

방광암 환자의 요세포 검사에서 p53 단백 발현의 의의

계명대학교 의과대학 병리학교실, 울산동강병원[†], 광병원[†]

이 상 숙 · 배 지 연 · 강 유 나 · 조 영 록 · 박 남 조 · 김 선 영[†], 김 정 희[†]

= Abstract =

Immunohistochemical Detection of p53 Gene Mutation in Urine Samples in the Patients with Bladder Cancer

Sang Sook Lee, M.D., Ji Yeon Bae, M.D., Yu Na Kang, M.D., Young Rok Cho, M.D.,
Nam Jo Park, Seun Young Kim, M.D.[†], and Jung Hi Kim, M.D.[†]

Departments of Pathology, Keimyung University School of Medicine,
Ulsan Dongkang Hospital[†] and Kwak Hospital[†]

Although bladder cancers are very common, little is known about their molecular pathogenesis. It is known that p53 alteration is found in about 60% of muscle-invasive bladder cancer, necessitating aggressive therapy and poor outcome.

We examined the nuclear expression of p53 protein, using D07 monoclonal antibody in the urine samples from 31 patients with transitional cell carcinoma of the bladder to investigate the correlation of p53 overexpression with histologic grades and depth of invasion. The positive rate of p53 protein was 27% in superficial bladder tumor, but increased up to 71% in the invasive bladder carcinomas. The overexpression of p53 protein increased according to Mostofi grading system from 18% in grade I, 45% in grade II, and up to 100% in grade III. The p53 expression tended to be higher in the invasive and high grade bladder cancers than in the superficial and low grade ones($p < 0.05$).

These results suggest that immunohistochemical analysis of the urine specimen in the bladder cancer patients could be a useful method of screening for the presence of p53 mutant protein. The mutant p53 protein expression may be an indicator of bladder cancer with more proliferative potential and/or aggressive biologic behavior.

Key words: Bladder cancer, Urine, p53 expression, Immunohistochemistry

서 론

표재성 방광암의 경우 병리학적 병기와 조직학적 분화도 및 종양의 다발성, 크기, 세포 증식능 등이 암의 재발 및 진행에 중요한 변수로 작용하나 침윤성 방광암은 병리학적 병기등이 중요한 예후 인자로 알려져 있다¹⁾. 그러나 아직까지 방광암의 자연 경과에 대한 완전한 이해가 이루어지지 않아 방광암 환자 개인에 대한 정확하고 적절한 치료 방침의 결정은 쉽지 않다. 따라서 방광암 환자에서 임상 병기와 병리조직학적 분화도의 예후 추정 능력을 향상시키고 적절한 치료법을 환자에게 적용시키기 위해 암 세포의 증식능을 평가하기 위한 객관적이며 재현성있는 방법을 찾아 방광암의 발생기전을 이해하려는 연구가 계속되고 있다^{2~4)}.

이들중 최근 염색체 17p에 존재하는 p53 유전자는 정상적으로 종양억제 유전자로 작용하고^{5,6)}, 변이가 있는 경우는 정상 P53 유전자의 기능을 억제하게 되어 세포의 악성변성(transformation)을 촉진한다고 알려져 있다^{7,8)}. p53 유전자는 유방암⁹⁾, 직장암¹⁰⁾, 폐암^{11,12)} 등 사람에서 발생하는 대부분의 악성 종양에서 가장 흔히 변이되는 종양억제 유전자^{13,14)}. 방광암의 경우 1991년 Sidransky 등¹⁵⁾이 18례의 방광암 중 61%에서 p53 유전자의 변이를 보고하고 이러한 p53 종양억제 유전자의 변이 또는 소실이 방광암에서 관찰되는 가장 흔한 유전자 변화라고 주장한 이후 방광암의 발생과 p53 유전자 변이간의 관계를 규명하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다^{3,4)}. p53의 면역조직화학적 분석은 변이단백을 검색하는데 확립된 방법이 되어¹⁶⁾ 많은 사람의 종양의 조직절편에서 광범위하게 연구되어 왔으나 세포진에는 많지 않다. Goukon 등¹⁷⁾이 식도암에서 행한 세포진과 조직절편에서의 p53염색의 일치율은 89%에 달하였다. 세포진에서 p53의 면역염색은 p53변이

를 검색하는 유용한 방법이며 단순하고 쉽고 신속한 기법으로 암의 진단에 기여하리라 기대된다. Dowell 등¹⁸⁾에 의한 세포진에서 p53단백의 면역세포화학적 검색의 임상적 유용성에 대해 전향적 연구를 실시한 결과 p53단백의 과발현과 종양간에는 긴밀한 상관관계가 도출되었으며 결론적으로 세포검사 표본에 p53면역염색의 가능성이 제시되었다.

이에 저자들은 방광뇨를 이용한 요세포진 검사에 p53 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 방법을 실시하여 방광이행상피암에서 p53 양성율과 방광이행상피암의 분화도 및 침윤도와의 관계를 비교분석하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

1994년 6월 1일부터 1995년 5월 31일까지 계명대학교 동산의료원 비뇨기과에 내원하여 경요도적 방광암 절제술을 시행한 31예의 방광이행상피세포암 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자중 남녀비는 남자는 27명 여자는 4명으로 6.8:1이었으며, 연령은 38세에서 86세까지로 평균 62.3세였고, 환자의 추적관찰 기간은 3개월에서 15개월까지 평균 10.7개월이었다.

술전 일반요검사, 배설성 요로조영술과 방광경검사를 시행하였고, 경요도적 방광암 절제술 전 골반쌍합진과 요세포화 검사를 시행한 후 종괴의 크기, 모양과 수를 관찰하였다.

2. 연구 방법

1) 면역조직화학적 염색 방법

면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 cytospin을 사용해서 방광뇨를 슬라이드에 부착하고 95% 알코올에 30분 정도 고정시킨 뒤 합수

를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 수세하였다. 실온에서 20분간 normal horse serum(Vectastain Elite kit)을 가한 후 일차항체인 p53 단클론 항체(DO7, Novocastra, U.K.)를 1:100으로 희석하여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 수세하고 이차항체인 biotylated anti-mouse IgG(Vectastain Elite kit)를 가하여 37°C에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. Peroxidase-conjugated streptavidin (Dako, U.S.A.), 1:500을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 10~20분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

광학현미경하에서 p53 발현 유무와 발현 양상을 관찰하였으며, 종양세포의 핵이 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 하고 염색정도가 약한 세포도 염색되지 않는 세포와 구별되는 것은 양성으로 판독하였다. 먼저 저배율(×100)로 염색된 부분을 선택한 후 p53 과발현 정도를 전체 종양 세포중 염색되는 종양세포로 나누어 백분율을 구하였다.

면역조직화학적 염색반응의 양성 대조군으로는 사전 실험을 통하여 p53의 표현이 이미 양성으로 밝혀진 폐 편평상피세포암 조직을 사용하였고, 음성 대조군으로는 일차 항체를 처리하지 않고 PBS를 사용하여 위와 동일한 과정에 의해 염색하였다.

2) 조직학적 분화도 평가

방광암의 조직학적 분화도는 Mostofi grading system에 의하여 분류하였는데¹⁹⁾, grade I이 16예, grade II가 9예, grade III가 6예였다. 이상의 면역조직화학적 염색결과와 조직학적 분화도의 평가는 2명의 병리전문의가 독립적으로

시행하여 결과의 객관성을 부여하였다.

3) 통계학적 분석

방광이행상피암에서의 p53변이 단백질 발현 유무와 Mostofi grade, 임상적 병기에 따른 상호간의 관계는 반응변수 p53 단백질 이항 변수이고 독립변수들이 순서있는 category이므로 logistic regression analysis 방법을 이용하여 분석하였다. p값은 0.05를 기준으로 하였다

결 과

면역조직화학적 염색결과 전체 방광암 31예 중 13예의 방광노(42%)에서 양성반응을 보였다(Fig. 1). 양성 대조군인 폐의 편평상피암에서도 강한 양성반응을 보였다. 그러나 정상인의 요검사와 음성 대조군은 음성반응을 보였다.

1. 임상 병기에 따른 변이 p53 단백질 발현의 차이

전체 방광암의 임상 병기에 따른 분포는 표재성 방광암(stage 0와 A/Ta, Tis와 T1)이 22예, 침윤성 방광암(stage B와 C)이 7예 및 전이성 방광암(stage D)이 2예였다. 변이 p53 단백질에 대한 면역학적 염색결과 표재성 방광암은 전체 22예중 6예(27%)에서 양성반응을 보였으며, 침윤성 방광암에서는 전체 7예중 5예(71%)에서 양성반응을 보였다. 또한 Stage D의 전이성 방광암에서는 2예 모두에서 양성반응을 보였다. 앞의 결과를 종합하여 봤을때 변이 p53 단백질 발현 환자의 비율이 표재성 방광암에서 보다는 침윤성 또는 전이성 방광암에서 높았으며, logistic regression analysis 결과 변이 p53 단백질 발현률과 병기 상호간에는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(p=0.0495)(Table 1).

Table 1. Nuclear expression of mutant p53 protein according to the clinical stage

p53 Expression	Clinical stage			Total No. of pts
	Superficial	Invasive	Metastatic	
Negative	16(73%)	2(29%)		18(58%)
Positive	6(27%)	5(71%)	2(100%)	13(42%)
Total	22	7	2	31

p=0.0495, pts: patients

Table 2. Nuclear expression of mutant p53 protein according to the Mostofi grades

p53 Expression	Mostofi grade(%)			Total No. of pts
	Grade I	Grade II	Grade III	
Negative	13(82%)	5(29%)		18(58%)
Positive	3(18%)	4(71%)	6(100%)	13(42%)
Total	16	9	6	31

p=0.0424, pts: patients

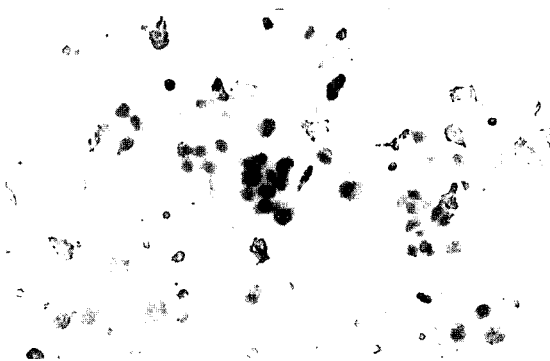


Fig. 1. Diffuse p53 nuclear staining of the anaplastic cells in the case of invasive transitional cell carcinoma of the bladder(Immunohistochemistry for p53, ×100).

2. 조직학적 분화도에 따른 변이 p53 단백질 발현의 차이

전체 방광암 환자의 조직학적 분화도에 따라 분포는 Mostofi grade I이 16예, grade II와

III가 각각 9예와 6예 였다. p53변이 단백질에 대한 면역학적 염색 결과 Mostofi grade I은 전체 16예중 3예(19%)에서 양성반응을 보였으며, grade II에서는 전체 9예중 4예(45%)에서 양성 발현을 관찰할 수 있었다. 또한 grade III는 6예 모두(100%)에서 양성 반응을 보였다. 앞의 결과를 종합하여 봤을때 변이 p53 단백질의 발현율은 조직학적 분화도가 나빠질수록, 즉 Mostofi grade가 높아질수록 증가하였으며, logistic regression analysis 결과 조직학적 분화도의 변화에 따른 변이 p53 단백질의 양성발현 빈도간에는 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(p=0.0424)(Table 2).

방광암 중 비교적 중등도의 분화도에 속하며 가장 높은 발생빈도를 보이는 Mostofi grade II와 III에서의 변이 p53 단백질 발현 유무에 따른 생존율의 분석은 가치가 있다고 생각되며, 또한 임상병기 0와 A인 표재성 방광암의 경우 보다 임상병기 B와 C의 침윤성 방광암에 있어서 아직까지 확실한 예후 인자가 없는 것을

감안할 때 임상 병기 B와 C 환자군에서 변이 p53 단백질 발현 유무에 따른 생존 분석은 의의가 있을 것으로 생각된다. 저자들의 경우 환자의 의무기록을 조사하여 수술 소견과 수술 당시의 병기를 고찰하고, 추적 기간 동안의 질병의 진행 여부와 환자의 생존 여부를 의무기록과 전화문답으로 추적관찰하였다. 그러나 전향적인 연구로 인한 적은 수의 환자, 짧은 추적 기간, 요도경하 방광종양절제술 후 일률적이지 못한 치료등으로 생존을 분석 및 각각의 생존을 차이는 구할 수 없었다.

고 찰

p53 유전자를 포함하는 종양억제 유전자는 정상상태에서는 세포의 분화, 증식을 조절하거나 발암인자를 억제하는 유전자이나, 이 유전자가 소실 또는 변이되면 종양억제 기능이 상실되며 오히려 암의 발생에 중요한 역할을 한다^{20,21}. 그러나 p53 유전자는 이론적으로 열성 발암 유전자이므로 두 개의 대립 유전자중 어느 하나만이라도 정상일 경우 종양발생을 억제시키는 능력을 가지게 되며, 이 p53 유전자의 비활성화는 일종의 염색체 17p의 이형접합성 소실(loss of heterozygosity; LOH)에 기인할 수 있다²².

정상 세포에서 p53 단백질의 세포내 농도가 빠른 전환으로 인해 매우 낮기 때문에 면역조직화학적 방법으로는 감지되지 않는다. 이에 반해 p53 유전자의 변이는 wild type 보다 4~20배 긴 반감기를 갖게 된다²³. 이런 긴 반감기 때문에 핵에 변이 p53 단백질이 축적되어 농도가 증가되고, 또한 분해가 감소되어 면역조직화학적 방법으로 p53 단백질의 감지가 가능하다¹⁶.

일반적으로 조직에서 일어난 p53의 변이를 감지하기 위해 세가지 방법이 이용된다. 첫째

로, 중합효소 연쇄반응을 이용한 특정 exon의 증폭 및 cloning과 sequencing, 둘째, single-strand conformational polymorphism(SSCP), 셋째, 변이 물질에 대한 면역조직화학적 입증이다^{9,10,22}. 저자들은 최근까지 널리 사용되는 방광암 환자의 방광종양 조직을 이용한 면역조직화학적 방법 대신 방광뇨를 이용하여 p53 단백질의 변이를 검색하였다.

방광뇨를 이용한 요세포 검사는 1945년 Papanicolaou와 Marshall에 의해 도입된 이후 요로 종양에 대한 고위험군의 집단 검진, 방광계실 내의 암의 진단, 상피내암의 진단, 방광종양 절제술 후의 잔류종양의 유무 및 종양의 재발을 알기 위한 추적검사등에 이용되고 있다²⁴. 방광뇨를 이용한 요세포검사는 간편하고 반복 시행할 수 있다는 장점이 있으나, 요검물을 판독하는데 있어서 개인적인 주관이 많이 작용하며, 많은 경험이 필요하고, 세포의 변성이 심하여 민감도가 낮다는 단점이 있다. 방광뇨의 경우 민감도는 61~88%로 보고되고 있는데²⁵, 일반적으로 방광종양의 크기가 클수록, 숫자가 많을수록, 병기가 높을수록, 분화도가 나쁠수록 요세포 검사의 민감도가 증가하며, 이 중에서 종양의 분화도가 가장 큰 영향을 미친다^{26,27}. 방광뇨의 세포학적 검사의 민감도는 낮으나 실제적으로 가치가 큰데 그 이유는 첫째, 비침습적이어서 반복적으로 검체를 채취할 수 있고 둘째, 상부요로나 요로의 종양을 진단할 수 있기 때문이다. 이에 저자들은 방광종양 조직 대신 방광뇨를 이용하여서 p53 단백질의 변이를 관찰하였다. 임상 병기에 따른 변이 p53 단백질의 면역학적 염색 결과 표재성 방광암은 전체 22예중 6예(27%)에서 양성반응을 보였으며(p=0.0495), 침윤성 방광암에서는 전체 7예중 5예(71%)에서, Stage D의 전이성 방광암에서는 2예 모두에서(100%) 양성 반응을 보였다(p=0.0424). 또한 조직학적 분화도에 따라 변이 p53 단백질의 염색 결과를 비교하여 보았을때 Mostofi

grade I는 전체 16예중 3예(18%)에서 양성반응을 보였으며, Mostofi grade II에서는 전체 9예중 4예(45%)에서, 또한 Mostofi grade III는 6예 모두에서(100%) 양성반응을 보였다($p < 0.05$). 방광암 중 비교적 중등도의 분화도에 속하며 가장 높은 발생빈도를 보이는 Mostofi grade II와 III에서의 변이 p53 단백질 발현 유무에 따른 생존율의 분석은 가치가 있다고 생각되며, 또한 임상병기 0와 A인 표재성 방광암의 경우보다 임상병기 B와 C의 침윤성 방광암에 있어서 아직까지 확실한 예후 인자가 없는 것을 감안할 때 임상 병기 B와 C 환자군에서 변이 p53 단백질 발현 유무에 따른 생존 분석은 의의가 있을 것으로 생각된다. 이것은 방광종양 조직을 이용한 다른 연구 보고들^{2~4)}과 유사한 결과로 병기가 높을수록, 분화도가 나쁠수록 양성율이 증가되었다.

p53 유전자 변이 유무가 인체 악성종양에서 예후측정인자로서의 가치를 인정받기에는 현재까지의 연구결과로는 충분하지는 않으나, 보고된 몇몇 실험결과에 의하면 예후 추정인자 또는 암의 진행 및 전이를 예측할 수 있는 지표로써 이용가능하다고 생각된다.

1993년 Sarkis등⁴⁾이 43예의 종양병기 T1 방광암에서 분석한 결과에 따르면 면역조직화학적 염색반응 정도가 20% 이상의 변이 p53 단백질 발현율을 보인 환자군에서는 암 진행율이 20.5%인데 비하여 반응 정도가 20% 미만인 환자군에서는 2.5%로서 변이 p53 단백질의 과발현을 보이는 종양병기 T1인 방광암 환자는 암의 진행 확률이 크게 증가한다고 주장하고 향후 중요한 예후인자로 평가될 수 있다고 보고하였다. 그러나 저자들의 경우 전향적인 연구로 인한 적은 수의 환자, 짧은 추적기간, 요도경하 방광종양절제술 후 일률적이지 못한 치료 등으로 생존율 분석 및 각각의 생존율 차이를 구할 수 없었다.

저자는 향후 방광암 조직뿐 아니라 방광뇨

를 이용한 전향적 연구등의 충분한 추적조사 및 연구를 통하여 방광암 환자의 치료방법의 선택 및 예후 추정에 있어 p53 유전자 변이의 임상적인 의의에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

저자들은 p53 유전자의 변이와 방광암의 분화도와 병기와의 관계를 알아보기 위해 방광 상피세포암으로 경요도적 절제술을 시행한 31명의 환자로부터 방광경 검사를 시행하기전 방광뇨를 이용하여 p53 면역조직화학적 염색을 시행하였다. p53 양성율은 5%를 기준하였을때 42% 였으며 병기가 높을수록(표재성: 21%, 침윤성: 71%, 전이성: 100%), 조직학적 분화도가 나쁠수록(I: 18%, II: 45%, III: 100%) 양성율이 증가하였다($p < 0.05$).

방광뇨를 이용한 변이 p53 단백질의 면역조직학적 방법을 통한 발현은 보다 나쁜 분화도와 보다 침습적인 방광이행상피암의 표지자로서 이용될 수 있으며, 향후 보다 많은 환자에서 전향적 연구등의 충분한 추적조사를 통한다면 방광종양 조직뿐 아니라 방광뇨를 이용하여서도 방광암 환자의 치료방법의 선택 및 예후 추정에 있어 변이 p53 단백질 발현의 임상적인 의의를 찾을 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM: Tumors of the Kidney, Bladder, and Related Urinary Structures. Atlas of Tumor Pathology, fascicle 11, 3rd series. Washington DC, AFIP, 1994
2. Wright C, Mellon K, Johnstone P, et al: Expression of mutant p53, c-erbB2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the

- human urinary bladder. *Br J Cancer* 63:967- 970, 1991
3. Fujimoto K, Yamata Y, Okajima E, et al: Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 52:1393-1398, 1992
 4. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. *J Natl Cancer Instit* 85:53-59, 1993
 5. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM: Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85, 1986
 6. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57:1083-1093, 1989
 7. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312:646-649, 1984
 8. Crawford L: The 53,000 Dalton Cellular Protein and Its Role in Transformation. London, Academic 1983
 9. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: Genetic and immunohistochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5: 893-899, 1990
 10. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al: Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989
 11. 전영준, 한승범, 이상숙: 편평세포암에서 p53 변이의 발현과 TNM 병기와의 상관관계. 계명 의대 논문집 13:405-416, 1994
 12. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335:675-679, 1990
 13. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53, 1991
 14. Nigro J, Baker SJ, Preisinger AC, et al: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342:705-708, 1989
 15. Sidransky D, Von-Eschenbach A, Tsai YC, et al: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706-709, 1991
 16. Thomas DW: p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-330, 1992
 17. Goukon Y, Sasano H, Nishihira T, et al: p53 immunolocalization in cytology specimens: a study in human esophageal carcinoma. *Diagn Cytopathol* 11:113-118, 1994
 18. Dowel SP, Wilson POG, Derias NW, Lane DP, Hall PA: Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 54:2914-2918, 1994
 19. Mostofi FK, Sobin IH, Torloni H: Histological Typing of Urinary Bladder Tumours. International Classification of Tumours, No. 10. Geneva: World Health Organization, 1973.
 20. Marshall CJ: Tumor suppressor genes. *Cell* 64: 313-326, 1991
 21. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146, 1991
 22. Cropp CS, Lidereau R, Campbell G, et al : Loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 18 in breast carcinoma: Two additional regions identified. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7737-7741, 1990
 23. Oren M: The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823:67-78, 1985
 24. Koss LG. Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Basis. Vol. 2, 4th ed. Philadelphia, JP Lippincott, 1992, pp 890-1017
 25. Rife CC, Farrow GM, Utz D: Urine cytology of transitional cell neoplasms. *Urol Clin N Am* 6: 599-612, 1979
 26. Koss LC, Deitch D, Ramanathan R, Shermann AB: Diagnostic value of cytology of voided urine. *Acta Cytol* 29:810-816, 1985
 27. Zein T, Wajsman Z, Englander LS, et al: Evaluation of bladder washings and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer and its correlation with selected biopsies of bladder mucosa. *J Urol* 132: 670-671, 1984