

췌장암에서의 Transforming Growth Factor (TGF) β 1, TGF β Receptor II, p53 단백질 및 K-ras 돌연변이 유전자의 임상적 의의

서울대학교 의과대학 분당서울대학교병원 외과학교실, ¹단국대학교 의과대학 단국대학교병원 외과학교실,
²엠디그린병원

김구상 · 채영수¹ · 김정택²

The Clinical Significance of Transforming Growth Factor (TGF) β 1, TGF β Receptor II, p53 Protein and K-ras Point Mutation in Pancreatic Cancer

Ku Sang Kim, M.D., Young Su Chae, M.D.¹ and Jung Taik Kim, M.D., Ph.D.²

Department of Surgery, Seoul National University Bundang Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seongnam, ¹Department of Surgery, Dankook University Hospital, College of Medicine, Dankook University, Cheonan, ²MD Green Hospital, Seongnam, Korea

Purpose: Many cancers, including pancreatic cancer, harbor defects in TGF β signaling and are resistant to TGF β mediated growth inhibition. In addition, the expression of the p53 gene and mutations in K-ras might play an important role in the multistep carcinogenesis of pancreatic cancer. This study examined the expression level of TGF β 1, TGF β receptor II, p53 protein and K-ras mutation in pancreatic cancer, along with their role and clinical significance.

Methods: The overexpression of TGF β 1, T β RII and p53 protein was evaluated using an immunohistochemical assay. The K-ras mutation was analyzed by PCR-RFLP in the surgical resected pancreatic tissue from 26 pancreatic ductal adenocarcinomas and 5 normal pancreases.

Results: Immunohistochemical analysis of TGF β 1 and T β RII revealed positive immunostaining in 73.1% and 76.9% of the tumors, respectively, which were significantly higher than the normal pancreas ($P=0.008$). The p53 protein was positive in none of the 5 normal ducts and 16 out of 26 (61.5%) pancreatic carcinoma specimens. The K-ras mutation was positive in none of the 5 normal ducts, and

in 20 of the 26 pancreatic carcinoma specimens (76.9%). The presence of TGF β 1 and T β RII in the cancer samples was significantly associated with node metastasis, advanced tumor stage ($P<0.01$), and a short survival time ($P<0.05$). The p53-positive pancreatic cancers showed a significantly lower survival rate than those with p53-negative tumors ($P<0.05$). There was no correlation between K-ras mutations and the survival rates.

Conclusion: The detection of K-ras mutations and TGF β 1, T β RII and p53 protein overexpression can predict the prognosis of pancreatic carcinoma patients. (J Korean Surg Soc 2008;74:274-281)

Key Words: Pancreatic cancer, Transforming growth factor β 1, Transforming growth factor β receptor II, p53 protein, K-ras mutation

서 론

췌장암의 발암과정에서 암유전자와 암 억제 유전자에 대한 접근은 발암기전의 이해는 물론, 미래에는 췌장암의 조기진단 예방, 치료 등의 임상적 응용 가능성을 제시할 수 있어 큰 흥미를 끌고 있다.(1-3) 췌장암의 발생에 가장 많이 알려진 암 관련 유전자로는 transforming growth factor β (TGF β), p53 및 K-ras 등이 있다.

TGF β 의 중요한 기능은 세포분열 시 세포주기 G1 시기에서 정지를 시킴으로써 성장억제의 작용을 하고 있고,(4) TGF β 의 활성화는 제1형과 제2형 수용체(TGF β receptor II, T β RII)의 결합에 의하여 이루어진다. 이들은 모두 transmembrane serine/threonine kinase로 heteromeric receptor complex를 형성하는데, TGF β 수용체의 돌연변이의 결과로 TGF β 의 저항성이 초래되어 성장억제인자로서의 정상적인 기능이 소실됨으로써 악성종양을 발생시킨다는 것이 확인되고 있다. TGF β 의 과 발현에 의한 p21^{WAF1}의 유도는 p53 비의존성 경로를 통하여 전사 수준에서 증가하며 증가된 p21은 T β R II cyclin E-Cdk2 결합을 방지하고 따라서 Rb의

책임저자 : 김정택, 경기도 성남시 분당구 이매동 137-5번지
⑨ 463-806, 엠디그린병원

Tel: 031-701-5395, Fax: 031-701-5305
E-mail: wind1023@hanmail.net

접수일 : 2007년 11월 26일, 개재승인일 : 2008년 1월 22일
중심 단어: 췌장암, 형질전환 성장인자 β 1, 형질전환 성장인자 β 수용체 II, p53 단백질, K-ras 돌연변이

인산화를 방해하며 c-myc 유도를 억제하여 세포성장을 억제한다.(5) TGF β 신호전달체계 자체의 결합과 TGF β 를 매개로 하는 성장억제 작용의 저항성 발현은 인체 대장암이나 위암에서 증명되고 있고 췌장암에서도 밝혀지고 있다.(6-9) TGF β 의 성장억제 작용에 저항성을 나타내는 악성 종양세포들은 TGF β 1을 과다발현하고 있는데 이는 jun, fos, src, abl, ras 등의 여러 암유전자에 의한 전사 활성화의 결과일 수도 있고 TGF β 1의 성장억제 작용으로부터 일단 도피한 종양세포들에 있어서는 오히려 TGF β 1은 세포 외 기질을 증가시키고 혈관생성을 촉진하고 면역감시기능을 억제하는 등의 작용을 받아 간접적으로 종양형성을 돋는 효과를 나타낼 수 있다고 추측되고 있다.(10)

p53도 TGF β 와 마찬가지인 종양억제 유전자로서 정상적으로는 손상된 DNA를 수리하고 능동적 세포사(apoptosis)를 유도하며 세포 주기 중 G1 시기에 정지를 일으켜 세포 증식을 막는 역할을 하지만, 유전자에 돌연변이가 생기는 경우에는 종양억제 기능이 상실되어 발암과정에 기여한다고 추측되고 있다.(11) 췌장암에서의 p53 유전자 변이율은 약 40~80%까지 보고하고 있고,(12,13) 국내에서는 췌장암 조직에서 p53 돌연변이율을 44.6%로 보고하였다.(14) 한편, K-ras 유전자 돌연변이는 췌장암에서 가장 많이 발견되는 것으로 췌장암의 70~95%에서 돌연변이성 K-ras 유전자가 관여하고 있음이 보고되고 있다.(15,16) 이런 K-ras 돌연변이는 codon 12에 주로 국한되어 점 돌연변이가 발생하는데 췌장암의 초기에 작용하며 세포의 성장과 분화 등 세포 주기에 영향을 주어 암을 유발한다고 추측하고 있다.(17) 이러한 암 관련 유전자 및 단백질들은 췌장암의 발생 조기 단계에 상호 복합적으로 영향을 미치는 것으로 이해되고 있다.

본 연구에서는 췌장암에서 TGF β 1, T β II, p53 단백질의 발현 및 K-ras 점 돌연변이 유전자의 검출 빈도를 조사하고 췌장암의 발생에 관한 역할 및 임상적 의의를 규명하고자 하였다.

방 법

1) 대상

단국대학교 의과대학 부속병원에서 췌장절제 수술을 받았던 31예를 대상으로 하였다. 대상 질환으로는 26예의 췌관선암과 5예의 정상 췌장조직으로 이들 정상췌장 군은 유두부암으로 수술을 받았던 환자들 중 조직학적으로 정상적인 췌장을 보였던 경우였다. 췌장암군의 평균 연령은 61.4 ± 10.5 세, 남녀 비는 17 : 9, 정상 췌장 군의 평균 연령은 65.6 ± 9.9 세, 남녀 비는 3 : 2였다.

대상 환자의 의무기록을 조사하여 임상소견의 분석 외에 조직학적 분화도, 병기설정(1989년 UICC 기준)을 조사하였으며 생존율은 의무기록의 열람 외에 전화 문의를 통하여

확인하였다.

2) 방법

(1) TGF β 1, T β II 및 p53 단백질 항체: 본 연구에서 TGF β 1, T β II 2가지의 일차항체는 상품화되어 있는 다 클론 항체를 사용하였다. 항 TGF β 1 항체는 인체 TGF β 1의 카르복실 말단 328부터 353 아미노산에 해당하는 웨타이드와 결합하는 항 토끼 다 클론 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로서 TGF β 1외의 다른 이형체(isoform)와는 반응이 없었다.

T β II에 대한 항체로는 T β R II의 246에서 266의 아미노산과 반응할 수 있는 항 토끼 다 클론 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 TGF β 수용체 1형과 교차반응이 없는 것 이었다. p53 단백질에 대한 일차 항체는 단 클론성 항체로서 DO7 (Novo-Castrum, Manhasset, NY, USA)을 사용하였다.

(2) 면역조직 화학적 염색: 조직은 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직을 사용하였는데 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만든 후 크릴렌으로 파라핀을 제거한 후 알코올로 털수하고 조직 내의 비특이적 과산화효소의 작용을 차단하기 위해 30분간 0.3% H₂O₂가 섞인 메탄올에 처리하였다. 상온에서 30분간 10% 정상 염소혈청으로 처리한 후에 일차 항체를 4°C에서 PBS 완충액으로 희석하면서 반응시켰다. 그 후 방법은 면역조직화학염색의 공통적인 방법인 avidin-biotin complex으로 biotin이 부착된 2차 항체인 항 토끼 IgG를 상온에

Table 1. Clinical characteristics of the patients with pancreatic cancer (n=26)

Parameters	Number (%)
Sex	
Male	17 (65.4)
Female	9 (34.6)
Location of tumor	
Head	21 (80.8)
Body/tail	5 (19.2)
Size of tumor	
≥ 4.0 cm	13 (50.0)
< 4.0 cm	13 (50.0)
Cellular differentiation of tumor	
Well	3 (11.5)
Moderate	13 (50.0)
Poor	10 (38.5)
Lymph node metastasis	
Without	11 (42.3)
With	15 (57.7)
Tumor stage	
I	11 (42.3)
II	0 (0.0)
III	13 (50.1)
IV	2 (7.6)

서 45분간 반응시켰다. 이 후 상온에서 streptoavidin이 부착된 peroxidase로 30분간 반응시킨 후 PBS 용액에 3회 세척하였다. 면역반응은 PBS에 2 mM H₂O₂를 넣고 0.06 mM 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride를 처리하여 확인 하였다. 대조 염색은 hematoxylin으로 시행하였으며 80% glycerol gelatin으로 표본제작하였다. TGF β 1, 2형 수용체에 대한 면역 조직화학적 염색에서의 양성 대조군은 상품화된 kit 내에 들어있는 악성립프종 조직이었고 음성 대조군은 일차 항체 처리를 하지 않은 조직으로 하였다. TGF β 1, T β R II 및 p53 단백에 대한 면역조직화학적 염색 과정은 각각의 일차항체 처리를 제외하고는 동일하게 시행되었다. p53에 대한 면역조직화학적 염색 결과의 판정으로 양성 대조군은 강 양성을 보이는 대장암을, 음성 대조군은 일차 항체 처리를 하지 않은 조직으로 하였다. 췌장암과 정상 췌장조직에 대

한 TGF β 1, T β R II 및 p53에 대한 면역조직화학 염색 후 판정은 대상환자들의 정보가 없는 상태에서 1인의 경험 있는 병리학자에 의해 시행되었으며 100배 시야 하에서 중등급 이상의 강 양성이 10% 이상인 경우에 양성으로 판정하였다.

(3) 췌장조직에서의 DNA 추출: 절편 된 파라핀 포매 조직에서 면역조직화학 염색에서의 크실렌과 알코올 처리로 파라핀을 제거한 후 30분간 0.3% H₂O₂에 침수시켰다. 조직 1 mg을 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 용해완충액 200 μ l와 proteinase K (10 mg/ml) 10 μ l를 첨가한 후 55°C에서 4시간 반응시켰다. 단백질 및 기타 불순물의 제거는 phenol-chloroform 법을 이용하였고 DNA의 첨전은 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 100% 에탄올을 첨가한 후 -20°C에서 빙 동안 저장하였다. 14,000 rpm에서 10분간

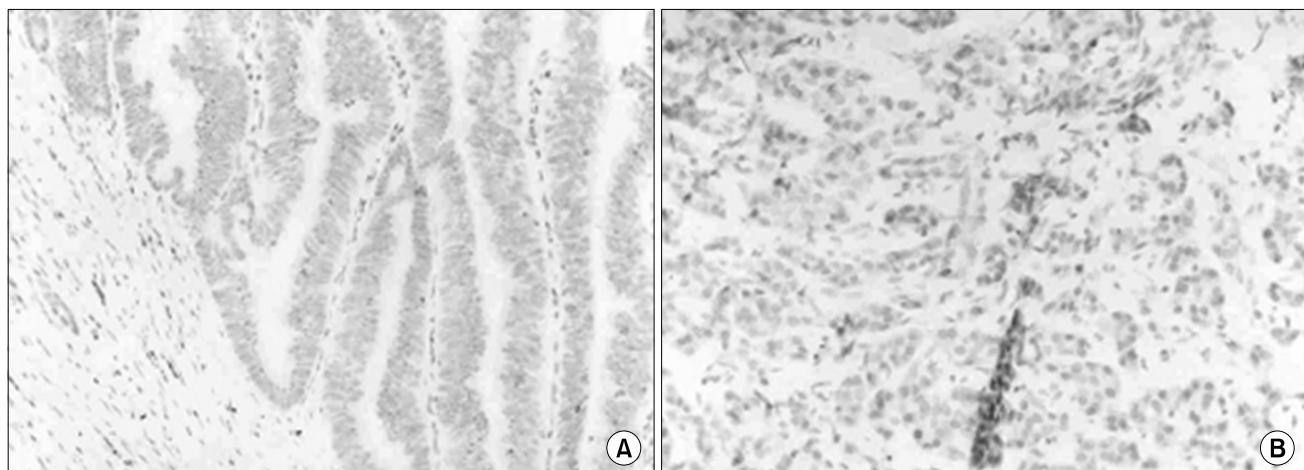


Fig. 1. Immunohistochemical staining of TGF β 1. (A) Brownish positive TGF β 1 cells are strongly expressed in the cytoplasm of pancreatic cancer cell. (B) However, in the ductal epithelial cell of normal pancreas, TGF β 1 is faintly expressed (ABC stain, $\times 100$).

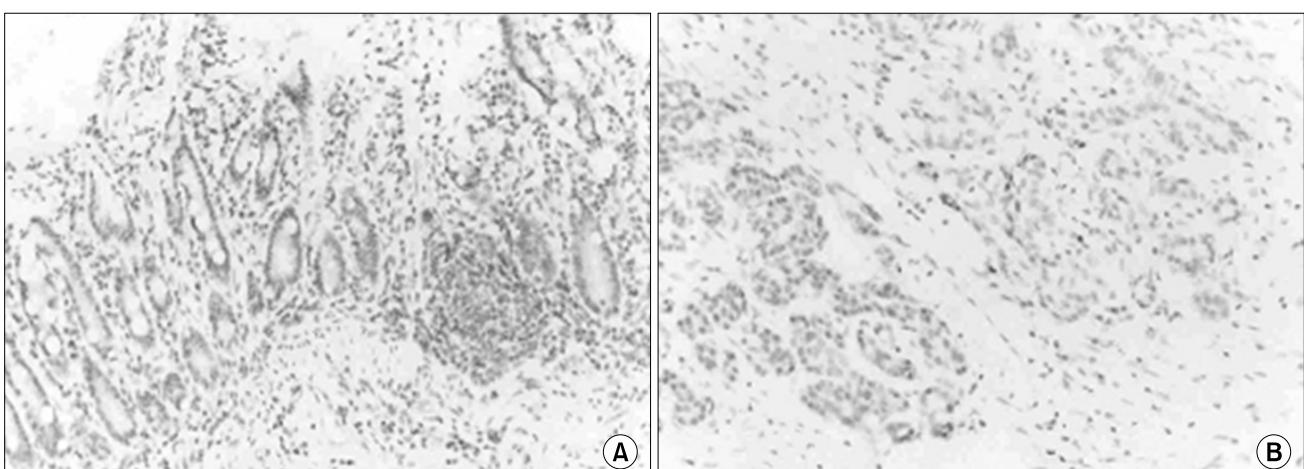


Fig. 2. Immunohistochemical staining of T β R II. (A) Diffuse, brownish stained T β R II cells are found in the pancreatic cancer cell. (B) However, in the normal pancreas, T β R II is faintly expressed (ABC stain, $\times 100$).

다시 원심분리한 후 상층액을 버리고 70% 에탄올로 세척하고 나서 진공 농축기로 20분간 말린 후 멸균된 3차 중류수 100 μ l를 첨가하였다. 분리된 DNA 용액은 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

(4) K-ras 유전자의 연쇄중합반응 및 제한효소반응: (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

K-ras codon 12의 돌연변이를 조사하기 위한 PCR 반응 용액의 조성으로는 10X PCR buffer 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 3 μ l, 10 mM dNTP 혼합액 1 μ l, 100 μ M primer 각각 2.5 μ l, Taq polymerase (Promega, USA) 2.5 unit와 멸균된 3차 중류수를 40 μ l가 되도록 첨가하였다. 여기에 template DNA를 10 μ l 추가하여 총 50 μ l 반응 용액이 되도록 하였다. 반응에 사용된 primers의 종류와 염기 서열은 다음과 같다.

Sense primer로 A-ACTGAATATAAAGTTGTGGTAGTTG-GACCT를 두 번의 PCR 반응에 사용하였으며 첫 번째 반응의 antisense primer로 B-TCAAAGAATGGCCTGGACC를, 두 번째 반응의 antisense primer로 C-TAATATGTCGACT-AAACAAGATTACCTC를 사용하였다. 첫 번째 PCR 반응 조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 1분, 55°C 1분, 73°C 30초씩 30회 반응 후 73°C에서 7분간 반응시켰다. K-ras primer의 첫 PCR 산물은 157 bp였으며 첫 PCR 산물 10 μ l를 제한효소 Mval (Boehringer-Manheim, Germany) 20 unit를 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. Mval 제한효소는 정상적인 ras의 codon 12 염기인 GGT를 인지하여 잘라지게 되며 정상형 ras가 제한효소의 처리로 114 bp로 나타나고 변이형 ras는 codon 12의 돌연변이가 존재하므로 제한효소의 작용을 받지 못하여 143 bp로 나타난다. 첫 번째의 Mval 반응 후의 산물 10 μ l를 두 번째 PCR의 template DNA로 이용하였다. 두 번째 PCR 반응 조건은 40회 반응시킨 것을 제외하고

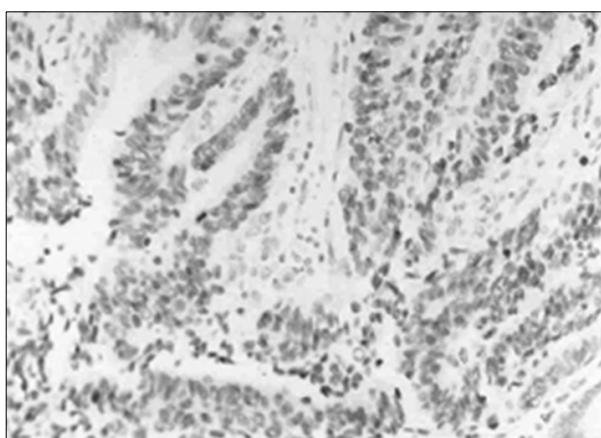


Fig. 3. Immunohistochemical staining of p53 protein. p53 protein is strongly expressed in the pancreatic cancer cell (ABC stain, $\times 100$).

는 첫 번째 PCR과 동일하게 하였다. 이후 다시 Mval 20 unit를 첨가하여 37°C에서 6시간 반응시켜 10% agarose gel에서 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 두 번째 Mval 제한효소 처리로 정상형 ras는 codon 12에서 잘려져서 106 bp로, 변이형 ras는 Mval의 작용을 받지 않아 135 bp로 확인되었다. K-ras 점 돌연변이 유전자 검출을 위한 PCR-RFLP법에서 돌연변이 유전자 양성 대조군으로는 대장암 세포주 SW 480을, 음성 대조군으로는 대장암 세포주 HT 29를 사용하였다.

(5) 통계: TGF β 1, T β RII 및 p53 단백 면역조직화학염색과 K-ras 돌연변이 유전자 검출 성적의 비교는 chi-square test를 사용하였으며 생존율의 비교는 Kaplan-Meier 방법을 이용하여 도식화한 후 Log-Rank test로 통계적 의의를 검정하였다. 통계적 유의성은 P<0.05인 경우로 하였다.

결 과

1) 췌장암의 임상적 특성

26예의 췌장암군의 임상적 특성을 조사한 결과 종양의 위치는 췌장두부가 21예(80.8%), 체부 및 미부가 5예(19.2%)였으며, 종양의 크기는 4 cm 이상인 경우 13예(50.0%), 4 cm 미만인 경우가 13예(50.0%)였다. 종양의 세포분화도는 분화도가 좋은 경우 3예(11.5%), 중등도인 경우가 13예(50.0%), 나쁜 경우가 10예(38.5%)였다. 림프절 전이가 있었던 경우는 15예(57.7%), 없었던 경우가 11예(42.3%)였다. 원격전이는 전 예에서 없었다. 1989년 UICC의 기준에 의한 병기로는 제1병기 11예(42.3%), 제3병기 13예(50.1%), 제4병기 2예(7.6%)였다(Table 1).

2) TGF β 1, T β RII, p53 단백발현률 및 K-ras 돌연변이 유전자 검출률

TGF β 1과 T β R II의 면역 화학조직 염색의 위치는 세포 내에서 비슷하였는데 TGF β 1은 세포질에서 미만성으로 염색되는 것이 많은 반면 T β R II는 세포막에 염색이 되는 경



Fig. 4. Detection of K-ras point mutation. K-ras mutation is very commonly observed in the pancreatic cancer tissue. M, 20 bp ladder; P, mutant control (SW 480); N, wild type control (HT 29); lane 1-3, wild type K-ras at 106 bp in normal pancreas; lane 4 ~ 6, mutant K-ras at 135 bp in pancreatic cancer.

우들도 자주 관찰되었다. 정상 췌장조직에서 TGF β 1과 T β R II는 췌관상피세포와 선방세포에서 각각 40%의 약한 발현을 나타내었다. 췌장암군에서는 TGF β 1 발현은 73.1% (19/26예), T β R II의 발현은 76.9% (20/26예)로 정상 췌장 조직에 비해 TGF β 1과 T β R II에서 모두 의미 있게 높게 발현되었다(각각 P<0.01)(Fig. 1, 2). 또한 p53 단백 발현은 정상 췌장조직에서 관찰되지 않았다. 26예의 췌장암 조직에서 p53 단백 발현율은 16예로서 61.5%였고(Fig. 3), K-ras 돌연변이 유전자는 정상 췌장조직에서는 관찰되지 않았고 췌장암 조직에서는 76.9% (20/26예)에서 검출되어(Fig. 4) p53 단백 발현과 K-ras 변이 유전자 검출에서 정상 췌장 조직에 비해 유의하게 증가되어 있었다(각각 P<0.01)(Table 2).

3) 췌장암의 임상적 특성과 TGF β 1 및 T β R II의 발현 관계

TGF β 1 및 T β R II 발현은 남자(n=17) 중 각각 13예(76.4%), 11예(64.7%)였고 여자는 각각 6예(66.7%), 7예(77.8%)로 성

별의 차이는 없었다. 종양의 크기가 4 cm 이상 되는 경우 TGF β 1의 발현은 76.9%(10/13예), T β R II의 발현은 69.2% (9/13예)였고 종양의 크기가 4 cm 미만의 경우 TGF β 1은 76.9% (10/13예), T β R II 발현은 76.9% (10/13예)로 유사하였다. 종양의 위치에서도 TGF β 1 및 T β R II의 발현의 차이는 보이지 않았다. 분화도에서도 분화가 잘되어 있는 경우 TGF β 1과 T β R II의 발현 차이도 없었다. 림프절 전이가 있었던 경우 TGF β 1 및 T β R II의 발현은 73.3% (11/15예), 66.7% (10/15예)였고 림프절 전이가 없었던 경우 TGF β 1 및 T β R II의 발현은 36.4% (4/11예), 27.3% (3/11예)로 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P<0.01). UICC 기준에 의한 병기에서도 stage I에서 TGF β 1의 발현은 36.3% (4/11예), T β R II는 27.3% (3/11예)였고 stage III+IV에서 TGF β 1은 73.3% (11/15예)에서, T β R II는 66.7% (10/15예)로 TGF β 1과 T β R II의 발현이 림프절전이 및 병기의 진행도와 유의하게 관련이 있음을 나타내었다(Table 3).

Table 2. TGF β 1, T β R II, p53 protein expressions and K-ras mutation in pancreatic cancer

	Positive immunoreactivity (%)			K-ras mutation rate (%)
	TGF β 1*	T β R II†	p53	
Pancreatic cancer (n=26)	19/26 (73.1)	20/26 (76.9)	16/26 (61.5)	20/26 (76.9)
Normal pancreas (n=5)	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	0/5 (0)	0/5 (0)
P-value	0.008	0.008	0	0

* = transforming growth factor β 1; † = transforming growth factor β receptor II.

Table 3. Relation between the expression of TGF β 1 and T β R II and clinical characteristics in pancreatic cancer (n=26)

Parameters	TGF β		P	T β R II		P
	Negative (%)	Positive (%)		Negative (%)	Positive (%)	
Sex						
Male (n=17)	4 (64.7)	13 (76.4)	0.73	6 (35.3)	11 (64.7)	0.72
Female (n=9)	3 (33.3)	6 (66.7)		2 (22.2)	7 (77.8)	
Size of tumor						
≥4.0 cm (n=13)	3 (23.1)	10 (76.9)	0.81	4 (30.8)	9 (69.2)	0.82
<4.0 cm (n=13)	3 (23.1)	10 (76.9)		3 (23.1)	10 (76.9)	
Differentiation						
Well (n=3)	0	3 (100)	0.75	1 (33.3)	2 (66.7)	0.68
Moderate(n=13)	4 (30.8)	9 (69.2)		2 (15.4)	11 (84.6)	
Poor (n=10)	2 (20.0)	8 (80.0)		3 (30.0)	7 (70.0)	
Lymph node metastasis						
Without (n=11)	7 (63.6)	4 (36.4)	0.008	8 (72.7)	3 (27.3)	0.007
With (n=15)	4 (26.7)	11 (73.3)		5 (33.3)	10 (66.7)	
Tumor stage						
I (n=11)	7 (63.6)	4 (36.4)	0.008	8 (72.7)	3 (27.3)	0.007
III+IV (n=15)	4 (26.7)	11 (73.3)		5 (33.3)	10 (66.7)	

Table 4. Relation between the expression of p53, K-ras mutation and clinical characteristics in pancreatic cancer (n=26)

Parameters	p53 protein		P	K-ras mutation		P
	Positive (%)	Negative (%)		Positive (%)	Negative (%)	
Sex						
Male (n=17)	9 (52.9)	8 (47.1)		13 (76.4)	4 (23.5)	
Female (n=9)	6 (66.7)	3 (33.3)	0.95	7 (77.8)	2 (22.2)	0.94
Size						
≥ 4.0 cm (n=13)	8 (61.5)	5 (38.5)		10 (76.9)	3 (23.1)	
< 4.0 cm (n=13)	7 (53.8)	6 (46.1)	0.88	10 (76.9)	3 (29.1)	0.95
Differentiation						
Well (n=3)	2 (66.7)	1 (23.3)		1 (23.3)	2 (66.7)	
Moderate (n=13)	8 (61.5)	5 (38.5)	0.77	11 (84.5)	2 (15.4)	0.85
Poor (n=10)	6 (60.0)	4 (40.0)		8 (80.0)	2 (20.0)	
Tumor stage						
I (n=11)	7 (63.6)	4 (36.4)		8 (72.7)	3 (27.3)	
III+IV (n=15)	9 (60.0)	6 (40.0)	0.83	11 (73.3)	4 (26.7)	0.87
Mean survival (months)						
	13.5±3.4	19.8±8.1	0.03	15.9±5.5	17.4±6.7	0.55

4) p53 단백발현 및 K-ras 돌연변이 검출과 임상적 특성과의 관계

p53 단백발현은 남자 9예(52.9%), 여자 6예(66.7%)로 성별에 따른 차이는 없었다. 종양의 크기는 4.0 cm 이상인 경우 p53 단백발현은 8예(61.5%), 4.0 cm 미만인 경우 7예(53.8%)에서 양성으로 크기에 따른 차이도 관찰되지 않았다. 세포분화도에서도 분화도가 좋은 경우 2예(66.7%), 중등도인 경우 8예(61.5%), 미분화인 경우 6예(60.0%)에서 p53 단백이 양성으로 조사되어 분화도에 따른 차이도 보이지 않았다. 세포병기에서도 I기는 7예(63.6%), III+IV기는 9예(60.0%)에서 양성으로 병기와 p53 단백발현은 큰 관계를 보이지 않았다. K-ras 돌연변이에서도 성별에서 남자 13예(76.4%), 여자 7예(77.8%)로 통계적 차이는 나타내지 않았다. 종양의 크기에서도 4 cm 이상 경우와 4 cm 미만인 경우에서 모두 각각 10예(76.9%)씩 돌연변이 K-ras가 검출되어 크기에 따른 차이도 보이지 않았다. 세포분화도에서도 분화가 좋거나 중등도 이거나 미분화인 경우에서 K-ras 돌연변이 유전자의 검출은 통계적으로 유의 있는 차이가 관찰되지 않았다. 또한 병기에서도 I기에서 K-ras 돌연변이는 8예(72.7%)에서 관찰되었고 III+IV기에서는 11예(73.3%)에서 관찰되어 병기에 따른 차이도 보이지 않았다(Table 4).

5) TGF β 1, T β R II 및 p53 단백발현율 및 K-ras 돌연변이 유전자 검출과 생존율과의 관계

TGF β 1이 발현된 체장암군의 평균 생존율은 12.6±5.8개월, TGF β 1가 발현되지 않은 경우의 생존율은 18.5±6.4개월로서 통계적으로 유의하였으며(P=0.03) 또한 T β R II가 발

Table 5. Correlation of Postoperative Survival with Expression of TGF β 1, T β R II, p53 Protein and K-ras Mutation in Pancreatic Cancer (n=26)

Markers (number of tumors)	Postoperative survival period	
	Mean±SD (months)	Wilcoxon test
TGF β 1		
Positive (n=19)	12.6±5.8	
Negative (n=7)	18.5±6.4	0.03
T β R II		
Positive (n=20)	11.8±5.8	
Negative (n=6)	17.9±5.2	0.03
p53		
Positive (n=16)	13.5±3.4	
Negative (n=10)	19.8±8.1	0.03
K-ras		
Positive (n=20)	15.9±5.5	
Negative (n=6)	17.4±6.7	0.55

현된 경우도 생존율 11.8±5.8개월, T β R II가 발현되지 않은 경우도 생존율 17.9±5.2개월로써 TGF β 1과 T β R II의 발현은 의미 있는 예후인자임을 나타내었다(p=0.03). p53 단백이 발현된 체장암은 16예로 평균 생존기간이 13.5±3.4개월이었고 발현되지 않은 체장암 10예의 평균 생존기간은 19.8±8.1개월로 p53 단백 발현이 된 경우 유의하게 생존기간이 낮았다(P=0.03). 그러나 K-ras 돌연변이 유전자는 검출된 체장암과 비 검출 체장암 간에 생존율의 차이는 관찰되지 않았다(Table 5).

고 쳤

췌장암은 5년 생존율이 0.4% 미만인 예후가 매우 나쁜 암으로 종양 생물학적 특성이나 종양의 빠른 진행도 등이 여전히 이해되지 못하고 있으며 이러한 췌장암의 종양학적 특성을 밝히기 위해 최근 많은 성장인자, 암유전자, 암 억제 유전자의 돌연변이 등이 연구 중에 있다. 외국의 보고에서는 췌장암에서 EGF (epidermal growth factor)와 TGF α (transforming growth factor α)가 증가되어 있음이 알려졌고,(18) ras 유전자의 돌연변이,(15) p53 유전자의 변이(19), TGF β 의 증가,(8,9) c-myc 유전자의 증가(20) 등이 보고되면서 췌장암의 발암과 진행기전의 이해에 관심이 고조되고 있다. 본 연구에서 조사된 TGF β 는 세포의 형질전환(transformation)을 촉진하는 인자의 하나로 발견되었는데 여러 종류의 상피세포의 성장을 촉진시키는 인자라기보다는 강력한 억제인자이고 collagen 합성의 강력한 촉진인자이며 T-림프구와 B-림프구 활성의 억제인자이며 단핵구/거대세포의 주화성(chemotactic)인자로 알려지고 있다.(4)

본 연구 결과에서 TGF β 및 T β R II는 췌장암의 크기, 위치, 분화도와는 관련이 없었지만 림프절 전이, 병기, 생존율과는 밀접한 관련이 있어 TGF β 및 T β R II가 발현되는 췌장암일수록 예후가 나쁘다는 것이 확인되었다. 이는 외국의 다른 보고들과도 일치되는 결과였다.(9,21-24) TGF β 가 발현된 췌장암의 평균생존 기간은 12.6±5.8개월로 발현되지 않는 췌장암의 18.5±6.4개월에 비해 유의한 생존기간의 차이를 나타내었는데 이는 T β R II의 발현에 따른 생존율과도 거의 유사하였다. 그러므로 TGF β 및 T β R II가 발현되는 종양이 림프절 전이를 더 많이 일으키고 병기의 진행과 관련 있으며 따라서 생존율을 나타내는 예후인자라는 것을 예시한다고 하겠다. 이와 같은 현상은 위암에서는 이미 밝혀져 있는 것으로 췌장암에서도 비슷한 소견임을 나타내었다.(22) p53단백 발현에 따른 임상양상은 TGF β 및 T β R II의 발현과 거의 유사하였으나 p53단백 발현은 생존율에서만 차이를 나타내고 있다. 즉, p53 단백 발현이 있는 경우 생존율은 13.5±3.4 개월이었고 발현이 없는 췌장암에서는 19.8±8.1 개월로 p53 단백 발현이 된 경우가 생존율이 유의하게 낮게 조사되었다. 즉 임상적 특성과 p53 단백 발현과는 보고자마다 생존율과 관계있거나,(25) 세포분화도와 관련 있거나,(26) 림프절 전이와 관계있다는 보고가(25) 있는 한편 림프절 전이, 병기, 분화도, 생존율 등에 전혀 관계없다고 보고하기도 하였다.(27) 그러므로 변이된 p53 단백이 예후인자와의 관련성은 아직까지는 확실히 정립되지 못하였고 보고자 또는 암의 종류마다 많은 차이가 있다고 하겠다. 국내 보고에서는 p53 단백발현이 생존율과 관계없다고 보고하였으나,(14) 본 연구에서는 p53 단백발현이 의미 있는 예후인자로 조사되었다. 이 차이는 연구에 사용된 췌장

암의 병기가 국내의 다른 보고에서는 III~IV기의 매우 진행된 병기가 전체 대상 췌장암의 70% 이상을 차지하고 있는 반면 본 연구에서는 I기가 대상 환자의 약 반 수를 차지하였고 수술 시 수술 대상자의 선택도 엄격하게 하여 이로 인한 생존기간의 차이가 있었을 것으로 추측하고 있다.

K-ras 돌연변이 출현빈도는 췌장암의 병기, 림프절 전이, 예후와 관계없다는 보고들이 있으며 예후인자로서의 K-ras 돌연변이 유전자는 인정되지 않는 것이 일반적 결론이다.(28) 본 연구에서도 K-ras 돌연변이 유전자는 췌장암에서 76.9%로 높은 빈도로 발견되었지만 림프절 전이, 병기, 생존율과는 관계없었다.

본 연구에서는 TGF β , T β R II 및 p53 단백의 발현 유무를 면역조직염색 방법으로만 조사하였고 northern blot법, in situ hybridization법 등의 방법을 병용하지는 않았으나 다른 방법들로 연구한 보고들의 결과와 크게 다르지 않았다.(8,9,24) 그러나 추후 췌장암의 발암적 기전의 이해, 혹은 규명을 위해서는 다른 연구방법들을 보완한 확인 연구들이 필요한 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Eskelin MJ, Haglund UH. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods. Eur J Surg 1999;165:292-306.
- Mangray S, King TC. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. Front Biosci 1998;3:D1148-60.
- Andre T, Balosso J, Louvet C, Gligorov J, Callard P, de Gramont A, et al. Adenocarcinoma of the pancreas. General characteristics. Presse Med 1998;27:533-6.
- Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. Transforming growth factor- β . Cancer Surv 1992;12:81-103.
- Bassing CH, Yingling JM, Howe DJ, Wang T, He WW, Gustafson ML, et al. A transforming growth factor β type I receptor that signals to activate gene expression. Science 1994; 263:87-9.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. Science 1995;268:1336-8.
- Hirayama D, Fujimori T, Satonaka K, Nakamura T, Kitazawa S, Horio M, et al. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and transforming growth factor- β in the penetrating type of early gastric cancer. Hum Pathol 1992;23: 681-5.
- Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Berger HG, Kobrin MS, Baldwin RL, et al. Enhanced expression of the type II transforming growth factor beta receptor in human pancreatic cancer cells without alteration of type III receptor expression.

- Cancer Res 1993;53:2704-7.
- 9) Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. Gastroenterology 1993;105:1846-56.
 - 10) Vincent F, Hagiwara K, Ke Y, Stoner GD, Demetrick DJ, Bennett WP. Mutation analysis of the transforming growth factor beta type II receptor in sporadic human cancers of the pancreas, liver and breast. Biochem Biophys Res Commun 1996;223:561-4.
 - 11) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994;54: 4855-78.
 - 12) Casey G, Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Lopez ME, Buchler M, et al. p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. Cancer Lett 1993;69:151-60.
 - 13) DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. Am J Clin Pathol 1994;101: 684-8.
 - 14) Lee DH, Song SY, Jung JB, Kang JK, Park IS, Lee WJ, et al. p53 protein expression in pancreatic cancer. Korean J Gastroenterol 1997;30:98-102.
 - 15) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Peruch M. Most human carcinomas of exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell 1988;53:549-54.
 - 16) Mariyama M, Kishi K, Nakamura K, Obata H, Nishimura S. Frequency and types of point mutation at the 12th codon of the c-K-ras gene found in pancreatic cancers from Japanese patients. Jpn J Cancer Res 1998;80:622-6.
 - 17) Satoh K, Sawai T, Shimosegawa T, Koizumi M, Yamazaki T, Mochizuki F, et al. The point mutation of c-Ki-ras at codon 12 in carcinoma of the pancreatic head region and in intraductal mucin hypersecreting neoplasm of the pancreas. Int J Pancreatol 1993;14:135-43.
 - 18) Korc M. Role of growth factors in pancreatic cancer. Surg Oncol Clin N Am 1998;7:25-41.
 - 19) Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, et al. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. Clin Cancer Res 1999;5:1147-53.
 - 20) Baldwin RL, Korc M. Growth inhibition of human pancreatic carcinoma cells by transforming growth factor beta-1. Growth Factors 1993;8:23-34.
 - 21) Grau AM, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans DB, Abbruzzese JL, et al. Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer Res 1997;57:3929-34.
 - 22) Kai T, Taketazu F, Kawakami M, Shimanuki K, Yamada S, Miyazono K, et al. Distribution of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric carcinoma tissue. Jpn J Cancer Res 1996;87:296-304.
 - 23) Friess H, Berberat P, Schilling M, Kunz J, Korc M, Buchler MW. Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. J Mol Med 1996;74:35-42.
 - 24) Lu Z, Friess H, Gruber HU, Guo X, Schilling M, Zimmermann A, et al. Presence of two signaling TGF-beta receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. Dig Dis Sci 1997;42:2054-63.
 - 25) Campani D, Boggi U, Cecchetti D, Esposito I, Ceccarelli F, D'Antonio L, et al. p53 overexpression in lymph node metastases predicts clinical outcome in ductal pancreatic cancer. Pancreas 1999;19:26-32.
 - 26) Sessa F, Bonato M, Bisoni D, Ranzani GN, Capella C. Ki-ras and p53 gene mutations in pancreatic ductal carcinoma: a relationship with tumor phenotype and survival. Eur J Histochem 1998;42:67-76.
 - 27) Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, et al. Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. Jpn J Cancer Res 1995;86:174-81.
 - 28) Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequency glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-K-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. Jpn J Cancer Res 1990;81:135-40.