

# 유방의 침윤성 관암종에서 염색체 17p13의 이형접합 소실과 p53 단백질 발현

이숙현, 김성래, 박찬흔, 조성진, 최영희  
한림대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>병리학교실

## Loss of Heterozygosity of Chromosome 17p13 and p53 Expression in Invasive Ductal Carcinomas

Sook Hyun Lee, Seong Rae Kim, Chan Heun Park, Seong Jin Cho<sup>1</sup>, Young Hee Choi<sup>1</sup>

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Pathology, Hallym University College of Medicine, Seoul

**Purpose:** The p53 gene is located on chromosome 17p13 and may play important roles in cell cycle regulation, apoptosis and the regulation of the expression of other genes as well as tumor suppression. In addition, the p53 gene is believed to play an important role in the progression of various human malignant tumors through mutation and overexpression. There have been few studies on loss of heterozygosity (LOH) study on 17p13 in invasive ductal carcinoma. This study evaluated a 17p13 LOH and protein expression in invasive ductal carcinomas and correlated

these results with the clinicopathological factors.

**Methods:** LOH analysis was carried out using a polymerase chain reaction with four polymorphic microsatellite markers (D17S796, TP53, D17S5, D17S513) in 50 surgically resected tumors and their non-tumorous counterparts. The p53 protein expression level was examined using immunohistochemistry.

**Results:** A LOH and protein expression was detected in 66% and 54% of the tumors, respectively. The LOH rates ranged from 26.3% (D17S513) to 33.3% (TP53). There was no detected LOH or protein expression in the non-tumor parts. The LOH results correlate well with the tumor size and stage. The protein expression results correlate well with the tumor histological grade. There was no correlation between the LOH and protein loss.

**Conclusion:** 17p13 LOH and p53 gene abnormalities may be associated with tumorigenesis and tumor invasion. In addition, the combined use of both methods may help in early detection as well as for determining the prognosis of an invasive ductal carcinoma. 17p13 LOH and p53 protein expression may contribute to tumor progression through reciprocal complementation in some portions of the invasive ductal carcinoma. (*J Breast Cancer* 2006;9: 309-316)

책임저자: 박 찬 흔

134-701 서울시 강동구 길동 445 한림대학교 강동성심병원 외과

접수일: 2006년 8월 7일 게재승인일: 2006년 11월 10일

TEL: 02-2224-2226, Fax: 02-2224-2570, E-mail: hhh@hallym.or.kr

**Key Words** Invasive ductal carcinoma, p53, loss of Heterozygosity Immunohistochemistry

**중심단어** 침윤성 유방 관암종, p53, 이형접합 소실, 면역조직화학 검사

## 서 론

국내에서의 유방암 발생 빈도가 꾸준히 증가되어 유방암이 한국인의 5대 암종에 포함되게 되었으며, 여성에서는 위암을 제치고 제일 높은 암 발생률을 보인다. (1) 유방암에 대해서는 국내외적으로 발생 요인에서부터 역학적 특성, 분자 종양생물학적 특성, 수술 요법 및 항암 화학요법과 방사선 치료 등의 부가적 치료에 이르기까지 많은 연구가 이루어졌고 임상 치료 기법과 성적에서 큰 발전을 이루었다. (2-4) 그러나 영상 진단과 진단 병리 영역의 발전으로 유방암의 조기 진단이 가능하게 되었음에도 암종이 상당히 진행된 상태에서 발견되는 경우가 여전히 많고 동일한 병기의 동일한 분화 등급의 암종이라도 각 환자마다 치료 성적과 암 전이 양상이 차이가 나며, 발전된 외과적 요법에도 불구하고 나쁜 예후를 보이는 경우도 많다. (5) 또한, 유방암의 예후를 결정하는 인자들로서 TNM 병기 외에도 BRCA, c-erbB2, p16, p53 등 종양의 진행, 침윤, 전이에 관련된 다양한 분자, 종양생물학적 인자들이 임상적으로 중요하게 적용되기에 이르렀다. (6-8)

그 중 p53 종양억제 유전자는 거의 모든 종양에서 가장 높은 빈도의 돌연변이가 일어나는 유전자로서 그 중요성이 가장 많이 알려져 있고 또한 가장 많은 연구가 이루어져 왔다. (9,10) 최근 20년간 p53의 기능과 역할에 대한 많은 기전이 규명된 바 p53 유전자는 암발생 억제 기능 외에도 전사 인자로서의 작용, 세포주기 및 세포분열의 조절, 다양한 유전자 발현의 조절, 세포자멸사 등에 관여함이 밝혀져 왔고, 비록 p53 유전자가 발견된 지 약 20년이 지났지만 현재도 종양 발생에서의 p53 유전자의 새로운 작용 기전들이 계속 밝혀지고 있다. (11,12) 게다가 최근 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검사는 통상적인 병리 진단에서 암종과 비암종의 감별에 보조적으로 적용되고 있으며, 다수 기관에서는 p53 유전자를 이용 또는 대상으로 한 유전자 및 면역 치료 등 임상 적용이 이루어지고 있다. (13-15) 한편, p53 유전자의 불활성화 기전은 다양한 방식으로 유발되는데 크게 p53 유전자 엑손에서의 돌연변이, 단백질 과발현 및 p53 유전자와 연관된 염색체 17p13상의 다형성 microsatellite 표식자에서의 이형접합소실 (loss of heterozygosity: 이하 LOH) 등으로 일어난다고 알려져 있다. (16,17) 유방암에서의 p53 연구는 국내외적으로 많이 이루어졌지만 유방암에서의 p53 단백질 발현만 보더라도 예후 인자들과의 연관성이 보고하는 문헌마다 차이가 나며 더욱이 p53 유전자의 LOH에 관련된

연구는 국내에서는 거의 이루어지지 않았으며 p53 단백질 발현과 LOH를 동시에 규명한 문헌은 외국에서도 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 50예의 침윤성 유방암을 대상으로 하여 한국인에서의 p53 유전자와 연관된 LOH를 분자생물학적으로 연구하고 단백질 발현을 면역조직화학적 방법으로 동시에 연구하여 여러 임상, 병리학적 인자들과의 연관성을 규명하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 연구대상

한림대학교 의료원에서 1997년 1월부터 2002년 12월까지 유방의 침윤성 관암종으로 진단받고 유방 적출술 및 림프절 제거술을 시행한 중증 중 수술 전 화학 항암 치료를 받지 않았으며 환자의 임상 기록이 잘 보관되어 있고 임상 추적 기록과 파라핀 블록 상태가 양호한 50예를 연구대상으로 하였으며, 모든 중례들은 수술 전날에 연구 목적으로의 조직 사용에 동의한 중례들이었다. 한편, 이들 환자들의 적출된 유방 조직 중 정상 부분 50예는 LOH 실험 기법에서 '정상 대조군'으로 사용되었으며 이 정상 대조군 중 20예에서 비종양 대조군에 대한 결과를 얻었다.

### 2) 연구 방법

#### (1) 병리조직학적 검색

모든 검체는 10% 중성 포르말린에 양호하게 고정된 후 통상 병리진단을 위한 처리과정을 거친 파라핀 포매 조직을 이용하였으며 각 예에서 암종과 비암종 부위가 포함된 파라핀 블록을 선택하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다. 50예의 침윤성 관암종 중례들은 광학현미경으로 조직학적 등급을 Bloom과 Richardson 체계의 변형인 Nottingham 방법 (21)에 따라 세 등급으로 재분류하였으며, 종양의 크기는 2 cm 이하인 예를 T1, 2 cm에서 5 cm 사이인 경우 T2, 5 cm 이상인 경우 T3으로 구분하였다.

#### (2) 염색체 17p13 microsatellite 표식자의 LOH 분석

DNA는 모두 파라핀 블록에서 획득하였으며, 각 예당 유방의 침윤성 관암종 조직과 정상 조직 등 2개의 파라핀 포매 조직을 6 μm 두께의 연속절편으로 만들어 파라핀을 제거한 후 H&E 염색을 매우 약하게 한 후, 슬라이드를 2% 글리세롤 용액에 2 분간 담가두었다가 광학현미경하에서 관찰하면서 미세절제기를 이용하여 슬라이드상의 순수 암종과 비암종을 조직을 1 ml 주사기 바늘로 긁어내고 각각 DNA 추출 완충액 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% Tween 20, 0.1 mg/ml proteinase K) 이 들어 있는 1.5 ml eppendorf tube에 넣었다. 이 때 슬라이드가 바뀔 때마다 조직이 서로 오염되지 않도록 알콜 솜으로

충분히 칼을 닦아냈으며, 증류수가 바뀔 때마다 오염을 방지하기 위해 새로운 칼을 사용하였다. 그 후 eppendorf tube는 52 °C 수욕조에서 2일 동안 방치시켰다. 그 후 시료는 끓는 물에 10 분간 방치하여 proteinase K의 반응을 불활성화 시킨 후, 분광광도계로 DNA 농도를 측정한다. 다음 -20 °C에서 냉장 보관하면서 이 중 용액 1 µl를 증합효소연쇄반응(이하 PCR) 증폭 시 주형 DNA로 사용하였다.

분석하려는 p53 유전자와 연관된 염색체 17p13상의 microsatellite 표식자는 D17S796, TP53, D17S5, D17S513 등 4가지로 그 시발체는 GIBCO사(USA)에서 제작된 것을 사용하였으며, 염기 서열은 다음의 Table 1과 같다. 그리고 암종, 비암종 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 각각 PCR을 시행하였다. 우선 종양 부위와 정상 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 각각 PCR을 시행하였으며, 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1µl, 0.2 mM dNTP, 10x buffer, 10 pmol/µl primer, 1U Taq polymerase에 증류수를 가하여 12µl로 되게 하였고, PCR은 각 표본에 대하여 35내지 40주기를 반복 실시하였다. 모든 반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, USA)에서 시행하였다. 기본적으로는 각 주기당 변성 반응은 94°C에서 30초, 결합반응은 55-60 °C에서 30초, 연장반응은 72 °C에서 40초씩 시행하고 마지막 주기의 연장반응은 72 °C에서 10분간 반응시키고, 증폭된 PCR 산물 3 µl를 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

이후 3µl의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20mM EDTA, 10mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3µl를 취해 98 °C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음 3 µl를 취해 전기영동에 사용하였다. 전기영동을 1400V에서 1 시간 반 동안 시행한 후 gel을 염색하였다. 은 염색은 binding solution에 의해 gel이 붙어 있는 유리판 쪽을 그대로 염색용기에서 10% acetic acid로 30분간 고정시킨 후, 증류수로 3분씩 2회 반복하여 세척하고, silver nitrate 용액에서 30분간 반응시킨 다음 증류수에서 신속히 세척을 한 후, sodium carbonate 용액에서 피가 뚜렷이 보일 때까지 발색시킨 후, 앞 과정에서 사용한 고정액 10% acetic acid를 혼합하여 반응을 중지시킨 후 피의 소실여부를 관찰하였다.

### (3) p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색

0% 중성 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 4 µm 두께로 연속절편을 만들어 100% xylene으로 3-5분간 탈파라핀하고, 증류수로 함수시킨 후 p53 단백질에 대하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 이들 단백질에 대한 면역조직화학적 염색은 단백질의 항원성을 유지하기 위해 pressure cooker를

**Table 1.** DNA sequences of 4 microsatellites on 17p13

TP53	(f) 5'-TGGATCCTCTTGCAGCAGCC-3' (r) 5'-TP53.A2 AACCTTGTCCTTACCAGAA-3'
D17S796	(f) 5'-CAATGGAACCAATGTGGTC-3' (r) 5'-AGTCCGATAATGCCAGGATG-3'
D17S5	(f) 5'-GCCTACCTTCCACAAATCTTTC-3' (r) 5'-TTGCTGGAGGGATACCTGTGTAC-3'
D17S513	(f) 5'-TTCACCTTGTGGGCTGCTGTC-3' (r) 5'-TAAGAAAGGCTCCACAAGCA-3'

**Table 2.** Clinicopathologic findings of 50 invasive ductal carcinomas.

Clinicopathologic parameters		number of case
Age	below 35	9 (18%)
	above 35	41 (82%)
Grade	I	10 (20%)
	II	25 (50%)
	III	15 (30%)
Size	<2 cm	14 (28%)
	2-5 cm	20 (40%)
	>5 cm	16 (32%)
LN metastasis	positive	23 (46%)
	negative	27 (54%)
Stage	I	13 (26%)
	II	25 (50%)
	III	12 (24%)

LN=lymph node

이용하였고 끓는 phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 처리한다. 4 °C의 PBS에 다시 5분간 처리한 후, 내인성 peroxidase의 활성을 억제하기 위해 3%의 과산화수소를 도포한 후, 1:100으로 희석된 단클론성의 1차 p53 항체(DO-7, Novocastra, UK)를 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS액으로 세척하였다. 2차 항체인 biotinylated link antibody (LSAB kit, DAKO, USA)와 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Streptavidin (Zymed, USA)과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시키고, 이후 발색반응은 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma, USA)로 발색시킨 다음 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입하였다.

### (4) 결과 판정과 통계 처리

#### ① LOH 판정

Gel상의 띠(band)를 밀도측정기를 이용하여 측정하고 정상 조직에 비해 종양조직에서 명백한 띠 소실이 있거나 최소한

50% 이상의 소실이 있는 경우를 LOH로 판정하였고 또한 각 증례 당 LOH가 2개 표식자 이상에서 검출되면 LOH-High 군으로 분류하였다. LOH가 1개의 표지자에서만 검출된 경우는 LOH-low 군으로 분류하였다. 실험결과 중 동형접합성을 보이는 경우와 PCR 산물을 얻을 수 없는 증례, 그리고 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우는 non-informative로 처리하고 결과 분석에서 제외하였다.

## ② 면역조직화학 염색 판정

p53 단백질 발현 판정은 광학현미경 400배 고배율하에서 실시하였다. 종양세포의 핵이 진한 적갈색으로 염색되는 경우로서 세포의 수를 세어 백분율을 구했고, 5% 이상의 염색을 보일 경우 그리고 대조군인 정상 관상피에서의 발현이 없을 경우 양성으로 판정하였다.

## ③ 통계학적 분석

각 증례의 각 microsatellite 표식자에 대한 LOH의 빈도와 p53 단백질 발현 결과등과 제반 임상병리학적 소견 및 예후 인자들과의 상관관계를 chi-square 검정을 이용하여 구하였으며,  $p$ 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

# 결 과

## 1) 임상 정보 및 조직학적 소견

대상 환자들 총 50예의 연령 분포는 27세부터 68세까지였고 평균연령은 45.3세였다. 종양의 크기는 2 cm 이하인 T1 등급이 14예 (28%), 2 cm에서 5 cm의 T2 등급이 20예 (40%), 5 cm 이상

의 T3 등급이 16예 (32%) 이었다. 조직학적 분화도는 Nottingham I 등급이 10예 (20%), II 등급이 25예(50%), III 등급이 15예(30%) 이었다. 림프절 전이가 있었던 예는 23예 (46%) 이었고, 전이가 없었던 예는 27예(54%) 이었다. 병기별로는 I 기가 13예(26%), II 기는 25예(50%), III기는 12예 (24%) 이었다(Table 2).

## 2) 17p13 microsatellite 표식자의 LOH 검출과 단백질 발현 양상

침윤성 관상피암중에서 TP53, D17S796, D17S5, D17S513 표식자의 분석에서 informative 증례는 각 표식자당 42예, 42예, 40예, 38예 이었고 그 중 각각 14예 (33.3%), 12예 (28.6%), 13예 (32.5%), 10예 (26.3%)에서 LOH를 보였으며, 네가지 표식자중 최소1개 이상의 LOH를 보인 증례는 총 33예 (66%) 이었다. 특히, 두개 이상의 표지자에서 LOH를 보이는 LOH-High 군은 18예 (36%), LOH-Low군은 15예 (30%)이었다. 한편, 정상대조군 조직에서는 LOH가 검출되지 않았다(Fig 1)(Table 3). 따라서 염색체 17p13 상의 microsatellite에서의 LOH는 암종에서만 특이적으로 검출되었다 ( $p=0.001$ ). 한편, 4개의 표식자 중 TP53 표식자에서 LOH 검출률이 33.3%로 가장 높았으며, D17S513에서 26.3%로 LOH 검출률이 가장 낮았다. 한편, 면역조직화학적 방법에 의해서 검출된 p53 단백질 발현은 종양 세포에서는 모두 세포의 핵에서 양성으로 염색되었고, 비종양 부분과 주변 간질 세포 및 혈관 등에서는 전혀 염색성을 보이지 않았다. p53 단백질은 총 27예 (54%)에서 발현되었으며, 암종에서만 특이적으로 발현이 관찰되었다 ( $p=0.001$ )(Fig 2)(Table 3).

## 3) LOH 검출과 임상병리학적 인자와의 상관관계

**Table 3.** 17p13 LOH and p53 protein expression according to the clinicopathological factors

		Trial	LOH	LOH-H	Protein expression
Tumor vs normal	Tumor	50	33 (66%)	18 (36%)	27 (54%)
	Normal	20	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Age	below 35	9	6 (66.7%)	3 (33.3%)	6 (66.7%)
	above 35	41	27 (65.9%)	15 (36.6%)	21 (51.2%)
Tumor Grade	I	10	6 (60.0%)	2 (20.0%)	3 (30.0%)
	II	25	16 (64.0%)	10 (40.0%)	13 (52.0%)
	III	15	11 (73.3%)	6 (40.0%)	11 (73.3%)
Tumor Size	below 2 cm	14	5 (35.7%)	2 (14.3%)	8 (57.1%)
	2 ~ 5 cm	20	15 (75.0%)	9 (45.0%)	9 (45.0%)
	above 5 cm	16	13 (81.3%)	7 (43.8%)	10 (62.5%)
LN Metastasis	(-)	27	15 (55.6%)	7 (25.9%)	12 (44.4%)
	(+)	23	18 (78.3%)	11 (47.8%)	15 (65.2%)
Tumor Stage	I	13	4 (30.8%)	1 (7.7%)	8 (61.5%)
	II	25	18 (72.0%)	11 (44.0%)	9 (45.0%)
	III	12	11 (91.7%)	6 (50.0%)	10 (83.3%)

LOH=Loss of Heterozygosity; LOH-H=loss of Heterozygosity-high; LN=lymph node

LOH 검출률은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

종양의 분화도에 따른 LOH 검출률은 I 등급 중례 10예 중 6예 (60.0%), II 등급 25예 중 16예 (64.0%), III 등급 15예 중 11예 (73.3%)로서 분화도와 LOH 검출률 간에는 상관관계가 없었다. 종양의 크기에 따른 LOH 검출률은 T1군에서 5예 (35.7%), T2군에서 15예 (75.0%), T3군에서 13예 (81.3%)로서 T1군에서 LOH 검출률이 유의성 있게 낮았다 ( $p=0.028$ ). 림프절 전이에 따른 LOH 검출률은 전이성 암종에서 18예 (78.3%), 비전이성 암종에서 15예 (55.6%)로서 전이성인 경우 LOH 검출률이 높은 경향을 보였으나 유의성 있는 차이는 없었다 ( $p>0.05$ ). 병기에 따른 LOH 검출률은 I 기 13예 중 4예 (30.8%), II 기 25예 중 18예 (72.0%), III 기 12예 중 11예 (91.7%)로서 병기별로 LOH 검출률의 차이는 없었지만, 병기 I 기와 II+III기로 구분하면 병기 I 기에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였다 ( $p=0.032$ ).

한편, LOH-High 군을 별도로 분석하면 종양의 분화도의 경우 분화 등급 I 등급에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였으며 ( $p=0.040$ ), 종양의 크기에 따른 경우 T1군에서 유의성 있게 낮게 검출되었고 ( $p=0.019$ ), 병기 I 기에서 유의성 있게 낮은 검출률을 보였다 ( $p=0.003$ ). 한편, 림프절 전이에 따른 경우 유의성 있는 차이는 없었으나 전이성인 경우 LOH-High 검출률이 높은 경향을 보였다 ( $p=0.086$ ).

#### 4) p53 단백질 발현과 임상병리학적 인자와의 상관관계

p53 단백질 발현은 35세를 기준으로 구분할 경우 연령에 따른 유의성 있는 차이는 없었다.

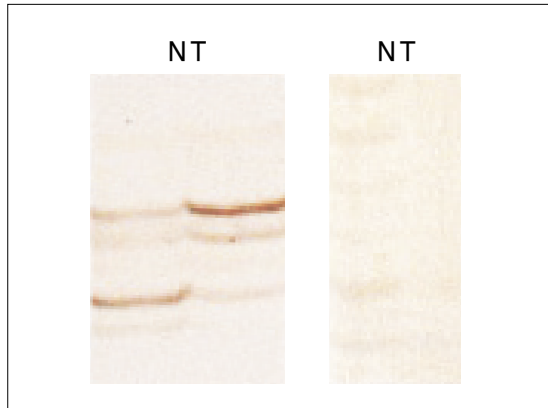
종양의 분화도에 따른 p53 단백질은 I 등급 중례 중 3예 (30.0%), II 등급에서 13예 (52.0%), III 등급에서 11예 (73.3%)로서 저분화도일수록 단백질 발현 비율이 높아졌으며 이는 통계적으로 유의하였다 ( $p=0.044$ ). 종양의 크기에 따른 단백질 발현은 T1군에서 8예 (57.1%), T2군에서 9예 (45.0%), T3군에서 10예 (62.5%)로서 유의성 있는 차이는 없었다. 림프절 전이에 따른 단백질 발현은 전이성인 경우 15예 (65.2%), 비전이성인 경우 12예 (44.4%)로서 전이성 암종에서 높은 발현의 경향을 보였지만 유의성 있는 차이는 없었다. 병기에 따른 단백질 발현은 I 기 8예 (61.5%), II 기 9예 (45.0%), III 기 10예 (83.3%)로서 병기 III 기에서 높은 단백질 발현의 경향이 있었으나 병기별 유의성 있는 단백질 발현 차이는 없었다 ( $p=0.133$ ).

#### 5) LOH와 p53 단백질 발현과의 상관관계

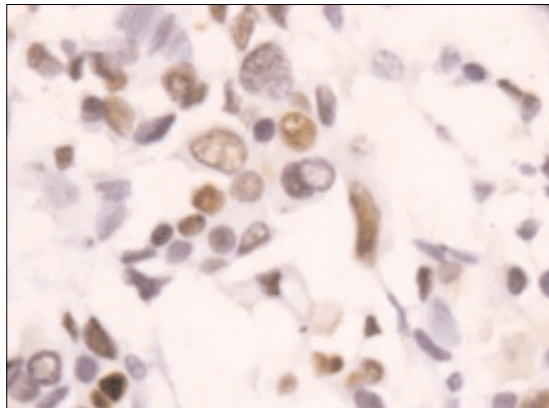
염색체 17p13의 LOH와 p53 단백질 발현과의 상관관계를 보면 양자 모두 양성인 중례는 18예 (36%), LOH만 검출된 중례는 15예 (30%), 단백질 발현만 있는 중례는 9예 (18%), 양자 모두 음성

**Table 4.** Correlation between LOH & Protein Expression

	p53 protein(-)	expression(+)
LOH (+)	18	15
LOH (-)	9	8



**Fig 1.** LOH at chromosome 17p13 loci in invasive ductal carcinoma. Representative D17S513 (left) and D17S5 microsatellite analysis of N (normal) and T (Tumor). Each T lane shows lower band loss (left) and considerable band loss (right).



**Fig 2.** Immunohistochemically, the tumor cells of invasive ductal carcinoma show strong nuclear expression.

인 중례는 8예 (16%)이었으며, 양 검사법간의 통계적 유의성은 없었다 (Table 4).

#### 고 찰

최근 국내에서 15세-34세 젊은 여성의 원발 장기별 암 발생 통계를 보더라도 유방암이 갑상선 다음의 발병률을 보임에 따라 중년 이상의 여성 뿐 아니라 젊은 여성에서의 유방암에 대한 조기 검진과 관리가 더욱 중요하게 되었다. (1) 물론 유방암의 예후를 결정하는 인자들 중에서 TNM 병기가 가장 신뢰성

있는 독립적 예후 인자로 환자 관리에 적용되고 있지만 종양의 진행, 침윤, 전이에 관련된 다양한 분자, 종양생물학적 인자를 규명하고 이들 물질들의 작용 및 발현 기전을 파악하는 것은 환자의 예후 추정에 매우 의의가 있을 것으로 생각된다. (2,6,7,13) 이들 중 p53 유전자는 인체에서는 17번 염색체의 단완 13.1 (17p13.1)에 위치하고, 약 20Kb 크기의 11개 exon 으로 구성되어 있으며 정상 세포에서는 세포 주기의 중요 조절인자인 p21, cdc 등과 작용하여 비정상세포의 G1/S 주기에서 세포성장을 억제시켜 손상된 DNA를 회복시키거나 세포자멸사 (apoptosis)를 유발시키는데 이 유전자에서 변이가 발생하면 정상 p53 유전자의 기능을 비활성화시킴으로써 종양발생에 기여하게 된다. (9-16)

특히 p53 유전자는 가장 많은 종양에서 가장 많은 연구가 이루어져 임상적인 적용도가 높을 뿐만 아니라 많은 발암 관련 유전자들의 발현을 조절하는 매우 중요한 역할을 하고 있다. (9,10,11,19) 또한 p53 유전자 발현과 관련된 대다수의 연구 문헌에서는 종양의 높은 악성도, 종양의 침윤 및 전이와 p53 유전자 이상 또는 단백질 발현 사이에 관계가 있다고 일반적으로 제시되고 있다. 다만, 유방을 비롯한 대부분 장기의 암종의 경우 p53 유전자 변이 및 발현 이상 비율이 연구자별로 다양하게 보고되고 있다. (10,12,17) 유전자의 이상은 크게 유전자 자체의 변이와 이상 단백질 과발현으로 나타나는데 p53 유전자의 경우도 불활성화 기전이 다양하므로 p53 유전자의 이상 검출 기법 역시 다양하다. 임상종양학 분야에서 p53 이상에 대한 대부분의 연구는 면역조직화학적 기법으로 p53 단백질 과발현 (overexpression)을 검출하는 방식이었지만, (20-22) 최근에는 종양억제 유전자의 돌연변이 또는 결손 등 분자적 수준의 발암 과정도 주요 기전으로 제시되고 있다. 즉, 종양억제 유전자의 불활성화에 대한 기전을 대립유전자의 결손으로부터 microsatellite 좌위의 돌연변이 (mutated microsatellite loci) 형태로 파악할 수 있으며, 이 돌연변이를 검출하는 기법으로 LOH를 적용할 수 있게 되었다. 따라서 염색체의 다형성 표식자 (polymorphic marker)에서의 LOH가 미지의 종양 억제 유전자의 존재를 암시한다고 보고되고 있으며, LOH는 종양억제 유전자의 결손과 관련되는 기전으로 정립되어졌고 유방암에서도 다양한 염색체 좌위의 종양억제 유전자에서의 LOH가 보고되었다. (23-29) 다만, 국내에서는 다른 장기의 암종과는 달리 유방암에서 분자종양학적인 연구는 그렇게 많이 연구된 것은 아니며, 특히 p53 유전자 변이에 대한 연구도 의외로 드문 실정이다. (30) 따라서 본 연구에서는 유방암에서 p53 유전자 이상을 규명하기 위해 면역조직화학적 검사로 단백질 발현을 조사하였고, 동시에 p53 유전자와 연관된 염색체 17p13에서의 LOH를 분자생물학적으로 연구하는 것은 큰 의

의가 있는 것으로 판단하였다.

본 연구에서는 p53 유전자와 관련 있는 염색체 17p13에서의 LOH를 검출하기 위해서 D17S796, TP53, D17S5, D17S513 등 4개의 대표적인 microsatellite 표식자를 사용하였다. LOH 검출 결과 LOH를 보인 증례는 33예 (66%)이고, 비종양 정상 부위에서는 LOH 검출이 있는 예가 없어서 유방암에서는 17p13 염색체의 LOH가 정상 조직과의 감별에 특이성이 있었다. 본 결과를 평가하기 위해 유방암을 대상으로 한 외국 연구자들의 결과를 참고하면 Roncuzzi 등 (23)은 D17S34, D17S30/5 2개의 표식자에서 27.6%의 LOH 검출률을 보고했으며, Tsuji 등 (17)은 D17S938 표식자에서 40%를 보고하였다. TP53 표식자의 경우는 비교적 많은 연구들이 이루어졌는데 Johnson, Otis, Seitz, Querzoli, Gentile 등 (24,26-29)은 각각 33.3%, 52%, 67%, 31.3%, 43%의 검출률을 보고하였다. 본 연구에서는 4개의 표식자에서 66%의 LOH 비율이었으므로 Roncuzzi 등의 연구에 어느 정도 부합되었지만 TP53 표식자의 경우 본 연구는 물론 외국 연구자들의 결과가 31.3%에서 67%까지 큰 차이를 보여 정확히 본 연구 결과를 평가하기 곤란하다. 다만, Johnson 등 (24)과 Querzoli 등 (28)은 본 연구의 TP53 LOH 검출률 결과가 유사한 수치를 보였다. 한편, 국내에서는 유방암에서의 p53 LOH 연구물이 매우 드물었지만 최근 Suh 등 (30)은 D17S654, 796, 799 등 3개의 표식자를 사용하여 총 29.0%의 낮은 LOH 검출률을 보고하여 본 연구와 다소 차이가 있었으나, 본 연구에서 사용된 표식자와 동일한 표식자가 아니므로 비교 평가를 할 수는 없다. 다만, Johnson 등의 연구에서는 본 연구에서 사용된 표식자 중 D17S796, TP53, D17S513 등 세가지가 같은 표식자였는데 LOH 검출률이 각각 36.7%, 33.3%, 59.3%로서 D17S796, TP53의 경우는 본 연구와 부합되는 결과를 보였으나, D17S513의 경우는 본 연구 결과와 큰 차이를 보였다. 본 연구에서의 LOH 결과와 임상병리학적 인자들과의 상관관계를 보면 높은 검출률의 LOH 및 LOH-High 경우 모두 종양의 크기 및 병기와 유의성 있는 상관관계가 있었다. 한편 유의성은 없었지만 림프절 전이가 있는 암종에서는 LOH가 높게 검출되는 경향이 있었고, 종양의 분화도는 LOH-High군과 연관성이 있어서 17p13 LOH가 임상적인 유용성이 있다고 판단되었다. 참고로 Ding 등 (25), Otis 등 (26)은 LOH와 종양의 분화도와의 상관관계를, Seitz 등 (27)은 종양의 크기 및 분화도와의 상관관계를 보고하여 본 연구 결과와 대체로 부합되었다.

따라서 본 연구에서 4가지의 17p13 microsatellite 표식자를 사용한 시도는 외국의 연구와 비교해도 낮은 LOH 검출률은 아닌 것으로 판단되고, 또한 p53 유전자와 연관된 17p13 microsatellite의 변이 및 소실은 유방의 침윤성 관상피 암종



의 발암 기전과 악성화에 기여하는 본 연구에서 면역조직화학 방법으로 검출한 p53 단백 발현은 암종의 54%에서 관찰되었고, 정상 조직에서는 발현이 없어서 암종과 정상 조직의 구분에 특이성이 있었다. 또한 p53 단백 발현은 종양의 크기, 림프절 전이 여부, 병기와는 유의성 있는 차이가 없었지만, 종양의 분화도가 낮을수록 발현이 유의성 있게 높았고, 전이성 암종과 병기 III기 암종에서 높은 발현의 경향을 보였다. 참고로 서 등(30), 박 등(20), 김 등(22)은 각각 37.1%, 36.5%, 29.6%의 발현율을 보고하여 본 연구와 비교하여 상당히 낮은 발현 양상을 보였다. 반면 조 등(21), Otis 등(26), Gentile 등(29), Regitnig 등(31)은 각각 50%, 57%, 46%, 51%의 발현율을 보고하여 본 연구와 유사한 양상이었다. 아울러 임상병리학적 인자들과 p53 단백 발현과의 연관성도 연구자마다 다양한 결과를 보이고 있다. 또한, 본 연구에서의 LOH와 단백 발현간의 상관관계를 보면 두가지 검사 기법 상호간의 연관성은 없었다. 본 연구와 유사한 방식으로 Otis 등(26)과 Regitnig 등(31)도 상호연관성이 없음을 보고하였지만, Querzoli 등(28)과 서 등(30)은 연관성이 있음을 보고하여 두 기전의 상호 기전에 대해서는 논란이 있는 것으로 파악된다.

결론적으로 본 연구를 종합하면 비록 국내에서의 연구 보고가 매우 미흡하여 외국의 연구들과 다소 상이한 부분들이 있지만 17p13에서의 LOH와 p53 단백 발현은 유방암의 악성화와 침습성 및 전이능에 관여하는 것으로 보이며, 특히 LOH-High군은 대다수의 임상병리학적 인자들과의 유의성 있는 상관관계가 있어서 임상적으로 유용한 지표라고 판단된다. 또한 LOH와 단백 발현간의 상관관계는 없지만 단백 발현이 있는 27예 중 18예 (66.7%)에서 LOH가 있으므로 일부의 침윤성 유방암종의 발암 과정에서 LOH와 단백 발현 기전이 각각 독립적으로 작용하는 것으로 보이지만 일부의 암종에서는 두 기전이 동시 작용하는 것으로 판단된다. 향후 더 많은 침윤성 관암종 및 전구 병변 증례를 대상으로 더 많은 종양억제 유전자에서 LOH 표식자를 늘려 연구하는 것이 요구되며, 궁극적으로는 유전자 돌연변이와 hypermethylation 기전까지 동시에 파악하는 것이 침윤성 관암종에서 p53 유전자 이상의 역할 규명에 도움이 될 것으로 판단된다.

## 결 론

유방의 침윤성 관암종에서 p53 유전자가 존재하는 염색체 17p13에서의 LOH 및 p53 단백 발현을 연구하고 임상병리학적 소견과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다. LOH와 단백 발현은 암종에서만 관찰되었고 정상에서는 검출되지 않았다. LOH는 증례의 66%에서 검출되었으며 림프절 전이와 유의성 있는 상관관계는 없었지만 T1군과 병기 I 기인 경우 유의성 있

게 낮은 검출률을 보였고, LOH-High군은 T1군, 고분화도, 병기 I 기에서 유의성 있게 낮게 검출되었다. p53 단백 발현은 증례의 54%에서 관찰되었으며 암종의 분화 등급과 상관관계를 보였으나 다른 인자들과의 상관성은 없었다. 따라서 17p13 LOH와 p53 단백 발현 소실은 각각 침윤성 유방암의 발암 및 침윤에 기여할 것으로 보이며, 임상적으로 암종의 조기 예후 판정에 기여할 수 있을 것으로 보인다. 아울러 두 기전 상호간에는 유의성 있는 상관관계가 없었지만 일부 암종에서는 두 방식이 발암 및 침윤 기전에 각각 상호 보완적인 기전으로 작용할 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- 1 2002 Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea. Ministry of Health and Welfare. Republic of Korea. 2003;11.
- 2 Sparano JA, Fazzari MJ, Childs G. Clinical application of molecular profiling in breast cancer. *Future Oncol* 2005;1:485-96.
- 3 Abrial C, Mouret-Reynier MA, Cure H, Feillel V, Leheurteur M, Lemery S, et al. Neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Breast* 2006;15:9-19.
- 4 Lo S, Johnston SR. Novel systemic therapies for breast cancer. *Surg Oncol* 2003;12:277-87.
- 5 Hollingsworth AB, Singletary SE, Morrow M, Francescatti DS, O'Shaughnessy JA, Hartman AR, et al. Current comprehensive assessment and management of women at increased risk for breast cancer. *Am J Surg* 2004;187:349-62.
- 6 Calderon-Margalit R, Paltiel O. Prevention of breast cancer in women who carry BRCA1 or BRCA2 mutations: a critical review of the literature. *Int J Cancer* 2004;10:357-64.
- 7 Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:139-52.
- 8 Ingvarsson S. Molecular genetics of breast cancer progression. *Semin Cancer Biol* 1999;9:277-88.
- 9 Liu MC, Gelmann EP. P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002;29:246-57.
- 10 Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005;14:7-10.
- 11 Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:332-7.

- 12** Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:121-37.
- 13** Nicolini A, Carpi A, Tarro G. Biomolecular markers of breast cancer. *Front Biosci* 2006;11:1818-43.
- 14** Hall PA, McCluggage WG. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol* 2006;208:1-6.
- 15** Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R. The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:868-80.
- 16** Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res* 2002;511:45-62.
- 17** Tsuji N, Furuse K, Asanuma K, Furuya M, Kondoh K, Kamagata C, et al. Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87:23-31.
- 18** Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003;10:431-42.
- 19** Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 2006;13:951-61.
- 20** Park JH, Kim SJ, Choi UJ, Lee KM. Correlation of the Immunohistochemical Coexpression of p53 and HER-2/neu and the Prognosis of Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2005;8:41-7.
- 21** Jo HJ, Yun KJ, Moon HB. Expression of p21, p53 and bcl-2 Proteins in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Korean J Pathol* 2003;37:393-399.
- 22** Kim JK, Song YJ, Cho SI, Ryu DH, Yun HY, Sung RH. Clinicopathologic Significance of p53 and c-erbB-2 Protein Expression in Breast Carcinoma. *J Korean Surg Soc* 2002;62:282-7.
- 23** Roncuzzi L, Brognara I, Baiocchi D, Amadori D, Gasperi-Campani A. Loss of heterozygosity at 17p13.3-ter, distal to TP53, correlates with negative hormonal phenotype in sporadic breast cancer. *Oncol Rep* 2005;14:471-4.
- 24** Johnson SM, Shaw JA, Walker RA. Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at p53, BRCA1 and BRCA2. *Int J Cancer* 2002;98:205-9.
- 25** Ding SL, Sheu LF, Yu JC, Yang TL, Chen BF, Leu FJ, et al. Abnormality of the DNA double-strand-break checkpoint/repair genes, ATM, BRCA1 and TP53, in breast cancer is related to tumour grade. *Br J Cancer* 2004;90:1995-2001.
- 26** Otis CN, Krebs PA, Albuquerque A, Quezado MM, San Juan X, Sobel ME, et al. Loss of heterozygosity of p53, BRCA1, VHL, and estrogen receptor genes in breast carcinoma: correlation with related protein products and morphologic features. *Int J Surg Pathol* 2002;10:237-45.
- 27** Seitz S, Poppe K, Fischer J, Nothnagel A, Estevez-Schwarz L, Haensch W, et al. Detailed deletion mapping in sporadic breast cancer at chromosomal region 17p13 distal to the TP53 gene: association with clinicopathological parameters. *J Pathol* 2001;194:318-26.
- 28** Querzoli P, Albonico G, di lasio MG, Ferretti S, Rinaldi R, Cariello A, et al. Biophenotypes and survival of BRCA1 and TP53 deleted breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66:135-42.
- 29** Gentile M, Bergman Jungstrom M, Olsen KE, Soderkvist P, Wingren S. p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer* 1999;35:1202-7.
- 30** Suh KS, Lee YH, Na SY, Park MI, Kim HS, Lee SK. Mutational and Loss of Heterozygosity Analysis of the p53 and PTEN Tumor Suppressor Genes in Breast Carcinoma. *Korean J Pathol* 2005;39:313-9.
- 31** Regitnig P, Moser R, Thalhammer M, Luschin-Ebengreuth G, Ploner F, Papadi H, et al. Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J Pathol* 2002;198:190-7.