

미만성대세포B림프종에서 복합약제내성단백질 P-glycoprotein의 발현 및 세포자멸사와의 상관관계연구

김지은 · 김영아 · 장미수 · 전윤경¹
백진호¹ · 윤선옥¹

서울대학교 보라매병원 병리과
¹서울대학교병원 병리과

Expression of P-glycoprotein and Apoptosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma

Ji Eun Kim, Young A Kim, Mee Soo Chang, Yunkyeong Jeon¹, JinHo Paik¹
and Seon-Og Yoon¹

Department of Pathology, Seoul National University Boramae Hospital; ¹Department of Pathology, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Background : Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of malignant lymphoma which responds well to conventional chemotherapy. However, quite a few patients have a recurrence with more aggressive forms after completion of therapy. Multidrug resistance proteins (MRP) are related to this process in several ways such as cell cycle alteration and modulation of apoptosis. **Methods :** We investigated the expression of P-glycoprotein (Gp), one of the well-known MRP, as well as apoptosis associated proteins in DLBCL. Immunohistochemical staining for Gp, p53, Bcl-2, Ki-67, active caspase 3 and FADD was done in forty DLBCL cases. The association between MRP and apoptosis associated proteins to clinical findings was also tested. **Results :** Twenty-nine patients out of 40 (73%) with DLBCL were positive for Gp, and 26 cases (65%) had a strong positive for Gp. Gp expression was stronger in high-grade lesions than in low-grade lesions and was associated to Bcl-2 expression. However, we could not find an adverse impact of Gp expression on patients' overall survival or relapse free survival rate. **Conclusions :** Our study revealed a high frequency of expression for Gp in DLBCL with a possible relationship between the expressions of Gp to apoptosis associated proteins.

Key Words : Lymphoma, Large B-Cell, Diffuse; P-Glycoprotein; Apoptosis; Proto-Oncogene Protein c-bcl-2

접 수 : 2008년 12월 30일
제재승인 : 2009년 3월 31일

책임저자 : 김 영 아
우 156-707 서울시 동작구 신대방2동 425
서울대학교 보라매병원 병리과
전화: 02-870-2643
Fax: 02-831-0261
E-mail: npol181@hanmail.net

미만성대세포B림프종(DLBCL)은 전 세계적으로 가장 흔히 발생하는 악성 림프종의 아형으로 비교적 항암치료에 잘 반응하는 질환이다. 그러나 초기 관해율이 상당히 높음에도 불구하고 많은 환자들이 재발을 경험하며, 이러한 환자들의 경우 이전보다 조직학적 등급이 높은 아형으로 발전하거나 매우 빠른 질병 진행을 거쳐 치명적 결과를 맞는 경우를 자주 보게 된다. 악성 림프종의 항암치료는 고전적인 CHOP 요법(cyclophosphamide, vincristin, doxorubicin, prednisolone)의 기본 위에, 1997년에 개발된 rituximab의 추가로 획기적인 치료 성공률을 나타내고 있다.^{1,2} 그럼에도 불구하고 여전히 약제 내성 및 재발에 대한 문제를 해결하지 못한 채, 최근 각각의 특이적 항암제뿐 아니라 여러 약제에 대해 복합 내성을 유도하는 약제 내성 단백질에 대

한 연구가 시도되고 있다.³⁻⁵

약제 내성 단백질의 생산을 유도하는 물질이나 억제 물질 또는 길항제 등을 밝혀낸다면 각종 암 질환의 항암치료 성공률을 높일 수 있으리라 기대되는데, 아직 이 분야에 대해 알려진 정보가 많지 않다. 이에 저자들은 DLBCL에서 대표적인 복합 약제 내성 단백질(multidrug resistance protein)인 P-glycoprotein (Gp, multidrug resistance protein-1, MDR1)의 발현과 이 단백질이 직접 영향을 미칠 것이라 예상되는 세포자멸사(apoptosis) 지표와의 상관성을 분석하고, 이것이 실제 환자의 치료 성공률 및 생존에 미치는 효과를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

대상환자 및 표본

본 연구는 1999년 1월부터 2006년 12월까지 본 병원에서 DLBCL로 진단받은 후 동일한 항암요법(R-CHOP)으로 치료 받은 40명의 환자를 대상으로 하였으며, 저자 소속 기관의 임상시험 심사위원회의 승인을 받았다. 조직학적 진단은 2008년 개정된 WHO 림프계 종양 분류를 참조하였다.⁶ 이때 세포학적으로 역형성 형태(anaplasia)를 보이거나 현저한 고사 혹은 세포자멸사를 보이는 경우, Ki-67 지표가 50% 이상인 경우는 고등급으로 분류하였다. 그리고 CD10 또는 Bcl-6에 양성반응을 보이는 경우는 여포형(germinal center, GC), 나머지는 활성림프구형(activated B-cell, ABC)으로 구분하였다.

면역조직화학적 염색

대표적인 파라핀 조직 절편을 취하여 통상적인 방법으로 면역염색을 시행하였다. 사용된 일차항체는 각각 Gp (MDR1, Santa Cruz, clone, 1:150, CA, USA), P53 (Dako, clone DO-7, 1:200, CA, USA), Bcl-2 (Dako, clone 124, 1:200), FADD (Cell Signaling, rabbit polyclonal, 1:50, MA, USA), active caspase 3 (Pharmingen, clone C92-605, 1:200, CA, USA), Ki-67 (Dako, clone M7240, 1:100) 등이었다.

염색의 전 쳐치로서 슬라이드를 pH 6.0 citrate 완충액에 담근 후 전자레인지를 이용해 가열하였으며, 일차 항체 도포 후 실온에서 약 1시간 반응시킨 다음 Dako사의 LSAB+HRP kit를 사용하여 완료하였다. 그리고 판독은 Gp 양성 세포의 수가 10% 이상인 경우를 양성으로 판독하였으며, 염색 강도에 따라 각각 음성, 1+, 2+, 3+ 등으로 감정하였다. Bcl-2는 악성림프종 연구에서 일반적으로 적용되는 원칙에 따라 양성 세포의 수가 30%

이상인 경우를 양성으로 판정하였고,⁷ 염색 강도에 따라 1+, 2+로 분류하였다. 또 P53, Ki-67, FADD, active caspase 3 등³은 양성 세포의 백분율을 그대로 통계 수치에 이용하였다.

통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS 16.0 소프트웨어를 이용하여 처리하였다. 이때 각 군과의 비교 분석은 Mann-Whitney test를 사용하였고 비모수적 상관관계는 Spearman's rho를 기준으로 하였으며, 생존 분석율은 Kaplan Meier 분석을 이용하였다. 그리고 도출 결과 p-value 0.05 이하인 경우를 의미 있는 결과로 해석하였다.

결 과

환자들의 임상 정보는 Table 1에 요약되어 있다. 이들의 평균 생존 기간은 39.5개월, 평균 추적 기간은 45.5개월이었으며, 완전 관해(complete remission, CR)에 이른 환자는 27명이었으나 이 중 8명이 재발하여 총 사망환자는 15명이었다. 원발 장기가 림프절인 nodal DLBCL은 25명, extranodal DLBCL은 15명이었다.

Gp는 총 40명 중 29명(73%)에서 발현되었으며, 26명(65%)은 중등도 이상의 강 양성 반응을 보였다. Table 1에 의해 분류된 각 임상 지표와 조직학적 지표를 기준으로 각각 Gp, P53, Bcl-2, Ki-67, active caspase 3, FADD의 발현 정도를 비교한 결과, 고등급 림프종 환자에게서 Gp 발현율이 높고($p=0.034$), P53, Ki-67, Bcl-2 등도 높게 발현되었다($p<0.05$). GC형과 ABC형으로 분류한 세포 기원 및 nodal DLBCL과 extranodal DLBCL으로 구분한 원발 장기에 따른 그룹 간 비교에서는 Gp 발현율의 차이를 보이지 않았다. 또한 Gp가 중등도 이상으로 발현된 환자군(양성도 2,3, Gp-H)과 음성 및 약 양성 환자군(양성도 0, 1, Gp-L)을 비교 분석하였는데(Table 2), 두 군 간 재발률, 골수

Table 1. Clinical and histologic characteristics of the patients

Characteristics	No of patients, N=40
Age, year (≥ 60 :younger)	28:12
Sex, M:F	21:19
Stage (I+II:III+IV)	18:22
IPI (Low to Interm:High)	17:23
Bone marrow involvement (%)	30:10
Complete remission (Yes:No)	27:13
Relapse (%)	8 (20%)
Death (%)	15 (38%)
Primary site (Nodal:Extranodal)	25:15
Histologic grade (Low:High)	10:30
Cell type (GC:ABC)	20:20

IPI, International prognostic index; Interm, intermediate; GC, germinal center type; ABC, activated B-cell type.

Table 2. Comparison of clinical parameters and immunohistochemical results between patients with high P-glycoprotein expression (Gp-H) and with low expression (Gp-L)

Characteristics	Gp-H (N=26)	Gp-L (N=14)
Age, year (>60 :<60)	18:8	10:4
Stage (I+II:III+IV)	12:14	6:8
IPI (High:Low)	11:15	6:8
BM involvement (Yes:No)	7:19	3:11
OS (months)	38.1 (3.7-66.4)	42.6 (4.8-62.1)
RFS (months)	16.1 (7.3-35.1)	19.5 (10.2-54.2)
P53 (%), mean \pm SD	44.5 \pm 11.2	38.9 \pm 7.9
Bcl-2 (mean \pm SD)	1.51 \pm 0.89	0.77 \pm 0.68
Ki-67 (%), mean \pm SD	35.8 \pm 12.1	33.3 \pm 14.1
Active caspase (%), mean \pm SD	17.6 \pm 6.2	11.4 \pm 8.6
FADD (%), mean \pm SD	14.0 \pm 7.1	11.2 \pm 5.8

BM, bone marrow; OS, overall survival; RFS, relapse free survival.

침범 빈도, 병기, GC형/ABC형 차이, 세포자멸사 관련 단백질 발현 정도 등을 비교한 결과, 의미 있는 차이를 발견하지 못하였다. 또한 원발 장기에 따른 영향을 배제하기 위해 동일한 분석을 nodal DLBCL ($N=25$)에 국한하여 시행하였으나, 역시 뚜렷한 차이는 없었다. 상관관계 분석에서 Gp 발현은 Bcl-2와 양성 상관성을 보였으나($p\text{-value}=0.045$), 세포자멸사 및 임상 지표들과는 상관성을 보이지 않았다.

또한 Gp-H군의 평균 생존 기간은 38.1개월로서 Gp-L군의 평균 생존 기간인 42.6개월보다 낮았으나, 통계학적으로 의미있는 수치를 보이지는 못하였다($p\text{-value}=0.73$). 두 그룹 간 무재발 생존기간(relapse free survival)의 비교에 있어서도 뚜렷한 차이는 드러나지 않았다($p\text{-value}=0.61$).

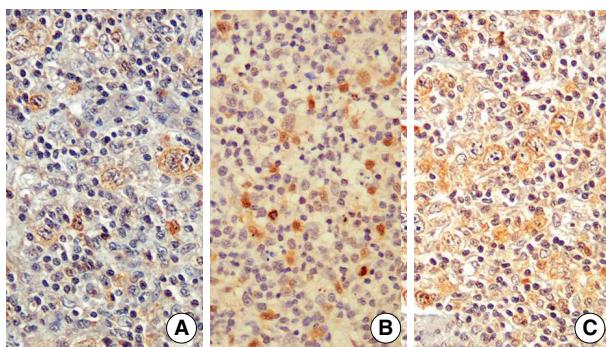


Fig. 1. Detection of P-glycoprotein, active caspase 3, and FADD in diffuse large B-cell lymphoma. (A) Staining for P-glycoprotein shows specific strong cytoplasmic positivity. (B) Active caspase 3 immunostain is noted as nuclear positivity in some tumor cells. (C) FADD is positive in tumor cell cytoplasm.

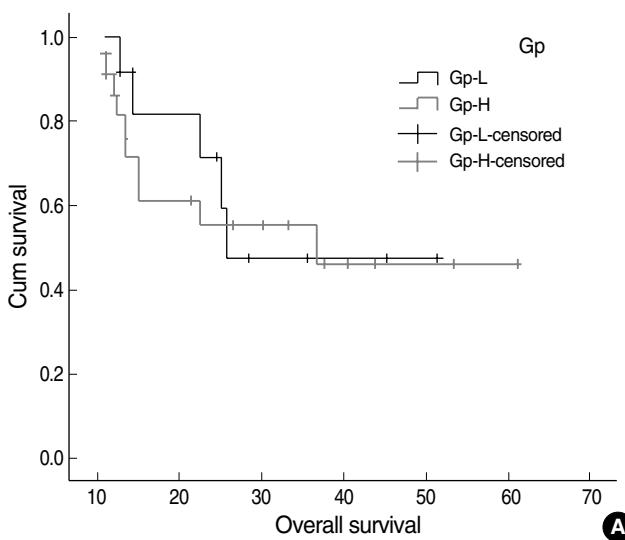


Fig. 2. Kaplan Meier survival analysis between patients with low P-glycoprotein expression (Gp-L) and with high P-glycoprotein expression (Gp-H). (A) Overall survival (B) Relapse free survival.

고 찰

본 연구는 각종 암 질환의 치료 결과에 영향을 미칠 수 있는 약제 내성 단백질의 발현이 DLBCL에서 어느 정도 발현되는지와 예후와의 관련성을 조사한 연구이다. 그러나 DLBCL에서는 아직 Gp를 비롯한 다른 약제 내성 단백질과의 연관성 연구 보고가 매우 적으므로⁸ 이 분야는 향후 새롭게 개척해 나가야 할 것이다.

Gp는 ATP binding cassette superfamily의 일종으로 각종 약제를 세포 밖으로 몰아내는 efflux pump의 역할을 하며, 특히 악성림프종 치료에서 가장 빈번히 사용되는 doxorubicin에 대한 내성을 갖게 한다고 알려져 있다.⁹ 또한 백혈병 세포에서 세포자멸사를 조절하고¹⁰ 특히 항암제 작용 중 caspase에 의한 세포자멸사 유도로부터 암세포를 보호한다는 것이 알려져 있다.¹¹ 저자들은 Gp가 과발현되는 Gp-H 환자군이 Gp-L 군에 비해 재발 빈도가 높고 무재발 생존 기간이 단축될 것을 가정하고 연구를 계획하였으며, 이러한 부정적 효과는 세포자멸사를 억제하는 단백질들의 이상 발현 혹은 과발현에 기인할 것이라고 가정하였다. 연구 결과 Gp는 대다수의 DLBCL 환자에게서 양성으로 나타났는데, 이는 Gp의 이상 발현이 DLBCL의 발병에 영향을 미치거나 질병 진행 과정에서 습득되었을 가능성을 강하게 시사하는 것이다. 특히 Gp의 발현은 항 세포자멸사 단백 중 Bcl-2의 발현과 깊은 상관성을 보였고 이는 기존에 다른 종양에서 시행된 연구 결과들과 부분적으로 부합하였다.¹²⁻¹⁴

Sakaeda 등¹⁴은 HeLa 세포에서 Gp가 Bcl-2 mRNA의 전사를 상향 조절하며, caspase 3의 발현을 유도함으로써 항암제 cis-platin의 작용을 억제한다는 것을 밝혀낸 바 있다. 따라서 본 연구 결과는 Gp의 과도 발현이 DLBCL에서도 Bcl-2를 통하여 종양 세포의 생존에 유리하게 작용할 것이라는 가설을 뒷받침한다.

그러나 Gp의 과발현과 active caspase 3 및 FADD와의 연관성은 드러나지 않았는데, 이는 Gp가 세포자멸사의 비교적 초기 단계인 Bcl-2의 활성화에는 관여하지만 그 이후 연쇄적으로 일어나는 기전에는 Gp와 관계없는 다른 요인들이 복합적으로 작용하기 때문이라고 추정된다.

Gp가 전체 생존율 및 무 재발 생존율에 미치는 영향 분석에서는 Gp-H 군이 다소 생존 기간이 짧은 경향을 보였으나, 통계적으로 의미 있는 수치에 도달하지는 못하였다. 또 Gp-H 군은 Gp-L에 비해 완전 관해율이 약간 떨어졌는데 이 역시 큰 차이를 보이지는 않았다. 그 이유로 몇 가지를 고려해볼 수 있는데, 그 중 한가지로 Gp가 DLBCL에서 장기나 세포 기원에 관계없이 전반적으로 높게 발현된다는 사실을 생각해볼 수 있다. 이 Gp의 과발현은 DLBCL의 종양 특성 즉 다른 암에 비해 약제 내성 소인을 강하게 가지고 있다는 특성을 설명하고 있으나, 실제 약제 내성이 나타나기까지는 다른 요인들이 관여할 것으로 예상된다. 특히 고등급의 DLBCL에서 Gp의 발현이 높은 점도 Gp가 DLBCL 종양의 생물학적 특성 또는 악성도를 나타내는 인자 중에 하나라는 것을 뒷받침한다. 또한 환자의 치료 효과 및 예후의 결정에는 많은 변수들이 작용하므로 Gp가 doxorubicin의 내성을 유발하기는 하지만 악성림프종의 치료에는 CHOP 요법의 다른 세가지 약제가 동시에 투여되기 때문에 한가지 약제의 내성으로 예후를 결정할 수 없다는 점을 고려해야 한다. 그러나 비록 Gp가 CHOP 요법에는 포함되지 않으나 악성림프종의 항암제로 사용되는 etoposide, daunorubicin, vinblastin 등의 다양한 약제 내성에 복합적으로 관여하고 있으며,¹⁵ 소아 림프구성 백혈병에서 다양한 약제 내성 단백질의 발현과 예후를 분석한 다른 연구에서는 많은 단백질 중에서 유일하게 Gp만 예후에 영향을 주는 인자임을 보고한 바도 있다.¹⁶ 그러므로 비록 본 연구 결과가 DLBCL에 있어서 Gp가 재발 및 예후에 미치는 영향을 직접적으로 밝히지는 못하였으나, 선부른 판단보다는 후속 연구를 통해 결정하는 편이 현명할 것으로 사료된다.

결론적으로 Gp는 DLBCL에서 매우 높은 발현율을 보였으며, Bcl-2를 통한 세포자멸사 억제에 적지 않은 영향을 미칠 것으로 생각된다.

참고문헌

- Csomor J, Kaszas I, Kollar B, et al. Prolonged survival using anti-CD20 combined chemotherapy in primary prostatic intravascular large B-cell lymphoma. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 281-4.
- Kahl B. Chemotherapy combinations with monoclonal antibodies in non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol* 2008; 45: 90-4.
- Bessho Y, Oguri T, Ozasa H, et al. ABCC10/MRP7 is associated with vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2009; 21: 263-8.
- Fedasenka UU, Shman TV, Savitski VP, Belevcev MV. Expression of MDR1, LRP, BCRP and Bcl-2 genes at diagnosis of childhood all: comparison with MRD status after induction therapy. *Exp Oncol* 2008; 30: 248-52.
- Larbcharoensub N, Leopairat J, Sirachainan E, et al. Association between multidrug resistance-associated protein 1 and poor prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy. *Hum Pathol* 2008; 39: 837-45.
- Jaffe E. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: IARC, 2001.
- Maeshima AM, Omatsu M, Nomoto J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses. *Cancer Sci* 2008; 99: 1760-8.
- Ohsawa M, Ikura Y, Fukushima H, et al. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology* 2005; 68: 422-31.
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-27.
- Shman TV, Fedasenka UU, Savitski VP, Aleinikova OV. CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML. *Ann Hematol* 2008; 87: 353-60.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 1-6.
- Azab SS, Salama SA, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Demerdash E, Al-Hendy A. 2-Methoxyestradiol and multidrug resistance: can 2-methoxyestradiol chemosensitize resistant breast cancer cells? *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113: 9-19.
- Fantappie O, Solazzo M, Lasagna N, Platin F, Tessitore L, Mazzanti R. P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines. *Cancer Res* 2007; 67: 4915-23.
- Sakaeda T, Nakamura T, Hirai M, et al. MDR1 up-regulated by apoptotic stimuli suppresses apoptotic signaling. *Pharm Res* 2002; 19: 1323-9.
- Germann UA, Chambers TC. Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Cytotechnology* 1998; 27: 31-60.
- Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2006; 42: 295-309.