

## 비소세포폐암에서 p53 종양억제 유전자와 K-ras 유전자의 돌연변이가 임상상에 미치는 영향<sup>†, ‡</sup>

인하대학교 의과대학 내과학교실, 연세대학교 의과대학 내과학교실\*, 아주대학교 의과대학 내과학교실\*\*

이홍렬 · 류정선 · 김주항\* · 김성규\* · 이원영\* · 이이형\*\*

### 서 론

암의 발생에 관여하는 유전자는 *ras*나 *myc* 유전자같이 직접 세포의 증식을 증가시킴으로써 암을 유발하는 우성 암유전자(dominant oncogene)와, 망막아세포종 유전자(Retinoblastoma gene: Rb)나 p53 유전자처럼 정상적으로는 세포의 증식을 억제하여 암의 발생을 억제하는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)의 두 종류로 분류할 수 있다<sup>1)</sup>. 비소세포폐암은 선암, 편평상피암, 대세포암을 포함하는 종양군으로 서로 연관되어 있으며 세기관지폐포 상피세포(bronchioloalveolar epithelial cell)에서 기인한다<sup>2)</sup>. 현재까지 보고된 비소세포폐암의 유전자 이상중 가장 높은 빈도를 보이는 것은 p53 유전자의 돌연변이이며 염색체 3p 결손이나 *ras* 유전자의 돌연변이 등이 그 다음의 빈도를 보인다<sup>3)</sup>. 암이 발생하기 위해서는 단 한번의 유전자 변화로 되는 것이 아니라, 여러 단계에서의 유전자 변화들이 동반되어야 하며 p53 유전자와 *ras* 유전자는 각각 암발생의 다른 단계에서 작용한다<sup>4, 5)</sup>.

세포가 DNA에 손상을 유발하는 인자에 노출되면 정상형 p53 유전자의 표현이 증가되며 세포를 성장주기 중 G1기에서 정지하게 하여 손상된 DNA를 정상으로 회복시키든지 또는 세포를 사멸시켜 결과적으로 암 발생을 억제하게 한다. 그러나 돌연변이에 의해 p53 유전자가 비활성화되면 정상형 p53 유전자의 기능을 억제하고 세포의 변성을 촉진시켜 암발생을 촉진시킨다<sup>6, 7)</sup>. 돌연

변이중에서 점 돌연변이가 가장 흔하고 유전자의 부분적 또는 전체적 소실, 틀변위(frame shift) 돌연변이, 삽입 등의 다양한 양식을 보인다<sup>8)</sup>. 점 돌연변이는 393개의 아미노산중 서열 130~290번 사이에서 주로 발생하며 현재까지 보고된 돌연변이의 95%가 exon 5~8 사이에서 관찰된다<sup>9, 10)</sup>. 그러나 두 개의 대립인자가 결손되거나 이상이 있어야만 암이 발생하는 다른 종양억제 유전자와는 달리, p53 유전자는 한 개의 대립인자에만 돌연변이가 생기고 다른 한 개의 대립인자는 정상인 경우에도 암이 발생하는데 이는 돌연변이형 p53 유전자가 정상형 p53 유전자의 작용을 억제하기 때문이다<sup>6, 7, 11)</sup>.

활성화된 *ras* 유전자는 NIH/3T3 세포를 형질변환시키는 능력을 가지며<sup>12)</sup> H-ras, K-ras, N-ras 등 세가지 *ras* 유전자의 codon 12, 13, 61에 발생하는 점 돌연변이, 유전자 전위에 의한 염색체 구조의 변화, 또는 *ras* 유전자 발현증가 등의 기전으로 활성화된다<sup>13)</sup>. *ras* 유전자의 돌연변이는 암의 종류와 관계가 있는데 폐암은 거의 모든 돌연변이가 K-ras 유전자의 codon 12에서 발생한다<sup>14)</sup>. 폐암에서는 비소세포폐암중 주로 선암에서 K-ras 유전자의 돌연변이가 발견되고<sup>15)</sup> 선암에서의 월등히 높은 빈도는 *ras* 유전자 돌연변이가 분비세포형(secretory cell type)으로 분화되는 세포에만 효과적으로 작용하여, 세기관지폐포 상피세포에서 분비세포형의 방향으로 분화되어 선암으로 전환되도록 유도함을 시사한다<sup>16)</sup>. 폐선암에서 발생하는 K-ras 유전자의 돌연변이는 대부분 G→T 염기전환 양상인 반면 대장암은 대부분 G→A 염기이행형으로, 이러한 차이는 p53 유전자의 경우와 마찬가지로 암의 종류에 따라 *ras* 유전자 돌연변이의 유도에 각기 다른 원인이 작용함을 시사한다<sup>14)</sup>.

유전자의 돌연변이는 암의 종류나 발암 원인 등과도 관계되지만 인종간에도 차이가 있는 것으로 보고되는데 한국인 폐암에서의 p53 유전자 돌연변이에 대한 보고는

접 수 : 1997년 10월 28일

통 과 : 1998년 6월 23일

\* 본 연구는 인하대학교 1996년도 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

† 본 연구의 요지는 1995년도 제 47 차 대한내과학회 추계학술 대회에서 발표되었음.

다수 있으나 염기서열확인법에 의한 보고는 드물고 한국인 폐암에서의 K-ras 유전자 돌연변이에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 폐암의 절제술후 추적관찰 중인 환자들을 대상으로, 절제된 폐암의 원발 병소조직을 이용해서 면역조직화학염색법, 그리고 PCR-SSCP 분석 및 염기서열확인법 등을 이용하여 p53 유전자 및 K-ras 유전자의 구조적 이상 유무를 검색한 후 비소세포폐암의 각 세포형과 병기에서 p53 유전자와 K-ras 유전자 돌연변이의 빈도, 그리고 돌연변이가 폐암의 예후에 미치는 영향 및 두 유전자간의 상호관계에 대하여 연구하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1987년 1월부터 1992년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 병기 I 기부터 III기까지의 비소세포폐암으로 확진된 후 근치적 절제술을 시행받고 합병증 없이 1개월이상 생존하면서 임상 경과를 추적관찰중인 환자들을 대상으로 하였다. 절제후 파라핀으로 포매된 이 환자들의 폐조직을 이용하여 p53 유전자의 파발현 및 돌연변이 검사를 시행하였고 같은 조직으로 K-ras 유전자의 돌연변이 검사를 시행하였던 58예에서 결과를 분석하였다. 대상 환자의 평균 연령은 56.2세였고 세포형은 평균상피암이 35예(60.3%), 병기별로는 IIIA기가 24예(41.4%)로 가장 많았다.

### 2. 방법

#### 1) p53 유전자의 발현 및 돌연변이 검색

##### (가) 면역조직화학염색에 의한 p53 단백질의 발현 검색

폐암 조직의 p53 단백질에 대한 면역조직화학염색은 파라핀 포매조직에서 여러 장의 조직절편을 만들어 일부는 hematoxylin-eosin(H-E) 염색으로 종양의 유무를 재검색한 후 종양이 확인된 절편을 대상으로 면역조직화학염색을 시행하였고 음성대조군으로 주변의 정상 폐조직을 이용하였다. p53 단백질에 대한 면역조직화학염색은 Vectastatin Elite ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하여 Avidin/Biotin

immunoperoxidase 방법으로 시행하였으며, p53 단백에 대한 일차항체로는 정상형 및 돌연변이형 p53 유전자에 모두 반응하는 DO7(Novocastra, Newcastle, UK)을 사용하였다.

방법을 약술하면 우선 4~5 μm로 절개된 조직절편을 58°C dry oven에서 60분간 건조시킨 후, xylene으로 파라핀을 제거하였다. 다음에 100%, 95%, 90%, 70%의 ethanol에 각각 10분씩 처리하여 험수반응을 시행한 후 endogenous peroxidase의 작용을 억제하기 위해 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 순수 methanol에 10분간 처리하고 PBS(phosphate buffered saline)(pH 7.4)로 10분씩 2회 세척하였다. 비특이적 항체결합을 억제하기 위하여 절편을 1:20으로 희석된 blocking serum에 30분간 처리하였다. 완충액으로 희석한 일차항체(p53 monoclonal antibody)으로 조직절편을 2시간동안 37°C humidified chamber에 배양하였으며, 음성대조군에서는 일차항체 대신 PBS를 사용하였다. Vectastatin ABC Reagent (Avidin dehydrogenase biotinylated horseradish peroxidase H complex)(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 30분간 처리한 후, PBS로 10분간 3회 세척하였으며, 다시 검사물을 peroxidase substrate solution으로 2~7분간 처리한 후 hematoxyline 용액으로 대조염색하고 80% glycerol gelatin에 mounting하였다. 면역조직화학염색법의 양성반응은 폐암세포의 핵에서 전체종양세포중 p53 발현세포의 비율에 따라 양성반응을 보이는 세포수가 전체 종양세포의 25% 미만인 경우를 음성군으로, 25% 이상인 경우를 파발현군으로 정의하였다.

#### (나) 조직 절편에서 DNA의 추출

폐암조직의 파라핀 block에서 H-E 염색을 시행하여 종양세포의 존재를 확인한 후, 파라핀 block에서 폐암의 조직절편을 선택적으로 절제 분리하였다. 폐암 종괴를 microtome을 사용해서 10~20 μm의 두께로 절편을 만들어 1.5 ml 시험관에 넣은 다음 파라핀을 녹이기 위해 시험관에 xylene 1 ml를 넣고 5분마다 1~2번씩 조심스럽게 혼들면서 30분간 보관한 후 최고속도로 5분간 회전시키고(spin down) xylene을 제거한다. 다시 xylene을 넣고 상기의 과정을 반복한 후 0.5 ml의 100% ethanol을 첨가하고 30분 정도 혼들어서 잘 섞이게 한 후 5분간 최대속도로 회전시키고 ethanol을 제거한다. 다시 ethanol

을 첨가하고 상기의 과정을 반복한 후 vacuum centrifuge(Jouan, Rue Bobby Sands, France)로 조직을 건조시킨다. 여기에 0.3 ml의 침지완충액(digestion buffer: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20)과 20% proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하고 혼든 후 침전물(pellet)을 55°C에서 3시간동안 용해시킨다. 95°C에서 10분동안 가열하여 proteinase K 를 비활성화시킨 후 30초간 최대속도로 회전시키고 시험관에서 상층액을 분리하여 새 시험관에 옮긴 후 -20°C에서 보관한다.

상층액에 chloroform 0.15 ml, phenol 0.15 ml, 3 M sodium acetate(pH 7.0) 0.045 ml를 섞어서 20초간 혼든 다음 10분간 최대 속도로 회전시키고 상층액을 새 시험관에 옮긴다. 다시 chloroform 0.15 ml을 첨가하고 10분간 회전시킨 후 상층액을 다시 새 시험관에 옮긴다. 이 시험관에 99.9% ethanol을 2.5~3배의 용량으로 첨가한 후 -70°C에서 30분간 보관하고 4°C에서 최대 속도로 30분간 회전시킨다. 상층액을 제거하고 DNA 침전물을 vacuum centrifuge로 건조시킨 후 0.02 ml의 이차증류수에 DNA를 용해시킨다.

#### (다) 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형검사법(PCR-SSCP)

p53 유전자의 oligonucleotide primer의 5' 말단에 end labelling 법으로 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP를 부착하여 PCR-SSCP 분석에 이용하였고 사용된 oligonucleotide primer는 한국 생명공학연구소(대덕)에 의뢰하여 합성하였다. 방법을 간략히 기술하면 genomic DNA(0.1  $\mu$ g)와 함께 labelled primer를 시험관에 넣고 Taq polymerase (Perkin-Elmer Corp., Foster city, CA, USA) 존재하에 Gene Amp Kit(Perkin-Elmer Corp., Foster city, CA, USA)를 이용하여 10  $\mu$ l의 완충용액을 만들어 TC-1 (Perkin-Elmer Corp., Buckinghamshire, England) 기계로 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 반응단계는 3단계로 하였으며 각 단계는 94°C에서의 변성(denaturation), 55°C에서의 결합(annealing), 72°C에서의 중합(polymerization) 반응으로 구성하였다. 제 1 단계는 94°C에서 4분, 55°C에서 2분, 72°C에서 3분간 반응시키고, 제 2 단계는 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 3분간 반응시켰으며 제 3 단계는 94°C에서 1분, 55°C에서 2분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 제 1 단계와 제 3 단계는 각각 1회만 시행하-

였고 DNA 증폭을 위한 제 2 단계는 연속해서 30회 반복시행하였다.

전기영동은 30% acrylamide 20 ml, 5% TBE 20 ml, 중류수 58.97 ml를 섞어서 syringe filtration을 시행한 후 10% ammonium per sulfate 1 mg과 TEMED ( $N,N',N'$ -tetramethylethylene diamine) 0.02~0.04 mg 을 첨가한 후 PCR 산물 1  $\mu$ l를 45  $\mu$ l의 formamide dye 혼합물과 함께 80°C에서 3분간 가열한 후 혼합물 2  $\mu$ l를 취하여 5% polyacrylamide gel에서 30W로 cold room에서 3~4시간동안 전기영동을 시행하며, 그 후 gel 을 여과지 위에서 건조시킨 후 자가방사기록을 시행하였다.

#### (라) DNA 염기서열 확인 (Nucleotide Sequencing)

p53 유전자의 염기서열을 확인하기 위해 p53 유전자의 5' 말단 및 3' 말단 특이 primer를 합성하여 Taq DNA polymerase의 존재하에 PCR을 시행한 후, PCR 산물을 pGEM4 plasmid vector에 삽입하여 넣었다. 이 때 cloning을 위해 primer의 5' 말단에 EcoR I tail을 부착하여 PCR에 이용하고 pGEM4 vector에 삽입된 PCR 산물은 *E.coli* HB101 균주에 형질도입한 후 균주를 배양하여 DNA를 추출하고 이를 dideoxy nucleotide sequencing 법을 이용해서 5% sequencing gel에서 전기 영동하여 염기서열을 확인하였다. 염기서열은 보고된 p53 유전자 돌연변이의 대부분을 차지하고 있는 exon 5부터 9까지에서 확인하였다.

염기서열확인법의 결과는 면역조직화학염색에 의한 p53 단백발현의 결과 및 PCR-SSCP 분석 결과와 상관관계를 분석하여 각 방법의 감수성과 특이성, 그리고 일치도를 검증하였다.

#### 2) K-ras 유전자 돌연변이의 검색

K-ras 유전자의 돌연변이를 검색하기 위하여 앞에서 추출된 DNA를 이용해서 K-ras 유전자의 5' 말단 및 3' 말단 특이 primer를 합성한 후 p53 유전자의 구조이상 유무 검색시와 동일한 방법으로 PCR-SSCP 및 염기서열을 확인하였다.

#### 3) 통계적 분석

자료의 통계 분석을 위해 Chi-square test를, 그리고

- 이홍렬 외 5인 : 비소세포폐암에서 p53 종양억제 유전자와 K-ras 유전자의 돌연변이가 임상상에 미치는 영향 -

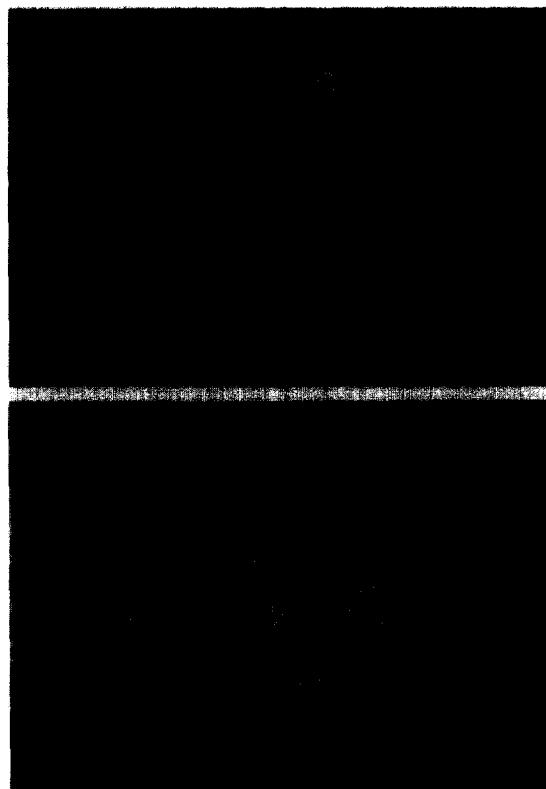


Fig. 1. Immunostaining of lung carcinoma with the p53 antibody. The upper figure shows the strongly positive result as the nucleoli of tumor cells are stained dark brownish by the chromogen for the p53 protein. The lower one is stained bluish by hematoxylin as the negative result.

생존분석은 Kaplan-Meier 및 log-rank test를 이용하였고 예후인자의 유효성을 분석하기 위하여 Cox regression test를 사용하였다. 모든 결과의 분석에서 p 값 0.05 미만인 경우만 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

## 결 과

### 1. 면역조직화학염색상 p53 핵단백질의 과발현에 따른 임상양상

p53 면역조직화학염색상(Fig. 1) p53 핵단백질의 과발현은 58예 중 15예(25.9%)에서 관찰되었다. 세포형에 따라서는 편평상피암에서 14예(40.0%)로 유의하게 높은 빈도를 보였고( $p=0.0163$ ) 선암이나 대세포폐암에서는 1 예도 관찰되지 않았다. 병기 중 II기(38.5%)에서 가장 많았으나 병기간에 유의한 차이는 없었다(Table 1). p53 핵단백질 과발현군과 음성군간에 전체 생존기간이나 무병생존기간의 유의한 차이는 없었다(Table 3).

### 2. PCR-SSCP 분석에 의한 p53 유전자의 돌연변이 및 임상양상

PCR-SSCP 분석으로 이동변위(mobility shift)를 실험한 결과(Fig. 2) 55예 중 16예(29.1%)에서 확인되었다. 세포형에 따라서는 대세포폐암이 33.3%로 가장 높은 빈도를 보였고 선암(26.7%), 편평상피암(24.2%) 등의 순으로 면역조직화학염색상의 빈도와 다른 양상을 보였으나

Table 1. p53 Protein overexpression by immunohistochemistry according to cell types and stages (n=58)

	Total	Overexpression(%) <sup>a</sup>
<b>Cell Type*</b>		
Epidermoid carcinoma	35	14 (40.0)
Adenocarcinoma	16	0 ( 0 )
Large cell carcinoma	3	0 ( 0 )
Others <sup>#</sup>	4	1 (25.0)
<b>Stage</b>		
I	18	4 (22.2)
II	13	5 (38.5)
III A	24	6 (25.0)
III B	3	0 ( 0 )

<sup>a</sup> : 15 cases (25.9%)

\* :  $p=0.01634$

# : Undifferentiated carcinoma, 3 and adenosquamous cell carcinoma, 1



**Fig. 2.** PCR-SSCP analysis in exon 5 of the p53 gene. The normal positions of bands are well demonstrated in SK-Hep1 cell line. Arrows indicate the samples having the mobility shift. The numbers in lung cancer specimens denote the arbitrary sample numbers used for distinguishing the patients in this study.

유의한 차이는 없었다. 병기중 IIIA기가 8예(34.8%)로 가장 많았으나 역시 유의한 차이는 없었다. 전체 생존기간이나 무병생존기간 역시 p53 유전자 돌연변이군과 돌연변이가 없는 군간에 유의한 차이가 없었다(Table 3).

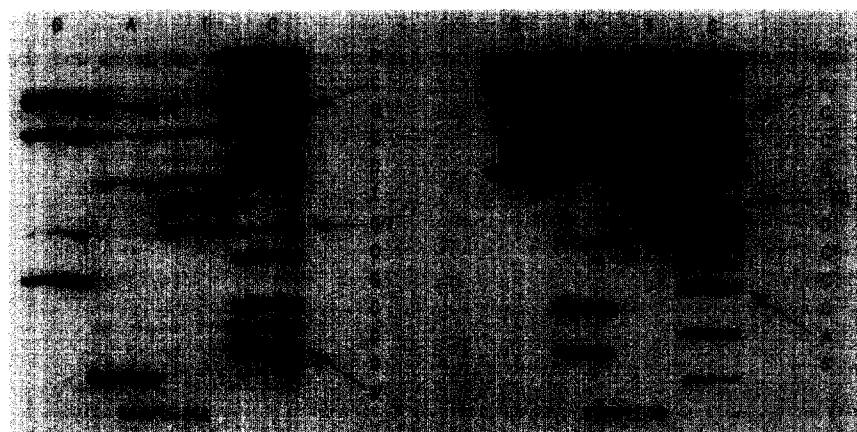
### 3. 염기서열확인법에 의한 p53 유전자의 돌연변이 및 염상양상

염기서열확인법(Fig. 3)을 시행한 29예 중 11예(37.9%)에서 돌연변이가 관찰되었다. 돌연변이가 확인된 위치는 exon 5가 5예(45.5%), exon 7과 exon 8이 각각 3예(27.3%)씩이었으며 exon 6과 exon 9에서는 돌연변이가 관찰되지 않았다. 돌연변이의 양상은 G→T 및 A→C의 염기전환형이 4예(36.3%), C→T, G→A, A→G의 염기이행형이 6예(54.6%)이었고 G 염기결손이 exon 8에서 1예(9.1%) 확인되었다(Table 2).

**Table 2. Mode of p53 gene mutation by nucleotide sequencing (n=29)**

Mode	No. of Patients (%)
Transversion	4 (36.3)
G → T	2
A → C	2
Transition	6 (54.6)
C → T	3
G → A	2
A → G	1
Deletion	1 ( 9.1)
G	1

염기서열확인법에 의한 돌연변이는 세포형에 따라서는 PCR-SSCP 분석 결과와 비슷하게 대세포폐암

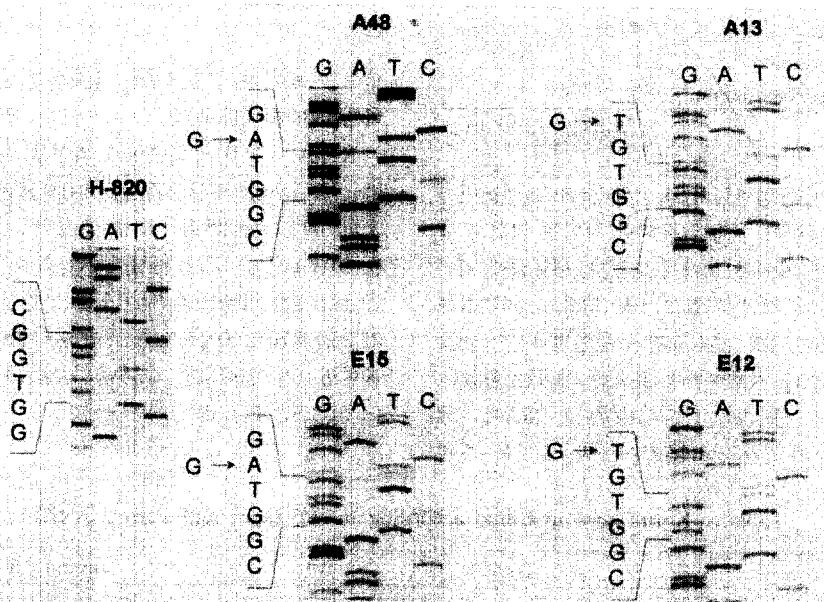


**Fig. 3.** Nucleotide sequencing of genomic DNA of the p53 gene. The left figure shows the mutation from GTC to TTC in codon 157 of sample 24A. The right figure shows the mutation from CCG to CTG in codon 152 of sample 38.

**Table 3. Survival analysis according to p53 gene abnormality**

	Overall survival*		Disease-free survival*	
	Mean	Median	Mean	Median
<b>Immunohistochemistry</b>				
Overexpression group	32.8	30.0	30.6	18.0
Negative expression group	35.9	24.0	32.0	12.5
<b>PCR-SSCP</b>				
Mutation group	33.7	23.0	28.0	17.0
Wild-type group	35.4	26.0	32.0	11.0
<b>Nucleotide sequencing</b>				
Mutation group	39.6	31.5	33.3	13.0
Wild-type group	36.7	27.0	34.7	18.0

\*: months



**Fig. 4.** Nucleotide sequencing of the K-ras gene. Wild-type sequence is demonstrated in H-820 cell line. Analyses in sample A48 and E15 show the mutation from GGT to GAT. In sample A13 and E12 the mutation from GGT to TGT is observed. The letter A and E denote adenocarcinoma and epidermoid carcinoma, respectively

(50.0%), 선암(44.4%), 편평상피암(33.3%) 등의 빈도 순을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 병기별이나 국 소적 임파절(N) 병기별로 유의한 차이가 없었고 T1 33.3%, T2 35.3%, T3 50.0%로 원발성 종양(T) 병기가 진행될수록 증가하는 양상을 보였으나 역시 유의한 차이는 없었다. p53 유전자 돌연변이군과 돌연변이없는 군간에 전체 생존기간이나 무병생존기간도 유

의한 차이가 없었다(Table 3).

#### 4. 검사 방법에 따른 p53 유전자 검색 결과의 비교

염기서열분석 결과를 기준으로 할 때 면역조직화학염색은 민감도 60.0%, 특이도 61.1%, 일치도 60.7%의 결과를 보였다. PCR-SSCP의 결과는 민감도 90.9%, 특이도 77.8%, 일치도 82.8%이었다.

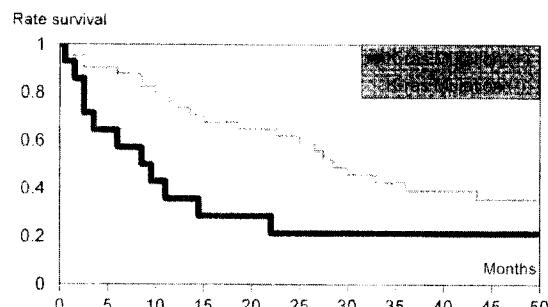
## 5. K-ras 유전자의 돌연변이 및 임상양상

K-ras 유전자의 염기서열(Fig. 4)은 58예에서 검사하여 14예(24.1%)에서 돌연변이가 확인되었는데 모두 codon 12에서만 관찰되었다. 정상적인 GGT(glycine)의 배열에서 GAT(aspartic acid)로 G→A 염기이행된 경우가 11예(78.6%)로써, TGT(cysteine)로 G→T 염기전환된 경우의 3예(21.4%)보다 많았다(Table 4).

**Table 4. Mode of K-ras gene mutation in codon 12 (n=14)**

Cell Type (n)	GAT Asp	TGT Cys
Epidermoid carcinoma	6	1
Adenocarcinoma	4	1
Large cell carcinoma	1	0
Undifferentiated carcinoma	0	1
Total	11(78.6%)	3(21.4%)

K-ras 유전자 돌연변이가 확인된 군과 돌연변이가 없는 군간에 성별이나 연령의 유의한 차이는 없었고 흡연력 역시 유의한 차이를 보이지 않았다. 세포형에 따라서는 대세포폐암이 33.3%였고 선암(31.3%), 편평상피암(20.0%)의 빈도순으로 p53 유전자 돌연변이시와 비슷한 양상을 보였으나 세포형간에 유의한 차이는 없었다. 병기에 따라서는 IIIB기에서 3예(100.0%), IIIA기 6예(25.0%), 그리고 II기가 2예(15.4%)로써, I기를 제외



**Fig. 5.** Overall survival according to K-ras gene mutation. The mean duration of survival is 22.1 months and the median, 9.0 months in the patients with K-ras gene mutation(n=14). In those without K-ras gene mutation(n=44), the mean duration of survival is 40.4 months and the median, 30.0 months ( $p=0.0391$ ).

하고는 병기가 진행될수록 유의하게 높은 빈도를 보였( $p=0.0146$ ) (Table 5).

K-ras 유전자 돌연변이가 확인된 군의 생존 기간은 평균 22.1개월, 중앙생존기간 9.0개월로 돌연변이 없는 군의 각각 40.4개월, 30.0개월보다 유의하게 짧았다 ( $p=0.0391$ ) (Fig. 5). 무병생존기간 역시 돌연변이군은 평균 18.5개월, 중앙기간 5.0개월로 돌연변이 없는 군의 각각 36.7개월, 24.0개월보다 유의하게 짧아 K-ras 유전자 돌연변이가 동반되면 조기에 재발함을 알 수 있었다 ( $p=0.0318$ ) (Fig. 6).

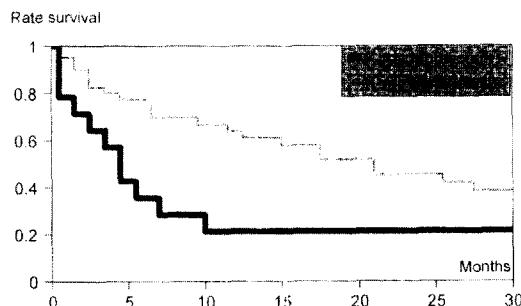
**Table 5. K-ras gene mutation according to cell types and stages (n=58)**

	Total	Mutant (%) <sup>a</sup>
Cell Type		
Epidermoid carcinoma	35	7 (20.0)
Adenocarcinoma	16	5 (31.3)
Large cell carcinoma	3	1 (33.3)
Others <sup>b</sup>	4	1 (25.0)
Stage <sup>c</sup>		
I	18	3 (16.7)
II	13	2 (15.4)
IIIA	24	6 (25.0)
IIIB	3	3 (100.0)

<sup>a</sup>: 14 cases (24.1%)

<sup>b</sup>: Undifferentiated carcinoma, 3 and adenosquamous cell carcinoma, 1

<sup>c</sup>:  $p=0.01455$

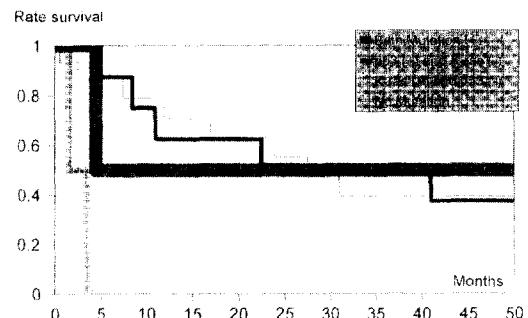


**Fig. 6.** Disease-free survival according to *K-ras* gene mutation. The mean duration of survival is 18.5 months and the median, 5.0 months in the patients with *K-ras* gene mutation(n=14). In those without *K-ras* gene mutation(n=44), the mean duration of survival is 36.7 months and the median, 24.0 months ( $p=0.0318$ ).

#### 6. p53 유전자 이상과 K-ras 유전자 돌연변이의 동반 여부에 따른 임상양상

면역조직화학염색상 p53 유전자 과발현 및 *K-ras* 유전자 돌연변이 여부에 따라 4군으로 분류한 경우 각 군간에 성별, 연령 및 흡연력에서 유의한 차이는 없었다. 세포형과 병기에 따라서도 각 군간에 역시 유의한 차이는 없었다.

염기서열확인법상의 p53 유전자 돌연변이 및 *K-ras* 유전자 돌연변이 여부에 따라 4군으로 분류한 경우에도 각 군간에 세포형이나 병기에 따라서 유의한 차이가 없



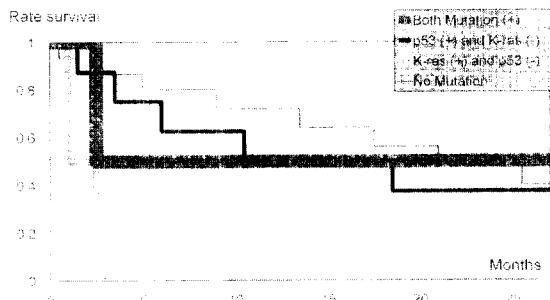
**Fig. 7.** Overall survival according to p53 gene and *K-ras* gene mutation by nucleotide sequencing. In the patients with only *K-ras* gene mutation(n=2), the mean duration of survival is 3.5 months and the median, 3.0 months. In those with both gene mutation (n=2), 11.0 and 9.0 months, respectively. In those with only p53 gene mutation(n=9), 35.3 and 31.5 months, respectively. In those with no mutation(n=16), 41.1 and 28.0 months, respectively. The patients with *K-ras* gene mutation alone show the significantly shorter survival period ( $p=0.0021$ )

었다(Table 6). 전체생존기간은, p53 유전자 돌연변이 없이 *K-ras* 유전자 돌연변이만 동반한 경우가 평균 3.5개월, 중앙생존기간 3.0개월로 유의하게 가장 짧았고 p53 유전자 돌연변이와 *K-ras* 유전자 돌연변이 모두를 동반한 군이 두번째로 짧았다( $p=0.0021$ )(Fig. 7). 무병생존기간 역시 동일한 양상으로, p53 유전자 돌연변이 없이 *K-ras* 유전자 돌연변이만 동반한 군이 평균 2.5개월,

**Table 6. p53 gene and K-ras gene mutation by nucleotide sequencing according to cell types and stages (n=29)**

	No. of Patients (%)			
	p53 Mutation with <i>K-ras</i> Mutation (n=2)	p53 Mutation with <i>K-ras</i> Mutation (n=9)	<i>K-ras</i> Mutation without p53 Mutation (n=2)	No Mutatio (n=16)
<b>Cell type</b>				
Epidermoid carcinoma	1 (50.0)	4 (44.5)	1 (50.0)	9 (56.3)
Adenocarcinoma	1 (50.0)	3 (33.3)	0	5 (31.2)
Large cell carcinoma	0	1 (11.1)	1 (50.0)	0
Others*	0	1 (11.1)	0	2 (12.5)
<b>Stage</b>				
I	1 (50.0)	2 (22.2)	0	7 (43.8)
II	0	1 (11.1)	1 (50.0)	5 (31.2)
III A	1 (50.0)	6 (66.7)	1 (50.0)	4 (25.0)

\*: Undifferentiated carcinoma, 2 and adenosquamous cell carcinoma, 1



**Fig. 8.** Disease-free survival according to p53 gene and K-ras gene mutation by nucleotide sequencing. In the patients with only K-ras gene mutation(n=2), the mean duration of survival is 2.5 months and the median, 2.0 months. In those with both gene mutation (n=2), 9.0 and 5.0 months, respectively. In those with only p53 gene mutation(n=9), 27.7 and 13.0 months, respectively. In those with no mutation(n=16), 39.0 and 24.0 months, respectively. The patients with K-ras gene mutation alone show the significantly earlier recurrence of malignancy ( $p=0.0166$ )

중앙생존기간 2.0개월로 유의하게 가장 짧았고 p53 유전자 돌연변이 및 K-ras 유전자 돌연변이를 모두 동반한 군이 두번째로 짧았다( $p=0.0166$ ) (Fig. 8).

## 7. 예후인자의 유의성 분석

예후에 영향을 미칠 수 있는 성별, 연령, 세포형, 병기, 흡연력, 체중감소 유무의 여부, p53 단백질 과발현, PCR-SSCP와 염기서열확인법에 의한 p53 유전자 돌연변이, 염기서열확인법에 의한 K-ras 유전자 돌연변이, 수술 후의 항암제나 방사선치료 같은 치료력 등을 전체 생존기간에 대하여 단변량 분석한 결과 세포형이  $p < 0.0395$ , 병기 0.0218, 염기서열확인법에 의한 K-ras 유전자 돌연변이 0.0282 등의 유의한 결과를 보였고 나머지 요소들은 모두  $p > 0.05$  이상의 값을 보였다. 따라서 이 3가지 요소만을 포함시켜 다변량 분석을 시행한 결과 병기( $p=0.0313$ )와 K-ras 유전자 돌연변이( $p=0.0457$ )만이 유의한 예후 인자로 확인되었다. 병기별로, 환자수가 비교적 적었던 I기(n=18)와 II기(n=13)를 제외하고 IIIA기와 IIIB기를 포함한 III기(n=27)의 환자들을 대상으로 분석한 경우에서도 K-ras 유전자 돌연변이군에서 생존기간이 유의하게 짧은 양상을 보여( $p=0.0085$ ) K-ras 유전자 돌연변이는 병기와 독립적으로 유의한 예후인자임이 확인되었다.

## 고 안

p53 단백질은 반감기가 정상형은 6~30분인 반면에 돌연변이형은 수시간으로 길어지기 때문에 세포내에 p53 유전자의 돌연변이가 있으면 p53 단백의 축적을 유발하여 면역조직화학염색에서 양성의 결과를 보이게 된다. p53 단백에 대한 면역조직화학염색의 감수성은 염기서열확인법의 결과와 비교해서 60~70% 정도이며 유전자의 소실이나 툴이동 돌연변이는 검출하기 어렵고 명확한 hot spot의 규모도 어렵지만 빠른 시간내에 많은 검체를 동시에 검토할 수 있는 장점이 있다<sup>17)</sup>. p53 단백은 모두 핵에서만 발현하고 발현율은 40%<sup>18)</sup>부터 71%<sup>19)</sup>까지 다양하게 보고되었으나 본 연구에서는 25.9%에서 관찰되었다. 이러한 빈도의 차이는 연구에 사용된 항체의 종류나 예민성, 과발현 정의에서의 차이, 그리고 암유발원이나 종족의 차이 등에 기인하는 것으로 생각된다. 본 연구의 경우 p53에 대한 일차항체로 정상형 및 돌연변이형 p53 유전자에 모두 반응하는 DO7을 사용하였기 때문에 발현된 p53 단백이 모두 돌연변이형은 아닌 것으로 생각되었다. 왜냐하면 정상형 p53 단백의 일부는 virus 암유전자와 결합하거나 DNA 손상 유발인자에 노출됨에 의해서도 p53 단백이 안정화되거나 축적될 수 있기 때문이다<sup>20)</sup>. 세포형에 따라서는 편평상피암에서 유의하게 가장 많아( $p=0.01634$ ) Iggo등의 보고<sup>19)</sup>와 비슷한 양상을 보였다. 병기간에는 차이가 없거나<sup>21)</sup> 원발 병소가 음성이라도 전이된 임파선에서 p53 단백의 양성을 높으므로 병기과의 연관성이 암시되기도 하였지만<sup>22)</sup> 본 연구에서는 병기간에 유의한 차이가 없었다.

PCR-SSCP 분석은 단시간에 특정 유전자를 선택적으로 대량 증폭을 하는 PCR과 400 bp까지의 DNA에서 점돌연변이같은 미세한 유전자 변이를 예민하게 검출할 수 있는 SSCP을 결합한 방법이다. 이는 단일가닥으로 구성된 핵산은 구성 염기 크기의 차이뿐만 아니라 염기서열의 차이에 따라서도 형상의 변화가 수반됨에 따라 전기영동시 핵산의 이동 속도에 차이가 존재하는 것에 근거를 두고 있으며 염기서열확인법에 비해 비교적 간단하기 때문에 유전자 이상의 일차 검색법으로 많이 이용된다<sup>3)</sup>. PCR-SSCP 분석에서 p53 유전자의 이동변위는 49~52%까지 보고되었으나<sup>22, 23)</sup> 본 연구에서는 비교적 낮은 29.1%에서 확인되었고 세포형과 병기에 따라서 유의한 차이가 없어 p53 유전자 돌연변이의 유의성을 확

인할 수 없었다. 염기서열확인법은 분석에 시간과 노력이 많이 드는 단점을 가지고 있지만 유전자의 구조 이상을 검색하여 돌연변이의 유무 및 양상을 직접 확인할 수 있기 때문에 현재까지 가장 정확한 검증 방법으로 평가된다<sup>10)</sup>. 염기서열은 보고된 p53 유전자 돌연변이의 95% 까지 차지하고 있는 exon 5부터 8까지에서 확인하는 것이 일반적인 방법이다<sup>9, 10)</sup>. 본 연구도 exon 5~9의 범위에서 검사를 시행하였고 29예 중 11예(37.9%)에서 돌연변이를 확인하여 염기서열확인법으로 보고된 전체 폐암의 50%<sup>24)</sup>, 또는 비소세포폐암 중 47~65%<sup>21, 25)</sup>보다 낮은 빈도를 보였다.

비세포폐암에서의 p53 유전자 돌연변이는 다른 종류의 암에 비해 돌연변이의 위치와 속성이 상당히 다양하다. 그래서 codon 117~142, 171~181, 234~258, 270~286 같은 생물학적 작용부위나 codon 175, 248, 273 등 최소한 3점의 hot spots 이외에도 진화중에 잘 변화되는 codon 144~166 사이에서 돌연변이가 발견되기도 한다<sup>3)</sup>. 본 연구에서 돌연변이가 확인된 위치는 exon 5가 5예(45.5%), exon 7과 exon 8이 각각 3예(27.3%)씩이었다. Codon별로는 152와 157만 각각 2예씩이었고 나머지는 143, 245, 249, 250, 266, 280, 294에 각각 1예씩 흩어져서 다양하게 분포하였다. p53 유전자의 돌연변이 양상도 암의 종류와 발암 원인에 따라 다양한데 대장암은 염기이행형의 돌연변이가 대부분인 반면 폐암에서는 염기전환과 염기이행이 모두 관찰된다. 폐암 중 흡연에 의해 발생하는 경우에는 guanine이 thymine으로 바뀌는 염기전환형이, 비흡연자에서는 guanine이 adenine으로 치환되는 염기이행형의 돌연변이가 많으며 G→T의 염기전환형이 42%~52.2%의 빈도로 보고되었다<sup>17, 25)</sup>. 본 연구에서는 흡연유무와 돌연변이 양상간에 연관된 소견은 관찰할 수 없었다. G→T 및 A→C의 염기전환형이 4예(36.3 %), C→T, G→A, A→G의 염기이행형이 6예(54.6%)이었고 G 염기결손이 1예(9.1%) 확인되었으며 G→T의 돌연변이는 전체 돌연변이의 18.8%로 낮게 관찰되었다. 이렇게 다양한 위치에서, 다양한 양상으로 돌연변이가 발생하는 것이 한국인 비소세포폐암의 특징적인 소견인지 확인하기 위해서는 좀 더 많은 환자들을 대상으로 한 연구가 필요하겠다.

p53 유전자 돌연변이의 빈도는 폐암의 세포형에 따라 다양하게 보고되고<sup>19, 26)</sup> 병기에 따른 빈도 역시 이론이 있지만<sup>21, 27)</sup> 본 연구에서는 세포형이나 병기에 따라 유의

한 차이가 없었다. 유방암, 방광암, 대장암에서 p53 유전자의 돌연변이는 불량한 예후인자로 확인된 반면 폐암에서는 아직 논란의 여지가 많이 있으나 실제로 예후인자로서의 유효성에 대해 부정적인 견해가 대부분이다<sup>3, 18, 22, 28)</sup>. 이는 ras 유전자의 돌연변이에 비하여 p53 유전자에서 생물학적 기능에 관계되는 codon의 범위와 염기치환을 유발하는 돌연변이의 속성이 너무 다양하고, p53 유전자 돌연변이의 속성에 따라 특정 종양의 진행이 다양하게 영향을 받기 때문으로 설명된다<sup>3)</sup>. 본 연구에서도 면역조직화학염색법이나 PCR-SSCP 분석, 염기서열 확인법상 모두에서 전체 생존기간이나 무병 생존기간이 과발현군과 음성군에, 또는 돌연변이군과 돌연변이가 없는 군간에 유의한 차이가 없었는데 이 결과 역시 돌연변이의 범위가 분산되어 있고 발생 양상도 다양했던 때문으로 생각된다.

본 연구에서 p53 유전자에 대한 면역조직화학염색법, PCR-SSCP법, 염기서열분석법 등의 세가지 검사법을 서로 비교해 본 결과 면역조직화학염색법도 나름대로의 장점은 있지만, 표본수가 많은 경우에는 PCR-SSCP로 일차 선별을 한 뒤 이상 소견이 관찰되면 염기서열분석법으로 돌연변이의 유무 및 양상을 확인하는 것이 바람직한 방법으로 생각된다.

K-ras 유전자는 폐암의 30%<sup>14)</sup>에서, 또는 비소세포폐암 중 45%<sup>19, 21)</sup> 정도에서 돌연변이가 보고되고 있는데 본 연구에서는 24.1%에서, 그리고 모두 codon 12에서만 관찰되었다. 폐선암 중 점돌연변이 양성종양은 흡연자에서만 관찰되었고 대부분이 G→T 염기전환형이기 때문에 담배의 발암물질이 폐선암의 발생과 밀접한 관계가 있다는 의견도 있으나<sup>14, 29)</sup> 돌연변이 유무에 따른 환자의 흡연력간에 유의한 차이가 없고 심한 흡연자의 50% 미만에서만 K-ras 유전자의 돌연변이가 발견되기 때문에 흡연이 단지 선암을 유발시키는데 관여하는, 아직도 확인되지 않은 유전자 변이를 촉진시키는데 지나지 않는 것으로 생각된다<sup>15)</sup>. K-ras 유전자 돌연변이가 동반된 폐선암은 비교적 작고 발현 당시 임파선 전이가 드문 경향을 보인다고 보고되기도 하였으나<sup>16)</sup> K-ras 유전자 돌연변이 동반 여부에 따른 발현 양상, 임상적 및 병리학적 차이는 없으며<sup>14, 30)</sup> 본 연구에서도 비슷한 결과를 보였다.

K-ras 유전자의 12번째 위치에 존재하는 glycine은 ras 단백질이 정상적으로 기능하기 위해 필수적인데 proline을 제외한 다른 아미노산으로 대치되면 이 단백

질이 활성화되며 glycine이 결손되거나 11번째 alanine과 12번째 glycine의 사이에 다른 아미노산이 삽입되어도 같은 효과를 보인다<sup>29)</sup>. 대장암은 G→A 염기이행의 양상을 보이는 반면 폐선암의 K-ras 유전자 돌연변이는 대부분 G→T 염기전환인데 본 연구에서는 G→A로 염기이행된 경우가 78.6%로, G→T 염기전환된 경우보다 많았다. 이 역시 한국인 비소세포폐암에서의 특징적인 소견인지 여부에 대해서는 좀 더 많은 환자들을 대상으로 한 연구가 필요하겠다.

Rodenhuis 등<sup>15)</sup>은 K-ras 유전자 돌연변이 동반 여부에 따라 전체생존기간, 재발시기 등에서 차이가 없다고 보고한 반면 폐암에서 K-ras 유전자 돌연변이가 동반되면 예후가 나쁘다는 의견도 제기되고 있다<sup>3, 31)</sup>. Rosell 등<sup>32)</sup>은 66명의 비소세포폐암 환자의 절제 표본에서 dot blot hybridization analysis로 분석한 결과 13명의 돌연변이 환자중 9명이 추적관찰중 사망하였고 돌연변이가 없는 53명중 22명이 사망하여 K-ras 유전자 돌연변이가 동반되면 유의하게 예후가 불량하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 K-ras 유전자 돌연변이군의 생존 기간은 돌연변이 없는 군보다 유의하게 짧았고 ( $p=0.0391$ ) 무병생존기간 역시 동일한 결과를 보여 ( $p=0.0318$ ) K-ras 유전자 돌연변이가 동반되면 예후가 불량해짐을 확인할 수 있었다.

돌연변이형 p53 유전자가 ras 유전자와 협력하여 효과적으로 세포의 형질변환을 유도하기 위해서는 dominant negative mutation, 또는 loss of function mutation의 기전에 의해, 정상형을 억제할 만큼 높은 수준(high level)의 돌연변이형 p53 유전자가 필요하다<sup>33-35)</sup>. 또한 돌연변이가 발생한 p53 유전자내 대립인자에 따라 ras 유전자와 상호작용하는 강도가 변화된다. 예를 들면 codon 175에서 arginine이 histidine으로 돌연변이되면, codon 273에서 arginine이 histidine으로, 또는 codon 281에서 aspartic acid가 glutamic acid로 돌연변이된 경우에 비하여 3~10배의 효과를 보인다. 이러한 차이는 궁극적으로 예후의 차이를 유발할 것으로 생각된다<sup>3, 6)</sup>. Mitsudomi 등<sup>3)</sup>은 비소세포폐암 세포주에서 PCR-SSCP로 일차선택한 후 염기서열을 확인한 결과 p53 유전자의 돌연변이는 위치와 속성이 매우 다양하였음에도 불구하고 두 유전자의 돌연변이가 동반되면 양자 모두 G:C→T:A 염기전환형이 가장 많으면서 p53 유전자의 돌연변이가 exon 8에 집중되는 경향을 보였다고 보고하였다.

이는 p53 유전자내에 ras 유전자와의 상호작용에 관련된 기능 구역이 따로 존재할 가능성을 시사한다. 그러나 임상적으로 ras 유전자 돌연변이를 동반한 경우의 p53 유전자 돌연변이는 ras 유전자 돌연변이를 동반하지 않은 경우와 비슷한 빈도를 보였으며 조직형, 생존 기간 등에서도 차이가 없었고 p53 유전자 및 ras 유전자 돌연변이의 동반 여부는 예후에 무관하였음을 확인하였다.

본 연구에서도 면역조직화학염색상 p53 유전자 과발현 및 K-ras 유전자 돌연변이의 여부에 따라 4군으로 분류한 경우, 그리고 염기서열확인법상의 p53 유전자 돌연변이 및 K-ras 유전자 돌연변이의 동반 여부에 따라 4군으로 분류한 경우에서 각 군간에 성별, 연령 및 흡연력에서 유의한 차이는 없었으며 세포형이나 병기에 따라서도 유의한 차이는 없었다. K-ras 유전자 돌연변이를 동반한 경우의 p53 유전자 돌연변이는 exon 5(codon 197)의 G→T 염기전환형이 1례, exon 8(codon 294)의 G 염기결손이 1예식으로 별다른 특징적인 소견은 관찰되지 않았다. p53 유전자 돌연변이에서 K-ras 유전자 돌연변이의 동반 여부에 따라 세포형이나 병기에서의 유의한 차이는 관찰되지 않았고 K-ras 유전자 돌연변이의 경우에서도 p53 유전자 돌연변이 동반 여부에 따라 역시 세포형이나 병기에서의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. K-ras 유전자 돌연변이시에 예후가 유의하게 불량하였으나 p53 핵단백의 과발현이나 돌연변이가 K-ras 유전자 돌연변이에 동반되더라도 예후에 대한 첨가적 또는 상승적인 효과는 없었다. 따라서 본 연구에서도 p53 유전자 돌연변이와 ras 유전자 돌연변이는 비소세포폐암의 병인, 진행 및 예후에 서로 독립적인 역할을 하는 것임을 확인할 수 있었다.

Mitsudomi 등<sup>3)</sup>의 보고에서는 치료력과 ras 유전자 돌연변이의 여부는 유의한 예후 인자이었고 본 연구의 경우 병기( $p=0.0267$ )와 K-ras 유전자 돌연변이 여부 ( $p=0.0493$ )만이 유의한 예후 인자로 확인되었다. 병기별로 K-ras 유전자 돌연변이의 여부에 따른 생존 분석상 상대적으로 수가 적었던 I 기( $n=18$ )와 II 기( $n=13$ )에서 유의한 차이가 없었던 반면에 III 기( $n=27$ )에서는 K-ras 유전자 돌연변이군의 생존 기간이 돌연변이가 없는 군에 비하여 유의하게 짧은 양상을 보여( $p=0.0085$ ) K-ras 유전자 돌연변이 자체가 병기와는 독립적인 예후인자로 생각되었다.

이상의 결과에서 p53 핵단백질의 과발현은 편평상피

- 이홍렬 외 5인 : 비소세포폐암에서 p53 종양억제 유전자와 K-ras 유전자의 돌연변이가 임상상에 미치는 영향 -

암에서 유의하게 높은 빈도를 보였고 p53 유전자 돌연변이는 다양한 양상을 보였다. K-ras 유전자 돌연변이는 codon 12에서만 관찰되었으며 염기이행형이 대부분이었다. p53 유전자 돌연변이 여부는 예후와 무관하였으나 K-ras 유전자 돌연변이가 동반되면 예후가 유의하게 불량해짐을 확인하였다. 비소세포폐암에서 p53 유전자 돌연변이와 K-ras 유전자 돌연변이는 상호작용 없이 임상 양상과 예후에 서로 독립적으로 작용함을 알 수 있었다.

## 결 론

**서 론 :** 암이 발생하기 위해서는 단 한번의 유전자 변화로 되는 것이 아니라, 여러 단계에서의 유전자 변화들이 동반되어야 하며 p53 유전자와 ras 유전자는 각각 암 발생의 다른 단계에서 작용한다. 현재까지 보고된 비소세포폐암의 유전자 이상 중 가장 높은 빈도를 보이는 것은 p53 유전자의 돌연변이이며 염색체 3p 결손이나 ras 유전자의 돌연변이 등이 그 다음의 빈도를 보인다. 본 연구에서는 아직까지도 논란의 여지가 많은, p53 및 ras 유전자의 돌연변이가 비소세포 폐암의 임상상에 미치는 영향과 두 유전자 돌연변이 간의 상호작용에 대하여 연구하고자 하였다.

**방 법 :** 본 연구에서 병기 I 기부터 III기까지의 비소세포폐암의 절제된 원발 병灶조직으로 면역조직화학염색법, 종합효소연쇄반응-단일가닥구조다형분석, 염기서열확인법을 시행하여 p53 유전자의 과발현 및 돌연변이, K-ras 유전자의 돌연변이를 검색한 후 비소세포폐암의 임상양상 및 예후, 그리고 두 유전자 간의 상호관계에 대해 분석하였다.

**결 과 :** p53 면역조직화학염색상 p53 핵단백질의 과발현은 25.9%에서 관찰되었고 편평상피암에서 유의하게 높은 빈도를 보였으나( $p=0.01634$ ) 병기와 생존분석상 유의한 차이가 없었다. PCR-SSCP 분석결과 p53 유전자의 이동변위는 29.1%에서 확인되었으나 세포형, 병기, 생존분석상 유의한 차이가 없었다. 염기서열확인법상 p53 유전자의 돌연변이는 37.9%에서 확인되었다. 돌연변이의 위치는 여러 codon에 분산되어 있었고 염기이행형(54.6%)이 염기전환형(36.3%)보다 많았으며 다양한 양상을 보였다. 염기서열확인법에 의한 돌연변이 역시 세포형, 병기, 생존 분석상 유의한 차이가 없었다. K-ras 유전자의 돌연변이는 24.1%에서 확인되었는데 모두 codon 12에서만 관찰되었고 G→A 염기이행형이 78.6%로, G→

T 염기전환형의 21.4%보다 많았다. K-ras 유전자의 돌연변이가 확인된 군과 없는 군간에 흡연력이나 세포형, 병기에 따라서 유의한 차이가 없었으나 K-ras 유전자의 돌연변이군에서 예후가 유의하게 불량하였다(생존기간  $p=0.0391$ , 무병생존기간  $p=0.0318$ ). p53 유전자 돌연변이 및 K-ras 유전자의 돌연변이의 여부에 따라 분류한 경우 각 군간에 세포형이나 병기에 따른 유의한 차이는 없었다. 그러나 생존기간은 p53 유전자 돌연변이 없이 K-ras 유전자의 돌연변이만 동반한 경우가 유의하게 가장 짧았고( $p=0.0021$ ), 무병생존기간 역시 동일한 양상을 보였다( $p=0.0166$ ). 예후에 영향을 미칠 수 있는 인자들을 Cox regression test로 분석한 결과 병기( $p=0.0313$ )와 K-ras 유전자의 돌연변이 여부( $p=0.0457$ )만이 예후에 유의한 예측 인자임을 확인하였다. 병기별로 K-ras 유전자의 돌연변이 여부에 따른 생존분석 결과 III기에서 K-ras 유전자의 돌연변이군의 생존 기간이 유의하게 짧은 양상을 보여( $p=0.0085$ ) K-ras 유전자의 돌연변이 자체가 병기와는 독립적인 유의한 예후인자로 생각되었다.

**결 론 :** p53 유전자의 돌연변이 여부는 예후와 무관하였으나 K-ras 유전자의 돌연변이가 동반되면 예후가 유의하게 불량해짐을 확인하였다. 비소세포폐암에서 p53 유전자의 돌연변이와 K-ras 유전자의 돌연변이는 상호작용 없이 임상 양상과 예후에 서로 독립적으로 작용함을 알 수 있었다.

## =Abstract=

### Effects of the Mutation of the p53 Tumor Suppressor Gene and the K-ras Gene on Clinical Manifestation in Non-small Cell Lung Cancer

Hong Lyeol Lee, M.D., Jeong Seon Ryu, M.D.  
Joo Hang Kim, M.D.\* , Sung Kyu Kim, M.D.\*  
Won Young Lee, M.D.\* and Yi Hyung Lee, M.D.\*\*

Department of Internal Medicine, College of Medicine,  
Inha University, Incheon, Yonsei University\*,  
Seoul and Ajou University\*\*, Suwon, Korea

**Objective :** A multistep process of gene alterations is required for tumor formation. p53 gene mutation is the most frequent and K-ras gene mutation places second in the gene abnormalities of non-small cell lung cancer (NSCLC). The effect by the mutations of the p53 and ras

genes on clinical manifestation is still highly controversial. Little is known about the interaction between them in NSCLC. The present study was designed to investigate the effect by the mutations of the p53 tumor suppressor gene and K-ras oncogene on clinical manifestation, and the interaction between the mutations of two genes in the Korean NSCLC.

**Methods :** Fifty-eight patients were enrolled in this study who had been diagnosed as having NSCLC from stage I to stage III. They all had been alive for more than one month without any complication after curative resection. The paraffin-embedded lung tissues after resection were used to investigate the p53 expression by immunohistochemical staining, the mutations of the p53 and K-ras genes by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) and nucleotide sequencing.

**Results :** p53 protein was overexpressed in 25.9% by immunohistochemical staining. Overexpression was significantly more frequent in epidermoid carcinoma( $p=0.01634$ ). But there was no significant difference between the overexpression group and the negative expression group according to stage and survival. By PCR-SSCP analysis, the mobility shift of the p53 gene was found in 29.1%. There was no significant difference between the groups with and without mobility shift according to cell type, stage and survival. By nucleotide sequencing, p53 gene mutation was 37.9%. The locations of mutation were dispersed among numerous codons and the modes of mutation were also diverse. There was also no significant difference between the groups with and without mutation according to cell type, stage and survival. K-ras gene mutation was 24.1% and only in codon 12 by nucleotide sequencing. Although there was no significant difference between the groups with and without mutation according to cell type or stage, K-ras gene mutation carried a significantly worse prognosis in NSCLC (overall survival  $p=0.0391$ , disease-free survival  $p=0.0318$ ). When the patients were divided into 4 groups according to p53 gene mutation and K-ras gene mutation, there was also no significant difference among any group according to cell type or stage. The prognosis became worse if K-ras gene mutation accompanied(overall survival  $p=0.0021$ , disease-free survival  $p=0.0166$ ). Only the stage( $p=0.0313$ ) and K-ras gene mutation( $p=0.0457$ ) were significant prognostic factors by Cox regression test. An analysis in stage III showed the significantly shorter survival period in the patients with K-ras gene mutation. K-ras gene mutation, therefore, was confirmed as the independently significant prognostic factor separately from stage.

**Conclusion :** p53 gene mutation had no clinical or

prognostic significance because of scattered locations and diverse modes of mutation in contrast to K-ras gene mutation, which had a significantly negative effect on the prognosis of NSCLC. p53 and K-ras gene mutations were apparently independent genetic alterations which played different roles in the clinical manifestation and prognosis of NSCLC.

**Key Words :** p53 mutation, K-ras mutation, Non-small cell lung cancer, Prognosis

## REFERENCES

- 1) Viallet J, Minna JD: *Dominant oncogenes and tumor suppressor genes in the pathogenesis of lung cancer*. Am J Resp Cell Mol Biol 2:225, 1990
- 2) Gazdar AF, Carney DN, Minna JD: *The biology of non-small cell lung cancer*. Oncology 10:3, 1983
- 3) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bonder S, Oie HK, Linnoila RI, Muishine JL, Minna JD, Gazdar AF: *p53 gene mutations in non-small cell lung cancer lines and their correlations with the presence of ras mutations and clinical features*. Oncogene 7:171, 1992
- 4) Vogelstein AC, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL: *Genetic alterations during colorectal tumor development*. N Engl J Med 319: 525, 1988
- 5) Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Wilson JKV, Hamilton S, Vogelstein B: *p53 gene mutations occur in combination with allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis*. Cancer Res 50:7717, 1990
- 6) Levine AJ, Momand J, Finlay C: *The p53 tumor suppressor gene*. Nature 351:453, 1991
- 7) Vogelstein B, Kinzler KW: *p53 Function and dysfunction*. Cell 70:523, 1992
- 8) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 Mutation in human cancer*. Science 253:49, 1991
- 9) Nigro JM, Baker SJ, Presinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Sevilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. Nature 342: 705, 1989
- 10) Soussi T, de Frontrinal CC, May P: *Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution*. Oncogene 5: 945, 1990
- 11) Kern SE, Pietenpol JA, Tjhiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B: *Oncogenic forms of p53*

- inhibit p53-related gene expression. *Science* 256:827, 1992
- 12) Krontiris T, Cooper GM: *Transforming activity in human tumor DNAs*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1181, 1981
- 13) Dahr R, Ellis RW, Shih TY, Oroszlan S, Shapiro B, Maizel J, Losy D, Scolnick EM: *Nucleotide sequence of the p21 transforming protein of Harvey murine sarcoma virus*. *Science* 217:934, 1982
- 14) Bos JL, Berlaan-de Vries M, Jansen AM, Veeneman GF, van Boom JH, van der Eb AJ: *Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotidehybridization*. *Nucleic Acid Res* 12:9155, 1989
- 15) Rodenhuis S, Slebos RJC, Boot AJM, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, Van Bodegom PC, Bos JL: *K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the lung: incidence and possible clinical significance*. *Cancer Res* 48:5738, 1988
- 16) Suda Y, Aizawa S, Hirai S, Inoue T, Furuta Y, Suzuki M, Hirohashi S, Ikawa Y: *Driven by the same Ig enhancer and SV40 T promoter ras induced lung adenomatous tumors, myc induced pre-B cell lymphomas and SV40 large T gene a variety of tumor in transgenic mice*. *EMBO J* 6:4055, 1987
- 17) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: *Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. *Cancer Res* 54: 4855, 1994
- 18) Quilan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM: *Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer*. *Cancer Res* 52:4828, 1992
- 19) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer*. *Lancet* 335: 675, 1990
- 20) Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ: *Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70 ~ p53 complex with an altered half life*. *Mol Cell Biol* 8:531, 1988
- 21) Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Ressman PT, Salmon DJ, Holmes EC, Minn JD: *Mutations in the p53 genes are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer*. *Oncogene* 5:1603, 1990
- 22) Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R, Takahashi T: *Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer*. *Cancer Res* 53:1, 1993
- 23) Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T: *Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas*. *Cancer Res* 52:4799, 1992
- 24) Yokoda J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T: *Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13,17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9252, 1987
- 25) Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariuoshi Y, Ueda R: *p53 mutations in non-small cell lung cancers in Japan: Association between mutations and smoking*. *Cancer Res* 52:734, 1992
- 26) Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokata J, Ruys CHCM, Terada M, Koeffler HP: *p53 mutations in human lung tumors*. *Cancer Res* 52:1695, 1992
- 27) Caamnno L, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, Klein-Szalai AJP: *Detection of p53 in primary lung tumors and nonsmall cell lung carcinoma cell lines*. *Am J Pathol* 139:839, 1991
- 28) McLaren R, Kuzu I, Dunnill M, Harris A, Lane D, Gatter KC: *The relationship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung*. *Br J Cancer* 66:735, 1992
- 29) Bergh JCS: *Gene amplification in human lung cancer. The myc family genes and other protooncogenes and growth factor genes*. *Am Rev Respir Dis* 142:S20, 1990
- 30) Barbacid M: *Ras genes*. *Ann Rev Biochem* 56:779, 1987
- 31) Miyamoto H, Harada M, Isobe H, Akita HD, Haneda H, Yamaguchi E, Kuzumaki N, Kawakami Y: *Prognostic value of nuclear DNA content and expression of ras oncogene product in lung cancer*. *Cancer Res* 51:6346, 1991
- 32) Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, Tolosa E, Armengol P, Barnadas A, Ariza A: *Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients*. *Oncogene* 8: 2407, 1993
- 33) Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M: *Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8763, 1989
- 34) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. *Cell* 57:1083, 1989
- 35) Hinds PW, Finlay CA, Levine AJ: *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation*. *Mol Cell Biol* 7:2863, 1989