

# 대장암종 및 선종에서 미세혈관 밀도와 세포증식능 및 p53 단백질 발현에 관한 연구

동국대학교 의과대학 병리학교실

장 태 정 · 김 정 란 · 배 한 익

## Microvessel Quantification, Expression of p53 Protein and MIB-1 in Colorectal Adenoma and Carcinoma

Tae Jung Jang, M.D., Jung Ran Kim, M.D. and Han Ik Bae, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, DongGuk University

Angiogenesis is a crucial step in tumor growth and progression. Scarce data is available on angiogenesis in gastrointestinal tumors. We studied 16 normal colon, 44 adenomas and 29 carcinomas to evaluate angiogenesis in colorectal tumors and to assess the correlation among p53 protein, proliferative activity and other clinical prognostic parameters. Endothelial cells were immunostained with an anti-Factor VIII mAb; in each case three microscopic fields(x 200) were counted: average number of the three fields was defined as microvessel density (MVD). p53 protein expression was 45.5%(20/44) in adenomas, and 79.3%(23/29) in carcinomas ( $p < 0.01$ ). p53 protein expression of carcinomas was 57.1%(4/7) in diploid tumors, 100%(8/8) in aneuploid tumors ( $p = 0.07$ ), 100%(8/8) in well differentiated tumors, and 50%(2/4) in poorly differentiated tumors ( $p = 0.09$ ). MIB-1 score was  $2.3 \pm 0.7(38)$  in adenomas,  $3.4 \pm 0.5(29)$  in carcinomas ( $p < 0.01$ ). There was no significant correlation between p53 protein and MIB-1 score. MVD was  $10.4 \pm 4.1(16)$  in the normal mucosa,  $21.5 \pm 7.9(39)$  in the adenomas,  $35.3 \pm 9.7(26)$  in carcinomas (normal versus adenomas,  $p < 0.01$ ; adenomas versus carcinomas,  $p < 0.01$ ). MVD was  $25.8 \pm 5.4(2)$  in carcinomas confined to mucosa, and  $36.1 \pm 9.6(24)$  in carcinomas with transmural invasion. The higher MIB-1 score was in carcinomas the more MVD increased but there was no statistical significance ( $r = 0.38$ ,  $p = 0.055$ ). MVD of carcinomas was not associated with nodal metastasis, p53 expression, and DNA ploidy. p53 protein and MIB-1 expression are useful methods for the evaluation of malignancy, and tumor angiogenesis is an early event in a colorectal tumor but MVD does not correlate with prognostic parameters except for the tumor depth. (Korean J Pathol 1997; 31: 40~50)

**Key Words:** Microvessel Density, p53 protein, MIB-1, Colorectal tumor

접 수: 1996년 8월 5일, 게재승인: 1996년 9월 20일  
 주 소: 경주시 석장동 707, 우편번호 780-350  
 동국대학교 의과대학 병리학교실, 장태정

## 서 론

발생 초기의 아주 작은 크기의 종양은 무혈관 상태이나 종양의 부피가 1~2 mm<sup>3</sup> 되면 종양세포나 침윤된 대식세포 혹은 비만세포에서 여러 혈관형성 인자를 생산하여 종양 내 미세혈관을 증식시키며 이렇게 증식된 혈관은 종양의 증식과 전이에 영향을 준다<sup>1</sup>. Factor VIII 연관 항체를 이용하여 종양 내 미세혈관의 수를 세어 종양의 악성도를 연구한 보고들이 많이 있으며 특히 유방암<sup>2</sup>이나 뇌종양<sup>3</sup>에서는 미세혈관의 수가 독립적인 예후인자로 취급되고 있다. 한편 종양억제 유전자중 돌연변이된 p53은 대장암을 포함한 거의 모든 종류의 암에서 발견되고 있다<sup>4,5</sup>. p53 단백질은 1970년대 말 SV40 DNA 바이러스의 T 항원에 결합되는 인단백질로 처음 분리되었고<sup>6</sup>, 그것의 유전자는 염색체 17p13.1에 위치하며, DNA에 결합하여 DNA의 수리 및 합성, 세포분화 그리고 고사(apoptosis)에 관여한다고 알려져 있다<sup>7-9</sup>. p53 단백질의 유전자 전사에 대한 영향은 p53 유전자의 돌연변이 혹은 p53 단백질과 세포성 단백질 또는 바이러스성 단백질과 결합에 의하여 변할 수 있는데 이렇게 변이된 p53 단백질은 wild type p53 단백질에 비하여 DNA에 대한 친화력이 감소되어서 정상적인 기능을 소실하여 세포증식을 유발시키고, 화학적으로 안정하여 핵 내에 축적하게 된다<sup>5</sup>. 또한 돌연변이된 p53 단백질은 혈관형성을 억제하는 것으로 알려진 thrombospondin-1을 조절하지 못하고<sup>10</sup>, protein kinase C을 활성화 시켜 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>. 종양 내 신생혈관은 종양세포에 충분한 영양을 공급하고, 각종 성장인자를 제공하여 종양세포의 증식에 많은 영향을 끼칠 것이다. 많은 종양에서 여러가지 다양한 측정법으로 세포증식능을 측정하여 종양의 악성도를 알아 보려는 시도가 활발하게 이루어지고 있는데 그 중에서 Ki-67 항원은 G0 기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵에 존재하며 비교적 종양의 악성도나 종양의 증식능과 상관성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>12,13</sup>. 지금까지 Ki-67 항원 항체 반응은 동결절편에서만 가능하였는데 최근에 포르말린에 고정된 조직에서 Ki-67 항원을 인지하는 항체(MIB-1) 만들 수 있게 되어 여러 종양의 세포증식능을 연구하는데 많은 도움이 되고 있다<sup>12-4</sup>. 대장암의 경우 종양의 형성과정중 여러 유전자, 즉 ras, p53, DCC gene, APC gene 등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실이 전암단계로부터 각 시기마다 작용하여

발생하는 것으로 알려져 있다<sup>5,15-16</sup>. 따라서 정상적인 대장과 선종 및 암종에서 각각 미세혈관의 변화를 조사하는 것은 종양의 발생에 미세혈관의 역할을 규명할 수 있다고 생각된다.

이에 저자들은 정상 대장과 선종 및 암종에서 미세혈관의 수를 세어 세포증식능 및 p53 단백질의 발현과 비교하고 아울러 이들과 기존의 예후인자로 알려진 종양의 크기, 침습깊이, 림프절 전이 유무 및 DNA ploidy와 비교함으로써 대장암종에서 미세혈관의 수와 세포증식능 및 p53 단백질의 표현정도가 예후인자로서의 가치유무와 신생혈관 형성이 종양의 진행에 미치는 역할을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

연구 재료로는 1992년 3월부터 96년 3월까지 동국대학교 부속병원에서 대장암으로 수술받은 29예와 내시경 검사와 조직검사로 선종으로 진단받은 44예 그리고 정상 대장은 16예의 대장암으로 절제된 조직의 절단 부위(resection margin)를 사용하였다. 환자의 나이 분포는 대장암종의 경우는 57.5±13.5였고 선종의 경우는 55.9±14.3 였다. 환자의 성별분포는 대장암종의 경우는 남자가 10예, 여자가 19예였고 선종의 경우는 남자가 26예, 여자가 18예 였다.

### 2. 병리조직학적 검색

대장암종의 육안적 검색상 종양의 크기는 주 병변의 최대 장경을 기준으로 하였고, 10% 중성 포르말린 용액에 고정된 후 파라핀에 포매하고 4~5 μm의 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 조직표본을 다시 관독하여 한국인 대장암 취급 지침서<sup>17</sup>와 WHO 분류에 의거 대장암을 고분화, 중등도 분화 및 저분화성 선암종과 점액암종으로 분류하였고, 종양의 침습깊이나 림프절 전이 여부 및 원격전이 유무에 따라 변형된 Dukes 병기법(Atsler-Coller)에 의거하여 A, B1, B2, C1, C2 군으로 나누었다. 선종은 내시경 검사상 내강내로 돌출된 용종이 있고 광학현미경 검사상 중첩된 핵으로 구성된 선들의 증식이 있으면서 주위 조직으로의 침윤이 없는 경우로 하였다.

### 3. 면역조직화학적 검색

DAKO-LSAB Kit를 이용하여 단클론 Factor VIII (F8/86/3, Dako)연관항체와 p53 단백질(DO-7, DAKO)

및 MIB-1(Immunoteck, 505)에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 과정을 요약하면 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 포매피를 4  $\mu$ m의 두께로 박절하여 연속 절편을 만든 후 poly-L-lysine(Sigma)이 입혀진 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 탈파라핀과 함수과정을 거친 파라핀 절편을 10 mM citrate 완충액(PH 6.0)에 담군 후 microwave oven에서 15분간 처리하였다. 조직내 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 15분간 처리하고 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 차단혈청으로 15분 동안 전처리 하였다. 일차항체를 각각 1 : 50, 1 : 100, 1 : 100으로 희석한 후 Factor VIII연관항체와 p53 단백질은 실온에서 1시간 반응시켰고 MIB-1은 40°C에서 밤새 부치시킨후 DAKO-LSAB Kit를 이용하여 biotinylated antibody와 peroxidase가 부착된 streptavidin을 결합시킨 후 AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)용액으로 발색하였다.

면역조직화학 염색의 판정은 Factor VIII 연관 항체에 염색되는 미세혈관의 경우, 괴사나 케양이 있는 부위를 제외하고 저배율( $\times$  40)에서 혈관 형성이 가장 많은 부위 3개를 선정하여 병리의사 2명이 200배 시야에서 미세혈관의 수를 세어 그 평균을 구하였다. 직경이 적혈구 크기 8배 이상인 혈관과 두터운 근육층을 가진 혈관은 제외하였으며 단일내피세포와 내피세포의 집락은 내강의 유무에 관계없이 포함시켰다. p53 단백질의 경우, 세포의 핵에 적갈색의 과립이 보이는 세포를 반정량적인 방법으로 세어 5 단계로 분류하였는데 전혀 염색이 되지 않은 경우(0), 1% 미만의 세포가 양성인 경우(1+), 1% 이상 10% 미만인 경우(2+), 10% 이상 50% 미만인 경우(3+), 50% 이상인 경우(4+)로 분류하였고 등급 0와 1+을 음성으로, 등급 2+ 이상을 양성으로 판정하였다. MIB-1의 경우, 세포의 핵에 적갈색의 과립이 보이는 세포를 양성으로 판정하고, 저배율상( $\times$  40) 염색이 제대로 된 부위 10군데를 택하여 고배율( $\times$  400)에서 검경하고 반정량적인 방법으로 세어 5 단계로 분류하였는데 전혀 염색이 되지 않은 경우(0), 1% 이상 25% 미만의 세포가 양성인 경우(1+), 25% 이상 50% 미만인 경우(2+), 50% 이상 75% 미만인 경우(3+), 75% 이상인 경우(4+)로 분류하였다.

#### 4. 유세포측정

신선한 종양조직을 동결절편하여 H&E 염색하여 종양 부위를 잘라내고 petridish에 citrate buffer를 1~2 ml 넣고 종양조직을 잘게 자른 다음 50  $\mu$ m 나일

론에 여과시켜서 여과액을 phosphate buffered solution에 세척한 후 원심분리하여  $1 \times 10^6$ 개의 세포부유액을 만든다. 세포부유액 100~200  $\mu$ l를 Cycle Test™PLUS DNA Reagent Kit의 A 용액(trypsin buffer) 250  $\mu$ l에 넣은 후 10분간 실온에 둔 후 B(trypsin inhibitor and RNase buffer)용액 200  $\mu$ l를 넣고 10분간 실온에서 반응시킨 후 C(propidium iodide stain solution) 용액 200  $\mu$ l를 넣고 10분간 2~8°C 되는 암실에서 반응시킨 후 50  $\mu$ m 나일론에 여과시키고나서 12 $\times$ 75 mm의 Falcon tube(No 2052)에 넣고 FACScan(Becton-Dickinson)으로 분석하였다. 배수성 측정은 하나의 대칭성 G0/G1 peak를 가진 경우를 이배수체로 하였고, 이수배수체는 이배수체 G0/G1 peak와 명확히 구분되며 전체 세포수의 10% 이상으로 구성된 하나 이상의 비정형 G0/G1 peak가 존재하는 경우로 하였다.

#### 5. 통계학적 분석

각 군의 변수를 t-test, chi-square test와 Fisher's exact test 및 상관분석으로 분석하고 P 값이 0.05 이하인 것을 유의있는 것으로 하였다.

### 결 과

#### 1. 정상 대장과 선종 및 대장암종의 미세혈관 밀도

미세혈관 밀도는 정상 대장의 점막의 경우는  $10.4 \pm 4.1$ , 선종의 경우는  $21.5 \pm 7.9$ , 암종인 경우는  $35.3 \pm 9.7$  였다(Fig. 1). 따라서 정상점막이나 선종에 비하여 암종에서 미세혈관 밀도는 유의있게 높았다(Table 1).

#### 2. 선종과 대장암종의 세포증식능 및 p53 단백질의 발현

MIB-1은 핵 및 핵소체에 과립상으로 염색 되었고,

Table 1. Microvessel density of normal colon, adenomas and carcinomas

	No. of cases	MVD(mean $\pm$ SD)
Normal mucosa	16	10.4 $\pm$ 4.1
Adenoma	39	21.5 $\pm$ 7.9
Carcinoma	26	35.3 $\pm$ 9.7

\*MVD: Microvessel density

P<0.01



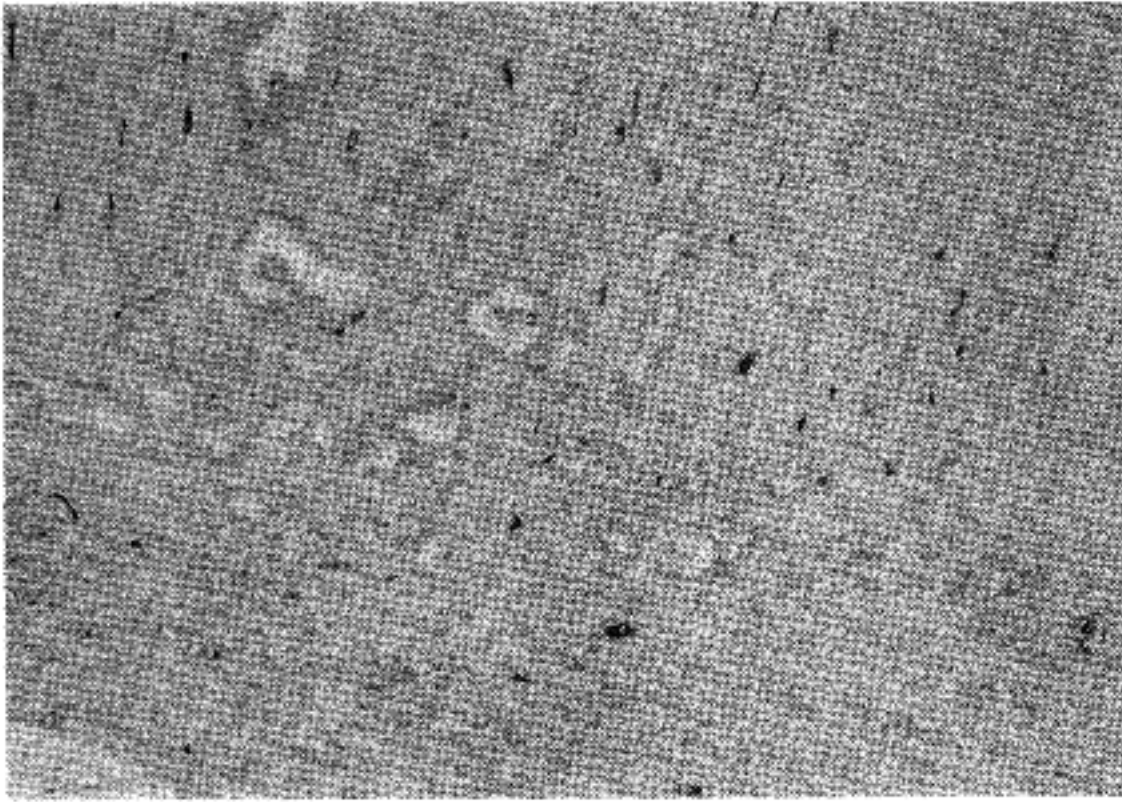


Fig. 1. Example of microvessel immunostaining with anti-Factor VIII monoclonal antibody in the adenocarcinoma.

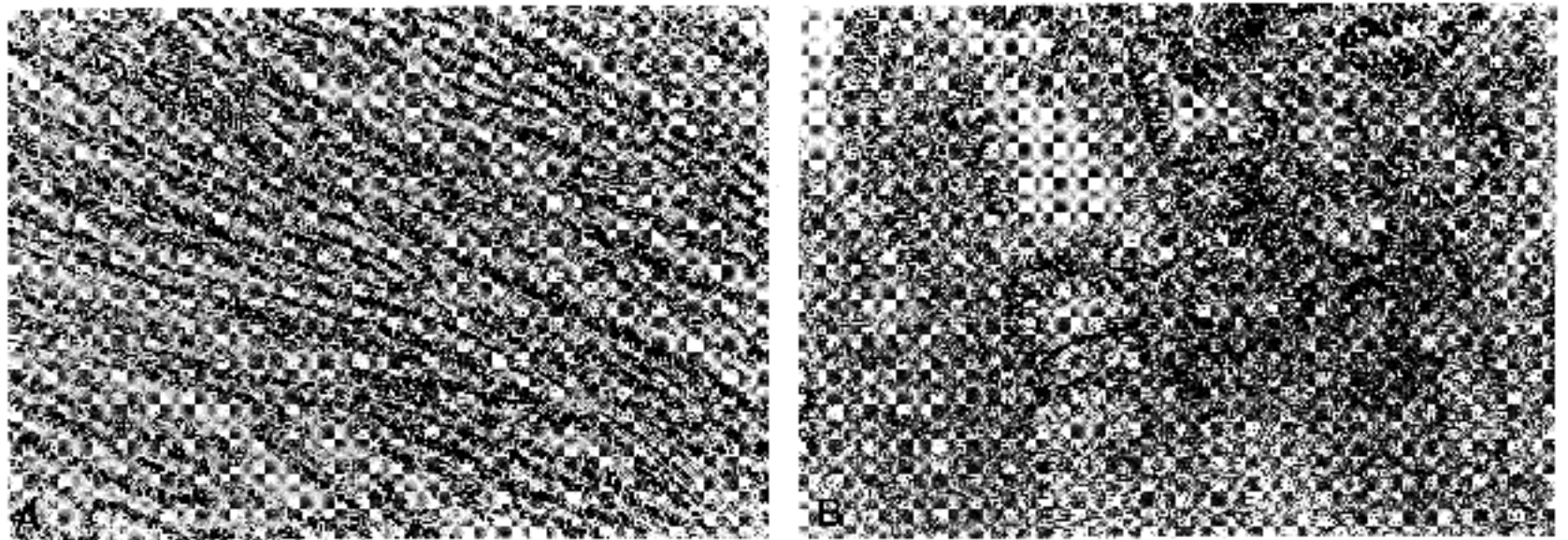


Fig. 2. Positive nuclear staining for MIB-1 in the adenocarcinoma(A) is more severe than that of the adenoma(B).

정상 대장에서는 선화 기저부의 증식되는 세포들의 핵도 염색이 되었다. MIB-1의 발현정도는 선종에서  $2.3 \pm 0.7$ (Fig. 2B), 암종에서  $3.4 \pm 0.5$ 였다(Fig 2A). p53 단백질은 대부분 핵내에 간색과립으로 발현되었고, 4 예는 핵 뿐만 아니라 세포질에도 약하게 염색이 되었으며 발현강도는 대장암종이 선종에 비하여 높았다. 주위 정상 대장은 단 2예에서 선화(crypt)의 기저부에 있는 세포에 약한 강도로 발현 되었고, p53 단백질의 발현은 선종에서 45.5%(20/44), 암종에서 79.3%(23/29)% 있다(Fig 3A, B). 따라서 암종에서 선종에 비하여 세포증식능과 p53 단백질의 발현이 모두 의의 있게 높았다(Table 2).

### 3. 대장암종에서 미세혈관 밀도와 세포증식능 및 p53 단백질의 발현의 관계 및 다른 임상적 예후인자들과의 비교

1) 임상적 예후인자들과 비교: 미세혈관 밀도는 종양세포의 분화가 중등도 일 때, 종양의 크기가 장경 4 cm 이하일 때, 림프전 전이가 있을 때, DNA ploidy가 이배수체일 때 상대적으로 더 높았지만 통계학적 의의는 없었으며, 종양의 침습깊이가 절막에 국한된 경우가  $25.8 \pm 5.4$ (2), 고유근층 이상 침윤된 경우가  $36.1 \pm 9.6$ (27)로, 종양의 침습깊이가 깊을수록 미세혈관의 밀도는 증가되었다. MIB-1의 발현정도는 종양의 침습깊이가 고유근층 이상일 때( $3.5 \pm 0.5$ )

가 점막에 국한된 경우보다( $3.2 \pm 0.1$ ) 높았지만 통계학적 의의는 없었으며 종양의 분화도, 종양의 크기, 림프절 전이 여부 및 DNA ploidy에 따른 유의한 차이는 없었다. p53 단백질의 발현은 분화가 좋을 때 (100.0%), 종양의 크기가 장경 8 cm 이상일 때, 종양이 점막에 국한된 경우, 림프절 전이가 없을 때, 이수배수체를 보이는 종양(100%)에서 더 높았지만 통계학적 의의는 없었다. 특히 저분화 종양중 2에는 조직학적으로 종양세포가 합포체를 이루면서 성장하고 있었고, 간질에 심한 림프구의 침윤이 있었으

며 세포증식능은 각각 2.8과 2.7로 다른 암종에 비하여 매우 감소되어 있었고, p53 단백질도 발현되지 않았다.

2) 미세혈관 밀도와 p53 단백질 발현과의 관계: 대장암종에서 미세혈관 밀도는 p53 단백질의 발현이 양성인 종양이  $35.4 \pm 9.6$ , 음성인 종양이  $32.6 \pm 3.7$ 로, p53 단백질의 발현이 양성인 종양에서 더 높았지만 통계학적 의의는 없었다(Table 4,  $P > 0.05$ ).

3) p53 단백질의 발현과 세포증식능과의 관계: 대장암종에서 세포증식능은 p53 단백질의 발현이 양성인 종양이  $3.5 \pm 0.5$ , 음성인 종양이  $3.1 \pm 0.6$ 로, p53 단백질의 발현이 양성인 종양에서 더 높았지만 통계학적 의의는 없었다(Table 4,  $P > 0.05$ ).

4) 미세혈관 밀도 및 세포증식능과의 관계: 미세혈관 밀도가 증가될수록 종양의 세포 증식능이 증가되는 경향을 보였지만 통계학적 의의는 없었다 ( $r=0.38$ ,  $P=0.055$ , Fig. 4).

**Table 2.** MIB-1 scores and p53 protein expression of adenomas and carcinomas

	MIB-1(No.)	p53 protein(No.)
Adenoma	$2.3 \pm 0.7(38)$	45.5%(20/44)
Carcinoma	$3.4 \pm 0.5(29)$	79.3%(23/29)

$P < 0.01$

**Table 3.** Microvessel density, MIB-1 scores and p53 protein according to clinical prognostic factors

	MVD(No.)	MIB-1(No.)	p53 protein
<b>Histologic grade<sup>a</sup></b>			
Well	$34.4 \pm 7.8(7)$	$3.5 \pm 0.3(8)$	100.0%(8/8) <sup>@</sup>
Mod	$38.8 \pm 12.2(11)$	$3.5 \pm 0.5(13)$	76.9%(10/13)
Poor	$28.7 \pm 6.6(4)$	$3.3 \pm 0.6(4)$	50.0%(2/4) <sup>@</sup>
Mucinous	$34.7 \pm 5.9(4)$	$3.5 \pm 0.5(4)$	75.0%(3/4)
<b>Size</b>			
≤ 4 cm	$39.0 \pm 9.8(6)$	$3.4 \pm 0.4(6)$	66.7%(4/6)
4 cm < ≤ 8 cm	$35.0 \pm 9.9(14)$	$3.4 \pm 0.5(16)$	81.3%(13/16)
> 8 cm	$30.0 \pm 7.6(5)$	$3.6 \pm 0.5(6)$	83.3%(5/6)
<b>Depth</b>			
A	$25.8 \pm 5.4(2)^*$	$3.2 \pm 0.1(2)$	100.0%(2/2)
B <sub>2</sub> , C <sub>2</sub>	$36.1 \pm 9.6(24)^*$	$3.5 \pm 0.5(27)$	77.8%(21/27)
<b>Nodal metastasis</b>			
Negative	$33.6 \pm 7.9(13)$	$3.6 \pm 0.4(16)$	81.3%(13/16)
Positive	$37.0 \pm 11.2(13)$	$3.3 \pm 0.6(13)$	76.9%(10/13)
<b>DNA ploidy</b>			
Diploidy	$37.4 \pm 4.4(6)$	$3.6 \pm 0.5(7)$	57.1%(4/7) <sup>#</sup>
Aneuploidy	$33.7 \pm 10.3(8)$	$3.4 \pm 0.6(8)$	100.0%(8/8) <sup>#</sup>

<sup>a</sup> Well, well differentiated; Mod., moderately differentiated; Poor, poorly differentiated

MVD, Microvessel density

\*;  $P < 0.05$ , @;  $P = 0.09$ , #;  $P = 0.07$

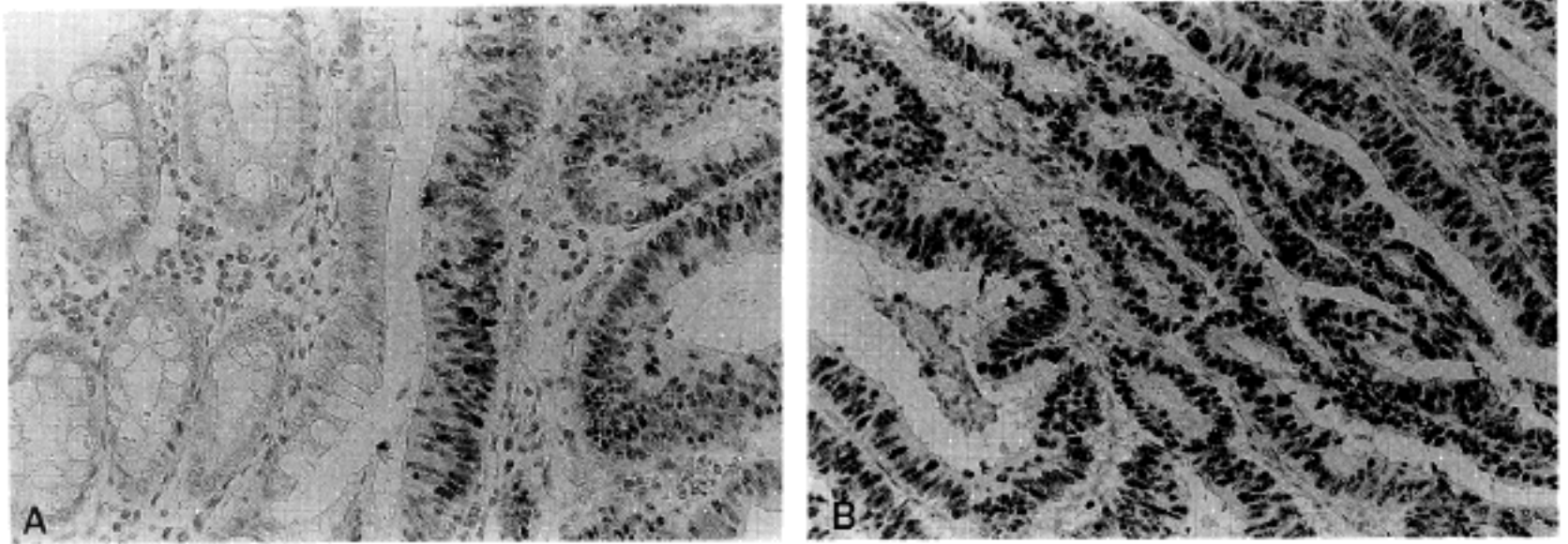


Fig. 3. Surrounding normal colonic mucosa is totally negative for p53 immunostaining, which is in contrast with adenocarcinoma showing positive staining(A and B).

Table 4. Mivrovessel density and MIB-1 scores according to p53 protein expression

	p53 negative(No.)	p53 positive(No.)
MVD	32.6 ± 3.7(5)	35.4 ± .6(21)
MIB-1	3.1 ± 0.6(6)	3.5 ± 0.5(23)

MVD; Microvessel density  
P>0.05

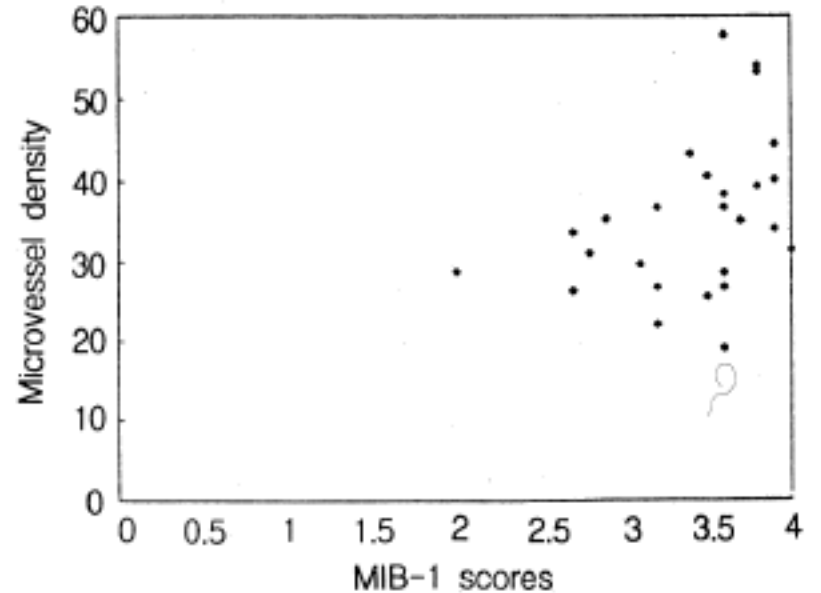


Fig. 4. Correlation of microvessel density with MIB-1 scores in colonic adenocarcinomas. The two parameters correlate but there is no statistical significance(r=0.38, P=0.055).

### 고 찰

종양 내 신생혈관은 종양세포에 영양을 공급하고, 종양세포에서 생기는 노폐물을 배출하며 basic fibroblast growth factor(bFGF), insulin-growth factor-2, platelet-derived growth factor 등과 같은 여러 성장인자를 분비하여 종양을 성장시키고<sup>18</sup>, collagenases, urokinases, plasminogen activator를 생성하여 종양세포가 주위 조직으로 침윤하는 것을 도와준다<sup>19</sup>. 신생혈관은 종양의 부위에 따라 조금씩 차이가 있지만 대장암종에서 미세혈관의 밀도를 측정할 Vermeulen등<sup>20</sup>은 종양 내 미세혈관의 밀도가 가장 높은 지역의 미세혈관의 수는 그 다음으로 높은 지역의 미세혈관의 수와 비례하므로 종양 내에서 미세혈관의 밀도가 가장 높은 지역의 미세혈관의 수를 측정하여 종양들의 미세혈관의 수를 비교할 수 있다고 하였다. 이렇게 측정된 미세혈관 밀도는 이미 지방암<sup>1,2</sup>,

악성 흑색종<sup>21</sup>, 자궁 경부암<sup>22</sup> 및 전립선암<sup>23</sup>등에서 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있다고 알려져 있다. 그래서 저자들은 미세혈관이 가장 많은 지역을 선별하여 각 종양의 미세혈관 밀도를 측정하였는데, 대부분의 대장암종에서 종양 내부보다 종양이 가장 깊숙히 침윤한 부위에서 미세혈관의 밀도가 가장 높았다. 이러한 현상은 Takahashi등<sup>24</sup>의 연구에서도 증명이 되었으며, 가장 깊숙히 침윤한 부위의 종양세포가 가장 왕성하게 증식하며 전이할 기회가 많다고 생각된다. 정상 대장의 점막의 경우는 10.4



$\pm 4.1$ , 선종의 경우는  $21.5 \pm 7.9$ , 암종인 경우는  $35.3 \pm 9.7$  였으며, 암종으로 진행될수록 미세혈관 밀도는 의의있게 증가하였다. 이러한 결과는 Takahashi 등<sup>24</sup>과 Bossi 등<sup>25</sup>의 연구결과와 일치하였다. 종양에서 신생혈관이 처음 생기는 정확한 시기는 아직 잘 알려져 있지 않지만 대체로 종양의 초기에 생성되는 것으로 생각하며, 특히 췌장  $\beta$  세포를 과증식 시켜서 종양으로 만든 실험에서 신생혈관은 과증식 단계에서 종양의 단계로 진행되는 시기에 생성되었다<sup>26</sup>. 이러한 사실은 본 연구에서 정상 대장보다 선종에서 미세혈관 밀도가 훨씬 높은 결과를 설명할 수 있을 것이다. Smith 및 Basu<sup>27</sup>는 신생혈관이 생긴 토끼의 각막에 India ink를 주입했을 때 동측의 림프절에서 India ink를 관찰하여 림프관과 신생혈관 사이에 문합이 있다고 주장하였다. 또한 종양내 생기는 신생혈관은 기저막이 취약하여 종양세포의 침투가 용이하다. 이러한 사실 등으로 혈관 내 종양세포가 림프절로 전이하는 것을 설명할 수 있다. 유방암<sup>12</sup>이나 폐의 비소세포 암종<sup>28</sup> 및 위암종 등<sup>29</sup>에서 미세혈관의 밀도와 림프절 전이 사이에 연관이 있다는 보고들이 많으며 Takahashi 등<sup>24</sup>은 대장암종에서 미세혈관의 밀도는 림프절 전이와 연관이 있다고 하였고, Saclarides 등<sup>30</sup>은 림프절 전이가 있는 대장암종의 미세혈관 밀도는 림프절 전이가 없는 대장암종보다 높지만 통계학적 의의는 없다고 하였다. 반면에 Bossi 등<sup>25</sup>은 미세혈관 밀도와 림프절 전이는 전혀 상관이 없다고 하였는데, 본 연구의 미세혈관 밀도는 림프절 전이가 없는 경우가  $33.6 \pm 7.9$ , 림프절 전이가 있는 경우가  $37.0 \pm 11.2$ 로써 림프절 전이가 있는 경우가 약간 높았지만 통계학적 의의는 없었다. 본 연구에서 종양세포의 분화도나, 종양의 크기 및 DNA ploidy에 따른 미세혈관 밀도의 차이를 발견할 수 없었다. Saclarides 등<sup>30</sup>은 종양의 침습깊이와 미세혈관 밀도 사이에 연관이 있다고 하였는데, 본 연구도 미세혈관의 밀도는 종양의 침습깊이가 점막에 국한된 경우( $25.8 \pm 5.4$ )보다 고유근층 이상 침윤된 경우( $36.1 \pm 9.6$ )가 의의있게 높았지만 종양의 침습깊이가 점막에 국한된 경우가 2예로 극히 적어서 더 많은 연구가 진행되어야 하겠다.

서구 선진국의 인구 약 15%에서 대장암이 발병하는데 우리나라의 대장암 발생은 타종양에 비하여 증가하는 추세이며 이러한 현상은 서구화된 식생활 습관이 하나의 원인으로 추정되고 있다. 대장암의 경우 종양의 형성과정중 여러 유전자, 즉 ras, p53, DCC gene, APC gene 등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실이 전암단계로부터 각 시기마다 작용하여

발생하는 것으로 알려져 있다<sup>5,15-6</sup>. 특히 p53 단백질의 유전자는 염색체 17p13.1에 위치하며, DNA에 결합하여 DNA의 수리 및 합성, 세포분화 그리고 고사(apoptosis)에 관여한다고 알려져 있다<sup>7-9</sup>. p53 유전자의 돌연변이나 다른 세포성 단백질 또는 바이러스성 단백질과 p53 단백질의 결합에 의하여 p53단백의 정상적인 기능이 소실되면 세포증식이 유발되고 또한 p53단백은 화학적으로 안정하여 핵 내에 축적하게 된다<sup>5</sup>. p53 단백질은 여러 종양에서 발현되며 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있는 경우가 많아서 각종 종양의 예후인자의 하나로 취급되고 있는데 대장의 상피성 종양에서 p53 단백질의 발현율을 보면 보고자마다 차이가 있다. 선종의 경우 김등<sup>31</sup>은 0%, 이등<sup>32</sup>은 33%, Hamana 등<sup>33</sup>은 종양세포의 이형성이 심한 선종의 경우는 71%, 이형성이 심하지 않은 경우는 9%로 보고하였으며, 대장암종의 경우 46.6%~89%로 보고되었다<sup>34-6</sup>. 본 연구에서 p53 단백질은 단 2예에서 정상 대장의 선와 기저부에 있는 세포에 발현이 되었고 선종에서 45.5%(20/44), 암종에서 79.3%였다. 따라서 암종은 선종에 비하여 p53 단백질의 발현이 의의있게 높았다( $P < 0.01$ ). p53 단백질의 발현과 대장암종의 여러 예후인자와 비교한 많은 연구들은 서로 상반된 연구결과를 보고하고 있는데<sup>34-6</sup> 본 연구에서 p53 단백질의 발현은 고분화 암종(100.0%)이 저분화 암종(50.0%)보다, 이수배수성인 암종(100.0%)이 이배수성인 암종(57.1%)보다 더 높았지만 임상적인 다른 예후인자와의 관계와 마찬가지로 통계학적 의의는 없었다. 특히 저분화 종양중 2예는 p53 단백질의 발현이 없었는데, 이런 종양은 조직학적으로 종양세포가 합포체를 이루고 있었고, 간질에 심한 림프구의 침윤이 있었으며, 세포증식능은 2.8과 2.7로 다른 암종에 비하여 감소되어 있었다. 이러한 종양은 예후가 좋을 것으로 추측하였고, 분자생물학적으로 유전자를 분석하면 DNA 복제이상을 발견할 가능성이 있다고 사료되었다. 왜냐하면 최근에 종양억제유전자의 돌연변이나 대립유전자의 소실이 없이 DNA 복제이상으로 대장암종이 발생하는 다른 암발생기전이 있음이 밝혀졌는데 DNA 복제이상은 선천성 비용종성 대장암의 대부분을 차지하고 특발성 대장암의 12~17%에서 발견된다고 알려져 있으며<sup>37</sup> 이러한 대장암의 조직학적 특징은 선을 형성하지 않는 미분화 암종으로 주위 간질에 염증세포의 침윤이 많으며 세포의 점액 분비가 많고<sup>38</sup> 또한 이러한 종양중에 예후가 좋은 경우가 많은데 이것은 종양에 대한 숙주의 강한 면역반응에 기인하는 것으로 추측되고 있기 때문이다<sup>39</sup>. p53 단백질과 DNA ploidy의

관계를 보면 Carder등<sup>40</sup>은 대장암종에서 p53 유전자의 돌연변이가 있는 뒤 이수배수성을 갖는 종양세포의 클론이 나타난다고 하였고, Kimura등<sup>41</sup>은 p53 단백질은 이수배수성인 대장암종에서 더 높게 발현된다고 하였고, Miki등<sup>42</sup>은 이배수성인 대장암종에서 더 높다고 하였다. 본 연구에서 p53 단백질은 이수배수성을 갖는 대장암종에서 더 높게 발현되었지만 ( $P=0.07$ ) 증례가 적어서 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 돌연변이된 p53 단백질은 혈관형성을 억제하는 것으로 알려진 thrombospondin-1을 조절하지 못하며<sup>10</sup> 또한 protein kinase C를 활성화시켜 혈관형성 인자로 알려진 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>11</sup>. 따라서 p53 단백질의 발현과 미세혈관 밀도 사이에 밀접한 관련이 있을 것으로 추측할 수 있지만 본 연구의 결과를 보면 p53 단백질의 발현이 양성인 암종에서 미세혈관 밀도는  $35.4 \pm 9.6$  였고, 음성인 암종은  $32.6 \pm 3.7$ 로써 p53 단백질의 발현이 양성인 암종에서 더 높았지만 p53 단백질의 발현과 미세혈관 밀도 사이에 유의한 연관성은 없었다. 이러한 결과는 대장암종을 대상으로 한 Bossi등<sup>25</sup>의 연구와 일치하였다. 이렇게 생체내 분석이 시험관 분석과 완전히 일치하지 않는 이유는 생체내 종양의 혈관형성에 다양한 인자들이 관여하기 때문일 것으로 추측하였다.

G0 기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵에 존재하는 Ki-67 항원을 파라핀에 포매된 조직에서 인지하는 MIB-1은 종양 주위의 정상 대장의 선과 기저부에서 증식되는 세포들의 핵에도 염색이 되었다. MIB-1의 발현정도는 암종에서  $3.4 \pm 0.5$ 로 선종보다 더 높았는데( $P<0.05$ ), 이러한 결과는 Koido<sup>43</sup>나 Risio<sup>44</sup>의 연구결과와 일치한다. 대장암종에서 MIB-1를 이용하여 면역조직화학 염색으로 종양세포의 증식능을 측정하여 다른 임상적 예후인자와 비교한 많은 연구들은 서로 상반된 결과를 보고하고 있다. 즉 Tatebe등<sup>45</sup>은 전이된 대장암종에서 세포 증식능 지수가 더 높다고 하였으며, Suzuki등<sup>46</sup>은 종양의 침습깊이와 종양세포의 증식능은 연관이 있지만 림프절 전이와 연관이 없다고 하였고, Hemming등<sup>47</sup>은 종양세포의 증식능과 종양의 침습깊이, 림프절 전이, DNA ploidy 등사이에 연관이 없다고 하였다. 본 연구에서는 종양세포의 증식능은 종양의 침습깊이가 고유근층 이상일 때( $3.5 \pm 0.5$ )가 점막에 국한된 경우보다 ( $3.2 \pm 0.1$ ) 높았지만 통계학적 의미는 없었으며, 종양의 분화도, 종양의 크기, 림프절 전이 여부 및 DNA ploidy에 따른 유의한 차이는 없었다. 그러므로

MIB-1를 이용한 대장암종의 증식능 측정이 예후인자로서 인정되려면 더 많은 대장암환자의 생존율과 비교하는 연구가 있어야 될 것으로 사료된다. 종양세포의 증식이 활발하면 유전자의 돌연변이가 발생할 기회가 증가될 것이고, 세포주기를 조절하는 p53의 돌연변이는 종양세포의 증식을 더욱 가속화시킬 것으로 추측할 수 있다. 유방암에서 p53 단백질의 발현과 Ki-67를 이용한 종양세포의 증식능은 서로 연관이 있다는 보고<sup>48</sup>가 있는 반면 대장암종에서는 서로 연관이 없다는 보고<sup>49</sup>가 있는데, 본 연구에서는 종양세포의 증식능은 p53 단백질의 발현이 양성인 종양이  $3.5 \pm 0.5$ 로써 p53 단백질의 발현이 음성인 종양 ( $3.1 \pm 0.6$ )보다 더 높았지만 통계학적 의미는 없었다. 미세혈관의 형성이 왕성하여 종양세포에 충분한 영양을 공급하고 각종 성장인자를 제공하면 종양세포의 증식에 많은 도움이 되리라 추측할 수 있는데, Takahashi 등<sup>24</sup> 대장암종에서 종양세포의 증식능과 미세혈관의 밀도는 서로 연관이 있다고 하였지만 전립선암<sup>49</sup>이나 유방암<sup>50</sup>을 대상으로 조사한 연구는 종양세포의 증식능과 미세혈관 밀도 및 혈관내피세포의 증식능은 서로 연관이 없다고 하였다. 본 연구에서는 미세혈관 밀도가 높을수록 종양세포의 증식능은 증가하는 경향을 보였지만 통계학적 의미는 없었다( $r=0.38$ ,  $P=0.055$ ).

## 결 론

동국대학교 부속병원에서 대장암으로 수술받은 29예와 내시경 검사와 조직검사로 선종으로 진단받은 44예 그리고 정상 대장 16예를 대상으로 미세혈관의 수를 세어 세포증식능 및 p53 단백질의 발현과 비교하고 종양의 크기, 침습깊이 림프절 전이 유무 및 DNA ploidy와 이 들을 비교함으로써 대장암종에서 미세혈관의 수와 세포증식능 및 p53 단백질의 예후인자로서의 가치와 신생혈관이 종양의 진행에 미치는 역할을 규명하고자 하였다.

미세혈관 밀도는 정상 대장의 점막의 경우는  $10.4 \pm 4.1$ , 선종의 경우는  $21.5 \pm 7.9$ , 암종인 경우는  $35.3 \pm 9.7$  였다. 따라서 암종으로 진행될수록 미세혈관 밀도는 의의있게 증가하였다( $P<0.01$ ). MIB-1 및 p53 단백질의 발현정도는 선종에서 각각  $2.3 \pm 0.7$  및 45.5% (20/44) 였고, 암종에서 각각  $3.4 \pm 0.5$  및 79.3% 였다. 따라서 암종은 선종에 비하여 세포증식능과 p53 단백질의 발현이 의의있게 높았다( $P<0.01$ ). p53 단백질의 발현은 고분화 암종(100.0%)이 저분화 암종(50.0%)



보다, 이수배수성인 암종(100.0%)이 이배수성인 암종(57.1%)보다 더 높았지만 종양세포의 증식능 및 p53 단백질의 발현은 대장암종에서 다른 임상적 예후인자들과 상관이 없었다. 대장암종에서 미세혈관 밀도는 침습깊이가 깊을수록 증가되었지만 종양세포의 분화나 종양의 크기, 림프절 전이 유무 및 DNA ploidy와 연관이 없었고, p53 단백질 양성인 암종 및 세포증식능이 높은 암종에서 각각 높았지만 통계학적 의의는 없었다.

이러한 결과로 혈관형성은 대장의 상피성 종양의 초기 단계인 선종에서 시작하여 종양의 진행에 관여하고, 선종보다 암종에서 세포증식능 및 p53 단백질의 발현이 증가하지만, 대장암종에서 이들이 예후인자로서 사용되기 위해서는 아직도 많은 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324: 1-8.
- Bosari S, Lee AKC, Delellis RA, Wiley BD. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*; 1992; 23: 755-61.
- Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, et al. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. *Lancet* 9 1994; 344: 82-6.
- Dickson RB, Lippmann ME. Molecular determinants of growth, angiogenesis, and metastases in breast cancer. *Sem Oncol* 1992; 19(3): 286-98.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-9.
- Levine AJ, Momand J, Finlay C. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
- Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-84.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9: 963-9.
- Mazerolles C, Rishmann P, Chopin D, et al. Usefulness of MIB1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma: comparison with Ki-67 antibody. *Histopathology* 1994; 25: 563-8.
- Ng IO, Na J, Lai EC, Fan ST, Ng M. Ki-67 antigen expression in hepatocellular carcinoma using monoclonal antibody MIB1. A comparison with proliferating cell nuclear antigen. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 313-8.
- Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995; 73: 844-50.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Presence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-7.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
- 대한대장항문병학회, 대한외과학회: 한국인 대장암 취급지침서. 의학문학회 1988; 2-40.
- Rak JW, Hegmann EJ, Lu C, Kerbel RS. Progressive loss of sensitivity to endothelium derived inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J Cell Physiol* 1994; 159: 245-55.
- Moscатели D, Gross J, Rifkin D. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. *J Pathol* 1993; 170(suppl): 388a.
- Vermeulen PB, Verhoeven D, Fierens H, et al. Microvessel quantification in primary carcinoma: an immunohistochemical study. *Br J Cancer* 1995; 71: 340-3.
- Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994; 145: 510-4.
- Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 800-4.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;

- 143: 401-9.
24. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3964-8.
  25. Bossi P, Viale G, Lee AKC, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: Microvessel Quantitation in adenoma and carcinoma with clinicopathological correlations. *Cancer Res* 1995; 55: 5049-53.
  26. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition of hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
  27. Smith S, Basu P. Mast cell in corneal immune reaction. *Can J Ophthalmol* 1970; 5: 173-83.
  28. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti C. Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-6.
  29. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 72: 319-23.
  30. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 921-6.
  31. 김주현, 정명자, 강명재, 이동근. 대장암종 및 선종의 p53 단백질 발현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1995; 29(부록): A145.
  32. 이미숙, 정유경, 이미자, 서재홍. 결장직암, 선종, 증식성 용종의 p53 단백질 발현에 대한 면역조직화학적 연구. 1995; 29(부록): A144.
  33. Hamana T, Kawai K, Serizawa A, Tsutsumi Y, Watanabe K. Immunohistochemical demonstration of p53 protein in colorectal adenomas and adenocarcinomas. Reliable application of the heat-induced antigen retrieval method to formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Pathol Int* 1994; 44: 765-70.
  34. Grewal H, Guillem JG, Klimstra DS, Cohen AM. p53 nuclear overexpression may not be an independent prognostic marker in early colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 1176-81.
  35. Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Anastassopoulos P, Nakopoulou L, Panoussopoulos D, Papadimitriou K. Prognostic significance of p53 and c-erbB-2 immunohistochemical evaluation in colorectal adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 1995; 10: 661-8.
  36. Bosari S, Viale G, Roncalli M. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 790-8.
  37. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clue to pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
  38. 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: 145-86.
  39. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-49.
  40. Carder PJ, Cripps KJ, Morris R, et al. Mutation of the p53 gene precedes aneuploid clonal divergence in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 71: 215-8.
  41. Kimura O, Hisamitsu K, Sugamura K, et al. Flow cytometric measurement of p53 protein and DNA content in colorectal carcinomas with liver metastasis. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995; 22(Suppl 2): 134-9.
  42. Miki T, Funahashi K, Tsujita K, et al. An immunohistochemical study of the relationship between p53 expression and the DNA ploidy pattern using image cytometry in colorectal carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995; 22(Suppl 2): 130-3.
  43. Koido S, Shimoda T. Immunohistochemical study of proliferative cells in colorectal adenoma and carcinoma. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1992; 89: 2664-72.
  44. Risio M, Rossini FP. Cell proliferation in colorectal adenomas containing invasive carcinoma. *Anticancer Res* 1993; 13: 43-7.
  45. Tatebe S, Ishida M, Kasagi N, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Apoptosis occurs more frequently in metastatic foci than in primary lesions of human colorectal carcinomas: analysis by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Int J Cancer* 1996; 65: 173-7.
  46. Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15: 317-20.
  47. Hemming AW, Davis NL, Kluffinger A. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 1992; 51: 147-52.
  48. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, et al. p53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 408-18.

49. Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995; 73: 844-50.
  50. Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 144: 1188-94.
-