

□ 증 레 □

비소세포폐암에서 p53과 *bcl-2*의 발현이 예후에 미치는 영향

한양대학교 의과대학 내과학교실¹, 병리학교실², 성균관대학교 의과대학 병리학교실³

양석철¹, 윤호주¹, 신동호¹, 박성수¹, 이정희¹, 금주섭³, 공 구², 이종달²

= Abstract =

Prognostic Value of the Expression of p53 and *bcl-2* in Non-Small Cell Lung Cancer

Seok Chul Yang, M.D.,¹ Ho Joo Yoon, M.D.,¹ Dong Ho Shin, M.D.,¹ Sung Soo Park, M.D.,¹
Jung Hee Lee, M.D.,¹ Joo Seob Keum, M.D.,³ Gu Kong, M.D.,² Jung Dal Lee, M.D.²

Department of Internal Medicine¹, Pathology², College of Medicine,
Hanyang University, SungKyunKwan University³, Seoul, Korea

Background : Alteration of p53 tumor suppressor genes is most frequently identified in human neoplasms, including lung carcinoma. It is well known that *bcl-2* oncoprotein protects cells from apoptosis. Recent studies have demonstrated that *bcl-2* expression is associated with favorable prognosis for patients with non-small cell lung carcinoma. However, the precise biologic role of *bcl-2* in the development of these tumors is still obscure. p53 and *bcl-2* have important regulatory influence in the apoptotic pathway and thus their relationship is of interest in tumorigenesis, especially lung cancer.

Purpose : The author investigated to know the prognostic significance of the expression of p53 and *bcl-2* in radically resected non-small cell lung cancer.

Method : 84 cases of formalin-fixed paraffin-embedded blocks from resected primary non-small cell lung cancer from 1980 to 1994 at Hanyang University Hospital were available for both clinical follow-up and immunohistochemical staining using monoclonal antibodies for p53 and *bcl-2*.

Results : The histologic classification of the tumor was based on WHO criteria, and the specimens included 45 squamous cell carcinomas(53.6%), 28 adenocarcinomas(33.3%) and 11 large cell carcinomas(13.1%). p53 immunoreactivity was noted in 47 cases of 84 cases (56.0%). *bcl-2* immunoreactivity was noted in 15 cases of 84 cases (17.9%). The mean survival duration was 64.23 ± 10.73 months in *bcl-2* positive group and 35.28 ± 4.39 months in *bcl-2* negative group. The *bcl-2* expression was significantly correlated with survival in radically resected non-small cell lung cancer patients(p=0.03). The mean survival duration was 34.71 ± 6.12 months in p53 positive group and 45.35 ± 6.30 months in p53 negative group(p=0.21). The p53 expression was not pre-

dictive for survival. There was no correlation between combination of the different status of p53 and *bcl-2* expression in our study.

Conclusions : The interaction and the regulation of new biologic markers, such as those involved in the apoptotic pathway, are complex. *bcl-2* overexpression is a good prognostic factor in non-small cell lung cancer and p53 expression is not significantly associated with the prognostic factor in non-small cell lung cancer. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 962-974)

Key words : Non-small cell lung cancer, Survival, p53, *bcl-2*

서 론

원발성 폐암은 유럽과 미국에서 이미 암에 의한 사망률 1위를 보이는 암종으로 전체폐암의 약 80%를 차지하는 비소세포폐암은 지난 20여년간 암치료의 획기적인 진전에도 불구하고 폐암 환자의 예후는 별로 개선되지 못하고 있으며 외과적 절제가 완치를 기대할 수 있는 가장 효과적인 치료법이지만 전체 환자중 약 30%도 안되는 경우가 수술적 치료를 받을 수 있는데 이중 국소적인 폐암인 경우 완치를 기대할 수 있는 수술적 치료를 시행할 수가 있고 조기에 발견하여 광범위한 절제로 치료된 경우에도 환자의 약 50% 정도만이 5년간 생존한다. 확실히 비소세포폐암에서 비슷한 병기의 환자들도 생존 가망성은 상당한 차이를 보인다. 이러한 상황이 보다 정확히 생존 가망성을 예측하고 각각의 환자에게 보다 효율적인 치료를 제공할 수 있게 도울 수 있는 새로운 예측 인자를 밝혀야 하는 필요성이 제기되었다¹⁾.

p53 암억제유전자의 변이는 인간에서 생기는 폐암을 비롯한 여러 암종에 가장 흔히 발견되는 것으로 특히 폐암에서 p53 유전자의 돌연변이 빈도는 소세포폐암에서 가장 높거나²⁾ 또는 소세포폐암보다 오히려 편평세포 폐암에서 더 높은 것으로 보고하는³⁾ 등 다양하게 보고되었고 병기와의 관련 유무에 대해서도 역시 이론이 많은 상태이다. 일부 연구에서는 p53 유전자 발현이 폐암환자의 예후에 나쁜 영향을 미친다고 보고하는 반면 다른 일부 보고에서는 임상적 예후와는 별다른 영향이 없다고 주장

한다⁴⁾.

bcl-2 유전자는 여포성 림프종에서 t(14 ; 18) 전좌되어 있는 것이 처음 발견되었으나⁵⁾ *bcl-2* 유전자의 생성은 항상 전좌에 의존하는 것은 아니다. *bcl-2* 유전자는 잘 알려진 바와 같이 세포가 apoptosis되는 것을 방지하는 역할을 보인다⁶⁾. *bcl-2* 유전자의 발현은 폐암, 유방암, 갑상선암, 난소암, 전립선암, 위암 및 대장암 등 다양한 표피 암종에서 보고되었으며⁷⁻¹⁰⁾ 최근 보고에서는 *bcl-2* 발현은 비소세포폐암 환자에서 보다 나은 예후 인자로 작용한다고 하였으나 이러한 암종에서 *bcl-2*의 정확한 생물학적 역할은 아직도 모호하다.

이 연구의 목적은 원발성 폐암의 발암과정에 밀접한 관계를 보이는 p53과 *bcl-2* 유전자가 비소세포폐암의 예후에 미치는 영향을 알아보기 위해 광범위 절제된 비소세포폐암 환자를 대상으로 이의 면역조직화학적 염색에 의한 유전자의 발현과 환자의 임상적 특징, 특히 생존률과의 연관성을 알아보았다.

대상과 방법

1. 실험 대상

연구재료는 1980년부터 1994년까지 한양대학교 부속병원에서 비소세포폐암으로 진단된 후 술전 병기가 초기(병기 I-IIIa)라고 판단되어 치료 목적으로 광범위 폐절제술을 시행받은 환자중 수술후 1달이내에

Table 1. Patients and Tumor Characteristics

	No	%
Total no. of patients	84	
Mean age (years)	56.8	
Sex		
Male	68	81
Female	16	19
Histologic type		
Squamous cell carcinoma	45	53.6
Adenocarcinoma	28	33.3
Large cell carcinoma	11	13.1
Differentiation grade		
Well differentiated	30	35.7
Moderately differentiated	18	21.4
Poorly differentiated	19	22.6
Unknow	17	20.3
Stage		
I	21	25.0
II	13	15.5
IIIa	37	44.0
IIIb	10	12.0
IV	3	3.5
Tumor size		
T1	5	6.0
T2	45	53.6
T3	25	29.8
T4	9	10.6
Nodal status		
N0	30	35.7
N1	24	28.6
N2	29	34.5
N3	1	1.2

수술의 합병증으로 사망한 예를 제외한 환자와 이들의 폐절제 조직 총 84예를 선택하였다. 환자의 임상적 특징과 암의 특징은 Table 1과 같다. 환자는 원발 폐암과 림프절에 대해 광범위 절제술(엽절제술 또는 전 폐절제술)을 시행하였으며 환자는 술전에 아무런 치료(방사선 또는 항암약제 치료)도 받지 않았고 수술에는 각각의 조직학적 병기에 따라 보조 치료를 받았

다. 폐절제로 얻은 조직의 조직학적 특징은 WHO 표준 기준에 맞추었고 또한 환자의 조직병리학적 병기 판정은 TNM 병기 판정 기준에 맞추었다.

2. 방 법

(1) 항 체

일차 항체로는 p53(Dako, Carpenteria, CA), *bcl-2*(Dako, Carpenteria, CA)에 대한 anti-mouse monoclonal antibody를 사용하였으며 본 연구에서 이용된 p53에 대한 항체(Dako, Carpenteria, CA)는 정상형 및 돌연변이형의 p53에 공통적으로 반응한다.

(2) 면역조직화학적 염색

폐암 조직에서 p53, *bcl-2*의 발현 양상을 보기 위한 면역조직화학적 염색은 ABC 방법(avidin-biotinyl peroxidase complex method)을 이용하였는데 파라핀 포매 조직에서 여러 장의 조직 절편을 만들어 일부는 hematoxyline-eosin(H-E) 염색으로 종양의 유무를 재검색한 후 종양의 존재가 확인된 절편을 대상으로 면역조직화학 염색을 시행하였고 음성대조군으로는 p53는 주변의 정상 폐조직을 이용하였고 *bcl-2*에 대한 양성 대조군은 표본내에 침윤된 B 림프구로 하였다.

염색 방법을 요약하면, 포르말린에 고정되어 파라핀에 보관된 조직을 4 μm의 두께로 절단한 후 poly-L-lysine으로 덮여있는 슬라이드에 붙인다. histoclear 용액을 이용하여 파라핀을 제거한 다음 100%, 95%, 75%, 50% ethanol에 연속적으로 각각 10분씩 처리한 후 재함수시켰다. 이후 내재된 비특이적 peroxidase 작용을 억제하기 위해 약 30분 간 0.3% H₂O₂와 함께 처리하고 슬라이드는 microwave에서 pH 6.0인 10-mmol/L citrate buffer 용액과 함께 가열한 뒤 적어도 실온에서 20분간 식힌 뒤 1 : 100으로 희석된 0.05M Tris buffered saline(TBS) 용액에서 10분씩 3번 세척하였다. p53과 *bcl-2*에 대한 비특이적인 염색을 방지하기 위해 슬라이드는 non-immune

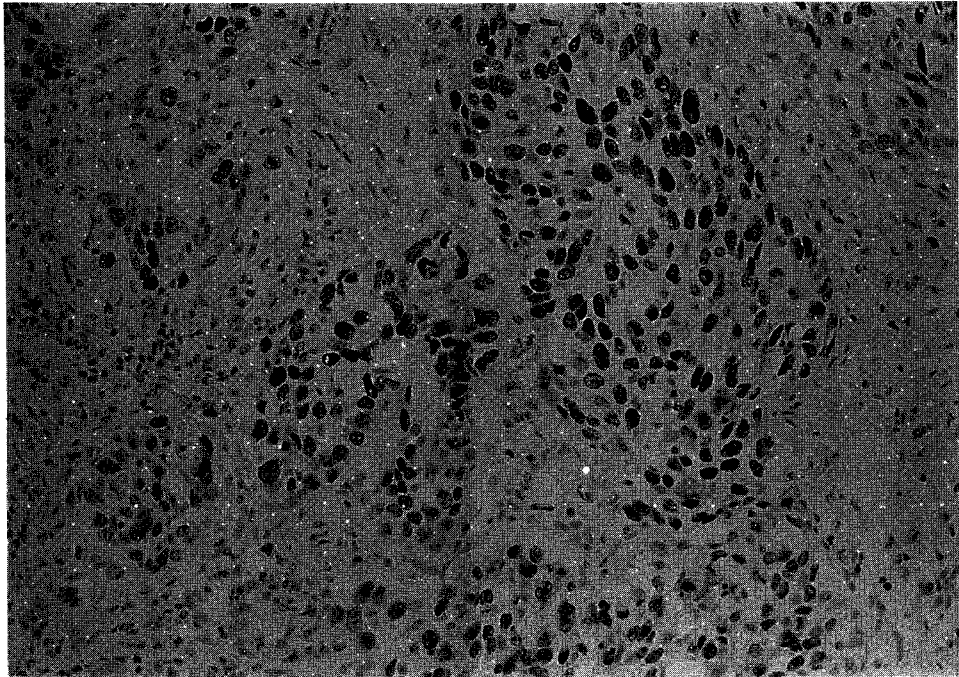


Fig. 1. p53 expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer tissue. Nuclear stain of cancer cells is prominent.

rabbit serum(5%, pH 7.6)과 함께 1 : 50 희석하여 10분간 반응시켰다. 그런 다음에 완충액으로 희석한 일차 특이 항체와 함께 조직절편이 있는 슬라이드를 2시간동안 37°C humidified chamber에서 배양하였으며 이후 TBS에 세척한 다음 anti-mouse IgG(Dako, Carpenteria, CA)에 30분간 반응시키고 이어 peroxidase-antiperoxidase conjugate(Dako, Carpenteria, CA)를 도포하였다. 이후 Diaminobenzidine tetrachloride(Dako, Carpenteria, CA)로 발색시킨 후 crystal mount로 봉입하여 검경하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체 대신에 phosphate-buffered saline(PBS)를 사용하였다.

면역조직화학적 염색의 양성 반응은 폐암세포의 핵에서 전체 종양 세포중 발현되는 세포의 비율이 p53은 전체 종양세포의 20%, *bcl-2*는 5% 이상으로 나타나면 양성으로 정의하였다.

3. 통계학적 분석

통계학적 분석은 SPSS 통계 분석 프로그램을 이용하였고 각 유전자의 조직내 발현치는 통계 분석을 위해 cutoff point를 이용하였다. 생존분석은 Kaplan Meier method를 이용하였다. 생존 curve는 log rank test로 비교하였으며 Cox's proportional hazards 생존 분석법을 이용하여 생존에 대한 분석을 시행하였다. 모든 결과의 분석에서 p값이 0.05 미만인 경우만 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다.

결 과

1. 임상적 특징

실험 대상의 임상적 특징을 보면 환자의 평균 연령은 56.8세였고 남자 환자가 68명, 여자 환자가 16명이

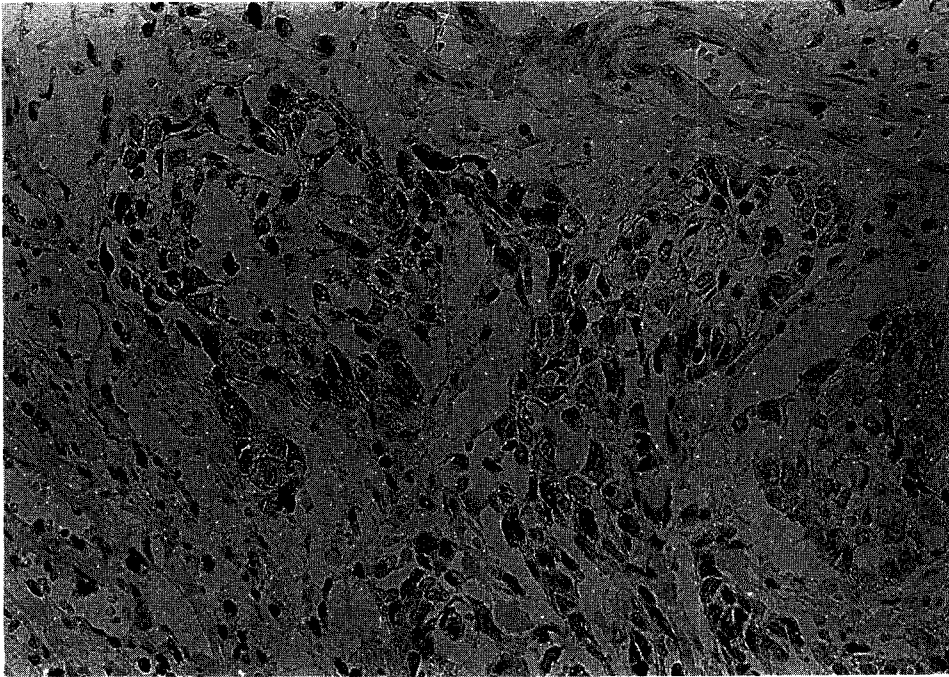


Fig. 2. *bcl-2* expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer tissue. *bcl-2* oncogene protein is present in the cytoplasm of most tumor cells.

었다. 또한 총 84명의 환자에서 흡연력이 확인된 79명중 흡연자 57명, 비흡연자가 22명었다. 흡연자의 평균 흡연 정도는 27.42 ± 21.83 pack-years이었다. 비소세포폐암의 각각의 조직형은 편평세포암종 45예(53.6%), 선암종 28예(33.3%), 대세포암종 11예(13.1%)을 보여 편평세포암종이 가장 많은 조직형을 보였다. 암의 병기로는 I기 21예(25.0%), II기 13예(15.5%), IIIa기 37예(44.0%), IIIb 10예(12.0%), IV기 3예(3.5%)로 총 84예중 IIIa기의 환자가 가장 많았다.

2. 실험 결과

(1) p53과 *bcl-2*의 발현

p53 발현은 총 84예에서 단클론성 항체를 이용하여 시행하였고 발현정도는 56.0%를 보였다. 한편 p53 유전자의 발현 양성은 핵에 염색되는 것을 양성으로

하였는데 고배율 시야에서 200개의 종양세포에 대해 핵이 갈색으로 염색되는 종양세포의 백분율을 구한 뒤 그 값이 20% 이상인 경우를 양성으로 판정하였다(Fig. 1).

bcl-2 유전자의 발현 양성 판정은 종양세포의 세포질에 진하게(주위의 침범한 림프구와 같은 정도의 강도) 염색된 경우에 한하여 양성 반응으로 간주하였으며 이러한 종양세포가 5% 이상인 경우를 양성으로 판정하였다(Fig. 2). *bcl-2*의 발현은 총 84예에서 평가되었다. 단클론성 항체에 대한 양성 염색은 항상 세포질내에 광범위하게 보였고 15예(17.9%)에서 발현되었다. 종종 암주변의 정상 기관지표피에 있는 기저세포에서 염색되기도 하였다.

(2) 생존 분석

*bcl-2*의 발현군은 생존기간이 64.23 ± 10.73 달이었으나 음성군은 생존기간이 35.28 ± 4.39 달로 전체 환

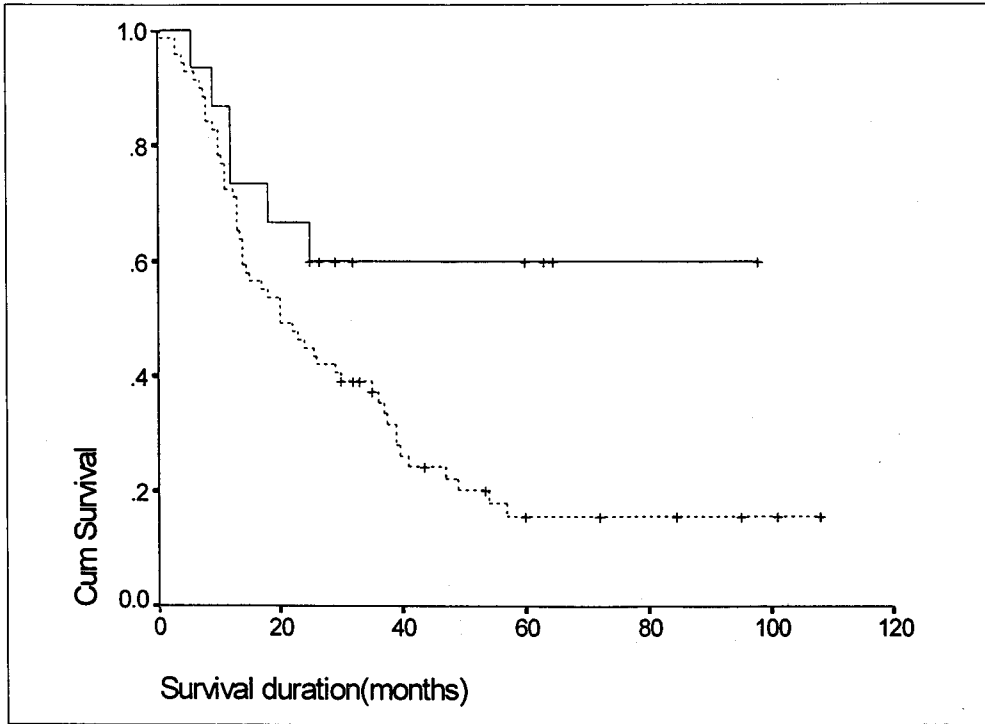


Fig. 3. Survival of patients with *bcl-2*(+) versus *bcl-2*(-) groups. (The mean survival duration was 64.23 ± 10.73 months in *bcl-2* positive group and 35.28 ± 4.39 months in negative group : $p=0.03$)
(solid line : *bcl-2* positive, dot line : *bcl-2* negative)

자의 생존 기간과 *bcl-2*의 발현은 밀접한 연관성을 보였다($p=0.03$)(Fig. 3). p53의 경우는 통계학적으로 의미가 없었다(양성군의 생존기간 34.71 ± 6.12 달, 발현 음성군의 생존기간 45.35 ± 6.30 달, $p=0.21$)(Fig. 4).

*bcl-2*의 발현과 p53 발현 사이에 역관계가 있다는 보고가 있어서 이의 연관성을 알아보았으나 생존율에 대한 *bcl-2*와 p53의 발현에서 일어날 수 있는 네가지 조합; *bcl-2*(+)/p53(+), *bcl-2*(+)/p53(-), *bcl-2*(-)/p53(+), 및 *bcl-2*(-)/p53(-) 사이에서 통계학적 의미를 발견하지 못하였다.

고 찰

일반적으로 암의 발생 및 성장은 세포의 증식과 세포괴사 또는 apoptosis에 의한 세포 사멸 양자의 균형

에 의해 좌우되는데, 종양 세포의 성장의 역학적 개념에서 종양은 세포의 생산과 손실중 세포의 생산이 증가된 결과이다. 1970년대 종양 유전자의 발견과 암세포에서 이의 유전자의 과발현 또는 증가된 활동력으로 암세포의 이상은 세포 주기의 가속도를 야기하는 신호가 과다한 것으로 생각되었으며 이후 1980년대 암억제 유전자의 발견으로 암세포의 이상은 암세포의 세포 주기의 억제와 세포 주기 가속인자, 즉 종양 유전자의 과다로 표현되었다. 이후 주어진 조직내 세포수의 조절에 세포사멸의 중요성이 인지됨에 따라 결국 조직 세포의 변화는 세포증식에 의해 새로이 생기는 세포수와 세포사멸에 의한 세포 손실의 합에 의해 결정된다고 여기게 되었다.

폐암에서 p53 유전자의 돌연변이 빈도는 소세포폐암에서 가장 높거나²⁾ 또는 소세포폐암보다 오히려 편

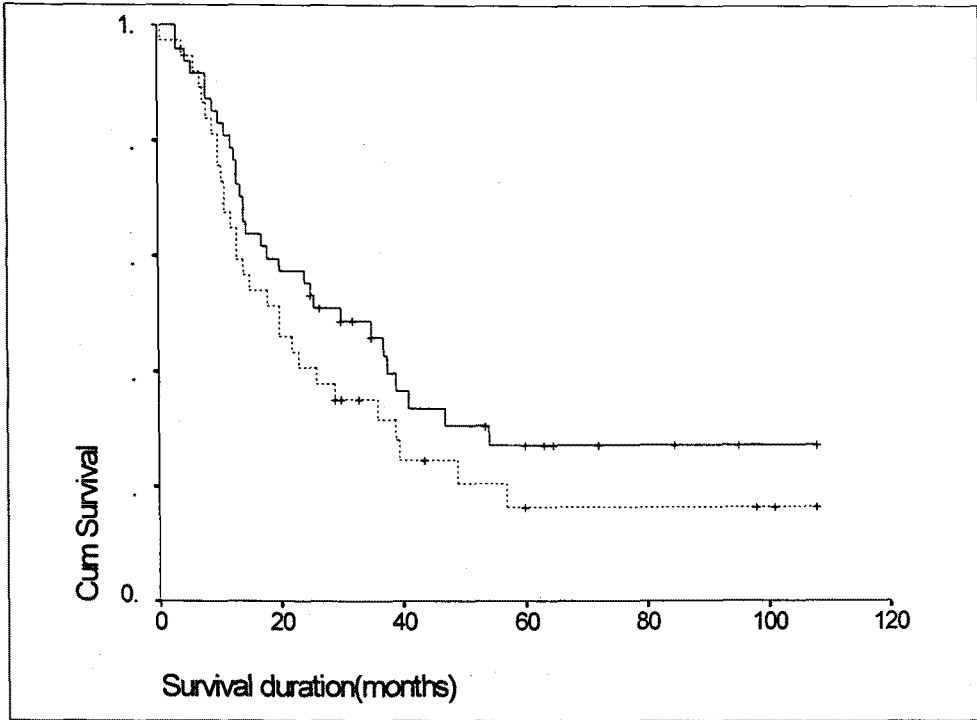


Fig. 4. Survival of patients with p53(+) versus p53(-) groups. (The mean survival duration was 34.71 ± 6.12 months in p53 positive group and 45.35 ± 6.30 months in negative group : $p=0.21$) (solid line : p53 negative, dot line : p53 positive)

평세포 폐암에서 더 높은 것으로 보고하는 등³⁾ 다양하게 보고되었고 병기와와의 관련 유무에 대해서도 역시 이론이 많은 상태이다. 예후에 미치는 영향 또한 아직은 논란의 여지가 많아 p53 유전자의 돌연변이는 예후에 상관없거나 또는 생존율이 유의하게 낮다고 보고되기도 하였다.

p53의 과발현은 모두 핵에서만 발현하고 발현율은 40%에서 71%까지 다양하게 보고되었으나 이번 연구에서는 56.0%에서 관찰되었으며 이것은 환자나 암종의 특징과 무관하였는데 이는 이미 발표된 여러 연구 결과와 같은 결과를 보였다¹¹⁾. 본 연구의 경우 p53에 대한 일차항체로 정상형 및 돌연변이형 p53 유전자에 모두 반응하는 DO7을 사용하였기 때문에 발현된 p53 단백질이 모두 돌연변이형은 아닌 것으로 생각된다. 왜냐하면 정상형 p53 단백질의 일부는 바이

러스 암유전자와 결합하거나 DNA 손상을 유발하는 인자에 노출됨으로써도 p53 단백질이 안정화되거나 축적될 수 있기 때문이다. 이번 연구에서는 또한 p53 발현과 생존과는 그 연관성을 찾을 수 없었으나 다른 연구에서는 암세포의 배열순서분석상 돌연변이가 없거나 p53 발현정도가 cutoff value보다 지극히 낮은 경우에 p53 양성인 환자에서 보다 오래 생존한다고 보고하기도 하였다¹²⁻¹⁶⁾. 또다른 연구 결과에 의하면 본 연구 결과에서와 같이 p53과 생존과의 연관성을 찾지 못하였다¹⁷⁻²⁰⁾. 이러한 논란의 결과를 해석하는 데는 어려운 점이 있다. 이런 결과는 서로 다른 연구 방법, 즉 nucleic acid-based screening과 면역조직화학적 염색법, 서로 다른 항체의 사용, 다른 방법(예를 들면, 동결 조직 versus 포매 조직) 및 다른 cut-off value 등에 따라 달라지게 되는 것이다. 더욱이

의미있는 결과를 유도하기 위해서는 적당한 환자수가 필요하게 되는 것이다.

p53 단백질은 반감기가 정상형에서는 6-30분인 반면에 돌연변이형은 4-8시간으로 수십배 길어지기 때문에 세포내에 p53 유전자의 돌연변이가 있는 경우 p53 단백질 축적을 유발하여 면역조직화학 염색에서 양성 결과를 보이게 된다. p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색의 감수성은 염기서열확인법의 결과와 비교하여 60-70% 정도이며 유전자의 소실이나 nonsense 돌연변이는 검출하기 어렵고 명확한 hot spot의 규명도 어렵지만 빠른 시간내에 많은 검체를 동시에 검토할 수 있는 장점이 있다.

이번 연구에서는 단클론성 항체를 이용하여 p53에 대한 발현을 보았고 이의 조직내 발현 결과는 최소 20% 이상이 염색될 때를 양성으로 정하였다. 이 항체에 대한 양성 반응은 정상형 p53뿐만 아니라 돌연변이 p53을 구별없이 나타내는 염색 결과의 것으로 한 연구 보고에 의하면 p53 면역조직화학 염색(BP53-12)과 실제 배열순서분석 결과에 따른 p53 돌연변이와 일치율은 67%에 불과하였고 이 연구 결과에서 p53 면역학적 염색 결과는 생존에 음성적 영향을 보였다²¹. 또 다른 연구에서 두가지 단클론성 항체(DO7, BP53-12)를 이용한 염색 결과와 배열순서분석 분석을 동시에 시행한 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)를 비교하였는데²² 이들 두 항체를 이용한 결과는 비슷하였고 27개의 암세포중 10개에서 배열순서분석상 돌연변이가 발견되지 않았으나 면역조직화학 염색에 의한 축적상 양성(>10%)을 보였다. 이 연구에서 p53 돌연변이와 p53 변이와 같은 축적의 증가를 보이는 경우는 좀더 오래 생존하였다. 이렇듯이 배열순서분석 결과와 면역학적 염색사이에 일치성이 떨어지는 문제점이 예전부터 대두되고 있는데 316예의 유방암 환자를 대상으로한 연구에서 면역조직화학적 염색(PAb1081) 결과는 돌연변이 33%를 발견하지 못하였고 면역조직화학적 염색 결과에서 양성을 보인 30%에서 실제 돌연변이가 발견되지 않았다²³. 확실히 배열순서분석과 p53 염색의

핵내 축적사이의 연관성은 간접적인 것으로 나타나고 있다. DNA가 파라핀에 고정된 조직에서 추출되거나 p53 양성이 매우 국소적일 때에는 single-strand conformation polymorphism(SSCP)로도 간과될 수 있다. 그러나 이러한 축적의 음성은 돌연변이의 형태(예를 들면, nonsense mutation)에 따른 결과일 수 있고 축적의 양성은 돌연변이 이외에 p53 단백질의 반감기가 길어져서 나타날 수도 있는 것이다²⁴.

면역조직화학적 염색을 이용한 방법에서 서로 다른 cutoff point를 사용하는 것은 실제로 결정적인 중요성이 있는데 이런 연구 방법에서 최소한의 p value를 보이는 것을 cutoff point로 정하게 되어 심각한 편견을 가진 결론을 낼 수 있다²⁵. cutoff point의 선택은 대개 임의적이고 최근에는 비록 일부 정보를 손실한다고 하여도 발현 정도의 중심치를 선택하는 방법이 새로운 예후 측정 인자로 이용되고 있다. 이번 연구에서는 p53에 대한 발현 정도를 한 시야에서 20% 이상 염색시 양성으로 삼아서 최근 여러 연구²⁶에서 선택한 10% cutoff point보다 높게 책정하였다. 본 연구에서는 p53의 발현율은 총 84예중 47예에서 양성을 보여 56.0%를 나타내었으나 p53 발현 양성 환자와 발현 음성 환자군에서 예후적 인자로서의 의의를 찾을 수가 없었다($p=0.21$).

세포는 다양한 형태의 자극에 대하여 apoptosis라는 계획된 세포 사망 기전이 발동되며 이러한 기전은 일종의 세포내 방어기전으로 생각되고 있다. *bcl-2*는 세포의 증식에 영향을 미치지 않으면서 apoptosis를 억제하여 세포의 사멸을 조절함으로써 조직의 항상성 유지에 기여하고 있다. 아직까지 *bcl-2*가 종양의 발생이나 진행에 있어서 어떠한 역할을 수행하는 지는 정확히 밝혀지지 않았으나 세포의 apoptosis를 억제함과 동시에 p53이나 c-myc 등과 같은 기존의 종양 유전자들과 상호 연계를 통하여 암화(tumorigenesis)에 기여하는 것으로 생각되고 있다^{27, 28}.

*bcl-2*는 18번 염색체에 위치하는 전암유발 유전자로 apoptosis를 방해하여 세포의 생존을 연장시키는 기능을 수행한다⁶. 이는 염색체의 전좌 t(14;

18)를 가지고 있는 여포성 림프종에서 최초로 발견되었으며⁵⁾ 비소세포폐암, 비인두암, 신경아세포종, 유방암 및 전립선암 등의 고형종양에서도 *bcl-2*가 발현되며 이의 발현이 환자의 예후와도 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다⁷⁻¹⁰⁾. *bcl-2*단백이 과발현되면 여러 가지 세포에 대한 스트레스와 세포에 해가 되는 화학물질(heat stroke, 이온화 방사선 조사, 과량의 칼슘 influx, 성장 인자의 결핍, 많은 치료약제 등)에 대해 세포 사멸을 예방할 수 있고 *bcl-2*는 c-myc 돌연변이 기능에 영향을 주지 않고 c-myc의 세포 사멸 촉진 기능을 억제함으로써 c-myc와 함께 세포 변이에 영향을 미칠 수 있다. 또한 정상 세포에서 *bcl-2*의 발현은 세포 발전, 성숙 및 terminal differentiation에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 것이다. 여러 연구 결과에 따라 *bcl-2*는 여러 생리학적, 병리학적 상황에서 apoptosis의 역 조절자의 역할을 한다는 것을 알 수 있다. 아직까지 *bcl-2* 유전자가 종양의 발생이나 진행에 있어서 어떠한 역할을 수행하는지는 정확히 밝혀지지 않았으나 세포의 apoptosis를 억제함과 동시에 p53이나 c-myc 등과 같은 기존의 종양유전자들과 상호 연계를 통하여 암발생에 기여하는 것으로 생각되고 있다.

비소세포폐암을 대상으로한 몇 연구에서는 *bcl-2*의 과발현이 예후에 양호한 결과를 보였으며²⁹⁻³¹⁾ 여포성 림프종³²⁾과 유방암³³⁾에서 행한 연구에서도 *bcl-2*의 과발현이 생존에 양호한 결과를 보이는 연관성을 보이는 것도 있다. 본 연구에서는 비소세포폐암 조직중 17.9%에서 *bcl-2* 발현을 보였고 *bcl-2* 발현 양성군에서 *bcl-2* 발현 음성군 환자보다 오래 생존한 결과를 보여($p=0.03$) *bcl-2*의 발현이 비소세포성폐암에서 좋은 예후적 인자로 작용한다는 것을 알 수가 있었다.

*bcl-2*와 정상형 p53은 apoptosis 조절에 있어서 서로 상반되는 역할을 한다. 돌연변이 p53과 *bcl-2*의 과발현은 여러 암종 즉, 유방암^{34, 35)}, 대장암³⁶⁾, non-Hodgkin's 임파종³⁷⁾ 및 비소세포폐암^{29, 31)}에서 서로 반대 연관 관계로 관찰되었으나 본 연구와 또다

른 최근 연구³⁸⁾에서는 이런 결론을 얻지 못하였다. p53과 *bcl-2*와 연관된 연구 결과에서 p53+/ *bcl-2*-인 경우가 생존 기간이 짧다는 보고도 있으나 본 연구에서는 통계적인 의의를 찾을 수가 없었다.

세포 주기와 apoptosis와 연관된 발암단백질사이의 많은 연관성에 대한 이해가 커짐에 따라 제한적 의미가 있던 단일 분자 지표로 얻어진 결과를 해석할 수 있게 되었는데 그예로 Rb 유전자와 p53 유전자의 두 개의 발암단백질의 복합 역할에 대한 연구가 최근 비소세포폐암에서 이루어졌다⁴⁰⁾.

p53과 *bcl-2*이 연관된 apoptosis를 이해하게 되므로 DNA 손상을 유도하여 p53을 활성화하는 방사선 치료 및 여러 세포독성 약제와 같은 치료에 새로운 도약이 되고 있으며 최근에는 국소적으로 진행된 비소세포폐암에서 neoadjuvant 항암치료의 불량한 예후 인자로 p53의 축적을 발표한 연구 결과도 있다⁴²⁾. 더욱이 비소세포폐암에서 apoptosis가 항진된 정도와 생존 기간이 짧은 것과 서로 상관성을 보이는 보고도 있다⁴³⁾.

결론적으로 본 연구에서는 비소세포폐암에서 *bcl-2*의 발현은 양호한 예후 인자로 작용하였으며 p53의 발현은 비소세포폐암의 예후적인 인자로의 통계학적 의미를 찾을 수가 없었다.

폐암의 발암과정은 어느 한 유전자 또는 인자에 의해 야기되는 단순한 과정이 아니고 여러 세포 주기 조절인자들의 복합적인 복잡, 다양한 상호 간의 작용에 의해서 서로 영향을 주므로써 폐암의 발암과정의 중요한 기전이 된다고 생각된다. 또한 비소세포폐암의 예후에 대한 p53 평가의 논란의 여지는 면역조직화학 방법에 의한 돌연변이 분석을 비교할 수 있는 보다 많은 연구가 필요하고 서로 다른 연구 결과를 비교하기 위해 면역조직화학적 염색 방법론에서의 개선이 필요 하리라 사료된다. 또한 세포 주기 또는 apoptosis에 관여하는 새로운 생물학적 지표들의 상호 작용과 조절이 복잡하고 이러한 지표 발현의 조합이 한 지표의 발현에 의한 연구보다 보다 가치있는 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다.

요 약

연구배경 :

최근 폐암은 전세계적으로 증가 추세에 놓여 있을 뿐 아니라 서구에서는 여성 폐암 환자의 비율이 크게 늘고 있으며 이미 폐암은 유럽과 미주에서 사망원인 1위의 암종으로 이미 우리 나라를 비롯하여 다른 여러 국가에서도 비슷한 경향을 보이고 있다. 원발성 폐암의 80%가 비소세포폐암으로 진행이 국소적인 폐암인 경우 수술적 제거가 주된 치료이나 이러한 양호한 경우에도 환자의 약 50%만이 5년이상 생존할 수 있다. 확실히 비슷한 병기에도 불구하고 환자의 생존률은 현격한 차이를 보이고 있기 때문에 폐암의 분자학적, 생물학적 특징 등에 대한 연구가 진행되어 생존률을 보다 정확하게 예측하고 각각의 환자에 대한 보다 알맞는 치료 방법을 적용하기 위한 새로운 예후적 인자를 알려는 노력이 진행되고 있다.

암은 세포의 증식과 함께 apoptotic 세포 소실의 감소에 의해 성장할 수 있다. 일반적으로 고형 종양은 성장과 세포의 손실은 종양의 전이, 분화, 죽음 등의 다양한 생물학적인 기전에 의하여 야기된다. 이중에 세포의 죽음은 면역학적 반응, 불가항력적인 미세환경의 상태(세포의 피사), 또는 apoptosis와 같은 유전자적인 조절에 의하여 생기게 된다. 암은 세포 주기의 증가로 인한 방법(종양 유전자의 활성화도의 증가)과 세포 주기 진행억제의 감소(암억제 유전자의 소실), *bcl-2*의 과발현과 같은 antiapoptosis signal의 감소 및 *bax*의 감소 또는 *p53*의 돌연변이와 같은 proapoptosis signal의 감소 등을 야기하게 되는 유전자의 돌연변이에 의해 발생된다고 할 수 있다. 세포 소실에 대한 변수에 대해 체계적인 연구가 거의 없지만 몇몇 단일 변수에 대한 연구가 진행되었다. 이에 저자들은 비소세포폐암에서 예후적 인자로서의 *p53*과 *bcl-2*의 발현이 환자의 예후에 어떠한 영향을 보이는지 알기 위해 본 연구를 시행하였다.

방 법 :

1980년부터 1994년 한양대학교 부속병원에서 비소세포

폐암으로 진단된 후 술전 병기가 초기(병기 I-III a)라고 판단되어 치료 목적으로 광범위 폐절제술을 시행받은 환자중 수술후 1달이내에 수술의 합병증으로 사망한 예를 제외한 환자와 이들의 폐절제 조직 총 84예를 대상으로 하였는데 환자는 원발 폐암과 림프절에 대해 광범위 절제술(엽절제술 또는 전폐절제술)을 시행하였으며 환자는 술전에 아무런 치료(방사선 또는 항암약제 치료)도 받지 않았고 술후에는 각각의 조직학적 병기에 따라 보조 치료를 받았다. 폐절제술은 조직의 조직학적 특징은 WHO 표준 기준에 맞추었고 또한 환자의 조직병리학적 병기 판정은 TNM 병기 판정 기준에 맞추었다. 이와 같이 얻어진 조직을 이용하여 *p53*과 *bcl-2* 각각의 단클론 항체로 면역조직화학적 염색을 시행하였고 이의 발현과 환자의 생존률과의 연관성을 알아보았다.

결 과 :

*p53*과 *bcl-2*의 발현은 총 84예에서 시행하여 각각 47예 56.0%, 15예 17.9%의 발현율을 보였다. *bcl-2*의 발현군은 생존기간이 64.23 ± 10.73 달이었으나 음성군은 생존기간이 35.28 ± 4.39 달($p=0.03$)로 전체 환자의 생존과 *bcl-2*의 발현은 밀접한 연관성을 보였고 cyclin D1은 양성 발현군의 생존 기간이 22.76 ± 3.50 개월, 음성 발현군의 생존기간이 45.38 ± 5.64 개월($p=0.0515$)로 생존율과의 상당한 통계적인 연관성의 가능성을 나타내었지만 *p53*의 경우는 통계적 의미를 찾을 수 없었다(양성군의 생존기간 34.71 ± 6.12 달, 발현 음성군의 생존기간 45.35 ± 6.30 달, $p=0.21$).

결 론 :

결론적으로 본 연구에서는 비소세포폐암에서 *bcl-2*의 발현은 양호한 예후 인자로 작용하였으며 *p53*의 발현은 비소세포폐암의 예후적인 인자로서의 통계학적 의미를 찾을 수가 없었다. 또한 *bcl-2*의 발현과 *p53* 발현 사이에 역관계가 있다는 보고가 있어서 이의 연관성을 알아보았으나 생존율에 대한 *bcl-2*와 *p53*의 발현에서 일어날 수 있는 네가지 조합; *bcl-2*(+)/*p53*(+), *bcl-2*(+)/*p53*(-), *bcl-2*(-)/*p53*(+)

및 *bcl(-)/p53(-)* 사이에서 통계학적 의의를 발견하지 못하였다. 결론적으로 폐암의 발암과정은 어느 한 유전자 또는 인자에 의해 야기되는 단순한 과정이 아니고 여러 조절인자들의 복합적인 복잡, 다양한 상호간의 작용에 의해서 서로 영향을 주므로써 폐암의 발암과정의 중요한 기전이 된다고 생각되므로 보다 광범위한 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Lee JS, Hong WK : Prognostic factors in lung cancer. *N Engl J Med* 327 : 47, 1992
2. Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokata J, Ruys CHUM, Terada M, Koeffler HP : P53 Mutations in human lung tumors. *Cancer Res* 52 : 1695, 1992
3. Iggo R, Gatter K, Barteks J, Lane D, Harris AL : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 : 675, 1990
4. Caamno L, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, Klein-Sznato AJP : Detection of p53 in primary lung tumors and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 139 : 839, 1991
5. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with t(14; 18) chromosome translocation. *Science* 226 : 1097, 1984
6. Korsmeyer SJ : *bcl-2* initiates a new category of oncogene: Regulators of cell death. *Blood* 80 : 879, 1992
7. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M et al : Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein *bcl-2* in hormone refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 143 : 390, 1993
8. Reed JC, Meister L, Tanaka S, Cuddy M, Yum S, Geyer C et al : Differential expression of *bcl-2* protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. *Cancer Res* 51 : 6529, 1991
9. Lu QL, Elia G, Lucas S, Thomas JA : *bcl-2* protooncogene expression in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 53 : 29, 1993
10. Pezzella F, Turley H, Kuzu I et al : *bcl-2* protein in non-small cell lung carcinoma. *N Eng J Med* 329 : 690, 1993
11. Top B, Mooi WJ, Klaver SG et al : Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 64 : 83, 1995
12. Lammie G, Peters G : Chromosome 11q13 abnormalities in human cancers, *Cancer Cells* 3 : 413, 1991
13. Kishimoto Y, Murakami Y, Shiraishi M et al : Aberration of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas of the lung. *Cancer Res* 52 : 4799, 1992
14. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T et al : Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 85 : 2018, 1993
15. Ebina M, Steinberg SM, Mulshine JL et al : Relationship of p53 overexpression and upregulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54 : 2496, 1994
16. Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi t et al : Prognostic significance of abnormal P53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 14 : 497, 1996
17. McLaren R, Kuzu I, Dunnill M et al : The rela-

- tionship of p53 immunostaining to survival in carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 66 : 735, 1992
18. Westra WH, Offerhaus JA, Goodman SN et al : Overexpression of p53 tumor suppressor gene product in primary lung adenocarcinoma is associated with cigarette smoking. *Am J Surg Pathol* 17 : 213, 1993
19. Mørkve O, Halvorsen OJ, Skjaerrven R et al : Prognostic significance of p53 protein expression and DNA ploidy in surgically treated non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res* 13 : 571, 1993
20. Kashii T, Mizushima Y, Lima CEQ et al : Studies on clinicopathological features of lung cancer patients with k-ras/p53 gene alterations: Comparison between younger and older groups. *Oncology* 52 : 219, 1995
21. Mitsudomi T, Oyama T, Kusano T et al : Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 85 : 2018, 1993
22. Top B, Mooi WJ, Klaver SG et al : Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 64 : 83, 1995
23. Sjogrens S, Inganas M, Norgerg T et al : The p53 gene in breast cancer ; Prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst* 88 : 173, 1996
24. Lane DP : p53, guardian of the genome. *Nature* 358 : 15, 1992
25. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W et al : Dangers of using "optimal" cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 86 : 829, 1994
26. Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi T et al : Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 14 : 497, 1996
27. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S : Novel primitive lymphoid tumors induced in transgenic mice by cooperation between myc and *bcl-2*. *Nature* 348 : 331, 1991
28. Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, Apel IJ, Merino r, Nunez G et al : c-myc and *bcl-2* modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 5878, 1994
29. Carbone DP, Mitsudomi T, Chiba I et al : p53 immunostaining positivity is associated with reduced survival and is imperfectly correlate with gene mutations in resected non-small cell lung cancer. *Chest* 106 : 377S, 1994(suppl)
30. Cleary MI, Smith SD, Sklar J : Cloning and structural analysis of cDNAs for *bcl-2* and a hybrid *bcl2/immunoglobulin* transcript resulting from the t(14 ; 18) transcription. *Science* 226 : 1097, 1994
31. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G : Small cell carcinomas of the lung express the *bcl-2* protein. *Am J Pathol* 145 : 1036, 1994
32. Mc donell TJ, Deane N, Platt FM et al : *bcl-2*-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57 : 79, 1989
33. Hellemans P, van Kam PA, Weyler J et al : Prognostic value of *bcl-2* expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 72 : 354, 1995
34. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG et al : The *bcl-2* protein : A prognostic indicator strongly re-

- lated to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 86 : 499, 1994
35. Gasparini G, Barbareschi M, Doglioni C et al : Expression of *bcl-2* protein predicts efficacy of adjuvant treatment in operable node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1 : 189, 1995
36. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR et al : *bcl-2* and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 55 : 237, 1995
37. Pezzella F, Morrison H, Jones M et al : Immunohistochemical detection of p53 and *bcl-2* proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 22 : 39, 1993
38. Cory S : Regulation of lymphocyte survival by the *bcl-2* gene family. *Ann Rev Immunol* 13 : 513, 1995
39. Rosa MA, Paul van der Valk, Johannes SJ et al : Prognostic value of the expression of p53, *bcl-2* and bax oncoproteins and neovascularization in patients with radically resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15 : 2456, 1997
40. Quinlan DC, Davidson AS, Summers CL et al : Accumulation of p53 correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 52 : 4828, 1992
41. Rush V, Klimstra D, Venkatraman E et al : Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 55 : 5038, 1995
42. Tormanen U, Aerola A-K, Rainio P et al : Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 55 : 5595, 1995