[UCI]I804:24011-200000233912

2007년 2월
석사학위논문

결직장선암종에서 connexin 26 발현의 의의

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과
홍 란

결직장선암종에서
connexin 26 발현의 의의

Pathologic signficance of connexin 26 expression
in colorectal adenocarcinoma

2007년 2월 일

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과
홍 란

결직장선암종에서 connexin 26 발현의 의의

지 도 교 수　임 성 철

이 논문을 의학석사학위 신청 논문으로 제출함

2006년　11월　　일

조 선 대 학 교　대 학 원
의　　학　　과
홍　　란

홍란의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서 재 홍 인

위 원 조선대학교 교수 전 호 종 인

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 인

2006년 11월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

표목차 i

도목차 ii

Abstract 1

Ⅰ. 서 론 3

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구재료 5

2. 연구방법 6

Ⅲ. 결 과

1. 임상 및 조직학적 소견 9

2. Cx26 의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의 9

3. COX-2의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의 11

4. p53 단백의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의 12

Ⅳ. 고 찰 13

Ⅴ. 결 론 16

참고문헌 17

표 24

사진부도 28

표 목 차

Table 1. Relation between Cx26 immunoreactivity and the clinicopathohologic features of the adenocarcinoma of the colorectum 24

Table 2.Difference of Cx26 immunoreactivity among normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma 24

Table 3. Relation between clinicopathologic features and extent of COX-2 expression in the colorectal adenocarcinoma 25

Table 4. Relation between clinicopathologic features and intensity of COX-2 expression in colorectal adenocarcinoma 25

Table 5. Relation between IRS-COX2 and the clinicopathologic features of the colorectal adenocarcinoma 26

Table 6. Expression of COX-2 in colorectal adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic parameters and patient survival (p-value) 26

Table 7. Relation between clinicopathologic features and immunoreactivity of p53 protein in the colorectal adenocarcinoma 27

Table 8. Relation between Cx26 immunoreactivity and expression of COX-2 and p53 protein in the colorectal adenocarcinoma 27

도 목 차

Fig. 1. Immunohistochemical staining for Cx26
in colonic adenocarcinoma. 28

Fig. 2. Immunohistochemical staining for Cx26
in colonic adenoma. 28

Fig. 3. Immunohistochemical staining for Cx26
in colonic adenocarcinoma. 29

Fig. 4. Immunohistochemical staining for COX-2
in colonic adenocarcinoma. 29

Fig.5 Immunohistochemical staining for p53
in colonic adenocarcinoma. 30

Abstract

Pathologic signficance of connexin 26 expression in colorectal adenocarcinoma

Hong, Ran
Advisor: Prof. Lim, Sung-Chul, M.D, Ph.D
Department of Medicine
Graduate School of Chosun University

Gap junctions are specialized cell membrane channels which composed of transmembrane proteins called connexin (Cx). A member of Cx family, Cx26, which is normally located in the cell membrane, is considered as a potential tumor suppressor in several cancers. The aim of the present study was to examine the significance between Cx26 expression and clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinoma, adenoma and normal epithelium by immunohistochemistry. The author also purpose to evaluate the relationship between expression of COX-2 and p53 protein in human colorectal adenocarcinoma and well-known clinicopathologic parameters .

The expression of Cx26 was evaluated using immunohistochemistry in total 127 surgical resected colorectal adenocarcinomas, 12 adenomas, and 10 normal mucosae.

There are statistical significance in difference of Cx26 expression rate among the normal epithelium, adenoma and adenocarcinoma ($p<0.001$). Of 127 cases of adenocarcinoma, 49% were positive for Cx26, and 51% were negative for that. Whereas in adenoma and normal epithelium, all cases showed positivity for Cx26, however, positive cell rates of Cx26 in adenoma were decreased rather than those in normal epithelium. Cytoplasmic staining was found in colorectal adenocarcinomas (22%), but not showing in adenoma and normal epithelium. Positive correlation between decrement of membrane expression of Cx26 and tumor invasion (pT) was statistically significant ($p<0.05$).

The positivity for COX-2 and p53 were 47%, 49%, respectively. Extent of COX-2 expression was related to tumor progression (pT) and clinical stage. And, Multiplication of intensity score and extent score resulted in the COX-2 immunoreactivity score (IRS-COX2), which showed significant difference in clinical stage. And, p53 protein expression was increased in reverse proportion to Cx26 membrane staining.

These results suggest that loss of intercellular Cx26 expression and cytoplasmic staining have a role in colorectal carcinogenesis, and tumor progression, especially, tumor invasion.

Ⅰ. 서 론

항상성 유지는 조직기능의 주된 역할로서 이에 장애가 발생할 경우 기관에 악성 종양을 포함한 여러 질환이 발생하게 된다.[1] 간극결합 세포 간 전달체계(gap junctional intercellular communication-GJIC)는 여러 유기체에서 세포의 성장과 분화, 이주 등을 조절함으로써 조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며, 따라서 종양억제에도 중요한 기능을 하게 된다. 세포 간 전달체계는 주로 간극결합으로 매개되는데, 이러한 간극결합을 통해 미세한 수용성 분자들(작은 대사물질, 이차 전달자, 이온 등)은 주변 세포의 세포질로 직접 이동한다.[1]

Connexin (Cx)은 약 20여 개의 세포막을 가로지르는 단백질로 구성된 connexon을 구성하는 일원으로 간극결합의 주된 단위를 구성한다. GJIC의 상실이나 기능저하, 혹은 Cx에 발생한 돌연변이는 정상세포가 정상 성장조절을 벗어나게 함으로써 종양세포로 전환되는 데 중요하게 작용하는 것으로 보인다.[2-10] 이제까지 여러 가지의 악성종양, 예를 들어 피부암[11], 폐암[12], 위암[13], 간암[14], 신경교아세포종[15], 전립선암[16]등에서 Cx 발현의 하향조절과 혹은 세포질 내 국지화 등의 변형된 Cx 발현 소견이 악성 표현형(malignant phenotype)과 관계있는 것으로 알려져 왔으며[17-21] Cx과 간극결합이 결여된 세포주에 Cx을 외부에서 인위적으로 발현시키면 세포간의 기능적 전달체계가 회복되며 이는 결과적으로 종양의 성장을 억제시킨다고 알려져 있다.[22,23] 따라서, 발암기전에 관여하는 간극결합은 세포 간 전달을 가능케 함으로써 종양발생억제에 중요한 역할을 하며 따라서 이러한 Cx family는 종양억제자로서 작용하는 것이다.[24,25]

하지만 이와 대조적으로 유방암이나 난소암에서는 좀 더 병기가 진행될수록 Cx26의 발현이 증가하는 것이 보고된 바 있으며[26] Cx26가 주변혈관의 내피세포와의 이형 간극결합을 형성함으로써 종양의 혈관 내 침입(intravasation)이나 혈관 외 유출(extravasation)을 용이하게 하여 종양세포의 침습 혹은 전이능력을 조절할 수 있다는 보고[27]도 있어 Cx과 간극결합의 정확한 역할은 종양의 종류와 그 발달단계에 따라 서로 상이할 것으로 보인다.

결직장암종은 초기의 APC 유전자의 소실 및 돌연변이가 폴립형성 이전에 나타나

고 DNA 메틸화의 변화가 동반되며 이후 작은 크기의 샘종에서는 *K-ras* 유전자의 돌연변이가 나타나며 이후 샘종이 커지면서 18q 염색체의 소실이 발생하고 샘종에서 샘암종이 발생하는 시기에 17q의 소실과 함께 p53 유전자의 돌연변이가 일어나는 순차적인 유전변화를 거친다는 사실은 잘 알려진 바이다.[28] 따라서 p53의 돌연변이는 결직장 샘암종의 발생과정이 아닌 종양의 성숙과정에 큰 역할을 하는 것으로 생각된다.

또한 프로스타글란딘은 신생혈관의 형성과 면역학적 감시작용을 억제함으로써 종양발생을 촉진한다.[29,30] COX-2는 프로스타글란딘을 형성하는데 촉매작용을 하는 효소로 염증 매개인자, 사이토카인, 성장인자, 종양유전자, 발암물질 등에 의해 유도되며 세포자멸사를 억제하여 발암과정에 중요하게 작용한다.[31-34]

본 연구에서는 면역조직화학적 방법을 통해 결장 및 직장의 상피세포에 정상적으로 존재하는 Cx26를 결직장 선암종, 선종 및 정상 상피로 구분하여 발현 정도 및 발현 양상을 평가하여 종양의 침습정도, 림프절 전이여부, 타장기 전이여부, 환자의 임상병기, 생존율, 생존 기간 등 기왕에 알려진 여러 가지 예후와 관련된 임상적 자료들과의 관련성을 검토해 보고 Cx26의 결직장 종양 형성 및 진행에서의 역할을 규명하고자 한다. 이와 더불어 COX-2와 p53의 결직장 선암종에서의 발현여부와 함께 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 검사하고, 이들의 Cx26과의 상관성을 비교 검토해 보고자 한다.

Ⅱ. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

가. 증례선정

1992년 1월부터 2004년 12월까지 13년 동안 조선대학교병원 외과에서 결직장 선암종의 진단 하에 외과적 적출술을 시행한 환자 중 생존여부 및 사망일을 확인할 수 있으며 조직보관 상태와 의무기록이 양호한 127명의 환자를 비연속적으로 선택하였다. 또한 비교분석을 위하여 2005년도에 내시경적 절제술을 시행한 12예의 대장 선종과 특별한 조직학적 이상소견을 찾을 수 없는 내시경적 생검된 정상 점막 10례를 대상으로 하였다.

나. 시약

면역조직화학적 검사에 사용된 1차항체는 connexin 26 goat polyclonal antibody (N-19, sc-761; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), COX-2 mouse monoclonal antibody (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), 그리고 p53 mouse monoclonal antibody DO-7 (DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하였고, 2차항체 및 발색제는 ImmunoCruz^{TM} Staining System: sc-2053 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 LSAB Kit (DAKO, Glostrup, Denmark)를 이용하였으며, Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였고, Clear Mount (Zymed, CA, USA)로 봉입하였다.

2. 연구방법

가. 조직병리학적 분석

1) 광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 화일을 후향적으로 분석하여 각 종양을 재검토하고 나이, 성별, 종양의 조직학적 형태 및 종양 침습 깊이, 림프절 또는 원격 전이 유무, 그리고, Cx26, COX-2 및 p53 단백 발현 등을 확인하였다. American Joint Committee on Cancer의 TNM staging system[35] 에 따라 병기를 정하였다.

관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4-5㎛ 두께로 박절하여 H&E 염색을 실시하여 광학현미경으로 검경하여 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다.

2) 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 조직을 4㎛ 두께로 박절하여 X-tra™슬라이드(Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈 파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시킨 후 LSAB 방법에 의해 염색을 시행하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (10mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10 분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 1차 항체 Cx26 (dilution-1:200), COX-2 (dilution-1:300), p53 (dilution-1:100)을 37℃ 배양기에서 2시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 Cx26에 대한 염색은 goat ImmunoCruz™ Staining System: sc-2053 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을, COX-2와 p53에 대한 염색은 LSAB Kit를 이용하여 비오틴이 함유된 2차항체를 실온에서

10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고, peroxidase가 결합된 streptavidin용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척 후 DAB (diaminobenzoic acid)로 발색하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Clearmount™ Mounting Solution (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA)으로 봉입하였다.

양성 대조군으로는 Cx26의 경우는 대장 선종 및 정상 대장 점막조직을 이용하였으며, COX-2는 유방의 관상피암종 조직을, p53은 장액성 난소선암종 조직을 이용하였다. 음성 대조군으로는 1차 항체 대신 tris 완충액을 사용하였다.

나. 면역조직화학적 염색의 판정

염색 결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과를 알지 못하는 2인의 병리의사에 의해 시행되었다.

Cx26에 대한 염색 결과는 세포막 염색과 세포질 내 염색으로 구분하였으며, 세포막 염색 또는 세포질 염색에 무관하게 종양세포 중 양성세포의 백분율을 판정하고, 그 정도에 따라 음성(<10% 양성)과 양성(≥10% 양성)으로 재분류하였다.

세포질 염색은 세포막 염색여부 및 정도에 무관하게 세포질 내 양성반응이 뚜렷이 관찰되면 양성으로 판정하였다.

종양세포에서의 COX-2 발현은 Remmele & Stegner[36]의 방법을 사용하여 염색의 강도를 0(음성), 1(약양성), 2(중간양성), 3(강양성)으로 분류하였으며, 각각 종양조직에서 양성의 소견을 보이는 부분을 백분율로 환산하여 양성소견을 보이는 범위를 0(0%), 1(1~20%), 2(21~50%), 3(51~80%), 4(81~100%)로 기술한 후 이들을 여러 임상병리학적 인자들과 비교하였고, 염색강도와 염색범위를 곱하여 0~12까지의 COX-2 면역발현점수(immunoreactivity score:IRS-COX2)를 산정한 후 COX-2 양성판정에 여러 단계의 임계지수를 적용하여 여러 임상병리학적 인자 및 환자의 생존기간과의 관계를 비교하였다.

p53 단백은 핵에 염색되는 것을 반응이 있는 것으로 간주하여 양성의 소견이 보이는 부분을 백분율로 표시하여 0(0~9%), 1(10~40%), 2(41~70%), 3(71~100%)으로 분류하였다.

다. 통계학적 분석

결직장암에서 Cx26, COX-2 및 p53 단백의 발현과 여러 임상병리학적 요소들, 생존율 또는 생존기간과의 관련성, 여러 임상병리학적 요소들과 생존율 또는 생존기간과의 관련성, 정상점막, 선종 및 결직장 선암종에서의 Cx26 발현의 차이에 대한 통계학적 분석은 χ^2 test, Fisher's exact test, ANOVA, Student's t test를 이용하였으며, 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$로 하였다. 분석은 Stat View software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) 프로그램을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 임상 및 조직학적 소견

전체적인 성비는 남자:여자가 60:67로 거의 비슷한 빈도로 나타났으며 연령대는 50대(30례, 23.6%), 60대(45례, 35.4%), 70대(45례, 35.4%)에 집중되어 있었다. 각 127례는 T 병기(종양침습 정도), N 병기(국소림프절 전이 유무), M 병기(원격전이 유무) 및 임상병기를 구분하였다.(Table 1) 환자의 생존여부 및 사망일은 전화 및 우편으로 확인하였다.

*2. Connexin 26*의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

1) Cx26 양성세포율*(positive cell rate)*과 양성여부*(positivity)*

Cx26에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 전체 종양세포 중 양성발현을 보이는 세포의 수를 백분율로 표시하였으며 그 중 10%이상의 발현도를 보이는 예에 한해 양성으로 판정하여 임상병리학적 요소들과의 관련성과 그룹 간 차이를 비교분석하였다. 결직장 선암종 127예중 62예(48.8%)에서 Cx26의 양성을, 65예(51.2%)에서 음성을 보였으며, 선종과 정상 상피에서는 전례에서 (12/12, 10/10)에서 양성을 보여 Cx26의 그룹 간 발현도는 통계적으로 유의한 차이를 보였다.($p<0.0001$)(Table 2, Fig. 1, Fig. 2)

선암종에서의 양성세포율은 0~80%의 분포를 보였으며 전체 결직장선암종에서의 평균발현율은 18.6%였다.

Cx26의 세포막과 세포질 발현을 구분하지 않은 전체적인 양성여부와 양성세포율은 여러 임상병리학적 인자들과는 상관성에서는 종양의 침습정도, 임파선전이여부, 타

장기 전이여부, 종양의 병기 모두에서 통계학적 유의성은 나타나지 않았으며 환자의 생존기간과도 의미 있는 상관관계를 보이지 않았다.

*2) Cx26*의 세포막 염색

세포막 염색은 선암종 127예중 50예(39.4%)에서 양성을, 77예(60.6%)에서 음성으로 판정되었으며 연령이나 성별에 따라 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 결직장 선암종의 침윤깊이, 림프절 전이정도 및 타 장기 전이여부, 임상적 병기와 Cx26의 세포막염색을 비교하여 보았을 때 점막까지 침윤한 경우 5례중 1례(20%) 근층까지 침윤한 경우 25례중 19례(76%) 장 주위 지방층이상 침윤한 경우 97예중 57예(58.8)에서 Cx26의 발현이 소실되어 종양의 침윤깊이(pT)간에 통계학적으로 유의한 차이를 보여($p=0.048$) Cx26이 결직장 선암종의 진행(progression), 특히 종양의 침습(invasion)에 중요한 작용을 하고 있을 것으로 판단된다. 그러나 림프절 전이(pT)나 타 장기 전이(pM), 임상병기에 따른 Cx26의 발현정도에서는 통계학적으로 유의한 차이가 발견되지 않았다.(Table 1)

환자들의 추적 검사 상 Cx26의 세포막 발현정도에 따른 생존율은 통계학적인 의의는 없었다.

*3) Cx26*의 세포질 염색

선암종의 28예(22%)에서 세포질에 염색되는 것을 확인할 수 있었으나 선종과 정상상피에서는 전 예에서 세포질 염색이 관찰되지 않아 그룹 간 유의한 차이를 보였다.($p<0.001$)(Table 2) (Fig. 3) 세포질 염색에서는 성별, 연령, 종양의 침윤깊이(pT), 림프절 전이(pN)나 타 장기 전이(pM), 임상병기(stage) 등 모든 임상병리학적 요소가 Cx26 세포질 염색여부와 상관관계를 보이지 않았으며(Table 1) 환자들의 추적 검사 상 Cx26의 세포질 발현정도에 따른 생존율은 통계학적인 의의는 없었다.

3. *COX-2*의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

COX-2는 결직장 선암종 127예 중 60예(47.2%)에서 양성을, 67예(52.8%)에서 음성을 보였다. COX-2의 발현도를 발현강도와 발현범위를 구분하여 결직장 선암종의 침윤깊이, 림프절 전이여부, 타 장기 전이여부 및 임상병기 등의 임상병리학적 인자들과의 상관여부를 살펴보았을 때 선암종의 침윤 깊이가 깊어질수록, 또한 임상병기가 높아질수록 COX-2 발현범위가 넓어지는 경향을 보였으며 이는 각각 통계학적으로 유의한 차이를 보였다.($p<0.05$)(Table 3) 그러나 림프절 전이여부나 타 장기 전이여부는 COX-2의 발현범위와는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.
COX-2 발현강도는 이상의 임상병리학적 요소들과 어떠한 상관관계도 보이지 않았다.(Table 4)

또한, COX-2의 발현강도와 발현범위를 점수화하여 이를 곱한 값(IRS-COX2)과 여러 임상병리학적 요소들과의 상관관계를 살펴보았을 때, 종양의 타 장기 전이여부(pM)와 종양의 임상병기가 높아질수록 그 값이 증가하는 것을 확인하였으며 이는 통계학적으로 유의한 값을 보였다. 하지만 전체 127명 중 타 장기 전이가 확인된 예가 1예에 불과하기 때문에 본 연구에서 확인된 타 장기 전이여부와 IRS-COX2값과의 상관여부는 신뢰성이 떨어질 것으로 생각된다. 종양의 침윤깊이(pT)와 림프절 전이여부(pN)는 IRS-COX2와는 유의한 관계를 보이지 않았다.(Table 5)

COX-2 발현범위 및 발현강도, IRS-COX2와 Cx26 발현과의 관계를 검사해 보았을 때 발현범위, 발현강도, IRS-COX 모두 Cx26 발현과의 관련성은 확인되지 않았다.
COX-2의 발현과 환자의 생존율간의 관련성을 비교해 보고자 IRS-COX2값의 양성판정시 임계점을 달리 하여 각각 비교해 보았을 때 어느 시점을 임계점으로 산정하더라도 COX-2가 발현되는 그룹보다 발현되지 않는 그룹에서 환자의 생존기간은 늘어나는 경향을 보였으나 이것이 통계학적 유의성을 보이지는 않았다.(Table 6)

4. p53 단백의 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

p53 단백은 62예(48.8%)에서 양성을, 65예(51.2%)에서 음성을 보였으며 염색강도로 구분하였을 때, 약약성이 13예(21%), 중간양성이 30예(48.4%), 강양성이 19예(30.6%)였으며 이상의 여러 임상병리학적 인자들과의 관련성은 보이지 않았다.(Table 7)

Cx26의 발현과 p53 발현정도를 비교해 보았을 때 Cx26의 세포막 발현이 소실되는 군에서 p53이 더 강하게 발현되어 그룹 간 차이를 보였으며 (p=0.035)(Table 8) p53 단백의 발현정도에 따른 환자의 생존율의 차이는 통계학적인 의의가 없었다.

Ⅳ. 고 찰

간극결합은 특수화된 세포막 통로로 인접한 세포의 세포질을 서로 연결한다. 이의 구조적 단위는 connexon으로 6개의 Cx으로 구성된 육량체의 통로(hexameric hemichannel)이다.[37] GJIC는 세포의 성장 및 분화에 관여함으로써 조직의 항상성 유지 기능을 하는데,[38] 이는 아마도 세포의 성장과 죽음에 관여하는 분자들의 세포간 교환이 이를 통하여 일어나게 됨으로써 가능하리라고 판단된다.[39]

간극결합의 연결은 종양세포의 악성도가 진행됨에 따라 감소한다고 알려져 있으며, 이러한 Cx 발현의 소실 및 gap junction channel 기능의 감소가 종양에서 확인되었고 각각의 Cx isoform들이 과발현되면 세포의 전이능력을 감소시킬 수 있기 때문에 Cx을 종양억제자라고도 부른다. 전통적인 간극결합은 동형(homometric)의 connexon으로 구성되어져 있고, 이 connexon은 한 종류의 Cx으로 구성되어져 있다. 일반적으로 발암과정에 Cx 발현의 감소나 간극결합 기능의 감소가 관련되어 있고, Cx의 과도한 발현이 종양억제를 시키는 것은 동형의 connexon으로 구성되어진 동형간극결합의 역할을 의미한다.[8,17,40] 하지만 종양이 좀 더 진행되면 Cx 단백과 간극결합이 다시 나타난다. 이들 중 일부는 서로 다른 Cx의 아형으로 이루어진 connexon을 만들며, 이런 connexon은 이형(heterotypic) 간극결합을 만든다. Cx 아형의 발현정도에 따라 숙주의 기질세포와 암세포 사이에서 비정상적인 세포 전달체계를 형성하여 숙주-기질세포의 표현형 전환(phenotype transformation)을 일으킴으로써 암세포의 침습을 초래하게 된다고 한다.[41,42] 또한 Cx이 세포의 성장 및 분화에 작용하는 유전자의 발현을 조절함으로써 종양의 진행을 조절한다고 추정되며[43], Ito 등[42]의 연구에 의하면 Cx이 흑색종에서의 전이능력을 조절한다고 보고하였다. 즉 혈관내피세포와 흑색종사이의 이형간극결합이 전이에 관여하는데, 이형간극결합의 Cx발현이 기질의 침습이나, 심지어는 전이를 용이하게 촉진하게 된다.

Cx26의 세포질 내 발현은 결직장 선암종의 발암과정에서 Cx 단백의 전사 과정중의 결함으로 종양세포의 세포질 내에 변형된 형태의 Cx 단백이 존재하는 것으로

추정된다.[43] Krutovskikh 등[44]은 Cx43에 대한 연구에서 Cx43은 Cx26, Cx32와 함께 정상 결직장 상피의 세포막에서 발현되며 Cx43의 3M domain에서의 돌연변이로 인해 Cx 단백이 세포와 세포사이에 위치하지 않고 세포내 즉, 핵과 세포질 내에 위치하는 것을 확인하였다. 그리고 이러한 종양세포의 핵과 세포질에 존재하는 Cx43이 세포성장을 조절하는 데 역할을 할 것으로 추정하였다. 한편 Oblina 등[45]은 Cx43의 돌연변이로 인해 이 단백의 세포막으로의 이동은 억제되지만 Cx의 종양세포 성장 억제능력은 감소시키지 못하므로 Cx에 의한 세포성장의 조절에 GJIC을 반드시 필요로 하지는 않음을 확인하였다. 따라서 세포질에서 발현하는 Cx 단백과 세포와 세포사이에서 발현하는 Cx 단백은 세포활성의 신호전달에 있어 서로 다른 역할을 하고 있을 것으로 추정된다.[43] 하지만 신호전달체계에 있어서의 Cx26의 역할에 대해서는 좀 더 기능적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 선암종에서 선종과 정상 상피에 비해 Cx26의 발현이 통계학적 유의성을 보이며 현저히 떨어지는 것을 확인하였다. Kanczuga 등[34]의 연구에서 결직장의 악성종양 대부분이 세포질 내 염색소견을 보였으나 본 연구에서는 일부 예(22%)에서 세포질 내 염색소견을 보이며 역시 선종이나 정상상피조직과 비교하였을 때 유의한 차이를 보였다. 따라서 이러한 Cx26 발현의 소실 혹은 감소의 소견과 세포질 내 염색소견이 결직장 발암과정에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정할 수 있다. 또한 Cx26의 발현과 기왕에 알려진 결직장 선암종의 임상병리학적 요소들 간의 상관여부에 대해서는 종양의 침습 정도와 Cx26의 발현여부가 유의한 상관관계를 보여 역시 Cx26가 종양의 진행(tumor progression), 특히 종양침습(tumor invasion)에 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 이와 대조적으로 림프절전이(pN)나 타장기 전이(pM)는 Cx26의 발현여부와 유의한 상관관계를 보이지 않았는데, 이는 본 연구에서 수집된 예에서 림프절 전이가 있는 예(41/127)의 경우 모두 pN1에 불과했고, 전체 127예 중 타장기 전이소견을 보이는 예가 1예로 국한되어 있어 자료수집과정에서의 편차가 결과에 영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

Cx26의 발현 여부 및 국지화와 환자들의 생존율과의 관계를 보고자 수술 후 추적관찰한 결과 Cx26의 발현여부 및 세포질 내 국지화와 환자의 생존기간 간에는 어떠한 유의한 차이도 보이지 않았다.

Cyclooxygenase (COX)는 아라키돈산으로부터 프로스타글란딘(PG)이 합성되는

데에 촉매작용을 하는 효소로, PG은 세포증식에 관여하며 악성종양세포에 대한 면역체계의 반응을 변화시킨다. COX의 유도체인 COX-2는 발암과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 결직장의 악성종양을 예방하는데 있어 표적이 되며 COX 억제제가 다른 부위에서도 상피성 악성종양의 예방과 치료에 유용한 것으로 알려지고 있다.[46)]

본 연구에서는 COX-2의 발현을 발현범위, 발현정도, 그리고 이 두 값을 곱한 값(IRS-COX2)으로 따로 구분하여 이들과 각각의 임상병리학적 요소, p53 단백 및 Cx26 발현, 환자의 생존율과의 관계를 살펴 보았다. 그 결과 COX-2의 발현범위가 종양의 침윤깊이(pT), 임상병기와 유의한 상관관계를 보였으며 IRS-COX2값이 종양의 타 장기 전이 여부 및 임상병기와 유의한 상관관계를 보임을 확인하였다. 또한 IRS-COX2에 따른 환자의 생존율의 차이를 보고자 양성여부의 판정을 하기 위한 임계계수의 값을 0~12중 다양하게 산정하여 비교한 결과 임계계수 값과는 상관없이 COX-2를 발현하지 않는 군에서 발현하는 군보다 환자의 생존율이 높은 경향은 보였으나 이는 통계학적으로 유의하지는 않았으며 이 결과는 Fux 등[47)]의 연구에서 밝힌 COX-2 발현이 환자의 생존율과 유의한 관련성이 없다는 내용과 일치하는 소견이었다.

또한, 종양억제자로 알려져 있는 p53 단백질의 돌연변이는 인간에서 발생하는 종양에서 가장 흔히 관찰되는 유전적 변형의 한 형태로 이 유전자의 산물이 세포주기, 세포자멸사, 염색체 안정성 조절에 관여하는 것으로 추정되는 핵단백이다.[48)] 본 연구결과 p53 단백의 발현은 여러 임상병리학적 인자들이나 COX-2발현과는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 Cx26의 세포막 발현과 의미있는 상관관계를 보였다.

본 연구에서는 결직장 선암종에서 선종과 정상상피에 비해 Cx26의 발현감소 및 세포질 내 염색소견을 확인할 수 있었으므로 추후 추가적인 연구를 통해 전암 단계인 선종에서 선암종으로 진행된 사례에 대한 자료를 통해 이들이 갖는 발암과정에서의 보다 더 구체적인 역할을 검토하고 면역조직화학적 분석을 통해 종양의 진단 및 환자의 예후 예측 등을 정당화할 수 있는 입증자료를 확립할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

Cx26 의 결직장 선암종의 발암과정 및 종양의 진행에서의 역할을 알아보고자 면역조직화학적 방법을 이용하여 결직장 선암종 127예, 선종 12예, 정상점막 10예를 대상으로 Cx26 단백 발현정도 및 발현양상을 여러 임상병리학적 요소들과의 관련성을 비교 검토하였다.

Cx26의 감소 혹인 소실의 소견이 결직장 선암종에서 선종과 정상 점막과 유의한 차이를 보이는 것을 확인하였고, 또한 Cx26의 정상위치인 세포막을 벗어나 세포질 내에 염색되는 소견이 선암종에서 관찰되었다. 또한 Cx26의 소실을 종양의 진행, 특히 종양의 침습(pT)에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

이러한 소견으로 볼 때 Cx26는 결직장 선암종의 발암과정및 종양의 진행에 중요한 역할을 하며 정상상피에 존재하는 GJIC의 정상적인 Cx26와는 또 다른 역할을 하고 있을 것으로 추정되어 이에 대한 추가적인 연구결과를 토대로 종양의 형성 및 진행을 Cx을 이용하여 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 COX-2와 p53 단백의 결직장 선암종에서의 발현양상을 살펴보았는데 COX-2는 그 발현범위가 종양의 임파절 전이여부(pN), 임상병기와 의미있는 관련성을 보였고, 발현범위와 발현강도를 곱하여 수치화한 IRS-COX2값이 환자의 임상병기와 통계학적 유의성을 보였다. 종양억제유전자인 p53 단백의 발현은 환자의 여러 임상병리학적 인자들과는 유의한 관련성을 보이지 않았으나, p53 단백의 발현이 높아질수록 Cx26의 세포막 발현은 감소되는 것으로 나타났으며 이는 통계학적 유의성을 보였다.

중심단어 : Connexin26, 결직장, 선암종, 발암단계

참고문헌

1. Charles AC, Naus CC, Zhu D, Kidder GM, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular calcium signaling via gap junction in glioma cells, J Biol Chem 1992;118:195-201.

2. Ruch RJ. The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. Ann Clin Lab Sci 1994;24:216-31.

3. Hanna EA, Umhauer S, Roshong SL, Piechocki MP, Fernstrom MJ, Fanning JD, Ruch RJ. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro. Carcinogenesis 1999;20:1369-73.

4. Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin32 cDNA retards growth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:10701-5.

5. Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA, Roos BA. Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. Mol Carcinog 1996;15:18-32.

6. Ruch RJ, Guan X, Sigler K. Inhibition of gap junctional intercellular communication and enhancement of growth in BALB/c3T3 cells treated with connexin43 antisense oligonucleotides. Mol Carcinog 1995;14:269-74.

7. Weinstein RS, Merk FB, Alroy J. The structure and function of intercellular junctions in cancer. Adv Cancer Res 1976;23:23-89.

8. Yamasaki H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. Carcinogenesis 1990;11:1051-8.

9. Klaunig JE, Ruch RJ, Weghorst CM, Hampton JA. Role of inhibition of intercellular communication in hepatic tumor promotion. In Vitro Toxicol 1990;3:91-107.

10. Ruch RJ, Klaunig JE. The effects of tumor promoters, genotoxic carcinogens, and hepatocytotoxins on mouse hepatocyte intercellular communication. Cell Biol Toxicol 1986;2:469-83.

11. Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo, Carcinogenesis 1995;16:1287-1297.

12. Jinn Y, Ichioka M, Marumo F. Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer, Cancer Lett 1998;127:161-169.

13. Mourelle M, Casellas F, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, Malagelada JR. Induction of nitric oxide synthase in colonic smooth muscle from patients with toxic megacolon, Gastroenterology 1995;109:1492-1496.

14. Krutovskikh V, Mazzoleni G, Mironov N, Omori Y, Aguelon AM, Mesnill M, Berger F, Partensky C, Yamasaki H. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32, Int J Cancer 1995;56:87-94.

15. Huang RP, Hossain MZ, Sehgal A, Boynton AL. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells, J Surg Oncol 1999;70: 21-24.

16. Tsai H, Werber J, Davia MO, Edelman M, Tanaka KE, Melman A, Christ GJ, Geliebter J. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells, Biochem. Biophys Res Commun 1996;227 :64-69.

17. Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O. Expression of Cx26, Cx32, and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. Int J Cancer 1992;51:522

18. Neveu MJ, Hully JR, Babcock KL, Hertzberg EL, Nicholson BJ, Paul DL. Multiple mechanisms are responsible for altered expression of gap junction genes during oncogenesis in rat liver. J Cell Sci 1994;107:83

19. Oyamada Y, Oyamada M, Fusco A, Yamasaki H. Aberrant expression, function, and localization of connexins in human esophageal carcinoma cell lines with different degrees of tumorigenicity. J Cancer Res Clin Oncol 1994;120:445

20. Defamie N, Mograbi B, Roger C, Cronier L, Malassine A, Brucker-Davis F, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. Carcinogenesis 2001;22:1537

21. Krutovskikh V, Mazzoleni G, Mironov N, Omor I, Aguelson Y, Mevsnil M. Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. Int J Cancer 1994;56:87

22. Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC, Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88: 10701-10705.

23. Huang RP, Fan Y, Hossain MZ, Peng A, Zeng ZL, Boynton AL. Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). Cancer Res 1998;58:5089-5096.

24. Yamasaki H, Naus CC. Role of connexin genes in growth control. Carcinogenesis 1996;17:1199-1213.

25. Omori Y, Zaidan Dagli ML, Yamakage K, Yamasaki H. Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. Mutat Res 2001;477:191-196.

26. Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, George WD. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumors. J Pathol 1998;184:37-43.

27. Ito A, Katoh F, Kataoka TR, Okada M, Tsubota N, Asada H, A role for heterologous gap junction between melanoma cells and endothelial cells in metastasis. J Clin Invest 2000;105:1189-1197.

28. Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. In Vogelstein B, Kinzler KW : The Genetic Basis of human Cancer, 2nd ed. New york, McGraw-Hill, 2002:583

29. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. FEBS Lett 1995;372:83-7

30. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol 1983;3:295-314

31. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase thpe II and demonstration of expression in response to cytokines. J Biol Chem 1993;268:9049-50

32. DuBois RN, Award J, Morrow J, Roberts LJ, Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and prorbol ester. J Clin Invest 1994;93:493-8

33. Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB. Regulation of cyclooxygenase-2 in aortic smooth muscle cells. Arterioscler Thromb 1994;14:1021-31

34. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. Cancer Res 1996;56:4424-9

35. Greene FL, Page DL, Fleming ID. AJCC cancer staging manual, 6th ed. New York:Springer-Verlag, 2002.

36. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score(IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection(ER-ICA) in breast cancer tissue. Pathologe 1987;8:138-40

37. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Eutsch U, Sohl G. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem 2002;383:725-737.

38. Krutovskikh VA, Piccoli C, Yamasaki H. Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. Oncogene 2002;21:1989-1999.

39. Trosko JE, Chang CC. Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. Mutat Res 2001;480-481,219-229.

40. Evans WH, Martin PE. Gap junction structure and function(review). Mol Membr Biol 2002;19:121-36

41. Akihiko I, Yu-ichihiro K, Kazuya U. Tomoyo O, Chiho O, Noriaki Y. Increased expression of connexin26 in the invasive component of lung squamous cell carcinoma significant correlation with poor prognosis. Cancer Lett 2006 Mar 28;234(2):239-48

42. Ito A, Katoh F, Kataoka TR, Okada M, Tsubota N, Asada H, Yoshikawa K, Maeda S, Kitamura Y, Yamasaki H, Nojima H. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. J Clin Invest 2000;105:1189-1197.

43. Kanczuga-Koda L , Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M. Alteration in Connexin26 expression during coloerctal carcinogenesis. Oncology 2005;68:217-222

44. Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. Oncogene 2000;19:505-513.

45. Olbina G, Eckhart W. Mutations in the second extracellular region of connexin43 prevent localization to the plasma membrane, but do not affect its ability to suppress cell growth. Mol Cancer Res 2003;1:690-700.

46. Robert A. Soslow RA, Andrew J. Dannenberg, Demaretta Rush. COX-2 is expression in human pulmonary, colonic, and Mammary Tumors. Cancer 2000;89:2637-2645

47. Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P. Clin Cncer Res 2005 Jul 1:11(13);4754-60

48. Bruner JM, Connelly JH, Saya H. p53 protein immunostaining in routeinly processed paraffin-embedded sections. Mod Pathol 1993;6:189-194

Table 1. Relation between Cx26 immunoreactivity and the clinicopathohologic features of the adenocarcinomas of the colorectum (%)

		n	membrane staining		cytoplasmic staining	
			+	−	+	−
sex	M	60	25(41.7)	35(58.3)	13(21.7)	47(78.3)
	F	67	25(37.3)	42(62.3)	15(22.4)	52(77.6)
age	30~39	5	1(20)	4(80)	2(40)	3(60)
	40~49	13	4(30.8)	9(69.2)	1(7.7)	12(92.3)
	50~59	30	13(43.3)	17(56.7)	9(30)	21(70)
	60~69	45	19(42.2)	26(57.8)	10(22.2)	35(77.8)
	70~79	29	11(37.9)	18(62.1)	5(17.2)	24(82.8)
	80~89	5	2(40)	3(60)	1(20)	4(80)
T stage*	1	5	4(80)	1(20)	1(20)	4(80)
	2	25	6(24)	19(76)	4(16)	21(84)
	3	97	40(41.2)	57(58.8)	23(23.7)	74(76.3)
N stage	(−)	86	34(39.5)	52(60.5)	21(24.4)	65(75.6)
	(+)	41	16(39)	25(61)	7(17.1)	34(82.9)
M stage	0	126	49(38.9)	77(61.1)	28(22.2)	98(77.8)
	1	1	1(100)	0	0	1(100)
Clinical stage	1	27	9(33.3)	18(66.7)	5(18.5)	22(81.5)
	2A	56	22(39.3)	34(60.7)	15(26.8)	41973.2)
	2B	3	2(66.7)	1(33.3)	1(33.3)	2(66.7)
	3A	1	0	1(100)	0	1(100)
	3B	27	11(40.7)	16(59.3)	5(18.5)	22(81.5)
	3C	13	6(46.2)	7(53.8)	2(15.4)	11(84.6)
	4	0	0	0	0	0

(* : statistically significant)

(− : no lymph node metastasis, + :positive lymph node metastasis)

Table 2. Difference of Cx26 immunoreactivity among normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of the colorectum (%)

	n	immunoreactivity		cytoplasmic staining	
		+	−	+	−
normal mucosa	10	10(100)	0	0	10(100)
adenoma	12	12(100)	0	0	12(100)
adenocarcinoma	127	62(48.8)	65(51.2)	28(22)	99(78)
p-value		<0.0001*		<0.05*	

(* : statistically significant)

Table 3. Relation between clinicopathologic features and extent of COX-2 expression of the colorectal adenocarcinoma (%)

		extent of COX-2 expression				
		0	1	2	3	4
T stage*	1	2(40)	0	1(20)	1(20)	1(20)
	2	16(64)	1(4)	6(24)	1(4)	1(4)
	3	49(50.5)	18(18.6)	17(17.5)	13(13.4)	0
N Stage	(-)	44(51.2)	9(10.5)	21(24.4)	10(11.6)	2(2.3)
	(+)	23(56.1)	10(24.4)	3(7.3)	5(12.2)	0
M stage	0	67(53.2)	19(15.1)	24(19)	14(11.1)	2(1.6)
	1	0	0	0	0	1(100)
clinical stage*	I	15(53.6)	1(3.6)	8(28.6)	2(7.1)	1(3.6)
	II A	27(48.2)	8(14.3)	13(23.2)	8(14.3)	0
	II B	2(66.7)	0	0	1(33.3)	0
	III A	1(100)	0	0	0	0
	III B	15(55.6)	6(22.2)	2(7.4)	4(14.8)	0
	III C	7(53.8)	4(30.8)	1(7.7)	1(7.7)	0
	IV	0	0	0	0	0

(* : statistically significant)

(- : no lymph node metastasis, + :positive lymph node metastasis)

Table 4. Relation between clinicopathologic feature and intensity of COX-2 expression(%)

		intensity of COX-2 expression			
		0	1	2	3
T stage	1	2(40)	1(20)	1(20)	1(20)
	2	16(64)	4(16)	3(12)	2(8)
	3	49(50.5)	23(23.7)	23(23.7)	2(2.1)
N Stage	(-)	44(51.2)	17(19.8)	20(23.3)	5(5.8)
	(+)	23(56.1)	11(26.8)	7(17.1)	0
M stage	0	67(53.2)	27(21.4)	27(21.4)	5(4)
	1	0	1(100)	0	0
clinical stage	I	15(55.6)	4(14.8)	6(22.2)	2(7.4)
	II A	27(48.2)	13(23.2)	14(25)	2(3.6)
	II B	2(66.7)	0	0	1(33.3)
	III A	1(100)	0	0	0
	III B	15(55.6)	7(25.9)	5(15.4)	0
	III C	7(53.8)	4(30.8)	2(15.4)	0
	IV	0	0	0	0

(- : no lymph node metastasis, + :positive lymph node metastasis)

Table 5. Relation between immunoreactivity score of COX-2 (IRS-COX2) and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas (%)

IRS-COX2		0	1	2	3	4	6	9	12
T stage	1	2(40)	0	0	1(20)	1(20)	0	0	1(20)
	2	16(64)	1(4)	3(12)	0	2(8)	2(8)	0	1(4)
	3	49(50.5)	7(7.2)	21(21.6)	6(6.2)	7(7.2)	5(5.2)	2(2.1)	0
N stage	(-)	44(51.2)	2(2.3)	19(22.1)	3(3.5)	8(9.3)	6(7)	2(2.3)	2(2.3)
	(+)	23(56.1)	6(14.6)	5(12.2)	4(9.8)	2(4.9)	1(2.4)	0	0
M stage	0	67(53.2)	8(6.4)	24(19)	6(4.8)	10(7.9)	7(5.5)	2(1.6)	2(1.6)
	1	0	0	0	1(100)	0	0	0	0
Clinical Stage	I	15(55.6)	0	4(14.8)	1(3.7)	4(14.8)	2(7.4)	0	1(3.7)
	II A	27(48.2)	2(3.6)	15(26.8)	2(3.6)	4(7.1)	4(7.1)	2(3.6)	0
	II B	2(66.7)	0	0	0	0	0	0	1(33.3)
	III A	1(100)	0	0	0	0	0	0	0
	III B	15(55.6)	4(14.8)	2(7.4)	3(11.1)	2(7.4)	1(3.7)	0	0
	III C	7(53.8)	2(15.4)	3(23.1)	1(7.7)	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0

(IRS-COX2 = COX-2 intensity x COX-2 extent)

(- : no lymph node metastasis, + :positive lymph node metastasis)

Table 6. Expression of COX-2 in colorectal adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic parameters and patient survival (p-value)

cut-off point for COX-2 expression	Absolute Numbers(%)	T stage	N stage	M stage	Clinical stage	Correlation with survival
0 vs 1-12	67:60(47.2)	0.409	0.371	0.472	0.880	0.6919
0-1 vs 2-12	75:52(40.9)	0.439	0.048	0.409	0.533	0.6058
0-2 vs 3-12	105:22(17.3)	0.032	0.389	0.173	0.895	0.1097
0-3 vs 4-12	106:21(16.5)	0.283	0.042	0.835	0.330	0.1119
0-4 vs 6-12	116:11(8.7)	0.491	0.076	0.913	0.419	0.0804
0-6 vs 8-12	123:4(3.1)	0.078	0.205	0.969	0.066	0.3047
0-8 vs 9-12	123:4(3.1)	0.078	0.205	0.969	0.066	0.3047
0-9 vs 12	125:2(1.6)	0.001	0.457	0.984	0.001	0.4357

Table 7. Relation between clinicopathologic features and immunoreactivity of p53 protein in the colorectal adenocarcinoma (%)

		p53 immunoreactivity			
		0	1	2	3
T stage	1	3(60)	1(20)	1(2)	0
	2	13(52)	1(4)	6(24)	5(20)
	3	49(50.5)	11(11.3)	23(23.7)	14(14.4)
N Stage	(-)	45(52.3)	10(11.6)	19(22.1)	12(14)
	(+)	20(48.8)	3(7.3)	11(26.8)	7(17.1)
M stage	0	65(51.6)	13(103.)	30(23.8)	18(14.3)
	1	0	0	0	1(100)
clinical stage	I	16(59.3)	3(11.1)	4(14.8)	4(14.8)
	II A	28(50)	6(10.7)	14(25)	8(14.3)
	II B	1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)	0
	III A	0	0	1(100)	0
	III B	13(48.1)	1(3.7)	7(25.9)	6(22.2)
	III C	7(53.8)	2(15.4)	3(23.1)	1(7.7)
	IV	0	0	0	0

(- : no lymph node metastasis, + :positive lymph node metastasis)

Table 8. Relation between Cx26 immunoreactivity and expression of p53 protein in the colorectal adenocarcinoma (%)

		membrane staining		p	cytoplasmic staining		p
		+	-		+	-	
p53	0	29(44.6)	36(55.4)	<0.05	13(20)	52(80)	>0.05
	1	8(61.5)	5(38.5)		4(30.8)	9(69.2)	
	2	19(63.3)	11(36.7)		8(36.4)	22(63.6)	
	3	6(31.6)	13(68.4)		5(26.3)	14(73.7)	

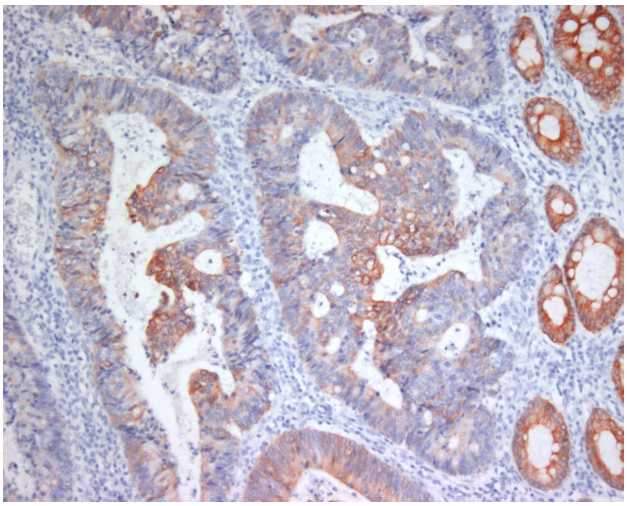

Fig. 1 Immunohistochemical staining for Cx26 in colonic adenocarcinoma. Decrement of Cx26 expression is noted in adenocarcinoma (left) compared with normal epithelium (right) (LSAB method, counterstained by hematoxylin)

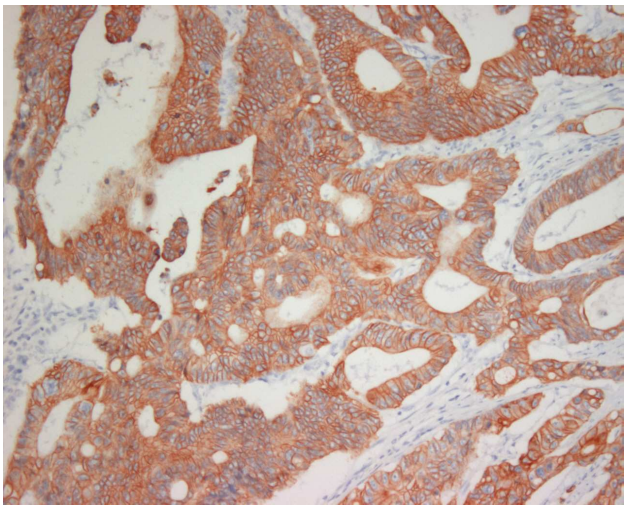

Fig. 2 Immunohistochemical staining for Cx26 in colonic adenoma. Distinct intercellular (membrane) immunoreactivity is identified in adenoma (LSAB method, counterstained by hematoxylin)

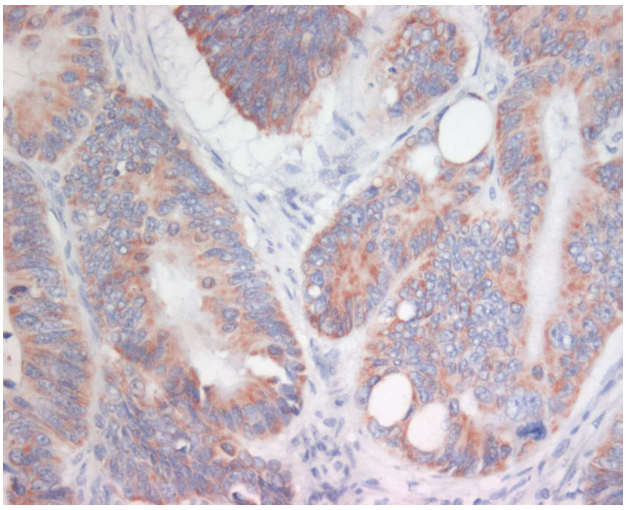

Fig. 3 Immunohistochemical staining for Cx26 in colonic adenocarcinoma. Distinct cytoplasmic immunoreactivity is noted. (LSAB method, counterstained by hematoxylin)

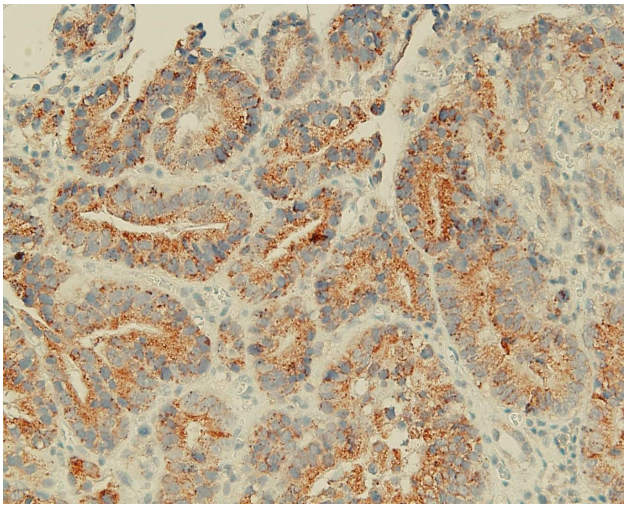

Fig.4 Immunohistochemical staining for COX-2 in colonic adenocarcinoma. Distinct cytoplasmic immunoreactivity is noted. (LSAB method, counterstained by hematoxylin)

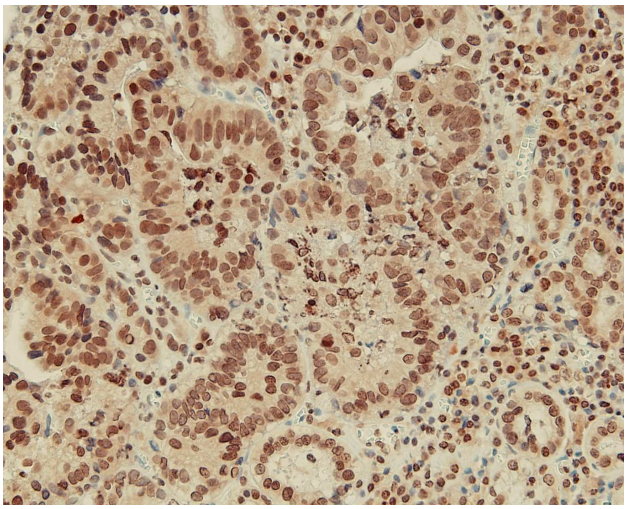

Fig.5 Immunohistochemical staining for p53 in colonic adenocarcinoma. strong nuclear staining is noted. (LSAB method, counterstained by hematoxylin)