

갑상선 종양에서의 p27^{kip1}의 발현

중앙대학교 의과대학 외과학교실, ¹병리학교실

유종원 · 이태진¹ · 차성재 · 박성준 · 임현묵 · 박성일

Expression of p27^{kip1} in the Thyroid Neoplasms

Jong-Won Yoo, M.D., Tae-Jin Lee, M.D.¹, Seong-Jae Cha, M.D., Sung-Jun Park, M.D., Hyun-Muck Lim, M.D. and Seung-Il Park, M.D.

Purpose: Cyclin-dependent kinase inhibitor, p27^{kip1} is an important cell-cycle regulator. In recent studies, the loss of p27^{kip1} expression has been examined in many neoplasms including colorectal cancer and breast cancer. The aims of this study are to evaluate the correlation between p27 expression and carcinogenesis of the thyroid gland and to determine its clinical applications.

Methods: Immunohistochemical staining for p27^{kip1} was performed in 10 nodular goiters, 12 follicular adenomas, 8 minimally invasive follicular carcinomas, 6 widely invasive follicular carcinomas, and 26 papillary carcinomas.

Results: p27^{kip1} was expressed in 90.0% (9/10) of nodular goiters, 66.7% (8/12) of follicular adenomas, 62.5% (5/8) of minimally invasive follicular carcinomas, 33.3% (2/6) of widely invasive follicular carcinomas, and 46.2% (12/26) of papillary carcinomas (P>0.05). The expression of p27^{kip1} was not found to be correlated with tumor size in either neoplasms or nodal metastasis in papillary carcinoma.

Conclusion: These results suggest that p27^{kip1} does play some role in the tumorigenesis of thyroid cancer but is not a prognostic factor. (J Korean Surg Soc 2001;60:386-390)

Key Words: p27^{kip1}, Thyroid neoplasm

중심 단어: p27^{kip1}, 갑상선 종양

Departments of Surgery and ¹Pathology, College of Medicine, Chung Ang University, Seoul, Korea

서 론

종양 세포 및 정상 세포의 증식은 여러 인자에 의해 복잡한 여러 단계의 과정을 통해 조절된다. Cyclin과 cyclin-dependent kinase (이하 CDK) 복합체는 세포주기 진행에 중요한 조절자 역할을 하며 p27^{kip1} (이하 p27)을 포함한 CDK inhibitor가 과발현 되었을 때 세포주기는 정지한다고 알려져 있다.(1-3) 세포주기의 진행은 cyclin, CDKs, CDK inhibitors 간의 복잡한 상호작용에 달려 있다. p27은 세포주기 중 G1기에서 S기로 전이(transition)되는 과정을 조절한다.(4,5) 암조직에서 흔히 돌연변이를 일으키는 p16과 p53과는 달리 p27 유전자의 돌연변이는 극히 드물다.(2) 그러나 퇴화(degradation)의 증가에 의한 p27의 결핍으로 종양이 발생할 수 있으며 p27 유전자의 결실(deletion)에 의해 발생할 수도 있다고 알려져 있다.(6) 최근 여러 연구에서 세포주기 억제단백질(cell cycle inhibitory protein)인 p16, p21과 함께 CDK inhibitor의 일종인 p27은 세포의 증식을 억제하고 결핍시 무조절적인 세포증식이 일어난다고 보고된다.(7,8) 대장암 및 유방암 등 여러 암세포에서 p27의 발현도가 낮은 경우 악성도가 더 높아 예후 예측인자로서 유용성이 보고되며 Qian등(7)과 Lloyd등(8)은 정상 내분비 조직 및 비내분비 조직의 p27 발현도가 내분비 종양 조직보다 통계적으로 유의하게 높다고 보고하였다. Loda등(6)은 대장직장암에 있어 p27은 예후인자로서 중요한 역할을 한다고 하였으며 Catzavelos등(9)은 유방암에서 p27은 감소되어 있으며 침윤성 암으로 진행에 연관이 있다고 하였다. 최근 내분비 종양의 연구에서 Lloyd등(8)은 양성 종양과 비교할 때 악성 종양에서 p27의 발현도가 낮다고 보고하고 있으나 현재까지 갑상선 암형성에서 p27의 역할은 정립되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 저자들은 갑상선에 발생하는 양성 및 악성 종양에서 p27의 발현을 비교해 봄으로써 p27과 갑상선 암형성의 상관관계 및 p27의 임상적 유용성에 대해 알아보려고 한다.

방 법

1) 재료

1995년 6월부터 1999년 6월까지 중앙대학교 부속 필동

병원 외과학교실에 갑상선 종양으로 수술을 받았던 환자 중 조직 보관 상태가 양호한 여포상선종 12예, 미세침윤성 여포상암종 8예, 광범위 침윤성 여포상암종 6예, 유두상암종 26예를 대상으로 포르말린에 고정된 파라핀 포매 조직을 이용하였다. 대조군으로는 결절성 갑상선 종대로 진단된 10예를 사용하였다.

2) 연구방법

(1) 면역조직화학적 염색: 포르말린에 고정한 후 제작된 파라핀 포매조직을 5µm 두께로 박절하여 탈파라핀화 시킨 후 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위해 3% H₂O₂에 20분간 처리하고 0.05 M TBS 완충용액으로 세척하였다. 비특이적 반응을 억제하기 위해 5% skin milk로 5분간 preblocking 시키고 TBS 완충용액으로 세척 후 blocking 용액으로 30분간 반응시켰다. 일차항체로 p27^{kip1} (Clone DCS-72.F6, 1 : 50, Neo Markers사)을 실온에서 2시간 반응시킨 후 TBS 완충용액으로 3회 세척하고 biotin과 결합된 이차항체(labeled streptoavidin biotin kit, DAKO Co.)를 30분간 반응시켰다. 완충용액으로 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase를 가하고 10분간 반응시켜 충분히 세척한 다음 AEC로 2분간 반응시킨 다음, 수세 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 면역조직화학 염색 결과 판정: 2명의 해부병리 전문의에 의해 각각 독립적으로 판독되었으며 종양세포들의 핵에서 과립상의 적갈색 염색반응이 전체 종양세포의 10% 이상에서 관찰될 때 양성반응으로 판정하였다.

(3) 통계처리: 결절성 갑상선 종대, 여포상선종, 미세침윤성 여포상암종, 광범위 침윤성 여포상암종, 유두상암종에서의 p27^{kip1}의 발현을 각 종양별로 비교분석하여 Window용 SPSS (version 8.0) 통계프로그램을 이용하여 Pearson Chi-Square test를 실시하였고, P값이 0.05인 이하일 때 통계학적으로 유의성 있는 것으로 인정하였다.

Table 1. Sex, age, and size distribution

	(n)	Sex (M/F)	Mean age	Mean size (cm)
Follicular adenoma	12	0/12	39.5	3.10±0.83
MI* follicular carcinoma	8	2/6	35.0	4.21±1.30
WI [†] follicular carcinoma	6	1/5	27.3	3.33±1.66
Papillary carcinoma	26	5/21	44.3	2.47±1.39

*MI = minimally invasive; [†]WI = widely invasive.

결 과

1) 임상소견

여포상선종 12예의 평균 연령은 39.5세였고, 12예 모두 여자였으며, 종양의 평균 크기는 3.10±0.83 cm이었고, 미세침윤성 여포상암종 8예의 평균 연령은 35.0세였고, 남자가 2예(25.0%) 여자가 6예(75.0%)였으며 종양의 평균 크기는 4.21±1.31 cm이었으며, 광범위 침윤성 여포상암종 6예의 평균 연령은 27.3세였고, 남자가 1예(16.7%) 여자가 5예(83.3%)였으며 종양의 평균크기는 3.33±1.66 cm이었다. 유두상암종 26예의 평균 연령은 44.4세였고, 남자가 5예(19.2%) 여자가 21예(80.8%)였으며 종양의 크기는 2.47±1.39 cm이었다(Table 1). 유두상암종 26예 중에서 림프절이 검색된 예는 13예였으며 그 중 8예(61.5%)에서 전이가 있었다.

2) 면역조직화학 염색에 의한 p27 단백질 발현

p27 단백질은 여포상선종 12예 중 4예(33.3%)에서 음성이었고, 8예(66.7%)에서 양성이었으며(Fig. 1), 미세침윤성 여포상암종 8예 중 3예(37.5%)에서 음성 5예(62.5%)에서는 양성이었으며, 광범위 침윤성 여포상암종 6예 중에서는 음성이 4예(66.7%) 양성 2예(33.3%)를 나타냈다. 유두상암종 26예 중에서는 14예(53.9%)에서 음성 12예(46.2%)에서 양성을 나타냈으며(Fig. 2), 각 종양별로 p27의 발현에 통계학적으로 유의성은 없었다(P>0.05). 대조군인 결절성 갑상선비대 10예 중에서는 9예(90%)에서 양성을 나타냈다(Fig. 3)(Table 2).

각 종양의 p27 단백질 발현 여부에 따라서 종양의 평균 크기를 비교해 보았을 때, 여포상선종의 경우 p27 단백질 음성군에서는 3.05±0.90 cm 양성군에서는 3.12±0.92 cm이었으며, 미세침윤성 여포상암종의 경우 p27 단백질 음성군

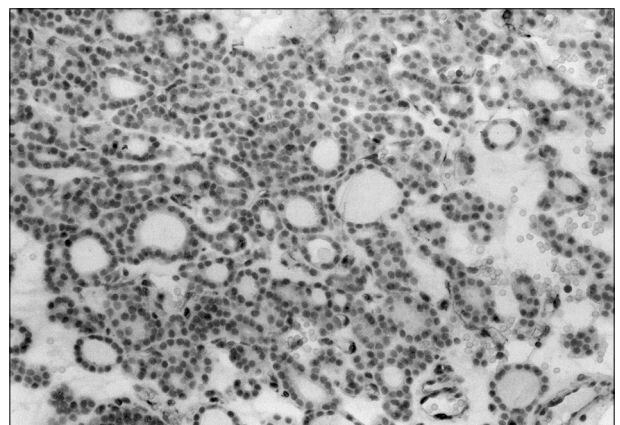


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p27^{kip1} in the follicular adenoma, p27^{kip1} is expressed in the more than 10% of the nuclei, ×200.

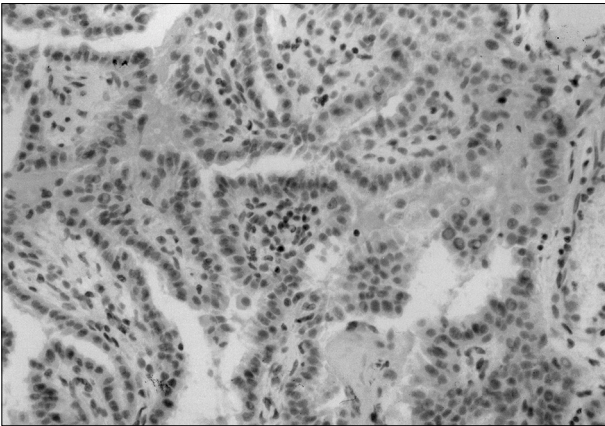


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p27^{kip1} in the papillary carcinoma, p27^{kip1} is not expressed in the nuclei of tumor cells, ×400.

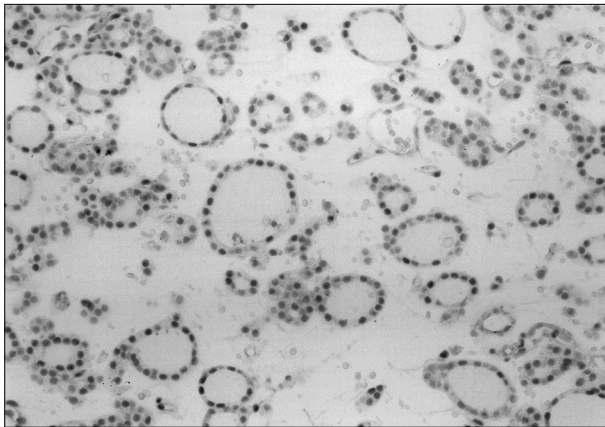


Fig. 3. Immunohistochemical staining for p27^{kip1} in the nodular goiter, p27^{kip1} is expressed in the almost nuclei of the follicular cells, ×200.

에서는 3.67±0.58 cm이었고 양성군에서는 4.54±1.57 cm이었다. 광범위 침윤성 여포상암종의 p27 단백질 음성군에서는 3.78±0.95 cm이었고, 양성군에서는 3.25±3.32 cm이었으며 유두상암종에서 p27 단백질 음성군에서는 2.69±1.28 cm이었고 양성군에서는 2.20±1.41 cm 이어서 각 종양에서 p27 단백질 발현 여부에 따른 종양의 크기는 통계학적인 유의성이 없었다(P>0.05)(Table 3).

유두상암종 26예 중에서 림프절 검색이 이루어진 13예를 대상으로 림프절 전이 여부와 p27 단백질 발현의 차이를 비교해 보았을 때, 림프절 전이가 없는 군 5예 중 p27 단백질 발현 음성이 2예(40.0%) 양성이 3예(60.0%)였고, 림프절 전이가 있는 군 8예 중에서는 p27 단백질 발현 음성이 5예(62.5%) 양성이 3예(37.5%)로 림프절 전이가 있는 군에서 p27 단백질 발현이 감소하는 경향을 보이기는 하였지만 통계학적인 유의성은 없었다(P>0.05)(Table 4).

Table 2. Expression of p27 in the thyroid neoplasms

	(n)	p27	
		(-)	(+)
Nodular goiter	10	1 (10.0%)	9 (90.0%)
Follicular adenoma	12	4 (33.3%)	8 (66.7%)
MI* follicular carcinoma	8	3 (37.5%)	5 (62.5%)
WI [†] follicular carcinoma	6	4 (66.7%)	2 (33.3%)
Papillary carcinoma	26	14 (53.9%)	12 (46.2%)

*MI = minimally invasive; [†]WI = widely invasive. P>0.05

Table 3. Association between p27 expression and tumor size

	(n)	p27	
		(-)	(+)
Follicular adenoma	12	3.05±0.90 cm	3.12±0.92 cm
MI* follicular carcinoma	8	3.67±0.58 cm	4.54±1.57 cm
WI [†] follicular carcinoma	6	3.78±0.95 cm	3.25±3.32 cm
Papillary carcinoma	26	2.69±1.28 cm	2.20±1.41 cm

*MI = minimally invasive; [†]WI = widely invasive. P>0.05

Table 4. Association between p27 expression and nodal metastasis in papillary carcinoma

	(n)	p27	
		(-)	(+)
Nodal metastasis (-)	5	2 (40.0%)	3 (60.0%)
Nodal metastasis (+)	8	5 (62.5%)	3 (37.5%)

P = 0.429

고 찰

세포 주기를 조절하는데에 CDK들의 순차적인 활성화와 비활성화가 중요한 역할하고, 특히 CDK 억제 단백질들은 CDK의 활성을 저해함으로써 세포주기를 조절한다. 이런 세포주기를 조절하는 인자들이 적절히 작용하지 못하면, 세포성장이 가속되고, 악성 종양으로 발전될 가능성이 높아진다.(11) CDK 억제 단백질에는 ink4 군과 cip/kip 군이 있다. Ink4 단백질은(p15, p16, p18, p19) 특히 cyclin D-CDK 4/6 복합체를 억제하는데, 현재 여러 암이나 세포

주에서 p15, p16의 유전자 결손이나 메틸화 등에 의한 단백질 소실이 발견되어 이것은 종양 억제자로서 기능을 할 것으로 알려져 있다.(12,13)

CDK 억제자의 다른 부류로, p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1}과 p57^{KIP2}가 있는데, 이들은 G1 cyclin E-CDK2, cyclin D-CDK4/6과 다른 cyclin kinase 활동성을 억제한다. 종양에서 ink4 군에 비하여 KIP CDK 억제자들의 경우 유전자 결손이나, 돌연변이는 거의 발견되지 않았으며, 전사과정 중이나, 전사 후 과정 중의 이상으로 발현이 저하된다는 설이 유력하다.(14) 최근 연구들에 의하면 여러 암종에서 p21^{WAF1/CIP1}이나 p27^{KIP1} 단백질의 발현 소실이 종양의 중요한 예후인자라고 알려져 있다.(15)

p27^{KIP1} (이하 p27)역시 세포주기를 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, p27을 만드는 유전자를 제거한 마우스에서의 최근 연구에서 대조군에 비해 성장이 빠르고, 뚜렷한 장기거대증이 생기고 뇌하수체 종양의 빈도가 높아진다는 사실이 알려졌다.(16) 여러 종류의 암에서 진단 혹은 예후 예측인자로서의 p27의 역할이 많이 연구되어 지고 있다. 유방, 전립선, 폐 및 대장직장암에서 악성도와 p27의 발현간의 역상관관계가 발견되어 p27의 발현도는 이러한 암들에 있어서 하나의 예후 예측인자로서 가능성이 보고되고 있다.(6,17-19) Erickson등(19)은 갑상선의 양성 및 악성 종양에서 p27의 발현도를 연구하여 갑상선 피막(capsule)의 조직 검사가 여의치 않거나 여포상 종양이 비정형적일 때 p27 염색이 여포상 선종과 여포상암간의 감별진단에 유용하다고 보고하였다. 박등(20)의 연구에서는 p27 발현도가 여포상 선종과 여포상암 간에 유의한 차이를 보였고 함께 연구한, 암세포의 증식능과 관련된 종양 표식자로 proliferating cell nuclear protein인, Ki67의 발현도에서 통계학적 차이는 없었지만 여포상암이 여포상 선종보다 Ki67의 발현도가 높아 선종성 갑상선종, 여포상 선종, 여포상암 간의 감별진단적 가치를 시사하였다. 본 연구에서는 여포상선종에 비하여 여포상암종에서 p27 단백질 발현이 감소하는 경향을 보이기는 하였지만 통계학적인 유의성은 없었다. 이는 연구 대상의 예가 적었기 때문으로 생각되며 연구 대상의 예를 확대하고 p27 단독의 검사보다는 Ki67 등 다른 종양 표식자와 함께 연구를 한다면 여포상 선종 및 여포상암의 감별진단에 도움이 될 것으로 생각된다.

종양의 크기와 p27의 발현도에 관한 연구는 이뤄지고 있지 않지만 p27이 세포의 성장을 조절하며 p27을 만드는 유전자를 제거한 마우스에서 장기거대증이 발생했다는 연구 보고에 착안을 하여 비교를 해 본 결과 본 연구에서는 통계학적인 유의성을 찾지 못하였다.

1998년 Resnick등(21)은 갑상선의 유두상암에서 p27의 결핍과 림프절 전이(18예), 림프절 비전이(9예)와는 상관관계가 없으며 미세 침윤성 여포상암(16예)과 광범위 침

윤성 여포상암(6예) 간의 p27 발현도의 차이를 밝히지 못하여 p27이 갑상선 종양의 예후 예측인자로서는 제한적이라고 보고하였다. 박등(20)은 비록 통계학적 차이는 없었지만 유두상암에서는 intrathyroidal type (8예)보다는 locally advanced type (8예)에서, 여포상암에서는 미세 침윤성(43예)보다는 광범위 침윤성(4예)에서 p27의 발현도가 낮게 나와 악성도의 연관성 및 위험인자로서의 가능성을 보고하였다. 본 연구에서는 유두상암에서 림프절 전이가 있는 군(8예)에서 림프절 전이가 없는 군(5예)보다 p27 발현도가 적기는 했지만 통계적 차이는 없었고 여포상암에서는 미세 침윤성(8예)보다 광범위 침윤성(6예)에서 p27 발현 감소가 더 높은 빈도로 나타나기는 하였지만 통계학적인 유의성은 없었다. 이상의 연구에서 p27은 종양의 형성과 악성도에 관여한다고 생각되며, 예후 예측인자로서 가능성을 입증하기 위해서는 좀더 광범위한 예들의 검색과 함께 장기간에 걸친 생존율과의 비교분석이 필요하리라고 생각된다.

결 론

1995년 6월부터 1999년 6월까지 중앙대학교 부속 필동병원 외과학교실에 갑상선 종양으로 수술을 받았던 환자 중 여포상선종 12예, 미세침윤성 여포상암종 8예, 광범위 침윤성 여포상암종 6예, 유두상암종 26예와 대조군으로 결절성 갑상선 종대 10예를 대상으로 p27 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. p27 단백질 발현의 감소가 결절성 갑상선 종대 10예 중 1예(10.0%), 여포상선종 12예 중 4예(33.3%), 미세침윤성 여포상암종 8예 중 3예(37.5%), 광범위 침윤성 여포상암종의 6예 중 4예(66.7%), 유두상암종의 26예 중 14예(53.9%)에서 나타났지만 통계학적인 유의성은 없었다. p27 단백질 발현의 차이와 종양의 크기와는 연관성이 없었으며, 유두상암종에서 림프절 전이 유무와 p27 단백질 발현과도 통계학적인 유의성이 없었다. 이상과 같은 결과로 갑상선 종양에서 p27 단백질은 독립적인 예후인자로서의 가치보다는 종양의 형성과정과 악성화에 영향을 미치는 것으로 생각되며 이를 규명하기 위해서는 향후 좀 더 광범위한 연구가 필요하리라고 사료된다.

REFERENCES

- 1) Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. Cell 1994; 79:551-5.
- 2) Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and inhibitors come of age. Cell 1994;79:573-82.
- 3) King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. Cell 1994;79:563-71.
- 4) Sherr CJ, Robert JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-

- dependent kinase. *Genes* 1995;9:1149-63.
- 5) Reed SI, Bally E, Dulie V, Hengst I, Resnitzky D, Slingerland S. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci* 1994;18:69-73.
 - 6) Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Florentino M, Draetta GF, et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997;3:231-4.
 - 7) Qian X, Jin L, Grande JP, Lloyd RV. Transforming growth factor- β and p27 expression in pituitary cells. *Endocrinology* 1996;137:3051-60.
 - 8) Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. Aberrant p27^{kip1} expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997;150:401-7.
 - 9) Catzavelos C, Bhattachara N, Ung YC, Willson JA, Robcari L, Sandhu D, et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27^{kip1} protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997;3:227-30.
 - 10) Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Faills L, Gillet CE, 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 cancer. *Proc Natl Sci USA* 1997;3: 6380-5.
 - 11) Dictor M, Ehinger M, Mertens F, Akervall J, Wennerberg J. Abnormal cell cycle regulation in malignancy. *Am J Clin Pathol* 1999;112:40-52.
 - 12) Nakashima R, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Yoshino K, Wada H, et al. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumors. *Br J Cancer* 1999;80:458-67.
 - 13) Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15/INK4B. *Cancer Res* 1996;56:722-7.
 - 14) Hengst L, Reed SI. Transitional control of p27/KIP1 accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-4.
 - 15) Ikeda H, Yoshimoto T, Shida N. Molecular analysis of p21 and p27 genes in human pituitary adenomas. *Br J Cancer* 1997;76:1119-23.
 - 16) Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27/KIP1-deficient mice. *Cell* 1996;85:733-44.
 - 17) Eposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Glordano GG, et al. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27, in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:3381-5.
 - 18) Guo Y, Skiar GN, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27/kip1, in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin Cancer Res* 1997;3: 2269-74.
 - 19) Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27^{kip1} and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998;11:169-74.
 - 20) Park CS, Chung WY, Chang HS, Lee MK. Significance of Ki67 and p27 reactivities in various thyroid disorder. *Korean J Head & Neck Oncology* 1999;15:3-8.
 - 21) Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:735-9.
-