

p53 변이, Cyclin D1의 과발현, Ki67 지수, 세포분열지수가 식도의 편평상피암의 예후에 미치는 영향

이해원* · 조석기** · 성숙환** · 이현주*** · 김영태*** · 강문철*** · 김주현***

A Study of Influences of p53 Mutation, Cyclin D1 Over Expression, Ki67 Index, Mitotic Index on the Prognosis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Hae Won Lee, M.D.*, Suk Ki Cho, M.D.**, Sook Whan Sung, Ph.D.**, Hyun Joo Lee, M.D.***
Young Tae Kim, Ph.D.***, Moon Chul Kang, M.D.***, Joo Hyun Kim, Ph.D.***

Background: Cancer of the esophagus is one of the most malignant tumors with poor prognosis. The p53 gene alteration, over expression of Cyclin D1, and Ki67 index were thought to be the prognostic factors. However, their clinical significances in esophageal squamous cell carcinoma are controversial and p53 accumulation may not correlate with genetic mutation. The current study investigates their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Material and Method:** The Subjects studied were 124 esophageal squamous cell carcinoma patients who underwent esophagectomy. The mutation of p53, over expression of Cyclin D1, Ki67 labelling index, mitotic index were examined by using an immunohistochemical staining. We compared the results and investigated the correlation with the mutation of p53, overexpression of Cyclin D1, Ki67 labelling index, mitotic index and tumor size, and duration of survival. **Result:** There was no correlation between the results in immunohistochemical staining according to age, sex, tumor size, lymph node status, and clinical stage of the disease. Mutant p53 protein was found in 69 cases (55.6%). Median survival time was 21 months in cases with negative for mutant p53 protein and 22 months in positive cases. There was no significant difference in survival ($p=0.46$). Median survival time was 22 months in cases with negative for Cyclin D1 and 16 months in positive cases ($p=0.18$). Median and mean survival time was 22 months and 36 months when Ki67 labeling index was 40 or less (102 cases). Median and mean survival was 16 months and 23 months, when Ki67 labeling index was more than 40 (22 cases). There was significant difference in survival rate ($p=0.011$). **Conclusion:** Positivity of p53 and cyclin D1 was not useful in predicting the prognosis in our study. There was no significant correlation among mutant p53 protein accumulation, Cyclin D1 over expression, and Ki67 labeling index. However, in several studies, PCR single strand conformational polymorphism analysis of p53 showed a correlation to the prognosis. We thought that there was a significant discordance between p53 gene mutation and mutant p53 protein accumulation. When Ki67 labeling index was more than

*원자력병원 흉부외과

Department of Thoracic Surgery, Korean Cancer Center Hospital

**분당서울대병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Bundang Seoul National University Hospital

***서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine

† 본 논문은 서울대학교병원 일반 연구 지원에 의해 이루어졌음.

논문접수일 : 2005년 6월 20일, 심사통과일 : 2005년 10월 22일

책임저자 : 성숙환 (463-707) 경기도 성남시 분당구 구미동 분당서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 031-787-7132 (Fax) 031-787-4050, E-mail: swsung@snuh.org

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

40, prognosis was poorer. Ki67 seems to be a prognostic factor in our study. Therefore, we confirmed the possibility of using molecular markers as prognostic factors.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2005;38:835-843)

Key words: 1. Esophageal neoplasm
2. Neoplasm

서 론

암의 연구에서 분자학적인 연구 기법이 보편화되었지만 임상적으로 어떠한 활용이 가능한지는 아직은 미지수이며 활용하는 방법에 대한 논의도 진행 중이다. 이에 유전자 변이나 세포분열에 관여하는 분자학적인 지표들이 분자학의 발전으로 비교적 쉽고 저렴한 방법으로 검사할 수 있게 되었고, 이를 이용하여 암과 관련된 임상적인 변수들을 분석하려는 시도를 하게 되었다.

유전자변이와 식도암의 관련성은 아직 뚜렷하게 밝혀진 바가 없다. p53 유전자의 변이는 이미 국내외 많은 문헌에서 암세포가 정상세포보다 강한 발현을 보임이 보고되었지만 p53과 식도암의 병기 또는 세포의 악성도, 그리고 임파선 전이 여부 등과의 관련성에 대해서는 현재까지 잘 알려지지 않았다. 그러나, 일부 다른 악성종양의 예후와 연관성이 있는 것으로 보고된 논문들이 있으며, 세포주기의 변화에 따라 발현되는 분자학적 표지자들이 악성세포의 증식 시에 과도하게 발현되는 생물학적인 특성을 보임에 따라 이를 이용할 수 있을 것으로 추정되었다.

또한 이러한 연구를 통해 분자학적인 표지자들이 생물학적인 양상에 직접 영향을 미칠 수 있는지를 직접적으로 확인할 수 있으며, 치료방법의 선택과 효과판정에 있어서도 유용한 인자가 될 가능성도 확인할 수 있다고 생각하였다.

본 연구에서는 이러한 표지자들의 역할과 예후가 나쁜 식도암과의 연관성을 확인하기로 하였다. 또한 이러한 지표들의 검사는 비교적 용이하게 할 수 있고, 비용과 시간이 적게 소요되는 면역 조직화학 염색법으로 확인이 가능하므로 실제 임상에 쉽게 적용이 가능하다는 점도 고려하였다. 본 실험 전에 실행한 예비실험에서 p53, Ki67 지수, Cyclin D1 등이 악성도, 예후, 임파선 전이와 관련이 있을 수 있다는 것에 어느 정도 개연성이 있는 것으로 나타났

다. 그러므로 p53, Cyclin D1과 Ki67 지수 등 종양 표식자가 국내 식도암 환자에서 수술 후 절제된 조직의 병기, 악성도, 임파선 전이 여부 등과 어떠한 관련성이 있는가를 알아보고 이를 이용해 향후 국내 식도암 환자에 대한 조기 발견에 이용할 수 있는 지표를 삼고자 하였다. 그리고 이 연구는 분자학적 표지자들의 임상적용의 기초를 마련하고자 하는 목적으로 시행되었다.

대상 및 방법

1) 대상

1992년 3월 이후 식도암 수술을 받고, 조직절편을 구할 수 있었던 124명의 환자를 대상으로 하였다. 연구 목적상 전향적인 연구가 바람직하지만 적절한 표본 수가 부족하여 후향적인 방법으로 대상 환자군을 선정하였다. 전체 식도암 환자를 대상군으로 하려 하였으나 분실, 파손, 기타의 이유로 검사에 적절한 조직절편을 구할 수 없었던 증례들이 많아서 일부의 환자들만을 대상으로 하게 되었다. 그러나 비슷한 시기에 다른 센터에서 수술 받은 245명의 환자들과 나이, 성비, 사망률, 병기를 비교하였을 때 두 그룹간의 나이, 성별, 수술사망률, 술 후 병기 등의 유의한 차이는 없어서 임의로 선택한 표본군이 모집단과 통계적 차이는 없을 것으로 추정하였다.

124명의 환자 중에 수술로 인한 2명의 사망 예는 생존 비교 시 제외시켰다. 수술 술식은 111예가 Ivor Lewis 술식 이었으며, 위장을 사용할 수 없어 대장을 이용한 문합술은 5예, 기타의 술식은 8예였다.

수술 후 항암치료만 받은 환자는 4명, 방사선치료만 받은 환자는 22명이었으며 항암치료와 방사선치료를 병행한 환자는 5명이었다. 항암치료나 방사선치료의 여부는 생존기간에 유의한 영향을 미치지 않았다. 추적 기간 중 2명의 환자에서 각각 위암과 유방암이 병발하였다.

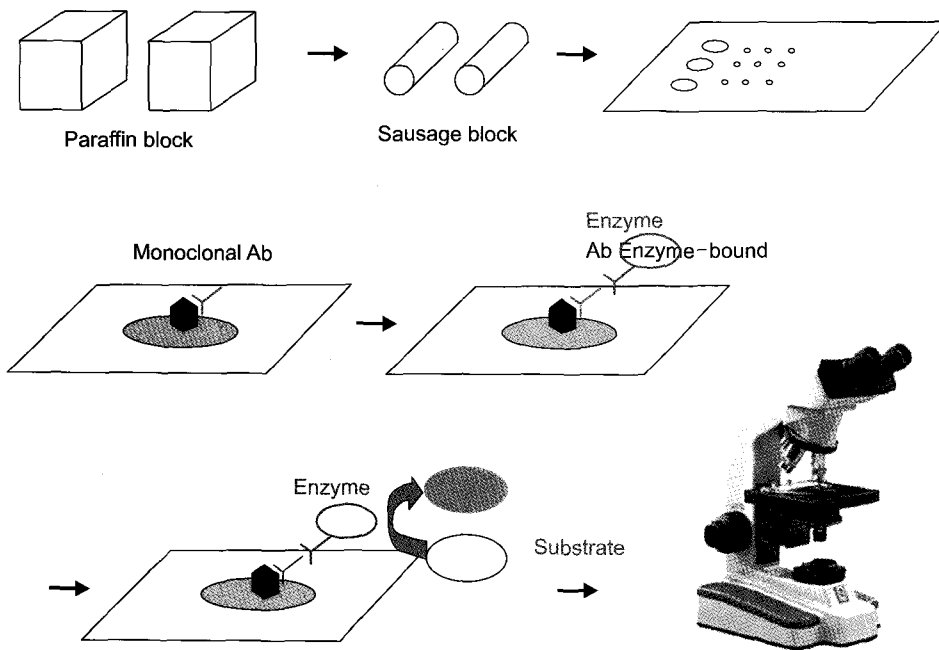


Fig. 1. Preparation of the test sample slides. Paraffin block of esophageal cancer specimen was cut in sausage-like block, and after paraffin was removed, 50 specimens were placed on one slide for immunohistochemical staining.

2) 방법

(1) 면역 조직화학 염색 및 판독

① 슬라이드 준비: 파라핀 절편으로 보관된 식도암조직을 이용하여 P53, Cyclin D1, Ki67 지수, 세포 분열 지수 등의 종양관련 유전자, 세포특성에 대한 검사를 실시하였다. 식도암 조직절편은 다시 작은 원통형 절편으로 자른 뒤에 1개의 슬라이드에 50개의 절편을 올려놓아 염색에 사용되는 시약의 비용을 절감하였을 뿐만 아니라 염색횟수를 줄임으로써 매번 염색정도에 따른 편차를 최소화하도록 하였다. 세포 분열 지수는 분자학적인 표지자는 아니지만 예후와의 관련성을 알기 위하여 본 연구에 포함시켰다(Fig. 1).

② p53의 면역 조직화학 염색: 파라핀 절편을 5 μ 의 두께로 자르고 xylene으로 파라핀을 제거 후 알코올로 농도를 점차 낮추면서 재수화를 시켰다. 다음 pH6.0, 10mM의 citrate buffer에서 95 $^{\circ}$ C로 14분간 microwave를 조사하였다. 물로 세척한 뒤 trisbuffered saline을 가하여 다시 세척하였다. 고유의 peroxidase의 작용을 억제하기 위해 상온에서 1% 과산화수소가 포함된 methanol에 15분간 담가두었다가 물로 세척한 뒤 PBS를 가하여 다시 세척하였다. 그 후 10% rabbit serum을 상온에서 10분간 가하였다. 그 다음 mouse monoclonal anti-p53 항체(NCL-p53-DO7, Novocastrol)를 1 : 100으로 희석하여 첨가한 뒤 습식 chamber에서

4 $^{\circ}$ C로 12시간 배양하였다. 이 슬라이드를 TBS로 3분간 3번 세척한 뒤 Rabbit anti-mouse IgG-biotinylated (10% rabbit 혈장으로 희석한 것)와 미리 배양된 avidin-biotin복합체를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 가하였다. TBS로 다시 세척한 뒤 DAB/H₂O₂ 용액에 상온에서 10분간 현상하였다. 이를 물로 세척하고 Mayer's haematoxylin으로 1분간 상온에서 대비염색하고 말려서 표본제작하였다. 음성대조군은 전 과정을 똑같이 시행하였지만 mouse antibody만 가하지 않은 것으로 하였다(Fig. 2)

③ Cyclin D1 염색: 4 μ 두께로 자른 절편을 xylene으로 파라핀을 제거하고 점차로 농도를 낮춘 ethanol로 재수화를 하였다. 압력용기로 가열하고 물로 세척한 뒤 TBS로 세척하였다. 고유의 peroxidase의 작용을 억제하기 위해 상온에서 3%과산화수소가 포함된 methanol에 10분간 담가두었다가 다시 물로 세척한 뒤 TBS로 세척하였다. 10% rabbit serum을 상온에서 10분간 가하였다. 그 다음 Cyclin D1/cyclinD1 항체(Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle upon Tyne, UK)를 1 : 100으로 희석하여 첨가한 뒤 37 $^{\circ}$ C로 30분간 incubation하였다. 이 슬라이드를 TBS로 3분간 3번 세척한 뒤 Rabbit anti-mouse IgG-biotinylated (10% rabbit 혈장으로 희석한 것, Dako, Glostrup, Denmark)와 미리 배양된 avidin-biotin복합체를 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 가하였다. TBS로 다시 세척한 뒤 DAB/H₂O₂ 용액에 상온에서 10분간 현상하였다. 이를 물로 세척하고 Mayer's haematoxylin으로 1분

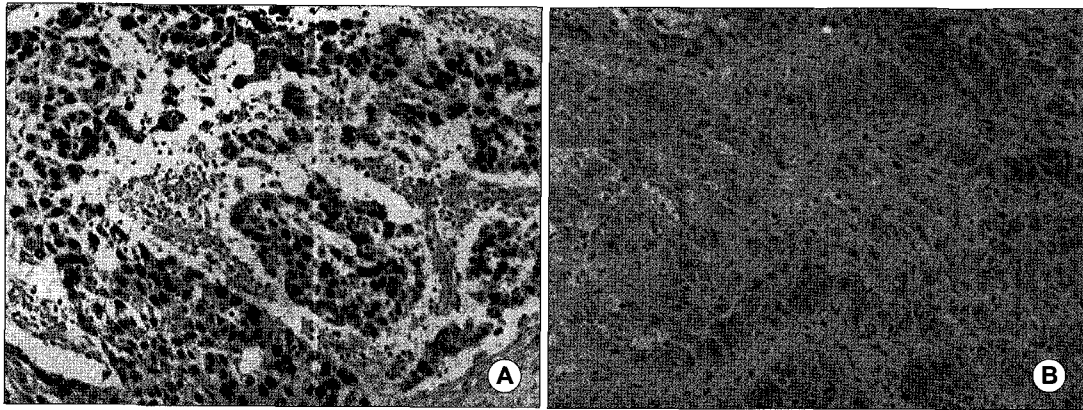


Fig. 2. Immunohistochemical staining of p53 protein. p53 mutant protein from the p53 mutant gene was stained reddish brown in the process of immunohistochemical staining at positive specimen (A) and no staining at negative specimen (B). ($\times 100$) (A) positive staining of p53 mutation, (B) negative staining of p53 mutation.

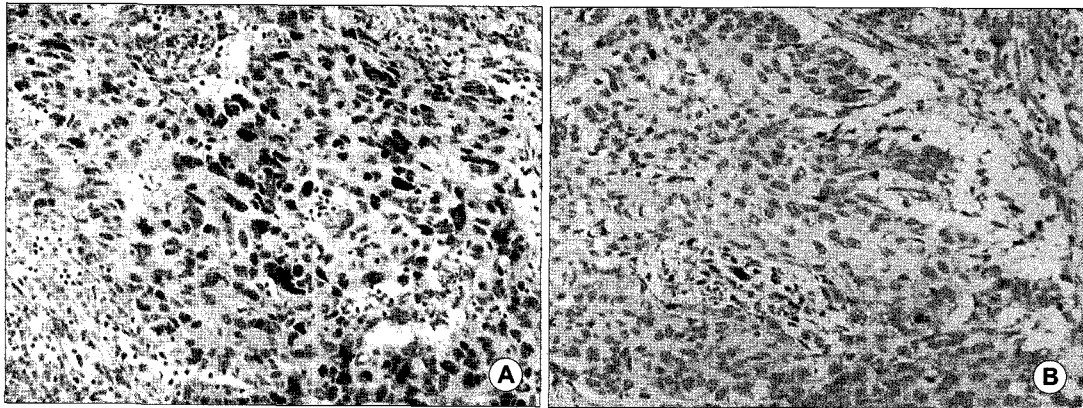


Fig. 3. Immunohistochemical staining of Cyclin D1 protein. Positive result (overexpression) (A) and negative result (B) ($\times 100$). (A) positive staining of Cyclin D1 protein, (B) negative staining of Cyclin D1 protein.

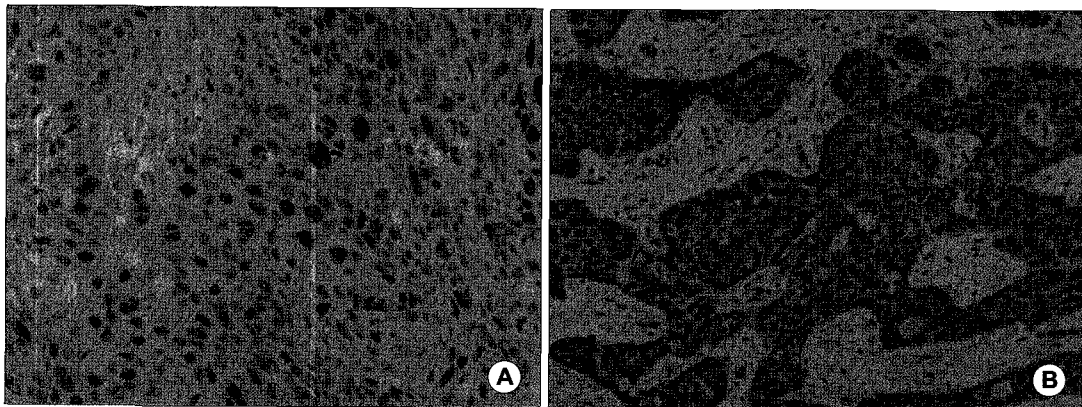


Fig. 4. Immunohistochemical staining of Ki67. Ki67 nuclear antigen was stained reddish brown, the index of Ki67 is high (A) and low (B). ($\times 100$) (A) high Ki67 index, (B) low Ki67 index.

Table 1. The results of tumor biomarkers according to the sex and the pathologic stage of esophageal cancer

	Sex		p-value	Stage					p-value
	M	F		I	IIa	IIb	III	IV	
Cyclin D1			0.629						0.742
(-)	95	8		4	32	11	54	2	
(+)	20	1		1	6	4	9	1	
p53			0.165						0.577
(-)	53	2		2	18	7	27	1	
(+)	62	7		3	20	8	36	2	
Mitotic index			0.144						0.168
<49	106	7		5	34	12	60	2	
50<	9	2		0	4	3	3	1	
Ki67			0.808						0.737
<39	72	6		3	25	7	41	2	
>40	43	3		2	13	8	22	1	

간 상온에서 대비염색하고 말려서 표본제작하였다. 음성 대조군은 전 과정을 똑같이 시행하였지만 mouse antibody 만 가하지 않은 normal rabbit serum으로 항체를 대신 가한 것으로 하였다(Fig. 3).

④ **Ki67의 면역 조직화학 염색:** 5 μ 의 두께로 절편을 만든 뒤 xylene으로 파라핀을 제거한 뒤 ethanol로 씻고, 고유의 peroxidase의 작용을 억제하기 위해 상온에서 0.3% H₂O₂가 포함된 methanol에 30분간 담가두었다. 그 다음 상온에서 0.1% trypsin으로 30분 담그고, 0.01 M sodium citrate buffer, pH 8.0하에서 15분간 microwave를 가하였다. 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4에서 세척한 뒤, non-specific antibody의 결합을 막기 위해 10% normal horse serum에 30분간 두었다. 그 다음 Ki-67의 mouse monoclonal antibody로 4°C에서 밤새 incubation을 하였다. PBS로 세척한 뒤 biotinylated horse anti-mouse IgG로 30분간 반응시켰다. 그 다음 30분간 avidin-biotin-peroxidase 복합체로 반응시켰다. PBS로 세척한 뒤 peroxidase와 0.02% 3,3'-diaminobenzine tetrahydrochloride가 포함된 0.005% H₂O₂로 50 mM ammonium acetate-citric acid buffer, pH 6.0에서 현상되도록 하였다. 그 다음 hematoxylin으로 대비염색하였다. Ki67은 그 결과의 판독 시에 개인에 따라서, 그리고 슬라이드에 따라서 판독결과가 달라질 수 있기 때문에 컴퓨터를 이용한 이미지 분석프로그램을 이용하여 판독하였다. Ki67 지수는 슬라이드의 총 세포 중에서 염색반응 양성인 세포의 수를 백분율로서 나타낸 것이다(Fig. 4).

⑤ **세포 분열 지수:** 1 mm² 당 세포분열의 수를 세어서 나타낸 지표.

(2) **추적조사:** 환자들의 의무기록지 사본을 이용하여 추적하였으며 사망여부의 확인을 위하여서는 동사무소의 주민등록조치를 이용하였다. 사망여부 및 사망원인이 불확실한 환자에 대하여서는 엽서 등을 이용하여 연락을 하도록 하였다. 최종 추적 일은 2000년 12월 31일이었다.

(3) **통계분석:** 환자의 성별, 나이, TNM 병기, 종양 크기, 타 장기 전이여부, 재발 여부, 추적 관찰 기간, p53, Ki67 지수, Cyclin D1, 세포분열 지수 등의 상관관계를 조사하였다. 모든 통계적인 변수의 분석은 SPSS 10.0을 이용하여 하였으며 χ^2 , independent-sample t-test 등을 이용하여 빈도 및 평균에 대한 검정을 하였으며, 생존 분석은 Kaplan-Meier method 와 Log rank method를 이용하여 분석하였다.

결 과

1) 일반변수들과의 상관관계

환자의 성별, 나이에 따른 Stage, p53, Cyclin D1의 발현 여부와는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 추적에 실패한 환자는 124명 중 3명이었으며 사망한 예로 포함시켰다. 13명의 환자는 치료 후 합병증 및 식도암관련 합병증이 병발하여 사망하였고, 5명의 환자는 항암치료나 방사선치료와 관련된 합병증으로 사망하였으며 나머지 72명의 환자는 전부 식도암과 관련된 합병증으로 사망하였다.

Table 2. The results of tumor biomarkers and recurrence of esophageal cancer. There is no significant difference in recurrence between the results of the biomarkers

	Recurrence		p-value
	Yes	No	
Cyclin D1			
(-) n=103	64	39	.078
(+) n=21	17	4	
p53			
(-) n=55	32	23	.097
(+) n=69	49	20	
Mitotic index			
<49 n=113	74	39	.571
50< n=11	7	4	
Ki67			
<39 n=78	55	23	.083
>40 n=46	26	20	

Table 3. Mean and median survival time of esophageal cancer patients according to the pathologic stage

	Stage				
	I	IIa	IIb	III	IV
Mean survival time (months)	71	42	33	18	40*
Median survival time (months)	80	29	24	14	13

*One patient of stage IV esophageal cancer lived more than 8 years.

전체 환자 중 29명이 추적 당시 생존해 있었으며, 2년 생존율은 37.1% (46/124), 5년 생존율은 8.1% (10/124)이었다.

p53의 변이, Cyclin D1의 과발현, Ki67 지수, 세포분열 지수에 따른 성별, 병기별, 연령, 종양 크기, 타 장기전이 여부, 재발 여부의 빈도에는 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1, 2). 병기별 생존율은 Table 3와 같았다. 생존분석에서는 이러한 차이를 적용하여 병기별 생존율의 차이를 보정하였다.

2) 생존분석

p53의 발현 여부, Cyclin D1의 발현 여부, Ki67 지수 40 이상인 경우 세포 분열 지수가 50 이상인 경우의 생존율의 차이를 비교하였다(Table 4).

Table 4. Mean and Median survival time of esophageal cancer patients according to the results of tumor biomarkers

	Survival time	
	Mean (months)	Median (months)
Cyclin D1		
(-)	32	22
(+)	26	16
p53		
(-)	28	21
(+)	34	22
Mitotic index		
<49	32	22
50<	22	12
Ki67		
<39	36	22
>40	23	16

*These values are adjusted by stratification function for removal of predictable bias which was made from the differences in uneven stage distribution.

(1) p53음성(유전자 정상)인 경우 평균 생존기간은 28개월, 50%생존기간은 21개월이었으며 p53양성(유전자 이상)인 경우 평균 생존기간은 34개월, 50%생존기간은 22개월로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.46). 식도암의 병기별로 보정해도 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.53) (Fig. 5).

(2) Cyclin D1 음성인 경우(101예) 평균 생존기간은 32개월, 50% 생존기간은 22개월이었으며 Cyclin D1 양성인 경우(21예) 평균 생존기간은 26개월, 50% 생존기간은 16개월로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.18). 식도암의 병기별로 보정해도 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.22) (Fig. 6).

(3) Ki67 지수가 40 미만인 경우(102예) 평균 생존기간은 36개월, 50% 생존기간은 22개월이었으며, Ki67 지수가 40 이상인 경우(22예) 평균 생존기간은 23개월, 50% 생존기간은 16개월이었으며 통계적으로 유의하게 Ki67 지수가 40 이상인 경우에 생존기간이 더 짧았다(p=0.033). 식도암의 병기별로 보정한 경우에도 통계적으로 유의하게 생존기간에 차이가 나는 것으로 나타났다(p=0.011) (Fig. 7).

(4) 세포 분열 지수가 50 미만인 경우 (108예) 평균 생존기간은 32개월, 50% 생존기간은 22개월이었으며, 분열 지수가 50 이상인 경우 (16예) 평균 생존기간은 22개월, 50%

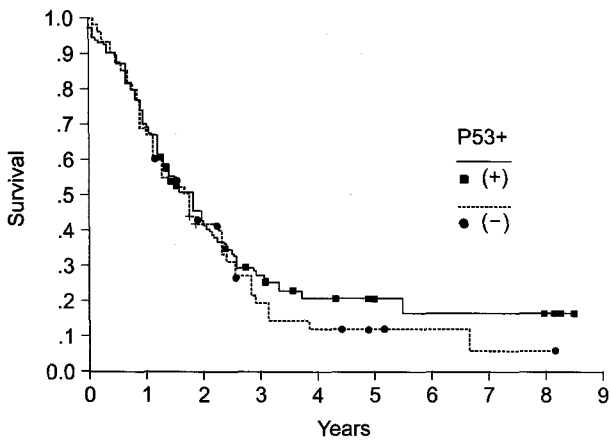


Fig. 5. Survival curves of the patients having esophageal cancer according to the results of p53 mutation. There is no significant difference in survival data. ($p=0.53$).

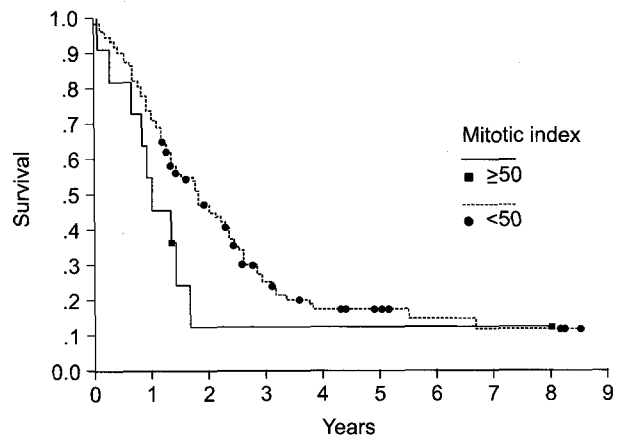


Fig. 7. Survival curves of the patients having esophageal cancer according to the results of mitotic index. There is no significant difference in survival data. ($p=0.12$).

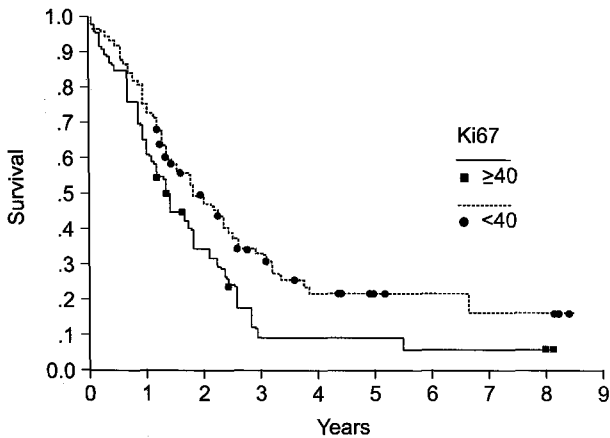


Fig. 6. Survival curves of the patients having esophageal cancer according to the results of Ki67 index. The patients with higher Ki67 index showed lower survival duration with statistical significance ($p=0.011$).

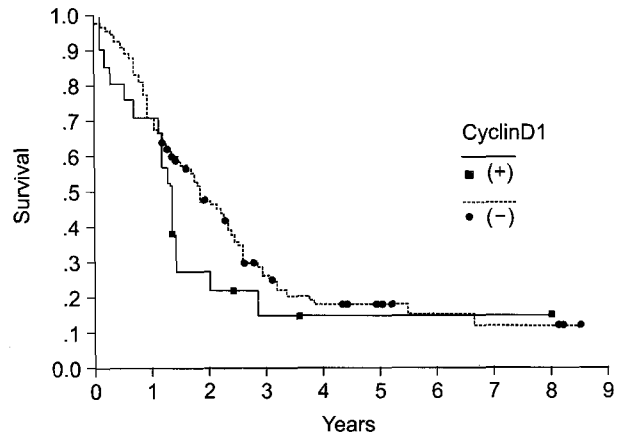


Fig 8. Survival curves of the patients having esophageal cancer according to the results of Cyclin D1 overexpression. There is no significant difference in survival data. ($p=0.22$).

생존기간은 12개월이었으며 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.15$). 식도암의 병기별로 계층화하여 보정하여도 유의한 차이를 보이지 않았다($p=0.12$)(Fig. 8).

고 찰

식도암은 조기 진단을 위한 많은 노력과 수술을 포함한 여러 치료 방법의 진전에도 불구하고 여전히 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다. 이러한 이유는 다른 고형암과 달리 기존의 병기체계 외에도 식도암 자체의 생물학적 특성에

기인한다고 여겨지고 있으며, 분자생물학적 연구를 바탕으로 암의 발현과 관련된 생물학적 표지자들을 이용해 그 성질을 규명하려는 많은 연구가 있어 왔다. 여러 생물학적 표지자들은 임파절 전이, 세포의 악성도, 재발 여부 등의 암세포의 생물학적 특성을 알 수 있어 수술 후 치료 방법의 선택에서도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 많은 보고에서 식도암의 예후와 관련이 있다고 여겨지는 여러 생물학적 표지자들이 거론되었지만[1-4], 보고자에 따라 그 관련성이 명백하지는 않았다[5,6]. 그래서 본 연구는 이런 암 표지자들이 한국인 식도암 환자군에서 예후에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. p53유전자는 널리 알려

진 암억제 유전자로서, 이 유전자에 변이(mutation)가 일어나거나 제거되면(deletion), 발암과정으로 진행되는 중요한 요소로 여겨지고 있다. p53유전자가 생산하는 핵단백질은 세포증식 과정의 조절에 필수적인 기능을 하는데, p53유전자가 이상이 생겨 핵단백질 생산을 못하게 되면 결국 손상 받은 세포가 암으로 진행되는 과정을 막지 못해 식도암을 포함한 여러 암의 발현을 초래한다. 즉, 세포주기의 G1기에 이상이 생겨 DNA가 손상 받은 세포들의 증식이 정상적으로 억제되지 않을 뿐더러, DNA의 수리가 되지 않아, 변이된 세포가 계속 증식하게 된다. 따라서 p53 유전자의 변이 혹은 제거 정도가 중요한 지표로 활용되고 있다. 전구암 병변 혹은 정상조직이 암으로 초기 전파될 때 잘 나타나므로 이미 암이 된 후에는 발현이 축소되어 큰 의미가 없을 수도 있다. 본 연구에서도 절제된 암으로부터 얻은 p53 변이와 식도암 환자들의 예후와는 통계적 의의가 없었다. 최근 본 연구에서 사용한 면역 조직화학 염색 외에, p53 변이를 측정하는 다른 방법인 PCR을 이용한 경우 예후와의 관련성이 있다는 보고가 있어[7], 향후 이에 대한 검증이 요구된다고 하겠다. 또한 p53변이가 전구암 병변의 발암과정을 잘 반영한다고 한다면, 조기 검진시 혹은 수술 절제 후 추적 관찰 시에 유용한 도구로 이용할 수 있으리라 생각되므로 이에 대해 연구가 필요하다고 여겨진다.

식도암에서 cyclin D1 과발현의 빈도는 25~75% 정도로 알려져 있으며, cyclin D1 gene amplification은 cyclin D1의 과발현보다 더 자주 발현되며, 특히 초기에 발현이 되어 예후 판정에 있어서 더 유용한 인자로 알려져 있다. 하지만 면역 조직화학 방법으로는 단세포 수준에서 cyclin D1의 과발현만 측정할 수 있어 이 실험에서는 적게 그리고 관계가 없는 것으로 나온 것 같다.

일부 실험에서는 cyclin D1이 발현되는 경우 그렇지 않은 경우 보다 생존율이 낮은 것으로 보고하고 있으며 각각의 병기에서도 발현되는 경우가 생존율이 낮았다. 수술로 절제된 식도암에서 cyclin D1의 발현은 종양의 분화와 반비례하고 mitotic activity와 nodal status와는 정비례하며 원격 장기전이와는 관련이 깊다.

문헌에서 cyclin D1과 항암치료 효과와 반비례하는데 이것은 cyclin D1을 발현하는 세포가 항암치료에 내성을 보이는 것으로 판단된다. 그러므로 cyclin D1의 발현 정도를 측정하여 항암치료에 대한 반응을 예측할 수 있어 다변치료 시에 고려할 수 있겠다[8-10].

Ki67은 정상적인 세포 주기 중 G1, S, M, G2기에만

선택적으로 나타나는 핵내 항원으로, 세포가 왕성하게 증식할 때, 높은 Ki67의 발현을 나타나게 된다. 따라서 암이 활발하게 분열을 하며 성장(침윤)중이라면 그 성질을 나타내는 중요한 지표로 작용할 수 있다. 따라서 당연히 항암치료에 잘 반응하리라고 예상된다[5,11,12]. 또한 Ki67은 정상 위장 점막에서 고도의 dysplasia로 진행할수록 더 많은 세포가 염색되어 지는 것으로 알려져 있어 식도의 선암종의 발생과 관련성이 있는 것으로 보고되어 왔다[13]. Ki67의 경우 본 연구에서 통계적으로 유의하게 예후에 영향을 미치는 인자로서 작용할 수 있음을 보여주었는데 여러 보고에서 Ki67 지수의 cut-off value를 30에서 50 사이로 다양하게 보고하고 있지만 본 연구에서는 Ki67 지수의 cut-off value를 40으로 정했을 때 통계적으로 의미가 있었다. Ki67 지수가 40 이상인 경우에서, 40 미만보다 평균 생존기간이 약 13개월 정도 더 짧은 것으로 관측되었다. 이는 세포의 증식능력이 예후에 큰 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미할 수 있는데, 즉 증식이 활발했던 식도암을 지닌 환자는 예후가 나쁘므로, Ki67로 표현된 암의 증식도가 예후인자로 고려될 수 있다고 하겠다. 이런 경우 항암제에 잘 반응할 것으로 여겨지므로 기존의 병기와는 무관하게 술 후 항암제를 추천하는 것을 생각해 볼 수 있다.

결론

본 연구를 통해 한국인의 식도암에서도 절제된 조직을 통해 확인한 암 표지자가 예후에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 비교적 비용이 저렴하고 적용이 용이한 분자학적인 표지자들의 임상적 이용의 가능성이 충분히 있다고 본다. 향후 술 후 치료 및 경과 관찰에 이용할 근거를 마련하였으며, 이를 위해 더 많은 연구가 필요하다.

참고 문헌

1. Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, et al. Correlation between cathepsin D expression and p53 protein nuclear accumulation in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2002;55:121-6.
2. 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. *Am J Surg* 1999;177:497-502.
3. Nasierowska-Guttmejer A, Szawowski A, Jastrzbska M, Jezi-

- orski 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;12:128-31.
4. 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;20:63-7.
 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;430:107-15.
 6. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, et al. *p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations*. *Cancer* 1997;79:425-32.
 7. Uchino S, Saito T, Inomata M, et al. *Prognostic significance of the p53 mutation in esophageal cancer*. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:287-92.
 8. Nagasawa S, Onda M, Sasajima K, et al. *Cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in patients with esophageal carcinoma*. *J Surg Oncol* 2001;78:208-14.
 9. Itami A, Shimada Y, Watanabe G, et al. *Prognostic value of p27 (Kip1) and Cyclin D1 expression in esophageal cancer*. *Oncology* 1999;57:311-7.
 10. Kohmura T, Hasegawa Y, Ogawa T, et al. *Cyclin D1 and p53 overexpression predicts multiple primary malignant neoplasms of the hypopharynx and esophagus*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1351-4.
 11. Xu M, Jin YL, Fu J, et al. *The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues*. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-2.
 12. Kitamura K, Saeki H, Kawaguchi H, et al. *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;47:419-23.
 13. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, et al. *Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus*. *Cancer* 1995;75:423-9.

=국문 초록=

배경: 분자학적 표지자들과 식도암과의 관련성에 대해서 아직 뚜렷하게 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 먼저 p53, Cyclin D1과 Ki67 지수 등 종양 표지자가 국내 식도암 환자에서 수술 후 얻어진 식도암 조직의 병기, 악성도, 임파선 전이 여부 등과 어떠한 관련성이 있는가를 알아보고 이를 이용해 향후 국내 식도암 환자에 대한 예후 분석 및 치료방침 결정 그리고 조기발견에 이용할 수 있는지 알아 보았다. 또한 본 연구는 분자학적 표지자들의 임상적용의 기초를 마련하고자 하는 목적으로 시행하였다. **대상 및 방법:** 1992년 3월부터 수술 후 조직절편이 보존된 124명의 환자를 대상으로 하였다. 조직절편의 파라핀을 제거한 뒤에 p53 변이, Cyclin D1의 과발현, Ki67 지수에 대한 면역조직화학 염색법을 시행하였으며 조직슬라이드상에서 세포분열지수를 구하였다. 이 결과와 임상적인 변수들과의 상관관계를 분석하였고, 환자의 생존 및 재발 결과와 비교하였다. **결과:** 환자의 성별, 나이, 병기, 종양 크기, 타장기 전이 여부, 국소적인 재발 여부와 p53의 변이, Cyclin D1의 과발현, Ki67 지수, 세포 분열 지수에 따른 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Ki67 지수는 40 미만인 경우와 40 이상인 경우로 나누었을 경우 통계적으로 유의하게 생존기간에 있어서 차이가 나는 것으로 나타났으나(p=0.011) 다른 표지자들은 생존기간에 유의한 차이를 보이지 않았다. **결론:** 높은 Ki67 지수는 식도의 편평상피암의 예후에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났으나 다른 표지자들은 영향을 미치지 않았다. 이번의 연구를 통해 분자학적인 지표들이 임상적으로 가치 있는 인자가 될 수 있다고 판단되었다.

중심 단어 : 1. 식도암
2. 암 표지자