

## 결직장선암종에서의 p53, E-cadherin, nm23, CD44의 발현양상과 종양의 맥관형성의 의의

국립의료원 병리과

팽 성 숙 · 장 희 진 · 서 정 일

### The Significance of the Expression of p53, E-cadherin, nm23, CD44, and Tumor Angiogenesis in Colorectal Adenocarcinoma

Sung Suk Paeng, M.D., Hee Jin Chang, M.D. and Jung Il Suh, M.D.

Department of Pathology, National Medical Center

Many oncogenes and tumor suppressor genes have been identified and studied in colorectal carcinoma. Among them, p53 is a tumor suppressor gene and its mutation is frequently noted in human tumors. E-cadherin is a cell adhesion molecule and associated with tumor differentiation. CD44 is a cell surface glycoprotein that plays a role in cell migration and metastasis. nm23 is a gene known to lower metastatic potential of tumors and has been proposed to be a metastasis suppressor gene. Tumor angiogenesis is required for the expansion of the primary tumor and metastasis and its degree is related to the potential of malignancy. We studied the expression of p53, E-cadherin, nm23, CD44 and tumor angiogenesis in 36 cases of colorectal adenocarcinomas. They were compared with previously known prognostic factors such as the stage, tumor size, depth of invasion, differentiation, presence of lymphatic or venous invasion, the lymph node and distant metastasis. The results were as follows. 1) The expression of p53 was not significantly associated with any prognostic factors. 2) The expression of E-cadherin was significantly associated with tumor differentiation. In the well differentiated adenocarcinomas, its expression was higher than in the poorly differentiated adenocarcinoma. 3) The expression of nm23 was also significantly associated with tumor differentiation. In carcinoma with lymph node metastasis, the expression of nm23 was reduced, but statistically it was not significant. 4) The expression of CD44 was higher in tumors with lymph node metastasis than in tumors without lymph node metastasis, but it was not statistically significant. 5) The degree of microvessel density was significantly associated with lymphatic invasion. According to the above results, the expression of E-cadherin and nm23 are related to the differentiation of the tumor and tumor angiogenesis is related to the lymphatic invasion of the colorectal adenocarcinoma. (**Korean J Pathol 1997; 31: 314~325**)

**Key Words:** Colorectal adenocarcinoma, p53, E-cadherin, nm23, CD44, Tumor angiogenesis, Factor VIII related antigen

접 수: 1996년 10월 22일, 게재승인: 1997년 1월 17일  
주 소: 서울시 중구 을지로 6가 18-79, 우편번호 100-799  
국립의료원 해부병리과, 팽성숙

## 서 론

결직장암은 구미에서 가장 호발하고 국내에서도 발생률이 점차 증가되고 있는 비교적 흔한 암으로 그동안 이 종양에 대한 많은 연구가 이루어졌고 여러 인자가 종양 발생 및 예후에 관여한다는 것이 밝혀져왔다. 분자생물학 분야의 진보로 1990년 Fearon과 Vogelstein등이<sup>1</sup> K-ras 유전자, Familial adenosis polyposis coli(APC) 유전자, p53 종양억제 유전자와 Deleted in colon cancer(DCC) 유전자가 종양의 발생에 관여하는 것을 밝혀낸 이래로, 이외에 c-myc, E-cadherin, Cyclin E, nm23, CD44와 종양의 맥관 형성 또한 종양의 발생 및 성장과 전이에 관여한다고 알려졌으며 이밖의 다른 인자들에 대한 연구도 꾸준히 이루어지고 있다.

저자들은 이들 중 종양 억제 유전자로 종양의 발생에 관여하는 p53, 세포간 유착 당단백질로 종양의 분화에 관여하는 것으로 알려진 E-cadherin, 전이 억제 유전자로서 유방암에서 불량한 예후와 연관이 있다고 알려진 nm23 단백질<sup>2,3</sup>, 세포 표면의 당단백으로서 림프구 귀환, 조혈 작용, 세포의 이동에 관여할 뿐 아니라 종양의 침습과 전이, 불량한 예후와 연관이 있음이 보고되어 있는 CD44<sup>4-6</sup>, 그리고 종양의 성장과 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 종양의 맥관형성<sup>7</sup>등 5개의 인자들의 결직장암에서의 역할을 알아보고 기존의 예후 인자 및 이미 보고되었던 다른 저자들의 결과들과 비교해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 재료 및 방법

1987년 1월부터 1992년 12월까지 국립의료원에서 외과적으로 절제된 원발성 결직장 선암종중에서 림프절 전이를 동반한 18례와 림프절 전이가 없었던 18례를 포함한 총 36례를 연구대상으로 하였다. 대상 환자들의 성별, 연령 및 수술후 재발 유무, 생존 여부를 조사하였다. 종양의 병기는 AJCC(American Joint Committee on Cancer)에 의해 제창된 TMN 병기에 따라 I, II, III과 IV가로 구분하였다. 종양의 위치는 맹장부터 횡행 결장까지를 우측 암종으로, 하행결장부터 직장까지를 좌측 암종으로 구분하고, 종양의 크기는 주 병변의 최대 장경을 기준으로 5.0 cm 미만인 종양군과 5.0 cm 이상의 종양군으로 구분하였다. 종양의 분화도에 따라 고분화군, 중등도

의 분화군, 저분화군으로 분류하고, 림프절 전이 여부와 원격 전이 여부에 따라 나누었으며 종양의 침습 정도와 림프관 침습, 정맥침습 여부를 알아보았다.

### 2. 면역조직화학적 염색 및 판독

면역조직화학 검사를 위하여 포르말린 처리 파라핀 포매 조직을 4 um 두께로 박절한 후 탈파라핀과정을 거쳐 B-SA(Biotin Streptavidin Amplified System) 법을 이용하여 염색하였다. p53항체는 단클론성 항체인 DO7(Biogenex)을 사용하였고, E-cadherin항체는 단클론성 항체인 E-cadherin Ab 6H9(Netherlands SYN BIO)을, nm23항체는 단클론성인 nm23Ab-1(Oncogene Science)을 사용하였다. CD44항체는 아형(variant)이 아닌 standard form의 단클론성 항체인 DF1485(Biogenex)를 사용하였고 종양의 맥관형성을 알아보기 위한

Table 1. Clinicopathologic findings of 36 cases of colorectal adenocarcinoma

Age(years)	:	0~73(mean: 57.2)
Sex	:	M 15(41.7%)
	:	F 21(58.3%)
Tumor size(cm)	:	2.5~19(mean: 5.7)
Tumor site	:	Rt 7(19.4%)
	:	Lt 29(80.6%)
Differentiation	:	Tub1 16(44.4%)
	:	Tub2 11(30.6%)
	:	Poor 9(25.0%)
Depth of invasion	:	pm 6(16.7%)
	:	ss 30(83.3%)
Lymphatic invasion	:	(-) 22(61.1%)
	:	(+) 14(38.9%)
Angioinvasion	:	(-) 20(55.6%)
	:	(+) 16(44.4%)
LN metastasis	:	(-) 18(50.0%)
	:	(+) 18(50.0%)
Distant metastasis	:	(-) 18(50.0%)
	:	(+) 18(50.0%)
Tumor stage	:	I 1(2.8%)
	:	II 6(16.7%)
	:	III 13(36.1%)
	:	IV 16(44.4%)
Follow-up(month)	:	1~90(mean: 26.8)

M; Male, F; Female, Tub1; Well, Tub2; Moderately, Poor; Poorly, pm; proper muscle layer, ss; subserosa, LN; Lymph node

Table 2. Clinicopathologic findings of colorectal adenocarcinoma

Case	Age	Sex	site	size	Dif.	Dept.	LI	AI	LN. Meta	Dis. Meta	P53	E-cadherin	nm23	CD44	MVC	Stage	F/U (month)
1	61	M	R	3.5	Tub1	pm	-	-	-	-	+	+	+	+	31	II	90
2	54	M	S	5.0	Tub1	pm	-	+	-	-	+	+	+	-	26	II	43
3	69	F	R	4.5	Tub1	ss	-	-	-	-	+	+	+	+	23	II	46
4	55	F	R	3.0	Tub1	pm	+	-	-	-	-	+	+	+	87	I	5
5	43	M	R	5.0	Tub1	ss	-	-	-	-	+	+	+	+	77	II	13
6	62	F	R	8.0	Tub2	ss	+	+	-	-	+	-	-	+	162	III	7
7	67	M	R	5.0	Tub2	ss	+	+	-	-	+	+	+	-	29	III	34
8	63	F	R	5.0	Tub2	pm	+	-	-	-	+	+	-	+	28	II	51
9	63	M	R	3.5	Tub2	ss	-	-	-	-	-	-	+	+	23	II	13
10	51	M	A	5.0	Tub1	ss	-	-	-	Liver	-	+	+	-	20	IV	1
11	42	F	R	5.0	Tub1	ss	-	-	-	Liver/Bone	-	+	-	+	53	IV	23/D
12	61	M	R	8.0	Tub1	ss	-	+	-	Lung	-	+	+	+	43	IV	34/D
13	67	F	S	5.0	Tub1	ss	-	-	-	Liver	-	+	+	+	65	IV	70
14	42	F	R	4.0	Tub2	ss	-	+	-	Liver	+	-	+	-	26	IV	40
15	67	M	R	5.0	Tub2	ss	-	+	-	Lung	+	+	-	-	26	IV	33
16	43	M	R	5.5	Tub2	ss	-	-	-	Liver	+	+	+	-	36	IV	-
17	39	F	A	5.0	Por	ss	-	-	-	Ovary	+	-	-	-	34	IV	2
18	63	M	R	3.5	Por	ss	-	+	-	Liver/Brain	+	-	-	-	50	IV	16/D
19	55	M	R	6.0	Tub1	ss	+	+	+	-	+	+	+	+	51	III	6/D
20	30	F	R	5.0	Tub1	ss	+	+	+	-	+	+	+	+	38	III	71
21	70	F	R	6.0	Tub1	ss	-	-	+	-	+	+	+	+	23	III	16
22	53	M	D	7.0	Tub2	ss	+	-	+	-	+	+	-	+	54	III	90
23	73	M	S	5.0	Tub2	ss	+	-	+	-	+	-	-	+	84	III	1/D
24	63	F	R	19.0	Por	ss	-	+	+	-	+	+	-	+	68	III	1/D
25	42	M	C	8.0	Por	ss	+	-	+	-	-	+	+	+	34	III	-
26	60	M	C	7.0	Por	ss	+	+	+	-	+	-	-	+	26	III	72
27	69	M	R	5.9	Por	ss	-	-	+	-	+	+	-	+	74	III	19
28	42	M	R	5.2	Tub1	ss	-	+	+	Lung	-	+	-	+	43	III	12

Table 2. Continued

Age	Sex	site	size	Dif.	Dept.	LJ	AJ	LN. Meta	Dis. Meta	P53	E-cadherin	nm23	CD44	MVC	Stage	F/U (month)
29	M	R	5.0	Tub1	ss	-	+	+	Liver	-	+	-	+	51	IV	17/D
30	F	A	4.0	Tub1	ss	-	+	+	Liver	+	+	+	-	32	III	34/D
31	F	T	3.3	Tub1	pm	+	-	+	Liver	+	+	+	-	82	IV	4/D
32	M	R	7.0	Tub2	ss	+	-	+	Bone	+	+	+	+	88	IV	16/D
33	M	A	11.0	Tub2	ss	+	+	+	Liver	+	+	+	-	49	IV	6/D
34	F	R	3.0	Por	ss	-	+	+	Liver/Lung	+	-	-	-	58	IV	7
35	M	R	2.5	Por	ss	-	+	+	Skin	+	+	+	-	38	IV	1/D
36	F	R	6.5	Por	pm	+	-	+	Axilla	+	+	-	-	38	IV	17

Dif; differentiation, Dept; invasion depth, LJ; lymphatic invasion, AJ; angioinvasion, LN; lymph node, Dis; distant, Meta; metastasis, M; male, F/U; follow up F; female R; rectum, S; sigmoid, A; ascending D; descending, C; cecum, T; transverse, Tub1; well differentiated, Tub2; moderately differentiated, Por; poorly differentiated, pm; proper muscle, ss; subserosa, D; dead

Factor VIII 연관항체는 단클론성 항체인 F8/86(Bio-genex)를 사용하였다. 각 조직절편에 1 내지 2 방울씩 도포하여 30분 내지 1시간 동안 항온시킨 후 완충액으로 씻어내었으며 발색은 AEC(3-amino-9ethylcarbazole)로 하였다. 판정은 각각 양성과 음성으로 구분하였는데 양성으로 염색되는 세포들이 25% 이상일 경우 양성으로 판정하였다. p53은 핵내에 명확한 갈색과립이 보이면 양성으로 하였고, E-cadherin은 세포막에 선택적으로 염색되는 것을 양성으로 하였으며, nm23과 CD44는 세포질에 선명하게 염색되는 것을 양성으로 하였다. 종양의 맥관 형성은 맥관 형성도가 비교적 높은부위를 3~5군데 선정하여 200배 시야에서 인지되는 단일 내피세포나 내피세포 집락을 포함한 모든 미세혈관수를 측정하여 평균치를 구하였다.

### 3. 통계학적 분석

p53, E-cadherin, nm23와 CD44 각각의 발현 양상, 기존에 알려진 예후인자와의 상관관계, 각 인자들간의 상관 관계에 대해서 SPSS 프로그램을 통해 Chi-square 법을 이용하여 검정을 실시하였다. 종양의 맥관 형성과 기존에 알려진 예후인자와의 상관관계 관계에 대해서는 역시 SPSS 프로그램을 통해 t-test, 분산분석(ANOVA)을 이용하여 검정하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있다고 보았다.

## 결 과

### 1. 임상 소견(Table 1, 2)

환자들의 연령은 30세부터 73세까지 었으며 평균 연령은 57세였다. 남자가 15명(41.7%)이었고 여자가 21명(58.3%)이었다. TMN 병기에 따라 병기I은 1예(2.8%), II는 6예(16.7%), III은 13예(36.1%), IV는 16예(44.4%)였다. 34예에서 수술후 추적 관찰이 가능하였으며 이들의 추적 관찰기간은 1~90개월(평균: 26.8개월)이었으며 12명이 사망하였다.

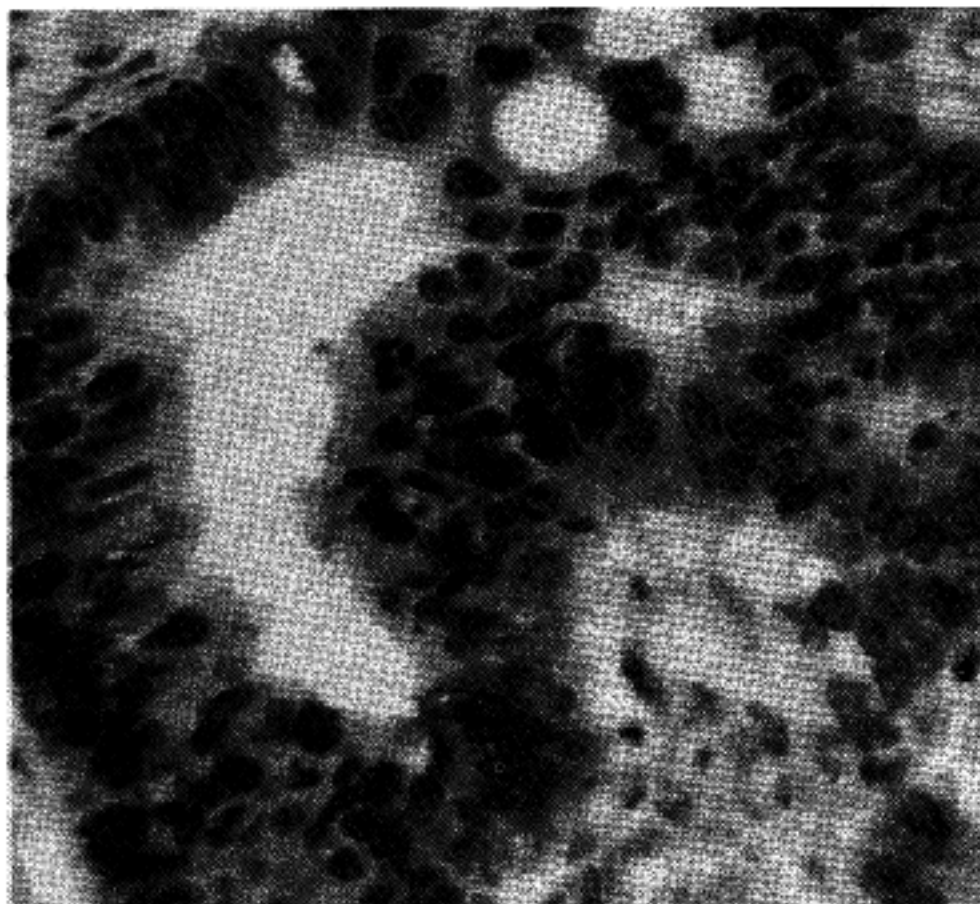
### 2. 병리학적 소견(Table 1)

종양의 위치는 우측 종양이 7예(19.4%), 좌측 종양이 29예(80.6%)였다. 종양의 크기는 2.5 cm에서 19 cm으로 평균 5.7 cm이었고 5 cm 미만인 것이 10예(28%), 5 cm 이상인 것이 26예(72%)였다. 36예 모두 선암종으로 종양의 분화도에 따라 살펴보면 고분화군이 16예(44.4%), 중분화군이 11예(30.6%), 저분화

**Table 3.** Expression of p53, E-cadherin, nm23, CD44 and Factor VIII related antigen in colorectal adenocarcinoma

		p53	E-cadherin	nm23	CD44	MVC(mean)
Tumor size(cm)	: <5 cm	80.0%	60.0%	80.0%	40.0%	42.9
	>5 cm	69.2%	50.0%	84.6%	69.2%	51.3
Differentiation	: Tub1	66.6%	61.5%	100%	75.0%	46.5
	Tub2	91.0%	45.4%	72.7%	54.5%	55.0
	Por	89.0%	33.3%	44.4%	44.4%	46.0
		(p=0.014)	(p=0.015)			
Depth of invasion	: pm	60.0%	100%	80.0%	50.0%	48.6
	: ss	74.2%	54.8%	74.2%	63.3%	49.0
Lymphatic invasion	: (-)	55.6%	60.7%	61.9%	54.5%	41.4
	(+)	44.4%	39.3%	38.1%	71.4%	60.7
					(p=0.016)	
Angioinvasion	: (-)	51.9%	60.7%	61.9%	70.0%	49.2
	(+)	48.1%	39.3%	38.1%	50.0%	48.7
LN metastasis	: (-)	61.0%	66.7%	72.7%	55.5%	46.6
	(+)	83.3%	50.0%	83.3%	66.7%	51.4
Distant metastasis	: ( )	77.8%	61.1%	77.8%	88.9%	52.1
	(-)	66.7%	55.6%	77.8%	33.3%	45.8
Tumor stage	: I, II, III	82.4%	58.8%	76.5%	85.0%	53.1
	IV	66.6%	55.6%	77.8%	31.0%	43.7

MVC: Microvessel count

**Fig. 1.** Immunohistochemical staining for p53 in moderately differentiated colorectal adenocarcinoma. Intense intranuclear staining for p53 is identified in tumor cells.



군이 9예(25%)였다. 종양의 침습 정도를 보면 근육까지 침습한 것은 6예(16.7%), 그 이상까지 침습된 것이 30예(83.3%)였다. 림프관 침습이 없는 것이 22예(61.1%), 림프관 침습이 있는 것은 14예(38.9%)였다. 정맥침습이 없는 것이 20예(55.6%), 정맥 침습이 있는 것이 16예(44.4%)였다. 림프절 전이가 없는 것이 18예, 림프절 전이가 있는 것이 18예였으며 원격 전이가 없는 것이 18예, 원격 전이가 있는 것이 18례로 전이는 간이가 가장 많았으며(11예) 폐, 골격, 난소, 뇌, 피부로도 전이가 있었다.

### 3. 면역조직화학적 염색 결과와 예후 인자와의 상관 관계(Table 1, 3)

(1) p53단백 발현: 전체 36예중 p53단백은 27예(72.3%)에서 양성 반응을 보였다(Fig. 1). 고분화군에서는 66.6%, 중분화군에서는 91.0%, 저분화군에서는 89.0%의 양성 반응을 보였고, 림프절 전이가 없었던 군에서는 61.0%, 림프절 전이가 있었던 군에서는 83.3%의 양성 반응을 보여 고분화군과 림프절 전이가 없었던 군에서 p53단백의 발현이 상대적으로 낮았으나 통계학적인 의의가 없었다. 원격 전이가 없었던 군에서는 78.1%, 원격 전이가 있었던 군에서는 66.7%의 양성 반응을 보였으나 역시 통계학적인 의의는 없었고 그외에 종양의 크기, 종양의 침습 정도, 림프관 침습 및 정맥 침습과도 상관 관계가 없

었다.

(2) E-cadherin 발현: 전체 36예중 E-cadherin은 28예(77.8%)에서 양성 반응을 보였다(Fig. 2). 종양의 분화도에 따라 보면 고분화군에서는 61.5%, 중분화군에서는 45.4%, 저분화군에서는 33.3%의 양성 반응을 보여 분화가 좋을수록 양성 발현율이 높았으며 이는 통계학적으로 유의한 상관 관계가 있었다. 림프절 전이가 없었던 군에서는 66.7%에서, 림프절 전이가 있었던 군에서는 50.0%에서, 원격 전이가 없었던 군에서는 61.1%에서, 원격 전이가 있었던 군에서는 55.6%에서 양성 반응을 보여 림프절과 원격 전이가 없는 군이 전이가 있는 군보다 발현율이 높았지만 통계학적 의의는 없었다. 종양의 크기, 종양의 침습 정도, 림프관 침습 및 정맥 침습과도 상관 관계가 없었다.

(3) nm23단백 발현: 전체 36예중 nm23단백은 21예(58.2%)에서 양성 반응을 보였다(Fig. 3). 고분화군에서는 100%, 중분화군에서는 72.7%, 저분화군에서 44.4%의 양성 반응을 보여 분화가 좋을수록 양성 발현율이 높았으며 이는 통계학적으로도 유의하였다. 전이여부에 따라 보면 림프절 전이가 없었던 군에서는 72.7%, 림프절 전이가 있었던 군에서는 83.3%, 원격 전이가 없었던 군에서는 77.8%, 원격 전이가 있었던 군에서도 역시 77.8%에서 양성 반응을 보였는데 통계학적인 유의성은 없었다. 종양의 크기, 종



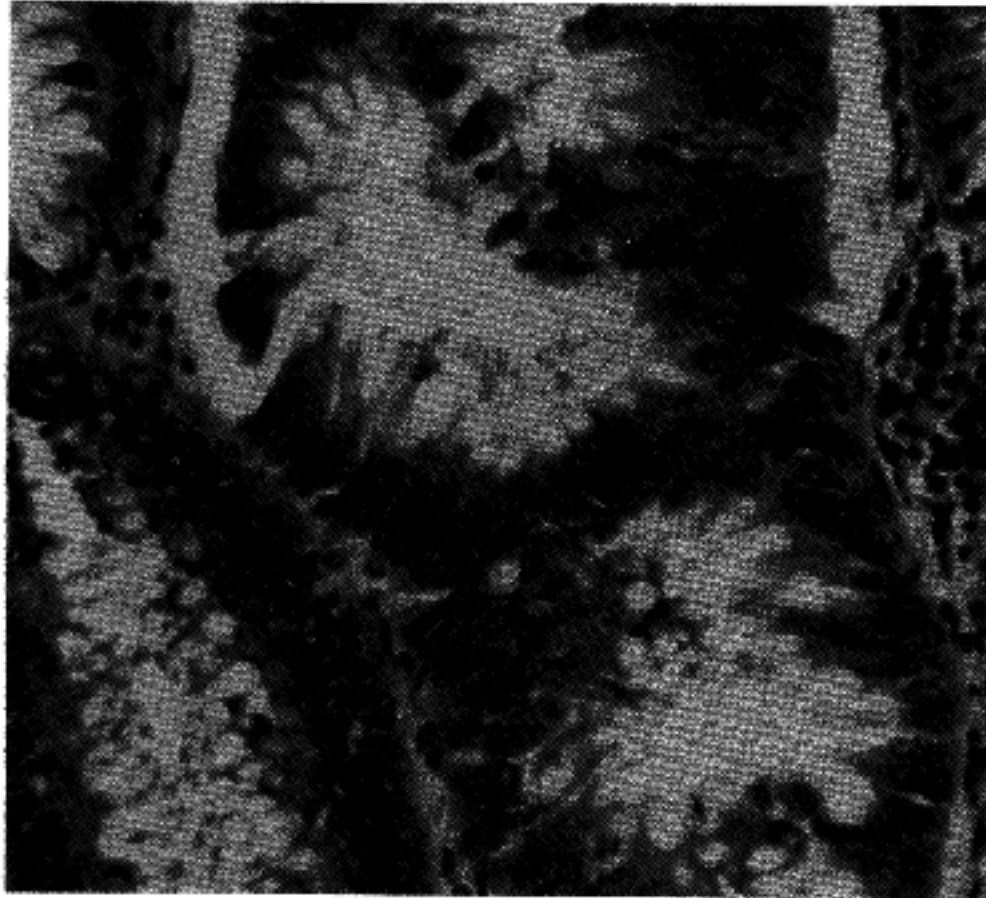
Fig. 2. Immunohistochemical staining for E-cadherin in moderately differentiated colorectal adenocarcinoma. Positive staining for E-cadherin is identified in intercellular membrane of tumor cells.

양의 침습 정도, 정맥 침습과도 상관 관계는 없었다.

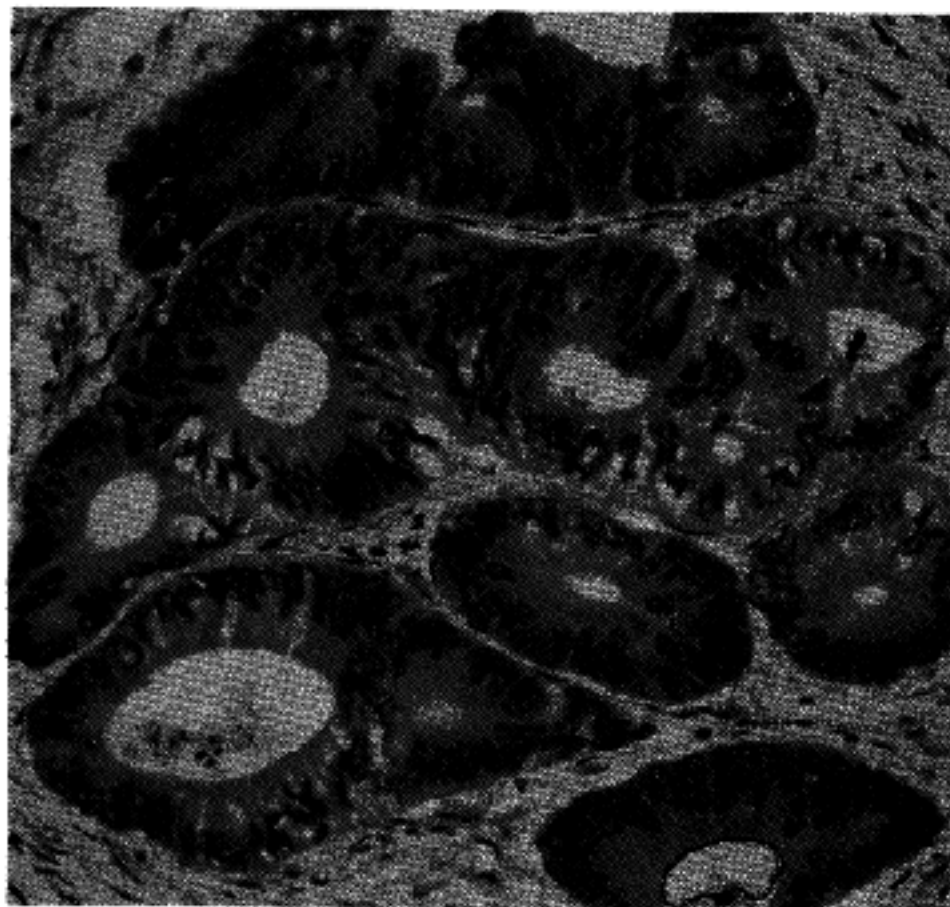
(4) **CD44 발현**: 전체 36예중 CD44는 22예(61.1%)에서 양성 반응을 보였다(Fig. 4). 림프절 전이가 있는 경우 66.7%, 전이가 없는 경우 55.5%의 양성 반응을 보여 림프절 전이가 있는 경우 발현율이 높았

지만 통계학적으로 유의한 상관 관계는 없었다. 종양의 크기, 분화도, 림프관 및 정맥 침습, 원격 전이, 병기와는 역시 상관 관계가 없었다.

(5) **종양의 맥관형성**(Factor VIII related antigen): 미세혈관의 수는 200배 시야에서 23~162개로 평균



**Fig. 3.** Immunohistochemical staining for nm23 in moderately differentiated colorectal adenocarcinoma. Cytoplasmic staining for nm23 is identified in tumor cells.



**Fig. 4.** Immunohistochemical staining for CD44 in poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. Cytoplasmic staining for CD44 is identified in tumor cells.

48.9개였다(Fig. 5). 평균 미세혈관의 수는 림프관 침습이 있는 경우는 60.7개, 림프관 침습이 없는 경우는 41.4개로서 림프관 침습이 있을수록 종양의 맥관 형성이 현저한 것을 알 수 있었으며 이는 통계학적으로 유의하였다. 림프절 전이가 있는 경우에는 51.4개, 림프절 전이가 없는 경우는 46.6개로 림프절 전이가 있는 경우에 맥관 형성이 많았으나 통계학적인 유의성은 없었다. 종양의 크기, 분화도, 침습 정도와 정맥 침습, 림프절 및 원격 전이와는 어떠한 상관 관계도 찾아 볼 수 없었다.

### 고 찰

의학에서의 분자생물학적인 연구의 진보에 힘입어 결직장암에서도 세포의 형질 전환, 형질 전환된 세포의 성장과 국소적 침습, 그리고 원격 전이등의 종양의 발생에서 전이에 이르기까지의 복합적인 과정에 관여하는 여러가지 종양 발생 유전자와 종양 억제 유전자가 밝혀지고 있다<sup>8-10</sup>.

종양의 발생 과정에서 종양 억제 유전자인 p53의 변이는 널리 알려져 있다<sup>11,12</sup>. p53 단백질은 53kD의 핵 내의 인단백질로서 17번 염색체의 단완 13.1에 위치하며 정상 야생형의 p53은 전사(轉寫)인자로 작용하여 세포의 성장을 조절하며 세포가 합성기에 들어가는 것을 방해하여 특정 세포에서 부적절한 세포

증식에 대해 계획된 세포사(cell death)를 유도하며 DNA의 무분별한 증복을 방지한다. 또한 p21을 활성화 시켜 세포 주기 조절에 중요한 역할을 하는 cyclin dependent kinases를 억제하여 분열전에 손상된 DNA를 복구할 수 있는 시간을 주어 손상된 DNA가 복제되지 않도록 하는 것으로 알려져 있다. 대장암, 폐암, 유방암등의 인체 종양에서 p53의 돌연변이가 증명되었으며 불량한 예후와도 상관이 있다고 보고되었다<sup>13,14</sup>. 본 연구 결과에서는 종양의 분화도를 고분화군과 저분화군으로만 구분하였을때 저분화군에서 p53의 발현이 많이 되는 것을 알 수 있었지만 이는 통계적으로 의의가 없어 이전의 여러 보고들과는 다른 결과를 보여주었다. 또한 종양의 병기, 진이등 그외의 다른 예후 인자와는 어떠한 상관 관계도 보이지 않았다. 따라서 p53은 결직장암의 종양 발생에는 관여하지만 종양의 침습과 전이에는 관여하지 않는 것으로 사료된다.

근래에는 종양에서의 세포간 유착 물질에 대한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 세포와 세포, 세포와 기질간의 상호 작용에 관여하는 유착 물질로 Integrin, Cadherin, Immunoglobulin superfamily와 Selectin의 4가지 군이 알려져 있다. Integrin은 세포와 세포, 세포와 기질간의 결합에, Cadherin은 세포와 세포의 상호간의 인식과 조직의 형태 유지등에 각각 중요한 역할을 한다. Immunoglobulin superfamily

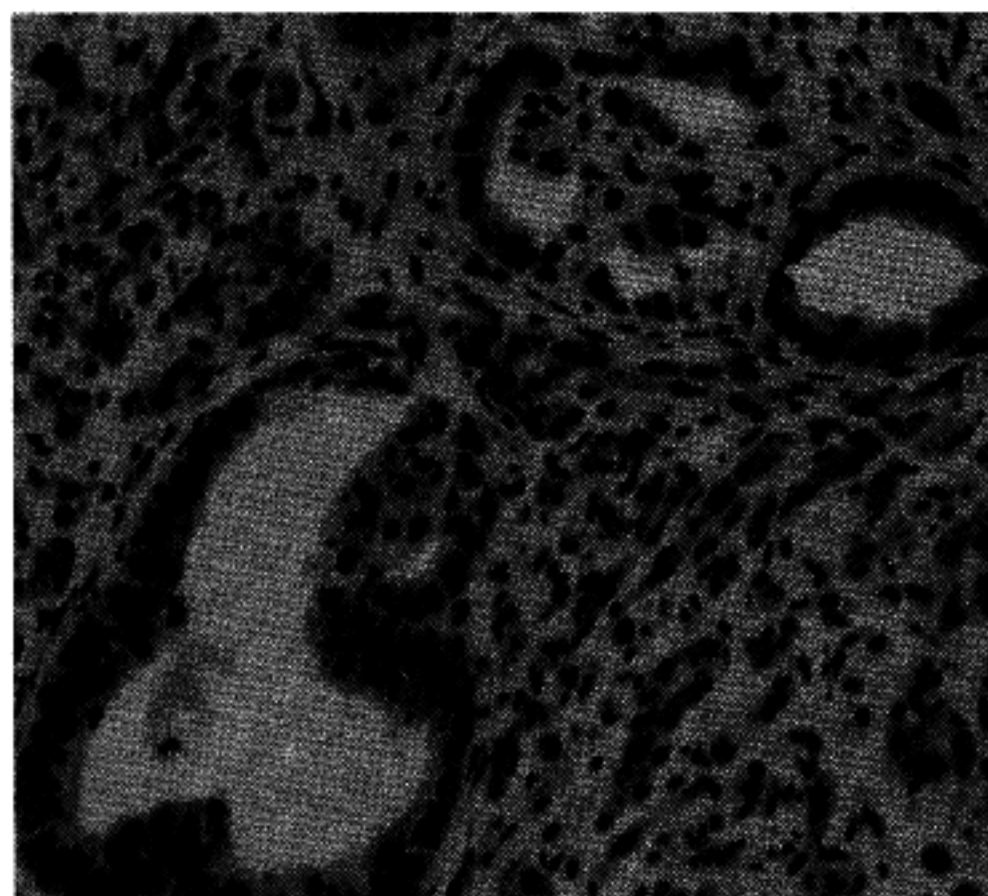


Fig. 5. Immunohistochemical staining for Factor VIII related antigen in moderately differentiated colorectal adenocarcinoma. The density of microvessels is high.



는 세포 표면 인자의 인식, 세포 번역 기능, 염증 세포 또는 종양 세포와 내피 세포간에 있어서 중요한 역할을 하며, Selectin은 염증 세포와 혈관 내피세포, 혈소판과 혈관 내피세포간의 상호작용에 관여한다.

Cadherin은 기본 구조와 분자적 특성에 따라 신경성의 N-cadherin, 태반성의 P-cadherin, 근육성의 M-cadherin, 망막성위 R-cadherin등이 있으며 일부는 이미 그 구조가 밝혀졌다. E-cadherin은 식도암, 위장관 종양, 방광암, 전립선암, 두경부 종양등에서 분화가 나뉠수록 발현이 감소됨이 보고되었는데<sup>15-19</sup> 본 연구에서도 E-cadherin은 결직장암의 분화도와 역관계에 있음을 보여 이전의 대부분의 보고들과 일치하였다. 하지만 Kinsella등<sup>20</sup>은 대장암에서 E-cadherin은 종양의 분화나 Duke 병기와는 상관 관계가 없으며, 림프절과 간 전이가 있었던 경우 발현이 감소되었지만 종양의 전이를 예측할 수 있는 인자로서의 가치는 인정할 수 없다고 하였고, Shimoyama등<sup>21,22</sup>은 E-cadherin의 발현과 종양의 침습 정도는 상관없다고 하였다. 본 연구에서는 전이가 있는 경우, 전이가 없는 경우보다 발현이 감소되었지만 통계학적인 의의는 없어 전이와는 뚜렷한 상관 관계를 보여 주지 못했다. 앞으로 전이과정에서의 E-cadherin의 역할에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라고 본다.

nm23단백은 염색체 17q22에 위치하고 있는 전이 억제 유전자로 알려져 있으며 nm23H1과 nm23H2이 있으며 이들은 약 88%에서 동일성을 보인다<sup>23</sup>. nm23 단백질은 정상 상피세포와 종양 세포에서 모두에서 발현되지만 종양세포에서 좀 더 광범위하고 강하게 발현된다. 1992년 Okabe-Kado등<sup>24</sup>은 쥐의 골수성 백혈병 세포에서 분화를 억제하는 nm23M2 (murine homologue of nm23-H2)와 일치되는 I-factor에 대해서 보고하였고, 1993년 Yamaguchi등<sup>25</sup>은 인간의 조혈 세포에서 분화를 유도한 직후에 nm23의 빠른 감소를 관찰할 수 있다고 하였는데 이러한 소견은 종양에서 분화가 좋을수록 nm23 gene의 발현이 증가되는 것과 연관이 있다고 하였다. 위암<sup>26</sup>, 대장암<sup>27,28</sup>에서 질병의 진행이나 림프절 전이와 nm23이 역관계에 있음이 보고되었지만, 뚜렷한 관계를 보여 주지 못하였다는 보고들<sup>29-31</sup>도 많아 이의 역할에 대해서 아직 논란의 여지가 있다. 그러나 근래의 여러 연구에서, 전이를 보이는 대장암에서 nm23H1 gene의 결손 또는 돌연변이등이 보고되어<sup>32-34</sup> nm23이 대장암의 전이에 관여하리라는 것을 강력히 시사하고 있

다. 본 연구에서는 종양의 분화가 나뉠수록 발현율이 감소하여 nm23이 종양의 분화도와 연관이 있는 것으로 나타났으나 nm23과 전이와의 연관성은 증명할 수 없었다.

전이과정에는 이외에도 종양세포와 세포외 기질 또는 다른 세포와의 상호 연관 작용이 필요하고 여기에는 종양 세포 표면 유착 물질이 관여한다. 이러한 유착 물질중에서 Lymphocyte adhesion molecule은 림프구가 내피에 부착해서 혈액 순환계로 들어갈 때 관여하며 이들을 lymphocyte homing receptors (HRs)라 한다. 인간에 있어서 HRs에는 림프절에서 작용하는 L-selectin과 Payer's patch의 점막 내피혈관에 작용하는 integrin, 피부에서 작용하는 CLA(cutaneous lymphocytes antigen), 그리고 림프절, 점막 혈관내피, 활막 혈관내피에 작용하는 CD44 항체가 있다. CD44에는 두가지 형태가 있는데 그 하나는 조혈형으로 크기가 80~90kD이며 조혈 세포와 섬유모세포뿐만 아니라 간엽(間葉) 기원과 신경외배엽 기원의 종양에 광범위하게 분포한다<sup>35</sup>. 또 다른 하나는 상피형으로 크기가 110~160kD이며 상피세포에 국한되어 분포한다<sup>36</sup> CD44는 종양의 성장과 전이에 관여하며 유방암, 악성 림프종, 대장암, 위암등에서 종양의 침습과 전이에 관여한다<sup>37-38</sup>. 여러 연구에 의해 CD44는 최소한 10개 이상의 아형(variant)이 있다는 것이 밝혀졌으며, 아형의 CD44가 종양의 진행에 있어서 각기 다른 단계에 관여하고 있음이 보고되었다<sup>39</sup>. Mudler등<sup>40</sup>은 exon V5는 종양 발생의 비교적 초기 단계에 관여하고 exon V6는 종양이 어느 정도 진행된 단계에서 작용된다고 하였다. Ham등<sup>41</sup>은 CD44 V5와 CD44 V6가 위암에서 발현율이 높으며 CD44 V5는 저분화 위암과 림프절 전이가 있는 경우 특히 발현이 많이 된다고 하였다. 본 연구에서는 아형이 아닌 standard form의 CD44에 대한 염색을 시행하였는데 림프절 전이가 있는 경우에 림프절 전이가 없는 경우보다 발현율이 높았으나 통계학적 유의성은 없었고 원격 전이와도 연관이 없었다. 이외에도 종양의 성장과 팽창 그리고 전이과정에 있어서 맥관 형성이 중요한 역할을 하는데<sup>42</sup>, 종양은 맥관형성(angiogenesis) 유무에 따라 혈관 형성이 없는 초기의 전조혈기(prevascular phase)와 맥관 형성이 있는 조혈기(vascular phase)로 구분할 수 있다<sup>43</sup>. 전조혈기에는 종양의 성장이 느리지만 조혈기에서는 종괴의 성장이 빨라 급격한 팽창을 초래한다. 종양의 맥관형성을 유도하는 종양 연관 angiogenic factor는 세포나 종양에 침윤되어 있는 내인성의

**Table 4.** Comparison with previous results and the present results

	Previous results <sup>10</sup>	Present results
Malignancy	K-ras p53 APC	p53*
Differmtiation	E-cadherin nm23	E-cadherin nm23
Metastasis	CD44 nm23 Tumor Angiogenesis	CD44* Tumor Angiogenesis

\*: Stastically not proved

내피세포, 비만세포, 대식세포등에 의해 분비되며 이미 밝혀진 맥관형성인자로는 Angiotropin, Angiogenin, Transforming growth factor-alpha(TGFa), Tumor necrosis factor-alpha, Basic fibroblast growth factor(bFGF), Platelet-derived endothelial cell growth factor(PD-ECGF), Vascular permeability factor(VPF), Heparin-binding fibroblast growth factors(FGFs) 등이 있다. 맥관 형성 인자들은 돌연변이에 의해 활성화되는 종양유전자와 연관되어 작용하거나, 종양억제유전자의 비활성화에 따른 맥관형성 억제인자의 소실로 인하여 활성화되어 결국 맥관형성을 유발한다고 하였다. 형성된 혈관들은 분절된 기저막을 가지므로 성숙된 혈관보다는 약해서 종양세포들이 쉽게 접근할 수 있고<sup>44</sup>, 신생혈관에서 분비되는 collagenase나 plasminogen activator 같은 분해 효소로 인해 종양세포가 순환계로 들어 가는 것을 촉진시킨다고 하였다. 종양의 맥관형성은 유방암, 폐암, 전립선암, 자궁경부암, 위암, 대장암등에서 불량한 예후와 연관이 있다고 알려져 있다<sup>45-48</sup>. 하지만 이들의 보고와는 다르게 Hoef<sup>49</sup>와, Hall<sup>50</sup>은 맥관형성이 예후나 전이와는 어떠한 상관관계도 없다고 하였다. 본 연구에서는 림프관 침습이 있는 경우에 맥관형성이 많아 불량한 예후와 연관이 있음을 보여 주었고 이는 이전의 대부분의 보고들과 일치하였다.

본 연구 결과를 Tahara<sup>10</sup>이 보고한 대장암의 분자생물학적 진단에 유용한 표지자와 비교해 보면 (Table 4) p53은 종양의 발생과 연관이 있을지라도 침윤암의 진행과 전이와는 상관이 없는 것으로 나

타났고 E-cadherin과 nm23은 종양의 분화도와 연관이 있으며, 맥관 형성은 종양의 전이에 관여하는 인자로 나타났으나, CD44는 기존의 보고와는 달리 전이와 연관이 없는 것으로 나타났다. 결직장암은 여러 가지 요인이 복합적으로 작용하는 다단계적인 과정에 의해 이루어짐을 알 수 있고 최근에는 결직장암에 대한 분자생물학적 연구도 더욱 활발히 이루어지고 있으므로 앞으로 결직장암의 진행과 예후를 예측할 수 있는 인자들이 보다 많이 밝혀지리라 본다.

### 결 론

본 연구는 36예의 결직장암을 대상으로 p53, E-cadherin, nm23, CD44와 Factor VIII 연관항체의 면역조직화학염색을 실시하여 그 발현 양상과 결직장암의 예후 인자들과의 상관성 여부를 알아보고, 이들의 예후적 인자로서의 가치를 비교해 본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) p53은 기존의 예후 인자와 뚜렷한 상관 관계를 보여주지 않았다.
  - 2) E-cadherin은 분화가 좋을수록 발현율이 높아 (P=0.014) 종양의 분화에 E-cadherin이 한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.
  - 3) nm23은 종양의 분화가 좋을수록 발현율이 높았다(P=0.015). 또한 림프질의 전이가 있는 경우에 발현율이 높았지만 통계학적인 유의성은 없어 이미 알려진대로 결직장암에서의 전이억제 역할에 대해서는 상관관계를 찾아 볼 수 없었기 때문에, 결직암에서 전이와 관련된 유전자에 대해서는 더 많은 연구가 필요하리라 본다.
  - 4) CD44는 림프질 전이와 원격 전이와는 연관이 없는 것으로 나타났다.
  - 5) 종양의 맥관형성은 림프관 침습이 있는 경우에 더욱 활발하여(P=0.016) 종양에서의 맥관형성은 종양의 전이에 관여함을 확인할 수 있었다.
- 따라서 결직장암의 발생과 성장, 전이에는 많은 인자가 관여하며 E-cadherin과 nm23 그리고 맥관형성도 예후를 예측할 수 있는 인자로 작용할 수 있는 것으로 나타났다.

### 참 고 문 헌

1. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.

2. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, et al. Reduced nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989; 342: 177-80.
3. Hall J, Friedman L, Guenther C, Lee M, Weber J, Black D, et al. Cloning in breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1235-42.
4. Mackay CR, Maddox JF, Wijffels GL, Mackay IR, Walker ID. Characterization of a 95,000 molecule on sheep leukocytes homologous to murine Pap-1 and human CD44. *Immunology* 1988; 65: 93-9.
5. Stamenkovi I, Martine A, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 1989; 56: 1057-62.
6. Reber S, Matzku S, Gunther U, Ponta H, Herrlich P, Zoller M. Retardation of metastatic tumor growth after immunization with metastasis-specific monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 1990; 46: 919-27.
7. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Semin in Diag Pathol* 1993; 10: 302-13.
8. Rosenthal MA, Ramsay RG. *Diagn Oncol* 1994-1995; 4: 73-9.
9. McKendrick JJ, Xing PX, McKenzie IFC. Tumour Markers in Colon Cancer. *Diagn Oncol* 1994-1995; 4: 97-104.
10. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer(Supplement)* 1995; 75: 1410-7.
11. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-21.
12. Sager R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 1989; 246: 1406-12.
13. Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991; 63: 317-9.
14. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1990; 5: 893-9.
15. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, et al. Expression of immunoreactive E-Cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23.
16. Pignatelli M, Smith MEF, Bodmer WF. Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1990; 61: 636-8.
17. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma E, et al. Decreased E-Cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993; 53: 3241-5.
18. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, et al. Decreased E-Cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostatic cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3929-33.
19. Schipper J, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck: invasive correlation with tumour dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991; 51: 6328-37.
20. Kinsella AR, Green B, Lepts GC, Hill CL, Bowie G, Taylor BA. The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* 1993; 67: 904-9.
21. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Hoguchi M, Shimosata Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissue and carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 2128-33.
22. Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E-and P-Cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2185-92.
23. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51: 445-9.
24. Okabe-Kado J, Kasukabe T, Homma Y, Hayashi M, Henzel WJ, Hozumi M. Identify of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with nm23/nucleoside diphosphate kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 3: 987-94.
25. Yamaguchi A, Urano T, Fushida K, Nishimura G, Yonemura Y, Miyazaki I, Nakagawara G, Shiku H. Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 1993; 68: 1020-4.
26. Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, et al. Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. *Cancer* 1994; 73: 259-65.
27. Haut M, Steeg PS, Willson JKV, Markowitz SD. Induction of nm23 gene expression in human colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer* 1991; 83: 712-6.
28. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. *Virchows Archiv B* 1993; 63: 213-8.

29. Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H, et al. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 533-6.
30. Stephenson TJ, Royds JA, Rens RC, Bleehen SS, Silcocks PB. Nm23(anti-metastatic) gene product expression in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Dermatology* 1993; 187: 95-9.
31. Ayhan A, Yausi W, Yokozaki H, et al. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. *Virchows Arch B[Cell Pathol]* 1993; 63: 213-8.
32. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chao H, Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 717-20.
33. Leone A, McBride OW, Weston A, et al. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2490-3.
34. Cohn KH, Wang F, DeSoto-LaPaix F, et al. Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. *Lancet* 1991; 338: 722-4.
35. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hemopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J* 1991; 10: 343-8.
36. Dougherty GJ, Dougherty ST, Eaves CJ, McBride WH. Expression of human CD44R1 enhances the metastatic capacity of murine fibrosarcoma cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1992; 33: 34.
37. Terpe HJ, Koopmann R, Imhof BA, Gunthert U. Expression of integrins and CD44 isoforms in non-Hodgkin's lymphomas: CD44 variant isoforms are preferentially expressed in high-grade malignant lymphomas. *J Pathol* 1994; 174: 89-100.
38. Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant protein in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53: 4754-6.
39. Rudy W, Hoffman M, Schwartz AR, Zoller M, Heider KH, Ponta H, Herrlich P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res* 1993; 53: 1262-8.
40. Mulder JWR, Wielenga VJM, Polak MM, van den Berg F, Adolf GR, Herrlich P, Pals ST, Offerhaus GJA. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. *Gut* 1995; 36: 76-80.
41. Harn HJ, Ho LI, Chang JY, Wu CW, Jiang SY, Lee HS, Lee WH. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44V in normal and carcinomatous stomach mucosa of chinese subjects. *Cancer* 1995; 75: 1065-71.
42. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer Metastasis and Angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-36.
43. Brem SS, Medina D. Angiogenesis: A marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science* 1977; 19: 880-2.
44. Najy JA, Brown LF, Senger DR, et al. Pathogenesis of tumor stroma generation: A critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochem Biophys Acta* 1989; 948: 305-26.
45. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
46. Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 139: 154-9.
47. Maeda K, Chung YS, Takasuka S, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995; 72: 319-23.
48. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 791-926.
49. Van Hoef MEHM, Knox WF, Dhesi SS, et al. Assessment of tumor vascularity as a prognostic factor in lymph node negative in invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29: 1141-5.
50. Hall NR, Fish DE, Hunt N, et al. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992; 1: 223-9.