진행된 성문상부암에서 PCR-SSCP에 의한 p53의 변이 양상과 임상적 의의

경희대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 생화학교실†, 을지의과대학 생화학교실‡

홍성언* ·강진오* ·백형환† ·윤경식‡

목 적 : 진행된 성문 상부암 환자에서 p53 유전자 변이 양상을 파악하고 이의 임상적 예후 인자로서의 관련성을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법 : 경희대학병원에서 병기 3 또는 4의 진행된 후두암으로 진단 받고 근치적 목적의 전 또는 부분 후두절제술을 시행 받고 4600 cGy 이상의 방사선 치료를 받은 환자 60례 중 적절한 조직을 확보 할 수 있었던 환자 26명을 대상으로 하였다. 조직 일부는 면역 염색을 시행하였고 일부는 p53 유전인자의 exon 5번 부터 8번까지 PCR-SSCP 시행후 PCR-SSCP 상 이상 소견이 있는 환자들의 DNA를 염기 서열 분석하였다. 이 결과를 임상적 소견과 비교 분석하였다.

결 과 : PCR-SSCP 검사 결과 exon 5 8번에서 전체 26례 중 8례(31%)에서 변이를 나타내었다. 8례 모두 점돌연변이었으며 transition이 전체 8례 중 6례이었다. Exon 5번의 변이가 3례, exon 6번의 변이가 4례, exon 7번의 변이가 1예이었다. 전체 환자의 평균 생존 기간은 67.4개월 이었고 p53 변이가 없는 군이 70.2개월, p53 변이가 있는 군이 61.3개월로 p53 변이가 있는 군의 생존 기간이 감소되어 나타났으나 두 군간의 생존 기간의 통계적인 유의한 차이는 없었다(p=0.596). 환자를 병기 III과 IV로 나누어 SSCP상 변이의 차이를 비교하였는데 병기 III은 양성이 25%이었고 병기 IV는 36%로 나타나 병기 IV 에서 약간 높게 나타났으나 통계적 차이는 없었다(p=0.563). 임파절 음성인 환자 중 SSCP 양성은 25%이었고 임파절 양성인 환자 중 SSCP 양성은 42%이었으나 통계적 차이는 없었다(p=0.437).

결 론 : PCR-SSCP 를 이용한 p53 유전인자 변이의 검색은 생존 기간, 병기, 임파절 전이 등과 관련이 없으며 예후 인자로서 유용하지 않은 것으로 판단하였다.

핵심용어 : p53 변이, 성문상부암

서 론

진행된 후두암은 항암제과 방사선 병용 요법으로 생존율과 국소 재발율 등의 결과가 상당히 좋아졌음에도 불구하고 전체 생존율은 아직 현저히 개선되고 있지 않다.[1] 치료 결과에 영향을 주는 예후 인자를 확인하는 것이 치료 결과의 개선에 도움을 주는 한 방법이며 p53 유전자의 변이는 두경부암에서 가장 흔하게 관찰되는 현상이기 때문에[2] 이의 임상적 예후 인자로서의 관계를 확인하는 것이 필요하다. 저자들은 면역염색법에 의한 p53의 변이 상태와 임상적 예후 인자들간의 관계를 연구하여 의미 있는 연관관계가 없음을 보고한 바 있다.[3] 그러나 면역염색에 의한 p53 유전자 변이의 검색은 정확도가 떨어져 이를 검식자로 사용하는 것은 결과가 다를 수가 있다.[4] 또한 최근의 보고에서 PCR-SSCP 기법을 이용한 p53 유전자 변이의 검색 결과는 생존율의 감소[5] 또는 생존율의 증가[6]와 관련이 있다는 보고가 있어 저자들은 이러한 결과를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

이 논문은 고황의학연구비 지원으로 이루어졌음

이 논문은 2001년 1월 27일 접수하여 2001년 4월 26일 채택되었음.

책임 저자 : 홍성언, 경희대학교 의과대학 방사선종양학교실

Tel : 02)958-8335, Fax : 02)958-8335

E-mail : haustin@khmc.or.kr

대상 및 방법

대상 환자는 1980년에서 1995년 사이 경희대학병원에서 병기 III, IV의 성문상부암으로 진단 받고 부분 또는 전 절제술 시행 후 근치 목적의 방사선치료를 받은 약 60례의 환자들 중 적절한 검체를 확보 할 수 있었던 26명을 대상으로 하였다. 기존의 예후 인자들을 p53 실험 결과와 비교 분석하였다.

병리 조직은 수술 당시 절제에 의해서 얻어진 일차 종양부위를 포함하는 것으로 포르말린에 고정 시킨 후 파라핀에

넣어 보관 된 것을 5 μm 두께로 최소 7 면 이상 잘라서 일부는 H&E로 염색하여 종양 조직을 확인하고 일부는 파라핀 제거 후 DNA 추출에 사용하였다. 면역 염색은 저자들의 기존의 보고한 방법을 사용하였다.[3] DNA의 추출은 Genomic DNA purification kit (#K0512, MBI Fermentas, Lithuaia)를 이용하였고 kit의 구성은 다음과 같다. 1) Lysis Solution : 40 ml of ready-to-use solution, 2) Precipitaiton Solution : 6 ml of 10x concentrated solution, 3) NaCl Solution : 10 ml of 1.2 M sodium chloride. PCR은 p53 exon 5-8번 시발체를 이용하여 2 mM dNTP mix 0.2 mM, sense primer 20 pmol, antisense primer 20 pmol, Taq DNA polymerase 1 U, 25 mM MgCl2 1.5 mM, template DNA 10 pg, PCR buffer 1x, total volume 50 μl로 initial denaturation 95°C 3분, denaturation 95°C 1분, annealing 65°C 1분, extension 72°C 1분 30초, last extension 72°C 1분, total 35 cycles 시행하였다. 염기 서열상 exon 5 8번의 시발체에 해당하는 부위는 다음과 같다.

Exon 5 1542-cctcttcctacagtactcccctgc
gcccccaccatgagcgctgctcagatagcga-1737
Exon 6 1808-gattgctcttaggtctggcccctc
ggttaagggtggttgtcagtggccctcc-1993
Exon 7 2487-gtgttatctcctaggttggctctg
gactccaggtcaggagccacttg-2625
Exon 8 2906-acctgatttccttactgcctcttgc
actaagcgaggtaagcaagcaggac-3105

Genomic DNA의 PCR 증폭 후 SSCP (single strand chain polymorphism analysis)를 시행하였다. PCR을 수행한 뒤 PCR이 완료된 혼합액에서 1 μl를 새 tube에 분주하고 9 μl의 formamide dye를 첨가하고 간단히 원심 침전에 의해 혼합하였다. 95°C에서 3분간 열을 가한 후 얼음에 넣었다가 5%의 nondenaturing polyacrylamide gel에 loading 하였다. 겔은 10% glycerol이 함유된 5% acrylamide (acrylamide : N,N'-methylene bisacrylamide = 49:1), 0.5X TBE buffer (50 mM tris-borate, 1mM EDTA) 혼합용액 100 mL에 0.6 mL의 10% ammonium persulfate (APS) 와 100 μl의 N'-tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED)을 혼합하여 만들어 사용하였다. 실온에서 Hybaid sequencing tank (Hyaid, UK)를 이용하여 250 볼트로 16시간 동안 전기 영동하였다. SSCP에서 발견되는 모든 종류의 변이에 대해 ABI 310 automatic sequencer (PE biosystem, USA)과 ABI 310 sequencing reaction kit (PE biosystem, USA)을 이용하여 염기 서열 분석을 하였다. 10×sequencing buffer 3 μl, primer 10 pmol/μl, template DNA 20 fmol, Taq DNA polymerase 1 μl, deionised water로 final volume 30 ul의 혼합물을 만들고 4 μl씩 분주하여 각각 1 μl의 dNTP를 섞고 최종 volume이 5 μl이 되게 하여 95°C에서 10초간 denaturation 한 후 50°C에서 5초간 annealing, 72°C에서 4분간 extention 하는 과정을 25 cycle하였다. 염기 서열 분석 결과는 Clustal X로 비교 분석 하였다.

분류성 변수는 X-2 test로 하고 연속 변수는 T-test를 이용하여 통계 처리하였다. 전체 생존 기간은 진단된 날로부터 환자의 사망일 또는 마지막 내원일 기준으로 하였다. 재발기간은 진단일로부터 처음 국소진행성 병변이 발견된 날이나 원격 전이가 발견된 날을 기준 하였다. 질병 재발의 증거가 없이 다른 질병으로 사망한 경우는 전체 생존 기간 통계에는 포함하지 않고 재발 기간의 계산에만 사용하였다. 생존기간의 통계에는 Kaplan-Meyer 방식을 사용하며 Log Rank test로 비교 하였다.

결 과

경희대학병원에서 근치적 목적의 전 또는 부분 후두 절제술을 시행 받고 방사선 치료를 받은 환자 60례 중 적절한 조직 확보가 가능하였던 26명의 환자들의 검체를 이용하여 각각 면역 염색과 SSCP를 시행하여 SSCP 상 차이가 있는 검체를 염기 서열 분석을 시행하였고 이 결과를 임상 소견과 비교 분석하였다. 환자들의 임상적 소견과 면역 염색 그리고 SSCP 결과는 Table 1과 같다. 추적 조사 기간은 SSCP 음성군은 14개월에서 153개월(중앙값 57.5개월) 이며 SSCP 양성군은 15개월에서 117개월(중앙값 67.5개월) 이었으며 두 군간의 추적 조사 기간의 유의한 차이는 없었다(p=0.527).

면역 염색 양성인 샘플에서 SSCP 검사상 양성인 것은 전체 9개 중 4개 면역 염색 상 음성인 것 중 SSCP 양성인 것은 17개 중 4개 이었다. 면역 염색의 결과와 SSCP 의 결과는 서로 상관 관계가 없었다(p=0.281).

p53 exon 5 8번 시발체를 이용하여 PCR-SSCP 검사 결과 exon 5 8번에서 전체 26fp 중 8례(31%)에서 변이를 나타내었다. 8례 모두 점 돌연변이며 transition이 전체 8례 중 6례이었고(75%) deletion 이나 frame shift 변이는 없었다. Exon 5번의 변이가 3례, exon 6번의 변이가 4례, exon 7번의 변이가 1예이었다(Table 2).

Exon 5번은 한 예에서 ACA→GCA 변이를 보여 Thr→Ala으로 아미노산의 변화가 있었고(Fig. 1) 두 예는 GAT→AT 변이로 Asp→Asn으로 아미노산의 변화가 발생하였다. Exon 5번의 변이를 보인 3례 중 2례에서 double primary cancer 가 있었으며 이는 전체환자 26명에서 발생한 double primary

Table 1. Clinical Data of Patients

No	Age	Sex	Stage	Operation	RT Dose	F/U (mo)	SSCP	IHS	Status
1	58	M	T3N0M0	TL	4600	34	(−)	(−)	NED
2	60	M	T3N0MX	TL/RND	5580	56	(−)	(−)	NED
3	59	M	T3N0M0	TL	5000	83	(−)	(−)	NED
4	55	M	T3N0M0	VL	5400	14	(−)	(−)	Death, lung cancer
5	58	M	T4N0M0	TL	5000	153	(−)	(−)	NED
6	64	M	T3N0M0	TL	5040	133	(−)	(+)	NED
7	59	M	T1N2aM0	SL/RND	5400	126	(−)	(−)	NED
8	47	M	T2N1M0	TL	5400	125	(−)	(+)	NED
9	60	M	T3N3M0	TL/RND	5040	91	(−)	(−)	NED
10	40	M	T2N1M0	SL/RND	5940	56	(−)	(+)	NED
11	61	M	T2N2cM0	SL/MRND	5940	76	(−)	(+)	Loss
12	55	M	T4N0M0	SL/MRND	6160	47	(−)	(−)	NED
13	55	M	T4N2bM0	TL	5400	68	(−)	(+)	Death, metastasis
14	49	M	T3N2bM0	TL/MRND	5400	33	(−)	(−)	NED
15	60	M	T2N2M0	VL	5400	22	(−)	(−)	NED
16	53	M	T3N2M0	TL/RND	5400	31	(−)	(−)	Death, local recurrence
17	65	M	T3N2M0	SL/RND	6000	58	(−)	(−)	NED
18	51	M	T3N0M0	SL	5040	57	(−)	(−)	Death, lung cancer
19	64	M	T3N0M0	TL/RND	5400	63	(+)	(−)	Death, stomach cancer
20	60	M	T2N2bM0	TL/RND	5220	15	(+)	(−)	Death, local recurrence
21	54	M	T2N2bM0	SL/RND	5940	72	(+)	(+)	Loss, esophageal cancer
22	70	M	T3N2cM0	TL/RND	5760	78	(+)	(−)	Death, metastasis
23	51	M	T2N0M0	SL	4860	84	(+)	(+)	NED
24	53	M	1N3M0	SL/RND	5400	117	(+)	(+)	NED
25	67	M	T3N0M0	VL	5400	30	(+)	(−)	NED
26	63	M	T3N2bM0	TL/RND	5220	31	(+)	(+)	Loss, local recurrence

SSCP : single strand conformal polymorphism, IHS : immunohistochemical staining, TL : total layngectomy, SL : supraglottic laryngectomy, VL : vertical laryngectomy, RND : radical neck dissection, MRND : modified radical neck dissection, NED : no evidence of disease

Table 2. DNA Sequencing Results of p53 Gene

No.	Exon	Sequence No.	Codon No.	Nucleotide	Aminoacid
19	5	1627	146	ACA → GCA	Threonine → Alanine (T→A)
20	5	1729	178	GAT → AAT	Aspartic acid → Asparagine (D→N)
21	5	1729	178	GAT → AAT	Aspartic acid → Asparagine (D→N)
22	6	1849	191	GTG → GAG	Valine → Glutamic acid (V→E)
23	6	1886	203	AGA → AAA	Arginine → Lysine (R→K)
24	6	1886	203	AGA → AAA	Arginine → Lysine (R→K)
25	6	1886	203	AGA → AAA	Arginine → Lysine (R→K)
26	7	2540	230	TGT → AGT	Cysteine → Serine (C→S)

cancer 4례 중 50%에 해당하여 exon 5번의 점 돌연변이가 double primary tumor의 발생에 어떤 연관 관계가 있을 가능성을 시사하였다. 또한 double primary cancer를 갖지 않은 한 환자도 15개월째 국소 재발로 사망하여 exon 5번의 변이를 보인 환자들이 다른 exon의 변이를 보인 환자들에 비해 질병의 경과가 좋지 않았다.

환자를 병기 III과 IV로 나누어 SSCP상 변이의 차이를 비교하였는데 병기 III 환자 12명 중 음성이 9례 양성이 3례(25%)이었고 병기 IV 환자 14명 중 음성이 9례 양성이 5례로(36%) 나타나 병기 IV에서 약간 높게 나타났으나 통계적 차이는 없었다(p=0.563).

SSCP 상 p53 변이의 유무에 따라 생존율을 비교 하였다 (Fig. 2). 전체 환자의 평균 생존 기간은 67.4개월 이었고 p53 변이가 없는 군이 70.2개월, p53 변이가 있는 군이 61.3개월로 p53 변이가 있는 군의 생존 기간이 감소되어 나타났으나 두 군간의 생존 기간의 통계적인 유의한 차이는 없었다

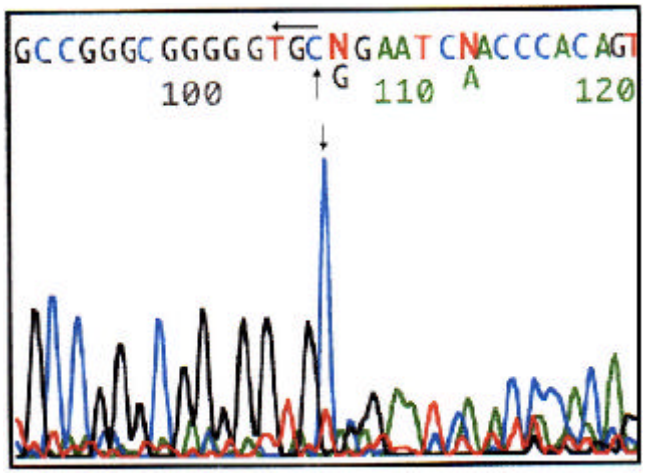

Fig. 1. The reverse sequencing shows TGT→CGT change resulting in ACA→GCA change in codon 146 (Exon 5, case number 19).

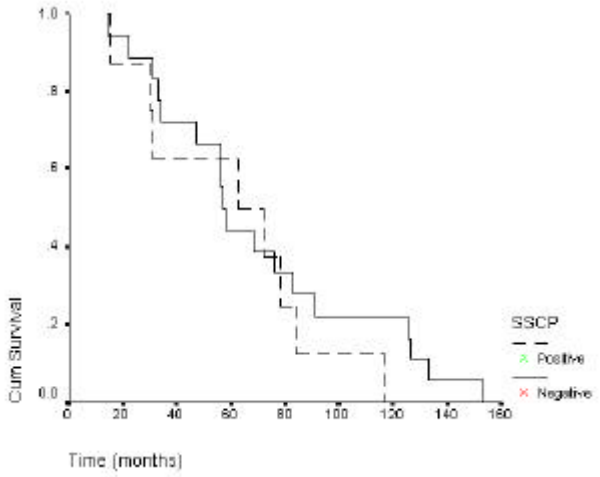

Fig. 2. Survival curves according to SSCP status. There was no statistically significant difference between p53 mutation positive and negative group (p=0.596).

(p=0.596).

임파절 전이유무를 SSCP 결과와 비교 하였는데 임파절 음성인 환자 12명 중 SSCP 양성인 환자는 3례(25%) 이었고 임파절 양성인 환자 14명 중 SSCP 양성인 환자는 5례(42%) 이었으나 p=0.437로 통계적 차이는 없었다.

고안 및 결론

후두 상피세포가 암세포로 변화 하기 위해서는 여러 가지 복잡한 과정이 필요하다. 암 억제 유전자의 변이가 이 과정에 필수적으로 관여하는데 대표적인 암 억제 유전자인 p53의 변이율은 조직의 종류와 검색 방법에 따라 33 100% 정도로 보고되고 있다.[7 9] 저자들은 면역 염색상 과발현을 보인 예가 26례 중 9례이었고(35%) SSCP 상 변이를 보인 예가 26례 중 8례에서 변이를 보여 약 30%의 환자에서 유전자 변이가 있음을 확인 할 수 있었다. p53의 과발현을 면역 염색으로 검색하여 p53 변이 유무를 판단하는 것은 오류의 소지가 많은데 어떤 종류의 종양 세포는 유전자 변이가 있음에도 불구하고 면역 염색에서 정상으로 보이거나 nonsense나 frameshift 변이를 갖는 경우에는 p53의 발현이 검색되지 않아 정상으로 판단되기도 하며 드물게 어떤 종류의 종양은 exon이 아닌 intron에 변형이 있어 RNA splicing에 영향을 주기도 하기 때문이다.[10] Bradford 등[5]은 파라핀 포매 조직을 이용한 면역 염색과 SSCP 비교 실험에서 면역 염색 양성이었던 26례 중 10례(38%)에서 SSCP 양성이었다고 하였고 면역 염색에서 나타나지 않았던 18례 중 11례(61%)에서 SSCP 음성이었다고 하였다. Taylor 등[11]은 85명의 두경부 종양 환자를 대상으로 하여 DO7 monoclonal antibody를 이용하여 면역염색을 시행하고 전체 환자를 exon 5 9번을 염기 서열 분석을 하여 비교하였는데 면역 염색 양성인 환자 중 51% 만이 유전자 변이를 보였으며 면역 염색 음성인 환자 중 28%에서 유전자 변이를 보여서 전체적인 correlation rate는 59%라고 하였다. 저자들의 예에서도 DO7 monoclonal antibody를 사용한 면역 염색 양성인 샘플에서 SSCP 검사상 양성인 것은 전체 9례 중 4례(44%) 면역 염색 상 음성인 것 중 SSCP 음성인 것은 17례 중 13례(76%)로 나타나 면역 염색의 결과와 SSCP의 결과는 서로 상관 관계가 없었으며(p=0.281) 이는 Taylor 등의 보고와 비슷한 상관율을 보인 것이다.

이 연구의 주안점은 진행된 후두암에서 p53 변이의 존재가 독자적인 예후 인자로서의 가능성을 가지고 있는지를 확인하는 것이다. Bradford 등[5]은 진행된 후두암 환자 44명을 대상으로 하여 exon 5 8번에서 SSCP 상 변이를 보이는 환자군은 변이가 없는 환자군에 비해 생존율의 감소가 있다고 보고를 하였고 또한 p53 변이의 존재 유무는 항암제에 대한 반응도, 후두 보존의 예측성 등과는 무관하다고 하였다. SSCP로 검색된 유전자 변이는 전체 환자 군을 대상으로 하여 생존기간의 감소되는 경향이 있다고 하였다. 그러나 Chomchai 등[6]은 45명의 후두암 환자들을 대상으로 하여 exon 5 8번에서 변이가 있는 환자들이 생존 기간의 증가가 있다고 하여 서로 상반된 결과를 보고 하였다. Chomchai[6]의 경우 29명의 환자가 성문암(63%) 환자이며 병기 III, IV 는 32례(70%)로 환자들의 동질성에 문제가 있어 이 보고의 결과를 인정하여 예후 인자로 인정하기는 어렵다. Koch 등[10]은

110명의 두경부 종양 환자들을 대상으로 exon 5 9번을 분석하여 국소 재발율과 관계가 있지만 전체 생존 기간과는 관련이 없다고 보고 하였으나 이 경우 두경부 종양의 원발 위치에 따른 평균 생존 기간의 차이를 명기 하지 않아서 이 또한 후두암의 예후 인자로서 인정하기가 힘들다.

저자들의 보고는 26례 모두 남자 환자이며 근치 목적의 전 또는 부분 후두 절제 술을 시행하고 4,600 cGy 이상의 방사선 치료를 받은 환자들을 대상으로 하여 조사한 것으로 기존의 다른 보고들에 비해 매우 동질성이 높은 환자군의 결과이다. 저자들은 SSCP 상 p53 변이의 유무에 따라 생존율을 비교 하였으며 p53 변이가 없는 군이 70.2개월, p53 변이가 있는 군이 61.3개월로 p53 변이가 있는 군의 생존 기간이 감소되어 나타났으나 두 군간의 생존 기간의 통계적인 유의한 차이는 없었다(p=0.596). 따라서 SSCP를 이용한 p53 유전자 변이 유무의 검색은 예후 인자로서 유용하지 않다고 판단하였다. 또한 SSCP에서 p53의 변이는 다른 예후 인자들인 병기나 임파절 전이 등과도 관련이 없는 것으로 판단하였다.

참 고 문 헌

1. **Haffty BG, Son YH, Sasaki CT, et al.** Mitomycin C as an adjunct to postoperative radiation therapy in squamous cell carcinoma of the head and neck: results from two randomized clinical trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1993;27: 241-250
2. **Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al.** Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. Cancer Res 1992;52:4832-4836
3. **Kang JO, Hong SE.** Association of p53 protein expression with clinical outcome in advanced supraglottic cancer. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1998;16:1-5
4. **Hall PA, Lane DP.** p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?-Revisited! J Pathol 1994;172:1-4
5. **Bradford CR, Zhu S, Poore J, et al.** p53 Mutation as a Prognostic Marker in Advanced Laryngeal Carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:605-609
6. **Chomchai JS, Du W, Sarkar FH, et al.** Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. Laryngoscope 1999;109:455-459
7. **Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, et al.** p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. Anticancer Res 2000;20:2613-2616
8. **Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G.** Frequent p53 mutations in head and neck cancer. Cancer Res 1992;52:5997-6000
9. **Watling DL, Gown AM, Coltrera MD.** Overexpression of p53 in head and neck cancer. Head Neck 1992;14:437-444
10. **Koch WM, Brennan JA, Zahurak M:** Goodman SN; Westra WH; Schwab D; Yoo GH; Lee DJ; Forastiere AA; Sidransky D. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst 1996; 88:1580-1586
11. **Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH.** Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. Hum Pathol 1999;30:1221-1225

Abstract

p53 Mutations in Advanced Supraglottic Cancer

Seong Eon Hong, M.D.*, Jin Oh Kang, M.D.*,
Hyung Hwan Baik, M.D.† and Kyung Sik Yoon, M.D.‡

*Department of Radiation Oncology, †Biochemistry,
School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea
‡Department of Biochemistry, Eulji Medical College, Daejon, Korea

Purpose : To determine the prognostic significance of p53 mutations in advanced supraglottic cancer patients.

Material and Methods : Twenty-six patients with pertinent tissue materials among 60 patients diagnosed as advanced supraglottic cancer in Kyung Hee university hospital and received total or partial laryngectomy followed by radiation therapy were enrolled. Immunohistochemical staining using DO7 monoclonal antibody was performed. Tumor specimens were analyzed for p53 mutations in exons 5 through 8 by using PCR-SSCP analysis followed by DNA sequencing of all variants.

Results : p53 mutations were present in 8 cases among 26 patiets. Mutations within exon 5 were 3 cases, exon 6 were 4 cases, and exon 7 was 1 case. Mean survival time was 70.2 months in patients without mutations, 61.3 months with mutations but there was no statistically significant differences (p=0.596). Mutations were 25% in stage III and 36% in stage IV but there was no statistically significant differences (p=0.563). Mutations were 25% in lymph node negative group and 42% in lymph node positive group but there was no statistically significant differences (p=0.437).

Conclusion : The presence of a p53 mutation detected by PCR-SSCP is not associated with survival, stage and lymph node status.

Key Words : p53 mutation, Supraglottic cancer