

신세포암종에서 p53 암유전자 산물의 발현과 PCNA 지수 및 DNA 배수성에 관한 연구

서남대학교 의과대학 병리학교실 및 전남대학교 의과대학 병리학교실*

정 종 재 · 이 지 신* · 최 찬*

A Study on the Expression of p53 Oncogene Products, PCNA Index and DNA Ploidy in Renal Cell Carcinoma

Jong Jae Jung, M.D., Ji Shin Lee, M.D.* and Chan Choi, M.D.*

Department of Pathology, Seonam University College of Medicine,
Department of Pathology, Chonnam University Medical School*

Mutant p53 is associated with the advanced stages of some human tumor but there is a wide variation in the reported incidence of p53 mutation in renal cell carcinoma and its prognostic significances. We designed this study to assess the expression of p53 in renal cell carcinomas and to compare with the established prognostic factors. Immunoreactivity for p53 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were assessed in 44 cases of primary renal cell carcinoma, and flow cytometric analysis of DNA ploidy was performed in 37 of those cases. p53 protein was over-expressed in 16/44 (36.4%) renal cell carcinomas and 5 tumors had more than 10% immunoreactive tumor cells. The expression of p53 protein was positively related to nuclear grade ($p=0.007$) and PCNA index ($p=0.002$), but was independent of stage and DNA ploidy. In univariate survival analysis, stage ($p<0.001$), nuclear grade ($p=0.017$), DNA ploidy ($p=0.045$) and PCNA index ($p<0.001$) were significantly associated with patient survival. However, considering the stage, all of the last three factors had no prognostic influence. Cases showing strong positivity of p53 expression had worse prognosis than those with no or weak p53 expression, especially in early lesions (stage I,II) ($p<0.001$). (Korean J Pathol 1997; 31: 672~682)

Key Words: Renal cell carcinoma, p53, PCNA, DNA ploidy, Stage, Prognosis

접 수: 1996년 11월 29일, 게재승인: 1997년 5월 7일

주 소: 광주시 서구 마북동 120-1, 우편번호 506-157

남광병원 해부병리과, 정종재

이 연구는 전남대학교 의과학연구소 지원에 의해 이루어졌음.

서 론

신세포암종은 근위 세뇨관의 상피세포에서 기원하는 비교적 드문 종양으로 예후에 영향을 주는 인자로는 조직학적 분화도¹, 진단시의 병기², 핵등급³, DNA 함량⁴ 및 암세포의 증식능⁵ 등이 있으며 이중 병기가 가장 중요한 것으로 알려져 있다.

신세포암의 발암인자는 잘 알려져 있지 않으나 여러 환경적인 인자들이 관계하는 것으로 생각되며 이러한 발암과정에서 암유전자 활성화나 암억제 유전자의 비활성화가 어떤 역할을 하는지 확실히 밝혀져 있지 않다⁶. p53 유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하고 정상에서는 매우 낮게 발현되며 세포 성장과 분화를 억제하나⁷ 돌연변이형의 p53 유전자는 비정상 p53 단백질의 축적과 세포증식을 자극하는 것으로 알려져 있다⁸. 돌연변이형의 p53 단백질은 반감기가 길어서 세포내에 축적되므로 면역조직화학적 방법으로 핵내에 축적된 p53 단백을 검출해 낼 수 있고⁹ 면역조직화학적으로 p53 단백을 검출하는 것이 p53 유전자 돌연변이와 관련이 있다고 말할 수 있다¹⁰. 여러 종양에서 p53 유전자 돌연변이와 종양 발생 및 예후와의 관계에 관한 많은 연구¹¹⁻¹³가 있었다. 그러나 신세포암에서 p53 유전자 돌연변이의 발암과정 및 예후와의 관계에 대해서는 몇몇 연구들^{6,14-16}이 있지만 서로 상반된 보고를 하는 등 확실히 밝혀져 있지 않다.

종양의 발생과정 및 예후추정에서 세포의 증식능은 매우 중요하며 Celis 등¹⁷이 증식세포 핵항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)이 후기 G1 및 S기의 세포에 표현된다고 보고한 후 PCNA를 이용한 세포의 증식능을 구하여 예후와의 상관성을 규명하려는 많은 연구들이 있었다¹⁸.

이에 저자들은 신세포암종 44예를 대상으로 p53 유전자 단백질과 PCNA를 면역조직화학적 방법으로 검색하여 이들 양자간의 상관관계 및 DNA 배수성과 병기, 핵등급 등 기존의 신세포암의 예후인자들과의 상관관계를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

전남대학교병원에서 1981년부터 1994년까지 신세포암으로 신적출술을 받은 44예를 대상으로 환자의 연령, 성별, 조직학적 분류, 핵등급 및 병기, 추적검사 기간, 추적기간중 생존여부를 조사한 후 p53 유전자

산물과 PCNA에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하고 유식세포 측정기로 DNA 배수성을 측정하였다.

1. 병기와 핵등급

병기는 국제 암 연합(Union Internationale Contre Cancer, UICC)¹⁹의 TNM분류를 근거로 나누었으며 핵등급은 헤마톡실린-에오신 염색 절편을 이용하여 Fuhrman 등³의 기준에 따라 4등급으로 분류하였다.

2. 면역조직화학적 염색

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 파라핀괴를 3 μ m 두께로 박절하여 Probe-on 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 다음 검색에 이용하였다. 염색은 Probe-on 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 Microprobe Immuno/DNA 염색기(Biomed)를 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1 \times automation buffer(Biomed)에 3분간 부치시켰다. 1 \times automation buffer를 제거한 후 wild형과 mutant형을 모두 검출할 수 있는 p53 유전자 산물에 대한 항체(Novocastra)를 1 : 50으로 희석하여 20분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하였다. 이차 항체는 biotin이 부착된 universal secondary antibody를 이용하여 10분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 streptavidin-horseradish peroxidase(HRP)에 10분간 작용시켰다. 발색은 완충액으로 수세한 후 aminoethylcarbazole(AEC)를 이용하였으며 헤마톡실린으로 대조염색후 양성반응을 관찰하였다.

PCNA 염색은 1 : 50으로 희석한 일차항체 PC 10 (Dako)를 이용하였고 이차항체 부치 후 완충액으로 세척하고 avidin-alkaline phosphatase를 작용시키고 fast red TR salt로 발색시켰다. 염색의 전과정에 있어서 부치온도는 45 $^{\circ}$ C로 하였으며 음성대조군은 일차항체 대신 항체 희석액을 부치시켜 실험에 이용하였다.

결과판정은 가장 강한 양성반응을 보이는 부위를 골라 1000개의 종양세포를 세어서 반응의 강도에 관계없이 양성인 세포수를 산정 백분율로 환산하였다. Uhlman 등¹⁶의 방법대로 p53 양성세포의 비율이 1% 미만인 경우는 음성, 1% 이상 10% 미만인 경우는 약한 양성, 10% 이상인 경우를 강한 양성으로 구분하였다. PCNA 지수는 양성세포의 백분율로 구하였고 PCNA 양성 세포가 15% 이상인 경우를 고 PCNA 지수군, 15% 미만인 경우를 저 PCNA 지수군

으로 분류하였다.

3. DNA 배수성 검색

p53 유전자에 대한 면역조직화학적 검사가 실시된 파라핀 포매체를 이용하여 DNA 배수성을 검색하였는데 Hedley 등²⁰의 방법을 다소 변형시켜 파라핀 조직괴로부터 세포부유액을 얻었다. 파라핀 조직괴에서 얻은 70 μ m 두께의 절편을 탈파라핀과 함유 과정을 거친 후 0.1% protease(Sigma) 용액에 60분간 37°C에서 부치시켰으며 부치도중 5분, 10분, 20분, 30분 및 60분에 부치액을 주사기로 흡입 및 분출시켜 개개 세포의 유리를 추진시켰다. 여과액내의 유리세포수가 2×10^5 /ml가 되도록 조정하여 최종부유액을 만들어 trypsin으로 10분간 실온에서 부치시키고 trypsin inhibitor와 RNase로 10분간 실온에서 작용시킨 후 0.416% propidium iodide와 spermine tetrahydrochloride로 20분간 4°C에서 핵의 DNA를 염색하였다.

염색된 단일세포 부유액을 15 mW Argon-ion laser가 부착된 FACScan(Becton Dickinson) 유식세포추정기를 이용하여 각 세포핵의 DNA 함량을 측정하였다. 각 중례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였으며 DNA 비배수성은 비정상적인 "DNA stem line"이 존재함으로써 적어도 2개 이상의 분리된 G_0/G_1 피크가 나타나는 경우로 하였다.

4. 통계학적 분석

PC-SAS를 이용하여 p53 유전자 산출과 DNA 배수성의 각 예후인자들과의 상관관계는 Kruskal-Wallis test, PCNA 지수와 예후인자들과의 상관관계는 ANOVA test로 검정하였고 생존율(disease free survival)은 Kaplan-Meier법을 이용하여 생존곡선을 구하고 log rank test로 검정하였다.

성 직

연구대상으로 이용한 신세포암종 44예는 남자 32예, 여자 12예로 남녀의 비는 2.67 : 1이었고 연령은 평균 56세(범위 36~76세)였다. 조직학적으로는 투명세포형(clear cell type) 암이 20예, 과립세포형(granular cell type) 암이 8예, 혼합형 암이 16예였다. Fuhrman 등의 기준에 의해 핵등급을 나누면 핵등급 1이 6예(13.6%), 핵등급 2가 15예(36.7%), 핵등급 3이 18예(40.9%) 그리고 핵등급 4가 4예(9.1%)였다. 병기별로는 병기 I이 2예(4.6%), 병기 II가 29예(65.9%), 병기 III이 10예(22.7%), 그리고 병기 IV가 3예(6.8%)였다. 예후관정을 위한 추적조사에서 평균 추적기간은 43.2개월(범위 4~99개월)이었고 추적기간중 사망 혹은 재발한 경우는 16예(36.4%)로 평균기간은 26.7개월이었으며 이중 병기 I, II에 해당하는 경우는 5예였다.

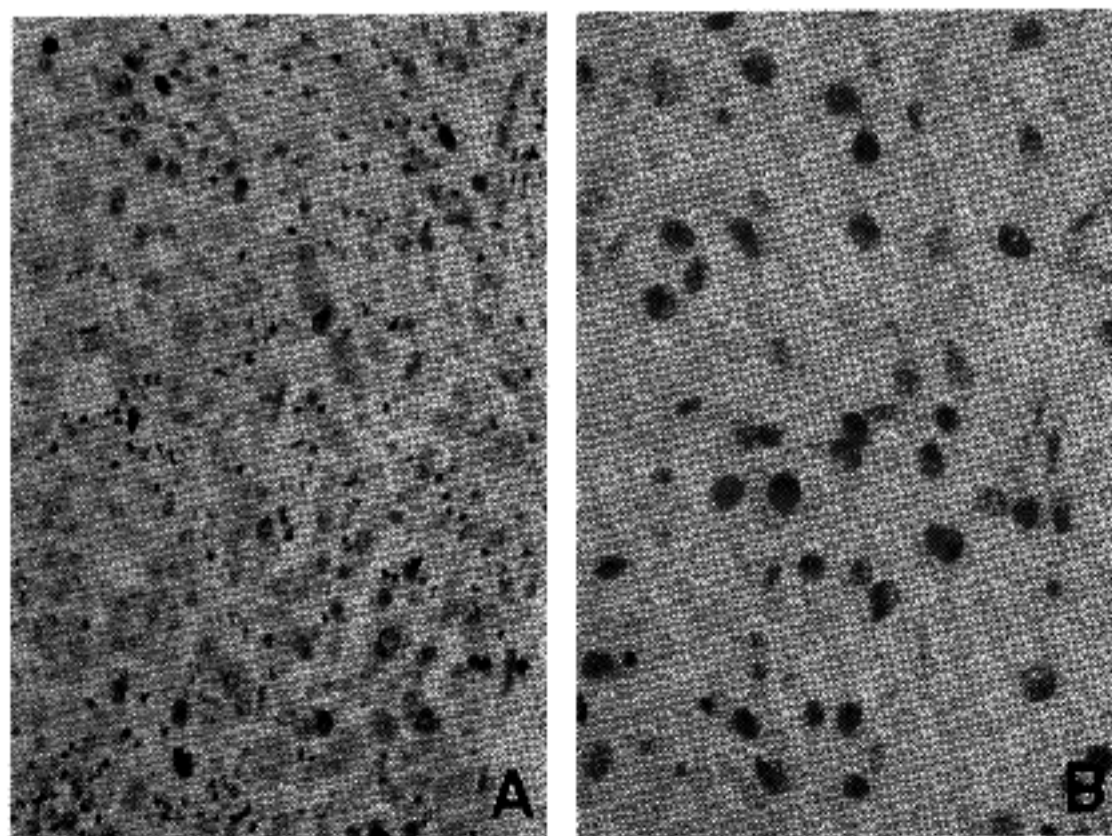


Fig. 1. In immunostaining for p53, a few positive cells are scattered in low grade renal cell carcinoma(Fig. 1a) and strong positive reactions are noted in high grade tumor(Fig. 1b).

p53 유전자 산물의 양성반응은 주로 암세포의 핵에서 관찰되었으며 국소적으로 발현되는 양상을 보였다(Fig. 1a). p53 유전자 산물의 양성반응은 총 44예중 16예(36.4%)에서 양성반응을 보였으며 이중 5예는 강한 양성반응을 보였다. 핵등급 1에서는 양성예가 없고 핵등급 2는 3예(18.8%), 핵등급 3은 10예(55.6%), 핵등급 4는 3예(75.0%)로 핵등급이 높아질수록 양성률이 높았으며($p=0.013$) 특히 강한 양성반응은 핵등급 3에서 16.7%, 핵등급 4에서는 50.0%로 핵등급이 높은 경우 강한 양성반응을 보였다($p=0.007$) (Fig. 1b). p53 유전자 산물의 표현과 병기와의 관계는 병기 I에서는 양성예가 없고 병기 II 31.0%, 병기 III 50.0%, 병기 IV 16.7%로 병기가 높아질수록 양성률이 높아지는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다. p53 유전자 산물의 양성반응은 DNA 배수성인 경우 27예중 10예(37.0%), DNA 비배수성인 경우 10예중 5예(50.0%)에서 양성반응을 보였으나 통계적으로 유의있는 차이는 없었다. PCNA 지수에 따라 p53 유전자 산물의 양성률을 비교해 보면 저 PCNA 지수군(PCNA index < 15)은 30예중 7예(23.3%), 고 PCNA

지수군(PCNA index ≥ 15)은 14예중 9예(64.2%)에서 양성반응을 보여 고 PCNA 지수군에서 p53 유전자 산물의 양성률이 높았으며($p=0.009$) 또한 강한 양성반응을 보인 5예중 4예가 고 PCNA 지수군에 포함되어 고 PCNA 지수군이 강한 양성반응을 보였다($p=0.005$). p53 유전자 산물의 양성반응은 성별, 나이, 조직학적 분류에 따른 차이는 없었다(Table 1).

PCNA 지수는 평균 16.93(범위 1~80)이었으며, 핵등급에 따라 PCNA 지수의 평균 값을 비교해 보면 핵등급 1에서 2.33, 핵등급 2는 7.94, 핵등급 3은 22.33, 핵등급 4는 50.50로 핵등급이 증가할수록 PCNA 지수가 증가하였고 핵등급 4는 다른 핵등급과 유의하게 PCNA 지수가 높았다($p < 0.001$) (Fig. 2a,b). 병기별로는 병기 I의 평균 PCNA 지수는 5.50, 병기 II는 11.24, 병기 III은 31.20, 병기 IV는 32.00으로 병기가 높은 경우 PCNA 지수가 높았으며($p < 0.05$), DNA 배수성인 예보다 비배수성인 예에서 평균 PCNA 지수가 유의하게 높게 나타났고($p=0.001$), p53이 강한 양성을 보이는 예에서 평균 PCNA 지수가 더 높았다($p < 0.001$)(Table 2).

Table 1. The expression of p53 oncogene product according to nuclear grade, stage, DNA ploidy and PCNA index

	No. of case(%)			Prob.
	Total	p53(-)	p53(+)	
Nuclear grade				
grade 1	6(13.6%)	6	0	p=0.007
grade 2	16(36.4%)	13	3(18.8%)	
grade 3	18(40.9%)	8	7(38.9%)	
grade 4	4(9.1%)	1	1(25.0%)	
Stage				
stage I	2(4.6%)	2	0	p=0.267
stage II	29(65.9%)	20	7(24.2%)	
stage III	10(22.7%)	5	3(30.0%)	
stage IV	3(6.8%)	1	1(33.3%)	
Ploidy				
diploidy	27(73.0%)	17	8(29.6%)	p=0.283
aneuploidy	10(27.0%)	5	2(20.0%)	
PCNA index				
low PCNA I	30	23	6(20.0%)	p=0.005
high PCNA I	14	5	5(35.7%)	

No.: number PCNA I: PCNA index Prob.: probability

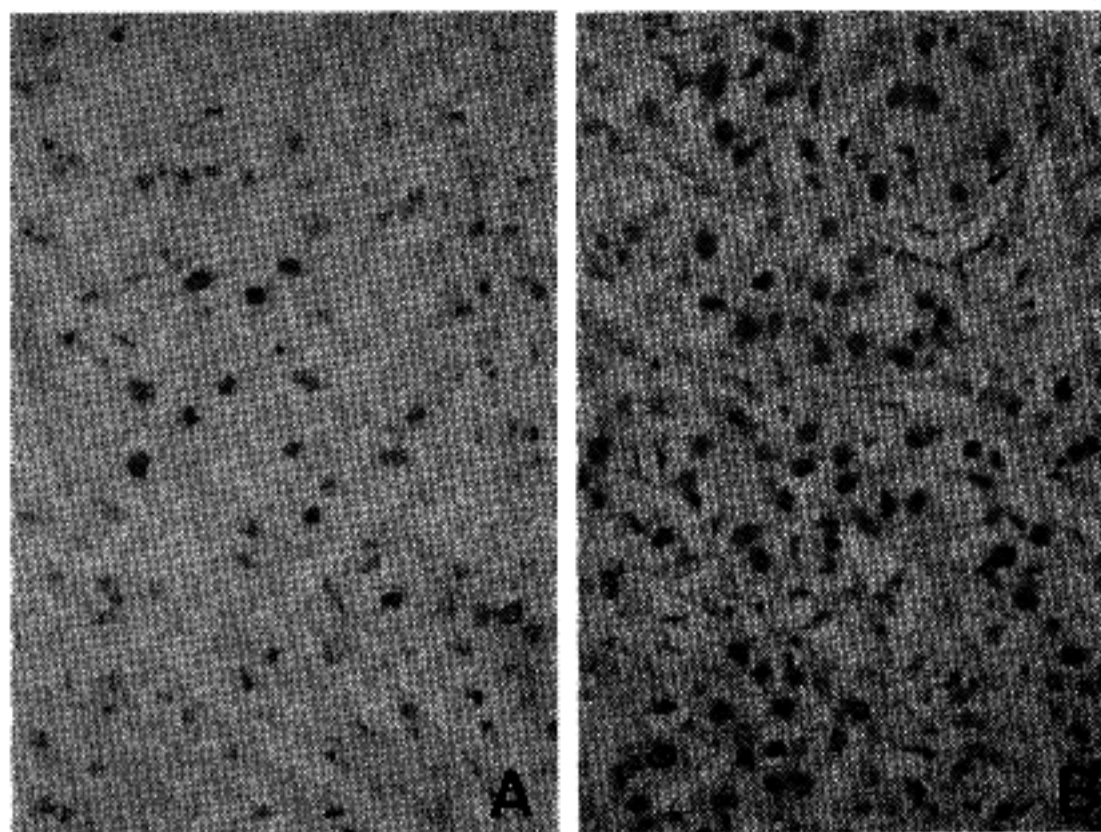


Fig. 2. In immunostaining for PCNA, a few positive cells are noted in low grade renal cell carcinoma(Fig. 2a) and many positive cells are noted in high grade tumor(Fig. 2b).

Table 2. PCNA index according to nuclear grade, stage, DNA ploidy and p53 expression

	No. of case	Mean	SD	Prob.
Nuclear grade				p<0.001
grade 1	6	2.33	1.97	grade 1 * grade 4 grade 2 * grade 4 grade 3 * grade 4
grade 2	16	7.94	8.57	
grade 3	18	22.33	24.89	
grade 4	4	50.50	29.85	
Stag				p=0.0047
stage I	2	5.50	0.71	
stage II	29	11.24	17.61	
stage III	10	31.20	25.32	
stage IV	3	32.00	42.15	
Ploidy				p=0.001
diploid	27	11.93	16.38	
aneuploidy	10	38.80	30.51	
p53 expression				p<0.001
p53(-)	28	8.71	11.03	p53(-) * p53(-+) p53(+) * p53(-+)
p53(+)	11	20.36	23.45	
p53(+ +)	5	55.40	30.52	

No.: number

SD: standard deviation *: significant difference

Prob.: probability

DNA 비배수성은 DNA 배수성이 분석된 총 37예 중 10예(27.0%)에서 관찰되었는데 DNA 비배수성의 빈도는 핵등급, 병기, p53 발현 여부와는 상관이 없었고 고 PCNA 지수군에서 DNA 비배수성의 빈도가 더 높게 나타났다(p=0.038)(Table 3).

Kaplan-Meier 생존곡선에서 핵등급, 병기, DNA 배수성, PCNA 지수, p53 유전자 산물의 발현에 따라 생존곡선의 차이를 비교해보면(Table 4) 병기(p<0.001), 핵등급(p=0.017), DNA 배수성(p=0.045)과 PCNA 지수(p<0.001)에 따라 생존율이 유의하게 차이가 있었

Table 3. Frequency of DNA aneuploidy according to nuclear grade, stage, PCNA index and p53 expression

	No. of case (%)			Prob.
	Total	Diploid	Aneuploid	
Nuclear grade				p=0.318
grade 1	6	6	0	
grade 2	12	9	3(25.0%)	
grade 3	15	10	5(33.3%)	
grade 4	4	2	2(50.0%)	
Stage				p=0.291
stage I	2	1	1(50.0%)	
stage II	22	18	4(18.2%)	
stage III	10	7	3(30.0%)	
stage IV	3	1	2(66.7%)	
p53 expression				p=0.482
p53(-)	22	17	5(22.7%)	
p53(+++)	15	10	5(33.3%)	
PCNA index				p=0.038
low PCNA I.	23	20	3(15.0%)	
high PCNA I.	14	7	7(50.0%)	

No.: number PCNA I.: PCNA index Prob.: probability

Table 4. Log rank analysis of Kaplan-Meier curves in renal cell carcinomas

	Probability		
	Total	Stage I, II	Stage III, IV
Nuclear grade(1,2 vs 3,4)	0.017*	0.254	0.976
Stage(I,II vs III,IV)	0.0001*		
Ploidy(diploidy vs aneuploidy)	0.0447*	0.409	0.097
p53 expression			
(p53(-) vs p53(+++))	0.148	0.269	0.549
(p53(-) vs p53(+))	0.0593	0.9971	0.4242
(p53(-/+) vs p53(++))	0.0003*	0.0004*	0.4886
PCNA index(low vs high)	0.0003*	0.478	0.1468

*: significant difference

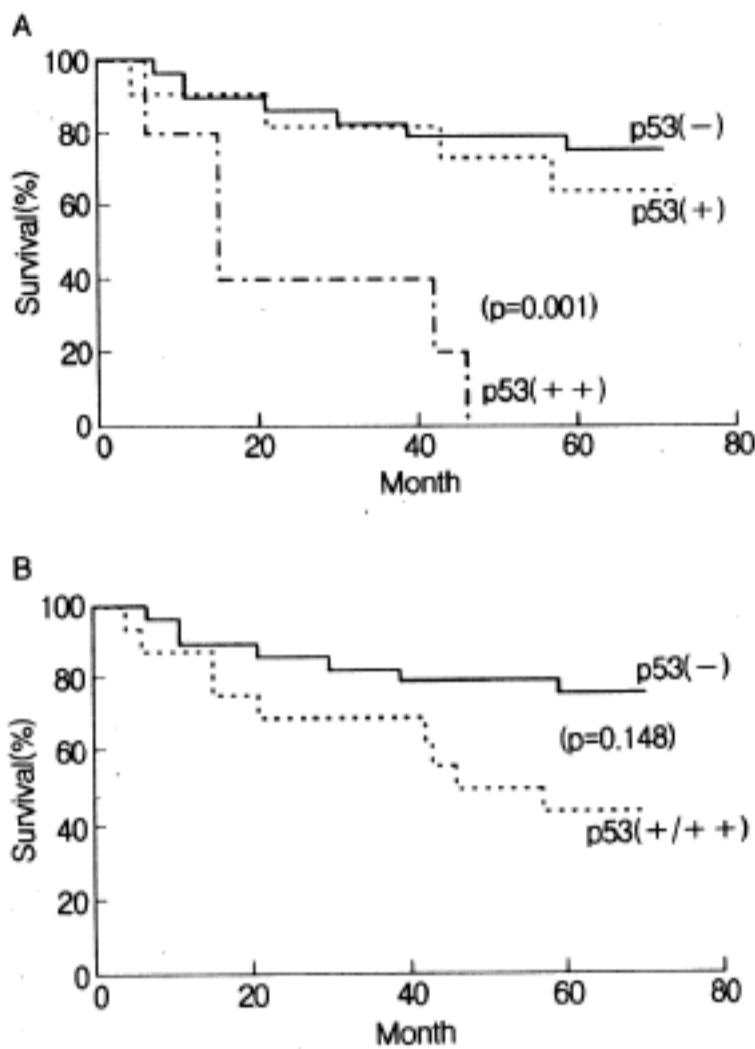


Fig. 3. The survival curve according to the intensity of p53 expression(Fig. 3a) and the expression of p53 protein (Fig. 3b) in renal cell carcinomas.

으나 p53 유전자 발현여부(p=0.148)에 따라서는 생존율의 차이가 없고 p53 유전자가 강하게 발현한 경우 불량한 예후를 보였다(p<0.001)(Fig. 3). 초기 병변이라고 할수 있는 병기 I, II 환자 31예를 대상으로 생존율을 분석하여 보면 p53 유전자 산물이 강하게 발현된 경우 불량한 예후를 보였으나(p=0.004) 핵등급, DNA 배수성이나 PCNA 지수에 따라서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 4). 병기 III, IV 환자에서는 p53 유전자 발현양상이나 핵등급, PCNA 지수, DNA 배수성 등에 따라 생존율에 유의한 차이가 없었다.

고 찰

신세포암에서 p53 유전자의 돌연변이나 17번 염색체 단완의 결손에 대한 보고는 매우 다양하여 Suzuki등²¹은 약 4%에서 돌연변이를 관찰하였다고 하며 Kikuchi등²²은 파라핀 블록에서 PCR-SSCP를 이용한 연구에서 118예중 2예에서 돌연변이를 확인했

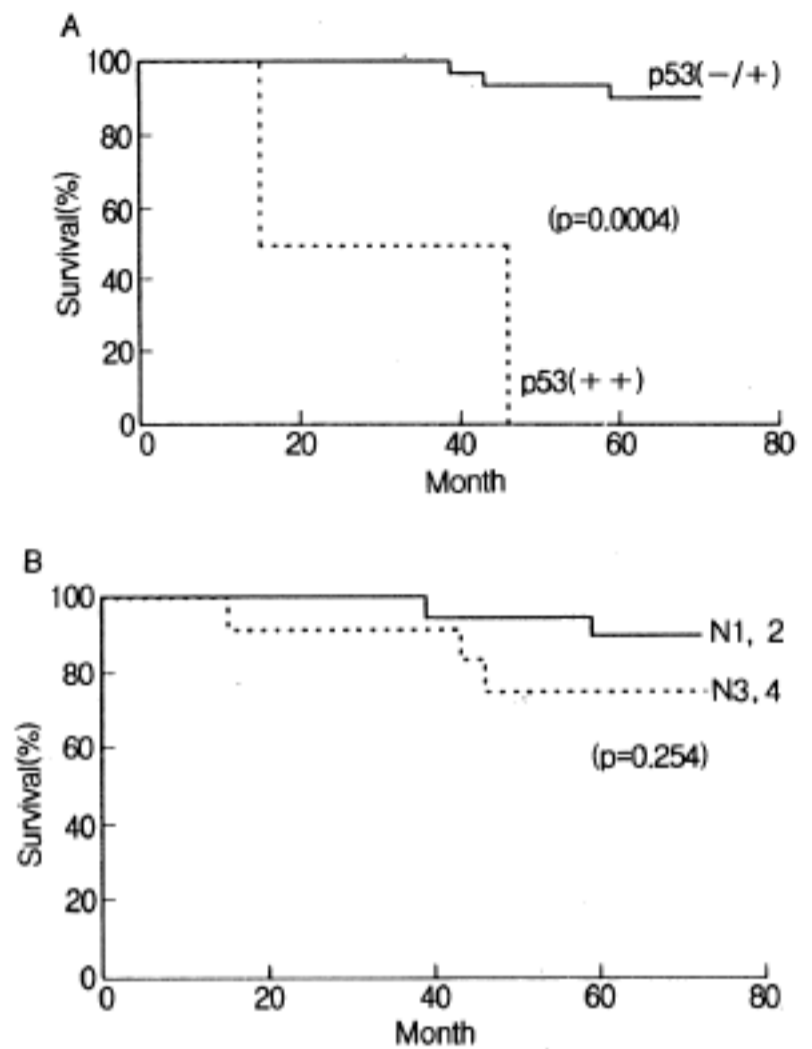


Fig. 4. The survival curve according to the intensity of p53 expression(Fig. 4a) and the nuclear grade(Fig. 4b) in stage I and II of renal cell carcinomas.

으나 Reiter등²³은 배양된 세포주를 이용한 연구에서 약 33%에서 p53유전자의 돌연변이를 관찰했고 48%에서 p53 유전자 부위의 대립유전자 소실(loss of heterozygosity, LOH)을 관찰하였다고 보고하고 있다. 또한 Lipponen등⁶과 Bot등¹⁴은 신세포암종에 대한 면역조직화학적 검사에서 p53 유전자 산물의 양성률을 32~33%로 보고하였는데 본 연구에서도 44예중 16예(36.4%)에서 p53 유전자 산물이 양성으로 관찰되어 이들과 유사한 성적을 보였다. Reiter등²³은 타 연구에 비해 p53 LOH 및 돌연변이율이 높게 나타난 이유에 대해 배양된 세포주를 사용했는데 배양된 세포주는 진행성 암에서 얻었으며 배양과정에서 p53에 대해서 이질적인 신세포암 세포중 p53 양성 세포만이 선택적으로 배양되었을 가능성을 제시했다. 본 연구에서도 신세포암 세포의 p53에 대해 이질성을 관찰할 수 있었는데 p53에 양성을 보이는 모든 신세포암에서도 많은 세포들은 p53 음성이고 양성세포의 비율은 1~50%정도였는데 이런 소견은 Uhlman등¹⁶의 결과와 일치하였다.

Ogawa등¹⁵⁾은 17번 염색체 단완의 소실이 과립형 암세포와 관련이 많다고 주장했으나 Reiter등²³⁾은 17번 염색체 단완의 소실을 보인 전이가 투명세포암이었다고 보고했다. 본 연구에서도 Uhlman등¹⁶⁾의 소견과 마찬가지로 세포유형 및 조직학적 양상과 p53 발현 양상은 관련이 없었다.

많은 종양에서 p53 돌연변이가 나타나는것은 종양발생의 후기이며 보다 악성을 갖게 하는 것으로 알려져있으나²⁴⁾ Lipponen등⁶⁾이나 Bot등¹⁴⁾은 신세포암에서 p53 유전자 발현이 어떤 임상-병리적 요소들과도 유의한 상관성을 갖지 못한다고 보고하였다. Uhlman등¹⁶⁾은 p53 유전자 산물이 핵등급 및 병기와 관련성이 높고 초기 신장암 환자의 경우 독립된 예후인자가 된다고 하였는데 본 연구에서는 p53 유전자 산물의 발현은 핵등급과는 강한 상관성을 가지나 병기, 나이, 성별 및 조직학적 유형과는 통계적으로 유의한 상관성이 없었다.

p53 유전자 발현과 세포의 증식능과의 관계에 대해 대부분의 종양²⁵⁾에서는 상관성이 있다고 알려져 있으나 Lipponen등⁶⁾은 신세포암종을 대상으로한 연구에서 상관성을 발견하지 못했다고 했다. 그러나 본 연구에서는 저 PCNA 지수군에 비해 고 PCNA 지수군에서 p53 유전자 발현율이 유의하게 높았으며 고 PCNA 지수군이 p53 유전자 산물에 강한 양성반응을 보여 PCNA 지수와 p53 유전자 발현 강도와도 상관성이 있는것으로 생각된다.

본연구에서 p53 유전자 산물의 발현과 DNA 배수성과는 통계적 상관성이 없었는데 Remvikos등²⁶⁾은 결직장암을 대상으로 한 연구에서 p53 유전자 산물이 양성인 경우 DNA 비배수성의 비율이 훨씬 높게 나타난다고 하였으나 Prudie등²⁷⁾과 Scott등²⁸⁾은 p53 유전자 산물의 발현이 DNA 배수성과는 무관하다고 주장하였다. 이는 암세포가 전혀 다른 기전에 의해 p53 유전자 돌연변이와 DNA 비배수성을 갖게 되기 때문으로 생각된다.

여러 종양에서 세포증식능은 생물학적 특성을 예측하는데 유용한 것으로 알려져 있으며 세포증식능을 측정하는 여러 방법중 파라핀 블록을 이용할수 있고 보다 객관적이고 재현성이 높다고 인정되는 방법중의 하나로 PCNA지수를 산정할 수 있다. PCNA는 DNA polymerase delta와 관련된 단백질로 주로 증식세포에서 표현되며¹⁷⁾ PCNA 양성세포가 여러 종양에서 악성도 및 불량한 예후와 관련이 있다고 보고되고 있다²⁹⁾. 본 연구에서 PCNA 지수는 핵등급, 병기, p53 발현 양상 및 DNA 배수성과 상관

관계가 높게 나타났다. Lipponen등⁶⁾과 Tannapfel등³⁰⁾은 신세포암종에서 PCNA 지수가 병기 및 핵등급과 상관성이 있고 예후와 관련이 있다고 보고했고 Delahunt등¹⁸⁾은 PCNA 지수와 핵등급은 상관성이 있고 병기에 따른 PCNA 지수의 차이는 없다고 했는데 Flint등³¹⁾은 PCNA 지수가 병기, 핵등급 및 DNA 배수성과 유의한 상관성이 없다고 보고했다. 이러한 차이는 종양의 이질성이 큰 신세포암종에서 치료체취의 차이와 면역조직화학적 염색 방법상의 차이때문인 것으로 사료된다.

Jochum등³²⁾은 신세포암종에서 DNA 배수성과 핵등급 및 병기가 상관성이 있다고 보고하였으나 Tannapfel등³⁰⁾은 DNA 배수성은 예후나 다른 예후인자와 상관성이 없었다고 했다. 본 연구에서는 핵등급이나 병기가 높아지거나 p53 발현에 따라 비배수성인 예의 비율이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었고 고 PCNA 지수군에서 비배수성의 비율이 높게 나타났다.

신세포암종에서 핵등급 및 병기는 독립적 예후지표로 잘 알려져 있으나 p53 유전자 산물의 발현, DNA 배수성, PCNA 지수등이 신세포암의 예후인자로 사용될 수 있는지에 대해서는 이론이 많다.

본 연구에서도 단일 변수 분석에서 병기($p < 0.001$) 및 핵등급($p = 0.017$)은 생존율과 상관성이 있었으며 DNA 배수성($p = 0.045$)과 PCNA 지수($p < 0.001$)에 따라서도 유의한 생존율의 차이가 있었고 p53 유전자 강양성군에서 불량한 예후를 보였다($p < 0.001$).

p53 발현과 예후와의 관계에 대해 Harris와 Holstein²⁴⁾은 불량한 예후인자로 보고하고 있으나 Dolcetti등³³⁾, McLaren등³⁴⁾ 및 Scott등²⁸⁾은 후두암, 폐암 및 유방암에서 p53 발현이 예후와 상관성이 없다고 보고하고 있고 Davidoff등³⁵⁾과 Bosari등³⁶⁾은 유방암에서 p53 발현이 불량한 예후를 나타내는 인자들과는 상관성이 있지만 예후와는 상관이 없다고 주장했다. 신세포암종에서 p53 유전자 산물의 발현에 대해서 Lipponen등⁶⁾과 Bot등¹⁴⁾은 생존율과 관계가 없다고 주장했으나 Ogawa등¹⁵⁾은 고등급 암과 관련이 있다고 보고하였으며 Uhlman등¹⁶⁾은 원격전이가 없는 신장암환자에서 p53 염색이 불량한 예후와 강한 상관성이 있으며 초기 신세포암에서 p53 유전자 산물이 음성인 경우는 예후가 훨씬 좋다는 보고를 했다. 또한 Uhlman등¹⁶⁾은 원발소에서 p53 음성이었던 예가 전이소에서는 양성으로 전환된 예를 여럿 확인하고 신세포암에서 p53 돌연변이가 잠재적 전이 능력과 관련이 있을 것으로 추정했었다. 본 연구에서도 병기 I, II인 예

에서 p53 유전자 산물이 강한 양성을 보이는 경우 불량한 예후를 보였다. Uhlman등¹⁶은 p53 양성세포가 적은량(1~9%)이라도 관찰되면 불량한 예후를 나타낸다고 했는데 본 연구에서는 p53 양성세포가 10%이상인 강한 양성을 보인 예는 p53 음성인 예나 p53에 약한 양성을 보인 예보다 유의하게 예후가 불량했으나($p < 0.001$), p53 음성인 예와 p53에 약한 양성을 보인 예는 생존율에 차이가 없었다.

Lipponen등⁶은 PCNA가 예후와 상관성이 높다고 주장했으며 Delahunt등¹⁸은 신세포암에서 PCNA 지수가 핵등급과 상관성이 있고 PCNA 지수에 따른 생존율의 차이가 있다고 했다. 본 연구에서도 PCNA 지수에 따라 유의한 생존율의 차이가 있었다.

DNA 배수성에 관해서 Jochum등³²은 DNA 배수성과 생존율이 상관성이 있다고 했으나 Flint등³¹은 DNA 배수성이나 PCNA 지수가 생존율과 상관성이 없다고 주장했는데 이러한 차이는 신세포암종이 종양의 이질성이 커서 시료채취의 차이와 비배수성에 대한 정의 등 연구방법상의 차이에 기인하는것으로 생각된다고 했다³². Nakano등³⁷과 Currin등³⁸은 진행성암에서 비배수성이 많다고 했는데 Currin등³⁸이 병기에 따라 분류했을때 DNA 비배수성과 배수성사이에 생존율의 차이가 없었다. 즉 비배수성이 불량한 예후를 갖는것 처럼 보이는 것은 대개 진행성암에서 비배수성이 많이 보이기 때문이며 따라서 DNA 배수성만으로는 예후를 추정할수 없다고 했다. 본 연구에서도 전체 예를 대상으로한 Kaplan-Meier 생존 곡선에서는 핵등급, DNA 배수성, PCNA 지수에 따라 생존율이 유의한 차이가 있었으나 병기 I, II 와 III, IV로 나누었을 때에는 유의성이 없어지는데 (Table 4), 이러한 차이는 진행된 병기(stage III, IV)에서 고핵등급 및 고 PCNA 지수군의 비율이 현격하게 높아지고 DNA 비배수성인 예도 증가하는 경향을 보여, 핵등급이나 PCNA 지수, DNA 배수성이 병기에 종속적인 변수가 되기 때문에 전체 예에서는 예후에 영향을 주는 것처럼 보였지만 병기에 따라 구분하면 영향이 없는 것으로 나온 것으로 사료된다.

p53 암유전자 산물 및 PCNA 지수, DNA 배수성이 신세포암에서 예후인자로 유용하게 이용되기 위해서는 앞으로 보다 많은 예를 대상으로 연구가 이루어지고 추적조사가 되어서 다변량 생존 분석을 해야 할것으로 사료된다.

결 론

신세포암종 44예를 대상으로 p53 유전자 산물의 발현 양상과 DNA 배수성 및 세포의 증식능 등 다른 예후인자들과의 상관관계를 알아보고자 본 연구를 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 면역조직화학적 염색상 신세포암종에서 p53 유전자 산물의 양성반응은 종양세포의 핵에서 주로 관찰되었으며 44예중 약한 양성 11예, 강한 양성 5 예로 전체적으로 16예(36.4%)에서 양성으로 관찰되었다.

2. p53 유전자 산물의 발현은 핵등급($p=0.007$) 및 PCNA 지수($p=0.002$)와 상관관계가 있었으나 병기나 DNA 배수성과는 상관 관계가 없었다.

3. PCNA 지수는 44예에서 평균 16.93 ± 22.58 (범위 1~80)이었으며 지수의 값은 핵등급($p < 0.001$), 병기($p=0.047$), DNA 비배수성($p=0.001$) 및 p53 유전자 산물의 발현($p < 0.001$)과 유의한 상관관계를 보였다.

4. DNA 배수성은 총 37예중 10예(27.0%)에서 비배수성을 보였으며 PCNA 지수를 제외한 다른 예후인자들과는 상관관계가 없었다.

5. 단일 변수 분석상 병기($p < 0.001$), 핵등급($p=0.017$), PCNA 지수($p < 0.001$) 및 DNA 배수성($p=0.045$)에 따른 생존율의 차이가 있었으나 병기를 I, II 및 III, IV의 두군으로 나누어 살펴보니 핵등급, PCNA 지수 및 DNA 배수성 모두 환자의 예후에 영향을 미치지 않았다. p53 유전자 발현은 양성과 음성군간에는 생존율의 차이를 보이지 않았으나, 강양성의 경우에는 특히 병기 I, II에서 나쁜 예후를 보였다($p < 0.001$).

이상의 성적으로 신세포암종에서 p53 암유전자 산물의 발현은 핵등급 및 PCNA 지수와 상관성이 있고 병기 I, II의 초기 신세포암종에서 p53 유전자 산물이 강한 양성반응을 보이는 경우 불량한 예후의 보조적 지표로 이용될 수 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Syrjanen K, Hjelt L. Grading of human renal adenocarcinoma. Scand J Urol Nephrol 1978; 12: 49-55.
2. Nurmi MJ. Prognostic factors in renal carcinoma. An evaluation of operative findings. Bri J Urol 1984; 56: 270-5.
3. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic signif-

- icance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-63.
4. Otto U, Baisch H, Huland H, Kloppel G. Tumor cell deoxyribonucleic-acid content and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Urol* 1984; 132: 237-9.
 5. Delahunt B, Ribas JL, Nacey NJ, Bethwaite PB. Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. *J Pathol* 1991; 163: 31-7.
 6. Lipponen P, Eskelinen M, Hietala K, Syrjanen K. Expression of proliferating cell nuclear antigen(PC 10), p53 protein and c-erbB-2 in renal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1994; 57: 275-80.
 7. Mercer WE, Shields MT, Lin D, Appella E, Ullrich SJ. Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating cell nuclear antigen expression. *Proc Nat'l Acad Sci(Wash.)* 1991; 88: 1958-62.
 8. Merlo GR, Bernardi A, Diela F, et al. In primary human breast carcinomas mutations in exons 5 and 6 of the p53 gene are associated with high S-phase index. *Int J Cancer* 1993; 54: 531-5.
 9. Lipponen P. Over-expression of nuclear oncoprotein p53 in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 1993; 53: 365-70.
 10. Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR. Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5006-10.
 11. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, et al. Genetic change of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3965-71.
 12. Davidoff AM, Kers BJM, Iglehart JD, Marks JR. Maintenance of p53 alteration throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991; 51: 2605-10.
 13. Sidransky D, Mikkelesen T, Schwechheimer K, Rosenblum ML, Cavance W, Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cell is associated with brain tumor progression. *Nature* 1992; 355: 846-7.
 14. Bot FJ, Godschalk JCJ, Krishnadath KK, van der Kwast THM, Bosman FT. Prognostic factors in renal cell carcinoma: Immunohistochemical detection of p53 protein versus clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 1994; 57: 634-7.
 15. Ogawa O, Habuchi T, Kakehi Y, Koshiha M, Sugiyama T, Yoshida O. Allelic losses at chromosome 17p in human renal cell carcinoma are inversely related to allelic losses at chromosome 3p. *Cancer Res* 1992; 52: 1881-5.
 16. Uhlman DL, Nguyen PL, Manivel JC, et al. Association of immunohistochemical staining for p53 with metastatic progression and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1470-5.
 17. Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin: Proliferating cell nuclear antigen in cultured cell: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-6.
 18. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN, Ribas JL. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: comparison with tumor grade, mitotic index, and silver-stained nucleolar organizer region numbers. *J Pathol* 1993; 170: 471-8.
 19. Hermanek P, Sobin LH. UICC: TNM classification of malignant tumors. 4th ed. 2nd revision. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
 20. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor WE. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6: 327-33.
 21. Suzuki Y, Tamura G, Satodate R, Fujioka T. Infrequent mutation of p53 gene in human renal cell carcinoma detected by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 233-5.
 22. Kikuchi Y, Kishi T, Suzuki M, Furusato M, Aizawa S. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis of the p53 gene in paraffin-embedded surgical material from human renal cell carcinomas. *Virchows Archiv(A)* 1994; 424: 229-33.
 23. Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarr JR, Lineham WM. Chromosome 17p deletions and p53 mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 3092-7.
 24. Harris CC, Holstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med* 1993; 329: 1318-27.
 25. Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Kolvula T, Isola J. Small subgroup of aggressive highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84: 883-7.
 26. Remvikos Y, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Frelat G, Dutrillaux B, Thomas G. Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinomas by flow cytometry. *Int J Cancer* 1990; 45: 450-6.
 27. Prudie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC.

- p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; 138: 807-13.
28. 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: 317-9.
29. Lipponen P, Eskelinen M. Cellular proliferation of transitional cell bladder tumor determined by PCNA /cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 171-6.
30. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 164-71.
31. Flint A, Grossman HB, Liebert M, Lloyd R, Bromberg J. DNA and PCNA content of renal cell carcinoma and prognosis. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 14-9.
32. Jochum W, Schroder S, AL-Taha R, et al. Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal cell carcinomas: A clinicopathologic study of 58 patients using mitotic count, MIB-1 staining, and DNA cytophotometry. *Cancer* 1996; 77: 514-21.
33. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, et al. p53 over-expression is an early event in the development of human squamous cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *Int J Cancer* 1992; 52: 178-82.
34. McLaren R, Kuzu I, Dunnili M, Harris A, Lane D, Gatter KC. The relationship of p53 cellular immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 1992; 66: 735-8.
35. Davidoff AM, Herndon JE, Glover NS, et al. Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991; 110: 259-64.
36. Bosari S, Lee AK, Viale G, Heatley GJ, Coggi G. Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with long-term follow-up. *Virchows Archiv (A)* 1992; 421: 291-5.
37. Nakano E, Kondoh M, Okatani K, Seguchi T, Sugao H. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content of renal cell carcinoma correlated with histologic and clinical features. *Cancer* 1993; 72: 1319-23.
38. Currin SM, Lee SE, Walther PJ. Flow cytometric assessment of deoxyribonucleic acid content in adenocarcinoma: does ploidy status enhance prognostic stratification over stage alone? *J Urol* 1990; 143: 458-63.
-