

Immunohistochemical Expression of Caspase 3 and Its Relationship with p53 Expression in Endometrial Cancers

Kyung Eun Lee[†]

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

Apoptosis is an important significance in the pathogenesis of cancer. Caspase 3 and p53 have been identified as important members of the apoptosis related proteins. This study was performed to define roles of caspase 3 expression and its relationship with p53 expression in endometrial cancers by immunohistochemistry. Immunoreactivity for caspase 3 was found in 13 (65.0%) out of 20 endometrial hyperplasia cases and 8 (36.4%) out of 22 endometrial cancers. Seven (87.5%) of the 8 cases with a positive caspase 3 immunoreactivity showed a positive p53 expression in 22 endometrial cancers. There were no significant associations between caspase 3 and p53 expressions. These findings suggest that caspase 3 expression might be associated with carcinogenesis of endometrial cancers. Further studies are needed to define the relationship between caspase 3 and p53 and apoptosis for examining the mechanisms of tissue-specific apoptosis related protein.

Key Words: Caspase 3, p53, Endometrial cancer, Immunohistochemistry

서 론

자궁내막암은 선진국의 여성 생식기암 중 가장 흔한 질환이며 최근 국내에서도 발생 빈도가 증가하는 추세이므로 자궁내막암의 진단 및 예후와 관련한 인자를 찾는 것은 매우 중요한 일이다. 악성 종양 발생은 다양한 종양유전자의 활성화 또는 종양억제유전자의 불활성화에 의해 유발될 뿐 아니라, 정상세포가 세포자멸사 기전을 벗어나 지속적인 증식을 함으로써 추가적인 유전자 변이를 일으키는 것도 하나의 종양 발생 기전으로 알려져 있다.

세포자멸사 (apoptosis)는 암의 발생과 진행에 영향을 미치며, 전암성 병변과 암종의 감별진단이 어려울 경우 세포자멸사 지수를 이용하여 감별할 수 있다는 보고도 있다 (Montironi et al., 1995). 최근 세포자멸사의 유도 및 조절에는 많은 유전자들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있는데, 그 중에서도 caspase 3는 세포자멸사 과정에 직접적으로 작용하여 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다

(Jänicke et al., 1998).

Caspase 3는 세포 내에서는 비활성화 효소원으로 존재하지만 다양한 자극에 의해 DNA가 손상되면 종양억제 유전자인 p53이 발현되고 그에 따라 caspase 3가 활성화되어 세포자멸사가 일어난다 (Alnemri et al., 1996). p53 유전자는 세포주기와 세포자멸사를 조절하는 대표적 종양억제유전자로 그 유전적 산물인 p53 단백질은 손상된 세포를 세포주기 중 G1기에 머물게 하여 손상된 DNA를 복구시킨다. 하지만 DNA 손상이 심할 경우에는 실행 활성화된 caspase 3에 의해 유도된 엔도뉴클리아제를 활성화시켜 세포자멸사가 유도된다고 한다 (Miraz et al., 2002).

최근에는 전암성 병변이나 암종에서 caspase 3 이상 발현에 의한 세포자멸사 억제가 암화 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Li et al., 2004). 유방암에서는 침윤성 암종으로 진행할수록 caspase 3의 발현이 증가한다고 하였으나 (Vakkala et al., 1999), 자궁경부 종양에서는 전암성 병변에 비해 진행성 암종으로 갈수록 caspase 3의 발현은 감소하고 p53 발현은 증가한다고 하였다 (Cha et al., 2008).

하지만 국내에서는 각종 인체 종양을 대상으로 세포자멸사에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나, caspase 3에 대한 연구는 많지 않고 결과 또한 일관성이 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 자궁내막증식증 및 자궁내막

*접수일: 2010년 10월 21일 / 수정일: 2010년 12월 2일
채택일: 2010년 12월 10일

[†]교신저자: 이경은, (우) 609-757 부산광역시 금정구 부곡3동,
부산가톨릭대학교 임상병리학과
Tel: 051-510-0821, e-mail: keelee@cup.ac.kr

암종에서의 caspase 3 발현을 면역조직화학 염색법을 통하여 관찰하고, 자궁내막암종에서 p53 단백질 발현과의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

2008년 3월부터 2010년 5월까지 부산지역 산부인과 병원에서 자궁내막 흡인 소파술을 통해 자궁내막증식증 및 자궁내막암종으로 진단 받은 예 중 병리학적 재검토가 가능한 파라핀 블록 42예를 대상으로 본 연구를 수행하였다. 수술 전에 방사선 요법이나 화학요법을 받은 예는 연구대상에서 제외하였으며, 연구대상의 병리진단 보고서를 참고하고 보관된 조직 슬라이드를 재검토하였다.

연구방법

면역조직화학 염색. 4 µm 두께로 절편된 조직을 100% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수 과정을 거친 후 흐르는 물에서 10분간 씻어냈다. 항원성 회복을 위하여 pH 6.0 citrate 용액으로 전처리에서 10분간 끓이는 전처리를 하였다. 조직 내의 내인성 과산화효소를 비활성화 시키기 위하여 실온에서 3% H₂O₂에서 10분간 반응시킨 후 Tris buffered saline (pH 7.4)로 세척하였다. 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 Cap-Plus™ Blocking solution (Zymed, California, USA)에서 10분간 더 반응시켰다. 수세 과정 없이 마우스 단클론성 일차항체 caspase 3 (Abcam, Cambridge, UK)와 p53 (DakoCytomation, Denmark)을 각각 1:100으로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 후, Cap-Plus™ Biotinylated secondary antibody (Zymed, California, USA)에서 30분간, Cap-Plus™ Streptavidine - HRP (Zymed, California, USA)에서 30분간 반응시켰다. 면역 염색 후 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)로 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

면역조직화학 염색 판독. 면역조직화학 염색 결과는 caspase 3 단백질은 종양세포의 세포질에 갈색으로 염색될 때를 양성으로 판정하였고, p53 단백질은 종양세포의 핵에 갈색으로 염색될 때를 양성으로 판정하였다. 100배 시야에서 염색되지 않은 경우 즉, 0%를 0점, 25% 미만의 종양세포가 염색되는 경우 1점, 26~50%를 2점, 50% 이상을 3점으로 하였다. 그리고 염색 강도에 따라 음성은 0

Table 1. Frequency of caspase 3 expression in endometrial hyperplasia and endometrial cancers

Expression	Endometrial hyperplasia	Endometrial cancer
	N=20 (%)	N=22 (%)
Caspase 3		
Negative	7 (35.0)	14 (63.6)
Positive	13 (65.0)	8 (36.4)

점, 약양성인 경우를 1점, 중등도 양성인 경우를 2점, 강양성을 3점으로 분류하였다. 염색 강도에 따른 점수와 분포 점수를 곱한 값이 0~2점이면 음성, 3점 이상이면 면역 염색 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석. 통계 처리는 SPSS (Version 14.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. Caspase 3와 p53 단백질 발현과의 연관성을 평가하기 위하여 χ^2 검정방법을 사용하여 분석하였고, $P \leq 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

임상병리학적 소견

World Health Organization 분류 기준 (Steven et al., 1997)에 근거하여 자궁내막증식증이 20예, 자궁내막암종이 22예였다. 총 42예의 환자 연령은 25세에서 65세 (평균 연령은 46.9세)까지 분포하였고, 이 중 자궁내막증식증 환자의 평균 연령은 42.3세, 자궁내막암종 환자의 평균 연령은 51.5세였다.

자궁내막증식증 및 자궁내막암에서의 caspase 3 단백질 발현

Caspase 3 단백질 발현은 자궁내막증식증 20예 중 13예 (65.0%)에서 양성이 관찰되었고, 7예 (35.0%)에서 음성이 관찰되었다. 자궁내막암종은 22예 중 8예 (36.4%)에서 양성이 관찰되었고, 14예 (63.6%)에서 음성이 관찰되었다 (Table 1).

자궁내막암에서 caspase 3와 p53 단백질 발현의 연관성

p53 단백질 발현은 자궁내막암종 22예 중 15예 (68.2%)에서 양성이 관찰되었다. Caspase 3 단백질 발현이 양성으로 나타난 8예 중 7예 (87.5%)에서 p53 단백질 발현이 양성으로 관찰되었고 (Fig. 1), 1예 (12.5%)에서 p53 단백질 발현이 음성으로 관찰되었다. Caspase 3와 p53 단백질 발

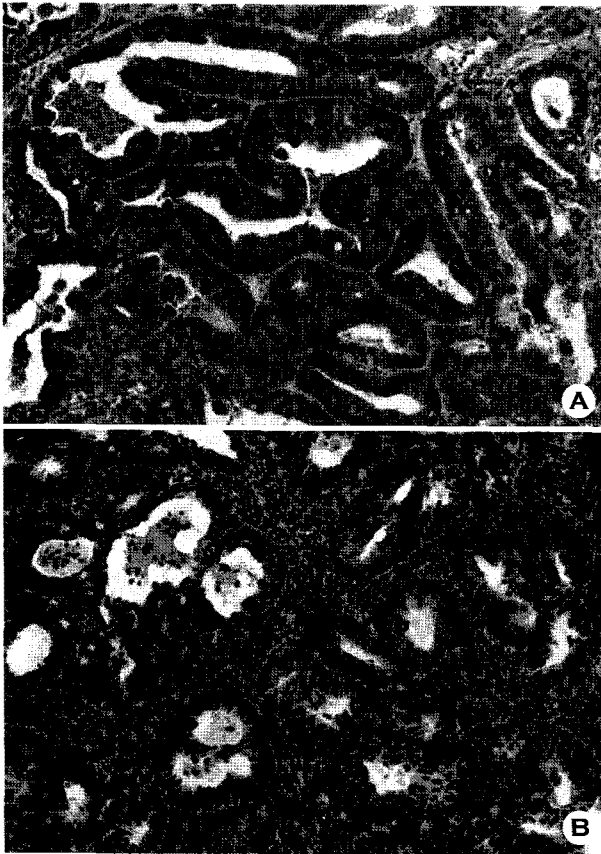


Fig. 1. Immunohistochemical findings of caspase 3 and p53 in endometrial cancer tissues. Caspase 3 showed a positive cytoplasmic immunoreactivity (A, $\times 100$), p53 showed a positive nuclear immunoreactivity (B, $\times 200$).

현 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다 ($P=0.193$) (Table 2).

고 찰

세포자멸사는 정상세포와 종양세포의 형태 발생, 면역 조절 및 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 세포자멸사가 억제되면 클론의 팽창과 이차적인 유전적 변화 및 악성 전환의 기회를 높임으로써 종양 발생이 일어난다고 알려져 있다. Caspase 3는 시스테인 단백질분해효소로서 세포자멸사 신호 전달에 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다. 즉, 사립체 막단백인 bcl-2가 사립체의 투과성을 변화시켜 cytochrome C와 세포자멸사 유발인자 (apoptosis inducing factor, AIF)의 분비를 막아 세포자멸사를 억제하게 되는데, 세포자멸사 유발인자가 분비되면 비활성화된 caspase 3를 활성화시켜 세포자멸사를 유발한다고 한다 (Kluck et al., 1997; Izban et al., 1999).

Table 2. Relationship between caspase 3 and p53 expressions in 22 endometrial cancers

Expression	Caspase 3		P
	Negative N=14 (%)	Positive N=8 (%)	
p53			0.193
Negative (N=7)	6 (42.9)	1 (12.5)	
Positive (N=15)	8 (57.1)	7 (87.5)	

Caspase 3가 세포사멸의 초기 단계에 직접적으로 작용한다고 밝혀지면서 여러 종양 발생 및 악성 종양의 등급이나 단계가 진행될수록 caspase 3의 발현이 증가 또는 감소한다고 보고되고 있으나 통일된 지견이 없는 실정이다. 전립선암에서는 전암성 병변보다 암종에서 caspase 3 단백질 발현이 높게 나타난다고 하였으나 (Montironi et al., 1995; Sohn et al., 2000), 위암종에서는 caspase 3 단백질 발현이 위선종보다 낮게 나타난다고 하였다 (Hoshi et al., 1997). 다른 연구에서도 고등급 상피내 종양에서의 caspase 3 단백질 발현이 침윤성 암종보다 상대적으로 증가한다고 하였으며 (Cha et al., 2008), 이는 본 연구 결과와 일치하였다. 본 연구에서도 caspase 3 단백질 발현은 전암성 병변인 자궁내막증식증에서 65.0%의 양성률을 보였고, 자궁내막암종에서는 36.4%의 양성률을 보여 침윤성 암종이 상대적으로 낮게 관찰되었다. 이는 전암성 병변에서는 악성 종양으로 형질전환이 일어나면서 부적절한 변이세포의 제거를 위해 caspase 3 합성이 증가하고 세포자멸사가 많아지기 때문이며, 악성으로 진행함에 따라 세포 증식을 극대화시키고 세포의 생존 능력을 증가시키기 위해 세포자멸사를 선택적으로 차단하기 때문으로 설명되어진다. 식도의 편평세포암종 (Hsia et al., 2003)이나 위의 샘암종 (Li et al., 2004)에서도 caspase 3 단백질 발현이 감소되고 결과적으로 세포자멸사가 억제되었다고 보고된 바 있다. 이는 자궁내막암종 발생에 있어서도 caspase 3 단백질 발현 감소가 임상적으로 의미가 있는 것으로 생각되나, caspase 3의 정확한 역할 규명을 위해서는 세포자멸사 지수 분석 및 환자의 생존 분석 등의 추가적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

p53 유전자는 종양억제유전자로서 DNA에 결합하여 DNA 합성, 세포 증식, 세포자멸사 등에 관여한다 (Chang et al., 1993). p53 단백질은 손상된 세포 DNA의 정상 복구 뿐 만 아니라 손상이 심한 경우에는 계획된 세포자멸사를 유도함으로써 변이세포의 반복적인 복제에 의한 종양 발생을 억제시키는 것으로 알려져 있다 (Haldar et al.,

1994). 또한 유방암 등 악성 종양에서 p53 단백질은 세포 자멸사와 역상호 작용이 있다고 보고되었다 (Chang et al., 1993; Haldar et al., 1994). 따라서 인체 종양에서 p53 조절 기능 상실로 인한 caspase 3 단백질 발현이 암의 발생 및 진행 과정에 영향을 미친다고 알려져 있다.

본 연구에서는 caspase 3 단백질 발현이 양성일 때 p53 단백질 발현이 양성인 경우가 87.5%로 caspase 3 단백질 발현이 양성일 때 p53 단백질 발현이 음성인 경우 12.5% 보다 상대적으로 높게 나타났으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 종양 발생 과정에서 p53 단백질 발현은 대부분의 경우 p53 유전자의 과오돌연변이로 생성된 돌연변이 p53 단백질이 정상 야생형 p53보다 안정한 상태로 있어서 세포 핵 내에 축적되어 면역조직화학 염색에서 양성을 보이게 된다. 그러나 면역조직화학 염색에 의해 검출된 p53 단백질이 반드시 유전자 돌연변이를 의미하는 것은 아니며, DNA 손상에 대한 반응으로 정상세포 내에 야생형 p53 단백질이 안정화되어 과발현을 보이는 경우도 있다 (Hall and Lane, 1994). 따라서 본 연구에서는 자궁내막암종에서 caspase 3 단백질 발현은 p53 단백질의 과발현과 관련이 있을 것으로 생각되나, 연구대상의 예가 너무 적고 면역조직화학 염색법에 의한 결과만으로 임상적 의의를 단언하기 어렵다. 향후 더 많은 예를 연구대상으로 하여 세포 자멸사와 관련한 다른 유전자들과의 추가적인 연구를 통해 종양 발생에서의 caspase 3 단백질 역할 및 p53 단백질과의 연관성을 규명해야 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996. 87: 171.
- Cha JY, Cho TI, Park TY, So JS, Choi SK, Park ES. Analysis of expression of survivin, caspase 3, and p53 protein in cervical neoplasia comparing with ki-67 index. *Korean J Gynecol Oncol*. 2008. 19: 17-25.
- Chang F, Syrjänen S, Kurvinen K, Syrjänen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 1993. 88: 174-186.
- Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1994. 54: 2095-2097.
- Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol*. 1994. 172: 1-4.
- Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Am J Pathol*. 1997. 151: 821-829.
- Hsia JY, Chen CY, Chen JT, Hsu CP, Shai SE, Yang SS, Chuang CY, Wang PY, Miaw J. Prognostic significance of caspase-3 expression in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2003. 29: 44-48.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997. 275: 1132-1136.
- Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998. 273: 9357-9360.
- 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: 1984-1988.
- Miraz A, McGuirk M, Hockenbery TN, Wu Q, Ashar H, Black S. Human surviving is negatively regulated by wild type p53 and participates in p53 dependant apoptotic pathway. *Oncogene* 2002. 21: 2613-2622.
- Montironi R, Galluzzi CM, Fabris G. Apoptotic bodies in prostate intra-epithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma following total androgen ablation. *Pathol Res Pract*. 1995. 191: 873-880.
- Izban KF, Wrone-Smith T, Hsi ED, Schnitzer B, Quevedo ME, Alkan S. Characterization of the interleukin-1 beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1999. 154: 1439-1447.
- Sohn JH, Kim DH, Choi NG, Park YE, Ro JY. Caspase-3/CPP32 immunoreactivity and its correlation with frequency of apoptotic bodies in human prostatic carcinomas and benign nodular hyperplasias. *Histopathology* 2000. 37: 555-560.
- Steven GS, Ronald AD. Principles and practice of surgical pathology and cytopathology. 3rd ed. Baltimore: Churchill Livingstone 1997. 2492-2494.
- Vakkala M, Pääkkö P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer*. 1999. 81: 592-599.