

□ 원 저 □

인체 폐암종에서 p53의 발현에 관한 연구

대전 을지병원 내과학교실, * 한양대학교 의과대학 내과학교실 및 병리학교실**

이영규* · 박성수 · 신동호 · 이동후 · 이정희 · 이종달**

= Abstract =

Expression of p53 in Human Primary Lung Cancers

Young Kyu Lee, M.D.*, Sung Soo Park, M.D., Dong Ho Shin, M.D.

Dong Hoo Lee, M.D., Jung Hee Lee, M.D. and Jung Dal Lee, M.D.**

Department of Internal Medicine, Tae Jeon Eul Ji Hospital*, and Departments of Medicine and Pathology**
Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The cell cycle is composed of a series of steps which can be negatively or positively regulated by various factors. Alteration or inactivation of p53 by mutations, or by its interactions with oncogene products of DNA tumor viruses, can lead to cancer. Mutations of the p53 gene occur frequently in human primary lung cancers and the wild-type p 53 allele is often concomitantly deleted. These suggest that deprivation of suppressive role of the wild-type p53 may ensure tumor cell growth presumable by the mutant p53 gene.

Methods: In an attempt to investigate this hypothesis, a mutant p53 gene was immunohistochemically demonstrated in the formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of lung cancers by using a monoclonal antibody p53 (Ab-3 and clone DO7).

Results: The expression of p53 (DO7) was found in all four normal lung tissues, four small cell carcinomas, and four non small cell carcinomas in histologic types of lung cancer. In the six normal lung tissues the expressions of p53 (Ab-3) were not found. Contrarily, the expression of p53 (Ab-3) was found in the nuclei of lung cancers among fifteen (46.9%) of thirty-two cases studied. The expression of p53 (Ab-3) was disclosed in three case (37.5%) of eight small cell carcinomas and twelve cases (50.0%) of twenty-four non small cell carcinomas in histologic types of lung cancer.

Conclusion: These findings suggest that expression of the mutant p53 is related to the one of events in the pathogenesis of human lung cancer and the role of the other oncogenes might be also related to the development of lung cancers.

Key Words: Expression, p53 Gene, Human Primary Lung Cancers

서 론

암억제 유전자 p53은 393개의 codon을 가지고, 17번 염색체에 위치하며, 정상세포에서 세포성장을 억제하며 암세포로의 형질전환 (transformation)을 억제하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 핵내 인단백(phosphoprotein)인 p53은 형질전환된 세포의 추출물 내에서 발견되었으며,

이인단백은 simian virus 40(SV 40)에 의하여 유발된 종양을 갖고 있는 동물의 항혈청과 반응을 한다²⁻⁴⁾. p53 단백질은 SV 40 암유전자 산물인 large T 항원과 함께 SV 40에 의하여 형질전환된 세포내에서 oligometric 복합체를 형성한다. p53의 조절은 전이(translation) 이후 발암단계에 나타나며, 형질전환되지 않은 세포에서 보다 형질전환된 세포 내에서 반감기가 훨씬 길다고 한다⁵⁾. 야생형 p53의 반감기는 20분이고, residue 175의

돌연변이형 p53의 반감기는 3 내지 6시간이란 사실로 보아 p53단백의 돌연변이형의 작용시간이 야생형보다 월등히 길다는 것을 알 수 있다^{6,7)}. 한편 여러 가지 genomic 및 complementary DNA (cDNA) clone은 ras 암 유전자와 협력하여 세포배양에서 일차적으로 설치류 태아의 섬유아세포를 형질전환에 관여하나^{8,9)}, 야생형 p53은 세포의 성장과 분열을 억제하는 방향으로 작용한다. 야생형 p53 대립인자(allele)는 세포 배양검사에서 형질전환된 세포의 성장 및 동물내 종양 형성을 억제하고¹⁰⁻¹⁴⁾, 어떤 종류의 p53의 돌연변이가 일어나 비활성 유전자로 바뀌면, 암억제 기능을 소실하게 되며 개체의 암발생 감수성이 높아진다는 것이 일반적인 견해이다.

소세포 폐암종과 비 소세포 폐암종, 대장암, 간세포암종, 유방암, 피부암, 골원성 육종, 뇌암, 방광암, 자궁암, 전립선암, 난소암, 고환암, 모세포발증을 동반한 만성 골수성 백혈병들에 있어서 p53에 encode 되어있는 유전자내에 돌연변이 형상에 관한 연구들이 밝혀져 왔으며^{7,13,15-19)}. 특히 인체 폐암종에서의 돌연변이형 p53의 발현빈도에 대한 연구들은 최근에 이르러서야 외국에서 활발하게 진행되고 있으나, 한국인에서의 연구는 아직 드물다.

이에 저자들은 한국인의 원발성 폐암종에 있어서 돌연변이형 p53유전자의 발현 빈도 및 조직학적 유형에 따른 돌연변이형 p53의 발현양상에 대한 연구를 하여 그의 의를 규명하고자 이 연구를 실시 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

병리조직학적 진단을 위해 실시한 기관지경 생검과 폐절제술을 실시하여 얻은 폐조직들을 10% 포르말린 완충액으로 고정하여 파라핀 포매를 실시한 다음, hematoxylin과 eosin 염색을 실시하였다. 조직병리학적 진단이 확정된 소세포암종 12예(기관지 생검에 의한 5예와 폐절제술로 얻은 7예)와 비소세포암종 28예(기관지 생검에 의한 6예와 폐절제술로 얻은 22예)의 총 40예의 파라핀 포매 조직절편들을 연구대상으로 이용하였다. 비암성 폐질환으로 폐절제술로 얻은 정상조직 10예를 대조군으로 삼았다.

Table 1. Characterization of Mutant p53 Monoclonal Antibody

| Mouse monoclonal Ig G ₁ epitope | p53 (Ab-3) |
|---|-----------------|
| p53 mutant : residue 156-214 deleted 9 amino acids adjacent to C-terminal | + |
| Origin | Clone P Ab 240* |

* Derived by immunization of BALB/c mice with p53-β-galactosidase fusion protein and fusion of splenocytes with SP2 mouse myeloma cells²⁰⁾.

2. 암억제 유전자 p53 탐지자

Table 1에서와 같이 p53 carboxyl 말단부에 인접한 9개의 아미노산을 지배하는 156~214번 residue가 결실된 돌연변이형만을 포착하는 p53 (AB-3) 단세포군 항체 (Oncogene Science Inc, uniondale, New York)와 야생형과 돌연변이형 두가지를 함께 다같이 포착하는 혼합형 단세포군항체 p53 (clone DO7, Novocastra Laboratories Ltd., United Kingdom) 들을 각각 구입하여 면역조직화학적 검사를 위한 일차 항체들로 사용하였다²⁰⁾.

3. 면역조직화학적 시그널 탐지과정

조직포본 슬라이드들을 60°C에서 6시간 동안 녹인 다음, 파라핀을 제거하기 위하여, xylene에 20분간 담그었다. 그 다음 100% ethanol에 10분, 70% ethanol에 5분 작용시킨다음, 흐르는 물에 30초간 씻었다. 3% H₂O₂에 5분 작용시킨 다음 증류수에 5분 담근다. 다시 1 X phosphate-buffered saline solution (PBS)에 5분작용시킨 다음 non-immune goat serum/0.05 M Tris HCl (pH 7.6)을 차단항체로 삼아 20분간 처리하였다. p53일차 항체를 20분간 반응 시켰다. 완충액으로 10분 세척후 연결항체를 도포 후 20분뒤 완충액으로 10분 세척하였다.

표적 시그날은 DAKO LSAB[®] kit(Dako Co, Carpinteria, CA)의 peroxidase-conjugated streptavidin을 30분간 반응시켰다. 다음 완충액으로 세척후 N, N-dimethyl-formamide에 3-amino-9-ethylcarbazole을 3% 함유시킨 기질 용액으로 20분간 발색반응을 일으키고 hematoxylin으로 대비염색을 실시하였다.

4. p53발현의 평가

p53의 발현평가는 현미경 400 배율하에서 임의의 시야 3곳을 관찰하고 주변산란(background scattering)과의 명확한 구분을 위해 중앙세포의 핵마다 5개이상의 입자로 시그널이 발현되는 핵이 존재하는 경우 양성으로 판정하였다.

결 과

돌연변이형 암억제 유전자 p53(Ab-3)은 정상 폐조직 6예의 기관지 및 폐포상피세포의 핵내에서는 발현되지

않았다. 그러나, 폐암종 32예 중 15예(46.9%)에서 핵내에설 비균질적인 발현 즉 산발적인 돌연변이형 p53의 발현을 보였다. 조직병리학적 분류에 따라 소세포 폐암종 8예중 3예(37.5%)의 그리고 비소세포 폐암종 24예 중 12예(50.0%)에서 돌연변이형 P53(Ab-3)이 발현되었다(Table 2).

돌연변이형 p53의 발현에 관한 특이성 검정을 위한 실험에서는 야생형과 돌연변이형을 다함께 포착하는 혼합형 p53(clone DO7)이 정상인 4예의 폐조직의 기관지 상피세포 및 폐포 상피세포 핵내 및 소세포 폐암종 4예와 비소세포 폐암종 4예를 포함한 총 8예의 전예의 핵내에서 모두 균질하게 발현되었다.

Table 2. Positive Rate of Mutant p53 Gene in Lung Cancers

| Cell Type | Total Cases | Positive Cases | Positivity (%) |
|-----------|-------------|----------------|----------------|
| SCLC | 8 | 3 | 37.5 |
| Non-SCLC | 24 | 12 | 50.0 |
| SQC | 5 | 3 | |
| ADC | 17 | 9 | |
| LCC | 2 | 0 | |
| Total | 32 | 15 | 46.9 |

SCLC : Small cell carcinoma, Non-SCLC : Non-small cell carcinoma, SQC : Squamous cell carcinoma, ADC : Adenocarcinoma, LCC : Large cell carcinoma.

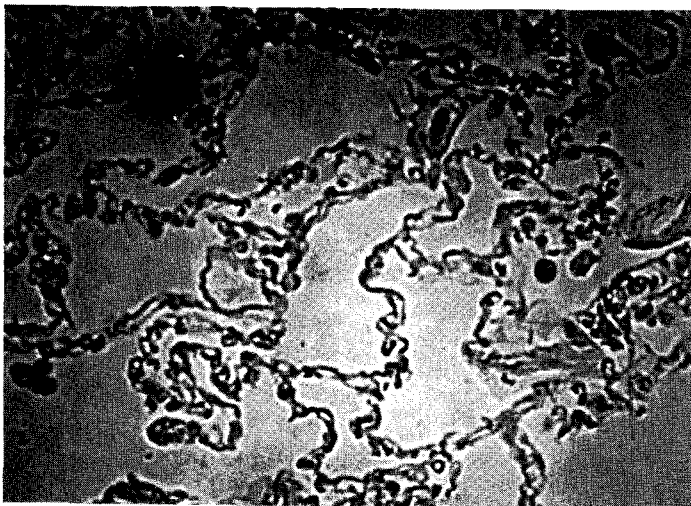


Fig. 1. Normal lung. Alveolar pneumocytes of normal lung show negative reaction to mutant p53 (Ab-3) (Hematoxylin counterstain, $\times 400$).

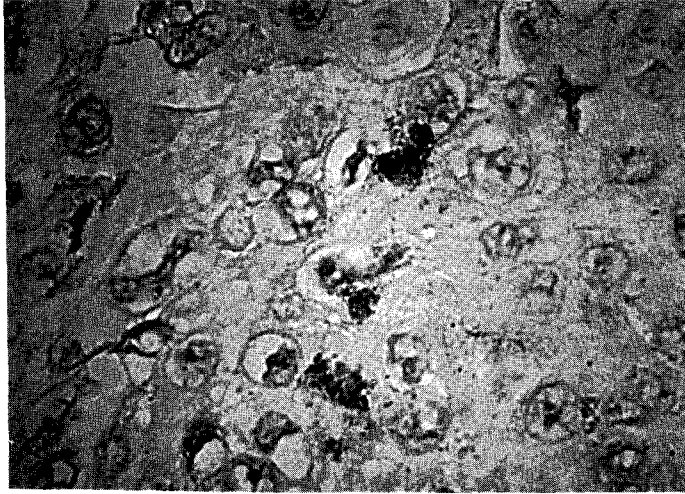


Fig. 2. Squamous cell carcinoma. Tumor cells show positive granules of mutant p53 (Ab-3) in their nuclei (Hematoxylin counterstain, $\times 400$).

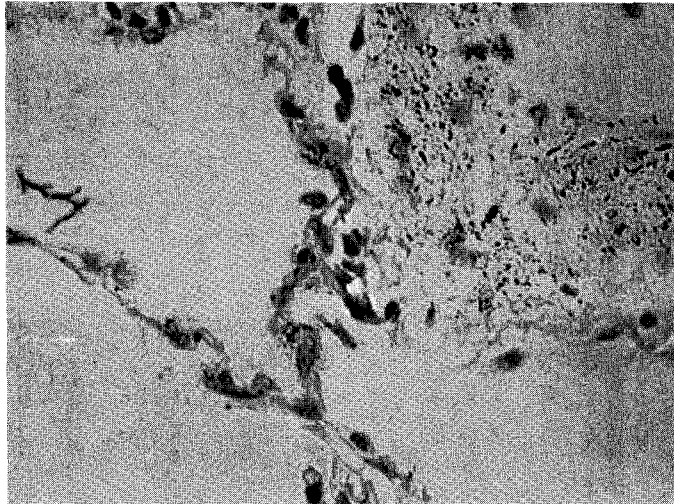


Fig. 3. Normal lung. Alveolar pneumocytes of normal lung show positive reaction to both of wild and mutant p53 (DO7) (Hematoxylin counterstain, $\times 400$).

고 찰

암억제 유전자는 일반적으로 세포 성장의 역조절 기능과 함께 정상 세포에서 암세포로의 형질변환을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 유전자의 결실 또는 점 돌연변이가 일어나면 불활성 유전자로 바뀌어 고유의 암

억제 기능을 잃게되어 암발생 가능성이 높아진다고 해석된다. 야생형 p53 유전자와 retinoblastoma 유전자(Rb)는 대표적인 암억제 유전자로서 모두 핵내의 성장을 억제하는 단백질로 알려져 있다²¹⁾. Rb는 4.7Kb의 cDNA로서 길이가 200Kb이고 유전자에 27 exon이 존재한다고 하며²²⁾ p53과 Rb의 유사점은 돌연변이형에 대한 대립인자가 비동질성 (heterozygosity)을 소실하는 2차 타격

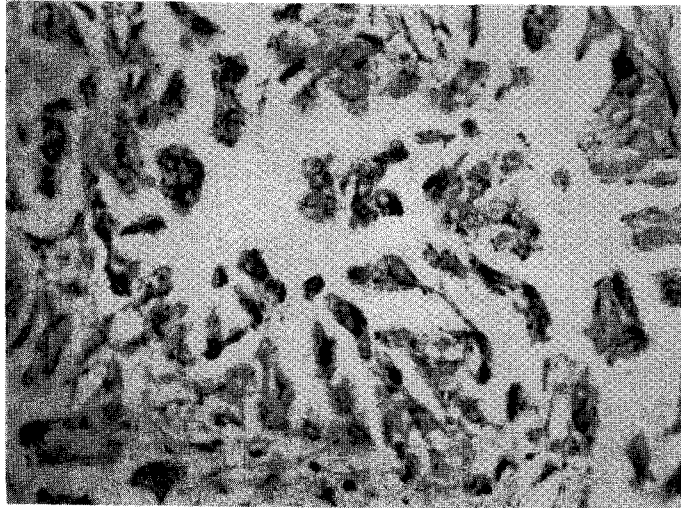


Fig. 4. Adenocarcinoma. The nuclei of tumor cells show positive granules to both of wild and mutant p53 (DO7) (Hematoxylin counterstain, $\times 400$).

설에 근거를 두고 있다. 돌연변이 p53 allele는 암의 발생소인을 선천적으로 결정하는 인자로 작용하는 배선(germline)을 통하여 통과될 수 있다고 하며^{23,24}, 많은 고형 종양에서 p53과 Rb의 손실 또한 돌연변이가 관찰되었다. 정상 세포분열에서 p53의 역할은 불분명한 점이 많으나, 분화 및 성장 조절과 계획된 세포 사망 등 정상적인 성장을 작용하는 항상성을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 한다²⁵⁻²⁸. p53은 G₀에서 G₁으로 이행하는데 있어서 적응 요소(competence factor)로 작동할 것으로 믿어지는데, p53의 mRNA와 단백질 양은 G₁ 중기에는 증가하며 G₁ 후기에는 최고조에 달하고, phosphorylation와 dephosphorylation cycle에 의하여 조절된다는 사실이 이를 잘 지적해 준다^{29,30}. 또한 p53은 DNA의 증식 및 in vitro 실험에서 DNA polymerase α 의 활동에도 영향을 준다고 하며¹⁸, p53은 정상세포와 형질 전환된 세포 내에서 생화학적인 검출이 가능하지만, 특히 정상 세포에서도 단백질이 불안정하기 때문에 소량이 축적된다. 야생형 p53은 세포배양에서 종양 발생의 잠재력을 감소 또는 제거 시키는 반면¹², 야생형 p53 유전자와 Rb는 SV 40, 아데노 바이러스, 사람의 유두종 바이러스의 암단백에 의한 파괴의 표적이 된다. p53 유전자는 과거에는 SV 40 바이러스로 형질 전환된 설치류(rodent) 세포에서 SV 40 T 항원으로 형성된 복합체이고 이는 세포내 연관된 유전자 생산물로 동일시 되었

다^{2,3,31}. 그래서 SV 40이나 아데노 바이러스 같은 DNA 종양 바이러스들에 의하여 형질 전환된 유전자의 지령을 받는 단백질은 Rb 단백질과 p53 단백질과 시험관내에서 복합체를 이룬 상황에서 작용한다고 추측되었다^{32,33}. SV 40 T 항원내 다른 부위는 p53 단백질과 복합물 형성을 할 수 있는 아데노 바이러스의 E1b와 사람의 유두종 바이러스(HPVB-encoded) E6와 sequence 상 상동성을 나타내며³³⁻³⁷, 경합하는 것으로 알려져 있다. 야생형 p53 유전자는 종양 억제 작용을 하는데 반하여¹⁰, 돌연변이형 p53 유전자는 설치류에서 종양을 발생하는 작용을 한다. 형질 전환된 세포내와 종양에서 p53이 과다 발현된다는 사실은 p53 유전자가 종양 형성에 있어서 양성적인 효과로 작용함을 의미한다³⁸. p53 유전자는 여러가지 종양 세포 계열에서 결손되어 있음이 밝혀진 반면에, p53 유전자는 섬유아 세포에 transfect 되었을 때 다른 암 유전자에 의한 형질 전환의 작용을 억제한다. 이와같은 사실들은 p53이 종양 억제군의 하나이거나 또는 항암 유전자로 작용하고 있음을 잘 증명해 준다고 하겠다. 그러나 항암 유전자는 점성 돌연변이 또는 결실에 의하여 양성 암 유전자로 변하게 되고 p53 돌연변이가 p53의 성장 억제 특성을 불활성화 시킨다. 다시 말해서 돌연변이형은 본래의 암 억제기능의 소실은 따르지만 특성에 있어서 우성이므로 dominant negative mutation으로 설명된다. 135번 위치의 valine residue를 alanine으로 변화시켜

점돌연변이를 유발시킨 cDNA clone은 encoded p53 단백을 효과적으로 불활성 시킨다³⁹⁾. 이러한 돌연변이형 p53 유전자는 자주 고형 종양 내에서 발견되었으며^{16,39)}, 세포내 p53단백의 변형이 사람에게 있어서 많은 종류의 암종의 발생과정에 의의있는 역할을 한다. 사람의 p53 유전자의 정보는 17p13 염색체에 존재한다¹⁶⁾. 대장암의 75% 이상에서 p53 유전자의 결손(deletion)이 보고 되었다³⁹⁾. 세포형이 서로 다른 분자 특성들이 이러한 형질 전환과정에 영향을 줄 수 있을 가능성이 있다. Takahashi등¹⁶⁾은 30예의 폐암 세포계열 중 17예에 있어서 동형 접합체의 결손, DNA의 재배열, 점돌연변이가 확인되었다 하였다. Yokoda등⁴¹⁾은 폐암의 거의 50%에서 p53 유전자의 돌연변이를 발견 할 수 있다 하였고, Chiba등⁴¹⁾은 절제술을 시행한 51예의 초기 원발성 비소세포폐암종 중 23예(45%)에서 codon 132에서 283번 사이에서 돌연변이를 발견할 수 있었다 하였다. Minna등⁴²⁾은 종양검사 재료의 45%에서, 또한 종양의 세포계열의 75%에서 p53의 돌연변이형을 발견할 수 있었으며, 종양의 진행시기, 성별, 림프관 상태, 나이, 치료, 조직형, 신경 내분비의 분화도, 환자의 생존, 배양 시간, 및 이전의 세포독성치료등과 통계학적으로 의미 있는 관계는 없었으며, 폐암의 모든 조직형에서 발견되었다고 보고하였다.

저자들의 본 실험에서는 야생형과 돌연변이형을 한꺼번에 포착하는 단세포항체에 의해 정상인 4예의 폐조직의 기관지 상피세포 및 폐포 상피세포 핵내 및 소세포 폐암종 4예와 비소세포 폐암종 4예를 포함한 총 8예 전예의 핵내에서 균질적인 발현을 보였으며, Table 2에서와 같이 소세포 폐암종 8예 중 3예(37.5%)와 비소세포폐암종의 24예 중 12예(50.0%) 총 32예의 폐암조직의 15예(46.9%)의 암세포들의 핵에서는 돌연변이형 p53의 산발적인 비균질성 발현을 관찰하였던 바 이러한 돌연변이형 p53의 발현빈도는 Minna등의 보고와 유사하다. 그러나 추후 폐암의 조직형, 종양의 시기, 환자의 생존 등의 임상적 지표와 p53의 발현과의 관계를 추구하여야 할 것이다. 사람의 폐암에 있어서 야생형 p53은 아미노산 1-42에 위치한 p53에 대한 transactivation domain을 갖는 강력한 transactivator이다. 점돌연변이는 여러가지 양상으로 나타나는데 점돌연변이의 가장 흔한 것이 missense돌연변이이고, 대부분 아미노산 residue 130에서 290번 사이에 밀집되어 있는데 가장 흔히 발생

하는 residue부위는 117번에서 142번사이, 171에서 181번사이, 234번에서 258번사이, 270에서 286사이로 알려지고 있다^{43,44)}. Minna등⁴²⁾은 돌연변이가 68번에서 342번사이의 아미노산에서 일어나고, 특히 151번에서 160번사이의 부위가 폐암과 관련이 있다고 하였다. 또한 G에서 T로 변위(transversion)가 소세포 폐암과 비소세포 폐암의 42%에서 나타난다고 하였다. 세균계의 돌연변이 hot spot이 있는데 residue 175, 248, 273에 영향을 준다. Hot spot의 분포는 조직형과 암의 종류에 따라 다르나, 조직형과 암에 종류에 따른 차이가 왜 존재하는지 아직은 잘 모른다⁷⁾. Minna등⁴²⁾은 돌연변이의 60%가 missense, 20%가 nonsense, 20%가 splicing 착오였다고 하였다. 이와같은 p53 암억제 유전자발현에 관한 연구는 유전자 염기배열분석에 의한 것이 가장 확실한 검증방법이긴하나, 분석에 필요한 실험 자료가 대량 필요하고, hot spots들이 반드시 일정하게 나타나는 것이 아니라는 점과 세포내 분포상을 파악하기 어렵다는 점과 아울러 검사과정이 복잡하다는 단점들이 있다. 이에 비해 흔히 돌연변이 결실이 일어나는 residue들을 한꺼번에 결손시켜서 제조한 단세포항체를 이용한 면역조직화학적인 검색은 비록 명확한 hot spots는 알 수 없다 하더라도 빠른시간 안에 많은 검체들을 동시에 검토할 수 있는 장점이 돋보인다.

본 실험에서는 돌연변이형 p53유전자는 c-terminal에 인접한 residue 156번에서 214번 사이에 9개의 아미노산의 결손이 있는 단세포균 항체로 검색하였고 이와 대비하여 야생형과 돌연변이형 두가지를 동시에 포착하는 혼합형 단세포균항체 p53들을 사용하여, 폐암 조직내에서 발현특성을 검토하였다. 본연구결과에서 돌연변이형과 야생형 p53들을 사용하여, 폐암 조직내에서 발현특성을 검토하였다. 본연구결과에서 돌연변이형과 야생형 p53을 함께 포착할 수 있는 혼합형 단세포균 항체로는 정상 및 폐암종들의 세포핵들에서 균질적인 발현을 보여준것은 매우 당연한 반면 이와는 대조적으로 돌연변이형만 포착하는 단세포균항체의 이용시 정상대조군에서는 발현을 전혀 확인할 수 없었고, 일부 폐암종에서 특징적으로 비균질적인 발현을 보였다. 폐암종에서도 동일 clone 유래의 암세포들에서는 균질성 발현을 보일수도 있겠으나, 암세포들의 특성이 본시 비균질성 이라는 점을 미루어 보아서도 p53돌연변이형의 발현이 비균질적이라는 결과를 이해할 수 있겠다⁴⁵⁾. Minna등⁴²⁾은 단세포

포군 항체를 사용하여 33개의 서로다른 p53돌연변이 단백들을 검출하였다. 쥐에설 ala에서 val 변화를 가져오는 residue 135에 대한 p53돌연변이형은 온도에 의존성이고, 야생형은 32°C에서 돌연변이형은 37~39.5°C에서 각각 작용을 발휘하는 것으로 보고 되었다. 37~39.5°C에서는 돌연변이형 p53단백은 세포의 세포질에 한정되어 있으나, 반면 32°C에서는 야생형으로 작용하고 세포의 핵내로 이동하여 세포성장을 중단시킨다고 알려지고 있다⁶⁾. 복사는 돌연변이형 보다는 야생형의 양이 많느냐 적으냐에 따라 증감한다.

암억제 유전자와 생산물의 작용기전은 암억제 유전자와 생산물 역시 세포가 주위 환경으로부터 성장 억제 신호등을 수신하고 진행할 수 있게 하는 세포내 신호 경로의 구성요소이다. 신호 전달체계의 증대한 구성성분의 결손이 있을 시 세포밖으로부터의 성장억제 신호에 대한 반응을 간혹 잃게된다. 여러가지 억제 유전자의 생산물은 내인성 세포정지 인자라기 보다는 오히려 세포내 또는 외에서 유리하는 음성 성장 신호의 변환장치(transducer)로 작용한다고 해석되고 있다.

암억제 유전자의 손실 또는 불활성화가 중앙 성장을 탈조절하거나 또는 다른 표현형을 나타내게 한다. 많은 유전자들이 clone이나 유전자 전이에 의하여 세포에 영향을 발휘하여 길항적으로 서로 작용한다. 암억제 유전자는 세포의 성장을 하향조절 시키나 암억제 유전자의 손실은 성장을 계속하게 하여 전암세포 clone으로 전개 되는 것으로 풀이하고 있다⁴⁶⁾.

본 연구에서는 한국인 정상 조직 10예 및 폐암종 40예(소세포암종 12예, 비소세포암종 28예)에서, 조직 병리학적 분류에 따른 암억제 유전자 p53의 발현을 관찰하기 위하여, p53(Ab-3, clone DO7) 단세포군 항체들을 이용하여, 면역조직화학적 검색을 시도하여 폐암종 32예 중 15예(46.9%)에서 핵내에서 산발적으로 p53돌연변이형의 발현을 확인하였다. 소세포암종은 8예 중 3예(37.5%) 그리고 비소세포암종은 24예 중 12예(50.0%) 중에서 각각 돌연변이형 p53의 발현을 보였다. 야생형과 돌연변이형 두가지 함께 다같이 포착하는 혼합형 단세포군항체 p53(clone DO7)은 정상인 4예의 폐조직의 기관지 상피 세포 및 폐포 상피세포 핵내 및 소세포 폐암종 4예와 비소세포 폐암종 4예를 포함한 총 8예 전예의 핵내에서 발현되었다.

따라서 이와같은 결과는 p53유전자의 돌연변이형의

발현을 의미하는 것이며, 소세포암종 및 비소세포암종에서 돌연변이형 p53유전자 발현뿐 아니라 다른 돌연변이형의 암억제 유전자들의 존재 가능성과 함께 또다른 우성 암유전자들의 작용이 폐암종의 발생에 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 : 암억제 유전자 p53은 393개의 codon을 가지고, 17번 염색체에 위치하며, 정상세포에서 세포의 성장과 함께 암세포로의 형질전환을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 유전자 재배열 또는 점 돌연변이가 일어나 비활성 유전자로 바뀌면, 암억제 기능을 소실하게 되어 암발생 감수성이 높아진다. 돌연변이형 p53유전자의 발현 빈도 및 조직학적 유형에 따른 돌연변이형 p53의 발현양상에 대한 연구를 하여 그의의를 규명하고자 이 연구를 실시하였다.

방법 : 한국인 정상 폐조직 10예 및 서로 다른 유형의 폐암종 40예(소세포암종 12예, 비소세포암종 28예)에서, 암억제 유전자 p53의 발현을 관찰하기 위하여, 돌연변이형 p53(Ab-3), 단세포군 항체와 야생형과 돌연변이형의 혼합형 p53(DO7) 단세포군 항체들을 이용하여, 면역조직화학적 검색을 시도하였다.

결과 : 암억제 유전자 돌연변이형 p53은 정상조직 6예의 기관지상피와 폐포 상피세포에서는 발현되지 않았다. 암억제 유전자 돌연변이형 p53을 시행하였던 폐암종 32예 중 15예(46.9%)의 암세포에서 핵내에 산발적으로 p53유전자가 발현되었으며, 소세포폐암종은 8예 중 3예(37.5%) 그리고 비소세포암종은 24예 중 12예(50.0%)에서 각각 돌연변이형 p53의 발현이 암세포의 핵내에서 관찰 되었다. 야생형과 돌연변이형을 다함께 포착하는 혼합형 p53(clone DO7)은 정상인 4예의 폐조직의 기관지 상피 세포 및 폐포 상피세포 핵내 및 소세포 폐암종 4예와 비소세포 폐암종 4예를 포함한 총 8예 전예의 핵내에서 균질하게 발현되었다.

결론 : 이와같은 결과는 p53유전자의 돌연 변이형의 발현을 의미하는 것이며, 소세포암종 및 대세포암종에서 돌연변이형 p53유전자의 발현 뿐만 아니라 다른 돌연변이형의 암억제 유전자들이 작용 할 가능성과 함께 또 다른 우성 암유전자들의 영향이 폐암종의 발생에 밀접한 관계가 있을 것으로 추측된다.

REFERENCES

- 1) Lamb P, and Crawford L: Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* **6**:1379, 1986
- 2) Lane DP, Crawford V: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**:261, 1979
- 3) Linzer DIH, Levine AJ: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinomas cells. *Cell* **17**:43, 1979
- 4) Sager R: Genetic strategies of tumor suppression. *Am Rev Respir Dis* **142**:S40, 1990
- 5) Reich NC, Oren M, Levine AJ: Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* **3**:2143, 1983
- 6) Gannon JV, Lane DP: Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* **349**:802, 1991
- 7) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**:453, 1991
- 8) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**:646, 1984
- 9) Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V: Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**:649, 1984
- 10) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**:1083, 1989
- 11) Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M: Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **86**:8763, 1989
- 12) Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JKV, Vogelstein B: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**:912, 1990
- 13) Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, Bressac B, Ozturk M, Baker SJ, Vogelstein B, Friend SH: p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* **10**:5772, 1990
- 14) Michalovitz D, Halevy O, Oren M: Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**:671, 1990
- 15) Ahuja H, Bar-Eli M, Clarke P, Snyder D, Foreman S, Goldman J: p53 gene alterations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cells* **7**:117, 1989
- 16) Takahashi T, Nau NM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**:491, 1989
- 17) Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5**:893, 1990
- 18) Lane DP, Benchimol S: p53P oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* **4**:1, 1990
- 19) Sidransky D, Mikkelsen T, Schwachheimer K, Rosenblum ML, Cavanee W, Vogelstein B: Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumor progression. *Nature* **355**:846, 1992
- 20) Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP: Activating mutations in p53 produce a common confirmational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* **9**:1595, 1990
- 21) Bergh JCS: Gene amplification in human lung cancer. *Am Rev Respir Dis* **142**:S20, 1990
- 22) Hong FD, Huang HJS, To H, Young LJS, Oro A, Bookstein R, Lee EYHP, Lee WH: Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:5502, 1989
- 23) Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH: Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**:747, 1990
- 24) Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**:1233, 1990
- 25) Shaulsky G, Goldfinger N, Peled A, Rotter V: Involvement of wild-type p53 in pre-B cell differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:8982, 1991
- 26) Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V: Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type and mutant p53 proteins. *Cancer Res* **51**:5232, 1991
- 27) Yonish-Rouach E, Resnitzsky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis

- of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**:345, 1991
- 28) Oren: p53: The ultimate tumor suppressor gene: *FASEB* **6**:3169, 1992
 - 29) DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM: The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* **58**:1085, 1989
 - 30) Kaye FJ, Kratzke RA, Gerster JL, Lin PS: Recessive oncogenes in lung cancer. *Am Rev Respir Dis* **142**: S44, 1990
 - 31) Prives C, Bargonetti C, Farmer G, Reynisdottir I, Friedman P, Zhu H, Prywes R: Structural and functional analyses of wild-type and mutant p53 tumor suppressor proteins. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**: 595, 1992
 - 32) Ludlow JW, Decaprio JA, Huang CM, Lee WH, Paucha E, Livingston DM: SV 40 large T antigen binds preferentially to an under phosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* **56**:57, 1989
 - 33) Whyte P, Williamson NM, Harlow E: Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**:67, 1989
 - 34) Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934, 1989
 - 35) Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E: Association between an oncogene and an antiocogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**:124, 1988
 - 36) Werness BA, Levine AJ, Howley PM: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76, 1990
 - 37) Lane DP, Vojtjsek B, Midgley C, Stephen C, Daniels D, Bartek J: Immunochemical analysis of p53 in human tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**:596, 1992
 - 38) Hinds P, Finlay C, Levine AJ: Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* **63**:739, 1989
 - 39) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**:217, 1989
 - 40) Yokota J, Wada M, Shimozato Y, Terada M, Sugimura T: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:9252, 1987
 - 41) Chiba I, Takashi T, Nau MM, D'Amico D, Curiel DT, Mitsudomi T, Buchhagen DL, Carbone D, Piantadosi S, Koga H, Reissman PT, Slamon DJ, Holmes EC, Minna JD: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene* **5**:1603, 1990
 - 42) Minna JD, D'Amico D, Bodner S, Buchhagen D, Carbone D, Chen J, Chiba I, Curiel DT, Fedorko J, Felix C, Gazdar A, Jensen S, Johnson B, Linnoila RI, Medcalf EA, Milner J, Mitsudomi T, Mulshine J, Nau M, Oie HK, Phelps R, Russell E, Segal S, Takahashi T, Unger T, Winter S: p53 mutations in human lung cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**: 596, 1992
 - 43) Soussi T, Fromental CC, May P: Structural aspects of p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**:945, 1990
 - 44) Harris AL: Telling changes of base. *Nature* **350**:377, 1991
 - 45) Harris CC: Personal communication. At 84th Annual Scientific Meeting of American Association for Cancer Research. 1993
 - 46) Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* **254**:1138, 1991