

진행된 성문 상부암 환자에서 p53의 발현과 임상적 의의

경희대학교 의과대학 방사선종양학교실

강진오·홍성언

Association of p53 Protein Expression with Clinical Outcome in Advanced Supraglottic Cancer

Jin Oh Kang, M.D. and Seong Eon Hong, M.D.

Department of Radiation Oncology, College of Medicine Kyung Hee University Hospital, Seoul, Korea

Purpose : To determine the incidence and prognostic effect of p53 expression in patients with advanced supraglottic cancer.

Materials and Methods : Twenty-one cases of total 48 advanced supraglottic cancer patients who received postoperative adjuvant radiation therapy were evaluated by immunohistochemical staining employing p53 monoclonal antibody.

Result : Three out of six stage III patients and four out of fifteen stage IV patients showed p53 expression without statistically significant difference ($p=0.608$). Five year survival rates are 93% in p53 negative, 86% in p53 positive patients and there was no significant difference ($p=0.776$). p53 expression does not show statistically significant correlation with primary tumor status ($p=0.877$), lymph node status ($p=0.874$) and age ($p=0.64$).

Conclusion : There was no statistically significant correlation between traditionally known risk factors and p53 expression.

Key Words : Supraglottic cancer, p53 expression, Prognostic factor

서론

두경부 암은 서구에서 전체 암의 5%에 해당하고 동아시아나 인도에서는 더 높은 빈도를 보이며 40%의 환자는 진단 후 5년 이내에 사망한다.¹⁻⁴⁾ 후두암은 두경부암 중에서 제일 많은 빈도를 차지하며, 이의 역학과 위험 인자들은 잘 알려져 있으나 이들의 분자생물학적 기전은 잘 알려져 있지 않다. 종양 억제 유전자인 p53은 두경부암의 분자 생물학적인 기전에 관련

되는 것으로 알려져 왔는데 이는 다른 종류의 종양^{5,6)}에서와 마찬가지로 두경부암에서도⁷⁻¹¹⁾ p53의 변이가 가장 흔하게 관찰되기 때문이다. 현재까지의 연구 보고들에 의하면 p53 변이가 상피 세포 암의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있으며,¹²⁾ 많은 종류의 암에서 정상 p53 유전자의 변이, 소실, 분해증가 등의 원인으로 인한 이차적인 p53의 과발현이나 발현소실이 정상적인 세포조절 기능의 상실을 초래하고 암세포의 증식에 영향을 주어 클론 증식을 일으키는 것으로 알려졌다.¹³⁻¹⁶⁾

또한 p53의 상태변화가 종양의 치료 효과를 결정한다는 증거도 있다. 세포주를 이용한 실험의 보고에서는 p53 변이가 방사선 저항성을 증가시킨다고 하였다.¹⁷⁾ 이 결과는 최근 방사선과 항암제에 의한 apop-

* 이 논문은 1997년 10월 23일 접수하여 1998년 2월 9일 채택되었음.

책임저자: 강진오, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학병원 치료방사선과

tos의 유도에 wild-type p53이 관여함을 보여준 보고서에서¹⁸⁻²⁰⁾ p53의 비활성화가 DNA에 손상을 주는 인자에 대한 저항성을 증가시킨다는 사실과 일치한다. 이에 반해 다른 연구에서는 변이된 p53을 갖는 세포는 방사선에 대한 DNA 손상회복에 실패함을 시사하였고^{21, 22)} 이로 인해 DNA 손상 민감도가 증가하여 더 많은 세포사를 볼 수 있을 것이라고 하였다. 따라서 DNA 손상인자에 대한 반응에서 어떤 효과가 주로 작용할 지는 조직의 유형에 따라 다르게 나타날 것으로 보이며 특정한 임상적 상황에서 각기 확인되어야 할 것이다.

저자들은 진행된 성문상부암 환자들 중 완치 목적의 방사선 치료를 받은 비교적 동일한 환자군을 대상으로 하여 p53과 통상적인 예후 인자들과의 관계 그리고 방사선 치료의 결과에 대해 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1985년부터 1995년까지 근치목적의 완전 또는 부분 후두절제술을 시행 받고 슬후 보조적 방사선치료를 받은 진행된 성문상부암 환자 48명 중 적절한 병리학적 조직 표본을 확보 할 수 있었던 21명을 대상으로 하였다. 두경부암 환자의 자료는 TNM 병기와 연령, 치료 결과를 p53 면역염색 결과와 비교 분석하였다. 환자들의 연령 분포는 40세에서 70세이었고 평균 연령은 59세이었다. 남자 20명, 여자 1명이었다. 병기 3은 6예, 병기 4는 15예이었다. 후두 전절제술을 받은 환자가 10예, 성문상부 절제술을 받은 환자가 9예, Vertical hemilaryngectomy를 시행 받은 환자가 2예이었다. 방사선 치료는 4860cGy에서 6160cGy를 시행하였다(중앙값 5400cGy). 추적 조사 기간은 16개월에서 154개월이며 중앙값 57개월이었다.

2. 방법

파라핀 블록을 8 마이크로미터 두께로 잘라서 하전된 슬라이드에 부착시킨 후 부착이 잘 되도록 하기 위해 -70℃ 냉장고에 24시간 보관하였다. 슬라이드를 꺼내어 실온에 약 20분간 방치한 후 60℃ xylene에 20분간 담겼고 다시 꺼내어 20℃ xylene에 10분간 처리하였다. 슬라이드를 꺼내어 100% 에탄올에 10분간 2회 처리하고 90% 에탄올에 10분간, 80% 에탄올에 10분간 처리하고 증류수로 2회 세척하였다. 슬라이드 위에 Poppen으로 조직 주변을 따라 원을 그리고 3% H₂O₂에 5분간 처리를 하였다. PBS(Phosphate buf-

fered saline)에 2회 세척하고 0.05M TrisHCl 2.5% BSA(Bovine serum albumin)로 5분간 blocking을 시켰다. 슬라이드위에 처리된 blocking agent를 버리고 그 위에 일차 항체(mouse antihuman p53 monoclonal Ab, NCL-p53-BP, Novocastra Lab. Ltd.)를 1:100의 비율로 적용하였다. 항체를 30분간 실온에서 반응시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 일차항체를 검색하기 위하여 삼단계의 peroxidase-antiperoxidase 과정을 LSAB kit(Dako Co./USA)를 이용하여 시행하였다. 2차 항체(biotin conjugated-anti rabbit immunoglobulin antibody)를 10분간 적용하고 PBS로 세척한 후 avidin biotin enzyme reagent를 10분간 적용하고 PBS로 세척하였다. AEC chromogen solution을 적용하고 5분에서 10분 사이 발색 반응을 시켰고 발색의 정도에 따라 충분하다고 생각되는 것은 PBS로 세척하여 반응을 중지 시켰다. 대조염색은 헤마톡실린으로 하였고 3-5분간 반응시켰다. 반응 후 PBS로 세척하고 실온에서 약간 건조시킨 후 crystal mount로 봉입하였다. 최적의 반응조건을 결정하기 위한 양성대조는 직장암 조직을 이용하였다. 핵이 붉은 색으로 염색이 된 세포가 일정한 무리를 이루어 나타나는 경우를 양성으로 판정하였다. 생존기간은 최초 진단일로부터 사망일 혹은 추적관찰 종료일로 계산하였으며, 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였고, 예후 인자들간의 통계적 유의성 검정은 χ^2 test로 하였다.

결 과

병기에 따른 생존 기간 중앙 값은 stage III가 70개월, IV가 61개월이었다. Stage III 6예 모두 마지막 관찰 시점까지 재발의 증거 없이 생존하였다. Stage IV는 15예 중 2예는 각각 15개월과 29개월째 국소 재발하였고 각각 16개월과 32개월째에 사망하였는데 16개월째 사망한 환자는 p53 음성이었다고 32개월째 사망한 환자는 p53 양성이었다. 1예는 81개월째 폐 전이로 사망하였고 p53 음성이었다. 5년 생존율은 stage III가 100%, stage IV가 87%이었다($p=0.073$). 사망한 3예 모두 후두 전절제술을 받았고 5000cGy 이상의 방사선 치료를 받았다.

전체 21명 중 14명이 p53 음성(66%)이었고 7명이 양성(33%)이었다. p53의 발현은 핵 내에 국한 되어 있었고 세포질 염색은 보이지 않았다. 염색 양상은 거의 모두 불균질한 염색 유형을 보였다. 조직간에는 분화도가 덜한 조직에 더 많은 염색 양상을 보였다(Fig. 1).

생존기간 평균값은 p53 음성군이 60개월, 양성군이 76개월이었고 5년 생존율은 p53 음성군이 93%, 양성군이 86%($p=0.776$)이었으나 p53 음성군의 평균 추적 조사기간(40개월)이 p53 양성군의 추적 조사기간(84개월)에 비해 짧아서 통계적 차이는 없었다(Fig. 2).

Stage III는 모두 6예 중 3예에서 양성 반응을 보였고(50%) stage IV는 15예 중 4예에서 양성 반응을 보였으나(27%) 통계적 차이는 없었다($p=0.608$)(Table 1). Stage IV 환자만을 대상으로 하여 p53 음성군과 양성군의 평균 생존 기간은 각각 46.3, 46.2개월로 차이가 없었다($p=0.995$).

T stage와 N stage에 따른 p53의 발현도의 차이는 각각 p value는 0.877과 0.874로 차이가 없었다. 전이된 림프절의 수에 따른 p53의 발현도의 차이는 없었다($p=0.365$).

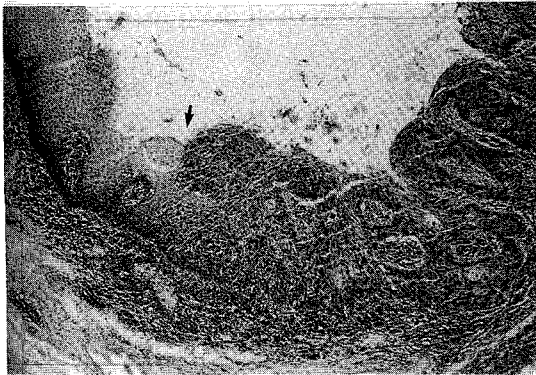


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in supraglottic cancer. p53 staining shows marked differences between neoplastic tissue and normal epithelium(arrow)($\times 200$).

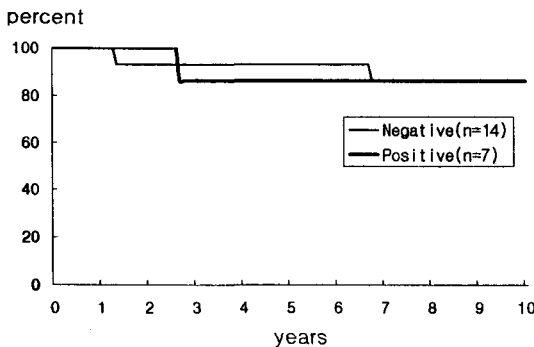


Fig. 2. p53 expression and survival. There was no statistically significant difference between p53 negative and positive groups($p=0.776$).

59세 이하와 60세 이상의 p53 발현도의 비교에서, 두 군사이의 발현도의 차이는 없었다($p=0.640$).

고 안

방사선치료는 후두암의 주요 치료 방법이지만 상당한 치료 기술의 발전에도 불구하고 지난 20년간 전체 생존율에는 변화가 없었다. 치료의 실패는 거의 다 국소재발이며 항암제와 방사선치료의 병용요법으로 결과가 상당히 고무적이긴 하지만 아직까지 현저한 개선은 없었다.²³⁾

전통적으로 후두 종양의 치료와 예후는 병기나 종양의 분화도 등의 변수들에 의해 결정되었다. 이러한 정보는 진단 당시에 쉽게 얻을 수 있지만 치료 방침의 결정에서 최적의 방법이 아닐 수도 있으며, 이는 아직까지 후두암의 치료에 있어서 커다란 진전을 보지 못하는 이유로 해석이 될 수 있을 것이다.

그런데 현재 많은 발전을 보이고 있는 분자 생물학적인 예후인자의 도입이 중요한 예후 인자의 역할을 하여 예후를 평가하고 치료 방침을 결정하는데 도움을 줄 수 있을 것이라는 보고가 있다.

기존의 보고된 연구에 의하면 면역염색에서 보이는 p53의 발현은 p53 유전자의 변이와 관련이 있음을 보여 주었고²⁴⁾ p53 기능의 소실이 유방암과 폐암에서는 생존기간의 감소와 연관이 있음을 확인하였다.²⁵⁻²⁸⁾

Brennan 등²⁹⁾에 의하면 두경부종양에서는 p53 변이 환자의 절제 변연과 림프절을 분자 생물학적인 검색을 하여 병리학적 소견상 완전절제를 한 것으로 판

Table 1. p53 Expression and Clinical Parameters

	p53		p value
	(-)	(+)	
Stage			
III	3	3	0.608
IV	11	4	
T stage			
1-2	6	4	0.877
3-4	8	3	
N stage			
0-1	5	3	0.874
2-3	9	4	
No. of LNs			
0-3	12	4	0.365
>4	2	3	
Age			
<59	7	5	0.64
>60	7	2	

정하였던 환자의 50% 이상에서 면역 염색상 p53의 양성변연(positive margin) 소견을 확인하였고 분자 생물학적으로 양성 변연의 소견을 보인 환자는 국소 재발율이 높았다고 보고하였다.

두경부종양에서 p53과 병기 그리고 임파절 전이에 대한 상관관계를 보기 위한 연구가 시도되었는데, p53의 발현 정도는 조직과 p53의 검색에 사용된 방법에 따라 33-100%로 보고되고 있으며,^{11, 30-33)} 이 연구들은 p53 변이가 신생물 형성의 비교적 초기 단계에 발생하여 병이 진행됨에 따라 발현의 빈도가 증가함을 시사하였다. 그러나 연령, 성별, 활동도, 조직의 분화도 등과는 관련성이 없음을 확인 하였다.

저자들은 근치 목적의 수술 후 방사선치료를 받은 환자들에 있어서 이와 같은 분자생물학적 표식자의 발현 빈도를 조사하고 임상 예후 인자들과 연계시켜 임상적 유용성을 증명하고자 하였다.

기존의 연구들은 방사선 치료를 받은 환자만을 대상으로 한 것이 아니었으나 수술 후 방사선 치료를 받은 21명의 환자들을 대상으로 한 저자들의 연구에서와 마찬가지로 p53의 발현과 전통적인 예후 인자들과의 상관성을 증명 할 수 없었다. 또한 p53 변이와 생존기간, 국소 재발율 등과도 연관성을 확인 할 수 없었다.

후두암은 많은 부분에서 담배나 술, 또는 발암물질에 대한 장기간 노출과 같은 환경적 원인으로 발생하는 것으로 밝혀져 있는데, p53 발현도는 흡연과 음주 습관과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.^{8, 34)} 그러나 본 논문에서는 21예 모두가 흡연의 경력이 있는 환자들이었기 때문에 흡연자와 비흡연자와의 차이를 확인 할 수 없었다.

결 론

진행된 성문상부암 환자로 부분 혹은 후두 전절제술 후 방사선 치료를 받은 21예를 대상으로 하여 p53 발현 빈도와 임상 예후 인자들간의 관계를 보았다. P53의 발현과 병기, T 병기, N 병기, 침범된 림프절의 수, 나이 등의 전통적인 예후 인자들과는 통계적인 연관 관계가 없었다. 또한 p53의 발현과 전체 생존율과의 관계도 통계적으로 의미있는 관련성을 확인 할 수 없었다. 진행된 성문 상부암에서 면역 염색을 통한 p53의 발현의 검색은 예후 인자로서의 유용성이 없을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Jacobs C. The internist in the management of head and neck cancer. *Ann Intern Med* 1990; 113(10):771-778
2. Boring CC, Squires TS, Tong T, et al. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 1994; 44(1):7-26
3. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, et al. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993; 328(3):184-194
4. Pinborg JJ. Control of oral cancer in developing countries. *Bull WHO* 1984; 62:817-839
5. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53
6. Levine AJ, Momand J, Finlay CA, et al. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351(6326):453-456
7. Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52(17):4832-4836
8. Field JK, Spandidos DA, Malliri A, et al. Elevated P53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991; 64(3):573-577
9. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, et al. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119(10):1118-1122
10. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, et al. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52(21):5997-6000
11. Watling DL, Gown AM, Coltrera MD. Over-expression of p53 in head and neck cancer. *Head Neck* 1992; 14(6):437-444
12. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, et al. p53 over-expression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *Int J Cancer* 1992; 52(2):178-182
13. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351(6326):453-456
14. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-16
15. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, et al. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature*

- 1992; 55(6363):846-847
16. Lane DP. **Cancer**. A death in the life of p53. *Nature*. 1993; 362(6423):786-787
 17. Brachman DG, Beckett M, Graves D, et al. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53(16):3667-3669
 18. Clark AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyte apoptosis by P53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362:849-852
 19. Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, et al. Dominant oncogenes, tumor suppressors, and radiosensitivity. *Cell Mol Biol Res* 1995; 41(3):161-166
 20. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362(6423):847-849
 21. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51:6304-6311
 22. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; 71(4):587-597
 23. Haffty BG, Son YH, Sasaki CT, et al. Mitomycin C as an adjunct to postoperative radiation therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck: results from two randomized clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27(2):241-250
 24. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?—Revisited!. *J Pathol* 1994; 172(1):1-4
 25. Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(3):200-206
 26. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329(18):1318-1327
 27. Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, et al. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82(7):835-840
 28. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, et al. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 1993; 53(12):2846-2851
 29. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332(7):429-435.
 30. Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52(17):4832-4836
 31. Boyle JO, Hakim J, Koch W, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53(19):4477-4480
 32. Pavelic ZP, Gluckman JL, Gapany M, et al. Improved immunohistochemical detection of p53 protein in paraffin-embedded tissues reveals elevated levels in most head and neck and lung carcinomas: correlation with clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 1992; 12(5):1389-1394
 33. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, et al. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52(21):5997-6000
 34. Field JK, Spandidos DA, Stell PM. Overexpression of p53 gene in head-and-neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. *Lancet* 1992; 339(8791):502-503

= 국문 초록 =

진행된 성문 상부암 환자에서 p53의 발현과 임상적 의의

경희대학교 의과대학 방사선종양학교실

강진오 · 홍성언

목적 : 진행된 성문 상부암 환자에서 p53 발현의 빈도와 예후 인자로서의 가능성을 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 : 완전 또는 부분 후두 절제술을 받고, 방사선 치료를 받은 성문 상부암 환자 21 예를 대상으로 하여 antihuman monoclonal p53 antibody를 이용하여 면역 염색을 실시하였다.

결과 : 3기 환자 6명 중 3명에서 양성 반응을 보였고 4기 환자 15명 중 4명에서 양성 반응을 보였다. 양군간의 발현의 빈도는 통계적으로 차이가 없었다($p=0.608$). p53 음성 환자 군과 양성 환자군의 5년 생존율은 각각 93%와 86%이었으나 통계적인 차이는 없었다($p=0.776$). p53의 발현은 연령($p=0.64$), T stage($p=0.877$), N stage($p=0.874$) 등과도 연관성을 보이지 않았다.

결론 : p53의 발현은 전통적인 임상 인자들과 통계적으로 유의한 관련성을 보이지 않았다. 진행된 성문 상부암에서 면역 염색을 통한 p53 발현의 검색은 예후 인자로서 임상적 유용성이 없을 것으로 생각된다.