

위암에서 다약물내성 유전자의 발현에 관한 면역조직화학적 연구

동아대학교 의과대학 병리학교실

한정희 · 박병곤 · 노미숙 · 홍숙희

Immunohistochemical Study of the Multidrug Resistant(MDR) Gene Expression in Gastric Carcinoma

Jung Hee Han, M.D., Byung Gon Park, M.D., Mi Sook Roh, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.

Department of Pathology, Dong-A University School of Medicine

We performed immunohistochemical stain of p-glycoprotein using JSB-1 monoclonal antibody to study multidrug resistant(MDR) gene expression in 137 gastric tumor tissues obtained from 87 gastric carcinoma patients. The incidence of p-glycoprotein expression was 60 of 87 cases(69%) and it was not correlated with age, sex, depth of tumor invasion, and lymph node metastasis, but was correlated with histologic type of gastric adenocarcinoma.

The distribution of p-glycoprotein positive cells in the tumor tissue was diffuse in 34 cases(73.9%) and focal in 12 cases(26.1%), and the dominant staining patterns of p-glycoprotein in the tumor cells were cytoplasmic and golgi staining in 20 cases(43.5%) and 19 cases(41.3%), respectively, and 7 cases(15.2%) showed fine granules in the cytoplasm. The incidence of p-glycoprotein expression in the tumor tissue was higher in A and AB blood type patients who have A antigen than in O and B blood type patients. Cytoplasmic staining pattern was dominant in O and B blood types and golgi staining in A and AB blood type patients.

Among 27 patients who received chemotherapy, partial remission was noted in 9 of 11 p-glycoprotein negative patients(81.8%) and no remission or progression of the tumor was seen in 9 of 16 p-glycoprotein positive patient(56.3%). The p-glycoprotein expression in gastric carcinoma had no direct correlation with known several prognostic factors of the gastric tumor except for histologic type, and it is supposed that p-glycoprotein detection in gastric tumor tissue by immunohistochemical stain is a good method for predicting the response of chemotherapy, especially in p-glycoprotein negative cases. (**Korean J Pathol 1994; 28: 38~48**)

Key Words: Multidrug Resistance, P-glycoprotein, Gastric carcinoma, Immunohistochemistry, Chemotherapy

서 론

악성종양의 치료 때 화학요법에 대한 내성이 발생

접 수: 1993년 4월 24일, 게재승인: 1993년 8월 20일
주 소: 부산시 서구 동대신동 3가 1번지, 우편번호 602-103
동아대학교 의과대학 병리학교실, 홍숙희

하는데 이는 환자 처치에 아주 심각한 문제를 야기시킨다. 이러한 약제내성의 기전을 규명하기 위한 연구에서 약물 내성을 보이는 각종 세포에서 약물 방출의 증가로 인해 세포내에 약물 축적이 감소됨을 발견하고, 이 세포에서 4.5 kb mRNA를 전사하는 유전자의 증폭이 있음을 발견했다¹⁾. 이 유전자를 다약물내성, 다제내성, 혹은 복합내성 유전자(Multidrug Resistance gene, MDR gene)라고 하고, 이 유전자에 의

해 만들어진 단백질 산물인 170 Kd의 세포막 당단백질을 p-glycoprotein으로 명명하고, 이 물질이 ATP-의존성 약물 방출 펌프로 작용하여 약물을 세포로부터 밖으로 퍼내므로 세포가 약물내성을 보인다는 것을 알게 되었다. 최근 분자생물학의 기술적인 발달로 다약물내성과 관련된 유전자와 mRNA, 그리고 그 단백질 산물의 분리가 가능하였고, 또 이들의 특성이 밝혀지면서 MDR 유전자의 발현이 여러 종양에서의 약물내성과 관계있음이 여러 연구에 의해 보고되고 있다¹⁾.

저자들은 아직 우리나라에서는 MDR 유전자의 발현과 다약물내성의 관계에 대한 연구가 미흡하고, 특히 한국인에서 가장 발생빈도가 높은 위암이 불행하게도 여러 화학요법제의 치료에도 반응을 잘 하지 않는 종양으로 알려져 있어, 약물내성과 연관된 MDR 유전자의 과발현을 위암조직에서 p-glycoprotein을 염색하여 검색하여, 이 물질의 존재와 지금까지 알려진 몇 가지 위암 예후 인자들과의 상관관계를 알아보고 또 화학요법에 대한 위암의 반응과 연관시켜 봄으로써 p-glycoprotein 검출이 위암 환자의 치료에 도움이 될 수 있을 것인지를 알고자 이 연구를 시도했다.

연구대상 및 방법

1990년 3월부터 1992년 6월까지 동아대학병원 해부병리과에 위내시경에 의한 생검이나 위절제술에 의해 적출된 위장 조직에서 위선암으로 진단된 환자 중에서 치료 경과에 대한 병력기록지 검토가 가능하고 또 파라핀 포매 조직이 충분한 87명을 선택 하였다. 87명중 위내시경에 의한 생검과 위절제 조직표본의 검색이 동시에 가능한 50명과 위절제 표본만 검색가능한 13명을 합하여 총 63명에서는 위절제 조직표본을 검색하였다. 위내시경 생검표본은 위내시경 검사만 시행한 24명을 합하여 총 74명에서 검색이 가능하였다. 그리하여 87명의 환자에서 얻어진 총 137예의 위암조직의 파라핀 포매 조직절편에서 p-glycoprotein 단일 클론 항체인 JSB-1(Synbio® bv, Netherland)을 사용하여 면역조직화학적 방법으로 염색하여 위암조직 및 종양주위 정상 위점막에서 p-glycoprotein의 발현 유무를 관찰하였다.

P-glycoprotein의 염색방법은 ABC 방법으로 염색했는데 순서는 다음과 같다. 파라핀 포매 조직을 4 μ 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 탈파라핀한 후 알코올을 거쳐 합수 시킨후 0.1 M PBS 완충액으로 씻는다. 3% H₂O₂를 떨어뜨려 5분간 내제된 peroxidase 활동을 저지시킨다. 면역 혈청에 5분간 접촉시켜 비특이적 항체 결합을 억제시킨다. 일차 항체인 p-glycoprotein 항체(Synbio® bv)를 1:80~1:100으로 희석한 후 습윤 상태에서 2시간 동안 실온에서 방치한다. PBS 완충액으로 5분간 2번 씻고 2차 항체인

biotinylated polyvalent antibody를 30분간 염색한다. PBS완충액으로 씻은 후 streptavidine peroxidase로 30분간 염색한다. 다시 PBS완충액으로 씻고 발색시약(AEC)으로 10분간 염색하여 발색시킨다. 흐르는 물로 세척한 후 hematoxylin으로 3분간 대조 염색을 한 후 흐르는 물로 다시 씻고 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검경한다.

염색된 조직을 현미경으로 고배율에서 관찰하여 세포질에 적갈색으로 염색되는 과립이 있을 때 p-glycoprotein발현 세포로 판독하였다. 종양 조직을 4부위로 나누어 각 부위에서 10% 이상의 양성 세포가 보이면 미만성 분포로 하고, 어느 한 곳 내지 두 곳에 편재해 있으면 국소적 분포로 간주하였다. 세포질 내에서 p-glycoprotein의 존재는 3가지 형태로 나누어 세포질 전체가 균질하게 적갈색으로 염색되면 세포질 염색상으로, 핵주위에 1~2개의 굵은 과립 혹은 덩어리로 보이면 골지 염색으로, 1개 내지 여러 개의 미세한 과립으로 보이면 미세 과립상으로 간주하였다. 통계학적 유의성 검정은 spss/pc+ 프로그램을 이용한 chi-square test로 검정하였다.

연구 결과

위암 조직에서 p-glycoprotein은 87명 중 60명에서 검출되어 69%의 양성율을 보였다. 위암환자의 연령은 25세부터 82세이었고, 59명의 남자 중 42명(71.2%)에서, 28명의 여자 중 18명(64.3%)에서 양성으로 나타나 연령군이나 남녀 사이에서 p-glycoprotein발현 빈도는 유의한 차이가 없었다(Table 1). 위선암의 조직학적 분류에 따라 p-glycoprotein의 양성율을 비교하였는데, 일반적으로 분화도가 좋은 유두상 선암, 고분화형 및 중분화형은 76.5% 내지 100%에서, 분화도가 나쁜 균인 저분화형, 인환세포암, 점액성 암종은 45.5% 내지 63%에서 p-glycoprotein 양성율 보여 분화도가 좋을수록 양성율이 높았다(p<0.05)

Table 1. Correlation of P-glycoprotein expression in gastric adenocarcinoma with age group

Age group (year)	No. of patient	P-glycoprotein	
		+	-
20~29	3	1(33.3%)	2(66.7%)
30~39	11	9(81.8%)	2(18.2%)
40~49	17	9(52.9%)	8(47.1%)
50~59	26	20(76.9%)	6(23.1%)
60~69	21	15(71.4%)	6(28.6%)
70~	9	6(66.7%)	3(33.3%)
Total	87	60(69.0%)	27(31.0%)

(Table 2). 근처 위 절제를 시행한 63명에서 p-glycoprotein 발현은 46명(73%)에서 보였으며, 조기 위 암에서는 8예 모두가 양성을 보였다. 위 선암의 침윤 정도가 깊을수록 p-glycoprotein의 발현 빈도가 높아지는 경향을 보이나 통계적으로 유의있는 상관 관계는 없었다(Table 3). 이 중 림프절 전이가 있는 47명 중 34명(72.3%)에서, 림프절 전이가 없는 16명 중 12명(75%)에서 p-glycoprotein 양성을 보여 두군 사이에 발현빈도의 차이는 없었다.

위 내시경 생검 조직과 위절제 조직표본에서 p-glycoprotein의 양성율을 비교했을 때 양조직에서 모두 양성을 보이는 경우가 50명중 28명(56%), 모두 음성을 보이는 경우가 13명(26%)으로 전체의 82%에서 두

Table 2. Correlation of P-glycoprotein expression with histologic type of gastric adenocarcinoma

Histologic type	No. of tumor	P-glycoprotein	
		+	-
Papillary	4	4(100%)	0 (0%)
Well diff.	34	26(76.5%)	8(23.5%)
Mod. diff.	7	6(85.7%)	1(14.3%)
Poor diff.	27	17(63.0%)	10(37.0%)
Signet ring cell	11	5(45.5%)	6(54.5%)
Mucinous	4	2(50.0%)	2(50.0%)
Total	87	60	27

p<0.05

조직 표본에서 일치된 염색 소견을 보였다(p<0.001). 위 내시경 생검 조직에서 위 음성을 보인 예가 8명(16%)이었고, 위양성을 보인 예가 1예(2%)이

Table 3. Correlation of P-glycoprotein expression with depth of invasion of gastric adenocarcinoma

Depth of invasion	No. of tumor	P-glycoprotein	
		+	-
Mucosa & submucosa	8	8(100%)	0 (0%)
Muscle layer	2	1(50.0%)	1(50.0%)
Serosa	6	4(66.7%)	2(33.3%)
Transmural	47	33(70.2%)	14(29.8%)
Total	63	46(73.0%)	17(27.0%)

Table 4. Comparison of incidence of p-glycoprotein expression in tumor tissue between biopsy and gastrectomy specimens

Gastrectomy \ Biopsy	Biopsy		Total
	+	-	
+	28(56%)	8(16%)	36(72%)
-	1 (2%)	13(26%)	14(28%)
Total	29(58%)	21(42%)	50(100%)

p<0.001

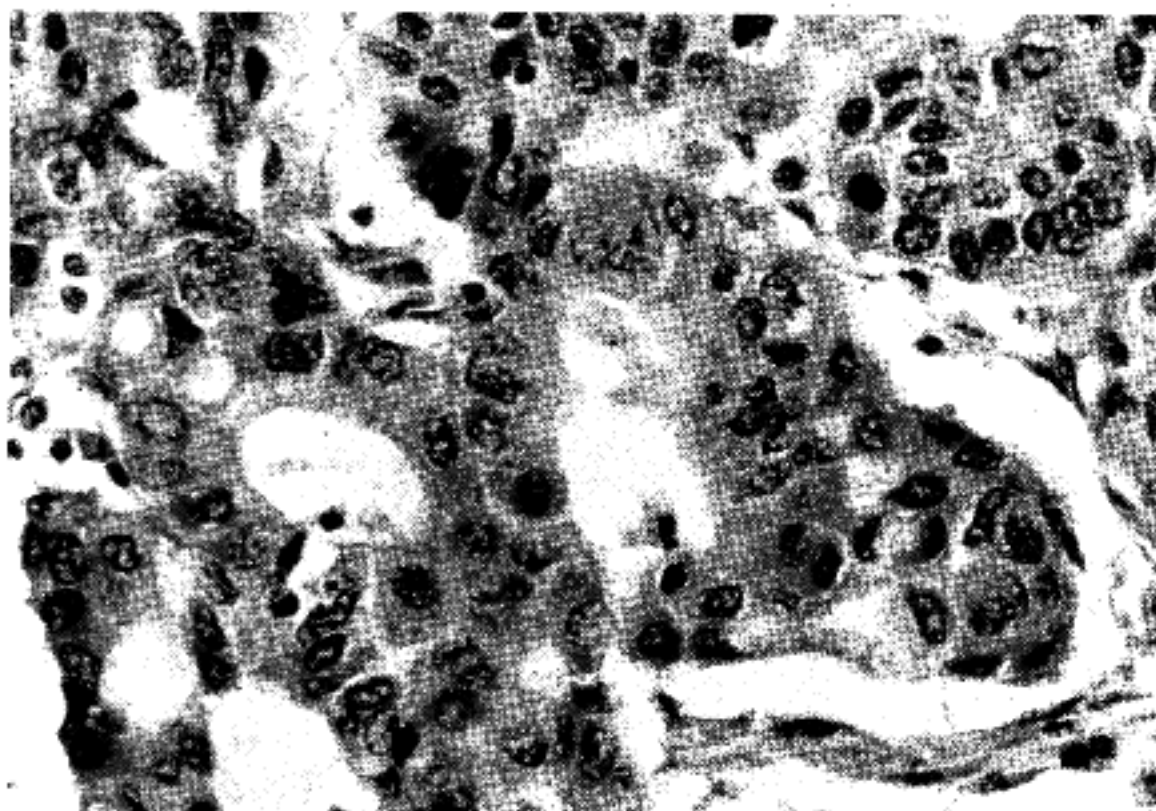


Fig. 1. Cytoplasmic staining pattern of p-glycoprotein in tumor cells of well differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC).

었다(Table 4). 63예의 위절체 조직 중에서 p-glycoprotein 양성을 보이는 46예에서 종양내 p-glycoprotein 양성 세포의 분포를 관찰하였는데, 양성세포가 전 종양조직에 미만성으로 존재하는 경우가 34예(73.9%)이었고, 12예(26.1%)는 국소적으로 분포하였다. 종양세포내에서 p-glycoprotein은 3가지 양상으로 나타났으며 각 종양 조직에서 p-glycoprotein의 염색 양상은 대개 한가지의 균일한 형태를 나타내었다(Fig. 1-4). 그 중 세포질 전체에 균질하게 염색되는 형태를 보이는 경우가 20예(43.5%), 핵주위의 골지에

Table 5. Immunostaining pattern of tumor cell and distribution of p-glycoprotein in tumor tissue

Stain pattern	No. of tumor	Tumor tissue	
		Diffuse	Focal
Cytoplasmic	20(43.5%)	17(37.0%)	3 (6.5%)
Golgi	19(41.3%)	15(32.6%)	4 (8.7%)
Fine granule	7(15.2%)	2 (4.3%)	5(10.9%)
Total	46(100%)	34(73.9%)	12(26.1%)

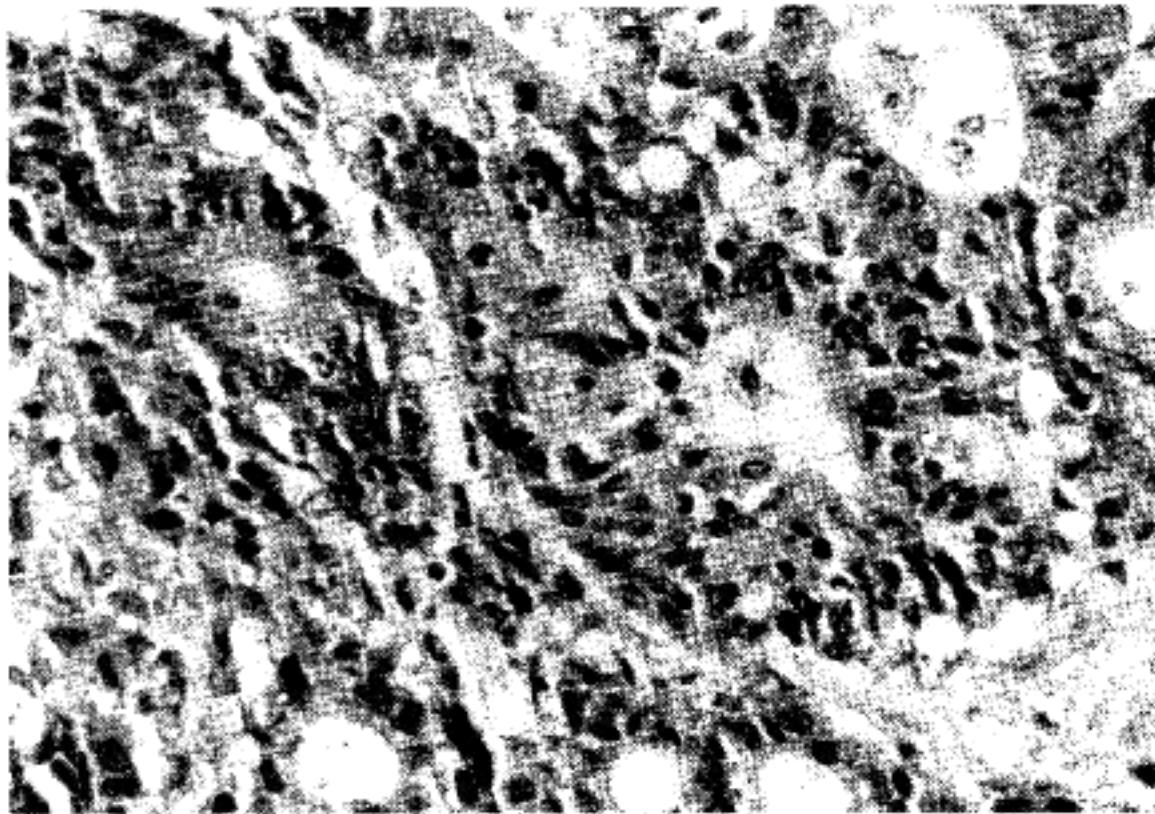


Fig. 2. Golgi staining pattern of p-glycoprotein in tumor cells of well differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC).

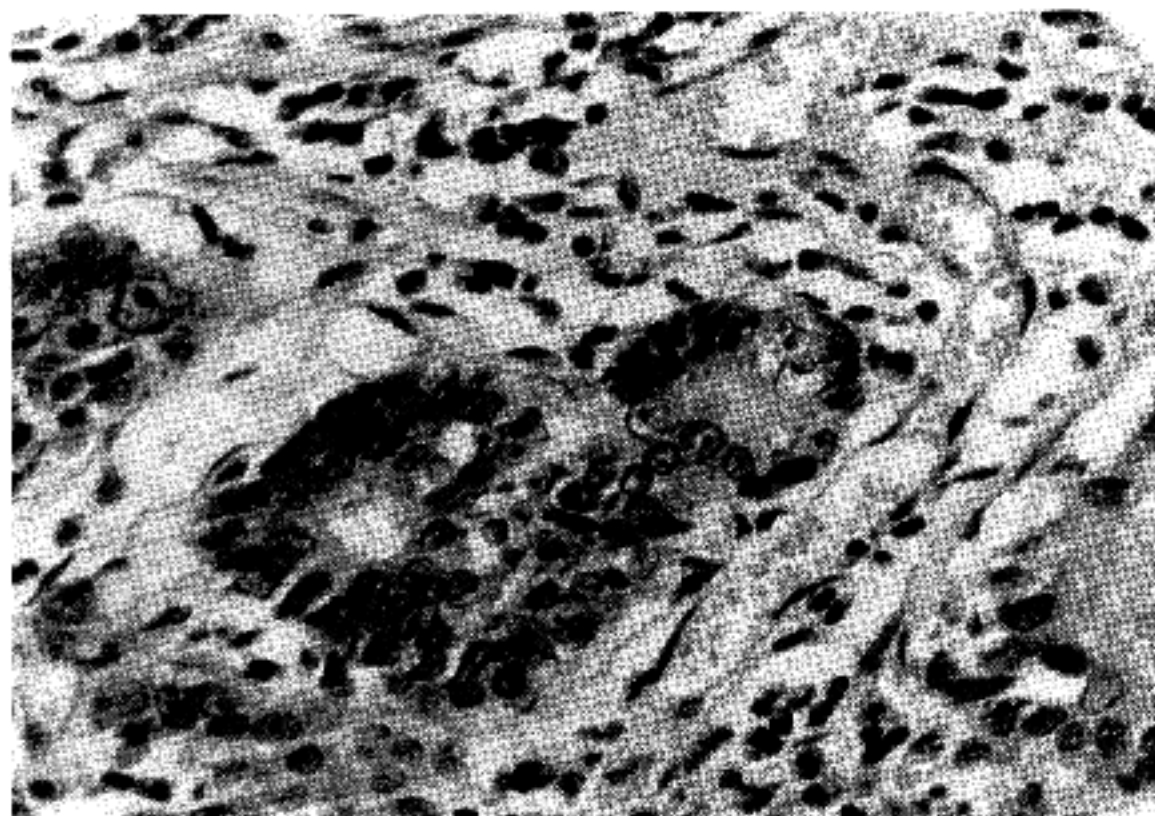


Fig. 3. Golgi staining pattern of p-glycoprotein in one tumor gland of well differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC).

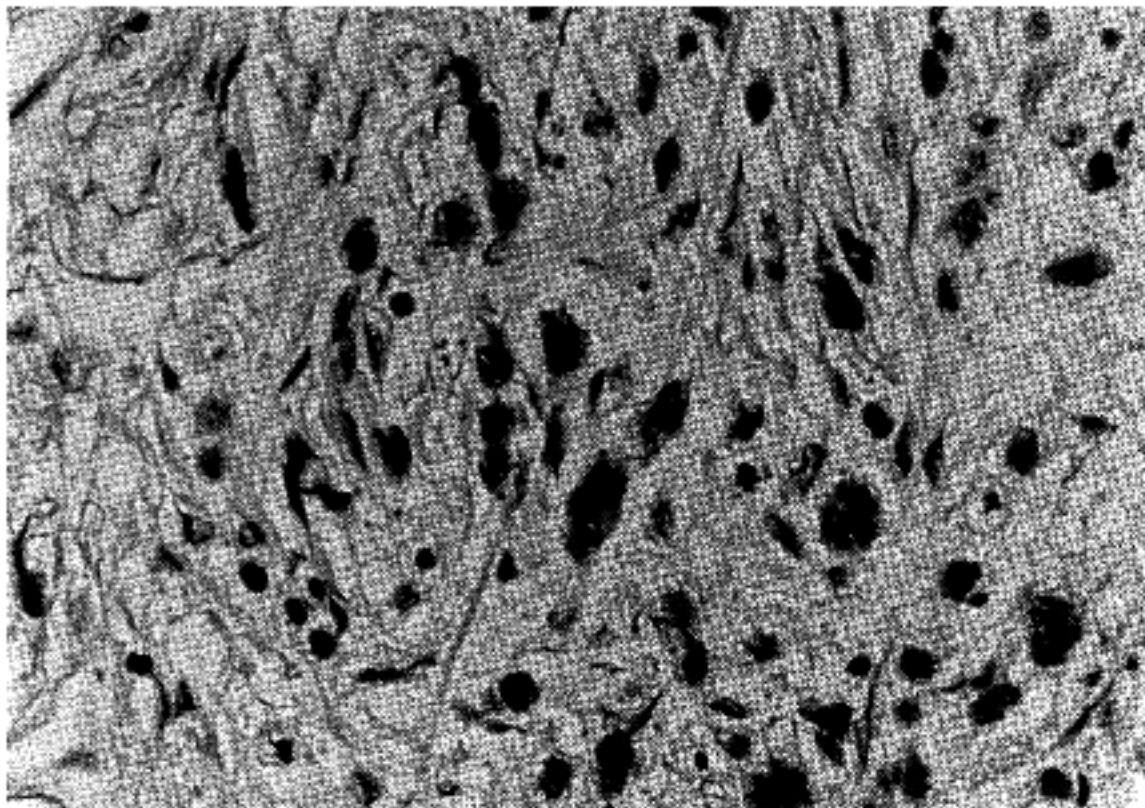


Fig. 4. A few fine granules of p-glycoprotein in some tumor cells of poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC).

Table 6. Immunostaining pattern of P-glycoprotein in tumor cells in each histologic type

Histologic type	No. of tumor	Cytoplasmic	Golgi	Fine granules
Papillary	3	2(66.7%)	0 (0%)	1(33.3%)
Well diff.	20	11 (55%)	8 (40%)	1 (5%)
Mod. diff.	3	1(33.3%)	2(66.7%)	0 (0%)
Poor diff.	15	5(33.3%)	6 (40%)	4(26.7%)
Signet ring cell	4	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)
Mucinous	1	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	46	20	19	7

염색되어 굵은 과립으로 혹은 덩어리로 보이는 경우가 19예(41.3%)이었으며, 세포질내 미세한 과립으로 나타난 예가 7예(15.2%)이었다. 전자의 두 형태는 대개 종양 전체에 미만성으로 존재했고, 미세 과립을 보인 예중 5예는 종양조직에 국소적으로 분포하고 있었다 (Table 5). 위 선암종의 조직학적 분류에 따라 위결체 조직에서 p-glycoprotein의 세포내 분포양상을 비교해 보았는데, 비교적 분화가 좋은 형에서는 주로 세포질 전체에 균질하게 또는 골지에 굵은 과립으로 존재하고, 저분화형에서는 3가지 양상이 비슷하게 분포하였다. 미세 과립형태로 나타나는 7예중 4예가 저분화형에서 관찰되었으나 예수가 적어 유의한 차이를 찾을 수가 없었다 (Table 6). 위암의 조직학적 분류에 따라 p-glycoprotein의 종양조직내 분포를 보면, 분화도가 좋은 유두상선암종과 고분화형은 대부분이 미만성으로 존재하나, 국소적으로 분포하는 12예중 7예는 저분화형으로 분포에 차이를 보였으나 통계학적 유의성은 없

Table 7. Distribution pattern of P-glycoprotein in tumor tissues in each histologic type

Histologic type	No. of tumor	Diffuse	Focal
Papillary	3	3(100%)	0 (0%)
Well diff.	20	18 (90%)	2 (10%)
Mod. diff.	3	1(33.3%)	2(66.7%)
Poor diff.	15	8(53.3%)	7(46.7%)
Signet ring cell	4	3 (75%)	1 (25%)
Mucinous	1	1(100%)	0 (0%)
Total	46	34	12

었다 (Table 7).

위암 환자의 혈액형에 따라 종양과 종양 수위 정상 점막에서의 p-glycoprotein 발현빈도를 보면, 16명

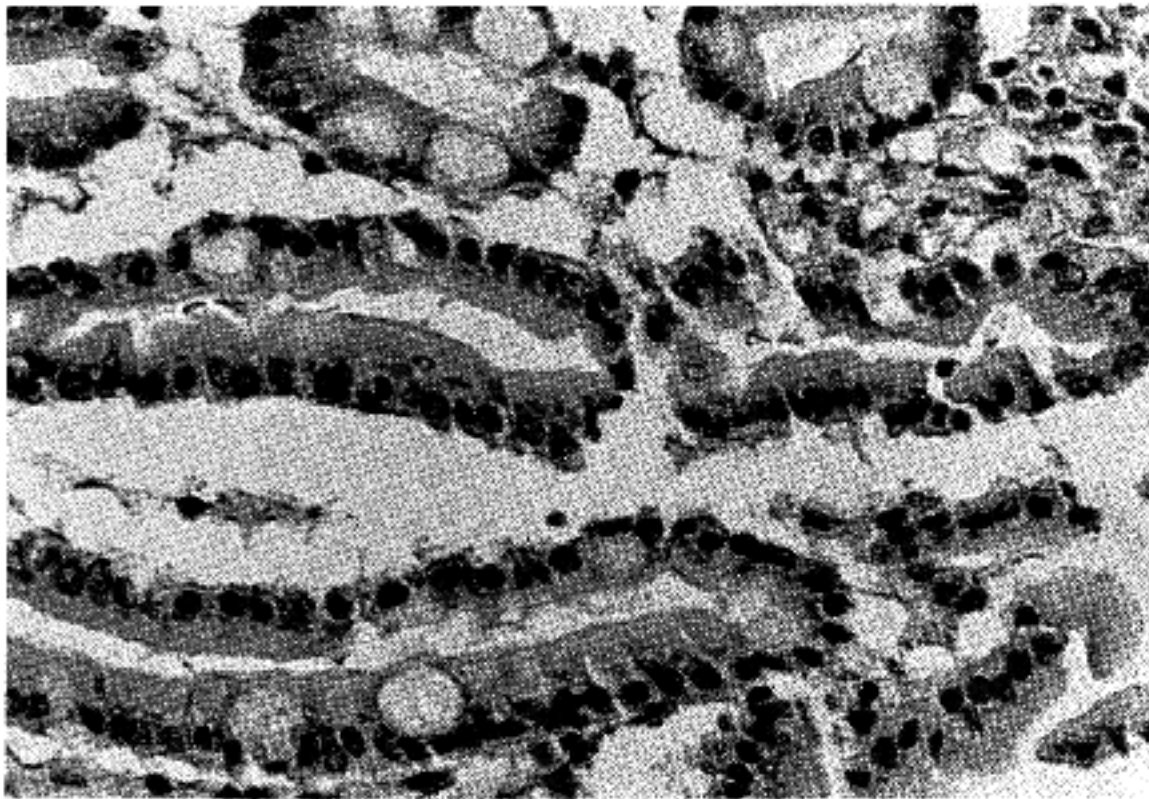


Fig. 5. Golgi staining pattern of p-glycoprotein in normal gastric gland adjacent to the tumor (ABC).

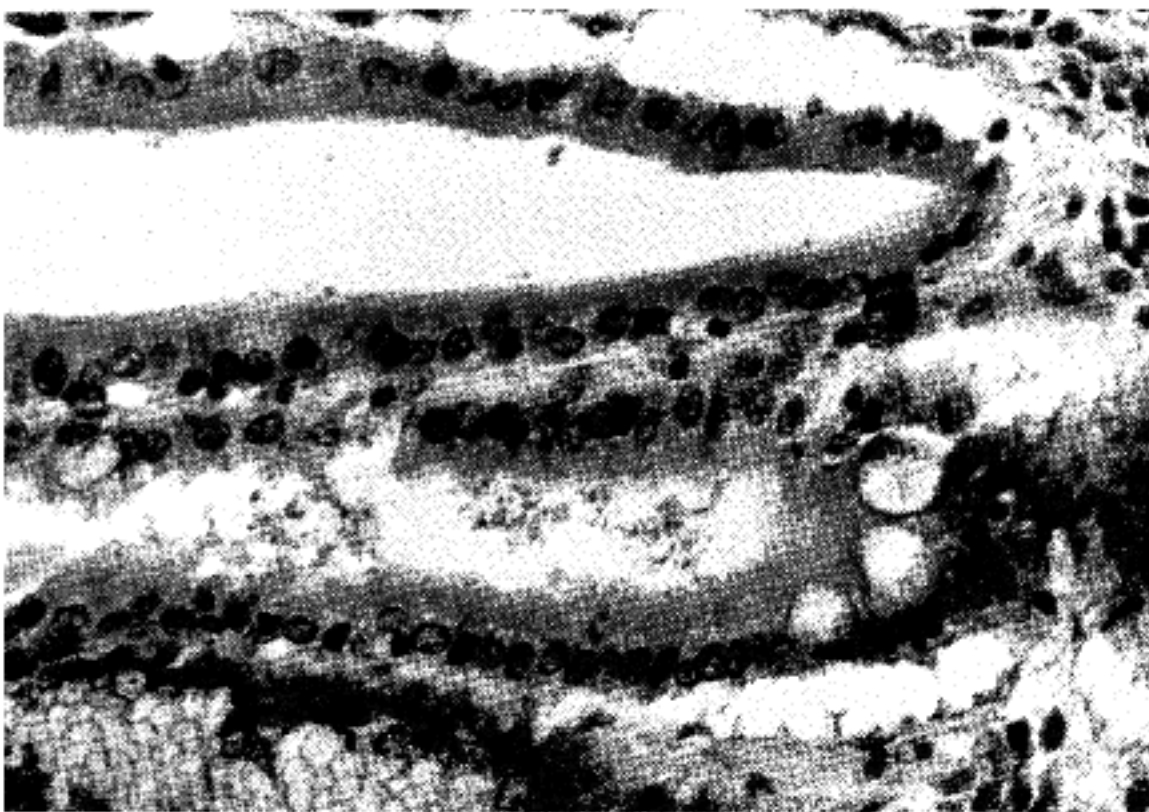


Fig. 6. Cytoplasmic staining pattern of p-glycoprotein in normal gastric gland adjacent to the tumor (ABC).

의 O형 환자는 다른 혈액형의 환자보다 낮아 종양 주위 정상 조직에서는 5명(31.3%)만이 양성을 보이나 종양조직에서는 증가하여 10명(62.5%)에서 나타났다. 그러나 A, B, AB형에서는 정상 조직에서는 양성률이 높았으나 종양조직에서 p-glycoprotein 발현 빈도는 오히려 약간 감소하였다. A항원을 가진 A와 AB형에서 종양조직에서 p-glycoprotein의 발현 빈도는 72.4% 및 87.5%로 O형(62.5%)과 B형(57.1%)보다 높았다(Table 8). 정상 점막 조직에서 p-glycoprotein은 위선에서는 핵외의 골지체에 해당하는 부위에 질서정

연하게 존재했으며(Fig. 5) 일부 표면 상피세포에서는 세포질 전체에 균질하게 존재하는 것이 소수에서 관찰되었다(Fig. 6). 정상 점막 조직에서의 이러한 염색 양상은 종양조직에서 나타나는 염색양상과 상관이 없이 일률적이었다. 위암 환자의 가 혈액형에서 종양 세포 내에서 p-glycoprotein의 분포 양상을 보면 A항원이 없는 O형과 B형은 대부분 세포질내 균질적으로 존재하였으나, A와 AB형에서는 골지에 염색되어 존재하는 경우가 많았다. 그러나 비교되는 예수가 적어 통계학적 유의성은 구할 수 없었다(Table 8). 화학요법의

Table 8. Incidence and staining pattern of P-glycoprotein expression in normal and tumor tissues of each blood type

Blood type	No. of tumor	Normal tissue		Tumor tissue		
		Positive No.	Positive No.	Cytoplasmic	Golgi	Fine granules
O	16	5(31.3%)	10(62.5%)	10	0	0
A	29	27(93.1%)	21(72.4%)	2	14	5
B	14	10(71.4%)	8(57.1%)	6	1	1
AB	8	8(100%)	7(87.5%)	2	4	1

Table 9. Correlation of P-glycoprotein expression with response to chemotherapy

Chemotherapy response	P-glycoprotein		Total
	+	-	
Partial remission	7(43.7%)	9(81.8%)	16
No response	9(56.3%)	2(18.2%)	11
Total	16(100%)	11(100%)	27

p<0.05

로 치료를 받은 27명에서 항암제 투여에 대한 종양의 반응을 p-glycoprotein의 발현 유무와 비교하였는데, p-glycoprotein 양성인 16명중 9명(56.3%)이 전혀 반응을 보이지 않았고 7명(43.7%)이 부분적 관해를 보였으나, p-glycoprotein 발현이 없는 11명 중에서는 9명(81.8%)이 부분적 관해를 보여 이두군 사이에는 유의한 차이를 보였다(p<0.05)(Table 9). 16예의 p-glycoprotein 양성 환자에서 화학요법에 대한 반응의 정도, 염색 양상 및 조직학적 유형사이의 상관 관계는 예수가 적어 통계학적 유의성을 구할 수가 없었다.

고 찰

화학요법제로 종양을 치료할 때 처음에 어떤 약제에 반응을 보이다가 후에 같은 약제나 전에 투여 받은 적이 없는 약제를 포함하여 구조적으로나 기능적으로 서로 연관이 없는 여러 약제에 동시에 내성을 보일 때를 다약물내성(multidrug resistance, MDR)이라 한다²⁾. 실험실에서 Chinese hamster ovarian cell을 이용하여 연구한 Juliano와 Ling³⁾과 human KB cervical carcinoma cell를 가지고 연구한 Roninson등⁴⁾은 자연 산물에서 추출한 한가지 항암제의 존재하에 이들 세포를 배양시켰을 때 이와 같은 종류의 다른 항암제, 즉 anthracycline(doxorubicin, daunorubicin), vinca alkaloid(vincristine, vin-

blastine), epipodophyllotoxin(etoposide, teniposide), actinomycin D, colchicine 등과도 동시에 교차내성을 보이는 것을 관찰하고 이러한 현상은 임상에서 종양의 약물 치료때 약제 내성을 얻는 것과 매우 흡사하고 약물내성 돌연변이 종양세포의 출현에 의한 것으로 생각했다²⁾. 이 세포내에는 약물의 축적이 낮고 약물 방출이 증가되는데 이러한 약물 운송의 변화에는 170~180 kd의 고분자 세포막 당단백질이 관계하고 있음을 알게 되었다⁵⁾. 최근에는 이러한 단백질을 만드는 유전자가 분리되었고 이를 토대한 연구 결과 이 단백질이 다약물내성 세포에서 여러 화학제의 에너지-의존성 방출 펌프로 작용하고 있음이 밝혀지므로써 다약물내성 기전을 이해하는데 가장 중요한 발전을 가져오게 되었다⁶⁾. 또 이 단백질의 과발현이 다약물내성 표현형을 가진 다약물내성 세포계에서 증폭된 유전자와 밀접한 연관이 있음을 알게 되었다⁶⁻⁹⁾. 다약물내성 유전자는 사람에서는 7번 염색체에 MDR 1과 MDR 2의 2 종류의 유전자가 있고 이들은 서로 구조가 유사하고 아미노산 배열의 동질성이 높아 75%의 아미노산 배열이 같다. 사람에서는 MDR 1 유전자가 다약물내성과 관계있는 것으로 알려져 있고, 1976년 Juliano와 Ling³⁾은 이 유전자에 의해 작성되는 단백질인 170 kd의 transmembrane glycoprotein을 p170 혹은 p-glycoprotein이라고 명명했다(p는 permeability에서 유래한 용어이다). 아직 MDR 2 유전자 및 그 단백질의 기능은 잘 모르고 있다. Mouse, hamster, rat등 설치류에서는 MDR 1, MDR 2, MDR 3의 3종류 유전자가 있고 MDR 1과 MDR 3가 다약물내성을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. P-glycoprotein 매개에 의한 다약물내성을 일으키는 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않는 않지만, p-glycoprotein분자는 지방 친화성 약제에 대한 광범위한 특이성을 가지는 한개의 결합 부위를 갖고 있는데 이에 결합된 약제가 세포막을 통과해 들어오면 이 결합부 근처에 있는 2개의 nucleotide 결합 부위에서 ATP 가수분해가 일어나고 이때 방출된 에너지를 이용하여 약제를 세포밖으로 배출해 내므로써 세포내 약물 농도는 낮아지고 따라서 그 세포는 약물 내성을 보이게 된다

고 알려져 있다¹¹⁾.

정상 조직에서 MDR 유전자 발현의 빈도와 그 양은 p-glycoprotein 자체의 복잡한 생분자적 특성과 또 개개인의 유전자형의 차이때문에 정상 조직에서도 그 분포가 다양하고 비균질적이고^{12,13)} 또한 검출방법의 차이, 조직의 취급 방법, 조직의 보관상태 등에 따라 차이가 있을 수 있다. 이러한 점들을 종합해 볼 때 사람에서 개인에 따라 양의 차이는 있지만 신장, 부신, 간, 대장에서 높은 농도의 MDR 유전자 발현을 보이고^{13,14)} 뇌에서는 혈액상벽의 혈관 내피세포에 존재하며¹⁵⁾ 그 외 여러 조직에서도 분포하고 있음을 알 수 있다. Thiebaut 등¹⁶⁾은 전자 현미경으로 신장, 간, 대장에서는 p-glycoprotein이 상피의 편광 표면에 분포하고 있음을 관찰하여 음식중에 포함된 물질의 방출 펌프로 작용하는 p-glycoprotein 기능을 형태학적으로도 증명하였는데 본 연구에서도 일부 정상 점막의 선 상피세포의 골지에 존재하는 p-glycoprotein이 표면 상피에서는 세포질 전체에 균질하게 산재해 있어 p-glycoprotein이 위장의 표면막으로 이동 중에 있음을 시사했다. 부신에서는 세포막에 위치하고 있어 이곳에서 p-glycoprotein이 스테로이드의 세포내 이동에 관여하고 있다는 기능적 역할을 시사하였다. 또 이 단백질이 여러 종의 동물 조직에도 분포하고 있는 점은 정상 세포에서 물질의 이동 및 배설에 운반체로서 또 내적·외적 독성 대사물에 대한 해독 작용 등 생리학적 대사에 관여하여 세포를 보호하는 역할을 한다는 보고와 일치하는 소견이다. 각종 종양에서 MDR 유전자 발현의 빈도에 관한 연구 보고가 많이 있는데, 400에 이상의 종양에서 MDR 유전자 발현을 연구한 Goldstein 등¹⁷⁾의 보고에 의하면 간암은 100%, 대장암, 비소세포성 폐암, 신경암은 80% 이상에서, carcinoid 종양, 부신 피질암, 크롬친화성 세포종, 췌장의 도세포암등은 50% 이상에서 MDR 유전자 발현이 있다고 하였다. 이러한 종양들은 정상적으로 MDR 1 mRNA 농도가 높은 조직에서 기원한 종양들로 종양 조직에서도 역시 높은치의 MDR 유전자 발현을 보이고 있었다. 또한 이 종양들은 화학요법에 대한 내성 내성을 가지고 있어 화학요법 치료에 별로 효과를 보이지 않는 종양으로 알려져 있는데, 이는 아마도 이들 조직에서 정상 세포가 악성 전환을 해도 MDR 유전자 발현은 지속되어 종양내에 p-glycoprotein이 잔존하기 때문인 것으로 사료 된다.

위암에서 MDR 유전자 발현 빈도에 대한 보고는 많지 않다. 상부 위장관 선암에서 p-glycoprotein의 빈도는 높으며 아직 많은 수의 위암을 대상으로 발현 빈도를 보고한 것은 없으나 26% 내지 46%로 보고되고 있는데¹⁸⁾ 이는 검출 방법에 따라서도 차이가 있다. 본 연구에서는 87명 중 60명(69%)로 상당히 높은 양성율을 보였다. 위암에서 p-glycoprotein의 존재와 조직학적 유형과의 상관관계는 보고자마다 다르다.

Mizoguchi 등¹⁹⁾은 본 연구에서 관찰된 것과 같이 분화가 좋은 종양에서 분화가 나쁜 종양보다 p-glycoprotein 빈도가 높았다고 보고하였는데 이 소견은 분화가 좋은 종양이 화학 요법에 잘 반응을 하지 않는 현상과 연관이 있을 것으로 생각했다. 이렇게 위암에서 MDR 유전자 발현이 다양한 이유는 종양 기원 세포의 성상이 다르거나, 종양이 진행하면서 성질이 변화하기 때문에 사료된다²⁰⁾. 위암에서 종양의 침윤 정도 및 림프관 전이 유무와 MDR 유전자 발현의 관계에 대해서는 빈도 관계가 없다고 했다^{21,22)}. 본 연구에서도 일치되는 소견을 보였다.

동상 임상에서 시행되고 있는 위내시경 생검 표본에서 p-glycoprotein 검출의 유용성을 알고자 위내시경 생검과 위절제술 받은 50명에서 p-glycoprotein 존재 유무를 두 조직 표본에서 비교하였는데 두 조직 모두에서 양성인 경우가 56%, 모두 음성인 경우가 26%로 전체의 82%에서 일치율을 보였다. 생검 조직에서 8예(16%)는 위음성을 보였다. 위절제 조직 표본에서 p-glycoprotein 양성 세포의 분포를 관찰한 바, 74%는 전 종양 조직에 미만성으로 존재하였으며 또 대부분은 강하게 염색되어 진단에 어려움은 없으나, 26%는 p-glycoprotein의 분포가 종양의 깊은 침윤층이나 종양 변연부 등 국소에 비균질적으로 분포해 있고 또 전 종양 세포의 10% 정도 내외의 일부 세포에만 발현을 보이거나 아주 미세한 과립으로 존재하여 세밀한 검사를 요했다. 이러한 소견은 Sugimoto 등²³⁾과 Robey-Cafferty 등²⁴⁾의 관찰과 유사하였다. 그러나 전체 종양을 대변하는 것은 아니지만 종양 조직이 다소 충분히 포함되어 있으면 위내시경 생검 조직에서 p-glycoprotein 검출을 시도해 볼만하다고 생각된다. 임상적으로 유용한 MDR 1 유전자 발현의 정량적 소견으로는 MDR 1 유전자 종류의 검출, Northern blot, in situ hybridization, PCR을 이용한 MDR 1 mRNA 측정, p-glycoprotein의 검출 등이 있으며 이들 각종 측정 방법은 장단점이 있고^{25,26)}, 정상조직에서 MDR 유전자 발현이 개개인에서 또 조직의 부위에 따라 발현 정도가 다양하고 또 비균질적이어서 표준화 검사법으로서 선택에 장애 요소가 되고 있다²⁷⁾. Immunoblotting이나 immunohistochemistry법으로 p-glycoprotein을 검출하는 법은 가격이 저렴하고, 조직의 구조를 유지하면서 종양 세포와 p-glycoprotein과의 연관을 직접 관찰할 수 있는 장점은 있으나 예민도가 떨어져서 정량 검사가 안된다는 점이 단점이다²⁸⁾. 위암 조직을 관찰한 몇 연구자들도 p-glycoprotein의 분포와 염색성이 균질하지 않고 다양함을 보고하였다^{29,30)}. 그리하여 아직 어떤 종양을 MDR 유전자 발현 양성으로 성하는데 있어서 어느 정도의 수치가 임상적으로 의의가 있는지 그 한계치의 설정이 어렵고 또 수치와 임상반응과의 관계도 다양하여 아직 명확히 밝혀져 있지 않다³¹⁾. 대부분의 종양 세포가 화학요법에

반응을 해도 내성을 가지는 소수의 MDR 유전자 발현 클론이 남아 있다가 증식을 계속하면 결국에는 MDR 유전자 발현 세포가 재발된 종양을 압도하여 화학요법 내성을 보일 것으로 생각된다.

면역조직화학 염색에서 p-glycoprotein은 세포내에서 세포막, 세포질 및 골지 염색의 3가지 형태로 염색되는 것으로 보고되고 있다. 그러나 종양세포내 p-glycoprotein의 분포 양상과 약물내성의 관계에 대해서 특별히 밝혀진 것은 없다. 세포막이 세포의 독성 물질에 대한 첫 단계의 방어선이므로 세포막을 따라 염색되는 p-glycoprotein은 약제 내성과 일치하는 소견으로 본다²²⁾. p-glycoprotein이 생성 초기단계에 세포내에 있으면서 골지로부터 관강 표면으로 이동중에 있을 때는 세포질내에서 균질하게 염색되는 것으로 추측된다¹⁴⁾. 또 핵 주위에 밀집하여 국소적으로 염색되는 형태는 골지체가 염색된 것이다. 이러한 골지 염색상이 다약물내성과 관계가 있는지 아니면 단순히 세포막 p-glycoprotein의 존재를 반영하는 것인지는 알 수 없으나 Robey-Cafferty 등¹⁷⁾의 관찰에 의하면 골지 염색이 약물내성을 나타내는 종양에서 관찰되었다고 하였다. 본 연구에서는 대부분의 p-glycoprotein이 종양과 정상세포의 세포질내에 균질하게 혹은 골지체의 위치와 일치하여 굵은 과립 혹은 덩어리로 존재했으며, 일부에서는 미세한 과립의 골지 염색을 보였는데, 본 연구에서 항암 요법에 대한 임상반응의 정도와 p-glycoprotein의 염색 양상과의 상관 관계는 좀더 많은 예를 비교 관찰하여야 할 것으로 생각된다. 본 연구의 위암 조직에서는 세포막 염색은 관찰되지 않았다. 각 연구자에 따른 p-glycoprotein의 염색 양상의 차이는 아마 p-glycoprotein염색에 사용된 단클론항체의 종류가 다르기 때문일 수도 있다. 면역조직화학법으로 p-glycoprotein을 검출하기 위하여 C219, MRK16, JSB-1 등 몇 가지의 단클론항체가 개발되었는데 각 항체마다 세포에 존재하는 p-glycoprotein 분자와의 결합 부위가 다르므로 염색 형태도 다르게 나타난다. 그러나 아직 아무것도 항체의 특징이 완전히 규명된 것은 없다. van der Valk 등²³⁾은 위 3가지 항체로 정상 및 종양 조직에서 p-glycoprotein 검출을 비교하였는데 약간의 차이가 있음을 관찰하고 적어도 2~3가지 항체로 검사하는 것이 바람직하다고 했다. Bloxterman 등²⁴⁾이 종양 조직에서 본 연구에서 사용된 항체와 같은 JSB-1으로 염색하여 그 형태를 기술했는데 약물내성이 약한 세포에서는 골지와 연관된 형태로 세포질내 균질하게 염색됨을 관찰하고 이형태가 다약물내성을 보이는 것과 관계 있을 것으로 생각했다. 이 염색 형태는 본 연구에서 관찰된 소견과 매우 유사했다.

p-glycoprotein 분자는 세포막의 구성성분이며 당과 결합하는 부위가 있어 포도당화되어 있고 또 인산화 되어 있으며 ATP와도 결합할 수 있다^{2, 11, 25)}.

Weinstein 등²⁶⁾은 대장과 방광의 정상 상피세포에서 p-glycoprotein의 발현 빈도가 혈액형과 깊은 연관이 있음을 관찰하고 A항원을 가진 혈액형에서는 골지 p-glycoprotein 발현이 높음을 보고했다. 이 이유는 잘 알 수 없으나 p-glycoprotein이 A형 항원 같은 특수 혈액형 항체의 제조 및 운반에 관여할 것으로 생각하며 이것이 p-glycoprotein이 다약제내성을 일으키는 기전과는 관계가 없을 것으로 본다²⁷⁾. 그의 보고에 의하면 정상 대장 조직에서 A형은 주로 골지에 염색을 보이고 O형은 극소수에서만 골지 염색을 보이고 있으나, 대장암 조직에서는 모든 혈액형에서 p-glycoprotein의 발현 빈도가 정상 조직보다 증가하여 A형의 79%, O형의 47%에서 골지 염색을 보였다. 본 연구에서도 종양 주위의 정상 조직에서 p-glycoprotein이 O형 위암 환자에서는 다른 혈액형보다 낮은 빈도로 나타났으나 종양으로 되면서 p-glycoprotein의 발현이 증가하였다. 그러나 다른 혈액형에서는 종양 조직으로 되면서 오히려 p-glycoprotein의 발현이 없어지는 경우도 있었다. 혈액형에 따른 p-glycoprotein의 세포내 분포 양상을 보면 O형과 B형은 세포질내에 균질하게 존재하였으나, A항원을 가진 A형과 AB형은 골지염색이 우세하여 Weinstein 등²⁷⁾의 보고와 유사하였다.

종양의 경과 중에 나타나는 다약물내성과 MDR 유전자 발현의 관계에 대한 많은 연구가 임상에서 진행되고 있는데, 몇 보고에 의하면 종양 치료 도중 p-glycoprotein치의 증가가 임상 반응과 관계가 있음이 알려졌다^{1, 21, 28)}. 또 여러 학자들이 원발종양과 재발된 종양 조직을 비교했을 때 재발한 종양에서 MDR 1 mRNA가 증가해 있음을 관찰하여 약물내성이 화학치료 약물과의 접촉 결과로 얻어질 수 있음을 시사하는 소견도 보고되었다^{1, 7, 9, 28, 29)}. 이러한 결과를 종합해 보면 인체 종양 조직에서 MDR 유전자 발현을 검출하는 것이 그 종양의 약물 반응 유무를 예측하는데 도움이 되고 나아가 치료 방안을 세우는데 도움이 될 것으로 사료 된다. 본 연구에서는 약물 치료를 받은 27명을 분석한 결과 그 중 p-glycoprotein 음성을 보이는 11명 중 9명(81.8%)이 부분관해를 보였고, 나머지 16명의 양성자 중 9명(56.3%)은 전혀 관해를 보이지 않거나 병소가 진행되어 p-glycoprotein 발현유무와 약물 치료의 반응 사이에 상관 관계가 있음을 시사하였다. 특히 p-glycoprotein이 음성인 경우 화학요법에 대한 반응을 어느 정도 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 다약물 내성 측정이 연구 분야에서 병리 진단 검사로 이용되기 위해서는 시약의 예민도와 특이도, 검사 방법의 간편성, 각 검사법 간의 장단점을 보완해야 하는 등 아직 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

위암 조직에서 MDR 유전자의 발현양상을 조사하기 위해 위내시경 생검과 위절제로 위선암으로 진단된 87명으로 부터 137예의 위암 조직을 JSB-1 단클론 항체를 사용하여 면역조직화학적 방법으로 p-glycoprotein의 발현을 검색한 결과 다음과 같은 소견이 관찰되었다.

1) 위암조직에서 p-glycoprotein은 87명 중 60명에서 나타나 69%에서 양성이었으며, 양성 빈도는 환자의 나이, 성별, 종양의 침윤 정도 및 림프절 전이 유무와는 상관관계가 없었으나, 위암의 조직학적 유형과 관계가 있어 비교적 분화가 좋은 군에서 분화가 나쁜 군보다 높게 나타났다($p < 0.05$).

2) 위내시경 생검과 위 절제술을 동시에 시행한 50명의 위암 조직 표본에서 p-glycoprotein염색의 양성과 음성의 일치율은 41명(82%)으로 일치율이 높았다 ($p < 0.001$).

3) 위절제 조직에서 p-glycoprotein 양성 세포는 대부분(73.9%)이 미만성으로 분포하고 일부(26.1%)는 국소적으로 분포하고 있었으며, 종양세포내에서 p-glycoprotein은 주로 세포질내 균질하게 또는 골지에 염색되는 양상이 우세하여 각각 20예(43.5%) 및 19예(41.3%)이었고, 나머지 7예(15.2%)는 p-glycoprotein발현 정도가 약하여 미세한 과립상을 보였다.

4) 종양조직에서 p-glycoprotein발현은 A항원을 가진 A와 AB형에서 O와 B형보다 발현 빈도가 높았으며 이들은 또한 골지에 주로 염색이 되었으며, O형과 B형에서 p-glycoprotein은 대부분이 세포질내에서 균질하게 존재하였다.

5) 화학요법을 받은 27명의 위암환자에서 p-glycoprotein 음성인 11명 중 9명(81.8%)에서 부분 관해가 있었고, p-glycoprotein 양성인 16명 중 9명(56.3%)은 전혀 관해를 보이지 않거나 오히려 병이 진행되는 소견을 보여 p-glycoprotein의 존재 유무와 화학요법에 대한 반응사이에는 유의 있는 상관 관계를 보였다($p < 0.05$).

이상의 소견으로 위암 조직에서 p-glycoprotein발현과 지금까지 알려진 위암 예후 인자와 연관성을 지었을 때, 분화가 좋은 위암 군에서 분화가 나쁜 군보다 p-glycoprotein이 발현빈도가 높음을 보였으나 나머지 인자와는 유의있는 상관관계를 찾기 어려웠다. 면역조직화학적 염색법에 의한 p-glycoprotein의 검출은 특히 p-glycoprotein음성인 경우에 화학요법에 대한 반응을 예견할 수 있는 좋은 검사방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1) Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai

S, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, Lieber M, Cossman J, Gottesman MM, Pastan I. *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 116-24.

2) Deuchars KL, Ling V. *P-Glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. Seminars in Oncology* 1989; 16: 156-65.

3) Juliano RL, Ling VA. *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim biophys Acta* 1976; 445: 153-62.

4) Roninson IB, Chin JE, Choi K. *Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4538-42.

5) Sugimoto Y, Asami N, Tsuruo T. *Expression of p-glycoprotein mRNA in human gastric tumors. Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 993-9.

6) Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. *Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. J Histochem Cytochem* 1989; 37: 159-64.

7) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. *Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 265-9.

8) Gerlach JH, Bell DR, Karakousis C, Slocum HK, Kartner N, Rustum YM, Ling V, Baker R. *P-Glycoprotein in human sarcoma: Evidence for multidrug resistance. J Clin Oncol* 1987; 5: 1452-60.

9) Pastan I, Gottesman M. *Multiple-drug resistance in human cancer, NEJM* 1987; 316: 1388-93.

10) Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Roninson IR. *Structure and expression of the human MDR(P-glycoprotein) gene family. Mol Cell Biol* 1989; 9: 3808-20.

11) Gros P, Shustik C. *Multidrug Resistance: A novel class of membrane-associated transport proteins is identified. Cancer Investigation* 1991; 9: 563-9.

12) Weinstein RS, Kuzak JR, Kluskens LF, Coon JS. *P-glycoproteins in pathology: The multidrug resistance gene family in humans. Hum Pathol* 1990; 21: 34-48.

13) Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S. *Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. Cancer Res* 1988; 48: 1926-9.

14) Weinstein RS, Coon JS. *Laboratory assessment of p-*

- glycoprotein in cancer chemosensitivity testing. Hum Pathol* 1990; 21: 785-6.
- 15) Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. *Expression of multidrug resistance gene product(p-glycoprotein) in human normal and tumor tissue. J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1277-87.
- 16) Mizoguchi T, Yamada K, Furukawa T, Hidaka K, Hisatsugu T, Shimazu H, Tsuruo T, Sumizawa T, Akiyama S. *Expression of the MDR1 gene in human gastric and colorectal carcinomas. J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1679-83.
- 17) Robey-Cafferty SS, Bruner JM, Cafferty LL. *P-glycoprotein expression in gastroesophageal adenocarcinomas, their metastases, and surrounding mucosa: A mapping study. Modern Pathology* 1991; 4: 694-7.
- 18) Robey-Cafferty SS, Rutledge ML, Bruner JM. *Expression of a multidrug resistance gene in esophageal adenocarcinoma. Am J Clin Pathol* 1990; 93: 1-7.
- 19) Rothenberg M, Ling V. *Multidrug resistance: Molecular biology and clinical relevance. J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 907-10.
- 20) Dalton WS, Goran TM. *Does p-glycoprotein predict response to chemotherapy, and if so, is there a reliable way to detect it? J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 80-1.
- 21) Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, Ling V. *Immunohistochemical detection of p-glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. J Clin Oncol* 1990; 8: 689-704.
- 22) Willingham MC, Richert ND, Cornwell MM, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan IH. *Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells. J Histochem Cytochem* 1987; 35: 1451-6.
- 23) van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Jeijer CJLM, Pinedo HM, Scheper RJ. *Distribution of multi-drug resistance-associated p-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Annals of Oncology* 1990; 1: 56-64.
- 24) Broxterman HJ, Pineto HM, Kuiper CM, van der Hoeven JJM, de Lange P, Quak J, Scheper RJ, Keizer HG, Schuurhuis GJ, Lankelma J. *Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in human tumor cells with a low degree of drug resistance. Int J Cancer* 1989; 43: 340-3.
- 25) Tsuruo T. *Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 285-96.
- 26) Weinstein RS, Kuszak JR, Jakate SM, Lebovitz MD, Kluskens LF, Coon JS. *ABO blood type predicts the cytolocalization of anti-p-glycoprotein monoclonal antibody reactivity in human colon and ureter. Hum Pathol* 1990; 21: 949-58.
- 27) Weinstein RS, Coon JS, Dominguez JM. *Correlation of ABO blood type and golgi p-glycoprotein expression in epithelia. Lancet* 1990; 336: 54-5.
- 28) Schneider J, Bak M, Efferth T, Kaufmann M, Mattern J, Volm M. *P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. Br J Cancer* 1989; 60: 815-8.
- 29) Ro J, Sahin A, Ro JY, Fritsche H, Hortobagyi G, Blick M. *Immunohistochemical analysis of p-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. Hum Pathol* 1990; 21: 787-91.
- 30) Lai S, Goldstein LJ, Gottesman MM, Pastan I, Tsai C, Johnson BE, Mulshine JL, Ihde DC, Kayser K, Azdar AF. *MDR1 gene expression in lung cancer. J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1144-50.