

외과적으로 절제한 폐의 편평세포암종과 샘암종에서 Anaphase Promoting Complex의 발현

송지선 · 정순희¹ · 엄민섭¹ · 이상엽
박광화¹ · 강엽³ · 김호영²

관동대학교 의과대학 병리학교실
¹연세대학교 원주의과대학 병리학교실
²내과학교실
³아주대학교 의과대학 의과학연구소

접 수 : 2005년 10월 10일
게재승인 : 2006년 1월 24일

책임저자 : 정 순 희
우 220-701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 병리학교실
전화: 033-741-1551
Fax: 033-731-6590
E-mail: soonheej@yonsei.ac.kr

Expression of Anaphase Promoting Complex in Surgically Resected Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Lung

Ji Sun Song, Soon-Hee Jung¹, Minseob Eom¹, Sang Yeop Yi, Kwang Hwa Park¹,
Yup Kang³ and Ho Young Kim²

Department of Pathology, Kwandong University College of Medicine, Goyang; ¹Departments of Pathology and ²Internal Medicine, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju; ³Institute for Medical Science, School of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

Background : The anaphase promoting complex (APC) promotes the degradation of mitotic cyclins as well as other substrates involved in sister chromatid adhesion. This study was carried out to examine the relationship between the APC expression and the clinicopathological variables, in an attempt to determine the role of the APC in the proliferation of lung cancer and to evaluate the possibility of an aberrant APC function in surgically resected squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. **Methods :** Immunohistochemical staining was performed for APC, Ki-67, cyclin B1, Cdc2, MMP-2 and VEGF in 55 cases of squamous cell carcinoma and 34 cases of adenocarcinoma of the lung, using the avidin-biotin-peroxidase method. **Results :** The immunohistochemical stains for APC revealed a positive reaction in 49 cases (55.1%). The APC expression level was higher in the cyclin B1-positive group ($p=0.01$), the Cdc2-positive group ($p=0.001$), the MMP-2-positive group ($p=0.03$), the group with lymph node metastasis (61.4% vs 48.9%), and the group with stage II/III cancer (60.7%) compared with those with stage I (42.9%). **Conclusions :** The APC may have an aberrant function, such as a change in its role in controlling the cell cycle, and might be associated with the invasiveness and proliferation of tumor cells.

Key Words : Anaphase-promoting complex; Squamous cell carcinoma; Adenocarcinoma; Lung cancer; Cell cycle

유핵세포는 G1기, S기, G2기와 M기의 세포주기를 거친 후 두 개의 딸세포로 분열된다. 이러한 세포 주기를 조절하는 물질들의 이상이나 변화가 종양세포로의 전환과 종양의 성장에 관여하는 것으로 생각되고 있다. 세포주기에서는 몇 가지 종류의 cyclin과 cyclin 의존 단백질 활성화소(cyclin dependent kinase, CDK)가 합성되어 다양한 조합으로 복합체를 형성함으로써 각각이 세포주기의 각 단계에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 또 다음 단계로 진행하기 위해서는 합성된 cyclin의 분해가 필수적이라는 사실 역시 알려져 있다.¹ 그렇지만 세포주기 후반부에 유사분열이 일어나는 M기의 조절 과정에 대해서는 그리 많은 연구가 이루어지지 않고 있다.

Anaphase promoting complex (APC)는 비교적 최근에 알려지기 시작하였으며, ubiquitin 의존성 단백질 분해 촉진 물질

로서 세포주기 중 M기에 급격히 활성도가 증가한다. 그리하여 G2기에서 M기의 진행을 유도한 cyclin B1을 분해시켜 방추사의 해체와 세포질 분열을 시작하게 함으로써 M기 중기에서 후기로 진입하게 한다.² Cyclin B1은 G2기 초반에 합성되기 시작하여 Cdc2 (CDK1)와 복합체를 형성하고 인산화됨으로써 활성화되면 세포를 M기로 진입시켜 유사분열, DNA 합성, 방추사 합성 등에 관여하는 다양한 단백질을 인산화시키며 G2/M기 후반에 최대치를 보인다. 이어 Cdc2는 p21, p27과 같은 CDK 억제인자와 결합함으로써 불활성화된다.³ Cyclin B1은 ubiquitin-proteasome 경로를 통해 분해됨으로써 결과적으로 세포가 유사분열을 마치고 세포주기를 나와서 두 개의 딸세포로 분리된다.⁴

APC는 이 ubiquitin-proteasome 경로에서 표적 단백질의 ubiquitination을 위한 복합체를 형성하는 데 필요한 물질인 E1 (ubiq-

uitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin protein ligase) 중 최종적인 과정에 필요한 E3에 해당하는 물질인 것으로 생각된다.⁵ Sudakin 등⁶은 대합조개의 난자에서 cyclin A와 B를 ubiquitination시키는 1,500 kDa 크기의 복합체를 분리하여 cyclosome이라 명명하였고, King 등⁷이 anaphase promoting complex라 명명하였으며, 척추동물에게도 이에 상응하는 구조가 존재한다는 것이 밝혀졌다.⁸

APC는 11개의 소단위로 구성된 단백질 복합체로서 새로운 소단위가 발견되고 있다.⁸ 그러나 각각의 소단위들이 어떤 기능을 하며 조화를 이루는지에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않다. 또한 조절되지 않는 증식이 특징인 종양의 발생기전과 성장 양상을 연구함에 있어 세포주기 조절 인자와의 연관성에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있다. 그렇지만 APC 발현의 증가 또는 감소가 어떤 종양의 발생이나 예후와 연관이 있는지 밝히기 위한 연구는 매우 미약한 실정이다.

폐암종은 매년 유병률이 증가하고 있으며 세계적으로 암사망률이 가장 높은 악성 종양이다. 비소세포폐암종은 병기에 따라 외과적 치료가 원칙이나, 절제 후에도 다른 암종에 비해 예후가 좋지 않기 때문에 수술 후 예후를 예측하고 화학요법이나 방사선치료와 같은 보조치료 여부를 결정하는 데 도움이 되는 인자들에 대한 연구가 중요시되고 있다. 이들 중 최근 세포주기 조절 인자인 cyclin과 CDK가 어떠한 역할을 하는지 밝히기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 함께 이미 발생된 종양의 잠재된 침습성과 전이성은 수술로 종양을 제거한 후에도 환자의 예후에 영향을 미칠 수 있다는 점에서 중요하다. 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinase (MMP)와 신생혈관 형성인자인 vascular endothelial growth factor (VEGF)는 종양의 침습과 전이에 관여할 것으로 여겨져 이들에 대한 연구가 여러 암종에서 이루어지고 있다.

종양세포가 기저막과 세포외기질을 통과하여 주변 조직으로 침습하기 위해서는 효소적 분해과정이 필요한데, 암세포는 자체적으로 단백질 분해효소를 분비하거나 섬유모세포나 대식세포와 같은 숙주 세포에서 단백질 분해효소를 분비하도록 유도한다. 단백질 분해효소인 MMP family 중 MMP-2는 gelatinase A라고도 하며 기저막의 주성분인 제4형 교원질을 분해하는 데 가장 중요한 역할을 한다. 침습하고 있는 종양의 가장자리에서는 단백질 분해효소와 단백질 분해 억제제의 균형이 깨져 단백질 분해효소의 활성이 증가한다. 대장암종, 폐암종 등 여러 암종에서 MMP의 발현율이 높은 경우 종양의 전이와 림프절 전이율이 높고, 예후가 좋지 않다는 보고들이 있다.^{9,10}

원발 종양이 신생혈관을 생성하는 능력은 종양의 성장과 전이에 매우 중요한 역할을 한다. 종양은 신생혈관을 형성함으로써 성장에 필요한 영양분을 쉽게 얻을 수 있으며, 다른 장기로 전이할 수 있는 경로에 쉽게 도달할 수 있기 때문이다. 혈관형성에 관여하는 인자 중에서 VEGF family는 VEGF, VEGF-B, placental growth factor, VEGF-C와 VEGF-D로 분류되며 각각

고유의 기능을 수행함으로써 발생 초기에 혈관형성과 신생혈관의 성장에 중심적인 역할을 한다.¹¹ VEGF는 거대 분자의 혈관 투과성을 높이고, 혈관내피세포의 강력한 유사분열인자일 뿐 아니라 혈관내피세포의 이동과 혈관의 내강 구조 형성을 증가시키며, 분화된 혈관 상태를 유지시킨다. 이 때문에 VEGF는 종양의 신생혈관형성과 함께 만성 염증과 상처 치유 과정을 촉진하는데도 관여하는 물질로 알려져 있다.¹² 신장암종, 방광암종, 난소암종, 유방암종 등에서 정상보다 VEGF mRNA의 발현율이 높다는 보고가 있고,¹³⁻¹⁶ 폐암종에서도 VEGF의 발현율이 조직학적 분화도, 미세혈관의 밀도와 림프절 전이, 임상 병기, 재발률 및 생존율 등과 상관이 있다는 보고들이 있어서 VEGF의 예후 추정인자로서의 가능성을 시사하였다.^{17,18}

따라서 본 연구에서는 비소세포폐암종의 대표적 유형인 편평세포암종과 샘암종에서 면역조직화학 염색을 시행하여 세포주기를 진행시키는 조절단백복합체로 알려진 APC에 대한 발현 정도를 알아보고, APC의 발현과 기존의 임상 및 병리학적 변수와의 관계를 살펴보고, Ki-67 표지 지수와의 관계를 통하여 APC의 발현이 종양세포의 증식에 미치는 영향을 알아보고, 세포주기에서 APC의 분해 목표물질인 cyclin B1 및 이와 복합체를 형성하는 Cdc2의 발현과의 관계, 나아가 종양의 침습과 전이 과정에 기여하는 것으로 생각되는 MMP-2, VEGF의 발현과의 관계를 알아봄으로써 APC가 비소세포폐암종에서 하는 역할과 다른 예후인자와의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

연구 재료

1986년 1월부터 1999년 12월까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에서 비소세포폐암종 진단을 받고 수술 전 화학요법이나 방사선조사 없이 폐절제술로 얻은 55예의 편평세포암종과 34예의 샘암종 환자의 파라핀 포매 조직을 이용하였다.

연구 방법

임상 정보

환자의 병리 진단지와 임상 기록지를 검토하여 환자의 연령, 성별, 종양의 크기를 조사하고 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 기준에 따라 병기를 정하였다.

병리조직학적 검색

파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 HE 염색을 시행한 슬라이드를 광학현미경으로 검색하였다. 그리하여 조직학적 유형과 분화도, 림프절 전이 유무를 재확인하고 각 예에서 종양 조직과 정상 폐조직이 함께 포함된 한 개의 대표적인 파라핀 블

를 선택하였다.

조직학적 유형은 편평세포암종과 샘암종으로 구분하였고 조직학적 분화도에 따라 고분화, 중분화, 저분화로 분류하였다. 편평세포암종은 중앙세포의 세포간교, 케라틴 형성, 그리고 핵의 이형성 정도에 따라 분화도를 고, 중, 저로 구분하였고, 샘암종은 샘 관내강, 유두상 구조 및 세포질 내 점액 형성, 그리고 핵의 이형성을 기준으로 분화도를 고, 중, 저로 구분하였다. 한 슬라이드에서 다양한 분화도가 나타난 경우에는 가장 낮은 분화도를 기준으로 판정하였다.

면역조직화학 염색

APC, Ki-67, cyclin B1, Cdc2, MMP-2, VEGF에 대한 면역조직화학 염색의 일차항체는 APC (아주대학교 의과연구소 강엽 교수 제공)를 1:50으로 희석하였고, Ki-67 (DAKO, Copenhagen, Denmark), cyclin B1 (Santa Cruz, CA, USA), Cdc2 (Santa Cruz, CA, USA), MMP-2 (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 각각 1:100으로 희석하였으며, VEGF (Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 1:50으로 희석하여 사용하였다.

파라핀 블록은 5 μm 두께로 박절하여 코팅 슬라이드 위에 부착하고 60°C에서 2시간 건조시켰다. 탈파라핀과 재수화를 시키고 수세한 후 pressure cooker를 이용하여 마이크로웨이브(750 W)에 5분간 3회 가열하고 20분간 pressure cooker 안에 유지시켰다. 3% 과산화수소 용액에 10분 동안 처리하여 내인성 peroxidase를 억제하였다. 증류수에 세척하고 트리스 완충액에 10분간 수세하였다. 일차항체를 각각 실온에서 하룻 밤 동안 반응시키고 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 트리스 완충액에 10분간 수세하였다. 이차항체에 30분간 반응시킨 후 트리스 완충액에 10분간 수세하였다. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)에 6분간 발색한 후 흐르는 물에 세척하고, 헤마톡실린으로 대조 염색한 다음 다시 흐르는 물에 세척하고 글리세롤로 봉입하였다.

면역조직화학 염색의 판독

APC와 Ki-67은 핵에 적갈색으로 염색되는 것을, cyclin B1, Cdc2는 세포질이나 핵에 염색된 것을, MMP-2와 VEGF는 세포질에 염색된 것을 양성으로 판독하였다. APC, cyclin B1, Cdc2, MMP-2, VEGF의 발현 정도를 객관화하기 위해 염색이 되지 않은 것은 0점, 그리고 염색 강도가 강할수록 1점(약양성), 2점(중양성), 3점(강양성)으로 점수화하였다. 그리고 염색된 중앙세포의 백분율에 따라 0%는 0점, 25% 미만은 1점, 25%부터 50% 미만은 2점, 50% 이상일 때 3점으로 점수화하여 염색 강도와 양성인 중앙세포의 백분율에 대한 점수를 합산한 다음 2점 이하인 경우를 음성, 3점 이상인 경우를 양성으로 최종 판독하였다.¹⁹ Ki-67 표지 지수는 면역조직화학 염색에 양성 반응을 보인 세포의 밀도가 가장 높은 부분을 다섯 군데 이상 400배의 고배율 시야로 관찰하여 1,000개의 중앙세포 중 양성인 세포 수를 세어 백분율로 표시하였다.

통계 처리

SPSS 프로그램을 통해 카이제곱 검정법과 t-검정법을 사용하여 APC의 발현과 조직학적 유형, 분화도, 종양의 크기, 림프절 전이, 임상 병기와와의 관계를 조사하고, Ki-67 표지 지수와와의 관계, 그리고 cyclin B1, Cdc2, MMP-2, VEGF 발현과의 연관성을 조사하였다. p값은 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미가 있다고 판정하였다.

결 과

임상 소견

환자의 연령은 37세부터 80세까지 분포했으며 평균 59.7세였다. 연령별로는 30대가 2예, 40대가 13예, 50대가 30예, 60대가 28예, 70대가 16예로 50대와 60대에서 가장 많았다. 성별로는

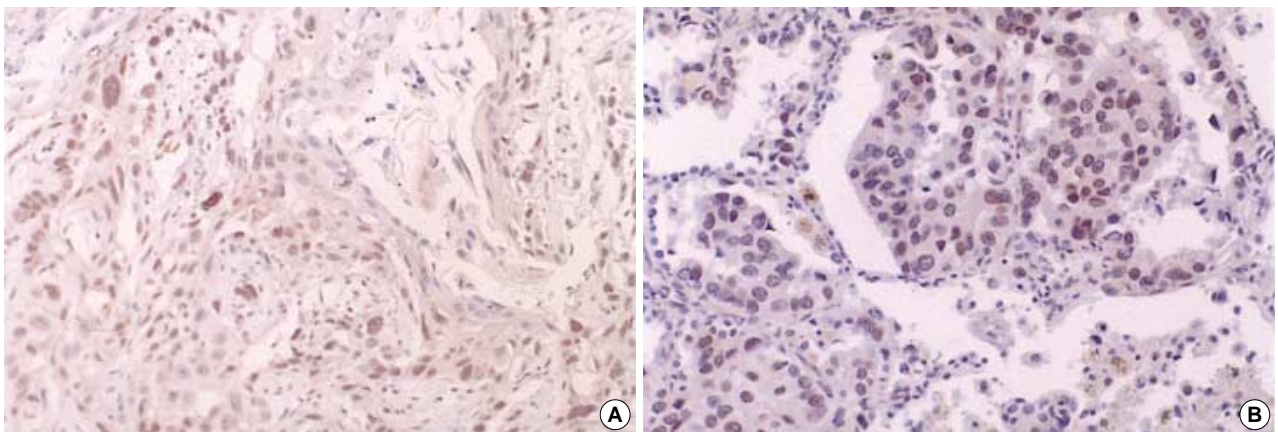


Fig. 1. The immunohistochemical stain for APC reveals positive reaction in tumor cell nuclei of squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B).

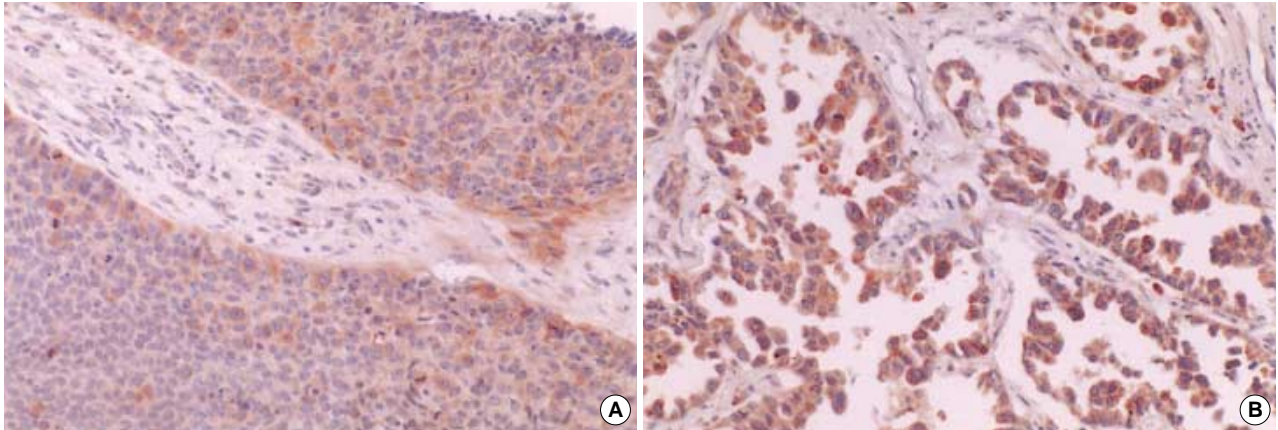


Fig. 2. The immunohistochemical stain for cyclin B1 reveals positive reaction in tumor cell cytoplasm and nuclei of squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B).

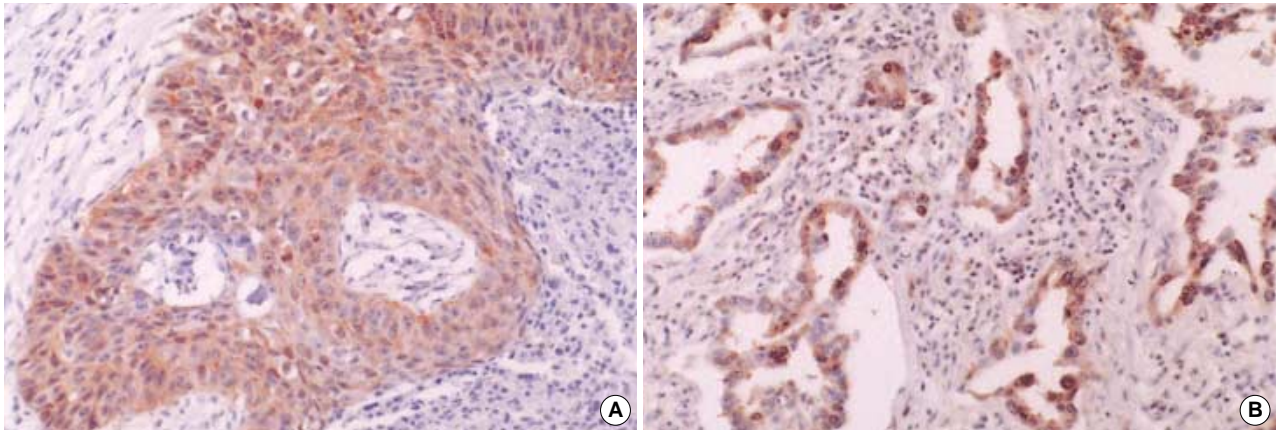


Fig. 3. The immunohistochemical stain for Cdc2 reveals positive reaction in tumor cell cytoplasm and nuclei of squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B).

남자가 68예(76.4%), 여자가 21예(23.6%)로 남녀 성비는 3.2:1 이었다. AJCC의 기준에 따라 병기를 분류하였을 때 병기 IA와 IB는 28예(31.5%), IIA와 IIB는 23예(25.8%), IIIA는 26예(29.2%), IIIB는 12예(13.5%)였다.

병리학적 소견

조직학적 유형별로는 편평세포암종이 55예(61.8%), 샘암종이 34예(38.2%)였고, 조직학적 분화도에 따라 분류하면 고분화 및 중분화가 63예(70.8%), 저분화가 26예(29.2%)였다. 종양의 크기는 3 cm 이하가 17예(19.1%), 3 cm 초과가 72예(80.9%)였다. 림프절 전이가 없는 예가 45예(50.6%), 림프절 전이가 있는 예는 44예(49.4%)였다.

면역조직화학 염색 결과

APC는 비소세포폐암종 89예 중 49예(55.1%)에서 양성 반응

을 보였고(Fig. 1), MMP-2는 43예(47.8%), VEGF는 34예(37.8%)에서 각각 양성 반응을 보였다. Cyclin B1과 Cdc2는 88예에서만 면역조직화학 염색을 시행하였으며, 이 중 cyclin B1 (Fig. 2)은 65예(73.9%)에서, Cdc2 (Fig. 3)는 44예(50.0%)에서 각각 양성 반응을 보였다.

APC의 발현과 임상 및 병리학적 변수와의 관계

APC의 조직학적 유형에 따른 발현율을 살펴보면 편평세포암종은 35예(63.6%)에서, 샘암종은 14예(41.2%)에서 양성 반응을 보였다(p=0.06). 조직학적 분화도에 따라 고-중분화도인 군에서 39예(61.9%), 저분화도인 군에서 10예(38.5%)가 양성 반응을 보였다(p=0.07). 종양의 크기에 따라 3 cm 이하인 군에서 11예(64.7%), 3 cm 초과인 군에서 38예(52.8%)가 양성 반응을 보였다(p=0.5). 림프절 전이가 없는 군에서 22예(48.9%), 림프절 전이가 있는 군에서 27예(61.4%)가 양성 반응을 보였다(p=0.3). 임상 병기에 따른 발현을 비교하면, 병기 I에서 12예(42.9%), 병기 II와 III에서 37예(60.7%)가 양성 반응을 보였다

Table 1. Relationship between APC expression and clinicopathologic variables

Variables	No. of cases	APC		p value
		Negative, n (%)	Positive, n (%)	
Histologic type				
Squamous cell carcinoma	55	20 (36.4)	35 (63.6)	0.06
Adenocarcinoma	34	20 (58.8)	14 (41.2)	
Differentiation				
Well to moderately	63	24 (38.1)	39 (61.9)	0.07
Poorly	26	16 (61.5)	10 (38.5)	
Tumor size				
≤3 cm	17	6 (35.3)	11 (64.7)	0.5
>3 cm	72	34 (47.2)	38 (52.8)	
Lymph node metastasis				
Negative	45	23 (51.1)	22 (48.9)	0.3
Positive	44	17 (38.6)	27 (61.4)	
Stage				
I	28	16 (57.1)	12 (42.9)	0.1
II/III	61	24 (39.3)	37 (60.7)	

Table 3. Relationship between APC expression and cyclin B1, Cdc2, MMP-2, and VEGF expression

Markers	No. of cases	APC		p value
		Negative, n (%)	Positive, n (%)	
Cyclin B1				
Negative	23	16 (69.6)	7 (30.4)	0.01
Positive	65	24 (36.9)	41 (63.1)	
Cdc2				
Negative	44	28 (63.6)	16 (36.4)	0.001
Positive	44	12 (27.3)	32 (72.7)	
MMP-2				
Negative	46	26 (56.5)	20 (43.5)	0.03
Positive	43	14 (32.6)	29 (67.4)	
VEGF				
Negative	55	29 (52.7)	26 (47.3)	0.09
Positive	34	11 (32.4)	23 (67.7)	

($p=0.1$)(Table 1).

따라서 APC의 발현과 임상 및 병리학적 변수의 관계를 살펴본 결과를 종합해보면, 편평세포암종에서, 조직학적 분화도가 낮은 군에서, 종양의 크기가 작은 군에서, 림프절 전이가 있는 군에서, 그리고 임상 병기가 높은 군에서 APC 발현율이 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

Ki-67 표지 지수에 따른 APC, cyclin B1, Cdc2의 발현

Ki-67 표지 지수는 백분율 값이 30 미만인 군과 30 이상인 군으로 분류하였을 때, APC는 Ki-67 표지 지수가 30 미만인 군(14예, 42.4%)보다 30 이상인 군(35예, 62.5%)이 발현율이 높은 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다($p=0.08$). Cyclin B1 ($p=0.014$)과 Cdc2 ($p=0.027$)는 Ki-67 표지 지수가 30 이상인 군이 30 미만인 군보다 통계학적으로 유의하게 발현율이

Table 2. Relationship between Ki-67 labeling index and the expression of APC, cyclin B1, and Cdc2

Markers	Ki-67 labeling index			mean Ki-67	
	<30%, n (%)	>30%, n (%)	p value	mean (%)	p value
APC					
Negative	19 (57.6)	21 (37.5)	0.08	32.8±15.9	0.03
Positive	14 (42.4)	35 (62.5)		40.0±14.8	
Cyclin B1					
Negative	14 (42.4)	10 (17.9)	0.014	30.7±17.7	0.1
Positive	19 (57.6)	46 (82.1)		37.1±15.5	
Cdc2					
Negative	22 (66.7)	23 (41.1)	0.027	30.5±15.6	0.004
Positive	11 (33.3)	33 (58.9)		40.3±15.6	

높았다.

또한 Ki-67 표지 지수에 대한 APC, cyclin B1, Cdc2의 발현을 t-검정법으로 분석하였을 때, APC에 음성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(32.8%)보다 APC에 양성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(40.0%)가 통계학적으로 유의하게 높았다($p=0.03$). Cyclin B1에 음성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(30.7%)보다 cyclin B1에 양성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(37.1%)가 높은 값을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다($p=0.1$). Cdc2에 음성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(30.5%)보다 Cdc2에 양성인 군의 Ki-67 평균 표지 지수(40.3%)가 통계학적으로 유의하게 높았다($p=0.004$)(Table 2).

따라서 Ki-67 표지 지수에 대한 결과를 종합하면 다음과 같다. APC에 양성인 군의 평균 표지 지수는 APC에 음성인 군보다 높았다. Cyclin B1에 양성인 군은 30% 이상의 높은 표지 지수를 갖는 예가 더 많았다. Cdc2에 양성인 군은 30% 이상 표지 지수를 갖는 예가 많았고 평균 표지 지수 역시 Cdc2에 음성인 군보다 높았다. 이러한 결과는 모두 통계학적으로 유의한 차이가 있었다.

APC 발현과 cyclin B1, Cdc2, MMP-2, VEGF 발현의 관계

APC 발현은 cyclin B1이 음성인 군에서 7예(30.4%), cyclin B1이 양성인 군에서는 41예(63.1%)가 양성 반응을 보였고($p=0.01$), Cdc2가 음성인 군에서 16예(36.4%), Cdc2가 양성인 군에서 32예(72.7%)가 양성 반응을 보여($p=0.001$) APC의 발현은 cyclin B1, Cdc2의 발현과 유의한 상관관계가 있었다. 또한 APC 발현은 MMP-2 음성인 군(20예, 43.5%)보다 MMP-2 양성인 군(29예, 67.4%)에서 통계학적으로 유의하게 더 높은 양성 반응을 보였고($p=0.03$), VEGF는 음성인 55예 중 26예(47.3%)에서, VEGF가 양성인 34예 중 23예(67.7%)가 APC에 양성 반응을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.09$)(Table 3).

고 찰

종양은 정상 세포에 비해 비정상적으로 증가한 증식능을 가짐으로써 발생, 성장한다고 할 수 있다. Ki-67은 증식하는 세포를 표지하는 대표적인 항원으로서 휴지기인 G0기 세포에서는 발현되지 않으며, 세포주기에 들어가면 G1, S, G2, M기를 거치는 세포 분열의 모든 단계에서 발현되는 핵단백으로 cyclin B/Cdc2 복합체에 의해 조절된다.²⁰ 이는 마우스 단세포군 항체로서 과라핀 포배 조직에서 면역조직화학 염색을 적용하면 대상 세포의 증식 정도를 쉽게 알아볼 수 있다.

유방암에서 APC가 하는 역할에 대한 이전 연구에서 Ki-67 표지 지수가 낮으면 APC가 높게 발현된다는 보고가 있었는데, 이는 APC가 세포주기 M기의 증기에서 후기로 진행을 촉진시켜 세포가 유사분열을 끝내고 세포주기에서 빠져나오도록 하는 역할을 한다고 볼 때 APC가 종양세포의 증식을 억제한다는 가설을 뒷받침한다고 하였다.²¹ 이에 반해 본 연구에서는 APC 양성인 군에서 Ki-67 표지 지수가 APC 음성인 군보다 유의하게 높은 값을 보여 상반된 결과를 보였다. 이전 연구의 가설에 비추어볼 때, 분열하는 세포에서 APC의 기능에 이상이 생겼다면 이 시기에 정확하게 이루어져야 할 딸세포의 염색체 분리가 불완전해짐으로써 세포가 유전자의 불안정성 혹은 비배수성을 획득하여 종양세포로 전환되는 한 기전이 될 것이라 생각된다.

따라서 본 연구 결과는 종양에서 APC는 정상 세포에서와는 다른 기능의 변화를 보일 수 있다는 가능성을 반영하는 것으로 생각된다. 이를 지지하는 소견으로 Wang 등²²은 사람의 여러 장기의 암세포주 중 대장암 세포주에서 APC의 주요 소단위 유전자의 돌연변이를 관찰하고, 이 돌연변이형 유전자를 대장암 세포주에 실험적으로 발현시켰을 때 APC의 분해 목표물질인 cyclin B1이 비정상적으로 높게 발현되고 동시에 세포주기가 G2/M기에서 정지되었다고 보고하였다. 그리고 대장암에서 APC의 이러한 돌연변이나 기능의 이상이 cyclin B1의 축적을 초래하고 세포주기 진행을 지연시킴으로써 대장암의 발생과정에 중요한 역할을 할 것이라고 주장하였다. 이들의 연구에서는 폐암 세포주가 포함되지 않았지만 여러 다른 암종마다 구성하는 APC 소단위의 종류나 구조가 조금씩 다르며 각각 다른 변화가 일어날 수 있다고 생각된다.

또한 Zhang 등²³은 사람의 폐암종 세포주에서 APC 활성화에 중요한 소단위인 Cdc20이 Mad2와 결합함으로써 불활성화되는 것을 확인하고, 돌연변이형 Cdc20은 구조적 변형을 일으켜 Mad2와는 결합할 수 있지만 APC와는 결합하지 못하며, 이 돌연변이형 Cdc20의 과발현은 cyclin B를 증가시키고 다핵세포의 형성을 유도한다고 하였다. 따라서 본 연구에서처럼 증식하는 비소세포암종에서 과발현된 APC는 구조나 기능의 이상을 초래하는 돌연변이와 같은 변화의 가능성이 있고, 정상적인 세포분열 단계를 완성시키지 못함으로써 유전자의 불안정성이나 비배수성 획득과 함께 종양 발생에 기여할 것으로 생각된다.

Cyclin B1은 최근 종양에서 세포주기 조절 이상에 대한 연구가 활발해지면서 주목받게 된 세포주기 조절 물질이다. Cyclin B1은 G2기에 합성되고 Cdc2와 복합체를 형성함으로써 활성화되어 세포주기를 M기로 진행시킨 후 APC와 같은 억제인자에 의해 분해된다. 따라서 본 연구에서 Ki-67 표지 지수가 cyclin B1 양성인 군과 Cdc2 양성인 군에서 모두 통계학적으로 유의하게 높은 값을 보인 것은 이러한 사실을 입증하는 결과라고 생각된다. Jin 등²⁴은 비호지킨 림프종에서 본 연구와 일치하는 결과를 얻었는데, cyclin B1과 Cdc2의 발현은 Ki-67 표지 지수와 밀접한 상관성이 있으며, 화학요법에 대해 완전 관해가 있는 군에서 Cdc2의 발현이 유의하게 낮아 이들이 악성 림프종의 발생과 성장에 관여하며, Cdc2는 화학요법의 반응을 예측할 수 있는 유용한 인자가 될 수 있다고 결론지었다.

또한 본 연구에서 APC의 발현은 cyclin B1 양성인 군과 Cdc2 양성인 군에서 더 높았고 통계학적 유의성이 있었다. 이는 G2/M기의 종양세포에서 활성화된 cyclin B1을 분해하는 APC의 정상적인 기능의 장애로 cyclin B1의 과발현과 더불어 Cdc2의 과발현이 초래된다는 가설을 뒷받침하는 결과라고 생각한다. 분열하는 세포에서 APC에 의한 cyclin B1 분해가 정상적으로 이루어지지 못하면 세포가 세포주기를 완전히 빠져나오지 못하고 다시 세포주기를 돌게 되어 비정상적인 증식이 초래될 수 있을 것이다. 세포주기의 각 단계 조절에 관여하는 여러 cyclin의 비정상적인 발현은 이미 다양한 악성 종양에서 보고된 바 있다. cyclin B1에 대한 이전의 연구들에서는 cyclin B1의 발현이 높은 경우 환자의 생존기간이 통계학적으로 유의하게 짧았고,²⁵ cyclin B1 발현이 높을수록 종양의 크기, 침윤 정도, 림프절 전이와 비례한다는 보고가 있었다.²⁶ 다른 여러 종양에서도 cyclin B1의 과발현이 종양 발생과정 및 예후와 관련된다는 연구가 발표되고 있다. 본 연구에서도 cyclin B1은 73.0%의 높은 발현을 보였고, APC의 발현과 유의한 관련성이 있다는 점에서 비소세포폐암종에서 APC의 과발현은 세포주기 진행의 장애로 인한 종양의 성장과 증식을 반영하는 것이라고 생각된다.

종양세포가 주변 조직으로 성장해 나가고, 림프절이나 원격 장기로 전이하기 위해서는 기저막과 버틸질의 효소적 분해과정을 통하여 침습해야 한다. MMP-2는 단백 분해효소의 하나로 신생혈관 형성에도 관여하여 여러 암종의 침윤과 진행에 관여하는 것으로 여겨진다. 최근 연구들에서도 폐암종에서 MMP-2에 양성인 군은 림프절 전이가 유의하게 높고, 생존율이 현저하게 낮아 MMP-2는 비소세포폐암종의 나쁜 예후인자라고 보고하였다.^{27,28} 본 연구에서 APC의 발현이 MMP-2가 양성인 군에서 유의하게 높게 나타난 점은 APC가 종양의 발생과 증식에 관여할 뿐 아니라 나아가 침윤성 성장에도 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다고 생각된다. 그러나 종양의 침윤성 성장에 APC가 미치는 영향에 대한 연구는 현재까지 거의 이루어지지 않은 실정이므로, 그 기전을 알아내기 위한 연구를 진행해야 할 것이다.

종양이 신생혈관을 생성하는 능력은 원발 종양이 성장할 수

있는 양분과 산소를 공급하고 노폐물을 신속히 제거시킬 뿐 아니라 혈행을 통해 다른 장기로 전이하고 또 전이한 후의 종양이 성장하고 증식하는 데도 중요한 역할을 한다. 여러 가지 혈관형성인자 중 VEGF는 종양의 신생혈관 형성에 매우 중요한 물질로 알려져 있고, 폐암중에서는 전이와 관련한 예후 추정인자로 사용될 뿐 아니라 신생혈관 형성 억제를 유발하는 항암제 개발에도 이용되고 있다.²⁹ 종양 내에 이미 존재하던 림프관이나 새로 형성된 림프관의 수가 많을수록 림프절 전이는 증가할 것이다. VEGF가 내피세포의 강력한 유사분열인자이며 림프관도 내피세포로 구성되어 있으므로 VEGF는 종양의 신생림프관 형성능력을 증가시키는 데도 관여한다고 생각된다. 최근에는 VEGF family 중 VEGF-C와 VEGF-D가 일차적으로 림프관 형성에 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹¹ 본 연구에서 APC는 VEGF 양성인 군에서, 림프절 전이가 있는 군에서, 그리고 낮은 병기보다는 병기가 높은 군에서 발현율이 더 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 따라서 본 연구는 비소세포 폐암중의 예후 추정인자로 APC를 사용할 수 있는 가능성을 나타내기에는 부족한 결과를 보였다. 이에 대해서는 신생혈관 형성이나 림프관 형성과 관련한 다른 인자 또는 다른 예후 추정인자와의 관련성을 좀더 연구해야 할 것으로 생각된다.

본 연구 결과를 종합해보면, 비소세포폐암중의 대표적 유형인 편평상피암중과 샘암중에서 APC가 높게 발현된 군은 평균 Ki-67 표지 지수가 더 높았고, cyclin B1과 Cdc2도 더 높게 발현되었다. 이 결과로, 세포주기에서 cyclin B1/Cdc2 복합체가 G2/M기 전환을 유도한 후 APC가 cyclin B1을 분해하는 과정에서 APC가 돌연변이와 같은 어떠한 변화에 의하여 기능에 이상이 초래되어 세포가 분열 단계의 세포주기를 마치지 못하고 딸세포의 불완전한 염색체 분리나 비배수성을 획득함으로써 종양이 발생하고, 또한 비정상적인 세포주기를 가짐으로써 종양의 증식과 성장을 유도한다고 생각할 수 있다.

또한 APC의 발현은 MMP-2가 양성인 군에서 유의하게 높게 나타나 기저막과 버팀질의 효소적 분해작용을 통해 침습하는 종양세포의 증식에도 관여하여 종양의 침습을 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 APC는 비소세포폐암중에서 종양의 발생과 증식, 성장 뿐 아니라 침습성 획득에도 관여할 가능성이 있다고 생각된다. 그러나 APC는 여러 개의 소단위로 구성된 복합체로서 기능을 하며, 소단위의 발현은 세포의 종류에 따라 조금씩 다르고, 어떤 소단위는 특정 조직에서 더 강하게 발현되기도 한다.³⁰ 그렇기 때문에 여러 다른 종양에서 각 소단위가 하는 역할에 대한 연구가 더 이루어져야 APC가 종양에서 하는 역할을 명확히 알 수 있을 것이다.

참고문헌

- Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374: 131-4.
- Morgan DO. Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* 1999; 1: E47-53.
- Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9: 1149-63.
- Zachariae W, Nasmyth K. Whose end is destruction: cell division and anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999; 13: 2039-58.
- Page AM, Hieter P. The anaphase promoting complex. *Cancer Surv* 1997; 29: 133-50.
- Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, *et al.* The cytosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 185-97.
- King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, Kirschner MW. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 1995; 81: 279-88.
- Page AM, Hieter P. The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 583-609.
- Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 190-6.
- Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 1997; 47: 461-9.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 550-63.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, *et al.* Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255-62.
- Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, *et al.* Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4233-7.
- Abu-Jawdeh GM, Faix JD, Niloff J, *et al.* Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest* 1996; 74: 1105-15.
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2013-6.
- Aikawa H, Takahashi H, Fujimura S, *et al.* Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 4305-9.
- Ohta Y, Tomita Y, Oda M, Watanabe S, Murakami S, Watanabe Y.

- Tumor angiogenesis and recurrence in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1034-8.
19. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 931-4.
 20. Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257: 231-7.
 21. Eom M, Park KH, Lee KG, Yi SY, Kang Y, Jung SH. Relationship between expression of anaphase-promoting complex and prognostic factors in invasive ductal carcinoma of breast. *Korean J Pathol* 2003; 37: 19-25.
 22. Wang Q, Moyret-Lalle C, Couzon F, *et al.* Alterations of anaphase-promoting complex genes in human colon cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 1486-90.
 23. Zhang Y, Lees E. Identification of an overlapping binding domain on Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5190-9.
 24. Jin YH, Park CK. Expression of cyclin B1 and cdc2 in nodal non-Hodgkin's lymphoma and its prognostic implications. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 322-7.
 25. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, *et al.* Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 2000; 60: 4000-4.
 26. Li JQ, Kubo A, Wu F, *et al.* Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. *Int J Oncol* 2003; 22: 1101-10.
 27. Lin TS, Chiou SH, Wang LS, *et al.* Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2004; 12: 717-23.
 28. Zhang HZ, Lu ZQ, Xie DR, *et al.* Effect of cyclooxygenase-2, and matrix metalloproteinase-2 expression on prognosis of lung cancer. *Ai Zheng* 2004; 23: 1190-3.
 29. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3243-56.
 30. Jorgensen PM, Graslund S, Betz R, Stahl S, Larsson C, Hoog C. Characterisation of the human APC1, the largest subunit of the anaphase-promoting complex. *Gene* 2001; 262: 51-9.