

결직장 암종에서 p53 유전자 산물의 발현과 DNA Ploidy에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

이 지 신 · 전 광 수 · 박 창 수

The Study of p53 Expression and DNA Ploidy in Colorectal Carcinoma

Ji Shin Lee, M.D., Kwang Soo Cheon, M.D. and Chang Soo Park, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School

Mutation of the p53 gene frequently results in overexpression of the p53 protein and loss of its tumor-suppressing properties. The overexpression of the p53 gene could be an indicator of rapid proliferation, poor differentiation, advanced stages, or poor prognosis. The prognostic value of the overexpression of the p53 gene in colorectal carcinoma is equivocal. The presence of DNA aneuploidy has been described as a powerful adverse prognostic indicator in relation to survival.

To investigate the prognostic significance of p53 expression, and the relationship with DNA ploidy, 92 cases of colorectal carcinomas were analyzed. The overexpression of p53 gene product was present in 50(54.4%) of 92 cases. p53 expression only correlated with recurrence or metastasis during the follow-up periods(p=0.045). DNA aneuploidy was observed in 32(39.1%) of 82 cases. DNA ploidy was strongly associated with lymph node invasion(p=0.005), Dukes' stage(p=0.003), TNM classification (p=0.003), and recurrence or metastasis during the follow-up periods (p=0.045). The frequency of DNA aneuploidy was higher in the p53-positive colorectal carcinomas(58.3%) than in the p53-negative colorectal carcinomas (21.6%) (p=0.003). p53-positive colorectal carcinomas had a higher rate of cell proliferation than p53-negative cases(p<0.001). These results suggest that checking the p53 expression and DNA ploidy could be useful prognostic indicators of colorectal carcinoma. (**Korean J Pathol 1996; 30: 775 ~ 783**)

Key Words: p53, DNA ploidy, Prognosis, Colorectal carcinoma

서 론

결직장암의 종양발생은 다양한 유전자 변화가 응

집되어 일어나는 여러 단계의 과정을 거친다¹⁻³. 이러한 과정에 있어서 돌연변이형 p53 유전자는 종양의 발생에 중요한 역할을 하는것으로 알려져 있다^{4,5}. p53 유전자는 17번 염색체 단완에 위치하고 정상세포에서는 그 유전자 산물이 매우 낮게 발현되며^{6,7}, 세포성장과 분열을 억제하여 종양발생을 억제한다⁴. 그러나 돌연변이형의 p53유전자는 주로 종양세포에서 발현됨으로서 종양포지자의 가능성이 제시되고

접 수 : 1995년 12월 19일, 게재승인 : 1996년 4월 24일
주 소 : 광주광역시 동구 학동 5번지, 우편번호 501-190
전남대학교 의과대학 병리학교실, 이지신

있는데, 유방암종에서는 증식이 빠르거나 분화가 안 된 종양세포에서 많이 발현됨으로서 불량한 예후인자로 보고되고 있다^{8,9}.

결직장 암종의 치료방침과 예후를 결정하는데는 장막 침입, 림프절 전이, 간전이등에 의해 결정되는 Dukes 병기와 TNM 분류, 그리고 종양의 크기, 조직학적 분화도 등이 이용되고 있다^{10,11}. 최근 분자생물학적 이상을 구명하여 이들을 예후인자로 사용하려는 연구들이 이루어지고 있으며 유식세포추정기에 의하여 측정된 DNA ploidy가 결직장 암종의 독립된 예후 인자로 간주되고 있다^{12,13}. 한편 돌연변이형 p53 유전자 산물의 발현이 결직장 암종의 유용한 예후측정 인자일 가능성이 제시되고 있지만 아직까지 확실하지 않다^{14~20}.

이에 저자들은 파라핀 절편에서 p53 유전자 산물을 면역조직화학적으로 검색하고 이를 기존의 결직장 암종의 예후인자 및 DNA ploidy와의 상관관계를 구명하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

전남대학교 병원에서 1991년부터 1993년까지 외과적으로 절제된 결직장 암종중 파라핀 포매피의 보관상태가 양호한 92례를 대상으로 환자의 연령, 종양의 위치, 종양의 크기, 조직학적 분류, 림프절 전이, 간으로의 전이, 림프관 혹은 혈관 침범, Dukes 병기, TNM 분류, 추적검사기간, 추적기간중 전이 및 재발여부를 조사한 후 p53 유전자 산물에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하고 유식세포추정기로 DNA ploidy를 측정하였다.

1. Dukes 병기와 TNM 분류

Astler와 Coller에 의해 수정된 Dukes 병기²¹와 미국합동위원회(AJC)가 암시기 결정과 최종 결과보고를 위하여 제정한 방법²²으로 TNM분류를 시행하였다.

2. 조직학적 검색

헤마톡실린-에오신 염색절편을 이용하여 대장암 취급 지침서와 WHO 분류에 의해 고분화, 중등도 분화, 저분화 선암종과 점액암종으로 분류하였다²³.

3. p53에 대한 면역조직화학적 염색

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 파라핀 포매피를 3 μ m 두께로 박절하여 Probe-On 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 다음 검색에 사용하였다. 염색은 Probe-On 슬라이드를 맞대어 생기는

capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 Microprobe Immuno/DNA 염색기(Biomedica, CA)를 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈 파라핀과 합수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1x automation buffer(Biomedica, CA)에 3분간 부치시켰다. 1x automation buffer를 제거한 후 wild형과 mutant형을 모두 검출할 수 있는 p53 유전자 산물에 대한 항체(Novocastra, UK)를 1:50으로 희석하여 20분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하였다. 일차 항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG를 이용하여 10분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 avidin-alkaline phosphatase에 10분간 작용시켰다. Alkaline phosphatase의 발색은 완충액으로 수세를 한 후 Fast Red TR salt를 이용하였으며 헤마톡실린으로 대조 염색을 시행한 후 양성반응을 관찰하였다. 염색의 전 과정에 있어서 부치 온도는 45°C로 하였으며 음성대조군은 일차항체 대신 항체 희석액을 부치시켜 실험에 이용하였다. p53 유전자 산물에 대한 발현은 종양세포의 핵에 국한되어 관찰된 예도 양성세포수와 관계없이 모두 양성으로 산정하였는데, 국소적인 발현양상도 포함시켰다.

4. DNA ploidy 검색

수술시 DNA ploidy 검사가 의뢰된 50예의 경우 괴사가 없는 부위의 종괴를 이용하였으며 DNA ploidy 검사가 시행되지 않았던 32예 경우는 p53 유전자에 대한 면역조직화학적 검사가 실시된 파라핀 포매피를 사용하였다.

1) DNA ploidy 검색: 신선한 조직은 4°C citrate 완충용액(pH 7.6)이 담긴 petri dish에서 가위로 잘게 절단후 0.5% collagenase(Sigma, USA)를 첨가하고 37°C에서 1시간씩 2회 부치시켰다. 이를 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 5% fetal calf serum을 함유한 RPMI 1640에 부유시킨 후 직경 60 μ m 구경의 nylon mesh를 통해 여과시켰고 여과액내에 단일세포수가 2×10^5 /ml되도록 조정하여 최종 단일세포 부유액을 만들었다.

DNA ploidy는 단일세포 부유액을 실온에서 0.416% propidium iodide(Aldrich)에 15분간 부치시켜 반응시킨 후 15mW argon-ion laser가 부착된 FACScan (Becton Dickinson, USA) 유식세포추정기로 검색하였으며 각 증례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였다. 내부 기준은 닭적혈구(chicken red blood cells)를 이용하였다.

파라핀 포매피를 이용한 DNA ploidy 검색은 Hedley 등²⁴, Hedley²⁵와 Jacobson²⁶등의 방법을 다소 변형시

켜 파라핀 조직괴로부터 세포부유액을 얻었다. 파라핀 조직괴에서 얻은 70 μm 두께의 절편을 xylene으로 30분간 2회 처리하여 파라핀을 제거하고 단계적 저농도의 에탄올(100%, 96%, 64%, 32%, 16%)과 증류수를 거쳐 합수시킨 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하였다. 절편을 0.1% protease(Sigma) 용액에 60분간 37°C에서 부치시켰으며 부치도중 5분, 10분, 20분, 30분 및 60분에 부치액을 주사기로 흡입 및 분출시켜 개개 세포의 유리를 촉진시켰으며 부치 후 냉 PBS로 세척하였다. 세포부유액을 60 μm 구경의 nylon mesh를 통해 여과시켰다. 여과액 내의 유리세포수가 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 이 되도록 조정하여 최종 부유액을 만들어서, trypsin으로 10분간 실온에서 부치시키고, trypsin inhibitor와 RNase로 10분간 실온에서 부치시킨 후, 0.416% propidium iodide와 spermine tetrahydrochloride로 20분간 4°C 암실에서 부치시켜서 Vindelov 염색을 시행하였다. 염색된 단일세포 부유액을 15 mW argon-ion laser가 부착된 FACScan(Becton Dickinson, USA) 유식세포측정기를 이용하여 DNA ploidy를 측정하였다. 각 증례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였고 내부기준은 diploid G₀/G₁ 피크(peak)를 이용하였다.

2) DNA histogram의 분석 및 합성기 세포분획의 측정: G₀/G₁ 피크, S phase fraction 그리고 G₂/M 피크로 구성된 single cell cycle의 소견을 보인 경우를 DNA diploidy라 하였고, DNA aneuploidy는 비정상적인 "stem cell line"이 존재함으로써 적어도 2개 이상의 분리된 G₀/G₁ 피크가 나타나는 경우로 하였다. 평균변이계수(coefficient of variation: C.V.)는 표준편차를 평균치로 나눈값으로 산정하였다. 유식세포측정기에 의해 얻어진 DNA histogram을 Multicycle program(Multiple option cell cycle analysis)(Phoenix, USA)으로 분석하여 얻어진 SG₂/M의 백분율을 합성기 세포분획으로 하였다.

5. 통계학적 분석

p53 유전자 산물 및 DNA ploidy의 각 예후인자들과의 상관관계는 Chi square analysis를 이용하였다. p53유전자 산물과 합성기 세포분획과의 관계는 Students t test를 이용하였다.

성 적

연구대상 92에는 남자 41명 여자 51명으로 남여의 비는 1:1.24 이었다. 연령별로는 50대와 60대 환자수가 가장 많았는데 각각 27명(29.4%)과 33명

(35.9%)이었다. 종양의 부위는 직장이 66예(71.7%)로 가장 많았으며 상행결장이 11예(12.0%), S-결장이 8예(8.7%)이었다. 종양의 부위를 좌측(하행 결장, S-결장, 직장) 및 우측(상행 결장, 횡행 결장)으로 구분해보면 좌측이 13예(14.1%), 우측이 79예(85.9%)이었다. 종양의 크기는 5 cm 미만인 34예(36.9%)이었고 5 cm 이상이 58예(63.1%)이었다. 조직학적 유형별로는 92예중 선암종이 85예(92.4%)이었고, 점액암종은 7예(7.6%)이었다. 선암종중 고분화 선암종이 51예(55.4%), 중등도 분화 선암종이 25예(27.2%), 그리고 저분화 선암종이 9예(9.8%)이었다. 한편 림프절 전이는 55예(59.8%), 간전이는 11예(12.0%)에서 각각 관찰되었다. 원발소에서 림프관을 침범한 경우는 15예(16.3%), 혈관을 침범한 경우는 6예(6.5%)이었다. Dukes 병기와 TNM 분류로는 수정된 Dukes 병기는 B₂가 38예(41.3%)이었으며 TNM 분류상 병기 II가 39예(42.4%)로 가장 많았다.

92예중 84명의 환자에서 1개월이상 추적검사가 가능하였는데 평균 추적 검사기간은 12.8개월이었다. 추적기간중 재발 혹은 전이한 경우는 21예(22.8%)이었다.

1. 면역조직화학적 검색

p53 유전자 산물의 양성반응은 주로 암세포의 핵에서 관찰되었으며 암 소주위의 정상 점막세포에서는 음성이었다(Fig. 1, 2). 이러한 양성반응은 대부분의 암세포에서 일양하게 관찰되었으나 일부의 종양 세포에서만 양성반응을 보이는 국소적인 발현양상을 보이는 경우도 있었다. 또한 종양의 변연부나 림프관 및 혈관내에 있는 종양세포의 많은수에서 양성반응을 보였으며(Fig. 3) 특히 진기하고 큰핵을 갖는 대형세포의 핵에서 강한 양성반응을 보였다. 선종에서 암종으로 전환된 1예의 경우 선종의 부위는 음성인 반면 이형성증이 심하거나 암종부위에서는 양성으로 관찰되었다(Fig. 4).

p53 유전자 산물은 전체 92예중 50예(54.4%)에서 양성으로 관찰되었다. 조직학적 유형에 따른 p53 유전자 산물 양성반응은 선암종이 85예중 48예(52.2%)로 점액암종 7예중 2예(28.6%)에 비해 높은 빈도로 발현되었다.

(1) p53 유전자 산물의 발현과 예후인자와의 상관관계; p53 유전자 산물의 발현도는 전이와 재발여부와 상관관계가 있었으나(p=0.042) 다른 예후 인자와는 상관관계가 없었다(Table. 1).

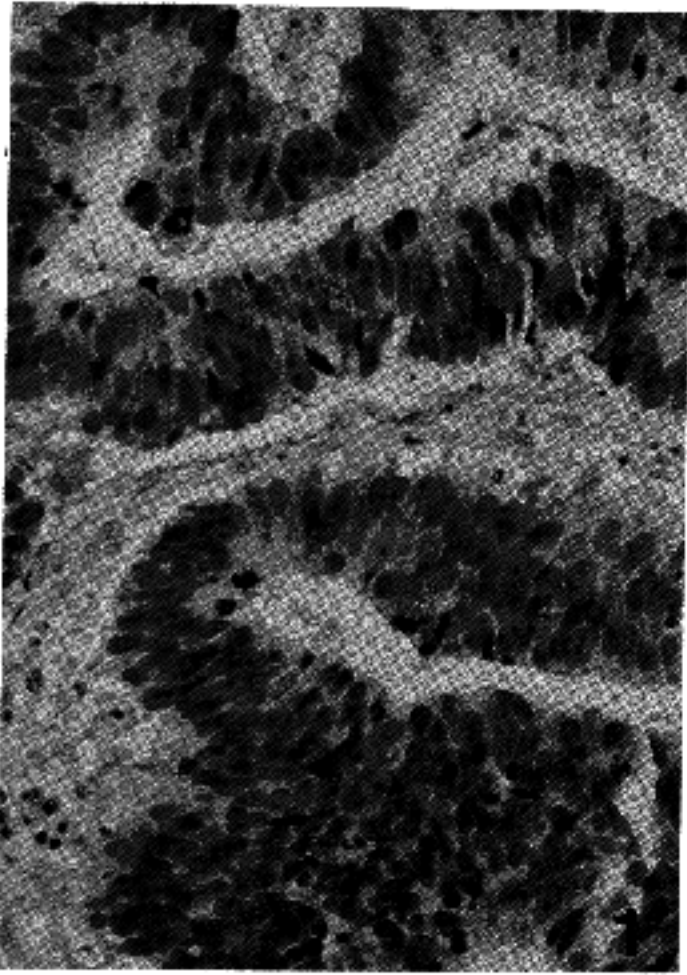


Fig. 1. Positive reaction was noted in the nuclei of tumor cells. Immunohistochemistry for p53

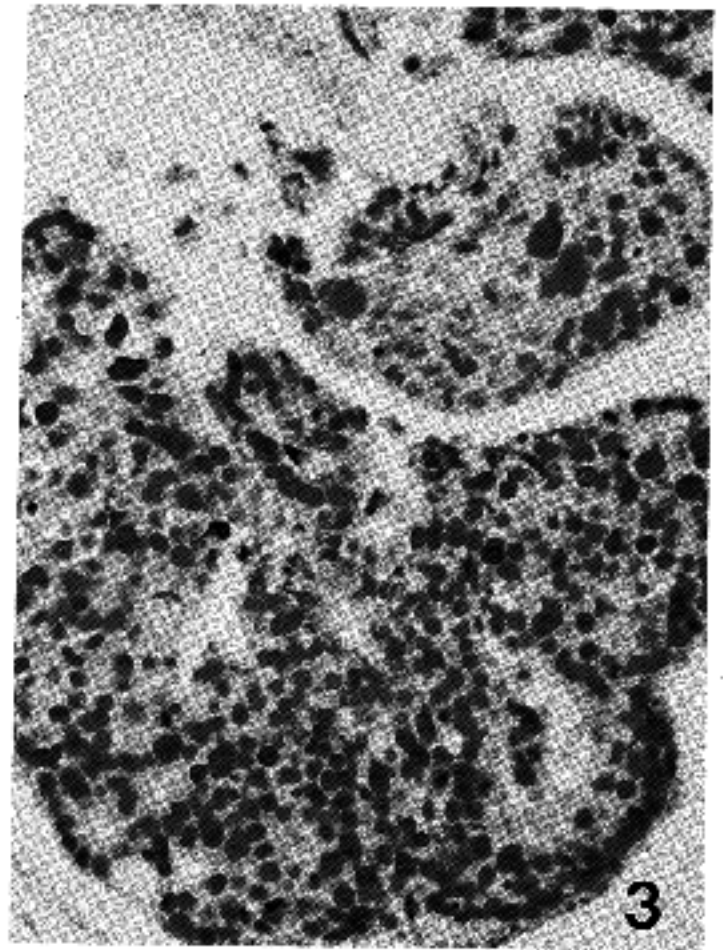


Fig. 3. Most of tumor cells in the lymphatic channels revealed positive reaction. Immunohistochemistry for p53

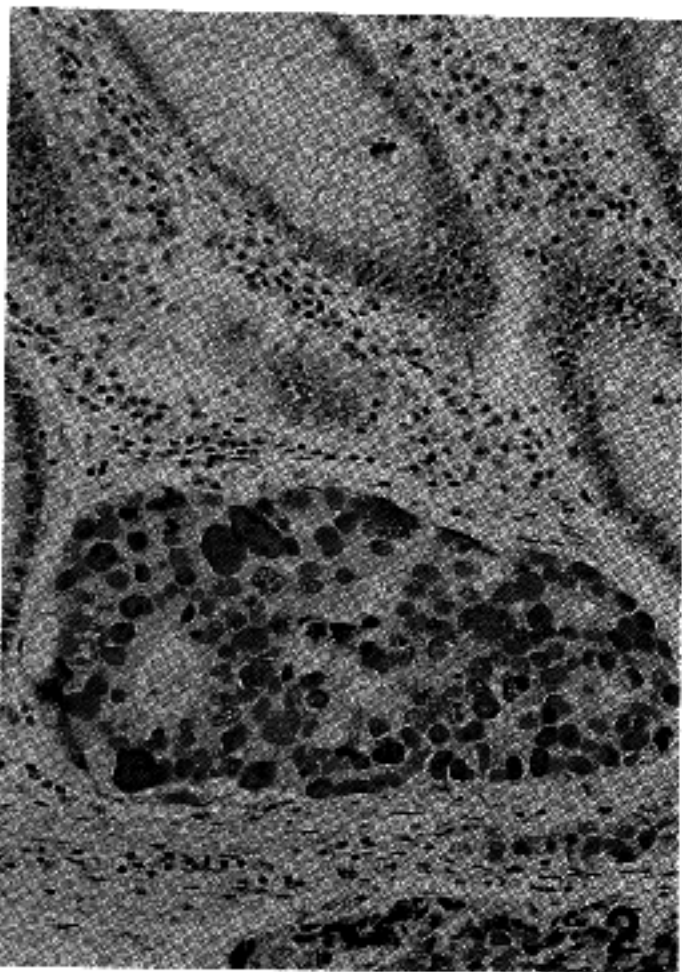


Fig. 2. Positive reaction was shown in the all of the tumor cells, but normal tissues adjacent to tumors revealed negative reaction. Immunohistochemistry for p53

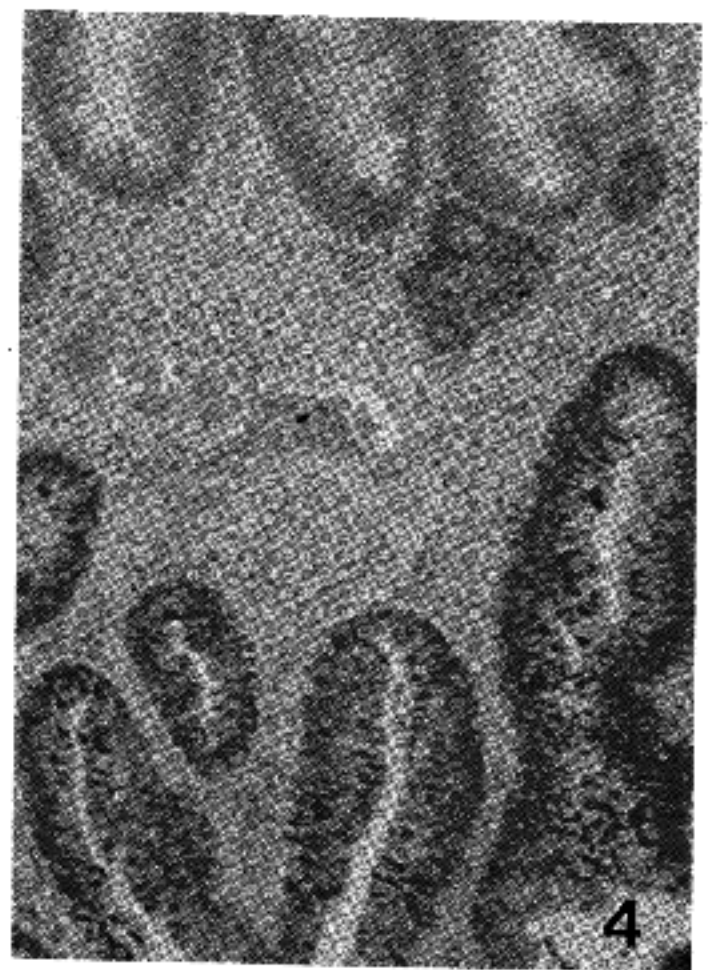


Fig. 4. Immunohistochemistry for p53 in adenocarcinoma arising from adenomatous polyp. Dysplastic cells showed positive reaction.

Table 1. p53 expression and clinicopathological variables

| Variables | p53 expression | | Statistical significance |
|---------------------------------|----------------|----------|--------------------------|
| | Negative | Positive | |
| Size : < 5 cm | 18 | 16 | NS |
| ≥ 5 cm | 24 | 34 | |
| Site : Right | 7 | 6 | NS |
| Left | 35 | 44 | |
| Tumor grade : Poorly diff.* | 6 | 3 | NS |
| Well/Moderately diff.* | 31 | 45 | |
| Lymph node metastasis: Negative | 25 | 30 | NS |
| Positive | 17 | 20 | |
| Liver metastasis : Negative | 36 | 45 | NS |
| Positive | 6 | 5 | |
| Lymphatic invasion : Negative | 36 | 41 | NS |
| Positive | 6 | 9 | |
| Vascular invasion : Negative | 40 | 46 | NS |
| Positive | 2 | 4 | |
| Dukes' stage : A/B | 23 | 23 | NS |
| C/D | 19 | 27 | |
| TNM classification : I/II | 23 | 23 | NS |
| III/IV | 19 | 27 | |
| Recur or metastasis : Negative | 31 | 32 | p=0.042 |
| Positive | 5 | 16 | |

*diff.: differentiated

NS: Not significant

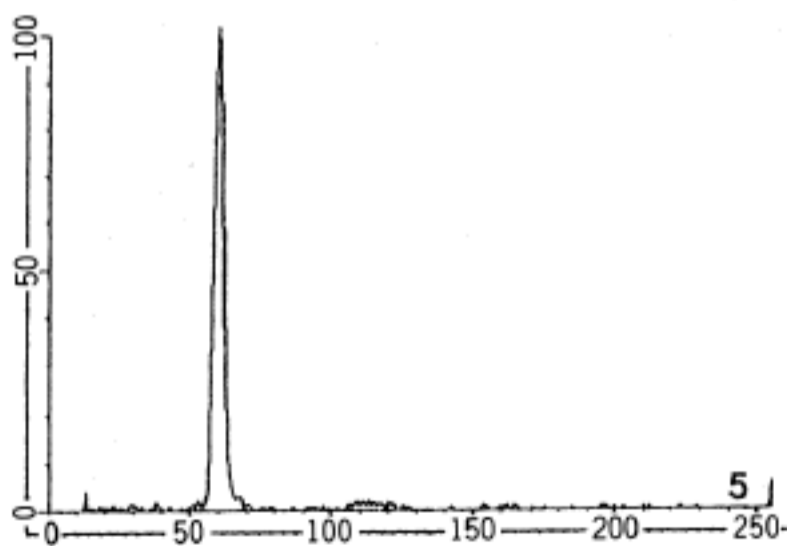


Fig. 5. Flow cytometric histogram from the colorectal carcinoma. Diploid pattern.

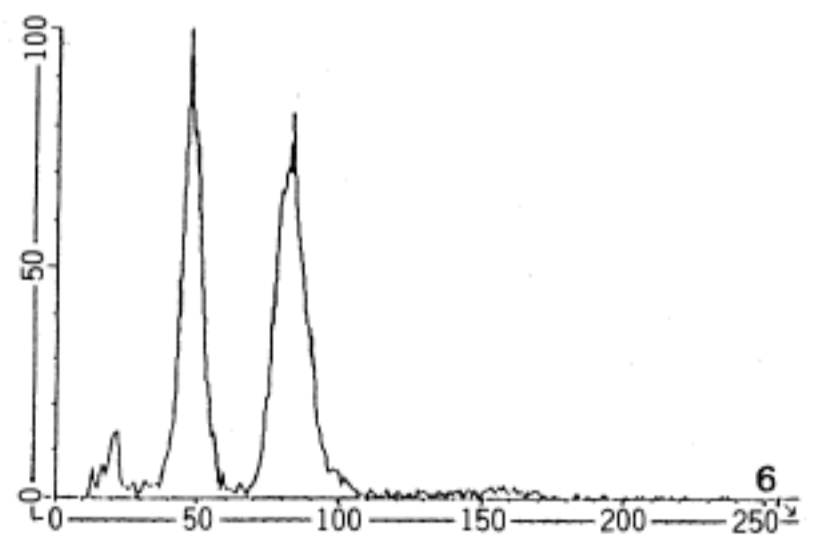


Fig 6. Flow cytometric histogram from the colorectal carcinoma. Aneuploid pattern.

2. DNA ploidy 검색

92예중 82예에서 DNA ploidy 검사가 시행되었는

데 신선조직이 50예, 파라핀 포매조직은 32예이었다. 신선조직의 변이계수는 5.31 ± 1.24 이었고 파라핀 포매조직은 6.69 ± 1.27 로 모두 해석가능한 변이계수

Table 2. DNA aneuploidy and clinicopathological variables

| Variables | p53 expression | | Statistical significance |
|---------------------------------|----------------|----------|--------------------------|
| | Negative | Positive | |
| Size : < 5 cm | 21 | 9 | NS |
| ≥ 5 cm | 29 | 23 | |
| Site : Right | 5 | 3 | NS |
| Left | 45 | 29 | |
| Tumor grade : Poorly diff.* | 4 | 2 | NS |
| Well/Moderately diff.* 42 | 28 | | |
| Lymph node metastasis: Negative | 36 | 13 | p=0.005 |
| Positive | 14 | 19 | |
| Liver metastasis : Negative | 46 | 26 | NS |
| Positive | 4 | 6 | |
| Lymphatic invasion : Negative | 44 | 25 | NS |
| Positive | 6 | 7 | |
| Vascular invasion : Negative | 48 | 29 | NS |
| Positive | 2 | 3 | |
| Dukes' stage : A/B | 31 | 9 | p=0.003 |
| C/D | 18 | 23 | |
| TNM classification : I/II | 31 | 9 | p=0.003 |
| III/IV | 18 | 23 | |
| Recur or metastasis : Negative | 42 | 15 | p=0.045 |
| Positive | 7 | 12 | |

*diff.: differentiated

NS: Not significant

Table 3. Relationship between p53 and DNA ploidy pattern

| p53 expression | DNA ploidy | | Total |
|----------------|-------------|---------------|-------|
| | Diploidy(%) | Aneuploidy(%) | |
| Negative | 29(78.4) | 8(21.6) | 37 |
| Positive | 21(46.7) | 24(53.3) | 45 |
| Total | 50 | 32 | 82 |

p=0.003

의 범위에 속하였다. 82예중 32예(39.1%)에서 DNA aneuploidy, 50예(60.9%)에서는 DNA diploidy가 관찰되었다(Fig 5, 6).

(1) DNA ploidy와 각예후인자와의 상관관계: DNA ploidy는 림프절 전이(p=0.005), Dukes 병기(p=0.003),

Table 4. Relationship between p53 and SG₂M phase fraction

| p53 expression | SG ₂ M phase fraction(%) |
|----------------|-------------------------------------|
| Negative | 19.70 ± 7.78 |
| Positive | 30.14 ± 14.36 |

p<0.001

TNM 분류(p=0.003), 전이나 재발여부(p=0.045)와 상관관계가 있었다(Table 2).

3. p53 유전자 산물의 발현과 DNA ploidy 및 합성기 세포분획(SG₂M)과의 비교

p53 유전자 산물이 양성인 경우 DNA aneuploidy가 24예(53.3%), p53 유전자 산물 음성인 경우 DNA aneuploidy가 8예(21.6%)에서 관찰되어 p53 유전자

산물 양성인 경우에 DNA aneuploidy 빈도가 높았다 ($p=0.003$). p53 유전자 산물 양성인 경우의 합성기 세포분획은 $30.1 \pm 14.4\%$ 로 p53 유전자 산물 음성인 경우의 합성기 세포분획 $19.7 \pm 7.8\%$ 에 비해 높았다 ($p<0.001$)(Table 3 & 4).

고 찰

결직장의 종양발생은 다양한 유전자 변화가 응집되어 일어나는 다단계 과정을 거친다¹⁻³. 즉 암유전자(oncogene)의 돌연변이에 의한 발현과 함께 종양억제 유전자의 불활성화가 있으며, 악성종양이 되기 위해선 적어도 4개 혹은 5개 이상의 유전자에 돌연변이가 있어야 한다. 지금까지 ras 암유전자 증폭이 절반 정도의 결직장 암종에서 보고 되고 있으며²⁷ 종양억제 유전자를 지니고 있는 것으로 추정되는 염색체 5, 17, 18번의 어떤 특정부위 대립유전자의 소실 등이 알려져 있다²⁸⁻³⁰.

염색체 17번의 대립인자 소실의 위치는 p53 유전자인데 이는 17번 염색체 단완에 존재하며 정상세포에서는 낮은 농도로 발현되며^{6,7} 세포성장과 종양발생을 억제한다⁴. 대립유전자의 결손, 돌연변이 혹은 다른 단백질과의 결합을 통한 p53 유전자의 비활성화는 p53 유전자의 종양억제효과를 마비시켜 돌연변이형 p53 유전자는 과발현을 가져온다^{6,7}. 돌연변이형 p53 유전자는 종양의 유전자 변화중 가장 흔하며 종양의 진행에 중요한데^{4,5} wild형에 비해 대사적으로 안정성을 지니며 반감기가 증가되어 변형세포나 암세포에서 높게 발현되므로 면역조직화학적으로 검출이 가능하다¹⁶⁻¹⁸.

본연구에서는 총 92예중 50예(54.4%)에서 p53 유전자 산물 양성반응을 관찰할 수 있었는데 이는 Scott 등¹⁸의 42% 나 Remvikos 등¹⁹의 67%와 유사한 성적으로 p53 유전자의 돌연변이가 결직장 암종의 발생과정에 관여한다고 생각되었다.

p53 유전자 산물 발현을 보인 예에서는 대부분의 암세포에서 일정한 양성반응을 보였는데 종양세포 일부에서만 국소적인 발현을 보이는 경우도 있었다. 이러한 이질성(heterogeneity)은 p53 유전자 산물 발현이 late G₁ phase에서 증가하였다가 분열세포에서 감소하며^{13,31}, 한종류의 항체로 만든 인지할 수 없는 다른 형태의 p53 돌연변이형을 지닌 세포가 존재하기 때문³² 이라고 사료되었다.

본 연구에서 p53 유전자 산물이 정상 점막에서는 관찰되지 않았으며, 선종에서 암종으로 전환된 1예의 경우 선종의 부분은 음성으로 관찰된 반면 이형

성증이 심한곳과 암종인 부분만이 양성으로 관찰된 점은 p53 유전자 산물의 발현이 결직장 암종 진단의 보조적인 방법으로 사용될 가능성을 시사하였다. 조직학적 유형에 따른 p53 유전자 산물의 양성반응은 선암종이 52.2%로 점액암종은 28.6%에 비해 높았는데 이는 Hanski 등과³³ 같은 성적으로 점액암종과 선암종이 서로 다른 gene lesion을 가지고 있기 때문이라고 사료되었다.

돌연변이형의 p53 유전자는 빠른 증식과 낮은 분화도를 보여 불량한 예후인자임을 시사하고 있다⁵. 본 연구에서는 p53 유전자 산물의 발현율이 종양의 크기, 림프절 전이, 림프관 및 혈관내 침범, Dukes 병기, TNM 분류등과는 상관관계가 없었는데 이는 기존의 보고¹⁸⁻²⁰와 같았다. 하지만 추적과정에서 전이나 재발한 경우에 p53 유전자 산물의 발현율이 높았는데($p=0.042$) 이는 p53 유전자 산물 양성인 경우 추적기간동안 전이나 재발을 잘한다는 보고와^{18,19} 일치한 것으로 p53 유전자 산물 양성인 경우 보다 더 세밀한 추적관찰이 필요할 것으로 사료되었다.

유식세포 측정기에 의해 얻어진 DNA ploidy는 환자의 예후 추정에 많은 도움을 주는데 일반적으로 DNA aneuploidy인 종양이 diploidy인 종양에 비해 예후가 불량하다. 본 연구에서도 DNA ploidy가 림프절 전이($p=0.005$), Dukes 병기($p=0.003$), TNM 분류($p=0.003$), 전이나 재발여부($p=0.045$)와 상관관계가 있어 DNA ploidy가 결직장 암종의 독립된 예후인자라는 기존의 보고^{12,13}를 뒷받침하고 있다.

본 연구에서 p53 유전자 산물이 발현되는 경우 DNA aneuploidy 빈도가 높았다. Purdie 등¹⁵과 Scott 등¹⁸은 p53 유전자 산물의 발현이 DNA ploidy와 무관하다고 하였으나 보다 많은 예를 대상으로 검색한 Remvikos 등^{17,19}과 Bell 등³⁴은 p53 유전자 산물이 양성인 경우 DNA aneuploidy 빈도가 높다고 하여 후자들의 주장이 좀 더 설득력이 있었다.

한편 유식측정기에서 측정되어진 합성기 세포분획은 세포증식능의 지표인데 일반적으로 세포증식능이 높을수록 낮은 증식능을 갖는 경우보다 예후가 불량하다고 한다^{35,36}.

본 연구에서 p53 유전자 산물 양성인 경우 합성기 세포분획이 $30.1 \pm 14.4\%$ 로 음성인 경우의 $19.7 \pm 7.8\%$ 에 비해 높았는데 이는 유방암종에서 p53 유전자 산물의 발현이 면역조직화학적으로 세포증식능을 측정할 수 있는 Ki 67 점수와 상관관계를 보였다는 보고³⁶와 결직장 암종에서 p53 유전자 산물 양성인 경우 음성인 경우 보다 DNA polymerase α 를 이용한 세포증식능이 높았다는 보고¹⁸와 일치하

였다.

p53 유전자 산물이 기존의 결직장 암종의 임상적 예후인자와 상관관계가 없었으나 추적조사 기간 중 전이나 재발한 경우에는 그렇지 않은 경우에 비하여 발현율이 높았고 유식세포 측정기에 의한 DNA ploidy 및 합성기 세포분획과 상관관계가 깊었다. 이러한 성적은 p53 유전자 산물이 결직장 암의 예후인자로서 이용될 가능성을 시사함으로 이의 검증을 위해선 생존여부가 확인된 많은 예에 대한 검사가 실행되어야 하고 또한 향후 본연구가 실시된 환자들의 추적조사를 통해 장기생존여부를 확인하여야 할것으로 사료되었다.

결 론

결직장 암종에서의 p53 유전자 산물을 면역조직화학적으로 검색하고 이를 기존의 결직장 암종의 예후인자 및 DNA ploidy와의 상관관계를 구명하고자 본연구를 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

p53 유전자 산물에 대한 면역조직화학적 양성반응은 전체 92예중 50예(54.4%)에서 양성으로 관찰되었으며 p53 유전자산물의 발현도는 전이와 재발여부와 상관관계가 있었으나($p=0.042$) 다른 예후 인자와는 상관관계가 없었다. 유식세포 측정기에 의해 DNA ploidy가 측정된 82예중 32예(39.1%)에서 DNA aneuploidy가 관찰되었고 DNA ploidy는 림프절 전이($p=0.005$), Dukes 병기($p=0.003$), TNM 분류($p=0.003$), 전이나 재발여부($p=0.045$)와 상관관계가 있었다. p53 유전자산물의 발현은 DNA ploidy와 상관관계가 있었으며($p=0.003$), p53 유전자산물에 양성인 경우 음성인 경우보다 합성기 세포분획이 높게 관찰되었다($p<0.001$).

이상의 성적으로 p53 유전자산물의 발현과 DNA ploidy가 결직장 암종의 예후인자로 이용될 수 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Blin N, Seitz G, Theisinger B, Schüder G, Welter C. Genetic changes in the genesis of gastrointestinal carcinoma. *Endoscopy* 1992; 24: 782-4.
2. Hamilton SR. Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 1216-21.
3. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-31.

4. Vogelstein B. Genetic alterations in colorectal tumors. *Adv Oncol* 1991; 7: 3-6.
5. Harris AL. Mutant p53-the commonest genetic abnormality in human cancer? *J Pathol* 1990; 162: 5-6.
6. Cossman J, Schlegel R. p53 in the diagnosis of human neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 980-1.
7. Lane DP, Benichou S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Gen Develop* 1990; 4: 1-8.
8. Davidoff AM, Hemdon JE, Glover NS, et al. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991; 110: 259-64.
9. Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988; 41: 178-83.
10. Steinberg SM, Barwick KW, Stablein DM. Importance of tumor pathology and morphology in patients with surgically resected colon cancer. *Cancer* 1986; 58: 1340-5.
11. Wood DA, Rhobbins GF, Zippin C, Lum D, Stearns M. Staging of cancer of the colon and cancer of the rectum. *Cancer* 1979; 43: 961-8.
12. Armitage NC, Robins RA, Evans DF, Turner DR, Baldroin RW, Hardcastle JD. The influence of tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. *Br J Surg* 1985; 72: 828-30.
13. Kokal W, Sheibani K, Terz J, Harada JR. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal cancer. *JAMA* 1986; 255: 3123-7.
14. Kem SE, Fearon ER, Tersmette KWF, et al. Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261: 3099-103.
15. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; 138: 807-13.
16. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1281-7.
17. Remvikos Y, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Frelat G, Dutrillaux B, Thomas G. Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. *Int J Cancer* 1990; 45: 450-6.
18. Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance *Br J Cancer* 1991; 63: 317-9.
19. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, et al. In-

- creased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758-64.
20. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778-84.
 21. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846-9.
 22. Stearns MWV Jr. Staging colonic and rectal cancer. *Int Adv Surg Oncol* 1981; 4: 189-208.
 23. 대한대장항문병학회, 대한외과학회: 한국인 대장암 취급 지침서, 의학문화사 1988; 2-40.
 24. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor WE. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6: 327-33.
 25. Hedley DW. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 1989; 10: 299-41.
 26. Jacobson AB, Thorud E, Fossa SD, et al. DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of malignant melanomas. A comparison of results from fresh and paraffin embedded material. *Virch Arch B Cell Pathol* 1988; 54: 273-8.
 27. Bos J, Fearon E, Hamilton S, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, Vogelstein B. Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-7.
 28. Baker S, Fearon E, Nigro J, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-21.
 29. Bodmer W, Bailey C, Bodmer J, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328: 614-6.
 30. Vogelstein B, Fearon E, Kern S, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 207-10.
 31. Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984; 308: 199-201.
 32. Varley JM, Brammar WJ, Lane DP, Swallow JE, Dolan C, Walker RA. Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene* 1991; 6: 413-21.
 33. Hanski C, Bornhoeft G, Shimoda T, et al. Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinomas of different histologic types. *Cancer* 1992; 70: 2772-7.
 34. Bell SM, Scott N, Cross D, et al. Prognostic value of p53 overexpression and c-k-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993; 104: 57-64.
 35. Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T, Aretxabala XD, Kamata T, Kosaka T. Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. *Cancer* 1988; 62: 1497-502.
 36. Gerdes J, Lelle RJ, Pickert HL, Heidenreich W, Schwarting R, Kurtsiefer L. Growth fraction in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol* 1986; 39: 977-80.
-