

Urethane으로 유발된 생쥐 폐섬암종 발생과정에서 Caspase 3, Survivin과 p53 단백질 발현

¹중앙대학교 의과대학 내과학교실, ²병리학교실
신종욱¹, 이수환², 박연섭²

Expression of Caspase 3, Survivin, and p53 Protein in Urethane Induced Mouse Lung Carcinogenesis

Jong Wook Shin, M.D.¹, Soo Hwan Lee, M.D.², Eon Sub Park, M.D.²

¹Division of Allergy, Respiratory and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, ²Department of Pathology, Chung Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: An imbalance of cell proliferation and cell apoptosis is an important mechanism in carcinogenesis. Caspase 3, survivin and p53 have been identified as important members of the apoptotic related proteins. This study evaluated the proliferating cell nuclear antigen(PCNA), apoptosis, apoptotic related protein such as caspase 3, survivin and p53 using urethane-induced mouse lung carcinogenesis, which provides reproducible steps from hyperplasia to adenocarcinoma.

Methods: Urethane was administered to the ICR mice through an intra-peritoneal injection, The mice were sacrificed at 5, 15, and 25 weeks after urethane intervention. The sequential morphological changes and immunohistochemical expression of PCNA, apoptosis, caspase 3, survivin, and p53 were examined during mouse lung carcinogenesis.

Results: During carcinogenesis, the sequential histological changes were observed from hyperplasia of type II pneumocytes, to adenoma, and ultimately to an overt adenocarcinoma. The PCNA Labeling index (LI) was 9.6% in hyperplasia, 23.2% in adenoma, and 55.7% in adenocarcinoma, respectively. The apoptotic LI was 0.24% in hyperplasia, 1.25% in adenoma, and 5.27% in adenocarcinoma. A good correlation was observed between the PCNA LI and apoptotic LI. The expression of caspase 3 was remarkable- i.e., 46.7% in adenocarcinoma, in contrast to 15% in hyperplasia and 16% in adenoma. Survivin was detected weakly in the alveolar hyperplasia and showed an increasing expressional pattern in adenoma and adenocarcinoma. p53 expression was detected only in the adenocarcinoma lesions with an expression rate of 13.3%. The level of caspase 3 expression correlated with the increase in the apoptotic index. The positive expression of caspase 3 was associated with an increased apoptotic index.

Conclusions: These results suggest that the PCNA LI and apoptotic LI might be useful markers for evaluating the risk of a malignant transformation. In addition, caspase, survivin and p53 might play a role in the early and late stages of urethane-induced mouse lung carcinogenesis. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 251-260)

Key Words: Survivin, caspase-3, p53, Lung cancer, Lung carcinogenesis, PCNA, Apoptosis.

서론

폐에서 발생하는 악성 종양 중 대부분(90-95%)은 기관-기관분지에서 발생하며 그 중에서 섬암종은 상

대적으로 젊은 나이, 비흡연자, 그리고 여성에게 발생 빈도가 높다. 또한 섬암종은 병리학적으로 대부분 말초 폐실질에서 발생하기 때문에 단순 흉부 방사선검사와 객담세포검사로 조기에 진단하기가 어렵고, 종양의 생물학적 특성상 주위 폐조직으로 침윤성 증식과 혈행성 전이가 빈번해하여 예후가 불량하다¹.

실험적 폐암종 모델로는 생쥐 복강 내에 담배에 함유되어 있는 nitrosamine 계열의 4-(methyl-nitrosamino)-12-(3-pyridyl)-1-butanone이나 알킬화 발암제인 urethane(ethyl carbamate) 등을 투여하는 방법이 가장 널리 사용되고 있는데, urethane을 이용한 실험적 폐 섬암종 모델은 섬암종의 전구병변으로 간주되고 있는 비정형성 증식, 섬종의 발생에 이어 인체에서 발

Address for correspondence: **Jong Wook Shin¹, M.D. and Eon Sub Park², M.D.**

¹Division of Allergy, Respiratory and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, ²Department of Pathology, Chung-Ang University Hospital, 224-1, Huk-suk-dong, Donjak-gu, Seoul, Korea

Phone: 82-2-6299-1407, Fax: 82-2-6263-2184

E-mail: basthma@cau.ac.kr, basthma@hanmail.net,

E-mail: esp@cau.ac.kr

Received: May. 3. 2007

Accepted: Sep. 14. 2007

생되는 샘암종과 형태학적으로 유사한 병변이 초래되어 이상적 모델로 이용되고 있다^{2,3}. Urethane에 의한 발암 기전은 대사산물에 의한 폐 상피세포 DNA 손상에 따른 유전자 돌연변이와 수반된 종양 유전자의 발현과 조절유전자의 소실 등으로 요약된다⁴.

화학적 발암물질에 의해 악성으로 형질전환된 세포의 핵심적인 특징은 지속적이며 자율적인 증식과 사망사멸회피가 동반되며, 여기에는 암세포의 증식에 관여하는 신호전달체계와 세포자멸사 조절 이상에 기인한다⁵.

형태학적으로 세포증식능을 측정하는 방법은 다양하지만 파라핀 포매조직을 이용하여야 하는 경우 면역조직화학염색으로 증식세포 핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)을 측정하는 방법이 일반적이다⁶.

종양형성에 세포자멸사의 역할은 세포자멸사를 촉진시키는 유전자와 억제시키는 유전자들 사이에 균형이 깨져 세포의 수명이 연장되면 결과적으로 발암원에 의해 항구적으로 DNA가 손상된 세포가 증식되어 악성종양의 발생과 더불어 종양의 진행에 영향을 미친다고 알려져 있다^{7,8}. 종양 형성에 관여하는 세포자멸사의 이상의 확인에는 일반 헤마토실린 및 에오신 염색에서 특징적인 형태소견과 더불어 분절된 DNA를 제자리에서 표지시켜 검출하는 TUNEL(Tdt-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 방법을 이용하여 측정할 수 있다⁹.

Caspase는 시스테인 단백질분해효소의 무리에 속하는 분해효소로 그 중에서 Caspase 3과 Caspase 8은 세포자멸사 신호전달에 중요한 조절자로 작용하는 것으로 알려져 있다.

최근 Caspase 의존성 및 비의존성 작용기전을 통하여 세포자멸사를 조절하는 새로운 단백질이 발견되고 있는데, 이 중 대표적인 한 가지가 Survivin으로 이 단백질은 세포주기의 G2/M기에 발현되어 세포분열의 조절과 세포자멸사를 억제시킨다. 따라서 Survivin의 과발현은 발암 과정에서 손상된 세포의 이상 증식을 초래하며, 일부에서는 화학요법으로 유도되는 종양세포의 자멸사를 survivin이 억제시켜 항암 치료

에 대한 저항을 유발하기도 한다¹⁰.

Caspase는 세포내에 비활성 효소원으로 존재하지만, 다양한 자극에 의해 DNA가 손상 받으면 종양억제 유전자인 p53이 발현되고 그에 따라 세포자멸사를 일으키는 유전자가 발현되어 Caspase 3가 활성화되고 세포자멸사가 일어난다¹¹.

한편, p53유전자 산물인 p53 단백질은 발암물질 등에 의해 DNA가 손상되면 p53이 활성화되고 세포는 세포주기 중 G1기에 머물게 되어 손상된 DNA를 복구시킨다. 그렇지만 DNA의 손상이 심할 경우에는 실행 활성화된 Caspase-3에 의한 엔도뉴클리아제가 활성화되고 세포자멸사가 유도된다. 또한 p53 단백질은 Survivin 유전자의 전사를 억제시키는 것으로 알려져 있는데, p53의 기능 상실이 인체의 다양한 악성 종양에서 Survivin의 과 발현을 유도시킨다는 보고도 있다¹².

결국 종양이 형성되는 과정에서 세포증식과 세포자멸사에 대한 연구는 암의 병인론을 이해하는데 매우 중요한 방법이다.

본 연구의 목적은 ICR 계의 생쥐 복강 내 urethane 투여 후 발생하는 폐암종의 형태적 변화를 관찰하고, 각 단계에서 세포증식능과 세포자멸사 조절인자인 Caspase 3, Survivin, p53 단백질의 발현을 관찰하고 이를 통해 폐샘암종 분자 생물학적 특성의 이해와 더불어 악성전환 위험성과 관련된 표지자로서의 유의성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 시약

실험동물은 생후 5주 된 ICR 계 수컷 생쥐(Samtaco Bio Korea) 70마리를 사용하였고, 사료는 시판 고형사료(삼양사료 주식회사, 한국)를 사용하였다. 실험동물은 생쥐용 쥐장에 10마리씩 넣어 환경 적응을 위해 실험 1주일 전부터 동일 조건 하에서 미리 사육시켰다. Urethane은 Sigma 회사(Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물의 구분과 실험방법

실험동물 70마리를 각각 정상대조군 15마리, 실험 대조군으로 urethane 투여 군 55마리로 배분하였다. 실험은 urethane(2.5 mg/gm 체중)을 1주에 2번 연속적으로 복강 내 3회 주입하였다.

3. 병리조직검사

실험시작 후 5주, 15주에 각각 대조군 5마리와 실험군 10마리씩, 그리고 실험이 종료되는 25주에는 생존해 있는 모든 동물의 경추를 탈골시키고 개복한 후 양측 폐를 절제 후 기관지에 10% 중성 포르마린을 주입하여 폐를 팽창시킨 다음 고정시켜 통상적인 방법으로 5 µm 두께의 조직표본을 만들어 헤마토실린과 에오신 염색하여 관찰하였다. 폐병변의 형태학적 소견은 Foley 등²의 판정기준에 따라 이형성 증식증, 샘종, 그리고 샘암종으로 분류하였다.

4. 면역조직화학염색

파라핀 포매조직을 통상적인 방법으로 알코올로 함수과정을 거쳐 감추어진 항원을 노출시키기 위해 citric acid 완충액에 넣고 고압극초단파(750 W)에서 20분간 처리 후, 실온에서 30분간 식힌 다음 Tris 용액으로 세척하고 avidin-biotin complex 방법을 이용하여 일련의 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 일차항체로 세포증식능은 생쥐 단클론 항PCNA 항체 (Novocastra Co, Newcastle, UK, 1 : 1000)를, 세포자멸사는 TUNEL 방식을 이용하여 Tdt DAB in situ apoptosis detection kit(Travigen, Gaithersburg, MD)를 사용하였다. 또한 Survivin(mouse monoclonal, MS-1203, 1:100, Neomarker, Fremont, CA), p53 (mouse monoclonal, MS-104, 1:100, Neomarker, Fremont, CA), 그리고 Caspase 3(rabbit polyclonal, ab4051-500, 1:100, Abcam, Cambridge, MA)를 사용하였고 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazol(AEC)로 염색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 클리세린으로 봉입한 다음 현미경으로 관찰하였다.

PCNA 양성세포와 세포자멸사 염색의 판정은 양측 폐에서 관찰된 증식증, 샘종, 그리고 샘암종을 40배 시야에서 사진촬영한 후 15개의 병변을 선정하여 하나의 병변마다 1,000개 이상의 세포를 관찰하여 양성 세포 수에 대한 백분율로 표기하였다.

Survivin, Caspase 3, 그리고 p53 항체에 대한 염색의 판정은 핵에 갈색으로 염색된 세포의 수가 5% 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

5. 통계 처리

실험적 폐 샘암종 발생과정에서 형태학적 분류에 따른 세포증식능지수, 세포자멸사 빈도, Survivin, Caspase 3, 그리고 p53 발현을 조사하는 것이므로 분석단위는 생쥐의 개체가 아니라 폐의 병변으로 하였다.

통계적 유의성에 대한 평가는 Student T 검정법을 이용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 종양 발생 및 조직학적 유형

Urethane 을 투여 후 생존한 40 마리의 생쥐 폐의 변화를 5주, 15주, 그리고 25주 간격으로 관찰하였다. Urethane 투여 5주 후에는, 폐포 내 정상 상피세포보다 두배 이상으로 농염된 핵과 핵소체가 보이는 이형성 증식세포가 부분적으로 관찰되었다. 15주에서는 세포가 수적으로 밀집하여 치밀하거나 유두상 구조를

Table 1. Histologic changes of the lung in mice treated with urethane

Group	No. of mouse	Tumor multiplicity (number/ mouse)		
		Hyperplasia	Adenoma	Adenocarcinoma
5 weeks	10	1.96±0.33	-	-
5 weeks	10	2.13±0.92	6.23±2.18	-
5 weeks	20	3.78±1.64	8.55±1.87	1.24±0.51

Tumor multiplicity; Number of tumor per mouse.

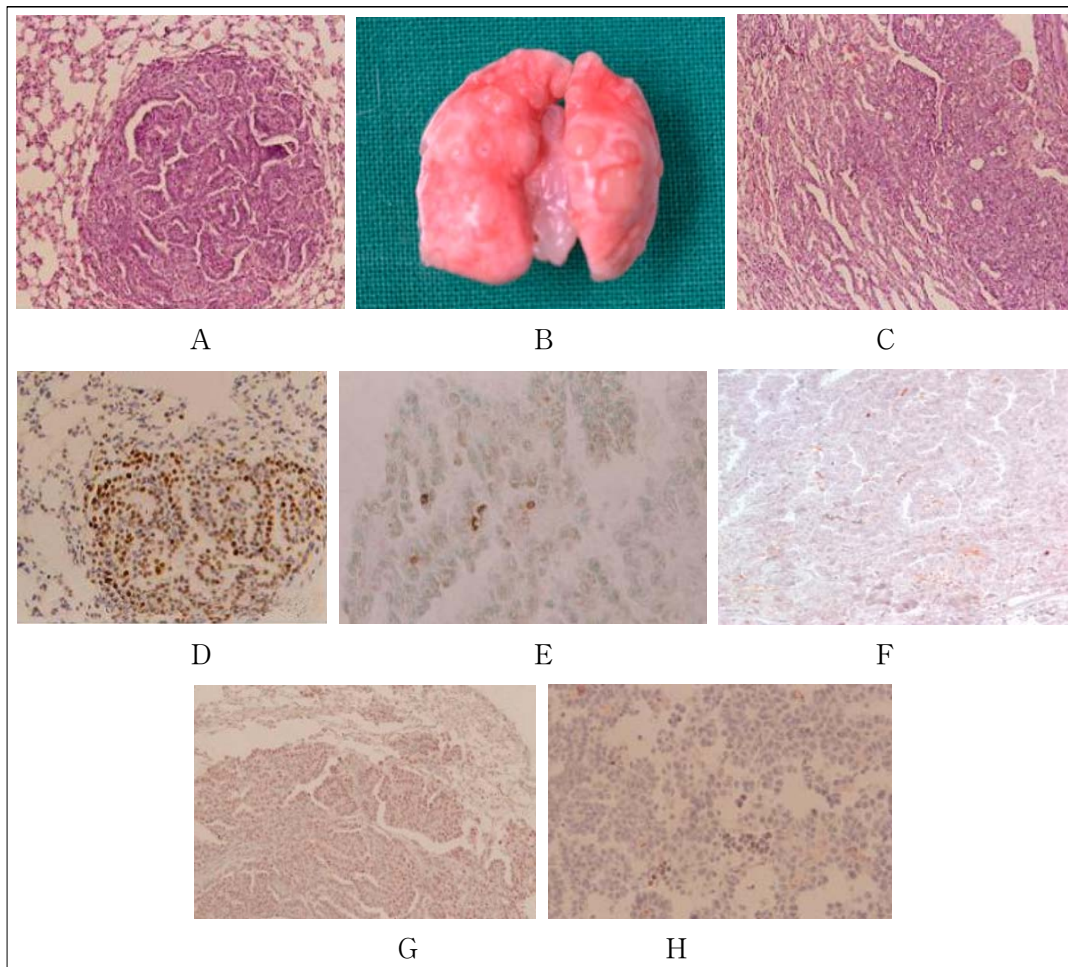


Figure 1 A. Gross finding of urethane-induced lungs, which shows multiple masses. B, C. Sequential change in urethane-induced lung lesions, showing adenoma (Figure 1B) and infiltrating adenocarcinoma (Figure 1C)(Hematoxylline & Eosin Stain, x200). D. Immunohistochemical reactivity for PCNA in adenoma (x200). E. TUNNEL stain shows occasional nuclear staining in adenocarcinoma of lung (x200). F, G, H. Immunohistochemical reactivity for caspase 3 (Figure 1F), p53 (Figure 1G) and survivin protein (Figure 1H) showing positive cytoplasmic staining (x200).

만들면서 주위를 압박하는 샘종이 출현하였고(Figure 1A), 실험이 종료된 25주 후에는 육안적으로는 양측

폐에 결절형의 종괴가 관찰되었고(Figure 1B) 비정형 유사분열과 세포의 이형성이 현저하며, 주변으로 침윤성 증식을 보이는 샘암종이 관찰되었다(Figure 1C). 증식중, 샘종, 그리고 샘암종의 발생빈도는 Table 1에 표기하였다.

Table 2. PCNA and apoptotic labeling index of the mice lung lesions during urethane-induced carcinogenesis

Histologic type	No. of lesions	Proliferation index (%)	Apoptotic index(%)
Hyperplasia	20	9.6±8.9	0.24±0.01
Adenoma	25	23.2±14.8	1.25±0.03
Adenocarcinoma	15	55.7±19.4	5.21±0.68
p value		< 0.01	< 0.01

Significantly greater than the other groups, p<0.01.

2. 세포증식능과 세포자멸사 지수

Urethane 투여 후 발생한 폐의 증식증에서 PCNA 표지지수는 9.6±8.9, 샘종에서는 23.2±14.8이었고 (Figure 1D) 샘암종에서는 55.7±19.4로 폐암종 발생과

Table 3. Expression rates of caspase-3, survivin and p53 protein in mouse lung lesions by urethane-induced lung carcinogenesis

Histologic type	No. of lesions	Caspase 3	Survivin	p53
Hyperplasia	20	15% (3/20)	10% (2/20)	0% (0/20)
Adenoma	25	16% (4/25)	20% (5/25)	0% (0/25)
Adenocarcinoma	15	46.7% (7/15)	40% (6/15)	13.3% (2/15)
p value		< 0.01	< 0.01	NS

NS: not significantly different.

Table 4. Proliferation and apoptotic index according to caspase 3 and survivin expression

Expression	Proliferation index (%)	Apoptotic index(%)	p value
Caspase-3			
positive (n=20)	32.2±18.5	3.08±2.01	0.01
negative (n=40)	20.5±19.9	1.53±1.71	
Survivin			
positive (n=15)	29.2±21.7	2.61±2.08	NS
negative (n=45)	21.4±20.1	1.64±1.86	

n: number of tumor lesion; NS: not significantly different. Significantly greater than the other groups, p<0.01.

정에서 통계적으로 유의하게 지속적으로 증가하였다(p<0.01). 세포자멸사는 폐섬암종 발생과정의 각종 병변에서 특정 부위에 편재되지 않고 흩어져서 관찰되었다. 세포자멸사 빈도는 증식증에서는 0.24±0.01, 샘종에서는 1.25±0.03, 그리고 샘암종에서는 5.21±0.68으로(Figure 1E) PCNA지수와 마찬가지로 폐암종 발생과정에서 지속적으로 증가하였다(p<0.01)(Table 2).

3. 면역조직화학 염색에 의한 Caspase 3, Survivin 과 p53 발현양상

Caspase 3 단백질의 발현은 세포질 부위에 나타났다. 폐의 증식증 병변에서는 20예 중 3예(15%)에서 양성 반응을 보였다. 또한 샘종에서는 16%(4/25)에서 양성을 보여 증식증에 비해 차이점은 없었다. 그렇지만 샘암종에서는 46.7%(7/15)에서 발현되어 Caspase 3의 발현은 통계적으로 유의하게 증가하였다(Figure 1 F)(p<0.01). Survivin 단백질의 발현은 주로 세포질과 일부에서 핵에 동시에 양성반응이 나타났다. 폐의 증

식증 20예 중 2예로 10%의 양성률을 보였고, 샘종 25예 중 5예로 20%에서, 그리고 샘암종 15예 중 6예에서 양성으로 40%의 양성률을 보여 암종으로 진행할수록 survivin의 발현은 증가하는 양상을 보여주었다(Figure 1G)(p<0.01). p53 단백질의 발현은 핵에 염색되었다. Urethane으로 유도된 폐의 증식증과 샘종의 전예에서 발현이 나타나지 않았으나 샘암종에서는 13.3%(2/15)에서 p53단백에 대한 양성 반응이 관찰되었다(Figure 1H)(Table 3).

4. Caspase 3와 Survivin의 발현에 따른 세포증식능 과 세포자멸사 지수

Urethane으로 유도된 폐의 증식증, 샘종, 그리고 샘암종에서 caspase 3의 양성부위와 음성부위에서의 세포증식능은 32.2±18.5%와 20.5±19.9%로 나타나 caspase 3 양성부위에서 세포증식 지수가 증가하는 경향을 보였다. 또한 survivin 양성부위와 음성부위에서의 세포증식능은 29.2±21.7%와 21.4±20.1%로 나타났으며, 통계적으로는 유의한 차이가 없었다. 세포자멸사 지수는 caspase 3 양성부위에서 3.08±2.01%로 음성부위에서의 1.53±1.71%보다 통계적으로 유의하게 증가하였다(p<0.01). Survivin 양성인 경우 세포자멸사 지수는 2.61±2.08%이었고 survivin이 음성인 경우에는 1.64±1.86%로 양성 및 음성군간에는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4).

고 찰

화학적 발암물질에 의한 세포의 암화과정은 매우

역동적인 과정으로 보통 발암개시, 촉진 및 진행 등의 다단계로 구분된다. 알킬화 발암물질인 urethane은 표적세포의 DNA에 직접 작용하여 돌연변이를 유발하는 유전자 독성물질로 ICR계 생쥐 복강 내에 투여하면 시간경과에 따라 폐포상피세포의 증식, 샘종을 거쳐 인체에서 발생하는 샘암종과 형태적으로 유사한 병변이 초래되어 널리 사용되고 있다³. 본 연구에서는 실험대조군으로 5주령 된 생쥐 한 마리당 urethane 60 mg을 1주에 2회씩 3회 복강 내 투여 후 생쥐 폐에서 관찰된 형태적 소견은 5주부터 부분적으로 폐포 내 벽을 따라 경도의 이행성을 보이는 상피세포가 증식하였고, 15주 후에는 일부에서 주변 폐 실질을 압축시키는 샘종의 출현과 더불어 점차 진행하여, 25주 이후에서 주변으로 침윤성 양상을 보이는 샘암종이 관찰되었다. Urethane에 의한 실험적 폐샘암종 유발은 보통 urethane의 농도를 5주령 생쥐 한 마리당 12 mg(0.5 mg/gm 체중) 투여할 경우 30주 이후에서 출현하는 것으로 보고되어 있으나¹³, 본 실험에서는 생쥐 한 마리당 5배 높은 60 mg(2.5 mg/gm 체중)을 투여하였다. 이는 폐샘암종 유발기간을 단축시키기 위함이었다.

세포의 증식과 세포자멸사간에는 수적인 평형이 유지되고 있다가 어떤 원인에 의해 세포의 증식력이 증가하거나 세포자멸사가 억제되면 종양을 형성할 수 있다⁷. urethane 투여 후 발생하는 폐의 다양한 증식증, 샘종 및 샘암종에서 세포증식능을 측정하여 각 병변에서 생물학적인 특성을 비교-검토할 수 있었다. 연구 결과 PCNA 표지지수는 증식증에서 9.6%, 샘종에서는 23.2%, 그리고 샘암종에서는 55.7%로 발암과정에 비례하여 순차적으로 증가하였다. 결국 종양세포에서 PCNA의 지속적인 증가의 의미는 G1기에서 S기에 있는 세포로 단백질 합성이 증가되고 있음을 의미하며, 이를 유발하는 세포분열의 조절기능 장애는 샘암종으로 진행되면서 더 심하게 일어난다고 생각된다. 따라서 PCNA 표지지수는 urethane에 의한 다단계 발암과정에서 생물학적 표지자로서의 유용성이 있다고 생각되었다. 세포증식에 관여하는 PCNA는 36kD의 DNA polymerase- δ 에 대한 보조 단백질로서 세포 주기 중 G1 후기에서 증가하기 시작하여 S

기에서 최대에 이른 후 M기에서 소실되기 때문에 G1 후기-S기 동안에 있는 세포의 특징적인 표지자가 될 수 있다¹⁴. 각종 세포에서 세포증식의 측정에 과라핀 포매조직에서 항 PCNA항체를 이용한 면역조직화학방법이 세포와 조직구조가 유지되고, 측정방법도 비교적 간편하며, 재현성과 더불어 DNA 복제 부위의 단백질과 결합하는 특이성이 높아 널리 사용되고 있다^{15,16}.

발암과정에서 세포자멸사가 유도되는 정확한 기전에 대해서는 알려져 있지 않았지만 일반적으로 세포자멸사를 촉진시키는 유전자와 억제시키는 유전자들 사이에 균형이 깨져 세포자멸사가 억제되면 발암원에 의해 항구적인 DNA가 손상된 세포가 지속적으로 증가하게 되고, 여기에 이차적인 유전적 변화가 일어나 악성전환의 기회가 높아져 종양이 발생하는 것으로 알려져 있다⁷. 본 연구에서 urethane에 의한 방광암 폐샘암종 발생 및 진행과정에서 세포자멸사는 증식증에서 0.24%, 샘종에서 1.25%, 그리고 샘암종에서 상대적으로 현저하게 높은 5.21%이었다. 이러한 결과는 urethane에 의한 폐샘암종 발생과정에서 악성종양으로 진행할수록 세포증식이 현저하게 증가함에 따라 과도하게 생성되었거나 유전적 손상을 가지고 있는 종양세포들을 제거하는 빈도가 상대적으로 증가하기 때문으로 생각된다. 그러한 증거로서 인체에 발생한 폐암종¹⁷과 방광암종¹⁸에서 종양 내에 세포자멸사가 많은 경우 대부분 증식하는 세포의 증가로 종양이 진행되어 있었다는 것과 일치하는 결과였다. 결국 본 연구에서 urethane에 의한 생쥐의 폐샘암종 발생 및 진행과정에서 세포증식과 세포자멸사가 서로 밀접하게 연관되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그렇지만 SV40-T 항원으로 형질전환 시킨 생쥐에 발생한 유방암종에서 세포자멸사 표지지수가 암종보다는 전암 단계인 비정형성 상피세포증식증에서 증가하였다는 Shibata 등¹⁹의 보고와는 상반되었다. 결국 세포자멸사와 PCNA의 상관성에 대해서 본 실험만으로는 그 이유를 설명할 수가 없었고, urethane에 의해 유발된 생쥐의 폐샘암종에서 세포자멸사를 연구한 다른 논문들이 없어 비교 고찰할 수가 없었다. 이에 대해 추후 다양한 방법으로 확인해야 할 것이다.

Survivin은 세포자멸사를 억제하여 세포분열을 조절하는 단백질로, 세포자멸사를 억제하는 기전으로는 첫째, 세포자멸사 과정에 작용하는 효소인 caspase 3와 caspase 9의 활성을 직접 억제함으로써 세포자멸사를 억제하거나²⁰, 둘째, 세포주기 조절인자인 CDK4와 결합하여 survivin-CDK4 복합체를 형성하여 caspase 3의 활성을 간접적으로 억제하여 세포자멸사를 차단한다고 알려져 있다²¹. 종양발생과정에서 survivin은 대장암의 형성과정에서 저등급 이형성의 샘종부터 고등급 이형성의 샘종, 암종으로 갈수록 의미 있게 증가되었고²², B형 간염바이러스 산물인 X 단백질(HBX)이 간암발생과정에서 survivin의 발현을 증대시킨다는 연구결과²³는 암형성 과정에서 지속적으로 survivin의 기능이 있음을 시사하는 소견이라 하겠다. 또한 인체 폐암종에서 survivin의 발현은 폐암종 주변의 이형성종이나 비정형성 증식증에서는 부분적으로 발현되나 폐암종에서는 64%에서 발현되며²⁴, 간세포암종에서는 세포증식능과 밀접한 관련이 있다는 연구결과도 있다²¹.

본 연구에서 survivin 단백질 발현은 증식증에서 10%, 샘종에서는 20%의 발현되었으나 샘암종에서는 40%에서 관찰되어 폐샘암종의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이와 같은 소견으로 Survivin 단백질은 종양이 형성되는 과정 동안 점차적으로 발현이 증가하는 단백질로 종양의 형성 및 진행 과정에 영향을 미치는 것으로 생각되었다. 또한 본 연구에서 survivin 발현 양성군과 음성군에서 세포증식능의 차이가 없었다. 이러한 점은 종양의 유형간 차이가 있을 것으로 추측하였다. Caspase 3는 caspase 계열 중 Fas 매개 세포자멸사에 가장 중요한 역할을 하며, 정상 세포의 세포질에 전효소 형태로 존재해 있으며 Fas 자극에 의해 단백질분해되거나 어떤 경우에는 스스로 단백질분해과정으로 거쳐 활성화 되면서 세포자멸사 과정을 진행시킨다¹¹. 전암성 병변이나 암종에서 Caspase 3의 발현은 활성형 또는 비활성형에 따라 다양하게 발현되는 것으로 보고되어 있다. 식도의 평편상피세포암종이나 위의 샘암종에서는 caspase 3의 활동형이 감소되어 있고 결과적으로 세포자멸사가 억제되어 있다^{25,26}. 그렇지만 비활성형 caspase 3의 발현증

가가 위샘암종에서 림프절전이의 증가와 관련이 있고 예후가 불량한 지표로 간주된다고 보고되어 있다²⁷. 본 연구에서 caspase 3는 폐샘암종 발생과정에서 발현형태가 survivin과 유사하게 관찰되었다. 이런 점으로 미루어 기능적으로 두 단백질이 샘암종으로 진행되는 과정에서 독립적으로 또는 상호 연관성을 통하여 일정한 역할을 하는 것으로 볼 수 있을 것이다. 또한 세포증식지수와 세포자멸사 지수가 모두 증식증이나 샘종에 비해 샘암종에서 증가하였고(Table 2) caspase-3나 survivin이 발현될 경우 세포증식지수나 세포자멸사지수가 증가하는 경향이 있어 보이는 결과(Table 3)로 보아, survivin과 caspase-3는 상반되는 기능을 가지고 있음에도 불구하고 유사하게 증가할 수 있을 것으로 보인다. 결국 Table 3에서 보는 바와 같이, caspase-3과 survivin의 발현으로 세포증식 지수나 세포자멸사 지수가 증가하는 것은 이 두 지수사이에는 분자생물학적인 기작에 연관성을 시사하면서도 구체적인 현상은 서로 독립적으로 다른 경로를 거칠 것이 충분히 예상되기 때문에, caspase-3와 survivin의 발현과 두 지수 사이의 관계는 앞으로 더욱 연구되어야 할 부분으로 보인다. Li 등²⁶은 위샘암종에서 survivin과 caspase 3의 발현양상은 역관계가 있다고 보고하였다. 이러한 점으로 미루어 survivin은 caspase 3의 활성을 억제시킬 수는 있지만 caspase 3 단백질발현과는 상호관련이 없을 수도 있을 것이다. 한편 본 연구에서 caspase 3가 발현되어 있는 세포군에서 세포자멸사가 증가되어 있는 점으로 보아 caspase 3는 세포자멸사와 관련이 있을 것으로 추측되었다.

p53 유전자의 돌연변이는 폐암종을 비롯한 각종 암종에서 대부분 발현되는 유전적 변화로 알려져 있다. 종양발생과정에서 p53 단백질 발현은 대부분의 경우 p53 유전자의 과돌연변이로 생성된 돌연변이된 p53 단백질이 정상 야생형 p53보다 안정한 상태로 있어서 세포 핵 내에 축적 되어 면역조직화학염색에서 양성을 보이게 되는 경우와, 다른 하나는 세포손상을 받거나 DNA 손상이 있을 시 생리적 반응으로 증가하는 경우이다²⁸. 그렇지만 인체에서와는 달리 화학적 발암원에 유도된 설치류의 폐암종에서 p53 유전자의 돌연

변이는 보고마다 차이를 보이는데 Cazorla 등²⁹은 urethane에 의한 폐암종 모델에서 p53 변이는 관찰되지 않는다고 하였고, Horio 등³⁰은 SSCP와 DNA염기서열 분석기법으로 샘종에서도 p53 유전자의 과오돌연변이가 36%에서 관찰되었으며, Ohno 등³¹은 샘암종에서 20%에서 p53 돌연변이를 관찰하였다. 심지어 p53의 돌연변이나 야생형 p53의 발현 증가가 전혀 관찰되지 않은 연구보고도 있다³². 이러한 결과들을 종합하여 보면, 생쥐에서 Urethane에 의한 폐암이 발현되는 과정에는 p53는 선도적인 역할을 하지 않는 것처럼 보이는데, 사람에서 생기는 발암 과정에서는 p53의 돌연변이가 매우 중요한 역할을 할 것으로 보이는 것과 대조되어 이러한 발암과정의 차이에 대한 연구가 앞으로 필요할 것으로 보인다.

본 연구에서도 urethane 투여 후 발생한 폐의 샘암종 발생과정에서 증식증과 샘종에서 p53 단백질은 발현되지 않았으나, 샘암종에서는 전체 15예 중 2예(13.3%)에서 관찰되었다. 이러한 결과로 p53단백은 화학적 발암원에 의한 폐샘암종 발생과정에서 대부분 발현되지 않거나, 발현되더라도 진행된 샘암종의 일부에서 관찰되는 변화로 생각되었다. Survivin과 p53 유전자와의 관계를 보면 야생형 p53 단백질이 survivin 유전자의 전사과정에 작용해 mRNA나 survivin 단백질 형성을 억제한다. 따라서 돌연변이 p53 유전자는 survivin의 작용을 억제하지 못하기 때문에 survivin 단백질발현이 증가한다¹². 본 실험에서는 폐암종 형성과정에서부터 caspase 3와 survivin이 발현되었고, 암종에서는 발현율이 현저하게 높았다. 그렇지만 p53 단백질은 샘암종의 일부에서만 발현된 점으로 미루어 caspase 3와 survivin의 발현은 p53유전자 이외에 다른 요소가 있을 것으로 생각한다.

Caspase 3와 survivin 발현은 샘암종의 초기단계에서부터 지속적으로 관여하며, 본 실험 모델에서는 p53 유전자 변이는 초기보다는 암종으로 형질전환이 일어난 후에 부분적으로 발생하였을 수 있다. 본 연구를 통하여 urethane에 의한 생쥐의 폐샘암종 발생과정에서 세포증식능과 세포자멸사는 종양의 발생과 진행과정에서 지속적으로 관여함을 알 수 있었다.

결론적으로 본 연구를 통하여 PCNA와 세포자멸사

지수는 암세포로의 형질전환하는 위험도를 평가하는 지표로 유용할 것으로 보이며, caspase, survivin은 p53는 urethane에 의해 유도된 생쥐 폐암 모델에서 발암과정에 중요하게 관여하는 단백질로 보인다.

요 약

연구배경 및 목적: ICR계의 생쥐에 Urethane을 투여하여 발생하는 폐 병변의 형태변화를 관찰하고, 폐 샘암종으로 진행과정에서 세포증식능과 세포자멸사, 세포자멸사와 관련된 조절인자인 caspase3, 자멸사 억제인자인 survivin, 그리고 종양억제 유전자 산물인 p53 단백질이 발암과정에서 발현되는 양상을 관찰함으로써 발암과정에서의 역할을 규명하고자 하였다.

방 법: Urethane을 ICR 생쥐에게 복강 내 주사를 하였고, 5주, 15주, 25주에 폐병변을 육안적으로 헤마토실린 및 에오신 염색을 관찰하였고, 면역조직화학적 방법으로 PCNA지수, 세포자멸사 지수, caspase 3, survivin 및 p53의 발현을 관찰하였다.

결 과: Urethane 투여 5주부터 폐의 증식이 관찰되었고, 샘종은 10주 이후부터 출현하여 시간 경과에 따라 크기와 구조적 변화가 동반되었고, 세포학적 이상소견과 더불어 주변으로 침윤성 변화가 있는 샘암종은 25주 이후에 출현하였다. 세포증식능과 세포자멸사 지수는 폐의 증식증에서는 9.6%와 0.24%, 샘종에서는 23.2%와 1.25%, 그리고 샘암종에서는 55.7%와 5.21%이었다. 따라서 세포증식능과 세포자멸사는 폐 샘암종 발생초기부터 통계적으로 유의하게 지속적으로 증가하였고, 특히 샘암종으로 진행할 경우 현저하게 증가하였다. caspase 3는 증식증에서는 15%, 샘종은 16%의 발현율을 보이는 반면, 폐샘암종은 46.7%의 발현율을 보이면서 암 단계에서 현저하게 발현이 증가하였다. Survivin 단백질의 발현은 폐의 증식증, 샘종, 그리고 샘암종으로 진행할수록 발현빈도가 통계적으로 유의하게 증가하였다. p53 단백질은 폐의 증식증과 샘종에서는 전혀 발현되지 않았으나 침윤성 샘암종의 일부에서 발현되었다.

이상의 결과로 생쥐의 폐샘암종 발생과정에서 세포증식능과 세포자멸사는 종양의 발생과 진행과정에서

지속적으로 관여함을 알 수 있었다. 또한 survivin 발현은 샘암종의 초기단계에서부터 지속적으로 관여하며, p53 유전자 변이는 초기보다는 암종으로 형질전환이 일어난 후에 부분적으로 발생하는 것으로 보인다.

결 론: 본 연구를 통하여 PCNA와 세포자멸사 지수는 암세포로 형질전환하는 위험도를 평가하는 지표로 유용할 것으로 보이며, caspase, survivin과 p53는 urethane에 의해 유도된 생쥐 폐암 모델에서 발암과정에 중요하게 관여하는 단백질로 보인다.

참 고 문 헌

- Zang EA, Wynder AL. Cumulative tar exposure. A new index for estimating lung cancer risk among cigarette smokers. *Cancer* 1992;70:69-76.
- Foley JF, Anderson MW, Stoner GD, Gaul BW, Hardisty JF, Maronpot RR. Proliferative lesions of the mouse lung: progression studies in strain A mice. *Exp Lung Res* 1991;17:157-68.
- Malkinson AM. Pulmonary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992;52:2670s-6s.
- Re FC, Manenti G, Borrello MG, Colombo MP, Fisher JH, Pierotti MA, et al. Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol Carcinog* 1992;5:155-60.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.
- Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:841-5.
- Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* 1997;183:134-40.
- Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999;113:1076-81.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- Altieri DC, Marchisio C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 1999;79:1327-33.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87: 171.
- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53 dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002;21: 2613-22.
- Chung JH, Jang JJ, Lee MJ, Ham EK. Altered retinoblastoma protein expression and proliferative activity in urethane induced mouse lung tumorigenesis. *Cancer Res Treat* 2002;34:258-63.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxillary proteins of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326:515-7.
- Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989;264:13856-64.
- Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997;14:629-40.
- Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, Vahakangas K, Soini Y, Sormunen R, et al. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5595-602.
- Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994;173:333-9.
- Shibata MA, Maroulakou IG, Jorcyk CL, Gold LG, Ward JM, Green JE. p53 independent apoptosis during mammary tumor progression in C(3)/SV 40 large T antigen transgenic mice; Suppression of apoptosis during the transition from preneoplasia to carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:2998-3003.
- Sela B. Survivin: anti-apoptosis proteins and a prognostic markers for progression and recurrence. *Harefuah* 2002;141:103-7.
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, et al. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:1080-5.
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-7.
- Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J, et al. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatoma tissues. *J Med Virol* 2005; 77:374-81.
- Akyurek N, Memis L, Ekinici O, Kokturk N, Ozturk C. Survivin expression in pre-invasive lesions and non-small cell lung carcinoma. *Virchows Arch* 2006;449:164-70.
- Hsia JY, Chen CY, Chen JT, Hsu CP, Shai SE, Yang SS, et al. Prognostic significance of caspase-3

- expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:44-8.
26. Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1984-8.
 27. Isobe N, Onodera H, Mori A, Shimada Y, Yang W, Yasuda S, et al. Caspase-3 expression in human gastric carcinoma and its clinical significance. *Oncology* 2004;66:201-9.
 28. Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 1994;172:1-4.
 29. Cazorla M, Hernandez L, Fernandez PL, Fabra A, Peinado MA, Dasenbrock C, et al. Ki-ras gene mutations and absence of p53 gene mutations in spontaneous and urethane-induced early lung lesions in CBA/J mice. *Mol Carcinog* 1998;21:251-60.
 30. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth JA, Malkinson AM, Schrump DS. Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog* 1996;17:217-23.
 31. Ohno J, Horio Y, Sekido Y, Hasegawa Y, Takahashi M, Nishizawa J, et al. Telomerase activation and p53 mutations in urethane-induced A/J mouse lung tumor development. *Carcinogenesis* 2001;22:751-6.
 32. Mori I, Yasuhara K, Hayashi SM, Nonoyama T, Nomura T, Yanai T, et al. Aberrant expression of cyclin D1 in pulmonary proliferative lesions induced by high doses of urethane in transgenic mice carrying the human prototype c-H-ras gene. *J Vet Med Sci* 2001;63:261-8.
-