

# 위암종에서 돌연변이형 p53의 검사를 위한 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP의 비교연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

김종순 · 이재혁 · 이민철 · 박창수 · 정상우

## A Comparative Study of Immunohistochemistry and PCR-SSCP for Detection of p53 Mutation In Gastric Carcinoma

Jong Soon Kim, Jae Hyuk Lee, Min Cheol Lee, Chang Soo Park, and Sang Woo Juhung

Department of Pathology, Chonnam University Medical School, Kwangju 501-190, Korea

Mutation of the p53 tumor-suppressor gene in exons 4 through 9 was examined in 34 cases of primary advanced gastric cancer using PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) and the results were compared with p53 protein expression as determined by immunohistochemistry (IHC) using a monoclonal antibody(DO-1). p53 protein detected by IHC was observed in 14 cases (41.2%) and genotypic mutation detected by PCR-SSCP in exons 4~9 was observed in 13 cases (38.2%) One case showed an aberrant band on PCR-SSCP both in Exon 7 and Exon 8/9. p53 alteration detected by either IHC or PCR-SSCP was observed in 19 cases (55.9%), but only 8 cases (23.5%) showed both p53 mutation and protein expression. We also tried to obtain the correlation between relative intensity of the shifted bands on PCR-SSCP and percentage of positive cells by IHC, but a significant correlation was not seen between relative intensity of shifted bands on PCR-SSCP and positive cell ratio. A discrepancy between p53 protein expression and p53 mutation is observed in primary gastric carcinomas. The reason for this discrepancy are not apparent. However, examination of gastric carcinomas for mutations in other exons may identify a better correlation with protein overexpression. The results obtained in this study suggest that the negative reaction for p53 immunohistochemistry may not necessarily mean no genetic alteration of the p53 locus. (Korean J Pathol 1998; 32: 21~28)

**Key Words:** p53, PCR-SSCP, Immunohistochemistry, Gastric carcinoma

### 서 론

p53은 375개의 아미노산으로 구성된 핵내단백이며, 유전자는 17p13.1에 위치한다. p53은 세포주기의 조절,<sup>1-4</sup> 전사 및 번역과정의 조절,<sup>5-7</sup> 세포분화,<sup>8-10</sup> apoptosis<sup>11</sup>를 포함한 많은 종류의 세포기능에 관계된다고 알려져 있다. p53 유전자의 발암과정에 역할하는 기전은 17번

염색체의 단완의 소실로 야생형 단백질의 결여, 돌연변이에 의해 생성된 변형단백이 야생형 단백질의 기능을 차단, 바이러스 단백질이 야생형 단백질과 결합하여 야생형 단백질의 정상적인 성장조절기능을 억제 등이다. 변형단백은 정상유전자에 의하여 생성된 야생형 단백질에 비하여 대사적으로 안정되어 면역조직학적 염색을 통하여 가시화할 수 있다고 하였다.<sup>12</sup> 많은 종류의 종양에서 면역염색 발현유무로만 p53의 발암과정에 미치는 정도나<sup>13</sup> 조직학적 등급 및 예후인자와의 관련성을 예기하고 있다.<sup>14</sup> 그러나 면역조직화학적 염색법은 염색수기, 조직처리과정 및 사용된 일차항체의 종류 등에 따라 양성률이 달라서 위암종의 경우 p53 발현율은 4%에서 64%까

접 수: 1997년 2월 12일, 게재승인: 1997년 10월 14일  
주 소: 광주광역시 동구 학동 5번지, 우편번호 501-190  
전남대학교 의과대학 병리학교실, 김종순  
ISSN : 0379-1149

지 보고되어 있다.<sup>15-19</sup>

이에 저자는 34예의 원발성 진행성 위암종을 대상으로 면역조직화학적 염색에 의한 p53발현율과 polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)에 의해 검색된 유전자수준의 돌연변이 양성률을 비교하고 양 방법간의 일치율을 알아 보고자 하였다.

**재료 및 방법**

1996년 1월부터 12월까지 전남대학교 병원에서 임상 및 병리학적 소견상 원발성 위선암으로 확진된 예중 파라핀 포매괴의 보관상태가 양호한 34예를 대상으로 하였다.

**1. p53에 대한 면역조직화학적 염색**

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 제작한 파라핀 포매괴를 3 μm 두께로 박절하여 Probe-On 슬라이드 (FisherBiotech)에 부착시켜 건조시킨 다음 검색에 사용하였다. 염색은 Probe-On 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 이용하여 개발된 Microprobe Immuno/DNA 염색기 (Biomed)를 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈 파라핀과 합수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1x automation buffer (Biomed)에 3분간 부치시켰다. 1x automation buffer를 제거한 후 p53 유전자 산물에 대한 단세포군 항체 (DO-1, Santa Cruz)를 1:50으로 희석하여 20분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하였다. 이차 항체로 biotin이 부착된 anti-mouse IgG를 이용하여 10분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 avidin-alkaline phosphatase에 10분간 작용시켰다. Alkaline phosphatase의 발색은 완충액으로 수세를 한 후 Fast Red TR salt를 이용하였으며 헤마톡실린으로 대조 염색을 시행하였다. 종양세포의 핵에 국한되어 붉게 발색되었을때 양성으로 판정하였다. 염색의 전 과정에 있어서 부치 온도는 45°C로 하였으며 음성대조군은 일차항체 대신 항체 희석액을 부치시켜 이용하였다.

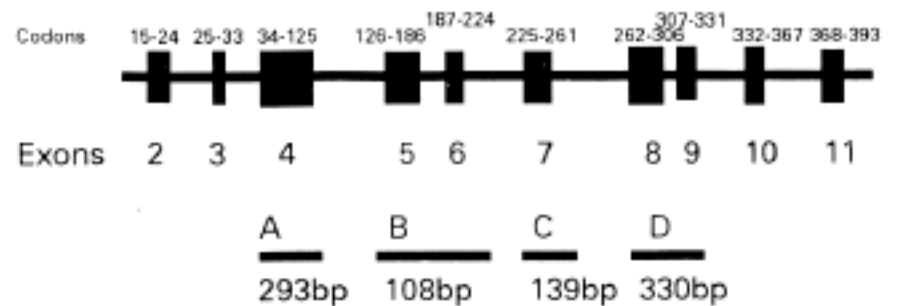
**2. 파라핀 포매괴에서 DNA의 추출 및 정제**

포매괴에서 종양세포가 아닌 부위는 가능한 한 면도

날로 제거한 후 사용하였고, 음성대조군은 해당환자의 정상 점막부위를 사용하였다. contamination에 주의하면서 2 cm×2 cm×10 μm로 2~3장을 잘라 1.5 ml eppendorf tube에 담았다. xylene과 100% alcohol로 탈파라핀과 합수준비과정을 각각 2회 거친후 진공건조기 (SpeedVac, SAVANT)로 잔여 alcohol을 완전히 제거하였다. 조직 용해액 (4 U Proteinase K, 10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.2) 400 μl를 첨가한 후 조직이 다 녹을 때까지 수조에서 54°C로 shaking incubation하였다. 1/10부피의 Saturated NaCl을 첨가하여 5초간 심하게 흔들고, 2.5부피의 100% alcohol를 넣고 조심히 흔든 후 14000 g로 15분동안 원심분리하고 침전물은 75% alcohol로 세척하였다. 최후의 침전물을 진공건조기 (SpeedVac, SAVANT)로 말린 후 50 μl의 T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 완충액에 녹여 PCR반응에 이용하였다.

**3. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

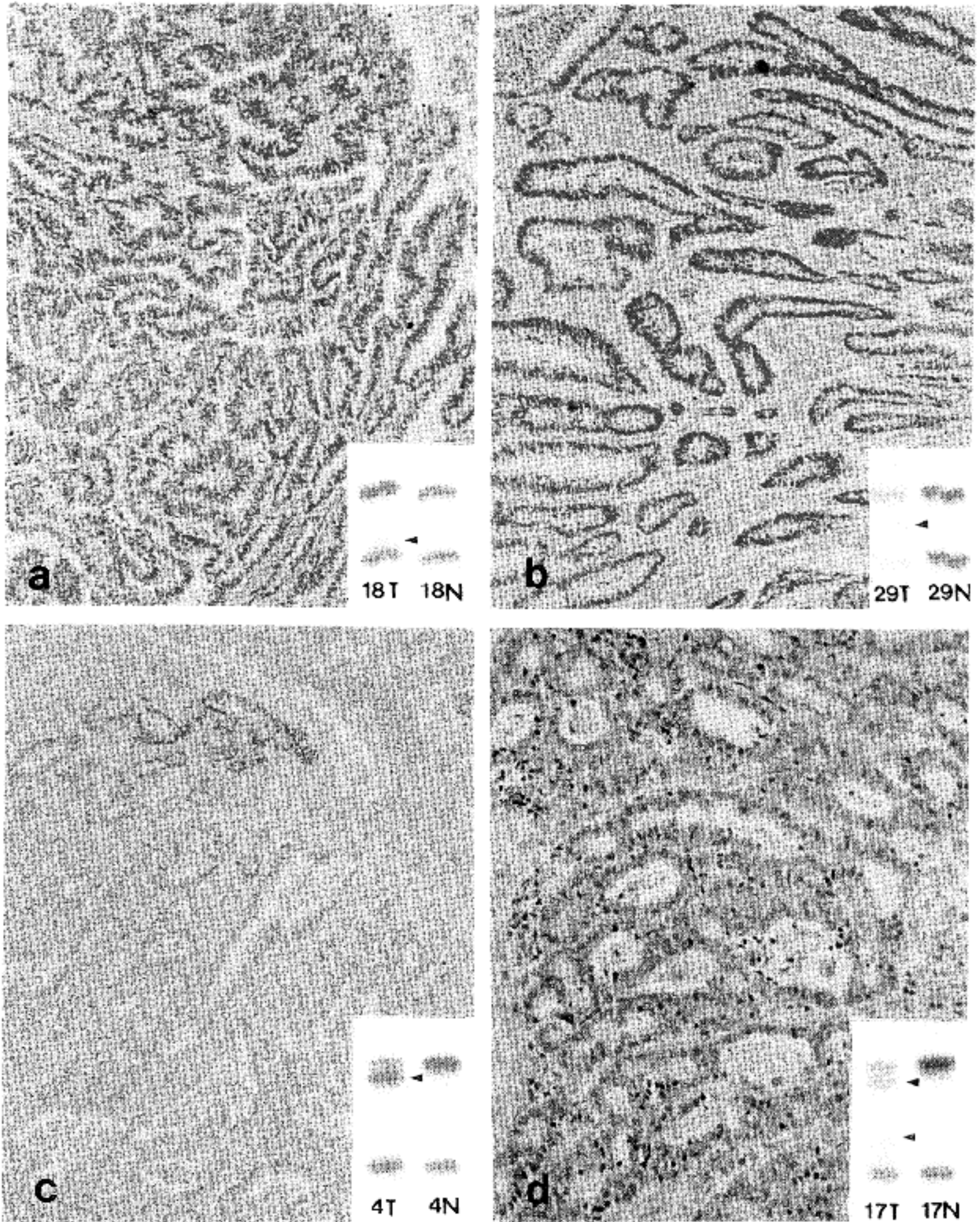
p53 돌연변이는 대부분 exon 5~8에서 발생한다고 알려져 있는데,<sup>20</sup> 본 연구에서는 exon 5에서 exon 9까지를 포함한 exon 4 (codon 34~125), exon 5~6 (codon 126~224), exon 7 (codon 225~261), exon 8~9 (codon 262~331)로 나누어서 증폭하도록 고안되었으며 (Fig. 1), 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다 (Table 1). 0.5 ml eppendorf tube에 50 μl의 PCR반응 혼합물[1x PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.8 at 25°C, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 각 primer (한국생명공학연구소) 10 pmole,



**Fig. 1.** Regions of the p53 gene subjected to PCR-SSCP analysis. The four fragments carrying the region of the p53 gene corresponding to exons 4 to 9 and amplified by the PCR are shown by horizontal bar with their nucleotide lengths.

**Table 1.** The oligonucleotide primers used to amplicate the Exon 4-9 of p53 gene in PCR(5'-3')

Exon	Upstream	Downstream
4	ATC-TAC-AGT-CCC-CCT-TGC-CG	GCA-ACT-GAC-CGT-GCA-AGT-CA
5/6	TTC-CTC-TTC-CTG-CAG-TAC-TC	AGT-TGC-AAA-CCA-GAC-CTC-AG
7	GTG-TTG-CCT-CCT-AGG-TTG-GC	CAA-GTG-GCT-CCT-GAC-CTG-GA
8/9	CCT-ATC-CTG-AGT-AGT-GGT-AT	CCA-AGA-CTT-AGT-ACC-TGA-AG



**Fig. 2.** Comparison of p53 immunohistochemical staining and the PCR-SSCP patterns. Each panel shows p53 immunohistochemistry and the corresponding PCR-SSCP experiment performed on DNA extracted from a serial section. (a) Sample 18 stained with DO-1 showing over 40% positive cells; the mutated/wild-type sequence ratio was less than 10%. (b) Sample 29 stained with DO-1 revealing 10% positive cells, whereas the mutated/wild-type ratio was 50%. (c) Sample 4 stained with DO-1 revealing less than 5% positive cells, whereas the ratio was 75-85%. (d) Sample 17 showing no immunoreactivity with DO-1, whereas mutant type bands were observed.



**Table 2.** The detection of p53 point mutation using different experimental condition for SSCP and the results of IHC. Electrophoresis was done using polyacrylamide gel on an FOKER FACE II sequencing gel apparatus. Gels were run at 30W constant power for 4 to 20 hrs depending on the condition used. The most informative conditions are marked(\*)

Exon	SSCP conditions samples	1T	2T	3T	4T	5T	7T	8T	9T	10T	13T	16T	17T	18T	20T	24T	27T	28T	29T	34T	Sum		
4	4°C, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/34	
	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/34
	RT, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/34
5/6	5% Glycerol	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/34
	*RT, 6~12% Acryl, 1 × TBE	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/34
	0% Glycerol	-	-	○	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/34
7	4°C, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	1/34
	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	1/34
	4°C, 6% Acryl, 1 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	1/34
8/9	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	2/34
	RT, 6~12% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	2/34
	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	2/34
7	*RT, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	5/34
	5% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	5/34
	4°C, 6% Acryl, 1 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	3/34
8/9	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/34
	4°C, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/34
	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/34
Result of PCR-SSCP	*RT, 6% Acryl, 0.5 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	5/34
	5% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	5/34
	4°C, 6% Acryl, 1 × TBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/34
Result of p53 IHC	0% Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13/34
	*RT, 6% Acryl, 0.5 × TBE	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	14/34

RT : Room temperature, 6% Acryl : 6% Acrylamide monomer (Acrylamide=29:1), 1 × TBE: 95mM Tris—Borate pH 8.3, 4mM EDTA, ○ : shifted bands were present on PCR-SSCP, ★ : p53 protein was detected by IHC

dNTPs 50 μM, template DNA 3 μl, DNA Polymerase (DynaZyme, Finnzymes OY) 1U, α-<sup>32</sup>P dCTP (NEN) 0.1 μCi를 만든후 mineral oil 한방울을 첨가하였다.

PCR은 Perkin-Elmer 480 유전자 증폭기를 이용하였으며, denaturation 94°C 1분, annealing A°C 1분 (A=58°C in Exon 5/6 and Exon 8/9, A=64°C in Exon4 and Exon 7), extension 72°C 2분의 반응을 35회 반복하였다. 증폭산물 15 μl를 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 가느다란 하나의 band가 나타날때 SSCP반응으로 진행하였다.

#### 4. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP의 원리는 denaturation이된 한 가닥의 strand를 재빨리 cooling시켰을때 상보성이 있는 가닥을 찾아가지 못하고 2차구조를 형성하게 되므로 이를 비변성 조건하의 polyacrylamide gel에 전기영동하여 single strand를 분석하는 것이다.

2 μl의 PCR산물을 SSCP loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue) 18 μl와 혼합하였다. 95°C에서 3분간 denaturation한 후 재빨리 얼음에 꽂아 single strand로 conformation을 유지하게한 다음, 0.35 mm×20 cm×40 cm 크기의 비변성 polyacrylamide gel에서 일정한 전력 (30W)으로 전기영동 (Poker-Face II, HOEFER)을 하였다. 전기영동이 끝나면 60°C에 3분간 gel을 건조시킨 후 (DrygelSr., HOEFER), -70°C에서 autoradiography 하였다.

SSCP의 판정은 각 환자의 조직이 만들어 낸 band를 wild형 대조군으로 사용된 정상 점막조직이 만들어낸 band와 서로 비교해서, 비정상적으로 변이된 band가 있을때를 p53 유전자의 해당 exon에 변이가 있는 것으로 하고 '양성'으로 하였다.

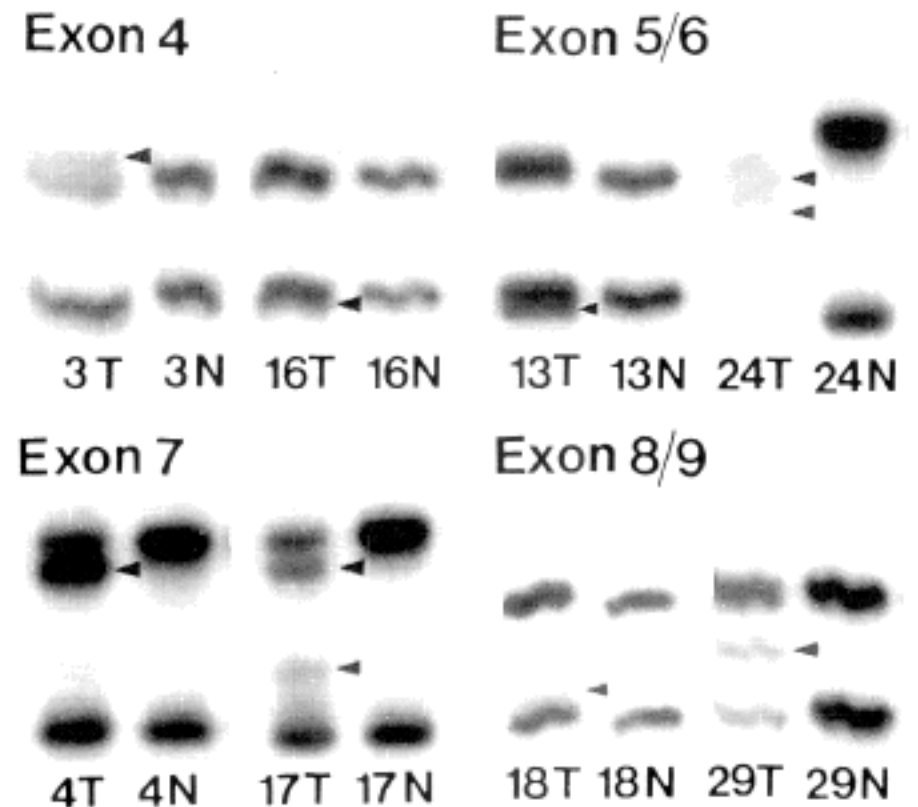
### 결 과

p53에 대한 면역조직화학적 염색법에서 양성반응은 총 34예중 14예 (41.2%)에서 관찰이 되었으며, 양성반

**Table 3.** Correlation of p53 immunoreactivity detected by IHC and genotypic mutation of p53 by PCR-SSCP

Immunohistochemistry of p53	PCR-SSCP		Total
	+	-	
Positive	8	6	14
Negative	5	15	20
Total	13	21	34

응을 나타낸 세포의 비율은 전체 유핵세포의 5% 미만에서 50% 까지 다양하게 나타났으며 (Fig. 2) 양성반응의 염색강도도 약한반응을 보인것에서부터 강한반응을 보이는 것까지 다양하였다. 한편 PCR-SSCP법에서 양성반응은 13예 (38.2%)에서 관찰되었으며, SSCP는 6% Acylamide, 90 mM Tris-Bolate pH 8.3, 4 mM EDTA, 5% glycerol의 성분으로 상온에서 시행할때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다 (Table 2). 면역조직화학적 염색법에



**Fig. 3.** SSCP analysis of exon 4~9 of the p53 gene. DNA from normal (N) and tumorous (T) tissue of advanced gastric cancer patients were analyzed by SSCP. Samples were scored positive(◀) for mutations when bands different from the normal control (N) were detectable.

**Table 4.** Location of 13 genetic alterations of p53 locus detected by PCR-SSCP in primary gastric carcinoma

PCR-SSCP	Immunohistochemistry		Total (34)
	Positive 14 (41.2%)	Negative 20 (58.8%)	
Exon 4	2	0	2
Exon 5/6	2	0	2
Exon 7	2	3	5
Exon 8/9	3	2	5
Total	<sup>a</sup> 8/14 (57.1%)	5/20 (25.0%)	<sup>a</sup> 13/34 (38.2%)

<sup>a</sup> One case shows an aberrant band on SSCP both in Exon 7 & Exon 8/9

서 양성인 14예중 8예 (57.1%)가 PCR-SSCP에서 양성 이었고, 나머지 6예 (42.9%)는 음성이었으며, 면역조직 화학적 염색법상 음성인 20예중 5예 (25.0%)는 PCR-SSCP에서 양성이었다(Table 3). 양 방법간의 일치율 (양성 또는 음성)은 67.6% (23/34)였다. PCR-SSCP 양성인 14예의 exon별 분포는 exon4에서 2예, exon 5/6에서 2예, exon 7에서 5예, exon 8/9에서 5예였으며, exon 7과 exon8/9에서 동시에 변이된 band를 관찰할 수 있는 경우가 1예였다 (Table 4, Fig. 3).

PCR-SSCP에서 양성인 13예에서, 변이된 band의 density와 정상 band의 상대적인 density는 다양했으며, 이는 면역조직화학적 염색상 전체 유핵세포중 양성세포의 비율과는 밀접한 관계는 없었다 (Fig. 2, Table 5).

## 고 찰

야생형 단백질은 그 짧은 반감기 때문에 세포핵 내에 축적되지 못하지만 변형된 단백질의 경우는 반감기가 길어져 종양세포내에 축적이 이루어지고 따라서 면역조직화학적 기법에 의해 가시화 시킬 수 있다. 그러나 p53 유전자의 변이를 찾기위한 면역조직화학적 방법은 단백질 수준에서 이루어지므로, 일차항체를 만들어낸 클론의 종류 및 유전자 산물의 보존 상태와 조직준비과정의 차이에 따라 같은 상태의 암종이라도 연구자들마다 결과가 다양하여 위암의 경우에 보고자에 따라 4%~64%까지 보고되어 있다. 본 연구에서는 41.2%에서 p53단백이 발현되었고 PCR-SSCP에 의한 유전자 변이는 38.2%로 단백질 측면에서 관찰된 변이 빈도가 더 높았다. 이는 신선조직을 대상으로 할 경우에는 조직 채취시 편견이 있을 수 있지만 본 실험에서는 H&E 염색으로 확인된 인접조직을 이용하였으므로, 그 점보다는 사용한 primer들로서 검색가능한 SSCP의 민감도가 낮거나 사용된 exon 4~9 이외의 장소에서 유전자 변이가 있었을 가능성 또는 야생형 p53단백이 경우에 따라 변이된 단백질과 면역학적으로 유사한 형태로 표현되어 검출되었을 것으로 추측되었다.

IHC법과 PCR-SSCP의 일치율(양성 또는 음성)은 67.6%(23/34)로 Lim등<sup>21</sup>의 73.0%보다는 낮았다. 많은 종류의 암조직에서 p53에 대한 두 방법간의 일치율은 59.5%~80%에 불과하였으며<sup>21-26</sup> 불일치되는 사례가 있었는데, 이러한 불일치의 원인에 대해서는 두 방법간의 민감성 차이로 주로 설명하지만, 현재까지는 확실히 알 수 없으며 각각의 방법에 대한 접합점을 모색하고자 하는 노력이 필요하다고 하였다.

유전자의 돌연변이를 검색하는 일반적인 방법 <ribo-nuclease cleavage (RNAase cleavage), Carbodiimide modification (CDI), Chemical cleavage of mismatch (CCM), Single-strand conformation polymorphism (SSCP), Heteroduplex analysis (HET), Denaturing gradient-gel electrophoresis (DGGE)> 중 SSCP는 한가닥으로 변성

**Table 5.** p53 expression in 14 cases of gastric cancer detected by immunohistochemistry and comparison with SSCP analysis

Sample No.	PCR-SSCP analysis Exon	Intensity <sup>b</sup>	Immunohistochemistry analysis <sup>a</sup>
1	4	+	<10%
2	4	+	20%
3	5/6	+++	45%
4	5/6	++	<5%
5	7	++++	<5%
6	7	+++	<5%
	8/9	++	<5%
7	8/9	+	40%
8	8/9	+++	10%
9	-	-	50%
10	-	-	30%
11	-	-	25%
12	-	-	20%
13	-	-	20%
14	-	-	10%

<sup>a</sup>Percentage of cells stained with the MAb 1801.

<sup>b</sup>Relative intensity of the shifted bands.

+, <25%; ++, <50%; +++, <75%; +++++, >75%

된 DNA가 어떤 특정상태에서 염기서열에 독특한 2차 구조를 형성하여 비변성조건하의 전기영동으로 서로 구분이 가능해진다는데 근간을 두고 있으며, 특히 다른 방법에 비해 실험이 간편하고 상당량의 정상조직이 섞여 single-base alternation이 10% 이하의 세포에만 존재 하더라도 확인이 가능하여 널리 이용되고 있다.<sup>27-29</sup>

SSCP의 민감성은 PCR 산물의 길이에 따라, primer의 종류에 따라, 그리고 PCR 산물내의 염기구성에 따라 좌우된다고 알려져 있다.<sup>30</sup> 또한 SSCP 시행시 가장 좋은 결과를 얻기 위하여 여러가지 변화인자를 고려해야 한다.<sup>31</sup> 본 실험에서는 같은 PCR산물일지라도 gel의 성분이나 전기영동 조건에 따라 p53 유전자 변이의 빈도가 서로 달랐으며 가장 좋은 결과는 6% Acrylamide, 0.5x TBE, 5% glycerol, 상온하에서 얻어졌다 (Table 2). 이는 SSCP 또한 면역조직화학적 염색만큼 실험조건에 따른 결과가 다양할 수 있으며, 절대적인 SSCP의 조건이 있을 수 없고 PCR산물의 염기성분에 따라 최적조건은 서로 다르다는 것을 암시했다.

본 실험에서 p53에 대한 IHC에서 핵에 염색된 세포의 비율과 PCR-SSCP상 변이된 band의 상대적인 density와는 서로 상관성이 적었다 (Table 5, Fig. 2). 이는, 한 검체내에서 SSCP상 변이된 band의 상대적인 진하가 변이된 DNA의 상대적인 양과 비례한다는 Hong등<sup>32</sup>과 Jacquemier등<sup>33</sup>의 연구를 고려해 보면, IHC상 양성

반응을 보이는 세포일지라도 반드시 유전자 수준에서 돌연변이를 가지고 있다고 말할 수 없으며 마찬가지로 IHC 음성반응이 돌연변이가 없다고 말할 수 없음을 시사하였다.

Tiemann<sup>34</sup>과 Inoue<sup>35</sup>은 종양 세포주에 virus를 감염시켜 정상형 p53이 안정화되는 것을 관찰하였고 이 안정화된 정상형 p53이 면역학적 방법으로 검출됨을 보여주었다. Reich<sup>36</sup>은 종양세포주에서 야생형 p53단백이 생성되는 경우를 관찰하였고,<sup>36</sup> 면역조직화학적 검색에서 음성으로 나타난 경우에서 유전자 수준의 변이를 확인하였다.<sup>37,38</sup> 세포의 주기와 분화상태에 따라 야생형 또는 변이형 단백질의 핵내 함량에 차이가 있을 수 있다는 보고도 있다.<sup>39</sup> 이상의 경우는 p53의 유전형과 표현형이 다르게 보여 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP의 불일치를 초래시키는 경우라 할 수 있다. 따라서 p53의 역할에 대한 많은 연구에서 단순히 IHC상의 발현유무로만 해석하기 보다는 유전자 수준에 대한 보조적 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료되었다.

### 결 론

원발성 진행성 위암 34예의 파라핀 포매괴를 대상으로 면역조직화학적 염색을 통한 p53단백 발현과 PCR-SSCP를 이용한 유전자수준에서의 p53돌연변이를 관찰한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. IHC법으로 검출된 p53단백 발현율은 41.2% (14/34)였으며, PCR-SSCP에서는 38.2% (13/34)였다.

2. IHC 양성인 14예중, 57.1% (8/14)가 PCR-SSCP에서 양성이고 42.9% (6/14)는 음성이었으며 IHC 음성인 20예중 25.0% (5/20)는 PCR-SSCP에서 양성으로, 두 방법간의 일치율은 67.6% (23/34)이었다.

3. PCR-SSCP 양성인 14예의 Exon별 분포는 Exon 4에서 2예, Exon 5/6에서 2예, Exon 7에서 5예, Exon 8/9에서 5예였으며, Exon 7과 Exon 8/9에서 동시에 변이된 band가 관찰되는 경우는 1예였다.

4. 변이된 band와 정상 band의 상대적인 density와 IHC상 유핵세포중 양성세포의 비율사이에는 상관성이 적었다.

이상의 성적은 원발성 진행성 위암에서 IHC상 양성 반응을 보이는 세포일지라도 반드시 유전자 수준에서 돌연변이를 가지고 있다고 말할 수 없으며 마찬가지로 IHC 음성반응이 돌연변이가 없다고 말할 수 없음을 시사하였으며, p53의 역할에 대한 많은 연구에서 단순히 IHC상의 발현유무로만 해석하기 보다는 유전자 수준에 대한 보조적인 연구와 상호 보완적으로 사용할 필요가 있음을 시사하는 소견이라 사료되었다.

### 참 고 문 헌

- Steinmeyer K, Maacke H, Deppert W. Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* 1990; 5: 1691-9.
- Deppert W, Buschhausen-Denker G, Patschinsky T, Steinmeyer K. Cell cycle control of p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cell. II. Requirement for cell cycle progression. *Oncogene* 1990; 5: 1701-6.
- Shohat O, Greenberg M, Reisman D, Oren M, Rotter V. Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense. *Oncogene* 1987; 1: 277-83.
- Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246: 603-8.
- Raycroft L, Wu HY, Lozano G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990; 249: 1049-51.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9979-83.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 1991; 252: 1708-11.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V. Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8982-6.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V. Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild-type or mutant p53 proteins. *Cancer Res* 1991; 51: 5232-7.
- Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, et al. Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* 1991; 51: 4279-86.
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4495-9.
- Hollingsworth RE, Lee W-H. Tumor suppressor genes: new prospects for cancer research. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 91-6.
- 오소영, 강명재, 이동근 등. 위선종 및 위암종에서 p53단백 발현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1996; 30: 886-892.
- Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-55.
- 김종재, 김철우, 김용일 등. 위암종에서의 p53 유전자와 pYNZ22 유전자의 대립인자소실과 p53 발현양상. *대한병리학회지* 1993; 27(Suppl.): A43.
- Yasui W, Nakayama H, Duniyasu H, et al. New prognostic factors in human gastric carcinomas. *Gan To Kajaku*



- Ryoho 1992; 19: 26-33.
17. Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S. p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993; 54: 759-64.
  18. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3056-8.
  19. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-62.
  20. Nigro JM, Baker ST, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1987; 342: 705-708.
  21. Lim BH, Soong R, Grieco F, Robbins PD, House aK, Iacopetta BJ. p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 69: 200-4.
  22. Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, et al. p53 nuclear immunostaining and gene mutations in non-small-cell lung cancer and their effects on patient survival. *Ann-Oncol.* 1995; 6 Suppl 3: S9-13.
  23. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I, et al. p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlated with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. A preliminary report of LCSG 871. *Chest* 1994; 106: 377-81.
  24. 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.
  25. Gorgoulis VG, Rassidakis GZ, Karameris AM, et al. Immunohistochemical and molecular evaluation of the mdm-2 gene product in bronchogenic carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 544-54.
  26. Soong R, Robbins PD, Dix BR, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27: 1050-5.
  27. Cotton RG. Current methods of mutation detection. *Mutat Res* 1993; 285: 125-44.
  28. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
  29. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.
  30. Moyret C, Theillet C, Puig PL, Moles JP, Thomas G, Hamelin R. Relative efficiency of denaturing gradient gel electrophoresis and single strand conformation polymorphism in the detection of mutations in exons 5 to 8 of the p53 gene. *Oncogene* 1994; 9: 1739-43.
  31. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4009.
  32. Hong WS, Hong SI, Lee DS, Son Y. Effect of non-tumor cell contamination on detection of p53 gene mutations in human gastric cancer cells by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Korean J Intern Med* 1994; 9: 20-4.
  33. Jacquemier J, Moles JP, Penault-Llorca F, et al. p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: comparison of staining and PCR-SSCP results. *Br J Cancer* 1994; 69: 846-52.
  34. Tiemann F, Deppert W. Stabilization of the tumor suppressor p53 during cellular transformation by simian virus 40: influence of viral and cellular factors and biological consequences. *J Virol* 1994; 68: 2869-78.
  35. Inoue H, Kondoh, Sudiro TM, Hakura A. Stability of p53 protein in rat cells transformed by various viral transforming genes. *Virology* 1992; 187: 343-7.
  36. Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumor antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 1984; 308: 199-201.
  37. Bennett WP, Hollstein MC, He A, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 1991; 6: 1779-84.
  38. Borresen AL, Hovig E, Smith-Sorensen B, et al. Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8405-9.
  39. Reich NC, Oren M, Levine AJ. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 2143-50.