

## 진행성 위암의 예후인자로서 p53, c-erbB-2, nm23, Ki-67 발현의 의의

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>외과학교실, <sup>2</sup>병리학교실  
<sup>3</sup>가천 의과대학 병리학교실

노성훈<sup>1</sup> · 류창학<sup>1</sup> · 이한영<sup>1</sup> · 김호근<sup>2</sup> · 오영하<sup>3</sup> · 민진식<sup>1</sup>

### Prognostic Significance of p53, c-erbB-2, nm23 and Ki-67 Expression in Patients with Advanced Gastric Carcinoma

Sung Hoon Noh, M.D.<sup>1</sup>, Chang Hak Yoo, M.D.<sup>1</sup>, Han Young Lee, M.T.<sup>1</sup>  
Hoguen Kim, M.D.<sup>2</sup>, Young Ha Oh, M.D.<sup>3</sup> and Jin Sik Min, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Surgery and <sup>2</sup>Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea;  
<sup>3</sup>Department of Pathology, Kacheon College of Medicine, Kanghwa, Korea

**Purpose:** We investigated the prognostic impacts of p53, c-erbB-2, nm23 and Ki-67 expression in patients with stage II and IIIA gastric carcinoma who underwent curative (R0) resections.

**Materials and Methods:** 261 paraffin-embedded gastric carcinoma tissues (stage II, 121; stage IIIA, 135) were stained with the monoclonal antibodies, p53, c-erbB-2, nm23 and Ki-67 using the labelled streptavidin biotin method. The positivity was determined by two pathologists who were kept blind for the patients' outcome.

**Results:** The overexpression was seen in 51.7% for p53, 11.9% for c-erbB-2, and 70.1% for nm23. The mean Ki-67 labelling index was  $25.5 \pm 16.7$ . The rates of overexpression between the stage II and stage IIIA were not significantly different in all these molecules. Overexpression of p53 was more likely to be associated with old age and lymph node metastasis. Overexpression of c-erbB-2 was more likely to be associated with Borrmann type I, II and well-differentiated tumor. However, nm23 was more frequently expressed in patients with older age and well-differentiated tumor. In survival analysis, the overexpressions of p53 and Ki-67 were significantly associated with poor prognosis of the patients ( $p < 0.01$ ), but c-erbB-2 and nm23 were not related to the patients' outcome. In a multivariate analysis of prognostic factors, only the lymph node metastasis was an independent prognostic factor.

---

책임저자 : 노성훈, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지, 연세대학교 의과대학 외과학교실, 120-752

Tel: 361-5540, Fax: 313-8289, E-mail: sunghoonn@yumc.yonsei.ac.kr

본 연구는 대한암연구재단 연구비 제 97-9호의 지원으로 이루어진 것임.

접수일 : 1998년 12월 26일, 게재승인일 : 1999년 6월 24일

**Conclusion:** Although the values did not reach statistical significance in a multivariate analysis, the overexpression of p53 and Ki-67 tended to have adverse effects on the prognosis of patients with gastric cancer.

**Key Words:** p53, c-erbB-2, nm23, Ki-67, Gastric cancer, Prognosis

## 서 론

위암은 우리 나라에서 발생 및 사망 빈도가 가장 높은 악성종양이다. 현재까지 알려진 위암의 예후인자 중 가장 의의있는 것은 암세포의 위벽 침윤도, 림프절 전이 및 원격전이에 의해 결정되는 TNM 병기이다(1,2). 그러므로 위암의 수술 후 치료 방침을 정하거나 예후를 예측하는 데에 TNM 병기가 사용되어 왔으나 동일한 병기의 환자에서도 재발 및 장기 생존 여부가 다양하기 때문에 기존의 TNM 분류방법을 보완할 수 있는 새로운 예후 예측인자를 찾고자 하는 노력이 시도되고 있다.

최근 분자생물학의 발달에 힘입어 암의 발생은 축적된 유전자의 변화의 결과라는 것이 정설로 받아들여짐에 따라 암유전자, 성장인자 및 그의 수용체 혹은 암억제 유전자를 암표식자나 예후인자로 이용하려는 많은 보고가 있었다. 면역조직화학적 분석법은 비교적 간단하면서도 그 결과가 분자생물학적 방법과 거의 일치하여 다수의 검체를 검사하는 데 시간과 노력을 절약할 수 있다는 장점이 있다. 위암의 경우에도 면역조직화학적 방법을 이용한 많은 보고가 있었으나 연구 결과가 일치하지 않는 경우가 적지 않다. 그 이유로는 면역조직화학적 분석의 결과가 조직 처리 방법, 사용한 항체, 염색 방법, 판독, 대상 환자의 수, 병기, 추적 기간 등에 따라 달라질 수 있기 때문이다(3).

이에 저자들은 진행성 위암 중 근치적 수술로 완치를 기대할 수 있으나 임상에서 적지 않은 재발을 경험하는 UICC 병기분류법(4)에 따른 II기 및 IIIA기 환자에 국한하여 암억제 유전자인 p53, 암유전자인 c-erbB-2, 암의 전이와 관련된 nm23

및 암의 증식 정도를 나타내는 Ki-67 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 또한 이들 단백질의 발현과 환자의 임상병리학적 소견 및 예후와의 상관성을 환자의 생존을 조사를 통하여 알아보고 예후 인자로서의 유용성을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상

1987년 1월부터 1994년 12월까지 만 8년간 연세대학교 의과대학 외과학교실에서 위선암으로 위절제를 시행한 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호하고 수술 후 추적조사가 이루어진 병기 II기(n=126) 및 IIIA기 환자(n=135) 261명을 대상으로 하였다. 대상환자의 평균연령은 56세(26~77세)로 모두 D2 절제술 이상의 근치적 수술을 시행하였으며 나이, 성별, 위암의 크기 및 위치, 육안적 소견, 조직 병리학적 소견 등을 기록하였고 병기는 UICC TNM 분류법(5)을 따랐다. 추적조사의 종료시점은 1998년 8월 31일이었으며 추적 중앙값은 63개월(6~124개월)이었다. 대상 환자 중 수술 후 합병증으로 1개월 이내에 사망한 예는 없었다. 마지막 추적일 현재 141명이 재발의 증거 없이 생존 중이며 120명은 위암으로 인해 사망하였다.

### 2) 방법

(1) **면역조직화학 염색:** 대상 환자의 Hematoxylin & Eosin 염색 슬라이드를 병리의사가 재검하여 최초 진단 및 병기가 정확한지 확인한 후 파라핀 포매조직을 6 m 두께의 연속 절편으로 만들어 슬라이드에 부착하였다. 면역조직화학 염색을

위해 파라핀 포매조직을 xylene으로 탈파라핀시킨 후 점차적으로 낮은 농도의 알콜로 함수시켰으며 내인성 peroxidase 활성을 제거하기 위해 20분간 methanol에서 3% hydrogen peroxide로 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS) 완충액으로 5분간 세척하였다. 비특이 항체 반응을 제거하기 위해 정상 토끼 혈청을 포함한 PBS에 20분간 방치한 후 적절한 비율로 희석시킨 일차 항체들을 4°C에서 하룻밤 반응시켰다.

염색에 사용한 일차 항체는 p53 (DO-7, Novocastra, Newcastle, UK; 희석비율 1 : 50), c-erbB-2 (Rabbit Anti-Human, DAKO, Glostrup, Denmark; 1 : 100), nm23 (NCL-nm23, Novocastra, Newcastle,

UK; 1 : 100), Ki-67 (MIB-1, Immunotech, Marseille, France; 1 : 50)이었다. 항체와 반응시킨 조직을 Tris buffered saline (TBS)으로 20분간 세척한 후 이차 항체로 biotinylated anti-rabbit serum (DAKO LSAB kit, K681, Carpinteria, CA, USA)에 30분간 반응시키고 Streptavidin peroxidase (DAKO LSAB kit, K681, Carpinteria, CA, USA)에 20분간 방치하였다.

TBS에 10분간 세척 후 AEC (3% 3-amino-9-ethylcarbazole) chromogen (DAKO, K3434, CA, USA)을 이용하여 2회 반복 염색하였다. 증류수로 세척한 후 hematoxylin으로 실온에서 1분간 대조 염색을 실시한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

**Fig. 1.** A. Staining of p53 ( $\times 40$ ). Intense nuclear staining is demonstrated in the scattered tumor cells. B. Staining of c-erbB-2 ( $\times 100$ ). Membranous staining of c-erbB-2 is demonstrated. C. Staining of nm23 ( $\times 40$ ). Cytoplasmic staining of tumor cells and adjacent normal epithelial cells are demonstrated. D. Staining of Ki-67 ( $\times 200$ ). Intense nuclear staining in some of the tumor cells is demonstrated.

(2) 판독: 대상 환자의 임상병리학적 소견에 대해 사전 지식이 없는 2명의 병리의사가 각 조직 절편 중 원발병소의 종양조직 및 인접 정상조직에서 저배율의 현미경 시야로 염색 여부를 확인한 후 고배율 시야에서 염색된 종양세포수 및 염색 강도를 표시하였다. 음성 대조군은 일차 항체를 사용하지 않고 면역조직화학 염색을 시행하여 얻은 결과로 하였고 양성 대조군은 항체 제조회사에서 제공하는 양성 염색 표본사진을 기초로 하여 음성 대조군에서 보이지 않았던 염색 세포가 고배율 시야에서 보이는 경우로 하였다.

p53의 양성 판정은 뚜렷한 세포핵 염색이 10% 이상일 경우(Fig. 1A), c-erbB-2는 세포막 염색이 20% 이상인 경우로 하였다(Fig. 1B). nm23는 중등도 이상의 강도(moderate or strong intensity)로 세포질내에 30% 이상 염색된 경우로 하였다(Fig. 1C). Ki-67은 핵에 염색된 세포수를 세어 표지자수(labeling index)를 구하였다(Fig. 1D).

(3) 통계처리: 통계처리는 Windows용 SPSS 7.5 program을 사용하였다. 염색 결과와 임상병리학적 소견간의 상관관계는 Chi-square test 및 Spearman's correlation 분석을 시행하였고, 생존율은

Table 1. Relationships between clinicopathologic features and p53, c-erbB-2 immunoreactivity in primary gastric carcinomas

Clinicopathologic features	Number of patients (%)					
	p53		p-value	c-erbB-2		p-value
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Age (years)			0.002			0.93
<50	44 (34.9)	25 (18.5)		61 (26.5)	8 (25.8)	
≥50	82 (65.1)	110 (81.5)		169 (73.5)	23 (74.2)	
Sex			0.11			0.07
Male	87 (69.0)	105 (77.8)		165 (71.7)	27 (87.1)	
Female	39 (31.0)	30 (22.2)		65 (28.3)	4 (12.9)	
Tumor size (cm)			0.85			0.48
<5	49 (38.9)	54 (40.0)		89 (38.7)	14 (45.2)	
≥5	77 (61.1)	81 (60.0)		141 (61.3)	17 (54.8)	
Tumor location			0.85			0.61
Upper third	19 (15.1)	21 (15.5)		32 (13.9)	6 (19.3)	
Middle third	39 (30.9)	40 (29.6)		69 (30.0)	8 (25.8)	
Lower third	68 (54.0)	74 (54.8)		129 (56.1)	17 (54.8)	
Gross type			0.38			0.01
Borrmann I/II	26 (20.6)	34 (25.2)		47 (20.4)	13 (41.9)	
Borrmann III/IV	100 (69.0)	101 (74.8)		183 (79.6)	18 (58.1)	
Histologic type			0.83			0.001
Differentiated	49 (38.9)	52 (38.5)		79 (34.3)	22 (71.0)	
Undifferentiated	77 (61.1)	83 (61.5)		151 (65.7)	9 (29.0)	
Depth of invasion			0.23			0.06
Serosa (-)	29 (23.0)	40 (29.6)		58 (25.2)	11 (35.4)	
Serosa (+)	97 (77.0)	95 (70.4)		172 (74.8)	20 (64.6)	
Lymph node metastasis			0.03			0.19
(-)	53 (44.4)	33 (24.4)		79 (34.3)	7 (22.6)	
(+)	73 (55.6)	102 (75.6)		151 (65.7)	24 (77.4)	
TNM stage			0.43			0.98
II	64 (50.8)	62 (45.9)		111 (48.3)	15 (48.4)	
IIIA	62 (49.2)	73 (54.1)		119 (51.7)	16 (51.6)	

Kaplan-Meier법에 따른 누적 생존율을 구하여 log-rank test로 비교하였다. 다변량 분석은 Cox's proportional hazard model을 적용하여 독립적인 예후 인자를 확인하였다. 통계적 유의성은 p 값이 0.05 이하인 경우로 하였다.

### 결 과

#### 1) p53, c-erbB-2, nm23의 발현에 따른 임상 병리학적 소견

p53 단백질의 발현율은 51.7% (n=135), c-erbB-2

는 11.9% (n=31), nm23는 70.1% (n=183)였고 II기 및 IIIA기의 병기에 따른 차이는 없었다. 각 유전자의 발현과 임상병리학적 소견과의 상관관계를 보면 p53 양성군의 경우 음성군에 비해 연령이 높았고 림프절 전이 빈도가 의의있게 높았으나, 성별, 암의 크기 및 위치, 육안적 혹은 조직학적 소견, 암의 침윤도에 따른 발현율의 차이는 없었다(Table 1). c-erbB-2의 경우 Borrmann type I/II 군과 분화암에서 발현율이 유의하게 높았으나 그의 다른 임상병리학적 소견과의 상관관계는 없었다(Table 1). nm23는 양성인 경우 음성군에 비해

**Table 2.** Relationships between clinicopathologic features and nm23, Ki-67 immunoreactivity in primary gastric carcinomas

Clinicopathologic features	nm23		p-value	Ki-67	
	(-)	(+)		Labelling Index (mean S.D.)	p-value
Age (years)			0.01		0.005
< 50	29 (37.2)	40 (21.8)		20.3 ± 11.4	
≥ 50	49 (62.8)	143 (78.2)		27.4 ± 17.9	
Sex			0.17		0.99
Female	25 (32.0)	44 (24.0)		25.7 ± 20.3	
Male	53 (68.0)	139 (76.0)		25.5 ± 15.4	
Tumor size (cm)			0.37		0.19
< 5	34 (43.6)	69 (37.7)		23.7 ± 14.9	
≥ 5	44 (56.4)	114 (62.3)		26.7 ± 17.7	
Tumor location			0.23		0.18
Upper third	10 (12.8)	28 (15.3)		23.1 ± 15.2	
Middle third	23 (29.5)	54 (29.5)		26.3 ± 18.3	
Lower third	45 (57.7)	101 (55.2)		26.5 ± 16.4	
Gross type			0.11		0.36
Borrmann I/II	13 (16.7)	47 (25.7)		27.3 ± 17.7	
Borrmann III/IV	65 (83.3)	136 (74.3)		24.9 ± 16.4	
Histologic type			0.01		0.12
Differentiated	21 (26.9)	80 (43.7)		27.7 ± 18.2	
Undifferentiated	57 (73.1)	103 (56.3)		24.1 ± 15.5	
Depth of invasion			0.91		0.27
Serosa (-)	21 (26.9)	48 (26.2)		27.5 ± 14.3	
Serosa (+)	57 (73.1)	135 (73.8)		24.8 ± 17.6	
Lymph node metastasis			1.00		0.003
(-)	26 (33.3)	61 (33.3)		20.8 ± 15.3	
(+)	52 (66.7)	122 (66.7)		27.8 ± 16.9	
TNM stage			0.93		0.06
II	38 (48.7)	88 (48.1)		23.3 ± 15.8	
IIIA	40 (51.3)	95 (51.9)		27.6 ± 17.3	

연령이 더 높았고 분화암의 빈도가 유의하게 높았다(Table 2). 각 유전자 발현들간에 상관관계를 보면 p53과 c-erbB-2 발현 사이에 약한 상관성(상관계수=0.14, p=0.021)을 보였으나 기타 유전자들의 발현간에는 상관관계가 없었다.

2) Ki-67 표지지수

Ki-67 표지지수는 평균 25.516.7이었고 50세 이상 연령군과 림프절 전이가 있는 경우 유의하게 높았다(Table 2). Ki-67 표지지수와 다른 유전자 발현과의 상관관계는 nm23 양성인 경우 표지지수

(27.0±17.5)가 음성(21.5±16.7)에 비해 유의하게 높았으나(p=0.032), p53, c-erbB-2 발현과는 상관관계가 없었다.

3) 생존율 분석

각 유전자의 발현 여부에 따른 생존율은 p53 양성인 경우 5년 생존율이 50.0%로 음성의 64.7%에 비해 유의하게 낮았으며(Fig. 2), c-erbB-2, nm23의 경우 양성군이 음성군에 비해 모두 불량한 예후를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 3, 4). Ki-67은 표지지수가 20% 이상 증가된

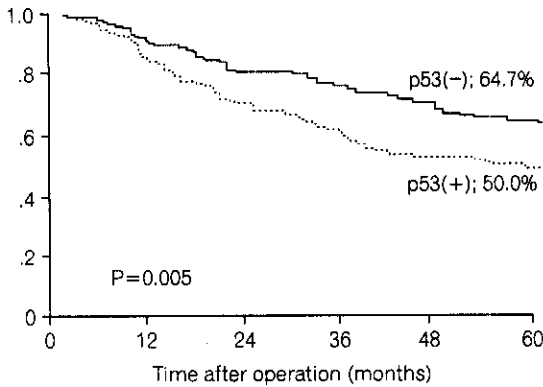


Fig. 2. Survival curves of patients with stage II & IIIA gastric cancer according to p53 immunohistochemical staining.

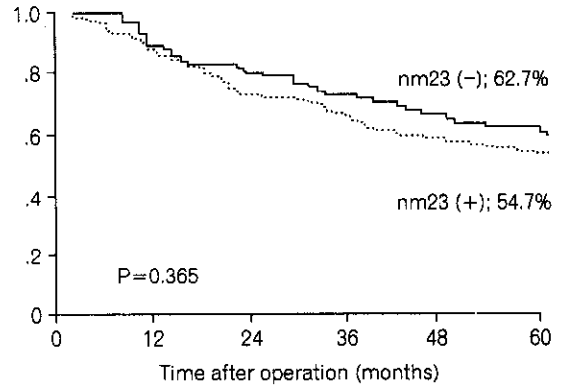


Fig. 4. Survival curves of patients with stage II & IIIA gastric cancer according to nm23 immunohistochemical staining.

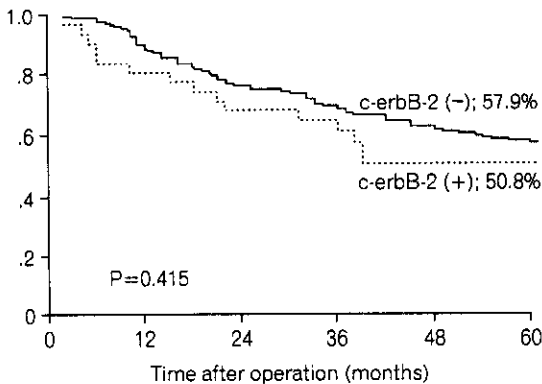


Fig. 3. Survival curves of patients with stage II & IIIA gastric cancer according to c-erbB-2 immunohistochemical staining.

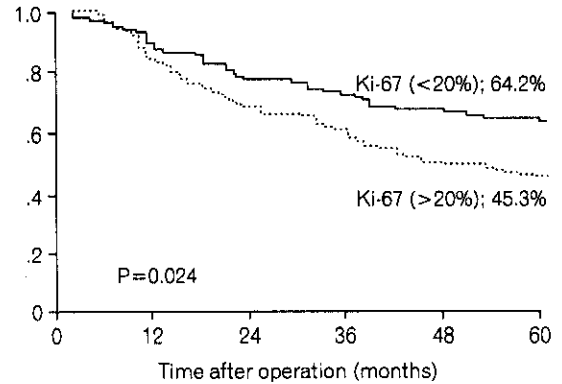


Fig. 5. Survival curves of patients with stage II & IIIA gastric cancer according to Ki-67 immunohistochemical staining.

**Table 3.** Multivariate Analysis of the various prognostic factors including p53, c-erbB-2, nm23, Ki-67 expressions in stage II and IIIA gastric cancer patients

Variable	Coefficient	Standard error	Relative risk	95% Confidence interval	P-value
LN metastasis	0.66	0.22	1.94	1.25~3.01	0.003
Gross type	0.37	0.27	1.45	0.84~2.53	0.179
Depth of invasion	0.32	0.28	1.38	0.79~2.41	0.256
Histologic type	0.28	0.22	1.33	0.85~2.07	0.209
Age	0.01	0.01	1.25	0.88~1.86	0.288
Tumor location	0.14	0.13	1.15	0.88~1.51	0.293
Tumor size	0.01	0.22	1.00	0.64~1.55	0.986
Sex	0.14	0.24	1.16	0.71~1.88	0.547
p53	0.24	0.22	1.28	0.83~1.95	0.258
Ki-67	0.23	0.13	1.26	0.98~1.63	0.067
c-erbB-2	0.19	0.31	1.21	0.65~2.24	0.544
nm23	0.01	0.23	1.00	0.63~1.59	0.988

경우 5년 생존율이 45.3%로 20% 미만인 경우의 64.2%에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 5). p53 발현에 따른 병기별 생존율을 보면 II기의 경우 양성군(68.7%)과 음성군(63.9%) 사이에 유의한 차이가 없었으나(p=0.328), IIIA기는 양성군(38.3%)이 음성군(60.7%)에 비해 예후가 불량하였다(p=0.014).

**4) 다변량 분석**

위암 환자의 임상병리학적 소견 및 유전자들의 발현여부를 대상으로 다변량 분석을 시행한 결과 림프절 전이만이 독립적 예후인자(상대위험도=1.89, p=0.004)였고 기타 예후인자 및 유전자들의 발현여부는 의의가 없었다(Table 3).

**고 찰**

현재까지 위암 환자에서 완치를 기대할 수 있는 유일한 치료법은 외과적 절제술이다. 조기위암 환자의 경우 5년 생존율이 90% 이상으로 좋은 결과를 보이고 있으나 우리나라의 경우 70% 이상의 환자가 진행된 위암으로 수술을 시행받기 때문에 진행 위암의 예후를 예측할 수 있는 인자를 밝혀내고 그에 따른 수술 후 치료 방침을 정하는 것이

필요하다. 특히 진행성 위암 중에서도 II기 및 IIIA기 위암은 수술 당시 원격전이가 없는 국소적 질환이므로 근치적 수술과 보조 항암요법을 적절히 시행할 경우 이론적으로 완치를 기대할 수 있다. 그러나 임상적으로 여러 보고들이 II기의 경우 5년 생존율을 60~76%, IIIA기는 50~60%로 보고하고 있어(1,2) 이 병기에 해당하는 환자의 수술 후 예후를 예측하고 수술 후 보조 항암요법 시행 여부를 결정할 수 있는 기준 설정이 요망되고 있다. 이에 TNM 병기 이외에 암과 관련된 유전자들을 찾아 환자의 예후나 보조 항암요법의 치료 효과 등과 연관시키려는 연구가 활발히 진행 중이다.

저자들이 이용한 면역조직화학 염색은 세포내 특정 항원에 대해 높은 특이성이 있는 항체를 이용하여 검사하는 방법이다. 최근 많은 종류의 단클론항체가 개발되어 상품화되었고 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매된 조직에서도 소실된 항원성을 회복하거나 감수성을 높여 항원성이 약해진 항원을 찾아내는 염색법의 개발로 인해 진단 및 연구 분야에서 분자 생물학적 기법과 함께 활발히 사용되고 있다(5). 면역조직화학 염색의 가장 큰 장점은 면역 반응의 결과를 조직 혹은 세

포 내에서 형태학적 소견과 연관지어 관찰할 수 있다는 점이나 immunoblot에 비해 객관적인 정량 분석이 어렵다는 것이 단점으로 지적되고 있다.

p53유전자는 17번 염색체 단완에 위치하며 53 kDa의 핵 인단백을 생성하는 종양 특이 항원으로 DNA의 손상이 일어날 경우 이를 치유하거나 세포사멸(apoptosis)을 유발하여 암 발생을 억제하는 유전자이다. 따라서 이 유전자의 변이가 일어날 경우 성장 능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하며, 궁극적으로 악성 종양이 발생하는 것으로 알려져 있다. p53 변이단백(mutant-type)은 구조적으로 안정되어 있어 세포내에 축적되기 때문에 p53 항체를 이용한 면역조직화학적 염색에 의해 검출할 수 있다(12). 유방암, 폐암, 대장암 등에서 p53 유전자의 면역조직화학적 발현이 예후와 상관있다는 보고가 많으며 위암의 경우에도 Martin 등(13)과 Starzynska 등(14)이 p53 발현이 위암환자의 불량한 예후와 상관성이 있다고 보고한 후 다양한 환자군을 대상으로 다양한 항체를 이용한 연구가 있었다(13~24). p53의 발현율은 28.8% 65%로 다양하였으나 대부분이 40~50%였으며 저자들의 경우에도 51.7%로 비슷한 결과를 보였다(Table 4). 본 연구에서 병기에 따른 p53 발현율의 차이는 없었으나 양성군의 경우 음성군에 비해 연령

이 높았고 림프절 전이 빈도가 높았다. 이러한 결과는 p53 발현군의 경우 암의 림프절 혹은 원격 전이의 빈도가 높다는 이전의 연구 결과들과 일치하고 있어 p53 유전자 변이가 암의 진행 혹은 전이 능력과 상관성이 있음을 알 수 있었다(15,19,21).

p53 발현과 위암 환자의 예후와의 상관 관계를 보면 단변량, 다변량 분석에서 모두 유의있는 예후 인자로 보고하거나 저자들의 경우와 같이 단변량 분석에서만 의의가 있다는 보고도 있으며 환자의 예후와 상관성이 없다는 보고도 있다(Table 4). Gabbert 등(4)은 이러한 결과들의 차이가 연구 대상이 되는 환자 수, 종양의 조직학적 유형, 병기, 추적기간, 사용한 항체의 차이 등에 기인한다고 하였으며 p53의 면역조직화학적 검사이 현재로서는 환자의 예후를 예측할 수 있는 유용한 방법이 아니라고 하였다. 또한 Dix 등(25)은 p53 유전자의 변이가 p53 단백질의 과발현으로 항상 나타나는 것이 아니라 2/3 정도의 종양에서만 관찰되기 때문에 면역조직화학적 염색 결과를 예후인자로 사용하는 데에는 무리가 있다고 하였다. 그러나 p53 유전자 변이가 종양의 발생이나 진행과 관련 있음이 밝혀졌고 비교적 간단한 면역조직화학적 염색으로 알 수 있는 p53 변이단백의 과발현이 다른 많은 보고들과 저자들의 결과에서와 같이 불

Table 4. Published studies dealing with the correlation of p53 expression and prognosis in gastric cancer

Author	No. of patients	p53 positivity (%)	Prognostic significance
Starzynska et al. (1992)	55	47.3	yes <sup>†</sup>
Martin et al. (1992)	125	57.0	yes*
Kakeji et al. (1993)	96	54.0	no
JoyPaul et al. (1994)	160	46.0	yes <sup>†</sup>
Gabbert et al. (1995)	418	57.5	no
Victorzon et al. (1996)	242	39.0	yes <sup>†</sup>
Muler et al. (1996)	120	43.0	yes <sup>†</sup>
Starzynska et al. (1996)	200	42.5	yes*
Tang et al. (1997)	170	28.8	no
Ichiyoshi et al. (1997)	196	48.0	yes*
Gomyo et al. (1997)	93	65	no

\*significant prognostic factor in multivariate analysis

<sup>†</sup>significant prognostic factor only in univariate analysis or marginally related to poor prognosis



량한 예후와 깊은 연관이 있으므로 p53 유전자의 변이에 대한 면역조직화학적 연구 방법은 임상적으로 환자의 예후를 예측할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

c-erbB-2 유전자는 염색체 17q21에 존재하는 세포 유전자로서 생성된 단백질이 EFGR (c-erbB-1)과 유사하지만 생물학적으로 구분이 되는 분자량 185 kDa 크기의 막 당단백을 생성하며 이 중 막 영역의 돌연변이가 이 유전자의 변형 작용에 관여한다고 알려졌다(26,27). 1986년 Yokota등(28)이 위, 신장, 유방의 선암종에서 이 유전자의 증폭을 보고한 이후 여러 장기의 선암종에서의 발현이 보고되었고 특히 유방암, 위암, 난소암 등에서 유전자의 증폭 정도와 예후와의 관련성이 보고되었다. 또한 c-erbB-2 유전자의 증폭에 의해 생성이 증가된 단백질의 존재를 면역조직화학적 염색을 이용하여 관찰할 수 있게 되어 보다 쉽게 이 유전자의 발현을 연구할 수 있게 되었다. 파라핀 포매조직을 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하는 경우 위암에서의 양성률은 11~27.4%로 보고되고 있으며(29~34) 저자들의 경우 11.9%였다. 대부분의 보고에서와 같이 저자들의 경우에도 c-erbB-2 발현이 분화가 잘 된 암에서 높았다. 이 유전자의 발현이 불량한 예후와 관련 있음을 보고하는 연구들은 대부분 발현이 양성인 경우 림프절, 복막, 간 전이의 빈도가 증가되었고 결과적으로 암의 진행과 관련이 있다고 하였다(29~34). 저자들의 경우 연구대상 환자를 II기 및 IIIA기로 하였기 때문에 원격전이와의 관계를 알 수 없었고, c-erbB-2 발현과 다른 임상병리학적 소견간에 상관관계는 없었으며 예후와도 상관이 없었다. 이러한 연구 결과들의 차이는 앞서 기술한 바와 같이 사용한 항체, 염색 방법 등의 차이에도 기인하지만 대상 환자의 병기와도 깊은 상관관계가 있다고 사료된다.

암전이 억제 유전자로 알려진 nm23은 Steeg등(35)이 쥐의 흑색종 세포에서 전이 능력이 서로 다른 세포주들간의 차이를 연구하다가 발견하였다. nm23 유전자는 nm23-H1과 nm23-H2의 이들이 생성하는 단백질의 아미노산 중 90%가 일치한다

(36). nm23 유전자가 암의 전이 단계에 작용하는 기전이나 기능에 대해 자세히 알려져 있지 않지만 GTP 결합 단백질에 직접 작용하는 NDP kinase의 역할로 추측해 볼 때 세포간 신호전달체계(signal transduction system)에 작용하는 것으로 생각된다(37). 최근 연구에서 nm23-H1과 NDP kinase A의 산물이 일치하는 것으로 알려져 NDP kinase A를 측정함으로써 nm23-H1 유전자의 발현을 간접적으로 측정할 수 있게 되었고 저자들이 사용한 NCL-nm23 항체는 사람의 적혈구에서 분리된 NDP kinase A를 선택적으로 측정한다. 사람의 위암이나 대장암에서 nm23 mRNA나 단백질의 발현이 감소된 경우 암의 전이 능력이 증가되고 결과적으로 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고가 있는 반면 nm23 발현이 증가할 경우 오히려 종양의 진행과 연관이 있고 불량한 예후를 보인다는 상반된 보고가 있다(38~41).

위암의 경우에도 Kodera등(42)과 Ura등(43)은 nm23의 저발현이 위암의 나쁜 예후와 상관이 있다고 하였으며 Nakayama등(44)은 암전이 림프절이나 간의 전이암 조직에서 원발암 조직에서보다 nm23의 면역학적 발현이 감소되었다고 하였다. 저자들의 경우 원발암 조직에서의 nm23 유전자의 발현이 조직학적으로 분화가 좋은 암에서 높았는데 이는 이전의 연구 결과들과 일치하였다. 그러나 저자들의 경우 nm23와 예후와의 상관성은 없었고 오히려 nm23 발현이 증가된 경우 통계적 유의성은 없었지만 나쁜 예후를 보였다. 이러한 결과는 Müller등(45), Kröning등(46), Wang등(47)의 결과와 일치하는데 그 기전으로 nm23 유전자의 발현이 종양의 생성 및 진행과 관련이 있는 반면 발현의 감소는 종양의 전이 능력과 관련이 있을 것이라는 추측 외에는 밝혀진 바가 없다(48). 따라서 위암에서 nm23 유전자의 정확한 역할을 알기 위해서는 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

악성 종양의 증식 정도는 종양의 전이 능력, 재발 및 생존율과 밀접한 관련이 있다. 암의 증식 정도를 평가하는 방법으로는 광학현미경 하에서

유사분열의 수를 직접 세는 단순한 방법에서부터 tritiated thymidine을 이용한 자가 방사 기록법, 유세포 분석기를 이용한 DNA 측정, bromode-oxyridine (BrdU) 흡수 정도를 측정하는 방법 및 Ag-NORs를 측정하는 방법 등이 있다. 증식 세포에서 표현되는 핵단백으로는 Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 등이 있는데 이 중 Ki-67 항원은 증식성 세포의 모든 세포 주기에서 발견되는 특성을 가지고 있어 암의 증식능 측정에 많이 이용하고 있다. 위암에서 Ki-67 항원의 표지 지수는 Yonemura 등(49)이  $22 \pm 12.6$ , Ramires 등(50)이  $32.7 \pm 18.9$ , Katoh 등(51)은  $56 \pm 7.9$  등으로 보고하였다. 저자들의 경우  $25.5 \pm 16.7$ 이었으며 평균값에 대한 표준편차가 대부분의 보고에서 높게 나와 위암의 증식능이 매우 다양함을 알 수 있다. 임상병리학적 소견 및 생존율과의 상관관계를 보면 저자들의 경우 50세 이상 연령군과 림프절 전이가 있는 환자에서 높은 발현을 보였고 20% 이상의 고발현군이 20% 미만군에 비해 유의하게 낮은 예후를 보였으나 이와 다른 결과의 보고들도 많아 Ki-67 발현의 예후인자로서의 임상적 유용성은 향후 연구해야 할 과제라고 생각된다.

## 결 론

근치적 위절제를 시행한 병기 II기 및 III기 위암 환자에서 p53, c-erbB-2, nm23, Ki-67의 예후인자로서의 의의와 다른 임상병리학적 소견과의 상관관계를 알아보기 위해 파라핀 포매조직을 이용한 면역조직화학 염색을 시행한 결과 p53과 Ki-67의 경우 양성 혹은 과발현군의 5년 생존율이 음성 혹은 저발현군에 비해 유의하게 낮았으나 c-erbB-2, nm23의 경우 예후와 유의한 상관관계가 없었다. 따라서 위암 환자에서 p53 변이단백이 과발현되거나 암세포의 증식능이 증가된 경우 불량한 예후와의 상관관계를 고려하여 보조항암요법 시행의 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Noh SH, Yoo CH, Yi Kim, CB Kim, JS Min, KS Lee. Results after gastrectomy of 2603 patients with gastric cancer: analysis of survival rate and prognostic factor. *J Korean Surg Soc* 1998; 55: 206-213.
2. Kim JP, Kwon OJ, Oh ST, Yang HK. Results of surgery on 6589 gastric cancer patients and immunochemosurgery as the best treatment of advanced gastric cancer. *Ann Surg* 1992; 216: 269-278.
3. Gabbert HE, Miller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 720-726.
4. Hermanek P, Sobin LH. TNM Classification of Malignant Tumors, International Union Against Cancer (UICC), 4th ed. Berlin: Springer-Verlag, 1987: 43-46.
5. Fan AG, Nakane PK. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies. *J Immunol Meth* 1981; 47: 129-134.
6. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-862.
7. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, Stern PL. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1992; 66: 558-562.
8. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67: 589-593.
9. Joypaul BV, Hopwood D, Newman EL, Qureshi S, Grant A, Ogston SA, et al. The prognostic significance of the accumulation of p53 tumour suppressor gene protein in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1994; 69: 943-946.
10. Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32: 215-220.
11. Mler W, Borchard F. Prognostic influence of p53 expression in gastric cancer. *J Pathol* 1996; 178: 255-258.
12. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, Marlicz K, Mietkiewski J, Roberts SA. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 2005-2012.

13. Tang H, Hokita S, Che X, Baba M, Aridome K, Kijima F, Tanabe G, Takao S, Aikou T. Comparison of p53 expression in proximal and distal gastric cancer: histopathologic correlation and prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 470-474.
14. Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, Sakaguchi Y, Ohno S, Maehara Y, Sugimachi K. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterol* 1997; 44: 546-553.
15. Gomyo Y, Ikeda M, Osaki M, Tanabe S, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N, Ito H. Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 2067-2072.
16. Lee SS, Kim SP, Sohn SS. Overexpression of p53 protein in intestinal-type early gastric carcinomas. *J Korean Cancer Asso* 1996; 28: 632-638.
17. Dix B, Robbins P, Carrello S, House A, Lacopetta B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 1994; 70: 585-590.
18. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Liebermann JA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230: 1132-1139.
19. Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K, Terada M, Sugimura T, Battifora H, Cline MJ. Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo. *Lancet* 1986; 1: 765-767.
20. Mizutani T, Onda M, Tokunaga A, Yamanaka N, Sugisaki Y. Relationship of c-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer* 1993; 72: 2083-2088.
21. Orita H, Maehara Y, Emi Y, Kakeji Y, Baba H, Korenaga D, Sugimachi K. c-erbB-2 expression is predictive for lymphatic spread of clinical gastric carcinoma. *Hepatogastroenterol* 1997; 44: 294-298.
22. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-204.
23. Lacombe ML, Sastre-Garau X, Lascu I, Wallet V, Thierry JP, Veron M. Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (Nm 23) in human solid tumors. *Europ J Cancer* 1991; 27: 1302-1307.
24. Haut M, Steeg PS, Wilson JKV, Markowitz SD. Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 712-716.
25. Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Kondoh K, Kimura N, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I, Takagi H. Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. *Cancer* 1994; 73: 259-265.
26. Ura H, Denno R, Hirata K. The significance of nm23 protein expression in human gastric carcinomas. *Jpn J Surg* 1996; 26: 957-965.
27. Nakayama T, Yasui W, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 184-190.
28. Miller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. In: Siewert JR, Roder JD, eds. 2nd International Gastric Cancer Congress Proceedings: Prognostic value of the putative metastasis suppressor gene nm23 in gastric cancer. Bologna: Monduzzi Editore, 1997: 701-705.
29. Krning KC, Pernice LM, Catarzi S, Amorosi A, Paglerani M, Pantalone D, Renzi F, Prosperi P. In: Siewert JR, Roder JD, eds. 2nd International Gastric Cancer Congress Proceedings: Relationship between nm23 expression and human gastric cancer both stage and survival. Bologna: Monduzzi Editore, 1997: 689-693.
30. Wang CS, Lin KH, Hsu YC, Hsueh S. Distant metastasis of gastric cancer is associated with elevated expression of the antimetastatic nm23 gene. *Cancer Lett* 1998; 128: 23-29.
31. Yonemura Y, Ohyama S, Sugiyama K. Growth fractions in gastric carcinomas determined with monoclonal antibody Ki-67. *Cancer* 1990; 65: 1130-1134.
32. Ramires M, David L, Leito D, Seixas M, Sansonetty F, Simes MS. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol* 1997; 182: 62-67.
33. Katoh R, Bray CE, Suzuki K. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Hum Pathol* 1995; 26: 139-146.