

흰쥐에서 발암물질로 유발된 갑상선 종양과 p21 및 p53 단백질의 발현

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실
백종민·장석균

= Abstract =

Development of Thyroid Tumors by Carcinogens and Its Expression of p21 & p53 Protein in Rats

Jong Min Baek, M.D., Suk Kyun Chang, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Objectives : The development of thyroid tumor has a relationship with carcinogen, oncogene and tumor suppressor gene. With aminotriazole, radioactive iodine and nitrosomethylurea as carcinogens in rat, authors investigate the incidence in type of the thyroid tumors, p21 and p53 protein expression pattern by immunohistochemical stain and the relationship between the tumors and p21-p53 protein expressions.

Materials and Methods : 80 experimental animals were divided into four groups; group 1(control, no carcinogen, n=20), group 2(oral administration of aminotriazole for 36 weeks, n=20), group 3(intraperitoneal injection of 131I for one time and oral administration of aminotriazole for 36 weeks, n=20), group 4(oral administration of nitrosomethylurea for 3 days and aminotriazole for 36 weeks, n=20). After 40 weeks they were sacrificed with pathologic examination and we performed immunohistochemical staining with pan-ras monoclonal antibody for p21 protein and CMI polyclonal antibody for p53 protein with paraffin-embedded specimens.

Results : 1) No tumors were observed in group 1, but 38.3% of nodular goiters, 11.7% of adenomas and 50.0% of carcinomas were observed in carcinogen treated groups(group 2, 3, 4). 2) The incidence of nodular goiter, adenoma and carcinoma were 70%, 20% and 10% in group 2, 40%, 15% and 45% in group 3 and 5%, 0% and 95% in group 4. 3) p21 protein was not expressed in normal thyroid tissues but was expressed in 26.1% of nodular goiters, 42.9% of adenomas and 6.7% of carcinomas. On the other hands, p53 protein was not expressed in normal thyroid tissues, nodular goiters, adenomas and in well differentiated thyroid carcinomas by immunohistochemical stain.

Conclusion : The authors suggest that aminotriazole, 131I, nitrosomethylurea can be etiologic agents in the development of thyroid tumor and the p21 protein can be expressed in the early stage and in benign condition of thyroid tumor but p53 protein is not expressed in all conditions of development in rats.

KEY WORDS : Carcinogenesis · Nitrosomethylurea · Aminotriazole · 131I · p21-p53 protein.

서론

갑상선 종양은 임상에서 흔히 볼 수 있는 질환으로 인구
교신저자 : 백종민, 480-130 경기도 의정부시 금오동 65-1
가톨릭대학교 의과대학 외과학교실
전화 : (0351) 820-3060 · 전송 : (0351) 847-2717

의 4~10%에서 발생하며, 갑상선암 또한 부검시 세심한 조직검사에 의하면 0.9~13%에서 나타나는 빈도가 높은 질환이다¹⁾. 그러나 대부분의 갑상선종양은 양성이고, 현재까지도 갑상선 양성종양과 갑상선암의 감별은 수술 후 병리조직학적 진단에만 의존하고 있으며, 갑상선암은 예후가 좋은

진화암부터 예후가 극히 불량한 미분화 혹은 역형성암(anaplastic carcinoma)까지 다양하여 갑상선암 자체의 임상적 진행과정이나 예후는 예측하기 어려운 상태이다. 1970년대 초반까지는 잘 분화된 유두상 혹은 여포상 선암이 병리학적으로 동일한 선종으로 진단되었던 것과 다른 암에 비해 상당히 높은 생존율을 고려한다면 갑상선암 환자에서 적절한 치료와 정확한 예후의 판단을 위하여 진단시 병리조직학적 진단과 함께 유전자적 진단을 고려해야 된다는 견해도 있다²⁻⁴⁾.

갑상선 종양의 발생에 대한 분자생물학적 기전은 잘 알려져 있지 않으나, 대장-직장암이나 폐암에서 이미 잘 알려진 다발적인 유전적 변이가 갑상선 종양에도 적용될 수 있다²⁻⁴⁾. 즉 다른 종류의 암에서 많이 나타나는 ras 암유전자와 p53 암억제유전자의 변이 중에서 ras 암유전자는 암발생 촉진인자로서 변이 p21(mutant p21) 단백질을 생성하고 종양발생 초기부터 나타나며 주로 양성종양에서 악성종양으로 이행되는 과정에 많이 발현하나 암이 진행되거나 전이가 되면 점차 감소하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷⁾. 또한 염색체 17p에 존재하는 p53 억제유전자는 정상상태에서는 암억제 작용을 하는 wild-type p53으로 존재하나 변이가 발생하여 변이 p53(mutant-p53) 유전자가 되면 암억제유전자로서의 기능을 소실하게 되고 이때 발생하는 변이는 p53 변이 단백질이 증가하는 여러 종류의 점변이에서부터 p53 단백질 생산이 완전히 없어지는 유전자 완전소실까지 나타난다⁸⁻¹⁰⁾.

저자들은 사람의 갑상선 조직과 유사한 흰쥐를 대상으로 갑상선종 유발약제 및 발암물질에 의하여 발생한 종양의 종류와 빈도 그리고 갑상선의 정상조직, 양성종양 및 악성종양에서 ras 암유전자와 연관된 변이 p21 단백질과 변이 p53 단백질의 발현여부와 정도를 알아보기 위하여 본 실험을 시도하였다.

실험대상 및 방법

1. 실험동물 및 실험군

실험동물은 생후 6주의 육안적으로 건강한 100g 체중의 Wistar계의 수놈 흰쥐를 사용하였으며 다음과 같이 4군으로 나누었다. 즉 일반 사료만으로 사육한 제 1군(대조군, 20마리) : 0.1% ATA(Sigma Co., USA)을 36주간 경구 투여한 제 2군(20마리) : ¹³¹I(원자력 연구소, 한국) 50~100 μ Ci를 1회 복강내 주입하고 0.1% ATA을 36주간 경구 투여한 제 3군(20마리) : NMU(Sigma Co., USA) 40mg/kg을 3일간 경구 투여하고 0.1% ATA을 36주간 경구 투여한 제 4군(20마리)⁹⁾으로 나누어 실험하였다.

각 실험동물은 실험 종료시 체중을 측정하고 갑상선 조직을 절제하여 육안적으로 종양발생유무를 관찰하였으며 또한 각 조직은 포르말린에 고정하여 hematoxylin-eosin 염

색을 하고 ras 암유전자에 의한 변이 p21 단백질 및 변이 p53 단백질은 면역조직화학적 염색을 시행하여 일반 병리조직 소견과 각각의 단백질 발현여부를 관찰하였다.

2. p21 및 p53 단백질의 면역조직화학적염색 방법

p21 단백질 염색은 anti-mouse total IgG인 pan-ras 모노클로날 항체를 사용하여 pan-ras immunohistochemistry system(Oncogene Science, USA)으로 Oncogene Science immunohistochemistry system의 Instruction (Cat. No. HSC02)에 따라 시행하였으며, p53 단백질 염색은 anti-rabbit IgG CM1 폴리클로날 항체를 사용하여 proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA) 염색법(Instructions DAKO LSAB Kit, Cat. No. PL0154-1092)으로 시행하였다. 염색과정은 MicroProbe Incubator(Biomed Co., USA)를 사용하였다.

1) 조직부착

파라핀에 포매된 조직을 4~5 μ m 두께의 조직절편으로 만들어 특수 처리된 슬라이드(poly-L-lysine coated probe on plus microscopic slides, Fisher Scientific, USA)에 부착시킨 후 실온에서 30분간 건조시켜 보관하였다.

2) 탈파라핀화와 재수화(Deparaffinization and rehydration)

조직절편은 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 건조시킨 후 histoclear와 xylene의 혼합용액으로 1분간 60 $^{\circ}$ C에서 4회 보온 세척 및 건조한 후 실온에서 순수 알코올과 95% 알코올에 연속적으로 2회씩 세척한 후 Berg 등¹¹⁾의 방법인 탈표적 용액(target unmasking fluid, Kreatech Biotechnology, Amsterdam, 이하 TUF)에 넣어 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 보온하고 실온에 15분간 방치하였다. 다시 증류수와 완충액 phosphate buffered saline(0.05M, pH 7.4, Tris-HCL buffer, DAKO TBS, code No. S3001, 이하 PBS)으로 30초간 2회 세척하였다.

3) 일차 항체반응

처리된 조직표본에 과산화수소수를 점적하여 40 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시키고 PBS 완충액으로 세척한 후 다시 Blocking 용액을 점적하여 2분간 보온하고 희석용액(1% 우형혈청 알부민 함유 0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.2~7.6, antibody dilution, code No. S809)에 p21 단백질에 대하여는 mouse total IgG pan-ras 모노클로날 항체(Oncogene Science Inc., USA)를 1 : 30으로, p53 단백질에 대하여는 rabbit IgG antibody CM1 폴리클로날항체(DAKO Co., USA)를 1 : 75로 희석하여 혼합하고 점적시킨 후 40 $^{\circ}$ C에서 10분간 보온하였다. 그 후 PBS 완충액으로 10회 세척하고 증류수로 세척하였다.

4) 이차항체 및 검출반응

p21과 p53에 대하여 각각의 이차항체 반응은 p21은 anti-mouse total IgG 항체인 pan-ras 이차항체(Oncogene Science Inc., USA)를, p53은 anti-rabbit IgG 항체인 CM1 이차항체(DAKO Co., USA)를 각각 슬라이드에 점적시키고, 40°C에서 8분과 10분간 보온한 후 2회 세척하였다. 다시 streptavidin peroxidase를 4분간 반응시키고 PBS 완충액으로 세척한 후 chromogen으로 7분간 보온시킨 후 증류수로 세척하였다.

5) 대조염색

p21 단백질의 대조염색은 실온에서 hematoxylin으로 30초간 염색하고 증류수로 2회 세척한 후, PBS 완충액에 2회 담구었다가 증류수에 2회 세척하고, 5% 암모니아수에 5초간 2회 세척하고, 증류수 및 95% 알코올에 담근 후 염색 과정을 마치고, p53 단백질은 암모니아수 및 알코올에 담그는 과정을 하지 않고 염색과정을 마친 후 각각의 슬라이드는 pristine mount(Research Genetics, cat. No., 750135, USA)를 사용하여 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 결과판정

조직병리 소견은 3회 반복하여 관찰하였으며, 갑상선암과 선종의 구별은 핵, 세포질, 여포의 분포형태 및 피막과 혈관의 침습성 등으로 진단하였다. p21 단백질의 염색결과는 세포질이 짙은 갈색 내지는 붉은 색으로 염색되는 것을, p53 단백질은 핵이 짙은 갈색 내지 붉은 색으로 염색되는 사람의 대장암 조직을 양성 대조슬라이드(PCNA 염색에 대한 사진을 참고)로, 일차항체만을 반응시킨 것을 음성대조 슬라이드로 사용하였다. 양성의 정도 판정은 Dobashi 등¹²⁾이 사용한 방법을 교정하여 전체의 25%까지 양성인 예를 +1, 50%까지를 +2, 75%까지를 +3, 75% 이상 양성인 예를 +4로 하여 +2 이상 되는 것을 양성으로 판정하였다.

4. 통계처리

각 군 및 관찰사항에 대한 유의정도는 Chi-square test로 검정하였으며 유의수준은 5% 이하로 하였다.

결 과

1. ATA, ¹³¹I 및 NMU 의한 갑상선 종양발생

제 1군에서는 종양 발생이 없었으나, 제 2, 3, 4군(발암물질 투여군, 60예)에서는 결절성 갑상선종(nodular goiter)이 38.3%(23예)(Fig. 1), 갑상선선종(adenoma)이 11.7%(7예)(Fig. 2), 갑상선암(carcinoma)이 50.0%(30예)(Fig. 3, 4)에서 발생하였다($p < 0.01$)(Table 1).

종양 발생군중에서 제 2군은 결절성 갑상선종이 70.0%,

갑상선선종이 20.0%, 갑상선암이 10.0%에서 발생하였으나 제 3군에서는 40.0%, 15.0%, 45.0%에서 발생하여 제 2군에 비하여 양성종양의 발생은 감소하였으나 암의 발생

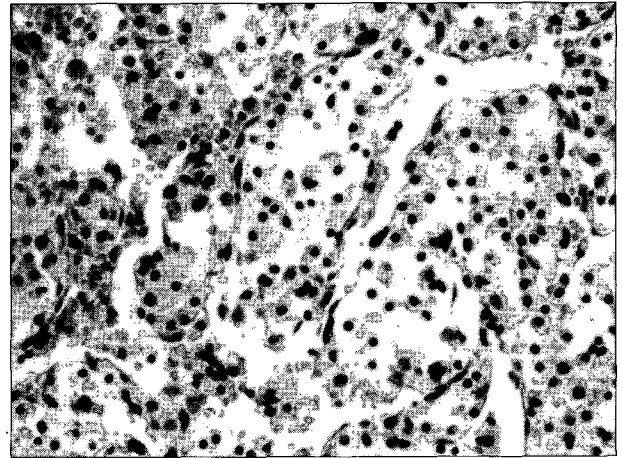


Fig. 1. Photomicroscopic findings showing nodular goiter in aminotriazole treatment group. Hematoxylin-eosin stain($\times 200$).

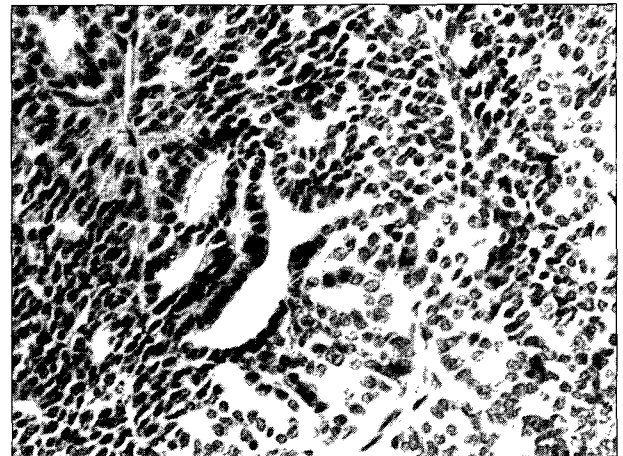


Fig. 2. Photomicroscopic findings showing follicular adenoma in aminotriazole and radioactive iodine treatment group. Hematoxylin-eosin stain($\times 200$).



Fig. 3. Photomicroscopic findings showing follicular carcinoma invaded the capsule in aminotriazole and nitrosomethylurea treatment group. Hematoxylin-eosin stain($\times 100$).

은 현저히 증가하였으며($p < 0.01$) 제 4군에서는 5.0%, 0.0%, 95.0%에서 발생하여 제 2군에 비하여는 물론이고($p < 0.01$) 제 3군에 비하여도 암의 발생이 현저하게 증가하였다($p < 0.05$)(Table 1).

현미경적 소견을 보면 갑상선선종과 암의 경우 대부분 갑상선 여포가 잘 발달된 여포상 선종과 잘 분화된 갑상선암 특히 여포상 갑상선암의 특징적 소견을 나타냈으며 부분적

으로는 유두상 분화암이 소견을 나타내기도 하였다(Fig. 2, 3, 4).

2. p21 단백질의 발현

대장암 조직에서의 양성 대조염색 소견은 세포질이 갈색으로 염색되어 p21단백질이 선명하게 구분되었다(Fig. 5). 결과로는 제 1군 및 정상 갑상선에서는 p21 단백질이 전혀 발현되지 않았으며(Fig. 6), 결절성 갑상선종에서는 26.1%에

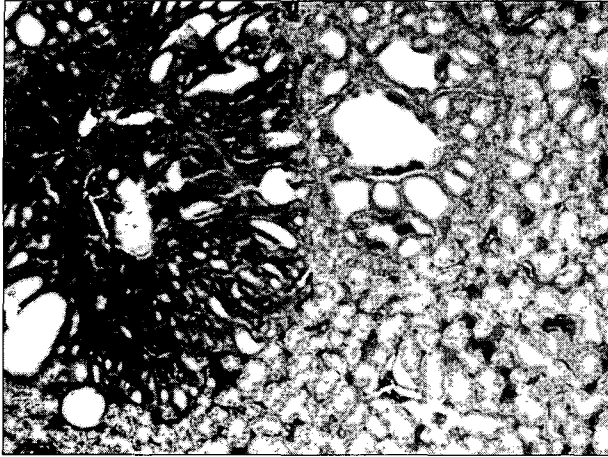


Fig. 4. Photomicroscopic findings showings multifocal follicular carcinoma in nitrosomethylurea and aminotriazole group. Hematoxylin-eosin stain(X40).

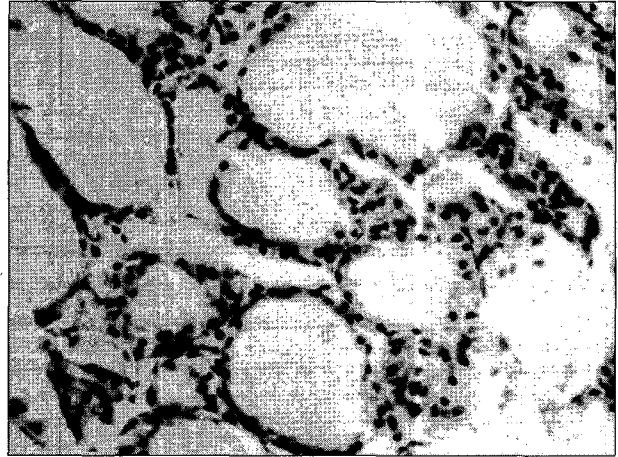


Fig. 6. Photomicroscopic findings showing negative expression of p21 ras protein in normal rat thyroid. Immunohistochemical stain(X200).



Fig. 5. Photomicroscopic findings showings positive control of p21 ras protein in human colon carcinoma. Brown colored staining(arrow). Immunohistochemical stain(X200).

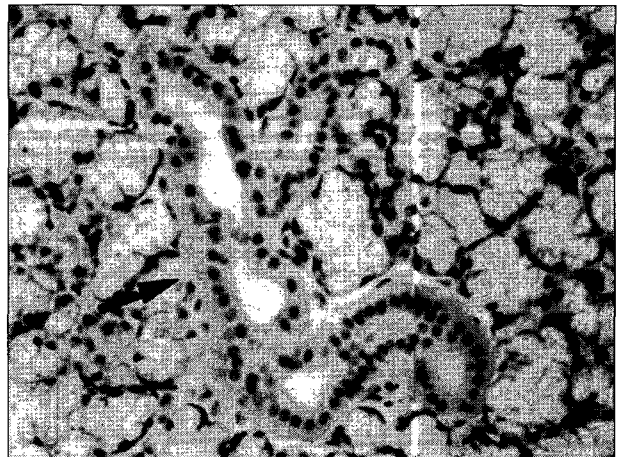


Fig. 7. Photomicroscopic findings showing positive expression of p21 ras protein in nodular goiter. Brown colored cytoplasmic staining(arrow). Immunohistochemical stain(X200).

Table 1. Agent specific thyroid tumor production

	Normal	Nodular goiter	Adenoma	Carcinoma	Total
No treat(group 1)	20(100)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	20
ATA(group 2)	0(0.0)	14(70.0)	4(20.0)	2(10.0)	20
RI+ATA(group 3)	0(0.0)	8(40.0)	3(15.0)	9(45.0)**	20
NMU+ATA(group 4)	0(0.0)	1(5.0)	0(0.0)	19(95.0)***	20
Treatment(group 2, 3, 4)	0(0.0)	23(38.3)*	7(11.7)*	30(50.0)*	60

ATA : aminotriazole, RI : radioactive iodine, NMU : nitrosomethylurea () : %

** : $p < 0.01$, compared to group 2

* : $p < 0.01$, compared to control group

*** : $p < 0.01$, compared to group 2, $p < 0.05$, compared to group 3

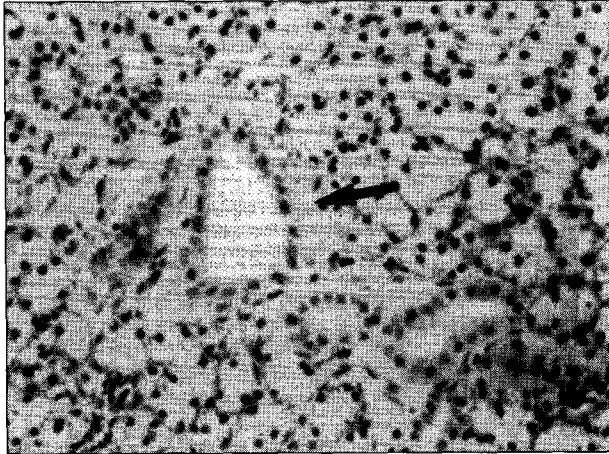


Fig. 8. Photomicroscopic findings showing positive expression of p21 ras protein in follicular carcinoma. Red-brown colored cytoplasmic staining (arrow). Immunohistochemical stain (X 100).

Table 2. p21 protein positivity by immunohistochemical stain

	Normal (n=18)	Nodular goiter (n=23)	Adenoma (n=7)	Carcinoma (n=30)
No treat (group 1)	0(0.0)	0(0.0)	0/0(0.0)	0(0.0)
ATA (group 2)	0(0.0)	6/14(42.8)	2/4(50.0)	0/2(0.0)
RI+ATA (group 3)	0(0.0)	0/8(0.0)	1/3(33.3)	1/9(11.1)
NMU+ATA (group 4)	0(0.0)	0/1(0.0)	0/0(0.0)	1/19(5.3)
Total	0	6/23(26.1)*	3/7(42.9)*	2/30(6.7)

ATA : aminotriazole, RI : radioactive iodine

NMU : nitrosomethylurea

() : %

* : p<0.05, compared to carcinoma group

Table 3. p53 protein positivity by immunohistochemical stain

Result	Positive	Negative
Normal	0(0.0)	20(100)
Nodular goiter	0(0.0)	23(100)
Adenoma	0(0.0)	7(100)
Carcinoma	0(0.0)	30(100)

() : %

서(Fig. 7), 갑상선선종에서는 42.9%에서, 갑상선암에서는 6.7%에서(Fig. 8) 발현을 보여 악성종양에 비하여 양성종양에서 현저하게 높은 발현율을 나타냈다(p<0.05)(Table 2).

3. p53 단백질의 발현

대장암 조직의 양성대조 염색 소견은 핵항체가 붉은 색으로 염색되어 p53 단백질이 선명하게 구분되었으며 음성대조 염색에서는 전혀 염색되지 않았다. 실험군들의 3차에 걸친 항체농도변경을 시도한 면역조직화학염색 소견에서는

정상 갑상선 조직, 결절성 갑상선종, 갑상선선종 및 갑상선암 모두에서 p53 단백질의 발현은 없었다.

고 찰

갑상선의 종양은 흔히 볼 수 있는 질환이며 그 중에서 갑상선암은 매우 흔한 암으로 비교적 예후가 좋은 편이다. 갑상선 암은 대부분 여포상피세포기원(follicular epithelial origin)의 분화가 좋은 암으로 80%를 유두상암과 여포상암이 차지하며 유두상암은 일반적으로 침습성이 적으나 여포상암은 침습성이 적은 것부터 전이가 매우 빠르고 심한 것까지 다양한 형태를 나타내는 질환으로 예후는 수술 후 병리조직학적 진단과 연령, 종양의 크기, 전이여부, DNA 농도 등 여러 인자로 예측할 수 있다. 그러나 실제로 갑상선의 양성 및 악성 결절을 수술 전에 감별하기는 힘들며 암의 임상적 진행과정도 예측하기 어려운 실정이다.

갑상선 종양은 결절성 갑상선종 부터 갑상선선종, 분화가 잘된 여포상암, 유두상암, 침습성이 강한 역형성암까지 종양의 표현형이 다양하여 상피세포변형에 따른 분자생물학적 연구에 적합한 모델이 될 수 있다⁷⁾. 이런 조건에도 불구하고 실제로 갑상선암종의 발생에 대한 분자생물학적 기전이 잘 알려져 있지 않으나, 종양의 여러 표현형을 결정하는데 관여하는 성장인자, 수용체, 암유전자 및 암억제유전자 등의 다단계적 유전적 변이가 갑상선 암의 발생과정에도 관여할 것이라고 생각된다¹³⁾.

쥐의 갑상선은 사람의 갑상선과 유사하여, 갑상선암의 실험동물로 가장 많이 사용된다¹⁴⁾. 본 실험에서는 갑상선종 유발 및 발암물질로 NMU, ¹³¹I, ATA를 사용하였는데 그 기전으로는 ATA가 티록신(thyroxine)의 생산을 억제하여 갑상선 자극호르몬의 분비를 지속적으로 증가시킴으로서 세포내 DNA 손상에 의한 세포분열과 핵산의 복제에 변형을 일으켜 세포손상을 가져오며, NMU나 ¹³¹I는 암유발 초기에 촉진인자로 작용하는 것으로 알려져 있다³⁾. Schaffner와 Muller¹⁵⁾는 쥐에서 NMU를 투여한 후 8주 후부터 작은 병소의 종양이 발생하며, 증가된 호염기세포에 대해 갑상선자극 호르몬의 자극으로 유사분열이 일어나 불규칙한 여포를 형성하며 시간이 경과함에 따라 경성결절이 되고 이어 여러 막으로 싸인 선종이 된 후, 악성도가 점차 진행되어 여포상암으로 발전한다고 하였다.

Lemoine 등³⁾에 의하면 화학적 발암물질, 방사성요오드, 갑상선종 유발물질의 순으로 암이 발생하는 속도가 빠르며, NMU와 ATA 및 ¹³¹I과 ATA를 투여한 실험에서 80%의 갑상선암이 발생하였는데 이러한 종양 및 암유발인자로 발생시킨 종양은 사람의 여포상선종과 여포상암에 해당하는 여

포상 종양이 주로 발생하였다고 하였다. 본 실험에서도 NMU와 ATA를 투여한 군의 95%에서, ¹²⁵I와 ATA를 투여한 군의 45.0%에서 갑상선암이 발생하여 유사한 결과를 보였지만 ¹²⁵I와 ATA 투여군의 실험기간이 Lemoine 등³⁾에 비하여 짧았기 때문에 차이가 있는 것으로 생각된다. 반면 양성종양의 발생은 ATA 투여군에서 다른 군에 비하여 현저하게 높은 발생률을 보여 종양 및 암 유발물질에 대한 노출시간과 발생속도에 대한 상기 소견을 뒷받침하는 것이라고 할 수 있다. 한편 본 실험에서 발생된 종양 및 암 조직의 ras 암유전자의 p21 단백질과 p53 암억제유전자의 단백질 발현을 관찰하기 위하여 면역조직화학 염색을 시행하였는데 Western blotting 방법이 조직의 단백질 발현 여부만을 알 수 있는데 반하여 면역화학염색은 발현여부와 발현부위를 알 수 있다는 장점이 있으며 Berg 등¹¹⁾이 사용한 탈표적 용액을 사용하여 깨끗한 염색을 얻을 수 있었다.

p21 단백질을 나타내는 ras 암유전자에는 1번 염색체에 위치하는 N-ras, 11번 염색체의 H-ras, 12번 염색체의 K-ras 등이 있으며, 돌연변이에 의하여 종양이 발생하는데 대장에서는 20~40%로 가장 많이 발생하고 그 외 방광암, 폐암, 급성 골수성 백혈병, 유방암 및 위암에서도 발현된다¹⁶⁾. 대장종양의 경우 Fearon과 Vogelstein¹⁷⁾에 의하면 ras 유전자의 점변이가 class I 대장선종에서는 9%, class II 대장선종에서는 58%, 대장암에서도 58%의 양성율을 보여 종양 발생 초기에 관여하는 것을 알 수 있었다. p21 단백질은 GTPase 활성화된 단백질과 작용할 때 GDP 결합체를 형성하여 GTP 활성을 차단시키게 되는데 변이가 생기면 활성화 GTP 입체구조로 남아있게 되어 성장유도신호(growth-promoting signals)를 지속적으로 활성화하게 되는 것이다¹⁸⁾. 유전자의 변화 중 ras 암유전자의 변이는 종양발생 촉진인자로서 종양발생 초기부터 나타날 수 있으며, 양성종양에서 악성종양으로 이행되는 과정에 많이 나타나다가 암이 진행되거나 전이가 되면 점차 감소하는데 이는 ras 암유전자에 의한 영향이 감소하고 자율성장세포군(autocrine tumor growth)이 증가하기 때문이라고 한다⁵⁻⁷⁾.

Lemoine 등³⁾은 사람의 갑상선 종양에서 소여포성 갑상선종에서 50.0%, 여포상암에서는 53.3%, 유두상암에서는 20.0%의 ras 암유전자 변이를 보고하였고, Namba 등¹³⁾은 소여포성 갑상선종에서 25.0%, 여포상암에서는 0.0%, 유두상암에서는 21.4%의 변이를 보고하였으며, Karga 등⁴⁾은 여포성 갑상선종에서 0.0%, 여포상 갑상선암에서 14.2%, 유두상암에서는 0.0%의 변이를 보고하여 ras 암유전자 변이는 갑상선 종양의 20~50%에서 나타나는 것으로 보고되었다. 본 실험에서도 결절성 갑상선종에서 26.1%, 갑상선선종에서 30.0%, 여포상암에서는 6.7%의 발현을 보여 갑

상선 종양발생의 초기단계에 관여한다는 것을 알 수 있었고, 악성으로 분화가 진행될수록 자율성장세포의 증가로 발현이 감소하는 것으로 생각된다.

p53의 변이는 사람의 대장암, 폐암 등 여러 암종에서 가장 흔히 발현되는 유전적 변화로서¹⁹⁾²⁰⁾ 최근 갑상선종양에서도 보고되기 시작하였으며 wild-type p53 유전자는 암유전자에 의한 세포의 형질변형, 변형세포의 성장, 종양형성 잠재력 등을 억제한다는 것이 알려지고 wild-type p53 대립형질의 변이나 결손이 동물과 사람의 여러 종양에서 발견되어 종양억제유전자로서 인식되게 되었다⁴⁾. Fagin 등²¹⁾은 정상 갑상선, 갑상선 선종, 유두상암, 수질성암종에서는 p53변이가 나타나지 않았으나 여포상 갑상선암의 9.1%에서, 역형성암의 83.3%에서 나타났다고 보고하였으며, Dobashi 등¹²⁾은 110예의 갑상선암을 면역조직화학적 방법으로 p53 단백질의 발현을 관찰하였는데 총 110예 중 22.7%에서 나타났으며, 분화가 잘 된 유두상암에서 11.1%, 여포상암에서 14.3%, 분화가 나쁜 암에서 40.9%, 미분화암에서는 63.6%의 발현을 나타내 갑상선에서 p53의 발현은 초기 종양형성에 관여하는 것보다 분화정도가 낮을수록 발현이 높다고 하였다. 본 실험에서는 항체의 농도를 1 : 50, 1 : 75, 1 : 100으로 다양하게 시행하였지만 p53 단백질의 발현은 관찰할 수 없었는데 이것은 발생한 종양조직이 모두 양성 내지는 분화암이었기 때문에 발현되지 않은 것으로 생각된다. 또한 1970년대 중반까지 분화암의 일부는 병리학적으로 양성종양으로 진단되었던 사실과 다른 악성종양에 비하여 생존율이 현저하게 높은 것을 감안한다면 갑상선암의 진단은 병리조직학적 진단 외에 유전자진단을 시행하여야 상태나 예후를 정확하게 예측할 수 있겠다고 생각되며 특히 p53 및 p21 단백질의 발현을 통한 유전자 진단도 중요하리라 생각된다.

위 결과를 종합하여 보면 흰쥐에서 NMU, ¹²⁵I 및 ATA는 갑상선의 양성종양 및 암발생의 강력한 유발인자라는 것을 알 수 있었고, ras 암유전자의 변이에 의한 p21 단백질의 발현은 종양 및 암발생의 초기에 관여하는 것을 알 수 있었다. 그러나 암억제유전자인 p53 단백질의 발현은 본 실험에서 발생한 종양이 양성이거나 분화암이었기 때문에 발현이 없는 것으로 생각되고 재차 미분화암을 대상으로 발현을 관찰하는 것이 필요하며, 갑상선암의 정확한 상태나 예후 측정을 위해서는 병리조직학적 진단 외에 p53 및 p21 단백질 발현과 같은 유전자진단이 동반되어야 한다고 생각된다.

결 론

저자들은 사람의 갑상선 조직과 유사한 흰쥐를 대상으로 갑상선 유발약제 및 발암물질에 의한 종양 발생 종류와 빈

도 및 갑상선의 정상조직, 양성종양, 악성종양에서 ras 암 유전자와 연관된 변이 p21 단백질과 변이 p53 단백질의 발현여부 및 정도를 알아보기 위하여 일반사료를 이용한 군(제 1군, 대조군), 갑상선종 유발약제인 aminotriazole을 투여한 군(제 2군), 방사성요오드(¹³¹I)와 aminotriazole 투여군(제 3군), 화학적 발암물질인 nitrosomethylurea와 aminotriazole을 투여한 군(제 4군)으로 각각 나누고, 각군에서 발생한 종양의 종류와 빈도를 관찰하고 변이 p21 단백질에 대한 pan-ras 모노클로날 항체와 변이 p53 단백질에 대한 CM1 폴리클로날 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 조직학적 분류에 따른 발현 정도를 알아보고자 본 실험을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉 ATA, ¹³¹I 및 NMU에 의한 갑상선 종양발생은 제 1군에서는 종양 발생이 없었고, 제 2군에서는 결절성 갑상선종이 70.0%, 갑상선 선종이 20.0%, 갑상선암이 10%에서 발생하였으며, 제 3군에서는 제 2군에 비하여 양성종양의 발생은 감소하였으나 암의 발생은 현저히 증가하였고, 제 4군에서는 제 2군에 비하여서는 물론이고 제 3군에 비하여도 암의 발생이 현저하게 증가하였다. 현미경적 소견을 보면 갑상선 선종과 암의 경우 대부분 갑상선 여포가 잘 발달된 여포상 선종과 여포상 분화암의 특징적 소견을 나타냈으며 부분적으로 유두상 분화암이 소견을 나타내기도 하였다. 다음으로 p21 단백질의 발현을 보면 제 1군에서는 p21 단백질이 전혀 발현되지 않았으며, 갑상선 악성종양에 비하여 양성종양에서 현저하게 높은 발현율을 나타냈다. 그러나 p53 단백질의 발현은 3차의 항체농도변경을 시도한 면역조직화학염색에서 정상 갑상선 조직, 결절성 갑상선종, 갑상선 선종 및 갑상선암 모두에서 p53 단백질의 발현은 없었다.

위 결과를 종합하여 보면 흰쥐에서 NMU, ¹³¹I 및 ATA는 갑상선의 양성종양 및 암 발생의 강력한 유발인자라는 것을 알 수 있었고, ras 암유전자의 변이에 의한 p21 단백질의 발현은 종양 및 암 발생의 초기에 관여하는 것을 알 수 있었다. 그러나 암억제유전자인 p53 단백질의 발현은 본 실험에서 발생한 종양이 양성이거나 분화암이었기 때문에 발현이 없는 것으로 생각되고 재차 미분화암을 대상으로 발현을 관찰하는 것이 필요하며, 갑상선암의 정확한 상태나 예후 측정을 위해서는 병리조직학적 진단 외에 p53 및 p21 단백질 발현과 같은 유전자진단이 동반되어야 한다고 생각된다.

References

- 1) Cutler SJ, Young JL Jr : *Third National Cancer Survey : Incidence data. National Cancer Institute Monograph 41, DHEW Publication No.(NIH) : 75-787. Bethesda, National Cancer Institute, 1975 : 107-111*
- 2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al : *Genetic alteration during colorectal tumor development. N Eng J Med. 1988 ; 319 : 525-532*
- 3) Lemoine NR, Mayall ES, Willam ED, Thurston V, Winford-Thomas D : *Agent-specific ras oncogene activation in rat thyroid tumors. Oncogene. 1988 ; 4 : 541-544*
- 4) Karga H, Lee JK, Vickery AL Jr, Thor A, Gaz RD, Jameison JL : *Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. J Clin Endocrinol Metab. 1991 ; 73 : 832-836*
- 5) Gallick GE, Kurzrock R, Kloetzer WS, Arlinghaus RB, Gutterman JU : *Expression of p21 in fresh primary and metastatic colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci USA. 1985 ; 82 : 1795-1799*
- 6) Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Percho M : *Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature. 1987 ; 327 : 298-303*
- 7) Michelassi F, Leuthner S, Lubienski M et al : *Detection of high incidence of K-ras oncogene p21 levels parallel malignant potential of different human colonic benign conditions. Arch Surg. 1987 ; 122 : 1414-1416*
- 8) Levin AJ, Momend J, Finlay CA : *The p53 tumor suppressor gene. Nature. 1991 ; 351 : 454-456*
- 9) Mercer WE, Shields MT, Lin D, Apella E, Ulrich SJ : *Growth suppression induced by wild type p53 protein accompanied by selective down regulation of proliferating cell-nuclear antigen expression. Proc Natl Acad Sci USA. 1991 ; 88 : 1958-1962*
- 10) Oren M : *p53 : The ultimate tumor suppressor gene? The FASEB J. 1992 ; 6 : 3169-3175*
- 11) Berg FM, Basso IO, Polak MM, Offerhaus JA : *Technical and methodologic advances : Detection of p53 overexpression in routinely paraffin-embedded tissue of human carcinomas using a novel target unmasking fluid. AM J Pathol. 1993 ; 142(2) : 381-385*
- 12) Dobashi Y, Sakamoto AJ, Sugimura H, et al : *Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. Am J Pathol. 1993 ; 7 : 375-381*
- 13) Bishop JM : *The molecular genetics of cancer. Science. 1987 ; 235 : 305-311*
- 14) Napalkov NP : *Tumors of the thyroid gland. In Pathology of Tumors in Laboratory Animals. ed. Turusov VS, Lyon. IARC Scientific Publ. 1976 ; 1 : 239-272*
- 15) Schaffer R, Muller HA : *On the development of metastasizing tumors of rat thyroid gland after combined administration of nitrosomethylurea and methylthiouracil. J Cancer Res Clin Oncol. 1980 ; 96 : 281-285*
- 16) Bos JL : *The ras gene family and human carcinogenesis. Mut Res. 1988 ; 195 : 255-271*
- 17) Fearon ER, Vogelstein B : *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990 ; 61 : 759-767*

- 18) McCormick F : *Ras GTPase activating protein. Signal transmitter and signal terminator. Cell. 1989 ; 56 : 5-8*
- 19) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al : *Mutations in p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature. 1989 ; 342 : 705-708*
- 20) Harris AL : *Mutant p53 the commonest genetic abnormalities in human cancer? J. Pathol. 1990 ; 162 : 5-6*
- 21) Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP : *High prevalence of the mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. J Clin Invest. 1987 ; 91 : 179-184*