

갑상선 유두암에서의 bcl-2와 P53 단백질 발현의 의의

고려대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

지웅배 · 배정원 · 우상욱 · 손길수 · 이재복 · 구범환 · 채양석¹

The Significance of bcl-2 and P53 Expressions in the Papillary Thyroid Cancer

Woong Bae Ji, M.D., Jeoung Won Bae, M.D., Sang Uk Woo, M.D., Gil Soo Son, M.D., Jae Bok Lee, M.D., Bum Whan Koo, M.D. and Yang-Seok Chae, M.D.¹

Purpose: Papillary thyroid cancer (PTC) has a good prognosis, and it's known to be related to the apoptosis of papillary thyroid cancer. The expression of bcl-2 is thought to be associated with the inhibition of apoptosis. We evaluated the differences of bcl-2 and P53 between PTC and the control (normal tissue and benign lesion). We then analyzed the correlation between the bcl-2 and P53 expressions and the classic prognostic factors.

Methods: Between January 2001 and December 2005, 30 patients who underwent total thyroidectomy for the PTC were included in this study and immunohistochemical staining was performed on the tumors.

Results: bcl-2 was expressed in 18 cases (60%) in their PTC ($P < 0.05$). The expression of P53 was not significantly related with the clinicopathological factors, but P53 was expressed in 9 cases (30%) of PTC ($P < 0.05$). The positive staining for was noted in 18 cases (62.1%) of the PTC tissue among the 30 patients, and as the TNM stage progresses, the expression rate of was significantly decrease for 7 stage I cases (100%), for 4 stage II cases (80%) and for 7 stage III cases (38.9%).

Conclusion: bcl-2 was expressed more as the TNM stage of PTC decreases. So bcl-2 is possibly useful as a prognostic factor for PTC, but further studies are needed for confirming its significance. (*Korean J Endocrine Surg* 2007; 7:231-236)

Key Words: Papillary thyroid cancer, Prognostic factor,

bcl-2, P53

중심 단어: 갑상선 유두암, 예후인자, bcl-2, P53

Departments of Surgery, ¹Pathology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

서론

갑상선 유두암은 갑상선의 악성 종양의 80%를 차지하며, (1) 질환의 진행이 다른 악성 종양에 비해 서서히 진행하고 예후가 좋은 질환으로 알려져 있다. 갑상선 고분화암에 대한 예후 예측은 나이, 원격전이 여부, 침윤정도, 종양의 크기, 수술의 완전 절제 여부 및 침윤정도 등을 위험인자로 고려하고 있다. 분자 생물학적 연구 방법의 발달로 다양한 인자가 예후 예측인자로 대두되고 있으며, 세포자멸사는 악성 종양의 발생에 있어 중요한 역할을 한다. 세포의 증식과 세포자멸사는 균형을 이루며, 손상된 세포의 세포자멸사 과정의 이상은 악성 종양의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 정상적으로 세포 자멸사는 손상된 세포를 제거하지만 그렇지 못한 경우 신생물로 진행하게 된다. Bcl-2 (B cell lymphoma gene-2)는 세포자멸사를 억제하며 종양 세포의 수명을 연장시킨다. (2,3) Bcl-2의 과발현은 전통적으로 악성림프종과 관련이 있으며 나쁜 예후인자로 알려져 있으나, (4) 난소암이나 폐암 등과 같은 고형암에서는 임상적으로 좋은 예후와 관련이 있는 것으로 보고된다. (5,6) Bcl-2의 작용 기전은 명확하지는 않으나, 고형 종양의 증식률을 지연시켜 종양의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. P53은 갑상선암의 진행에 있어 중요한 역할을 하는 유전자이다. P53은 발암과정에 관여하여 갑상선 세포의 악성세포로의 전환과 갑상선 암의 진행에도 관여한다. (7) Bcl-2와 P53이 종양발생기전과 관계가 있다고 보고되고 있으나, 갑상선 유두암의 예후와의 관계는 명확히 알려져 있지는 않다. 이에 갑상선 유두암에서 bcl-2와 P53 단백질 발현과 갑상선 유두암의 예후인자와의 관계에 대해 알아보고, 예후 예측인자로서의 가능성에 대해 연구하였다.

책임저자 : 배정원, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
☎ 136-701, 고려대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-920-5305, Fax: 02-928-9231
E-mail: kujwbae@korea.ac.kr

게재승인일 : 2007년 12월 15일

본 논문은 2005년 내분비외과학회 추계학술대회 발표 논제임.

방 법

1) 대상

2001년 1월부터 2005년 12월까지 갑상선 유두암으로 갑상선 전절제술을 시행 받은 환자 중에서 파라핀 포매조직의 보존상태가 양호한 것 중 무작위로 선택한 30예를 대상으로 bcl-2와 P53 단백질에 대해 면역조직화학적 염색을 시행하였으며, 임상적 병리학적 예후인자들과의 상관관계를 비교 분석 하였다. 각각 15예의 정상 갑상선 조직과 갑상선 결절성 증식증 환자의 조직을 대조군으로 하여 bcl-2와 P53 단백질 발현에 대해 면역조직화학적 염색을 시행하여 악성 종양에서의 발현양상의 차이를 비교하였다.

2) 면역조직화학적 검사

수술 시 얻은 조직을 중성 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀에 포매 된 조직을 4 μ m 두께로 연속 절편하였다. Xylene으로 3분간 3회 담구어 탈파라핀화 후, 100%, 85%, 70% 및 50% 알코올에 3분씩 처리하고 증류수에 넣어 함수화하였다. 10 mM citrate 용액에 넣어 121°C에서 10분간 가압멸균 후 조직 표본 위에 peroxidase-blocking solution을 떨어뜨려 10분간 두어 내인성 peroxidase를 저지시켰다. 10 mmol/L Tris buffer 용액과 1 mmol/L EDTA으로 세척하여 비면역성 체액과 실온에서 10분간 반응시킨 후 항원 결정기 복원법을 사용하였다. 0.3% H_2O_2 와 methanol로 과산화 효소의 활성을 억제시켰다. 일차항체는 Dakocytomation의 clone 124 bcl-2 antibody와 Dakocytomation의 clone DO-7 P53 antibody를 사용하여 4°C에서 하루 동안 반응시켰다. Tris buffer 용

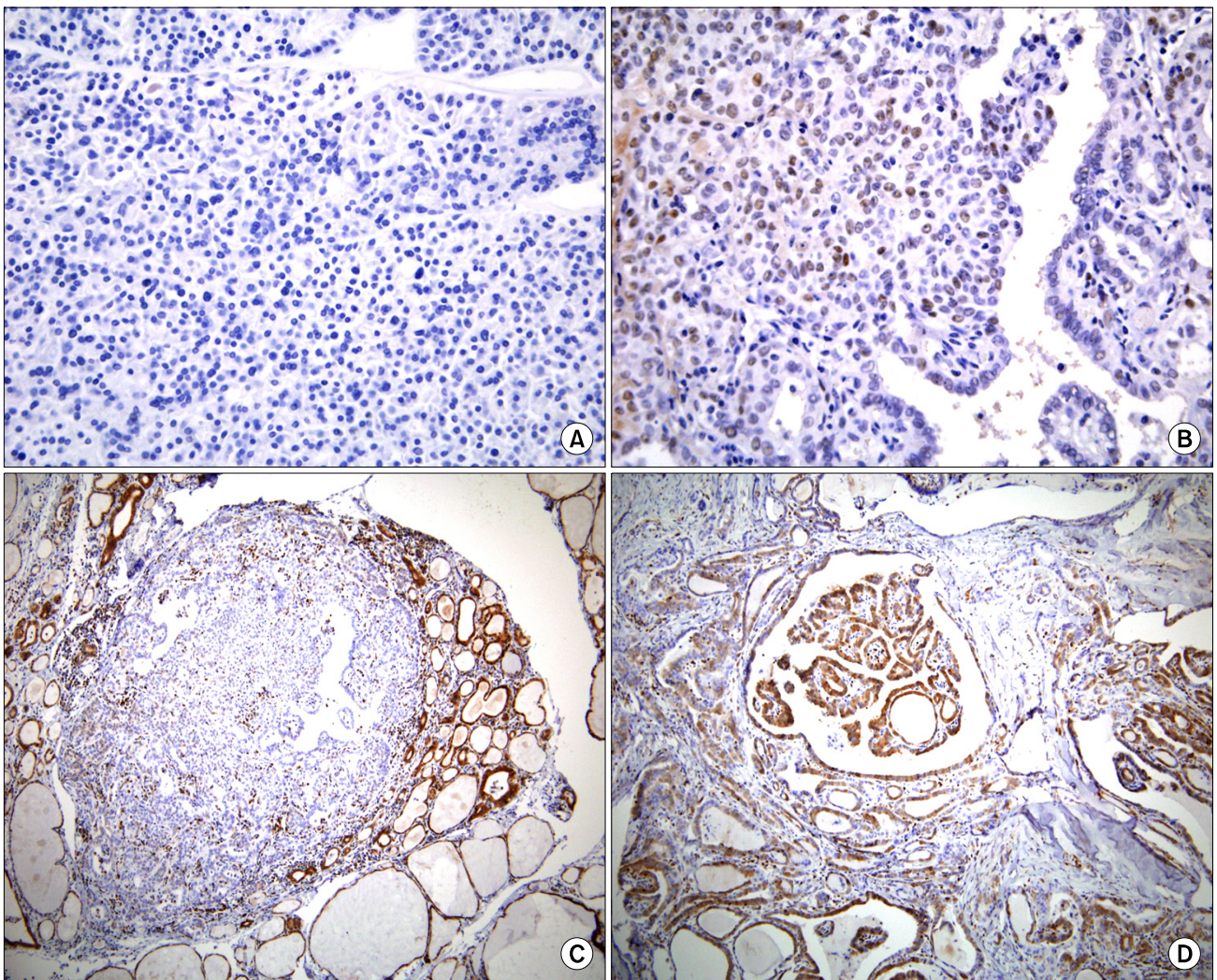


Fig. 1. Results of P53 and bcl-2 immunohistochemical stains in papillary thyroid cancer. (A) negative expression of P53 ($\times 200$). (B) positive expression of P53 ($\times 200$). (C) negative expression of bcl-2 ($\times 100$). (D) positive expression of bcl-2 ($\times 100$).

액으로 세척 후 2차항체인 antimouse IgG와 실온에서 10분간 반응시켰다. Tris buffer 용액을 세척하고 발색시약인 DAB로 5분간 반응시킨 후 물로 세척하였다. Gill's hematoxylin solution으로 대조 염색 하였다.

3) 면역조직화학염색에 대한 판정

Bcl-2의 염색 결과는 염색 범위에 따라 25% 이상을 양성군으로 그 이하를 음성군으로 정의 하였으며, P53의 염색결과는 염색범위가 10% 이상인 경우를 양성으로 그 이하를 음성으로 판정하였다(Fig. 1).

4) 통계학적 분석

성별, 나이 및 피막 침범 유무와 TNM 병기, AMES 체계 등에 따라 분석하였으며, SPSS 11.0을 이용하여 chi-square test와 student's t-test를 사용하였다. P value 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

군과 대조군 간에 차이가 없었다. P53 단백 발현은 갑상선 유두암 군에서 30% (9/30)의 양성률을 보였으나 대조군에서는 전예에서 발현되지 않았다(P=0.005). bcl-2의 발현은 유두암 군에서는 60% (18/30)에서 양성률은 보였으나 대조군에서는 전 예(100%)에서 발현되었다(P=0.001) (Table 1).

2) 갑상선 유두암의 병기와 피막침범에 따른 P53과 bcl-2의 발현의 차이

TNM 병기에 따른 P53 발현은 유의한 차이가 없었으나, bcl-2의 발현은 병기 I, 병기 II, 병기 III에서 양성률은 각각 100% (7/7), 80% (4/5), 38.9% (7/18)로 병기가 진행될수록 통계학적으로 유의하게 감소하였다(P=0.012). 또한 피막 침범의 유무에 따른 발현의 차이는, P53의 발현은 통계적으로 유의한 차이가 없었으나(P=0.936), bcl-2의 발현은 피막침범이 없는 군에서 76.5% (13/17)의 양성률을 보여 피막침범이 있는 군에서의 38.5% (5/13)에 비해 통계적으로 유의하게 높았다(P=0.035) (Table 2).

3) 갑상선 유두상암과 갑상선의 유두상 미세암에서의 P53과 Bcl-2의 발현의 차이

갑상선 유두암과 유두상 미세암을 비교해 보면, 성별에 따라서는 두 군 간에 차이가 없었고, 갑상선 유두암과 유두

결 과

1) 갑상선 유두암과 대조군에서의 P53과 Bcl-2의 발현의 차이

임상 병리학적 특성에서는 연령과 성별은 갑상선 유두암

Table 1. Comparison of P53 and Bcl2 expression among thyroid cancer, benign and normal tissues

	Papillary cancer (%)	Nodular hyperplasia (%)	Normal tissue (%)	P value
Age	44.50±10.77	44.467±11.02	44.67±11.73	0.998
Gender				0.649
	Male	3 (10.0)	2 (13.3)	
	Female	27 (90.0)	13 (86.7)	
P53				0.005
	Positive	9 (30.0)	0 (0)	
	Negative	21 (70.0)	15 (100)	
Bcl-2				0.001
	Positive	18 (60.0)	15 (100)	
	Negative	12 (40.0)	0 (0)	

Table 2. P53 and bcl-2 expression according to the stage and capsular invasion

		P53		Bcl-2	
		Positive (%)	Negative (%)	Positive (%)	Negative (%)
TNM stage		P=0.561		P=0.012	
	I	1 (14.3)	6 (85.7)	7 (100)	0 (0)
	II	2 (40.0)	3 (60.0)	4 (80.0)	1 (20.0)
	III	6 (33.3)	12 (66.7)	7 (38.9)	11 (61.1)
Extrathyroidal extension		P=0.936		P=0.035	
	Positive	4 (44.4)	9 (42.9)	5 (27.8)	8 (66.7)
	Negative	5 (55.6)	12 (57.1)	13 (72.2)	4 (33.3)

Table 3. P53 and bcl-2 expression between papillary and micro-papillary types

	Papillary (%)	Papillary microcarcinoma (%)	P value
Gender			1.000
Male	2 (9.5)	1 (11.1)	
Female	19 (90.5)	8 (88.9)	
Capsular invasion			0.002
Positive	13 (61.9)	0 (0)	
Negative	8 (38.1)	9 (100)	
P53			0.139
Positive	8 (38.1)	1 (11.1)	
Negative	13 (61.9)	8 (88.9)	
Bcl-2			0.193
Positive	11 (52.4)	7 (77.8)	
Negative	10 (47.6)	2 (22.2)	

상 미세암에서 P53 단백발현의 양성율은 각각 38.1% (8/21) 과 11.1% (1/9)로 유두암에서 높았지만 통계적 유의성은 없었으며(P=0.139), bcl-2 발현의 양성률은 각각 52.4% (11/21) 와 77.8% (7/9)로 유두상 미세암에서 높았지만 역시 통계적 유의성은 없었다(P=0.193). 하지만 피막 침범은 유두상암 (61.9%)에서 유두상 미세암(0%)에 비해 유의하게 많았다 (P=0.002) (Table 3).

4) AMES 위험군에 따른 P53과 Bcl-2의 발현의 차이

AMES 체계에 따른 P53과 bcl-2 발현의 차이는 P53의 발현은 AMES 고위험군과 저위험군 간의 유의한 차이가 없으나(P=0.936), bcl-2의 발현은 고위험군의 38.5% (5/13)에서 양성으로, 저위험군의 76.5% (13/17)에 비해 유의하게 낮은 양성률을 보였다(P=0.042) (Table 4).

고 찰

갑상선 유두암은 좋은 치료결과와 장기 생존율을 보이 나, 갑상선 고분화 암도 역시 악성 신생물로 질환의 진행에 의해 원격전이와 사망을 보이고 있다. 따라서 예후를 예측 하기 위해 여러 인자를 이용한 예후 예측 방법과 함께 TNM 병기 결정 방법을 적용하고 있다. 분자 생물학적 연구 방법의 발달로 특정한 유전자나 생물학적 표지인자가 예후 예측에 도움이 되는 것으로 알려져 있으나 기존의 예후 예측 인자와의 관계와 예후에 대해 단독으로의 적용은 아직 명확하게 확립되어 있지 않다. 본 연구에서는 분자생물학적 요인 중 세포 자멸사에 관여하는 P53과 bcl-2의 단백질 발현의 예후인자로서의 역할에 대해 연구 하였다. 세포 자멸사는 생물의 발생 과정이나 자가 면역 질환, 그리고 종양의 성장에 있어서 중요한 역할을 한다.(8) 신체의 여러 정상 조직과 림프종, 폐암, 유방암, 갑상선암 등의 악성 조직에서

Table 4. P53 and bcl-2 expression according to the AMES system

	AMES		P value
	High risk (%)	Low risk (%)	
P53			0.936
Positive	4 (30.8)	5 (29.4)	
Negative	9 (69.2)	12 (70.6)	
Bcl-2			0.042
Positive	5 (38.5)	13 (76.5)	
Negative	8 (61.5)	4 (23.5)	

bcl-2 단백 발현은, 주로 상피 세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.(9,10) Bcl-2는 세포 자멸사를 억제하여 종양 세포의 생존을 연장한다.(2,3) P53 돌연변이는 갑상선 세포의 전환과 갑상선 종양의 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다.(7,11-14) 본 연구에서 대조군과 유두상암에서의 bcl-2 와 P53의 발현을 비교 하였을 때, P53은 대조군에서는 발현 되지 않았으나 유두상암에서는 9 (30%)에에서 발현되었다. 이러한 결과는 P53 돌연변이가 갑상선 암의 종양 발생에 작용한다는 보고와 일치한 결과로 보인다.(13) 하지만, TNM병기와 AMES 체계 등의 예후 인자와의 관련성은 찾을 수 없었다. 이러한 결과는 P53 발현이 종양의 진행에 있어서의 역할이 아직 명확하지 않은 것과 유사한 결과로 생각된다.(15-17) bcl-2의 과발현은 전통적으로 악성 림프종과 그 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.(4) 하지만 역설적으로 난소암이나 폐암 같은 몇몇 고형 종양에서는 bcl-2의 과발현이 좋은 예후와 관련이 있다는 보고가 있다.(6,18,19) 본 연구에서는 대조군과 비교하였을 때 대조군에서는 모두 발현 되었으며 유두상암에서는 18 (60%)에에서 양성으로 발현되었다. Denise 등에 의하면 갑상선 여포 암에서 암의 재발과 암과 관련된 사망은 모두 bcl-2 음성인 군에서 일어났으며, 이는 bcl-2의 발현 소실이 종양의 재발과 관련이 있다고 보고하고 있다. bcl-2가 일부 고형종양에서 종양 세포의 분열 속도를 늦추는 작용을 하고, 그로 인해 종양이 천천히 자라게 된다는 것을 제시하기도 한다.(20) 병기에 따른 bcl-2의 발현은 병기 III에서 양성률이 38.9%로 I, II기의 양성률 100%, 80%에 비해 적은 발현을 보였다. 피막의 침범에 있어서는 피막 침범이 없는 경우에 유의하게 bcl-2 발현이 관찰되었다. 세포의 분화도는 같으나 크기로 분류되는 갑상선 유두암과 갑상선 유두상 미세암에서는 bcl-2의 발현의 차이에는 통계적 유의성이 없었다. 본 연구에서는 AMES 예후 체계에 따른 위험군의 분류에서 저위험군에서 유의하게 bcl-2의 발현을 관찰할 수 있었다. 고형암에서의 양호한 예후와의 관련성은 bcl-2가 Bax 등과 같은 세포 자멸사와 관계된 다른 유전자와의 상호 관계에 의해 세포 자멸사를 조절한다는 사실로 설명하고 있다.(23-25) Manetto 등은 bcl-2와 Bax 단백질의 면역 화학 염색 소견을

세가지로 나누었는데, 첫째, 양성 조직과 분화가 좋은 갑상선암은 정상 상피세포의 양상과 비슷한 bcl-2의 집중 발현이 나타나고, 둘째, 유두암과 미분화암의 중간 정도의 예후를 지니는 암처럼 비교적 심한 양상을 보이는 갑상선 암에서는 두 가지 단백 발현이 같이 나타나며, 셋째, 미분화암은 bax 단백질이 발현됨을 보고하였다.(26) 세포 자멸사는 여러 유전자의 양성 또는 음성 조절로 인한 매우 조직된 반응이다. 암을 일으키는데 이러한 세포자멸사를 조절하는 유전자들의 역할은 복잡하고 아직 다 알려지지 않았다. 하지만 이러한 유전자들의 예후 예측인자로서의 역할에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으며, 본 연구에서도 bcl-2의 갑상선 유두암에서의 예후 예측 인자로서의 역할에 대해 가능성을 제시하였다.

결론

P53 발현은 대조군에서는 찾을 수 없었으며, bcl-2 발현은 정상 갑상선 조직과 결절성 증식증 조직에서 보다 갑상선 유두암 조직에서 감소하는 양상을 보였다. AMES 고위험군에서 저위험군에 비해 bcl-2 발현이 감소하는 결과를 보였다. 또한 갑상선 유두암과 미세 유두암과는 발현율에 차이가 나지 않았으며, 병기가 진행됨에 따라 P53 발현은 차이를 보이지 않았으나, bcl-2는 병기가 진행될수록 발현이 감소하였다. 이는 bcl-2의 갑상선 유두암 예후 예측 인자로서의 가능성을 제시한다.

REFERENCES

- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 2000;89:202-17.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-9.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348: 334-6.
- Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 1989;320:1047-54.
- Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Research* 1996;56: 2178-84.
- Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2003;89:55-64.
- Zou M, Shi Y, Farid NR. p53 mutations in all stages of thyroid carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993;77:1054-8.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980;68:251-306.
- Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Human Pathology* 1996;27: 102-10.
- Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Pathology, Research & Practice* 1996;192:676-83.
- Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *The Journal of Clinical Investigation* 1993;91:1753-60.
- Moretti F, Farsetti A, Soddu S, Misiti S, Crescenzi M, Filetti S, et al. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene* 1997;14:729-40.
- Kikuchi S, Hiraide H, Tamakuma S, Yamamoto M. Expression of wild-type p53 tumor suppressor gene and its possible involvement in the apoptosis of thyroid tumors. *Surgery Today* 1997;27:226-33.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation* 1993;91:179-84.
- Komminoth P. The RET proto-oncogene in medullary and papillary thyroid carcinoma. Molecular features, pathophysiology and clinical implications. *Virchows Arch* 1997;431: 1-9.
- Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P. A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *International Journal of Cancer* 1999;80:345-8.
- Soravia C, Sugg SL, Berk T, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, et al. Familial adenomatous polyposis-associated thyroid cancer: a clinical, pathological, and molecular genetics study. *The American Journal of Pathology* 1999;154:127-35.
- Herod JJ, Eliopoulos AG, Warwick J, Niedobitek G, Young LS, Kerr DJ. The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Research* 1996;56: 2178-84.
- Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *American Journal of Pathology* 1994;145:1191-8.
- Haynik DM, Prayson RA. Immunohistochemical expression of

- Bcl-2, Bcl-x, and Bax in follicular carcinomas of the thyroid. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2006;14:417-21.
- 21) Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996;73:139-43.
 - 22) Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, et al. Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *International Journal of Cancer* 1999;84:545-52.
 - 23) Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995;80:285-91.
 - 24) Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 1995;80:279-84.
 - 25) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
 - 26) Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Archiv* 1997;430:125-30.
-