

## 위암 환자에 있어서 *p53* 유전자 돌연변이, 종양 *p53* 단백질 과발현 및 혈청 *p53* 항체

<sup>1</sup>침례병원 외과, 경북대학교병원 <sup>2</sup>병리과, <sup>3</sup>진단검사의학과, <sup>4</sup>외과

봉진구<sup>1</sup> · 이명훈<sup>2</sup> · 송경은<sup>3</sup> · 김태봉<sup>4</sup> · 유완식<sup>4</sup>

### *p53* Gene Mutation, Tumor *p53* Protein Overexpression, and Serum Anti-*p53* Antibody in Patients with Gastric Cancer

Jin-gu Bong, M.D.,<sup>1</sup> Myung-Hoon Lee, Ph.D.,<sup>2</sup> Kyung-Eun Song, M.D.,<sup>3</sup> Taebong Kim, M.D.<sup>4</sup> and Wansik Yu, M.D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Wallace Memorial Baptist Hospital, Busan, Korea, Departments of <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Laboratory Medicine, and <sup>4</sup>Surgery, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

**Purpose:** The clinical implication of *p53* mutation in gastric cancer is still unclear, as shown by the discordant results that continue to be reported in the literature.

**Materials and Methods:** To assess *p53* gene mutation, tumor *p53* overexpression, and serum anti-*p53* antibody, we employed a polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis, an immunohistochemistry using monoclonal antibody DO-7, and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively.

**Results:** Of 169 surgical specimens of gastric cancer, mutation at exon 5~8 of the *p53* was identified in 33 (19.5%) and was significantly correlated with lymph node metastasis. Overexpression of *p53* was found in 62 specimens (36.7%) and had a significant correlation with tumor differentiation. Serum anti-*p53* antibody was positive in 18 patients (10.7%). Twenty-three of the mutated tumors (69.7%) and 39 of the non-mutated tumors (28.7%) displayed immunoreactivity. Twelve of the immunopositive tumors (19.4%) and 6 of the immunonegative tumors produced anti-*p53* antibody. These differences were statistically significant ( $P < 0.001$  and  $P = 0.005$ , respectively). There was no significant difference in survival according to the mutation of *p53*.

**Conclusion:** Mutation and overexpression of *p53* can be easily detected by immunohistochemistry. However, standardization of the immunohistochemical staining method, as well as guidelines for interpreting the stained result, will produce concordant results and thereby improve clinical application. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:206-213)

**Key Words:** Gastric cancer, *p53* mutation, *p53* overexpression, anti-*p53* antibody

**중심 단어:** 위암, *p53* 유전자 돌연변이, *p53* 항체

## 서 론

정상 상피세포에서 위암으로 진행되는 과정에 있어서는 여러 가지의 암유전자, 암억제 유전자, DNA 복구유전자, 세포주기 조절물질, 세포부착 분자, 성장인자와 그 수용체들의 다양한 변화가 일어난다. 이들 중의 일부는 고분화형 위암과 저분화형 위암에 따라서 다르게 나타나므로 위암의 발암과정에는 두 가지의 다른 유전적 경로가 있음을 시사한다. 일반적으로 유전적 불안정성, 텔로메라제 활성화, CD44의 이상 전사, *p53* 유전자의 돌연변이는 위암의 두 가지 조직형 모두에서 흔히 일어나므로 이들 변화는 위암의 발암과정 중에서 초기에 관여할 것이고, 암유전자의 활성화, 상피세포 성장인자와 관련된 성장인자들의 과발현은 주로 위암의 진행과 관련이 있을 것이다.(1)

암 억제 유전자는 주로 세포 성장을 저해한다고 생각했으나 근래에는 성장과 관계없이 암 형성을 저해하는 다른 기전들이 발견되어 사실상 이들 암 억제 유전자들은 성장을 저해하는 것이 가장 중요한 작용이 아닌지도 모른다.(2) 정상세포에서 고도의 DNA 손상이 일어나서 복구능력을 벗어난다면 세포 사멸을 유발하는데 이는 돌연변이 유전자의 축적을 예방하는 기전이다. 대표적인 암 억제 유전자인 *p53* 유전자는 DNA 손상, 저산소증, 암유전자 활성화 등과 같은 여러 가지 세포자극에 의해서 유도되며,(3) 세포에 DNA 손상이 있을 때 G(1)에서 정지하도록 cyclin-dependent kinases

책임저자 : 유완식, 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50  
경북대학교병원 외과, 700-712  
Tel: 053-420-5616, Fax: 053-421-0510  
E-mail: wyu@knu.ac.kr

접수일 : 2003년 12월 11일, 게재승인일 : 2003년 12월 17일

(CDKs)를 억제하는 신호전달체계의 결정적인 요소이기 때문에, p53 유전자의 소실은 CDK 억제제를 약화시켜서 손상된 DNA도 복제되게 하고, 정상적으로는 세포자멸사를 일으켜야 할 세포들이 살아있도록 한다.(4) 따라서 p53 유전자의 기본적인 역할은 성장을 조절하는 것이 아니고 세포의 유전적 통합성을 유지하는 것이므로,(2) p53 유전자의 돌연변이가 암 발생에 있어서 결정적인 요소이기는 하지만 p53 유전자의 돌연변이가 하나만으로 암을 유발하기에는 불충분하고, 다른 유전적 변화가 필요하다.(4)

p53 유전자에 대한 연구는 위암의 발암기전을 밝히기 위해서 주로 사용되지만 암의 치료에 직접 이용하거나 치료 후의 결과를 예측하는데도 이용된다. 인체의 정상적인 기능은 보존하면서 암세포에만 선택적으로 작용하는 치료법 중에서 세포자멸사 유전자를 발현하는 바이러스 매개체를 종양에 직접 주입하는 것이 가능하며 p53을 발현하는 아데노바이러스 매개체를 인체 암에 주입하여 종양의 성장을 억제하기도 하는데, 이러한 유전자 치료는 여러 가지 항암제와 상승작용을 나타내기도 하기 때문에 비소세포 폐암에서 임상시험이 진행되고 있다.(5) 항암화학요법의 효과를 예측하는데도 이용하려는 시도가 있는데, p53 유전자의 돌연변이는 위암에서 항암화학요법이 효과 없을 것을 예측할 수 있다고 한다.(6)

p53 유전자의 돌연변이는 이렇게 임상적으로도 다양하게 활용될 수 있기 때문에 여러 가지 방법으로 검색하고 있으나, 암세포의 핵 내에 변형 p53 단백질의 축적은 p53 유전자의 돌연변이를 반영한다고 알려져 있기 때문에,(7) 특정한 단백질을 확인하는 면역조직화학적 검사방법이 임상적으로 가장 많이 사용되고 있다.(8) 또한 p53 유전자 변이를 직접 확인하는 여러 가지 방법들도 있고, 암세포 내에 변형 p53 단백질이 축적되면 이것에 대한 항체가 형성되기 때문에 위암 환자의 혈청에서 변형 p53 단백질에 대한 항체를 검사하기도 한다.(9)

이에 위암 조직에서 polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis로 p53 유전자의 돌연변이를 검색하고, 면역조직화학적 염색으로 변형 p53 단백질을 확인하고, 동일 환자의 혈청에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 p53 항체를 측정하여 이들의 임상적 유용성을 확인하고, 각 방법 간의 양성률을 비교하여 향후 연구에 도움을 얻고자 하였다.

## 방 법

### 1) 대상 환자

1999년 3월부터 2000년 2월까지 경북대학교병원 외과에서 위암으로 진단되어 위절제 수술을 받은 환자 중에서 수술 전에 정맥혈을 이용하여 ELISA 방법으로 p53 항체를 측정하고, 절제 표본을 이용하여 p53 단백질에 대한 면역조직

화학적 검사와 p53 유전자의 exon 5~8에 대해서 PCR-SSCP analysis를 한 169명을 대상으로하였다.

### 2) 유전체 DNA 추출

위암 조직 파라인 블록을 7 $\mu$ m의 두께로 잘라서 슬라이드에 부착시키고, 탈파라인 과정을 거쳤다. 마이크로톱을 사용하기 전에 75% 알코올로 철저히 닦고, 일회용 박절용 칼날을 매 시료마다 바꿔가면서 사용함으로써 오염에 주의하였다. 헤마톡실린 에오진 염색을 한 위암조직 슬라이드를 현미경하에서 11번 날을 부착한 수술용 메스를 이용하여 종양세포가 아닌 것은 미세 절제술로 제거하였고, 15번 날로써 위암조직만 끊어내어서 DNA 추출 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, 500 $\mu$ g/ml Proteinase K) 25 $\mu$ l에 넣고 55°C에서 48시간 동안 항온 반응시켜 충분히 조직을 용해시켰다. 대조군으로는 절제면의 점막 부위를 선택하였다. 반응이 끝난 다음 100°C에 5분 간 두어 Proteinase K를 불활성화하고, 6,000 rpm에서 10분 간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 새 tube로 옮겼다.

### 3) 중합효소 연쇄반응

p53 돌연변이는 대부분 exon 5~8에서 발생한다고 알려져 있으므로, 본 연구에서는 exon 5에서 exon 8까지를 포함한 exon 5 (codon 126~186), exon 6 (codon 187~224), exon 7 (codon 225~261), exon 8 (codon 262~306)로 나누어 증폭하도록 Table 1과 같이 primer의 염기서열을 고안하였다. DNA 추출액을 template로 p53의 exon 5, 6, 7, 8의 증폭 과정에 이용하였다. Perkin-Elmer 9,600을 이용하여 exon 5는 95°C에서 10분 간 초기 변성과정을 거친 다음, 94°C 30초, 57°C 30초, 72°C 30초의 과정을 40회 반복하고, 72°C에서 10분 간 post-elongation 과정을 거쳤다. Exon 6은 62°C, exon 7과 8은 63°C에서 불림 과정을 수행한다는 점 외에는 동일한 조건을 사용하였다. 중합효소 연쇄반응을 위해 Taq polymerase, dNTP, PCR 반응액 등이 미리 첨가되어 있는 premix (Bioneer, USA)를 사용하였으며, 10 pmole의 primer와 DNA 시료 및 증류수를 각각 첨가하여 총 반응부피를 20 $\mu$ l로 맞추었다.

### 4) Single strand conformation polymorphism analysis

중합효소 연쇄반응을 통해 얻어진 산물 3 $\mu$ l와 loading buffer (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue) 6 $\mu$ l를 섞은 다음 끓는 물에 5분 간 두어 변성을 유도하였다. 변성과정이 끝나면 즉시 얼음에 두어 single-stranded DNA의 형성이 유지될 수 있도록 하였다. Exon 5, 7과 8은 15% polyacrylamide gel에서 exon 6은 10% polyacrylamide gel에서 각각 전기영동을 하였으며, 냉각순환장치로 10°C의 온도를 유지하여 DNA의 입체형태가 유지되도록 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 10% acetic acid

**Table 1.** The oligonucleotide primers used to amplify the exon 5-8 of *p53* gene

Exon	Size	Upstream	Downstream
5	196 bp	CTCTTCCTACAGTACTCC	CATCGCTATCTGAGCAGCGC
6	181 bp	GCCTCTGATTCCTCACTGAT	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA
7	177 bp	AGGCGCACTGGCCTCATCTT	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC
8	231 bp	TGGTAATCTACTGGGACGGA	CGGAGATTCTCTCCTCTGT

에 넣고 30분 간 흔들면서 고정시킨 다음 삼차 증류수로 3회 씻었다. 0.5% silver nitrate 용액에서 30분 간 염색한 다음 삼차 증류수로 간단히 씻은 후 3% sodium carbonate 용액에 넣어 발색을 유도하였으며 적절히 발색되었을 때 10% acetic acid를 넣어 발색을 중단시켰다. 각 환자의 정상 조직을 야생형의 대조군으로 사용하였을 때 만들어진 band와 서로 비교하여 비정상적인 band가 있을 때를 *p53* 유전자의 해당 exon에 변이가 있는 것으로 하고 양성으로 판정하였다.

##### 5) 면역조직화학적 검사

10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 제작한 위암조직 파라핀 블록을 4 $\mu$ m 두께로 잘라서 Probe-On 슬라이드 (Fisher, USA)에 부착시켜 60°C에서 2시간 건조시켰다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드를 xylene에서 10분 간 4회의 탈 파라핀 과정을 거치고 10분 동안 100% alcohol 2회, 95% alcohol 3회의 흡수 과정을 거친 후 증류수에 5분 간 흡수시켰다. Microwave에 citric acid buffer (pH 6.0)를 먼저 10분 간 끓인 후 슬라이드를 넣고 10분 간 더 끓이고 15분 간 냉각시킨 후 Tris buffer로 3회 세척하였다. Protein blocker (Research genetics, USA)로 5분 간 처리 후 세척하지 않고 바로 *p53*의 일차 항체(DO-7, Dako, USA)를 1시간 동안 반응시켰다. Tris buffer로 3회 세척한 후 universal secondary antibody (Research genetics, USA)로 10분 간 반응시키고 Tris buffer로 3회 세척하였다. Streptavidin HRP detection system (Research genetics, USA)으로 10분 간 처리하고 Tris buffer로 3회 세척한 후 DAB (Research genetics, USA)로 20초간 발색시켰다. 증류수로 세척한 후에 Meyer's Hematoxyline (Research genetics, USA)으로 1분 간 대비 염색하고 증류수를 거쳐 95%와 100% alcohol로 탈수한 후, xylene으로 청명 과정을 거쳐서 Malinol로 봉입하여 관찰하였다. 종양세포의 핵에 국한되어 염색되었을 때 양성으로 하고, 음성 대조군은 일차 항체 대신 항체 희석용액을 떨어뜨려 비교하였다. 암세포의 핵이 전혀 염색되지 않았으면 음성으로 판정하였고, 양성은 염색되는 정도에 따라서 +1 (25%까지), +2 (25~50%), +3 (50~75%), +4 (75%이상)로 구분하였다.

##### 6) Enzyme-linked immunosorbent assay

수술 전 환자의 전박정맥에서 채혈한 혈액을 실온에서

**Table 2.** Patients characteristics

Variable	No. of patients (%)
Age (mean+s.d.)	57.89+10.66
Sex	
Female	65 (38.5)
Male	104 (61.5)
Depth of invasion	
EGC*	59 (34.9)
AGC <sup>†</sup>	110 (65.1)
Nodal metastasis	
No	88 (52.1)
Yes	81 (47.9)
Distant metastasis	
No	166 (98.2)
Yes	3 (1.8)
Differentiation	
Differentiated	86 (50.9)
Undifferentiated	83 (49.1)
Surgery	
Curative	160 (94.7)
Palliative	9 (5.3)
Chemotherapy	
No	104 (61.5)
Yes	65 (38.5)

\*EGC = early gastric cancer; <sup>†</sup>AGC = advanced gastric cancer.

응고되게 한 후 원심분리를 하여 혈청을 얻고 이를 냉동고 (-70°C)에 보관하였다. *p53* 항체는 *p53*-Autoantibody ELISA<sup>plus</sup> (CN Biosciences, USA)를 이용하여 제조사에서 제공한 측정 방법을 따랐으며 간략히 기술하면 다음과 같다. 냉동혈청은 해동 후 분석하기 전에 dilution buffer를 이용하여 1:100으로 희석하였다. 재조합 인체 *p53* 단백질로 coating된 96-well microtiter plate에 각 well 당 200 $\mu$ l의 1배 wash buffer를 넣고 실온에서 3분 간 항온 반응시킨 후 plate를 종이 수건에 두드려서 남아 있는 wash buffer를 제거하였다. Calibrator와 negative control과 희석한 시료를 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 1시간 동안 항온반응 시킨 후 1배 wash buffer로 5회 세척하였다. 각각의 well에 100 $\mu$ l의 detector antibody conjugate solution을 넣고 실온에서 1시간 동안 항온반응 시킨 후 5회 세척하였다. 각각의 well에 100 $\mu$ l의 substrate solution을 넣고 실온의 암소에서 30분 간 항온반응시켰다. 효소반응을 중지시키기 위해서 각각의 well에 50 $\mu$ l의 stop solution을 첨가한 후 450 nm의 파장에서 흡광도를

측정하였다. 실험은 2회 반복하여 평균치를 계산하였다. 제조사의 결과판독자침에 따라서 cut-off value를 계산하고 그 이상이면 양성으로, 그 이하이면 음성으로 판정하였다.

7) 통계학적 방법

각 방법에 따른 양성률과 여러 가지 임상 및 병리학적인 인자의 비교와 각 방법에 따른 양성률의 비교는 chi-square test 혹은 Fisher's exact test를 이용하였다. 수술 후의 생존율은 Kaplan-Meier 방법으로 계산하여 log-rank 방법으로 비교하였고, Cox의 비례위험모형을 이용하여 다변량 분석을 하였다. p 값이 0.05 이하를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1) 대상 환자의 특성

대상 환자의 임상 및 병리학적인 특성은 Table 2와 같다.

2) PCR-SSCP analysis 결과

PCR-SSCP analysis에서는 33에서 변이가 확인되어 양성률은 19.5%이었으며, exon 5의 변이는 10예(5.9%), exon 6의 변이는 2예(1.2%), exon 7의 변이는 10예(5.9%), exon 8의 변이는 11예(6.5%)에서 확인되었다(Fig. 1). 여러 가지 임상 및 병리학적인 인자에 따른 양성률은 Table 3과 같으며, 림프

Table 3. Correlation of PCR-SSCP analysis with clinicopathologic factors

Variable	PCR-SSCP* analysis		
	Negative	Positive	p-value
Depth of invasion			0.066
EGC <sup>†</sup>	52 (88.1)	7 (11.9)	
AGC <sup>‡</sup>	84 (76.4)	26 (23.6)	
Lymph node metastasis			0.044
No	76 (86.4)	12 (13.6)	
Yes	60 (74.1)	21 (25.9)	
Distant metastasis			1.000
No	133 (80.1)	33 (19.9)	
Yes	3 (100)	0	
Differentiation			0.213
Differentiated	66 (76.7)	20 (23.3)	
Undifferentiated	70 (84.3)	13 (15.7)	
Surgery			0.208
Curative	127 (79.4)	33 (20.6)	
Palliative	9 (100)	0	

\*PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism; <sup>†</sup>EGC = early gastric cancer; <sup>‡</sup>AGC = advanced gastric cancer.

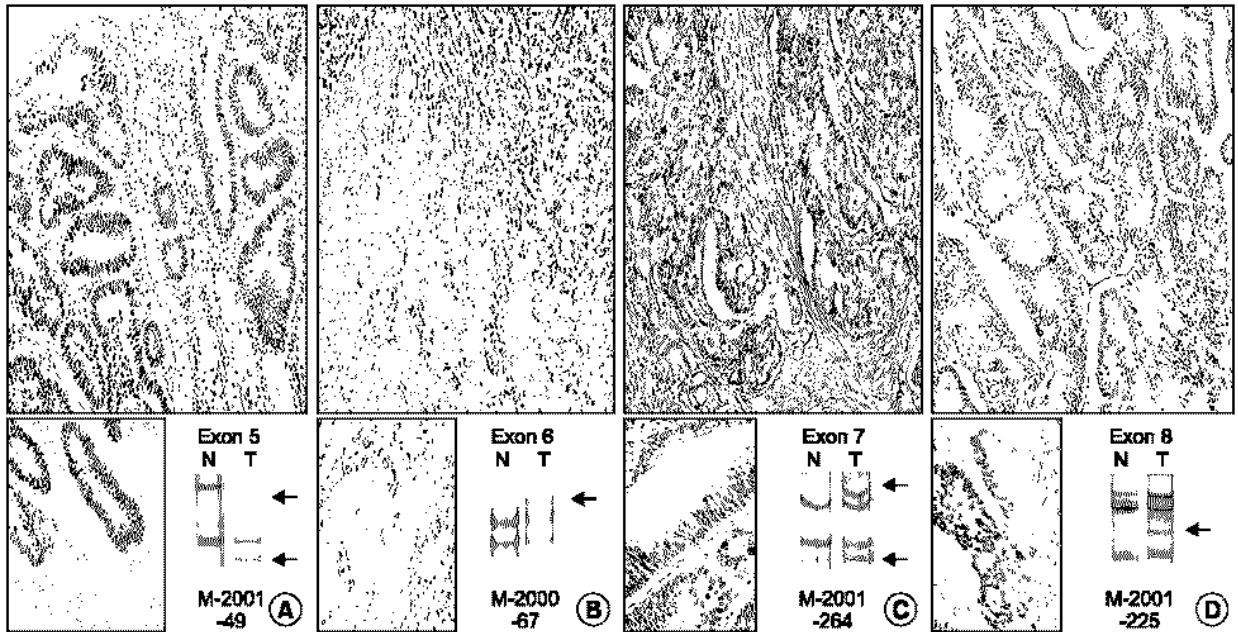


Fig. 1. Immunohistochemical staining and PCR-SSCP patterns of gastric adenocarcinoma. (A) a well differentiated adenocarcinoma showing strong expression for p53 protein and mutated exon 5; (B) a poorly differentiated adenocarcinoma, infiltrating muscle layer showing mutated exon 6; (C) a moderately differentiated adenocarcinoma revealed high expression of p53 protein with mutated exon 7; (D) a well differentiated gastric adenocarcinoma showing focal expression of p53 protein (about 60%) with mutated exon 8.

**Table 4.** Correlation of immunohistochemistry with clinicopathologic factors

Variable	Immunohistochemistry		p-value
	Negative	Positive	
Depth of invasion			0.222
EGC*	41 (69.5)	18 (30.5)	
AGC*	66 (60.0)	44 (40.0)	
Lymph node metastasis			0.091
No	61 (69.3)	27 (30.7)	
Yes	46 (56.8)	35 (43.2)	
Distant metastasis			0.048
No	107 (64.5)	59 (35.5)	
Yes	0	3 (100)	
Differentiation			0.039
Differentiated	48 (55.8)	38 (44.2)	
Undifferentiated	59 (71.1)	24 (28.9)	
Surgery			0.291
Curative	103 (64.4)	57 (35.6)	
Palliative	4 (44.4)	5 (55.6)	

\*EGC = early gastric cancer; \* AGC = advanced gastric cancer.

질 전이가 없는 경우는 13.6%, 있는 경우는 25.9%로 양성률의 차이가 통계학적으로 유의하였다(P=0.044).

**3) 면역조직화학적 검사 결과**

면역조직화학적 검사에서 169예 중 62예에서 양성이어서 양성률은 36.7%이었고, +1이 22예, +2가 19예, +3이 17예, +4가 4예이었다(Fig. 1). 여러 가지 임상 및 병리학적 인자에 따른 양성률은 Table 4와 같으며, 원격전이가 없던 166예 중에서 59예(35.5%), 원격전이가 있던 3예는 모두 양성을 나타내어 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었고(P=0.048), 조직의 분화도가 좋을 때는 86예 중 59예(35.5%), 나쁠 때는 83예 중 24예(28.9%)에서 양성을 나타내어서 역시 유의한 차이가 있었다(P=0.039).

**4) ELISA 결과**

ELISA에서는 18예에서 항체가 양성이어서 10.7%의 양성률을 나타내었으며 여러 가지 임상 및 병리학적인 인자 중에서 양성률의 차이가 통계학적으로 유의한 항목은 없었다(Table 5).

**5) 검사방법에 따른 양성률의 차이**

PCR-SSCP analysis에서 양성인 33예 중 면역조직화학적 검사에서 양성인 23예(69.7%)이었고, PCR-SSCP analysis에서 음성인 136예 중 면역조직화학적 검사에서 양성인 39예

**Table 5.** Correlation of ELISA with clinicopathologic factors

Variable	ELISA*		p-value
	Negative	Positive	
Depth of invasion			0.708
EGC*	52 (88.1)	7 (11.9)	
AGC*	99 (90.0)	11 (10.0)	
Lymph node metastasis			0.092
No	82 (93.2)	6 (6.8)	
Yes	69 (85.2)	12 (14.8)	
Distant metastasis			1.000
No	148 (89.2)	18 (10.8)	
Yes	3 (100)	0	
Differentiation			0.936
Differentiated	77 (89.5)	9 (10.5)	
Undifferentiated	74 (89.2)	9 (10.8)	
Surgery			0.600
Curative	142 (88.8)	18 (11.3)	
Palliative	9 (100)	0	

\*ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; \* EGC = early gastric cancer; \* AGC = advanced gastric cancer.

**Table 6.** Correlation of PCR-SSCP analysis and immunohistochemistry

PCR-SSCP* analysis	Immunohistochemistry		Total
	Negative	Positive	
Negative	97 (71.3%)	39 (28.7%)	136
Positive	10 (30.3%)	23 (69.7%)	33

\*PCR-SSCP = polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism; P<0.001.

(28.7%)로 유의한 차이를 나타내었다(P<0.001; Table 6). 면역조직화학적 검사에서 양성인 62예 중에서 ELISA 검사에서 양성인 경우는 12예(19.4%)이었고 면역조직화학적 검사에서 음성인 107예 중에서 ELISA 검사에서 양성인 6예(5.6%)로 역시 유의한 차이가 있었다(P=0.005; Table 7). 그러나 PCR-SSCP analysis에서 양성인 33예 중 ELISA 양성인 6예(18.2%)이었고, PCR-SSCP analysis에서 음성인 136예 중 ELISA 양성인 12예(8.8%)로 유의한 차이가 없었다(P=0.118).

**6) 생존율**

환자들의 수술 후 3년 생존율은 단변량 분석에서 암의 침윤깊이에 따라서(P<0.0001), 림프절 전이에 따라서(P<

**Table 7.** Correlation of immunohistochemistry and ELISA

Immunohistochemistry	ELISA*		Total
	Negative	Positive	
Negative	101 (94.4%)	6 (5.6%)	107
Positive	50 (80.6%)	12 (19.4%)	62

\*ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; P=0.005

**Table 8.** Three-year survival rates

Variable	3-year survival rate	p-value
Sex		0.8399
Female (65)	84.3%	
Male (104)	83.7%	
Depth		0.0033
EGC* (59)	96.3%	
AGC* (110)	77.2%	
Nodal metastasis		<0.0001
No (88)	95.3%	
Yes (81)	71.7%	
Distant metastasis		0.0426
M0 (166)	84.3%	
M1 (3)	0.0%	
Differentiation		0.0173
Differentiated (86)	91.8%	
Undifferentiated (83)	76.0%	
Surgery		<0.0001
Curative (160)	87.4%	
Palliative (9)	25.4%	
Chemotherapy		0.0004
No (104)	91.7%	
Yes (65)	72.0%	
Immunohistochemistry		0.0815
Negative (107)	87.1%	
Positive (62)	78.4%	
PCR-SSCP <sup>‡</sup> analysis		0.3422
Negative (136)	82.4%	
Positive (33)	90.4%	
ELISA <sup>§</sup>		0.7055
Negative (151)	84.2%	
Positive (18)	82.2%	

\*EGC = early gastric cancer; †AGC = advanced gastric cancer; ‡PCR-SSCP = polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism; §ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay. Numbers in parentheses are number of patients.

0.0001), 원격전이에 따라서(P=0.0426), 조직의 분화도에 따라서(P=0.0173), 근치적 수술 여부에 따라서(P<0.0001), 항암화학요법 실시 여부에 따라서(P=0.0004) 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었으나(Table 8), 다변량 분석에서는 림프절 전이만이 유의한 것으로 나타났다.

그러나 면역조직화학적 검사에서 양성인 경우의 3년 생존율은 78.4%, 음성인 경우는 87.1%로 양성인 경우의 생존율이 낮은 경향을 나타내었을 뿐(P=0.0815), PCR-SSCP analysis의 양성인 경우는 90.4%, 음성인 경우는 82.4%이었으며(P=0.3422), ELISA의 양성인 경우는 82.2%, 음성인 경우는 84.2% (P=0.7055)로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

### 고 찰

PCR-SSCP analysis에 의해서 발견되는 p53 유전자에 대한 돌연변이의 양성률은 7.6%, 22.5%, 35% 등으로 보고되어 있으며,(10-12) 암의 침윤깊이나 림프절 전이와는 무관하다고 한다.(13) 조직의 분화도가 좋은 경우보다 나쁜 경우에 양성률이 유의하게 낮다는 보고가 있으나,(11) 차이가 없다는 보고들도 있다.(10,14)

대부분의 인체 암에서는 발생과 진전에 있어서 일정한 유전자 변화가 일어난다. 위암에 있어서 이런 일정한 유전자 변화를 확인하기 어려운데 이유로는 DNA 시료가 정상 기질 세포들의 DNA와 심하게 섞여있고, 암이 이질적이기 때문이다.(15) 따라서 본 연구에서 사용한 방법과 같이 현 미경하에서 암세포를 분리해서 분석에 이용하기도 하고, 유세포분석기를 이용하여 세포를 골라내는 방법(14) 등을 이용하기도 한다.

면역조직화학적 검사에서 변형 p53 단백질의 발현빈도는 위암 환자의 20.2%에서 54.5%까지 다양하게 보고되어 있으며,(16,17) 본 연구에서의 양성률은 36.7%이었다. 암의 침윤깊이에 따른 양성률은 대부분의 보고에서 차이가 없었으며,(16,18-20) 본 연구에서도 조기위암에서는 30.5%, 진행위암에서는 40.0%로 진행위암에서 약간 높았으나 통계학적으로 유의한 차이는 아니었다. 그러나 진행위암에서 60.7%, 조기위암에서 30.4%로 유의한 차이가 있다는 보고도 있다.(17) 본 연구에서는 림프절 전이가 있는 경우에 양성률이 높은 경향을 나타내었는데(P=0.091), 림프절 전이에 따라서 양성률에 유의한 차이가 있다는 보고도 있으나,(21) 차이가 없다는 보고들도 있다.(16,17,20,22) 본 연구에서와 같이 원격전이가 있는 경우에 양성률이 유의하게 높다는 보고들이 있으나,(21,22) 그렇지 않았다는 보고들도 있다.(16, 20) 본 연구에서는 분화도가 높은 경우에 양성률이 유의하게 높아서 Shun 등(17)과 같은 결과를 나타내었으나, 오히려 분화도가 나쁜 경우에 양성률이 유의하게 높다는 보고도 있고,(23) 분화도에 따른 양성률에는 차이가 없다는 보고도 있다.(19,20) 면역조직화학적 검사로 확인된 p53 단백

질의 발현은 여러 가지 암에서 예후와 관련이 있다고 한다.(8) 그러나 위암에서의 연구결과는 다양하며 예후와는 관련이 없다는 보고도 있고,(17) 단변량 분석에서는 양성인 경우의 생존율이 유의하게 낮았으나 다변량 분석에서는 독립적인 예후인자가 아니었다는 보고도 있지만,(16,22) 진행 위암의 경우,(18) 림프절 전이가 없는 경우,(19) 장형 위암(20)에서는 독립적 예후인자라고도 한다. 본 연구에서는 일반적으로 알려진 예후인자들 즉, 암의 침윤 깊이, 림프절 전이, 원격전이, 근치적 수술 여부 등은 예후에 유의한 차이를 나타내는 것으로 나타났으나, p53 단백질의 발현이 있는 경우에 나쁜 예후를 나타내는 경향은 있었으나 통계학적으로 유의하지는 않았다.

이상과 같은 다양한 결과는 면역조직화학적 검사에 사용하는 항체가 단세포군 항체라 할지라도 PAb1801,(7) DO-1,(20) DO-7,(22) 등으로 다양하고, 양성판정의 기준 또한 본 연구에서와 같이 한 개의 세포라도 염색되면 양성으로 간주하는 경우, 10% 이상의 세포핵에 염색될 때,(20) 20% 이상일 때,(22) 30% 이상일 때(19) 양성으로 간주하는 등 다양하기 때문에 생각된다. 또한 면역조직화학적 검사는 그 과정이 철저하게 이루어져야 하고 결과는 항상 적절한 배경 하에서 해석되어야 하며 위양성의 가능성을 염두에 두어야 한다. 시료의 처리과정에서 일어날 수 있는 항원성의 소실 가능성 때문에 위음성의 가능성 또한 있음을 고려해야 한다.(8)

위암 환자의 혈청에서 p53 항체의 양성률은 11.2%, 11.3%, 16%, 32%로 보고되어 있다.(9,24-26) 항체가 양성인 경우는 나쁜 예후를 나타낸다고 하지만,(9,24,26) 예후와는 관계가 없다고도 한다.(25)

본 연구에서 유전자의 돌연변이에 따른 면역조직화학적 검사의 양성률에 유의한 차이가 있었으며, 유전자 돌연변이가 없는 경우의 28.7%에서 p53 단백질이 발현되었는데 Ranzani 등(27)의 연구에서도 유전자 돌연변이가 없는 경우의 28%에서 면역조직화학적 검사 양성률 나타내었다. P53 항체는 암세포에 p53 단백질의 축적이 있으면 생성될 수 있지만 p53 단백질의 축적은 면역반응을 일으키는데 충분하지도 않고 필요하지도 않다.(28) Maeta 등(24)은 면역조직화학적 검사의 양성률은 45.2%이었으나 p53 항체의 양성률은 11.3%로 보고하였고, 본 연구에서도 p53 단백질이 양성인 경우에는 19.4%, 음성인 경우에는 5.6%에서 p53 항체가 검출되어서 양성률에 있어서는 통계학적으로 유의한 차이가 있지만 양성률이 낮아서 혈청 p53 항체의 검출이 임상적으로 널리 사용하기는 어려울 것으로 생각된다.

암억제 유전자인 p53 유전자에 대한 연구는 위암의 발암 기전을 밝히기 위해서 주로 사용되지만 유전자치료에 이용하기도 하고 항암화학요법의 효과를 예측하는데도 이용되기도 한다. p53 유전자의 돌연변이는 항암제감수성을 예측할 수 있어서 위암 환자의 화학요법에서 음성인 경우에 더

높은 관해율을 나타내며,(29) 야생형 p53 유전자는 유전자 치료에도 이용될 가능성이 제기되고 있다.(30)

## 결 론

p53 유전자의 돌연변이를 직접 검색하는 방법은 과정이 복잡하여 임상에서 널리 사용되기 어렵고, 혈청 p53 항체의 검출은 조직을 이용하지 않고 혈액을 이용할 수 있다는 장점이 있으나 양성률이 낮아서 임상적으로 보편화되기는 어렵다. 면역조직화학적 검사는 조직을 이용해야 하지만 비교적 간편하게 할 수 있으므로 임상적으로 널리 이용되고 있지만, 다양한 항체를 이용하여 염색하고 있고, 염색 방법이나 판정 기준 또한 다양하기 때문에 일관된 결과를 얻지 못하고 있다. 따라서 표준화된 면역조직화학적 검사방법이 확립되면 임상적으로 더 많이 활용될 것으로 기대된다.

## REFERENCES

1. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23:307-315.
2. Liotta LA, Liu ET. Essentials of molecular biology: genomics and cancer. In *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 17-29.
3. Korsmeyer SJ, Zinkel SS. Molecular biology of cancer: apoptosis. In *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 111-122
4. Liotta LA, Liu ET. Essentials of molecular biology: basic principles. In *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 3-15
5. Chu E. DeVita Jr. Principles of cancer management. In *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 289-306
6. Cascinu S, Graziano F, Del Ferro E, et al. Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1998;83:1917-1922.
7. Uchino S, Noguchi M, Hirota T, et al. High incidence of nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1992;22:225-231.
8. Costa J, Cordon-Cardo C. Cancer diagnosis: molecular pathology. In *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001. p. 641-657
9. Wu CW, Lin YY, Chen GD, Chi CW, Carbone DP, Chen JY. Serum anti-p53 antibodies in gastric adenocarcinoma patients are associated with poor prognosis, lymph node metastasis and

- poorly differentiated nuclear grade. *Br J Cancer* 1999;80:483-488.
10. Rugge M, Shiao YH, Busatto G, et al. The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* 2000; 53:207-210.
  11. Hsieh LL, Hsieh JT, Wang LY, Fang CY, Chang SH, Chen TC. p53 mutations in gastric cancers from Taiwan. *Cancer Lett* 1996;100:107-113.
  12. Tolbert D, Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, et al. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. *Cancer Causes Control* 1999;10:227-231.
  13. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993;54:759-764.
  14. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991;51:3056-3058.
  15. Hirohashi S, Sugimura T. Genetic alterations in human gastric cancer. *Cancer Cells* 1991;3:49-52.
  16. Lee WJ, Shun CT, Hong RL, Wu MS, Chang KJ, Chen KM. Overexpression of p53 predicts shorter survival in diffuse type gastric cancer. *Br J Surg* 1998;85:1138-1142.
  17. Shun CT, Wu MS, Lin JT, et al. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, Helicobacter pylori infection and prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1997;44:604-609.
  18. Ichiyoshi Y, Oiwa H, Tomisaki S, et al. Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1997;44:546-553.
  19. Sgambato A, Migaldi M, Leocata P, et al. Loss of p27Kip1 expression is a strong independent prognostic factor of reduced survival in N0 gastric carcinomas. *Cancer* 2000;89:2247-2257.
  20. Roviello F, Marrelli D, Vindigni C, De Stefano A, Spina D, Pinto E. P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type. *Ann Surg Oncol* 1999;6:739-745.
  21. Yonemura Y, Fushida S, Tsugawa K, et al. Correlation of p53 expression and proliferative activity in gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1993;5:277-288.
  22. Victorzon M, Nordling S, Haglund C, Lundin J, Roberts PJ. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A:215-220.
  23. Schneider BG, Hilsenbeck SG, Hensel CH, et al. p53 mutations in gastric and colorectal cancers in Texas Hispanics versus Anglos. *Virchows Arch* 1994;424:187-193.
  24. Maeta M, Saito H, Oka S, Tsujitani S, Ikeguchi M, Kaibara N. Mutated p53 in tumors, mutant p53 and p53-specific antibodies in the circulation in patients with gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19:489-495.
  25. Nakajima K, Suzuki T, Shimada H, Hayashi H, Takeda A, Ochiai T. Detection of preoperative serum anti-p53 antibodies in gastric cancer. *Tumour Biol* 1999;20:147-152.
  26. Shiota G, Ishida M, Noguchi N, et al. Clinical significance of serum P53 antibody in patients with gastric cancer. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998;99:41-51.
  27. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al. p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:223-231.
  28. Angelopoulou K, Yu H, Bharaj B, Giai M, Diamandis EP. p53 gene mutation, tumor p53 protein overexpression, and serum p53 autoantibody generation in patients with breast cancer. *Clinical Biochemistry* 2000;33:53-62.
  29. Kikuyama S, Inada T, Shimizu K, Miyakita M, Ogata Y. p53, bcl-2 and thymidine phosphorylase as predictive markers of chemotherapy in patients with advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2001;21:2149-2153.
  30. Ohashi M, Kanai F, Ueno H, et al. Adenovirus mediated p53 tumour suppressor gene therapy for human gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Gut* 1999;44:366-371.