

생식세포종양에서 p53 유전자 돌연변이와 Rb 유전자 단백질의 발현

고려대학교 의과대학 병리학교실, ¹연세대학교 원주의료원 해부병리과,
²순천향대학교 의과대학 산부인과학교실

이주한 · 조미연¹ · 이해혁² · 염범우 · 원남희

p53 Mutation and Expression of Rb Protein in Germ Cell Tumors

Ju Han Lee, Mee Yon Cho¹, Hae Hyeog Lee², Bom Woo Yeom,
and Nam Hee Won

Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul 152-025, Korea

¹Department of Anatomical Pathology, College of Medicine, Won Ju Yonsei University,

²Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, Soonchunhyang University

We investigated the role of the tumor suppressor genes in the germ cell tumor. Immunohistochemistry (IHC) and polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) for p53 mutation were done in 46 cases of the germ cell tumor with paraffin embedded tissue. The immunohistochemical staining for Rb protein was also performed in the same specimens. The following results were obtained. The overexpression of the p53 protein was detected in 7 of 46 cases (15%). p53 mutation by PCR-SSCP was detected in 1 of 46 cases (2.2%). Expression of Rb protein was negative in 19 cases (41%). These results suggest that p53 mutation does not play an important role in the initiation and progression of germ cell tumors. (*Korean J Pathol* 1998; 32: 1074~1080)

Key Words: Germ cell tumor, p53, Rb

서 론

생식세포종양은 크게 배세포종 (germinoma), 배아성 암종 (embryonal carcinoma), 난황막종양 (yolk sac tumor) 혹은 내배엽동종양 (endodermal sinus tumor), 융모막암종(choriocarcinoma), 기형종 (teratoma)으로 분류한다. 이중 악성 종양은 특히 10대에서 30대 사이의 젊은 사람들에게 높은 빈도로 발생한다.¹ 최근 분자생물학의 발달로 암유전자 및 종양 억제 유전자의 규명과 암유전자 단백 산물의 연구로 각종 장기에서 악성화하는 기전이 일부 밝혀졌으나, 생식세포

종양에 대한 연구는 극히 적다.²⁻¹¹ 종양 억제 유전자인 p53 유전자는 인체의 많은 종양에서 가장 흔히 돌연변이를 일으키는 유전자로, 인체에서 17번 염색체 단완 13.1 (17p13.1)에 위치하고, 약 20 kb의 11개 exon으로 구성되어 있으며, 정상에서는 세포 주기의 조절인자인 p21, cdc 등과 작용하여 비정상 세포의 G1/S 주기에서 세포성장을 억제하여 손상된 DNA를 회복시키거나 세포사 또는 세포소멸 (apoptosis; programmed cell death)을 유발한다.^{12,13} 따라서 p53 유전자 변이가 발생하면 정상 p53 유전자의 기능이 비활성화됨으로써 종양 발생에 기여한다는 것이 밝혀졌다.¹⁴⁻¹⁶ p53 유전자의 11개 exon 중 돌연변이는 118 codon과 309 codon사이, 즉 exon 5에서 exon 8사이에서 주로 일어나는데, 이는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)과 single strand conformational polymorphism (SSCP)법으로 쉽게 검출할 수

접 수: 1998년 1월 8일, 게재승인: 1998년 10월 7일

주 소: 서울시 구로구 구로동 80, 우편번호 152-050

고려대학교 구로병원 해부병리과, 이주한

ISSN : 0379-1149

있다.^{17,18} Shibata등¹⁹은 파라핀 포매 조직을 이용한 PCR을 가능케 하여 장기 보관 조직에서도 유전자 변이를 검색할 수 있게 되었다. 한편, 야생형의 p53 단백질은 반감기가 약 20분 정도로 정상 세포에는 아주 적은 양이 존재하므로 실제 조직에서 검출되지 않으나, 돌연변이형 p53 단백질은 수시간의 반감기를 가지므로 조직에서 면역조직화학적 방법으로 p53 단백질의 검출이 가능하게 되었다.²⁰

Rb 유전자는 13번 염색체 장완 14 (13q14)에 위치하고, 이 부위에 변이나 결손이 일어나면 Rb 유전자의 불활성화가 일어나게 된다.²¹ 그 결과 Rb 단백질이 생성되지 않아 세포주기에서 G0/G1 단계에서 S 단계로의 진입에 제동 작용을 못하게 되므로 세포분열에 대한 조절 능력을 잃게 되어 종양 발생에 중요한 역할을 한다. 또한 Rb 단백질 발현의 변화 혹은 소실이 환자의 예후와 연관이 있다는 보고가 있으나, 아직까지 확실한 상관관계에 대해서는 밝혀져 있지 않다.²²

생식세포종양에서 p53, Rb 유전자의 변이나 p53, Rb 단백질에 대한 연구는 매우 드물고, 그 결과가 매우 상이하다.²⁻¹¹ 본 연구에서는 p53 단백질에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP 분자생물학적 방법을 이용한 p53 유전자 변이 검출, 그리고 Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 방법을 이용하여 p53 유전자, Rb 유전자 등이 생식세포 종양에 어떠한 영향을 미치는지를 밝히고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구 대상

1987년부터 1997년까지 고려대학교 의과대학 안암병원, 구로병원과 연세대학교 원주병원에서 악성 생식세포종양으로 진단 받은 46예를 대상으로 하였다. 배세포종 22예, 배아성 암종 4예, 난황막종양 20예였다.

2. 연구 방법

1) 병리 조직학적 검색: 외과적으로 절제된 조직을 포르말린으로 고정하고, 통상적인 외과 병리학적 검색 후 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 칩투의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4~5 μ m의 두께로 박절한 후 H-E 염색을 시행하고 광학현미경으로 검경 후 분류하였다.

2) 면역조직화학적 염색: 종양 세포를 확인한 파라핀 포매 조직에서 5~6 μ m 두께의 두 개의 절편을 59°C 보온기에 60분간 처리 후 100% xylene으로 5분간 탈파라핀하고 100%, 95%, 75% 에탄올로 순차적으로 각각 3분간 처리 후 증류수로 함수시키고, 메탄올과 30% 과산화수소를 15분간 작동시킨 후 극초단파를 이용하여 끓는 phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 처리 후 4°C의 PBS에 다시 5분간 처리했다.

내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위해 3%의 과산화수소를 투여한 후, 다시 PBS에 10분간 수세 후 희석된 정상 염소 혈청 (Zymed, U.S.A.)을 도포하여 비특이적 결합을 억제하고 각각 1:100으로 희석된 단클론성의 p53 1차 항체 (DO-7, Novocastra, U.K.)와 단클론 항체인 mouse anti-human Rb, PMG 3-245 (PharMingen, San Diego, CA, U.S.A.)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 PBS로 세척했다. 2차 항체인 biotinylated link antibody (LSAB kit, DAKO, U.S.A.)와 20분간 반응시킨 후 PBS로 세척한뒤 streptavidin (Zymed, U.S.A.)과 peroxidase가 결합된 용액에 30분간 반응시켰다. 이후 AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole)로 발색한 다음 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색 후 흐르는 물에 세척하여 실온에 건조시킨 후 봉입하였다. 각각의 염색 시, 다른 장기에서 p53 단백질과 Rb 단백질이 표현된 바가 있는 조직을 대조군으로 함께 염색하였다.

3) DNA 추출 및 PCR-SSCP법에 의한 exon 5, 6, 7, 8에 대한 p53 유전자 변이의 검출

(1) 암 조직에서 DNA 추출: 파라핀 포매 조직을 10 μ m 두께로 자르고 1.5 ml Eppendorf tube에 담았다. 이 때 시료들간의 상호 오염을 방지하기 위해 조직 절단에 사용하는 칼은 한 시료를 자른 후 xylene으로 깨끗이 닦았으며, 기타 모든 시약 및 기구들은 1회용 또는 소독하여 사용하였다. 이들 파라핀 조직을 xylene으로 2회 탈파라핀하고 0.5 ml 무수 에탄올로 2회 세척한 후 2~3방울의 아세톤을 가한 다음 58°C에서 15분간 방치하였다. 건조된 시료를 1 ml의 digestion buffer (100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% SDS)에 넣고 proteinase K 용액 (20 mg/ml) 5 μ l를 넣어 54°C에서 48시간 단백질을 용해시켰다. 이 중 500 μ l를 새 튜브로 옮기고 여기에 동일 부피의 phenol/chloroform (1:1)을 넣고 DNA를 추출했다. 깨끗한 DNA 용액을 얻을 때까지 이 작업을 계속 반복했다. 50 μ l의 3.5 M sodium acetate와 1 ml의 100% ethanol을 넣고 -20°C에서 30분간 방치한 후 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. DNA는 1 ml의 70% ethanol로 수세한 후 Speed-Vac Concentrator로 건조시켰다. DNA pellet을 증류수 200 μ l로 녹이고 4°C에 보관하였다. 이렇게 pellet 형태로 얻어진 DNA를 증류수에 완전히 녹여서 분광흡입기로 DNA의 농도를 측정하는 다음 PCR 반응에 사용하였다.

(2) 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR);

① Primer: PCR은 한국생공으로부터 구입한 Premixtop을 이용하여 수행하였고, DNA integrity 측정용 (internal amplification control)으로서 human β -globin specific primer (한국 생공)를 사용하였고, PCR에 이용된 primer는 한국 생공에 의뢰하여 합성하였다.

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 M씩의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer Mannheim, Germany), primer, template DNA 및 Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)와 증류수를 차례로 혼합하고 PCR 용 premixed 용액에 조직에서 분리한 DNA 200 ng과 forward 및 reverse primer 각 50 pmole을 넣고, mineral oil로 반응액을 덮은 후 denaturation, annealing, extension을 계획하고 automatic thermal cycler (Takara)에서 PCR을 수행하였다. PCR 산물의 일부를 취하여 1.2% agarose gel에서 30분간 전기영동하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide 용액에 염색하여 자외선에서 DNA증폭 여부를 확인한 다음 Polaroid로 촬영하여 결과를 남기고 SSCP를 수행하기까지 -20°C에 보관하였다.

③ Single strand conformation polymorphism (SSCP) 법: 15 μ l의 PCR 산물에 denaturing solution (95% formamide, 0.05% bromophenol blue) 15 μ l를 넣고 끓는 물에서 3분간 둔 후 급히 얼음에 냉각한 후, 12.5% polyacrylamide gel (15 cm \times 15 cm \times 0.75 mm)에서 200 V로 16시간정도 전기영동했다. 전기영동이 끝난 후 다음과 같은 방법으로 염색했다. gel을 10% ethanol에 5분간 담가둔 후 1% 질산에 3분간 담가두었다. 0.012 M 질산은 용액에 20분간 담구고 증류수로 씻어준 후 0.28 M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde 용액으로 발색시켰다. DNA band 가 적절한 진하기로 염색되면 10% 초산으로 10분간 고정시키고 증류수로 씻은 후 cellophane으로 gel을 말려서 보관하였다.

4) 결과의 판정: p53 단백질과 Rb 단백질에 대한 면역조직화학적 염색 반응의 판정은 조직 표본을 광학현미경으로 판정하여 조직의 중심부에서 종양의 핵이

진한 적갈색으로 염색되는 것 중 전체 종양 세포에 대해 0%인 경우를 음성, 1~4%를 trace, 5~24%를 1+, 25~50%를 2+, 51% 이상을 3+으로 하였다. PCR-SSCP 법에 의한 p53 유전자 돌연변이의 확인은 정상인에서 분리한 DNA로부터 얻은 PCR 생성물을 같이 전기영동하고 환자 시료를 그 결과와 비교하여 p53 유전자의 돌연변이 여부를 확인하였다.

5) 통계처리: p53 단백질 발현, p53 유전자 변이 및 Rb 단백질 발현의 상호 관련성과 종양 종류별 관련성은 SSCP/PC+ 프로그램을 이용하여 chi-square test로 검정하였으며 유의수준은 p-value 0.05 이하로 하였다.

결 과

1. 임상 자료의 분석 (Table 1)

대상 환자의 연령 분포는 1세부터 48세였으며, 20대가 가장 많았다 (43%). 성별은 남자가 30예 (65%), 여자가 16예 (35%)였다. 장기별로는 고환 (25예), 난소 (15예), 종격동 (4예), 외음부 (1예), 척수 (1예) 등의 분포를 보였다.

2. p53 단백질에 대한 면역 조직화학 염색 (Table 2)

p53 단백질의 발현은 총 46예 중 7예 (15%)에서 양성이었다. 배세포종이 22예 중 4예 (18%)에서 양성 이었고, 배아성 암종은 4예 중 1예 (25%), 난황막종양은 20예 중 2예 (10%)에서 양성을 보였다 (Fig. 1). 배아성 암종, 배세포종, 난황막종양의 순서로 양성을 보였으나 통계학적 의의는 없었다 (p>0.05).

3. PCR-SSCP법에 의한 p53 유전자 변이 검출 (Fig. 3)

p53 단백질에 양성을 보였던 배세포종 1예에서 exon 7에서 유전자 변이가 관찰되었다 (2.2%).

Table 1. Age and sex distribution in the germ cell tumors

	Germinoma	YST	Embryonal
Age (years)			
0~10	1	8	0
11~20	4	3	1
21~30	10	7	3
31~40	3	1	0
41~50	4	1	0
Sex			
Male	15	11	4
Female	7	9	0
Total	22	20	4

YST: Yolk sac tumor, Embryonal: Embryonal carcinoma

Table 2. p53 protein expression in germ cell tumors

	Germinoma	YST	Embryonal
Negative	15	11	2
Trace	3	7	1
+	4	2	1
++	0	0	0
+++	0	0	0
Total	22	20	4

YST: Yolk sac tumor, Embryonal: Embryonal carcinoma (-): 0%, trace: 1~4%, (+): 5~24%, (++) : 25~50%, (+++): >50%

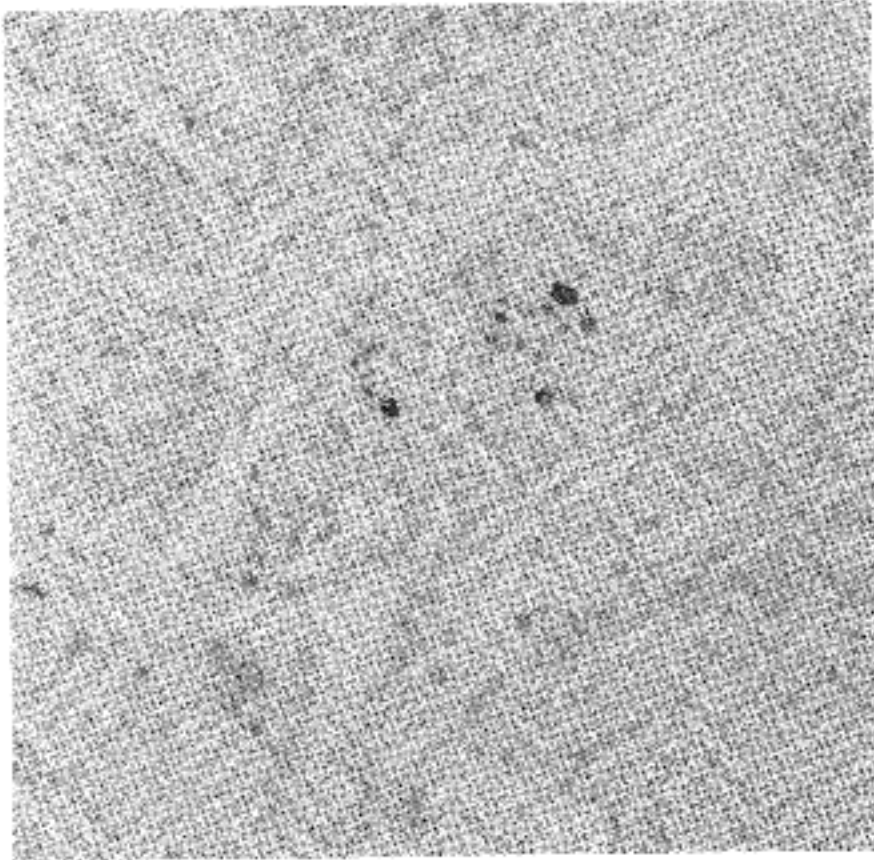


Fig. 1. The yolk sac tumor displays a focal reactivity for p53 immunostaining.

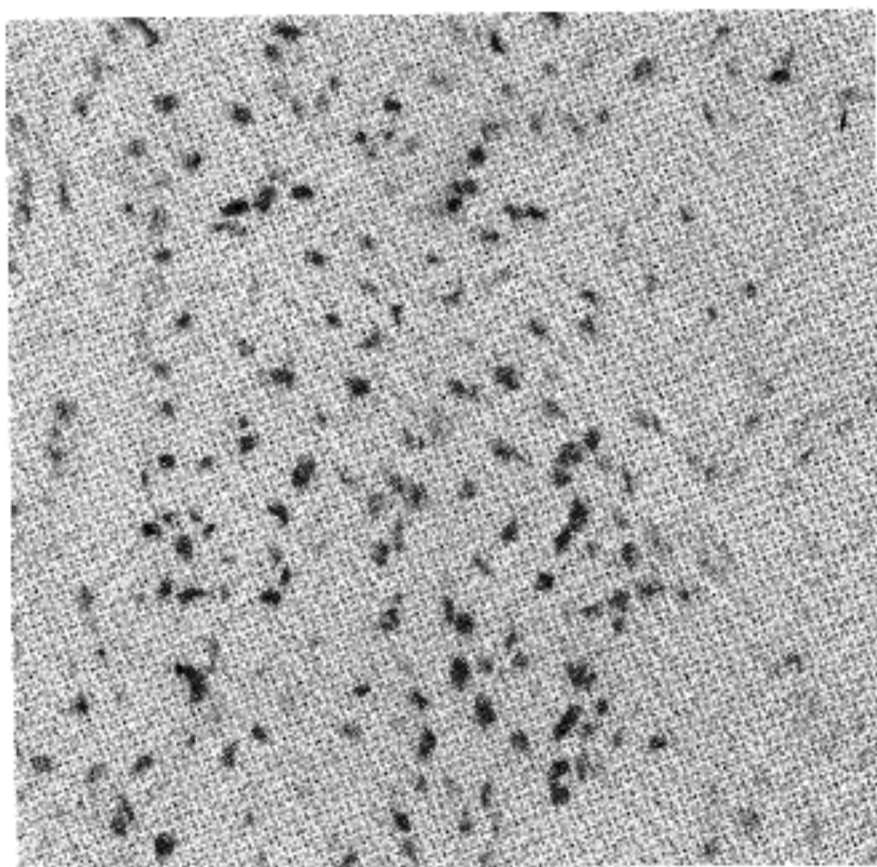


Fig. 2. The yolk sac tumor displays a strong reactivity for Rb immunostaining.

4. Rb 단백질에 대한 면역 조직화학 염색 (Table 3)

Rb 단백질의 발현은 46예 중에서 19예 (41%)에서 음성이었다. 배세포종에서 22예 중 10예 (45%)에서 음성을 보였고, 난황막종양은 20예 중 5예 (25%), 배아성 암종은 4예 모두 음성을 보였다 (Fig. 2). 배아성 암종, 배세포종, 난황막종양 순서로 음성률을 보였으나 통계학적 의의는 없었다 ($p > 0.05$).

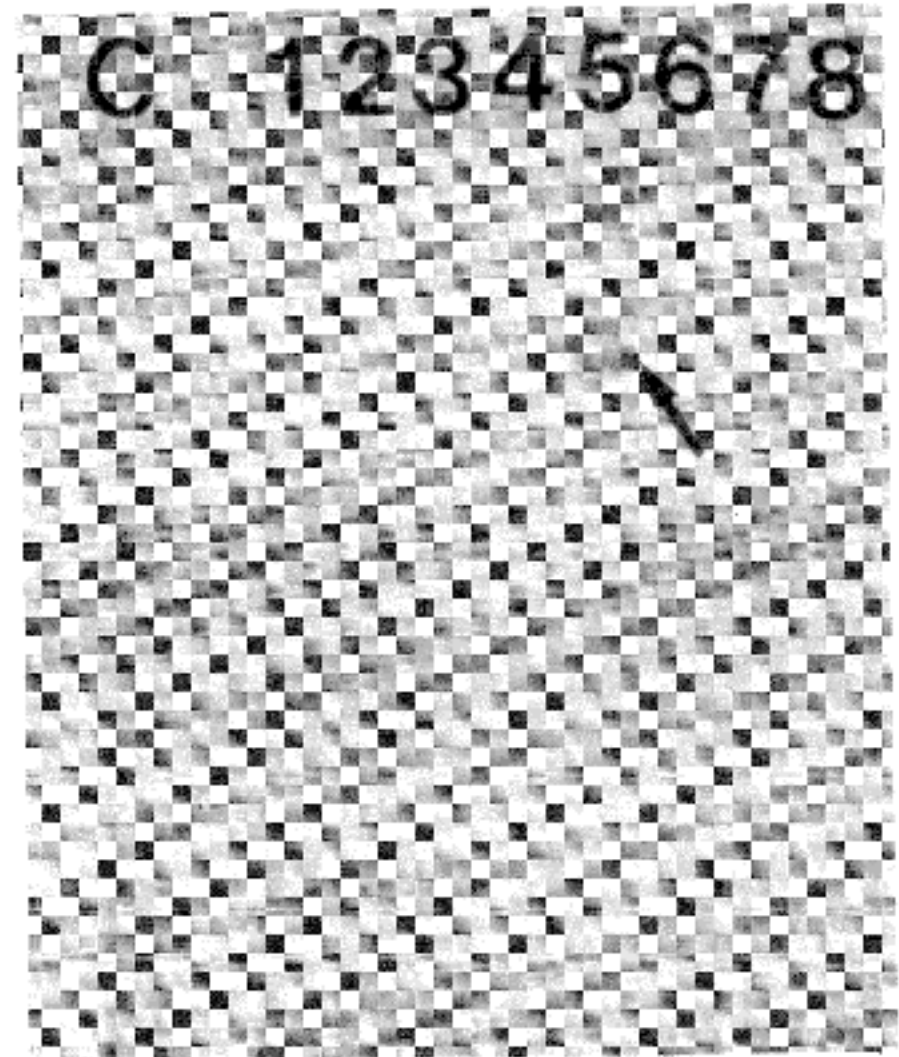


Fig. 3. The SSCP gel electrophoresis shows mutation in exon 7 (arrow) of p53 gene in one germinoma. (c: control, 1-6: germinoma, 7 and 8: yolk sac tumor)

Table 3. Rb protein expression in germ cell tumors

	Germinoma	YST	Embryonal
Negative	10	5	4
Trace	1	4	0
+	9	6	0
++	1	3	0
+++	1	2	0
Total	22	20	4

YST: Yolk sac tumor, Embryonal: Embryonal carcinoma (-): 0%, trace: 1~4%, (+): 5~24%, (++) : 25~50%, (+++) : >50%

고찰

악성 생식세포종양은 주로 젊은 나이에 호발하고 악성도가 높은 종양으로 발생 기원은 명확하게 밝혀지지 않았으나, 정상피종은 원시생식세포 또는 정모세포로부터 단배체로 분열하기 전에 발생하는 종양이고, 정상피종을 제외한 생식세포 암종 중 가장 분화가 안된 순수 배아성 암종은 생식세포들이 다분화능을 가진 종양 세포로 변한 것으로 생각한다.¹ 반

면에 내배엽종양은 배아성 암종의 미분화 세포들이 배아의 조직으로 분화된 것으로 이해하고 있으나, 지금까지 생식세포종양의 뚜렷한 발생 원인과 기전에 관해서는 밝혀지지 않고 있는 실정이다.¹ 최근에는 분자생물학의 발전으로 생식세포종양에서 종양 유전자와 종양 억제 유전자에 대한 연구로 이들 종양의 발생에 관여하는 유전자를 규명하고자 하는 노력이 있어 왔다.²⁻¹¹ 본 연구에서는 현재까지 많은 종양에서 연구하고, 또한 그 기능과 생리활성이 많이 밝혀진 p53 유전자의 돌연변이와 Rb 유전자의 단백질 발현을 검출하여 이들이 생식세포 종양 발생에 관여하는지를 밝히고자 하였다.

p53 유전자에 의하여 발현되는 p53 단백질은 53,000 dalton 크기의 인단백으로, 발암 작용에서 p53의 역할은 매우 다양하다.¹²⁻¹⁷ 최근까지 밝혀진 바에 의하면 대장, 유방, 간, 난소, 방광, 간엽조직, 중추신경계, 폐, 그리고 조혈기관에서 기원하는 악성 종양에서 p53 유전자의 변이나 결손이 구체적으로 규명되었고, p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고 있다.¹⁷ 야생형 p53 단백질이 종양 세포의 성장을 억제하는 기전은 세포주기 중 후반기 G1 기에 작용하여 세포의 분열을 억제하여 세포분열 과정에서 negative regulator로 작용한다고 알려져 있다.¹²

생식세포종양에서 p53 유전자 변이에 관한 연구 보고는 매우 적으며, 특히 면역조직화학 검사를 이용한 p53 단백질 발현에 관하여서는 상반된 보고들이 많다. 그러나 최근의 연구 보고 중 일부에서는 생식세포종양의 경우, 인체의 타 종양과 달리 p53 유전자 등이 중요한 역할을 하지 않는다고 한다.²⁻¹¹ Peng 등은 22예의 생식세포종양에서 DNA 분석을 한 결과 p53 유전자 변이를 찾지 못했고,⁵ Heimal등도 34예를 대상으로 PCR 등의 방법을 통해 p53 유전자 변이를 관찰하고자 하였으나, 한 예에서도 관찰하지 못하였다.³ Schenkman등¹¹은 생식세포종양에서 면역조직화학 검사를 통해 p53 단백질 과발현된 30예의 생식세포종양에 대해 PCR-SSCP 방법과 sequencing 등을 통해 p53 유전자 변이를 관찰하고자 하였는데, 단 한 예에서만 codon 140에 silent mutation이 관찰되어 p53 단백질 표현이 p53 돌연변이와 일치하지는 않는다는 주장을 하기도 하였다. p53 단백질 발현과 p53 유전자 변이의 불일치에 대해, Peng등은 고환에서 생긴 암들이 p53 단백질의 반감기가 길어졌기 때문이라고 주장하였고,⁵ Schenkman등은 p53 단백질의 과표현이 비정상적인 기능을 의미하는 것은 아니며, 세포 내 단백질과 결합 후 안정화된 단백질의 비활성화된 형태일지도 모른다는 주장을 하였으나,¹¹ 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 46예 중 7예에서 p53 단백질 발현이 관찰되었고, 발현 정도가 전체 종양

세포의 5~24% 사이에서 양성 반응을 보였으며, 이중 PCR-SSCP 방법을 통한 p53 유전자 변이는 1예에서만 관찰되었다. 이러한 결과는 첫째, 생식세포종양의 p53 유전자에 대한 선행 연구 결과들과 동일하게 p53 유전자 변이 없이 p53 단백질 발현되었을 가능성이 매우 높고,^{3,5,9,11} 둘째 PCR-SSCP 방법 자체의 한계 때문으로 볼 수 있다. PCR-SSCP 방법이 p53 유전자 변이를 검출하는데 빠르고 예민한 방법이지만,¹⁸ 추출된 세포의 DNA 중 변이를 일으킨 세포의 농도가 문제가 되므로,²³ 본 실험의 결과처럼 면역조직화학 검사를 통해 양성으로 확인된 종양세포의 수가 작을 경우에는 변이를 확인하기 힘들 것으로 보인다. 결론적으로 다른 종양과 달리 생식세포종양에서 관찰되는 p53 단백질 표현의 감소와 p53 유전자 변이의 감소로 보아, p53이 생식세포종양의 생성과 발전에 관여하지 않는 것으로 추측한다.

Rb 유전자는 1980년대 중반에 각기 다른 세 그룹의 연구자들에 의해 클론화된 최초의 종양억제유전자이다.²⁴⁻²⁶ Rb 유전자는 4.7 kb의 cDNA로서 클론화되고 그들의 산물은 인산화의 상태에 따라 110 혹은 116 kD의 핵인산화 단백질이다. Rb 단백질은 G0 혹은 G1 단계에서는 저인산화 상태이고 S 단계에서와 초기 M 단계 동안에 점진적으로 인산화한다. 저인산화 상태에서 Rb 단백질은 c-myc 등의 종양 유전자의 산물이나 전사인자인 E2F와 결합하여 세포 증식을 억제한다. 그러나 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 감소하면 세포의 비조절성 주기가 발생한다. 또한 Rb 유전자는 발암 과정에서 유전자의 두 대립형질 모두에 돌연변이 또는 소실이 일어나야 종양이 발생하는 열성 유전자이다. 초기 변이는 주로 점 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 이중접합성을 상실하게 된다. 이러한 가설은 1971년 Knudson등에 의해 이미 제시된 two hit theory로써 지놈 (genome)의 DNA와 Rb 전사수준에서 일치하는 여러 연구 결과들로 증명되어 있다.^{27,28} Rb 유전자의 불활성화는 각종 장기에 종양 발생을 일으키며 이중에는 유방, 폐, 방광, 간, 전립선 등에서 생기는 암들이 있다.²⁹⁻³⁶

Reissmann등은 219예의 비소세포폐암에서 DNA, mRNA, 그리고 단백질 수준에서의 Rb 유전자 불활성화를 조사한 바 Southern blot에서는 2예 (0.9%), northern blot에서는 22예 (10.0%)의 Rb 유전자 불활

성화가 검출되었고 면역조직화학법이 실시 가능한 163예 중 53예 (32.5%)에서 소실 혹은 변화된 Rb 단백질 변화를 보였고,³⁴ 이외에도 다른 보고자들의 연구에서도 일치하는 결과를 보여 면역조직화학법이 Rb 유전자 비활성 상태를 검출하는데 가장 민감한 검사 중의 하나로 인정되고 있다.^{35,36} 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 비종양 세포에 회석되어 정상 세포에서 유래된 band나 transcript가 검출될 수 있기 때문으로 설명할 수 있다.³⁵

본 실험에서는 생식세포종양의 48예 중 19예(41%)에서 음성률을 보여 Rb 유전자가 생식세포종양의 생성과 발전에 관여함을 확인할 수 있었으나, 아직 이에 대한 연구가 매우 부족한 실정이므로 더 많은 증거를 통한 지속적인 연구가 필요하리라 생각한다.

결 론

생식세포종양 46예를 대상으로 p53 단백질의 면역조직화학 검사와 PCR-SSCP법을 통한 p53 유전자 변이, Rb 단백질의 면역조직화학 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 전체 46예 중 p53 단백질의 발현은 7예 (15%)에서 관찰되었고, 배세포종이 22예 중 4예 (18%), 난황막종양은 20예 중 2예 (10%), 그리고 배아성 암종은 4예 중 1예 (25%)에서 양성을 보였다.

2) PCR-SSCP를 이용한 p53 유전자 변이는 배세포종 1예 (2.2%)에서만 관찰되었다.

3) 전체 46예 중 Rb 단백질의 발현은 19예 (41%)에서 음성이었다. 배세포종에서 22예 중 10예 (45%), 난황막종양은 20예 중 5예 (25%), 그리고 배아성 암종은 4예 모두 음성을 보였다.

이상의 결과로 p53 유전자는 생식세포종양 발생에 관여하지 않는 것으로 밝혀졌고 Rb 유전자가 생식세포종양의 생성과 발전에 관여하리라 생각되며 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 생각한다.

참 고 문 헌

1. 대한병리학회. 병리학. 제 3판. 서울: 고문사, 1997: 863-73.
2. Feng X, Zhang S, Ichikawa T, et al. Intracranial germ cell tumors: Detection of p53 gene mutations by single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 555-61.
3. Heimdal K, Lothe RA, Lystad S, Holm R, Fossa SD, Borresen AL. No germline TP53 mutations detected in familial and bilateral testicular cancer. *Genes Chrom Cancer* 1993; 6: 92-7.

4. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Okada S, Matsuura S, Hirohashi S. High incidence of p53 gene mutation in human ovarian cancer and its association with nuclear accumulation of p53 protein and tumor DNA aneuploidy. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 978-84.
5. Peng HQ, Hogg D, Malkin D, et al. Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3574-8.
6. Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, et al. Alterations of the p53 tumor suppressor gene in carcinoma in situ of the testis. *Cancer* 1996; 78: 1958-66.
7. Bartkova J, Bartek J, Lukas J, et al. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991; 49: 196-202.
8. Lewis DJ, Sesterhenn IA, McCarthy WF, Moul JW. Immunohistochemical expression of p53 tumor suppressor gene protein in adult germ cell testis tumors: clinical correlation in stage I disease. *J Urol* 1994; 152: 418-23.
9. Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP. Mutation of the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod Pathol* 1994; 7: 435-9.
10. Wei YD, Jiafu Z, Xi QS, et al. p53 gene mutations in chinese human testicular seminoma. *J Urol* 1993; 150: 884-6.
11. Schenkman NS, Sesterhenn IA, Washington L, et al. Increased p53 protein dose not correlate to p53 gene mutations in microdissected human testicular germ cell tumors. *J Urol* 1995; 154: 617-21.
12. Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362: 786-7.
13. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. *Cell* 1993; 74: 777-9.
14. 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.
15. Marin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-62.
16. Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Borresen AL, Nesland JM. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissue of the cervix uteri. *J Pathol* 1993; 169: 21-6.
17. Caron de Fromentel C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chrom Cancer* 1992; 4: 1-15.
18. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. A rapid and sensitive detection of point mutations and DNA poly-

- morphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
19. Shibata DK, Arnheim N, Appleman MD, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225-30.
 20. Starzynska T, Marsh PJ, Stern PL. p53 overexpression as a marker of malignancy in gastric biopsies. *Surg Oncol* 1993; 2: 321-4.
 21. Lee WH, Shew JY, Hong FD, et al. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 1987; 329: 642-5.
 22. Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 695-9.
 23. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3056-8.
 24. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-6.
 25. Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 1987; 236: 1657-61.
 26. Lee WH, Bookstein R, Hong FD, Yong LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* 1987; 235: 1394-9.
 27. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogene and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-43.
 28. Dunn JM, Phillips RA, Becker AJ, Gallie BL. Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Science* 1988; 241: 1797-800.
 29. Sawan A, Randoll B, Angus B, 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.
 30. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Tateishi R. Retinoblastoma protein expression in lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Oncology* 1994; 51: 544-51.
 31. Logothetis CJ, XU HJ, Ro JY, et al. Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1256-61.
 32. Seki S, Kawakita N, Yanai A, et al. Expression of the retinoblastoma gene product in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 366-74.
 33. Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, et al. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7762-6.
 34. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, et al. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1993; 8: 1913-9.
 35. Yokota J, Akiyama T, Fung YK, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene in small cell carcinoma of the lung. *Oncogene* 1988; 3: 471-5.
 36. Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in small cell lung carcinoma. *Science* 1988; 241: 353-7.
-