

대장암의 예후와 Apoptosis 활성

대구효성가톨릭대학교 자연대학 생물학과 및 계명대학교 의과대학 일반외과학교실¹

전소영 · 배옥석¹ · 김종봉[†]

국문초록: 본 연구에서는 genomic DNA 전기영동과 TUNEL labeling법을 이용하여 정상대장조직, 대장암조직, 대장암인접림프절조직과 대장암환자 혈액에서 apoptosis 발현을 분석하였다. 정상대장조직 37례중 4례에서, DNA ladder가 확인되었고, 암조직은 47례중 20례에서, 림프절조직은 15례중 5례에서 나타났으며 대장암환자혈액은 7례 모두에서 발현되지 않았다. TUNEL labeling법을 이용한 조직상의 in situ apoptosis 발현은 암조직과 림프절조직에서 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 대장암이 진행됨에 따라 apoptosis 발현비가 증가되었으므로 apoptotic index가 대장암 발현과 관련되어 있는 듯 하며 예후예측지표로서 이용될 가능성이 있다고 사료된다.

서 론

Apoptosis는 조직이 상해를 입었거나 바이러스 등에 감염되어 잠재적으로 위험한 세포가 생긴 경우 이들을 제거하여 생물체가 최적상태로 있기 위한 방어기작이며 조직이나 개체의 분화, 발생, 생리현상 (특히 면역)에도 관여한다. 따라서 apoptosis는 몸의 효율적 생존을 위한 세포의 능동적 사망기전으로 유전자의 제어에 의해 지배되는 세포사멸 (pro-programmed cell death)기구로서 인식되고 있다¹²⁾.

최근에는 방사선이나 열 등의 물리적 요인과 약물 등의 화학적 요인에 의한 암세포의 발생, 증식, 억제, 소실, 분화유도 과정에도 apoptosis가 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있어 암치료의 한 요법으로 주목받고 있다³⁾.

전립선 암이나 난소암 등에서 보고된 바로는 apoptosis 발현비가 암진행도와 비례하여 증가하므로 환자예후에 관한 정보를 줄 수 있고 환자의 생존률을 예측하는데 좋은 인자의 하나로서 인식되고 있다^{2,26)}.

대장의 경우, 표피세포는 3~4일마다 탈락되어 하부층의 세포가 그 자리를 대신하는데 이러한

정상적인 생리적 항상성을 유지하려면 세포증식 뿐 아니라 apoptosis 활성에 의한 결실이 필요하다. 이 과정에서 apoptosis가 저해되면 신생종이 발생하기도 하며 점차 양성선종으로 진행되어 이후 선암증, 암증으로 전환된다. 따라서 정상적인 대장상피세포가 암증으로 형질전환되는 것이 apoptosis에 대한 감수성 변화와 관련이 가능성을 제기하여 주었다.

그동안 apoptosis 발현과 관련하여 Watson²²⁾과 Bedi 등⁴⁾은 apoptosis저해가 대장암 진행에 중요 요인이라 보고했으며 Barenton 등³⁾도 대부분의 대장암에서 apoptosis가 저해되었다고 하였다. Langlois 등¹¹⁾은 대장암에서 환자의 생존률을 나타내는데 apoptosis가 좋은 인자라고 보고하였다.

그러나 대장암에서 보이는 이러한 결과들은 전립선암이나 난소암 등과는 차이가 있어 apoptosis의 발현비가 암의 종류와 진행정도에 따라 증가 또는 감소하는 것으로 보고되고 있으며 저자들에 따라서도 그 견해를 달리하고 있다.

따라서 본 실험은 아무런 처치를 않은 정상대장조직, 암조직, 림프절조직별로 대장암의 진행에 따른 apoptosis 발현양상을 분석하고자 하였다. 이를 바탕으로 화학요법이나 방사선치료후 apoptosis 증감을 비교하고자 하며, 또한 TUNEL법을 이용하여 조직상의 apoptosis 발현위치를 각각 비교하여 이들이 여러 임상병리적 요인과 더불어 환자의 예후를 판단하는데 주요한 지표로

* 논문접수 : 1998년 11월 2일

수정재접수 : 1998년 12월 22일

[†] 별책요청 저자

사용될 수 있는지 알아 보고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 조직

계명대학교 의과대학 외과학교실에서 대장종양절제술과 임파선 광청술을 실시한 환자로부터, 수술직후 종양조직상연에서 10 cm 이상 떨어진 대장정상점막조직, 종양인접조직, 전이조직, 종양조직을 분리한 후 액체질소통에 보관하였다. 12시간 이내에 genomic DNA를 추출하였으며 대장암 환자 7명과 정상인 5명을 대상으로 혈액을 채취하여 조직의 경우와 동일하게 genomic DNA를 추출하였다.

2. Genomic DNA 추출

Tissue 100 mg당 extraction buffer 1 ml씩 넣어 얼음에서 3~5분 분쇄 하였다. 10% SDS를 extraction buffer 1 ml당 60 µl 넣고 vortex한 후 37°C 진탕기에 1시간 두었다. 100 µg/ml Proteinase K를 extraction buffer 1 ml당 20 µl씩 넣고 vortex한 후 37°C W/B에서 하루 두었다. 실온에 둔 후 Tris-saturated phenol (pH 8.0)을 동량 넣고 20분간 가볍게 섞은 후 10,000 rpm에 15분 돌린 다음 DNA층을 분리하였다 (3회반복). 3 M sodium acetate 0.2 vol.과 ethanol 2 vol.을 첨가하여 10회 섞은 후 DNA thread를 바늘로 건져 내어 70% ethanol에 10회 세척하였다. 증류수에 녹여 OD를 측정 한 뒤 농도가 2 µg/µl되도록 맞추어 사용하였고 2% agarose gel에서 20 V로 7시간 전기영동하였다.

3. 파라핀포매와 탈파라핀

각 환자의 정상대장조직, 대장암조직, 선천성 가족성용종증조직, 림프절조직을 4 mm 두께로 잘라 10% formalin 용액에 24시간 이상 고정시킨 다음 labelling 종이가 든 수세망에 넣어 수도물로 하루 이상 수세 하였다.

자동표본제작기 (autotechnicon, citadel 2000 shandon)에서 탈수과정, 청명과정, 침투과정을 시행한 후 Histoembedder (Leica)에서 포매과정을 실시하였다. Block은 Jung histocut (Leica)을 이용하여 4 µm 두께로 박절하였다.

절편은 50°C water bath (Fisher)에서 퍼서 aminopropyltriethoxysilane-coated slide에 붙여 50°C slide

warmer (Fisher)에서 하루이상 두어 고정시켰다. Paraffin을 제거하기 위해 xylene에 5분씩 3회, 100% ethanol 5분씩 2회, 90% ethanol 5분, 80% ethanol에 5분 두었다. 흐르는 물에 2분 두었다가 증류수에 행구었다.

4. TUNEL labeling⁹⁾

Proteinase K (20 µg/ml)를 넣어 37°C, 30분간 slide를 처리한 뒤 3% H₂O₂를 실온에서 5분 처리하고, PBS로 2회 씻었다. Permeation을 4°C에서 2분 처리하고 PBS로 2회 세척하였다. Labeling reaction mixture (TdT enzyme 5 µl + labeling safe buffer 45 µl)에 담구어 slide를 37°C humidified chamber에 2시간 둔 후 PBS로 3회 행구었다. Anti-FITC HRP conjugate 70 µl를 37°C 30분 처리하였고 PBS로 3회 씻은 후 DAB coloring 용액 (Diaminobenzidine tetrachloride 6 mg, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 9 ml, 0.3% NiCl₂ 1 ml, 3% H₂O₂ 100 µl)에 실온에서 10~15분간 처리한 후 증류수로 씻었다. Slide를 하루 건조시킨 뒤 mount하여 사진 찍었다. 결과를 대조하기 위해 positive control은 labeling reaction mixture 앞 단계에서 1 µg/ml DNase를 3시간 처리하였고, negative control은 Anti-FITC HRP conjugate를 넣지 않았다. HE stain은 Harris의 일반염색법을 사용하였다⁹⁾. TUNEL labeling은 DaKaRa in situ apoptosis detection kit (MK500)를 사용하였다.

결 과

1. 대장암조직 및 혈액에서의 DNA ladder

정상대장조직에서 37례중 4례 (10.81%), 가족성 선 폴립증, 대장암조직에서 47례중 20례 (42.55%), 전이림프절조직에서 15례중 5례 (33.33%)로 DNA ladder를 확인할 수 있었다 (Figure 1, 2, 3, 4).

혈액은 정상인 5례와 대장암환자 7례 모두에서 DNA ladder가 확인되지 않았다.

2. TUNEL labeling법에 의한 조직의 apoptosis 발현

TUNEL염색을 한 결과 점막하층에서는 발색반응이 나타나지 않았으며, DNase를 처리한 경우 단층림프주상피의 DNA가 단편화되어 TUNEL 염색된 것이 관찰되었다.

Anti-FITC HRP conjugate를 첨가하지 않은 negative control에서는 발색반응이 나타나지 않았다.

고분화대장암에서, DNA ladder가 나타나지 않은 조직의 경우 TUNEL염색시 발색반응이 거의

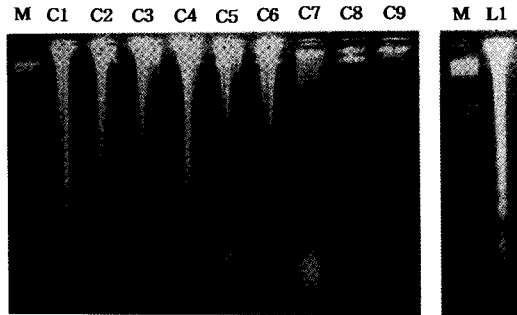


Figure 1. Gel electrophoretic analysis of epithelial cells from colorectal cancer and lymph node tissues for detection of oligonucleosomal DNA fragmentation. Molecular size marker: λ /Hind III fragments, C: colorectal cancer tissue, L: lymph node. DNA ladders by apoptosis were indicated by arrows.

나타나지 않았으며 DNA ladder가 나타난 조직은 발색이 부분적으로 확인되었다 (Figure 2B). DNase를 처리한 경우 암세포가 많이 모인 곳에서 고른 발현이 보였고 (Figure 2C, Figure 3C), negative control에서는 발현되지 않았다. 가족성선종폴립증의 경우, 정상조직과 폴립이 동시에 존재하도록 마련된 조직에서 정상조직이 폴립의 경우보다 apoptosis 발현이 높게 나타났다 (Figure 3B).

정상대장암인점립프절조직들중 DNA ladder가 나타난 한 조직에서 TUNEL염색시 발색반응이 부분적으로 일어남이 관찰되었고 (Figure 3B), DNase를 처리한 경우는 조직전체에 고른 발현이 나타났으며 (Figure 3C), negative control에서는 발현이 보이지 않았다 (Figure 4D).

고 찰

인체의 조직은 세포증식과 세포의 자연사과정

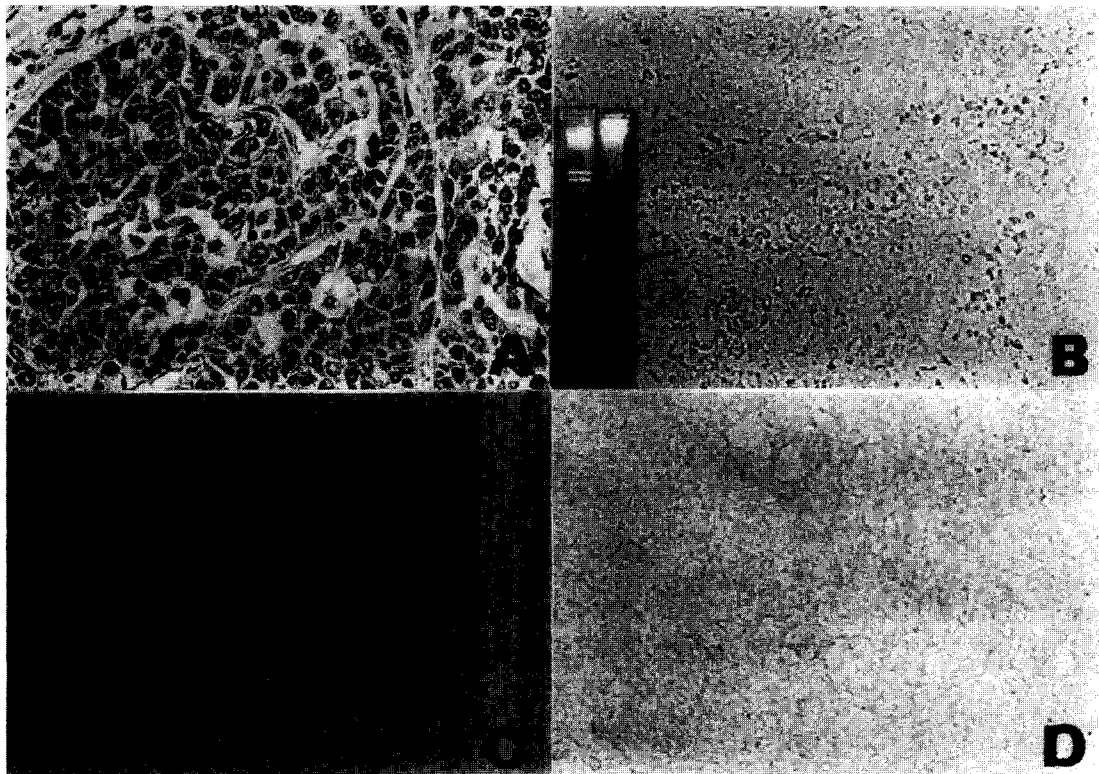


Figure 2. In Situ labeling of apoptosis DNA fragmentation in TUNEL-staining histopathological sections and electrophoretic analysis of Colorectal cancer tissue (A). H & E stain (B). TUNEL stain (C). DNase treated TUNEL stain DNA ladder was indicated by arrow (D). negative control ($\times 100$).

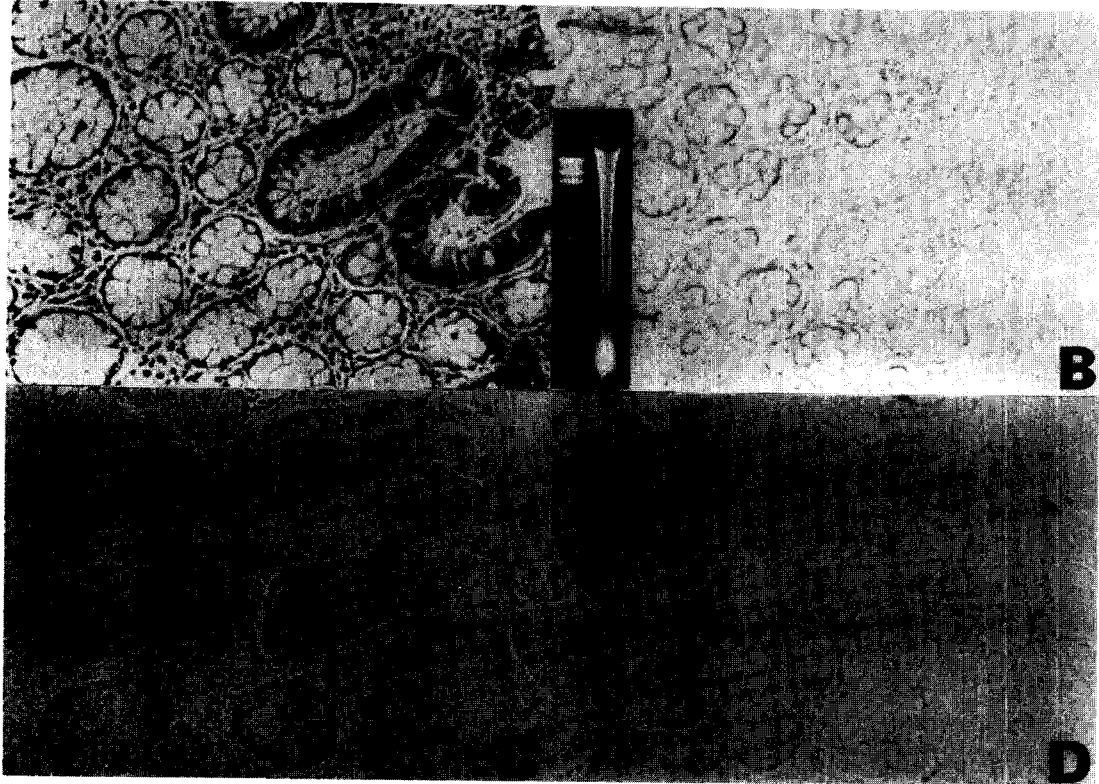


Figure 3. In Situ labeling of apoptosis DNA fragmentation in TUNEL-staining histopathological sections and electrophoretic analysis of Familial adenomatous polyposis (A). H & E stain (B). TUNEL stain (C). DNase treated TUNEL stain DNA ladder was indicated by arrow (D). negative control ($\times 200$).

에 의하여 성장, 분화, 사멸 등이 이루어진다.

악성종양에서는 세포증식이 비정상적으로 증가되는 반면 세포사멸조절은 혼란되어 있으므로 종양이 성장하게 된다³⁾.

Apoptosis는 세포주기에서 G1기에서 S기로의 이행시 발생하며 bcl-2, p53, c-myc, c-fos, hsp-70, bax 유전자 등의 영향을 받으며, 유사한 종양이라도 유전자의 종류에 따라 apoptosis비가 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다^{3,8,11,18,24,26)}.

정상대장조직에서는 조직의 항상성을 유지하기 위해 상피세포를 탈락시키며 내강에 면한 음와세포끝에 있는 핵에서 apoptosis가 일어남이 관찰되고 있다³⁾.

Apoptosis에 의한 세포의 사멸은 대장암의 증식에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며^{3,11,14)}, 대장암환자의 생존에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌고, 대장암환자의 연령에 따라 발현비가 다르게 나타난다고 한다¹¹⁾.

본 연구에서의 경우 정상대장조직보다 대장암 조직에서 DNA ladder 비율이 높게 나타났는데 이는 종양에서 apoptosis가 증가한다는 보고⁸⁾와 어떠한 치료도 하지 않은 악성종양에서 자주 보인다는 보고^{8,25)}와 일치하며, 환자예후와 관련하여서 방광암¹²⁾, 폐암, 전립선암²⁾, 자궁내막선암, 난소암²⁶⁾에서 예후가 나빠질수록 apoptosis가 증가되었다는 보고들과도 유사한 결과이다. 그러나 Langlois 등의 보고¹¹⁾는 대장암에서 AI (apoptotic index로 암세포 1000개당 apoptosis가 일어난 세포수)²⁶⁾가 높을수록 예후가 좋았다고 하며 Bedi⁴⁾와 Watson 등²²⁾은 대장암으로의 형질전환이 점진적인 apoptosis저해와 관련이 있다고 하며 apoptosis 증가로 암성장이 지연되었다고 주장하였다. 전립선에서는 비종양성전립선조직과 종양성전립선조직의 apoptosis 비교시 종양성조직에서 높게 나타나고 전립선암이 진행될수록 발현이 증가되었다는 보고하고 있다¹¹⁾.

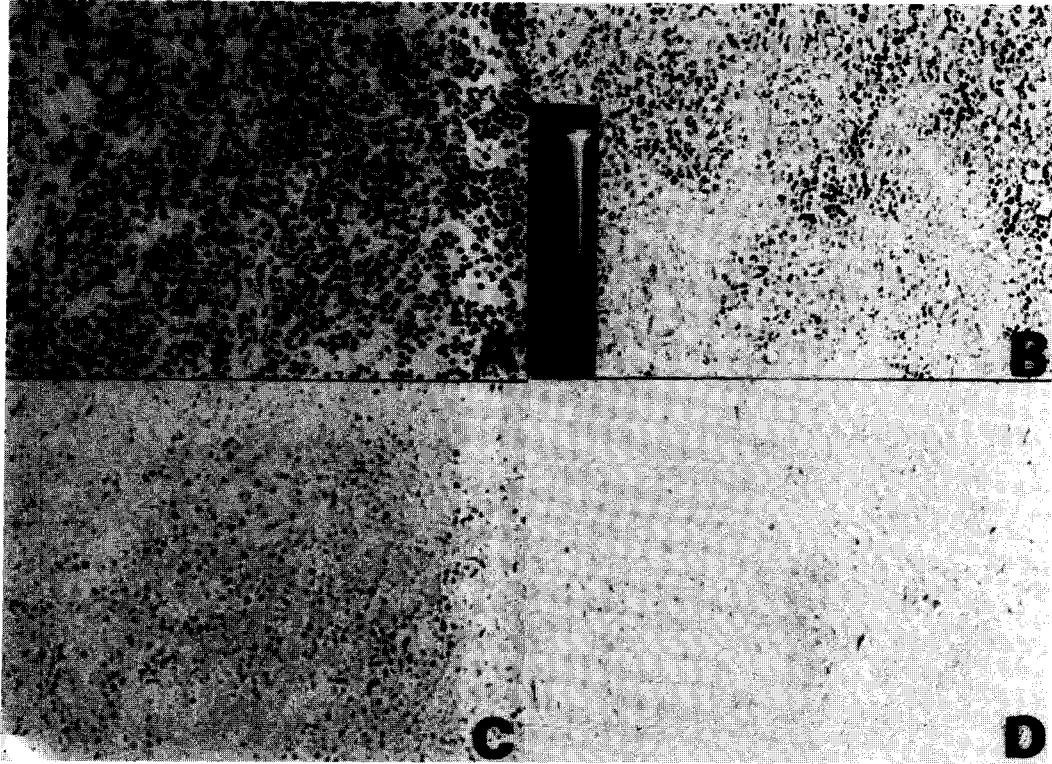


Figure 4. In Situ labeling of apoptosis DNA fragmentation in TUNEL-staining histopathological sections and electrophoretic analysis of lymph node tissue (A). H & E stain (B). TUNEL stain (C). DNase treated TUNEL stain (D). negative control ($\times 40$).

Kim 등⁹⁾은 apoptosis와 림프절전이 상관계가 없다고 하였으나 본 연구의 경우 정상대장조직보다 림프절에서 apoptosis 비율이 높게 나타났으며 이는 종양주의 림프절의 전이억제를 위한 세포방어기전으로 추측할 수 있다.

혈액의 경우 매일 약 5×10^{11} 개 세포가 apoptosis로 죽는다고는 하나 본 실험에서 혈액을 이용한 apoptosis 검출은 12례 모두에서 보이지 않았으므로 혈액세포에 대한 종양 영향력이 적은 것으로 추정된다.

이처럼 암중에서 apoptosis가 증가하는 현상은 apoptosis에 의한 암진행억제 또는 암세포제거효과^{8,26)}와 모순되는 것처럼 보이는데 이에 대한 해석은 여러 가지가 있다. 유사분열과 apoptosis의 count에 관련된 해석상의 차이라는 주장²⁶⁾이 있으나 약물에 대한 저항적 수단(암치료 약물에 의해 일정수의 암세포만 죽고 그 뒤 저항에 의해 일정수 이상은 죽지 않은 것처럼)으로 apoptosis가 암중에서 일정수준까지만 일어나고 더 이상 일어

나지 않아 apoptosis기작에 의한 전체 세포사멸의 경로를 종양세포가 회피하거나 증식되는 암세포에 비례하여 이를 저지하려는 자연적인 사멸기작 역시 증가되므로 암이 진행될수록 apoptosis도 발현이 증가될 가능성도 있다.

DNA를 추출하여 전기영동하는 방법은 조직에서 apoptosis 발현유무를 관찰하기에 편리하나 조직상에서 발현위치를 검색하는데는 부적합하다. 이를 보완하기 위해서는 dig-11-dUTP를 이용한 TUNEL법이 DNA 단편화 검출에 유용한데 Watanabe 등²¹⁾은 TUNEL법을 이용한 실험에서 대장암 인접조직에서 apoptosis가 일어남을 보고하였으며 Yamasaki 등²⁶⁾은 난소암에서 apoptosis가 일어나는 세포를 암세포와 구분하였음을 보고하였다.

본 실험에 사용된 정상대장조직은 음와세포의 선단이 아니어서 apoptosis현상이 관찰되지 않았으므로 apoptosis 발현을 나타낼 때는 사용된 조직의 부위를 명시하는 것이 필요할 것으로 여겨진다. 대장암조직상의 apoptosis 발현은 조직내 세포

의 위치나 주기에 따라 그 발현정도에 차이가 있는 듯 하며, 대장암의 초기증세인 가족성선종폴립증의 예에서 정상조직이 암화되기 시작하는 단계에는 apoptosis 발현비가 정상조직에 비해 다소 저하되는 듯 하다.

대장암인접림프절에서는 apoptosis가 발현되었는데 DNase를 처리한 경우 균일하게 발색되었다. Figure 4B 그림은 세포에 따라 감수성이 다른 것으로 나타났다.

본 실험결과로 볼 때 apoptosis가 종양이 진행됨에 따라 세포사멸도 증가하는 경향이며 종양성장억제에 영향을 주는 것으로 사료된다.

본 연구에서 apoptotic body를 가진 세포를 확인하지 못했으나 앞으로 gel document system을 이용하여 발색정도를 수치화할 필요는 있다고 사료되며 Duke stage와의 관련여부와, 화학요법이나 방사선치료를 받은 후 종양이 있었던 자리와 간조직에서 apoptosis 비율이 증가하고 난소암세포주에서 화학요법약물들이 apoptosis를 유도한다는 보고 등²⁶⁾이 있으므로 차후 치료전후에 apoptosis 비율을 측정하여 환자예후와의 관련성을 연구하는 것이 필요하리라 생각된다.

따라서 본 실험에서는 apoptosis가 정상대장조직보다 대장암조직과 대장암인접 림프절에서 증가되었는데 이는 apoptosis가 암진행과 비례하여 활성화되어 암성장을 저지시키는 것을 의미하는 것으로 차후 apoptosis가 암의 진단예후인자로서 이용될 가능성이 있다고 본다.

참 고 문 헌

- 1) Aihara M, Truong Ld, Dunn JK (1994): Frequency of apoptotic bodies positively correlates with gleason grade in prostate cancer. *Hum Pathol*, **25**: 797-801.
- 2) Arihara M, Scardino PT, Truong LD (1995): The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer*, **75**: 522-9.
- 3) Barretton GB, Diebold J, Christoforis G (1996): Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer*, **77**: 255-64.
- 4) Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ (1995): Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res*, **55**: 1811-6.
- 5) Duvall E and Wyllie AH (1986): Death and the cell. *Immunol Today*, **7**: 115-119.
- 6) Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**: 493-501.
- 7) Karin F, Victoria KB and Hubert K (1991): Analysis of TNF α -induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol*, **139**: 251-4.
- 8) Kerr JFR, Winterford CM and Harmon BV (1994): Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**: 2013-36.
- 9) Kim DW, Jin SY and Lee DW (1997): A study of apoptosis and bcl-2 and p53 expressions in breast cancer. *J Korean Cancer Assoc*, **29**: 412-421.
- 10) Kishimoto M, Ueda K, Nakata M (1990): Detection of the DNA strand breaks by in situ nick translation using non-radioactive nucleotide. *J Histochem Cytochem*, **38**: 1052.
- 11) Langlois NEI, Justin L, Eremino O (1997): Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-s protein products. *J Pathol*, **182**: 392-397.
- 12) Lipponen PK and Aaltomaa S (1994): Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol*, **173**: 333-339.
- 13) Long AA, KomminothP, Wolfe HJ (1992): Detection of HIV provirus by in situ polymerase chain reaction. *N Engl J Med*, **327**: 1529.
- 14) Martin CR (1992): Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, **356**: 397-400.
- 15) Mulder JR, Krut PM, Sewnath M (1994): Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins *Lancet*, **344**: 1470-2.
- 16) Peter M Howley, Mark A Israel (1995): The molecular basis of cancer. *WB Saunders Company John Mendelsohn*.
- 17) Shu SI, Baek WK, Park JW (1995): Identification of CD44 splice variant in korean colorectal

- cancers and cell lines. *Journal of Korean Medical Science*, **10**(3): 169-175.
- 18) Stewart BW (1994): Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, **86**: 1286-96.
 - 19) TaKeuch K, Yamaguchi A, Vrano T (1995): Expression of CD44 Variant exon 8-10 in colorectal cancer and its relationship to metastasis. *Jpn J Cancer Res*, **86**: 292-297.
 - 20) Tanabo KK, Ellis Lm and Saya H (1993): Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet*, **341**: 725-726.
 - 21) Watanabe I, Isozaki H, Toyoda M (1997): Correlations between cell proliferating activity and apoptosis in the colorectal cancer and apoptosis in the mucosa adjacent to colorectal cancer. *Gan-to-kagaku-ryoho*, **24**: 301-6.
 - 22) Watson AJ (1995): Review article: manipulation of cell death-the development of novel strategies for the treatment of gastrointestinal disease. *Aliment-Pharmacol-Ther*, **9**: 215-26.
 - 23) William GT, Louis EK and Pamela JF (1992): Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, **13**: 137-43.
 - 24) Wyllie AH (1992): Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal neoplastic tissues: an overview. *Cancer Met Rev*, **11**: 95-103.
 - 25) Wyllie AH (1993): Apoptosis. *BR J Cancer*, **67**: 205-208.
 - 26) Yamasaki F, Tokunaga O and Sugimori H (1997): apoptotic index in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathologic factors and prognosis. *Gynecol-oncol*, **66**: 439-48.

=Abstract=

Prognosis of Colorectal Cancer and Apoptosis Activation

So-Young Chun, Ok-Suk Bae¹ and Jong-Bong Kim[†]

*Department of Biology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan 712-702,
Korea, Department of Surgery, Keimyung University¹*

We studied on the expression of apoptosis in colorectal cancer, lymph node, their corresponding normal mucosa and colorectal cancer patient's blood by genomic DNA electrophoresis and TUNEL labeling method. From 7 cases among 37, 20 cases among 47 and 5 cases among 15, DNA ladders were expressed in normal tissues, colorectal tissues and lymph node tissues, respectively. A DNA ladder was not observed in 7 cases of colorectal cancer patients blood. In case of TUNEL labeling, we could observe TUNEL color expression in colorectal cancer and lymph node tissues. As these result suggest that apoptotic index may be associated with the colorectal cancer development, and mat be used as a prognostic indicator but further evaluations will be needed.

Key Words: Apoptosis, Colorectal cancer, DNA electrophoresis, *In situ* hybridization

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(2): 121-128, December, 1998]

[†]Corresponding author