

근치적 방사선치료를 시행한 제2기의 자궁경부암 환자에서 p53과 Bax의 발현과 임상적 의의

인하대학교 의과대학 방사선종양학교실, 병리학교실*, 산부인과학교실†, 샘안양병원 산부인과‡

최석진* · 김현정 · 송은섭† · 김창영† · 이미조 · 김우철 · 노준규

목적: 진행된 자궁경부암 환자에서 bax와 p53의 발현 빈도를 방사선치료를 받은 환자를 대상으로 예후인자로서의 유용성을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법: 본 연구는 1996년 6월부터 2003년 12월까지 근치적 방사선치료를 받은 FIGO stage IIb의 자궁경부암 환자 65명을 대상으로 면역조직화학 염색을 시행하여 관찰된 bax와 p53의 발현과 환자의 5년 생존율과 무병생존율의 관계를 연구하였다.

결과: 대상환자 65명에 대한 5년 생존율과 무병생존율은 각각 65.1%와 62.9%였다. p53에 대한 면역조직화학염색은 26.2%의 발현을 보였으며, 음성 환자 군과 양성 환자 군의 5년 생존율은 각각 66.6%와 61.1% ($p=0.176$)였으나, 무병생존율은 각각 72.1%와 50.9% ($p=0.027$)로 단변량분석에서 통계학적 차이를 보였다. 면역염색에 대한 bax의 발현은 52.3%에서 양성을 보였으며, 음성 환자 군과 양성 환자 군의 5년 생존율은 각각 68.8%와 63.6% ($p=0.726$)였으며, 무병생존율은 각각 68.1%와 64.1% ($p=0.505$)로 통계학적 차이가 없었다. 다변량분석에서는 p53 단백질의 발현과 bax의 발현이 생존율에 의미 있는 영향을 주지 못했다. 그러나 p53+/bax-의 면역화학염색 결과를 보인 9명의 환자에서 의미 있는 가장 낮은 무병생존율을 관찰할 수 있었다.

결론: p53과 bax의 발현은 단독적으로 방사선치료를 시행한 환자에서 유의성을 가지는 예후인자로 사용할 수 없었다. 그러나 p53과 bax의 발현을 동시에 평가할 경우 유용한 예후 인자로서 임상적 유용성이 있을 것으로 생각한다.

핵심용어: 자궁경부암, p53, bax, 예후인자

서론

자궁경부암은 우리나라 여성의 악성종양 중 5번째를 차지하는 질환으로,¹⁾ 최근 조기진단 및 수술 및 방사선치료 단독 또는 약물치료와 병합요법의 발전으로 높은 치료성적을 보이고 있다. 그러나 2기말 이상으로 국소적으로 진행된 자궁경부암의 경우에는 방사선치료가 가장 중요한 치료방법이 되었다.²⁾ 방사선치료의 효과에 영향을 주는 인자로 병기, 종양의 크기와 림프선의 전이 여부 등을 들 수 있다.^{3,4)} 최근 많은 발전을 보이는 분자 생물학적인 예후인자로 종양억제 유전자인 p53, 종양유도 유전자인 bcl-2, bax 등의 apoptosis와 연관된 인자들이 관심을 끌고 있다.

특히 방사선에 의한 apoptosis 중 p53 단백질은 여러 방면으로 연구되어 왔다.⁵⁾ p53 유전자는 17번 염색체의 단완에 위치하는 종양억제 유전자로,⁶⁾ 정상적으로 세포증식을 조절하며 손상된 세포의 성장을 G1기에서 정지시켜 S기로 진행을 막아, 손상 받은 DNA를 복구할 수 있는 여유를 주거나, 손상된 DNA의 복구가 불가능할 경우 apoptosis로 진행하게 하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{7,8)} 그러나 p53 유전자에 의한 apoptosis의 진행 과정에 대해서는 아직도 명확하게 밝혀져 있지는 않다.

bcl-2나 bax, bak 등이 포함된 bcl-2 family는 apoptosis의 억제와 촉진을 조절하는 유전자 군으로, 미토콘드리아의 내막과 핵막, 소포체 등에 존재하며, 미토콘드리아의 투과운반의 변화에 관여하는 이온 채널을 만들거나 막에 구멍을 낼 수 있으며, 이렇게 bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아에서 세포질로 사이토크롬 C와 다른 apoptosis 유도 인자의 방출을 조절함으로써 apoptosis를 억제하거나 유발하는 것으로 알려져 있으며,^{9,10)} p53의 억제가 bcl-2 발현의 증가

이 논문은 2005년 3월 11일 접수하여 2005년 4월 20일 채택되었음.
이 논문은 인하대학교의 지원에 의하여 연구되었음.
책임저자: 송은섭, 인하대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: 032)890-3430, Fax: 032)890-3097
E-mail: songsong2000@hotmail.com

와 bax 발현의 감소와 관계가 있다는 보고도 있으며,¹¹⁾ 특히 자궁경부암의 경우 *in vitro*에서 p53의 불활성화가 bcl-2와 bax의 발현의 증가와 관련이 있다는 보고가 있다.¹²⁾

분자생물학적 방법의 발전과 더불어 예후 인자로써의 종양 유전자와 억제 유전자에 대한 연구가 보고되고 있으며, Ishikawa 등¹³⁾은 p53 유전자는 방사선치료를 예후와 관련이 있다고 보고하였지만, Ebara 등¹⁴⁾과 같이 반대의 결과도 있으며, 세포유형에 따라 서로 다양하게 보고되고 있다. bcl-2 유전자군도 예측인자로 유방암, 폐암 및 전립선암 등에서 많은 연구가 있었으나 자궁경부암에 대해서는 연구가 일관성이 없으며 부족한 상태이다.¹⁵⁻¹⁹⁾

이에 저자들은 국소적 침윤을 보인 FIGO 분류상 2기말에 해당하는 자궁경부의 침윤성 편평상피암종에서 apoptosis에 영향을 주는 인자인 p53과 bax의 발현을 면역조직화학적 분석을 통하여 방사선치료를의 결과와 상관관계를 알아보고 예후인자로서의 유용성이 있는지 살펴보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

1996년 12월부터 2003년 12월까지 병리 조직적으로 확진된 편평상피세포암 환자로 자궁경부암 FIGO (Federation of Gynecology and Obstetrics Stage Distribution) 병기 2기말 환자 중 근치적 목적으로 방사선치료를 받은 65명의 환자를 대상으로 하였다. 대상 환자의 중앙 추적기간은 34개월이며, 최소 5개월에서 83개월까지의 추적기간을 보였다. 연령 분포는 35세에서 78세까지 고르게 분포하였으며 중앙값은 57세였다.

모든 환자들은 치료 전에 이학적 검사와 흉부 방사선 촬영, 심전도, 간 기능 검사, 혈액소 및 백혈구 검사, 소변검사, 직장내시경 및 방광 내시경을 시행하였다. 복부 및 골반부위의 컴퓨터단층촬영 혹은 자기공명영상촬영을 시행하여 1 cm 이상 크기의 림프선을 림프선 전이로 분류하였는데, 65명 중에서 13예(20%)에서 림프선 전이가 보였다.

2. 치료방법

모든 환자는 외부방사선치료와 강내 근접 방사선치료를 병합하여 치료하였다. 외부방사선치료는 10MV 선형가속기(Linear accelerator)를 사용하여 전 골반강에 사문조사 방법으로 매일 180 cGy씩 주 5회 조사하여, 3,600 cGy를 시행 후, midline block을 추가해 4,500 cGy까지 시행하였고, 자궁방결합조직에 900 cGy를 추가로 조사하였다. 고선량을 근접 방사선치료는 Ir-192 고선량 근접 치료기(Micro-

Selectron HDR)로 A점에 500 cGy씩 총 주 2회 6~7회를 시행하여 총 3,000~3,500 cGy를 조사하였다.

3. 치료반응 판정 및 추적 검사

치료 종료시점과 치료 종료 후 1개월과 3개월에 시행한 골반 내 이학적 검사와 치료 종료 후 시행한 방사선학적검사를 시행하였다. 그 후 1년간은 3개월마다, 3년 후부터는 6개월마다 정기적인 병원 방문을 통하여 진찰을 받았다. 치료 종료 3개월 후부터 자궁 세포질 검사를 시행하였으며, 재발이 의심되는 경우에는 이학적 검사, 전산화단층촬영 및 조직검사로 확인하였다.

4. 면역조직화학 염색

방사선 치료 시작 전 환자에서 채취하여 보관중인 파라핀 포매 조직으로부터 5 μ m 두께의 절편을 만들어 3-aminopropyltriethoxysilane이 도포된 유리슬라이드에 부착한 후 100% xylene에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 70% 알코올에서 차례대로 합수 과정을 거쳐서 증류수에서 5분간 수세하였다. 내인성 과산화효소의 억제를 위하여 0.3% 과산화수소와 100% 메탄올의 혼합액에서 30분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 citrate buffer (0.01 M, pH 6.0)에 담가 5분간 두 차례 microwave로 열을 가하여 실온에서 냉각시킨 후 PBS로 수세하였다. 일차 항체인 bax (pharmingen)와 p53 (DO-7, pharmingen)을 각각 1 : 500과 1 : 100으로 희석하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하고, 이차 항체인 biotinylated link antibody (DAKO)로 37°C에서 10분간 반응시켰다. Immidazole buffer와 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB)와 chromogen (DAKO)을 1 : 1로 혼합하여 발색시킨 후 수세하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하여 환자의 정보를 모르는 병리학자 1인이 광학현미경 하에서 관찰하였다. 정상 림프구를 각각의 염색에 대해서 내재성 양성염색 대조 표준으로 사용하였다.

5. 결과 판정

p53 단백질의 발현은 세포의 핵이 진한 갈색으로 염색된 경우만을 양성으로 판정하였으며 광학현미경을 이용하여 염색된 세포의 조직학적 분포를 관찰하고, 염색이 잘된 다섯 현미경 시야를 선택하여 400배를 시야에서 양성 세포의 백분율을 구하였다. Bax의 발현은 세포질이 갈색으로 염색되는 세포를 양성으로 판정하였으며 마찬가지로 방법으로 양성 세포의 백분율을 구하였다. p53과 bax단백질은 양성 세포 수의 비율이 5%인 경우가 환자군의 재발률이 높은

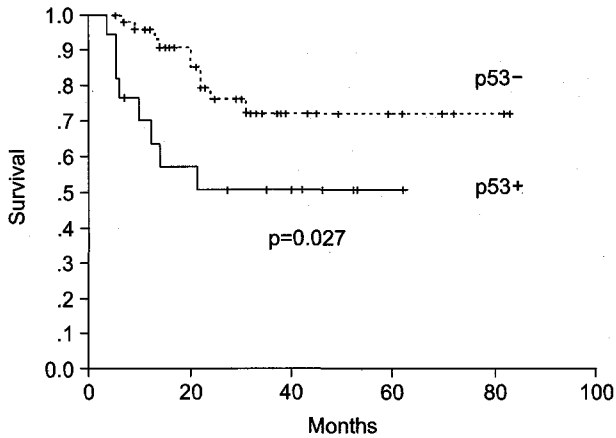


Fig. 1. Kaplan-Meier survival estimates for disease-free survival rate by p53 expression.

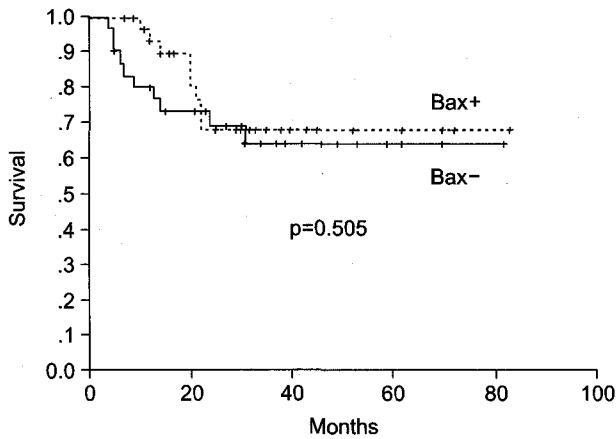


Fig. 2. Kaplan-Meier survival estimates for disease-free survival rate by bax expression.

군과 낮은 군으로 분류하는 데 적합하다²⁰⁾는 보고에 따라서 5%를 양성과 음성의 기준으로 삼았다.

6. 통계학적 검증

연구결과에 대한 분석은 SPSS 10.0 프로그램을 이용하였다. 생존율은 Kaplan-Meier법을 이용하였고, 비교는 log-rank test로 하였으며, 생존율에 대한 인자에 대한 비교분석은 Cox proportional Hazard Model을 이용하였다.

결 과

대상환자 65명에 대한 5년 생존율과 무병생존율은 각각 65.1%와 62.9%였다.

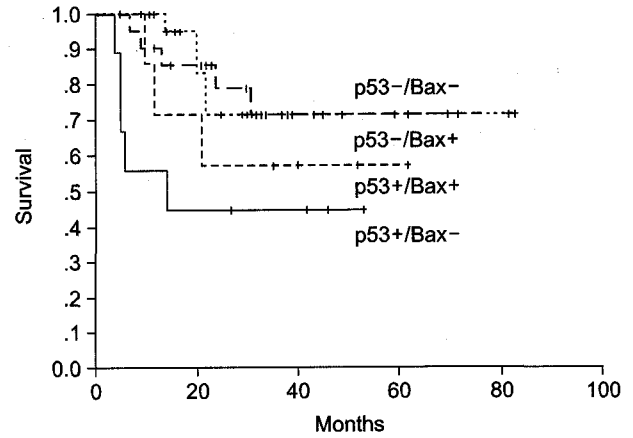


Fig. 3. Kaplan-Meier survival estimates for disease-free survival rate by coexpression of p53 and bax proteins.

1. p53 단백질의 발현

전체 종양 세포 중 p53 단백질에 종양세포의 핵이 갈색으로 염색된 수가 5% 이상인 경우가 65명 중에서 17명(26.2%)이었으며, 5% 이상 염색된 수를 기준으로 log-rank test로 단변량분석 시 발현된 경우와 발현되지 않은 경우 생존율이 각각 61.1%와 66.6%로 통계적 유의성을 보이지 않았으나 (p=0.176), 무병생존율은 각각 50.9%와 72.1%로 p53이 발현된 군에서 생존율의 유의한 감소를 보였다(p=0.027)(Fig. 1). 발현 정도는 약양성, 중앙성, 강양성이 각각 7명(10.7%), 7명(10.7%), 3명(4.6%)으로 생존율과 무병생존율에서 차이를 보이지 않았다.

2. Bax 단백질의 발현

Bax 단백질이 종양세포의 세포질에 갈색으로 염색된 수가 5% 이상인 경우가 34명(52.3%)이었으며, 단변량분석 시 발현된 경우와 발현되지 않은 경우 생존율이 각각 68.8%와 63.6%로 유의한 차이를 보이지 않았으며(p=0.726), 무병생존율도 각각 68.1%와 64.1%로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.505)(Fig. 2). 발현 정도는 약양성, 중앙성, 강양성이 각각 21명(32.2%), 8명(12.3%), 5명(7.7%)으로 생존율과 무병생존율에서 차이를 보이지 않았다.

3. p53/Bax 단백질의 발현과 생존율

p53의 발현과 bax의 발현이 생존율이 미치는 영향을 보기 위하여, 발현여부에 따라 4개의 군으로 나누어 생존율과 무병생존율을 비교하였다(Fig. 3). 면역조직화학염색 결과의 연령과 림프선 전이 여부의 영향을 교정한 다변량분석은 생존율에서 p53+/Bax- 군이 가장 낮은 생존율을 보

Table 1. Coexpression of p53 and Bax Protein, Overall Survival and Disease-free Survival

Expression	n	5-year DFS		5-year OS	
		Survival (%)	HR, 95% CI*	Survival (%)	HR, 95% CI*
p53+/Bax+	8	57.1	1	67.5	1
p53-/Bax-	22	71.7	0.63 (0.14~2.74)	67.7	0.72 (0.12~4.06)
p53-/Bax+	26	71.3	0.50 (0.11~2.13)	70.9	0.79 (0.14~4.40)
p53+/Bax-	9	44.4	3.06 (0.57~16.25)	55.5	2.35 (0.38~14.32)

*adjusted for age, lymph node status

Table 2. Survival Rate according to Prognostic Factors

		Overall survival (%)		Disease-free survival (%)	
		5 year	p-value	5 year	p-value
Age	< 58	63.8	0.563	70.1	0.714
	≥ 58	66.8		63.6	
Lymph node metastasis	Negative	83.5	0.021	60.3	0.077
	Positive	40.2		39.6	
p53	Negative	66.6	0.176	72.1	0.027
	Positive	61.1		50.9	
Bax	Negative	63.6	0.726	64.1	0.505
	Positive	68.8		68.1	

였으나 생존율에서는 통계적으로 차이를 보이지 않았으며, 무병생존율에서는 통계적으로 의미 있게 가장 낮은 무병생존율을 보였다($p=0.0447$)(Table 1). p53의 발현 정도와 bax의 발현 정도에 대한 Spearman 상관관계는 서로 통계적으로 유의성을 가지는 관계를 보이지 않았다($\gamma=-0.027$, $p=0.829$).

4. 생존율과 무병생존율에 대한 다변량분석

생존율에 대한 다변량분석으로 Cox proportional hazards model test를 적용하였다. p53의 발현($p=0.793$), bax의 발현($p=0.352$)은 생존율에 영향을 주는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 마찬가지로 무병생존율에서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 림프선 전이 여부는 다변량분석($p=0.021$)에서는 유의한 차이를 보였으나, 다변량분석에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2).

고안 및 결론

침윤성 자궁경부암은 지난 수십 년 사이 조기 진단의 발

전과 치료 방법의 발전에도 불구하고, 여전히 흔하고 사망률이 높은 여성암 중 하나이다. 수술, 방사선 및 항암화학요법 등이 치료방법으로 이용되고 있으며, FIGO 분류법상 stage IIB 이상의 국소적으로 진행된 경우는 주로 방사선 치료 요법이 사용되어 왔다. 전통적으로 자궁경부암에서 임상적 병기는 가장 중요한 예후 인자이며,²¹⁾ 그 이외 종양의 크기, 임파선의 침범 여부 등이 방사선 치료 시 예후에 영향을 주는 인자로 보고되고 왔다.^{22,23)} 최근 분자 생물학적인 발전과 더불어 예후인자로서 분자 생물학적인 방법이 도입되고 있다. 또한 이러한 분자생물학적인 평가가 예후를 평가하고 치료 방침을 결정하는 데 도움을 줄 수 있다는 보고가 있다.^{17,19,24)} 종양세포의 증식과 사멸을 조절하는 apoptosis 관련 인자인 p53과 bcl-2 family gene에 대한 연구가 많이 이루어져 있다. 그러나 방사선 치료에 따른 자궁경부암의 반응성과 apoptosis의 관련인자와의 상관성에 대한 연구는 드문 실정이다. 이에 본 연구에서는 자궁경부암에서 apoptosis에 결정적인 역할을 하는 p53 단백질과 bax의 발현을 생존율과의 상관관계를 살펴 예후 판정에 유용하게 이용할 수 있는지 알아보려 본 연구를 시행하였다.

방사선 치료 또는 항암약물 치료에 중요한 역할을 하는 apoptosis는 p53 유전자의 활성화와 크게 연관이 된다.⁵⁾ 17번 염색체의 단완에 위치하고 있는 p53은 종양억제 유전자로 인체 암 발생에 중심적인 역할을 한다. 정상적으로 유전자 전사(gene transcription), DNA 복구 및 세포의 자연사의 관여하고 있으며, p53의 기능의 소실은 종양억제 기능의 소실과 종양원성 활성화(oncogenic activity)의 증가를 가져와 악성으로 전환을 일으키는 것으로 알려져 있다. 기존의 보고에 의하면 면역염색에서 보이는 p53 단백질의 발현은 p53 유전자의 변이와 관련되어 있음을 보여주고 있다.²⁵⁾ 야생형 p53 단백질은 반감기가 수분 정도로 정상세포에 적은 양으로 존재하며 돌연변이 p53 유전자의 산물인 돌연변이형 p53 단백질은 그 구조에 변화가 생겨 반감기가 수 시간으로 연장된다. 따라서 일반적으로 종양 내에서 p53 단백질의 증가는 p53 유전자의 돌연변이에 의한 돌연

변이형 p53 단백질의 증가로 생각할 수 있다.²⁵⁾ p53 기능의 소실이 유방암과 폐암에서 생존기간의 감소와 연관을 보여주었다.^{17,19,24,26)} 여러 악성종양에서 p53 단백질의 과 발현은 예후와 연관성을 보이고 있다.^{27~29)} 자궁경부암 환자의 경우 p53 단백질은 면역염색에 20~62%의 환자에서 발현되는 것으로 보고되고 있다.^{30~33)} 그러나 위의 다른 악성종양과 달리 자궁경부암의 경우 예후와의 연관성을 보이지 않는 것으로 보고되고 있다.^{34~37)} 본 연구에서도 마찬가지로 26.2%의 환자에서 p53 단백질의 발현을 볼 수 있었으나, 발현과 예후와의 관계는 유의한 차이를 보이지 않았다.

이는 우선적으로 자궁경부암의 경우 p53과 예후와의 연관을 보이는 폐암 등과 달리 방사선치료만으로도 5년 생존율이 60% 이상의 높은 치료 성적을 가지고 있어 p53의 발현 정도가 예후에 영향을 끼치지 못한 것으로 사료되고, 다른 이유로 human papilloma virus (HPV) type 16과 18 E6 단백질이 야생형 p53과 결합하여 불활성화되어 종양세포 내의 핵내 p53 단백질의 축적을 방해하는 이유로 인하여 p53과 치료 예후와의 연관성을 가지지 못한 것으로 사료된다.^{38,39)}

Bcl-2 단백 무리 중에 하나인 bax 단백질은 heterodimer로 과도하게 발현되었을 때 apoptosis를 촉진한다.⁴⁰⁾ Bax에 대한 발현은 본 연구에서는 52.3%의 환자에서 보였으며, Wootipoom 등⁴¹⁾이 보고한 64.8%에 크게 차이를 보이지 않는다. Bax의 발현과 예후에 관해서는 상관 관계의 유의성을 주장하는 보고와 그렇지 않은 보고가 있으나,^{42~46)} 본 연구에서는 Mukherjee 등⁴⁵⁾과 Chung 등⁴⁶⁾의 보고와는 다르게 bax의 발현이 예후에 긍정적인 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

Bcl-2 유전자는 18번 염색체의 장완에 위치하는 종양 유전자로 apoptosis를 억제함으로써 세포의 수명을 연장시켜 암화 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁴⁷⁾ Bcl-2의 예후에 대한 영향은 여러 종양에 대해서 여러 연구가 보고되고 있다. Lipponen 등⁴⁸⁾은 방광암에서, Bubendorf 등⁴⁹⁾은 전립선암에서 bcl-2의 발현이 예후에 악영향을 주는 것을 보고하였으며, Lipponen 등⁵⁰⁾은 분화도가 좋은 유방암에서, Diebold 등⁵¹⁾은 난소암에서 좋은 영향을 주는 것으로 보고하였고, Spafford 등⁵²⁾은 후두암에는 예후와의 상관 관계를 보이지 않음을 보고하였다. 자궁경부암의 경우 아직은 bcl-2의 예후인자로의 역할은 밝혀지지 않은 상태이다. 20~68% 정도의 자궁경부암에서 발현이 보고되고 있으며, Dimitrakakis 등³⁷⁾과 Tjalma 등⁴³⁾은 bcl-2의 발현이 예후에 긍정적인 영향을 준 것으로 보고하였으나, Pillai 등³⁵⁾과 Rajkumar 등³⁴⁾은 bcl-2의 발현이 환자의 예후에 좋지 않은 영

향을 준다고 보고하였다.

p53과 bcl-2 family 사이의 관계는 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나, p53 유전자의 활성화는 apoptosis 조절할 수 있는 단백질인 bcl-2의 억제와 bax의 활성화로 이끄는 것으로 보고되고 있다.^{53,54)} Oltvai 등⁵⁵⁾은 bax에 대한 bcl-2의 비율이 apoptotic 자극에 대하여 세포의 apoptosis로 진행 여부에 큰 영향을 주는 것으로 보고, bax가 많은 경우 세포는 apoptosis로 쉽게 진행이 되지만, 반대로 bcl-2가 많은 경우에는 apoptosis로 잘 진행되지 않는 것을 기술하였다. p53의 발현과 bcl-2의 발현의 상보적인 역학관계가 유방암과 난소암에서 보고되고 있으며,^{53,56)} p53이 음성인 세포에서 p53의 과발현 유도 시 bcl-2의 발현을 억제하는 현상이 보고되고 있다.^{11,53)} Jain 등⁵⁷⁾은 방사선치료를 시행한 자궁경부암 환자의 치료 결과는 p53-/bcl-2+의 유전자형에서 가장 좋은 높은 생존율을 보고하였다. 본 연구에서는 bcl-2에 대해 연구를 시행하지 못하였으나, 면역조직화학 염색 결과에서 p53이 발현되고 bcl-2에 상보적인 역할을 하는 bax가 억제된 경우 가장 낮은 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 p53 단백질의 발현과 bax 단백질의 발현은 유의한 상관관계를 보이지 않아 p53의 발현이 bax 단백질의 발현의 활성화의 유도 여부는 확인할 수 없었다.

면역조직화학염색에 의한 p53 단백질과 bax의 발현은 단독적으로 방사선치료를 시행한 진행된 자궁경부암 환자에서 생존율을 예측할 수 있는 예후인자로 나타나지 않았다. 그러나 p53과 bax의 발현을 동시에 평가할 경우 무병 생존율에서 유의한 생존율의 차이를 확인할 수 있었다. 면역조직화학염색의 방법으로 p53, bax, bcl-2 등의 단백질의 발현을 동시에 평가하면 좀 더 나은 예후인자로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로 이들 단백질의 상호작용에 대한 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 2002 Annual Report of the Korea Central Cancer Registry, Ministry of Health and Welfare Republic of Korea
2. Toita T, Nakano M, Higashi M, Sakumoto K, Kanazawa K. Prognostic value of cervical size and pelvic lymph node status assessed by computed tomography for patients with uterine cervical cancer treated by radical radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995;843-849
3. Ohara K, Tanaka YO, Tsunoda, et al. Nonoperative assessment of nodal status for locally advanced cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy with regard to patterns of treatment failure. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003;55:354-361
4. Eifel PJ, Morris M, Wharton JT, Oswald MJ. The influ-

- ence of tumor size and morphology on the outcome of patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:9-16
5. **Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T.** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847-849
 6. **Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM.** Location of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986;320:84-85
 7. **Hall PA, Meek D, Lane DP.** p53-integrating the complexity. *J Pathol* 1996;180:1-5
 8. **El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al.** WAF/CIP1 in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-1174
 9. **Yang E, Korsmeyer SJ.** Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401
 10. **Yang J, Liu X, Bhalla K, et al.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132
 11. **Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al.** Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805
 12. **Liang XH, Mungal S, Ayscue A, et al.** Bcl-2 proto-oncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. *J Cell Biochem* 1995;57:509-521
 13. **Ishikawa H, Mitsuhashi N, Sakurai H, Maebayashi K, Niibe H.** The effects of p53 status and human papillomavirus infection on the clinical outcome of patients with stage IIIB cervical carcinoma treated with radiation therapy alone. *Cancer* 2001;91:80-89
 14. **Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, et al.** Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 1996; 63:216-218
 15. **Jaros E, Perry RH, Adam L, et al.** Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumors. *Br J Cancer* 1992;66:373-385
 16. **Awwad S, Jaros E, Somes J, Lunec J.** P53 overexpression in head and neck carcinoma and radiotherapy results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:323-332
 17. **Allred DC, Clark GM, Elledge R, et al.** Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-206
 18. **Harris M, Metcalf RA, Welsh A, Montesano R, Harris CC.** Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Soc USA* 1990;87:9958-9961
 19. **Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, et al.** Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:835-840
 20. **Tjalma W, De Cuyper E, Weyler J, et al.** Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:113-117
 21. **Stehman FB, Bundy BN, Disasia PJ, Keys HM, Larson JE, Fowler WC.** Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991; 67:2776-2785
 22. **Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trope C, Bryne M.** Tumor size, depth of invasion and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999;74: 245-251
 23. **Kim HJ, Kim WC, Lee MJ, Kim CS, Song ES, Loh JK.** Comparison of the result of radiation alone and radiation with daily low dose cisplatin in management of locally advanced cervical cancer. *J Korea Soc Ther Radiol Oncol* 2004;22: 200-207
 24. **Harris CC, Hollstein M.** Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-1327
 25. **Hall PA, Lane DP.** P53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?—Revisited! *J Pathol* 1994;172:1-4
 26. **Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, et al.** p53 alterations in non-small cell lung cancers correlated with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res* 1993; 53:2864-2851
 27. **Skirnisdottir I, Seidal T, Gerdin E, Sorbe B.** The prognostic importance of p53, bcl-2, and bax in early stage epithelial ovarian carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12:265-276
 28. **Lipponen P, Ji H, Aaltomaa S, Syrjanen S, Syrjanen K.** p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer* 1993; 55:51-56
 29. **Couture G, Raybaud-Diogene H, Tetu B, et al.** p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer* 2002;94:713-722
 30. **Oka K, Nakano T, Arai T.** p53CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma. *Cancer* 1993;72:160-164
 31. **Gitsch G, Kainz C, Joura E, Breitenecker G.** Mutant p53 product in patients with stage III cervical cancer. *Anticancer Res* 1992;12:2241-2242
 32. **Kainz C, Kohlberger P, Gitsch G, Sliutz G, Breitenecker G, Reinthaller A.** Mutant p53 in patients with invasive cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995;57:212-214
 33. **Holm R, Skomedal H, Helland P, Kristensen G, Borresen AL, Nesland JM.** Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant, and malignant tissue of the cervix uteri. *J Pathol* 1993;169:21-26
 34. **Rajkumar T, Rajan S, Baruah RK, Majhi U, Selvaluxmi G, Vasanthan A.** Prognostic significance of Bcl-2 and p53 protein expression in stage IIB and IIIB squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;19:556-560
 35. **Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK.** Bcl-2 immunoreactivity but not p53 accumulation associated with tumour response to radiotherapy in cervical carcinoma. *J Cancer Res*

- Clin Oncol 1999;125:55-60
36. Jain D, Srinivasan R, Patel FD, Kumari Gupta S. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2003;88:22-28
 37. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000;77:129-136
 38. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79
 39. Park TW, Fujiwara H, Wright TC. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995;76:1902-1913
 40. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, et al. Induction of apoptosis of the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995;374:733-736
 41. Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2004;94:636-642
 42. Crawford RA, Caldwell C, Iles RK, Lowe D, Shepherd JH, Chard T. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *Br J Cancer* 1998;78:210-214
 43. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;97:223-230
 44. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka Y. Bax and bcl-2 expressions predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:503-510
 45. Mukherjee G, Freeman A, Moore R, et al. Biologic factors and response to radiotherapy in carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11:187-193
 46. Chung TK, Cheung TH, Lo WK, et al. Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett* 2002;180:63-68
 47. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992;80:879-886
 48. Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M. Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumors. *Histopathology* 1996;28:135-140
 49. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, et al. Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* 1996;148:1557-1565
 50. Lipponen P, Pietilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syrjanen K. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with a favourable prognosis. *J Pathol* 1995;177:49-55
 51. Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al. bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1996;105:341-349
 52. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:627-632
 53. Halder S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2095-2097
 54. Chiou SK, Rao I, White E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 1994;14:2556-2563
 55. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619
 56. Henriksen R, Wilander E, Oberg K. Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumors. *Br J Cancer* 1995;72:1324-1329
 57. Jain D, Srinivasan R, Patel FD, Kumari Gupta S. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic marker in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2002;88:22-28

— *Abstract* —

Evaluation of p53 and Bax Expression as Prognostic Markers in Invasive Cervical Carcinoma Stage IIB Patients Treated with Radiation Therapy

Sukjin Choi, M.D.*, Hunjung Kim, M.D., Eunseop Song, M.D.[†], Changyoung Kim, M.D.[‡],
Meejo Lee, M.D., Woochul Kim, M.D. and John J K. Loh, M.D.

Departments of Radiation Oncology, *Pathology, [†]Obstetrics and Gynecology,
Inha University Medical College, Incheon, [‡]Department of Obstetrics and Gynecology,
Sam Hospital, Anyang, Korea

Purpose: The objective of our study was to evaluate the immunohistochemical expression of p53 and bax proteins as prognostic markers in FIGO stage IIB invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix.

Materials and Methods: Sixty-five cases of squamous cell carcinoma of the cervix (stage IIB) that were diagnosed from October 1996 to December 2003 were analyzed retrospectively for the bax and p53 expression. These expressions were determined immunohistochemically and they were correlated to the patients' overall survival and disease-free survival.

Results: The overall 5-year survival (OS) rate and the disease-free survival (DFS) rate were 65.1% and 62.9%, respectively. p53 and bax immunoreactivity was seen in 26.2% and 52.3% of cases, respectively, with variable levels of expression. On the univariate analysis, only p53 positivity correlated with poor survival in DFS (log-rank test $p=0.027$), but this significance was not maintained on multivariate analysis by Cox's regression. The nine cases with the immunophenotype p53+/bax- had the poorest survival.

Conclusion: Neither p53 nor bax expression are independent predictors of the prognosis for stage IIB cervical squamous cancers. Evaluation of p53 and bax co-expression may affect the clinical outcome and further investigation is needed.

Key Words: p53, Bax, Cervical carcinoma, Prognosis