

위상피의 증식성 병변에서 p53, p21waf1/cip1, Cyclin D1 및 Rb 단백질의 발현

김형중 · 이태진 · 박언섭 · 유재형

중앙대학교 의과대학 병리학교실

Expression of p53, p21waf1/cip1, Cyclin D1 and Rb in Gastric Epithelial Proliferative Lesions

Hyoung-Joong Kim, Tae-Jin Lee, Eon-Sub Park and Jae-Hyung Yoo

Department of Pathology, Chungang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Aberrations of cell cycle-related genes have been reported to contribute to the formation and development of various human tumors. To investigate the gastric carcinogenesis, the expression of cell cycle-related genes (p53, p21waf1/cip1, cyclin D1 and Rb protein) compared to the morphological changes of gastric epithelial lesions were studied. **Methods :** The expression of p53, p21waf1/cip1, cyclin D1 and Rb protein was immunohistochemically studied in a series of surgical specimens including the 36 normal/regenerating lesions and the 127 gastric epithelial proliferative lesions (GEPLs). The gastric epithelial proliferative lesions consisted of 25 regenerating epithelia with atypias (REAs), 27 low grade gastric dysplasias (LGDs), 17 high grade dysplasias (HGDs), 24 early gastric carcinomas (EGCs), and 34 advanced gastric carcinomas (AGCs). **Results :** The frequency of p53 protein overexpression was significantly associated with histologic grades of GEPLs ($p=0.031$); occurring in 4% of REAs, in 14.8% of LGDs, in 23.5% of HGDs, in 41.7% of EGCs and 58.9% of AGCs. The p21 waf1/cip1 immunohistochemical reaction showed superficial eccentric positivity, representing an inverse correlation with histologic grades of GEPLs ($p=0.04$); occurring in 83.4% of normal/regenerating lesions, in 80% of REAs, in 74.1% of LGDs, in 29.4% of HGDs, 20.8% of EGCs and 8.8% of AGCs. Although Cyclin D1 and Rb proteins were expressed highly in the GEPLs, the frequency of both proteins were insignificantly associated with histologic grades of GEPLs ($p=0.092$). However, cases with both the Rb and cyclin D1 positivity were increased with statistical significance along histologic grades of GEPLs ($p=0.044$). **Conclusions :** The altered expression of p53, p21, Rb, and cyclin D1 was considered to be related to dysplastic progression and advancement of malignancy in GEPLs. Therefore, immunohistochemical studies of cell cycle related proteins and a combined analysis may be useful for estimating and following up cases of GEPLs.

Key Words : Gastric epithelial proliferative lesions-p53-p21waf1/cip1-cyclin D-Rb

접 수 : 2002년 5월 16일

게재승인 : 2002년 8월 2일

책임저자 : 이 태 진

우 100-272 서울시 중구 필동 2가 82-1

중앙대학교부속 필동병원 병리과

전화: 02-2260-2094

Fax: 02-2260-2094

E-mail: taejee@chollian.net

위샘암은 우리나라에서 발생하는 악성 종양 중 가장 높은 빈도를 차지하며, 조기 발견을 위하여 내시경을 통한 조직검사가 빈번히 시행되고 있다. 이에 따라 위장 조직에서는 악성 종양을 비롯하여 전암성 병변과 다양한 정도의 형성 장애가 동반된 증식성 병변이 생검 조직에서 관찰되고 있으며, 이러한 병변들과 암증과의 관계를 밝히기 위한 각종 연구가 진행 중이다. 위샘암 발생 과정에서 일어나는 형태학적 변화 중 악성 전환 능력이 있는 형성 장애의 정도는 악성 전환 능력과 비례한다고 알려져 있다. 위샘암을 가지고 장기적으로 추적한 결과를 보면 양성인 위샘암이 악성인 위샘암으로 변형되는 빈도는 약 10%

내지 11%에 이른다고 하였으며 중등도 내지는 고도의 형성 장애 혹은 용모형 구조로부터 점진적인 변형이 악성으로 진행되는 위험 인자라고 제시하고 있다.^{1,2} 이러한 다양한 형태의 증식성 병변에서 위샘암이 발생하기까지는 수많은 단계의 유전적 변화가 있을 것으로 생각되며, 위샘암의 발생 과정에서 다수의 종양유전자와 종양억제유전자의 변이가 언급되고 있고 이와 더불어 세포주기조절과 종양 발생과의 연관성에 대한 연구가 진행 중이다. 과거 수년 동안 세포주기 조절인자에 대한 연구로 정상 세포 주기의 조절 붕괴가 암 발생의 중요한 과정이라고 알려졌고, 이 세포주기 조절에 관여하는 여러 구성 성분의 이상이

여러 형태의 인체 종양에서 보고되고 있다. 세포주기 조절에 관련된 인자로서 cyclin, cyclin-dependent kinase (CDK), 그리고 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) 등이 있으며 이러한 인자들은 여러 유형의 인체 암종에서 연구되고 있다.³ 더구나 암억제 유전자로 알려져 있는 *p53*과 *Rb*가 이들 세포주기 조절 인자와 긴밀한 상호관계를 맺으면서 세포의 분열, 분화, 암발생, 세포자멸 등의 다양한 현상과 연관이 있다는 것이 알려지면서 세포주기 조절기전에 대한 연구의 중요성이 강조되었다.

세포주기 중 G1/S 단계에서 세포주기의 진행을 조절하는 감시문(restriction point)에서의 역할이 중요한데, 이 부분에서 가장 중요한 억제 역할을 담당하고 있는 물질이 망막세포종양(retinoblastoma, *Rb*) 유전자의 산물인 Rb 단백질이다. Rb 단백질은 염색체 13q14에 위치하며 110 kDa의 핵내 인산 단백을 암호화한다. 세포주기에서 Rb 단백질의 역할은 G0/G1 단계에서 저인산화상태로 종양억제유전자로서 활성화되어 있으며 E2F와 같은 전사인자와 결합하고 있어 세포가 S단계로 진행하는 것을 억제하는 것으로 이해되고 있다.⁴ Rb 단백질의 과인산화는 G1/S 이행 과정에서 중요한데, 이 과정에 필수적인 복합체가 cyclin D1/CDK4이다. cyclin D1은 염색체 11q13에 위치하며 세포주기에서 G1 단계의 CDK와 복합체를 형성하여 종양의 발생과 관계가 있다. 이는 cyclin D1 단백질의 변이 혹은 조절 붕괴로 제어할 수 없는 세포증식을 유발하는 데 기여하기 때문이다.^{5,6} 또한 cyclin D1에 의하여 CDK4가 활성화되면 cyclin D1/CDK4 복합체를 형성하게 되는데, 이는 Rb 단백을 인산화시켜 불활성화시킴으로써 세포증식을 초래해서 궁극적으로 암을 유발하게 된다.⁷ 따라서 Rb 단백질은 변이나 결손이 있을 경우 그 산물의 생산이 감소하거나 혹은 기능이 소실되어 G1/S 단계에서 세포주기 조절에 이상을 초래하는데, 이때 CDK4/cyclin D1 복합체가 Rb 단백을 인산화시키면 E2F와 같은 전사 인자가 유리되어 S 단계로의 이행에 필요한 유전자의 전사 활성도를 높여 세포증식을 유발하는 것으로 알려졌다.

한편 세포주기조절에서 *p53* 유전자의 돌연변이는 *p53* 단백질의 과발현과 더불어 *p21waf1/cip1* 단백질 발현소실과 상관관계가 있다. 정상적으로 *p21waf1/cip1* 단백질은 21 kDa 크기의 단백질로 야생형 *p53* 단백질에 의해서 유도되고 cyclin/CDK 복합체를 비활성화시켜 세포주기의 진행을 차단함으로써 정상 *p53* 단백질의 기능을 간접적으로 반영한다고 보고되어 있다.⁸

현재까지 위장에서 샘암종을 가지고 임상 병리학적인 변수와 세포주기 조절인자와의 관련성에 관한 연구는 상당수 보고되고 있으나 임상 및 병리학적인 측면에서 위 상피의 증식성 병변에 따른 발암 과정의 연구는 적다. 이에 본 연구에서는 *p53*, *p21waf1/Cip1*, cyclin D1 및 Rb 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여, 위암종의 발암 단계라고 생각되는 위의 재생상피, 비정형적 재생상피, 저등급과 고등급의 형성이상상피 및 조기위샘암종과 진행위샘암종을 포함하는 위샘암종에서 이들의 발현양상과 상호 관련성을 알아보고자 한다.

재료와 방법

연구 대상과 병리학적 검토

연구 대상은 1995년 1월부터 2001년 5월까지 중앙대학교 의료원에서 내시경적 생검 혹은 위절제술로 얻어진 위장 질환의 파라핀 포매 조직을 선별 및 병리학적인 재검토를 시행하였다. 대한병리학회 소화기병리연구회에서 제시한 위 상피 증식성 병변의 5등급에 따라 심한 염증이나 미란 혹은 궤양병변이 있는 예에서 분명한 재생상피라고 인정되는 부분을 관찰하였다. 이중 분명한 형성이상상피라고 할 수는 없지만 비정형성을 보이는 것을 비정형적 재생상피로 평가하였고 위 상피 형성이상은 저등급과 고등급으로, 위샘암종은 조기위샘암종과 진행위샘암종으로 분류하였다.⁹ 모두 6개의 군으로 위의 정상/재생상피 36예, 비정형적 재생상피 25예, 저등급 형성이상상피 27예, 고등급 형성이상상피 17예, 조기위샘암종 24예, 그리고 진행위샘암종 34예를 가지고 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

면역조직화학적 염색

포르말린에 고정된 후 제작된 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 통상의 탈파라핀화 및 합수과정을 거친 뒤, 조직 절편을 적절하게 전처리한 후 수세하고, 3% 과산화수소수로 20분간 처리하여 0.05 M TBS 완충용액으로 세척한 다음 내인성 과산화수소의 작용을 차단한다. 증류수와 Tris 완충액으로 수세한 후 일차 항체로 *p53* (Zymed, San Francisco, U.S.A.), *p21waf1/cip1* (Neomarkers, Union City, U.S.A.), cyclin D1 (Zymed, San Francisco, U.S.A.), Rb (Zymed, San Francisco, U.S.A.)를 1:500으로 희석하여 표본에 가한 후 60분간 반응시킨다. Biotin과 결합된 이차 항체(labeled streptoavidin biotin kit, DAKO, Glostrup, Denmark)를 10분간 반응시키고 3,3'-diaminobenzidine으로 발색한 후 methyl green으로 대조 염색하고 알코올 탈수 과정을 거친 다음 canada balsam으로 봉입하고 관찰하였다.

결과 판독 및 통계학적 분석

결과 판정은 광학현미경하에서 각각의 세포주기 조절 단백질 1) 핵내에서 세포질보다 진하게 염색된 경우, 2) 종양 세포가 간질 세포보다 진하게 염색된 경우를 양성으로 판정하였으며, 각 군을 대표하는 정상 혹은 증식성 상피 병변 부위의 전체 세포 중에서 5% 이상에서 관찰되었을 때 양성으로 판정하고 5% 미만일 때 음성 발현으로 판정하였다. 핵내에 진하게 반응을 나타낸 경우가 5% 이상 25% 미만이면 제 1양성(1+), 25% 이상 50% 미만이면 제 2양성(2+), 50% 이상이면 제 3양성(3+)으로 세분하였으며, 이중 25% 이상이면 과발현으로 판정하였

다. 통계학적 분석은 SPSS 통계프로그램 (version 8.0, Chicago, U.S.A)을 이용하여 Chi-square test와 student's t test를 시행하였고 Spearman의 상관관계를 분석하였다. 통계적으로 p 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

위점막의 정상/재생성 상피에서의 p53, p21, cyclin D1 및 Rb 단백질의 발현

위점막의 정상/재생상피에서 세포주기 조절 단백질의 발현은 위점막을 크게 세 부위로 구분하였을 때 36예 중에서 p53 단백질은 핵내에 균질하고 진하게 양성 반응을 보인 경우를 관찰할 수 없었으며, 2예의 경우 위샘외부 경부와 기저부에 있는 상피세포의 핵내에 미약하게 반응을 나타내었다. p21 단백질은 36예 중 30예(83.3%)에서 발현을 나타내었는데 모두 점막 표면의 위샘외부에 있는 상피세포의 핵내에 국한하여 균질하게 진한 갈색으로 양성 반응을 보였다. 위샘외부 경부와 기저부에 있는 상피세포에서 핵내에 미약하게 반응을 보인 경우는 3예에서 관찰되었다. Rb 단백질은 위샘외부 경부 및 기저부에 위치한 세포의 핵질에 비균질하면서 미약하게 반응을 나타냈으며, 36예 중 모두 29예(80.5%)에서 관찰되었다. 위점막 고유 샘 상피에서는 한 예에서만 핵질에 비균질하게 반응을 나타내었다. cyclin D1 단백질은 대부분에서 음성 발현을 보였으며(20/36, 55.5%) 점막 표면 위샘외부 상피, 위샘외부 경부 및 기저부, 그리고 고유 샘 상피에

위치한 세포의 핵에 각각 4예, 6예 및 6예에서 비특이적으로 미약하게 반응을 나타냈는데, 세포질에만 미만성으로 반응을 나타낸 경우도 관찰되었다(Table 1)(Fig. 1).

위 상피 증식성 병변에서 세포 주기 조절 단백질 p53, p21, Rb 및 cyclin D1 단백질의 발현

정상/재생상피를 제외한 위 상피 증식성 병변들에서 4가지 세포주기 조절 단백질의 발현을 분석하였을 때 우선, p53 단백질은 조기위샘암종 10예(41.7%)와 진행위샘암종 20예(58.9%)에서 핵내에 진하게 갈색으로 양성 반응을 보였으며 종양의 대부분에서 미만성으로 관찰되는 과발현을 나타내었다. 고등급 형성장애 상피에서는 모두 4예로 23.5%에서 핵내에 양성 발현을 보였으나, 저등급 형성이상상피에서는 4예인 14.8%에서 핵내에 양성 발현을 나타내었다(Fig 2A, B). 25% 이상에서 발현을 나타낸 과발현은 양성 발현을 나타낸 4예의 고등급 형성이상상피에서 1예가 있었으나, 저등급 형성이상상피에서 p53 단백질의 과발현은 관찰할 수 없었다. 25예의 비정형적 재생상피에서는 1예(4%)에서만 양성 발현을 나타내었다. p53 단백질은 위 상피 증식성 병변의 등급과 통계학적으로 유의한 상관성을 나타내었다(Table 2). p21 단백질 발현을 보면 비정형 재생상피에서는 20예(80.0%), 저등급 형성이상상피에서는 20예(74.1%), 고등급 형성이상상피에서는 5예(29.4%), 조기위샘암종에서 5예(20.8%), 진행위샘암종에서는 3예(8.8%)에서 핵내에 갈색으로 진하게 양성 발현을 보였으며, 양성 발현은 대부분 각각의 증식성 병변의 표면에 있는 세포핵에서 관찰할 수 있었다. 각각의 위 상피 증식성 병변

Table 1. Immunohistochemical reactions of p53, p21, Rb, and cyclin D1 in normal/regenerating epithelia of the stomach

	Normal/regenerating epithelia (n=36)			
	Negative (%)	Superficial foveolar epithelia positive (%)	Regenerating neck or base zone epithelia positive (%)	Proper glandular epithelia positive (%)
p53	34 (94.3)	0 (0)	2 (5.7) ^a	0 (0)
p21	3 (8.3)	30 (83.4)	3 (8.3) ^a	0 (0)
Rb	6 (16.7)	0 (0)	29 (80.5) ^a	1 (2.8) ^a
cyclin D1	20 (55.5)	4 (11.1) ^a	6 (16.7) ^a	6 (16.7) ^a

^a: The immunohistochemical reactions are not relevant to the positive criteria given in this study.

Table 2. Expressions of cell-cycle regulatory gene products in gastric epithelial proliferative lesions

	Gastric epithelial proliferative lesions					p value
	REA (n=25) ^a positive (%)	LGD (n=27) ^a positive (%)	HGD (n=17) ^a positive (%)	EGC (n=24) ^a positive (%)	AGC (n=34) ^a positive (%)	
p53	1 (4.0)	4 (14.8)	4 (23.5)	10 (41.7)	20 (58.9)	0.031
p21	20 (80.0)	20 (74.1)	5 (29.4)	5 (20.8)	3 (8.8)	0.044
Rb	10 (40.0)	21 (77.8)	13 (76.5)	20 (83.3)	26 (76.5)	NS
cyclin D1	16 (64.0)	12 (44.4)	10 (58.8)	17 (70.8)	23 (67.6)	NS

REAs: regenerating epithelia with atypia, LGDs: low grade gastric dysplasias, HGDs: high grade gastric dysplasias, EGCs: early gastric carcinomas, AGCs: advanced gastric carcinomas, ^apositive: positive cells >5% among relevant cells of each gastric epithelial proliferative lesion.

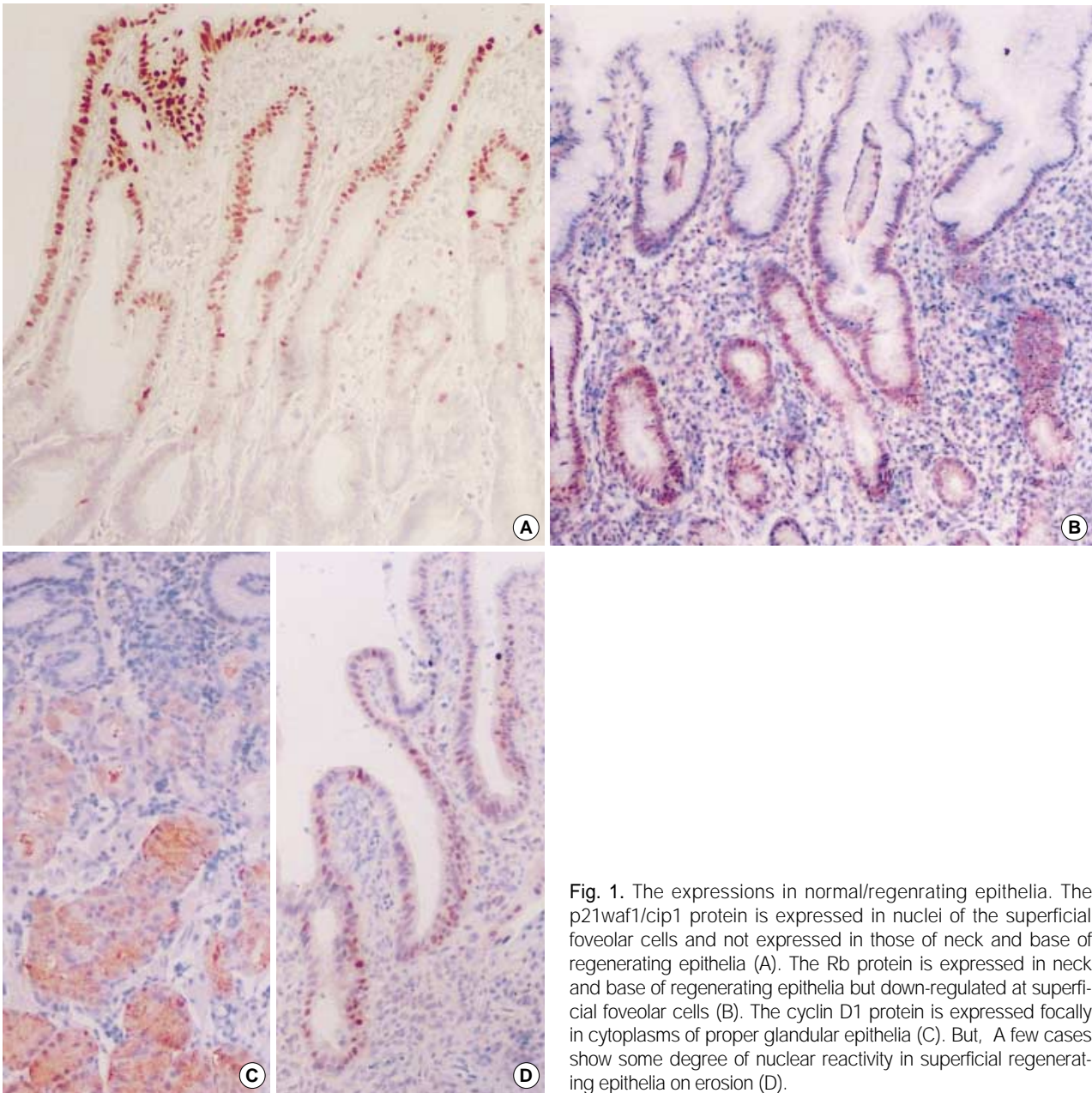


Fig. 1. The expressions in normal/regenerating epithelia. The p21waf1/cip1 protein is expressed in nuclei of the superficial foveolar cells and not expressed in those of neck and base of regenerating epithelia (A). The Rb protein is expressed in neck and base of regenerating epithelia but down-regulated at superficial foveolar cells (B). The cyclin D1 protein is expressed focally in cytoplasm of proper glandular epithelia (C). But, A few cases show some degree of nuclear reactivity in superficial regenerating epithelia on erosion (D).

에서 p21 단백질의 발현 소실은 위 상피 증식성 병변의 등급이 올라갈수록 증가하는 경향을 보였는데 이는 통계적으로 유의하였다(Table 2)(Fig. 2C, D).

Rb 단백질의 발현은 비정형적 재생상피에서 10예(40.0%), 저등급 형성이상상피에서 21예(77.8%), 고등급 형성이상상피에서 13예(76.5%), 조기위샘암종에서는 20예(83.3%), 그리고 진행위샘암종에서는 26예(76.5%)로 나타나 위 상피 증식성 병변의 등급에 따른 양성 발현율에 있어서는 통계학적 의미가 없는 것으로 나타났다(Table 2). cyclin D1 단백질에 있어서도 Rb 단백질 발현과 마찬가지로 양성 발현율에 있어서는 위 상피 증식성 병

변의 등급에 따른 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 2).

그러나 Rb 단백질과 cyclin D1 단백질 발현에 있어서 반정량적인 평가를 했을 때 Rb 단백질의 고발현(>25%)은 비정형적 재생상피와 저등급 형성이상상피에서는 없었으나 고등급 형성이상상피에서 3예로 11.1%의 빈도로 시작하여 조기위샘암종에서는 8예(33.3%), 진행위샘암종에서는 15예(44.1%)로 나타났다(Fig 2E, F). cyclin D1 단백질의 고발현(>25%)은 비정형적 재생상피에서는 나타나지 않았으며 저등급 형성이상상피에서 1예(3.7%), 고등급 형성이상상피에서 1예(5.9%), 조기위샘암종에서 4예(16.7%), 진행위샘암종에서 7예(20.6%)로 나타났다

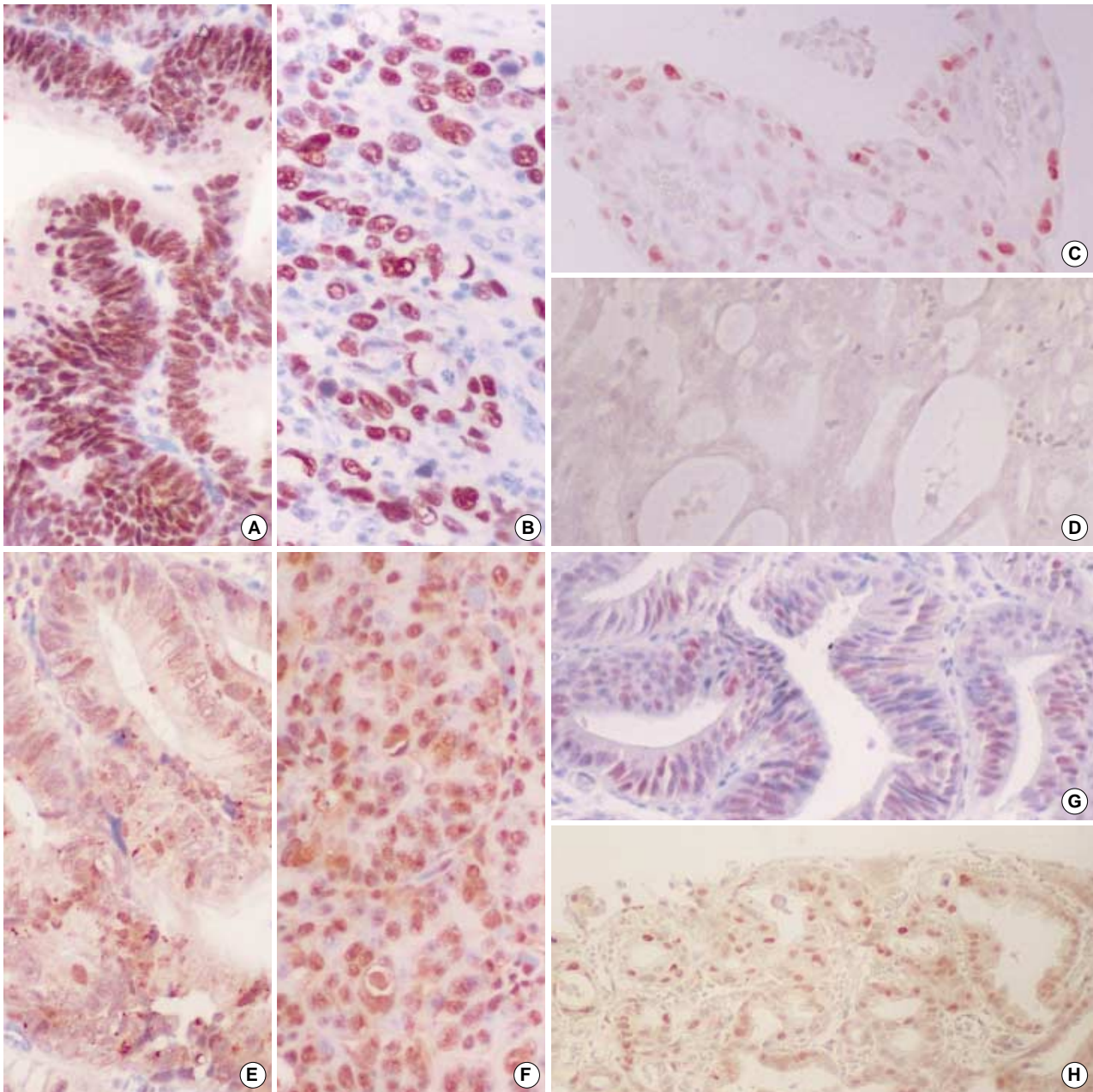


Fig. 2. The expressions in dysplasia and carcinoma. The p53 overexpression is noted in nuclei of high grade gastric dysplasias (A) and overt adenocarcinomas (B). In advanced gastric carcinomas, the p21waf1/cip1 protein is expressed on the surface of tumor cell nuclei (C) but the p21waf1/cip1 protein expression loss is noted in center area of the tumors (D). The Rb protein is overexpressed in the nuclei of high grade gastric dysplasias (E) and overt carcinomas (F). The cyclin D1 protein expression is noted in nuclei of low grade gastric dysplasias (G) and early gastric carcinomas (H). (Fig. 2. Continued next)

(Table 3)(Fig. 2G, H, I).

Rb 단백질과 cyclin D1 단백질의 발현을 연관시켜 상관관계를 보았을 때 샘암종 중 진행위샘암종에서는 cyclin D1 단백질과 Rb 단백질이 동시에 양성 발현을 보인 예는 21예로 61.8%, cyclin D1 단백질 발현이 없으면서 Rb 단백질 발현 역시 소실된 예는 6예로 17.6%로 나타나 진행위샘암종에서 Rb 단백질과 cyclin D1의

단백이 서로 양의 상관관계를 나타내었으며 이는 통계학적인 유의성을 보였다. 또한 형성이상상피 중 고등급 형성이상상피에서 두 단백질이 동시에 양성 발현을 보인 예는 6예(35.3%)로 나타났고 두 단백질이 동시에 발현 소실을 보인 경우는 없는 것으로 나타나 통계적인 유의성은 없었으나, 저등급 형성이상상피와 비교했을 때 고등급 형성이상상피에서 두 단백질 사이에 양의 상관성

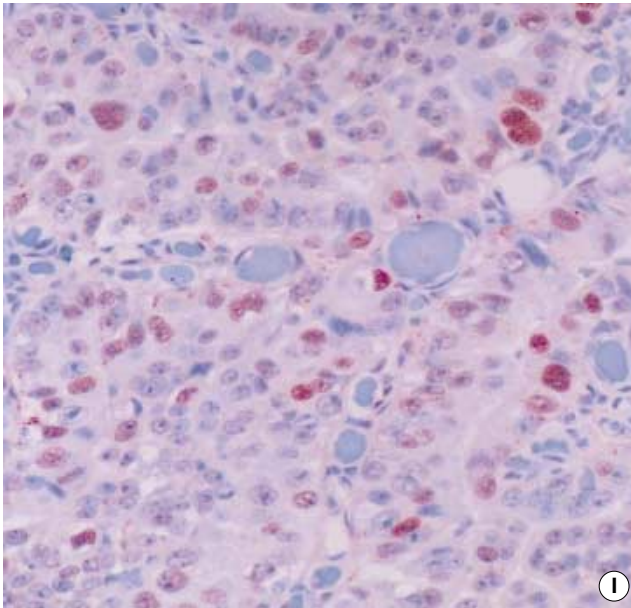


Fig. 2. (Continued from the previous page) In advanced gastric carcinomas, the cyclin D1 protein is overexpressed in tumor cells invading proper muscle layer (I).

Table 3. Semiquantitative evaluation of the cyclin D1 and Rb expression in gastric epithelial proliferative lesions

	cyclin D1 expression		Rb expression	
	Low-expression (5-25%)	High-expression (>25%)	Low-expression (5-25%)	High-expression (>25%)
REAs (n=25)	16 (64.0%)	0	10 (40.0%)	0
LGDs (n=27)	11(40.7%)	1 (3.7%)	21 (77.8%)	0
HGDs (n=17)	9 (52.9%)	1 (5.9%)	10 (58.8%)	3 (11.1%)
EGCs (n=24)	13 (54.2%)	4 (16.7%)	12 (50.0%)	8 (33.3%)
AGCs (n=34)	16 (47.5%)	7 (20.6%)	11 (32.4%)	15 (44.1%)

GEPLs: gastric epithelial proliferative lesion, REAs: regenerating epithelia with atypia, LGDs: low grade gastric dysplasias, HGDs: high grade gastric dysplasias, EGCs: early gastric carcinomas, AGCs: advanced gastric carcinomas.

Table 4. Correlation between cyclin D1 and Rb protein in gastric epithelial proliferative lesions

	cyclin D1 expression									
	REAs (n=25)		LGDs (n=27)		HGDs (n=17)		EGCs (n=24)		AGCs (n=34)	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Rb (-)	6 (24.0)	9 (36.0)	4 (14.8)	2 (7.4)	0 (0)	4 (23.5)	1 (4.2)	3 (12.5)	6 (17.6)	2 (5.9)
Rb (+)	3 (12.0)	7 (28.0)	11 (40.7)	10 (37.0)	7 (41.2)	6 (35.3)	6 (25.0)	14 (58.3)	5 (14.7)	21 (61.8)
p value	NS		NS		NS		NS		0.007	

REAs: regenerating epithelia with atypia, LGDs: low grade gastric dysplasias, HGDs: high grade gastric dysplasias, EGCs: early gastric carcinomas, AGCs: advanced gastric carcinomas.

을 보이는 경향을 나타내었다(Table 4).

Rb 단백질 양성 발현을 보이면서 cyclin D1 단백질 양성 발현을 보인 경우와 두 단백질 중 어느 한 단백질 양성이거나 두 단백질 발현이 없는 경우에 있어서 위 상피 증식성 병변에 따른 상관관계를 분석하였을 때 두 단백질 동시에 양성을 보인 예는 비정형적 재생상피에서는 7예(28.0%), 저등급 형성이상상피에서는 10예(37.0%), 고등급 형성이상상피에서는 6예(35.3%), 조기위암에서는 14예(58.3%), 그리고 진행위암에서는

21예(61.8%)로 관찰되었으며 위 상피 증식성 병변의 등급과 통계학적 유의성이 있는 상관관계를 보였다(Table 5).

고찰

최근의 위암 발생 과정에 관한 연구를 보면 위암 발생에 있어서 여러 기능적 및 생물학적 변수들이 논의되고 있다.

Table 5. Relationships between cases of both the Rb-positive and cyclin D1-positive expressions and others in gastric epithelial proliferative lesions

	Gastric epithelial proliferative lesions (n=127)					p value
	REA (n=25)	LGD (n=27)	HGD (n=17)	EGC (n=24)	AGC (n=34)	
Rb (+)/cyclin D1 (+)	7 (28.0%)	10 (37.0%)	6 (35.3%)	14 (58.3%)	21 (61.8%)	0.044
others	18 (72.0%)	17 (63.0%)	11 (64.7%)	10 (41.7%)	13 (38.2%)	

REAs: regenerating epithelia with atypia, LGDs: low grade gastric dysplasias, HGDs: high grade gastric dysplasias, EGCs: early gastric carcinomas, AGCs: advanced gastric carcinomas.

Hirata 등¹⁰은 *H. pylori*가 cyclin D1 발현을 활성화하고 활성화된 cyclin D1이 세포의 중앙원성 변형에 기여하는 것과 관련하여 *H. pylori* 감염으로 인한 cyclin D1의 활성화와 세포주기의 가속화를 세포의 악성화에 기여하는 요소로 보고하고 있으며, 김 등¹¹은 SNU-16세포주를 이용한 연구에서 transforming growth factor- β 1이 초기 G1단계를 정지시키며 동시에 caspase-3 활성화를 자극하여, p21, p27 및 Rb의 분해로 왜해된 세포주기 정지와 비정상적인 CDK2 활성화를 유발한다고 하여 궁극적으로는 CDK2 활성화가 발암 과정에서 중요한 단계이며 비가역적인 세포자멸사에 이르게 한다고 하였다. 이러한 인자들의 대부분은 세포증식과 세포사멸사의 조절과 관련되어 있거나, 또는 이들이 세포 성장 인자와 그 수용체에 직접 작용한다고 여겨지고 있다.

본 연구에서 p53 단백질 발현은 정상/재생상피에서는 발현이 없었고 비정형성 재생상피에서는 4.0% (1/25), 그리고 저등급 형성이상상피에서는 14.8% (4/27)로 나타났지만 고등급 형성이상상피에서는 23.5% (4/17), 조기위샘암은 41.1% (10/24), 그리고 진행형 위샘암중에서는 58.9% (20/34)로 나타났다. 또한 p53 단백질의 발현 상태를 보면 비정형성 재생상피나 저등급 형성이상에서는 미약하게 국소적으로 발현되었고 고등급 형성이상상피와 샘암종에서는 미만성으로 핵에 균질하게 진하게 염색되는 빈도가 훨씬 높았다. 이전 연구에 의하면 p53 단백질의 발현은 저등급 형성이상을 지닌 위샘종에서 보다 고등급 형성이상을 지닌 위샘종에서 더 높았음을 보였는데, p53 유전자의 변이가 위샘종의 형성이상상피의 진행에 관여한다고 보고하였다.¹² p53 유전자의 상태를 고려할 때 지금까지 보고되었던 잘룩창자-곧창자암에서의 연구를 보면, 5% 이상의 면역조직화학적 양성 발현을 나타낸 잘룩창자-곧창자암 세포는 대부분 p53 유전자의 돌연변이를 지니고 있다고 하였다.¹³ 또한 Wang 등¹⁴은 p53 유전자의 돌연변이와 단백질 발현의 상관성과 관련한 연구에서 p53 유전자의 돌연변이가 위샘암종 발생과정에 기여할 수 있다고 보고하였다. 따라서 비정형성 재생상피에서 p53 단백질의 발현된 경우와 형성이상상피에서 p53 단백질의 발현이나 과발현은 전암성 병변으로 간주하여 주의 깊은 추적 관찰이 필요하다.

최근 보고에 의하면 p53 유전자의 돌연변이는 p53 단백질의 과발현과 더불어 p21waf1/cip1 발현소실과 상관관계가 있다고 하

였다.⁸ 정상적으로 p21waf1/cip1 단백질은 21 kDa 크기의 단백질로 야생형 p53 단백질에 의해서 유도되며, cyclin/CDK 복합체를 비활성화시켜 세포주기의 진행을 차단해서 정상 p53 단백질의 기능을 간접적으로 반영한다고 볼 수 있다. 하지만 p21 단백질은 정상 p53 단백질의 기능을 간접적으로 반영하기도 하나, p53 단백질과는 별개로 약물, 성장억제제 및 분화 유도제로 인하여 유도될 수 있다고 보고되고 있어 중앙억제유전자로서 p53과는 무관하게 기능할 가능성도 제기되고 있다.¹⁵ 또한 p21waf1/cip1은 완전히 분화된 세포에서 더 이상의 성장을 하지 못하도록 유지하는 데 중요한 역할을 한다고 보고되고 있으며 세포 자멸사, 노화 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. p21waf1/Cip1 단백질의 발현이 감소하는 경우 위샘암종 환자에서 생존율이 떨어지고 중앙이 보다 악성으로 진행한다는 상관관계가 제시되고 있다. p21 단백질의 면역조직화학적 발현 양상은 정상 대장 상피에서 보면 상피세포의 증식성과 역 상관관계를 보였으며 정상 대장 상피의 종말 분화도와 직접적으로 관련을 나타내었다.¹⁶ 본 연구에서 p21 단백질의 발현은 위점막의 정상/재생상피에서 30예에서 나타났으며 전체 36예 중에서 83.4%의 발현율을 나타냈다. 비정형성 재생상피에서는 20예로 80.0%의 발현율을 나타내었고 저등급 형성이상에서 20예(74.1%), 고등급 형성이상에서는 5예(29.4%)로 나타나 형성이상상피에서 저등급과 고등급에서 p21 단백질의 발현의 차이를 보였다. 조기위샘암중에서는 5예(20.8%), 진행위샘암중에서는 3예(8.8%)로 관찰되어 형성이상상피와 샘암종에서 각각 형성이상상피의 정도와 샘암종의 진행도에 따라 p21 단백질 발현의 차이를 보였다. 최근에 보고된 바에 의하면 인체의 다양한 암종에서 연구한 결과 p21 유전자 돌연변이는 없는 것으로 나타나 면역조직화학적으로 검출되는 p21 단백질은 야생형 단백질이라 할 수 있다.¹⁷ 따라서 정상적으로는 야생형 p53 단백질의 기능이 하위 단백질(downstream protein)인 야생형 p21 단백질과 관련이 있으며, p21 단백질이 p53 단백질을 중심으로 세포주기 조절에 관여한다고 볼 수 있다.

Rb 단백질은 염색체 13q14에 위치하며 정상 조직에서 발현하는 110 kDa의 핵내 인산 단백질을 암호화하며 세포주기 조절기전에서 성장 억제 역할을 하는 주요인자로 중앙 발생에 관여한다.¹⁸ Rb 유전자의 이상 혹은 결손은 유전성 망막모세포종 환자의 암종에서 처음 발견되었으며, 망막모세포종 환자에서 육종의 발생률이 높은 점으로 보아 Rb 유전자의 결손이 육종의 발생과

도 연관이 있을 것이라는 보고도 있다. 지금까지 일부 육종 및 육종의 세포주에서 Rb 유전자의 결손이나 재배열 등이 산발적으로 보고되었으며 이는 돌연변이를 검색함으로써 알게 되었다.¹⁹ 그러나 Rb의 기능적 불활성화는 유전자 변화가 없어도 Rb 단백질이 인산화되었을 때 나타나는데 Rb 유전자 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 염색법은 원인에 관계없이 결과적으로 초래되는 활성 단백질의 소실을 검출해 내는 데 민감한 방법이다.

지금까지 각 종양의 악성도나 예후에 미치는 Rb 단백질의 발현 양상은 종양의 종류에 따라 또 연구자에 따라 서로 다르게 보고되고 있다. 즉 조직학적 등급이 증가할수록 Rb 단백질 발현이 감소하는 예도 있고 반대로 증가하는 경향을 보이기도 하였다. 전자의 경우 Rb 유전자의 변이나 결손 등으로 설명하고 후자의 기전으로는 종양 세포의 성장을 억제하기 위해 이차적으로 Rb 단백질이 증가한다는 것으로 설명하고 있다.²⁰ 또한 Rb 단백질 발현 감소는 조직학적 악성도와 상관이 없다는 보고도 있다.²¹ 예후와의 연관성도 일치된 결과를 보이지 않고 있는데, 예를 들어 유방암의 경우 조직학적 등급 III에서 Rb 단백질이 발현이 빈번하게 감소되어 불량한 예후와 관련을 맺었으나 다른 연구에 의하면 암종의 크기가 작거나 림프절 전이가 없는 군에서 오히려 발현 감소가 증가하여 좋은 예후 인자라고 하였다.^{22,23}

본 연구에서 실시한 Rb 단백질의 면역조직화학적 발현을 보면 위점막의 정상/재생상피에서, Rb 단백질은 표층에 있는 위샘외부 상피세포의 핵에서는 발현 소실을 보이거나 발현 감소를 보였고 위샘외부 경부 및 기저층에 있는 세포에서는 핵내에 비교적하게 양성 발현을 나타내었다. 정상 위 점막의 상피세포에서 Rb 단백질은 점막의 표층부에 있는 위 샘외부 세포에서는 하향 조절되고 위 샘외부 경부나 기저부에서는 발현이 유지되어 정상 위 점막의 상피세포에서 Rb 단백질은 위 샘외부 표층부에서 발현이 감소되고 세포자멸사로 경로를 유도하여 정상적인 위 점막 상피세포의 항상성을 유지시킨다고 볼 수 있다. Yamamoto 등²⁴은 인체 정상 대장 점막에서 Rb 단백질이 장샘의 중간부와 기저부에서는 발현이 유지되었으나 장샘의 표층부에서는 의외하게 발현이 감소됨을 관찰하고 Rb 단백질의 하향 조절이 인체 잘록창자 점막에서 장샘의 표층에서 일어남을 보고하였는데, 본 연구에서 정상 위 점막 상피에서도 Rb 단백질은 같은 발현 양상을 보였다. 위 상피 증식성 병변에서는 Rb 단백질 발현을 보면 비정형적 재생상피에서 10예(40.0%), 저등급 형성이상상피에서 21예 (77.8%), 고등급 형성이상상피에서 13예(76.5%), 조기위샘암중에서는 20예(83.3%), 그리고 진행위샘암중에서는 26예(76.5%)로 나타나 위 상피 증식성 병변의 등급에 따른 양성 발현율에 있어서는 유의한 차이를 보이지는 않았다. 그러나 Rb 단백질 발현에 있어서 반정량적인 평가를 했을 때 Rb 단백질의 과발현(>25%)은 비정형적 재생상피와 저등급 형성이상상피에서는 없었으나 고등급 형성이상상피에서 3예로 11.1%의 빈도로 시작하여 조기위샘암중에서는 8예(33.3%), 진행위샘암중에서는 15예(44.1%)로 나타났다. 이는 고등급 형성이상상피와 샘암종의 세포에서는 Rb

단백의 발현 수준 조절이 변형되어 있음을 시사한다고 할 수 있다. 대장 조직을 가지고 한 이전 연구에서 보면 잘록창자암 조직에서 RB-1 mRNA 수준이 정상 대장 점막보다 높고 동시에 인산화된 Rb 단백질이 증가한다는 것은 잘록창자암의 발생 과정에서 활성화된 Rb 단백질이 유지되고 있으며 상향 조절됨을 나타내고 있고, 따라서 잘록창자 및 곧창자 세포는 기능적인 Rb 단백을 가지고 있다는 것을 암시한다고 하였다.²⁵ 본 연구에서 조기 위샘암중과 진행위샘암중에서 Rb 단백질의 과발현은 같은 맥락에서 볼 때 기능성 Rb 단백질 발현이 높게 나타났다고 할 수 있고, 이런 현상은 Rb 단백질의 발현을 유지 혹은 과발현 함으로써 암세포가 세포자멸사로부터 벗어날 수 있도록 하는 것이며 결국 Rb 단백질 발현은 실제로 위샘암중에서 변형된 세포 생존을 유도하여 종양 세포의 증식을 초래한다고 볼 수 있다. 대장암 연구에서 보인 것과 마찬가지로 위샘암중에서도 RB-1의 소실이나 돌연변이가 없다는 것이고 위샘암중 발생과정에서 RB-1의 비활성화보다는 기능성을 지닌 Rb 단백질의 조절이 변형되어 나타난다고 예측할 수 있다.

cyclin은 세포주기의 여러 단계에서 서로 다른 CDK와 연관된 단백질이다. cyclin 계열 단백질은 cyclin A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E로 구성되고 세포주기 G1, S, G2, M 단계에 따라 발현의 변화로 인하여 세포주기의 진행에 관여한다.²⁶ 더욱이 cyclin D1은 증식 신호에 대한 감지기 역할을 하며 과발현 자체가 암 발생 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁷

본 연구에서 정상/재생상피에서의 cyclin D1 단백질의 발현을 보면 55.5%에서는 발현 소실을 보였다. 점막의 표층부 위샘외부 상피, 위샘외부 경부 및 기저부 그리고 고유 샘 상피에 있는 세포의 핵과 세포질에 미약하게 양성 반응을 나타낸 반면, 위 상피의 증식성 병변에서는 발현율이 높게 나타남을 알 수 있다. 이전의 연구에서 보면 결장 점막의 상피성 병변에서 cyclin D1 발현은 결장 샘종과 샘암중에서 핵 발현이 34%와 30%로 나타났으며 정상 조직에서는 핵에서 발현되지 않고 세포질에 발현되었으며 샘암중 주변의 형성이상상피에서는 85%에서 세포질에 발현되었다고 하였다.²⁸ 25% 이상의 세포 핵에 양성을 보인 cyclin D1의 과발현은 저등급 형성이상상피에서 1예(3.7%)를 시작으로 진행위샘암중에서는 7예로 20.6%의 발현율을 나타내어 cyclin D1의 과발현이 위상피 증식성 병변에서 생물학적인 악성도와 연관성을 지닌다고 추정할 수 있다. 이전 보고에 의하면 위샘암중에 있어서 cyclin D1은 약 20%에서 과발현이 나타나는 것으로 알려졌다.²⁹ 이는 본 연구에서 cyclin D1의 과발현율이 54예 중 11예로 19.0%에서 나타난 것과 유사한 발현율을 나타내었다. 또한 cyclin D1 단백질 과발현은 저등급 형성이상상피에서 나타나기 시작하였고 Rb 단백질의 과발현은 고등급 형성이상상피에서 나타났는데, 위 상피 증식성 병변에서 cyclin D1의 과발현이 시기적으로 초기에 일어난다고 추정할 수 있다.

cyclin D1 단백질과 Rb 단백질의 발현의 상관관계를 보면 진행 위샘암중에서는 분명한 양의 상관성을 나타내어 cyclin D1의 과

발현과 Rb 단백질의 과발현이 샘암종의 진행성에 기여를 한다고 볼 수 있다. 또한 이 두 가지 단백질이 동시에 양성 발현을 보인 예를 보면 위 상피 증식성 병변의 등급이 올라감에 따라 증가하는 경향을 보였고 이는 통계학적인 유의성이 있었다. 크게 형성 이상상피와 샘암종 상피에서 두 단백질이 동시에 발현을 보인 예가 형성 이상상피에서는 16예(36.3%)이지만 샘암종에서는 35예(60.3%)로 더욱 높았으며 분명한 양의 상관성을 나타내었다. 결국 cyclin D1과 Rb 단백질의 과발현은 위 상피 증식성 병변의 등급이 상승하는 데 있어서 어느 한 단백질의 기여가 요구된다고 할 수 있고, cyclin D1 단백질이 위 상피 증식성 병변의 변화 중에서 비교적 이른 시기에 발생하고 특히 샘암종에서는 두 단백질이 서로 양의 조절 관계를 나타내며 두 단백질이 동시에 과발현을 보인다는 것이 형성 이상상피와는 다른 면이라고 할 수 있다. 본 연구에서 조기위샘암종과 진행위샘암종에서 Rb 단백질의 과발현은 기능성 Rb 단백질 발현이 높게 나타났다고 볼 수 있는데 이런 현상은 Rb 단백질의 발현을 유지 혹은 과발현시킴으로써 암세포가 세포자멸사로부터 벗어날 수 있도록 하는 것이다. 여기에 cyclin D1의 과발현이 또한 밀접한 관계를 지닌다고 예측할 수 있고 이런 연관성으로 위샘암종 발생 과정에서 RB-1의 비활성화보다는 기능성을 지닌 Rb 단백질의 조절이 변형되어 나타나며, 이 두 단백질은 서로 양의 조절 관계를 나타내어 이전 연구에서 나타난 장액낭샘암종에서 조직학적 등급이 높을수록 감소하는 것과는 대조적이라고 볼 수 있다.

위 점막의 정상/재생상피에서 p53 단백질의 발현은 나타나지 않으며 p21 단백질은 샘외부의 기저부나 경부의 상피세포에서는 발현되지 않고 표층부의 세포 핵에 발현되어 위 점막에서 상피세포의 종말 분화도와 내강에 접하고 있는 표층부 세포의 세포정지와 관련된 역할을 한다고 볼 수 있다. p21 단백질 발현 소실은 위 상피 증식성 병변의 등급이 증가함에 따라 그 빈도가 증가하였다. Rb 단백질은 정상 위 점막에서는 재생성의 상피세포인 위 샘외부 기저부와 경부의 세포핵에서 발현되고 표층부에서 발현이 감소되어 표층부 세포의 세포자멸사로 유도하여 결국 위 점막의 항상성을 유지하는 역할을 한다고 볼 수 있다. 고등급 형성 이상상피와 샘암종에서의 Rb 단백질의 과발현은 조절 이상으로 인한 기능성 Rb 단백질의 증가로, 형성 이상상피와 샘암종 세포의 세포자멸사로의 경로를 벗어나 더욱 높은 증식성을 나타내는 것과 관련이 있으며 이는 cyclin D1의 과발현과 상관관계가 있다. 위샘암종의 발생과정에서 p53의 과발현 즉 p53의 돌연변이가 중요한 역할을 하며 세포 주기 조절의 이상을 초래하게 되고 p21 단백질 발현 소실과 Rb 단백질의 과발현, 그리고 cyclin D1 단백질의 과발현이 또한 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다. 따라서 위 상피 증식성 병변에서 여러 세포 주기 조절 관련 단백질의 발현 유무와 조합 분석은 형성 이상상피의 진행과 샘암종의 진행성을 예측하는 데 도움이 될 것이다.

결론적으로 위 상피 증식성 병변에서 p21 단백질 발현의 소실과 p53, Rb 및 cyclin D1 단백질의 과발현이 형성장에 상피에서 샘

암종으로의 진행에 영향을 미친다고 생각하며, 위 상피 증식성 병변에서 세포주기 조절 단백질 발현의 관찰은 형성 이상상피의 진행과 샘암종의 진행성을 예측하는 데 유용한 인자라고 생각한다.

참고문헌

- Orlowska J, Jarosz D, Pachlewski J, Butruk E. Malignant transformation of benign epithelial gastric polyps. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2152-9.
- Kolodziejczyk P, Yao T, Oya M, *et al.* Long term follow-up study of patients with gastric adenomas with malignant transformation: An immunohistochemical and histochemical analysis. *Cancer* 1994; 74: 2896-907.
- Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* 1998; 82: 2407-9.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-30.
- Peters G. The D-type cyclins and their role in tumorigenesis. *J Cell Sci* 1994; 18: 89-96.
- Keyomarsi K, Pardee A. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1112-6.
- Kamp A. Cell cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 1995; 11: 136-40.
- Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, *et al.* Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 1996; 180: 122-8.
- Kim HG, Jin SY, Jang JJ, *et al.* Grading System for Gastric Epithelial Proliferative Diseases Standardized Guidelines proposed by Korean Study Group for Pathology of Digestive Diseases. *Korean J Pathol* 1997; 31: 389-400.
- Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, *et al.* Helicobacter pylori activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. *Infect Immun* 2001; 69: 3965-71.
- Kim SG, Kim SN, Jong HS, *et al.* Caspase-mediated Cdk2 activation is a critical step to execute transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 1254-65.
- Joynt BV, Newman EL, Hopwood D, *et al.* Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1993; 170: 279-83.
- Costa A, Marasca R, Valentini B, *et al.* p53 gene point mutations in

- relation to p53 nuclear protein accumulation in colorectal cancers. *J Pathol* 1995; 176: 45-53.
14. Wang JY, Lin SR, Hsieh JS, *et al.* Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan. *Anticancer Res* 2001; 21: 513-20.
 15. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54: 3391-5.
 16. Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, *et al.* p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: Its relationship with differentiation. *J Pathol* 1996; 179: 248-53.
 17. Shiohara M, EL-Deiry WS, Wada M, *et al.* Absence of WAF1 mutation in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 84: 3781-4.
 18. Bernardis R, Schackleford GM, Gerber MR, *et al.* Structure and expression of the murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6474-8.
 19. Stratton MR, Williams S, Fisher C, *et al.* Structural alterations of the RB1 gene in human soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1989; 60: 202-5.
 20. Reissmann PT, Simon MA, Lee WH, Salmon DJ. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 1989; 4: 839-43.
 21. Trudel M, Mulligan L, Cavenee W, Margolese R, Cote J, Gariepy G. Retinoblastoma and p53 gene product expression in breast carcinoma: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 1992; 23: 1388-94.
 22. Dubulin EA, Patel NK, Gillett CE, Smith P, Peters G, Barnes DM. Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and clinicopathological parameters. *Int J Cancer* 1998; 79: 71-5.
 23. Berns EM, de Klein A, van Putten WL, *et al.* Association between RB-1 gene alterations and factors of favorable prognosis in human breast cancer, without effect on survival. *Int J Cancer* 1995; 64: 140-5.
 24. Yamamoto H, Soh J, Monden T, *et al.* Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1805-15.
 25. Gope R, Gope ML. Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human colon cancer. *Mol Cell Biochem* 1992; 110: 123-33.
 26. Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-60.
 27. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374: 131-4.
 28. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, *et al.* Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996; 110: 669-74.
 29. Takano Y, Kato Y, Masuda M, Ohshima Y, Okayasu I. Cyclin D2, but not cyclin D1, overexpression closely correlates with gastric cancer progression and prognosis. *J Pathol* 1999; 189: 194-200.