

인체 유방암종에서 p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} 및 p53 의 발현

김동훈 · 박찬금¹ · 이호정 · 이원미
김은경 · 주종은

노원을지병원 병리과
한양대학병원 병리과

접 수 : 2005년 5월 9일
게재승인 : 2005년 8월 27일

책임저자 : 김 동 훈
우 139-231 서울시 노원구 하계1동 280-1
노원을지병원 병리과
전화: 02-970-8524
Fax: 02-972-0068
E-mail: idavidkim@yahoo.co.kr

Expression of p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 in Human Breast Cancers

Dong Hoon Kim, Chan Kum Park¹, Ho Jung Lee, Won Mi Lee, Eun Kyung Kim and Jong Eun Joo

Department of Pathology, Nowon Eulji Hospital, ¹Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background : Cell cycle progression is governed by cell cycle regulators and inhibitors such as the cyclin dependent kinases (CDK), p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53. The purpose of this study was to correlate expressions of p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 with the various clinicopathologic prognostic parameters of human breast cancers. **Methods :** The paraffin-embedded tissue sections from 102 patients with human breast carcinomas were examined by performing immunohistochemical staining. The primary antibodies used for immunohistochemical staining were mouse monoclonal antibody to human p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1}, p53, ER and PR. **Results :** The expression rates of p34^{cdc2}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 were 29.3%, 40.2% and 49.1% in breast carcinomas, respectively. In normal breast tissues, p34^{cdc2}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 were not expressed. The p34^{cdc2} was expressed in the cytoplasm of cancer cells. The expression rate of p27^{Kip1} was 29.3% in breast carcinomas and 100% in normal breast tissues, so the loss of p27^{Kip1} expression in breast cancer was noted. The high expression of p21^{WAF1/Cip1} in neoplastic cells was associated with the p53 expression (p=0.03). The expression of p27^{Kip1} was correlated with that of the progesterone receptor (PR) (p=0.04) and the expression of p21^{WAF1/Cip1} was correlated with that of positivity for estrogen receptor (ER) (p=0.04) and PR (p=0.04). No correlation was demonstrated between the mean patient survival and the expression rate of p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53. **Conclusions :** The loss of the normal cell growth cycle by the abnormal expression of cyclin dependent kinases and their inhibitors and the steroid hormones may play an important role in human breast carcinogenesis. The p53 dependent p21^{WAF1/Cip1} pathway, the p27^{Kip1} protein loss and the cdc2 overexpression were important in development and progression of human breast cancer.

Key Words : p34^{cdc2}; p27^{Kip1}; p21^{WAF1/Cip1}; p53; Breast cancer

세포주기의 G1-S와 G2-M 이행에서 cyclins, cyclin 의존성 키나아제(cyclin dependent kinases, CDK)와 CDK 억제제들은 서로 밀접하게 연관되어 있으며, 이들의 상호작용으로 세포주기의 조절이 이루어진다. 세포주기 조절 인자의 이상이 악성종양의 발생 및 진행 과정에서 중요한 역할을 하고 있음이 여러 종양에서 연구된 바 있다.^{1,2}

cdc2 (CDK1)는 cyclin A 또는 cyclin B1과 복합체를 이루어 G2-M 이행에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 p34^{cdc2}는 cdc2 mRNA의 발현으로 형성된 단백질이다. 세포주기는 CDK와 결합하여 이를 불활성화 시키는 여러 CDK 억제제들에 의해

조절되는데, 이들 CDK 억제제들이 암 억제 유전자로 작용할 수 있다.³

CDK 억제제는 특정한 CDK나 CDK-cyclin 복합체와 결합하여 G1-S기로의 이행을 억제한다. CDK 억제제는 아미노산 배열에 따라 INK 과와 CIP/KIP 과로 나뉜다. 이 중 CIP/KIP 과에 속하는 것으로 p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}과 p57^{Kip2}가 있으며 G1기에 작용하는 여러 CDK 복합체에 다소 비특이적으로 결합한다. p27^{Kip1} 유전자는 염색체 12p 12.3에 위치하며 유전자 산물은 p21^{WAF1/Cip1}과 N 말단 부위에서 42%의 유사성을 보이며, p21^{WAF1/Cip1}과 마찬가지로 다양한 CDK-cyclin 복합체와 결합한다.⁴

p27^{Kip1}은 변형성장인자 β (transforming growth factor β , TGF β), 세포와 세포의 접촉, cyclic adenosine monophosphate 양의 증가와 같은 여러 인자의 영향을 받아 많이 발현되어 G1에서 S로의 이행을 억제하는 것으로 알려져 있다. p27^{Kip1}의 생물학적인 기능은 여러 CDK들의 활성화를 억제하여 세포 성장을 조절하는 것이므로, p27^{Kip1}의 이상은 정상적인 세포주기의 조절 실패로 인해 세포 변형을 초래할 수 있다. p27^{Kip1}의 감소로 암세포의 특징인 빠른 성장을 억제할 수 있는 기능이 상실되므로, p27^{Kip1}의 감소를 암의 악성도를 평가하는 지표로 이용할 수 있다.⁴

p21^{WAF1/Cip1} 유전자는 cyclin 의존성 G1 키나아제와 G2/M 특이 cdc2 키나아제를 억제하며 일반적으로 p53에 의하여 유도되는 것으로 알려져 있다. 그러나 p53과는 상관없이 독자적인 경로에 따라 유도된다는 보고도 있다.⁵ 종양 억제 유전자인 p53 유전자는 인체의 많은 종양에서 돌연변이를 가장 흔히 일으키는 유전자로, 인체에서 염색체 17p 13.1에 위치하고, 11개 exon으로 구성되어 있다.

p53 유전자는 정상 상태에서는 세포주기 조절 인자인 p21^{WAF1/Cip1}이나 cdc 등과 작용하여 비정상 세포의 G1/S 주기에서 세포 성장을 억제하여 손상된 DNA를 회복시키거나 세포사 또는 세포소멸을 유발하여 유전체 통합성을 유지하는 것으로 추정되고 있다.⁶ 따라서 p53 유전자에 변이가 발생하면 정상 p53 유전자의 기능이 비활성화됨으로써 종양 발생에 기여한다는 사실이 밝혀졌다.^{7,8} 이와 같이 세포주기 조절 인자들은 복잡하고 다양한 경로에 의하여 발현되며 종양에 따라 차이가 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 이들 세포주기 조절 인자들이 유방암의 발생 및 진행 과정에서 어떠한 역할을 담당하고 있는지 알아보고 또한 유방암의 임상 및 병리학적 예후 인자들과 어떠한 상관관계가 있는지 관찰하기 위하여 시행하였다.

재료와 방법

연구 재료

1990년 1월부터 1995년 12월까지 한양대학병원과 노원을지병원에서 절제된 유방암 102예를 연구 대상으로 하였다. 증례는 모두 여성에게서 발생한 것이었고, 연령 분포는 26-73세(평균 46.8±10.16세)였다. 종양의 종류별로는 침윤성 도관 세포암종 92예, 침윤성 소엽암종 2예, 점액암종 2예, 수질암종 4예 그리고 비정형 수질암종이 2예였다.

연구 방법

병리조직학적 검사

병리과에 보관된 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색된 유리 슬라이드를 재검토하였다.

면역조직화학염색

각 증례의 대표적인 절편을 선택하여 4 μ m 두께로 박절한 후 탈파라핀한 조직 절편을 증류수에서 5분간 흡수하였다. 구연산 완충액(pH 6.0)에 담가 autoclave 안에서 121°C에서 15분간 작동시켰다. 증류수에 10분간 방치한 후 3% H₂O₂에 30분간 담근 다음 Tris 완충액(pH 7.6)에 10분간 중화시켰다. 그런 다음 차단혈청(blocking serum)에 10분간 작용시켜 비특이성 단백질의 반응을 차단하였다. 일차 항체로 조직에 p21^{WAF1/Cip1} (Neomarkers, Fremont, CA, USA), p27^{Kip1} (Neomarkers, Fremont, CA, USA), p53 (Neomarkers, Fremont, CA, USA), p34^{cdc2} (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), estrogen receptor (Novocastra, Benton Lane, Newcastle, UK), progesterone receptor (Novocastra, Benton Lane, Newcastle, UK)를 1:100으로 희석하여 조직 위에 떨어뜨린 후 70분간 실온에서 반응시켰다. Tris 완충액(pH 7.6)에 10분간 방치하여 중화시킨 후 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako, San Francisco, CA, USA)를 떨어뜨리고 실온에서 12분간 반응시켰다. 다시 Tris 완충액에서 10분간 중화한 후 Streptavidin-biotin-peroxidase complex technique [UltraTek HRP (Anti-Polyvalent), ScyTek, Logan, Utah, USA]을 이용 30분간 작용시켰다. 그런 후 Tris 완충액에 10분간 방치하고, AEC (3-amino-9-ethyl carbazole, Dako)로 발색시켰다. 현미경으로 관찰하여 발색이 되는 즉시 증류수에 넣어 5-10번 정도 수세하였다. 헤마톡실린으로 염색한 후 탈수하고 permount로 봉입하였다.

판정

조직학적 관찰

종양의 종류와 크기, 종양세포의 조직학적 등급, 종양 가장자리에서의 종양세포의 침윤형태, 림프관 침습, 혈관 침습 및 신경 주위 침습의 유무, 림프절 전이 유무, 광범위한 도관 내 암종 성분(extensive intraductal carcinoma component)과 종양 내 괴사의 유무 등을 관찰하였다. 종양의 종류는 통상 알려진 예후의 정도에 따라 침윤성 도관 세포암종, 침윤성 소엽암종, 점액암종, 수질암종, 비정형 수질암종 등으로 구분하였다.

조직학적 등급은 Bloom과 Richardson 체계의 Nottingham modification을 사용하여 매겼다.⁹

림프절 전이가 있는 경우는 TNM 분류의 소속 림프절의 병리학적인 분류에 따라 전이된 림프절의 위치와 수, 주위 조직과의 유착 여부, 림프절에 전이된 종양의 크기, 림프절 주위 연부조직으로 침윤되었는지 여부에 따라 림프절 전이 양상을 분류하였다. 같은 쪽 액와부의 림프절에 전이가 있으며 림프절이 움직이면 pN1, 같은 쪽 액와부 림프절에 전이가 있으며 고정되어 있으면 pN2, 같은 쪽의 내부 유방 림프절(internal mammary lymph node)에 전이가 있으면 pN3로 분류하였다. pN1을 다시 세분화하여 림프절에 전이된 종양이 0.2 cm보다 작으면 pN1a, 0.2 cm보다 크면

pN1b로 분류하였다. pN1b를 다시 세분화하여 림프절에 전이된 종양이 0.2 cm보다는 크지만 2 cm보다는 작으면서 3개 이하의 림프절로 전이된 경우는 pN1bi이고, 4개 이상의 림프절에 전이된 경우는 pN1bii으로 분류하였다. 전이된 림프절의 수에 상관없이 2 cm를 넘지 않으면서 림프절 주위 연부 조직으로 침윤되었으면 pN1biii, 림프절에 전이된 종양의 크기가 2 cm를 넘으면 pN1biv로 분류하였다.

단백질 발현의 판정

p34^{cdc2}는 5% 이상의 암종 세포에서 세포질 및 핵에 염색된 경우를 발현된 것으로 판정하였고, p21^{WAF1/Cip1} 및 p53은 5% 이상의 암종 세포에서 핵에 염색된 경우를 발현된 것으로 판정하였다. p27^{Kip1}은 30% 이상의 암종 세포의 핵에 염색된 경우를 발현된 것으로 판정하였고, 30% 미만의 암종 세포의 핵에 염색된 경우는 발현 소실로 판정하였다. 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체는 5% 이상의 암종 세포의 핵에 염색된 경우를 발현된 것으로 판정하였다.

통계학적 분석

통계 처리는 Windows용 SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 프로그램을 이용하여 각 지표에 따라 χ^2 test와 one-way ANOVA를 시행하였다. 그 결과 p-value가 0.05보다 작은 것을 의의 있는 것으로 분류하였다.

Kaplan-Meier survival curves를 시행하여 p34^{cdc2}, p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1} 그리고 p53의 발현 정도와 유방암종 환자의 생존 기간 사이의 상관관계를 보았고, log-rank test를 사용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

결 과

Table 1에 면역조직 화학염색 결과와 임상 및 병리학적 예후 인자들의 상관관계를 요약하였다.

p34^{cdc2} 발현과 여러 병리학적 예후 인자의 상관관계

정상 유방 상피에서는 p34^{cdc2}가 발현되지 않았다(Fig. 1A). 중앙세포에서는 102예 중 30예(29.3%)에서 양성으로 발현되었다(Fig. 1B). 조직학적 등급에 따라 살펴보면 grade 1인 경우 54.5%, grade 2인 경우 28.2%, grade 3인 경우 16.7%로 등급이 낮을수록 많이 발현되었으며, 통계학적으로 경계적 유의성을 보였다(p=0.06).

종양의 조직학적 유형(p=0.97), 크기(p=0.74), 침윤 형태(p=0.94), 림프관 침습(p=0.75), 혈관 침습(p=0.48), 신경 주위 침습(p=0.88), 림프절 전이(p=0.56), 림프절 전이의 병리학

적 분류(p=0.60), 광범위한 도관 내 암종 성분(p=0.44), 중앙 내 괴사(p=0.24), 타 장기전이(p=0.85), 재발 여부(p=0.74), 생존 여부(p=0.49), 나이(p=0.38), 병기(p=0.90) 등과의 연관성은 통계학적으로 유의하지 않았다.

p27^{Kip1} 발현과 여러 병리학적 예후 인자의 상관관계

p27^{Kip1}은 정상 유방 상피 102예에서 모두 발현되었으나(Fig. 2A), 102예 유방암에서는 30예(29.3%)에서 암종 세포의 핵에 갈색으로 발현되었다. 나머지 72예(70.7%) 중앙에서는 발현의 소실이 있었다. p27^{Kip1}은 암종 세포에서 발현되는 강도가 정상 유방 상피에 비해 낮았다(Fig. 2B).

그러나 종양의 조직학적 유형(p=0.49), 크기(p=0.49), 조직학적 등급(p=0.61), 침윤 형태(p=0.48), 림프관 침습(p=0.50), 혈관 침습(p=0.48), 신경 주위 침습(p=0.15), 림프절 전이(p=0.47), 림프절 전이의 병리학적 분류(p=0.84), 광범위한 도관 내 암종 성분(p=0.44), 중앙 내 괴사(p=0.24), 타 장기전이(p=0.66), 재발 여부(p=0.59), 생존 여부(p=0.90), 나이(p=0.66), 병기(p=0.90) 등과의 연관성은 통계학적으로 유의하지 않았다.

p21^{WAF1/Cip1} 발현과 여러 병리학적 예후 인자의 상관관계

p21^{WAF1/Cip1}은 102예의 유방암 중 41예(40.2%)에서 암종 세포의 핵에 갈색으로 발현되었으나(Fig. 3A), 정상 유방 상피에서는 102예 모두 발현되지 않았다.

p21^{WAF1/Cip1}은 종양의 조직학적 유형과 림프절 전이의 병리학적 분류에 따라 발현 유무에 유의한 차이가 있었다. 종양의 조직학적 유형 중에서 침윤성 도관 세포암종은 42.4%에서 양성이고, 나머지 암종에서는 10.0%에서 양성으로, 침윤성 도관암종에서 더 잘 발현되었으며 통계학적으로 경계적 유의성이 있었다(p=0.07). 림프절 전이의 병리학적 분류상 pN2 이상인 경우 57.9%에서 양성이고, pN1 이하인 경우는 35.8%에서 양성으로, 림프절 전이 등급이 높을수록 더 잘 발현되었다(p=0.08).

그러나 종양의 크기(p=0.32), 조직학적 등급(p=0.78), 침윤 형태(p=0.75), 림프관 침습(p=0.13), 혈관 침습(p=0.75), 신경 주위 침습(p=0.82), 광범위한 도관 내 암종 성분(p=0.26), 중앙 내 괴사(p=0.69), 타 장기전이(p=0.59), 재발 여부(p=0.21), 생존 여부(p=0.14), 나이(p=0.46), 병기(p=0.19) 등과의 연관성은 통계학적으로 유의하지 않았다.

p53 발현과 여러 병리학적 예후 인자의 상관관계

유방암 55예 중 27예(49.1%)가 양성이었다(Fig. 3B). 정상 유방 상피에는 55예 모두 발현되지 않았다.

조직학적 등급에 따라 살펴보면 grade 1인 경우 0%, grade 2인 경우 52.3%, grade 3인 경우는 66.7%로 등급이 높을수록 잘

Table 1. Relation between clinico-pathologic parameters and p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 expression in 102 human breast carcinomas

	p34 ^{cdc2}	p-value	p27 ^{Kip1}	p-value	p21 ^{WAF1/Cip1}	p-value	p53	p-value
No. of expression /total cases	30/102 (29.3%)		30/102 (29.3%)		41/102 (40.2%)		27/55 (49.1%)	
Tumor type		0.97		0.49		0.07		0.41
Invasive ductal carcinoma (n=92)	27		28		39		25	
Invasive lobular carcinoma (n=2)	0		1		0		1	
Medullary carcinoma (n=4)	1		1		1		1	
Atypical medullary carcinoma (n=2)	2		0		0		0	
Mucinous carcinoma (n=2)	0		0		0		0	
Tumor size		0.74		0.49		0.32		0.70
≤ 4cm (n=77)	22		24		28		18	
>4cm (n=25)	8		6		12		9	
Tumor grade		0.06		0.61		0.78		0.07
1 (n=11)	6		4		5		0	
2 (n=71)	20		22		31		25	
3 (n=12)	2		2		3		2	
Tumor margin		0.94		0.48		0.75		0.11
Infiltrative (n=88)	26		27		35		21	
Infiltrative & pushing (n=5)	2		2		2		1	
Pushing (n=9)	2		1		3		5	
Lymphatic invasion		0.75		0.50		0.13		0.38
Absent (n=76)	23		17		33		22	
Present (n=26)	7		9		7		5	
Vascular invasion		0.48		0.48		0.75		0.67
Absent (n=96)	29		29		38		25	
Present (n=6)	1		1		2		2	
Perineural invasion		0.88		0.15		0.82		0.32
Absent (n=99)	29		28		39		27	
Present (n=3)	1		2		1		0	
Nodal involvement		0.56		0.47		0.68		0.89
Absent (n=46)	15		12		19		14	
Present (n=55)	15		18		21		13	
Nodal pathologic classification		0.72		0.84		0.08		0.41
pN0 (n=46)	15		12		19		14	
pN1bi (n=18)	5		7		6		4	
pN1bii (n=9)	4		2		2		2	
pN1biii (n=9)	1		3		2		2	
pN2 (n=19)	5		6		11		5	
Extensive intraductal component		0.44		0.44		0.26		0.45
Absent (n=89)	25		25		33		21	
Present (n=13)	5		5		7		6	
Tumor necrosis		0.24		0.24		0.69		0.19
Absent (n=85)	23		27		34		18	
Present (n=17)	7		3		6		9	
Distant metastasis		0.85		0.66		0.59		0.86
Absent (n=64)	19		20		27		16	
Present (n=22)	7		8		8		5	
Tumor recurrence		0.74		0.59		0.21		0.92
Absent (n=60)	19		18		22		15	
Present (n=25)	7		9		13		6	
Survival state		0.49		0.90		0.14		0.09
Alive (n=75)	22		24		33		20	
Death (n=10)	4		3		2		1	
Age		0.39		0.66		0.46		0.68
≤ 45 (n=51)	17		16		22		12	
>45 (n=51)	13		14		18		15	

(Table 1 continued next)

Table 1. (Continued from the previous page) Relation between clinico-pathologic parameters and p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 expression in 102 human breast carcinomas

	p34 ^{cdc2}	p-value	p27 ^{Kip1}	p-value	p21 ^{WAF1/Cip1}	p-value	p53	p-value
ER		0.44		0.44		0.04*		0.74
Positive (n=31)	11		11		17		7	
Negative (n=51)	14		14		16		12	
PR		0.74		0.04*		0.04*		0.29
Positive (n=14)	4		8		10		0	
Negative (n=45)	15		12		18		13	
Stage		0.90		0.90		0.19		0.69
I (n=9)	1		5		6		2	
IIA (n=40)	12		8		13		9	
IIB (n=29)	11		9		9		8	
IIIA (n=22)	5		8		11		5	
IIIB (n=1)	1		0		1		1	

*p<0.05.

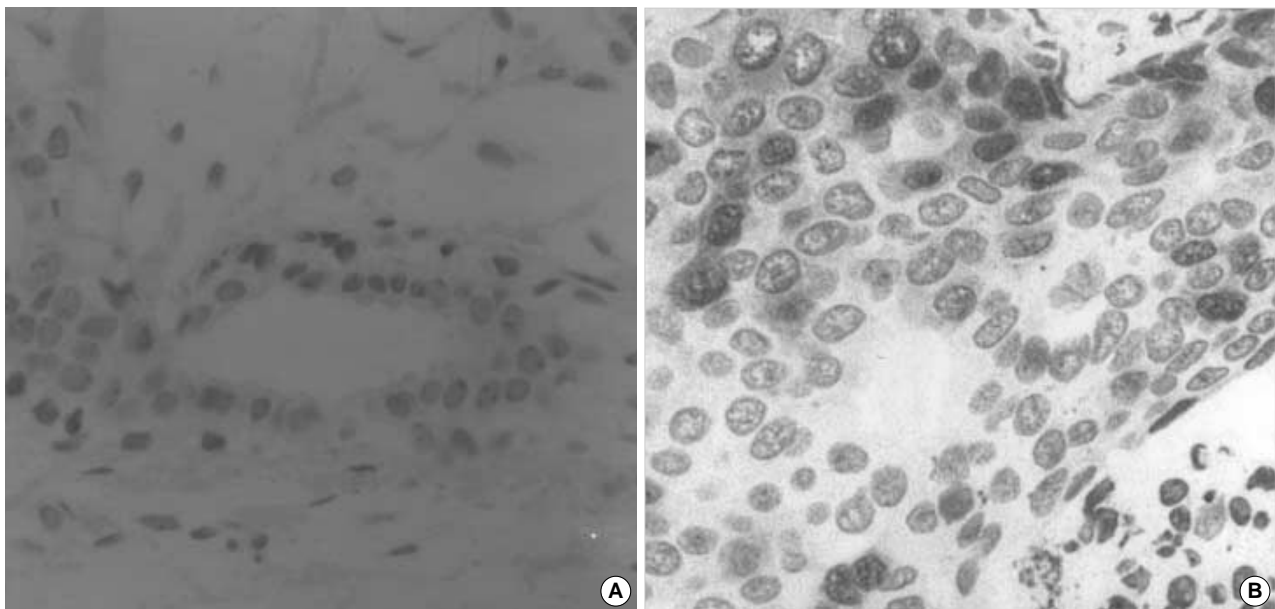


Fig. 1. Immunostaining for p34^{cdc2} in the normal breast tissue (A) and in invasive ductal carcinoma (B). p34^{cdc2} are not expressed in the cytoplasm of normal mammary ductal cells (A), whereas are diffusely expressed in the cytoplasm of carcinoma cells (B).

발현되었으며, 통계학적으로 경계적 유의성을 보였다(p=0.08).

그러나 종양의 조직학적 유형(p=0.41), 크기(p=0.70), 침윤 형태(p=0.11), 림프관 침습(p=0.38), 혈관 침습(p=0.67), 신경주위 침습(p=0.32), 림프절 전이(p=0.89), 림프절 전이의 병리학적 분류(p=0.41), 광범위한 도관 내 암중 성분(p=0.45), 중앙내 괴사(p=0.19), 타 장기전이(p=0.86), 재발 여부(p=0.92), 나이(p=0.68), 생존 여부(p=0.09), 병기(p=0.69) 등과의 연관성은 통계학적으로 유의하지 않았다.

호르몬 수용체와의 상관관계

p27^{Kip1} 발현 소실은 프로게스테론 수용체(PR) 발현 여부와 밀접한 관련이 있었다. 즉 프로게스테론 수용체가 양성인 경우 42.9

%, 음성인 경우 73.3%에서 발현 소실이 있었으며, 통계학적으로 유의하였다(p=0.04).

p21^{WAF1/Cip1}은 에스트로겐 수용체(ER)와 프로게스테론 수용체 발현 여부에 따라 발현 유무에 유의한 차이가 있었다. 에스트로겐 수용체가 양성인 유방암에서 54.8%, 음성인 유방암에서는 31.4%에서 발현되었다. 즉, 에스트로겐 수용체가 발현된 경우에 p21^{WAF1/Cip1}이 발현되는 확률이 높았으며, 통계적으로 유의하였다(p=0.04). p21^{WAF1/Cip1}의 발현은 프로게스테론 수용체가 양성인 유방암에서 71.4%, 음성인 유방암에서는 40.0%에서 발현되었다. 즉, 프로게스테론 수용체가 발현된 유방암에서 p21^{WAF1/Cip1}이 더 잘 발현되었으며, 통계학적으로 유의하였다(p=0.04).

p34^{cdc2}와 에스트로겐 수용체(p=0.44)와 프로게스테론 수용체(p=0.74), p27^{Kip1}과 에스트로겐 수용체(p=0.44), p53과 에스트

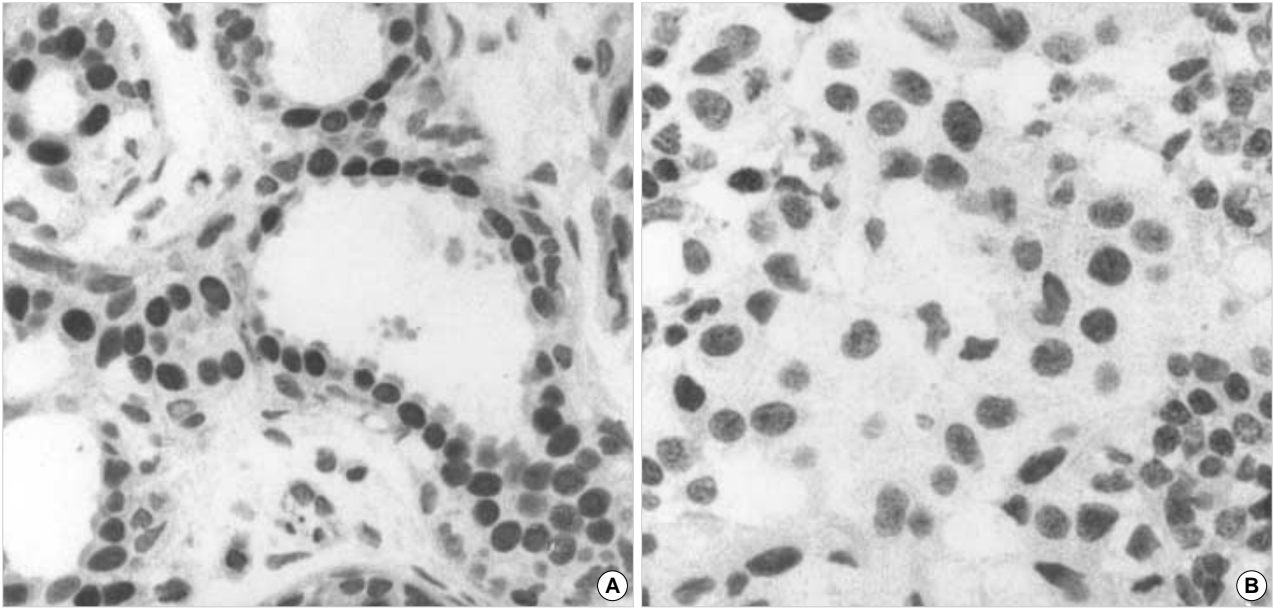


Fig. 2. Immunostaining for p27^{kip1} in normal breast tissue (A) and in the case of invasive ductal carcinoma (B). p27^{kip1} are strongly expressed in the nuclei of normal mammary cells (A), whereas carcinoma cells are weakly positive in the nuclei (B).

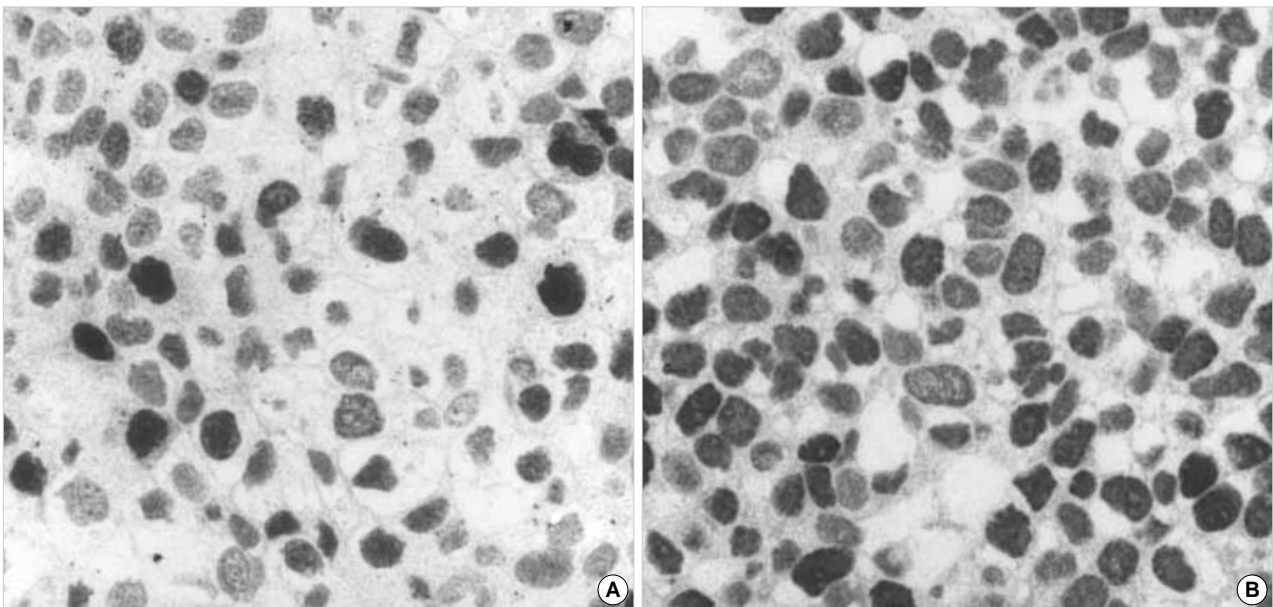


Fig. 3. Immunostaining for p21^{WAF1/Cip1} (A) and p53 (B) in the case of invasive ductal carcinoma. Both p21^{WAF1/Cip1} (A) and p53 (B) are strongly expressed in the nuclei of carcinoma cells.

로겐 수용체($p=0.74$)와 프로그스테론 수용체($p=0.29$) 발현사이의 상관관계는 통계적으로 유의하지 않았다.

p34^{cdc2}, p27^{kip1}, p21^{WAF1/Cip1} 및 p53의 상관관계

p34^{cdc2}가 발현되었을 경우 p27^{kip1}이 발현 소실된 비율은 83.0%이었고, p34^{cdc2}가 발현되지 않았을 경우 p27^{kip1}이 발현 소실되는 비율은 65.3%였다. 즉 p34^{cdc2}가 발현되었을 경우 p27^{kip1}가 발현

소실되는 비율이 더 높았다($p=0.07$) (Table 2).

p53이 발현되었을 경우 p21^{WAF1/Cip1}이 발현되는 비율은 53.8%이었고, p53이 발현되지 않았을 경우 p21^{WAF1/Cip1}이 발현되는 비율은 25.0%였다. 즉 p53이 과발현된 예에서 더 많은 비율로 p21^{WAF1/Cip1}이 발현되었다($p=0.03$) (Table 3).

p34^{cdc2} 발현과 p21^{WAF1/Cip1} 발현, p34^{cdc2} 발현과 p53 발현, p21^{WAF1/Cip1} 발현과 p27^{kip1} 발현, p53 발현과 p27^{kip1} 발현 사이의 상관관계는 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 2, 4).

Table 2. The correlation between p34^{cdc2}, p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 expression

	p34 ^{cdc2} expression		p value
	Negative	Positive	
p27 ^{Kip1} expression			0.07
Negative (n=72)	47/72 (65.3%)	25/30 (83.3%)	
Positive (n=30)	25/72 (34.7%)	5/30 (16.7%)	
p21 ^{WAF1/Cip1} expression			0.96
Negative (n=71)	43/71 (60.6%)	28/71 (39.4%)	
Positive (n=30)	18/30 (60.0%)	12/30 (40.0%)	
p53 expression			0.70
Negative (n=40)	21/40 (52.5%)	19/40 (47.5%)	
Positive (n=15)	7/15 (52.5%)	8/15 (52.5%)	

Table 3. The correlation between p21^{WAF1/Cip1} and p53 expression

	p21 ^{WAF1/Cip1} expression		p value
	Negative (n=33)	Positive (n=21)	
p53 expression			0.03
Negative	21/28 (75%)	7/28 (25%)	
Positive	12/26 (46.2%)	14/26 (53.8%)	

각 단백질의 발현에 따른 생존율

Kaplan-Meier 방법으로 유방암 환자의 누적 생존율은 1년 후에는 약 94%, 3년 후에는 76%, 5년 후에는 63%였다. p34^{cdc2}가 발현되었을 경우 정중 생존은 60개월이었고, p34^{cdc2}가 발현되지 않았을 경우에는 72개월이었으며, log-rank 방법(Mantel-Cox)으로 검사 시 p=0.88, 일반화된 Wilcoxon 방법(Breslow 검사)에서 p=0.81, Tarone-Ware 검사에서 p=0.83이었다(Fig. 4A).

p27^{Kip1}이 발현되었을 경우 정중 생존은 66개월이었고, p27^{Kip1}이 소실되었을 경우에는 69개월이었다. log-rank 방법(Mantel-Cox)으로는 p=0.47, 전신 Wilcoxon 방법(Breslow 검사)으로는 p=0.43, Tarone-Ware 검사에서는 p=0.40이었다(Fig. 4B).

p21^{WAF1/Cip1}이 과발현되었을 경우 정중 생존은 66개월이었고, p21^{WAF1/Cip1}이 발현되지 않았을 경우에는 70개월이었다. log-rank 방법(Mantel-Cox)으로는 p=0.14, 전신 Wilcoxon 방법(Breslow 검사)에서는 p=0.30, Tarone-Ware 검사에서는 p=0.20으로 모두 통계학적인 의의가 없었다(Fig. 4C).

p53이 발현되었을 경우 정중 생존은 56개월이었고, 발현되지 않았을 경우에는 74개월이었다. log-rank 방법 (Mantel-Cox)으로는 p=0.19, 전신 Wilcoxon 방법 (Breslow test)에서는 p=0.40, Tarone-Ware 검사에서는 p=0.29로 모두 통계학적인 의의가 없었다(Fig. 4D).

고 찰

세포의 성장 및 분화 조절은 세포가 정상적으로 자라는 데 중

Table 4. The correlation between p27^{Kip1}, p21^{WAF1/Cip1} and p53 expression

	p27 ^{Kip1} expression		p value
	Negative	Positive	
p21 ^{WAF1/Cip1} expression			0.35
Negative (n=61)	45/61 (73.8%)	16/61 (26.2%)	
Positive (n=40)	26/40 (65.0%)	14/40 (35.0%)	
p53 expression			0.15
Negative (n=28)	18/28 (64.3%)	10/28 (35.7%)	
Positive (n=27)	22/27 (81.5%)	5/27 (18.5%)	

요한 인자이다. 이 과정에서 어떤 원인에 의해서든 균형이 깨지면 정상 세포에서 비정상적인 세포로 변형되며, 이런 무절제한 세포의 성장은 암으로 발전하는 계기가 된다.³ 세포주기의 4단계는 많은 조절 인자들에 의하여 조절되며, 이런 조절 인자들의 이상과 인체 내에서 발생하는 다양한 암종 사이의 관련성은 오래 전부터 연구의 대상이 되어왔다. 세포주기 중 G1단계에서 S단계로 이행하는 과정이 세포의 증식에 가장 중요한 것으로 알려져 있다. 이 과정에 관여하는 여러 조절 인자들 중에서 cyclin과 CDK는 세포주기 조절을 촉진하는 인자로서 종양의 진행과 연관이 있다.

cdc2는 cyclin A 또는 cyclin B1과 복합체를 이루어 G2-M 이행에 관여하는 것으로 알려져 있다. cdc2는 cyclin A 또는 cyclin B1의 부착에 의해서 활성화되고 CDK 억제제(CDK inhibitor, CKI)에 의해서 불활성화된다. 본 연구에서는 cdc2 mRNA의 발현 단백질인 p34^{cdc2}가 유방암의 29.3%에서 발현되었으나, 정상 유방 상피에서는 전혀 발현되지 않았다. 이러한 결과를 토대로 cdc2의 과발현이 악성 세포로 진행되는 과정에 영향을 미침을 추정할 수 있다.

본 연구에서 p34^{cdc2}는 주로 세포질에만 염색되었고 핵에는 아주 희미하게 염색되었다. Kourea 등¹⁰의 연구에서는 세포질 뿐만 아니라 핵에도 강하게 염색되었으며, 암종 주위의 정상 유방 조직에도 염색되었는데, 이러한 결과는 본 연구 결과와는 사뭇 다르다. 그러나 Kourea 등의 연구에서도 유방암에서보다 정상 유방 조직에서 약하게 발현되었다고 하였다. 본 연구에서 Kourea 등의 연구와 다르게 핵보다 세포질에서 p34^{cdc2}가 더 많이 발현된 이유를 밝히기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

CKI는 두 종류로 구분되며 INK4 계열과 CIP/KIP 계열이 있다. 이 중에서 CIP/KIP는 cyclin A/cdk2, cyclin E/cdk2, cyclin D/cdk4 복합체에 작용한다. 최근 실시된 여러 암종에 대한 연구 결과에 따르면, p27^{Kip1} 단백질은 유방, 뇌, 대장암 등에서 정상 조직보다 암조직에서 더 적게 발현되며, 종양의 악성도와 예후에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다.¹⁻³

p27^{Kip1}은 198개의 아미노산으로 구성된 단백질로 주로 G1에서 S기로의 세포주기 진행을 차단하는 역할을 한다. 다른 발암 억제 유전자와는 달리, p27^{Kip1} 유전자는 인체 종양에서 돌연변이나 유전자가 소실되는 경우가 거의 없고 mRNA로의 발현에도 거의

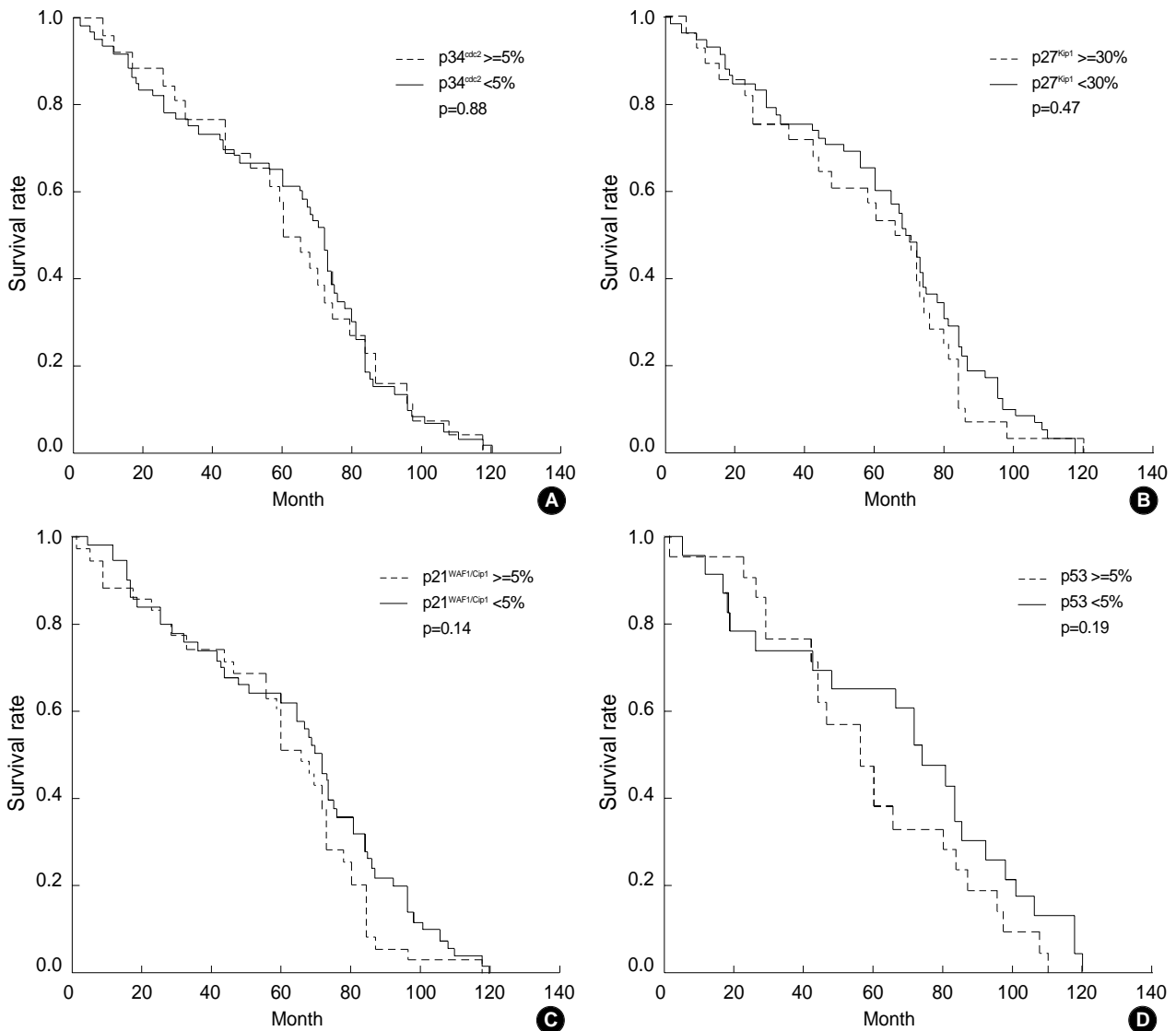


Fig. 4. Kaplan-Meier survival curve stratified according to the extent of p34^{cdc2} (A), p27^{kip1} (B), p21^{WAF1/Cip1} (C) and p53 (D). When the expression of p34^{cdc2} is stratified as 5% or more (n=30) and below 5% (n=72), the survival curve of p34^{cdc2} shows no significance (A). When the expression of p27^{kip1} is stratified as 30% or more (n=30) and below 30% (n=72), the survival curve of p27^{kip1} shows no significance (B). When the expression of p21^{WAF1/Cip1} is stratified as 5% or more (n=41) and below 5% (n=61), the survival curve of p21^{WAF1/Cip1} shows no significance (C). When the expression of p53 is stratified as 5% or more (n=27) and below 5% (n=28), the survival curve of p53 shows no significance (D).

변화가 없는 것으로 알려져 있다.⁴ 또 p27^{kip1} 단백질 발현은 ubiquitin-proteasome에 의하여 매개되는 단백질 분해 기전에 따라 후전사 단계에서 조절되는 것으로 알려져 있다.¹¹

p27^{kip1} 발현을 판정할 때는 연구자들마다 다른 방법을 사용하였다. Loda 등¹²은 50%의 양성 세포를 기준으로 고발현군과 저발현군으로 나누었고, Palmqvist 등¹³은 25%의 양성 세포를 기준으로 4등급으로 나누었으며, 송 등¹⁴은 10%를 기준으로 양성군과 음성군으로 나누었고, 이 등¹⁵은 30%를 기준으로 양성군과 음성군으로 나누었다. 본 연구에서는 50% 이상의 고발현군은 증례가 10예 미만이고, 10% 이상인 증례는 90예 이상이어서 통계 처리가 곤란하여, 이 등¹⁵과 같이 30%를 기준으로 하였다.

본 연구에서 p27^{kip1}이 정상 유방 상피에서 모두 발현되었고, 암종 세포에서는 29.3%에서 발현되어, 암종 세포에서 p27^{kip1}의 발현 소실이 있었다. 이로써 세포주기 조절 억제자인 p27^{kip1}이 종양 증식을 억제하는 기능이 있으며, 악성 세포로 진행되는 과정에서 단백질이 소실됨을 알 수 있다. p34^{cdc2}가 발현된 경우 p27^{kip1} 발현 소실률이 높은 경향을 보였으며, 이것은 Craig 등¹⁶의 연구 결과와 일치한다. 이는 세포주기 중 G1단계에서 S단계로의 이행하는 과정에서 p27^{kip1}이 cdc2를 불활성화시키기 때문이다. 즉 p27^{kip1} 발현 소실과 cdc2 과발현에 따른 세포증식을 유방암의 병인으로 추정해 볼 수 있다. p27^{kip1}은 프로게스테론 수용체가 양성인 경우보다 음성인 경우에 통계학적으로 유의한 발현 소실이 있었다.

즉 비정상적인 세포 주기조절과 스테로이드 호르몬의 상호 작용에 의한 정상 세포 성장 조절 소실이 악성 유방암종의 발생 및 진행에 영향을 미칠 가능성이 있었다.

p27^{Kip1} 단백질은 휴지기의 세포에서는 많이 발현되나 세포주기로 들어간 세포에서는 적게 발현된다. p27^{Kip1}의 발현 소실은 위암, 대장암, 폐암, 전립선암 등에서 종양의 진행 뿐 아니라 좋지 않은 예후와 관련이 있다고 보고되고 있으며 세포 간 접착력을 떨어뜨려 전이를 촉진한다는 보고도 있다.¹ 그러나 소세포 암종과 유방암 일부에서는 종양의 진행에도 불구하고 p27^{Kip1}이 많이 발현된다고 보고되어 있다.² 인체 종양에서의 p27^{Kip1} 유전자가 돌연변이를 일으키거나 소실되는 경우는 거의 없으나, p27^{Kip1} 발현이 저하되면 종양의 진행이나 나쁜 예후와 연관이 있다.^{1,2,17}

종양 억제 유전자인 p53 유전자는 발암 과정에서 매우 다양한 역할을 한다.⁵⁻⁷ 대장, 유방, 간, 난소, 방광, 갑상선, 중추 신경계, 폐, 그리고 조혈 기관에서 기원하는 악성 종양에서 p53 유전자의 변이나 결손이 구체적으로 규명되었다. 그리고 p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이의 한 형태로 인정되고 있다.^{6,18} 야생형 p53 단백질은 세포주기 중 G1 후반기에 작용하여 세포분열을 억제하여 세포분열 과정에서 부정적 조절자로 작용해야 종양세포의 성장을 억제할 수 있는데, 변이형 p53이 증가하여 결과적으로 유방암의 발생을 촉진한다. 본 연구에서도 p53이 특히 많이 발현되었으며, 이는 유방암에서도 p53 유전자의 변이나 결손이 있음을 알 수 있다. 또 조직학적 등급이 높을수록 p53의 발현율이 증가하는 경향을 보여 p53 과발현과 암종의 조직학적 등급이 연관이 있음을 알 수 있다. Ceccarelli 등¹⁹도 본 연구에서와 같이 p53 과발현과 유방암의 높은 조직학적 등급이 상관관계가 있다고 하였다.

여러 종류의 암 발생과 관련된 유전적 변화의 원인으로 p53의 하부 단계인 p21^{WAF1/Cip1} 유전자가 알려지자, 각종 악성 종양에서 p21^{WAF1/Cip1} 유전자의 돌연변이를 찾기 위한 연구가 시행되었다.^{20,21} KIP 중에서 p21^{WAF1/Cip1}의 발현은 p53에 의해서 조절되고 주로 세포 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. p21^{WAF1/Cip1} 유전자는 p53의 하부 물질로서 야생형 p53에 의하여 발현되며, p53에 돌연변이가 일어난 경우에는 활성화되지 않는다.⁵ 본 연구에서는 p53의 발현율이 높은 유방암에서 p21^{WAF1/Cip1}의 발현율이 높았으며, Ceccarelli 등¹⁹의 연구에서도 같은 결과를 보였다. 따라서 유방암의 병인으로서 DNA 손상에 의한 p53 의존성 p21^{WAF1/Cip1} 경로를 추정해 볼 수 있다.

그리고 p53의 발현율이 높은 유방암에서 p27^{Kip1}의 발현이 흔히 소실되었는데, 이렇게 CIP/KIP 계열 세포주기 조절 억제자인 p21^{WAF1/Cip1}과 p27^{Kip1}의 발현 양상이 다른 것으로 보아 이들 유전자가 유방암에서 서로 다른 경로로 작용하였을 가능성이 있다. 즉 p21^{WAF1/Cip1} 단백질은 CDK-cyclin 복합체에 결합하여 CDK의 반응을 활성화하거나 억제하는 작용을 할 수 있는데, 단일 분자로 결합할 경우는 CDK를 활성화하나, 그 이상의 분자가 결합할 경우

는 억제하는 역할을 하여 세포가 G1 주기에 멈추게 된다. p21^{WAF1/Cip1} 유전자의 발현에는 상기 언급한 p53-의존성 경로 이외에도 p53-비의존성 경로도 존재한다. 이는 p53과는 독립적인 과정이며, 주로 종말 분화(terminal differentiation)에 관여하는 것으로 알려져 있다.²¹

Ceccarelli 등¹⁹과 Caffo 등²²에 따르면 유방암종에서 림프절 전이의 정도와 연관성이 있으며, p21^{WAF1/Cip1} 단백질의 발현과 종양의 림프절 전이는 비례한다는 보고가 있다. 본 연구에서도 p21^{WAF1/Cip1} 단백질의 발현과 림프절 전이 정도는 비례하였으며, 이로 미루어 보건대 p21^{WAF1/Cip1} 단백질의 발현이 종양의 전이에 관여할 것으로 추정된다.

정상 유방 세포 내에서 에스트로젠과 프로게스테론은 G1기 전반기 또는 중반기에 단백질 양이 증가하며, 세포증식을 촉진한다.²³ Reed 등은 77예의 인체 유방암종 연구에서 p21^{WAF1/Cip1}과 p27^{Kip1}의 과발현과 에스트로젠 및 프로게스테론 수용체 발현은 비례적인 상관관계가 있다고 하였다.²⁴ Oh 등²⁵의 49예의 유방암종 연구에서도 p21^{WAF1/Cip1}과 p27^{Kip1}의 발현과 에스트로젠 수용체 발현은 비례적인 상관관계가 있다고 하였다. 반면 Talley 등은 p27^{Kip1} 발현 여부와 프로게스테론 수용체 발현 여부 간에는 아무런 관련이 없다고 하였다.²⁶

본 연구에서 p21^{WAF1/Cip1}은 에스트로젠 수용체와 프로게스테론 수용체가 발현된 경우 발현율이 높았으며, p27^{Kip1}은 프로게스테론 수용체가 발현되지 않을 경우 발현 소실률이 높은 비례적인 상관관계가 있었으며, 모두 통계적으로 유의하였다(p=0.04). 즉 G1단계에서 S단계로 이행하는 과정에서 세포의 증식과 관련된 에스트로젠과 프로게스테론이 유방암 발생 과정에서 CDK 억제제와 상호 작용을 하는 것으로 추정된다.

여러 세포주기 조절 인자와 세포주기 조절 억제자들 사이의 균형이 유방암에서 세포증식을 결정하는 역할을 담당하리라고 여겨지며, 이들 인자들이 예후 인자로서의 중요성을 가지려면 더 많은 분자 생물학적 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. Lee HI, Kim DH, Nam ES, *et al.* Expression of p27^{Kip1} protein in colorectal adenocarcinoma. *Korean J Pathol* 2000; 34: 132-7.
2. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, *et al.* High level expression of p27 (kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: Inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6380-5.
3. Dictor M, Ehinger M, Mertens F, Akervall J, Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999; 112: S40-52.
4. Martin E, Cacheux V, Cave H, Lapierre JM, Le Paslier D, Grandchamp

- B. Localization of the CDKN4/p27Kip1 gene to human chromosome 12p12.3. *Hum Genet* 1995; 96: 668-70.
5. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
 6. Lane DP. Cancer. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362: 786-7.
 7. Lee JH, Cho MY, Lee HH, Yeom BW, Won NH. p53 mutation and expression of Rb protein in germ cell tumors. *Korean J Pathol* 1998; 32: 1074-80.
 8. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50: 859-62.
 9. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-10.
 10. Kourea HP, Koutras AK, Scopa CD, *et al.* Expression of the cell cycle regulatory proteins p34cdc2, p21waf1, and p53 in node negative invasive ductal breast carcinoma. *Mol Pathol* 2003; 56: 328-35.
 11. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, *et al.* Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269: 682-5.
 12. Loda M, Cukor B, Tam SW, *et al.* Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3: 231-4.
 13. Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G. Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 1999; 188: 18-23.
 14. Song SY, Kim DH, Suh YL, *et al.* Significance of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor, p27^{Kip1}, in human breast cancer. *Korean J Pathol* 1998; 32: 1081-8.
 15. Lee PL, Kim JS, Yeon HC, *et al.* Correlation between p53 and p27^{Kip1} expression and clinicopathologic features in hepatocellular carcinoma. *J Korean Cancer Assoc* 2000; 32: 390-7.
 16. Craig C, Wersto R, Kim M, *et al.* A recombinant adenovirus expressing p27^{Kip1} induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997; 14: 2283-9.
 17. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, *et al.* Decreased levels of the cell-cyclin inhibitor p27^{Kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3: 227-30.
 18. Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 4: 1-15.
 19. Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, *et al.* Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* 2001; 95: 128-34.
 20. Roh JW, Kim KS, Kim JW, *et al.* p21^{WAF1/CIP1} Codon 31 polymorphism in Korean women: association with cervical cancer susceptibility and prognosis. *J Korean Cancer Assoc* 2000; 32: 1050-8.
 21. Lukas J, Groshen S, Saffari B, *et al.* WAF1/Cip1 gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary and endometrium. *Am J Pathol* 1997; 150: 167-75.
 22. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, *et al.* Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1591-9.
 23. Kim HJ, Jung WH, Kim DY, Lee HD. Expression of cyclins in ductal hyperplasia, atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of the breast. *Yonsei Med J* 2000; 41: 345-53.
 24. Reed W, Florens VA, Holm R, Hannisdal E, Nesland JM. Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. *Virchows Arch* 1999; 435: 116-24.
 25. Oh YL, Choi JS, Song SY, *et al.* Expression of p21^{Waf1}, p27^{Kip1} and cyclin D1 proteins in breast ductal carcinoma *in situ*: Relation with clinicopathologic characteristics and with p53 expression and estrogen receptor status. *Pathol Int* 2001; 51: 94-9.
 26. Talley LI, Grizzle WE, Waterbor JW, Brown D, Weiss H, Frost AR. Hormone receptors and proliferation in breast carcinomas of equivalent histologic grades in pre- and postmenopausal women. *Int J Cancer* 2002; 98: 118-27.