

두경부 편평 세포암에서 예후인자로서의 p53 발현

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실, 병리학교실*

정승원 · 이형석 · 박철원 · 박용욱* · 박찬금* · 장세진* · 태 경

= Abstract =

The Overexpression of p53 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma as Prognostic Marker

Seung Won Jeong, M.D., Hyung Seok Lee, M.D., Chul Won Park, M.D.,
Yong Wook Park, M.D.,* Chan Keum Park, M.D.,*
Se Jin Jang, M.D.,* Kyung Tae, M.D.

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Pathology* College of Medicine,
Hanyang University, Seoul, Korea

Objectives : The p53 tumor suppressor gene encodes a nuclear transcription factor that is critical regulator of cell growth and proliferation through its action in cell-cycle checkpoint control. The wide variety of stressful stimuli which include DNA damage, hypoxia, heat shock, metabolic changes activate the p53 protein, which in turn drives a series of events that culminate either in cell cycle arrest or apoptosis. Mutations of the p53 gene is the most common genetic alteration in human cancer. This gene is altered in approximately 40–60% of head and neck cancers. Whereas the wild-type form of the p53 protein plays a central role in cell-cycle control in response to DNA damage, most of the mutant forms are unable to do so. The high levels of p53 protein expression in tissues are related to the increased cellular proliferative activity and may be associated with the poor clinical outcome. To determine whether the expression of the p53 protein has prognostic significance and is associated with patterns of treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), We analyzed p53 overexpression in 40 cases of HNSCC.

Materials and Methods : Immunohistochemical analysis with a monoclonal antibody (DO7) specific for p53 protein was used to detect expression of the protein in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples from 40 HNSCC. We evaluated p53 protein expression and analyzed the relationship between the p53 overexpression and age, sex, primary tumor site, stage, survival rate, recurrence. All reported P values resulted from two-sided statistical tests.

Results : Overexpression of p53 was detected in 20 cases (50%) among 40 cases of HNSCC. The p53 overexpression was not associated with age, sex, primary tumor site, stage, recurrence and survival rate.

Conclusions : In our results, p53 was not significant prognostic factor in HNSCC. Based on many previous studies, It is evident that p53 has a certain role in tumorigenesis of HNSCC. So, the further study is needed to evaluate the prognostic significance of p53 in HNSCC.

KEY WORDS : p53 · Head and neck cancer.

서 론

두경부 암뿐만 아니라 인체 대부분의 종양의 발생 및 억제

에 큰 역할을 하고 있는 유전자들중 가장 대표적인 것이 p53
종양 억제 유전자이다¹⁻⁵⁾. 실험을 통해 p53 유전자 결핍 생
쥐는 태어난 지 수 주 후에 암이 여러 장기에서 발생하는 것

을 밝혔으며, p53은 정상세포가 암세포로 전환되는 것을 막는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Wild type p53은 세포 분열 주기의 G1/S에서 세포분열이 진행되는 것을 조절하며, 또한 세포고사에 관여한다⁶⁾⁷⁾. p53의 G1/S 세포 주기의 조절은 p21을 통해 이루어진다. p53에 의해 p21이 상승하게 되면 cyclin/CDK complex는 더 이상 Rb 단백질을 인산화 시키지 못하게 된다. 이것은 DNA 합성에 필요한 E2F transcription factor를 억제시켜서 S-phase로 가기 전에 세포 주기의 차단이 일어나게 된다. 이러한 G1/S 경계가 세포주기에 있어서 check point가 되고 p21에 의하여 억제된다.

p21은 DNA 복제에 필수적인 요소인 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 직접 결합함으로써 DNA 합성을 방해한다.

p53과 관련된 또 하나의 유전자는 GADD45 (growth arrest DNA damage)이다. 이것은 p21과 기능이 유사하여 PCNA와 결합함으로써 DNA 합성을 억제한다. 또한 MDM-2 protooncogene은 p53의 N-terminal에 있는 transcription-promoting domain과 결합하여 p53 자체의 feedback loop 역할을 함으로써 세포주기의 조절에 관여한다.

p53과 연관된 세포고사의 기전은 아직 명확하지는 않으나 세포고사에 관련된 중요한 조절인자인 Bax와 Bcl-2의 균형에 의해 조절된다. 즉 p53은 세포고사를 유발하는 인자인 Bax의 농도를 증가시키고 세포고사를 차단하는 Bcl-2 단백질의 농도를 억제하는 작용을 한다.

p53 유전자 돌연변이는 두경부 편평 세포암의 약 40~60%에서 일어나는 것으로 알려져 있으며⁵⁾⁸⁾⁹⁾. p53 유전자의 point mutation에 의해 mutant p53 단백질이 생성되며 mutant type p53은 종양 억제 기능을 잃어버려 이차암의 유발 또는 원발암종의 재발에 관여하는 것으로 알려져 있다.

저자는 두경부 편평 세포암에서 p53의 발현 정도를 알아보고 임상적인 여러 요소들 즉 연령, 성별, 흡연, 원발병소, 병기, 림프절 전이, 생존률 등과의 상관관계를 분석하여 두경부 편평세포암에서 p53의 역할을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1995년부터 1999년까지 한양대학교 의료원 이비인후과에서 두경부 편평 세포암으로 치료를 받은 환자 중 파라핀 블록의 보존이 양호하고 환자의 추적이 가능하였던 총 40례를 대상으로 하였으며 후향적으로 의무기록을 조사하여 여러 임상적 정보를 얻었다.

2. 방 법

조직검사 혹은 수술 후 얻어진 조직은 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 파라핀에 포매시켜 파라핀 블록을 만들었다. 파라핀 블록 조직을 4 μ m의 두께의 연속 절편으로 만들어서 L-lysine coated slide에 고정하여 실험에 이용하였다. p53 단백질의 발현 정도를 알기 위하여 면역조직화학을 사용하였다. p53 유전자에 대한 면역조직화학적 염색은 파라핀에 포매되어 있는 슬라이드를 65 $^{\circ}$ C 보온기에서 밤새 incubation을 시행하였으며, xylene으로 20분간 2회 담그어 탈 파라핀 과정을 거쳤다. 그 후 100%, 90%, 70%, 30%의 ethanol에 각 10분, 5분, 5분, 5분씩 처리하여 합수를 유도하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 메탄올과 과산화수소를 1:4로 혼합한 용액에 15분간 반응시킨 후 phosphate-buffered saline(이하 PBS, pH 7.0)에 3회 세척하였다. 다음 슬라이드를 citric acid(pH 6.0) 용액에 담가서 microwave에서 10분 정도 가열하고 30분 정도 상온에서 식힌 후 PBS에 3회 세척하였다. Blocking 항체를 도포하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시킨 후 PBS에 3회 세척하였다. 그 후 p53 항체(DO7, NeoMarkers, CA, USA)를 슬라이드에 반응시켜 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시킨 후 세척하였다. 이차 항체를 도포하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분을 반응시킨 후 PBS로 세척하였으며, Avidin-biotin complex를 도포하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분을 반응시킨 후 세척하였다. 마지막으로 Diaminobenzidine으로 발색시킨 후에 헤마톡실린으로 대조염색 시행하고 고정된 후 봉입하였다.

결과는 광학 현미경 400배 시야에서 각 슬라이드를 대상으로 종양이 있는 부분을 찾아서 핵이 갈색으로 염색되어 있는 세포를 p53 양성으로 하고 염색상이 없거나 주변의 비특이적인 반응과 차이가 나지 않는 경우를 음성으로 판독하였다. p53 발현 정도를 반정량적인 방법으로 측정하였는데 각 세포를 기준으로 0(no expression)~+3(highest expression)의 단계로 나누었으며 Weighted mean index(WMI)를 구하였다. 이는 염색된 정도에 따라서 가중치를 두어 이를 합산 한 후 모든 종양세포로 나눈 값이다. p53 과발현의 cut-off point로 WMI 0.1을 사용하였으며 WMI 0.1 이상의 경우를 p53 양성이라 판정하였다. 대상자 40명의 의무기록을 후향적으로 조사하여 연령, 성별, 흡연 유무, 병기(TNM Stage, AJCC, 1997), 림프절 전이, 3년 생존여부, 재발등의 임상적 변수를 구하고 임상적 변수들과 p53의 상관관계를 구하였다. 통계처리는 SPSS 8.0을 사용하여 연령, 원발병소, 림프절 전이, T stage, Stage등의 임상적인 변수는 Chi-square test를 이용하여 p value를 구하였고 성별, 흡연, 재발, 원격 전이 등의 임상적 변수는 Fisher's Exact test를 이용하여 p value를 구하였다. 생존률에 따른 분석은 Kaplan-Meier an-

alysis를 사용하였다.

결 과

1. p53 발현 양상

p53의 발현양상은 주로 세포의 핵에서 관찰되었으며 같은 종양내에서도 구역에 따라 양성과 음성인 부분이 혼재해 있는 양상을 보였다(Fig. 1). Weighted mean index가 0.1 이상으로 p53 양성인 경우는 전체 40례중 20례로 50%의 양성률을 나타내었다.

2. 연령별 차이

40례 중에서 연령은 60세를 기준으로 하여 60세 미만이 21례, 이상이 19례를 차지하였으며 60세 미만의 연령에서의 p53의 발현정도와 60세 이상의 p53의 발현정도는 통계학적으로 의미있는 차이는 없었다(p value=0.752) (Table 1).

3. 성별 차이

40례중 남자는 37례, 여자 3례였으며 여자의 숫자가 적은 관계로 통계학적으로 큰 의미가 없었으며 남녀간의 차이와 p53의 발현에는 Fisher's Exact test결과 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(p value=1.000).

4. 흡연여부에 따른 차이

흡연과 p53의 상관관계를 알아보기 위하여 흡연을 하는 그룹과 하지 않는 그룹으로 나누고 흡연자를 다시 세분하여 30 pack/year 이하의 저흡연자군, 그 이상의 고흡연자군으로 구분하였다. 흡연자는 35례, 비흡연자는 5례였으며 통계적으로 의미가 없었다(p value=1.000).

5. 원발병소에 따른 차이

원발병소에 따른 구분은 구강암, 구인두암, 하인두암과 후두암으로 구분하였는데 구강암은 5례, 구인두암은 4례, 하인

두암은 5례 그리고 후두암은 26례를 차지하였다. 원발병소에 따른 p53의 발현은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p value=0.185).

Table 1. Characteristics of 40 patients according to p53 expression

		p53 Positive	p53 Negative	p-value	
Age	<60	10	11	0.752	
	≥60	10	9		
Sex	Male	18	19	1.000	
	Female	2	1		
Smoking	Non-smoker	2	3	1.000	
	Smoker	<30pack years	11		9
		≥30pack years	7		8
Primary site	Oral cavity	3	2	0.185	
	Oropharynx	1	3		
	Hypopharynx	1	4		
	Larynx	15	11		
T stage	T1	7	7	0.842	
	T2	8	4		
	T3	1	5		
	T4	4	4		
N stage	N0	14	13	0.736	
	N+	6	7		
	N1	4	2		
	N2	2	3		
Stage	N3	0	2	0.781	
	I	7	5		
	II	5	2		
	III	2	2		
Recurrence	IV	6	8	0.781	
	No recur	13	17		
Survival	Recur	7	3	0.736	
	Below 36m	10	4		
	Above 36m	10	16		

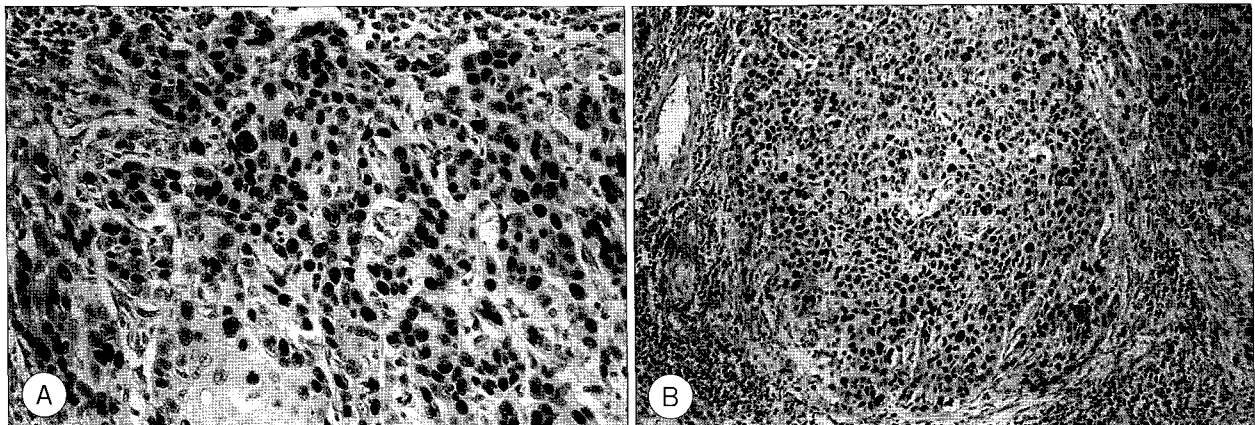


Fig. 1. Immunohistochemical demonstration of p53 expression in HNSCC.
 A : The positive immunoreactivity is mainly detected in the nucleus ($\times 400$).
 B : The immunostaining pattern of p53 is heterogenous in same tumor tissue ($\times 100$).

6. 림프절 전이에 따른 차이

림프절 전이는 1997년 AJCC(American Joint Committee of Cancer)의 기준에 의거하여 구분하였으며 전이가 있는 군과 없는 군, 그리고 전이가 있는 경우 다시 N1, N2, N3로 나누어 분석하였다. 전이가 있는 군에서 없는 군보다 p53의 발현이 임상적으로 높기는 하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(p value=0.736).

7. T stage에 따른 차이

1997년 AJCC(American Joint Committee of Cancer)의 기준에 의거하여 T stage를 분류하였고 T1,2와 T3,4를 묶어서 분석한 결과 두 군사이에 통계학적인 유의성은 없었다(p value=0.842).

8. Stage에 따른 차이

Stage I, II, III, 그리고 IV로 나누어서 분석하였고 Stage에 따라 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p value=0.781).

9. 재발이나 원격전이에 따른 차이

40례중 원발병소의 치료후에 국소재발 또는 원격전이가 일어난 예가 10례였으며 재발이 없었던 예가 30례였다. 재발이 있었던 10례중 7례에서 p53의 과발현이 있었으며 재발이 없었던 30례중에서는 13례가 p53 양성으로 나타났다. 재발이 있었던 군에서 p53 양성률이 높기는 하였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p value=0.273).

10. 생존률에 따른 차이

p53이 발현된 환자와 발현되지 않은 환자의 3년 생존률을 비교하였으며 Kaplan-Meier 분석상(Fig. 2) p53양성군과 음성군간의 유의한 차이는 없었다(p value=0.5766).

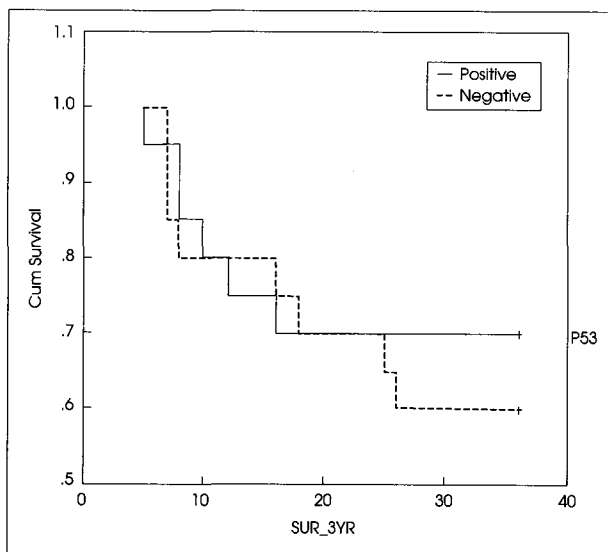


Fig. 2. Kaplan-Meier estimation of 3year survival rate according to p53 expression status in HNSCC (p -value=0.5766).

두경부 영역뿐 아니라 인체의 대부분의 종양발생 및 억제에 큰 역할을 하고 있는 유전자들중 가장 대표적인 것이 p53 유전자이다¹⁻⁸⁾. 1979년 최초로 Lane, Crawford에 의해서 p53이 발견되었을 때는 암세포에서 현저히 증가되어 있어 oncogene의 일종으로 여겨졌으나 이는 Mutant p53으로 밝혀지고 1989년 Fainlay와 Baker에 의하여 Wild type p53은 강력한 성장억제와 형질변환의 억제기능을 하는 종양 억제 유전자인 것으로 밝혀졌다⁹⁾¹⁰⁾.

30~70%의 암종에서 p53 유전자의 point mutation이 일어나거나 다른 allele의 loss가 일어난다고 한다. 이러한 점 돌연변이의 대부분은 missense mutation으로 core domain에서의 하나의 아미노산의 변형을 유발하여 p53 coding 순서를 바꾸어서 p53의 종양 억제 유전자로서의 역할대신에 증식촉진능력 새로운 능력을 획득한다고 한다⁸⁾¹⁰⁾¹¹⁾.

지금까지 두경부암에서 p53의 발현이나 변이에 관한 많은 연구가 있었는데 Field 등¹²⁾은 두경부 편평세포암종에 있어서 흡연과 p53의 발현정도와 관련성이 있음을 보고하였고, Shaulsky 등¹³⁾에 따르면 두경부 편평 세포암에서 수술 및 방사선 치료 등의 적극적인 치료에도 불구하고 p53의 과발현이 있었던 예가 없었던 예보다 생존기간, 재발기간, 이차암 발생기간 등이 짧아서 나쁜 예후를 보인다 하였다.

또한 Nees 등¹⁴⁾은 종양과 떨어진 정상 점막부위에서도 p53의 변이가 있었던 15명의 두경부암 환자의 추적관찰 결과 5례에서 이차암이나 재발암이 발견되었다고 보고하였으며 Boyle 등¹⁵⁾은 p53의 변이는 침습성암뿐 아니라 이형성(dysplasia) 및 상피내암(carcinoma in situ)에서도 발현하는 것으로 보고하여 p53의 변이는 침습성암으로의 진행 이전에 일어난다고 주장하였다.

본 연구에서는 p53의 발현을 면역조직화학법(immunohistochemistry)에 의하여 분석하였는데 mutant p53 단백질은 반감기가 길어서 세포내에 축적되어 검출이 가능하다.¹⁶⁾¹⁷⁾

본 연구에서는 40례중 20례(50%)에서 p53 발현을 보이는 것으로 나타났고 이는 다른 여러 연구에서 발표한 수치 50~60%와 비슷하였다.

흡연과 p53의 상관관계를 알아보기 위하여 크게 흡연을 하는 그룹과 하지 않는 그룹으로 나누고 흡연자를 다시 세분하여 30packs/year 이하의 흡연자(저흡연군), 그 이상의 흡연자(고흡연군)를 구분하였다. 비흡연군 및 저흡연군에 비해 고흡연군에서 p53의 발현이 상대적으로 높았으나 통계적으로 의미가 있지는 않았다. 이 결과는 다른 여러 연구에서도 결과에 따라 논란이 있는 부분이어서 정밀한 연구와 많은 자료가 있어야 할 것으로 사료된다.

림프절 전이에 따라서 p53 발현의 차이가 있는지 분석해 보았으며 본 연구에서는 전이가 있는 그룹에서 없는 그룹보다 p53의 발현이 빈도상으로 높기는 하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

1997년 AJCC (American Joint Committee of Cancer)의 기준에 의거하여 환자의 T stage중 T1, 2과 T3, 4를 묶어서 분석한 결과 통계학적인 유의성은 없었으며 전체 임상병기로 Stage I, II, III, IV로 나누어서 분석한 결과에서도 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 이는 다른 연구의 결과와 유사하였는데 p53의 발현과 암종의 크기와는 큰 상관관계가 없다고 단정짓기는 어려우며 보다 많은 연구가 있어야 하겠다.

40례중 원발병소의 치료후에도 국소재발 또는 원격전이가 일어난 그룹이 10례였으며 이 중 7례에서 p53의 발현이 나타났으나 통계적으로는 전이가 재발이 없었던 그룹에 비해 유의하게 높지는 않았다. 환자의 숫자가 그리 많지 않고 선택 오차를 어느정도 감안해야 할 것으로 사료된다.

p53 단백질의 발현과 3년 생존률과의 관계를 Kaplan-Meier 법으로 분석하였는데 통계적으로 유의한 차이가 없었다. p53과 생존률과의 관계는 여러 논문에서 서로 상이한 결과가 발표되어 논란이 있으며 향후 더 많은 표본과 추적관찰이 필요할 것으로 사료된다¹⁴⁾¹⁶⁾.

결 론

두경부 편평 세포암에서 p53 발현을 면역조직화학법으로 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

총 40례중 20례 (50%)에서 p53 단백질의 과발현을 관찰할 수 있었으며 p53의 과발현유무와 환자의 연령, 성별, 흡연력, 림프절 전이, 종양의 원발병소, 생존률, 임상병기등과는 통계학적 유의성이 없었다. 본 연구의 결과로 미루어 두경부 편평 상피 세포암의 약 50%에서 p53이 발현되며 p53의 발현과 병기, 림프절 전이, 재발, 생존률등의 임상적 예후 인자와는 연관이 없을 것으로 사료된다. 앞으로 더 많은 레에서 긴 추적관찰을 하여 p53과 두경부 편평 세포암의 연관 관계를 밝히려는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심 단어 : p53 · 두경부암.

References

- 1) Steele RJC, Tompson AM, Hall PA, et al : *The p53 tumor suppressor gene. Br J of surgery.* 1998 ; 85 : 1460-1467
- 2) David Sidransky : *Clinical implications of the p53 gene. Annu. Rev Med.* 1996 ; 47 : 285-301
- 3) Urpegui Garcia AM, Morandera Garcia MJ, Soria Navarro J, et al : *Immuno histochemical expression of p53 suppressor genes and retinoblastoma in laryngeal carcinoma. Acta Otorhinolaryngol Esp.* 2000 ; 51 : 133-142
- 4) Shin DM, Lee JS, Scott M Lippman, et al : *p53 expression : Predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. J of National Cancer Institute.* 1996 ; 88 (8) : 519-529
- 5) Choi G, Lee JS, Yoo DH, Chae SW, Jung KW, Choi JO : *p53 mutation patterns in primary head and neck squamous cell carcinomas and their metastatic neck nodes. Korean J Otolaryngol.* 1998 ; 41 : 906-912
- 6) Harris AL : *Mutant p53-the commonest genetic abnormality in human cancer? J pathol.* 1990 ; 162 : 5-6
- 7) Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, et al : *Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. Oral oncology.* 2001 ; 37 : 315-322
- 8) Min JH, Moon YI, Kim JN, Hong YS, Kim JK : *Genetic alterations of tumor suppressor genes in laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol.* 2000 ; 43 (10) : 1094-1101
- 9) Munck-Wikland E, Kuylensstierna R, Lindholm J, Auer G : *p53 immunostaining and image cytometry DNA analysis in precancerous and cancerous squamous epithelial lesion of the larynx. Head Neck.* 1997 ; 19 (2) : 107-115
- 10) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : *p53 mutations in human cancer. Science.* 1991 ; 253 : 49-53
- 11) Tamas L, Kraxner H, Mechtler L, Repassy G, et al : *Prognostic significance of p53 histochemistry and DNA histoparameters in head and neck malignancies. Anticancer Res.* 2000 ; 20 (5c) : 4031-4037
- 12) Field JK, Spandidos DA, Malliri A : *Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of head and neck. Br J Cancer.* 1991 ; 64 : 573-581
- 13) Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V : *Alteration in tumor development in vitro mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. Cancer Res.* 1991 ; 51 : 5232-5237
- 14) Nees M, Homan N, Discher H, et al : *Expression of mutated p53 occurs in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patient : A possible molecular basis for the development of multiple tumors. Cancer Res.* 1993 ; 53 : 4189-4196
- 15) 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 : 4477-4480
- 16) Choi G, Song JS, Yoo DH, et al : *Expression of p53, mdm-2, nm23 and TGF α in primary and second primary cancers in multiple head and neck cancers. Korean J Otolaryngol.* 1998 ; 41 (5) : 614-619
- 17) Christian Sittel, Hans E Eckel, Michael Damm, et al : *Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. Laryngoscope.* 2000 ; 110 : 1012-1017