

p53 변이, bcl2 발현, Ki67 인덱스, E-cadherin의 발현 등이 식도암의 예후에 미치는 영향에 대한 연구

원자력의학원 흉부외과¹, 해부병리과²

이 해 원¹⁾ · 박 선 후²⁾ · 이 승 숙²⁾ · 박 종 호¹⁾

=Abstract=

Influences of p53 Mutation, Expression of bcl2, Ki67 Index and Expression of E-Cadherin on the Prognosis of the Esophageal Cancer

Hae Won Lee MD¹⁾, Sun Hoo Park MD, PhD²⁾, Seung Sook Lee MD, PhD²⁾,
Jong Ho Park MD, PhD¹⁾

¹⁾Department of Thoracic Surgery and ²⁾Department of Pathology,
Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

Background and objectives ; Esophageal cancer is one of the most malignant tumors and has a poor prognosis. Many clinical studies have been tried for improving prognosis of esophageal cancer. Some clinical studies used molecular markers as the predictor of prognosis & the indicator for the choice of multimodality treatments. We investigated the relationship between some molecular markers, including p53 mutation, expression of bcl2, Ki67 index, expression of E-Cadherin and the prognosis of esophageal cancer. **Materials and Method;** The materials used in this study were the tumor specimens from 72 esophageal cancer patients who underwent esophagectomy from 1987 to 2002 in our institute. The mutation of p53, expression of bcl2, Ki67 index, and expression of E-cadherin were examined by using the tissue array and immunohistochemical staining method. The patients were subgrouped into higher Ki67 index group if the index was higher than 30. The patients were also subgrouped into grade 1(>90%), grade 2(50~90%), grade 3 (10~50%), and grade 4(<10%) according to the rate of E-Cadherin expression. We studied the relationship between the rates of immunohistochemical staining and the survival rate. **Results;** Seventy two tumor specimens from 72 patients were studied. (mean age ; 59.6 years, male : female = 69 : 3) The histologic type of the specimens was all squamous cell carcinoma. The patient's number of stage IIA, IIB, and IV was 30, 37, and 7 respectively. Thirty patients were alive and overall 5 year-survival rate was 28%. The mutation of p53 was shown in 54.2% of the patients. Five year survival rates of negative and positive groups were 29% and 28% respectively.(p=0.4) Expression of bcl2 gene was found in 13.9% of the specimens. Five year survival rates of negative and positive groups were 30% and 21%.(p=0.3) Higher Ki67 index was correlated to poorer differentiation.(p=0.05) Five year survival rates of higher and lower groups of Ki67 index were 47% and 30%.(p=0.15) Higher expression rate of E-Cadherin showed better differentiation.(p=0.04)

교신저자 : 박종호, 139-706, 서울 노원구 공릉2동 215-4

원자력의학원 흉부외과

전화 : 02-970-1240 FAX : 02-972-3093

E-mail : jhpark@kocch.re.kr

However we couldn't find any survival differences between these 4 groups.(p=0.23) **Conclusion;** We could not find any molecular markers meaningful in the prognosis of esophageal cancer patients. We just found the tumor markers correlated to the differentiation of esophageal cancer. However, we knew that we need further study with some more samples to stratify other important prognostic factors of esophageal cancer.

Key word - Esophageal Cancer, p53, bcl2, Ki67, E-Cadherin

I. 서 론

식도암은 아직까지도 예후가 극히 나쁜 질환 중 하나이다. 다양한 치료방법들이 시도되고 있으나 그 치료 효과에는 한계가 있는 실정이다. 치료방법 선정을 위하여 여러 가지 예후예측인자들이 활용되고 있으며, 아울러 분자유전학적인 표지자들을 이용하는 것도 고려되고 있는 실정이다. 암의 연구에서 분자유전학적인 연구 기법이 보편화되었지만 임상적으로 어떠한 활용이 가능한지는 아직도 미지수이며 활용방법에 대한 논의도 진행 중이다. 이에 유전자 변이나 세포분열에 관여하는 분자유전학적인 지표들과 같이 비교적 쉽고 저렴한 방법인 면역조직화학염색법을 이용하여 식도암의 임상적인 변수들과의 관계를 분석하려는 시도를 하게 되었다. 본 연구에서는 중앙표식자들 중 p53, bcl2, Ki67, E-cadherin 등을 이용하였으며, 식도암 환자에서 제거한 조직의 악성도 및 예후 등과 어떠한 관련성이 있는지를 알아보았다. 한편 식도암 환자에 대한 예후 분석에 이용될 가능성에 대해서도 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1987년부터 2002년까지 외과적으로 완전절제를 받은 식도암 환자 중 식도근육까지만 침범한(T2) 환자들을 대상으로 하였다. 이 실험에는 72명의 환자가 포함되었다. Tissue array방법으로 슬라이드를 만든 뒤에 조직절편의 paraffin을 제거하고 p53 변이, bcl2의 발현, Ki67 인덱스, E-cadherin 발현 등에 대한 면역조직화학 염색법을 시행하였다(Table. 1). 그리고 이 결과와 임상적인 변수들과의 상관관계를 분석하였다.

조직표본에서는 암종의 침범 깊이와 침윤 양상을

비교하였는데, 암종의 침범 깊이는 식도의 내근을 침범한 것과 외근을 침범한 것으로 구분하였고, 침윤 양상은 돌기형, 침윤형, 궤양성 침윤형 등으로 구별하였다.

면역조직화학염색 및 판독방법; 슬라이드 준비는 paraffin block으로 보관된 식도암 조직을 이용하여 P53, bcl2, Ki67, E-cadherin 등의 중앙관련 유전자, 분자유전학적지표 등에 대한 검사를 실시하였다. 식도암 조직절편은 다시 작은 원통형 절편으로 자른 뒤에 1개의 슬라이드에 24개의 절편을 올려놓아 염색에 사용되는 시약의 비용을 절감하였을 뿐만 아니라 염색방법의 편차에 따른 결과의 편차를 최소화하도록 노력하였다.

Paraffin block을 5 μ m의 두께로 section하여 xylene으로 paraffin을 제거한 후 alcohol을 점차로 농도를 낮추면서 열을 가하여 rehydration 시켰다. 다음 단일항체를 이용하여 알고자 하는 분자유전학적 표지자들을 반응시키고(Table. 1) 다시 rabbit anti-mouse 또는 mouse anti-rabbit IgG-biotinylated(10% rabbit 혈장으로 희석한 것) antibody와 미리 incubation된 avidin-biotin 복합체를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다.

환자의 성별, 나이, 병기, 생존기간, 암종의 침범 깊이, 조직 표본의 침윤 양상 등에 따른 차이를

Table 1. Monoclonal antibodies used in this study

Molecular markers	Antibodies
p53 mutation	mouse monoclonal anti-human p53 (DAKO)
bcl2 expression	mouse monoclonal anti-human Bcl2 (DAKO)
Ki67 index	Rabbit anti-human Ki67 (Novocastra)
E-Cadherin	mouse monoclonal anti-human E-Cadherin, clone NCH-38 (DAKO)

chi-square test로 비교하였으며 생존 분석은 Kaplan-Meier 법으로 하였고, 생존률 비교는 log-rank method를 이용하였다.

III. 결 과

대상 환자들의 평균나이는 59.6세(43-76)이었으며 남녀비는 69:3 이었다. 수술은 모든 환자에 대해서 식도절제후 위-식도 문합술을 시행하였으며 최소한 종격동림파절이상의 범위에 대하여 청소술을 시행하였다. 물론 완전절제가 가능하였던 환자들만을 대상

으로 하였다. 세포의 종류는 모두 편평상피세포암이었으며 수술 후 병기는 IIA, IIB, IV가 각각 30, 37, 그리고 7명이었다.

bcl2 발현여부는 임파구의 염색보다 더 진하게 염색되는 부분을 양성으로 판독하였다(Fig. 1). p53 변이는 변이된 p53 단백질이 염색된 정도로 판정하였는데, 약한 양성 이상이면 양성으로 판정하였다.(Fig. 2, 3) Ki67 인덱스는 염색되는 세포의 비율로 평가하였으며 인덱스가 30 이상인 경우와 30 이하인 경우로 나누어 비교하였다.(Fig. 4, 5) E-cadherin 은 세포질내에 E-cadherin 양성으로 염색되는 비율로 판정



Fig 1. bcl2 immunohistochemical staining (+) – normal lymphocyte staining is negative control

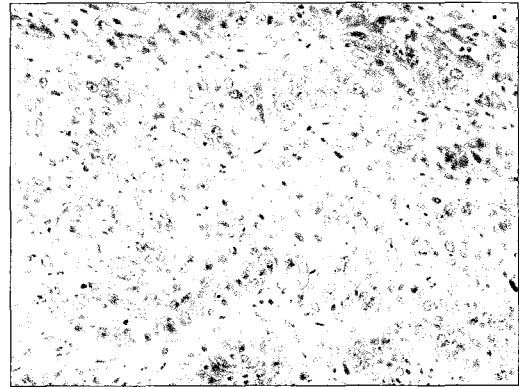


Fig 3. Negative p53 mutation
Negative results of immunohistochemical staining of p53 protein. Mutant protein was not found.

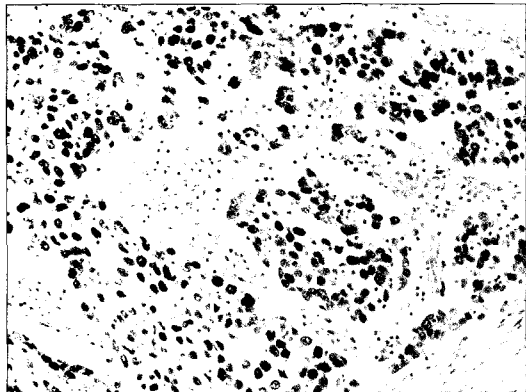


Fig 2. Positive p53 mutation
Immunohistochemical staining of p53 protein, p53 mutation makes mutant p53 protein and this mutant protein was stained reddish brown in the process of immunohistochemical staining.

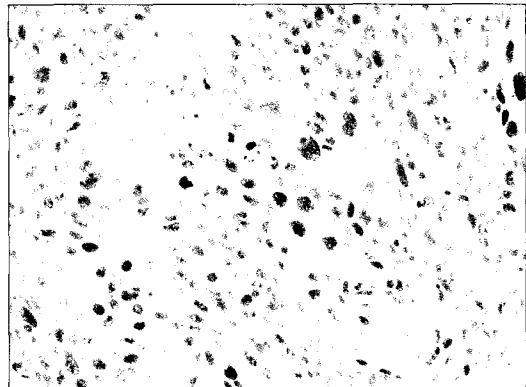


Fig 4. High Ki67 Index
Ki67 index higher than 30. Ki67 nuclear antigen was stained reddish brown.

하였다. 90% 이상인 경우 grade 1으로 하였고(Fig. 6), 50% 이상 90% 미만인 경우가 grade 2, 10% 이상 50% 미만인 경우가 grade 3(Fig. 7), 그리고

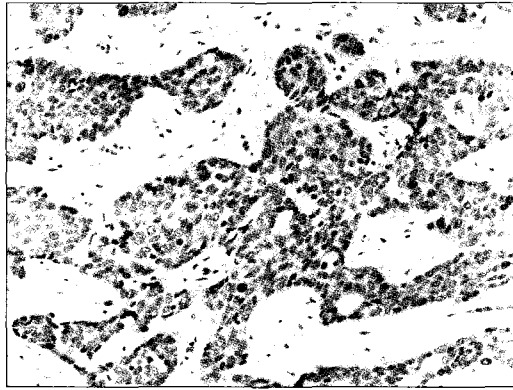


Fig 5. Low Ki67 Index
Ki67 index lower than 30, Ki67 nuclear antigen was stained reddish brown and found in a few cells.

10% 미만을 grade 4로 하였다.

추적 관찰기간중 사망한 환자는 42명이었고 5년 생존률은 31%이었다.(Fig. 8) 각각 병기별로 5년 생존

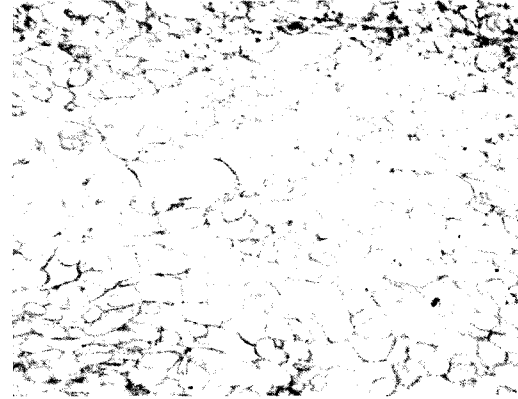


Fig 6. E-Cadherin highly positive
E-Cadherin positive cytoplasm was stained $\geq 90\%$

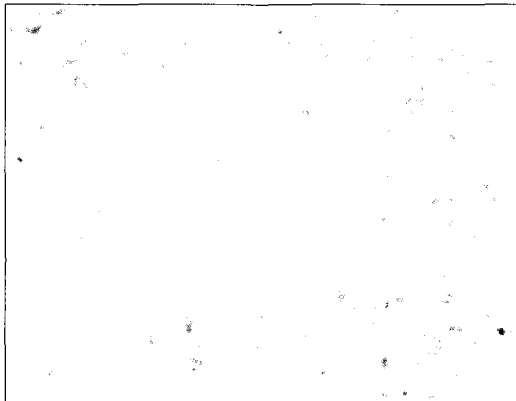


Fig 7. E-Cadherin grade 3
Positive cytoplasm was stained $\geq 10\%$ & $< 50\%$

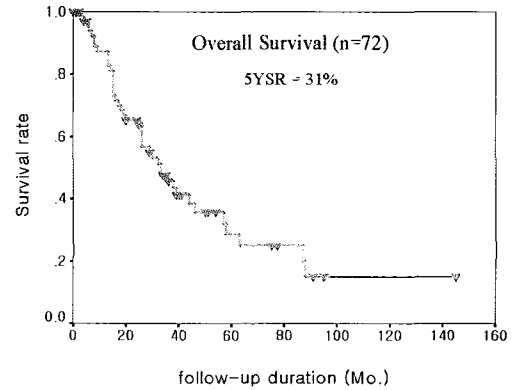


Fig 8. Overall survival

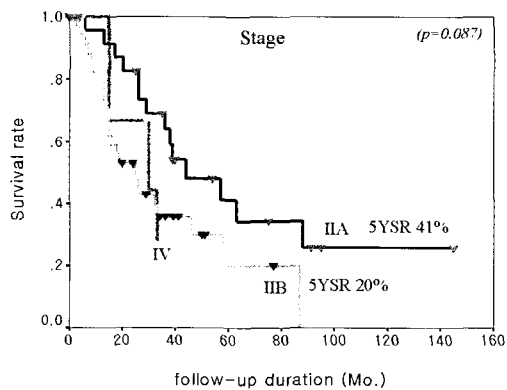


Fig 9. Survival of each stage

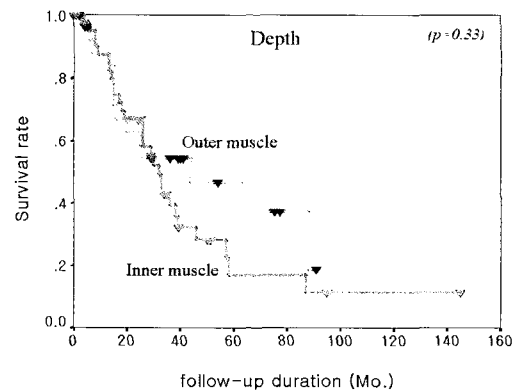


Fig 10. Survival of each invasion depth

율을 보면 IIA기가 41%, IIB기가 20%로 유의한 차이를 보여줬다.($p=0.01$) 그러나 IV기의 경우 5년 생존자가 없고 3년 생존만 20%이나 숫자가 7명으로 적어서 IIB기와는 생존률의 차이가 통계적으로 유의하지 않았다.(Fig. 9)

p53 변이율은 54.2% 이었다. 변이율에 따른 5년 생존률은 음성이 29%, 양성인 28%로 두 군간에 차이가 없었다.($p=0.4$, Fig. 12)

bcl2의 발현율은 13.9% 이었다. 역시 변이율에 따

른 5년 생존률은 음성과 양성인 30%, 21%로 차이가 없었다.($p=0.3$, Fig. 11)

Ki67 인덱스는 수치가 높을수록 조직의 분화도가 낮은 것으로 나타났다.($p=0.05$, Table 2) 그러나 5년 생존률은 30 이하인 경우가 25%, 30 이상인 경우가 47%로, 병기별 계층화를 한 결과 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.($p=0.15$)

E-cadherin의 발현은 지수가 높을수록 조직의 분화도가 좋았으며 ($p=0.042$, Table 3) 발현율은 90%

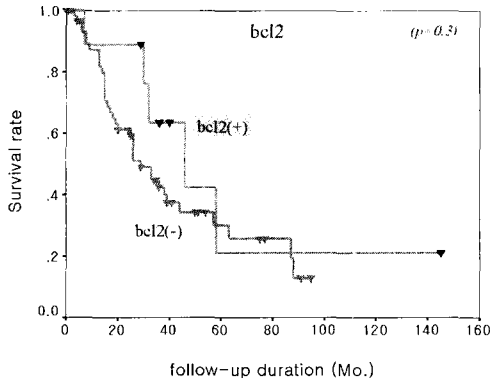


Fig 11. bcl2 expression and survival

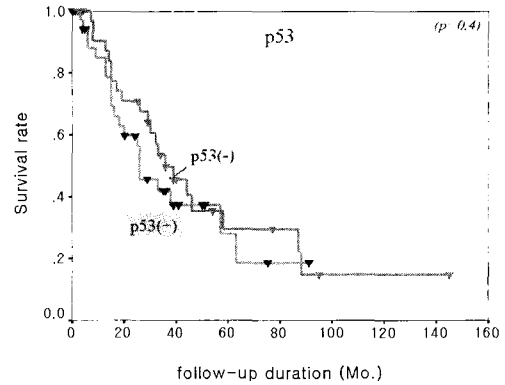


Fig 12. p53 mutation and survival

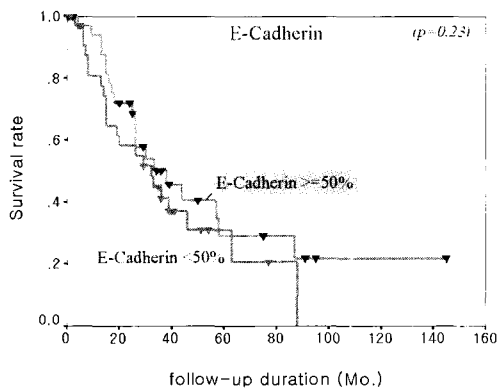


Fig 13. E-Cadherin expression and survival

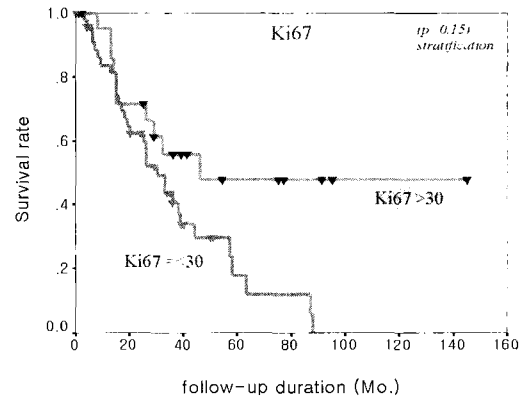


Fig 14. Ki67 Index and survival

Table 2. Relationship of Ki67 index & differentiation

	1+	2+	3+	4+
WD*	4	9		
MD †	5	2	8	1
PD ‡		7	8	3
total	9	18	16	4

$p=0.05$

*WD; well differentiated, †MD; moderately differentiated, ‡PD; poorly differentiated

Table 3. Relationship of E-cadherin & differentiation

	Grade 1	Grade 2,3	Grade 4
WD*	8	7	3
MD †	4	23	9
PD ‡	2	11	5
total	14	41	17

$p=0.04$

*WD; well differentiated, †MD; moderately differentiated, ‡PD; poorly differentiated

이상이 14명, 50-90%가 41명, 50%이하가 17명으로 확인되었고, 각 그룹간의 생존률에는 차이가 없었다.(p=0.23)

IV. 고 찰

이번 연구에서는 p53의 변이, Ki67 인덱스, bcl2의 발현, E-cadherin 발현 등의 요소들이 식도 상피암의 예후에 어떤 영향을 미치는지를 알아보았다. p53의 변이는 세포주기의 G1 주기에 영향을 미쳐서, DNA가 손상받은 세포들의 증식이 억제되지 않고, DNA 수리가 일어나지 않으므로 세포들의 변이가 계속 증폭되는 효과를 만들 수가 있다. bcl2 유전자의 발현은 세포의 사멸을 방해하는 현상을 일으키기 때문에 악성세포의 발생을 일으키는 중요한 요소이다. Ki67 index는 세포의 증식 상태를 반영하여 지수가 높을수록 세포의 증식이 활발하다는 것을 의미한다. 이러한 요소들은 세포의 증식 속도에 직접적으로 영향을 미칠 수 있기 때문에 예후에도 영향을 미칠 수 있을 것이라고 예측할 수 있다. 또 E-cadherin의 경우 세포질 내에서 많이 존재할수록 암세포의 전이가 어려워지리라 예상되어 예후와 연관성이 있을 것으로 추정할 수 있다.

임상적으로 예후에 미치는 요소들을 미리 알 수 있다는 것은 매우 중요하다. 그것은 치료방법의 선택에 있어서 좀 더 세분화된 방법을 정할 수 있고 불필요한 치료를 피할 수 있기 때문이다. 내시경 등을 통한 암의 조기 진단에서 예후가 매우 나쁜 경우에 해당되는 전암병변이 발견된 경우에 예방적 차원에서 조기치료를 하는 것이 설득력을 갖게 할 수도 있다. 또한 평균적인 경우보다 암의 발현과 나쁜 예후의 가능성이 높은 경우 보다 짧은 주기의 내시경검사를 하는 것이 도움이 될 수도 있겠다.

과거의 연구들을 고찰해 보면 p53의 변이와 식도암의 예후와의 관계에 대하여는 많은 연구가 되어왔다. p53의 변이와 식도암의 예후, 치료방법선택 등과 관련이 있는 것으로 보고된 경우도 있으나¹⁾ 아직까지는 관계가 명확히 확정되지 않았다.²⁾

이번 연구에서는 각각의 분자유전학적 지표가 예후에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. p53 변이에 의한 단백질을 염색하는 것과 PCR을 이용한 특정방법이 차이가 있는 것으로 보아 면역조직화학염색법은

PCR법보다 예후인자로서 가치가 떨어질 가능성이 있어서⁶⁾ 예후를 예측하는 인자로서의 가치가 떨어지는 문제도 있을 수 있다고 생각된다.

또한 이번 연구는 이미 암이 발현된 환자에 대한 분석이므로 암의 발병인자로서 중요한 p53의 역할이 이미 중요하지 않다는 면을 생각해 볼 수도 있다.

bcl2의 발현은 암세포의 사멸을 억제하므로, 식도암의 예후와 관련이 있을 개연성이 있다는 보고가 있다.¹⁴⁾ 아직 예후와 관련성이 입증되지 않는다고 이번 연구에서도 입증되지 않았지만 모든 종류의 암의 예후와 관련성이 있을 가능성이 있다고 추정된다.

Ki67은 세포증식을 반영하는 지표로서 사용되어 왔는데 식도의 선암종의 발생과 관련성이 있는 것으로 보고되어 왔다.³⁾¹³⁾ Ki67이 식도암의 예후에 영향을 미친다는 결론은 아직 명확치 않지만, Ki67 index가 높은 경우 수술전 항암치료에 더 높은 반응을 보인다는 보고도 있으며⁴⁾ 암의 초기 진행정도에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.⁵⁾

그러나 이번 연구에서는 몇 가지 문제점을 지적할 수 있다. 표본수가 적어서 식도암의 치료방법에 따른 차이를 세밀하게 구분하여 비교할 수 없었다. 만약 좀 더 많은 표본을 이용할 수 있다면 기준에 알려진 중요한 예후인자들인 병기, 수술자의 수술기법에 따른 차이, 수술후의 치료 및 관리방법에 따른 차이를 통계학적으로 보정하는 방법을 사용하여 비교하는 것도 고려될 수 있었을 것이다. 방사선 치료와 항암치료는 식도의 편평상피암 환자의 생존기간에 대하여 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않았으나 표본 수가 적어서 이러한 치료가 통계적인 오류를 초래하였을 가능성도 완전히 배제하기 어려웠다. 또한 수술방법에 따른 합병증의 발생여부 등이 예후에 미치는 영향도 보정할 수 없었다.

식도암 환자의 생존기간에 영향을 미치는 요인은 매우 다양하므로 조직에 대한 분자유전학적인 검사만으로 생존기간에 대한 예측을 하는 것은 어렵다고 할 수 있다. 이러한 다양성 때문에 이번 연구의 결과가 기대했던 관련성을 명확히 보여주지 못했다고 생각된다. 하지만 위험요소들을 더 다양하게 분석하는 것이 가능해짐으로써, 상대적으로 더 정확한 예후에 대한 예측이 가능해 진다면 위험군에 해당되는 환자들에 대한 보다 적극적인 치료가 정당성을 얻을 수 있을

것이다. 또한 치료 전에 조직검사를 하면서 이러한 방법을 사용한다면 치료방침을 결정하는데 있어서 도움을 줄 수도 있을 것이다. 그리고 다양하고 세밀한 분자유전학적인 분석을 시도한다면 보다 정밀한 결과들이 나오리라 기대할 수 있다. 다만 실제 임상적인 적용면에 있어서는 비용과 시간을 고려하지 않으면 안 되는 문제들이 있다. 이번 실험에서 예후인자에 대한 발견은 어려웠으나 비교적 비용이 저렴하고 적용이 용이한 종양 표지자들의 임상적 이용 가능성이 충분히 있다고 생각할 수 있었다. 향후 연구에서는 보다 많은 표본수와 종양 표지자들을 추적하여 임상적 이용 가능성이 있는 요소들을 찾아내는 것이 필요하리라 생각된다.

IV. 결 론

식도암의 편평상피암 조직에 대한 종양 표지자들을 이용하여 예후 및 기타 임상적인 연관관계를 분석하였다. 식도암의 편평상피암에 대한 예후인자로서의 종양 표지자를 찾아내지는 못하였다. 그러나 예후가 불량한 암종에 대해서 예후인자를 찾아내고 치료방침을 결정하는 방법으로서, 간단하고 비용이 저렴한 분자유전학적 종양 표지자들이 임상적으로도 이용될 가능성은 있다고 생각되었다.

References

1. Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *American Journal of Surgery*. 177(6):497-502, June 1999.
2. Nasierowska-Guttmejer A, Szawowski A, Jastrzbska M, Jeziorski K, Radziszewski J. p53 Protein accumulation as a prognostic marker of preoperative radiotherapy and/or chemotherapy in advanced squamous cell esophageal carcinoma—preliminary report. *Dis Esophagus* 1999 12:2 128-31
3. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, Allegra CJ, Johnston PG. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995 Jan 15 75:2 423-9
4. Kitamura K, Saeki H, Kawaguchi H, Araki K, Ohno S, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K. Immunohistochemical status of the p53 protein and Ki-67 antigen using biopsied specimens can predict a sensitivity to neoadjuvant therapy in patients with esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000 Mar-Apr 47:32 419-23
5. Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Proliferative activity and p53 protein accumulation correlate with early invasive trend, and apoptosis correlates with differentiation grade in esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1997 Feb 430:2 107-15
6. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, Buffa R, Ferrero S, Piazza M, Blandamura S, Segalin A, Bonavina L, Peracchia A. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. *Cancer* 1997 Feb 1 79:3 425-32
7. Monges GM, Seitz JF, Giovannini MF, Gouvernet JM, Torrente MA, Hassoun JA. Prognostic value of p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Detect Prev* 1996 20:1 63-7
8. Uchino S, Saito T, Inomata M, Osawa N, Chikuba K, Etoh K, Kobayashi M. Prognostic significance of the p53 mutation in esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1996

Oct 26:5 287-92

9. Kohmura T, Hasegawa Y, Ogawa T, Matsuura H, Takahashi M, Yanagita N, Nakashima T. CyclinD1 and p53 over-expression predicts multiple primary malignant neoplasms of the hypopharynx and esophagus. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1999 Dec 125:12 1351-4
10. Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27(Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. Oncology 1999 Nov 57:4 311-7
11. Wu, et al. Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. Anticancer Res 2000 May-Jun;20(3A):1385-90
12. Research Committee on Malignancy of Esophageal Cancer, Japanese Society for Esophageal Diseases. Prognostic significance of CyclinD1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. J Am Coll Surg 2001 Jun; 192(6):708-18
13. Polkowski, et al. The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. Surg Oncol 1995 Jun;4(3):163-71
14. Shimada, et al. Prognostic factors of esophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. Br J Cancer 1999 Jun;80(8):1281-8