

## 식도암 조직에서 p53 및 nm23 유전자 발현의 임상적 의의

박 건\* · 이종호\* · 사영조\* · 진 웅\* · 권종범\* · 박재길\* · 이선희\* · 곽문섭\*

### Clinical Significance of p53 Gene and nm23 Gene Expression in Esophageal Cancer

Kuhn Park, M.D.\*, Jong Ho Lee, M.D.\*, Young Jo Sa, M.D.\*, Ung Jin, M.D.\*  
Jong Bum Kwon, M.D.\*, Jae Gil Park, M.D.\*, Sun He Lee, M.D.\*, Moon Sub Kwak, M.D.\*

**Background:** Although significant progress has been made in the surgical treatment of esophageal carcinoma as well as in the detection of early stage esophageal carcinoma by diagnostic techniques, the prognosis of the esophageal carcinoma patients remain poor. The p53 gene product is known to regulate cell growth and proliferation. And the nm23 gene was identified originally as an anti-metastatic influence whose expression was correlated inversely with tumor metastatic potential in murine melanoma cell lines. This experiment was intended to know the relationship among the p53 and nm23 gene expression versus clinicopathologic characteristics of the esophageal cancer. **Material and Method:** Total 40 cases were collected from patients who had undergone esophagectomy at St. Mary's Hospital, Catholic university of Korea. Immunohistochemical stain for p53 mutant-type protein and nm23 protein was graded as <10% positive tumor cells: negative; 10~30% positive tumor cells: +; 30~50% positive tumor cells: ++, and >50% positive tumor cells: +++. The tumor invasion was grades as none: -; mild: +; moderate: ++; severe: +++. **Result:** Overexpression of p53 protein and nm23 was not associated with the survival and clinicopathologic characteristics of the esophageal cancer. Moreover, the combination analysis of p53 and nm23 revealed that there was no relationship between the gene expression and the clinicopathologic characteristics of the esophageal cancer.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:261-266)

**Key words:** 1. Esophageal neoplasms  
2. Oncogene proteins  
3. Genes, p53  
4. Gene expression

### 서 론

1980년대에 들어 암 유전자 및 암 억제유전자가 발견되고 암 유전자의 연구가 급속히 진전됨에 따라, 암은 유전자의 변화에 의해 야기되는 유전자의 질환임이 밝혀져 왔다. 또한 최근에는 암의 특성 중의 하나인 암세포의 전이, 침윤에도 직접적인 영향을 주는 전이 관련 유전자들이 보

고되어 흥미를 끌고 있다.

식도암은 해부학적으로 경부로부터 흉부를 거쳐 복부에까지 위치하며, 기도 및 심혈관계에 밀접되어 있고 또 상하좌우로 관류되는 풍부한 림프관이 있어, 암 발생의 초기부터 쉽게 암세포의 침윤과 전이가 일어나 타 소화기계 암에 비해 불량한 치료성적을 나타내고 있다.

p53 유전자는 여러 장기에서 암 발생 및 임상적 상관관

\*가톨릭대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Catholic University Medical College

논문접수일 : 2003년 9월 2일, 심사통과일 : 2003년 12월 1일

책임저자 : 이종호 (301-723) 대전광역시 중구 대흥동 520-2번지, 가톨릭대학교 의과대학 대전성모병원 흉부외과

(Tel) 042-220-9570, (Fax) 042-252-6807, E-mail: phenix@catholic.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

계에 대해 많이 밝혀져 왔으며, 식도암에서의 관계도 현재 광범위하게 연구 중으로 식도암의 발생과 예후에 영향을 미칠 것으로 생각되는 유전자이며, nm23 유전자는 설치류의 흑색종[1] 및 사람의 유방암[2]에서 전이 억제효과가 있다고 보고되고 있는 유전자로 식도암에서의 역할이 연구 중이다.

본 실험은 이 두 가지 유전자의 발현이 식도암 조직에서 임상적 의의가 있는지 여부를 알기 위해 수술을 시행한 40명의 식도암 환자의 조직에서 면역화학적 염색을 시행하여, 유전자 발현과 생존율 및 임상병리학적 특성과의 관계를 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상

식도암 조직은 1993년 1월부터 1995년 12월까지 가톨릭대학교 의과대학 부속 성모병원에서 수술한 환자 40명을 대상으로 하였다. 포르말린으로 고정된 파라핀 조직 블록은 임상병리과에 보관되어 있는 것을 다시 사용하였으며, UICC TNM(p) 분류에 따라 병기를 기록하였다. 환자와 중앙 특징 및 시행한 치료 등을 Table 1에 정리하였다. 추적 관찰 도중 사망한 환자는 25명이며, 그중 2명은 병원사하였고, 1명은 추적관찰이 불가능하였다. 평균 추적 관찰 기간은 20개월이었다(범위: 1~66개월).

### 2) 방법

(1) **면역조직화학적 분석:** 면역조직화학적 염색을 위해 파라핀 블록 된 식도암 조직을 5 $\mu$ m 두께의 조직절편으로 만들어 유리슬라이드에 부착한 후, 크실렌과 알코올에 처리하여 파라핀을 제거하였다. 내인성 과산화효소의 작용을 막기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고, Tri-buffered saline (TBS, 0.05 M Tri-HCl in isotonic solution, pH 7.6)에 1 : 10으로 희석된 정상 토끼 혈청과 정상 돼지 혈청으로 상온에서 20분 정도 전 처리하여 단클론 항체와 다클론 항체에 대한 비특이 단백결합소를 포화시켰다.

p53의 변종형 단백질을 면역화학적으로 염색을 위해 단클론 마우스 항사람 항체(1 : 50, DO-7, DAKO, Glostrup, Denmark)를 사용하였고, nm23 단백질을 염색하기 위해 다클론 토끼 항체(anti-nm23/nucleoside diphosphate kinase A, 1 : 50, Boeringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 2시간 동안 반응시켰다.

Avidin-biotin-peroxidase complex 기법을 이용하여 단백

**Table 1.** Esophageal carcinoma: patients and tumor characteristics

Characteristics	No. of patients	Percentage
Total patients	40	100
Age (years)	Range 56~75	
Sex		
Male	31	77.5
Female	9	22.5
Histologic type		
Squamous cell carcinoma	38	95
Adenocarcinoma	1	2.5
Carcinosarcoma	1	2.5
Tumor invasion		
Lymphatic	35	87.5
Vein	9	22.5
Perineural	16	40
Immunohistochemical status		
p53 (n=40)		
Negative	20	50
Positive	20	50
nm23(n=40)		
Negative	8	20
Positive	32	80
Stage		
I	3	7.5
II	13	32.5
III	24	60
Treatment offered		
Surgery and preoperative therapy	8	20
Chemotherapy	3	7.5
Radiation therapy	2	5
Chemo-and radiation therapy	3	7.5
Surgery only	12	30
Surgery and postoperative therapy	20	50
Chemotherapy	10	25
Radiation therapy	7	17.5
Chemo-and radiation therapy	3	7.5

질을 국소화시켰다. 절편들을 TBS로 세척한 후 2차 항체 (supersensitive multilink biotinylated IgG, Biogenex, San Ramon, CA) 및 3차 항체(supersensitive peroxidase conjugated streptavidin, Biogenex)에 각 40분씩 상온에서 반응시켰다.

0.05 M Tri-HCl (pH 7.6) 용액에 chromogen인 3', 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) 과 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 반응시켜 발색하였고, 증류수로

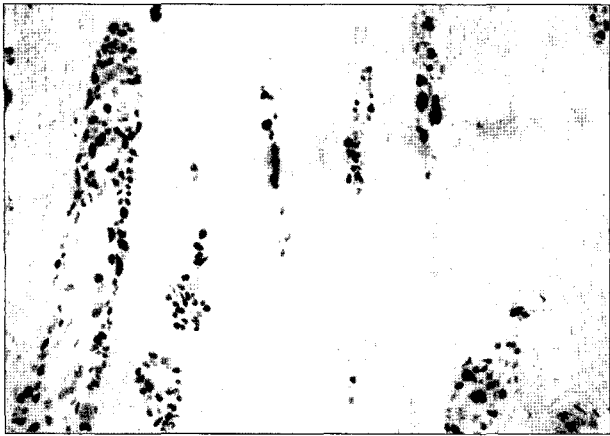


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 mutant-type protein in esophageal squamous cell carcinoma. P53 mutant-type protein was detected in the nucleus of cancer cells ( $\times 100$ ).



Fig. 2. Immunohistochemical staining for nm23 protein in esophageal squamous cell carcinoma. Nm23 protein was detected in the cytoplasm of cancer cells ( $\times 100$ ).

Table 2. Combined analysis of p53 and nm23 protein expression

Variable	p53 - /nm23 +	p53 - /nm23 -	p53 + /nm23 +	p53 + /nm23 -	p-value
Differentiation (n=40)					0.990
Well	4	2	3		
Moderately	9	4	14	1	
Poorly	2	1	2		
pTNM stage (n=40)					
pT					0.435
pT1	2		3		
pT2	3	1	3		
pT3	8	3	9	2	
pT4	1	2	3		
pN					0.618
pN0	4	1	6	1	
pN1	10	5	12	1	
Tumor invasion					
Lymphatic (n=35)	12	6	15	2	0.855
Vein (n=9)	3	2	4		0.752
Perineura l(n=16)	5	3	8		0.608

세척한 후 Mayer's hematoxyline으로 대조 염색하여 glycerol gelatin으로 봉입한 후 광학 현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1, 2).

성적의 평가는 면역조직학적 염색에서, 염색이 되는 부위(nuclear: p53, cytoplasmic: nm23)를 평가하고, 염색된 세포의 비율을 수치화하였다. 양성으로 나타난 퍼센트를 결정하고, 대상을 4개의 군으로 분류하였다. <10% 양성 종

양세포: negative; 10~30% 양성 종양세포: +; 30~50% 양성 종양세포: ++; 그리고 >50% 양성 종양세포: ++++. 또한 종양의 침습 정도는 none: negative; mild: +; moderate: ++; severe: ++++로 분류하였다.

(2) 통계처리: 통계적 유의성은 통계프로그램(SPSS for windows® Ver. 8.0, SPSS, Chicago, Illinois)을 사용하였고, 각 변수들 사이의 생존율의 차이가 있는가를 알기 위해

Log-Rank test을 시행하였고, 이 중 유의한 변수만을 골라 Kaplan-Meier method을 시행하였고, 각 변수와 침습과의 상관관계는 Spearman's correlation 및 partial correlation coefficients를 사용하여 분석하였다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1) 유전자 발현과 생존율 및 임상양상과의 관계

p53 변종형 단백질은 20예(50%)에서 발현되었고, nm23 단백질은 32예(80%)에서 발현되었다. 그러나 이러한 유전자의 발현에 따른 생존율에는 유의한 차이가 없었다(p53;  $p=0.2844$ , nm23;  $p=0.1935$ ).

임상양상과의 관계에 있어서 p53 및 nm23 유전자의 발현은 성별, 나이, 병기, 종양의 분화도, 치료방법 따른 유의한 차이는 없었다. 또한 Table 2에서와 같이 p53과 nm23 유전자 발현을 조합한 비교 분석에서도 유의한 차이는 없었다.

### 2) 유전자 발현과 종양 침습과의 관계

p53의 발현은 림프선( $p=0.776$ ), 주위신경( $p=0.938$ ), 및 혈관 침습( $p=0.240$ )과는 무관하였고, nm23 발현도 림프선( $p=0.359$ ), 주위신경( $p=0.312$ ) 및 혈관 침습( $p=0.561$ )과는 상관관계가 없었다. 또한 Table 2에서와 같이 p53과 nm23 유전자 발현을 조합하여 분석하였으나 유의한 상관관계는 없었다.

## 고 찰

종양은 다단계 과정을 거쳐 발생하는 것으로 암이 발생하는 것은 정상적인 세포 분화와 성장을 조절하는 기능을 변화시키는 유전적인 변이의 축적 결과로써 발생한다 [3,4].

식도암은 전 세계적으로 상당히 흔한 악성종양으로, 매년 300,000명 정도 새로 발생하고[5], 식도암에 대한 조기 진단 및 수술적 치료 방법의 상당한 진전에도 불구하고 식도암 환자의 예후는 여전히 좋지 않다. 수술적 치료를 시행 받은 환자의 5년 생존율은 약 30%이며[6] 진단 당시 국소적인 질환이었다 하더라도, 종양 절제 후 처음 2년 이내에 절반 정도가 전이에 의한 재발로 사망한다[7].

p53 종양억제 유전자는 17번 염색체, 단완에 위치하며, p53 유전자 생산물은 세포의 성장과 증식을 조절하는 것

으로 알려져 있다. 야생형 p53 단백질은 G1 조절점에 작용하여 세포의 성장을 억제하고, p21<sup>WAF1</sup>을 통해 이루어진다[8]. 또한 야생형 p53 단백질은 G2 세포주기 조절점 조절과 세포의 자멸사 등과 같은 여러 가지 생리적인 기능을 하는 것으로 알려져 있다.

Wagata 등[9]은 p53 유전자 변이는 식도의 편평상피 세포암(ESCCs)의 약 47%에서 발견되고, 이러한 종양에서는 p53 단백질이 과발현된다고 보고하였다. p53 유전자의 변이는 p53 단백질의 안정화와 축적을 가져와 면역화학적 방법으로 검출할 수 있게 한다. 이러한 과발현은 다른 종양에서는 예후와 밀접한 연관성을 가지나, ESCCs에서는 예후와 관련이 없다는 결과가 보고되고 있다[10,11]. 본 실험에서 식도암 조직 20예(50%)에서 p53 면역반응이 발견되었으며, 초기단계의 식도암조직에서도 p53 단백질의 과발현이 관찰되고, 또한 TNM 병기 및 종양의 침습 및 림프절 전이와의 연관성이 없는 것으로 보아, p53 단백질의 발현은 식도암 환자의 예후와는 관련이 없는 것 같다. 그러나 p53 단백질의 발현은 식도암과 여러 면에서 밀접하게 연관되어 있어, 아마도 p53 단백질은 암의 진행이나 전이보다는 암 발생 기전과 관련이 있는 것 같다[12].

nm23 유전자는 설치류의 흑색종 세포 주에서 종양의 전이력(metastatic potential)과 상반되게 표현되는 항전이 인자로서 처음 기술[1]된 유전자로, 분자량이 17 kDa이며 152개의 아미노산으로 구성되어 있고, 사람에게서는 nm23-H1과 nm23-H2의 두 가지로 되어 있다. 이들의 아미노산 구조는 88%의 상동성을 갖고 있으며, 종양의 전이를 억제하는 효과가 있다고 보고되었으나[13-15], 다른 한편에서는 이와는 상반된 결과를 보고하여 [16,17] 논란의 여지가 많다.

식도암에서 nm23 유전자의 역할은 명확하게 밝혀지지 않았지만 Iizuka 등[18]은 전이된 림프절에서의 nm23-H1 단백질과 원 종양(primary tumor)에서의 단백질 수준이 거의 유사하고, 또한 nm23-H1 발현과 식도암의 전이력을 대표하는 림프절 전이와는 관련이 없다고 보고하였다. Szumilo 등[19]도 nm23의 발현과 전이력 사이에는 직접적인 연관이 없다고 보고하였다. 본 실험에서 nm23 단백질 발현은 림프절 전이 및 림프선 침습과는 유의한 상관관계가 없어, 이러한 결과로 보아 nm23 유전자는 항전이 인자라기보다는 식도암에서 다른 역할이 하는 것으로 보여진다.

Patel 등[20]은 ESCCs (T3-4N1M0)에서 nm23 단백질이 음성인 경우가 양성인 경우보다 전반적인 생존율이 유의하게 감소하였다고 보고하였으며, Iizuka 등[18]도 ESCCs

에서 nm23-H1의 발현 감소는 림프절 전이가 있는 경우 불량한 예후와 관련이 있으나 림프절 전이가 없는 경우에는 전반적인 생존율이 비슷하다고 보고하였다. 생존율에 이러한 차이가 나는 것은 nm23-H1이 항암제인 cisplatin에 대한 민감도와 관련되어 있다고 하였다[21,22]. Lizuka 등 [18]은 림프절 전이가 있는 환자의 93.3%에서 수술 후 cisplatin을 기본으로 한 화학요법을 시행하여 이 중 nm23-H1 발현이 되는 환자에서 전반적인 생존율이 좋았으나, 림프절 전이가 없는 경우 환자의 40%에서 수술 후 cisplatin을 기본으로 한 화학요법을 시행하였기 때문에 nm23-H1 발현과 예후 사이에는 연관성이 없었다고 하였으며, 그 기전으로 세포 내 nm23-H1의 발현감소는 미토콘드리아 DNA 손상을 억제하여 cisplatin에 의한 저항력을 증가시킨다고 설명하였다. 본 실험에서 nm23 유전자 발현과 생존율 사이에는 유의한 상관관계가 없었으며 이러한 결과의 일부는 대부분의 환자에서 림프절 전이가 있었으나 적은 수에서(수술 전 15%, 수술 후 32.5%) 화학요법을 시행한 것과 연관이 있다고 할 수 있다.

Sarbia 등[23]은 ESCCs에서 림프선 침습과 림프절 전이 사이에는 상관관계가 있고, 림프선 침습 및 혈관 침습은 원격 전이와 관련이 있어 림프선 침습 및 혈관 침습은 예후를 결정하는 중요인자라고 보고하였고 Tomita 등[24]은 ESCCs에서 nm23-H1 발현과 림프선 침습 사이에는 역 상관관계가 있으나, 림프절 전이와는 관련이 없어 nm23-H1 유전자 생산물은 림프선 침범 이후의 전이 과정에서 중요한 역할을 할 것이라고 하였다. 본 실험에서는 p53과 nm23 유전자 발현과 종양의 혈관 및 주위신경, 림프선 침습과의 상관 관계가 없었으며, 또한 유전자 조합 분석에서도 뚜렷한 상관관계를 찾을 수가 없었다.

## 참 고 문 헌

1. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J Natl Cancer Inst 1988;80:200-4.
2. Hirayama R, Sawai S, Takaki Y. Positive relationship between expression of anti-metastatic factor(nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. J Natl Cancer Inst 1991;83:1249-50.
3. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Ritchie AJ, Russell SEH. Base transitions at CpG dinucleotides in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. Cancer Res 1995;55:3406-11.
4. Kashiwazaki H, TonoKi H, Tada M, et al. High frequency of

- p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. Oncogene 1997;15:2667-74.
5. Hollstein M, Sudamsky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. Science 1991;253:49-53.
6. Isono K, Sato H, Nakayama K. Results of a nationwide study on the three-field lymph node dissection of esophageal cancer. Oncology 1991;48:411-20.
7. Roder JD, Busch R, Stein HJ, Fink U, Siewert JR. Ratio of invaded to removed lymph nodes as a predictor of survival in squamous cell carcinoma of the esophagus. Br J Surg 1994;81:410-3.
8. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth, and division. Cell 1997;88:323-31.
9. Wagata T, Shibagaki I, Imamura M. Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer Res 1993;53:846-50.
10. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabert HE. p53 protein expression, and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer 1994;74:2218-23.
11. Masahide I, Shinichi O, Yoshihito G, Shunichi T, Michio M, Nobuaki K. Combined analysis of p53 and retinoblastoma protein expressions in esophageal cancer. Ann Thorac Surg 2000;70:913-7.
12. Hiroyuki K, Minako Y, Tatsuya M, et al. Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. Cancer Lett 2001;167:65-72.
13. Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. Oncogene 1993;8:2325-33.
14. Iizuka N, Oka M, Noma T, Nakazawa A, Hirose K, Suzuki T. NM23-H1 and NM23-H2 messenger RNA abundance in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 1995;55:652-7.
15. Tokunaga Y, Urano T, Furukawa K, Kondo K, Kanematsu T, Shiku J. Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2 is concordant with the frequency of lymph node metastasis of human breast cancer. Int J Cancer 1993;55:66-71.
16. Lindma G. NM23-H1 immunohistochemistry is not useful as predictor of metastatic potential of colorectal cancer. Br J Cancer 1996;74:1413-8.
17. Shimada M, Taguchi K, Hasegawa H, et al. Nm23-H1 expression in intrahepatic or extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. Liver 1998;118:337-42.
18. Iizuka N, Tangoku A, Hayashi H, et al. The association between nm23-H1 expression and survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Lett 1999;138:

- 139-44.
19. Szumilo J, Skomra D, Chibowski D, Dabrowski A, Wallner G, Maciejewski R. *Immunoeexpression of nm23 in advanced esophageal squamous cell carcinoma*. Folia Histochemica Et Cytobiology 2002;40:377-80.
  20. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, et al. *Clinical significance of p53, nm23, and bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach*. J Surg Oncol 1997;65:111-6.
  21. Ferguson AW, Flatow U, MacDonald NJ, Larminat F, Bohr VA, Steeg PS. *Increased sensitivity to cisplatin by nm23-transfected tumor cell lines*. Cancer Res 1996;56: 2931-5.
  22. Freije JM, Lawrence JA, Hollingshead MG, et al. *Identification of compounds with preferential inhibitory activity against low-Nm23-expressing human breast carcinoma and melanoma cell lines*. Nature Med 1997;4:395-401.
  23. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabert HE. *Incidence and prognostic significance of vascular and neural invasion in squamous cell carcinomas of the esophagus*. Int J Cancer 1995;61:333-6.
  24. Tomita M, Ayabe T, Matsuzaki Y, et al. *Expression of nm23-H1 gene product in esophageal squamous cell carcinoma and its association with vessel invasion and survival*. BMC Cancer 2001;1:3.

=국문 초록=

배경: 식도암 환자에서 조기진단 및 수술적 치료 방법의 상당한 진전에도 불구하고 환자의 예후는 여전히 좋지 않다. p53 종양 억제유전자는 세포의 성장과 증식을 조절하는 것으로 알려져 있고 nm23 유전자는 설치류 흑색종에서 종양의 전이억제 효과가 있다고 알려져 있다. 이 실험은 p53과 nm23 유전자 발현과 식도암 환자의 임상병리학적 특징상의 관련성을 알아보려고 하였다. 대상 및 방법: 가톨릭대학교 의과대학 부속 성모병원에서 수술한 식도암 환자 40명의 조직을 대상으로 하였고, p53 변이형 단백질과 nm23 단백질을 면역화학적 염색을 시행하여 <10% 양성 종양세포 : negative ; 10~30% 양성 종양세포: +; 30~50% 양성 종양세포 : ++; >50% 양성 종양세포: +++의 4개의 군으로 분류하였고, 또한 종양의 침습 정도는 none, mild, moderate, severe로 분류하여 평가하였다. 결과: p53 변이형 단백질과 nm23 단백질의 과발현은 생존율 및 임상병리학적 특징과 연관성이 없었고, 또한 p53 및 nm23유전자 발현의 조합 분석에서도 유의한 상관관계를 발견하지 못하였다.

- 중심 단어 : 1. 식도암  
2. 종양원성 단백질  
3. 유전자, p53  
4. 유전자 발현