

구강 편평세포암에서 EGFR과 C-erb-B2 유전자 발현에 관한 면역조직화학적 연구

전남대학교 의과대학 이비인후과학교실

조 원 · 조재식 · 이종원 · 김해송 · 박근재

=Abstract=

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF EGFR AND C-ERB-B2 GENE EXPRESSION OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN ORAL CAVITY

Won Cho, M.D., Jae Shik Cho, M.D., Chong Won Lee, M.D.,
Hae Song Kim, M.D., Guen Jae Park, M.D.

*Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery College of Medicine
Chonnam National University, Kwang Ju, Korea*

The clinical staging systems for oral squamous cell carcinoma is limited as a prognostic indicator because of different biological characteristics of cancer in this region and variable microenvironment depending on subsites, there have been study to determine prognosis by evaluating malignancy, that is the nature of tumor cells. Many studies have been tried to determine prognostic indicator in various malignancies for the evaluation of differentiation capacity and the expression of oncogene product.

EGF make a role in cellular growth and differentiation and to be essential in cellular survival. EGFR is an intergral membrane protein, stimulate cellular differentiation and hormonal secretion, and has structural homology with V-erb-B transforming protein. Recent reports have demonstrated that EGFR is overexpressed in stomach, breast, vagina, dermis, head and neck, genitourinary and lung tumors, and possibly used as a tumor marker. In head and neck region, most of studies were mainly carried out on laryngeal squamous cell carcinoma.

In the present study, immunohistochemical study for EGFR and C-erb-B2 gene in paraffin sections of 45 squamous cell carcinoma in oral cavity was performed to evaluate the presense of EGFR and C-erb-B2 gene in this lesion, to evaluate them as a prognostic indicator by analysing the correlation between these expression and subsites, primary stages, clinical stages, pathologic grades, neck node metastasis, recurrences and treatment results, and to determine relation between EGFR and C-erb-B2 gene.

The results as follows ;

1. Positive reaction for EGFR was observed in all cases, strong positive reaction was found in 30 cases (67%) except in the cases of poorly differentiated carcinoma.
 2. Positive reaction for EGFR was observed mainly in cytoplasm of tumor cells.
 3. Positive reaction for C-erb-B2 gene was observed in 14 cases(31%), mainly in cell membrane.
 4. A correlation was found between presence of EGFR and C-erb-B2 gene, and pathologic grades ; the EGFR and C-erb-B2 positive cells were relatively differentiated and strong positive reaction for EGFR was observed only in moderately to well differentiated carcinoma, whereas poorly differentiated tumor cells exhibited less intense staining and negative staining for EGFR and C-erb-B2 gene. But, there was no significant correlation statistically.
 5. There was no significant correlation between positive rate of EGFR, C-erb-B2 gene expression and clinical stages, T stages, N stages, recurrences, and treatment results.
- In conclusion, EGFR and C-erb-B2 gene expressed mainly in moderately to well differentiated tumor cells in squamous cell carcinoma of oral cavity.

Key Words : EGFR, C-erb-B2, Squamous cell carcinoma

I. 서 론

두경부 편평세포암의 예후는 종양측 인자, 환자측 인자, 치료 인자 등 여러 요인들에 의하여 결정되지만 이러한 인자들을 종합하는 데는 문제점들이 있어 현재까지는 임상적 병기가 주로 이용되고 있는 실정이다. 그러나, 임상적 병기는 종양의 생물학적 특성과 미세환경의 차이 등을 반영하기에 미흡하여 종양세포의 본질, 즉 악성도를 측정함으로써 예후를 판정하려는 연구가 시도되어 왔다. 현재 각종 악성 종양에서 종양의 증식능이나 암유전자 단백질의 발현양상을 측정하여 종양의 악성도의 지표를 찾고자 하는 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있으나 구강 편평 세포암에 대하여는 아직도 연구가 부족하고 또한 종양의 발현에 관계하는 암유전자 단백질의 발현과 악성도에 관한 연구는 미흡하다. 상피성장인자(epidermal growth factor: 이하 EGF로 약함)는 분자량 6,046 dalton의 다단백으로^{9, 11, 24)} 생쥐의 악하선에서 처음 추출되었으며 호르몬과 유사하게 세포의 증식과 분화에 관여하

여 세포의 생존에 필수적이며¹⁸⁾, 세포막에 위치하는 상피성장인자수용체(epidermal growth factor receptor. 이하 EGFR로 약함)에 결합하여 작용한다. EGF와 반응하는 EGFR은 분자량 17-kD의 당단백으로 세포막의 표면에 존재하며⁶⁾, 세포의 분화와 호르몬의 분비에 관여하는데^{4, 19)} 구조적으로 C-erb-B 단백질과 유사하고²⁵⁾, 존재하는 위치에 따라 세포막외 부위, 세포막 부위, 세포질 부위의 3가지로 구분되어 세포질 부위는 tyrosine kinase의 활성화와 관련이 있다고 알려져 있으며⁸⁾, 주로 피부, 유방, 위장관, 비뇨생식기 등의 활성화된 상피세포에서 관찰된다. 근래에 EGFR이 외음부 종양세포에서 유래한 A431 세포주로부터 추출이 가능해 지면서 V-erb-B 유전자와 유사성이 거론되었고 발암인자로서의 가능성이 제시되었으며⁷⁾, 유방, 비뇨생식기, 두경부^{13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23)}, 폐 등의 종양에서 높게 발현 된다고 보고되고 있다.

EGFR 발현에 관한 연구에는 최근 분자생물학의 발달과 더불어 blotting, polymerase chain reaction (PCR)과 in situ hybridization 등의 기술이 이용

되고 있으나 아직까지는 주로 면역조직화학적 염색법이 이용되고 있다.

이에 저자들은 구강 편평세포암으로 진단되고 적출된 조직의 파라핀 절편을 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 EGFR과 C-erb-B2 유전자의 존재를 확인하고 이들의 발현양상과 종양의 원발부위, 임상적 병기, 병리조직학적 분화도, 경부 림프절의 전이, 재발여부, 치료결과 등과의 관계를 검토하여 EGFR이 구강 편평세포암에서 암표지자로서의 이용 가능성이 있는가를 알아보고 동시에 EGFR과 C-erb-B2 유전자와의 관련성을 구명하기 위해 본 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1991년 1월부터 1993년 12월까지 3년간 전남대학교병원 이비인후과학교실에서 구강 편평세포암으로 진단받고 채취된 종양의 파라핀 포매조직의 처치 및 보관상태가 양호한 환자들중 45례를 대상으로 하여 EGFR과 C-erb-B2 유전자의 발현양상을 면역조직화학적으로 비교 검색하였다.

대상례의 연령별 분포는 최저 44세에서 최고 84세였으며 중앙연령은 64세였다. 대상례의 원발부위는 종양의 중심부위를 기준으로 하였을 경우 구강설 30례, 구강저 6례, 협부 점막 4례, 경구개 2례, 치은 2례, 구순 1례였다. 1988년 미국 암협회 분류(AJCC classification, Beahrs 등 1988)에 따른 대상례의 임상적 병기는 제 0기 1례, 제 1기 8례, 제 2기 2례, 제 3기 9례, 제 4기 15례였다⁵⁾.

2. 방 법

가. 조직학적 검색

병리조직학적 검사상 구강 편평세포암으로 확진된 총 45례의 파라핀 포매괴를 5 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin(H&E)염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하여 종양세포를 재확인하였고 1988년 미국 암협회 분류(AJCC classification)에 따라 분화도가 좋은 예, 분화도가 중등도인 예, 분화도가 좋지 않은 예, 미분화인 예로 구분하였다.

나. 면역조직화학적 염색

실험에 이용한 파라핀 절편의 제작은 파라핀 포매괴를 5 μ m 두께로 연속절편을 만들어 probe-on 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 염색의 전과정은 probe-on 슬라이드에 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 이용한 Microprobe Immuno/DNA 염색기(Fisher Co.)를 이용하여 실시하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 일차항체인 EGFR1(Dako) 항체에 20분간 부치시킨 후 완충액으로 씻어냈다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG를 이용하여 10분간 부치시켰고 완충액으로 씻은 후 avidin-horse radish peroxidase(HRP)에 10분간 작용시켰으며 양성반응의 관찰을 위하여 diaminobenzidine(DAB)으로 발색시켰다. hematoxylin으로 대조염색을 시행하고 crystal mount(Biomed)로 봉입한 후 현미경으로 검색하였다.

양성대조군으로는 정상 구강조직 표본을 사용하였고, 음성대조군으로는 염색시 일차항체대신 완충액을 부치시킨 표본을 실험에 이용하였다. C-erb-B2 유전자에 대한 면역조직화학적 염색에 있어서도 EGFR과 동일한 방법으로 시행하였는데 일차항체로 C-erb-B2(Triton) 항체를 사용하였고 이차항체로는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG를 이용하였으며 양성반응의 관찰을 위한 발색제로는 3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)을 사용하였다.

다. 염색 결과의 판정

면역조직화학적 염색의 판정에 있어서 EGFR은 세포질이나 세포막을 따라서 과립상으로 보이는 것을 양성으로 판정하였는데 전례에서 양성으로 판정되어 양성인예를 염색의 강도에 따라 3단계로 구분하였다. 200배의 현미경시야에서 3명의 서로 다른 판독자에 의하여 반복판독하여 양성 세포수가 전체 세포수의 50%이하인 경우를 (+), 50%이상이지만 염색강도가 약한 경우를 (++), 50%이상이면서 염색강도가 강한 경우를 (+++)로 구분한 다음 염색도가 낮은 (+)와 (++)인 경우는 자료 분석시 결과를 합하여 분석하였다. C-erb-B2 유전자에 대한 면역조직화학적 염색에 있어서 양성반응은 세포막을 따라서 과립상으로 보이는 것을 양성으로 판정하

었다.

III. 결 과

1. EGFR과 C-erb-B2 유전자에 대한 면역조직화학적 염색

EGFR에 대한 염색소견상 갈색의 양성반응은 정상 후두조직의 세포질(Fig.1)과 종양세포의 세포막과 세포질에서 관찰되었다. 병소에 따른 양성반응은 암세포에서 뿐만 아니라 암소주위 정상 편평상피 세포 및 선 조직, 혈관 내피, 혈관 주위 근육 조직에서 양성반응을 나타냈다(Fig. 4). 특히 세포간질로 침윤하는 곳에서 염색도가 강하게 발현되었다. 강한 양성반응은 분화가 좋은 예와 분화가 중등도인 예에서만 나타났으며(Fig. 5, 6), 고분화 세포에서 양성반응이 강하게 발현되었다(Fig. 5, 6).

정상 편평상피를 포함하는 절편에서는 기저 세포층보다 윗쪽에 있는 세포학적으로 분화된 세포에서 양성반응이 관찰되었다. 각화를 보이는 편평세포암의 경우 암소 중앙부의 분화되어 각화된 물질에서 강한 양성반응을 보인 반면, 암소의 주변부를 구성하는 미분화 세포에서는 약한 양성반응이 관찰되었다. C-erb-B2 유전자에 대한 염색소견상 갈색의 양성반응은 주로 분화도가 좋은 예에서 관찰되었으며, 세포막을 따라 갈색으로 보이는 것을 양성으로 판정하였다(Fig. 8).

2. EGFR과 C-erb-B2 유전자에 대한 양성발현율의 비교

1) 종양의 원발부위와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성발현율의 관계

종양의 원발부위와 EGFR의 양성발현율의 관계에 있어서 부위별 양성발현율은 구순 100%(1례), 협부점막 75%(3례), 구강저 67%(4례), 구강설 67%(20례), 경구개 50%(1례), 치은 50%(1례)였다. 종양의 원발부위와 C-erb-B2 유전자의 양성발현율과의 관계에 있어서 부위별 양성발현율은 구순 100%(1례), 협부점막 25%(1례), 구강저 33%(2례), 구강설 33%(10례)였다(Table 1).

2) 종양의 임상적 병기와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성발현율의 관계

종양의 임상적 병기에 따른 EGFR의 양성발현율

은 제 0기 100%(1례), 제 1기 62%(5례), 제 2기 58%(7례), 제 3기 88%(7례), 제 4기 67%(10례)로 임상적 병기의 진행도와 양성발현율은 무관하였다. 종양의 임상적 병기에 따른 C-erb-B2 유전자의 양성발현율은 제 1기 33%(2례), 제 2기 25%(3례), 제 3기 67%(6례), 제 4기 20%(3례)로 임상적 병기와는 무관하였다(Table 2).

3) 원발병소의 병기와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성발현율의 관계

원발병소의 병기는 Tis 1례, T1 10례, T2 18례, T3 9례, T4 7례 이었다. 원발병소의 병기에 따른 EGFR의 양성발현율은 Tis 100%(1례), T1 70%(7례), T2 67%(12례), T3 67%(6례), T4 57%(4례)로 원발병소의 병기의 진행도와 양성발현율은 무관하였다. C-erb-B2 유전자의 양성발현율은 T1 30%(3례), T2 33%(6례), T3 44%(4례), T4 14%(1례)로 원발병소의 병기와는 무관하였다(Table 3).

4) 경부 림프절의 병기와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성발현율의 관계

경부 림프절의 병기는 NO 29례, N1 6례, N2 10례 이었다. 경부 림프절의 병기에 따른 EGFR의 양성발현율은 NO 62%(18례), N1 83%(5례), N2 30%(7례)로 양성발현율과 경부 림프절의 병기의 진행도는 무관하였다. 경부 림프절의 병기에 따른 C-erb-B2 유전자의 양성발현율은 NO 24%(7례), N1 83%(5례), N2 20%(2례)로 경부 림프절의 병기와 무관하였다(Table 4).

5) 병리조직학적 분화도와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성발현율의 관계

대상례의 병리조직학적 분화도는 분화도가 좋은 레(WD)가 29례, 분화도가 중등도인 레(MD)가 10례, 분화도가 나쁜 레(PD)가 5례이었고 미분화형인 레는 없었다. 종양의 병리조직학적 분화도에 따른 EGFR의 양성발현율은 분화도가 좋은 레 76%(22례), 분화도가 중등도인 레 70%(7례), 분화도가 나쁜 레 0%로 상관관계를 보여 병리조직학적 분화도가 좋을수록 양성발현율이 높은 경향을 보였으나 각 표본 수가 적어 통계학적으로 검증할 수는 없었다. 종양의 병리조직학적 분화도에 따른 C-erb-B2 유전자의 양성발현율은 분화도가 좋은 레 38%(11례), 분화도가 중등도인 레 20%(2례), 분화도가 나

Table 1. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each subsite

Subsite	Total	No. of cases			
		EGFR		C-erb-B	
		+/+	+++	-	+
Lip	1		1		1
Buccalmucosa	4	1	3	3	1
Floor of mouth	6	2	4	4	2
Tongue	30	10	20	20	10
Hard palate	2	1	1	2	
Gingiva	2	1	1	2	
Total	45	15	30	31	14

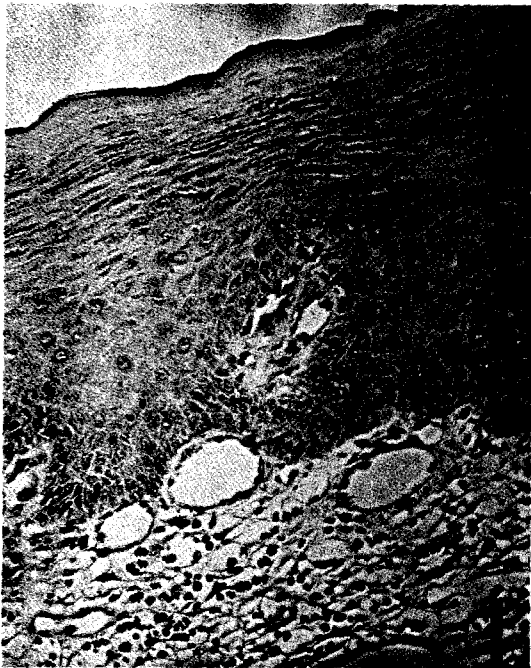


Fig. 1. Positive control Immunohistochemistry of EGFR X 100 Positive reaction is noted in the cytoplasm of tumor cells, more cytologically developed, above basal cell layer

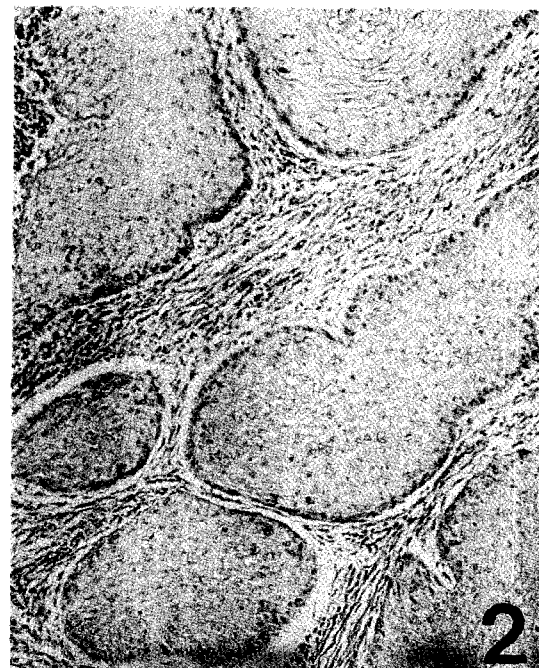


Fig. 2. Negative control Immunohistochemistry of EGFR X 100 Any positive reaction is not noted in tumor cells

뿐 레 20%(1례)로 병리조직학적 분화도와 무관하였다(Table 5).

6) 재발과 EGFR, c-erb-B2 유전자 양성발현율의

관계

치료종결 후 원발부위에서 5례가 재발하였다. EGFR의 양성발현율은 재발이 없었던 경우 66%

Table 2. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each clinical stages

Clinical stages	Total	No. of cases			
		EGFR		C-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
Stage 0	1		1	1	
I	8	3	5	6	2
II	12	5	7	9	3
III	9	2	7	3	6
IV	15	5	10	12	3
Total	45	15	30	31	14

Table 3. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each primary stages

Primary stages	Total	Nm cases			
		EGFR		C-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
Tis	1	1	1		
T1	10	3	7	7	3
T2	18	6	12	12	6
T3	9	3	6	5	4
T4	7	3	4	6	1
Total	45	15	30	31	14

Table 4. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each nodal stages

Nodal stages	Total	No. of cases			
		EGFR		C-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
N0	29	11	18	22	7
N1	6	1	5	1	5
N2	10	3	7	8	2
N3					
Total	45	15	30	31	14

(13례),있었던 경우 60%(3례)로 재발유무는 그 발현율에 차이가 없었다. C-erb-B2 유전자의 양성 발현율은 재발이 없었던 경우에만 14례(35%)에서

관찰 되었다(Table 6).

7) 치료결과와 EGFR, C-erb-B2 유전자 양성 발현율의 관계

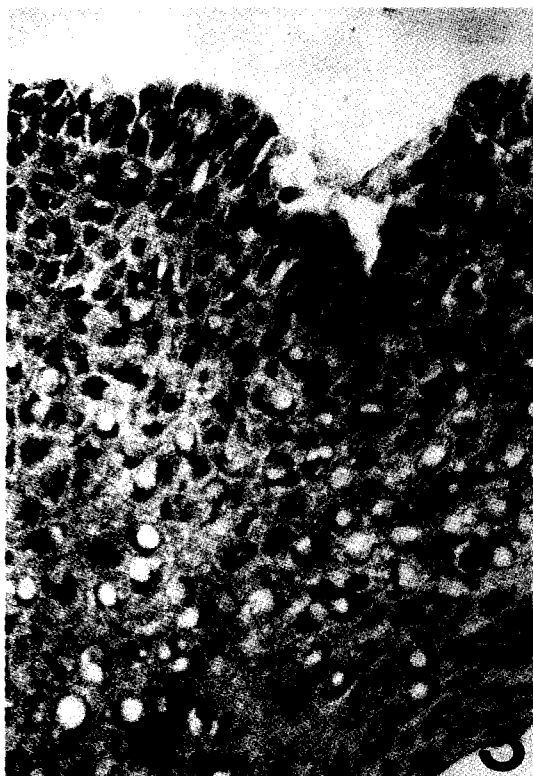


Fig. 3. Carcinoma in situ Immunohistochemistry of EGFR X 200 Positive reaction is noted in the cytoplasm of tumor cells

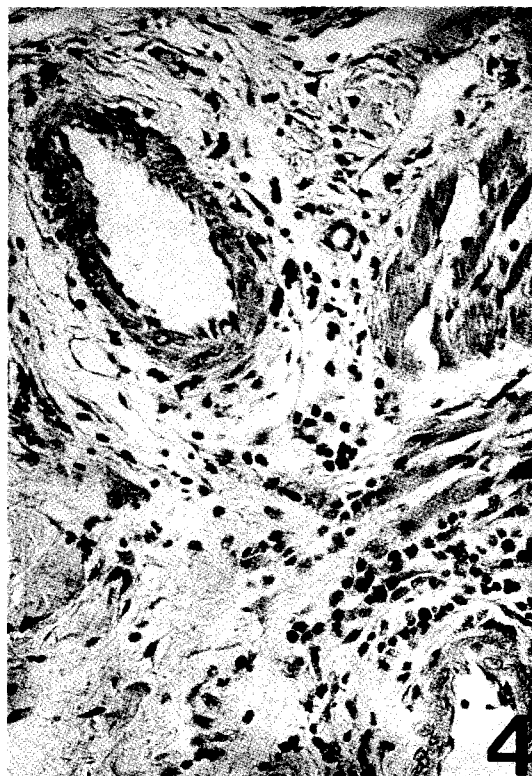


Fig. 4. Normal oral cavity Immunohistochemistry of EGFR X 100 Muscle layers of blood vessels and stromal muscle fibers are stained by immunohistochemistry

Table 5. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each pathologic grades

Grade	Total	No. of cases			
		EGFR		c-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
WD*	29	7	22	18	11
MD*	10	3	7	8	2
PD*	5	5	4	1	
UD*					
Total	44	15	29	30	14

* WD: 분화도가 좋은 예
PD: 분화도가 나쁜 예

MD: 분화도가 중등도인 예
UD: 미분화인 예

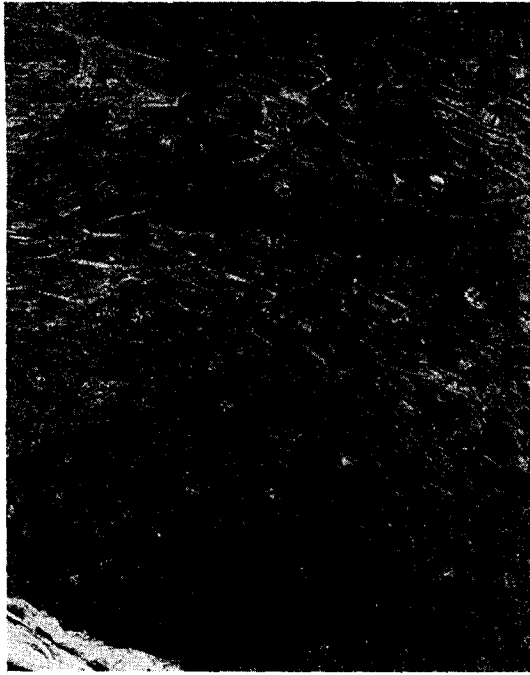


Fig. 5. Well differentiated carcinoma Immunohistochemistry of EGFR X 200 Positive reaction is noted in the cytoplasm of tumor cells. Most of tumor cells revealed strongly positive reaction



Fig.6. Moderately differentiated carcinoma Immunohistochemistry of EGFR X 200

Table 6. Expression of EGFR & C-erb-B2 in recurrent cases

Recurrences	Total	No. of cases			
		EGFR		c-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
No	40	13	27	26	14
Yes	LR*	5	2	3	5
	RR*				
Total	45	15	30	31	14

* LR : local recurrence
 RR : regional recurrence

대상례 45례중 수술요법과 술후 방사선요법, 항암 약물요법, 또는 이들의 병합 요법으로 치료를 받았던 경우가 34례였다. 이들 34례중 치료종결 후

연구시작시기까지 추적관찰한 결과 무병생존예가 16례, 사망례가 16례였다. 치료결과에 따른 EGFR의 양성발현율은 무병생존예 75%(12례), 사

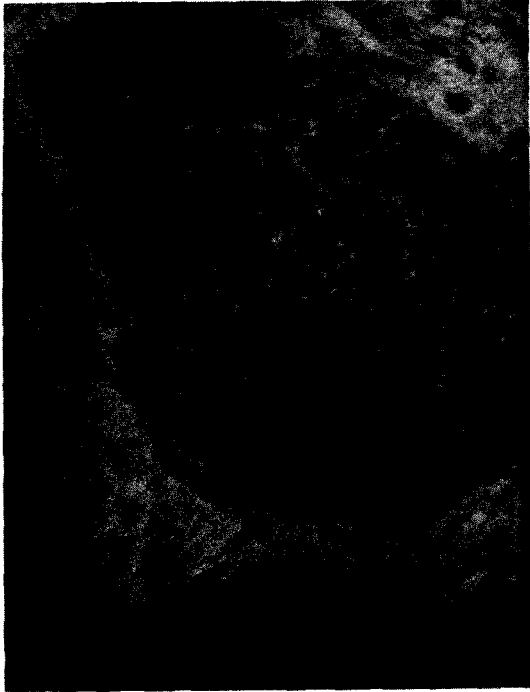


Fig.7. Poorly differentiated carcinoma Immunohistochemistry of EGFR X 200

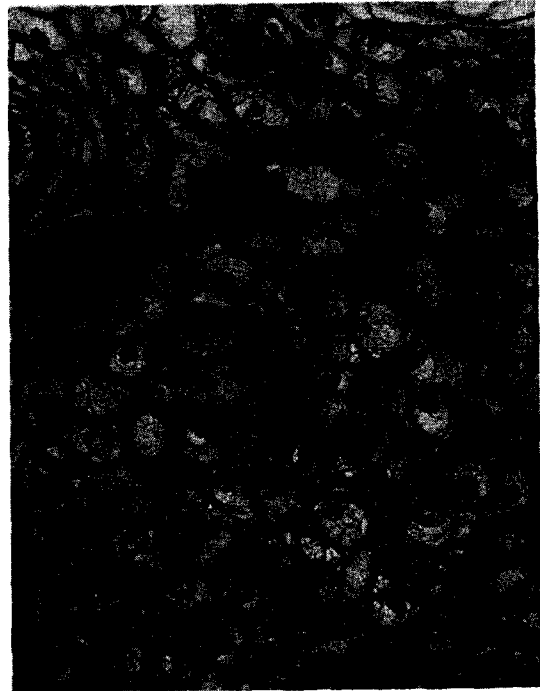


Fig.8. Well differentiated carcinoma Immunohistochemistry of C-erb-B2 gene X 200 Positive reaction was noted in the cell membrane of tumor cells

Table 7. Frequency of the expression of EGFR & C-erb-B2 in each treatment results

Result	Total	No. of cases			
		EGFR		c-erb-B2	
		+ / ++	+++	-	+
NED*	16	4	12	10	6
DWD*	16	6	10	10	6
DID*	1	1	1		
SD*	1	1	1		
Total	34	10	24	21	13

* NED : no evidence of disease DWD : dead with disease
 DID : dead with intercurrent disease (CVA attack)
 SD : stable disease

망례 62%(10례)로 양성발현율은 치료결과와 특별한 상관관계가 없었다. 치료결과에 따른 C-erb-B2 유전자의 양성발현율은 무병생존예 38%(6례), 사망례 38%(6례)로 치료결과와 무관하였다(Table 7).

IV. 고 찰

두경부 편평세포암의 예후 판정 1) 종양측 인자: 발생부위, 병소의 진행정도, 전이 유무, 암세포의

분화도, 이형성도 및 침습성, 2) 환자측 인자: 연령, 성별, 영양, 전신상태 및 면역학적 방어상태, 3) 치료 인자: 수술, 방사선 치료, 항암제 등의 단독 또는 병합 요법과 이들에 대한 반응성 등 여러 요인들에 의하여 결정된다²⁾. 그러나, 이러한 예후인자들을 모두 종합하는 데는 많은 문제점들이 있고 치료의 관점에 따라 차이가 있을 수 있어 현재까지는 종양측 인자중 임상적 병기가 주로 이용되고 있는 실정이다. 그러나 같은 병기일지라도 종양의 발생부위, 종양 세포의 생물학적 특성과 미세환경의 차이등에 따라서 임상적 경과와 예후에 차이가 있어 보다 근본적으로 종양세포의 본질, 즉 악성도를 측정함으로써 예후를 판정하려는 연구가 시도되어 왔다. 최근에는 종양의 악성도를 평가하는 방법들이 다양하게 시도되어, 많은 성장인자와 그 수용체들이 변형된 암유전자나 암유전자 단백질 물, 혹은 암억제유전자 단백질을 종양세포에서 구명하여 종양의 악성도 및 예후와의 관계를 밝히려는 노력이 행하여지고 있다.

EGFR은 어느 배엽에서 유래한 세포에서나 모두 표현되지만 주로 피부, 유방, 위 장관, 비뇨생식기 등의 활성화된 상피세포에서 관찰되고, 정상 후두의 기저세포(basal cell)나 부기저세포(parabasal cell)에서 표현된다. 근래에 EGFR이 외음부 종양 세포에서 유래한 A431 세포주로부터 추출이 가능해지면서 V-erb-B 종양유전자와 구조적 유사성이 거론되었고 발암인자로서의 가능성이 제시되고 있다⁷⁾. 아직까지 생체내에서 생성된 완전한 EGFR이 발암과정에서 어떻게 관여하는지 밝혀지지는 않았지만, Fitzpatrick등과 Lundy등¹²⁾은 EGFR이 유방암에서 분화도가 나쁜 경우나 estrogen 수용체가 없는 경우에 표현율이 높다고 하여 예후와 치료를 결정하는 독립인자로 보고되고 있고 Neal등(1985)은 방광암에서 악성도의 지표로써 침윤도와 관계가 있는 것으로 보고하였다. 두경부영역에 있어서도 정등(1993)은 후두 편평세포암에서 EGFR이 종양의 원발부위, 임상적 병기, 원발병소의 병기, 경부 림프절의 병기, 병리조직학적 분화도, 그리고 치료결과 등과는 상관없이 경부 림프절의 피막의 침범과 재발이나 원격전이 등과 관련되어 있음을 밝히면서 예후 인자로서의 가능성을 제시하고 있다.

최근, EGFR을 포함한 유전자의 발현을 연구하는 방법으로 핵산을 추출하여 관찰하는 blot법이 이용되고 있는데 이 방법은 유전자의 증폭을 정량적으로 확인할 수 있는 장점이 있으나 종양세포에서만 선택적으로 발현됨을 확인할 수 있는 특이성은 결여되어 있고 냉동조직 절편을 이용하여야 하므로 조직보관의 어려움이나 세포의 형태유지의 저하, 그리고 새로운 암유전자에 대해서 역행적인 연구의 불가능 등의 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하는 방법들이 면역조직화학적 염색 및 in situ hybridization으로서 본 연구에서는 통상적인 10% 포르말린에 고정된 후 제작된 파라핀 포매괴를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하여 발현양상을 분석하고자 하였다.

본 연구에서 EGFR은 정상 구강조직의 세포질과 선세포, 혈관 내피, 혈관 주위 근육조직에서 양성 이었고, 종양 세포에서는 전례에서 양성반응을 보이면서 세포질과 세포막에서 양성으로 발현되었으며, 특히 세포간질로 침윤하는 곳에서 강하게 발현되었다. 이는 후두 편평세포암에서 EGFR의 양성발현을 보고한 정등(1993)과 Christensen등(1992,1993)의 성적과 일치되었으나 선세포나 혈관내피, 혈관 주위 근육조직에서 나타난 양성반응은 일차항체의 회색 배울에 따라 양성반응의 정도가 다르며¹¹⁾ 특히 종양세포의 염색강도가 약할 경우 그 해석에 있어서 위양성의 가능성을 배제할 수 없으므로 면역조직화학적 염색보다 민감성과 특이성이 더 높은 in situ hybridization과 같은 다른 방법을 이용하여 비교하여 보아야 할 것으로 생각된다.

구강 편평세포암에서 EGFR에 대한 면역조직화학적 염색상 양성반응은 병리조직학적 분화도와 상관없이 전례에서 관찰되었고, 특히 강한 양성반응은 저분화암에서는 관찰되지 않고 중등도 및 고분화암에서만 관찰되었으며, 이러한 종양세포들에서 immunoreactivity는 세포학적으로 좀 더 분화된 세포에서 관찰되는 것으로 보아 구강 편평세포암에 있어서 EGFR이 다른 유전자 산물 등과는 다른 일정한 발현 양상을 보여 저분화암에서 EGFR 발현의 감소 또는 소실을 나타내고 있는 것으로 보인다. 이는 정상 후두 점막조직과 이형성세포에서는 양성반응이 관찰되지 않으나 14례의 후두 편평

세포암에서는 전례에서 양성반응이 보이며 병리 조직학적 분화도와 양성발현과는 상관관계가 없다고 발표한 Miyaguchi등(1990)의 보고와 상이하나, 15례의 후두 편평세포암에서 12례의 양성반응의 검출과 함께 중등도 및 고분화 암에서 본 연구결과와 같은 일정한 양성발현 양상을 보고한 Christensen등(1993)과의 성적과 유사하다. 이후 Christensen등(1993)은 40례의 구강 편평세포암에서 EGFR과 transforming growth factor-alpha(TGF-alpha)에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하고 정상 구강조직을 포함한 중등도 및 고분화암에 있어서 세포학적으로 좀 더 분화된 세포에서의 일정한 양성발현 양상을 보고하면서, 저분화암에서 EGFR의 양성발현이 관찰되지 않으며 TGF-alpha의 양성발현이 관찰되는 것으로 보아 TGR-alpha가 저분화암에서 EGFR의 ligands일 수 있다는 가능성을 제시하였는데 본 연구결과와는 양성반응이 정상 구강조직을 포함한 중등도 및 고분화암에서 세포학적으로 분화된 세포에서 관찰된다는 점과 강한 양성반응이 저분화암에서는 발현 되지 않았다는 점 등 어느정도 유사하나 이에 대한 고찰이 필요할 것으로 생각된다.

양성대조군으로 이용한 정상 구강조직과 적출된 종양조직에 포함된 정상 상피세포에서 EGFR에 대한 양성반응은 기저세포층의 상방에서 중등도 및 고분화암에서의 발현양상과 같이 세포학적으로 좀 더 분화된 세포에서 관찰되었는데 이는 후두 편평세포암에서의 Christensen등(1992,1993)의 성적과 일치한다. 각화를 보이는 편평세포암의 경우 암소 중앙부의 분화된 각화성 물질에서 암소의 주변부를 구성하는 미분화세포에서 보다 강한 양성반응을 보였는데 이는 이전의 Christensen등(1992)의 성적과 상이하나 이후 발표된 Christensen등(1993)의 성적과 일치하여 정확한 발현양상에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서 C-erb-B2 유전자에 대한 면역조직화학적 염색의 결과 양성반응은 14례(31%)에서 관찰되었다. EGFR과 erb-B 종양유전자의 단백질의 연관성은 이 들에 대한 연관성은 Ozanne등¹⁷⁾이 동물실험을 통하여 편평세포암의 암세포를 배양 하면서 암세포에 있어서 erb-B 종양유전자

의 과표현과 증폭이 EGFR 단백질의 생성증가를 가져옴을 발견함으로써 제시되었다. 이전에는 주로 선암을 중심으로 연구가 이루어져왔으나³⁾ 그 후 Ueda(1992)가 식도 편평세포암에서 파라핀 포매체를 사용 Slot-blot hybridization법을 이용하여 14%의 검출율을 보고하면서 예후인 자로서의 가능성을 제시하였고 Yamada등²⁶⁾은 25례의 구강 편평세포암에서 면역조직화학적 염색을 통해 1례의 양성반응을 보고하였다.

최근에는 분자생물학의 발전과 더불어 Slot blot RNA analysis와 Southern blot analysis를 이용하여 Jonathan등¹⁰⁾ 27례의 두경부영역의 편평세포암에서 18례(67%)의 양성반응을 보고하였는데, 앞으로 이와 같은 보다 나은 분자생물학적 접근방법으로 종양유전자에 대한 정량적 분석과 함께 여러가지 임상적 인자들과의 연관성을 규명하여 예후인 자로서의 역할을 확인하려는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

45례의 구강 편평세포암 조직을 대상으로 EGFR과 C-erb-B2 유전자의 발현에 관한 면역조직화학적 염색을 시행하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. EGFR에 대한 면역조직화학적 염색 소견상 양성반응은 전례에서 관찰되었으며, 강한 양성반응은 저분화암인 레를 제외한 30례(67%)에서 관찰되었다.
2. EGFR에 대한 면역조직화학적 염색 소견상 양성반응은 주로 암세포의 세포질에서 관찰되었다.
3. C-erb-B2 유전자에 대한 면역조직화학적 염색 소견상 양성반응은 14례(31%)에서 관찰되었으며, 주로 암세포의 세포막에서 관찰되었다.
4. EGFR과 C-erb-B2 유전자의 양성발현과 종양의 병리조직학적 분화도 사이에는 상관관계를 보여 양성반응을 보인 종양 또는 세포들은 비교적 분화가 잘 되어 있어서 강한 양성반응이 중등도 및 고분화암에서만 나타났으며 분화도가 낮은 종양 또는 세포들은 양성반응

의 정도가 감소하거나 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 미루어 구강 편평세포암에서 EGFR 과 C-erb-B2 유전자는 분화도가 높은 종양세포에서 잘 발현됨을 알 수 있었다.

References

1. 나경현, 조규혁 : 자궁경부암의 Epidermal Growth Factor Receptor 표현에 관한 연구. 대한 의학 협회지 Vol.32, No.7, July:767-774, 1989
2. 최종욱:두경부 편평세포암의 예후인자. 이비인후과학 서울심포지움 제 4권:173-194, 1993
3. Asamoto M,Hasegawa R, Masuko T,et al : Immunohistochemical analysis of c-erbB-2 oncogene product and epidermal growth factor receptor expression in human urinary bladder carcinomas. *Acta Pathol Japo* 40(5) : 322-326, 1990
4. Bahn RS,Speeg Jr KV,Ascoli M,et al:Epidermal growth factor stimulates production of progesterone in cultured human choriocarcinoma cells. *Endocrinol* 167 : 2121-2123, 1980
5. Beahrs OH, Henson DE,Hutter RVP,et al:Manual for staging of cancer. American Joint Committee on Cancer, 3rd Ed,JB Lippincott Co, Philadelphia,1988
6. Carson SA, Chase R, Ulep E, et al : Oncogenesis and characteristics of epidermal growth factor receptors in human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 147 :932-939,1983
7. Downward J,Yarden Y,Mayes E, et al : Close similarity of epidermal growth factor receptor and V-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307 :521-527,1984
8. Hiroshi U,Stanley C:Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biolog Chemi* 255 (18) : 8363-8365, 1980
9. Huot RI, Foidart JM, Nardone RM, et al: Differential modulation of human chorionic gonadotropin secretion by epidermal growth factor in normal and malignant placental cultures. *J Clin Endocrinol Metab* 53 : 1059-1063, 1981
10. Jonathan C, Alan B :Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngo-scope* 103 :42-52, 1993
11. Lichtner RB, Schirmacher V :Cellular distribution and biologic activity of epidermal growth factor receptors in A431 cells are influenced by cell-cell contact. *J Cell Physiol* 144 : 303, 1990
12. Lundy J, Schuss A, Stanick D, et al : Expression of neu protein, epidermal growth factor, and transforming growth factor alpha in breast cancer : correlation with clinicopathologic parameters. *Am J Pathol* 138 : 1527-1534, 1991
13. Maria EC, Marianne HT, Steen SP, et al:Immunoreactive transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* 169 : 323-328, 1993
14. Maria EC, Marianne HT, Steen SP, et al :Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in laryngeal carcinomas demonstrated by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol (stockh)* 113 : 563-567, 1993
15. Mamoru M, Jan O, Henrik BH : Expression of epidermal growth factor receptor in laryngeal dysplasia and carcinoma. *Acta Otolaryngol* 110:309-313, 1990
16. Mukaida H, Yamamoto T, Hirai T, et al: Expression of human epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Jpn J Surg* 20:275-282,1990
17. Ozanne B, Richards CS, Henden F, et al: Over-Expression of EGF-Receptor is a Hallmark of Squamous Cell Carcinoma. *J*

- Pathol 149 : 9-14, 1986*
18. Rao CV, Carman Jr FR, Chegini N, et al : *Binding sites for epidermal growth factor in human fetal membranes. J Clin Endocrinol Metab 58 :1034-1042,1984*
 19. Reynolds RK, Talavera F, Roberts JA, et al: *Characterization of epidermal growth factor receptor in normal and neoplastic human endometrium. Cancer 66 : 1967-1974, 1990*
 20. Santini J, Formento JL, Francoul M, et al : *Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. Head Neck 13 : 132-139, 1991*
 21. Scambia G, Panici PB, Battaglia F, et al : *Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors. Cancer 67 :1347-1351,1991*
 22. Veale D, Aschcroft T, Marsh C, et al: *Epidermal growth factors in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 55:513-516,1987*
 23. Weinberg RA: *Oncogenes, anti-oncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res 49 : 3713-3721, 1989*
 24. William JG, Christine MH, Killian M, et al: *Immunohistochemical detection of the epidermal growth factor receptor in paraffin-embedded human tissues. J Pathol 164 : 285-289, 1991*
 25. Xu Y-H, Richert N, Ito S, et al : *Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 81:7308-7312,1984*
 26. Yamada T, Takagi M, Shioda S : *Evaluation of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 73(1): 67-70, 1992*