

곧창자 샘암종에서 세포주기 조절 단백질 발현: 수술 전 방사선화학 치료 반응 및 예후에 미치는 영향

유진영 · 신정하 · 정지한 · 최현주
강석진 · 강창석 · 이교영

가톨릭대학교 의과대학병원 병리학교실

Expression of Cell Cycle-Regulatory Proteins in Rectal Cancer: Significance of the Tumor Response to Preoperative Radiochemotherapy and for the Prognosis

Jinyoung Yoo, Jung Ha Shin, Ji Han Jung, Hyun Joo Choi, Seok Jin Kang,
Chang Suk Kang and Kyo Young Lee

Department of Pathology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea, Suwon, Korea

Background : Preoperative radiochemotherapy (PRCT) improves the outcomes for patients suffering with locally advanced rectal carcinoma, compared with surgery alone. However, there are no reliable factors predicting the survival and therapeutic benefits. **Methods :** The cell-cycle regulatory proteins were investigated in the pretreatment biopsies from 68 patients who were suffering with rectal cancer by performing immunohistochemical studies of p53, p21, cyclin D1, Rb and p16 protein. The tumor response was graded on a three-scale grading system: no response (NR), partial remission (PR) and complete remission (CR). **Results :** The tumors were positive for p53, p21 and cyclin D1 in 46 (67.6%), 32 (47.1%) and 14 (20.6%) cases, respectively. Abnormalities in Rb immunostaining were observed in 9 (13.2%) cases, while an abnormal p16 expression was noted in 59 (86.8%) tumors. Forty-two patients (61.8%) responded to PRCT: 18 (26.5%) cases achieved a CR and 24 (35.3%) cases achieved a PR. None of the above molecular markers were significantly associated with tumor response. However, the altered expression of p16 showed a significant correlation with overall survival ($p=0.001$). The high expression of p21 demonstrated a trend for longer survival ($p=0.061$). **Conclusions :** Of the cell-cycle regulatory proteins, p16 may be a valuable marker for to predict rectal cancer patients' survival; however, the role of each cell-cycle regulatory protein for the therapeutic benefits of PRCT needs to be further studied.

Key Words : Rectal neoplasm; Cell cycle proteins

접 수 : 2006년 1월 3일
게재승인 : 2006년 4월 27일

책임저자 : 강 석 진
우 442-060 경기도 수원시 팔달구 지동 93
성빈센트병원 병리과
전화: 031-249-7591
Fax: 031-244-6786
E-mail: sjkang@vincent.cuk.ac.kr

대장암종은 세계적으로 폐암 다음으로 발생률이 높은 악성 종양으로, 국내에서도 전체 악성 종양의 장기별 발생 빈도에서 폐암, 위암, 간암에 이어 4위(9.9%)를 차지한다. 그리고 최근 식생활이 서구화되면서 대장암종의 발생률 및 이에 따른 사망률이 점차 증가하는 추세다.^{1,2}

대장암종 가운데 특히 진행성 하부 곧창자 샘암종은 경항문 국소 절제부터 전이된 암의 병합 절제까지 병기에 따라서 치료를 달리하는데,³ 외과적 절제술만 시행할 경우 20-40%의 국소 재발률과 57%의 원격 전이율을 보인다.^{4,5} 수술 전에 방사선화학 요법을 시행한 후 근치적 절제술을 시행한 결과 병변의 크기와 병기가 감소하고 이에 따른 항문괄약근의 보존 가능성이 높아진다는 보고들⁶⁻⁸이 발표된 바 있다. 그리하여 최근에는 항문

연에서 8-10 cm 이내에 위치하고 컴퓨터 전산화 단층 촬영 결과 병기가 T3나 N1 이상이면서 조직 생검으로 진단이 확인된 곧창자 샘암종에 한하여 보조 항암 약물 치료와 방사선 치료 등을 단독 또는 병행하여 시행한 다음 절제술을 시행하는 추세다. 그러나 병기가 동일한 환자라도 치료에 반응하는 정도가 다르기 때문에 이러한 치료 결과를 예측할 수 있다면 불필요한 수술 전 치료를 피하고 근치적 수술이 늦어지지 않도록 해서 수술 후 사망이나 합병증 발생률을 줄일 수 있을 것이다.

대부분의 대장암종은 샘종에서 악성 변화를 통해 암종으로 이어지는 일련의 과정을 거쳐 발생한다. APC (adenomatous polyposis coli), K-ras, p53, SMAD2, SMAD4를 비롯한 여러 종양 유전자와 종양 억제 유전자의 변화가 체세포에 단계적으로

축적되어 다단계 과정을 거쳐 세포의 성장 조절 능력이 상실되어 샘암종이 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 유전자들의 변화는 모든 대장암종에 일률적으로 나타나지 않고 일부 샘암종에서는 다른 종류의 종양 유전자가 관여하는 것으로 보이는데, 특정 유전자의 발현 여부에 따라 대장암종의 생물학적 특성이 달라지고 이러한 특정 유전자의 발현 여부 및 발현 정도는 종종 예후나 방사선 화학 치료에 대한 감수성과 연관되어 있다.⁹ 세포주기 조절 단백질은 인체 종양의 발생과 관련 있으며, 특히 대장암종은 예후를 예측하는 인자로서 활용할 수 있는 가능성도 제기되고 있으므로,^{10,11} 이들에 대한 분자생물학적 분석은 매우 중요하다.

이에 저자들은 조직 검사상 곧창자 샘암종 진단을 받고 방사선화학 요법 치료(preoperative radiochemotherapy, PRCT)를 받은 후 수술한 환자들 중 완전 또는 부분 관해를 보이는 반응군과 무반응군 사이에 세포주기 조절인자들이 분자생물학적으로 어떤 차이를 보이는지를 규명하고, 그런 분자생물학적 특징이 PRCT에 대한 반응 여부를 예측할 수 있는 표지자뿐 아니라 예후인자로서 의의가 있는지 밝히고, 그리고 환자의 나이, 종양의 크기, 조직학적 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 유무 등 기타 임상 병리학적 표지자들과 연관이 있는지도 함께 밝혀서 환자의 치료 방침 결정과 예후에 대한 유용한 정보를 제공하고자 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

재료

가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원 병리과에서 1998년 1월부터 2002년 12월까지 조직학적으로 곧창자 샘암종 진단을 받아 PRCT 후 외과적 근치술을 받은 환자 중에서 조직의 고정이나 파라핀 포매 블록의 보존 상태가 양호하고 최근까지 추적 관찰을 해온 환자 68예를 대상으로 하였다.

방사선 치료는 전체 골반강과 전이가 의심되는 원발 림프절군에 1회 180 cGy의 용량을 5주간 주 5회, 총 4,500 cGy를 조사한 후 540 cGy를 추가로 원발 종양부에 조사하여 모두 5,040 cGy를 조사하였다. 항암약물 치료는 매일 5-FU를 425 mg/m², Leucovorin을 20 mg/m²씩 5일간 수술 전 2회, 수술 후 4회 정맥 투여하였다. PRCT 종료 후 4-8주 사이에 곧창자 초음파와 곧창자 MRI를 시행하여 병기하향 조정된 정도 및 종양의 반응 정도를 평가하고 외과적 절제술을 시행하였다.

임상 소견 및 병리 조직학적 검색

10% 중성 포르말린에 고정한 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매괴를 제작해서 헤마톡실린-에오신 염색을 시행한 곧창자

샘암종 생검 및 수술 조직의 슬라이드를 재검토하여 진단과 병리학적 소견들을 확인하였다. 특히 수술 조직의 경우, PRCT에 대한 반응 여부를 조사하였다. PRCT에 대한 반응은 수술 후 병리조직 검사 결과로 WHO 기준¹²에 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 변화가 50% 미만이거나 병기 하향이 없는 경우를 무반응군(no response, NR)으로 간주하였다. 추적은 수술 후 외래에서 대장 내시경, 컴퓨터 전산화 단층 촬영, 암태아성 항원(carcinoembryonic antigen) 검사 등을 정기적으로 시행하였다. 환자의 임상 기록을 검토하여 현재 생존 여부 및 경과를 추적 조사하였으며 추적 기간은 환자가 생존한 경우 수술일로부터 2005년 8월까지, 사망한 경우에는 사망일까지로 하였으며, 평균 추적 기간은 49 (8-83)개월이었다.

면역조직화학 염색

면역조직화학 염색을 위하여 모든 증례의 생검 조직으로 만든 포르말린 고정 파라핀 포매괴에서 잘라낸 4 μm 두께의 절편을 각각 poly-L-lysine 도포한 슬라이드에 부착하였다. 우선 80°C 오븐에서 1시간 건조한 다음 실온에서 자일렌으로 2분간 4회 탈파라핀 하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer에 담가 120°C의 고압멸균기에서 15분간 가열한 다음 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, USA), p21 (EA10, Zymed, San Francisco), cyclin D1 (ZY-7D2, Zymed, San Francisco), Rb (Rb1, Zymed, San Francisco), p16 (16P07, 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. 그런 다음 다시 씻어낸 후 DAB를 이용해서 10분간 발색한 다음 Meyer 헤마톡실린으로 대조염색을 하였다. 각 항체에 대한 양성 대조군으로 p53, p21, cyclin D1, Rb는 양성 확인된 유방암 조직을, p16은 편도 조직을 이용하였다. 음성 대조군은 염색 때 일차 항체 대신 정상 면양 혈청을 첨가해

주고 나머지 모든 과정은 동일하게 하였다.

판독과 통계학적 분석

결과는 두 명의 병리의사가 독립적으로 판정하되, 일치하지 않는 경우 이중 광학현미경으로 재검하였다. 면역조직화학 염색은 종양 세포에서 면역 반응이 핵에 갈색으로 나타나는 경우를 양성으로 판독하였다. p53, p21, cyclin D1은 광학현미경 400배 시야에서 관찰한 전체 종양 세포의 수와 양성으로 판정한 세포의 수를 각각 세어 이를 백분율로 나타내었으며, 그 결과가 10% 미만일 때 음성으로 판정하였다.¹³ Rb와 p16은 염색된 세포의 수를 세어 백분율을 구해서 세 군(20% 미만은 음성; 20-80%는 불균질 양성; 80% 이상은 양성)으로 분류한 다음, 양성 반응은 발현 보존형으로 간주하였고 음성이거나 불균질 양상을 보일 때는 비정상적인 발현 감소형으로 판독하였다.¹⁴

통계처리는 SPSS version 11.5 (Chicago, USA)를 이용하여 Fisher's exact test로 분석하였고, 유의 수준은 0.05 이하로 하였다. 또한 면역조직화학 염색 결과나 기존의 예후인자와 예

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

Variable	CR (n=18)	PR (n=24)	NR (n=26)	p-value
Age				NS
<60 (n=30)	9	11	10	
≥60 (n=38)	9	13	16	
Sex				NS
Male (n=37)	10	11	16	
Female (n=31)	8	13	10	
Tumor size				NS
<5 cm (n=50)	11	18	21	
≥5 cm (n=18)	7	6	5	
T				0.001
T2 (n=12)	6	2	4	
T3 (n=46)	9	21	16	
T4 (n=10)	3	1	6	
N				NS
- (n=41)	10	13	18	
+ (n=27)	8	11	8	
M				NS
- (n=65)	17	22	26	
+ (n=3)	1	2	0	
Differentiation				0.013
well (n=19)	7	9	3	
moderate (n=45)	11	14	20	
poor (n=4)	0	1	3	
Recurrence				NS
- (n=66)	18	23	25	
+ (n=2)	0	1	1	
Distant metastasis				0.005
- (n=54)	18	19	17	
+ (n=14)	0	5	9	

PRCT, preoperative radiochemotherapy; CR, complete remission; PR, partial remission; NR, no response; NS, not significant; TNM, radiologic TNM classification; Differentiation, before PRCT.

후의 연관성은 Cox proportional-hazard model을 이용하여 분석하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 의미가 있다고 판정하였다.

결 과

임상병리학적 소견

골창자 샘암종 68예의 연령 분포는 31세부터 81세로 평균 연령은 60세였고, 남자가 37명(54.4%), 여자가 31명(45.6%)이었다(Table 1). 종양의 크기는 장경 5 cm 미만이 50예(73.5%), 5 cm 이상은 18예(26.5%)였다. 전산화 단층 촬영상 침윤 깊이는 T2가 12예(17.6%), T3 46예(67.6%), T4 10예(14.7%)였고, 림프절 전이가 의심되는 경우는 27예(39.7%)였으며, 원격전이가 있는 군은 3예(4.4%)였다. 조직학적 분화도는 PRCT 이전의 생검 조직에서 고분화 19예(27.9%), 중분화 45예(66.2%), 저분화 4예(5.9%)였다. 추적 기간 동안 국소 재발과 원격 전이는 각각 2예(2.9%), 14예(20.6%)에서 관찰되었으며, 원격 전이는 폐, 간 골, 뇌 등에서 일어났고 폐로 전이된 경우가 7예(10.3%)로 가장 많았다. 추적 기간 동안 평균 생존 기간은 40개월(8-80개월)이었고, 사망한 경우가 8예(11.8%)였는데 이 중 3예는 사망 원인과 질병 사이에 관련이 없었다.

병리학적 완전 관해는 18예(26.5%), 부분 관해는 24예(35.3%)로 PRCT에 대한 반응군은 42예(61.8%)였고, 무반응군은 26예(38.2%)였다. 임상병리학적 표지자 중 PRCT 이전의 방사선 소견상 T병기가 낮을수록(p=0.001), 그리고 PRCT 이전의 생검 조직에서 조직학적 분화도가 좋을수록(p=0.013) PRCT의 효과가 좋았다. 수술 후 국소 재발은 반응군의 2.4% (1/42),

Table 2. Relationship between immunohistochemical studies and tumor response to PRCT

Variable	CR (n=18)	PR (n=24)	NR (n=26)	p-value
p53				NS
- (n=22)	7	6	9	
+ (n=46)	11	18	17	
p21				NS
- (n=36)	11	13	12	
+ (n=32)	7	11	14	
CD1				NS
- (n=54)	18	16	20	
+ (n=14)	0	8	6	
Rb				NS
preserved (n=59)	17	19	23	
reduced (n=9)	1	5	3	
p16				NS
preserved (n=9)	5	0	4	
reduced (n=59)	13	24	22	

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

무반응군의 3.8% (1/26)에서 관찰되었으며 유의한 상관 관계는 없었다. 반면에 수술 후 추적 기간 동안 원격 전이는 반응군의 11.9% (5/42), 무반응군의 34.6% (9/26)에서 일어났으며 이는 유의한 상관 관계를 보였다($p=0.005$).

면역조직화학 발현 양상

모든 면역조직화학 염색은 PRCT 전 생검 조직에서 시행하였

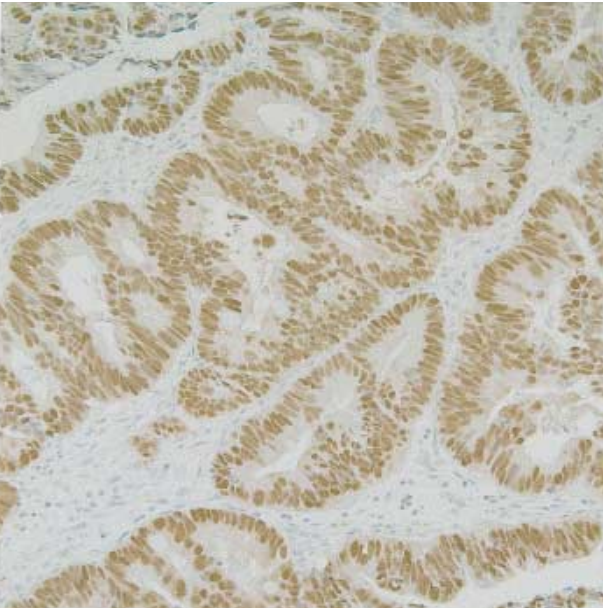


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in rectal cancer demonstrates diffuse strong nuclear positivity.

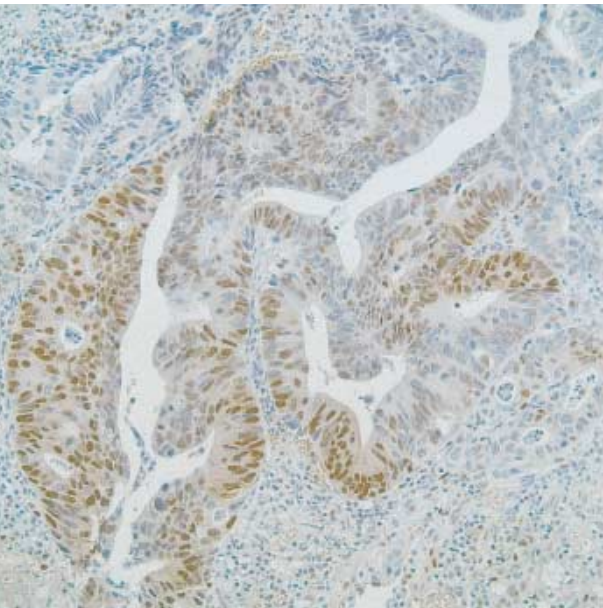


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p21 protein shows a positive reaction in tumor nuclei.

다. p53 단백질은 핵에 국한해서 발현되었으며 세포질 내에서는 양성 반응이 관찰되지 않았고 주변 정상 점막 세포에서는 음성이었다. 샘암종 68예 중 46예(67.6%)에서 양성이었다고, 22예(32.4%)에서 음성이었다(Fig. 1) (Table 2). p21 단백질은 종양 세포의 핵에서 발현되었고, 양성으로 표현되는 빈도는 32예(47.1%), 음성은 36예(52.9%)였다(Fig. 2). Cyclin D1 단백질은 14예(20.6%)에서 양성, 54예(79.4%)에서 음성이었다(Fig. 3). Rb 단백질은 정상 점막 상피세포의 핵에 대부분 균일하게 염색되었으며, 이것을 정상 발현의 대조군으로 삼았다. 종양 세포에서도 핵에 염색되었으며, 59예(86.8%)가 양성으로 정상 발현되었고, 9예(13.2%)가 불균질 양성(7예)이거나 음성(2예)으로 발현 감소를 보였다(Fig. 4). p16은 샘암종 주변의 정상 장 상피세포들의 핵에서 균질하게 강한 양성 반응을 보였고 세포질에도 부분적으로 염색되었다. 전체 증례 중 9예(13.2%)에서만 종양 세포에 양성 반응을 보여 이들은 발현 보존형에 해당되었고, 29예(42.6%)는 불균질 양성, 30예(44.1%)는 음성 반응을 보여 모두 59예(86.8%)가 p16 발현 감소형이었다(Fig. 5).

PRCT 후 종양 반응과의 연관성을 보면, 본 연구에 포함된 세포주기 관련 단백질 모두 상관 관계가 없었다.

면역조직화학 발현과 임상병리학적 인자의 상관관계

p53 단백질 발현은 PRCT 이전의 생검 조직에서 조직학적 분화도, PRCT 이전의 방사선 소견상 T, N과 M, 그리고 국소 재발, 추적 기간 동안 발생한 원격 전이와 유의한 상관 관계를 보이지 않았다(Table 3). p21 단백질 발현은 원격전이와 유의한 상관 관계를 보였고($p=0.041$), cyclin D1 단백질은 PRCT 이전의 방사

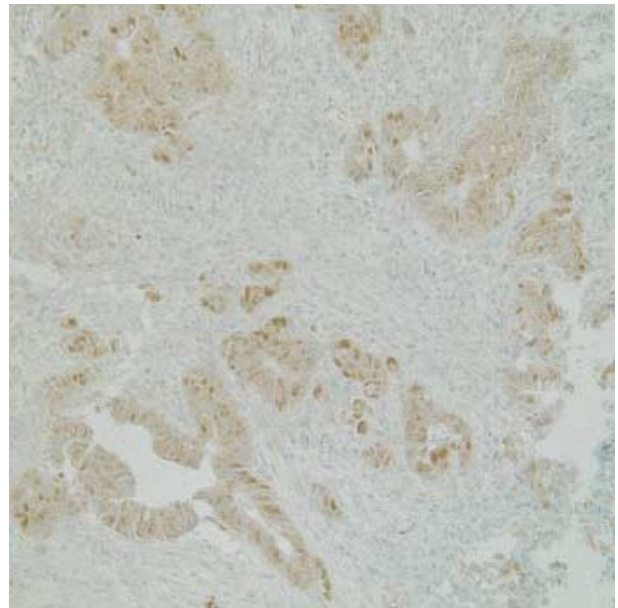


Fig. 3. Immunohistochemical staining for cyclin D1 shows a nuclear staining.

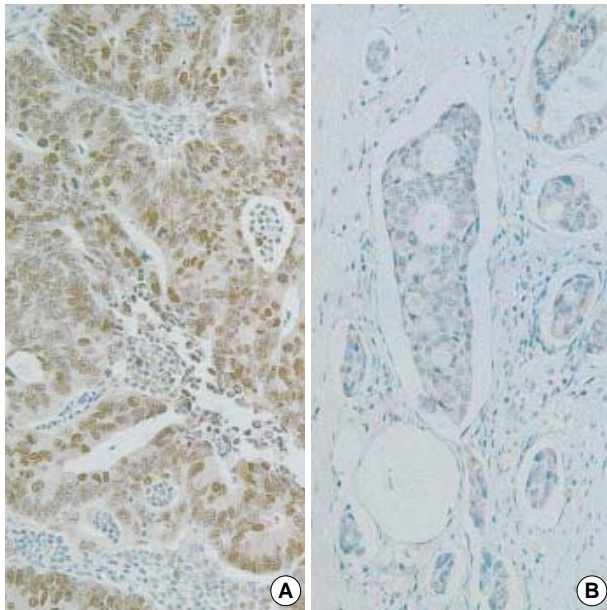


Fig. 4. The immunohistochemical staining for Rb reveals diffuse strong nuclear positivity in a Rb-preserved sample (A), compared to almost negative activity in a Rb-reduced specimen (B).

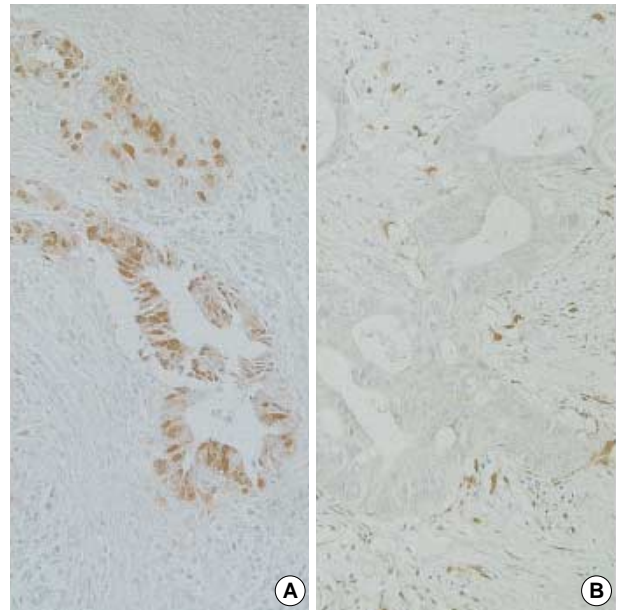


Fig. 5. The immunohistochemical staining for p16 demonstrates intense nuclear expression in a p16-preserved tumor (A), compared to a negative reaction in a p16-reduced sample (B).

Table 3. Relationship between clinicopathologic variables and immunohistochemical studies

Variable	p53		p21		CD1		Rb		p16	
	+	-	+	-	+	-	reduced	preserved	reduced	preserved
Differentiation										
well (n=19)	12	7	9	10	3	16	1	18	18	1
moderate (n=45)	31	14	20	25	10	35	5	40	37	8
poor (n=4)	3	1	3	1	1	3	3	1	4	0
T										
T2 (n=12)	8	4	4	8	3	9	1	11	10	2
T3 (n=46)	30	16	24	22	9	37	8	38	41	5
T4 (n=10)	8	2	4	6	2	8	0	10	8	2
N										
- (n=41)	29	12	17	24	10	31	4	37	37	4
+ (n=27)	17	10	15	12	4	23	5	22	22	5
M										
- (n=65)	45	20	31	34	14	51	9	56	56	9
+ (n=3)	1	2	1	2	0	3	0	3	3	0
Recurrence										
- (n=66)	45	21	31	35	14	52	8	58	57	9
+ (n=2)	1	1	1	1	0	2	1	1	2	0
Distant metastasis										
- (n=54)	41	13	23	31	9	45	7	47	47	7
+ (n=14)	5	9	9*	5	5	9	2	12	12	2

*p=0.041. Differentiation, before PRCT; TNM, radiologic TNM classification.

선 소견상 T와 유의 수준에 근접하는 상관 관계를 보였고(p=0.056) 나머지 임상병리학적 인자들과는 별다른 상관 관계가 없었다. Rb 단백질 발현은 각각의 임상 병리학적 인자들과 유의한 상관 관계를 보이지 않았다. p16 단백질도 PRCT 이전의 조직학적 분화도, PRCT 이전의 방사선 소견상 T, N과 M병기, 국소

재발 및 원격 전이에 따른 발현 이상과 연관성이 없었다.

한편, 환자의 생존 기간은 단변수 분석에서 PRCT 이전의 조직학적 분화도가 좋을수록(p=0.039), PRCT 후 종양의 반응이 좋을수록(p=0.056), 그리고 p21 발현이 높을수록(p=0.061) 길었으며(data not shown), p16 단백질 발현 감소군보다 유지군에

Table 4. Cox regression multivariate analysis of overall survival time

Variable	Hazard risk	95% CI	Log-rank p-value*	MVA
Tumor size	1.127	0.334-4.212	0.11	NS
Differentiation	1.192	0.296-4.798	0.039	NS
Tumor status	1.358	0.273-6.745	0.131	NS
Nodal status	1.775	0.482-6.528	0.574	NS
Tumor response	3.085	0.054-4.125	0.056	NS
Recurrence	1.287	0.033-5.648	0.64	NS
Distant metastasis	2.31	0.201-6.574	0.544	NS
p53	3.253	0.334-6.679	0.18	NS
Rb	0.427	0.087-3.015	0.822	NS
p16	2.83	0.255-5.769	0.001	NS
cyclin D1	3.804	0.390-7.113	0.456	NS
p21	0.906	0.263-3.116	0.061	NS

*Fisher's exact test.

CI, confidence interval; MVA, multivariate analysis; NS, not significant.

서($p=0.001$) 길었다. 그러나 이들의 상관 관계는 다변수 분석 상 유의하지 않았다(Table 4).

고 찰

곧창자 샘암종으로 진단받고 PRCT 후 수술 절제된 68예를 대상으로 PRCT 이전의 생검 조직에서 G1기에 관여하는 세포주기 조절인자들에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그리하여 세포주기 조절인자들의 발현 정도를 관찰하고 PRCT에 대한 반응 및 예후와의 상관 관계를 비교 분석하였다. 그 결과 대부분의 환자에서 세포주기 조절 단백질의 이상 발현을 관찰하였고 이들 인자들 모두 PRCT에 대한 종양의 반응에 직접적인 상관 관계는 없었으나, p16과 p21 단백질의 경우 환자의 생존 기간과 연관이 있었다.

p53은 세포주기를 조절하고 DNA가 손상된 세포를 자가 사멸시켜 세포가 암세포로 형질전환되는 것을 막는 암 억제 유전자다. 다양한 암에서 p53 돌연변이나 이종접합성 소실 등에 따른 p53 단백질 과발현이 흔히 관찰되는데, 대장직장암의 50-80%에서 p53 과발현이 보고되었다.¹⁵ 본 연구에서 p53 단백질 발현은 67.6%에서 관찰되어 다른 연구자들의 결과와 일치하였다. 한편, p53 유전자와 방사선 치료 후 종양 세포의 반응이 관련이 있는지를 둘러싸고 있는 아직 논란의 여지가 많다. 방사선 감수성과 상관 관계가 없다는 보고도 있지만,¹⁶ p53 결손 쥐의 흉선에 방사선을 조사하였더니 세포사멸사가 잘 일어나지 않는다는 보고도 있고, p53 유전자 돌연변이가 방사선 치료 저항의 원인이라며 방사선 조사로 인한 세포사멸사가 p53 유전자와 밀접한 관계가 있다고 말하는 연구자들도 있다.¹⁷

본 증례에서는 반응군과 무반응군(69% vs. 65.4%)의 p53 단백질 발현에 유의한 차이가 없었다. 따라서 p53 단백질 과발현 여

부만으로는 PRCT에 대한 곧창자 샘암종의 감수성을 예측할 수 없다. 그러나 다른 인자들이 개입함으로써 발생할 수 있는 간접적인 연관성은 완전히 배제하기 어렵다. Fu 등¹⁸은 p53 단백질 음성이면서 p21 단백질 양성인 예의 80% 이상이 방사선 감수성을 보였고 반대로 p53 단백질 양성인 예 중 90% 이상이 방사선 저항성을 보였으며, 이러한 분자생물학적 특성이 치료 반응을 예견하는 데 도움이 된다고 보고하였다. 본 연구에서는 전자와 동일한 발현 양상을 보이는 군의 33.3%만이 방사선 감수성을 보이고, 후자와 동일한 발현 양상군의 42.3%만이 방사선 저항성을 보여 Fu 등¹⁸의 연구 결과와는 다른 결과를 얻었다. 오히려 p53, p21 단백질 모두 음성인 경우 90%가 방사선 감수성을 보였다.

지금까지의 문헌을 살펴보면 보고자에 따라 방사선 조사량이나 화학 약물 치료제에 다소 차이가 있는데, 저자들의 연구에서는 대상 환자 모두 PRCT를 받았던 반면, Fu 등¹⁸의 대상 환자들은 모두 화학 약물 치료 없이 방사선 치료만을 받았으므로 이에 따른 차이를 감안해야 할 것이다. 또한 연구에 포함된 대상 증례의 성상에 따라 다른 결과가 나타날 것으로 생각되는데, 실제로 본 연구와 그들 연구의 대상 증례 가운데 고분화 암종(27.9% vs. 65.3%)과, 듀크스 병기 A (1.5% vs. 22.4%)에 차이가 있었다. 향후 이를 구분해서 좀 더 포괄적인 연구를 할 필요가 있다.

Rb-cyclin D 경로는 암 발생과 연관된 유전자 변화 시 세포주기 조절에서 단일 표적으로 작용하는 중요한 요소이며, cyclin-cyclin-dependent kinase (cdk) 복합체와 cdk 억제 단백질의 균형에 의한 활성, 불활성화 과정을 통해 조절된다.¹⁹ Rb 단백질은 G0/G1 단계에서 저인산화 상태로 활성화되며 E2F와 같은 전사인자와 결합하여 세포가 S기로 진행하는 것을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 한편, Cyclin D1에 의해 cdk4가 활성화되면 cyclin D1-cdk4 복합체는 Rb 단백을 인산화시켜 불활성화함으로써 세포 증식을 초래해서 궁극적으로 암을 유발하는데, 이러한 과정은 p16과 같은 억제 단백질에 의해 조절된다. Cyclin D1 유전자는 염색체 11q13에 위치하며 종양 발생과 관계가 있다고 알려져 있다. 특히 대장직장암에서는 초기 발암기전에 관여하나 예후와는 상관 관계가 없다고 보고되었다.^{14,20} 본 연구에서도 cyclin D1에 대한 면역염색 결과 종양의 재발 또는 환자의 생존 기간과 직접적인 연관은 없었다.

한편, 곧창자 샘암종에서 Rb 유전자가 임상적으로 어떠한 역할을 하는지에 관한 자료는 극히 드문 형편이다. 본 연구에서 Rb 단백질에 대한 면역염색 결과 총 68예의 곧창자 샘암종 중 59예(86.8%)에서 발현 유지를 보였고 9예(13.2%)만 음성이거나 불균질 양상(heterogeneous pattern)의 저발현을 보인 점으로 미루어, 곧창자 샘암종에서 Rb 유전자는 별다른 역할을 하지 않는 것으로 생각된다.

p16 유전자는 세포주기 조절 경로에서 중요한 역할을 하는 종양 억제 유전자로서, 염색체의 9p21에 위치하며 cdk4와 관련이 있는 단백질들에 대한 조사 연구 도중 처음 발견되었다. 정상적

으로 cyclin D1-cdk4 복합체에 의한 Rb의 인산화를 억제한다고 알려져 있다. 여러 가지 암종에서 이 유전자의 결손이나 변이가 보고되었는데 변이보다는 결손이나 과메틸화가 주된 기전일 것으로 추정하고 있다.²¹ 흑색종, 유방암종, 폐암종 등에서 p16 단백질 소실이 예후와 밀접한 관계가 있으며,^{22,23} 육종에서는 p16을 부호화하는 INK4A 유전자가 결손된 환자가 더 나쁜 예후를 보임에 따라 p16 기능 소실이 예후에 나쁜 영향을 끼치는 것으로 생각된다.²⁴ 본 연구에서 p16 단백질은 86.8%에서 발현 감소를 보였고 이들은 발현 유지군보다 생존 기간이 짧은 p16 단백질의 예후 인자로서 활용할 수 있는 가능성을 시사하였다.

정상 Rb 유전자를 가진 쥐와 동형접합의 Rb 유전자 변이를 가진 쥐에서 채취한 배아 섬유모세포에서 p16 발현의 효과를 비교한 연구자들은, p16이 Rb 활성 단백질이 있는 세포에만 작용한다고 밝혔으며 이에 따라 Rb 단백질이 주 표적임을 주장하였다.²⁵ 본 연구에서도 Rb 단백질 발현 감소군 9예 가운데 7예(77.8%)가 p16 단백질 저발현으로 Rb 단백질 저발현일 때 p16 단백질도 불활성화되는 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 89.7%에서 Rb 단백질이나 p16 단백질 가운데 적어도 한 가지 단백질에서 발현 감소를 보인 점으로 미루어 곧창자 샘암종의 세포주기 조절에 Rb/p16의 변화가 매우 중요하다는 것을 알 수 있다.

최근 국소 진행된 곧창자 샘암종의 치료로 원격 전이율을 줄이고 국소 재발을 억제하기 위해 PRCT 시도가 늘고 있고, 문헌에 따르면 60-79%의 병기 하향률에, 5-31%에서는 완전 관해를 보였다.^{9,26-29} 그러나 치료에 반응하지 않는 경우도 30% 정도 되는 것으로 나타났다. 이러한 종양의 특징을 미리 파악하여 반응이 없을 것으로 생각되면 불필요한 치료를 피하고 근치적 수술이 늦어지지 않도록 해서 수술 후 사망이나 합병증을 줄일 수 있을 것이다. 동일한 병기를 지닌 환자들이 동일한 방사선화학 치료에도 다양한 반응을 보이는 데는 여러 가지 요인들이 영향을 미칠 것으로 생각된다. 따라서 이에 관여하는 인자들의 발현 또는 돌연변이와 같은 분자생물학적 방법을 이용한 연구가 보고되고 있으나 아직 명확히 밝혀진 것은 없다. 본 연구에서 PRCT 후 종양의 반응과 국소 재발 사이에 유의한 상관 관계는 관찰되지 않았는데, 대상 환자의 국소 재발률이 매우 낮아서 통계 처리의 신뢰도가 떨어진다는 점을 고려해야 할 것으로 생각한다. 또한 상당수 환자가 원격 전이로 사망하는 것이 문제가 되는데,^{7,8,30} p21 단백질 발현이 원격 전이와 상관 관계를 보임에 따라 앞으로 종양의 진행을 예측하는 연구에 중요한 정보가 될 것으로 기대한다.

결론적으로, 곧창자 샘암종에서 p53 단백질, p21 단백질, cyclin D1 단백질은 각각 67.6%, 47.1%, 20.6%에서 양성이었으며, Rb 단백질은 13.2%에서 발현 감소되었고, p16 단백질은 86.8%에서 발현 감소를 보였다. 이들 인자들과 PRCT 후 반응의 상관 관계는 없었으나 p16 단백질은 환자의 생존 기간과 통계적으로 유의한 상관 관계를 보였다. 즉 곧창자 샘암종에서 p16 단백질의 불활성화가 흔하며 종양 발생에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다. 또한 p21 단백질은 원격전이와 유의 수준에 근접하는 상관

관계를 보여 종양의 진행과 연관이 있음을 시사하였으며, p16과 함께 곧창자 샘암종 환자의 예후 예측 인자로서 이용할 수 있을 것으로 기대한다. 향후 증례 누적과 충분한 추적 조사 기간을 통해 검증할 필요가 있다.

참고문헌

- Almeida FF, Araujo SE, Santos FP, *et al.* Colorectal cancer screening. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2000; 55: 35-42.
- Ministry of Health and Welfare. Annual Report of Tumor Registry in Korea (2002.1-2002.12). Seoul. 2003.
- Garcia-Aguilar J, Mellgren A, Sirivongs P, Buie D, Madoff RD, Rottenberger DA. Local excision of rectal cancer without adjuvant therapy: a word of caution. *Ann Surg* 2000; 231: 345-51.
- 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.
- 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.
- Mehta VK, Poen J, Ford J, *et al.* Radiotherapy, concomitant protracted-venous infusion 5-fluorouracil, and surgery for ultrasound-staged T3 or T4 rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 52-8.
- 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.
- Read TE, McNeven MS, Gross EK, *et al.* Neoadjuvant therapy for adenocarcinoma of the rectum: tumor response and acute toxicity. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 513-22.
- Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-31.
- Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI. Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg* 1997; 132: 371-3; discussion 374-5.
- Moore HG, Shia J, Klimstra DS, *et al.* Expression of p27 in residual rectal cancer after preoperative chemoradiation predicts long-term outcome. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 955-61.
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-14.
- Schwandner O, Bruch HP, Broll R. p21, p27, cyclin D1, and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 11-9.
- Karpeh MS, Brennan MF, Cance WG, *et al.* Altered patterns of retino-

- blastoma gene product expression in adult soft-tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1995; 72: 986-91.
15. Jessup JM, Loda M. Prognostic markers in rectal carcinoma. *Semin Surg Oncol* 1998; 15: 131-40.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-30.
 20. Kristt D, Turner I, Koren R, Ramadan E, Gal R. Overexpression of cyclin D1 mRNA in colorectal carcinomas and relationship to clinicopathological features: an in situ hybridization analysis. *Pathol Oncol Res* 2000; 6: 65-70.
 21. Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, *et al.* Homozygous deletion frequency and expression levels of CDKN2 gene in human sarcomas: relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCDND1. *Br J Cancer* 1995; 72: 393-8.
 22. Dublin EA, Patel NK, Gillett CE, Smith P, Peters G, Barnes DM. Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int J Cancer* 1998; 79: 71-5.
 23. Berns EM, de Klein A, van Putten WL, *et al.* Association between RB-1 gene alterations and factors of favorable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int J Cancer* 1995; 64: 140-5.
 24. Orlow I, Drobnjak M, Zhang ZF, *et al.* Alterations of INK4A and INK4B genes in adult soft tissue sarcomas: effect on survival. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 73-9.
 25. Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16^{ink4} requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6289-93.
 26. 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.
 27. Minsky BD, Cohen AM, Kemeny N, *et al.* Pre-operative combined 5-FU low dose leukovorin, and sequential radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 821-7.
 28. 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.
 29. Chari RS, Tyler DS, Anscher MS, *et al.* Preoperative radiation and chemotherapy in the treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann Surg* 1995; 221: 778-86; discussion 786-7.
 30. Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, *et al.* Randomized study on preoperative radiotherapy in rectal carcinoma. stockholm colorectal cancer study group. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 423-30.