

## 대장 직장암에서 Inducible Nitric Oxide Synthase 및 p53 발현의 임상적 관련성

조선대학교 의과대학 외과학교실 및 <sup>1</sup>병리학교실

정 성 훈 · 김 정 용\* · 기 근 흥<sup>1</sup>

### Clinical Correlation of iNOS and p53 Expression in Colorectal Cancer

Seong Hun Jeong M.D., Cheong Yong Kim M.D. and Keun Hong Kee M.D.<sup>1</sup>

**Purpose:** Nitric oxide (NO) is synthesized from the amino acid L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) which exists as three isoforms, the calcium-dependent endothelial NOS and neuronal NOS, and a calcium-independent inducible NOS. NO has been studied in a variety of human cancers and is implicated in both tumor promotion and inhibition. NO cause p53 mutation in human cells and mutations of p53 are the most common genetic abnormality yet found in human cancers. Aims of this study is to investigate the correlation of iNOS and p53 expression in colorectal cancer, and to evaluate its clinicopathological significance with the expression of these proteins.

**Methods:** 125 patients, who received curative resection of colorectal cancer from 1992 to 1996, were analyzed retrospectively. The monoclonal antibody to the iNOS (Transduction Laboratories.), the monoclonal antibody to the mutant p53 (Dako Co.) were used for the immunohistochemical analysis. Normal colorectal tissue were assayed in 45 cases. The relationship between mutant p53 and iNOS was investigated.

**Results:** When iNOS expression were detected in specimens, positive rate of mutant p53 were 72.4%. When mutant p53 expression were detected in specimens, positive rate of iNOS expression were 65.8% ( $P < 0.05$ ). Positive rate of iNOS, mutant p53 in tumor size were 51%, 56% below 4 cm and 60%, 63% in 4~8 cm and 47%, 67% above 8 cm. Positive rate of iNOS, mutant p53 in Dukes' stage were

55%, 55% in stage B and 56%, 67% in stage C. Positive rate of iNOS, mutant p53 in histologic differentiation were 55%, 55% in well-differentiation and 61%, 66% in moderate differentiation and 35%, 48% in poor-differentiation. There was no difference in each Dukes stage between iNOS expression or p53 mutation and postop five year survival rate. Positive rate of iNOS, mutant p53 in normal tissue were 22%, 32%.

**Conclusion:** The prevalence of iNOS expression and p53 mutation has been found in exceeding 50% of cases. There was a significant correlation between iNOS expression and p53 mutation in colorectal cancer. No correlation was found between iNOS expression or p53 mutation and clinicopathologic parameters. (*J Korean Surg Soc* 2002;62:64-7)

**Key Words:** iNOS, p53, Colorectal cancer

**중심 단어:** iNOS, p53 유전자, 대장 직장암

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Pathology, College of Medicine, Chosun University Hospital, Gwangju, Korea

### 서론

현재 인간의 대장 직장암에서 뿐만 아니라 인간의 난소, 유방, 중추신경계 등의 종양에 Nitric Oxide Synthase (NOS)의 발현이 증가되고 있다고 보고 있으며, 또한 Nitric Oxide (NO)가 종양의 형성과 전이에 어떠한 역할을 하는지 연구가 활발히 진행되고 있다.(1) NO는 NOS라는 isoenzyme에 의하여 L-arginine이 Citrulline로 전환될 때 형성 되는 중요한 물질이다.(2) NOS는 calcium 의존성인 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) 그리고 calcium 비의존성인 inducible NOS (iNOS)로 분류된다.(3) NO는 혈관확장, 신경전달과정, 숙주 면역 반응, 그리고 철의 대사에 관여한다.(1) 또한 혈소관의 응집 억제에 관여하고,(4) 인체의 면역 기전으로써 암의 형성을 억제하기보다 오히려 암의 성장을 증진시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(2) iNOS는 Lipopolysaccharide 같은 세균성 내독소나 interleukin-1 $\beta$ , Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ 와 같은 여러 염증성 cytokine에 의하여 유도

책임저자 : 김정용, 광주광역시 동구 서석동 588번지  
☎ 501-140, 조선대학교 부속병원 일반외과  
Tel: 062-220-3068, Fax: 062-228-3441  
E-mail: crscykim@hanmail.net

접수일 : 2001년 6월 26일, 게재승인일 : 2001년 12월 5일  
본 논문은 1999년도 조선대학교병원 지정진료 학술연구비에 의하여 연구되었음.

\*현 근무지: 경기도 평택시 합정동 883 굿모닝병원 일반외과  
(우편번호:450-833)

된다.(5) p53 종양 억제 유전자는 염색체 17번 단완(17p 13.1)에 있는 핵인산 단백질로(6) 유전자의 전사, DNA의 치유, 세포 주기 조절, 유전자의 항상성 유지, apoptosis 등 수많은 세포 내 기초활력을 유지시키는 기능을 가지고 있다.(7) iNOS에 의하여 형성된 NO와 Proxynitrite와 같은 NO 대사산물은 DNA의 손상을 일으키는 mutagen으로 작용하여 세포 내의 p53의 발현을 증가시키며(7) wild type p53 단백질은 손상된 DNA를 복구하거나 손상된 세포들의 apoptosis를 일으키고(7) iNOS의 활성성을 억제하여 iNOS 발현의 down regulation을 조장한다.(1) NO와 그의 대사산물은 p53 유전자의 point mutation을 일으켜 비정상적인 이상 단백 형성을 조장하며 이로 인해 종양 억제 유전자의 기능 이상을 가져온다.(6,7) 현재 여러 논문에서 인간의 대장 직장암에서 iNOS의 양이 정상 조직에 비해 증가되어 있다고 발표되고 있고(1,5) 또한 p53 유전자의 변화가 암의 발생에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.(6) 이에 저자들은 대장 직장암에서 iNOS와 p53의 발현 및 상관관계를 조사하고 또한 iNOS 발현과 p53 유전자의 변이에 의한 비정상 단백질의 발현이 대장 직장암의 임상 조직학적인 면에 있어서 중요한 차이가 있는지 알아보기 위해 본 연구를 하였다.

**방 법**

**1) 연구 재료**

조선대학교 부속병원에서 1992년 1월부터 1996년 12월 까지 조선대학교 일반외과에서 대장 직장암으로 수술 받은 환자 중 조직 보관이 양호하고 5년간 생존의 추적이 가능한 125예를 실험군으로 연구했으며 45예의 정상조직을 대조군으로 연구했다. 각 예를 남녀 성별, 연령, 종양의 크기, 조직적 분화도, Duke stage, 수술 후 5년 생존 group 과 사망 group별로 iNOS, mutant p53 발현의 양성률을 분류했다. 면역조직화학적 염색에 사용된 일차항체는 p53 (Dako Co, CA, USA), iNOS (Transduction Lab., NJ, USA) 이었다. 염색은 Srepaavidin biotin universal detection system (Immunotech Co., CA, USA)을 이용하였고, 발색은 3-acetyl-9-ethyl carbazole (AEC, DAKO Co., CA, USA)을 이용하였다.

**2) 연구 방법**

(1) 광학현미경적 관찰: 대장직장암으로 진단되어 절제 된 조직은 먼저 육안 검사를 거쳐 조직을 펼쳐 놓은 후 코르크 판에 핀으로 고정시켜 10% 중성 포르말린 통에 넣어 24시간 고정한다. 고정된 조직에서 종양의 크기를 측정하고, 대표적인 부위를 자른 후 탈수시켜 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하였다. 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. 이들은 병리의사의 도움을 받아 조직학적 유형, 종양 침습 깊

이, 림프절 전이 유무 등에 관하여 관찰한다.

(2) 면역조직화학적 염색: 선택된 증례들의 파라핀 포매 조직을 4 μm로 박절한 절편을 취하여 probe on plus slide (DAKO사, USA)에 얹어 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 saline sodium citrate 용액에 담구어 pleco™ laboratory microwave oven (Ted Pella Inc, CA, USA)에 5분씩 3회 끓였다. 그 후 phosphate buffered saline (PBS)에 세척하고, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.methanol 용액으로 조직 내 내인성 과산화 효소의 활성을 저지시킨 후 단백질과의 비특이성 결합을 억제시키기 위하여 정상 혈청을 실온에서 10분간 가하였다. 혈청을 가볍게 제거하고, 본 연구에 사용된 일차항체들을 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS로 세척하고 이차항체와 streptavidin-biotin conjugate를 각각 처리하였다. 그 후 AEC로 발색시키고, hematoxylin으로 대조 염색을 실시한 후 crystal mount로 봉입하여 관찰하였다.

(3) 면역조직화학적 염색 결과와 판정: 양성세포에 대한 판정은 p53은 핵에 염색된 경우를, iNOS는 세포질에 염색된 경우를 양성으로 하였다. 각각의 증례는 광학현미경에서 10부위를 선택하고 400배 시야에서 관찰되는 종양세포의 수를 세고 이들 중 양성으로 판정되는 세포의 수를 세

**Table 1.** Patient characteristics

	Number of patient	125
Sex		
Male		68
Female		57
Age distribution		
21~30		4
31~40		10
41~50		18
51~60		39
61~70		31
>70		23
Tumor size		
<4 cm		45
4~8 cm		65
>8 cm		15
Dukes' stage		
Stage B		62
Stage C		63
Histologic type		
Well		20
Moderate		82
Poor		23
5 year survival group (postoperation)		
Survival		56
Expired		69

어 백분율로 나타내었다. 이들 중 10% 이상에서 염색되는 경우를 양성으로, 10% 미만으로 염색된 경우는 음성으로 판정하였다.

(4) 통계학적 처리: 통계학적 처리는 SSPS 통계프로그램을 이용하였고, chi-square test 방법으로 분석했으며, 통계적 유의성은 95% 유의수준으로 검증하였다.

**결 과**

**1) 대상환자의 특성(Table 1)**

대상환자 125명 중 남자는 68명, 여자는 57명이었다. 연령별로는 20대가 4명, 30대가 10명, 40대가 18명, 50대가 39명, 60대가 31명, 70대 이상이 23명이었다. 조직학적 분화도로 분류하면 고분암이 20예, 중등도 분화암이 82예, 저분화암이 23예였다. 암의 크기로 분류하면 4 cm 이하가 45예, 4~8 cm가 65예, 8 cm 이상이 15예였다. Dukes' 병기 분류에 따르면 Dukes' stage B가 62예였고, C가 63예였다. 술 후 5년 생존한 사람이 56명, 사망한 사람이 69명이었다.

**2) iNOS 발현과 mutant p53과의 상관관계(Table 2)**

iNOS 발현 시 mutant p53의 양성률은 72.4%였고 mutant p53 발현 시 iNOS 양성률은 65.8%였으며 통계학적으로

**Table 2.** Correlation between iNOS and mutant p53 expression

	Case/Total case (%)		p-value
	Mutant p53 (+)	Mutant p53 (-)	
iNOS (+)	50/69 (72.4%)	19/69 (27.6%)	0.0001

	Case/Total case (%)		p-value
	iNOS (+)	iNOS (-)	
Mutant p53 (+)	50/76 (65.8%)	26/76 (34.2%)	0.006

**Table 3.** Correlation between tumor size and iNOS, mutant p53 expression

	Positive case/Total case (%)		p-value
	iNOS	Mutant p53	
< 4 cm	23/45 (53%)	25/43 (56%)	NS*
4~8 cm	39/65 (60%)	41/65 (63%)	NS*
> 8 cm	7/15 (47%)	10/15 (67%)	NS*

\*NS = not significance.

유의성이 있었다(P<0.05).

**3) 종양의 크기와 iNOS, mutant p53의 상관관계(Table 3)**

4 cm 이하에서 iNOS, mutant p53의 양성률은 51%, 56%였고 4~8 cm에서 60%, 63%였고 8 cm 이상에서 47%, 67%였지만 통계적 유의성은 없었다(P>0.05).

**4) Dukes' stage와 iNOS, mutant p53의 상관관계(Table 4)**

Dukes' stage B에서 iNOS, mutant p53의 양성률은 55%, 55%였고 Dukes' stage C에서는 56%, 67%였지만 통계적 유의성은 없었다(P>0.05).

**5) 조직학적 분화도와 iNOS, mutant p53의 상관관계 (Table 5)**

고분화암에서 iNOS, mutant p53의 양성률은 55%, 55%였고 중등도 분화암에서 61%, 66%였고 저분화암에서 35%, 48%였지만 통계적 유의성은 없었다(P>0.05).

**6) 각각의 Dukes' stage에서 술 후 5년 생존군과 사망군에 있어서 iNOS, mutant p53과의 상관관계(Table 6)**

Dukes' stage B에서는 iNOS 발현과 mutant p53이 동시에 나타난 군에 있어 사망률이 가장 높았고 Dukes' stage C에서는 iNOS 발현과 mutant p53이 동시에 나타나지 않는 군에 있어 사망률이 가장 높았지만 통계학적인 유의성은 없

**Table 4.** Correlation between Dukes' stage and iNOS, mutant p53 expression

	Positive case/Total case (%)		p-value
	iNOS	Mutant p53	
Stage B	34/62 (55%)	34/62 (55%)	NS*
Stage C	35/63 (56%)	42/63 (67%)	NS*

\*NS = not significance.

**Table 5.** Correlation between Histologic type and iNOS, mutant p53 expression

	Positive case/Total case (%)		p-value
	iNOS	Mutant p53	
Well	11/20 (55%)	11/20 (55%)	NS*
Moderate	50/82 (61%)	54/82 (66%)	NS*
Poor	8/23 (35%)	11/23 (48%)	NS*

\*NS = not significance.

**Table 6.** Correlation between postop 5-year survival and iNOS, mutant p53 according to tumor stage

	iNOS/p53	Case/Total case		p-value
		Expired (%)	Survival (%)	
Dukes' stage B	+/+	15/41 (36.6%)	5/21 (23.8%)	NS*
	+/-	7/41 (17.1%)	7/21 (33.3%)	
	-/+	11/41 (26.8%)	3/21 (14.3%)	
	-/-	8/41 (19.5%)	6/21 (28.6%)	
Dukes' stage C	+/+	9/28 (32.1%)	21/35 (60.0%)	NS*
	+/-	2/28 (7.1%)	3/35 (8.6%)	
	-/+	7/28 (25.0%)	5/35 (14.3%)	
	-/-	10/28 (35.7%)	6/35 (17.1%)	

\*NS = not significance.

**Table 7.** Correlation between normal tissue and iNOS, mutant p53 expression

	Positive case/Total case (%)		p-value
	iNOS	Mutant p53	
Normal tissue	10/45 (22%)	7/45 (16%)	NS*

\*NS = not significance.

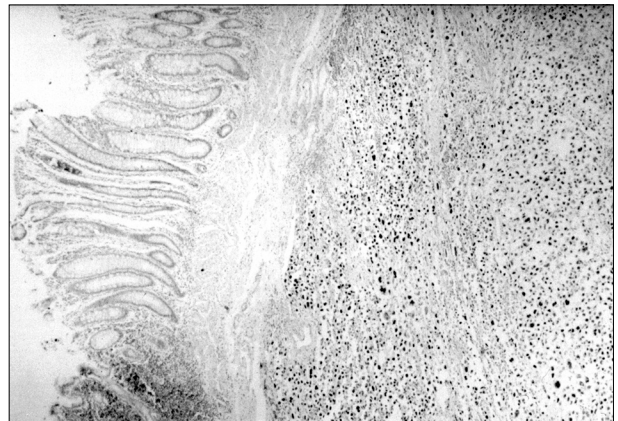
었다(P>0.05).

**7) 정상 조직에서 iNOS, mutant p53의 상관관계(Table 7)**

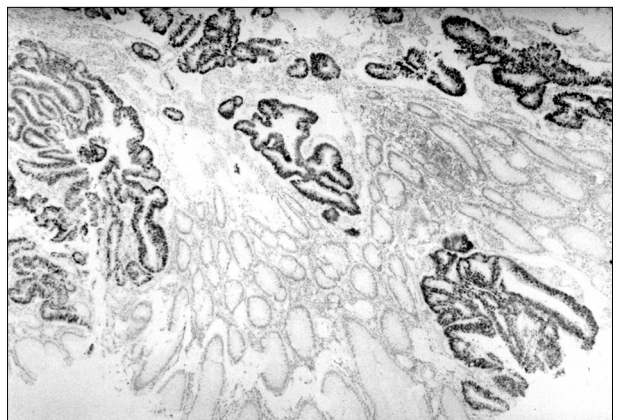
정상 조직에서 iNOS, mutant p53의 양성률은 22%, 16%였고 통계학적 유의성은 없었다(P>0.05).

**고 찰**

Nitric oxide (NO)는 Jenkens 등(3)이 Nitric oxide synthase에 의해 L-arginine이 citrulline로 전환되는 과정에서 생기는 물질이라고 발표한 이래로 현재까지 활발하게 그 역할에 대해 연구되고 있다.(2,8) NO는 신경전달, 숙주 면역과정, 철의 대사 등에 참여하는 중요한 물질이다.(1) Constitutive nitric oxide synthase (cNOS)에 의하여 생성된 NO는 심혈관계와 신경계에 있어 신경전달물질로 작용하며,(8) 중추 신경계에서는 NMDA 수용체나 microglial 활성화에 의해 신경독성을 일으킨다.(9) 또한 iNOS에 의해 생성된 NO는 면역반응에 의해 여러 미생물이나 종양세포에 세포독성을 가진다.(8,10-13) 많은 세포와 조직, 특히 혈관 내피 세포나, 혈소판, 혈관 내의 대식세포는 NO를 형성하는



**Fig. 1.** Intense nuclear staining for p53 in tumor cell labelled with a monoclonal antibody to p53 (Dako Co.). positive staining is indicated by red deposits. Normal mucosa is seen in right side (H&E stain, ×100).



**Fig. 2.** Intense cytosolic staining for iNOS in tumor cell labelled with monoclonal antibody to iNOS (Transduction laboratories). Positive staining is red deposits, which can be seen in most of the invasive tumor cells in this section (H&E stain, ×100).

데, NO는 혈소판의 응집이나 유착 작용 억제제로서 작용하고 또한 혈관을 확장시키며(4,14) 상처 치유과정에 있어서는 혈관신생에 관여한다.(14) Cytokine이나 hypoxia가 iNOS의 발현을 유도한 이후로 premalignant or malignant tumor tissue에서의 미세환경변화가 종양세포에서 NO 생성을 계속적으로 가능하게 하며 증가된 NO는 VEGF (vascular endothelial growth factor)의 유도와 생성에 참여한다. 그러므로 iNOS와 VEGF가 같은 induction pathway를 가지고 있다고 할 수 있다.(7) NO는 숙주의 면역 체계를 활성화시켜 종양 세포를 죽이는 기능과 종양의 전이를 억제시키는 기능을 가지고 있지만(15,16) 종양의 혈관 생성이나 확장을 유도하여 종양으로 가는 혈류량을 조절하며 종양의 성

장을 촉진시킨다.(2,12,17) 또한 p53 종양억제유전자의 변이를 일으키며 이것이 carcinogenesis의 시발점으로 알려져 있다.(1,16) Thomsen 등(15)이 처음으로 인간의 종양세포에서 iNOS의 역할과 발현에 대해 발표한 이후로 최근에는 종양발생에 중요한 역할을 수행하는 NO와 그의 생성을 유도하는 iNOS에 대해 활발히 연구가 이루어지고 있다. 인간의 난소, 유방, 중추신경계 등의 종양뿐만 아니라,(5,8,10,15) 인간의 대장암에서 NOS의 증가를 관찰할 수 있다고 보고되고 있다.(1) Ambts 등(1)은 인간의 대장선종에 있어서 거의 60%에서 iNOS가 발현되며 대장암에서는 20~25%가 발현되고 주위의 정상 조직에서는 거의 발현이 되지 않는다고 주장한다. 즉 iNOS에 의해 형성된 NO는 중요한 carcinogen이며 양성종양이 악성종양으로 변형되는 데 중요한 연관관계가 있다고 주장한다. 저자들이 연구했던 125예 중 iNOS가 발현된 경우가 50% 이상이었다. 그리고 정상조직에서의 iNOS 양성률은 22%였다. Ambts 등(1)은 NOS의 발현을 Western blot analysis 같은 정량적인 방법으로 설정했으며 또한 Brennan 등(18)은 구강암 조직에서 iNOS와 p53의 발현율을 조사하였는데 각각의 specimen에서 양성으로 염색되는 기준을 25% 이상 발현되는 경우로 설정했다. 저자들은 각각의 specimen에서 10% 이상으로 염색되는 경우를 양성으로 판정했기 때문에 종양조직에서 iNOS의 발현율이 여러 다른 연구 결과보다 높게 나타났다고 생각한다. Thomson과 Miles(10)는 주위의 대식세포에서 Tumor necrosis factor- $\alpha$ , LPS, Interferon- $\gamma$  같은 cytokine에 의하여 iNOS가 유도되고 NO의 형성이 증가되며, 또 증가된 NO는 종양의 성장에 있어 좋은 환경적인 조건을 제공한다고 주장했다. iNOS는 저자들의 경우처럼 일차항체를 이용하여 면역조직학적 염색으로 검출할 수 있다. 그 외에도 1) Nitrate, Nitrite, Methemoglobin과 같은 NO의 산화대사물을 측정하거나, 2) L-arginine이 L-citrulline로 전환될 때 L-citrulline을 측정하거나, 3) guanylate cyclase 활동성이나 혈소판 응집작용의 억제와 같은 NO와 연관된 대사과정을 monitoring하는 것으로 측정할 수 있다.(15) 또한 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-RCR)으로 종양조직에서 iNOS mRNA가 증가되어 있음을 알 수 있다.(3,5) NO는 종양의 혈류량을 유지시키는 중요한 물질인데 실험적으로 NOS의 inhibitor인 N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA)을 투여하면 정상 조직에서는 혈류의 감소가 없지만 종양조직에서는 중요한 혈류감소가 관찰되며 L-NNA의 투여 후에 L-arginine을 투여하면 다시 혈류량이 증가한다.(17) 따라서 NOS inhibitor는 선택적으로 종양의 혈류를 감소시키는 효과를 가져와 인체 내의 종양의 진행과 성장을 지연시키는 물질이다.(2,8,15,17) 또 Kojima 등(5)은 인간의 대장암 조직에서 형성된 iNOS mRNA와 그의 단백질 그리고 NO의 부산물들이 종양과 연관된 면역억제를 조장한다고 주장하고 있다. Jenkins 등

(8)은 암에 있어서 iNOS의 활동성이 종양의 grade와 관계가 있다고 주장했다. 그러나 Brennan 등(18)은 암의 크기와 조직학적 분화도에서 iNOS발현의 차이는 없다고 주장했다. 저자들이 경험한 예에서는 암의 조직학적 분화도에서 iNOS 발현의 현격한 차이는 없었으며, 또한 종양의 크기와 iNOS 발현의 차이는 없었다. 그리고, Dukes' stage에서 Stage B와 Stage C의 iNOS 발현의 차이는 없었다. 그리고 여러 저자들은 NO와 종양의 관계에서 오히려 NO의 항암 작용에 대해 강조하고 있다. 예를 들면 Mochhala 등(12)은 대장직장암에서 iNOS와 eNOS의 현저한 감소를 주장했다. 즉 종양세포에서 iNOS의 발현은 없었으며 반면에 정상세포보다 eNOS는 약 34%가 있었고 66%가 감소되었다고 보고했다. 즉 NOS는 정상대장조직의 상피안에 존재하며 NOS의 활동성과 표현의 소실이 대장암을 유발한다고 주장한다. 또 NO는 대식세포에 의한 세포독성(cytotoxicity)의 매개체이며, 종양세포의 DNA 합성이나 mitochondria의 호흡기능을 억제하므로 LPS와 Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 대식세포나 내막세포, 암세포에서 유리된 NO가 종양억제(tumoricidal)기능을 하고 있고 혈소판 응집 억제 기능이 종양세포의 전이를 억제한다는 주장이 제기되고 있다.(4,19) Stage B와 C에서 동시에 비슷한 비율로 양성이므로 암이 진행될수록 발현되는 것이 아니라 carcinogenesis의 과정에서 암 발생의 초기에 작용하는 것을 강력히 시사하며 이에 대한 연구가 필요하리라 여겨진다. 종양억제유전자인 p53은 유전자의 전사(gene transcription), DNA 복구, 세포주기조절, 유전자 항상성(genomic stability) 등에 관여한다.(7) 정상적으로 방사선이나 다른 mutagen에 의해서 DNA의 이중나선구조가 파괴되면 이것이 p53 유전자를 자극하여 wild type p53 단백질의 축적을 일으키며, 이로 인해 세포 주기에서 G1 기에 세포 성장 억제가 일어나거나 DNA의 복구가 일어나며 또한 mutation이나 aneuploidy을 방지하기 위한 apoptosis가 일어난다.(6,7,18,20,21) iNOS의 down regulation을 야기시켜 유전적인 항상성을 유지시킨다.(18,21) p53 유전자는 11개의 exon으로 구성되며(23) 일반적으로 p53 유전자의 5~8부위의 exon에서 변이가 일어난다.(6,22,23) 가장 많은 변이는 점변이(point mutation)이고 또한 allelic loss, rearrangement, deletion, missense mutation, nonsense mutation, frame shift mutation 등으로 종양억제기능이 사라지고 oncogenic activity를 갖는다.(6,7,22,23) 현재 인간의 종양 연구에서 p53의 변이를 초래하는 물질로써 NO의 역할에 대해 활발히 연구 중이다. NO와 그 대사물인 peroxynitrite는 종양세포에서 mutagen으로 작용한다. 즉 인체 내의 종양 발생과 진행에서 필요한 mutant p53 세포를 형성하게 된다.(7) 어떤 저자들은 Ca 비의존성인 iNOS에 의하여 형성된 NO와 그 대사산물인 peroxynitrite가 DNA의 이중나선구조를 파괴하며 또한 DNA의 복구능력을 억제시키고 중요한 유전적인

변형을 초래하는 DNA의 deamination을 일으킨다고 주장하고 있다.(7,21) 또한 인간의 대장암, 뇌종양, 백혈병, 임파종 등에서 p53 종양억제유전자의 CpG site의 점변이를 일으키며, 특히 인간의 대장암에서는 CpG dinucleotide에 G : C to A : T transition을 발생시키고 이것이 종양 발생의 시발점이라고 주장하고 있다.(7,22) Greenblatt 등(23)은 인간의 암발생에 있어서 대부분의 경우에 p53 유전자의 변이가 발생하며, 중요한 암의 경우 약 60%에서 p53 유전자의 변이가 있음을 발표했다. 특히 대장암에서 약 50%의 p53 변이의 유병률을 발표했으며 p53 변이가 대장암의 발생 초기에 일어난다고 주장했다. 그러므로 인간의 종양조직에서 iNOS에 의한 지속적인 NO의 생성이 DNA의 손상을 일으켜서 mutant p53 세포를 발생시키고, 이로 인해 apoptosis의 유발이나 비정상적인 세포성장의 억제 같은 정상적인 wild type p53 단백질에 의한 종양억제기능이 소실되므로 암의 발생과 성장이 이루어진다고 생각할 수 있다. 본 연구에서도 iNOS 발현 양성일 때 mutant p53의 양성률이 72.4%였고 mutant p53이 발현될 때 iNOS 양성률이 65.8%였고 통계학적으로 유의성이 있었다( $P < 0.05$ ). 이는 iNOS의 발현이 p53 mutation에 어떠한 형태로든 영향을 미친다는 것을 의미한다. 앞에 언급된 p53의 negative feedback의 소실이 대장직장암의 carcinogenesis에 관여할 가능성이 있으나 아직까지 이에 대한 확증은 없는 것 같다.

## 결 론

대장직장암에서 iNOS와 mutant p53의 발현율은 각각 50% 이상이었다. 그리고 종양의 크기, 조직학적 분화도, Duke's stage에서 iNOS와 mutant p53 발현의 차이는 없었으며 술 후 5년 생존군과 사망군에 있어서 iNOS와 p53의 차이는 없었다. 정상 조직에서의 iNOS와 mutant p53의 발현율은 22%, 32%로서 종양조직에 비하여 낮았다. 그리고 대장 직장암에 iNOS 발현과 p53 유전자의 변이가 밀접한 연관관계가 있다는 것을 알 수 있었다. 앞으로 iNOS가 대장직장암에서 p53에 미치는 영향에 대해 분자생물학적 연구가 활발히 이루어져야 한다고 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Stefan A, William GM, William PB, Emanuela FB, Mofolusara OO, Sean MO, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: Implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Research* 1998;58:334-41.
- 2) Lindy L. Thomsen, James MJS, Peter T, Richard GK, Amanda JK, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: Studies with 1,400 W, a Novel inhibitor. *Cancer Research* 1997;57:3300-4.
- 3) Jenkens DC, Charles IG, Baylis SA, Lelchuk R, Radomski MW & S. Moncada, Human colon cancer cell lines show a diverse pattern of nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide generation. *Br J Cancer* 1994;70:847-9.
- 4) Marek WR, David CJ, Lesley H, Salvador M. Human colorectal adenocarcinoma cells: Differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. *Cancer Research* 1991;51:6073-8.
- 5) Masayuki K, Takashi M, Yasuhiro T, Akihiko U, Yasuo M, Ryuichi M, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-9.
- 6) Kim HO, Kim WH, Bae SI, Lee HW, Kim CJ, Hong SY, et al. Effect of wild-type p53 gene transfection into human colon cancer cell line. *Korean Cancer Assoc* 1999;31:367-76.
- 7) Stefan A, Hussain SP, Curtis CH. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB* 1997;11:443-8.
- 8) Jenkins DC, Charles IG, Thonsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Medical Science* 1995;92:4392-6.
- 9) Hironori F, Tsutomu O, Atsushi H, Alessandro W, Junkoh Y, Hiroyasu E. Inducible nitric oxide synthase in a human glioblastoma cell line. *J Neurochem* 1995;64:85-91.
- 10) Kitano H, Kitanishi T, Nakanishi Y, Suzuki M, Takeuchi E, Yazawa Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human thyroid papillary carcinomas. *Thyroid* 1999;9:113-7.
- 11) Joseph S, Leibovich, Peter JP, Timothy WF, Lisa AH. Production of angiogenic activity of human monocytes requires an l-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Cell Biol* 1994;91:4190-4.
- 12) Shabbir M, Vikram JSC, Steven TFC, Sing SN, Yee WC, Abu R. Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1996;17:1171-4.
- 13) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews* 1991;43:109-41
- 14) Park JS. Endothelium-derived nitric oxide. *J Korean Soc Vascular Surg* 1998;14:179-93.
- 15) Lindy L. Thomsen, David W. Miles. Role of nitric oxide in tumor progression: Lessons from human tumours. *Cancer and Metastasis Reviews* 1998;17:107-8.
- 16) Limin L, Robert GK, James A, Isaiah JF. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Research* 1991;51:2531-5.
- 17) Gillian MT, Vivien EP, David JC. Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Research* 1997;57:948-55.
- 18) Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Hughes D, Speding AV, Zaki GA. Correlation between typr II nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma.

- Br J Oral Maxillofacial Surg 2000;38:627-32.
- 19) Keping X, Zhongyun D, Isaiah JF. Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. J Leukocyte Biol 1996;59:797-803.
- 20) Michael BK, Onyine O, David S, Bert Y, Ruth WC. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA Damage. Cancer Research 1991;51:6304-11.
- 21) Kathleen F, Stefan A, Shawn EL, Rachel BK, Elisa AS, Wendy CW, et al. Nitric Oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. Med Sci 1996;93:2442-7.
- 22) Monica H, David S, Bert V, Curtis CH. p53 mutation in human cancers. Science 1991;253:49-53.
- 23) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 1994;54:4855-78.
-