

## 위암종에서 p53 단백 발현과 Ki-67 표지자 및 DNA Ploidy와의 관계에 대한 연구

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단병리과

오영륜 · 한정호 · 고영혜 · 박철근 · 이회정

### Correlation between p53 Immunohistochemical Expression, DNA Ploidy and Ki-67 Expression in Gastric Carcinoma

Young Lyun Oh, M.D., Joung-ho Han, M.D., Young Hye Ko, M.D.  
Cheol Keun Park, M.D. and Hwoe J. Ree, M.D.

Department of Diagnostic Pathology, Samsung Medical Center  
Sung Kyun Kwan University, Seoul, Korea

We examined the p53 protein overexpression and evaluated its correlation with pathobiological variables, including: (1) patient age, sex, tumor size, histological type and grade, invasion depth, vascular invasion, perineural invasion and lymph node status; (2) the Ki-67 labeling index in 100 gastric carcinomas; and (3) the DNA ploidy pattern, S phase fraction (SPF), and the proliferation index (PI) in 84 cases using flow cytometry. The positive rate of p53 staining was 48% and the p53 immunoreactivity was independent of variable clinicopathologic factors. No correlation was made between the Ki-67 labeling index with p53 immunostaining and DNA ploidy parameters. Aneuploidy rate was slightly higher in the p53 positive group (55.6%) than the p53 negative group (44.4%)( $p=0.097$ ). The mean values of SPF and PI were significantly higher in the p53 protein positive group. Aneuploidy was more often observed in the intestinal type ( $p=0.038$ ), advanced gastric carcinoma ( $p=0.015$ ) and lymph node positive group( $p=0.039$ ). The above results suggest that although the p53 protein overexpression has no significant correlation with pathological factors and the Ki-67 labeling index, it may play an important role in tumor cell proliferation. Since p53 protein overexpression was slightly higher in the aneuploidy group showing significant correlation with poor prognostic parameters, it is thought that re-evaluation of the p53 mutation by molecular biological study is needed. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 1264~1271)

**Key Words:** Gastric carcinoma, p53, DNA ploidy, Ki-67

접 수: 1997년 6월 17일, 게재승인: 1997년 9월 6일  
주 소: 서울시 강남구 일원동 50, 우편번호 130-710  
삼성서울병원 진단병리과, 오영륜

ISSN : 0379-1149

이 논문은 1997년도 삼성서울병원 임상연구비 지원으로 이루어졌음.

### 서 론

위암의 발생과정 중에는 다양한 암유전자와 암억제 유전자가 관여하며 그 중 p53 유전자의 이상은 특히 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다.<sup>1</sup> p53 유전자는 사람의 17번째 염색체의 단완에 위치

해 있으며,<sup>2</sup> 이것이 coding하는 p53 단백질은 세포주기의 G1-S주기에 대한 조절을 함으로써 세포의 과도한 성장을 막을 뿐 아니라<sup>3</sup> 손상된 DNA를 수복하거나 apoptosis를 유발하는 핵내 인단백으로 알려져 있으며,<sup>4,5</sup> 또한 돌연변이형 p53 단백질은 내제복제 단계를 촉진시킴으로써 유전자적 불안정을 초래하는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> p53 유전자의 돌연변이는 인체 악성종양에서 발견되는 가장 흔한 유전적 이상이며, 주로 exon 5부터 exon 8 사이에서 잘 일어나는데<sup>7</sup> 위암종에 있어서는 조기위암의 경우는 20~30%,<sup>8</sup> 진행성위암의 경우는 40~60%에서 돌연변이가 일어나는 것으로 보고되어 있다.<sup>9,10</sup> p53 단백질은 그 반감기가 약 20분 정도로 짧아 정상 세포에는 거의 축적되지 않기 때문에 면역조직화학적 방법으로 검출되지 않으나, 돌연변이형 p53 단백질은 형태학적 변화로 인해 안정화되어 그 반감기가 수시간까지 증가하기 때문에 면역조직화학적 방법으로 검출이 가능하다.<sup>11</sup>

최근 p53 유전자가 세포증식 및 종양의 진행을 조절할거라는 전제하에 종양세포 증식능을 대변하는 DNA 배수성과 Ki-67 및 PCNA 등과 같은 세포증식 표지지수와와의 연관성이 유방암,<sup>12</sup> 췌장암<sup>13</sup> 및 신장암<sup>14</sup> 등 일부 암종에서 연구된 바 있다. DNA 배수성과 세포증식 표지지수는 종양의 악성도 및 예후인자로 많은 종양에서 인정 받고 있으며 위암에서도 그 유용성이 잘 밝혀져 있다.<sup>15-18</sup> 그러나 위암에서 이들 인자와 p53 유전자의 돌연변이나 p53 단백질의 과발현과의 연관성에 대한 연구는 극히 소수이고 그 결과도 상반되어 있어 해석에 어려움이 따른다.<sup>19-21</sup>

본 연구에서는 위암에서 p53 단백질의 발현과 DNA 배수성 및 Ki-67 표지지수와와의 상호관계를 알아보고 아울러 이들과 여러 임상-병리학적 인자들간의 관련성을 살펴보고자 하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 연구 대상

1995년 7월부터 1996년 2월까지 삼성서울병원에서 위절제술을 시행받고 위선암종으로 진단 받은 100예를 대상으로 p53 단백질의 발현과 Ki-67 표지지수를 검색하였고 이 중 종양의 크기가 작거나 괴사나 출혈이 심해 유세포 분석에 적합하지 않은 예를 제외한 총 84예에서 유세포분석을 시행하였다.

### 2. 연구 방법

1) 병리 조직학적 검색: 환자의 병리 기록지를 토대로 환자의 연령, 성별, 종양의 크기를 조사하였고 종양의 분화도는 일본위암연구회의 분류<sup>22</sup>와 Lauren의 분류<sup>23</sup>로 각각 나누어 보았으며, 종양의 침습 깊이, 혈관 및 림프관 침범, 신경 침습 및 림프절 전이 유무를 조사하였다.

2) p53 및 Ki-67 단백질에 대한 면역조직화학적 염색: 10% 중성 완충 포르말린에 고정시킨 조직의 파라핀 블록을 4  $\mu$ m 두께로 박절한 후 탈파라핀과 합수과정을 거쳤다. 구연산 완충액(citrate buffer)을 약 5분 정도 전자오븐에서 끓인 후 조직을 넣고 다시 전자오븐에서 5분씩 반복해서 끓인 다음 구연산 완충액에서 약 20분 정도 식혔다. 이들을 증류수로 세척한 후 3% 과산화수소로 20분간 처리한 후 Tris 완충액으로 10분간 세척한 다음 단백질차단혈청 (DAKO-LSAB Kit)을 10분간 도포하였다. 단클론성 p53 일차항체 (Zymed, 1 : 80)와 Ki-67 (DAKO, 1 : 100)을 1% 소혈청알부민이 들어있는 pH 7.4의 일차항체희석액 (DAKO-LSAB Kit)에 적절히 희석하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 20분간 세척하였다. 그 후 biotin이 부착된 이차항체 (DAKO-LSAB Kit)에 10분 동안 반응시키고 수세한 후 streptavidin에 10분 동안 부치시킨 후 Tris 완충액으로 10분간 수세하였다. Diaminobenzidine tetrachloride를 5-10분간 도포하여 발색하고 10% Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다. 음성대조군으로 일차항체 대신 식염수를 이용하여 관찰하였다. p53 단백질에 대한 염색의 판정은 핵에 염색된 경우만 양성으로 판독하였으며, 염색의 강도에 따른 구분은 하지 않았고, 세포증식능은 Ki-67로 염색된 슬라이드에서 가장 염색이 잘된 곳에서 종양세포 1,000개를 세어 그 중 양성세포의 백분율을 구하였다.

3) 유세포분석: p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 동일 파라핀 조직을 50  $\mu$ m의 두께로 박절하고 이를 xylene에서 탈파라핀 과정을 거친 다음, 100%, 95%, 80%, 70%, 50%, 에탄올의 순서대로 30분씩 방치하여 합수시키고 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)에 10~15분간 2회 담가 두었다. 합수후 조직을 면도날로 작게 자른 후 15 ml 시험관에 옮기고 pH 1.5의 0.5% pepsin (Sigma)을 1~2 ml 넣어 37°C 항온조에서 10분 간격으로 흔들며 30분간 처리한 다음 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 DPBS를 5~10 ml 첨가한

후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켰다. 다시 상층액을 버리고 53  $\mu\text{m}$  구멍크기를 갖는 나일론 망을 사용하여 거른 후 여과한 세포 부유액에서 세포수를  $5 \times 10^5/\text{ml}$ 으로 맞춘 다음 부유액 500  $\mu\text{l}$ 를 Falcon 튜브에 옮기고 여기에 트립신 용액을 250  $\mu\text{l}$  가하여 10분간 실온의 암실에서 작용시켰다. 다시 RNAase용액 200  $\mu\text{l}$ 를 가하여 15분간 실온의 암실에서 반응시킨 다음 propidium iodide 200  $\mu\text{l}$ 를 가하고 10분간 암소에서 반응시켜 DNA를 염색하였다. 염색된 단일 세포 부유액을 15 mW Argon-ion laser가 부착된 FACScan (Becton Dickinson)으로 excitation wave length 488 nm에서 DNA양을 측정하였다. 조직내 림프구나 정상세포를 내부표준으로 정하고 각 검체마다 20,000개 이상의 세포의 DNA함량을 측정하여 CellFIT 프로그램으로 분석하였다. DNA histogram의 판독은 대다수 세포가 내부 기준의  $G_0/G_1$  peak에 있고 하나의 뚜렷한  $G_0/G_1$  peak를 가진 경우를 이배수성 (diploidy)이라고 하였고, 10% 이상의 세포가 정배수체의 G2M 이외의 위치에 있어 2개 이상의 뚜렷한  $G_0/G_1$  peak를 보이며 각각 peak에 대응하는  $G_2/M$  peak가 있을때를 비배수성 (aneuploidy)으로 정의하였다. DNA지수는 이배수성과 비배수성의  $G_0/G_1$  peak의 channel비로 계산하였으며 S phase fraction (SPF)과 proliferation index (PI)를 산출하였다. 모든  $G_0/G_1$  peak의 변이 계수 (half peak coefficient of variation, CV)는 10이하가 되는 경우만 연구 대상에 포함시켰다.

4) 통계학적 분석: 통계학적 처리는 SAS program을 사용하여 각 지표에 따라 chi-square test, t-test를 이용하였고 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 경우로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 임상 및 병리학적 소견

환자의 나이는 32세부터 86세까지로 평균연령은 59세였고 여자가 42예, 남자가 58예였다. 조기위암이 21예이고 진행성 위암이 79예였으며 종양의 크기는 1.5 cm에서 15 cm 사이였다.

### 2. p53 단백질의 발현

p53 단백질의 발현은 총 100예의 위암종중 48예에서 양성이었으며 정상 위점막이나 장형화생을 보이는 곳에서는 염색되지 않았다. p53 단백질의 양성율에서 성별의 차이는 없었으나 p53 단백질이 양성인 군

의 평균연령은 61.8세로 음성인 군의 56.9세보다 높았다 ( $p < 0.05$ ). p53 단백질의 발현여부를 종양의 크기, 조직학적 유형과 분화도, 침습정도, 혈관 및 신경 침습의 유무 및 림프절 전이와 비교하였으나 통계학적으로 의미있는 연관성은 없었고, 단지 장형에서 p53 단백질의 양성 발현율이 58.3%로 미만형의 41.7%보다 약간 높게 나타났다 ( $p = 0.072$ )(Table 1).

### 3. Ki-67 표지지수

Ki-67 표지지수는 23.6%에서 94.3%까지의 분포를 보였으며 평균치는 51.1%이었으며 환자의 나이를 50세 전후로 나누어 보았을 때 50세 이상 환자의 위선암종에서 Ki-67 표지지수가 의미있게 높았다 ( $p < 0.05$ ). 또한 종양의 크기를 7 cm를 기준으로 나누었을 때 7 cm 이상의 군에서 그 이하의 군보다 Ki-67 표지지수가 의미있게 높았다 ( $p < 0.05$ ). 그러나

Table 1. Correlation between p53 staining and pathologic findings

	Number of cases	Nuclear p53 staining	
		Positive(%)	Negative(%)
Histologic type(JRSGC)			
Well	5	2(40)	3(60)
Moderately	44	26(59.1)	18(40.9)
Poor	23	10(43.5)	13(56.5)
Signet ring cell	28	10(35.7)	18(64.3)
Histologic type(Lauren)*			
Intestinal	49	28(57.1)	21(42.9)
Diffuse	51	20(39.2)	31(60.8)
Depth of invasion			
Early(m, sm)	21	8(38.1)	13(61.9)
Advanced(pm, ss, s)	79	40(50.6)	39(49.4)
Endolymphatic emboli			
Negative	46	20(43.5)	26(56.5)
Positive	54	28(51.9)	26(48.1)
Perineural invasion			
Negative	60	27(45.0)	33(55.0)
Positive	40	21(52.5)	19(47.5)
Lymph node metastasis			
Negative	31	14(45.2)	17(54.8)
Positive	69	34(49.3)	35(50.7)

JRSGC: Japanese Research Society for Gastric Cancer; \*:  $p < 0.1$ ; m: mucosa; sm: submucosa; pm: muscularis propria; ss: subserosa; s: serosa

종양의 조직학적 유형과 분화도, 침습정도, 혈관 및 신경 침습의 유무 및 림프절 전이와는 아무런 관련성이 없었다 (Table 2).

**4. DNA 배수성 검사**

유세포 분석기를 이용한 DNA 배수성의 분석 결과는 비배수성이 54예 (64.3%), 이배수성이 30예 (35.7%)로 비배수성이 더 많았다. 특히 장형에서 미만형보다 비배수성이 빈번히 나타났고, 진행성 위암의 경우 조기위암보다 비배수성이 의미있게 높았으며 종양의 침습깊이가 깊을수록 비배수성인 경향을 보였다 (p<0.05). DNA 비배수성은 혈관이나 신경내 종양 침범 유무와는 관련성이 없었으나 림프절 전이가 있는 위암종에서는 의미있게 높게 나타났다 (p<0.05)(Table 3).

**Table 2.** Correlation between Ki-67 labeling index and pathologic findings

	Number of cases	Ki-67 labeling index
<b>Age*</b>		
< 50	23	46.0 ± 11.16
≥ 50	77	52.6 ± 15.66
<b>Size*</b>		
< 7	63	48.8 ± 15.00
≥ 7	37	54.7 ± 14.46
<b>Histologic type (Lauren)</b>		
Intestinal	49	50.2 ± 14.11
Diffuse	51	51.8 ± 15.80
<b>Depth of invasion</b>		
Early(m, sm)	21	54.5 ± 16.80
Advanced(pm, ss, s)	79	50.1 ± 14.39
<b>Endolymphatic emboli</b>		
Negative	46	51.5 ± 16.28
Positive	54	50.7 ± 13.85
<b>Perineural invasion</b>		
Negative	60	52.0 ± 15.52
Positive	40	49.5 ± 14.09
<b>Lymph node metastasis</b>		
Negative	31	51.5 ± 15.60
Positive	69	50.8 ± 14.71

\*: p<0.05; m: mucosa; sm: submucosa; pm: muscularis propria; ss: subserosa; s:serosa

**5. p53 단백질의 발현과 DNA 배수성, SPF, PI 및 Ki-67 표지 지수와의 관계**

비배수성을 보인 종양에서 p53 단백질의 양성율은

**Table 3.** Correlation between DNA ploidy and pathologic findings

	Number of cases	Aneuploidy (%)	Diploidy (%)
<b>Histologic type (JRSGC)*</b>			
Well	4	1(25.0)	3(75.0)
Moderately	39	33(84.6)	6(15.4)
Poor	20	9(45.0)	11(55.0)
Signet ring cell	21	11(52.4)	10(47.6)
<b>Histologic type (Lauren)*</b>			
Intestinal	43	34(79.1)	9(20.9)
Diffuse	41	20(48.8)	21(51.2)
<b>Depth of invasion*</b>			
Early (m, sm)	10	3(30.0)	7(70.0)
Advanced (pm, ss, s)	74	51(68.9)	23(31.1)
<b>Endolymphatic emboli</b>			
Negative	37	24(64.9)	13(35.1)
Positive	47	30(63.8)	17(36.2)
<b>Perineural invasion</b>			
Negative	51	31(60.8)	20(39.2)
Positive	33	23(69.7)	10(30.3)
<b>Lymph node metastasis*</b>			
Negative	20	9(45.0)	11(55.0)
Positive	64	45(70.3)	19(29.7)

JRSGC: Japanese Research Society for Gastric Cancer; \*: p<0.05; m: mucosa; sm: submucosa; pm: muscularis propria; ss: subserosa; s:serosa

**Table 4.** p53 overexpression, DNA analysis, and proliferative activity

	Nuclear p53 staining	
	Positive(%)	Negative(%)
<b>DNA ploidy*</b>		
Diploidy	11(36.7)	19(63.3)
Aneuploidy	30(55.6)	24(44.4)
<b>S phase fraction**</b>	29.6 ± 24.40	19.1 ± 13.01
<b>Proliferative index**</b>	36.8 ± 22.92	26.3 ± 16.59
<b>Ki-67 labelling percentage</b>	52.0 ± 13.15	50.2 ± 16.50

\*: p<0.1; \*\*: p<0.05

55.6%로서 이배수성에서의 36.7%보다 약간 높았다 ( $p=0.097$ ). 또한 SPF의 평균치와 PI의 평균치를 p53 단백질 양성인 군과 음성인 군에서 각각 비교하였을 때 모두가 p53 단백질 양성인 군에서 높게 나타났다 ( $p<0.05$ ). 그러나 p53단백의 발현과 Ki-67 표지자수와는 관련성이 없었다 (Table 4).

## 고 찰

p53 유전자는 점돌연변이, 대립유전자 소실 등의 기전을 통해 여러 종류의 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며,<sup>24</sup> p53 단백질의 과발현은 면역조직화학염색 방법에 의해 폐, 대장, 유방 및 위암 등 많은 인체암에서 보고되고 있다.<sup>25</sup> p53 단백질의 염색상은 고정 방법이나 열처리 과정에 따라 달라질 수 있는데 본 실험에서 위암종에서의 p53 단백질의 염색율은 48%로 Starzynska등<sup>26</sup>이 포르말린 고정된 위암 조직에서 보고한 47.3% 및 Fukunaga등<sup>27</sup>이 전자오븐에 고정한 위암조직에서 얻은 48.9%와 비슷한 결과이나 Kitayama등<sup>20</sup>이 에탄올로 고정한 위암조직에서 얻은 65.6%의 양성 발현율에 비해서는 약간 낮았다.

p53 단백질의 과발현과 위암종의 병리조직학적 소견 및 병기와의 연관성에 대한 결과는 다양하다. p53 단백질의 과발현과 종양의 분화도를 비교했을 때 Martin등<sup>10</sup>의 결과에서는 관련성이 없었으나 Kitayama등<sup>20</sup>의 결과에서는 p53 단백질이 고분화도 및 중분화도의 위선암종에서는 73.2%의 양성 염색율을 보인 반면 저분화도의 위선암종에서는 52.2%의 양성 발현율을 보여 차이가 있었다. 그러나 위선암종을 Lauren의 분류에 의해 장형과 미만성으로 나누어 p53 단백질의 발현을 보았을 때 Martin등<sup>10</sup>도 p53 단백질이 장형에서 미만형보다 자주 발현됨을 보고하였다. 본 실험에서는 p53 단백질과 각각의 조직학적 유형간의 의미있는 연관성은 없었고 다만 p53 단백질의 발현이 통계학적으로 의미있지는 않았지만 장형에서 미만형보다 좀 더 많이 나타났다. p53 단백질의 양성율이 장형에서 미만형보다 높게 나타남은 여러 보고에서 기술된바 있으며 이는 두가지 조직학적 유형에서 암의 발생기전이 다소 다름을 시사하는 결과이다. p53 단백질의 발현과 종양 침습 및 병기와 관련성은 Fukunaga등<sup>27</sup>과 Kitayama등<sup>20</sup>은 없다고 보고하였으나 Martin등<sup>10</sup>은 관련이 있으며 그 뿐 아니라 림프절 전이가 있는 군에서도 p53 단백질의 과발현율이 높기 때문에 p53 단백질의 과발현이 종양의 성질에 영향을 주는 것으로 가정하였다. 또한

Martin등<sup>10</sup>은 p53 단백질의 발현이 있는 군이 없는 군보다 예후가 나쁘고, p53 단백질의 과발현이 환자의 병기나 림프절 전이 유무와 관계없이 하나의 독립적인 예후 인자임을 주장하였다. 그러나 본 연구 결과에서는 p53 단백질의 발현과 종양의 침습정도 및 림프절 전이 유무와는 관련성이 없었다.

Ki-67 항체는 휴지기 세포를 제외한 증식하는 세포들에서만 발현되는 핵항원을 인식하는 것으로 대장암<sup>28</sup> 등에서 세포증식능을 측정하는데 널리 이용되고 있다. Yonemura등<sup>18</sup>은 내시경적 생검으로 얻어진 위암조직에서 Ki-67 표지자수를 측정하고 이를 수술로 절제된 위암의 여러 가지 병리학적 소견과 비교하여 Ki-67 표지자수가 혈관 침범 및 림프관 침윤이 있는 군과 림프절 전이가 있는 군에서 상대적으로 높음을 보았고 Ki-67 표지자수가 높은 군이 예후가 좋지 않음을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 Ki-67 표지자수와 연관성을 보인 병리학적 인자가 없는 상반된 결과를 보였다. 이는 Ki-67 표지자수가 같은 종양내에서도 측정 장소에 따라 최소 1.4배에서 최대 3.4배까지 차이가 있기 때문에 그 결과가 달라질 수 있으리라 생각된다.<sup>29</sup> 또한 위암종과 같이 염색과 계양이 자주 동반되는 경우에는 이에 따른 수복성 반응이 뒤따르고 따라서 세포증식이 활발할 것으로 사료되며 특히 본 연구에서는 Ki-67 항체 염색이 가장 잘 된 곳에서 세포증식능을 측정하였기에 종양간의 의미있는 차이가 없지 않았나 생각된다. 이는 세포증식 표지로 Ki-67 항원과 함께 널리 사용되고 있는 PCNA 지수 역시 조직의 고정 방법이나 시간 및 면역조직화학적 방법에 따라 그 결과가 다르며 따라서 위선암종의 예후인자로 상반된 해석이 되고 있는 점으로 미루어 보아 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 좀 더 표준화된 염색법 및 해독이 필요하리라 생각된다.

종양에서의 DNA ploidy는 많은 악성 종양의 예후 인자로서 인정되고 있으며 특히 위암에서는 비배수성을 보이는 종양이 혈관 침범 및 림프관 침윤을 잘하고 재발이 많은 등 예후가 안 좋은 것으로 알려져 있다.<sup>15-17</sup> 위암의 나쁜 예후 인자로 알려진 림프절 전이와 비배수성과의 관련성도 역시 잘 알려져 있으며,<sup>30</sup> Yonemura등<sup>17</sup>은 비배수성 종양이 장막 침윤, 림프절, 복강 및 간전이를 잘 하는 것으로 보고한 바 있는데 본 연구에서도 림프절 전이가 있는 예에서 비배수성이 높게 나타났다. 또한 본 연구에서는 비배수성이 진행성위암에서 조기위암에서 보다 더 높게 나타났는데 이는 Korenaga등<sup>31</sup>의 결과와

일치한다. 아울러 비배수성이 장형에서 미만형에서 보다 더 빈번하였는데 이는 Flyger등<sup>15</sup>의 결과와 일치하며 미만형에서 비배수성이 적은 이유는 종양이 분화가 나쁜 비교적 균질한 작은 세포들로 이루어졌기 때문으로 생각된다.

위암에서 종양세포의 p53 단백질의 발현과 DNA 배수성 또는 세포증식능과의 연관성을 알아본 연구는 극히 소수이며 특히 이들 모두의 상호관계를 연구한 것은 Kakeji등<sup>19</sup>의 보고외는 없다. Tamura등<sup>21</sup>은 cell sorting 방법으로 얻어진 위암세포들에서 DNA 배수성을 검색하고 PCR-SSCP 방법으로 p53 유전자의 돌연변이를 조사하였는데 비배수성 종양의 64%에서 돌연변이가 있었던 반면 10예의 이배수성 종양에서는 돌연변이가 관찰되지 않아 p53 유전자의 돌연변이가 DNA 배수성의 변화와 관계가 있으며 아마도 위암 발생과정중 비교적 늦은 시기에 일어나는 것으로 추정하였다. 그 후 Kakeji등<sup>19</sup>과 Kitayama등<sup>20</sup>은 면역조직화학적 염색에 의한 p53 단백질의 과발현 여부와 DNA 배수성간의 관계를 조사하였는데 모두에서 p53 단백질의 과발현이 비배수성 종양에서 의미있게 높이 일어났을 뿐만 아니라 Tamura등<sup>21</sup>과는 달리 이배수성 종양에서도 p53 단백질의 발현이 있었다. 본 연구에서도 Kakeji등<sup>19</sup>과 Kitayama등<sup>20</sup>의 결과와 같이 이배수성 종양에서 p53 단백질의 발현이 있었을뿐 아니라 조기위암의 30%가 비배수성을 보였는데 이는 p53 유전자의 돌연변이가 종양 발생의 초기에 일어남을 시사하는 소견이다. Tohdo등<sup>32</sup>은 p53 유전자의 이상이 위선종의 30%에서 일어남을 보였고 Ochiai등<sup>33</sup>은 위의 불완전 장형화생 10예 중 4예에서 p53 유전자의 돌연변이와 함께 p53 단백질의 축적을 관찰한바 있으며, Shiao등<sup>34</sup>은 PCR-SSCP와 direct sequencing 방법으로 p53 유전자의 이상을 검사하였는데 장형화생의 37.5%, 위이형성증 58.3% 및 위암종의 66.7%에서 이상이 있음을 밝혔다. 이러한 결과는 p53 유전자의 이상이 위암 발생과정 중 초기에 일어남을 강력히 시사하며 특히 이배수성에서의 p53 단백질의 과발현은 면역조직화학적 염색이 유세포분석기로 찾을 수 없는 소수의 돌연변이형 p53 단백을 검출한 것으로 생각되며, 이는 p53 돌연변이와 같은 유전자적 변화가 위암 진행과정 중 비교적 후기에 일어나는 염색체의 큰 변화가 있기전에 먼저 발생하는 것을 암시하는 바이다. 그러나 Fisher등<sup>35</sup>이 밝혔듯이 면역조직화학적 방법에 의해 검출되는 p53 단백질의 발현이 반드시 p53 유전자의 이상을 의미하는 것은 아니며, 또한 반대로 p53 단백질이

발현되지 않았다고 해서 p53 유전자의 이상이 없다고 단정할수는 없다. 손상된 DNA나 바이러스 단백질에 의해서 야생형 p53 단백질의 축적이 일어날 수도 있으며,<sup>36,37</sup> 조직의 고정과 슬라이드 제작과정 중에 p53 유전자의 이상에 의해 만들어진 비정형 단백질의 항원성이 떨어져 면역조직화학적 방법으로 검색이 안되는 경우도 있을 수 있으므로 PCR-SSCP 및 DNA sequencing에 의한 정확한 검색이 같이 동반되어야 하리라 생각된다. 또한 본 예에서는 Kakeji등<sup>19</sup>과는 달리 p53 단백질의 과발현과 Ki-67 표지지수간의 연관성이 없었는데 이는 앞서도 기술하였듯이 Ki-67 항원의 염색과 계측시에 생길수 있는 오차때문이나 아닐까 생각되며, p53 단백질의 과발현이 있는 군에서 유세포분석에 의해 얻어진 SPF와 PI의 평균치가 유의하게 높았던 점으로 미루어 보아 돌연변이형 p53 단백질의 축적이 종양의 성장을 촉진시키는데 중요한 역할을 한다는 설을 뒷받침하는 결과로 생각된다.

## 결 론

전체된 100예의 위암종을 대상으로 p53 단백질의 발현과 DNA 배수성 및 Ki-67 표지지수를 조사하고 이들간의 상호 연관성을 보았으며 아울러 임상-병리학적 인자들과의 관계를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) p53 단백질의 과발현은 장형 선암종에서 미만형보다 약간 높게 나타났으며 위암종의 분화도나 종양의 침윤도 및 림프절 전이에 따라서는 차이가 없었다.
- 2) Ki-67 표지지수는 50세 이상 환자의 위선암종에서 50세 이하보다 의미있게 높게 나타났으나, 그 외 병리학적 변수와의 유의한 상관성이 없었다.
- 3) DNA 비배수성은 장형 선암종에서 유의하게 높았고, 종양의 침습도가 깊을수록, 림프절의 전이가 있는 경우 의미있게 높이 나타났다.
- 4) p53 단백질의 과발현이 있는 군에서 DNA 비배수성이 약간 높았고, SPF와 PI의 평균치 역시 p53 단백질의 과발현이 있는 군에서 유의하게 높이 나타났다. 그러나 p53 단백질의 과발현과 Ki-67 표지지수 및 DNA 배수성과 Ki-67 표지지수간에는 연관성이 없었다.

이상의 결과로 p53 단백질의 과발현은 여러 가지 위암의 병리학적 인자 및 Ki-67 표지지수와는 관련성이 없었으나 p53 단백질 양성인 예들의 SPF 및 PI의 평균치가 의미있게 높았기에 종양세포 증식을

촉진시키는데 중요한 역할을 하리라 추정할수 있으며, DNA 배수성이 위선암종의 예후인자로 중요하며 따라서 통계학적인 유의성은 없었으나 비배수성인 위선암종에서 이배수성에서보다 p53 단백질의 발현이 약간 높았던 점을 기초로 하여 추후에 p53 돌연변이를 면역조직화학적 검사뿐 만 아니라 분자생물학적인 방법으로도 검색하여 이들의 관계를 재검토해야 할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 307-15.
2. Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, Koeffler HP. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319: 783-4.
3. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
4. Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 75: 241-51.
5. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-67.
6. Carder PJ, Wyllie AH, Purdie CA, et al. Stabilized p53 facilitates aneuploid clonal divergence in colorectal cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1397-401.
7. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
8. Uchino S, Noguchi M, Hirota T, et al. High incidence of nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1992; 22: 225-9.
9. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993; 54: 749-64.
10. Martin HM, Filipe MI, Moris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-62.
11. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect: a monoclonal antibody specific for a mutant form. *EMBO J* 1990; 9: 1595-602.
12. 조성진, 김애리, 원남희. 인체 전이성 유방암에서 p53 유전자 돌연변이와 DNA ploidy의 분석. *대한병리학회지* 1997; 31: 135-144.
13. Weyrer K, Feichtinger H, Haun M, et al. p53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest* 1996; 74: 279-89.
14. 정종재, 이지신, 최찬. 신세포암종에서 p53 암유전자 산물의 발현과 PCNA 지수 및 DNA 배수성에 관한 연구. *대한병리학회지* 1997; 31: 672-82.
15. Flyger HL, Christensen IJ, Thorup J, Hakansson TU, Norgaard T. DNA aneuploidy in gastric carcinoma: Flow cytometric data related to survival, location, and histopathologic findings. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 258-64.
16. Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. Proliferative activity and malignancy in human gastric cancers: Significance of the proliferation rate and its clinical application. *Cancer* 1992; 69: 314-21.
17. Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K, et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and s-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990; 50: 509-14.
18. Yonemura Y, Kimura H, Ooyama S, et al. Immunohistochemical staining of proliferating cells in endoscopically biopsied tissues of gastric carcinomas with monoclonal antibody Ki-67. *Oncology* 1991; 48: 162-5.
19. Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S, et al. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasis to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67: 589-93.
20. Kitayama Y, Sugimura H, Tanaka M, Nakamura S, Kino I. Expression of p53 and flow cytometric DNA analysis of isolated neoplastic glands of the stomach: an application of the gland isolation method. *Virchows Arch* 1995; 426: 557-62.
21. Tamura G, Kihara T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirokashi S. Detection of frequent p53 gene mutation in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3056-8.
22. Japanese Research Society for Gastric Cancer. The general rules for gastric cancer study in surgery and pathology. *Jpn J Surg* 1982; 11: 127-39.
23. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
24. Lane DP. Mutations of the p53 gene and accumulation of the p53 protein: common steps found in the majority of human cancers. In: Foriner JG, Rhoades JE, eds. *Accomplishments in cancer research*. Phil-

- adelphia; JB Lippincott, 1990: 252-66.
25. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699-703.
  26. Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, et al. The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 2005-12.
  27. Fukunaga M, Monden T, Nakanishi H, et al. Immunohistochemical study of p53 in gastric carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 177-80.
  28. Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 1988; 155: 213-9.
  29. Porschen R, Kriegel A, Langen C, et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47: 686-91.
  30. Umehara Y, Kimura T, Yoshida M, Oba N, Harada Y. Comparison of flow cytometric DNA content in primary gastric carcinoma and metastases. *J Surg Oncol* 1992; 50: 156-60.
  31. Korenaga D, Haraguchi M, Okamura T, Baba H, Saito A, Sugimachi K. DNA ploidy and tumor invasion in human gastric cancer. *Arch Surg* 1989; 124: 314-8.
  32. Tohdo H, Yokozaki H, Haruma K, Kajiyama G, Tahara E. p53 gene mutations in gastric adenomas. *Virchows Arch [B]* 1993; 63: 191-5.
  33. Ochiai A. Genetic changes in gastric cancer and gastric precancerous lesions (Japanese). *Pathol Clin Med* 1995; 13: 107-11.
  34. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann P, Scheer WD. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994; 144: 511-7.
  35. Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994; 69: 26-31.
  36. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-18.
  37. Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ. Adenovirus E1b-58Kd tumor antigen and SV 40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 Kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-94.
-