

## 비소세포폐암조직에서 XIAP 발현과 고사지수 및 수술 후 예후와의 관계

동의병원 내과<sup>1</sup>, 부산대학교 의과대학 병리학교실<sup>2</sup>, 부산대학교 의과대학 내과학교실<sup>3</sup>, 동아대학교 의과대학 해부학교실<sup>4</sup>  
김상현<sup>1</sup>, 이창훈<sup>2</sup>, 설미영<sup>2</sup>, 송진미<sup>2</sup>, 이종협<sup>1</sup>, 이민기<sup>3</sup>, 김종민<sup>4</sup>

### Relationship between Expression of XIAP Protein in Operable Non-small Cell Lung Carcinomas and Apoptosis Index and Postoperative Prognosis

Sang Hyun Kim, M.D.<sup>1</sup>, Chang Hun Lee, M.D.<sup>2</sup>, Mee Young Sol, M.D.<sup>2</sup>, Jin Mi Song, M.S.<sup>2</sup>, Jong Hyub Lee, M.D.<sup>1</sup>, Min Ki Lee, M.D.<sup>3</sup>, Jong Min Kim, M.D.<sup>4</sup>

Department of Internal Medicine, Dong Eui Hospital, Busan, Korea<sup>1</sup>, Department of Pathology<sup>2</sup>, Internal Medicine<sup>3</sup>, Pusan National University College of Medicine, Busan, Korea<sup>2</sup>, Department of Anatomy, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea<sup>4</sup>

**Background** : Dysregulation of apoptosis plays an important role in carcinogenesis, tumor progression, and resistance to chemotherapy. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is considered to be the most potent caspase inhibitor of all known IAP (inhibitor of apoptosis) family members. This study was designed to assess the pattern of expression and the prognostic value of XIAP in radically resected non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients.

**Method** : The expression of XIAP and its relationship with clinicopathologic parameters (patient age, TNM stage, TNM-pT, TNM-pN, histologic type, VEGF expression, microvessel density, PCNA index) and overall survival were analysed with formalin-fixed, paraffin-embedded blocks from eighty cases of NSCLC. In addition, the apoptotic index (AI) was also assessed.

**Results** : In a regard to histologic type, squamous cell carcinoma (SCC) showed XIAP expression in 91.3%(42/46) and adenocarcinoma (AC) in 61.8%(21/34). The difference was significant( $p=0.001$ ). There was no correlation between XIAP expression and other parameters. In the group of AC, XIAP expression showed the significant correlation with older age group  $\geq 58$  years and VEGF expression( $p=0.028$ ,  $p=0.014$ , respectively). The AI in the group with or without XIAP expression were  $2.5\pm 4.9\%$  and  $18.5\pm 28.9\%$ , respectively( $p=0.001$ ). Both groups just aforementioned showed no significant difference in median survival time (42.5 months, 29.8 months, respectively).

**Conclusion** : This study suggests that the XIAP expression in NSCLCs could have relation to inhibition of apoptosis, and show differential expression according to histologic type. However, its prognostic role during the progression of NSCLC needs to be further defined. (*Tuberc Respir Dis 2005; 58: 480-489*)

**Key words** : Carcinoma, Non-small cell lung; Inhibitor-of-apoptosis protein; Apoptosis

## 서 론

한국에서 폐암의 발생 빈도는 점점 증가하여 1999년 현재 전체 악성 양 중 2위를 차지하고 있고, 2000년 이후에는 암 사망률 1위를 차지하고 있다<sup>1</sup>. 이 중 비소세포 폐암중(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)은 전체 폐암의 약 80%를 차지하고 있다<sup>2</sup>. 많은 폐암환자들의 수술 후 경과를 매우 비관적인데, 이것은 부분

적으로 NSCLC의 높은 국소 재발율 및 원격전이의 발생과 관련이 있다. 그러나 불행히도 이러한 종양의 경과를 대개 예측이 쉽지 않으므로 종양의 분자생물학적 측면의 연구를 통해 예후를 추정하려는 시도가 계속적으로 이루어지고 있다<sup>3</sup>.

세포자멸사(apoptosis)는 정상적인 조직의 발생과 항정성의 조절에 중요한 생리학적 과정이다. 그러나 세포자멸사 과정에 관여하는 유전자에서 돌연변이가 발생하면 세포사의 장애가 초래되면서 종양의 발생과 진행, 전이 및 종양의 항암제 내성 등의 원인이 될 수 있다<sup>4</sup>. 세포자멸사의 분자적 경로는 진화적으로(evolutionarily) 잘 보존되어 있는데, caspases로 알려진 일련의 세포내 시스템 단백질의 활성을 촉진하거나 혹은 억제시키는 단백질에 의해 조절되고, caspase 활성은 inhibitor of apoptosis (IAP) 계열 단백질에 의해

Address for correspondence : **Chang Hun Lee, M.D.**  
Department of Pathology, Pusan National University  
College of medicine, 1-10, Ami-Dong, Seo-Gu,  
Busan, 602-739, Korea  
Phone : 051-240-7718 Fax : 051-256-1870  
E-mail : cnlee@pusan.ac.kr  
Received : Feb. 14, 2005  
Accepted : May. 4, 2005

억제된다. 현재까지 사람에서는 X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), human inhibitor of apoptosis protein-1 (HIAP-1), HIAP-2, survivin, neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), BRUCE, ILP-2 및 ML-IAO (livin) 등 총 8개의 IAP 단백질이 확인되고 있다<sup>56</sup>. 생체의 실험에서 IAP 단백질의 과발현을 보이는 종양세포는 여러 가지 항암제에 의해 유도되는 세포자멸사로부터 보호받을 수 있는 것으로 보고되고 있다<sup>56</sup>. IAPs 중 XIAP는 가장 강력한 caspase 억제성 단백질로서, 시발체인 caspase-9 뿐 아니라 작용체(effector)인 caspase-3 및 caspase-7을 억제할 수 있다<sup>7</sup>. 즉, XIAP는 CD95와 tumor necrosis factor (TNF) 수용기의 활성화, 항암제 및 자외선을 포함한 여러 가지 세포의 자극에 의해 유발되는 세포자멸사를 효과적으로 억제한다<sup>8</sup>.

IAP의 발현으로 세포자멸사가 억제되면 생체내에서 종양의 진행은 촉진될 것으로 보이며, 이러한 가정은 IAP 자체가 종양 연구에서 유용한 예후적 인자로 이용될 가능성을 제시한다. 특히 survivin은 폐암을 포함한 많은 인체 암들에서 연구되었는데, 이의 과발현은 불량한 임상경과와 관련성이 있다고 알려져 있다<sup>9,10</sup>. 이에 반해 XIAP는 고형 종양들에서 아직 광범위한 연구가 되어 있지 않은 상태이며, 예후적 인자로서 XIAP의 역할에 대해서는 아직 논란이 있다. 즉, 급성골수성백혈병에서 XIAP의 저발현은 유의하게 높은 생존 기간과 관련이 있지만<sup>11</sup>, 자궁경부 암종에서는 XIAP의 발현이 예후와 관련이 없다고 한다<sup>12</sup>. 더구나 NSCLC의 경우 환자의 전반적인 생존율에 대한 XIAP 발현의 영향에 대해서는 아직 상당한 논란이 있다<sup>13</sup>.

이에 본 연구는 수술이 가능했던 80예의 NSCLC를 대상으로 임상병리학적 여러 인자들과 관련하여 XIAP의 면역조직화학적 발현이 종양의 진행이나 환자의 생존율에 미치는 영향을 확인해 보고자 수행되었다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구는 부산대학교 병원에서 NSCLC로 진단받

고, 폐절제술 혹은 폐엽절제술을 실시 받은 80명의 폐암 환자들로 부터 얻어진 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직 블록을 이용하여 수행되었다. 임상병리학적 변수들로서 TNM 병기, 원발종양의 pT 상태(T1, T2, T3-4), 림프절 전이유무인 pN 상태(N0, N1-2), NSCLC의 조직학적 유형, 환자의 성별 및 연령에 관한 정보 등은 환자의 조직검사 보고서와 의무기록지를 참고하였다.

### 2. 연구 방법

각 증례에서 대표적인 파라핀 블록을 한 개씩 선택한 뒤 4  $\mu$ m 두께의 연속 절편을 각각 6장씩 잘라서 poly-L-lysine이 도포된 유리슬라이드에 부착시킨 후 hematoxylin-eosin 염색, XIAP, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), vascular endothelial growth factor (VEGF), CD34 항원에 대한 면역조직화학 염색, 그리고 apoptotic index (AI)를 위한 TUNEL 염색을 실시하였다.

#### 1) 면역조직화학 염색

각 증례의 파라핀 블록에서 얻어진 조직 절편은 10% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수과정을 거친 후 흐르는 물에서 10분간 수세시켰다. 목적 항원 단백질 중 PCNA와 VEGF의 경우 항원노출의 향상을 위해 전자렌지 (Samsung RE-400B, 700W)에서 5분간 끓인 10 mM/L citrate buffer (pH 6.0)가 담긴 용기에 조직절편을 넣은 후 전자렌지를 이용하여 마이크로파 조사를 5분간 두 차례 더 시켰다. 이후의 과정은 모든 항원 단백질에 대해서 동일한 절차를 거쳤다. 실온에서 냉각시킨 후 흐르는 물에서 충분히 10분간 수세시키고, 내인성 과산화수소의 억제를 위하여 0.3% 과산화수소수에 20분간 처리한 후 pH 7.6의 Tris buffered saline (TBS)으로 세척하였다. 일차 항체로서 XIAP는 산양 다클론성 항체(1:500 희석; Trevigen, Ave. Carlsbad, CA, USA), PCNA는 생쥐 단클론성 항체(PC10, 1:1,500 희석; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), VEGF는 생쥐 단클론성 항체(VFF-8, 1:100 희석; NeoMarkers,

Fremont, CA, USA), 그리고 CD34 항원은 생쥐 단클론성 항체(QBEnd/10, 1:50 희석; NeoMarkers, Fremont, CA, USA)를 사용하였다. 상기한 일차 항체들을 각각 조직 절편과 4°C에서 하루 밤 동안 반응시켰다. 이후의 면역조직화학 염색과정은 Histostain Plus kit, horseradish peroxidase (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA)를 사용하였고, 그 과정은 일반적인 면역조직화학 염색과정과 동일하였다. 면역염색 후 발색은 3-amino-9-ethyl-carbazole을, 대조염색은 Mayer 헤마톡실린을 사용하였다. Universal Mount (Dako, Carpinteria, CA, USA)로 1차 봉입하고, xylene으로 희석시킨(50:50) malinol로 2차 봉입한 뒤 광학현미경(Olympus BX, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

음성 대조군은 염색 때 일차 항체 대신 정상 면역혈청을 적용한 것을 제외하면, 전 과정에서 실험 예들과 동일하게 하였다. 양성 대조군으로 XIAP는 XIAP 양성인 신세포암종, VEGF는 VEGF 양성인 침윤성 유관 암종, PCNA의 경우 PCNA 양성 위암종 조직을 이용하였고, CD34 항원은 중앙주변의 정상 혈관내피세포를 내부 대조군(internal control)으로 하였다.

면역조직화학 염색의 판독은 XIAP와 VEGF의 경우 전자의 경우 중앙세포의 세포질 혹은 세포막에서, 후자의 경우는 세포질에서 적갈색의 염색 반응을 보일 때 양성으로 판정하였다. 염색강도(staining intensity)에 따른 점수는 음성인 경우는 "0", 약하게 염색된 경우는 "1", 중등도로 염색된 경우는 "2", 그리고 강하게 염색된 경우는 "3"으로 하였다. 염색범위(staining extent)는 중앙내에서 양성세포들이 출현하지 않는 경우는 "0", 중앙세포들의 1~25%가 양성반응을 보일 경우는 "1", 26~50%에서 양성반응을 보이는 경우는 "2", 그리고 51%이상에서 양성반응을 보이는 경우는 "3"으로 하였다. 염색강도와 염색범위의 점수 합계가 2점 이하인 경우는 음성으로, 3점 이상의 경우는 양성으로 판독하였다<sup>14</sup>. PCNA는 중앙세포의 핵에서 적갈색의 염색반응이 관찰될 때 양성세포로 인정하였다. 양성세포들이 출현하는 경우 양성반응이 가장 현저한 부위를 선별하여 400배 시야에서 중앙세포 1,000개를 계수한 후 양성세포들의 백분율을 구하여 PCNA 지수

를 결정하였다. CD34에 염색되는 미세혈관 수의 결정을 위해 광학현미경의 저배율 시야에서 염색밀도가 가장 높은 세 부위를 찾아서 각 부위로 부터 200배 시야에서 미세혈관 수를 세고, 세 부위에서 얻어진 수치의 평균을 미세혈관 수(microvessels/mm<sup>2</sup>)로 정하였다<sup>15</sup>. 미세혈관 수를 계산시 적혈구의 직경보다 8배이상의 직경을 가지거나 뚜렷한 근육층을 가지는 혈관은 제외하였다. 괴사, 심한 염증 및 경화가 관찰되는 부위는 수복반응으로 인한 이차적인 혈관 증식을 보일 수 있으므로 역시 제외하였다. 혈관 내강의 존재유무와는 상관없이 CD34에 양성인 단일 혈관 내피세포 혹은 내피세포의 집락은 한 개의 혈관으로 인정하였다.

## 2) TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL)

AI를 구하기 위해 ApopTaq<sup>®</sup> Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (CHEMICON International, CA, USA)를 사용하였다. 조직 절편을 10% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 함수시킨 후, 증류수로 수세하고 37°C 인산염완충액에 30분간 방치하였다. 20 µl/ml의 proteinase K 용액을 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 2분간 4회 수세하고 DNA nick end labelling 과정으로 50 µl TdT buffer II를 가한 후 10분간 실온에서 방치하였다. 여분의 용액을 제거하고, 50 µl의 TdT 용액을 가한 후 37°C에서 60분간 반응시켰다. 실온에서 TB 완충액 용기에 조직 절편을 15분간 둔 후 증류수로 수세하였다. 50 µl의 차단용액으로 10분간 실온에서 반응시킨 후 인산염완충액으로 5분씩 3회 수세하고 과산화효소가 결합된 streptavidin에 20분간 반응시켰다. 반응 후 인산염완충액으로 세척하고 diaminobenzidine으로 1분간 발색하였다. 증류수로 2분씩 3회 세척한 후 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색하고, xylene으로 희석시킨(50:50) malinol로 봉입한 뒤 400배의 광학현미경(Olympus BX, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

판독방법으로는 핵에 진하게 갈색으로 염색된 세포를 TUNEL 양성세포로 판정하였고, 1,000개의 중앙세포 중 양성세포의 백분율을 구하여 AI로 정하

였다.

### 3) 통계학적 분석

NSCLC의 전 예에서 임상병기, TNM-T 상태, TNM- N 상태, 그리고 종양의 조직학적 유형 등 임상병리학적 변수와 XIAP 발현의 상관관계는  $\chi^2$  검정 혹은 Fisher 정확 확률 검정을 이용하여 분석하였다. XIAP의 발현과 PCNA 지수 및 미세혈관 수의 관련성은 Student t 검정을, AI와 임상병리학적 인자들과의 관련성은 Spearman's correlation, 혹은 Kruskal Wallis 검정으로, 그리고 XIAP의 발현 정도에 따른 NSCLC 환자들의 생존율의 차이는 Kaplan-Meier 분석 후, log-rank 검정으로 유의성을 평가하였다.

통계분석은 컴퓨터용 통계 프로그램인 SPSS, version 10.0.7 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며, *p* 값은 0.05 미만인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 변수들의 분포는 평균± 표준편차로 표현하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자 군의 연령 및 병기별 분포

환자의 연령 분포는 27세에서 79세로서 평균 연령은 58.1세였고, 성별 분포는 남자가 66예(82.5%), 여자

가 14예(17.5%)였다. NSCLC 80예의 조직학적 유형은 편평세포암종(squamous cell carcinoma, SCC)이 46예(57.5%), 샘암종(adenocarcinoma, AC)이 34예(42.5%)였다. TNM 병기는 I기가 36예(45.0%), II기가 14예(17.5%), III기가 30예(37.5%)였다.

### 2. 비소세포폐암종에서 XIAP 발현 양상

XIAP의 발현 양상은 종양의 조직형에 상관없이 고분화(well differentiated) 암종들은 주로 종양세포의 세포막 양성 소견을, 중등도 혹은 저분화(moderately to poorly differentiated) 암종들은 주로 세포질 양성 소견의 경향을 보였다(Fig. 1A, 1B). 양성 예들에서는 종양의 조직형이나 분화도에 상관없이 양성 세포들이 종괴내에서 미관성으로 균일하게 (homogeneously) 분포하였다. 세기관지폐포암종의 소견을 국소적으로 보이는 일부 ACs의 경우 이들 부위의 대부분은 XIAP에 음성소견을 보였다.

비종양성 조직에서는 기관지 상피, 폐포 상피, 기관지 점액샘 세포 및 폐 대식구(alveolar macrophages)에서도 XIAP 양성 소견을 관찰할 수 있었으며, 폐 대식구를 제외한 비종양성 세포들에서 XIAP는 주로 강측(luminal) 세포질에 치우쳐서 발현되었다. 전체적으로 비종양성 조직에서 XIAP 염색성의 강도는 종양세포들과 비교할 때 약하게 관찰되었다.

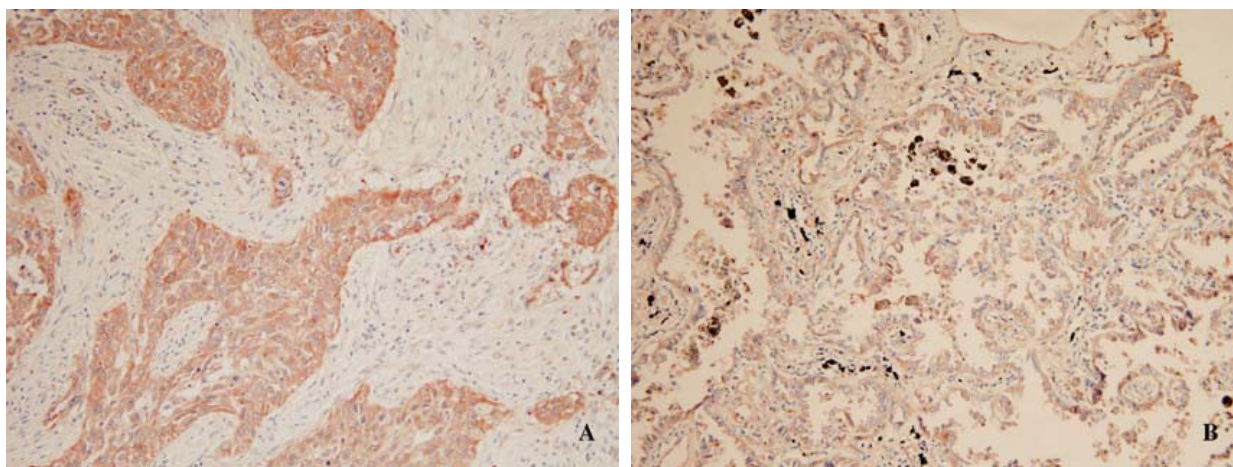


Figure 1. Diffuse cytoplasmic immunoreactivity for XIAP in a squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B) (Streptavidin-biotin method, x200).

3. 비소세포폐암종에서 XIAP 발현과 임상병리학적 인자들과의 관련성

NSCLCs에서 XIAP의 발현을 임상병리학적 인자들과 관련시켰을 때(Table 1), SCC는 46예 중 42예(91.3%)에서, AC는 34예 중 21예(61.8%)에서 양성을

보여 종양의 조직형별 비교시 SCC는 AC에 비해 유의하게 높은 XIAP의 발현을 보였다(p=0.001). VEGF 발현의 경우, VEGF 양성군이 57예 중 47예(82.5%), 음성군이 23예 중 16예(69.6%)에서 XIAP 양성을 보여 전자에서 높은 XIAP 발현을 보이지만, 통계학적으로 의미 있는 차이는 아니었다. MVD는 XIAP 양성

Table 1. Relationship between XIAP protein expression and the clinicopathological parameters in patients with non-small cell lung carcinoma

Variables	Factors	Total (No. cases)	XIAP protein		p value
			Negative	Positive	
Age (yr.)	≤57	35	10	25	0.158
	≥58	45	7	38	
Stage	I	36	7	29	0.333
	II	14	5	9	
	III	30	5	25	
pT factor	T1	11	1	10	0.349
	T2	46	12	34	
	T3-4	20	3	17	
pN factor	N0	43	8	35	0.597
	N1-2	34	8	26	
Histologic type	SCC	46	4	42	0.001
	AC	34	13	21	
VEGF	Negative	23	7	16	0.202
	Positive	57	10	47	
MVD (microvessels/mm <sup>2</sup> )			16.9±10.1	20.0±9.8	0.257
PCNA index (%)			47.7±25.3	51.4±21.3	0.543

SCC, squamous cell carcinoma; AC, adenocarcinoma; VEGF, vascular endothelial growth factor; MVD, microvessel density; PCNA, proliferating cell nuclear antigen ; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis.

Table 2. Relationship between XIAP protein expression and the clinicopathological parameters in patients with adenocarcinoma

Variables	Factors	Total (No. cases)	XIAP protein		p value
			Negative	Positive	
Age (yr.)	≤57	13	8	5	0.028
	≥58	21	5	16	
Stage	I	17	5	12	0.444
	II	5	3	2	
	III	12	5	7	
pT factor	T1	6	1	5	0.378
	T2	19	9	10	
	T3-4	9	3	6	
pN factor	N0	22	7	15	0.297
	N1-2	12	6	6	
VEGF	Negative	8	6	2	0.014
	Positive	26	7	19	
MVD (microvessels/mm <sup>2</sup> )			15.1±10.2	16.8±10.0	0.625
PCNA index (%)			44.6±25.4	45.1±20.8	0.946

VEGF, vascular endothelial growth factor; MVD, microvessel density; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis.



군이  $20.0 \pm 9.8$  microvessels/mm<sup>2</sup>, XIAP 음성군이  $16.9 \pm 10.1$  microvessels/mm<sup>2</sup>였고, PCNA 지수는 XIAP 양성군이  $51.4 \pm 21.3\%$ , XIAP 음성군이  $47.7 \pm 25.3\%$ 로서 XIAP 양성 군에서 음성군에 비해 MVD와 PCNA 지수가 다소 높았지만, 역시 유의한 차이를 보이지는 않았다( $p=0.202$ ,  $p=0.257$ ,  $p=0.543$ , respectively). 그 밖에 환자의 연령, 임상병기, TNM pT 인자 그리고 TNM pN 인자들도 XIAP 발현과 상관관계를 보이지 않았다.

4. 폐의 샘암종에서 XIAP 발현과 임상병리학적 인자들과의 관련성

NSCLCs 중 AC에서 XIAP의 발현을 임상병리학적 인자들과 관련시켰을 때(Table 2), 환자의 연령군은 57세 이하인 군이 13예 중 5예(38.5%), 58세 이상인 군이 21예 중 16예(76.2%)에서 양성을, VEGF 양성군은 26예 중 19예(73.1%), VEGF 음성군은 8예 중 2예(25.0%)에서 양성을 보여, AC에서 환자의 고 연령군과 VEGF 양성군은 XIAP의 발현과 유의한 상관관계를 보였다( $p=0.028$ ,  $p=0.014$ , respectively). 그러나 다른 인자들은 XIAP의 발현과 상관관계를 보이지 않았다( $p>0.05$ ).

NSCLCs 중 SCC에서 XIAP의 발현은 모든 임상병리학적 인자들과 관련성을 보이지 않았다( $p>0.05$ ).

5. 비소세포암종에서 AI와 임상병리학적 인자들과의 관련성

80예의 NSCLCs 중 52예 (SCC 39예, AC 13예)에서 AI를 구하기 위한 TUNEL 염색이 실시되었다(Fig. 2A, 2B). 검사된 52예 중 XIAP 양성군은 AI가  $2.5 \pm 4.9\%$ , XIAP 음성군은 AI가  $18.5 \pm 28.9\%$ 로서 후자에서 AI가 유의하게 높은 수치를 보였다( $p=0.001$ ). 조직형에 따른 AI는 SCC가  $4.0 \pm 11.4\%$ , AC가  $7.7 \pm 17.1\%$ 였고, VEGF의 발현에 따른 AI는 VEGF 양성인 38예가  $4.4 \pm 11.0\%$ , 음성인 14예가  $6.6 \pm 17.7\%$ 로서 조직형과 VEGF의 발현에 따른 AI는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 다른 임상병리학적 인자들과 AI도 상관관계를 보이지 않았다( $p>0.05$ )(Table 3). PCNA 지수 역시 AI와 상관관계를 보이지 않았다 ( $r=-0.168$ ,  $p=0.234$ )

6. 비소세포암종에서 XIAP의 발현에 따른 생존율의 비교

술 후 생존 여부의 확인이 가능했던 72예 중 XIAP 양성군은 56예, 음성은 16예였다. XIAP 음성군에서 관찰 기간은 6개월에서 61개월까지로 사망은 12예에서 발생하였고, 중앙 생존기간(median survival time)은 29.8개월이었다. XIAP 양성군에서 관찰 기간은 1개월

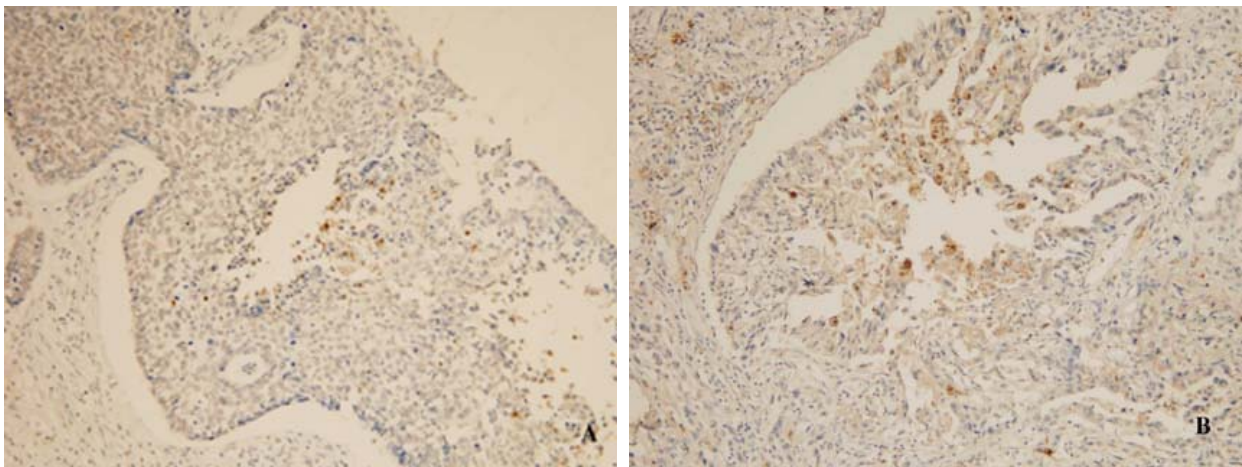


Figure 2. Scattered apoptotic cells noted around the necrotic areas of the squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B) (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling, x200).

Table 3. Relationship between the apoptotic index and the clinicopathological parameters in patients with non-small cell lung carcinoma

Variables	Factors	Total (No. cases)	Apoptotic index (%)	p value
Age (yr.)	≤57	25	2.7± 6.0	0.305
	≥58	31	6.5±16.0	
Stage	I	21	6.2±15.3	0.864
	II	9	2.9± 4.5	
	III	22	5.0±13.9	
pT factor	T1	5	2.2± 3.8	0.262
	T2	30	4.9±13.0	
	T3-4	15	6.4±16.0	
pN factor	N0	25	7.4±17.7	0.226
	N1-2	25	2.8± 5.7	
Histologic type	SCC	39	4.0±11.4	0.387
	AC	13	7.7±17.1	
XIAP	Negative	8	18.5±28.9	0.001
	Positive	44	2.5± 4.9	
VEGF	Negative	14	6.6±17.7	0.590
	Positive	38	4.4±11.0	

SCC, squamous cell carcinoma; AC, adenocarcinoma; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis; VEGF, vascular endothelial growth factor.

에서 132개월로 이 중 사망은 38예에서 발생하였고, 중앙 생존기간은 42.5개월이었다. XIAP 양성군에서 술 후 생존 기간은 더 길었지만, 통계학적 차이를 보

이지는 않았다( $p=0.085$ )(Fig.3).

### 고 찰

세포 증식과 세포자멸사를 조절하는 인자들간 균형의 상실은 발암과정의 중요한 특징이다. 세포자멸사의 조절 인자들 중 대표적인 IAP 단백질의 구조적 특징은 caspase (주로 작용체인 caspases 3과 7)의 억제시 필수적인, 고도로 보존된 baculoviral inhibitory repeat (BIR) domains을 가지는 것이다<sup>16</sup>. Caspase의 억제 효과 외에도 HIAP-1과 XIAP와 같은 IAP 단백질은 nuclear factor (NF)-κB 활성 인자로서, NF-κB에 의해 매개되는 세포 생존을 촉진시키는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>. 이러한 항 세포자멸 기능에 비추어볼 때 IAP 단백질은 암세포에서 흔히 관찰되는 비정상적으로 증가된 세포수명이나, 암의 항암제 내성과 관련된 1차적인 요인으로 여겨진다. IAP 단백질들 중 survivin은 세포자멸사의 효과적인 억제자로서, 여러 가지 종양들에서 독립적인 예후 표지기로 소개되고 있다<sup>18,19</sup>. 그러나 또 다른 IAP계 단백질인 XIAP의 경우 생체의 실험에서는 가장

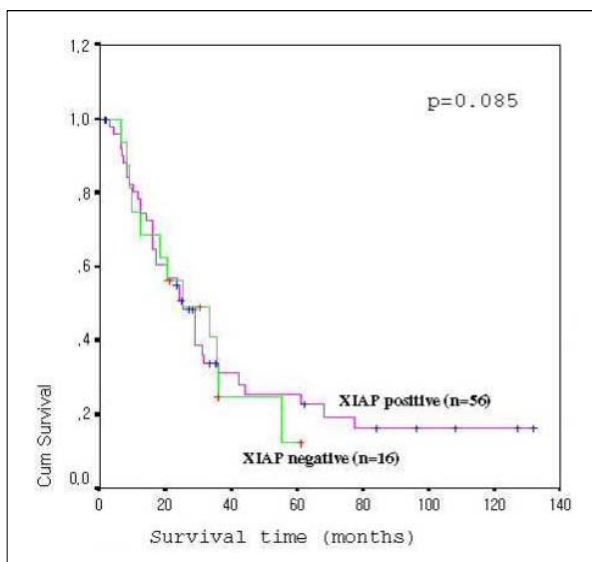


Figure 3. Survival curves of 72 non-small cell lung carcinoma patients with positive (n=56) and negative (n=16) XIAP expression.

강력한 caspase 억제자들 중의 하나로 밝혀져 있지만<sup>7,8</sup>, survivin과 같은 다른 IAP 단백질과 달리 고형 종양의 생체 조직에서는 아직 그 역할이 충분히 연구되어 있지 않다<sup>3-9,10</sup>. 이에 저자는 NSCLC 환자의 암 조직에서 XIAP의 발현과 그 예후적 가치를 평가하여 보고자 본 연구를 수행하였다.

본 연구에서 NSCLC의 임상병리학적 변수들 중 종양의 조직형에 대해서만 XIAP의 발현은 유의한 차이를 보였다. 즉 SCC는 91.3%(42/46)에서, AC는 61.8%(21/34)에서 XIAP 단백질에 대해 양성을 보여 종양의 조직형별 비교시 SCC는 AC에 비해 유의하게 높은 XIAP의 발현을 보였다. 이러한 소견은 SCC와 AC가 폐내 발생 부위와 형태학적 소견의 차이 뿐 아니라, 발암과정의 세포유전학적 성격도 분명한 차이를 보인다는 것을 암시하고 있다. 전체적으로 XIAP 양성군이 음성군에 비해 VEGF 발현, MVD 및 PCNA 지수가 다소 높았지만, 통계학으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 충실성 종양에서 불량한 예후의 지표가 되는 것으로 알려진 종양증식지수인 PCNA, VEGF 그리고 MVD 등이 XIAP 단백질의 발현과 관련성을 보이지 않은 것은 XIAP에 의해 매개되는 항 세포자멸 효과가 NSCLC의 경우에는 종양의 진행 혹은 예후에 크게 영향을 주지 않는 것 같다. 이 것은 발암 과정에서 세포 증식과 세포사의 균형 상실로 초래될 종양 성장의 기전 자체가 매우 복잡 다양하다는 것을 암시하는 소견일 수 있다. 본 연구에서 검토된 임상적 변수들, 즉 TNM 병기, TNM-pT 상태 및 TNM-pN 상태가 XIAP 발현과 역시 유의한 상관성을 보이지 않은 것도 이와 부합되는 소견이다. Hofmann 등<sup>20</sup>도 제한된 증례를 대상으로 했지만, NSCLC에서 XIAP 발현의 임상적 의의에 관해서 저자와 비슷한 성적을 보고한 바 있다.

NSCLC 중 AC에서 XIAP 발현은 검토된 임상병리학적 인자들 중 고 연령군과 VEGF 양성군에서 양의 상관관계를 보였다. 고 연령군에서 XIAP 발현이 높은 것을 본 연구에서 설명하기는 힘들었으며, 향후 더 많은 증례들을 대상으로 한 추가적인 실험에서 통계학적 재검증이 필요할 것으로 생각된다. 종양세포는 숙주의 맥관계로부터 신생혈관 형성을 유도하는 혈관

형성 인자(angiogenic factor)를 분비할 수 있으며, 대표적인 혈관형성 인자인 VEGF는 종양의 신생혈관형성 혹은 MVD와 원격 전이에 영향을 줄 수 있다<sup>21,22</sup>. 폐의 AC는 전통적으로 전이 경향이 매우 높은 예후가 불량한 종양으로 알려져 있는데<sup>23</sup>, 전체 NSCLC에서와 달리 AC군내에서만 XIAP와 VEGF의 발현이 유의한 상관관계를 보인 것은 이러한 견해에 부합하는 소견일 수 있다.

본 연구에서 XIAP의 발현이 AI와 음(negative)의 상관관계를 보인 것은 다른 연구자들<sup>7,8</sup>에 의해 체외 실험에서 이미 밝혀진 것처럼 XIAP의 강력한 항 세포자멸 활성화와 부합하는 것으로 보인다. 하지만, Ferreira 등<sup>13</sup>은 NSCLC 환자의 수술 검체를 대상으로 한 연구에서 XIAP는 AI와 관련성을 보이지 않는다고 하였다. 그들은 TUNEL 기법을 사용하지 않고, 단순히 hematoxylin eosin 염색에서 형태학적 소견에 근거하여 AI를 구하였는데, 이러한 실험기법의 차이가 본 연구의 성적과 차이를 보인 이유가 될 수도 있을 것이다. 그렇지만 본 연구에서 AI는 NSCLC의 다른 임상병리학적 인자들과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 세포자멸사와 예후의 상관관계는 NSCLC를 포함한 여러 종양에서 다양하게 보고되고 있다<sup>24,25</sup>. 이러한 다양성에 대해 Tanaka 등<sup>25</sup>은 대부분의 연구들이 세포자멸사에만 초점을 맞춘 나머지, 종양 성장이 세포사와 증식의 총체적 결과로 이루어진다는 사실을 간과하였기 때문일 것이라고 생각하였다. 그러나 다른 한편으로 본 연구에 이용된 증례들의 수가 비교적 적은 점을 고려할 때 AI의 예후적 의의에 대한 결론은 보다 신중할 필요가 있다고 생각된다.

XIAP의 발현 유무에 따른 환자의 생존율은 XIAP 양성군의 중앙 생존기간이 42.5개월, 음성군의 중앙 생존기간이 29.8개월로서 유의한 차이는 아니지만, XIAP 양성군에서 술후 생존기간이 더 길었다. Ferreira 등<sup>13</sup>은 XIAP의 고 발현군이 생존율이 유의하게 높았고, 이러한 사실로 미루어 XIAP가 독립적인 예후인자로서 가치를 가진다고 하였다. 하지만 급성 골수성 백혈병의 경우 XIAP의 고 발현은 오히려 생존율의 저하와 관련 있으며<sup>11</sup>, 자궁경부 암종에서 XIAP의 발현은 예후와 관련이 없다고 한다<sup>12</sup>. 이처럼 다양한 연구



결과는 caspase 억제 기능과 관련하여 체외 실험에서 원래 제안되었던 것보다 체내 조직에서 XIAP는 훨씬 더 복잡한 역할을 수행하기 때문일 것이다. XIAP가 NF- $\kappa$ B 경로의 긍정적(positive) 조절을 통해 환경적 자극에 대한 세포 반응의 조절에 관여하는 것을 그 예로 들 수 있으며, 또한 XIAP는 암의 종류에 따라 그 역할이 상이할 수 있다는 것을 암시하는 것일 수 있다.

이상과 같은 본 연구 성적은 체외 실험의 결과와 달리 생체 조직에서 XIAP의 생물학적 기능은 매우 복잡할 수 있다는 것을 암시하며, 따라서 향후 이의 생물학적 역할과 관련 물질들에 대한 연구가 좀더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 요 약

#### 연구 배경 :

세포자멸사의 장애는 발암, 암의 진행, 화학치료시 내성 등에 중요한 역할을 한다. XIAP는 IAP군 중에 가장 강력한 caspase 억제제로 알려져 있다. 본 연구는 비소세포폐암에서 XIAP의 면역조직화학적 발현이 종양진행이 환자생존율에 미치는 영향을 확인해 보고자 시행되었다.

#### 방 법 :

수술적 절제가 시행된 80예의 비소세포 폐암종의 조직에서 XIAP의 면역 조직학적 발현을 조사하여 임상병리학적 인자들[환자의 연령, TNM 병기, TNM-pT, TNM-pN, VEGF, microvessel density(MVD), PCNA index, apoptotic index (AI)]과 생존율과의 연관관 분석하였다.

#### 결 과 :

편평세포암종 46예 중 42예(91.3%)에서, 샘암종 34예 중 21예(61.8%)에서 양성을 보여 종양의 조직형별 비교시 편평세포암종은 샘암종에 비해 유의하게 높은 XIAP의 발현을 보였다( $p=0.001$ ). 각 조직형내에서 비교시 샘암종의 경우 XIAP는 58세이상의 고 연령군 및 VEGF의 발현과 유의한 상관관계를 보였지만( $p=0.028$ ,  $p=0.014$ , respectively) 편평세포암종의 경우 XIAP는 모든 임상병리학적 인자들과 상관관계를 보이지 않았다. TUNEL 염색으로 결정된 AI는 XIAP

양성군이  $2.5\pm 4.9\%$ , XIAP 음성군이  $18.5\pm 28.9\%$ 로서 후자에서 유의하게 높은 수치를 보였다( $p=0.001$ ). AI는 XIAP를 제외한 다른 임상병리학적 인자들과는 상관관계를 보이지 않았다. 생존 여부의 확인이 가능했던 72예에서 XIAP 양성군의 중앙 생존기간은 29.89개월, XIAP 양성군의 중앙 생존기간은 42.5개월로서, 후자에서 술 후 생존 기간은 더 길었지만 통계학적 차이를 보이지는 않았다.

#### 결 론 :

비소세포폐암종에서 XIAP는 종양의 조직형, 특히 편평세포암종에서 높은 발현과, 종양의 AI와 역의 상관관계를 보였다. 그러나 XIAP의 발현이 임상병리학적 예후인자들 및 생존율과 유의한 관련성을 보이지 않은 것은 생체 조직에서 XIAP의 생물학적 역할은 매우 복잡할 수 있다는 것을 암시하므로 향후 이의 생물학적 역할과 관련 물질들에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Kim HK. Lung cancer in Korea. *Cancer Res Treat* 2002;34:1-2.
2. Lee CT. Epidemiology of lung cancer in Korea. *Cancer Res Treat* 2002;34:3-5.
3. Poleri C, Morero JL, Nieva B, Vazquez MF, Rodriguez C, de Titto E, et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma. *Chest* 2003;123:1858-67.
4. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-95.
5. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941-53.
6. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:401-10.
7. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999;18: 5242-51.
8. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome C. *Mol Cell Biol* 1998;18:608-15.
9. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in

- human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152:43-9.
10. Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA is a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-4.
  11. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000;6:1796-803.
  12. Liu SS, Tsang BK, Cheung AN, Xue WC, Cheng DK, Ng TY, et al. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 2001; 37:1104-10.
  13. Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, Ludwig I, Smit EF, Kruyt FA, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2001;7:2468-74.
  14. Mattern J, Koomägi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73:931-4.
  15. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324: 1-8.
  16. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, van Dongen JL, Gilfillan MC, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996;15: 2685-94.
  17. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. Anatomy of TRAF2: distinct domains for nuclear factor- $\kappa$ B activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* 1996;271:19935-42.
  18. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-4.
  19. Kappler M, Köhler T, Kampf C, Diestelkötter P, Wurl P, Schmitz M, et al. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 2001;95:360-3.
  20. Hofmann HS, Simm A, Hammer A, Silber RE, Bartling B. Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:554-60.
  21. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-84.
  22. Duarte IG, Bufkin BL, Pennington MF, Gal AA, Cohen C, Kosinski AS, et al. Angiogenesis as a predictor of survival after surgical resection for stage non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:652-8.
  23. Teppo L, Salminen E, Pukkala E. Risk of a new primary cancer among patients with lung cancer of different histological types. *Eur J Cancer* 2001;37: 613-9.
  24. Komaki R, Fujii T, Perkins P, Ro JY, Allen PK, Mason KA, et al. Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 nonsmall cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36:601-5.
  25. Tanaka F, Kawano Y, Li M, Takata T, Miyahara R, Yanagihara K, et al. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2728-36.