

## 상피성난소종양에서 clusterin, bax, p53, Ki-67의 발현 및 세포사멸지수에 관한 연구

고려대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 병리학교실<sup>2</sup>, 한양대학교 의과대학 병리학교실<sup>3</sup>

이지영<sup>1</sup> · 나중렬<sup>1</sup> · 김인선<sup>2</sup> · 박문향<sup>3</sup> · 강재성<sup>1</sup>

### The expression of clusterin, bax, p53, Ki-67, and apoptotic index in epithelial ovarian tumors

Ji-Young Lee, M.D.<sup>1</sup>, Jung Yeol Na, M.D.<sup>1</sup>, In-Sun Kim, M.D.<sup>2</sup>,  
Moon Hyang Park, M.D.<sup>3</sup>, Jae Seong Kang, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Pathology, Korea University College of Medicine;

<sup>3</sup>Department of Pathology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** The purpose of this study was (1) to evaluate the expressions of clusterin, bax, Ki-67, p53, and apoptotic index in epithelial ovarian tumors, borderline and malignant ovarian tumors, (2) to find out the correlation between their expressions and clinicopathological parameters, and (3) to evaluate the effect on the patient's survival according to their expressions.

**Methods:** The histological and clinical findings of 22 cases of ovarian cystadenomas, 44 cases of borderline tumors and 96 cases of carcinomas were evaluated. Expressions of clusterin, bax, Ki-67, p53, and apoptotic index were studied on paraffin-embedded tissue sections by immunohistochemical methods.

**Results:** The expressions of clusterin, p53, and Ki-67 were higher in ovarian carcinomas than borderline tumors. The overexpression of p53, and Ki-67 were frequent in high stage, poorly differentiated and bilateral ovarian carcinomas. The overexpressions of clusterin, bax, p53, and Ki-67 showed a statistically significant correlation with histologic type. Apoptotic index was higher in bax overexpression group, but there was no correlation with overexpression of clusterin or p53. Ki-67 was higher in p53 overexpression group, but there was no correlation with overexpression of clusterin or p53. There was no statistically significant correlation with each other between the overexpressions of clusterin, bax, p53, and Ki-67. The overexpressions of clusterin, Ki-67, p53 was associated with overall patient's survival in borderline significance.

**Conclusion:** The overexpression of p53, and Ki-67 were frequent in poorly differentiated ovarian carcinomas. So the overexpression of p53, and Ki-67 can be used as prognostic factor. The overexpression of clusterin was more in epithelial ovarian carcinomas than in borderline tumors but showed no significant correlation with the overall patient's survival. Further studies are required to clarify the possibility of using clusterin for target therapy in epithelial ovarian carcinomas.

**Key Words:** Epithelial ovarian tumors, Clusterin, Bax, Ki-67, p53

난소암은 여성 생식기의 악성 종양 중 비교적 흔하게 발

생하는 암으로, 2009년 한국 중앙 암등록사업 연례보고서에 의하면 국내 여성의 생식기 악성종양 중 자궁경부암에 이어 2위의 발생률을 보이고 있다.<sup>1</sup> 미국의 경우는 모든 암 중에서 8번째로 흔하며, 2006년도 통계에 의하면 한 해에 20,385명의 신환자가 발생하였고, 16,413명이 사망하여 여성에서의 암으로 인한 사망률 5위에 해당한다.<sup>2</sup> 난소암의

접 수 일 : 2010. 3. 31.  
수 정 일 : 2010. 7. 7.  
채 택 일 : 2010. 8. 2.  
교신저자 : 강재성  
E-mail : jskang@kumc.or.kr

90% 가량을 차지하는 상피성 난소암은 원격 부위로 전이가 일어날 때까지 무증상인 경우가 대부분이기 때문에 단지 25%의 경우에서만 1기에서 발견되고,<sup>3</sup> 이런 환자에서 적절한 치료가 이루어진다면 1기에서의 5년 생존율은 95%에 이르지만 3기에는 20~25%로 감소하는 것이 문제이다.<sup>4</sup> 따라서 초기에 암을 발견하는 것이 무엇보다도 환자의 예후에 중요하다. 난소암의 발생은 다양한 유전적 변이를 포함하는 다단계의 과정을 거치는 것으로 알려져 있다. 그러나 정상 난소 표면상피세포가 악성 세포로 되는 기전은 정확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 난소암 발생 기전에 관여하는 유전적 변화 경로를 알아낸다면 난소암의 조기진단, 정확한 예후 예측이 가능할 것이고, 유전자 표적 치료를 통해 난소암을 더 효과적으로 치료할 수 있을 것이다. 2000년 유전자 발현 직렬분석과 실시간 중합효소연쇄 반응법을 이용한 유전자 정량 분석법을 통한 난소암종에 관한 연구에서 clusterin 유전자의 과발현이 발견되었는데,<sup>5</sup> clusterin은 apolipoprotein J라고도 불리는 모든 포유류의 체액에 존재하는 이중 이량성 당단백질이며, 지금까지 연구된 거의 모든 종류의 세포에서 유도 및 발현된다. 또한 정자성숙, 지질운송, 조직 재구성, 세포막 재활용, 세포-세포 또는 세포-세포하층 간의 상호작용 및 세포사멸 등의 다양한 정상적인 생물학적 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>6-10</sup> 인간의 여러 악성종양의 발생과 진행과정에 관여하는 clusterin의 강력한 종양형성 능력에 관해 보고되어 있고, 전립선암과 신장암에서 clusterin의 과발현이 관찰되었으며,<sup>11,12</sup> clusterin의 과발현이 유방암의 공격적인 성향과도 연관성이 있는 것으로 나타났다.<sup>13</sup> 본 연구의 목적은 상피성난소암 발생 및 진행 과정에서 clusterin의 역할을 규명하기 위해 기존에 알려진 세포사멸관련 단백질인 bax와 p53, 세포증식지수인 Ki-67을 면역조직화학염색법으로 검사하고 TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL)염색을 이용하여 세포사멸지수를 비교 분석하여 임상병리학적 소견에 따른 발현 차이를 비교하고, 예후인자로서의 효율성을 알아보고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

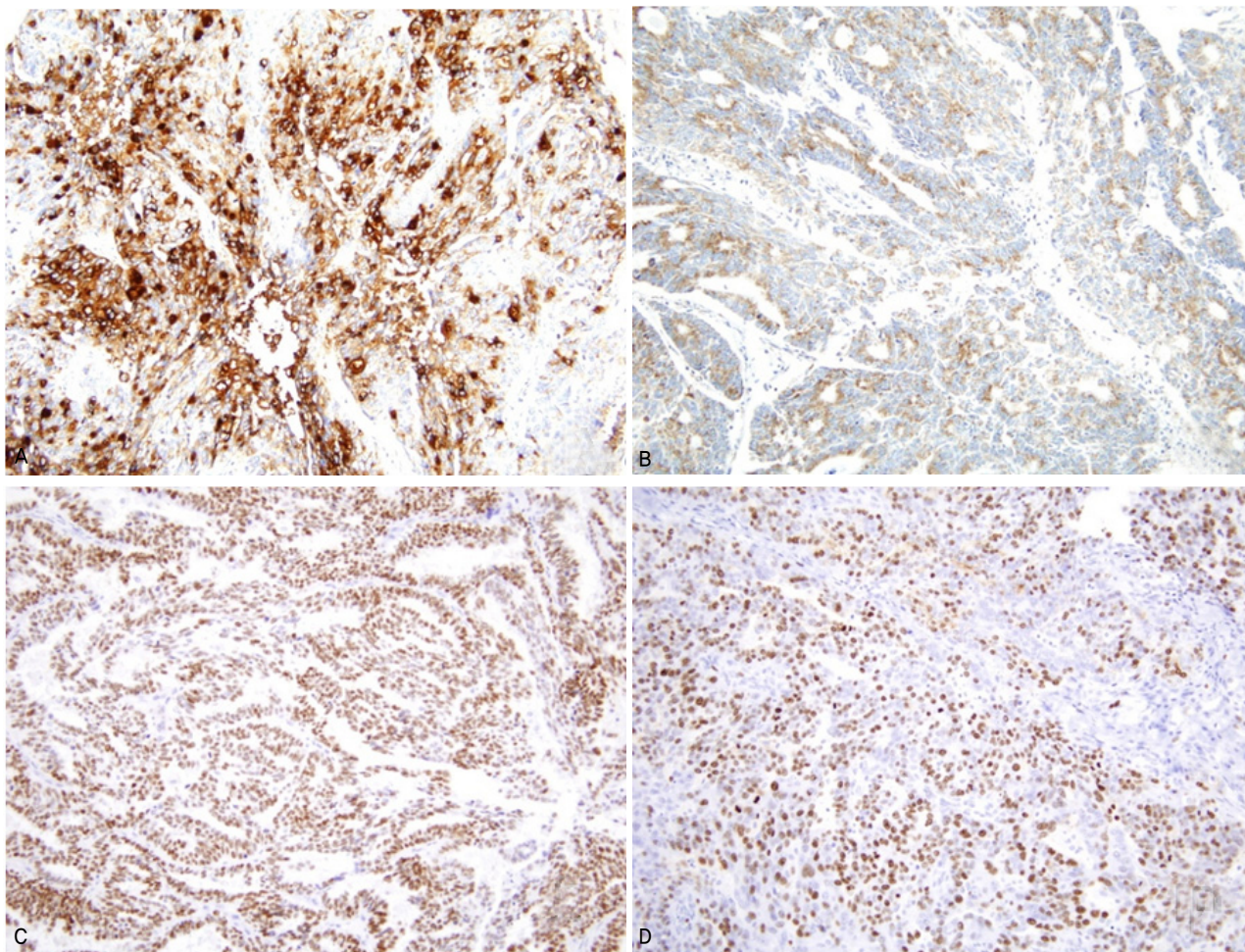
1995년 1월부터 2006년 12월까지 고려대학교 안암병원

산부인과에서 난소종양으로 수술받은 환자 중 표본이 적절한 162예를 대상으로 하였다. 조직학적 유형에 따라 분류하면 낭샘종 22예 (장액낭샘종 10예, 점액낭샘종 12예), 경계악성상피난소종양 44예 (장액낭샘종 15예, 점액낭샘종 29예), 상피성난소암종 96예 (내막모양암종 9예, 장액낭샘암종 63예, 점액낭샘암종 12예, 투명세포암종 12예)의 대표적인 표본을 선택하였다.

환자의 병리 진단지를 참조하고 모든 유리 슬라이드 표본을 재검토하여 수술 당시 난소암종의 International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) 병기, 조직학적 유형, universal grading system에 따른 분화도를 정리하였다. 대상 환자의 의무기록을 후향적으로 조사하여 임상양상과 생존기간을 조사하여 clusterin, bax, p53 발현 및 Ki-67 지수, 세포사멸지수 (apoptotic index, AI)와 연관성을 분석하였다.

### 2. 면역조직화학염색 및 결과 판정

선택된 파라핀 포매 조직을 4 µm 두께로 박절하여 snowcoat X-tra slide (Surgipath, Richmond, IL, USA)에 부착하여 탈파라핀과 함수 과정을 거친 절편은 조직 내에 있는 과산화효소를 제거하기 위해 3% 과산화수소에 10분간 반응시킨 후 물로 씻어냈다. 항원을 복구하기 위해 0.1 M 구연산 완충액 (pH 6.0)을 이용해 압력밥솥에 5분간 처리한 후 물로 씻어내고, 다시 Tris 완충액 (pH 7.6)으로 세척한 후 비특이 반응을 제거하기 위해 5% 정상 염소 혈청에 10분간 반응시켰다. 면역조직화학염색은 과산화효소가 결합된 streptavidin-biotin-complex (ABC) 방법을 이용하여 시행하였다. 1차 항체는 clusterin에 대한 단클론 항체 (Millipore, Watford, UK), bax에 대한 다클론 항체 (DAKO, Carpinteria, CA, USA), Ki-67에 대한 단클론 항체 (MM1, Novocastra, Newcastle, UK), p53에 대한 단클론 항체 (DO-7, Novocastra)를 1:100 희석하여 각각 실온에서 60분간 반응시켰다. 그런 다음 biotin이 결합된 2차 항체인 goat anti-mouse IgG (DAKO)로 실온에서 20분간 반응시키고 Tris 완충액으로 다시 세척하였다. 과산화효소 (peroxidase)가 결합된 streptavidin에 20분간 반응시킨 후 3,3'-diaminobenzidine을 가하여 갈색으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 10초간 대조염색한 후 Canada



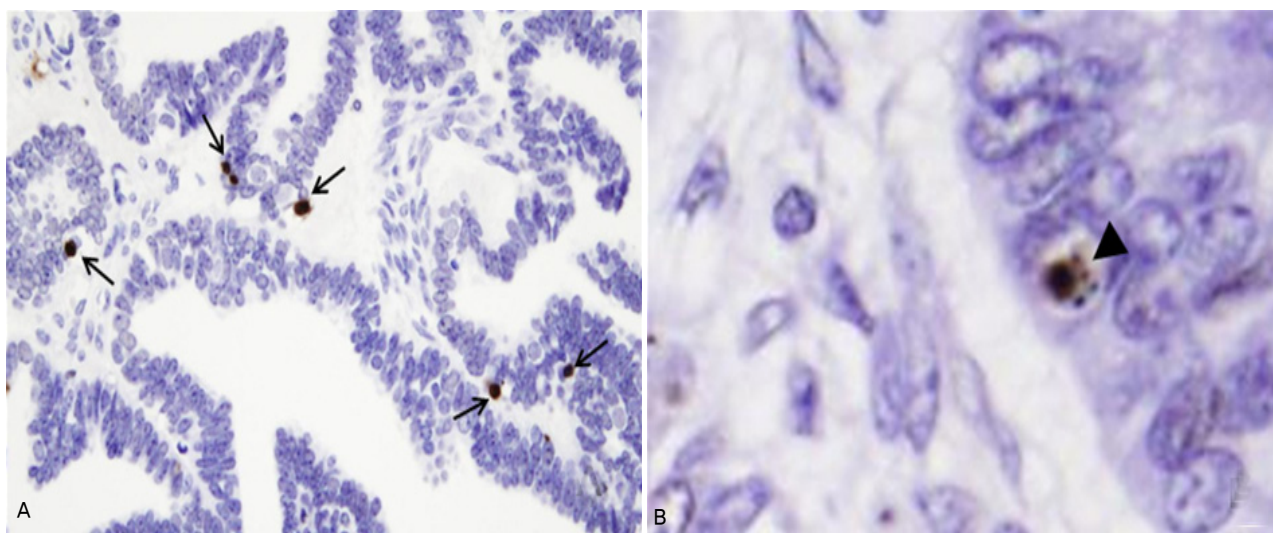
**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of clusterin, bax, p53 and Ki-67. (A) Clusterin overexpression in serous cystadenocarcinoma. (B) Bax overexpression in serous cystadenocarcinoma. (C) p53 overexpression (>50%) in serous cystadenocarcinoma. (D) The increased Ki-67 positive cells (>50%) in serous cystadenocarcinoma ( $\times 200$ ).

balsam으로 봉입하였다. 양성 대조는 침윤성 유방암종을 이용하였고, 음성 대조로는 1차 항체를 완충액으로 대신한 후 동일한 방법으로 시행하였다. Clusterin과 bax의 발현율은 염색강도 (0=음성, 1=약 양성, 2=중등도 양성, 3=강 양성)와 염색범위 (<10%=1, 10~50%=2, >50%=3점)를 구한 다음, 그 곱을 구하여 염색지수 (staining index)로 하였다. 양성종양군에서 염색지수가 4 이하이므로 4를 초과하는 염색지수를 양성으로 판정하였다. Ki-67과 p53의 발현율은 종양세포의 핵이 염색된 세포의 수를 세어서 종양세포 수의 백분율로 표시하여 50% 이상인 예와 50% 이하인 예를 비교하였다 (Fig. 1).

### 3. TUNEL 염색 및 양성세포 판독

Mebstain Apoptosis kit II (Medical & Biological Lab, Nagoya, Japan)를 사용하여 지시된 염색 과정에 따라 증류수에 수세한 후 37°C phosphate buffered saline (PBS)에 30분간 방치하였다. PBS를 제거한 후 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 의 proteinase K 용액을 가하고 37°C에서 30분간 작용시켰다. 증류수로 2분간 4회씩 수세하였다. DNA nick end labeling 과정으로 50  $\mu\text{L}$ 의 TdT buffer II를 가한 후 5~10분간 실온에서 방치한 다음 용액을 제거하고, 50  $\mu\text{L}$ 의 TdT 용액을 가하고 37°C에서 60분간 작용시켰다. 그 후 Tris 완충액 속에 15분간 실온에 방치한 후 증류수로 수세하였다. 50  $\mu\text{L}$ 의 차단 용액으로 10분간 실온에 방치한 후 PBS 완충액으로 5분





**Fig. 2.** Morphology of apoptosis. (A) Apoptotic bodies in serous adenocarcinoma (arrows) (TUNEL method,  $\times 400$ ). (B) Nuclear fragmentation known as apoptotic body in endometrioid adenocarcinoma (arrow head) (TUNEL method,  $\times 600$ ).

씩 3회 세척하였고, peroxidase가 결합된 streptavidin에 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS 완충액으로 세척하였고, DAB로 1분 동안 발색시켰다. 그 후 슬라이드를 2분씩 3회 세척한 후 Mayer's hematoxylin으로 10초 동안 대조 염색하였다. 알코올과 xylene으로 탈수하여 canada balsam으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다. TUNEL 결과의 판독은 세포 중 핵에 적갈색으로 분명히 염색되는 세포핵 파편을 양성으로 판독하여 종양세포 1,000개당 양성인 수를 세포사멸지수로 하였다 (Fig. 2). 전체 세포사멸지수의 평균값이 6.6이었으므로 이에 따라 세포사멸지수가 낮은 군 (세포사멸지수 $\leq 6.6$ )과 세포사멸지수가 높은 군 (세포사멸지수 $> 6.6$ )으로 분류하였다.

#### 4. 통계학적 분석

Clusterin, bax, p53 및 Ki-67의 발현 정도, 세포사멸지수와 임상 및 병리학적 예후인자들을 비교, 분석하기 위해 카이제곱 검정법을 사용하였다. 상피성난소암종 환자의 생존율은 난소암종 진단 시점부터 사망한 시점까지로 계산하였으며, 생존율 분석을 위해 Kaplan-Meier 방법을 사용하였다. 단변량 분석에서 통계학적 유의성을 획득한 변수로 다변량 분석을 시행하였고, 각각의 예후인자들이 예후에 미치는 상대적 영향을 평가하기 위해 cox's proportional hazard regression model을 사용하였다. 모든 결과는  $P$

$< 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 모든 통계는 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다.

## 결 과

난소암종 환자의 평균 연령 분포는 내막모양샘암종, 장액낭샘암종, 점액낭샘암종, 투명세포암종에서 각각 47.9, 53.7, 41.0, 51.0세로 점액낭샘암종의 경우 평균 발병 연령이 더 젊은 것으로 나타났다. 경계영역성 장액낭샘종 환자의 평균 연령은 41세, 경계영역성 점액낭샘종 환자의 평균 연령은 38.2세로 암종에 비해 평균 연령이 젊은 것으로 나타났다. FIGO 병기에 따라 분류하면 I기가 29명 (30.2%), II기가 6명 (6.25%), III기가 57명 (59.38%), IV기가 3명 (3.13%)이었다. 내막모양샘암종 환자는 I기가 7명으로 가장 많았고, 장액낭샘암종 환자는 III기가 48명으로 가장 많았다. 경계영역성 낭샘종 환자는 44명이 모두 I기였다. Universal histologic grading system에 따라 분화도를 분류하면 분화도 1이 26명, 분화도 2가 25명, 분화도 3이 44명으로 분화도가 나쁜 증례가 많은 편이었는데, 이 중 40예가 장액낭샘암종으로 분화도 3인 경우의 대부분을 차지하였다 (Table 1).

# 1. 조직학적 유형에 따른 clusterin, bax, p53, Ki-67 발현 및 세포사멸지수 간의 연관성 (Table 2)

## 1) Clusterin의 발현양상

Clusterin은 경계악성 상피난소종양의 34.1%에서 양성 이었고, 상피성난소암종의 55.2%에서 양성으로 나타났 다 ( $P=0.02$ ). 경계영역성 장액낭샘종의 60%에서 양성으로 나 타났고, 장액낭샘암종의 61.9%에서 양성으로 나타났 다 ( $P=0.19$ ).

## 2) Bax의 발현양상

Bax는 경계악성 상피난소종양의 13.6%에서 양성이었고, 상피성난소암종의 28.1%에서 양성으로 나타났 다 ( $P=0.061$ ). 경계영역성 장액낭샘종의 6.7%에서 양성으로 나타났고, 장

액낭샘암종의 22.2%에서 양성으로 나타났 다 ( $P=0.034$ ). 경계영역성 점액낭샘종의 17.2%에서 양성으로 나타났고, 점액낭샘암종의 16.7%에서 양성으로 나타났 다 ( $P=0.12$ ). 상피성난소암종 중에서는 투명세포암종에서는 66.7%에서 양성을 보인 반면 점액낭샘암종의 16.7%에서만 양성으로 유의한 차이가 있었다 ( $P=0.013$ ).

## 3) p53의 발현양상

p53은 경계악성 상피난소종양의 6.8%에서 양성을 보였 고, 상피성난소암종의 42.7%에서 양성을 보여 유의한 차이 가 있었다 ( $P<0.001$ ). 경계영역성 장액낭샘종의 전 예에서 발현이 없어 음성이었고, 장액낭샘암종의 55.6%에서 양성 으로 나타났 다. 경계영역성점액낭샘종의 10.7%에서 양성 으로 나타났고, 점액낭샘암종의 33.3%에서 양성으로 나타

**Table 1.** Histologic and clinical characteristics of the epithelial ovarian tumors

	Carcinoma (n=96)					LMP (n=44)	
	Endometrioid (n=9)	Serous (n=63)	Mucinous (n=12)	Clear cell (n=12)	Total (%)	Serous (n=15)	Mucinous (n=29)
Mean age (yr)	47.9	53.7	41.0	51.0		38.2	41.0
FIGO stage							
I	7	9	7	6	29 (30.2)	15	29
II	1	3	0	2	6 (6.3)	0	0
III	1	48	5	3	57 (59.4)	0	0
IV	0	3	0	0	3 (3.1)	0	0
Universal histologic grade							
1	6	7	6	7	26 (27.1)		
2	2	16	5	2	25 (26.0)		
3	1	40	1	2	44 (45.8)		

LMP: tumor of low malignant potential, FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

**Table 2.** Clusterin, bax, p53, Ki-67, and AI expressions in relation to histologic types

	Total number	Clusterin (SI>4)	Bax (SI>4)	p53 (>50%)	Ki-67 (>50%)	AI (>6.6)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Cystadenoma	22	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (27.3)
Serous LMP	15	9 (60)	1 (6.7)	0 (0)	0 (0)	2 (13.3)
Mucinous LMP	29	6 (20.7)	5 (17.2)	3 (10.7)	0 (0)	11 (37.9)
Total LMP	44	15 (34.1)	6 (13.6)	3 (6.8)	0 (0)	13 (29.5)
Serous Ca	63	39 (61.9)	14 (22.2)	35 (55.6)	25 (39.7)	23 (36.5)
Mucinous Ca	12	1 (8.3)	2 (16.7)	4 (33.3)	2 (16.7)	6 (50)
Endometrioid Ca	9	7 (77.8)	3 (33.3)	1 (11.1)	1 (11.1)	4 (44.4)
Clear cell Ca	12	6 (50)	8 (66.7)	1 (8.3)	1 (8.3)	7 (58.3)
Total Ca	96	53 (55.2)	27 (28.1)	41 (42.7)	29 (30.2)	40 (41.7)

AI: apoptotic index, LMP: tumor of low malignant potential, Ca: carcinoma, SI: staining index.

났다. 상피성난소암종 중에서는 장액낭샘암종의 55.6%에서 양성을 보인 반면 그 이외 점액성샘암종의 33.3%, 내막모양샘암종의 11.1% 및 투명세포암종의 8.3%에서 양성을 보여 유의한 차이가 있었다 ( $P=0.003$ ).

#### 4) Ki-67의 발현양상

Ki-67은 경계악성 상피성난소종양에서는 전 예에서 음성이고 상피성난소암종에서는 30.2%에서 양성으로 유의한 차이가 있었다 ( $P<0.001$ ). 상피성난소암종 중에서는 장액낭샘암종에서는 39.7%에서 양성인 반면 점액낭샘암종의 16.7%, 내막모양암종의 11.1%, 투명세포암종의 8.3%에서 양성을 보여, 장액낭샘암종이 비장액낭샘암종들과 유의한 차이가 있었다 ( $P=0.046$ ).

#### 5) 세포사멸지수

세포사멸지수는 낭선종에서는 27.3%에서 증가되었고, 경계악성 상피성난소종양에서는 29.5%, 상피성난소암종 41.7%에서 증가되었으나 유의성은 없었다 ( $P=0.170$ ). 경계영역성 장액낭샘암종의 13.3%에서 양성으로 나타났고, 장액낭샘암종의 36.5%에서 양성으로 나타났고, 장액낭샘암종의 37.9%에서 양성으로 나타났고, 점액낭샘암종의 50%에서 양성으로 나타났고, 투명세포암종이 58.3%로 가장 많았고, 장액낭샘암종은 36.5%로 가장 적었다 ( $P=0.488$ ) (Table 2).

**Table 3.** Correlation between clinicopathologic characteristics and expressions of clusterin, bax, p53, Ki-67 and AI in epithelial ovarian carcinomas

Clinico pathologic variables	Clusterin (%)			Bax (%)			p53 (%)			Ki-67 (%)			AI (%)		
	Negative (SI≤4)	positive (SI>4)	<i>P</i> *	Negative (SI≤4)	positive (SI>4)	<i>P</i> *	Negative (≤50%)	positive (>50%)	<i>P</i> *	Negative (≤50%)	positive (>50%)	<i>P</i> *	Low (≤6.6)	High (>6.6)	<i>P</i> *
Age															
≤50 yr	21 (21)	26 (27)	0.983	33 (34)	14 (14)	0.723	28 (29)	19 (19)	0.658	37 (38)	10 (10)	0.062	27 (28)	20 (20)	0.863
>50 yr	22 (22)	27 (28)		36 (37)	13 (13)		27 (28)	22 (22)		30 (31)	19 (19)		29 (30)	20 (20)	
FIGO stage															
I, II	18 (18)	17 (17)	0.322	22 (22)	13 (13)	0.137	25 (26)	10 (10)	0.034	29 (30)	6 (6)	0.035	19 (19)	16 (16)	0.542
III, IV	25 (26)	36 (37)		47 (48)	14 (14)		30 (31)	31 (32)		38 (39)	23 (23)		37 (38)	24 (25)	
Universal histologic grade															
1	14 (14)	12 (12)	0.55 (1, 2 vs 3)	15 (15)	11 (11)	0.096 (1, 2 vs 3)	21 (21)	5 (5)	0.009 (1, 2 vs 3)	25 (26)	1 (1)	<0.001 (1, 2 vs 3)	13 (13)	13 (13)	0.358 (1, 2 vs 3)
2	11 (11)	15 (15)		22 (22)	4 (4)		15 (15)	11 (11)		20 (20)	6 (6)		18 (18)	8 (8)	
3	18 (18)	26 (27)		32 (33)	12 (12)		19 (19)	25 (26)		22 (22)	22 (22)		25 (26)	19 (19)	
Tumor size															
≤10 cm	16 (16)	27 (28)	0.178	28 (29)	15 (15)	0.185	25 (26)	18 (18)	0.88	26 (27)	17 (17)	0.073	28 (29)	15 (15)	0.225
>10 cm	27 (28)	26 (27)		41 (42)	12 (12)		30 (31)	23 (23)		41 (42)	12 (12)		28 (29)	25 (26)	
Laterality															
Unilateral	23 (23)	19 (19)	0.083	25 (26)	17 (17)	0.018	31 (32)	11 (11)	0.004	34 (35)	8 (8)	0.036	24 (25)	18 (18)	0.835
Bilateral	20 (20)	34 (35)		44 (45)	10 (10)		24 (25)	30 (31)		33 (34)	21 (21)		32 (33)	22 (22)	

SI: staining index, AI: apoptotic index., FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics.

\* $P$ -values are for chi-square test.

## 2. 상피성난소암종에서 임상병리학적 양상과

## clusterin, bax, p53, Ki-67 발현 및 세포사멸지수 간의 연관성 (Table 3)

Clusterin의 과발현은 비장액성 세포유형보다 장액성 세포유형에서 더 많이 나타났다 ( $P=0.003$ ). Bax의 과발현은 비장액성 세포유형보다 장액성 세포유형에서 더 많이 나타났다 ( $P=0.013$ ), 양측성 암종에서 과발현이 더 많았다 ( $P=0.018$ ). p53의 과발현은 FIGO병기 I, II군보다 III, IV군에서 ( $P=0.034$ ), 비장액성 세포유형보다 장액성 세포유형에서 ( $P=0.003$ ), 분화도가 좋지 않을수록 ( $P=0.009$ ) 그리고 양측성일수록 발현이 더 많았다 ( $P=0.004$ ). Ki-67의 과발현은 FIGO 병기 I, II군보다 III, IV군에서 ( $P=0.035$ ), 비장액성 세포유형보다 장액성 세포유형에서 ( $P=0.046$ ),

분화도가 좋지 않을수록 ( $P<0.001$ ) 그리고 양측성일수록 과발현이 더 많았다 ( $P=0.036$ ). 세포사멸지수는 임상병리학적 양상들과 연관성을 보이지 않았다.

## 3. 상피성난소암종에서 Ki-67 발현 및 세포사멸지수와 clusterin, bax, p53 발현 간의 연관성 (Table 4)

## 1) Clusterin, bax, p53의 과발현과 세포증식지수와와의 연관성

증식지수인 Ki-67의 발현은 p53 음성군에서 21.8%, p53 양성인 군에서 41.5%로 두 군 간에 유의한 차이를 보였고 ( $P=0.038$ ), clusterin과 bax는 양성군과 음성군 간에 Ki-67의 발현 차이가 없었다.

Table 4. Relation of Ki-67 and AI with the expressions of clusterin, bax, and p53 in surface epithelial ovarian carcinomas

	Total (n=96)	Ki-67			<i>P</i> <sup>*</sup>	AI			<i>P</i> <sup>*</sup>
		Negative (≤50%) (%)	Positive (>50%) (%)			Low (≤6.6) (%)	High (>6.6) (%)		
Clusterin									
Positive (SI>4)	43	30 (69.8)	13 (30.2)	0.996	22 (51.2)	21 (48.8)	0.199		
Negative (SI≤4)	53	37 (69.8)	16 (30.2)		34 (64.2)	19 (35.8)			
Bax									
Positive (SI>4)	27	20 (74.1)	7 (25.9)	0.568	9 (33.3)	18 (66.7)	0.002		
Negative (SI≤4)	69	47 (68.1)	22 (31.9)		47 (68.1)	22 (31.9)			
p53									
Positive (>50%)	24	24 (58.5)	17 (41.5)	0.038	24 (58.5)	17 (41.5)	0.972		
Negative (≤50%)	43	43 (78.2)	12 (21.8)		32 (58.2)	23 (41.8)			

SI: staining index, AI: apoptotic index.

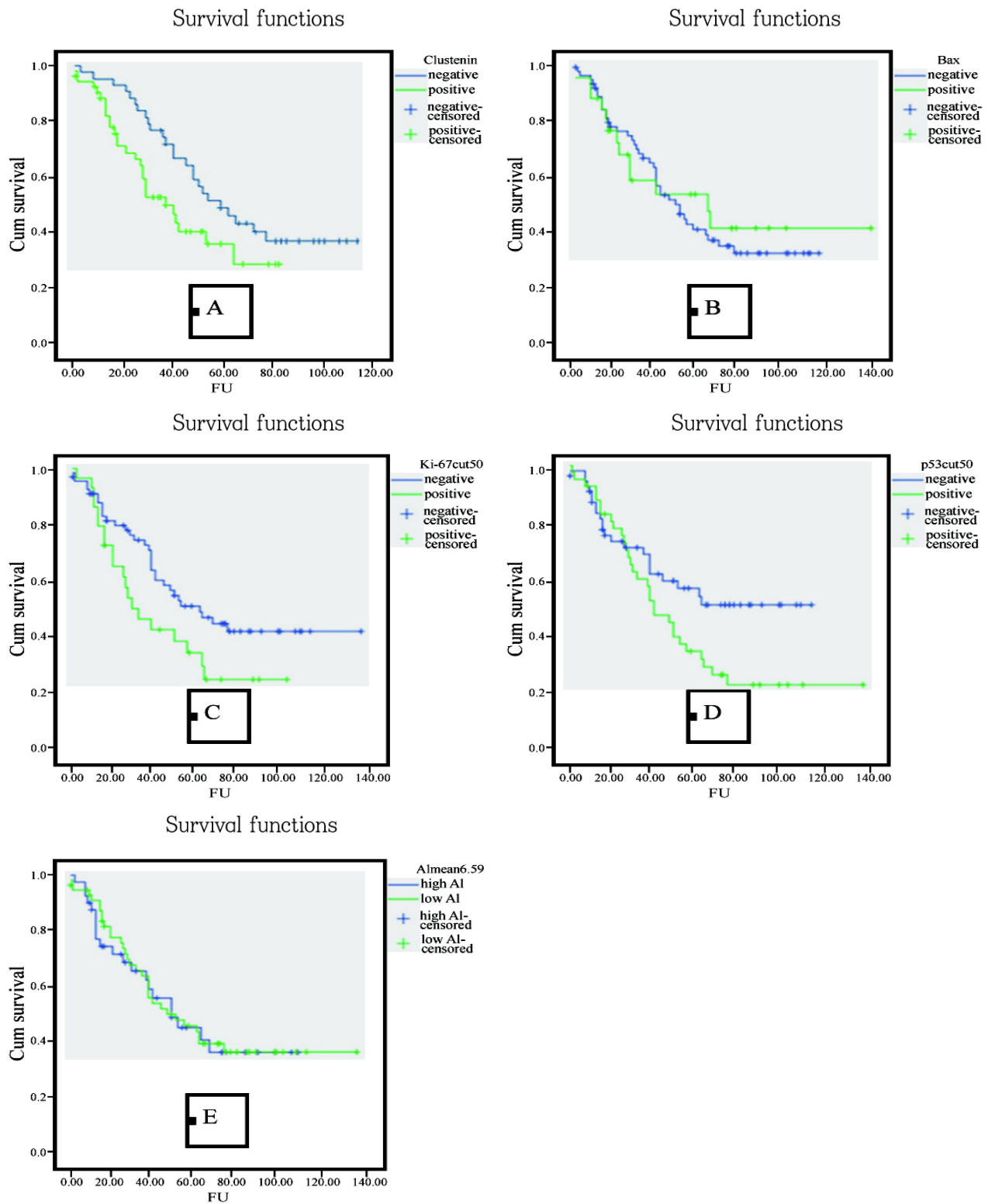
\*P-values are for chi-square test.

Table 5. Univariate and multivariate survival analysis of 96 patients with surface epithelial ovarian carcinomas

Overall survival	Significance univariate <sup>†</sup>	Significance multivariate <sup>†</sup>	HR	95% CI
Age ( $\leq 50$ vs $>50$ yr)	0.1439	0.658	0.992	0.548~1.796
Stage (I, II vs III, IV)	$<0.001$	$<0.001$	14.837	4.712~46.718
Histologic type (serous vs others)	0.0423	0.774	0.87	0.337~2.249
Universal grade (1, 2 vs 3)	0.0022	0.453	1.125	0.534~2.372
Size ( $\leq 10$ cm vs $>10$ cm)	0.0456	0.325	0.839	0.413~1.702
Laterality (unilateral vs bilateral)	$<0.001$	0.367	0.553	0.247~1.237
Clusterin (negative vs positive)	0.0574	0.106	1.467	0.773~2.785
Bax (negative vs positive)	0.7568	0.487	0.83	0.368~1.871
p53 (negative vs positive)	0.055	0.940	0.963	0.486~1.910
Ki-67 (negative vs positive)	0.0591	0.621	0.856	0.446~1.644
AI (low vs high)	0.8603	0.907	0.917	0.464~1.809

HR: hazard ratio, CI: confidence interval, AI: apoptotic index.

\*log-rank test, <sup>†</sup>Cox regression hazard model.



**Fig. 3.** Kaplan Meier analysis of overall survival of patients with epithelial ovarian carcinoma according to the overexpressions of (A) Clusterin ( $P=0.0574$ ), (B) Bax ( $P=0.7568$ ), (C) Ki-67 ( $P=0.0591$ ), (D) p53 ( $P=0.0550$ ), and (E) AI ( $P=0.8603$ ) (log-rank test). FU: follow up, AI: apoptotic index.



## 2) Clusterin, bax, p53의 발현과 세포사멸지수 (AI)와의 연관성

세포사멸지수는 bax 음성군에서 31.9%, bax 양성군에서 66.7%로 유의한 차이가 있었고 ( $P=0.002$ ), 다른 지표자들의 경우 세포사멸지수의 차이가 없었다.

## 4. 상피성난소암종에서 임상병리학적 소견, clusterin, bax, p53, Ki-67 발현 및 세포사멸지수와 생존율의 연관성

Log-rank 검정법을 통한 단변량 분석에서는 병기, 조직학적 유형, 분화도, 암종의 크기 및 양측성 여부에 따라 생존율에 유의한 차이를 보였다 ( $P<0.05$ ). Clusterin이 양성인 경우보다 음성인 경우, p53이 양성인 경우보다 음성인 경우와 Ki-67이 양성인 경우보다 음성인 경우에 생존율이 더 높은 것으로 나타났으나 통계학적으로는 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $P=0.0574$ ,  $P=0.055$ ,  $P=0.0591$ ). Cox's proportional hazard model을 통한 다변량 분석에서는 병기만이 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ( $P<0.001$ ) (Table 5, Fig. 3).

## 고 찰

Clusterin은 종양 형성 과정과 몇몇 인간의 악성종양의 진행 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 그 기전은 첫째로 clusterin이 세포-세포간, 세포-세포하층의 상호작용을 조절함으로써 고착되지 않고도 자랄 수 있는 종양 세포의 특징을 획득하는 것, 둘째로 clusterin이 정상 세포나 암세포에서 세포사멸을 억제함으로써 종양 형성을 촉진시키는 것, 셋째로 종양 형성능력을 가진 세포들이 세포독성 단백질과의 접촉을 피해서 별다른 손상 없이 주변 조직이나 체액을 통과하여 쉽게 전이될 수 있도록 하는 clusterin의 세포 보호 기능 등으로 보고 있다.<sup>14</sup> 본 연구에서는 clusterin은 양성난소종양, 경계악성 상피난소종양에서 상피성난소암종으로 갈수록 양성인 경우가 증가하였다. 이러한 결과는 clusterin 유전자의 과발현이 양성난소종양, 경계악성 상피난소종양에서 상피성난소암종으로의 진행 과정과 밀접한 연관이 있을 수 있음을 의미한다. Clusterin에 역배열 올리고핵산을 트랜스펙션시키면 세포사멸이 증가한다

는 연구나,<sup>15</sup> small interfering RNA를 이용하여 clusterin 유전자의 기능을 손실시켰을 때 인간 종양 세포의 성장이 크게 감소하고 자발적인 세포사멸이 훨씬 증가하였다는 연구 결과<sup>16</sup>와 일치한다. Clusterin은 상이한 두 가지 생물학적 기능을 발휘하여 전세포사멸분자 또는 항세포사멸 분자로서 세포사멸에 관여한다.<sup>14</sup> 최근에 밝혀진 바에 의하면 clusterin은 동일한 53ku 단백질 전구체로부터 다른 전사 후 과정을 거치는 두 가지 아형 단백질을 코딩하는 것으로 알려져 있다.<sup>17</sup> 핵 clusterin은 세포사멸 단백질인 것으로 알려졌으나,<sup>18</sup> 최근에 대장암 발생 과정에 관한 체내 및 체외 실험에서 핵 clusterin이 정상 대장점막에 월등히 많이 발현되어 전세포사멸 단백질로 작용할 것으로 생각되는 반면, 세포질 clusterin은 항세포사멸 단백질로 작용하는 것으로 나타났다.<sup>19</sup>

Clusterin과 세포사멸지수 간에 역상관 관계를 보일 것으로 예상하였으나 본 연구에서는 clusterin과 세포사멸지수 간에 상관관계가 없는 것으로 나타났다. Clusterin 염색이 세포질내 발현이 보였음에도 불구하고 세포사멸지수와 연관성이 없는 것으로 나타났는데 이는 세포질 clusterin의 발현과 세포사멸지수와 연관성이 없는 것으로 보고한 Xie 등<sup>20</sup>의 연구 결과와 일치하였다. 종양억제유전자인 p53과 전세포사멸 유전자인 bax는 세포사멸 신호체계에서 핵심적인 조절자이다. p53 유전자는 유전자 손상을 가지고 있는 세포가 복제되는 것을 방지하고 세포 주기의 진행을 중단시키며, DNA 복제 과정에 심각한 손상이 있는 경우에는 bax 유전자를 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도하는 방법으로 악성세포가 복제되는 것을 억제한다. 그러나 p53 유전자에 변이가 생기면 bax와 같은 하부신호전달자를 유도하지 못하게 되므로 세포주기의 진행을 중단시키지 못하거나 세포사멸 유도에 차질이 생기게 된다. 최근에는 p53유전자의 변이나 결손이 상피성 난소암 이외에 대장, 유방, 방광, 폐에서 기원한 악성종양에서도 밝혀졌고, p53유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서만 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암종에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고 있다.<sup>21</sup> p53이 면역조직화학적방법에서 발견되는 것은 p53에 돌연변이가 일어났거나,<sup>22,23</sup> 기능에 이상이 생겼다는 것이므로,<sup>24</sup> 세포사멸 연쇄과정에 이상이 생겼다고 추정할 수 있다. Bax는 직접적인 미토콘드리아 활성화체로, cytochrome c의 유리를 매개하고, 미토콘드리아의 투

과성을 변화시키는 역할을 한다. Cytochrome c는 APAF-1과 활성 복합체를 형성하여 procaspase-9을 증가시켜 하부 caspase 연쇄반응을 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도한다. 본 연구에서는 p53과 함께 p53의 중요한 하부 신호 전달자인 bax의 발현 양상을 검색한 바 경계악성 상피난소종양에서 난소암종으로 갈수록 p53 양성인 경우가 의미 있게 증가하였으나, bax는 그렇지 않은 것으로 나타났으며, p53 발현과 bax 발현 간에도 연관성이 없었다. Wild p53은 bax 유전자의 전사를 촉진시키고,<sup>25</sup> wild p53이 과발현될 경우 bax의 발현이 증가하지만,<sup>26</sup> p53이 돌연변이에 의해 비활성화된다고 해서 bax의 발현이 감소하지는 않는데, 이는 bax 유전자 발현의 조절이 p53에 의해서만 일어나는 것이 아님을 의미한다.<sup>27</sup> p53의 과발현은 난소암종에서 병기, 조직학적 유형, 분화도 및 양측성 여부와 밀접한 연관이 있었고, p53 음성인 군보다 양성인 군에서 Ki-67 양성인 경우가 유의하게 더 많았다. p53의 과발현이 예후와의 관련성에 관해서는 상반된 결과들이 있는데, 몇몇 연구들에서는 면역조직화학적방법에서 p53이 과발현되는 경우 예후가 좋지 않다고 한 반면,<sup>28-33</sup> 다른 연구자들은 난소암종에서 p53

의 과발현 여부로 예후를 예측할 수 없다고 하였다.<sup>34-38</sup> 세포증식지수는 인간의 여러 가지 악성종양에서 예후 또는 다른 임상병리학적 양상들과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>39</sup> 세포증식 지표자인 Ki-67은 G0를 제외한 모든 세포주기에서 발현된다. 본 연구에서 Ki-67은 경계악성 상피난소종양에서 난소암종으로 갈수록 Ki-67 양성인 경우가 의미 있게 증가하였고, 병기, 조직학적 유형, 분화도, 양측성 여부와 밀접한 연관이 있는 것으로 나타나 임상조직학적 요소와의 관련성이 p53과 비슷한 양상을 보였다.

요약하면 난소암종 환자에서 p53과 Ki-67은 분화도가 나쁜 난소암종에서 과발현하여 환자의 예후를 예측하는 지표자로 활용될 수 있다. Clusterin, p53, Ki-67의 과발현은 경계영역 성난소종양보다 난소암종에서 많았다. 이를 기초로 하여 현재 여러 암종에서 clusterin 표적치료에 대한 연구가 진행 중인 것처럼,<sup>40</sup> clusterin을 이용하여 난소암종의 치료 예후를 예측하고, 난소암종에서도 새로운 표적치료가 가능한 환자군을 선택하는 데 clusterin을 사용할 수 있을지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

## 참고문헌

1. Ministry of Health and Welfare. Annual Report of the Korea Central Cancer Registry. Seoul: Ministry of Health and Welfare; 2009.
2. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
3. Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. J Clin Oncol 2003; 21(10 Suppl): 200s-5s.
4. Ozols RF, Rubin SC, Thomas GM, Robboy SJ. Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, editors. Principles and practice of gynecologic oncology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 981-1058.
5. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, et al. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. Cancer Res 2000; 60: 6281-7.
6. Aronow BJ, Lund SD, Brown TL, Harmony JA, Witte DP. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 725-9.
7. Fratelli M, Galli G, Minto M, Pasinetti GM. Role of clusterin in cell adhesion during early phases of programmed cell death in P19 embryonic carcinoma cells. Biochim Biophys Acta 1996; 1311: 71-6.
8. Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. J Biol Chem 1999; 274: 6875-81.
9. Murphy BF, Kirsbaum L, Walker ID, d'Apice AJ. SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. J Clin Invest 1988; 81: 1858-64.
10. O'Sullivan J, Whyte L, Drake J, Tenniswood M. Alterations in the post-translational modification and intracellular trafficking of clusterin in MCF-7 cells during apoptosis. Cell Death Differ 2003; 10: 914-27.
11. Parczyk K, Pilarsky C, Rachel U, Koch-Brandt C. Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120: 186-8.
12. Steinberg J, Oyasu R, Lang S, Sintich S, Rademaker A, Lee C, et al. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. Clin Cancer Res 1997; 3: 1707-11.
13. Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK. Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. Am J Pathol 2000; 157: 393-9.
14. Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34: 1430-48.
15. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). Cancer Res 1995; 55: 2431-7.
16. Trougakos IP, So A, Jansen B, Gleave ME, Gonos ES. Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. Cancer Res 2004; 64: 1834-42.

17. Wong P, Ulyanova T, Organisciak DT, Bennett S, Lakins J, Arnold JM, et al. Expression of multiple forms of clusterin during light-induced retinal degeneration. *Curr Eye Res* 2001; 23: 157-65.
18. Leskov KS, Klokoy DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 11590-600.
19. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 2004; 23: 2298-304.
20. Xie D, Lau SH, Sham JS, Wu QL, Fang Y, Liang LZ, et al. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 277-83.
21. Kim YJ, Nam DG, Lee JK, Cho SH, Kim KT. P21 and p53 expression in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Korean J Obstet Gynecol* 2007; 50: 1695-705.
22. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
23. Skilling JS, Sood A, Niemann T, Lager DJ, Buller RE. An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene* 1996; 13: 117-23.
24. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
25. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
26. Hermann S, Sturm I, Mrozek A, Klosterhalfen B, Hauptmann S, Dorken B, et al. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92: 805-11.
27. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, Benter T, Luck HJ, Wolff G, et al. Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer* 2000; 87: 517-21.
28. Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 341-9.
29. Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Givens SS, Zhou Z, Miller GA. Quantification of p53 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 435-8.
30. Henriksen R, Strang P, Wilander E, Backstrom T, Tribukait B, Oberg K. p53 expression in epithelial ovarian neoplasms: relationship to clinical and pathological parameters, Ki-67 expression and flow cytometry. *Gynecol Oncol* 1994; 53: 301-6.
31. Klemi PJ, Pylikkanen L, Kiilholma P, Kurvinen K, Joensuu H. p53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 1201-8.
32. Levesque MA, Katsaros D, Yu H, Zola P, Sismondi P, Giardina G, et al. Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer* 1995; 75: 1327-38.
33. Viale G, Maisonneuve P, Bonoldi E, Di Bacco A, Bevilacqua P, Panizzoni GA, et al. The combined evaluation of p53 accumulation and of Ki-67 (MIB1) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. *Ann Oncol* 1997; 8: 469-76.
34. Eltabbakh GH, Belinson JL, Kennedy AW, Biscotti CV, Casey G, Tubbs RR, et al. p53 overexpression is not an independent prognostic factor for patients with primary ovarian epithelial cancer. *Cancer* 1997; 80: 892-8.
35. Hartmann LC, Podratz KC, Keeney GL, Kamel NA, Edmonson JH, Grill JP, et al. Prognostic significance of p53 immunostaining in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 64-9.
36. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, et al. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 2979-84.
37. Niwa K, Itoh M, Murase T, Morishita S, Itoh N, Mori H, et al. Alteration of p53 gene in ovarian carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1994; 70: 1191-7.
38. Silvestrini R, Daidone MG, Veneroni S, Benini E, Scarfone G, Zanaboni F, et al. The clinical predictivity of biomarkers of stage III-IV epithelial ovarian cancer in a prospective randomized treatment protocol. *Cancer* 1998; 82: 159-67.
39. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
40. Biroccio A, D'Angelo C, Jansen B, Gleave ME, Zupi G. Antisense clusterin oligodeoxynucleotides increase the response of HER-2 gene amplified breast cancer cells to Trastuzumab. *J Cell Physiol* 2005; 204: 463-9.

**= 국문초록 =**

**목적:** 상피성난소종양에서 clusterin, bax, Ki-67, p53의 발현과 세포사멸지수에 관해 알아보고, 각 지표의 발현이 상호 간에 어떤 연관성을 갖는지, 각 지표의 발현이 전체 생존율과 연관이 있는지 알아보려고 하였다.

**연구 방법:** 낭선종 22예, 경계악성 상피난소종양 44예, 상피성난소암종 96예의 조직학적, 임상병리학적 양상을 후향적으로 분석하였다. 파라핀 포매조직을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하여 clusterin, bax, Ki-67, p53의 발현 양상과 세포사멸지수를 분석하였다.

**결과:** Clusterin, p53, Ki-67의 과발현은 상피성난소암종에서 유의하게 많았고, p53과 Ki-67의 과발현은 높은 병기, 나쁜 분화도, 양측성인 상피성난소암종에서 유의하게 많았다. 세포사멸지수는 bax가 과발현된 군에서 높았으나 clusterin이나 p53의 발현과는 유의한 연관성이 없었다. Clusterin, p53 및 Ki-67의 과발현은 상피성난소암종 환자의 전체 생존율과 유의한 연관성이 없었다.

**결론:** 난소암종 환자에서 p53과 Ki-67은 분화도가 나쁜 난소암종에서 과발현하여 환자의 예후를 예측하는 지표자로 활용될 수 있다. Clusterin의 과발현은 경계악성 피난소종양보다 난소암종에서 많아 향후 clusterin 과발현을 보이는 상피성난소암종 환자에서 표적치료에 대한 연구를 시도할 가치가 있다.

**중심단어:** 상피성난소종양, clusterin, bax, Ki-67, p53

---