

## 질북창자곧창자 샘암종에서 p21 단백질, p53 단백질, Ki-67 단백질의 발현 및 세포자멸사

박영의 · 최경찬 · 손진희<sup>1</sup> · 최영희  
신형식

한림대학교 의과대학 병리학교실  
강북삼성병원 병리과

접 수 : 2002년 7월 12일  
게재승인 : 2002년 8월 27일

책임저자 : 최 경 찬  
우 200-704 강원도 춘천시 교동 153  
한림대 춘천성심병원 해부병리과  
전화: 033-252-9970  
Fax: 033-256-4161  
E-mail: kcchoi@hallym.ac.kr

\*본 연구는 1999년 한림대학교 교비 지원  
으로 이루어졌음.

### Expression of p21, p53 and Ki-67, and Apoptosis in Colorectal Adenocarcinoma

Young Euy Park, Kyung Chan Choi, Jin Hee Sohn, Young Hee Choi  
and Hyung Sik Shin

Department of Pathology, Hallym University College of Medicine, Chuncheon, Korea

**Background** : The purpose of this study is to assess the roles of p21 protein, p53 protein, and Ki-67 expressions and apoptosis in colorectal tumorigenesis. **Methods** : Fifty-seven colorectal cancers and 15 villotubular adenomas were investigated by immunohistochemical staining for p21 protein, p53 protein, Ki-67, and in situ labeling of apoptotic cells. Clinicopathologic values (tumor size, histologic grade, Dukes stage, and lymph node metastasis) were compared with the incidence of expressions of p21 protein and p53 protein, index of Ki-67 expression, and apoptosis. **Results** : The incidence of p21 protein expression was decreased with lymph node metastasis ( $p < 0.005$ ), and that of p53 expression was increased with lymph node metastasis ( $p < 0.005$ ). There were no statistically significant correlations among the p21 protein or p53 protein expressions, tumor size, histologic grade and stage. The correlation between the Ki-67 labeling index and the clinicopathologic values was not statistically significant. The labeling index of apoptosis was increased with the Astler-Coller stage ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis revealed a significant inverse correlation between the p21 protein and p53 protein expressions ( $p < 0.05$ ). **Conclusions** : It is suggested that p21 protein, p53 protein and the apoptotic labeling index are useful variables for the prognostic assessment of colorectal adenocarcinoma. Down-regulation of p21 protein expression may be associated with poor prognosis. Also, the expressions of p21 protein and p53 protein may play an important role in the tumorigenesis and progression of the colorectal adenoma-carcinoma sequence.

**Key Words** : Colorectal Neoplasms-Immunohistochemistry-Apoptosis

대장암종은 구미에서 더 많이 발생하는 위장관 종양이나, 우리나라에서의 발생률도 점차 증가하는 추세로 악성 종양 중 남녀 모두 제 4위를 차지한다.<sup>1</sup> 이와 같이 증가하는 추세에 있는 대장암종의 경우 빠른 시기에 발견하고 암의 발생이나 전이 유발에 결정적인 영향을 주는 인자를 찾아 치료를 하면 좋은 예후를 가질 수 있으므로, 각종 예후 인자들을 찾아서 이들 물질의 발현 양상의 변화를 관찰하거나, 치료에 이용하려는 시도가 계속되고 있다.<sup>2,3</sup>

대장암종의 발생 기전은 샘종에서 악성 변화를 통해 암종으로 전환하며 육안상 장관내로 돌출하는 종괴를 형성하는 경우와, 선상 침몰 내지는 편평한 모양을 보이는 경우의 두 가지가 있

다.<sup>4</sup> 첫 번째 기전을 소위 '샘종-암종 연쇄'라고 하는데, 정상 세포로부터 세포가 증식하면서 K-ras 원종양유전자의 활성화와 APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colon carcinoma), 그리고 p53 같은 종양억제 유전자의 불활성화를 포함한 여러 종양유전자와 종양억제유전자의 변화가 축적되어 다단계 과정을 거쳐 샘암종이 발생한다.<sup>5</sup> 이와 달리 샘종을 동반하지 않은 함몰된 대장암종이 보고된 이래 조직학적으로 샘종을 거치지 않고 정상 점막에서 직접 암종으로 전환하는 대장암종이 보고되고 있다.<sup>6</sup> 이 종류의 대장암종은 폴립형의 암종과 달리 초기에 침윤성 성장을 하며, 분자생물학적으로 다단계적인 유전자 변화를 거치지 않거나 또는 다른 종류의 종양유전자가 관여하는

것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> 이런 유전자 변화는 발암의 단계에 따라 다르며 암이 진행되는 동안 종양 세포들은 일련의 유전자 변화를 통해 침윤성과 전이 능력을 얻게 되고, 원발종양에서 탈락한 종양 세포는 결합 조직과 기저막을 뚫고 림프절이나 혈관에 들어가 인접 장기를 침범하거나 원격 전이를 일으킨다. 이런 일련의 과정에는 다양한 유전자의 변형이 수반되며, 최근에 종양의 형성 및 성장과 암종의 침윤에 관여하는 다양한 종양표지자에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

세포분열 주기의 변화는 성장조절 경로의 변화를 일으켜 종양성 전환의 특징이 되며, cyclin dependent kinase (cdk) 억제자로 불리는 많은 종류의 단백질들이 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 이것을 불활성화 시킴으로써 세포주기 진행의 억제제를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 최근에는 거의 모든 종류의 암종에서 발견되며 생물학적 악성도와 연관이 있는 종양억제유전자인 p53 단백질과, cdk 억제자의 하나인 p21 단백질이 잘룩창자곤창자암의 발생 과정에서 어떠한 역할을 하는지를 밝히고자 하는 연구가 진행되었고,<sup>8</sup> 세포의 증식과 세포자멸사간의 불균형이 잘룩창자곤창자암의 발생과 진행에 관여할 것으로 추정하기도 한다.<sup>9</sup> 따라서 잘룩창자곤창자암에서 p21 단백질과 p53 단백질, 세포표지자수 및 세포자멸사지수수를 함께 추적하여 이들 인자들의 발현과 상호 관련성을 검색하는 것이 필요할 것으로 생각되며, 이에 대해서 최근까지 발표된 예는 많지 않다.

잘룩창자곤창자암종에서 환자의 예후는 환자의 연령, 종양의 크기, 병소의 조직학적 분화도, 발생 장소, 침윤 정도, 림프절 전이 유무, Dukes 혹은 Astler-Coller병기, DNA ploidy 상태 등의 소견과 종양유전자 발현 등이 관련되어 있다.<sup>8,10</sup>

저자들은 잘룩창자곤창자 샘종과 샘암종을 대상으로 면역조직화학적 염색을 통해 p21 단백질과 p53 단백질의 발현 빈도, Ki-67 세포 표지자수 및 세포자멸사지수수를 비교하고 상관관계를 추적하였다. 특히 p21 단백질 발현과 세포자멸사지수가 잘룩창자곤창자 종양의 발생 과정에 어떤 역할을 하는지를 알아보고 여러 임상-병리학적 예후 인자와 어떤 상관관계가 있는지를 밝혀 환자의 치료 및 예후 추정에 도움을 주고자 하였다.

## 재료와 방법

### 재료

1996년 1월부터 2000년 2월까지 잘룩창자곤창자 샘암종으로 진단되어 한림대학교 의과대학 부속 춘천성심병원에서 대장절제술을 시행한 예 중 수술 전 방사선 요법이나 약물 요법 등의 보조적 치료를 받지 않았고, 파라핀 블록의 보존상태가 양호하고 환자의 임상적 자료검색이 가능한 샘암종 57예, 샘종 15예를 선택하였다. 대조군으로는 각 환자의 정상 대장 조직을 포함하였다.

### 방법

#### 임상소견 및 병리조직학적 검색

잘룩창자곤창자 샘암종을 world Health Organization (WHO) 분류에 의거하여 고분화, 중등도 분화 및 저분화성 샘암종과 점액암종으로 분류하였다. 환자의 임상기록과 병리 보고서들을 재검토하여 나이, 성별, 위치, 종양의 크기를 확인하였고, 침습 깊이와 림프절 전이 및 원격 전이 유무에 따라 변형된 Dukes 병기법에 의거하여 A-D군으로 나누었다. 내시경 검사상 내강내로 폴립형으로 돌출하고 병리학적 검사상 증착된 핵으로 구성된 샘들의 증식이 있는 샘종에서 기원하면서 주위 조직으로 침윤하는 경우를 폴립성 암종으로 구분하였고, 내시경 검사상 편평하거나 함몰된 모양을 보이고 병리학적으로 주위에 샘종이 없이 침윤하는 경우를 침윤성 암종으로 구분하였다.

#### 면역조직화학염색

10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매한 조직을 4 μm의 두께로 박절하였다. 항온기에서 56-58°C로 30분간 건조시킨 후 실온에서 파라핀을 제거한 뒤 다단계 농도의 알코올로 탈수시켰다. 파라핀 절편을 내인성 과산화효소 활성을 억제하기 위하여 methanol에 0.3% 과산화수소수를 사용하여 30분간 처리한 후 인산염완충액으로 2-3회 세척하였다. p21과 Ki-67 단백질은 10 mM의 구연산완충액으로 세척 후 극초단파에 5분씩 3회 처리하고 실온에서 식힌 후 인산염완충액으로 5분씩 3회 세척하였고, p53 단백질은 37°C 항온기에서 0.1% trypsin 용액(DAKOPATTS)에 30분간 처리 후 인산염완충액에 세척하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위하여 정상 차단 양혈청(DAKO kit 1:5)으로 15분간 전처리하였다. 일차 항체인 p21 (purified mouse anti-human p21 monoclonal antibody, 1:100, Pharminogen, San Diego, CA, U.S.A.), p53 (DO7, 1:70; Novocastra, Clarendon Place)과 MIB-1 (Monoclonal mouse anti-Ki-67 nuclear antigen, CA, U.S.A.)을 4°C에서 약 10-12시간 반응시킨 후 DAKO-LSAB kit를 이용하여 biotinylated antibody와 과산화효소가 부착된 streptavidin을 결합시켰다. 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride 용액으로 5분간 발색 과정을 거친 후 헤마톡실린 원액(Biomed)으로 대조 염색하여 봉입제로 봉입하고 광학현미경하에서 관찰하였다. 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 정상 양혈청을 처리하였다.

#### 세포자멸사 염색: TdT-mediated d-UTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

In-situ apoptosis detection kit (TaKaRa Shyzo Co. Ltd, Japan)을 사용하였다. 파라핀 조직 절편을 탈파라핀하여 proteinase K (20 μg/mL)로 실온에서 20분간 처리한 후 세척액으로 세척하였다. 다음으로 실온에서 5분간 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in methanol)로 내인성 과산화효소를 차단하였다. 세척 후 얼음 위에

서 2-5분간 permeabilization buffer를 처리한 후, 습도가 유지되는 37°C chamber에서 fluorescein-dUTP (TdT+labeling safe buffer)로 90분간 반응시켰다. 세척 후 Anti-FITC HRP conjugate를 습도가 유지되는 37°C chamber에서 30분간 항체 반응 후, DAB (5 mg/mL, in Tris buffer, pH 7.0)로 실온에서 10-15분간 발색하였고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 양성 대조군으로는 편도를 같은 방법으로 검사하였고, 음성 대조군으로는 fluorescein-dUTP (TdT+labeling safe buffer)에서 TdT 효소처리를 하지 않은 것을 사용하였다.

#### 판독과 통계처리

각 항체에 대한 면역조직화학염색의 결과는 핵에 갈색의 과립상이 보이는 세포를 양성으로 판정하였고, p21 단백질과 p53 단백질 발현의 결과 평가는 양성인 세포가 전혀 없는 경우 0, 1-25%인 경우 1+, 26-50%인 경우 2+, 50-75%인 경우 3+, 75% 이상인 경우 4+ 분류하였다. 그리고 p53 단백질 발현은 핵의 염색 강도를 약양성, 중양성, 강양성으로 나누었고, 특히 염색 강도가 균일하지 않는 경우는 가장 염색이 뚜렷한 부위를 선택하였다. 양성 판정 기준은 염색 강도와 양성인 세포를 동시에 고려하여 약양성이면서 1+ 이상인 것으로 하였다. Ki-67 및 세포자멸사는 염색된 세포의 밀도가 높은 3-5개의 400배 시야에서 1,000개의 중양세포 중 핵이 갈색으로 염색된 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다.

통계처리는 Windows 용 SPSS version 7.5 (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.) 프로그램을 이용하여 chi-square test와 Kruskal-Wallis test를 시행하였고, Spearman의 상관관계 분석을 시행하였다. 통계적 유의성은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

## 결 과

잘룩창자곤창자 샘종과 샘암종의 남녀 성비는 1.2:1 (샘종: 1.3:1, 샘암종: 1.1:1)로 남자가 약간 많았으며 평균 연령은 61.3세(샘종: 62.2세, 샘암종: 60.4세)였다.

#### 임상적 소견에 따른 폴립성 암종과 침윤성 암종의 비교

57예의 잘룩창자곤창자 샘암종을 종양의 성장 양상에 따라 나누었을 때 폴립성 샘암종이 40예(70.2%), 침윤성 샘암종이 17예(29.8%)였다. 폴립성 샘암종 환자의 평균 나이는 60.3세, 침윤성 샘암종은 60.1세였다. 남녀비는 폴립성 샘암종이 1.67:1, 침윤성 샘암종이 0.42:1로 폴립성 샘암종은 남자가, 침윤성 샘암종은 여자가 많았다. 종양의 발병 부위는 오름잘룩창자 12예(21.1%)(폴립성 샘암종 10예, 침윤성 샘암종 2예), 내림잘룩창자 6예(10.5%)(폴립성 샘암종 4예, 침윤성 샘암종 2예), 가로

잘룩창자 2예(3.5%)(폴립성 샘암종 1예, 침윤성 샘암종 1예), 그리고 구불잘룩창자와 곧창자 37예(64.9%)(폴립성 샘암종 25예, 침윤성 샘암종 12예)로, 두 암종 모두 구불잘룩창자와 곧창자에서 가장 많이 발생하였다. 종양의 크기는 5 cm 미만인 27예(47.4%)(폴립성 샘암종 21예, 침윤성 샘암종 6예), 5 cm 이상은 30예(52.6%)(폴립성 샘암종 19예, 침윤성 샘암종 11예)였다. 크기가 클수록 침윤성 샘암종의 빈도가 약간 증가하였으나 통계학적으로 유의하지 않았다. 샘암종의 조직학적 분화도는 고분화 샘암종이 17예(29.8%)(폴립성 샘암종 13예, 침윤성 샘암종 4예), 중등도분화 샘암종이 31예(54.4%)(폴립성 샘암종 20예, 침윤성 샘암종 11예), 저분화 샘암종 5예(8.8%)(폴립성 샘암종 4예, 침윤성 샘암종 1예), 그리고 점액성 샘암종 4예(7.0%)(폴립성 샘암종 3예, 침윤성 샘암종 1예)였다. Dukes 병기에 따라 비교해 보면, A기는 12예(21.1%)(폴립성 샘암종 8예, 침윤성 샘암종 4예), B기는 19예(33.3%)(폴립성 샘암종 17예, 침윤성 샘암종 2예), C기는 22예(38.6%)(폴립성 샘암종 12예, 침윤성 샘암종 10예), 그리고 D기는 4예(7.0%)(폴립성 샘암종 3예, 침윤성 샘암종 1예)였다. 림프절 전이는 폴립성 샘암종 40예 가운데 16예(40.0%), 침윤성 샘암종은 17예 가운데 10예(58.8%)로 침윤성 샘암종에서 림프절 전이 빈도가 더 높았다.

#### 면역조직화학적 소견

p21 단백질 발현과 임상병리학적 특성과의 상관관계(Table 1)

p21 단백질 발현은 정상 점막내 표면 상피세포에서 57예 중 27예(47.4%)가 양성이었다. 샘종은 15예 중 11예(73.3%)가 양성(1+는 6예, 2+는 5예)이었고, 샘암종은 57예 중 35예(61.4%)에서 양성(1+ 28예, 2+ 5예, 3+ 2예)이었다(Fig. 1). 샘암종에서는 종양의 크기가 클수록 p21 단백질 발현의 양성률이 높게 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다. 조직학적 분화도는 고분화 샘암종 17예 중 13예(76.5%), 중등도분화 샘암종 31예 중 17예(54.8%), 저분화 샘암종 5예 중 3예(60%)가 양성을 보여 분화가 좋을수록 p21 단백질 발현이 높은 양성률을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 점액성 샘암종에서는 4예 중 2예(50.0%)에서 양성을 보였다. Dukes 병기간 양성률 차이는 통계학적인 유의성이 없었다. 림프절 전이는 전이된 26예 중 7예(26.9%), 전이가 되지 않은 31예 중 28예(90.3%)가 양성을 보여 전이되지 않은 예에서 p21 단백질 발현의 양성률이 높았으며 통계학적인 유의성이 있었다(p<0.05).

p53 단백질 발현과 임상-병리학적 특성과의 상관관계(Table 1)

p53 단백질 발현은 핵에 국한되어 있으며 세포질내에서는 양성 반응이 관찰되지 않았고, 주변 정상 점막세포에서는 음성이었다. 샘종에서 15예 중 2예(13.3%)가 양성(모두 1+), 샘암종에서 57예 중 36예(63.2%)에서 양성(1+는 14예, 2+는 8예, 3+는 9예, 4+는 5예)이었다(Fig. 2). 양성 발현을 보인 36예의 샘암종

**Table 1.** Correlation between expression of p21, p53, Ki-67 and apoptosis, and clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinomas

	No.	p21 (%)	p53 (%)	KI (%)	AI (%)
Tumor size					
<5 cm	27	13 (48.1)	19 (70.4)	24.73±13.59	0.92±0.65
>5 cm	30	22 (73.3)	17 (56.7)	25.99±12.03	1.23±0.78
Histologic type (WHO)					
W	17	13 (76.5)	9 (52.9)	21.49±9.75	1.13±0.93
M	31	17 (54.8)	22(71.0)	29.99±12.63	1.16±0.66
P	5	3 (60.0)	2 (40.0)	16.21±13.61	0.94±0.48
Mu	4	2 (50.0)	3 (75.0)	17.89±11.81	0.44±0.15
A	12	10 (83.30)	8 (66.7)	32.01±12.97	0.81±0.53
B	19	17 (89.5)	7 (36.8)	22.87±13.26	1.02±0.42
C	22	4 (18.2)	19 (86.4)	26.28±11.27	1.16±0.72
D	4	4 (100)	2 (50.0)	12.66±3.04	1.79±1.78
LN metastasis					
Negative	31	28 (90.3)	14 (45.2)	24.87±13.72	0.93±0.51
Positive	26	7 (26.9)	22 (84.6)	26.02±11.59	1.26±0.91
Total	57	35 (61.4)	36 (63.2)	25.39±12.70	1.08±0.73

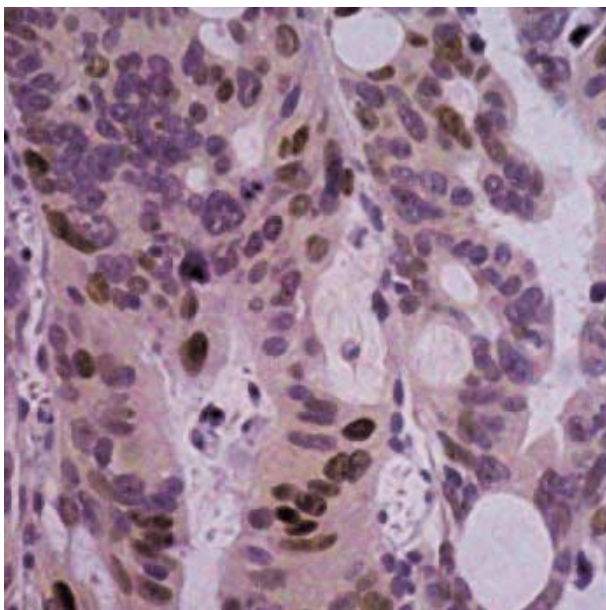
W: well differentiated, M: moderately differentiated, P: poorly differentiated, Mu: mucinous type, KI: labelling index of Ki-67, AI: labelling index of apoptosis, \*: p<0.05, \*\*: p<0.005

의 염색 강도는 약양성이 10예(27.8), 중양성이 17예(47.2%), 강양성이 9예(25.0)였다. 폴립성 샘암종과 침윤성 샘암종은 각각 약양성이 7예와 3예, 중양성이 13예와 4예, 강양성이 3예와 6예로 침윤성 샘암종이 폴립성 샘암종에 비해 강양성의 빈도가 증가하였으며 통계학으로 유의하였다(p<0.05). 염색 강도가 균일하지 못한 경우는 36예 중 5예(13.9%)였다. 림프절 전이는 전이된 26예 중 22예(84.6%), 전이가 안 된 31예 중 14예(45.2%)에서 양성을 보여 p53 단백질이 전이된 예에서 높은 양성률을 보였고, 이는 통계학적으로 유의하였다(p<0.05). 종양의

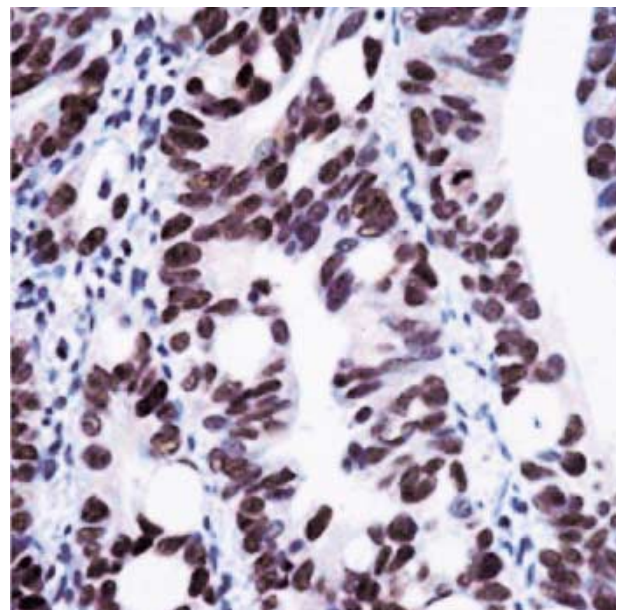
크기, 조직학적 분화도 및 병기에 따른 p53 단백 발현 양성률은 통계학적인 유의성이 없었다.

**Ki-67 발현과 임상-병리학적 특성과의 상관관계(Table 1)**

Ki-67 발현은 세포핵이 뚜렷하게 염색되었으며(Fig. 3), Ki-67 세포표지지수가 샘종에서는 22.18±13.16%, 샘암종에서는 25.39±12.70%였다. 종양의 크기가 클수록 Ki-67 세포표지지수가 경미하게 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 조직학적 분화도는 고분화 샘암종 21.49±9.75%와 중등도분화 샘암종



**Fig. 1.** The immunohistochemical staining for p21 shows intense nuclear staining in the adenocarcinoma.



**Fig. 2.** The immunohistochemical staining for p53 shows intense nuclear staining in the adenocarcinoma.

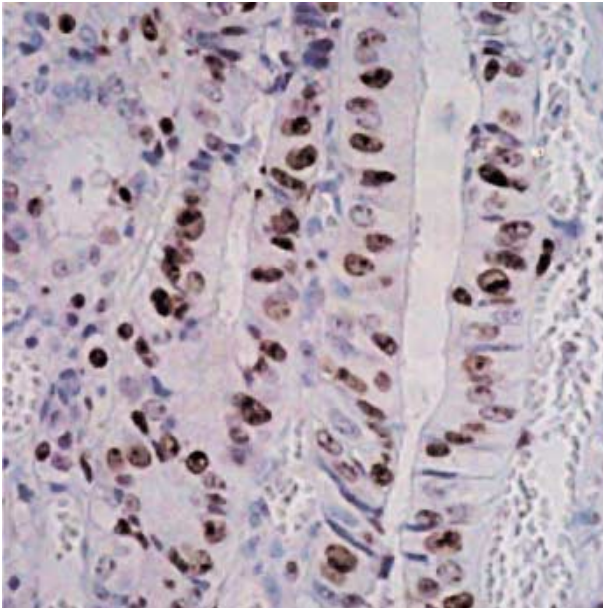


Fig. 3. The immunohistochemical staining for Ki-67 shows intense nuclear staining in the adenocarcinoma.

29.99±12.63%가 저분화 샘암종 16.21±13.61%에 비해 높았으나 통계학적인 유의성이 없었다. 점액성 샘암종에서는 17.89±11.81%였다. Dukes 병기간에는 A기 32.01±12.97%, B기 22.87±13.26%, C기 26.28±11.27%로 D기 12.66±3.04%보다 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 림프절 전이에서는 전이된 예에서 26.02±11.59%로 전이 안 된 예의 24.87±13.72%보다 경미하게 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다.

#### 세포자멸사 발현과 임상-병리학적 특성과의 상관관계(Table 1)

세포자멸사 세포들은 핵이 갈색으로 뚜렷하게 염색되었고 (Fig. 4), 세포자멸사지수는 샘종에서 0.90±0.83%, 샘암종에서 1.08±0.73%였다. 종양의 크기가 5 cm 미만에서 0.92±0.65%, 5 cm 이상에서 1.23±0.78%로 종양의 크기가 클수록 증가하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 조직학적 분화도는 고분화 샘암종 1.13±0.93%, 중등도분화 샘암종 1.16±0.66%, 저분화 샘암종 0.94±0.48%로 변화하였으나 통계학적인 유의성이 없었다. 점액성 샘암종에서는 0.44±0.15%였다. Dukes 병기간에는

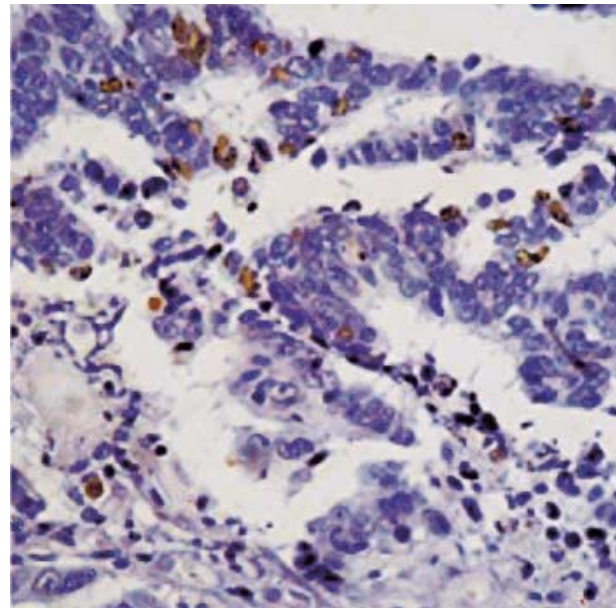


Fig. 4. *In-situ* immunostain for apoptosis shows stained apoptotic cells in the adenocarcinoma.

A기 0.81±0.53%, B기 1.02±0.42%, C기 1.16±0.72%, D기 1.79±1.78%로 병기가 진행할수록 세포자멸사지수가 증가하였고 통계학적인 유의성이 있었다( $p<0.05$ ). 림프절 전이에 따른 통계학적인 유의성은 없었다.

#### 성장 양상과 p21 단백질, p53 단백질 발현과 Ki-67 세포표지지수, 그리고 세포자멸사지수의 상관관계(Table 2)

폴립성 암종 40예에서 p21 단백질 발현은 28예(70%)가 양성(1+는 21예, 2+는 5예, 3+는 2예)이었고, p53 단백질 발현은 23예(57.5%)가 양성(1+는 11예, 2+는 6예, 3+는 5예, 4+ 1예)이었으며, Ki-67 세포표지지수는 24.36±13.66%, 세포자멸사지수는 1.08±0.79%였다. 침윤성 암종 17예 가운데 p21 단백질 발현은 7예(41.2%)가 양성(모두 1+), p53 단백질 발현은 13예(76.5%)가 양성(1+는 3예, 2+는 2예, 3+는 4예, 4+는 4예), Ki-67 세포표지지수는 27.81±10.03%, 세포자멸사지수는 1.09±0.59%였다. p21 단백질은 침윤성 암종보다 폴립성 암종에서 더 높게 발현하였고 p53 단백질은 폴립성 암종보다 침윤성 암종에서

Table 2. Correlation between positive expression of p21, p53 protein, and labeling index of Ki-67, and apoptosis in adenoma, polypoid carcinoma and infiltrative carcinoma

	No.	p21 (%)	p53 (%)	KI (%)	AI (%)
Adenoma	15	11 (73.3)	2 (13.3)	22.18 ± 13.16	0.90 ± 0.83
PA	40	28 (70.0)	23 (57.5)	24.36 ± 13.66	1.08 ± 0.79
IA	17	7 (41.2)	13 (76.5)	27.81 ± 10.03	1.09 ± 0.59
p value		<0.05	<0.05	NS	NS

KI: labelling index of Ki-67, AI: labelling index of apoptosis, PA: polypoid adenocarcinoma, IA: infiltrative adenocarcinoma.

**Table 3.** Correlation between expression of p21 and p53 in colorectal adenocarcinoma,

	p21					total
	- (%)	1+ (%)	2+ (%)	3+ (%)	4+ (%)	
p53 - (%)	0 (0)	17 (29.8)	2 (3.5)	2 (3.5)	0 (0)	21 (36.8)
+ (%)	6 (10.5)	7 (12.3)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	14 (24.6)
++ (%)	5 (8.3)	1 (1.8)	2 (3.5)	0 (0)	0 (0)	8 (14.0)
+++ (%)	7 (12.3)	2 (3.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (15.8)
++++ (%)	4 (7.03)	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (8.8)
	22 (38.6)	28 (49.2)	5 (8.8)	2 (3.5)	0 (0)	57 (100)

p Value<0.05 (p21 vs p53)

발현이 높았는데, 이들 간의 상관관계는 통계학적으로 유의성이 없었다. 그러나 세포표지수, 세포자멸사지수와 성장양상과는 통계학적인 유의성이 없었다.

샘종과 샘암종에서 p21 단백질, p53 단백질 발현과 Ki-67 세포표지수, 그리고 세포자멸사지수와와의 상관관계(Table 2)

샘종 15예에서는 p21 단백질 발현 11예(73.3%), p53 단백질 발현 2예(13.3%)가 양성이고, Ki-67 세포표지수는 22.18±13.16%, 세포자멸사지수는 0.90±0.83%였다. 샘종의 p21 단백질, p53 단백질 발현과 Ki-67 세포표지수, 세포자멸사지수와 폴립성 암종 및 침윤성 암종에서의 p21 단백질, p53 단백질 발현과 Ki-67 세포표지수, 세포자멸사지수의 상관관계를 살펴보았을 때 샘종, 폴립성 암종 및 침윤성 암종으로 갈수록 p21 단백질 발현은 감소하였고 p53 단백질 발현은 증가하였는데, 이는 통계학적으로 유의하였다(p<0.05).

p21 단백질, p53 단백질 발현, Ki-67 세포표지수, 그리고 세포자멸사지수와의 상관관계

샘암종 57예 중 43예(75.4%)에서 p21 단백질 발현과 p53 단백질 발현의 비의존성(역상관) 관계가 관찰되었는데, 21예(36.8%)는 p21 단백질 발현 양성과 p53 단백질 발현 음성이었으며 22예(38.6%)는 p21 단백질 발현 음성과 p53 단백질 발현 양성이었다. 14예(24.6%)는 p21 단백질과 p53 단백질 발현 모두 양성을 보였고(의존성 관계), p21 단백질과 p53 단백질 발현 모두 음성인 예는 없었는데(Table 3), 이는 통계학적으로 유의성이 있었다 (p<0.05). p21 단백질 발현과 Ki-67 세포표지수, p21 단백질 발현과 세포자멸사지수, p53 단백질 발현과 Ki-67 세포표지수, p53 단백질 발현과 세포자멸사지수, Ki-67 세포표지수와 세포자멸사지수 상호간에는 통계학적인 유의성이 없었다.

### 고 찰

대장암종의 예후 인자로는 환자의 연령, 종양의 크기, 병소의 조직학적 분화, 발생 장소, 국소 침윤과 림프절 전이를 포함하는

Dukes병기 혹은 Astler-Coller, 조직학적 유형 및 등급, 종양유전자 발현 등이 있다.

p21 단백질은 세포주기의 역조절자로 세포 노화와 연관이 있어서 샘암종 주변의 정상 점막조직의 표면 상피세포에서 관찰되며, 심부의 증식하는 세포나 기저샘에서는 관찰되지 않는다.<sup>11</sup> p21 단백질 과발현의 생물학적인 의의에 대해서는 다양한 보고들이 있는데, 대장이나 난소의 종양에서는 p21 단백질 과발현이 암종의 진행과 연관성이 있었으며,<sup>11,12</sup> 위암에서는 상반된 결과를 보이는 예들도 있었고,<sup>13</sup> 치료전의 유방암 환자에서는 불량한 예후와 연관성이 있다고 하였다.<sup>14</sup> 잘룩창자근창자 샘암종에서 p21 단백질 발현율은 보고자마다 31-87%로 차이가 있었다.<sup>11,15,16</sup> Yasui 등<sup>11</sup>은 샘종에서 55%가 양성, 샘암종에서 66%가 양성을 보였으며, 병기가 진행할수록, 그리고 림프절 전이된 예에서 p21 단백질 발현율이 뚜렷하게 감소하였음을 보고하였고, Zirbes 등<sup>15</sup>은 샘암종에서 67%가 양성을 보였으며 림프절 전이된 예에서 p21 단백질 발현율이 감소하였으나 나이, 성별, 위치 조직학적 등급, 병기와는 상호 관련성이 없음을 보고하였다. 본 연구에 의하면 샘종에서 73.3%가 양성, 샘암종에서 61.4%가 양성을 보여 샘암종이 샘종보다 높은 양성률을 보인 Yasui 등<sup>11</sup>과 차이를 보였는데, 이에 대해서는 더 많은 증례를 대상으로 동일한 양성 판단 기준을 적용하여 연구를 함으로써 정확한 결과를 얻을 수 있으리라 생각한다. 그리고 본 연구에서 종양의 크기가 클수록 p21 단백질의 양성률이 높았으나 통계학적 유의성은 없었고 조직학적 분화도가 낮을수록 p21 단백질의 양성률이 낮았으나 통계학적 유의성은 없었다. 병기간 양성률 차이는 통계학적 유의성이 없었고, 림프절 전이된 예에서 p21 단백질의 양성률이 유의하게 낮아서 Yasui 등<sup>11</sup>과 Zirbes 등<sup>15</sup>의 결과와 일치하며 이는 예후에 영향을 미치지리라 생각한다. 그리고 샘종 73.3%, 폴립성 암종 70.0%, 침윤성 암종 41.2%의 양성률을 보여 샘종, 폴립성 암종 및 침윤성 암종으로 갈수록 p21 단백질 발현이 유의하게 감소하여 p21 단백질의 저발현이 잘룩창자근창자 샘암종의 진행 과정에 관여할 것이라는 Yasui 등<sup>11</sup>, Zirbes 등<sup>15</sup>의 연구 결과와 부합한다.

p53 유전자에 의하여 발현되는 p53 단백질은 종양억제 유전자의 산물로 발암작용에서의 역할이 다양하다. 최근에는 p53 유전자의 변이나 결손이 대장 이외에도 유방<sup>17</sup>, 방광<sup>18</sup>, 폐<sup>19</sup>에서 기원한 악성 종양에서도 밝혀졌고, p53 유전자 변이 및 결손은 어느 특정 암에서만 일어나는 것이 아니라 인체의 거의 모든 암종에서 나타나는 가장 흔한 유전자변이의 한 형태로 인정되고 있다. 야생형 p53 단백질이 종양 세포의 성장을 억제하는 기전은, 세포주기 중 G1 후반기에 작용하여 세포의 분열을 억제하는 세포분열 과정에서의 음성 조절자로 알려져 있다.<sup>20</sup> 본 연구에서는 샘종보다 샘암종에서 p53 단백질 발현이 많았으나 통계학적으로 유의성이 없었다. 그러나 림프절 전이된 예에서 전이 안 된 예보다 높은 양성률을 보였으며, 이는 통계학적으로 유의하여 p53 단백질 발현이 종양의 전이 능력과 관련이 있음을 간접적으로 제시하였다. 이는 p53 유전자 돌연변이를 동반한 환자에서 원격

전이가 많고 생존율이 낮았다는 보고<sup>21</sup>와 일치하였다. 한편 잘룩창자곤창자의 상피성 증양에서 p53 단백질의 발현율은 보고자마다 차이가 있는데, 샘종의 경우 Purdie 등<sup>22</sup>은 8.7%, 서 등<sup>23</sup>은 16.7%, 문 등<sup>24</sup>은 대롱샘종에서 73%, 용모샘종에서 11%로 보고하고 있고, 샘암종의 경우 Purdie 등<sup>22</sup>은 46.5%, 서 등<sup>23</sup>은 31.3%, 문 등은 폴립성 암종은 79%, 침윤성 암종은 71%로 보고하고 있다. 본 연구결과 샘종에서는 13.3%, 샘암종에서는 38.6% (폴립성 암종 32.5%, 침윤성 암종 52.9%)의 양성률을 보여 샘암종에서 p53 단백질의 발현율이 다소 낮았으며 폴립성 암종과 침윤성 암종 간에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이는 서 등<sup>23</sup>과 문 등<sup>24</sup>의 결과와 일치하는 것이었다. 샘종, 폴립성 암종 및 침윤성 암종으로 갈수록 p53 단백질 발현이 증가한 본 연구 결과는 Kawasaki 등<sup>25</sup>의 연구 결과와 부합되어 p53 단백질이 잘룩창자곤창자 샘암종의 발생 및 악성화에 연관되는 것으로 추정된다.

p53 단백질의 양성 염색은 염색 강도에 대한 검색이 필요한데, 그것은 양성 염색이더라도 강염색이 아니면서 균일하지 못한 염색 양상을 보일 경우 p53 단백질의 과발현이 돌연변이형에 의한 기전이 아닌 것으로 알려져 있다.<sup>26</sup> 본 연구에서는 p53 단백질 발현 양상을 보인 36예 중 5예(13.9%)에서 일부 균일하지 못한 염색 양상을 보였는데 p21 단백질과의 상호관계에서 통계학적 유의성은 없었다. 향후 더 많은 증례에서 검색이 필요할 것으로 생각한다. p21 단백질의 활성화는 DNA 손상에 의한 p53 단백질의 활성화 혹은 여러 가지 성장인자를 포함한 세포의 유사분열 물질에 의한 p53 단백질의 활성화 등 두 가지 서로 다른 경로에 의해서 유도된다.<sup>27</sup> p21 단백질 발현을 p53 의존성 경로로 설명하자면 p21 단백질과 p53 단백질의 염색 양상은 역상관 관계가 되어야 하며, p53 비의존성 경로에서는 p53 단백질과 p21 단백질 염색 양상은 정상관 관계가 되어야 한다. 본 연구에서는 잘룩창자곤창자 샘암종에서 p21 단백질 양성/p53 단백질 양성, p21 단백질 양성/p53 단백질 음성, p21 단백질 음성/p53 단백질 양성, p21 단백질 음성/p53 단백질 음성이 각각 14.0%, 47.4%, 24.6%, 14.0%로, 72.0% 예에서 p21과 p53 단백질 발현의 염색 양상에서 역상관 관계가 관찰되어(p<0.05), p21 단백질이 p53 단백질 의존성 경로를 따른 것으로 시사되며, 28%의 예에서 정상관 관계를 보여 비의존성 경로를 따른 것으로 생각한다. 이는 Pasz 등<sup>8</sup>, Girlando 등<sup>16</sup>과는 일치된 결과를 보였으나, Yasui 등<sup>11</sup>과는 상반된 결과를 보였다. 따라서 잘룩창자곤창자 샘암종에서 p21 단백질의 발현에는 p53 단백질 외에도 많은 요인들이 작용할 것으로 생각되며 더 많은 증례를 대상으로 연구를 함으로써 정확한 결과를 얻을 수 있으리라 생각한다.

Ki-67 세포표지지수는 다양한 종양의 증식능을 측정하는 효과적인 방법으로 잘룩창자곤창자 샘암종의 예후와 관련하여 다양한 결과가 보고되었다. Shepherd 등<sup>28</sup>은 조직학적 분화도와 Ki-67 세포표지지수와의 상관성이 없는 것으로 보고하였고, Akino 등<sup>9</sup>은 고분화 샘암종이 45.3±18.9%, 중등도분화 샘암종

이 47.4±20.1%, 저분화 샘암종이 52.5±18.5%, 그리고 점액성 샘암종은 30.2±18.2%로 점액성 샘암종이 비점액성 샘암종에 비해 Ki-67 세포표지지수가 뚜렷하게 낮다고 하였다. 본 연구에서는 Ki-67 세포표지지수가 고분화 샘암종이 21.49±9.75, 중등도분화 샘암종이 29.99±12.63%, 저분화 샘암종이 16.21±13.61%, 그리고 점액성 샘암종이 17.89±11.81%로 점액성 샘암종이 비점액성 샘암종에 비해 Ki-67 세포표지지수가 낮아서 Akino 등<sup>9</sup>의 결과와 부합하였으나 통계학적인 유의성은 없었다. 종양의 크기, 병기 그리고 림프절 전이와 Ki-67 세포표지지수 간에는 통계학적인 유의성이 없어서 Shepherd 등<sup>27</sup>의 결과와 일치하였다. 샘종, 폴립성 샘암종, 침윤성 샘암종으로 진행할수록 Ki-67 세포표지지수가 다소 증가하였으나 통계학적인 유의성이 없었다

세포자멸사는 괴사와는 다른 형태와 과정을 가진 세포사로 조직의 정상 발달에 많은 영향을 미칠 뿐만 아니라 여러 가지 병적 현상에도 영향을 미친다. 따라서 세포자멸사는 정상 세포와 종양 세포의 형태 발생, 면역 조절 및 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. Akino 등<sup>9</sup>은 고분화 샘암종이 1.1%±0.8%, 점액성 샘암종이 1.6%±1.0%로 보고하였다. 본 연구에서는 고분화 샘암종이 1.13±0.93, 중등도분화 샘암종이 1.1±0.66%, 저분화 샘암종이 0.94±0.48%, 그리고 점액성 샘암종이 0.44±0.15%로 점액성 샘암종이 비점액성 샘암종보다 높게 나타난 Akino 등<sup>9</sup>의 결과와 다소 달랐다. Bareton 등<sup>29</sup>은 샘종에서 1.7±0.14%, 샘암종에서 1.9±0.15%로 샘종에 비해 샘암종에서 세포자멸사지수가 높게 나왔는데, 본 연구 결과 샘종에서 0.90±0.83%, 샘암종에서 1.08±0.73% (폴립성 샘암종 1.08±0.79%, 침윤성 샘암종 1.09±0.59%)로 샘종에서 샘암종으로 진행할수록 높아져 Bareton 등<sup>29</sup>의 결과와 부합하였으나 통계학적 유의성은 없었다. Elkablawy 등<sup>3</sup>은 잘룩창자곤창자 샘암종에서 Duke 병기가 진행할수록 세포자멸사지수가 높게 나왔는데, 본 연구 결과 Astler-Coller 병기간에는 A기 0.38±0.01%, B1과 B2기 0.98±0.46%, C1과 C2기 1.16±0.72%, D기 1.79±1.78%로 병기가 진행할수록 세포자멸사지수가 증가하여 Elkablawy 등<sup>3</sup>과 일치된 결과를 보였고 통계학적인 유의성이 있었다(p<0.05). 이러한 결과로 볼 때 세포자멸사지수가 잘룩창자곤창자 샘암종 환자의 예후에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

본 연구 결과 잘룩창자곤창자에서 발생한 샘종, 폴립성 샘암종 및 침윤성 샘암종과 p21 단백질, p53 단백질 발현, Ki-67 세포표지지수와 세포자멸사지수의 상관성에서 샘종, 폴립성 샘암종 및 침윤성 샘암종으로 진행될수록 림프절 전이와 관련하여 p21 단백질 발현이 증가하였고, p53 단백질도 림프절 전이와 관련하여 발현이 증가하였으며 세포자멸사지수는 Dukes 병기가 진행될수록 증가하였다. 그리고 p21 단백질과 p53 단백질 발현 간에는 역상관관계가 있었다.

결론적으로 p21 단백질, p53 단백질 발현과 세포자멸사지수는 잘룩창자곤창자 선암종 환자의 예후 추정에 도움이 될 것으로 생

각된다. 그리고 샘종, 폴립성 샘암종 및 침윤성 샘암종으로 진행될수록 p21 단백질 발현은 감소하고 p53 단백질 발현은 증가하여 샘종과 샘암종의 발생 및 진행에 관여할 것으로 보인다.

### 참고문헌

1. Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea, Annual report of the central cancer registry of Korea (1998.1.1.-1998.12.31). June, 2000.
2. August DA, Ottow RT, Sugarbaker PH. Clinical perspective of human colorectal cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1984; 3: 303-24.
3. Elkablawy MA, Maxwell P, Williamson K, *et al.* Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumor stage and patient survival. *J Pathol* 2001; 194: 436-43.
4. Kuramoto S, Oohara T. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 1989; 64: 950-5.
5. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-31.
6. Spratt JS, Ackerman LV. The growth of a colonic adenocarcinoma. *Am Surg* 1961; 27: 23-8.
7. Sada M, Mitomi H, Igarashi M, *et al.* Cell kinetics, p53 and bcl-2 expression, and c-Ki-ras mutations in flat-elevated tubulovillous adenomas and adenocarcinomas of the colorectum: comparison with polypoid lesions. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 798-807.
8. Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. P21 (WAF1) expression in colorectal cancer: correlation with p53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 683-9.
9. Akino F, Mitomi H, Nakamura T, *et al.* High apoptotic activity and low epithelial cell proliferation with underexpression of p21(WAF/CIP1) and p27Kip1 of mucinous carcinomas of the colorectum: comparison with well-differentiated type. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 908-15.
10. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, *et al.* A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-95.
11. Yasui W, Akama Y, Yokozaki H, *et al.* Expression of p21WAF1/CIP1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression. *Pathol Int* 1997; 47: 470-7.
12. Ferrandina G, Stoler A, Fagotti A, *et al.* p21WAF/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *Int Oncol* 2000; 17: 1231-5.
13. Liu XP, Kawachi S, Oga A, *et al.* Combined examination of p27 (Kip1), p21 (Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 603-10.
14. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, *et al.* Prognostic value of p21 and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow up. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1591-9.
15. Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP *et al.* Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer *Int J Cancer* 2000; 89: 14-8.
16. Girlando S, Slomp P, Caffo O, *et al.* p21 expression in colorectal carcinomas: a study on 103 cases with analysis of p53 gene mutation/expression and clinic-pathological correlations. *Virchows Arch* 1999; 435: 559-65.
17. Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, *et al.* Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-55.
18. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, *et al.* Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 53-9.
19. Quinlan DC, Davidson AG, Summers CL, *et al.* Accumulation of p53 protein correlates with a poor prognosis in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 4828-31.
20. Horne GM, Anderson JJ, Tiniakos DG, *et al.* p53 protein as a prognostic indicator in breast carcinoma: a comparison of four antibodies for immunohistochemistry. *Br J Cancer* 1996; 73: 29-35.
21. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KF, *et al.* Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261: 3099-103.
22. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991; 138: 807-13.
23. Suh CH, Lee MJ, Cho SK. Expression of chromogranin A, cathepsin D, Cyclin D1 and p53 proteins in colorectal adenocarcinoma. *Korean J Pathol* 2001; 35: 7-13.
24. Moon JS, Park SH, Shin BK, Lee JH, Shin JH, Yeom BW. A comparative study of immunohistochemical expression of p53, bcl-2, c-erbB-2, and MIB-1 in polypoid and infiltrative colorectal carcinomas. *Korean J Pathol* 1998; 32: 581-9.
25. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, *et al.* Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 244-9.
26. Leung SY, Chau KY, Yuen ST, Chu KM, Branicki FJ, Chung LP. p53 overexpression is different in Epstein-Barr virus-associated and Epstein-Barr virus-negative carcinoma. *Histopathology* 1998; 33: 311-7.
27. DiGiuseppe JA, Redston NS, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. p53-independent expression of the cyclin dependent kinase in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 884-8.

28. Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 1988; 155: 213-9.

29. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, *et al.* Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. *Cancer* 1996; 77: 255-64.