

□ 원 저 □

## 비소세포폐암에서 p53유전자의 구조적 이상 및 단백질 발현이 예후에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 호흡기내과학교실<sup>1</sup>, 중앙내과학교실<sup>4</sup>

연세대학교 의과대학 병리학교실<sup>2</sup>, 내과학교실<sup>3</sup>, 흉부외과학교실<sup>5</sup>, 연세암센터<sup>6</sup>, 연세대학교 상경대학 응용통계학과<sup>7</sup>

이이형<sup>1</sup>, 신동환<sup>2</sup>, 김주형<sup>3,6</sup>, 임호영<sup>4</sup>, 정경영<sup>5</sup>, 양우익<sup>2</sup>, 김세규<sup>3</sup>,  
장 준<sup>3</sup>, 노재경<sup>3,6</sup>, 김성규<sup>3</sup>, 이원영<sup>3</sup>, 김병수<sup>6</sup>, 김병수<sup>7</sup>

= Abstract =

### Correlation of p53 Protein Overexpression, Gene Mutation with Prognosis in Resected Non-Small Cell Lung Cancer(NSCLC) Patients

Y.H. Lee M.D.,<sup>1</sup> D.H. Shin M.D.,<sup>2</sup> J.H. Kim M.D.,<sup>3,6</sup> H.Y. Lim M.D.,<sup>4</sup> K.Y. Chung M.D.,<sup>5</sup>  
W.I. Yang M.D.,<sup>2</sup> S.K. Kim M.D.,<sup>3</sup> J. Chang M.D.,<sup>3</sup> J.K. Roh M.D.,<sup>3,6</sup> S.K. Kim M.D.,<sup>3</sup>  
W.Y. Lee M.D.,<sup>3</sup> B.S. Kim M.D.,<sup>6</sup> and B.S. Kim Ph.D.<sup>7</sup>

Department of Pulmonary Medicine<sup>1</sup> and Medical Oncology<sup>4</sup>, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Department of Pathology<sup>2</sup>, and Internal Medicine<sup>3</sup> Cardiac and thoracovascular Surgery<sup>5</sup>,

Yonsei Cancer Center<sup>6</sup>, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

Department of Applied Statistics, College of Business and Economics<sup>7</sup>, Yonsei University, Seoul, Korea

**Background :** The p53 gene codes for a DNA-binding nuclear phosphoprotein that appears to inhibit the progression of cells from the G1 to the S phase of the cell cycle. Mutations of the p53 gene are common in a wide variety of human cancers, including lung cancer. In lung cancers, point mutations of the p53 gene have been found in all histological types including approximately 45% of resected NSCLC and even more frequently in SCLC specimens. Mutant forms of the p53 protein have transforming activity and interfere with the cell-cycle regulatory function of the wild-type protein. The majority of p53 gene mutations produce proteins with altered conformation and prolonged half life; these mutant proteins accumulate in the cell nucleus and can be detected by immunohistochemical staining. But protein overexpression has been reported in the absence of mutation. p53 protein overexpression or gene mutation is reported poor prognostic factor in breast cancer, but in lung cancer, its prognostic significance is controversial.

본 연구는 1992년도 한국학술진흥재단 학술연구조성 연구비의 지원으로 이루어 졌음.  
본 연구결과는 1993년도 대한내과학회 추계학술대회에서 발표 되었음.

**Method :** We investigated the p53 abnormalities by nucleotide sequencing, polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP), and immunohistochemical staining. We correlated these results with each other and survival in 75 patients with NSCLC resected with curative intent. Overexpression of the p53 protein was studied immunohistochemically in archival paraffin- embedded tumor samples using the D07(Novocastra, U.K.) antibody. Overexpression of p53 protein was defined by the nuclear staining of greater than 25% immunopositive cells in tumors. Detection of p53 gene mutation was done by PCR-SSCP and nucleotide sequencing from the exon 5-9 of p53 gene.

#### Result:

1) Of the 75 patients, 36%(27/75) showed p53 overexpression by immunohistochemical stain. There was no survival difference between positive and negative p53 immunostaining(overall median survival of 26 months, disease free median survival of 13 months in both groups).

2) By PCR-SSCP, 27.6%(16/58) of the patients showed mobility shift. There was no significant difference in survival according to mobility shift(overall median survival of 27 in patients without mobility shift vs 20 months in patients with mobility shift, disease free median survival of 8 months vs 10 months respectively).

3) Nucleotide sequence was analysed from 29 patients, and 34.5%(10/29) had mutant p53 sequence. Patients with the presence of gene mutations showed tendency to shortened survival compared with the patients with no mutation(overall median survival of 22 vs 27 months, disease free median survival of 10 vs 20 months), but there was no statistical significance.

4) The sensitivity and specificity of immunostain based on PCR-SSCP was 67.0%, 74.0%, and that of the PCR-SSCP based on the nucleotide sequencing was 91.8%, 96.2% respectively. The concordance rate between the immunostain and PCR-SSCP was 62.5%, and the rate between the PCR-SSCP and nucleotide sequencing was 95.3%.

**Conclusion :** In terms of detection of p53 gene mutation, PCR-SSCP was superior to immunostaining. p53 gene abnormalities either overexpression or mutation were not a significant prognostic factor in NSCLC patients resected with curative intent. However, patients with the mutated p53 gene showed the trends of early relapse.

---

**Key Words:** Lung cancer, p53 gene, Immunohistochemical stain, PCR-SSCP, Nucleotide sequencing, Survival, Prognosis

## 서 론

폐암은 전세계적으로 가장 흔한 악성종양의 하나로 미국에서는 전체 암 사망원인의 제1위를 차지하고 있으며<sup>1)</sup>, 한국에서는 1992년 남성 암에서 발생을 2위를 차지하고 있다<sup>2)</sup>. 우리나라 통계청의 발표에 의하면 인구

10만명당 폐암에 의한 사망률은 1985년에는 8.3이었으나 1991년에는 15.2로써 폐암에 의한 사망률이 빠른 속도로 증가하고 있음을 알 수 있다.

종양은 분자생물학적으로 암유전자(oncogene)의 활성화 또는 암억제유전자(tumor suppressor gene)의 비활성화에 의해 유발되는 것으로 설명되고 있다<sup>4,5)</sup>. 염색체 17p13.1에 존재하는 p53유전자는 돌연변이가 없는 정상유전자의 경우 종양억제유전자로 작용하고 돌연변

이가 있는 경우는 정상 p53유전자의 기능을 억제하게 되어 세포의 변성을 촉진한다<sup>6,7)</sup>. Eliyahu 등<sup>8)</sup> 및 Finlay 등<sup>9)</sup>은 ras, myc, adenovirus E1A 등을 단독 또는 조합하여 rat embryo fibroblast에 형질도입시킨 후 다시 정상 p53유전자를 전형시키면 transformed foci가 현저히 감소함을 보고하여 p53유전자가 dominant negative fashion으로 작용하는 종양억제유전자임을 증명하였고, Baker 등<sup>10)</sup> 및 Chen 등<sup>11)</sup>은 각각 대장암 및 골육종 세포주에 정상 p53유전자를 형질도입시킨 결과 암세포주의 집락형성 감소, 세포의 형태학적 변화, 그리고 성장 속도의 감소 등을 보고하여 p53유전자가 종양억제 유전자임을 다시 증명하였다.

p53유전자는 폐암, 대장암, 유방암, 그리고 위암 등<sup>7,12~14)</sup>에서 비활성화 되어 있음이 보고되어 있다. 비소세포폐암에서 p53유전자의 돌연변이는 수술적으로 절제된 예의 45~47%<sup>15,16)</sup>에서 보고되는데, p53유전자에 돌연변이가 있는 경우 돌연변이형 단백질(mutant protein)은 반감기가 4~8시간으로 정상형(wild type)의 6~20분에 비하여 현저하게 증가하여<sup>17)</sup> p53 단백질의 과발현을 보이게 된다<sup>18,19)</sup>. 이러한 기전을 이용한 p53 면역조직화학염색은 p53유전자 돌연변이의 검색 방법으로 많이 이용되고 있으나 많은 예를 대상으로 면역조직화학염색의 감수성 및 특이성을 검증한 보고는 거의 없다.

p53유전자의 돌연변이가 암환자의 예후에 미치는 영향에 관하여 Thor 등<sup>20)</sup>은 유방암 조직에서 p53 단백질을 대한 단클론항체를 이용한 면역조직화학염색 결과 p53 핵단백질의 과발현이 있는 경우 환자의 무병생존기간 및 전체생존기간 모두 유의하게 나쁜 임상 결과를 취함을 보고하였고, 또한 p53 단백질의 과발현을 보이는 유방암조직 5예를 대상으로 염기서열을 확인한 결과 이들 모두에서 돌연변이를 확인할 수 있었음을 함께 보고하였다. 폐암환자에서는 Mitsudomi 등<sup>21)</sup>이 p53유전자의 돌연변이가 유무가 환자의 생존기간에 유의한 차이가 없었음을 보고하였으나 다른 연구자들<sup>22~24)</sup>은 p53유전자의 돌연변이가 있는 경우 환자의 생존기간이 돌연변이가 없는 경우보다 짧았음을 보고하고 있어 폐암환자에서 p53유전자의 돌연변이가 유무, p53 핵단백질의 과발현 유무와 예후와의 상관관계는 아직 논란의 여지가 많

다. 이에 저자들은 한국인의 비소세포폐암에서 p53 종양억제 유전자의 돌연변이 빈도를 확인하고, 이들이 폐암 환자의 임상경과에 미치는 영향을 분석하고, 또한 p53유전자의 돌연변이 검색을 위해 많이 이용되고 있는 면역조직화학염색 및 PCR-SSCP(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) 분석의 감수성과 특이성을 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1987년 1월부터 1992년 6월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 비소세포폐암으로 진단된 환자중 병기 I-IIIa로 폐암의 근치적 절제술을 시행받은 후 임상경과를 추적중인 환자로서 수술후 특기할 만한 합병증이 없이 수술 후 1개월 이상 생존한 75예를 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

폐암환자의 파라핀 포매조직에서 여러장의 조직절편을 만들고, hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 시행하여 종양의 유무를 재검색한 후 종양의 존재가 확인된 절편을 대상으로 p53 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색을 시행하였다. 또한 파라핀포매 조직으로부터 선택적으로 종양병소를 절제하여 DNA를 추출하고 이를 이용하여 PCR-SSCP 및 nucleotide sequencing을 시행하였다.

#### 1) 면역조직화학 염색에 의한 p53 단백질의 발현 검색

폐암 조직의 p53에 대한 면역조직화학염색은 파라핀 포매조직으로부터 여러장의 조직절편을 만들어 시행하였으며 음성대조군으로는 주변 정상 폐조직을 이용하였다. 조직절편중 일부는 H-E 염색을 시행하여 병리조직학적 소견을 미리 판독하였다. p53에 대한 면역조직화학염색은 Vectastain Elite ABC kit(Vector Laboratory, U.S.A.)를 사용하여 Avidin/Biotin immunoperoxidase 방법으로 시행하였으며, p53에 대한 일차항체로는 DO7 (Novocastra, United Kingdom)을 사용하였다. 방법을

약술하면 우선 조직절편을 탈 파라핀 및 함수시킨 다음 조직을 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol에 30분간 처리한 후에 PBS buffer로 씻는다. 비특이적 항체결합을 억제하기 위하여 절편을 1:20으로 희석된 정상 blocking serum에 20분간 처리한 후 buffer로 희석한 일차항체(p53 monoclonal Ab)으로 2시간 동안 처리한다. 음성대조군으로 각 대상 조직절편에서 일차항체 대신 PBS를 사용한다. Vectastatin ABC Reagent(Avidin dehydrogenase biotinylated horseradish peroxidase H complex)로 30분간 처리한 후 peroxidase substrate solution에 2~7분간 방치후 hematoxyline 용액으로 대조염색하고 80% glycerol gelatin에 mounting한다.

면역 반응을 시각적 강도에 따라 반정량적인 등급을 주어 반응이 전혀 없는 경우를 음성으로 하였으며, 양성 반응은 전체 종양세포중 p53 발현세포의 비율로 나타내어 폐암세포의 핵에서 양성반응을 보이는 세포수가 전체 종양세포의 25%미만인 경우를 1+, 25-50%인 경우를 2+, 50-75%인 경우를 3+, 75% 이상인 경우를 4+로 하여 4단계로 나누어 판독하였다. 결과분석에서는 양성 반응을 보이는 세포수가 전체 종양세포의 25% 이상인 경우를 과발현군으로 정의하였으며, 양성반응을 보이는 세포수가 전체 종양세포의 25%미만인 경우는 음성(-)군으로 정의하였다.

## 2) 조직 절편에서 DNA의 추출

폐암조직 paraffin block에서 H-E 염색을 통하여 종양세포의 존재를 확인한 후, paraffin block에서 폐암의 조직절편을 선택적으로 절제 분리하였다. 분리된 폐암 조직에서 Wright등<sup>25)</sup>의 방법으로 DNA를 추출하였으며, 방법을 약술하면 다음과 같다. 폐암 종괴를 microtome을 이용하여 10-20  $\mu$ M의 두께로 절편을 만든 후 xylene을 처리하여 파라핀을 제거하고 digestion buffer (50mM Tris, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 20% proteinase K)로 pellet을 55°C에서 3시간 동안 용해시킨 후 95°C에서 10분간 가열하여 proteinase K를 비활성화시켰다. 용해액은 원심분리를 시행하여 잔존 파라핀 또는 조직 찌꺼기를 제거하고, DNA가 함유되어 있는 상층액을 이용하여 PCR-SSCP 분석 및 nucleotide sequencing을 위한 PCR을 시행하였다.

## 3) PCR-SSCP 분석

p53유전자의 oligonucleotide primer의 5' 말단에 end labelling 법으로 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP를 부착하여 PCR-SSCP 분석에 이용하였다. Genomic DNA(0.1  $\mu$ g)와 함께 labelled primer를 함께 tube에 넣고 Taq polymerase의 존재 하에 Gene Amp Kit (Perkin-Elmer Cetus, U.S.A.)를 이용하여 10  $\mu$ l의 완충용액을 만들어 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 시행하였다. PCR은 30 cycle 시행하며 PCR 산물 1  $\mu$ l을 45  $\mu$ l의 formamide dye 혼합물과 함께 80°C에서 3분간 가열한 후 혼합물 2  $\mu$ l를 취하여 45 mM Tris-borate 및 4 mM EDTA를 함유하는 5% polyacrylamide gel에서 30 w로 cold room 에서 3~4시간 동안 전기영동을 시행하며, 그후 gel을 여과지 위에서 건조시킨 후 자가방사기록을 시행하였다<sup>26)</sup>.

## 4) 염기서열 확인(Nucleotide sequencing)

폐암에서 p53유전자의 염기서열 확인을 위하여는 p53유전자의 5' 말단 및 3' 말단 특이 primer를 합성하여 Taq polymerase의 존재하에 PCR을 시행한 후, PCR 산물을 pGem4 plasmid vector에 삽입하여 넣었다. 이때 cloning을 위하여는 primer의 5' 말단에 EcoRI tail을 부착하여 PCR에 이용하고 pGem4 vector는 EcoRI으로 소화한 후 cloning을 시행하였다. Vector에 삽입된 PCR 산물은 HB101 균주에 형질도입하고 균주를 배양하여, DNA를 추출하고 이를 dideoxy nucleotide sequencing 법을 이용하여 5% denaturing sequencing gel에서 전기영동하여 염기서열을 확인하였다<sup>27)</sup>. 염기서열은 보고된 p53유전자 돌연변이의 대부분을 차지하고 있는 exon 5에서 9까지의 염기서열을 확인하였다<sup>28)</sup>. 염기서열 확인의 결과는 면역조직화학염색에 의한 p53 단백질 발현 결과 및 PCR-SSCP 분석의 결과와 상관관계를 함께 분석하여 각 방법의 감수성과 특이성을 검증하였다.

## 5) 통계적 분석

각 군의 기술적 통계분석을 위하여는 Student's t test와 chi-square test를 이용하였고, 생존분석은 Kaplan-Meier 및 log-rank test를 이용하였으며, p<0.05 일 때 유의적인 차이로 인정하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 임상적 특성

전체 대상환자는 75예였으며 이들의 임상적 특성은 Table 1과 같다.

### 2. p53 단백질 과발현

전체적으로 75예의 면역조직화학염색 결과 27예(36%)에서 p53 단백질의 과발현을 보였다(Table 2.3, Fig 1). 폐암의 조직형에 따른 면역조직화학염색의 양성율은 편평상피암 39예중 20예(51.3%), 선암 27예중 3예(11.1%), 대세포암 3예중 0예, 선편평상피암 4예중 3예

Table 1. Patients' Characteristics

No. of Cases	75
Sex M : F	59 : 16
Age Median(Range)	58(25-74)
Smoking History No	16
Yes	51
Histology(%)Epidermoid	39 (52.0)
Adeno	27 (36.0)
Large cell	3 ( 4.0)
Adenosquamous	4 ( 5.3)
Undifferentiated	2 ( 2.7)
Stage(%) I	15 (20.0)
II	16 (21.3)
IIIA	40 (53.3)
IIIB	4 ( 5.3)

Table 2. p53 Immunohistochemistry According to Histology

	No. of Cases	p53 status	
		Positive(%)	Negative(%)
Epidermoid	39	20(51.3)*	19(48.7)
Adeno	27	3(11.1)	24(88.9)
Large cell	3	0( 0.0)	3(100.0)
Adenosquamous	4	3(75.0)	1(25.0)
Undifferentiated	2	1(50.0)	1(50.0)
Total	75	27(36.0)	48(64.0)

\* p<0.01 vs adenocarcinoma

(75%), 미분화폐암 2예중 1예(50%)에서 p53 핵단백질의 과발현을 나타내었다. 병기별로는 I기 15예중 4예(26.7%), II기 16예중 8예(50.0%), IIIA기 40예중 15예(37.5%), IIIB 4예중 0예에서 p53 핵단백질의 과발현

Table 3. p53 Immunohistochemistry According to Stage

Stage	No. of Cases	p53 status	
		Positive(%)	Negative(%)
I	15	4(26.7)	11 (73.3)
II	16	8(50.0)	8 (50.0)
IIIA	40	15(37.5)	25 (62.5)
IIIB	4	0( 0.0)	4(100.0)
Total	75	27(36.0)	48 (64.0)

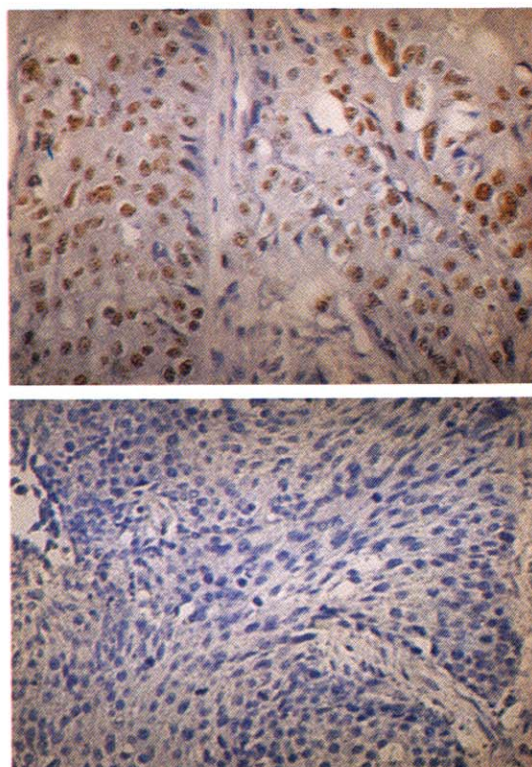


Fig. 1. Immunostaining of lung carcinoma with antibody to p53 protein. Nuclear Immunoreactivity is noted on the upper but not on the lower one.

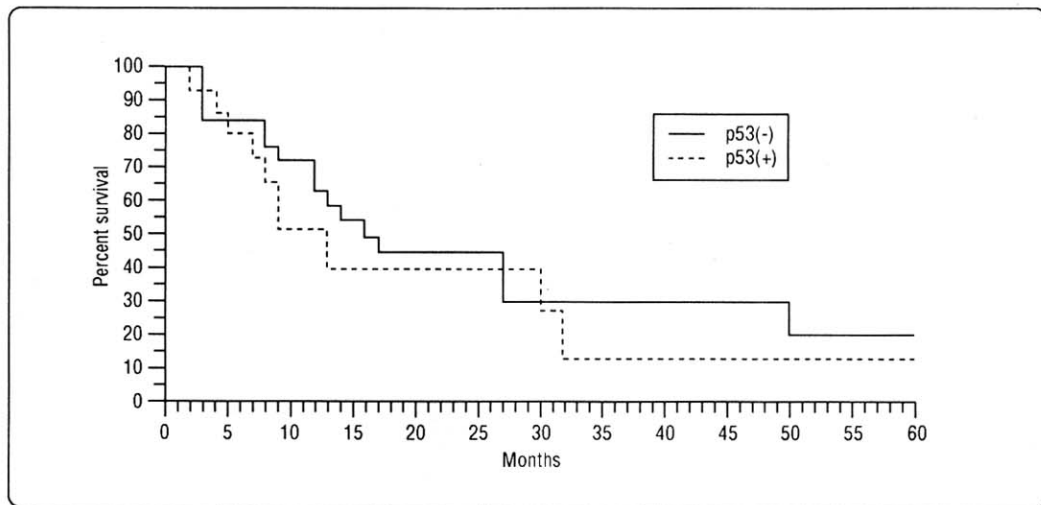


Fig. 2. Overall survival of stage IIIA patients according to the p53 immunohistochemistry.

을 나타내었다.

폐암의 조직형에 따라서는 편평상피암이 선암에 비하여 p53 면역조직화학염색의 과발현율이 통계학적으로 유의하게 높았으나 ( $p < 0.01$ ), 병기에 따른 과발현율의 유의한 차이는 없었다.

### 3. p53 면역조직화학염색상 p53 핵단백질 과발현 빈도와 생존기간과의 상관관계

전체 대상환자의 p53 핵단백질 과발현 여부에 따른 전체생존기간은 p53 음성군과 양성군 모두 25개월, 무병생존기간은 두군 모두 13개월로 동일하였다. 이들을 병기에 따라 나누어 보면 병기 I,II 환자 31예에서 p53 핵단백질 과발현 유무(양성군 12예, 음성군 19예)에 따른 전체생존기간은 음성군 37개월 이상, 양성군 24개월, 무병생존기간은 음성군 27개월 이상, 양성군 18개월로 양성군이 음성군에 비해 조기재발 및 생존기간이 짧은 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 병기 IIIA 환자에서 p53 핵단백질 과발현 여부(양성군 15예, 음성군 25예)에 따른 전체생존기간은 음성군 15개월, 양성군 9개월, 무병생존기간은 음성군 10개월, 양성군 5개월로 양성군이 음성군에 비해 조기재발 및 생존기간이 짧은 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 2).

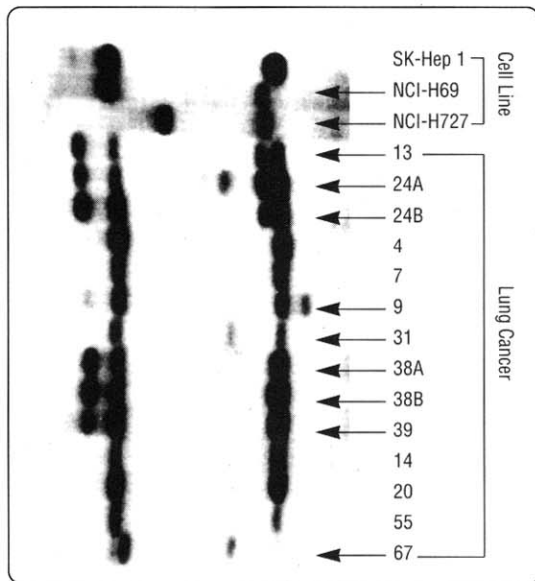


Fig. 3. PCR-SSCP analysis of exon 5 of the p53 gene. Arrows indicate samples having the mobility shift.

### 4. PCR-SSCP를 통한 돌연변이의 빈도 및 생존기간과의 상관관계

PCR-SSCP 분석에 의한 p53유전자의 mobility shift

는 시험한 58예중 16예(27.6%)에서 확인되었다(Fig 3). Mobility shift 유무에 따른 중앙전체생존기간은 shift가 있는 군과 없는 군에서 각각 27개월과 20개월, 무병생존기간은 각각 8개월, 10개월로 유의한 차이가 없었다.

5. 염기서열 확인을 통한 돌연변이의 빈도, 양상 및 생존기간과의 상관관계

염기서열확인을 통한 p53 유전자의 돌연변이는 시험한 29예중 10예(34.5%)에서 확인되었다(Fig 4). 돌연변

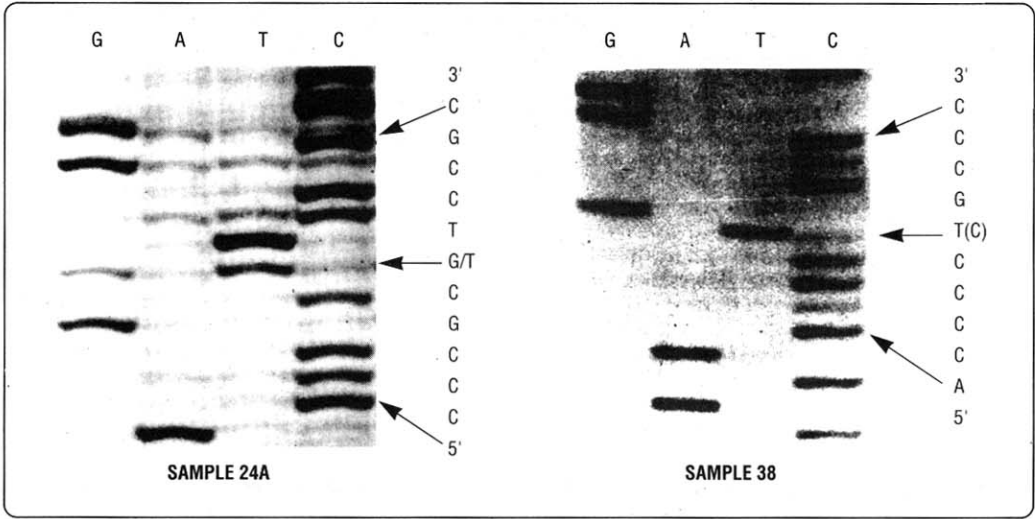


Fig. 4. Analysis of genomic DNA for the p53 gene shows mutation from GTC to TTC at codon 157 in sample 24A and from CCG to CTG at codon 152 in sample 38. Note that sample 24 has a mutant allele as well as a wild type.

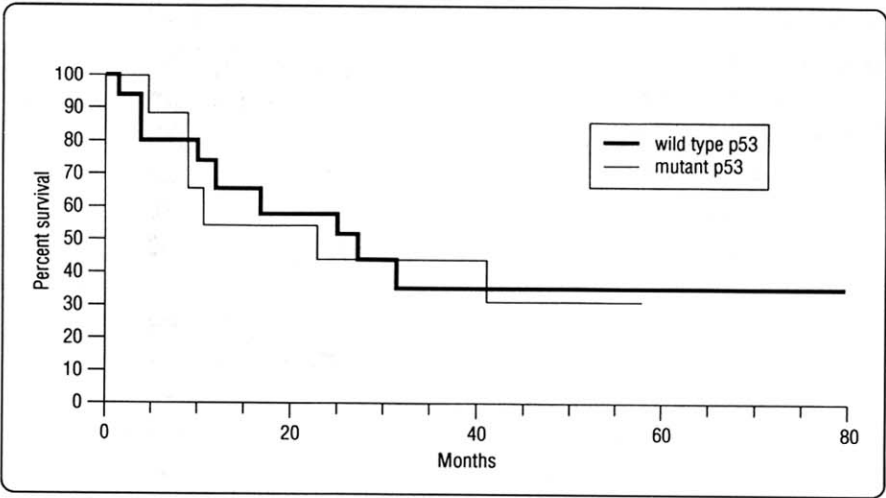


Fig. 5. Overall survival by the p53 nucleotide sequencing.

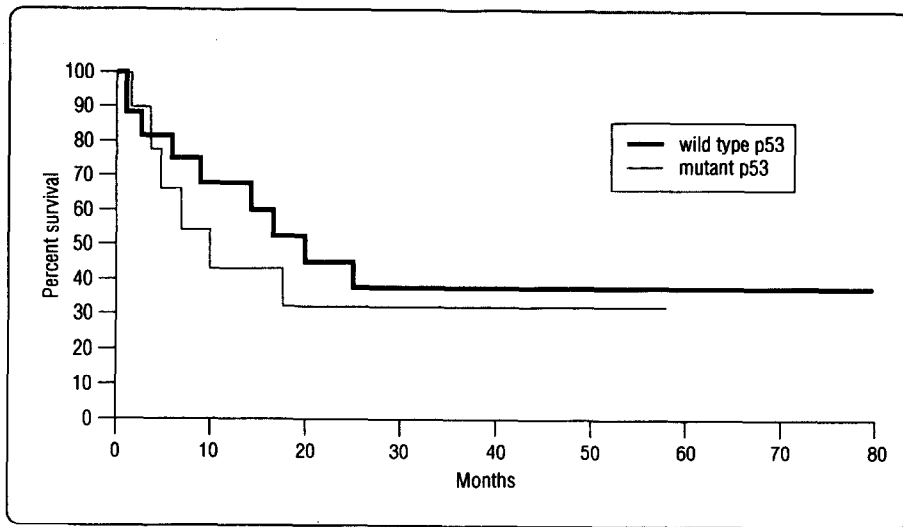


Fig. 6. Disease free survival by the p53 nucleotide sequencing.

이가 확인된 codon은 152 2예, 157 2예, 249 2예였으며, 돌연변이의 양상은 G/T transversion 3예, A/C transversion 2예, C/T transition 1예가 확인되었다. p53유전자의 염기서열 확인상 돌연변이 유무에 따른 중앙전체생존기간은 돌연변이가 있었던 군과 없었던 군에서 각각 27개월, 22개월이었으며, 무병생존기간은 각각 20개월과 10개월로 돌연변이가 있는 군에서 없는 군에 비하여 전체 및 무병생존기간이 짧은 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Fig 5,6).

##### 5. p53 면역조직화학염색 및 PCR-SSCP법의 민감도 및 특이도

면역조직화학염색은 PCR-SSCP법의 결과를 기준으로 할 때 민감도 67.0%, 특이도 74.0%, 그리고 일치도는 62.5%이었다. PCR-SSCP의 결과는 염기서열분석 결과를 기준으로 할 때 민감도 91.8%, 특이도 96.2%, 그리고 일치도는 95.3%이었다.

## 고 찰

p53유전자는 53kDa의 핵인산화단백질을 생성하는 유전자로써 초기에는 우성 암유전자<sup>29,30)</sup>로 생각되었으나, 근래의 연구결과 정상 p53유전자(wild type)는 돌연

변이형 p53유전자(mutant type), 또는 ras유전자 등에 의한 세포변성을 억제하며, 몇개의 암세포주에서 정상 p53유전자를 형질도입시키면 암세포의 표현형이 억제됨이 보고됨에 따라 현재는 돌연변이가 없는 정상 p53 유전자는 종양억제유전자로 인정되고 있다<sup>8~10,31)</sup>. p53 유전자가 어떻게 종양억제유전자로 작용하는지에 대한 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 돌연변이형 p53단백질은 정상형 p53단백질이 가지는 세포성장을 억제하는 능력이 없으며 정상형 p53단백질과 복합체를 형성하여 정상형을 비활성화시킨다고 보고된 바 있다<sup>32)</sup>.

본 연구 결과 폐암조직의 p53 면역조직화학염색상 과발현율은 36%(27/75)였는데, 이는 Iggo 등<sup>19)</sup>의 70%, Quinlan 등<sup>22)</sup>의 40%, Carbone 등<sup>23)</sup>의 55%, Hiyoshi 등<sup>24)</sup>의 49%보다 낮았고, 한국인 폐암을 대상으로 한 과발현율 41~55%<sup>33~36)</sup>에 비하여도 낮은 경향을 나타내었다. 또한 미국과 일본에서 보고된 p53유전자의 염기서열확인상 돌연변이의 빈도, 즉 비소세포폐암 세포주의 57~74%<sup>12,21)</sup>, 절제된 비소세포폐암 조직의 45~54%<sup>21,23)</sup>에 비하여도 본 연구에서 확인된 P53유전자의 돌연변이율이 34.5%로 양성률이 낮았다. 이러한 차이는 암 유발원인의 차이, 종속에 따른 차이, 또는 연구에 이용한 항체에 따른 예민성의 차이 등의 가능성을 생각할 수 있으나 아직은 규명되지 않은 상태이다. 폐암의



조직형에 따른 p53유전자의 돌연변이 빈도는 편평상피암(42~67%)이 선암(18~35%)에 비해 높다고 보고되었는데<sup>15,16,35,37)</sup>, 본 연구 결과 p53 단백질의 과발현율은 편평상피암 51.3%, 선암 11.1%로 편평상피암의 양성율이 선암에 비하여 높았다. 그러나 Mitsudomi 등<sup>21)</sup>과 Hiyoshi 등<sup>24)</sup>은 p53유전자의 돌연변이와 환자의 성별, 연령, 흡연력, 조직학적 분류 및 분화도와 유의한 상관관계가 없었다고 보고한 바 있다. 또한 병기의 진행과 p53유전자의 과발현 빈도는 상관관계가 없어 p53유전자의 돌연변이가 폐암의 진행(progression)보다는 폐암의 발생 초기과정에 관여할 것으로 여겨진다.

PCR-SSCP법은 유전자의 구조적 변형 여부를 검증하는데 대단히 유용한 방법으로 single strand로 구성되어 있는 핵산은 구성염기의 크기 뿐만 아니라, 염기서열에 따라서도 형상(conformation)의 변화가 수반되게 되어, 전기 영동시에 핵산의 이동속도에 차이가 있음에 그 이론적 근거를 두고 있다<sup>21,26)</sup>. p53 유전자의 돌연변이의 대부분은 exon 5-8사이에서 일어나며<sup>12,13)</sup>, 수술적으로 절제된 비소세포폐암조직에서 확인된 돌연변이도 대부분 이부분에서 있음이 보고되었으므로<sup>15)</sup>, 본 연구는 p53유전자의 exon 5-9를 대상으로 PCR-SSCP를 시행하고 dideoxy termination 방법에 의하여 염기서열을 확인하였다. 본 대상환자의 PCR-SSCP 결과 58예중 16예(27.6%)에서 mobility shift를 나타내었는데, 이는 Lee 등<sup>37)</sup>이 48예의 폐암조직에서 보고한 PCR-SSCP의 양성율 35.4%에 비하여 약간 낮았다. 또한 염기서열 분석을 통한 p53 유전자의 돌연변이는 29예중 10예(34.5%)에서 확인되었는데, PCR-SSCP와 염기서열분석 방법의 일치도는 95.3%, 민감도 91.8%, 특이도 96.2%로 PCR-SSCP 분석법의 효용성이 높음을 알 수 있었다. Mitsudomi 등<sup>21)</sup>은 염기서열에서 p53유전자에 돌연변이가 확인된 39예를 대상으로 PCR-SSCP분석을 시행한 결과 mobility shift를 확인할 수 있었던 예가 36예로서 PCR-SSCP 분석의 감수성을 92%로 보고하였고, 본 연구결과도 PCR-SSCP법이 염기서열분석 결과와 일치도가 높았다. 따라서 많은 시료를 대상으로 p53 유전자의 돌연변이 유무를 검색하는 방법으로는 염기서열분석보다는 간편한 PCR-SSCP법이 추천된다.

그러나 p53유전자의 돌연변이가 한 부위에만 국한되

어 있지는 않으므로 염기서열분석보다는 면역조직화학염색이 p53유전자의 돌연변이를 발견하는데 더 좋다는 보고도 있다<sup>19)</sup>. 실제로 본 연구결과 p53면역조직화학염색과 PCR-SSCP 및 염기서열분석 사이의 일치도가 62.5%로 낮았으며 이는 Carbone 등<sup>23)</sup>이 보고한 일치도 65%와 유사하였다. 이와 같이 일치도가 낮은 원인으로 는 다음의 몇가지 가능성이 있겠는데, 첫째로 p53 면역화학염색의 민감도 및 특이도를 생각할 수 있다. 종양세포에서 세포내 p53 단백질의 양을 조절하는 기전은 전사(transcription) 중 또는 전사 후의 조절, 그리고 단백질의 파괴(degradation), 세포주기, 단백질 결합, intron의 존재와 안정화(stabilization) 등이 거론되고 있다. 세포내 p53단백질의 농도는 세포주기중 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>M 기, 특히 G<sub>1</sub>기에 증가된다고 하며<sup>20)</sup>, Isola 등<sup>38)</sup>은 p53 염색양성세포의 핵분율이 종양에 따라 다른 이유가 실제 종양내 다양성(intratumor heterogeneity) 또는 세포주기에 따른 p53단백 발현의 변화일 수 있다고 주장하였다. 즉 p53단백의 농도와 분포가 세포주기에 따라 다르므로 표본에 따른 염색결과의 다양성, 또는 동일표본에서 세포간의 염색결과의 다양성은 세포의 성장조건 및 증식능과 관련될 것으로 생각할 수 있겠다. 또한 종양조직에서 DNA를 추출하는 과정에서 일부의 정상조직이 섞여있거나 종양조직 중에서도 부위에 따라 p53 면역조직화학염색 양성도가 다르므로 추출된 DNA가 어느 부위인가에 따라서 p53 면역조직화학염색과 염기서열분석 사이에 차이가 생길 수 있다. 본 연구에서 동일한 환자에서 여러개의 종양조직(tumor block)을 대상으로 p53 면역조직화학염색 및 PCR-SSCP, 염기서열분석을 시행한 결과 동일 환자에서 종양의 부위에 따라 p53 면역화학염색의 결과가 달랐으나, 염기서열분석의 결과는 동일한 양상의 돌연변이(G/T transversion)를 codon 157에서 확인할 수 있었다. 그러므로 p53 면역조직화학염색과 PCR-SSCP, 염기서열분석의 일치도를 비교하기 위하여는 p53 면역조직화학염색에서 양성을 나타낸 부위를 정확하게 선택하여 DNA를 추출하여 돌연변이 여부를 확인하는 것이 필요하다고 생각된다.

둘째, p53유전자의 돌연변이가 exon 5~9 이외의 부위에서 일어났을 경우나 또는 현재의 일반적인 염기서열 확인방법으로는 찾을 수 없는 intron 부위에서 돌연

변이가 있는 경우에도 면역조직화학염색과 염기서열 분석상에 불일치를 나타낼 수 있다. 실제로 폐암에서는 evolutionary conserved region(ECR) 이외의 부위에서 돌연변이가 비교적 흔하게 발견되고, 비소세포폐암의 경우 돌연변이의 부위가 다른 종양보다 광범위함이 보고되었다<sup>21)</sup>. Mitsudomi 등<sup>21)</sup>에 의하면 NSCLC 세포주의 경우 codon 35~298에서 돌연변이가 확인되었는데 이들 중 반수 이상(31/52)의 돌연변이가 ECR을 벗어난 부위에서 있었고 이중 7예는 exon 4에서 돌연변이가 있었다고 하였는데, 본 연구에서는 p53유전자의 exon 5~9만을 대상으로 돌연변이 유무를 검증한 것에도 그 원인이 있을 수 있다. 이와는 대조적으로 대장암에서는 p53유전자의 돌연변이가 확인된 32예중 5예만이 ECR 이외의 부위에 있었다고 보고되었다<sup>30)</sup>. 또 다른 가능성으로는 p53유전자에 돌연변이가 없어도 p53단백질과 결합하여 p53단백질의 안정도는 높여주지만 p53단백질 자체를 비활성화시키는 MDM2유전자의 증폭 또는 과표현에 의하여도 p53단백질의 과발현이 나타날 수 있으며<sup>40)</sup>, p53유전자의 하부(downstream)구조 등에서 돌연변이가 있는 경우에도 p53유전자에 돌연변이가 있는 경우와 같은 결과를 초래하였음이 보고되기도 하였다.

셋째, 돌연변이의 종류에 따라 면역조직화학염색의 양성도가 달라질 수 있다. Bordner 등<sup>41)</sup>은 p53유전자의 돌연변이가 확인된 33예의 폐암세포주에서 p53 면역조직화학염색 결과 과발현군 16예(48%), 저발현군 17예(52%)가 있었는데, 과발현군의 경우 돌연변이의 종류는 모두 exon 5-8사이의 missense mutation이었으나, 저발현군의 경우는 deletions, splicing mutants, nonsense mutants, 그리고 exon 5~8이외 부분의 missense mutants였으며, exon 5~8의 missense mutation은 면역조직화학염색으로 94%(16/17)가 발견가능하였다고 보고하였다. Mitsudomi 등<sup>21)</sup>은 비소세포폐암에서 p53유전자의 돌연변이의 특징으로 유전자의 비활성화의 기전이 다양함을 들었는데, 염기서열분석으로 돌연변이가 확인된 52예중 missense mutation 34예, insertion or deletion 6예, splice mutation 4예, nonsense mutation 7예로, 돌연변이의 대부분(87%)이 missense mutation이었던 다른 종양의 경우와 차이가 있었다고 보고하였다. 위 보고들을 고려하면 exon 5~8의 missense mutation 이

외의 돌연변이가 상당수를 차지하는 폐암의 경우 p53 면역조직화학염색의 민감도가 낮을 수 있을 것이다. 또한 Thor 등<sup>20)</sup>은 유방암환자를 대상으로 15예의 snap-frozen으로 채취된 신선한 종양조직과 2예의 유방암세포주에서 면역조직화학염색과 sequencing의 일치도가 100%였다고 보고하였지만 본 연구는 포르말린으로 고정된 파라핀 포매 종양조직을 사용하였으므로 고정 및 보존의 영향으로 인하여 세포의 면역반응이 일정하지 않을 가능성도 배제할 수는 없다.

저자 등이 염기서열분석에서 확인한 돌연변이의 부위는 codon 152, 157, 249가 각 2예였고, 돌연변이의 양상은 G/T 염기전환(transversion) 3예, A/C 염기전환 2예, C/T 염기이전(transition) 1예로 G/T 염기전환이 30%를 차지하였다. 이 결과는 폐암에서 p53유전자의 돌연변이의 양상으로 G/T 염기전환이 가장 흔하였다는 보고들<sup>15,16,19,21,38)</sup>과 유사하였으나, 호발부위가 codon 175, 248, 273이라는 점은 차이가 있었다. Suzuki 등<sup>16)</sup>은 비소세포폐암에서 흡연력, 즉 일생동안의 흡연량이 p53유전자의 돌연변이와 상관관계가 있으며, p53유전자의 돌연변이중 50%가 G/T 염기전환이었으며 이러한 돌연변이가 담배에 포함되어 있는 benzo[a]pyrene에 의해서 유발될 것이라고 보고하였다. 이와 달리 위암 및 대장암에서는 p53유전자의 돌연변이의 형태중 G/A 염기이전이 가장 흔하며<sup>7,13,14)</sup>, 다른 지방의 간암환자에서는 발견되지 않는 codon 249의 돌연변이가 중국의 Quidong지역 및 남아프리카지방의 aflatoxin B1에 의해서 발생한 간암의 반수이상에서 특징적으로 codon 249의 돌연변이가 있음이 보고되었는데<sup>42,43)</sup>, 이 사실은 암의 종류 및 진행정도, 그리고 암의 발생원인에 따라 p53유전자의 돌연변이의 빈도 및 양상, 부위에 차이가 유발될 수 있음을 시사한다.

p53 유전자의 돌연변이가 환자의 예후에 미치는 영향에 대하여 유방암에서는 p53 유전자의 돌연변이는 나쁜 예후인자로 작용한다는 보고가 많다<sup>20,31)</sup>. Isola 등<sup>38)</sup>은 유방암에서 p53 단백질의 과발현이 있는 경우 S-phase fraction(SPF)이 높았는데 이것은 과발현된 p53 단백질이 정상적인 세포주기의 조절을 방해하고 암세포에 대해서 증식의 이점(proliferative advantage)을 줄 것으로 추측하였다. 이들은 p53단백의 과발현이 조직학적으로

높은 악성도, estrogen 수용체 음성, 높은 DNA index 등의 악성도의 표지자들과 상관관계가 있고, c-erbB-2 단백질의 과발현과도 상관관계가 있었다고 보고하였다. p53 유전자의 돌연변이와 폐암환자의 예후와 관련성에 대하여는 아직도 논란의 여지가 있다. Mitsudomi 등<sup>21)</sup>은 비소세포폐암 환자에서 p53 유전자의 돌연변이가 환자의 생존기간과 유의한 상관관계가 없었다고 보고하였으나, 면역조직화학염색상 p53 단백질의 과발현이 폐암에서 나쁜 예후인자라는 보고가 많다<sup>22,24,36)</sup>. Hiyoshi 등<sup>24)</sup>은 편평상피폐암에서는 p53 단백질의 과발현이 환자의 예후와 상관이 없었지만 선암에서는 주위림프절 전이가 있거나 원격전이가 있을 때, 그리고 병리학적병기가 진행될수록 p53 단백질의 과발현 빈도가 높았으므로 p53 단백질의 과발현은 폐의 선암에서 불량한 예후인자라고 하였다. Quinlan 등<sup>22)</sup>은 병기 I, II 선암 및 편평상피폐암 환자에서 p53 면역조직화학염색 양성군이 음성군에 비하여 생존기간이 짧았고(16개월 vs 38개월), 제 II 병기환자중 원발종양부위에서는 p53 염색이 음성이었으나 전이된 림프절에서 p53 염색이 양성으로 나타난 환자의 생존기간이 원발부위 및 림프절에서 모두 p53 음성이었던 환자에 비하여 짧았으므로(11개월 vs 34개월), p53 단백질의 과발현이 불량한 예후를 나타내는 환자를 미리 선별할 수 있다고 보고하였다. 국내에서도 김 등<sup>36)</sup>이 비소세포폐암환자 38예를 대상으로 p53 단백질의 면역조직화학염색 결과 양성군이 음성군에 비하여 2년 생존율이 유의하게 짧았음(41% vs 66%)을 보고하였다. 한편 Carbone 등<sup>23)</sup>은 p53 단백질의 면역조직화학염색 양성군의 생존기간이 음성군에 비하여 유의하게 짧았으나 PCR-SSCP 및 염기서열분석상 돌연변이 유무는 예후와 상관관계가 없었다고 보고하며, p53 유전자가 우성 암 유전자로 작용하기 때문이거나 또는 p53 단백질의 과발현이 종양에서 DNA 손상을 반영하므로 악성도의 표지자 역할을 할 가능성을 제시하였다.

p53 유전자의 돌연변이가 암의 발생 또는 진행의 어느 단계에 관여하는지에 대하여는 암의 종류에 따라 다르게 보고되고 있다. 본 연구 결과 제 I 병기 폐암환자의 26.7%(4/15)에서 p53 단백질의 과발현이 나타났는데 이 사실로 미루어 폐암의 발생과정, 또는 진행 초기단계에 p53 유전자의 돌연변이가 관여할 것으로 해석할 수 있

다. 유방암에서도 in situ carcinoma의 16~22%에서 p53 단백질의 과발현이 있었으나 종양부위에 인접한 비후성 유선상피세포(hypertrophic ductal epithelium)에서는 p53 단백질의 과발현이 없었음이 보고되었는데<sup>18,20)</sup> 이 결과는 유방암 발생의 초기단계, 즉 암세포가 주위조직으로 침범능력을 획득하기 이전에 p53 유전자의 돌연변이가 일어남을 시사한다. 그러나 위암에서 Kim 등<sup>44)</sup>은 원발성 위암조직(1/5)보다 전이성 위암조직(5/5)에서 유래된 세포주에서 p53 유전자의 돌연변이의 빈도가 높았음을 보고하면서 p53 유전자의 돌연변이가 위암의 발생보다는 진행에 관여할 것으로 추측하였다. 또한 뇌종양에서는 p53 유전자의 돌연변이가 low-grade의 astrocytoma에서 invasive high grade tumor로 진행하는데에 관계할 것이라고 보고되고 있다<sup>45)</sup>. 결국 p53 유전자의 이상은 암의 종류에 따라 암의 시발(initiation) 또는 진행에 관여하는 것에 차이가 있으며, p53 유전자의 돌연변이의 양상에 따라 그들의 세포변성능력(transforming activity)의 정도가 다르며, 각 종양에서 특징적인 돌연변이의 형태에 따라 종양의 진행에 기여하는 정도가 다를 것이라고 추측된다. 이 가정은 폐암에서 다른 종양과 달리 p53 유전자의 돌연변이 유무와 종양의 범위, 환자의 생존기간과 상관관계가 없었던 결과에 대한 부분적인 설명이 될 수 있을 것이다.

결론적으로 p53 유전자의 이상 또는 단백질의 과발현은 기존의 폐암의 예후인자에 비하여 의미있는 영향을 미치지 못하는 듯하였다. 특히 제 IIIA 병기 환자만을 대상으로 p53 유전자의 돌연변이 및 단백질의 과발현 유무에 따라 분류한 두군의 전체생존기간이 유의한 차이가 없었으므로 p53 유전자의 돌연변이 및 p53 단백질의 과발현 유무는 현재 이용되는 병기, 조직형, 수행상태 등의 예후인자보다 유용한 지표로 사용하기는 힘들 것으로 생각된다. 그러나 통계학적인 유의성은 없었지만 제 IIIA 병기환자에서 p53 유전자의 돌연변이가 있는 경우 돌연변이가 없는 군에 비하여 특히 수술후 2년 이내에 무병생존기간이 짧은 경향을 나타내었으므로 p53 유전자의 돌연변이 유무가 폐암환자의 근치적절제술 후 조기재발을 예측하는 보조지표로 이용될 수 있을 가능성이 있으며 추후 이를 정확히 판단하기 위하여는 다수의 환자를 대상으로 한 비교연구가 요구된다.

## 요 약

연구배경 : p53 유전자는 염색체 17p에 존재하는 종양억제유전자인데, 돌연변이가 있는 경우의 mutant protein은 그 반감기가 4~8시간으로 wild type protein의 반감기 6~20분에 비하여 현저한 증가를 보이게 된다. 결과적으로 돌연변이가 있는 경우 p53 단백질이 과축적되어 과발현이 유발되는데, 이러한 기전을 이용하여 p53 면역조직화학염색은 p53유전자의 돌연변이의 검색 방법으로 많이 이용되고 있다. 유방암에서는 p53 핵단백질의 과발현이 있는 경우에 없을 때보다 무병생존기간 및 전체 생존기간 모두에서 유의하게 나쁜 임상 경과를 취함이 보고되고 있지만 폐암에서는 p53 유전자의 돌연변이가 유무, 또는 p53단백의 과발현 유무가 예후에 미치는 영향은 아직까지 확실하지 않다. 저자 등은 한국인의 폐암에서 p53 종양억제 유전자의 돌연변이 빈도를 확인하고, 이들이 폐암 환자의 임상 경과에 미치는 영향을 분석하며, 면역조직화학염색 및 PCR-SSCP 분석의 감수성과 특이성을 염기서열분석과 비교하여 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

방법 : 근치적 폐절제술 후 임상경과를 추적중인 원발성폐암환자 75예를 대상으로 하였으며, 면역조직화학검사 및 분자생물학적 연구를 위하여는 이들의 종양조직(paraffin block)을 이용하였다. p53 단백질의 면역조직화학검사를 위한 일차항체로는 DO7(Novocastra, U.K.)을 사용하였고, PCR-SSCP 및 염기서열분석 등을 위하여는 파라핀 포매조직에서 암조직을 선택적으로 박절하여 DNA를 추출하여 이용하였다.

### 결과:

1) 전체 75예 폐암환자의 면역조직화학염색 결과 27예(36%)에서 p53단백질의 과발현을 보였다(Table 2.3, Fig 1).

2) 전체 환자의 p53 핵단백질 과발현 여부에 따른 중앙전체생존기간은 p53 음성군과 양성군 모두 25개월, 무병생존기간은 두군 모두 13개월로 동일하였다(Fig. 2).

3) PCR-SSCP 분석에 의한 p53 유전자의 mobility shift는 시험한 58예중 16예(27.6%)에서 확인되었다(Fig 3). Mobility shift 유무에 따른 중앙전체생존기간

은 shift가 있는 군과 없는 군에서 각각 27개월과 20개월, 무병생존기간은 각각 8개월, 10개월로 유의한 차이가 없었다.

4) 염기서열분석을 통한 p53 유전자의 돌연변이는 시험한 29예중 10예(34.5%)에서 확인되었다(Fig 4). 염기서열분석 결과 돌연변이가 유무에 따른 중앙전체생존기간은 돌연변이가 있었던 군과 없었던 군에서 각각 27개월, 22개월이었으며, 무병생존기간은 각각 20개월과 10개월로 유의한 차이는 없었으나 돌연변이가 있는 경우 조기재발을 하는 경향을 보였다(Fig 5, 6).

5) 면역조직화학염색은 PCR-SSCP 결과를 기준으로 할 때 민감도 67.0%, 특이도 74.0%, 그리고 일치도는 62.5%이었다. PCR-SSCP의 결과는 염기서열분석 결과를 기준으로 할 때 민감도 91.8%, 특이도 96.2%, 일치도는 95.3%이었다.

결론 : p53 핵단백질의 과발현 정도, PCR-SSCP 및 염기서열분석상 돌연변이가 유무는 비소세포폐암환자의 근치적수술후 예후의 예측지표로서는 그 효용성이 적었으나, 돌연변이가 있는 경우 조기재발을 하는 경향을 보였다. 또한 p53유전자의 돌연변이 검색법으로는 면역조직화학염색보다는 PCR-SSCP법이 우수하였다.

## REFERENCES

- 1) Minna J, Pass H, Glastein E, Ihde D: Cancer of the lung, In Devita JV(Ed). Cancer Principles and Practice of Oncology, 3rd Ed., p 591, Philadelphia, JB Lippincott 1989
- 2) 보사부: 한국인 암등록 조사자료 분석보고서. 대한 암학회지 19:131, 1987
- 3) Comings DE: A general theory of carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 70:3324, 1973
- 4) Murphree AL, Benedict WF: Retinoblastoma: Clues to human oncogenesis. Science 223:1028, 1984
- 5) Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ: Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science 241:353, 1988

- 6) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JW, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B: Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**:217, 1989
- 7) Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M: Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:8763, 1989
- 8) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**:1083, 1989
- 9) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**:912, 1990
- 10) Chen PL, Chen Y, Bookstein R, Lee WH: Genetic mechanism of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* **250**:1576, 1991
- 11) Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**:491, 1989
- 12) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F, Weston A, Modali R, Harris C, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* **342**:705, 1989
- 13) Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, Lee HD, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* **83**:938, 1991
- 14) Chiba I, Takahashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagan DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Reissman PT, Slamon DJ, Holmes EC, Minna JD: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* **5**:1603, 1990
- 15) Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R: p53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan: Association between mutations and smoking. *Cancer Res* **52**:734, 1992
- 16) Lane DP, Benchimol S: p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Develop* **4**:1, 1990
- 17) Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5**:893, 1990
- 18) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* **335**:675, 1990
- 19) Thor AD, Moore II DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayhall BH, Smith HS: Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* **84**:845, 1992
- 20) Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, Gazdar AF: p53 gene mutations in non-small cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**:171, 1992
- 21) Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, Warden HE, Doshi HM: Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* **52**:4828, 1992
- 22) Carbone DP, Mitsudomi T, Rusch V, Nowak JA, McIntire D, Chiba I, Gazdar AF, Minna JD: p53 protein overexpression, but not gene mutation, is

- predictive of significantly shortened survival in resected non-small cell lung cancer(NSCLC) patients. *Proc ASCO* 12:334, 1993
- 23) Hiyoshi H, Matsuno Y, Kato H, Shimosato Y, Hirohashi S: Clinicopathological significance of nuclear accumulation of tumor suppressor gene p53 product in primary lung cancer. *Jap J Cancer Res* 83:101, 1992
  - 24) Wright DK, Manos MM: Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR protocols. Academic Press, Sandiago, p153, 1990
  - 25) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874, 1989
  - 26) Davis LG, Dibner MD, Battey JF: Basic methods in molecular biology. Elsevier, New York, p234, 1986
  - 27) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49, 1991
  - 28) Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261, 1979
  - 29) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M: Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312:646, 1979
  - 30) Hinds P, Finlay C, Levine AJ: Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63: 739, 1989
  - 31) Milner J, Medcalf EA, Cook AC: Tumor suppressor p53: Analysis of wild-type and mutant p53 complex. *Mol Cell Biol* 11:12, 1991
  - 32) 이영규, 박성수, 신동호, 이동후, 이정희, 이중달: 인체 폐암종에서 p53의 발현에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* 40:395, 1993
  - 33) 박인원, 김상훈, 성운업, 이상표, 김봉식, 김영준, 최병휘, 허성호: 폐암절편 조직에서 면역조직화학염색법과 in situ 교잡법에 의한 p53 돌연변이 유전자와 인형 유두종 바이러스 검출. *대한내과학회지* 45 (Suppl I):292, 1993
  - 34) 김선영, 홍석철, 한표성, 이종진, 조해정, 김애경, 김주옥: 비소세포 폐암에서의 p53단백의 발현양상. *결핵 및 호흡기질환* 40:659, 1993
  - 35) 김동순, 성영주, 염호기, 이봉춘, 서연림, 주종은: 원발성폐암에서의 p53단백의 발현양상과 예후와의 관계. *대한내과학회지* 45:736, 1993
  - 36) Lee CT, Kim CM, Kang SU, Zo JI, Shim YM, Hong WS, Lee JH, Kang TW: Genetic alterations of p53 in lung cancer. *대한내과학회지* 45(Suppl I):291, 1993
  - 37) Isola J, Visakorpi T, holli K, Kallioniemi O: Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 84:1109, 1992
  - 38) Soussi T, Caron C, May P: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5:945, 1990
  - 39) Leach F, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner J, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B: p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 53:2231, 1993
  - 40) Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Fedorko J, Buchhagen DL, Nau MM, Gazdar AF, Linnoila I: Expression of mutant p53 protein in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 7:743, 1992
  - 41) Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC: Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350: 427, 1991
  - 42) Bressac B, Key M, Wands J, Ozturk M: Selective

G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern africa. Nature **350**:429, 1991

- 43) 김주향, 박주배, Mitsudomi T, 최정주, 유내춘, 최진혁, 임호영, 노재경, 이정식, 김병수: 한국인의 간암조직 및 간암세포주에서 p53 유전자의 이상에 관

한 연구. 대한암학회지 **25**:359, 1993

- 44) Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. Nature **355**:846, 1992