

## 비소세포폐암종에서 Cyclin E 경로 단백질(cyclin E, cdk2, p21, p27, p57)의 발현 및 예후 지표 인자로서 의의

정지한 · 박경신 · 이명아 · 변재호  
정찬권 · 이희정 · 이교영 · 심상인  
강창석

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실  
내과학교실

접 수 : 2005년 9월 12일  
게재승인 : 2005년 11월 24일

책임저자 : 심 상 인  
우 150-713 서울시 영등포구 여의도동 62  
성모병원 임상병리과  
전화: 02-3779-1295  
Fax: 02-3779-1931  
E-mail: sishim@catholic.ac.kr

### Expressions of Cyclin E-pathway Proteins (cyclinE, cdk2, p21, p27, p57) and Their Prognostic Significance in Non-small Cell Lung Carcinomas

Ji Han Jung, Gyeongsin Park, Myung-Ah Lee,<sup>1</sup> Jae Ho Byun,<sup>1</sup> Chan-Kwon Jung, Heejeong Lee, Kyo Young Lee, Sang In Shim and Chang-Suk Kang

Departments of Clinical Pathology, <sup>1</sup>Internal Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background :** The aberrant expression of cyclins, cdk and cdk inhibitor has been shown to be involved in oncogenic transformation. The aim of this study was to investigate the expression of the cyclin E-pathway proteins (cyclin E, cdk2, p21, p27, p57) in human non-small cell lung carcinomas (NSCLC) and also to evaluate the clinical significance of these expressions.

**Methods :** A total of 203 consecutive patients with completely resected pathological stage I-III NSCLC were retrospectively reviewed. The expressions of cyclin E, cdk2, p21, p27 and p57 was examined by performing immunohistochemistry with using the tissue microarray method. **Results :** In the total cases, the expression levels of cyclin E, cdk2, p21, p27 and p57 were 39.9% (81/203), 48.3% (98/203), 68.0% (138/203), 32.5% (66/203) and 2.7% (5/203), respectively. The overexpression of cyclin E and cdk2 was significantly and inversely correlated with the histologic differentiation in the adenocarcinoma ( $p < 0.05$ ), but not in the squamous cell carcinoma. Among the clinicopathologic factors, the stage and lymph node metastasis were associated with overall survival ( $p < 0.05$ ). Among these proteins, the negative expression of p21 was significantly correlated with a shortened survival rate ( $p < 0.05$ ). **Conclusions :** These data suggest that the overexpression of cyclin E and cdk2 and the loss of p21 and p27 are associated with tumor progression in NSCLC. The aberrant expression of p21 is correlated with a poor prognosis. Therefore the immunohistochemical analysis of this protein as well as the clinical stage and, lymph node metastasis may be useful tools for evaluating the prognosis of NSCLC patients.

**Key Words :** Cyclins; Cyclin-dependent kinases; Carcinoma, Non-small-cell lung

폐의 비소세포암종은 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 그 빈도가 증가하고 있으며, 현재 우리나라 암의 원발 부위별 발생 빈도 2위(11.9%)를 차지하는 종양이다. 그러나 비소세포폐암종은 조기 발견이 어렵고 수술로 종양을 완전히 절제한 후에도 5년 상대 생존율이 15% 이하에 머물고 있는, 현재 국민 암사망의 20.2%를 차지하는 예후가 나쁜 종양이다.<sup>1</sup> 일반적으로 비소세포폐암종의 예후를 예측하는 방법으로 조직학적 분화도, TNM 분류, 임상적인 병기가 있다. 그러나 같은 임상적 병기라 하더라도 치료에 대한 반응이나 예후에 차이를 보인다. 그러므로 최근

비소세포폐암종 환자의 생존을 연장하고 예후를 예측하기 위해 세포주기 조절인자와 같은 분자 생물학적인 인자들에 대한 연구가 시도되고 있다.<sup>2,3</sup>

세포주기는 cyclin, cyclin-dependent kinase (cdk), cdk 억제제의 상호작용에 의해 조절된다. 세포의 성장을 자극하는 인자로 세포를 자극하면 세포는 세포주기로 들어가고 세포주기의 각 단계에 특이한 cyclin이 합성된다. 이는 불활성화 상태의 cdk와 결합하여 cdk를 활성화시킴으로써 세포주기를 진행시킨다. 또한 cdk는 두 종류의 cdk 억제제(CIP/KIP군과 INK4군들)에

의해 억제되어 세포주기 진행이 멈추게 된다.

여러 종류의 cyclin 중 cyclin E는 cdk2와 복합체를 형성하여 세포주기 중 가장 중요한 G1기에서 S기로 진행되는 데 관여하고 이 복합체는 cdk 억제제 중 CIP/KIP 군인 p21, p27, p57에 의해 억제된다.<sup>4</sup> 이러한 cyclin E 경로 단백질(cyclin E, cdk2, p21, p27, p57)의 비정상적인 발현이 폐 종양 발생에 관여한다는 보고가 있다. 그러나 연구자마다 조직학적 유형과 예후의 연관성에 대해서는 다른 의견을 제시하고 있다.<sup>5-8</sup>

p57은 염색체 11p15에 위치하는 유전자로 cdk의 억제제로 작용하고 배아의 기관발생과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10</sup> 최근 p57이 식도암, 위암, 간암, 난소암 등에서 발현이 감소하여 새로운 종양 억제 유전자로 간주되고 있다.<sup>11-14</sup> 그러나 폐암종에서 p57 단백질의 발현 여부와 예후의 연관성에 대해서는 보고된 예가 거의 없는 실정이다.<sup>15</sup>

본 연구에서는 폐의 비소세포암종에서 조직 집적 기술의 장점을 이용하여 cyclin E 경로 단백질의 발현 양상을 관찰하고 이들의 발현 양상과 조직학적 유형 및 분화도, 임상적 병기 및 생존 기간의 상관관계를 비교 분석하였다. 그리하여 종양의 생물학적 성상과 예후인자로서 유용성을 확인함으로써 환자의 치료 계획을 수립하는 데 도움을 주고자 하였다.

## 재료와 방법

### 연구 재료

가톨릭대학교 의과대학 부속 성모병원 및 강남 성모병원에서 1994년 9월부터 2003년 8월까지 외과적으로 적출한 폐종양 조직 중 비소세포암종으로 진단되고 파라핀 블록 상태가 양호한 203예(편평세포암종 95예, 샘암종 98예, 대세포암종 5예, 샘편평세포암종 4예, 세기관지폐포암종 1예)를 연구대상으로 하였다. 수술 전에 방사선요법이나 화학요법을 받은 예는 연구대상에서 제외하였다. 연구대상의 병리진단 보고서를 참고하고 보관된 조직 슬라이드를 재검토하여 조직학적 유형과 분화도, 림프절 전이 유무를 조사하였고, 대상 환자의 의무기록과 추적조사를 통해 나이, 성별 등의 임상양상과 TNM기, 임상병기 및 생존 유무를 조사하였다.

### 연구 방법

#### Tissue array block 제작

대상 증례의 헤마톡실린-에오신 염색 슬라이드를 재검하여 각 증례의 조직학적 소견을 대표할 수 있는 부위를 표시하고, 해당하는 파라핀 포매 조직에서 tissue array block 제작기구를 이용하여 조직을 채취하였다. 조직 배열블록 제작을 위해서 조직이 없는 파라핀 블록에 지름 3 mm, 깊이 2 mm의 구멍을 뚫어 6

열 7행으로 총 42개의 구멍을 뚫었다. 그 후 각 증례의 파라핀 포매 조직에서 채취한 실험군 조직 조각을 가운데 5열 6행의 총 30개의 구멍에 심었으며 가장자리 1열 1행의 구멍에는 대조군 블록에서 채취한 조각을 삽입하여 총 8개의 블록을 제작하였다.

#### 면역조직화학염색

Tissue array block에서 5 μm 두께의 절편을 얻어 다음과 같이 면역 조직화학염색을 시행하였다. 조직절편을 특수 처리한 슬라이드(poly-L-lysine coated, Probe on plus slides, Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA)에 부착한 후 80°C 오븐에 15분간 넣었다. 그런 다음 자일렌으로 실온에서 2분간 4회 반복 처리하여 파라핀을 제거하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리한 다음, 10% citrate buffer (Zymed, San Francisco, CA, USA)에 담갔다. 그런 다음 121°C의 고압 멸균기에서 15분간 방치하고 다시 실온에서 20분간 방치하였다.

세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소 용액에 실온에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세한 후 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 비면역 염소혈청(Zymed, San Francisco, CA, USA)에 실온에서 10분간 작용시켰다.

일차 항체는 cyclin E (NeoMarkers, Fremont, CA, USA), cdk2 (NeoMarkers), p21 WAF-1 (NeoMarkers), p27 (NeoMarkers), p57 (NeoMarkers)에 대한 단클론 항체를 사용하였다. Cyclin E, cdk2, p21, p57은 1:50, p27은 1:100으로 희석한 후 실온에서 90분간 반응시킨 다음 biotin이 부착된 이차 항체 (biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako Co., Ltd., Kyoto, Japan)를 30분간 반응시켰다.

세척 완충액으로 3분씩 3회 수세한 후 streptavidin peroxidase detection system (Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 실온에서 10분간 방치하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였다. 다시 수세 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution, Research Genetics, USA)로 10분간 발색한 다음 증류수로 세척하고 Mayer's hematoxylin (Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 대조 염색을 하였다. Cyclin E, cdk2, p57의 양성 대조군 조직으로는 정상 태반 조직을, p21의 양성 대조군 조직으로는 정상 피부 조직을, p27의 양성 대조군 조직으로는 편도에 침윤하고 있는 정상 림프구를 사용하였다.

#### 면역조직화학염색 결과의 판독

결과는 두명의 병리의사가 독립적으로 판정하였다. Cyclin E와 cdk2 단백질은 종양세포의 10% 이상에서, p21, p27, p57 단백질은 종양세포의 50% 이상에서 핵에 붉은 갈색으로 발현되는 경우를 양성으로 판독하였다.

#### 통계 분석

조직학적 유형 및 분화도, 임상병기, 림프절 전이 유무, 생존

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of 203 non-small cell lung carcinoma patients

Characteristics	No. of cases	Characteristics	No. of cases
Age (years)		T classification	
<65	85	T1	50
≥65	118	T2	119
Gender		T3	16
Male	155	T4	18
Female	48	N classification	
Histology		N0	131
SCC(W/M/P)	95 (4/75/16)	N1	42
AC(W/M/P)	98 (25/53/20)	N2	26
LCC(P)	5	N3	4
ASC(M)	4	Clinical stage	
BAC	1	I	117
		II	39
		III	47

SCC, squamous cell carcinoma; AC, adenocarcinoma; LCC, large cell carcinoma; ASC, adenosquamous cell carcinoma; BAC, bronchioloalveolar carcinoma; W, well differentiated; M, moderately differentiated; P, poorly differentiated.

올에 따른 각 단백질의 발현을 차이는 SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의  $\chi^2$  검정방법을 사용하여 분석하였고 유의수준을  $p < 0.05$ 로 하였다. 생존기간과의 연관성을 분석하기 위해 Kaplan-Meier 생존곡선을 사용하였다.

## 결 과

### 증례 분석

총 203예의 연령 분포는 19세에서 89세(평균 연령은 66세)였고, 이중 남자는 155명, 여자는 48명(남자:여자=3.33:1)이었다.

WHO 분류에 근거한 조직학적 유형을 보면 편평세포암종 95예(47%), 샘암종 98예(48%), 대세포암종 5예(2.5%), 샘편평세포암종 4예(2%), 세기관지폐포암종 1예(0.5%)였다. 조직학적 분화도에 따라서는 편평세포암종 95예 중 고분화암종이 4예(4.2%), 중등도분화암종이 75예(79.0%), 저분화암종이 16예(16.8%)였다. 샘암종 98예 중에서는 고분화암종이 25예(25.5%), 중등도

**Table 2.** Relationship between expression of cyclin E-pathway proteins and clinicopathological parameters in non-small cell lung carcinomas

Clinico-pathologic factors	No. of cases	No. of positive cases (%)				
		cyclin E	cdk2	p21	p27	p57
Histologic type						
SCC						
Total	95	40 (42.1)	56 (58.9)	65 (68.4)	22 (23.2)	5 (5.3)
W	4	2 (50.0)	2 (50.0)	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)
M	75	30 (40.0)	45 (60.0)	52 (69.3)	17 (22.7)	4 (5.3)
P	16	8 (50.0)	9 (56.3)	11 (68.8)	4 (25.0)	0 (0)
p value		0.723	0.898	0.720	0.976	0.134
AC						
Total	98	36 (36.7)	37 (37.8)	65 (66.3)	41 (41.8)	0 (0)
W	25	2 (8.0)	2 (8.0)	15 (60.0)	13 (52.0)	
M	53	23 (43.4)	24 (45.3)	34 (64.2)	20 (37.7)	
P	20	11 (55.0)	11 (55.0)	16 (80.0)	8 (40.0)	
p value		0.002*	0.001*	0.327	0.483	
LCC	5	3 (60.0)	3 (60.0)	3 (60.0)	2 (40.0)	0
ASC	4	2 (50.0)	2 (50.0)	4 (100)	1 (25.0)	0
BAC	1	0	0	1 (100)	0	0
pT category						
T1-T2	169	67 (39.6)	83 (49.1)	114 (67.5)	60 (35.5)	5 (3.0)
T3-T4	34	14 (41.2)	15 (44.1)	24 (70.6)	34 (17.6)	0 (0)
p value		0.868	0.595	0.721	0.043*	0.310
pN category						
N0	131	50 (38.2)	63 (48.1)	94 (71.8)	40 (30.5)	3 (2.3)
N1-3	72	31 (43.1)	35 (48.6)	44 (61.1)	26 (36.1)	2 (2.8)
p value		0.496	0.944	0.120	0.417	0.830
Stage						
I-II	156	60 (38.5)	74 (47.4)	111 (71.2)	53 (34.0)	4 (2.6)
III	47	21 (44.7)	24 (51.1)	27 (57.4)	13 (27.7)	1 (2.1)
p value		0.445	0.663	0.077	0.418	0.866

\*statistically significant.

분화암종이 53예(54.1%), 저분화암종이 20예(20.4%)였다. American Joint Committee on Cancer의 기준에 따라 T기별로 나누면 T1 50예(24.6%), T2 119예(58.6%), T3 16예(7.9%), T4 18예(8.9%)였고, N기별로 나누면 N0 131예(64.5%), N1 42예(20.7%), N2 26예(12.8%), N3 4예(2.0%)였다. 수술 후 최종 병기로 살펴본 병기는 I기 117예(57.6%), II기 39예(19.2%), III기 47예(23.2%)였다(Table 1).

추적 조사를 통해 생존유무를 조사한 결과 생존 126예, 사망 77예였으며 추적 조사 기간은 0.6개월부터 115.7개월(평균 33.9개월)이었다.

**면역조직화학 염색 결과**

조직학적 유형 및 분화도에 따른 발현 양상(Table 2, Fig. 1)

전체 비소세포폐암종 203예 중 cyclin E 단백질은 81예(39.9%), cdk2 단백질은 98예(48.3%), p21 단백질은 138예(68.0%), p27 단백질은 66예(32.5%), p57 단백질은 5예(2.7%)에서 양성반응을 보였다.

조직학적 유형에 따른 발현 양상을 보면 cyclin E 단백질은 편평세포암종 95예 중 40예(42.1%), 샘암종 98예 중 36예(36.7%), 대세포암종 5예 중 3예(60.0%), 샘편평세포암종 4예 중 2예(50.0%)가 양성이었고, 세기관지폐포암종 1예는 음성반응을 보였다. cdk2 단백질은 편평세포암종 95예 중 56예(58.9%), 샘암종 98예

중 37예(37.8%), 대세포암종 5예 중 3예(60.0%), 샘편평세포암종 4예 중 2예(50.0%)가 양성이었고, 세기관지폐포암종 1예는 음성반응을 보였다. p21 단백질은 편평세포암종 95예 중 65예(68.4%), 샘암종 98예 중 65예(66.3%), 대세포암종 5예 중 3예(60.0%), 샘편평세포암종 4예 중 4예(100.0%), 세기관지폐포암종 1예 중 1예(100.0%)가 양성반응을 보였다. p27단백은 편평세포암종 95예 중 22예(23.2%), 샘암종 98예 중 41예(41.8%), 대세포암종 5예 중 2예(40.0%), 샘편평세포암종 4예 중 1예(25.0%)가 양성이었고, 세기관지폐포암종 1예는 음성반응을 보였다. p57 단백질은 편평세포암종 95예 중 5예(5.3%)만이 양성이었고 나머지 암종은 모두 음성반응을 보였다.

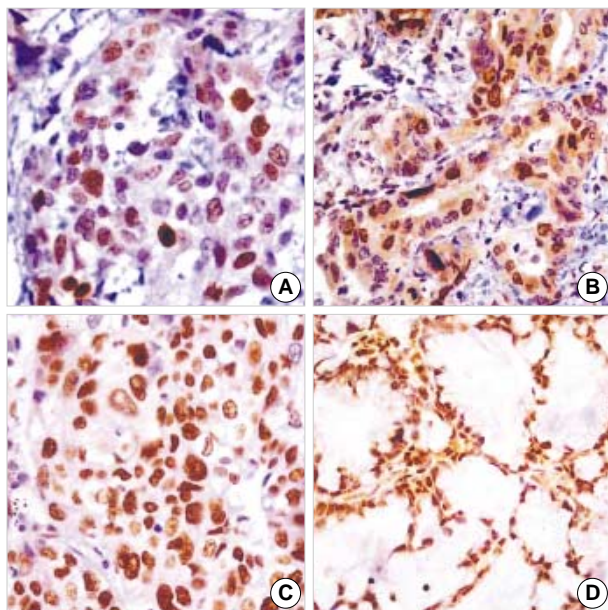
편평세포암종과 샘암종에서 각 단백질의 발현을 차이를 보면 cdk2와 p57 단백질은 샘암종보다는 편평세포암종에서 발현율이 높았고(각각 p=0.003, p=0.021), p27 단백질은 편평세포암종보다는 샘암종에서 발현율이 높았으며(p=0.006), cyclin E 단백질과 p21 단백질은 발현율에 차이를 보이지 않았다(각각 p=0.445, p=0.756).

조직학적 분화도에 따른 발현 양상을 보면 cyclin E 단백질은 편평세포암종의 고분화암종 4예 중 2예(50.0%), 중등도분화암종 75예 중 30예(40.0%), 저분화암종 16예 중 8예(50.0%)에서 양성을 보여 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이는 없었다(p=0.723). 그러나 샘암종은 고분화암종 25예 중 2예(8.0%), 중등도분화암종 53예 중 23예(43.4%) 저분화암종 20예 중 11예(55.0%)에서 양성을 보여 조직학적 분화도가 나빠질수록 발현율이 높아졌으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.002).

cdk2 단백질은 편평세포암종의 고분화암종 4예 중 2예(50.0%), 중등도분화암종 75예 중 45예(60.0%), 저분화암종 16예 중 9예(56.3%)에서 양성을 보여 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이는 없었다(p=0.898). 샘암종의 경우 고분화암종 25예 중 2예(8.0%), 중등도분화암종 53예 중 24예(45.3%), 저분화암종 20예 중 11예(55.0%)에서 양성을 보여 cyclin E와 마찬가지로 조직학적 분화도가 나빠질수록 발현율이 높아졌으며 통계적인 유의성을 보였다(p=0.001).

p21 단백질은 편평세포암종의 고분화암종 4예 중 2예(50.0%), 중등도분화암종 75예 중 52예(69.3%), 저분화암종 16예 중 11예(68.8%)에서 양성을 보여 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이는 없었다(p=0.720). 샘암종의 경우 고분화암종 25예 중 15예(60.0%), 중등도분화암종 53예 중 34예(64.2%), 저분화암종 20예 중 16예(80.0%)에서 양성을 보여 편평세포암종과 마찬가지로 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이는 없었다(p=0.327).

p27 단백질은 편평세포암종의 고분화암종 4예 중 1예(50.0%), 중등도분화암종 75예 중 17예(22.7%), 저분화암종 16예 중 4예(25.0%)에서 양성을 보였고, 샘암종의 경우 고분화암종 25예 중 13예(52.0%), 중등도분화암종 53예 중 20예(37.7%) 저분화암종 20예 중 8예(40.0%)에서 양성을 보여 편평세포암종이나 샘암종 모두에서 조직학적 분화도에 따른 발현율의 차이는 없었다



**Fig. 1.** The expression of cyclin E (A), cdk2 (B), p21 (C) and p27 (D) in non-small cell carcinomas. (A) Cyclin E is expressed in the nuclei of poorly differentiated squamous cell carcinoma. (B) Cdk2 is expressed in the nuclei of moderately differentiated adenocarcinoma. (C) p21 is expressed in the nuclei of poorly differentiated squamous cell carcinoma. (D) p27 is expressed in the nuclei of well differentiated adenocarcinoma.

(각각  $p=0.976$ ,  $p=0.483$ ).

p57 단백질은 양성을 보인 5예의 편평세포암종 중 고분화암종 1예(25.0%), 중등도분화암종 4예(5.3%), 저분화암종 0예(0%)에서 양성을 보여 조직학적 분화도에 따른 차이는 없었다( $p=0.134$ ).

TNM기와 임상병기에 따른 발현양상(Table 2)

T기에 따른 발현 양상을 보면 낮은 T기(T1-T2) 총 169예 중 cyclin E 단백질 67예(39.6%), cdk2 단백질 83예(49.1%), p21 단백질 114예(67.5%), p27 단백질 60예(35.5%), p57 단백질 5예(3.0%)가 양성이었다. 이에 비해 높은 T기(T3-T4) 총 34예 중 cyclin E 단백질 14예(41.2%), cdk2 단백질 15예(44.1%), p21 단백질 24예(70.6%), p27 단백질 34예(17.6%), p57 단백질 0예(0.0%)가 양성으로, p27 단백질만이 통계적으로 유의하게 높은 T기로 갈수록 발현율이 감소하는 경향을 보였고( $p=0.043$ ) 나머지 인

자들은 통계적으로 유의성이 없었다(각각  $p=0.868$ ,  $p=0.595$ ,  $p=0.721$ ,  $p=0.310$ ).

N기에 따른 발현 양상을 보면 림프절 전이가 없었던 증례 131예 중 cyclin E 단백질 50예(38.2%), cdk2 단백질 63예(48.1%), p21 단백질 94예(71.8%), p27 단백질 40예(30.5%), p57 단백질 3예(2.3%)가 양성이었다. 이에 비해 림프절 전이가 있었던 증례 72예 중에서는 cyclin E 단백질 31예(43.1%), cdk2 단백질 35예(48.6%), p21 단백질 44예(61.1%), p27 단백질 26예(36.1%), p57 단백질 2예(2.8%)가 양성으로, 각 단백질들 모두 그 차이가 통계적으로 유의하지 않았다(각각  $p=0.496$ ,  $p=0.944$ ,  $p=0.120$ ,  $p=0.417$ ,  $p=0.830$ ).

임상병기에 따른 발현 양상을 보면 낮은 병기(1기-2기) 총 156예 중 cyclin E 단백질 60예(38.5%), cdk2 단백질 74예(47.4%), p21 단백질 111예(71.2%), p27 단백질 53예(34.0%), p57 단백질 4예(2.6%)가 양성이었다. 이에 비해 높은 병기(3기) 총 47예 중

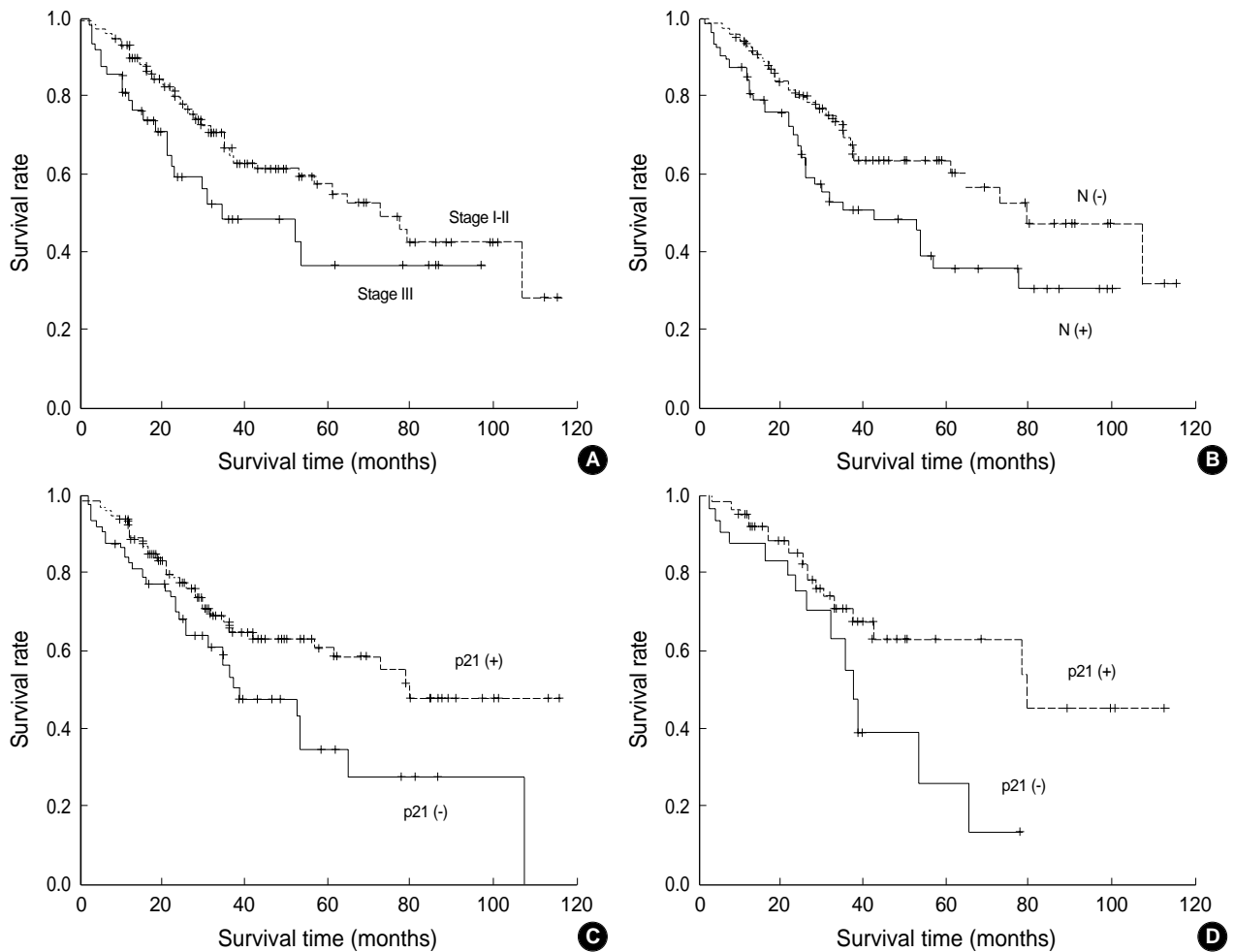


Fig. 2. Kaplan-Meier survival curves indicate prolonged survival in non-small cell lung carcinoma patients with early stage (I and II) rather than advanced stage (III) ( $p=0.0346$ ) (A), absence of lymph node metastasis rather than presence of lymph node metastasis ( $p=0.0066$ ) (B), p21 (+) rather p21 (-) ( $p=0.0128$ ) (C). (D) The survival curve with patients in adenocarcinoma shows statistically significant differences in the survival rate between p21 (+) and p21 (-) ( $p=0.0286$ ).

Table 3. Relationship of expression patterns among cyclin E- pathway proteins in 203 non-small cell lung carcinomas

	Cyclin E		p	cdk2		p	p21		p	p27		p	
	-	+		-	+		-	+		-	+		
cdk2	-	90	15	0.000*									
	+	32	66										
p21	-	43	22	0.227	40	25	0.055						
	+	79	59		65	73							
p27	-	78	59	0.185	73	64	0.521	49	88	0.099			
	+	44	22		32	34		16	50				
p57	-	177	81	0.065	102	96	0.708	64	134	0.561	136	62	0.022*
	+	5	0		3	2		1	4		1	4	

\*statistically significant.

cyclin E 단백질 21예(44.7%), cdk2 단백질 24예(51.1%), p21 단백질 27예(57.4%), p27 단백질 13예(27.7%), p57 단백질 1예(2.1%)가 양성으로, 각각의 단백질들은 병기에 따른 차이를 보이지 않았다(각각 p=0.445, p=0.663, p=0.077, p=0.418, p=0.866).

Cyclin E 경로 단백질들의 상호 연관성(Table 3)

Cyclin E와 cdk2 단백질은 cyclin E 단백질의 발현이 증가할수록 cdk 단백질의 발현이 증가하여 양성의 상관관계를 보였다(p=0.0000). 또 p27 단백질과 p57 단백질 역시 양성의 상관관계를 보였다(p=0.022). 그러나 그 외 다른 인자들은 연관성이 없었다.

생존기간과의 연관성 분석(Fig. 2)

여러 가지 임상조직학적 인자들과 생존기간의 연관성을 분석해보니 임상병기가 높을수록, 림프절 전이가 없는 예보다 있는 예가 생존율이 감소하였고 통계적으로 유의하였다(각각 p=0.0346, p=0.0066). 그러나 연령(p=0.3231), 성별(p=0.7833), 조직학적 유형(p=0.7847), 조직학적 분화도(p=0.2496)는 생존율에 영향을 미치지 않았다. 관찰한 단백질들과 생존기간의 연관성을 보면 p21 단백질 발현이 나타난 환자군이 그렇지 않은 환자군보다 생존기간이 길었으며 통계적으로 유의하였다(p=0.0128). 그러나 cyclin E, cdk2, p27, p57 단백질들은 생존기간과 연관성을 보이지 않았다(각각 p=0.5283, p=0.3457, p=0.9107, p=0.5051). 또 편평세포암종과 샘암종에서 p21 단백질과 생존기간의 연관성을 관찰해보면 편평세포암종에서는 연관성을 보이지 않았으나(p=0.2113) 샘암종에서는 연관성을 보여 발현이 나타난 환자군이 그렇지 않은 환자군보다 생존기간이 길었다(p=0.0286).

고 찰

세포주기는 cyclin, cyclin-dependent kinase (cdk), cdk 억제제의 상호작용에 의해 조절된다. 자극을 받은 세포는 세포주기로 들어가고 세포주기의 각 단계에 특이한 cyclin이 합성된다. 이는 불활성화 상태의 cdk와 결합하여 cdk를 활성화시킴으로써

세포주기를 진행시킨다.<sup>4</sup> 세포주기 중 가장 중요한 단계가 G1기에서 S기로 진행되는 단계인데, G1 초기에는 cyclin D와 cdk4/6의 결합이 관여한다.<sup>4</sup> G1 후기에는 cyclin E가 발현되어 cdk2와 복합체를 형성하고 이는 Rb 단백을 인산화시킨다. 그리하여 Rb 단백질이 억제하고 있던 전사인자인 elongation factor-2 (E2F)를 활성화시킴으로써 세포주기를 진행시킨다.<sup>4</sup>

이러한 세포주기 인자들의 비정상적인 발현이 폐 중앙 발생에 관여한다는 보고가 있으나, 조직학적 유형 및 예후와의 연관성에 대해서는 연구자들마다 의견의 차이가 있었다. 2000년 Anton 등<sup>16</sup>은 비소세포폐암종 중에서도 특히 편평세포암종에서 cyclin D1과 cyclin E의 발현이 나쁜 예후와 연관성을 보였다고 하였고, Hayashi 등<sup>17</sup>은 샘암종에서 cyclin E의 과발현이 나쁜 예후와 연관이 있다고 하였다. 그러나 그 후 Ikehara 등<sup>3</sup>은 cyclin D1은 예후와 연관성이 있으나 cyclin E는 연관성이 없다고 보고하였다. Dobashi 등<sup>7</sup>은 조직학적 유형에 따라 cyclin E 단백질의 발현 양상이 달라 샘암종에서는 cyclin E의 과발현이 나쁜 예후와 연관성이 있으나 편평세포암종에서는 좋은 예후와 연관이 있다고 보고하였다.

본 연구에서 cyclin E 단백질의 발현은 조직학적 유형에 따른 차이를 보이지 않았다. 그러므로 조직학적 유형에 관계없이 비소세포폐암종과 연관성이 있을 것이라고 생각되고, cdk2 단백질은 샘암종보다는 편평세포암종과 연관성이 있을 것이라고 생각된다. 조직학적 분화도와 연관성을 보면 cyclin E와 cdk2 단백질이 샘암종에서 중앙의 분화도가 나빠질수록 발현율이 높아졌으므로 세포주기 활성화와 분화도가 연관성이 있다고 생각된다. 또 cyclin E와 cdk2 인자는 양성의 상관관계를 보이므로 cyclin E가 cdk2와 복합체를 형성한다는 사실도 뒷받침해주고 있다. 그러나 cyclin E 단백질과 cdk2 단백질의 발현은 임상병기 또는 생존기간과 연관성을 보이지 않아, 이 두 단백질은 비소세포폐암종의 예후를 측정하는 인자로는 별 가치가 없다고 생각된다.

이와 같이 cyclin-cdk의 복합체에 의해 세포주기가 진행된다면 cdk억제제는 이를 억제하여 세포주기의 진행을 멈추게 한다.<sup>4</sup> cdk억제제는 여러 종류의 cdk를 억제하는 CIP/KIP 군과 cyclin D/cdk4와 cyclin D/cdk6만을 선택적으로 억제하는 INK4 군으

로 분류된다.<sup>4</sup> CIP/KIP 군에는 p21, p27, p57이 포함되며 INK4 군에는 p15, p16, p18, p19가 포함된다.<sup>4</sup> 비소세포폐암중에서 ckd 억제제에 대해 연구한 결과 p21과 p27 단백질의 발현 소실이 관찰되며 예후를 예측하는 인자로서 가치가 있다고 보고된 바 있다.<sup>5,6,18</sup> 본 연구에서 p27 단백질은 총 203예 중 66예(32.5%)만이 양성이므로, 음성인 나머지 증례들은 p27 단백질의 소실로 cyclin E-cdk2 복합체가 활성화되고 이로 인해 중앙 진행에 관여하는 것이라고 생각할 수 있다. 또 샘암종보다는 편평세포암종에서 발현율이 더욱 낮게 나타났으므로 p27 단백질 소실이 샘암종보다는 편평세포암종의 발생 또는 진행에 더 관여하는 것으로 생각할 수 있다.

정상적인 p21waf1/cip1 단백질은 cdk 억제제이면서 p53 단백질의존적 방법을 통해 작용한다. 즉 야생형 p53 단백질에 의해 유도되어 cyclin-cdk 복합체를 비활성화시켜 세포주기의 진행을 차단시킴으로서 정상 p53 단백질의 기능을 간접적으로 반영한다고 볼 수 있다.<sup>6</sup> 많은 중앙에서 나타나는 p53 유전자의 돌연변이는 p53 단백질의 과발현과 더불어 p21waf1/cip1 발현 소실과 상관관계가 있다고 보고되었다.<sup>6,19,20</sup> 폐 중앙에서 p21에 대한 보고를 보면 중앙이 진행함에 따라 p21 단백질의 소실이 관찰된다고 보고하였다.<sup>6,21</sup>

본 연구에서 p21 단백질도 p27 단백질과 마찬가지로 소실이 관찰되었으나 조직학적 유형 및 분화도는 연관이 없었다. 그러나 p21 단백질 발현이 나타난 환자군이 다른 환자군보다 생존기간이 길었으며 통계적으로 유의하였다. 따라서 임상병기, 림프절 전이 유무와 함께 비소세포폐암종의 예후 예측인자로서 p21이 가치가 있다고 생각된다. 또 샘암종과 편평세포암종을 나누어 살펴본 결과 특히 샘암종에서 생존기간과 연관성을 보였으므로 편평세포암종보다는 샘암종에서 예후 예측인자로 가치가 있다고 생각된다.

p57은 염색체 11p15에 위치하는 유전자로 cdk의 억제제로 작용하고 배아의 기관발생과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10,15</sup> 최근 식도암, 위암, 간암, 난소암 등에서 발현이 감소하는 것이 관찰되어 새로운 중앙 억제 유전자로서 간주하고 있으며 예후와의 연관성을 밝히려는 연구가 이루어지고 있다.<sup>11-14</sup> 그러나 폐암중에서 이의 발현 여부 및 예후와의 연관성을 보고한 문헌은 거의 없는 실정이다. 본 연구에서 p57 단백질은 전체 203예 중 오직 편평세포암종 5예(5.3%)에서만 양성반응을 보여 비소세포폐암종의 중앙과는 연관성이 있는지 또는 중앙 억제 유전자로서 가능성이 있는지에 대해서는 추후 좀 더 연구해볼 필요가 있다고 생각된다.

저자들은 조직 집적 기술의 장점을 이용하여 비소세포폐암종에서 cyclin E 경로 단백질들의 발현을 관찰한 결과 cyclin E, cdk2 단백질의 과발현과 p21, p27 단백질의 소실이 비소세포폐암종과 연관성이 있음을 알 수 있었다. 이들 단백질 중 cyclin E, cdk2 단백질은 샘암종에서 조직학적 분화도가 나뉠수록 발현율이 증가하였다. 또 생존기간과 연관성을 분석한 결과 p21 단백질 발현이

생존기간과 연관성을 보여, 이 단백질 임상병기, 림프절 전이 유무와 함께 비소세포폐암종에서 예후를 예측할 수 있는 강력한 예후 인자로 생각된다.

## 참고문헌

1. Korea Central Cancer Registry, Ministry of Health and Welfare Republic of Korea. 2002 Annual Report of the Korea Central Cancer Registry (2002.1-2002.12). 2003.
2. Mack PC, Davies AM, Lara PN, Gumerlock PH, Gandara DR. Integration of the proteasome inhibitor PS-341 (Velcade) into the therapeutic approach to lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 41 (Suppl 1): 89-96.
3. Sasakawa Y, Naoe Y, Inoue T, *et al.* Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on tumor growth and expression of p21 and c-myc genes in vivo. *Cancer Lett* 2003; 195: 161-8.
4. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders 1999; 282-92.
5. Takahashi S, Kamata Y, Tamo W, *et al.* Relationship between post-operative recurrence and expression of cyclin E, p27, and Ki-67 in non-small cell lung cancer without lymph node metastases. *Int J Clin Oncol* 2002; 7: 349-55.
6. Shoji T, Tanaka F, Takata T, *et al.* Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3865-71.
7. Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, Morinaga S, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol* 2003; 199: 208-20.
8. Ikehara M, Oshita F, Ito H, *et al.* Expression of cyclin D1 but not of cyclin E is an indicator of poor prognosis in small adenocarcinomas of the lung. *Oncol Rep* 2003; 10: 137-9.
9. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, *et al.* p57<sup>KIP2</sup>, a structurally distinct member of the p21CIPcdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995; 9: 650-62.
10. Yan Y, Frisen J, Lee MH, Massague J, Barbacid M. Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* 1997; 11: 973-83.
11. Matsumoto M, Furihata M, Ohtsuki Y, Sasaguri S, Ogoshi S. Immunohistochemical characterization of p57KIP2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 1947-52.
12. Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, *et al.* Expression of cell cycle regulators p57 (KIP2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. *Hum Pathol* 2001; 32: 808-13.
13. Nakai S, Masaki T, Shiratori Y, *et al.* Expression of p57 (KIP2) in

- hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol* 2002; 20: 769-75.
14. Liang B, Wang S, Yang X, Ye Y, Yu Y, Cui Z. Expressions of cyclin E, cyclin dependent kinase 2 and p57 (KIP2) in human gastric cancer. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 20-3.
  15. Magdaleno SM, Wang G, Mireles VL, Ray MK, Finegold MJ, DeMayo FJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor expression in pulmonary Clara cells transformed with SV40 large T antigen in transgenic mice. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 145-55.
  16. Anton RC, Coffey DM, Gondo MM, Stephenson MA, Brown RW, Cagle PT. The expression of cyclins D1 and E in predicting short-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000; 13: 1167-72.
  17. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, *et al.* High cyclin E and low p27 / Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2001; 34: 59-65.
  18. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, *et al.* Prognostic significance of p27KIP1 protein and ki-67 growth fractions in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4073-81.
  19. Wakasugi E, Kobayashi T, Tamaki Y, *et al.* p21 (Waf1 / Cip1) and p53 protein expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 684-91.
  20. Seo YH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2003; 18: 98-103.
  21. Xue O, Sano T, Kashiwabara K, Saito M, Oyama T, Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in stage I adenocarcinomas of the lung. *Pathol Int* 2002; 52: 103-9.