

난소암에서 면역조직화학염색법을 이용한 p53 유전자의 과발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

김재욱 · 이연혜 · 김영태 · 이정필 · 김동규 · 송찬호

= Abstracts =

Clinical Significance of p53 Gene Expression with Immunohistochemical Staining in Ovarian Cancer

Jae Wook Kim, M.D., Yeun Hae Lee, M.D., Young Tae Kim, M.D., Chung Pil Lee, M.D.,
Dong Kyu Kim, M.D., Chan Ho Song, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei College University, of Medicine

Mutation of p53 gene is one of the commonest genetic changes in the development of human cancer including ovary. We investigated the diagnostic usefulness of the demonstration of p53 gene immunoreactivity in ovarian cancers, because immunohistochemical demonstration of p53 immunoreactivity is inexpensive, easily controlled and can be applied in routine pathology laboratories.

p53 immunoreactivity was not identified in any patients in whom there was no morphological evidence of neoplasia. In contrast, in 46% of patients of ovarian cancer, p53 immunoreactivity was identified.

Overexpression of p53 gene correlated with advanced stage but did not correlate with grade, cell type and tumor size.

key word : ovarian cancer, p53, immunohistochemistry

I. 서론

암유전자는 정상세포의 암세포로의 전환 및 진행 관여하는 것으로 밝혀졌고 여러 연구에 의해 정상

세포에 존재하는 전암유전자(proto - oncogene)가 암 유전자로 변환되어 암을 발생시킨다고 알려져 있다.

종양억제 유전자는 세포성장의 조절에 중요한 역할을 하여 암 발생을 통제하는 역할을 하고¹⁾ 종양

억제 유전자가 돌연변이나 소실에 의해 비활성화되어 그 기능을 상실하게 되면 암 발생을 억제하는 기능이 사라져 암이 발생하는 것으로^{2,3)} 알려져 있는데 p53 유전자는 인체의 각종 암을 갖고 있는 환자들에서 가장 흔하게 나타나는 유전학적 변화로 알려져 있다.^{4,5)}

p53 유전자는 1979년 발견된 이후⁶⁾ 그 작용과 정체에 대해 논란이 많았으나, 1989년 Hinds 등에 의해 wild type p53이 종양억제유전자로 작용하고, 그의 돌연변이나 대립인자 소실이 일어나면 p53 유전자가 비활성화되고 암 발생에 억제력을 상실하게 되어 암 유발에 관여하는 것으로 알려지면서 p53은 종양억제 유전자로 확인되었다.^{2,7)}

부인암 영역에서도 p53 유전자의 발현에 대한 많은 연구가 진행되어 왔는데^{8,9)} 난소암과 관련된 연구를 보면, 1991년 Marks 등은 p53의 발현이 병기나 조직학적 분화도, 전반적인 생존율과는 관련성이 없으나 진행된 병기에서는 유의미한 상관성을 보인다¹⁰⁾ 하였고 1992년 Kihana 등은 난소암이 진행됨에 따라 p53 1유전자의 돌연변이가 발생하며 p53의 발현은 고도의 악성도와 관련된다고 하였다.¹¹⁾ Eccles 등은 p53 종양억제유전자가 상피성 난소암의 진행에서 나타나며 예후적인 중요성을 갖는다고 하였다.¹²⁾ 1993년 Kohler 등은 p53 유전자의 과표현과 돌연변이는 초기의 난소암에서보다는 진행된 난소암에서 더 자주 나타나며 난소암의 재발, 전반적인 생존율과의 관련성은 없다고 하였다.¹⁰⁾

이상에서 본 바와 같이 p53 유전자의 발현이 진행된 난소암이나 고도의 악성도와 관련되어 있다고 하나 난소암의 예후인자들과는 관련이 없다고도 하고 또 예후적인 중요성을 가질 수 있다고도 하여 아직 예후판단에서 p53 발현의 의의를 분명히 하고 있지 못한 실정이다.

이에 저자들은 비교적 적은 시간이 소요되고, 간편하게 임상적으로 검사 가능한 면역조직화학적 염색방법을 이용하여¹³⁾ 난소암환자에서 변이된 p53의 발현율과 정상난소조직에서의 발현율을 비교하였으며 또한 예후인자들과의 상관관계를 알아보고자 본 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

본 연구는 1993년 1월부터 1994년 8월까지 연세의료원 산부인과에 내원한 난소암 환자 27예와 대조군 18예(양성 난소종양 5예, 13예의 정상난소조직)을 대상으로 하였고 수술장에서 얻은 난소조직을 -70℃에서 동결 저장하여 검사를 실시하였다.

면역화학조직 염색은 DAKO사에서 나온 LSAB test를 이용하였고, 그 과정은 3%의 Hydrogen peroxide로 Endogenous peroxidase의 활성을 제거하고 Blocking serum으로 암세포 표면의 비특이적 항체 수용체를 제거한 후 Novocastras에서 나온 NCL - DO7을 p53에 대한 1차 항체로 사용하였고, link Ab를 이용하여 peroxidase - labelled streptavidin과 AEC substrate의 결합을 용이하게 하여 발색시킨 후 Hematoxiline으로 대조 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 염색 결과는 염색 유무에 따라 양성, 음성으로 하였다.

통계 처리는 Fisher's exact test로 하였고 p-value 0.05 미만인 경우에 통계학적인 의의를 갖는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. 난소암에서 p53 단백질의 과발현

양성난소조직 5예와 대조군 13예에서는 p53이 모두 발현되지 않았고(Fig. 1), 악성난소암 환자군에서는 27예 중 12예(46%)에서 p53 유전자 단백질이 과발현 되었다(Fig. 2, Table 1).

2. 임상병기별 발현 정도

초기 난소암과 진행된 병기에 따른 p53 단백질 발현은 1기와 2기에서 10예 중 4예(40%)가 발현되었고, 3기, 4기에서는 17예 중 8예(47%)에서 발현을 보여 초기 난소암에 비해 진행된 병기에 높은 발현율을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다(Table 2, 3).

3. 조직분화도에 따른 p53 단백질의 과발현

난소암의 예후인자 중의 하나인 조직분화도별로 각각의 발현을 살펴보면 세포분화가 잘되어 있는 경우 12예 중 4예(33%)에서 양성으로 발현되었고, 중간 정도의 조직분화를 보여준 6예에서는 40예

Fig. 1. No expression of p53 in ovarian cancer

Fig. 2. Overexpression of p53 in ovarian cancer

Table 1. Expression of p53

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
Ovarian tumor malignancy	12(46)	15(54)	27
benign	0	5	5
Control	0	13	13

* p<0.05

(67%)가 발현되었으며, 미분화된 조직상태를 보인 9예 중 4예(44%)에서 발현되었으나 통계적 유의성은 없었다(Table 4).

4. 세포형태별 발현

Table 2. Expression of p53 according to stage

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
I	3(33)	6(67)	9
II	1	0	1
III	4(44)	5(56)	9
IV	4(50)	4(50)	8
Total	12(46)	15(54)	27

* p>0.05

유두상 장액성 선암 8예 중 4예(50%)에서 p53이 발현되었고 점액성 선암 7예 중 3예(43%), 자궁내막양 난소암 3예 중 1예(33%), 기타 난소암 9예 중 4예(44%)에서 p53 유전자가 발현되어 특정한 세포형태와 p53의 발현은 관련성을 보이지 않았다

(Table 5).

Table 3. Expression of p53 according to stage

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
I & II	4(40)	6(60)	10
III & IV	8(47)	9(53)	17
Total	12(46)	15(54)	27

* p>0.05

Table 4. Expression of p53 according to grade

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
Well diff	4(33)	8(67)	12
Moderate diff	4(67)	2(33)	6
Poorly diff	4(44)	5(56)	9
Total	12(46)	15(54)	27

Table 5. Expression of p53 according to cell type

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
Papillary serous	4(50)	4(50)	8
Mucinous	3(43)	4(57)	7
Endometrioid	1(33)	2(67)	3
Mixed * /other	4(44)	5(56)	9
Total	12(46)	15(54)	27

* Mixed mulerian malignant tumor.

5. 병소크기별 발현

난소암의 병소 크기별로 각각의 발현을 살펴보면 병소 크기가 10cm 미만일 경우 p53은 6예 중 3예(50%), 10cm 이상에서는 21예 중 9예(43%)가 발현되어 종양의 크기와 p53의 발현도 관련성을 보이지 않았다(Table 6).

IV. 고 찰

최근 많은 관심이 집중되고 있는 종양억제유전자는 recessive oncogene, tumor suppressor gene, antioncogene 등으로 불리어지고 있는데 이들은 세포성장의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려

Table 6. Expression of p53 according to tumor size

	No. of positive(%)	No. of negative(%)	Total
>10	9(43)	12(57)	21
<10	3(50)	3(50)	6
Total	12(46)	15(54)	27

* p>0.05

져 있고 암 발생을 통제하는 역할을 하고 있으며¹⁴⁾ 대표적인 것이 RB 종양억제유전자와 p53으로, RB 종양억제유전자는 염색체 13번에 위치하며 거의 대부분의 망막아 세포종에서 관찰되고 일부 다른 암의 발생에도 관계된다고 한다. 유전자 p53은 사람의 염색체 17번의 단완에 위치하며 분자량 53k dalton의 핵인 단백을 encode 한다.¹⁵⁾

처음에 p53은 그 과표현으로 우세 암유전자로 간주되었으나 실제 그 경우 대부분이 돌연변이된 형태였고 wild type p53은 종양억제 유전자로 작용한다는 것이 알려졌다. 정상적인 p53 유전자가 기능을 상실하게 되면 in vitro에서는 세포 전환(cell transformation)이 일어나고 in vivo에서 종양의 발생과 동반된다.⁵⁾

대부분의 p53 유전자가 비활성화되는 과정은 2가지가 있는데 첫째, 단백질의 변성을 야기하는 missense mutations으로 적어도 4개의 돌연변이의 hot spots(175, 248, 273, 282)을 보이고 이는 모든 p53의 돌연변이에서 30% 정도를 차지한다.¹⁵⁾

둘째, 종양 유발 virus의 종양 단백질과 정상 p53의 상호작용에 의한 p53의 비활성화이다. 그 예로는 sv40 large T Ag, Adenovirus E1 B protein, 유두종 바이러스 E6 단백질이 있는데 1990년에 Werness 등은 유두종 바이러스와 p53의 관련에 대한 연구에서도 유두종 바이러스에 의해 encode 되는 E6 종양단백이 p53의 퇴화를 조장하여 suppressor의 작용을 억제한다고 보고한 바 있는데¹⁶⁾ 부인암 영역에서는 E6 단백질과 p53의 상호작용에 의한 p53의 비활성화가 가장 많이 알려져 있다.⁵⁾

지금까지 p53의 과표현을 wild type p53의 과표현으로 혼동하여 p53을 oncogene으로 간주한 적도 있으나, wild type p53은 6~20분 정도의 짧은 반감기 때문에 양적으로 측정되지 않아 면역조직화학적 방법으로 검색하기 힘들고, 변이된 p53은 6시간

까지 반감기의 증가로 면역조직화학적 검색이 가능하므로 우리가 과표현되었다고 하는 p53은 변이된 p53을 말한다.¹²⁾

그러므로 p53의 면역조직화학적 검색은 p53변이의 간접적인 지표가 될 수 있고 검체에서 종양억제 유전자의 비활성화를 나타낸다.^{3,15)}

대체로 유방, 대장, 간, 식도, 폐, 신장, 난소와 연조직 종양뿐만 아니라 백혈병, 임파종 등의 악성종양의 절반 이상(63% 식도암, 77% 위암, 67% 대장암, 30% 간암, 75% 담낭암)에서 p53 단백질의 과표현이 보여진다.¹⁷⁾

1990년 Iggo 등은 anti p53 Antibody pAb 240을 사용하여 40예의 폐암에서 44~82%의 p53의 과표현을 관찰하였고¹⁸⁾ 1992년 Porter 등은 monoclonal Ab를 사용하여(deparaffinized section of methacarn-fixed tissue) 면역조직화학적으로 39%의 악성종양에서 p53의 과표현을 검색하였다.¹⁹⁾ 개별적으로는 34% 유방암, 33% 연조직종양, 92% 난소암에서 검색되었고 그 형태는 homogenous, heterogenous, and focal patterns으로 다양하였다. 그리고 주변의 정상조직과 양성종양들, 또 태아세포조직에서는 p53의 과표현은 나타나지 않았음을 보여 주었다. 이와 같이 악성종양에서 모두 p53이 발현되는 것은 아니었으나 정상조직, 양성종양에서는 전혀 발현되지 않음으로 악성종양의 검색에서의 의의를 시사하였고 태아 세포조직에서 검색되지 않는 것으로 보아 p53의 변이는 악성전이와는 동반되나 악성세포 또는 정상세포의 증식 그 자체와 동반되는 것은 아님을 보여 주었다.¹⁰⁾

1992년 Eccles 등은 27예의 난소종양에서 세포형태와 병기 진행도에 따른 p53 단백질의 과표현과 이종접합성의 상실이 상관관계를 갖는다는 것을 유의수준 0.01 이하로 보여 진행된 병기의 난소암과 p53의 발현은 밀접한 관련이 있다고 하였고¹²⁾ Kihana는 24예의 난소암에서 면역조직화학검색과 flow-cytometry를 시행하여 p53 유전자의 돌연변이가 경계성 상피성난소종양(borderline ovarian tumor)에서는 전혀 보이지 않았고 난소암의 진행과 거의 동시에 발생한다고 하였으며 악성도의 정도와 관련이 있다고 하였다. 또 미분화된 상태, 진행된 병기, 전이된 정도에 따라 p53의 축적이 가속화된다고 하기도 하였다.²⁰⁾

이상에서와 같이 분자생물학적인 검사방법이 많은 시간을 들여야 하고 특수 기구나 숙련된 기술을 요구할 뿐만 아니라 많은 비용이 들고 실제 임상적으로는 이용하기 어려운 반면, 최근 들어 면역조직화학적 검사방법은 양성종양이나 정상세포로부터 악성 세포의 구별뿐만 아니라 암의 진행이나 그 예후인자와의 관련 여부를 조사하는 데 적은 비용으로 쉽게 검사가 가능하므로 암 진단에서의 유용성과 임상양상, 치료 및 예후인자와의 관련 등을 조사하여, 임상적으로 많이 이용되고 있다.¹³⁾

Kohler 등은 약 10년 동안의 초기 상피성난소암 환자 52예를 대상으로 p53 발현의 임상적 의의를 살펴보고 있는데, 병기의 진행, 종양세포의 크기와 고위험군에서 p53의 발현은 상관관계를 가지며 세포 분화도나 세포형태와 유의미한 상관성은 없다고 하였다.¹⁰⁾

본 연구에서도 46%의 난소암환자에서 p53 유전자가 과발현되었는데 병기진행에 따라 p53 유전자의 과표현율은 증가되었으나, 통계적인 유의성은 없었고 세포형태, 조직분화도, 병소크기에 따른 p53의 발현은 상관성을 보이지 않았다.

V. 결론

결론적으로 p53 유전자 단백질은 대조군에서는 전혀 발현되지 않은 반면, 난소암조직에서는 27예 중 12예(46%)에서 의의있게 발현되어, p53 유전자가 난소암의 악성화에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었으나, p53 유전자의 과발현과 임상병기, 조직분화도, 세포형태 및 병소크기 등의 임상적 예후인자들와의 상관성을 살펴본 바 통계적 유의성을 보여 주지는 않았다.

추후 p53 유전자 과발현이 난소암에 있어 불량한 예후인자로 규명되기 위해서는 보다 많은 증례의 전향적인 연구와 장기간의 추적관찰에 의한 생존율에 대한 관찰이 필요할 것으로 생각된다.

- References -

1. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al. : Participation of

- p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984 ; 312 : 646~9.
2. Nigro J, Baker SJ, Preisinger AC, et al. : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989 ; 342 : 705.
 3. Milner J, Medicalf EA, Cook AC : Tumor suppressor p53 analysis of wild type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 12.
 4. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. : p53 mutation in human cancers. *Science* 1991 ; 253 : 49.
 5. Chang F, Syrjanen S, Krunen K, et al. : The p53 Tumor Suppressor Gene as a Common Cellular target in human carcinogenesis. *AM. J. of Gastroenterology* 1993 ; vol 88 : 174.
 6. Lane D, et al. : T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cells. *Nature* 1979 ; 278 : 261.
 7. Finlay C, Hinds P, Levine A : The p53 proto-oncogene can act as a supressor of transformation. *Cell* 1989 ; 57 : 1083.
 8. Tsuda H, Hirohashi S : Frequent Occurence of p53 Gene Mutation in Uterine Cancers at Advanced Clinical Stage and with Aggressive Histological Phenotypes. *Jpn J Cancer res.* 1992 ; 83 : 1184.
 9. Yaginuma Y, Westphal H : Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Reserch* 1991 ; 51 : 6506.
 10. Kohler MF, Kerns BM, Humphrey PA, Marks JR, Bast RC, Berchuck A : Mutation and Overexpression of p53 in Early Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology* 1993 ; 81(5) : 643.
 11. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S : High incidence of p53 Gene Mutation in Human Ovarian Cancer and Its Association with Nuclear Accumulation of p53 Protein and Tumor DNA Aneuploidy. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992 ; 83 : 978.
 12. Eccles DM, Brett L, Lessells A, Gruber L, Lane D, Steel CM, et al. : Overexpression of the p53 protein and allele loss at 17p13 in ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* 1992 ; 65 : 40.
 13. Hall PA, Ray A, Lemoine NR, et al. : p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology *The Lancet* 1991 ; 338 : 513.
 14. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, et al. : Wild type p53 can inhibit oncogene mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 8763.
 15. Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991 ; 351 : 453.
 16. Werness BA, Levine AJ, Howley PM : Association of papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990 ; 248 : 76.
 17. Yandel DW, Thor AD : p53 analysis in diagnostic pathology *Diagnostic Molecular Pathology* 1992 ; 140 : 145.
 18. Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990 ; 335 : 675.
 19. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, et al. : Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J of Pathology* 1992 ; 140 : 145.
 20. Kupryjanczyk J, Thor AD, Beauchamp R, Merritt V, Edgerton SM, Bell DA, Yandell DW : p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993 ; 90 : 4961.