

대장암중에서 p16^{INK4A}과 Rb 및 E2F-1 단백질의 발현

중앙대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

김성수 · 이태진¹ · 김범규 · 차성재 · 박성준 · 임현묵 · 박성일

Expression of p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 Proteins in Colorectal Carcinoma

Sung Soo Kim, M.D., Tae Jin Lee, M.D.¹, Beom Gyu Kim, M.D., Sung Jae Cha, M.D., Sung Jun Park, M.D., Hyun Muck Lim, M.D. and Sung Il Park, M.D.

Purpose: An altered cell cycle regulation may underline the development and progression of human malignancies. The purpose of this study was to determine whether the degree of p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 expressions are related to certain parameters such as histologic differentiation, T-stage, lymph node metastasis and TNM stage in colorectal carcinoma. The correlation between the above proteins were compared.

Methods: Immunohistochemical stain was performed, for p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 on 84 formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of colorectal adenocarcinomas.

Results: The overall expression frequencies of the p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 were 54.8 (46/84), 76.2 (64/84) and 48.8% (41/84), respectively. Loss of the p16^{INK4A} expression frequency was higher with a poorly differentiated histologic grade, the presence of nodal metastasis and higher TNM stage. The expression of Rb was not correlated with any of the parameters studied. The frequency of the E2F-1 expression was higher with a poorly differentiated histologic grade, the presence of nodal metastasis and higher TNM stage. A highly significant inverse correlation between the expressions of p16^{INK4A} and E2F-1 was observed.

Conclusion: These data suggest that the loss of p16^{INK4A} expression and the expression E2F-1 may play roles in the progression of colorectal adenocarcinomas and could possibly be used as prognostic factors. Further studies to determine the relationships in the expressions of p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 will be required. (J Korean Surg Soc 2003;65: 119-125)

Key Words: Colorectal carcinoma, p16^{INK4A}, Rb, E2F-1
중심 단어: 대장암, p16^{INK4A}, Rb, E2F-1

Department of Surgery, ¹Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

서 론

대장암은 서구에서 소화기암 중 가장 흔하며 우리나라에서도 최근 식생활이 서구화되면서 그 발생률이 점차 증가하는 추세다.(1) 대장암에서 이미 잘 알려진 예후인자로는 종양의 침윤 정도, 림프절 전이 유무, 원격 전이 유무 등이 있으며 조직학적 유형이나 세포의 분화 정도와는 상관관계가 확실치 않다. 현재까지 대장암의 수술 후 치료방침을 정하거나 예후를 예측하는 데는 병리조직학적 소견과 임상적 병기에만 의존하여 왔으나, 같은 병기의 암이라도 재발률 및 생존율에 차이가 있는 경우가 많아서 기존의 방법을 보완하는 새로운 예측인자의 발견이 필요한 실정이다. 최근에는 암형성과 발전에 관여하는 여러 기능적 생물학적 변수들이 논의되고 있으며 이들 중 세포주기 조절인자에 대한 연구로 정상 세포주기의 장애가 암형성의 중요한 과정이라는 사실이 밝혀지고 있고 이 세포주기에 관여하는 여러 구성 성분의 이상이 여러 형태의 인체 종양에서 보고되고 있다.(2) 세포주기 조절에 관련된 cyclin 계열의 단백질과 cyclin dependent kinase (CDK) 및 cyclin dependent kinase inhibitor 등의 발견과 이들에 관한 활발한 연구는 세포주기를 조절하는 분자생물학적 기전을 이해하는 데 크게 기여하였다. 세포의 핵 내에서 cyclin이라는 단백질은 주기적으로 증가와 감소를 하고 있으며 cyclin의 증가에 의하여 CDK는 Rb의 serine 및 threonine을 인산화시키고, 그 결과 Rb가 억제하고 있던 E2F나 c-Abl, Elf-1과 같은 전사인자들이 활성화되면서 세포는 G1에서 S기로 들어가 증식하게 된다. 한편, 세포의 주기를 정확히 조절하기 위하여 세포는 cyclin이나 CDK 같은 활성인자 이외에도 p27^{kip1}, p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p21^{WAF1/CIP1} 등의 CDK 억제인자(CDKI)들을 가지고 있다. 이 중 p16^{INK4A}는 1993년 Serrano 등(3)이 처음 보고한 CDKI의 하나로, 세포주기와 관련된 종양 억제인자이다.

책임저자 : 박성일, 서울시 용산구 한강로 3가 65-207번지
☎ 140-757, 중앙대학교 의료원 외과학교실
Tel: 02-748-9560, Fax: 02-793-1042
E-mail: sungsoo73@lycos.co.kr

접수일 : 2003년 2월 27일, 게재승인일 : 2003년 6월 17일

이미 알려진 종양억제 인자 Rb는 p16^{INK4A}의 promotor 부위에 결합하여 p16^{INK4A}의 발현을 억제하는 한편, p16^{INK4A}은 CDK4, CDK6에 결합하여 Rb의 인산화를 방해함으로써 세포 주기 G1기에서 S로 진행되는 것을 방해한다.(4) Kamb(5)은 변이나 결손이 있을 경우 그 산물의 생산이 감소하거나 기능이 소실되어 G1/S 이행 단계에의 조절에 이상을 초래하는데, 이때 CDK4/Cyclin D1 복합체가 Rb 단백을 인산화시키면 E2F와 같은 전사 요소가 축적되어 S기로의 이행에 필요한 전사를 활성화시켜 세포증식을 유발하는 것으로 보고하였다.

이에 본 연구는 대장암에서 p16^{INK4A}과 Rb 및 E2F-1 단백질의 발현과 종양의 T-stage, 림프절 전이의 여부, 원격성 전이 여부 및 병기의 연관성을 알아보고 예후인자로서의 의의를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 연구 대상

1989년 1월부터 1995년 12월까지 병리학적으로 대장암종으로 진단되어 외과적으로 수술한 환자 중 1989년 1월부터 1998년 8월까지 추적 조사가 가능했던 환자 84명을 대상으로 파라핀 포매 조직을 이용한다.

2) 연구 방법

(1) 면역조직화학 염색: 파라핀 포매조직을 두께 4~5µm의 절편으로 박절하고 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀시킨 후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 합수시켰다. 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 p16^{INK4A} (Zymed, South San Francisco, U.S.A.), Rb (Zymed, South San Francisco, U.S.A.) E2F-1 (Zymed, South San Francisco, U.S.A.)을 1 : 50으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 일차항체 반응 후 절편을 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체 (Zymed, South San Francisco, U.S.A., 1 : 300)와 작용시킨 후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시킨다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)를 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 glycerol gelatin으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 염색 결과의 판정은 종양세포의 핵에 진한 갈색으로 염색된 세포의 수가 전체 종양의 10% 이상이면 양성으로 하였다.

(2) 통계학적 분석: Window용 SPSS (version 8.0) 통계 프로그램을 이용하여 Pearson Chi-square test를 실시하였고, P 값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1) 임상소견

환자의 연령은 36세부터 73세로 평균 54.5세였으며 39세 이하 군이 1예(1.1%), 40세에서 49세 군이 30예(35.7%), 50세에서 59세 군이 42예(50.0%), 60세에서 69세 군이 10예(11.9%), 70세 이상이 1예(1.1%)이었다. 환자의 성별은 남자가 41명, 여자가 43명이었다.

2) 조직학적 소견

종양의 분화도는 고분화도가 18예(21.4%), 중등도 분화도가 53예(63.1%), 저분화도는 13예(15.5%)였으며, 종양의 침윤

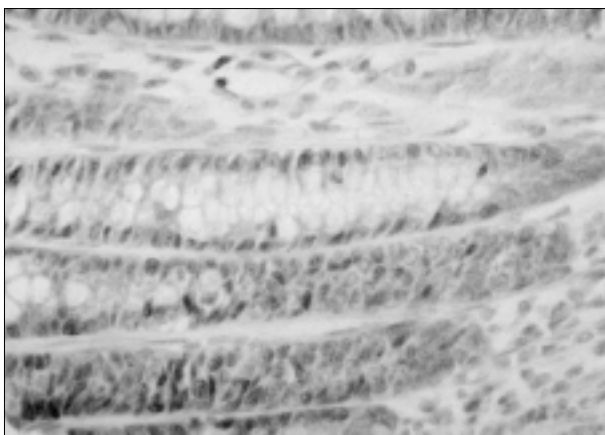


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p16^{INK4A} is diffusely expressed in the normal colonic epithelium (×400).

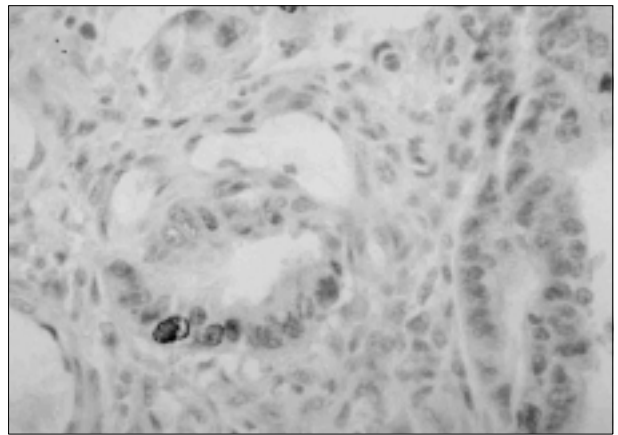


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p16^{INK4A} is occasionally expressed in the moderately differentiated adenocarcinoma (×400).

Table 1. Expression of p16^{INK4A} according to clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinomas

	(n=84)	p16 ^{INK4A}		P-value
		(-)	(+)	
		38 (45.2%)	46 (54.8%)	
Sex				
Male	41	18 (43.9%)	23 (56.1%)	NS
Female	43	20 (46.5%)	23 (53.5%)	
Differentiation				
Well	18	2 (11.1%)	16 (88.9%)	0.001
Moderate	53	26 (49.1%)	27 (50.9%)	
Poor	13	10 (76.9%)	3 (23.1%)	
T-stage				
1	2	0 (0%)	2 (100%)	NS
2	8	2 (25.0%)	6 (75.0%)	
3	69	34 (49.3%)	35 (50.7%)	
4	5	2 (40.0%)	3 (60.0%)	
Nodal metastasis				
(-)	42	14 (33.3%)	28 (66.7%)	0.024
(+)	42	24 (57.1%)	18 (42.9%)	
TNM stage				
I	7	1 (14.3%)	6 (85.7%)	0.011
II	35	13 (37.1%)	22 (62.9%)	
III	38	21 (55.3%)	17 (44.7%)	
IV	4	3 (75.0%)	1 (25.0%)	

NS = not significant.

도(T)는 T1이 2예(2.4%), T2는 8예(9.5%), T3는 69예(82.1%), T4는 5예(6.0%)였다. 림프절 전이 여부는 전이가 있는 군이 42예(50.0%)였고, 전이가 없는 군이 42예(50.0%)로 같았다. AJCC에 의한 환자의 병기 I이 7예(8.3%), 병기 II가 35예(41.7%), 병기 III가 38예(45.2%), 병기 IV가 4예(4.8%)이었다.

3) p16^{INK4A}과 Rb 및 E2F-1 단백질 발현과 예후인자와의 상관관계

총 84예 중 p16^{INK4A} 단백질 발현이 음성인 경우가 38명(45.2%), 양성인 경우가 46명(54.8%)였다. 성별에 따른 p16^{INK4A} 발현의 차이는 없었으며, 분화도가 나빠질수록 통계학적으로 유의하게 p16^{INK4A} 양성 발현이 적었고(P=0.001), T-병기와 연관은 관찰되지 않았지만, 림프절 전이가 있는 42예 중 18예(42.9%)에서 p16^{INK4A}에 양성 발현을 나타냈으며, 전이가 없는 군에서는 42예 중 28예(66.7%)에서 양성 발현을 나타내 통계학적으로 유의하게 림프절 전이가 있는 군에서 p16^{INK4A} 단백질 발현이 양성인 예가 적었

Table 2. Expression of Rb according to clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinomas

	(n=84)	Rb		P-value
		(-)	(+)	
		20 (23.8%)	64 (76.2%)	
Sex				
Male	41	8 (19.5%)	33 (80.5%)	NS
Female	43	12 (27.9%)	31 (72.1%)	
Differentiation				
Well	18	5 (27.8%)	13 (72.2%)	NS
Moderate	53	12 (22.6%)	41 (77.4%)	
Poor	13	3 (23.1%)	10 (76.9%)	
T-stage				
1	2	0 (0%)	2 (100%)	NS
2	8	4 (50%)	4 (50%)	
3	69	14 (20.3%)	55 (79.7%)	
4	5	2 (40%)	3 (60%)	
Nodal metastasis				
(-)	42	12 (28.6%)	30 (71.4%)	NS
(+)	42	8 (19.0%)	34 (81.0%)	
TNM stage				
I	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)	NS
II	35	10 (28.6%)	25 (71.4%)	
III	38	8 (21.1%)	30 (78.9%)	
IV	4	0 (0%)	4 (100%)	

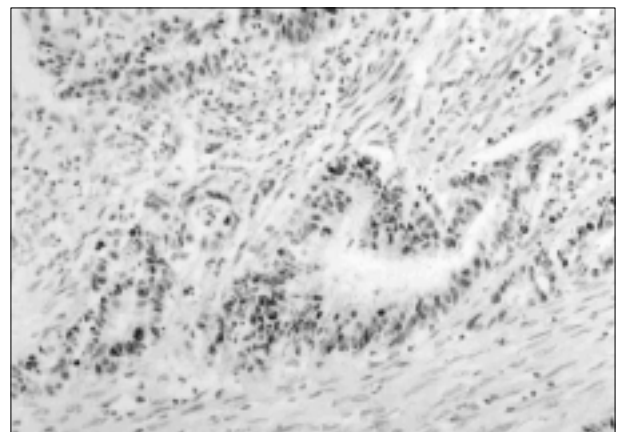


Fig. 3. Immunohistochemical staining for Rb is diffusely expressed in the moderately differentiated adenocarcinoma (×200).

다(P=0.024). 병기에 따라서는 병기 I에서 IV로 높아질수록 p16^{INK4A} 양성 발현은 85.7%, 62.9%, 44.7%, 25.0%로 통계학적으로 유의하게 감소하였다(P=0.011)(Fig. 1, 2, Table 1).

Rb 단백질의 음성 발현은 20예(23.8%)였고, 양성 발현은 64예(76.2%)였으나 조직의 분화도, 종양의 침윤도, 림프절의

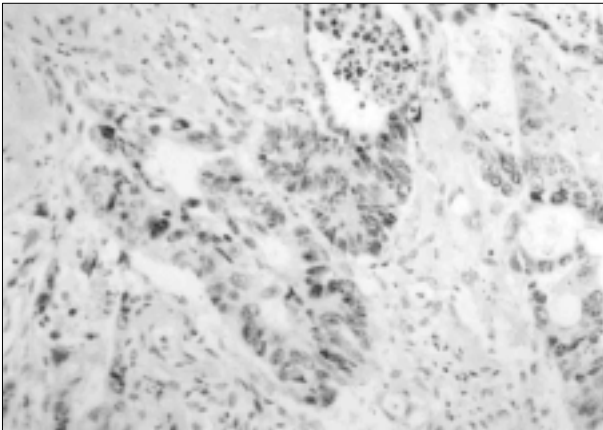


Fig. 4. Immunohistochemical staining for E2F-1 is diffusely expressed in the moderately differentiated adenocarcinoma (×200).

전이 여부, 병기에 따른 차이는 통계적인 유의성이 없었다 (Fig. 3, Table 2).

E2F-1 단백질은 음성 발현이 43예(51.2%)였고, 양성 발현이 41예(48.8%)였다. E2F-1 단백질 발현은 분화도가 나빠지고 (P=0.021), 림프절 전이가 있으며(P=0.014)와 병기가 높을수록(P=0.037) 통계적으로 유의하게 양성 발현의 예가 증가하였다(Fig. 4, Table 3).

p16^{INK4A}와 Rb 및 E2F-1 단백질 발현의 상관관계는 p16^{INK4A}과 E2F-1 단백질은 통계학적으로 유의한 역상관계(Correlation coefficient=-0.548, P=0.01)를 나타냈으나, p16^{INK4A}과 Rb 단백질 발현 및 Rb와 E2F-1 발현 간의 통계학적인 유의성은 없었다(Table 4).

고 찰

우리나라에서 대장암의 발생빈도는 점차 증가하여 1990년대는 한국인 10대 암종 중 남녀 모두에서 4위를 차지하는 호발 암종이 되었다(1). 현재까지의 대장암의 수술 후 치료 방침을 정하거나 예후를 예측하는 데는 근래까지는 병리 조직검사가 예후를 판정하는 가장 믿을 만한 것으로 여겨졌으나 병리조직검사만으로는 주관적이며 때로 임상적 경과를 예측하지 못하는 경우도 있었다. 근래에 종양의 핵산 배수성, 세포증식 등이 중요한 예후인자로서의 가능성이 인정되어 많은 연구가 이루어지고 있다(6-9). 또한 최근에는 암형성과 발전에 관여하는 정상 세포주기의 장애가 증식에 가장 중요한 것으로 알려져 있다. MacLanchlan 등(10)은 이 세포주기에 관여하는 여러 구성 성분의 이상이 여러 형태의 인체 종양에서 관찰됨을 보고하였다. Kamb(5)과 Reymond와 Brent(11)는 multiple tumor suppressor 1 (MTS1)으로도 불리는 CDKN2/p16^{INK4A} 유전자는 염색체 9p21에 위

Table 3. Expression of E2F-1 according to clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinomas

	(n=84)	E2F-1		P-value
		(-)	(+)	
		43 (51.2%)	41 (48.8%)	
Sex				
Male	41	19 (46.3%)	22 (53.7%)	NS
Female	43	24 (55.8%)	19 (44.2%)	
Differentiation				
Well	18	13 (72.2%)	5 (27.8%)	0.021
Moderate	53	26 (49.1%)	27 (50.9%)	
Poor	13	4 (30.8%)	9 (69.2%)	
T-stage				
1	2	2 (100%)	0 (0%)	NS
2	8	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
3	69	33 (47.8%)	36 (52.2%)	
4	5	3 (60.0%)	2 (40.0%)	
Nodal metastasis				
(-)	42	27 (64.3%)	15 (35.7%)	0.014
(+)	42	16 (38.1%)	26 (61.9%)	
TNM stage				
I	7	5 (71.4%)	2 (28.6%)	0.037
II	35	22 (62.9%)	13 (37.1%)	
III	38	16 (42.1%)	22 (57.9%)	
IV	4	0 (0%)	4 (100%)	

NS = not significant.

Table 4. Correlation of expressions of p16^{INK4A}, Rb and E2F-1 in colorectal adenocarcinomas

		p16 ^{INK4A}	Rb	E2F-1
p16 ^{INK4A}	CC	-	0.53	-0.548
	p	-	NS	0.01
Rb	CC	0.53	-	-0.013
	p	NS	-	NS
E2F-1	CC	0.548	-0.013	-
	p	0.01	NS	-

NS = not significant.

치하고 있으며, Musgrove 등(12)은 16kD의 핵단백질을 생성하고 이 핵단백질은 156개의 아미노산 배열과 4개의 ankyrin motif를 갖고 있음을 확인하였다. Hartwell과 Kastan(13)은 p16^{INK4A}의 기능이 소실되어 정상 조절 기전으로부터 벗어나 있는 암세포주들은 세포주기 중 DNA의 손상을 감지하

는 확인점(check point)을 넘어 세포 증식을 계속하게 된다고 하였다. Musgrove 등(12)은 이 p16^{INK4A} 단백을 전사하는 p16^{INK4A} 유전자가 유방암을 포함한 다수의 원발암이나 암 세포주에서 결실이나 점 돌연변이 등의 형태로 기능을 상실하여 p16^{INK4A} 단백질 발현이 억제됨으로써 종양 억제자로서의 기능을 상실해 암 발생에 관여한다고 발표하였다. Elledge와 Harper(14), Nobori 등(15)은 p16^{INK4A}이 유방암(60%)을 비롯해 흑색종(57~61%), 신경교종(17~97%), 백혈병(25~60%), 췌장암(70%) 등 여러 가지 종양에서 유래된 세포주에서 자주 불활성 상태를 보이는 것으로 보고하였다. 이런 결과를 보면, p16^{INK4A}의 변이로 인해 CDK4의 활동성이 증가하여, 종양세포의 성장 억제력 상실과 DNA 복제과다가 암발생을 유발할 수 있을 것으로 설명될 수 있다. 그러나 이러한 추론은 아직은 연구 단계로, 여러 가지 종양 세포주에서는 p16^{INK4A}의 변이가 빈번하게 나타나나, 원발성 대장암에서는 연구된 바가 드물다. 본 연구에서는 p16^{INK4A} 단백질의 음성 발현이 조직학적 분화도가 나쁘고 병기가 높은 것과 연관성이 있어서 p16^{INK4A} 단백질의 기능 소실이 대장암의 형성과 진행에 영향을 미치며 예후인자로서의 가능성이 있다고 생각된다.

E2F 단백질은 DNA 합성에 관련된 많은 유전자들의 전사를 조절하는 전사 조절인자로 알려져 있는데 E2F와 Rb 단백질이 결합하면 전사인자로서의 기능이 상실된다. Cyclin D1/CDK4 복합체는 Rb에 직접 결합하여 mid-G1기에서 late-G1기 동안 이를 인산화하는데 이렇게 Rb 단백질이 과인산화되어 E2F와 결합하지 못하게 되면 자유롭게 된 E2F는 S기를 위하여 필수적인 유전자 발현을 촉진시키는 것이 가능하게 되어 세포주기는 G1기에서 S기로 진행하게 되는 것으로 알려져 있다. E2F 전사인자군은 c-myc, c-myb, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 CDK2 kinase 등의 몇 가지 유전자의 발현을 조절한다. Nakamura 등(16)은 E2F 전사인자군에는 E2F 1에서 6까지가 있으며, E2F-1의 과발현은 세포의 증식을 자극하고 종양을 유발시킨다고 하였으며, E2F-1은 종양의 분화도와 림프절 전이 여부, 병기와 연관성이 있다는 연구결과가 발표되고 있다. Zhang 등(17)은 E2F-1이 인간 두경부 암종 세포에서 침습성을 증가시키는데 중요한 역할을 하며, Benerjee 등(18)은 E2F-1의 높은 발현이 대장암종의 폐전이와 연관성이 있음을 발표하였다. Rabbani 등(19)은 방광암 환자에게서 임상추적 검사를 시행하였을 때 E2F 표현이 낮은 환자에서 더 좋은 예후를 나타냈다고 보고하였고, Zhang 등(20)은 높은 E2F의 표현이 저분화도의 암과 연관이 있고 유방암 환자에게서 나쁜 예후를 나타냈다고 보고하였다.

본 연구에서는 면역조직학적 분석의 한계가 인정되기는 하지만 E2F-1에 양성을 나타내는 경우가 전체 84명의 환자에서 41명이었고 E2F-1은 종양의 분화도가 나쁘고 림프절 전이가 있으며 병기가 진행됨에 따라 통계학적으로 유

의하게 발현되는 예가 증가하여 예후인자로서의 가치가 있다고 생각된다. 또한 p16^{INK4A}이 음성인 군에서 병기가 진행되었으며 p16^{INK4A}과 E2F-1의 발현은 상호 간에 통계학적으로 유의한 연관성이 관찰되어, 두 물질 사이에는 서로 연관성있게 발현되는 것으로 생각된다. 또한, 동일한 병기에서 p16^{INK4A}과 E2F-1의 상관관계를 분석하여 보았을 때, 병기 II와 III에서는 통계학적으로 유의한 상관관계가 있었지만, 병기 I과 IV에서는 유의한 상관관계가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 병기 I과 IV가 상대적으로 증례의 수가 적어 비롯된 결과일 수도 있다고 생각되며 분석에 충분한 증례수를 가지고 있는 병기 II와 III를 중심으로 생각해 본다면 같은 병기에서도 두 인자 간에 상관관계가 있는 것으로 미루어 병기와 상관없이 즉 암의 진행과정과 상관없이 두 인자간에 연관성이 있을 것이라고 추정되지만 충분한 증례를 토대로한 분석이 필요하다고 생각된다.

Weinberg(21)는 cyclin과 CDKI들과 연관성을 가지는 Rb 유전자는 염색체 13q14에 위치하며 정상 조직에서 발현하는 110 kD의 핵내 인산 단백을 encoding하고, 세포조절 기전에서 성장억제 역할을 하는 주요 인자로 종양 발생에 관여한다고 하였다. Draper 등(22)은 유전성 망막세포종 환자의 암종에서 이 유전자의 결손이 처음 발견되었고, Reissmann 등(23)은 이런 환자 가운데 육종의 발생률이 높은 것으로 Rb 단백질의 결손이 육종의 발생과 연관이 있을 것으로 추측하였고, 현재까지 일부 육종에서 Rb 유전자의 결손이나 재배열, Rb 단백질의 발현 이상이 보고되어 있다. 현재까지 여러 연구자들에 의하여 악성 종양과 Rb 단백질에 관한 연구가 진행되어 왔지만 연구자마다 각각 다른 결과들을 보고하고 있다. Juan 등(24)은 림프종에 대한 연구에서도 종양의 악성도가 증가함에 따라 Rb 단백질이 증가하였다고 보고하면서 그에 대한 설명으로 Rb가 세포의 성장을 억제하기 위하여 세포분열이 왕성할 때 이를 억제하기 위해 Rb 단백질도 함께 증가할 것이라고 주장하였다. 그러나 허 등(25)은 폐암종에서 Rb 단백질의 발현과 예후에 관한 연구에서 폐암의 각 조직형의 분화도와 병기에 따른 Rb 단백질의 발현율은 차이가 없지만 2년 생존율이 Rb 단백질이 양성인 군에서 높았다고 하였다. 본 연구에서 Rb 단백질은 종양의 76.2%에서 발현되었고 조직학적 분화도를 포함한 림프절 전이 여부 및 병기와 연관성이 없었다. 이는 대장암종에서 Rb 단백질의 발현에 대한 연구가 드물지만 대부분의 연구자들에 의하여 매우 높은 발현 빈도를 보인다는 것과 일치한다. Bukholm과 Nesland(26)은 93예의 대장암종을 대상으로 Rb 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시한 결과 모든 예에서 강한 양성 반응을 보였다고 보고하였다. Guy 등(27)은 대장상피세포에서 분화도의 증가와 세포자멸의 유도과 관계된 Rb 단백질 발현의 조절을 조사하였는데 Rb 단백질의 발현은 정상 대장 점막 선구조의 상층으로 갈수록 하향 조절되는 것을 관찰할 수 있었고 이는 분화와 세포자멸이 일어나

는 부위와 일치한다고 하였으며 대장암 조직에서는 고도로 발현되는 것을 관찰하였다. 대장암중에서 Rb 단백질은 비교적 높은 빈도로 발현되고 있는데 이는 대장암중에서 Rb 유전자의 돌연변이는 거의 일어나지 않는 것으로 추정할 수 있지만, 면역조직화학염색에서는 Rb 단백질의 기능에 밀접한 관계가 있는 인산화 상태를 알 수 없기 때문에 발암 과정에서의 Rb 단백질의 역할을 이해하는 데는 부족함이 있다고 생각된다. 면역조직화학 염색에서는 인산화되어 기능을 소실한 Rb 단백질까지 검출이 되는 것이므로 대장암에서는 Rb 유전자의 돌연변이가 없이 그 기능만이 소실되어 전사인자인 E2F-1의 기능을 활성화시켜 세포증식이 발생했다고 생각된다. 하지만 본 연구에서 돌연변이가 없음을 나타내는 Rb 단백질의 발현과 E2F-1의 발현에 연관성이 없어서 이를 정확히 설명하기에는 부족함이 있다. 하지만 p16^{INK4A}의 발현 감소와 E2F-1의 발현 증가와의 연관성이 관찰된 것은 p16^{INK4A}의 기능 소실이 CDK/cyclinD 복합체의 기능을 억제하지 못하고 이들이 Rb를 인산화시킴으로써 Rb와 E2F-1의 복합체가 해체되고 자유로워진 E2F-1이 세포증식을 유도한다는 가설에 합당한 연구 결과라고 생각된다.

결 론

1989년 1월부터 1995년 12월까지 병리학적으로 대장암중으로 진단되어 외과적으로 수술한 환자 84예를 대상으로 p16^{INK4A}와 Rb 및 E2F-1 단백질의 발현을 조사하였고 기존의 예후인자들인 종양의 분화도, 종양의 침윤도, 림프절 전이 여부, 종양의 병기 등과의 상관성을 비교 분석한 결과로 대장암에서의 p16^{INK4A}과 E2F-1의 발현은 다른 예후인자들과 상관관계가 있고 서로 연관성이 있게 발현되어 중요한 예후인자로 활용 가능성이 있다고 판단되었고 Rb단백과의 연관성에 대해서는 향후 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Annual report of the central registry in Korea (Based on registered data from 128 hospital: Jan, 1999~Dec, 1999). Central cancer registry center in Korea, Ministry of health and welfare).
- 2) Oh HE, Cho SJ, Won NH, Lee D, Kim IS. k-ras gene mutations and Expression of k-ras, p16, cyclin D and p53 in synchronous lesions of the colon adenoma-carcinoma sequences. Korean J Pathol 2001;35:291-8.
- 3) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature (Lond.) 1993;366:704-6.
- 4) Caldas C, Hahn SA, Da Costa LT, Redston MS, Shutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adeno-

- carcinoma. Nature Genet 1994;8:27-30.
- 5) Kamb A. Cell cycle regulators and cancer. Trends Genet 1995;11:136-40.
- 6) Lee CK, Paik NS, Choi DW. Clinical study for prognostic factors in colorectal cancer. J Korean Cancer 1991;23:619-22.
- 7) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Ullrich A, McGuire WL. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989;244:707-10.
- 8) Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T. Ras gene mutation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. Cancer Res 1992;52:2903-5.
- 9) Hong BK, Lee TJ, Lee JH. Expression of p27Kip1 protein and correlation with clinicopathologic factors in colorectal carcinoma. J Korean Surg Soc 2001;60:536-40.
- 10) MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclin, cyclin-dependent kinase and Cdk inhibitors: implication in cell cycle control and cancer. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1995;5:127-56.
- 11) Reymond A, Brent R. p16 proteins from melanoma-prone families are deficient in binding to CDK4. Oncogene 1995;11:1173-80.
- 12) Musgrove EA, Lilischkis R, Cornish AL, Lee CS, Setlur V, Seshadri R, et al. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p16INK, p15INKB and p21WAF1/CIP1 in human breast cancer. Int J Cancer 1995;63:584-91.
- 13) Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science (Washington DC) 1994;266:1821-77.
- 14) Elledge SJ, Harper JW. CDK inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Current Opinion in Cell Biol 1994;6:847-53.
- 15) Nobori T, Miuria K, Wu DJ, Lois A, Takabayasi K, Carson DA. Deletion of the cyclin dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer. Int J Cancer 1995;63:584-88.
- 16) Nakamura T, Monden Y, Kawashima K, Nuruke T, Nishimura S. Failure to detect mutation in the retinoblastoma protei-binding of the transcription factor E2F-1 in human cancers. Japanese Journal of Cancer Research 1999;87:1204-9.
- 17) Zhang SY, Liu SC, Johnson DG, Klein-Szanto AJ. E2F-1 gene transfer enhances invasiveness of human head and neck carcinoma cell lines. Cancer Research 2000;69:5972-6.
- 18) Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg PC, Danenberg PV. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. Cancer Research 2000;60:2365-7.
- 19) Rabbani F, Richon V, Orloe I, Lu M, Drobnjak M, Dudas M, et al. Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1999;91:874-81.
- 20) Zhang SY, Liu SC, Al-Saleen L, Holloran D, Babb J, Guo X, et al. A Proliferative marker of breast neoplasia. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2000;9:395-401.

- 21) Weingerg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-30.
 - 22) Darper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Second primary neoplasm in patients with retinoblastoma. *Br J Cancer* 1986;53:661-71.
 - 23) Reissman PT, Simon MA, Lee WH, Salmon DJ. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcoma. *Oncogene* 1989;4:839-43.
 - 24) Juan CM, Miguel AP, Margarita SB. Retinoblastoma gene product expression in lymphoma correlation with Ki-67 growth fraction. *J Pathol* 1993;169:405-12.
 - 25) Hur HK, Rha SH, Hong SH. Expression pattern of the Rb protein and its correlation with prognosis on primary lung cancer. *Korean J Pathol* 1997;31:152-61.
 - 26) Bukholm IK, Nesland JM. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, cyclin D1 and pRb in human colon carcinoma. *Int J Cancer* 1994;568-73.
 - 27) Guy M, Moorghen M, Bond JA, Collard TJ, Paraskva C, Williams AC. Transcriptional down-regulation of the retinoblastoma protein is associated with differentiation and apoptosis in human colorectal epithelial cells. *Br J Cancer* 1996;84:520-8.
-