

상피성 난소암에서 p53 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 산부인과학교실

남동호 · 차순도 · 이정호

조치홍 · 이태성 · 서영우

=Abstract=

Overexpression of the p53 Tumor Suppressor Gene in Epithelial Ovarian Cancer

Dong Ho Nam, M.D., Soon Do Cha, M.D., Jung Ho Lee, M.D.,
Chi Heum Cho, M.D., Tae Sung Lee, M.D., Young Wook Suh, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keimyung University,
Taegu, Korea*

It has been recognized that abnormalities of tumor suppressor gene play a significant role in the development of some human tumors.

One of the most common genetic alterations seen in human tumors is the mutational inactivation of the tumor suppressor gene p53. Intranuclear p53 accumulation is a common finding in many different human tumors and is associated with a worse prognosis. We examined samples of common epithelial ovarian cancers to assess the prevalence of p53 accumulation and its clinicopathologic correlations, and its prognostic implication, using anti-p53 antibodies and peroxidase immunohistochemistry. Of 40 cases with ovarian cancers(22 cases of serous type, 10 cases of mucinous types, 4 cases of endometrioid type, 3 cases of undifferentiated type, and 1 case of malignant mixed epithelial tumor), a variable degree of p53 immunoreactivity was seen in 27 cases(67.5%).

No relationship was seen among p53 overexpression, age, histologic type, stage and mean survival. Strong expression of p53, however, was correlated with cell differentiation and tumor size($p=0.02$, respectively).

These results have implications suggesting that abnormal expression of p53 occurs frequently in ovarian cancers and p53 is overexpressed more frequently in tumors with poor cell differentiation & big size.

Key Words : p53 tumor suppressor gene, epithelial ovarian cancer.

I. 서 론

최근 암의 발생과정에 관여하는 암유전자(oncogene) 및 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)에 대한 분자생물학의 발전은 암의 원인규명 및 암의 예후판정에 까지 기여하기 시작했다. 이중 종양억제 유전자로 알려진 p53 유전자의 돌연변이는 인체에 발생하는 여러 악성종양에서 가장 흔히 관찰되는 유전자 이상으로 알려져 있다(Harris, 1990).

17번 염색체의 단완(17p 13.1)에 위치하고 있는 p53 유전자는 53 kD의 분자량을 가진 핵 인단백질로서 정상 세포내에서 소량으로 존재하며 짧은 반감기를 가지고 있으나, 돌연변이나 소실 등에 의해 그 기능을 상실하게 되면 암 발생을 억제하는 기능이 사라져 암이 발생되는 것으로 알려져 있다(Lavigueur et al., 1989).

또한 돌연변이된 p53 유전자에 의해 생성된 p53 단백질은 정상형에 비하여 단백질의 반감기가 길어지게 되어 전환된 세포나 악성종양에서 많은 양이 발견 된다(Banks et al., 1986; Levin et al., 1991). 최근에는 p53 단백에 대한 단 클론항체의 개발로 p53 단백의 과표현을 면역조직화학적 방법으로 용이하게 관찰할 수 있게 되었다(Rogel et al., 1985). 이러한 p53 유전자의 변이는 다양한 종류의 암종, 육종, 혈액 종양에서 발견되며(Nigro et al., 1989), 유방암에서는 p53 단백의 과표현이 불량한 예후와 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Ostrowski et al., 1991). 이에 저자는 면역화학염색법을 통한 난소암에서의 p53 단백의 발현도와 p53 단백 발현이 이미 잘알려진 난소암의 예후인자들과의 상관관계가 있는지를 알아보기 위해 본 연구를 시도하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

1986년 9월부터 1991년 9월까지 계명대학교 동산의료원 산부인과를 내원하여 임상 및 병리조직학적으로 진단된 난소상피성 암종 40례의 파라핀포매조직을 대상으로 연구하였다. 총 40례의 난소종양중 장액성 낭선암종 22례, 점액성 암종 10례, 자궁내막암 암종 4례, 미분화 암종 3례 및 악성 혼합성 상피암종 1례이었다(Table 1).

Table 1. Malignant ovarian neoplasms divided according to histopathologic type and FIGO stage

Histologic type	Stage				
	I	II	III	IV	Total
Serous	6	1	13	2	22
Mucinous	8	0	1	1	10
Endometrioid	3	0	1	0	4
Undifferentiated	1	0	2	0	3
Mixed	1	0	0	0	1
Total	19	1	17	3	40

2. 연구방법

1) 조직학적 등급

난소상피성 암종에서는 Decke 등(1973)에 의한 고분화, 중등도 분화 및 저분화로 분류하였다. 장액성 낭선암종에서는 명확한 유두상 구조로만 종양세포가 구성되어 있을 때를 고분화로 하였고, 유두상 양상 및 미만성 부분이 존재되어 있는 경우를 중등도 분화로 하였으며 유두상이 관찰되지 않고 미만성 부분만 관찰되는 경우는 저분화로 하였다. 점액성 낭선암종에서는 많은 낭을 가지면서 내강으로 돌출되는 종양세포들이 존재하고 국소적인 기질내 침윤을 보이는 경우를 고분화로 하였고, 부분적으로 낭을 형성하는 경우를 중등도 분화로 하였으며 낭성변화는 보이지 않고 미만성 부위만 관찰되는 경우를 저분화로 하였다. 자궁내막암 암종에서도 종양세포 전체가 선으로 이루어진 경우를 고분화, 부분적인 선구조를 보이는 경우를 중등도 분화, 선구조 없이 미만성 부위만 있는 경우를 저분화로 하였다.

2) p53 단백에 대한 면역조직화학 염색

p53 발현을 보기 위한 면역조직화학염색을 위해 일차 항체로 p53 monoclonal antibody DO7(Novocastra Lab, UK)을 1:500으로 회석하여 사용하였다. 각 증례당 대표되는 2장의 조직절편을 탈파라핀과 탈수를 시행한 후 계열 에탄올을 거쳐 함수하고 메탄올과 30% H₂O₂를 9:1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 0.01 M 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 둔후 30μl의

일차 항체를 조직 절편위에 놓고 coverslip를 덮은 다음 37 °C에서 2시간 두었다. 세척후 이차항체로서 biotinylated anti-mouse immunoglobulin(Vectastain Elite kit, USA)와 avidin-biotin peroxidase complex(Vector, USA)을 1 : 200으로 희석하여 조직절편위에 적당량 놓은 후 각각 37 °C에서 30분간 두었다. 세척은 phosphate-buffered saline(PBS)을 사용하였다. Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-H₂O₂ 용액으로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

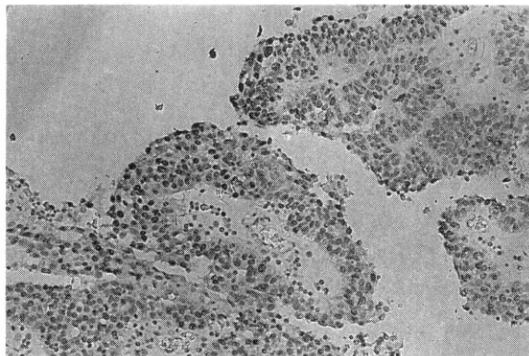


Fig. 1. Immunohistochemical staining of p53 protein of cystadenocarcinoma showing diffuse strong positive in the tumor cells(Avidin-biotin peroxidase complex, original magnification $\times 100$).

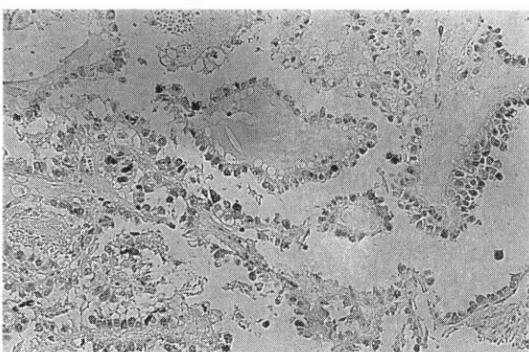


Fig. 2. Immunohistochemical staining of p53 protein of cystadenocarcinoma showing focal weak positive in the tumor cells(Avidin-biotin peroxidase complex, original magnification $\times 100$).

3) 결과판정

결과판정은 광학현미경으로 슬라이드 전시야의

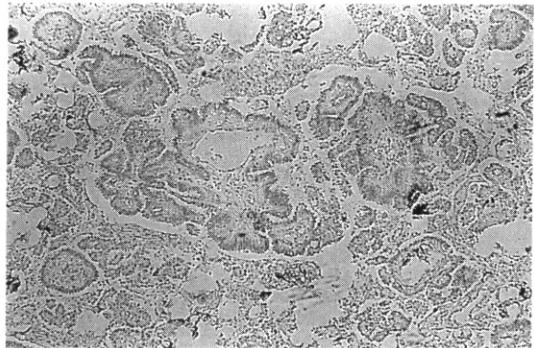


Fig. 3. Immunohistochemical staining of p53 protein of cystadenocarcinoma showing negative in the tumor cells(Avidin-biotin peroxidase complex, original magnification $\times 100$).

종양세포를 검색하여 염색이 되지않는 경우를 음성(negative), 50 %미만의 종양세포에 약하게 염색되는 경우를 부분적 약양성(weak/focal), 50 %이상의 종양세포에서 약하게 염색되는 경우를 미만성 약양성(weak/diffuse), 강하게 염색되는 경우를 미만성 강양성(strong/diffuse)로 판정하였다(Fig. 1, 2, 3).

4) 통계학적 처리

통계학적 유의검증은 Chi-square test를 이용하였고, $p < 0.05$ 에서 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. 난소암에서 나이에 따른 p53의 발현도

연령분포는 p53 음성군 44.3세, p53 약양성군 41.1세, p53 강양성군 50.6세로서 나이에 따른 발현빈도는 유의한 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Relationship between p53 expression and patient's age in carcinoma of the ovary

	p53		
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)
Age(yr)	44.3	41.1	50.6

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

Table 3. Comparison of p53 status and stage of the ovarian cancer

Stage	p53			Total (No. of tumors)
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)	
I / II	8	4	8	20
III / IV	5	6	9	20
Total	13	10	17	40

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

Table 4. Comparison of p53 and histologic type of the ovarian cancer

Histology	p53			Total (No. of tumors)
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)	
Serous	7	6	9	22
Mucinous	4	1	5	10
Endometrioid	1	1	2	4
Undifferentiated	1	1	1	3
Mixed	0	1	0	1
Total	13	10	17	40

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

2. 난소암의 병기에 따른 p53의 발현도

총 40례의 난소암 중 27례(67.5%)에서 p53 발현양성을 보였으며, 초기난소암(1기 및 2기)에서 20례, 진행난소암(3기 및 4기)에서 20례로, 임상기별에 따른 p53 발현은 유의성이 없었다(Table 3).

3. 난소암의 조직학적 형태와 p53 발현의 상관 관계

장액성 낭성암종이 22례 중 15례(68.1%), 점액성 낭성암종이 10례 중 6례(60%), 자궁내막양 낭성암종이 4례 중 3례(75%), 미분화 낭성암종이 3례 중 2례(66.7%), 혼합상피낭종암종이 1례 중 1례로서 조직학적 형태에 따른 p53 발현은 통계학적 의의가 없었다 (Table 4).

4. 난소암의 조직분화도에 따른 p53 단백의 발현

세포에 분화도에 따른 p53 발현율은 고분화도군

8례 중 4례(50%), 중등도분화도군 17례 중 8례(47%), 미분화도군 15례 중 10례(66.7%)로서 세포의 분화가 나쁠 수록 p53 발현율이 높았다($p=0.02$)(Table 5).

5. 난소암의 종괴 크기에 따른 p53 발현도

난소암의 종괴 크기가 10 cm 이하군에서 13례 중 7례(53.8%), 10 cm 이상군에서 27례 중 20례(74.1%)로서, 종괴 크기가 클 수록 p53 발현도가 높았으며 통계학적인 유의성이 있었다($p=0.02$)(Table 6).

6. 평균 생존률에 따른 p53 발현도

평균 생존률은 p53 발현군과 음성군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 7).

IV. 고 칠

난소암의 원인은 아직까지 거의 밝혀지지 않은 실정이다. 그러나 최근 분자생물학의 발전으로 인간

Table 5. Comparison of p53 and tumor grade of the ovarian cancer

Tumor grade	p53			Total (No. of tumors)
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)	
I	4	4	0	8
II	4	5	8	17
III	5	1	9	15

*Differences in p53 between tumors of grade I - III is significant($p=0.02$)

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

*I : well differentiated

II : moderate differentiated

III : poor differentiated

Table 6. Comparison of p53 expression and tumor size of the ovarian cancer

Tumor size(cm)	p53			Total (No. of tumors)
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)	
<10	0	5	2	13
>10	7	5	15	27

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

Table 7. Comparison of p53 expression and mean survival of ovarian cancer

	p53		
	Negative (No. of tumors)	W/F (No. of tumors)	S/D (No. of tumors)
Mean survival (mo)	40.1	38.8	42.2

*W/F : weak/focal

S/D : strong/diffuse

의 세포증식은 염색체 DNA의 복제(cDNA)에 이은 세포질 분열(cytokinesis)에 의해 일어난다는 사실이 밝혀졌고, 나아가서는 인간의 암 발생에 관여하는 암유전자(proto-oncogene) 및 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 실체를 밝힘으로써 암의 원인규명 및 진단, 임상적 양상, 치료와 예후까지 파악 할 수 있게 되었다. 고형성 종양에서 가장 널리 연

구되고 있는 종양억제 유전자는 DNA 와 결합하여 복사조절인자(transcriptional regulator)로 작용한다고 알려져 있고(Kern et al., 1991), 종양세포 아포토시스(apoptosis)를 유도하여 종양세포 성장, 크론생산 그리고 종양형성 등의 감소와 억제에 깊이 관여함이 확인됐다(Yonish-Rouach et al., 1991). 이러한 정상적인 암억제유전자는 자외선, 바이러스, 화학물질 등의 영향에 의해 유전자의 소실, 절단 혹은 접돌연변이 등에 의해 불활성화가 생기게 되면 그로 인한 구조적 이상으로 p53 유전자는 고유의 세포증식 억제기능을 잃게 되고 오히려 암세포의 증식을 초래하게 된다(Jenkins et al., 1985). 결과적으로 p53 단백의 과표현을 나타내는 p53 유전자의 돌연변이는 암종, 육종 그리고 혈액악성 종양 등을 포함한 다양한 암들에서 발견되고 있으며 인간의 암에서 관찰될 수 있는 가장 흔한 분자 유전학적 현상이다(Nigro et al., 1989 ; Hollstein et al., 1991 ; Caron et al., 1992).

p53 유전자의 돌연변이를 관찰할 수 있는 방법은 암세포내에 돌연변이된 p53 유전자의 염기서열 이상을 찾아내는 분자 생물학적 방법과 돌연변이된 p53 유전자로부터 생성된 p53 단백의 과발현을 조사하는 면역조직화학적 방법이 있다. 본 연구에서 실시한 p53 단백에 대한 면역조직화학 염색의 장점은 이미 확보되어 있는 동결조직이 없는 종례에서도 파라핀 포매조직을 이용할 수 있고, 통상적인 분자생물학적 방법보다 p53 단백의 과발현 및 조직학적 관찰을 동시에 할 수 있어 종양세포에서만의 p53 단백의 발현을 측정할 수 있고 다른 조직학적인 소견들과 상호 비교분석이 가능하다. 본 연구에서도 종양세포에서만 p53 단백이 염색되어 최근에 발표된 연구들과 비슷한 양상을 나타내었다. Bur 등(1992)은 p53 단백의 음, 양성 염색반응의 판독을 광학현미경으로 검색하여 염색이 안되면 음성(negative), 드물게 양성 세포들이 존재하면 약양성(weak/focal), 다수의 양성 세포가 관찰되면 강양성(strong/diffuse, S/D)으로 나누어 판정하였으나 최근 Henriksen 등(1994)은 양성군을 세분하여 판정한 것과 단지 음성 및 양성으로 판정한 결과 이에 차이점이 없음을 발표하였다. 본 연구에서도 양성군을 약양성 및 강양성으로 세분하여 조사하였으나 통계학적 처리는 음성 및 양성으로만 구분하여 시행하였다.

난소암에서 나이에 따른 p53 단백의 발현율에 대한 문헌보고는 없으나, 본 연구에서 나타난 결과는 p53 음성군은 44.3세였고, p53 양성군은 45.9세(약 양성군 41.1세, 강양성군 50.6세)로서 나이에 따른 유의한 차이는 없었다. 최근 Marks 등(1991)은 난소암 107례 중 54례(50%), Henriksen 등(1994)은 55례 중 24례(44%)의 p53 발현율을 보고하였으며, 저자의 경우는 이들의 결과보다 높은 발현율을 보였다. 또 Kohler 등(1993)은 초기 난소암(2기 이하) 52례 중 19례(29%)의 발현율을 보고하였고, 이중 병변이 난소에 국한된 경우(stage IA/IB) 15%, 난소를 넘어선 경우(stage IC/II) 44%의 발현율을 보고하였으며, Berchuck 등(1994)은 144례의 난소암 중 61례(42.4%)에서 발현을 보였고 이들 중 초기암(stage IA/IB)은 15%, 진행된 암(stage IC/IV)에서는 50%의 발현율을 보여 이들은 임상기가 높을수록 높은 발현율을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서 임상기별에 따른 p53 발현은 유의성이 없었다. 세포조직학적 형태에

따른 p53 발현율에 따른 지금까지의 문헌보고는 없으며 본 연구에서도 유의성이 없는 것으로 보아 p53 발현양상은 조직학적 형태에 따른 난소암의 예후인자로서 의의가 없는 것으로 생각된다.

Bosari 등(1993)은 난소암에서의 p53 발현과 예후인자로서의 상관관계에 대한 연구에서 p53 발현과 조직학적 형태와 질병의 임상기 사이에는 아무 연관성이 없다고 하였으나 세포의 분화가 나쁠수록 발현율이 높았으며, 발현율이 높을 수록 평균 생존율을 낮았다고 보고하였다. 본 연구에서 p53 단백은 난소암의 세포분화정도가 나쁘고 종양의 크기가 클수록 발현율이 높게 나타났다. 그러나 세포분화정도와 수술전 종양크기는 난소암의 예후와는 크게 관련이 없는 것으로 알려져 있기 때문에 이들에 대한 p53의 높은 발현율은 임상적 의의가 없는 것으로 생각된다. 그러나 p53 양성발현 종양의 종양세포 분열증식이 보다 왕성하다는 의미에서는 보다 더 많은 조사 대상군에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Dieti 등(1994)은 7례의 난소미분화종에서 p53 발현도를 조사하여 전례에서 양성발현을 보고하였으며 종양의 임상기와 p53 발현도와는 연관이 없다고 하였다. 그리고 난소암이외의 타장기암에서 p53 발현과 예후인자로서의 상관관계에 대한 보고로서 Scott 등(1991)은 대장암에서, McLaren 등(1992)은 폐암에서 그리고 Ostrowski 등(1991)은 유방암에 대한 연구에서 p53의 양성발현이 생존률과는 관련이 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 p53 발현 음성군과 양성군에서 비슷한 평균생존율을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 보면 종양억제 유전자인 p53 단백은 난소암의 발생에 중요하게 관여하며 암의 진행에 따른 임상적 예후인자에 부분적으로 관계가 있는 것으로 추정된다. 그러나 정확한 연구결과를 얻기 위해서 다변수 분석을 위한 보다 더 많은 조사 대상군이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

p53 단백발현이 상피성 난소종양의 악성도를 반영하는 여러 임상예후 인자들과의 상관관계를 알아보기 위해 1986년 9월부터 1991년 9월까지 계명의대 동산의료원 산부인과에 내원하여 치료 및 추적검사를 받는 상피성 난소종양 환자중 임의로 추출된 40

명의 파라핀 포매된 종양조직을 이용하여 면역조직화학적 방법으로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 40례의 난소암중 27례(67.5%)에서 p53 발현을 보였으며, 나이, 조직학적 형태, 임상기 및 평균생존율에서는 p53 발현율과 뚜렷한 상관관계를 찾을 수 없었으나 세포분화도가 나쁘고 종괴의 크기가 클수록 p53 발현율이 높았다. 이는 p53 종양억제 유전자가 난소암 발생에 중요하게 관여하고 있음을 알 수 있고 임상적 예후인자에 부분적으로 관여함을 추정할 수 있다. 향후 난소암 발생의 분자생물학적 기전에 대한 더 많은 연구를 함으로써 난소암의 진단과 치료방법을 발전시켜 나가야 할 것이다.

-References-

- Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. Eur J Biochem 1986 ; 159 : 529.
- Berchuck A, Kohler MF, Marks JR, et al. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancer. Am J Obstet Gynecol 1994 ; 170 : 246.
- Bosari S, Viale G, Radaelli U, et al. p53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognostic implications. Hum Pathol 1993 ; 24 : 1175.
- Bur ME, Perlman C, Edelmann L, et al. p53 expression in neoplasm of the uterine corpus. Am J Clin Patho 1992 ; 98 : 81.
- Decker DG, Mussey ME, Williams TJ, et al. Grading of gynecological malignancy ; Epithelial ovarian cancer. In : Seventh National Cancer conference proceedings. Philadelphia JB Lippincott 1973 : 223.
- Dietl J, Horny HP, Kaiserling E. Frequent overexpression of p53 in dysgerminoma of the ovary. Gynecol Obstet Invest 1994 ; 37 : 141.
- Harris AL. Mutant p53-the commonest genetic abnormality in human cancer? J Pathol 1990 ; 162 : 5.
- Henriksen R, Strang P, wilander E, et al. p53 expression in epithelial ovarian neoplasm ; relationship to clinical and pathological parameters. Ki-67 expression and flow cytometry. Gynecol Oncol 1994 ; 53 : 301.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein Ac, et al. p53 mutations in human cancers. Sciente 1991 ; 253 : 49.
- Jenkins JR, Rudge K, Chumakov P, et al. The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. Nature 1985 ; 317 : 816.
- Kern SE, Kizler KW, Bruskin A, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein science. 1991 ; 252 : 1708.
- Kohler MF, Kerris BM, Humphery PA, et al. Mutation and overexpression of p53 in early stage epithelial cancer. Obstet Gynecol 1993 ; 81 : 643.
- Lavigueur A, Maltby V, Mock D, et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 on 10 genes. Mol Cell Biol 1989 ; 9 : 3982.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. the p53 tumor suppressor gene. Nature 1991 ; 351 : 453.
- Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, et al. Overexpression and mutation of p53 in epithelial cancer. Cancer Res 1991 ; 51 : 2979.
- 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 : 735.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 1989 ; 342 : 705.
- Ostrowsk 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.
- Rosel A, Poplker 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.
- Scott N, Sagar J, Stewart GE, et al. p53 in colorectal cancer : clinicopathological correlation and prognostic significance. Br J Cancer 1991 ; 63 : 317.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Loten J, et al. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature 1991 ; 352 : 345.