

타액선 종양의 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자 발현

인제대학교 의과대학 부산백병원 외과학교실,* 병리학교실**

윤혜경** · 강미선** · 이재우** · 김상효*

= Abstract =

Apoptosis and Expressions of Apoptosis-Related Factors in Salivary Gland Tumors

Hye Kyoung Yoon, M.D.,** Mi-Seon Kang, M.D.,**

Jae-Woo Yi, M.D.,** Sang-Hyo Kim, M.D.*

Departments of Surgery* and Pathology,** Pusan Paik Hospital, Inje University, Busan, Korea

Objectives : The salivary gland tumor shows heterogeneity in histologic patterns and biological behavior. The aim of this study is to elucidate the relationships between apoptosis and expressions of apoptosis-related factors (bcl-2, bax, M30), p53 and MIB-1 in the salivary gland tumors.

Methods : Immunohistochemical stains for apoptosis-related factors, p53 and MIB-1 and TUNEL study for apoptosis were performed in 46 cases of salivary gland tumors (12 benign and 34 malignant).

Results : Twenty (43.5%) of 46 cases showed positive reaction for apoptosis, and the expression rates of bcl-2, bax, M30, p53 and MIB-1 were 85.3%, 68.8%, 65.9%, 39.1% and 26.1%, respectively. A significant difference between benign and malignant tumors was only noted in MIB-1 expression ($p=0.0167$). In malignant tumors, apoptosis showed no significant relationships to expressions of apoptosis-related factors. There were inverse relationships between p53 and bcl-2 expression ($p=0.0375$), and between M30 and MIB-1 expressions ($p=0.0379$). No significant differences of apoptosis, bcl-2, bax, M30, p53 and MIB-1 expression rates according to the tumor size, lymph node status, recurrence and survival were found.

Conclusion : In the development of benign and malignant salivary gland tumors, apoptosis might be associated, however, apoptosis and expressions of apoptosis-related factors seemed to be not reliable prognostic factors in malignant salivary gland tumors.

KEY WORDS : Apoptosis · bcl-2 · bax · M30 · p53 · MIB-1 · Salivary gland.

서 론

대부분의 종양에서 세포의 증식과 함께 세포자멸사가 증가되어 있다¹⁻²⁾. 세포자멸사는 유전적으로 결정되는 세포사의 한 기전으로 정상 생리과정이나 병적인 과정에서 나타나며, bcl-2, bcl-2 연관유전자, p53, Rb, c-myc 등에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다¹⁻⁴⁾.

bcl-2 family는 세포자멸사를 억제하거나 촉진하는 조절 유전자군으로 bax, bcl-xL, bcl-xS, mcl-1, bad, bak 등이 포함되어 있다¹⁻⁴⁾. bcl-2는 미토콘드리아에서 세포질로 치토 크롬 c 혹은 세포자멸사 유도인자가 방출되는 것을 억제하여, 발암과정에서 세포의 수명을 연장시키고 세포의 자연사를 억제하며⁴⁾ 다른 유전자 변이의 기회를 증가시켜 종양 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 반면 bax는 세포자멸사를 촉진시키는 인자로서 세포자멸사 과정의 조절에 관여한다. M30은 사이토케라틴 18 분해 산물과 반응하는 물질로서 인체 타액선 조직에서 세포자멸사를 시사하는 표지자로 보고된 바 있다⁶⁾.

p53 돌연변이에 의한 p53 발현은 악성 종양 발생 과정에

교신저자 : 윤혜경, 614-735 부산광역시 부산진구 개금동 633-165 인제대학교 의과대학 부산백병원 병리학교실
전화 : (051) 890-6628 · 전송 : (051) 891-1834
E-mail : pathyoo3@inje.ac.kr

있어서 흔히 동반하며, p53 유전자 변이에 따른 세포 증식능의 증가는 종양의 생물학적 악성도와 연관이 있어 각종 종양의 예후 인자로 이용된다. 또한 p53은 DNA에 결합하여 DNA의 수복 및 합성, 세포분화 뿐만 아니라 bcl-2 발현을 억제하고, bax 발현을 증가시켜 직접적으로 세포자멸사 과정에 관여한다고 알려져 있다⁷⁾. Ki-67 항원은 세포주기의 G₀기를 제외한 모든 세포의 핵 내에 존재하며⁸⁾ Ki-67 항원을 인지하는 MIB-1은 타액선 종양의 분화도나 환자의 생존율과 연관성이 깊은 표지자로 알려져 있다⁹⁾.

타액선 종양에서 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자들의 연관성 및 이들 인자와 예후와의 연관성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 타액선 종양에서 bcl-2 발현은 양성 및 악성 종양 모두에서 나타나므로 타액선 종양 발달에 bcl-2가 관여할 것이라고 보고되어 있다¹⁰⁾. Pammer 등¹¹⁾은 정상 타액선 조직의 도관 구성 상피 중 기저세포는 bcl-2 양성이고, 샘파리세포, 근상피세포, 내강세포 등은 bcl-2 음성 반응을 보이므로 기저세포로 분화를 보이는 타액선 종양은 bcl-2 양성을 보인다고 하였다. Soini 등¹²⁾은 양성 타액선 종양에 비해 악성 종양에서 세포자멸사가 높았으며, 악성일 때 세포자멸사가 증가하는 것은 bcl-2 발현 억제와 관련이 있으며, bax 발현과는 연관성이 없다고 보고하였다. Xin 등¹³⁾은 Ki-67이 양성 및 악성 다형성선종에서 발현의 차이를 보이므로 유의있는 표지자로 생각되지만, p53과 E-cadherin 발현은 도움이 되지 않았다고 하였다. Yin 등⁹⁾은 점액상피양 암종에서 bcl-2, p53, 세포자멸사, Ki-67 발현이 유용한 예후인자라고 하였고, 기저세포선종과 기저세포암종의 감별에 p53, bcl-2, EGFR 등이 유용하다고 보고하였다¹⁴⁾.

이에 본 연구는 양성 및 악성 타액선 종양 조직에서 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자인 bcl-2, bax, M30, p53 발현과 종양 증식능 표지자인 MIB-1 발현을 조사하여 타액선 종양 조직에서 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자의 발현, 표지자간의 상호연관성, 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자와 예후인자와의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1993년 1월부터 2002년 12월까지 부산백병원 병리과에서 진단된 타액선 종양 증례 중 병리조직학적 재검색 및 병력지 검토가 가능한 악성 종양 34예를 택하였다. 악성 종양은 악성 다형성선종 9예, 점액상피양 암종 10예, 선양낭성암종 9예, 샘파리세포암종 3예, 기타 상피근상피성 암종, 편평상피암종, 유두상 낭성암종 각 1예로 구성되어 있다. 양성 타액선 종양은 최근 병리과 파일에서 12예를 선택하였

는데, 다형성선종 5예, 기저세포 선종 4예, Warthin 종양 3예로 구성되었다. 총 46예의 타액선 종양 환자 중 남자는 23명, 여자는 21명이었고, 50세 이상이 23예, 50세 미만은 23예이었다. 종양의 크기가 2cm 미만인 경우는 13예, 2cm 이상은 33예이었다. 림프절 절제는 20예에서 실시되었고, 그 중 6예에서 전이가 관찰되었다. 환자의 나이, 성별, 발생 부위, 위치, 종양의 크기, 림프절 전이 유무를 기록하였으며, 생존 및 재발 여부는 병력지 및 의무기록실을 통하여 확인하였는데, 환자의 추적기간은 첫 조직학적 진단 이후 2004년 4월까지 최단 34개월, 최장 111개월이었다.

1. 면역조직화학검사 및 TUNEL법

증례의 파라핀 블록에서 연속적으로 4~5 μ 두께의 10개 이상의 조직절편을 얻어 organic silane이 처리된 슬라이드에 부착시키고 탈파라핀 과정과 함유과정을 거친 후 0.01M citrate buffer (pH 6.0)에 슬라이드를 담구어 microwave oven을 이용하여 10분간 가열한 후 실온에서 서서히 식혔다. 내인성 peroxidase의 작용 방지를 위해 5% 과산화수소수를 이용하여 10분간 처리한 후 수세하였다. 그 후 일차항체를 처리한 후 실온에서 1시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시켰는데, 사용한 일차항체와 희석배수는 bcl-2 (DAKO, Glostrup, Denmark)는 1 : 50, bax (Zymed, South San Francisco, US)는 1 : 60, M30 (Roche, Mannheim, Germany)은 1 : 150, p53 (DO-7, DAKO, Glostrup, Denmark)은 1 : 50, MIB-1 (Zymed, South San Francisco, US)은 1 : 100이었다. 이후 과정은 EnVision kit (DAKO, Carpinteria, US)를 이용하여 실온에서 30분간 반응시켰으며, 발색은 diaminobenzidine (DAB) 혹은 AEC (acetyl ethyl carbazole)를 이용하여 5~10분간 두었으며, Mayer hematoxylin으로 대조염색하여 검경하였다.

세포자멸사를 관찰하기 위하여 MEBSTAIN apoptosis kit II (Immunotech, France)를 이용하여 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method (TUNEL)를 시행하였다. 과정을 간단히 기술하면 박절한 조직을 xylene 과 알코올로 탈파라핀 및 함유과정을 거친 후 37 $^{\circ}$ C로 가열한 PBS에 30분간 담군 다음 proteinase K (20um/ml)를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리한 후 증류수로 수세하고 TdT 효소와 실온에서 5분 내지 10분간 반응시킨 후 TdT를 떨어뜨려 플라스틱 덮개를 덮어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. TBS에 담아 실온에서 15분간 두었다가 증류수로 수세한 다음 blocking solution을 실온에서 10분간 반응시킨 후 peroxidase-conjugated streptavidine을 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 수세하였다. AEC로 10~20분간 실온에서 발색시켰으며, 대조염색은 Mayer's hematoxyline으로 하였고 crystal mount를 사용하여 봉입하였다.

세포자멸사는 전혀 발현을 보이지 않으면 음성, 광학현미경 400배 시야에서 핵에서 발현을 보이는 세포가 쉽게 관찰되면 양성으로 구분하였으며, 표지자수는 산정하지 않았다. bcl-2, bax, M30 면역염색은 세포질에 발현을 보이는 세포가 5% 이상일 때, p53과 MIB-1에 대한 면역염색은 종양세포의 핵에 적갈색으로 염색된 세포가 5% 이상일 때 양성으로 판독하였다.

2. 통계학적 분석

세포자멸사 정도 및 bcl-2, bax, M30, p53과 MIB-1 발현은 SPSS를 이용하여 chi-square와 Fisher's exact probability test로서 분석하였다.

타액선 종양의 악성도 및 유형, 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 생존 및 재발 유무에 따른 세포자멸사, bcl-2, bax, M30, p53과 MIB-1 발현 정도의 차이를

조사하였다. 세포자멸사에 관여하는 표지자인 bcl-2, bax, M30 발현 정도와 세포자멸사의 연관성, p53 및 MIB-1 발현과 세포자멸사에 관여하는 표지자인 bcl-2, bax, M30 발현과 세포자멸사 간의 상관관계를 조사하였으며, p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의의가 있다고 판정하였다.

결 과

1. 타액선 종양의 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자 발현

전체 46예 중 28예(60.7%)에서 정상 타액선 조직이 관찰되었는데, 세포자멸사는 도관세포의 핵에서 자주 관찰되었고, 샘파리세포에서는 음성이었다. bcl-2, bax, M30 발현은 도관세포에서는 관찰되지 않았으나 샘파리세포의 세포질에서 과립상으로 발현을 보였다. 그러나 정상 타액선 조

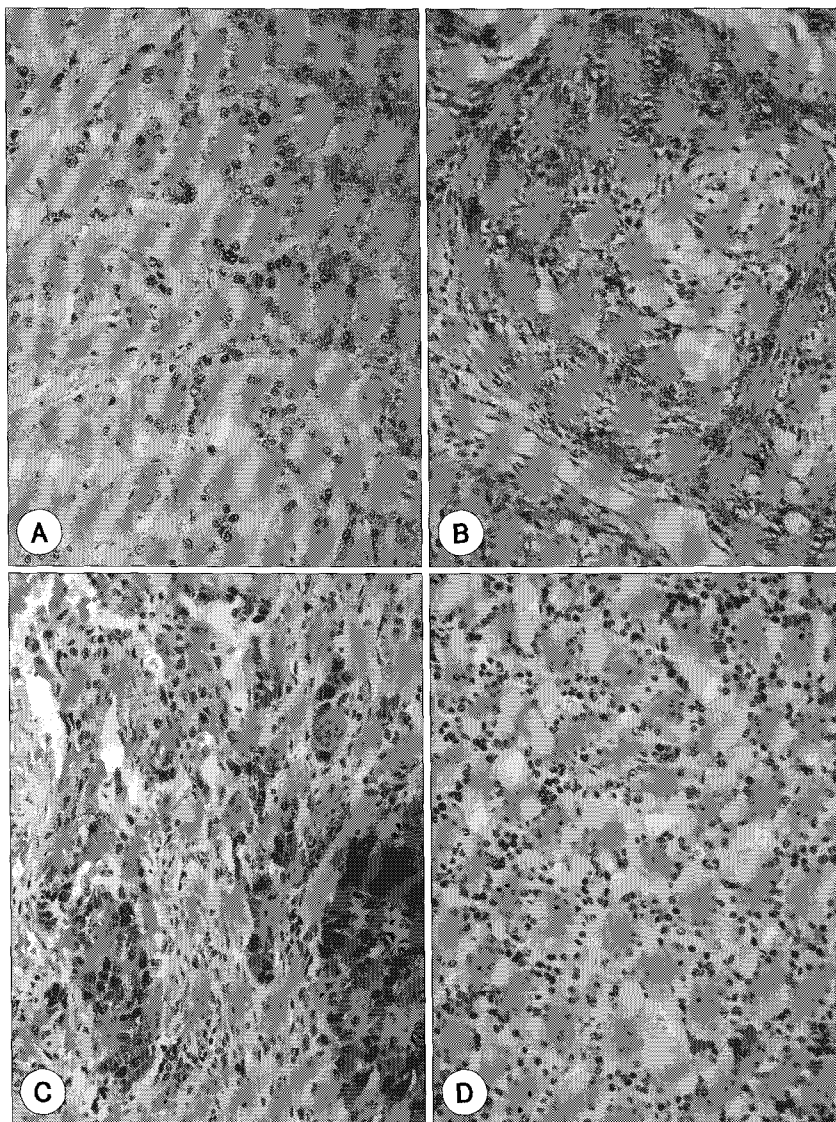


Fig. 1. Immunohistochemical stains for apoptosis-related factors and TUNEL study in salivary gland tumors. The mucoepidermoid carcinoma shows increased apoptotic index more than 5%(A), and diffuse cytoplasmic positivity for bcl-2(B) and for bax (C). M30 expression is conspicuous in acinic cell carcinoma(D) ($\times 200$).

직에서 p53과 MIB-1 발현은 관찰되지 않았다. 전체 타액선 종양 46예 중 20예(43.5%)에서 세포자멸사가 관찰되었으며, bcl-2 발현은 45예 중 39예(86.7%)에서, bax 발현은 45예 중 31예(68.8%)에서, M30 발현은 44예 중 29예(65.9%)에서 관찰되었다(Fig. 1). p53 발현은 46예 중 18예(39.1%)가 양성이었다고, MIB-1 발현은 46예 중 12예(26.1%)에서 양성이었다(Fig. 2) (Table 1).

양성 타액선 종양 12예 중 6예(50.0%)에서, 악성인 34예 중 14예(41.2%)에서 세포자멸사가 관찰되어 양성파 악성 타액선 종양의 세포자멸사 빈도는 차이가 없었다. bcl-2 발현은 양성 타액선 종양 11예 중 10예(90.9%), 악성 타액선 종양 34예 중 29예(85.3%)에서 관찰되었으며, bax 발현은 양성 타액선 종양 11예 중 8예(72.7%), 악성 타액선 종양 34예 중 23예(67.7%)에서, M30 발현은 양성 타액선 종양 10예 중 7예(70.0%), 악성 타액선 종양 34예 중 22예(64.7%)에서, p53 양성은 양성 타액선 종양 11예 중 5예(41.7%), 악성 타액선 종양 34예 중 13예(38.2%)에서 관찰되는 등 양성파 악성 타액선 종양 간 bcl-2, bax, M30 및 p53 발현의 유의한 차이는 없었다. MIB-1은 양성 타액선 종양 11예에서 5% 이상 발현을 보이는 경우는 한 예도 없었으나 악성 타액선 종양 34예 중 12예(35.3%)에서 양성으로 MIB-1 발현은 양성 및 악성 종양에서 유의

차이를 보였다. 양성 및 악성 타액선 종양 간 bcl-2, bax, M30 및 p53 발현의 유의한 차이는 없었다. MIB-1은 양성 타액선 종양 11예에서 5% 이상 발현을 보이는 경우는 한 예도 없었으나 악성 타액선 종양 34예 중 12예(35.3%)에서 양성으로 MIB-1 발현은 양성 및 악성 종양에서 유의

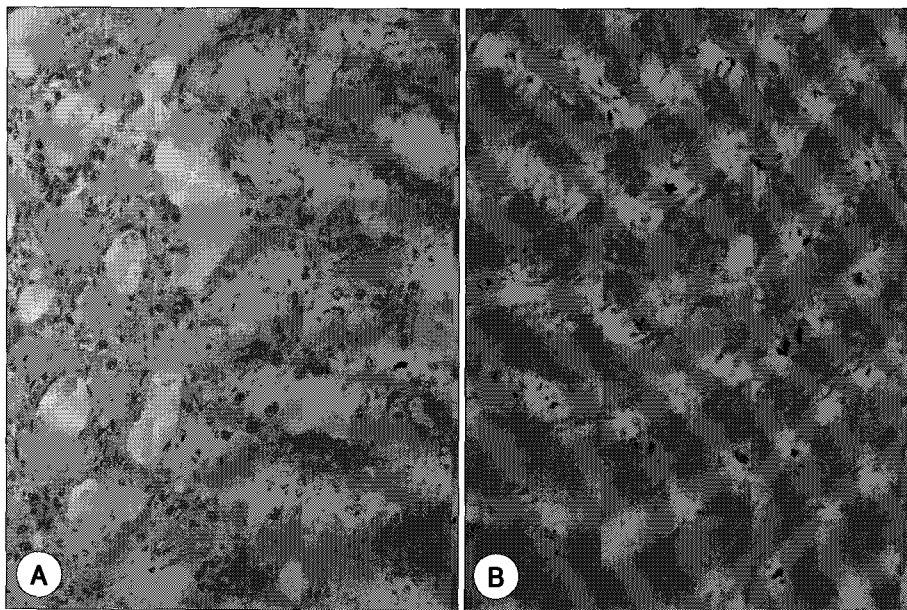


Fig. 2. In mucoepidermoid carcinoma, the tumor cells show positive reaction of p53(A) and increased MIB-1 labelling index(B) ($\times 200$).

Table 1. Apoptosis and expressions of apoptosis-related factors in the salivary gland tumors

		Total (n=46)	Malignant tumor(n=34)	Histologic types of malignant tumors					Benign tumor (n=12)	p-value ¹
				MMT (n=9)	ADC (n=9)	MEC (n=10)	ACC (n=3)	Misc (n=3)		
Apoptosis	-	26(56.5)	20(58.8)	6	4	6	3	1	6(50.0)	0.3014
	+	20(43.5)	14(41.2)	3	5	4	0	2	6(50.0)	
bcl-2 ²	-	6(13.3)	5(14.7)	1	3	0	1	0	1(9.1)	0.7088
	+	39(86.7)	29(85.3)	8	6	10	2	3	10(90.9)	
bax ²	-	14(31.1)	11(32.3)	2	3	6	0	0	3(27.3)	0.5686
	+	31(68.8)	23(67.7)	7	6	4	3	3	8(72.7)	
M30 ²	-	15(34.1)	12(35.3)	3	3	5	0	1	3(30.0)	0.8190
	+	29(65.9)	22(64.7)	6	6	5	3	2	7(70.0)	
p53	<5%	28(60.9)	21(61.8)	3	5	10	1	2	7(58.3)	0.6874
	\geq 5%	18(39.1)	13(38.2)	6	4	0	2	1	5(41.7)	
MIB-1	<5%	34(73.9)	22(64.7)	5	4	7	3	3	12(100.0)	0.0167
	\geq 5%	12(26.1)	12(35.3)	4	5	3	0	0	0	

p-value¹ : between benign and malignant salivary gland tumors

² : bcl-2 and bax immunohistochemistry was done in 11 cases of benign tumor, and M30 in 10 benign tumors

MMT : malignant mixed tumor, ADC : adenoid cystic carcinoma, MEC : mucoepidermoid carcinoma, ACC : acinic cell carcinoma, Misc : miscellaneous malignant tumor

한 차이를 보였다($p=0.0167$) (Table 1).

세포자멸사는 악성 다형성선종 9예 중 3예, 선양낭성암종 9예 중 5예, 점액상피양 암종 10예 중 4예, 기타 악성 종양 3예 중 2예에서 양성이었으나 샘파리세포암종 3예는 세포자멸사가 음성이었다. bcl-2 발현은 악성 다형성선종 9예 중 8예, 선양낭성암종 9예 중 6예, 점액상피양 암종 10예 모두, 샘파리세포암종 3예 중 2예, 기타 악성 종양 3예 모두가 양성이었다. bax 발현은 악성 다형성선종 9예 중 7예, 선양낭성암종 9예 중 6예, 점액상피양 암종 10예 중 4예, 샘파리세포암종 3예와 기타 악성 종양 3예에서 양성이었다. M30 발현은 악성 다형성선종 9예 중 6예, 선양낭성암종 9예 중 6예, 점액상피양 암종 10예 중 5예, 샘파리세포암종 3예 모두, 기타 악성 종양 3예 중 2예에서 양성이었다. p53은 악성 다형성선종 9예 중 6예, 선양낭성암종 9예 중 4예, 샘파리세포암종 3예 중 2예, 기타 악성 종양 3예 중 1예에서 양성이었으나 점액상피양 암종 10예는 모두 음성이었다. MIB-1 발현은 악성 다형성선종 9예 중 4예, 선양낭성암종 9예 중 5예, 점액상피양 암종 10예 중 3예에서 5% 이상 관찰되었으나 샘파리세포암종 3예와 기타 악성 종양 3예에서는 MIB-1 발현이 5% 이상인 경우는 없었다(Table 1).

2. 악성 타액선 종양에서 세포자멸사 및 세포자멸사 연관 표지자와 임상병리학적 인자, 재발 및 생존과의 연관성

환자의 연령에 따른 세포자멸사의 차이는 유의하지 않았으나, 50세 미만일 때 bcl-2 발현율이 유의하게 높았으며 ($p=0.0181$). 반면 bax 발현과 p53 발현은 50세 이상일 때 유의하게 높았다($p=0.0151$, $p=0.0384$). 그러나 환자의 나

이에 따른 M30 양성 및 MIB-1 5% 이상인 빈도의 차이는 없었다. 종양의 크기에 따른 세포자멸사, bcl-2, bax, M30, p53 및 MIB-1 발현은 유의한 차이가 없었다. 림프절 전이 유무에 따른 세포자멸사, bcl-2, M30, p53 및 MIB-1 발현은 유의한 차이가 없었으나, bax 양성일 때 림프절 전이가 양성인 경향을 보였다($p=0.0912$) (Table 2).

악성 타액선 종양 환자 34예 중 11예에서 재발하였는데, 그 중 5예가 선양낭성암종이었고, 악성 다형성선종 3예, 점액상피양 암종 2예, 편평상피암종 1예였다. 세포자멸사 양성이거나 MIB-1 발현이 5% 이상일 때 재발한 경우가 다소 많았으나 세포자멸사, bcl-2, bax, M30, p53, MIB-1 발현과 재발은 통계학적으로 유의한 차이는 보여주지 않았다(Table 2). 또한 악성 타액선 종양 환자 34예 중 5예가 사망하였는데, 그중 3예는 선양낭성암종이었고, 1예는 악성 다형성선종, 나머지 1예는 편평상피암종이었다. 선양낭성암종 3예 중 2예는 종양의 크기가 5.0cm, 4.3cm이었으며, 악성 다형성선종의 크기는 2.5cm이었으며 림프절 전이가 33개 중 8개에서 관찰되었다. 편평상피암종 1예 역시 10개의 림프절 전이가 관찰되었던 중례이었다. 그러나 생존 유무에 따른 세포자멸사, bcl-2, bax, M30, p53 및 MIB-1 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2).

3. 악성 타액선 종양에서 세포자멸사와 세포자멸사 연관 표지자간 상호연관성

악성 타액선 종양 34예에서 세포자멸사와 bcl-2, M30, p53 및 MIB-1 발현 간에는 유의한 연관성을 보여주지 않았으나, bax 음성일 때 오히려 세포자멸사가 관찰되는 빈도가 높은 경향을 보였다($p=0.0657$). bcl-2 발현과 bax, M30

Table 2. Relationships between clinicopathological parameters and apoptosis and apoptosis-related factors in malignant salivary gland tumors

		No. of cases	Apoptosis		bcl-2	bax	M30	p53	MIB-1
			Positive (%)	Positive (%)	Positive (%)	Positive (%)	≥5% (%)	≥5% (%)	
Age (yrs)	<50	15	5(33.3)	15(100.0)	7(46.6)	9(60)	3(20)	3(20)	
	≥50	16	8(50.0)	11(68.7)	14(87.5)	12(75)	9(56.2)	7(43.7)	
	p-		0.3473	0.0181	0.0151	0.3719	0.384	0.1575	
Size (cm)	<2cm	10	4(40.0)	8(80.0)	5(50.0)	5(50.0)	4(40.0)	4(40.0)	
	≥2cm	21	9(42.8)	18(85.7)	15(71.4)	15(71.4)	9(42.8)	8(38.0)	
	p-		0.8802	0.6859	0.2438	0.2438	0.8802	0.9189	
LN	Negative	11	4(36.3)	10(90.9)	7(63.6)	5(45.4)	4(36.3)	5(45.4)	
	Positive	6	3(50)	5(83.3)	6(100)	5(83.3)	2(33.3)	2(33.3)	
	p-		0.5851	0.6431	0.0912	0.1294	0.9006	0.6275	
Recurrence	Negative	23	7(30.4)	21(91.3)	17(73.9)	15(65.2)	9(39.1)	6(26.0)	
	Positive	11	7(63.6)	8(72.7)	6(54.5)	7(63.6)	3(27.2)	6(54.5)	
	p-		0.1562	0.3297	0.3837	0.5364	0.7967	0.1370	
Survival	Alive	29	12(41.3)	25(86.2)	19(65.5)	19(65.5)	10(34.4)	9(31.0)	
	Dead	5	2(40.0)	4(80.0)	4(80.0)	3(60.0)	3(60.0)	3(60.0)	
	p-		0.9538	0.7174	0.5226	0.8116	0.2782	0.2107	

Table 3. Relationships between apoptosis and expressions of apoptosis-related factors, p53 and MIB-1 in malignant salivary gland tumors

		No. of cases	Apoptosis	bcl-2	bax	M30	p53
			Positive (%)	Positive (%)	Positive (%)	Positive (%)	≥5% (%)
bcl-2	Negative	5	3(60.0)				
	Positive	29	11(37.9)				
			p=0.3544				
bax	Negative	11	7(63.6)	10(90.9)			
	Positive	23	7(30.4)	19(82.6)			
			p=0.0657		0.5226		
M30	Negative	12	6(50)	11(91.6)	7(58.3)		
	Positive	22	8(36.3)	18(81.8)	16(72.7)		
			p=0.4401		0.4384		0.3912
p53	<5%	21	9(42.8)	20(95.2)	12(57.1)	15(71.4)	
	≥5%	13	5(38.4)	9(69.2)	11(84.6)	7(53.8)	
			p=0.8002		0.0375		0.0961
MIB-1	<5%	22	9(40.9)	20(90.9)	14(63.6)	17(77.2)	6(27.2)
	≥5%	12	5(41.6)	9(75)	9(75)	5(41.6)	7(58.3)
			p=0.9658		0.2107		0.4985
						0.0379	0.8749

및 MIB-1 발현 간에는 유의한 연관성이 없었으나, p53 발현과 bcl-2 발현은 유의한 역 상관관계를 나타내었다($p=0.0375$). bax 발현은 M30 및 MIB-1 발현과 유의한 연관성이 없었으나, p53 발현이 5% 이상일 때 bax 양성인 경향을 보였다($p=0.0961$). M30 발현은 p53 발현과는 유의한 연관성을 보여주지 않았으나 M30 발현과 MIB-1 발현은 유의한 역 상관관계를 보였다($p=0.0379$). p53 발현과 MIB-1 발현 간에는 통계학적으로 유의한 연관성이 없었다(Table 3).

고 찰

인체 종양의 발생 과정에 세포자멸사가 관여하고, 양성 종양에 비해 악성 종양에서 세포자멸사가 증가되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁵. 그러나 종양에서 세포자멸사의 의의는 아직 이견이 많아서, 침윤성 유방암에서 비침윤성 혹은 전암성 병변에 비해 유의하게 세포자멸사가 증가되어 있다는 보고가 있는 반면¹⁶ 결장직암의 경우 bcl-2 발현이나 TUNEL 법에 의한 세포자멸사 소견이 예후인자와 연관성을 보여주지 않는다고 하였다¹⁷.

타액선 종양에서 세포자멸사가 양성에 비해 악성에서 빈번하여 다형성 선종과 Warthin 종양의 평균 세포자멸사 지수는 0.01%인 반면 악성의 경우 0.42%로서 악성 타액선 종양에서 세포자멸사가 높다고 하였다¹². 본 연구에서는 전체 타액선 종양 46예 중 20예(43.5%)에서 세포자멸사가 관찰되었는데, 양성과 악성 타액선 종양 간에 차이를 보이지 않았으며, 악성 타액선 종양의 유형에 따른 세포자멸사 양성인 빈도도 차이가 현저하지 않았다. 세포자멸사에 대한 연구자간 차이를 보이는 이유는 세포자멸사를 조사하는

방법, 판독 기준 및 연구대상의 구성이 다르기 때문일 것으로 추정된다. Soimi 등¹²은 TUNEL 염색 후 핵 전체에서 분명한 양성을 보이는 세포와 H-E 슬라이드에서 세포자멸사체를 형성한 것을 합쳐 세포자멸사 지수로 산정한 반면, 본 연구에서는 TUNEL 염색 후 핵 전체에서 분명한 양성을 보이는 세포가 관찰되면 양성으로 하였고, 양성인 세포수가 적어 표지지수를 따로 산정하지 않아 양성 및 악성 타액선 종양 간 차이를 알기 어려웠으며, 양성 타액선 종양이 12예로 증례 수가 적은 점도 연구자간 차이를 보이는 요인이 될 수 있을 것으로 생각한다.

Yanez 등¹⁰에 의하면 bcl-2 단백질 대부분의 양성 및 악성 타액선 종양에서 관찰되므로 타액선 종양의 발생 과정에 bcl-2가 관여할 것이라고 하였다. Soimi 등¹²은 양성 타액선 종양에서 bcl-2는 대부분 강하게 발현되나 악성 종양에서 음성이거나 발현 강도가 약하다고 하였다. 반면 Pammer 등¹¹에 의하면 정상 타액선 조직의 도관의 기저세포는 bcl-2 양성인 반면 샘파리세포, 근상피세포, 내강면 원주세포는 bcl-2 음성 반응을 보이므로 타액선 종양에서 bcl-2 양성 소견을 보이면 기저세포로의 분화를 나타냄을 시사한다고 하였다. 본 연구에서도 전체 타액선 종양 45예 중 39예(86.7%)에서 bcl-2 발현이 관찰되었고, 양성과 악성 타액선 종양에서 bcl-2 발현율은 90.3%와 85.3%로서 악성에 비해 양성 종양에서 약간 높았으나 유의한 차이는 아니었다. 또한 타액선 종양 유형에 따른 bcl-2 발현은 차이가 없으므로 bcl-2가 타액선 종양의 발생과정에 전반적으로 관여함을 시사하였다. Soimi 등¹²은 타액선 종양에서 세포자멸사 과정이 bcl-2 발현의 감소와 연관성이 있다고 하였으나 본 연구에서는 bcl-2 음성일 때 세포자멸사 양성이 조금 많았

으나 통계학적으로 유의한 역 상관관계를 보여주지 않았다. 따라서 타액선 종양에서 나타나는 세포자멸사 과정에 bcl-2 뿐만 아니라 다른 인자들이 관여한다는 것을 시사하였다.

Soini 등¹²⁾은 양성 및 악성 타액선 종양 모두에서 bax 발현이 강하게 관찰되었으나 bax 발현과 세포자멸사 간 연관성이 없으므로 악성 타액선 종양에서 세포자멸사 증가는 bax 발현 증가에 의한 것이 아니라 bcl-2 발현 억제와 연관성이 있다고 설명하였다. 본 연구에서 bax 발현은 전체 45예 중 31예(68.8%)에서 나타났으며, 양성 및 악성 타액선 종양에서 bax 발현율은 각각 72.8%, 67.7%로서 차이가 없었으며, 종양의 유형에 따른 발현율의 차이도 없었다. 또한 본 연구에서 악성 타액선 종양에서는 bax 음성일 때 세포자멸사 양성인 경우가 오히려 조금 많은 경향을 보였다. 이러한 결과는 타액선 종양에서 나타나는 세포자멸사 과정에 bax 발현 증가나 bcl-2 발현 억제가 아닌 다른 경로가 관여함을 시사하였다.

M30은 인체 타액선 조직에서 세포자멸사를 나타내는 표지자로 보고된 바 있으며⁶⁾ 본 연구에서 M30 발현은 44예 중 29예(65.9%)에서 양성이었으며, 양성 및 악성 타액선 종양에서 M30 발현율은 70.0%, 64.7%로서 유의한 차이는 보이지 않았다. 샘파리세포암종에서 비교적 발현율이 높았으나 타액선 종양의 유형에 따른 M30 발현의 유의한 차이는 없었다. 또한 M30 발현이 세포자멸사, bcl-2, bax 발현과 유의한 연관성을 보여주지 않으므로 M30 발현이 세포자멸사 과정에 미치는 영향을 추정하기 어려웠다. 그러나 M30 발현은 MIB-1 발현과 역 상관관계를 보이므로 M30 발현 종양은 생물학적으로 덜 공격적인 종양일 가능성을 시사하였다.

p53은 bcl-2 발현을 억제하고, bax 발현을 증가시켜 직접적으로 세포자멸사 과정에 관여한다고 하며⁷⁾, p53 양성인 종양은 대부분 분화가 나쁜 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 본 연구에서 p53 발현은 46예 중 18예(39.1%)에서 양성인데, 양성 및 악성 종양에서 p53 발현율은 각각 41.7%, 38.2%로서 차이가 없었다. 악성 타액선 종양의 p53 발현은 세포자멸사 및 M30 발현과는 연관성이 없었고, bcl-2 발현과 역 상관관계를, bax 발현과는 정의 상관관계 경향을 보이므로 악성 타액선 종양의 세포자멸사 과정에 p53이 bcl-2 발현을 억제하고, bax 발현을 촉진하는 역할을 하는 것으로 추정되었다.

종양의 증식능을 나타내는 MIB-1 발현은 전체 타액선 종양 46예 중 12예(26.1%)에서 양성이었으며, 12예 모두 악성 타액선 종양이었으며, 양성 타액선 종양에서 5% 이상 발현을 보인 증례는 없었다. 악성 타액선 종양은 유형에 따라 MIB-1 발현율의 차이를 보였는데, 악성 다형성 선종 9예 중 4예에서 MIB-1 발현이 25% 이상으로 MIB-1 발

현율이 가장 높았으며, 반면 샘파리세포 암종 3예는 모두 MIB-1 발현이 음성이었다. 본 연구에서 MIB-1 발현은 세포자멸사, bcl-2, bax와 유의한 연관성을 보여주지 않았으나 M30 발현과 역 상관관계를 보이므로 M30 억제를 통해 세포자멸사 과정에 관여할 가능성을 시사하였다. 또한 p53 양성일 때 MIB-1 양성인 경우가 다소 많았으나 통계학적 유의성은 없었다. 따라서 타액선 종양의 악성도를 평가하는데 세포자멸사 정도나 세포자멸사 연관 표지자의 발현보다는 MIB-1 발현이 유용할 것으로 추정되었다. Xin 등¹³⁾은 양성 및 악성 다형성 선종에서 Ki-67 발현이 차이를 보이므로 Ki-67이 유의한 표지자이지만, p53과 E-cadherin 발현은 도움이 되지 않았다고 하였다. 분화가 나쁜 점액상피양 암종에서 Ki-67 발현율이 유의하게 높으며, 생존율도 감소하였다는 보고도 있다⁹⁾.

일반적으로 bcl-2 발현이 양성인 종양은 생물학적으로 덜 공격적인 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 구강에서 발생한 점액상피양 암종 71예를 대상으로 bcl-2, bax, p53, 세포자멸사, Ki-67 발현을 연구한 보고에 의하면, 분화가 좋은 경우에 bcl-2 발현율이 유의하게 높았고, bcl-2 양성인 경우 음성인 경우에 비해 생존율이 유의하게 높다고 하였으며, 세포자멸사가 높을 경우 그렇지 않은 경우에 비해 생존율이 높고, p53 발현과 세포자멸사는 유의한 연관성을 보였다고 하였다⁹⁾. 본 연구에서 악성 타액선 종양의 bcl-2 발현율은 환자의 나이가 50세 이상일 때 감소하였으나 종양의 크기, 림프절 전이, 재발 및 생존유무와는 유의한 연관성을 나타내지 않으므로 bcl-2 양성인 악성 타액선 종양의 생물학적 특성을 추정하기 힘들었다. 본 연구에서 세포자멸사 정도가 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 재발 및 생존 유무와 연관성을 보여주지 않았고, p53 발현과 MIB-1 발현과도 유의한 연관성이 없었으므로 세포자멸사 정도로 악성 타액선 종양의 예후를 추정하는 것은 의의가 없는 것으로 생각된다. 세포자멸사를 촉진하는 역할을 하는 bax 발현율이 환자의 나이가 50세 이상에서 유의하게 높으며, bax 양성일 때 림프절 전이 양성인 경향을 보였다. 그러나 bax 발현이 종양의 크기, 재발이나 생존유무와 유의한 연관성을 보이지 않으므로 bax 발현 역시 악성 타액선 종양의 예후인자로 이용하기에는 제한적이었다. M30 발현도 악성 타액선 종양에서 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 재발 및 생존 유무와 연관성이 없으므로 M30 발현을 예후 추정인자로 이용하기는 곤란할 것으로 생각되었다. 그러나 Jia 등²⁰⁾은 선양낭성암종에서 p53 발현과 세포자멸사 정도는 예후인자로서 의의를 지니고 있으며, bcl-2 발현이 세포자멸사의 억제에 관여하므로 bcl-2 발현 역시 예후인자로서 유용성이 있을 것이라고 하였다.

본 연구에서 악성 타액선 종양 환자에서 세포자멸사 양

성이거나 MIB-1 발현이 5% 이상일 때 재발한 경우가 다소 많았으나 세포자멸사, bcl-2, bax, M30, p53, MIB-1 발현과 재발은 통계학적으로 유의한 차이는 보여주지 않았다. 따라서 세포자멸사 양성이나 bcl-2, bax, M30, p53, MIB-1 발현을 재발을 예측하는 인자로 이용할 수 없을 것으로 생각된다. 또한 악성 타액선 종양 환자의 생존 여부가 세포자멸사, 세포자멸사 연관인자, p53 및 MIB-1 발현과 유의한 연관성은 보여주지 않았다. 사망한 5예 중 선양낭성 암종이었던 3예는 종양이 2.1cm 이상이었으며, bcl-2, bax, M30 중 두 표지자가 비교적 높은 발현율을 보였으며, p53 과 MIB-1 발현도 3예 중 2예가 양성이었다. 반면 악성 다형성선종 1예는 림프절 전이가 33개 중 8개에서 관찰되었던 증례로서 세포자멸사는 음성이었으나 bcl-2와 bax 양성 이었고, p53과 MIB-1 발현이 높았다. 편평상피암종이었던 1예 역시 림프절 전이가 다수 있었던 예로서 세포자멸사, p53 과 MIB-1 발현은 음성이었으나 bcl-2, bax, M30은 양성 이었다.

결 론

양성 및 악성 타액선 종양의 발생에 세포자멸사 및 세포 자멸사 연관 표지자인 bcl-2, bax, M30 발현이 관여할 것으로 생각되며, p53 발현은 bcl-2 및 bax와 상호연관성을 지니고 관여할 것으로 추정되었다. MIB-1 발현은 악성 타액선 종양에서만 발현되므로 타액선 종양의 악성도 판정에 MIB-1 표지자가 도움이 될 것으로 생각되었다. 그러나 악 성 타액선 종양에서 세포자멸사와 세포자멸사 연관 표지자 인 bcl-2, bax, M30, p53 발현과 MIB-1 발현은 종양의 크기, 림프절 전이 유무, 재발이나 생존 여부와 유의한 연관 성을 보여주지 못하므로 세포자멸사와 세포자멸사 연관 표 지자는 예후인자로서 의의는 없는 것으로 생각한다.

중심 단어 : 세포자멸사 · bcl-2 · bax · M30 · p53 · MIB-1 · 타액선 종양.

References

- 1) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 1994;73:2013-2036*
- 2) Hockenbery DM: *bcl-2 in cancer, development and apoptosis. J Cell Sci. 1994;18:51-55*
- 3) Reed JC: *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol. 1994;124:1-6*
- 4) Kroemer G: *The proto-oncogene bcl-2 and its role in regulation of apoptosis. Nature Med. 1997;3:614-620*
- 5) Yang J, Liu X, Bhalla K, et al: *Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science. 1997;275:1129-1132*
- 6) Kusama K, Jiang Y, Toguchi M, et al: *Use of the monoclonal antibody M30 for detecting HSG cell apoptosis. Anticancer Res. 2000;20:151-154*
- 7) Miyashita T, Reed JC: *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell. 1995;80:293-299*
- 8) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: *Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol. 1984;133:1710-1715*
- 9) Yin HF, Okada N, Takagi M: *Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. Pathol Int. 2000;50:603-609*
- 10) Yanez M, Roa I, Garcia M, Ibacache G, Villaseca M: *Bcl-2 gene protein expression in salivary gland tumors. Rev Med Chil. 1999; 127:139-142*
- 11) Pammer J, Horvat R, Weninger W, Ulrich W: *Expression of bcl-2 in salivary glands and salivary gland adenomas. A contribution to the reserve cell theory. Res Pract. 1995;191:35-41*
- 12) Soini Y, Tormanen U, Paakko P: *Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not to bax expression in salivary gland tumours. Histopathology. 1998;32:28-34*
- 13) Xin W, Paulino AF: *Prognostic factors in malignant mixed tumors of the salivary gland: correlation of immunohistochemical markers with histologic classification. Ann Diagn Pathol. 2002; 6:205-210*
- 14) Nagao T, Sugano I, Ishida Y, et al: *Basal cell adenocarcinoma of the salivary glands: comparison with basal cell adenoma through assessment of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53 and bcl-2. Cancer. 1998;82:439-447*
- 15) Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al: *Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. Cancer. 1996;77:255-264*
- 16) Kayaselcuk F, Nursal TZ, Polat A, et al: *Expression of survivin, bcl-2, p53 and bax in breast carcinoma and ductal intraepithelial neoplasia (DIN 1a). J Exp Clin Cancer Res. 2004;23:105-112*
- 17) Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, et al: *Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. J Clin Oncol. 2004;22:1572-1582*
- 18) Karja VJ, Syrjanen KJ, Kurvinen A-K, Syrjanen SM: *Expression and mutations of p53 in salivary gland tumors. J Oral Pathol Med. 1997;26:217-223*
- 19) Kapuccuglu N, Losi L, Eusebi V: *Immunohistochemical localization of Bcl-2 and Bax proteins in in situ and invasive duct breast carcinomas. Virchows Arch. 1997;430:17-22*
- 20) Jia L, Esguerra RL, Tang X, et al: *Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma. Pathol Int. 2004;54:217-223*