

원발성 폐암에서 종양억제유전자 RB와 p53 단백질 발현양상과 예후와의 상관관계

홍 숙 희* · 이 상 용* · 허 혜 경* · 최 필 조** · 우 종 수**

=Abstract=

Expression Pattern of RB and p53 Proteins and its Correlation with Prognosis in Primary Lung Cancer

Sook Hee Hong, M.D.*, Sang Yong Lee, M.D.*, Hea Kyoung Hur, M.D.*,
Pill Jo Choi, M.D.**, Jong Soo Woo, M.D.**

Immunohistochemical stains for RB and p53 tumor suppressor gene products were performed on 72 cases of resected primary lung cancer tissues to study the correlation between their expressions and the histologic types, the clinical stage, and the survival rate. The results were as follows.

1. The RB protein was altered or absent in 38 cases (52.8%), and the mutant p53 protein was detected in 35 cases (48.6%).
2. The incidences of RB and p53 protein expression were significantly different among the histologic types ($p < 0.05$) but were not correlated with the clinical stages of lung cancer ($p > 0.05$).
3. The two year survival rate of patients with alteration of both RB and p53 genes (RB-/p53+) was 22.4%, and that with no alteration of both genes (RB+/p53-) was 63.1%. This difference was statistically significant ($p = 0.01$).
4. It was shown that alteration of RB protein greatly affects the prognosis of lung carcinoma by multivariate analysis of prognostic factors.

The presence or absence of RB and mutant p53 protein in tumor cells is closely related to the survival of primary lung cancer patients, and it is suggested that RB gene expression is an independent prognostic factor of primary lung cancer.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 1223-31)

Key words: 1. Lung neoplasm
2. Neoplasm Suppressor gene

* 동아대학교 의과대학 병리학교실

* Department of Pathology, Dong-A University College of Medicine

** 동아대학교 의과대학 흉부외과학교실

** Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Dong-A University College of Medicine

논문심사일 : 96년 5월 3일 심사통과일 : 96년 7월 18일

책임저자 : 홍숙희, (602-103) 부산광역시 서구 동대신동 3가 1번지 Tel. (051) 240-5351, Fax. (051) 243-7396

서 론

원발성 폐암의 발생빈도는 전세계적으로 증가 추세를 보이고 있으며¹⁾ 1993년도 우리나라의 암 사망통계를 분석한 통계청 자료에서도 폐암에 의한 사망이 남자가 25.8%, 여자가 9.3%로 각각 암사망의 3위를 차지하고 있다²⁾. 폐암의 발생기전은 현재까지도 명확히 밝혀져 있지 않지만, 흡연 및 여러 환경적인 발암물질 등에 의한 어떠한 생물학적인 변화가 폐암 발생과 관련있다고 알려져 있다³⁾. 최근에 급속히 발달되고 있는 분자생물학적 기술을 이용한 연구에 의하면, 정상 기관지상피의 악성 전환은 체세포 유전자들의 일련의 변화에 의한 다단계 과정이며, 종양유전자와 종양억제유전자의 변화가 발암과정에 필수적으로 동반된다고 한다^{4, 5)}. 또한 폐암의 발생 뿐만 아니라 진행 및 예후도 이들 유전자의 활성 혹은 비활성에 의한 기능의 획득 혹은 기능의 소실과 관련있는 것으로 알려져 있으며, 최근 여러 종양에서 암유전자중 종양억제 유전자인 Rb와 p53의 변화에 대한 연구가 많이 되고 있다⁶⁻¹⁰⁾.

세포주기에서 Rb 유전자의 변이나 결손으로 인해 RB 유전자가 불활성화되어 RB 단백질이 생성되지 않게되면 S 단계로의 진입에 제동이 안 일어나고 세포분열에 대한 조절 능력이 상실되어 세포증식이 계속되므로 RB는 종양의 개시와 진행에 중요한 역할을 하고 있다¹⁰⁻¹²⁾. 어떤 종양에서는 RB 유전자의 발현 유무가 종양의 예후와 관련되는 인자임을 주장하는 보고도 있다⁹⁾.

또한 정상세포에서 생산된 야생형 p53 단백질은 세포 손상이 있을 때는 세포주기에서 DNA의 복구가 완료될 때까지 DNA 복제단계를 S 단계로의 진입을 지연시켜 세포분열의 진행을 억제하는 기능을 가지고 있다. p53 단백질이 없거나 변이형 p53 단백질이 존재할 경우에는 DNA의 복구가 완료되지 않은 채 S 단계로 진입하므로 염색체의 재배열이나 유전자의 증폭과 같은 염색체 이상이 발생하고 또 억제되지 아니하는 세포분열이 초래되어 종양이 유발될 수 있다¹³⁾. 인체 각종 종양에서 높은 빈도로 p53 유전자 변이나 소실이 있음이 보고되어 있고 예후와의 관계에 대한 연구보고도 다수 있다¹⁴⁾.

p53 유전자의 변이와 RB 유전자의 불활성화는 유전자 혹은 단백질 수준에서 여러 검사법으로 검출될 수 있는데^{14, 15)}, 야생형 p53 단백질은 15~20분의 짧은 반감기를 가지며 정상세포에서 매우 소량으로 존재한다. 그러나 변이형 p53 단백질은 hsp70 세포단백과 결합하여 단백질 구조

변화를 일으켜 안정되어 수시간 정도의 긴 반감기를 가지게 되어 세포 핵내에 축적되므로 면역조직화학적 염색으로도 검출이 된다¹⁴⁾. 한편 RB 유전자의 변화도 여러 방법으로 검사할 수 있는데, 이 유전자는 크기가 크고 복잡한 구조로 되어 있어 유전자 수준의 검사법보다 단백질 발현을 보는 면역조직화학적 방법이 오히려 예민도가 높다는 보고가 있다^{16, 17)}.

본 연구자들은 원발성 폐암 조직에서 RB와 p53 유전자의 발현양상을 이들 단백질에 대한 면역조직화학적 방법으로 관찰하고 폐암의 조직형, 병기, 생존률과의 상관관계를 비교함으로써 p53 유전자의 변이와 RB 유전자의 불활성화가 원발성 폐암환자의 예후와 어떤 상관관계가 있는지를 알아보려고 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

연구 재료는 1990년 3월부터 1995년 8월까지 5년 6개월 동안 동아대학교 병원에서 폐암으로 진단받고 편측폐절제술이나 폐엽절제술을 실시받은 환자중 파라핀 포매조직의 상태가 양호하고 병력지 기록 검토가 가능한 72명의 환자들로부터 얻은 원발성 폐암 조직을 사용하였다. 이들 환자의 성별, 연령, 병기, 생존 기간 등은 병력기록지를 통해 얻었고, 조직형 등 병리학적 소견을 재검토하였다. 폐암의 병기는 American Joint Committee on Cancer의 TNM 병기에 따라 분류하였다¹⁸⁾.

2. 연구방법

1) 면역조직화학적 염색

먼저 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 72예의 폐암 조직절편을 hematoxylin-eosin염색한 표본을 검색하여 WHO 분류에 따라 조직학적 분류를 시행하였다. RB와 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검사는 폐암 조직절편을 압력술을 이용한 고온 열처리법으로 전처치를 시행한 후 avidin과 biotin 사이의 강한 결합력을 이용한 ABC 방법(avidin-biotinyl peroxidase complex method)으로 실시하였다. RB에 대한 일차 항체로는 단클론 항체인 mouse anti-human Rb, PMG3-245(PharMingen, San Diego, CA, U. S. A.)를 그리고 p53에 대한 일차 항체로는 단클론 항체(Ab-6)(Oncogene Science Inc, Cambridge, MA)를 사용하였다.

염색방법은 우선 파라핀 조직절편을 4mm 두께로 잘라

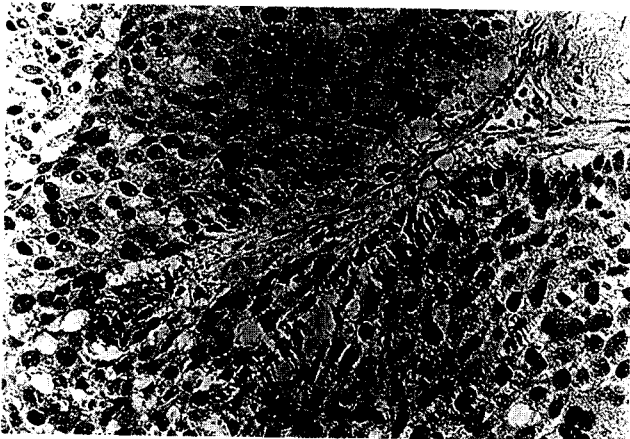


Fig. 1. Positive nuclear staining for RB protein in squamous cell carcinoma of the lung (Immunohistochemical stain, X400)

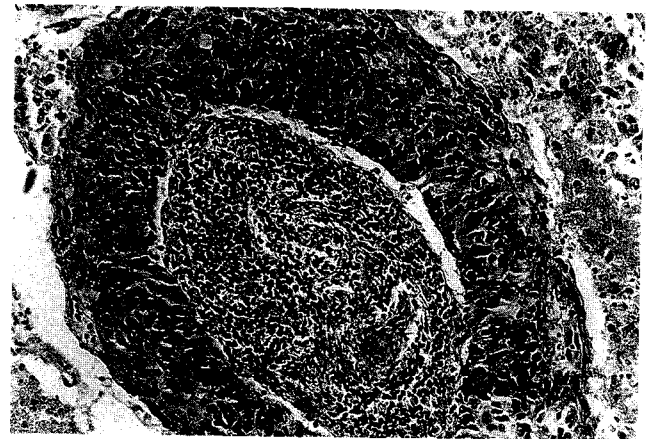


Fig. 2. Positive nuclear staining for p53 in Squamous cell carcinoma of the lung (Immunohistochemical stain, X200)

서 슬라이드에 부착시켜 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 1분씩 담구어 흡수시키고 증류수로 씻었다. 항원 복구법으로 압력솥에 citrate buffer (pH 6.0)를 슬라이드에 잠기게 넣은 다음 끓는 점에 도달한 후 1분간 더 끓인 후 불을 끄고 식혔다. 3% 과산화수소수를 조직 절편위에 떨어뜨려 30분간 실온에 방치하여 내인성 peroxidase를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 각각 1:40과 1:100으로 희석된 RB와 p53 단백질에 대한 단클론 1차 항체와 4°C에서 하루밤 정도 반응시킨 후 PBS로 세척한 뒤, 다시 biotin과 결합된 2차 항체(biotinylated goat anti-mouse Ig G)를 실온에서 45분간 반응시키고 난 후 PBS로 씻었다. streptavidin-biotin conjugate 를 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 씻은 후 발색제인 AEC를 첨가하였다. Mayer hematoxylin 에 3분간 대조 염색후 crystal mount 로 봉입하여 광학현미경으로 검경하였다.

2) 면역조직화학적 염색의 판독

폐암 주변의 정상 세포핵들이 적갈색으로 염색되어 RB 단백질 발현이 있는것을 확인하고 종양세포들을 관찰하였다. 종양조직 전반에 걸쳐 확실한 핵염색이 보이는 경우를 RB 양성으로 하였고(Fig. 1), RB 음성은 전체 종양세포가 핵염색이 안되거나, 넓은 범위에서 핵염색이 되지 않으면서 국소에서만 핵염색이 관찰되어 변화된 RB 단백질 발현양상을 보이는 경우로 하였다.

p53에 대한 면역조직화학적 염색의 분석은 종양주위의 정상세포는 음성임을 확인하고, 종양세포의 핵이 적갈색으로 염색되면 양성으로 하였는데(Fig. 2) 전체 종양세포

의 10% 미만에서 염색된 경우는 음성으로 판독하였다.

3) 통계처리

폐암의 조직형, 병기, 생존기간, 그리고 환자의 성별, 연령 등의 임상병리학적 자료들과 RB 과 p53 단백질 발현양상과의 상관관계를 비교분석하였다. 생존율은 Kaplan과 Meier의 방법을 이용하여 log-rank statistical analysis에 의해, 발현빈도 및 경향분석은 Chi-square test 를 이용하여 통계적 유의성을 검정하여 p-value 가 0.05 이하인 것을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 예후인자의 비교위험도는 Cox's proportional hazards model을 이용하였다. 통계처리는 SAS system (statistical package for window release 6. 11)을 이용하였다.

결 과

1. 임상 및 병리학적 소견에 따른 RB와 p53의 발현 빈도 (Table 1)

대상환자의 연령분포는 32세부터 80세였으며 평균연령은 56세였고 60세 이상이 32명으로 전체의 44.4%를 차지하였다. 성별로는 남자가 60예(83.3%), 여자가 12예(16.7%) 이었다.

RB와 p53 단백질의 발현빈도를 보면, RB 단백질은 총 72예의 종양조직 중 34예(47.2%)에서 양성반응을 보여 종양세포 핵내에 그대로 존재하였으나, 38예(52.8%)에서는 전혀 존재하지 않거나 감소하여 종양의 일부분에서 양성을 보여 변화된 RB 단백질 발현소견을 보여 주었다. 성별에 따른 RB 단백질의 발현빈도는 여자의 수가 적었지만

Table 1. Incidence of RB and p53 expression in primary lung cancer

	No. of cases	RB		p value	p53		p value
		+(%)	- (%)		+(%)	- (%)	
Total cases	72	34 (47.2)	38 (52.8)		35 (48.6)	37 (51.4)	
Mean age (years)		57	55	0.385	56	57	0.663
Sex				0.021			0.075
Male	60	32 (53.3)	28 (46.7)		32 (53.3)	28 (46.7)	
Female	12	2 (16.7)	10 (83.3)		3 (25)	9 (75)	
Histologic type				0.008			0.03
Squamous car.	42	26 (61.9)	16 (38.1)		25 (58.5)	17 (40.5)	
Adenocarcinoma	23	6 (26.1)	17 (73.9)		8 (34.8)	15 (65.2)	
Undiff. large car.	3	2 (66.7)	1 (33.3)		0 (0)	3 (100)	
Small cell car.	2	0 (0)	2 (100)		2 (100)	0 (0)	
Adenosquamous car.	1	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
Atypical carcinoid	1	0 (0)	1 (100)		0 (0)	1 (100)	
Stage				0.324			0.28
I, II	39	21 (53.8)	18 (46.2)		18 (46.2)	21 (53.8)	
III, IV	33	13 (39.4)	20 (60.6)		17 (51.5)	16 (48.4)	

통계학적으로 유의한 차이를 보여 남자보다 여자에서 발생한 폐암에서 RB 단백질 음성 빈도가 높았다(p=0.045). 나이에 따른 RB 단백질 발현의 차이는 통계적 의의는 없었다(p>0.05). p53 단백질은 총 72예중 35예(48.6%)에서 종양세포 핵이 양성반응을 보여 변이형 p53 단백질의 발현을 나타내었다. 나이와 성별에 따른 p53 단백질의 발현율의 차이는 없었다(p>0.05).

폐암의 조직형에 따른 RB와 p53 단백질의 발현양상을 보면, RB 단백질은 편평세포암 42예중 16예(38.1%), 선암 23예중 17예(73.9%)에서 음성을 보였다. 3예의 미분화성 대세포암중 1예(33.3%)에서 음성을 보였으며, 2예의 소세포암, 1예의 편평상피선암 그리고 1예의 비정형 유암종에서는 모두가 음성을 보여 선암에서 RB 단백질 음성 빈도가 높았으며, 대상군 수는 적었지만 소세포암, 편평세포선암, 비정형 유암종에서 모두 음성으로 나타나 각 조직형에 따른 RB 단백질의 발현빈도는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.008). p53 단백질은 편평세포암 42예 중 25예(59.5%), 선암 23예 중 8예(34.7%), 소세포암 2예 중 2예(100%)에서 양성을 보인 반면, 미분화성 대세포암 3예, 편평상피선암 1예 그리고 비정형 유암종 1예는 모두 음성이었다. 편평세포암에서 선암보다 높은 빈도의 p53 발현율을 보여 폐암의 조직학적 형과 p53의 발현 빈도 사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(p=0.03).

폐암의 병기에 따른 RB와 p53 단백질의 발현빈도는 I기와 II기 병기를 초기군으로 III기와 IV기를 후기군으로

Table 2. The correlation between the expression of RB and p53 in primary lung cancer

		RB Expression*		Total (%)
		Positive (%)	Negative (%)	
p53	Positive	21 (29.2)	14 (19.4)	35 (48.6)
	Negative	13 (18.1)	24 (33.3)	37 (51.4)
Total		34 (47.2)	38 (52.8)	72 (100)

* p=0.036

나누어 관찰하였다. RB 단백질은 초기군 39예중 18예(46.2%), 후기군 33예중 20예(60.6%)가 음성을 보였고, p53 단백질은 초기군 39예중 18예(46.2%), 후기군 33예중 17예(51.5%)에서 양성을 보여, 병기에 따른 RB와 p53 단백질의 발현빈도는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p>0.05).

2. RB와 p53 단백질 발현의 상호 연관성 (Table 2, 3)

한 종양에서 RB와 p53 단백질 발현의 상호 연관성을 살펴보기 위해 각 종양조직에서 RB와 p53 단백질 발현 유무를 조합하여 4군으로 나누어, 두 종양억제유전자 단백질의 발현에 모두 변화가 없는 군(RB+/p53-)을 I군, p53 단백질의 발현만 변화가 있는 군(RB+/p53+)을 II군, RB 단백질의 발현만 변화가 있는 군(RB-/p53-)을 III군, 그리고 두 단백질의 발현에 모두 변화가 있는 군(RB-/p53+)을 IV군으로 하였다. 총 72예중 I군이 13예

Table 3. Incidence of RB and p53 expression according to histologic type and stage in four groups of primary lung cancer

Variate	No. of cases	Group I (RB+/p53-)	Group II (RB+/p53+)	Group III (RB-/p53-)	Group IV (RB-/p53+)	p-value
Histologic type						
Squamous carcinoma	42	10(23.8)	16(38.1)	8(19)	8(19)	0.297
Adenocarcinoma	23	2(8.7)	3(13)	14(60.7)	4(17.4)	0.629
Stage						0.15
I, II	39	9(23.1)	12(30.8)	12(30.8)	6(15.4)	
III, IV	33	4(12.1)	9(27.3)	12(36.4)	8(24.2)	
Total	72(100)	13(18.1)	21(29.2)	24(33.3)	14(19.4)	

(18.1%), II군이 21예 (29.2%), III군이 24예 (33.3%), 그리고 IV군이 14예 (19.4%)로 RB 혹은 p53 한가지의 종양억제 유전자 단백질의 발현만 보이는 II군과 III군이 많았다. 이들 두 단백질의 발현은 서로 무관하게 독립적으로 일어나고 있음을 시사하였다(p=0.03)(Table 2).

폐암의 조직형에 따른 각군의 발현빈도를 보면, 편평세포암은 I군이 42예중 10예 (23.8%), II군이 16예 (38.1%), III군이 8예 (19%) 그리고 IV군이 8예 (19%)로 p53 단독 변화만 있는 II군이 가장 많았다. 23예의 선암중에는 I군이 2예 (8.7%), II군이 3예 (13%), III군이 14예 (60.9%) 그리고 IV군이 4예 (17.4%)로 RB 단독 변화만 있는 III군이 가장 많았다. 기타 조직형은 예수가 적어 4군으로 나누어 설명하기가 곤란하였다. 폐암의 병기중 I, II기 초기군과 III, IV기 후기군에서 모두 두 종양억제 유전자 중 RB 혹은 p53 중 한가지 단백질의 발현만 변화를 보인 예가 많아 각각 24예 (33.3%)와 21예 (29.2%)를 차지하였다(Table 3).

3. RB와 p53 단백질의 발현에 따른 폐암 환자의 생존율 (Fig. 3)

총 72예의 원발성 폐암 환자의 생존기간은 환자가 본원에서 진단받은 시점부터 산정하였다. 평균 생존기간(median survival time)은 17개월이었다. 두 종양억제 유전자 RB와 p53 단백질의 발현 유무에 따라 나눈 4군의 Kaplan-Meier 평균생존확률곡선은 그림 3에 도시하였다. I군에서부터 IV군으로 즉 두가지 단백질 발현의 변화가 동반될수록 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 각군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(p>0.05). 그러나 I군과 IV군의 생존율을 비교하였을 때 I군에 비해 IV군이 통계학적으로 유의하게 2년 생존율이 감소

하였다(p=0.01).

RB와 p53 두 종양억제 유전자 중 어느 것이 환자의 예후에 더 영향을 미치는 변수인지를 알기 위하여 각군을 비교해 보았다. p53 단백질 발현의 변화는 없지만 RB의 발현에 차이를 보이는 I군과 III군의 생존율을 비교하였을 때, RB 단백질 발현 변화를 동반한 III군이 RB 양성인 I군에 비해 통계학적으로 유의한 생존율의 감소를 보였다(p=0.04). 또 변이 p53 단백질이 모두 양성인 II군과 IV군의 생존율을 비교하였을 때, RB 단백질 발현의 변화가 같이 동반된 IV군에서 RB 양성인 II군에 비해 통계학적으로 유의한 생존율의 감소를 보였다(p=0.02). 반대로 RB 단백질 발현의 변화가 동반되지 않은 I군과 II군의 생존율을 비교하였을 때, 변이 p53 단백질 양성인 I군과 p53 음성인 II군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p>0.05). 그러나 RB 단백질 발현의 변화가 있는 III군과 IV군의 생존율을 비교하였을 때, 변이 p53 단백질 발현의 변화가 같이 동반된 IV군에서 p53 음성인 III군에 비해 통계학적으로 유의하게 생존율의 감소를 보였다(p=0.03). 이러한 결과는 RB 유전자의 변이나 소실이 p53 유전자의 변이와 상관없이 환자의 예후에 영향을 끼친다는 것을 시사하였으며, 이러한 소견은 예후인자의 다변량 분석을 Cox's proportional hazards model을 이용한 예후인자의 비교위험도 분석을 하여서도 증명되었다. 예후인자 중 RB 단백질의 위험율이 가장 높아 1.15를 나타내었는데, 이 수치는 환자 성별에서 위험율 1.1, p53 단백질 1.06, 나이 1.01, 환자 병기 0.89, 종양의 조직형 0.81 보다 높아 여러 예후인자 중에서 RB가 예후에 가장 영향을 미치는 인자임을 시사하였다. p53 유전자의 변화도 예후인자의 비교위험도 분석에서 보면 다소 환자의 예후에 영향을 주는 것으로 나타났다.

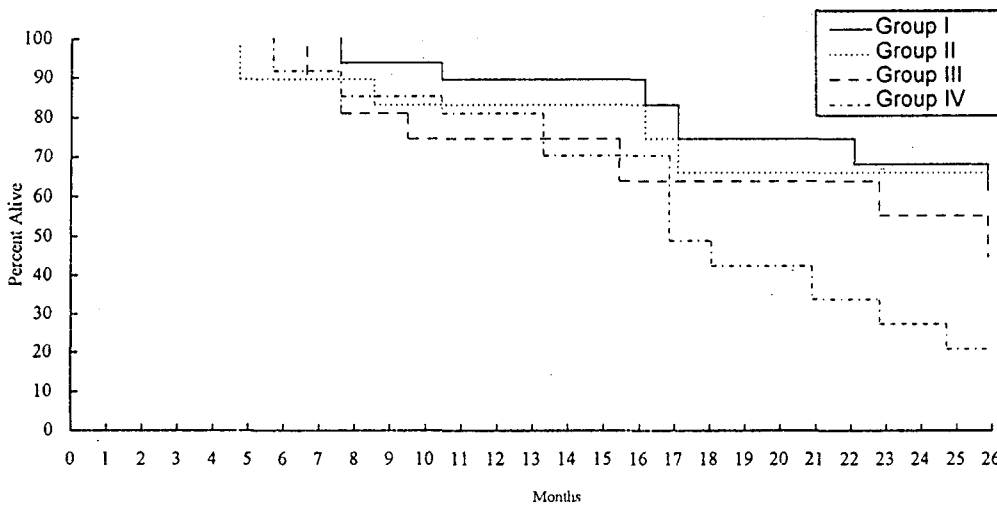


Fig. 3. Kaplan-Meier survival curves for following groups: group I(RB+/p53-), group II (RB+/p53+), group III(RB-/p53-), and group IV(RB-/p53+). Logrank analysis of four groups yielded a p-value of 0.07.

고찰

원발성 폐암은 우리나라에서도 암에 의한 사망의 주요한 원인으로 되어 있다²⁾. 비록 흡연이 폐암을 유발하는데 있어서 중요한 위험인자로 알려져 있지만 아직까지도 정상 기도세포가 악성세포로 전환되는 분자학적 변화 및 기전은 완전히 밝혀져 있지 않은 상태이다⁴⁾. 암의 발생은 여러 유발인자가 복합적으로 관여하여 유전자의 변화가 초래되고 이로 인해 발암 개시 및 촉진의 다단계 과정을 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있다.

인체에 발생하는 여러 암의 발생과정의 연구에서 최근에 종양억제유전자의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지의 분자생물학적 연구에서 밝혀진 종양억제유전자 중에서 인체의 여러 종양에서 활발한 연구가 진행중인 것은 p53과 RB 유전자이다^{5-10, 19)}.

RB유전자는 1980년대 중반에 각기 다른 세 그룹의 연구자들에 의해 클론화된 최초의 종양억제유전자이다. RB 유전자는 4.7kb의 cDNA로써 클론화되고 그들의 산물은 인산화의 상태에 따라 110 혹은 116 kD의 핵인산화 단백질이다. RB 단백질은 Go 혹은 G1 단계에서는 저인산화 상태이고 S 단계에서와 초기 M 단계동안에 점진적으로 인산화된다. 저인산화 형태에서 이 단백질은 c-myc 등의 종양억제유전자나 E2F와 같은 전사인자가 되는 세포단백질과 결합하여 세포증식을 억제하는 역할을 한다. RB 유전자의 돌연변이는 소위 RB pocket 이라고 불리는 전사인자 결합 영역에서 일어나고 이러한 변화로 전사인자의 활성도가 조절이 되지 않게되면 세포의 비조절성 주

기가 발생한다. 또한 RB 유전자는 발암과정에서 유전자 두 대립형질 모두에 돌연변이나 소실이 일어나야 종양이 발생하는 열성유전자이다. 초기 변이는 주로 점 돌연변이 혹은 또다른 작은 변화가 일어나 유전자의 하나의 대립형질의 불활성화 혹은 변화가 일어나게 되고, 두번째의 유전자 변화시에는 상보적 유전자의 결손 혹은 전위와 같은 더 큰 변화가 생겨 종양억제유전자의 이중접합성을 상실하게 된다. 이러한 가설은 1971년 Knudson¹¹⁾에 의해 이미 제시된 two hit theory로써 지놈(genomic) DNA와 RB 전사수준에서 일치하는 여러 연구결과들로 증명되어 있다. 이러한 RB 유전자는 유아기의 안구 암종인 망막모세포종의 종양세포로부터 발견되었다. 망막세포종의 가족력이 없는 개체에서의 이러한 RB유전자의 불활성화는 폐암^{5, 8-10, 17)} 이외에도 유방암²⁰⁾과 육종²¹⁾ 등 여러 종양의 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

p53 유전자는 암억제유전자로서 이 유전자가 만든 단백질은 DNA와 결합하여 전사를 조절함으로써 세포성장을 조절한다. 변이형 p53 단백질을 생성하는 유전자 변화가 원발성 폐암의 각 조직형에서 발견되고 정상 폐조직에서는 전혀 발현되지 않는 것으로 보아 분명히 p53 단백질의 과발현은 폐암의 발생과 연관이 있음을 시사해 준다. p53 유전자의 변이종 암을 유발하는데 있어서 중요하고 대부분을 차지하는 것은 mis-sense 변이인데, 이때 염기 서열중 구아닌이 티미딘으로 대체되면서 변이형 p53 단백질이 만들어지는 것이다³⁾. 폐 외 인체 여러 장기에 발생한 암종에서도 p53 유전자의 변이가 빈번히 관찰된다.

본 연구에서는 폐암조직에서 RB 음성빈도가 52.8%로

RB 단백질 발현의 변화 혹은 소실을 보였는데, 이는 Xu 등⁹⁾이 보고한 21.4% 그리고 Higashiyama 등¹⁶⁾의 34% 에 비하면 높은 수치이다. 이러한 RB 단백질의 발현빈도 차이를 정확히 설명하기는 어렵지만 이전의 연구들과 본 연구를 비교해 볼 때 실험 대상군의 조직형의 분포에 차이가 있었고, 또 유전자 혹은 단백질 수준에서의 검출 등 서로 다른 방법을 사용했기 때문으로 생각되는데, 본 연구에서 사용한 면역조직화학적 검사방법은 유전자 산물인 단백질을 검출하는 것으로 조직에 잠재해 있는 단백질 항원의 노출 방법에 따라 검출율이 많이 좌우되는데, 본 연구에서는 검출율을 높이기 위해 압력솥을 이용한 고온 열처리 방법을 이용하여 최대 항원의 노출을 시도하였지만 RB 양성 빈도는 낮았다. 변이 p53 단백질은 48.6%에서 발현이 되었는데 이 빈도는 Iggo 등⁶⁾이 고정하지 않은 신선한 폐암 조직의 66%에서 발현을 관찰한 것에 비하면 다소 낮은 검출율이다. 결국 이러한 검출율의 차이는 병리조직검사를 위한 조작 중에 조직의 보관 및 고정상태, 면역조직화학적 검사에서 잠재된 항원의 노출방법 등에 의한 것으로 사료되므로 앞으로의 연구를 위해서 조직 취급에 세밀한 주의가 필요할 것으로 여겨진다.

폐암의 조직형에 따른 변화된 혹은 소실된 RB 유전자 단백질의 발현은 편평세포암 42예 중 16예 (38.1%), 선암 23예 중 17예 (73.9%)로 선암에서 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다. 폐암에서 연구된 몇 보고에 의하면 Reissmann 등¹⁷⁾은 편평세포암에서 38%, 선암에서 19%, Xu 등⁹⁾은 편평세포암에서 21%, 선암에서 24%, 그리고 Higashiyama 등¹⁶⁾은 편평세포암에서 16%, 선암에서 25%에서 변화된 혹은 소실된 RB 단백질의 발현을 보여 보고자에 따라 폐암의 조직형에 따라 다소 RB 단백질의 발현율의 차이를 보였다. p53 단백질의 발현빈도는 편평세포암 42예 중 25예 (58.5%), 선암 23예 중 8예 (34.8%)로 편평세포암에서 높게 나타났다. 이 소견은 p53이 선암보다 편평세포암에서 비교적 높게 발현된다는 이전의 다른 보고와도 일치하는 결과이다^{6, 15)}. 한편 대상군 중 소세포암 등은 폐절제 예수가 적어 염색결과에 대한 결론을 내리기가 어려웠다.

몇가지의 악성종양에서 RB가 예후인자로서 제시되고 있다. Xu 등⁹⁾의 보고에 의하면 폐의 비소세포암에 있어서 RB 단백질의 소실은 낮은 병기에서 보다 높은 병기에서 좀더 흔하게 나타났다고 하였고, Xu 등⁹⁾은 101 명의 초기군 비소세포 폐암 환자를 대상으로 5년 추적을 실시하여 평균 생존기간을 구하였는데 RB 양성은 32개월, RB 음성은 18개월로 두 군 사이에 유의한 차이를 보였다고 하였

다. 그러나 본 연구에서는 RB 단백질의 발현 빈도와 종양의 병기 사이에 통계학적인 유의성을 보이지 않았다. Higashiyama 등¹⁶⁾의 연구에 의하면 RB 단백질의 발현의 변화는 잘 분화된 형보다 분화가 안되고 많은 유사분열을 보이는 종양에서 훨씬 많이 나타나고 있어 어떤 경우에 있어서는 종양의 분화 정도와 소실된 혹은 변화된 RB 단백질의 발현이 서로 상관관계가 있다고 주장하였다. 예후 추정인자로서의 p53의 가치에 대한 Brambillia 등¹⁵⁾의 연구에서 p53 발현이 I기 II기에서는 39%, III기 IV기에서는 74%로 병기가 진행될수록 유의한 차이로 발현율이 높았다고 하였는데, 본 연구 결과에서는 폐암의 후기군에서 RB 음성율이 60.6%, p53 양성율이 51.5%로 초기군보다 약간 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다 ($p > 0.05$).

폐암 환자의 예후를 종양억제유전자 발현과의 관계를 알기 위해 종양조직에서 RB와 p53 단백질의 발현 유무에 따라 환자를 4군으로 나누어 관찰하였는데, 각군에서 두 단백질의 발현율을 조직형과 병기에 따라 살펴본 결과 각군에서 발현빈도 차이는 통계학적 유의성은 없었다 ($p > 0.05$). 본 연구 대상환자의 생존기간을 추적해 보았는데, 생존기간은 본원에서 진단받은 시점을 기준으로 추적하였고 통계처리시 치료방법에 의한 변수는 고려되지 않았다. 72명 중 7명은 추적이 불가능하였고 나머지 65명의 환자들은 추적기간이 짧아 Kaplan-Meier 생존확률곡선상에서 평균 생존기간을 구하지는 못하고 2년 생존율을 서로 비교하였다. 2년 생존율은 p53 음성인 I군과 III군에서는 RB 음성인 III군이 46.9%로 RB 양성인 I군의 63.1%에 비해 통계학적으로 유의하게 낮은 2년 생존율을 보였고 ($p = 0.04$), 또한 p53 양성인 II군과 IV군에서 RB 음성인 IV군이 22.4%로 RB 양성인 II군의 67.7%에 비해 통계학적으로 유의하게 낮은 2년 생존율을 보였다 ($p = 0.02$). 이러한 결과는 RB 유전자의 변이나 소실이 p53 유전자의 변이와 상관없이 환자의 예후에 영향을 끼친다는 것을 시사하였다. 한편 RB가 양성인 I군과 II군에서 p53음성인 I군의 2년 생존율은 63.1%, p53 양성인 II군은 67.7%로서 이 두군 사이에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 그러나 RB가 음성인 III군과 IV군에서 p53 음성인 III군의 2년 생존율은 46.9%, p53 양성인 IV군은 22.4%로 통계학적으로 유의하게 IV군에서 낮은 2년 생존율을 보여 ($p = 0.03$) p53 유전자의 변화도 다소 폐암환자의 예후에 영향을 끼치고 있음을 시사하였다. 이상의 소견을 종합하면 폐암에서 환자의 나이, 성별, 폐암의 조직형, 환자의 병기, RB 단백질의 발현 소실, 그리고 변이 p53 단백질의 발현 등의 예후인자들을 다변량 분석을 하여 비교위험도를 보았을

때 그중 RB 변화가 가장 높은 수치를 보여 RB 유전자의 변화가 가장 예후에 영향을 미치는 인자임을 시사하였다. 더 나아가서 RB와 p53 두 단백질의 발현과 환자의 예후와의 관계를 보면 RB와 더불어 p53 유전자의 변이가 같이 동반된 환자군에서 예후가 가장 좋지 않은 것으로 나타났다.

본 연구에서 폐암의 각 조직형의 예수가 많지 않고 또 추적기간이 짧지만 RB와 p53 단백질의 발현의 유무가 원발성 폐암 환자의 예후와 관련이 있음을 시사하였고, 이 두가지 종양억제유전자의 발현 유무 검사가 폐암환자의 예후지표 인자로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

RB와 p53 종양억제유전자 단백질 발현과 폐암의 조직형, 임상 병기, 그리고 환자 생존율과의 상관관계를 알아 보기 위하여 72예의 원발성 폐암조직에서 면역조직화학적 방법으로 시행하여 다음과 같은 소견을 얻었다.

1. RB 단백질 발현은 38예(52.8%)에서 감소하거나 소실되었고, 변이형 p53 단백질은 35예(48.6%)에서 발현을 보였다.
2. RB와 p53 단백질의 발현 빈도는 폐암의 조직형에 따라 유의한 차이를 보여 RB는 선암에서 p53은 편평세포암에서 발현율이 높았다($p < 0.05$). 그러나 임상 병기와는 두 단백질의 발현율과는 상관이 없었다.
3. 폐암 환자의 2년 생존율은 두 단백질 발현의 변화가 동반된 군(RB-/p53+)에서 22.4%, 두 단백질 발현의 변화가 전혀 없는 군(RB+/p53-)에서 63.1%로 두군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다.
4. 예후인자의 다변량 분석에서 RB 단백질의 변화가 가장 예후에 영향을 미치는 인자임을 나타내었다.

본 연구 결과에서 RB와 p53 단백질의 발현의 유무가 원발성 폐암 환자의 생존율과 관련이 있고, 특히 RB 단백질의 발현이 원발성 폐암의 예후인자임을 시사하는 소견이 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Westra WH, Offerhaus JG, Goodman SN, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene product in lung adenocarcinoma is associated with cigarette smoking. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 213-20
2. 통계청. 1993년 사인 통계 결과 분석, 사인 원인 통계 연보. 1994;14:34-5
3. Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, et al. p53 mutation in non-small cell cancer in Japan: Association between mutation and smoking. *Cancer Res* 1992; 52: 734-6
4. Minna JD, Battey JF, Brooks BJ, et al. Molecular genetic analysis reveals deletion, gene amplification and autocrine growth factor production in the pathogenesis of human lung cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1986; 51: 843-53
5. Ookawa K, Shiseki M, Takahashi R. Reconstruction of the RB gene suppresses the growth of small cell carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene* 1993; 8: 2175-81
6. Iggo R, Gaster K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-9
7. Dennis CQ, Ann GD, Carol LS, et al. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828-31
8. Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, et al. Absence of retinoblastoma protein expression in primary lung carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2735-9
9. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early stage non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 695-6
10. Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, et al. Role of retinoblastoma gene in the inhibition and progression of human lung cancer. *J Clin Invest* 1990; 85: 988-93
11. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-43
12. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clue for human oncogenesis. *Science* 1984; 223: 1028-33
13. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51: 6304-11
14. Rogel A, Poplike M, Webb CO, et al. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 2852-5
15. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 199-210
16. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, et al. Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Oncology* 1994; 51: 544-51
17. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, et al. Inactivation of retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1913-9
18. American Joint Committee on Cancer. *Manual for staging of cancer.* 4th ed. Chicago: AJCC, 1992.
19. Skuse GR, Ludlow JW. Tumor suppressor genes in disease and therapy. *Lancet* 1994; 345: 902-6
20. Ali S, Barbara R, Brian A, et al. Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1992; 168: 23-8
21. Reissmann PT, Simon MA, Lee WH, et al. *Studies of the*

retinoblastoma gene in human sarcoma. Oncogene 1989;4:439-43

=국문초록=

72예의 원발성 폐암조직에서 두 종양억제유전자 RB와 p53의 단백질 발현 빈도를 면역조직화학적 방법으로 검출한 결과 RB 단백질 발현은 38예 (52.8%)에서 감소하거나 소실되었고, 변이형 p53 단백질은 35예 (48.6%)에서 발현을 보였다. 이들의 발현 빈도는 폐암의 조직형에 따라 유의한 차이를 보여 RB는 선암에서 그리고 p53은 편평세포암에서 발현율이 높았다($p < 0.05$). 그러나 임상 병기와는 두 단백질의 발현율과는 상관이 없었다.

폐암 환자의 2년 생존율은 두 단백질 발현의 변화가 동반된 군(RB-/p53+)에서 22.4%, 두 단백질 발현의 변화가 전혀 없는 군(RB+/p53-)에서 63.1%로 두 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 본 연구에서 RB와 p53 단백질의 발현의 유무가 원발성 폐암 환자의 생존율과 관련이 있음을 나타내었고, 특히 RB가 원발성 폐암의 예후에 가장 큰 영향을 미치는 인자임을 나타내었다.