

대장 상피종양에서 Cathepsin B, H, L 발현의 의의

심재영 · 이미자 · 기근홍

조선대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2008년 9월 4일
게재승인 : 2009년 6월 4일

책임저자 : 기 근 홍
우 501-759 광주광역시 동구 서석동 374
조선대학교 의과대학 병리학과
전화: 062-230-6342
Fax: 062-234-4584
E-mail: khkee@chosun.ac.kr

*본 논문은 2005년도 조선대학교 연구비의 지원을 받아 연구되었음.

Significance of the Expression of Cathepsins B, H, & L in Colonic Epithelial Neoplasms

Jae-Young Sim, Mi-Ja Lee and Keun-Hong Kee

Department of Pathology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea

Background : Cathepsin is associated with tumorigenesis, tumor invasion and metastasis through its ability to induce degradation of extracellular matrix components. **Methods :** To investigate the correlation between cathepsin expression and tumor progression, invasion depth or nodal metastasis, immunohistochemical staining for cathepsins B, H and L were done on 20 hyperplastic polyps, 48 adenomas, and 67 adenocarcinomas of the colon. Evaluation of the expression of cathepsins B, H and L was based on the percentage of neoplastic cells that stained positive for any given cathepsin. **Results :** Cathepsin B expression was significantly higher in adenocarcinomas than adenomas (29.33 vs 5.48%), but was not associated with the degree of differentiation, depth of invasion and nodal status of the tumors. Expression of cathepsins H and L was absent or low in both adenomas and adenocarcinomas. **Conclusions :** We suggest that cathepsin B is involved in progression of a subset of colonic adenomas, while cathepsins H and L are not.

Key Words : Cathepsin; Colon; Adenoma; Adenocarcinoma

Cathepsin은 세포외마atriz 파괴하여 암종의 침습이나 전이 과정에 관여하는 것으로 알려져 있는데,¹ cathepsin 계열에는 cysteine 단백분해효소인 cathepsin B, L, H, K, S, O와 aspartate 단백분해효소인 cathepsin D, E 그리고 serine 단백분해효소인 cathepsin G가 있다.¹

본 연구의 대상인 cathepsin B, L, H는 리소솜에 존재하는 cysteine 단백분해효소의 일종으로 대장암종에서의 과활동 및 과발현이 보고된 바 있다.²⁻⁶ 이전의 연구에서는 주로 cathepsin B의 기질 조직에서의 발현 양상이나 샘암종의 분화도와와의 관계 등이 조사된 것에 반해, 본 연구에서는 샘암종의 비교 및 샘암종의 침윤 정도, 전이 여부와의 연관성 조사를 통하여 대장 샘암종의 조기 발견 등 임상적 응용 가능성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

대장 내시경 생검을 통하여 진단된 증식성 폴립 20예와 샘종 48예에 근치적 절제술을 시행하여 샘암종으로 진단된 67예를 연구대상으로 삼았으며, 이들을 포르말린액으로 고정한 파라핀 포매

조직에 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 선택된 블록의 4 μ m 절편에 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 saline sodium citrate 용액에 담구어 Pelco™ laboratory microwave oven (Ted Pella Inc, Redding, CA, USA)에 5분씩 3회 가열하였다.

그런 후 PBS에 세척하고 3%의 H₂O₂-methanol 용액으로 조직 내 내인성 과산화효소의 활성을 저지시킨 후 단백질과의 비특이성 결합을 억제시키기 위하여 정상 혈청을 실온에서 10분간 가하였다. 혈청을 털어서 제거한 후에는 일차 항체인 cathepsin B (rabbit polyclonal, dilution 1:50, Calbiochem, Darmstadt, Germany), cathepsin H (goat polyclonal, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 그리고 cathepsin L (rabbit polyclonal, dilution 1:100, Calbiochem)을 실온에서 1시간 반응시키고 PBS로 세척한 후 이차항체로 각각 10분간 처리하였다. 그 다음 PBS로 세척하고, 발색제로 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC, Immunotech Co., Foster City, CA, USA)을 반응시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색하고 crystal mount (Biomedica Corp., Foster City, CA, USA)로 봉입하여 관찰하였다.

면역조직화학적 염색 결과의 판정은 1인의 병리의사가 동일

한 기준으로 일관성을 가지고 하였다. 이때 종양 세포의 세포질에 염색된 경우를 양성으로 판정하였고, 광학현미경 400배 시야에서 종양 세포 500-1,000개당 양성 세포의 수를 세어 백분율로 나타내었으며, 1% 미만의 경우는 음성으로 취급하였다. 통계학적 처리는 마이크로소프트사의 엑셀 프로그램을 이용하여 평균값과 표준편차를 구하였고, Student t-test를 시행하였으며, 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

일반적 특성

샘종의 종류와 샘암종의 분화도, 침윤 정도 및 림프절 전이 여부를 Table 1에 정리하였다.

Cathepsin B 발현율

증식성 폴립 20예 중 18예가 음성이었고, 2예에서 극히 소수의 세포가 양성이었다. 또한 대식구를 포함한 염증 세포 일부도 양성으로 염색되었다. 샘종은 $5.48 \pm 8.20\%$ 의 양성률을 보였는데

(Table 2) (Fig. 1A), 이를 조직학적 유형에 따라 분류하면 관상이 $1.25 \pm 2.26\%$, 관용모상이 $13.33 \pm 14.43\%$, 용모상이 $10.00 \pm 8.37\%$ 로서 용모상이 있는 경우 양성률이 약간 높았으나 통계적 유의성은 없었다($p = 0.283$, $p = 0.145$). 또한 샘종과 증식성 폴립 간의 차이는 통계적으로 유의하였다($p = 0.012$).

한편, 샘암종의 양성률은 $29.93 \pm 22.05\%$ 로서 (Table 2) (Fig. 1B), 증식성 폴립이나 샘종보다 유의하게 높았는데($p < 0.0001$, $p < 0.0001$), 샘암종의 분화도에 따라서는 고분화군이 $30.79 \pm$

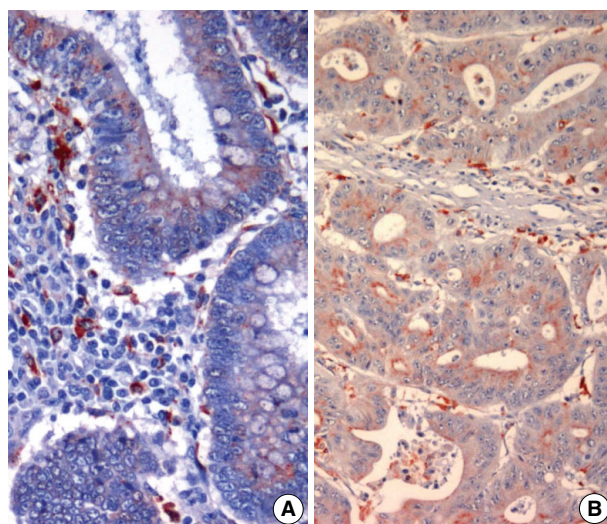


Fig. 1. Cathepsin B reactivity in tubular adenoma (A) and colonic adenocarcinoma (B). Of tubular adenoma, cytoplasmic positivity is shown in about 40% of tumor cells. Of adenocarcinoma, cytoplasmic positivity is shown in about 90% of tumor cells. Overall positive cell rates are $5.48 \pm 8.20\%$ and $29.33 \pm 22.05\%$ in adenoma and adenocarcinoma, respectively.

Table 1. General characteristics of study cases

| | Adenoma (No.) | Adenocarcinoma (No.) |
|------------------|---------------|----------------------|
| Differentiation | | |
| TA | 27 | Well 19 |
| TVA | 7 | Moderate 43 |
| VA | 13 | Poor 5 |
| Sex | | |
| Male | 34 | Male 40 |
| Female | 14 | Female 27 |
| Invasion depth | | |
| | | Submucosa 2 |
| | | Muscle 12 |
| | | Subserosa 13 |
| | | Pericolic fat 40 |
| Nodal metastasis | | Absent 35 |
| | | Present 32 |

TA, tubular adenoma; TVA, Tubulo-villous adenoma; VA, Villous adenoma.

Table 2. Cathepsin B, H, and L immunoreactivity (percentage of positive cells) in adenomas and adenocarcinoma of the colon

| | Positive cell rate (%) | | |
|-------------|------------------------|-----------------------|-----------|
| | Adenoma (n=48) | Adenocarcinoma (n=67) | p-value |
| Cathepsin B | 5.48 ± 8.20 | 29.33 ± 22.05 | <0.0001 |
| Cathepsin H | 0.48 ± 2.18 | 0.99 ± 3.26 | 0.017 |
| Cathepsin L | 0.71 ± 1.79 | 2.24 ± 2.90 | 0.083 |

Table 3. Cathepsin B, H, and L immunoreactivity (percentage of positive cells) in adenocarcinoma of the colon according to the differentiation, invasion depth and nodal metastasis status

| | Cathepsin B | Cathepsin H | Cathepsin L |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Differentiation ^a | | | |
| Well (n=19) | 30.79 | 2.11 | 1.84 |
| Moderate (n=43) | 29.77 | 0.62 | 2.26 |
| Poor (n=5) | 28.33 | 0 | 3.33 |
| Invasion depth ^a | | | |
| Submucosa (n=2) | 32.50 | 0 | 0 |
| Muscle (n=13) | 25.00 | 1.23 | 2.69 |
| Subserosa (n=12) | 31.25 | 1.02 | 2.16 |
| Pericolic fat (n=40) | 31.00 | 1.00 | 2.25 |
| Node metastasis ^a | | | |
| Absent (n=35) | 25.57 | 1.03 | 2.00 |
| Present (n=32) | 32.50 | 0.94 | 2.50 |

^aThere is no statistical significance ($p > 0.05$) between cathepsin B, H, and L expression, differentiation grade, invasion depth and nodal metastasis status of colonic adenocarcinoma.

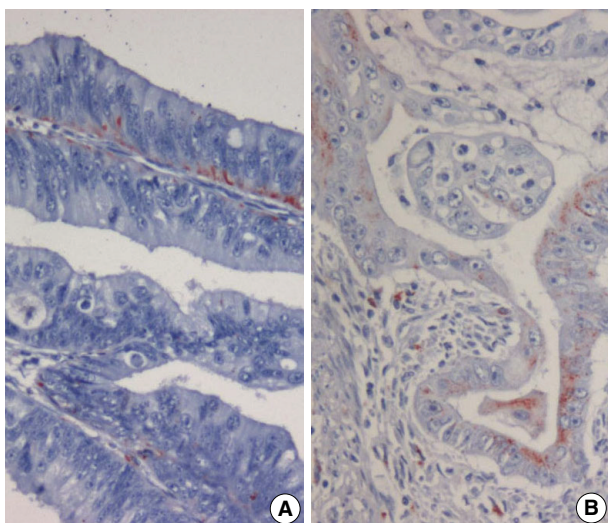


Fig. 2. Cathepsin H reactivity in tubular adenoma (A) and colonic adenocarcinoma (B). Of tubular adenoma, cytoplasmic positivity is shown in about 5% of tumor cells. Of adenocarcinoma, cytoplasmic positivity is shown in about 10% of tumor cells. Overall positive cell rates are $0.48 \pm 2.18\%$ and $0.99 \pm 3.26\%$ in adenoma and adenocarcinoma, respectively.

26.57%, 중등도분화군이 $29.77 \pm 21.97\%$, 저분화군이 $28.33 \pm 19.41\%$ 로서 차이가 없었다(Table 3). 침윤 정도에 따른 양성률도 점막하층 이하가 32.50%, 근층이 $25.00 \pm 22.17\%$, 장막하층이 $3.25 \pm 21.75\%$ 그리고 주위 지방 조직이 $1.00 \pm 22.40\%$ 로서 서로 차이가 없었다. 림프절 비전이군 및 전이군의 cathepsin B 양성률 또한 $27.57 \pm 22.80\%$ 및 $32.50 \pm 21.63\%$ 로서 역시 차이가 없었다.

Cathepsin H 발현율

증식성 폴립은 20예 모두 음성이었으며, 샘종은 48예 중 3예에서만 양성 소견을 보였다(Fig. 2A). 특히 샘암종의 양성률은 $0.99 \pm 3.26\%$ 로서(Table 2) (Fig. 2B), 샘종과의 차이는 없었지만($p=0.417$) 증식성 용종보다는 유의하게 높았다($p=0.017$). 또한 샘암종의 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 여부에 따른 차이는 없었다(Table 3).

Cathepsin L 발현율

증식성 폴립은 20예 모두 음성이었으며, 샘종 48예 중 6예의 일부 세포가 양성이어서 양성률은 $0.71 \pm 1.79\%$ 이었고(Table 2) (Fig. 3A), 유형에 따른 차이는 없었다. 샘암종은 증식성 폴립 및 샘종보다는 높았으나 $2.24 \pm 2.90\%$ 의 낮은 양성률을 나타냈으며(Fig. 3B), 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 여부와는 무관하였다(Table 3).

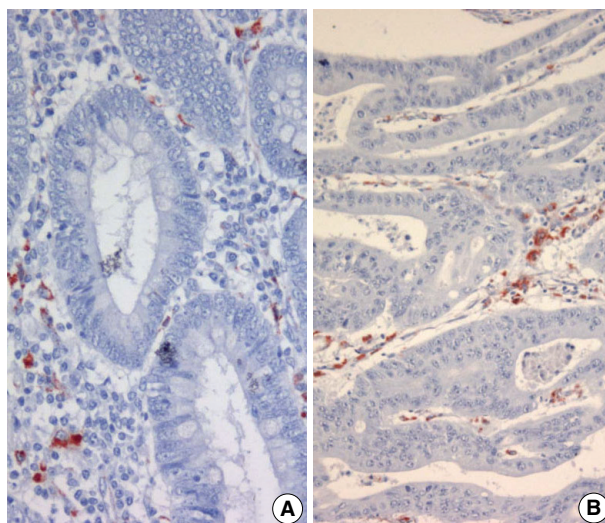


Fig. 3. Cathepsin L reactivity in tubular adenoma (A) and colonic adenocarcinoma (B). Overall positive cell rates are $0.71 \pm 1.79\%$ and $2.24 \pm 2.90\%$ in adenoma and adenocarcinoma, respectively.

고 찰

종양 세포의 침윤에는 단백분해효소가 그 역할을 하는 것으로 생각되며, 이를 규명하기 위한 연구의 일환으로 cathepsin의 임상적 의미에 관한 다양한 연구가 시행되고 있다.⁷⁻⁹ Cathepsin은 다종의 단백분해효소로서 기질 단백을 파괴하는 특성을 가지며, 주로 세포질 내 리소솜에서 발견되는데¹ 이 중 cathepsin B는 43 kD의 불활성 형태에서 활성화되는 경우 31 kD로 변하여 작용한다.^{10,11}

본 연구 결과도 증식성 폴립보다 샘종에서, 관상 샘종보다 용모성 샘종에서 그리고 샘종보다 샘암종에서 cathepsin B의 양성률이 높게 나왔는데, 이는 cathepsin B가 세포 악성화 과정에서 역할을 하고 있음을 시사한다. 한편, Satoh 등⁴의 연구에 의하면 cathepsin B는 샘종과 샘암종의 구분을 위한 표지자로서도 민감도가 높으며, Guzinska-Ustymowicz 등⁵의 연구에서는 악성 종양의 tumor-budding 부위에서 채취한 세포에서 생화학적 검사상 cathepsin B의 증가가 있다고 하였다. 또한 Kruszkowski 등⁶의 연구에 의하면 cathepsin B의 과발현이 종양 세포에서의 혈관 발생과도 관련이 있다고 하였다. 본 연구에서 샘암종의 분화도에 따른 cathepsin B 발현의 차이는 발견되지 않았으며, 종양의 침윤 정도 및 림프절 전이 유무에 따른 발현율의 차이도 발견되지 않았다. 따라서 이는 cathepsin B가 대장 샘암종의 초기에 일정한 역할을 하였으나 암종의 침윤이나 전이와는 관련성이 없을 가능성을 시사한다.

Cathepsin H는 리소솜 당단백 성분으로 cathepsin B나 L과 다르게 papain 유사군에서 유일한 mono-aminopeptidase로 알려져 있고, 주로 종양의 전이와 관련이 있다고 밝혀져 있는데,¹² 특히 최근 대장암, 유방암, 피부 종양 및 방광암에서의 발현 양

상이 보고되고 있다.^{3,13-16}

본 연구에서 cathepsin H는 증식성 폴립 모두에서 음성이었고, 샘종 3예 및 샘암종 7예에서 일부 세포에서 양성이었으나, 전체적으로는 음성 증례가 많은 부분을 차지하여 의미를 부여하기 어려웠다. Cathepsin H와 대장 샘암종의 연관관계에 대한 연구는 아주 부족한 실정인데, del Re 등³이 대장암에서 발현이 나타나는 것을 보고한 바가 있으나, 이는 77예 중 양성 소견이 나타나는 것만을 단순히 기술하였을 뿐이다. 또한 Schweiger 등¹³은 대장 샘암종 환자를 ELISA로 수술 전 혈청 내 cathepsin H의 수준을 측정하면 정상인에 비해 증가되어 있는데 그 수준이 예후와 관련이 있다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 샘암종 일부 증례에서 cathepsin H가 조직에서 발현은 하였으나, 샘암종의 분화도나 침윤 정도, 림프절 전이와의 관련성은 찾을 수 없었다. 이러한 결론을 보완하기 위해서는 대장 샘암종 환자에서 cathepsin H의 혈청 수준을 조직과 비교하여 분석하는 연구를 추가적으로 시행할 필요가 있을 것이다.

Cathepsin L은 32 kD의 분자량을 갖는 경우 활성을 나타내는 cystein 단백질효소이다.¹⁷ 본 연구에서 cathepsin L은 증식성 폴립에서 모두 음성으로 관찰되었으며 샘종에서도 48예 중 6예에서만 낮은 양성률을 나타냈다. 또한 샘암종에서는 27예가 양성이었으나 대부분 소수의 세포에서만 발현하였다. 이 양성률은 증식성 폴립이나 샘종과 비교하면 의미 있게 높았으나, 수치 자체가 너무 낮아서 cathepsin H와 마찬가지로 임상적 의미를 부여하기 어렵다고 판단된다. 또한 샘암종의 분화도, 침윤 정도, 림프절 전이 유무에 따른 차이도 관찰되지 않았다. 특히 Adenis 등¹⁸의 연구에서 cathepsin L의 활성도는 대장 샘암종 세포의 분화도나 TNM 병기와 관련이 낮다고 하여 본 연구와 유사한 결론을 보이고 있다. 또한 Kim 등¹⁹에 의하면 K-ras 유전자 변이가 있는 암종에서 변이가 없는 경우에 비해 활성도가 높다고 하였으므로 Cathepsin L 발현과 K-ras 등 다른 유전자 변이와의 관계에 관해서는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 cathepsin B는 대장 샘종에서 샘암종으로 진행되는 과정에서 발현이 증가하지만 침윤 과정에는 관여하지 않는 것으로 추정된다. 또한 샘종과 샘암종 간 양성률의 차이를 감별 진단에 활용할 수 있을 것으로 사료되며, Cathepsin H와 L는 대장에서 발생하는 각종 종양성 병변 발생과는 관련이 없는 것으로 생각된다.

참고문헌

- Jedieszko C, Sloane BF. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* 2004; 385: 1017-27.
- Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, *et al.* Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 1421-30.
- del Re EC, Shuja S, Cai J, Murnane MJ. Alterations in cathepsin H activity and protein patterns in human colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 82: 1317-26.
- Satoh Y, Higashi T, Nouse K, *et al.* Cathepsin B in the growth of colorectal cancer: increased activity of cathepsin B in human colorectal cancer. *Acta Med Okayama* 1996; 50: 305-11.
- Guzinska-Ustymowicz K, Zalewski B, Kasacka I, Piotrowski Z, Skrzydlewska E. Activity of cathepsin B and D in colorectal cancer: relationships with tumour budding. *Anticancer Res* 2004; 24: 2847-51.
- Kruszewski WJ, Rzepko R, Wojtacki J, *et al.* Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. *Neoplasma* 2004; 51: 38-43.
- Tsukuba T, Okamoto K, Yosuda Y, Morikawa W, Nakanishi H, Yamamoto K. New functional aspects of cathepsin D and cathepsin E. *Mol Cells* 2000; 10: 601-11.
- Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, *et al.* Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 213-21.
- Fernandez PL, Farre X, Nadal A, *et al.* Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 95: 51-5.
- Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981; 80: 535-61.
- Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF. Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 7721-5.
- Guncar G, Podobnik M, Pungercar J, Strukelj B, Turk V, Turk D. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure* 1998; 6: 51-61.
- Schweiger A, Christensen IJ, Nielsen HJ, Sørensen S, Brünner N, Kos J. Serum cathepsin H as a potential prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2004; 19: 289-94.
- Decock J, Obermajer N, Vozelj S, Hendrickx W, Paridaens R, Kos J. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer. *Int J Biol Markers* 2008; 23: 161-8.
- Frohlich E, Mohrle M, Klessen C. Cathepsins in basal cell carcinomas: activity, immunoreactivity and mRNA staining of cathepsins B, D, H and L. *Arch Dermatol Res* 2004; 295: 411-21.
- Staack A, Tolic D, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Expression of cathepsins B, H, and L and their inhibitors as markers of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2004; 63: 1089-94.
- Hashimoto Y, Kondo C, Kojima T, *et al.* Significance of 32-kDa cathepsin L secreted from cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*

- 2006; 21: 217-24.
18. Adenis A, Huet G, Zerimech F, Hecquet B, Balduyck M, Peyrat JP. Cathepsin B, L, and D activities in colorectal carcinomas: relationship with clinico-pathological parameters. *Cancer Lett* 1995; 96: 267-75.
19. Kim K, Cai J, Shuja S, Kuo T, Murnane MJ. Presence of activated ras correlates with increased cysteine proteinase activities in human colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 79: 324-33.