

대장의 용종성 암종과 침윤성 암종에서 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질의 면역조직화학적 발현에 관한 비교연구

고려대학교 의과대학 병리학교실, ¹강북삼성병원 일반외과

문정석 · 박성환 · 신봉경 · 이주한 · 신준호¹ · 염범우

A Comparative Study of Immunohistochemical Expression of p53, bcl-2, c-erbB-2, and MIB-1 in Polypoid and Infiltrative Colorectal Carcinomas

Jeong Seok Moon, Seong Hwan Park, Bong Kyong Shin, Ju Han Lee, Joon Ho Shin¹, and Bom Woo Yeom

Department of Pathology, Korea University College of Medicine, Seoul 152-050, Korea

¹Department of General Surgery, Kangbuk Samsung Hospital, Seoul, Korea

Almost all colorectal carcinomas have been thought to develop from pre-existing adenomas. However, some colorectal carcinomas can arise directly from normal flat mucosa, and usually form infiltrative mass at the early stage. The carcinogenesis of this infiltrative carcinoma may be different from the well-known adenoma-carcinoma sequence, which usually forms a polypoid mass. The purpose of this study is to investigate the different expression of various oncogenes in polypoid carcinoma and infiltrative carcinoma. We performed immunohistochemical staining on p53, bcl-2, c-erbB-2 and MIB-1 in 29 polypoid carcinomas arised from adenomas, and 21 infiltrative carcinomas. The average tumor size of infiltrative carcinomas (5.5 cm) was larger than that of polypoid carcinomas (3.1 cm), and the polypoid carcinomas were differentiated more than the infiltrative carcinomas. The results of p53, bcl-2, c-erbB-2, and MIB-1 antisera immunoreactivity in the polypoid carcinoma were 79%, 17%, 21%, and 100%, and those in the infiltrative carcinoma were 71%, 29%, 29%, and 100%, respectively. However the diffuse positivities of p53 and MIB-1 antisera were slightly higher in the infiltraive carcinomas (62%, 76%) than in the polypoid carcinomas (55%, 41%) (p=0.63, 0.01). And the results of p53 and c-erbB-2 immunoreactivity in the adenomas were 52% and 17%, respectively, which is significantly lower than that in the polypoid carcinoma(p=0.03, 0.74). The immunoreactivity of bcl-2 in the adenoma was 72%, which was significantly higher than that in the polypoid carcinoma (17%) (p<0.01). In summary, we did not show the significant difference in expression of p53, bcl-2, c-erbB-2, and MIB-1 proteins between polypoid and infiltrative carcinomas. However, the tendency of infiltrative carcinomas having a more aggressive nature suggests another carcinogenetic mechanism is involved in the colorectal carcinogenesis. (**Korean J Pathol 1998; 32: 581~589**)

Key Words: Colorectal carcinoma, p53, bcl-2, c-erbB-2, MIB-1

서 론

대장암은 1993년도 기준 한국인 10대 암종에서 남자

는 7.2%, 여자는 7.7%로 남녀 모두 4위를 기록하였고 단백질과 육류섭취가 많은 서구적인 식습관으로 인해 최근들어 점차 증가추세에 있다.¹ 대장암은 대부분 용종에서 기원하고 증상이 비교적 빨리 나타나기 때문에 대장경을 통해 조기에 발견할 수 있고 조기 수술로 완치가 가능한 암 중의 하나이다.

대장암의 발생기전은 크게 두 가지로 제안되고 있는데, 첫째는 선종에서 악성변성을 통해 암종으로 전환하

접 수: 1998년 3월 17일, 게재승인: 1998년 6월 30일
주 소: 서울시 구로구 구로동 80번지, 우편번호 152-050
고려대학교 의과대학 병리학교실, 문정석
ISSN : 0379-1149

여 육안상 장관내로 돌출하는 종괴를 형성하는 경우이고, 둘째는 선종과는 무관하게 정상 점막에서 원발성으로 암이 발생하여 육안상 함몰 내지는 편평한 모양을 보이는 경우이다.² 첫 번째 기전이 소위 "선종-암종 연쇄 (adenoma-carcinoma sequence)"³라고 하는데 암종의 형성과정에서 여러 유전자, 즉 ras, p53, DCC (deleted in colon carcinoma), APC (adenomatous polyposis coli) 등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실이 전암단계에서부터 각 시기마다 작용하여 다단계적인 과정을 거쳐 암종이 발생한다는 것이다.⁴

이와 달리 1961년 Spratt 등이 선종을 동반하지 않은 함몰된 대장암을 보고한⁵ 이래 조직학적으로 선종을 거치지 않고 정상점막에서 직접 암종으로 전환하는 대장암이 보고되고 있다. 이 종류의 대장암은 용종형의 암종과 달리 조기에 침윤성 성장을 하며^{6,7} 분자생물학적으로 다단계적인 유전자 변이를 거치지 않거나 또는 다른 종류의 종양 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다.⁸

물론 모든 대장암이 두 가지 기전만으로 발생하는 것은 아니다. 드물기는 하지만 췌양성 대장염, Crohn 병, juvenile polyposis, Peutz-Jeghers syndrome 등의 염증성 또는 비선종성 양성 종양에서도 다른 기전에 의해 악성 변화가 올 수 있다.^{9,10}

대장암의 발암기전에 관여하는 유전자로는 p53, bcl-2, c-erbB-2, ras 등이 알려져 있다.¹¹

p53 유전자 변이는 인체의 거의 모든 장기의 암에서 발견되고 장기에 따라 암의 전구단계 또는 진행단계에 발생하는 것으로 알려져 있다.¹² p53 유전자 변이는 대장암에서 일반적으로 선종-암종 연쇄에서 후기단계인 선종의 악성변성에 관여한다고 보고 있으나 진행단계에도 관여하여 대장암의 전이와 예후에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다.^{12,13} p53 단백질은 핵과 세포질에 축적될 수 있으나 세포질에 축적되는 것은 p53 유전자 변이와 무관하다.¹⁴ bcl-2 유전자는 세포자연사(apoptosis)로부터 세포를 구하여 세포수명을 연장시키는 역할을 하며, 대장암에서는 초기 발암기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ bcl-2 단백질은 자연사되는 세포의 핵막, 소포체 및 미토콘드리아의 막에 위치한다. c-erbB-2 유전자는 protein kinase를 활성화시키는 암유전자의 하나로 epidermal growth factor receptor (EGFR)와 구조적으로 유사한 transmembrane receptor^{11,16}이며 유방암종, 위암종 및 난소암종 등의 선암에서 변이가 증명되었다. c-erbB-2 단백질에 대한 양성반응은 주로 세포막에 국한되어 과립상으로 나타나고 일부 암세포에서는 세포막 뿐만 아니라 세포질내에서도 양성반응을 보인다. c-erbB-2는 주로 선암에서 나타나며 대장암에서도 약 4~7%가 관찰된다고 보고되어 있다.^{17,18}

이와함께 악성종양의 특징인 왕성한 세포분열을 반영하는 세포증식능이 Ki-67을 이용함으로써 확인될 수 있다. MIB-1은 G₀기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵

에 존재하는 Ki-67 단백을 인지하는 항체로서 종양의 세포증식능을 반영하는 표지자이다.¹⁹ MIB-1을 이용한 목적은 세포증식능에 있어서 용종성암과 침윤성암의 차이가 있는지, 종양의 병기나 분화도와 어떤 관계가 있는지, 그리고 세포증식 표지자와 다른 종양단백이 연관이 있는지를 확인하고자 하였다.

따라서 저자는 파라핀에 포매된 조직을 이용하여 선종에서 기시한 용종성암과 선종이 없이 발생한 침윤성암을 대상으로 p53, bcl-2 및 c-erbB-2 단백질과 세포증식 표지자인 MIB-1을 이용하여 양자간의 발현양상을 서로 비교분석하고 분자적인 발암기전을 파악하고자 하였다. 한편 대장암에서 예후와 관련되어 있다고 알려진 임상적인 예후인자들과 각각의 단백질이 관계가 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1992년부터 1997년까지 고려대학교 안암병원 및 구로병원에서 결직장 절제술과 대장경적 절제술을 통하여 얻어진 결직장 암 조직을 재검토하여 선종의 악성변성에 의한 용종성 암 전례와 이에 대별되는 선종이 없는 침윤성 암 중 무작위적으로 얻은 것들을 대상으로 하여 암종과 주변의 선종 또는 정상점막 부위를 포함하는 파라핀 블록을 실험재료로 하였다. 대상 암종은 선종을 동반한 용종성 암 29예 전부와 선종을 동반하지 않은 침윤성 암 21예로 하였고 전자는 결직장 절제술 20예와 대장경적 절제술 9예, 후자는 결직장 절제술 21예였다.

2. 임상소견 및 병리조직학적 검색

대장암은 10% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거쳐 통상적인 방법으로 H&E 염색을 시행한 슬라이드를 재검색하여 WHO 분류에 의거 대장암을 고분화, 중등도 분화 및 저분화성 선암종과 점액암종으로 분류하였다. 환자의 임상기록과 병리 보고서들을 재검토하여 나이, 성별, 위치, 종양의 크기를 확인하였고 침습 깊이와 림프절 전이 및 원격 전이 유무에 따라 변형된 Dukes 병기법, 즉 Astler-Coller 병기법에 의거하여 A, B1, B2, C1, C2, D 군으로 나누었다. 용종성 암종은 내시경 검사상 내강내로 용종형으로 돌출하고 병리학적 검사상 중첩된 핵으로 구성된 선들의 증식이 있는 선종에서 기원하면서 주위 조직으로 침윤하는 경우로 하였다. 침윤성 암종은 내시경 검사상 편평하거나 함몰된 모양을 보이고 병리학적으로 주위에 선종이 없이 침윤하는 경우로 하였다.

3. 면역조직화학적 염색

10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직을 4 μm 두께의 연속절편을 만들어 xylene으로 5분간

2회 탈파라핀하고 100%, 95%, 75% 에탄올로 처리한 후 증류수로 함수시킨 다음 p53, bcl-2, c-erbB-2, MIB-1 단백질에 대하여 labelled streptavidin biotin (LSAB) 방법을 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

1) p53, bcl-2 및 MIB-1 단백질에 대한 염색: 파라핀에 포매한 조직을 탈파라핀한 후 함수시킨 절편을 autoclave를 이용하여 121°C의 끓는 citrate buffer (pH 6.0)에 15분간 처리한 후 3% 과산화수소로 내인성 과산화 효소의 작용을 억제시킨다. TBS로 5분씩 3회 수세 후 정상혈청으로 비특이적인 반응을 억제시켰다. 각각 1 : 100, 1 : 50, 1 : 100으로 희석한 p53 (Zymed, USA), bcl-2 (DAKO, Denmark), MIB-1 (Zymed, USA)에 대한 생쥐 단클론성 항체를 가한 다음 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 뒤 TBS로 수세하고 biotin과 결합된 생쥐 이차항체에 5분씩 3회 반응시켰다. TBS에 수세하고 streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 15분간 반응시킨 후 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

2) c-erbB-2에 대한 염색: 탈파라핀한 후 함수시킨 절편을 3% 과산화수소로 내인성 과산화 효소의 작용을 억제시킨다. TBS로 5분씩 3회 수세 후 정상혈청으로 비특이적인 반응을 억제시켰다. 1 : 50으로 희석한 bcl-2 (Zymed, USA)에 대한 생쥐 단클론성 항체를 가한 다음 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 뒤 TBS로 수세하고 biotin과 결합된 생쥐 이차항체에 5분씩 3회 반응시켰다. TBS에 수세하고 streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 15분간 반응시킨 후 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

4. 면역조직화학적 염색의 양성 판정 및 평가

p53 단백질의 경우는 핵에 갈색의 과립상으로 염색되는 세포를 양성으로 판정하였고, bcl-2 단백질은 세포질에서 갈색으로 염색되는 세포를 양성으로 판정하였다. 또한 MIB-1의 경우는 핵에 갈색의 과립상이 보이는 세포를 양성으로 판정하였다. p53, bcl-2 및 MIB-1에 대한 면역조직화학적 염색의 결과 평가는 5 단계로 분류하였는데, 양성인 세포가 전혀 없는 경우 (0), 1% 미만인 경우 (trace), 1% 이상 25% 미만인 경우 (1+), 25% 이상 50% 미만인 경우 (2+), 50% 이상 75% 미만인 경우 (3+), 75% 이상인 경우 (4+)로 분류하였다. 양성판정 기준은 1+이상인 것으로 하였다.

c-erbB-2 단백질의 경우는 세포막을 따라 갈색의 과립상을 보이는 것을 양성으로 판정하였다. 염색결과에 대한 판정은 3 단계로 분류하였는데, 양성인 세포가 전혀 없는 경우 (0), 국소적인 경우 (<25%) (1+), 미만성인 경우 (>25%) (2+)로 분류하였다.

5. 통계학적 분석

각 군의 변수를 chi-square test로 분석하고 p 값이

0.05 이하인 경우를 의미있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 임상적 소견에 따른 용종성 암과 침윤성 암의 비교 (Table 1)

나이와 성에 따른 두 암종의 차이는 없었다. 용종성 암은 평균 나이가 55세이었고 침윤성 암의 61세이었다. 또한 남녀비에 있어서는 용종성 암이 1대 0.93, 침윤성 암이 1대 0.62으로 침윤성 암이 남자에 많았다. 종양의 위치는 두 암종 모두 S자 결장 및 직장에 많아 용종성 암종의 72%, 침윤성 암종의 67%가 위치하고 있었다. 종양의 크기는 용종성 암종이 3.1 cm, 침윤성 암종이 5.5 cm로 전체적으로 침윤성 암종이 좀더 컸다. Astler-Coller 병기에 따라 비교해 보면 조기 병기인 A군과 B1군에서 용종성 암이 더 많았다. 그리고 이 때 종양의 크기는 침윤성 암종이 5.9 cm인데 비해 용종성 암종은 2.5 cm으로 크기가 더 작았다. 같은 병기에서 암종의 분화도는 용종성 암종이 침윤성 암종에 비해 좋은 분화도를

Table 1. Clinical findings of 29 polypoid carcinomas and 21 infiltrative carcinomas

	Polypoid ca(%)	Infiltrative ca(%)	p value
Mean age (years)	54.5	60.5	NS
Sex (male:female)	1 : 0.93	1 : 0.62	NS
Location			
Ascending	4 (14)	7 (33)	NS
Descending	0	0	
Transverse	4 (14)	0	
Rectosigmoid	21 (72)	14 (67)	
Tumor size			
< 3 cm	13 (45)	3 (14)	NS
3~5 cm	12 (41)	11 (52)	
> 5 cm	4 (14)	7 (33)	
Histologic type			
Well	20 (69)	5 (24)	<0.01
Moderately	9 (31)	15 (71)	
Poorly	0	0	
Mucinous	0	1 (5)	
Astler-Coller stage			
A	10 (35)	0	0.01
B1 or B2	10 (35)	11 (52)	
C1 or C2	8 (27)	6 (29)	
D	1 (3)	4 (19)	
LN metastasis			
Positive	8 (28)	10 (48)	NS
Negative	21 (72)	11 (52)	

ca: carcinoma, NS: not significant

나타냈다. 그 밖에 두 암종의 림프절 전이는 유의한 차이를 보이지 않았다.

2. 용종성암과 침윤성암의 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질의 발현양상

전체적으로 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질에 대한 면역조직화학 검사상 용종성 암과 침윤성 암 사이에 통계학적으로 의미있는 차이를 보이는 결과는 없었다 (Table 2). 단지 p53 단백질의 발현양상이 4+이상 미만성

Table 2. Expression of p53, bcl-2, c-erbB-2 and MIB-1 in the polypoid carcinoma and infiltrative carcinoma

	Polypoid ca(%)	Infiltrative ca(%)	p value
p53 positive	23 (79)	15 (71)	NS
p53 strong positive(>4+)	16 (55)	13 (62)	NS
bcl-2 positive	5 (17)	6 (29)	NS
c-erbB-2 positive	6 (21)	6 (29)	NS
MIB-1 positive	29 (100)	21 (100)	NS
MIB-1 strong positive(>4+)	12 (41)	16 (76)	0.01

NS: not significant, 4+: 75% of positive cells

으로 염색되는 예가 침윤성 암에서는 62%, 용종성 암에서는 55%가 보여 다소 침윤성 암에서 높게 나타났다 (Fig. 1). 또한 MIB-1 염색은 4+이상 염색되는 예가 용종성 암에서는 41%, 침윤성 암에서는 76%로 통계학적인 차이를 보여주었다 (Fig. 2). 다음으로 앞의 결과를 토대로 아래와 같이 예후에 관계되어 있는 인자들에 따라 나누어서 각각 비교분석하였다.

1) 종양의 크기, 분화도, 병기 및 림프절 전이유무에 따른 p53 단백질발현의 양상 (Table 3) 이들 인자들에 따른 용종성 암과 침윤성 암의 p53 단백질발현 양상의 차이는 없었으나 단지 용종성 암에서 종양의 크기가 증가할수록 p53 단백질발현이 증가하는 경향을 보였다.

2) 종양의 크기, 분화도, 병기 및 림프절 전이유무에 따른 bcl-2 단백질발현의 양상 (Table 4) 이들 인자들에 따른 용종성 암과 침윤성 암의 bcl-2 단백질발현 양상의 차이는 없었다.

3) 종양의 크기, 분화도, 병기 및 림프절 전이유무에 따른 c-erbB-2과 MIB-1 단백질발현의 양상 이들 인자들에 따른 용종성 암과 침윤성 암의 c-erbB-2 단백질과 MIB-1 단백질발현도 차이를 보이지 않았다.

4) 용종성 암과 침윤성 암에서 MIB-1, p53, bcl-2 및 c-erbB-2 단백질의 상관관계는 용종성 암에서 MIB-1 단백질발현이 증가할수록 p53 단백질의 발현도 같이 증가하여 MIB-1 단백질과 p53 단백질이 서로 유의한 비례관계에 있었다 (Table 5).

Table 3. The relationship between p53 immunoreactivity and clinical factors

	Polypoid ca(%)		Infiltrative ca(%)		p value
	No.	p53 positive	No.	p53 positive	
Tumor size					
< 3 cm	13	9 (69)	3	3 (100)	NS
3~5 cm	12	10 (83)	11	8 (73)	
> 5 cm	4	4 (100)	7	4 (33)	
Differentiation					
Well	20	16 (80)	5	3 (60)	NS
Moderately	9	7 (78)	15	11 (73)	
Poorly	0	0	0	0	
Mucinous	0	0	1	0	
Astler-Coller stage					
A	10	9 (90)	0	0	NS
B1 and B2	10	7 (70)	11	8 (73)	
C1 and C2	8	6 (75)	6	5 (83)	
D	1	1 (100)	4	2 (50)	
LN metastasis					
Positive	8	5 (63)	10	8 (80)	NS
Negative	21	17 (81)	11	7 (64)	

NS: not significant

Table 4. The relationship between bcl-2 immunoreactivity and clinical factors

	Polypoid ca(%)		Infiltrative ca(%)		p value
	No.	bcl-2 positive	No.	bcl-2 positive	
Tumor size					
< 3 cm	13	3 (23)	3	1 (33)	NS
3~5 cm	12	3 (25)	11	4 (36)	
> 5 cm	4	0	7	0	
Differentiation					
Well	20	5 (25)	5	2 (40)	NS
Moderately	9	1 (11)	15	3 (20)	
Poorly	0	0	0	0	
Mucinous	0	0	1	0	
Astler-Coller stage					
A	10	4 (40)	0	0	NS
B1 and B2	10	1 (10)	11	3 (27)	
C1 and C2	8	1 (13)	6	0	
D	1	0	4	2 (50)	
LN metastasis					
Positive	8	1 (13)	10	2 (20)	NS
Negative	21	5 (24)	11	3 (27)	

NS: not significant

Table 5. The relationship between p53, bcl-2, and c-erbB-2 and MIB-1 proteins

		MIB-1						Total	p value
		0	Trace	1+	2+	3+	4+		
Polypoid ca									
p53	+	0	0	2	4	5	12	23	0.02
	-	0	0	2	0	4	0	6	
bcl-2	+	0	0	0	4	5	4	13	NS
	-	0	0	4	0	4	8	16	
c-erbB-2	+	0	0	1	0	4	1	6	NS
	-	0	0	3	4	5	11	23	
Infiltrative ca									
p53	+	0	0	0	0	4	11	15	NS
	-	0	0	2	0	1	5	6	
bcl-2	+	0	0	0	0	1	5	6	NS
	-	0	0	0	0	4	11	15	
c-erbB-2	+	0	0	0	0	3	3	6	NS
	-	0	0	0	0	2	13	15	

NS: not significant, trace: <1%, 1+: 1~24%, 2+: 25~49%, 3+: 50~74%, 4+: 75~100%

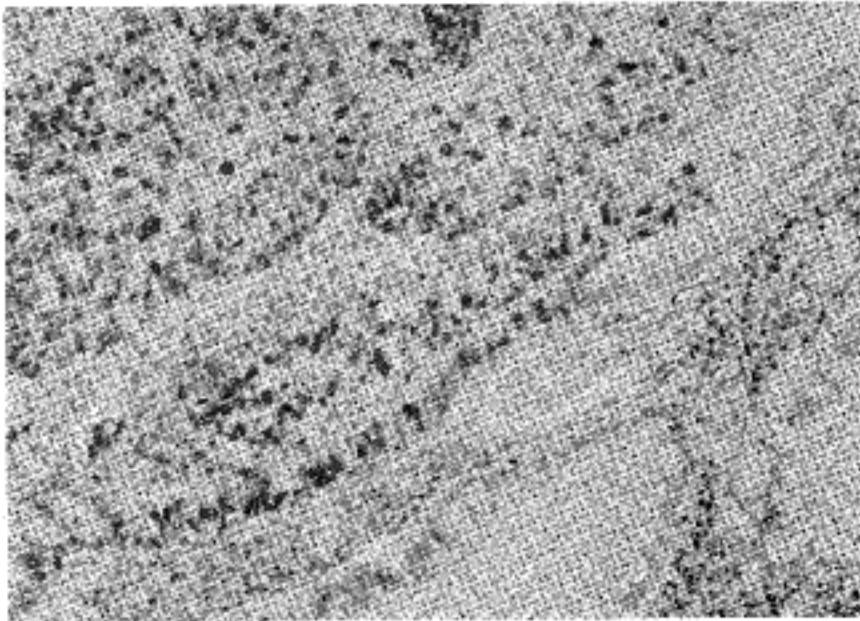


Fig. 1. The immunohistochemical staining for p53 oncoprotein. It shows intense nuclear brown positive reaction in the infiltrative adenocarcinoma in contrast to adjacent normal colonic epithelium.



Fig. 3. The immunohistochemical staining for bcl-2 oncoprotein. There is intracytoplasmic positive reaction in the adenoma, whose staining pattern is decreased or absent in the adenocarcinoma.

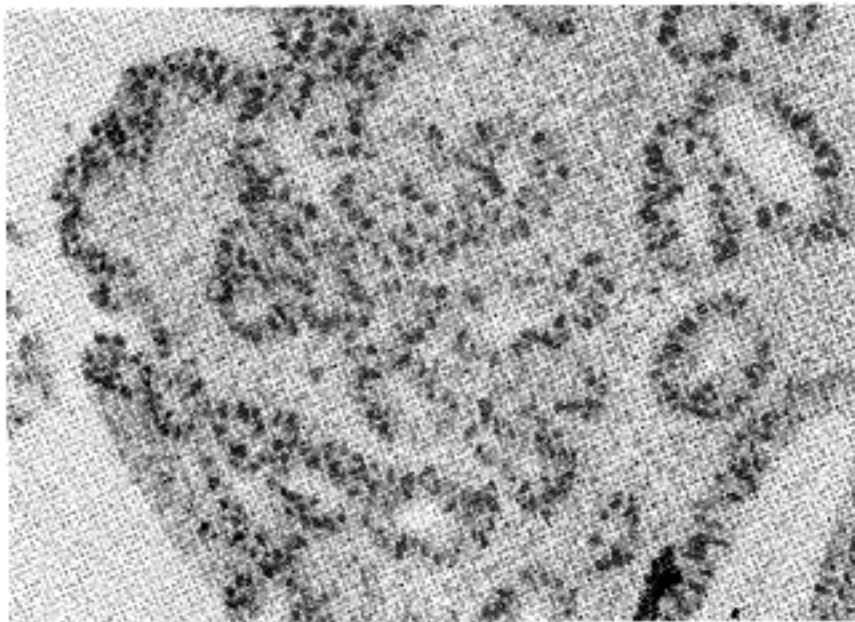


Fig. 2. The immunohistochemical staining for MIB-1. It shows intense nuclear staining in well differentiated adenocarcinoma and adenoma with severe atypia.

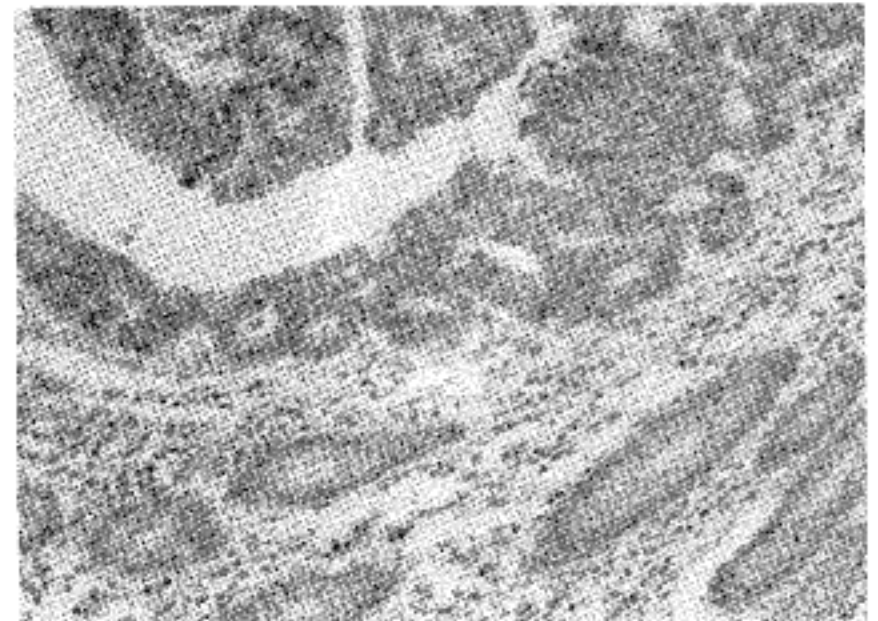


Fig. 4. The immunohistochemical staining for c-erbB-2 oncoprotein. It shows cytoplasmic fine granular membrane staining pattern in adenocarcinoma.

3. 용종성 암과 선종의 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질의 발현양상 (Table 6)

p53 단백질은 용종성 암이 선종에 비해 양성으로 염색된 경우가 많았고 특히 4+이상의 미만성 염색상이 용종성 암에서 더 많았다. 또한 염색강도를 비교하였을 때 용종성 암이 선종에 비해 강한 염색상을 보였다.

bcl-2 단백질은 용종성 암보다 선종에서 양성으로 염색되는 경우가 많았고 특히 4+이상의 미만성 염색상이 선종에서 더 많았다 (Fig. 3).

c-erbB-2 단백질은 선암에서 약간 높은 양성률을 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다 (Fig. 4).

MIB-1 단백질발현율은 전체적인 선종과 선암간의 차이는 없었으나 4+이상 미만성으로 염색되는 양성률이 선

종에는 없는 반면에 선암에서는 41%로 높게 나와 큰 차이를 보였다.

4. 선종에서 조직학적 형태에 따른 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질의 발현양상 (Table 7)

선종을 관상선종, 용모선종 및 혼합선종으로 분류하여 이들 네 가지 단백질의 발현은 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.

고 찰

대부분의 대장암은 선행하는 선종에서 기원하고, 관상 선종보다 용모성 선종에서 악성변성이 더 흔한 것으로 알려져 있다.²⁰ 대장암은 종양의 형성과정 중 여러

Table 6. Expression of p53, bcl-2, c-erbB-2 and MIB-1 in the polypoid carcinoma and adenoma

	Polypoid ca(%)	Adenoma(%)	p value
p53	23 (79)	15 (52)	0.03
bcl-2	5 (17)	21 (72)	<0.01
c-erbB-2	6 (21)	5 (17)	NS
MIB-1	29 (100)	26 (90)	NS

NS: not significant

유전자, 즉 APC, ras, DCC, p53 유전자등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실 등이 단계적으로 나타나 발생한다고 한다. 이 밖에도 c-myc, c-erbB-2, bcl-2 유전자 등도 대장암 발생에 관여한다고 알려져 있다.^{15,17}

대장암의 예후 추정인자로는 환자의 연령, 종양의 크기, 병소의 조직학적 분화, 발생 장소, 국소침윤과 림프절 전이를 포함하는 Astler-Coller 병기, 조직학적 유형 및 등급, 암 유전자 발현 등이 있는데 이 중 환자의 예후에 직접적인 영향을 주는 인자로는 Astler-Coller 병기, 조직학적 유형 및 등급, 장폐쇄가 있다고 한다.²¹ 본 연구에서는 이런 인자들과 예후와의 관련성을 확인할 수는 없었으나 용종성 암과 침윤성 암에서 차이를 발견할 수 있었다. 즉, 조기 병기인 A군과 B1군에는 용종성 암종이 더 많았고 이 때 종양의 크기는 침윤성 암종이 평균 5.9 cm인데 반해 용종성 암종은 2.5 cm이었다. 또한 같은 병기에서 용종성 암종이 침윤성 암종에 비해 좋은 분화도를 나타냈다. 따라서 침윤성 암이 용종성 암에 비해 조기에 더 파괴적인 성격을 띠는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 이런 예후인자들과 세 가지의 암유전자, 즉 p53, bcl-2, c-erbB-2 단백질과 세포증식 표지자인 MIB-1 단백질과의 상관성을 확인하고자 하였다.

Mueller등⁸에 의하면 p53 단백질발현이 용종성 조기대장암에 비해 침윤성 조기대장암에서 의미있게 높게 나왔고 bcl-2 단백질발현은 반대로 용종성 조기암에서 침윤성 조기암에 비해 높게 나타나는 경향이 있다고 하였다. 이런 결과로 침윤성암이 용종성암에 비해 더 파괴적인 경향을 보인다는 것이다. 한편 Hemming등²²에 의하면 c-erbB-2 와 유사한 EGFR 단백질의 발현이 대장암의 Dukes 병기에 비례한다고 보고하였다. 물론 c-erbB-2 단백질발현이 병기와 예후와 무관하다고 보고한 경우¹¹도 있지만 부분적으로 암의 진행단계에 관여하는 것으로 보인다. 따라서 위에서 언급한 세 가지 종양단백을 이용하면 용종성 암과 침윤성 암의 분자적인 발암기전을 파악하는데 도움을 줄 것으로 사료된다.

p53 단백질은 각종 장기의 종양에서 발현되며 종양의 등급과 연관되어 있는 경우가 많아서 각 종양의 예후인자의 하나로 인식되고 있다. wild-type p53 단백질은 보통

Table 7. The relationship of immunoreactivity between histologic types of adenoma

	Tubular(%)	Villous(%)	Mixed(%)	p value
p53	11 (61)	2 (33)	2 (40)	NS
bcl-2	11 (61)	4 (67)	5 (100)	NS
c-erbB-2	4 (22)	0	1 (20)	NS
MIB-1	17 (94)	4 (67)	4 (80)	NS

NS: not significant

반감기가 너무 짧고 그 양이 너무 적어 면역조직화학적 검사상 검출되지 않으며¹² 면역조직화학적 염색에 보이는 p53 단백질은 대개 mutant-type이다. 대장의 상피성 종양에서 p53 단백질의 발현율은 보고자마다 차이가 있는데 선종의 경우 Hamana등²³은 9~71%, 장등²⁴은 45.5%, Purdie등²⁵은 8.7%, 이등²⁶은 관상선종에서 73%, 용모선종에서 11%로 보고하고 있고 선암의 경우는 Purdie등²⁵이 46.5%, Bosari등¹⁴이 59%로 보고하고 있다. 본 연구에서는 관상선종에서 61%, 용모선종에서 33%의 양성률을 보였다. 한편 선종에서 기시한 선암에서는 79%의 양성률을 보여 주변 선종보다 높은 비율의 양성반응을 보였고 염색강도에서도 암세포에서 선종세포에 비해 강양성으로 나타났다. 그리고 용종성 암보다 더 파괴적인 성격을 띠는 침윤성 암에서도 선종과 동일한 차이를 보여주었다. 그러나 용종성 암과 침윤성 암을 비교하였을 때 p53 단백질발현에 있어서 용종성 암은 79%, 침윤성 암은 71%의 양성률을 보여 두 암종간의 유의한 차이는 보이지 않았다. 이것은 이미 암의 진행단계에서는 p53 유전자 변이가 두 암종의 차이에 크게 작용하지 않을 것이라는 추측을 가능하게 한다. 하지만 조기암단계에서는 이와달리 침윤성 암이 더 높은 p53 단백질발현을 보이는 것으로 알려져 있다.⁸ 본 연구대상에는 1 cm이하의 조기 침윤성 암이 없어 이를 확인할 수 없었다. 한편 p53 단백질발현과 암종과 관련된 예후인자들과는 상관성이 없어서 예후에 서로 독립적으로 작용하는 것으로 생각한다.

bcl-2 단백질은 발암과정에서 세포의 증식을 활성화시키기보다는 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를 억제함으로써 종양발생에 관여한다. 따라서 발암과정의 초기단계에서 bcl-2 단백질이 과발현되어 발암과정 동안 지속함으로써 여러 종류의 유전자 변이를 축적케 함으로써 종양발생의 조건을 만들어 준다. 한 예로 Bosari등¹⁵은 선종과 선암을 대상으로 한 bcl-2 단백질 선종에서 100%, 선암에서 50%에서 발현한다고 하여 bcl-2 단백질발현이 발암과정의 초기에 관여한다고 하였다. 본 연구에서도 선종에서 72%, 용종성 암에서 17%의 양성률을 보여 선종에서 훨씬 높게 발현됨을 알 수 있었다. 또한 침윤성 암에서도 29%로 낮은 발현율을

보여 대부분의 주변 정상점막 기저부에서 bcl-2 단백질 발현이 높게 관찰되는 것과 대조를 이루었으며 용종성 암과 침윤성 암의 비교에 있어서는 유의한 차이를 보이지 않았다. bcl-2 발현과 다른 예후인자들과의 관계는 p53 단백질과 마찬가지로 상관성이 없는 것으로 판명되었다.

c-erbB-2 단백질은 EGFR과 50%의 상동성을 가지며 세포막에 위치한다.¹⁶ c-erbB-2 유전자의 증폭은 정상 세포 증식능의 소실을 가져와 종양을 일으키는 것으로 알려져 있고 편평상피암에서 자주 관찰되지만 최근들어 유방암²⁷ 및 대장암에서도 c-erbB-2 단백질 발현이 보고되어 있다.¹⁸ 본 연구에서는 c-erbB-2 단백질 양성률이 선종에서 10%, 용종성 암에서 21%를 보여 통계학적인 의의는 없었지만 암에서 발현율이 좀더 높았다. 그러나 침윤성 암에서는 29%로 용종성 암과 유의한 차이를 보이지 않았다. 그리고 암의 조직학적 병기나 등급과의 상관성은 보이지 않아 c-erbB-2 단백질이 암의 진행단계에 주로 관여하는지는 좀더 연구할 가치가 있다. 양성반응은 주로 세포막에 국한되어 과립상으로 나타나고 일부 암세포에서는 세포막 뿐만 아니라 세포질내에서도 양성반응을 보이는데 이는 암유전자 산물과 결합된 성장인자의 세포내 이주 또는 생성운반 중이기 때문에 나타나는 소견이라고 생각된다.¹⁷

G₀기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵에 존재하는 Ki-67 단백을 파라핀 포매된 조직에서 인지하는 MIB-1은 종양뿐만 아니라 종양 주위의 정상 대장의 선과 기저부에 있는 세포들의 핵에도 염색되었다. MIB-1 단백질은 선종은 97%, 용종성 암과 침윤성 암에서는 각각 29예와 21예 모두에서 양성소견을 보였다. 그러나 4+ 이상의 미만성 양성을 보인 경우는 침윤성 암이 76%로 용종성암의 41%에 비해 통계학적으로 높게 나왔다. 이는 침윤성 암이 더 많은 증식능을 보이면서 더욱 파괴적인 성격을 띠는 것을 의미한다 하겠다. MIB-1 단백질은 다른 종양단백과의 상관관계를 비교해 보면 p53 단백질과 통계학적으로 유의한 비례관계를 보이고 있어 종양의 세포증식능 뿐 아니라 예후인자로서의 역할에 관한 연구도 필요하다고 사료된다.

이처럼 용종성 암과 침윤성 암의 p53, bcl-2, c-erbB-2에 대한 면역조직화학 검사는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 침윤성 암에서 p53 단백질이 미만성으로 염색되는 경향이 있고 MIB-1 단백질의 미만성 염색이 유의하게 높게 나왔음을 알 수 있었다.

한편 선종과 그로부터 기원한 선암의 차이는 비교적 명백하였다.

p53 단백질에 대한 양성률이 선종에서 52%인데 비해 선암에서는 79%를 보여 유의한 차이를 보였다. 이는 이미 알려진 바대로³⁴ 비정상적인 p53 단백질 발현이 대장암의 발암과정 중 후기에 작용하는 것을 의미하는 소견이라고 생각된다. bcl-2 단백질은 선암에서 17%인데 반해 선종에서는 72%로 높아 bcl-2 단백질은 p53 단백질과는 반대로 대장암 발암과정의 초기에 작용하는 것으로 사료된

다. 이 밖의 c-erbB-2 단백질은 선암에서 약간 높은 양성율을 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. MIB-1 단백질 발현율은 전체적인 선종과 선암간의 차이는 없었으나 4+이상 미만성으로 염색되는 양성율이 선종에는 없는 반면에 선암에서는 41%로 높게 나와 대조를 보였다. 따라서 세포증식능에 있어서도 선암이 훨씬 높은 증식을 보인다는 것을 알 수 있었다. 한편 이들 단백질의 발현율이 선종의 조직학적 형태와는 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

결 론

대장암에서 선종을 동반한 용종성 암 29예와 선종을 동반하지 않고 편평하거나 함몰된 증식을 보이는 침윤성 암 21예를 대상으로 임상 및 병리학적 소견들을 검토한 결과 종양의 위치는 두 암종 모두 S자 결장 및 직장에 많았고 종양의 크기에 있어서 침윤성 암이 5.5 cm, 용종성 암이 3.1 cm 로 침윤성 암이 좀 더 컸다. 또한 조기 병기인 A군과 B1군에서도 침윤성 암종이 5.9 cm로 용종성 암종의 2.5 cm보다 큰 장경을 가지고 있었고 조직학적 분화도는 더 나쁘게 나타났다.

그리고 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질에 대한 면역조직화학적 검사를 시행한 결과 용종성 암과 침윤성 암의 p53, bcl-2, c-erbB-2 및 MIB-1 단백질의 발현양상에 있어서 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 p53 단백질의 발현양상이 침윤성 암에서 좀더 높은 미만성으로 나타났고 (p=0.63), MIB-1 단백질도 역시 침윤성 암에서 통계학적으로 유의하게 미만성으로 나타났고 (p=0.01). 또한 이들 단백질과 임상적인 예후인자들과의 상관관계는 없는 것으로 판명되어 서로 독립적으로 예후에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

한편 p53 단백질은 용종성 암 (79%)이 선종 (52%)보다 높은 p53 단백질 발현율을 보였다 (p=0.027). 반면에 bcl-2 단백질은 선종 (72%)이 용종성 암 (17%)보다 더 높은 양성율을 보였다 (p=0.000024). 이러한 사실로 p53은 종양의 후기에, bcl-2는 종양의 초기에 관여하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부. 한국인 암등록 조사자료 분석보고서. 서울, 1995.
2. Bedenne L, Faivre J, Boutron MC, Piard F, Cauvin JM, Hillon P. Adenoma-carcinoma sequence or de novo carcinogenesis? *Cancer* 1992; 15: 883-8
3. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994; 219.
4. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-31.
5. Spratt JS, Ackerman LV. The growth of a colonic adeno-

- carcinoma. *Am Surg* 1961; 27: 23-8.
6. Kuramoto S, Oohara T. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 1989; 64: 950-5.
 7. Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989; 64: 1138-46.
 8. Mueller J, Mueller E, Hoepner I, et al. Expression of bcl-2 and p53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma: a comparative immunohistochemical study. *J Pathol* 1996; 180: 259-65.
 9. Jass JR. Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World J Surg* 1989; 13: 45-51.
 10. Pascal RR. Dysplasia and early carcinoma in inflammatory bowel disease and colorectal adenoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 1160-71.
 11. Meltzer SJ, Ahnen DJ, Battifora H, Yokota J, Cline MJ. Protooncogene abnormalities in colon cancers and adenomatous polyps. *Gastroenterology* 1987; 92: 1174-80.
 12. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
 13. Bertorelle R, Esposito G, Del Mistro A, et al. Association of p53 gene and protein alterations with metastases in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 463-71.
 14. Bosari S, Viale G, Roncalli M, et al. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 790-8.
 15. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, et al. bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 534-40.
 16. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-9.
 17. 김 완, 최홍란, 이지신, 박종태, 박창수, 조규혁. 대장 및 직장 암종의 c-erbB-2 암유전자 발현과 예후에 관한 연구. *대한병리학회지* 1993; 27: 217-25.
 18. Mccann A, Mod BA, Peter A, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990; 65: 88-92.
 19. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab V, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
 20. Muto T, Bussey R, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-70.
 21. Griffin MP, Bergstralh EJ, Coffey RJ, Beart RW, Melton LJ. Predictors of survival after curative resection of carcinoma of colon and rectum. *Cancer* 1987; 60: 2318-24.
 22. Hemming AW, Davis NL, Kluffinger A, et al. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 1992; 51: 147-52.
 23. Hamana T, Kawai K, Serizawa A, Tsutsumi Y, Watanabe K. Immunohistochemical demonstration of p53 protein in colorectal adenoma and adenocarcinomas. Reliable application of the heat-induced antigen retrieval method to formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Pathol Int* 1994; 44: 765-70.
 24. 장태정, 김정란, 이금배. 대장암종 및 선종에서 p53 단백질과 HSP70의 발현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1997; 31: 201-10.
 25. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; 138: 807-13.
 26. 이미숙, 서재홍, 임성철. 결직장 종양에서의 p53 단백질의 면역조직화학적 과발현. *대한병리학회지* 1996; 30: 595-603.
 27. Tal M, Wetzler M, Josefberg Z, et al. An erb-B-related gene, c-erbB-2, encodes a possible receptor protein similar to the epidermoid growth factor receptor. *Nature* 1988; 319: 230-34.