

두경부 편평세포암종에서 인유두종 바이러스와 p53과 Proliferating Cell Nuclear Antigen 발현의 임상적 의의

가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실

김종수 · 김민식 · 박경호 · 선동일 · 박동선 · 조승호

= Abstract =

The Clinical Implication of Human Papilloma Virus, p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Jong Su Kim, MD, Min Sik Kim, MD, Kyung Ho Park, MD, Dong Il Sun, MD,
Dong Sun Park, MD, Seong Ho Cho, MD

Department of Otolaryngology-HNS, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

The presence of HPV DNA and the expression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in head and neck squamous cell carcinoma were determined to evaluate the relationship of these factors and their association with their pathologic stages and cervical lymph node metastasis.

Among 65 patients the presence of HPV DNA was found in 12 cases(18.5%), p53 was found positive in 32 cases(49.2%) and expression of PCNA was observed in 24 cases(36.9%).

The expression of PCNA was more frequent in the HPV positive cancers compared with the HPV negative ones($p=0.0018$), and p53 revealed its higher rate of cooccurrence with the expression of PCNA($p=0.008$), which might suggest that PCNA expression has a positive relationship with HPV and p53 mutation in head and neck cancer. There might be inverse relationship between HPV and p53 mutation($p=0.063$), but 3 cases showed both HPV DNA positivity and p53 expression.

HPV was detected at a higher rate in the early pathologic stages than in the advanced stages of cancer, and p53 expression was more frequently found in the advanced stages($p=0.044$). These results suggests that HPV and p53 mutation might have different etiologic roles in the development of head and neck cancer, or cases with p53 mutation might have more aggressive behavior. PCNA expression showed no difference between early and late stages of cancer, and between cases with and without cervical lymph node metastasis.

Key Words : Human papilloma virus · p53, PCNA, Head and neck squamous cell carcinoma

서 론

교신저자 : 김민식, 137-701 서울특별시 서초구 반포동
505 가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : 02)590-2762, 전송 : 02)595-1354
E-mail : entkms@cmc.cuk.ac.kr

두경부 편평세포암종은 전체 악성종양 중 6번째로 발생빈도가 많아 세계적으로 연간 약 400,000명 이상의 환자가 보고되고 있는 질환으로서³⁰⁾ 흡연, 음주가 가장 중요한 위험인자로 알려져 있으나, 발생기전에

대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 최근 분자생물학의 발전으로 암의 발생은 여러 단계의 유전자 변이에 의하여 형성되며 바이러스 감염, 암억제 유전자의 이상, 암억제 유전자의 활성화 등 다양한 유전학적 변화가 복합적으로 관여하여 발생한다고 알려져 있다.

이중 인유두종 바이러스(human papilloma virus : HPV)는 약 8000 base pair를 갖는 이중 나선구조의 DNA 바이러스로 약 90여종의 아형이 있고¹¹⁾ 인체의 비노생식기, 상기도 등에 잠복감염의 형태로 존재하다가 어떤 원인에 의하여 활성화되어 암발생에 보조적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 특히 자궁경부의 편평세포암종에서 인유두종 바이러스 DNA가 80%이상의 높은 빈도로 검출되어 인유두종 바이러스가 암발생의 병인에 있어 중요한 역할이 알려지면서²³⁾, 두경부 편평세포암종에서도 인유두종 바이러스를 검출하고, 암발생에 있어서의 역할에 대해 규명하려는 연구가 진행되어 왔다⁵³⁾³⁹⁾.

p53 유전자는 염색체 17번 단원에 위치하는 암억제 유전자로서 p53 단백질은 세포의 DNA 손상시 세포주기(cell cycle)의 정지 또는 세포고사(apoptosis)를 유도함으로써 암 발생을 억제하는 역할을 갖고 있다¹²⁾. 두경부 편평세포암종의 발생에서 가장 중요한 원인인자로 알려진 흡연 및 알콜 섭취가 p53 유전자 변이와 상관 관계가 있다고 보고되었고⁷⁾, 최근 연구들에 따르면 두경부 편평세포암종의 39%~45%에서 p53 유전자의 변이가 확인되고 있다²⁸⁾. 한편 인유두종 바이러스 감염세포에서 생성되는 종양유발 단백질이 p53 유전자의 산물인 p53 단백을 비활성화하여 암세포 억제능이 약화되면서 종양이 유발될 수 있는 가능성도 제기되었다⁴⁴⁾. 이와 관련하여 두경부 편평세포암종에서 인유두종 바이러스가 다양한 빈도로 검출되고 있어²⁴⁾, 두경부 편평세포암종의 발생과 진행에 있어 인유두종 바이러스와 p53의 역할과 관계가 주목되고 있다.

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)은 DNA 중합효소- δ 의 보조단백으로서 DNA합성에 관여하며, 종양의 세포증식을 나타내는 표지자로 PCNA의 발현율이 높다는 것은 DNA복제가 왕성하다는 것을 의미하고, 일부 종양에서는 종양의 악성도를 반영한다

고 하며¹⁶⁾, PCNA의 발현이 인유두종 바이러스 DNA 양성인 경우에 높게 나타났다는 보고가 있다²⁷⁾.

이에 저자는 두경부 편평세포암종 조직에서 종합연쇄반응을 이용하여 인유두종 바이러스 DNA를 검출하고, 변이형 p53 단백질 및 PCNA의 발현정도를 면역조직화학적 염색으로 검사하여, 두경부 편평세포암종의 병인에 있어서의 인유두종 바이러스와 p53의 역할 및 상호연관과 악성도의 지표로서 PCNA의 의미, 그리고 이들과 암의 병기, 림프절 전이와의 관계에 대하여 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 대상

연구대상은 가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 이비인후과에서 조직학적으로 편평세포암종으로 진단하여 조직검사 및 수술을 시행한 두경부 편평세포암종 환자 65례를 대상으로 하였다. 각 부위별로는 후두암 36례, 하인두암 7례, 구강암 14례, 구인두암 8례였다. 성별분포는 남자 59례, 여자 6례였고, 평균연령은 60세였다. 대상환자의 AJCC(American Joint Committee on Cancer, 1997)기준에 의한 병리조직학적 임상병기, 병리조직학적 경부 림프절 전이여부에 대한 조사를 시행하였다.

2. 방법

대상환자로부터 생검이나 외과적 적출로 얻은 두경부 편평세포암종 조직 중 일부는 PCR에 사용하기 위해 -70°C에 신속히 냉동보관하였고, 나머지 조직은 파라핀 포매를 위해 10%의 buffered formalin에 고정하였다.

1) DNA 추출

-70°C에 냉동보관한 두경부편평세포암종 동결조직에서 DNA추출 kit(InstaGene Matrix, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 먼저 3 mg의 조직을 균질화하여, 1.5 ml 소형 원심기용 시험관에 넣고 세포용해용액을 첨가하여 원심분리하고 상층을 제거한후, 1 X PBS buffer 1 ml를 넣어 다시 원심분리 하였다. 3차 증류수와 세포부

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers

primers	Sequence(5'-3')	size of amplified products
L1	5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450
L2	5'-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	

Table 2. Detection of HPV, p53 and PCNA according to anatomical sites in head and neck squamous cell carcinomas

anatomical site	No. of cases	HPV (%)	p53 (%)	PCNA (%)
Larynx	36	7(19.4)	19(52.8)	15(41.7)
oral cavity	14	3(21.4)	4(28.6)	5(35.7)
oropharynx	8	2(25.0)	5(62.5)	2(25.0)
hypopharynx	7	0(0)	4(57.1)	2(28.6)
total	65	12(19.0)	32(49.2)	24(36.9)

유액 각각 20 μ l 와 kit시약 200 μ l 를 혼합하여 56°C 에서 15~30분간 처리하고, 시험관에 침전된 조직이 풀어질 만큼의 vortex로 섞었다. 남아있는 단백질의 비활성화를 위해 100°C에서 8분간 처리하고 재 부유시킨 후 원심분리하여 상층액 5 μ l 를 각 PCR에 이용하였다.

2) 인유두종 바이러스 DNA의 증합연쇄반응

추출한 HPV DNA의 증합연쇄반응은 L1 open reading frame중 450 base pair를 증폭할 수 있는 Manos들(1980)이 고안한 HPV L1 consensus primer set를 이용하였다(Table 1).

추출한 DNA 5 μ l 에 0.2 mM의 각 dNTP들, 10 배 농축 PCR 완충액 10 μ l, 0.5 mM의 consensus primer, 2.5 unit의 Taq polymerase(Boehringer Mannheim, Germany)와 증류수를 혼합하여 총 100 μ l 이 되도록하였다. Thermal cycler(Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분간의 반응을 35회 반복한후 72°C에서 10분간 처리하였다. 양성대조군으로 HPV 16, 18 DNA 5 μ l 를 표준 DNA로, 음성대조군으로는 조직대신 증류수와 반응액을 혼합한 것을 각각 사용하였다. 증폭 산출물 중 10 μ l 를 2% agarose gel(Boehringer Mannheim, Germany)에서 전기영동(80V에서 5분, 120V에서 45분)한 후 0.5 μ l/ml 농도의 ethidium bromide용액

(Boehringer Mannheim, Germany)으로 30분간 염색하여 전기영동상의 존재를 확인하였다.

3) p53과 PCNA의 면역조직화학적 검색

10%의 buffered formalin에 고정된 대상환자의 조직을 파라핀 포매후 4 μ m 두께의 절편으로 잘라 poly-L-lysine 등으로 표면처리한 슬라이드에 부착시킨 후 56°C 보온기에서 30분간 항온 처리하였다. 슬라이드에 부착된 조직을 xylene으로 5분간 2~3회 탈파라핀화하고 100% 에칠알콜로 2~3회 닦아준 후 APAAP(alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase)를 avidine-biotin을 이용하는 면역염색을 하였다. 1차 항체는 마우스 단클론성항체(clone-DO7, Novocasta Lab., Ltd. Newcastle, U.K.)로서 정상형과 변이형 p53 단백질에 모두 반응하는 항체를 1:100으로 희석한 후 45°C에서 1시간, PCNA는 mouse PC10 단클론성 항체(clone PC10, DAKO, Novocasta Lab., Ltd. Newcastle, U.K.)를 1:50으로 희석한 후 45°C에서 30분간 항온처리하였다. 2차항체는 biotinylated rabbit antimouse immunoglobulin (Vectastatin Elite kit, U.S.A.)을 사용하였으며 45°C에서 30분간 항온처리한 후 2-3회 세척하고, 45°C 검출액에서 15분간 처리한 후 3회 세척하였다. 발색제에 45°C에서 10분간 처리한 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 광학현미경 하에서 p53의 양성판정

Table 3. Relationship between HPV and p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinomas

	Overexpression of p53 (%)		Total
	(+)	(-)	
HPV(+)	3(25.0)	9(75.0)	12(18.5)
(-)	29(54.7)†	24(56.3)	53(81.5)
Total	32(49.2)	33(50.8)	65(100.0)

† p=0.063

은 세포안에 붉은색 과립이 있을 때 양성으로 판정하였다. PCNA의 염색은 고정방법과 사용하는 항체에 따라 염색정도가 차이를 보일수 있는데⁴³⁾, 본 실험에서는 낮은 염색정도를 보였기 때문에 Kamel (1994)¹⁶⁾들이 사용한 기준에 따라 전체 세포수에서 핵염색을 보이는 세포수의 비율이 0인 경우 발현하지 않은 것으로, 10% 미만인 경우 발현, 10% 이상인 경우 과발현으로 각각 판정하였다.

4) 자료분석과 통계처리

자료의 유의성 검정은 χ^2 -검정을 이용하였고, 표본수가 적은 경우 Fisher's exact test로 하였다. 유의성 검정에서 유의 수준을 $P < 0.05$ 범위로 정하였다.

결 과

전체 대상환자의 성별은 남자 59례 여자 6례로 남자에게 많았으며, 평균연령은 60세였다. 각 부위별로는 후두암 36례, 하인두암 7례, 구강암 14례, 구인두암 8례였다(Table 2).

1. 발암 부위에 따른 HPV 및 p53, PCNA의 발현 빈도

이들 환자의 각 부위별 두경부 편평세포암종 조직에서 HPV 및 p53, PCNA의 발현을 관찰한 결과는 다음과 같았다(Table 2). 전체 65 대상 환자중 12례(18.5%)에서 HPV DNA가 검출되었고, p53 단백질은 32례(49.2%)에서, PCNA는 24례(36.9%)에서 발현이 확인되었다.

Table 4. Relationship between HPV and PCNA overexpression in head and neck squamous cell carcinomas

	Overexpression of PCNA (%)		Total
	(+)	(-)	
HPV(+)	8(66.7)	9(75.0)	12(18.5)
(-)	16(30.2)†	37(69.8)	53(81.5)
Total	24(36.9)	41(63.1)	65(100.0)

† p=0.018

2. HPV, p53 및 PCNA간의 관계

1) HPV 양성군과 음성군에서의 p53 발현을 비교한 결과 HPV 음성군에서 상대적으로 p53 발현이 높은 빈도로 나타났으나 통계적으로 유의는 없었다($p=0.063$). 3례에서는 HPV DNA검출 및 p53 단백질 발현이 동시에 확인되었다.

2) HPV 양성군과 음성군에서의 PCNA의 발현을 비교한 결과 HPV 양성군에서 통계적으로 유의하게 PCNA의 발현이 높게 나타났다($p=0.018$).

3) p53 발현 유무에 따른 PCNA의 발현을 비교한 결과 p53 발현군에서 통계적으로 유의하게 PCNA의 발현이 높게 나타났다($p=0.008$).

3. 임상병기 및 경부 림프절 전이유무에 따른 HPV 및 p53, PCNA의 발현

AJCC기준(1997)에 의한 병기별로 1기, 2기 및 3기, 4기로 분류하였을 때, HPV 검출결과는 통계적으로 유의하지는 않았으나($p=0.056$), 조기암(1기, 2기)에서 진행암(3기, 4기)보다 더 높은 빈도로 검출되었고, p53 단백질은 통계적으로 유의하게($p=0.044$) 진행암에서 조기암보다 더 높은 빈도로 발현되었다. PCNA의 발현은 조기암과 진행암 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 경부 림프절 전이유무에 따른 HPV 및 p53, PCNA의 발현에서 HPV는 경부 림프절 전이가 없었던 군에서 높게 나타났으나 통계적 유의는 없었다. p53와 PCNA의 발현은 두 군간에 차이를 보이지 않았다.

Table 5. Relationship between p53 and PCNA overexpression in head and neck squamous cell carcinomas

	Overexpression of PCNA(%)		Total
	(+)	(-)	
overexpression of p53			
(+)	17(53.1)†	15(75.0)	32(49.2)
(-)	7(21.2)	26(69.8)	33(78.9)
Total	24(36.9)	41(63.1)	65(100.0)

† p = 0.008

Table 6. Clinical correlationship of HPV, p53 and PCNA according to AJCC pathologic stages and cervical lymph node metastasis

Clinicopathologic	No. of cases	HPV(%)	p53(%)	PCNA(%)
Clinical stage				
I & II	10	4(40.0)†	2(20.0)	4(40.0)
III & IV	55	8(14.5)	30(54.5)‡	20(36.4)
Lymph node metastasis				
Absent	27	7(25.9)	13(48.0)	10(37.0)
Present	38	5(13.2)	19(50.0)	14(36.8)

† p = 0.056 ‡ p = 0.044

고찰

분자생물학의 발전으로 암의 발생은 여러 단계의 유전자 변화에 의하여 형성되며 바이러스 감염, 암억제 유전자의 이상, 암억제 유전자의 활성화 등 다양한 유전학적 변이가 복합적으로 관여한다고 알려져 있는데, 최근 연구는 HPV가 두경부 편평세포암종의 발생에 중요한 역할을 한다는 보고가 있었다. HPV의 E6, E7 유전자의 산물인 E6, E7 종양단백이 암억제 유전자의 산물인 p53 단백질, pRB 단백질과 복합체를 형성하여 이들의 정상적인 암억제작용을 저지하여 암발생을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 특히 HPV type16과 같이 고 위험군에 속하는 HPV에서 생성되는 E6 단백질은 p53 단백질의 중심구조(core structure)에 결합하여 p53 단백을 분해하고²¹⁾⁴⁴⁾, p53 단백질이 분해되어 기능이 소실되면 세포주기조절의 와해와 유전자변이의 증가, 염색체 불안정성을 동반하면서 숙주 세포의 암발생을 초래한다⁴⁴⁾. 본 실험에서는 비교적 넓은 범위의 HPV 아형을 검출할 수 있는 Manos들(1980)이 고안한 L1 consensus primer를 이용한 중합연쇄반응으로 HPV를 검출하였는데(Table 1), 후두

암에서는 36례중 7례(19.4%), 하인두암에서는 7례 중 검출된 례가 없었고, 구강암 및 구인두암에서는 각각 14례중 3례(21.4%) 8례중 2례(25%)로 검출되었다. 전체적으로는 65례중 12례로 18.5%의 검출 빈도를 보였는데 이는 Paz들(1997)³¹⁾의 16%와 비슷했고 Fouret들(1995)¹³⁾의 11.4%보다는 높았지만, McKaig들(1998)²⁴⁾이 이제까지의 보고를 조사하여 종합한 두경부 편평세포암종에서의 HPV DNA의 중합연쇄반응에 의한 검출율의 평균인 34.5%보다는 낮았다. 이러한 검출빈도의 차이는 지역과 인종적인 차이 및 검사재료의 종류, 검사방법의 차이등에 의한 것으로 생각된다.

두경부 편평세포암종에서 p53 유전자 변이는 39 - 45%로 보고되고 있는데²⁸⁾, 본 연구에서도 p53 단백질의 발현은 65례중 32례(42.9%)로 이들의 보고와 비슷한 빈도를 보였다. p53과 관련하여 종양이 유발되는 기전으로는 우선 이 p53 유전자의 변이로 인해 정상적인 기능을 하지 못하는 변이형 p53 단백질이 생성되는 경우가 있는데, 변이를 일으킨 p53 단백질은 반감기가 길어지고, 되먹임 억제 상실로 정상보다 많은 양이 세포핵에 존재하게 되어 본 실험에서처럼

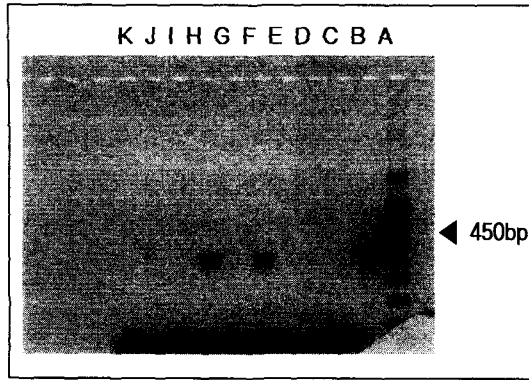


Fig 1. Photomicrography of agarose gel electrophoresis of 450 base pairs DNA amplified with HPV L1 consensus primers. Lane A : Marker (100 base pair ladder), Lane B : positive control, Lane C : negative control, Lane D-K : amplified products of patients. Lane F and H demonstrate the positive signal for the presence of HPV.

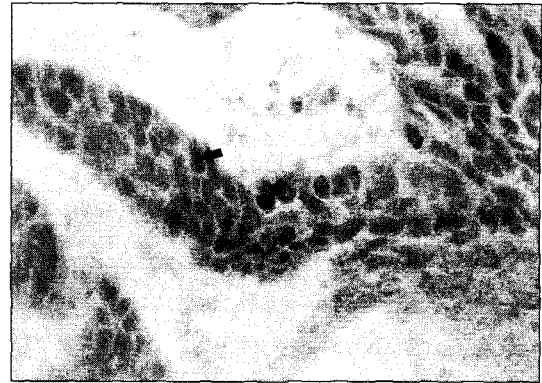


Fig 2. Immunohistochemical staining of p53 protein with APAAP (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase) method in laryngeal squamous cell carcinoma tissue. The positive immunoreactivity is localized in the nucleus (arrows). x400

면역조직화학적 검출이 가능하다⁴¹⁾. 또한 HPV 감염 세포의 변형유전자가 생산하는 E6 단백질과 같은 종양 유발성 바이러스 단백질이 p53 단백질에 결합하여 p53 단백질이 불활성화됨으로써 암세포 억제기능을 소실하게 되어 종양이 유발될 수 있다⁴³⁾³³⁾. p53과 관련된 이러한 두가지의 상이한 암 발생 기전중 하나의 과정만으로도 충분히 암 발생이 가능하므로 p53 유전자의 변이와 HPV 감염간에 역 상관관계의 가능성이 제시되었는데 실제로 자궁경부암, 두경부암, 식도암, 폐암에서 이러한 역 상관관계가 보고된 바 있다³¹⁾¹⁰⁾¹⁴⁾³⁶⁾. 본 연구에서는 HPV 양성군과 음성군에서의 p53 단백질의 발현을 비교한 결과 HPV DNA 음성군에서 상대적으로 p53 발현이 높은 빈도로 나타나 역 상관관계의 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았고($p=0.063$), 반면 3예에서는 HPV DNA와 p53 단백질의 발현을 모두 보였다(Table 3). 두경부 편평세포암종에서 HPV DNA와 p53 유전자의 변이가 모두 존재하는 경우도 상당수 보고된 바 있는데¹⁾²⁰⁾²⁴⁾³⁵⁾, 이중 Anwar들¹⁾ (1993)은 보고에서 43례의 후두암 환자중에서 p53 단백질의 발현과 HPV 감염이 동시에 있는 11례들을 확인하고, 이를 p53 변이가 일어난 후 2차적으로 HPV 감염이 된 것으로 설명하였고, McKaig들(1998)²⁴⁾은 두경부 편평세포암종 33례 중 5례에서 HPV와 p53 단백질의 발현을 확인하고, 이것은 HPV 감염과 p53 유전자 변이가 서로 배반적이

아님을 나타낸다고 하였다. 이들의 보고에서와 같이 본 연구에서도 p53의 기능을 불활성화 시키는 두가지의 기전인 HPV 감염과 p53 변이가 서로 배반적이지 아니며 독립적으로 동시에 작용할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Brandwein 들(1994)⁶⁾은 64례의 구강암을 대상으로 임상적 병기와 HPV 감염간에 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고하였는데, 본 연구에서도 HPV DNA는 조기암에서 상대적으로 높은 빈도로 나타났지만 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.056$). 이에 반해 p53 단백질의 발현은 진행암에서 높은 빈도로 나타났는데($p=0.044$), 이는 HPV 감염과 p53 유전자 변이가 두경부 편평세포암종의 생성과정에 있어 초기와 후기에 각각 다르게 작용하거나, p53 유전자변이가 동반된 종양이 더 악성으로 진행되는 성향을 반영할 가능성을 생각할 수 있다. 두경부 편평세포암종에서 정상형 p53이 암세포 증식과 진행을 막고 세포고사를 유도할 수 있다는 실험 보고들로부터 p53 유전자의 변이가 있는 경우 나쁜 예후를 보일 것이라는 추정이 가능하다²²⁾³²⁾. 그러나 p53 유전자가 두경부 편평세포암종에서 환자의 생존기간, 종양의 재발, 원격전이등에 어떤 영향을 미치는지에 대한 많은 연구가 있어왔지만, 아직 이에 대해 명확히 밝혀지지 않아 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

PCNA는 본 연구에서 HPV DNA 양성인 표본에

서 통계적으로 유의하게 높은 빈도로 발현을 보였다 ($p=0.018$). 이는 Noffsinger들 (1995)²⁷⁾이 항문암에서 HPV 음성의 종양에서보다 HPV 양성의 종양에서 PCNA 발현정도가 높았다고 한 것이나 Shindoh들 (1995)³⁵⁾이 구강암에서 HPV type 16과 PCNA 발현이 함께 나타남을 보인 것과 일치한다. PCNA는 p53 단백질의 발현을 보인 표본에서도 통계적으로 유의하게 높은 빈도로 발현을 보였다 ($p=0.008$). 이러한 결과들은 HPV 감염이나 p53 유전자변이에 의하여 p53 단백질이 기능을 상실하게 되어 세포들이 지속적으로 활발하게 증식하는 상태를 유지하는 것을 반영한다고 할 수 있다³⁵⁾. Kamel들 (1994)¹⁶⁾은 신세포암에서 PCNA의 발현정도가 높을수록 진행암으로 진단되는 빈도가 높으며 원격전이도 많았다고 하였고 그밖에 림프종, 자궁내막암, 유방암등에서도 PCNA양성인 세포의 수가 많을수록 종양이 임상적으로 악성을 보인다는 보고하였다¹⁸⁾²⁶⁾⁴⁰⁾. Shin들 (1993)³⁴⁾은 PCNA가 두경부암이 진행되는 다단계 과정을 반영하는 표지자로서 사용될 수 있으며, PCNA의 발현율이 높다는 것은 향후 침윤성 암종으로 진행할 가능성이 높다는 것을 의미한다고 하였다. 본 연구에서는 PCNA의 발현이 조기암과 진행성암 간에 차이를 보이지 않았고, 경부 림프절 전이유무에 따른 PCNA의 발현에서도 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상의 본 연구 결과에서 두경부 편평세포암종에서 HPV DNA와 p53 변이 간에 통계적으로 역 상관관계의 경향을 보이나, HPV DNA양성이면서 p53 단백질 발현을 보인 3례를 통하여 HPV감염과 p53 유전자 변이가 독립적으로 동시에 작용할 수 있음을 확인하였다. HPV DNA는 조기암에서, p53 단백질의 발현은 진행암에서 더 높은 빈도로 확인되어, HPV 감염과 p53 유전자 변이가 두경부 편평세포암종의 생성과정에 있어 각각 초기와 후기에 다른 작용을 하거나, p53 유전자변이를 동반한 종양이 높은 악성도를 보일 가능성을 보였다. PCNA의 발현은 HPV DNA 양성군과 p53 단백질 발현군에서 모두 높은 빈도로 확인되어 이들 종양에서 활발한 세포증식이 있음을 확인하였으나, 조기암과 진행암 간에 발현의 유의한 차이는 보이지 않았고, 경부 림프절 전이의 유무 간에도 유의한 차이를 보이지 않아 종양의 악성도와

는 관련이 없는 것으로 나타났다.

향후 보다 많은 증례를 대상으로한 객관적 분석과 재발여부, 생존기간등에 대한 추적검사를 통해 두경부 편평세포암종에서 HPV와 p53 및 PCNA 발현의 임상적인 예후인자로서의 의미를 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- 1) Anwar K, Nakakuki K, Imai H, Naiki H, Inuzuka M. *Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. Int J Cancer 1993;53:952-956.*
- 2) Boyle J, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban R, Roa R, Correo R, Eby Y, Ruppert J, Sidransky D. *The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. Cancer Res 1993;53:4477-4480.*
- 3) Brachman D, Graves D, Vokes E, Beckett M, Haraf D, Montag A, Dunphy E, Mick R, Yandell D, Weichselbaum R. *Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. Cancer Res 1992;52:4832-4836.*
- 4) Brachman D. *Molecular biology of head and neck cancer. Semin Oncol 1994;21:320-329.*
- 5) Brandsma J, Abramson A. *Association of papilloma virus with cancers of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1989;115:621-625.*
- 6) Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo G. *HPV detection using "hot start" polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. Mod Pathol 1994;7:720-727.*
- 7) Brennan J, Boyle J, Koch W, Goodman S, Hruban R, Eby Y, Couch M, Forastiere A, Sidransky D. *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck.*

- N Engl J Med* 1995;332:712-717.
- 8) Caamano J, Zhang S, Rosvold E, Bauer B, Klein-Szanto A. *p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. Am J Pathol* 1993;142:1131-1139.
 - 9) 최종욱, 김경현, 정근, 최진, 염병우, 민헌기. 후두 이형성증에서 TGF- α , p53과 PCNA의 발현양상. 대한이비인후과학회지 1997;40:861-868.
 - 10) Crook T, Wrede D, Tidy J, Mason W, Evans D, Vousden K. *Clonal p53 mutation in primary cervical cancer : association with human papilloma virus negative tumours. Lancet* 1992 ;339:1070-1073.
 - 11) de Villiers EM. *Human pathogenic papilloma virus types: an update. Curr Top Microbiol Immunol* 1994;140:1345-1355.
 - 12) Finlay C, Hinds P, Levine A. *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell* 1989;57:1083-1093.
 - 13) Fouret P, Dabit D, Sibony M, Alili D, Commo F, Saint-Guily JL, Callard P. *Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. Am J Pathol* 1995;146:599-604.
 - 14) Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S, Takahashi A, Tamiya T, Ogata T. *Prognostic significance of human papillomavirus genomes (type-16,-18) and aberrant expression of p53 protein in human esophageal cancer. Int J Cancer* 1993; 54:226-2230.
 - 15) 황찬승, 김기범, 한병상, 양훈식, 김춘길. 후두편평세포암에서 HPV, p53 및 PCNA 발현양상과 세포고사와의 관계. 대한이비인후과학회지 1998; 41:767-772.
 - 16) Kamel D, Turpeenniemi-Hujanen T, Vahakangas K, Paakko P, Soini Y. *Proliferating cell nuclear antigen but not p53 or human papillomavirus DNA correlates with advanced clinical stage in renal cell carcinoma. Histopathology* 1994;25: 339-347.
 - 17) 김민식, 서병도. 후두암의 예후 판정을 위한 인유두종 바이러스 검출의 임상적 의의. 가톨릭대 학 의학부 논문집 1993 ; 46 : 1715-1727.
 - 18) Korkolopoulou P, Patsouris E, Pangalis G, Tsenga A, Elemenoglou J, Thomas-Tsangli E, Spandidos D, Kittas C. *A comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen, c-myc p62, and nucleolar organizer region staining in non-Hodgkin's lymphomas : a histochemical and immunohistochemical study of 200 cases. Hum Pathol* 1993;24:371-377.
 - 19) Kurki P, Ogata K, Tan E. *Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. J Immunol Methods* 1988;109:49-59.
 - 20) Lee N, Ye Y, Chen J, Li X, Waber P, Nisen P. *p53, retinoblastoma, and human papillomavirus in squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa of the upper aerodigestive tract. Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119: 1125-1131.
 - 21) Li X, Coffino P. *High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. J Virol* 1996;70:4509-4516.
 - 22) Liu T, El-Naggar A, McDonnell T. *Apoptosis induction mediated by wild type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res* 1995;55:3117-3122.
 - 23) Lorincz A, Temple G, Kurman R, Jensen A, Lancaster W. *Oncogenic association of specific human papilloma viruses types with cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst* 1987;79: 671-677.
 - 24) McKaig R, Baric R, Olshan A. *Human papillomavirus and head and neck cancer : epidemiology and molecular biology. Head Neck* 1998;20:250-265.
 - 25) Mounts P, Kashima H. *Association of human papillomavirus subtype and clinical course in respiratory papillomatosis. Laryngoscope* 1984:

- 94:28-33.
- 26) Nielsen A, Nyholm H. *Proliferating cell nuclear antigen in endometrial adenocarcinomas of endometrioid type correlated with histologic grade, stage, previous hormonal treatment, and survival. Hum Pathol 1993;24:1003-1007.*
 - 27) Noffsinger A, Hui Y, Suzuk L, Yochman L, Miller M, Hurtubise P, Gal A, Fenoglio-Preiser C. *The relationship of human papillomavirus to proliferation and ploidy in carcinoma of the anus. Cancer 1995;75:958-967.*
 - 28) Park N, Gujuluva C, Baek J, Cherrick H, Shin K, Min B. *Combined oral carcinogenicity of HPV-16 and benzo(a)pyrene : an in vitro multistep carcinogenesis model. Oncogene 1995 : 10:2145-2153.*
 - 29) 박영학, 조승호. 인후두암에서 p53 유전자 변이 및 인유두종 바이러스 DNA 검출. 대한이비인후과학회지 1997;40:699-709.
 - 30) Perkin D, Pisani P, Ferlay J. *Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int J Cancer 1993;54:594-606.*
 - 31) Paz I, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski S. *Human papilloma virus in head and neck cancer : An association of HPV16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. Cancer 1997;79:595-604.*
 - 32) Roth J, Cristiano R. *Gene therapy for cancer : what have we done and what were we are going? J Natl Cancer Inst 1997;89:21-30.*
 - 33) Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse J, Minna J, Howley P. *Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. J Virol 1992;66:5100-5105.*
 - 34) Shin D, Voravud N, Ro J, Lee J, Hong W, Hittelman W. *Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis : a potential biomarker. J Natl Cancer Inst 1993;85:971-978.*
 - 35) Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, Saito T, Funaoka K, Kohgo T, Amemiya A, Sawada Y, Fujinaga K. *Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. Cancer 1995;76:1513-1521.*
 - 36) Soini Y, Nuorva K, Kamel D, Pollanen R, Vahakangas K, Lehto V, Paakko P. *Presence of human papillomavirus DNA and abnormal p53 protein. accumulation in lung carcinoma. Thorax 1996;51:887-893.*
 - 37) Steinberg B. *Human papillomaviruses and upper airway oncogenesis. Am J Otolaryngol 1990;11 : 370-374.*
 - 38) 선동일, 서병도. 두경부암에서 인유두종 바이러스 검출의 임상적 의의. 가톨릭대학 의학부 논문집 1996;49:415-426.
 - 39) 선동일, 김민식, 조재홍, 박영학, 조승호. 후두암에서의 인유두종 바이러스의 검출과 아형분류. 대한이비인후과학회지 1998;41:608-613.
 - 40) Tahan S, Neuberg D, Dieffenbach A, Yacoub L. *Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. Cancer 1993;71:3552-3559.*
 - 41) Thomas D. *P53 in tumor pathology: Can we trust immunocytochemistry? J Pathol 1992; 166:329-330.*
 - 42) Ting Y & Manos M. *Detection and typing of genital papilloma viruses. In PCR protocols : a guide to methods and applications, San Diago, Academic Press 1980:356-367.*
 - 43) Van Dierendonck J, Wijisman J, Keijzern R. *Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Am J Pathol 1991;138:1165-1172.*
 - 44) Werness B, Levine A, Howley P. *Association of human papilloma virus type 16 and 18 E6 oncoproteins with p53. Science 1990;248:76-79.*