

## 만성 간질환에서 혈청 p53 자가항체와 간조직내 p53 발현의 비교관찰

아주대학교 의과대학 소화기내과학교실, 일반외과학교실\*, 병리학교실\*\*

김영수 · 신용준 · 함기백 · 왕희정\* · 진윤미\*\* · 조성원

### =Abstract=

#### Relationship of Serum Anti-p53 Antibody with p53 Expression in Liver Tissue of Chronic Liver Diseases

Young Soo Kim, M.D., Young Jun Shin, M.D., Ki Baik Hahm, M.D.,  
Hee Jung Wang, M.D.\*, Yun Mi Jin, M.D.\*\*, and Sung Won Cho, M.D.

*Department of Gastroenterology, Department of General Surgery\*,  
Department of Pathology\*\*, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

**Background/Aims:** The p53 mutations have been described as the most common genetic alteration during development and progression of malignancy in a wide range of human cancers. Mutant p53 proteins have a prolonged half-life accounting for increased levels of p53 protein frequently detected in tumors. This can induce the production of anti-p53 in the serum of patients with HCC. We determined the relationship of serum anti-p53 with p53 expression in the liver tissue of chronic liver disease and the correlation of serum anti-p53 with serum alpha-fetoprotein(AFP) in patients with HCC. **Methods:** In sera of same patients, we analysed the anti-p53 using ELISA system. As controls we tested 50 healthy individuals and 20 patients with chronic hepatitis. Immunohistochemical study for the presence of mutant p53 was performed on liver tissue from 50 patients with cirrhosis and 30 patients with HCC using monoclonal antibody clone DO-7 and LSAB kit by ABC method. **Results:** Anti-p53 was positive in 9(30%) of 30 patients with HCC. Among nine patients with positive anti-p53, only two patients had detectable p53 expression in their tumor tissues. Anti-p53 was positive in 5(10%) of 50 patients with liver cirrhosis. The AFP was elevated in 21(70%) of 30 patients with HCC. Among the 9 AFP- negative HCC patients, 4(44.4%) were found to be positive for anti-p53. p53 expression was detectable in 9(30%) of 30 HCCs and 1(3.3%) of 30 surrounding non-tumorous cirrhotic tissues. **Conclusion:** These findings suggest that anti-p53 was not correlated with the status of p53 expression in liver tissue and serological testing for anti-p53 antibody may be complementary to serum AFP for diagnosing of HCC with normal serum AFP.

(Korean J Hepatol 1998; 4:131-142)

---

**Key Words :** Anti-p53, p53 protein, Chronic liver disease, Hepatocellular carcinoma

---

책임저자\* : 조성원, 수원시 팔달구 원천동 산 5번지, 442-749, 아주대학교병원 소화기내과

## 서 론

일반적으로 대부분의 간세포암은 오랜 기간 동안 간경변을 가지고 있는 상태에서 발생되므로<sup>1</sup> 간세포암을 조기 진단하기 위해서는 지속적으로 복부 초음파나 복부 전산화단층 촬영과 같은 방사선학적인 검사가 필요하다. 그러나 이러한 검사의 문제점은 비용이 많이 들고 검사의 정확도 등이 요구되며<sup>2</sup> 조직학적으로 분화가 좋은 소간세포암의 검출이 용이하지 않은 것이다.<sup>3</sup>

혈청 alpha-fetoprotein(AFP)은 간세포암의 진단에 이용되는 종양 표지자이지만<sup>4</sup> 종양의 발생 초기에는 정상이거나 약간 증가되는 정도이고<sup>2, 5, 6</sup> 간경변을 포함한 양성 간질환에도 높은 수치를 나타내기도 한다.<sup>7, 8</sup> 이러한 문제점을 보완하고자 지금까지 여러 종양 표지자에 대한 연구가 있었으나 아직까지 혈청 AFP보다 유의한 종양 표지자는 발견되지 않았다.

최근에 p53 종양 억제유전자는 간세포암 발생에 관여하는 것으로 알려졌는데 간세포암 발생률이 높은 지역에서 발생한 간세포암에서 p53 유전자 변이의 빈도가 높게 보고되고 있다.<sup>9-11</sup> p53 유전자는 염색체 17 단완에 위치하는 세포성 단백질로 1979년 Lane과 Crawford<sup>12</sup>는 SV 40 종양 바이러스에 의하여 형질전환된 세포주들에서 large T 항원과 결합하는 분자량 53 kD의 인단백질을 발견하고, 이 단백질을 SV 40에 의한 형질전환에 관여하는 세포성 인자로 발표했다.

p53 유전자는 처음에 종양 유전자로 생각되었으나 1989년에 Finlay<sup>13</sup>와 Elyauhu<sup>14</sup>에 의해 야생형 p53 유전자가 분리되고 이를 정상 및 종양세포에 도입한 결과 p53 유전자는 정상세포의 형질전환을 유도하는 것이 아니라 오히려 종양세포의 증식을 억제한다는 사실이 밝혀져 종양 억제유전자로 명명되었다.

p53 유전자는 정상세포 및 종양세포의 성장

조절에 있어서 중요한 역할을 수행하는데 전사 조절 인자로서 다른 유전자들의 전사를 유도 혹은 억제시킴으로써 세포주기를 조절한다.<sup>15</sup> p53의 종양 억제기능은 다양한 환경요인들에 의하여 DNA가 손상되면 p53이 활성화되어 세포주기의 G1기 정지가 일어나 DNA 복제가 중단된다.<sup>16-18</sup> 이후 DNA가 수복되면 세포는 다시 증식을 시작한다. 반면에 DNA의 손상이 심각하여 수복이 어렵게 되면 p53 단백질은 세포의 능동적 세포사(apoptosis)를 유발한다.<sup>19-20</sup> 즉 p53 유전자는 세포주기 조절기능과 능동적 세포사를 통하여 세포의 유전정보를 안전하게 지켜준다.

p53 유전자 변이는 인체 종양에서 약 50-60%의 고빈도로 발견되어 인체종양에서 발견되는 발암 혹은 암억제 유전자들의 변이율중에서 가장 높은 빈도이고<sup>15, 21</sup> 간세포암에서는 약 9-45%에서 관찰된다.<sup>22-24</sup> 야생형 p53 유전자의 발현은 반감기가 20-30분으로 매우 짧은 반면에 변이형 p53 유전자는 반감기가 1.5-7 시간까지 길어져 면역조직화학 염색법으로 조직내에서 p53 유전자 발현을 관찰할 수 있다.<sup>25, 26</sup> 이러한 변이형 p53은 형태학적인 변화가 일어나 종양세포핵에 축적되고 이로 인해 혈청으로 야생형 p53 단백질과 함께 변이형 p53 단백질이 유리되어 면역반응을 일으켜 p53 단백질에 대한 자가항체인 anti-p53을 형성시킨다.<sup>18, 22, 27-31</sup>

혈청 anti-p53은 유방암,<sup>28, 32-34</sup> 폐암, 전립선암, 갑상선암, 방광암, 백혈병, 췌장암,<sup>31</sup> B세포 림프종<sup>35</sup> 및 간세포암<sup>30, 36, 37</sup> 등 각종 암환자의 혈청에서 검출되었으며 국내에서는 이에 대한 보고가 드물어 저자들은 본 연구에서 만성 간질환 환자에서 혈청 anti-p53의 양성율을 알아보고 혈청 AFP와 비교관찰하여 간세포암의 종양 표지자로 이용될 수 있는지 확인하고자 하였다. 또한 anti-p53 양성정도도 간조직내 p53 유전자 발현과의 상관성을 조사하였고 anti-p53 양성유무 및 간조직내 p53 발현유무에 따른

여러 임상병리학적인 인자의 차이를 살펴보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1994년 8월부터 1997년 7월까지 아주대학교 병원에 입원하였거나 외래에서 추적관찰을 받고있는 만성 B형 간염 20예, 간경변증 50예, 절제술을 받은 간세포암 30예와 건강한 대조군 50예의 총 150예를 대상으로 하였다. 대상 환자 모두에서 혈청 생화학적 검사와 간염 바이러스 표지자 검사를 시행하였고 복부초음파를 실시하였다. 간경변 및 간세포암 환자에서 혈청 AFP를 측정하였다. 만성간염 및 간경변증 환자에서는 간침생검을 통한 간조직검사를 실시하였고, 간세포암 환자에서는 복부 전산화단층 촬영을 시행한후 간암절제술을 시행하였다 (Table 1).

### 2. 방법

#### 1) 효소결합 면역흡착검사(ELISA)

대상환자의 말초혈액을 채취후 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리한후 즉시 영하 70℃이하

로 냉장보관하였다. 보관된 혈청에서 p53-autoantibody ELISA kit(Calbiochem, USA)를 이용하여 sandwich assay로 anti-p53 농도를 측정하였다. 즉 재조합된 p53 단백질이 도포된 96 well plate에 시료를 넣어 상온에서 1시간 정지하고 0.1% Tween-20이 함유된 인산염 완충식염수(PBST)로 3회 세척후 단백질의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 1% bovine serum albumin이 포함된 PBS(1%BSA-PBST)를 well 당 350 µl씩 넣어 2시간 실온에서 반응시켰다. 혈청을 1% BSA-PBST로 1:100 희석하여 well 당 duplicate하여 100 µl씩 넣고 4℃에서 18시간 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척한 다음 peroxidase가 부착된 정제된 goat polyclonal 항체를 well당 100 µl씩 넣고 37℃에서 30분간 반응시켰다. PBST로 5회 세척후 발색용액인 tetra-methylbenzidine(TMB)을 acetate buffer에 희석하여 각 well당 100 µl씩 넣어 실온에서 30분간 발색시킨후 2.0N HCL 용액 50 µl을 넣어 반응을 중단시켰다. 이를 컴퓨터가 부착된 microplate reader(Molecular devices Corporation, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Microplate reader와 연결된 컴퓨터에서 SOFTmax program(Molecular devices Corporation, CA, USA)을 이용하여 표준 혈청의

**Table 1.** Clinical Characteristics of 30 Patients with Resected Hepatocellular Carcinoma

Total number	30	Tumor size	
Age(yr)	54.6(32-72)	<2cm	3
Sex(M/F)	21/9	2-5cm	11
Etiology		<5cm	16
HBV	22	Tumor number	
HCV	1	1	19
Alcohol	2	2-3	11
Unknown	5	Stage	
Tumor grade		I	3
WD	0	II	12
MD	13	III	10
PD	17	IV	5

희석액의 흡광도로 표준 곡선을 그린후 각 검체의 흡광도와 비교하여 혈청내의 p53 자가항체를 정량하였다. 자료의 통계분석으로 대조군과 환자군의 혈청 anti-p53은 Mann-Whitney U test를 이용하여 비교하였으며, 혈청 anti-p53과 혈청 AFP, 혈청 anti-p53과 간조직내 p53 발현과의 상관관계는 chi-square test를 이용하였다.

2) 면역조직화학 염색

염색방법은 LSAB(labeled streptavidin biotin)법으로 시행하였다. 환자로부터 적출된 간조직을 4% 중성 포르말린 용액에 고정시킨후 파라핀 블록을 제작하여 보관시켰다. 파라핀 포매조직을 5 μm 두께의 조직절편으로 만들어 poly-L-lysine 슬라이드에 부착하여 건조시킨 다음, xylene으로 파라핀을 제거한후 알코올을 거쳐 함수시켰다. PBS 완충액으로 세척후 10 mM

citric acid buffer(pH 6.0)를 이용하여 60℃이상으로 10분간 microwave oven(750W)에 끓인 후 효소를 노출시켰으며, 조직내의 내재된 peroxidase를 제거하기 위하여 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 10분간 담근 후 다시 PBS로 세척하였다. 조직에 정상 및 변이 p53 단백질에 반응하는 단일클론 항체(DO-7, Dako, Japan)를 1:50으로 희석하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척후 이차항체인 biotinylated antibody(Dako, Japan)를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨후, 삼차항체인 avidin과 biotinylated horseradish peroxidase를 가하여 역시 실온에서 30분간 반응시켰다. 발색은 AEC(3-amino-9-ethylcarbazol)(Vector, USA)를 사용하여 10분간 반응을 거친 후 염색된 표본은 hematoxylin 용액으로 3분간 대조염색하여 crystal mount로 봉입하였다. 종양 세포핵에서의 염색정도는 음성인 경우 negative, 10%이하 염색은 slight, 10-30% 염색은 moderate, 30% 이상 염색은 strong으로 구분하였다.

결 과

1. 혈청 anti-p53의 농도

혈청 anti-p53의 평균 OD 값은 건강대조군은 0.083 ± 0.016 ng/ml, 만성 간염 0.085 ± 0.018 ng/ml, 간경변증 0.129 ± 0.086 ng/ml, 간세포암 0.176 ± 0.331 ng/ml로 건강대조군, 만성 간염, 간경변증에 비하여 간세포암에서 통계적으로 유의하게 상승되어 있었다 (p<.05)(Figure. 1). 혈청 anti-p53 양성율은 건강 대조군과 만성 간염을 대조군으로 하여 측정된 평균 OD값인 0.084 ± 0.017 ng/ml에 표준편

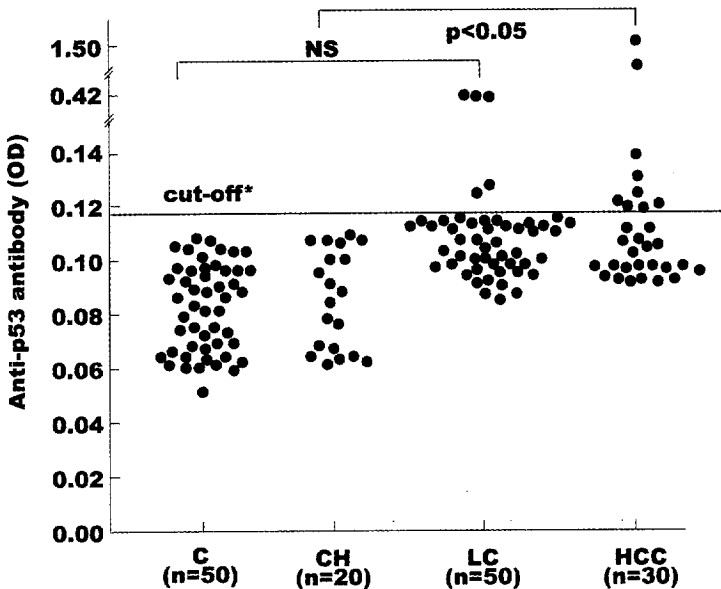


Figure 1. Anti-p53 antibody levels in patients with chronic liver disease (C=healthy control, CH=chronic hepatitis, LC=liver cirrhosis, HCC=hepatocellular carcinoma), NS=not significant, \*OD value above mean plus two standard deviations of control group.

**Table 2.** Correlation of Anti-p53 Antibody with Serum AFP Levels in Patients with Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma

Serum AFP	Anti-p53 antibody		Total(%)
	Positive	Negative	
Liver cirrhosis(n=50)			
Elevated	4	30	34(68)
Normal	1	15	16(32)
Total	5(10)	45(90)	50(100)
HCC(n=30)			
Elevated	5	16	21(70)
Normal	4	5	9(30)
Total	9(30)	21(70)	30(100)

**Table 3.** Positivity of Anti-p53 Antibody and Serum AFP in Patients with Hepatocellular Carcinoma

	No. of patients (positive/total)	Percent
Anti-p53	9/30	30.0
AFP	21/30	70.0
Anti-p53 +AFP	25/30	83.3

**Table 4.** Correlation of Anti-p53 Antibody with p53 Expression in Tumor Tissues

p53 expression in tumor tissues	Anti-p53 antibody		Total
	Positive	Negative	
Positive	2	7	9
Negative	7	14	21
Total	9*(30)	21(70)	30(100)

\*surrounding non-tumorous cirrhotic liver was stained in one case

차 0.017의 2배수인 0.034를 더한 OD값인 0.118 이상을 하였는데 간경변증 50예중 5예(10%), 간세포암 30예중 9예(30%)에서 양성이었다 (Table 2).

## 2. 혈청 anti-p53과 혈청 AFP와의 상관관계

혈청 anti-p53과 혈청 AFP간에는 유의한 상관관계가 없었다. 간경변증 50예중 혈청 AFP가 양성(>20ng/ml)인 경우는 34예, 음성은 16예이었고 이중 혈청 anti-p53 양성은 각각 4예

(11.7%) 및 1예(6.2%)이었다. 간세포암 30예중 혈청 AFP가 양성인 경우 21예, 음성은 9예로 이중 혈청 anti-p53 양성은 각각 5예(23.8%) 및 4예(44.4%)이었다(Table 2). 간세포암 30예에서 혈청 AFP 또는 anti-p53이 양성인 경우는 25예(83.3%)로 나타났다(Table 3).

## 3. 간조직내 p53 단백질의 발현

간조직내 p53 단백질의 발현은 만성 간염 및 간경변증 전예에서 발견되지 않았다. 간세포암

예중 2예에서만 간조직내에서 p53 단백질이 발현되어 이들간의 유의한 상관성은 발견되지 않았다 (Table 4). 또한 간조직내 p53 단백질의 염색정도에 따른 혈청 anti-p53 양성 반응의 차이는 관찰되지 않았다.

**5. 혈청 anti-p53, 간조직내 p53 단백질의 발현과 임상 또는 병리학적인 요인과의 상관관계**

**Figure 2.** Strongly positive immunohistochemical staining of the p53 protein with the clone DO-7 in the tumor nuclei of hepatocellular carcinoma (arrows) (x200).

간세포암 30예를 대상으로 혈청 anti-p53 양성 유무와 조직내 p53 유전자

환자에서는 절제된 30예의 간암조직중 9예 (30%)에서 관찰되었고 이중 한 예는 종양주위의 간경변 조직에서도 발견되었다(Tabel 4, Figure. 2-3).

발현유무에 따른 연령, 성별, 원인 질환, 종양의 크기, 위치, 육안적 및 현미경적 소견, 피막형성 및 피막침범, 림프절 전이, 담도침범 및 병기의 유의한 차이는 발견되지 않았다. 종양 갯수에 있어서 혈청 anti-p53 양성유무에 따른 유의한 차이는 없었으나, 간조직내 p53 유전자 발현율은 종양 갯수가 4개이상인 경우(100%)에서 3개이하인 경우(25%)보다 높았다( $p < .05$ )(Table 5).

**4. 혈청 anti-p53과 간조직내 p53 단백질의 발현과의 상관관계**

간세포암 30예중 혈청 anti-p53이 양성인 9

**Table 5.** Comparison of the Clinical and Pathological Features of Resected Hepatocellular Carcinoma between p53 Expression Group (n=9) and Nonexpression Group (n=21)

Characteristics	P	Characteristics	P
Age	NS*	Gross type	NS
Sex	NS	Degree of differentiation	NS
Etiology	NS	Capsule formation	NS
Serum a-FP	NS	Capsule invasion	NS
Tumor size	NS	Lymph node metastasis	NS
Tumor location	NS	Bile duct invasion	NS
Tumor number	<0.05	Stage	NS

\*NS, not significant

는 과오 돌연변이(mis-sense mutation)로 추정되고 있는데<sup>25, 35</sup> 변이 p53 유전자는 반감기가 길어져 세포핵내에 축적되고 이는 면역조직화학적 방법으로 쉽게 확인할 수 있다. 그러나 p53 유전자의 비과오 돌연변이(non-missense mutation)는 면역 조직화학적 방법으로 확인이 어려운 것으로 알려져 있고<sup>18</sup> 면역 조직화학적 방법은 변이 p53 유전자의 조직내 농도, 검사시 사용되는 항체의 특성 및 농도, 조직 고정방법 및 시간 등에 따라 검사 결과가 다르게 나타나는 변수를 갖고 있다.<sup>38-40</sup> 또한 변이 p53 단백 자체는 혈청에서의 농도가 일정하지 않고 사용하는 검사의 예민도에 따라 검출되는 정도가 다르며 단백질 분해효소 작용에 의하여 빠르게 제거되어 혈청에서의 검출이 매우 어렵다. 반면에 혈청 anti-p53은 조직내에서 혈청으로 유리되는 정상 및 변이 p53 단백질

**Figure 3.** (A) Moderately positive immunohistochemical staining of the p53 protein in the tumor nuclei of HCC (arrows). (B) Slightly positive immunohistochemical staining of the p53 protein in the surrounding non-tumorous cirrhotic liver parenchyma in the same patients (arrows) (x200).

**고 찰**

인체 종양에서 p53 유전자 변이의 80% 정도

대한 면역 반응이므로 비교적 안정되게 대부분의 p53 유전자 변이를 간접적으로 확인할 수 있다.<sup>15</sup>

간세포암에서 혈청 anti-p53의 유용성에 대

해서는 1993년에 Volkmann 등<sup>30</sup>과 1995년 Raedle 등<sup>36</sup>이 보고하였다. Volkmann 등은 29예의 간경변이 포함된 67예의 대조군과 80예의 간세포암을 대상으로 혈청 anti-p53을 측정 한 결과 대조군은 모두 음성이었고 간세포암 80예 중 20예(25%)가 양성이었으며 이중 21예의 혈청 AFP 음성인 간세포암중 5예(23.8%)에서 혈청 anti-p53이 양성이었다. Raedle 등의 연구는 만성 C형 간질환을 대상으로 82예의 만성 C형 간염, 58예의 간경변, 7예의 간세포암을 대상으로 혈청 AFP와 anti-p53을 비교 관찰하였는데 혈청 anti-p53은 만성 간염과 간경변에서는 모두 음성이었고 간세포암 7예중 3예(42.9%)에서 양성이었다. 이 두연구에서의 문제점은 Volkmann 등의 경우 대조군에 간세포암 전단계인 간경변을 포함시킨 것이고 Raedle 등의 연구는 대상 환자중 간세포암 환자가 7예에 불과한 것이다. 또한 Rossi 등<sup>41</sup>은 유럽 여러 국가의 간세포암 환자 462명을 대상으로 조사한 결과 54명(11.7%)에서 혈청 anti-p53이 양성이었으며, 이중 HBsAg 양성은 24%, anti-HCV 양성은 50%로 비교적 C형 간염 환자에서 높게 나타났다.

본 연구에서 혈청 anti-p53의 농도는 건강 대조군과 만성 간염군을 포함한 대조군과 간경변에 비하여 간세포암에 있어서 유의하게 높았으나, 양성 반응은 간경변 환자의 10%, 간세포암 환자의 30%에서 발견되어 간세포암에 특이적인 반응을 보이지 않았다. 이는 간경변 단계에서 p53 유전자 변이가 이미 시작되었거나 검사상 발견되지 않는 간세포암의 존재를 생각해볼 수 있겠다.

혈청 anti-p53은 혈청 AFP와 유의한 상관성은 발견되지 않았고 서로 별개의 표지자로 나타났다. 이는 Volkmann 등<sup>30</sup>의 보고와도 동일한 결과를 보여주었다. 그러나 혈청 AFP가 음성인 간세포암 일부에서 양성 반응을 보여 혈청 AFP의 보조적인 종양 표지자로서의 가능성을 제시해주고 있다. 본 연구에서도 간세포암중

혈청 AFP만 양성인 경우는 간세포암 환자의 70%이나 혈청 AFP 또는 혈청 anti-p53이 양성인 경우는 83.3%로 나타났다.

간조직내 p53 단백질 발현에 대한 단일클론 항체는 야생형 및 변이형 p53 단백질에 대하여 모두 반응하는 것을 사용하였는데 이는 p53 유전자의 변이가 없이도 간세포암 조직에서 p53 단백질의 높은 발현을 관찰할 수 있기 때문이며 Bourdon 등<sup>27</sup>과 Volkmann 등<sup>22</sup>은 각각 50% 및 25%의 간세포암 조직에서 p53 유전자의 변이 없이 p53 유전자의 발현을 보고한 바 있다.

혈청 anti-p53은 간암세포내의 p53 유전자 발현과 상관성이 없었는데, 간암세포내에 p53 유전자 변이가 있음에도 혈청 anti-p53이 음성인 경우는 동반된 간경변에 의한 면역반응 저하나 p53 유전자의 변이 양상이 서로 다른 변이를 나타내어 면역성이 동일하지 않기때문으로 생각된다. 또한 종양의 괴사에 의한 면역체계로 전달된 변이 단백질의 양이 적거나 종양에 침윤된 림프구의 정도가 미약한 경우도 생각해볼 수 있겠다.<sup>30</sup>

반면에 간암세포내에 p53 유전자의 발현이 없음에도 혈청 anti-p53이 양성인 경우는 조직내의 p53 유전자 변이가 면역 조직화학적 방법으로 검출되지 않는 비과오 돌연변이이거나 간암형성 과정에서 일시적으로만 p53 유전자가 발현되는 것을 생각할 수 있으며 이런 경우 종양 조직내의 변이형 p53 유전자의 발견이 어렵게 된다.<sup>30</sup> 또한 p53 유전자 변이를 유발하는 다른 악성 종양의 존재를 생각해볼 수 있겠으나 본 연구에서는 간세포암 환자의 경우 수술전 정밀 검사에서 다른 신체부위에서 종양을 발견할 수 없었다.

본 연구에서 간세포암 환자에서 혈청 anti-p53의 양성 및 조직내 p53 유전자 발현 유무에 따른 연령, 성별, 원인 질환 등의 여러 임상병리학적 인자를 살펴보았을때 유의한 차이는 발견되지 않았고 단지 종양 갯수가 4개이상인 경우



에서 3개이하인 경우보다 간조직내 p53 유전자 발현율이 높았다. 이와같이 유의한 차이가 없는 것은 대상 환자가 모두 절제가 가능하였던 간세포암이기 때문이며 향후 절제가 불가능한 진행된 간세포암을 포함하여 보다 많은 환자에서 장기간의 추적관찰을 통하여 예후인자로서의 혈청 anti-p53의 역할을 규명하는 것이 바람직 하겠다. 지금까지 예후인자로서 혈청 anti-p53의 역할에 대한 연구는 Peyrat 등<sup>34</sup>이 절제술을 시행받은 유방암 환자에서, Shiota 등<sup>37</sup>이 86명의 간세포암에서 장기 생존에 영향을 미치는 유의한 예후인자로 보고하였다.

결론적으로 혈청 anti-p53은 간조직내 p53 단백질의 발현상태와 상관관계가 없었으나 일부 간경변 환자에서 양성으로 나타나 이들 환자에서의 간세포암 발생에 대한 추적관찰의 필요성을 제시해주며 혈청 AFP가 음성인 간세포암 환자에서 양성으로 나타나 혈청 AFP의 보조적인 종양표지자로서 그 역할을 할 수 있으나 향후 보다 많은 환자에서 장기적인 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

## 요 약

**목 적** : p53 유전자의 변이는 인체 암에서 가장 흔하게 발견되는 유전적 결함으로 간세포암에서는 9-45%의 환자에서 발견된다. 변이 p53 단백질은 형태학적인 변화를 일으켜 반감기가 길어져 종양세포핵내에 축적되고 이로 인해 혈청에 정상 p53 단백질과 함께 변이된 p53이 유리되어 면역반응을 일으켜 p53 단백질에 대한 자가항체인 anti-p53이 형성되게 된다. 저자들은 본 연구에서 간경변증과 간세포암 환자에서 혈청 anti-p53의 양성율을 알아보고 혈청 AFP와 비교관찰하여 간세포암의 종양 표지자로 이용될 수 있는지 확인하고자 하였다. **대상 및 방법** : 만성 B형 간염 20예, 간경변 50예, 절제술을 받은 간세포암 30예와 건강한 대조군

50예의 총 150예를 대상으로 ELISA를 이용하여 혈청 anti-p53을 측정하였고 간경변과 간세포암 환자에서 혈청 AFP를 측정하였다. 만성 간염, 간경변 및 간세포암의 간조직내에서 면역조직화학적 염색법을 이용하여 변이형 p53 유전자의 발현을 조사하였다. **결 과** : 1) Anti-p53 농도는 건강대조군  $0.083 \pm 0.016$  ng/ml, 만성 간염  $0.085 \pm 0.018$  ng/ml, 간경변  $0.129 \pm 0.086$  ng/ml, 간세포암  $0.176 \pm 0.331$  ng/ml로 나타나 건강대조군, 만성 간염, 간경변에 비하여 간세포암에서 통계적으로 유의하게 상승되어 있었다( $p < 0.05$ ). 혈청 anti-p53 양성은 간경변 50예중 5예(10%), 간세포암 30예중 9예(30%)이었다. 2) 혈청 anti-p53과 혈청 AFP는 유의한 상관관계는 없었다. 3) 간조직내 p53 유전자의 발현은 만성 간염 및 간경변 전예에서 관찰되지 않았다. 간세포암 30예중 9예(30%)에서 관찰되었고 이중 한 예는 중앙주위의 간경변 조직에서도 관찰되었다. 4) 혈청 anti-p53과 간조직내 p53 유전자의 발현과의 상관관계는 간세포암 30예중 혈청 anti-p53이 양성인 9예중 2예에서만 간조직내에서 p53 유전자가 발현되어 이들간의 유의한 상관성은 발견되지 않았다. 5) 간세포암에서 anti-p53 양성 및 p53 유전자의 발현과, 임상병리화학적 요인과의 상관관계는 유의한 차이는 발견되지 않았다. 단지 중앙 갯수에 있어서 혈청 anti-p53 양성유무에 따른 유의한 차이는 없었으나, 간조직내 p53 유전자 발현율은 중앙 갯수가 4개이상인 경우에서 3개이하인 경우보다 높았다( $p < 0.05$ ). **결 론** : 혈청 anti-p53은 간조직내 p53 단백질의 발현상태와 상관관계가 없었으나 일부 간경변증 환자에서 양성으로 나타나 이들 환자에서의 간세포암 발생에 대한 추적관찰의 필요성을 제시해주며 혈청 AFP가 음성인 간세포암 환자에서 양성으로 나타나 혈청 AFP의 보조적인 표지자로서 그 역할을 할 수 있으나 향후 보다 많은 환자에서 장기적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Oka H, Kurioka N, Kim K, et al. Prospective study of early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1990;12:680-687.
2. Colombo M, de Frnachis R, del Ninno E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325:675-680.
3. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, et al. Imaging diagnosis of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;20:82-87.
4. Wespice HT, Kirkpatrick A. Alpha-fetoprotein and its relevance to human disease. *Gastroenterology* 1979;77:787-796.
5. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, et al. Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1984;86:1404-1409.
6. Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kobayashi K, Yamamoto S. Prospective study of  $\alpha$ -fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994;19:61-66.
7. Imberti D, Fornari F, Sbolli G, Buscarini E, Squassante L, Buscarini L. Hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis. A prospective study. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:540-544.
8. Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med* 1993;328:1802-1806.
9. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NY, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 1991;350:427-428.
10. Bressac B, Kew M, Wands JR, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from Southern Africa. *Nature* 1991;350:429-431.
11. Ozturk M, Bressac B, Puisieux A, et al. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991;338:1356-1359.
12. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;278:261-263.
13. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1089-1093.
14. Elyahu D, Michalovitz D, Elyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:8763-8767.
15. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
16. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson JKU, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990;249:912-915.
17. Diller L, Kassel J, Nelson CE, et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcoma. *Molec Cell Biol* 1990;10:5772-5781.
18. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-1327.
19. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 1991;51:6304-6311.
20. Kerr JF, Winterford CM, Haarmann BV. Apoptosis. Its significance in cancer and

- cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-2026.
21. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
  22. Volkmann M, Hofmann WJ, Müller M, et al. p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene* 1994;9:195-204.
  23. Collier JD, Carpenter M, Burt AD, Bassendine MF. Expression of mutant p53 protein in hepatocellular carcinoma. *Gut* 1994;35:98-100.
  24. Laurent-Puig P, Flejou JF, Fabre M. Overexpression of p53: A rare event in a large series of white patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992;16:1171-1175.
  25. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M. Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 1984;312:646-649.
  26. Hinds PW, Finaly CA, Quartin RS et al. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the 'hot spot' mutant phenotypes. *Cell Growth Different* 1990;1:571-580.
  27. Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, Grigioni W, May E, Debuire B. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation. *Gastroenterology* 1982;108:1176-1182.
  28. Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982;30: 403-408.
  29. Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T. Mutations in p53 produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward central part of the p53 protein. *Oncogene* 1994;9:3689-3694.
  30. Volkmann M, Müller M, Hofmann WJ, et al. The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the  $\alpha$ -fetoprotein status. *Hepatology* 1993;18:559-565.
  31. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res* 1992;52:4168-4174.
  32. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, et al. The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res* 1992;52:6380-6384.
  33. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 3439-3442.
  34. Peyrat JP, Bonnetterre J, Lubin R, Vanlemmens L, Fournier J, Soussi T. Prognostic significance of circulating p53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 1995;345:621-622.
  35. Schlichtholz RLB, Bengoufa D, Zalzman BG, et al. Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-cell epitopes of human p53: distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer Res* 1993;53: 5872-5876.
  36. Raedle J, Roth WK, Orenmek G, Caspary

- WF, Zeuzem S.  $\alpha$ -fetoprotein and p53 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1995;40:2587-2594.
37. Shiota G, Kishimoto Y, Suyama A, et al. Prognostic significance of serum anti-p53 antibody in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatology* 1997;27:661-668.
38. 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* 1991;6:1699-1703.
39. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology : can we trust immunohistochemistry? *J Patho* 1992;166:329-330.
40. Pestr AH, David PL. p53 in tumor pathology : can we trust immunohistochemistry? - revisited! *J Patho* 1994;172:1-4.
41. Rossi S, Zentgraf H, Jaffredo F, et al. Prevalence of antibodies to p53 protein in hepatocellular carcinoma in Europe(Abstract). *J Hepatology* 1997;26:283