

뇌종양 조직의 혈관형성과 p53 단백질 과표현과의 관계

연세대학교 의과대학 병리학교실

심정연·김호근·김태승

Angiogenesis and Overexpression of p53 Gene Product in Brain Tumor

Jeong Yun Shim, M.D. Hoguen Kim, M.D. and Tai Seung Kim, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

Angiogenesis depends on the net balance between positive and negative angiogenic factors. Tumor cells are angiogenic resulting from increased production of positive factors and decreased production of negative factors. Among these, vascular endothelial growth factor and glioma-derived angiogenesis inhibiting factor are related to glioblastoma multiforme. The p53 gene is more frequently mutated than any other known oncogene or tumor suppressor gene in human tumors including glioblastoma multiforme. Angiogenesis is reported to be controlled by p53 regulation in recent studies. To examine the effect of p53 overexpression on angiogenesis in glioblastoma multiforme, we performed immunohistochemical staining in 51 cases of glioblastoma multiforme, using monoclonal antibodies to p53 protein and factor VIII. 20 cases of low grade astrocytoma were used as control. p53 overexpression was present in 15(75%) of 20 cases of low grade astrocytoma and the mean vessel count was 37.7 ± 9.9 at $\times 200$ field and 17.5 ± 5.8 at $\times 400$ field. p53 overexpression was present in 35(68%) of 51 cases of glioblastoma multiforme and the mean vessel count was 91.9 ± 45.8 at $\times 200$ field and 40.7 ± 19.1 at $\times 400$ field. Mean vessel count in low grade astrocytoma with p53 overexpression was 39.4 ± 10.2 at $\times 200$ field and 18.9 ± 5.7 at $\times 400$ field, while in cases without p53 overexpression it was 32.4 ± 7.6 at $\times 200$ field and 13.2 ± 3.5 at $\times 400$ field. Mean vessel count in glioblastoma multiforme with p53 overexpression was 94.5 ± 51.8 at $\times 200$ field and 42.1 ± 16.8 at $\times 400$ field, while in cases without p53 overexpression it was 86.1 ± 29.5 at $\times 200$ field and 37.1 ± 16.8 at $\times 400$ field. The mean survival time was 12.4 months in the 39 cases of glioblastoma multiforme in which follow-up studies were possible. Significant prognostic factors were age, p53 overexpression and adjuvant therapy. These results show that p53 gene mutation is one of the many contributing factors to angiogenesis in glioblastoma multiforme. In addition, other oncogenes and tumor suppressor genes, as well as growth factors may be involved. Age, p53 overexpression and adjuvant therapy proved to be significant prognostic factors, while microvessel density was not. (Korean J Pathol 1997; 31: 23-33)

Key Words: Glioblastoma multiforme, Low grade astrocytoma, p53, Factor VIII

서 론

암조직의 성장과정에서 종양 및 주변 부위의 혈관형성은 필수적이거나 아직까지 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다. 고형성 종양 중 특히 뇌종양은 많은 정도의 혈관증식을 보인다. 신생혈관 형성이 많을수록 악성도는 높고 예후가 나쁜 종양으로 생각된다.

혈관형성은 신생혈관의 증식을 촉진하는 인자와 이를 억제하는 인자의 평형에 의해 조절된다. 배아 발육과정 이후에는 억제인자가 우세하여 창상치유 또는 골절치유 등의 몇몇 병적인 상황을 제외하고는 혈관형성이 억제되어 있다. 그러나 종양에서는 억제인자의 분비는 감소하는 반면에 촉진인자의 분비는 감소하여 혈관생성이 활발하게 일어나서 종양의 국소 성장과 전이가 일어나게 된다.

종양의 혈관형성을 자극하는 인자로 알려진 것은 acidic fibroblast growth factor(aFGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), epidermal growth factor(EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived growth factor(PDGF) 등이다¹. 이중 VEGF는 면역조직화학적 검사와 in situ hybridization을 통해서 뇌종양 특히 다형성 교모세포종에서 발현이 증가되는 것이 확인되었고 VEGF에 대한 단일세포항체로 치료하였을 때 종양의 성장이 감소하는 것으로 보아 혈관형성을 유발하는 인자임을 알수있다²⁻⁵.

억제인자로 thrombospondin-1(TSP-1)⁶, angiostatin⁷ 과 최근에 밝혀진 glioma-derived angiogenesis inhibitory factor(GD-AIF)⁸ 등이 알려져 있다.

종양의 진행에 있어서 정상 세포가 악성 표현형으로 유전변화가 일어나는데 17번 유전자의 단완에 위치한 p53 종양억제유전자의 돌연변이와 삭제가 사람에서 생기는 악성 종양에 있어서 많은 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 특히 뇌종양중에서는 신경교종에서 p53 유전자의 돌연변이가 일어나는 것으로 생각된다⁹⁻¹¹.

최근에 암조직내의 혈관형성이 p53 단백질의 변화 여부와 관련이 있다는 가설이 제기되고 있다. 즉, 사람의 섬유아세포에 있어서 p53 정상형 대립유전자는 TSP-1 promotor를 자극하여 정상인에서는 TSP-1 형성이 활발하게 일어나서 신생혈관 형성이 조절되는데 암조직의 경우 p53 유전자의 돌연변이가 일어나면 TSP-1 형성이 억제되어 신생혈관 형성이 증가한다고 한다⁶. 다형성 교모세포종에서도 p53정상형 대립

유전자의 조절을 받는 GD-AIF가 존재하는 것이 알려졌다⁸.

본 연구는 신경교종에 있어서 종양내 혈관형성을 정량적으로 측정하고 이들을 p53 단백 과표현 유무와 비교함으로써 종양내 혈관형성과 p53 유전자의 돌연변이와의 관계를 규명하고 생존율과의 관계를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원에서 1986년 1월부터 1994년 12월까지 종양 제거술을 시행한 80예를 대상으로 하였다. 이중 29예는 광학현미경적 접색과 면역조직화학 염색에 필요한 양의 조직이 불충분하거나 반복 시행하여도 면역조직화학 염색이 불충분하여 제외하였다.

비교군으로는 1992년 1월부터 1994년 12월까지 종양 제거술을 시행받은 저등급 성상세포종 20예를 포함시켜 다형성 교모세포종예와 비교하였다.

2. 방 법

1) 광학현미경적 검색: 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 하여 세포 밀도, 세포 역형성 정도, 신생혈관 형성 정도와 종양내 괴사 여부를 관찰하였다.

2) 면역조직화학적 검색: 면역조직화학 염색은 통상적인 avidin-biotin immunoperoxidase 방법으로 시행하였으며 p53는 정상형 및 돌연변이형 p53 유전자에 모두 반응하는 일차항체(Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)를 1:50으로 희석하여 사용하였고 factor VIII은 혈관 내피세포에 반응하는 일차항체(DAKO Carpinteria, CA, USA)를 1:300으로 희석하여 사용하였다.

각예의 대표적인 블록을 선택하여 6 μ m 두께로 절개한후 dry oven에서 60분간 건조시킨후 xylene에 5분씩 2회 침수하여 파라핀을 제거하였다. 면역글로불린의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 100%, 90%, 70% methyl alcohol에 각각 1분씩 처리한 다음 0.3% H₂O₂에 10분간 처리하였다. p53 염색은 citrate buffer에 침수시킨 상태로 10분간 microwave에 처리한후 실온에서 항체와 함께 약 60분간 반응시킨후 10°C에서 12시간 정도 반응시켰다. Factor VIII 염색은 microwave에 처리하지 않고 바로 일차항체와 반응시켰다. PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로

세척한후 이차항체(DAKO, Carpinteria, CA, USA)와 peroxidase conjugated streptavidin(DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 각각 처리하였다. 다시 PBS로 세척하여 diaminobenzidine(ZYMED, San Francisco, CA, USA)으로 발색시켰으며 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 하였다.

p53 단백질은 확실하게 종양세포의 핵에 염색이 된 경우만을 양성으로 판정하여 양성군과 음성군으로 분류하였다. 종양내 혈관형성은 먼저 저배율에서 혈관이 가장 많은 부위를 선택한후 200배와 400배 시야에서 factor VIII 염색에 양성인 혈관과 내피세포의 수를 측정하였다.

3) 임상기록 검토 및 추적조사: 대상 환자들의 입원 및 외래 기록지를 통하여 환자의 연령, 성별, 내원시 주증상, 종양 제거술후 방사선이나 약물등의 보조치료 여부 그리고 생존기간을 조사하였다.

4) 통계학적 분석: SPSS program으로 chi-square test와 student's t-test를 이용하여 p53 단백질 과표현과 종양내 신생혈관 형성과의 관계 및 생존율과 p53 단백질 과표현, 혈관형성, 환자의 연령, 성별, 보조치료 유무와의 관계를 분석하였다. 생존율에 대한 분석은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였으며 유의한 예후인자의 분석은 Cox proportional hazards model을 이용하여 여러 변수에 의한 동시효과를 알아보았다.

결 과

1. 저등급 성상세포종

1) 임상 양상: 20예중 11예(55%)가 남자였고 9예(45%)가 여자로 남녀비는 1.2:1이었다(Table 1). 환자의 연령분포는 11~48세로서, 평균연령은 33±10.6세였다. 컴퓨터 단층화 촬영상 9예에서 우측에 종양이 발생하였고 6예에서는 좌측에 발생하였다. 2예의 경우 양측에 발생하였다. 전두엽과 두정엽에 각각 5예씩 위치하였고 측두엽에 4예가 위치하였으며 이외에도 소뇌에 2예와 교뇌, 후두와, 대상회전과 시상상 각각 1예씩 있었다.

2) 광학현미경적 소견: 세포밀도가 낮고 역형성이나 유사분열이 관찰되지 않는 균일한 크기의 성상세포들로 이루어진 종양이었다. 괴사는 찾아볼 수 없었으며 신생혈관 형성도 적었다(Fig. 1).

3) 면역조직화학 염색 소견:

(1) p53; p53 염색은 15예(75%)에서 양성하였고 5예(25%)에서 음성이었다(Table 2). 염색 양상은 염색이 안되는 다수의 세포들 사이에 양성인 몇몇 세포가 흩어져있는 focal labelling 형태로 나타났다(Fig. 1).

Table 1. Clinical characteristics

Characteristics	Number of patients
a. Low grade astrocytoma	
Sex	
Male	11(55.0%)
Female	9(45.0%)
Age(years) ¹⁾	33.0±10.6(11-48)
Site	
Frontal lobe	5(25%)
Parietal lobe	5(25%)
Temporal lobe	4(20%)
Other	6(30%)
Survival	
Alive	15(75%)
Dead	0(0%)
b. Glioblastoma multiforme	
Sex	
Male	35(68.8%)
Female	16(31.4%)
Age(years) ¹⁾	45.9±13.1(18-67)
Site	
Frontal lobe	22(43.1%)
Parietal lobe	15(29.4%)
Temporal lobe	10(19.6%)
Other	4(8.0%)
Adjuvant therapy	
Radiotherapy	24(47.1%)
Chemotherapy	2(3.9%)
Radiotherapy & Chemotherapy	14(27.5%)
None	11(21.6%)
Survival	
Alive	12(30.8%)
Dead	12(69.2%)

¹⁾: Mean(Range)

(2) Factor VIII: Factor VIII 염색에서 측정된 평균혈관수는 200배 시야에서 37.7±9.9개(22~64개)였고 400배 시야에서 17.5±5.8개(10~30개)이었다(Table 2).

4) 통계학적 분석

p53 염색에 양성인 경우 평균혈관수는 200배 시야에서 39.4±10.2개, 400배 시야에서 18.9±5.7개 이었고 음성인 경우 200배 시야에서 32.4±7.6개, 400배 시야에서 13.2±3.5개였다(Table 3). 따라서 p53 단백질 과표현이 나타나는 경우 혈관형성이 많은 것

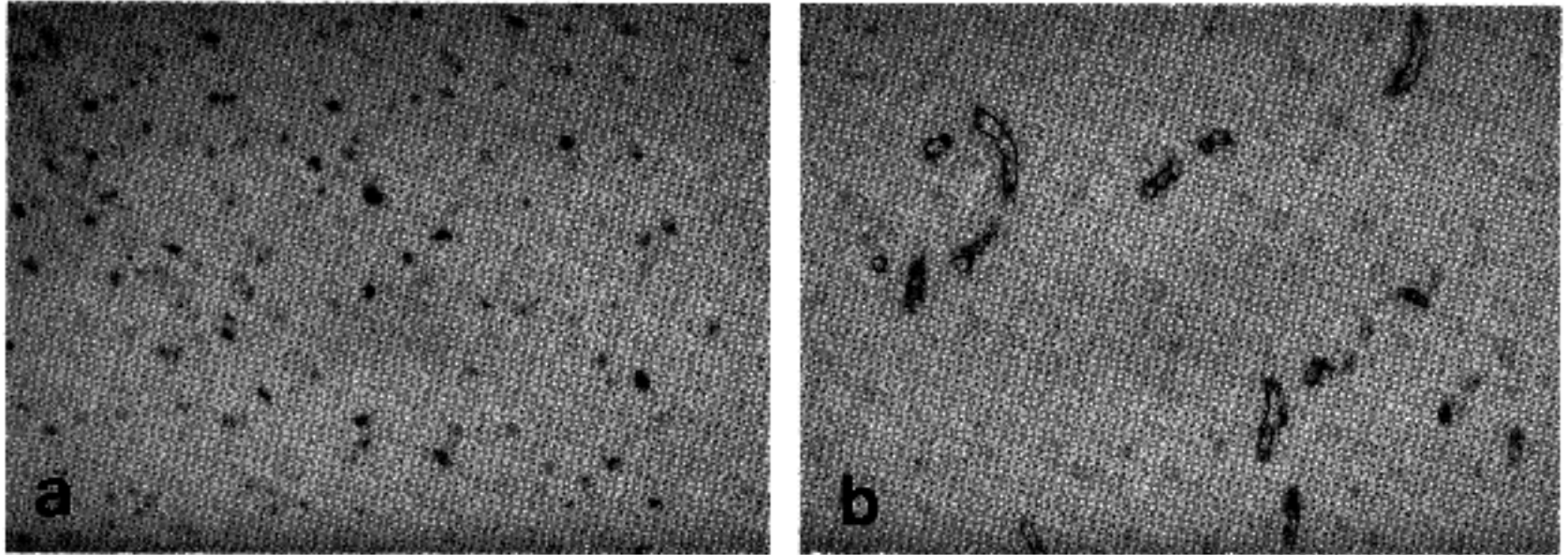


Fig. 1. Low grade astrocytoma. p53 immunostain demonstrates focal nuclear labelling of tumor cells(a), while factor VIII immunostain shows some vascular proliferation(b).

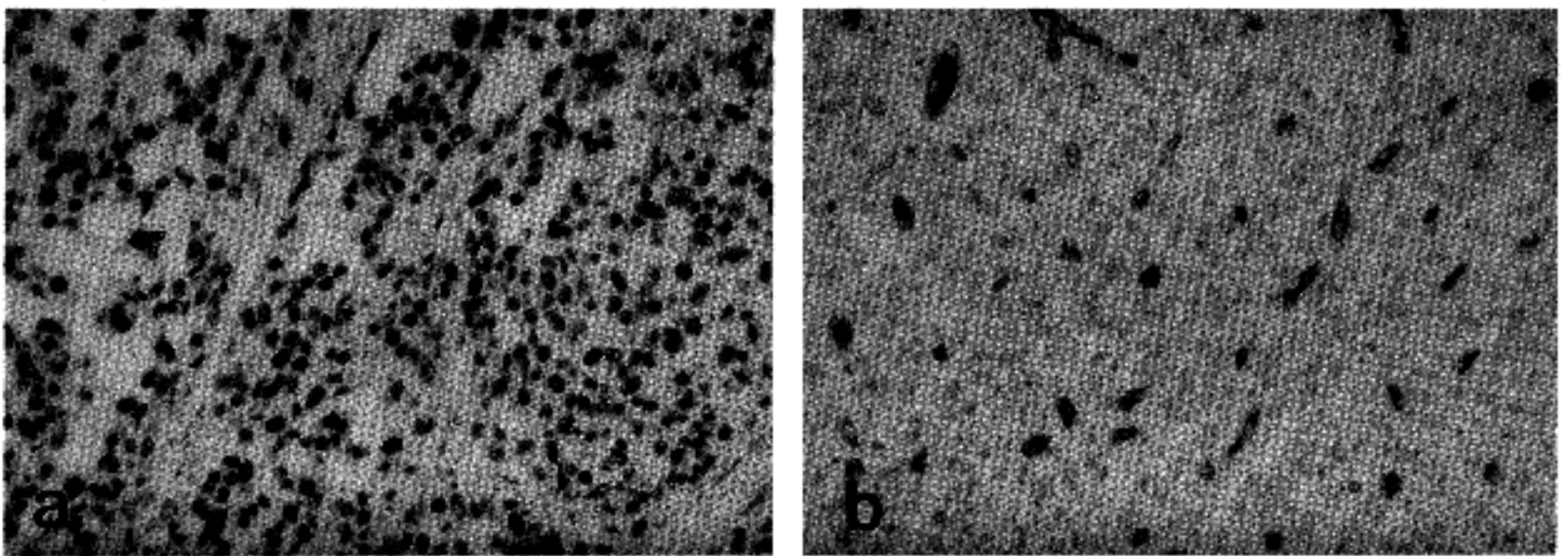


Fig. 2. Glioblastoma multiforme. p53 immunostain demonstrates diffuse nuclear staining of tumor cells(a), while factor VIII immunostain shows marked vascular proliferation(b).

으로 나타났으나 통계학적으로 유의한 상관관계는 없었다($p > 0.05$). 환자의 연령과 p53 단백 과표현과의 사이에도 유의한 상관관계가 없었다($p = 0.4294$).

5) 추적조사: 5예에서는 추적조사가 불가능하였으며 나머지 15예는 모두 생존해 있었다(Table 1). 평균생존기간은 29개월(4~64개월)이었다.

2. 다형성 교모세포종

1) 임상양상: 51예중 35예가 남자(68.6%)였고 16예(31.4%)가 여자로 남녀비는 2.2:1이었다(Table 1). 환자의 연령분포는 18~67세로서 평균연령은 45.9 ± 13.1 세였고 40~60세군이 58.8%로 가장 많았다. 컴퓨터 단층화 촬영상 종양은 27예에서는 우측, 23예

에서는 좌측에 위치하였고 양측에 위치한 경우도 1예 있었다. 전두엽에 22예가 발생하였고 두정엽에 15예와 측두엽에 10예가 발생하였다. 이외에도 후두엽, 송과선, 대뇌기저핵과 측뇌실에 각각 1예씩 발생하였다.

2) 광학현미경적 소견: 세포밀도가 높고 역형성이 심한 성상세포들로 구성된 종양으로 유사분열이 자주 관찰되었다(Fig. 2). 책상배연의 괴사가 많은 예에서 관찰되었으며 신생혈관 형성도 풍부하였는데 혈관 내피세포의 증식과 사구체 모양의 혈관구조 형성이 많은 예에서 특징적으로 나타났다.

3) 면역조직화학 염색 소견

(1) p53; p53 염색은 35예(68.6%)에서 양성하였고

Table 2. Results of p53 overexpression and microvessel density according to tumor type

Tumor	p53 ¹⁾		Microvessel ²⁾	
	+	-	×200 field	×400 field
Low grade astrocytoma	15(75%)	5(25%)	37.7(22- 64)	17.5(11-30)
Glioblastoma multiforme	35(68.6%)	16(31.4%)	91.9(31-268)	40.7(11-89)
p-value	0.597		0.0001	0.0001

¹⁾: Number(%)

²⁾: Mean number(Range) in Factor VIII stained slides

Table 3. Comparison of microvessel density and p53 gene product overexpression

p53 gene overexpression	Mean vessel count ± SD ¹⁾	
	×200 field	×400 field
Low grade astrocytoma		
Overexpression	39.4 ± 10.2	18.9 ± 5.7
No overexpression	32.4 ± 7.6	13.2 ± 3.5
Glioblastoma multiforme		
Overexpression	94.5 ± 51.8	42.1 ± 16.8
No overexpression	86.1 ± 29.5	37.1 ± 16.8
p-value ²⁾	0.1787/0.4675	0.0541/0.3895

¹⁾: Standard deviation

²⁾: Low grade astrocytoma/Glioblastoma multiforme

16예(31.4%)에서 음성이었다(Table 2). 염색 양상은 종양세포의 30% 미만에서 양성인 경우가 14예(27.5%)였고 그 이상에서 양성인 경우가 21예(41.2%)이었다(Fig. 2).

(2) **Factor VIII;** Factor VIII 염색에서 측정된 평균혈관수는 200배 시야에서 91.9 ± 45.8개(31 ~ 268개)였고 400배 시야에서 40.6 ± 19.1개(11 ~ 89개)이었다(Table 2).

4) 통계학적 분석

(1) **Univariate analysis;** p53 염색에 양성인 경우 평균혈관수는 200배 시야에서 94.5 ± 51.8개, 400배 시야에서는 42.1 ± 16.8개이었고 음성인 경우 200배 시야에서 86.1 ± 29.5개이었다(Table 3). 따라서 p53 단백질 과표현이 나타나는 경우 200배와 400배 시야에서 모두 혈관형성이 많은것으로 나타났으나(Fig. 3, 4) 통계학적으로 유의한 상관관계는 없었다(p=

Table 4. Relationship of prognostic factors with p53 overexpression and microvessel count in glioblastoma multiforme

Factors	p53 overexpression	Microvessel count
Age	p=0.5564	p=0.0988
Necrosis	p=0.7490	p=0.9384

0.4675, 0.3895).

p53 단백질 과표현과 환자의 연령(p=0.5564) 및 종양내 괴사여부(p=0.749)는 상관관계가 없는 것으로 나타났다. Factor VIII과 환자의 연령(p=0.0988), 및 종양내 괴사여부(p=0.9384) 역시 상관관계가 없었다(Table 4). 이외에도 환자의 연령과 종양내 괴사여부 와도 아무런 관계가 없었다(p=0.5147).

환자의 연령, 성별, 종양내 괴사여부, p53 단백질 과표현 유무와 혈관수는 예후와 관계가 없는 것으로 나타났다(Table 5, Fig. 5, 6, 7, 8). 반면에 종양제거술후 방사선이나 약물 등의 보조치료를 받은 경우가 예후가 좋았다(p=0.0027, Table 5, Fig. 9).

(2) **Multivariate analysis;** 예후인자의 분석은 여러 인자의 동시효과를 알아보기 위하여 multivariate analysis를 시행한 결과 p53 단백질 과표현이 나타나지 않은 경우가 예후가 좋았다(p=0.0442, Table 6). 환자의 연령은 적을수록 예후가 좋았으며(p=0.0065) 종양제거술후 방사선이나 약물등의 보조치료를 받은 경우가 예후가 좋았다(p=0.0001)

5) **추적조사;** 추적조사가 가능했던 39예의 평균생존기간은 12.4개월(1 ~ 58개월)이었으며 27예(69.2%)에서 사망하였다. 1년 생존율은 48.7%인 반면에 2년 생존율은 5.1%이었다(Table 1, Fig. 10).

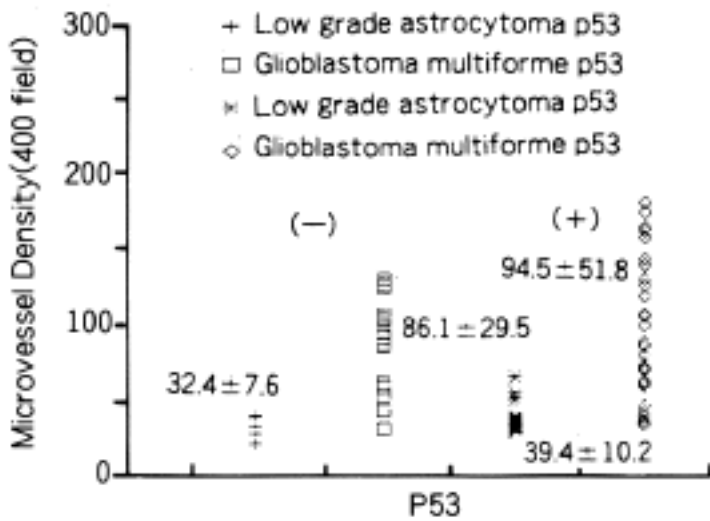


Fig. 3. Scatterdiagram showing relationship between p53 overexpression & microvessel density(200 field)

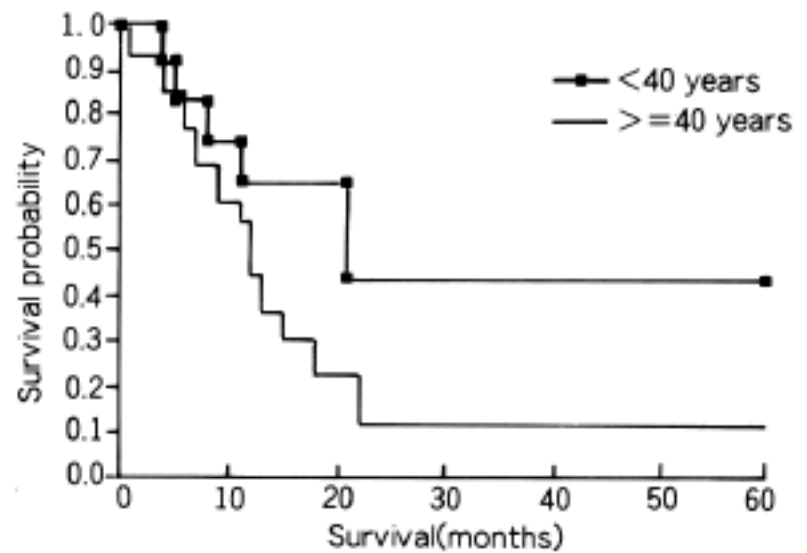


Fig. 5. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma according to age. There is no significant difference in overall survival according to age(p=0.2690)

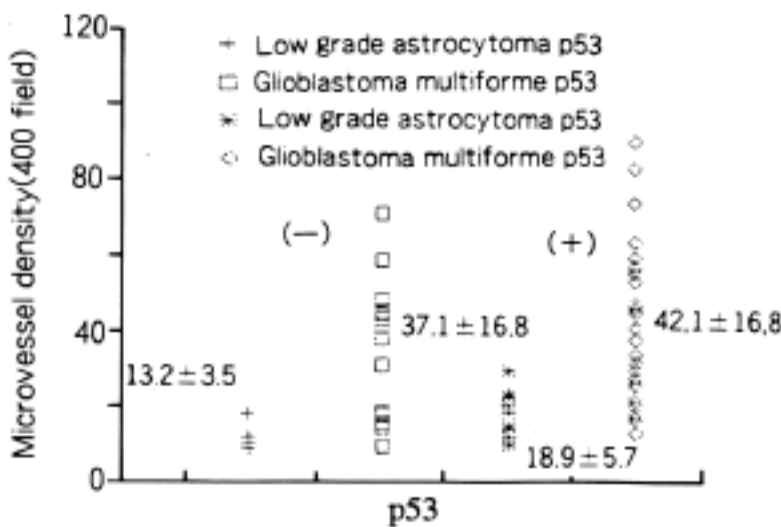


Fig. 4. Scatterdiagram showing relationship between p53 overexpression & microvessel density(400 field)

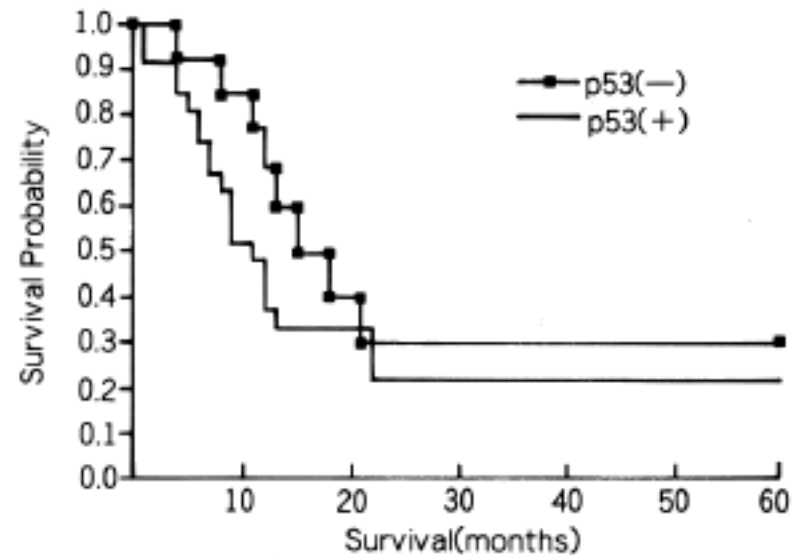


Fig. 6. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma multiforme according to p53 overexpression. There is no significant difference in overall survival according to p53 overexpression(p=0.2015)

Table 5. Significance of prognostic factors in glioblastoma multiforme by univariate analysis

Variables	Category	p-value
Age	Years	0.2690
Sex	Male, female	0.2130
Necrosis	Present, absent	0.1178
p53	Overexpression, no overexpression	0.2015
FactorVIII($\times 200$ field)	Microvessel density/ $\times 200$ field	0.1774
Factor VIII($\times 400$ field)	Microvessel density/ $\times 400$ field	0.7187
Adjuvant therapy	Yes, no	0.0027

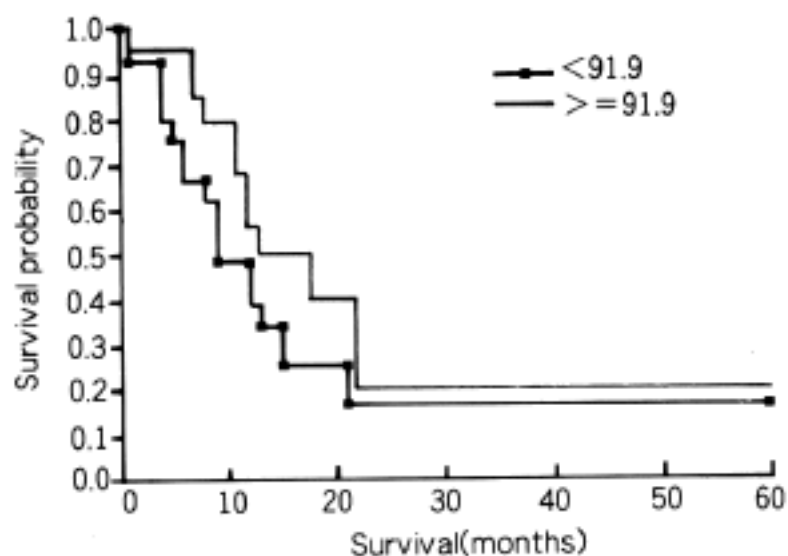


Fig. 7. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma multiforme according to factor VIII(200 field). There is no difference in overall survival according to factor VIII at 200 field($p=0.1774$)

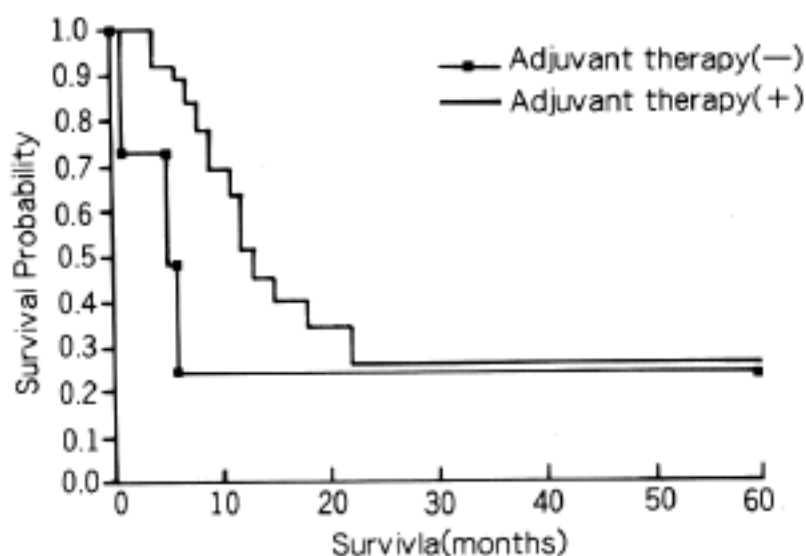


Fig. 9. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma multiforme according to adjuvant therapy. There is significant difference in overall survival according to adjuvant therapy($p=0.027$)

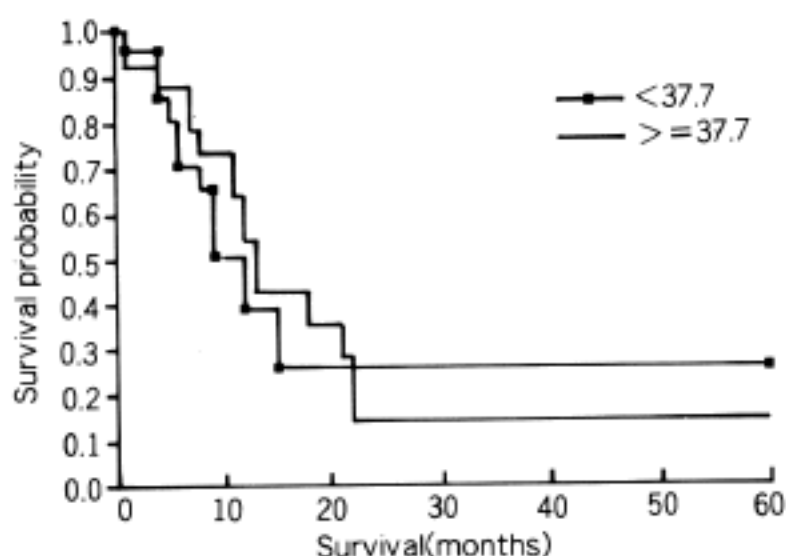


Fig. 8. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma multiforme according to factor VIII(400 field). There is no significant difference in overall survival according to factor VIII at 400 field($p=0.7187$)

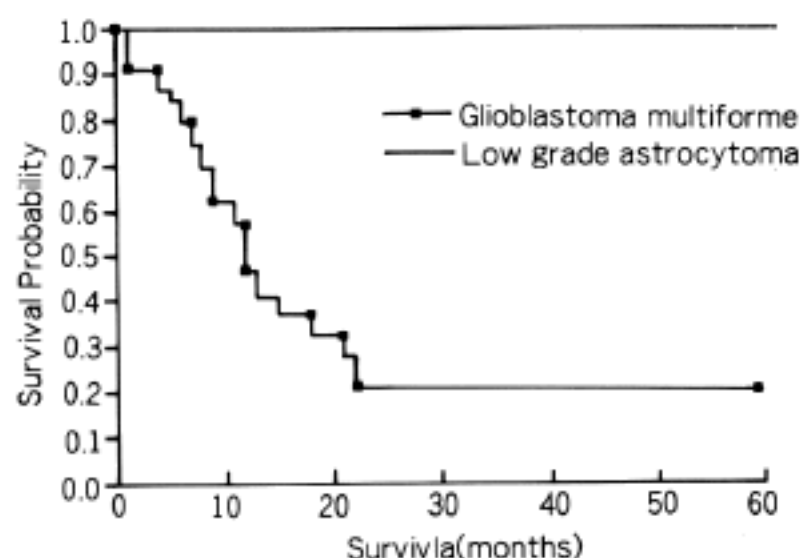


Fig. 10. Kaplan-Meier survival curve in glioblastoma multiforme and low grade astrocytoma

Table 6. Significance of prognostic factors in glioblastoma multiforme by multivariate analysis

Variables	Category	p-value	Risk ratio
Age	Years	0.0065	1.050
Sex	Male, female	0.2435	1.741
Necrosis	Present, absent	0.0504	0.419
p53	Overexpression, no overexpression	0.0442	2.544
Factor VIII($\times 200$ field)	Microvessel density/ $\times 200$ field	0.6414	1.005
Factor VIII($\times 400$ field)	Microvessel density/ $\times 400$ field	0.5655	0.985
Adjuvant therapy	Yes, no	0.0001	0.076

고 찰

최근에 암조직내 혈관형성이 p53 유전자의 돌연변이 여부와 관련이 있다는 가설이 제기되고 있다. 즉, p53 유전자의 돌연변이가 일어나면 사람의 섬유세포에 있는 신생혈관의 억제인자인 TSP-1의 생성이 억제되어 신생혈관 형성이 증가되는 것으로 알려져있다⁶. 또한 뇌종양중 다형성 교모세포종의 경우에도 정상적인 조건에서는 p53의 정상형 대립유전자의 조절을 받아 신생혈관 형성을 억제하는 GD-AIF가 p53 유전자의 돌연변이가 일어남에 따라 그 생성이 억제되므로 혈관형성이 증가된다고 보고되었다⁸.

본 연구에서는 저등급 성상세포종 20예중 15예(75%)에서 p53 염색에 양성을 보였고 다형성 교모세포종 51예중 36예(68%)에서 양성을 보였는데 이와 같이 양군에서 비슷한 정도로 양성이었으므로 p53 유전자의 돌연변이는 신경교종 형성에 있어서 초기 변화일 것으로 생각된다.

p53 유전자의 정상형 대립인자는 반감기가 짧고 정상세포에 미량이 존재하며 면역조직화학 염색에서 발현이 되지 않는 반면에 p53 종양억제유전자의 돌연변이가 일어나면 p53 단백질의 이상발현이 일어나 이것이 세포의 핵에 축적되어 면역조직화학 염색에서 나타나게 된다. 현재까지 p53 염색에 종양세포가 양성인 경우 p53 유전자의 돌연변이가 있는 것으로 생각되어 왔지만 최근에 면역조직화학 염색과 분자생물학적 연구를 같이 시행하여 비교한 결과 차이가 있는 것으로 나타났다²¹⁻²². 즉, 19예의 성상세포종을 대상으로 p53 염색과 PCR-SSCP(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)를 시행하였더니 14예(73.7%)에서는 결과가 일치하였으나 5예(26.3%)에서는 상이하였다²². 돌연변이가 있음에도 불구하고 면역조직화학 염색에서 음성을 보이는 경우는 난센스돌연변이(nonsense mutation), 틀변이돌연변이(frameshift mutation), 두 대립인자가 동시에 삭제된 경우와 변형된 p53 단백질의 안정성(stability)이 적은 경우 등의 원인을 생각할 수 있고, 반대로 돌연변이가 없으나 면역조직화학 염색에서 양성을 보이는 경우는 관찰한 범위 바깥에서 돌연변이가 일어났거나 정상형 p53 단백질이 염색된 것을 생각할 수 있다. 따라서 p53 염색에서 양성을 보였다고 해서 p53 유전자의 돌연변이가 반드시 있다고 할 수는 없을 것이다.

신경교종에서 p53 유전자의 돌연변이가 일어나는 시기에 대해서는 논란이 많다. 많은 연구에서 저등

급 성상세포종, 역형성 성상세포종 그리고 다형성 교모세포종을 p53 염색과 분자생물학적 연구를 시행한 결과 저등급 성상세포종보다는 다형성 교모세포종에서 p53 단백질 과표현이 많이 나타나므로 신경교종에 있어서 p53 유전자의 돌연변이는 비교적 후기변화인 것으로 알려져 있다^{9,19,23,24}. 또한 저등급 성상세포종에서도 일부에서 p53 유전자의 돌연변이를 보이는 경우가 존재하는데 이들이 선택적으로 증식이 유리해져서 clonal expansion이 일어나 다형성 교모세포종으로의 진행이 일어난다고 하였다¹¹. 그러나 최근에는 다형성 교모세포종 못지 않게 저등급 성상세포종에서도 p53 유전자의 돌연변이가 발견되어 신경교종 형성에 있어서 후기보다는 오히려 초기에 중요한 역할을 한다고 보고되었다²⁵. 또한 저등급 성상세포종중 일부에서는 p53 유전자의 돌연변이가 있음에도 불구하고 재발이나 악성변화를 보이지 않는 점으로 보아 신경교종의 악성변화에 있어서 p53 유전자의 돌연변이만으로는 불충분하다는 주장도 있다²².

다형성 교모세포종에서 p53 단백질 과표현율은 보고에 따라 24~75%로 알려져 있고^{9,19} 저등급 성상세포종의 경우 0~71%로 알려져 있다^{10,25}.

뇌종양에 있어서 p53 유전자의 돌연변이가 종양의 진행과 연관이 있는것으로 가장 많이 알려져 있으나 이외에 다른 유전변화도 작용한다고 생각된다. 즉, sis와 erbB 종양형성유전자의 증폭과 과발현 및 다른 종양억제유전자의 손실 또는 돌연변이가 연관이 있다고 보고된 바있다¹⁹⁻²⁰. 특히, erbB의 경우 성상세포종에서 EGF 수용체 단백질과 c-erbB-2 종양형성 유전자의 발현이 모두 증가되어 있다는 연구도 있어서 신생혈관 형성과의 관계가 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 분화형 성상세포종과 다형성 교모세포종 모두에서 p53 염색에 양성인 경우가 음성인 경우에 비하여 혈관수는 많았지만 통계처리를 하였을때 유의한 상관관계는 보이지 않았는데 이는 증례의 수가 부족한 결과로 생각하였다.

신경교종에서 신생혈관 형성에는 p53 유전자의 돌연변이에 의한 혈관형성 억제인자의 분비감소 뿐만 아니라 여러 혈관형성 자극인자의 분비증가도 작용하는 것으로 생각된다. 특히 다형성 교모세포종에서는 혈관형성 자극인자중 혈관 내피세포에 특이적으로 작용하는 유사분열 물질인 VEGF에 의한 촉진비 작용에 의해 신생혈관 형성이 조절되는 것으로 알려져 있다¹³. 즉, 저등급 성상세포종과 달리 다형성 교모세포종에서는 VEGF와 그 수용체인 flt-1과

flk-1이 in situ hybridization과 면역조직화학 염색 모두에서 증가되어 있다. 그러나 p53 염색을 같이 시행한 실험에서는 p53 단백질 과표현에 따른 VEGF의 발현여부는 유의한 차이가 없었으므로 VEGF는 p53 유전자의 조절을 받지않음을 알 수 있다. 최근에 면역학적 검정법으로 bFGF를 정량적으로 측정하고 factor VIII 염색을 시행하여 종양내 혈관수를 측정 한 결과 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타나서¹⁵ bFGF도 다형성 교모세포종에 있어서 신생혈관 형성 및 종양의 진행과정에 중요한 역할을 하는것으로 알려졌다¹⁴. 또한 cotransfection assay를 시행한 결과 bFGF는 복사단계(transcriptional level)에서 p53 유전자의 조절을 받는 것으로 밝혀졌다¹⁴. VEGF와 bFGF 외에도 aFGF, TGF- α , PDGF와 EGF도 다형성 교모세포종에 있어서 혈관형성을 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁵⁻¹⁷. 반면에 Northern blot analysis와 면역조직화학 염색을 이용하여 뇌종양에서의 신생혈관 형성과 여러 성장인자와의 관계를 알아본 한 연구에 의하면 VEGF만이 혈관형성과 유의한 상관관계가 있었으며 TGF- α , TGF- β 와 bFGF는 연관이 없다고 하였다¹⁸.

다형성 교모세포종에 있어서 예후에 영향을 미치는 인자로 알려진것은, 환자의 연령, multimodal treatment, 진단후 긴 disease-free survival 그리고 Karnofsky score이다. 즉, 환자의 연령이 40세 이하인 경우, multimodal treatment를 받은 경우, disease-free interval 이 긴 경우 그리고 Karnofsky score가 높은 경우가 예후가 좋은 것으로 알려져 있다²⁶⁻²⁸. 조직학적 인자로는 세포밀도, 역형성 정도, 유사분열, 괴사, 가성척상배열, 혈관 내피세포 증식과 염증세포 침윤 등은 예후와 연관이 없었으나 크기가 매우 크고 역형성이 심한 거대세포종의 경우 예후가 좋은 것으로 알려진 바 있다²⁹. 이 경우, 세포가 크기는 하지만 유사분열이 적고 indolent behavior를 보이기 때문이라고 한다.

본 연구에서는 다형성 교모세포종에서 univariate analysis결과 생존율은 p53 단백질 과표현 여부와 혈관형성 정도와는 연관이 없었고 종양제거술후 보조치료 여부(p=0.0027)만 상관관계가 있었다. Multivariate analysis에서는 p53 단백질 과표현 여부(p=0.0042), 환자의 연령(p=0.0065) 그리고 종양제거술후 보조치료 여부(p=0.0001)가 유의한 예후인자로 나타났다. 즉, p53 과표현이 있는 경우, 환자의 연령이 많은 경우 그리고 종양제거술후 보조치료를 받지 않은 경우 예후가 나빴다. 이에 반해 저등급 성상세포종은 충분한 추적조사가 이루어지지 않아서 예후인자를 추정할

수 없었다.

p53 유전자의 돌연변이가 예후에 미치는 영향에 대해서는 많은 논란이 있다고 본다. 면역조직화학 염색을 시행한 한 연구 결과 p53 염색이 양성인 경우 평균생존기간이 7.2개월인데 비해 음성인 경우 15.5개월로 p53 과발현이 있는 경우가 생존기간이 유의하게 짧았다³⁰. 반면에 univariate analysis에서는 p53 염색에 양성인 경우가 유의한 예후인자로 나타났으나 multivariate analysis 결과 의의가 없었다는 보고도 있다³¹. 분화형 성상세포종에서는 p53 염색 양성인 경우 생존기간이 짧았으나 다형성 교모세포종에서는 상관이 없게 나타난 경우도 있었는데 이는 다형성 교모세포종에서는 축적된 변화가 많아서 p53 염색 유무의 예후인자로서의 역할이 작아지기 때문이라고 설명하였다³².

본 연구에서는 univariate analysis에서는 p53 과표현 유무가 유의한 예후인자가 되지 못하였으나 multivariate analysis에서는 상관관계가 있는것으로 나온 이유는 환자의 연령이나 종양제거술후 보조치료 여부와 연관이 있기 때문인 것으로 생각하였다.

결 론

저자는 51예의 다형성 교모세포종과 20예의 분화형 성상세포종을 대상으로하여 p53 단백질과 factor VIII에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 p53 유전자와 종양내 신생혈관형성과의 관계를 알아보고 생존율과의 관계를 알아보고자 하였다.

p53 단백질 과표현을 보이는 경우 factor VIII 염색에 양성인 혈관수가 많은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 상관관계는 보이지 않았다. 다형성 교모세포종과 분화형 성상세포종 모두에서 p53 단백질 과표현이 나타났으며 유의한 차이는 없었다. Factor VIII 염색에 양성인 혈관형성은 다형성 교모세포종에서 유의하게 많이 나타났다(p=0.0001).

Univariate analysis에서는 환자의 연령과 종양제거술후 보조치료 유무만이 유의한 예후인자로 나타났다. Multivariate analysis에서는 p53 단백질 과표현 유무, 환자의 연령 그리고 종양제거술후 보조치료 유무가 유의한 예후인자로 나타났다.

이상의 결과로 다형성 교모세포종에서 종양내 혈관형성은 p53 유전자의 돌연변이가 일어남에 따라 혈관형성 억제인자의 분비가 감소하고 VEGF 등의 여러 혈관형성 자극인자에 의한 촉진작용에 의해 일어난다고 생각된다. 또한, 다형성 교모세포종과 분화형 성상세포종 모두에서 p53 단백질 과발현이 일

어나는것으로 보아 p53 유전자의 돌연변이는 종양의 형성과정에 있어서 비교적 초기변화로 생각된다. 다형성 교모세포종에서는 p53 단백 과표현이 있는 경우, 환자의 연령이 많은 경우 그리고 종양제거술 후 보조치료를 시행하지 않은 경우 예후가 나쁜 것으로 나타났다.

면역조직화학 염색과 더불어 분자생물학적 검사를 이용한 p53 유전자의 돌연변이 유무의 확인과 신경교종의 진행에 영향을 미치는 여러 성장인자와 p53 종양억제유전자 이외의 다른 종양발생유전자와 종양억제유전자에 대한 추후 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
2. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-4.
3. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1993; 53: 5822-27.
4. Hatva E, Kaipainen A, Mentula P, et al. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1995; 146: 368-78.
5. Zagzag D. Angiogenic growth factors in neural embryogenesis and neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 146: 293-309.
6. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-4.
7. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin-A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-28.
8. Van Meir EG, Polverini PJ, Chazin VR, Huang HJS, Tribolet N, Cavenee WK. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 1994; 8: 171-6.
9. Ellison DW, Gatter KC, Steart PV, Lane DP, Weller RO. Expression of the p53 protein in a spectrum of astrocytic tumors. *J Pathol* 1992; 168: 383-6.
10. Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res* 1992; 52: 674-9.
11. Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavenee W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
12. Anker L, Ohgaki H, Lideke BI, Herrmann HD, Kleihues P, Westphal M. p53 protein accumulation and gene mutations in human glioma cell lines. *Int J Cancer* 1993; 55: 982-7.
13. Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis. *Int J Cancer* 1994; 59: 520-9.
14. Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, et al. Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9009-13.
15. Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, et al. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet* 1994; 344: 82-6.
16. Agnosti RM, Leuthold M, Gullick WJ, Yasargil MG, Wiestler OD. Expression of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumors is specifically associated with glioblastoma multiforme. *Virchows Arch* 1992; 420: 321-5.
17. Nakayama Y, Sueishi K, Fukushima T, Oka K, Tomonaga M. Localization of platelet-derived endothelial cell growth factor in human glioblastoma and meningioma. *Noshuyo Byori* 1994; 11: 187-91.
18. Samoto K, Ikezaki K, Ono M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1189-93.
19. Wu JK, Ye Z, Darras BT. Frequency of p53 tumor suppressor gene mutations in human primary brain tumors. *Neurosurgery* 1993; 33: 824-30.
20. Dietzman K, von Bossanyi P. Coexpression of epidermal growth factor receptor protein and c-erbB-2 oncoprotein in human astrocytic tumors. An immunohistochemical study. *Zentralbl Pathol* 1994; 140: 335-41.
21. Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, Lang FF, Koslow M, Miller DC. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 1993; 3: 229-35.
22. Koga H, Zhang S, Kumanishi T, et al. Analysis of p53

- gene mutations in low- and high-grade astrocytomas by polymerase chain reaction-assisted single-strand conformation polymorphism and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 225-32.
23. Haapasalo H, Isola J, Sallinen P, Kalimo H, Helin H. Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain-association with proliferation. *Am J Pathol* 1993; 142: 1347-51.
 24. Ng HK, Lo SY, Huang DP, Poon WS. Paraffin section p53 protein immunohistochemistry in neuroectodermal tumors. *Pathology* 1994; 26: 1-5.
 25. Lang FF, Miller DC, Pisharody S, Koslow M, Newcomb EW. High frequency of p53 protein accumulation without p53 gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas. *Oncogene* 1994; 9: 949-54.
 26. Chandler KL, Prados MD, Malec M, Wilson CB. Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* 1993; 32: 716-20.
 27. Simpson JR, Horton J, Scott C, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme-Results of three consecutive radiation therapy oncology group (RTOG) clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 26: 239-44.
 28. Jeremic B, Grujcic D, Antunovic V, Djuric L, Stojanovic M, Shibamoto Y. Influence of extent of surgery and tumor location on treatment outcome of patients with glioblastoma multiforme treated with combined modality approach. *J Neurooncol* 1994; 21: 177-85.
 29. Burger PC, Vollmer RT. Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. *Cancer* 1980; 46: 1179-86.
 30. Soini Y, Niemela A, Kamel D, et al. p53 immunohistochemical positivity as a prognostic marker in intracranial tumors. *APMIS* 1994; 102: 786-92.
 31. Jaros E, Perry RH, Adam L, et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumors. *Br J Cancer* 1992; 66: 373-85.
 32. Chozick BS, Pezzullo JC, Epstein MH, Finch PW. Prognostic implications of p53 overexpression in supratentorial astrocytic tumors. *Neurosurgery* 1994; 35: 831-8.
-