

결장 및 직장암에서 면역화학염색법을 이용한 Thymidylate Synthase 발현

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실, ¹임상병리학교실

안창혁 · 서학준 · 김기환 · 오승택 · 김정수 · 전해명 · 임근우 · 이은정¹

Thymidylate Synthase Expression Using Immunohistochemical Staining in Colorectal Cancer

Chang Hyeok An, M.D., Hak Jun Seo, M.D., Kee Hwan Kim, M.D., Seung Tack Oh, M.D., Jeong Soo Kim, M.D., Hae Myung Jeon, M.D., Keun Woo Lim, M.D., Eun Jung Lee, M.D.

Departments of Surgery and ¹Clinical Pathology, Uijeongbu St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Uijeongbu, Korea

Purpose: Thymidylate synthase (TS) is a critical enzyme in the DNA synthesis and an important target of cancer chemotherapeutic agents, such as 5-fluorouracil (5-FU). Recent studies suggest that TS expression is related to the prognosis of various cancers and the mechanism of chemotherapeutic drug resistance. This retrospective study was performed to determine whether TS expressions in primary colorectal tumors influence the overall survival and recurrence for patients with colorectal cancer.

Methods: Intratumoral TS expression was evaluated by immunohistochemical staining using TS-106 monoclonal antibody in primary colorectal cancers of 64 patients who had undergone surgery from July, 1995 to June, 1999. The relationship between TS expressions and patients' survival was evaluated statistically. The median follow-up period was 25.7 months.

Results: Overall positive TS expression rate was relatively high (54.7%) in colorectal cancers, and overall disease-free survival rate was significantly higher in the TS positive group ($P=0.0204$). But there was no statistically significant differences in overall survival rates ($P=0.249$) and tumor recurrence rates ($P=0.732$) between positive TS group and negative TS group.

Conclusions: These results suggest that TS expression status in the colorectal cancer tissue is only related to the overall disease-free survival rates, not the overall survival rates and tumor recurrence rates. More objective method

and long term follow up study will be required for accurate assessment of clinical importance of TS expression in colorectal cancers. *J Korean Soc Coloproctol* 2001; 17:3 16-323

Key Words: Thymidylate synthase, Colorectal cancer, Survival and recurrence

결장직장암, 생존과 재발

서 론

결장직장암의 치료는 일반적으로 조기암이거나 종양의 침범이 국한되어 있을 경우에는 수술적 제거가 원칙이지만, 종양이 진행된 상태 혹은 전이된 경우에는 부수적인 항암치료가 요구된다. 결장직장암에서의 항암화학요법은 5-fluorouracil (5-FU)을 근간으로 약 30년 가까이 지속되어 왔으나 반응률은 저조하여 40% 미만을 나타낸다.¹ 또한 5-FU는 피부의 색소침착, 설사, 골수 억제작용, 소화기 점막염 등 부작용이 나타날 수 있어 약물을 투여받는 환자를 힘들게 하기도 한다. 그러므로 5-FU를 근간으로 하는 약물요법 시행 시 약물이 효과적으로 작용할 수 있는 환자를 선별하여 불필요한 약물투여로 인한 부작용을 줄일 수 있고 치료효과도 높일 수 있는 방법에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. Thymidylate Synthase (TS)는 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP)를 thymidine 5'-monophosphate (dTMP)로의 환원성 메틸화를 촉매하는 효소로서 세포 내 DNA 합성에 있어 필수적인 역할을 하며, 5-FU의 중요한 공격목표가 되는 것으로 알려져 있다(Fig. 1).² 5-FU는 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP)로 대사되어 5,10-methylene-tetrahydrofolate (CH₂-THF), TS와 함께 3차 복합체 (covalent ternary complex)를 형성함으로써 TS 활성도를 낮추어 DNA 합성을 억제하게 된다. 결장직장암 조직 내에서 TS 발현의 차이는 5-FU의 약물저항성과 밀접한 관련이 있을 뿐만 아니라^{2,3} 예후와도 깊은 상

책임저자: 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1
의정부성모병원 외과(우편번호: 480-130)
Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717
E-mail: drbreast@cmc.cuk.ac.kr

본 논문의 요지는 2001년 대장항문학회 춘계학술대회에서 구 연 발표하였음.

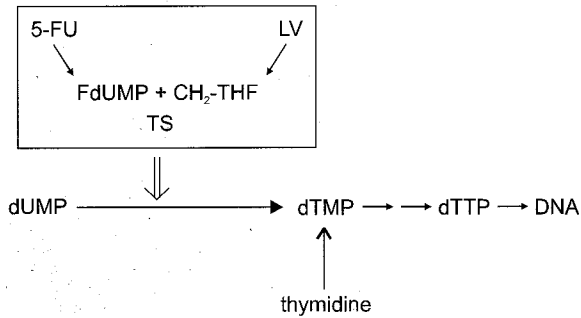


Fig. 1. Mechanism of inhibition of thymidylate synthase by FdUMP, active metabolic form of 5-FU, including the ternary complex formation (represented by the box), and preventing binding of natural substrat dUMP to thymidylate synthase, and thus inhibiting its conversion to dTMP and subsequently DNA synthesis.

관관계를 보여, TS 발현이 높을수록 예후가 불량하므로^{4,5} 보다 적극적인 치료가 필요하다는 보고가 많다. 그러나, 이와 달리 환자의 예후와 TS 발현의 연관성이 없다는 보고⁶도 있어, 저자들은 TS 106 단일 항체를 사용한 면역화학염색법을 이용하여 결장직장암에서의 TS의 발현양상을 알아보고, TS의 발현과 결장직장암 환자의 생존율 및 재발률과의 관계를 알아봄으로써 예후인자로서 TS의 임상적 의의에 대하여 조사하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법

1995년 7월 1일부터 1999년 6월 30일까지 4년간 가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과에서 결장 및 직장암으로 수술을 받은 환자 중 임상기록 및 병리조직의 조회가 가능했던 64예를 대상으로 하여, 재입원, 외래방문, 전화, 행정자치부 전산망을 통하여 2000년 3월까지 추적 조사를 하였다. 추적기간은 6개월에서 57개월까지로 평균 25.7개월이었다. 총 64명의 환자 중 수정된 Dukes씨 병기 B2 이상인 59예에서 항암화학요법을 시행하였다. 사용된 주요제제는 5-FU (425 mg/BSA)와 Leucovorin (20 mg/BSA)의 병합투여로서 1회 5일 4주 간격으로 6차례 시행한 후 (Mayo regimen) 추적검사를 하였다. 방사선 치료는 병기가 B2 이상인 직장암 환자에서 수술 후 4,800~6,000 cGy를 12~38회로 분할 조사하였다. 추적검사는 첫 2년간은 3개월마다 외래방문을 하여 검사하였고, 이후에는 6개월 간격으로 하였다. 추적검사는 혈액검사, 생화학검사, 혈중 CEA, 흉부방사선 촬영, 대

장내시경 혹은 하부장관바리움 촬영, 복부 컴퓨터 촬영 등을 시행하였다.

1) 면역조직화학염색

먼저 파라핀 포매 절편을 4µm 두께로 잘라 probe on plus 슬라이드에 부착시켰다. Xylene으로 3분간 3회 담구어 파라핀을 제거한 후, 100%, 85%, 70%, 50% 알코올에 3분씩 처리 후 증류수에 넣어 합수화하였다. 종양의 항원을 노출시키기 위해 10 mM Citrate 용액에 넣어 121°C에서 10분간 가압 멸균한 후 조직 표본 위에 Peroxidase-Blocking solution을 떨어뜨려 10분간 두어 내인성 peroxidase를 저지시키고, TBS 용액으로 씻은 다음 비특이적인 결합을 막기 위해서 non-immune serum과 실온에서 10분간 반응시킨 후, 1 : 50으로 희석한 TS-106 (Chemicon, Temecula, CA, USA) 일차항체를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. TBS용액으로 씻은 후 2차 항체인 biotinylated polyvalent antibody (Histostain-Plus, Zymed, South San Francisco, USA)를 실온에서 10분간 반응시켜 TBS 용액으로 씻고 HRP-streptavidine과 10분간 반응시켰다. TBS 용액으로 씻고 발색시약인 DAB로 5분간 반응시킨 후 물로 세척하였다. Hematoxylin으로 15초간 대조염색하고 알코올과 Xylene으로 탈수시켜 canada balsam으로 봉입한 후 현미경으로 검경하였다. 종양의 이질성(heterogeneity)으로 인한 염색의 차이를 줄이기 위해 시료는 종양과 정상조직과의 경계부위에서 채취하였으며, 염색결과에 대한 판독상의 오차를 최소화하기 위해 한 종양당 3개의 슬라이드를 제작하여 2개 이상의 판독결과에 따라 자료를 정리하였다.

2) 면역조직화학염색의 평가

TS는 종양 세포의 세포질 내에서 갈색으로 염색되었으며, Sinicrope 등⁷의 방법을 이용하여 음성군(negative expression group)과 양성군(positive expression group)으로 나누었다. 즉, TS 발현부위를 백분율로 5단계로 나누어 5% 미만은 0.5~25%는 1, 25~50%는 2, 50~75%는 3, 75% 이상은 4로 하고, 염색의 강도를 3단계로 나누어 발현이 약한 경우 1, 중등도의 경우를 2, 고도의 경우를 3으로 한 후 두 값을 곱하여 4점 미만인 경우 음성군, 4점 이상인 경우 양성군으로 정의하였다(Fig. 2).

3) 통계 처리

각 군에서의 임상변수의 차이는 unpaired t-test와

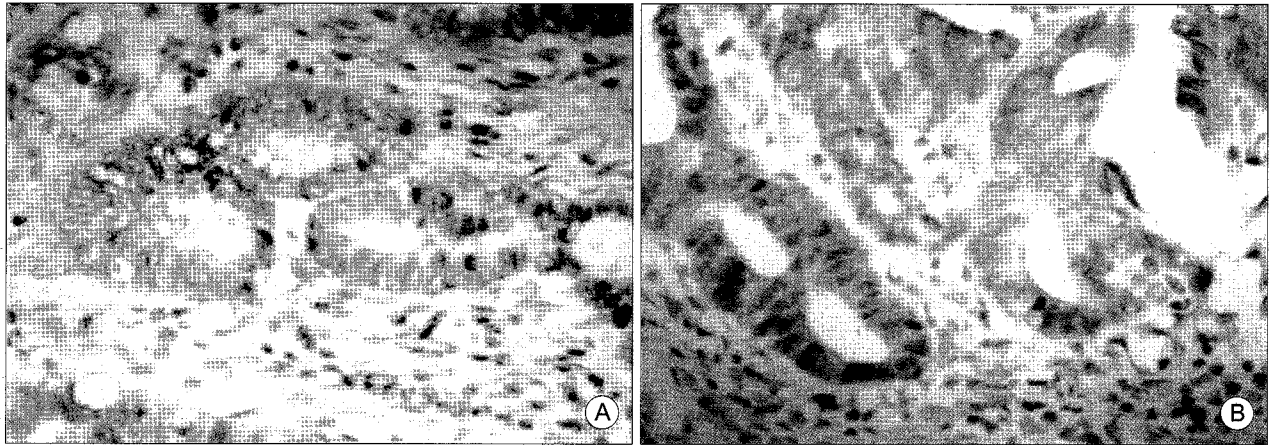


Fig. 2. Immunohistochemical staining of thymidylate synthase (TS) in colorectal cancer ($\times 200$) (A) Negative TS expression group and (B) Positive TS expression group. Diffuse, high density TS staining in the cytoplasm of cancer cells (B) compared with low immunoreactivity (A)

chi-square test를 이용하여 P-value를 구한 후 $P < 0.05$ 인 경우를 의의 있다고 판정하였고, 생존곡선은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였으며 통계적 검정은 Peto의 log-rank test로 하였다.

결 과

전체 64예 중 남녀는 각각 35명과 29명이었고, 나이는 28세부터 77세까지로 평균 56.5세이었으며, 암병소를 위치로 보면 결장 38예(59.4%), 직장 26예(40.6%)이었다. Dukes씨 병기는 A 3예(4.7%), B 24예(37.5%), C 27예(42.2%), D 10예(15.6%)이었고, 조직분화도를 보면 고분화암이 47예(73.4%), 미분화암이 17예(26.6%)이었으며, 재발형태는 국소재발 2예(3.1%), 원격재발 16예(25%)로 나타났다. TS발현의 양성군은 35예(54.7%)에서 나타났으며, 나이와($P=0.340$) 성별($P=0.565$)에 따른 차이는 보이지 않았다. 병기에 따른 TS 발현을 보면 병기 A의 경우 TS 음성 2예, 양성 1예, 병기 B에서는 TS 음성이 8예, 양성 16예, 병기 C에서는 TS 음성이 14예, 양성 13예, 병기 D에서는 TS 음성이 5예, 양성 5예로 통계적 의의는 없었으나, 병기 B에서 약간 더 많은 TS의 양성률을 보였다($P=0.476$). 조직의 분화도에 따른 TS 발현을 보면 고분화암 조직에서 TS 음성이 20예, 양성 27예, 미분화암 조직에서 TS 음성이 9예, 양성 8예로 차이점이 없었다($P=0.461$). 암의 재발에 따른 TS 발현은 TS 음성이 7예, 양성 11예로 통계적 의의는 없었으나, TS 양성군에서 약간 높았다($P=0.732$)(Table 1). TS

Table 1. TS expression and clinicopathological features in colorectal cancer

	TS(-) (N=29)	TS(+) (N=35)	P-value
Age (mean \pm SD)	58.17 \pm 11.71	55.17 \pm 13.0	0.3402
Sex			0.5650
Male	12	17	
Female	17	18	
Dukes' stage			0.4759
A	2	1	
B	8	16	
C	14	13	
D	5	5	
Differentiation			0.4609
Well & moderate	20	27	
Poorly & other	9	8	
Recurrence			0.7324
Local	1	1	
Distant	6	10	

발현 유무에 따른 전체 무병 생존율(overall disease-free survival)은 TS 양성군에서 통계적으로 의의있게 높았다($P=0.0204$). 그러나 수술 후 1년 이내의 초기에는 통계적으로 의의는 없지만 TS 음성군에서 약간 높게 나타났다(Fig. 3). 또한 각각의 병기 B나 C에서 TS 발현에 따른 무병 생존율을 분석해 본 결과 차이가 없었다. TS 발현에 따른 전체 생존율(overall survival)을 보면 TS 음성군과 양성군에서 통계적 차이는 없었지만($P=0.249$) 오히려 TS 양성군에서 약간 더

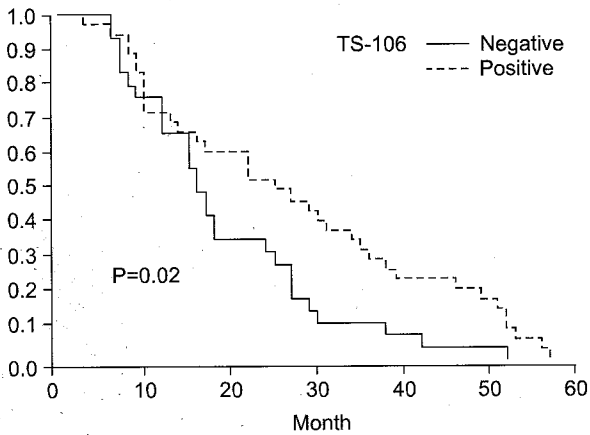


Fig. 3. Overall disease-free survival rates between TS positive and negative group

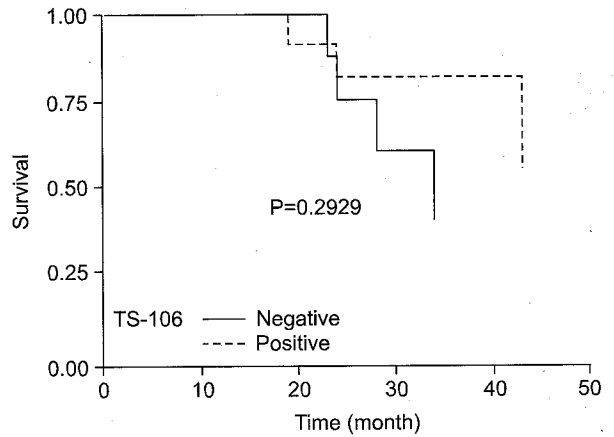


Fig. 6. Survival rates at the Dukes' stage C colorectal cancer between positive TS and negative TS expression group

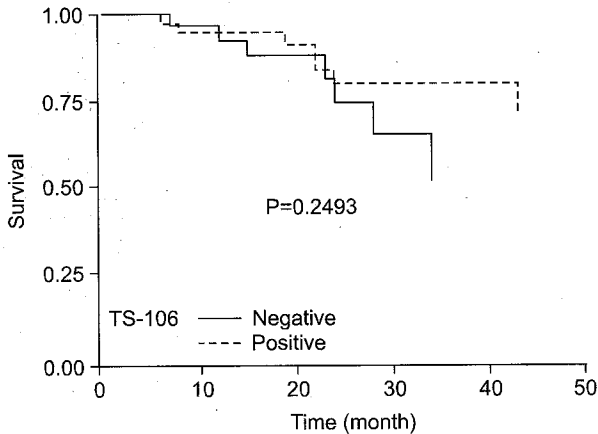


Fig. 4. Overall survival between positive TS and negative TS expression group

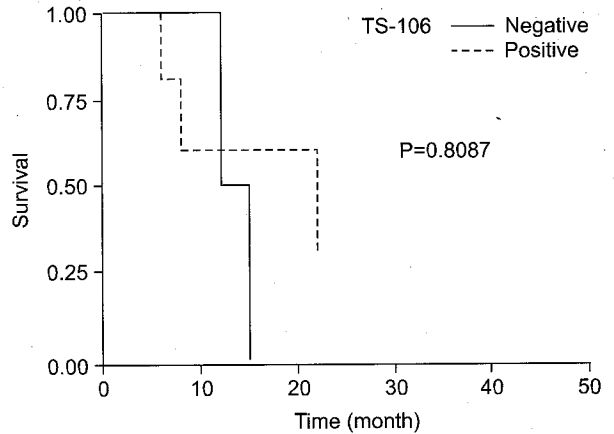


Fig. 7. Survival rates at the Dukes' stage D colorectal cancer between positive TS and negative TS expression group

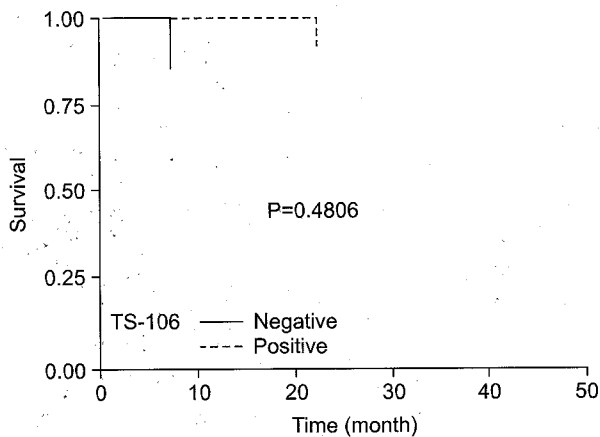


Fig. 5. Survival rates at the Dukes' stage B colorectal cancer between positive TS and negative TS expression group

생존율이 높았다(Fig. 4). 병기 B, C, D에서 각 병기별 TS 음성군과 양성군에서의 생존곡선을 비교해 보면 통계적으로 별 차이가 없었다(병기 B, $P=0.481$, C $P=0.293$, D, $P=0.808$)(Fig. 5~7).

고 찰

진행성 결장직장암의 치료 방법은 일반적으로 외과적 절제 후 보조적인 항암화학요법 및 방사선치료 혹은 면역학적 요법의 시행 등이라고 할 수 있다. 항암화학요법에 사용되는 대표적인 약제 중 하나가 5-FU이며, 그 작용기전은 크게 2가지 방법을 통해 이루어진다. 첫 번째는 thymidylate synthase (TS) 효소의 작용저해를 통한 DNA합성의 억제이고, 다른 경로는

fluorouridine triphosphate (FUTP)을 통한 RNA합성의 억제로 이루어진다. 또한 5-FU는 정맥으로의 투여 속도에 따라 다른 작용기전을 보인다. 즉 점진적 투여 (prolonged infusion)는 TS 저해작용을 통해 이루어져 피부독성, 수족증후군(hand-foot syndrome) 등의 부작용을 일으킬 수 있으며, 급진적 투여(pulse treatment)는 주로 RNA의 억제작용을 보여 골수에 독성작용을 나타낼 수 있다. 5-FU가 TS의 작용을 효율적으로 억제시키기 위해서는 CH₂FH₄ (F=folic acid)와 함께 강력한 3차 복합체를 형성하여야 하는데 이것의 외부공급원이 leucovorin (5-formyl-tetrahydro-folate, LV)이다. 5-FU 단독으로 사용한 경우와 5-FU와 LV를 병합 투여한 경우 후자에서 반응률이 높다는 것은 이미 알려져 있다. 그 이유는 5-FU에 대한 약물 저항성의 발생은 TS를 충분히 억제하지 못하기 때문인데, 실험적으로 5-FU만 투여 시 48시간 후 TS 억제율은 50%였지만, LV과 병합 투여 시 70%로 증가하였다. 그러므로, TS 발현율이 높고 이 효소의 억제율이 저하된 경우 약물에 대한 반응률은 낮아질 수밖에 없다고 하였다.² 5-FU와 LV의 병합 투여 시 LV의 투여량과 간격은 5-FU에 4시간 노출시켰을 때 소량(0.1 μM)을 투여해도 다량(10 μM) 투여와 같은 효과를 볼 수 있다고 하였다.⁸ 그러므로 대부분의 투여량은 이를 기준으로 결정하고 있다. 지금까지 결장직장암으로 수술 후 예후를 결정하는 인자로서 수술 시 병기, 암의 분화도 및 병리조직학적 특성(예를 들면 점액암이 선암보다 예후가 불량) 등이 이용되고 있으나, 동일 병기의 환자들에게 동일한 치료를 하여도 다른 임상적 경과를 보이는 경우를 볼 수 있는데 이는 예후를 결정짓는 다른 요소들의 영향이 있기 때문이다. 여기에는 Sialosyl-Tn 항원⁹과 Sialyl Lex 항원의 발현,¹⁰ flow cytometry로 분석한 세포 내 DNA content,¹¹ K-ras 유전자와 같은 종양인자,¹² p53같은 종양억제유전자 등¹³이 예후와 관련이 있다고 보고되고 있다. 5-FU의 목표 효소인 TS는 약물의 저항성뿐만 아니라 예후와도 연관성이 있어, 종양 내 TS의 발현이 높을수록 약물의 저항성이 증가하고 예후가 불량하다고 한다.⁵ TS의 활성도는 DNA 복제기간에는 높지만, 세포가 분열하지 않고 있을 때에는 감소하며, 재생되는 간에서처럼 증식하는 세포의 경우 TS의 과발현이 나타날 수 있다. 세포가 5-FU 같은 항암제에 노출되면 세포 내 TS 치가 급격히 증가하게 되는데, 종양세포의 경우 세포독성에 대한 방어기전으로 TS 치를 증가시킴으로써 종양의 약물 저항성을 나타낸다. 또한 TS는

c-myc 유전자의 변형에 연관되는 등 다른 유전자의 조절에 관여하고 있다는 보고¹⁴도 있다. 결장직장암에서 면역조직화학적으로 감지된 TS의 발현 정도는 종양조직 내 TS효소 활성도, TS 단백질의 농도, TS mRNA의 정도와 밀접한 관계가 있다고 하며,¹⁵⁻¹⁷ TS의 발현을 측정하는 방법으로는 FdUMP-binding assay, TS catalytic assay, ELISA, Quantitive PCR, 면역조직화학염색법 등이 있는데, 이 중에서 면역조직화학염색법은 쉽고 간단하여 정례적으로 임상에 적용할 수 있으며, 많은 양의 자료를 빠른 시간 내에 처리할 수 있고 파라핀 포매된 종양세포를 염색하여 후향적으로 TS content를 조사함으로써 재발 및 생존율을 연구할 수 있는 장점이 있다. 그러나 판정 기준이 다소 주관적이고 종양의 1/3에서 heterogeneity을 나타내는 단점이 있다.¹⁵ 어떤 종양에서는 TS 효소량보다 TS mRNA가 과량으로 생산되기도 하고, 반대로 TS mRNA보다 효소를 더욱 과량으로 생산하는 경우가 있으므로 두 가지를 모두 측정해야 정확한 예후를 얻을 수 있다. TS의 면역조직화학적 염색을 평가하는 방법은 저자들이 사용한 Sinicrope 등의 방법 외에 종양의 10% 이상에서 TS 발현이 있을 경우 양성으로 판정하는 방법 등 여러 가지가 있는데 객관적 기준이 없는 것이 단점이다. 저자들의 경우 주관적인 면을 가능한 배제하기 위해 임상정보를 전혀 모르는 2명의 병리의사에게 판독을 의뢰하였고, 만약 결과가 일치하지 않는 경우(2/64예) 재검토하여 결정하도록 하였다. 암 전이의 위치에 따라서도 TS의 발현을 및 약물 반응에 차이를 보인다고 하는데, 결장대장암이 진행되어 복강 내로 전이된 경우 간으로 전이된 경우보다 TS 발현율이 높아 약물 반응성이 낮게 나타난다고 하였으며,¹⁸ 폐로 전이된 경우도 간으로 전이된 경우보다 TS의 발현율이 높아서 5-FU 투여 시 반응률이 떨어진다고 하였다.¹⁹ 또한 같은 환자에서도 종양의 위치에 따라, 즉 원발성 종양과 전이성 종양에서 각각 TS 발현율에 차이를 보이는 경우도 있다. TS의 발현은 transcription factor E2F-1의 발현과도 밀접한 관계가 있어 E2F-1을 표적으로 삼는 치료방법의 연구에 이론적 근거를 제시해 준다. 재미있는 것은 E2F-1 혈중농도가 증가한 경우 TS 발현을 증가시켜 5-FU에 대한 저항성이 증가된다고 하는데,²⁰ 이런 세포는 etoposide, doxorubicin (topo II inhibitors), irinotecan (topo I inhibitor) 같은 topoisomerase inhibitors 약물에 민감한 반응을 보인다고 하여, 이를 배경으로 TS발현이 낮은 경우 5-FU를 투여하지만, TS 발현이

높은 경우 irinotecan을 투여하는 임상시도가 현재 진행 중에 있다. TS 길항제와 topoisomerase I 길항제와는 상승작용이 있으며, 두 약물의 투여 순서에는 상관관계가 없으나, TS 길항제와 5-FU를 같이 투여할 경우에는 TS 길항제를 먼저 투여한 후 24시간 경과 후 5-FU를 투여하여야 상승효과를 보인다고 하며, 같이 투여하거나 순서를 바꿀 경우 이러한 효과가 적어진다고 한다.²¹ 또한 5-FU 약물저항성의 기전으로 folypolypglutamate synthase의 발현 감소,²² 결손된 (defective) nucleoside transport,²³ Uridine monophosphate kinase (UMP5K)의 활성도 저하²⁴ 등이 요인이 된다고 한다. 종양억제 유전자인 p53의 정상적인 역할 중의 하나는 DNA손상을 감지하여 보수(repair)를 시작하거나 세포 자연사(apoptosis)를 유도하는 것인데, wild-type p53이 발현되는 세포가 변이(mutant) 혹은 결손(deleted)된 p53이 발현되는 세포보다 5-FU와 fluorodeoxyuridine에 더욱 민감하다고 한다.²⁵ p53 변이의 빈도는 간전이기가 있는 경우 증가하게 되며, p53의 과발현은 생존율의 감소와 연관이 있으나, 5-FU의 반응률과의 관련성은 아직 밝혀지지 않고 있다. 또한 p53의 과발현은 전체 생존율에 별로 영향을 주지 않는다.⁴ 일반적으로 TS 발현이 낮은 경우 5-FU에 대한 반응성이 높으나 약 50%에서는 반응성이 없는데, 이러한 반응이 없는 군에서 p53발현과 5-FU와의 반응률을 조사해 보았으나 영향이 없었다. 종양의 위치에 따라서 예후에 차이를 보여, 우측에 발생한 대장암 3기는 좌측보다 예후가 불량하고²⁶ 좌측에 발생한 대장암 2기는 우측보다 불량하다고 하는데,²⁷ 이를 설명해주는 예를 보면, 대장암 2기에서 p53 및 TS의 과발현은 불량한 예후를 보이고 TS가 과발현된 경우 역시 p53도 과발현을 보여 서로 상관관계가 있으며, 특히 좌측 대장암에서 빈발하는 것으로 보아 좌측 대장암의 예후인자로서의 TS 및 p53의 역할을 강조하기도 하였다. 종양의 위치에 따른 예후의 차이를 설명하는 다른 분자생물학적 근거가 제시되고 있는데, DCC 유전자의 loss of heterozygosity (LOH)와 연관된 18q 염색체의 결손은 주로 좌측 대장암에서 발생하며 불량한 예후와 관계가 있고,²⁸ microsatellite instability는 주로 우측 대장암에서 일어나 생존율의 증가를 가져온다고 한다.²⁹ TS의 발현 여부와 항암화학치료의 필요성에 대한 보고에는 연구자에 따라 논란이 있는데, Takenoue 등⁵은 148명의 대장암 환자를 대상으로 TS 발현에 따른 생존율을 조사하여 TS 음성군에서 TS 양성군보다 전체 생존율이 높았으며,

TS 음성군에서는 항암화학치료를 받은 군과 받지 않은 군 사이에 생존율에 차이를 보이지 않았으나, TS 양성군에서는 항암화학치료를 받은 군에서 받지 않은 군에 비해 생존율이 의의있게 높았다고 하여, TS 양성군에서의 항암화학치료의 중요성에 대하여 강조하였다. 본 연구결과는 TS 발현여부가 전체 무병 생존율과는 밀접한 관련이 있으나, 전체 생존율과 재발률에는 영향을 주지 않았음을 보여준다. 또한 본 연구에서는 항암화학요법(chemotherapy)을 시행받은 환자만을 대상으로 하였으며 항암화학요법을 시행받지 않은 군과의 비교를 하지 못하였는데, 그 이유는 현실적으로 항암화학요법의 적응증이 되는 환자의 경우 환자가 거부하지 않는 경우를 제외하고는 약물치료를 하지 않을 수 없으며, 이러한 환자들은 그 규모가 작아서 전향적 비교연구가 어려웠기 때문이다. 최근에는 tamoxifen과 gonadal steroid가 estrogen receptor beta mediated system을 통해 TS 활성도를 억제함으로써 대장암의 성장을 방해한다는 주장도 있다.³⁰ 최 등³¹은 위암 환자에서 TS 발현율은 주로 남성, 미분화조직, 그리고 Lauren씨 분류의 혼합형 등에서 높았으나 생존율 및 4년 무병률과는 관계가 없었다고 하였다. 고 등³²도 위암에서 Lauren씨 분류의 장형과 임파계 침습이 있는 경우에만 TS 발현율이 높았다고 하였다. 본 연구에서도 생존율 등에는 연관성을 보이지 않았으나 정확한 결론을 내리기 위하여는 더 많은 환자에서의 검사와 추적조사가 요구된다.

결 론

TS 발현이 5-FU의 약물저항성과 연관이 있고, 암의 재발률 및 생존율 등의 예후와 밀접한 관계가 있다는 여러 보고와는 달리 저자들의 연구는 TS 발현이 전체 무병 생존율(overall disease-free survival)과는 밀접한 관련이 있었으나, 결장직장암의 예후에 미치는 영향을 찾을 수 없었는데, 이는 대상 환자의 수가 적었고, 염색 결과를 판독하는데 객관적인 기준의 부재로 인한 것으로 생각되며, 보다 정확한 평가를 위해 향후 좀더 객관적인 방법을 모색하고 대상환자의 규모를 확대하고 오랜 기간의 추적검사를 통한 연구가 필요하리라 생각한다.

REFERENCES

- Goker E, Gorlick R, Bertino JR. Resistance mechanisms

- to antimetabolites, In: Pinedo HM, Giaccone G (eds): Drug Resistance in the Treatment of Cancer. Cambridge, MA, Cambridge University Press; 1998. p. 1-13.
2. Peters GJ, Vander Wilt CL, Van Triest B, Pisanelli GC, Johnston PG, Van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-305.
 3. Shibata J, Aiba K, Shibata H, Minowa S, Horikoshi N. Detection and quantitation of thymidylate synthase mRNA in human colon adenocarcinoma cell line resistance to 5-fluorouracil by competitive PCR. *Anticancer Res* 1998;18:1457-64.
 4. Edler D, Kressner U, Ragnhammar P, Johnston PG, Magnusson I, Glimelius B, et al. Immunohistochemically detected thymidylate synthase in colorectal cancer: an independent prognostic factor of survival. *Clin Cancer Res* 2000;6:488-92.
 5. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K, et al. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 2000;7:193-8.
 6. Findlay M, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997;75:903-9.
 7. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995;55:237-41.
 8. Drake JC, Voeller DM, Allegra CJ, Johnston PG. The effect of dose and interval between 5-fluorouracil and leucovorin on the formation of thymidylate synthase ternary complex in human cancer cells. *Br J Cancer* 1995;71:1145-50.
 9. Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Hakomori S, Kim YS. Sialosyl-Tn: a novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer* 1990;66:1960-6.
 10. Nakayama T, Watanabe M, Katsuyama T, Teramoto T, Kitajima M. Expression of sialyl Lewis as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer* 1995;75:2051-6.
 11. Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Sam WH, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal cancer. *Cancer* 1991;68:879-88.
 12. Span M, Moerkek PT, DeGoeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996;69:241-5.
 13. Smith DR, Ji CY, Goh HS. Prognostic significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1996;74:216-23.
 14. Che E, Voller DM, Jones KL, Takechi T, Maley GF, Maley F. et al. Identification of a thymidylate synthase ribonucleoprotein complex in human colon cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:207-13.
 15. Edler D, Blomgren H, Allegra CJ, Johnston PG, Lagerstedt U, Magnusson I, et al. Immunohistochemical determination of thymidylate synthase in colorectal cancer-methodological studies. *Eur J Cancer* 1997;33:2278-81.
 16. Johnston PG, Liang CM, Henry S, Chabner BA, Allegra CJ. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize human thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 1991;51:6668-76.
 17. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995;55:1407-12.
 18. Stefano C, Carlo A, Sandro B, Momizia D, Chiara B, Gianni T, et al. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999;5:1996-9.
 19. Gorlick R, Metzger R, Danenberg K. Higher levels of thymidylate synthase expression are observed in pulmonary as compared to hepatic metastases of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1465-9.
 20. Banerjee D, Schnieders B, Fu JZ. Role of E2F-1 in chemosensitivity. *Cancer Res* 1998;58:4292-6.
 21. Giuseppe SAL, Julie I, Yu MC, William PT, Zbigniew Z, Richard G, et al. Pretreatment of colon carcinoma cells with tomudex enhances 5-fluorouracil cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 1998;4:469-73.
 22. Wang FS, Aschele C, Sobreto A. Decreased folylpolyglutamate synthase expression: A novel mechanism of fluorouracil resistance. *Cancer Res* 1993;53:3677-80.
 23. Sobreto AF, Moir RD, Bertino JR. Defective facilitated diffusion of nucleotides, a primary mechanism of resistance to 5-fluoro-2'-deoxyuridine in the HCT-8 human carcinoma. *Cancer Res* 1985;45:3155-60.
 24. Gorlick R, Rode W, Miles JS. Purification and cloning of uridine monophosphate kinase (UMP5K) and its role in 5-fluorouracil resistance. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1996;15:189(abstr).
 25. Ju J-F, Banerjee D, Lenz HJ. Restoration of wild-type p53 activity in p53-null HL-60 cells confers multidrug

- sensitivity. *Clin Cancer Res* 1998;4:1315-22.
26. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 1995;122:321-6.
 27. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. A intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes'B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:2936-43.
 28. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levit RC, Sistonen P, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1995;331:213-21.
 29. Thibodeau S, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (Washington DC)* 1993;260:816-9.
 30. Nakayama Y, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, survivin and telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system. *Cancer Letters* 2000;161:63-71.
 31. Choi JH, Lim HY, Nam DK, Cho DY, Yi JW, Kim HC, et al. Expression of thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin based adjuvant chemotherapy after curative resection. *Br J Cancer* 2001;84:186-92.
 32. 고대경, 박찬훈, 하도원, 서효찬, 김덕환. 위암에서 Thymidylate synthase의 발현에 대한 연구. *대한외과학회지* 2000;59:738-45.
-