

체강삼출액의 진단에 있어서 p53 단백질의 유용성

국군중앙의무시험소 및 전남의대 병리학교실*

이 지 신 · 박 창 수*

= Abstract =

Diagnostic Value of p53 Expression in the Evaluation of Effusions

Ji Shin Lee, M.D. and Chang Soo Park, M.D.*

Departments of Pathology, Military General Laboratory and Chonnam University Medical School*

The diagnostic accuracy of routine cytological preparations from effusions ranges from 60% to 70%. Immunohistochemical markers, especially tumor-associated antigens, have been successfully employed to increase diagnostic sensitivity in effusion cytology. However, more than two different antibodies in diagnosis of effusions are needed.

In the view of prevalence of abnormalities of p53 gene in human malignancies we investigated the diagnostic usefulness of demonstration of p53 protein immunoreactivity in distinguishing benign changes versus malignant processes in effusions. p53 protein expression was studied immunohistochemically in 76 effusions (28 malignant and 48 benign) using anti-human p53 antibody. p53 immunoreactivity was identified in 19 of 28 (67.9%) malignant effusions. In contrast, no p53 immunoreactivity was observed in all benign effusions. A specificity of 100% and a sensitivity of 67.9% were observed.

These results suggest that immunohistochemical detection of p53 protein seems to be helpful in distinguishing benign changes versus malignant processes in effusions, although its principal limitation is its relatively low sensitivity.

Key words: Immunohistochemistry, p53 protein, Effusion cytology

서 론

체강내 삼출액의 세포학적 검사는 환자의

치료방침 및 예후판정에 중요한 역할을 한다.
체강내 삼출액에 대한 세포학적 진단의 정확
성은 60~70%인데 이러한 낮은 진단율은 많은

염증세포와 섞여있는 소수의 악성세포를 인지하기 어렵고 세포학적 소견만으로 악성세포와 반응성 중피세포를 감별하기가 쉽지않기 때문이다¹⁾. 다양한 일차항체를 이용한 면역조직화학적 방법이 악성세포의 식별에 도움을 주어 세포학적 진단의 정확성을 향상시키고 있으나 악성세포의 유일한 표지자는 없는 실정이다^{2~6)}.

최근 종양 유전자를 이용하여 세포학적 진단의 정확도를 높이고자 하는 연구들이 시도되고 있다^{7~10)}. p53 유전자는 세포성장과 종양 발생을 억제하는 종양억제 유전자로¹¹⁾ 이 유전자의 돌연변이는 거의 대부분의 악성 질환에서 관찰된다^{12~14)}. 돌연변이형 p53 유전자 산물은 대사적으로 안정성을 지니며 반감기가 증가되어 면역조직화학적 방법으로 쉽게 검출이 가능하다^{15,16)}.

이에 저자들은 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검색이 체강내 삼출액의 악성변화와 양성변화의 감별에 도움이 되는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

전남대학교 병원 해부병리과에 의뢰된 체강내 삼출액 중 세포학적 검사와 삼출액의 세포블록을 이용한 cytokeratin(CK), carcinoembryonic antigen(CEA), epithelial membrane antigen(EMA), fibronectin에 대한 면역조직화학적 검사로 최종 진단된 76예를 연구대상으로 하였다. 검색대상 76예 중 흉강삼출액은 45예, 복강 삼출액은 31예이었다. 76예 중 환자의 병력상 조직학적으로 진단된 암종이 있는 경우는 50예이었고 악성 기왕력이 없는 경우는 26예이었다.

p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색은 CK, CEA, EMA, fibronectin 등의 면역조직화학적 염색이 시행된 세포블록을 3 μ m 두께로 박절하여 Probe-On Plus 슬라이드(Fisher)에 부착시켜 건

조시킨 다음 염색에 사용하였다. 염색은 Probe-On Plus 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 Microprobe System(Fisher)을 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 20 mM 구연산 완충액(citrate buffer)에 담근 후 전자렌지(삼성 630W)에서 8분간 가열한 후 0.2M Tris 완충액으로 세척하였다. 일차항체는 야생형과 돌연변이형을 모두 검출할 수 있는 p53 (Santa Cruz DO-1) 항체를 이용하였고, 20분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하였다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotinylated anti-mouse IgG를 이용하여 10분간 부치시킨 후 완충액으로 세척하고 streptavidin-horseradish peroxidase에 10분간 작용시켰다. Horseradish peroxidase의 발색은 amino-ethyl carbazole(AEC)를 이용하였으며 헤마톡실린으로 대조염색을 시행한 후 양성반응을 관찰하였다. 염색의 전과정에 있어서 부치온도는 45 $^{\circ}$ C로 하였으며 음성대조군은 일차항체 대신 항체 희석액을 실험에 이용하였다. 양성반응은 양성신호(positive signal)가 세포의 핵에 국한되어 있으면 양성인 세포의 수와 관계없이 모든 경우를 양성으로 판정하였다.

결 과

세포학적으로 악성세포의 형태학적 소견을 보이면서(Fig. 1) 이들 세포가 세포블록의 면역조직화학적 염색상 CK, CEA, EMA중 2개 이상에서 양성인면서 동시에 fibronectin에 음성인 경우를 최종적으로 "악성"으로 진단하였으며, 세포학적으로 비정형적인 세포가 없고(Fig. 2) 세포블록의 면역조직화학적 염색상 CEA, EMA 음성인면서 fibronectin에 양성인 세포만이 관찰된 경우를 최종적으로 "양성"으로 진단하였

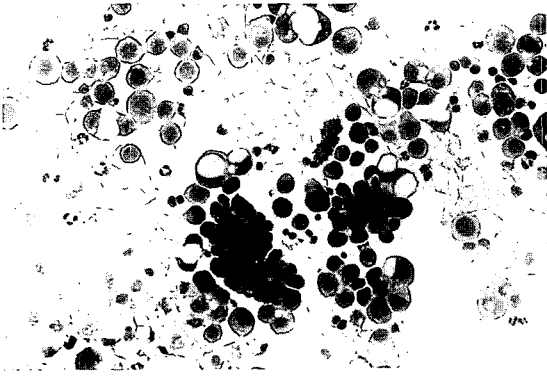


Fig. 1. Malignant pleural effusion from a pulmonary adenocarcinoma(Papanicolaou, X 400).

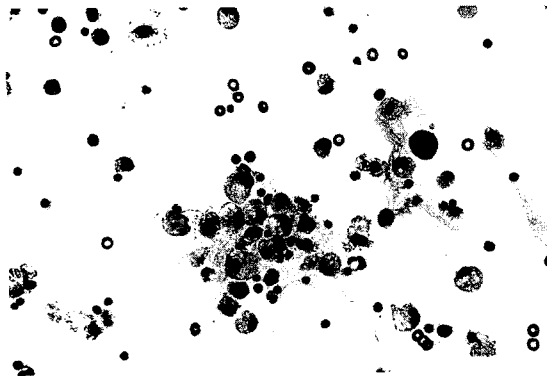


Fig. 2. Peritoneal effusion in cirrhosis. Many reactive mesothelial cells and inflammatory cells are noted (Papanicolaou, X 400).

다⁶⁾. 76예의 최종적인 진단은 28예가 “악성” 이었고 48예는 “양성”이었다. 최종적으로 “악성”으로 진단된 28예의 원발부위는 폐가 가장 많았다(Table 1).

p53 단백질에 대한 면역조직화학적 염색상 양성반응은 갈색으로 핵에서만 관찰되었다. 최종적으로 “악성”으로 진단된 28예 중 19예(67.9%)에서 p53 단백질에 대한 양성반응을 관찰할 수 있었다. p53 단백질에 양성인 예의 대부분은 다수의 악성세포에서 일양한 양성반응을 관찰할 수 있었으나(Fig. 3), 일부 예에서는 몇개의 악성세포만이 양성반응을 보였다(Fig. 4). 한편 악성세포와 함께 출현하는 반응성 중피세포와 염증세포는 모두 음성이었다. 원발부위에 따른 p53 단백질의 양성율은 원발병소가 폐인 경우는 75%, 위인 경우 70%, 난소인 경우 66.7%, 직장인 경우 50%로 원발병소가 폐인 경우가 p53 단백질의 양성율이 가장 높았다(Table 1).

최종적으로 “양성”으로 진단된 48예 모두는 p53 단백질에 대해 음성으로 반응성 중피세포와 염증세포 모두에서 음성으로 관찰되었다.

p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검색은 체강내 삼출액의 악성세포를 진단함에 있어서 민감성은 67.9%, 특이성은 100%이었다(Table 2).

Table 1. Origin of malignant effusions and p53 expression

Origin	No. of cases	No. of cases of p53 expression(%)
Lung	12	9(75)
Gall bladder	1	0
Stomach	10	7(70)
Rectum	2	1(50)
Ovary	3	2(66.7)
Total	28	19(67.9)

고 찰

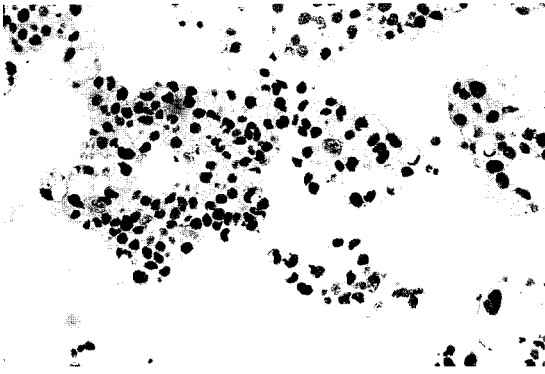


Fig. 3. Malignant pleural effusion from a pulmonary adenocarcinoma. An intense and diffuse nuclear staining pattern with p53 protein is demonstrated (ABC, ×200).

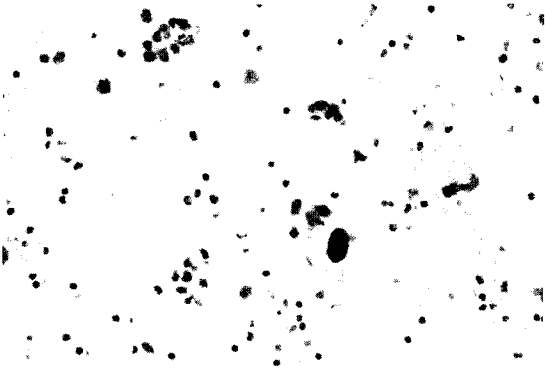


Fig. 4. Malignant peritoneal effusion from a gastric adenocarcinoma. A few carcinoma cells are positive to p53 protein(ABC, ×200).

세포학적 소견만으로 체강내 삼출액에 존재하는 암종세포와 반응성 증피세포의 감별이 어려운데 다양한 일차항체를 이용한 면역조직화학적 방법이 이들 양자의 감별에 도움을 주고 있다²⁻⁵. 본 저자는 세포학적 소견을 기초로 세포블록의 절편에 CK, CEA, EMA, fibronectin 등으로 구성된 일차항체 panel의 면역조직화학적 검사를 실시한 결과 이 panel이 암종세포와 반응성 증피세포의 감별에 도움이 됨을 보고한바 있다⁶. 이 연구에서 세포학적 소견과 면역조직화학적 결과를 종합한 결과 세포학적으로 “악성의심”의 경우가 “악성” 혹은 “양성”으로 재진단되어 정확한 진단이 가능하였다.

그러나 다른 보고와²⁻⁵ 마찬가지로 우리의 연구에서도⁶ 암종세포와 반응성 증피세포를 감별할 수 있는 유일한 표지자가 없어 panel 검사로 시행되어야 함을 알았고 이러한 점이 병리검사실에서 통상적으로 이용하는데 제한점이 될 수 있다고 생각되었다. 따라서 체강내 삼출액에 존재하는 악성세포의 유일한 표지자를 찾고자 본 연구를 시도하였다.

p53 유전자는 17번 염색체 단완에 존재하고 정상 상태에서는 낮은 농도로 발현되면서^{17,18} 세포성장과 종양발생을 억제한다¹¹. 돌연변이 등의 방법을 통해 wild 형의 p53 유전자가 비활성화 될때 돌연변이형 p53 유전자는 과발현된다^{17,18}. 이러한 p53 유전자의 돌연변이는 거의 대부분의 악성 질환에서 관찰된다¹²⁻¹⁴. 한편 돌연변이형 p53 유전자 산물은 대사적으로 안정성을 지니며 반감기가 증가되어 면역조직화학적 방법으로 쉽게 검출이 가능하다^{15,16}. 따라서 면역조직화학적 방법을 이용한 돌연변이형 p53 유전자 산물인 p53 단백질의 검출을 악성 표지자로 사용할 수 있을 것이다.

Table 2. Final diagnosis and p53 expression

Final diagnosis	p53 expression	
	p53-positive	p53-negative
Malignant	19	9
Benign	0	48

지금까지 p53 유전자의 검출이 세포학적 진단에서 악성표지자로 사용할 수 있는지의 여부에 대한 연구는 다양한 종류의 검체물을 이용한 경우⁷⁾, 유방의 세침흡인물을 이용한 경우⁵⁾, 방광암 환자의 뇨를 대상으로 중합효소연쇄반응의 방법을 사용한 경우¹⁹⁾ 등으로 체강내 삼출액을 대상으로 면역조직화학적 방법에 의한 p53 단백질 검출은 드물다^{8~10)}. 중합효소연쇄반응에 의한 방법은 비용이 많이 들고 결과가 나오는데 시간이 오래 걸리며 특별한 장비를 구비하여야 하는 반면, 면역조직화학적 방법은 비용이 저렴하고 술기가 간단하여 통상의 병리검사실에서 쉽게 사용할 수 있는 방법이다.

면역조직화학적 방법은 사용한 일차항체의 종류, 염색의 기법 등에 따라 결과가 상이할 수 있는데 본 연구는 일차항체로 DO-1을 사용하였으며 조직항원이 잘 노출되도록 일차항체 처치전에 전자렌지로 가열한 후 염색을 시행하였다.

본 연구에서 최종적으로 “악성”으로 진단된 경우에 있어서의 p53 단백질의 양성율은 67.9%이었으며 원발장소에 따른 차이는 크지 않았다. 지금까지 보고된 논문에 따르면 “악성” 삼출액에서의 p53 단백질의 검출은 32~83%^{8~10)}로 본 연구와 유사하였다. p53 유전자 돌연변이의 빈도가 장기에 따라 다소의 차이는 있으나 악성질환에서 30~70% 정도¹²⁾인 점을 미루어 합당한 결과라고 생각되었다. 한편 악성세포와 함께 출현하는 반응성 증피세포는 모두 p53 단백질에 음성이었다.

본 연구에서 최종적으로 “양성”으로 진단된 48예 모두에서 p53 단백질은 검출되지 않았다. 지금까지 보고된 바에 따르면 “양성”인 삼출액에서의 p53 단백질의 검출은 음성 즉 0% 인 경우가 우세하였으나^{7,9)} 73%에서 p53 단백질이 검출되었다는 보고도 있었다⁸⁾. 그러나 p53 단백질이 검출된 경우도 반응성 증피세포 일부에서만 검출되며 반응하는 세포수 또한 “악성”

삼출액에 비해 적었다. “양성”인 삼출액에서의 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 결과가 상이함으로 많은 예를 대상으로 다양한 p53 단백질의 일차항체를 이용한 면역조직화학적 연구와 *in situ hybridization* 등과 같은 보다 정확한 방법을 사용한 연구가 필요하다고 생각된다.

본 연구의 결과로 체강내 삼출액에 대한 p53 단백질의 면역조직화학적 검색이 악성세포를 진단함에 있어서 위양성이 없음을 알 수 있었는데 이러한 성적은 p53 단백질이 체강내 삼출액의 악성 표지자가 될 수 있음을 시사하였다. 그러나 민감성이 다소 낮기 때문에 제한점이 있다고 생각된다.

본 연구에서는 악성종피종의 예는 없었는데 악성종피종에서 p53 유전자의 돌연변이가 자주 관찰된다는 보고로^{20,21)} 미루어 체강내 삼출액에 있어서 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 방법이 전이성 암종과 악성종피종의 감별에는 도움이 되지 않는다고 생각된다.

결 론

p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검색이 체강내 삼출액의 악성변화와 양성변화의 감별에 도움이 되는지를 알아보하고자 체강내 삼출액에 대한 세포학적 검사와 삼출액의 세포블록을 이용한 CK, CEA, EMA, fibronectin에 대한 면역조직화학적 검사로 최종 진단된 76예를 연구 대상으로 하였다.

세포학적 소견과 면역조직화학적 소견을 종합하여 최종적으로 “악성”으로 진단된 경우는 28예, “양성”으로 진단된 경우는 48예 이었다. 최종적으로 “악성”으로 진단된 28예 중 p53 단백질에 대한 양성률은 19예(67.9%)에서 관찰된 반면 최종적으로 “양성”으로 진단된 48예 모두는 p53 단백질에 음성이었다. 반응성 증피세포와 염증세포는 p53 단백질에 모두 음성이었다. p53 단

백에 대한 면역조직화학적 검색은 체강내 삼출액의 악성세포를 진단함에 있어서 민감성은 67.9%, 특이성은 100% 이었다.

이상의 성적으로 체강내 삼출액에서 p53 단백을 면역조직화학적으로 검색하는 것이 체강삼출액의 진단에 도움은 되나 민감성이 낮아 약간의 제한점이 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Gavin FM, Gray C, Sutton J, Clayden DA, Banks RI, Bird CC: Morphometric differences between cytologically benign and malignant serous effusions. *Acta Cytol* 32:175-182, 1988
2. Kwee WS, Veldhuizen RW, Golding RP, et al: Histologic distinction malignant mesothelioma, benign pleural lesions and carcinoma metastasis: Evaluation of the application of morphometry combined with histochemistry and immunostaining. *Virchows Archiv(Pathol Anat)* 397:287-299, 1982
3. Duggan MA, Masters CB, Alexander F: Immunohistochemical differentiation of malignant mesothelioma, mesothelial hyperplasia and metastatic adenocarcinoma in serous effusions, utilizing staining for carcinoembryonic antigen, keratin and vimentin. *Acta Cytol* 31:807-814, 1987
4. Mezger J, Stotzer O, Schilli G, Bauer S, Wilmanns W: Identification of carcinoma cells in ascitic and pleural fluid: Comparison of four pan-epithelial antigens with carcinoembryonic antigen. *Acta Cytol* 36:75-85, 1992
5. Tickman RJ, Cohen C, Varma VA, Fekete PS, DeRose PB: Distinction between carcinoma cells and mesothelial cells in serous effusions: Usefulness of immunohistochemistry. *Acta Cytol* 34:491-496, 1989
6. Lee JS, Nam JH, Lee MC, Park CS, Juhng SW: Immunohistochemical panel for distinction of carcinoma cells and reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 40:631-636, 1996
7. Hall P, Ray A, Lemoine M, Midgley C, Krausz T, Lane D: p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology(lett). *Lancet* 338:513, 1991
8. Walts AE, Said JW, Koeffler HP: Is immunoreactivity for p53 useful in distinguishing benign from malignant effusions?: Localization of p53 gene product in benign mesothelial and adenocarcinoma cells. *Mod Pathol* 7:462-468, 1994
9. Zoppi JA, Pellicer EM, Sundblad AS: Diagnostic value of p53 protein in the study of serous effusions. *Acta Cytol* 39:721-724, 1995
10. El-Habashi A, El-Morsi B, Freeman SM, El-Didi M, Marrogi AJ: Tumor oncogenic expression in malignant effusions as a possible method to enhance cytologic diagnostic sensitivity: An immunocytochemical study of 87 cases. *Am J Clin Pathol* 103:206-214, 1995
11. Vogelstein B: Genetic alterations in colorectal tumors. *Adv Oncol* 7:3-6, 1991
12. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53, 1991
13. Kern S, Pietenpol J, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler K, Vogelstein B: Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256: 827-830, 1992
14. Marshall C: Tumor suppressor gene. *Cell* 64:313-326, 1991
15. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC: Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem* 39:1281-1287, 1991
16. Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P: p53 in colorectal cancer: Clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 63:317-319, 1991
17. Cossman J, Schlegel R: p53 in the diagnosis of human neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 83:980-981, 1991
18. Lane DP, Benchimol: p53: oncogene or antioncogene? *Gen Develop* 4:1-8, 1990
19. Sidransky D, Von Eschenbach A, Tsai Y, et al: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706-709, 1991
20. Kafiri G, Thomas D, Shepherd N, Krausz T, Lane D, Hall P: p53 expression is common in malignant mesothelioma. *Histopathology* 97:244-249, 1992
21. Mayall F, Goddard H, Gibbs A: p53 immunostaining in the distinction between benign and malignant mesothelial proliferations using formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:377-381, 1992