

## 두경부에 발생한 점막형 악성흑색종에서 nm23의 발현양상\*

고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실  
한림대학교 의과대학 이비인후과학교실\*\*

최종욱 · 정 근\*\* · 민헌기\*\* · 김용환 · 이승훈 · 최 건

= Abstract =

### Expression of nm23 in Mucosal Melanoma of the Head and Neck

Jong-Ouek Choi, M.D., Keun-Chung, M.D.,\*\* Hun-Ki Min, M.D.,\*\*  
Yong Hoan Kim, M.D., Seung-Hoon Lee, M.D., Geon-Choi, M.D.

*Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine,  
Korea University, Seoul, Korea*

*Department of Otorhinolaryngology,\*\* College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea*

Malignant melanoma has a very poor prognosis compared to other cancers. There are no specific tumor markers other than clinical staging and depth of invasion to predict the prognosis of the malignant melanoma. The nm23 has been known to inhibit the metastasis of the malignant melanoma, some studies showed that it is highly expressed in the malignant melanoma cell line which has a relatively weak metastatic potential.

In this study, we compared the expression of nm23 in mucosal type with that in cutaneous type of the malignant melanoma in the head and neck according to the stage and survival rate to identify the role of nm23 expression as a prognostic factor in mucosal melanoma of the head and neck. Six out of eight cases in mucosal type and seven out of 11 cases in cutaneous type expressed nm23, which showed no significant differences. Between the two groups there were no significant differences in expression of nm23 according to clinicopathologic staging or two year survival rate. However, in cases with low clinicopathologic staging and those surviving more than two years the expression was significantly increased which suggests that expression of nm23 can be used as an aid in determining the prognosis of mucosal melanoma.

KEY WORDS : Mucosal melanoma · nm23.

## 서 론

악성흑색종은 흑색세포에서 기원하는 암종으로 원

\*본 논문은 고려대학교 이비인후-두경부외과학교실의 연구비 보조로 이루어졌음.

발부위에 따라 피부형과 점막형으로 분류된다. 점막형은 피부형에 비하여 조기 발견과 완전한 외과적 절제가 어렵고 세포분열과 혈관침습빈도가 높으며 국소 재발 및 원격전이 빈번하여 예후가 불량한 것으로 보고되어 있으나<sup>1)2)3)</sup>, 예후판정의 기준이 설정되지 않아 치료지침의

결정에 어려움이 있다.

최근 악성암종의 증식능, 암억제유전자, 그리고 암유전자 단백질의 발현양상을 측정하여 종양에 대한 악성도와 예후와의 관련지표를 얻으려는 분자생물학적 시도가 활발하게 진행되어 악성흑색종의 예후인자로서의 가능성이 제시되고 있다.

이에 저자들은 두경부에 발생한 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종사이에서 nm23 발현의 차이 및 종양의 병기와 생존율에 따른 nm23 발현양상을 규명하여 두경부에 발생한 점막형 악성흑색종의 예후인자로서 nm23의 관련성을 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구대상

최근 10년간 고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과교실에서 악성흑색종으로 등록되어 관리되었던 총 24례 중 슬라이드와 파라핀 포매조직의 보관상태가 불량하였던 3례와 추적관찰이 불가능하였던 2례를 제외한 19례를 대상으로 하였다.

대상은 의무기록을 후향적으로 비교 분석하였고, 병기는 미국국립건강연구소(US National Institutes of Health)<sup>®</sup>에서 제정한 3단계 임상병리학적 병기(clinical pathologic three-stage system)를 적용하였으며(Table 1), 2년 평균유병생존율을 기준으로 발현양상을 비교하였다(Table 2).

대상례의 분포는 점막형 악성흑색종은 8례(평균연령 56.2세, 남녀비 5 : 3), 피부형 악성흑색종 11례(평균연령 59세, 남녀비 6 : 5) 이었다.

### 2. 연구방법

#### 1) 면역조직화학염색

대상군의 파라핀 포매조직을 약 7 $\mu$ m 두께로 절단하여

**Table 1.** Clinicopathologic stage

Stage	Mucosal(N=8)	Cutaneous(N=11)	Total(N=19)
I	4	8	12
II	1	1	2
III	3	2	5

**Table 2.** Two year survival rate of the cases

	Mucosal(N=8)	Cutaneous(N=11)	Total(N=19)
>2 years	2	5	7
<2 years	6	6	12

슬라이드에 포매한 후 자일렌에 탈파라핀시키고 100%, 95%, 90%, 80% 알코홀로 함유처리하였다. 내인성 과산화효소를 억제시키고, 일차 마우스 단클론항체의 비특이적 결합을 감소시키기 위하여 메탄올과산화수소액에 20분간 반응시켰다.

각 절편을 PBS용액으로 10분간 세척한 후 정상혈청으로 30분간 반응시키고 PBS용액에 세척하여 nm23-H1/NDPK-A protein(Novocastra Lab., Ltd., Newcastle, England) 를 1 : 100농도로 PBS에 희석하여 각 절편에 2시간동안 반응시켰다. 다시 PBS용액에 세척 후 anti-mouse immunoglobulin을 30분간 반응시킨 후 PBS용액에 세척하고 streptoavidin(ABC kit, Vectastatin)과 30분간 반응시켰다. 각 절편은 PBS용액에 세척 후 발색제인 DAB(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)으로 반응시키고 세척한 후 메이어 헤마톡실린으로 30초간 대조염색 후 봉입하였다.

#### 2) 헤마톡실린-에오진 염색

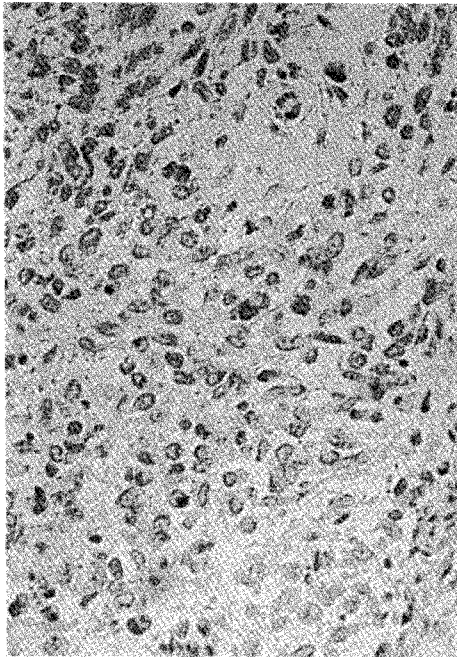
각 대상군의 파라핀 절편에서 정확한 악성흑색종의 위치를 확인하기 위하여 면역조직화학염색을 시행한 각 절편의 인접부위 절편에 헤마톡실린-에오진 염색을 시행하였다.

#### 3) 대조군

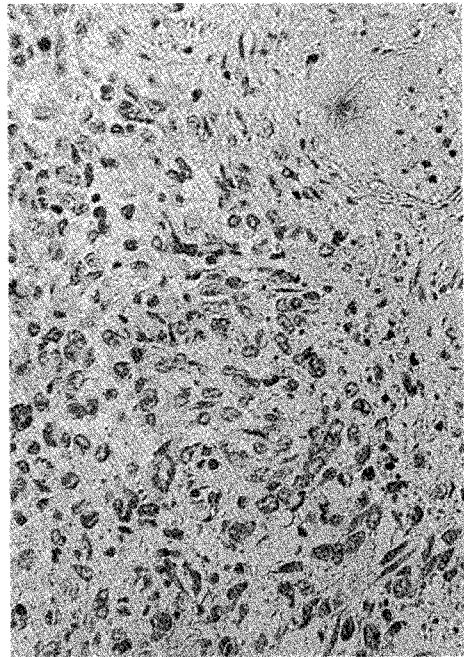
양성대조군은 이미 nm23 양성으로 본교 조직병리학교실에서 확인된 신세포암종과 유방암종의 조직을 사용하였으며, 음성대조군은 악성흑색종에서 일차항체를 처리하지 않고 항체희석에 사용되었던 PBS용액으로 대체하여 동일한 방법으로 염색하였다.

#### 4) 결과 판정

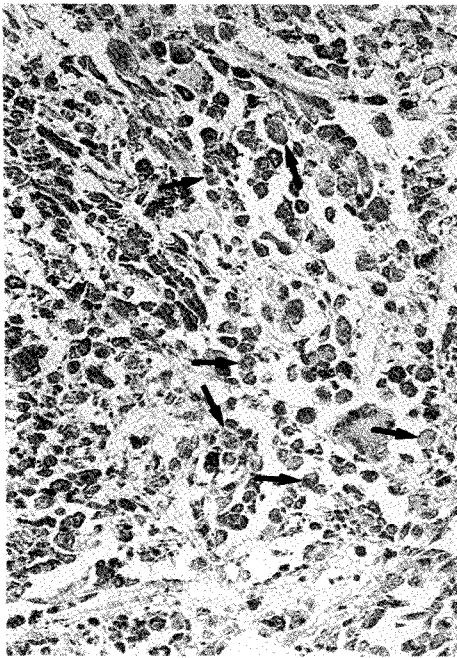
nm23의 염색정도는 광학 현미경으로 관찰하여 세포질에 염색되는 염색강도에 따라 4등급으로 구분하였으며 염색이 되지않은 대상은 Grade 0, 미약한 염색반응 Grade 1, 중등도 염색반응 Grade 2, 강한 염색반응은 Grade 3으로 분류하여 Grade 0와 Grade 1은 음성으로(Fig. 1, Fig. 3), Grade 2와 Grade 3은 양성으로 판정하였다(Fig. 2, Fig. 4). 양성인 경우 각 종양세포는 세포질 전반에 걸쳐 진한 갈색으로 염색되었다. 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종사이에서 nm23 발현의 차이 및 종양의 병기와 생존율에 따른 nm23 발현 결과에 대한 통계학적 검증은 chi-square 검정으로 분석하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.



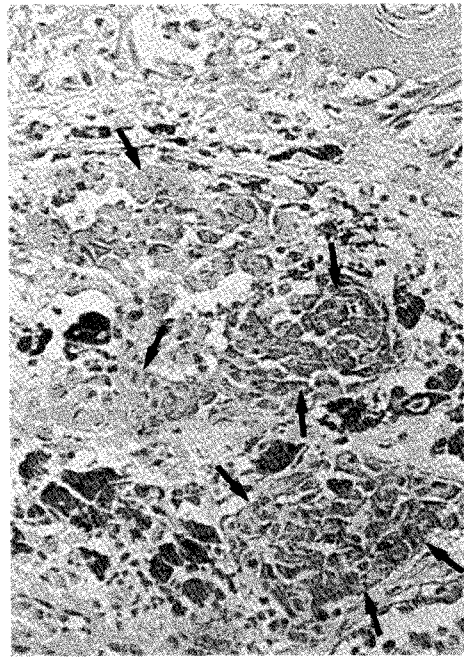
**Fig. 1.** Mucosal malignant melanoma : negative immunohistochemical staining for nm23( $\times 200$ ).



**Fig. 3.** Cutaneous malignant melanoma : negative immunohistochemical staining for nm23( $\times 200$ ).



**Fig. 2.** Mucosal malignant melanoma : positive immunohistochemical staining for nm23( $\times 200$ ). The cytoplasm of malignant melanoma cells are stained with dark-brown color (arrow).



**Fig. 4.** Cutaneous malignant melanoma : positive immunohistochemical staining for nm23( $\times 200$ ). The cytoplasm of malignant melanoma cells are stained with dark-brown color (arrow).

**Table 3.** Expression of nm23 between mucosal and cutaneous group

	Mucosal(N=8)	Cutaneous(N=11)	Total(N=19)
Positive	6(75%)	7(63%)	13(68%)
Negative	2(25%)	4(37%)	6(32%)

**Table 4.** Expression of nm23 according to the clinicopathologic stage

	Mucosal	Cutaneous	Total
I	4(100%)	6(75%)	10(83%)
II	1(100%)	0(0%)	1(50%)
III	1(34%)	1(50%)	2(40%)
	6	7	13

**Table 5.** Expression of nm23 according to the two year survival rate

	Mucosal	Cutaneous	Total
> 2 years	2(100%)	4(80%)	6(86%)
< 2 years	4(66%)	3(50%)	7(58%)

## 결 과

### 1. 점막형과 피부형 악성흑색종에서 nm23 발현율

nm23 발현은 점막형에서 6례(75%), 피부형에서 7례에서(63%)발현되어 대상군간에 통계학적으로 의미있는 차이가 없었다( $p > 0.05$ , Table 3).

### 2. 임상병리학적 병기에 따른 nm23 발현율

원발병소에 국한된 제 I 병기군 12례에서 10례(83%), 암종이 원발부위로 전이된 제 III 병기군 5례 중 2례에서(40%) 양성반응을 보여 임상병리학적 병기가 낮을수록 nm23의 발현빈도가 높았고( $p < 0.05$ ), 각각의 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종에서도 임상병리학적 병기가 낮을수록 nm23의 발현빈도가 높았다( $p < 0.05$ , Table 4).

### 3. 평균유병생존율에 따른 nm23 발현율

2년이상 생존한 대상군 7례에서 6례(86%), 2년내에 사망한 대상군에서는 12례 중 7례에서(58%) 양성반응을 보여 2년이상 생존한 대상군에서 nm23의 발현빈도가 높았으며( $p < 0.05$ ), 각각의 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종에서도 2년이상 생존한 대상군에서 nm23의 발현빈도가 높았다( $p < 0.05$ , Table 5).

## 고 찰

점막형 악성흑색종은 비교적 드물게 발생하는 악성암

종으로 두경부의 점막에서 발생빈도는 비강, 구강, 인후 두 순으로 보고되고 있으며, 호발연령은 50대에서 70대 사이이고 성별비는 남성에서 조금 더 호발한다<sup>7)</sup>. 대부분의 경우에서 환자들은 비특이적인 증상을 호소하며 진단이 될때까지 수개월이상 지연되는 경우가 많다고 한다. 주된 증상은 비강 및 부비동의 경우 비출혈, 비출혈이 구강에서는 무통성 종물이라고 한다<sup>8)</sup>.

진단은 호소하는 임상증상과 조직병리학적인 소견으로 하게되는데 암세포의 원형질내에 흑색소를 증명함으로써 타암종과 구분할 수 있다. 점막형 악성흑색종에 대한 병기 분류는 invasion level에 따른 Clark's 분류와 melanoma 병변의 깊이에 따른 Breslow's 분류는 적용하기에 한계가 많아 대부분의 경우 three-stage systems를 이용하고 있다<sup>6)</sup>.

치료는 침범부위와 병기에 따라서 차이가 있으나 우선적으로 수술적치료가 권장되며 국소조절과 보존적요법으로 방사선요법이 병용되어 사용되기도 한다. 항암화학요법은 원격전이가 있거나 재발한 경우에 사용할 수 있으며 nitrogen mustard, DTIC, CCNU, vincristine 등을 단독 혹은 병용해서 사용한다<sup>10)</sup>. 최근들어 면역요법으로 BCG, DNCB, interferon 등이 이용되고 있다<sup>11)</sup>.

nm23은 쥐의 악성흑색종세포주(K-1735)의 전이능력에 관한 연구 중에 발견되어<sup>12)</sup>, 현재까지 2종류의 murine type와 2종류의 human type이 알려져있다. Human type nm23 gene는 염색체 17q21에 위치하며 90%정도의 유전자 순서의 동일성을 가지는 두가지 형태의 유전자(nm23 H1과 nm23 H2 gene)로 존재하고 이중 nm23 H1이 종양의 전이를 억제하는데 관여한다고 한다<sup>13)</sup>. 그리고 최근의 연구에 의하면 이 두가지 형태의 유전자는 약 17kDa의 단백질을 만들고 이들은 각각 human nucleotide diphosphate kinase-A, -B와 매우 유사하다는 보고가 있다<sup>14)</sup>. 1988년 Steeg등은 악성흑색종 세포주(K-1735) 중에서 전이능력이 강한 세포주와 전이능력이 낮은 세포주의 nm23 mRNA를 각각 측정할 결과 전이능력이 낮은 세포주에서 10배정도 증가되어 있다고 보고하였고<sup>12)</sup>, 피부형 악성흑색종에 대한 연구에 의하면 전이 능력이 약한 세포에서 nm23의 발현이 강하고 전이를 동반한 피부형 악성흑색종에서 발현이 약하여 예후와 상관관계가 있다고 한다<sup>5)</sup>. nm23의 악성종양에서 전이 억제 능력의 기전에 대해서는 GTP-binding proteins의 활성화에 관여하여 세포내신호전달에 영향을 주며

종양세포내의 세포골격에 영향을 미쳐 종양의 성장에 관여한다는 보고가 있다<sup>15)</sup>. 그밖에 타암종에 대한 연구에 따르면 유방암종에서 주위 임파조직으로의 전이가 있는 경우가 전이가 없는 경우보다 nm23의 발현이 높으며 무병생존기간도 nm23의 발현이 높을수록 연장되는 등 유방암종의 예후인자로서 관련되어 있다고 하며<sup>16)</sup>, 인체 간세포암종에서 NDP kinase를 이용한 면역조직화학 검사상 원격전이가 동반된 경우 nm23의 발현정도가 낮았다<sup>17)</sup>. 위암종에서는 주위 장막조직과 주변 임파절로의 전이가 있는 경우 nm23의 발현이 적으며 예후가 좋지 않은 경우에 nm23의 발현이 적다는 보고가 있다<sup>18)</sup>. 그러나 대장에 발생한 암종에 대한 연구에 따르면 정상 점막조직에 비하여 nm23의 발현이 증가되어 나타나고 nm23의 발현과 임상적 기수(clinical stage) 와 관련이 없다는 보고가 있으며<sup>19)</sup>, 방광암종에서도 nm23-H1의 발현이 림파절 전이상태와 연관성이 없으며, 오히려 근 침윤정도가 심하고 림파절전이가 있는 경우에 강하게 발현되었다<sup>20)</sup>는 보고도 있어 현재까지 암종의 전이성여부 및 예후판정과 nm23의 발현정도에는 논란이 있다. 본 연구에서는 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종 사이에 nm23의 발현정도의 차이가 없어 피부형과 점막형의 예후 차이에 영향을 주는 요인은 아닐 것으로 생각되나 각각의 점막형과 피부형 악성흑색종에서는 임상병리학적 병기가 낮고 2년이상 생존한 대상군에서 발현이 증가되어 있어 악성흑색종의 예후와 관련이 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

저자들은 이 연구를 통하여 점막형 악성흑색종과 피부형 악성흑색종 사이에 nm23 발현정도의 차이를 규명할 수 없어 피부형과 점막형의 예후에 영향을 주는 요인은 아닐 것으로 생각되나, 점막형과 피부형 악성흑색종에서는 임상병리학적 병기가 낮고 2년이상 생존한 대상군에서 발현이 증가되어 있어, nm23의 발현정도가 악성흑색종의 예후평가에 보조적인 인자로서 적용될 수 있을 것으로 사료되었다.

## References

1) Greelhoe GW, McCune WS : *Malignant melanoma : correlation of long term follow-up with clinical*

*staging, level of invasion and thickness of primary tumor. Arch Jr Surg. 1977 ; 43 : 77-85*

2) Moschella SL, Hurler HJ : *Tumor of the skin. Dermatology, 2nd edition. 1975 ; 2 : 1360-1363*

3) Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA et al : *Otolaryngology Head and Neck Surgery , St Louis CV Mosby Co. 1993 ; 422-423*

4) Rigel DS : *Prognosis of malignant melanoma(Symposium on melanoma and pigmented lesions). Dermatologic clinics. 1985 ; 309-321*

5) Xerri L, Grob JJ, Battyani Z, Gouvernet J, Hassoun J, Bonerandi J : *nm23 expression in metastasis of malignant melanoma is a predictive prognostic parameter correlated with survival. Br J Cancer. 1994 ; 70 : 1224-1228*

6) Stern SJ, Guillaumondegui OM : *Mucosal melanoma of the head and neck : Head and Neck. 1991 ; 13 : 22-27*

7) Batsakis JG, Regezi JA, Solomon AR et al : *Mucosal melanoma. The Pathology of Head and Neck. 1982 ; 4 : 404-412*

8) Conley J, Pack GT : *Melanoma of the mucous membrane of the head and neck. Arch Otolaryngol. 1974 ; 99 : 315-319*

9) Seok YS, Choi JO, Jung KY, Kim KH : *Mucosal melanoma of the head and neck. Korean journal of head & neck oncology. 1996 ; 12 : 188-192*

10) Carter SK, Glastein E, Livingston RB : *Principle of cancer treatment. New York, McGraw-hill Book Co. 1982 ; 679-684*

11) Schuchter LM, Wohlaganger J, Fishman EK et al : *Sequential chemotherapy and immunotherapy for the treatment of metastatic melanoma. Journal of Immunotherapy. 1992 ; 12 : 272-276*

12) Steeh PS, Bevilacqua G, Kopper L et al : *Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. Journal of the National Cancer Institute. 1988 ; 80 : 200-204*

13) Brewster SF, Browne S, Brown KW : *Somatic allelic loss at the DCC, APC, nm23-H1 and p53 tumor suppressor gene loci in human prostatic carcinoma. J Urol. 1994 ; 151 : 1073-1078*

14) Gilles AM, Presecan E, Vonica A, Lascu I : *Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes : structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric*

- enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 ; 266 : 8784-8792
- 15) Kimura N, Shimada N : Evidence for complex formation between GTP binding protein(Gs) and membrane-associated nucleoside diphosphate kinase. *Biochem Biophys Res Comm*. 1990 ; 168 : 99-106
- 16) Lee SJ, Suh JD, Kim KY, Shim MC, Kwun KB, Kim DS : Expression of nm23 protein in breast cancer : an immunohistochemical study. *Journal of Korean Cancer Association*. 1996 ; 28(3) : 451-460
- 17) Nakayama t, Ohtsuru A, Nakao K et al : Immunohistochemical analysis of nucleoside diphosphate kinase or nm23 gene product expression in human hepatocellular carcinoma. *J natl Cancer Inst*. 1992 ; 84 : 1349-1354
- 18) Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M et al : Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer*. 1994 ; 73 : 259-265
- 19) Cohn KH, Wang FS, Desto-LaPaix F et al : Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinoma. *Lancet*. 1991 ; 338 : 722-729
- 20) Park DS, Lee JM : Prediction of lymph node metastasis based on p53 and nm23-H1 expression in muscle invasive grade III transitional cell carcinoma of bladder. *Journal of Korean Cancer Association*. 1996 ; 28(2) : 326-335