ORIGINAL ARTICLE

Korean J Clin Lab Sci. 2013, 45(1):32-36
ISSN 1738-3544

Correlation of Expression of p53, Cylcin D1 and Galectin-3 in Papillary Carcinoma and Follicular Carcinoma

Oun-Cheol Back

Department of Pathology, Hanyang University Guri Hospital, Guri 471-703, Korea

The thyroid is the organ that has the greatest risk of malignant tumors among the endocrine tumors. The papillary carcinoma occupies 80% of the entire thyroid tumors. Immunohistochemical staining of galectin-3 has usually been used in differentiating papillary carcinoma and follicular carcinoma. The p53 gene of the cell cycle is a tumor suppressor gene acting in on the control points. The cyclin D1 genes in the cell cycle, involved in the implementation of G1 and S phase, plays an important role in the progression of thyroid tumors. This research compares and analyzes correlation between papillary carcinoma, follicular carcinoma, p53, cyclin D1 and galectin-3 gene expression patterns. In a total of 30 cases from papillary carcinoma, 21 cases from p53 (70%), 27 cases in galectin-3 (90%), and 26 cases in cyclin D1 (86.7%) showed positive rate. The galectin-3 staining investigated, showed a significant difference between a papillary carcinoma and a follicular carcinoma. Follicular carcinoma from 15 cases, p53 in 13 cases (86.7%), galectin-3 in 5 cases (33.3%) and cyclin D1 in 12 cases (80%) showed a positive rate. The cyclin D1 in follicular carcinoma and staining between the p53 that had correlation was also investigated. In this study, as the examples of the expression of the 27 cases of galectin-3 (90%) in papillary carcinoma and 5 cases in follicular carcinoma (33.3%) indicate, it was concluded that there is a difference in the expression on both carcinoma. In addition, cyclin D1 and p53 has a positive rate in follicular carcinoma, when cyclin D1 in 12 cases (80%), there was a significant correlation that was investigated. Distinguishing between papillary carcinoma and follicular carcinoma can be identified by the expression of galectin-3. It is considered to get results that are more accurate in follicular carcinoma diagnosis depending on whether the cyclin D1 and p53 is expressed or not.

Keywords: Thyroid, Papillary carcinoma, Follicular carcinoma, Galectin-3, p53, Cyclin D1

Corresponding author: Oun-Cheol Back
Department of Pathology, Hanyang University Guri Hospital, Gyeongchun-ro 153, Guri 471-703, korea
Tel: 82-31-560-2638
E-mail: boomb119@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 Korean Society of Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: January 31, 2013
Revised: February 8, 2013
Accepted: March 13, 2013

서 론

갑상샘암은 내분비 종양 중 악성종양 발병률이 가장 높은 장기이다. 이는 초음파를 통한 갑상샘 결절에 대한 발견율이 증가하였고 결절이 관찰되는 갑상샘은 초기에 조직학적 검사를 통해 양성과 악성을 구분할 수 있기 때문이다(Davies 등, 2006). 그중에서 유두상 암종은 전체 갑상샘 종양의 80% 정도를 차지하고 그중에서 1 cm 미만 미세암이 대부분을 차지하고 있다(Leenhardt 등, 2004).

최근에는 갑상샘의 악성종양 중 유두상 암종과 여포상 암종을 감별하는데 galectin-3의 면역조직화학염색을 많이 이용하고 있다(Orlandi 등, 1998). Galectin-3는 β-galactoside에 부착하는 단백으로서 세포와 세포, 세포와 간질사이에 상호작용을 하고 pre-mRNA의 splicing에 중요한 역할을 하고 있다(Bartolazzi 등, 2001). 또한 세포의 성장, 조절, 암종으로의 변화와 전이, 세포 주기의 조절과 세포 자멸사에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Papotti 등, 2002). 양성 또는 정상 갑상샘 세포에서는 발현되지 않고 악성종양의 갑상샘 세포 표면에서 발현되기 때문에 좋은 악성종양 표지자로 사용될수 있다고 보고되고 있다(Semenov 등, 2008).

p53 유전자는 손상된 DNA의 수복과 세포성장조절의 전사인자로서, 세포주기 중 G1 조절점(checkpoint)에 작용하는 종양억제 유전자이다(Kastan 등, 1992). p53 단백은 정상조직에서는 반감기가 짧아 발현을 검출할 수 없으나, 악성조직에서는 반감기가 길어 면역조직화학검사로 검출할 수 있으며 p53 단백이 발현된다는 것은 p53 유전자가 돌연변이가 되었다는 증거로 손상된 DNA의 수

복의 역할을 못하므로 많은 악성종양의 표지자로 사용할 수 있다.

Cyclin D1 유전자는 세포주기 중 G1/S기의 이행에 관여하는데, cyclin D1이 CDK4 또는 CDK6와 복합체를 이루어 활성화되면 Rb 단백을 인산화시켜 세포주기를 S기로 이행할 수 있게 한다(Kang 등, 2002). 정상 또는 양성 갑상샘 종양에서는 거의 발현되지 않는 반면, 악성 갑상샘 종양에서는 발현이 증가됨으로써 cyclin D1의 발현이 갑상샘 종양의 진행에 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다(Lazzereschi 등, 1998). 또한 유방암 세포에서는 galectin-3는 인체의 여러 암종에서 잠재적인 종양 유전자로 작용하는 cyclin D1의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Kim 등, 1999). 그러나 갑상샘 종양에서 galectin-3, cyclin D1과 p53 단백의 상호 연관성에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

이에 본 연구는 갑상선암종에서 유두상 암종과 여포상 암종을 면역조직화학적 방법을 통해서 galectin-3, cyclin D1과 p53 단백의 발현 양상과 발현율을 조사하였고, galectin-3, cyclin D1과 p53 단백의 상관관계를 비교분석하였다.

Table 1. Comparison between p53, galectin-3 and cyclin D1 in papillary carcinoma and follicular carcinoma

	p53 No (%)		Galectin-3 No (%)		Cyclin D1 No (%)	
	−	+	−	+	−	+
Papillary ca	9 (30)	21 (70)	3 (10)	27 (90)	4 (13.3)	26 (86.7)
Follicular ca	2 (13.3)	13 (86.7)	10 (66.7)	5 (33.3)	3 (20)	12 (80)
p-value	0.220		0.00*		0.561	

*Correlation is significant at the 0.05 level ($p<0.05$).

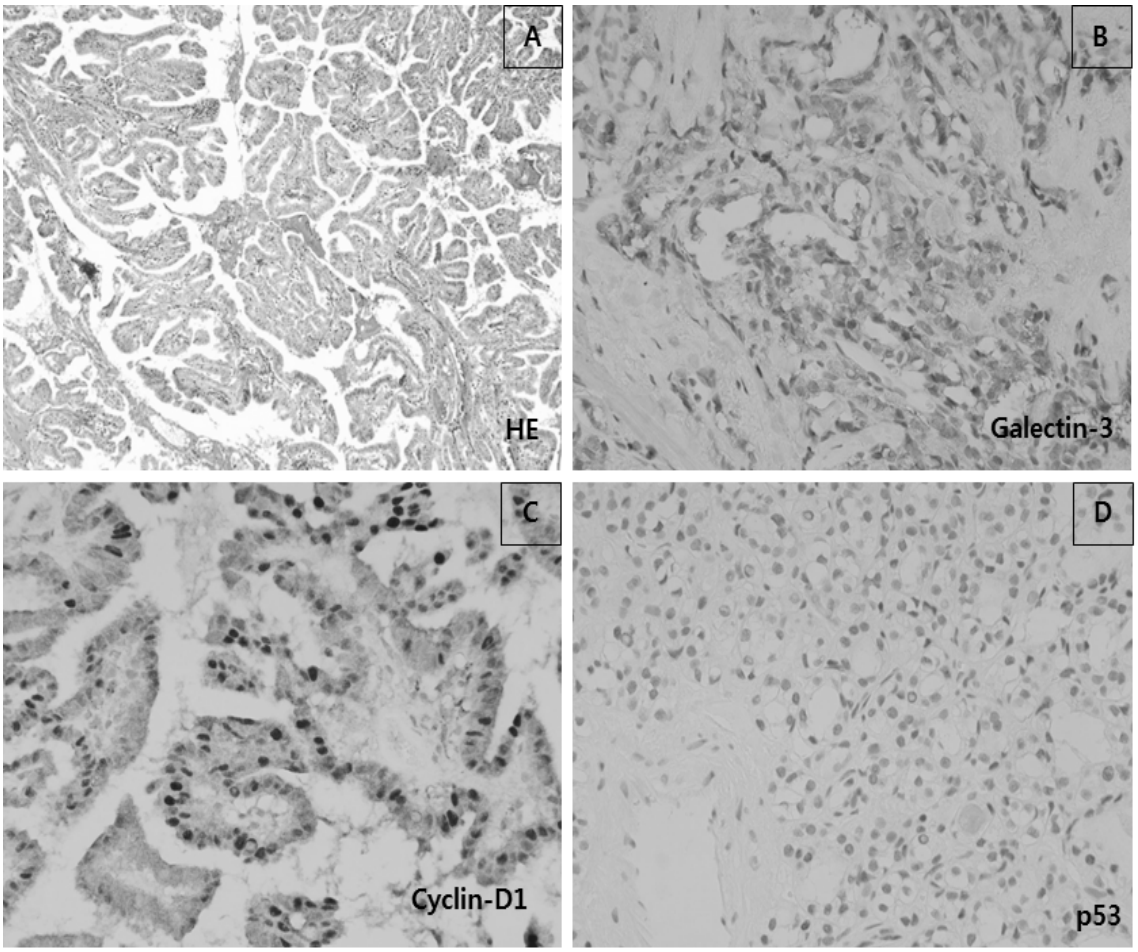

Fig. 1. The expressions of H&E, galectin-3, cyclin D1 and p53 deteched with in papillary carcinoma (A, ×100; B, ×400; C, ×400; D, ×400).

재료 및 방법

2000년부터 2012년까지 한양대학교 구리병원에서 갑상선 조직검사를 시행받은 633예 중 유두상암종으로 진단받은 30예와 소포상암종으로 진단받은 15예를 선별하였다.

Paraffin 절편을 4 μm 두께로 잘라 bond III장비(Leica Biosystems, Australlia)를 사용하여 면역염색을 실시하였다. 처리과정은 dewax solution (Leica Biosystem, UK)으로 탈파라핀을 하였고 100% alcohol 1분씩 3회 실시하였다. Antigen retrieval 과정을 실시하였고, H_2O_2 (Leica Biosystems, UK) 10분간 처리하였다. Primary ab는 p53 (Leica Biosystems, UK, 1:300), cyclin D1 (Dako, Denmark, 1:200)과 galectin-3 (Cellmarque, USA, 1:200)로 반응시켰다. Post primary (Leica Biosystems, UK) 8분, polymer (Leica Bilsystems, UK) 8분, chromogen DAB (Leica Biosystems, UK) 5분 처리 후 hematoxylin (Leica Bilsystems, UK)으로 5분간 대조염색 후 봉입하였다. 염색된 표본은 광학현미경으로 검경하여 p53과 cyclin D1 단백은 종양의 핵에 염색되면 양성으로 판정하였고 galectin-3 단백은 종양의 세포질에 염색되면 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석 SPSS Window version 10.0 프로그램을 이용하여 카이제곱 통계량과 상관관계를 분석하였고 통계 검증은 p값이 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

1. 유두상 암종에서 p53, galectin-3 and cyclin D1의 발현양상

유두상 암종에서 총 30예 중 p53은 21예(70%), galectin-3은 27예(90%) 그리고 cyclin D1은 26예(86.7%)가 양성으로 나타났다(Table 1, Fig. 1). 여포상 암종과 발현율을 비교해본 결과 galectin-3이 유두상 암종과 여포상 암종 간에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 1). 유두상 암종에서 p53과 galectin-3의 상관관계를 비교해보면 p53이 음성일 때 galectin-3이 음성인 경우 1예와 양성인 경우는 8예가 있었고, p53이 양성일 때 galectin-3이 음성인 경우 2예와 양성인 경우 19예로 조사되었다. p53과 galectin-3는 유의한 차이점을 보이지 않았다. p53과 cyclin D1의 상관관계를 비교해보면 p53이 음성일 때 cyclin D1이 음성인 경우 0예와 양성인 경우 9예였으며, p53이 양성일때 cyclin D1이 음성인 경우는 4예, 양성인 경우는 17예로 나타났으며, p53과 cyclin D1사이에는 유의한 차이점은 없었다. Galectin-3와 cyclin D1의 상관관계를 비교해보면 galectin-3이 음성일 때 cyclin D1이 음성인 경우는 0예, 양성인 경우는 3예였고, galectin-3이 양성일 때 cyclin D1이 음성인 경우는 4예, 양성인 경우는 23예로 조사되었고 galectin-3과 cyclin D1사이에도 유의한 차이점은 없었다(Table 2).

2. 여포상 암종에서 p53, galectin-3 and cyclin D1의 발현양상

여포상 암종은 총 15예 중 p53은 13예(86.7%), galectin-3은 5예(33.3%) 그리고 cyclin D1은 12예(80%)가 양성으로 나타났다(Table 1, Fig 2). 유두상 암종과 발현율을 비교해본 결과 galectin-3이 유두상암종과 여포상 암종간에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p<0.05$). 여포상 암종에서 p53과 galectin-3의 상관관계를 비교해보면 p53이 음성일 때 galectin-3이 음성인 경우 1예와 양성인 경우 1예가 있었고, p53이 양성일 때 galectin-3이 음성인 경우 9예와 양성인 경우 4예로 조사되었고, 두 염색간에 유의한 차이점은 없었다. p53과 cyclin D1의 상관관계를 비교해보면 p53이 음성일 때 cyclin D1 음성이 2예, 양성이 0예로 조사되었고, p53이 양성일 때 cyclin D1이 음성인 경우 1예와 양성인 경우가 12예로 나타났고 p53과 cyclin D1 단백의 상관관계는 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$). Galectin-3와 cyclin D1의 상관관계를 비교해보면 galectin-3이 음성일 때 cyclin D1이 음성인 경우는 2예, 양성인 경우는 8예였으며, galectin-3이 양성일 때 cyclin D1이 음성인 경우 1예와 양성인 경우 4예로 조사되었다. Galectin-3

Table 2. Correlations between expression of p53, galectin-3 and cyclin D1 in papillary carcinoma

	p53 No (%)			Galectin-3 No (%)			Cyclin D1 No (%)		
	−	+	p	−	+	p	−	+	p
p53	−	−	−			0.894			0.160
−	−	−	−	1 (3.3)	8 (26.7)		0 (0)	9 (30)	
+	−	−	−	2 (6.7)	19 (63.3)		4 (13.3)	17 (56.7)	
Gal-3			0.894	−	−	−			0.474
−	1 (3.3)	2 (6.7)		−	−	−	0 (0)	3 (10)	
+	8 (26.7)	19 (63.3)		−	−	−	4 (13.3)	23 (76.7)	
Cyclin D1			0.160			0.474	−	−	−
−	0	4		0	4 (13.3)		−	−	−
+	9	17		3 (10)	23 (76.7)		−	−	−

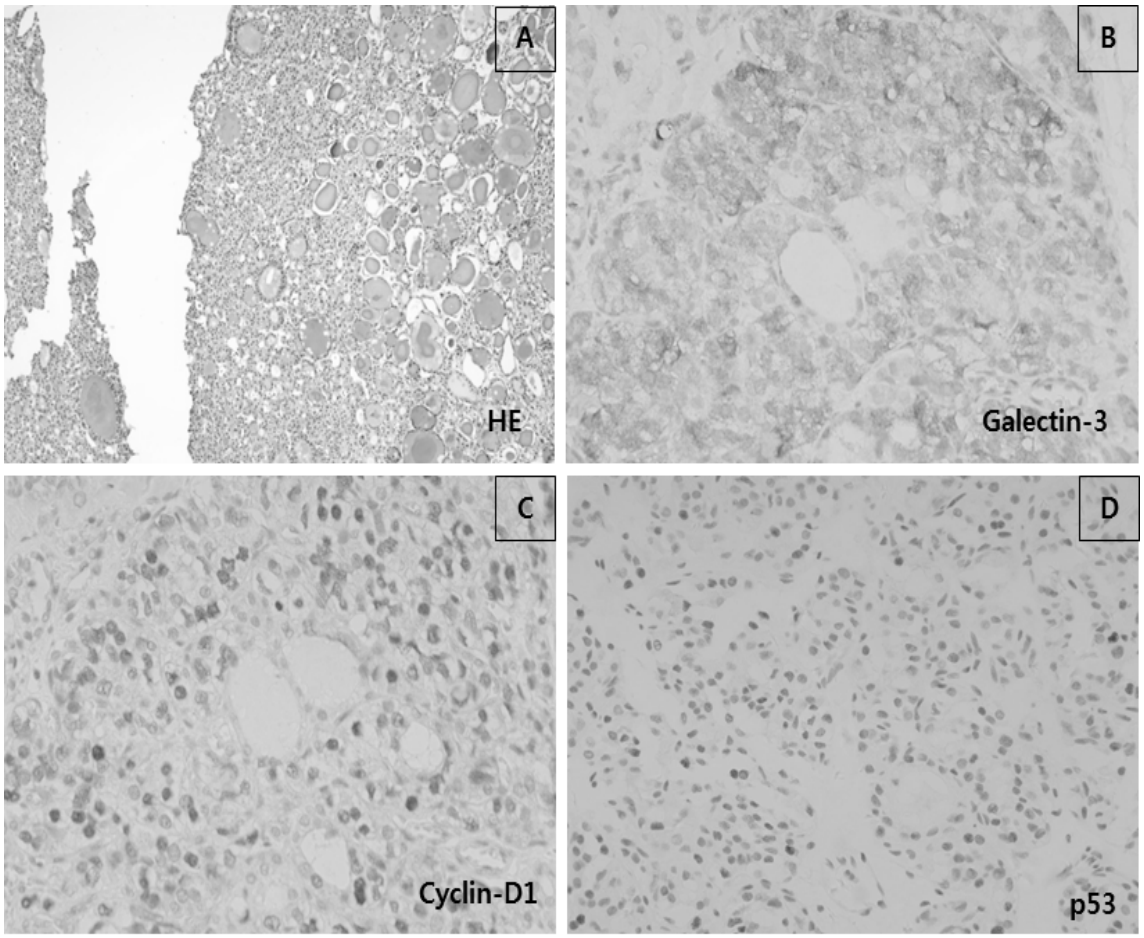

Fig. 2. The expressions of H&E, galectin-3, cyclin D1 and p53 deteched with in Follicular carcinoma (A, ×100; B, ×400; C, ×400; D, ×400).

Table 3. Correlations between expression of p53, galectin-3 and cyclin D1 in follicular carcinoma

	p53 No (%)			Galectin-3 No (%)			Cyclin D1 No (%)		
	−	+	*p*	−	+	*p*	−	+	*p*
p53	−	−	−			0.591			0.002*
−	−	−	−	1 (6.7)	1 (6.7)		2 (13.3)	0 (0)	
+	−	−	−	9 (60)	4 (26.7)		1 (6.7)	12 (80)	
Gal-3			0.591	−	−	−			1.00
−	1 (6.7)	9 (60)		−	−	−	2 (13.3)	8 (53.3)	
+	1 (6.7)	4 (26.7)		−	−	−	1 (6.7)	4 (26.7)	
Cyclin D1			0.002*			1.00	−	−	−
−	2 (13.3)	1 (6.7)		2 (13.3)	1 (6.7)		−	−	−
+	0 (0)	12 (80)		8 (53.3)	4 (26.7)		−	−	−

*Correlation is significant at the 0.05 level ($p<0.05$).

와 cyclin D1의 상관관계는 유의한 차이점은 없었다(Table 3).

고 찰

갑상샘 결절 수술 전에 세침흡인검사를 시행하여 악성 유・무를 확인하지만 양성의 결절성 증식증이나 양성의 소포샘종양과 혼동하기 쉽다. 그러나 galectin-3가 갑상샘의 종양표지자로 사용되므로 양성과 악성의 구분이 용이해졌다. Galectin-3은 정상 갑상샘 조직이나 양성 결절성 증식증 또는 양성 소포샘종에서는 거의 발현하지 않고, 악성 종양에서 과발현되어 유용한 생물학적 표지자로 사용되고 있다(Orlandi 등, 1998). 본 연구에서는 galectin-3는 p53 및 cyclin D1과는 유의한 차이를 보이지 않았지만, 갑상샘의

유두상 암종에서 27예(90%)가 양성으로 발현되었고 여포상 암종에서 5예(33.3)에서 양성으로 발현되어 유두상 암종과 여포상 암종간에 유의한 차이가 있는 것으로 조사되었다. Galectin-3는 갑상샘의 악성종양인 유두상 암종과 여포성 암종을 구분하는데 사용할 수 있고 특히, 여포성형태를 가진 유두상 암종과 여포성 암종을 구분하는데 유용할 것으로 기대된다.

정상의 p53 유전자는 종양억제유전자로 17p13에 위치하며 손상된 DNA의 수복과 세포주기 조절의 경로에 관계하고 세포자연사를 유발시킬 수 있어 종양을 억제한다고 보고되었다(Harris와 Hollstein 등, 1993). 그러나 돌연변이 된 p53은 종양억제유전자의 기능 상실하여 암을 발생시키거나 진행시킬 수 있다(Livingstone 등, 1992). p53은 유두상 암종에서 21예(70%)와 여포상 암종에서 13예(86.7%)가 양성으로 발현되었으며, 두 암종 사이에는 유의한 차이가 없었다. p53의 발현은 유두상 암종에서는 다른 종양표지자와 유의한 차이를 보이지 않았으나 여포성 암종에서 cyclin D1과 정의 상관관계를 보였고 유의성이 있었다.

Cyclin D1 유전자는 11q13에 위치하고 세포의 성장 과정 중 G1-S기 이행에 관여하며 세포분열을 촉진시키며, 특히 갑상샘 종양의 발전과 예후에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Wang 등, 2000). 본 연구에서는 유두상 암종에서 26예(86.7%), 여포상 암종에서 12예(80%)에서 양성률을 나타냈으며, 두 암종 사이에는 유의한 차이가 없었다. 유두상 암종의 다른 종양표지자와 유의성을 보이지 않았으나 여포상 암종에서 p53과 정의 상관관계로 유의성이 있는 것으로 나타났다.

결론적으로 본 연구에서는 galectin-3의 발현은 유두상 암종과 여포상 암종사이에 유의성이 관찰되었고 두 암종을 구분하는 데 유용할 것으로 기대된다. 세포주기와 관련된 cyclin D1과 p53은 유두상 암종에는 유의성이 나타나지 않았으나, 여포상 암종에서 유의한 차이를 보여 두 암종을 구분하는 데 galectin-3와 함께 유용한 종양표지자로 생각된다. 그리고 다른 악성종양에 이용되는 종양표지자를 갑상샘의 악성종양에도 이용한다면 좋은 연구결과를 기대할 수 있을 것이다.

참고 문헌

Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, *et al*. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesion. *Lancet*. 2001, 357:1644-1650.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006, 295:2164-2167.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*. 1993, 329:1318-1327.

Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, *et al*. A mammalian cell cycle check-point pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangietasia. *Cell*. 1992, 71: 587-597.

Kang YK, Kim WH, Jang JJ. Expression of G1-S modulators (p53, p16, p27, cyclin D1, Rb) and Smad4/Dpc4 in intrahepatic cholangio-carcinoma. *Hum Pathol*. 2002, 33:877-883.

Kim KR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in hyman breast epithelial cells. *Cancer Res*. 1999, 59:4148-4154.

Lazzereschi D, Sambuco L, Carnovale-scalzo C, Ranieri A, Mincione G, Nardi F, *et al*. Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinoma. *Int J Cancer*. 1998, 76:806-811.

Leenhardt L, Grosclaude P, Cheeriee-Challine L. Increase incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effect: Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid*. 2004, 14:1056-1060.

Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tilsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992, 70:923-935.

Orlandi F, Saggioratio E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, *et al*. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1998, 58: 3015-3020.

Papotti M, Volante M, Saggiorato E, Deandreis D, Veltri A, Orlandi F. Role of galectin-3 immunodetection in the cytological diagnosis of thyroid cystic papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2002, 147:515-521.

Semenov Dlu, Pozharsskii KM, Boriskova ME, Pankova PA, Mukhina MS, Feshchenko NS. Galectin-3 in diagnosis of thyroid cancer. *Vopr Onkol*. 2008, 54:321-323.

Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol*. 2000, 13:882-887.