

## 원발성 폐암에서 Rb 유전자 단백질의 발현양상과 예후와의 상관관계

동아대학교 의과대학 병리학교실

허혜경·나서희·홍숙희

### Expression Pattern of the Rb Protein and its Correlation with Prognosis in Primary Lung Cancer

Hea Kyoung Hur, M.D., Seo Hee Rha, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.

Department of Pathology, Dong-A University College of Medicine

An immunohistochemical stain for the Rb tumor suppressor gene product was performed in pathologic specimens from 72 primary lung cancer patients to study the correlation between its expression and histologic type, cancer differentiation, clinical stage and survival rate. The expression of the Rb protein was positive in 34 cases(47.2%) and negative in 38 cases(52.8%). The Rb protein was not expressed in 16 of 42 cases(38.1%) in squamous cell carcinoma, in 17 of 23 cases(73.9%) in adenocarcinoma, in one of three cases(33.3%) in undifferentiated large cell carcinoma, in two of two cases(100%) in small cell carcinoma, in one of one case(100%) in an adenosquamous carcinoma and in one of one case(100%) in an atypical carcinoid. There were significant difference of the Rb protein expression between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma( $p < 0.05$ ). The expression of Rb protein was not correlated with degree of cancer cell differentiation and clinical stage of the lung cancer( $p > 0.05$ ). The two year survival rate for patients with the Rb positive was 65% compared with 37% for those with the Rb negative which was significant( $p < 0.05$ ). This result suggests that an altered or the absence of the Rb protein in cancer cells can be a valuable prognostic factor in the lung cancer. (**Korean J Pathol 1997; 31: 152 ~ 161**)

**Key Words:** Rb protein, Tumor suppressor gene, Lung cancer, Prognosis

### 서론

원발성 폐암은 전세계적으로 암에 의한 사망의

주요 사인 중의 하나이며 1993년도 우리나라에서의 암종의 사망통계를 분석한 통계청 자료에서도 폐암에 의한 것이 남자가 25.8%, 여자가 9.3%로 전체 암으로 인한 사망자 중에서 각각 3위를 차지한다<sup>1</sup>. 폐암의 발생기전은 아직까지 확실히 밝혀져 있지 않으나 지금까지의 연구로는 흡연이 가장 중요한 원인으로 알려져 있으며 석면, 방사선 폭로, 식이와 폐의 반흔 등도 폐암의 발생과 연관이 있는 것으로

접수: 1996년 3월 26일, 게재승인: 1996년 9월 12일  
주소: 부산시 서구 동대신동 3가 1, 우편번호 602-103  
동아대학교 의과대학 병리학교실, 허혜경

보고되어 있다<sup>2,3</sup>.

암은 유전자 변화에 의한 세포의 과성장을 보이는 질환이므로 암의 궁극적인 원인은 세포 혹은 세포하 수준에서 규명되어야 한다. 최근에 급속히 발전된 분자생물학적 연구 결과 종양의 다단계 발암 과정이 제시되었고, 폐암의 발생에 여러 인자가 관련되고, 또한 폐암의 발생, 진행 및 예후는 여러 종양유전자와 종양억제유전자의 변화가 축적되면서 이들 유전자의 활성 혹은 비활성에 의한 기능의 획득 혹은 기능의 소실과 관련이 있다는 것이 알려져 있다<sup>4-6</sup>.

종양억제유전자의 정상적인 기능은 세포의 증식을 억제하여 암발생을 억제하는 것이다. 폐암 발생과 관련성이 있다고 알려진 종양억제유전자 중에서 Rb 유전자는 13번 염색체의 장완의 14 band에 위치하며 이 부위에 변이나 결손이 일어나면 Rb 유전자의 불활성화가 일어나게 된다<sup>7</sup>. 그 결과 Rb 단백질이 생성되지 않아 세포주기에서 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계에서 S 단계로의 진입에 제동작용을 못하게 되므로 세포 분열에 대해 조절 능력을 잃게 되어 종양의 개시와 진행에 중요한 역할을 한다. 또한 Rb 단백질 발현의 변화 혹은 소실이 환자의 예후와 연관이 있다는 것이 제시되어져 왔으나<sup>8</sup> 아직까지 확실한 상관관계에 대해서는 밝혀져 있지 않다.

이에 본 연구자는 원발성 폐암 조직에서 발암 개시와 진행에 중요한 요인이 되는 종양억제유전자인 Rb 유전자의 발현 양상을 Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 방법으로 관찰하고 폐암의 조직학적 형, 분화도, 병기, 그리고 생존율과의 상관관계와 비교함으로써, Rb 유전자 불활성화가 원발성 폐암환자의 예후와 어떤 상관관계가 있는지를 알아보려고 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

연구 재료로는 1990년 3월부터 1995년 8월까지 5년 6개월동안 동아대학교 병원에서 원발성 폐암으로 진단받고 편측 폐절제술이나 폐엽절제술을 실시 받은 환자 중 파라핀 포매조직의 보관 상태가 양호하고 병력지 기록 검토가 가능한 72명의 환자들로부터 얻은 폐암 조직을 사용하였다. 이들 환자의 성별, 연령, 병기, 생존 기간 등은 병력기록지를 통해 얻었고, 조직학적 분화도, 조직학적 형 등 병리학적 소견을 재검토하였다. 폐암의 병기는 American Joint Committee on Cancer의 TNM 병기에 따라 분류하였

다<sup>9</sup>.

### 2. 연구 방법

1) **면역조직화학적 염색:** 먼저 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 72예의 폐암 조직절편을 hematoxylin-eosin염색한 표본을 검색하여 WHO 분류에 따라 조직학적 분류를 시행하였다. Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 검사는 폐암 조직절편을 압력솔을 이용한 고온 열처리법으로 전처리를 시행하였는데 압력솔에 citrate buffer(pH6.0)를 슬라이드에 잠기게 넣은 다음 끓는 점에 도달한 후 1분간 더 끓인 후 불을 끄고 식혔다. 1:40으로 희석한 단클론 항체인 mouse anti-human Rb, PMG3-245(PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.)를 사용하여 통상적인 ABC방법(avidin-biotinyl peroxidase complex method)으로 염색하였다.

2) **염색의 평가:** Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 염색의 분석은 환자의 임상 소견에 대한 지식없이 시행하였다. 폐암조직에서 먼저 주변의 정상세포들이 Rb 단백질이 발현됨을 확인하고 종양세포를 관찰하였다. 종양조직 전반에 걸쳐 확실한 핵염색이 확인되는 경우를 Rb 양성으로 하였다. 전체 종양세포가 핵염색이 안되거나, 넓은 범위에서 핵염색이 안되면서 국소에서 핵염색이 관찰되는 변화된(altered) Rb 단백질 발현 양상을 보이는 경우를 모두 Rb 음성으로 간주하였다.

3) **통계 처리:** 폐암의 조직학적 형, 분화도, 병기, 생존 기간, 그리고 환자의 성별, 연령 등의 임상병리학적 자료들과 Rb 단백질 발현 양상과의 상관관계를 비교 분석하였다. 생존율은 Kaplan과 Meier의 방법<sup>10</sup>을 이용하여 log-rank statistical analysis에 의해, 발현빈도 및 경향 분석은 Chi-square test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였다. 통계적 유의 수준은 95%로 설정하였고 통계 처리는 SAS system (statistical package SAS for windows release 6.08)을 이용하였다.

## 결 과

### 1. 임상 자료의 분석(Table 1)

대상 환자의 연령 분포는 32세부터 80세였으며 평균연령은 56세였고 60대 이상이 32명으로 전체의 44.4%를 차지했다. 성별로는 남자가 60예(83.3%), 여자가 12예(16.7%) 이었다.

**Table 1.** Age and sex distribution in Rb-positive\* and Rb-negative\* lung cancer groups

Variable	No. of cases	Rb		p value
		Positive	Negative	
Age (years)				
30~39	6	2(33.3%)	4(66.7%)	0.385
40~49	6	2(33.3%)	4(66.7%)	
50~59	28	13(46.4%)	15(53.6%)	
60~32		17(53.1%)	15(46.9%)	
Mean age		57 years	55 years	
Median age		60 years	56 years	
Sex				
Male	60	32(53.3%)	28(46.7%)	0.045
Female	12	2(16.7%)	10(83.3%)	
Total	72	34(47.2%)	38(52.8%)	

\* Rb-positive : normal Rb protein expression  
Rb-negative : altered or no Rb protein expression

**2. Rb 단백질 발현 빈도 및 발현 양상(Table 1)**

Rb 단백질은 총 72예 중 34예(47.2%)에서 양성이었다고, 38예(52.8%)에서 음성이었다. 성별에 따른 Rb 단백질 발현 빈도는 통계학적으로 유의한 차이를 보여 여자에서 발생한 폐암에서 Rb 단백질 음성의 빈도가 높았으나(p=0.045) 환자의 나이에 따른 통계학적 차이는 없었다(p=0.385).

**3. 폐암의 조직학적 형과 Rb 단백질 발현(Table 2)**

Rb 단백질은 편평세포암 42예 중 16예(38.1%)에서, 선암 23예 중 17예(73.9%)에서, 미분화성 대세포암 3예 중 1예(33.3%)가 음성을 보였다. 또 2예의 소세포암, 1예의 편평상피선암, 그리고 1예의 비정형 유암종은 모두 음성을 보였다. 선암에서 Rb 단백질 음성빈도가 높았으며, 대상군 수는 적었지만 소세포암, 편평상피선암, 비정형 유암종에서 모두 음성으로 나타났다.

**4. 폐암의 조직학적 분화도와 Rb 단백질 발현 (Table 3, 4)**

폐암의 조직학적 분화도에 따른 Rb 단백질 발현을 보면, Rb 음성을 보이는 16예의 편평세포암 중에서 고분화성암이 3예(18.8%), 중등도 분화성암이 9예(56.3%), 그리고 저분화성암이 4예(25.1%)이었다.

**Table 2.** Rb protein expression in various histologic types of lung carcinoma

Histologic type	No. of cases	Rb	
		Positive	Negative
SCC	42	26 (61.9%)	16 (38.1%)
AC	23	6 (26.1%)	17 (73.9%)
UDLCC	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)
SCLC	2	0 ( 0.0%)	2 ( 100%)
ASC	1	0 ( 0.0%)	1 ( 100%)
ACT	1	0 ( 0.0%)	1 ( 100%)
Total	72	34 (47.2%)	38 (52.8%)

SCC : Squamous Cell Carcinoma  
AC : Adenocarcinoma  
UDLCC: Undifferentiated Large Cell Carcinoma  
SCLC : Small Cell Lung Carcinoma  
ASC : Adenosquamous Carcinoma  
ACT : Atypical Carcinoid Tumor

**Table 3.** Correlation between Rb protein expression and histologic grade of 42 squamous cell carcinomas of the lung

Rb	Grade of differentiation		
	Well	Moderate	Poor
Total (n=42)	14(33.3%)	18(42.9%)	10(23.8%)
Positive (n=26)	11(42.3%)	9(34.6%)	6(23.1%)
Negative (n=16)	3(18.8%)	9(56.3%)	4(25.0%)

(Chi-Square = 2.746, p>0.05)  
(Mantel-Haenszel Chi-Square = 1.116, p>0.05)

또 Rb 음성을 보이는 17예의 선암 중에서 고분화성암이 9예(52.9%), 중등도 분화성암이 3예(17.7%), 그리고 저분화성암이 5예(29.4%)이었다. 그러나 Rb 단백질 발현 빈도와 편평세포암과 선암의 조직학적 분화도 사이에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.253, p=0.680).

**5. 폐암의 병기와 Rb 단백질 발현(Table 5)**

폐암의 병기를 I기와 II기를 초기군으로 III기와 IV를 후기군으로 나누었다. 병기에 따른 Rb 단백질 발현을 관찰한 바 초기군 39예 중 18예(47.4%), 후

**Table 4.** Correlation between Rb protein expression and histologic grade of 23 adenocarcinomas of the lung

Rb		Grade of differentiation		
		Well	Moderate	Poor
Total	(n=23)	12(52.2%)	3(13.0%)	8(34.8%)
Positive	(n=6)	3(50.0%)	0 (0.0%)	3(50.0%)
Negative	(n=17)	9(52.9%)	3(17.7%)	5(29.4%)

(Fisher's Exact Test(2-Tail),  $p>0.05$ )  
(Mantel-Haenszel Chi-Square = 0.280,  $p>0.05$ )

**Table 5.** Correlation between Rb protein expression and tumor stage of lung cancer

Rb		Stage	
		I-II	III-IV
Total	(n=72)	39 (54.2%)	33 (45.8%)
Positive	(n=34)	21 (61.8%)	13 (38.2%)
Negative	(n=38)	18 (47.4%)	20 (52.6%)

(Continuity Adjustment Chi-Square = 0.947,  $p>0.05$ )

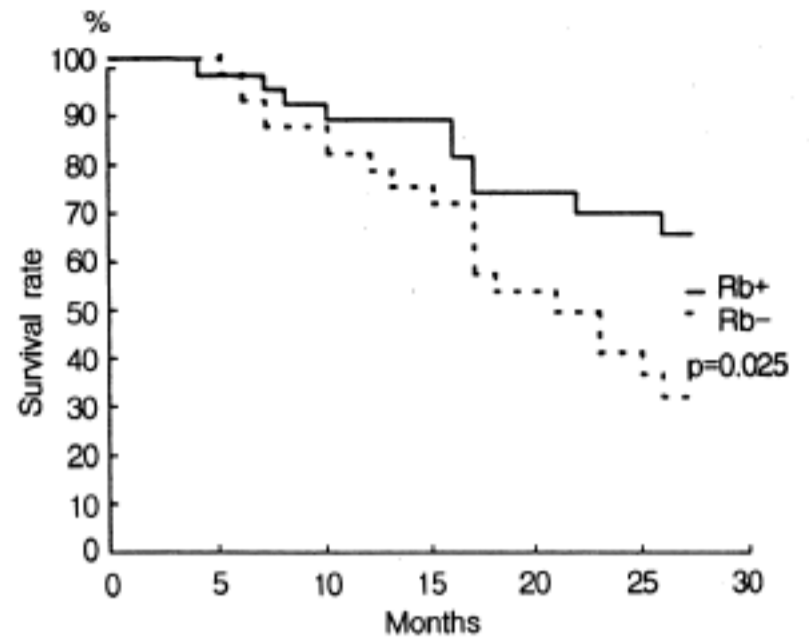
기군 33예 중 20예(52.6%)가 음성을 보였지만, Rb 단백질 발현 빈도와 병기와는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다( $p=0.324$ ).

**6. Rb 단백질 발현에 따른 폐암 환자의 생존율 (Fig. 1)**

총 72예의 원발성 폐암 환자의 생존기간은 환자가 본원에서 진단받은 시점부터 산정되었고 평균생존기간(median survival time)은 17개월 이었으며, Rb 발현 유무에 따른 Kaplan-Meier 생존확률곡선은 Fig. 1에 도시된 대로 2년 생존율은 Rb 단백질 양성의 경우 65%, Rb 단백질 음성의 경우 37%로 두 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.025$ ).

**고 찰**

현재까지 폐암은 흡연이 아주 중요한 유발인자로 알려져 있으나 그 외 다른 여러 유발인자가 복합적으로 관여하여 유전자의 변화가 초래되고 이로 인해 발암 개시 및 발암 촉진의 다단계 과정을 거쳐



**Fig. 1.** Kaplan-Meier survival probability curve of lung cancer based on Rb protein expression (Log-rank analysis).

발생되는 것으로 알려져 있다.

최근 분자생물학의 발달로 종양의 발생에 관여하는 종양유전자에 대한 연구가 활발한데, 세포의 성장과 증식을 촉진시키는 종양유전자, 정상적인 세포 증식과 성장을 조절하는 종양억제유전자, 그리고 세포사를 조절하는 유전자가 중요대상으로 연구되고 있다. 이 중 현재까지의 분자생물학적 연구에서 종양억제유전자는 적어도 11개가 있음이 밝혀졌다<sup>11</sup>. Rb 유전자는 1980년대 중반에 각기 다른 세 그룹의 연구자들에 의해 클론화된 최초의 종양억제유전자이다<sup>12-14</sup>. Rb 유전자는 4.7 kb의 cDNA로써 클론화되고 그들의 산물은 인산화의 상태에 따라 110 혹은 116 kD의 핵인산화 단백질이다. Rb 단백질은 Go 혹은 G<sub>1</sub> 단계에서는 저인산화 상태이고 S단계에서와 초기 M단계 동안에 점진적으로 인산화된다. 저인산화 상태에서 이 단백질은 c-myc 등의 종양유전자나 E2F와 같은 전사인자가 되는 세포 단백질과 결합하여 세포 증식을 억제하는 역할을 한다. 이러한 억제 기능은 고인산화 상태나 혹은 SV 40 virus의 large T, adenovirus의 E1A, human papilloma virus의 E7과 같은 바이러스 전환성 단백질(viral transforming protein)에 의해 상실된다. Rb 유전자의 돌연변이는 소위 Rb pocket이라고 불리는 전사인자 결합 영역에서 일어나고 이러한 변화로 전사인자의 활성도가 조절이 되지 않게되면 세포의 비조절성 주기가 발생한다. 또한 Rb 유전자는 발암과정에서 유전자의 두 대립형질 모두에 돌연변이나 소실이

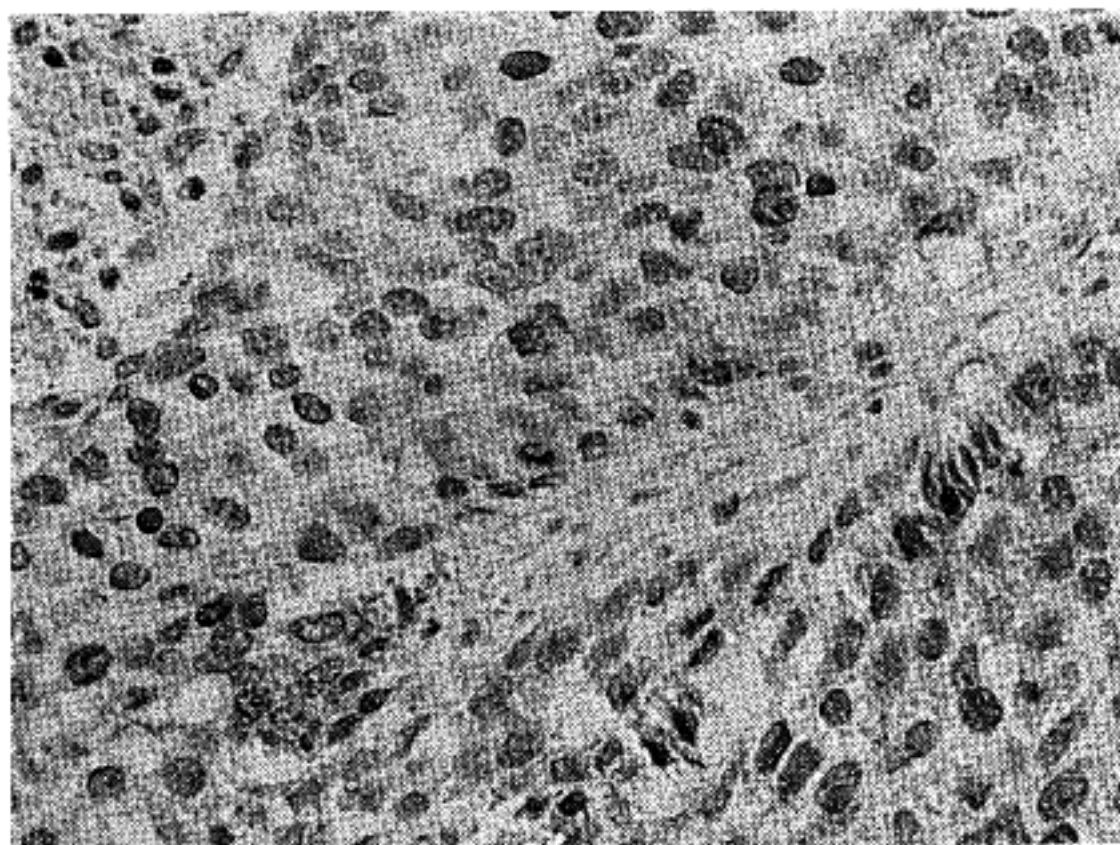


Fig. 2. Squamous cell carcinoma, well differentiated type. Rb protein was strongly expressed in the nuclei of most cancer cell.

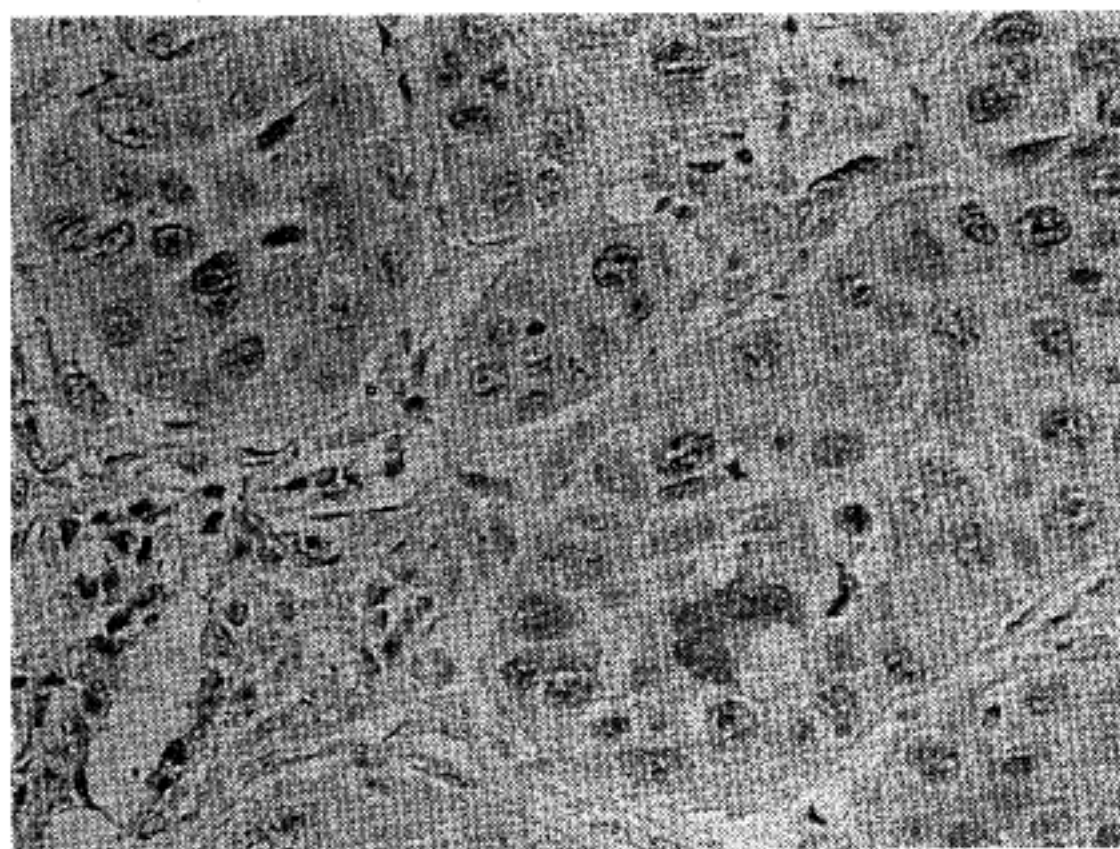
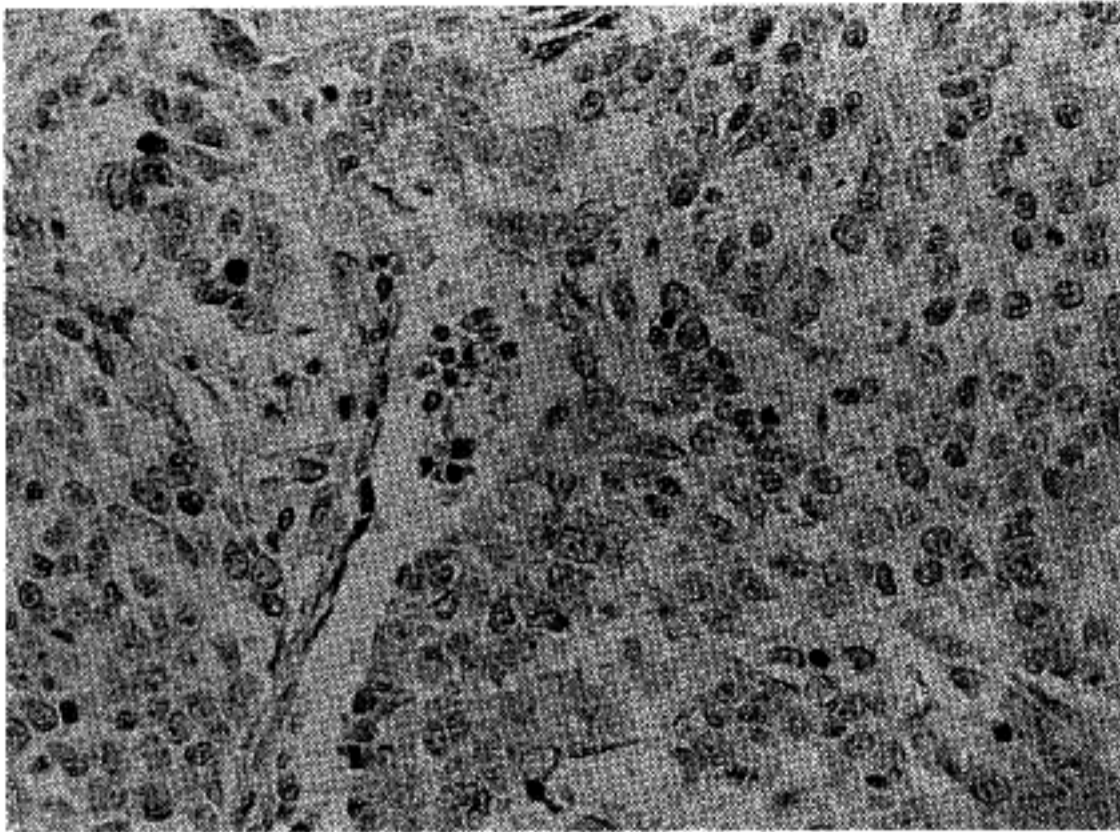


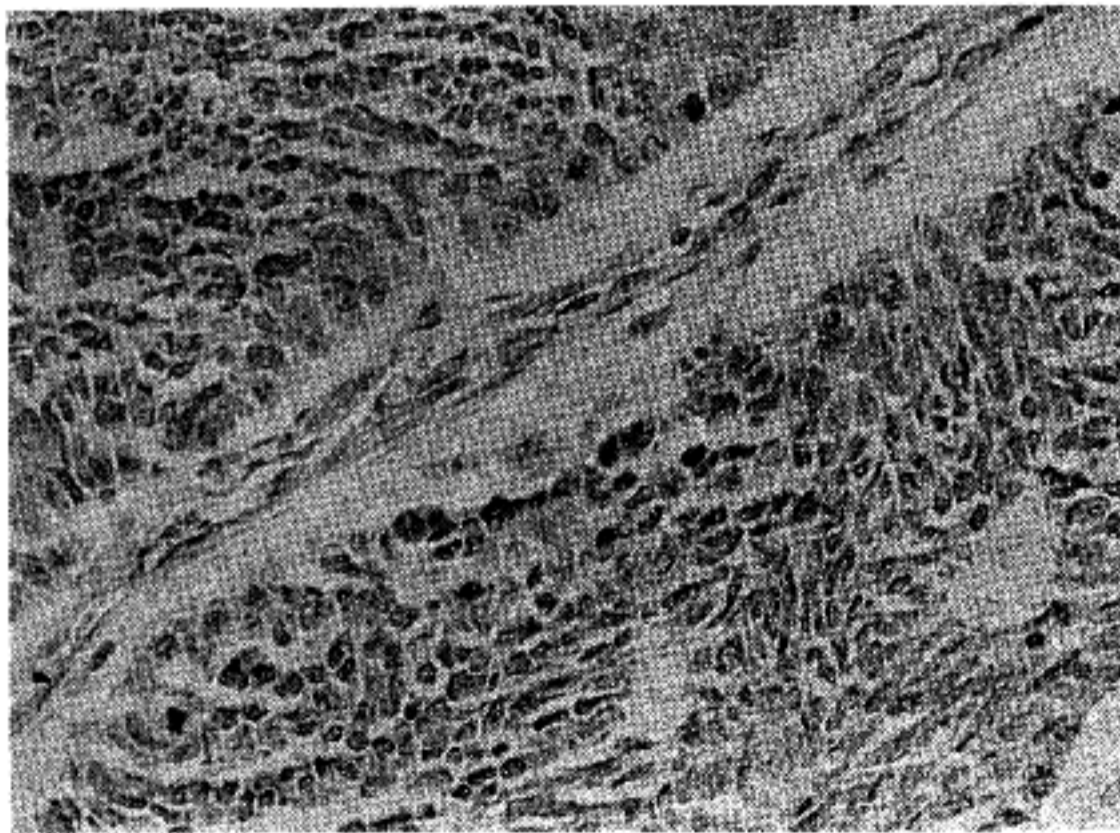
Fig. 3. Adenocarcinoma, well differentiated type. Weak to strong Rb positive cancer cells were scattered in the tumor tissue.

일어나야 종양이 발생하는 열성 유전자이다. 초기 변이는 주로 짐 돌연변이 혹은 또 다른 작은 변화가 일어나 유전자의 하나의 대립형질의 불활성화 혹은 변화가 일어나게 되고, 두번째의 유전자 변화 시에는 상보적 유전자의 결손 혹은 전위와 같은 더 큰 변화가 생겨 종양억제유전자의 이중 적합성을

상실(loss of heterozygosity)하게 된다. 이러한 가설은 1971년 Knudson<sup>15</sup>에 의해 이미 제시된 two hit theory 로써 지놈의(genomic) DNA와 Rb 전사수준에서 일치 하는 여러 연구결과들로 증명되어 있다<sup>16,17</sup>. 이러한 Rb 유전자의 불활성화는 이러 종양 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 이에는 폐암<sup>18,19</sup> 이외에



**Fig. 4.** Squamous cell carcinoma, poorly differentiated type. The Rb protein immunoreactivity was negative in the cancer cells and positive in the stromal cells.



**Fig. 5.** Small cell carcinoma, Markedly decreased or altered Rb protein expression was recognized in most tumor cells while distinct Rb nuclear staining was present in the endothelial or stromal cells.

도 유방<sup>20,21</sup>, 방광<sup>22,23</sup>, 간<sup>24</sup>, 진립선<sup>25</sup> 등에서 생기는 암종과 골육종<sup>26</sup>, 연부 육종<sup>27</sup> 등이 있다.

폐암에서 Rb 유전자의 불활성화는 최초로 1988년 두 그룹에 의해 4개의 비소세포 폐암의 세포계에서 보고되었다<sup>28,29</sup>. 1991년 Xu 등<sup>30</sup>은 처음으로 파라핀 절편에서 원발성 비소세포 폐암에서의 Rb 단백질 발현의 변화를 관찰하였다. 또한 여러 보고에 따르

면 Rb 유전자의 불활성화가 소세포 폐암의 발생과도 관련이 되며 오히려 비소세포 폐암에 비해 더 강한 연관성을 보이고 있다<sup>28,29</sup>. 소세포 폐암에서 Rb 단백질 발현의 변화는 증양의 개시뿐 아니라 생물학적 악성도와 또 임상적으로는 증양의 진행과도 관련이 있음이 제시되었다. Yokota 등<sup>28</sup>의 연구에 따르면 Rb 단백질 발현의 소실 혹은 변화는 소세포

폐암의 세포계에서는 거의 100%에 달하고 비소세포 폐암의 세포계와 폐암 조직에서는 30% 정도에 달한다고 보고하고 있고, 108명의 폐암환자를 대상으로 한 Higashiyama 등<sup>19</sup>의 연구에서는 소세포 폐암에서 88%로 높았으나, 비소세포폐암에서 23%로 더 낮다고 보고하고 있다. 또 1993년 Ookawa 등<sup>31</sup>은 소세포 폐암의 세포계에 외부로부터 야생형의 Rb expression plasmid를 주입하였을 때 종양세포의 성장속도가 감소 혹은 억제됨을 밝혀 Rb 유전자가 악성종양의 치료에 있어서도 관심의 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 72예의 원발성 폐암 중에서 소세포 폐암은 단지 2예가 포함되어 있었고 2예 모두 Rb 음성을 보여 비록 대상군 수가 적어 단정적으로 말하기는 어렵지만 다른 연구자들의 연구 결과와 비슷한 소견을 보였다. 70예의 비소세포 폐암 중 38예(54.3%)가 Rb 음성을 보여 다른 연구자들의 연구 결과보다 높은 Rb 음성율을 보였는데 파라핀 포매한 조직에서 단클론 항체인 PMG3-245를 사용하여 면역조직화학적 염색을 시행하는 경우 항원복구법을 꼭 시행해야 하는 것으로 되어 있고 적당한 항원복구법이 시행된다면 Rb 단백질 발현에 문제가 없는 것으로 알려져 있다. 그러나 조직의 과사, 과고정, 부적당한 처리(processing)와 불완전한 염색등으로 단백질의 비특이적 상실(non-specific loss)이 올 수 있는 것으로 되어 있다. 이중 특히 고정시간이 중요한 것으로 되어 있으며 다른 연구자들의 조직이 포르말린에 1~2시간 고정 후 면역조직화학적 염색을 시행했는데 반하여 본 예에서는 24시간 이상의 장시간 고정을 하여 종양 조직내에 숨겨져 있던 항원의 복구에 문제가 있었던 것으로 생각된다.

비록 생체내 조직에서 Rb 단백질은 광범위하게 발현되지만 강양성부터 음성에 이르기까지 핵염색의 다양성을 보인다. Rb 양성세포의 비율은 조직의 종류, 세포주기 분포와 세포의 분화 정도에 따라 다르고 또한 면역조직화학적 검출 역치에 따라서도 다르다<sup>32</sup>. 예를 들면, 정상 성인의 장에서 빠르게 분열되는 소낭선(crypt) 세포들이 다른 용모의 상피세포나 결체조직의 섬유모세포, 횡문근 세포에 비해 강양성을 보이고, 특히 이행권(transitional zone)에 있는 중간 소낭성(midcrypt)에서 최고에 달한다는 보고가 있다<sup>15</sup>. 조직학적 형에 따라서도 각기 다른 Rb 단백질의 발현 양상을 보이는데 갑상선과 부신피질 세포의 잘 분화된 비분열성 상피세포들은 높은 수준의 Rb 단백질 발현을 보이나, 같은 분화정도를 보이는 부신피질의 크롬친화세포들은 중등도 수준의 발현을 보인다. 또 Rb 염색양상은 생체내 같은 조직

에서도 다르게 나타날 수 있는데, 예를 들면 정상 기관지 상피들은 약양성 혹은 음성인데 반해 폐암 종 주위의 기관지 점막의 정상 상피나 과증식성 기저세포들은 강한 Rb 양성 반응을 보여준다. 이것은 실제로 암종 주위의 정상조직이 세포증식과 분화를 유지하기 위하여 세포내 혹은 세포외 반응을 하고 있음을 시사해 준다. 본 실험에서도 폐암종 주위의 정상 기관지 상피세포, 림프구, 섬유모세포와 내피 세포 등에서 강양성에서 약양성까지 다양한 정도의 핵염색이 관찰되었고 앞서 언급한 바와 같이 정상 세포들이 모두 양성 반응을 보이지는 않았다. 그리고 종양세포에서도 조직학적 형태나 분화도에 따라 다양한 정도의 양성 반응을 보였는데, 종양 전반에 걸쳐 핵염색이 되는 경우를 양성 그리고 종양의 넓은 범위에서 핵염색이 안되거나 혹은 모든 종양세포에 핵염색이 안되는 경우를 음성으로 하였을 때 총 72예 중 34예가 양성(47.2%), 38예가 음성(52.8%)이었다. 이와 같은 판정 기준은 Xu<sup>18</sup>에 의해 제시된 방법으로 이러한 판정기준을 사용한 여러 종양에서 Western blot이나 Rb 유전자좌에서의 소실에 의한 Rb 유전자의 비활성의 검출과 면역조직화학적 방법에 의한 Rb 음성종양사이에 우수한 연관성(excellent correlation)이 보고된 바 있다<sup>33</sup>. 그러나 본 연구에서는 유전자 수준에서의 Rb 유전자 검사가 병행되지는 않았다. 지금까지의 연구에 따르면 면역조직화학적 Rb 유전자 비활성상태를 검출하는데 가장 민감한 검사 중의 하나로 인정되고 있는데 Reissmann 등<sup>33</sup>이 219예의 비소세포폐암에서 실시한 DNA, mRNA 그리고 단백질 수준에서의 Rb 유전자 불활성화에 대한 연구 결과에 따르면 Southern blot에서는 2예(0.9%), Northern blot에서는 22예(10.0%)의 Rb 유전자 불활성화가 검출되었고 면역조직화학적 방법이 실시 가능한 163예 중 53예(32.5%)에서 소실 혹은 변화된 Rb 단백질 발현을 보였다. 또한 이전에 실시한 여러 연구자들의 연구에서도 일치하는 결과들을 보였다<sup>28,29</sup>. 이러한 현상은 Rb 유전자가 비교적 크고 복잡한 구조를 가지고 있으며 Southern blot이나 Northern blot에서 단백질 발현에 이상을 일으킬 수 있는 작고 미세한 유전자 변화를 검출하는 것은 불가능하며 또한 비종양세포에 의해 희석되어 정상 세포에서 유래된 band나 transcript가 검출될 수 있기 때문으로 설명되어진다<sup>33</sup>. 본 연구의 대상 중 몇몇 증례에서는 종양세포는 물론 주위 정상세포에서도 Rb 단백질 발현이 전혀 안되는 경우가 있었다. 이는 여러가지 원인이 있을 수 있으나 가장 중요한 것은 조직 절편의 고정상태를 들 수 있다. Rb 단백질을 비롯한

여러 유전자 단백질의 발현에 대한 면역조직화학법에서 포르말린 고정시간이 중요한 영향을 미치는 것은 이미 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 예가 관찰될 때는 여러 개의 조직절편을 염색하여 정상세포가 Rb 단백질 발현이 되는 조직절편을 골라 결과를 판정하였다. 또 항원 노출을 증가시키기 위해 압력솥을 이용한 고열을 매개로 한 항원복구법을 사용하였다. 이는 기존의 방법에 비해 신속하고 경제적이며 결과에 대한 재현성도 높은 장점이 있다<sup>34</sup>. Rb 유전자는 핵인산화 단백질이므로 정상세포뿐 아니라 종양세포에서 Rb 양성인 경우는 핵염색이 되는데 본 예에서는 핵 뿐만 아니라 염색의 강도는 약했지만 세포질에서도 반응이 관찰되었다. 이는 아마도 본 예에서 항체의 희석배수가 비교적 고농도임에 기인하는 것으로도 생각된다. 대부분의 연구자들은 Rb 단백질이 핵에서 발현된다고 보고하고 있으나<sup>30,32,33</sup> Nork등<sup>35</sup>이 파라핀으로 포매한 조직에서 4가지 종류의 Rb 항체로 시행한 면역조직화학적 염색에서는 핵 뿐만 아니라 세포질에서도 강한 Rb 양성을 보임을 보고 하였다. 이들은 이러한 현상을 동결절편 조직의 경우와 비교하였을 때 파라핀으로 포매한 조직의 경우는 조직의 처치도중에 핵으로부터 세포질로 단백질 이동이 발생하여 일어나는 것으로 설명하고 있다. 그러나 이러한 결과만으로 세포질에서의 Rb 단백질 발현을 단정적으로 설명하기에는 불충분하며 앞으로 더 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

폐암에서 변화된 Rb 단백질 발현과 성별 및 환자의 나이와의 상관관계가 보고된 바는 없다. 본 예에서는 성별에 따른 Rb 단백질 발현 빈도는 통계학적으로 유의한 차이를 보여 여자에서 발생한 폐암에서 Rb 단백질 음성의 빈도가 높았으나( $p=0.045$ ) 환자의 나이에 따른 통계학적 차이는 없었다( $p=0.385$ ). 폐암에서 변화된 Rb 단백질 발현과 조직학적 형, 분화도 등과의 상관관계에 대하여 아직까지 확실히 밝혀진 바는 없다. 폐암의 조직학적 분류에 따른 Rb 단백질 발현의 변화는 보고자마다 다소 차이는 있는데 Reissmann등<sup>33</sup>의 연구에 따르면 편평세포암은 38%인데 비해 선암은 19%의 변화된 혹은 소실된 Rb 단백질 발현을 보이고, Xu등<sup>8</sup>은 편평세포암이 21%인데 반해 선암은 24%로 보고하였다. 본 연구에서는 편평세포암의 Rb 단백질 음성율은 38.1%, 선암에서는 73.9%로 선암에서 높게 나타났고 통계학적 유의성을 보였다( $p=0.012$ ). 그 외 다른 조직학적 형은 종례 수가 적어 통계학적 분석이 불가능하였다. 각각의 조직학적 형에서 분화도와 Rb 단백질 발

현과는 통계학적으로 유의성을 보이지 않았다.

폐암의 임상적 병기와 변화된 Rb 단백질 발현과는 통계학적으로 유의성을 보인다는 여러 연구결과가 이미 보고된 바가 있다<sup>8,18,30</sup>. 이들은 병기를 초기군과 후기군으로 나누었을 때 이들 두 군사이의 차이 뿐 아니라 초기군 내에서도 I기와 II기 사이에 차이가 있음을 보고하였다<sup>8</sup>. 이러한 결과는 비교적 병의 초기부터 Rb 유전자가 관여함을 시사해 주는 것이라 주장하고 있다. 그러나 Higashiyama등<sup>19</sup>의 연구에서는 Rb 단백질 발현과 병기와는 통계학적 유의성이 없음이 보고되어 이것에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 Rb 단백질 발현 빈도와 병기와는 통계학적 유의한 상관성을 보이지 않았다( $p=0.324$ ).

Xu등<sup>8</sup>은 101명의 초기군 비소세포 폐암 환자를 대상으로 5년 추적을 실시하여 평균생존기간을 구하였는데 Rb 양성은 32개월, Rb 음성은 18개월로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.007$ ). 본 연구에서는 대상 환자의 생존기간 산정은 본원에서 진단받은 시점을 기준으로 하였고 통계처리시 치료 방법에 의한 변수는 고려되지 않았고 또한 Rb 단백질 발현율과 병기와는 통계학적 유의성이 없음으로 병기에 대한 고려없이 생존율을 구하였다. 72명의 환자 중 7명은 추적이 불가능하였고 나머지 65명의 환자들에서도 추적기간이 짧아 Kaplan-Meier 생존확률곡선상에서 평균생존기간을 구할 수는 없었다. 그러나 치료적 근치수술을 시행받은 환자에서 비교 가능한 2년 생존율은 Rb 양성이 65%, Rb 음성이 37%로 log-rank analysis상  $p$ 값이 0.025로 통계학적 유의한 차이를 보였다. 따라서 좀 더 큰 표본에 대한 장기간의 코호트 연구가 시행된다면 Rb 유전자와 임상병리학적 요소들과의 구체적인 확실한 연관성이 규명되어, Rb 유전자가 폐암의 예후와 관련된 중요한 인자임을 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

1990년 3월부터 1995년 8월까지 동아대학교 병원에서 원발성 폐암으로 진단받고 편측 폐절제술이나 폐엽절제술을 시행받은 72명을 대상으로 폐암조직에서 단클론의 항 Rb 단백질 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색으로 Rb 유전자 단백질의 발현 양상을 관찰하였다. 폐암의 조직학적 형태, 분화도, 병기 그리고 2년 생존율과 Rb 단백질 발현 양상과의 상관관계를 고찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.



1) 전체 72예의 폐암 조직 중 Rb 단백질은 34예 (47.2%)에서 양성을, 38예 (52.8%)에서 음성을 보였다.

2) 편평세포암 42예 중 16예(38.1%)에서, 선암 23예 중 17예(73.9%)에서 Rb 음성이었다. 미분화성 대세포암 3예 중 1예(33.3%)에서, 소세포암 2예 중 2예 (100%)에서, 편평상피선암과 비정형유암종 각각 1예에서는 모두 Rb 음성을 보였다. 통계분석이 가능한 편평세포암과 선암을 비교하였을 때 선암이 편평세포암에 비해 Rb 음성율이 높았고 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.012).

3) 폐암의 각 조직형의 분화도에 따른 Rb 단백질의 발현율은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

4) 폐암의 병기에 따른 Rb 단백질 발현은 초기군인 I기와 II기의 39예 중 18예 (47.4%), 그리고 후기군인 III기와 IV기의 33예 중 20예(52.6%)가 음성을 보여 양군에서 Rb 단백질 발현율은 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

5) Rb 단백질 발현 유무에 따른 2년 생존율은 Rb 양성인 경우는 65%, Rb 음성인 경우는 37%로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.025).

이상의 결과로 종양억제유전자 산물인 Rb 단백질의 발현이상인 원발성 폐암의 발생과 관련됨을 알 수 있었고 환자의 예후와도 관련된 인자임을 시사하는 소견을 제시하였다.

### 참 고 문 헌

- 통계청. 1993년 사인통계 결과 분석. 사인 원인 통계 연보. 14. 1994: 34-5.
- Mohsenifar Z. Epidemiology of lung cancer. Lung Biol Health Dis 1990; 44: 1-5.
- Frank AL. The epidemiology and etiology of lung cancer. Clin Chest Med 1982; 3: 219-28.
- Iggo R, Gaster K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335: 675-9.
- Dennis CQ, Ann GD, Carol LS, Herbert EW, Himanshu MD. Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. Cancer Res 1992; 52: 4828-31.
- Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Takahashi R. Role of the retinoblastoma gene in the inhibition & progression of human cancer. J Clin Invest 1990; 85: 988-93.
- Lee WH, Shew JY, Hong FD. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. Nature 1990; 329: 642-5.
- Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst 1994; 86: 695-6.
- Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ. American joint committee on cancer. Manual for staging of cancer. 4th. ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 115-22.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 1958; 53: 457-81.
- Skuse GR, Ludlow JW. Tumor suppressor genes in disease and therapy. Lancet 1994; 345: 902-6.
- Friend SH, Bernards R, Rogeli S. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 1986; 323: 643-6.
- Fung YKT, Murphree AL, T'Aag A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. Science 1987; 236: 1657-61.
- Lee WH, Bookstein R, Hong FD, Young LJ, Shew JY, Lee EYH. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. Science 1987; 235: 1394-9.
- Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. Cancer Res 1985; 45: 1437-43.
- Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma : clue for human oncogenesis. Science 1984; 223: 1028-33.
- Dunn JM, Phollips RA, Becker AJ, Galhe BL. Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. Science 1988; 241: 1797-800.
- Xu HJ. Altered retinoblastoma protein expression in human malignancies. Advances in Anatomic Pathology 1995; 2: 213-26.
- Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. Oncology 1994; 51: 544-51.
- Ali S, Barbara R, Brian A, et al. Retinoblastoma and p53 gene expression related to relapse and survival in human breast cancer: an immunohistochemical study. J Pathol 1992; 168: 23-8.
- Wang NP, To H, Lee WH, Lee EY-HP. Tumor suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells. Oncogenes 1993; 8: 279-88.

22. Logothetis CJ, Xu HJ, Benedict WF, et al. Altered expression of retinoblastoma protein & known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1256-61.
  23. Xu HJ, Cairns P, Hu SX, Knowles MA, Benedict WF. Loss of Rb protein expression in primary bladder cancer correlates with loss of heterozygosity at the RB locus and tumor progression. *Int J Cancer* 1993; 53: 781-4.
  24. Seki S, Kawakita N, Atsushi Y, et al. Expression of the retinoblastoma gene product in human hepatocellular carcinoma. *Human Pathol* 1995; 26: 366-74.
  25. Bookstein R, Rio P, Madreperia SA. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7762-6.
  26. Bun IW, Kanji I, Masao SS, Yoshihiko K, Takao Y. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3042-8.
  27. Reissman PT, Simon MA, Lee WH, Slamon DJ. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 1989; 4: 439-43.
  28. Yokota J, Alkiyama T, Fung YK. Altered expression of the retinoblastoma gene in small cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988; 3: 471-5.
  29. Harbour JW, Lai SL, Whang PJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in small cell lung carcinoma. *Science* 1988; 241: 353-7.
  30. Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, Moore GE, Benedict WF. Absence of retinoblastoma protein expression in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 2735-9.
  31. Ookawa K, Shiseki M, Takahashi R. Reconstruction of the RB gene suppresses the growth of small cell carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene* 1993; 8: 2175-81.
  32. Xu HJ, Hu SX, Benedict WF. Lack of nuclear RB protein staining in G0/middle G1 cells: correlation to changes in total RB protein level. *Oncogene* 1991; 6: 1139-44.
  33. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1913-9.
  34. Andrew JN, Suzanne J, Patricia Y. Brief, high temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* 1994; 173: 371-9.
  35. Nork TM, Millecchia LL, Poulsen G. Immunolocalization of the retinoblastoma protein in the human eye and in retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2682-92.
-