

子宮頸部癌에서 腫瘍抑制 遺傳子 p53 生性物의 發現

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*
권경익 · 이태성 · 이정호 · 차순도 · 이상숙* · 서영욱

= Abstract =

Expression of the mutant p53 gene in the carcinoma of the cervix uteri

Kyung Ik Kwon, M.D., Tae Sung Lee, M.D., Jung Ho Rhee, M.D.,
Soon Do Cha, M.D., Sang Sook Lee*, M.D., Young Wook Suh, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, Pathology,
School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*

The nuclear accumulation of p53 protein is known to correspond with mutation of the p53 tumor suppressor gene.

To investigate the relationship between clinico-pathologic features and expression of p53 mutations, 65 cases of primary cervical carcinoma were analysed by an immunohistochemical method using monoclonal antibody of p53.

Immunostaining demonstrated various nuclear stainings of cancer cells in 48.4% of squamous cell carcinoma (51.9% in large cell carcinoma and 25.0% in small cell carcinomas) and 23.5% of adenocarcinoma. ($p < 0.05$) No differences in clinical stage and p53 positivity were found.

There was no significant correlation between p53 positive cases and status of recurrence.

This data suggests that p53 mutation plays an important role in carcinogenesis of the cervical cancer. The nuclear accumulation of p53 protein is not correlated with the disease progression and prognosis.

Key Word : p53, Carcinoma of the Cervix.

I. 서 론

자궁경부암은 한국 여성 생식기암 중 가장 높은 발생률을 보이고 있는 암으로서 조직병리학적 으로 여러 형태를 보이고 있고, 임상양상 역시 서로 많은 차이가 있으며 그 발생원인에 있어서

도 조직학적인 형태에 따라 서로 상이한 것으로 알려져 있다. 그 중 자궁경부 편평상피암은 가장 많은 형태로서 발생원인에 있어 인유두종 바이러스(Human papillomavirus)의 역할은 잘 알려져 있다(zur Hausen, 1987). 그러나 인유두종 바이러스는 단지 유발인자로 작용할 뿐이고 그 외의

* 본 논문은 1994년도 계명대학교 울종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

여러 보조인자가 필요하며 특히 p53 유전자와의 관계에 관한 연구가 최근 활발히 되어지고 있다 (Scheffner et al, 1991; Fujita et al, 1992).

p53 변이유전자는 사람에서 생기는 암에서 가장 흔하게 발견되는 발암과정에 관여하는 암유전자로서 전체 암의 약 절반에서 변이를 보이고 있다. 53kD의 핵 인산단백(nuclear phosphoprotein)을 encoding하는 이 유전자는 mutant p53 clone을 transfection시 수용세포에서 활성화된 ras 유전자와 함께 수용세포를 전환(transform)시키므로 초기에는 cellular oncogene으로 알려졌으나 (Lane and Crawford, 1979; Eliyahu et al, 1984), 그 후 많은 연구결과 정상 p53 유전자(wild-type)는 암억제 유전자로 알려졌다(Eliyahu et al, 1989; Finlay et al, 1989; Hinds et al, 1989). 그러나 p53 유전자의 돌연변이시엔 암억제기능을 할 수 없기 때문에 세포의 변성을 촉진하게 되며 (Lavigne et al, 1989), p53 유전자를 가지고 있는 17번 염색체의 단완(short arm band B-1)이 여러 종류의 암에서 소실되어 있는 것이 많이 관찰되었다(Vogelstein et al, 1989; Baker et al, 1989).

p53은 핵산의 보수와 재생, 세포분화, programmed cell death(Harris and Hollstein, 1993) 및 세포주기 조절(Levine et al, 1991; Baker et al, 1990) 등에 관여한다. 정상인 p53 단백질은 아주 짧은 반감기를 가지고 있어 면역조직화학적으로 측정하기 힘들다. p53 변이시 반감기가 길어져 면역조직화학법에 의하여 쉽게 찾아 낼 수 있다(Rogel et al, 1985).

자궁경부암에서 가장 많은 형태인 편평상피암과 선암은 서로 다른 암화과정을 가지며 또 치료 후 재발에 관계되는 예후인자로서는 자궁경부암 자체에 의한 요인, 치료에 의한 요인 등 여러 가지 인자가 관여한다는 것은 잘 알려져 있다. 최근 분자생물학의 발달로 인하여 수많은 암유전자가 밝혀져 암화과정에서 뿐 아니라 일부는 또 예후인자로서의 역할에 관하여서도 연구가 되고 있으며, 특히 지금까지 폐암, 대장암 위암등에 관한 연구가 많이 발표되고 있다. 그러나 자궁경부암에서 p53 유전자의 발현과 임상병리학적 상관관계에 관한 연구는 많지 않다. 이에 저자는 과

거 치료후 추적관찰을 받고 있는 환자를 대상으로 치료전 조직절편 검사를 위해 생검하여 보관되어 있는 파라핀 포매된 조직을 이용한 면역조직화학법에 의하여 p53 유전자 발현과 자궁경부암의 임상병리학적 양상과 예후인자로서의 역할을 보기 위하여 본 연구를 시도하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

1989년 5월부터 1993년 6월까지 계명대학교 동산의료원 산부인과에 내원하여 자궁경부암의 조직학적 진단을 받은 67명의 환자병력지를 조사하여 임상 병리학적인 양상 및 재발유무를 조사하였으며, 사용된 조직은 치료시작전 조직생검 시 얻어져 파라핀 포매되어 보관된 조직을 이용하였다. 임상병기는 FIGO 분류상 I b기 21예, II a기 36예, II b기 4예, III b기 5예, IV기 1예 였으며, 조직학적으로 편평상피암종이 31예, 선암이 34예, 선평상피암이 2예였다.

2. 연구방법

가) P53 단백질에 대한 면역조직화학 염색

p53 발현을 보기 위한 면역조직화학염색을 위해 일차항체로 p53(monoclonal antibody DO7, Novocastra Lab, UK)을 1 : 500으로 희석하여 사용하였다. 조직절편을 탈파라핀과 탈수를 시행한 후 계열 에탄올을 거쳐 함수하고, 메탄올과 30% H₂O₂를 9 : 1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 0.01M citrate buffer(PH 6.0) 용액에 담근 뒤 microwave로 5분씩 2회 가열하였다. 그 후 1% 정상 마혈청(normal horse serum, Vectastain kit, USA)으로 37°C에서 30분간 둔 후 30μl의 일차항체를 조직 절편 위에 놓고 coverslide를 덮은 다음 37°C에서 2시간 두었다. Phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척 후 이차항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin, Vectastain Elite Kit, USA) 1 : 200과 avidin-biotin peroxidase complex(Vector, USA)을 조직 절편 위에 적당량을 놓은 후 각각 37°C에서 30분간 반응하였다. 이후 Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-H₂O₂ 용액으로 발색하고

Mayer's hematoxylin으로 대조염색 하였다.

나) p53 단백질발현에 대한 결과 판정은 광학현미경으로 슬라이드 전시야의 중앙세포를 검색하여 염색이 되지 않는 경우나 10% 미만의 중앙세포에서 양성으로 염색되는 경우를 음성으로 판정하였다.

3. 통계학적 처리

통계학적 검증은 Chi-square test를 이용하였고, P<0.05에서 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 자궁경부암에서 p53발현과 조직학적 형태와의 상관관계

편평상피암 31예 중 15예에 양성을 보여 48.4%, 선암 34예 중 8예에 양성을 보여 23.5%로서, 편평상피암이 선암에 비해 유의한 발현율의 증가를 보였다(p=0.03).

Table 1. Relationship between p53 mutation and histologic types of carcinoma of the cervix

Histology	No. of patients	No. of positivity(%)
Squamous carcinoma	31	14(48.4)
Adenocarcinoma	34	8(23.5)*
Adenosquamous carcinoma	2	1(50.0)

* p=0.03

2. 자궁경부 편평상피암의 subtype에 따른 p53 발현

대세포형과 소세포형에서의 발현율의 차이는 소세포형의 수가 적어 비교가 어려웠으며, 편평상피암세포의 각화성에 따른 발현빈도는 유의한 차이가 없었다.

Table 2. Relationship between p53 mutation and subtypes of squamous cell carcinoma of the cervix

Histology	No. of patients	No. of positivity(%)
Large cell	27	14(51.9)
Keratinizing	17	9(52.9)
Nonkeratinizing	10	5(50.0)
Small cell	4	1(25.0)

3. 자궁경부 암의 임상기별에 따른 p53 발현

임상기 Ib에서 편평상피암 6예 중 4예, 선암 15예 중 2예가 양성으로 나왔으며, IIa에서는 편평상피암 19예 중 16예, 선암 11예 중 4예가 양성을 보였다. 임상기별 진행에 따른 p53 발현은 유의한 증가는 없었다.

Table 3. Immunohistochemical staining of p53 protein in squamous cell carcinoma and adeno-carcinoma of the cervix according to the stage

Stage	No. of patients		No. of positive(%)	
	SCC	adenoca	SCC	adenoca
Ib	6	15	4	2
IIa	19	16	11	4
IIb	3		0	
IIIb	2	3	1	1
IV	1		0	

SCC : Squamous cell carcinoma,

Adenoca : Adenocarcinoma

4. 자궁경부 편평상피암 Ib기 및 IIa기에서 재발에 따른 p53 발현

재발한 6예 중 3예에서 (50.0%), 재발하지 않은 16예 중 10예서 양성(62.5%)으로 나타나서 재발에 따른 p53의 유의한 증가는 없었다.

Table 4. Immunohistochemical staining of p53 protein in stage Ib and IIa squamous cell carcinoma of the cervix according to recurrence except small cell cancer.

Status	No. of patients	No. of positivity(%)
Recurrence	6	3(50.0)
No recurrence	16	10(62.5)

P>0.05

IV. 고 찰

본 연구의 결과 p53 염색은 모든 비종양 자궁경부 조직에서는 발견되지 아니하고 다만 암세포에서만 발견되어 최근의 폐암, 대장항문암, 난소암 및 유방암에서의 결과와 유사한 양상을 보이고 있다. 자궁경부 편평상피암에서 48.4%의 p53 양성염색은 p53의 안정화에 기인하는 p53 단백질변이의 과다 존재에 기인한다. Wild-type p53은

핵에서 낮은 양의 단백질로 발견되는 반면 변이형은 긴 반감기를 가지고 있어 핵내에 축적이 된다. Wild-type은 반감기가 5~10분인 데 비하여 변이형은 변형된 세포 내에서 30배 정도 증가가 된다(Rogel et al, 1985).

p53 유전자 변이가 암화과정에 관여한다는 증거는 암에 관련하여 나타나는 유전자 변이 중 이것이 가장 흔하게 볼 수 있는 양상이기 때문이다. 이 가설을 가장 강하게 뒷받침할 수 있는 증거는 세포에 p53 변이를 가지고 있는 사람이 암에 걸릴 확률이 아주 높은 Li-Fraumeni syndrome 이다(Li et al, 1988). 자궁경부암 발생의 p53의 역할에 대하여서는 몇 가지 가설이 있다. Marshall(1991)은 정상 p53은 c-myc의 작용을 방해하며 p53의 변이가 있을 경우엔 c-myc의 생성을 촉진시키므로 자궁경부암의 발생을 촉진시킬 수 있다는 것이다. 자궁경부암의 발생과정에서 고위험 인유두종 바이러스의 작용은 잘 알려져 있다. 인유두종 바이러스는 E6 및 E7 유전자들의 발현을 억제하지 못하게 되어 암이 발생한다고 알려져 있는데 HPV type 16과 type 18의 E6 단백질들은 p53 단백질과 복합체를 형성하고 그 결과 p53 단백질을 불활성화시키며, 결과적으로 세포의 형질전환(transformation) 및 종양을 유도한다고 보고되고 있다.

본 연구에서는 인유두종 바이러스나 c-myc 등과의 관계에 대한 조사는 하지 않았으나 p53 변이가 자궁경부 편평상피암에서 더 많이 발현이 되고 또 임상기 진행에 따른 발현의 증가는 없는 것으로 보아 이는 주로 암발생 과정에서만 관계되고 이후 암의 진행에 미치는 역할은 크지 않는 듯 하다. 최근 Crook 등(1991)은 24명의 원발성 자궁경부암에서 3명(12%), Scheffner 등(1991)은 자궁경부암 세포주 7종 중 3종(29%), Oka 등(1993)은 자궁경부암 환자에서 평균 25.9%(15.0%~59.5%)의 p53 발현을 보고하고 있어 저자의 경우보다 낮은 발현율을 보이고 있다. 세포조직학적 형태에 따른 p53 변이 발현은 선암에서 선 편평상피암에 비하여 낮은 발현율을 보여 이는 Holm 등(1993)의 결과와 유사한 결과를 보이며, 또 폐암에서도 선암에 비하여 편평상피암에서 더 높은 결과를 보인다는 Iggo 등(1990)의 결과와

유사한 결과를 보이고 있다. 예후 인자로서 p53 변이 발현의 의의는 본 연구의 결과 재발한군에서 발현이 증가하지 않았으며, 생존율과의 비교는 대상환자의 생존율이 높은 관계로 인하여 비교가 힘들었다.

지금까지 유방암, 폐암 및 대장 항문암 등에서 p53의 예후인자로서의 역할에 관한 많은 보고가 있다. Ostrowski 등(1991)은 유방암에서 p53과 생존율과의 관계에서 임파절전이, 암의 분화정도, 프로세스테론 수용체 등의 타예후인자는 생존율과 밀접한 관계가 있으나 p53은 관계가 없는 것으로 보고하였으며, 항문대장암에서 Scott 등(1991)은 50%의 원발성암에서 양성을 보였으나 p53의 과다발현은 예후인자로서 의의가 없는 것으로 보고하였다. p53 양성과 음성의 경우 평균생존기간은 48.1개월과 49.2개월로서 유사한 결과를 보여 폐암의 경우 McLaren 등(1992)은 125명의 폐암에서 54%의 p53 양성을 보였지만, 생존과의 관계에서는 선암 및 편평상피암 모두에서 의의있는 차이는 없었다. 51예의 폐의 비소세포성암에서 Chiba 등(1990)은 암의 임상기별, 임파절전이 및 조직형태학적으로 다른 상관관계는 없는 것으로 보고했으며, 생존에 관한 분석은 없었다. 위암에서 김영돈 등(1994)은 278명의 위암에서 p53 단백질발현은 5년 누적생존율과의 상관관계가 없는것으로 보아 예후인자로서는 의의가 없는 것으로 또 Sasano 등(1993)도 p53의 면역조직화학적 발현은 5년 누적 생존율과 연관이 없는 것으로 보고하고 있다. 상기한 몇몇 보고는 저자의 경우와 유사한 결과를 보이고 있으나, Horio 등(1993)은 비소세포성 폐암에서 초기암이나 진행된 경우 모두에서 p53변이의 발현은 유의한 생존율의 감소를 가져오는 것으로, Martin 등(1992)은 p53 양성군에서 p53 음성군보다 5년 누적 생존율이 유의하게 낮은 것으로 보고하여 저자와 상반된 결과를 보이고 있다. 이러한 p53 변이의 조직 내에서의 발현은 예후인자로서의 역할은 기대하기 힘들것 같으며, 자궁경부암의 병인, 특히 편평상피암의 병인에서 p53의 역할에 관한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

1989년 5월부터 1993년 6월까지 계명의대 동산의료원 산부인과에 내원하여 치료를 받은 후 추적검사를 받고 있는 자궁경부암 환자 중 65명을 임의로 추출하여 치료전 조직절편검사에 의하여 얻어져 파라핀 포매된 자궁경부암 조직을 이용하여 면역조직화학적 방법에 의하여 p53 유전자변이의 발현에 관하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

조직학적 형태에 따라 편평상피암에서 48.4%의 발현을 보여 23.5%의 발현을 보인 선암에 비하여 편평상피암에서 유의한 높은 발현율을 보였다. 병의 진행상태와의 관계에서는 임상기별 진행에 따른 p53 발현의 증가는 보이지 않는 것으로 보아 상관관계가 없는 것으로 보이며, 재발유무에 따른 p53 발현 증가도 없는 것으로 보아 예후인자로서의 역할은 기대하기 어렵다.

이상의 결과로 보아 자궁경부암에서 p53의 발현은 선암에 비하여 편평상피암에서 훨씬 높은 발현율을 보이고 있어 선암과 편평상피암의 암화과정이 서로 다른 것을 알 수 있으며, 암이 발생하여 치료후 예후인자로서의 p53 단백질발현은 의의가 없는 것으로 보여서 향후 자궁경부암의 암화과정 특히 편평상피암에서의 p53의 역할에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

-References-

- 1) 김영돈, 이종인, 김용규 등 : The prognosis and expression of p53, c-erbB-2 in gastric cancer patients. *Kor Cancer* 1994 : 26 : 534.
- 2) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. : Chromosome 17 deletions and p53 mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989 : 244 : 217.
- 3) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, et al. : Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990 : 249 : 912.
- 4) Chiba I, Takahashi T, Nau MM, et al. : Mutations in the p53 gene are frequent in primary resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1990 : 50 : 1603.
- 5) Crook T, Wrede D, Vousden KH, et al. : p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* 1991 : 6 : 873.
- 6) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al. : Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984 : 312 : 646.
- 7) Eliyahu D, Mechalovitz D, Eiyahu S, et al. : Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989 : 86 : 8763.
- 8) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 protooncogene can act as a supressor of transformation. *Cell* 1989 : 57 : 1083.
- 9) Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, et al. : Alterations of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papilloma virus infection. *Cancer Res* 1992 : 52 : 5323.
- 10) Harris CC, Hollstein M : Medical progress-clinical implications of the tumor-suppressor gene. *New Engl J Med* 1993 : 329 : 1318.
- 11) Hinds P, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989 : 63 : 739.
- 12) Holm R, Skomedal H, Helland A, et al. : Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal premalignant, and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 1993 : 169 : 21.
- 13) Horio Y, Takahashi T, Karohishi T, et al. : Prognostic significance of p53 mutations and 3p. deletions in primary resected non small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993 : 53 : 1.
- 14) Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990 : 335 : 675.
- 15) Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cells. *Nature* 1979 : 278 : 261.
- 16) Lavigueur A, Maltby V, Mock D, et al. : High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice over expressing mutant alleles of the p53 on 10 genes. *Mol Cell Biol* 1989 : 9 : 3982.
- 17) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991 : 351 : 453.
- 18) Li FP, Fraumeni JF, Blattner WA, et al. : A cancer family syndrome in 24 kindreds. *Cancer Res* 1988 : 48 : 5358.
- 19) Martin MM, Filipe MI, Morris RW, et al. : p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992 : 50 : 859.
- 20) McLaren R, Kuzu I, Dumill M, et al. : The relationship

- of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992;66 : 835.
- 21) Oka K, Nakano T, Arai T. p53 CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma. *Cancer* 1993 : 72 : 160.
- 22) Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, et al. : p53 Expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors : An immunohistochemical study. *J Pathol* 1991 : 164 : 75.
- 23) Rogel A, Popliker M, Webb C, et al. : p53 cellular tumor antigen : Analysis mRNA levels in normal adult tissues, embryos and tumors. *Mol Cell Biol* 1985 : 5 : 2851.
- 24) Sasano H, Date F, Imatani A, et al. : Double immunostaining for C-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Human Pathol* 1993 : 24 : 584.
- 25) Scott N, Sagar J, Stewart GE, et al. : p53 in colorectal cancer : clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991 : 63 : 317.
- 26) Scheffner M, Minger K, Byrne JC, et al. : The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell line. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991 : 88 : 5523.
- 27) Vogelstein B, Fearo ER, Hamilton SR, et al. : Genetic alterations during colorectal tumor development. *New Engl J Med* 1989 : 319 : 525.
- 28) Zur Hausen H : Papillomaviruses in human cancer. *Appl Pathol* 1987 : 5 : 19.
-