

## 자궁 내막 증식증 및 선암종의 p53 변이

—면역조직화학 연구 및 PCR-SSCP 분석—

을지중앙의료원 노원병원\* 및 한양대학교 의과대학 병리학교실

김은경\* · 박찬금 · 공 구 · 박문향 · 이종달

### Alteration of p53 Tumor Suppressor Gene in Hyperplastic Lesions and Adenocarcinomas of Uterine Endometrium

—Immunohistochemistry and PCR-SSCP—

Eun Kyung Kim, M.D.\*, Chan Kum Park, M.D., Gu Kong, M.D.  
Moon Hyang Park, M.D. and Jung Dal Lee, M.D.

Departments of Pathology, Nowon Hospital, Eulji University\* and  
College of Medicine, Hanyang University

To investigate the role of the p53 gene in the development of endometrial adenocarcinoma and to study the relation between alteration of the p53 gene and histologic grade, the author studied the alteration of the p53 gene in hyperplastic lesions and adenocarcinomas of the uterine endometrium. The study was carried out with immunohistochemical stain and PCR-SSCP. The materials included ten cases of endometrial hyperplasia (five simple and five atypical complex) and 18 cases of endometrial adenocarcinoma. Overexpression of the p53 protein were found in one of five atypical complex hyperplasias (20%) and 11 of 18 adenocarcinomas (61.1%). The intensity of p53 overexpression appeared to have increasing tendency with higher histologic grade of adenocarcinomas. Among the 11 cases of adenocarcinoma that overexpressed p53 protein, five cases (45.5%) were found to have mutations by PCR-SSCP. One was grade I (20%), two were grade II (25%), and two were grade III (40%). The sites of mutation were three exon 8, one exon 5, and one exon 6. In conclusion, alteration of the p53 gene may play a role in the development of endometrial adenocarcinoma and appears to occur as a late event in carcinogenesis. However, inactivation of the p53 gene in early stage of tumor development cannot be excluded. (Korean J Pathol 1997; 31: 662~671)

**Key Words:** p53 gene, Uterine endometrium, Hyperplasia, Adenocarcinoma, PCR-SSCP

접 수: 1997년 1월 20일, 게재승인: 1997년 5월 3일  
주 소: 서울시 노원구 하계 1동 280-1, 우편번호 139-231  
노원을지병원 해부병리과, 김은경

## 서 론

분자생물학적 기법이 발달하면서 최근에는 종양 발생을 유도하는 유전자에 초점을 두고 종양발생을 연구하고 있다. 종양발생에 관여하는 유전자로는 종양 유전자와 종양억제 유전자 두 종류가 있는데 종양 유전자의 증폭이나 활성화 또는 종양억제 유전자의 비활성에 의해 종양이 발생한다고 알려져 있다<sup>1</sup>. p53 유전자는 종양억제 유전자의 하나로 17번 염색체의 단완에 위치하며 세포증식을 조절하는 역할을 하고 있다<sup>2</sup>. 즉 세포주기중 G1기에서 세포성장을 중지시키며<sup>3</sup> S기로 넘어가는 세포의 수를 조절한다<sup>4</sup>. p53 유전자의 돌연변이나 대립인자의 소실이 발생한 세포는 정상적인 세포증식 조절기능이 상실되어 클론성 확대가 일어나며 종양으로 발전하게 된다<sup>2,5,6</sup>. p53 유전자의 돌연변이는 인체 암종에서 가장 흔히 관찰되는 유전자 이상<sup>7</sup>으로 알려져 있고 유방<sup>8,9</sup>, 대장<sup>3</sup>, 폐<sup>10</sup>, 방광<sup>11</sup> 및 간<sup>12</sup>의 암종과 뇌종양<sup>13</sup>에서 그 역할이 밝혀져 있다. 가장 흔한 p53 유전자의 변이는 단일 염기 과오돌연변이(single base missense mutation)<sup>7,13</sup>로 대립인자 소실과 동반되어 변이된 단백질(mutant protein)만을 합성하게 된다<sup>11</sup>. 그외에 소실(deletion), 삽입(insertion)등의 이상도 인체의 여러 암종에서 보고되고 있다<sup>14</sup>.

자궁 내막 선암종은 폐경기 전후에 발생하는 암종으로 서양뿐만 아니라 동양에서도 그 발생이 점차 늘어가는 추세로 일본에서는 여성 요로생식계 종양중 두번째의 순위를 차지하고 있다<sup>15</sup>. 한국에서 자궁 내막 선암종의 빈도도 최근 평균 수명의 연장, 생활의 서구화와 호르몬 영향등으로 꾸준히 높아지고 있다. 자궁 내막 선암종의 발생과 관계가 있다고 알려진 요인은 외인성 에스트로겐, 비만, 임신 경력이 없는 사람, 초경이 빠르거나 폐경이 늦은 사람등 오랜 기간 에스트로겐의 영향을 받은 경우이다. 일부 자궁 내막유형 암종(endometrioid type)의 경우는 비정형성 복합증식증이 암 전구병변이라고 추정되고 있지만 어느 요인이 암종으로의 진행에 관여하는지는 밝혀져 있지 않다. 자궁 내막 선암종이 여성 생식계의 흔한 종양임에도 불구하고 다른 장기의 암종에 비해 발암 과정과 연관된 분자유전학적인 연구는 미흡한 상태이다. 현재까지 자궁내막 선암종에서 연구된 종양 유전자는 K-ras<sup>16-18</sup>, Her-2/neu<sup>19</sup>등이고 종양억제 유전자로는 p53 유전자가 활발히 연구되고 있다<sup>20-22</sup>. 저자는 p53 단백질에 대한 면역조직

화학 염색과 종합효소 연쇄반응-단일가닥 구조 다형(PCR-SSCP)<sup>23</sup>을 이용하여 자궁 내막 선암종 및 전구 병변으로 생각되는 비정형성 복합 증식증을 포함한 자궁 내막 증식증에서 p53 유전자의 변이를 조사하고, 암종에서의 조직학적 분화도와 변이와의 연관성을 알아보고 자궁 내막 선암종 발암 과정에서의 p53 유전자의 변이가 미치는 역할을 추정해 보고자 이 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

1987년부터 1996년까지 한양대학교 의과대학 병리학교실에서 진단된 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 자궁 내막 조직 28예를 연구대상으로 하였다. 이들중 10예는 자궁 내막 증식증(단순 증식증 5예, 비정형성 복합 증식증 5예), 18예는 자궁 내막 선암종이었다. 대조군으로 5예의 정상 자궁 내막 조직(증식기 2예, 분비기 2예, 위축 1예)을 이용하였다. 자궁 내막 선암종의 경우는 소파술로 얻은 표본을 선택하였는데 그 이유는 첫째, 자궁 적출술에 비해 고정이 잘되어 괴사등의 변성이 적고 둘째, 근층이나 혈관등 다른 정상 조직이 적게 포함되어 비교적 순수한 자궁 내막 조직을 얻을 수 있고 셋째, 조각으로 구성된 조직이므로 면역조직화학 염색후 암종과 비정형성 복합 증식증 부위를 구분하기 쉽기 때문이었다. 암종은 조직학적으로 재검토하여 WHO 분류<sup>26</sup>에 따라 분류하였다. 5예는 고분화(grade I), 8예는 중등도 분화(grade II), 5예는 저분화(grade III)였다. 18예는 모두 자궁 내막유형 선암종이었다. 자궁 내막 선암종의 전암성 병변으로 생각되는 비정형성 복합 증식증이 10예에서 종양과 함께 관찰되었다. 자궁 내막 선암종 18예는 모두 수술전 화학요법이나 방사선 치료를 받지 않았다.

### 2. p53 단백질의 면역조직화학 염색

자연형(wild type)과 변이형(mutant type) p53 단백을 동시에 검출할 수 있는 p53-D07 마우스 단클론성 항체(Novocastra, Newcastle, United Kingdom, 희석 배수 1 : 100)를 이용하여 통상적인avidin-biotin immunoperoxidase complex(ABC) 염색법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다.

### 3. 종합효소 연쇄반응-단일가닥 구조 다형(PCR-SSCP)

#### 1) DNA 추출: DNA 추출은 QIAamp Tissue Kit

Table 1. Primers used for PCR-SSCP analysis of p53 gene

Primer	Sequence	Product size(bp)
Exon 5, 6 (outer)	5'-TTC CTC TTC CTG CAG TACTC-3' 5'-AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG-3'	408
Exon 5 (inner)	5'-GTA CTC CCC TGC CCT CAA CA-3' 5'-CTC ACC ATC GCT ATC TGA GCA-3'	190
Exon 6 (inner)	5'-TTG CTC TTA GGT CTG GCC CC-3' 5'-CAG ACC TCA GGC GGC TCA TA-3'	126
Exon 7	5'-TAG GTT GGC TCT GAC TGT ACC-3' 5'-TGA CTT GGA GTC TTC CAG TGT-3'	117
Exon 8 (outer)	5'-CCT ATC CTG AGT AGT GGT AA-3' 5'-CCA AGA CTT AGT ACC TGA AG-3'	330
Exon 8 (inner)	5'-AGT GGT AAT CTA CTG GAC GG-3' 5'-ACC TCG CTT AGT GCT CCC TG-3'	138

(QIAGEN, Germany)를 이용하였다. 6  $\mu$ m의 파라핀 절편 4~5 조각을 1.5 ml 튜브에 담고 xylene 1,000  $\mu$ l를 넣어 파라핀을 용해시켰다. xylene을 제거한 후 침전물을 공기중에서 건조시키고 조직 25 mg당 kit의 ATL buffer 180  $\mu$ l와 proteinase K(20  $\mu$ g/ml) 20  $\mu$ l을 넣고 55°C에서 조직이 용해될 때까지 방치하였다. AL buffer 200  $\mu$ l를 넣고 진탕한 후 70°C에서 10분간 방치하고 100% 에탄올 210  $\mu$ l을 넣었다. 2 ml 튜브내의 QIAamp spin column에 혼합물을 넣고 1분 동안 8,000rpm으로 원심분리하였다. Spin column을 새 튜브에 옮긴 후 AE buffer 200  $\mu$ l를 넣고 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 UV spectrometer를 이용하여 DNA 농도와 A260/A280의 비를 측정하였다. A260/A280비가 1.7 이상인 경우를 사용하였으며 그 이하일 경우 위의 과정을 반복하여 정제하였다. 표본의 DNA 농도를 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l로 일정하게 맞추었다.

## 2) P53 종양억제 유전자의 exon별 PCR-SSCP:

(1) 시발체(primer) 합성: p53 유전자의 exon 5, 6 7 및 8의 염기서열의 변이를 PCR-SSCP 방법으로 검색하였다. 각 exon의 시발체는 Buchman등<sup>24</sup>과 Fujita 등<sup>25</sup>의 염기서열을 참고하여 미국 Biosynthesis 사에 의뢰하여 합성하였다. 각 exon별 primer의 염기서열

및 증합효소 연쇄반응 산물의 크기는 Table 1에 기술되어있다.

(2) p53 exon별 PCR 반응: 각각의 PCR 반응은 총량을 10  $\mu$ l로 하였다. 0.2 ml microtube에 1  $\mu$ l 10X buffer, 0.6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>(최종농도 1.5 mM), 시발체 각각 2.5 pmol, dNTP(1 mM each) 0.25  $\mu$ l, Taq polymerase(5 unit/ $\mu$ l, Takara, Japan) 0.05  $\mu$ l, 표본 DNA (0.1  $\mu$ l/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, <sup>32</sup>P- $\alpha$ -dCTP(10mCi/ml, 3000 Ci/ mmol, Amersham) 0.1  $\mu$ l의 혼합물에 증류수를 첨가하여 10  $\mu$ l가 되게 하고 DNA thermal cycler(Perkin -Elmer Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.)를 이용하여 DNA를 증폭시켰다.

① Exon 5와 exon 6의 반응 조건. Exon 5와 6에 대한 outer PCR후에 각각의 exon에 대하여 inner PCR을 시행하였다.

Exon 5~6의 outer PCR 조건은 95°C에서 5분 가열 후, 95°C 1분, 60°C 1분을 40회 시행 후 72°C에서 10분간 연장하였다. Exon 5의 inner PCR은 outer PCR의 반응 산물 1  $\mu$ l를 기질로 하였으며 조건은 95°C에서 5분간 가열 후, 95°C 1분, 58°C 1분에서 35회 시행 후 72°C에서 10분간 연장하였다. Exon 6의 inner PCR 조건은 exon 5의 58°C 대신 62°C에서 시행한 것외에 다른 조건은 동일하였다.

② **Exon 7의 반응 조건.** Exon 7에 대한 outer PCR은 95°C에서 5분간 가열 후, 95°C 1분, 62°C 1분에서 35회 시행 후 72°C에서 10분간 연장하였다. Inner PCR은 outer PCR의 반응 산물 1 μl를 채취하여 outer PCR과 같은 조건으로 시행하였다.

③ **Exon 8의 PCR 반응 조건.** Exon 8에 대한 outer PCR은 95°C에서 1분간 가열 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분을 40회 반복 후 72°C에서 10분간 연장하였다. Inner PCR은 outer PCR의 반응 산물 1 μl를 채취하여 55°C 대신 57°C에서 1분간 반응시켰으며 나머지 과정은 outer PCR과 같은 방법으로 시행하였다.

(3) **전기영동;** PCR 반응 산물 2 μl에 8 μl의 formamide dye(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 95°C에서 5분간 가열 후 얼음에 급속 냉각상태로 5% glycerol이 포함된 8% polyacrylamide gel에 넣고 25°C에서 30W 정전압으로 5~6시간동안 전기영동하였다. 변성시키지 않은 표본(non-denaturation)은 PCR 반응 산물 2 μl에 loading dye 4 μl와 물 4 μl를 넣어 만들고 젤의 첫째 칸에 넣어 전기영동함으로 대조군으로 사용하였다. 전기영동 후 젤을 여과종이에 옮겨 건조시킨후 -70°C에서 12~16시간동안 Agfa Curix XP 필름에 자가방사시켜 돌연변이 유무를 검색하였다.

## 결 과

### 1. p53 단백질의 과발현

p53 단백질의 과발현은 Table 2에 요약하였다. p53 단백질의 면역조직화학 염색의 판정은 세포의 핵에 염색된 경우를 양성으로 인정하였다. 광학현미경하에서 모든 세포가 음성이면 음성(-), 25%미만에서 양성인 경우를 약양성(+), 25~75%의 세포가 양성인 경우를 중등도 양성(++), 75% 이상의 세포가 양성인 경우를 강양성(+++)으로 구분하여 발현정도를 조사하였다. p53 단백질은 비정형성 복합 증식증 5예중 1예(20%)에서 부분적으로 약양성(+)로 발현되었고(Fig. 1) 암종과 함께 비정형성 복합 증식증이 관찰되었던 10예중에서는 2예(20%)가 증식증 부위에 p53 단백질의 과발현이 관찰되었다. 암종에서는 18예중 11예(61.1%)(Fig. 2)에서 p53 단백질이 과발현되었는데 조직학적 분화도에 따른 발현을 보면 고분화는 5예중 2예(40%)가 약양성이었고 중등도 분화는 8예중 5예(63%)로 약양성 3예와 중등도 양성 2예였다. 그리고 저분화는 5예중 4예(80%)로 약양성 2예, 중등도 양성 1예, 강양성 1예였다. 즉, 분화도가 낮을수록 p53 단백질의 과발현이 많이 관찰되고 발현정도도 증가되는 경향이 있었다. 그러나 통계학적 의의는 없었다(p>0.05). 주변의 간질세포나 혈관 내피세포등에는 염색되지 않았다. 단순 증식증 및 정상 자궁 내막 조직에서도 모두 음성이었다.

Table 2. Results of immunohistochemical stain for p53 protein

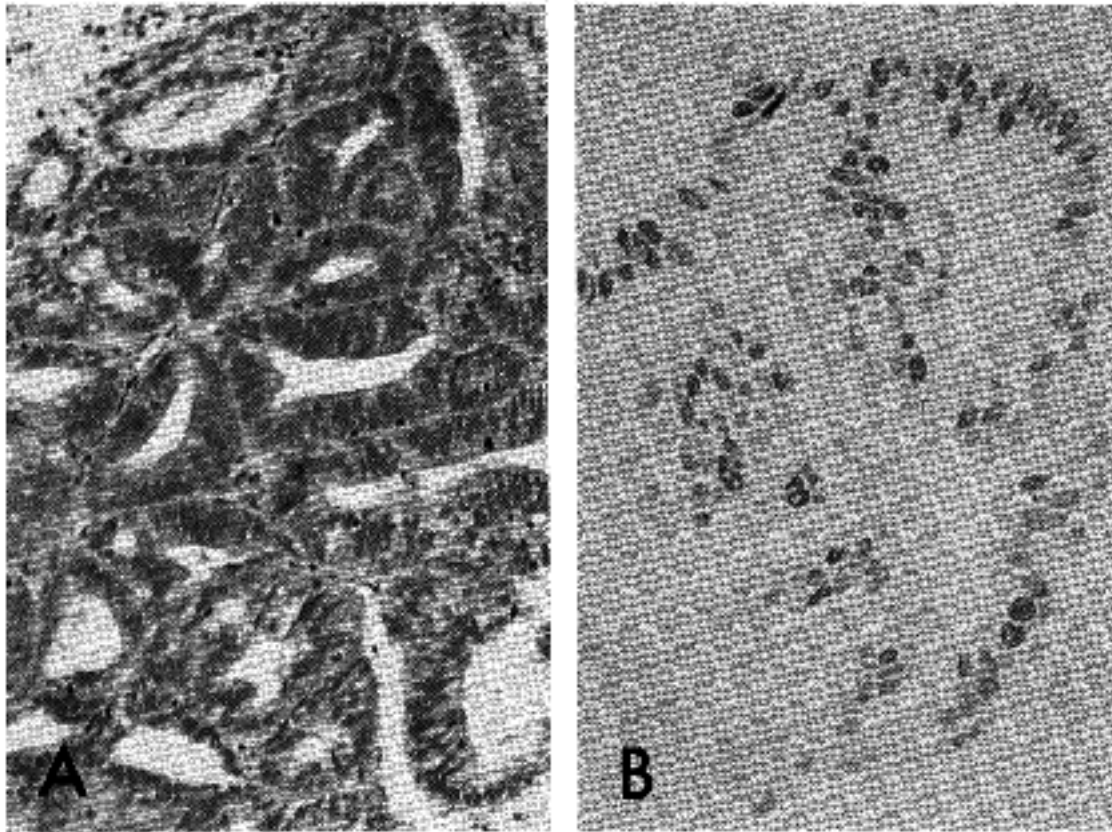
	Total case no.	p53			Positive rate(%)
		(+)	(++)	(+++)	
Simple hyperplasia	5	0	0	0	0%
Atypical hyperplasia	15	3	0	0	20%
Endometrial carcinoma	18	7	3	1	61.1%
<i>grade I</i>	5	2	0	0	40%
<i>II</i>	8	3	2	0	63%
<i>III</i>	5	2	1	1	80%

(+); positive less than 25% of tumor cells

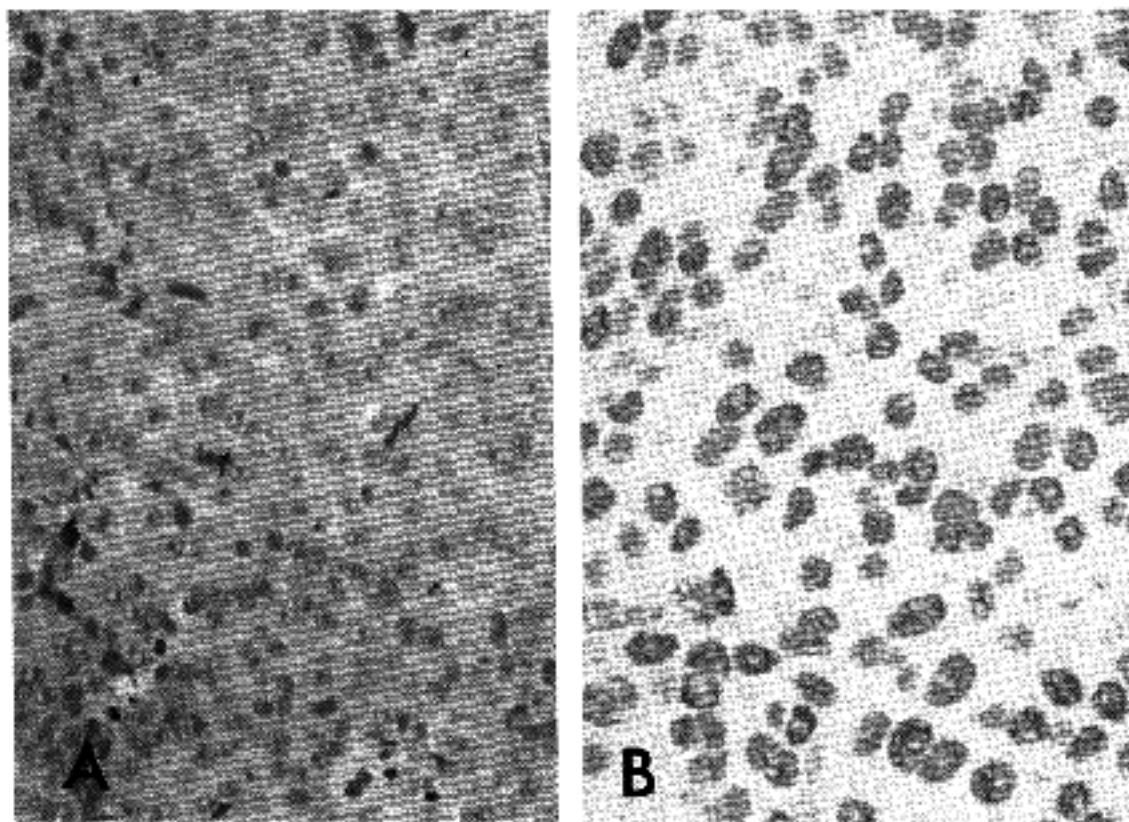
(++); positive in 25-75% of tumor cells

(+++); positive over than 75% of tumor cells





**Fig. 1.** Overexpression of p53 protein in atypical complex endometrial hyperplasia. (A) H & E stain (B); Immunohistochemical stain reveals focal nuclear staining( $\times 400$ ).



**Fig. 2.** Overexpression of p53 protein in endometrial adenocarcinoma, grade III. (A) H&E stain(B); Immunohistochemical stain shows strong nuclear staining in most of the tumor cells( $\times 400$ ).

## 2. p53 유전자의 돌연변이

PCR에 의하여 원하는 부위의 DNA 증폭을 2% agarose gel에서 확인하고(Fig. 3) SSCP로 분석한 결과는 표 3에 요약하였다. 자궁 내막 선암증 18예중 5예(27.8%)에서 DNA 절편의 이동변화가 관찰되어 p53 유전자의 돌연변이가 증명되었다. 그 위치는

exon 5가 1예, exon 6이 1예(Fig. 4) 그리고 exon 8이 3예(Fig. 5)였다. 조직학적 분화도에 따르면 고분화 1예(1/5, 20%), 중등도 분화 2예(2/8, 25%) 그리고 저분화 2예(2/5, 40%)로 분화도가 낮을수록 돌연변이가 자주 관찰되었다. 비정형성 복합 증식증, 단순 증식증 및 정상 자궁 내막 조직에서는 돌연변이가 관찰되지 않았다.

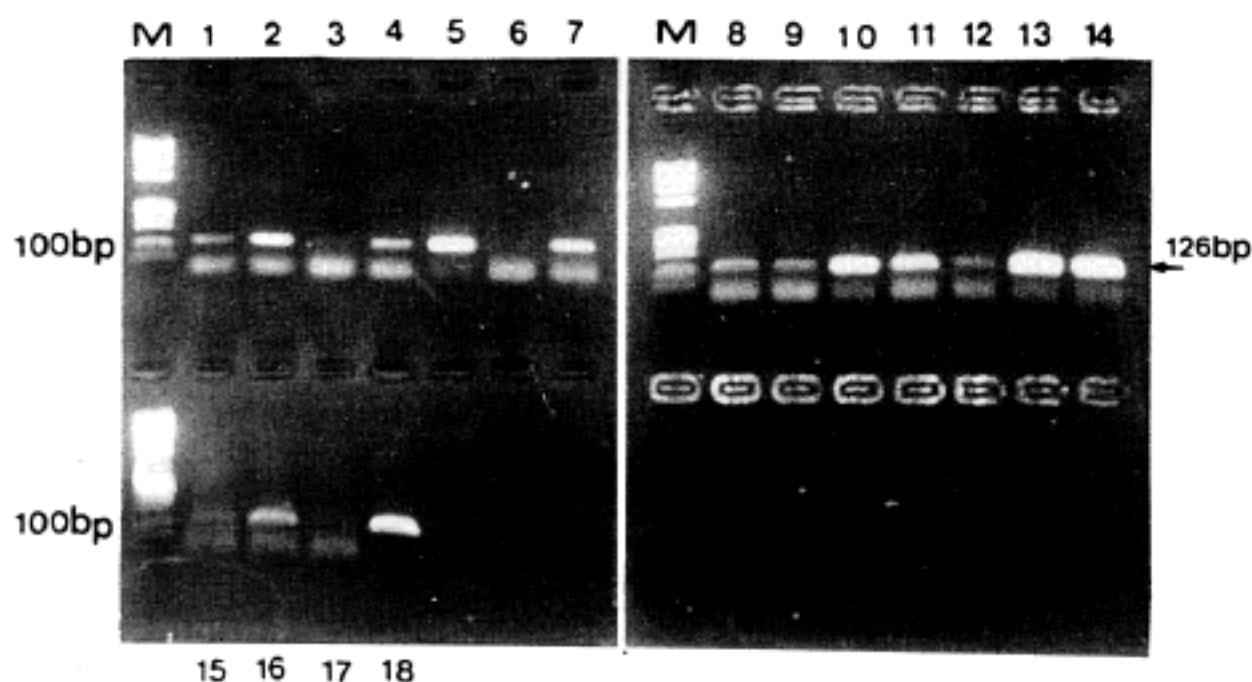


Fig. 3. Amplification of exon 6 of p53 gene by polymerase chain reaction. Electrophoresis in 2% agarose gel shows positive bands in 126 base pairs. \*M; DNA molecular weight size marker.

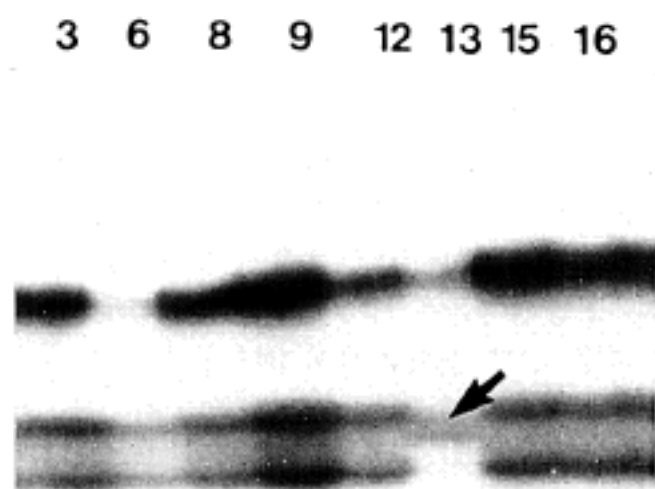


Fig. 4. PCR-SSCP analysis of exon 6 of p53 gene. Case number 13 shows a mobility shift band (arrow).

### 3. p53 단백질의 과발현과 p53 유전자 돌연변이와의 상관관계

p53 단백질이 과발현되었던 11예의 자궁 내막 선암 종종 돌연변이가 확인된 예는 5예(45.5%)였다. 이들의 p53 단백질의 발현강도는 약양성 4예와 강양성 1예로 유전자의 돌연변이와 p53 단백질의 과발현 정도는 연관성이 없었으나 돌연변이가 있는 경우는 반

Table 3. Mutation of p53 gene in endometrial carcinomas

Case no.	Histologic grade	Overexpression of p53	Mutation site
2	I	+	-
3	I	+	+, exon 8
4	II	+	-
5	II	+	+, exon 8
6	II	++	-
8	II	++	-
10	II	+	+, exon 5
11	III	+	+, exon 8
12	III	+	-
13	III	+++	+, exon 6
15	III	++	-

드시 p53 단백질의 과발현이 관찰되는 것으로 확인되었다.

### 고 찰

인체 암종의 발생과 가장 밀접하게 관련이 있다고 알려진 p53 종양억제 유전자의 변이는 그동안 대장<sup>3</sup>, 폐<sup>10</sup>, 유방<sup>8,9</sup> 등 여러 장기의 암종에서 활발하

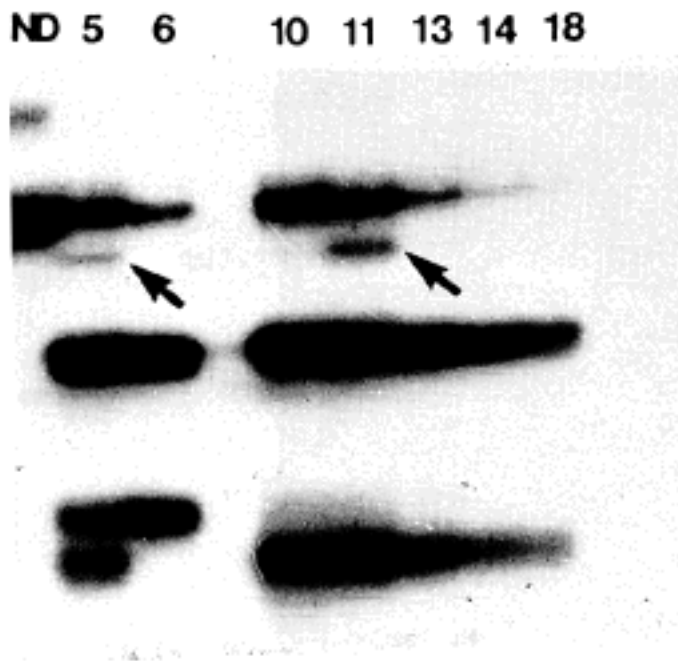


Fig. 5. PCR-SSCP analysis of exon 8 of p53 gene. Case number 5 and 11 show mobility shift bands(arrows). \*ND; non-denaturation sample.

게 연구되었다. 자궁 내막 선암종의 경우 p53의 변이는 종양 유전자인 K-ras의 활성화는 독립적으로 일어나며 ras가 발암과정의 초기에 작용하는 것과 반대로 발암 과정의 후반기에 작용할 것으로 추정되고 있다<sup>22,27</sup>. 이와같이 추정되는 이유는 암종의 병기가 높고 자궁외로 침윤하는 정도가 높을수록 p53 유전자의 과발현이 빈번히 관찰되기 때문이다. 자궁 내막 선암종에서의 p53 유전자의 변이를 찾는 방법으로는 면역조직화학 염색으로 변이된 p53 유전자의 산물인 p53 단백을 증명<sup>21</sup>하거나 분자유전학적인 방법으로 변이된 유전자를 찾고 유전자 배열을 확인하는 두가지 방법이 있다.

본 연구에서 p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색 결과 종양에서는 종양세포의 핵에 염색이 되었지만 주변 간질세포나 정상 자궁 내막 조직은 음성이었다. 즉 정상 조직에 존재하는 자연형의 p53 단백질은 반감기가 짧고 검출되지 않을만큼 소량이어서 면역조직화학 염색으로 인지되지 않지만 종양세포에는 변이형 p53 단백질이 존재하므로 면역조직화학 염색에서 과발현되는 것이다. 본 연구 결과 자궁 내막 선암종에서 p53 단백질의 과발현은 61.1%에서 관찰되어 Kohler등<sup>21</sup>의 20%, Ambros등<sup>28</sup>의 39%, 그리고 Jiko등<sup>29</sup>의 48%보다 높은 빈도로 관찰되었다. 그리고 조직학적 분화도에 따른 양성률은 고분화 40%, 중등도 분화 63%, 저분화 80%로 분화도가 낮을수록 발현율이 증가하는 것으로 나타났다. 비정형성 자궁

내막 증식증은 자궁 내막 선암종의 전암단계로 생각되며 암종으로 발전할 가능성은 5~12%<sup>30</sup> 정도로 알려져 있지만 어느 요인이 침윤성 암종으로의 발전에 작용하는지는 밝혀져 있지 않아 임상에서 비정형성 증식증의 치료에 많은 어려움이 있었다. Enmoto등<sup>17,23</sup>은 비정형성 증식증에서 K-ras 종양 유전자와 p53 종양억제 유전자의 돌연변이가 각각 13%, 8%에서 관찰되었음을 보고하였다. 본 연구에서는 비정형성 증식증에서 돌연변이는 관찰되지 않았지만 면역조직화학 염색으로 p53 단백질의 과발현이 20%에서 관찰되었다. 그러므로 p53 유전자의 변이는 전암단계인 비정형성 증식증에서도 일어날 수 있고 따라서 비정형성 증식증에서 p53 단백질의 과발현이 관찰된다면 이는 암종으로 발전할 가능성을 암시할 수 있으므로 향후 집중적인 추적관찰이 필요하다고 생각된다.

자궁 내막 선암종에서 PCR-SSCP 분석으로 p53 유전자의 돌연변이가 확인된 예는 p53 단백질의 과발현이 관찰된 11예중 5예(45.5%)로 그 위치는 exon 5와 6이 각각 1예 그리고 exon 8이 3예였다. 자궁 내막 선암종의 돌연변이율은 27.8%(18예중 5예)였다. 조직학적 분화도에 따라 보면 고분화 40%, 중등도 분화 63% 그리고 저분화 80%로 p53 단백질의 과발현과 마찬가지로 분화도가 낮을수록 돌연변이가 자주 관찰되었다. 자궁 내막 선암종에서 관찰되는 p53 유전자의 돌연변이율은 연구자에 따라 조금씩 차이가 있다. 자궁 내막 선암종에서 p53 유전자의 돌연변이를 처음으로 밝힌 Okamoto등<sup>30</sup>의 연구에 의하면 13%에서 p53 유전자의 돌연변이가 관찰되었고 그 이후에 14%<sup>31</sup>, 10%<sup>32</sup>, 23%<sup>27</sup>등으로 p53 유전자의 돌연변이가 발표되었다. 종양세포주(cell line)를 대상으로 하였던 Yaginuma와 Westphal<sup>33</sup>의 연구에서는 연구대상 6예 모두에서 돌연변이가 관찰되었다고 보고하고 있다. 이와같이 p53 유전자의 돌연변이율이 연구자에 따라 차이가 나는 이유는 여러 가지로 설명되고 있다. 첫째, 표본의 조작과정에 따라 변이율에 차이가 나는데 간질세포나 염증세포 혹은 혈관이 풍부하게 포함된 종양 조직은 변이된 유전자를 가진 세포의 비율이 상대적으로 낮아지므로 돌연변이가 검출되기 어렵게 된다. 둘째, 적용한 실험 방법의 민감도에 따라서도 유전자 돌연변이의 검출에 영향을 받는다. PCR-SSCP 분석법은 간단하고 200bp 이하의 작은 PCR 산물에서도 하나의 염기 변화를 찾을 수 있는 매우 민감한 방법이다<sup>23</sup>. 그러나 돌연변이의 위치가 증폭시키는 부위에 있지 않다면

PCR-SSCP 분석에서 DNA 분절의 이동변화가 나타나지 않으므로 PCR-SSCP 분석만으로 돌연변이가 없다고 장담할 수는 없다<sup>34</sup>. 셋째, PCR-SSCP 분석에 영향을 주는 또 다른 중요한 요인은 DNA의 크기이다. Sheffield등<sup>35</sup>은 마우스 글로불린 유전자(mouse globulin gene)에서 변이를 찾을 수 있는 가장 적절한 크기는 150bp라고 밝히고 분절의 크기가 클수록 검출율은 낮아진다고 보고하고 있다.

p53 단백질의 과발현과 유전자 돌연변이의 관계를 보면 본 연구 결과 p53 단백질의 과발현이 관찰된 11예의 자궁내막 선암종중 5예(45.5%)에서 PCR-SSCP 분석에 의하여 돌연변이를 확인할 수 있었다. 이와 같이 p53 단백질의 과발현과 유전자 돌연변이가 일치하지 않는 이유는 우선 PCR은 선택된 부위만을 기하급수적으로 증폭시키므로 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서 얻은 DNA의 원하는 부위가 손상되었다면 돌연변이가 검출되지 않을 수 있다. 두번째로는 p53 유전자의 돌연변이가 없어도 변이형 단백질 특이항체(mutant-specific antibody)를 이용한 면역조직화학 염색에서 p53 단백질이 발현되기도 하는데 이는 Zhang등<sup>36</sup>이 주장한 바와 같이 자연형 p53 단백질이 '안정한 구조(mutant or altered conformation)'로 변형되었기 때문일 수도 있다.

본 연구에서 p53 단백질의 과발현이나 유전자의 돌연변이가 분화가 낮은 선암종에서 더 자주 관찰된 점은 p53 유전자의 변이가 종양발생 과정의 후반기에 작용할 것이라는 이전의 학설을 뒷받침하는 것이지만 p53 단백질의 과발현이 암종의 전구병변인 비정형성 증식증의 20%에서 관찰된 사실은 p53 유전자의 변이가 발암 과정의 초기에도 일어날 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 현재 비정형성 증식증이 암종으로 발전하는데 작용하는 요인이 정확히 밝혀져 있지 않아 치료에 어려움이 많은 실정으므로 비정형성 증식증에서의 p53유전자의 역할이 더욱 연구되어야 할 것이다.

## 결 론

자궁 내막 선암종의 발암과정중 p53 유전자의 역할을 규명하기 위하여 자궁 내막 증식증 10예(단순 증식증 5예, 비정형성 복합 증식증 5예) 및 자궁 내막 선암종 18예등 총 28예와 대조군으로 정상 자궁 내막 조직 5예를 대상으로 p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색과 PCR-SSCP 분석을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) p53 단백질의 면역조직화학 염색 결과 비정형성 복합 증식증 15예중 3예(20%)에서 과발현되었다. 자궁 내막 선암종에서는 18예중 11예(61.1%)에서 과발현되었는데 고분화는 5예중 2예(40%), 중등도 분화는 8예중 5예(63%), 저분화는 5예중 4예(80%)였다. 발현정도 및 발현율은 자궁 내막 선암종의 조직학적 분화가 낮을수록 증가되었으나 통계학적인 의의는 없었다( $p>0.05$ ). 단순 자궁 내막 증식증과 종양 주변의 혈관내피세포나 간질세포, 그리고 정상 자궁 내막 조직에서는 p53 단백질이 발현되지 않았다.

2) p53 유전자의 돌연변이는 자궁 내막 선암종에서만 18예중 5예(27.8%)에서 관찰되었는데 고분화는 5예중 1예(20%), 중등도 분화는 8예중 2예(25%), 저분화는 5예중 2예(40%)로 조직학적 분화가 낮을수록 더 자주 관찰되었다. 그러나 통계학적인 의의는 없었다( $p>0.05$ ). 돌연변이의 위치는 exon 8이 3예, exon 5와 exon 6이 각각 1예였다. 단순 및 비정형성 복합 증식증과 정상 자궁 내막 조직에서는 p53 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않았다.

3) p53 유전자의 돌연변이는 p53 단백질의 과발현이 관찰된 11예의 자궁 내막 선암종중 5예(45.5%)에서만 확인되어, p53 유전자의 돌연변이가 있으면 그 산물인 p53 단백을 면역조직화학 염색으로 관찰할 수 있지만 p53 단백질의 과발현이 나타나는 모든 예에서 돌연변이를 증명할 수 있는 것은 아니었다.

p53 유전자의 돌연변이는 자궁 내막 선암종의 발암 과정에 한 역할을 담당하며 종양의 분화가 낮을수록 자주 관찰되는 점으로 미루어 보아 자궁 내막 선암종의 발생과정의 후기에 작용할 것으로 추정된다. 그러나 비정형성 복합 증식증의 약 20%에서도 p53 단백질의 과발현이 관찰되기 때문에 초기 발암 과정에도 일부 작용할 것으로 생각된다. 또한 비정형성 복합 증식증에서 p53 단백질의 발현은 향후 자궁 내막 선암종으로 발전할 가능성을 암시하므로 이 병변에 대한 적극적인 추적 검사 및 새로운 치료 방침이 설정되어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Ponder B. Gene losses in human tumors. *Nature(Lond)* 1988; 335: 400-2.
2. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
3. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV,



- Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-5.
4. Diller K, Kassel J, Nelson CE, et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcoma. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5772-81.
  5. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-38.
  6. Sidransky D, Milckelsen T, Schwechheimer K. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
  7. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
  8. Barbareschi M, Leonardi E, Mauri FA, Serio G, Palma PD. p53 and c-erb-2 protein expression in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 408-18.
  9. Fridrichs K, Gluba S, Editmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993; 72: 3641-7.
  10. Chiba I, Takahashi T, Nau MM, et al. Mutations in the p53 are frequent in primary resected non-small cell lung cancer. Lung cancer study group. *Oncogene* 1990; 5: 1603-10.
  11. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; 250: 1576-80.
  12. Irene OL, Srivastava G, Chung LP, Tsang SWY, Matthew MT. Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in HongKong Chinese people. *Cancer* 1994; 74: 30-7.
  13. 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.
  14. Runnebaum IB, Tong XW, Meobius V, Heilmann V, Kieback DG, Kreienberg R. Multiplex PCR screening detects small p53 deletions and insertions in human ovarian cancer cell lines. *Hum Genet* 1994; 93: 620-4.
  15. Masubuchi K, Nemoto H, Masubuchi S Jr, Fujimoto I, Uchino S. Increasing incidence of endometrial carcinoma in Japan. *Gynecol Oncol* 1975; 3: 335-46.
  16. Long CA, O'brien T, Sanders M, Bard DS, Quirk JG. *Ras* oncogene is expressed in adenocarcinoma of the endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 1512-6.
  17. Enmoto T, Inoue M, Perantoni AO, Terakawa N, Tanizawa O, Rice JM. *K-ras* activation in neoplasm of the human female reproductive tract. *Cancer Res* 1990; 50: 6139-45.
  18. Boyd J, Risinger JJ. Analysis of oncogene alteration in human endometrial carcinoma: prevalence of *ras* mutations. *Mol Carcinogenesis* 1991; 4: 189-95.
  19. Berchuck A, Rodriguez G, Kinney RB, et al. Overexpression of Her-2/neu in endometrial carcinoma is associated with advanced stage disease. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 15-21.
  20. Okamoto A, Sameshima Y, Yamada Y, et al. Allelic loss on chromosome 17p and p53 mutations in human endometrial carcinoma of the uterus. *Cancer Res* 1991; 51: 5632-6.
  21. Kohler MF, Berchuck A, Davidoff AM, et al. Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 1622-7.
  22. Enmoto T, Fujita M, Inoue M, et al. Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the *c-K-ras-2* protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Res* 1993; 53: 1883-8.
  23. Orita M, Suzuki Y, Seika T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
  24. Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 1988; 70: 245-52.
  25. Fujita M, Inoue M, Tanizawa S, Enmoto T. Alterations of the p53 gene in human primary cervical carcinoma with and without human papillomavirus infection. *Cancer Res* 1992; 52: 5323-8.
  26. Polsen HE, Taylor CW, Sobin LH. Histological typing of female genital tract tumors. In: International Histological Classification of Tumors. Vol 13. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1975; 63-73.
  27. Enmoto T, Fujita M, Inoue M, Nomura T, Shroyer KR. Alteration of the p53 tumor suppressor gene and activation of *c-K-ras-2* protooncogene in endometrial adenocarcinoma from Colorado. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 224-30.
  28. Ambros RA, Vigna PA, Figge J, et al. Observation on tumor and metastatic suppressor gene status in endometrial carcinoma with particular emphasis on p53. *Cancer* 1994; 73: 1686-92.
  29. Jiko K, Sassano H, Ito K, Ozawa N, Sato S, Yajima A. Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of p53 in human endometrial carcinoma of the uterus. *Anticancer Res* 1993; 13: 305-10.
  30. Disaia PJ, Creasman WT. Endometrial hyperplasia.

- Clinical Gynecologic Oncology, 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby Company, 1989; 133-60.
31. Naito M, Satake M, Sakai E. Detection of p53 mutations in human ovarian and endometrial cancers by polymerase chain reaction polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1030-6.
  32. Honda T, Kato H, Imamura T. Involvement of p53 gene mutations in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1993; 53: 963-7.
  33. Yaginuma Y, Westphal H. Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 6506-9.
  34. Hayashi K. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *GATA* 1992; 9: 73-89.
  35. Sheffield VC, Beck JS, Kweitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-32.
  36. Zhang W, Hu G, Estey E, Hester J, Deissertoh A. Altered conformation of the p53 protein in myeloid leukemia cells and mitogen stimulated normal cells. *Oncogene* 1992; 7: 1645-7.
-