

제 1 병기 비소세포폐암에서 cyclin E, p27, 및 pRb의 발현과 예후 <cyclin E, p27, pRb의 발현과 예후>

천봉권*, 조봉균**, 조성래**

고신대학교 의학대학 흉부외과학교실*, 병리학교실**

Prognostic Significance of Cyclin E, p27, and pRb in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer

Bong Kwon Chun, M.D.*, Bhong Gyun Jo, M.D.***, Sung Rae Cho, M.D.**

Department of Pathology*, Kosin University College of Medicine

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Kosin University College of Medicine

Abstract

Background: Cyclin E and cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kpl} are two important regulators of the G1-S transition modulating the activity of cyclin-dependent kinases and completing phosphorylation of pRb. Aberrations in the cell cycle control are often observed in tumors and might even be mandatory in tumor development. Little is known about the expression and prognostic significance of cyclin E and p27 and relationship between the expression of cyclin E, p27, and pRb in non-small cell lung cancer(NSCLC). **Materials and Methods:** The expression of cyclin E, p27, and pRb in eighty-one cases of resected stage I NSCLC tissues and its relation to major clinico-pathological factors, including histology, differentiation, size of tumor, pleural extension and survival rate were investigated and analyzed. Immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies specific for cyclin E, p27, pRb were performed by ABC method. **Result:** Expression rates of cyclin E, p27, and pRb in stage I NSCLC tissues were 29.6%, 28.4%, and 58.0% respectively. Cyclin E was expressed higher in cases of pleural extension($p=0.04$), and p27 was expressed higher in tumor of less than 3cm in diameter($p=0.015$), and pRb was expressed higher in cases of poorly differentiated tumor ($p=0.049$). The relationship between expression of cyclin E and pRb was not observed. The 5-years survival rate was lower in cases of positive expression of cyclin E than in cases of negative expression of cyclin E(44.4% vs 68.2%, $p=0.015$), and the 5-years survival rate was 72.2% in positive expression of p27 and 56.2% in negative expression of p27($p=0.09$). The 5-years survival rate was higher in negative expression of cyclin E and positive expression of p27 than in cases of positive expression of cyclin E and negative expression of p27 (73.5% vs 36.3%, $p=0.0029$). In multivariate analysis, expression of cyclin E and p27 were an unfavorable prognostic factor($RR=3.578$, $p=0.006$) and an favorable prognostic factor($RR=0.183$, $p=0.019$) respectively. **Conclusion:** Cyclin E and p27 may play an important role for the biological behavior of stage I NSCLC, so that the expressions of cyclin E and/or p27 may be new prognostic markers.

Key words : Non-small cell lung cancer, cyclin E, p27, pRb

서론

교신저자 : 천 봉 권
TEL 051-990-6322 · FAX : 051-241-7420
E-mail achunp@ns.kosinmed.or.kr

* 본 연구는 고신대학교 의학부 연구비의 지원으로 하였음

폐암 환자의 예후는 매우 불량하여 병기에 따라 차이가 있으나, 전체 폐암의 5년 생존율은 15% 이하로 매우

낮게 보고되고 있다¹⁾. 제1병기 폐암은 전체 비소세포폐암 중 약 15% 내지 25%를 차지하며, 치료는 외과적 절제술이 가장 좋으나 수술 후 환자의 30% 내지 40%는 사망에 이르게 된다.¹⁾ 비소세포폐암의 예후와 관련된 임상적-병리학적 인자를 규명하기 위한 많은 연구가 시행되어 왔으며, 예후와 관련된 분자생물학적 변화, 특히 세포주기 조절인자의 변화 등 실제적으로 임상에 유용한 많은 유전자들이 많이 보고되어 있다.²⁾ 그러나 이들 유전자들의 임상적 유효성에 대해서는 논란이 되고 있다.

인체에서 암의 발생기전은 조절되지 않는 세포분열로 설명될 수 있다. 세포주기와 관련된 각종 유전자의 DNA 복제이상은 세포내 신호 전달경로의 이상과 함께 종양 유전자의 활성화 또는 종양 억제유전자의 변이를 유발하여 정상세포의 악성 변환을 초래한다. 따라서 세포주기 조절의 이상은 대부분의 인체 암 발생의 중요한 필요조건이다.³⁾ 세포주기 중 세포가 G₀/G₁기로부터 S기로 이행하도록 하는 중요한 기전이 최근에 밝혀졌다.^{4,5)} 여러 종류의 종양에서 유전자의 이상에 근거하여 세포주기 중 G₀/G₁기로부터 S기로의 이행이 종양형성에 중요한 요소라고 보고되고 있다.³⁾ 세포주기는 cyclin 의존성 인산화효소(cyclin-dependent kinases, cdk)에 의하여 조절되며, cdk들은 cyclin 등의 촉진제나 cdk 억제인자 등의 억제인자와 결합함으로써 조절된다.⁶⁻⁸⁾ cdk는 세포분열신호 및 성장억제신호를 총괄하며, 세포주기 내의 이행을 조정한다.⁶⁾ 세포주기 G₁기를 지나 S기로의 이행은 G₁기의 cyclin들의 활성화도에 의존하며, D-형 cyclin 및 cyclin E가 G₁기의 cyclin에 속한다. D-형 cyclin은 G₁ 중간기에 활성화도가 최고조에 이르며 cdk4 및 cdk6와 결합하여 인산화효소 복합체를 형성한다.⁹⁻¹²⁾ 반면에 cyclin E는 G₁-S 경계에서 표현되며 cdk2와 활동형의 복합체를 구성한다.¹³⁾ cdk2-cyclin E 복합체는 cdk4/6-cyclin D 복합체에 의한 pRb의 불완전한 인산화를 완전하게 이루어, S기의 시작을 촉발한다.¹⁴⁾ Cyclin E의 발현은 종양세포에 특이한 소견으로 간주되어 종양과 관련된 이상소견이며, 유방암 등에서 이의 발현은 예후가 불량한 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾

p27^{Kip1}은 27Kda의 열안정 단백질이며, 인간 *Kip1*은 198개의 아미노산으로 이루어진 하나의 단백질 유전자로¹⁶⁾ cyclin E-cdk2 복합체에 의한 pRb(retinoblastoma)단백질의 탈인산화와 순조로운 G₁-S기 이행을 억제시킴으로써 세포주기를 멈춘다. 따라서 p27^{Kip1}은 종양에서 성장

을 억제시키는 역할을 함으로, 유방암과 대장암 등에서 p27^{Kip1}의 발현은 예후가 양호한 것으로 알려져 있다.

현재까지 비소세포폐암에서 예후와 관련된 많은 종류의 유전자가 보고 되어 있지만, 세포주기 조절인자 중의 하나인 cyclin E에 관한 연구는 거의 없으며, p27 및 pRb과의 상호연관성에 대해서도 전혀 연구되어져 있지 않다.

이에 저자들은 절제된 제1병기의 비소세포폐암에서 cyclin E와 p27의 발현이 예후인자로서의 역할을 할 수 있는지 또한 cyclin E 단백질의 발현과 pRb의 발현의 상호연관성을 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1991년 1월부터 2000년 10월까지 폐암의 진단하에 외과적으로 절제되어 고신대학교 복음병원 병리과에서 진단된 비소세포폐암 중에서 수술 병리학적으로 제1병기이며, 병력지의 기록이 충실하고 파라핀 포매 조직표본의 보관상태가 양호한 81예의 환자를 대상으로 하였다. 81예 환자의 연령분포는 21세에서 75세로 평균 59.64세였으며, 성별은 남자 71명(87.7%), 여자 10명(12.3%)이었다. 병기는 American Joint committee on Cancer (AJCC)¹⁷⁾의 지침을 따랐으며, 각종 검사에 사용된 조직은 절제되어 보관된 파라핀 포매 조직표본 중에서 종양세포가 있는 대표적인 부위를 연구재료로 하였고, 암조직이 없는 정상 폐조직을 대조군으로 하였다.

2. 연구방법

1) 임상-병리조직학적 분석

환자의 임상기록을 검토하여 환자의 나이, 성별, 생존여부와 생존기간 등을 조사하였고, 종양의 크기와 위치 등에 관한 육안병리학적 소견은 보관된 병리보고서와 육안표본 사진을 참고로 하였다. 외과적으로 절제된 폐암 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 고정한 후, 통상적인 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친 후 파라핀에 포매하고 4-5 μ m의 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였고, 광학현미경 하에서 재검사하였다. 각 증례는 종양의 크기, 흉막의 침

범여부, TNM병기, 조직학적 유형, 조직학적 등급 등 병리학적 파라미터에 따라 분석하였다. 조직학적 유형은 WHO/IASLC 분류법¹⁸⁾에 따라 분류하였고, 조직학적 등급은 3단계로 나누어 고등급 분화, 중등도 분화, 저등급 분화로 분류하였다.

2) 면역조직화학적 염색 및 판정

(1) 일차항체

antimouse monoclonal antibody cyclin E(Clone CYE05, NeoMarkers, Fremont, U.S.A.), antimouse monoclonal antibody p27(Clone DCS-72.F6, NeoMarkers, Fremont, U.S.A.), 및 antirabbit polyclonal antibody retinoblastoma suppressor protein(NeoMarkers, Fremont, U.S.A.) 을 각각 1:40, 1:50, 1:50으로 희석하여 사용하였다.

(2) 면역조직화학적 염색

포르말린 고정과 파라핀 포매 조직으로서 각 항원에 대한 단클론 항체를 이용하여 avidin-biotin complex (ABC) 법으로 면역조직화학적 염색을 아래와 같은 과정으로 시행하였다. 종양의 대표적인 부위의 넓이가 20x20 mm 이상이며, 또한 이웃한 비종양성 폐조직을 포함하는 대표적인 파라핀 포매 블록을 4-5 μ m의 두께로 박절하고, 60°C 오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 xylene에서 10분간 탈파라핀 과정을 거친 다음, 100%, 90% 에탄올의 순서로 각각 두 번씩 3분 동안 함수과정을 수행하고, Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 pH 6.0의 citrate 완충용액에 슬라이드를 담근 후 극초단파로 약 15분간 끓인 후, 실온에 약 20분간 방치하여 온도를 내린 다음 Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하였다. H₂O₂로 endogenous peroxidase 활성도를 억제시킨 후 Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하였다. 비특이적인 배경 염색을 방지하기 위하여 정상 양 혈청(LSAB kit: DAKO, Carpinteria, U.S.A.)을 처리하여 실온에서 약 30분간 반응시켰다. 각 일차항체의 희석액을 슬라이드 조직위에 충분한 양으로 떨어뜨린 후 상온에서 90분간 두어 반응을 시켰다. Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하고 2차 항체(LSAB kit: DAKO, Carpinteria, U.S.A.)로 약 30분간 처리하였다. 다시 Tris

완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하고 Streptavidin horse radish peroxidase (HRP)에 30분간 반응시켜 biotin-avidin 특이 결합을 유도하고 다시 Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC, DAKO company, Carpinteria, U.S.A.)을 도포 하여 6분간 두어 발색하고, 다시 Tris 완충용액(x10 Immunoassay buffer: Biomed, Foster, U.S.A.)에 10분간 수세하였다. Mayer hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 면역조직화학적 염색의 판정

면역조직화학적 염색의 판정은 cyclin E 단백질, p27, 및 pRb 모두 핵에 적갈색으로 염색된 경우를 양성으로 하였다. 염색의 강도에 따라서 종양세포의 핵에 발현이 없는 경우는 (-), 핵에 약하게 발현된 경우는 (+), 분명한 발현이 있는 경우 (++), 아주 강하게 발현된 경우 (+++)로 분류하였다. 이 중에서 (++) 및 (+++)로 발현된 경우만 양성으로 판정하였다. 또 양성으로 판정된 핵 염색을 보이는 종양세포의 범위는 발현이 없는 경우와 30% 미만의 종양세포가 양성인 경우는 음성으로 판정하였고, 30% 이상의 종양세포가 양성인 경우는 양성으로 판정하였다(Fig. 1, 2, 3). 조직표본 내에 포함된 정상 세기관지의 상피세포와 폐포세포에서 cyclin E 단백질은 세포 핵에 드물게 발현되었고, p27은 약 20%의 세포핵에서 (+)/(++)의 발현을 보였으며, pRb는 약 10%의 세포핵에서 (+)/(++)의 강도로 발현되었다.

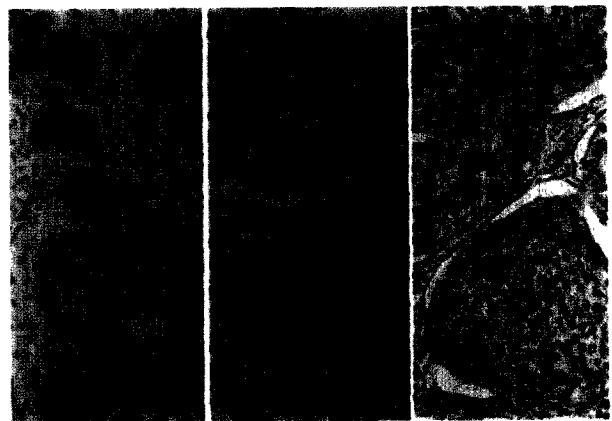


Fig. 1. Expression of cyclin E in non-small cell lung cancer. Positive nuclear staining in squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B), and negative staining in nuclei of the tumor cells (C). (Immunohistochemical staining, $\times 200$)



Fig. 2. Expression of p27 in non-small cell lung cancer. Positive nuclear staining in squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B), and negative staining in nuclei of the tumor cells (C). (Immunohistochemical staining, $\times 200$)

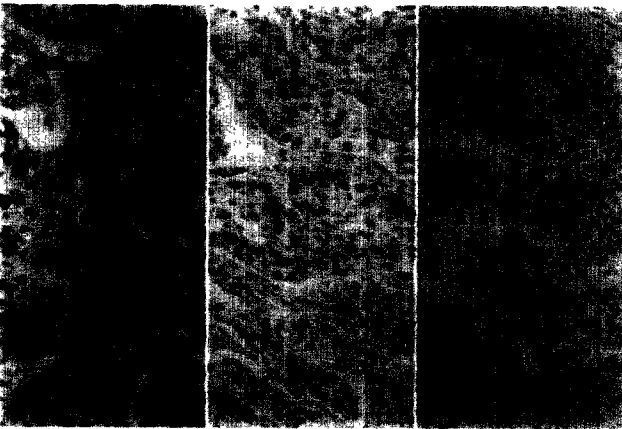


Fig. 3. Expression of pRb in non-small cell lung cancer. Positive nuclear staining in squamous cell carcinoma (A) and adenocarcinoma (B), and negative staining in nuclei of the tumor cells (C). (Immunohistochemical staining, $\times 200$)

3) 통계분석

SPSS 프로그램(Statistical Package for , Windows, 11.0.0, SPSS Inc., Chicago, U.S.A.)을 사용하여 통계학적 분석을 하였다. log-rank 검사를 이용하여 종양 무재발 생존과 여러 가지의 병리학적 인자들, 즉 조직학적 유형, 종양의 분화도, 종양의 크기, 흉막으로의 침습 여부와 cyclin E, p27, 및 pRb 발현과의 상관성을 조사하였다. Cyclin E, p27, 및 pRb 발현 상호간의 상관성도 조사하였다. 생존 곡선은 Kaplan-Meier 법을 이용하였고 cyclin E와 p27을

포함한 여러 가지의 임상적-병리학적 인자들과의 상관성은 Fisher exact probability test 및 Pearson chi-square test를 이용하여 조사하였다. 의미 있는 예후인자간의 다변량 분석을 위하여 Cox proportional hazards 모델을 이용하였다. 모든 통계학적 분석은 p값이 0.05 이하일 때 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 제1병기 비소세포폐암의 병리조직학적 특징

총 81례의 제1병기 비소세포폐암 조직에서 조직학적 유형에 따른 분포는 편평세포암종 54예(66.7%), 선암종 22예(27.2%), 대세포암종 3예(3.7%), 선편평세포암종 1예, 점액표피양 암종 1예였다. 조직학적 분화의 정도에 따른 분포는 고등급 분화 암종 27예(33.3%), 중등도 분화 암종 28예(34.6%), 저등급 분화 암종 26예(32.1%) 이었다.

TNM병기에서 T병기에 관여하는 인자 중 종양의 크기에 따른 분류로 종양의 크기가 3cm 이하 32례(39.5%), 3cm 이상 49례(60.5%)였고, 장측 늑막으로의 침습 여부에 따라 장측 늑막으로의 침습이 있는 경우가 26예(32.1%), 장측 늑막 침습이 없는 경우가 55예(67.9%) 이었다(Table 1).

Table 1. Main pathological characteristics of stage I non-small cell cancer

Characteristics	No. of Patients	%
Histology		
Squamous cell carcinoma	54	66.7
Adenocarcinoma	22	27.2
Large cell carcinoma	3	3.7
Mixed, NOS	2	2.5
Differentiation		
Well	27	33.3
Moderately	28	34.6
Poorly	26	32.1
Tumor diameter(cm)		
≤ 3	32	39.5
> 3	49	60.5
pleural extension		
Present	26	32.1
Absent	55	67.9

2. 제1병기 비소세포폐암에서 cyclin E의 발현

총 81례의 제1병기 비소세포폐암 조직에서 cyclin E 단백질의 양성 발현은 24례로 29.6% 이었다. 폐암조직 유형에 따라 cyclin E의 발현은 편평세포암종 35.2%, 선암종 18.2%로 선암종에 비해 편평세포암종에서 높은 발현을 보였고($p<0.05$), 종양의 분화도나 종양의 크기에 따른 발현율의 차이는 없으나 장측 늑막을 침습한 경우는 26례 중 11례에서 발현되어 42.3%로, 장측 늑막침습이 없는 경우 55례 중 14례, 25.5%에 비해 높은 발현율을 보였다($p<0.05$)(Table 2).

3. 제1병기 비소세포 폐암에서 p27의 발현

총 81례의 제1병기 비소세포폐암 조직에서 p27의 양성 발현은 23례로 28.4%의 발현율을 보였으며, 폐암조직의 유형, 분화도, 장측 늑막침습 여부에 따른 발현율에는 차이가 없으나 종양의 크기가 3cm 이하인 군은 43.7%의 발현율을 보여, 3cm 이상인 군 19.2%에 비해 높게 발현되었다($p<0.05$)(Table 2).

4. 제1병기 비소세포 폐암에서 pRb의 발현

총 81례의 제1병기 비소세포폐암 조직에서 pRb의 양성 발현은 47례로 58.0%의 발현율을 보였으며, 폐암조직의 유형, 종양의 크기, 장측 늑막침습 여부에 따른 발현율에는 차이가 없으나 종양세포의 분화도에 따라 40.7%, 60.7%, 및 73.1%의 발현율을 보여, 분화도가 낮은 군에

서 높게 발현되었다($p<0.049$) (Table 2).

5. 제1병기 비소세포폐암에서 cyclin E와 p27의 발현과 예후와의 상관성

제1병기 비소세포폐암의 5년 생존율은 61%이었다. 폐암조직에서 cyclin E 발현군의 5년 생존율은 44.4%로, 미발현군 68.2%에 비해 의미 있게 낮았다($p=0.015$). 또 폐암조직에서 p27의 발현군의 5년 생존율은 72.2%로, 음성군 56.2% 보다 낮게 나타나는 경향이 있었다($p=0.09$) (Table 3) (Fig. 4, 5). 폐암조직에서 pRb의 발현 유무와 5년 생존율은 통계학적 의미가 없었다 ($p=0.44$) (Table 3).

Table 3. The 5-Years survival rate according to expression of cyclin E, p27 and pRb in stage I non-small cell lung cancer

	No. of patients	(%)	5-yr Survival Rate	p-value
Cyclin E				0.015
Positive	24	(29.6)	44.4	
Negative	57	(70.4)	68.2	
p27				0.09
Positive	23	(28.4)	72.2	
Negative	58	(71.6)	56.2	
Rb				0.44
Positive	47	(58.0)	27.7	
Negative	34	(42.0)	37.1	

* $p < 0.05$

Table 2. Frequency of cyclin E, p27, and pRb protein in stage I non-small cell cancer

Characteristics	No. of patients	Cyclin E+	(%)	p27+	(%)	Rb+	(%)
All patients	81	24	(29.6)	23	(28.4)	47	(58.0)
Histology							
Squamous cell carcinoma	54	19	(35.2)	15	(27.8)	33	(61.1)
Adenocarcinoma	22	4	(18.2)	8	(36.7)	10	(45.5)
Large cell carcinoma	3	1	(33.3)	0	(0.0)	2	(66.7)
Mixed, NOS	2	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(100.0)
Differentiation							
Well	27	10	(37.0)	6	(22.2)	11	(40.7)*
Moderately	28	6	(21.4)	6	(21.4)	17	(60.7)
Poorly	26	8	(30.8)	10	(38.5)	19	(73.1)
Tumor diameter(cm)							
≤ 3	32	9	(28.1)	14	(43.7)*	19	(59.4)
> 3	49	15	(30.6)	9	(19.2)	28	(57.1)
pleural extension							
Present	26	11	(42.3)*	8	(30.8)	15	(57.7)
Absent	55	14	(25.5)	15	(27.3)	32	(58.2)

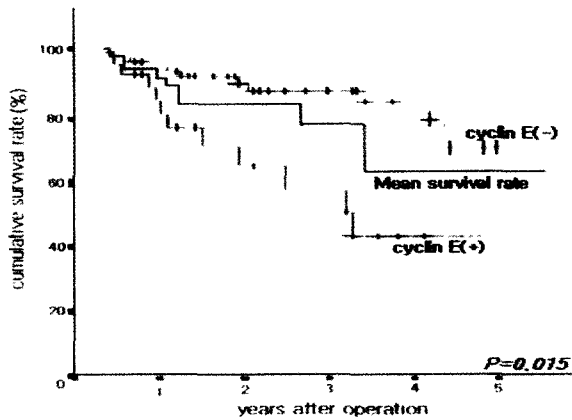


Fig. 4. Kaplan-Meier survival curves according to expression of cyclin E in stage I NSCLC

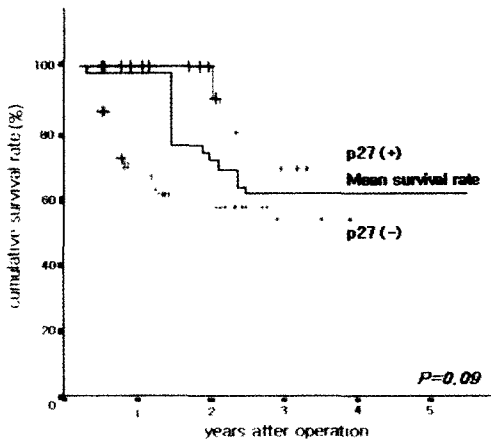


Fig. 5. Kaplan-Meier survival curves according to expression of p27 in stage I NSCLC

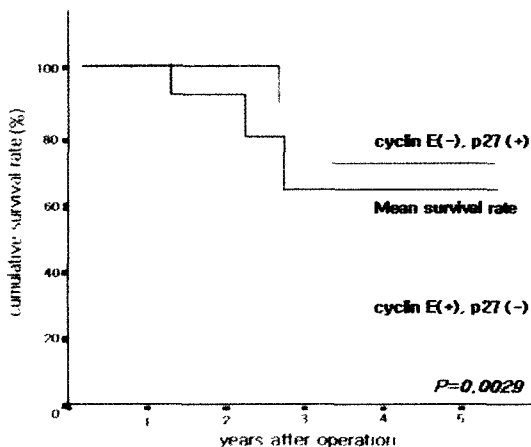


Fig. 6. Kaplan-Meier survival curves according to expression of cyclin E and p27 in stage I NSCLC

6. 제1병기 비소세포폐암에서 cyclin E와 p27의 발현간 및 cyclin E와 pRb의 발현간의 상관관계

제1병기 비소세포폐암 81례중 cyclin E와 p27의 발현이 역위로 일치하는 경우는 35례(43.2%), 역위로 불일치하는 경우 46례(56.8%)로 두 단백질의 발현은 상호 역위된 관계를 보이지 않았다($p=0.43$, $Kappa=-0.049$)(Table 4). 그러나 cyclin E의 발현이 없으면서 p27의 발현이 있는 군의 5년 생존율은 73.5%로, cyclin E의 발현이 있으면서 p27의 발현이 없는 군 36.3%에 비해 높았다($p=0.0029$)(Fig. 5).

제1병기 비소세포폐암 81례중 cyclin E와 pRb의 발현이 일치하는 경우는 33례(40.7%), 불일치하는 경우 48례(59.3%)로 두 단백질의 발현은 상관 관계를 보이지 않았다($p=0.164$, $Kappa=-0.117$)(Table 4).

Table 4. Correlation between overexpression of cyclin E and p27 in stage non-small cell lung cancer

Cyclin E \ p27	Cyclin E	
	+	-
p27 + (n=23)	6	17
p27 - (n=58)	18	40

$p=0.43$, $Kappa=0.6$

7. 제1병기 비소세포폐암에서 다변량 분석에 의한 예후인자

생존율에 대한 독립적인 위험인자를 정하기 위하여 종양의 크기와 장축 늑막의 침습여부, cyclin E, p27, 및 pRb의 발현을 Cox proportional hazards regression model에 포함하여 분석하였다. Cyclin E와 p27의 발현은 생존율에 대한 독립적인 위험인자로서 의의가 있었다($RR=3.578$, $p=0.005$; $RR=0.183$, $p=0.019$)(Table 6).

Table 5. Correlation between overexpression of cyclin E and pRb in stage I non-small cell lung cancer

Cyclin E \ Rb	Cyclin E	
	+	-
Rb + (n=47)	12	35
Rb - (n=34)	13	21

$p=0.164$, $Kappa=0.117$

Table 6. Cox's proportional hazards model analysis of prognostic factors

Factors	Time to Death		
	RR	95% CI	p-value
Tumor size	1.581	1.012-2.247	0.44
pleural extension	1.132	0.435-2.946	0.80
Cyclin E positive	3.578	1.462-8.762	0.005
p27 positive	0.183	0.044-0.757	0.019
Rb positive	0.886	0.733-1.072	0.214

고 찰

여러 종류의 암에서 세포주기의 cyclin의 이상이 보고되었으며, cyclin의 과발현이 세포의 증식과 암의 발생 및 진행에 관여함이 보고되었다.¹⁹⁾ 본 연구는 외과적으로 절제된 비소세포 폐암조직에서 cyclin E, p27, pRb의 다양한 발현을 보여 주었으며, cyclin E와 p27이 비소세포폐암의 예후인자로서의 가능성을 보여준 연구이다. Cyclin E의 과발현이 유방암에서 27%, 위암에서 40-60%, 대장암에서 92%, 그리고 비소세포 폐암에서 47.1%-53%로 관찰되었으나, 본 연구에서도 29.6%의 증례에서 관찰되어 다소 낮은 과발현율을 보였다.^{15,23-23)} 그러나 비소세포 폐암에서 cyclin E의 과발현은 불량한 예후를 시사하는 의미있는 독립적인 인자로 관찰되었다. 본 연구에서는 암조직이 발견되지 않는 정상 폐조직에서는 cyclin E의 핵염색을 보이는 세포가 드문 반면에 암세포에서는 쉽게 관찰되어 cyclin E의 과발현이 종양세포에 특이한 이상 소견을 나타낸다고 발표한 Mishina 등²²⁾의 연구와 일치하였다. 발암제를 이용한 시험관내 연구에서 cyclin E는 인간 기관지 상피세포의 형질전환에 중심적 역할을 하는 것이 관찰되었다.²⁴⁾ Lonardo 등²⁵⁾은 기관지 편평세포암의 전암 병변에서 cyclin E가 빈번하게 발현되어 cyclin E는 비소세포폐암, 특히 편평세포 폐암의 발달의 다단계 과정 중에 중요한 요소임을 암시하였는데, 본 연구에서도 Lonard 등²⁵⁾과 Mishina 등²²⁾의 연구에 부합하여 cyclin E의 발현빈도가 선암보다 편평세포암에서 높게 나타났다.

유방암에서 cyclin E의 발현은 진행된 병기, 고분화 등급, 불량한 예후와 관련이 있다고 보고가 있으며,¹⁵⁾ 비소세포폐암에서는 cyclin E의 발현이 성별, 흡연 지수, 진행된 병기 및 불량한 예후 등과 관련이 있다는 보고도 있다.²²⁾ 본 연구에서도 병리학적 제1병기 환자에서 cyclin E의 발현은 의미있는 독립적인 예후인자로서 불량한 예후를 시사하였다. Muller-Tidow 등²⁶⁾은 제1병기부터 제IIIa병기까지의 비소세포폐암에 대한 연구에서 cyclin E의 발현이 종양의 크기와는 관련이 없고 원격전이의 발생과 밀접한 관련을 가진다고 하였으나, 본 연구에서는 제1병기 비소세포폐암을 연구대상으로 하였기 때문에 원격전이와의 상관성은 알 수 없으나, 제1병기 비소세포폐암을 IA병기와 IB병기로 구분하는 요소인 종양의 크기와 장측 늑막의 침습 여부와 cyclin E의 발현을 조사한 결과, cyclin E의 발현은 종양의 크기와는 관련이 없었고 장측 늑막의 침범과는 상관관계를 나타내었고, 생존율에 대한 독립적인 위험인자로서 의의를 나타내어 종양의 침습성과 관련이 있는 것으로 나타났다. 따라서 앞서 언급한 Mashina 등²²⁾의 연구에서 종양의 병기를 T1 병기와 T2-4병기로 구분하여 T2-4병기에서 cyclin E의 발현이 의미 있게 관찰되었다고 보고 한 내용과 일치하는 소견을 보였다.

cdk4/6 또는 cdk2를 방해하면 D-형 cyclin이 pRb를 단지 부분적으로 인산화하며, cyclin E-cdk2가 pRb의 인산화를 완결하여 G1/S 이행기를 지나게 된다.¹⁴⁾ 또한 pRb의 인산화는 E2F의 방출로 인하여 유전자의 활성화가 야기되어 세포증식을 촉발하게 된다. pRb의 비활성화는 인산화와 유사한 결과, 즉 E2F의 방출로 인한 유전자의 활성화로 종양의 형성에 관계한다. Modi 등²⁷⁾에 의하면 폐암에서 RBL1p107 유전자와 RBL2p130 유전자의 돌연변이성 비활성화는 드물다고 한다. 본 연구에서는 cyclin E의 과발현과 pRb의 발현간의 상관 관계가 관찰되지 않았다.

유방암, 대장암, 비소세포폐암에서 p27의 발현이 보다 양호한 예후를 보여준다는 연구들이 보고되었다.²⁸⁾ 본 연구에서도 역시 p27Kip1의 발현을 보이는 제1병기 비소세포폐암군의 5년 생존율은 72.2%로 미발현군 56.2%보다 높은 경향이 있었으나($p=0.09$), 여러 가지 예후인자들을 포함한 다변량 분석을 실시한 결과, p27의 발현

은 양호한 예후를 시사하는 독립적인 예후인자로 나왔다(RR=0.183, $p=0.019$). 그러나 Ishihara 등²⁸⁾의 성, 연령, 조직학적 유형, 임상병기, 흡연지수 및 항암제에 대한 반응 등과 p27의 발현은 관련이 없다고 하였다. 본 연구에서는 제1병기 비소세포폐암을 IA기와 IB기로 구분하는 요소 중에서 흉막의 침습과는 관련이 없는 것으로 나타났으나, 종양의 직경이 3cm 이하인 군에서 43.7%로, 종양의 직경이 3cm 이상인 군 19.2%에 비해 높게 나타나 p27의 발현은 종양의 크기와 관련성이 있으며, 이는 종양조직에서 p27 발현의 소실이 위암의 병기와 침윤도와 상관 관계가 있다고 보고한 Yasui 등²⁹⁾의 연구와도 일치하였다.

p27은 cyclin E-cdk4 복합체를 억제함으로써 세포주기의 진행을 방해하며 p27과 cyclin E-cdk4 복합체 사이에 항상성의 균형이 유지됨으로써 과도한 증식이 방지된다고 알려져 있다. Yasui 등²⁹⁾은 위암조직에서 cyclin E의 발현과 p27의 발현 사이에 상호 역위된 관계를 발견하고 p27의 미발현이 cdk2-cyclin E 복합체의 활성을 적절히 억제하지 못함으로써 종양의 진행에 관계 된다고 주장하였고, Erlanson 등³⁰⁾도 비호지킨성 림프종에서 cyclin E와 p27의 발현 사이에 상호 역위된 관계를 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 cyclin E의 발현과 p27의 발현 사이에 의미 있는 상호 역위된 관계는 관찰되지 않았다. Cyclin E의 발현은 불량한 예후를, p27의 발현은 양호한 예후를 시사하는 독립적인 인자로 나왔기 때문에 cyclin E의 발현이 있으면서 p27의 발현이 없는 군과 다른 군들, 즉 cyclin E와 p27이 모두 음성, cyclin E 음성과 p27의 양성, cyclin E와 p27 모두 양성인 군들 사이의 생존율의 차이는 의미있게 관찰되었다. 이러한 소견들은 cyclin E와 p27 발현에 의한 종양 표현형의 차이와 종양의 진전은 서로 다른 기전에 의하여 나타나는 것으로 생각된다.

본 연구는 81례라는 비교적 적은 예의 제1병기 비소세포폐암만을 대상으로 하였고, 수술 후 재발과의 관련성에 대해서도 연구되지 못했기 때문에 cyclin E와 p27의 발현과 종양의 침습과의 관련성에 대한 연구로는 다소 제한점이 있는 것으로 생각되어 진다. 따라서 향후 보다 많은 증례에서 제1병기부터 제4병기까지의 모든 병기의 환자를 대상으로 하여 재발과의 관련성까지도

같이 연구되어 진다면 보다 훌륭한 결과가 나올 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

81예의 제1병기 비소세포폐암에서 cyclin E은 종양의 침습도와 생존율, p27은 종양의 크기와 관련이 있는 것으로 나타났고 또 cyclin E와 p27은 각각 독립적인 예후 인자가 될 수 있었다. Cyclin E와 pRb의 발현간의 상관관계는 없었다. 따라서 제1병기 비소세포폐암 절제 예에서도 종양의 조직에서 cyclin E가 발현되거나 p27이 발현되지 않는 경우에는 보강적인 항암치료를 적절히 시행함으로써, 생존율의 향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Fry WA, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base report on lung cancer. *Cancer* 77:1947-55, 1966
2. Minna JD, Sekido Y, Fong KM, Gazdar AF. Principles and Practice of Oncology. 5th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers. 849-57, 1997
3. Sherr CJ. Cancer cell cycles *Science* 274:1672-7, 1966
4. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1:9-19, 1995
5. Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 9:768-72 1997
6. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 39:131-4, 1995
7. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-63, 1995
8. Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* 18:69-73, 1994
9. Bates S, Bonetta L, MacAllan D, et al. CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9:71-9, 1994
10. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, et al. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14:2066-76, 1994
11. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14:2077-86, 1994
12. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with

- multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505-14, 1992
13. Koff A, Giordano A, Desai D, et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257:1689-94, 1992
14. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18: 753-761, 1998
15. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, et al. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54:380-5, 1994
16. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22, 1994
17. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 6:1710-7, 1997
18. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E, and Collaborators from 14 countries. *Histologic Typing Lung and Pleural Tumors*. Berlin:Springer Verlag. 1999
19. Weinberg RA. The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther*. 2:105-10, 1996
20. Sakaguchi T, Watanabe A, Sawada H, et al. Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer* 82:1238-43, 1998
21. Wang A, Yoshimi N, Suzui M, et al. Different expression patterns of cyclins A, D1, and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:122-6, 1996
22. Mishina T, Dosaka-Akita H, Hommura F, et al. Expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 6:11-6, 2000
23. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, et al. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60:242-4, 2000
24. Langenfeld J, Lonardo F, Kiyokawa H, et al. Inhibited transformation of immortalized human bronchial epithelial cells by retinoic acid is linked to cyclin E down-regulation. *Oncogene* 13:1983-90, 1996
25. Lonardo F, Rusch V, Langenfeld J, Dmitrovsky E, Klimstra DS: Overexpression of cyclins D1 and E is frequent in bronchial preneoplasia and precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 59:2470-6, 1999
26. Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, et al. Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61:647-53, 2001
27. Modi S, Kubo A, Oie H, Coxon AB, Rehmatulla A, Kaye FJ. Protein expression of the RB-related gene family and SV40 large T antigen in mesothelioma and lung cancer. *Oncogene* 19:4632-4639, 2001
28. Ishihara S, Minato K, Hoshino H, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer: its immunohistochemical evaluation using biopsy specimens. *Lung Cancer* 26:187-94, 1999
29. Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E: Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88:625-9, 1997
30. Erlanson M, Portin C, Linderholm B, et al. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas- prognostic implications. *Blood* 92:770-7, 1998