

기관지도말 표본에서 p53단백 발현의 진단적 의의

계명대학교 의과대학 병리학교실, 울산동강병원*, 광병원**

이 상 숙·배 지 연·강 유 나·조 영 록·김 시 남·박 남 조·김 선 영*·김 정 희**

= Abstract =

Diagnostic Application of p53 IMMUNOSTAINING in Bronchial Brush Specimens

Sang Sook Lee, M.D., Ji Yeon Bae, M.D., Yu Na Kang, M.D., Young Rok Cho, M.D.,
Si Nam Kim, M.D., Nam Jo Park, M.D., Seun Young Kim, M.D. *, and Jung Hi Kim, M.D. **

Departments of Pathology, Keimyung University School of Medicine,
Ulsan Dongkang Hospital* and Kwak Hospital**

Abnormalities of p53 gene are common in lung cancers and are associated with immunologically detectable p53 protein. p53 immunoreactivity is uncommon in normal cells but is frequently seen in neoplasia. Therefore, assessment of p53 expression may assist in the cytological diagnosis of malignancy. The usefulness of p53 immunostaining as a marker of malignancy in the cytological analysis of bronchial brush specimens from the patients with lung cancers was investigated in this study. A total of 71 bronchial brush samples submitted for cytologic diagnosis were immunostained with D07, a monoclonal antibody to recombinant p53 protein. Resultant p53 data were correlated with cytologic diagnosis and clinical information. Of the 17 smears with a benign cytodiagnosis, all were p53 negative. Of the 40 cases with a malignant cytodiagnosis (histologically confirmed), 35 were p53 positive and 5 were negative. Of the 14 cases that were cytologically suspicious but nondiagnostic for malignancy, 11 were p53 positive, 9 of which were subsequently proved to be malignant by histologic examination, and the remaining 2 cases were tuberculosis clinically. Forty four of 51 histologically confirmed lung carcinomas were p53 positive, including 25 of 28 squamous cell carcinomas, 13 of 17 small cell carcinomas, 3 of 3 adenocarcinomas, and 3 of 3 large cell undifferentiated carcinomas. These results suggest that p53 immunostaining could be of value as a marker of malignancy in the cytologic examination of bronchial brush specimens. Furthermore, we have shown the possible clinical utility of p53 immunostaining in cytopathological diagnosis, that is, as a valuable adjunct to morphological assessment in the analysis of cytopathologically suspicious cases.

Key words: p53, Lung cancers, Bronchial brush, Immunohistochemistry

서 론

p53 유전자는 유방암¹⁾, 직장암²⁾, 폐암⁸⁾ 등 대부분의 사람에서 발생하는 악성 종양에서 가장 흔히 변이되는 종양억제 유전자다⁹⁾. p53 유전자는 사람의 제17번 염색체의 단완에 위치하여 세포증식을 조절하는 53kDa의 nuclear phosphoprotein을 encode하며 cell cycle 중 특히 G0기에서 G1기로의 이행에 관여한다고 알려져 있다¹⁰⁾. 대부분의 정상세포들은 낮은 치의 p53 mRNA를 발현하나 p53단백은 거의 검출되지 않으며^{11,12)}, p53 mRNA 농도가 높은 정상적으로 분열하는 세포도 거의 단백을 검출할 수 없는데 이는 아마 정상세포에서 p53의 짧은 반감기 때문으로 생각된다¹³⁾. Wild-type p53 유전자는 종양억제능력을 갖고 있으나 p53의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하게 된다. 변형된 세포들 및 세포주와 종양내에서 이러한 p53 유전자의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하여 성장능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하며, 궁극적으로 악성종양의 발생에 도달하는 것으로 알려져 있다^{14,15)} 이때 p53 유전자의 변이로 생성된 p53 생성물은 구조적으로 안정되어 침범된 세포내에 축적되게 되며 이런 안정화된 비정상적 p53 단백을 p53 항체를 이용한 면역화학염색에 의해 검출할 수 있다. 면역화학적 염색에서 핵의 p53단백의 과발현은 반감기가 길어진 p53 변이 단백질의 축적으로 간주되고 있다¹⁸⁾. 최근 사람의 다양한 종양에서 p53 단백을 면역화학적 방법으로 조직에 적용하여 p53의 과표현과 예후와의 상관관계가 연구되고 있다^{1,4~8)}. 사람에 생기는 폐암의 가장 흔한 유전자 변화는 p53 유전자의 변이이다²⁴⁾. 사전 연구에 의하면 폐암의 약 60%에서 p53 단백질이 발현됨이 알려져 있다⁸⁾. 세포병리학 분야에서는 p53에 대한 연구가 많지 않으나 Goukon등¹⁶⁾이 식도암에서 행한 세포도말표본과 조직절편에서의 p53염색의 일치율은 89%에

달하였다. 세포도말표본에서 p53의 면역화학염색은 p53변이를 검색하는 유용한 방법이며 단순하고 쉽고 신속한 기법으로 암의 진단에 기여하리라 기대된다. Dowell 등¹⁷⁾에 의한 세포도말표본에서 p53단백의 면역화학적 검색의 임상적 유용성에 대해 전향적 연구를 실시한 결과 p53 단백질의 과발현과 종양간에는 긴밀한 상관관계가 도출되어 진단세포학에 p53 면역화학염색의 응용 가능성이 제시되었다.

저자들은 기관지도말표본에서 비정상적 p53 단백질의 발현 유무가 폐암의 진단적 표지자로서 지니는 의의를 알아 보고자 71예를 대상으로 p53 단구항체를 이용한 면역화학적 염색을 실시하여 그 결과를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

1994년부터 1995년까지 계명대학교 동산의료원에서 실시한 71예의 기관지 도말표본을 연구 대상으로 하였다. 그 중 51예는 폐암환자의 표본으로 남자 44명과 여자 7명였다. 환자의 연령은 43세부터 80세까지 분포되어 평균 연령은 63.6세였다. 나머지 20예는 대조군으로 폐의 만성염증 환자였다.

2. 방법

면역화학적 염색을 시행하기 위하여 유리슬라이드면에 도말된 표본을 젖은 상태에서 95% 알코올에 30분 동안 고정된 다음 흡수하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS)으로 수세하였다. 실온에서 20분간 normal horse serum(Vectastain Elite kit)을 가한 후 일차

항체인 p53 단클론 항체(DO7, Novocastra, U.K.)를 1:500으로 희석하여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastain Elite kit)를 가하여 37°C에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. Peroxidase-conjugated streptavidin(Dako, U.S.A) 1:500을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 10~20분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 양성 대조로는 사전 실험에 의해 p53의 발현이 증명된 폐의 편평상피암조직을 이용하였고 염색 결과의 판독은 핵에 갈색으로 염색되면 양성으로 간주하였다. 음성 대조는 일차항체 대신 PBS를 사용하여 위의 동일한 과정에 의해 염색하였다.

결 과

비정상적 p53 단백질의 발현은 양성 대조군으로 선택한 폐암조직과 마찬가지로 기관지도말 표본에서도 주로 종양 세포의 핵에 국한하여

염색되었다. 이러한 p53의 발현은 대부분 미만성으로 나타났으며(Fig. 1) 이는 특히 소세포암에서 눈에 띄었다. 종양세포의 핵에 일부 또는 전부가 염색되었으며(Fig. 2) 세포질내의 염색도 드물게 관찰되었다. 때로는 종양거대세포등에서 즉 종양세포의 미분화가 심해질수록 더욱 강한 p53 단백질의 발현을 볼 수 있었다.

총 71예의 기관지 도말표본의 세포병리학적 진단 결과 양성(정상 또는 염증)이었던 20예중 2예에서 일부 세포의 핵에 약한 양성으로 염색되었다. 세포병리학적 검사로 암이 의심스러웠으나 확진할 수 없었던 11예(후에 전 예가 조직학적으로 암으로 판명되었음) 중 9예(81.8%)에서 강하게 염색되었다. 반면 임상적으로 결핵을 의심하고 세포의 이형성이 관찰되었던 3예중 2예에서 양성으로 염색되어 앞으로의 추적 관찰이 요구되었다. 세포병리학적 검사 및 그후 조직학적 검사로 악성종양으로 진단되었던 40예중 35예(87.5%)에서 p53 단백질에 양성으로 염색되었다. 조직학적 검사에서 폐암으로 확진되었던 환자 51명 중 44명에서 p53 단백질의 핵내 발현이 관찰되었다. 그중 편평상피암 28예중 25예(89.3%), 소세포암종은 17예중 13예

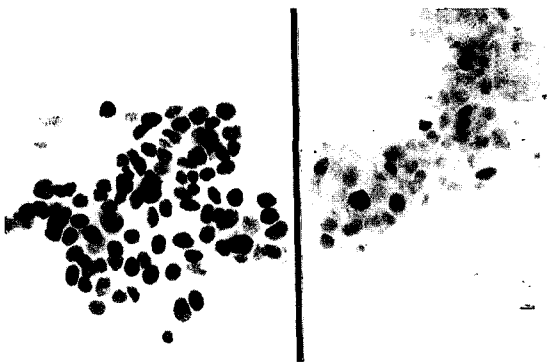


Fig. 1. p53 immunostaining in squamous cell carcinoma of the lung, showing diffusely scattered and strongly expressed p53 protein in the anaplastic cells(immunohistochemistry for p53, ×100).



Fig. 2. Diffuse(left) and focal(right) p53 nuclear staining of the anaplastic squamous cells(immunohistochemistry for p53, ×200).

(76.5%), 선암은 3예중 3예(100%), 기타 미분화 암종은 3예중 3예(100%)의 양성율을 보였다.

고 찰

현재 여러 종류의 p53 항체들이 개발되고 이를 이용한 면역화학적 염색으로 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 종양 조직에서도 p53의 변이를 검출하는 방법이 확립되어 사람의 많은 종양의 조직절편에서 광범위하게 연구되어 왔으나¹⁸⁾ 객담, 복수, 뇨 및 유방의 흡인생검 세포도말표본 등 세포병리학적 검사의 진단용으로 사용하는 경우는 많지 않다^{19~23)}. 저자들의 연구에서 총 폐암 환자 51명 중 44명 (86.3%)에서 p53 단백질의 핵내 발현이 관찰되었다. 그중 편평상피암종은 28예중 25예(89.3%), 소세포암은 17예중 13예(76.5%), 선암과 미분화 암은 6예중 6예(100%)에서 양성율을 보였다. 이는 폐암환자의 파라핀으로 포매된 조직을 이용한 p53 단백질의 발현율인 60%⁸⁾ 보다 훨씬 상회하였다. 이러한 결과는 포르말린으로 고정되지 않은 신선한 기관지 brush 표본이 훨씬 더 감도가 높음에 기인된다고 생각되었다. 때로는 종양세포의 핵과 더불어 세포질에도 p53 단백질의 양성 염색 소견이 관찰되었는데 이에 대한 원인은 불분명하나 면역화학적 방법의 교차반응이거나 소량의 p53 생성물이 세포질에 생성된 것이나 또는 파괴물질의 축적으로 생각된다¹⁸⁾. 비정상적 p53 단백질의 표현은 폐암의 시작과 진행에 관여하는 여러 분자생물학적 유전자의 표지자로서 초기 암환자의 예후의 예측과 치료의 선택, 그리고 진단이 애매한 생검과 세포도말표본에서 암을 확진하는데 도움이 된다. 또한 미래에 이런 표지자들이 폐암의 조기 발견과 특수한 치료에 대한 반응을 예견하는데 쓰일 수 있을 것이다²⁴⁾.

Mao 등²⁵⁾이 폐의 선암환자를 대상으로 사전

에 행한 객담 표본을 이용하여 암의 검색 방법을 모색한 결과 ras나 p53 유전자의 변이를 가진 선암 환자중 80%에서 객담에서도 원발암과 동일한 유전자의 변이가 발견되었을 뿐만 아니라, 임상진단이 내리기 1년전에 객담 속의 암세포의 클론을 형성하는 집단을 처음 발견하여 보고하였다. 이는 객담을 이용하면 임상적으로 증상이 나타나기 전에 유전자의 변화를 감지할 수 있음을 의미하며 객담이 폐암환자에서 진단을 할 수 있는 중요한 검체가 됨을 알 수 있다.

세포병리학적 검사에서 악성과 양성병소 사이의 감별이 만족스럽게 이루어 지지 않아 진단이 애매한 예를 종종 경험할 수 있다. 세포병리학적 검사에서 의심스러운 세포를 정확하게 판별하는 것은 진단세포학에서 아주 중요한 문제이다. 최근 연구에서 p53 유전자의 변이가 사람의 암에서 가장 흔히 생기는 유전학적 사건으로 알려졌으며, 일단 변이가 생기면 conformation의 변경을 초래하며 p53 단백질의 반감기가 길어져 면역화학기법에 의해 검출되게 된다. 체액의 세포병리학적 분석을 위해 암의 한 표지자로 p53의 면역화학염색이 체액의 세포병리학적 검사의 암의 표지자로서의 가치가 있음이 알려 졌다²²⁾. 물론 p53이 염색되지 않았다고 암의 가능성을 배제할 수 있는 것은 아니나 세포도말표본에서 p53의 면역화학염색으로 양성으로 염색되면 암을 강하게 제시함이 밝혀 졌다. 본 연구에서도 세포병리학적 검사로 암이 의심스러웠으나 확진할 수 없었던 11예중 9예에서 강하게 p53 단백질이 염색되었다. 이와 같이 특히 세포병리학적으로 의심스러운 증례들의 분석에서 p53 단백질의 발현 여부는 세포의 형태학적 특성과 함께 진단의 한 가치있는 보조 수단임을 알게 되었다. 그러나 임상적으로 결핵을 의심한 환자로 세포의 이형성을 보인 3예중 2예가 p53 단백질이 양성으로 염색되어 앞으로의 추적 관찰이 요구된다. 세

포병리학적 검사로 악성종양으로 진단되었던 40예중 35예에서 p53 양성으로 염색되었다.

본 연구의 결과 폐의 진단세포학 분야에서 p53 단백질의 면역화학염색을 실시함으로써 신속하게 암세포를 검색할 수 있어 폐암 환자의 조기 발견 및 위음성율의 감소를 통한 진단율의 향상을 도모하리라 생각된다. 또한 p53 유전자의 변이를 감지할 수 있는 유용한 연구자료가 됨과 동시에 이를 통하여 진단세포학 분야에서도 폐암진단을 분자 수준에서 더욱 깊이 이해하여 치료 결정 및 예후 등을 예견할 수 있으리라 기대된다.

결 론

기관지 도말표본에서 p53 단백질의 발현이 폐암의 진단 표지자로서 가능성이 있는가를 알아보고자 71예의 기관지 도말표본을 대상으로 p53 단구항체를 이용하여 면역화학염색을 실시하였다. 본 연구 결과 총 폐암 환자 51 명 중 44 명에서 p53 단백질이 종양세포의 핵에 발현되었다. 그중 편평상피암은 89.3%, 소세포암은 76.5%, 선암 및 미분화암종은 100%의 양성율을 보였다. 세포병리학적 진단 결과 양성(정상 또는 염증)이었던 20예중 2예에서 일부 세포의 핵에 약한 양성으로 염색되었다. 세포병리학적 검사로 암이 의심스러웠으나 확진할 수 없었던 11예중 9예에서 강하게 염색되었다. 반면 임상적으로 결핵을 의심하였으나 비정형세포가 있었던 3예중 2예에서 염색되어 앞으로의 추적 관찰이 기대된다. 세포병리학적 검사로 악성종양으로 진단된 40예중 35예에서 p53 양성으로 염색되었다.

본 연구의 결과 폐의 진단세포학 분야에서 p53 단백질의 면역화학염색을 실시함으로써 신속하게 암세포를 검색할 수 있어 폐암 환자의 조기발견 및 위음성율의 감소를 통한 진단율

의 향상을 도모하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP: Genetic and immunohistochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5: 893-9, 1990
2. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al: Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-221, 1989
3. Caamano J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, Klein-Szanto AJP: Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 139:839-845, 1991
4. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679, 1990
5. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, et al: Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 52:4828-4831, 1992
6. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al: Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. *Am J Pathol* 143:199-210, 1993
7. Dosaka-Akita H, Shindoh M, Fujino M, et al: Abnormal p53 expression in human lung cancer is associated with histologic subtypes and patient smoking history. *Am J Clin Pathol* 102:6602-6607, 1994
8. 전영준, 한승범, 이상숙: 편평세포폐암에서 p53 돌연변이의 발현과 TNM 병기와의 상관관계. 계명의대 논문집 13:405-416, 1994
9. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53, 1991
10. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7491-7495, 1992
11. Calabretta B, Kaczmarek L, Sella L, et al: Growth dependent expression of human 53,000 tumor antigen messenger RNA in normal and neoplastic

- cells. *Cancer Res* 46:5738-5742, 1986
12. Crawford L: The 53,000 Dalton Cellular Protein and Its Role in Transformation. London, Academic, 1983
 13. Oren M: The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823:67-78, 1985
 14. Marshall CJ: Tumor suppressor genes. *Cell* 64: 313-326, 1991
 15. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146, 1991
 16. Goukon Y, Sasano H, Nishihira T, et al: p53 immunolocalization in cytology specimens: a study in human esophageal carcinoma. *Diagn Cytopathol* 11:113-118, 1994
 17. Dowel SP, Wilson POG, Derias NW, Lane DP, Hall PA: Clinical utility of the immunocytochemical detection of p53 protein in cytological specimens. *Cancer Res* 54:2914-2918, 1994
 18. Thomas DW: p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-330, 1992
 19. El-Habashi A, el-Morsi B, Freeman SM, et al: 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
 20. 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* 7:462-488, 1994
 21. Sidransky D, Von-Eschenbach A, Tsai YC, et al: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252:706-709, 1991
 22. Tiniakos DG, Healicon RM, Hair T, et al: p53 immunostaining as a marker of malignancy in cytologic preparations of body fluids. *Acta Cytol* 39:171-176, 1995
 23. Stephenson TJ, Royds JA, Silcocks PB, et al: Diagnostic associations of p53 immunostaining in fine needle aspiration cytology of the breast. *Cytopathology* 5:146-153, 1994
 24. Cagle PT: Molecular pathology of lung cancer and its clinical relevance. *Monogr Pathol* 36:134-144, 1993
 25. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D: Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 54: 1634-637, 1994