creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000237430

2009년 2월

박사학위논문

결직장샘암종에서 Slug, Twist 발현과 E-cadherin 발현의 의의

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

홍 란

결직장샘암종에서 Slug, Twist 발현과 E-cadherin 발현의 의의

Significance of the expression of Slug, Twist

and E-cadherin in the Colorectal Adenocarcinoma

2009년 2월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

홍 란

결직장샘암종에서 Slug, Twist 발현과 E-cadherin 발현의 의의

지도교수 임 성 철

이 논문을 의학박사신청 논문으로 제출함

2008년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

홍 란

홍란의 박사학위논문을 인준함

위원장 충남대학교 교수 강 대 영 인

위 원 조선대학교 교수 서 재 홍 인

위 원 조선대학교 교수 기 근 홍 인

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 인

위 원 조선대학교 교수 이 미 자 인

2008년 12월 3일

조 선 대 학 교 대 학 원

목 차

표목차 ii

도목차 iii

Abstract 1

Ⅰ. 서론 3

Ⅱ. 재료 및 방법 5

Ⅲ. 결 과

1. 임상 및 병리학적 소견 8

2. Twist 발현에 따른 임상병리학적 의의 8

3. Slug 발현에 따른 임상병리학적 의의 9

4. Twist와 Slug 발현의 상관관계 9

5. E-cadherin 발현에 따른 임상병리학적 의의와 Twist와 Slug의 발현과의 상관관계 9

6. Twist, Slug 단백발현과 환자 예후의 상관관계 10

Ⅳ. 고 찰 11

Ⅴ. 결 론 15

참고문헌 16

표 24

사진부도 29

표 목 차

Table 1. Summary of clinicopathologic features ____ 24

Table 2. Relation between Twist expression and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas ____ 25

Table 3. Relation between Slug expression and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas ____ 26

Table 4. Relation between E-cadherin expression and the clinicopathologic features of the colorectal adenocarcinomas ____ 27

Table 5. Relation between E-cadherin expression and the expression of Twist and Slug in colorectal adenocarcinomas ____ 28

도 목 차

Fig. 1. Immunohistochemical staining results of E-cadherin negative tumors. Well to moderately differentiated adenocarcinoma (A-C), poorly differentiated adenocarcinoma (D-F), and mucinous adenocarcinoma (G-I) show strong nuclear staining of Slug (A, D, G) and Twist (C, F, I) and weak or no expression of E-cadherin (B, E, H) _____ 29

Fig. 2. Immunohistochemical staining results of E-cadherin positive tumors. Well to moderately differentiated adenocarcinoma (A-C), poorly differentiated adenocarcinoma (D-F), and mucinous adenocarcinoma (G-I) show strong membraneous staining of E-cadherin (B,E,H) and weak or no nuclear staining of Slug (A, D, G) and Twist (C, F, I) _____ 30

Abstract

Significance of the expression of Slug, Twist and E-cadherin in the Colorectal Adenocarcinoma

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

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) involving down-regulation of E-cadherin is thought to play a fundamental role during early steps of invasion and metastasis of carcinoma cells. There are several EMT regulators including Snail, SIP1 (both are direct repressors of E-cadherin), and Twist (an activator of N-cadherin during *Drosophila* embryogenesis). Twist, a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor, is a master regulator of gastrulation and mesoderm specification , and has now been characterized as a newly found EMT-inducer and has been shown to be involved in tumor invasiveness and metastasis. Slug, a member of the Snail family of transcription factors, plays a crucial role in the regulation of EMT by suppressing several epithelial markers and adhesion molecules including E-cadherin. The purpose of the present study was to examine the significance between expression of Twist and Slug and clinicopathological parameters in colorectal adenocarcinoma (CRA) as

determined by immunohistochemical analysis and the correlation between Twist, Slug and E-cadherin expression in CRA. Moreover, to elucidate whether Twist and Slug may be used as a novel parameter to predict prognosis in CRA. A semiquantitative scoring system was applied based on the intensity and extent of positive immunohistochemical staining. Twist and Slug expression was significantly related to tumor invasion depth ($p=0.001$, $p=0.019$, respectively), and showed inverse correlation with expression of E-cadherin ($p=0.045$, $p<0.001$, respectively). However, Twist and Slug did not influence overall survival. These results demonstrated that a positive role of Slug and Twist in tumor invasion in CRA, and inverse correlation between Twist and Slug expression and E-cadherin expression suggest that Twist and Slug may play some role in the EMT by inhibition of E-cadherin activity.

Ⅰ. 서 론

상피-간엽 전환(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)은 잘 알려진 발생학적 과정으로 종양의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[1] 이는 종양의 침습과 전이를 유도하는 중심기전 중 하나로 이 과정을 통해 상피세포는 극성을 소실하고, 간엽성 표현형으로 전환된다.[2,3] EMT 유도자들에는 Zeb1, SIP1 Slug, E47, Twist 등이 포함되며, 이들은 E-cadherin의 발현을 억제함으로써 EMT와 전이를 유도한다.[4] 이전의 여러 연구에서 EMT가 결직장샘암종의 진행과 공격성(aggressiveness)에 중요한 역할을 함이 보고되어 왔다.[5-7] Twist는 기초 나선-고리-나선 전사인자(basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor)로서 창자배형성(gastrulation)과 중배엽 특성화(mesoderm specification)의 주된 조절자로서[8] 자궁내막암[9], 이행세포암[10], 간암[11], 전립선암[12], 위암[13] 등 여러 암종의 침습과 이로 인한 환자의 생존에서 Twist의 중요성이 보고되어 왔다. Slug는 전사인자인 Snail family의 한 종류로 E-cadherin을 포함한 여러 상피 표식자(epithelial marker)를 억제함으로써 EMT를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 최근, 유방암, 식도의 편평세포암에서 Slug의 과발현과 환자의 짧은 생존기간과의 유의한 관련성이 보고되어 있다.[14]

국소 침습과 원격 전이는 악성상피종양과 연관된 이환율과 사망률의 주된 결정인자이다.[15] 이 과정에는 단백용해작용의 증가(increased proteolysis)와 세포유착의 소실(loss of cell adhesion)이라는 세포 내 사건이 관여한다.[16] 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases, MMP)는 아연과 칼슘 의존성 효소(zinc- and calcium-dependent enzymes)로서 기저막과 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 분해하는 능력을 통해 종양의 증식 과정 동안 단백 분해를 증가시키는 중심매개체가 된다.[17] Cadherin은 필수적인 칼슘의존성 세포막 당단백질(Ca^{2+}-dependent integral membrane glycoprotein)으로서 세포와 세포의 유착부위(cell-cell adhesion junction)에 위치해 있으면서 주변세포와의 동종성 접촉(homophilic contact)을 매개한다.[18-20] Cadherin은 carboxy-terminal intracytoplasmic domain을 통해 β-catenin (88 kilodaltons [kD]) and ɣ-catenin (80 kD)과

상호작용함으로써 α-catenin에 결합하여 actin 분자에 연결된다.[21]

E-cadherin은 상피조직의 세포유착부위에 위치하는 동종성의 칼슘의존성 세포유착분자로 종양의 침습억제에 중요한 역할을 하며 E-cadherin의 기능이 소실되면 종양의 악성도가 증가한다.[22] 대부분의 상피성 악성종양이 E-cadherin의 발현이 감소하거나 E-cadherin이 불활성화를 보인다는 사실이 이러한 주장을 뒷받침하며 앞서 여러 연구에서 다양한 종양에서 E-cadherin의 기능이 회복되었을 때 침습이 억제된다는 점을 밝힌 바 있다.[23,24] Cadherin이 매개하는 세포간 유착은 또한 초기 배아발생(embryonic development)에도 중요한 작용을 하는데, 이 과정에서 상피-간엽 전환이라고 불리는 기전에 의해 수많은 표현형의 변화가 발생한다.[22] 섬유모세포성 표현형(fibroblastic phenotype)을 획득하기 위해서는 E-cadherin 소실이 동반되어야 하는데, 이로써 세포가 상피조직으로부터 분리되어 자유롭게 이동할 수 있게 된다. 이는 창자배형성 운동(gastrulation movement)과 신경릉(neural crest) 형성에 중요한 사건일 뿐 아니라 악성 상피 종양세포의 침습과 전이의 초기 단계에 기본적인 역할을 하는 것으로 알려져 왔으며,[25] 또한 이렇게 EMT를 유발하여 종양의 증식, 침습, 전이에 관여할 동일한 역할의 다양한 분자들이 존재함을 시사한다.[22] 악성종양에서 E-cadherin이 매개하는 세포유착체계(cell adhesion system)를 불활성화시키는 다양한 기전이 알려져 있는데, 유전자 변이(gene mutation), 촉진자 고메틸화(promoter hypermethylation), 염색질 재배열(chromatin rearrangement), 번역 후 절단 혹은 변이(post-translational truncation or modification) 등이 이에 속한다. 최근에 각광받고 있는 기전으로는 전사억제자(transcriptional repressor)가 있으며,[26-29] Snail, Slug, ZEB, Twist 등이 이에 포함된다.[4]

본 연구에서는 결직장샘암종 109예를 대상으로 면역조직화학적 염색으로 Twist, SLUG, E-cadherin의 발현양상을 관찰하였고, 또한 이들의 발현양상과 여러 임상병리학적 인자들과 환자의 생존기간과의 연관성을 살펴 보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 증례 선정

1992 년 1 월부터 2004 년 12 월까지 13 년 동안 조선대학교병원에서 결직장샘암종 진단 하에 외과적 적출술을 시행한 환자 중 생존여부 및 사망일을 확인할 수 있으며 조직보관 상태와 의무기록이 양호한 109 명의 환자를 비연속적으로 선택하였다. 모든 증례는 T 병기(종양침습 정도), N 병기(국소림프절 전이 유무), M 병기(원격전이 유무) 및 임상병기를 구분하였으며 환자의 생존여부 및 사망일은 전화 및 우편으로 확인하였다.

2. 조직병리학적 분석

1) 광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 화일을 후향적으로 분석하여 각 종양을 재검토하고 나이, 성별, 종양의 크기 및 조직학적 형태 및 침윤 깊이, 림프절 또는 원격 전이 유무, 그리고 Twist, Slug 및 E-cadherin 의 발현 등을 확인하였다. 병기는 American Joint Committee on Cancer의 TNM staging system[30] 에 따라 정하였다.

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

2) 면역조직화학적 염색

파라핀 포매 조직을 4㎛ 두께로 박절하여 X-tra^{TM}슬라이드(Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈파라핀한 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 15 분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20 분간 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 10 분간 반응시킨 뒤 1 차 항체 Twist (dilution-1:100), Slug (dilution-1:100)을 overnight 시켰으며, E-cadherin (dilution-1:100)을 37℃ 배양기에서 1 시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 Twist에 대한 염색은 goat ImmunoCruz™ Staining System: sc-2053 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을, Slug와 E-cadherin에 대한 염색은 LSAB Kit를 이용하여 비오틴이 함유된 2 차항체를 실온에서 10 분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고, peroxidase가 결합된 streptavidin 용액에 10 분간 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 대장 샘종 및 정상 대장 점막조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 1 차 항체 대신 tris 완충액을 사용하였다.

3) 면역조직화학적 염색의 판정

염색 결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과를 알지 못하는 2 인의 병리의사에 의해 시행되었다. Twist와 Slug는 핵에 염색되는 경우를 양성으로 판정하고 종양세포 내의 염색 강도를 4 등급(0:음성, 1:약양성, 2:양성, 3: 강양성)으로 나누고 전체 종양세포 중 양성을 보이는 종양세포의 범위를 다섯 등급(0: 0%, 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75%, 4: 76-100%)으로 나누어 염색 강도에 대해서 0, 1, 2, 3점, 염색 범위에 대해서 0, 1, 2, 3, 4점을 부여하였다. 염색범위는 종양세포의 밀도가 높은 부분을 4 개 이상의 고배율 시야(×400배)에서 1,000개의 종양세포 중 양성인 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다. 염색 강도와 범위의 점수를 합하여 0(0), 1(1-2), 2(3-5), 3(6-7)점으로 다시 재분류한 후 이 점수를 최종 점수로 통계분석에 사용하였다. 또한 최종점수가 6 이상인 경우 고등급(6-7), 그 미만을 저등급(0-5)으로 나누어 별도로 분석하였다.[9] E-cadherin은 세포막에 발현을 보이는 종양세포의 백분율을 구하고 이를 점수화하여 0(<5%), 1(5-25%), 2(26-50%), 3(51-75%), 4(76-100%)로 분류하고 염색강도에 따라 0(음성), 1(약양성), 2(양성), 3(강양성)으로 분류한 후 염색강도와 염색범위을 합을 구하고, 6 이상의 점수를 고등급으로 간주하였다.[9]

3. 통계학적 분석

결직장암종에서 Twist, Slug, E-cadherin 단백의 발현과 여러 임상병리학적 요소들, 생존율 또는 생존기간과의 관련성, 여러 임상병리학적 요소들과 생존율 또는 생존기간과의 관련성, 결직장샘암종 중 원발암과 전이암에서의 Twist, Slug, E-cadherin의 발현의 차이에 대한 통계학적 분석은 χ^2 test, Kendall's tau-b correlation coefficient, Kaplan-meier survival 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 병리학적 소견

임상병리학적 자료는 표 1에 요약하였다. 전체적인 성비는 남자:여자가 55:54로 거의 비슷한 빈도로 나타났으며 연령 대는 40 대 이하 (14례, 12.9%), 50 대(26례, 23.9%), 60 대(40례, 36.7%), 70 대 이상(29례, 26.7%)으로 분포되었다. 종양의 위치는 우측 결장 19 례(17.5%), 횡행결장 8 례(7.3%), 좌측 결장 20 례(18.3%), 직장 62 례(56.9)로 직장에 집중되어 있었으며 대부분 고등도 혹은 중등도의 분화(well to moderate differentiation)를 보였으나 7 례(6.4%)에서 분화가 좋지 않았으며(poor differentiation), 14례(12.8%)는 점액양 샘암종(mucinous adenocarcinoma)이었다.

2. Twist 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

Twist에 대한 면역조직화학 염색 결과는 염색 강도(0,1,2,3)와 염색 범위(0,1,2,3,4)를 더한 값을 그룹화하여 각각 0(0), 1(1-2), 2(3-5), 3(6-7)으로 분류하였으며 이를 최종 점수로 간주하여 여러 임상병리학적 요소들과의 연관성을 분석하였다(표 2). 또한 이를 저등급(0-5), 고등급(6-7)으로 다시 분류하여 동일한 분석을 시도하였다. 결직장샘암종 환자 109 례 중 Twist 단백발현은 15 례(17.8%)이 음성을 보였으며 양성판정을 받은 증례를 분류하면 1점이 6 예(5.5%), 2점이 40 예(36.7%), 3점이 48 예(44.0%)이었다. 또한 이를 고등급과 저등급으로 이분하였을 때 저등급 발현이 61례(56.0%), 고등급 발현이 48례(44.0%)이었다. Twist 단백발현 정도와 여러 임상병리학적 인자들과의 관련성을 분석하였을 때 4 등급 분류와 2 등급 분류 모두에서 종양의 침습정도(pT stage)와 종양의 분화도에 따라 Twist 단백의 발현 정도가 증가하는 것으로 나타났으며 이는 통계학적 유의성을 보였다($p=0.001$, $p<0.001$). 즉 종양의 침습 정도에 비례하여 Twist 단백의 발현이 증가하며, 종양의 분화도에 따른 단백발현을 살펴 보았을 때 분화가 좋은 종양에 비해 분화가 좋지 않거나 점액양 샘암종의 증례에서 Twist 단백발현이 증가하는 것으로

나타났다(Figure 1, 2). 분화도에 따른 분류와 함께 점액양 샘암종과 비점액양 샘암종을 분류하여 Twist 단백발현을 비교할 경우 점액양 샘암종에서 통계적으로 유의하게 높은 발현율을 보였다(p=0.001, p<0.001). 또한 Twist 발현의 평가 방법 중 염색 강도(intensity)가 여러 임상병리학적 인자들 중 림프절 전이 여부와 임상적 병기와 유의한 상관관계를 보였다 (p=0.012, p=0.027). 그러나 이 이외의 임상병리학적 인자(림프절 전이 여부, 타 장기 전이 여부, 임상적 병기)와 Twist 단백 발현은 유의한 상관성을 보이지 않았다.

3. Slug 면역조직화학적 발현에 따른 임상병리학적 의의

Slug의 면역조직화학 염색 결과를 분석해 보았을 때 109 례의 증례 중 음성의 결과를 보이는 증례가 6 례(5.5%)이었으며 양성 판정을 받은 증례를 분류하면 1 점이 11 례(10.1%), 2 점이 32 례(29.4%), 3 점이 60 례(55.0%)이었으며 이를 고등급발현과 저등급발현으로 이분하였을 때 49례(45.0%)가 저등급 발현을, 60례(55.0%)가 고등급 발현을 보였다. Slug 단백발현 양상과 여러 임상병리학적 인자들과의 상관성에 대한 분석을 표 3에 나타나 있다. Slug 단백 발현양상은 Twist 단백과 유사한 결과를 보였는데, Slug 발현정도를 0, 1, 2, 3점으로 분류하여 비교해 보았을 때 종양의 침윤 깊이가 증가할수록 발현이 증가하였으며(p=0.019), 또한 이를 저등급, 고등급으로 이분하여 비교하였을 때 역시 동일한 결과를 보였다(p=0.03). 점액양 샘암종과 분화가 좋지 않은 종양은 분화가 좋은 종양에 비해 Slug발현이 증가하였다.(p=0.019, p<0.001). (Figure 1, 2) 또한 점액양샘암종과 비점액양 샘암종의 구분에 따른 Slug 단백발현을 비교하였을 때 점액양 샘암종에서 높은 발현율을 보였으며 이는 Twist의 결과와 동일했다. (p=0.001, p<0.001)

4. Twist와 Slug 면역조직화학적 발현의 상관관계

Twist 단백과 Slug 단백의 면역조직화학검사 결과를 토대로 두 단백 사이의 상관관계를 분석하였을 때 강한 양의 상관관계를 보이는 것으로 나타났다(p<0.001) (Figure 1, 2)

5. E-cadherin 면역조직화학적 발현에 따른 임상 병리학적 의의와 Twist와 Slug의 발현과의 상관관계

E-cadherin은 전체 환자 중 67 례(61.5%)에서 발현이 되지 않거나 약하게 발현되었으며 42 례(38.5%)에서 강하게 염색되었다. 여러 임상병리학적 인자들과의 유의한 상관성은 보이지 않았으나 종양의 분화도와의 상관성을 분석하였을 때 중등도-저등도-점액양 샘암종의 순서로 갈수록 E-cadherin의 발현이 떨어지는 것으로 나타났으며(p=0.001) 이를 점액양 샘암종과 비점액양 샘암종으로 구분하여 비교 분석하였을 경우에도 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 점액양 샘암종에서 E-cadherin 발현이 떨어지는 것이 확인되었다(p=0.007).(표 4) Slug와 Twist단백의 발현양상과 비교해 보았을 때 Slug와 Twist가 강하게 발현하는 부분에서 E-cadherin의 발현이 감소하거나 발현하지 않는 경향을 보여 Twist 단백과 Slug 단백 모두 E-cadherin과 통계학적으로 유의한 역 상관관계를 보였다. (Twist : p=0.045, Slug : p<0.001) (표 5) (Figure1,2)

6. Twist, Slug 단백발현과 환자 예후와의 상관관계

109 명의 환자들 중 25 명이 추적관찰 도중 사망하였다. 환자의 생존기간에 대한 분석을 시행하였을 때 Twist와 Slug 단백은 환자의 생존기간과 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 여러 임상병리학적 인자들 중 림프절 전이가 환자의 생존기간과 유의한 상관관계를 보였다(p=0.017). Cox 회귀분석을 이용한 다변량 분석을 시행하였을 때에도 림프절 전이가 환자의 생존에 영향을 미칠 수 있는 독립적인 예후 인자로 확인되었다.

Ⅳ. 고 찰

결직장 샘암종은 전세계적으로 세 번째로 가장 흔한 악성종양이다.[31] 다른 장기의 대부분의 악성종양에서와 같이 결직장 샘암종에서도 종양발생의 위험과 관련된 조건들이 존재한다. 결직장샘암종의 병인은 자연발생경로 (de novo pathway) 이외에 '샘종-샘암종 서열(adenoma-carcinoma sequence)' 이라고 알려져 있는 임상적, 조직병리학적 변화로 특징지을 수 있는데, 이는 1990년대에 Fearon과 Vogelstein에 의해 제안된 것으로 기존에 알려진 여러 발암 유전자들과 종양억제유전자들의 점진적인 유전자 변화의 과정에 의해 발생하는 것으로 여겨지고 있다.[32] 이 '선종-샘암종 서열'에서 정상 상피가 과증식되고, 이로써 선종성 폴립이 발생하며 이어 악성 종양으로 진행한다.[33] 이 과정에는 2 가지의 병인론적으로 분명히 구별되는 경로가 있는데, APC/β-catenin 경로와 현미부수체 불안정성 경로(microsatellite instability pathway)가 그것이며 두 경로 모두 점진적인 다중 돌연변이의 축적과정을 포함한다.[32] 여러 연구에서 결직장 샘암종에서 종양억제자 adenomatous polyposis coli (APC) 유전자의 돌연변이에 대해 보고하였다.[34-36]

APC의 주된 종양억제기능은 Wnt 신호전달체계의 중요한 인자인 세포내 β-catenin의 proteosomal degradation를 매개하는 능력에 있는 것으로 알려져 있다.[37] 결직장 샘암종에서 APC와 β-catenin의 돌연변이로 세포 내 β-catenin 농도의 조절이 이루어지지 않게 되고, 따라서 β-catenin의 핵내 축적을 가져온다.[37] 이로써 Wnt 표적 유전자가 비정상적 발현을 하게 되며 결국 결직장샘암종이 발생하게 한다.[38] 흥미롭게 β-catenin은 또한 E-cadherin의 세포질 도메인과 상호작용하여 α-catenin과 결합함으로써 actin 세포골격과 연결된다.[39] 결직장 샘암종에서도 앞서 언급한 E-cadherin 억제의 여러 기전들이 보고되었는데, 유전자 돌연변이와 촉진자 고메틸화뿐만 아니라 E-cadherin 전사억제와 이와 관련된 Snail의 상향조절이 결직장 샘암종의 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.[40-42]

EMT 프로그램을 조절하는 중요한 인자들 중 하나인 Twist 단백은 고도로 보존된 기초 나선-고리-나선 전사인자(highly conserved basic helix-loop-helix transcription factor)로 축(axis)과 패턴형성을 매개한다.[8] 암종의 전이에서 Twist 역할의 증거는 유방암 동물

모델에서 처음 보고되었으며, 이는 전이된 유방암 세포에서 Twist에 의해 유도된 EMT가 종양세포 침습을 촉진하는데 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.[43] 추가적인 연구들에서 Twist가 인간의 여러 암종의 발병과 진행에 관여하는 새로운 인자가 될 수 있음을 제시하고 있는데, 위암[13], 간암[11], 전립선암[12], 유방암[44], 자궁내막암[9], 이행세포암[10], 흑색종[45], 횡문근육종[46] 등 여러 다양한 암종에서 Twist가 높게 발현됨이 확인되었다. 본 연구에서도, 결직장샘암종 환자의 40.5%에서 Twist의 과발현을 확인하였다. Twist의 발현은 종양의 침윤 깊이(p=0.001)와 종양의 발현도(p=0.003)에 통계적으로 유의한 상관관계를 보이며 증가하는 양상을 보였다. Twist의 조절 기전은 아직 더 밝혀져야 하나, Fackler 등[47]은 유방암에서 Twist 유전자의 프로모터(promoter)가 침윤관암종(invasive ductal carcinoma)에 비해 침윤소엽암종(invasive lobular carcinoma)에서 덜 메틸화됨을 밝혔은데, 침윤관암종은 침윤소엽암종에 비해 더 높은 Twist 발현을 보이는 것으로 알려져 있다. 또한 Mehrota 등[48]은 유방암에서 전이부위에 비해 원발부위에서 Twist유전자의 촉진자의 고메틸화가 더 자주 관찰된다고 하였다. 따라서 어떻게 Twist의 촉진자 부위의 메틸화가 임상 경과에 영향을 미치는지 연구하는 것도 흥미로운 일일 것이다.[9] Twist의 고발현과 E-cadherin 발현감소와의 중요한 상관관계가 자궁내막암[9]과 간암[11]에서 밝혀진 바 있다. E-cadherin 발현의 소실은 EMT의 중요한 요소로써 E-cadherin 발현을 억제하는 주요한 기전 중 하나가 촉진자 부위의 E-box를 통해 E-cadherin의 전사를 억제하고, E-cadherin의 촉진자 활성이 억제된 인간의 유방상피세포에서 Twist가 과발현되는 것이다.[13,44] Twist와 같이 다른 EMT 유도자들, Zeb1, SIP1, Slug, Snail, E47 등도 E-cadherin 억제를 통해 EMT와 전이를 유도하게 된다.[5]

본 연구에서 Twist와 Slug의 발현은 E-cadherin의 발현과 역 상관관계를 보이는 것이 확인되었다.(p=0.045, p<0.001) 또 다른 기전으로 Yang 등[49]은 Twist가 HIF-1(Hypoxia-Inducible Factor-1)의 하부(downstream) 표적이며 저산소증과 HIF-1의 과발현에 의해 유도되는 전이성 표현형(metastatic phenotypes)에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 이들은 저산소증이나 HIF-1이 직접적으로 Twist를 활성화시킴으로써 EMT를 유도한다고 제안하였는데, 직접적인 Twist의 활성화가 아마도 저산소증에 의한 종양의 진행 및 전이를 야기하는 초기 단계이자 중요한 기전으로 작용하는 것으로 추정된다. 최근에 악성종양 세포가 항암제 내성을 획득하는데 있어 Twist의 기능이 보고되었다.[9] Twist의

과발현은 미세관표적 항암제(microtubular-targeting anticancer drug)에 대한 세포저항성(cellular resistance)과 연관이 있다고 한다.[50] 종양세포가 Twist를 이소성 발현(ectopic expression)을 하게 되면 이러한 약제에 대한 저항성이 생기게 된다.[50] Dupont 등[51]은 Twist가 비활성화되면 DNA를 손상시키는 항암제인 etoposide에 유도되는 세포자멸사(cell apoptosis)가 증가함을 밝혔다.

Slug (SNAI2)는 zinc-finger 전사인자인 Snail 집단의 한 종류로 병아리 배아(chick embryo)의 신경릉과 발달중인 중배엽에서 처음 확인되었다.[52] 이는 EMT가 진행중인 발생단계의 병아리 배아에서 높은 수준으로 발현되며, 원시삭(primitive streak), endocardial cushion, decondensing somites 등의 형성과 구개 폐쇄 시에 중요한 작용을 한다.[14] 최근 Snail family 전사인자들이 E-cadherin을 억제한다고 보고되었는데,[53] Snail 전사인자들에는 Snail (SNAI1)와 Slug 등이 포함되며 이 두 단백은 모두 인간의 다양한 암종과 관계있다. 예를 들면, 이전의 연구에서 생체 내 조건에서(in vivo) E-cadherin 억제자로서 Slug가 유방암과 식도의 편평상피세포암종에서 나쁜 예후와 관련있다는 점이 보고된 바 있다.[54-56]

본 연구에서 Slug는 109 례의 결직장 샘암종 중 60 례(55.0%)에서 과발현되었으며, Twist 의 결과와 동일하게 종양의 침습 정도(pT)에 따라 유의하게 그 발현이 증가하였다(p=0.001). 또한 E-cadherin 발현과 비교하였을 때 강한 역 상관관계를 보이는 것이 확인되었다.(p<0.001) Garinis 등[57] 이 보고한 바에 의하면 결직장 샘암종에서는 잦은 E-cadherin의 소실이 나타나며 이는 대부분(약 80%)이 촉진자 고메틸화때문이다. 하지만 결직장샘암종에서 고메틸화이외의 E-cadherin의 소실을 조절하는 기전은 아직 잘 밝혀지지 않았다.[57] 그러나 몇몇 연구에 의하면 결직장 샘암종 생물학에 중요한 수많은 유전자들이 E-box motif를 함유하고 있으며, E-cadherin도 이러한 E-box motif를 함유하는 종양 억제자들 중 하나로 결장의 발암과정의 개시와 증진기(promotion phase)에 중요한 역할을 하는데[58] SNAIL은 앞서 기술한 Twist와 같이 유전자 촉진자의 E-box motif에 결합한다.[59] 유방암에서는 SNAIL 과발현이 E-cadherin silencing의 complementary 혹은 alternative 기전을 의미한다는 결과도 있다.[60] Truncation이 APC 불활성화에 가장 흔한 기전인데 반하여, APC의 전사억제는 실험적 결장 발암과정에서 가장 초기에 관찰되는 사건으로 알려져 있는데,[61] 이렇게 종양의 개시(initiation)시에 중요한 APC 종양억제유전자

역시, 그 촉진자 부위에 E-box motif를 함유하고 있으며, 따라서 잠재적인 Snail의 표적이 될 것이다.[59]

본 연구결과는 Twist와 Slug가 결직장샘암종의 종양세포에 좀 더 침습적 표현형(invasive phenotype)의 성격을 부여하는 새로운 발암유전자임이 증명되었다. Twist 와 Slug의 발현은 종양의 침습 정도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며, E-cadherin과는 두 인자 모두 역 상관관계를 보인 반면, Twist와 Slug 상호간에는 강한 양의 상관관계를 보여 Twist와 Slug가 아마도 EMT 통로를 통해 종양세포에 좀 더 침습적인 표현형을 부여해 줄 수 있는 새로운 발암유전자임을 시사해 준다. 향후 Twist와 Slug를 비롯한 여러 EMT 조절자들의 분자적 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하지만, 본 연구 결과를 토대로 Twist와 Slug가 결직장샘암종의 임상치료에서 종양침습과 전이에 대한 예후인자로서의 가이드라인을 제시해 줄 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

결직장샘암종에서 악성상피종양과 연관된 이환율과 사망률의 주된 결정인자인 국소침습과 원격전이에 중요한 역할을 하는 E-cadherin의 소실로 대표되는 세포유착소실의 기전을 알아보고자 결직장샘암종 109 예를 대상으로 면역조직화학적 염색으로 E-cadherin의 발현양상과 상피-간엽전환조절자로 알려져 있는 Twist, Slug의 발현양상을 관찰하였고, 또한 이들의 발현양상을 서로 비교하고, 또한 여러 임상병리학적 인자들과의 연관성을 살펴 보았다.

결직장샘암종에서 Slug, Twist의 과발현을 확인하였고, 이들 단백은 상호간에 강한 양의 상관관계를, E-cadherin과는 역 상관관계를 보였다. 또한 Slug, Twist 단백발현은 종양의 침습 정도가 증가함에 따라 유의하게 증가하였으며 종양의 분화도가 떨어질수록 증가하는 경향을 보였다. 이러한 소견으로 볼 때 Twist와 Slug가 아마도 EMT 통로를 통해 종양세포에 좀 더 침습적인 표현형을 부여해 줄 수 있는 새로운 발암유전자임을 시사해 줄 것으로 생각되며 향후 Twist와 Slug를 비롯한 여러 EMT 조절자들의 분자적 기전에 대한 더 많은 연구가 요구되지만, 상기의 결과를 토대로 Twist와 Slug가 결직장샘암종의 임상치료에서 종양침습과 전이에 대한 예후인자로서의 가이드라인을 제시해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. World J Gastroenterol 2008;14:3792-7.

2. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer 2002;2:442-54

3. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7:131-42

4. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat Rev Cancer 2007;7:415-28

5. Barker N, Clevers H. Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer. Trends Mol Med 2001;12:535-7

6. Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. Cancer Biol Ther 2005;4:365-70

7. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. Cells Tissues Organs 2005;179:56-65

8. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate:evolutionary comparison of Twist structure and function. Gene 2002;287:11-22

9. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. Hum Pathol 2006;37:431-8

10. DI Kim, SO Yoon, SY Park, BM Kim, GH Kang, KC Moon. Twist expression in upper urinary tract urothelial carcinoma affects patients disease free survival and is associated with Tumor Grade. Korean J Pathol 2007;41:324-8

11. Lee TK, Poon RT, Yuen AP, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. Clin Cancer Res 2006;12:5369-76

12. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. Cancer Res 2005;65:5153-62

13. Yang Z, Zhang X, Gang H, et al. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. Biochem Biophys Res Commun 2007;358:925-30

14. Shioiri M, Shida T, Koda K, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. Br J Cancer 2006;94:1816-22

15. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, et al. Snail, Slug, and Smad-interacting protein q as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. Cancer 2005;103:1631-43

16. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70

17. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002;2:161-74

18. Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development 1988;102:639-55

19. Shirayoshi Y, Hatta K, Hosoda M, Tsunasawa S, Sakiyama F,Takechi M. Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. EMBO J 1986;5:2485-8

20. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991;51:1451-5

21. Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. Cancer Metastasis Rev 1999;18:15-30

22. Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators Snail, SIP1, and Twist in gastric gancer. Am J Pathol 2002;161:1881-91

23. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. Am J Pathol 1998;153:333-9

24. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion elated adhesion receptors. Am J Pathol 2000: 156:1515-25

25. Boyer B, Valles AM, Edme N: Induction and regulation of epithelial mesenchymal transitions. Biochem Pharmacol 2000;60:1091-9

26. Batlle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. Nat Cell Biol 2000;2:84-9

27. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol 2000;2:76-83

28. Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. The two-handed e-box binding zinc finger protein sip1 down-regulates e-cadherin and induces invasion. Mol Cell 2001;7:1267-78

29. Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT. Snail/Slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. Gene 2000;257:1-12

30. Greene FL, P. D., Fleming ID. AJCC cancer staging manual, 6th ed. New York. Springer-Verlag. 2002

31. Early DS, Fontana L, Davidson NO. Translational approaches to addressing complex genetic pathways in colorectal cancer. Transl Res 2008;151:10-6

32. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 7th edition. p862-3

33. Lee S, Bang s, Song K, Lee I. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. Oncol Rep 2006;16:747-54

34. Soctt RJ, van der Luijt R, Spycher M, et al. Novel germline APC gene mutation in a large familial adenomatous polyposis kindred displaying variable phenotypes. Gut 1995;36:731-6

35. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, et al. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/TCF pathway in colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:1130-4

36. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. Eur J Cancer 2002;38:867-71

37. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-TCF signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 1997;275:1787-90

38. Behrens J. The role of the Wnt signaling pathway in colorectal tumorigenesis. Biochem Soc Trans 2005;33:672-5

39. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. J Cell Biol 1994; **127**: 2061-9

40. Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, et al. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2316-21

41. Wheeler JM, Kim HC, Efstathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF. Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. Gut 2001;48:367-71

42. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK. The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. Dig Dis Sci 2005; **50**:42-6

43. Zuniga A, Quillet R, Perrin-Schmitt F, Zeller R. Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial-mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis. Mech Dev 2002;114:51-9

44. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 2004;117:927-39

45. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. Cancer Res 2004;64:5270-82

46. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. Genes Dev 1999;13:2207-17

47. Frackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSFIA, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. Int J Cancer 2003;107:970-5

48. Mehrota J, Vali M, McVeigh M, et al. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. Clin Cancer Res 2004;10:3104-9

49. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. Nat Cell Biol 2008;10:295-305

50. Wang X, Ling MT, Guan XY, et al. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. Oncogene 2004;23:474-82

51. Dupont J, Fernandez AM, Glackin CA, Helman L, LeRoith D. Insulin-like growth factor

1 (IGF-1)-induced twist expression is involved in the anti-apoptotic effects of the IGF-1 receptor. J Biol Chem 2001;276:26699-707

52. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behaviour during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. Science 1994;264:835-9

53. Battle E, Sancho E, Franci C, et al.The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin in gene expression in epithelial tumor cells. Nat Cell Biol 2000;2:84-9

54. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res 2002;62:1613-8

55. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang W. Expression of the transcription factors Snail, Slug, and Twist and their clinical significance in human breast cancer. Ann Surg Oncol 2005;12:1-9

56. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, et al. Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res 2005;11:1174-80

57. Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, et al. Hypermethylation associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. J Pathol 2002;198:442-9

58. Smits R, Ruiz P, Diaz-Cano S, et al. E-cadherin and adenomatous popyposis coli mutations are synergistic in intestinal tumor initiation in mice. Gastroenterology 2000;119:1045-53

59. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, et al. The transcriptional repressor Snail is overexpressed in human colon cancer. Dig Dis Sci 2005;50:42-6

60. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, et al. Mechanisms of inactivations of E-cadherin in breast carcinoma: Modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. Oncogene 2001;20:3814-23

61. Kishimoto Y, Takata N, Jinnai T, et al. Sulindac and a cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, increase APC mRNA in the colon of rats treated with azoxymethane. Gut 2000;47:812-9

Table 1. Summary of clinicopathologic features

Characteristics	No (%)
Age	
≤49	14(12.9)
50-59	26(23.9)
60-69	40(36.7)
≥70	29(26.7)
Gender	
Male	55(50.5)
Female	54(49.5)
Tumor location	
Right colon	19(17.5)
Transverse colon	8(7.3)
Left colon	20(18.3)
Rectum	62(56.9)
Differentiation	
Mild/Moderate	88(80.7)
Poor	7(6.4)
Mucinous	14(12.8)

Table 2. Relation between Twist expression and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas (%)

Variables		n	Twist expression				p-value	Twist expression		p-value
			0	1	2	3		low[1]	high[2]	
T Stage	1	2	1	0	1	0	0.001[#]	2	0	0.017[#]
	2	23	6	3	10	4		19	4	
	3	79	8	3	25	43		36	43	
	4	5	0	0	4	1		4	1	
N stage	0	73	10	4	23	36	0.429	37	36	0.151
	1	36	5	2	17	12		24	12	
M stage	0	106	15	6	38	47	0.701	59	47	1.0
	1	3	0	0	2	1		2	1	
Clinical stage	low[a]	75	10	4	24	37	0.337	38	37	0.144
	High[b]	34	5	2	16	11		23	11	
Differen-tiation[1]	W/M[*]	87	15	5	37	30	<0.001[#]	57	30	<0.001[#]
	P[*]	8	0	1	2	5		3	5	
	M[*]	14	0	0	1	13		1	13	
Differen-tiation[2]	N/M[*]	95	15	6	39	35	0.001[#]	60	35	<0.001[#]
	M[*]	14	0	0	1	13		1	13	
Total		109 (100)	15 (13.8)	6 (5.5)	40 (36.7)	48 (44.0)		61 (56.0)	48 (40.5)	

(Clinical stage - low[a]:clinical stage I and II, high[b]:clinical stage≥III)

(Twist expression - low[1]:score 0~2, high[2]:score 3)

(W/M[*]:well to moderate differentiation, P[*]:poor differentiation, M[*]:mucinous adenocarcinoma)

(N/M[*] : Non-mucinous adenocarcinoma, M[*] : Mucinous adenocarcinoma)

([#]:statistically significant, p<0.05)

Table 3. Relation between Slug expression and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas (%)

Variables		n	Slug expression				p-value	Slug expression		p-value
			0	1	2	3		low[1]	high[2]	
T Stage	1	2	1	0	0	1	0.019[#]	1	1	0.030[#]
	2	23	1	4	11	7		16	7	
	3	79	4	7	19	49		30	49	
	4	5	0	0	2	3		2	3	
N stage	0	73	5	7	21	40	0.678	33	40	1.000
	1	36	1	4	11	20		16	20	
M stage	0	106	6	11	31	58	0.511	48	58	1.0
	1	3	0	0	1	2		1	2	
clinical stage	low[a]	75	5	7	22	41	0.730	34	41	1.0
	high[b]	34	1	4	10	19		15	19	
Differen-tiation[1]	W/M[*]	87	6	10	32	39	0.001[#]	48	39	<0.001[#]
	P[*]	8	0	1	0	7		1	7	
	M[*]	14	0	0	0	14		0	14	
Differen-tiation[2]	N/M[*]	95	6	11	32	46	0.001[#]	49	46	<0.001[#]
	M[*]	14	0	0	0	14		0	14	
Total		109 (100)	6 (5.5)	11 (10.1)	32 (29.4)	60 (55.0)		49 (45.0)	60 (55.0)	

(Clinical stage - low[a]:clinical stage I and II, high[b]:clinical stage≥III)

(Slug expression - low[1]:score 0~2, high[2]:score 3)

(W/M[*]:well to moderate differentiation, P[*]:poor differentiation, M[*]:mucinous adenocarcinoma)

(N/M[*] : Non-mucinous adenocarcinoma, M[*]: Mucinous adenocarcinoma)

([#]:statistically significant, p<0. 05)

Table 4. Relation between E-cadherin expression and the clinicopathohologic features of the colorectal adenocarcinomas (%)

Variables		No	E-cadherin expression		p-value
			low[1]	high[2]	
T Stage	1	2	2	0	0.849
	2	23	13	10	
	3	79	48	31	
	4	5	4	1	
N stage	0	73	46	27	0.679
	1	36	21	15	
M stage	0	106	65	41	1.0
	1	3	2	1	
Clinical stage	low[a]	75	47	28	0.832
	high[b]	34	20	14	
Differentiation[1]	W/M[*]	87	47	41	0.001[#]
	P[*]	7	7	0	
	M[*]	14	13	1	
Differentiation[2]	N/M[*]	95	54	41	0.007[#]
	M[*]	14	13	1	
Total		109 (100)	67 (61.5)	42 (38.5)	

(Clinical stage - low[a]:clinical stage I and II, high[b]:clinical stage≥III)

(E-cadherin expression - low[1]:score 0~2, high[2]:score 3)

(W/M[*]:well to moderate differentiation, P[*]:poor differentiation, M[*]:mucinous adenocarcinoma)

(N/M[*] : Non-mucinous adenocarcinoma, M[*] : Mucinous adenocarcinoma)

([#]:statistically significant, $p<0.05$)

Table 5. Relation between E-cadherin expression and expression of Twist and SLUG in colorectal adenocarcinomas (%)

		E-cadherin expression		Total	p-value
		low[A]	high[B]		
Twist	low[1]	32	29	61(56.0)	0.045[#]
	high[2]	35	13	48(44.0)	
Slug	low[a]	21	28	49(45.0)	<0.001[#]
	high[b]	46	14	60(55.0)	
		67(61.5)	42(38.5)	109(100.0)	

(E-cadherin expression - low[A]:score 0~2, high[B]:score 3)

(Twist expression - low[1]:score 0~2, high[2]:score 3)

(Slug expression - low[a]:score 0~2, high[b]:score 3)

([#]:statistically significant, p<0.05)

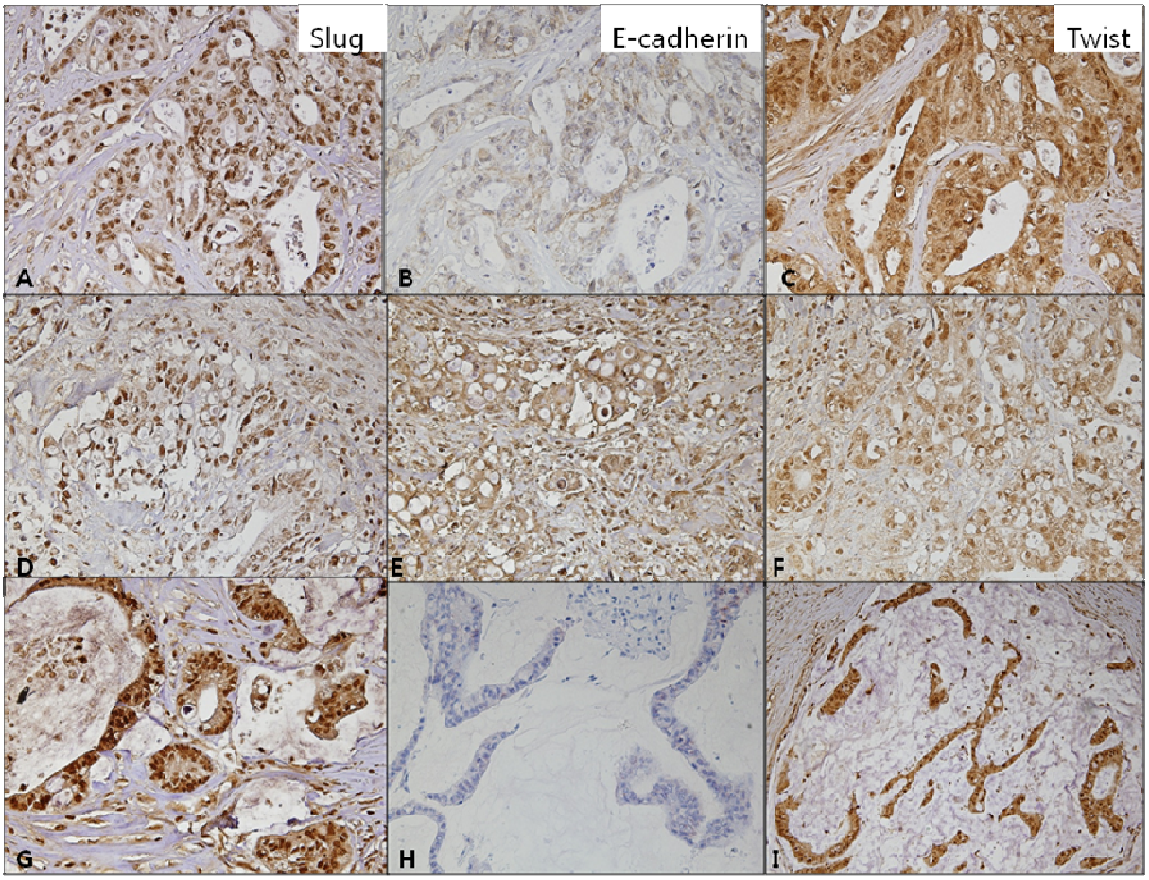

Figure 1. Immunohistochemical staining results of E-cadherin (-) tumors. Well to moderately differentiated carcinoma (A-C), poorly differentiated adenocarcinoma (D-F), and mucinous adenocarcinoma (G-I) show strong nuclear staining of Slug (A, D, G) and Twist (C, F, I) and weak or no expression of E-cadherin (B, E, H)

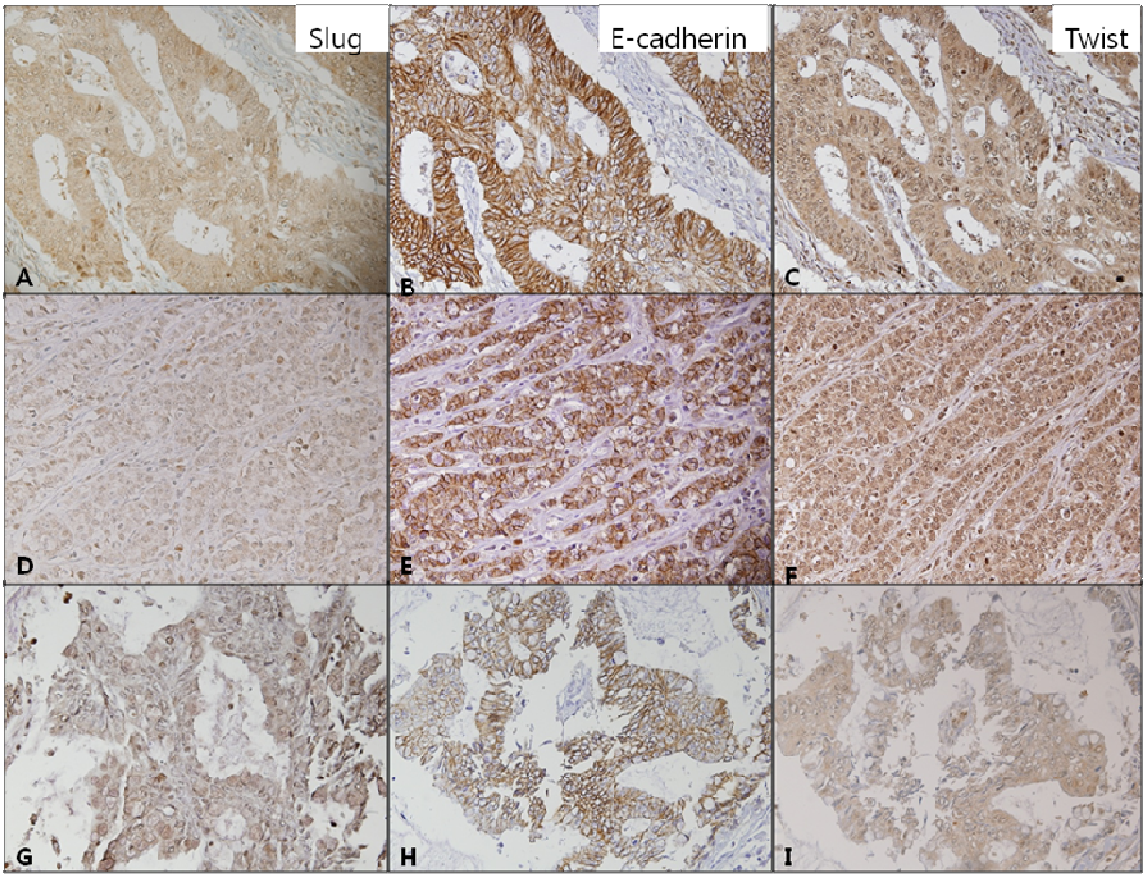

Figure 2. Immunohistochemical staining results of E-cadherin (+) tumors. Well to moderately differentiated carcinoma (A-C), poorly differentiated adenocarcinoma (D-F), and mucinous adenocarcinoma (G-I) show strong membraneous staining of E-cadherin (B,E,H) and weak or no nuclear staining of Slug (A, D, G) and Twist (C, F, I)