

방광의 이행상피세포암에서 세포증식능 표지자로서의 p53단백 및 hsc70의 발현에 관한 연구

- 조직학적 분화도, 종양의 침윤도, DNA배수성과의 비교 -

고려대학교 의과대학 병리학교실

조현이 · 조성진 · 김한경 · 채양석

Immunohistochemical Study for p53 and hsc70 in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder

- Correlation with Histologic Grade, Clinical Stage and DNA Ploidy Pattern -

Hyuni Cho, M.D., Sung Jin Cho, M.D., Han Kyeom Kim, M.D and Yang Seok Chae, M.D.

Department of Pathology, Korea University College of Medicine

Transitional cell carcinoma of the urinary bladder is the most common cancer of the genitourinary tract in Korea and its prognosis is determined by the histologic grade and clinical stage present at initial diagnosis. Recently, an extensive search for a more objective and reproducible method to evaluate the proliferation activity of cancer cells has been done. The p53 gene is located on the short arm of the chromosome 17 and acts as a cancer suppressor gene. Mutant p53 gene induces malignant transformation. Recent studies reveal that the level of mutant p53 protein is elevated in some human tumor and many diverse transformed cell lines. Heat shock proteins(HSPs) are present constitutively in normal cells, where they play an important role in normal cell metabolism. In mammalian cells, they are induced by a variety of physical and chemical stimuli. A protein that belongs to the hsp70 family, called hsc70, is only slightly heat inducible and is found at a higher level in growing cells than in the resting cells. The mutant p53 protein binds with hsc70 and the p53-hsc70 complex has functional significance in the transforming capacity of the mutant p53. We investigated the correlation between the p53 and hsc70 by immunohistochemical methods and with better defined prognostic indicators such as histologic grade, clinical stage, and DNA ploidy pattern in 42 transitional cell carcinomas of the urinary bladder. The results are summarized as follows. p53 expression rate was higher in the DNA aneuploid group than in the DNA diploid group($p=0.061$), but there was no significant difference in the histologic grade($p=0.861$) or clinical stage($p=0.154$). The higher the hsc70 expression rate was, the poorer the tumor differentiation($p=0.000$) and the deeper the invasion($p=0.001$). The aneuploid group showed a higher hsc70 expression rate than the diploid group($p=0.017$). 27 of 42(64.3%) carcinomas showed positivity of both p53 and hsc70. Though statistically insignificant, their correlation showed a relatively low correlation coefficient

접 수 : 1995년 8월 17일, 게재승인 : 1995년 9월 27일

주 소 : 성북구 안암동 5가 126-1, 우편번호 136-071

고려의대 안암병원 해부병리과, 조현이

($p=0.059$). In conclusion, we suspect that p53 and hsc70 are closely correlated to each other by comparing the results of this immunohistochemical study, and hsc70 will be a useful prognostic marker in transitional cell carcinomas of the urinary bladder after sufficient follow up studies are performed. (Korean J Pathol 1995; 29: 766~775)

Key Words: p53, hsc70, Transitional cell carcinoma, Urinary bladder

서 론

방광의 이행상피세포암은 우리나라에서 가장 발생빈도가 높은 비뇨기계 악성종양으로 주로 처음 진단시의 임상병기와 조직학적 분화도에 따라 그 예후가 결정된다. 그러나 아직까지는 방광암의 발생기전 및 자연경과에 대해 명백히 밝혀진 것이 없기 때문에 적절한 치료를 위하여 임상병기나 조직학적 분화도 이외에 암세포의 증식능을 평가하기 위한 보다 객관적이고 재현성 있는 방법을 찾기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

그 중 하나가 유세포 측정기를 이용한 DNA분석으로써 DNA배수성과 종양의 분화도¹, DNA배수성과 임상병기²⁻⁴, DNA비배수성을 보인 암종에서의 S phase fraction(SPF)과 종양의 분화도 및 SPF과 임상병기의 연관성이 증명되어져 왔으며² 몇몇 저자들에 의해 DNA배수성과 암종의 재발 및 진행여부, DNA배수성 및 SPF과 생존율과의 연관성이 증명되면서⁵⁻⁷ DNA배수성 및 SPF이 중요한 예후인자로서 대두되고 있다.

p53유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하며 암 발생을 억제하는 항암유전자이지만 단완의 소실이나 점돌연변이에 의한 돌연변이형 p53유전자는 오히려 암발생을 유발하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹¹. 근래에는 p53단백에 대한 단일클론항체가 만들어져 여러 암종 및 다양한 변형세포주(transformed cell line)에서 돌연변이형 p53단백의 발현이 증가하는 것이 보고되고 있다¹¹⁻¹⁶. 방광암의 경우 1991년 Sidransky 등¹⁷이 18례의 방광암중 61%에서 p53유전자의 돌연변이가 관찰되었다고 보고하면서 이러한 p53유전자의 돌연변이가 방광암에서 가장 흔히 관찰되는 유전자 변화라고 주장한 이후 방광암의 발생과 p53유전자 돌연변이간의 관계를 규명하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다¹⁸⁻²⁰.

Heat shock protein(HSP)은 정상세포내에서 낮은 농도로 존재하면서 세포대사에 중요한 역할을 하며

다양한 물리적 및 화학적 자극에 의하여 그 합성이 증가한다²¹⁻²³. 그 중 HSP70 family는 hsp70, hsc70, hsc70이라는 적어도 세가지의 단백질로 구성되어 있으며 이들은 아미노산수준에서 80% 이상의 동질성을 보인다²⁴. hsp70은 highly heat inducible protein으로 정상상태에서는 검출되지 않으며 hsc70 또한 quite heat inducible protein이나 세포주기에 따라 조절되는 높은 basal level을 보인다^{25,26}. hsc70은 73KDa의 분자량을 갖는 slightly heat inducible protein으로 휴지기 세포에 비하여 성장 세포에서 고농도로 발견되며²⁴ 인간 골육종 세포주인 HOS-SL에서 p53과 hsc70의 coimmunoprecipitation을 관찰한 이후로²⁷ 다양하게 murine, 원숭이 그리고 인간의 종양세포에서 돌연변이형 p53과 hsc70과의 연관성이 증명되어져 왔다²⁷⁻³¹. 또한 hsc70이 돌연변이형 p53과 결합하여 p53-hsc70 complex를 형성함으로써 p53이 transforming activity를 발휘하게끔 하는 것으로 알려져 있다^{30,32}.

저자들은 방광의 이행상피세포암 42예를 대상으로 p53단백 및 hsc70에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 상호연관성을 알아봄과 동시에 기존의 방광암 예후인자로 알려진 조직학적 분화도, 종양의 침윤도 및 DNA배수성과의 연관성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1987년부터 1993년까지 고려대학교 구로병원에서 경요도적 방광종양 절제술 및 방광적출술을 통하여 얻어진 방광의 이행상피세포암 조직을 재검토하여 파라핀 블록의 보관상태가 양호한 42예를 선택하였다.

2. 종양의 조직학적 등급 및 종양의 침윤도 결정

조직학적 등급은 Ash grading system을 사용하였는데 grade I에 해당하는 예는 없었고, grade II가 14예,

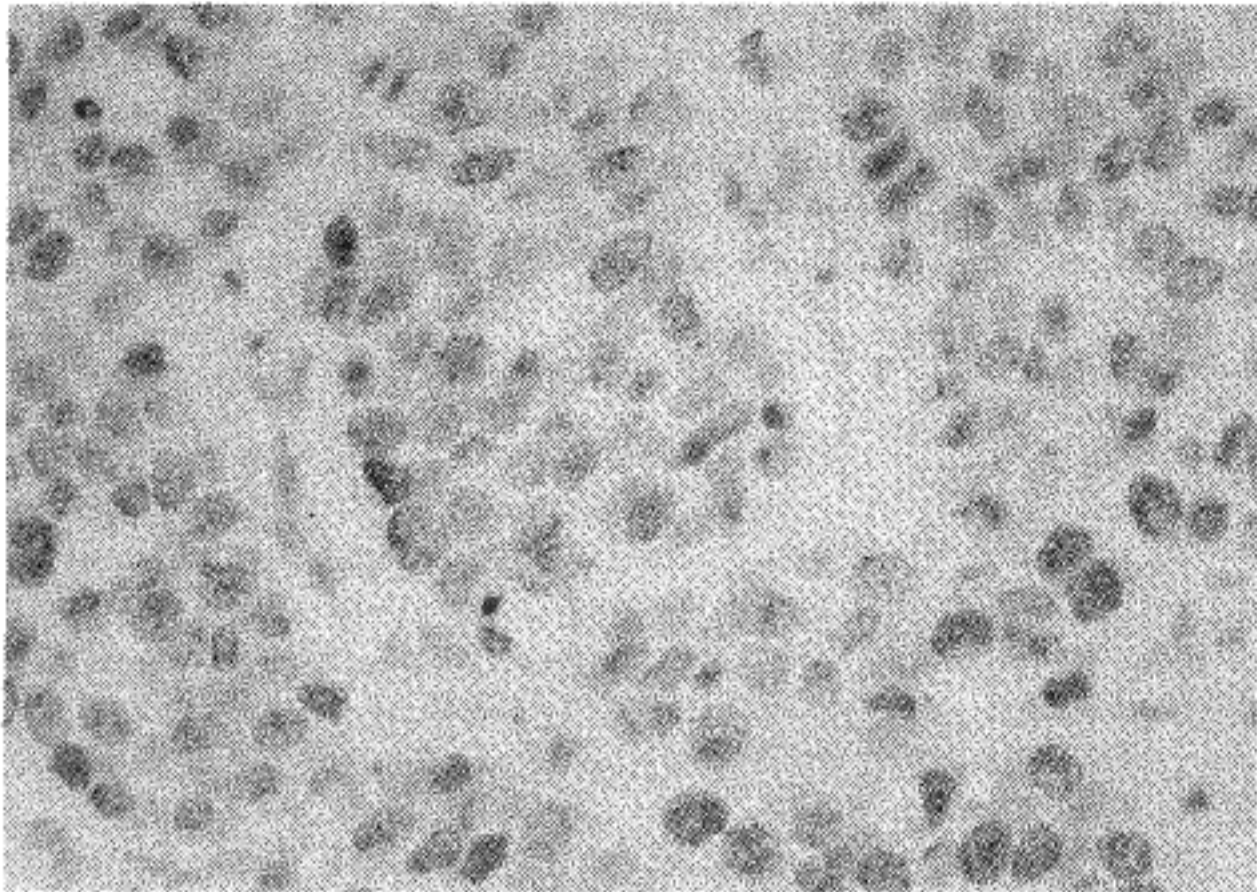


Fig. 1. Immunohistochemical stain for p53 in the Ash grade III transitional cell carcinoma. Most tumor cells revealed diffuse reddish brown nuclear staining(LSAB method, $\times 400$).

grade III가 15에, grade IV가 13에였다. 종양의 침윤도는 TNM pathologic staging system에 따라 Ta, T1, T2 이상으로 구분하였으며 각각 6에, 10에, 그리고 26에였다.

3. 면역조직화학적 염색

동상적인 포르말린고정과 파라핀포매를 기친 조직을 6 μ m 두께의 연속절편을 만들어 xylene으로 3~5분간 탈파라핀하고 100%, 95%, 75% alcohol로 처리한후 증류수로 환수시킨다음 한 절편은 p53, 또 다른 절편은 hsc70에 대하여 labelled streptavidin biotin(LSAB) 방법을 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

1) p53에 대한 염색: 탈파라핀한후 환수시킨 절편을 극초단파를 이용하여 끓는 phosphate buffered saline(PBS)에 5분간 처리한후 4°C의 PBS에 다시 5분간 처리하였다. 3% 과산화수소로 내인성 과산화 효소를 억제시킨 다음, PBS로 10분간 수세후 정상 염소혈청을 가하여 10분간 반응시켰다. 1:5로 희석한 Novocastra사의 p53에 대한 생쥐 단클론성 항체(DO7)를 가한 다음 상온에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 수세하고 Biotin과 결합된 이차항체에 20분간 반응시켰다. PBS에 수세하고 Streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시킨 후 3-

amino-9-ethyl carbazole(AEC)로 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

2) hsc70에 대한 염색: 탈파라핀한후 환수시킨 절편을 과산화수소로 내인성 과산화 효소를 억제시킨 다음, pH7.6의 Tris완충액(TBS)으로 10분간 수세후 정상 염소혈청을 가하여 10분간 반응시켰다. 1:100으로 희석한 StressGen사의 hsc70에 대한 생쥐 단클론성 항체를 가한 다음 상온에서 2시간 동안 반응시킨뒤 TBS로 수세하고 Biotin과 결합된 이차항체에 30분간 반응시켰다. TBS에 수세하고 Streptavidin과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시킨후 3,3'-diaminobenzidine(DAB)으로 5~10분간 양성대조세포가 갈색으로 염색될 때까지 발색시킨 다음 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하였다.

3) 염색결과의 판정: 경요도적 방광종양 절제술로 얻어진 조직인 경우 cautery artifact가 없는 부위를 선택하여 광학현미경으로 관찰하였으며 p53인 경우는 핵이 진한 적갈색으로 염색된 종양세포를 양성으로 하였고(Fig. 1) hsc70인 경우는 세포질 또는 핵이 진한 갈색으로 염색된 종양세포를 양성으로 판정하였다(Fig. 2, 3).

4. DNA배수성 검사

동상적인 포르말린고정과 파라핀포매를 기친 조

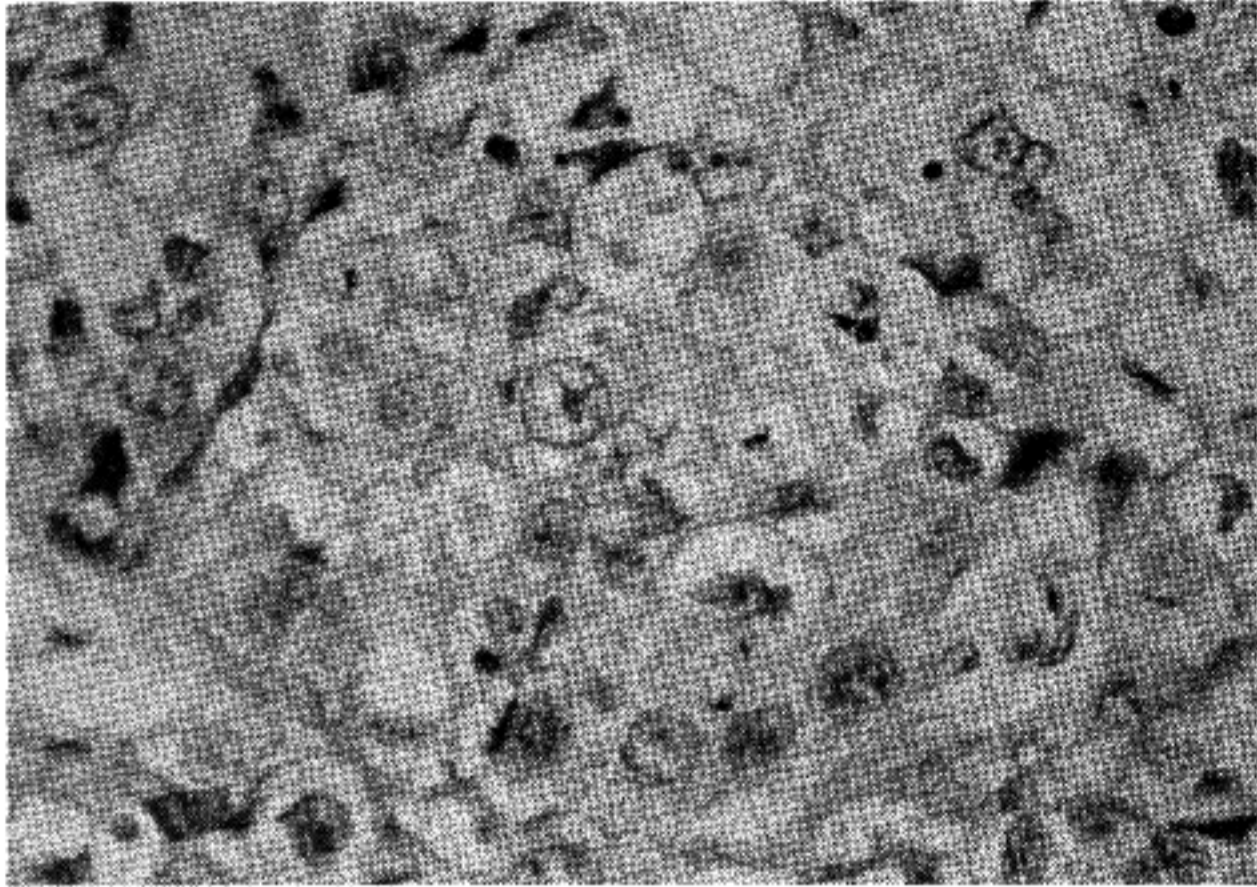


Fig. 2. Immunohistochemical stain for hsc70 in the Ash grade IV transitional cell carcinoma. Most tumor cells show diffuse brown staining in the nucleus as well as in the cytoplasm(LSAB method, $\times 400$).

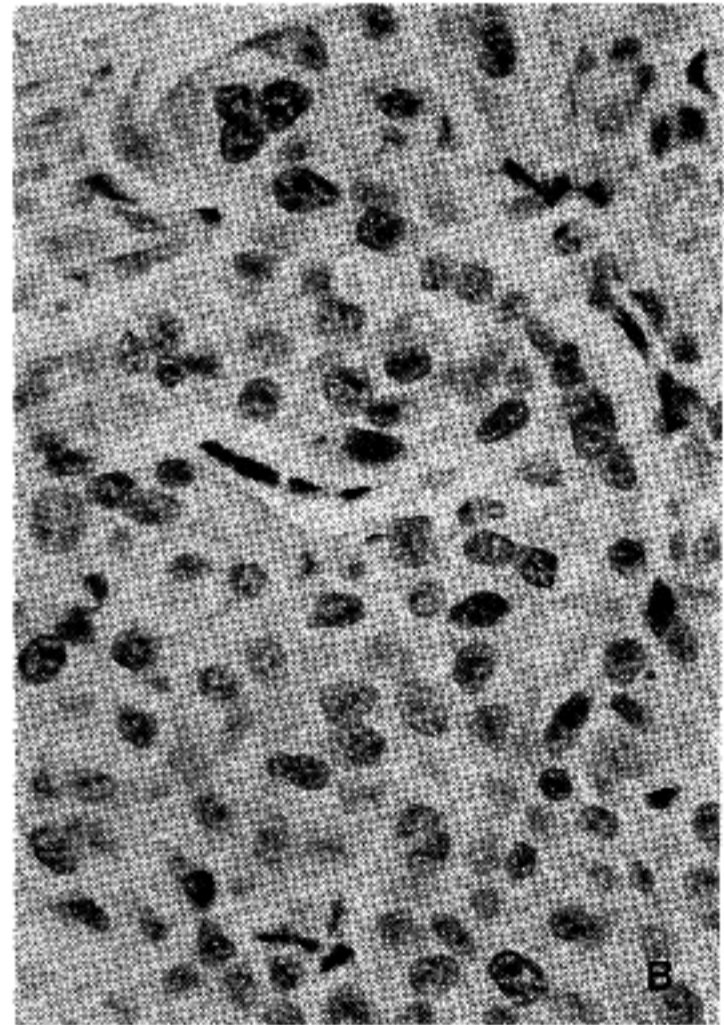


Fig. 3. Immunohistochemical stain for hsc70 in the Ash grade III transitional cell carcinoma. (A) Infiltrated tumor cells in the lamina propria showed diffuse positive staining for hsc70 but overlying normal urothelium was entirely negative(LSAB method, $\times 100$). (B) Higher magnification. Most tumor cells showed diffuse brown staining in the nucleus but negative staining in the cytoplasm(LSAB method, $\times 400$).

직을 50 μ m 두께로 박절하고 탈과라핀한후 합수시킨 다음 37°C에서 0.5% pepsin(pH1.5)에 30분간 부란한 후 세포부유액을 만들었다. pepsin을 제거하기 위하여 4°C냉장고에 10분간 두었다가 원심분리로 침전물만을 얻어 RNase에 30분간 부란하였다. 부유액을 나일론 망사에 거른후 Coulter counter로 세포수를 측정하여 2 \times 10⁶/ml로 맞추는 다음 propidium iodide로 염색하였다. Becton-Dickinson사 FACScan의 CellFIT software를 이용하여 각 검체마다 20,000개 세포의 DNA함량을 측정한 후 그 결과를 분석하였다. 하나의 뚜렷한 G₀/G₁ peak를 가진 경우를 이배수성이라 하였고 두개 이상의 뚜렷한 G₀/G₁ peak를 보이며 이에 대응하는 G₂/M peak가 있는 경우를 비배수성으로 분석하였다.

5. 통계학적 분석

연구결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 Chi square test로 하였다.

결 과

1. 조직학적 등급 및 종양의 침윤도와 DNA배수성과의 관계

Ash grade II 14예중 9예(35.7%), grade III 15예중 11예(73.3%), grade IV 13예중 12예(92.3 %)가 그리고 병기Ta 6예중 2예(33.3%), T1 10예중 5예(50.0%), T2이상 25예중 20예(80.0%)가 DNA비배수성을 보여 조직학적으로 분화가 나쁠수록(p=0.006) 종양의 침윤도가 깊을수록(p=0.047) DNA비배수성을 보인 경우가 많았다.

2. p53발현과 조직학적 등급과의 관계

Ash grade II 14예중 7예(50%), grade III 15예중 9예(60%), 그리고 grade IV 13예중 7예(53.8%)가 p53에 대하여 양성반응을 보여 조직학적 등급에 따른 p53발현율의 차이는 없었다(p=0.861)(Fig. 4).

3. p53발현과 종양의 침윤도와의 관계

병기Ta 6예중 2예(33.3%), T1 10예중 4예(40.0%), T2이상인 25예중 17예(68.0%)가 p53에 대하여 양성반응을 보여 종양의 침윤도가 깊을수록 발현이 증가하는 양상을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다(p=0.154)(Fig. 5).

4. p53발현과 DNA배수성과의 관계

DNA이배수성인 14예중 4예(33.3%), 비배수성인

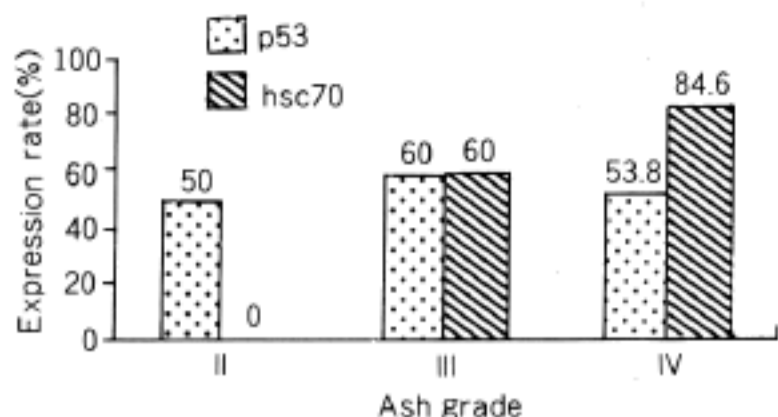


Fig. 4. p53 expression rate showed no significant difference according to the histologic grade(p=0.861), but hsc70 expression rate increased significantly as differentiation became poorer(p=0.000).

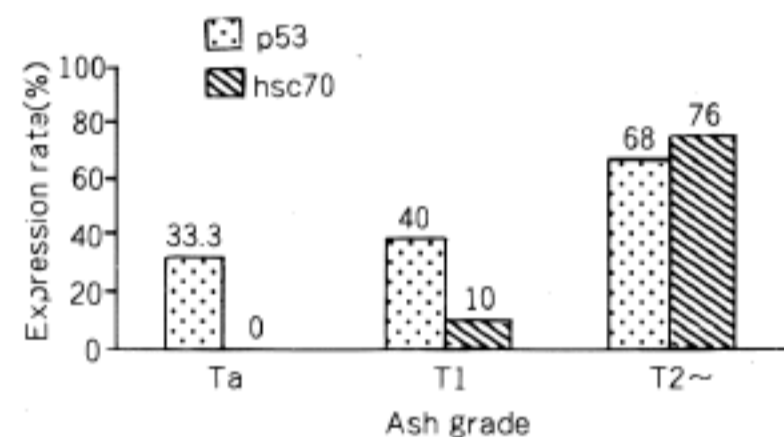


Fig. 5. p53 expression rate was increased according to the deeper invasion but the difference was statistically insignificant(p=0.154). hsc70 expression rate was significantly increased according to the deeper invasion(p=0.000). Especially, the difference between the superficial and invasive tumors was marked.

28예중 19예(66.7%)가 p53에 대하여 양성반응을 보여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.016)(Fig. 6).

5. hsc70발현과 조직학적 등급과의 관계

Ash grade II 14예중 0예(0%), grade III 15예중 9예(60.0%), grade IV 13예중 11예(84.6%)가 hsc70에 양성반응을 보여 조직학적 분화도가 낮을수록 hsc70의 발현이 의의있게 증가하였다(p=0.000)(Fig. 4).

6. hsc70발현과 종양의 침윤도와의 관계

병기Ta 6예중 0예(0%), T1 10예중 1예(10%), T2이상인 25예중 19예(76.0%)가 hsc70에 대하여 양성반응을 보여 종양의 침윤도가 깊을수록 hsc70의 발현이 의의있게 증가함을 알 수 있었으며(p=0.000) 특히

고 안

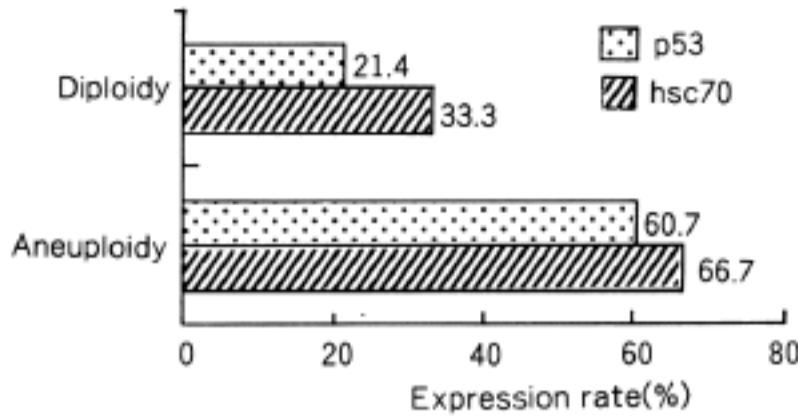


Fig. 6. Both p53(p=0.016) and hsc70(p=0.017) expression rates were significantly higher in the aneuploid group than in the diploid group.

Table 1. Correlation between p53 and hsc70 in 42 transitional cell carcinomas of the urinary bladder

		hsc70		Total
		Positive	Negative	
p53	Positive	14(33.3%)	9(21.4%)	23(54.7%)
	Negative	6(14.3%)	13(31.0%)	19(45.3%)
Total		20(47.6%)	22(52.4%)	42

p=0.059

병기T1과 T2이상간의 차이가 두드러져 표재성 방광암에 비해 침윤성 방광암에서 hsc70의 발현이 현저하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 5).

7. hsc70의 발현과 DNA배수성과의 관계

DNA이배수성인 14예중 3예(21.4%), 비배수성인 28예중 17예(60.7%)에서 hsc70의 발현이 양성으로 관찰되어 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.017)(Fig. 6).

8. hsc70과 p53발현간의 상호관계

양자 모두 양성인 예가 14예, 양자 모두 음성인 예가 13예, hsc70만 양성인 예가 6예, p53만 양성인 예가 9예로 전체 42예중 27예(64.3%)가 hsc70과 p53의 발현일치를 보여 통계학적 의의는 없었으나 비교적 낮은 유의수준으로 양자의 발현이 일치함을 보여주었다(p=0.059)(Tab. 1).

방광의 이행상피세포암은 한국에서 발생빈도가 가장 높은 비뇨기계 악성 종양으로 1989년의 통계 자료에 의하면 인구 10만명당 남자에서 4.43명, 여자에서 0.98명의 발생율을 보이며³³ 첫 진단시 표재성 암종과 침윤성 암종으로 구분되는데 각각이 70%와 30%를 차지한다³⁴. 예후는 주로 처음 진단시의 임상병기와 조직학적 분화도에 따라 결정되나 경요도적 절제술 시행후 표재성 암종의 50~70%가 재발하고³⁵ 5~15% 정도는 침윤성 암종으로 진행되는 것으로 알려져 있어서³⁶ 임상병기나 조직학적 분화도 이외에 예후추정을 위한 보다 객관적이고 재현성있는 방법을 찾기 위한 연구가 행하여져 왔다. Catalonia³⁷는 표재성 방광암에서 ABH표면항원이 양성인 경우 45%에서 재발하고 4%에서 진행하며, 음성인 경우는 90%에서 재발하고 66%에서 진행한다고 보고하였고 세포분화도가 낮은 경우 ABH표면항원이 음성일 확률이 높다고 하였다. 또한 Coon등³⁸은 T항원이 양성인 경우 39%에서 진행하고 음성인 경우는 10%에서 진행하며 T항원은 종양의 조직학적 분화도와 상관관계가 있다고 보고하였으나 ABH및 T항원 검사는 위양성율과 위음성율이 높은 것으로 알려져 있다. Falor등³⁹은 세포유전학적 분석에 의한 연구결과 종양표지 염색체의 검출여부는 종양의 분화도와 상관관계가 있으며 이 염색체가 양성인 경우 재발율과 진행율이 높다고 하였고, Neal등⁴⁰은 종양조직 내에 EGF receptor의 양이 증가되어 있으면 진행율이 높다고 하였으나 이와 같은 광범위한 연구에도 불구하고 현재까지 만족할만한 방법이 없다. Tribukait등¹이 유세포측정기를 이용한 DNA배수성 검사를 시행한 결과 이배수성을 보이는 표재성 방광암은 침윤성 암종으로 진행하지 않으나 비배수성을 보이는 경우 사배수성인 경우는 10%, 사배수성 이외의 비배수성을 보이는 경우는 50%에서 침윤성 암종으로 진행한다고 하여 예후추정에 유세포측정기의 효용성을 주장한 이후 유세포 측정기를 이용한 방광의 이행상피세포암의 DNA분석에 대한 집중적인 연구가 이루어진 결과 DNA배수성에 대하여는 종양의 조직학적 분화도가 높은 경우 대개 DNA이배수성을 보이나 분화도가 낮을수록 이배수성보다 비배수성을 보이는 경우가 많아지며^{2~4,41~43} 종양병기가 Ta인 경우 대개 DNA이배수성을 보이는 반면 T1인 경우는 이배수성과 비배수성을 보이는 경우가 반반 정도이고 T2이상인 경우는 대개 비배수성을

보인다고 알려져 있다²⁻⁴. 또한 DNA이배수성인 암종의 경우는 조직학적 분화도에 따라 SPF의 차이를 보이지 않으나 비배수성인 암종의 경우 조직학적 분화도가 낮을수록 그리고 종양의 침윤도가 깊을수록 SPF이 증가하며² 침윤성 암종에서 림프절 전이 유무와 SPF증가 여부와는 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있다⁴. 또한 임상경과와의 연관성에 대하여는 DNA비배수성을 보이는 표재성 암종의 경우 높은 재발율 및 진행율을 보이므로 국소적 절제 이외에 좀 더 적극적인 치료가 필요하며^{5,6} DNA비배수성을 보이는 경우와 SPF가 10% 이상인 경우 생존율이 의의있게 낮은 것으로 알려져 있다⁷. 본 연구에서는 paraffin block을 사용하였기 때문에 SPF에 대한 분석은 sensitivity가 떨어져 시행하지 않았으나 DNA배수성에 대하여는 조직학적 분화도가 낮을수록($p=0.006$) 종양의 침윤도가 깊을수록($p=0.047$) 비배수성인 경우가 이배수성인 경우보다 많았다.

p53유전자는 17번 염색체의 단완 region 1, band 3, sub-band 1에 위치하고 있는 DNA복제와 세포증식 및 세포사를 조절하는 핵인산화단백질로서 13번 염색체의 장완에 위치하는 Rb유전자와 함께 종양억제 유전자로 분류되고 있다^{10,45}. 정상 조건에서 p53은 수분간의 아주 짧은 반감기를 가지며 정상 세포분열에 관여한다는 증거는 없으나 세포가 mutagenic agent에 노출되면 post-translational modification을 통해 p53이 안정화 되면서 핵내에 축적된다. 축적된 정상 p53은 DNA에 결합하여 세포주기중 G₁ phase에서 세포를 정지시킴으로써 세포로 하여금 손상받은 DNA를 복구할 시간을 갖게끔 한다⁴⁶. 따라서 정상적인 p53이 손상된 상태에서 세포가 mutagenic agent에 노출되면 손상받은 DNA가 그대로 복제되어 종국에는 악성 변화를 일으키게 된다. p53유전자의 비활성화는 흔히 missense mutation에 의해 일어나며 그 결과 생성된 비정상적인 p53단백은 DNA에 결합하지 못하고 상당히 긴 반감기를 갖게 된다. 따라서 종양세포내에서 면역조직화학적 염색에 의하여 쉽게 검출이 되며 이런 방법으로 검출된 p53단백은 거의 항상 p53유전자의 돌연변이와 연관되어 있으나⁴⁷ 돌연변이 이외에도 SV40이나 HPV같은 DNA viruses의 변형단백이나 특정 핵종양유전자의 생산물 등이 정상 p53에 결합함으로써 p53의 종양억제효과를 비활성화 시킬 수 있다⁴⁸. 한편 p53유전자의 변이는 인체 악성종양에서 가장 흔히 관찰되는 단일 유전자변이로써 유방암, 장암, 췌암, 간암, 혈액세포암, 방광암, 뇌종양등 현재까지 인체의 거의 모든 악성종양에서 p53유전자의 변형이 관찰되었다^{8,11-16,46}. 그

중 방광의 이행상피세포암에 대한 연구는 1991년 Sidransky등¹⁷이 18예의 방광암중 61%에서 p53유전자의 돌연변이를 관찰하였다고 보고하면서 이러한 p53유전자의 변이가 방광암에서 관찰되는 가장 흔한 유전자 변화라고 주장한 이후 활발히 이루어지고 있는데 종양의 조직학적 분화도에 따른 p53발현율에 대한 연구들을 살펴보면 Fujimoto등¹⁹은 분자생물학적인 분석을 통하여 또 Wright등¹⁸은 면역조직화학적 염색을 통하여 조직학적 분화도가 낮을수록 돌연변이형 p53유전자의 빈도가 증가한다고 보고하였으나 본 연구에서는 p53에 대한 면역조직화학적 염색 결과 Ash grade II인 예의 50%, III인 예의 60%, IV인 예의 53.8%가 양성반응을 보여 조직학적 등급에 따른 p53발현율의 차이는 없었다($p=0.861$). 또한 종양의 침윤도에 따른 p53발현율에 대한 연구들을 살펴보면 Fujimoto등¹⁹은 분자생물학적인 분석에서 표재성 방광암의 8%, 침윤성 방광암의 50%에서 p53유전자의 돌연변이가 발견되어 표재성 보다는 침윤성 방광암에서 p53유전자의 변이가 더 많이 발생한다고 하였고 Wright등¹⁸은 p53에 대한 면역조직화학적 염색결과 표재성 방광암의 2%, 침윤성 및 전이성 방광암 36%에서 양성반응을 보인다고 보고하였다. 본 연구에서도 병기Ta인 경우 33.3%, T1인 경우 40.0%, T2 이상인 경우 68.0%에서 p53에 대해 양성반응을 보여 종양의 침윤도가 깊을수록 p53의 발현이 증가하는 양상을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다($p=0.154$).

HSP은 정상세포내에서 세포대사에 중요한 역할을 하며 다양한 물리적 및 화학적 자극에 의하여 그 합성이 증가하는 stress단백질의 일종이다²¹⁻²³. 그 중 HSP70과 HSP60 두 families는 intracellular protein folding과 targeting에 관여함으로써 외부자극에 의하여 손상된 세포내 단백질을 회생시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다⁴⁹. HSP70 family에는 hsp70, hsc70, hlx70이라는 적어도 세가지의 단백질이 포함되는데²⁴ 이중 hsp70은 정상 상태하에서는 검출되지 않는 highly heat inducible protein이며 hsc70 또한 quite heat inducible protein으로 세포주기에 따라 조절되는 high basal level을 보인다^{25,26}. hsc70은 73kDa의 분자량을 갖는 slightly heat inducible protein으로 휴지기 세포에 비하여 성장 세포에서 훨씬 고농도로 발견되며²⁴ 인간 골육종 세포주인 HOS-SL에서 p53-hsc70의 coimmunoprecipitation을 관찰한 이후로²⁷ 다양하게 murine, 원숭이 그리고 인간의 종양세포에서 돌연변이형 p53과 hsc70의 연관성이 증명되어 왔다²⁷⁻³¹. 한편 최근 Hinds등³⁰은 hsc70이 돌연

변이형 p53과 결합하여 p53-hsc70 complex를 형성함으로써 돌연변이형 p53이 transforming capacity를 획득하게 되는 것으로 추정할 바 있다. 방광의 이행상피세포암을 대상으로한 본 연구에서 면역조직화학적 염색결과 조직학적 분화도가 낮을수록($p=0.000$) 종양의 침윤도가 깊을수록($p=0.000$) hsc70의 발현이 유의있게 증가하였으며 특히 표재성 암종과 침윤성 암종간의 차이가 두드러져 향후 hsc70의 발현유무에 따른 재발율, 진행율 및 생존율 분석등 충분한 추적조사와 연구를 통하여 hsc70이 방광의 이행상피세포암에서 종양의 증식능 및 예후추정에 유용한 인자로 사용될 수 있으리라 생각되었고 또한 전체 42예 중 64.3%가 hsc70과 p53의 발현일치를 보여 주어 hsc70과 p53과의 상호연관성을 면역조직화학적 염색을 통하여서도 추측할 수 있었고 발현이 일치하지 않았던 예에 대하여는 hsc70과 관련된 기전 이외에 돌연변이형 p53의 transforming capacity에 관여하는 다른 기전이 존재할 것으로 생각되었다.

결 론

저자들은 방광의 이행상피세포암을 대상으로 p53 단백질 및 hsc70에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 상호연관성을 알아봄과 동시에 기존의 방광암 예후인자로 알려진 조직학적 분화도, 종양의 침윤도 및 DNA배수성과 그 결과를 비교함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) p53의 발현은 DNA비배수성인 예에서 이배수성인 예보다 유의있게 증가하였으나($p=0.016$) 조직학적 분화도($p=0.861$) 및 종양의 침윤도($p=0.154$)와는 상관관계가 없었다.

2) hsc70의 발현은 조직학적 분화도가 낮을수록($p=0.000$) 종양의 침윤이 깊을수록($p=0.000$) 유의있게 증가하였으며 DNA비배수성인 예가 이배수성인 경우보다 유의있게 증가하였다($p=0.017$).

3) hsc70과 p53의 발현이 일치한 경우는 전체 42예 중 27예(64.3%)로 hsc70과 p53의 상관관계가 통계학적 의의는 없었으나 비교적 낮은 유의수준으로 양자의 발현이 일치함을 보여주었다($p=0.059$).

이상의 결과로 p53과 hsc70의 상호연관성을 면역조직화학적 염색을 통하여서도 추측할 수 있었으며 향후 충분한 추적조사 및 연구를 통하여 hsc70이 방광의 이행상피세포암에서 종양의 증식능 및 예후추정에 유용한 인자로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Tribukait B, Gustafson H, Esposti P. Ploidy and proliferation in human bladder tumors as measured by flow cytometric DNA analysis and its relations to histopathology and cytology. *Cancer* 1979; 45: 1743-51.
2. Gustafson H, Tribukait B. Characterization of bladder carcinomas by flow DNA analysis. *Eur Urol* 1985; 11: 410-7.
3. Chin JL, Huben RP, Nava E, Rostum YM, Greco GM, Pontes JE, et al. Flowcytometric DNA content in human bladder tumors and irrigation fluids. *Cancer* 1985; 56: 1677-81.
4. Fossa SD, Thorud E, Shoaib MC, Pettersen EO. DNA flow cytometry of cells obtained from old paraffin-embedded specimens. A comparison with results of scanning and asorption cytometry. A methodological study. *Pathol Res Pract* 1986; 181: 200-5.
5. Gustafson H, Tribukait B, Esposti PL. DNA pattern, histological grade and multiplicity related to recurrence rate in superficial bladder tumors. *Scan J Urol Nephrol* 1982; 15: 135-9.
6. Gustafson H, Tribukait B, Esposti PL. DNA profile and tumor progression in patients with superficial bladder tumors. *Urol Res* 1982; 10: 13-8.
7. Blomjous CEM, Schipper NW, Baak JPA, Van Galen EM, De Voogi HJ, Meyer CJLM. Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol* 1988; 41: 21-5.
8. Chang F, Syrjnen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 174-86.
9. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1979; 312: 646-9.
10. Finaly CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57: 1083-93.
11. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup M, et al. Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* 1989; 244: 217-21.
12. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP. Genetic and immunohistochemical analysis of mutant p53 in hu-

- man breast cancer cell lines. *Oncogene* 1990; 5: 893-9.
13. Camano 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
 17. Sidransky D, Eschenbach AV, Tsai YC, Jones P, Summerhays I, Marshall F, Pul M, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 1991; 252: 706-9.
 18. Wright C, Mellon K, Johnstons P, Lane DP, Harris AL, Horne CHW, et al. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer* 1991; 63: 967-70.
 19. Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakioe T, Sasaki H, Sugimura T, et al. Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1393-8.
 20. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: A marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-9.
 21. Hunt C, Morimoto R. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6455-6459.
 22. Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 1984; 159: 4501-13.
 23. Welch WJ, Feramisco JR. Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1229-37.
 24. Pelham HR. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-related proteins. *Cell* 1986; 46: 959-61.
 25. Kao HT, Capasso O, Heintz N, Nevins JR. Cell cycle control of the human HSP70 gene: implications for the role of a cellular E1A0-like function. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 628-33.
 26. Wu BJ, Morimoto RI. Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 6070-4.
 27. Ehrhart JC, Duthu A, Ullrich S, Appella E, May P. Specific interaction between a subset of p53 protein family and heat shock proteins hsp72/hsc73 in a human osteosarcoma cell line. *Oncogene* 1988; 3: 595-603.
 28. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 531-9.
 29. Sturzbecher HW, Addison C, Jenkins JR. Characterization of mutant p53-hsp72/73 protein-protein complexes by transient expression in monkey COS cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 3740-7.
 30. Hinds PW, Finlay CA, Frey AB, Levine AJ. Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 1987; 2863-9.
 31. Sturzbecher HW, Chumacov P, Welchi WJ, Jenkins JR. Characterization of mutant p53 proteins bind hsp72/73 cellular heat shock protein-related proteins in SV40-transformed monkey cells. *Oncogene* 1987; 1: 201-11.
 32. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modli RV, et al. p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 4090-6.
 33. Lee CW, Lee ES, Choi H, Koh SK, Lee JM, Chai SE, et al. Incidence estimation of genitourinary cancer in Korea. *J Kor Med Sci* 1992; 7: 154-61.
 34. 안한중, 이종욱. 방광의 종양: 20년 동안의 체험. *대한비뇨학회지* 1986; 27: 451-7.
 35. Green LF, Hanash KA, Farrow GM. Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder. *J Urol* 1973; 110: 205-7.
 36. Cutler SJ, Heney NM, Friedell GH. Longitudinal study of patients with bladder cancer: factors associated with disease recurrence and progression. In: AUA Monograph Bladder cancer Willims & Wilkins Co. 1982; 35-46.

37. Catalona WJ. Practical utility of specific red cell adherence test in bladder cancer. *Urology* 1981; 18: 113-9.
 38. Coon JS, Weinstein RS, Summers JL. Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 692-7.
 39. Falor WH, Ward RM. Prognosis in early carcinoma of the bladder based on chromosomal analysis. *J Urol* 1978; 119: 44-8.
 40. Neal DE, Benette MK, Hall RR. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: comparisons of invasive and superficial tumors. *Lancet* 1985; 1: 366-8.
 41. Murphy WM, Chandler RW, Trafford RM. Flow cytometry of deparaffinized nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinomas. *J Urol* 1986; 135: 694-7.
 42. Coon JS, Schwartz D, Summers JL, Miller III AW, Weinstein RS. Flow cytometric analysis of deparaffinized nuclei in urinary bladder carcinoma. Comparison with cytogenetic analysis. *Cancer* 1986; 57: 1594-601.
 43. De Vita R, Forte D, Maggi F, Eleuteri P, Di Silverio F. Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by flow cytometry versus histopathological and staging classifications in human bladder tumors. *Eur Urol* 1991; 19: 65-73.
 44. Shaaban AA, Tribukait B, El-Bedeiwy A-FA. Prediction of lymph node metastases in bladder carcinoma with deoxyribonucleic acid flow cytometry. *Urology* 1990; 144: 884-7.
 45. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-27.
 46. Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biologic activities of wild type and mutant p53. *FASEB J* 1993; 7: 855-65.
 47. Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Baigrie RJ, Heryet A, Lane DP, et al. p53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 1993; 142: 87-93.
 48. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 5th. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994; 266-70.
 49. Craig EA. Chaperones: Helpers along the pathways to protein folding. *Science* 1993; 260: 1902-3.
-