

폐암 환자의 혈청과 조직 표본상에서 Alpha 1-Proteinase Inhibitor의 조사 연구

김승명* · 조성래* · 이재성* · 박성달* · 허강배* · 하현철* · 김수현*
허만하** · 강구일***

=Abstract=

Investigation of Alpha 1-Proteinase Inhibitor in Serum and Specimen of Lung Cancer Patients

Song Myung Kim, M.D.* , Sung Rae Cho, M.D.* , Jae Seong Lee, M.D.* , Sung Dal Park, M.D.* ,
Gang Bae Huh, M.D.* , Hyeon Cheol Ha, M.D.* , Soo Hyeon Kim, M.D.* ,
Man Ha Huh, M.D.** , Goo Il Kang, Ph.D.***

Alpha 1-Proteinase inhibitor(PI) was known as a major protective enzyme against to excessive hydrolytic and proteolytic reaction. So, it was suggested that Alpha 1-PI may implicated in growth of bronchogenic cancer.

This study was undertaken to investigate the role of Alpha 1-PI in local invasion of bronchogenic cancer. Three groups of patients were studied; Preliminary research group of 15 bronchogenic cancer patients, Main research group of 13 bronchogenic cancer patients and Normal control group of 10 nephrectomy donor.

Serum Alpha 1-PI level was observed in each group of patients during pre-and postoperative days. Pre-operative serum Alpha 1-PI level in preliminary research group (329.2 ± 14.21 mg/dl) and main research group (406.2 ± 39.30 mg/dl) were higher than in normal control group (236.2 ± 19.55 mg/dl) significantly ($p < 0.005$).

Serial Alpha 1-PI level in each group during pre-and postoperative days shows peaked at 3rd. postoperative day in preliminary and main research group, thereafter decreased gradually.

According to AJCC classification, 13 main research lung cancer group patients were subdivided into stage I(6cases, 46.2%), stage II(2cases, 15.3%), stage III(5cases, 38.5%). Serum Alpha 1-PI level in stage I, and III cases of main research group was higher than in normal control group during whole time course of research ($p < 0.05$), and its level at 1 st. , 5th. , and 14th. postoperative day in stage III was higher than in stage I ($p < 0.1$).

Protein amount, elastase and cathepsin G activity were analyzed quantitatively in tumor tissue, tum-

* 고신대학교 의학부 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular surgery, College of medicine, Kosin University

** 고신대학교 의학부 병리학 교실

** Department of Pathology, College of medicine, Kosin University

*** 고신대학교 의학부 약리학 교실

*** Department of Pharmacology, College of medicine, Kosin University

† 본 논문은 1992년도 고신대학교 의학부 임상 기초 의학 공동 연구기금에서 지원(92-1)으로 이루어진 것임.

통신저자: 김승명, (602-030) 부산시 서구 안남동 34, Tel. (051) 240-6114, Fax. (051) 248-9407

or border tissue and non-tumor tissue, respectively, in main research group of lung cancer patients. Protein amount in tumor-border tissue was higher than in tumor tissue($p < 0.1$), elastase activity shows highest level in tumor border tissue and elastase in tumor and tumor-border tissue was higher than in non-tumor tissue($p < 0.005$). Cathepsin G activity was highest in tumor tissue and progressively decreased passing through tumor border and non-tumor tissue.

Immunohistochemical study for Alpha 1-antitrypsin(A₁AT) was carried out by ABC(avidin-biotin peroxidase complex) method using Alpha-1 antitrypsin DAKO^R to tumor tissues of 13 lung cancer patients in main research group. 6 cases(46.2%, squamous cell ca.; 5, adenocarcinoma; 1) of above 13 cases show positive immunoreactivity for A₁AT.

In conclusion, alpha 1-PI and elastase are disclosed that have defined actions for lung cancer growing or spreading.

(Korean J Thoracic Cardiovas Surg 1993;27:364-73)

Key words : 1. Lung neoplasm
2. Alpha 1-proteinase Inhibitor

서 론

Alpha 1-proteinase Inhibitor(이하 Alpha 1-PI)는 간에서 생성되는 다형체의 당단백체로서 혈청내에 다량 존재하며 Proteinase Inhibitor계를 형성하여 염증의 진행에서 급성 반응체로서 주로 작용하나, 아직도 단백질분해효소 억제 능력 이외에도 밝혀지지 않은 많은 미지의 부분이 있는 실정이다. 특히 폐장의 암세포는 전파 방식에 있어서 임파선, 혈행, 기관지 또는 흉강의 경로를 따라서 이루어진다는 사실은 잘 알려져 있다.

이에 저자들은 폐암 절제술 전후의 Alpha 1-PI치의 변화를 일차 조사한 바 있으며 이어서 폐암 조직에서의 조직 표본상의 Alpha 1-PI 분포를 규명함으로써 암세포가 정상 조직으로 이행되는 기전을 밝히는데 실마리를 만들어 보고자 한다.

고신 의과대학 흉부외과 교실에서는 1989년 6월 개심 수술 전후의 Alpha 1-PI에 대하여 연구논문을 일차 발표한 바 있었으며 그 이후 폐암 환자의 혈청 Alpha 1-PI가 수술전후 증가되어 있다는 사실을 발견하였다. 이에 폐암 환자의 혈청 Alpha 1-PI가 증가되어 있음과 암조직에서는 정상 조직과 암세포의 변화로서 폐의 혈관내 침착된 다형 핵구는 lisosome 을 분비할 것이며 이들이 강력한 hydrolytic proteolytic enzyme을 포함하고 있으므로 폐실질의 직접적인 손상을 초래하게 되고 암세포와 정상조직의 파괴가 혈액내의 Alpha 1-PI의 조직이나 삼출액으로의 이행을 일으키

고 이것은 폐암 조직 표본상에서 농도의 차이를 보일 것으로 예견된다. 이러한 변화를 면역 조직 화학 염색법(im-

munohistochemical staining method)으로서 조사해 보고자 한다.

연구 대상 및 방법

1) 연구 대상

사전조사와 주 연구로 구분하였다. 사전 조사는 1990년 5월에서 1990년 9월까지 폐암 절제술을 시행한 15례와 건강한 신장 공여자로서 신절제술을 시행한 10례를 선정하여 폐암 절제술 환자 15례를 사전 조사군으로 하였으며, 신장 공여자로 신절제술을 시행한 10례를 정상 대조군으로 하였다. 주 연구는 1992년 9월부터 1993년 7월까지 폐암으로 확진된 환자 13례를 조직 확진 후 연구 대상으로 선정하여 위의 사전 조사의 폐암 절제군과 정상 대조군을 비교검토 하였다(Table 1).

2) 연구 방법

정상 대조군은 건강한 신장 공여자로 결정한 후 수술 전, 수술 직후, 수술 후 제 1, 3, 5, 9, 14일에 각각 정맥혈을 채혈하여 Alpha 1-PI를 검사하였다. 사전 연구는 폐암으로 확진된 환자나 의심되는 환자에서 수술 전 정맥혈을 채혈하고 수술시 동결조직 검사에서 폐암으로 확진이 되면 채혈시기는 정상 대조군과 동일한 시기에 각각 채혈하여 Alpha 1-PI를 정량 검사하였다. 주 연구는 사전 연구와 동일한 진단 방법으로 하였으며 AJCCS(American Joint Comitetee for Cancer Staging)에 의한 TNM staging을 시행하였다. 채혈은 역시 정맥혈에서 시행하였다. 수술 적출된 암종이 포함된 표본은 내측 1/2은 영구 조직 검사를 위해

Table 1. Clinical Research Material

Research Group	Number of cases	Age (yrs)	Sex	
			Male	Female
Preliminary Research Group (Bronchogenic cancer)	15	58.6 (49-68)	13	2
Main Research Group (Bronchogenic cancer)	12	59.2 (40-75)	12	1
Normal Control Group (Nephrectomy Donor)	10	30.3 (22-40)	5	5
	38	51.4	30	8

병리과에 보냈으며 외측 1/2은 면역 조직 화학 검사를 위해 고정액 속에 보관하였다. 주연구의 13례중 6례는 조직의 단백질 elastase와 cathepsin G의 정량 분석을 검사기 위해 절편을 만들어 냉동 보관하여 종양 조직과 종양의 경계 부위와 종양아닌 부위에서 각각 단백질 성분총량과 elastase 및 cathepsin G치를 정량 검사하였다. (Fig 1)

3) Alpha 1-proteinase Inhibitor 측정 방법

Alpha 1-PI 검사는 방사 면역 확산법으로 시행하였으며, 사용 기기는 일본 MBL사의 1123 Alpha 1-PI 검사용 MBL Plate와 2125 표준 혈청을 이용하였다. 측정 방법은 먼저 채혈한 검체의 정맥혈을 원심 분리 후 혈청을 얻어 냉동 보관하고 한천과 소공내의 수분 및 기포 제거를 위하여 4℃에 보관된 1125 Alpha 1-PI 검사용 MBL Plate를 실온에 약 24시간 방치하였다. 그후 이 MBL Plate에 표준 혈청 3종류를 저 농도에서 고 농도 순으로 microsyringe로 소공내 4μl씩 주입하고, 검체 혈청 4μl를 혈청 소공에 주입하여, 실온에 48시간 방치한 후 표준혈청 1, 2, 3의 침강운 직경을 침강운 측정용 Scale로 0.1 mm까지 측정하여 표준 그래프를 작성하고 검체 혈청의 침강운을 scale로 측정하여 표준 그래프에서 Alpha 1-PI의 양을 구한다.

4) 면역 조직 화학적 염색

단일클론항체 (Alpha 1-antitrypsin DAKO^R를 이용하여 Avidin-biotin peroxidase complexes(ABC)법으로 면역조직 화학염색을 시행하였다. 선택된 파라핀 포매블록을 4~5 μm 두께로 박절하고, 60℃이하의 온도에서 건조시킨 후 xylene에서 탈 파라핀 과정을 거친 다음 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서대로 1분씩 방치하여 흡수 시켰고, 흐르는 수돗물에 수세하였다. 이들은 메탄올-과산화수소 용

Clinical Research Protocol

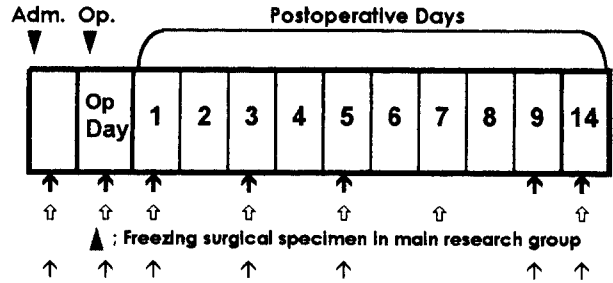


Fig 1. Ascheme representing the whole time course of research. Arrow indicates the time of blood sampling.

▲; Preliminary research group, ↑; Main research group, ↑; Normal control group.

액 (100% methanol 200 ml + 30% H₂O₂ 5 ml)에 2분간 처리하여 세포내의 내인성 과산화 효소의 활성화를 저지시킨 후 인산완충 용액 (phosphate buffer solution)으로 3회 수세하였다. 비 특이적인 배경 염색을 방지하기 위하여 정상 산양혈청을 가한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 일차 항체를 도포하여 40분간 방치한 후 인산완충 용액으로 3회 수세하였다. 이차 항체를 20분간 처리한 후 인산완충 용액으로 3회 수세하였다. Peroxidase labelled streptavidin을 20분 도포하여 표시한 후 인산완충 용액으로 3회 수세하였다. 기질인 H₂O₂-aminoethyl carbazole 용액을 도포 후 20분 동안 처리한 후 인산 완충용액과 흐르는 수돗물로 수세하였다. Geltol 봉입제로 덮게 유리를 유리 슬라이드에 부착시켰다.

5) 조직내 단백질 정량법

적출 냉동된 상태의 6개의 표본 조직에서 앞서 언급한 바와 같이 각기 3부분 즉 종양조직, 종양 경계조직, 종양아닌 부위를 각각 0.3 gm씩 절단하였다. 이를 pH 7.3으로 조절된 Tris-Cl buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 200 mM CaCl₂)내에서 세포 분쇄기 (Polytron:kinematica CH-6010, Kriens-Luzern, Brickmann사, Switzerland)를 이용하여 2분 간격으로 30초간 3번 분쇄하였다. 분쇄된 sample을 원심분리기 (Centrifuge 5415, Eppendorf사, West Germany)를 이용하여 14,000 rpm으로 5분간 원심 분리시켰다. 원심 분리된 상층액을 채취하여 Lowry procedure 로서 정량 검사하였다.

6) Elastase 효소 활성도 측정

pH 7.3으로 조절된 반응 용액인 TN액 (50 mM Tris-Cl,

150mM NaCl, 5mM CaCl₂ buffer 100 μl) 에 sample을 10 μl씩 넣고, 기질인 SANA (N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-P-Nitroanilide)를 최종 농도 0.3mM이 되도록 일정량 첨가한 후, 37℃에서 150분간 반응 시킨 다음 Titertek Multiskan Spectrophotometer(MCC/340, Flow laboratories사)를 이용하여 유리된 nitroanilide의 양을 405nm에서 흡광도를 읽어서 효소 활성도를 측정하였다.

7) Cathepsin G 효소 활성도 측정

원심 분리된 상층액을 pH 7.3으로 조절된 반응 용액인 TN액에 시액을 10 μl 넣고 기질인 SANA를 일정량 37℃에서 150분간 반응 시킨 다음 Titertek Multiskan Spectrophotometer (MCC/340, Flow Laboratories사, Finland)를 이용하여, 유리된 nitroanilide의 양을 405nm에서 흡광도를 읽어서 효소 활성도를 측정하였다.

8) 통계처리법

검사에서 얻어진 성적들은 통계학적으로 SAS Program 을 이용하여 paired T와 ANOVA 검정을 실시하였다.

결 과

1. 수술 전 Alpha 1-PI의 측정치

예비 조사군, 주 연구군과 정상대조군의 수술 전 입원시 채혈한 정맥혈에서 Alpha 1-PI치를 검사하였다. 정상대조군 236.2≥19.55mg/dl 이었으며, 예비조사군은 329.2≥14.21mg/dl 이었으나 주 연구군에서는 가장 높게 나왔으며 406.2≥118.62mg/dl 이었다. 정상 대조군에 비해 주 연구군과 예비 연구군에서 통계학적인 유의성이 있었다. (Table 2, Fig. 2, p<0.005)

2. 수술전후 임상 경과 중 Alpha 1-PI치의 변화

예비군은 수술 전 검사한 혈청 Alpha 1-PI치는 329.6≥14.21mg/dl이었고, 수술 즉시는 수술전보다 약간 증가한 364.5≥28.5mg/dl이며, 수술 후 제 1일과 3일에는 417.8≥29.87mg/dl와 487.4≥27.53mg/dl로서 수술 제 3일째에 최고치에 도달하고 수술 제 5, 7, 14일에는 점차 하강하는 추세를 보였으며 그 측정치는 각각 443.1≥25.76mg/dl, 420.0≥26.45mg/dl, 375≥26.2mg/dl이었다. 주 연구군은 앞서 언급한 바와 같이 수술 전 Alpha 1-PI치는 406.2≥32.9mg/dl이었고, 수술 당일은 355.5≥28.82mg/dl로서 예비군과는 반대의 현상이며 정상 대조군과 유사하게 술전보다 현저하게 감소하였으며 (p<0.01), 수술 제 1일과 3일에는 상승

Table 2. Serum levels of Alpha1-Proteinase Inhibitor in Preliminary and Main Research of Lung Cancer Patients

Group	Number of cases	Alpha1-Proteinase Inhibitor (Mean ± SE, mg/dl)
Preliminary Research		
Brochogenic Cancer	15	329.2 ± 14.21*
Squamous cell Ca.	9	311.9 ± 9.72
Small cell Ca.	1	350
Adenocarcinoma	4	323.5 ± 49.50
Adenosquamous cell Ca.	1	290
Main Research		
Brochogenic Cancer	13	406.2 ± 118.62*
Squamous cell Ca.	8	400.0 ± 118.3
Small cell Ca.	2	440.0 ± 40
Adenocarcinoma	1	600
Large cell Ca.	1	350
Adenosquamous cell Ca.	1	250
Normal Control		
Nephrectomy Donor	10	236.2 ± 19.55*

*; p<0.005 Main and Preliminary Research vs. Normal control group

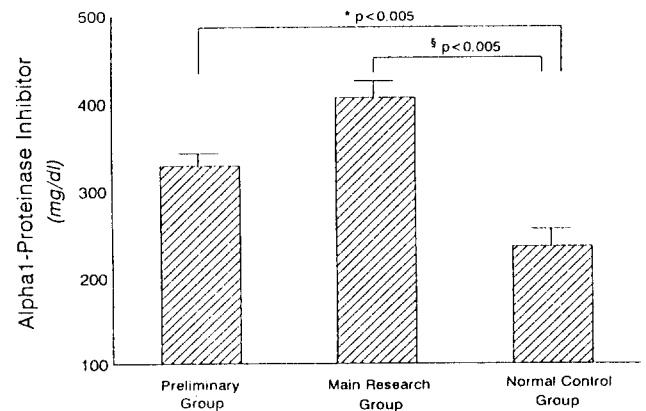


Fig 2. Serum levels of Alpha1-Proteinase Inhibitor in Preliminary and Main Research Group of Lung Cancer Patients. *; p<0.005 Preliminary Research vs. Normal control group. §; p<0.005, Main vs. Normal control group.

하여 404.3≥23.17mg/dl와 515.4≥17.66mg/dl로서 제 3일째는 최고치에 도달하였다. 술전에 비해 제 3일치는 통계학적인 유의성이 있었다(p<0.01). 수술 후 제 5일과 7일에는 plateau를 형성하여 각각 504≥20.5mg/dl와 501.5≥20.98mg/dl이었고, 다시 제 14일에는 약간 하강하여 459.1≥25.35mg/dl로 측정되었다. 정상 대조군의 수술 전후

Table 3. Serum levels of Alpha1-Proteinase Inhibitor in Pre and Post operative courses of each group(mean ± SE, mg/dl)

	Pre-op.	Imm. post-op	Post operative day				
			# 1	# 3	# 5	# 7	# 14
Preliminary Research	329.6	364.5	417.8	487.4	443.1	420.0	375.0
Bronchogenic Ca.	± 14.21	± 28.50	± 29.87	± 27.53	± 25.76	± 26.45	± 26.20
Main Research*	406.2	355.5	404.3	515.4	504.0	501.5	459.1
Bronchogenic Ca.	± 32.9	± 28.82	± 23.17	± 17.66	± 20.5	± 20.98	± 25.35
Normal Control*	236.2	217.8	263.4	353.6	361.1	306.9	245.5
Nephrectomy Dornor	± 19.55	± 13.94	± 23.79	± 20.79	± 11.45	± 12.31	± 14.23

*; p<0.005 Main Research vs. Normal Control group

Table 4. Serum levels of Alpha1-Proteinase Inhibitor in Main Research Lung Cancer group(mean ± SE, mg/dl)

AJCCS TNM Stage	Number of Cases	Alpha1-Proteinase Inhibitor						
		Pre-op	Imm. Post-op	Post-operative days				
				# 1	# 3	# 5	# 7	# 14
I*	6	345 ± 48.3	305 ± 35.03	354 ± 38.17	493.3 ± 29.6	386.7 ± 33.4	500 ± 39.8	404 † ± 16.5
II	2	430	391	410	460	450	415	600
III (a+b)*	5	479 ± 39.4	414 ± 41.6	458.4 ± 16.1	548 ± 21.6	530 ± 22.4	528 ± 25.2	507.5 † ± 42.4
Normal* Control	10	236.2 ± 19.55	217.8 ± 13.94	263.4 ± 23.79	535.6 ± 20.79	361.1 ± 11.45	306.9 ± 12.31	245.5 ± 14.23
Total		406.2 ± 32.9	355.5 ± 28.82	404.3 ± 23.17	515.5 ± 17.66	504 ± 20.5	501.5 ± 20.98	459.1 ± 25.35

*; p<0.05, Stage I and II vs. normal control group. † ; p<0.1, Stage I vs. Stage III (a+b)

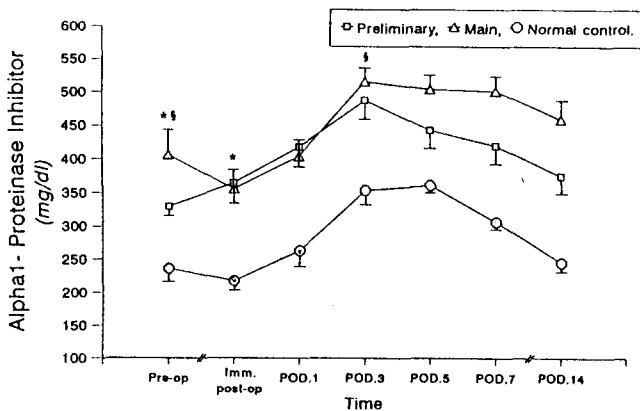


Fig 3. Serum levels of Alpha1-Proteinase Inhibitor in Pre and Post-operative course of each group(mean ± SE). *; p<0.1, Pre-op. vs. immediate post-op. Alpha1-PI level in main research group; §; p<0.1, Pre-op. vs. 3rd. post-op day's Alpha1-PI level in main research group.

Alpha 1-PI치의 변화는 수술전 236.2 ± 19.55 mg/dl이었고 수술직후 217.8 ± 13.94 mg/dl로 12.5% 감소하였으며 수술 후 제 1, 3, 5일까지 현저하게 상승하여 각각 263.4 ±

23.79 mg/dl, 353.6 ± 20.79 mg/dl, 361.1 ± 11.45 mg/dl로 제 5일에 최고치에 도달하고 제 7일과 14일에는 점차 하강하여 각각 306.9 ± 12.31 mg/dl와 245.5 ± 14.23 mg/dl로서 나타났다(Table 3, Fig. 3).

3. 폐암 환자의 Cancer staging과 Alpha 1-PI의 수술전 후 변화

주 연구군의 AJCCS분류에 의한 TNM staging과 Alpha 1-PI정량 검사를 분석하였다(Table 4). 제 1기 폐암이 13례 중 6례로 46.1%이었고, 제 2기 폐암이 2례로 15.4%이고, 제 3기 폐암이 5례로 38.5%이었다. 제 1기 폐암은 수술 전 345 ± 48.3 mg/dl이었고 수술직후 감소하여 305 ± 35.03 mg/dl이었다가 수술 제 1일과 제 3일에는 354 ± 38.17 mg/dl와 493.3 ± 29.6 mg/dl로 수술 제 7일에 500 ± 39.8 mg/dl로 최고치에 도달한 후 수술 제 14일에는 다시 감소하여 404 ± 16.5 mg/dl 이었다. 폐암 환자 제 3기는 IIIa와 IIIb를 합한 것으로 모두 수술가능한 환자였다. 수술전 470 ± 39.4 mg/dl 이었던 Alpha 1-PI치는 수술직후 감소하여 414 ± 41.6 mg/dl이었다가 수술 후 제 1일, 3일까지 증가하여 각각

Table 5. Positive rate of Immunohistochemical staining for Alphas-Proteinase Inhibitor in Lung Cancer tissue

Number of Case	Sex	Age	Diagnosis	AJCCS TNM Stage	Operation	Tumor
1	M	63	Lung Ca. Lt. C1	II(210)	Pneumonectomy	-
2	M	63	Lung Ca. LUL. C1	I(200)	Lobectomy	+
3	M	40	Lung Ca. RUL. C1	I(200)	Lobectomy	-
4	M	45	Lung Ca. Rt. C1	IIIb(420)	Pneumonectomy	+
5	M	55	Lung Ca. Rt. C2	IIIb(430)	Pneumonectomy	-
6	M	41	Lung Ca. Lt. C1	IIIa(310)	Pneumonectomy	-
7	M	64	Lung Ca. Rt. C2	IIIb(430)	Pneumonectomy	-
8	M	57	Lung Ca. LLL. C5	I(200)	Lobectomy	-
9	M	70	Lung Ca. Rt. C4	IIIa(310)	Pneumonectomy	-
10	M	75	Lung Ca. LLL. C1	I(200)	Lobectomy	+
11	M	69	Lung Ca. Lt. C1	II(210)	Pneumonectomy	+
12	F	63	Lung Ca. RLL. C1	I(200)	Lobectomy	+
13	M	65	Lung Ca. Rt. C3	I(200)	Wedge Resection	+
59 ± 10.69						46.2%

Lt: Left, Rt: Right, LUL: Left upper lobe, LLL: Left lower lobe, RUL: Right upper lobe, RLL: Right lower lobe, C1: squamous cell Ca., C2: small cell Ca., C3: adenocarcinoma, C4: large cell Ca., C5: adenosquamous cell Ca.

458.4 ≥ 16.1 mg/dl, 548 ≥ 21.6 mg/dl로 최고치에 도달한 후 수술 후 제 5일과 7일에 plateau 를 형성한 후 제 14일에는 507.5 ≥ 42.4 mg/dl로 감소하는 경향을 나타내었다. 정상 대 조균에 비하여 폐암 제 1기 및 제 3기의 수술전후 전 과정에서의 Alpha 1-PI치의 차이에는 유의성이 인정되었으며 (P<0.05), 제 1기와 제3기 사이에는 수술 후 제 1일, 5일 그리고 14일에는 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다. 또한 제 1기 폐암의 경우 수술전에 비해 수술 후 제 14 일에는 통계학적으로 유의한차이는 없었다(Table 4, Fig. 4).

4. 폐암 조직 표본의 면역 화학염색 검사 결과

주 연구군의 13례중에서 Alpha 1-PI의 면역 조직 화학 염색법을 실시한 결과 6례 (46.2%)에서 양성으로 나타났 으며 이중 5례는 squamous cell carcinoma였으며 1례는 선 암이었다(Table 5, Fig 5).

5. 폐암 조직의 단백질량, Elastase효소와 Cathepsin G 효 소 활성화도 측정 결과(Table 6, Fig. 6).

1) 단백질량

정상 폐조직의 단백질량은 2.9 mg/dl이었고, 폐암 조직내 에는 3.62 ≥ 0.2991 mg/dl로 정상에 비해 높게 나왔으며 폐 암의 경계부는 암조직 보다 높은 4.992 ≥ 0.5376 mg/dl 이었 으며 암조직에서 떨어진 폐조직에서는 4.867 ≥ 0.2317 mg/dl로 나타났다.

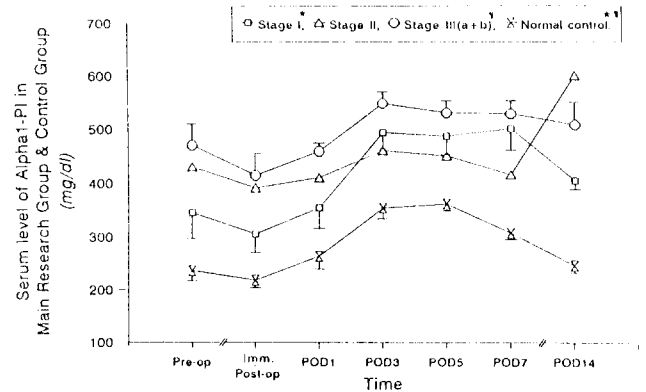


Fig 4. Serum levels of Alpha-Proteinase Inhibitor in Main Research Lung Cancer group and Normal Control group (mean ± SE, mg/ml). *: <0.05, Stage I vs. normal control group. □: p<0.1, Stage III(a + b) vs. normal control group.

2) Elastase효소 활성화도

정상 폐조직의 elastase활성도는 0.323 μM/mg/hr이었고 폐암 조직은 0.970 ≥ 0.1375 μM/mg/hr 이었으며 폐암 경계 조직에서는 1.022 ≥ 0.1453 μM/mg/hr이고 폐암에서 거리가 있는 동일한 폐장조직에서는 0.528 ≥ 0.2049 μM/mg/hr 로 나타났다.

3) Cathepsin G 효소 활성화도

정상 폐조직의 Cathepsin G 효소 활성화도는 2.107 μM/mg/hr 이었고, 폐암 조직은 1.478 ≥ 0.3927 μM/mg/hr 이었 으며, 폐암 경계 조직에서는 0.792 ≥ 0.4217 μM/mg/hr이고

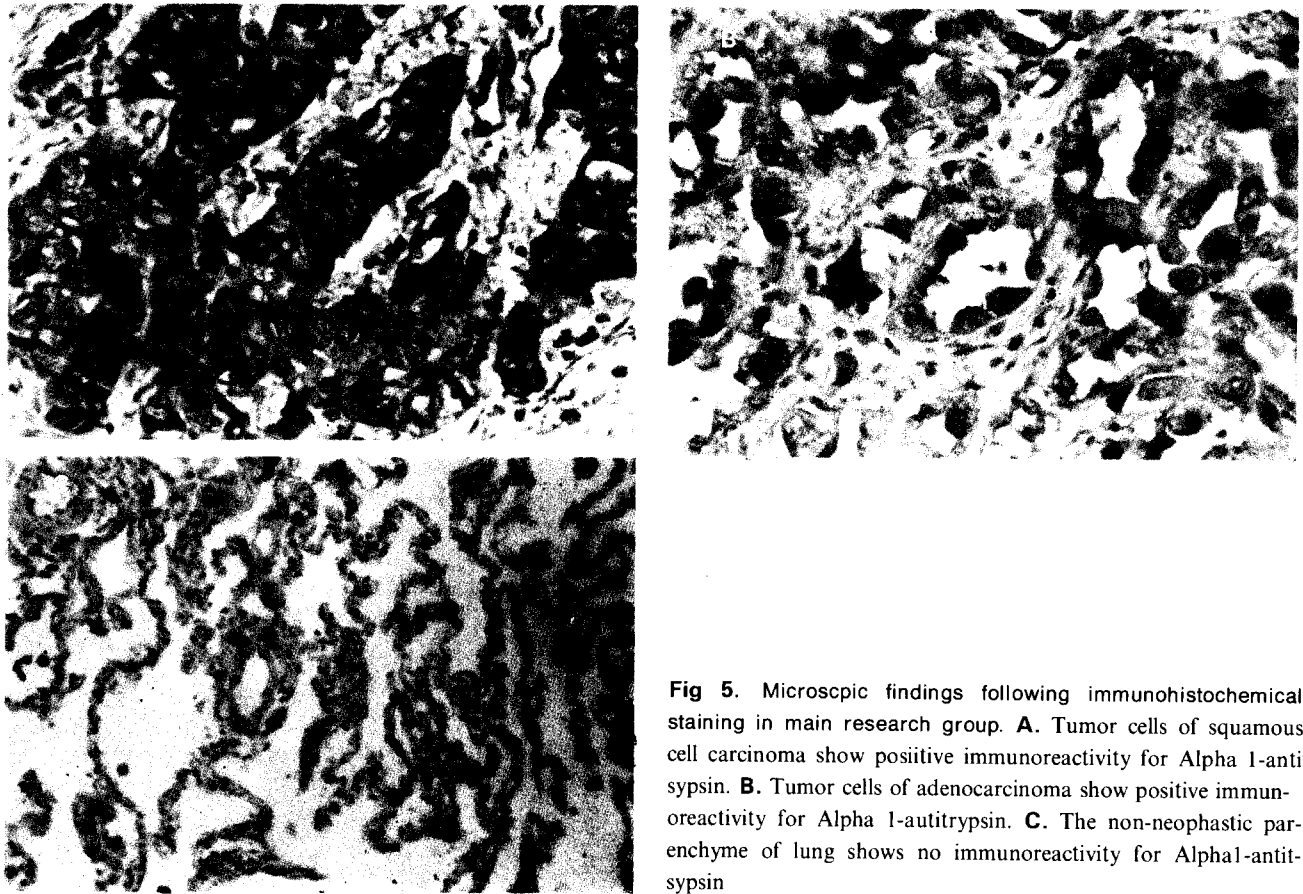


Fig 5. Microscopic findings following immunohistochemical staining in main research group. A. Tumor cells of squamous cell carcinoma show positive immunoreactivity for Alpha 1-antitrypsin. B. Tumor cells of adenocarcinoma show positive immunoreactivity for Alpha 1-antitrypsin. C. The non-neoplastic parenchyma of lung shows no immunoreactivity for Alpha 1-antitrypsin

Table 6. Quantitative analysis of Protein amount, Elastase and Cathepsin G activity in Tumor containing tissue (mean \pm SE)

	Control	No.	Tumor	Tumor border	Non-tumor
Protein (mg/dl)	2.900	6	3.620* \pm 0.2991	4.992 \pm 0.5379	4.867* \pm 0.2317
Elastase (μ M/mg/hr)	0.323	6	0.970 § \pm 0.1375	1.022 \pm 0.1453	0.528 § \pm 0.2049
Cathepsin G (μ M/mg/hr)	2.107	6	1.478 \pm 0.3927	0.792 \pm 0.4217	0.528 \pm 0.3036

*: p<01 tumor vs. non-tumor tissue in protein amount. § : p<0.005 tumor vs. non-tumor tissue in elastase activity

폐암에서 떨어진 동일한 폐장조직에서는 $0.528 \geq 0.3036 \mu$ M/mg/hr로 나타났다.

고 찰

가족성 폐기종에 이환된 환자의 혈청중에서 Alpha 1-PI 치가 현저히 낮은 것을 발견하게 된 것을 시발점으로 Alpha 1-PI와 폐기종¹⁻⁴⁾ 관계나 표현형들에⁵⁻⁷⁾ 대한 연구는 상당히 진행되어 괄목할 만한 진전을 보았다. 그러나 Alpha 1-PI와 폐암의 발생, 암세포의 정상조직으로의 이행

기전, 혹은 방어 기전에 관련된 연구는 밝혀지지 못하고 있는 실정이다.

1974년 Harris 등⁸⁾은 폐암 환자 73명을 대상으로 조직학적 분류와 Alpha 1-antitrypsin정량 검사를 시행하여 정상 대조군에 비해 유의한 증가가 있음을 보고한 것이 폐암과 Alpha 1-PI간의 논문으로는 시작인 것 같다. 그후 1981년 Sehested⁹⁾와 1987년 인도의 Mohan 등¹⁰⁾이 연이어 보고한 바 있었다.

저자들은 1988년 정종화 등¹⁰⁾의 보고에 언급된 바와 같이 개심술과 Alpha 1-PI에 대해 연구한 것이 시작이 되었

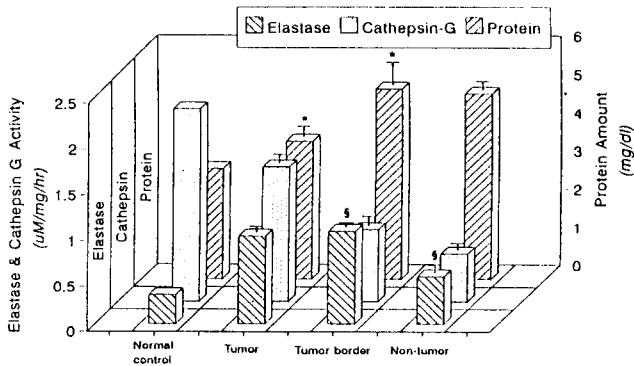


Fig 6. Quantitative analysis of Protein, Elastase and Carthep-sin G activity in tumor containing tissue(mean±SE). *:p<0.1, tumor vs. tumor border tissue in Protein amount. §:p<0.005 tumor border vs. non-tumor tissue in Elastase activity.

으며 관련 논문을 검색중 폐암과의 관계에 주목하기 시작 하였다.

Alpha 1-PI는 간에서 생성되는 당단백으로 분자량이 54,000인 α-globulin분획에 속하며 Trypsin, Collagenase 및 백혈구, 대식세포내의 Proteinase에 대해 억제작용을 가지고, 각종 염증 반응에 대한 과도한 단백 분해 효소 작용에 대하여 신체를 방어하는 Alpha 1-PI계를 형성한다는 것은 이미 보편화된 지식이다^{10, 11}. Alpha 1-PI의 정상치는 학자에 따라서^{10, 12}, 채취한 혈액 부위에 따라, 검사 방법¹³⁻¹⁵에 의하여 좌우된다. 저자는 방사 면역 확산법^{8, 13-15}에 의한 정량법을 채택하였다. 그리하여 236.2≥19.55 mg/dl로 결정하였으며¹¹ 한국인의 표현형의 종류에 의한 정상치의 작업이 포함되지 못한 것은 밝혀 두어야 하겠다. Homozygous형 결핍 환자는 전체 인구의 0.01%에 불과하며 Alpha 1-PI치는 정상인의 10~15%에 달한다고 하며 Heterozygous형 환자는 전체 인구의 4~10%에 해당되며 정상인의 55% 수준의 Alpha 1-PI치를 갖는다고 Harris 등⁸은 주장하고 있다.

수술 전후의 Alpha 1-PI변화에 대한 연구는 1988년 정종화 등¹⁰과 이재성 등¹¹에 의해 개심 수술과 폐암의 절제 수술후에 변화를 연구한 논문에서 처음으로 밝혔다. 즉 수술 직후는 감소하고 수술 후 일주일 이내에 최고치에 달하고 수술 후 7일 이후에는 감소하는 경향이 모든 수술 환자에서 동일하게 나타나고 있다는 것도 저자들이 처음으로 보고하는 사실이다. 1971년 Miesch 등¹³은 폐암 환자의 Alpha 1-PI치는 정상인에 비해 약 2배정도 증가한다고 했으며 Harris 등⁸의 보고에 의해도 1.5~2배정도 증가되어 있었다는 사실은 저자의 술 전 Alpha 1-PI의 값과 거의 일

치되는 것이다.원발성 간암에서는 Alpha 1-PI결핍과 관련을 지을 수 없다고 했다.

백혈구의 elastase가 파괴 기능의 후보로서 elastin을 공격하는 주범이고 elastic tissue가 가장 많은 폐의 matrix 단백질들을 공격하는 주체가 된다¹⁶. Alpha 1-PI는 혈장내에만 존재하는 것이 아니고 조직내는 물론이고 심지어는 epithelial lining fluid로 transude된다^{17, 18}. Elastase isoenzyme은 분자량이 29,000, 30,000, 30,500인 3가지 종류가 인정되고 Cathepsin G는 28,500과 29,000의 2종류의 isoenzyme이 있다는 것을 강 등^{19, 20}은 보고하고 있다. 폐암 조직내의 elastase와 Cathepsin G치의 농도를 조사한 것은 Alpha 1-PI의 농도와 무관하지 않는 저자들의 독창적인 개념이라고 주장하고 싶다. 비록 저자들의 연구 방법상에 약간의 문제가 있기 때문에 폐암조직에서의 Alpha 1-PI의 면역조직 염색 결과가 저조하게 나오기는 하였지만 만약 연구 계획을 보완하여 재 시도를 하면 지금의 결과보다도 훨씬 우수한 결과를 얻을 수 있을 수 있으리라고 확신하는 바이다.

혈장내에서 또는 조직내에서 작용하는 proteolytic inhibitors는 Alpha 1-PI, Alpha-1-antichemotrypsin, antithrombin III, inter-alpha-1-antitrypsin, C'esterase inactivator와 alpha 2-macroglobulin의 6가지이나, 이 중 능력의 95%를 Alpha 1-PI가 담당하고 있다²¹. 폐암 조직내에서는 Alpha 1-PI농도가 정상적이라도 Alpha 1-PI를 불활성화시키는 여러 조건들이 있을 수 있으며 예로서는 과도한 elastase²²나 CathepsinG^{19, 22}를 거론할 수 있으며, 흡연 유무, 감염과 산화제²³ 등이다.

Robin 등²⁴은 abscess와 fibrosis로의 운명이 양자 즉 proteolysis와 antiproteolysis의 균형에 따라 결정된다고 지적하고 있는 것과 같이 폐암내의 혈류 공급 부족에 의한 central necrosis와 같은 경우에도 상기의 기전들이 작용할 것이라고 주장한다. 폐암의 전파 방식은 임파관 및 동정맥을 통한 혈행에 의한 것과 국소적인 종양 세포의 증식에 의한 방법으로 대별할 수 있으며 본 논문에서는 후자를 관심의 대상으로 조사해 본 것이다. 정상적인 폐조직은 elastase나 cathepin G와 elastase inhibitor 사이에 균형을 잘 이루고 있으나 균형이 파괴될 때 폐기종이 발생한다는 사실은 보편화된 지식이다^{2, 5, 15, 25}. 폐암 세포는 정상 폐조직의 환경을 방해할 뿐만 아니라 파괴를 유발한다²⁶. 저자들은 Alpha 1-PI가 암조직의 괴사시에도 혈장에서부터 괴사부위로 파급될 것이고 또는 정상조직이 파괴시에도 출현하는 것이라고 생각하고 있으며, hyaluronidase와 같이 암세포의 전파에도 역할을 할 수 있다는데 착안한 것이다. Thom-

psion 등²⁷⁾은 Ovarian cancer에서 furosylated alpha 1-AT이 발견되고 증가된 사실을 증명한 것은 저자의 생각과도 일치된다고 볼 수 있다. 악성 종양인 경우는 세포 성질에 따른 방어 기전으로 혈중 Alpha 1-PI치가 증가한다고 했으며 Eckert 등²⁸⁾에 의하면 흉곽내에 있는 종양을 Alpha 1-AT을 입증하기 위한 면역 조직 화학적 검사를 한 결과 약 60%의 종양 조직에서 Alpha 1-AT의 침착을 발견하였고 bronchial carcinoma에서 75%의 가장 높은 양성을 보였으며 carcinoid tumor나 신경 종양에서는 음성 소견이 나타났다고 보고하였다. 1984년 김송명 등²⁹⁾이 폐암 환자 203명의 암 태아성 항원을 암의 기별에 따라 분석한 결과 제 3기에서 높은 율을 보인 사실을 주목할 필요가 있으며 이번의 저자의 성적에 의하면 폐암⁷⁾ 1기 보다도 3기에서 Alpha 1-PI가 높았으며 이는 폐암 세포가 진행함에 따라 국소 부위의 Alpha 1-PI 소모가 많아지고 결과적으로 간장에서 많은 양을 생산해 놓았다고 해석되는 것이다. 그리고 폐암의 3기에 이르면 임상적으로나 신체 내부의 조직적 혹은 생화학적 변화가 뚜렷하게 나타나는 병기와 관련이 있다고 생각한다.

본 실험적 연구에서 저자들은 폐암 환자에서 Alpha 1-PI치의 동향을 살핀 결과 수술전부터 의미 있는 상승을 인정하였다. 비록 이는 악성 종양에 있어서 Alpha 1-PI치가 증가한다는 종래의 견해를 확인한 것이나, 수술후의 변화 추세를 관찰한 것은 귀중한 자료라고 할 수 있다. 종양조직 보다도 종양의 경계 부위에서 elastase치가 높다는 것과 Cathepsin G치는 오히려 종양에서 경계부로 정상 폐조직으로의 이행에서 점차 감소하는 반대 현상이 저자들의 연구에서 나타난 사실이다. 이것은 동일한 중성 PI계이지만 elastase 와 Cathepsin G 사이에 모종의 역할을 하거나 경한 정도의 염증성 변화가 있음도 시사하는 것 같다.

결 론

1. 폐암 환자의 예비 연구군이나 주 연구군에서 수술 전 수술 후 Alpha 1-PI치는 정상 대조군에 비해 유의하게 증가되어 있었으며, 수술직후는 수술전에 지하여 약간 감소하였다가 다시 수술 후 제 1일과 3일, 5일을 경과하면서 증가하여 최고치에 도달하고 다시 plateau를 형성하였다가 수술 제 7일과 14일에는 감소하는 추세를 보였다.
2. 주 연구군의 폐암 환자의 AJCCS에 의한 TNM 분류법으로 구분한 폐암 제 I기, III기와 정상 대조군 사이에는 예비 연구군이나 주 연구군 전체의 Alpha 1-PI치의 변화와 동일한 변화를 보여주고 있다.

3. 폐암 환자의 암조직 표본에서 면역 화학 염색 검사 결과는 주 연구군 13례중 6례에서 만이 46.2%가 양성으로 나타났다.

4. 폐암 조직내의 단백량은 폐암 경계 부위가 가장 높았으며 Elastase활성도는 역시 폐암 경계 부위가 가장 높았으며 이 값은 폐장 조직에 비해 유의하게 ($P < 0.005$) 높게 나왔다. Cathepsin G치는 폐암 조직에서 가장 높게 나왔고 폐암 경계부와 폐장 조직으로 이행하면서 점차 감소되어 가는 추세를 보였다.

Alpha 1-PI와 elastase가 본 실험을 통하여 폐암의 성장과 확산에 국소적인 작용이 있는 것으로 결론을 지었다.

References

1. Mohan SR, Somaysjulu GL, Agarwal JP. *Alpha 1-antitrypsin in lung diseases*. Indian J Pathol Microbiol 1987;30:75-80
2. Guenter CA, Welch MH, Hammarsten JF. *Alpha 1 antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema*. Annu Rev Med 1971;22:283-92
3. Kueppers F, Bearn AG. *A possible experimental approach to the association of reditary 1-antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema*. Proc Soc Exp Biol Med 1966;120:7-9
4. Ganrot PO, Laurell CB, Eriksson S. *Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in 1-antitrypsin deficiency*. Scand J Clin Lab Invest.1967;19:205-8
5. Lieberman J. *Alpha 1-antitrypsin deficiency. Symposium on chronic respiratory disease*. Med clin North Am 1973;57(3):691-706
6. Klasen EC, Bos A, Simmelink HD. *PI (1-antitrypsin) subtypes: Frequency of PI M4 in seberal papulations*. Hum Genet 1982;62:139-41
7. Fagerhol MK, Laurell C. *The PI system-inherited variants of serum alpha 1-antitrypsin*. Prog Med Genet 1970;7:96-111
8. Harris CC, Primack A, Cohen MH. *Elevated alpha1-antitrypsin serum levels is lung cancer patients*. Cancer 1974;34:280-1
9. Sehested M, Hirsch FR, Jensen K, Hansen HH. *Histological examination for E-gene alpha 1-antitrypsin serum levels in lung cancer patients*. Carcinoma of the lung. Eur J Resp Dis 1981; 62:107-10
10. 정종화, 김송명. 개심술 전후의 Alpha 1-Proteinase Inhibitor의 추이. 대흉외지 1989;22:402-15
11. 이재성, 김송명. 폐암 환자에서 폐엽 절제술 전후의 혈청 Alpha 1-Proteinase Inhibitor의 변화. 제 10회 아시아 흉부외과 학회 초록집 1991;195
12. 전인선, 허만하. 위궤양 및 위암 환자 혈청의 Alpha 1-antitrypsin 치. 대한 병리 학회지 1982;16(2):119-123
13. Miesch F, Beith J, Metais P. *The Alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin content and the protease-inhibiting capacity of normal and pathological sera*. Clin Chim Acta 1971; 31:231-41

14. Pesce AJ, Kapla LA. *Methods in clinical chemistry*. The C.V. Mosby Co. 1987;141-5
15. Gast A, Dietemann-Molard A, Pelletier A, Pauli G, Bieth JG. *The antielastase screen of the lower respiratory tract of Alpha 1-Proteinase inhibitor-sufficient patients with emphysema or pneumothorax*. Am Rev Resp Dis 1990;141:880-3
16. Bieth JG. *Elastase catalytic and biological properties*. In: Mechanism RP, ed. *Biology of extracellular matrix. Regulation of matrix accumulation*. New York:Academic Press 1986;217-320
17. Fera T, Abboud RT, Richter A, Johal SS. *Acute effect of smoking on elastase-like esterase activity and immunologic neutrophil elastase levels in bronchoalveolar lavage fluids*. Am Rev Resp Dis 1986;133:568-73
18. Jochum M, Pelletier A, Boudier C, Pauli G, Bieth JG. *The concentration of leukocyte elastase alpha 1-proteinase complex in bronchoalveolar lavage fluids from healthy human individuals*. Am Rev Resp Dis 1985;132:913-4
19. Kang K, Ghim S, Joung H, Bal S. *Purification and characterisation of human neutrophil elastase and cathepsin G*. Korean Biochem J 1989;22(4):379-87
20. Bae S, Kim W, Kim K, Chang M, Kang K. *Human neutrophil cathepsin G: In vivo synthesis of anti-HNCG antibody, inhibition of the activity of HNCGs and mechanism of the inhibitions*. Korean J Pharmacology 1991;27(2):145-53
21. Miteman C. *Summary of symposium on pulmonary emphysema and proteolysis*. Am Rev Resp Dis 1972;105:430-48
22. Kang K. *Human neutrophil elastase: Rapid purification metal binding stoichiometry and modulation of the activity by chylating agents*. Korean J Pharm 1988;24(1):111-23
23. Carp H, Janoff A. *Potential mediators of inflammation*. J Clin Invest 1980;66:987
24. Robin WC, Jepperson J. *Structure & human AIAT*. Nature 1982;298:329
25. Fuzita J, Nelson NL, Daughton DM, et al. *Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema*. Am Rev Respir Dis 1990;142:57-62
26. Jenoff A. *Elastase and emphysema. Current assessment of the proteinase-antiprotease hypothesis*. Am Rev Respir Dis 1985; 132:417-33
27. Thompsin S, Guthrie D, Turner GA. *Fucosylated forms of alpha 1-antitrypsin that predict unresponsiveness to chemotherapy in ovarian cancer*. Br J Cancer 1988;58:589
28. Eckert H. *Immunohistochemical findings in intrathoracic tumors. Demonstration of alpha 1-antitrypsin in tumor tissue*. E Erkr Atmungsorgane 1983;161(3):319-24
29. 김송명, 이성행. 폐암 환자의 혈청 알 태아성 항원. 경북의대 잡지 1984;25(3):300-13