

대장암종에서 HSP 70의 예후 인자로서의 의의

중앙대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

윤상호 · 차성재 · 박성준 · 임현묵 · 박성일 · 이태진¹ · 김형중¹

Prognostic Value of HSP 70 in Colorectal Cancer

Sang-Ho Youn, M.D., Seong-Jae Cha, M.D., Sung-Jun Park, M.D., Hyun-Muck Lim, M.D., Seong-Il Park, M.D., Tae-Jin Lee, M.D.¹ and Hyung-Jung Kim, M.D.¹

Purpose: To evaluate the relationships between the expression of HSP 70 and prognostic factors, including T-stage, lymph node metastasis, distant metastasis, stage, differentiation and survival rate in colorectal cancer.

Methods: We studied 62 patients with colorectal cancer in order to evaluate the relationships between the expression of HSP 70 and multiple prognostic factors, including T-stage, lymph node metastasis, distant metastasis, stage and differentiation.

Results: There was no statistically significant correlation among HSP 70, T-stage, lymph node metastasis, distant metastasis, stage and differentiation. However, in our study, the expression of HSP 70 was slightly elevated in case with no lymph node metastasis, a lower stage and well differentiated colorectal cancer. In regards to survival, the overall survival rate was lower in the group with positive HSP 70 vice the negative group, and this was statistically significant.

Conclusion: HSP 70 expression and the prognostic factors of colorectal cancer appear not to be correlated to each other, although HSP 70 may play a certain role in colorectal cancer. Further studies are required for determining the prognostic factors in colorectal cancer. (*J Korean Surg Soc* 2001;60:531-535)

Key Words: Heat shock protein (HSP) 70, Colorectal cancer
중심 단어: HSP 70, 대장암종

Departments of Surgery and ¹Pathology, School of Medicine, Chung Ang University, Seoul, Korea

서 론

열처리를 받은 *Drosophila melanogaster*의 침샘 세포에서 stress protein에 대한 mRNA의 전사가 활발해지고 정상적인 세포구성 단백질의 mRNA의 전사가 감소되는 것을 관찰한 이후 Heat shock protein(이하 HSP)에 대한 많은 연구가 있었다.(1-3) HSP은 여러 가지 환경인자나 병태 생리학적인 자극 즉 heat, hypoxia, trauma, heavy metal, local trauma, hemorrhage 등에 노출된 세포에서 생성되며 주 기능은 미성숙된 단백질이나 세포손상으로 변성된 단백질을 복구하는데 도움을 주며 면역체계에 중요한 역할을 하여 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다.(4-7) HSP family는 분자량이나 생리학적 기능에 따라 28 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 110 kDa로 구분되는데 70 kDa, 90 kDa, 100 kDa는 종양세포에 대한 면역체계에 관여하며, 70 kDa, 90 kDa는 암유전자로 변형된 세포주에서 많이 발현되어 변형된 세포의 제거기능에 관여하는 것으로 알려져 있다.(8-10) HSP 70은 세포 주기중 합성기때 핵에 위치하고 양은 10~15배 증가하는 것으로 보고되어서 세포 주기를 조절하는 기능도 있을 것으로 추측된다.

각종 암에서 HSP 70의 발현은 유방암에서 35~50%, 췌장암에서 57%, 그리고 대장암에서 77.3%로 보고되었다.(12-14) 대장암종은 종양의 형성과정 중 여러 유전자가 즉 ras, p53, DCC gene, APC gene 등의 돌연 변이 혹은 대립 유전자의 소실이 전암단계로부터 각 시기마다 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다.(15) 따라서 대장암종에서 HSP의 발현을 조사하는 것은 종양의 발생에서 이들의 역할을 규명할 수 있다고 생각된다. 이에 저자들은 대장암종에서 HSP 70의 발현 상관성을 조사하여 이들의 역할을 알아보고자 하였고 또 대장암종에서 종양 세포의 분화도, T-stage, 림프절 전이와 원위성 전이 여부 및 stage와 HSP 70의 관련성 및 예후를 조사하고자 하였다.

방 법

1) 연구 재료

1989년 1월부터 1995년 12월까지 중앙대학교 의료원에서 병리학적으로 대장직장암종으로 진단되어 외과적으로

책임저자 : 박성일, 서울시 중구 필동 2가 82-1
☎ 100-272, 중앙의대부속 필동병원 일반외과
Tel: 02-2260-2159/2160 Fax: 02-2275-7869
접수일 : 2001년 2월 28일, 게재승인일 : 2001년 3월 28일

수술한 환자 중 1989년 1월부터 1998년 8월까지 추적 조사가 가능했던 환자 62명을 대상으로 하였다.

2) 면역조직화학 염색

파라핀 포매조직을 두께 4~5 μm으로 절편으로 박절하고 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀시킨 후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 흡수시켰다. 조직 절편에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하였다. 절편을 50 mM Tris 완충용액 (TBS, pH 7.5)으로 수세 후 비특이적 항원을 제거하기 위해 30분간 염소혈청과 반응시켰다. 여분의 용액을 제거한 후 일차항체로 HSP 70 (polyclonal, 1 : 50, Zymed Co.) 일차항체 반응 후 절편을 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체(1 : 300, Zymed Co.)와 작용시킨 후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시켰

다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)를 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 glycerol gelatin으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학염색 결과 판정

종양세포의 발현정도가 광학 현미경하에서 인접한 정상 점막세포와 같은 정도로 염색되거나 각 조직 절편에서 전체 종양세포핵의 10% 미만에서 염색이 되면 0, 10~20% 염색이 되면 1, 21~50% 염색이 되면 2, 51% 이상 염색이 되면 3으로 판정하고, 0을 HSP70 음성(-), 1~3을 HSP 70 양성(+)으로 판정하였다.

4) 통계학적 분석

종양의 T-stage, 림프절 전이 여부, 원위성 전이 여부, 병기, 조직학적 분화도와 HSP 70 발현과의 상관성을 Window용 SPSS (version 8.0) 통계 프로그램을 이용하여 Pear-

Table 1. Correlation between expression oh HSP 70 and clino-pathologic factors of colorectal cancer

	(n)	HSP 70					(-) (0)	(+) (1~3)
		0	1	2	3			
T1	2	1 (50.0%)	2 (50.0%)	0 (%)	0 (0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	
T2	4	1 (25.0%)	0 (0%)	3 (75.0%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (75.0%)	
T3	51	16 (31.4%)	12 (23.5%)	15 (29.4%)	8 (15.7%)	16 (31.4%)	35 (68.6%)	
T4	5	3 (60.0%)	1 (20.0%)	1 (20.0%)	0 (0%)	3 (60.0%)	2 (40.0%)	
p value		NS					NS	
LN (-)	30	8 (26.6%)	8 (26.6%)	11 (36.7%)	3 (10.0%)	8 (26.6%)	22 (73.3%)	
LN (+)	32	13 (40.6%)	6 (18.65%)	8 (20.0%)	5 (15.6%)	13 (40.6%)	19 (59.4%)	
p value		NS					NS	
M (-)	60	21 (35.0%)	14 (23.3%)	17 (28.3%)	8 (13.3%)	21 (35.0%)	39 (65.0%)	
M (+)	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
p value		NS					NS	
ST1	5	1 (20.0%)	1 (20.0%)	3 (60.0%)	0 (0%)	1 (20.0%)	4 (80.0%)	
ST2	25	7 (28.0%)	11 (44.0%)	8 (32.0%)	3 (12.0%)	7 (28.0%)	18 (72.0%)	
ST3	30	13 (43.3%)	6 (20.0%)	6 (20.0%)	5 (16.7%)	13 (43.3%)	17 (56.7%)	
ST4	2	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
p value		NS					NS	
Well	13	2 (15.4%)	5 (38.5%)	4 (30.8%)	2 (15.4%)	2 (15.4%)	11 (84.6%)	
Moderate	40	16 (40.0%)	8 (20.0%)	12 (30.0%)	4 (10.0%)	16 (40.0%)	24 (60.0%)	
Poor	9	3 (33.3%)	1 (11.1%)	3 (33.3%)	2 (22.2%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)	
p value		NS					NS	

son Chi-square test를 실시하였고, p값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다. 생존곡선은 Kaplan-Meier의 생존율 분석을 이용하였고 통계학적인 유의성은 Breslow 방법으로 검정하였다.

결 과

1) 임상소견

전체 62예 중 남자는 27예(43.5%)이고, 여자가 35예(56.5%)였으며, 평균 연령은 60.4세였다. 생존기간은 평균 39.8 개월이었고 남자가 평균 43.6개월, 여자가 37.0개월로 성별에 따른 생존기간의 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 임상 병기는 AJCC cancer staging manual에 근거하였으며 병기 I이 5예(8.1%), 병기 II는 25예(40.3%), 병기 III는 30예(48.4%), 병기 IV는 2예(3.2%)이었다. 조직학적 분화도는 선암종 62예 중 고분화도가 13예(21.0%), 중등도 분화도는 40예(64.5%), 저분화도는 9예(14.5%)이었다.

2) 면역조직화학 염색 결과와 예후인자와의 상관 관계

전체 62예 중 염색범위가 0인 예는 21예(33.9%), 염색범위가 1인 예는 14예(22.6%), 염색범위가 2인 예는 19예(30.6%), 염색범위가 3인 예는 8예(12.9%)로 HSP 70 발현 양상으로 판정된 예가 66.1%(41예)였다.

종양의 T-stage에 따른 발현은 T2와 T3에서 각각 3예(75.0%)와 51예(68.6%)의 양성 반응을 보였지만 T-stage에 따른 HSP 70의 발현은 통계적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$). 림프절 전이 여부에 따른 발현의 차이는 림프절에 전이가 없는 30예 중 22예(73.3%), 전이가 있는 32예 중 19예(59.4%)에서 양성을 나타냈지만 통계적으로 유의성은 없었다($p > 0.05$). 원위성 전이가 있는 2예 모두에서 HSP 70은 양성을 나타냈고 전이가 없는 60예 중에서는 39예

(65.0%)에서 양성을 나타냈지만 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). 또한 병기에 따른 HSP 70의 발현도 통계학적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$).

종양의 조직학적 분화도에 따른 HSP 70의 발현 양상은 고분화도 종양 13예 중 11예(84.6%)에서 양성하였고, 중등도 분화도 40예 중 24예(60.6%)에서 양성이었으며, 저분화도 9예 중 6예(66.7%)에서 양성을 나타내어 분화도에 따른 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$)(Fig. 1, 2). 일부의 예에서 중등도의 분화를 보이며 선구조를 이루는 세포에서는 HSP 70이 음성을 보이면서 종양 주변의 기질로 침윤하는 부분의 종양 세포에서는 강한 양성 반응을 보이는 현상이 관찰되었다(Fig. 3). 본 연구 대상인 62예의 대장 및 직장 선암종에서 HSP 70 단백질의 발현 양상에 따른 생존율을 분석하였을 때 HSP 70 단백질의 염색범위가 0인 군에서 HSP 70 단백질의 염색범위가 1, 2 및 3으로

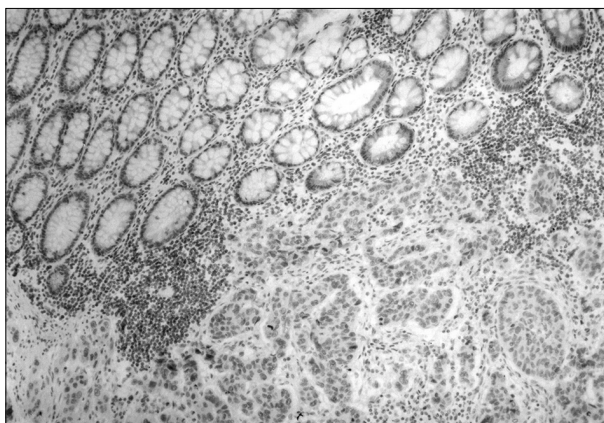


Fig. 1. Immunohistochemical staining, HSP 70 is expressed in normal colonic mucosa (upper) and not poorly differentiated adenocarcinoma (lower), $\times 100$.

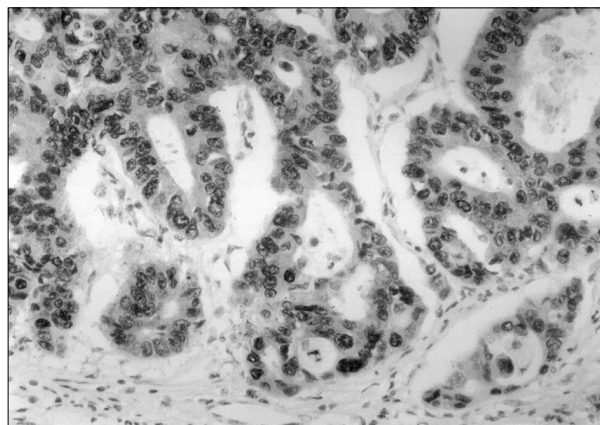


Fig. 2. Immunohistochemical staining, HSP 70 is strongly expressed in the moderately differentiated adenocarcinoma, $\times 200$.

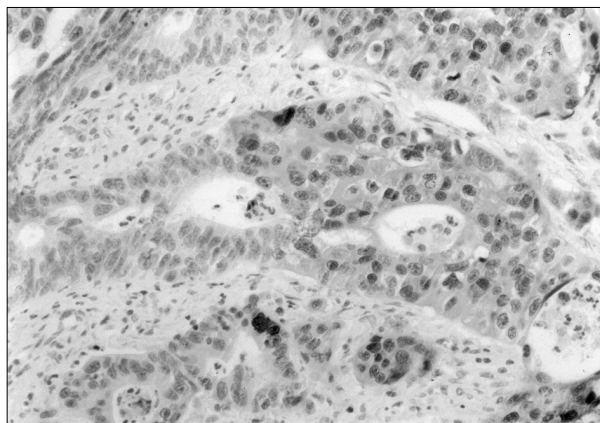


Fig. 3. Immunohistochemical staining, HSP 70 is strongly expressed in invasive tumor cell nest, $\times 200$.

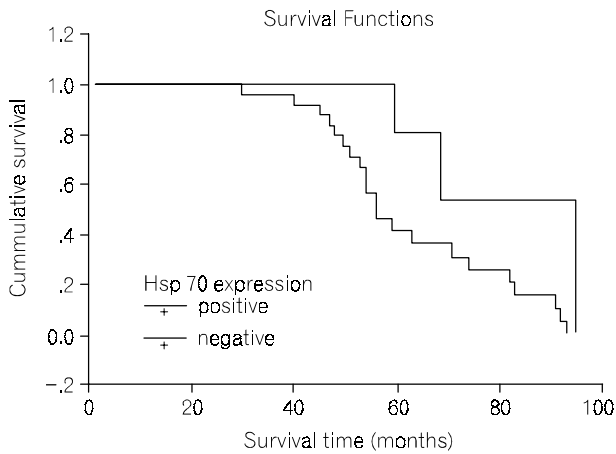


Fig. 4. Survival curves according to the expression of HSP 70 protein in colorectal adenocarcinomas ($p < 0.05$).

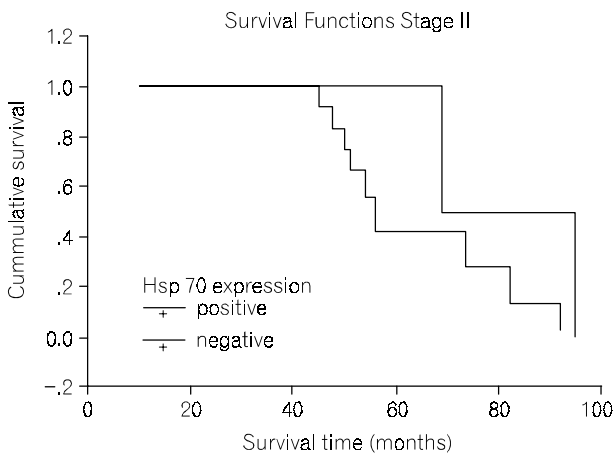


Fig. 5. Survival curves according to the expression of HSP 70 protein in stage II of colorectal adenocarcinomas ($p < 0.05$).

양성인 군보다 통계학적으로 유의 있게 생존이 연장된 것으로 나타났다($p < 0.05$, Fig. 4). 또한 임상 병기별로 HSP 70 단백질의 염색 양상에 따른 생존을 비교를 하였을 때 제 2기와 3기 각각에서 염색 범위가 0으로 평가된 군에서 그렇지 않은 염색범위가 1, 2 및 3인 군에서 보다 생존율이 높은 경향을 나타내었다($p < 0.05$, Fig. 5 and 6).

고 찰

서구 선진국의 인구 약 15%에서 대장암이 발병되며 우리 나라에서도 근래에 들어 대장암 발생은 타 종양에 비하여 증가하는 추세이며 이러한 현상은 서구화된 식생활 습관이 하나의 원인으로 추정되고 있다. 대장암은 종양의 형성 과정 중 여러 유전자, 즉 ras, p53, DCC gene, APC gene 등의 돌연 변이 혹은 대립 유전자의 소실이 전암단

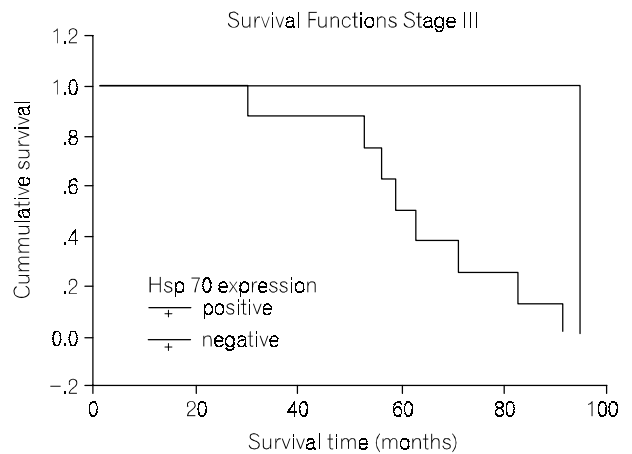


Fig. 6. Survival curves according to the expression of HSP 70 protein in stage III of colorectal adenocarcinomas ($p < 0.05$).

계로부터 각 시기마다 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다.(15) 최근에 종양 억제 유전자의 변화나 대립 유전자의 소실이 없이 DNA 복제 이상으로 대장 암종이 발생하는 다른 암발생 기전이 밝혀졌는데, DNA 복제 이상은 선천성 비용종성 대장암의 대부분을 차지하고 특발성 대장암의 12~17%에서 발견된다고 알려져 있다.(16) 이러한 대장암의 조직학적 특징은 선을 형성하지 않는 미분화 암종으로 주위 간질에 염증 세포의 침윤이 많으며 세포의 점액 분비가 많다.(17) 이러한 종양 중에 예후가 좋은 경우가 많은데 이것은 종양에 대한 숙주의 강한 면역 반응에 기인하는 것으로 추측되고 있다.(18)

대장암의 경우 종양의 형성 과정 중 여러 유전자의 돌연 변이 혹은 대립 유전자의 소실이 전암단계로부터 각 시기마다 작용하여 발생하는 사실과 암유전자 등으로 변형된 세포주에서 HSP 70이 표현되는 사실에 비추어 볼 때 이러한 결과는 대장의 상피성 종양의 진행에 HSP 70이 관여하거나 이차적인 현상으로 HSP 70이 발현될 수 있다고 생각되었다.(9,10) 또한 악성 종양 세포가 주위의 환경으로부터 많은 stress를 받고 있다고 추측하였다. 각종 암의 HSP 70의 표현과 생물학적 악성도와와의 관계는 항암 물질에 대한 저항성, 돌연 변이형 p53 단백질과 결합, ras나 c-myc 같은 암유전자와의 관계 및 숙주의 면역 체계와의 관계로 나누어 설명할 수 있다.(9,10) 특히 종양의 면역에 관여하는 HSP 70은 양면적인 성격을 가지고 있다. 즉 phospholipase A₂를 경유하는 신호 전달 기전을 방해하여 tumor necrosis factor (TNF)의 종양 세포 살상을 억제하거나 종양 세포 연관 항원(tumor associated antigen)에 결합하여 natural killer cell (NK)의 종양 세포 살상을 억제하여 종양 세포의 생존을 돕는 면역 기전이 있고, 쥐의 어떤 종양 세포에서 유래된 HSP 70에 대한 백신을 HSP 70을 제공한 쥐에게 주사하면 그 종양에 대하여 저항하는 성질도 있

다.(19-21) 본 연구에서도 염색 정도가 고분화 종양이 저분화 종양보다 강하였는데 이는 Lazaris등(14)이 대장암중에서 HSP 70은 분화가 나쁜 종양에서 의미있게 높았다고 하는 것과 차이가 있었다. Ciocca등(22)은 림프절 전이가 없는 유방암에서 치료 후 암의 재발을 추측할 수 있는 인자로서 HSP 70의 발현이 가장 유의있는 것으로 보고하였고, Lazaris등(14)은 대장 암중에서 환자의 생존과 HSP 70은 밀접한 관련이 있다고 하였지만 본 연구에서는 대장암종의 예후 인자와 HSP 70의 관련성을 찾지 못하였다. 앞으로 더 많은 대장암종을 대상으로 암유전자나 숙주의 면역 체계 및 항암제에 대한 저항성과 연관한 연구를 통해서 대장암종의 생물학적 악성도와 HSP 70의 관계가 밝혀질 것으로 추측된다.

결 론

1989년 1월부터 1995년 12월까지 중앙대학교 의료원에서 병리학적으로 대장직장암으로 진단되어 외과적으로 수술한 환자 중 1989년 1월부터 1998년 8월까지 추적 조사가 가능했던 환자 62명을 대상으로 HSP 70에 대한 면역조직화학 염색을 시행하고, T-stage, 림프절 전이 여부, 원위성 전이 여부, 병기, 조직학적 분화도, 생존율 등과 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 대장직장암중에서 HSP 70의 발현은 총 62예 중 양성인 41예(66.1%) 음성이 21예(33.9%)였고, T-stage, 림프절 전이 여부, 원위성 전이 여부, 병기, 조직학적 분화도와는 통계학적으로 유의성이 없었다. 하지만, HSP 70 양성인 예에서 통계학적으로 유의성 있게 전체적인 생존율과 각 병기별 생존율이 감소하여, 독립적인 예후 인자로서의 활용 가능성을 시사하였다.

REFERENCES

- 1) Dickson RB, Lippmann ME. Molecular determinants of growth, angiogenesis, and metastasis in breast cancer. *Sem Oncol* 1992;19:286-98.
- 2) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- 3) Tissiers A, Mitchell HK, Tracy U. Protein Synthesis in Salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol Physiol* 1974;84:389-98.
- 4) Kaufmann SHE. Heat shock proteins immune response. *Immunol Today* 1990;11:129-36.
- 5) Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ. Examining the function and regulation of HSP 70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol* 1992;117:1137-50.
- 6) Nakamura K, Rokutan K, Mami N. Induction of heat shock proteins their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastro-*

- enterology* 1991;101:161-9.
- 7) Xiao-Feng S, Hong Zang, John Carstensen, Agneta Jansson. Heat shock protein 72/73 in relation to cytoplasmic p53 expression and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1997;74:600-4.
- 8) Shrivastava PK, Maki RG. Stress induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;167:109-23.
- 9) Konno A, Sato N, Yagihashi A. Heat or stress inducible transformation associated cell surface antigen on the H-ras oncogene transfected rat fibroblasts. *Cancer Res* 1989;49:6578-82.
- 10) Kingstone RE, Baldwin AS, Sharp PA. Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature* 1984;312:280-2.
- 11) Milarski KL, Morimoto RI. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Pro Natl Acad Sci* 1986;83:9517-21.
- 12) Takahashi S, Mikami T, Watanabe Y. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;101:519-25.
- 13) Richard M, Elledge RM, Clark GM. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:3752-7.
- 14) Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Davaris PS. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1995;38:739-45.
- 15) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR. Presence of ras gene mutations in human colorectal cancer. *Nature* 1987;327:293-7.
- 16) Altonen LA, Deltomaki P, Leach FS. Clue to pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6.
- 17) Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:145-86
- 18) Lynch HT, Smyrk TC, Watson P. Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 1993;104:535-49.
- 19) Jatella M. Overexpression of major heat shock protein 70 inhibits tumor necrosis factor induced activation of phospholipase A₂. *J Immunol* 1993;151:4286-94.
- 20) Gioufas AG, Moutsopoulos CM. Immunology. 1st ed. Athens. Litsas; 1991. p.141-8.
- 21) Blachere NE, Udono H, Janetzki S, Li Z, Heike M. Heat shock protein vaccines against cancer. *J Immunother* 1993;14:352-6.
- 22) Ciocia DR, Clark GM, Tandon AK. Heat shock protein 70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-4.