

체강 삼출액의 세포학적 검사에서의 p53 면역염색의 유용성

이화여자대학교 의과대학부속 목동병원 폐부병리과

성 순 희 · 한 훈 섭

= Abstract =

p53 Immunoreactivity in the Cytology of Body Cavity Fluid

Sun Hee Sung, M.D. & Woon Sup Han, M.D.

Department of Pathology, Ewha Womans University, Mok-Dong Hospital

Mutant form of the *p53* gene product is abnormally accumulated in the nuclei of the tumor cells due to prolonged half life, and readily detected by immunohistochemical methods. To determine the positivity rate of p53 in body cavity fluid according the primary site and histological types of tumors and the utility of p53 immunostaining as an adjunct in the diagnosis of malignancy, we reviewed 69 effusions, including pleural effusion, ascitic fluid, and pericardial fluid, that were diagnosed as overt malignancy and 21 effusions of suspicious malignancy. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded cell blocks using a monoclonal antibody to *p53* suppressor gene product(Clone DO7) and a standard avidin-biotin complex technique with a citrate buffer antigen retrieval solution. The results were as follows: of the 46 pleural effusions with overt malignancy, 22 were immunopositive for p53 protein; of the 21 ascitic fluids with overt malignancy, 5 were positive for p53. Positivity rates according to the primary sites of tumors were 18 of 34(52.9%), 8 of 21(38.1%), 1 of 9(11.1%) cases of the tumors of the lung, GI tract, and ovary, respectively. According to the histologic types of lung cancer, 11 cases(61.6%) were positive out of 18 adenocarcinomas, 2 of 5 large cell undifferentiated carcinomas, and 1 of 2 small cell undifferentiated carcinomas. Of 21 cases of suspicious malignancy, 6 were positive for p53 and all of them(6/6) were confirmed as adenocarcinoma of the lung or GI tract. These findings indicate that p53 immunostaining using paraffin embedded cell block is useful diagnostic and prognostic marker in body fluid cytology although negative immunostaining does not exclude malignancy.

Key words: p53, Body fluid, Cytology

서 론

삼출액의 세포학적 검사는 흉강, 복강 및 심낭에서 이루어지는데 이 곳의 삼출액은 상태에 따라서는 매우 다양한 또는 비전형적인 세포를 보이기 때문에 악성 종양세포의 존재를 통상적인 H-E 및 Papanicolaou 염색으로 확인하는데 어려울 때가 많다¹⁾. 그러므로 삼출액의 보다 정확한 세포학적 진단 및 종양의 분류를 위하여 면역조직화학적 검색을 사용하여 도움을 받을 수 있다^{2, 3)}. p53 핵단백은 17번 염색체의 단완에 위치하는 유전자로부터 생성되며 정상세포에서는 세포증식을 조절하지만 변이에 의해 기능이 소실되면 손상된 DNA를 가진 세포의 증식을 차단하지 못하여 유방암⁴⁾, 대장암^{5, 6)}, 위암⁷⁾, 폐암⁸⁾, 골육종 등 인체의 여러 주요 장기의 악성종양이 발생한다⁹⁻¹¹⁾. p53 과발현은 종양의 조직형, 등급, 병기와 연관성이 있음이 많이 연구되었고, 종양에서의 p53의 변이의 의미에 대해서는 아직 논쟁의 여지는 있지만 많은 문헌에서 대체적으로 불량한 예후 인자로 간주되고 있다⁴⁻¹¹⁾. 저자들은 삼출액의 세포학적인 검사에서 악성으로 확진된 경우와 악성이 의심되나 여러 조건에 의해 확진하기 어려웠던 예들을 선별하여 파라핀포대 세포블록을 이용하여 p53에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 삼출액의 종류 및 원발종양, 원발종양의 조직학적 분류별 p53의 양성율이 어떠한지를 보고 p53에 대한 면역염색의 결과가 진단에 도움을 주는지를 알고자 본 연구를 시행하였다.

연구재료 및 방법

1. 재료

이화여자대학교 의과대학 부속 목동병원에

서 1995년부터 1997년까지 흉강, 복강 및 심낭 삼출액의 세포학적 검사에서 악성 종양으로 진단되거나 악성종양이 의심되었던 예들 중 원발부위의 조직학적인 진단이 가능하고 파라핀포대 세포블록이 있는 경우 각각 69예와 21예를 대상으로 하였다.

2. 방법

각각의 세포학적 소견 및 조직학적 소견을 재검토하였으며 파라핀에 포대된 세포블록을 5 μ 두께로 microtome을 이용하여 세절하여 유리슬라이드에 부착시켰다. p53에 대한 단클론 항체(clone DO7, 1:50 희석, Dako Carpinteria U.S.A.)를 일차항체로 하였다. 면역조직화학적 염색은 avidin-biotin immunoperoxidase complex 법으로 하였으며 AEC(aminoethyl carbazole)을 이용하여 발색하였고 hematoxylin으로 대조염색하였다. 면역염색 시행전에 항원의 노출을 용이하게 하기 위해 microwave oven법을 이용하였다. 800W로 조절된 전자레인지내의 10 mM citrate buffer(pH 6.0)속에 매 5분씩 4회 가열하였다. 염색 결과의 판정은 핵내에서 뚜렷한 발현을 보인 경우만을 양성으로 판정하였으며 결과는 양성과 음성으로 이분하였다. 매우 약한 양성이거나 의심스러운 경우는 음성으로 판정하였다. 비악성(negative for malignancy)으로 진단되었던 10예를 대조군으로 사용하였다.

결 과

1. 악성으로 확진된 경우 삼출액의 종류별, 원발 장기별 p53 양성율

69예의 악성으로 확진된 경우 중 흉강이 46예, 복강이 21예, 심낭이 2예이었으며 이중 각각 22예(47.9%), 5예(23.8%), 1예에서 p53 염색

Table 1. Immunoreactivity for p53 in body cavity fluid cytology according to the primary site

Primary sites	No. of positive cases/ Total No. of cases(%)	
Pleural cavity		
Lung	17/31	(54.8)
Stomach	2/7	(28.6)
Colorectum	2/4	(50)
Breast	1/2	(50)
Ovary	0/2	(0)
Peritoneal cavity		
Stomach	2/6	(33)
Colorectum	2/4	(50)
Ovary	1/9	(11.1)
Lung	0/1	(0)
Pancreas	0/1	(0)
Pericardial cavity		
Lung	1/2	(50)
Total	27/69	(39.1)

에 양성이었다(Table 1). 흉강에서의 악성세포의 원발장기는 폐가 31예, 위가 7예, 대장이 4예, 유방 2예, 난소 2예였으며 이 중 p53의 양성을 보인 경우는 폐가 17예(54.8%), 위 2예(28.6%), 대장 2예(50%), 유방 1예(50%)였고 난소암의 p53의 발현은 없었다. 한편 복강에서는 위가 6예중 2예, 대장이 4예중 2예, 난소가 9예중 1예에서 p53의 발현을 보였고 췌장 1예는 음성이었다. 삼흉액에서의 악성세포는 2예에서 발견되었는데 모두 폐가 원발장기였으며 이 중 1예에서 p53양성이었다. 한편 대조군인 비악성 삼흉액 10예는 모두 p53에 음성이었다.

2. 폐암에서의 p53의 조직학적 유형별 양성율

원발장기가 폐이면서 흉강삼흉액에서 악성세포가 확인된 경우 25예중 조직학적으로 선

Table 2. Positive rates of p53 immunostaining according to the histologic types of lung cancer in effusion cytology

Histologic types of lung cancer	No. of positive cases/ Total No. of cases(%)
Adenocarcinoma	11/18(61.1)
Large cell undifferentiated carcinoma	2/5 (40.0)
Small cell undifferentiated carcinoma	1/2 (50.0)

암종이 18예, 대세포 미분화암종이 5예, 소세포 미분화 암종이 2예였는데 이 중 p53의 양성은 각각 11예(61.1%), 2예(40.0%), 1예(50.0%)였다(Table 2).

3. 삼흉액의 세포학적 진단중 악성이 의심되는 경우의 p53 양성율

삼흉액에서 악성이 의심되는 것으로 진단된 21예중 6예가 p53에 양성이었었는데 이들은 모두 폐 또는 위장관의 선암종이었다.

고 찰

흉강 삼흉액에서의 악성종양의 세포학적 진단은 삼흉액의 특수성 즉 악성세포와 혼동되기 쉬운 활성화된 증피세포, 비전형세포와 유사한 탐식구 등의 증식을 흔히 동반하므로 숙련된 세포학자에게도 매우 어려운 경우가 많다¹⁾. 이러한 경우 진단을 위한 보조수단으로 면역세포화학적 검사를 통하여 악성종양의 진단과 종양의 조직학적 유형을 분류하는데 도움을 얻을 수 있다^{2, 3)}. 실제 암배아항원에 대한 면역염색은 전이성 선암종을 진단하는데 있어 악성 및 양성 증피세포와의 구분에 유용

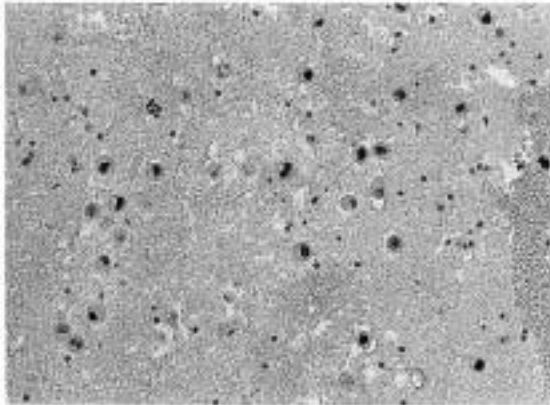


Fig. 1. Immunohistochemistry for p53: Distinct nuclear immunopositivity in a case of pleural effusion of poorly differentiated adenocarcinoma of lung (avidin-biotin immunoperoxidase complex, $\times 200$).

하며^{12, 13} Leu M1(CD15)은 담식구 및 Reed Sternberg 세포, 선암종의 세포에 양성을 보여 증피세포와 구분하는데 쓰이기도 한다¹⁴. B72.3은 유방암의 암세포막에서 추출한 성분으로 이에 대한 항체를 이용한 면역염색으로 유방암의 진단에 있어 좋은 결과가 보고되기도 하였다^{15, 16}. 그 외 상피막항원, CA125, MBr1, MOv2 등이 세포를 이용한 면역화학적 검사에 사용될 수 있으며¹⁷ 악성림프종을 반응성 림프구와 구분하기 위해 림프구 표면항원에 대한 항체의 파넬을 이용하기도 한다^{18, 20}. 삼출액에서 세포의 면역조직화학적 검사를 시행할때 주의하여야 할 것은 양성파 음성의 해석이다. 암배아항원, Leu M1, 전립선특이항원 등이 세포질에서 발현되나 드물게 암배아항원은 다핵백혈구와 교차반응을 일으킬 수 있으므로 해석에 주의가 필요하다. 반면 p53은 핵에 염색되므로 좀 더 명료한 결과를 얻을 수 있음이 장점이다^{2, 21}.

p53 종양억제 유전자의 변이는 인체 악성종양의 가장 흔한 유전적 변화로 여러 장기의 악성 종양에서 파리핀 포배 조직을 이용한 면역조직화학적 연구가 많이 시행되었는데 대장

암에서 30~70%, 유방암에서 약 50%, 위암의 약 30%에서 p53 단백질의 과발현이 보고되고 있다^{4~11}. 조직을 이용한 p53의 연구와는 달리 종양의 세침흡인 또는 삼출액의 세포를 이용한 p53에 대한 연구결과는 그다지 많지 않다. Mayall 등²²은 장애성 체액의 세포검사중 악성 35예 중 17예에서 p53의 과발현이 있는 반면 115예의 양성 삼출액은 모두 p53 음성이라고 보고하였고, Mullick 등²³은 흉강삼출액의 세포 검사에서 악성이었던 75예중 41예(55%)에서 p53 양성이었다고 악성이 의심되는 19예중 3예에서 p53 양성이었으며 이들은 모두 분화가 나쁜 대세포암종으로 확인되었다고 보고하여 삼출액에서의 p53의 면역염색이 진단에 도움이 될을 시사하였다. 또한 이들의 p53 양성율은 조직을 이용한 면역화학염색의 결과와 유사하여 세포학적 검사를 통한 p53의 변이여부의 평가가 신뢰도가 높음을 반증한다고 할 수 있겠다. 그 외에도 객담²⁴, 폐장종양의 세침흡인 세포학적 검사²⁵, 방광의 이행상피세포암종의 요세포학적 검사²⁶에서도 p53의 면역염색이 시도되어 좋은 결과를 보고하였다. King²⁷은 악성종양에 의한 삼출액에서 p53, B72.3, c-erb-B2 등 면역화학염색의 파넬을 이용하여 기존의 형태학적 검사에 의한 진단의 민감도를 70%에서 98%로 올릴 수 있었음을 보고하였다. 본 연구에서는 흉강의 삼출액에서 47.9%로 높은 p53 양성율을 보였으나 복강의 삼출액에서는 23.8%로 다소 저조하였는데 이는 복강 악성 삼출액의 많은 예의 원발장기가 p53의 변이율이 낮은 난소기원이기 때문으로 해석된다. 또한 악성이 의심되었으나 확진이 어려웠던 21예중 p53에 양성을 보인 6예가 모두 선암종으로 조직검사서 확인된 점은 첫째, 선암종이 실제 반응성 증피세포의 증식과 구분이 어렵다는 것과 둘째, 악성이 의심되나 확진이 안 되는 경우 p53의 면역염색이 유용함을 시사한다고 할 수 있겠다.

결 론

체강 삼출액의 파라핀포매 세포분획을 이용한 p53에 대한 면역조직화학적 검색은 진단이 어려운 삼출액의 세포학적 진단에 도움을 줄 것으로 판단되며 p53의 과발현 여부를 세포학적 검사만으로 임상 의에게 줄 수 있어 유용할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Koss LG: Diagnostic Cytology. 4th ed, Philadelphia, JB Lippincott Co. 1992, pp 1116-1163
2. Lauritzen AF: Distinction between cells in serous effusions using a panel of antibodies. *Virchows Arch/A* 411:299-304, 1987
3. Mason MR, Bedrossian CWM, Pahey CA: Value of immunocytochemistry in the study of malignant effusions. *Diagn Cytopathol* 3:251-221, 1987
4. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR: Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis. *Hum Pathol* 24:469-476, 1993
5. Hanski C, Bornhoeft G, Shimoda T, et al.: Expression of p53 protein in invasive colorectal carcinoma of different histologic types. *Cancer* 70:2772-2777, 1992
6. Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, et al.: p53 in node negative breast carcinoma: An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 13:821-830, 1995
7. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silverstre F: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 50:859-862, 1992
8. Bodner SM, Minna JD, Jensen SM: Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. *Oncogene* 7: 743-749, 1992
9. Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, et al.: Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699-1703, 1991
10. Crossman J, Schlegel R: p53 in the diagnosis of human neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 83:980-981, 1991
11. Porter PC, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD: Widespread p53 overexpression in human malignant tumors: An immunohistochemical study using methicarn-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 140:145-153, 1992
12. Li CY, Ziesmer SC, Wong YC, Yam LT: Diagnostic accuracy of the immunocytochemical study of body fluids. *Acta Cytol* 33:667-673, 1988
13. Walts AE, Said JW: Specific tumor markers in diagnostic cytology, immunoperoxidase studies of carcinoembryonic antigen, lysozyme, and other tissue antigens in effusions, washes, and aspirates. *Acta Cytol* 27:408-416, 1983
14. Sheibani K, Buttifira H, Burke JS, Rappaport H: Leu-M1 antigen in human neoplasms. *Am J Surg Pathol* 10:227-236, 1986
15. Lauritzen AF: Diagnostic value of monoclonal antibody B72.3 in detecting adenocarcinoma cells in serous effusions. *APMIS* 97:761-766, 1989
16. Szpak CA, Johnston WW, Lonich SC, Kufe D, Thor A, Schlom J: Pattern of reactivity of four novel monoclonal antibodies(B72.3, FS, B1-1, B6.2) with cells in human malignant and benign effusions. *Acta Cytol* 28:356-367, 1984
17. Heyderman E, Strudley I, Powell G, Richardson TC, Cordell JL, Mason DY: A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen(EMA)-E29: A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal EMA antibodies and with another monoclonal antibody HMPG-2. *Br J Cancer* 52:355-361, 1985
18. Johnston WW, Szpak CA, Thor A, Schrom J: Use of a monoclonal antibody as an immunocytochemical adjunct to diagnosis of adenocarcinoma in human effusions. *Cancer* 45:1984-1900, 1985
19. Spriggs AI, Vanhegan RI: Cytological diagnosis of lymphoma in serous effusions. *J Clin Pathol* 34: 1311-1325, 1981
20. Ghosh AK, Spriggs AI, Mason DY: Immunocytochemical staining of T and B lymphocytes in serous effusions. *J Clin Pathol* 38:608-612, 1988
21. Li CY, Lazcano-Villareal O, Pierre RV, Yam LT: Immunocytochemical identification of cells in

- serous effusions: Technical considerations. *Am J Clin Pathol* 88:696-706, 1987
22. Mayall F, Heryet A, Manga D, Kriegeskotten A: p53 immunostaining is a highly specific and moderately sensitive marker of malignancy in serous fluid cytology. *Cytopathol* 8:9-12, 1997
 23. Mullick SS, Green LK, Ramzy I, Brown RW, Smith D, Gondo MM, Cagle PT: p53 gene product in pleural effusions: Practical use in distinguishing benign from malignant cells. *Acta Cytol* 40:855-860, 1996
 24. Tokman MS: Clinical detection of lung cancer progression marker. *J Cell Biochem Suppl* 25: 177-184, 1996
 25. van Es JM, Polak MM, van den Berg FM, Ramsoekh TB, Craanen ME, Hruban RH, Offerhaus GJ: Molecular markers for diagnostic cytology of neoplasms in the head region of the pancreas: Mutation of K-ras and overexpression of the p53 protein product. *J Clin Pathol* 48: 218-222, 1995
 26. Keeley FX Jr, Bibbo M, McCue PA, Bagley DH: Use of p53 in the diagnosis of upper tract transitional cell carcinoma. *Urology* 49:181-186, 1997
 27. King JJ: 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