

## 비소세포 폐암에서의 p53 단백질 발현 양상

충남대학교 의과대학 내과학교실, 계명대학교 의과대학 해부병리학교실\*

김선영 · 홍석철 · 한표성 · 이종진  
조해정 · 김애경 · 김주옥 · 이상숙\*

= Abstract =

### p53 Expression Patterns in Non-small Cell Lung Cancers

Sun Young Kim, M.D., Seok Cheol Hong, M.D., Pyo Seong Han, M.D., Jong Jin Lee, M.D.  
Hai Jeong Cho, M.D., Ae Kyoung Kim, M.D., Ju Ock Kim, M.D. and Sang Sook Lee, M.D.\*

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

\*Department of Anatomical Pathology, College of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

**Background:** p53 is currently considered as a tumor suppressive gene product, and its alterations are suggested to be involved in several human malignancies, including non-small cell lung cancers. p53 expression rates are variable in many reports and among cell types. Also, whether the phase of p53 expression is early or late during carcinogenesis is not certain. Thus, We have investigated to evaluate p53 expression rates of the various cell types and tissues and identify expression phase (early or late).

**Method:** We obtained 71 tissue from 50 non-small cell lung cancer patients and performed the simple immunohistochemical staining using nonspecific monoclonal antibody (NCL-p53DO7).

**Results:**

- 1) In non-small cell lung cancer patients. the expression rate of lungs (46.5%) is higher than that (25.0%) of lymph nodes. But, there is no significant difference between two groups.
- 2) Among the various cell types, p53 expression rates in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma are 58.3% and 50.0% respectively without significant difference.
- 3) p53 expression rates in various stages are 33.3%, 60.0%, 40.0%, 60.0% and 66.7% in stage I, II, IIIa, IIIb and IV, respectively with no significant difference.
- 4) p53 expression rates in the various T parameters are 33.3%, 50.0%, 16.7% and 100% in T1, T2, T3 and T4, respectively and p53 expression rates in the various N parameters are 27.3%, 22.2% and 25.0% in N1, N2 and N3, respectively. There are no significant differences in the expression rates among various T & N parameters.
- 5) p53 expression rates of lymph nodes in patients who have positive stains in lungs are 12.5% and 50.0% in N1 and N2.
- 6) p53 expression rates of all lymph nodes in patients who have negative stains in lungs are 0.0%.

**Conclusion:** The above results show that p53 expression rate in non-small cell lung cancers is not correlated with cell type and progression of stage and it is thought to need further investigations about at what phase p53 expression influences the development and progression of lung cancers.

**Key Words:** p53 protein expression rate, Non-small cell lung cancer Tumor suppressive Gene, Immunohistochemistry

## 서 론

지난 수 년 동안 종양의 발생과 진행에 있어서 p53 유전자와 이의 기능에 대한 관심이 높아져 오고 있다. 처음에는 p53 유전자가 종양 유전자(oncogene)로 생각되었으나, 현재는 세포의 성장을 억제하고 분화를 촉진하는 종양 억제 유전자(tumor suppressive gene)로 받아들여지고 있다<sup>1)</sup>. 그러나, 이 유전자가 점성 돌연변이(point mutations)<sup>2,3)</sup>, 결실(deletions)<sup>2,4)</sup> 또는 재배열(rearrangements)<sup>2,5,6)</sup>되면 종양 억제 기능의 소실에 따라 세포들의 악성변화를 용이하게 하는 종양 유전자가 된다<sup>7)</sup>. 실질적으로 돌연변이된 p53 유전자가 직접적인 종양 발생 효과를 갖고 있어<sup>8)</sup>, 여러 암발생에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되며, 이의 예로서는 대장암<sup>4)</sup>, 유방암<sup>9)</sup>, 방광암<sup>10)</sup>, 뇌종양<sup>11)</sup> 및 폐암 등<sup>12)</sup>이 있다.

비소세포 폐암에서의 p53 발현율은 저자의 보고마다 차이가 있어 35.9%<sup>13)</sup>에서 74%<sup>14)</sup>이며, 세포형에 따른 발현율의 차이도 보고되고 있어 Iggo 등<sup>12)</sup>은 편평 세포암에서의 발현율이 82%로 선암의 57%에 비해 높다고 하였다. 또한, 성 등<sup>15)</sup>은 대상 환자수는 적었지만 병기가 진행할수록 발현율의 빈도가 증가하는 추세를 보인다고 보고하였으며, Fontanini 등<sup>13)</sup>은 폐문 및 종격동 임파절 침범이 있는 환자군에서의 p53 발현율이 임파절 침범이 없는 군에서 보다 유의하게 높았고, 더우기 p53 발현이 수술후 병기와 유의한 상관 관계를 보인다고 하였다. 따라서, 비소세포 폐암에서의 p53 발현 증가는 다소 후기 발현(late expression)에 관여한다고 하였다. Morkve 등<sup>16)</sup>은 낮은 병기(low stage)의 비소세포 폐암에서 p53이 유용한 하나의 예후적 지표가 될 수 있다고 하였다. 그러나, 동일한 세포형내에서의 서로 다른 조직에서의 p53 발현율의 차이에 관한 보고는 없다.

Iggo 등<sup>12)</sup>의 연구에 의하면 p53 돌연변이는 단일 부위에 국한되는 것이 아니기 때문에 p53 돌연변이를 확인하기 위한 유용한 방법으로 핵산에 근거한 접근방법보다는 면역조직화학법이 될 것이라고 하였다. p53 산물의 각기 다른 epitopes에 대한 단일클론 항체의 발달이 세포 및 조직에서의 면역조직화학적 검출을 가능케 하였다<sup>17)</sup>.

따라서, 본 연구는 면역조직화학 염색을 이용하여

p53 유전자 발현과 비소세포 폐암과의 연관성 즉, p53 유전자가 폐조직의 악성화 과정에 기여하는지의 여부를 확인하기 위해, 그리고 p53 유전자 발현율이 서로 다른 세포형에서의 폐조직과 임파조직에서의 차이가 있는지를 알아보기 위해, 또한 p53 유전자가 종양 발생에 있어서 후기에 관여하여 증식 속도와 나쁜 예후 인자와 어떤 관계를 갖는지를 규명하기 위해 시작하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

대상환자는 수술받은 환자 43명과 수술받지 않은 환자 7명으로 총 50명이었다. 대상 조직 슬라이드의 수는 폐조직, 림프조직 및 늑막을 포함한 연부조직이 각각 43, 24, 4개로 총 71개였다. 각 환자의 병기 결정은 TNM 분류<sup>18)</sup>에 따랐다.

### 2. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직을 60°C에서 30분내지 한시간 정도 데우고, 파라핀 제거를 위해 100% xylene에 또한 탈수 및 고정을 위해 100% 알코올에 각각 5분씩 3회 처리한 후 90%와 75% 알코올에 각 5분씩 처리하였다. 비특이적 결합을 배제하기 위해 3% bovine serum albumin으로 처리후 30분간 실온에 두었고, 일차 항체로 자연형(wild type)과 돌연변이형(mutant type)모두를 포착할 수 있는 p53(Novocastra NCL-p53-DO7)을 PBS(1:100)로 희석하여 2시간동안 37°C의 수조에 둔 다음, pH 8인 TBS로 수세후 이차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(Vector 1:200)로 처리한 후 37°C에서 30분간 incubation을 시행하였다. TBS로 수세후 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin(Vector 1:200)로 처리후 37°C에서 30분간 보온하고, TBS로 수세후 new-fuchsin(Dako kit) with levamisole(10  $\mu$ l/ml)로 처리한 후 0.1% methyl green으로 염색을 시행하였다.

### 3. 면역조직화학적 검사(Immunohistochemical Evaluation)

각각의 종양에 대한 면역조직화학적 검사는 양성세포의 비율에 근거하였다. 모든 면역 염색된 조직 절편

(immunostained sections)에 최소 400개 이상의 세포를 임의로 선정하여 400배 또는 1,000배로 검사하였다. p53 면역반응도는 음성 (negative), 낮음 (low, 1~20%), 중간(intermediate, 21~60%) 및 높음(high, >60%)으로 구분하였다<sup>13)</sup>.

## 결 과

본 연구에 포함된 대상 환자수와 조직 슬라이드 수는

**Table 1. Patients Characteristics**

| Categories                   | Number | Percent (%) |
|------------------------------|--------|-------------|
| Sex                          |        |             |
| Males                        | 41     | 82.0        |
| Females                      | 9      | 18.0        |
| Age                          |        |             |
| <50 years                    | 6      | 12.0        |
| ≥50 years                    | 44     | 88.0        |
| Cell Types                   |        |             |
| Squamous cell carcinoma      | 27     | 54.0        |
| Adenocarcinoma               | 12     | 24.0        |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 5      | 10.0        |
| Large cell carcinoma         | 3      | 6.0         |
| Adenosquamous carcinoma      | 1      | 2.0         |
| Mixed type*                  | 1      | 2.0         |
| Unclassified**               | 1      | 2.0         |
| Stages                       |        |             |
| I                            | 15     | 30.0        |
| II                           | 11     | 22.0        |
| IIIA                         | 11     | 22.0        |
| IIIB                         | 7      | 14.0        |
| IV                           | 6      | 12.0        |

\*Mixed type: Squamous cell carcinoma & Large cell carcinoma

\*\*Unclassified: Non-small cell lung cancer

각각 50명과 71개로 환자의 중간 연령 (median age)은 58세(36~76세)이며 성비는 남자가 각각 82%(41/50)와 18%(9/50)이었다. 세포형에 따른 분포는 편평 세포암, 선암 및 기관지 폐포암이 각각 54%(27/50), 24%(12/50) 및 10%(5/50)이었다. 병기결정은 TNM 분류에 근거한 International Staging System<sup>18)</sup>을 이용하였으며, 병기에 따른 분포는 I기, II기, IIIA기, IIIB기 및 IV기가 각각 30%(15/50), 22%(11/50), 14%(7/50) 및 12%(6/50)였다 (Table 1).

조직에 따른 면역염색 발현율은 폐와 림프절에서 각각 46.5%(20/43)와 25.0%(6/24)로 폐에서 양성율이 높은 경향이 있으나 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수는 없었다(p=0.057, Table 2).

폐조직에서의 anti-p53 항체에 의한 면역염색의 결과는 남자와 여자에서 각각 51.4%와 25.0%의 발현율을, 50세 미만에서는 33.3%의 그리고 50세 이상에서는 48.7%의 발현율을 보였다. 그러나, 성별과 연령에 따른 유의한 차이는 없었다. 세포형에 따른 발현율의 편평 상피암과 선암에서는 각각 58.3%와 50.0%였으나, 기관지 폐포암 및 대세포암에서는 양성반응을 보이지 않았으며, 세포형에 따른 발현율의 유의한 차이도 관찰할 수 없었다 (Table 3). 또한, 병기에 따른 발현율은 I기, II기, IIIA기, IIIB기 및 IV기에서 각각 33.3%, 60.0%, 40.0%, 60.0% 및 66.7%로 병기에 따른 발현율의 유의한 차이는 없었고 (Table 4), 낮은 병기 (I기와 II기)와 진행된 병기 (IIIA, IIIB 및 IV) 간에도 유의한 차이는 없었다. 또한, 폐조직에서 T지표에 따른 발현율은 T1, T2, T3 및 T4 각각에서 33.3%, 50.0%, 16.7% 및 100%로 T4에서 발현율이 높았으나, 대상환자수가 적어 의의를 둘 수는 없었다 (Table 4).

면역염색 결과상 폐조직에서의 발현율이 중간(intermediate)과 높음 (high)으로 나온 환자들을 대상으로 시행한 성, 연령, 세포형 및 병기에 따른 양성율의 유의한

**Table 2. Tumor Stainings of Lung Tissues, Lymph Nodes & Other Tissues with Anti-p53 Antibody**

|             | p53 expression |     |              |      | Total (%) |
|-------------|----------------|-----|--------------|------|-----------|
|             | Negative       | Low | Intermediate | high |           |
| Lungs       | 23             | 9   | 5            | 6    | 20(46.0)  |
| Lymph nodes | 18             | 2   | 3            | 1    | 6(25.0)   |
| Others*     | 3              | 1   | 0            | 0    | 1(25.0)   |

\*Others: Chest walls & Pleurae

**Table 3. Tumor Stainings of Lung Tissues with anti-p53 Antibody according to Sex, Age & Cell Types**

|                              | p53 expression |     |              |      | Total(%) |
|------------------------------|----------------|-----|--------------|------|----------|
|                              | Negative       | Low | Intermediate | High |          |
| <b>Sex</b>                   |                |     |              |      |          |
| Male                         | 17             | 9   | 5            | 4    | 18(51.4) |
| Female                       | 6              | 0   | 0            | 2    | 2(25.0)  |
| <b>Age</b>                   |                |     |              |      |          |
| <50 years                    | 4              | 0   | 1            | 1    | 2(33.3)  |
| ≥50 years                    | 19             | 9   | 4            | 5    | 18(48.7) |
| <b>Cell Types</b>            |                |     |              |      |          |
| Squamous cell carcinoma      | 10             | 6   | 4            | 4    | 14(58.3) |
| Andenocarcinoma              | 5              | 2   | 1            | 2    | 5(50.0)  |
| Bronchioloalveolar carcinoma | 5              | 0   | 0            | 0    | 0( 0.0)  |
| Large cell carcinoma         | 2              | 0   | 0            | 0    | 0( 0.0)  |
| Adenosquamous carcinoma      | 1              | 0   | 0            | 0    | 0( 0.0)  |
| Mixed type*                  | 82             | 1   | 0            | 0    | 1( 100)  |

\*Mixed type: Squamous cell carcinoma & Large cell carcinoma

**Table 4. Tumor Stainings of Lung Tissues with Anti-p53 Antibody according to Stages & T Parameters**

|                     | p53 expression |     |              |      | Total(%) |
|---------------------|----------------|-----|--------------|------|----------|
|                     | Negative       | Low | Intermediate | High |          |
| <b>Stages</b>       |                |     |              |      |          |
| I                   | 10             | 1   | 3            | 1    | 5(33.3)  |
| II                  | 4              | 4   | 0            | 2    | 6(60.0)  |
| III A               | 6              | 2   | 0            | 2    | 4(40.0)  |
| III B               | 2              | 0   | 2            | 1    | 3(60.0)  |
| IV                  | 1              | 2   | 0            | 0    | 2(66.7)  |
| <b>T parameters</b> |                |     |              |      |          |
| T1                  | 2              | 1   | 0            | 0    | 1(33.3)  |
| T2                  | 16             | 7   | 4            | 5    | 16(50.0) |
| T3                  | 5              | 1   | 0            | 0    | 1(16.7)  |
| T4                  | 0              | 0   | 1            | 1    | 2( 100)  |

**Table 5. Tumor Staining of Lymph Nodes with Anti-p53 Antibody according to N Parameters**

|    | p53 expression |     |              |      | Total(%) |
|----|----------------|-----|--------------|------|----------|
|    | Negative       | Low | Intermediate | High |          |
| N1 | 8              | 1   | 1            | 1    | 3(27.3)  |
| N2 | 7              | 1   | 1            | 0    | 2(22.2)  |
| N3 | 3              | 0   | 1            | 0    | 1(25.0)  |

차이는 없었다.

율은 N1, N2 및 N3가 각각 27.3%, 22.2% 및 25.0%

림프절 침범이 있는 환자군에서 N 지표에 따른 발현

이었고, 발현율의 유의한 차이는 없었다(Table 5).

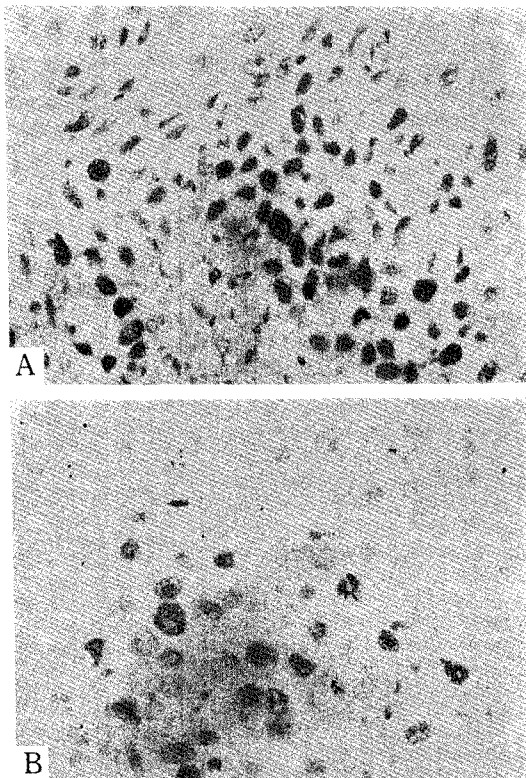
**Table 6. Tumor Stainings of Lymph Nodes with Anti-p53 Antibody in Patients Who Have Positive Stains in Lungs**

| Cases | Age/Sex | Cell Types | Stages       | N1  | N2  | N3 |
|-------|---------|------------|--------------|-----|-----|----|
| 1     | 50/M    | ADCA       | T2N1MO(II)   | 0/1 | —   | —  |
| 2     | 54/M    | SQCA       | T2N1MO(II)   | 0/1 | —   | —  |
| 3     | 55/M    | SQCA       | T4N1MO(IIIb) | 0/1 | —   | —  |
| 4     | 57/M    | Mixed      | T3N1MO(IIIa) | 1/3 | —   | —  |
| 5     | 65/F    | SQCA       | T2N2MO(IIIa) | —   | 2/2 | —  |
| 6     | 63/M    | SQCA       | T2N1MO(II)   | 0/1 | —   | —  |
| 7     | 64/M    | ADCA       | T2N2MO(IIIa) | 0/1 | 0/2 | —  |

SQCA: Squamous cell carcinoma

ADCA: Adenocarcinoma

Mixed type: Squamous cell carcinoma & Large cell carcinoma



**Fig. 1.** Tumor staining of lymph node with anti-p53 antibody in a patient who has positive stain in lung.

This figure shows that immunohistochemical staining of lymph node (A) with nonspecific monoclonal antibody (NCL-p53-DO7) is positive in a patient who has positive stain in lung (B). (Methyl green counterstain,  $\times 400$ )

폐조직에서 양성반응을 보인 환자들에서의 림프절 침범에 따른 발현율은 N1, N2에서 12.5% (1/8)와 50.0% (2/4)이었으며 (Table 6, Fig. 1), 폐조직에서 음성반응을 보인 모든 환자들에서 림프절 침범에 따른 발현율은 0.0%이었다 (Table 7).

## 고 찰

K-ras<sup>(19)</sup>, N-myc<sup>(20)</sup> 및 epidermal growth factor receptor<sup>(21,22)</sup>를 포함하는 여러 종양 유전자의 비정상적인 발현이 원발성 폐암에서 보고되고 있다. 그러나, 단지 소수의 종양에서 점성 돌연변이 또는 유전자 증폭을 보이며, 대부분의 폐암에서 암발생 기전이 알려지지 않고 있다. 따라서, 세포 증식을 정상적으로 조절하는데 필요하며, 결여 또는 중화시 악성변화를 초래하는 종양 억제 유전자의 기능에 많은 관심이 모아지게 되었다. 모든 조직형태의 폐암에서 이러한 종양 억제 유전자로 작용하는 것으로 p53<sup>(7)</sup>과 망막모세포종 유전자<sup>(23)</sup>가 있고, 이중 p53 유전자는 17번 염색체의 단완(17p-13)에 위치하는 핵질 인산단백<sup>(24)</sup>으로 정상적으로 항상 세포핵내에서만 발견된다<sup>(2,3,25,26)</sup>. p53 유전자의 변화를 빈번히 일으키는 종양으로서 육종<sup>(27)</sup>, 대장암<sup>(4)</sup>, 유방암<sup>(9)</sup>, 성상세포종<sup>(25)</sup>, 간암<sup>(28)</sup>, 백혈병<sup>(29,30)</sup> 및 폐암 등<sup>(2,12)</sup>이 있다.

p53 유전자는 많은 산발적인 그리고 유전적인 형태의 인간 종양과 관련되어 있으며, 이중 가장 많이 연구되어 온 것은 대장암으로 75~80%에서 두개의 대립형질 모두가 소실(하나는 결실, 다른 하나는 점성 돌연변이)되

**Table 7. Tumor Stainings of Lymph Nodes with Anti-p53 Antibody in Patients Who Have Negative Stains in Lungs**

| Cases | Age/Sex | Cell Types | Stages       | N1  | N2  | N3 |
|-------|---------|------------|--------------|-----|-----|----|
| 1     | 52/M    | SQCA       | T2N1MO(II)   | 0/1 | -   | -  |
| 2     | 76/F    | ADCA       | T1N2MO(IIIa) | -   | 0/1 | -  |
| 3     | 59/M    | LCCA       | T3N2MO(IIIa) | -   | 0/1 | -  |
| 4     | 58/M    | SQCA       | T2N3MO(IIIb) | -   | 0/2 | -  |
| 5     | 58/M    | SQCA       | T2N3MO(IIIb) | 0/1 | 0/1 | -  |

어 있다<sup>7)</sup>. 이런 점성 돌연변이는 대개 과오돌연변이로 단백질의 변화를 초래한다<sup>3,31)</sup>. 이중이식과 여러 종양에서 유도된 세포에서 인간 p53 유전자의 점성 돌연변이의 위치를 살펴보면 여러 특징을 갖는 것을 알 수 있다. 첫째는, 대부분이 과오 돌연변이로 단백질 변화를 유도하며, 둘째로, 돌연변이는 무작위로 분포되어 있지 않다는 점이다. 즉, 대부분이 393 codons 중에서 아미노산 잔기가 130에서 190사이에 집중되어 있다<sup>30)</sup>. 이런 돌연변이의 대부분은 단백질의 4부위(잔기 117~142, 171~181, 234~258 및 270~286)에 국한되어 있고 이것은 서로 다른 여러 종(species)간에도 고도로 보존되어 있다. 결국 최소 3개의 돌연변이 “hot spots”이 있어, 잔기 175, 248 및 273을 침범한다. 이런 hot spots의 빈도와 분포는 서로 다른 조직 형태의 종양간에 차이가 있는데 이러한 이유가 왜 있는지는 밝혀져 있지 않다<sup>7)</sup>.

p53 돌연변이가 일어나는 유전형태의 종양으로서 Li-Fraumeni 증후군이 있으며<sup>32,33)</sup>, 이는 상염색체 우성으로 유전되는 드문 질환으로 그 특징은 몸의 여러 다른 부위에서 다양한 종양이 발생한다는 점이다. 이와 관련된 가족은 높은 암 발생율을 보이며, 이 모두는 codons 245와 258사이에 집중되는 p53 돌연변이를 갖고 있다. 이런 유전 형태의 p53 돌연변이를 갖는 환자에서 일차성 암에 대한 화학요법 또는 방사선 치료가 이차성 원발성 암발생의 소인이 된다는 보고가 있다<sup>34)</sup>.

치료에 따른 p53 돌연변이의 예로서 치료후에 속발하는 급성 골수성 백혈병이 있다. 즉, 17번 염색체의 전체적인 소실 또는 17번 염색체 단완의 결실은 급성 골수성 백혈병에서 비교적 흔치 않은 소견이나, 화학요법 또는 방사선 치료후에 속발하는 급성 골수성 백혈병의 경우에는 보다 빈번하게 나타날 수 있다<sup>35,36)</sup>.

p53은 정상세포에서 세포염색시 관찰할 수 없는 양(level)이 확립되지는 못했지만 대략 세포당 5,000 분자

정도로 너무 낮기 때문에 생각된다<sup>12)</sup>. p53의 발현이 증가되는 이유는 합성증가에 의하기 보다는 바이러스성 종양 유전자(viral oncogenes)와의 결합 또는 돌연변이에 기인한 단백질의 안정화 때문으로 생각하고 있다<sup>37,38)</sup>. 즉, 정상적인 p53은 정상 세포내에서의 반감기가 6~20분으로 짧으나, 바이러스 전환체내에서 p53이 SV40 바이러스의 주요 전환 단백질인 큰 T항원과 결합하여 반감기가 48시간으로 연장되어 발견된다. 이에 반하여 돌연변이된 p53은 큰 T항원과 결합하지 않으며 세포내의 반감기는 자연형태의 p53에 비해 길어 돌연변이된 p53 단백질 훨씬 높은 안정성을 갖게된다<sup>25)</sup>. 돌연변이된 p53은 상동성 결실(homozygous deletion)<sup>2)</sup>과 재배열(rearrangements) 등<sup>2,5,6)</sup>의 gross DNA 이상과 아미노산 치환을 초래하는 점성 돌연변이 등<sup>2~4,17)</sup>에 의해 생기며, 전자의 예로서는 골육종, 폐암, 만성 골수성 백혈병 등이며, 후자의 예로서는 폐암, 대장암, 유방암 등이 있다. 정상 p53 단백질이 항상 세포핵내에서 발견되거나 돌연변이된 유전자는 때때로 세포질과 핵내에서 발견되는데 이는 아마도 hsp70과의 연관관계에 의하는 것으로 생각된다<sup>39)</sup>. Iggo 등<sup>12)</sup>의 연구에 의하면 p53 돌연변이는 단일 부위에 국한되는 것이 아니기 때문에 p53 돌연변이를 확인하기 위한 유용한 방법으로 핵산에 근거한 접근방법보다는 면역조직화학법이 될 것이라고 하였다. p53 산물의 각기 다른 epitopes에 대한 단일클론 항체의 발달이 세포 및 조직에서의 면역조직화학적 검출을 가능케 하였다<sup>17)</sup>. 이런 항체의 예로서 PAb240 및 PAb1801과 PAb421이 있고, 각각이 인지하는 epitope의 위치는 P53 아미노산 잔기 156~335사이, 32~79사이 및 370~378사이이며, PAb240은 돌연변이된 p53에 특이성을 갖으나 PAb1801과 PAb421은 비특이적이다<sup>39)</sup>. 그럼에도 불구하고 후자들이 많이 쓰이는 이유는 정상 산물의 반감기가 짧아 돌연변이형만이 면역 조직화학적

방법으로 검출되기 때문으로 생각하고 있다.

자연형(wild-type)의 p53은 바이러스성 또는 세포성 종양유전자에 의해 배양중인 세포의 변형을 억제하며, 배양중인 변형된 세포에 정상 p53 투여시 세포주기의 유사분열 시기뒤의 G1기에서 S기로 들어가지 못하게 하여 세포증식을 중단케 한다<sup>7,40~42</sup>. 돌연변이된 p53의 작용 기전으로서 마우스에서 잔기 135가 Ala에서 Val로 돌연변이된 p53은 온도에 민감하여 32°C에서는 자연형의 단백질처럼 작용하여 세포핵내로 이동하여 세포증식을 중단시키는데 비해, 37~39.5°C에서는 돌연변이된 p53 단백질은 세포질내에 국한된다. 이런 결과를 설명하기 위해 제안되어온 두가지 가설로서는 첫째, 돌연변이단백(mutant protein)이 자연형태 단백질(wild type subunit)과 올리고머 복합체를 형성한다<sup>11</sup>는 점이다. 따라서, 돌연변이 단백질이 충분히 있는 경우 자연형태 단백질의 기능을 방해하여 소실형 변이(dominant loss-of-function mutation)를 나타내게 된다. 둘째로, 돌연변이된 p53은 소량의 자연형태의 p53에 의한 음성 조절을 극복하는 새로운 기능을 획득하게 되는데 이를 획득형 변이(gain-of-function mutations)라 한다. 이 두 가설은 다르므로 생각할 수 없으며 또한 한 세포에서의 돌연변이와 자연 형태의 p53비가 세포분열 조절에 중요하다<sup>7</sup>.

Iggo 등<sup>12</sup>은 PAb240을 이용하여 편평 세포암과 선암에서의 발현율을 각각 82%와 57%로 높게 보고하였고, Mitsudomi 등은<sup>14</sup> PCR-SSCP를 이용하여 비소세포 폐암에서의 발현율을 74%로 높게 보고하였으나, Iggo 등<sup>12</sup>의 보고와는 달리 편평 세포암과 선암간의 발현율의 차이를 발견할 수는 없다고 하였다. 또한, 비소세포 폐암에서의 p53 발현율에 대한 보고에서 저자마다 차이가 있어, Chiba 등<sup>26</sup>은 RNase 방어정량법과 cDNA 배열 순서법을 이용하여 45%의 발현율을, Kishimoto 등<sup>43</sup>은 PCR-SSCP를 이용하여 52%의 발현율을, Quinlan 등<sup>44</sup>은 PAb1801을 이용하여 43%의 발현율을, Caamano 등<sup>45</sup>은 PAb1801과 PAb421을 이용하여 약 50%의 발현율을, Fontanini 등<sup>13</sup>은 PAb1801과 PAb240을 이용하여 각각 68%와 35.9%의 발현율을 그리고 이 등<sup>46</sup>은 p53(Ab-3)을 이용하여 50.0%의 발현율을 보고 하였다. 본 연구에서는 돌연변이된 p53에 비특이적인 항체를 이용한 폐조직에서의 전체적인 p53 발현율이 46.5%(20/43)로 비교적 다른 저자들의 보고와 유사하였으며, 림프절에서의 25.0%(6/24) 발현율에 비해서는

높은 경향이 있었으나 유의한 차이는 없었다(Table 2).

성 등<sup>15</sup>은 폐의 편평상피암과 선암에서 55.2%의 발현율을 보고하면서 대상환자수는 적었지만 병기에 따른 발현율이 I기, II기, IIIa기 및 IIIb기 환자 각각에서 40%, 57%, 73% 및 100%로 병기가 진행할수록 발현율의 빈도가 증가하는 추세를 보인다고 하였다. Fontanini 등<sup>13</sup>은 폐문 및 종격동 림프절 침범이 있는 환자군에서의 p53 발현율이 림프절 침범이 없는군에서 보다 유의하게 높았고, 더우기 p53 발현이 수술후 병기와 유의한 상관관계를 보인다고 하였다. 따라서, 비소세포 폐암에서의 p53 발현 증가는 다소 후기 발현에 관여하며, 결론적으로는 p53 유전자 발현에 관한 연구를 통해 절제 가능한 비소세포 폐암환자에서 보다 나쁜 예후성향을 갖는 환자를 인지하는데 도움을 줄 수 있을 것이라 하였다. Morkve 등<sup>16</sup>의 보고에 의하면 p53 발현이 없거나 지극히 높을 때가 중등도로 발현될 때보다 유의하게 나은 예후를 보인다고 하면서, 결론적으로 p53은 단일클론 항체인 PAb1801을 이용한 낮은 병기의 비소세포 폐암에서 유용한 예후 지표가 될 수 있다고 하였다. 또한, p53 발현율이 5년 생존을 예측하는 최선의 지표라고 하였다. Harris의 보고도<sup>25</sup> p53 유전자가 후기에 관여하여 빠른 증식속도와 나쁜 예후 인자로서 작용할 수 있다고 하였다. Iggo 등<sup>12</sup>은 세포질 p53 염색은 예후가 특히 불량한 소세포암에서 가장 두드러지며, 따라서 이러한 소견이 다른 조직 형태의 폐암에서 특별히 불량한 예후를 나타내는 경우와 어떠한 연관성이 있는지 조사해 보는 것도 흥미있는 일이라 하였다. Marchetti 등<sup>47</sup>은 p53 발현율이 폐문 및 종격동 림프절 침범과 유의한 상관관계가 있어 비소세포 폐암에서 p53 발현이 종양의 나쁜 예후의 한 지표가 될 수 있을 것이라고 보고하면서, p53 발현이 병기가 진행되면서 그 빈도가 증가함에도 불구하고 stage I에서 발현율이 60%로 높았기 때문에 p53 돌연변이는 특히 나쁜 예후 인자를 갖는 종양형의 조기 발현일 것이라고 하였다. Caamano 등<sup>45</sup>은 늑막 및 흉벽 그리고 림프절 전이 유무에 따른 p53 발현율을 조사하여, 면역 반응 정도와 전이정도간의 상관관계를 알아보았으나, 유의한 상관관계가 없음을 보고하였고, 더우기 Chiba 등<sup>26</sup>은 조기와 후기(early and late stage)에 있어서의 p53 돌연변이 빈도가 유사하며 p53이 종양진행(tumor progression)과정에 중요한 역할을 담당하지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서는 병기와

N 지표에 따른 발현율 사이에 유의한 차이는 없었으며 (Table 4 & 5), T 지표에 따른 발현율은 T1, T2, T3 및 T4에서 각각 33.3%, 50.0%, 16.7% 및 100%로 T4에서의 발현율이 높았으나, 대상 환자수가 적어 의의를 둘 수는 없었다 (Table 4). 폐조직에서 양성반응을 보인 환자들에서의 림프절 침범에 따른 발현율은 N1, N2에서 12.5%와 50.0%이었으나 (Table 6), 폐조직에서 음성반응을 보인 모든 환자들에서의 림프절 침범에 따른 발현율은 0.0%이었다 (Table 7). 병기 진행에 따른 p53 발현율의 유의한 증가가 없고 (Table 4), 원발 부위인 폐조직에서 p53이 발현된 환자들에서는 림프절에서의 발현율이 25% (3/12) 이었는데 (Table 6) 반해 0% (0/7) 이었다 (Table 7). 이러한 결과가 폐에서 먼저 p53 발현이 일어난 후 림프절에서의 발현이 일어나는 것을 의미하는지에 대해서는 추후 보다 많은 증례에서 검토되어야 할 것으로 생각되었다.

Chiba 등<sup>26)</sup>은 p53 돌연변이와 젊은 연령 및 편평 세포암간의 연관성을 발견하였으나, 병기, 림프절 침범 및 성에 따른 차이는 발견할 수 없었다. 그러나 Morkve 등<sup>10)</sup>은 p53 발현율과 성, 연령, 세포형 및 병기에 따른 유의한 상관관계는 없다고 하였고, Mitsudomi 등<sup>14)</sup>은 연령, 성 및 세포형에 따른 차이는 없다고 하였으며, Suzuki 등<sup>48)</sup>은 연령, 성 및 세포형에 따른 차이는 없다고 하였다. 본 연구에서도 성, 연령 및 세포형에 따른 유의한 발현율의 차이를 발견할 수 없었다 (Table 3).

p53 유전자의 다른 유전자 및 에후와의 상호작용은 아직도 분명치 않고 새로운 치료적 접근, 즉, 유전자 치료나 또는 돌연변이된 p53에 특이성이 있는 세포매개 면역반응의 유도에 의해 정상적인 p53 활동도를 회복시키는 것 등이 시도될 것이다<sup>27)</sup>.

## 요 약

**연구배경 :** p53은 흔히 종양 억제 유전자로 생각되며, 그것의 변화는 비소세포 폐암을 포함하는 여러 악성 종양에 관여하게 된다. 그런, p53 발현율은 저자들의 보고마다 그리고 서로 다른 세포형에서 차이가 있다. 또한, p53의 발견시기가 조기인지 또는 후기인지도 명확치 않다. 이에, 저자들은 서로 다른 세포형과 조직에서의 p53 발현율을 조사하기 위해 그리고, 조기 또는 후기의 어느 시기에 발현하는지를 알아보기 위해 본 연구를 시작하였

다.

**방법 :** 비소세포 폐암환자 50명으로부터 얻은 71개의 조직을 대상으로 비특이적인 단일클론 항체를 이용한 비교적 간단한 면역조직화학적염색을 시행하였다.

**결과 :**

1) 비소세포 폐암환자에서 폐조직에서의 전체적인 p53 발현율은 46.5% (20/43)로 림프절의 25.0% (6/24)에 비해 높았으나, 통계적인 유의성은 없었다.

2) 세포형에 따른 폐조직에서의 p53 발현율은 편평 세포암과 선암에서 각각 58.3%와 50.0%로 두 군간의 유의한 차이는 없었다.

3) 병기에 따른 폐조직에서의 p53 발현율은 I기, II기, IIIA기, IIIB기 및 IV기 각각에서 33.3%, 60.0%, 40.0%, 60.0%, 66.7%이었으며, 병기에 따른 발현율의 유의한 차이는 없었다. 또한, 낮은 병기 (I기 및 II기)와 진행된 병기 (IIIA기, IIIB기 및 IV기) 간에도 유의한 차이는 없었다.

4) T 지표에 따른 p53 발현율은 T1, T2, T3 및 T4에서 각각 33.3%, 50.0%, 16.7% 및 100%로 T4에서 발현율이 높았으나 대상 환자수가 적어 의의를 둘 수가 없었다. N 지표에 따른 발현율은 N1, N2 및 N3에서 각각 27.2%, 22.2% 및 25.0%로 발현율의 유의한 차이는 없었다.

5) 폐조직에서 양성반응을 보이고 림프절 침범이 있었던 7명의 환자들에서 N1, N2의 발현율은 각각 12.5% (1/8)과 50.0% (2/4)이었다.

6) 폐조직에서 음성반응을 보이고 림프절 침범이 있었던 5명의 환자들에서 발현되는 림프절은 없었다.

**결론 :** 이상의 결과로 비소세포 폐암에서의 p53 발현율은 세포형과 병기의 진행과는 관련이 없는 것으로 생각되며, 폐암 발생 및 진행의 어느 시기에 관여하는지에 대해서는 또 다른 연구가 필요하리라 생각되었다.

## REFERENCES

- 1) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a supressor of transformation. *Cell* 57:1083, 1989
- 2) Takahashi T, Nou MM, Chiba I, Birrer MB, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53-A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246:



- 491, 1989
- 3) Nigro J, Baker S, Preisinger A, Jessup J, Hostetter R, Cleary K, Bigner S, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F, Weston A, Modali R, Harris C, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**: 705, 1989
  - 4) Baker, Fearson SE, Nigro J, Hamilton S, Preisinger A, Jessup J, van Tuinen P, Ledbetter D, Barker D, Nakamura Y, White R, Vogelstein B: Chromosome 17 deletions of p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**:217, 1989
  - 5) Masuda H, Miller C, Koeffler H, Battifora H, Cline M: Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:7716, 1987
  - 6) Ahujja H, Bar-Eli M, Advani S, Benchimol S, Cline M: Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:6783, 1989
  - 7) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* **351**:453, 1991
  - 8) Michalovitz D, Halevy O, Oren M: p53 mutations-gains or losses? *J Cell Biochem* **45**:22, 1991
  - 9) Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennessy C, Lennard TJW, Angus B, Horne CHW: p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: An immunohistochemical study. *J Pathol* **164**:75, 1991
  - 10) Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CHW, Neal DE: 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* **63**:967, 1991
  - 11) Sidell N, Koeffler HP: Modulation of Mr, 53,000 protein with induction of differentiation of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **48**:2226, 1988
  - 12) 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
  - 13) Fontanini G, Bigini D, Vignati S, Macchiaroni P, Pepe S, Angeletti A, Pingitore R, Sqartini F: p53 expression in non small cell lung cancer: Clinical and biological correlations. *Anticancer Res* **13**:737, 1993
  - 14) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnolia RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazdar AF: p53 gene mutations in non-small cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**:171, 1992
  - 15) 성영주, 권성운, 이봉춘, 김동순, 오미혜, 서연림, 주종은 : 원발성 폐암에서의 p53단백의 발현양상. 제 75 차 대한결핵 및 호흡기 학회 추계학술대회 초록집 **33** : 80, 1992
  - 16) Morkve O, Halvorsen OJ, Skjaerven R, Stangeland L, Gulsvik A, Laerum OD: Prognostic significance of p53 protein expression and DNA ploidy in surgically treated non-small cell lung carcinomas. *Anti-cancer Res* **13**:571, 1993
  - 17) Takahashi T, D'Amico D, Chiba I, Buchhagen DL, Minna D: Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J Clin Invest* **86**:363, 1990
  - 18) Mountains CF: A new international staging system for lung cancer. *Chest*, **89**:225s, 1986
  - 19) Rodenhuis S, Slebos RJC, Boot AJM, et al: K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the lung: Incidence and possible clinical significance. *Cancer Res* **48**:5738, 1988
  - 20) Saksela K, Makela TP, Alitalo K: Oncogene expression in small-cell lung cell lines and a testicular germ-cell tumor: Activation of the N-myc gene and decreased RB mRNA. *Int J cancer* **44**:182, 1989
  - 21) Berger MS, Gullick WJ, Greenfield C, Evans S, Addis BJ, Waterfield MD: Epidermal growth factor receptors in lung tumors. *J Pathol* **152**:297, 1987
  - 22) Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Harris AL: Characterization of epidermal growth factor receptor in primary human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **49**:1313, 1989
  - 23) Harbour JW, Lai S-L, Whang-Peng J, Gazdar AF, et al: Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* **241**: 353, 1988
  - 24) Isobe M, Emanuel B, Givol D, Oren M, Croce C: Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. *Nature* **320**:84, 1986
  - 25) Harris AL: Mutant p53-The commonest genetic abnormality in human cancer? *J Pathol* **162**:5, 1990
  - 26) Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Reissman RT, Slamon DJ, Holmes EC, Minna JD: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* **5**:1603, 1990

- 27) Mulligan LM, Matlashewski GJ, Scrabble HJ, Cavenee WE: Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5863, 1990
- 28) Hsu I, Metcalf R, Sun T, Welsh J, Wang K, Harris C: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427, 1991
- 29) Sugimoto K, Toyoshima H, Sakai R, Miyagawa K, Hagiware K, Hirai H, Ishikawa F, Takaku F: Mutations of the p53 gene in lymphoid leukemia. *Blood* 77:1153, 1991
- 30) Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, Lai JL, Pignon JM, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP: p53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood* 78:1652, 1991
- 31) Vogelstein B: A deadly inheritance. *Nature* 348:681, 1990
- 32) Malkin D, Li FP, Strong LC: Germ Line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233, 1990
- 33) Srivastava S, Zou ZO, Pirolo K, Blattner WA, Chang EH: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348:747, 1990
- 34) McCarthy PE, McDermott WM, Amoroso CS: The p53 tumor suppressive gene. *New Eng J Med* 1350, 1992
- 35) Heim S, Mitelman F: Cytogenetics of acute non-lymphocytic leukemia in *Cancer Cytogenetics*. New York, NY, Liss, p65, 1987
- 36) Pedersen BJ, Philip P, Olesen LS, Jensen G, Byting K: Chromosome aberrations and prognostic factors in therapy related myelodysplasia and acute non-lymphocytic leukemia. *Blood* 76:1083, 1990
- 37) Finlay CA, Hinds PW, Tan T-H, Elyahu D, Oren M, Levine AJ: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 70~p53 complex with an altered half-life. *Mol cell Biol* 8:531, 1988
- 38) Oren M, Maltzman W, Levine AJ: Post translational regulation of the 54K cellular tumour antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1:101, 1981
- 39) Chang K, Ding I, Kern FG & Willingham MC: Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem & Cytochem* 39:1281, 1991
- 40) Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Whillie AH & Bird CC: p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 138:807, 1991
- 41) Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ: Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5:151, 1991
- 42) Lane DP, Benchimol S: p53 oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 4:1, 1990
- 43) Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, Haysashi K, & Sekiya T: Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas of the lung. *Cancer Res* 52:4799, 1992
- 44) Quinlan 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
- 45) Caamano J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY & Klein-Szanto AJP: Deletion of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 139:839, 1991
- 46) 이영규, 박성수, 신동호, 이동후, 이정희, 이종달 : 인체 폐암종에서 p53의 발현에 관한 연구. 대한 결핵 및 호흡기질환 40:395, 1993
- 47) Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, Macchiarini P, Chella A, Angeletti CA, Callahan R, Bisticchi M and Squartini F: p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 53:2846, 1993
- 48) Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T and Ueda R: p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: Association between mutations and smoking. *Oncogene* 5: 1603, 1990