

두경부 편평상피세포암의 p53단백과 PCNA 및 Ki-67의 발현양상

이은진 · 이상한 · 손윤경*

경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 경북대학교 의과대학 병리학교실 *

Abstract

CORRELATION BETWEEN P53, PCNA AND KI-67 EXPRESSION IN HEAD NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Eun-Jin Lee, Sang-Han Lee, Yoon-Kyung Sohn

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyungpook National University.

*Department of Pathology, College of Medicine, Kyungpook National University.**

To investigate the correlation between the clinical features and the expression of p53, PCNA, and Ki-67 of the head neck squamous cell carcinoma, immunohistochemical staining of p53, PCNA, and Ki-67 on the paraffin embedded tissue blocks of 116 surgically removed specimens were done. The staining intensity was divided as grade 1 to grade 3 and the results were statistically analysed.

1. The positive reaction rates of cell proliferation markers (PCNA and Ki-67) were higher than that of p53. There was significant correlations of the PCNA and Ki-67 expression but there was no significant correlations between p53 and PCNA or p53 and Ki-67.
2. There were no significant correlation between the expression of p53, PCNA and Ki-67 and tumor site or tumor size.
3. There was no significant differences in the positive response according to the nodal status. The node metastasis groups revealed that higher proportion of grade 3 staining of PCNA and Ki-67 than node negative group.

From the above results it is concluded that p53 and cell proliferation markers PCNA and Ki-67 might have their unique mechanism involving in the growing and progression of tumor. Overexpression of p53 does not appear to represent an independent prognostic marker in head neck squamous cell carcinoma.

Key words : p53, PCNA, Ki-67, Head neck squamous cell carcinoma.

I. 서 론

편평상피세포암은 두경부종양의 90% 이상을 차지하는 가장 흔한 악성 종양이다. 두경부 편평상피세포암의 알려진 예후 인자는 종양의 병기, 부위 및 세포 악성도 등이며 생물학적 인자로 확인된 것은 현재까지 밝혀져 있지 않다. 정상세포의 암화과정을 분자생물학적 측면에서 볼 때 원종양유전자의 활성화와 종양억제유전자의 불활성화로 대별할 수 있으며 이러한 관점에서 다수의 암관련 유전자들이 밝혀져 있다. 이들 중 p53은 가장 대표적인 종양억제유전자로 사람에게 발생하는 대다수의 악성종양에서 p53의 결손이나 변이 혹은 기능적인 불활성화가 관찰된 바 있다. p53유전자는 17p13.1에 위치하며 이 유전자로부터 생산된 p53단백은 정상적인 세포주기의 유지에 중추적인 역할을 하는

일종의 감시자로 알려져 있다. p53단백은 정상세포에서 DNA 손상이 있을 경우 세포주기의 late G1-phase에서 정지하도록 한 후 손상이 있는 DNA부위를 교정하여 다음 단계로 넘어갈 수 있도록 하는데 만일 치명적인 손상이 있을 경우 세포괴사로 유도하는 역할을 한다^{1,2}. 그러므로 p53의 변이나 불활성화는 결국 비정상적인 유전자를 가진 세포가 증식할 수 있도록 하며 이는 바로 세포의 다단계 암화과정에서 매우 중요한 작용을 할 것으로 생각된다. 실제 생검조직의 면역조직화학검사상 변이 p53단백의 발현율은 대다수의 악성종양에서 50% 이상의 높은 발현율을 나타내고 있으며 구강암의 경우 보고자에 따라 차이가 있으나 가장 많은 경우 90% 이상의 높은 발현율을 나타내고 있다.

종양이 자라나는 것은 결국 종양세포가 괴사 등으로 없어지는 것보다 증식이 많기 때문으로 풀이될 수 있다. 그러므로 세포증식을 표현할 수 있는 생물학적 인자를 찾기 위한 노력이 활발히 진행되어 왔다. 최근 분자생물학적 기법의 발달과 함께 세포주기에서 세포증식을 나타내는 생물학적 지표가 될 만한 물질들이 다수 발견되었으며 이들 중 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)와 Ki-67(MIB-1)이 가장 대표적이다³⁻⁵. PCNA는 36kDa의 매우 안정된 단백질로 세포주기에서 S-phase에 발현되며 손상받은 DNA의 수복에 중요한 역할을 한다. Ki-67은 G1, S,

이 은 진

경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Eun-Jin Lee

Dept. of OMF, College of Dentistry, Kyungpook National University

50 Samduk 2 ka, Jung-Gu, Taegu, 700-412, Korea.

Tel : 82-53-420-5911 Fax : 82-53-426-5365

E-mail : cyanne@hanmail.net

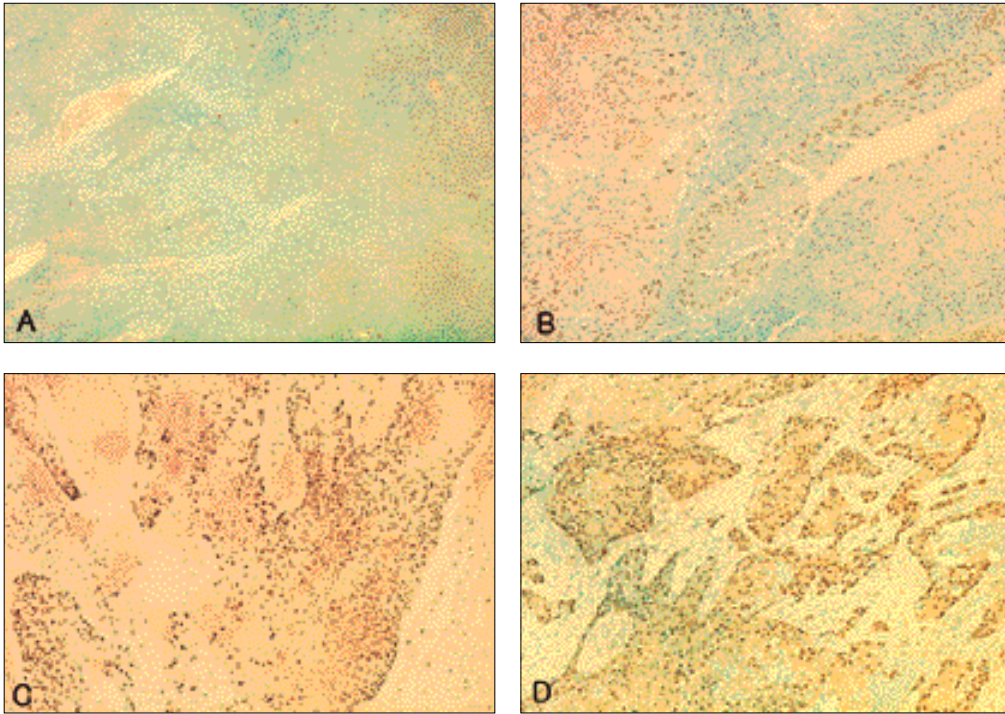


Fig. 1. Staining intensity of p53 in head neck squamous cell carcinoma. A: grade 0, B: grade 1, C: grade 2, D: grade 3. The specimen with grade 0 (A) reveals no positive cell in tumor mass. Most of tumor of cells show positive reaction (brown colored nucleated cells) in the case with grade 3(D). The expression of PCNA and Ki-67 are interpreted as the same manner.

G2 및 M phase 에 발현된다. 이 단백질은 PCNA보다 반감기가 짧으며 PCNA와 달리 DNA 수복에는 관여하지 않는다. 이상의 세가지 단백질은 세포주기에 발현된다는 공통점을 가지고 있으나 각각의 역할이 다르며 종양조직에서 이들의 발현을 관찰하는 것은 매우 흥미로울 것으로 생각된다.

현재까지 두경부 암종의 면역조직화학 검사에서 P53의 이상발현과 Ki-67 및 PCNA의 발현에 대한 여러 연구들이 국내에서도 발표된 바 있으나⁶⁷⁾ 이들의 상관관계에 대해서는 이론이 많다. 이에 수술로 적출된 두경부 암종 조직을 이용하여 두경부 편평상피세포암의 부위(구강, 후두 및 인두)에 따른 p53, PCNA 및 Ki-67의 발현양상을 비교하고 임상 양상 중 특히 종양의 전이 유무에 따른 이들 단백질의 발현 정도와 p53과 PCNA 및 Ki-67 발현의 상관관계를 알아보고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 재 료

1995년 1월에서 1998년 12월까지 경북대학교 병원에서 수술로 적출된 두경부 편평상피세포암종 조직의 파라핀 포매 표본 중 조직의 보관 상태가 양호하다고 인정되는 116예를 연구대상으로 하였다.

2. 면역조직화학 검사

병리조직학적 검색에 사용한 것과 동일한 파라핀에 포매된 조직을 6 μ m 두께로 박절하여 organosaline을 부착한 슬라이드 (Probe-on plus slide, Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 탈파라핀과 합수과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. p53단백과 Ki-67에 대한 염색은 microwave oven법을 이용하여 10mM citrate buffer(pH6.0)에 슬라이드를 넣고 95°C에서 10분간 가온 후 20분간 실온에 방치하여 온도를 서서히 낮추었으며 이어 tris buffered saline(이하 TBS, 50mM, pH7.4)으로 세척한 후 0.3% 과산화수소용액 처리를 하였다. PCNA는 microwave oven 법을 사용하지 않고 바로 메탄올로 희석한 0.3% 과산화수소용액에 20분간 처리하여 내인성 과산화수소수를 제거하고 TBS로 세차레 세척하였다. 조직내 비특이 항원을 차단하기 위해 Normal horse serum에 30분간 반응시키고 항 Ki-67(MIB-1)항원은 1 : 60, 항 PCNA항원은 1 : 60, 항 p53 항원은 1 : 100으로 희석하여 일차항체를 부친후 4°C의 수조에 두고 하룻밤동안 반응을 시킨 후 TBS 로 세차레 세척하고 이차항체(Vector Elite kit, Vector Laboratories, USA)를 30분간 반응시킨후 ABC (avidin-biotin conjugate) reagent를 실온에서 45분간 반응시켰다. TBS에 세척후 Tris-HCl(pH7.6) buffer에 세척한후 diaminobenzidine tetrahydrochloride(이하 DAB, Sigma Chemicals, USA)로 발색하였다. 물에 수세한 후 methyl green으로 20초간 대조염색한 후 permount로 봉입하여 슬라이드를 완성하였다.

3. 판독 및 통계적 분석

p53 단백질과 Ki-67 및 PCNA는 종양세포의 핵에 갈색으로 분명히 염색된 경우를 양성으로 판정하였고 불확실하거나 애매한 것은 모두 음성으로 판정하였다. 염색된 슬라이드에서 가장 강한 양성반응을 보이는 부위를 선택하여 10개 이상의 고배율시야($\times 400$)를 관찰하여 양성인 세포가 5% 이하인 경우를 등급 0, 5~20%인 경우를 등급 1, 20~50% 양성인 경우를 등급 2, 50% 이상의 세포가 양성인 경우를 등급 3으로 하여 총 4등급으로 분류 하였다 (Fig 1). 이때 조직절편이 작은 경우는 전체 종양세포를 모두 세었으며 출혈부위나 괴사부위는 제외하였다. Ki-67(MIB-1), PCNA 및 p53단백 발현 유무의 상관관계는 chi-square test와 Fisher exact test로 분석 하여 $p < 0.05$ 인 경우를 통계학적으로 의의가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 임상소견

대상 환자의 연령은 17세~81세로 분포하였고 평균 연령은 59.5세였다. 이중 환자의 대부분에 해당되는 112명(97%)이 40세 이상이었다. 환자 중 남자는 103명(88%), 여자는 13명(12%)으로 남녀의 성비는 7.9 : 1이었다. 연구대상 116예 중 림프절 전이가 있는 경우가 36예(31%)였고 림프절 전이가 없는 것이 80예(69%)였다. 종양의 발생 장소는 후두암종이 40예(35%)로 가장 많았고 다음으로 구강암이 33예(28%)였다. 그 외 인두와 부비동, 비강 등을

Table 1. Clinopathologic parameters of 116 head neck squamous cell carcinomas

Parameters	Values
Age (y/o)	17~81 (mean 59.5)
<49	18 (16%)
50-59	36 (31%)
60-69	38 (33%)
>70	24 (20%)
Gender	
Male	103 (88%)
Female	13 (12%)
Tumor site	
Oral cavity	33 (28%)
Larynx	40 (35%)
Pharynx & others	43 (37%)
Tumor size	
< 2cm	44 (38%)
2-4cm	38 (33%)
> 4cm	34 (29%)
Node metastasis	
Positive	36 (31%)
Negative	80 (69%)

합하여 43예 (37%)였다.

2. p53, Ki-67 및 PCNA의 면역조직화학검사 소견 및 상관관계

p53단백의 발현 양상은 전체 조사대상 116예 중 67예(58%)에서 등급 1 이상의 양성 반응을 나타내었으며 나머지 49예(42%)는 전체 종양세포에서 양성반응이 관찰되지 않았다. 양성 반응을 나타낸 67예중 등급 1은 14예(12%)였고 등급 2는 15예(13%)였으며 등급 3은 38예(33%)였다.

PCNA의 발현 양상은 전체 조사대상 116예 중 102예(88%)에서 등급 1 이상의 양성 반응을 나타내었으며 나머지 14예(12%)는 전체 종양세포에서 양성반응이 관찰되지 않았다. 양성 반응을 나타낸 102예중 등급 1은 19예(16%)였고 등급 2는 31예(27%)였으며 등급 3은 52예(45%)였다.

Ki-67의 발현 양상은 전체 조사대상 116예 중 100예(86%)에서 등급 1 이상의 양성 반응을 나타내었으며 나머지 16예(14%)는 전체 종양세포에서 양성반응이 관찰되지 않았다. 양성 반응을 나타낸 100예중 등급 1은 27예(23%)였고 등급 2는 45예(39%)였으며 등급 3은 28예(24%)였다.

p53과 PCNA 및 Ki-67 발현의 상관관계에 대한 성적은 다음과 같다. 즉 p53이 등급 1 이상의 양성을 나타낸 67예에서 PCNA는 등급 1 이상의 양성이 61예였으며 등급 0이 6예였다. 그리고 Ki-67의 경우는 등급 1 이상의 양성이 62예, 등급 0이 5예였다. 그리고 p53의 발현이 등급 0인 49예에서 PCNA의 발현이 등급 1 이상의 양성인 경우가 41예, 등급 0이 8예 였으며, Ki-67경우는 등급 1 이상의 양성이 38예, 등급 0이 11예였다. 이상의 성적에서 p53과 Ki-67 및 PCNA 발현을 양성으로 판정하였을 때 p53과 Ki-67 그리고 Ki-67과 PCNA 발현은 통계적으로 유의한 상관관계 ($p < 0.05$)가 있었다(Table 2). 그러나 이들을 발현의 등급에 따라 분류하고 그 상관관계에 대한 통계처리를 하였을 때 Ki-67과 PCNA 발현간에 유의한 상관관계가 인정되었으나 p53과 PCNA 및 Ki-67 사이의 상관성은 통계적 유의성이 없었다(Table 3).

3. 종양 발생부위와 p53, Ki-67 및 PCNA발현의 관계

전체 116예 중 증례 수가 가장 많은 후두(40예)와 구강내 암종(33예)을 대상으로 73증례를 가지고 p53, PCNA 및 Ki-67의 발현

Table 2. The relationship between the PCNA and Ki-67 positivity according to the p53overexpression in head neck squamous cell carcinoma.

	p 53 positive n=67 (%)	p53 negative n=49 (%)
PCNA positive	61 (91)	41 (84)
PCNA negative	6 (9)	8 (16)
Ki-67 positive	62 (93)	38 (78)
Ki-67 negative	5 (7)	11 (22)

Table 3. Correlation between p53, PCNA and Ki-67 expression according to the grading system in head neck squamous cell carcinoma

A. The numbers and proportion of PCNA and Ki-67 expression (grade 0 to grade 3) according to the p53 grades

	p53 grade 0 n=49 (%)	p53 grade 1 n=14 (%)	p53 grade 2 n=15 (%)	p53 grade 3 n=38 (%)
PCNA grade 0	8 (16)	3 (21)	1 (7)	2 (5)
grade 1	9 (18)	2 (14)	3 (20)	5 (13)
grade 2	13 (27)	4 (29)	3 (20)	11 (29)
grade 3	19 (39)	5 (36)	8 (53)	20 (53)
Ki-67 grade 0	11 (22)	2 (14)	1 (7)	2 (5)
grade 1	9 (18)	4 (29)	6 (40)	8 (21)
grade 2	17 (35)	6 (43)	6 (40)	16 (42)
grade 3	12 (24)	2 (14)	2 (13)	12 (32)

B. The numbers and proportion of PCNA and p53 expression (grade 0 to grade 3) according to the Ki-67 grades

	Ki-67 grade 0 n=16 (%)	Ki-67 grade 1 n=27 (%)	Ki-67 grade 2 n=45 (%)	Ki-67 grade 3 n=28 (%)
PCNA grade 0	8 (50)	5 (18)	1 (2)	0 (0)
grade 1	3 (19)	3 (11)	8 (18)	5 (18)
grade 2	3 (19)	8 (30)	13 (29)	7 (25)
grade 3	2 (12)	11 (41)	23 (51)	16 (57)
p53 grade 0	11 (69)	9 (33)	17 (38)	12 (43)
grade 1	2 (12)	4 (15)	6 (13)	2 (7)
grade 2	1 (6)	6 (22)	6 (13)	2 (7)
grade 3	2 (12)	8 (30)	16 (36)	12 (43)

C. The numbers and proportion of Ki-67 and p53 expression (grade 0 to grade 3) according to the PCNA grades

	PCNA grade 0 n=14 (%)	PCNA grade 1 n=19 (%)	PCNA grade 2 n=31 (%)	PCNA grade 3 n=52 (%)
Ki-67 grade 0	8 (57)	3 (16)	3 (10)	2 (4)
grade 1	5 (36)	3 (16)	8 (26)	11 (21)
grade 2	1 (7)	8 (42)	13 (42)	23 (44)
grade 3	0 (0)	5 (26)	7 (22)	16 (31)
p53 grade 0	8 (57)	9 (47)	13 (42)	19 (37)
grade 1	3 (21)	2 (11)	4 (13)	5 (10)
grade 2	1 (7)	3 (16)	3 (10)	8 (15)
grade 3	2 (14)	5 (26)	11 (35)	20 (38)

양상을 비교하였다. 후두암종의 경우 p53은 40예 중 24예(60%)에서 양성반응을 나타내었으며 PCNA 34예(85%)와 Ki-67 32예(80%)에서 각각 등급 1 이상의 양성 반응을 나타내었다. 양성으로 판정된 표본의 등급에 따른 분포양상은 p53의 경우 등급 1이 6예, 등급 2와 3이 각각 3예와 15예였다. 34예의 PCNA 양성 증례에서 등급 1이 6예, 등급 2가 10예 그리고 등급 3이 18예였으며 Ki-67은 등급 1이 11예, 등급 2가 10예 그리고 등급 3이 11예였다.

구강내 암종은 18예(55%)가 p53양성을 나타내었고 PCNA는 29예(88%) Ki-67은 32예(97%)에서 등급 1 이상의 양성반응을 나타내었다. 양성으로 판정된 표본의 등급에 따른 분포양상은 p53의

경우 등급 1이 4예, 등급 2와 3이 각각 7예 씩 이었다. 29예의 PCNA 양성 표본은 등급 1이 7예, 등급 2가 13예 그리고 등급 3이 9예였으며 Ki-67은 등급 1이 8예, 등급 2가 16예 그리고 등급 3이 8예였다(Table 4). 이상의 성적에서 구강내암종이 후두암종에 비하여 Ki-67과 PCNA의 발현이 많았으나 통계적 유의성은 없었다 ($p>0.05$).

4. 종양의 크기와 p53, Ki-67 및 PCNA발현의 관계

전체 116예 중 44예(38%)가 직경 2cm이하였고, 38예(33%)가

Table 4. Correlation between the site and the expression of p53, PCNA and Ki-67 in head neck squamous cell carcinoma.

		Larynx n=40 (%)	Oral cavity n=33 (%)	Others n=43 (%)
p53	grade 0	16 (40)	15 (45)	18 (42)
	grade 1	6 (15)	4 (12)	4 (9)
	grade 2	3 (7.5)	7 (21)	5 (12)
	grade 3	15 (37.5)	7 (21)	16 (37)
Ki-67	grade 0	8 (20)	1 (3)	7 (16)
	grade 1	11 (27.5)	8 (24)	8 (19)
	grade 2	10 (25)	16 (48)	19 (44)
	grade 3	11 (27.5)	8 (24)	9 (21)
PCNA	grade 0	60 (15)	4 (12)	4 (9)
	grade 1	6 (15)	7 (21)	6 (14)
	grade 2	10 (25)	13 (39)	8 (19)
	grade 3	18 (45)	9 (27)	25 (58)

Table 5. Correlation between the size and the expression of p53, PCNA and Ki-67 in head neck squamous cell carcinoma.

		< 2cm n=44 (%)	2 - 4cm n=38 (%)	> 4cm n=34 (%)
p53	grade 0	16 (36)	17 (45)	16 (47)
	grade 1	6 (14)	4 (11)	4 (12)
	grade 2	9 (20)	5 (13)	1 (3)
	grade 3	13 (30)	12 (32)	13 (38)
Ki-67	grade 0	5 (11)	8 (21)	3 (9)
	grade 1	11 (25)	7 (18)	9 (26)
	grade 2	19 (43)	15 (39)	11 (32)
	grade 3	9 (20)	8 (21)	11 (32)
PCNA	grade 0	5 (11)	6 (16)	3 (9)
	grade 1	10 (23)	5 (13)	4 (12)
	grade 2	12 (27)	11 (29)	8 (24)
	grade 3	17 (39)	16 (42)	19 (56)

2~4cm, 34예(29%)가 4cm이상이었다. 종양의 크기가 2cm이하인 44예에서 p53 양성인 28예(64%)였으며 이중 등급 3이 13예(30%)였다. PCNA와 Ki-67은 89%(39예)의 양성율을 나타내었고 이중 등급 3에 해당되는 것은 각각 17예(39%)와 9예(20%)였다. 2~4cm크기에 해당되는 38예 중 p53 양성 반응을 나타내는 것이 21예(55%)였고, PCNA와 Ki-67은 각각 32예(84%)와 30예(80%)였다. 4cm이상의 직경을 가진 34예에서 p53 양성인 18예(53%)였고 PCNA와 Ki-67은 31예(91%)였다. 이중 등급 3을 나타내는 것은 p53이 38%(13예), PCNA 56%(19예), Ki-67 35%(11예)였다. 이상의 성적에서 종양의 크기가 클수록 p53의 양성 발현율은 오히려 감소하는 추세를 나타내었으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. PCNA와 Ki-67은 크기에 따른 양성율의 차이가 뚜렷하지 않았다. 또한 등급 3의 강양성 반응의 빈도로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이상의 성적은 Table 5에 요약하였다.

5. 종양의 전이와 p53, Ki-67 및 PCNA발현의 관계

전체 116예 중 36예(31%)에서 림프절 전이가 증명되었고 나머지 80예(69%)는 전이가 없었다. 종양의 전이유무에 따른 이들 핵단백의 발현 양상은 다음과 같다. p53의 경우 전이가 있는 36예 중 17예(47%)와 전이가 가지 않은 80예 중 50예(63%)에서 등급 1 이상의 양성 반응이 있었다. PCNA는 전이가 있는 36예 중 32예(89%)와 전이가 없는 80예 중 70예(88%)에서 양성 반응을 나타내었다. Ki-67은 전이가 있는 36예 중 32예 (89%), 그리고 전이가 없는 80예 중 68예(85%)에서 양성 반응을 나타내었다. 이상의 성적에서 전이 유무와 p53, PCNA 및 Ki-67의 발현 유무에는 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다 (p>0.05).

p53, PCNA 및 Ki-67의 발현등급 정도와 전이의 상관관계에 대한 성적으로 전이가 있는 36예에서 p53은 11예(31%), PCNA는 19예(53%), Ki-67은 12예(33%)가 등급 3의 강 양성 반응을 나타내었

Table 6. Correlation between the nodal metastasis and the expression of p53, PCNA and Ki-67 in head neck squamous cell carcinoma

		Metastasis positive n=36 (%)	Metastasis negative n=80 (%)
p53	grade 0	19 (53)	30 (37.5)
	grade 1	4 (11)	10 (12.5)
	grade 2	2 (6)	13 (16)
	grade 3	11 (30)	27 (34)
Ki-67	grade 0	4 (11)	12 (15)
	grade 1	9 (25)	18 (22.5)
	grade 2	11 (30)	34 (42.5)
	grade 3	12 (33)	16 (20)
PCNA	grade 0	4 (11)	10 (12.5)
	grade 1	7 (19)	12 (15)
	grade 2	6 (17)	25 (31)
	grade 3	19 (53)	33 (41)

다. 한편 전이를 하지 않은 80예에서 p53은 27예(34%), PCNA는 33예(41%), Ki-67은 16예(20%)가 등급 3을 나타내었다. 따라서 PCNA와 Ki-67의 등급 3의 강양성 반응은 전이를 한 종양에서 발현 빈도가 증가되었음을 알 수 있으나 통계적 유의성은 없었다 ($p>0.05$). 이상의 성적은 Table 6에 요약하였다.

IV. 고 찰

두경부 편평상피세포암의 상피세포의 발암과정은 복합적이며 다단계과정을 거치는 것으로 알려져 있다⁹. 여기에는 다수의 내적 혹은 외적 요인들이 관련되어 있으며 두경부 편평상피세포암의 상피세포는 이와 같은 인자들에 의해 장기간 반복해서 노출되거나 자극을 받음으로써 암세포로 전환될 것으로 생각되고 있다. 최근의 발암기전에 관한 분자생물학적 연구는 세포의 암화 과정에서 유전자의 역할이 매우 중요함을 일깨워 주었다. 특히 세포 내 유전자가 정상상태로 유지될 수 있도록 방어하는 역할을 하는 유전자가 있으며 이들의 손상이나 불활성화는 암화과정에서 결정적인 작용을 할 것으로 생각되고 있다¹⁰. 이러한 방어역할을 하는 유전자 중 가장 대표적인 것으로 p53유전자를 들 수 있다¹⁰. p53 유전자는 염색체 17p13.1에 위치하며 11개의 exon으로 구성되어 있다. 이는 인체의 거의 모든 세포에서 표현되는데 이 유전자에 의해 만들어지는 p53 단백질은 세포 주기 중 G1 checkpoint로 작용하여 손상받은 세포는 G1기에서 정체되어 더 이상의 손상이 억제되고 일단 손상된 DNA는 복구하여 정상으로 회복되도록 한다. 그러나 손상이 심한 세포에서 복구 불가능한 손상이 있을 경우 p53은 세포의 apoptosis를 유도한다. 이와 같이 p53은 세포 유전자를 정상상태로 유지하도록 하는데 중추적인 역할을 하며 결과적으로 비정상적인 세포의 생성이나 증식 즉 종양의 발생을 억제하는데 가장 중요한 유전자의 하나이다.

따라서 현재까지 알려진 거의 대부분의 악성종양에서 p53유전자의 변이나 불활성화가 관찰되는 것은 정상세포에서 p53유전

자의 역할이 중요함을 표현하는 것으로도 해석할 수 있다. p53 유전자의 이상을 검사하는 방법은 크게 유전자의 이상을 검사하는 것과 p53유전자에 의해 만들어진 p53 단백질의 발현양상을 검사하는 것 등 두 가지로 나누어 생각할 수 있다. 그 중 p53 단백질의 이상발현은 면역조직화학 검사를 이용하는 방법으로 p53 유전자 변이에 의해 반감기가 긴 비정상적인 p53 단백을 검색하는 것이다. 이 검사는 조직 진단에 사용된 것과 동일한 파라핀 포매 절편을 이용할 수 있으며 검사법이 간단하여 널리 쓰이는 방법이다. p53 단백질의 과발현이나 유전자 변이는 인체에서 발병하는 거의 모든 종류의 암종에서 보고되고 있고 두경부암에서도 역시 높은 빈도로 발견되고 있다. 또한 종양의 진행이나 예후에도 관련이 있을 것으로 추정되고 있으나 아직까지 p53 유전자가 암종의 발생과 진행에 관여하는 기전은 밝혀지지 않았다.

본 연구는 두경부 편평상피세포암의 파라핀 포매 조직절편에 대한 p53단백의 면역조직화학 검사를 하여 p53 과발현의 정도와 이 종양의 성장 및 전이와의 상관관계에 대하여 알아보고자 조직의 세포증식 표지자로 알려진 PCNA와 Ki-67 (MIB-1)에 대한 면역조직화학검사를 같이 실시하였다. 그리고 성적의 판정은 염색 정도에 따라 등급 0에서 등급 3까지 4단계로 나누어 판정하였다.

본 연구의 대상인 두경부 편평상피세포암의 조직은 수술로 적출된 116례를 대상으로 하였으며 모두 상피내암의 단계가 지난 침윤암이었다. 조사대상 환자의 88%가 남자였으며 97%가 40세 이상이였다.

p53단백 과발현은 조사대상 증례의 58%(67예)에서 관찰되었다. 이중 12%가 등급 1이었고 13%가 등급 2, 그리고 33%가 등급 3의 과발현을 나타내었다. PCNA는 88%(102예)에서 양성이었으며 이중 16%가 등급 1, 27%가 등급 2, 그리고 45%가 등급 3에 해당되었다. Ki-67은 조사대상의 86%(100예)에서 양성 반응을 나타내었으며 양성반응을 나타낸 조직의 등급별 분포는 등급 1이 23%, 등급 2가 39%였으며 등급 3은 24%였다. 본 연구의 결과에 의하면 두경부 편평상피세포암에서 세포증식 표지자인 PCNA와 Ki-67의 양성 발현율이 p53에 비하여 높다는 것을 알 수 있다.

이들의 발현의 상관관계는 판정을 양성과 음성으로 나누어 비교할 때 p53과 Ki-67 그리고 Ki-67과 PCNA의 발현은 통계적으로 유의한 상관관계 ($p<0.05$)가 있었으나 p53과 PCNA는 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 그리고 발현의 정도를 등급별로 분류할 때 Ki-67과 PCNA 발현간에 유의한 상관관계가 인정되었으나 p53과 PCNA, p53과 Ki-67 사이의 상관성은 통계적 유의성이 없었다. 그러므로 두경부편평상피세포암에서 조직내 p53과발현의 정도가 세포증식을 시사하는 것으로 볼 수 없다고 생각된다.

Ioachim 등(1999)⁹은 후두 편평상피세포암 조직의 40%에서 p53 과발현이 있었으며 p53과 Ki-67 및 PCNA의 면역조직화학 검사 결과에서 이들의 양성세포발현 정도에 상관관계가 있다고 하였다. Girod 등(1998)¹¹도 구강의 전암병변과 편평상피세포암을 비교할 때 상기한 p53과 세포증식 표지자들 상이에 상관관계가 있었으며 이들의 발현 정도와 세포증식능에 유의한 상관성이 있을 것으로 보고하였다. Goulsinski 등(1996)¹⁰은 후두 편평상피세포암에서 p53이 70%, Ki-67이 57% 그리고 PCNA가 67%의 양성율을 나

타내었으며 이들 상호간에 유의한 상관관계가 있다고 하였다. 그러나 Nylander 등(1997)¹²⁾과 Warnakulasuriya와 Johnson(1994)¹³⁾은 이들 사이에 유의한 상관성이 없다고 보고하였다. 이와 같이 p53의 과발현 정도와 PCNA나 Ki-67과 같은 세포증식 표지자와의 상관관계는 보고자에 따라 다르게 해석되고 있다. 여기에는 조사대상 집단, 염색방법과 판독, 그리고 통계방법에 따른 차이 등이 관여할 것으로 생각된다. 악성 종양의 성장과 예후를 예측할 수 있는 객관적인 인자가 있다면 환자의 치료에 획기적인 향상이 있을 것이다. 따라서 이를 찾고자하는 노력이 많은 연구자들에 의하여 시도되었으나 현재까지 뚜렷한 성과를 거두지 못하였다. 현재까지 일반적으로 인정받고 있는 인자로는 종양의 병기와 세포의 악성도를 들 수 있으며 특히 종양의 전이 유무가 중요한 예후인자로 인정받고 있다. 최근 면역조직화학 검사법이나 분자생물학적 기법의 발달로 종양조직에서 종양의 발생이나 증식에 관여할 것으로 알려진 각종 항원 혹은 유전자의 검사가 활발하게 이루어지고 있으며 이들의 발현과 종양의 예후와의 상관관계를 밝히고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다. 특히 수술이나 생검으로 얻어진 종양조직에 대한 면역조직화학 검사는 진단에 사용된 것과 동일한 조직을 사용할 수 있으며 검사방법이 간편하므로 적절한 항원에 대한 염색과 그 결과에 대한 판정기준이 확립된다면 실제 임상에서 응용 가능한 검사법이 될 것이다. 이와 같은 목적으로 세포증식 표지자인 Ki-67이나 PCNA, apoptosis 관련 유전자인 bcl-2, bax, 그리고 p53 등에 대한 면역조직화학 검사가 많이 시도되고 있으나 아직 그 결과에 대하여 이 론이 있다.

p53의 과발현과 종양의 진행에 관하여 다수의 연구들이 발표된 바 있으며 두경부암에서 조직내 p53 과발현의 정도가 증가할수록 예후가 나쁘다는 것^{14,15)}과 예후가 더 좋다는 보고¹⁶⁾ 등이 상반되는 주장을 하고 있다. 또한 두경부암의 초기 암화과정에 p53의 과발현은 종양의 진행과 유의한 정보를 제공하나^{17,18)} 진행된 암의 경우 예후를 추정할 수 있는 인자로 볼 수 없다는 보고¹⁹⁾도 있다. Ki-67의 발현 역시 종양의 재발이나 치료에 대한 반응도^{19,20)}, 혹은 종양의 전이²¹⁾와 유의한 관계가 있을 것으로 다수 보고되었다. 그러나 이들 단백질의 발현정도를 두경부암의 진행이나 예후를 예측할 인자로 볼 수 없으며 p53과 PCNA, 그리고 Ki-67 상호간에 유의한 상관성이 없을 것으로 본 연구들^{22,26)}도 다수 보고되었다.

종양의 발생부위에 따른 이들 단백질의 발현양상을 알아보기 위하여 후두암 40예와 구강내암 33예를 대상으로 조사하였다. 후두암의 경우 p53은 60%에서 양성반응을 나타내었으며 PCNA는 85%, 그리고 Ki-67은 80%의 양성율을 나타내었다. 한편 구강내암중은 55%가 p53양성을 나타내었고 PCNA는 88%, Ki-67은 97%에서 양성반응을 나타내었다. 이상의 성적에서 구강내암에서 Ki-67의 양성율이 후두암에 비하여 높았으나 통계적 유의성은 없었으며 따라서 종양의 발생 부위에 따른 이들 단백질의 양성율은 유의한 차이가 없음을 알 수 있다. 또한 발현의 정도에도 유의한 차이가 없었다.

또한 종양의 크기를 2cm이하, 2~4cm, 4cm이상으로 나누고 각

실험군의 p53, PCNA, Ki-67의 발현양상을 비교한 결과 크기가 2cm이하인 44예에서 p53은 64%의 양성율을 나타내었으며 PCNA와 Ki-67은 89%였다. 그리고 크기가 4cm이상인 실험군에서 p53은 53%, PCNA와 Ki-67은 81%의 양성율을 나타내었다. 여기서 크기에 따른 p53, PCNA, Ki-67의 양성율에는 뚜렷한 차이가 없음을 알 수 있다. 이들 염색 정도에 따라 구별할 때 등급 3을 중심으로 비교하면 종양의 크기가 2cm 이하인 경우 p53 30%, PCNA 39%, Ki-67 20%의 빈도였고 종양의 크기가 4cm 이상인 경우 각각 38%, 56%, 32%로 종양의 크기가 클수록 강양성반응을 나타내는 증례의 빈도가 높다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 이들 단백질의 발현을 비교한 결과 림프절 전이가 있는 36예 중 47%에서 p53 양성이고 PCNA와 Ki-67은 89%에서 양성이었다. 전이가 없는 80예에서 p53은 63%, Ki-67은 85%, 그리고 PCNA는 88%에서 양성이었다. 또한 염색의 강도로 보아 림프절 전이가 있는 예에서 p53 31%, PCNA 53%, Ki-67 33%가 등급 3을 나타내었다. 한편 전이를 하지 않은 증례에서는 p53은 34%, PCNA는 41%, Ki-67은 20%가 등급 3을 나타내었다. 이 성적에서 통계적 유의성은 없었으나 전이를 한 경우 PCNA와 Ki-67은 강양성을 나타내는 증례의 빈도가 전이를 하지 않은 경우에 비하여 높다는 것을 알 수 있다. 그러나 p53은 발현은 림프절 전이와 관계가 없다는 것을 알 수 있다.

V. 결 론

두경부 편평상피세포암의 임상적 양상과 p53, PCNA 및 Ki-67의 조직내 발현양상과 이들간의 상관관계를 알아보기 위하여 수술로 제거된 116예의 침윤성 두경부 편평상피세포암을 대상으로 면역조직화학 검사를 하였고 그 성적을 통계처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 두경부 편평상피세포암에서 세포증식 표지자인 PCNA와 Ki-67의 양성율이 p53의 과발현에 비하여 높다는 것을 알 수 있다. 또한 Ki-67과 PCNA의 발현은 통계적으로 유의한 상관관계($p < 0.05$)가 있었으나 p53과 PCNA, p53과 Ki-67 사이에는 유의한 상관관계가 인정되지 않았다.
2. 종양의 부위나 크기에 따른 발현은 유의한 차이를 나타내지 않았다.
3. 림프절전이에 따른 발현양상을 보면 전이유무에 따라 이들 단백질 발현율의 차이는 없었으나 전이가 있을 경우 PCNA와 Ki-67의 등급 3의 빈도가 전이를 하지않은 경우에 비하여 높다는 것을 알 수 있었다.

그러므로 p53과 세포증식 표지자는 각기 다른 기전을 통하여 종양의 성장이나 진행에 관여 할 것으로 보인다. 두경부 편평상피세포암의 성장이나 진행과 p53 과발현은 유의한 관계가 없으므로 p53 과발현의 정도를 독립적인 예후추정인자로 볼 수 없을 것으로 생각한다.

참고문헌

- Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, and Syrjanen K: Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993;68:653-661. radiosensitivity for head and neck cancers. *Br J Cancer*. 80:1400-4, 1999.
- Thomas WD: Oncogenes and antioncogenes: The molecular basis of tumor behaviour. *J Pathol*. 15:187-201, 1991.
- MckormickD, Chong H, Hobbs C, Datta C, and Hall P.A: Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody Ki-67(MIB-1). *Histopathology* 22:355-60, 1993.
- Golusinski W, Szmeja Z, Olofsson J, Biczysko W, Krygier-Stojalowska A, and Majewski P: Diagnostic and prognostic value of p53 oncogene and the selected neoplastic markers (Ki67,PCNA, DNA ploidy) of the ultrastructure in patients with laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*. 50:607-17, 1996.
- Ioachim E, Assimakopoulos D, Agnantis NJ, Peschos D, Zissi A, and Skevas A :Altered patterns of retinoblastoma gene product expression in benign, premalignant and malignant epithelium of the larynx: an immunohistochemical study including correlation with p53, bcl-2 and proliferating indices. *Anticancer Res*. 19:541-5, 1999.
- 문선힬, 이상한, 이상숙 : DMBA 유도 햄스터 협낭암 발생과정에서 p53 유전자, 상피 성장 인자 수용체 (EGFr) 및 증식세포핵항원 (PCNA)에 대한 면역조직학적 연구. *대한구강악안면외과학회지*, 21 (2):132-148, 1995.
- 곽동호, 이상한 : 발암기전에 미치는 세포주기 조절 단백질들의 역할. *대한구강악안면외과학회지*, 23 (3):374-387, 1997.
- G. Kenneth Haines III, Ralph J Panos, Philip M. Bak, Tim Brown, Mike Zielinski, John Leyland, and Radosevich: Interferon-responsive protein kinase(p68) & PCNA are inversely head & neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biology* 19:1:52-59, 1998.
- Franco EL, Kowalski LP, and Kanda JL: Risk factors for second cancers of the upper respiratory and digestive systems: a case-control study. *J Clin Epidemiol*. 44:615-25, 1991.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science*. 253:49-53, 1991.
- Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, and Pape HD: Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 36:252-60, 1998.
- Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, and Roos G: PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anal Cell Pathol*. 14:101-10, 1997.
- Warnakulasuriya KA and Johnson NW: Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 23:246-50, 1994.
- Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJ, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, and Hittelman WN: p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 88:519-29, 1996.
- Chiang CP, Huang JS, Wang JT, Liu BY, Kuo YS, Hahn LJ, and Kuo MY: Expression of p53 protein correlates with decreased survival in patients with areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 28:72-6, 1999.
- Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, Halonen P, Helin H Raitiola H, Pukander J, Kellokumpu-Lehtinen P, and Kosma VM: *J Clin Oncol* 15:3111-2, 1997.
- Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, Kathuria S, Walter SA, and Reddy SP: Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*. 82:286-91, 1998
- Stoll C, Baretton G, and Lohrs U: The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 433:427-33, 1998.
- Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, and Eckel HE: Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*. 35:583-9, 1999.
- Sittel C, Ruiz S, Kvasnicka HM, Volling P, Jungehulsing M, and Eckel HE: Prognostic relevance of proliferation marker Ki-67 (MIB 1), PCNA and p53 in combined surgically and radiologically treated cancers of the oropharynx and mouth cavity. *Laryngorhinotologie*. 79:86-92, 2000.
- Matsumoto M, Komiyama K, Okae M, Shimoyama Y, Iwakami K, Namaki S, Tanaka H, Moro I, and Sato H: Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki 67. *J Oral Sci*. 41:53-6, 1999
- Bjork-Eriksson T, West CM, Cvetskovska E, Svensson M, Karlsson E, Magnusson B, Slevin NJ, Edstrom S, and Mercke C: The lack of correlation between proliferation (Ki-67, PCNA, LI, Tpot), p53 expression and 2. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993;68:653-661. radiosensitivity for head and neck cancers. *Br J Cancer*. 80:1400-4, 1999.
- Sommer T and Olofsson J: Significance of p53, PCNA and Ki-67 in the prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngorhinotologie*. 76:189-96, 1997.
- Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CH, and Hordijk GJ: Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 108:1548-52, 1998.
- van Heerden WF, van Rensburg EJ, Hemmer J, Raubenheimer EJ, and Engelbrecht S: Correlation between p53 gene mutation, p53 protein labeling and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*. 18:237-40, 1998.
- Morawski K, Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Pietrawska V, and Steplewska K: Clinical application of proliferating cell nuclear antigen, oncoprotein p53 and tumor front grading analysis in patients operated on for laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 256:378-83, 1999.