

# 완전 절제된 제ⅢA기 비소세포폐암에서 Cyclin D1, p53, Bcl-2 단백질 발현의 의의

정 경 영\* · 양 우 익\*\*

=Abstract=

## Correlation between Cyclin D1, p53, Bcl-2 Protein Expression and Prognosis in Primary, Resected Stage IIIA Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)

Kyung Young Chung, M.D. \*, Woo-Ick Yang, M.D. \*\*

**Background:** Lung cancer formation is a multistage process involving activation of protooncogene and inactivation of tumor suppressor genes. We evaluate the significance of cyclin D1, p53, bcl-2 gene mutations in patients with curatively resected stage IIIA non-small cell lung cancer(NSCLC). **Material and Method:** One hundred consecutive cases of stage IIIA lung cancers from patients operated on curatively between 1990 and 1995 for which adequate paraffin blocks and clinical history were available. Immunohistochemical studies were performed on the representative tissue sections from each case by the labelled streptavidin- biotin method. Sections for cyclin D1, p53, Bcl-2 immunostaining were pretreated in a microwave oven for 10 to 20 minutes in citrate buffer before immunostaining. The overnight incubation with NCL-cyclin D1-GM for cyclin D1, with clone DO-7 for p53, with clone 124 for bcl-2 was done. Mean follow-up was 24.1 months (range 2-84 months) after operation. **Result:** One hundred cases of lung cancers were composed of 56 cases of squamous cell carcinoma, 37 cases of adenocarcinoma, 5 cases of adenosquamous cell carcinoma, and 2 cases of large cell carcinoma. The 5-year survival was 32.1%. The positive expression rate of cyclin D1 was 35%, p53 was 56%, and bcl-2 was 17%. But there were no correlation between cyclin D1, p53, Bcl-2 protein expression and survival. **Conclusion:** These observation indicate that cyclin D1, p53, bcl-2 protein overexpression might be implicated in the oncogenesis of non-small cell lung carcinomas but they have no usefulness as a prognostic marker.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:1200-5)

**Key word :** 1. Lung neoplasm  
2. Lung surgery  
3. Neoplasm marker

\* 연세대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

\*\* 연세대학교 의과대학 병리학교실

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

† 이 논문은 제 28차 대한흉부외과 연차학술대회 및 제13차 아시아 흉부외과학술대회에서 구연되었음.

‡ 이 논문은 1997년 제29차 추계학술대회에서 포스터로 발표하였음.

논문접수일 : 98년 4월 21일 심사통과일 : 98년 7월 22일

책임저자 : 정경영, (120-752) 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학. (Tel) 02-361-5595, (Fax) 02-393-6012

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

## 서 론

폐암은 세계적으로 가장 많은 사망원인 중의 하나이다. 비소세포폐암의 치료는 수술에 의한 완전 절제가 가장 중요한 치료방법이지만 완전절제술 후에도 재발이 빈번하며,<sup>1)</sup> 치료시 예후는 병기, 조직학적 세포형태와 같이 잘 알려진 임상적 병리학적 척도(clinicopathological parameter)와 밀접한 관계가 있으나 완전하지 못하며 따라서 가장 좋은 치료방법의 결정(수술절제, 화학요법과 또는 방사선치료)에 도움을 줄 수 있는 예후인자의 결정이 중요하다. 만약 유전인자를 이용하여 폐암의 악성 정도(aggressiveness)를 알아낼 수 있고 이에 따른 보조적 치료를 하게 된다면 수술 후 예후를 향상시킬 수 있을 것이다.

*cyclin D1*, *p53*와 *bcl-2*는 폐암의 발생기전에 관여하는 유전인자들로 알려져있으나 이 유전자들의 치료예후에 미치는 영향은 확실히 정립되지 않은 상태이며 국내에서는 폐암에 있어서 이들 유전인자에 관한 연구가 극소수에 불과하다. 연구자들은 *cyclin D1* 단백질 발현의 폐암 발생에 관여 여부와 조직학적 형태, 폐암병기에 따른 차이, 예후에 미치는 영향 등을 보고한 바 있으나<sup>1</sup> 각 폐암병기의 환자 수가 적었고 추적조사 기간이 충분하지 못하여 불충분한 결과를 보였고 이에 stage IIIA 환자만을 대상으로 *Cyclin D1*, *p53*, *Bcl-2* 단백질 발현을 조사함으로써 이들이 폐암의 발생에 관여하는지 여부와 수술 후 예후 결정에 기여할 수 있는 인자로서 가치가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상 및 조직

1990년부터 1995년까지 연세의료원에서 치료목적의 완전절제가 가능하였던 stage IIIA 비소세포폐암 환자 100명을 대상으로 이들의 paraffin embedded tissue를 이용하였다. Hematoxyline-eosine 염색 조직 절편으로 조직학적 진단을 얻었고 WHO분류에 따라 분류하였다.

### 2. Immunohistochemical staining

microwave enhanced immunohistochemical staining method를 사용하였다.

#### 1) *Cyclin D1*

10 nmol/L의 citrate buffer(pH6.0)에서 20분간(5분×4) microwave oven으로 전처리 (pretreat) 한 후 1:20으로 희석된 *cyclin D1* antibody NCL-Cyclin D1-GM(Novocastra Labor-

atories Ltd. Newcastle, UK)으로 overnight incubation 하였다.

#### 2) *p53*

10 nmol/L의 citrate buffer(pH 6.0)에서 10분간(5분×2) microwave oven으로 전처리한 후 1:100으로 희석된 *p53* antibody clone DO-7(Novocastra Laboratories Ltd. Newcastle, UK)으로 overnight incubation하였다.

#### 3) *Bcl-2*

10 nmol/L의 citrate buffer(pH 6.0)에서 10분간 microwave oven으로 전처리한 후 1:80으로 희석된 *Bcl-2* oncoprotein antibody인 Clone 124(Dako, Denmark)로 over-night incubation 하였다.

4) 1)2)3)후 Dako LSAB Kit(Dako carpinteria, CA, USA)를 사용하여 labelled streptavidin-biotin method로 protocol에 따라 Immunohistochemical staining을 시행하고 chromogene으로 diaminobenzidine(DAB)을 counterstain으로 light hemetoxylin을 이용 발색(color development)을 하였다. Nagative control은 non-immune serum으로 staining하였다.

### 3. Immunohistochemical stain의 결과 분석

병리학자에 의해 판독되었으며 *Cyclin D1*은 암세포 핵(nuclei)의 50% 미만 양성시 +, 50% 이상 양성시 ++로, *p53*는 핵 또는 세포질(cytoplasm) 양성시 +로, *Bcl-2*는 핵의 5% 미만시 -, >1/3: +, 1/3-2/3: ++, 2/3> : +++로 하고 세포질과 세포막(cytoplasmic membran)에 염색시 양성으로 판독하였다.

### 4. Clinical Data와 통계분석

임상자료는 환자의 의무기록 및 흉부외과의 폐암수술 환자 protocol에서 수집 분석하였고 환자의 추적조사는 환자의 사망시기 또는 본 연구의 완료시기(1997년 8월 30일)까지 시행하였다. 대상환자 100명에서 100% 추적조사가 가능하였으며 추적조사 기간은 평균 35.8개월(range; 2~84개월)이었다.

각 gene의 양성율과 각 gene의 양성여부에 따른 생존율을 구하였으며 Actuarial survival curve는 Kaplan-Meier method를 사용하였고 subgroup 간의 비교는 log-rank test로 하였으며 *p* 값이 0.05 이하시 의의 있는 것으로 하였다.

## 결 과

환자는 남자가 82명 여자가 18명이었고 평균연령은 55.7세(range; 33~75세)였으며 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)가 56예로 가장 많았고 선암(adenocarcinoma)이 37예, adenosquamous cell carcinoma가 5예, large cell

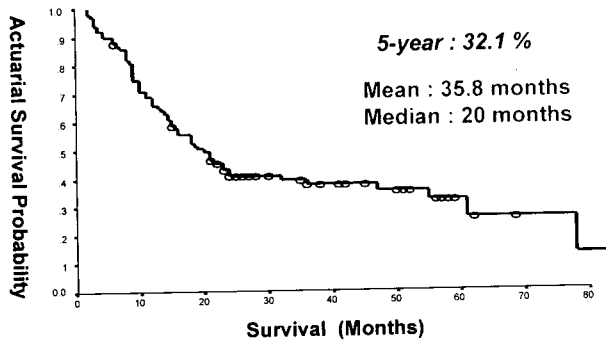


Fig. 1. Overall survival of 100 patients after complete resection of primary stage IIIA non-small cell lung cancer.

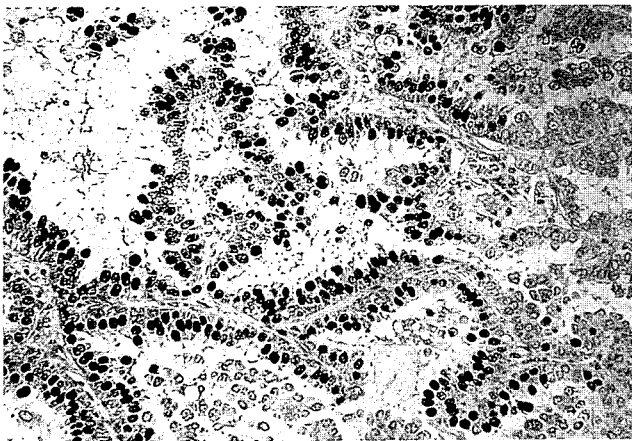


Fig. 2. Cyclin D1 immunostaining of a case bronchioloalveolar cell carcinoma showing intense nuclear staining. (DAB chromogen with hematoxylin counter staining)

carcinoma가 2에 등이었다.

수술 후 병리학적 TNM 병기분류는 T1N2가 6예, T2N2가 44예, T3N2가 17예, T3N0가 19예, T3N1이 14예로 N2 질환이 67예(67%)이었고 T3 질환이 50예(50%)에서 있었다.

전체 환자의 5년생존률은 32.1%이었고 평균수명은  $35.76 \pm 3.44$ 개월, 중앙값은  $20.0 \pm 2.82$ 개월이었다(Fig. 1).

cyclin D1은 35예(35%)에서 양성을 보였으며(Fig. 2), p53는 63%(Fig. 3), bcl-2는 17%(Fig. 4)의 양성율을 보였고 각각의 조직학적 형태 분류에 따른 양성율은 cyclin D1과 p53의 발현율이 선암에서 높은 반면 bcl-2의 발현율은 편평상피세포암에서 높았다(Table 1).

cyclin D1 단백질 발현 여부에 따른 5년생존률은 양성시 23.4% 음성시 36.9%로 양성시 낮았으나 통계적으로 유의 있는 차이는 없었으며( $p=0.94$ )(Fig. 5), p53 단백질 발

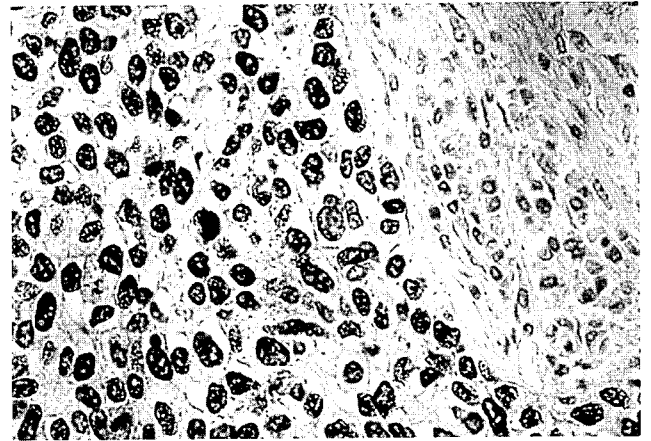


Fig. 3. P53 immunostaining of the squamous cell carcinoma showing intense nuclear staining. (DAB chromogen with hematoxylin counter staining,  $\times 100$ )

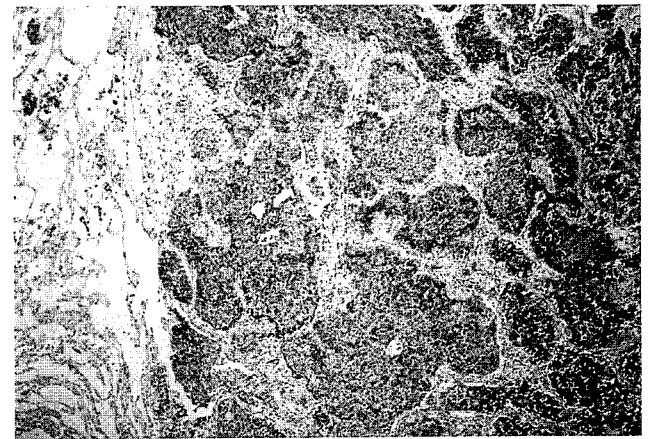


Fig. 4. Bcl-2 immunostaining of the squamous cell carcinoma showing nuclear staining. (DAB chromogen with hematoxylin counter staining,  $\times 200$ )

현 여부에 따른 5년생존률은 양성시 36.5%, 음성시 28.1%로 양성시 높았으나 통계적으로 유의 있는 차이는 없었고( $p=0.46$ )(Fig. 6), bcl-2 단백질 발현 여부에 따른 5년생존률도 양성시 47.1% 음성시 29.4%로 양성시 높았으나 통계적으로 유의 있는 차이는 없었다( $p=0.37$ )(Fig. 7). 각 gene의 단백질 발현 여부에 따른 평균생존기간 및 중앙값은 Table 2와 같았다. 각 gene의 단백질 발현 여부에 따른 disease free survival의 차이도 비교하였으나 유의 있는 차이는 없었다(데이터는 5년생존률과 대동소이하므로 생략함).

조직학적 분류에 따른 환자의 생존은 편평상피세포암의 5년생존률이 45.8% 선암은 23.1%로 편평상피세포암이

Table 1. Relationship between overexpression of cyclin D1, p53, bcl-2 protein and histologic types

Histologic types	cyclin D1(%)	p53 (%)	bcl-2 (%)
Squamous cell carcinoma (N=56)	16 (28.6)	31 (55.4)	15 (26.8)
Adenocarcinoma (N=37)	17 (45.9)	28 (75.7)	1 ( 2.7)
Adenosquamous cell carcinoma (N=5)	1 (20.0)	2 (40.0)	1 (20.0)
Large cell carcinoma (N=2)	1	2	0
Total (N=100)	35	63	17

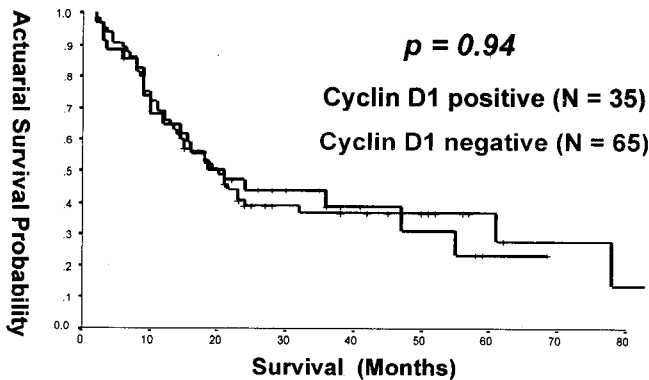


Fig. 5. Survival according to cyclin-D1 protein overexpression.

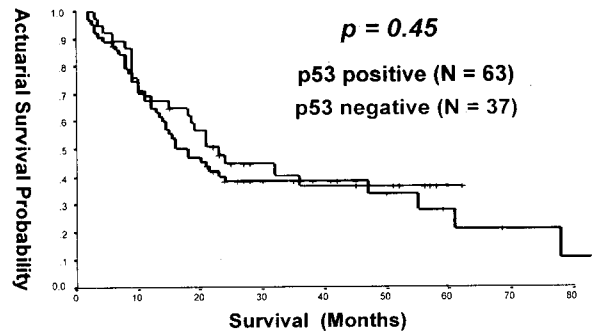


Fig. 6. Survival according to p53 protein overexpression.

높았으나 통계적으로 유의 있는 차이는 없었고(p=0.25) 각 조직학적 차이에 따른 차이도 없었다(p=0.54)(Table 3.)

56예의 편평상피세포암에서의 *cyclin D1*(p=0.67), *p53* (p=0.78), *bcl-2*(p=0.74) 단백질 발현 여부에 따른 생존률의 차이, 37예의 선암에서 *cyclin D1*(p=0.44), *p53*(p=0.97), *bcl-2* (p=0.55) 단백질 발현 여부에 따른 생존률의 차이는 없었다.

N2 질환 67예에서의 *cyclin D1* (p=0.74), *p53* (p=0.70), *bcl-2*(p=0.38) 단백질 발현 여부에 따른 생존률의 차이도 없었다.

### 고 찰

폐암의 발생기전에서 유전인자의 변이가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 K-ras, cyclin D1, erb-B2과 같은 proto-oncogene의 활성화(activation)와 p53, Rb, p16<sup>INK4</sup>과 같은 종양발생 억제인자(tumor suppressor gene)의 비활성화(inactivation) 등의 다단계 과정(multistage process)에 의하여 폐암이 형성된다.<sup>2,3)</sup>

*Cyclin D1*은 chromosome 11q13에 위치하는 putative oncogene으로서 세포의 정상 성장조절 역할(G1 to S phase transition)을 하며 DNA 합성 개시의 시기 조절에 관여한

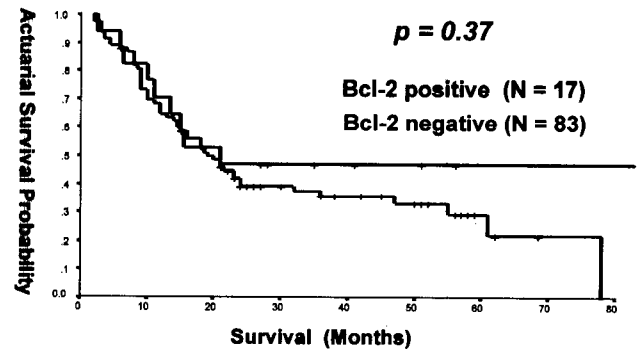


Fig. 7. Survival according to bcl-2 protein overexpression.

다.<sup>4,5)</sup> *Cyclin D1*은 다양한 인체 종양에 연루되어 있으며,<sup>6-8)</sup> 비소세포폐암의 6~47%에서 overexpression을 보이며 *Cyclin D1*의 overexpression은 종양의 미분화시 많이 나타나지만 폐암의 재발율은 낮아 negative indicator로 알려져 있다.<sup>9-11)</sup> 본 연구에서는 전에 발표한 결과와<sup>1)</sup> 같이 35%의 비교적 높은 양성율을 보였으나 overexpression 여부에 따른 생존율의 차이는 없었다.

*p53*는 가장 많이 알려진 종양발생 억제인자(tumor suppressor gene)로서 chromosome 17p13에 위치하고 cell cycle 과 분화(proliferation)에 작용하며,<sup>12)</sup> 인체의 다양한 종양발생에 관여하는 것으로 보고되고 있으며,<sup>13)</sup> 비소세포폐암

**Table 2.** Relationship between overexpression of *cyclin D1*, *p53*, *bcl-2* protein and survival

Gene	5-year survival(%)	Mean	SE (months)	Median (months)	p
cyclin D1 positive (N=35)	27.8	32.1 ± 4.6		21.0 ± 5.6	0.939
	negative (N=65)	35.9	36.3 ± 4.3	20.0 ± 3.1	
p53 positive (N=63)	21.0	33.8 ± 4.2		18.0 ± 3.2	0.46
	negative (N=37)	36.5	32.5 ± 4.0	23.0 ± 3.5	
bcl-2 positive (N=17)	47.1	45.5 ± 8.9		21.0 ±	0.374
	negative (N=83)	29.4	33.5 ± 3.5	19.0 ± 2.7	

**Table 3.** Relationship between histologic types and survival

Types	5-year survival(%)	Mean	SE (months)	Median (months)	p
Squamous cell ca. (N=56)	45.8	42.8	4.9	21.0 12.1*	0.25
Adenocarcinoma (N=37)	23.1	28.5	3.8	18.0 2.6*	
Adenosquamous cell ca. (N= 5)		23.0	7.4	16.0 8.8	
Large cell ca. (N= 2)		31.0	24.0	7.0	

에서 최고 75%까지 p53 변이가 나타난다고 하고,<sup>14~16)</sup> p53 변이가 나타났을 때 이의 예후에 미치는 영향은 예후가 좋다는 보고와,<sup>14,17,18)</sup> 예후가 나쁘다는 보고가<sup>19~23)</sup> 다양하게 있어 아직 확실하게 규명되지 않았다.<sup>24,25)</sup> 본 연구의 경우 p53 변이 양성율이 63%로 상당히 높았고 양성시 음성의 경우보다 생존율이 낮았으나 통계적 의의는 없었다.

Bcl-2는 protooncogene으로서 programmed cell death(apoptosis)를 억제하며 편평상피세포암이 25%, 선암이 12%에서 overexpression을 보이고 폐암의 전이가 있는 말기 환자에서는 overexpression이 낮은 빈도로 나타나 overexpression시 예후가 좋은 것으로 보고되고 있다.<sup>19,21)</sup> 본 연구에서도 양성시 훨씬 높은 생존율을 보였으나 통계적 의의는 없었다.

결과적으로 *Cyclin D1*, *p53*, *Bcl-2*의 overexpression 여부에 따른 생존율의 차이가 통계적으로는 유의하지 않았으나 *Bcl-2*의 경우에는 좀 더 많은 환자와 추적기간이 필요한 것으로 생각되며 폐암의 발생기전과 수술 후 예후 등의 결정에 유용한 새로운 유전인자의 발견이 필요한 것으로 생각된다.

## 결 론

*cyclin D1*, *p53*, *bcl-2* gene은 이들 단백질의 높은 양성 발현율로 보아 비소세포 폐암의 발생기전에 관여함을 알 수 있었으나 환자의 수술 후 예후를 예측할 수 있는 인자로서는 부적합하였다.

## 참 고 문 헌

1. Yang WI, Chung KY, Shin DH, et al. *Cyclin D1 Protein Expression in Lung Cancer*. *Yonsei Med J* 1996;37:142-50.
2. Ginsberg J, Kris MG, Armstrong JG. *Cancer of the lung: non-small cell lung cancer*. In: de Vita Jr VT, Heliman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott. 1993;673-723.
3. Minna JD. *Molecular Biology overview*. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turriss AT. *Lung cancer: Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996;143-8.
4. Giaccone G. *Oncogenes and antioncogenes in lung tumorigenesis*. *Chest* 1996;109(Suppl): 130S-4S.
5. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, et al. *Function of a human cyclin gene as an oncogene*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:709-13.
6. Hunter T, Pinls J. *Cyclins and cancer*. *Cancer* 1991;66: 1071-4.
7. Callender T, El-Naggar AK, Lee MS, et al. *PRAD-1 (CCND1)/cyclinD1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell exarcinoma*. *Cancer* 1994;74: 152-8.
8. Lammie G, Peters G. *Chromosome 11q13 abnormalities in human cancers*. *Cancer Cells* 1991;3:413-7.
9. Buckley MF, Sweeney KJE, Hamilton JA, et al. *Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer*. *Oncogene* 1993;8:2127-33.
10. Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, et al. *Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) over expression in primary resected non-small-cell lung cancer*. *Br J cancer* 1996;73:294-300.