

인체 전이성 유방암에서 p53 유전자 돌연변이와 DNA Ploidy의 분석

고려대학교 의과대학 병리학교실

조 성 진 · 김 애 리 · 원 남 희

The p53 Mutation and DNA Ploidy in Human Metastatic Breast Cancer

Seong Jin Cho, M.D. Aeree Kim, M.D. and Nam Hee Won, M.D.

Department of Pathology, Guro Hospital, College of Medicine, Korea University

The p53 gene, one of the tumor suppressor genes, is believed to play an important role through mutation and overexpression in the progression of various human malignant tumors. To compare the p53 mutation status between the primary and metastatic lesions of breast cancers and to investigate the mutational pattern of p53, immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction and single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) were performed in 25 cases of breast cancers with paraffin embedded tissue. Mutant protein products or point mutation were detected through IHC or PCR-SSCP method. And flow cytometrical (FCM) analysis were performed in the same paraffin blocks to correlate the DNA ploidy and p53 mutation. The following results are summarized. 1. The detection of the p53 gene mutation and overexpression of the p53 protein were measured in 40% and 48%, respectively, in 25 primary tumors, either or both methods was detected in 64%. 2. A concordance rate of the p53 protein expression between the primary and metastatic lesions of 25 breast cancers was 100%, but the concordance rate of the p53 gene mutation was 72%. 3. The correlation between the p53 mutation and the DNA aneuploidy was not statistically significant ($p=0.38$) 4. A p53 mutation by IHC or PCR-SSCP was more frequently detected in grade III breast cancers than in grade I or II. 5. Among 5 to 9 exons of the p53 gene, exon 7 was the most frequent mutation spot in this study. 6. Additional mutation of the p53 gene was developed in the three metastatic lesions. With the above results it is suggested that the p53 protein overexpression by immunohistochemistry is not correlated with the p53 mutation by PCR-SSCP. The p53 mutation pattern between the primary and metastatic lesions are not identical and an additional point mutation can occur in the metastatic lesion. The DNA aneuploidy is more frequently detected in the cases with the p53 protein overexpression than in the p53 protein negative, but it is not statistically significant. (Korean J Pathol 1997; 31: 135~144)

Key Words: Breast carcinoma, Primary and metastatic, p53, Immunohistochemistry, PCR-SSCP, DNA ploidy

서 론

유방암은 서구인들에게서 가장 흔한 발생 빈도를 보이는 악성 종양의 하나로¹, 우리나라 여성에서도 최근 그 빈도가 증가하고 있다². 유방암에서 최근의 분자생물학의 발달로 암유전자 및 종양억제유전자의 발현 조절기전의 규명과 암유전자 단백질의 발현의 연구로 악성화가 되는 병인을 밝히려는 보고가 많이 있고³⁻⁵, 특히 종양 억제 유전자중 하나인 p53 유전자는 인체의 많은 종양에서 가장 흔히 돌연변이를 일으키는 유전자로⁶ 특히 대장암에서 그 소실 및 돌연변이가 가장 흔히 나타나는 것으로 밝혀졌다⁷. p53 유전자는 인체에서 17번 염색체 단완 13.1(17p13.1)에 위치하고, 약 20Kb의 11개 exon으로 구성되어 있으며⁸, 정상에서는 세포 주기의 조절인자인 p21, cdc 등과 작용하여 비정상세포의 G1/S 주기에서 세포성장을 억제시켜 손상된 DNA를 회복시키거나 programmed cell death(apoptosis: 세포사 또는 세포소멸)를 유발시키는데⁹⁻¹², 이 유전자에서 변이가 발생하면 정상 p53 유전자의 기능을 비활성화시킴으로써 종양 발생에 기여한다는 것이 밝혀져 있다¹³⁻¹⁵. p53 유전자의 11개의 exon중 돌연변이는 118 codon과 309 codon 사이, 즉 exon 5에서 exon 8 사이에서 주로 일어나는데^{16,17} 이렇게 크기가 작은 각 exon에서의 유전자 변이는 빠르고 간편한 분자생물학적 방법으로 중합 효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 single strand conformational polymorphism (SSCP) 법으로 비교적 쉽게 검출할 수 있게 되었다^{18,28,29}. Shibata 등¹⁹은 파라핀 포매 조직을 이용한 PCR을 가능케 하여 오래 지난 조직에서도 유전자를 검사할 수 있게 되었다. 한편 야생형의 p53단백은 반감기가 약 20분 정도로 정상 세포에는 아주 적은 양이 존재하므로 실제 조직에서 검출되지 않으나, 돌연변이형 p53단백은 수시간의 반감기를 가지므로 조직에서 면역조직화학적 방법으로 p53단백의 검출이 가능하게 되었다²⁰. 유방암에서 p53 유전자의 변이나 p53 단백질에 대한 연구는 외국에서는 다수 있으나 그 결과가 상이하며^{21,30}, 국내에서는 드물고, 방법도 면역조직화학적 방법으로 검출한 것이 대부분이다. 더욱이 그 방법 및 결과도 매우 다양하여 일치된 의견이 없는 실정이다. 본 연구에서는 p53단백에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP 분자 생물학적 방법을 이용한 p53유전자 변이검출을 원발병소와 액와 림프절 전이 병변에서 동시에 동일한 부위에서 시행하

여, 전이성 유방암에서의 p53 돌연변이가 두 병소에서 일치하는지 여부와 기존의 잘 알려진 예후 추정인자중 종양의 조직학적 분화도와 DNA 배수성과의 상관관계를 비교 검토하였으며, 아울러 한국 여성 유방암에서의 p53 유전자 변이 양상을 알고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구대상

1993년부터 1996년까지 고려대학교 의과대학 구로병원에서 전이성 침윤성 암종으로 진단받고 변형근치절제술과 액와 림프절 절제술로 절제된 유방암 중 조직 및 파라핀 블록 보관 상태가 양호한 25예를 대상으로 하였다. 환자의 나이 분포는 22세에서 56세 사이로 평균 연령은 44세였다.

2. 연구 방법

1) 임상 소견: 환자의 연령 및 기타 임상기록은 병리과 및 외과에 보관되어있는 임상기록을 이용하였다.

2) 병리 조직학적 검색: 외과적으로 절제된 유방 조직을 수술 즉시 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정하고, 대략 1 cm 간격의 연속 절편을 내어 종양 부위를 확인하여 통상적인 외과병리학적 검색 후 조직 표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4~5 μ m의 두께로 박절한 후 헤마톡실린-에오진염색을 시행하고 광학현미경으로 슬라이드를 병리의사 2명이 반복해서 검경후 Bloom과 Richardson이 제시한 조직학적 등급과 핵등급에 따라 종양의 등급³¹을 정하였다.

3) p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색반응 평가: 파라핀 포매조직을 5~6 μ m 두께로 절편을 만들어 한 절편을 헤마톡실린-에오진 염색을 하여 종양세포를 확인하고, 다른 한 절편은 59°C 보온기에 60분간 처리후 100% xylene으로 5분간 탈파라핀하고, 100%, 95%, 75% 에탄올으로 순차적으로 각각 3분간 처리 후 증류수로 함수시키고, 메탄올과 30%과산화수소수를 15분간 작용시킨 후 극초단파를 이용하여 끓는 phosphate buffered saline(PBS)에 5분간 처리후 4°C의 PBS에 다시 5분간 처리한다. 내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3%의 과산화수소를 투여 후, 다시 PBS에 10분간 수세후 희석된 정상 염소 혈청(Zymed, USA) 을 도포하여 비특이적 결합을 억제하고, 1:100으로 희석된 단클론성의 p53 1차항체(DO-7, Novocastra, England)로 상온에서 2시간

반응시킨 후 PBS액으로 세척한다. 2차항체인 biotinylated link antibody(LSAB kit, DAKO, USA)와 20분간 반응시킨 후 PBS와 세척한다. streptavidin(Zymed, USA)과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시킨다. 이후 발색반응은 AEC(3-amino-9ethylcarbazole)로 발색시킨 다음 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색 후 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입한다. 염색반응의 판정은 조직표본을 광학현미경으로 관찰하여 조직의 중심부에서 종양의 핵이 진한 적갈색으로 염색되는 것 중 전체 종양세포에 대해 0~4%인 경우를 음성(-), 5~24%를 1+, 25~50%를 2+, 50% 이상을 3+로 하였다. 그러나 실험성적의 통계처리시에는 양성, 음성으로만 구분하였고, 염색의 강도에 따른 구분은 하지 않았다.

4) 유세포분석: p53단백에 대한 면역조직염색을 시행한 동일 파라핀 조직을 50 μm 의 두께로 박절하고 이를 xylene에서 탈파라핀 과정을 거친 다음 citrate 완충용액이 담긴 페트리 접시에서 가위와 면도날을 이용하여 잘게 분쇄한 후, 100%, 95%, 80%, 70%, 50% 에탄올의 순서대로 10분씩 방치하여 합수시키고 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)에 10~15분간 2회 담가 두었다가 합수후 조직을 15 ml 시험관에 옮기고 pH 1.5의 0.5% pepsin(Sigma)을 1~2 ml 넣어 30분간 처리하였다. DPBS를 5~10ml 첨가한 후 1200 rpm에서 5분간 원심분리시킨후, 상층액을 버리고 53 μm 구멍크기를 갖는 나일론 망을 사용하여 세포 부유액을 여과하였다. 여과한 세포 부유액에서 세포수를 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 맞춘 다음 부유액 50 μl 를 Falcon 튜브에 옮기고 여기에 트립신 용액을 450 μl 가하여 10분간 실온에서 작용시킨다. 다시 RNAase용액 375 μl 를 가하여 10분간 실온에서 반응시킨 다음 propidium iodide 375 μl 를 가하고 10분간 암소에서 반응시켜 DNA를 염색하고, 이 염색된 단일 세포 부유액을 15 mW Argon-ion laser가 부착된 FAC scan(Becton Dickenson)으로 DNA양을 excitation wave length 488 nm에서 측정하였다. 기계의 작동을 위하여 chicken RBC를 propidium iodide로 염색하여 표준물질로 이용하였다. 조직내 림프구나 정상세포를 내부표준으로 정하고 각 검체마다 20,000개 이상의 세포의 DNA함량을 측정하여 Cellfit 프로그램으로 분석하였다. 아울러 의양성으로 나타날수 있는 비배수체의 경우를 배제하기 위하여, 사용한 조직은 상태가 매우 고정되어 있고, 괴사, 출혈, 염증등의 소견이 심한곳은 제외시켰다.

5) 히스토그램 분석: 유세포 측정법으로 얻어진 결과를 분석할 때, 대다수의 세포가 내부 기준의

G₀/G₁ peak에 있고 하나의 뚜렷한 G₀/G₁ peak를 가진 경우를 이배수성(diploidy) 이라고 하였고, 10% 이상의 세포가 정배수체의 G₂M 이외의 위치에 있어 2개 이상의 뚜렷한 G₀/G₁ peak를 보이며 각각 peak에 대응하는 G₂/M이 있을 때를 비배수성(aneuploidy)으로 정의하였다. 이 중 핵산지수가 0.95 이하일 때는 저이배수성(hypodiploidy), 1.05보다 크고 1.95보다 작을 때를 과이배수성(hyperdiploidy)이라고 하였으며, G₂/M peak가 전체 세포의 20% 이상이고 핵산지수가 1.95에서 2.05사이에 있으며 8N 부위에 G₂/M peak가 관찰될 때를 사배수성(tetraploidy)이라고 정의하였다. 핵산지수가 2.05이상일 때는 과사배수성(hypertetraploidy)이라고 하였다. 또한 두개 이상의 비배수성 peak가 있을때를 다배수성(multiploidy)으로 하였다. DNA지수는 이배수성 G₀/G₁ peak에 대한 비배수성 G₀/G₁ peak의 평균 channel의 비율로 계산되었다. 아울러 모든 G₀/G₁ peak의 변이 계수(half peak coefficient of variation, CV)는 10이하가 되는 경우만 연구 대상에 포함 시켰다.

6) DNA 추출 및 PCR-SSCP 법에 의한 exon 5, 6, 7, 8, 9 에 대한 p53 유전자 변이의 검출

(1) 암조직에서 DNA 추출: 생검조직 또는 파라핀 포매조직을 박편 절단기를 사용하여 10 μm 두께로 2개의 조직 절편을 분리하여 1.5 ml Eppendorf tube에 담았다. 이때 시료들간의 상호 오염을 방지하기 위해 조직 절단에 사용하는 칼은 한 시료를 자른후 xylene으로 깨끗이 닦았으며 기타 모든 시약 및 기구들은 1회용 또는 소독하여 사용하였다. 이들 파라핀 조직을 xylene으로 2회 탈파라핀하고 0.5 ml 무수 에탄올로 pellet을 2회 세척한 후 2~3방울의 아세톤을 가한 다음 58°C에서 15분간 방치 하였다. 건조된 시료를 1 ml의 digestion buffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH8.0, 0.5% SDS)에 넣고 proteinase K 용액(20 mg/ml)5 μl 를 넣어 처리 하였다. DNA 분리를 위한 proteinase K는 Boehringer Mannheim으로부터 구입하였으며, water saturated phenol은 Sigma에서 구입하였다. 파라핀 포매조직인 경우 54°C에서 하루밤 동안, 생검조직인 경우 54°C에서 6~7시간 놓아두어 세포를 용해시키고 단백질을 분해시켰다. 이 중 500 μl 를 새 튜브로 옮기고 여기에 동일 부피의 phenol/chloroform(1:1)를 넣고 추출했다. 깨끗한 DNA용액을 얻을 때까지 이 작업을 계속 반복했다. 50 μl 의 3.5M sodium acetate와 1ml의 100% ethanol을 넣고 -20°C에서 30분간 방치한후, 14,000 rpm 4°C로 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. DNA는 1 ml의 70% ethanol로 wash 한후

Table 1. p53 primer sequences

Exon	Primer	Sequence (5' TO 3')	Product size (BP)	Position (BP)
5	F	CTCTT CCTGC AGTAC TCCCC TGC	211	13042-13065
	R	GCCCC AGCTG CTCAC CATCG CTA		13253-13231
6	F	GATTG CTCTT AGGTC TGGCC CCTC	185	13308-13331
	R	GGCCA CTGAC AACCA CCCTT AACC		13489-13466
7	F	GTGTT GTCTC CTAGG TTGGC TCTG	139	13986-14009
	R	CAAGT GGCTC CTGAC CTGGA GTC		14124-14579
8	F	ACCTG ATTTC CTTAC TGCCT CTGGC	200	14404-14428
	R	GTCCT GCTTG CTTAC CTCGC TTAGT		14603-14579
9	F	GCGTC TTTCC TAGCA CTGCT GCCC	102	14668-14691
	R	CCCAA GACTT AGTAC CTGAA GGGTG		14769-14746

F; FORWARD, R; REVERSE

Speed-Vac Concentrator로 건조시켰다. DNA pellet을 증류수 200 μ l로 녹이고 4°C에 보관하였다. 이렇게 pellet형태로 얻어진 DNA를 증류수에 완전히 녹여서 분광흡광기로 DNA의 농도를 측정하고 다음 PCR반응에 사용하였다.

(2) Polymerase Chain Reaction (PCR):

① **Primers;** PCR은 한국생공으로부터 구입한 Premix-top을 이용하여 수행하였고, DNA integrity 측정용 (internal amplification control)으로서 human β -globin specific primer(한국 생공)를 사용하고, PCR에 이용된 primer 염기서열은 아래와 같으며 한국생공에 의뢰하여 합성하였다(Table 1). agarose gel electrophoresis나 polyacrylamide gel electrophoresis에 사용된 agarose, polyacrylamide, N,N'-bisacrylamide, tris-base, ammonium persulfate, TEMEN, EDTA, boric acid, polyacrylamide gel의 staining에 이용된 silver nitrate, sodium carbonate, ethanol, nitric acid, acetic acid는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하거나 그와 같은 등급의 시약을 사용하였다.

② **PCR 방법;** 반응액 총량을 시료당 25 μ l로 하고, reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin), 각각 20 μ M 씩의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer Mannheim, Germany), primer, template DNA 및 Taq DNA polymerase(Promega, USA)와 증류수를 차례로 혼합하고, PCR용 premixed 용액에 조직에서 분리한 DNA 200 ng과 forward 및 reverse primer 각 50 pmole을 넣

고, mineral oil로 반응액을 덮은 후 아래 도표와 같은 방식으로 denaturation, annealing, extension을 계획하고 automatic thermal cycler(Takara)에서 PCR을 수행하였다. exon 8의 경우는 annealing 온도를 55°C로 하는 것 이외에는 위와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR산물의 일부를 취하여 1.2% agarose gel에서 30분간 전기영동(electrophoresis)하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide용액에 염색하여 ultra-violet light하에서 DNA증폭 여부를 확인한 다음 polaroid로 촬영하여 결과를 남기고 SSCP를 수행하기까지 -20°C에 보관하였다.

③ **Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP);** 15 μ l의 PCR 산물에 denaturing solution(95% formamide, 0.05% bromophenol blue) 15 μ l를 넣고 끓는 물에서 3분간 둔 후 급히 얼음에 식힌 후, 12.5% polyacrylamide gel(15 cm \times 15cm \times 0.75 mm)에 load하고 200V로 16시간 정도 전기영동했다. 전기영동이 끝난 후 다음과 같은 방법으로 염색했다. gel을 10% ethanol에 5분간 담가둔 후 1% nitric acid에 3분간 담가 두었다. 0.012M silver nitrate 용액에 20분간 담그어두고 증류수로 씻어준 후 0.28M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde 용액으로 발색 시켰다. DNA band가 적절한 진하기로 염색되면 10% acetic acid로 10분간 고정시키고 증류수로 씻은 후 cellophane으로 gel을 말려서 보관하였다.

7) **결과판독:** 정상인에서 분리한 DNA로부터 얻은 PCR 생성물을 같이 전기영동하고 환자시료를 그 결

Table 2. p53 protein overexpression and gene mutation in primary tumor & metastatic lymph nodes

	Primary tumor	Metastatic node
p53 protein expression	(+) 12 (48%)	(+) 12 (48%)
	(-) 13 (52%)	(-) 13 (52%)
p53 gene mutation	(+) 10 (40%)	(+) 6 (24%)
		(-) 4 (16%)
	(-) 15 (60%)	(+) 2 (8%)
		(-) 13 (52%)

참고) +: positive for p53 protein or mutation, -: negative for p53 protein or mutation

과와 비교하여 p53 유전자의 돌연변이 여부를 확인하였다.

8) 자료 및 통계학적 분석: p53 단백 발현, p53 유전자 변이 및 DNA 배수성의 상호관련성과 병리 조직학적 예후인자와의 관련성은 SPSS/PC+ 프로그램을 이용하여 χ^2 -test로 검정하였으며 유의수준은 p-value 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 일반적 특징

대상 환자들의 전이성 유방암 25예의 WHO 분류법³³에 따른 조직학적 유형을 보면 침윤성 관암종이 23예 (92%)로 대부분을 차지하였고, 점액암종이 2예 (8%) 였다. 종양의 크기는 1.6 cm에서 10 cm 사이 이었고, 2 cm 이하인 경우가 4예, 2~5 cm이 17예, 5 cm 이상이 4예이었다. Bloom & Richardson 등급에 따른 조직학적인 분화도는 I, II, III등급이 각각 11, 10, 4예이었다.

2. p53 단백질에 대한 면역 조직화학 염색

p53단백의 발현은 종양 세포의 핵에 진한 갈색으로 염색되고, 주위의 정상 조직에서는 발현되지않은 것을 양성으로 판독하였으나, 한 예에서는 핵외의 세포질에서도 발현되었다. p53단백 발현은 25예의 원발성 암종중 총 12예 (48%)에서 양성하였고, 양성 증례의 전이암에서도 모두 양성이었다(Table 2). p53 단백질발현 음성인 13예의 임프절 전이병변에서는 모두 p53 단백질발현이 없어서, 원발 종양과 전이 종양의 p53 단백질발현 일치율은 100% 이었다. 또한 조직

Table 3. Pattern of mutational exons of p53 gene by PCR-SSCP

	Primary tumor	Metastatic node
exon 5	3	4
exon 6	2	1
exon 7	6	3
exon 8	0	2
Total	11	10

Table 4. Comparison of p53 protein overexpression to p53 mutation in primary tumors

	p53 mutation(+)	p53 mutation(-)
p53 protein(+)	6	5
p53 protein(-)	5	9

학적 등급에 따른 p53 단백질의 발현율은 grade I, II, III에서 각각 4예로 백분율은 36%, 40%, 100%로 각 등급간에 통계학적인 유의한 차이는 없었으나(p value=0.136) (Table 6), grade I, II를 합친 예와 grade III사이에는 유의한 상관관계가 있었다(p value=0.038).

3. PCR-SSCP법에 의한 p53 유전자 변이 검출

p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8 및 9에서의 돌연변이 검색에서는 원발암에서 총 10예(40%)에서 양성이고, 전이암에서는 8예가 양성이었다고, 원발암과 전이암의 양성 일치율은 6예(24%)이었다. 또한 원발 병소에서는 양성이지만 전이암에서 음성인 경우는 4예이었고, 그 반대의 경우는 2예이었다.

양자간의 양성, 음성 일치율은 18예(72%)이었다 (Table 2). 조직학적 등급에 따른 p53 유전자 변이는 grade I, II, III에서 각각 18%, 40%, 100%이었다 (Table 6). 원발암에서 p53 유전자의 exon별로 검색된 돌연변이는 exon 7에서 6예(60%)로 가장 많았고, exon 5는 3예, exon 6는 2예였고, 이중 1예에서 exon 7과 exon 5의 동시 검출이 있었다. 전이암에서는 exon 5가 5예, exon 7이 3예, exon 6,8은 각각 2예씩 이었고, 이중 한 예에서는 exon 6, 7, 8이 동시에 검출되었다. 원발 병소와 전이 병소에서 변이가 모두 있었던 6예중 한가지 예에서 원발암은 exon 7, 전이 암은 exon 5의 변이가 있었고, 또 한 예에서 원발암

Table 5. Comparison of p53 protein expression to DNA ploidy

DNA ploidy	p53 protein (+)	p53 protein (-)	p53 mutation(+)	p53 mutation (-)
Diploidy	5	6	4	7
Aneuploidy	7	7	7	7
Total	12	13	11	14

은 exon 6, 전이암은 exon 6, 7, 8에서 동시에 변이가 검출되었고, 나머지 4예에서는 원발암과 전이암에서의 변이 exon이 같았다(Table 3).

4. p53 단백발현과 p53 유전자 돌연변이의 관계

원발암에서 p53 단백발현과 p53 유전자 변이를 비교하면, 두 검사법에서 모두 양성인 경우는 6예(24%)이고, 모두 음성인 예는 9예로 두 검사법의 양성, 음성 일치율은 15예(60%) 이었고, p53 단백발현 음성으로 p53 유전자 변이가 있던 예는 5예이고, p53 변이 음성으로 p53 단백발현 양성인 경우는 5예였으며, 양 검사법에 의해 양성으로 검출된 예는 모두 15예(60%) 이었다. 또한 p53 단백발현이 양성인 경우가 음성인 경우보다 PCR-SSCP법에 의한 p53 유전자 변이 양성율이 높았으나 유의한 차이는 없었다($p=0.217$)(Table 4).

5. DNA 배수성 검사

유세포 분석기를 이용한 DNA 배수성의 분석 결과는 이배수성(diploidy)이 11예, 비배수성(aneuploidy)이 14예 이었다. 원발암중 p53 단백 양성인 12예에서는 이배수성이 5예, 비배수성이 7예이었다. p53 단백 음성인 경우는 이배수성이 6예, 비배수성이 7예이고, 원발암의 p53 유전자 변이가 있던 11예에서는 이배수성 4예, 비배수성 7예, p53 유전자 변이가 없는 14예중에는 이배수성 7예, 비배수성 7예였다. 전반적으로 p53 단백 양성 및 p53 유전자 변이 양성인 경우 DNA비배수성이 더 많았으나, 통계학적 상관관계는 p value가 각각 0.158, 0.316으로 유의성이 없었다(Table 5).

고 찰

유방암은 서구 여성에서 가장 높은 빈도의 악성 종양이고 우리나라에서도 높은 빈도로 증가추세에 있다². 유방암에 있어서 중요한 예후인자로 림프절 전이 유무, 종양의 크기, 조직학적 분화²⁵ 및 에스트

Table 6. Comparison of p53 protein overexpression, p53 gene mutation and DNA aneuploidy in breast cancers according to the histologic grade

Histologic grade	p53 protein expression	p53 gene mutation	DNA aneuploidy
I (n=11)	4 (36%)	2 (18%)	3 (40%)
II (n=10)	4 (40%)	4 (40%)	7 (62.5%)
III (n=4)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)

로겐과 프로게스테론 수용체등이 많이 연구되어²²⁻⁴ 실제로 임상에서 환자들의 치료나 추적 관찰에 매우 유용하게 적용되고 있고, 최근에는 유방암의 발생 및 경과에 관련된 종양 유전자와 종양 억제 유전자에 대해 예후인자로서의 유용성에 대한 분자 생물학적 연구가 행해지고 있다⁵⁻⁷. 이는 림프절 전이가 없는 유방암 환자라도 높은 재발율과 낮은 생존율을 보이는 환자들이 적지 않으므로 이를 미리 예측하여 적절한 치료로 재발을 방지하기 위함이 목적이다. 본 연구에서는 현재까지 가장 많은 종양에서 연구되어지고, 또한 많이 그 기능과 생리활성이 밝혀진 p53 유전자의 돌연변이 및 단백발현을 면역조직화학검사로 검출하여³⁴, 양 검사법을 비교 혹은 통합 정리하면서 여러 병리학적인 예후인자들 및 DNA 배수성과의 관련성을 밝히고자 하였다.

Vogelstein등에 의해 대장암에서 다단계의 발암기전이 유전자 수준에서 밝혀짐에 따라⁵⁻⁷ 이제는 일련의 유전자 변이가 정상적인 세포성장조절기구 및 세포주기가 파괴되어 세포의 지속적인 성장과 증식을 초래하여 악성종양이 유발된다는 것이 분자종양학의 기초를 이루고있다. p53 유전자에 의하여 발현되는 p53단백질은 53,000 dalton 크기의 단백질로 인체의 17번 염색체 소실 또는 돌연변이로 인하여 정상 기능이 소실되는 종양 억제 유전자로 밝혀졌으

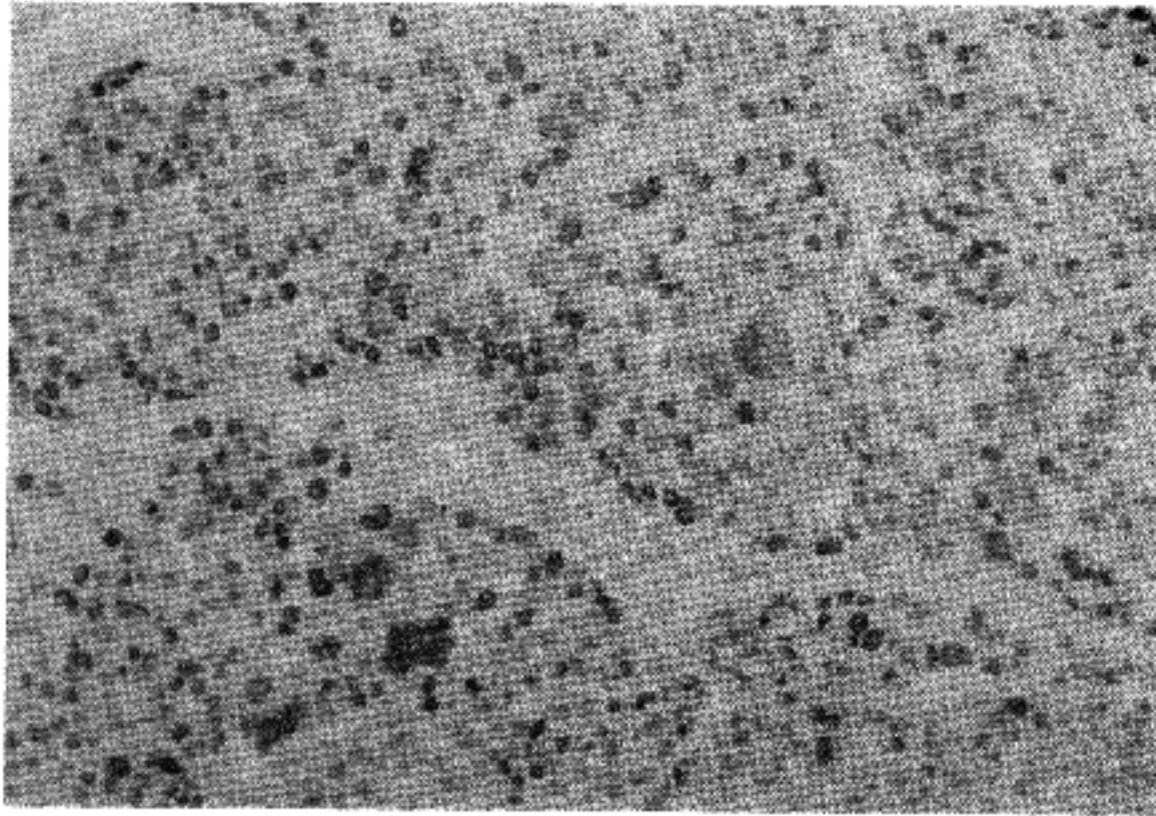


Fig. 1. The invasive breast carcinoma cells display strong reactivity for p53 immunostaining.

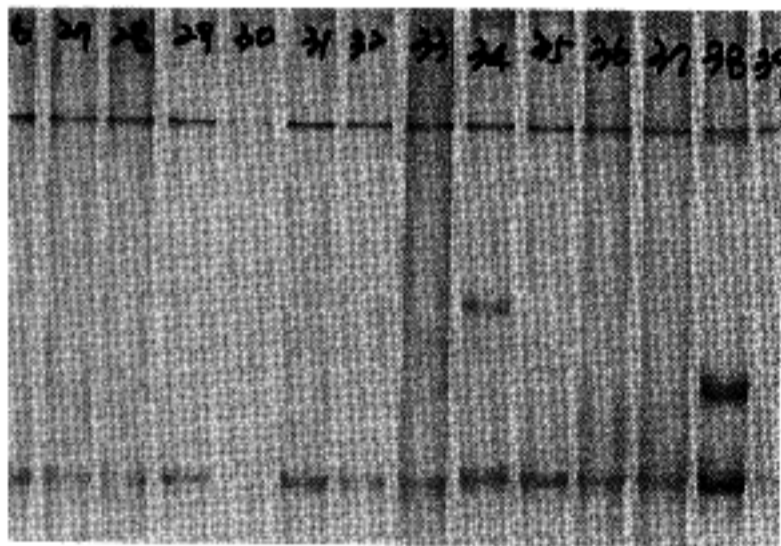


Fig. 2. The SSCP gel electrophoresis show mutation in exon 7 of p53 gene.(34, 38 lanes)

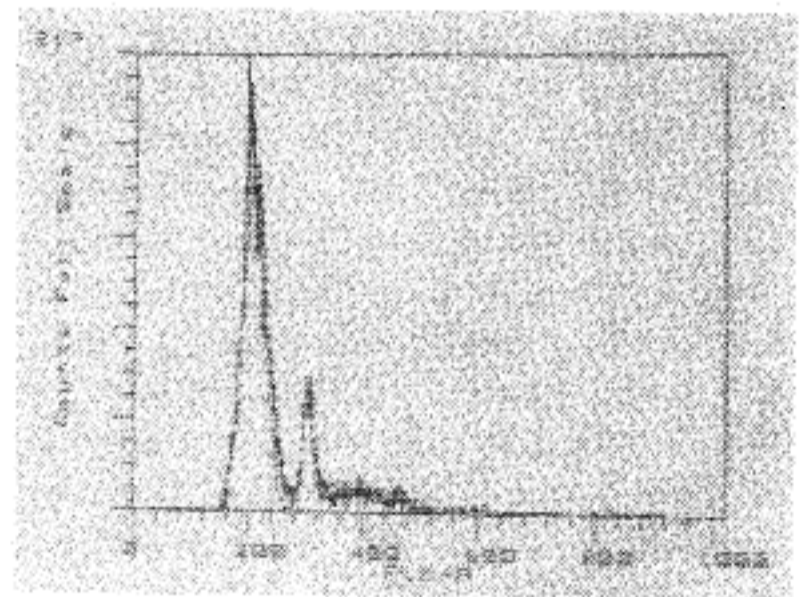


Fig. 3. Aneuploid pattern of the DNA Flow cytometry.

며⁶⁻⁸, p53유전자 산물인 p53단백은 phosphoprotein으로¹⁴ 발암작용에서의 p53의 역할은 매우 다양하다. 최근에는 p53 유전자가 대장암외에도 유방, 간, 난소, 방광, 간염조직(mesenchyme), 중추 신경계, 폐 그리고 조혈기관에서 기원하는 악성종양에서 이 유전자의 변이나 결손이 구체적으로 규명되었고, 많은 연구로서 p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정암에서만 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암종에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고있다^{8,16}.

야생형 p53 단백질이 종양세포의 성장을 억제하는

기전은 세포주기중 후반기 G1 phase에 작용하여 세포의 분열을 억제하여 세포 분열과정에서 negative regulator로 작용한다고 알려져있다^{9,10}. 최근 돌연변이가 있는 p53 유전자의 단백산물을 간단한 면역조직화학 검사법으로 그 발현율을 규명한 문헌은 많이 보고되었고, 일반적으로 유방암에서의 p53 단백질 발현이 이리 장기와 마찬가지로 높은 악성도, 나쁜 조직학적 분화도, 핵의 다형성 및 높은 재발율과 낮은 생존율과 관련이 있고 그 예후도 나쁘다는 것이며, 또한 많은 논문에서 밝혀진 p53 단백질 양성율은 보고자 및 국가, 인종에 따라 매우 다양한 27~48%까

지의 차이를 보이고 있는 실정이다. 본 연구에서는 그 발현율이 48%이었고, 원발암에서 p53 단백 양성을 보인 12예의 전이병소 모두에서도 양성 소견을 보였고, 음성 소견을 보인 13예의 전이 병소에서는 모두 음성 소견을 보여, 원발암과 전이암과의 p53 단백질 발현일치율은 100%였다. p53 단백질 발현 양상은 암종 주위의 정상 조직이나, 유방암의 전구 병변으로 여겨지는 비정형성 상피성 증식 병변에서는 p53 단백질 발현이 음성이었고, 침윤성 암종부위에 있는 상피내 암종부위에서도 침윤성 종양과 같은 양상으로 염색상을 보여, Poller³² 등이 주장 한바처럼 유방암의 진행과정에서는 p53 유전자의 변이가 암의 진행과정중 초기에 일어나는 것으로 본 연구에서도 생각이 되어지지만 본 실험에서 채택한 검체 수가 제한되어서 확실하지는 않다. 종양의 분화도별에 따른 p53 단백질 발현율은 grade I, II에서는 유의있는 차이는 없었으나, 발현율 100%인 grade III와는 유의있는 차이가 있었다. 본 연구에서 PCR-SSCP법에 의한 돌연변이 검출율은 40%로 면역조직화학검사로 시행한 p53 단백질양성을 48%보다 낮아서, 변이 p53의 검출은 면역조직화학검사가 비교적 높았으나, 중요한 것은 앞서 결과에서 제시된바처럼 두 검사법의 일치율이 24%에 그친 것으로, 이는 Thompson 등²⁷의 보고와 거의 일치하는 소견이다. p53단백이 양성이면서 PCR-SSCP법에 음성으로 나타난 것은 DNA 수준에서 유전자 돌연변이가 없다기보다는 PCR-SSCP법의 한계로 볼수있으며^{18,19}, PCR-SSCP법에서 돌연변이가 검출되었음에도 불구하고, p53 단백질에서 음성인 경우는 missense, nonsense mutation, intronic insertional mutation, deletion 등의 심각한 돌연변이는 있으나³⁰, 만들어진 비정형 단백질 면역성이 떨어져 통상적인 면역조직화학염색으로는 검출이 안되는 경우와 point mutation은 일어났으나 아미노산은 변하지 않아서 단백질형성에 이상이 없을 가능성을 생각할 수 있다. 따라서 p53 유전자의 변이는 p53단백에 대한 면역조직화학검사뿐만 아니라, PCR-SSCP법에 의한 유전자 돌연변이 screening으로 상호보완되어야 할것으로 생각한다. 본 연구에서도 양자중 어느 하나에 양성인 경우는 64%에 달하였다. 그러나 DNA sequencing등 보다 정확한 기법을 사용한다면 p53 돌연변이의 양성률은 더 높을것으로 예상된다³⁰. 종양의 분화도별에 따른 PCR-SSCP법에 의한 변이 검출율은 p53 단백질 발현과 마찬가지로 grade I, II에서는 유의있는 차이는 없었으나, 발현율 100%인 grade III와는 유의있는 차이가 있었다. 본 연구결과에 흥미있는 점은 전이암과 원발암에서 유전자변이 위치

가 다르게 해석된다.

p53 유전자는 세포주기내의 G1/S phase에 작용하여 손상된 DNA의 회복을 유도하며, 또한 분열시 mitotic spindle에 작용하는 것으로 알려져 있다. Cunningham 등²⁶은 DNA 이배수성인 환자들에게서 림프절 전이와 상관없이 p53단백 발현이 양성인 경우에는 높은 종양의 재발율과 짧은 생존율이 통계학적으로 유의있게 검증되어, DNA배수성과 p53단백 발현사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 없으며, p53단백 발현외에도 호르몬 수용체, 환자의 나이, 종양의 크기, 전이가 있는 림프절의 숫자, 폐경 여부등과도 상관관계가 없음을 보고하였다. 본 연구에서도 이배수성이 11예, 비배수성이 14예로 전반적으로 비배수성이 이배수성에 비하여 더 많았으며, p53 면역 조직화학 검사와 PCR-SSCP법으로 검출한 p53 변이의 양성, 음성 여부별로 DNA 배수성을 보아도 비배수성이 더 많았으나, 상관관계는 없었다. 즉 염색체 수준에서의 세포유전학적인 변이는 p53 유전자의 상태와 직접적인 연관성이 없다는 중요한 사실로, 이 결과는 Fujimoto³³ 등이 간암등에서 DNA 비배수체는 예후가 나쁜 것으로 보면서, 종양의 크기가 클수록 비배수체의 빈도가 높음을 지적한 보고와는 차이가 있으나, 암치료의 예후에 거의 모든 장기에서 제일 중요한 인자로 평가받는 p53 단백질발현 및 p53 유전자 변이등과 DNA 배수성을 관련시킨 문헌은 현재 다른 장기에서도 매우 드물어 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다. 다만 DNA 배수성과의 연관성에서 PCR-SSCP법으로 확인한 유전자 변이 보다는 면역 조직화학 검사법으로 검출한 p53 단백질 발현여부가 통계학적인 유의성은 없었으나, p value가 낮아서 비교우위에 있었다. 본 연구에서 p53 유전자 변이와 p53 단백질발현율이 국내외의 문헌들보다 비교적 높은 수치인 48%의 양성율을 보인 것은, 표본 선택시 고정상태가 양호한 최근의 검체를 사용했고, 면역조직화학 염색시 극초단파의 사용으로 그 발현율이 높았을 것으로 생각한다. 임상적으로는 화학요법 및 방사선 치료효과가 직접적인 핵독성 손상(genotoxic injury)에 의하기 보다는 종양의 DNA의 손상을 유발한 후 세포소멸(apoptosis)기전을 통해 세포사시킴으로서⁹⁻¹² 항암 효과가 나타난다는 사실들이 보고 되었고⁹, 실질적으로 bcl-2와 변이형 p53을 표현해서 세포소멸 기전이 제거된 종양에서는 치료 효율이 떨어지고 오히려 수리기전의 손상 상태에서 다른 정상 유전자에 추가적인 변이만 가중시킨다는 보고가 있으므로^{10,11} p53 유전자 변이의 검출은 치료성적과 예후 추정에 유용한 지표가 될

것이다. 앞으로 치료효과와 생존율, 재발율에 대한 추적조사가 보강된다면 p53 유전자 돌연변이는 유방암에서 치료 및 예후의 지표로서의 의의를 알수 있을것으로 생각된다.

결 론

저자는 침윤성 유방암 환자중 림프절 전이가 있는 25예의 유방암 환자에서 원발병소와 전이병소에서 p53 유전자 돌연변이를 비교 검색하기 위하여 p53 단백질에 대한 면역조직화학검사와 polymerase chain reaction(PCR)과 single stranded conformational polymorphism(SSCP)법을 시행하였고, p53 돌연변이와 DNA 비배수성과의 상관관계를 밝히기 위하여 동일한 조직에서 DNA유세포 검사를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 유방암 25예중 p53 단백질과 p53 유전자의 돌연변이는 각각 12, 10예로 48%, 40%였고, 양자중 하나라도 양성인 경우는 16예(64%)로 양자간에 양성 일치율은 24% 였다.

2) 원발암과 전이암 사이에서의 p53 단백질 양성 일치율은 100% 였으나, PCR-SSCP법에 의한 양성 일치율은 72%이었다.

3) p53단백 양성 및 p53유전자의 변이와 DNA비배수성과의 상관관계는 유의성이 없었으나(p value=0.158, 0.316), 면역조직 화학적 방법이 SSCP법보다 비교우위에 있었다.

4) 유방암의 조직학적 분화 등급과 p53 단백질의 양성률과의 연관성은 각각의 등급별 차이는 없었으나(P=0.136), grade I 및 II 와 grade III 사이에는 상관관계가 있었다(p=0.038).

5) 유방암의 조직학적 분화 등급과 p53 유전자 변이사이의 양성률은 각각의 등급별 차이는 없었으나(P=0.257), grade I 및 II와 grade III 사이에는 상관관계가 있었다(p=0.046).

6) p53 유전자의 exon별 돌연 변이는 exon 7에서 가장 많았다.

상기의 결과들로 유방암에서 p53 돌연변이 여부는 면역조직화학적 검사와 분자생물학적 방법이 일치하지 않으므로 동시에 시행하여 보완하는 것이 바람직하며, 원발병소와 전이암사이의 p53 유전자 돌연변이 부위가 일치하지 않는 것으로 보아, 전이 부위에서 또 다른 유전자의 변이가 진행됨을 시사하였다. 또한 p53 돌연변이가 있는 암종에서 DNA 비배수성이 보다 흔히 일어남을 알수 있었으나 통계학적 의미는 없었다.

참 고 문 헌

1. Boring CC, Squires TS, and Tong T. Cancer Statistics. CA Cancer J. Clin 1994; 44: 7-26.
2. 보건사회부. 한국인 암등록 조사자료 분석 보고서. 보건사회부, 1993
3. Hand PH, Thor AD, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A. Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 5227-31.
4. Thor AD, Hand PH, Wunderlich D, Caruso A, Murao R. Monoclonal antibodies define different ras gene expression in malignant and benign colonic disease. Nature 1984; 311: 562-5.
5. Pitot HC. Oncogenes and human neoplasia. Clin Lab Med. 1986; 6: 167-79.
6. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC. Mutation in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 1989; 342: 705-8.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits M, and Bos L. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 1988; 319: 525-32.
8. Oliner JD. The role of p53 in cancer development. Sci Amer Science and Medicine 1994; 16-25.
9. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, and Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 1993; 74: 957-67.
10. Lane DP. A death in the life of p53. Nature 1993; 75: 241-51.
11. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. Cell 1993; 74: 777-9.
12. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW and Osborne BA. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993; 362: 847-9.
13. 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: 317-25.
14. Marin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. Int J Cancer 1992; 50: 859-62.
15. Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borrensens AL, and Nesland JM. Immunohistoche-

- mical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissues of the cervix uteri. *J Pathol* 1993; 169: 21.
16. Caron De Fromentel C and Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 1991; 4: 1-17.
 17. Carbone D, Chiba I & Mitsudomi T. Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 1991; 6: 1691-92.
 18. Wright D, Manos M. Sample preparation from paraffin-embedded tissue. In: *PCR Protocols, A guide to methods and applications*, San Diego: Academic Press, 1990: 153-8.
 19. Shibata D, Arnheim N, Appleman MD, Causey DM, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225-30.
 20. Kajeki Y, Korenaga D, Tsujitani S, Baba H, Anai H, Maehara Y, Sugimachi K. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 1993; 67: 589-93.
 21. Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, Hennessy C. p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991; 164: 75.
 22. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Predictions of survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1988; 320: 627-33.
 23. McCarty KS Jr., McCarty KS. Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. *Am J Pathol* 1977; 86: 705-44.
 24. Williams MR, Todd JM, Ellis IO, Dowle CS, Haybittle JL, Elston CW, Nicholson R, Griffiths K, Blamey RW. Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review cases. *Br J Cancer* 1987; 55: 67-73.
 25. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriga M. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 2141-9.
 26. Cunningham JM, Ingle JN, Jung SH, Krook JE, Kovach JS. p53 gene expression in node-positive breast cancer: Relationship to DNA ploidy and prognosis. *J of NCI* 1994; 86: 1871-3.
 27. Thompson AM, Anderson Tj, Condie A, Prdsser J, Chetty U, Carter DC, Evans Hj & Steel CM. p53 Allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathological parameters. *Int J Cancer* 1992; 50: 528-32.
 28. Orita M, Suzuki Y, Seklya T & Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
 29. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4009.
 30. Varley JM, Brammar Wj, Lane DP, Swallow JE, Dolan C and Walker RA. Loss of chromosome 17p13 sequences and mutations pf p53 in human breast carcinomas. *Oncogene* 1991; 6: 413-21.
 31. Bloom HJG, Richardson WW, Harris ED. Natural history of untreated breast cancer. Comparison of untreated cases according to histological grade of malignancy. *Br Med J* 1962; 2: 213-21.
 32. Poller DN, Hutchings CE, Galea M, Bell JA, Nicholson RA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in human breast carcinoma: relationship to expression of epidermal growth factor receptor, c-erbB2 protein overexpression, and estrogenic receptors. *Br J Cancer* 1992; 66: 583-8.
 33. Fujimoto J, Okamoto E, Yamanaka N, Toyosaka A, Mitsunobu M. Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1991; 67: 939-44.
-