대한병리학회지 1994; 28: 376~380

뇌의 퇴행성 성상세포종과 다형성 교모세포종에서 비정상적 p53의 발현

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 신경외과학교실*

이상숙·조갑래·윤철희·김상표
박관규·장은숙·손은익*

Overexpression of Mutant p53 in Human Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme

Sang Sook Lee, M.D., **Kam Rae Cho,** M.D., **Cheoul Hee Yun,** M.D., **Sang Pyo Kim,** M.D.
Kwan Kyu Park, M.D., **Eun Sook Chang,** M.D. and **Eun Ik Sohn*,** M.D.

Department of Pathology and Neurosurgery Keimyung University School of Medicine*

A total of 30 cases of cerebral gliomas, including 6 cases of low grade astrocytomas, 6 anaplastic astrocytoomas and 18 glioblastomas multiforme, was examined immunohistochemically to demonstrate the overexpression of mutant forms of p53 protein and to evaluate their relationships with histological subtypes. A p53 monoclonal antibody was applied to the routine formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for this study using microwave-assisted avidin-biotin method. Overexpression of p53 protein was identified in 4 out of 6 anaplastic astrocytomas (66.7%) and in 13 out of 18 glioblastomas multiforme (72.2%). No immunohistochemical positivity of p53 was found in adjacent normal brain tissue, gliosis and 6 cases of astrocytoma. These results suggest that overexpression of mutant p53 may be an important step in the development and progression of malignant astrocytoma, especially of the aggressive subtypes of glioma, including glioblastoma multiforme. **(Korean J Pathol 1994; 28: 376~380)**

Key Words: p53, Anaplastic astrocytoma, Glioblastoma multiforme, Immunohistochemistry

서 론

p53 유전자는 유방암[1], 직장암[2], 폐암[3~5]등 대부분의 사람에서 발생하는 악성 종양에서 가장 흔히 변이되는 종양억제 유전자다[6]. 악성 성상세포종의 60%에서 17번 염색체 단완의 heterozygosity의 손실과 함께 나머지 allele의 변이가 있음이 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 분석에 의해 밝혀 졌다[7~10]. 또한 사람의 신경교종(glioma)에서 p53 단구항체를 사용한 면역조직학적 사전연구에 의해 p53 변이가 있음이 보고되어 17번 염색체의 변이가 성상세포(astrocyte)의 악성변화의 초기 단계에 관여함을 시사하였다[11]. p53 유전자는 사람의 제 17번 염색체의 단완에 위치하여 세포증식을 조절하는 53 kDa의 nuclear phosphoprotein을 encode하며 cell cycle중 특히 G0 phase에서 G1 phase로의 이행에 관여한다고 알려져 있다[12]. 대부분의 정상세포들은 낮은 치의 p53 mRNA를 발현하나 p53단백은 거의 검출되지 않으며[13,14], p53 mRNA농도가 높은 정상적으로 분열하는 세포도 거의 단백을 검출할 수 없는데 이는 아마 정상세포에서 p53의 아

접 수:1993년 11월 10일, 게재승인:1994년 3월 2일
주 소:대구시 동산동 194번지, 우편번호 700-310
계명대학교 의과대학 병리학교실, 이상숙
†본 연구는 1994년도 동산의료원 조사연구비 및 을종연구비에 의해 지원되었음.

주 짧은 반감기때문으로 생각된다[14,15]. Wild-type p53 유전자는 종양억제능력을 갖고 있으나 p53의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하게 된다. 변형된(transformed) 세포들, 세포주와 종양내에서 이러한 p53 유전자의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하여 성장능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하며, 궁극적으로 악성종양의 발생에 도달하는 것으로 알려져 있다[16,17]. 이 때 p53 유전자의 변이로 생성된 p53 생성물은 구조적으로 안정되어 침범된 세포내에 축적되게 되며 이런 안정화된 비정상적 p53 단백을 p53항체를 이용한 면역염색에 의해 검출할 수 있다. 최근 사람의 다양한 종양에서 p53 단백을 면역화학적 방법으로 조직에 적용하여 p53의 과표현과 예후와의 상관관계에 대해서 연구되고 있다[18].

저자들은 일련의 뇌의 신경교종에서 비정상적 p53 단백의 발현 유무 및 신경교종의 악성화와 진전에 미치는 생물학적 표지자로서의 의의를 알아 보고자 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 생검조직을 대상으로 면역화학적 염색을 실시하여 그 결과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1980년부터 1990년까지 계명대학교 동산의료원에서 수술 후 조직생검으로 진단되 뇌의 신경교종 30예를 연구 대상으로 하였다. 신경교종의 조직학적 분류는 1983년도에 발표된 Nelson등[19]의 분류를 이용하여 6예의 성상세포종(astrocytoma), 6예의 퇴행성 성상세포종(anaplastic astrocytoma) 그리고 18예의 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme)으로 나누었다. 대상환자는 남자 16명과 여자 14명으로 13세부터 65세까지 분포되어 평균 연령은 40세였다.

2. 방 법

면역조직화학적 염색을 시행하지 위하여 5 μm 두께의 파라핀 절편을 유리슬라이드에 부착시키고 60℃에서 1시간동안 방치한 후 xylene과 계열알코올로 탈파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직내 감추어진 항원을 들어내기 위해 1% zinc sulfate 용액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 5분간 가열하였다. 실온에서 20분 가량 식힌 후 30분간 normal horse serum(Vectastain Elite kit)을 가한 후 일차항체인 p53 단클론 항체 (DO7, Novocastra, U.K.)를 1 : 500으로 희석하여 2시간 37℃에서 반응시켰다. PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG(Vectastain Elite kit)를 가하여 37℃에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. Peroxidase-conjugated streptoavidin (Dako, U.S.A) 1 : 500을 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochoride)로 10~20분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 양성 대조로는 사전 실험에 의해 p53의 발현이

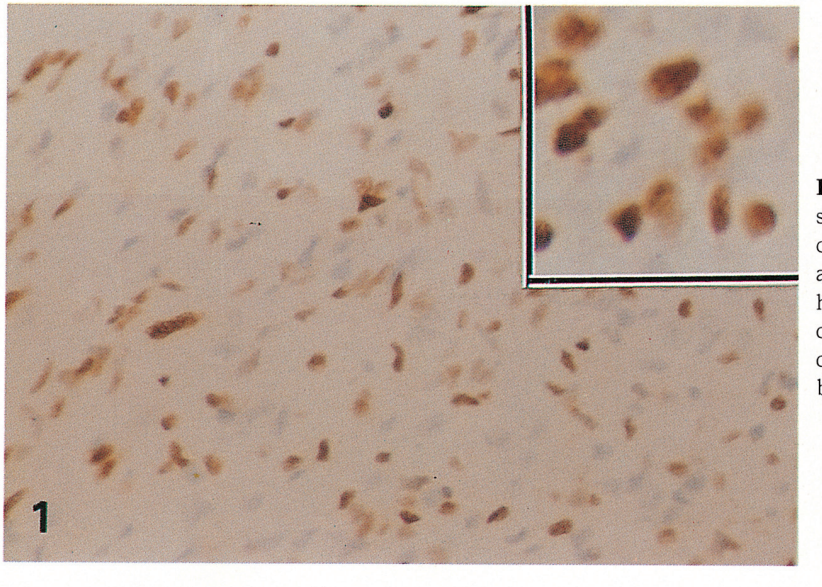

Fig. 1. Diffuse p53 nuclear stai-ning of the anaplastic glial cells in the case of anaplastic astrocytoma (Inset shows the higher magnification of the nuclear staining of anaplastic cells by p53 monoclonal antibody).

증명된 폐의 편평상피암조직을 이용하였고 염색 결과의 판독은 핵에 갈색으로 염색되면 양성으로 간주하였다. 음성 재도는 일차항체 대신 PBS를 사용하여 위의 동일한 과정에 의해 염색하였다.

결 과

비정상적 p53 단백의 발현은 양성 대조군으로 선택한 폐암조직과 마찬가지로 퇴행성 성상세포종과 다형성성교모세포종에서 나타났으며 반면 주변의 정상 뇌조직, 신경교증(gliosis)과 6예의 성상세포종 모두에서 나타나지 않았다. 총 30예의 신경교종중 17예(56.7%)가 비정상적 p53 단백의 발현을 보였다. 퇴행성 성상세포종의 경우 세포가 많이 밀집된 부위에서 더욱 강하게 염색되었다(Fig. 1). 다형성교모세포종에서 p53 단백은 주로 괴사지역 주변이나 증식된 혈관 주변의 종양세포의 핵에 강하게 발현되었다(Fig. 2). p53 단백은 주로 종양 세포의 핵에 국한하여 미만성으로 염색되었다. 때로는 종양거대세포등에서 즉 종양세포의 마분화가 심해질수록 더욱 강한 p53 단백의 발현을

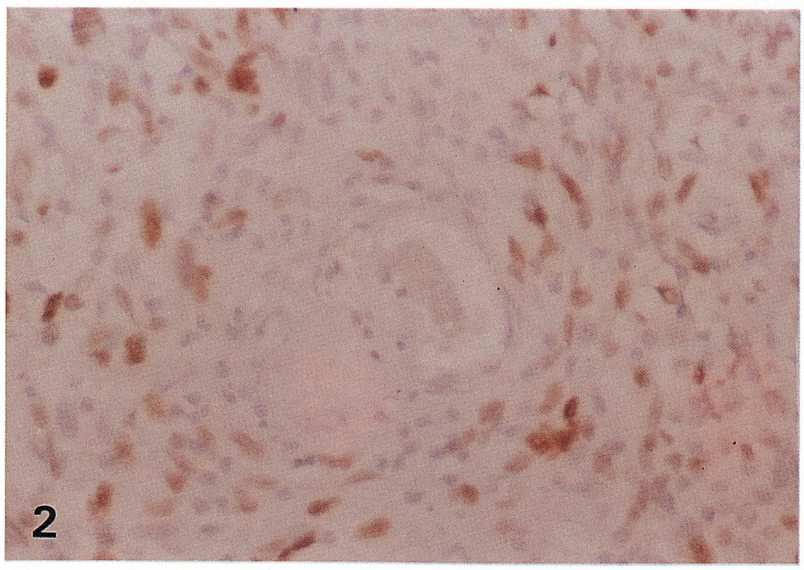

Fig. 2. p53 immunostaining in glioblastoma multiforme strongly expressed in the anaplastic glial cells adjacent to the areas with vascular endothelial proliferation.

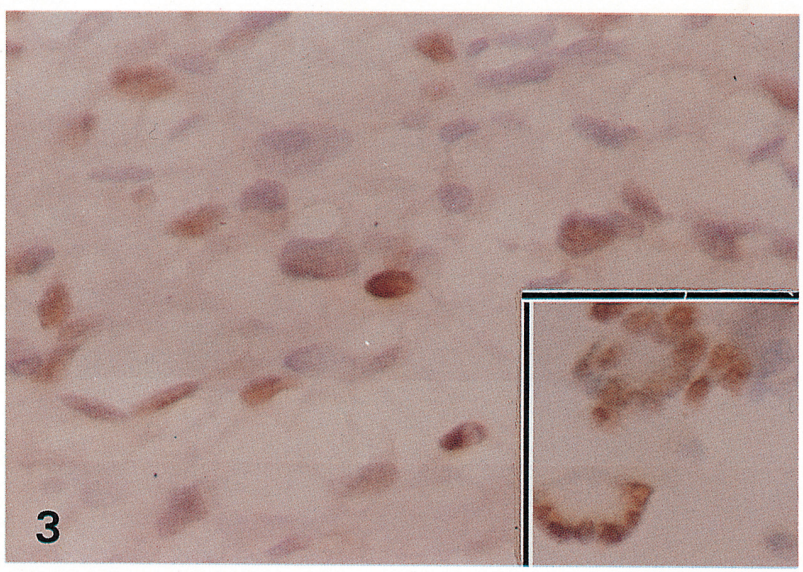

Fig. 3. Higher magnification of nuclear staining of p53 protein in the case of Fig. 2(Inset shows p53 nuclear staining in the nests of tumor cells).

Table 1. Overexpression of p53 mutant protein in cerebral astrocytomas

Histological subtype	Total cases	Positive cases(%)
Astrocytoma	6	0(0%)
Anaplastic astrocytoma	6	4(66.7%)
Glioblastoma multiforme	18	13(72.2%)
Total	30	17(56.7%)

볼 수 있었다(Fig. 3). 종양 주변부의 정상 뇌조직과 신경교증에서는 p53은 염색되지 않았고 주위 뇌조직으로 침윤하는 악성세포에는 강하게 염색되었다. 이러한 p53의 발현은 대부분 미만성으로 나타났으며 핵의 염색과 더불어 세포질내의 염색도 드물게 관찰되었다.

고 찰

p53 단백은 53kDa의 polypeptide로 DNA종양 virus인 SV40의 우성(dominant) transforming oncogene인 T 항원에 결합된 숙주단백으로 처음 발견되었다[9,10]. p53 유전자는 사람의 제 17번 염색체의 단완에 위치한다[15,20,21]. 정상 p53 유전자는 종양 억제 능력을 가진다고 제시되어 졌고 이러한 정상 p53의 불활성화로 말미암아 인체의 종양을 유발하는 중요한 암유전자로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16,17,22~24].

p53 유전자의 변이는 사람의 유방, 직장, 폐암을 포함한 여러 악성종양에서 생긴다고 보고되어 있다[1~6,25]. 또한 성상세포기원의 여러 종양에서 염색체 17p의 이상이 발견되어 17p의 소실이 성상세포의 악성 변화의 초기단계에 관여할 것이라는 보고가 있다[7~11]. 현재 상업적으로 여러 p53 항체들이 개발되어 이를 이용한 면역화학적 염색으로 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 종양 조직에서도 p53의 변이를 검출하는 방법으로 많이 이용되고 있다[18]. 저자들의 연구에서 p53 단구 항체에 대한 양성염색은 주로 퇴행성 성상세포종과 다형성교모세포종의 종양세포의 핵에서 미만성으로 관찰되었으며 비종양 세포나 성상세포종에서는 발현되지 않았다. 때로는 종양 세포의 핵과 더불어 세포질에도 p53의 염색이 관찰되었는데 이에 대한 원인은 불분명하나 면역화학적 방법의 교차반응이거나 소량의 p53 생성물이 세포질에 생성된 것이나 또는 파괴물질의 축적으로 생각되어 진다[18]. 저자들의 연구 결과 비정상적 p53 단백의 표현은 신경교종의 조직학적 유형과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났으며, 악성도가 높은 종양에서 더욱 강한 발현을 보였다. Bruner등[11]의 뇌종양에서의 p53 발현의 보고에 따르면 퇴행성 성상세포종과 다형성교모세포종에서 p53의 발현이 있었으며 그외의 다른 신경교종, 수막종등에서는 발현이 나타나지 않아 저자들의 연구결과와 일치하였다. 또한 Bruner등[11]은 그외 정상 뇌조직과 주변부의 신경교증에서 p53의 발현은 관찰되지 않았으나 다형성교모세포종은 수술한 병력이 있는 환자의 뇌조직의 신경교증에서 p53의 발현을 보고하였다. 본 연구의 결과로 보아 신경교종중 악성도가 높은 퇴행성 성상세포종과 다형성교모세포종 조직내 과도한 p53단백이 발현하는 점으로 보아 신경교종의 악성도의 구분에 이용될 수 있을 것으로 생각되었다. p53유전자의 변이는 악성교세포종의 발생 및 진전의 한 중요한 단계가 될 것이라고 추측되어 진다.

요 약

p53 종양억제 유전자의 변이로 야기되는 비정상적 p53 단백의 과표현과 대뇌에 생긴 신경교종의 조직학적 유형에 따른 상관관계를 보고자 p53 단클론 항체를 이용하여 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 6예의 성상세포종과 6예의 퇴행성 성상세포종 그리고 178예의 다형성교모세포종 조직을 이용하여 microwave-assisted avidin-biotin방법에 의해 면역화학적 염색을 실시한 결과 66.7%의 퇴행성 성상세포종과 72.2%의 다형성교모세포종에서 p53 단백의 과표현이 관찰되었으며 다형성교모세포종에서 더욱 강하게 핵에 염색되었다. 그외 성상세포종, 정상 뇌조직, 신경교증에서는 발현이 없었으나 주변부의 정상조직으로 침윤하는 악성교세포에서 염색되는 소견을 보였다.

이와 같은 소견으로 보아 p53 변이가 악성교세포종의 발생 및 진전에 관여하며 또한 p53 단백의 발현은 성상세포종의 악성도를 결정하는데 한 역할을 한다고 생각된다.

참 고 문 헌

1) Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: *Genetic and immunohistochemical analysis of mutant p53 in hyuman breast cancer cell lines. Oncogene 1990; 5: 893-9.*

2) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Milburn Jessup J, vanTuinen P, Ledbetter DH, Basrker DF, Nakamura y, White R, Vogelstein B: *Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989; 244: 217-21.*

3) Caamaño J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler a, Zhang SY, Klein-Szanto AJP: *Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma*

cell lines. Am J Pathol 1991; 139: 839-45.

4) 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. Jpn J Cancer Res 1992; 83: 101-6.*

5) Iggo R, Gatter k, Bastrek J, Lane D, Harris AL: *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335: 675-9.*

6) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49-53.*

7) El-Azouzi M, Chung RY, Farmer GE, martuza RL, Black PM, Rouleau GA, Hettlich C, hedley Whyte ET, Zervas NT, Panagopoulos K, Nakamura Y, Gusella JF, Seizinger BR: *Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of hyuman astrocytomas. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 71286-90.*

8) Fults D, Tippets RH, Thomas GA, Nakamura Y, White R: *Loss of heterozygosity for loci on chromosome 17p in human malignant astrocytoma. Cancer Res 19789; 49: 6572-7.*

9) James CD, Carlbom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold m, Collins VP, Cavenee WK: *Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. Cancer Res 1988; 48: 5546-51.*

10) James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK: *Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2858-62.*

11) Bruner JM, Saya H, Moser RP: *Immunocytochemical detection of p53 in human gliomas. Mod Pathol 1991; 4: 671-4.*

12) Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 7491-5.*

13) Calabretta B, Kaczmarek L, Selleri L, Torelli G, Ming PML, Ming SC Mercer WE: *Growth dependent expression of human 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells. Cancer Res 1986; 46: 5738-42.*

14) Crawford L: *The 53,000 dalton cellular protein and its role in transformation. London, Academic, 1983.*

15) Oren M: *The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. Biochim Biophys Acta 1985; 823: 67-78.*

16) Marshall CJ: *Tumor suppressor genes. Cell 1991; 64: 313-26.*

17) Weinberg RA: *Tumor suppressor genes. Science 1991; 64: 313-26.*

18) Thomas DW: *p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? J Pathol 1992; 166: 329-30.*

19) Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, Fulling K, Lamarche J, Peress N: *Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas. Cancer 1983; 52: 550-4.*

20) Tan TH, Wallis J, Levine AJ: *Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. J Virol 1986; 59: 574-83.*

21) Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM: *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 1986; 320: 84-5.*

22) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M: *Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature 1984; 312: 646-9.*

23) Finlay CA, Hins PW, Levine AJ: *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 1989; 57: 1083-93.*

24) 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: a739-46.*

25) Nigro J, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Clearly K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 1989; 342: 705-8.*