

## 결장직장암에서 현미부수체불안정성에 따른 COX-2와 iNOS 발현 및 미세혈관밀도

순천향대학교 의과대학 임상병리학교실, <sup>1</sup>외과학교실, <sup>2</sup>가정의학교실

진소영 · 김진원<sup>2</sup> · 장용석<sup>1</sup> · 김재준<sup>1</sup> · 홍성호<sup>2</sup> · 조주연<sup>2</sup>

### COX-2 and iNOS Expression and Microvessel Density by Microsatellite Instability in Colorectal Cancer

So-Young Jin, M.D., Jin-Won Kim, M.D.<sup>2</sup>, Yong-Seog Jang, M.D.<sup>1</sup>, Jae-Joon Kim, M.D.<sup>1</sup>, Sung-Ho Hong, M.D.<sup>2</sup>, Choo-Yon Cho, M.D.<sup>2</sup>

Departments of Pathology, <sup>1</sup>General Surgery, and <sup>2</sup>Family Medicine, College of Medicine, Soonchunhyang University Hospital, Seoul, Korea

**Purpose:** We tried to identify the overall incidence of microsatellite instability (MSI) and the utility of mismatch repair (MMR) protein expression in sporadic colorectal cancers in Korean. We also investigate the role of angiogenesis in colorectal cancers by MSI status. **Methods:** A total 85 resected colorectal cancers were submitted for MSI study using PCR methods with 5 markers and immunohistochemistry (IHS) for hMLH1 and hMSH2. Expression of COX-2 and iNOS and microvessel density by IHS were correlated with various clinicopathologic prognostic factors. **Results:** Among 85 cases of sporadic colorectal cancers, MSI was observed in 11 cases (12.9%) including 10 MSI-H and 1 MSI-L cases. Patients with MSI (+) showed female prevalence (1.75 : 1), low Dukes stage, mucinous histologic type, and Crohn-like lymphoid reaction than those with MSS. Overall sensitivity of hMLH1 and/or hMSH2 expression was 98.6% and specificity was 72.7%. iNOS expression was significantly correlated with COX-2 expression in tumor cells (P=0.006), however, they were not correlated with MSI status. High microvessel density was correlated with hMLH1 expression (P=0.025), COX-2 expression (P= 0.05), and Crohn-like lymphoid reaction (P=0.041). **Conclusions:** IHS for MMR proteins is a valuable substitute of MSI status and COX-2 related neoangiogenesis is thought to be related to inhibition of microsatellite unstable colorectal cancer progression via decreased microvessel

density. J Korean Soc Coloproctol 2005;21:27-35

**Key Words:** Colorectal neoplasm, Microsatellite instability, Mismatch repair protein, Microvessel density, Immunohistochemistry  
결장직장암, 현미부수체불안정성, 부적합수복 단백질, 미세혈관밀도, 면역조직화학염색

### 서 론

결장직장암은 서구에서 암으로 인한 사망원인 중 가장 흔한 원인 중의 하나이며 우리나라에서도 최근 빈도가 점차 증가하고 있다. 결장직장암은 여러 단계의 유전변화 과정을 거쳐 발생하며 크게 억제유전자 관련 과정과 돌연변이 과정으로 나눌 수 있다. 억제유전자 관련 과정은 종양억제유전자의 불활성화와 암유발유전자의 활성화로 인해 비배수체 종양을 생성하는 것으로서 가족성대장용종증(familial adenomatous polyposis)과 대부분의 산발성 결장직장암에서 이러한 과정을 밟는다.<sup>1</sup> 돌연변이과정은 비적합수복(mismatch repair, 이하 MMR) 유전자의 불활성화 즉 hMLH1 및 hMSH2의 불활성화, 돌연변이 및 개체신생(epigenetic) 변화로 인해<sup>2</sup> 현미부수체불안정성(microsatellite instability, 이하 MSI)이 유도되어 암이 발생하는 것이다. 대표적인 예가 유전성비용종성대장암(hereditary non-polyposis colon cancer, 이하 HNPCC)이지만 산발성 결장직장암의 약 15%에서도 MSI 기전이 관여한다고 알려져 있다.<sup>3</sup>

접수: 2004년 1월 27일, 승인: 2004년 10월 21일  
책임저자: 조주연, 140-743, 서울시 용산구 한남동 657-58  
순천향대학교병원 가정의학과  
Tel: 02-709-9278, Fax: 02-709-9459  
E-mail: fmsch@hosp.sch.ac.kr

Received January 27, 2004, Accepted October 21, 2004  
Correspondence to: Choo-Yon Cho, Departments of Family Medicine, College of Medicine, Soonchunhyang University Hospital, Seoul 140-743, Korea.  
Tel: +82-2-709-9278, Fax: +82-2-709-9459  
E-mail: fmsch@hosp.sch.ac.kr

MSI 양성 결장직장암의 특징은 생존율이 높으며<sup>4,5</sup> 항암제 치료에도 더 반응을 잘 한다고 알려져 있으며,<sup>6</sup> 여성, 대장의 근위부, 점액 및 수질 조직유형, 저분화 암종, 이배수체, 주변조직과 경계가 좋은 경우가 많다고 한다.<sup>7,8</sup> 현재까지 한국인 대장암의 MSI에 대한 연구는 극히 드물다.<sup>9,10</sup>

결장직장암의 혈관형성 및 종양성장과 관련 있는 두 가지 경로는 cyclooxygenase (이하 COX) 관련 경로와 산화질소(nitric oxide, 이하 NO) 관련 경로이다. COX-2는 COX-1과는 달리 정상적으로는 없다가 성장인자나 시토카인(cytokine)의 자극에 의해 나타나며 여러 외인성 인자 특히 NO에 의해 영향을 받는다.<sup>11</sup> NO는 세 종류의 NO synthase isoenzymes 에 의해 생성되는데 이중 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 정상적으로는 없으며 시토카인과 염증관련 인자에 의해 유도되어 나타난다.<sup>12</sup> 최근 인체의 여러 암종 즉, 부인과암종,<sup>13</sup> 유방암,<sup>14</sup> 두경부암<sup>15</sup> 등에서 iNOS 활성화와 표현에 대한 연구가 이루어지고 있다. 결장직장암을 대상으로 한 연구에서도 NO가 COX-2 과표현과 종양내 혈관형성과 관련이 있다고 보고된 바 있고<sup>16</sup> 내피세포 증식을 유도하고 종양 내 혈류를 조절함으로써 암종 내 혈관형성에 관여한다고 알려져 있다. 결장직장암종 내 미세혈관밀도는 재발 예측 및 예후 인자로서 유용하다고 보고되었으나<sup>17</sup> 아직 그 역할에 대해서는 논란이 있다.

따라서 본 연구자는 한국인에서 발생한 산발결장직장암을 대상으로 첫째 MSI의 빈도를 알아보고, 둘째 MMR 단백질발현과 현미부수체불안정성과의 상관관계를 알아보고, 셋째 혈관형성과 MSI와의 연관성을 조사하고자 한다.

## 방 법

### 1) 연구대상

1997년부터 1999년까지 썬암종으로 진단받은 후 대장절제술을 시행한 결장직장암 총 140예 중 조직의 양이 충분하고 DNA의 보존상태가 양호하여 MSI 검사가 가능한 총 85예를 대상으로 연구하였다.

환자의 평균연령은 61.5세(35~83세)였으며 남자 44예, 여자 41예로 남녀 비는 1.1 : 1이었다. 발생부위는 직장을 좌측 대장에 포함시켜 우측 21예, 좌측 64예이었다. 임상병기는 변형된 Astler-Coller 분류에 따라 나누었을 때 Dukes B1 7예, B2 40예, C1 4예, C2 31예, D 3예이었다. 수술 후 항암요법은 71예, 방사선치료는

25예에서 시행하였으며 이중 24명은 항암요법과 방사선치료를 모두 받았다. 추적관찰기간은 1개월부터 76개월로 평균 32.4개월이었다.

종양의 조직학적 분화도는 고분화도가 19예, 중등분화도가 60예, 저분화도가 6예이었다. 조직학적 유형은 모두 샘암종이었으며 15예가 점액암종이었다. 침습깊이는 점막하층과 근층이 각 5예였으며 나머지 75예는 모두 대장주변조직으로 침습하였다. 종양과 정상사이 경계부의 침윤양상은 미는 유형(pushing type) 23예, 침윤형(infiltrative type) 51예, 혼합형 11예이었다. 림프절 전이는 41예, 림프관침습은 68예, 혈관침습은 21예, 신경침윤은 35예이었으며 종양주변 크론유사 림프반응은 27예에서 동반하였다.

## 2) 연구방법

### (1) 현미부수체불안정성 검사

① DNA 분리; 보관된 파라핀 블록 중 암종조직 블록과 정상 블록으로부터 각각 6~10 μm 절편을 얻어 통상의 과정을 거쳐 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 시행하였다. 봉입은 하지 않은 채 광학현미경하에서 정상과 종양 부위를 따로 선별하여 용해완충액에 넣었다. 정상블럭은 종양의 전이가 없는 림프절 또는 절제된 대장조직을 이용하였으나 종양의 파급이 심해 정상 조직만이 포함된 블럭을 얻기 어려운 경우는 종양과 3 mm 이상 떨어진 부위의 정상 대장조직을 따로 분리하여 이용하였다. DNA분리는 QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN, 독일)을 사용하였다. 각각의 조직을 microcentrifuge tube에 담고, 단백질을 제거하기 위해 180 μl의 ATL Buffer와 20 μl의 Proteinase K를 넣어준 후 56°C에서 완전히 용해될 때까지 방치한다. 완전히 용해가 일어난 뒤 AL Buffer 200 μl를 넣은 후 70°C에서 10분간 반응시킨다. 200 μl의 100% 에탄올을 첨가하여 15분간 섞어준 후 완전히 혼합된 용액을 키트에 포함된 QIAamp spin column에 넣어준 후 8000 rpm에서 1분간 원심분리한다. 수세를 위하여 column에 500 μl의 AW1 Buffer를 넣어주어 8000 rpm에서 1분간 원심분리하고, 2차로 AW2 Buffer 500 μl를 넣어 14000 rpm에서 3분간 원심분리한다. Column에 붙어있는 DNA를 분리하기 위해 수세된 column을 깨끗한 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮기고, AE Buffer 200 μl를 넣어 1분간 방치한 후 8000 rpm에서 1분간 원심분리한다. 분리된 DNA는 UV Spectrophotometer (Beckman, 미국)를 이용하여 정량하고 사용하기 전까지 -20°C에서 보관한다.

② **현미부수체 불안정성 검사**; 분리된 DNA와 5개의 NCI 표지자(Bat 25, Bat 26, D2S123, D5S346, D17S 250)를 이용하여 증합효소연쇄반응을 하였다. 5개의 튜브에 1  $\mu$ l (100 ng)의 분리된 DNA를 넣고, 각 표지자 별로 형광이 표지된 primer 4  $\mu$ l (sense, antisense 각 10 pmoles)를 넣어준다. 다음 5  $\mu$ l의 HotStarTaq Master Mix (QIAGEN, 독일)를 넣어준 후 잘 섞어준다. 시료는 GeneAmp PCR system 2700 (Appliedbiosystems, 미국)에 장착한 후 95°C에서 15분간 반응한 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30회전을 반응하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응한다. 반응이 끝난 시료에 GeneScan-500 ROX Size Standard (Appliedbiosystems, 미국) 1  $\mu$ l와 Hi-Di Formamide (Appliedbiosystems, 미국) 10  $\mu$ l를 넣어 잘 혼합한 후 95°C에서 5분간 반응한다. 혼합된 시료를 96 well plate에 옮긴 후 3100 Genetic Analyzer (Appliedbiosystems, 미국)에 장착하여 조각분석을 실시한다. 분석이 끝난 결과물은 GeneScan software (Appliedbiosystems, 미국)를 이용하여 결과를 분석하였다. 정상조직과 암조직으로부터 얻은 피크(peak)를 비교하여 정상에서 없던 것이 암조직에서 나타나면 불안정성으로 간주하고 5개 표지자 중 2개 이상의 표지자에서 불안정성으로 보이는 peak가 있는 경우를 ‘고도 현미부수체불안정성(MSI-H)’, 한 개의 표지자에서만 비정상적인 피크가 나타난 경우 ‘저도 현미부수체불안정성(이하 MSI-L)’으로 간주하였으며 정상과 종양의 그래프가 일치하는 경우 ‘현미부수체불안정성이 없음(이하 MSS)’으로 판단하였다(Fig. 1).

(2) **hMLH1과 hMSH2에 대한 면역조직화학염색**: 파라핀에 포매된 조직을 4  $\mu$ m 두께로 연속 박절하여 얻

은 조직을 probe on plus<sup>®</sup> 슬라이드(Fisher, 미국)에 부착하여 실험에 사용하였다. 오븐에서 일부 파라핀을 녹인 후 xylene으로 파라핀을 완전히 제거하였다. 계열 알코올로 함수시킨 후 조직 내 항원의 재현성을 높이기 위하여 EDTA 완충액에 넣고 마이크로웨이브 오븐(Pelco, 미국)으로 10분간 2회 열처리하였다. 내인성 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% 과산화수소 용액에서 10분간 처리하고 PBS 완충액으로 세척하였다. 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 3% 정상 편양 혈청으로 10분간 반응시켰다. 슬라이드를 가볍게 턴 후 일차 항체를 4°C 냉장고에서 하룻밤동안 반응시켰다. 일차 항체로는 anti-human mouse monoclonal hMLH1 antibody (Oncogene, CA, 미국) 및 anti-human mouse monoclonal hMSH2 antibody (Oncogene, CA, 미국)를 각각 1 : 50, 1 : 100 배율로 희석하여 사용하였다. PBS 완충액으로 세척한 후 이차 항체인 streptavidin biotin complex를 떨어뜨려 15분간 상온에서 반응시킨 후 PBS 완충액으로 세척하였다. 이후 streptavidin peroxidase를 가하여 15분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하였다. 발색은 amino-ethyl carbazole (AEC)로 3~5분간 반응시킨 후 완충액으로 세척하여 Mayer’s hematoxylin으로 대조염색하고 Crystal mount<sup>®</sup> (Biomedica, CA, 미국)로 봉입하였다. 양성 대조표본은 위양성대장암 조직을 사용하였으며 양성 내부 대조표본으로는 종양 주변 정상 대장조직을 참조하였다. 음성 대조표본은 일차 항체 대신 PBS 완충액으로 대체하여 염색하였다. 염색 표본을 검색하여 정상 대장샘의 기저부세포와 림프구 핵에 적갈색으로 염색된 경우 염색이 잘 되었다고 판정하였다. 정상세포와 비교하여 암세포의 핵에 염색되지 않은 경우 비적합수복단백의 소실로 판정하

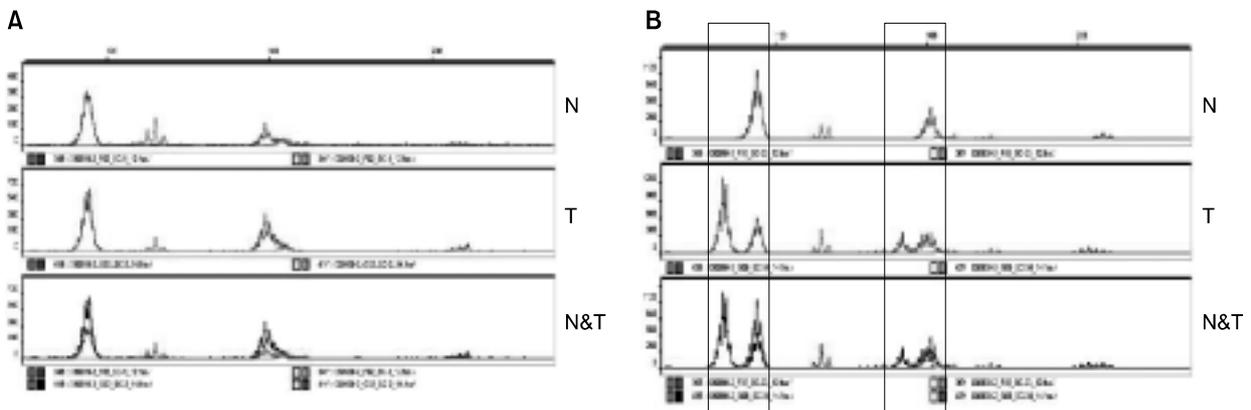


Fig. 1. Microsatellite status of colorectal cancers. (A) Peaks of tumor (T) are identical with normal ones (N) in microsatellite stable (MSS) cancer. (B) Abnormal peaks are noted in tumor for two markers (boxes) in microsatellite instability-high (MSH- H) cancer.

였다.

(3) **iNOS, COX-2, 및 미세혈관밀도:** 다음 몇 단계를 제외하고 나머지 과정은 3)번 과정과 동일하게 시행하였다. 항원재현을 위해 citrate buffer에서 열처리하였으며 일차항체는 antihuman mouse monoclonal iNOS 항체 (BD Biosciences Pharmingen, 미국), antihuman monoclonal COX-2 항체(Cayman Chemical Company, MI, 미국)를 각각 1 : 100, 1 : 150배로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 미세혈관밀도는 미리 희석된 항체인 CD34 (Immunotech, Marseville, 프랑스)를 사용하였다. 양성 대조조직은 iNOS에 대해 전립선암종 조직을 이용하였으며 COX-2에 대해 활성 케양성 대장암조직을 이용하였다. 결과의 판독은 iNOS는 정상 대장조직에서 음성이면서 암종세포의 세포질에 염색되는 정도에 따라 염색되는 세포가 없는 경우 음성, 20% 이하인 경우 1점, 70% 이하인 경우 2점, 그 이상인 경우 3점으로 산정하였다. 침윤된 염색세포에서의 발현도 같은 방법으로 등급을 매겨 산정하였다. COX-2는 종양세포의 세포질에 염색되지 않는 경우 0, 경도나 중등도로 50% 미만의 종양세포에서 염색되는 경우 1점, 염색되는 세포가 경도나 중등도로 50% 이상이거나 강하게 50% 미만에서 염색될 경우 2점, 강하게 50% 이상의 종양세포에서 염색될 때 3점으로 산정하여 판독하였다. 미세혈관밀도는 케양이나 육아종 형성 등의 부위를 제외하고 종양 내 신생혈관형성이 가장 활발한 부위를 선정하여 200배 시야당 미세혈관밀도를 세 부위에서 센 후 평균치를 구하였다. 이때 CD34에 대해 내피세포의 세포막에 염색된 혈관 중 적혈구 4개 미만이 들어갈 정도의 작은 직경을 갖는 신생혈관과 날개의 내피세포만을 인정하였으며 근육층을 갖는 혈관이나 내피세포 외의 CD34 양성 간엽세포나 염색세포는 제외하였다.

(4) **통계처리:** 각 예후 인자, MSI 상태나 COX-2, iNOS 발현 및 미세혈관밀도 수치에 따라 Pearson's Chi square 법으로 처리하여 상관관계를 알아보았으며 P값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의 있다고 판정하였다. 생존율에 대한 분석은 Kaplan-Meier법으로 처리하였다.

## 결 과

### 1) 현미부수체불안정성

결장직장암 총 85예 중 MSI는 11예(MSI-H 10예, MSI-L 1예)로 빈도는 12.9%였으며 MSS는 74예(87.1%)였다. 성별은 MSI 11예 중 여자가 7예로 1.75배 많았으

며 발생부위는 MSS군 총 74예 중 우측 대장이 17예(23.0%), 좌측 대장이 57예이었으며 MSI군은 우측 4예(36.4%), 좌측 7예로서 MSI와 발생부위 간에 유의한 상관관계는 없었다(P=0.441). 종양의 크기는 두 군 간에 차이가 없었다. 수술당시 Dukes 병기는 MSS군 74예 중 B가 39예(52.7%), C가 32예(43.2%), D가 3예(4.1%)였으며 MSI군은 B가 8예(72.7%), C가 3예(27.3%)이었으며 D는 없었다. 국소재발 및 원격전이 여부는 MSS군 71예 중 13예(18.3%)에서 국소재발, 17예(23.9%)에서 원격전이가 있었으며 MSI 군은 국소재발은 없었으며 원격전이는 2예(18.2%)에서 있었고 이중 1명은 수술 후 16개월째 사망하였다(Table 1).

조직소견은 MSS군 총 74예 중 고중등도분화 68예(91.9%)였으며 저분화 6예(8.1%)였다. MSI군은 11예

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of colorectal cancers by microsatellite status

Factors	MSS (n=74)	MSI (n=11)	P value
Age (yr)	61.82 (35~83)	59.72 (38~81)	0.256
Sex (M : F)	40 : 34	4 : 7	0.128
Side (Rt. : Lt.)			0.441
Right	17 (23.0%)	4 (36.4%)	
Left	57	7	
Size (cm)	5.1±3.1	5.5±2.9	0.865
Dukes stage			0.007
B	39	8	
C	32	3	
D	3	0	
Local recurrence	13/71 (18.3%)*	0/11	0.263
Distant metastasis	17/71 (23.9%)*	2/11	0.779
Differentiation			0.287
Well to moderate	68	11	
Poor	6	0	
Margin			0.735
Pushing	20	3	
Infiltrative	45	6	
Mixed	9	2	
Nodal metastasis	37	4	0.400
Lymphatic invasion	60	8	0.326
Vascular invasion	19	2	0.254
Perineural invasion	32	3	0.649
Crohn's like reaction	29	5	0.176
Microvessel density	44.2±18.5	39.5±15.0	0.243

MSS = microsatellite stable; MSI = microsatellite instability-high and microsatellite instability-low. \*Clinical data could not be obtained from 3 patients.

모두 고중등도분화였으며 저분화 예는 없었다. 점액유형은 MSS군의 74예 중 12예(16.2%), MSI군 11예 중 3예(27.3%)가 있었다. 종양 경계부의 침윤양상은 두 군간의 차이가 없었으며 림프절전이는 MSS군에서 50% (37/74), MSI군 36.4% (4/11)로 유의한 상관관계가 없었다(P=0.400). 크론유사 림프반응은 MSS군의 29.7%

(22/74), MSI군은 45.5% (5/11)로 MSI군에서 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.176)(Table 1).

2) hMLH1과 hMSH2 발현과 MSI와의 상관관계

hMLH1은 총 85예 중 79예에서 양성이었으며 MSS 총 74예 중 73예(98.6%)가 양성, MSI 11예 중 6예에서 양성으로 hMLH1 발현의 민감도는 98.6%, 특이도 45.5%, 위양성률 54.5%, 위음성률 1.4%였다. hMSH2는 총 85예 중 81예에서 양성이었으며 MSS 총 74예 중 74예(100%)가 양성, MSI 11예 중 7예가 양성이었다. hMSH2 발현의 민감도는 100%, 특이도 36.4%, 위양성률 63.6%, 위음성률 0%였다. MSI-H 10예 중 hMLH1 또는 hMSH2 중 하나라도 발현이 소실된 경우는 8예(80%)였다(Fig. 2). 전체 MSI군 11예에서 hMLH1, hMSH2 중 하나라도 발현이 소실된 예의 전체적인 민감도는 98.6%, 특이도는 72.7%, 위양성률 27.3%, 위음성률 1.4%이었다(Table 2).

Table 2. Correlation of microsatellite status and hMLH1 and hMSH2 expression in colorectal cancers

Microsatellite status	hMLH1		hMSH2	
	+	-	+	-
MSS (n=74)	73	1	74	0
MSI-H (n=10)	5	5	6	4
MSI-L (n=1)	1	0	1	0

MSS = microsatellite stable; MSI-H = microsatellite instability-high; MSI-L = microsatellite instability-low.

Table 3. COX-2 and iNOS expression by microsatellite status in colorectal cancers

Microsatellite status	COX-2*				E-iNOS <sup>†</sup>				I-iNOS <sup>‡</sup>			
	-	+	2+	3+	-	+	2+	3+	-	+	2+	3+
MSS	9	23	23	19	5	8	18	43	22	22	12	18
MSI-H	1	2	5	2	0	2	3	5	1	3	0	6

E-iNOS = iNOS expression in tumor epithelial cells; I-iNOS = iNOS expression in inflammatory cells; MSS = microsatellite stable; MSI-H = microsatellite instability-high. \*: P=0.425, <sup>†</sup>: P=0.397, <sup>‡</sup>: P=0.079.

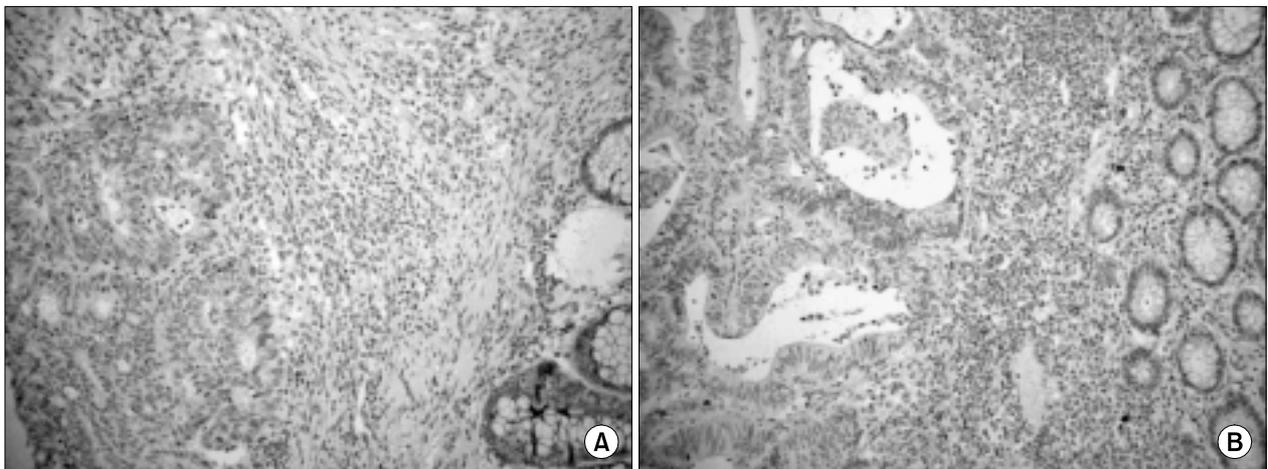
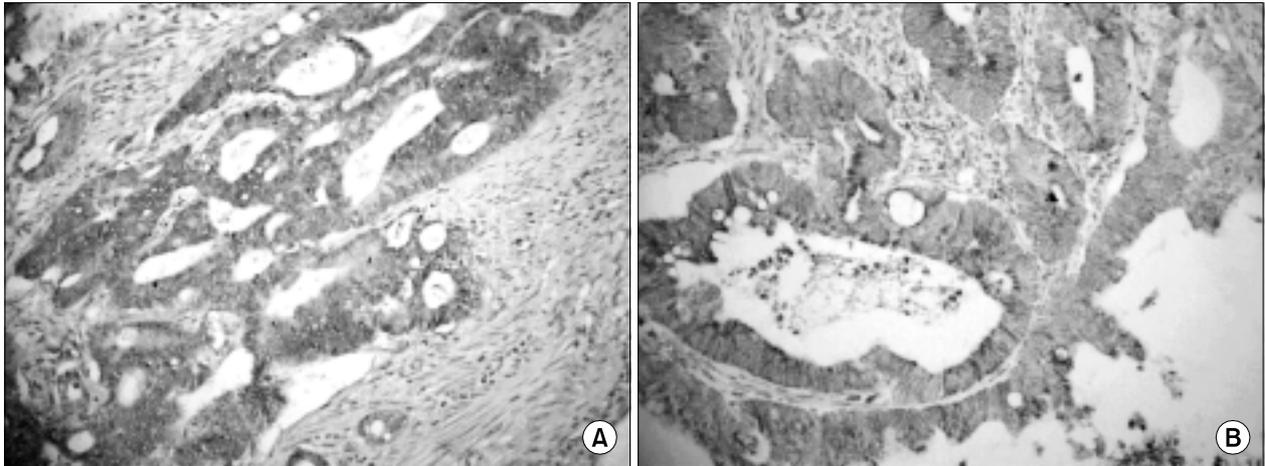
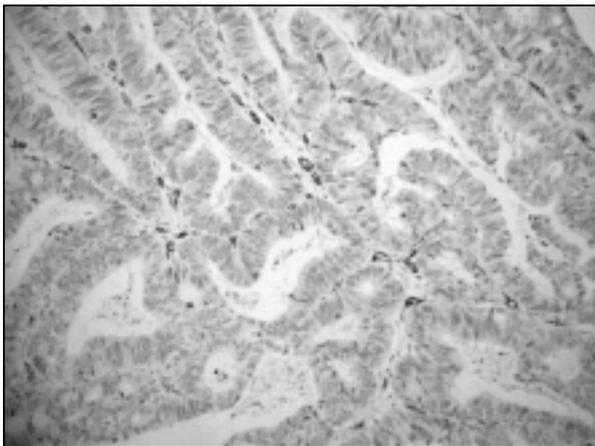


Fig. 2. Mismatch repair protein expression in colorectal cancers. (A) Loss of hMLH1 expression is seen in MSI-H cancer, compared to the normal crypt cells in the right (ABC for hMLH1, ×200). (B) Loss of hMSH2 expression is seen in MSI-H cancer, compared to the normal crypt cells in the right (ABC for hMSH2, ×200).



**Fig. 3.** COX-2 and iNOS expression in colorectal cancers. (A) COX-2 expression is seen in the cytoplasm of tumor cells. (ABC for COX-2,  $\times 200$ ). (B) iNOS expression is noted in both the cytoplasm of tumor cells and the inflammatory cells (ABC for iNOS,  $\times 200$ ).



**Fig. 4.** Microvessel density in colorectal cancers. Immunohistochemistry highlighted increased neovascularization within the tumor (ABC for CD34,  $\times 200$ ).

### 3) COX-2 및 iNOS 발현과 미세혈관밀도

COX-2와 iNOS 발현(Fig. 3)의 상관관계는 COX-2와 상피세포 iNOS 발현은 유의한 상관관계가 있었고 ( $P=0.006$ ), 염증세포 iNOS 발현은 비례하는 경향이 있었으나 통계학적으로 유의성이 없었다( $P=0.063$ ). COX-2와 MSI는 유의 있는 상관관계가 없었으며( $P=0.425$ ) 상피세포 iNOS 발현은 상관관계가 없었고( $P=0.397$ ) 염증세포 iNOS 발현은 MSI군에서 발현이 증가하는 경향은 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다( $P=0.079$ ) (Table 3).

평균 미세혈관밀도(Fig. 4)는 MSS군  $44.2 \pm 18.5$ , MSI

군  $39.5 \pm 15.0$ 으로서 MSI 상태에 따른 유의한 차이가 없었다( $P=0.243$ ). 미세혈관밀도는 크론유사 림프반응이 있을수록( $P=0.041$ ), hMLH1 단백질 발현이 있을수록( $P=0.025$ ), COX-2 발현이 증가할수록( $P=0.05$ ) 유의하게 증가하였다.

## 고 찰

대장암의 발암기전에 대해서는 전통적으로 여러 가지 종양억제 유전자의 이상이 축적됨으로써 샘종 단계를 거쳐 암종으로까지 발전한다는 가설이 정립되어 있다. 최근 HNPCC 환자에서의 발암기전에 대한 연구로부터 대장암종의 발암과정 중 비적합수복유전자의 이상이 관여한다는 사실이 알려졌으며 또한 이러한 기전을 통한 현미부수체불안정성이 산발성 결장직장암의 경우에도 약 10~15%에서 관찰할 수 있다고 한다.<sup>3</sup> 국내에서 한국인 대장암을 대상으로 한 MSI 연구는 제한적이다. 차 등<sup>9</sup>은 246예의 파라핀 조직을 대상으로 실험하여 약 9.8%에서 MSI를 관찰하였으며, 김 등<sup>10</sup>은 107예의 신선한 대장암조직을 대상으로 실험한 결과 15%에서 MSI가 있었다고 하였다. 본 연구에서는 총 85예의 한국인 직장결장암을 대상으로 시행한 현미부수체불안정성 검사상 11예(12.9%)에서 MSI 양성으로 나타나 빈도는 타 연구자의 결과와 비슷하였다.

MSI 상태를 조사하는 검사법은 중합효소연쇄반응법(PCR)이 가장 적합한 검사로 알려져 있으나 모든 검사실에서 사용하기에는 제한이 있으므로 대체검사로

서 면역조직화학염색을 통한 MMR단백 발현에 대한 연구가 이루어졌다.<sup>18</sup> 이때 이용되는 표지자인 MMR 단백질로서는 hMLH1, hMSH2, hMSH6, 및 hPMS2 등이 있으나 모든 표지자를 시행하려면 비용이 많이 드는 단점이 있어, 이중 가장 널리 이용되는 표지자는 hMLH1 및 hMSH2이다. Rigau 등<sup>19</sup>은 204예의 결장직장암 파라핀 포매 조직을 이용하여 D2S123, D5S346, D17S250, TGFβRII, BAT25, BAT26 등 여섯 가지 표지자에 대한 MSI 검사를 시행하고 동시에 MMR 단백질 발현을 조사하여 MSI 상태와 비교한 결과, MSI 양성 예의 17%에서 최소한 1개 이상의 MMR 단백질에 대해 발현이 소실되었으며 MSI-H 예의 100%에서 MMR 단백질 발현이 소실되었다고 하면서 면역조직화학염색이 MMR 유전자 돌연변이 연구의 표본검사로 유용하다고 하였다. 이들은 또한 이제까지 현미부수체불안정성검사와 MMR 단백질발현의 상관관계를 연구한 16개의 기존 연구 자료를 종합하여 MMR 단백질발현의 전체적인 민감도는 92.4% (75~100%), 특이도 99.6% (95~100%)이었다고 하였다.<sup>19</sup> 본 연구에서도 MMR 단백질 표지자중 가장 널리 사용되는 hMLH1과 hMSH2를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하고 MMR 단백질발현유무를 현미부수체불안정성 상태와 비교한 결과 hMLH1, hMSH2 각각에 대한 민감도는 98.6%, 100%, 특이도는 45.5%, 36.4%였는데, 두 표지자 중 한 개라도 발현이 소실된 경우를 발현소실로 간주하면 전체적인 민감도가 98.6%, 특이도가 72.7%로서 단독 표지자만을 시행한 것보다 특이도가 증가하였다. 이 성적을 타 연구 성적과 비교하여보면 민감도는 높았으나 특이도는 낮았으며 hMLH1 표지자가 hMSH2보다 MSI 상태를 예측하는데 더 유의 있는 표지자로 생각할 수 있다.

일반적으로 MSI 양성 결장직장암은 특징적인 임상병리학적 특징을 지닌다고 알려져 있다. 즉, 젊은 연령, 여성, 우측 근위 대장, 저분화암종, 점액암종, 수질분화, 림프구침윤이 많은 경우에서 높았다고 하였다.<sup>4,7,9,10</sup> 본 연구에서는 MSI 양성 암종에서 MSS 암종에 비해 여자에 빈발하고 크론유사 림프반응을 더 동반하고 점액유형이 많았으나 다른 임상병리학적 인자와의 의미있는 관련성을 찾을 수 없었다. 특히 본 연구에서는 MSI 양성 암종에서도 좌측 대장에서 발생한 예가 많았는데, 이는 본 연구의 대상인 결장직장암의 3/4이 좌측 대장에서 발생하였기 때문이라고 생각한다.

연구자마다 의미있는 임상병리학적 특징이라고 주장한 인자가 다소 다르나, 대부분의 연구에서 MSI 양성 대장암종이 MSI 음성 대장암종에 비해 예후가 좋

다는 사실에는 의견이 일치한다. Gryfe 등<sup>6</sup>은 50세 이하 대장암종을 대상으로 한 연구에서 MSI 양성 대장암종에서 림프절 전이율과 원격 전이율이 낮고 생존율이 높았다고 하였으며 같은 임상 병기의 암종을 대상으로 한 타 연구에서 MSI 양성일 경우 생존율이 높았다고 하였다.<sup>5</sup> 본 연구에서는 Dukes 병기(P=0.007)와는 생존율과 MSI 사이에 통계학적으로 유의 있는 상관관계가 없었다.

NO는 DNA수복을 방해함으로써 DNA를 손상시킬 수 있으며 염증관련 시토카인의 전사후 변형을 초래함으로써 종양의 발생단계 중 시작(initiation)과 진전(promotion)에 관여한다. 최근 Ahn과 Oshima의 연구<sup>20</sup>에서 APC mice에서 iNOS 유전자를 knock-out 시킨 후 장용종의 수가 현저히 줄어들었다고 보고하여 대장암의 발암과정에 iNOS와 NO가 관여함을 뒷받침하였으며 NO와 유리산소라디칼 등이 조직 및 직접적인 DNA 손상을 일으킨다고 생각된다. 실험적으로 배양세포주에서 NO를 투입하면 COX를 활성화시킴으로써 프로스타글란딘 계열 물질을 유리시키며, NO 억제제를 투입하면 PGE2의 유리가 감소됨을 관찰함으로써 iNOS와 COX-2가 서로 상승작용을 함을 알 수 있다.<sup>11</sup> 또한 대장암에서 내피세포에 의해 생성된 NO는 COX 합성에 관여함으로써 아라키돈산으로부터 염증산물 생성을 촉진시킨다.<sup>16</sup> 그러므로, COX-2, iNOS 및 다른 염증관련 유전자 등이 대장암의 발생에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. COX-2는 일반적으로 정상 대장에서는 발현되지 않으나 대장암에서 발현이 증가된다고 알려져 있다.<sup>21</sup> 대장암종의 상피세포에서 COX-2를 발현함으로써 접합능을 변화시키고 아포프토시스에 저항성을 갖게 하여 종양의 성장과 침윤을 촉진하며,<sup>22</sup> 실험동물<sup>23</sup> 및 인체 대장 생검 및 생검종<sup>24</sup>을 대상으로 한 연구에서는 주변 비종양점막과 비교하여 종양 내 iNOS의 활성화도 및 단백질발현이 증가되어 있다고 하였다. 본 연구에서는 COX-2 발현과 상피세포에서의 iNOS 발현과 의미 있는 상관관계가 있어 COX-2와 iNOS 발현이 결장직장암에서 밀접하게 관련이 있음을 알 수 있었다. iNOS 및 COX-2 발현과 MSI 상태와의 관련성에 대하여 Kames 등<sup>25</sup>은 MSI 양성 대장암에서는 COX-2 발현이 감소된다고 하였는데 본 연구에서는 COX-2 발현과 MSI 양성 여부와의 유의 있는 관련성은 찾을 수 없었다.

Cianchi 등<sup>16</sup>은 대장암 종양 내 iNOS 및 VEGF 발현과 미세혈관밀도 사이에 상관관계가 있으며 iNOS 활성화도와 cGMP 생성이 정상에 비해 원발 암종 및 전이 암종

모두에서 의미 있게 증가하였다고 하면서 NO는 혈관형성을 촉진시킴으로써 대장암의 성장을 돕는다고 하였다. Wendum 등<sup>26</sup>은 MSI 양성 점액암종은 MSS 점액암종 및 MSS 대장암종에 비해 미세혈관밀도 및 VEGF 발현이 낮음을 관찰하고 MSI 양성 대장암종에서 신생혈관형성이 억제됨으로써 종양의 파급이 감소되어 예후가 좋을 것이라고 하였다.

본 연구에서는 미세혈관밀도가 COX-2 발현이 증가할수록 의미 있게 증가하였으나(P=0.05) 현미부수체불안정성 여부와 미세혈관밀도의 상관관계는 찾을 수 없었다(P=0.243).

이상의 연구결과로 COX-2 관련 미세혈관밀도의 증가가 대장암종의 파급에 관련이 있음을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 MSI 양성 결장직장암이 총 11예로 의미있는 결과를 얻어내기에는 부족하였다. 따라서 앞으로 더 많은 예를 대상으로 현미부수체불안정성 여부와 혈관형성 관련인자와의 상관성에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

### 결 론

대장절제술로 얻어진 산발성 직장결장암 총 85예를 대상으로 MSI 빈도를 알아보고, hMLH1 및 hMSH2에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 MMR 단백질발현과 MSI 상태의 상관관계를 알아보았으며 COX-2와 iNOS 발현 및 미세혈관밀도를 조사하여 MSI와 혈관형성과의 연관성을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 85예 중 11예(12.9%)에서 MSI 양성이었으며 이중 고도 현미부수체불안정성(MSI-H) 10예, 저도 현미부수체불안정성(MSI-L) 1예였다.

2. hMLH1과 hMSH2 발현과 MSI의 상관관계는 hMLH1은 MSS군과 MSI 군 각각 98.6%, 50.0%가 양성이었으며 hMSH2는 MSS군과 MSI 군 각각 100%, 60%가 양성으로 hMLH1 또는 hMSH2 중 하나라도 발현이 소실된 경우는 MSS군 1.4%, MSI 군 80.0%로서 전체적인 MSI에 대한 민감도는 98.6%, 특이도는 72.7%였다.

3. COX-2 발현과 상피세포 iNOS 발현은 유의한 상관관계가 있었으며(P=0.006), COX-2 및 iNOS 발현은 MSI와 유의한 상관관계가 없었다. 미세혈관밀도는 크론유사 림프반응이 있을 때(P=0.041), hMLH1 발현이 유지되어 있을수록(P=0.025), COX-2 발현이 증가할수록(P=0.05) 증가하였다.

따라서 hMLH1 및 hMSH2에 대한 면역조직화학염색이 MSI의 대체검사로서 가치가 있으며, MSI 양성

결장직장암의 좋은 예후와 관련한 기전 중 일부가 COX-2 관련 신생혈관형성 감소로 인한 종양의 파급 억제 효과와 관련이 있을 것으로 생각한다.

### REFERENCES

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
2. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
3. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.
4. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69-77.
5. Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 2000;87:1197-202.
6. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000;355:1745-50.
7. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, et al. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998;42:673-9.
8. Alexander J, Watanabe T, Wu T-T, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001;158:527-35.
9. Cha HJ, Woo DK, Kim SH, Kim YI, Park J, Kim WH. Microsatellite instability in colorectal carcinomas. *J Korean Pathol* 2001;35:111-4.
10. Kim NK, Kim H, Park JK, Lee KY, Sohn SK, Min JS. Clinicopathological characteristics of sporadic colorectal cancer with DNA microsatellite instability. *Korean Soc Coloproctol* 2003;19:13-9.
11. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7240-4.
12. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-8.
13. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994;54:1352-4.
14. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in

- hyman breast cancer. *Br J Cancer* 1995;72:41-4.
15. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:587-96.
  16. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: Correlation with tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2003;12:793-801.
  17. Engel CJ, Bennett ST, Chambers AF, Doig GS, Kerkvliet N, O'Malley FP. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for dukes staging. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1260-5.
  18. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1248-55.
  19. Rigau V, Sebbagh N, Olschwang S, Paraf F, Mourra N, Parc Y, et al. Microsatellite instability in colorectal carcinoma: The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 immunostaining. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:694-700.
  20. Ahn B, Ohshima H. Suppression of intestinal polyposis in APC (Min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res* 2001;61:8357-60.
  21. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-8.
  22. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
  23. Takahashi M, Fukuda K, Ohata T, Sugimura T, Wakabayashi K. Increased expression of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat colon tumors induced by azoxymethane. *Cancer Res* 1997;57:1233-7.
  24. Lagares-Garcia JA, Moore RA, Collier B, Heggere M, Diaz F, Qian F. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am Surg* 2001;67:709-13.
  25. Karnes WE Jr, Shattuck-Brandt R, Burgart LJ, DuBois RN, Tester DJ, Cunningham JM, et al. Reduced COX-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair. *Cancer Res* 1998;58:5473-7.
  26. Wendum D, Boelle P-Y, Rigau V, Sebbagh, Olschwang S, Mourra N, et al. Mucinous colon carcinomas with microsatellite instability have a lower microvessel density and lower vascular endothelial growth factor expression. *Virchows Arch* 2003;442:111-7.