

p53 유전자 돌연변이에 따른 유방암의 위험 요인 구명을 위한 환자-대조군 연구

김 현, 안세현¹, 이무송²

충북대학교 의과대학 예방의학교실

울산대학교 의과대학 ¹외과학교실 및 ²예방의학교실

= Abstract =

A Case-control Study for Assessment of Risk Factors of Breast Cancer by the p53 Mutation

Heon Kim, Se-Hyun Ahn, Moo-Song Lee

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University

Department of General Surgery, and Department of Preventive Medicine,

College of Medicine, Ulsan University

p53 is the most frequently mutated gene in female breast cancer tissues and the prognosis of breast cancer could be changed by mutation of the gene. This study was performed to examine risk factors for breast cancer subtypes classified by p53 mutation and to investigate the roles of p53 gene mutation in carcinogenesis of breast cancer.

The study subjects were 81 breast cancer patients and 121 controls who were matched to cases 1:1 or 1:2 by-age, residence, education level and menopausal status. All the subjects were interviewed by a well-trained nurse with standardized questionnaire on reproductive factors, and were asked to fill the self-administrative food frequency questionnaire. p53 gene mutation in the cancer tissue was screened using polymerase chain reaction (PCR)-single strand conformational polymorphism (SSCP) method. Mutation type was identified by direct sequencing of the exon of which mobility shift was observed in SSCP analysis.

Mutations were detected in p53 gene of 25 breast cancer tissues. By direct sequencing, base substitutions were found in 20 cancer tissues (10 transition and 10 transver-

이 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 연구되었음.

sion), and frame shift mutations in 5 (4 insertions and 1 deletion). For the whole cases and controls, risk of breast cancer incidence decreased when the parity increased, and increased when intake amount of total calory, fat, or protein increased. Fat and protein were statistically significant risk factors for breast cancer with p53 mutation. For breast cancer without p53 mutation, protein intake was the only significant dietary factor.

These results suggest that causes of p53 positive breast cancer would be different from those of p53 negative cancer, and that dietary factors or related hormonal factors induce mutation of p53, which may be the first step of breast cancer development or a promoter following some unidentified genetic mutations.

Key words : Breast cancer, Case-control study, p53, Mutation

I. 서 론

유방암은 미국이나 유럽의 여성에게 매우 흔한 암으로서, 10명의 미국 여성 중 1명이 평생 동안 한번 이상 유방암에 걸린다(Parkin 등, 1992). 우리나라 여성의 유방암 발생률은 구미에 비해서는 상대적으로 낮지만, 점차 증가하는 추세를 보이고 있다. 로스앤젤레스에 거주하는 한국 여성의 유방암 발생률이 국내에 거주하는 우리나라 여성의 유방암 발생률(Ahn 등, 1994)에 비하여 현저히 높는데, 이 사실은 유방암 발생에 환경적 요인이 작용하고 있음을 시사하는 것이다. 따라서 생활양식이 서구화될수록 우리나라의 유방암 발생률은 급격하게 증가할 전망이다.

일반적으로 발암 물질은 DNA에 손상을 가할 수 있는 변이원성 물질이며(Watson 등, 1992), 암이 발생되기 위해서는 적어도 두 가지 이상의 돌연변이가 일어나야 한다. 가족 집적성 암에서는 생식 세포 돌연변이(germinal mutation)를 부모로부터 물려받고, 그후 체세포 돌연변이(somatic mutation)가 일어나서 암이 발생된다. 반면, 두 가지 이상의 체세포 변이가 암을 유발하기도 한다(Knudson, 1985). p53 유전자의 돌연변이가 이러한 예로서, 이는 암조직에서 가장 흔히 발견되는 유전적 이상 소견이다(Nigro 등, 1989; Baker 등, 1989; Levine 등, 1991; Hollstein 등, 1991). p53 유전

자에 점 돌연변이(point mutation)가 있는 Li-Fraumeni 증후군을 가진 사람 중 50%가 30세 이전에 암에 걸리고, 90%가 70세 이전에 암에 걸리며(Watson 등, 1992), 이러한 특성이 유전된다(Li 등, 1988). 성상세포종(astrocytoma)(James 등, 1989), 폐암(Yokoda 등, 1987), 그리고 대장암(Baker 등, 1989) 등에서 p53 유전자가 자리잡고 있는 17번 염색체 단완(short arm)의 이종접합성의 상실(loss of heterozygosity, 이하 LOH)이 흔히 관찰되는데, 유방암에서도 17번 염색체 단완의 LOH가 관찰된 예가 전체의 70%에 이르기도 한다(Mackay 등, 1988; Callahan과 Campbell, 1989). 한편, 중국이나 남아프리카에서 흔히 발생하는 간암은, 아플라톡신(aflatoxin)이 p53 유전자 249번 코돈(codon)에 돌연변이를 유발함으로써 발생되는 것으로 보고되었는데, 이는 폭로되는 발암물질의 종류에 따라 유발되는 p53 유전자 돌연변이 유형도 달라질 것임을 시사하는 것이다(Hsu 등, 1991; Bressac 등, 1991).

이와 같이, p53 돌연변이가 암발생과 밀접한 관련이 있으므로, p53 유전자의 돌연변이가 있는 암과 그렇지 않은 암, 더 나아가서 p53 유전자 돌연변이가 있는 암중에서도 변이 유형이 다른 암은 그 원인이나 예후가 서로 다를 것으로 짐작할 수 있다. p53에 대한 면역 조직 화학 검사(immunohistochemistry)에서 양성인 환자는 암의 침습이 깊고 임파선 전이율이 높으

며(Filipe 등, 1993), 그 평균 생존 기간이 p53 염색 음성인 환자에 비하여 유의하게 짧고 5년 생존율도 낮다(Martin 등, 1992; Horak 등, 1993; Harris 등, 1993). 이러한 사실들은 p53 유전자 돌연변이가 있는 암과 없는 암이 서로 다른 종류의 아형임을 입증하는 소견이다.

이러한 p53 유전자의 돌연변이를 일으키는 원인물질이 무엇인가를 확인하는 방법은 p53 유전자 돌연변이가 생긴 암과 생기지 않은 암의 유발인자를 비교하는 방법이다. 기존의 유방암에 대한 환자-대조군 연구가 유방암 환자와 대조군간의 각종 위험인자 폭로정도를 비교하여 유방암의 원인을 찾아내는 방법이라면, p53 유전자 돌연변이가 있는 환자군과 대조군, 그리고 돌연변이가 없는 환자군과 대조군 사이에 위험인자 폭로정도가 차이가 있는지를 비교하는 연구는 특정 유형의 p53 유전자 돌연변이의 원인을 찾아내는 새로운 유형의 환자-대조군 연구라 할 수 있다. 따라서 저자 등은, 유방암을 p53 유전자 돌연변이 양성인 유방암과 p53 유전자 돌연변이 음성인 유방암으로 나누고, 유방암의 중요한 위험인자로 알려져 있는 식이요인과 생식 요인이 이들 각각에 대하여 어떻게 작용하는지를 평가함으로써, p53 유전자 돌연변이가 유방암의 발생과정에서 작용하는 시기와 그 역할을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1993년 1월부터 1994년 11월 사이에 서울중앙병원에서 조직학적으로 유방암 진단을 받고 수술을 받은 환자 중에서 종양 조직의 채취가 가능하고, 그 조직에서 DNA를 추출할 수 있었던 여성 81명을 환자군으로 하였다. 이들의 연령 범위는 31세와 85세 사이였으며 평균 연령은 47.6세였다. 한편 이들과 연령차가 3세 이내이면서, 거주 지역, 교육 수준, 그리고 폐경 상태가 동일하고, 동일 병원에 암이 아닌 질환으로 입원한

여성들, 환자군에 대하여 1:1 혹은 1:2로 짝지어서 대조군으로 정하였다. 대조군의 수는 121명이었으며, 연령 범위는 31-87세였고 그 평균 연령은 46.5세였다.

2. 연구 방법

1) 설문 조사

숙련된 간호사가 환자군과 대조군의 모든 대상자에 대하여 직접 면담을 시행하였다. 면담 내용에는, 인적 사항 및 인구학적 요인, 여성 생리력과 임신력, 식이 습관 등에 관한 사항이 포함되어 있다. 식이 습관에 대한 조사 방법으로는 음식 섭취 빈도법(food frequency method)을 이용하여 주요 음식물의 섭취량 및 섭취 빈도를 파악한 후, 음식물별 식이 성분표를 이용하여 탄수화물, 동물성 지방, 단백질 섭취량 및 총 칼로리 섭취량 등을 계산하여 분석에 사용하였다.

2) Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism

유전자 분석을 위하여, 환자군에 대해서는 수술시 적출한 종양조직에서 암 조직과 암 주위의 정상조직 일부를 용기에 채취하여 -70℃의 초저온 냉동고(deep freezer)에 보관하였다. 냉동 보관한 암 조직과 정상 조직에 proteinase K를 가하여 단백질을 소화시키고 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 이용하여 DNA를 추출한 다음 RNase를 가하여 RNA를 분해하였다. p53 유전자는 5-9번 exon만을 선택적으로 증폭하였다(Mashiyama 등, 1991). 추출된 DNA 500ng을 원형(template)으로 사용하며, 각 엑손(exon)에 적합한 양쪽 시발체(primer)를 가하여 5-10번 엑손을 따로따로 증폭시켰다. 최종 반응액 100μl에는 4가지 dNTP 200μM씩, 3.0mM MgCl₂, 1X PCR 반응 완충액, [α-³²P] dCTP 0.1μl, 그리고 Taq polymerase 2.5 unit 등이 포함되어도록 한 후 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus)로 35회 증폭시켰다. 각 시발체와 온도 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Primers and thermal conditions for PCR-SSCP and sequencing reactions

| Primer | Amplified size (Exon number) | Thermal condition |
|--|---------------------------------|----------------------------|
| 5'-TTCCTCTTCTGCAGTACTC-3' 5'-AGTTGCAAACCCAGACCTCAG-3' | 408 bp (5, 6) | 94°C(1')-58°C(1')-74°C(1') |
| 5'-GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC-3' 5'-CAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3' | 139 bp (7) | 94°C(1')-55°C(1')-74°C(1') |
| 5'-CCTATCCTGAGTAGTGGTAA-3' 5'-CCAAGACTTAGTACCTGAAG-3' | 330 bp (8, 9) | 94°C(1')-55°C(1')-74°C(1') |
| 5'-TGTGCTGCAGATCCGTGGG-3' 5'-GAGGTCACTCACCTGGAGTG-3' | 139 bp (10) | 94°C(1')-62°C(1')-74°C(1') |

Single strand conformational polymorphism(SSCP) 분석은 Hensel 등(1991)에 의해서 기술된 방법을 사용하였다. PCR product 5µl을 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10 mM EDTA 용액(pH 8.0) 95µl에 가한 다음, 이 혼합액 10µl을 denaturing buffer(95% formamide, 20mM EDTA, pH 8.0, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 10µl와 섞었다. 80°C로 5분간 가열한 후 이 용액 3µl를 1X TBE 완충액을 함유한 5% polyacrylamide (acrylamide:bis-acrylamide=59:1) gel 상에서 4°C 또는 상온에서 40W로 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 젤을 꺼내서 말린 다음, -70°C에서 자가감광하여 이동거리와 띠 모양에 차이가 있는지를 관찰하였다.

3) 염기서열 분석(Cycle sequencing)

PCR-SSCP에서 이상이 발견된 부분은 염기서열 분석으로 염기서열을 확인하였다. 먼저 이상이 발견된 부분을 PCR을 이용하여 다시 증폭하고, Centricon 30을 사용하는 초원심분리(ultracentrifuge) 방법과 에탄올(ethanol) 침전법을 이용하여 남아 있는 시발체를 제거하고 증폭된 부분만을 정제하였다. 염기서열 분석에 이용한 시발체는 T4 polynucleotide kinase와 [γ -³²P] ATP를 써서 종말표지(end-labelling)하고 다음의 반응에 사용하였다. 염기서열 분석 반응을 위해서는 1.5 pmol 표지된 시발체, 10X 완충액, 정제된 DNA 원형, 그리고 Taq polymerase를 넣고, DNA thermal

cycler로 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 그리고 70°C에서 1분의 주기를 35회 반복하였다. 반응이 끝난 다음, urea가 함유된 6% polyacrylamide gel에서 60 W로 3시간동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 젤은 말려서, -70°C에서 밤새 자가감광한 다음 현상하여 염기서열에 이상이 있는지 판독하였다.

4) 통계적 분석

각 위험 인자의 유방암 발생에 대한 효과에 대해서는, 통계 프로그램인 PC-SAS 6.08과 EGRET을 이용하여 chi-square 검정법과 조건부 로지스틱 분석(conditional logistic analysis)을 시행하였다. 먼저 전체 대상자를 모두 포함하여 분석한 다음, p53 돌연변이 여부로 나누어 통계분석을 반복하였다.

III. 연구 결과

1. 유방암 환자의 돌연변이 유형

유방암 환자 81명중에 돌연변이가 관찰된 예는 25예로서 전체의 30.9%를 차지하였다(Table 2). 이 중에서 염기 치환(base substitution)이 20예(24.6%)로서 전이(transition)와 변위(transversion)가 각각 10예를 차지하여 전체 돌연변이의 40.0%밖에 해당하였다. 전이 중에는 C to T 전이가 8예(9.9%)로서 전체 전이의 80%를 차지하였고, 'G to A'와 'A to G'는 각각 1예

Table 2. The detection rate of p53 mutation by the type of mutation in breast cancer cases

| Type of mutation | Frequency (%) among all cases (n=81) | Frequency (%) among all mutations (n=25) |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| Base substitution | 20/81 (24.6) | 20/25 (80.0) |
| Transition | 10/81 (12.3) | 10/25 (40.0) |
| C to T | 8/81 (9.9) | 8/25 (32.0) |
| G to A | 1/81 (1.2) | 1/25 (4.0) |
| A to G | 1/81 (1.2) | 1/25 (4.0) |
| Transversion | 10/81 (12.3) | 10/25 (40.0) |
| C to G | 4/81 (4.9) | 4/25 (16.0) |
| G to T | 4/81 (4.9) | 4/25 (16.0) |
| A to T | 1/81 (1.2) | 1/25 (4.0) |
| T to A | 1/81 (1.2) | 1/25 (4.0) |
| Insertion | 4/81 (4.9) | 4/25 (16.0) |
| Deletion | 1/81 (1.2) | 1/25 (4.0) |
| Total | 25/81 (30.9) | 25/25 (100) |

에 불과하였다. 변위는 'C to G'와 'G to T'가 각각 4예(4.9%)로서 전체 돌연변이의 16.0%를 차지하였고, 'A to T'와 'T to A'가 각각 1예로서 전체 돌연변이의 4.0%를 차지하였다. 삽입(insertion)은 4예(4.9%)에서 발견되어 전체 돌연변이의 16.0%였으며, 탈락(deletion)은 1예(1.3%)로서 전체 돌연변이의 4.0%였다.

2. 전체 환자군과 전체 대조군 사이의 비교

전체 202명(환자군 81명, 대조군 121명)이 분석 대상에 포함되었다. 유방암 발생과 관련이 깊은 것으로 알려진 여성 임신력, 그리고 성분별 영양소 섭취량 등에 대한 조건부 로지스틱 분석의 결과는 Table 3과 Table 4와 같다. 분만 횟수가 증가할수록 유방암의 대응비는 감소하는 경향을 보였으며, 경향 분석에서도 통계적으로 유의한 결과를 얻었다(Table 3). 영양소 섭취량에서는 열량, 지방, 단백질의 섭취량이 증가할수록 유방암의 위험도가 증가하는 것으로 나타났다(Table 4). 특히 동물성 지방의 섭취량이 10g 증가하

면, 유방암 발생위험도가 1.67배로 증가하여 영양소 가운데 가장 현저한 효과를 나타냈다. 한편 탄수화물의 섭취가 증가하면 유방암의 위험도는 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

3. p53 돌연변이 양성 환자군과 그 대조군 사이의 비교

돌연변이가 검출된 환자는 25명이었으며, 그 대조군의 수는 36명이었다. p53 돌연변이 양성 유방암의 대응비는 분만 횟수가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Table 3). 조건부 로지스틱 분석을 이용한 총 열량, 동물성 지방, 단백질, 그리고 탄수화물 섭취량의 증가와 p53 돌연변이가 존재하는 유방암 발생간의 분석에서는 지방과 단백질 섭취가 유의한 위험인자로 나타났다(Table 4). 특히 동물성 지방은 그 섭취량이 10g 증가함에 따라 유방암 발생 위험도가 2.67배가 되는 것으로 나타나, 가장 강력한 위험인자였다. 탄수화물은 섭취량이 증가할수록 유방암의 위험도가 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다.

4. p53 돌연변이 음성 환자군과 그 대조군 사이의 비교

SSCP와 염기서열 분석에서 p53의 돌연변이가 확인되지 않은 유방암 환자는 56명이었으며 그 대조군은 85명이었다.

분만 횟수가 증가할수록 p53 음성 유방암 발생의 위험성은 감소하는 양상을 나타냈으나 통계적으로 유의한 경향을 나타내지는 않았다(Table 3). 조건부 로지스틱 분석을 이용한 분석에서 단백질의 섭취량이 증가할수록 p53 돌연변이 음성 환자군의 대응비가 증가하였으나, 총열량이나 지방 섭취량의 증가와는 유의한 관련이 없었다(Table 4). 한편, 탄수화물의 섭취가 증가할수록 p53 돌연변이 음성 유방암의 대응비가 감소하는 경향을 보였으나 유의한 것은 아니었다.

Table 3. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for the association between parity and breast cancer by the p53 mutation

| Parity | All cases and controls | | p53 mutation positive cases and controls | | p53 mutation negative cases and controls | |
|----------------|------------------------|-------------------|--|------------------|--|------------------|
| | No. of cases/controls | OR (95% CI) | No. of cases/controls | OR (95% CI) | No. of cases/controls | OR (95% CI) |
| Nulliparous | 5/3 | 1.00 | 3/2 | 1.00 | 2/1 | 1.00 |
| One | 8/10 | 0.50 (0.09-2.66) | 3/5 | 0.47 (0.05-4.27) | 5/5 | 0.51 (0.03-8.14) |
| Two | 40/53 | 0.35 (0.08-1.56) | 14/16 | 0.47 (0.07-3.28) | 26/37 | 0.28 (0.03-3.13) |
| Three | 13/37 | 0.12 (0.02-0.64) | 3/7 | 0.15 (0.01-2.97) | 10/30 | 0.11 (0.01-1.40) |
| Four, and over | 15/18 | 0.22 (0.04-1.33) | 2/6 | 0.14 (0.01-2.69) | 13/12 | 0.27 (0.02-4.02) |
| Total | 81/121 | $\chi^2 = 4.97^*$ | 25/36 | $\chi^2 = 2.10$ | 56/85 | $\chi^2 = 2.40$ |

*: P-value < 0.05

Table 4. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for the association between nutritional factors and breast cancer by the p53 mutation

| Nutritional factors | Unit | Odds ratio (95% Confidence interval) | | |
|---------------------|------------|---------------------------------------|--|--|
| | | All cases and controls | p53 mutation positive cases and controls | p53 mutation negative cases and controls |
| Calories | / 100 Cal | 1.09* (1.00-1.19) | 1.12 (0.98-1.29) | 1.07 (0.95-1.20) |
| Fat | / 10 grams | 1.38* (1.11-1.73) | 1.54* (1.03-2.31) | 1.30 (0.99-1.71) |
| Animal fat | / 10 grams | 1.67* (1.18-2.36) | 2.67* (1.21-5.89) | 1.41 (0.96-2.01) |
| Protein | / 10 grams | 1.34* (1.13-1.58) | 1.40* (1.05-1.86) | 1.30* (1.06-1.60) |
| Carbohydrate | / 10 grams | 0.28 (0.00-) | 0.38 (0.00-) | 0.27 (0.00-) |

*: P-value < 0.05

IV. 고 찰

유방암은 구미 여성에게 매우 흔한 암으로서, 미국 여성이 평생동안 유방암으로 진단 받을 확률과 사망할 확률은 각각 10명 중 1명과 30명 중 1명에 달하고 있다(Parkin 등, 1992). 아시아 지역 및 우리 나라의 유방암 발생률 및 사망률은 구미에 비하면 상대적으로 낮은 수준이나(Parkin 등, 1992; 이무송 등, 1992), 아시아에서 미국 등 서구 국가로 이주한 이민 집단에 대한 연구(migrant study)의 결과에 따르면 이주후 세대가 바뀌고 생활 습관이 서구화될수록 그 발생 수준이 급격히 증가하는 것으로 나타났다(Buell, 1973). 로

스앤젤레스 거주 한국인의 유방암 발생 수준(Parkin 등, 1992)을 국내 거주 여성의 유방암 발생 수준(Ahn 등, 1994)과 비교한 결과 미국 거주 한국인에서 유방암 발생률이 40% 정도 증가한 것으로 나타났다. 따라서 우리 나라 여성의 유방암 발생률은 생활 습관의 서구화와 만혼 경향 등의 영향으로 앞으로 계속 증가할 것으로 예상된다.

유방암에 대한 역학적 연구에 의하면, 임신 횟수가 증가할수록 상대 위험도는 감소하는데(Pathak 등, 1986; Bruzzi 등, 1988; Kvale와 Heuch, 1987; Layde 등, 1989), 본 연구 결과에서도 만삭 분만 횟수가 증가할수록 유방암의 위험도는 감소하는 것으로 나타나서,

기존의 연구 결과와 일치하였다. 또, 본 연구의 결과는, 최초 만삭 출산 연령, 일일 칼로리 섭취량, 지방 섭취량 등이 증가할수록 우리 나라 여성의 유방암 발생률은 증가하며, 출산아의 숫자가 증가하면 그 발생률은 감소한다는 안세현 등(1996)의 연구 결과와 거의 일치하는 것이다.

유방암의 위험 인자에 대한 역학적 연구 중에서는 유방암을 두 가지 혹은 그 이상의 아종(subtype)으로 분류하고 각각의 아형별로 그 원인을 찾아내려는 연구가 시도되고 있다. 유방암을 에스트로젠 수용체 발현이 잘 되는 유방암과 발현이 빈약한 유방암의 위험 인자를 서로 비교한 연구(Lesser 등, 1981; Hildreth 등, 1983; McTiernan 등, 1986; Hislop 등, 1986; Stanford 등, 1986)나 프로제스테론 수용체 존재 여부에 따라서 비교한 연구(Yoo 등, 1993), 폐경 여부로 나누어 비교한 연구(안세현 등, 1996), 그리고 암 유전자(oncogene) 발현 여부에 따라서 유방암을 아형으로 분류하는 최근의 연구(Gordon, 1985; Treurniet 등, 1992; Garrett 등, 1993)등이 여기에 속한다.

P53 단백질은 393개의 amino acids로 구성되어 있으며, 전사 요소(transcriptional factor)와 비슷한 구조를 갖고 있는데, 그 돌연변이가 유방암 조직에서 가장 흔히 나타나는 유전적인 변화이다(Bartek 등, 1990; Horak 등, 1991; Runnenbaum 등, 1991). Wild-type P53은 세포 성장을 저하시키고, 유전자의 안정성을 유지하며 손상된 DNA를 복구하도록 도와줌으로써 암 발생을 억제한다. 실험실에서(in vitro) wild-type P53의 기능을 제거시켰더니 유방 세포가 변형되었다(Chang 등, 1993). 한편, mutant p53은 trans-dominant 방식으로 wild-type p53의 기능을 억제하며, 세포 성장을 촉진하고 암 유전자로서도 작용하여 종양을 유발한다(Finlay 등, 1989). 따라서 wild-type P53은 암의 예방에 필수적인 단백질이다(Zambetti와 Leven, 1993). p53의 돌연변이 여부는 위암의 침습 깊이나 임파선 전이와 밀접한 관련이 있으며(Filipe 등, 1993), P53에 대한 면역 조직 화학 염색의 결과가 양성인 환자의 예후는 음성인 환자에 비하여 유의하게 나쁘고 5년 생존율

도 낮다(Martin 등, 1992). 유방암에 있어서 암 조직의 P53 염색 여부는 EGF 수용체와 같은 예후 불량 인자와 유의한 상관관계를 나타냈으며(Horak 등 1993), 특히 에스트로젠 수용체나 프로제스테론 수용체가 잘 발현되지 않는 경우가 많아서 예후가 불량하다(Thompson 등, 1992; Harris, 1992; Poller 등, 1992). p53 유전자 돌연변이가 있는 유방암은 재발을 잘하고, 생존 기간이 짧은데(Barnes 등, 1993), 임파선 전이 여부 다음으로 유방암의 예후에 중요한 역할을 하며, 악성도가 높은 암일수록 p53 돌연변이율이 높으므로(Martinazzi 등, 1993), p53을 유방암의 예후에 대한 지표로 사용할 수 있다고 주장하는 학자도 있다(Harris 등, 1993). 현재까지 보고된 연구에 의하면 p53 유전자의 돌연변이가 있는 유방암과 없는 유방암은 그 예후가 완전히 다르므로 이 둘은 비슷하지만 서로 다른 아형이라고 가정할 수 있다. 따라서 p53 돌연변이 여부에 따라서 유방암을 분류하고 각 군의 위험 인자를 각각 조사해보는 것이 p53 돌연변이와 관련된 위험인자를 밝히는데 유용할 것이다. 본 연구는 이러한 면에서 새로운 연구라고 할 것이다.

각종 식이요인은 유방암 발생의 중요한 위험 인자인데 그 중에서도 지방 섭취량이 유방암 발생과 밀접하게 관련되어 있다(Graham 등, 1982; Willett 등, 1987; La Vecchia 등, 1987). 지방 섭취량 중에서도 동물성 지방이 특히 유방암 발생과 연관되어 있다는 본 연구의 결과는 이러한 연구의 결과와 일치하는 것이다. 본 연구에서는 단백질과 총 열량의 섭취량과도 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 이러한 양상은 특히 p53 돌연변이 양성인 유방암에서 음성에 비하여 보다 뚜렷하게 나타났으며, 돌연변이 음성 유방암에서는 지방이나 총열량 섭취량이 통계적인 유의성을 상실하고 단지 단백질 섭취량만이 유의한 것으로 나타났다. 이는 식이요인이 p53 돌연변이 양성인 유방암과 더 밀접하게 관련되어 있음을 암시하는 것으로, 식이요인이 p53 돌연변이를 유발하거나, p53 돌연변이에 의하여 시작된 유방암세포의 성장을 촉진하는 효과가 있을 가능성을 시사하는 것이다. 한편, 비타민의 보호

효과(Graham 등, 1982; Wald 등, 1984; Katsouyanni 등, 1988; Russel 등, 1988)에 대해서는 본 연구에서 확인하지 않았다.

이러한 결과에 대한 해석으로서 다음과 같은 두 가지를 추측해 볼 수 있다. 우선, 동물성 지방, 단백질 섭취 등의 식이 요인이나 그와 관련된 내분비적 요인에 의하여 p53 돌연변이가 유발되고 이 돌연변이가 유방 세포 암발생의 첫 단계로 작용하는 경우이다. 아플라톡신 폭로가 p53 유전자의 특정 codon에 돌연변이를 유발할 수 있다는 연구 결과(Hsu 등, 1991; Bressac 등, 1991)를 감안한다면, 위험 인자에 폭로되는 경우, 그 위험 인자에 해당하는 p53 유전자의 돌연변이가 발생될 수 있을 것으로 사료된다. p53의 돌연변이를 관찰할 수 없는 경우는 다른 암 유전자나 암억제 유전자에 의하여 암발생 과정이 시작될 것으로 생각된다. 그러므로, p53 돌연변이와 음의 상관관계가 있는 유전자 변이를 확인하는 것이 또 다른 유방암 발생 요인을 찾아내는 방법이 될 것이다. 본 연구의 결과에 대하여 가능한 다른 설명은, p53과는 전혀 다른 유전자의 변이에 의하여 유방암 발생이 시작되고, p53의 변이가 그 뒤를 이어서 promoter로 작용하는 것이다. 이 경우 동물성 지방, 그리고 단백질 등의 섭취가 증가하면서 p53 변이가 발생하고, 그 결과 좀 더 예후가 나쁜 암종으로 자라나게 될 수 있다. 그러나 본 연구가 환자-대조군 연구이므로 시간적 선후 관계가 서로 상이한 두 가지 유방암 발생 기전 중에서 어느 것이 옳은 것인지를 밝혀줄 수는 없다. 앞으로 p53 유전자의 염기 서열상의 돌연변이 양상과 각종 위험 인자 폭로와의 관련성에 대한 분자 역학적 연구가 시행된다면 p53 돌연변이가 유방암 발생 과정 중 어느 단계에서 작용하는지를 좀 더 정확하게 알 수 있을 것이다.

그러나 이상의 결과는 유방암 조직의 p53 돌연변이 여부를 면역조직화학검사로 확인하고, P53 염색 양성인 환자와 음성인 환자로 나누어 각각의 위험인자를 조사하였던, 본 연구진이 시행한 다른 연구(이무송 등, 1994)의 연구결과와는 상이한 면이 있다. 과거의 연구에서는 출산경력이 P53 염색 양성인 유방암에

대해서는 유의한 보호효과가 있으나, 음성인 유방암에 대해서는 그렇지 않았으며, 반면, 식이요인은 P53 염색 음성인 유방암에 대해서만 유의한 위험인자로 나타났다. 이러한 차이는 p53 유전자의 돌연변이를 찾아내는 방법이 서로 다르다는 것에서 그 원인을 찾을 수 있다. 암세포 내 p53 돌연변이 존재여부를 검사하기 위하여 면역조직화학검사를 사용하는 경우에는 P53이 발현되지 않는 돌연변이(non-sense mutation)는 찾아낼 수 없고, 단클론 항체의 인식부위가 서로 다르기 때문에 모든 종류의 돌연변이를 발견할 수도 없다(Harris 등, 1993). 또, 염색 조건에 따라서는, p53 돌연변이가 존재하지 않는데도 염색되는, 위양성이 잘 생기기도 한다. 이 때문에 면역조직화학검사를 사용한 기존의 연구와, 돌연변이 여부를 직접 확인한 본 연구는 그 결과에서 상당한 차이가 생겼을 것으로 생각된다.

DNA에서 p53 유전자의 돌연변이를 직접 조사하는 방법은 p53 유전자 돌연변이 여부를 밝히거나 그 유형을 확인하는데 효과적이며, 모든 종류의 돌연변이를 확인할 수 있다. 그런데, p53 유전자 돌연변이 중 거의 대부분이 5 - 9번 exon에서 발생하는 것으로 알려져 있으므로(Nigro 등, 1989; Hollstein 등, 1991), 이 부분의 돌연변이 여부를 확인하는 방법은, p53 유전자 전체의 염기서열을 분석하는 방법을 대신하여 사용할 수 있다. 본 연구에서 유전자 돌연변이 존재여부를 확인하기 위하여 우선 SSCP 방법으로 돌연변이가 있는 부분만을 골라내서, 그 염기 서열을 분석하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 약 10% 정도의 위음성율이 존재하므로 분류 편재(misclassification bias)를 유발할 수 있다. 만약 이러한 오분류가 요인 폭로와 관련되어 일정한 방향으로 치우치지 않았다면, 통계적인 유의성을 줄여 주는 방향(toward the null)으로 작용했을 것이다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 분만 횟수와, 지방과 단백질 섭취 등의 식이요인이 유방암 발생에 유의하게 작용하는 것으로 나타난 것은, 이러한 요인들의 효과가 실제로는 본 연구에 나타난 정도보다 더 크다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에 사용한 연구방법의 불완전성에도 불구하고, 본 연구의 결과는 매

우 중요한 의의를 갖는다고 하겠다.

V. 요약

p53 돌연변이 여부에 따른 유방암의 위험 인자를 찾아내고, p53 유전자 돌연변이가 유방암 발생에 관여하는 기전을 알아보기 위하여, 1993년 1월부터 1994년 11월 사이에 서울중앙병원에서 유방암으로 진단받고 수술을 받은 환자 81명과, 이들과 연령, 거주 지역, 교육 수준, 그리고 폐경 상태 등에 따라 1:1 혹은 1:2로 짝지은 대조군 121명을 대상으로, 임신력과 중요 영양소 및 총 칼로리 섭취량, 그리고 기타 유방암 관련 요인, p53 유전자 돌연변이 여부, 돌연변이 유형 등을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

유방암 환자 81명중에 돌연변이가 관찰된 예는 25예(30.9%)였다. 이중에서 염기 치환이 20예(24.6%)로서 전이와 변위가 각각 10예(12.3%)였다. 전이 중에는 'C to T' 전이가 8예(9.9%), 'G to A'와 'A to G'는 각각 1예(1.2%)에 불과하였다. 변위는 'C to G'와 'G to T'가 각각 4예(4.9%)였고, 'A to T'와 'T to A'가 각각 1예(1.2%)였다. 삽입과 탈락은 각각 4예(4.9%)와 1예(1.2%)였다.

전체 환자군과 전체 대조군 사이의 비교에서 분만 횟수가 증가할수록 유방암의 대응비는 유의하게 감소하는 경향을 보였으며, 열량, 지방 및 단백질의 섭취량이 증가할수록 유방암의 위험도가 유의하게 증가하였다. p53 돌연변이 양성 환자군과 그 대조군 사이의 비교에서 지방과 단백질의 섭취량이 증가할수록 유방암의 위험도가 증가하였으나, 분만횟수증가는 유방암 위험도에 유의한 영향을 미치지 않았다. p53의 돌연변이가 확인되지 않은 경우에도 분만횟수 증가는 유의하지 않았으며, 식이요인 중에는 단백질만이 의미 있는 위험인자로 나타났다. 식이요인에 의한 유방암의 위험도 증가는 p53 돌연변이가 존재하는 경우에 특히 두드러지게 나타났다.

이러한 결과는 식이 요인이나 그와 관련된 내분비적 요인에 의하여 p53 변이가 유발되고 이 변이가 유

방 세포 암발생의 첫 단계로 작용하거나, 혹은 p53의 변이가 다른 유전자의 변이에 뒤 이어서 발생하는 촉진인자(promoter)로 작용할 수 있음을 시사하는 소견이다.

참고문헌

- 안세현, 박건춘, 윤용이, 이무송, 김영식, 김미경, 이양자. 한국인 유방암의 발병 위험 요인에 관한 환자-대조군 연구. *외과학회지* 1996;50:26-35
- 이무송, 박태수, 안윤옥. 한국인 암사망률의 추정에 관한 연구 -경상남도지역을 중심으로-. *예방의학회지* 1992;25:115-126
- 이무송, 이규호, 안세현, 김현, 김미경, 이양자. P53 면역조직화학적 염색에 따른 한국인 여성 유방암의 위험 요인에 대한 환자-대조군 연구. 제46차 대한예방의학회 추계학술대회연제집. 대한예방의학회, 1994, 쪽 59-60
- Ahn YO, Park BJ, Yoo KY, Lee MS, Kim H, Noh DY, Park TS. Incidence estimation of female breast cancer in Korea. *J Kor Med Sci* 1994;9:328-334
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221
- Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Human Path* 1993;24:469-476
- Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer. *Oncogene* 1990;5:893-899
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350:429-431.
- Bruzzi P, Negri E, La Vecchia C, Decarli A, Palli D, Parazzini F, Del Turco MR. Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *Br Med J* 1988;297:1096-1098
- Buell P. Changing incidence of breast cancer in Jap-

- anese-American women. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1479-1483
- Callahan R, Campbell G. Mutations in human breast cancer: an overview. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1780-1786
- Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:174-186
- Filipe MI, Martin HM, Lane DP. p53 overexpression in gastric carcinoma is a prognostic indicator. In *Mutant Oncogenes Targets for therapy*. Eds. Lemoine N and Epenetos A. Chapman & Hall Medical, London, 1993, pp. 185-186
- Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms and hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539
- Garrett PA, Hulka BS, Kim YL, Farber RA. HRAS protooncogene polymorphism and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2: 131-138
- Gordon H. *Oncogenes*. *Mayo Clin Proc* 1985;60: 697-713
- Graham S, Marshall J, Mettlin C, Rzepka T, Nemoto T, Byer T. Diet in the epidemiology of breast cancer. *Am J Epidemiol* 1982;116:68-75
- Harris AL, Gatter K, Horak E, Kaklamanis L, Pezzella F, Lane DP, Neal D, Stretch J. p53 expression in tumors: breast, lung, colon, bladder and prostate cancer, melanoma and lymphoma. In *Mutant Oncogenes Targets for therapy*. Eds. Lemoine N and Epenetos A. Chapman & Hall Medical, London, 1993, pp. 175-179
- Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer (1). *N Engl J Med* 1992;327: 319-328
- Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer (3). *N Engl J Med* 1992;327: 473-480
- Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL. Use of the single strand conformational polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer. *Oncogene* 1991;6:1067-1071
- Hildreth NG, Kelsey JL, Eisenfeld AJ, Livolsi VA, Holford TR, Fischer DB. Difference in breast cancer risk factors according to the estrogen receptor level of the tumor. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:1027-1031
- Hislop TG, Coldman AJ, Elwood JM, Skippen DH, Kan L. Relationship between risk factors for breast cancer and hormonal status. *Int J Epidemiol* 1986;15:469-476
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science* 1991;253:49-53
- Horak E, Smith K, Bromley L, Le Jeune S, Greenall M, Lane D, Harris AL. Mutant p53, EGF receptor and c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Oncogene*. 1991;6:2277-2284
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1991;350:427-428
- James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collin VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2858-2862
- Katsouyanni K, Willet WC, Trichopoulos D, Boyle P, Trichopoulos A, Vasilaros S, Papadoamantis J, MacMahon B. Risk of breast cancer among Greek women in relation to nutrient intake. *Cancer* 1988;61:161-165
- Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985;45:1437-1443
- Kvale G, Heuch I. Is the incidence of colorectal cancer related to reproduction? A prospective study of 63,000 women. *Int J Cancer* 1991;47: 390-395
- La Vecchia, Decarli A, Franceschi S, Gentile A, Negri E, Parazzini F. Dietary factors and the risk of breast cancer. *Nutr Cancer* 1987;10:205-214.
- Layde PM, Webster LA, Braughman AL, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *J Clin Epidemiol* 1989;42:963-973
- Lesser ML, Rosen PP, Senie RT, Duthie K, Menezes-Botet C, Schwartz MK. Estrogen and prog-

- estrogen receptors in breast carcinoma: correlation with epidemiology and pathology. *Cancer* 1981;48:299-309
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-460
- Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48:5358-5362
- Mackay J, Steel CM, Elder PA, Forrest AP, Evans HJ. Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers. *Lancet* 1988;2:1384-1385
- Martin HM, Filipe MI, Morris PW, Lane OP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:859-862
- Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. An immunohistochemical study. *Am J Clin Path* 1993;100:213-217
- Mashiyama S, Murakami Y, Yoshimoto T, Sekiya T, Hayashi K. Detection of p53 gene mutation in human brain tumors by single-strand conformational polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1991;6:1313-1318
- McTiernan A, Thomas DB, Johnson LK, Roseman D. Risk factors for estrogen receptor-rich and estrogen receptor-poor breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:849-854
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Holtzman R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Bayliss S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-708
- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in five continents. Vol VI. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 1992 (IARC scientific publications No. 120).
- Pathak DR, Speizer FE, Willett WC, Rosner B, Lipnick RJ. Parity and breast cancer: Possible effect on age at diagnosis. *Int J Cancer* 1986;37:21-25
- Poller DN, Hutchings CE, Galea M, Bell RA, Nicholson RA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in human breast carcinoma: relationship to expression of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein overexpression, and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1992;66:583-588
- Runnebaum IB, Nagarajan M, Bowman M, Soto D, Sukumar S. Mutations in p53 as potential markers for human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10657-10661
- Russel MJ, Thomas BS, Bulbrook RD. A prospective study of the relationship between serum vitamin A and E and risk of breast cancer. *Br J Cancer* 1988;57:213-215
- Stanford JL, Szklo M, Brinton LA. Estrogen receptors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1986;8:42-59
- Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, Evans HJ, Steel CM. p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 1992;50:528-532
- Treurniet HF, Rookus MA, Peterse HL, Hart AAM, van Leeuwen FE. Differences in breast cancer risk factors to neu (c-erbB-2) protein overexpression of the breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:2344-2245
- Wald NJ, Boreham J, Hayward JL, Bulbrook RD. Plasma retinol, beta-carotene and vitamin E levels in relation to the future risk of breast cancer. *Br J Cancer* 1984;49:321-324
- Watson JD, Witkowski J, Gilman M, Zoller M. Recombinant DNA. Scientific American Books, New York, 1992, pp. 335-367
- Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Speizer FE. Dietary fat and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1987;316:22-28
- Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13 and 17 in small-cell lung carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9252-9256
- Yoo KY, Tajima K, Kuroishi T, Hirose K, Yoshida M, Miura S, Murai H. Independent protective effect of lactation against breast cancer: A case-control study in Japan. *Am J Epidemiol* 1992;135:726-733.

Zambetti GP, LevienAJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. FASEB J 1993;7:855-865
