

유방암의 원발 종양 및 전이 림프절의 p53 변이양상 및 MIB-1 Index 비교

고려대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

민연기 · 조성진¹ · 김남렬 · 조민영 · 정석인 · 배정원 · 원남희¹ · 서성옥 · 김영철 · 구범환 · 황정웅

Correlation between p53 and MIB1 Index Expression of Primary Tumor and Metastatic Lymph Node in Breast Cancer

Youn Ki Min, M.D., Seong Jin Cho, M.D.¹, Nam Ryeol Kim, M.D., Min Young Cho, M.D., Suk In Jung, M.D., Jeoung Won Bae, M.D., Nam Hee Won, M.D.¹, Sung Ock Suh, M.D., Young Chul Kim, M.D., Bum Whan Koo, M.D. and Cheung Wung Whang, M.D.

Departments of Surgery and ¹Pathology, Korea University Medical College, Seoul, Korea

Purpose: This study was designed to elucidate the biology of cancer metastasis and differences in the biologic status between primary tumors and metastatic lymph nodes of invasive breast cancer by comparing the well known prognostic factors p53 gene mutation, p53 protein expression and the MIB-1 index. An additional goal was to investigate the p53 mutational pattern of breast cancer patients.

Methods: We used the PCR-SSCP method to detect p53 gene mutation and immunohistochemical staining to establish p53 protein expression and the MIB-1 labelling index in 25 primary tumors and metastatic lymph nodes from breast cancer patients. We then made a comparison the between primary tumors and the metastatic lymph nodes.

Results: The results indicated a correlation between histologic grade and p53 gene mutation as well as p53 protein expression, but showed no correlation to MIB-1 labelling index. The concordance rates of p53 gene mutation and p53 protein expression between the primary tumors and metastatic lymph nodes were 72% and 100%, respectively.

Three cases showed a different mutated exon number between the primary tumors and the metastatic lymph nodes. Some cases showed p53 gene mutation only in the primary tumors, but while other cases only in the metastatic lymph nodes. The MIB-1 labelling index increased with tumor grade. The p53 altered group show a higher mean MIB-1 index than the non altered group's in both the primary tumors and metastatic lymph nodes.

Conclusion: p53 gene mutation is not consistent with p53 protein expression and there are some differences in p53 gene mutation between primary tumors and metastatic lymph nodes in breast cancer. Therefore, metastatic tumor have different characteristics from those of primary tumors. In breast cancer, metastasis is regulated not only by an up-regulating mechanism but also by a down-regulating mechanism. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2001;4: 152-160)

Key Words: Breast cancer, p53 gene mutation, p53 protein expression, MIB-1 index

중심 단어: 유방암, p53 유전자 변이, p53 단백질발현, MIB-1 index

서론

유방암은 서구 여성에 흔한 암으로 알려져 있으나 최근 한국 여성에 있어서도 그 발생이 증가하는 경향이 있으며 빈도가 높은 암의 하나로 인식되고 있다. 최근 국내외적으로 유방암의 종양 특성을 밝혀 환자의 예후 및 치료에 응용하려는 노력들이 있었다. 특히 분자생물학 기법의 발전으로 유방암과 관련된 많은 암 유전자와 종양 억제 유전자가 발견되었으며, 그러한 유전자 및 유전자에 의해 생성되는 단백질 발현 양상과 그 기능에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그중 유방암뿐만 아니라 대장암 등 많은 암의 발생과정과 관련이 있을 것으로 생각되어지는 p53 유전자의 소실 및 돌연변이 발생은 종양발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.(1,2) p53 유전자는 인체에서 17번 염색체 단완 13.1 (17p13.1)에 위치하고 약 20 kb

책임저자 : 배정원, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 부속 안암병원 일반외과
☎ 136-705, 고려대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-920-5305, Fax: 02-928-9231
E-mail: kujwbae@unitel.co.kr

접수일 : 2001년 8월 22일, 게재승인일 : 2001년 9월 10일
본 논문의 내용은 제3차 아시아유방암학회에서 구연되었음.

의 11개의 exon으로 구성되어 있으며(3) 정상에서는 p21, cdc 등의 주요한 세포주기 조절인자들과 작용하여 비정상 세포의 G1/S 주기에서 세포 성장을 억제시켜 손상된 DNA를 회복시키거나 세포사멸(Apoptosis)을 유발시키는데,(4-7) 이 유전자에서 변이가 발생하면 정상 p53유전자의 기능이 비 활성화됨으로써 종양발생에 기여한다고 알려져 있다.(8-10) 이중 유전자 변이는 11개의 exon중 118 codon과 309 codon 사이, 즉 exon 5에서 8 사이에서 주로 일어난다.(11,12) 유방암에 있어서도 이러한 p53 유전자 변이는 종양발생에 있어서 중요한 작용을 할 것으로 생각되며 유방암에서의 p53 유전자 변이 및 단백질 발현양상에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 그 결과는 연구마다 상이하다.(13,14) 저자들은 본 연구에서 p53 단백질에 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP 분자생물학적 방법을 이용한 p53유전자 변이를 유방암의 원발 종양과 전이된 액와 림프절의 종양조직에서 동시에 검토하여, 두 종양조직 간의 p53 유전자 변이의 차이를 알고자 하였으며, 종양의 중요한 예후 추정 인자인 종양의 조직학적 분화도와 증식 능 인자로 알려진 MIB1 index와의 상관관계를 비교하여 원발 종양과 전이종양의 분자생물학적 특성을 알고자 하였다.

방 법

1) 연구대상

1993년부터 1996년까지 고려대학교병원에서 유방암으로 진단받고 변형 근치유방절제술을 통해 액와 림프절 전이가 확인된 침윤성 관암종(Invasive ductal carcinoma)으로서 조직 및 파라핀 블록 보관상태가 양호한 25예를 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 44세이었으며 나이 분포는 22세에서 56세이었다. 각 원발 종양의 Bloom과 Richardson에 따른 조직학적 등급은 grade I이 11예, II가 10예이었으며 III가 4예였다.

2) 방법

종양세포가 확인된 원발 종양조직 및 전이 림프절 조직을 대상으로 Bloom & Richardson 조직등급, 면역화학염색에 의한 p53 단백질 발현 및 MIB-1 labelling index, PCR-SSCP 방법을 이용한 p53 유전자 변이양상을 조사하였다.

(1) 병리 조직학적 검색: 수술을 통해 절제된 유방 조직을 수술 즉시 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정하고, 1 cm 간격의 연속 절편을 내어 종양 부위를 확인하여 통상적인 외과병리학적 검색 후 조직 표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4~5 μ m의 두께로 박절한 후 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하고 슬라이드를 광학 현미경으로 반복하여 검경 후 Bloom & Richardson이 제시한 조직학적 등급과 핵등급에 따라

종양의 등급을 결정하였다.

(2) p53 단백질 및 MIB1 index에 대한 면역조직화학적 염색반응 평가: 원발 종양 및 액와 림프절의 파라핀 포매조직을 5~6 μ m 두께로 절편을 만들어 한 절편을 hematoxylin-eosin 염색을 하여 종양세포를 확인하고, 다른 한 절편은 59°C 보온기에서 60분간 처리 후 100% xylene으로 5분간 탈 파라핀화하고, 100%, 95%, 75% 에탄올로 각각 3분간 순차적으로 처리 후 증류수로 함수시키고, 메탄올과 30% 과산화수소수를 15분간 작용시킨 후 극초단파를 이용하여 끓는 phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 처리 후 4°C의 PBS에 다시 5분간 처리하였다. 내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3%의 과산화수소 투여 후, 다시 PBS에 10분간 수세 후 희석된 정상 염소 혈청(Zymed, USA)을 도포하여 비 특이적 결합을 억제하고, 1 : 100으로 희석된 단 클론성의 p53 1차 항체(monoclonal mouse anti-human immunoglobulin, DO-7, Novocastra, England)로 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS액으로 세척한다. 2차항체인 biotinylated link antibody (LSAB kit, DAKO, USA)와 20분간 반응시킨 후 PBS에 세척한다. streptavidin(Zymed, USA)과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시킨다. 이후 발색반응은 diaminobenzidine으로 발색시킨 다음 Meyer's hematoxylin으로 대조염색 후 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입하였다. 염색 반응의 판정은 조직표본을 광학현미경으로 관찰하여 조직의 중심부에서 종양의 핵이 진한 적갈색으로 염색되는 것이 전체 종양세포에 대해 0~5%인 경우를 음성(-), 5~25%를 1+, 25~50%를 2+, 50% 이상을 3+로 하였다(Fig. 1A).

그러나 실험성적의 정리 시에는 크게 양성, 음성으로만 구분하였으며 염색의 강도에 따른 구분은 하지 않았다.

MIB1 index는 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절한 뒤 saline 또는 poly-L-lysine이 처리된 slide에 얹어 통상의 방법대로 탈 파라핀화하고 증류수로 씻은 뒤 3% 과산화수소로 5분간 처리하였다. 다음 10 mM citrate buffer에 담긴 채 750 W microwave에 5분 그리고 trypsin에 5분 처리하고 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 세척한 뒤 정상 쥐 혈청으로 20분간 반응시켰다. 여기에 150배 희석된 MIB1 단 클론항체(DACO® Denmark)로 30분간 반응시켰다. 발색은 diaminobenzidine을 사용하였고 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 판독은 10개의 고배율 시야에서 전체 암세포에 대한 염색된 세포의 비율을 측정하였으며 평균값을 labeling index로 결정하였다(Fig. 1B).

(3) PCR-SSCP 법에 의한 p53 유전자 exon 5, 6, 7, 8에 대한 변이의 검출

① 암조직에서 DNA 추출: 생검조직 또는 파라핀 포매조직을 박편 절단기를 사용하여 10 μ m 두께로 2개의 조직 절편을 분리하여 1.5 ml Eppendorf tube에 담았다. 이때 시료들간의 상호 오염을 방지하기 위해 조직 절단에 사용하

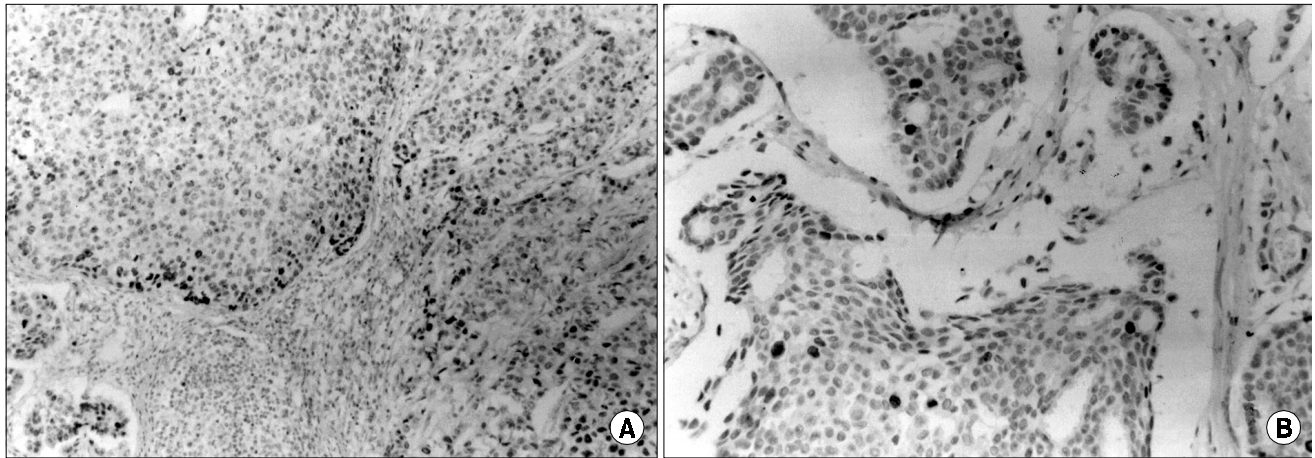


Fig. 1. The immunohistochemical stain of p53 protein shows diffuse strong positive reaction in the nuclei of metastatic infiltrating ductal carcinoma (1A), and focal positive MIB-1 immunoreactivity is noted in the primary infiltrating ductal carcinoma, grade I (1B).

Table 1. p53 primer sequence

Exon	Sense	Antisense	Product size (bp)
5	5'-ATC-TAC-AGT-CCC-CCT-TGC-CG-3'	5'-GCA-ACT-GAC-CGT-GCA-AGT-CA-3'	293
6	5'-TTC-CTC-TTC-CTG-CAG-TAC-TC-3'	5'-AGT-TGC-AAA-CCA-GAC-CTC-AG-3'	408
7	5'-GTG-TTG-CCT-CCT-AGG-TTG-GC-3'	5'-CAA-GTG-GCT-CCT-GAC-CTG-GA-3'	139
8	5'-CCT-ATC-CTG-AGT-AGT-GGT-AT-3'	5'-CCA-AGA-CTT-AGT-ACC-TGA-AG-3'	330

는 칼은 한 시료를 자른 후 xylene으로 깨끗이 닦았으며 기타 모든 시약 및 기구들은 1회용 또는 소독하여 사용하였다. 이들 파라핀 조직을 xylene으로 2회 탈 파라핀하고 0.5 ml absolute ethanol로 pellet을 2회 세척한 후 2~3방울의 acetone을 가한 다음 58°C에서 15분간 방치하였다. 건조된 시료를 1ml의 digestion buffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.5% SDS)에 넣고 proteinase K 용액(20 mg/ml) 5 μ l를 넣어 처리하였다. DNA 분리를 위한 proteinase K는 Boehringer Mannheim으로부터 구입하였으며, water saturated phenol은 Sigma에서 구입하였다. 파라핀 포매조직인 경우는 54°C에서 하루밤 동안, 생검 조직인 경우는 54°C에서 6~7시간 놓아두어 세포를 용해시키고 단백질을 분해시켰다. 이 중 500 μ l를 새 튜브로 옮기고 여기에 동일 부피의 phenol/chloroform (1 : 1)를 넣고 추출했다. 깨끗한 DNA용액을 얻을 때까지 이 작업을 계속 반복했다. 50 μ l의 3.5 M sodium acetate와 1 ml의 100% ethanol을 넣고 -20°C에서 30분간 방치한 후, 14,000 rpm 4°C로 30분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다.

DNA는 1 ml의 70% ethanol로 수세한 후 Speed-Vac Concentrator로 건조시켰다. DNA pellet을 증류수 200 μ l로 녹이고 4°C에 보관하였다. 이렇게 pellet형태로 얻어진 DNA를 증류수에 완전히 녹여서 분광흡광기(spectropho-

meter)로 DNA의 농도를 측정한 다음 PCR반응에 사용하였다.

② Polymerase Chain Reaction (PCR)

ㄱ) Primers: PCR은 한국생공으로부터 구입한 Premix-top을 이용하여 수행하였고, DNA integrity 측정용(internal amplification control)으로서 human β -globin specific primer (한국 생공)를 사용하고, PCR에 이용된 primer 염기서열은 Table 1과 같으며 한국생공에 의뢰하여 합성하였다 (Table 1). Agarose gel 전기영동이나 polyacrylamide gel 전기영동에 사용된 agarose, polyacrylamide, N,N'-bisacrylamide, tris-base, ammonium persulfate, TEMEN, EDTA, boric acid, polyacrylamide gel의 staining에 이용된 silver nitrate, sodium carbonate, ethanol, nitric acid, acetic acid는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하거나 그와 같은 등급의 시약을 사용하였다.

ㄴ) Polymerase chain reaction방법: 반응액 총량을 시료당 25 μ l로 하고, reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin), 각각 20 μ M 씩의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer Mannheim, Germany), primer, template DNA 및 Taq DNA polymerase (Promega, USA)와 증류수를 차례로 혼합하고, PCR용 premixed 용액에 조직에서 분리한 DNA 200 ng과 forward 및

reverse primer 각 50 pmole을 넣고, mineral oil로 반응액을 덮은 후 아래 도표와 같은 방식으로 denaturation, annealing, extension을 계획하고 automatic thermal cycler (Takara)에서 PCR을 수행하였다. Exon 8의 경우는 annealing 온도를 55°C로 하는 것 이외에는 위와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR산물의 일부를 취하여 1.2% agarose gel에서 30분간 전기영동(electrophoresis)하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide용액에 염색하여 ultra-violet light하에서 DNA증폭 여부를 확인한 다음 polaroid로 촬영하여 결과를 남기고 SSCP를 수행하기까지 -20°C에 보관하였다.

③ **Single Strand DNA Conformation Polymorphism (SSCP)**; 15 μ l의 PCR 산물에 denaturing solution (95% formamide, 0.05% bromophenol blue) 15 μ l를 넣고 끓는 물에서 3분간 둔 후 급히 얼음에 식힌 후, 12.5% polyacrylamide gel (15 cm \times 15 cm \times 0.75 mm)에 load하고 200 V로 16시간 정도 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 다음과 같은 방법으로 염색했다. Gel을 10% ethanol에 5분간 담가둔 후 1% nitric acid에 3분간 담가 두었다.

0.012 M silver nitrate 용액에 20분간 담그어 두고 증류수로 씻어준 후 0.28 M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde 용액으로 발색시켰다. DNA band가 적절한 진하기로 염색되면 10% acetic acid로 10분간 고정시키고 증류수로 씻은 후 cellophane으로 gel을 말려서 보관하였다. 정상인에서 분리한 DNA로부터 얻은 PCR 생성물을 같이 전기영동하고 환자시료를 그 결과와 비교하여 p53 유전자의 돌연변이 여부를 확인하였다(Fig. 2).

(4) **자료 및 통계학적 분석**: 원발 종양과 액와 림프절 전이종양의 p53 단백질 발현, p53 유전자 변이 및 DNA 배수성의 상호관련성과 병리 조직학적 예후인자와의 관련성은 SPSS/PC+ 프로그램을 이용하여 chi-square test로 검정하였으며 MIB1 labeling Index의 평균값의 비교는 Student's t-test로 비교하였고 유의수준은 p-value 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 정의하였다.

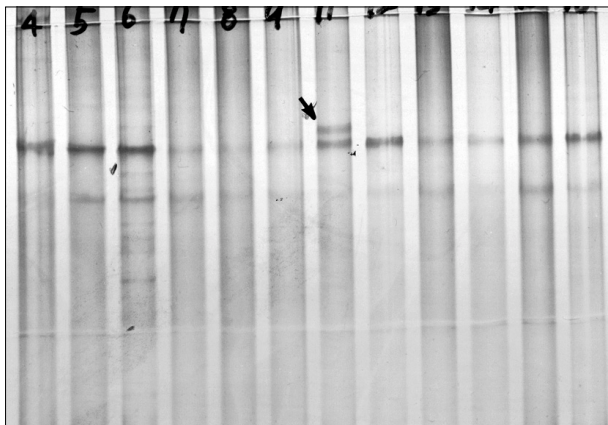


Fig. 2. SSCP analysis of exon 5 and exon 7 of p53 gene, Mobility shift is observed (arrow).

결 과

1) 일반적 특징

연구에 포함된 환자는 25예로 모두 침윤성 관암종이었고 모두 액와림프절 전이를 보인 환자들이었다. 종양의 크기는 최소 1.6 cm에서 10 cm 사이였으며, 2 cm 미만인 경우가 4예, 2 cm 이상 5 cm 미만인 예가 17예, 5 cm 이상이 4예이었다. Bloom & Richardson 등급에 따른 조직학적 분화도는 I, II, III 등급이 각각 11, 10, 4예이었다.

2) 원발 종양과 전이 림프절의 p53 유전자 변이 및 p53 단백질 발현의 비교(Table 2)

p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8에서의 돌연변이 검색결과 원발 종양에서는 총 10예(40%)에서 양성을 나타내었으며, 전이 림프절에서는 8예(32%)에서 양성이었다. 원발 종양과 전이 림프절의 p53 유전자 변이의 양성 일치율은 6예(24%)이었다. 또한 원발 종양에서 p53 유전자변이 양성이었으나 전이 림프절에서 음성인 예는 4예이었다. 반대로 원발 종양에서 음성이었으나 전이 림프절에서 양성인 예가 2예이었다.

p53 단백질 발현은 원발 종양 25예 중 12예(48%)에서 양성을 보였으며, 전이 림프절 역시 12예(48%)로 같은 양성 발현율을 보였으며, 원발 종양과 전이 림프절의 p53 단백질 발현은 일치하는 것으로 나타났다.

3) 원발 종양의 종양등급에 따른 p53 유전자 변이 및 p53 단백질 발현, MIB-1 Labelling 지수 양상(Table 3)

p53 유전자 변이는 원발 종양의 등급 I, II, III인 예에서 각각 18%, 40%, 100%의 변이율을 보여 종양 등급이 높을수록 양성 변이율이 높게 나타났다. p53 단백질 발현은 각각 36%, 40%, 100%로 역시 종양 등급과 유의한 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$). 평균 MIB-1 labelling index는 종양등

Table 2. Comparison of p53 gene mutation and p53 protein expression between primary tumor and metastatic node

	Primary tumor	Metastatic node
p53 gene mutation	Positive 10 (40%)	Positive 6 (24%) Negative 4 (16%)
	Negative 15 (60%)	Positive 2 (8%) Negative 13 (52%)
p53 protein expression	Positive 12 (48%)	Positive 12 (48%)
	Negative 13 (52%)	Negative 13 (52%)

급 I, II, III인 예에서 각각 33.70 ± 11.25 , 47.52 ± 13.73 , 58.47 ± 18.58 로 종양등급이 높을수록 높게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다($p > 0.05$).

4) PCR-SSCP에 의한 원발 종양 및 전이 림프절에서 p53 유전자 변이의 exon별 양상(Table 4, 5, 6)

원발 종양의 p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8에서 변이를 보인 예는 각각 3예, 2예, 6예, 0예로 변이를 가장 많이 일으킨 exon은 7번이었다. 전이 림프절에서는 각각 4예, 1예, 3예, 2예로 exon 5번에서 가장 많은 변이를 일으킨 것으로 나타났다. 두 곳 이상의 exon에서 변이를 일으킨 경우도 있었으며 예로 #22번 예에 있어서는 원발 종양에서 exon 5, 7에서 변이가 있었으며 #14번의 전이 림프절에서는 exon 6, 7, 8에서 변이가 일어났다(Table 4). 원발 종양과 전이 림프절간에 p53 유전자 변이가 다른 양상으로 나타난 경우는 모두 9예로서 원발 종양에서 한곳 이상의 exon에서 변이가 있었으나 전이 림프절에서는 변이가 일어나지 않은 예가 4예(#2, #4, #5, #22), 그 반대의 예가 2예(#6, #23) 있었으며 변이된 exon번호가 서로 다른 예가 2예

Table 3. p53 gene mutation and p53 protein expression and MIB1 labeling index in the primary tumor according to the histologic grade

	Tumor grade of primary tumor			p value
	I (n=11)	II (n=10)	III (n=4)	
p53 gene mutation	2 (18%)	4 (40%)	4 (100%)	<0.05
p53 protein expression	4 (36%)	4 (40%)	4 (100%)	<0.05
MIB1 labeling index	33.70 ± 11.25	47.52 ± 13.73	58.47 ± 18.58	>0.05

Table 4. The number of cases according to mutated exon of p53 gene by PCR-SSCP in primary and metastatic node

Mutation point	Primary tumor	Metastatic node
Exon 5	3	4
Exon 6	2	1
Exon 7	6	3
Exon 8	0	2
Total	11	10

Mutation point exon 7 and of metastatic node of case #14 are exon 6, exon 7 and exon 8.

(#17, #19), 원발 종양과 같은 exon에서의 변이가 있었으나 전이 림프절에서 추가로 다른 exon의 변이를 보인 경우가 1예(#14, E6/E6, 7, 8) 있었다(Table 5). 한편 원발 종양 및 전이 림프절 모두에서 p53 유전자 변이가 일어난 예는 6예(24%)로 그중 4예에서 종양등급이 III이었으며 변이가 일어난 exon은 Table 6과 같다.

5) 원발 종양 및 전이 림프절에 있어서 PCR-SSCP에 의한 p53 유전자 변이 양상과 면역조직화학염색에 의한 p53 단백 발현과의 상관성

원발 종양에서 p53 유전자 변이와 p53 단백질이 모두 양성을 보인 예는 6예(24%)이었고 모두 음성인 경우는 9예(36%)를 보여 두 검사의 일치율은 60%이었다. 전이 림프절에서 모두 양성 발현된 예가 5예로 20%이었으며 모두 음성 발현된 예는 11예로 44%이었으며 두 검사의 일치율은 64%이었다. 원발 종양에서 p53 단백 양성 발현을 보인 환자 중 p53 유전자 변이 양성률은 54.5%로 p53 단백 음성

Table 5. Analysis of cases having different p53 gene mutations between primary tumor and metastatic node. But all cases show concordant p53 protein expression status between primary tumor and metastatic node

Case	p53 mutation	p53 protein expression	Primary tumor grade
	Primary/Metastatic	Primary/Metastatic	
#2	E7/-	-/-	I
#4	E7/-	-/-	II
#5	E7/-	-/-	II
#6	-/E5	-/-	I
#14	E6/E6,7,8	+/+	III
#17	E6/E8	-/-	I
#19	E7/E5	+/+	II
#22	E5,7/-	+/+	I
#23	-/E7	-/-	II

E = exon number; # = case number.

Table 6. Primary tumor grades of the cases having p53 gene mutation both in primary tumor and metastatic node

Case	p53 mutation	Primary tumor grade
	Primary/Metastatic	
#7	E5/E5	III
#14	E6/E6,7,8	III
#17	E6/E8	I
#19	E7/E5	II
#21	E7/E7	III
#25	E5/E5	III

Table 7. Correlation of p53 gene mutation and p53 protein expression in primary tumor and metastatic node

	p53 gene mutation			p value
	Positive	Negative	Total	
In primary tumor	n=11 (44%)	n=14 (56%)	n=25	p>0.05
p53 protein (+)	6 (54.5%)	5 (45.5%)	11	
p53 protein (-)	5 (35.7%)	9 (64.3%)	14	
In metastatic node	n=8 (32%)	n=17 (68%)	n=25	p>0.05
p53 protein (+)	5 (45.5%)	6 (54.5%)	11	
p53 protein (-)	3 (21.4%)	11 (78.6%)	14	

을 보인 군의 35.7%에 비해 높았다. 역시 전이 림프절에서도 p53 단백 양성 발현을 보였던 군에서 p53 유전자 변이 양성률이 54.5%로 p53 단백 발현 음성군의 21.4%에 비해 높았지만 모두 통계적으로 유의한 차이는 아니었다(p>0.05)(Table 7).

6) 원발 종양과 전이 림프절의 MIB-1 labelling index 비교

MIB-1 index가 원발 종양에서 전이 림프절에 비해 높게 나타난 예는 17예(68%)이었고 8예(32%)에서는 전이 림프절에서 더 높게 나타났다. 원발 종양에서 MIB-1 index가 높게 나타난 환자의 비율이 종양 등급 I, II, III로 높아짐에 따라 82%, 60%, 50%로 감소되었고, 반대로 종양 등급이 높아짐에 따라 전이 림프절에서 MIB-1 index가 원발 종양보다 높았던 환자의 비율이 18%, 40%, 50%로 증가됨을 알 수 있었다. 즉 종양 등급이 낮은 경우 MIB-1 index가 전이 림프절에 비해 원발 종양에서 더 높은 경향이 있고 종양 등급이 높을 경우 MIB-1 index가 전이 림프절에서 더 높을 가능성이 많아짐을 나타내었다(p<0.05)(Table 8).

원발 종양에서 p53 유전자 변이를 나타낸 군의 평균 MIB-1 index는 48.37±12.31로 변이를 나타내지 않은 군의 33.24±11.28에 비해 높게 나타났고 전이 림프절 역시 p53 유전자 변이를 보인 군의 MIB-1 index가 47.28±13.22로 변이를 나타내지 않은 군의 36.21±13.27에 비해 높게 나타나 원발 종양, 전이 림프절 모두 p53 유전자 변이가 있을 경우 MIB-1 index가 높게 나타남을 보여 주었다(p<0.05)(Table 9).

고 찰

유방암은 서구 여성에서 가장 높은 빈도의 악성 종양이고 우리 나라에서도 그 빈도가 점차 증가 추세에 있다. 유

Table 8. The composition of the group by their higher MIB1 index site according to primary tumor grade

	MIB1 index		p value
	Primary > Metastatic	Metastatic > Primary	
Grade I (n=11)	9 (82%)	2 (18%)	<0.05
II (n=10)	6 (60%)	4 (40%)	
III (n=4)	2 (50%)	2 (50%)	
Total	17	8	

Table 9. Mean MIB1 index of primary tumor and metastatic node according to p53 gene mutation

	p53 gene mutation		p value
	Positive	Negative	
Primary tumor	48.37±12.31	33.24±11.28	<0.05
Metastatic node	47.28±13.22	36.21±13.27	

방암에 있어서 가장 중요한 예후인자로 잘 알려진 TNM 병기는 원발 종양의 크기와 액과 림프절 전이유무와 원격 전이 유무를 기초로 평가되어진다. 이외에 조직학적 분화도 및 에스트로겐과 프로게스테론 수용체 등에 대하여도 활발히 연구되어 실제로 임상에서 환자들의 치료유형의 선택이나 예후 예측에 유용하게 사용되고 있다. 최근에는 유방암의 발생 및 경과에 관련된 종양 유전자와 종양 억제 유전자에 대해 예후인자로서의 유용성에 대한 분자 생물학적 연구가 활발히 행하여지고 있다. 대장암에서 종양유전자와 종양억제유전자의 발견이후 1990년 Vogelstein 등(2)에 의해 다단계 발암 기전이 보고되어 이제는 일련의 유전적 변이들(genetic alteration)로 정상적인 세포 성장 조절기구 및 세포주기가 파괴되어 세포의 지속적인 성장과 증식을 초래하여 악성 종양이 유발된다는 것이 분자 종양학의 기초를 이루고 있다. p53 유전자는 53,000 dalton 크기의 p53 단백을 발현시키며 인체의 17번 염색체 소실과 더불어 정상 기능이 소실되는 종양 억제유전자로 밝혀졌으며(1-3) p53 유전자에 의해 발현되는 p53 단백질은 핵내 인단백질(phosphoprotein)로서 발암 작용에서의 p53의 역할은 매우 다양하다.(15,16) 최근에는 p53 유전자가 대장암 외에도 유방, 간, 난소, 방광, 간엽조직(mesenchyme), 중추신경계, 폐 그리고 조혈기관에서 기원하는 악성종양에서도 이 유전자의 변이나 결손이 구체적으로 규명되고, p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서만 일어나는

것이 아니라 인체의 거의 모든 암종에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고 있다.(3,11) 저자들은 유방암 중 가장 많은 빈도를 보이는 침윤성관암 중 수술로써 액와 림프절 절제를 통해 원발 종양과 전이된 림프절의 전이 종양조직을 얻을 수 있었던 환자들의 표본 조직을 통해 p53 유전자의 돌연변이 및 단백 발현을 PCR-SSCP 방법과 면역조직화학검사로 검출하여 원발 종양과 전이 림프절에서의 p53 유전자의 변이 exon 양성, p53 단백 발현 양성, MIB-1 labelling index 등을 서로 비교하고 원발 종양의 등급에 따른 각각의 발현 양상과 차이를 고찰하였다. 최근 p53 유전자의 단백 산물을 간단한 면역조직화학 검사를 통해 그 발현율을 규명한 문헌은 많이 보고되어 있으나 보고 기관 및 국가, 인종에 따라 매우 다양한 차이를 보여 주고 있다. 일반적으로 유방암에서의 p53 단백 발현은 다른 여러 장기와 마찬가지로 높은 악성도, 나쁜 조직학적 분화도, 핵의 다형성, 높은 재발률, 낮은 생존율 등 나쁜 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. (17-19) Davidoff 등(20)에 의하면 p53 유전자 변이는 림프절 전이에서도 같은 양상으로 나타난다고 보고하였다. 그리고 Shimizu 등(21)의 연구에서는 원발 유방암 조직과 다른 장기에 전이된 유방암 조직에서 p53 단백 발현은 서로 일치한다고 보고하였다. 본 연구에서도 면역조직화학염색법에 의한 p53 단백 발현은 원발 종양 및 전이 림프절의 48%에서 양성 발현을 보였으며 원발 종양과 전이림프절간의 p53 단백 발현은 100% 일치하였다. 다만 PCR-SSCP법에 의한 p53 유전자 돌연변이 검출률은 40%로 면역조직화학검사로 시행한 p53 단백 양성률 48%보다 낮아서, 변이 p53 유전자와 p53 단백 양성 발현의 일치율은 24%에 그쳤으며 이는 Thompson 등(22)의 보고와 거의 일치하는 소견이었다. p53 단백질이 양성되면서 유전자 변이가 음성으로 나타난 것은 DNA 수준에서 유전자 돌연변이가 없다기보다는 PCR-SSCP법의 한계로 볼 수 있으며(23,24) PCR-SSCP법에서 p53 유전자 변이가 검출되었음에도 불구하고 p53 단백질에서 음성을 보인 경우는 missense, nonsense mutation, intronic insertional mutation, 결손(deletion) 등의 심각한 돌연변이는 있으나 만들어진 비정형 단백질의 면역성이 떨어져 통상적인 면역조직화학염색으로는 검출이 안되는 경우와 point mutation은 일어났으나 아미노산은 변하지 않아 단백질 형성에 이상이 없었을 가능성을 생각할 수 있다.(14) 따라서 p53 유전자 변이는 p53 단백질에 대한 면역조직화학염색법 뿐만 아니라 PCR-SSCP법에 의한 유전자 돌연변이의 Screening으로 상호 보완되어야 할 것으로 생각한다. 본 연구에서 p53 유전자 변이와 p53 단백 발현이 국내·외의 문헌들 보다 비교적 높은 수치인 40%와 48%의 양성률을 보인 것은 표본 선택 시 고정상태가 양호한 검체를 사용했고, DNA 추출 시 미세 절제술로 종양 부위를 비 종양 부위로부터 정확하게 분리시켜 그 발현율이

높았을 것으로 생각한다. 본 연구에서 p53 유전자 변이를 원발 종양과 전이 림프절에서 비교하였을 때 그 변이양상은 모두 일치하지는 않았다. 원발 종양에서 p53 유전자 변이 양성을 보였으나 전이 림프절에서 음성을 보인 예가 6예(24%), 반대로 원발 종양에서 음성소견을 보였으나 전이 림프절에서 양성을 보인 예가 2예(8%)에서 있었다. 그리고 p53 유전자의 11개 exon 중 가장 변이가 흔히 일어나는 곳으로 알려진 exon 5, 6, 7, 8번(11,12)에서 원발 종양과 전이 림프절의 변이된 exon을 비교할 때 원발 종양과 전이 림프절의 변이된 exon이 일치하지 않았던 9예를 살펴보면 원발 종양과 전이 림프절간에 변이된 exon의 번호가 상이하거나(예; E7/E5), 또는 어느 한쪽에서만 변이가 일어났고(예; E7/- 또는 -/E5) 혹은 어느 한쪽의 변이 exon외에 추가로 다른 exon의 변이가 더 일어났음(예; E6/E6, 7, 8)을 알 수 있었다. 이러한 결과는 유방암의 경우 원발 종양과 전이 림프절의 세포 공간에는 이질성(heterozygosity)이 있음을 뜻한다고 하겠다. 원발 종양과 전이 림프절 모두에서 p53 유전자 변이를 보였던 6예 중 변이된 exon 번호도 일치하였던 4예는 모두 종양 등급 III였다. 종양 등급에 따른 p53 단백 발현과 유전자 변이율은 종양등급 I, II 간에서는 유의한 차이를 보이지 않았으나, 발현율 100%인 종양등급 III인 종양과는 유의한 차이가 있었다. 종양의 세포 증식능을 평가하는 방법에는 1000개의 종양세포 핵에 대한 세포분열 수를 표시하는 세포분열지수(mitotic index), 세포주기에서 합성기에 있는 세포 군만을 측정하는 방법으로 triated thymidine 또는 bromodeoxyuridine을 이용하는 증식능 평가, 유세포 측정에 의한 세포의 DNA 양을 측정하는 방법 등이 있으나 최근에 세포상호간의 조직학적 형태를 유지하면서 종양세포의 증식능을 평가하는 방법으로 세포주기에 특이한 분자들에 대한 면역조직화학염색방법이 개발되었는데 이러한 분자들로는 Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p105, ribonucleotid reductase, DNA polymerase alpha 등이 있으며 특히 Ki-67 항원은 세포핵과 밀접한 연관 관계가 있으면서 세포주기에 따라 발현 정도가 다른 것으로 알려져 있으나(25,26) Ki-67이나 bromodeoxyuridine에 대한 면역조직화학적 염색방법은 반드시 신전한 조직을 이용하여야 한다는 단점이 있어 임상적 이용이나 후향적 연구에 적용하기 어려우며 이러한 단점을 극복하기 위해 Gerdes 등(27)은 재조합 Ki-67 유전자 산물을 쥐(mice)에 주입하여 제조한 단클론항체인 MIB1을 이용하여 포르말린 고정 파라핀포매 조직에서 Ki-67 항원을 염색할 수 있는 방법을 개발하였다. 유방암과 관련한 MIB1 labelling index에 관한 연구에 있어서 국내 환자를 대상으로한 고 등(28)의 연구에 의하면 MIB-1 labelling index는 종양 등급, p53 단백 양성, 낮은 핵등급과 연관성이 있으며, 호르몬 수용체의 발현이 낮을수록 높게 나타나는 것으로 보고하였다. 본 연

구에 있어서도 Table 3과 같이 종양등급이 높을수록 높은 MIB-1 index의 평균값을 보여 주었으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 그리고 종양 등급이 높을수록 MIB-1 index가 전이 종양에서 원발 종양에 비해 높은(Primary < Metastatic) 환자의 구성비율이 높아졌으며 종양 등급이 낮을수록 MIB-1 index가 원발 종양에서 전이 림프절에 비해 높은(Primary > Metastatic) 환자의 구성비가 높게 나타났다(Table 8). 본 연구에서 p53 변이가 있는 원발 종양 또는 전이 림프절은 MIB-1 labelling index의 평균값이 p53 변이가 없는 예에 비해 상대적으로 높게 나타났으며 이는 통계적으로 유의한 차이였다($p < 0.05$). 이러한 결과는 기존의 다른 연구들과도 일치하는 결과였다.(28,29)

결론

유방의 침윤성관암 원발 종양과 전이 림프절 종양조직의 p53 유전자 변이는 항상 일치하지는 않으며 변이가 일어날 경우 서로 같은 exon에서만이 아니라 서로 다른 exon의 변이를 보일 수 있으며 어떤 경우에는 원발 종양에서 p53 유전자 변이를 보여도 전이 림프절에서는 유전자 변이가 나타나지 않는 경우도 있고 또 그 반대의 경우도 있었다. 따라서 전이 종양과 원발 종양은 서로 이질성(heterogenicity)을 갖으며 원발 종양 중 전이에 적합한 형질을 갖춘 세포가 전이하였거나, 혹은 전이 후 새로운 변이에 의해 원발 종양과 다른 종양 특성을 갖게 되었음을 의미한다 하겠다. 종양등급과 p53 변이 정도는 연관성을 갖는 것으로 보인다. 그리고 세포 증식 능력을 나타내는 MIB-1 labelling index는 종양 등급이 높을수록 높게 나타나며 p53 변이 양성군에서 그 평균값이 유의하게 높게 나타남을 알 수 있었다. 따라서 원발 종양과 전이 병소의 종양 및 분자생물학적 특성은 서로 완전히 일치하지는 않으며 림프절 또는 다른 장기에 전이가 있는 유방암 환자의 예후나 종양의 생물학적 성상은 원발 종양에 발현되는 예후인자의 특성과 더불어 전이 종양의 특성에 의해서도 영향을 받을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC: Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342:705-8, 1989
- 2) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 319:525-32, 1988
- 3) Oliner JD: The role of p53 in cancer development. *Sci Ame Science and Medicine* 1994; 16-25.
- 4) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74:957-67, 1993
- 5) Lane DP: Cancer. A death in the life of p53. *Nature* 362:786-7, 1993
- 6) Williams GT, Smith CA: Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74:777-9, 1993
- 7) Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA: p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-9, 1993
- 8) Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P: p53 in colorectal cancer: Clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 63:317-25, 1991
- 9) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50:859-62, 1992
- 10) Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borresen AL, Nesland JM: Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 169:21-6, 1993
- 11) De Fromental CC, Soussi T: TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 4:1-15, 1991
- 12) Carbone D, Chiba I, Mitsudomi T: Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6:1691-2, 1991
- 13) Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennessy C, et al: p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: An immunohistochemical study. *J Pathol* 164:75-81, 1991
- 14) Varley JM, Brammar WJ, Lane DP, Swallow JE, Dolan C, Walker RA: Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene* 6:413-21, 1991
- 15) Hand PH, Thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J: Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5227-31, 1984
- 16) Thor A, Hand PH, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R: Monoclonal antibodies define different ras gene expression in malignant and benign colonic disease. *Nature* 311:562-5, 1984
- 17) Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Cappelletti V, et al: p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 85:965-70, 1993
- 18) Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L: Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1:1029-34, 1995
- 19) Heimann R, Hellman S: Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 36:1631-9, 2000
- 20) Davidoff AM, Kerns BJ, Iglehart JD, Marks JR: Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 51:2605-10, 1991

- 21) Shimizu C, Fukutomi T, Tsuda H, Akashi-Tanaka S, Watanabe T, Nanasawa T, et al: c-erbB-2 protein overexpression and p53 immunoreaction in primary and recurrent breast cancer tissues. *J Surg Oncol* 73:17-20, 2000
 - 22) Thompson AM, Anderson TJ, Condie A, Prosser J, Chetty U, Carter DC, et al: p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 50:528-32, 1992
 - 23) Wright D, Manos M: Sample preparation from paraffin-embedded tissue. In *PCR protocols, A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990; 153-8
 - 24) Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ: Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 167:225-30, 1988
 - 25) Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: Its use in histopathology. *J Pathol* 17:489-503, 1990
 - 26) Sawhney N, Hall PA: Ki-67 structure, function, and new antibodies. *J Pathol* 168:161-2, 1992
 - 27) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983
 - 28) Ko CD, Kang HJ, Kim SW, Youn YK, Oh SK, Choe KJ, et al: Assessment of MIBI (Ki-67) labeling index and correlation with other well established prognostic factors in breast cancer. *J Korean Surg Soc* 60:361-7, 2001
 - 29) Midulla C, De Iorio P, Nagar C, Pisani T, Cenci M, Valli C, et al: Vecchione A: Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res* 19:4033-7, 1999
-