

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine으로 유도된 흰쥐의 방광암 발생과정에서 Survivin, HSP90, Bcl-2, Bax 단백질의 발현

이상대 · 박성웅 · 홍순익 · 권귀영
이태진

중앙대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2006년 2월 9일
게재승인 : 2006년 9월 19일

책임저자 : 이 태 진
우 156-755 서울시 동작구 흑석동 224-1
중앙대학교병원 병리과
전화: 02-6299-2757
Fax: 02-6293-5630
E-mail: taelee@chol.com

*본 논문은 2004년도 중앙대학교 교내 학술 연구비를 지원받아 이루어졌음.

Expression of Survivin, HSP90, Bcl-2 and Bax Proteins in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis

Sang Dae Lee, Sung Woong Park, Soon Auck Hong, Gui Young Kwon
and Tae Jin Lee

Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Background : Survivin belongs to the inhibitor of apoptosis family, and it has recently been found to be expressed in most solid tumors. Therefore, its expression is suggested to have prognostic significance. However, no data are available concerning the significance of survivin for the carcinogenesis of bladder cancer. **Methods** : In order to induce urothelial tumor in the rat urinary bladder, 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) was administered to male Sprague-Dawley rats for 30 weeks. We used immunohistochemistry to investigate the expressions of survivin, HSP90, Bcl-2 and Bax in rat bladder carcinogenesis. **Results** : Urothelial cell hyperplasia, papilloma, non-invasive urothelial carcinoma and invasive urothelial carcinoma appeared at 5, 10, 20 and 30 weeks, respectively. The expressions of survivin and HSP90 increased sequentially from normal mucosa, hyperplasia, papilloma, non-invasive urothelial carcinoma to invasive urothelial carcinoma. The expressions of Bcl-2 and Bax did not increase, however the number of cases with more than 1 of Bcl-2/Bax expression ratio increased sequentially during the progression of urothelial lesion. The expression of survivin showed a statistically significant correlation with the expression of HSP90 and the Bcl-2/Bax expression ratio. **Conclusions** : Our findings suggest that survivin may be involved in the carcinogenesis of rat bladder and its expression is correlated with the expression of HSP90 and the Bcl-2/Bax expression ratio.

Key Words : Urinary bladder; Carcinogenesis; Survivin; HSP90; Bcl-2; Bax

방광암은 비뇨기계에서 발생하는 흔한 암 중의 하나로 표재성 암이 상당수를 차지하지만 임상 양상이 다양하여 거의 60%의 환자에게서 초기에 재발하는 경향이 있다.¹ 표재성 방광암의 진행에는 c-erbB1, c-erbB2, p53, c-myc와 같은 유전자의 증폭이나 재배열에 의한 분자생물학적 변화가 동반한다고 알려져 있지만, 이들 표지자로 병의 예후를 판단하기는 어렵다.² 최근 몇 년 사이에 세포사 경로의 변화가 암의 발생과 진행에 관여한다는 사실이 밝혀졌으며, 방광암의 경우에는 Bcl-2와 Bax 사이의 발현 비율이 세포사멸사에 관여하여 암의 진행에 영향을 미친다는 보고가 있다.³

최근 caspase 의존성·비의존성 작용기전을 통하여 세포사멸사를 억제하는 새로운 단백질들이 발견되었고, 이들은 세포사멸사

억제인자(inhibitors of apoptosis, IAPs)로 명명되었다. 인체에서 발견된 세포사멸사 억제인자군으로는 HIAP1, HIAP2, XIAP, survivin, livin 등 6개가 있다.^{4,5} 이 중 가장 최근에 발견된 것이 survivin이며, 이것은 정상조직에서는 제한적으로 발현되지만 다양한 종양에서 과발현되는 것으로 보고되었다.⁶ 면역조직화학염색 결과 survivin은 위암에서 30%, 흑색종에서 90%까지 다양하게 발현되었고, 이들 연구에서는 대부분 survivin의 발현과 예후 사이에 연관성이 있으며 survivin이 암의 진행을 예측할 수 있는 인자라고 보고하였다.⁷ 또한 방광암에서 survivin의 발현과 단기 무병율의 연관성이 관찰되기도 하여 survivin이 종양의 발생과 진행에 영향을 미치는 인자로 주목을 받고 있다.⁸

한편, Fortugno 등이 survivin과 heat shock protein (HSP)90

의 연관성을 연구한 바 있는데⁹ 이 연구에 따르면 HSP90의 ATP 결합부위와 survivin이 결합한 survivin-HSP90 복합체의 세포 보호효과가 세포자멸사를 조절하는 경로에 중요한 역할을 한다고 한다. Survivin과 복합체를 형성하는 HSP90은 HSP군의 하나로 HPS가 열처리를 받은 *Drosophila melanogaster*의 침샘 세포에서 스트레스 단백질에 대한 mRNA의 전사가 활발해지고 정상적인 세포구성 단백질의 mRNA의 전사가 감소하는 것을 관찰한 후 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.¹⁰ HSP는 여러 가지 환경인자나 병태생리학적 자극(열, 저산소, 손상, 중금속, 출혈 등)에 노출된 세포에서 생성되며, 미성숙 단백질이나 세포손상으로 변성된 단백을 복구하는데 도움을 주며 면역체계에 중요한 역할을 하여 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 이러한 HSP는 분자량이나 생리학적 기능에 따라 28 kDa, 70 kDa, 80 kDa, 90 kDa, 100 kDa, 110 kDa로 구분된다.¹¹ 이 중 HSP90은 실험적으로 흰쥐의 방광에서 여성호르몬의 조절에 의하여 합성되며,¹² 방광암에서는 92.9%의 높은 발현 빈도를 나타내고 조직학적 악성도 및 침윤성과 연관성이 있는 것으로 보고 되었다.¹³

이에 본 연구에서는 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐에게 지속적으로 0.05% 농도의 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine을 투여하여 방광암의 형태 변화를 관찰하고, 방광암의 발생 및 진행 과정에서 survivin과 HSP90 및 기존의 세포자멸사 관련 단백질인 Bcl-2와 Bax를 면역조직화학염색법으로 관찰하여 이들의 발현 양상을 알아보고자 한다.

재료와 방법

재료

실험동물

실험동물은 생후 8주 이내의 체중 150-160 gm의 SD계 수컷 흰쥐 85마리를 사용하였다. 사료는 시판 고형사료(삼양사료 주식회사)를 사용하였다. 실험동물은 1 cage에 3마리씩 사육하였고, 환경 적응을 위해 실험 1주일 전부터 동일 조건 하에서 미리 사육하였다.

발암제

발암제는 N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (이하 BBN, Kasei Co, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이를 농도 0.05%가 되게 수돗물에 희석한 후 물병을 알루미늄 호일로 싸 차광한 다음 자유로이 먹게 하였다. 발암제를 투여하는 기간에 식수는 별도로 공급하지 않았다.

방법

실험동물의 구분과 실험기간

실험동물 85마리를 크게 대조군 10마리와 0.05% BBN을 투

여한 실험군 75마리로 나누었다. 실험군은 BBN 투여기간에 따라 다시 5주(1군), 10주(2군), 15주(3군), 20주(4군) 및 30주(5군)의 다섯 군으로 분류하였으며, 각 군의 실험동물은 15마리로 각각 해당하는 주에 도살하였다. 각 군마다 2마리의 대조군을 사용하였는데, 이들에게는 처음부터 일반 사료와 발암제를 첨가하지 않은 수돗물만을 공급하였다.

조직학적 검사

실험동물을 경추탈골시키고 회복한 다음 방광 내에 10% 중성 포르말린을 주입하고 충만 상태로 방광을 절제하였다. 고정된 방광을 종으로 2등분한 뒤 육안으로 형태학적 변화를 관찰하였다. 그런 다음 통상적인 방법으로 파라핀 포매 조직을 만들어 5 μ m 두께로 박절하고 헤마톡실린에오신염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 방광 병변의 형태학적 소견은 Ito 등의 분류를 참고하여 요로상피 과형성, 요로상피 유두종, 비침윤성 암, 침윤성 암으로 나누었다.¹⁴

면역조직화학염색

파라핀 포매조직을 4-5 μ m 두께로 박절하고 자이렌으로 5분간 세 차례 탈파라핀한 후, 무수 알코올, 90%, 75%, 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 내인성 과산화 효소가 활성화되지 않도록 0.5% 과산화수소에 10분간 처리 후 증류수로 세척하였다. 그런 다음 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 씻어낸 후 비특이 반응을 제거하기 위해 30분간 염소혈청으로 처리하였다. 여분의 용액을 제거한 다음 일차항체인 survivin (Zymed Co., South San Francisco, USA), HSP90 (Zymed Co., South San Francisco, USA), Bcl-2 (Zymed Co., South San Francisco, USA)와 Bax (Zymed Co., South San Francisco, USA)를 1:50으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 작용시켰다. 일차항체 반응 후 TBS로 5분간 세차해 씻어낸 다음 biotin이 부착된 이차항체(Zymed Co., South San Francisco, USA)에 20분간 작용시켰다. Streptavidin과 결합한 과산화 효소 복합체를 가하여 20분간 반응시킨 후 AEC (amino-ethyl carbazol)로 발색하고 Mayer 헤마톡실린으로 대조 염색하여 글리세린으로 봉입하였다. 면역조직화학염색의 음성 대조군은 일차항체를 처리하지 않고 음성대조 시약으로 대체한 방광조직을 이용하였다.

Survivin과 HSP90은 핵과 세포질에 짙은 갈색으로 염색된 세포의 수가 5% 이상이면 양성으로 판정하였으며, Bcl-2와 Bax는 세포질에 갈색으로 염색된 세포의 수가 5%이면 양성으로 판정하였다. Bcl-2와 Bax의 발현율을 알아보기 위해 염색 범위와 염색 강도를 구하였다. 염색 범위는 4등급으로 나누어 0은 염색된 세포의 수가 5% 미만, 1은 5-25%, 2는 25-50%, 3은 50-75%, 4는 75% 이상일 경우로 하였으며, 염색 강도는 3등급으로 나누어 약하게 염색된 경우는 1, 중등도 염색이면 2, 강하게 염색된 경우는 3으로 정하였다. 그리고 염색 범위와 염색 강도를 곱하여 각 예의 염색 지수를 구하였다.¹⁵

통계학적 분석

Window용 SPSS (version 8.0) 통계 프로그램으로 Pearson's correlation test를 실시하여 방광 병변의 진행에 따른 survivin, HSP90, Bcl-2, Bax 단백질의 발현 및 Bcl-2/Bax 발현 비율의 상관성을 분석하였다. Survivin과 HSP90 단백질 발현과 HSP90, Bcl-2, Bax 단백질의 발현 및 Bcl-2/Bax 발현 비율은 Pearson's χ^2 test를 실시하여 비교하였는데, p값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

방광 병변

원주에 BBN을 투여한 방광의 육안적 변화를 매 5주마다 30주 동안 육안으로 관찰한 결과 10주 후에는 미세한 과립성 병변이 일부 방광의 점막에서 관찰되었고, 이러한 변화는 시간이 경과하면서 점차 뚜렷해졌다. 20주 후에는 방광벽이 비후를 일으키며 유두 모양의 증식을 보이는 종양이 발생하였고, 30주 후에는 일부에서 종양이 진행하여 방광벽을 침범하는 소견이 관찰되었다. 조직학적 소견상 대조군에서는 30주까지는 정상적인 방광의 소견으로 3-5층의 균일한 두께의 세포층을 보였으며, 일부에서

Table 1. Histological changes of the urinary bladder in rats treated with 0.05% BBN

Observation period	No. of rats	No. of rats (%)			
		Hyperplasia	Papilloma	UCA (NI)	UCA (I)
5 weeks	15	15 (100%)			
10 weeks	15	9 (60.0%)	6 (40.0%)		
15 weeks	15	4 (26.7%)	11 (73.3%)		
20 weeks	15			10 (66.7%)	5 (33.3%)
30 weeks	15			8 (53.3%)	7 (46.7%)

Table 2. Expressions of survivin, HSP90, Bcl-2, and Bax in the urinary bladder in rats treated with 0.05% BBN

Histologic type	Total No. of lesions	Survivin	HSP90	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax ratio >1
Control	10	2 (20.0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20.0%)	0 (0%)
Hyperplasia	28	7 (25.0%)	7 (25.0%)	8 (28.6%)	10 (35.7%)	6 (21.4%)
Papilloma	17	6 (35.3%)	7 (41.2%)	12 (70.6%)	10 (58.8%)	4 (23.5%)
UCA (NI)	18	9 (50.0%)	10 (55.6%)	14 (77.8%)	11 (61.1%)	11 (61.1%)
UCA (I)	12	8 (66.7%)	9 (75.0%)	8 (66.7%)	6 (50.0%)	8 (66.7%)
(p-value)		0.003	0.0001	0.0001	0.042	0.001

UCA (NI), urothelial carcinoma non-invasive; UCA (I), urothelial carcinoma invasive.

미약한 염증세포의 침윤 이외에는 특별한 소견이 관찰되지 않았다. 실험군에서는 BBN 투여 후 5주군 모두에서(15/15) 과형성이 관찰되었으며, 방광암의 전 단계인 유두종은 10주군의 40% (6/15), 15주의 73.3% (11/15)에서 관찰되었다. 20주 후에는 66.7% (10/15)에서 비침윤성 암이 관찰되었고 33.3% (5/15)에서 침윤성 암이 관찰되었다. 30주 후에는 53.3% (8/15)에서 비침윤성 암이 관찰되었고 46.7% (7/15)에서 침윤성 암이 관찰되었다. 유두종이라고 판정한 예들은 대부분 역유두종 형태를 띠고 있었고 비침윤성 암도 비유두형 성장을 나타내고 있었다(Table 1, Fig. 1).

Survivin, HSP90, Bcl-2, Bax 단백질의 발현

Survivin 단백질의 발현은 대조군 10예 중 2예(20%)에서 관찰되었고, 병변이 과형성, 유두종, 비침윤성 암, 침윤성 암으로 진행할수록 25.0% (7/28), 35.3% (17/6), 50.0% (9/18), 66.7% (8/12)로 발현 빈도가 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p=0.003, Table 2, Fig. 2). HSP90 단백질은 대조군에서는 발현되지 않았으며, 병변이 과형성, 유두종, 비침윤성 암, 침윤성 암으로 진행할수록 25.0% (7/28), 41.2% (7/17), 55.6% (10/18), 75.0% (9/12)로 발현 빈도가 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p=0.0001, Table 2, Fig. 3).

Bcl-2와 Bax의 경우에는 병변의 진행에 따른 발현 빈도의 순차적인 증감이 관찰되지 않았다. 그러나 Bcl-2와 Bax 발현 비율이 1 이상인 군은 병변이 과형성, 유두종, 비침윤성 암, 침윤성 암으로 진행할수록 21.4% (6/28), 23.5% (4/17), 61.1% (11/18), 66.7% (8/12)로 발현 빈도가 통계학적으로 유의하게 증가하였다(p=0.001, Table 2).

Survivin과 HSP90의 발현은 상호 유의성이 있어서 survivin의 발현이 양성일 경우 HSP90는 78.1% (25/32)에서 양성이었다

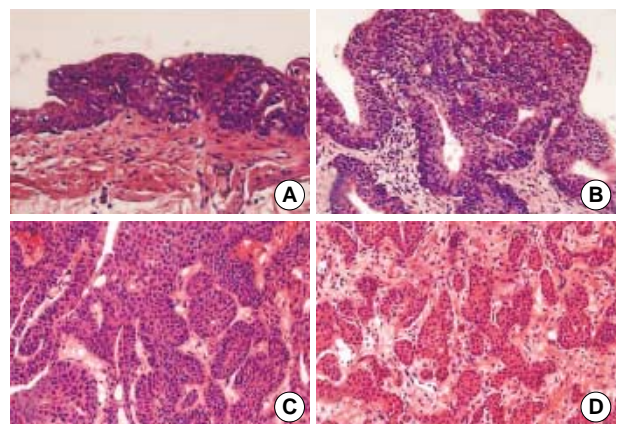


Fig. 1. Histologic features of the urinary bladder treated 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. (A) hyperplasia, (B) papilloma, (C) non-invasive urothelial carcinoma, and (D) invasive urothelial carcinoma.

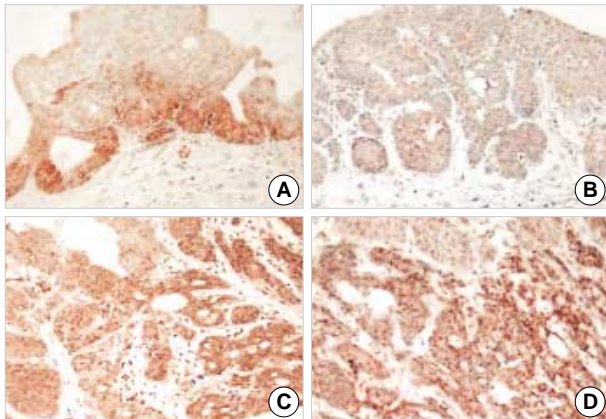


Fig. 2. Immunohistochemical staining for survivin. (A) hyperplasia, (B) papilloma, (C) non-invasive urothelial carcinoma, and (D) invasive urothelial carcinoma.

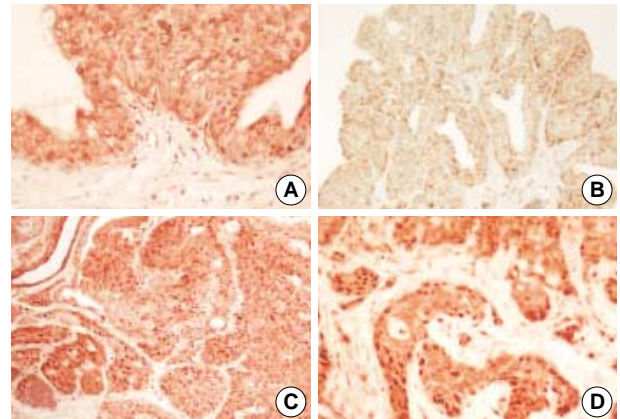


Fig. 3. Immunohistochemical staining for HSP90. (A) hyperplasia, (B) papilloma, (C) non-invasive urothelial carcinoma, and (D) invasive urothelial carcinoma.

Table 3. Correlations among expressions of survivin, HSP90, Bcl-2, and Bax in the urinary bladder induced by 0.05% BBN in rats

	(n)	Survivin		HSP90		Bcl-2		Bax		Bcl-2/Bax ratio >1	
		(-)	(+)	(-)(%)	(+)(%)	(-)(%)	(+)(%)	(-)(%)	(+)(%)	(-)(%)	(+)(%)
Survivin (-)	53			45 (84.9)	8 (15.1)	28 (52.8)	25 (47.2)	26 (49.1)	27 (50.9)	51 (96.2)	2 (3.8)
Survivin (+)	32			7 (21.9)	25 (78.1)	15 (46.9)	17 (53.1)	20 (62.5)	12 (37.5)	5 (15.6)	27 (84.4)
(p-value)				0.0001		NS		NS		0.0001	
HSP90 (-)	52	45 (86.5)	7 (13.5)			31 (59.6)	21 (40.4)	28 (53.8)	24 (46.1)	47 (90.4)	5 (9.6)
HSP90 (+)	33	8 (24.2)	25 (75.8)			12 (36.4)	21 (63.6)	18 (54.5)	15 (45.5)	9 (27.3)	24 (72.7)
(p-value)				0.0001		0.031		NS		0.0001	

다($p=0.0001$). Survivin의 발현과 Bcl-2와 Bax의 발현은 연관성이 없었고, survivin의 발현이 양성인 군에서 Bcl-2와 Bax 발현 비율이 1 이상인 군은 84.4%로 통계학적인 유의성이 있었다($p=0.0001$). HSP90은 Bcl-2의 발현과 연관성이 있었고($p=0.031$), Bcl-2와 Bax의 발현 비율이 1 이상인 군과도 연관성이 있었다($p=0.0001$).

고 찰

Survivin은 세포자멸사를 억제하며 세포분열을 조절하는 단백질로 1997년에 발견되었고, survivin 유전자는 15 kb 길이로, 17번 염색체 장완의 25번 띠에 위치한다. Survivin이 세포자멸사를 억제하는 기전으로는 두 가지가 알려져 있다. 첫째, 세포자멸사 과정에 작용하는 효소인 caspase-3와 caspase-7의 활성을 직접 억제하거나,¹⁶ 둘째, 세포주기 조절인자인 CDK4와 결합하여 survivin-CDK4 복합체를 형성하고 이 복합체가 p21을 분비하며 결국엔 미토콘드리아 caspase-3와 결합하여 caspase-3의 활성을 억제하여 세포자멸사를 차단한다고 알려져 있다.¹⁷

최근 survivin이 성인의 여러 장기에서 발생한 종양에 특이적으로 발현되는 성질을 갖고 있는 점 때문에 종양을 진단적하는

데 가치가 있는 표지자 또는 항암제의 표적물질 후보로 주목받고 있으며, 실제로 다양한 종류의 암에서 발현된다.¹⁸ 여러 연구를 통하여 survivin은 정상 성인의 조직에서는 발견되지 않으며 종양의 발달 과정 중에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁹ 특히 위장관 종양에서 survivin이 어떤 기능을 하는지 밝혀내기 위한 연구가 많이 이루어졌는데 Yu 등은 위점막에서 survivin이 발현되는 빈도가 정상 대조군(27%)보다 위암환자(68%)에게서 높다고 보고하였다.²⁰ 또한 Survivin의 발현율은 위암 조직 주변의 점막에서는 22%였으나 모든 정상 대조군과 병변에서 멀리 떨어진 정상 점막에서는 발현되지 않았다고 한다. 식도암에서 survivin의 발현은 종양의 재발률과 관련이 있으며, 대장에서는 survivin의 발현이 과증식성 폴립과 샘종성 폴립뿐 아니라 대장암이 침범하지 않은 경계부위 정상 점막에서도 관찰되었다고 한다. 대장직장암의 형성과정에서 survivin 단백질의 발현은 저등급 이형성의 샘종부터 고등급 이형성의 샘종, 암종으로 갈수록 의미 있게 증가하였다고 보고되었다.²¹ 이러한 연구 결과들은 암형성 과정에서 survivin이 중요한 역할을 하고 있음을 시사하는 소견이라 하겠다.

방광암에서 survivin이 하는 역할을 연구한 Ku 등은 survivin의 발현이 방광암의 등급이나 병기와는 연관이 없었지만 환자의 생존율과 연관이 있는 나쁜 예후인자임을 시사하는 연구결과를

발표하였다.²² 또 Schultz 등은 survivin이 암의 진행이나 생존을 과는 연관이 없지만 방광의 재발과 연관이 있음을 보고하였다.²³

본 연구에서 survivin 단백질 발현은 정상조직의 20.0%, 과형성의 25.0%, 유두종의 35.5%, 비침윤성 암의 50.0%, 침윤성 암의 66.7%에서 관찰되어 방광암의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이와 같이 방광암의 발생 단계별로 survivin의 발현 정도를 보고한 연구 결과는 없다. 그렇지만 최근에 본 연구와 같이 BBN으로 유도된 방광암에서 survivin이 대부분의 예에서 다양한 정도로 발현되었다는 연구 결과는 있다.²⁴ 방광암 이외에 간암 발암 과정에서 survivin이 하는 역할에 대한 연구도 이루어졌다. 이 연구에서는 aflatoxin으로 유도된 간암 발생 과정에서 survivin이 30주에 40%, 60주에 37.1%, 간암에서 57.1%에서 발현되었다.¹⁵ 이와 같은 소견으로 미루어보아 survivin 단백질은 종양이 형성되는 동안 점차 발현이 증가하는 단백질로 종양의 형성 과정에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 하지만 본 연구에서 survivin은 정상 조직의 20%에서 발현되었다. Lubet 등²⁴은 정상 방광 조직에서 survivin이 발현되지 않는다고 하였지만 Duan 등¹⁵은 정상 간 조직의 30.8%에서 Gianani 등¹⁶은 대장 조직의 100%에서 survivin이 발현되었다고 보고하였다. Gianani 등의 연구에서 survivin은 정상 대장 점막의 기저부에서 제한적으로 발현되었다고 기술하고 있으며 본 연구에서도 survivin은 주로 방광 상피의 기저부에서 발현되었다. 본 연구를 비롯하여 정상 조직에서 survivin이 발현된다고 보고한 연구에서는 대부분 염색된 세포가 5% 이상이면 양성으로 판정하였다. 그러나 Lubet 등의 연구에서는 염색된 세포가 20% 이상인 경우를 양성의 기준으로 기술하고 있어서 판독 기준에 따라 정상 조직에서 survivin의 발현 빈도가 달라질 수도 있으며 일부 정상 세포에서 survivin이 발현될 수도 있을 것으로 생각된다.

이러한 survivin은 임상적인 유용성 면에서 실제로 방광암 세포의 증식능과 연관성이 있고,²⁵ 소변에서 RT-PCR을 통한 mRNA의 발현은 방광암 세포의 검색에 특이적이라는 연구결과도 있다.²⁶ 따라서 방광암의 진단에 survivin을 유용한 표지자로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

유해한 미세환경에서 종양세포의 생존과 증식에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 최근 연구 결과에 따르면 survivin과 HSP90의 직접적인 결합이 세포의 성장과 사멸을 조절한다고 한다. Survivin과 HSP90은 상호 작용을 하여 종양세포에서 세포자멸사 억제에 역할을 증가시키고 이로 인해 세포가 증식한다는 것이다.²⁷ HSP90의 광범위 억제제인 geldanamycin이나 survivin의 선택적인 억제제의 사용으로 survivin과 HSP90의 결합이 파괴되고 결과적으로 survivin의 proteasomal degradation을 초래하며, 미토콘드리아 의존성 세포자멸사를 유발하여 세포의 증식을 억제한다는 연구 결과도 보고되고 있다.²⁸

본 연구에서 HSP90은 정상 대조군에서는 발현되지 않았고, 병변이 과형성, 유두종, 비침윤성 암, 침윤성 암으로 진행함에 따라 각각 25.0%, 41.2%, 55.6%, 75.0%로 단백질 발현 비율이 증가

하였다. 따라서 HSP90도 방광암 발생과 진행에 관여하는 것으로 판단되었다. 또한 survivin 단백질 발현이 음성인 군에서 HSP90은 21.9%에서 발현되었지만, 양성인 군에서는 78.1%에서 발현되어 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다. 이러한 결과로 미루어 보건대 survivin과 HSP90은 서로 연관성 있게 발현을 하면서 방광암 발생과 진행에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 종양에서는 survivin과 HSP90의 상호 조절이 아니라 survivin과 HSP90이 상호 조절될 때 HSP90의 ATP 결합 부위와 survivin이 직접 결합하여 survivin-HSP90 복합체가 형성되고 이 복합체가 세포자멸사를 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다.⁹

Bax는 세포자멸사를 촉진하는 인자이고 Bcl-2는 세포자멸사를 억제하는 인자다. Bax는 인체의 여러 조직과 세포에 분포해 있으며 특히 간과 신장 조직에서 많이 발현된다.²⁹ 본 연구에서 Bax는 정상 대조군의 20%에서 발현되었고, 병변의 진행에 따라 다양한 빈도로 발현되었다. 또한 Bcl-2는 정상 대조군에서는 발현되지 않았고 병변이 진행함에 따라 발현 빈도는 Bax와 유사하게 다양하게 나타났다. 이와 같은 결과로 Bcl-2와 Bax가 종양의 형성에는 관여하지만, 종양의 진행에 따른 발현 빈도의 증감을 알기는 어려웠다. Bcl-2의 세포자멸사 억제 효과는 Bax의 영향을 받는다고 알려져 있으며, Bcl-2와 Bax의 비율이 세포자멸사를 결정하는 중요 요소가 된다고 한다. Bcl-2가 과발현되면 Bcl-2와 Bax의 이질성 결합체가 우세해지고 이로 인하여 세포자멸사가 억제된다. 한편 Bax가 과발현되면 Bax와 Bax의 동질성 결합체가 우세해지고 세포자멸사가 증가한다고 한다.³⁰ 본 연구에서는 면역조직화학 염색을 실시하여 염색의 범위와 강도로 나누어 Bcl-2와 Bax 단백질의 발현을 관찰하고 염색 지수를 구하여 반정량적으로 발현 비율을 산출하였다. Bcl-2와 Bax의 발현 비율이 1 이상인 군을 대상으로 병변의 진행과 연관성을 관찰해본 결과 병변이 진행할수록 Bcl-2와 Bax의 발현 비율이 1 이상인 예가 통계학적으로 유의하게 증가하였으며, Bcl-2와 Bax의 발현 비율은 survivin과 HSP90의 발현과도 연관성을 보였다.

결론적으로 survivin과 HSP90은 방광암의 발생과 진행 과정에서 발현이 증가하며 서로 연관성을 가지고 발현을 하고 Bcl-2와 Bax 단백질 발현 비율과도 연관성이 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Ozen H, Hall MC. Bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 255-9.
- Lee E, Park I, Lee C. Prognostic markers of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for multiple, high-grade, stage T1 bladder cancers. *Int J Urol* 1997; 4: 552-6.
- Gazzaniga p, Gradilone A, Vercillo R, et al. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 100-4.
- Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splic-

- ing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001; 495: 56-60.
5. Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, *et al.* Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003; 14: 85-90.
 6. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-21.
 7. 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.
 8. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 452-3.
 9. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, *et al.* Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13791-6.
 10. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Caperones* 2005; 10: 86-103.
 11. Tytell M, Hooper PL. Heat shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. *Expert Opin Ther Targets* 2001; 5: 267-87.
 12. Stein PC, Ha TJ, Parsons CL. Estrogenic regulation of HSP90 kD synthesis in rat urinary bladder. *Urol Res* 2001; 29: 338-44.
 13. Cardillo MR, Sale P, Di Silverio F. Heat shock protein-90, IL-6 and IL-10 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4579-83.
 14. Ito N, Hiasa Y, Tamai A, Okajima E, Kitamura H. Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gann* 1969; 60: 401-10.
 15. Duan XX, Ou JS, Li Y, *et al.* Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4740-4.
 16. Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-23.
 17. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, *et al.* Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-5.
 18. Andersen MH, Thor SP. Survivin--a universal tumor antigen. *Histol Histopathol* 2002; 17: 669-75.
 19. O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M. Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 131-52.
 20. Yu J, Leung WK, Ebert MP, *et al.* Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002; 87: 91-7.
 21. Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WC, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 974-7.
 22. Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee E, Lee SE. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004; 171: 631-5.
 23. Schultz JJ, Kiemeny LA, Wities JA, *et al.* Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003; 23: 3327-31.
 24. Lubet RA, Huebner K, Fong LY, *et al.* 4-Hydroxybutyl (butyl) nitrosamine-induced urinary bladder cancers in mice: characterization of FHIT and survivin expression and chemopreventive effects of indomethacin. *Carcinogenesis* 2005; 26: 571-8.
 25. Wu Y, Wang G, Wei J, Wen X. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer. *Indian J Med Sci* 2005; 59: 235-42.
 26. Weikert S, Christoph F, Schrader M, Krause H, Miller K, Muller M. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer* 2005; 116: 100-4.
 27. Altieri DC. Coupling apoptosis resistance to the cellular stress response: the IAP-Hsp90 connection in cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 255-6.
 28. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, *et al.* Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13791-6.
 29. Chong MJ, Murray MR, Gosink EC, *et al.* Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 889-94.
 30. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.