

자궁경부암에서 TRAIL 수용체의 발현

아주대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*
장석준 · 유희석 · 김명신 · 주희재* · 장기홍 · 오기석

=Abstract=

Expression of TRAIL Receptors in Cervical Cancer

Suk Joon Chang, M.D., Hee-Sug Ryu, M.D., Myoung Shin Kim, M.D.,
Hee Jae Joo*, M.D., Ki-Hong Chang, M.D., Kie Suk Oh, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology,
Ajou University School of Medicine*

Apoptosis is an intrinsic and fundamental biological process that plays a critical role in the normal development of multicellular organisms and in maintaining tissue homeostasis. Some of the well known regulators of apoptosis are cytokines of the tumor necrosis factor(TNF) ligand family, such as Fas ligand(Fas L) and TNF, which induce apoptosis by activation of their corresponding receptors, Fas and TNFR-1. Recently, a new member of the TNF family known as TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) was identified and shown to induce p53-independent apoptosis in a variety of tumor cell lines but not in normal cells. Four human receptors for TRAIL were also recently identified and designated TRAIL-R1, -R2, -R3, and -R4.

The aim of this study is to examine whether TRAIL and TRAIL receptors(-R1, -R2, -R3) are expressed in uterine cervical cancer and whether it is correlated with apoptosis, TRAIL and TRAIL receptors. The subjects were 20 patients who were diagnosed with cervical cancer. Western blotting was performed in 9 cases, immunohistochemical staining for TRAIL and TRAIL receptors(-R1, -R2, -R3) and TUNEL method for detection of apoptosis in 11 cases.

There were proteins for TRAIL, TRAIL-R1, -R2, and -R3 in tissues from cervical cancer. All TRAIL receptors were expressed in both normal cervical epithelium and tumor cells, and TRAIL-R1 and -R2 were more strongly expressed in tumor cells than normal epithelium($p < 0.05$). Apoptosis correlated with expression of TRAIL-R1 and -R2($p < 0.05$). This study suggests that TRAIL induces apoptosis in cervical cancer through its receptors.

Key Words: Cervical cancer, Apoptosis, TRAIL, TRAIL receptors

서 론

세포사(cell death)의 한 형태로서 주목을 받고 있는 apoptosis는 정상적인 세포의 생활에 있어서 항상성을 유지하게 하므로 생존만큼 중요한 의미를 갖는다. 따라서 세포의 중요한 생리적인 조절 기전의

하나로서 apoptosis에 대한 많은 연구 결과가 보고되고 있으며, 특히 종양 세포들의 경우 항암제들에 의해서 유도되는 apoptosis는 전형적인 형태학 및 생화학적 소견을 보임으로써 종양 세포의 apoptosis와 종양의 치유 기전 사이에 깊은 연관이 있음이 확인되었다. 따라서 종양 치유의 관점에서 종양 세포의 apoptosis와 관련된 apoptosis 유도인자, 신호전달경

로 그리고 관련 유전자들과 단백질들을 연구하여 항암 기전을 규명하고 새로운 항암 치료를 개발하여 임상에 응용하고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다.

종양세포의 apoptosis 유도인자로서 알려 있는 여러 가지 인자들 중에서 최근 보고되고 있는 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)은 다양한 조직에서 검출되며, 다른 유도인자와는 달리 정상적인 세포에는 apoptosis를 보이지 않고 변형된 세포만을 고사시키는 특징을 가지고 있다.^{1,2)} TRAIL의 자극전달기전과 작용에 대한 연구 결과, TRAIL은 TRAIL 수용체에 결합하여 그 작용을 나타내게 된다는 사실이 밝혀지게 되었으며 현재까지 4종류의 수용체가 있음이 확인되었다.^{3-10,12,14)} 그러나 TRAIL의 apoptosis 효과가 밝혀졌음에도 불구하고 여러 다양한 세포 및 조직에서 TRAIL에 의한 apoptosis와 종양과의 관련성은 아직 많이 연구되고 있지 못한 실정이며 이러한 세포들간에 특이적인 apoptosis 현상을 보이는 것은 세포에 존재하는 TRAIL 수용체 유무에 따라 다른 기전을 보이는 것으로 보이나 아직 이에 대한 연구 또한 부족한 상태이고, 특히 여성 생식기 종양과 TRAIL 및 그 수용체와의 관련성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 저자들은 본 연구에서 자궁경부암 조직을 대상으로 Western blot 및 면역조직화학적 방법을 통하여 apoptosis와 TRAIL, TRAIL 수용체의 발현 양상 및 그들의 상관관계를 알아보려고 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

아주대학교 병원에서 자궁경부암으로 진단된 환자 중 20예를 연구대상으로 하였으며 환자들의 조직병리학적 인자들은 다음과 같았다. 종양세포의 조직학적 유형에 따라서는 편평세포암(squamous cell carcinoma) 16예, 선세포암(adenocarcinoma) 2예, 그리고 선편평세포암(adenosquamous carcinoma) 2예였다. 임파절 전이 유무에 따라서는 전이가 있었던 예는 4예, 없었던 예는 16예였다.

20예 중 임의로 추출한 9예에서 Kevorkian biopsy forcep을 이용, 자궁경부 조직을 채취하였고 이들에

서 Western blot을 이용하여 TRAIL, TRAIL 수용체에 대한 단백질 발현 여부를 조사하였으며 이들의 조직병리학적 소견은 모두 편평세포암이었다. 나머지 11예에서 면역조직화학적 방법을 통하여 apoptosis, TRAIL, TRAIL 수용체(TRAIL-R1, -R2, -R3)의 발현 양상을 확인하였으며 정상 상피를 보이는 부분과 종양세포가 있는 부분간의 발현 정도를 비교하였다. 또한 세포형태, 임파절 전이 여부 및 apoptosis 유무에 따라 각각 두 군으로 대별하여 TRAIL 수용체의 발현 양상을 비교하였다.

2. 연구방법

(1) TUNEL 방법에 의한 apoptosis 확인

Apoptosis를 확인하기 위하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)- mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling(TUNEL) 방법에 의한 in situ apoptosis detection kit(ApopTag; Oncor, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 5 μm 두께로 절편된 조직에서 paraffin을 제거시키고 Tris buffer로 세척하였다. 세포에 내재하는 peroxidase를 중화시키기 위하여 2% H₂O₂를 상온에서 5분간 처리한 후 ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 10초간 처리한 다음 TdT enzyme를 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응 정지 완충액을 상온에서 10분간 처리한 후 Tris buffer로 3번 세척하고 그런 다음 anti-digoxigenin-peroxidase로 37℃에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 세척하였다. Diaminobenzidine(DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켜 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(2) Western blotting에 의한 TRAIL 및 TRAIL 수용체의 단백질 분석

-70℃에 보관된 자궁 경부 조직을 단백질 분해효소 억제제인 apotinine과 PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride)가 포함된 RIPA 완충용액(50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 10 mM sodium deoxycholate)을 첨가하여 얼음 위에서 homogenizer로 균질화 하였다. 세포질 추출물을 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만을 분리한 후 얻은 단백질을 추출물을 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여

정량 분석하여 적당량으로 분주한 후 실험 전까지 -70°C 에 보관하였다.

추출된 단백질 $30\ \mu\text{g}$ 을 $2\times\text{SDS sample buffer}$ ($50\ \text{mM Tris}\cdot\text{HCl}$, $100\ \text{mM dithiothreitol}$, $2\% \text{SDS}$, $0.1\% \text{bromophenol blue}$, $10\% \text{glycerol}$)로 1:1로 희석하여 100°C 에서 5분간 가열한 후 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였다.

전기 영동이 끝난 후 gel을 분리하여 $48\ \text{mM Tris}$, $39\ \text{mM glycine}$, $0.037\% \text{SDS}$, $20\% \text{methanol}$ 을 함유하는 전이 완충용액(pH 8.0)에서 니트로셀룰로스 막(Micron Separation Inc., Westborough, MA, USA)에 전이시켰다. 니트로셀룰로스 막을 ponceau S 용액에 5분간 염색한 후 2~3회 증류수로 세척하여 여분의 염색액을 제거했다. 니트로셀룰로스 막을 5% 탈지분유를 함유하는 Tris buffered saline(TBS-T, $10\ \text{mM Tris}$, $0.2\ \text{M NaCl}$, $0.1\% \text{Tween-20}$)에서 1 시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 여러 번 세척하였다. TRAIL(C-19), TRAIL-R1(N-19), -R2(N-19), -R3(N-19)에 대한 일차항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 1 시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 여러 번 세척하였다. HRP(horseradish peroxidase)로 표지된 이차항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA)와 1 시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 여러 번 세척하여 ECL(enhanced chemi-luminescence) reagents(Amersham Life Science Ltd., Little Chalfont, UK)로 1분간 반응시킨 후 X-ray film에 10초 동안 노출시켰다.

(3) 면역조직화학적 방법에 의한 TRAIL 및 TRAIL 수용체의 확인

Paraffin에 포매된 $5\ \mu\text{m}$ 두께의 조직 절편을 통사의 탈파라핀 과정과 합수 과정을 수행하였다. $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 용액에 5분간 전처리 하여 조직에 남아있는 내재성 peroxidase를 제거한 후 1:200으로 희석한 TRAIL(C-19), TRAIL-R1(N-19), -R2(N-19), -R3(N-19)의 일차항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 동안 상온의 항습 chamber에서 반응시킨 후 Tris-buffered saline(TBS)으로 세척하였으며, LSAB kit(DAKO A/S, Denmark)에 들어 있는 이차항체(biotinylated IgG)와 streptavidin-peroxidase를 각각 15분간 처리한 후 다시 TBS로 세척하였다. Diaminobenzidine을 이용하여 발색시켜 Ma-

yer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

3. 관찰 및 분석

면역조직화학적으로 염색된 슬라이드를 위상차 현미경(phase contrast inverted microscope; Diaphot 300, Nikon Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Apoptotic body는 짙은 갈색으로 염색된 핵을 가지고 있는 세포로 확인되었으며 400배 시야에서 관찰되는 전체 세포수를 total cell count로 하여 1000개의 전체 세포에서 관찰될 수 있는 apoptotic body의 수를 세어 apoptotic index(AI)를 구하였다.

$$\text{AI} = (\text{Apoptotic body}/1000\ \text{cells}) \times 100$$

TRAIL, TRAIL-R1, -R2, -R3의 발현 정도는 다음과 같은 방법으로 구분하였다. 정상 상피에서의 발현 강도를 기준으로 하여 정상 상피보다 강도가 약한 경우를 1로, 정상 상피와 같은 정도로 발현된 경우를 2, 정상 상피보다 강도가 강한 경우를 3으로 표시하였으며 발현의 분포도에 따라 5% 미만의 세포가 발현된 경우를 0으로, 5~25%의 세포가 발현된 경우를 1, 25~50%의 세포가 발현된 경우를 2, 50% 이상의 세포가 발현된 경우를 3으로 표시하였다. 이를 근거로 종양 세포에서의 발현 정도는 강도와 분포도를 곱하여 0부터 9까지 표시하였다.

정상 상피와 종양 세포간의 TRAIL 수용체의 발현 양상 차이의 통계학적인 처리는 Binomial test로 하였으며, Apoptotic index와 TRAIL 수용체간의 상관관계는 Spearman 상관계수법을 이용하여 처리하였고 apoptosis 유무, 세포 형태 여부, 임파절 전이 여부에 따른 TRAIL 수용체의 발현 양상 차이의 통계학적 처리는 Mann-Whitney test와 Kruskal-Wallis test로 하였으며, 이들 모두에서 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 하였다.

연구 결과

1. Apoptosis의 관찰

Apoptosis는 11개의 조직 표본 중 정상 상피가 있는 부분에서는 관찰되지 않았으며 종양이 있는 부위에서는 9개의 표본에서 관찰되었다. Apoptotic

index는 1.1에서 4.0까지 관찰되었다.(Fig. 1)

2. Western blot에 의한 TRAIL 및 TRAIL 수용체에 대한 단백질 확인

TRAIL 및 TRAIL 수용체(-R1, -R2, -R3)의 단백질이 자궁경부 조직에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.(Fig. 2)

3. 면역조직화학적 방법에 의한 TRAIL 및 TRAIL 수용체의 발현 양상

(1) 정상 상피에서의 TRAIL 및 TRAIL 수용체의 발현 양상

정상 상피에서 TRAIL은 3예에서 발현되었으며 TRAIL 수용체(-R1, -R2, -R3)는 전 예에서 발현되었고 세포질에 염색되었다. 이들은 기저층과 부기층 뿐 아니라 표면층까지 상피 세포의 전 층에 걸쳐 발현되었다.(Fig. 3)

(2) 종양 세포에서의 TRAIL 및 TRAIL 수용체의 발현 양상

종양 세포에서 TRAIL은 3예에서 발현되었으며 TRAIL 수용체(-R1, -R2, -R3)는 전 예에서 발현되었

고 정상 상피와 마찬가지로 세포질에 염색되었다.(Fig. 4)

4. TRAIL 수용체의 발현 양상 비교

(1) 정상 상피와 종양 세포간의 TRAIL 수용체의 발현 양상 비교

종양 세포에서 TRAIL-R1, -R2는 정상 상피보다 강하게 발현되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다. TRAIL-R3의 발현은 정상 상피와 종양 세포간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다.(Table 1)

(2) Apoptosis 유무에 따른 TRAIL 수용체의 발현 양상 비교

종양 세포에서 apoptosis가 관찰된 조직에서 TRAIL-R1, -R2는 apoptosis가 일어나지 않은 조직보다 강하게 발현되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다. TRAIL-R3의 발현은 apoptosis가 관찰된 조직과 관찰되지 않은 조직간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. AI와 TRAIL 수용체간에는 상관관계가 없었다.(Table 2, Table 3)

(3) 임상 병리적 변수에 따른 TRAIL 수용체의 발현 양상 비교

Fig 1. Apoptosis in cervical cancer. Apoptotic bodies are stained dark brown, and are seen in tumor cells. (A) Squamous cell carcinoma (×400). (B) Adenocarcinoma (×400).

Fig 2. Western blotting for TRAIL, TRAIL-R1, -R2, and -R3. (A) TRAIL. (B) TRAIL-R1(DR4). (C) TRAIL-R3(DR5). (D) TRAIL-R3(DcR1).

Fig 3. Expression of TRAIL, TRAIL-R1, -R2, and -R3 in normal cervical epithelium. TRAIL receptors are expressed in all layers of the normal epithelium. (A) TRAIL-R1($\times 200$). (B) TRAIL-R2($\times 200$). (C) TRAIL-R3($\times 200$).

종양 세포의 형태(편평세포암, 선세포암, 선편평세포암) 및 임파절 전이 여부에 따른 TRAIL 수용체의 발현 양상에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.(Table 4, Table 5)

고 찰

생명체에 있어 그 생명 유지를 위한 가장 기본적인 단위는 세포이다. 생명체는 이러한 세포의 수를 적당한 수준으로 유지하게끔 하는 항상성을 가지고 있는데, 만약 항상성이 여러 요인들에 의해 깨어지게 되면 세포 숫자의 조절이 원활하게 이루어지지

Fig 4. Expression of TRAIL, TRAIL-R1, -R2, and -R3 in cervical cancer. TRAIL receptors are expressed in the cytoplasm of tumor cells. (A) TRAIL-R1($\times 400$). (B) TRAIL-R2($\times 400$). (C) TRAIL-R3($\times 400$).

Table 1. Expression of TRAIL receptors in normal cervical epithelium and tumor cells

	Median		p value*
	Tumor cells	Normal epithelium	
TRAIL-R1	6	2	0.001
TRAIL-R2	6	2	0.012
TRAIL-R3	3	2	1

* Binomial test

않게 되어 생명 유지에 치명적인 결과를 초래할 수 있게 된다. 따라서, 세포의 수를 적절하게 유지하기 위한 정교한 기전들이 생명체에 존재하는데, 그 중

Table 2. Apoptosis and expression of TRAIL receptors

	Mean rank		p value*
	Apoptosis -	Apoptosis +	
TRAIL-R1	3.38	7.50	0.029
TRAIL-R2	2.88	7.79	0.013
TRAIL-R3	6.13	5.93	0.922

* Mann-Whitney test

Table 3. Apoptotic index and expression of TRAIL receptors

		p value*
TRAIL-R1	0.558	0.075
TRAIL-R2	0.537	0.089
TRAIL-R3	0.242	0.473

* Spearman's correlation
rs : Spearman's coefficient

의 하나가 세포의 자연사에 의한 조절이다. 이러한 자연사에 의한 세포의 조절 현상은 생물의 발생, 분화 혹은 암, 면역결핍, 신경퇴행과 같은 여러 질병에서 관찰되는데, 대개의 경우 apoptosis라고 하는 세포의 능동적인 기전이 담당하고 있다.¹⁵⁾

Apoptosis는 1971년 Kerr가 토끼의 간문정맥의 가지를 결찰한 후 일정 시간이 지나서 기존에 알려진 괴사(necrosis)와는 전혀 다른 조직학적 소견을 보이며서 간세포들이 사망하는 현상을 발견함으로써 알려지게 되었으며, 1972년 Kerr 등이 이런 현상을 apoptosis라고 명명하였다.¹⁶⁾ 수동적인 죽음인 괴사는 외부의 자극에 의해 세포의 삼투평형이 깨어져 세포의 여러 구조가 팽창된 후 파괴된다. 이러한 현상과 동반되어 세포 내의 단백질 및 핵산 분해효소들이 라이소좀(lysosome)으로부터 유리되고 이들에 의해 세포의 형태가 완전히 소멸되며 주위에 염증 반응이 일어나게 된다.^{17,18)} 그러나 apoptosis는 괴사와는 달리 죽음의 신호가 전달된 세포에서 여러 유전자들의 작용에 의해 특징적인 형태적 변화를 보이는 능동적인 죽음이다.^{17,18)} 이런 apoptosis가 일어난 세포의 형태학적인 특징으로는 세포막 박리, 세포 수축, 핵의 응축, DNA 분해 등을 들 수 있으며 이러한 세포가 염증 반응을 일으키지 않고 주위의

Table 4. Cell types and expression of TRAIL receptors

	Mean rank			p value*
	SCC	AC	ASC	
TRAIL-R1	5.64	5.75	7.50	0.737
TRAIL-R2	4.57	9.50	7.50	0.114
TRAIL-R3	6.79	3.25	6.00	0.385

* Kruskal-Wallis test
SCC : Squamous cell carcinoma
AC : Adenocarcinoma
ASC : Adenosquamous cell carcinoma

Table 5. LNs metastasis and expression of TRAIL receptors

	Mean rank		p value*
	LNs -	LNs +	
TRAIL-R1	6.71	4.75	0.298
TRAIL-R2	7.14	4.00	0.112
TRAIL-R3	4.71	8.25	0.077

* Mann-Whitney test
LNs - : Lymph nodes metastasis negative
LNs + : Lymph nodes metastasis positive

다른 세포들에 의해 탐식 되어 apoptotic body를 형성하게 된다.^{19,20)}

Apoptosis는 여러 종류의 세포 내·외부의 자극들에 의해서 유도되는데, 방사선, 항암제, 고온, 바이러스의 감염, TNF 등의 사이토카인(cytokine), 다양한 면역학적 기전 등에 의해 나타날 수 있고 이러한 apoptosis 유도 과정의 조절은 유전자에 의해 이루어지게 된다.^{15,21)} Apoptosis와 관련된 대표적인 조절 유전자로서 1985년 최초로 bcl-2가 발견되었다.²¹⁾ bcl-2는 발견 당시에는 암유전자로 생각되었으나 Hockenbery 등(1990)에 의해 apoptosis의 발생을 억제한다는 것이 확인되었다.²²⁾ bcl-2가 발견된 이후 bcl-2와 상호 작용하는 Bcl-XL, Bax, Bad, Bak, BAG-1과 같은 유전자 단백질이 밝혀졌으며, 이들은 직접적으로 apoptosis를 억제하거나(Bcl-XL, BAG-1), bcl-2의 apoptosis 억제 기능을 방해하는(Bax, Bad, Bak) 역할을 하게 된다.²³⁻²⁶⁾ bcl-2 이외에 종양억제 유전자인 p53도 apoptosis에 관여한다.²¹⁾ 정상적인

세포 주기에서 세포 DNA 손상이 있을 경우 wild type p53에 의해 세포 주기의 진행이 차단되어 DNA의 복구가 이루어지게 되고 그렇지 못할 경우엔 apoptosis를 유도하여 항상성을 유지하게 된다. 그러나 암세포에서는 p53 결합 단백질이나 mutant type p53로 인해 손상된 DNA의 복구가 일어나지 않고 변형된 세포의 증식이 계속되는 현상이 나타나게 된다. 이와 같이 p53는 apoptosis에 의한 비정상 세포의 증식을 억제하는 유전자로 발암과정에 있어서 중요한 의미를 지니고 있으며, 모든 악성 종양의 약 50%는 mutant type p53를 가지고 있어 apoptosis에 의한 조절을 받지 못하게 된다.²¹⁾ p53는 여러 유전자에 의해 조절되는데, Miyashita 등(1994)은 p53가 Bax의 전사 개시 부위(promoter)에 결합하여 Bax의 발현을 증가시키거나 bcl-2의 억제 조절 부위에 결합하여 bcl-2의 발현을 억제시켜 apoptosis를 유도한다고 하였고,²⁷⁾ Bates 와 Vousden(1996)은 Bax이외에 p21WAF1/CIP1, GADD45, MDM2 등의 유전자들이 관여한다는 것을 밝혔다.²⁸⁾

한편 Tumor necrosis factor(TNF)는 면역체계에 중요한 역할을 담당하는 사이토카인의 일종으로 TNF 수용체(TNFR)와 반응하여 세포의 분화 및 증식에 관여하며 apoptosis를 유도하는 인자로서 알려져 있다.²⁹⁾ TNF family의 종류와 단백질 및 그 유전자 구조가 밝혀지면서 이들의 family member로서 TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand, Apo-2L)이 apoptosis 유도 인자로서 작용함이 최근 알려지게 되었다.^{1,2)} TRAIL은 281개의 아미노산으로 구성되어 있으며 유전자는 3번 염색체에 위치한다(3q26).^{1,2)} 구조적으로 TRAIL은 type II 막단백질(membrane protein)로서 세포 내 N-말단 부분과 세포 외 C-말단 부분으로 이루어져 있고 C-말단 부분이 다른 TNF family와 상동성을 보이게 된다. Fas ligand(28%), TNF- α (23%), lymphotoxin- α (23%), lymphotoxin- β (22%).^{1,2)} TRAIL은 다음과 같은 독특한 특징을 지니고 있는데, 첫째로 정상 세포에는 apoptosis를 유발하지 않고 종양 세포에서만 apoptosis를 유발하며 이는 9D, Raji, Jurkat, HeLa, U937, A549, ME180, 293 등의 종양 세포주에서 확인되었고 p53와는 무관하게 나타나게 된다.^{1,2)} 둘째로 다른 TNF family는 그 발현이 매우 제한적이고 일시적으로 나타나지만 TRAIL의 mRNA는 매우 다양한 조직-임파

구, 비장, 흉선, 폐, 전립선, 난소, 소장, 대장, 태반 등-에서 검출된다.^{1,2)} 이러한 TRAIL의 발현은 TRAIL에 의한 apoptosis 조절이 특정한 수용체와 관련이 있음을 시사하며 이에 대한 많은 연구가 진행되어 현재까지 4 종류의 TRAIL 수용체(TRAIL-R1, -R2, -R3, -R4)가 세포 표면에 존재하고 이들 수용체와 TRAIL과의 결합에 의해 apoptosis가 유도된다는 것이 밝혀지게 되었다.

TRAIL 수용체는 type I 막단백질로서 그 유전자는 8번 염색체에 위치하며(8p21-22),^{5,6,8)} TRAIL과 결합하는 세포 외 부분이 있고 세포 내 죽음 부위(death domain) 유무에 따라 기능적으로 분류된다. TRAIL-R1(DR4)과 TRAIL-R2(DR5, Trick2, KILLER/DR5)는 서로간에 58%의 상동성을 보이는데, 각각 468개와 411개의 아미노산으로 구성되어 있으며 세포 내 죽음 부위가 존재하고 TRAIL과 마찬가지로 대부분의 조직에서 나타난다.^{3,5,7)} 반면에 TRAIL-R3(TRID/DcR1, LIT)와 TRAIL-R4(DcR2, TRUNDD)는 각각 299개와 386개의 아미노산으로 이루어져 있으며 TRAIL-R1, -R2와는 58%, 54%의 상동성을 보이고 서로간에 70%의 상동성을 보이나, TRAIL-R1, -R2와는 달리 세포 내 죽음 부위를 가지고 있지 않고 발현되는 조직도 그 범위가 제한적이다.^{4,6-9)}

TRAIL 수용체가 규명된 이후 TRAIL에 의한 정상 세포와 종양 세포에 있어서 apoptosis 차이는 다음과 같은 세 가지 이론으로 설명된다. 첫째는 'Decoy hypothesis'로서,³⁰⁾ 세포의 TRAIL에 대한 민감성/저항성이 특정 수용체의 존재 여부에 의한다는 것인데, 종양 세포에는 TRAIL-R1, -R2가 있어 TRAIL에 의한 apoptosis가 유도되지만, 정상 세포에는 세포 내 죽음 부위를 가지고 있지 않아 신호를 전달하지 못하는 수용체인 TRAIL-R3, -R4가 같이 존재하여 TRAIL에 의한 apoptosis가 일어나지 않는다는 것으로, 이는 TRAIL에 민감한 세포에 TRAIL-R3와 -R4를 transfection시킬 경우 apoptosis가 감소되는 현상으로 뒷받침된다.^{4,7-9)} 현재까지 이 이론이 가장 설득력 있게 받아들여지고 있으나 일부 TRAIL에 민감한 종양 세포주에서 TRAIL-R3, -R4의 mRNA가 발현되고 TRAIL에 저항성을 보이는 일부 세포주에서 TRAIL-R3, -R4가 발현되지 않는다는 연구 결과가 보고되고 있다.³¹⁾ 둘째는 정상 세포에 있는 TRAIL-R4가 전사 인자인 NF- κ B를 활성화시켜 세

포 내 apoptosis를 억제하는 신호를 전달함으로써 apoptosis를 유도하지 못한다는 것이다.^{8,32,33} 그러나 TRAIL-R1, -R2도 NF- κ B를 활성화시킨다는 연구 결과가 있어^{11,13} 이 이론으로도 TRAIL에 의한 apoptosis를 완전히 설명하지는 못한다. 셋째는 세포 내 죽음의 연쇄반응이 진행되는 과정 중 여러 다양한 억제 인자들이 관여하여 apoptosis 여부를 결정한다는 것이다. TRAIL에 의한 apoptosis 신호전달체계는 Fas와 다른 TNF에 의한 apoptosis 기전과 유사한 caspase(cystein protease cleave after aspartic acid) 연쇄반응으로 생각된다. TRAIL에 의해 TRAIL-R1, -R2가 활성화되면 procaspase-8/-10이 연결 단백질과 함께 세포 내 죽음 부위에 작용하여 활성형의 caspase-8/-10이 형성되고 이는 procaspase-3와 다른 caspases를 활성화시켜 PARP(poly [ADP-ribose] polymerase)와 DNA가 분해되어 apoptosis가 유도되는데, 각 단계마다 FLIP(FLICE-like inhibitory protein), CrmA(cytokine response modifier A), carbobenzyloxy [z] VAD 등의 caspase 억제 인자가 작용하여 apoptosis의 유도를 방해한다.^{11,13,34}

아직 정상 조직과 종양 조직에 있어 TRAIL에 의한 apoptosis의 기전과 그 임상적 관련성, 분자생물학적 조절에 대한 기전이 명확하게 규명되어 있지 않지만, 종양 세포에 대한 선별적인 apoptosis 효과로 현재 일부에서 각종 종양 세포주를 대상으로 하여 TRAIL 단독 혹은 TRAIL과 항암제와의 병용 투여에 대한 연구가 진행 중이다.³⁵ 본 연구 결과 자궁경부암 조직에서 TRAIL, TRAIL-R1, -R2, -R3가 존재한다는 사실을 확인 할 수 있었다. 그러나 TRAIL은 일부에서만 발현되었는데, 이는 TRAIL이 ligand로서 세포의 어느 특정 부위에 발현되지 않고 혈류로 유리되는 일반적인 싸이토카인의 특성을 보이기 때문으로 생각된다. 그리고 정상 상피 보다 종양 세포에서 TRAIL-R1과 -R2가 강하게 발현되는 양상을 보였으며, apoptosis가 관찰되지 않았던 조직에 비해 apoptosis가 관찰된 경우 TRAIL-R1과 -R2가 더 강하게 발현되는 양상을 보였다. 이로써 본 연구를 통해 자궁경부암에서의 apoptosis를 유도하는 인자 중 TRAIL이 한 부분을 차지하며 이는 TRAIL 수용체와의 상호작용에 의해 매개될 수 있다는 결론을 내릴 수 있었고 TRAIL-R3가 정상 세포와 종양 세포 모두에서 발현됨을 확인함으로써 자궁경부암에서

apoptosis 현상을 설명하는 데 있어 'Decoy hypothesis'를 적용하기에는 힘들 것으로 생각되었다. 그러나 세포형태와 임파절 전이에 따른 TRAIL 수용체의 발현 양상 및 apoptosis와 TRAIL-R3의 발현에는 통계학적인 유의성이 없었으며, apoptotic index와 TRAIL 수용체간에는 상관관계가 없었고 TRAIL-R4에 대한 연구는 시행되지 못하였다. 따라서 앞으로 더 많은 예를 대상으로 임상병리적 인자, apoptosis, TRAIL 및 TRAIL-R4를 포함한 TRAIL 수용체에 관한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

자궁경부암에 있어서 정상 상피와 종양 세포의 apoptosis, TRAIL, TRAIL 수용체(TRAIL-R1, -R2, -R3)의 발현 양상을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Western blot을 통하여 자궁경부암 조직에서 TRAIL 및 TRAIL-R1, -R2, -R3의 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다.
2. 면역조직화학적 방법을 통하여 정상 상피와 종양 세포에서 TRAIL-R1, -R2, -R3가 모두 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
3. 정상 상피 보다 종양 세포에서 TRAIL-R1과 -R2가 더 강하게 발현되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다. 그러나 TRAIL-R3의 발현 양상은 차이가 없었다. Apoptosis가 유도된 경우 TRAIL-R1과 -R2가 더 강하게 발현되었으며 이는 통계학적으로 유의하였다. 그러나 TRAIL-R3의 발현 양상은 차이가 없었다.

이상의 결과들을 근거하여 볼 때, 자궁경부암에 있어 TRAIL은 그 수용체인 TRAIL-R1과 -R2를 통하여 apoptosis를 유도하는 것으로 생각된다.

- 참고문헌 -

1. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al: Identification and characterization of a new member of the TNF

- family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682.
2. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-12690.
 3. Pan G, O'Rourke K, Chinnaian AM, et al: The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113.
 4. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821.
 5. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, et al: TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-5397.
 6. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, et al: Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997;186:1165-1170.
 7. Pan G, Ni J, Wei YF, et al: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818.
 8. Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, et al: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF- κ B and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820.
 9. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, et al: A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997;7:1003-1006.
 10. MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, et al: Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997;272:25417-25420.
 11. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, et al: Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- κ B. *Immunity* 1997;7:821-830.
 12. Schneider P, Bodmer JL, Thome M, et al: Characterization of the two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997;416:329-334.
 13. Schneider P, Thome M, Burns K, et al: TRAIL receptors 1(DR4) and 2(DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* 1997;7:831-836.
 14. Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, et al: p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and TNF- α . *Cancer Res* 1998;58:1593-1598.
 15. H.Steller: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
 16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
 17. Ellis HM, Horvitz HR: Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44:817-829.
 18. Cohen JJ, Duke RC: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-293.
 19. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
 20. Fedok V, Voelker DR, Campbell PA, et al: Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
 21. Sheets EE, Yeh J: The role of apoptosis in gynecological malignancies. *Ann Med* 1997;29:121-126.
 22. Hockenbery DM, Nunez G, Milliman CL, et al: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336.
 23. Oltvai ZN, Millian CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 heterodimer in vivo with a conserved homology, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
 24. Yang E, Zha J, Jockel J, et al: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-291.
 25. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, et al: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995;14:5589-5596.
 26. Takayama S, Sato T, Krajewski S, et al: Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80:279-284.
 27. Miyashita T, Harigai M, Hanada R, et al: Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994;54:3131-3135.
 28. Bates S, Vousden KH: p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet* 1996;6:1-7.
 29. Cosman D: A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* 1994;12:440-455.
 30. Gura T: How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* 1997;277:768.
 31. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al: Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 1998;161:2833-2840.
 32. Beg AA, Baltimore D: An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 1996;274:782-784.
 33. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, et al: Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B.

- 1996;274:787-789.
34. Irmier M, Thome M, Hahne M, et al: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature 1997;388:190-195.
35. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al: Safety and anti-tumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest 1999;104:155-162.
-