

대장암 조직에서 Western Blotting을 이용한 Survivin의 발현

원자력 의학원 원자력병원 외과, ¹이화여자대학교 의과대학 외과학교실

강성구 · 이령아¹ · 김인경 · 문선미 · 황대용

Western Blotting to Assess the Expression of Survivin in Colorectal Cancer

Sung-Ku Kang, M.D., Ryung-Ah Lee, M.D.¹, In Kyoung Kim, M.D., Sun-Mi Moon, M.D., Dae-Yong Hwang, M.D.

Department of Surgery, Korea Cancer Center Hospital, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, ¹Department of Surgery, Ewha Woman's University, Seoul, Korea

Purpose: The balance between cell death and proliferation is a key step in cellular homeostasis. Inhibition of apoptosis could trigger an abnormal malignant change. Survivin is a recently reported anti-apoptotic molecule that inhibits the caspase system along the apoptosis pathway. It is expressed in fetal tissue and transformed tissue, but not in normal tissues except during the mitosis period. Some authors have described abnormal survivin expression in various cancer tissues. We performed western blotting in colorectal cancer to assess the expression pattern of survivin.
Methods: Thirty-four colorectal cancer tissues and adjacent normal colonic epithelia of patients operated at KCCH from June 1998 were assessed. We used the common western blotting method with the polyclonal anti-survivin antibody.

Results: Survivin was expressed in all cases (34 cases, 100%) of cancer tissues and two cases (5.8%) of normal tissue. Seven of 34 cases showed a strong positive result. Univariate analysis of sex, age, stage, original site, lymphatic invasion, neural invasion, and vessel invasion between the positive group and the strongly positive group revealed no significant relationship except for neural invasion.

Conclusions: Survivin should be a good tumor marker of colorectal cancer. *J Korean Soc Coloproctol* 2003;19:386-390

Key Words: Survivin, Colorectal cancer, Western blotting
Survivin, 대장암, 웨스턴 영동법

책임저자: 황대용, 서울시 노원구 공릉동 215-4
원자력의학원 원자력병원 외과(우편번호: 139-706)
Tel: 02-970-1219, Fax 02-978-2005
Email: hwangrc@kcch.re.kr

본 논문의 요지는 2002년 대한대장항문학회 추계학술대회에서 포스터 발표하였음.

본 논문은 원자력 의학원 자체연구 개발사업 연구사업기금의 보조로 이루어짐.

서 론

생명체는 세포의 사멸과 증식 간의 미묘한 균형을 유지하는 것으로 생명을 유지하며 불필요하고 노화된 세포를 제거하여 생명체 내의 원활한 생명활동을 유지시키게 된다. 아포토시스(apoptosis)¹는 계획된 세포 사로 괴사(necrosis)와는 구별되는 세포 사멸의 한 형태로서 모든 종류의 세포에서 일어날 수 있는 기전으로 특히 태생기의 조직분화과정에 결정적인 역할을 하여 정상적인 성인의 개체를 형성하도록 한다.² 이 과정에 장애가 생기면 여러 가지 질병이 야기되는데 과도하게 아포토시스가 진행되면 세포의 조기사멸을 초래하고 이에 따라 여러 종류의 퇴행성 질환이 야기된다. 특히 알츠하이머씨 병³이나 파킨슨씨 병,⁴ 뇌허혈⁵ 등의 퇴행성 질환과의 연관성에 대한 많은 보고들이 있다. 또, 아포토시스가 억제되면 해로운 자극을 받은 세포들이 죽지 않고 축적되어 결과적으로 비정상적인 세포들이 지속적으로 생존하여 유해한 효과를 내게 되는데 이런 상태 중에서 가장 대표적인 것이 종양이다.⁶ 따라서 종양의 발병 기전에서 아포토시스의 역할은 매우 결정적이며 종양과 관련된 아포토시스 기전을 변화시키는 여러 유전자와 단백질, 세포 신호들에 대한 연구들이 활발하게 이루어지고 있다.

Survivin은 최근에 밝혀진 IAP family (Inhibitor of Apoptosis)의 하나로 인간의 IAP 동질형 중의 하나이다.⁷ 이는 인간과 설치류의 조직분화 과정에서 선택적으로 발현하는 것으로 알려져 있으며, 특히 태생기의 조직에서는 발현되나 정상적인 성인의 조직에서는 발현이 되지 않으나 암화조직이나 여러 종류의 암종에서는 발현된다고 하여 인간의 암종에서 아포토시스 억제 효과로 인한 암화과정의 조절물질로서의 그 중요성이 부각되고 있다. 최근 survivin을 이용한 새로운 항암제의 개발이 성과를 거두면서 여러 종류의 암종에서 survivin의 발현 양상에 대한 다양한 기법을 이용한 연구 보고들이 이루어지고 있다.⁸ 저자들은 대장암

조직에서 western blotting을 이용하여 발현도가 얼마나 되는지 알아보고 정상 대장조직에서의 발현양상과 비교해 보기 위해 본 연구를 시행하였다.

방 법

연구 대상은 1998년 6월에서 12월 사이에 본원에서 대장암으로 진단받고 수술 받은 환자 중 34예를 무작위 선정하였다. 환자들의 임상적 특징은 원자력병원 외과 대장암 환자 database를 기초로 분석하였으며 추적 기간은 평균 39개월(8~51개월)이었다.

실험 방법은 통상적인 western blotting 방법을 사용하였다. 조직은 수술 시 채취하여 -70°C의 냉동고에서 보관하였던 암 조직과 동일 환자의 정상 대장 점막 부위의 동결 조직을 해동하여 전 단백질을 추출하였다. 약 200 mg의 조직에 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 1μl당 1μg이 되도록 하였으며, SDS-PAGE는 Laemmli에 의한 방법을 이용하였다. 전기 영동 시 단백질 시료는 5x 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 원심 분리하였다. 이 시료를 10% SDS gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 이 중 한 장은 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, DW 100 ml, acetic acid 450 ml/L)으로 여러 번 바꾸어 탈색시키는 방법으로 단백질의 띠를 확인하였다. 다른 판은 영동분석을 위해 mini-protean III kit (Bio-rad)를 사용하여 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 (1X TBS, 0.3% Tween 20)으로 씻어준 다음 5% 무지방유가 포함된 TTBS에서 2시간 동안 반응을 정지시켰다. TTBS로 5분에 1회씩 6회 세척한 후에 polyclonal anti-survivin (Oncogene)

을 1 : 1,000으로 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 membrane 위에 부어서 발광시키고 암실에서 X선 필름에 감광한 다음 자동 현상기로 현상하였다.

결 과

환자들의 성비는 남자 16예, 여자 18예로 1 : 1.2이었고 평균연령은 53 (±12)세(33~77세)였다. 원발부위는 직장암이 14예(41.2%)로 가장 많았으며 상행결장암이 9예(26.5%), 횡행결장암이 3예(8.8%), 하행결장암이 2예(5.9%), 에스결장암이 6예(17.6%)였다. TNM 병기로는 1기는 없었으며 2기가 17예(50%), 3기가 13예(38.2%), 4기가 4예(11.8%)였다(Table 1).

Survivin의 단백질의 크기는 16.5 kDa으로 전기영동시 16.5 kDa 위치의 띠를 확인하는 것을 양성으로 하였다(Fig. 1). 띠의 명암 정도에 따라 -, +, ++로 구분하여 분석하였다. 대조군으로 사용된 beta-actin의 경우 34예 모두에서 동일한 명암도의 띠를 나타내었다. Survivin은 대장암 조직 34예에서 모두 발현하였으며 +는 27예(79.4%), ++는 7예(20.6%)였다. 정상 대장 조직에서는 발현되지 않을 것으로 예상되었으나 2예(5.8%)에서 매우 약한 발현을 확인할 수 있었다. 정상

Table 1. Clinical characteristics

Parameters		Number (%)
Sex	Male	16 (47.1%)
	Female	18 (52.9%)
Origin	Rt. colon	9 (26.5%)
	T-colon	3 (8.8%)
	Lt. colon	6 (5.9%)
	Sigmoid	6 (17.6%)
	Rectum	14 (41.2%)
Stage	I	0
	II	17 (50%)
	III	13 (38.2%)
	IV	4 (11.8%)

Rt. colon = right colon; T-colon = transverse colon; Lt. colon = left colon.

조직에서 survivin이 확인된 2예의 환자의 임상적 특징

Table 2. Clinical characteristics in cases of detecting survivin in normal colon

Patients	Sex	Age	Operation	Site	TNM	Prognosis
1	M	50	APR	Rectum	II	NED
2	F	42	APR	Rectum	II	NED

APR-Abdominoperineal resection; NED-No evidence of disease.

5N 5C 6N 6C 7N 7C 8N 8C

Fig. 1. Pictures of western blotting of beta-actin and survivin in colorectal cancer tissues and counterpart normal colon. Survivin expression was found in all of tumor tissues not in normal tissues. But number 7 and 8 patients showed faint survivin expression in normal colon (N normal colon; C cancer).

을 보면(Table 2) 50세 남자와 42세 여자로 직장암으로 진단받고 2예 모두 복회음 절제술을 시행받았고 수술 후 병기는 2기였으며 림프절 전이나 원격전이의 소견은 없었다. 두 환자 모두 재발의 소견 없이 현재 추적 관찰 중에 있다.

종양 조직 내에서의 survivin의 발현이 100%이므로 다른 임상적 특징들과 연관성을 확인할 수 없어 명암도의 차이에 따라 그 연관성을 분석해 보았다(Table 3). 성별, 연령, T stage, N stage, M stage, TNM stage, 수술 전 혈청 CEA 수치, 맥관 침습의 유무, 혈관 침습의 유무와 신경주위 침습의 유무에 따라 연관성을 분석해 보았으나 신경주위 침습 외의 다른 인자들은

Table 3. Univariate analysis according to survivin expression intensity

Parameters	P value
Sex	0.429
Tumor size	0.566
T stage	0.196
N stage	0.706
M stage	0.612
TNM stage	0.796
Preoperative CEA	0.552
Lymphatic invasion	0.614
Vessel invasion	0.180
Neural invasion	0.037*

*statistically significant.

survivin의 명암도와 통계적인 연관성이 없었다.

고 찰

아포토시스는 정상적인 개체의 기능을 유지하기 위한 일종의 방어기전이면서 또한 항상성 기전이기도 하다. 종양학에서 아포토시스의 역할의 중요성은 이미 주지의 사실이다. 아포토시스의 억제로 인한 비정상적인 세포의 생존은 종양 형성의 촉진제가 되고 이차적인 증상을 유발하게 된다. 이러한 배경하에 최근에 중요성이 부각되고 있는 것이 IAP이다. IAP는 지금까지 약 20여종이 보고되어 있으며, 그중에서 인간에서는 NAIP, HIAP1, HIAP2, XIAP, BRUCE, TIAP와 survivin 등 7종의 IAP가 보고되어 있다.⁹ 이들의 유전자는 각각 다른 염색체에 위치하는데 survivin의 유전자는 염색체 17q25에 위치하는 것으로 알려져 있다.⁷ IAP는 세포종류에 따라 특이성을 가지고 있어 조직에 따라 발현율에 차이가 있기는 하나 이들이 baculovirus로부터 인간에 이르기까지 보존적인 형태로 존재하고 있으므로 이들이 아포토시스 기전에 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 생각되며 이러한 가설을 뒷받침하는 여러 보고들이 있다.¹⁰ 최근 항체를 이용한 항암제의 개발이 이어지면서 분자량이 작고 암관련성이 확실하며 여러 종류의 종양에서 모두 확인되는 형태의 물질에 대한 관심이 높아졌으며 이런 조건에 survivin이 잘 맞으므로 현재 여러 각도로 약제의 개발이 추진되고 있다.^{8,11-13}

Survivin은 1997년에 보고된 IAP군으로 가장 작은 크기의 IAP이며 다른 IAP와는 달리 특징적으로 하나의 BIR 영역만을 갖고 있다. Survivin은 인간에서 태생기의 분화과정에 직접적인 영향을 끼침으로써 분화에 의해 사멸하는 조직과 잔존하는 조직을 결정짓는 역할을 하는 것으로 기대되는 물질이다. 특히하게도 이 유전자는 혈액응고 기전 중 Xa 인자의 세포막 수용체인 EPR-1 (effector protease receptor-1)에 상보적인 구조를 갖고 있다고 한다. EPR-1은 Xa 인자가 혈관의 평활근 세포에 대한 증식효과를 갖도록 유도하는 역할을 한다고 알려져 있다. Ambrosini 등에 의한 초기 보고에 의하면 survivin의 발현은 정상 성인 조직에서는 발견되지 않고 폐, 대장, 유방, 췌장 및 전립선 등의 여러 장기의 선암과 고등급 림프종 등의 암세포와 태생기의 세포에서만 확인된다고 하였으며⁷ Adida 등¹⁴은 신경아세포종에서 면역조직화학 염색의 시행 결과 72예 중 34예(47%)에서 양성 결과를 확인하여 보고하였다. 또 Kawasaki 등¹⁵은 대장암에서 survivin에 대한 면

역조직화학 염색 결과를 발표하였는데 171예 중 91예 (53%)에서 양성이었다고 하며 bcl-2의 발현과 높은 연관성을 가지며 생존율의 저하와 관련이 있다고 보고하였다. 이 연구 결과가 발표된 이후 유방암,¹⁶ 자궁경부암,¹⁷ 식도암,¹⁸ 간세포암,¹⁹ 림프종,²⁰ 폐암²¹ 등에서 survivin의 발현에 대해 여러 센터에서 보고되고 있다. 대부분의 보고들은 면역조직화학 염색을 사용하여 survivin의 발현을 확인하여 30~60% 정도의 발현율을 보고하고 있다. 이 등²²은 RT-PCR을 이용하여 여러 종류의 대장암 세포주에서도 survivin이 발현하는 것을 보고하였으며 대장암 조직에서 61.1%의 발현율을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 대장암 조직에서 western blotting을 이용한 결과 중앙조직 모든 예에서 survivin의 발현을 확인할 수 있었는데 이와 같이 다른 보고들보다 높은 발현율을 보임에 따라 결과의 신뢰도를 위하여 3회에 걸쳐 반복실험을 실시하여 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 본 결과는 실험의 방법론적인 차이에 의한 것일 수 있다고 생각되는데 면역조직화학 염색은 특정 단백질에 대한 항체를 이용하여 조직의 한 부분에 대하여 항원-항체 반응에 의한 발색의 정도를 확인하는 것으로 실험할 조직의 선택, 염색자의 기술, 염색의 조건이나 판독자의 자질 등에 의해 그 결과가 좌우되므로 항상 결과에 대한 이론의 여지가 있는 반면 western blotting은 암 조직을 모두 사용해서 단백질을 추출한 후 이 중에 특정 물질이 있는지에 대해 역시 항원-항체 반응을 이용하여 확인하는 것으로 면역조직화학 염색 보다는 보다 민감도가 높을 수 있다. 그러나 외국의 보고에서도 종양의 100%에서 발현이 보고된 예는 없으므로 추후 더 많은 예를 대상으로 추가 실험을 하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

Western blotting의 결과를 육안적으로 음성(-), 양성(+), 강양성(++)으로 분류하였는데 강양성을 보이는 예가 7예(20.5%) 있었다. 이 경우 반복실험에도 다른 예와 확실하게 구분되게 강한 띠를 확인할 수 있었다. 이 환자들의 임상적 특징을 분석하기 위해 양성으로 판독된 환자와 임상적 특징을 통계처리하였는데 단변량 분석 결과 신경주위 침습 외에 전혀 두 군의 차이가 없었다. 염색 정도에 따른 생존율도 분석하였는데 역시 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 survivin의 발현의 정도는 임상적 특징이나 환자의 예후와는 관련이 없는 것으로 생각된다.

정상 성인세포에서 survivin이 유사분열 과정 중의 metaphase에서 mitotic spindle의 microtubule에 붙어서

G2/M기의 장애를 일으키는 것으로부터 세포를 보호하는 역할을 한다는 것이 보고되면서 survivin의 정상 세포분열에서의 역할에 대한 연구가 진행 중이다. 즉 초기에 알려진 바와 같이 비정상적인 세포에서만 survivin이 발현되는 것이 아니라 정상세포의 세포분열 기간에서도 survivin의 출현이 가능하다는 것이다. 따라서 정상적인 조직에서의 survivin의 발현은 설명이 가능하다. 그러나 아포토시스 과정의 변화가 암화과정의 초기에 관련되는 것으로 보고된 것을 감안할 때 정상조직에서 survivin이 발현된 경우는 보다 밀접하게 추적관찰을 해야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구의 결과 survivin이 대장암의 모든 예에서 발현됨이 확인되어 대장의 양성질환에 대한 조직검사 후의 암화 가능성을 확인하는 검사방법으로 사용할 수 있는 가능성이 높다고 보며 또한 대장암의 screening에서도 새로운 암 표지자로 활용할 수 있는 가능성이 있으므로 추후 이에 대한 더 많은 연구가 필요하겠다.

REFERENCES

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
2. Fotadar R, Diederich L, Fotadar A. Apoptosis and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 1996;2:147-63.
3. Banercher C, Lassmann H, Breitschopf H, Jellinger KA. Mechanisms of cell death in Alzheimer's disease. *J Neurol Transm Suppl* 1997;50:141-52.
4. Burke RE, Kholodilov NG. Programmed cell death: does it play a role in Parkinson's disease? *Am Neurol* 1998;44:126-33.
5. Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:99-109.
6. Rew DA. Cancer-a degenerative disorder? *Eur J Surg Oncol* 1998;24:362-6.
7. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21.
8. Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:230-5.
9. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The

- inhibitors of apoptosis (IAP) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59.
10. Clem RJ, Miller LK. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* 1994;14:5212-22.
 11. Bao R, Connolly DC, Murphy M, Green J, Weinstein JK, Pisarcik DA, et al. Activation of cancer-specific gene expression by the survivin promoter. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:522-8.
 12. Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets* 2003;4:159-79.
 13. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
 14. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Musica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-3.
 15. 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.
 16. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-34.
 17. Yoshida H, Sumi T, Hyun Y, Nakagawa E, Hattori K, Yasui T, et al. Expression of survivin and matrix metalloproteinases in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Oncol Rep* 2003;10:45-9.
 18. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001;95:92-5.
 19. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-45.
 20. Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, Ito H, Ohgane N, Suzuki R, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep* 2002;9:835-8.
 21. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-5.
 22. 이령아, 김광호, 심강섭, 구혜수, 박용범. 대장암 조직에서 Survivin 발현에 관한 연구. *대한대장항문학회지* 2000;16:131-8.
-