

## 대장의 양성 및 악성종양에서 Bcl-2 종양단백의 발현과 p53 종양단백 및 Apoptosis와의 상관성에 관한 연구

고려대학교 의과대학 병리학교실

김애리 · 조성진 · 원남희 · 채양석

### Expression of bcl-2 Protein in Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma and its Relationship with p53 and Apoptosis

Aeree Kim, M.D., Seong Jin Cho, M.D., Nam Hee Won, M.D.  
and Yang Seok Chae, M.D.

Department of Pathology, Korea University College of Medicine

Either increased cellular proliferation or decreased death might result in an expansion of their numbers in the oncogenic process. Cellular apoptosis represents an autonomous suicide pathway that helps to restrict the cell number. However bcl-2 and mutant p53 inhibit programmed cell death. To determine whether the bcl-2 gene is activated during colorectal tumorigenesis and whether it has any relationship with p53 and apoptosis, we studied the expression of bcl-2 and p53 in the normal colonic mucosa, in the adenomatous polyps and in the adenocarcinomas using the immunohistochemical method. Also we evaluated the status of apoptosis using the in situ end labeling method. The bcl-2 immunoreactivity was restricted to the basal epithelial cells of all normal colonic mucosa and they were expressed in all adenomas and 86% of adenocarcinomas, especially in the superficial lesion of some tumors. Mutations of p53 were not found in the normal colonic mucosa, but they were present in dysplastic cells of adenomas (52%) and in cancer cells of the adenocarcinomas (47%). Apoptosis was confined to the tips of the normal colonic mucosa. It was more easily detected in the p53-positive adenomas than in the p53-negative adenomas ( $p=0.010$ ). In the adenocarcinomas, the findings of apoptotic process are not related with p53 mutation ( $p=0.3$ ) and bcl-2 expression ( $p=0.187$ ). p53 and bcl-2 are probably one step of several apoptotic processes in the adenocarcinomas. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 417~426)

**Key Words:** Colon, Carcinogenesis, Apoptosis, bcl-2, p53

접 수: 1996년 12월 9일, 게재승인: 1997년 2월 28일

주 소: 서울시 구로구 구로동 80번지, 우편번호 152-050

고려대학교 구로병원 해부병리과, 김애리

\*본 연구는 95년도 기초의학 진흥기금 보조금지원금으로 이루어졌음.

## 서 론

정상 조직에서는 세포의 증식과 세포의 사망 간에는 수적인 평형이 유지되고 있다<sup>1</sup>. 그러나 어떤 원인에 의하든 세포의 증식력이 증가하거나 세포의 사망이 감소하면 세포의 수가 증가하여 종양을 형성하게 된다. 세포의 증식과 성장을 조절하는 발암 과정에는 세포의 성장과 증식을 조장하는 유전자<sup>2</sup>, 세포의 성장과 증식을 억제시키는 종양억제유전자<sup>3</sup>, 또 새로운 범주의 종양유전자로서 apoptosis를 조절하는 유전자들이 관여한다<sup>1</sup>. 이중 bcl-2 종양 유전자는 정상적인 세포소멸을 억제하는 종양 유전자로서 18번 염색체의 장완에 위치하며, 이것이 전좌에 의해 immunoglobulin heavy chain gene 주위로 근접하여 bcl-2-IGH 융합 유전자가 형성됨으로써 bcl-2 단백질이 활성화되어 여포성림프종 발암과정에 관여한다고 알려져있다<sup>4</sup>. bcl-2 발현 여부는 폐<sup>5</sup>, 전립선<sup>6,7</sup>, 비인두<sup>8</sup>, 유방<sup>9,10,11</sup> 등에서 의미있는 예후 인자로 보고된 바 있다. Lu 등은 bcl-2가 피부, 소화기, 호흡기, 비뇨생식기에서 상피의 기저세포와 자궁의 내막과 근층과 같은 호르몬의 자극을 받는 조직과, 태아의 신장과 연골에서 발현되므로 이 종양 유전자가 세포의 성장과 성숙 및 분화에 중요한 역할을 제시하였다<sup>12</sup>. 따라서 이 유전자의 과발현은 정상적인 세포소멸을 억제하여 세포수명을 연장시키며 이런 비정상적인 수명연장은 종양 발생에 필수적인 여러 가지 유전적 또는 환경적인 영향들을 축적시켜 종양 발생에 기여한다고 생각하고있다<sup>13,14</sup>. 한편 p53의 변이는 인체암 중에 가장 흔히 발견되는 유전자 이상 중의 하나이며<sup>15</sup> 야생형 p53(Wt p53) 유전자는 DNA 손상여부를 확인하여 DNA 손상이 있는 세포를 G<sub>1</sub>기에서 세포순환을 정지시켜 및 DNA 수리를 유도하고 수리가 불가능한 경우에 apoptosis를 일으키지만, 변이형 p53은 apoptosis를 억제하고<sup>16</sup> bcl-2 종양 유전자의 발현과는 그 관계가 상반되어있음이 보고된 바 있다<sup>17</sup>.

저자들은 대장의 정상 점막과 양성 종양 및 악성 종양 세포에서 bcl-2 및 p53 단백질의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰하고 이 발현이 세포의 apoptosis에 미치는 영향이 있는지 알아보고, 또한 대장의 선종에서 암종으로 이행하는 과정에서 bcl-2 종

양단백의 출현이 apoptosis로 유도하여 암종발생에 관여하는지 알아보려고 이 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상 및 재료

1994년부터 1996년까지 고려대학교 구로병원에서 병리 조직학적으로 진단되어 수술한 대장 선암 중 30예와 대장 내시경하 절제술로 진단된 29예의 선종을 실험 대상으로 하고, 정상 대조군으로 선암과 같이 절제된 대장조직을 이용하였다.

p53 단백질에 대한 항체는 mouse monoclonal anti-human antibody(clone DO7, Novocastra Lab)를, bcl-2 단백질에 대한 항체는 mouse monoclonal anti-human antibody(clone 124, Dako)를 사용하였고, apoptosis는 ApopTag in situ apoptosis detection kit(Oncor)를 이용하였다.

### 2. 연구방법

1) **병리조직학적 검색**: 10% 포르말린에 고정시켜 파라핀에 포매된 조직 절편을 통상적인 H & E 염색을 시행하며 광학현미경으로 검색하였다. 선종은 크기에 의해 1cm 미만과 1cm 이상, 2cm 미만으로, 이형성 정도에 따라 low grade와 high grade로 분류하였다<sup>18</sup>.

2) **면역조직화학적 검색**: 포르말린에 고정되어 파라핀에 포매된 조직을 4μm 두께로 절편을 만들어 다음과 같은 염색을 시행하였다.

bcl-2와 p53 염색은 labeled streptavidin biotin(LSAB) 방법을 이용하여 염색을 시행하였다. xylene으로 탈파라핀한 후 100%, 95%, 70% 알코올에 차례로 담귀 함수시켰다. 3% 과산화 수소수로 내인성 peroxidase를 차단하고 증류수로 수세하였다. 항원의 표출을 증가시키기 위하여 pH 6의 citrate 완충액에 담귀 121°C autoclave에서 20 분간 처리한 후 수세하였다. 슬라이드를 Blocking reagent에 5분간 반응시켰다. bcl-2는 1 : 40, p53은 1 : 75로 희석시킨 일차항체를 처리하였고 5°C에서 하룻밤 방치한 후 수세하고 완충액에 넣었다. 음성대조염색은 일차항체대신 nonimmune mouse saline으로 처리하였다. 이차항체로 biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin을 10 분간 반응시켰고 수세한 후, streptavidin peroxidase로 10분간 처리하였다. 수세 후 substrate chromogen solut-

ion으로 처리하여 발색시킨 다음 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

3) **apoptosis:** apoptosis는 TdT가 잘린 DNA의 3'-OH end에 특이하게 결합하는 것을 이용하였다<sup>19</sup>. 박절한 조직을 xylene으로 탈파라핀하고 앞서 설명한 방법으로 함수시켰다. proteinase K(20 μm/ml)를 실온에서 15분간 실온에서 처리한 후 증류수로 수세하였다. 2.0% 과산화수소수를 2 분간 가하였다. phosphate 완충액으로 수세하고 equilibration 완충액을 두 방울씩 떨어뜨린 후 건조를 방지하기 위해 플라스틱 덮개를 덮어 실온에서 15초간 부화시켰다. TdT효소와 반응시킨 후 플라스틱 덮개를 덮어 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 37°C로 데운 stop/wash 완충액에 담귀 매 10분 마다 흔들어 주었다. phosphate 완충액으로 수세하였다. 두 방울의 anti-digoxigenin-peroxidase를 slide에 가한 후 플라스틱 덮개를 덮어 실온에서 30분간 항습조에 방치하였다. phosphate 완충액으로 수세하고 aminoethylcarbazole로 발색시켰다. 증류수로 수세한 후 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

4) **면역 조직화학적 염색과 apoptosis 염색의 판정:** bcl-2는 염색된 세포의 조직학적 분포를 관찰하고 염색 정도에 따라 약양성(1+), 중등도 양성(2+), 강양성(3+)으로 분류하고, p53염색은 확실하게 세포의 핵에 염색된 경우만을 양성으로 판정하였고 염색된 세포의 조직학적 분포를 관찰하고, 염색이 잘 된 다섯 지역을 채택하여 광학현미경 400배에서 양성 염색상을 보이는 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다.

apoptosis는 핵 염색이 뚜렷하게 된 세포들의 조직학적 위치를 관찰하고 in situ labeling한 슬라이드에서 피사가 있는 부분을 제외하고 염색이 잘 된 다섯 지역을 설정하여 광학현미경 400배 배율에서 염색된 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다.

### 3. 통계학적 분석

bcl-2와 p53종양단백의 발현사이의 상관관계와 각 종양단백의 발현정도, apoptosis 발현과 정상대조군, 선종, 선암군 간의 관계를 Chi square test로 분석하였다.

## 결 과

### 1. 병리 조직학적 관찰 소견

선종은 크기가 1 cm 미만인 것이 20예, 1 cm 이상 2 cm 미만인 것은 5예, 2 cm 이상인 것은 4예였고, 이 중 음모성 선종이 6예, 음모성관상선종 1예, 나머지는 관상선종이었다. 또, 이형성 정도에 따라 고등급 이형성을 보이는 것이 8예, 저등급 이형성을 보이는 것이 21예였다. 선암은 조직학적 분화도에 따라 고분화형이 2예, 중등도 분화를 보이는 것이 26예, 저분화형이 2예였으며, 개량 Duke 분류 별로는 A 병기가 1예, B<sub>1</sub> 병기는 3예, B<sub>2</sub> 병기는 2예, C 병기는 18예였다.

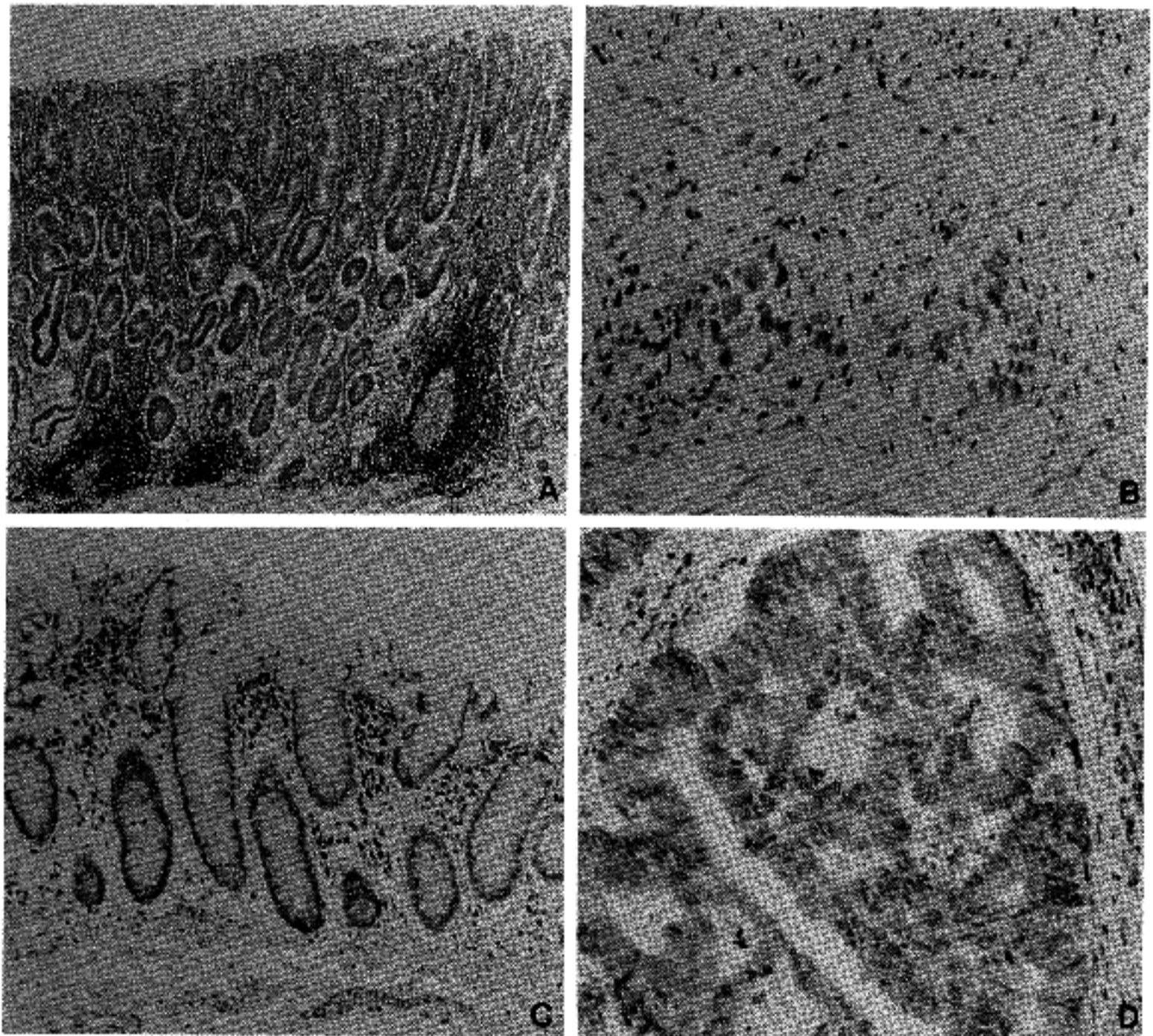
### 2. 면역조직화학적 염색과 apoptosis 염색 소견

1) **bcl-2 단백질 발현:** bcl-2 종양단백은 세포질에 염색된 것을 양성으로 기술하였는데, 각 예마다 림프구의 침윤이 관찰되었고, 이 림프구들은 균질한 염색양상을 보였으며 이것이 좋은 내부 대조염색이 되었다.(Fig. 1) 또 ganglion cell도 양성반응을 보였다 (Fig. 1). 정상 대조군은 전 예에서 소낭선의 기저부에서 발현되며(Fig. 1), 29 예의 선종 모든 예에서 중등도 또는 고도의 발현을 보였고(Table 1), 선암

Table 1. Bcl-2 expression in adenomas, by subtypes, dysplastic grading and sizes

	Negative	1+	2+	3+	Total No* of case
Subtype		3	17	9	29
villous	0	0	5	1	6
tubulovillous	0	1	0	0	1
tubular	0	2	12	8	22
Grade					
low	0	2	12	7	21
high	0	1	5	2	8
Size					
~1 cm	0	2	11	7	20
1~2 cm	0	1	3	1	5
2 cm	0	0	3	1	4

No\*: number



**Fig. 1.** Immunohistochemical staining for bcl-2 in human colonic mucosa and adenocarcinoma.  
**A)** The follicular mantles reveal intense staining but germinal centers reveal negative staining. Tubular adenomas display diffuse bcl-2 immunostaining and more intense reaction at the bottom of crypt.  
**B)** Ganglion cells in the colonic wall show positive staining.  
**C)** In the normal colonic mucosa, the positive staining is confined to the lower crypt and lymphocytes.  
**D)** Malignant colonic glands demonstrate diffuse cytoplasmic immunostaining for bcl-2 protein in the adenocarcinoma cells.

30예중 25예(86%)에서 발현되었으며(Fig.1), Dukes 병기에 따른 발현도의 차이는 없었다(Table 3).

2) p53 단백질 발현: p53 종양단백은 정상 대조군에서는 발현되지 않았으나, 선종의 경우 29예 중 15예(52%)에서 발현되었고, 이중 용모성 선종 6예 중 3예(50%)에서 발현되었으며, 이들은 모두 고도의 이형성을 보였다(Fig. 2)(Table 2). grade에 따라서는 고도의 이형성을 보일수록 p53 종양단백이 발현되는 세포가 많은 경향을 보여 주었으나 통계학적인 의

의는 없었다( $p=0.474$ )(Table 2). 선암은 30예중 14예(47%)에서 발현되었다(Fig. 2)(Table 4).

3) apoptosis 염색소견: apoptosis는 정상대조군 전 예에서 소낭선 침단부에서 관찰되었으며, 선종은 29예의 선종 중 19예에서 양성반응을 보였고, 이중 11예(38%)는 표면부에, 8예(28%)는 선의 위치에 상관 없이 불규칙적으로 세포의 군집에서 apoptosis를 보였다. 10예(34%)는 apoptosis가 관찰되지 않았다. 선암은 전 예에서 불규칙적으로 관찰되었다(Fig. 3).

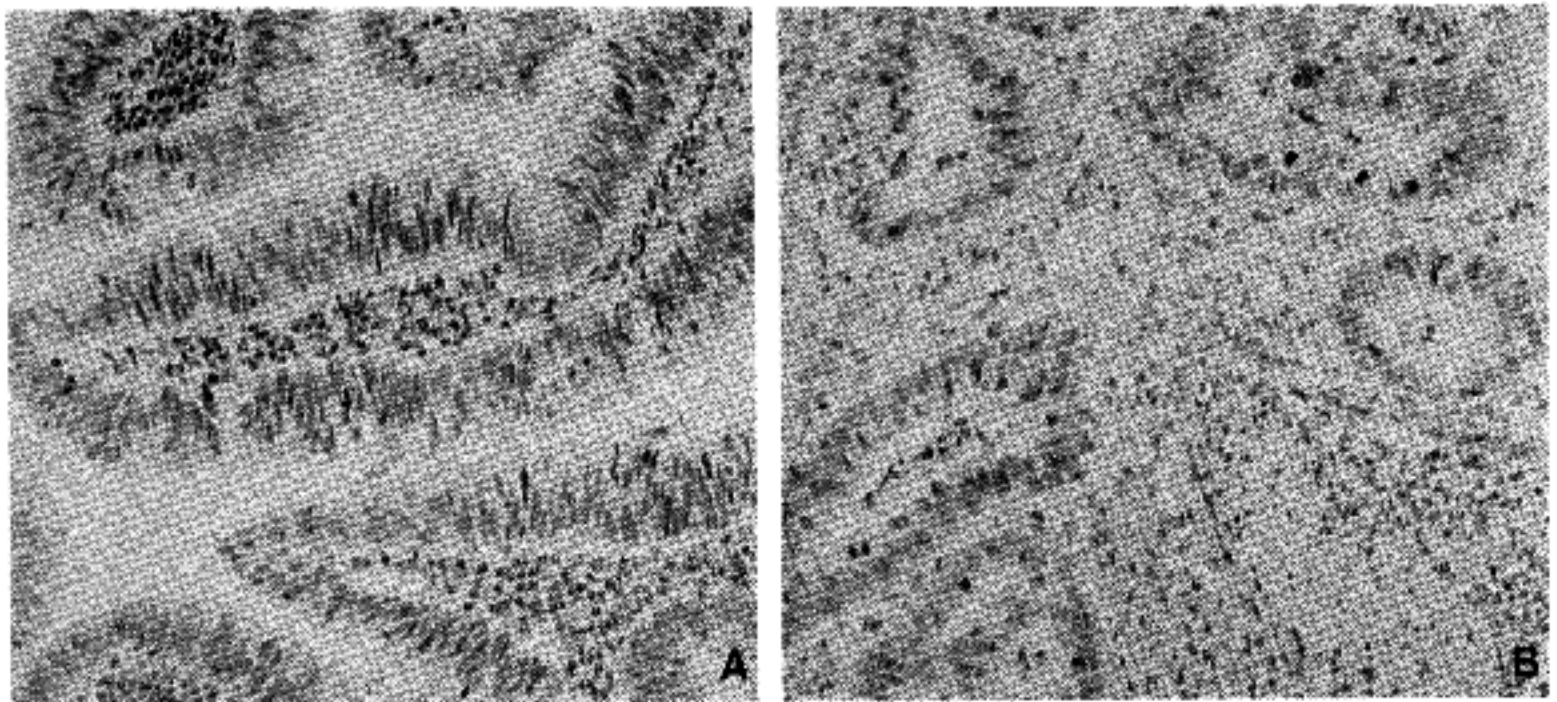


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p53 in the villous adenoma and the adenocarcinoma. p53-positive nuclear staining is in the epithelial cells of a villous adenoma(A) and adenocarcinoma(B).

Table 2. p53 expression in adenomas, by subtypes, dysplastic grading and sizes

	Negative	Positive		Total No of case
		~5%	5%~	
Subtype	14	8	7	29
villous	3	1	2	6
villotubular	0	0	1	1
tubular	11	7	4	22
Grade				
low	11	7	3	21
high	3	1	4	8
Size				
~1 cm	11	6	3	20
1~2 cm	2	2	1	5
2 cm	1	0	3	4

No\*: number

그러나 괴사부위에서 관찰된 것을 제외하면 18예에서 2 내지 23개 세포의 군집으로 관찰되었으며 세포 수는 평균 4.1±5.6이었다. 선암에서 bcl-2종양단백의 발현의 유무는 apoptosis와 관계가 없었으며 (p=0.187)(Table 5), 선종군에서는 p53 단백질발현이 있는 선종에서 apoptosis 나타내는 예가 더 적었으나 (p=0.010), 암에서는 p53 단백질발현과 apoptosis간에

Table 3. Pathologic and clinical parameters and bcl-2 expression in the adenocarcinomas

		Negative	1+	2+	3+	Total
Dukes' stage	A	0	0	0	0	0
	B <sub>1</sub>	1	1	1	0	3
	B <sub>2</sub>	0	0	0	0	0
	C <sub>1</sub>	1	3	4	1	9
	C <sub>2</sub>	3	7	7	1	18
	D	0	0	0	0	0
Grade	well	1	0	1	0	2
	moderate	4	11	8	2	25
	poor	0	0	3	0	3

유의한 관계가 없었다(Table 6).

### 고 찰

bcl-2 종양단백은 24-kd의 단백질로서 apoptosis를 일으키는 조직에서<sup>20</sup> 세포의 핵막, 소포체 및 미토콘드리아의 막에 위치한다<sup>21</sup>. 이 종양단백은 편도선에서는 여포의 맨틀에 있는 림프구에서는 강하게 발현되지만, 여포사이의 림프구에서는 발현이 약하고, 흉선의 피질에서 흉선세포는 발현이 음성인 반면에

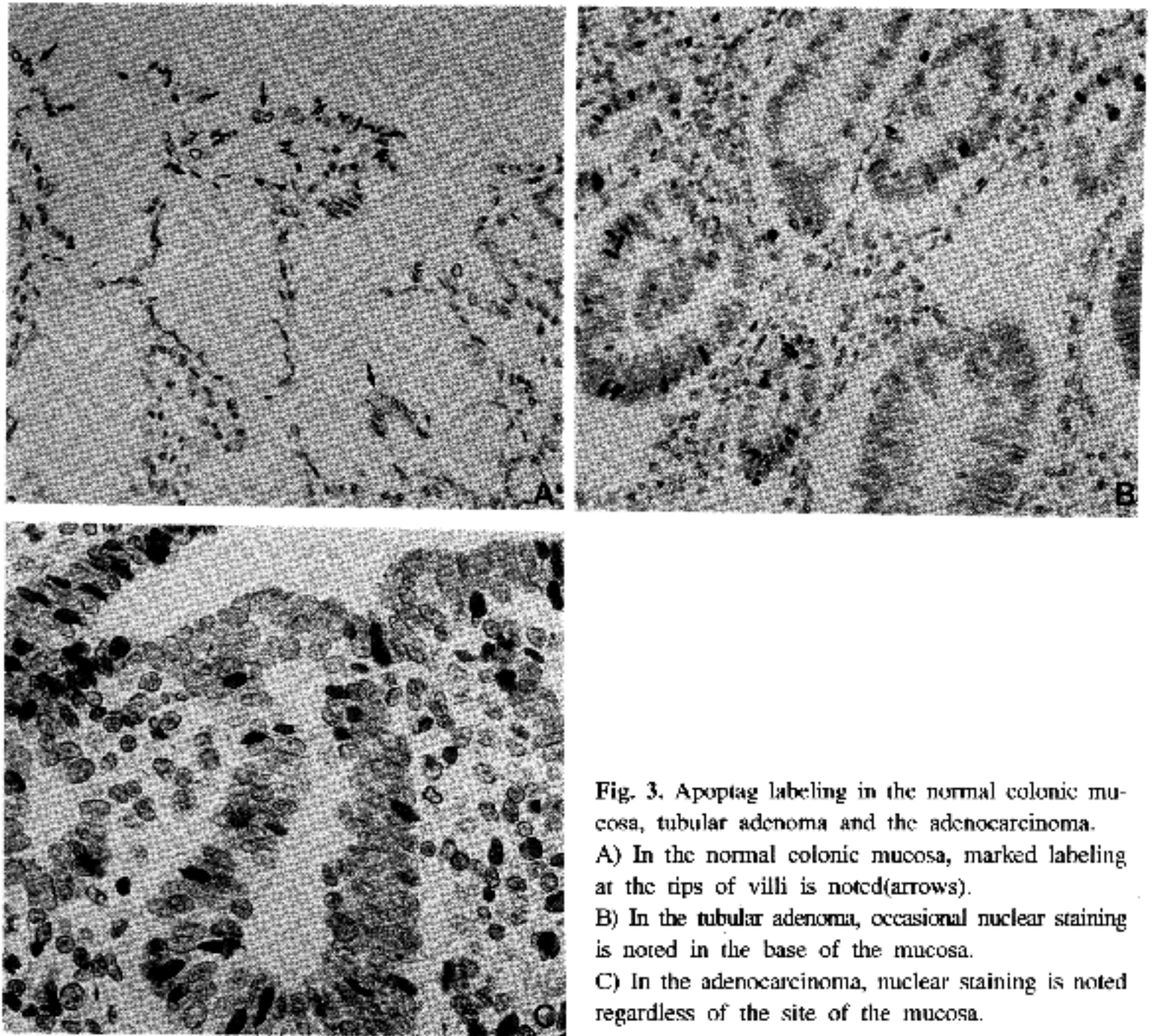


Fig. 3. Apoptag labeling in the normal colonic mucosa, tubular adenoma and the adenocarcinoma.  
 A) In the normal colonic mucosa, marked labeling at the tips of villi is noted (arrows).  
 B) In the tubular adenoma, occasional nuclear staining is noted in the base of the mucosa.  
 C) In the adenocarcinoma, nuclear staining is noted regardless of the site of the mucosa.

Table 4. Pathologic and clinical parameters and p53 expression in the adenocarcinomas

		Negative	Positive	Total
Dukes' stage	A	0	0	0
	B <sub>1</sub>	0	3	3
	B <sub>2</sub>	0	0	0
	C <sub>1</sub>	7	2	9
	C <sub>2</sub>	9	9	18
	D	0	0	0
	well	0	2	2
Grade	moderate	14	11	25
	poor	2	1	3

Table 5. Correlation between the expression of bcl-2 and apoptosis in the adenomas and the adenocarcinoma

	Apoptosis bcl-2	Negative	Positive	Total	p value
		Adenoma	0	0	
1+	2	1	3		
2+	12	5	17		
3+	7	2	9		
	Total	21	8	29	
Adeno-carcinoma	-	3	2	5	0.187
	1+	3	8	11	
	2+	4	8	12	
	3+	2	0	2	
	Total	12	18	30	

**Table 6.** Correlation between the expression of p53 & apoptosis in the adenomas and the adenocarcinoma

p53	Apoptosis		Total	p value
	Negative	Positive		
Adenoma	-	12	2	0.010
	+	9	6	
	total	21	8	
Adeno-carcinoma	-	5	11	0.3
	+	7	7	
	total	12	18	

수질의 용선세포들은 강양성이다. 또한 골수조직에서는 미분화된 조혈세포에서는 발현이 강하지만 성숙한 조혈세포들은 이 종양단백이 발현되지 않는다<sup>20</sup>. 이 종양단백은 발암과정에서 세포의 증식을 활성화 시키기보다는 세포의 수명을 연장시키고 apoptosis를 억제함으로써 종양발생에 관여한다. bcl-2의 과발현은 염색체의 전좌 즉 t(14;18)(q32;q21)에 의한다고 알려져있었으나, 이것 외에 호르몬등 여러 인자들의 상호 작용에 의하여 bcl-2의 과발현이 일어난다고 한다<sup>22</sup>. 거세된 쥐에서 안드로젠 분비가 소실되면 전립선의 기저세포는 bcl-2를 발현하며, apoptosis가 억제되는 것이 보고된 바있다<sup>24</sup>. 저자들의 연구에서도 bcl-2 종양단백은 대장의 소낭선의 기저부에서 가장 강하게 발현되었고 표면부로 갈수록 발현되지 않는 양상을 보였다. 따라서 대장상피세포의 분화과정에서 bcl-2 종양단백의 발현의 소실은 정상적인 현상임을 알 수 있었다. 또 점막 고유층의 여포에서 맨들의 림프구에서도 bcl-2가 발현되었고 대장벽에 있는 신경절 세포에도 발현되어 세포의 수명이 긴 영구세포들에서도 정상적으로 발현되는 것을 알 수 있었다. 발암과정에서 bcl-2 종양단백이 관여되는지를 알아보고 그 시기는 언제인지를 추정키 위하여 저자들은 발암과정의 단계가 비교적 잘 제시되어 있는 대장의 선종과 선암을 선택하였다. Fearon과 Vogelstein등은 정상으로 시작하여 양성 종양인 선종성 용종에서 수년에 걸쳐 악성으로 이행한다는 다단계발암기전을 보고하고 일련의 유전적 변이들에 의해 protooncogene의 활성화와 종양억제유전자의 소실 및 돌연변이로 정상적인 세포의 성장조절기구 및 세포주기가 파괴되어 세포는 지속적인 성장과 증식

을 초래하여 악성종양이 유발된다고 하였다<sup>25</sup>. 선종에서는 bcl-2 종양단백이 정도의 차이는 있으나 전예에서 발현되었으며 크기가 2 cm 이상인 4예 전예에서 중등도 이상의 발현을 보였고, 용모성 선종 7예중 6예에서도 중등도 이상의 발현을 보였다. 발현양상은 표면에 가까운 층까지도 bcl-2 종양단백의 발현이 관찰되었으나 극성은 유지되었다. Bronner등은 bcl-2의 발현은 위선종에서는 92%, 대장선암에서는 67%가 과발현되었다고 보고하였고<sup>26</sup>, 대장의 선종에서는 모든 예에서 과발현됨을 보고하여 저자들의 결과와 일치하였다. 따라서 발암과정의 초기단계에서 bcl-2 종양단백은 과발현되어 발암과정동안 지속되며, 이 발현은 세포의 수명을 연장시켜 여러 종류의 새로운 유전자 변이를 축적케하여 종양을 형성하는 전제조건을 만드는 것으로 추정된다. Bosari등은 대장과 직장의 선암에서는 bcl-2의 발현율이 50%라고 보고하여<sup>27</sup>, 이것은 Bronner 등과 저자들의 결과인 83%보다 낮다. 이처럼 bcl-2 종양단백의 발현이 정도의 차이는 있으나 정상 대장선과 양성종양에서 전 예에서 발현되다가 악성종양에서 발현이 다양해지는 것은 bcl-2 종양단백의 발현이 종양의 진행에는 중요한 역할을 하지않는다는 것을 시사한다. 대장암에서 bcl-2 종양단백의 발현과 예후와의 관계는 아직 알려진 바 없다. 그러나 유방암에서는 bcl-2 종양단백의 발현이 에스트로젠과 프로제스테론 수용체의 발현과 관계가 있고, p53의 변이, EGFR의 발현 및 Ki67와의 반응성과는 상반되는 관계를 보인다는 보고<sup>10,11,28</sup>가 신경모세포종에서는 좋지않은 예후를 보이는 조직형과 N-myc의 증폭과 bcl-2 발현이 관계가 있어서<sup>29</sup> 종양의 종류에 따라 bcl-2 발현이 갖는 의미는 다를 것으로 생각한다. 또한 대장암에서도 예후와의 관계를 추정키 어렵다.

한편 p53은 종양억제 유전자로서 대장암에서도 흔히 소실 및 돌연변이를 일으킨다. 야생형의 p53 단백질은 반감기가 약 20분 정도이므로 정상 세포에는 p53단백이 아주 적은 양으로 존재한다. 그러나 p53 유전자의 변이가 일어난 세포에서는 p53단백의 구조에 변화가 생겨 반감기가 수시간이 되며 많은 양의 p53 단백질이 세포내 존재한다. 그러므로 여러 연구에서 면역조직화학적 방법으로 변이형의 p53 유전자에 의하여 생기는 p53단백을 검출하여, 돌연변이형의 p53 유전자와 악성종양과의 연관성을 밝

히려는 노력이 계속되어왔다. 대장 선종에서는 p53의 변이가 거의 일어나지 않으므로 대장암의 발생에는 후기에 작용한다고 생각된다<sup>25</sup>. 그러나 저자들의 결과는 선종의 52%(15예)에서 발현되었고, 이 중 5% 이상의 세포에서 발현된 예는 7예였는데 음모성 선종이 3예, 관상 선종이 4예였고, 관상 선종 중 1예는 고도의 이형성을 보인 예였다. 따라서 선종에서 p53이 발현된 세포들은 부분적 악성화가 일어났다고 보는 것이 타당하다. 한가지 의문점은 Fearon과 Vogelstein의 다단계발암기전<sup>25</sup>을 고려한다면 p53 유전자 소실이나 돌연변이 이전의 여러 가지 종양 유전자의 돌연변이가 정상적인 p53 종양억제유전자의 감시기능을 어떻게 벗어났는가 하는 것이다. 이것은 정상세포의 apoptosis를 억제하는 변이형 p53과는 별개의 유전자가 존재할 것이라는 추측과 Vogelstein의 발암기전과는 다른 기전에 의해 선암이 되는 것이 있을 것이라는 것이다. 저자들의 연구에서 선암에서는 47%에서 발현되었는데 이것은 다른 연구와 비슷한 결과이다. 유방암에서는 bcl-2와 p53 단백질의 면역조직화학 염색의 결과가 상반되는 관계를 보이고<sup>17</sup> 배양된 유방암 세포에서 돌연변이형의 p53이 bcl-2 종양단백의 발현을 억제한다는<sup>30</sup> 보고가 있으나 저자들의 경우 이들 두 종양단백 간의 유의한 연관관계는 찾을 수 없었다.

Apoptosis는 생리적인 세포의 자살로서 끊임없이 재생이 일어나는 조직의 용적에서 평형을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 야생형 p53은 DNA손상 여부를 확인하여 세포의 G<sub>1</sub>기에서 핵산의 합성기로의 진입여부를 판정하는 것으로 생각된다. p53은 DNA손상을 입은 세포를 G<sub>1</sub> arrest 및 DNA 수리로 유도하고 수리가 불가능한 경우에는 bax를 유도하여 apoptosis를 초래한다. 따라서 apoptosis를 억제하는 bcl-2와 p53은 apoptosis와 밀접한 관계가 있다고 하겠다. 저자들이 관찰한 바로는 apoptosis는 정상 대장 점막에서는 소낭선의 침단부에서 관찰되었고, 선종 중 11예에서 정상과 비슷하게 소낭선의 침단부에서 관찰되었으며, 선의 위치와 상관없이 관찰된 8예중 4예는 음모성 선종이었고, 이중 4예는 5% 이상의 세포에서 p53 단백질의 발현을 보였다. 선암에서는 전예에서 관찰되었으나 괴사된 부위를 제외한다면 18예에서 관찰되었으며 악성종양에서는 apoptosis가 나타나는 세포는 선종과 다르게 규칙적 극성이 소실되

었고 그 빈도는 다양하였다. Lipponen 등은 유방암에서 apoptosis와 조직학적 소견을 비교하였는데 apoptosis는 종양의 괴사가 있는 부분에 많고, 세포분열이 많거나, 간질에 림프구의 침윤이 많거나, 종양의 분화도가 나쁜 예, 비배수성 종양, 합성기 분획이 높은 예에서 그 출현이 많으며 스테로이드 수용체가 없는 예, p53 종양 억제 유전자의 발현된 예, 또한 형태 계측학적으로 핵의 분화도가 낮은 종양이 이와 밀접한 관계가 있다고 보고하였다<sup>31</sup>. apoptosis와 다른 종양단백과의 관계를 살펴보면 c-myc에 의해 조장된 apoptosis는 bcl-2에 의해 억제된다고한다<sup>32</sup>. 본 연구에서 apoptosis는 bcl-2 종양단백의 발현과는 특별한 연관이 없었으나, bcl-2 종양단백이 발현되는 부위와 apoptosis를 나타내는 세포들의 위치가 상반되어 있었다. 그러나 유방암에서 면역조직화학적 염색을 이용한 연구에서 bcl-2 종양단백의 과발현이 있는 예들이 예후가 좋았다는 보고<sup>10,11,28</sup>를 보면 변이형의 p53 유전자나 bcl-2의 과발현은 apoptosis를 조절하는 여러 가지 경로 중 한 가지에 불과한 것으로 생각된다. 실제로 MyD118의 초기 발현이 저지되었을 때나 myb의 조절 장애가 apoptosis를 억제시켰다는 보고<sup>33</sup>와 활성화된 ras에 의해 억제된다는 보고<sup>34</sup>는 단순히 p53과 bcl-2 유전자의 발현만으로 apoptosis를 예측할 수 없다는 것을 뒷받침하고 있다. 또한 apoptosis는 세포의 분화, 성장, 증식, 면역기능과 같은 일련의 생물학적인 과정 뿐만 아니라 물리적 혹은 화학적인 물질에 의한 세포 손상과도 깊은 관계가 있다. 즉 암의 발생 초기과정에서 억제된 apoptosis의 의미와 악성종양이 발생하여 monoclonal에서 여러 subclone을 형성한 이후의 apoptosis는 암의 생태에서 그 역할이 다르리라 생각된다. 최근 bcl-2 뿐 아니라 몇가지 bcl-2 관련 유전자 즉 bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1등이 apoptosis를 억제하고 bax, bcl-X<sub>S</sub>, bag, bad 등이 apoptosis를 활성화시킨다는 연구가 발표되었고<sup>35</sup>, 돌연변이, 전좌, 삼입등과 같은 유전적인 변화가 apoptosis 억제유전자를 활성화 시키거나 apoptosis 유발 유전자를 억제시키며 이 과정이 대부분의 종양의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각하여 이에 관한 연구가 요망된다.

## 결 론

본 연구는 대장에서 발생한 선종 29예와 외과적



으로 절제된 대장 선암종 30예의 종양조직을 대상으로 면역조직화학적염색을 이용하여 bcl-2와 p53 종양단백의 발현을 관찰하고, ApopTag in situ apoptosis detection kit를 이용하여 종양세포의 apoptosis를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

bcl-2 단백질은 정상 대조군에서 소낭선 기저부에서 양성으로 발현되었고, 선종에서는 전 예에서 다양한 정도로 양성 발현을 보였고, 선암은 83%의 발현율을 보였으며 발현부위는 다양하였다. 따라서 bcl-2 종양단백의 발현은 종양의 진행에는 중요한 역할을 하지않는 것을 시사한다.

p53 종양단백은 관상 선종 22예 중 11예에서, 용모성과 관상의 혼합형 선종 1예중 1예, 용모성 선종 6예 중 3예에서 양성반응을 보였다. 양성종양에서 p53 단백질의 발현은 선종에서도 이 세포가 악성화로 진행할 가능성을 나타내는 것이다. bcl-2 단백질발현과 p53 단백질발현은 apoptosis와 특이한 상관관계가 없어 apoptosis의 조절은 p53 이외의 다른 기전들이 관여할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiated a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
2. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-11.
3. Sager R. Tumor suppressor genes: The puzzle and the promise. *Science* 1989; 246: 1406-1412.
4. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5214-8.
5. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC and Mason DY. bcl-2 Protein in non-small cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-4.
6. Colombel M, Symmans F, Gil S. et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein Bcl-2 in hormone refractory human prostatic cancers. *Am J Pathol* 1993; 143: 390-400.
7. McDonnell TJ, Toroncoso P, Brisbay SM, et al. Expression of the emergence of androgen-independent prostatic cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6940-4.
8. Lu QL, Elia G, Lucas S, thomas JA. Bcl-2 protoonco-gene expression in Epstein-Barr- virus associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 53: 29-35.
9. Bhargava V, Kell DL, Rijn M, Warnke RA. Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994; 145: 535-40
10. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinico-pathologic correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Vir Arch* 1994; 424: 47-51.
11. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal and breast carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor -negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-9.
12. Lu QL, Poulson R, Wong L, Hanby A. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169: 431-7.
13. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-8.
14. Clark WH. Tumor progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 631-44.
15. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumor suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-16.
16. Lotem J, Sachs L. Regulation by bcl-2, c-myc and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-component and-defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ* 1993; 3: 41-7.
17. Silvestri R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Rilke F, Veronesi U. The bcl-2 protein: prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer proteins. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.
18. Gabbert H, Hohn P. Grades of atypia in tubular and villous adenomas of human colon. An electron microscopic study. *Virch Arch B Cell Pathol* 1980; 33: 1-15
19. Gavrieli Y, Sermal Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
20. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-65.

21. Krajewski S, Tanaka S, Takayama M, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1993; 53: 4701-14.
  22. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Dulford KAF, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14; 18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-32.
  23. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, Mckearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hematopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144: 3602-10.
  24. English HF, Kyprianou N, Isaacs JT. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* 1989; 15: 233-50.
  25. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-67.
  26. Bronner MP, Culin C, Reed JC, Furth EE. The bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am J Pathol* 1995; 146: 20-6.
  27. Bosaru S, Moneghini L, Graziani D, Lee AKC, Murray JJ, Coggi G, Viale G. bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 534-40.
  28. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long term survival in breast cancer. *Am J Pathol* 1994; 145: 1191-8.
  29. Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, et al. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* 1994; 143: 1543-50.
  30. Haldar S, Negrini M, Monna M, Sabbioni S, Croce C. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 3131-5.
  31. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V-M, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30: 2068-73.
  32. Bissonette RP, Echeerri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-4.
  33. Smarda J, Lipsick JS. c-myc prevents TPA-induced differentiation and cell death in v-Myb transformed monoblasts. *Oncogene* 1994; 9: 237-45.
  34. Arends MJ, McGregor AH, Toft NJ. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by c-myc and mutated Ha-ras oncogenes and is associated with endonuclease availability. *Br J Cancer* 1993; 68: 1127-33.
  35. Gauthier ER, Piche Lyson, Lemieux G, Lemieux R. Role of bcl-X<sub>L</sub> in the control of apoptosis in murine myeloma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 1451-56.
-