는 점이고 본 연구에서는 survivin과의 관련성을 확인하지는 못하였으나 더 많은 표본을 대상으로 한 연구에서는 다른 결

과를 얻을 수도 있으리라고 생각한다. 또한 survivin이 다른 IAP처럼 caspase 3의 비활성형에 대한 직접적 저해자로서 작용하여 caspase 3을 불활성화시킬 가능성에 대해서도 연구하여야 할 것이다.

PARP는 핵내 효소의 일종으로 DNA가 파괴되었을 때 DNA 재생에 관여하는 대표적인 물질로 세포자멸사가 일어나면 분해되는 것으로 알려져 있으며 이는 세포자멸사의 유무를 확인하는 지표로 사용된다. 본 연구에서 대조군인 정상 조직에서는 핵에서 양성 소견을 보였으나 대장암 조직은 17예(85%)가 음성이었고 2예에서는 핵에서 양성반응을 관찰할 수 있었으며 1예에서는 5% 미만에서 양성 소견을 보여 약양성으로 판별하였다. 이러한 현상은 대부분의 대장암 조직에서 세포자멸사가 일어나지 않는 것을 간접적으로 시사하는 소견이다. 이 결과 역시 예상과는 달리 survivin이나 caspase 3의 발현과 통계적 유의성을 확인하지 못하였으나 다른 결과와 마찬가지로 더 많은 수의 표본을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

대장암 조직에서 survivin은 61.1%의 높은 비율로 발현되며 caspase 3, PARP가 각각 65%, 85%에서 정상에 비하여 발현도가 저하되거나 소실되어 있으며 caspase 3가 비활성 형태로 존재하는 것을 알 수 있었다. 그러나 두 인자간의 상호관계는 발견할 수 없었다. 이러한 사실은 대장암조직에서 세포자멸사가 억제되어 있으며 이 과정에 survivin이 작용하고 있을 가능성을 시사하고 있다.

REFERENCES

1. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997;4:9-19.
2. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens C, Lee JJ, Levin B. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41.
3. Hao X, Du M, Bishop AE, Talbot IC. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 1998;6:523-7.
4. Yamamoto T, Igarashi N, Kato Y, Kobayashi M, Kawakami M. Apoptosis in adenoma and early adenocarcinoma of the colon. *Histol Histopathol* 1998;3:743-9.
5. Aorake T, Lu CD, Chiba Y, Muraoka R, Tanigawa

- N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 1999; 1:135-42.
6. Tomei LD, Cope FO. Apoptosis: The molecular basis of cell death. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. p. 5-15.
 7. Fotedar R, Diederich L, Fotedar A. Apoptosis and cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 1996;2:147-63.
 8. Rew DA. Cancer-a degenerative disorder? *Eur J Surg Oncol* 1998;5:362-6.
 9. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surg Oncol* 1997;3:133-42.
 10. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci* 1997;3:119-25.
 11. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
 12. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 1:43-9.
 13. Dorstyn L, Kinoshita M, Kumar S. Caspases in cell death. *Results Probl Cell Differ* 1998;24:1-24.
 14. Lazebnik YA, Kaufman SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994;22:346-7.
 15. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20.
 16. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAP) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59.
 17. Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Bio Chem* 1998;18:11177-82.
 18. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-4.
 19. Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Develop* 1998;12:806-19.
 20. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares AH, Smulson ME. Transient poly (ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Bio Chem* 1998;22:13703-12.
 21. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-25.
 22. Herbert JM, Heralut JP, Avril C, Mares AM, Schaeffer P. Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1997;101:993-1000.
 23. Duckett CS, Li P, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of bcl-x and cytochrome C. *Mol Cell Biol* 1998;1:608-15.
 24. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-12.
 25. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-4.
 26. Hoshi T, Sasano H, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, et al. Immunohistochemistry of caspase 3/CPP32 in human stomach and its correlations with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998;6A: 4347-53.