

곧창자 샘암종에서 p53, bcl-2, Ki-67 발현과 세포자멸사에 대한 연구: 수술 전 방사선화학 치료 반응과의 상관관계

유진영 · 김수지¹ · 조현민² · 김성환¹
진형민² · 이정용 · 김준기² · 강석진¹
전정수² · 강창석

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실
방사선 종양학과, ²외과

접 수 : 2005년 3월 17일
게재승인 : 2005년 6월 20일

책임저자 : 강 석 진
우 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93
성빈센트병원 병리과
전화: 031-249-7591
Fax: 031-244-6786
E-mail: sjkang@vincent.cuk.ac.kr

*본 논문은 성빈센트병원 임상의학연구소
2004년 연구지원비로 이루어졌음.

An Analysis of p53, bcl-2 and Ki-67 Expressions, and Apoptosis in Rectal Cancer: Their Correlation with the Tumor Response after Preoperative Radiochemotherapy

Jinyoung Yoo, Su Zy Kim¹, Hyeon-Min Cho², Sung Whan Kim¹, Hyung-Min Chin²,
Jung Yong Lee, Jun-Ki Kim², Seok Jin Kang, Chung-Soo Chun² and Chang Suk Kang

Departments of Pathology, ¹Radiation Oncology and ²Surgery, The Catholic University of Korea
College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Preoperative radiochemotherapy (RCT) has been administered for locally advanced rectal cancer to increase the therapeutic benefits, and to preserve the sphincter in low-lying tumors, however, tumor responses after RCT are variable. **Methods :** Apoptotic index (AI), and expressions of Ki-67, p53 and bcl-2 were analyzed in pretreatment biopsies from 69 patients with rectal cancer by immunohistochemistry. Tumor response was graded in surgically resected specimens by using a three-scale grading system: no response (NR), partial remission (PR) and complete remission (CR). **Results :** CR was identified in 19 cases (28%), PR in 24 cases (35%), and NR in 26 cases (38%) of 69 cases. p53 protein was expressed in 49 cases (71%), whereas bcl-2 was in 42 cases (61%). The pretreatment Ki-67 labeling index was $65.4 \pm 23.4\%$. The tumor response was not associated with any of these markers. Tumors with CR/PR showed a higher AI ($0.84 \pm 0.84\%$ / $0.66 \pm 0.52\%$) than that of tumors with NR ($0.58 \pm 0.54\%$). There was a significant correlation between tumor response and the histologic differentiation ($p=0.008$) or recurrence ($p=0.039$). **Conclusions :** The AI revealed a tendency to increase in tumors with CR/PR, while expressions of p53 and bcl-2, and Ki-67 labeling index had little direct association with tumor response.

Key Words : Rectal neoplasms; Protein, p53; bcl-2 protein antigen; Ki-67 protein antigen; Apoptosis

대장암종은 세계적으로 흔한 악성 종양의 하나로서 발생 빈도 3위를 차지하는 종양이다.¹ 우리나라에서도 최근 식생활의 서구화로 점차 발생률이 증가하는 추세로 전체 악성 종양의 장기별 발생 빈도에서 네 번째(9.9%)에 해당한다.²

그 발생 기전은 첫째, 소위 "샘종-암종 연쇄", 즉 샘종에서 악성 변화를 통해 암종으로 전환하는 것인데, 정상 세포로부터 세포가 증식하면서 K-ras의 활성화와 APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colon carcinoma) 그리고 p53 유전자의 불활성화를 포함한 여러 종양 유전자와 종양 억제 유전자의 변화가 체세포에 단계적으로 축적되어 다단계 과정을 거쳐 세포의 성장 조절 능력이 상실되어 샘암종이 발생한다.

둘째, 조직학적으로 샘종을 거치지 않고 정상 점막에서 직접

암종으로 전환하는 것으로 보고되고 있는데, 이때는 분자생물학적으로 다단계적인 유전자 변화를 거치지 않거나 다른 종류의 종양 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다.³ 이러한 유전자 변화는 발암의 단계에 따라 다르며 암이 진행되는 동안 종양 세포들은 일련의 유전자 변화를 통해 침윤성과 전이 능력을 얻게 되고, 원발 종양에서 탈락한 종양 세포는 결합 조직과 기저막을 뚫고 림프절이나 혈관에 들어가 인접 장기를 침범하거나 원격 전이를 일으킨다.

대장암종은 조기에 발견해서 수술할 경우 완치가 가능하고 특히 암의 발생이나 전이 유발에 결정적인 영향을 미치는 인자를 찾아 치료하면 예후가 좋을 수 있다. 그러므로 각종 예후 인자들을 찾아서 이들 물질의 발현 양상의 변화를 관찰해서 치료에 이

용하려는 시도가 계속되고 있다. 진행성 허부 곧창자 샘암종은 경향문 국소 절제에서 전이된 암의 병합 절제까지 병기에 따라서 수술적 치료가 달라지는데,⁴ 외과적 절제술만을 시행할 경우 20-40%의 국소 재발과 57%의 원격 전이를 보인다.⁵⁻⁷ 그러므로 좀 더 효과적인 치료를 위하여 수술 전 후에 보조 항암 약물 치료와 방사선 치료 등을 단독 또는 병행 요법으로 수술적 절제와 더불어 시행하고 있다.

최근 수술 전 방사선화학 요법 시행 후 근치적 절제술을 시행한 결과 병변의 크기와 병기가 감소하고 이에 따른 항문괄약근의 보존 가능성이 높아진다는 보고들⁸⁻¹⁰이 발표된 이래, 항문연에서 8-10 cm 이내에 위치하고 컴퓨터 전산화 단층 촬영상 병기가 T3나 N1 이상이면서 조직 생검으로 진단이 확인된 곧창자 샘암종에 한하여 방사선 요법이나 화학 요법 등의 보조적 치료를 시행한 다음 절제술을 시행하는 추세다.

저자들은 최근 본원에서 조직 검사상 곧창자 샘암종으로 진단 받은 후 방사선화학 요법 치료를 받고 수술한 환자들 중 일부는 완전 관해를 보이나 일부는 무반응인 점에 주목하였는데, 이에 대한 연구는 드문 실정이다. Willet 등¹¹은 증식능이 낮은 세포들이 병합 치료에 잘 반응을 하지 않는 것을 관찰하였고, Rodell 등¹²은 세포자멸사가 방사선화학 치료 후 종양의 반응과 관계가 있다고 보고하였다. 이에 저자들은 반응군과 무반응군 사이에 분자생물학적으로 어떤 차이가 있는지를 규명하고, 그런 분자생물학적 특성이 방사선화학 요법 치료에 대한 반응 여부를 예측할 수 있는 표지자로서 이용 가치가 있는지를 알아보기 위해서, 방사선화학 요법 치료 후 절제된 곧창자 샘암종의 치료 전 생검 조직을 대상으로 면역조직화학적 염색을 통해 p53 단백질과 bcl-2 단백질의 발현 빈도, Ki-67 표지지수와 세포자멸사지수를 비교 분석하였다. 그리고 환자의 나이, 종양의 크기, 조직학적 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 유무, 수정된 듀크스병기(Astler-Coller's modification of Duke's stage) 등 기타 임상 병리학적 표지자들이 방사선화학 요법 치료에 대한 감수성과 어떤 상관관계가 있는지도 함께 밝혀서 환자의 치료를 결정하고 예후를 미리 예측할 수 있는 유용한 정보를 제공하고자 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

재료

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실에서 1998년 1월부터 2002년 12월까지 조직학적으로 곧창자 샘암종으로 진단되어 외과적 근치술을 받은 환자 중에서 생검 조직의 고정이나 파라핀 포매 블록의 보존 상태가 양호하고 최근까지 추적 관찰이 가능하며 수술 전에 방사선화학 요법을 받은 환자 69예를 대상으로 하였다.

방사선 요법은 전체 골반강과 전이가 의심되는 원발 림프절군

에 1회 180 cGy의 용량을 주 5회 5주간 시행하는 방법으로 총 4,500 cGy를 조사 후 540 cGy를 추가로 원발 종양부에 조사하여 모두 5,040 cGy를 조사하였다. 화학 요법은 매일 5-FU를 425 mg/m², Leucovorin을 20 mg/m²씩 5일간 정맥 투여를 수술 전 2회, 수술 후 4회 시행하였다. 수술은 방사선화학 요법 종료 후 4-8주 사이에 시행하였다.

추적 기간은 환자가 생존 할 경우 수술일로부터 2004년 10월 까지 조사하였고 사망한 경우에는 사망일까지로 하였으며, 평균 추적 기간은 29.6 (10-51)개월이었다. 추적은 외래에서 대장 내시경, 컴퓨터 전산화 단층 촬영, 암태아성 항원 검사 등을 수술 후 정기적으로 시행하였다.

임상 소견 및 병리 조직학적 검색

신선한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매괴를 제작해서 헤마톡실린 에오신 염색을 시행한 곧창자 샘암종 생검 및 수술 조직의 슬라이드를 재검토하여 진단을 확인하였다. 특히 수술 조직의 경우, 임상 기록과 병리 보고서를 통해 환자의 나이, 성별, 종양의 크기, 생존 기간, 재발 여부, 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 및 원격 전이 여부, 수정된 듀크스병기와 수술 전 방사선화학 요법에 대한 반응 여부를 조사하였다. 수술 전 치료에 대한 반응은 WHO 기준¹³에 따라 다음과 같이 분류하였다. 완전 관해(complete remission, CR)는 수술 후 병리조직 검사에서 종양 세포가 전혀 관찰되지 않은 경우로 정의하였고, 부분 관해(partial remission, PR)는 수술 전과 비교해서 수술 후 병기가 낮아지거나 종양의 직경이 50% 이상 감소한 경우로 하였다. 완전 또는 부분 관해를 보이는 예는 반응군으로 인정하였고, 종양의 크기 변화나 병기 하향이 없는 경우를 무반응군(no response, NR)으로 간주하였다.

면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위하여 각각의 증례에서 박절한 통상의 표준 절편에서 4 μm 두께의 절편을 각각 poly-L-lysine을 도포한 슬라이드에 부착하였다. 우선 80°C 오븐에서 1시간 건조한 다음 크실렌으로 실온에서 2분간 4회 탈파라핀 하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 45°C에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세한 후 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 1:100으로 희석한 비면역 염소혈청에 45°C에서 60분간 반응시켰다.

일차 항체는 p53 (BP53.12, Zymed, San Francisco, U.S.A.), bcl-2 (Bcl-2-100, Zymed, San Francisco), Ki-67 (7B11, Zymed, San Francisco)에 대한 단클론 항체들로서, 각각 1:50으로

희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이후 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako, Kyoto, Japan)를 10분간 반응시킨 후, 세척 완충액으로 3분씩 3회 씻어내고 streptavidin peroxidase detection system (Zymed, San Francisco, USA)을 이용하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 다시 씻어낸 후 DAB를 이용해서 10분간 발색한 다음 Meyer's hematoxylin으로 대조염색을 하였다. 양성 대조군으로 p53에 대해서는 양성이 확인된 유방암 조직을, bcl-2와 Ki-67에 대해서는 편도 조직을 이용하였다. 음성 대조군은 염색 때 일차 항체 대신 정상 면양 혈청을 첨가해 주고 나머지 모든 과정은 동일하게 하였다.

세포자멸사 염색

ApopTag Plus Peroxidase In-Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, Boroona Victoria, Australia)을 사용하였다. 파라핀 조직 절편을 탈파라핀하여 단단계 에탄올로 함수시킨 후 phosphate-buffered saline에 5분간 두었다가 실온에서 프로테아제 K (20 µg/mL)와 15분간 반응시키고 세척했다. 그런 다음 3% 과산화수소수소 5분간 처리하여 내인성 과산화효소를 차단한 후 세척하였다. Equilibration Buffer로 10초간 처리 후 37°C 습도 기에서 TdT와 1시간 동안 반응시킨 다음 효소 반응을 중지시키고 실온에서 anti-digoxigenin conjugate와 30분간 반응시켰다. 발색을 위하여 peroxidase substrate로 염색하고 methyl green 으로 대조 염색하였다. 양성 대조군으로는 편도 조직을 같은 방법으로 검사하였고 음성 대조군은 TdT 효소 처리를 하지 않고 나머지는 동일하게 하였다.

판독과 통계학적 분석

결과 판정은 두 명의 병리 의사가 독립적으로 하였고 면역조직 화학 염색은 종양 세포에서 면역 반응이 핵에 붉은 갈색으로 나타나는 경우를 양성으로 판독하였다. p53과 bcl-2의 경우 광학 현미경 400배 시야에서 관찰한 전체 종양 세포의 수와 양성으로 판정한 세포의 수를 각각 세어 이를 백분율로 나타내었으며 그 결과가 1% 미만일 때 음성으로 판정하였다. Ki-67 표지자수는 염색된 세포의 밀도가 높은 3-5개의 400배 시야에서 1,000개의 종양 세포 중 핵이 갈색으로 염색된 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다. 세포자멸사지수는 괴사가 없고 염색이 잘 된 다섯 군데의 400배 시야에서 농축된 호염기성 염색질이 하나 또는 여러 조각으로 나뉘어 있는 경우를 선별하여 세포들의 백분율을 구하였다.

통계학적 분석은 SPSS version 11.5 (Chicago, USA)를 이용하여 면역조직화학 염색에 의한 p53 및 bcl-2 단백질 발현, Ki-67 표지자수, 세포자멸사지수와 임상 병리학적 예후 인자들의 방사선화학 요법 반응간의 상관 관계를 Pearson's χ^2 test로 분석

하였고, 유의 수준은 0.05 미만으로 하였다.

결 과

본 병원에서 수술 전 방사선화학 요법을 시행한 후 근치적 수술을 받은 69예 가운데, 병리학적 완전 관해는 19예(28%), 부분 관해는 24예(35%)로 방사선화학 요법 반응군은 43예(62%), 무반응군은 26예(38%)였다(Table 1).

총 69예 중 남자는 37명, 여자는 32명이었으며 평균 나이는 60세(31-81세)였다. 종양의 크기는 5 cm 미만이 38예(55%), 5 cm 이상은 31예(45%)였다. 조직학적 분화도는 고분화 샘암종 20예(29%), 중등도분화 샘암종 44예(64%), 저분화 샘암종 5예(7%)였다. 전산화단층촬영상 침윤 정도는 T2 13예(19%), T3 54예(78%), T4 2예(3%)였고, 림프절 전이가 의심되는 경우는 28예(41%)였다. 수술 후 사망은 한 예도 없었고 추적 기간 내 국소 재발은 무반응군에서만 4예가 관찰되었다. 이들 인자들 가운데 나이, 성별, 종양의 크기, 침윤 정도와 림프절 전이 여부는 방사선화학 요법 후 나타난 반응과 관련이 없었다. 그러나 조직학적 분화도($p=0.008$)와 재발($p=0.039$)은 수술 전 치료에 대한 반응과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다(Table 1).

p53 단백질 발현은 핵에 국한되어 있으며 세포질내에서는 양성

Table 1. Relationship between clinicopathologic variables and tumor response to radiochemotherapy

Variables	No. (%)	NR	PR	CR	p-value
Age					NS
<60	40 (58)	9	11	9	
≥60	40 (58)	17	13	10	
Sex					NS
Male	37 (54)	15	12	10	
Female	32 (46)	11	12	9	
Tumor size					NS
<5 cm	38 (55)	16	12	10	
≥5 cm	31 (45)	11	12	9	
Differentiation					0.008
well	20 (29)	3	9	8	
moderate	44 (64)	9	14	11	
poor	5 (7)	4	1	0	
Tumor status					NS
T2	13 (19)	4	2	7	
T3	54 (78)	22	21	11	
T4	2 (3)	0	1	1	
Nodal status					NS
-	41 (59)	16	14	11	
+	28 (41)	10	10	8	
Recurrence					0.039
-	65 (94)	22	24	19	
+	4 (6)	4	0	0	
Total	69	26 (38%)	24 (35%)	19 (28%)	

NR, no response; PR, partial remission; CR, complete remission; NS, not significant.

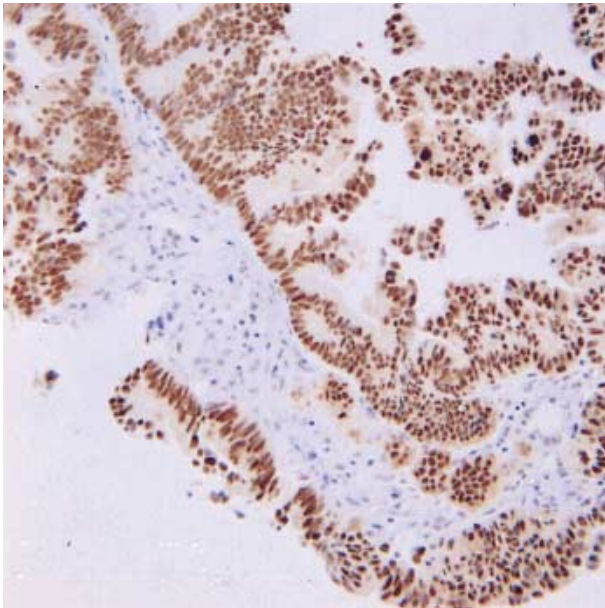


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in rectal cancer demonstrates diffuse strong nuclear positivity.

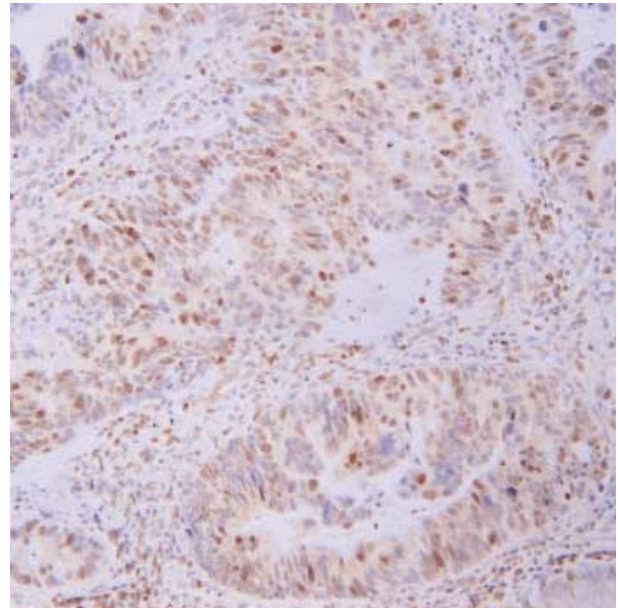


Fig. 2. Immunohistochemical staining for bcl-2 protein shows a positive reaction in tumor nuclei.

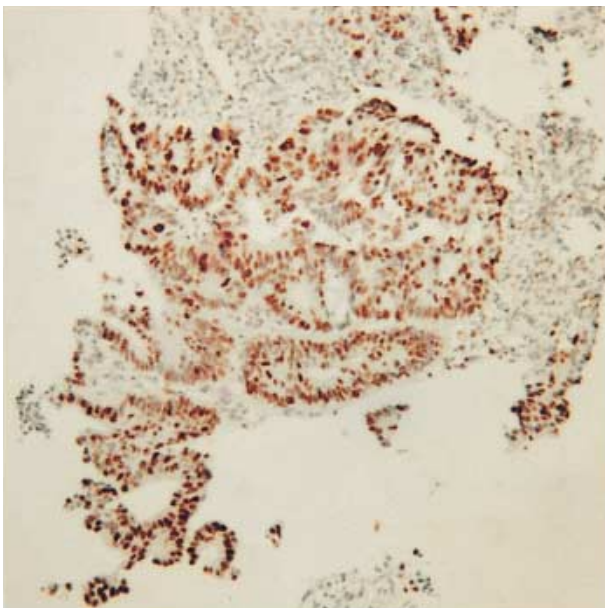


Fig. 3. Immunohistochemical staining for Ki-67 shows intense nuclear staining.

반응이 관찰되지 않았고 주변 정상 점막세포에서는 음성이었다. 샘암종 69예 중 49예(71%)에서 양성이었다고, 20예(29%)에서 음성이었다(Fig. 1). CR군 19예 중 13예(68%), PR군 24예 중 18예(75%), NR군 26예 중 18예(69%)에서 양성 반응을 보였고 이는 통계학적으로 유의하지 않았다(Table 2). 종양의 크기, 조직학적 분화도 및 병기에 따른 p53 단백질 발현 양성은 통계학적 유의성이 없었다(Table 3).

bcl-2 단백질 발현은 핵에 국한되어 있었고 42예(61%)에서 양

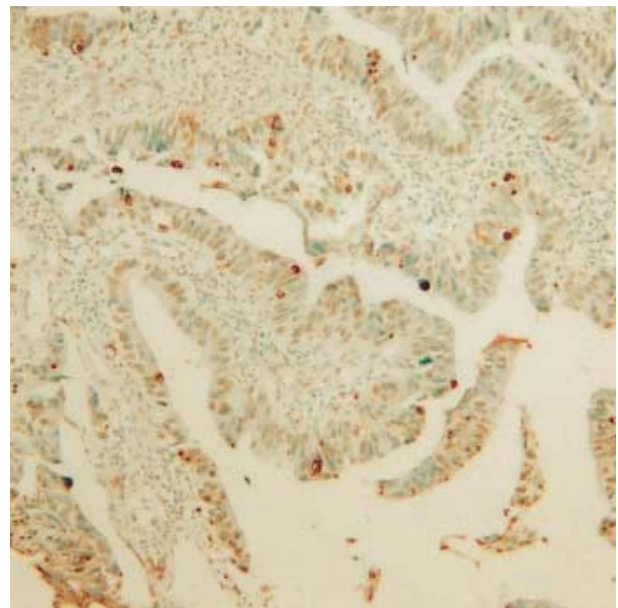


Fig. 4. In-situ immunostaining for apoptosis stains apoptotic cells.

성이었으며 27예(39%)에서 음성이었다(Fig. 2). CR군에서 13예(68%), PR군에서 11예(46%), NR군에서 18예(69%)에서 양성 발현을 보였고 이는 통계학적으로 유의하지 않았다(Table 2). 조직학적 분화도 및 병기에 따른 bcl-2 단백질 발현 양성은 통계학적인 유의성이 없었다. 그러나 종양의 크기가 클수록 양성 빈도가 증가하였으며 통계학적으로 유의하였다($p=0.021$) (Table 3).

Ki-67은 세포핵에 뚜렷이 염색되었으며(Fig. 3), Ki-67 표지 지수는 $65.4 \pm 23.4\%$ 였다. CR군, PR군, NR군에서 각각 $68.2 \pm$

Table 2. Relationship between p53 expression, bcl-2 expression, Ki-67 labeling index and apoptotic index, and tumor response to radiochemotherapy

	No. (%)	NR	PR	CR	P-value
p53					NS
-	20 (29)	8 (31)	6 (25)	6 (32)	
+	49 (71)	18 (69)	18 (75)	13 (68)	
bcl-2					NS
-	27 (39)	8 (31)	13 (54)	6 (32)	
+	42 (61)	18 (69)	11 (46)	13 (68)	
Ki-67 labeling index (mean ± SD)		66.3 ± 25.7	62.1 ± 21.0	68.2 ± 23.8	NS
Apoptotic index (mean ± SD)		0.58 ± 0.54	0.66 ± 0.52	0.84 ± 0.84	NS

No., case number; NR, no response; PR, partial remission; CR, complete remission; -, negative; +, positive; SF, standard deviation; NS, not significant.

23.8%, 62.1 ± 21.0%, 66.3 ± 25.7%로 통계학적 유의성은 없었다 (Table 2). 종양의 크기, 조직학적 분화도, 병기 및 재발 여부에 따른 p53 단백질 발현 양상률은 통계학적 유의성이 없었다 (Table 3).

세포자멸사 세포들은 핵이 갈색으로 뚜렷하게 염색되었고 (Fig. 4), 평균 세포자멸사지수는 0.68 ± 0.63%였다. NR군에서 0.58 ± 0.54%, PR군 0.66 ± 0.52%, CR군 0.84 ± 0.84%로 종양의 수술 전 치료에 대한 반응이 좋을수록 증가하였으나 통계학적 의의는 없었다 (Table 2). 또한 종양의 조직학적 분화도가 좋을수록 (0.38 ± 0.22 vs. 0.65 ± 0.59 vs. 0.81 ± 0.75), 침윤도가 낮을수록 (0.15 ± 0.21 vs. 0.69 ± 0.66 vs. 0.72 ± 0.53), 림프절 전이가 없고 (0.49 ± 0.47 vs. 0.79 ± 0.69) 재발이 없을 때 (0.50 ± 0.57 vs. 0.69 ± 0.64) 증가하였으나 모두 통계학적 의의는 없었다 (Table 3).

p53 단백질 발현, bcl-2 단백질 발현, Ki-67 표지자수와 세포자멸사지수 사이에 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구의 대상 증례 중 완전 또는 부분 관해를 보인 43예 모두 재발하지 않았고 재발한 4예는 무반응군으로 종양의 반응과 국소 재발 사이에 유의한 상관 관계가 관찰되었다 (p=0.039). 이는 국소 진행된 허부 골창자 샘암종에서 수술 전 방사선 치료는 수술 후 국소 재발을 억제한다는 다른 연구자들의 결과와 일치하는 소견이다. 그러나 생존율이 의미있게 향상된 예는 없다는 보고도 있었으며, 상당수 환자가 원격 전이로 사망하는 것이 문제가 되었다.^{8,9,14} 5-fluorouracil과 방사선 조사의 항암 작용의 상승 효과는 동물 실험에서 이미 증명되었다.¹⁵ 따라서 최근에는 항암 약물 및 방사선 병합 치료로 원격 전이율을 줄이고 국소 재발을 억제하고자 하는 시도가 늘고 있고 그 치료 효과에 대한 보고들이 발표되고 있다. 보고자에 따라 방사선 조사량과 화학 약

Table 3. Relationship between clinicopathologic variables and p53 expression, bcl-2 expression, Ki-67 labeling index and apoptotic index in 69 rectal cancers

Variables	No.	p53+ (%)	bcl-2+ (%)	Ki-67 labeling index	Apoptotic index
Tumor size					
<5 cm	38	29 (76)	18 (47)	63.0 ± 27.8	0.70 ± 0.54
≥5 cm	31	20 (65)	24 (77)*	70.4 ± 20.7	0.78 ± 0.91
Differentiation					
well	20	13 (68)	4 (70)	59.4 ± 24.4	0.81 ± 0.75
moderate	44	31 (70)	24 (55)	68.4 ± 23.5	0.65 ± 0.59
poor	5	3 (60)	4 (80)	61.8 ± 11.5	0.38 ± 0.22
Tumor status					
T2	13	9 (69)	9 (75)	72.2 ± 19.0	0.72 ± 0.53
T3	54	39 (72)	32 (59)	64.8 ± 23.4	0.69 ± 0.66
T4	2	1 (50)	1 (50)	38.7 ± 40.6	0.15 ± 0.21
Nodal status					
-	41	30 (73)	24 (59)	64.7 ± 25.6	0.79 ± 0.69
+	28	19 (68)	18 (64)	66.3 ± 19.9	0.49 ± 0.47
Recurrence					
-	65	47 (72)	39 (60)	65.6 ± 23.3	0.69 ± 0.64
+	4	2 (50)	3 (75)	61.9 ± 26.6	0.50 ± 0.57
Total	69	49 (71)	42 (61)		

*p=0.021; No., number of case.

물 병합 치료제에 다소 차이가 있는데, 문헌에 따르면 60-79%에서 병기 하향율, 5-31%에서는 완전 관해를 보이기도 한다.^{10,16-19}

수술 전 방사선 조사와 동시에 5-fluorouracil을 주사한 Chen 등¹⁶은 74%의 병기 하향률과 9.7%의 완전 관해율을 얻었고, 수술 전 방사선 조사(5040 cGy)와 5-fluorouracil, leucovorin을 주사한 Minsky 등¹⁷은 9%의 완전 관해를 보고하였다. Burke 등¹⁸은 방사선 조사(4,030-6,040 cGy)와 함께 5-fluorouracil과 mitomycin을, Chari 등¹⁹은 mitomycin 대신 cisplatin을 정맥 주사해서 각각 종양 반응률 61%와 49%, 병리학적 완전 관해율 20%와 27%의 성적을 보고하였다. Minsky 등¹⁷의 치료 방법과 유사한 치료 방법을 적용한 저자들의 연구에서는 Minsky 등¹⁷의 결과 보다 좋아 종양 반응률은 62%, 완전 관해율은 28%로 수술 전 방사선화학 요법이 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 일부 종양에서 치료에 반응하지 않는 경우도 30% 정도 되는 것으로 나타났다. 이러한 종양의 특징을 미리 파악하여 반응이 없을 것으로 생각되면 불필요한 치료를 피하고 근적 수술이 늦어지지 않도록 해서 수술 후 사망이나 합병증 발생을 줄일 수 있을 것이다. 동일한 병기를 지닌 환자들이 동일한 방사선 화학 치료에 반응하는 정도가 다양한 데는 여러 가지 요인들이 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그리하여 이에 관여하는 인자들의 발현 또는 돌연변이와 같은 분자생물학적 방법을 이용한 연구가 진행되고 있으나 아직 명확히 밝혀진 것은 없다.

p53은 세포주기를 조절하고 손상된 세포를 자가 사멸시켜 세포가 암세포로 형질전환되는 것을 막는 암억제 유전자다. 여러 장기의 암에서 p53 돌연변이와 과발현이 흔히 관찰되는데 대장직장암의 경우 50-80%에서 p53 과발현이 보고되었다.²⁰ 이러한

돌연변이나 이중접합성 소실에 따른 p53 불활성화로 세포자멸사가 감소하고 암 진행이 빨라진다는 지적도 있다.

한편, p53이 방사선으로 인한 세포반응과 밀접한 관계가 있다는 실험적 보고가 많은데, 방사선 조사가 p53 단백질 발현과 p53 전사 활성도를 유발하고 p53 결손 쥐의 흉선에 방사선을 쬐면 세포자멸사가 잘 안 일어난다고 하였고 이후 p53 유전자 돌연변이가 방사선 조사 치료 저항의 원인이라며 방사선 조사로 인한 세포자멸사가 p53 유전자와 연관이 있다고 하였다.²¹ 그러나 p53 유전자는 방사선 감수성과 상관 관계가 없다는 보고도 있다.²²

본 연구에서 p53 단백질 발현은 71%에서 관찰되어 다른 연구자들의 결과와 일치하였고, 반응군과 무반응군(63 vs. 69%) 사이에 유의한 차이는 없었다. 따라서 p53 단백질 발현 여부 만으로는 방사선화학 요법에 대한 곧창자 샘암종의 감수성을 예측할 수 없다고 생각한다.

bcl-2 유전자는 여포성 림프종의 암발생에 관여하고 소장이나 대장의 재생 상피 세포에서 발현하며 세포자멸사를 억제한다. 일반적으로 발현이 높을 경우 방사선화학 요법에 잘 반응하지 않고 예후가 안 좋은 것으로 알려져 있으나 폐암 등에서는 예후가 좋다는 연구 결과도 있다.²³ 저자들의 연구에서 bcl-2 단백질 발현율은 61%로 다른 보고자들의 결과(33-67%)와 유사하였고,²⁴ 반응군과 무반응군(57 vs. 69%) 사이에 통계학적으로 유의한 상관 관계는 없었다.

Ki-67 표지지수의 경우 무반응군보다 반응군에서 높은 수치를 보여 종양세포의 증식 활동이 높은 경우 방사선화학 요법에 잘 반응한다고 한다.¹¹ 그러나 본 연구에서는 반응 여부에 따른 Ki-67 표지지수에 차이가 없었다. Tannapfel 등²⁵도 치료 전과 치료 후 Ki-67 표지지수를 비교해 보니 예측대로 치료 후 Ki-67 표지지수가 낮아졌으나 치료 전 Ki-67 표지지수가 방사선 치료 효과에 영향을 미친다는 증거는 없다고 하였다.

곧창자 샘암종에서 방사선화학 치료 후 세포자멸사지수가 치료 전 보다 두 배로 증가한 점으로 미루어 방사선화학 치료가 곧창자 샘암종의 종양 세포에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 보이는데, 치료로 유도된 세포자멸사지수가 무반응군보다 반응군에서 더 높았다. 방사선화학 요법 치료 반응에 대한 세포자멸사의 역할에 관하여 다른 종양을 이용한 연구에서 치료 전 생검에서 높은 세포자멸사지수를 보인 예가 예후가 더 좋았다는 보고가 있는 반면, 이와 상반되는 보고도 있었다.^{12,26}

본 연구에서 치료 전 세포자멸사지수는 $0.68 \pm 0.63\%$ 였는데 이는 다른 보고자들의 수치(0.5-5%)와 비슷하다.²⁵ 높은 세포자멸사지수를 보인 환자가 치료에 대한 반응이 좋았다고 하는데, 저자들도 반응군 특히 완전 관해를 보인 증례가 더 높은 세포자멸사지수를 보이는 경향이 있음을 관찰하였다. 이는 치료 전 세포자멸사지수를 방사선화학 요법 후 반응을 예측할 수 있는 표지자로서 이용할 수 있음을 시사하는 매우 중요한 소견이다.

세포자멸사지수가 높은 경우 왜 방사선화학 치료에 반응이 좋은 지 그 기전은 명확하지 않다. 세포자멸사가 종양에서의 단순

한 세포 손실을 의미하고 이는 곧 종양 클론의 숫자와 연관이 있어 결국 간접적으로 종양 반응을 조절한다는 주장이 있다.²⁷ 세포자멸사지수가 높은 종양은 그만큼 종양 클론의 숫자가 적은 반면, 세포자멸사가 없는 종양은 종양 클론의 숫자가 상대적으로 많아서 방사선화학 치료에 저항한다고 설명할 수 있다.

방사선화학 치료 반응도와 관련이 있는 것으로 보이는 종양내 세포자멸사가 무엇에 의해 조절되는 지를 밝히는 게 중요하다. 지금까지 서로 다른 많은 인자들이 세포자멸사에 영향을 끼치는 것으로 알려졌고, 특히 p53과 bcl-2 유전자의 역할이 큰 데 이들의 정확한 기전에 관해서는 아직 이견이 많다. p53 암억제 유전자가 기능을 상실할 때 세포자멸사가 감소하고 따라서 종양 반응도가 낮다는 연구도 있지만, 야생형 p53 유전자가 없을 때 오히려 방사선 치료로 인한 세포자멸사가 일어나고 p53 변이가 있을 때 p53에 의존하는 DNA 교정이 감소하여 종양 반응도가 높다는 보고도 있다.²⁸

저자들은 본 연구에서 p53 유전자와 세포자멸사나 종양 반응도 사이에 유의한 상관 관계를 볼 수 없었다. 특히 p53 단백질 발현과 세포자멸사 사이에 직접적인 연관성을 관찰할 수는 없었다. 그러나 다른 인자들의 개입에 의한 간접적인 연관성은 완전히 배제하기 어렵다고 생각한다. 한편, Fu 등²⁹은 p53 단백질 음성이면서 p21 단백질 양성인 예의 80% 이상이 방사선 감수성을 보였고 반대로 p53 단백질 양성이고 p21 단백질 음성인 예 중 90% 이상이 방사선 저항성을 보였다고 하였다. 앞으로 p53 관련 유전자를 포함하는 좀 더 복합적인 연구가 도움이 될 것이다.

대장 직장암에서 bcl-2와 세포자멸사의 역상관 관계 및 bcl-2 단백질 음성인 종양에서 방사선 감수성이 보고되기도 하였지만,²⁶ 본 연구나 다른 연구자들의 결과에서는 bcl-2와 세포자멸사나 종양 반응 사이에 유의한 상관 관계가 없었다. 방사선 조사로 인한 세포자멸사의 유도 과정 중 초기에 미토콘드리아에서 시토크롬 C가 분비되는데, 이는 bcl-2 family 가운데 antiapoptotic (bcl-2, bcl-X1)과 proapoptotic (bax, bak, bid) member들 간의 균형에 의해서 조절된다.³⁰ 따라서 bcl-2 단백질의 발현 양 자체보다는 이들간의 비례가 더 큰 의의가 있을 것으로 추정된다. 그러므로 이들에 대한 연구가 그 기전을 이해하는데 도움이 되리라 생각되어, 좀 더 많은 증례를 대상으로 한 연구를 현재 진행 중이다.

결론적으로, 진행성 하부 곧창자 샘암종에서 수술 전 방사선화학 요법에 대한 종양의 반응은 62%에서 관찰되었고 종양 반응의 차이는 조직학적 분화도 및 세포자멸사지수와 관련이 있었다. 향후 증례누적과 세포자멸사를 조절하는 인자들에 관한 자세한 연구를 통해 종양 반응 예측 표지자로서 이용할 수 있을 지를 검증할 필요가 있다.

참고문헌

1. Almeida FF, Araujo SE, Santos FP, et al. Colorectal cancer screening.

- Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2000; 55: 35-42.
2. Department of Health and Welfare. Annual Report of Tumor Registry in Korea (2002.1-2002.12). Seoul. Department of Health and Welfare; 2003.
 3. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70 (Suppl 6): 1727-31.
 4. Garcia-Aguilar J, Mellgren A, Sirivongs P, Buie D, Madoff RD, Rothenberger DA. Local excision of rectal cancer without adjuvant therapy: a word of caution. *Ann Surg* 2000; 231: 345-51.
 5. Pihl E, Hughes ES, McDermott FT, Milne BJ, Price AB. Disease free survival and recurrence after resection of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 1981; 16: 333-41.
 6. Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG, *et al.* Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 174: 27-32.
 7. Mohiuddin M, Derdel J, Marks G, Kramer S. Results of adjuvant radiation therapy in cancer of the rectum. Thomas Jefferson University Hospital experience. *Cancer* 1985; 55: 350-3.
 8. Mehta VK, Poen J, Ford J, *et al.* Radiotherapy, concomitant protracted-venous infusion 5-fluorouracil, and surgery of ultrasound-staged T3 or T4 rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 52-8.
 9. Theodoropoulos G, Wise WE, Padmanabhan A, *et al.* T-level downstaging and complete pathologic response after preoperative chemoradiation for advanced rectal cancer result in decreased recurrence and improved disease-free survival. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 895-903.
 10. Read TE, McNevin MS, Gross EK, *et al.* Neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the rectum: tumor response and acute toxicity. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 513-22.
 11. Willett CG, Hagan M, Daley W, Warland G, Shellito PC, Compton CC. Changes in tumor proliferation of rectal cancer induced by preoperative 5-Fluorouracil and irradiation. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 62-7.
 12. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, *et al.* Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52: 294-303.
 13. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-14.
 14. Randomized study on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma. Stockholm Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 423-30.
 15. Nakajima Y, Miyamoto T, Tanabe M, Watanabe I, Terasima T. Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with X-rays. *Cancer Res* 1979; 39: 3763-7.
 16. Chen ET, Mohiuddin M, Brodovsky H, Fishbein G, Marks G. Downstaging of advanced rectal cancer following combined preoperative chemotherapy and high dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 169-75.
 17. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, *et al.* Pre-operative combined 5-FU low dose leucovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 821-7.
 18. Burke SJ, Percarpio BA, Knight DC, Kwasnik EM. Combined preoperative radiation and mitomycin/5-fluorouracil treatment for locally advanced rectal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 164-70.
 19. Chari RS, Tyler DS, Anscher MS, *et al.* Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1995; 221: 778-87.
 20. Jessup JM, Loda M. Prognostic markers in rectal carcinoma. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 131-40.
 21. 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.
 22. Brachman DG, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum RR. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53: 3667-9.
 23. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, *et al.* bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-4.
 24. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 237-41.
 25. Tannapfel A, Nusslein S, Fietkau R, Katalinic A, Kockerling F, Wittekend C. Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 585-91.
 26. Marijnen CA, Nagtegaal ID, Mulder-Stapel AA, *et al.* High intrinsic apoptosis, but not radiation-induced apoptosis, predicts better survival in rectal carcinoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 434-43.
 27. Meyn RE, Stephens LC, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 119-31.
 28. Bracey TS, Miller JC, Preece A, Paraskeva C. Gamma-radiation-induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene* 1995; 10: 2391-6.
 29. Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, *et al.* Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 68-74.
 30. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-36.