

Grade III의 근침윤성 방광암에서 p53와 nm23-H1단백 발현을 이용한 방광전적출술의 타당성 평가

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

박동수 · 이진무 · 양승칠

= Abstract =

Evaluation of Appropriateness of Radical Cystectomy Using p53 and nm23-H1 Protein Expression in Grade III, Muscle Invasive Transitional Cell Carcinoma of Bladder

Dong Soo Park, Jin Moo Lee and Seung Choul Yang

From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: About 50% of patients undergoing radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer have occult distant micrometastasis. Most of these patients have clinical manifestations of distant metastasis within 1 year of operation, and not likely to achieve 2-year survival. But in other words, the remaining half of patients can expect definite survival benefit from radical surgery. Therefore if those who have micrometastasis can be selected preoperatively, unnecessary cystectomies can be avoided, and bladder preservation by anticancer chemotherapy, radiotherapy, and partial cystectomy can be employed instead.

Materials and Methods: From 1985 to 1993, 45 patients diagnosed with high grade muscle invasive transitional cell carcinoma at transurethral resection of bladder (TURB) who later confirmed to have stage T2, T3a, and T3b tumors after radical cystectomy were selected. Patients with double primary tumor, early death, follow up period under 2 years, and poor quality of paraffinized tissue preservation were excluded. Immunostaining of tumor suppressor gene p53 (DO7 and PAb1801; both wild and mutant type) and antimetastatic gene nm23-H1(NM301) were performed and the survival function was analysed. Stainings were interpreted as positive when more than heterogeneous pattern for p53, and stronger than moderately stained for nm23-H1 were seen.

Results: Pathological nodal status (pN stage), combination of p53 and nm23-H1 expression, and p53 expression were correlated with survival. Pathological tumor stage (pT stage), nm23-H1 expression alone were not correlated with survival. Expression of p53 was 44.4% (20/45) and nm23-H1 expression was seen in 55.6% (25/45). Combinations of p53 negative plus nm23-H1 negative, p53 negative plus nm23-H1 positive, p53 positive plus nm23-H1 negative, and p53 positive plus nm23-H1 positive were 12, 13, 8, and 12 cases, respectively. Cases when both proteins were expressed poor survival was observed. Detection time elapsed from cystectomy to metastasis and duration from detection of metastasis to death was only related with N stage.

Conclusion: 1. When cellular grade of TURB specimen is III, muscle invasive, and positive for both p53 and nm23-H1, the chance of surgical cure by radical cystectomy is significantly reduced. 2. In high grade tumors, the degree of muscle invasion does not affect survival, but might

*본 연구는 1995년도 연세대학교 의과대학 일반과제연구비에 의해 이루어졌다.
접수인자: 1995년 12월 1일

affect the detection time elapsed from cystectomy to metastasis and the duration from detection of metastasis to death. 3. Lymph node metastasis is related to survival, and especially p53 expression is related to survival.

Key Words: Invasive bladder cancer, radical cystectomy, nm23-H1, p53

서 론

방광암은 우리나라에서 가장 흔한 비뇨기계암이며 전체 방광암의 90%이상이 이행상피세포암이다. 세계보건기구(WHO)에서는 이행상피세포암을 요로상피 성상 즉, 세포의 크기, 다형성, 핵분열, 과색소증, 유사 핵분열의 수에 근거하여 세가지의 Grade로 구분하였다¹. 여기에서는 분화가 좋은 고분화군(Grade I), 분화가 나쁜 저분화군(Grade III), 그리고 중간 정도의 분화군(Grade II)의 세 단계로 구분하였다.

방광암의 병기 체계로서 흔히 사용하는 것은 Jewett-Strong 체계를 변형시킨 Marshall 체계와 Union Internationale Centre le Cancer(UICC)의 TNM 병기 체계이다. 이들 중에서 TNM 병기 체계가 현재 널리 사용되고 있으며 이를 이용하여 종양의 생물학적 상태를 평가하고 치료 방법을 선택하고 있다. 그러나 의사의 전찰 소견과 영상 진단에 의한 임상 병기와 수술적 제거에 의한 병리학적 병기간에는 차이가 많다. 특히 실제 진행 정도 보다 낮게 임상 병기가 결정되는 경우 (clinical understaging)가 혼하나². 따라서 연구에 이용·할 수 있는 객관적인 자료는 병리학적 병기를 이용하는 것이 좋다. TNM 병기 체계에 따르면 방광의 이행상피세포암은 크게 방광 점막 또는 고유층 까지반을 침범한 표재성 방광암(Ta, T1 병기)과 방광근 이상을 침범한 침윤성 방광암 (T2 이상의 병기)으로 구분할 수 있다. 이들 방광암에서 생명에 영향을 줄 수 있는 것은 침윤성 방광암이며, 원격전이가 없는 국소적인 병기 일 때에는 적극적인 치료의 하나로서 근치적 방광 전적출술이 적용된다.

즉, 방광암의 예후인자로서 가장 중요한 것은 조직학적 분화도와 암의 병기이다. Torti 등³은 표재성 방광암에서 근침윤에 영향을 줄 수 있는 인자들을 분석한 결과 각 인자들의 근침윤에 대한 영향을 알아 보기 위해 득립변수 분석을 했을 때에는 종양의 분화도와 병기가 모두 의의있는 반

면, 여러 인자를 함께 고려한 다변수 회귀분석에서는 조직학적 분화도만이 의의를 갖는다고 하였다. 박등⁴은 침윤성 빛 전이성 방광암의 예후 인자들을 분석한 결과 암의 병기가 제일 중요하며 암의 조직학적 분화도는 암의 병기에 영향을 가장 크게 주는 인자라고 하였다. 따라서 종양의 조직학적 분화도는 방광암의 예후와 밀접한 관련이 있다고 하겠다.

침윤성 방광암 환자의 80-90%는 초기 진단시에 이미 침윤성이고, 근 침윤성 방광암 환자의 약 50%가량은 이미 잠복 원격 미세전이가 있다. 미세전이가 있는 경우 국소적 치료의 한계를 나타내게 된다. 이러한 환자들은 대부분 1년 이내에 원격 전이가 명백히 나타나게 되며 2년 이내에 사방하게 되지만, 원격 전이가 명백한 환자들 중 약 5%에서는 무활동성 암으로 5년 이상 지속된다. 근침윤성 방광암 환자들의 약 50%는 잠복 원격 미세전이가 없는 환자로서 국소적 치료법을 잘 적용하면 생존기간을 늘릴 수 있을 것이다⁵.

이렇듯 침윤성 방광암의 임상 경과는 예측하기 어려워 적절한 치료법 선택에 어려움이 있다 고 하겠다. 특히 근치적 방광전적출술이 적용될 수 있는 T2 이상 병기의 환자들 중에서 세포 분화정도가 가장 나쁜 집단에서는 미세전이가 문제로 될 수 있겠다.

본 연구는 근 침윤성 방광암 환자의 약 50% 가량을 차지할 것으로 추정되는 잠복 원격 미세전이가 존재하는 경우에 방광 전적출술을 시행하여도 술후 초기에 원격전이가 명백하게 진행이 되어 사방하게 되는 집단에서는 방광 전적출술의 이점을 상실하게 되므로 이러한 집단에서는 조기 방광 전적출술 보다는 최대한의 경요도적 종양절제술 또는 부분 방광절제술, 항암약제의 사용과 방사선 요법을 시행하는 방법을 고려해 볼만 하다. 실제로 근침윤성 방광암에서 근치적 방광 적출술을 시행했을 때⁶와 방광을 보존하고 치료한 경우 즉, 부분 방광절제술⁷, 경요도적 종양절제술과 항암 화학요법을 병행했을 때⁸ T2, T3 병기의 5년 생존률은 차이를 보이지 않고 있

다(T2 병기에서의 방광적출술:방광보존=64%:29-80%, T3병기에서의 방광적출술:방광보존=39%:14-62%). 그러나 술후 원격전이가 명백해진 후에도 더 이상의 진행 없이 무활동성으로 5년 이상 지속되는 약 5%의 환자 집단에서는 방광 전적출술이 필요할 것으로 생각된다 (Fig. 1).

본 연구에서는 근치적 방광 전적출술의 적응증이 깨끗적으로 인정되어 있는 상태의 집단을 대상으로 술 후의 경과를 평가하고 예상해 보고자 하였다. 동일한 상태 즉, 암의 조직학적 분화도가 가장 좋지 않은 Grade III를 나타내고 근 침윤성 (T2 및 T3 병기) 망광암조직에서 항전이 유전자인 nm23-H1과 항암유전자인 p53의 단백 발현 여부 또는 발현정도를 이용하여 술후 경과와의 상관성을 규명해 보고자 하였다. 이리하여 침윤성 망광암 환자에서 삼복 원격 미세전이의 존재 유무의 가능성과 경과를 미리 객관적으로 예측할 수 있다면 치료법 선택에 도움이 될것이다.

대상 및 방법

본 연구에서는 근침윤성 망광암에서 망광암 세포의 조직학적 분화도가 Grade III 있던 환자의 근치적 방광전적출술의 병리소견을 검토하고 술 후의 추적 진료 소견과 의부기록이 불충분 한 예는 전화 또는 우편 통신을 이용하여 환자 방문을 유도하고 자료를 보충하였다. 본 연구에 사용할 조직은 치료시작 당시에 시행한 경요도적 방광 종양 절제술에서 얻은 망광암 조직을 이용하였으며 항전이유전자와 항암유전자의 발현 양상을 알아보았다.

또한 대상군의 동질성을 유지하기 위해 망광암의 경요도절제술에서 Grade III, 근침윤성 이행 상피세포암으로 진단된 후 근치적 방광적출술을 시행하여 병리학적 병기 T2, T3a 및 T3b로 판명된 환자를 대상으로 하였다. 대상은 1985년부터 1993년에 수술을 시행받은 예였으며 double primary tumor예, 술후 경과가 좋지않아 조기 사망한 예, 술후 추적기간이 2년 이내인 예(추적총 2년이내에 방광암 전신전이로 사망한 예는 포함), 파라핀 포매블록의 보존 상태가 좋지 않은 예는 제외하였다. 총 45예의 경요도절제술에서 얻어진 조직을 종양억제유전자 p53 [DO7; Novocastra Lab. Ltd., UK 및 PAb1801(Ab-2); Oncogene Science, USA : 모두 wild&mutant]와 항전

이유전자 nm23-H1 (NM301; Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)의 면역염색을 하였으며, 생존 평가 하였다. 방법을 요약하면

1) p53 핵단백에 대한 면역조직화학 염색

대상 환자들의 파라핀 블록을 5 um 두께로 절단하여 poly-L-Lysine을 바른 슬라이드에 포네하였다. 절편을 자일렌과 알코홀로 파라핀제거와 탈수과정을 거친 후 중류수로 합수시켰다. 형체 회복을 위하여 합수시킨 조직을 500 watt의 microwave를 이용하여 citrate buffer에서 10분간 처리하였다. 다음 내인성 peroxidase 활동성을 증시시키기 위하여 3% H₂O₂로 10분간 처리하고 PBS로 20분간 세척하였다. PAb1801 (Ab-2)를 사용한 경우에는 0.1% pepsin으로 5분간 실온에서 처리한 후 중류수로 세척하였다. 10% normal horse serum에서 30분간 incubation 한 후 DO7 및 PAb1801의 mouse monoclonal antibody를 1:50의 농도로 희석하여 슬라이드에 얹고 4°C에서 하루밤 incubation 하였다. 그 후 biotinylated horse anti-mouse secondary antibody와 1:100 희석하여 30분간 반응시킨 후, avidin-biotin peroxidase complex 와 1:25 희석 농도로 30분간 반응시켰다. 발색은 diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., Mo, USA)을 사용하였다. 발색시킨 다음 Mayer hematoxylin으로 1-2분간 세포핵을 대조 염색하고 흐르는 물에 세척하고 실온에서 건조 후 봉입하였다. 결과 판정은 핵반응을 보인 세포만을 양성으로 간주하여 종양세포 핵의 염색 percentage에 따라 4 범주로 구분하였다. 즉, negative stain(less than 5%), patchy stain(5-19%), heterogeneous stain(20-75%), homogeneous stain(greater than 75%) 으로 하였다.

2) nm23-H1에 대한 면역조직화학 염색

p53와 동일한 방법으로 시행하였으며 사람 nucleoside diphosphate kinase A에 특이한 사람 적혈구로부터 정제된 nm23-H1(NM301)를 1:100의 농도로 incubation하였다. 발색은 3-amino-9-ethyl-carbazole (DAKO, CA, USA)로 하였다.

암세포의 염색 강도는 네가지 등급으로 분류하였다. 즉, 등급 0은 염색이 되지 않은 종양 세포, 등급 1은 약하게 염색된 종양 세포, 등급 2는 중간정도로 염색된 종양 세포, 등급 3은 강하게 염색되었을 때로 분류하였다.

3) 대조군

nm23-H1 단백과 p53 단백에 대한 면역 염색의 양성 대조군으로는 각각 이비 본 교실과 병리학 교실에서 nm23 양성으로 확인된 신세포암⁹과 p53 양성으로 확인된 유방암 조직을 사용하였다. 양성 대조군으로는 방광암 조직에서 일차 항

체를 처리하지 않고 negative control reagent로서 대체하여 이용하였다.

4) 결과판독

결과판독은 먼저 저배율($\times 100$) 시야하에 주변부위, 괴사부위와 간질조직 부위를 제외한 부위에서 약 염색 부위와 강 염색 부위를 한개씩 선택하고, 선택된 각 부위를 고배율($\times 250$) 시야에서 렌즈 격자를 이용하여 세포수를 세었다.

p53의 면역염색 양성은 heterogenous stain 이상, nm23-H1의 면역염색 양성은 등급 2 이상으로 정의하였다. 염색결과 및 병리학적소견을 생존기능과 비교하였다.

4) 통계 분석

본 연구에서 조사한 병리 소견과 p53 발현 및 nm23-H1 발현 결과를 Cox's proportional hazards linear regression model을 이용하여 생존평가하였고, log-rank test로 검정하였다. 또한 각 변수들 간의 관계를 t(two-tail) test, Wilcoxon test등의 비모수검정법, Chi-Square test로 분석하였다. 모든

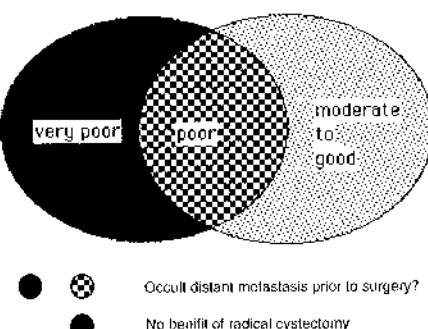


Fig. 1. Classification of the grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder in aspect of prognosis.

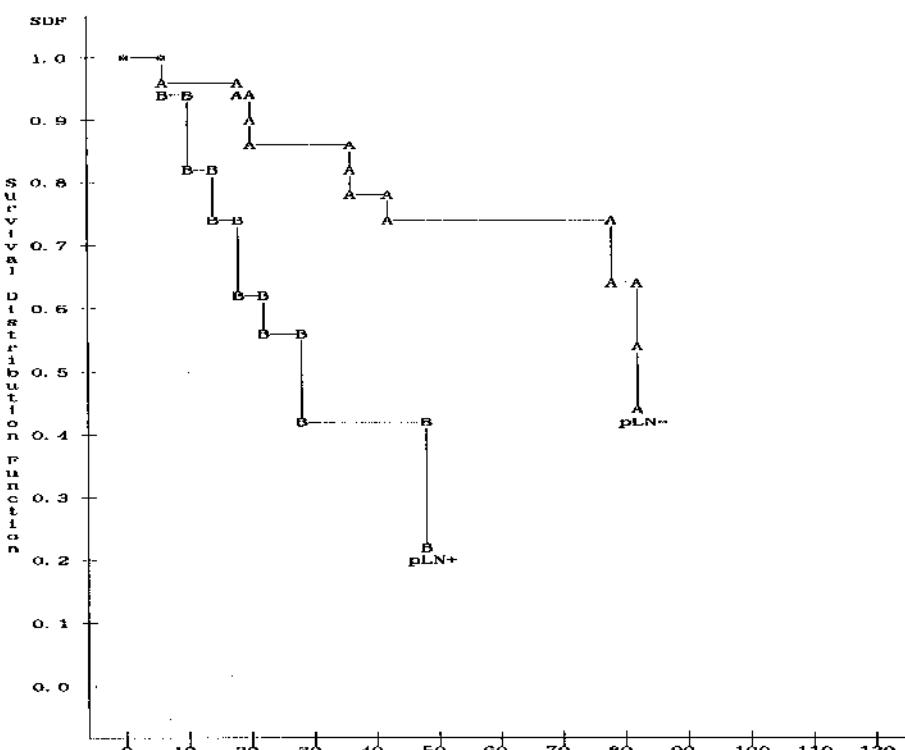


Fig. 2. Survival of patients according to the pathologic lymph nodal status in 45 patients of grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder. The survival curve shows difference in survival between lymph node positive group(pLN+) and negative group(pLN-) ($p=0.0033$).

Table 1. Expression rate of p53 & nm23-H1 according to the pathologic T stage and lymph node status

		p53(DO7) N' expression (rate)	p53(PAb1801) expression (rate)	nm23-H1 expression (rate)	p53 & nm23-H1 expression (rate)
STAGE	pT2	11	3 (27.77)	1 (9.10)	6 (54.55)
	pT3a	11	5 (45.45)	5 (45.45)	8 (72.73)
	pT3b	23	11 (47.83)	5 (21.74)	11 (47.83)
LYMPH NODE	pLN-	29	7 (24.14)	5 (17.24)	15 (52.72)
	pLN+	16	12 (75)	6 (37.5)	10 (62.5)
Total	45	19 (42.22)	11(24.44)	25 (55.56)	12 (26.7)

N: Number of cases.

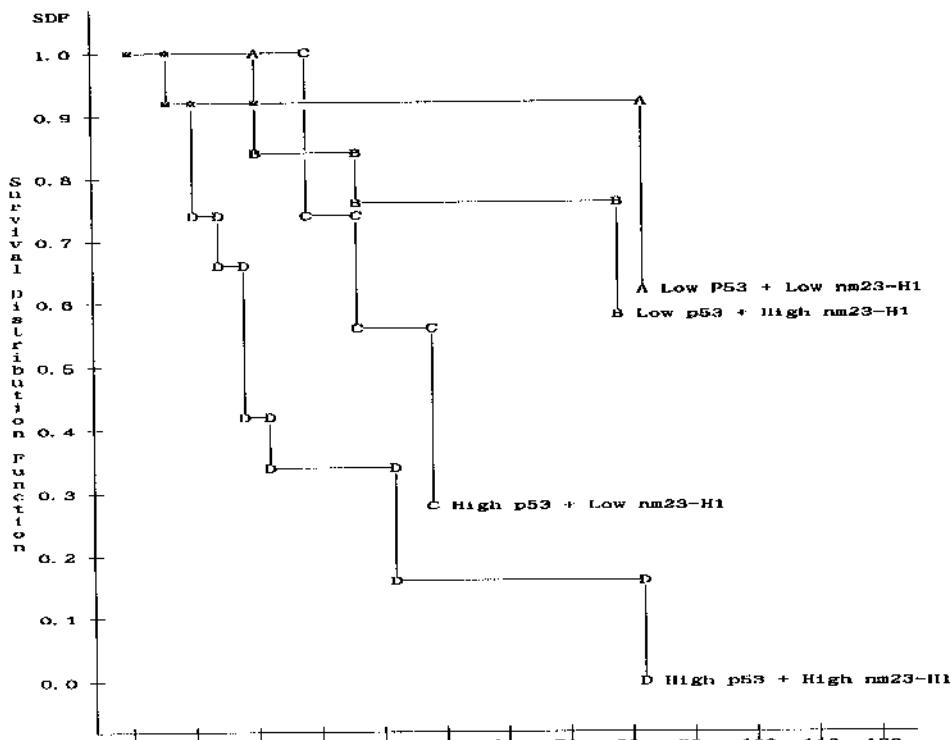


Fig. 3. Survival of patients according to the combination of the expression results of p53 and nm23-H1 in 45 patients of grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder. The survival curve shows difference in survival among the four groups($p=0.0005$).

분석은 SAS software (SAS institute, Cary, NC, USA)를 사용하였다.

결 과

대상 환자의 수술 당시 평균 나이는 59.0세 (범위: 38세~78세)였으며, 남녀비는 42:3으로 남자가 대부분이었다. 술후 추적기간은 6~113개월 (평균: 44.67개월) 이었다. 대상이 되었던 환자 54례 중 다른 종류의 암과 동반되어 있었던 2례,

술후 경과가 좋지 않았던 1례, 추적기간이 2년 미만이었던 4례 (2년 이내에 방광암 전신전이로 사망한 11례는 포함), 파라핀 블록 보존 상태가 좋지 않은 2례를 제외시켜 총 45례를 분석하였다. p53 발현율은 DO7이 42.2%(19/45), PAb 1801이 24.4%(11/45)로 DO7이 우월했으며 PAb 1801이 발현된 예중 1례에서 DO7이 발현되지 않았다. p53 발현율은 44.4%(20/45), nm23-H1발현율은 55.6%(25/45)였다. p53와 nm23-H1이 모두 음성, p53가 음성이면서 nm23-H1이 양성, p53가

Table 2. Pathologic T stages and follow-up (metastasis & expire) durations in 20 patients died of bladder cancer

No.	pT	Duration to metastasis (months)	Duration to expire (months)
1	T2	8	14
2	T2	11	18
3	T2	71	81
4	T3a	15	18
5	T3a	72	82
6	T3a	31	42
7	T3a	48	77
8	T3b	6	19
9	T3b	4	6
10	T3b	12	28
11	T3b	8	20
12	T3b	27	48
13	T3b	9	36
14	T3b	13	28
15	T3b	12	22
16	T3b	6	18
17	T3b	6	10
18	T3b	22	35
19	T3b	9	10
20	T3b	4	6

양성이면서 nm23-H1이 음성, p53와 nm23-H1이 모두 양성인 경우는 각각 12, 13, 8, 12예 였다 (Table 1). 병리학적 림프절 전이상태, p53와 nm23-H1발현결과의 조합, p53발현이 생존과 유의성이 있었으며(각각 $p=0.0033$, 0.0005 , 0.0003 ; Fig. 2, 3, 4), 두 유전자 모두 발현된 예는 5년 생존률이 16%로서 저조한 생존기능을 나타냈다. 병리학적 T 병기, nm23-H1발현은 생존과 유의성이 없었다(각각 $p=0.1309$, 0.0903). 술후 추적과정에서 사망한 20례에서 원격전이가 분명해 지는 기간, 원격전이 후 사망까지의 기간들의 의미 즉, 전이기간과 전이 후 사망기간의 비는 병리학적 T 병기와만 관련되었다(General linear models procedure: $p=0.0407$; Table 2, Fig. 5). 한편 방광전적출술 후 원격전이가 분명해 지는 기간, 원격전이 후 사망까지의 기간들의 의미를 알아본 결과 방광암의 근침윤정도가 원격전이 기간과 사망까지의 기간의 비에 영향을 주었다. 또한 두 유전자 발현결과의 조합과 p53발현결과는 병리학적 림프절 전이상태와만 유의한 연관성이 있었다(각각 $p=0.003$, 0.000 ; Table 3, 4). nm23-H1 단백

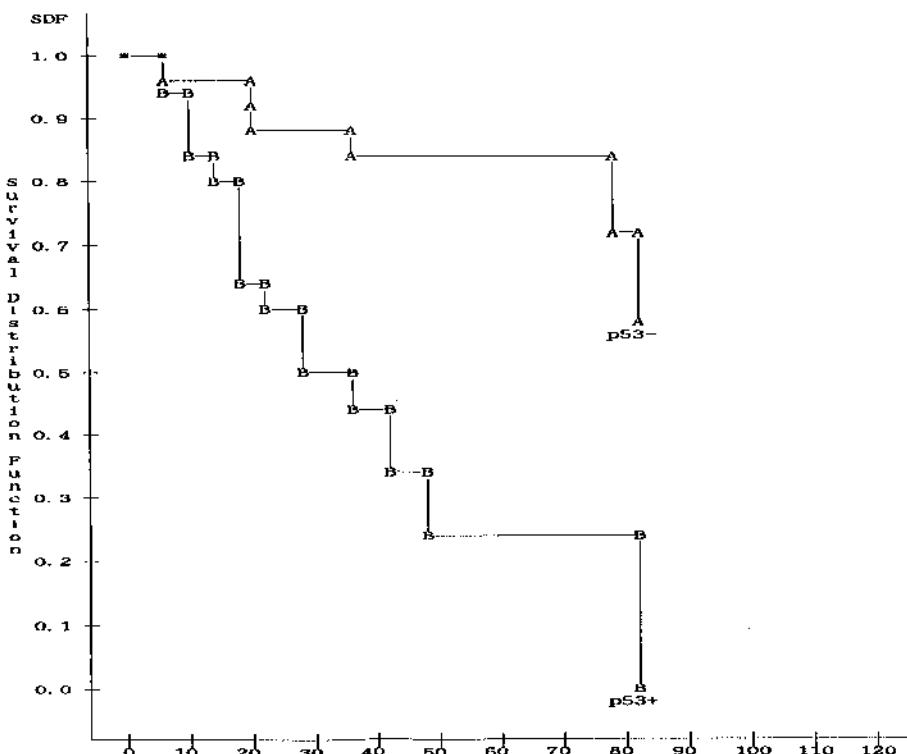


Fig. 4. Survival of patients according to the p53 expression in 45 patients of grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder. The survival curve shows difference in survival between p53 positive group(p53+) and negative group (p53-) ($p=0.0003$).

Table 3. Expressions of p53 & nm23-H1 according to the lymph node status^a

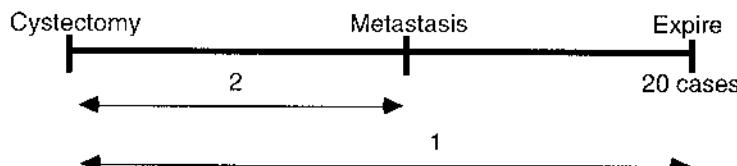
	p53 - & nm23-H1 -	p53 - & nm23-H1 +	p53 + & nm23-H1 -	p53 + & nm23-H1 +
pLN-	11	11	3	4
pLN+	1	2	5	8
Total	12	13	8	12

^ap=0.003.Table 4. Expression of p53 according to the lymph node status^a

	p53-	p53+
pLN-	22	7
pLN+	3	13
Total	25	20

^ap=0.000.Table 5. Relation of the pathologic T stage and pathologic lymph node status^a

	pLN-	pLN+
pT2	12	2
pT3a	12	2
pT3b	14	15
Total	38	19

^ap=0.0001.

2/1; pT2:pT3a:pT3b (p=0.0407)

2 ; no significant variable

1-2; no significant variable

Fig. 5. Relationships between the duration of metastasis or expire and variables.

과 p53 단백에 대한 면역염색의 양성 대조군들에서는 강염색을 보았으며, 유성 대조군에서는 염색되지 않았다. 병리학적 림프절 전이상태와 nm23-H1발현 결과는 연관성이 없었다($p=0.486$). 한편 병리학적 림프절 전이상태는 병리학적 T병기와 연관성이 있었으며($p=0.0001$, Table 5), T3b 병기에서는 림프절 전이가 매우 많았다.

고 안

원격전이가 없는 고형 암의 경우 가장 좋은 치료법인 수술요법을 같은 술기의 술자가 시행하더라도 환자들의 예후는 암의 악성도, 진행 정도 또는 어떤 다른 요인에 따라 달라지게 될 것이다. 따라서 동일한 병기와 조직학적 문화도를 갖는 군을 선택하면 악성도와 진행정도 이외의 요소의 영향을 평가할 수 있을 것이다.

또한 전이상 방광암 환자는 수술적 치료의 적용 시점에 문제가 있거나 이미 수술적 치료의 의

미를 상실한 경우로서 현재의 치료방법들 중 항암약제의 사용이 필요하게 된다. 따라서 수술적 치료 시점을 정하는 것이 중요하다. 방광에 국한된 근침윤성 방광암은 일반적으로 방광 진적출술을 시행하게 되는데 술전에 방사선치료, 항암약제 요법을 병행하는 경우도 있다. 따라서 방광 전적출술로 일어진 암조직은 초기 상태와는 다른 세포의 양상을 나타낼 수 있으므로 본 연구에서는 치료시작 당시에 시행한 경요도적 방광종양 절제술에서 일은 방광암 조직을 이용하였다. 또한 대상군의 동질성을 유지하기 위해 근치적 방광 전적출술을 시행한 환자를 대상으로 병리학적 T 병기와 조직학적 문화도가 같은 환자를 대상으로 하였다. 병리학적 T 병기 중에서는 근침윤성 방광암인 T2 와 T3를 선택하고 이러한 병기에서 조직학적 문화도는 가장 문화정도가 좋지 않은 Grade III (WHO 분류 기준) 만을 대상으로 하였다. 대상이 되는 환자 중 술전 방사선 조사가 생존측면에 영향을 주지 않는다는 결론

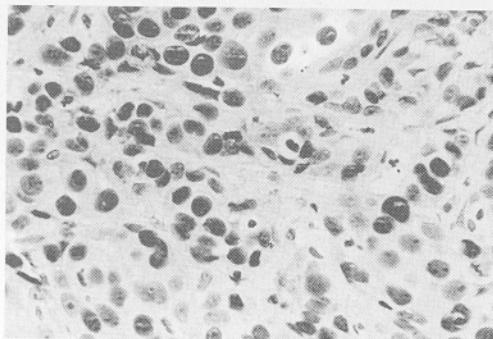


Fig. 6. Positive expression of DO7(1:50) in grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder($\times 400$, DAB).

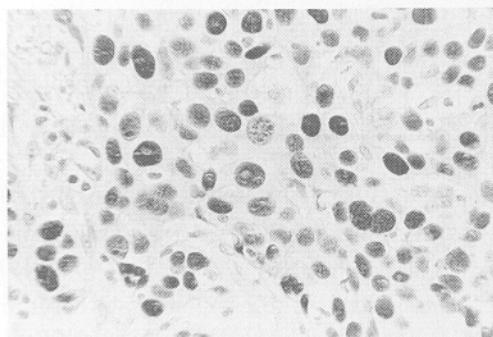


Fig. 7. Positive expression of PAb1801(1:50) in grade III muscle invasive transitional cell carcinoma of the bladder($\times 400$, DAB).

에 근거하여 1989년초 까지 방광 전적출술전 2000 CGy의 방사선 조사를 시행했던 경우를 포함시켰다. 또한 술후 추적과정에서 전신전이가 발견된 환자들은 대부분의 경우 Cisplatin을 기본으로 한 항암약제를 사용하였으므로 생존기간에 대한 영향은 거의 같을 것이다. 즉, 1985년 이후 방광암에서 림프절 절제술을 포함한 고전적 의미의 근치적 방광전적출술 시행 환자에서 이 수술 전 시행했던 경요도적 절제술에서 얻어진 방광암 조직을 이용하여 항암유전자 p53와 항전이유전자인 nm23-H1의 발현 결과와 술후 전신 전이 발생, 전이의 진행, 생존 기간과의 상관성을 알아보고 근치적 방광 전적출술전 전이 및 생존 예측의 가치를 평가하였다. 그 결과 염색결과들의 조합을 이용한 생존기능 분석에서 p53와 nm23가 모두 발현되지 않을 때에는 근치적 방광전적출술로서 90%이상의 5년 생존률을 기대할 수 있지만, p53와 nm23가 둘다 과발현 되는 경우에는 5년 생존률이 16%의 저조한 생존기능을 나타내

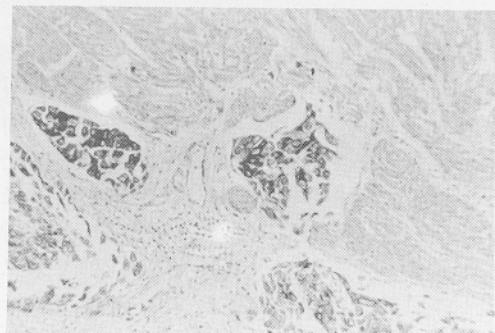


Fig. 8. Positive expression of nm23-H1 (1:100) in grade III transitional cell carcinoma of the bladder($\times 100$, AEC).

어 방광전적출술에도 불구하고 예후가 매우 나쁠 것으로 예상할 수 있었다. 따라서 방광보존식의 결과 보고가 임상병기에 근거한 것임을 감안하더라도 예후가 나쁠 것으로 생각되는 군에는 방광보존을 하는 치료법을 적용하여도 방광전적출술과 대등한 5년 생존률(임상병기 T3:43%, T4: 16%)을 기대할 수 있으므로⁸ 방광보존식을 선택하는 것이 바람직 할 수도 있겠다. 또한 p53 발현 결과에 따른 생존기능의 차이가 있어서 p53 발현 결과는 단독으로도 중요하며 여기에 nm23-H1이 발현되면 방광전적출술의 의미를 상실할 수도 있겠다. 즉, 경요도적 방광종양 절제술의 결과가 Grade III, 근침윤성 이행상피 세포암인 환자들을 예후적 측면에서 분류해 볼 때 이러한 부류는 방광전적출술의 이점이 없을 수 있겠다.

한편 병리학적 T병기와 병리학적 림프절 전이 상태가 관련이 있지만 병리학적 T병기에 따른 생존기능의 차이는 없고, 병리학적 림프절 전이 상태에 따른 생존기능의 차이가 있으므로, Grade III의 침윤성 이행상피 세포암에서 생존기능을 평가할 때 근침윤 깊이 차체의 의미보다는 림프절 전이 성향을 우선적으로 고려해야 할 것으로 생각된다. 본 연구결과에서는 병리학적 림프절 전이 상태와 p53 발현은 관련성이 있었다.

한편 방광전적출술 후 원격전이가 분명해지는 기간, 원격전이 후 사망까지의 기간들의 의미를 알아본 결과 방광암의 근침윤정도가 원격전이 기간과 사망까지의 기간의 비에 영향을 주어서 근침윤성 방광암에서의 병리학적 T병기의 의미를 이러한 측면으로 부여할 수도 있겠다.

방광암에서 p53유전자의 발현은 의미가 있다. 방광암의 61%에서 p53 유전자의 변이가 있고,

고병기와 저분화종양에서 주로 관찰된다¹⁰.

방광의 이행상피세포암에서 wild와 mutant p53 단백 모두에 염색 반응하는 PAb1801 단클론 항체를 사용한 면역조직화학염색 결과 T1병기의 방광암 중 20% 이상의 양성 발현을 나타내는 군에서 암의 진행이 두드러 진다¹¹. Wright등¹²은 표재성 방광암에서 2%, 침윤성 및 전이성 방광암의 36%에서 등등도 이상의 강한 양성 반응을 보였다고 하였다. Fujimoto등¹³은 25례의 방광암 조직에서 p53 유전자의 hot spot들이 모두 존재하는 exon 4에서 11까지를 분석한 결과 표재성 방광암 보다 침윤성 방광암에서 p53유전자 변이가 훨씬 많이 발생하니 (7.7%:50%) exon 4에서 11까지의 exon 중 일치되는 exon 위치의 변이는 없어서 방광암에서는 변이의 특이 형태는 없다고 하였다.

정상상태의 wild type p53 단백은 20분 이하의 짧은 반감기를 가지고 검출되기 어렵지만, 돌연변이형의 mutant type p53 단백은 반감기가 wild type의 4배에서 20배여서¹⁴ 주로 mutant type p53 단백이 세포핵에 축적되어 그 발현이 관찰되는 데^{15,16}, 면역조직화학 연구에서 p53 핵단백의 과발현은 p53 유전자의 돌연변이 상태와 거의 일치한다^{16,17}. 또 파라핀 포매 조직을 이용한 p53에 대한 면역조직화학 연구는 신선동결조직을 이용한 연구와 일치율이 매우 높아서¹⁸ 후향성 연구도 의의가 있다고 하겠다.

면역조직화학 염색을 이용한 p53 유전자 단백의 발현에 관한 연구에서 방광암에서 등등도 이상의 좋은 분화도를 가진 경우는 4%에서만 강한 염색 양성반응을 보이나, 분화도가 나쁜 경우에는 36%-70%에서 20% 이상의 p53 단백 발현을 보이는 것으로 알려져 있다^{12,19}. 그러나 조직학적 분화도와 p53 유전자 돌연변이의 표현 정도는 부관하다는 주장도 있다¹¹.

본 연구에서 사용한 DO7 (Fig. 6)과 PAb1801 (Fig. 7)은 p53의 wild type과 mutant type 모두를 인지한다. 본 연구 결과 파라핀 포매조직을 이용할 때 DO7의 발현율이 PAb1801보다 월등하나 이것은 PAb1801의 발현을 담당하는 것으로 알려진 부위 (이 단클론 항체는 wild와 mutant p53 단백에 존재하는 아미노산 32와 79사이에 위치하는 denaturation-resistant epitope를 감지한다²⁰) 가 손상될 수 있을 가능성이 있는 반면 DO7의 발현을 담당할 수 있는 항원결정부위 (이 단클론 항체는 wild와 mutant p53 단백에 존재하는 아미노

산 1과 45사이에 위치하는 epitope를 감지한다는 보고도 있으나²¹ 현재까지 정확히 밝혀져 있지 않나)는 PAb1801보다는 쉽게 손상되지 않음에 기인할 가능성이 있다. 또는 밸류율의 차이가 이것들의 항원결정부위에서 나타나는 돌연변이 형태가 구조적 돌연변이 형태인지 결합형 돌연변이 형태인지 아니면 두가지 형태 모두가 일어나는지 불확실하지만 이러한 점의 차이에 의할 수도 있겠다. 따라서 DO7의 항원결정부위의 위치와 구조, 해내에 축적된 p53 단백산물의 종류에 대한 추가적 규명이 필요하다고 하겠다.

한편 본 연구에서 사용한 항전이 유전자 non-metastatic nm23는 포유류 암의 전이능과 관련된 독립적으로 조절되는 유전자의 일종이다^{22,23}.

nm23유전자의 초기 연구에서 전이성향이 강한 쥐의 흑색종 세포주와 럼프절 전이가 있는 사람 유방암에서 발현이 감소되어 있음이 밝혀졌다^{24,25,26}.

nm23는 두가지 형태(nm23-H1과 nm23-H2)가 규명되어 있다. nm23-H1은 Dictyostelium nucleoside diphosphate(NDP) Kinase와 매우 유사하고²⁷, Drosophila의 비정상적인 wing disc(awd) 유전자 산물과도 매우 유사하며²⁸, 사람의 NDP Kinase A와 동일하다²⁹. nm23-H1은 p19로 표현되며 전이성 종양에서 많이 감소되어 있는 반면 p17로 표현되는 nm23-H2는 NDK 활성을 가지며 전이성 종양에서 약간 감소되어 있다²³.

최근 Brewster등³⁰의 연구에서는 nm23-H1은 17q21.3에 위치함이 밝혀져서 p53와는 연관성이 없는 것 같다.

nm23의 어제 효과는 종양진이 같은 암진행 과정의 여러 측면에서 나타난다. 사람과 쥐의 종양 세포에 nm23을 transfection하면 세포운동성이 억제되며³¹, nm23 특이 항체를 microinject하면 DNA의 합성에는 영향없이 쥐의 배 섬유아세포에서 세포분열을 억제한다³².

한편, 종양의 전이능을 억제하는 것은 nm23의 NDK의 활성에 의한 것이 아니고 serine phosphorylation에 의한 것이라는 보고도 있다³³. 최근 nm23의 조절기전을 밝히기 위해 nm23-H1 유전자의 promotor region 5' region을 연결하는 regulatory DNA fragment를 분리, 클론ning, 염기서열을 결정하여³⁴ nm23 발현의 조절기전과 역할을 이해하는 데 도움이 될 것으로 기대 된다.

또한 nm23 유전자와 암유전자와의 관련성을

연구한 몇 개의 보고가 있다. 줘에서 자연 발생한 곤육종의 폐전이 병소와 4-hydroxyamino-quinaline 1-oxide로 유발된 플유종의 폐전이 병소에서 NDP Kinase/nm23과 c-Ha-ras 암유전자의 발현은 전이능과 관련이 있고, c-myc mRNA의 발현은 전이능과 관련이 없다. Southern blot 분석을 시행했을 때 NDP Kinase/nm23, c-Ha-ras, c-myc 암유전자의 재배열이나 증폭이 없는 것으로 보아 이들 유전자의 발현을 조절하는 것이 전사 단계 또는 전사후 단계에서 이루어 진다는 것을 암시한다. 또한 이러한 결과들은 NDP Kinase/nm23과 c-Ha-ras가 G-단백 반응과 연관되어 신호전달과정(signal transduction process)에 관련되어 있을 수 있다³⁵.

Hirayama 등³⁶은 유방암 조직에서 anti-rat NDP kinase 항체를 사용한 면역조직화학염색을 시행하여 염색 강도를 내기지 등급으로 분류하는 것이 가능하였다. 즉, Grade 0는 염색이 되지 않은 중양세포, Grade 1은 약하게 염색된 중양세포, Grade 2는 중간정도로 염색된 중양세포, Grade 3는 강하게 염색되었을 때로 분류하였다. 정상 소포(acini)와 선(gland)의 세포는 Grade 1이 하로 염색이 가능하였다. 유방암(infiltrating ductal carcinoma)에서는 nm23에 대한 rabbit antibody로 면역조직화학염색을 시행했을 때 상피에서 균일하게 높은 nm23단백의 성분을 나타내는 경우와 불균일한 형태로 염색이 약하게 된 경우가 있었는데 염색이 약하게 되는 군이 생존율이 낮다³⁷. 폐선암 조직에 대한 nm23단백의 면역조직화학 염색결과는 예후적 가치가 없고³⁸, 또 간세포암에서는 면역색결과 원격전이부위, 원격 전이가 있는 암종의 원발부위, 원격전이가 없는 원발 암종의 순서로 발현강도가 강하나 암종의 크기, 수, 조직병리의 소견과는 무관하다³⁹. 립프절, 폐, 간으로 전이된 대장암은 nm23-H1의 부호 결정순서에서 결실이 있거나 전좌 결실이 있으나, 전이가 없는 대장암에서는 nm23-H1의 변화가 없어서 nm23 유전자는 대장암에서 전이 유발에 역할을 한다^{40,41}.

신세포암에서의 nm23 단백 발현 결과에서는 핵등급, 병리학적 병기, 생존율과의 역상관관계를 보여서 nm23의 발현이 조직특이한 현상인지 또는 중양세포 증식과 관련된 것인지 밝혀볼 필요가 있다⁹.

이상과 같이 nm23에 대한 연구들이 많이 진행

되고 있으나 방광암에 대한 기초적인 연구보고는 없다. 본 연구에서는 Grade III 이면서 근침윤성 방광암인 경우 nm23-H1 발현율은 55.56%(25/45)를 나타냈으나 nm23-H1발현 결과(Fig. 8)와 생존기능은 연관성이 없었고 오히려 근침윤 정도가 심할 수록, 립프절 전이가 있는 경우에 강하게 발현되는 경향을 보였으나 통계학적 의미는 없었다. 이러한 결과는 방광암에서의 항전이 유전자의 의미를 보고한 것⁴²과는 상이한 결과이다.

결 론

근치적 방광적출술을 시행한 Grade III의 근침윤성 방광암 45례를 대상으로 방광전적출술의 타당성을 평가한 결과

1. 근치적 수술을 시행하기에 앞서서 시행한 경뇨도·중앙절제술의 조직이 Grade III 근침윤성이고 p53와 nm23-H1이 모두 발현될 때에는 근치적 수술의 의미가 매우 감소한다고 할 수 있다.
2. Grade III 이행상피세포암인 경우 근침윤의 정도는 생존기간에 영향을 주지는 않으나 근침윤정도에 따라 전이가 분명해지는 기간 및 전이후 사망까지 기간의 차이가 있을 수 있다.
3. 립프절 전이 여부는 생존과 관련이 있고, 항암유전자 특히 p53 발현과 연관성이 있다.

이상의 결과로서 Grade III, 근침윤성의 방광암의 치료는 방광전적출술을 일률적으로 시행하기보다는 선택적으로 시행하고 나머지에서는 다른 치료방법들을 적용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mostofi FK, Sorbin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours: International classification of tumours. WHO 1973; 10.
2. Skinner DG, Tift JP, Kaufman JJ. High dose, short course preoperative radiation therapy and immediate single stage radical cystectomy with pelvic node dissection in the management of bladder cancer. J Urol 1982; 127: 671-4.
3. Torti FM, Lum BL, Aston D, Mackenzie N, Faysel M, Shortliffe LD, et al. Superficial

- bladder cancer: The primacy of grade in the development of invasive disease. *J Clin Oncol* 1987; 5: 125-30.
4. 박동수, 이진무, 이영태. 방광의 침윤성 빛 전이성 이행상피세포암의 예후인자. *대한비뇨기학회지* 1989; 30: 135-42.
 5. Catalona WJ. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh PC, Retick AB, Stamey TA, Vaughan EDV Jr, editors. *Campbell's Urology*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992; 1094-158.
 6. Frazier HA, Robertson JE, Dodge RK, Paulson DF. The value of pathologic factors in predicting cancer-specific survival among patients treated with radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder and prostate. *Cancer* 1993; 71: 3993-4001.
 7. Sweeney P, Kursh ED, Resnick MI. Partial cystectomy. *Urol Clin North Am* 1992; 19: 701-11.
 8. Dunst J, Sauer R, Schrott KM, Kuhn R, Wittekind C, Altendorf-Hofmann. Organ-sparing treatment of advanced bladder cancer: A 10-year experience. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1994; 30: 261-6.
 9. Park DS, Cho NH, Lee YT, Park C, Lee JM. Analysis of nm23 expression as a prognostic parameter in renal cell carcinoma. *J Kor Med Sci* 1995; 10: 258-62.
 10. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.
 11. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-9.
 12. Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CHW, et al. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer* 1991; 63: 967-70.
 13. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, et al. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1393-8.
 14. Arnold JV, Jamil M, Cathy AF. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
 15. Peggy LP, Allen MG, Steven GK, Marc DC. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol* 1992; 140: 145-53.
 16. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris A. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-9.
 17. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1990; 5: 893-9.
 18. Kerns BJ, Jordan PA, Moore MB, Humphrey PA, Berchuck A, Kohler MF, et al. p53 overexpression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue detected by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1047-51.
 19. 정진수, 이상은. T1 방광 이행상피세포암에서 종양 진행의 예후인자로서 p53 단백질 과 발현의 의의. *대한비뇨기학회지* 1993; 34: 952-61.
 20. Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem* 1986; 159: 529-34.
 21. Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. *J Immunol Methods* 1992; 151: 237-44.
 22. Kimura N, Shimada N, Nomura K, Watanabe K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 1990; 265: 15744-9.
 23. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991; 51: 445-9.
 24. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgerisson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence for a novel gene associated with low

- tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-4.
25. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989; 49: 5158-90.
 26. Hennessy C, Henry JA, May FEB, Westley BR, Angus B, lennard TWJ. Expression of the anti-metastatic gene nm23 in human breast cancer: An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 281-5.
 27. Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, et al. Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to nm23 and awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and drosophila development. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1199-202.
 28. Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A drosophila gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 1990; 63: 933-40.
 29. Gilles AM, Prescan E, Vinica A, Lascu I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* 1991; 266: 8784-9.
 30. Brewster SF, Browne S, Brown KW. Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. *J Urol* 1994; 151: 1073-7.
 31. Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1971-3.
 32. Sorscher SM, Steeg P, Feramisco JR, Buckmaster C, Boss GR, Meinkoth J. Microinjection of an nm23 specific antibody inhibits cell division in rat embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 195: 336-45.
 33. MacDonald NJ, Rosa ADL, Benedict MA, Freije JMP, Krutsch H, Steeg PS. A serine phosphorylation of nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* 1993; 268: 25780-9.
 34. Chen HC, Wang L, Banerjee S. Isolation and characterization of the promoter region of human nm23-H1, a metastasis suppressor gene. *Oncogene* 1994; 9: 2905-12.
 35. Honoki K, Tsutsumi M, Miyauchi Y, Mii Y, Tsujuchi T, Morishita T, et al. Increased expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 and c-Ha-ras mRNA is associated with spontaneous lung metastasis in rat-transplantable osteosarcomas. *Cancer Res* 1993; 53: 5038-42.
 36. Hirayama R, Sawai S, Takagi Y, Mishima Y, Kimura N, Shimada N, et al. Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1249-50.
 37. Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard AM, Coggan DL, Crowell T, et al. Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. *Am J Pathol* 1991; 139: 245-50.
 38. Higashiyama M, Yokouchi DII, Kodama K, Nakamori S, Tateishi R, Kimura N. Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: Lack of prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 533-6.
 39. Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K, Shima M, Nakata K, Watanabe K, et al. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1349-54.
 40. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 717-20.
 41. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res*

- 1993; 53: 3652.
42. 이준현, 문우천. The role of NM23-H1 gene analysis in urothelial cancer. 대한비뇨기학회지
in urologic cancer(I): Immunohistochemical 1995; 36: 135-47.
-