

뇌신경교종의 악성도에 따른 p53 및 c-fos 단백의 발현양상*

계명대학교 의과대학 신경외과학교실, 병리학교실**
손은익 · 이장철 · 김동원 · 임만빈 · 김인홍 · 이상숙**

= Abstract =

Immunohistochemical Detection of p53 and c-fos in Brain Gliomas

Eun Ik Son, M.D., Chang Chul Lee, M.D., Dong Won Kim, M.D.,
Man Bin Yim, M.D., In Hong Kim, M.D., Sang Sook Lee, M.D.**

Department of Neurosurgery and Pathology, ** Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

The epidemiology of cancer has long been suggested that cancer is a multistep disease. We suspect some of these steps might be related with activation of oncogenes and loss of tumor suppressor genes in primary brain tumors. Moreover, recent reports suggest that astrocytomas have shown alterations in chromosome 17p, and this chromosomal location that encodes the p53 protein, as well as c-fos gene may take an important role in the carcinogenesis of human primary brain tumors.

Expression of p53 protein was detected in 12 of 17 cases(70.6%) of glioblastoma multiforme, 4 of 6 cases(66.6%) of anaplastic astrocytoma with positive nuclear p53 staining. All low grade astrocytomas and normal brain tissue failed to express p53. Correlation of p53 protein levels with mRNA alterations or genomic DNA alterations may help to guide future therapy or diagnosis of brain tumors. On the other hand, the level of c-fos oncoprotein expression may be correlated with the degree of cell differentiation and proliferation. The presence of these expression in low-grade astrocytoma suggest that activation of the c-fos gene is an early step in tumor development.

KEY WORDS : Astrocytoma · Glioblastoma multiforme · Oncoprotein · C-fos · Mutant p53 ·
Immunohistochemistry.

서 론

신경교세포에서 기원한 종양은 원발성 두개강내

*본 논문의 요지는 1992년 신경외과 추계학술대회에서 발표되었음.

*본 논문은 동산의료원 특수과제연구비의 보조로 이루어졌음.

종양의 50 내지 60%를 차지하며 그중 80%이상이 다형성 교아세포종과 역행성 성상세포종이며, 이들의 병리조직소견에 따른 임상경과는 최근의 적극적인 방사선치료 및 수술적 방법으로 다소 호전은 보이나 평균 생존기간이 다형성 교아세포종에서 15.2 개월, 역행성 성상세포종은 22.8 개월 정도의 나쁜 예후를 보이고 있다¹⁹⁾²³⁾.

최근의 분자생물학적인 접근방법의 발달로 암세포의 분화와 증식에 관여하는 특정 암유전자에 대한 연구가 가능하여 암화과정의 규명외에도 진단 및 치료효과 판정에도 기여할 수 있게 되었다. 특히 종양억제유전자인 p53는 사람에서 발생하는 종양에서 가장 흔히 변이가 생기는 유전자로서, 17번 염색체의 단완(17p)에 위치하면서 세포증식을 조절하는 53 kDa의 nuclear phosphoprotein을 encode하고 특히 G0 phase에서 G1 phase로의 이행에 관여하며, 이러한 p53 유전자의 변이가 일어날 경우 성장능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하며 궁극적으로는 악성종양에 도달하는 것으로 알려져 있다³⁾⁵⁾¹¹⁾³⁰⁾. 한편 원시 암유전자(proto-oncogene)인 fos는 세포의 성장, 분화 및 발달에 관여하며 mitogens, differentiation-specific agents, 약제등의 다양한 자극에 의해 생성될 수 있다고 알려져 있다⁶⁾²⁵⁾.

최근에 여러 장기의 종양에서 이런 비정상적인 종양 단백을 항체를 이용한 면역염색에 의해 검출하고, 임상경과와의 관계에 대한 보고는 있으나 원발성 뇌종양에 대한 연구는 드물다. 이에 저자들은 난치성으로 알려진 뇌신경교종에서 p53 및 c-fos 종양단백의 발현양상을 관찰하고, 병리학적인 악성도에 따른 연관성을 비교하여 임상적인 이용 가능성을 알아보기 위해 본연구를 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 계명대학교 동산의료원 신경외과에서 최근 10년간 수술로 적출되고 병리조직학적으로 성상세포종과 다형성 교아세포종으로 확진된 117례중 조직표본의 크기나 파라핀 포매 상태가 양호한 30례를 대상으로 하였으며, 이중 성상세포종은 7례, 역행성 성상세포종은 6례이며 다형성 교아세포종은 17례였다. 대상환자의 성비는 남자 16명과 여자 14명이며, 연령분포는 13세부터 65세까지 다양하였으며 평균연령은 40세였다.

2. 방법

면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 자른 5 μm의 파라핀 절편을 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간동안 고정시킨 후 xylene과 계열알

코올에서 탈 파라핀 및 함수를 시켰다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처치하고 PBS로 수세한 후 microwave를 이용하여 1% zinc sulfate 용액에 담구어 5분간 가열하였다. 이후 실온에서 30분간 blocking reagent를 가한 후 일차 항체인 p53 단클론 항체(DO7, Novocastra, U.K.)를 1 : 500으로 회석하여 2시간 37°C에서 반응시킨 후 PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG(Vectastain Elite kit, USA)를 가하여 37°C에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin, 1 : 1000(Vector, USA)을 37°C에서 30분간 처리한 후 PBS로 수세하고 new fuchsin substrate로 10~20분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 일차항체 대신 PBS 만을 도포시킨 것을 음성 대조로 사용하였고 양성 대조로는 이미 p53이 과발현된 적이 있는 폐암조직을 이용하였다. 정상적으로 wild type p53 단백은 이 방법으로 검출되지 않기 때문에 조금이라도 양성으로 염색되면 비정상적 p53의 발현이 있다고 간주하였으며 핵내에 자주색으로 염색된 경우를 양성으로 간주하였다.

한편 c-fos 종양단백의 면역조직화학적 염색을 위해 일차항체로 c-fos 복클론 항체(Oncogene Science, USA)를, 이차항체로 biotinylated anti-rabbit IgG (Vectastain Elite kit, USA)를 이용하였으며 p53과 같은 방법으로 염색을 시행하여 관찰하였으며, c-fos의 핵과 세포질의 발현정도에 따라 0에서 4까지 구분하여 악성도에 따른 c-fos단백의 발현경향을 비교하였다.

결 과

비정상적(mutant type) p53 단백은 총 30례의

Table 1. Immunohistochemical positivity of p53 and c-fos oncprotein in 30 cases of human astrocytoma according to histopathological grade

Histological subtype	p53+(%)	c-fos+(%)
Low grade astrocytoma	0/7	6/7
Anaplastic astrocytoma	4/6	6/6
Glioblastoma multiforme	12/17	17/17
Total	16/30(53.3)	29/30(96.7)

신경교종중 16례에서 나타나 53.3%의 발현율을 보였고(Table 1), 주로 퇴행성 성상세포종 6례중 4례(66%)와 다형성 교아세포종 17례중 12례(70.6

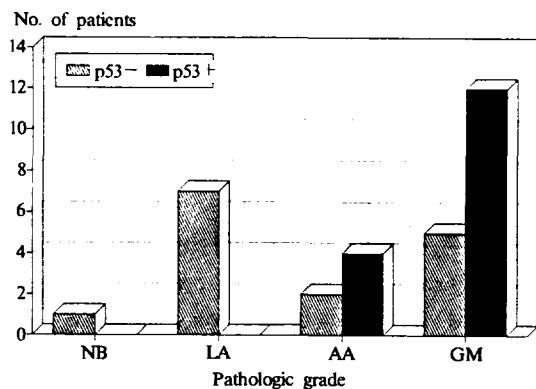


Fig. 1. Detection of mutant p53 protein in 30 cases of human astrocytoma according to histopathological grade ; NB(normal brain/control), LA(low grade astrocytoma), AA(anaplastic astrocytoma) and GM(glioblastoma multiforme).

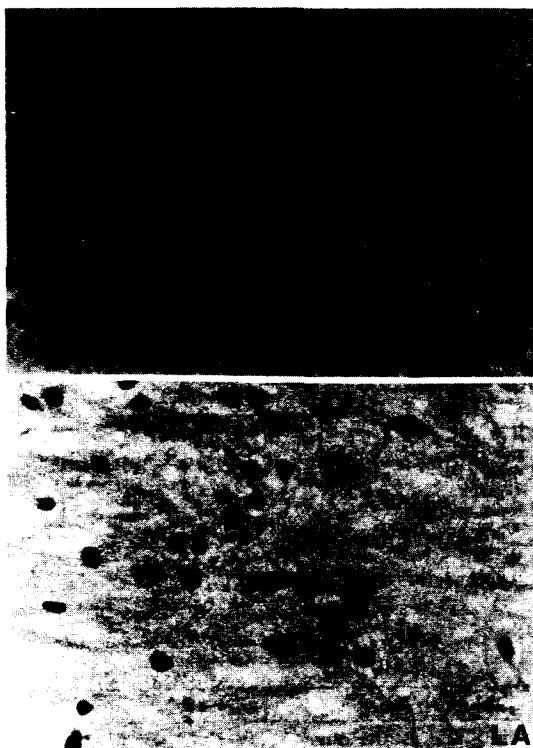


Fig. 2. No p53 immunohistochemical staining in adjacent normal brain tissue(NB) and low grade astrocytoma(LA).

%)에서만 발현을 나타내었으나(Fig. 1), 정상 뇌조직과 신경교증(gliosis) 및 낮은 grade의 성상세포종에서는 나타나지 않았다(Fig. 2). 염색의 강도에 따라 구분한 경우 퇴행성 성상세포종 보다 다형성 교아세포종에서 더욱 강하게 염색되는 경향을 보였고, 세포밀집도가 높은 부위에서 주위조직으로 침윤하는 악성세포는 세포밀집도가 낮더라도 강하게 염색되었다(Fig. 3). 이러한 p53의 발현은 대부분 미만성으로 나타났으며 핵의 염색과 더불어 드물게 세포질내의 염색도 관찰되었다.

C-fos 종양단백은 총 30례중 29례(96.7%)에서 거의 모두 발현되었고(Table 1), 특히 혈관주변에서 세포의 충실도가 높거나 악성인 경우 발현의 강도가 증가되는 경향을 보였으며(Fig. 4), 성상세포 계열의 핵과 세포질에서 비교적 미만성으로 나타났다. 정상 뇌조직과 종양주위의 reactive gliosis에서는 c-fos단백은 관찰되지 않았으나, 역행성 성상세포종과 다형성 교아세포종에서 더많은 세포의 핵에서 강하게 나타났으며 p53와는 달리 낮은 grade의 성상세포종에서도 c-fos단백이 발현되었다(Fig. 5).

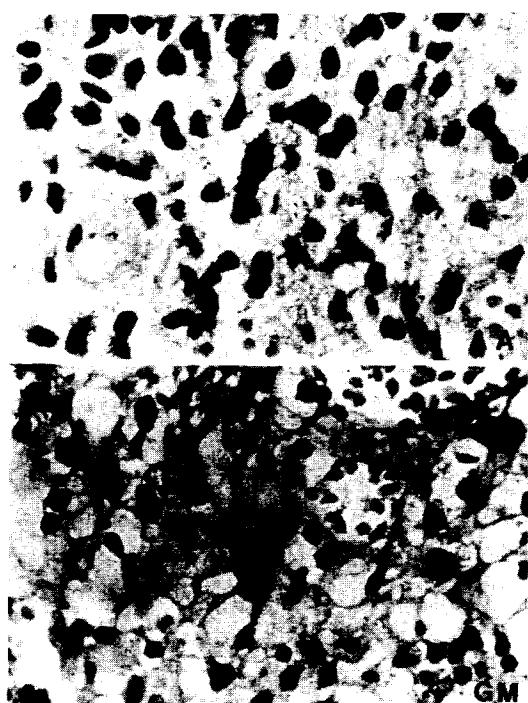


Fig. 3. Overexpression of mutant p53 protein in anaplastic astrocytoma(AA) and glioblastoma multiforme(GM).

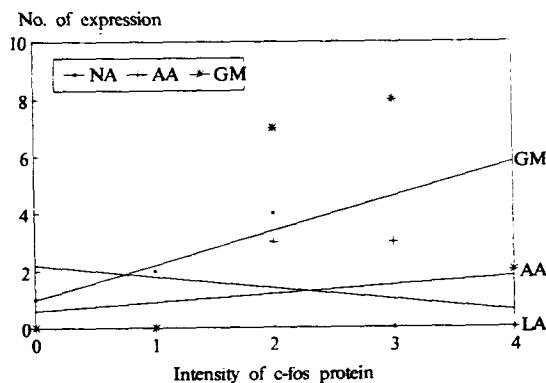


Fig. 4. Detection and trend of c-fos protein in 30 cases of human astrocytoma according to histopathological grade ; LA(low grade astrocytoma), AA(anaplastic astrocytoma) and GM(glioblastoma multiforme).

고 졸

세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 수행하는 암유전자의 특성이 규명되어짐에 따라, 뇌종양에서도 특정 암유전자의 양상과 변화에 대한 연구가 활발하며¹⁰⁾¹⁸⁾ gene therapy로의 접근을 모색하고 있다.

저자들의 사전 연구에서 이미 뇌신경교종에서의 암유전자의 발현과 암의 grade에 따른 예후와의 관련성을 보기위해 c-myc 암유전자를 *in situ hybridization* 방법으로 검색한 결과를 보고하였으며²⁷⁾, 신경교종의 암화과정과 밀접한 관계가 있음을 시사하며, c-myc 암유전자의 발현이 악성도에 따라 증가하는 것을 알수 있었다. 이와 같이 세포의 기본적인 분화 활동에 관여하는 암유전자의 하나로 c-fos가 중요한 역할을 한다는 것은 teratocarcinoma를 calcium-phosphate 침전법에 의한 연구²⁶⁾에서 밝혀졌으며, 또한 c-fos 단백은 gene expression의 조절에도 관계하는데⁶⁾, 이는 그 핵의 39 kDa단백이 c-jun 원시암유전자의 산물인 AP-1이며, 이런 c-fos/c-jun 단백복합체가 AP-1 binding site를 가진 DNA를 인지하여 전사과정의 조절에 연관이 있다고 알려져 있다⁶⁾²⁵⁾. 그러나 이 c-fos 단백은 총세포단백의 0.01%에 불과하며 짧은 반감기와 extensive posttranslational modification등의 이유로 밝혀내기가 쉽지 않다. 본 연구에서는 polyclonal



Fig. 5. Immunohistochemical staining in low grade astrocytoma(A), anaplastic astrocytoma(B) and glioblastoma multiforme(C) show increasing expression of c-fos protein.

항체를 이용하여 뇌신경교종 조직에서 c-fos종양단백을 발현시켰으며, 낮은 grade의 성상세포종에서부터 나타나 악성도가 높아짐에 따라 점점 강하게 염색되는 것으로봐서 c-fos종양단백의 과도한 발현은 성상세포종의 발생, 분화 및 증식에 관계된 세포kinetics에 중요한 지침이 될수 있으며 악성도와 밀접한 관련이 있어 예후 판정에도 도움이 될수 있을 것으로 생각된다.

한편, p53 단백은 53 kDa의 polypeptide로 DNA 종양 virus인 SV40의 우성(dominant) transforming oncogene인 T 항원에 결합된 숙주단백으로 처음 발견되었으며¹⁶⁾¹⁷⁾, p53 유전자는 사람의 17p에

위치한다²⁴⁾²⁸⁾. p53 유전자는 처음에는 암유전자로 간주되어 왔으나 여러가지 연구에 의하여 정상(wild-type) p53 유전자는 종양억제 능력을 가진다고 제시되어졌고⁸⁾¹⁴⁾²¹⁾²⁹⁾³¹⁾ 이러한 정상 p53의 불활성화는 여러가지 내부 또는 외부의 요인이나 종양 virus가 인체의 종양을 유발하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. p53 유전자의 변이는 여러가지 악성종양에서 발현된다는 보고와²⁾⁴⁾⁷⁾¹²⁾¹⁵⁾²⁰⁾ 성상세포기원의 여러 종양에서 17p의 이상이 발견되어 17p의 소실이 성상세포의 악성 변화의 초기단계에 관여할 것이라는 연구가 있고⁹⁾ 현재 상업적으로 개발된 항체를 이용하여 면역화학적 염색 방법으로 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서도 많이 이용되고 있다. 본 연구에서 p53 단백은 주로 종양세포의 핵에서 염색되었으며 비종양 세포나 성상세포종에서는 발현되지 않았다. 종양세포의 핵과 더불어 세포질내에서 염색되는 경우 이에 대한 원인은 불분명하나 면역화학적 방법의 교차반응이거나 p53 생성물의 소량의 세포질내 생성 또는 파괴물질로 생각되어 진다²²⁾. 본 연구에서 실험결과 비정상적 p53 단백의 표현은 신경교종의 조직학적 유형과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났으며, 악성도가 높은 종양에서 더욱 강한 발현을 보였다. 이는 뇌종양의 p53 발현이 퇴행성 성상세포종과 다형성 교아세포종에서는 나타나나 그외의 다른 신경교종이나, 수막종등에서는 발현되지 않는 Bruner등¹⁾의 보고와 일치된 소견을 보였다.

그외에는 정상 뇌조직과 주변부의 신경교종에서 p53의 발현은 관찰되지 않았으나 다형교아종으로 수술한 병력이 있는 환자의 뇌조직의 신경교종에서 p53의 발현이 있다는 보고가 있다¹⁵⁾. 이런 경우 세포밀집도는 높지 않으나 비정형의 악성 성상세포가 관찰되는 것으로 되어 있으며 저자들의 연구에서도 비교적 세포밀집도가 낮은 악성종양의 주변부에서 강하게 염색되는 세포가 나타나 일치하는 소견으로 생각하였으며 이런 소견으로 미루어 임상적인 악성경과의 추정에 이용될 수 있을 것으로 간주된다.

따라서 신경교종 일부에서 p53 단백의 과도한 발현은 단백자체의 변경에 따르거나 혹은 종양내의 단백의 구조적 변화와 관계된 비정상적인 결합에

의해 초래된 단백의 안정화를 의미하며 p53 단백의 정도와 mRNA변화 또는 genomic DNA 변화의 상관관계는 앞으로 뇌종양의 치료와 진단에 유용할 것으로 사료된다.

요약

암은 다단계 과정의 종산물인 것으로 생각되고 있으며, 각 단계에서 특정 암유전자가 중요역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 원발성 뇌종양인 신경교종의 암화과정에서 c-fos와 p53의 영향을 알아보기 위해 면역조직학적 염색으로 c-fos 종양단백 및 비정상적 p53 단백의 발현을 관찰한 결과, c-fos 암유전자의 활성은 종양생성의 초기단계의 분화 및 증식과 연관이 있으며, p53은 종양의 후기단계 및 악성화에 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 향후 많은 중례와 다른 암유전자에 대한 연구도 병행함으로서 악성도와 관계된 진단 뿐 아니라 유전자 치료에 대한 접근에도 도움이 될 것으로 사료된다.

References

- 1) Bruner JM, Saya H, Moser RP : *Immunocytochemical detection of p53 in human gliomas*. *Modern Pathol* 4 : 671-674, 1991
- 2) Camano J, Ruggeri B, Momiki S, et al : *Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines*. *Am J Pathol* 139 : 839-845, 1991
- 3) Calabretta B, Knezmarc I, Sellen I, et al : *Growth dependent expression of human Mr53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic cells*. *Cancer Res* 46 : 5738, 1986
- 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* 5 : 1603-1610, 1990
- 5) Crawford I : *The 53,000 dalton cellular protein and its role in transformation*. London, Academic, 1983
- 6) Curran T : *The fos oncogene*, in Reddy EP, Skalka AM, Curron T(eds) : *The oncogene handbook*, Amsterdam : Elsevier, 1988, pp307-325
- 7) Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, et al : *Ove-*

- reexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. Am J Surg Pathol* 17 : 375-381, 1993
- 8) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al : *Participation of p53 cellular antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature* 312 : 646-649, 1984
 - 9) Finlay C, Hinds P, Levine A : *The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. Cell* 57 : 1083-1093, 1989
 - 10) Haah LE, Chong YG, Chu JW, et al : *Immunohistochemical study of gliomas using glial fibrillary acidic protein(GFAP), S-100 protein, and neurofilament. J Kor Neurosurg Soc* 20 : 389-398, 1991
 - 11) Hinds P, Finlay C, Levine A : *Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. J Virol* 63 : 739-746, 1989
 - 12) Hiyoshi H, Matsuno Y, Kato H, et al : *Clinicopathological significance of nuclear accumulation of tumor suppressor gene p53 product in primary lung cancer. Jpn J Cancer Res* 83 : 101-106, 1992
 - 13) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al : *p53 mutations in human cancers. Science* 253 : 49-53, 1991
 - 14) Isobe M, Emanuel B, Givol D, et al : *Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17 p13. Nature* 320 : 84-85, 1986
 - 15) James D, Carlstrom F, Nordenskjold M, et al : *Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2858-2862, 1989
 - 16) Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M, et al : *Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. Cancer Res* 52 : 4799-4804, 1992
 - 17) Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al : *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Sci USA* 89 : 7491-7495, 1992
 - 18) Lee SH, Kim JH, Rhee CH, et al : *Loss of heterozygosity on chromosome 10, 13, 17, and p53 gene mutations in human brain gliomas. J Kor Neurosurg Soc* 22 : 537-550, 1993
 - 19) Lee SH, Son EI, Lee JC, et al : *Clinical analysis of stereotactic brachytherapy with high activity Iridium-192 sources for treatment of malignant astrocytoma. J Kor Neurosurg Soc* 22 : 252-260, 1993
 - 20) Iggo R, Gatter K, Brtek J, et al : *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet* 335 : 375-379, 1990
 - 21) Marshall CJ : *Tumor suppressor genes. Cell* 64 : 313-326, 1991
 - 22) Miller CW, Simon K, Aslo A, et al : *p53 mutations in human lung tumors. Cancer Res* 52 : 1695-1698, 1992
 - 23) Nelson JS, Tsukada Y, Schoenfeld D, et al : *Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas. Cancer* 52 : 550-554, 1993
 - 24) Oren M : *The p53 cellular tumor antigen : gene structure, expression and protein properties. Biochim Biophys Acta* 823 : 76, 1985
 - 25) Pimentel E : *The fos oncogene protein product, in Pimentel E(eds) : Oncogenes. ed 2. Florida : CRC press, 1989, pp32-39*
 - 26) Pletro DT, Henry N, Vincent R, et al : *Detection of fos protein during osteogenesis by monoclonal antibodies. Mol Cell Biol* 8 : 2251-2256, 1988
 - 27) Son EI, Suh MH, Lee JK, et al : *Expression of c-myc oncogene in glioma of human brain by in situ hybridization. Keimyung Univ Med J* 11 : 446-451, 1992
 - 28) Tan T, Wallis J, Levine A : *Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T antigen p53 protein complex. J Virol* 59 : 574-583, 1986
 - 29) Thomas DW : *p53 in tumor pathology : Can we trust immunocytochemistry ? . J Pathol* 166 : 329-330, 1992
 - 30) Watson JD, Gilman M, Tooze J, et al : *Oncogenes and anti-oncogenes, Watson JD, Gilman M, Tooze J(eds) : Recombinant DNA, ed 2. New York : Scientific American Books, 1992, pp335-368*
 - 31) Weinberg RA : *Tumor suppressor genes. Science* 254 : 1138-1146, 1991