

## 유방암의 p53, bcl-2단백의 발현과 에스트로겐 수용체에 관한 연구

고신대학교 의학부 병리학교실 및 외과학교실\*

장 희 경 · 이 충 한\* · 허 만 하

### Expression of p53, bcl-2 Proteins and Estrogen Receptors in Human Breast Cancer

Hee-Kyung Chang, M.D., Choong-Han Lee, M.D.\* and Man-Ha Huh, M.D.

Department of Pathology, Surgery\*, Kosin University, Medical College

In 56 breast cancer tissues (infiltrating ductal carcinoma) with a clinical follow-up period of more than 5 years, positivity of estrogen receptor(ER) by enzyme immunoassay and expressions of bcl-2 and p53 oncoproteins by immunohistochemistry were evaluated. The purposes of this study were to determine prevalence of bcl-2 and p53 in breast cancer, the interrelationship between expression of the proteins and estrogen receptor, correlation between histologic grade and the expression of the tumor-related oncogenes, and to explore the biologic behavior of breast cancer (lymph node metastasis, recurrence rate, and survival) via expression of bcl-2 and p53. Twelve of 56 (21.4%) carcinomas were bcl-2 positive, and seventeen (30.4%) were p53-positive. Eleven of 12 bcl-2 positive tumors (91.7%) were ER-positive, and bcl-2 expression was significantly associated with ER-positivity( $P=0.043$ ). Seven of 36 ER-positive tumors (12.5%) were p53 positive, and p53 expression was inversely associated with ER-positivity( $P=0.006$ ) significantly. The bcl-2 protein expression showed a significant relationship to low histologic grade of tumor ( $P=0.0002$ ), and an almost significant relationship to lower recurrence rate ( $P=0.09$ ). The p53 protein expression showed a significant relationship to high histologic grade of tumor ( $P=0.002$ ) and an almost significant relationship to lymph node metastasis ( $P=0.09$ ). Also an almost inverse relationship between bcl-2 and p53 was demonstrated ( $P=0.057$ ). The bcl-2 expression had a tendency to be associated with longer patient survival( $P=0.09$ ), but p53 immunoreaction was found not to be associated with shorter patient survival( $P=0.16$ ). These results provide further evidence that higher incidence of bcl-2 expression is correlated with higher incidence of ER and lower grade of tumor, while p53 expression is correlated with lower incidence of ER and higher grade of tumor. In conclusion, although the biologic function of bcl-2 protein is not yet well understood in breast cancer, our results suggest that bcl-2 and p53 oncoproteins might play significant roles in estrogen receptor and development of breast cancer. But their prognostic significance could not be determined; our results are 'not significant' but

접 수 : 1995년 12월 14일, 게재승인 : 1996년 3월 21일

주 소 : 부산시 서구 암남동 34, 우편번호 602-702

고신의료원 해부병리과, 장희경

'almost significant'. Thus, contribution of bcl-2 and p53 immunohistochemical phenotyping of breast cancer with ER to the clinical management need verification in larger series. (Korean J Pathol 1996; 30: 662~670)

**Key Words:** Breast Carcinoma, bcl-2, p53, Estrogen Receptor

## 서 론

최근 유방암의 발생에는 에스트로겐 호르몬이 관여한다고 알려져 있으며, 종양조직내에서의 호르몬 수용체의 존재 유무는 치료약제의 선택 및 치료의 반응에 대한 예측 지표가 될 수 있을 것으로 추측되고 있다<sup>1</sup>. 따라서 이런 호르몬 수용체를 조절하거나 연관이 있는 암유전자를 검출하는 것은 유방암 발생 기전 규명, 발생의 예방, 치료, 그리고 예후 판정에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 유방등의, 호르몬이나 성장 인자들에 의해 증식과 퇴축이 조절되어지는 장기들의 정상 선상피 세포에서 검출될 수 있다고 최근 보고된 바 있는 bcl-2<sup>2</sup>는 프로그램된 세포사(apoptosis)를 억제함으로써 종양의 성장에 관여할 것이라는 가설하에 림프내망계와 폐종양을 대상으로 연구가 진행되고는 있으나 아직은 유방암에서의 역할에 대해서는 뚜렷이 밝혀진 바 없다. p53<sup>3</sup>은 17번 염색체의 단완에 위치하는 53-kd 핵 인산단백질로 세포 주기의 합성기 동안에 핵내에 축적되며 정상에서는 종양발생의 억제 유전자이나, 점상 돌연변이등으로 DNA 손상이 있을 때는 오히려 종양의 발생을 유발하는 것으로 알려져 근래에 위장관암<sup>4</sup>, 난소암<sup>5</sup> 등에서는 연구가 진행되고 있으나 유방암에서는 연구가 미흡한 실정이다. 이에 저자는 종양 조직내에서의 bcl-2와 p53의 발현을 조사하고, 아울러 에스트로겐-호르몬 수용체의 존재와의 연관성을 조사하여 이들 단백질이 성호르몬 조절에 관여하는 지를 밝힘으로써 유방암의 발생기전과 생물학적 양상의 일부를 이해하고, 기존의 예후 인자들과의 상관성 및 생존률과 비교검토하여 한국인 여성 유방암의 질병경로의 예후 인자와 치료의 반응에 대한 예측 지표에 대한 객관적인 근거를 제시하고자 하였다.

## 관찰재료 및 방법

### 1. 대상환자군의 선택 및 임상기록 검토

고신의료원에서 유방암으로 진단받고 유방절제술을 받은 환자중에서 5년 이상의 임상추적 조사가 가능했던 56예를 대상으로 하였다. 대상증례를 일관성 있게 하기 위하여 침윤성 관암으로 병리 조직 진단을 받은 증례에 국한시켰으며, 술후 반대측에 재발한 유방암, 술전에 유도화학요법이나 방사선 요법을 시행하였던 예는 연구 대상에서 제외시켰다. 조사의 대상이 된 유방암 환자의 예후 인자들로는 수술당시의 환자 연령, 폐경유무, 림프절 전이 유무 및 임상병기를 병력지를 참조하여 후향적으로 조사하였다.

### 2. 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) 유무 검사

1) **검체 조작:** 신선한 유방암 조직을 적출된 후 2시간 이내에  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관하였다가, 최대 2주 이내에 효소면역측정법을 이용하여 수용체 검사를 시행하였다.

2) **cytosol 제작:** 검체는 빙조상에서 잘게 자른 후 homogenization buffer (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 5 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 10% (v/v) MTG, pH7.4)를 조직 1 g 당 20 ml의 비율로 섞었다. Homogenizer(ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik)를 이용하여 빙조상에서 5초간 균질화한 후, 30초간 간격으로 3회 내지 4회 반복하였다. 균질액을 냉장저속원심분리기를 이용하여,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $2600 \times g$ 에서 한 시간 원심분리시켜 얻은 상층액을 에스트로겐 수용체 검사에 사용하였다.

3) **수용체 측정:** 수용체 측정을 위해서 사용된 에스트로겐 수용체 항체(anti-ER)는 사람의 MCF-7 유방암 스테로이드 호르몬 수용체에 대한 rat monoclonal antibody(Abott)이었다. 암조직에서 분리된 cytosol 100  $\mu\text{l}$ 을 well에 넣고, 에스트로겐 수용체 측정을

위해서는 에스트로겐 수용체 항체가 부착된 bead를 well에 넣고, 4°C에서 18시간 반응시켰다. 이후, horseradish peroxidase가 포함된 이차항체를 well에 넣은 후, 37°C에서 한시간 반응시켜서 결합된 수용체를 표지한다. Bead를 시험관에 옮겨 효소기질인 hydrogen peroxidase와 발색제인 O-phenylenediamine-HCL이 들어 있는 OPD 기질용액을 시험관에 넣고, 실온에서 30분간 반응시킨후, Quantum 11 Analyzer를 이용하여 흡광도를 측정하였고, 20 femtomole 이상인 경우를 양성으로 판정하였다.

### 3. 헤마톡실린-에오신 염색에서의 종양의 조직학적 악성도 판정기준

외과적으로 절제된 유방암 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 통상의 조직표본 제작법에 따라 만들어진 파라핀 포매조직을 만든후 헤마톡실린-에오신 염색을 실시하였고, 암조직의 조직학적 악성도 판정은 Elston과 Ellis<sup>8,9</sup>의 반정량적인 방법을 사용하였다.

### 4. 면역조직화학적 검색

외과적으로 절제된 유방암 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 후 통상의 조직표본 제작법에 따라 만들어진 파라핀포매조직을 4~5 μm 두께로 박절한 후 p53(Dako, DO-7) 및 Bcl-2(Dako, 124) 단백질의 각 항원에 대한 단클론항체를 이용하여 avidin-biotin complex(ABC) 법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 염색과정중에 항원 회복을 위해 극초단파를 이용하였다. 음성대조(negative control)으로는 1차 항체대신에 nonimmune mouse IgG를 사용하였고, 양성대조로는 인체의 편도조직을 사용하였다.

### 5. 면역조직화학염색의 양성 판정 및 평가

p53은 핵에서 양성반응을 보이는 경우에 양성으로 판정하였고, bcl-2단백은 세포질에서 양성을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다. 두 암유전자에 대한 면역조직화학염색의 결과 평가는 전체 종양세포에 대한 양성 세포의 비율이 0%인 경우는 0, 1% 이하인 경우 1로, 1~10%인 경우 2로, 11~25%인 경우는 3, 26~50%인 경우는 4, 51% 이상인 경우는 5라고 채점하였다.

### 6. 통계 검증

모든 통계 검증은 SAS 프로그램을 이용하였다. bcl-2, p53 암유전자의 발현율을 에스트로겐 수용체 양성 유무, 조직학적 악성도와 각각 비교 분석하기

위하여 Kendall, Sperman test와 chi-squared test로 검정하였고, P값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 인정하였으며, p값이 0.05~0.1인 경우에는 'almost significant'<sup>6,7</sup>으로 판정하고 단정적인 결론 유도는 보류하였다. 생존율을 Kaplan-Meier 방법으로 산출한 후 각 예후인자들이 생존율 미치는 의의는 log-rank test로 검정하였다.

## 관찰 결과

### 1. 호르몬 수용체 상태

ER 양성인 예는 총 56예중 36예로 64.3%였다.

### 2. bcl-2 암유전자의 발현 상태 (Table 2)

Bcl-2는 종양세포의 세포질에만 염색되었으며, 56예중 12예에서 양성반응을 보여 21.4%의 양성률을 나타내었고, 양성으로 판정된 종양의 약 2/3에서는 전체 종양 세포의 50% 이상에서 염색되는 양상(Fig. 3)을 보였으며, 정상 유선 기저부의 일부 상피세포에서도 세포질내 양성 반응을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Table 1. Distribution of clinicopathologic parameters in 56 breast carcinoma

Parameter	Classification	No. of patient (%)
Age	≤ 30	0 ( 0. )
	31-40	17 (30.4%)
	41-50	24 (42.8%)
	> 50	15 (26.8%)
Mean age	46	
Menopause	premenopausal	52 (92.9%)
	postmenopausal	4 ( 7.1%)
Tumor size	< 2 cm	9 (16.1%)
	2-5 cm	46 (82.1%)
	> 5 cm	1 ( 1.8%)
Lymph node involvement	None	26 (46.4%)
	1-3 nodes positive	14 (25.0%)
	>3 nodes positive	16 (28.6%)
Recurrence	recurred	10 (17.9%)
	non-recurred	46 (82.1%)

**Table 2.** Distribution of the immunoreactivity for Bcl-2 in 56 infiltrating ductal carcinoma

Immunohistochemical	Tumor		
	Score	Number	%
None	0	44	78.6
Less than 1 %	1	0	0
1-10 %	2	1	1.8
11-25 %	3	2	3.5
26-50 %	4	2	3.5
Over 50 %	5	7	12.5

**Table 3.** Distribution of the immunoreactivity for p53 in 56 infiltrating ductal carcinoma

Immunohistochemical	Tumor		
	Score	Number	%
None	0	39	69.4
Less than 1 %	1	0	0
1-10%	2	1	1.8
11-25%	3	3	5.4
26-50%	4	3	5.4
Over 50%	5	10	17.9

**3. p53암유전자의 발현상태(Table 3)**

p53은 주로 핵에 염색되었으며, 17예에서 양성반응을 나타내어 30.4%의 양성율을 나타내었고, 양성으로 판정된 종양의 2/3에서 전체종양세포의 50%이상에서 양성반응이 관찰되었으며(Fig. 4), 정상유선세포와 간질세포에서는 염색되지 않았다.

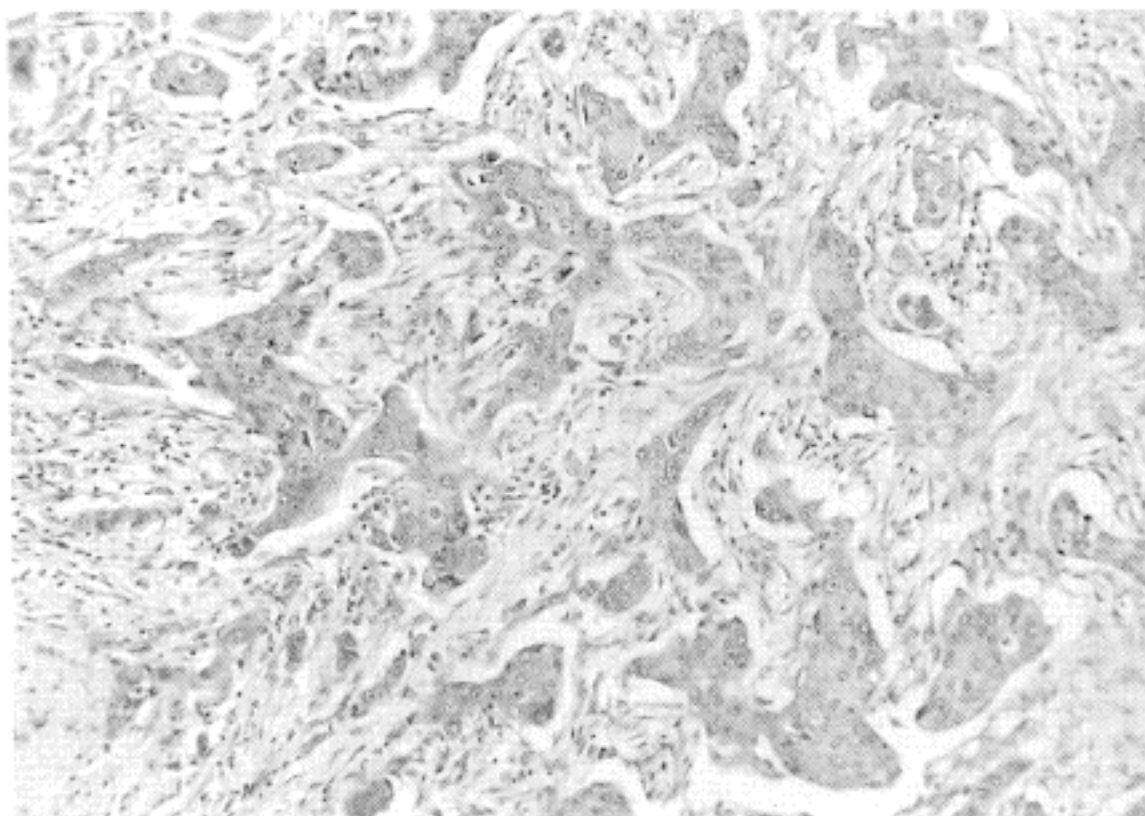
Bcl-2와 p53이 동일한 종양에서 발현한 예는 1예(1.8%)였다.

**4. 병리조직학적 악성도및 bcl-2와 p53 발현과의 관련성 유무**

병리조직학적 악성도는 I, II, III(Fig. 1)가 각각 16예(28.6%), 26예(46.4%), 14예(25%)를 차지하였다. bcl-2 양성인 예중 악성도 I이 9예, II가 3예, III인 없어서 악성도가 낮을수록 bcl-2의 발현이 높았다(P=0.0002). p53 양성인 예는 악성도 I, II, III가 1, 7, 9예로 p53의 발현은 악성도가 높을수록 유의하게 발현되었다(P=0.0026)(Table 4, 5).

**5. bcl-2, p53의 암유전자 발현과 ER과의 관련성 유무**

bcl-2 양성인 환자 12명중 11명(91.7%)에서 ER가 존재하므로 bcl-2 발현 종양일수록 ER 존재의 빈도가 유의하게 높다고 할 수 있다(P=0.043)(Table 4). ER 양성 36예중에서 p53양성인 예는 7예로(12.5%), p53은 ER이 존재하지 않을수록 유의하게 발현한다



**Fig. 1.** Histologic grade III-infiltrating ductal carcinoma.

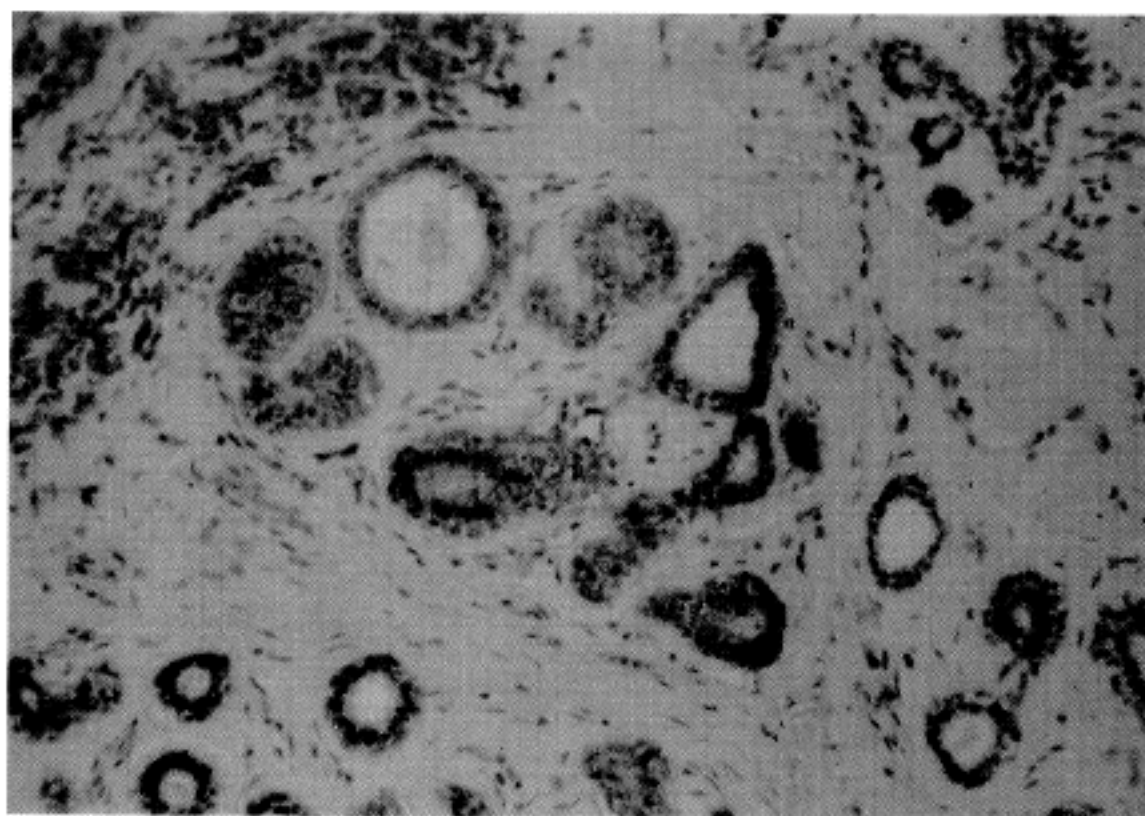


Fig. 2. bcl-2 immunoreactivity in non-neoplastic ductal epithelium. (ABC,  $\times 100$ )

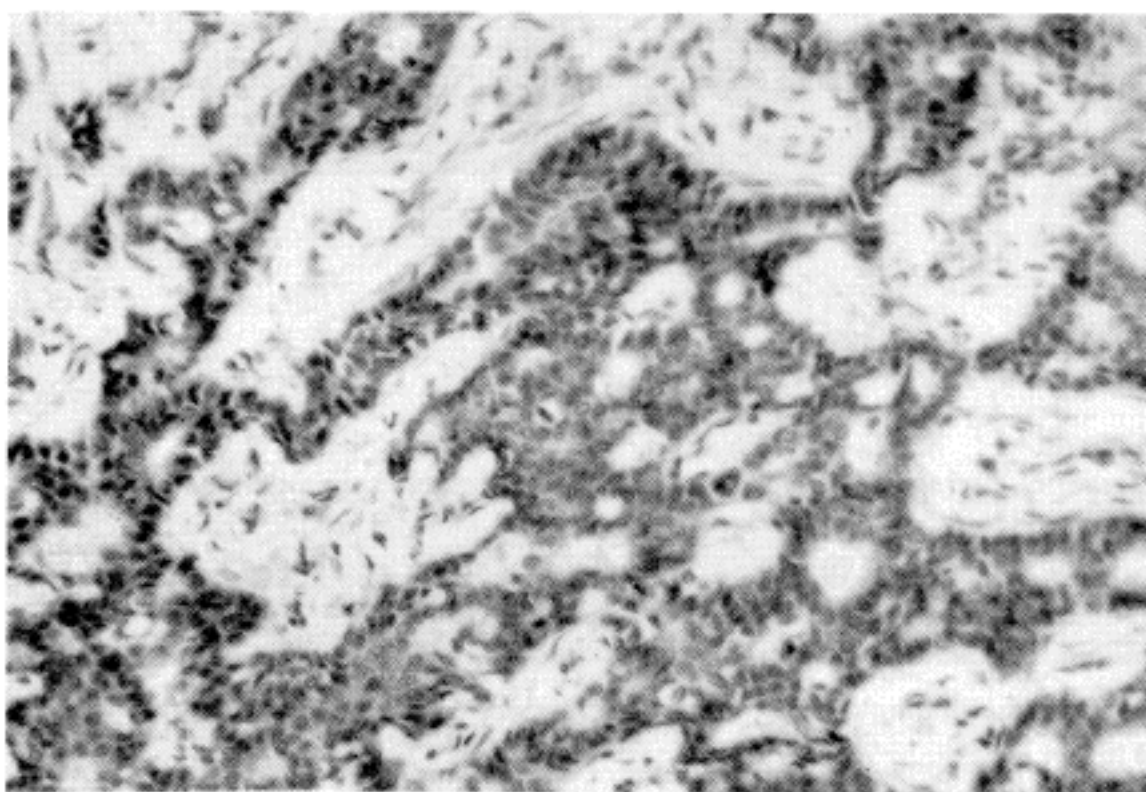


Fig. 3. Immunoreactivity of bcl-2 in over 50% of tumor cells, disclosing fine granular expression in the cytoplasm. (ABC,  $\times 100$ ).

고 수 있다( $P=0.006$ )(Table 5).

6. 림프절 전이, 재발을 예측할 수 있는 지표와 생존률에 영향을 미치는 예후인자(Table 6)

예후 인자로 고려되고 있는 기존의 인자들을 포함한 생존 분석에서, 림프절 전이를 예측할 수 있는 지표로서는 병리조직학적 악성도가 가장 유의한 인자이나( $P=0.006$ ), p53 발현( $P=0.092$ ), 종양의 크기( $P=0.086$ )가 림프절 전이의 예측을 가능케 할 수도

있으며, 재발을 예측할 수 있는 인자로서는 종양의 크기가 의미가 있으며( $P=0.036$ ), bcl-2의 발현 유무( $P=0.085$ ), 조직학적 악성도( $P=0.066$ )도 또한 재발을 예측할 수 있다 하겠다( $0.05 < p < 0.1$ ). 그러나, 5년 이상의 생존률에 영향을 미치는 독립인자로서는 종양의 크기( $P=0.000$ )가 의미가 있었으며, bcl-2의 발현 유무( $P=0.092$ ), 조직학적 악성도( $P=0.077$ ) 또한 다소의 의미가 있을 수도 있다 하겠으나 통계적인 유의성은 없었다( $0.05 < p < 0.1$ ).

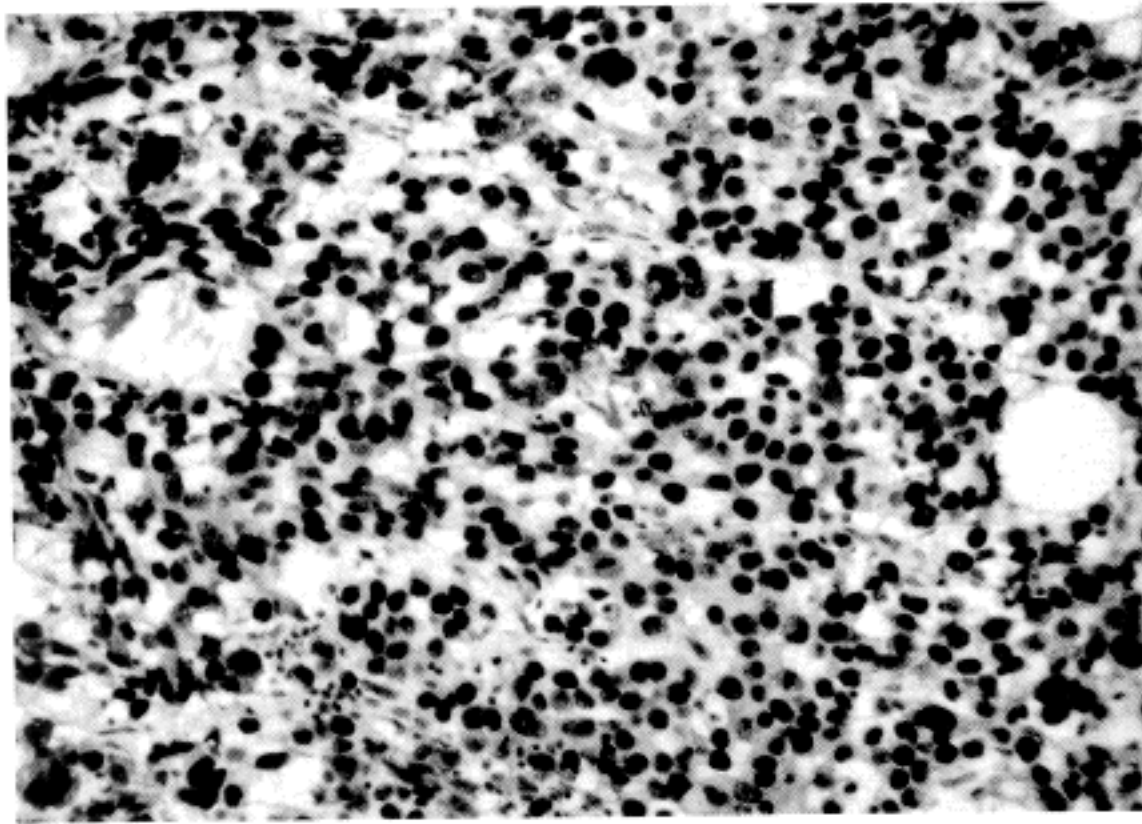


Fig. 4. Immunoreactivity of p53 in over 50% of tumor cells, disclosing intranuclear expression. (ABC, × 100)

Table 4. Relationship between bcl-2 expression and clinicopathological parameters

Parameter	Positive %/(n=56)	bcl-2		
		Numbers of cases		P value
		Positive	Negative	
Estrogen receptor				
positive	36(64.3)	11	25	P=0.043
negative	20(35.7)	1	19	
p53				0.05<P=0.057<0.1
positive	17(30.4)	1	16	
negative	39(69.6)	11	28	
Histologic grade				P=0.002
1	16(28.6)	9	7	
2	26(46.4)	3	23	
3	14(25.0)	0	14	
Lymph node metastasis				P=0.202
positive	30(53.6)	4	26	
negative	26(46.4)	8	18	
Recurrence				0.05<P=0.085<0.1
recurred	10(17.9)	0	10	
non-recurred	46(82.1)	12	34	

Table 5. Relationship between p53 expression and clinicopathological parameters

Parameter	Positive %/(n=56)	p53		
		Numbers of cases		P value
		Positive	Negative	
Estrogen receptor				P=0.006
positive	36(64.3)	7	29	
negative	20(35.7)	10	10	
bcl-2				0.05<P=0.057<0.1
positive	12(21.4)	1	11	
negative	44(78.6)	16	28	
Histologic grade				P=0.026
1	16(28.6)	1	15	
2	26(46.4)	7	19	
3	14(25)	9	5	
Lymph node metastasis				0.05<P=0.092<0.1
positive	30(53.6)	12	18	
negative	26(46.4)	5	21	
Recurrence				P=0.136
recurred	10(17.9)	5	5	
non-recurred	46(82.1)	12	34	

**Table 6.** Prognostic predictors of overall survival in 56 patients with primary breast carcinoma and in those with lymph node metastasis and recurrence

Parameter	P value		
	Lymph node metastasis	Recurrence Survival	Overall
Age	0.405	0.110	0.115
Menopausal state	0.882	0.699	0.652
Size	0.086	0.036	0.0001
E-R receptor	0.505	0.236	0.292
bcl-2 expression	0.202	0.085	0.092
p53 expression	0.092	0.136	0.161
Histologic grade	0.006	0.066	0.077

## 고 찰

현재 서구에서 많이 연구되고 있는 유방암의 예후 인자들로써는 종양의 크기, 폐경유무, 호르몬 수용체 유무, 종양의 증식능, 종양의 악성도, 암유전자발현, 종양의 침윤성 등이다. 본 연구 결과에서는 환자의 평균 연령이 46세로, 서구의 60세보다 10년 이상의 차이가 나며, 폐경상태의 환자가 56명중 4명으로 7%에 지나지않아, 서구에서처럼 폐경에 도달한 환자가 많지 않다는 점등 서구의 유방암과 우리나라의 유방암의 생물학적 특성이 같다고는 할 수 없다<sup>8,10</sup>. 따라서, 서구에서 입증된 생물학적 특성이나 예후인자들을 우리나라에서 임상적으로 적용하기에 앞서 이에 대한 검증이 필요하다고 생각되며, 우리나라 여성의 유방암을 대상으로한 보다 많은 연구가 필요하다 하겠다.

종양조직을 cytosol 형태로 만들어 에스트로겐 수용체 유무를 측정할 후 얻어진 에스트로겐 수용체는 64.5%로 노등<sup>12</sup>의 유방암에서의 에스트로겐 수용체 존재를 48.3% 보다는 높다고 할 수 있으나, 정등<sup>1</sup>의 원발성 유방암 환자의 55~65%에서 에스트로겐 수용체가 존재한다는 보고와 일치한다고 하겠다. 대조 염색이 충분히 잘된 3회 반복 염색에서 동일한 반응을 보인, 본연구 결과의 bcl-2 양성율은 21.4%로 국내에서는 아직 보고가 없어 비교가 불가능하나, Leek<sup>13</sup>의 79%, Doglioni<sup>14</sup>의 81.6%등 외국의 결과들보다 훨씬 낮다. 이와 같은 상이한 결과에 대한 검증

이 추후 필요하다 하겠다. bcl-2는 ER이 존재할수록 유의하게 발현이 높았으며(P=0.043), 악성도가 높은 종양일수록 bcl-2의 양성율은 유의하게 낮았다(P=0.002). 이는 Doglioni<sup>14</sup>, Bhargave<sup>15</sup>의 보고와는 일치하는 결과이나 종양의 분화도와 bcl-2발현율과는 상관성이 없다는 Leek<sup>13</sup>의 결과와는 상반된다 하겠다.

p53단백은 56예중 17예에서 양성반응을 나타내어 30.4%의 양성율을 나타내었고, 이는 국내 전등<sup>16</sup>의 49%, 국외의 Ostrowski<sup>17</sup>의 35.6%보다는 낮으나, 일본 Iwaya<sup>18</sup>의 23%보다는 오히려 저자의 결과가 높다. 또한 p53의 발현이 없는 종양에서 ER이 유의하게 존재한다고 할 수 있으며(P=0.006), 조직학적 악성도와 p53의 발현은 P=0.002로 조직학적 악성도가 높을수록 p53의 발현율도 유의하게 증가한다고 할 수 있다. 또 bcl-2와 p53발현은 서로 상반되어 발현되는 경향이 관찰되었다(P=0.057). 이상의 결과들은 Leek<sup>13</sup>, Doglioni<sup>14</sup>, Iwaya<sup>18</sup>의 보고와도 일치하는 결과라고 하겠다. p53유전자의 변이에 의해 종양의 발생이나 증식에 대한 억제 기능이 상실된다면, 종양의 증식과 전이를 통한 임상적 진행양상이 좀 더 공격적이고 예후 또한 불량할 것이라는 가설하에 Iwaya<sup>18</sup>, Eriksson<sup>19</sup>, Davidoff<sup>20</sup> 등은 p53단백의 면역조직화학염색에 의한 발현 유무와 기존의 예후 인자와의 상관성을 비교하였는데, 병기, 에스트로겐, 프로게스테론 수용체, 세포분화도등의 척도에서 모두 불량한 예후와 연관되었다고 보고하였다. 본 연구의 결과에서는 림프절 전이가 있는 예에서 p53 단백질의 발현이 높은 경향을 보였으나(P=0.092), 재발이나 생존율과는 유의한 상관성이 인정되지 않았다. 그러나 국내의 전등<sup>16</sup>은 p53의 발현은 액와 림프절 전이, 조직학적 분화도, 생존율과는 유의한 상관성이 인정되지 않는다고 했으며, Charpin<sup>21</sup>도 조직학적 악성도와는 유의한 상관성이 인정되었으나, 액와 림프절전이와는 유의한 상관성이 인정되지 않았고, 독립된 예후인자가 아닐 것이라고 추측하였다. 이렇게 다양한 보고가 있음으로써 p53<sup>22,23,24</sup>, bcl-2<sup>25</sup>의 발현을 예후인자로서 이용하기 위해서는 표준화된 면역조직학적 검출 방법이 우선되어야 할 것으로 생각된다. 그러나, 본 연구결과에서 bcl-2, p53의 발현이 호르몬 수용체, 특히 ER과의 상관성이 인정되었다는 것은 이 단백질들이 에스트로겐-조절단백일 가능성을 시사하는 것으로 생각되며, 특히 bcl-2 유전자 발현의 상향 조절은 에스트로겐 의존성 전사 경로와 관련이 있을 것으로 짐작된다<sup>14,25</sup>. 따라서 에스트로겐-의존성 유방암인 경우에 bcl-2의 역할은 프로그램

된 세포사의 억제에 의한 종양 세포의 생존기간 연장과는 별도로 호르몬 조절 역할로 생각할 수 있으나, 아직은 이 기전에 대한 명백한 설명은 없다. 이런 관찰결과는 에스트로겐-의존성 유방암인 경우 또는 예방적 화학요법 약제로 사용하는 tamoxifen등에서 에스트로겐-의존성 암세포의 세포사를 유도하는 능력이 bcl-2 유전자 발현의 소실로 인하여 상항조절되어지지 못하면 변형되어질 수도 있을 것이며, 이러한 bcl-2의 발현율은 에스트로겐 수용체 유무에 따라 달라질 수도 있을 것으로 추측해 볼 수도 있다. 따라서 본 관찰 결과와 해석을 차후 검증한 후, 그 결과를 참고하여 수술후 보조 화학 요법이나 내분비 요법을 선별적으로 시행하면 유방암 치료에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 면역조직화학 염색에서 검출되는 p53(DO-7)은 종양의 발생 및 종양 세포의 불멸(immortalization)에 기여하는 것으로 알려진 돌연변이형 p53이 주로 발현되는 것으로 알려져 있으나, 종양의 억제 유전자이며 프로그램된 세포사를 유도한다고 알려진 야생형 p53도 발현될 수도 있다. 본연구에서는 프로그램된 세포사를 억제하는 것으로 알려진 bcl-2단백과 p53단백의 발현양상이 상반되는 경향을 보였고, 두 단백질이 공존하는 경우는 1예에 지나지 않았다. 이 결과를 Merlo등<sup>24</sup>의 유선 조직 배양에서 야생형 p53이 발현되는 세포에서는 DNA 분절(fragmentation)이 관찰되지 않았으며, 분화 특이성 우유 단백질(differentiation-specific milk protein) 합성을 활성화 시키지도 않았고, 세포의 성장 억제와 프로그램된 세포사와는 관련이 없었다는 보고에 비추어 보면, 본 연구에서 검출된 p53의 대부분은 돌연변이형 p53으로 생각되나, 이의 검증을 위해 추후 PCR-SSCP등의 분자병리학적 방법을 이용하여 돌연변이형 유전자 이상을 확인하는 것이 앞으로 필요하리라고 생각된다.

본 연구 결과들의 생존 분석에서 bcl-2 발현 종양은 유의성은 인정되지 않았으나, 낮은 재발(P=0.085)과 높은 생존율(P=0.092)을 의심케 하고, p53 발현 종양은 재발(P=0.136), 생존율(P=0.161)과는 무관하나, 림프절 전이(P=0.092)의 빈도가 높은 경향이 있으므로, 보다 많은 증례수의 추가후 이에 대한 통계학적인 유의성에 대한 재검정이 필요하다고 하겠다.

## 결 론

병리조직학적으로 침윤성 유선관암으로 진단된 56예의 여성 유방암 환자의 조직 검체들 대상으로

에스트로겐 수용체 유무를 신선한 종양조직에서 효소면역측정법을 이용하여 측정하였고, bcl-2와 p53의 발현을 파라핀 포매조직에서 조사하여, 이를 Elston과 Ellis에 의한 병리조직학적 악성도 및 기존의 예후인자들과의 상관성을 비교 분석하고, 아울러 5년 이상의 추적조사하여 림프절 전이, 재발 그리고 5년 생존율에 영향을 미친다는 다른 예후 인자들에 대한 검증을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

1) 에스트로겐 수용체 수용체는 각각 36예(64.3%)로 존재하였다.

2) bcl-2는 종양세포의 세포질에 미세한 과립상으로 염색되었고, p53은 주로 핵에서 염색되었으며, 각단백의 발현은 12예(21.4%), 17예(30.4%)였으며, 두단백이 공존한 예는 1예뿐이었다.

3) 병리조직학적 악성도는 I, II, III가 각각 16예(28.6%), 26예(46.4%), 14예(25%)였다.

4) bcl-2는 에스트로겐 수용체가 존재하는(P=0.043), 병리조직학적 악성도가 낮은 종양(P=0.002)일수록 유의하게 발현되었으며, p53의 발현 양상과는 다소 상반되는 경향을 보였다.(P=0.057)

5) p53은 ER가 존재하지 않는(P=0.006), 조직학적인 악성도가 높은 종양(P=0.0026)일수록 유의하게 발현되었다.

6) bcl-2 발현 종양은 림프절 전이(P=0.202)와는 무관하였으며, 낮은 종양의 재발(P=0.085)과 높은 생존율(P=0.092)의 경향을 보였으나, 통계학적인 유의성은 없었다. p53 발현 종양은 재발(P=0.136), 생존율(P=0.161)과는 무관하였고, 통계학적인 유의성은 없으나, 림프절 전이(P=0.092)의 빈도가 다소 높은 경향을 보였다.

이상의 결과로 보아 bcl-2와 p53의 발현은 에스트로겐 수용체 유무와 관련되어 에스트로겐 호르몬의 작용에 관여할 수 있으며, 따라서 에스트로겐으로 인해 발생하는 유방암의 발생기전에도 관여할 것으로 생각되며, bcl-2의 발현은 양호한 예후인자들과, p53은 불량한 예후를 짐작케 하는 인자와의 상관성이 추측되나 예후인자로서의 의의는 앞으로 증례수의 추가와 장기추적조사를 통하여 검증함이 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. 정상선, 김인철, JL Wittliff. 스테로이드 수용체의 임상적 의의. 대한의학협회지 1987; 30: 1115-1124.
2. Pezzella F, Gatter K. What is the value of bcl-2



- protein detection for histopathologists. *Histopathology* 1995; 26: 89-93.
3. Pezzella F, Micklem K, Turley H, et al. antibody for detecting p53 protein by immunohistochemistry in normal tissues. *J Clin Pathol* 1994; 47: 592-596.
  4. 이승도, 백승언, 이충한, 허 방, 허만하. 병기 III 위암에서 예후 인자로서의 c-erb B2, c-fos, p53, Proliferatin Cell Nuclear Antigen(PCNA) 및 Epidermal Growth Factor(EGF)의 의의. 1995; 27: 527- 534.
  5. 이재화, 김영옥, 허만하. 상피성 난소 종양의 p53, c-myc, 형질전환 성장인자- $\alpha$  와 - $\beta$ 의 발현. *대한병리학회지* 1996; 30: 23-31.
  6. Armitage D, Berry G. *Statistical Methods in medical research*. 3rd ed.: Blackwell Scientific Publications, 1994: 94-96.
  7. Fayers PM, Machin D. Sample size; how many patients are necessary?. *Br J Cancer* 1995; 72: 1-9.
  8. 전형기, 이승도, 최경현 등. 유방암의 임상적 고찰 및 원격 성적. *외과학회지* 1995; 48: 170-179.
  9. 황성환, 이진용, 김상효. 유암의 임상적 고찰. *외과학회지* 1992; 42: 776-780.
  10. Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1953; 11: 359-377.
  11. Elston CW, Ellis IO. pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathol* 1991; 19: 403-410.
  12. 노금석, 오성수, 박윤규 등. 유방암의 estrogen수용체와 생존율과의 관계. *대한암학회지* 1992; 24: 82-91.
  13. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, et al. bcl-2 in normal breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-139.
  14. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, et al. the prevalence of Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to estrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424: 47-51.
  15. Bhargava V, Kell DL, Rijn M, et al. bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma correlates with hormone receptor positivity. *Am J Pathol* 1994; 145: 535-540.
  16. 전훈배, 구범환, 채양석. 유방암에 있어서의 p53 단백질 발현의 예후 인자들과 상관성에 관한 연구. *외과학회지* 1995; 48: 170-179.
  17. Ostrowski JL, Sawan LH, Henry L. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991; 164: 75-81
  18. Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, et al. nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 835-840.
  19. Eriksson ET, Schimmelpenning H, Aspenblad U, et al. immunohistochemical expression of the mutant p53 protein and nuclear DNA content during the transition from benign to malignant breast disease. *Hum Pathol* 1994; 25: 1228-1233.
  20. Davidoff AM, Herndon JE, Glover NS, et al: relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991; 110: 259-264.
  21. Charpin C, Devictor B, Andrac L, et al. p53 quantitative immunocytochemical analysis in breast carcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 159-166.
  22. Bhargava V, Thor V, Deng G, et al: The association of p53 immunopositivity with tumor proliferation and other prognostic indicators in breast cancer. *Mod Pathol* 1994; 7: 361-368.
  23. Haerslev T, Jacobsen GK. An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathologic parameters, c-erbB-2, PCNA, and Prognosis. *Hum Pathol* 1995; 26: 295-301.
  24. Isola J, Visakorpi T, Holli K, et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1109-1114.
  25. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, et al. bcl-2 protein is topographically in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 6961-6965.
  26. Merlo GR, Venesio T, Taverna D, et al. Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53. *Oncogene* 1994; 9: 443-453.