

## 진행된 구강암 및 후두암 환자의 혈청 Intercellular Adhesion Molecule-1(ICAM-1) 및 Sialic acid(SA)농도

울산대학교 의과대학 이비인후과학교실

최승효 · 남순열 · 윤두환 · 강진욱 · 임현우 · 권현자 · 박정제

=Abstract=

### Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Total Sialic Acid in Serum of Patients with Oral Cavity Cancer and Laryngeal Cancer

Seung-Hyo Choi, MD, Soon Yuhl Nam, MD, Doo Hwan Yun, MD, Jin Wook Kang, MD, Hyun Ja Kwan PhD, Jae Dong Lee, MD, Jung Je Park, MD.

Department of Otolaryngology,  
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : Adhesion molecules have been implicated in tumor progression. In this study, we aimed to investigate serum soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and sialic acid (SA) levels in oral cavity cancer and laryngeal cancer and correlate their levels with cancer progression.

**Method** : The sera from 31 patients with advanced oral cavity cancer (5 at stage III, 10 at stage IV) and advanced laryngeal cancer (1 at stage III, 15 at stage IV) were extracted before treatment. The concentrations of ICAM-1 was measured by Endogen kit (measured absorbance at 490nm) and the concentration of SA was measured by Roche kit (measured absorbance at 550nm). Respectively, gained data was compared with those from a control group (n=12).

**Results** : Mean serum ICAM-1 and SA levels were found to be higher in oral cavity cancer group and laryngeal cancer group than control group. But statistical meaning was at SA ( $p < 0.001$ , oral cavity cancer and laryngeal cancer versus control).

**Conclusion** : These data reveal that the significant correlations serum SA level in advanced oral cavity cancer and laryngeal cancer. Serum ICAM-1 level was higher at advanced oral cavity cancer and laryngeal cancer than at control group but that was not significant.

**Key words** : Intercellular Adhesion Molecule -1, Sialic acid, laryngeal neoplasm, mouth neoplasm,

## 1. 서 론

암의 치료계획을 수립하고 시행하는 데 있어서 예후의 예측은 매우 중요하다. 두경부암에서도 이러한

목적으로 예후 인자를 결정하기 위한 연구가 지속적으로 시행되었다. 특히 후두암과 구강암은 경부 전이가 환자의 생존을 결정에 있어서 가장 중요한 인자이다. 후두암과 구강암이 진행된 병기에서 많이 진단되고, 이러한 진행된 암은 5년 생존율이 40% 이내이며 화학요법으로는 한계가 있다.<sup>1)</sup> 또한 최근 수년간 후두암과 구강암의 진행에 관여하는 생체분자의 분자생물학적

교신저자 : 남순열, 138-736, 서울 송파구 풍납동 388-1  
울산대학교 의과대학 서울아산병원 이비인후과학교실  
전화 : 02-3010-3710 FAX : 02-489-2773  
E-mail : synam@www.amc.seoul.kr

인 증명을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 만일 암의 진행된 정도와 전체 생존율을 반영할 수 있는 종양 표지자(tumor marker)가 있다면 이러한 종류의 암의 치료 및 그 경과 관찰에 있어서 많은 도움을 줄 것이다.<sup>2)3)</sup>

한편 종양세포의 표면은 정상세포와 다르게 생겨 있다. 정상세포에서 암세포로의 전환은 세포막의 당단백질(glycoprotein of the cell membrane)의 구성과 분포의 변화와 밀접한 관련이 있다.<sup>4)</sup> 세포의 접착 및 이동에 있어서 중요한 역할을 하는 세포 접착 분자(cell adhesion molecule)가 악성 종양에서 암세포의 이동 및 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>5)6)</sup> 아직 많이 알려져 있지는 않지만 세포 접착 분자의 soluble form이 원발성 종양(primary tumor)의 임상적 진행과 연관이 있다. 이들 세포 접착 분자를 통해 암세포는 혈액 순환에 참여하고 다른 세포 및 세포의 기질에 부착한다. 따라서 몇몇 세포 결합 분자는 암세포의 국소 침습적 성장 및 전이과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>7)</sup>

아직 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)의 source는 완전히 밝혀지지는 않았지만 ICAM-1은 종양세포, 단핵 혈관(mononuclear blood), 혈관 내피세포, 그리고 섬유아세포 등에서 분비되는 접착 분자의 일종으로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 한 연구에 따르면 혈청 ICAM-1이 대장암 주변의 소혈관에서 증가되어 있었고, ICAM-1의 분비는 종양의 전이와 밀접한 관련이 있었다. 종양세포에서 분비된 ICAM-1은 세포독성 T세포나 자연 독성 세포(Natural Killer cell)가 종양세포에 작용하여 종양을 파괴하는 것을 간접적으로 막아주어 종양세포의 전이를 돕는다.<sup>9)</sup>

한편 혈청 sialic acid (SA)는 이상적인 종양 표지자는 아니지만 몇몇 악성종양에서 비특이적 표지자로 그 유용성이 밝혀졌다.<sup>10)</sup> 대부분의 혈청 SA는 당단백질이나 당지질의 구성성분으로 나타난다. 암세포의 연구에서 당단백질이나 당지질이 SA량의 변화를 통해 세포 표면이나 세포막의 변화를 유발함을 알 수 있었다. 1958년 Winzler<sup>11)</sup>가 단백 결합된 sialic acid가 암 환자에서 증가하는 것을 처음으로 보고하였다. 그 이후 악성종양과 sialic acid의 level의 연관성을 알아보기 위한 많은 연구가 진행되었고, 악성 흑색종, 폐암, 전립선암, 유방암, 대장암등 여러 악성 종양의

연구에서 현저한 혈청 SA의 현저한 증가가 질병의 활성과 관련이 있음을 보여 주었다.<sup>12)</sup>

SA와 ICAM-1은 둘다 세포와 세포의 상호작용 및 접착에서 중요한 인자이다. 따라서 이번 연구에서는 진행된 후두암 및 구강암 환자에서 혈청 ICAM-1과 SA의 농도를 측정하여 암의 진행 정도와 농도 사이의 연관성을 찾고자 했다

## II. 재료 및 방법

2002년 3월부터 7월까지 서울아산병원 이비인후과를 내원하여 진단 받은 15명의 구강암 환자와 16명의 후두암 환자로 구성된 환자군과 그리고 12명의 대조군을 대상으로 실험을 시행하였다. 환자들의 연령은 구강암 환자는 36-77세(mean: 56.6), 후두암 환자는 44-80세(mean: 59.9), 대조군 환자는 32-63세(mean: 48.6)였다. 각 환자를 대상으로 약 10 mL의 혈액을 채취하였으며 이를 가지고 혈청 ICAM-1, SA의 농도를 측정하였다.

ICAM-1은 Endogen kit를 이용하여 실험을 시행하였다. 먼저 혈액은 2-8 C에서 보관되어야 한다. 혈액 표본을 4 C에서 2000 rpm으로 원심 분리시켜서 혈청 표본을 얻었다. 이번 분석에 10 l의 표본이 필요했다. 분석에 들어가기 전에 표본을 1:100으로 희석하였다. 비어 있는 kit의 well에 25l의 표본을 채우고 나머지 75 l는 ICAM-1과 결합시킨 뒤 20-25 C에서 2시간 동안 150 10 rpm으로 회전시키면서 배양하였다. 배양이 끝난 후 3차례 세정한 뒤 100l의 O-phenylenediamine 추출물을 첨가한 뒤 20-25 C에서 밀봉은 하지 않으면서 한편 강한 빛은 차단한 채 30분간 배양한 뒤 50 l의 stop solution을 첨가한 뒤 490 nm에서 absorbance를 측정하였다. calibration curve를 absorbance vs 농도를 plotting함으로써 구했으며, 실험 하고자 하는 sample의 sICAM-1 농도는 이 calculation curve로부터 계산하였다.

한편 SA는 Roche Kit를 이용하여 실험을 시행하였다. 먼저 neuraminidase와 4-aminoantipyrine으로 구성된 시약을 MgCl<sub>2</sub>와 EHMT가 들어있는 완충액 5 mL에 녹인다. 0.50 mL와 AcNeu-aldolase, pyruvate oxidase, peroxidase, FAD, 그리고 TPP로 구성된 시약을 역시 동일한 성분의 완충액 5 mL에

녹인다. 실험에 사용될 환자 및 대조군의 혈청 sample 0.02 mL을 추출하여 앞서 만든 시약을 각각 0.50 mL씩 혼합하여 총 부피가 3.02 mL가 되게 하여 37 C에서 20분간 배양한다. 배양 후 2 mL의 세정액과 혼합한 뒤 실온에서 550 nm에서 흡수도 (absorbance)를 측정하였다. 표준 혈청 0.02 mL을 이용하여 같은 방법으로 시약들과 혼합하여 배양 후 550 nm에서의 흡수도를 측정하였다.

### III. 결 과

구강암 환자 15명 중 stage III는 5명, stage IV는 10명 이었으며, 후두암 환자 16명 중 stage III는 1명, stage IV는 15명 이었다. 대조군은 총 12명이었다.

SA분석에 있어서 후두암은  $85.04 \pm 5.70$ , 구강암은  $85.40 \pm 3.68$ , 대조군은  $60.68 \pm 16.34$ 로 나타났다. 후두암 및 구강암은 대조군에 비해 수치가 증가되어 있었으며 Mann-Whitney 검정에 의하면 후두암이나 구강암은 모두 진행된 암에서 대조군 보다 유의한 차이를 보였다( $P < 0.01$ ) (Fig. 1).

| Group       | N  | Min   | Max   | Average | SD     |
|-------------|----|-------|-------|---------|--------|
| Oral cavity | 15 | 78.46 | 92.50 | 85.40   | 3.679  |
| Larynx      | 16 | 77.66 | 96.83 | 85.04   | 5.697  |
| Control     | 12 | 33.21 | 87.74 | 60.68   | 16.338 |

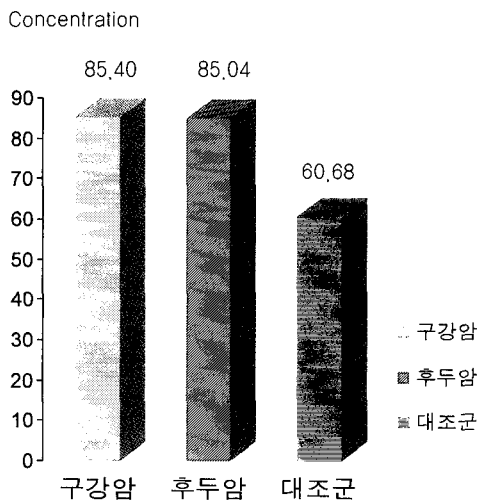


Fig 1. Concentration of sialic acid (90mg/100 mL)

ICAM-1의 분석에 있어서 후두암은  $554.28 \pm 190.20$ , 구강암은  $559.34 \pm 297.15$ , 대조군은  $423.14 \pm 126.81$ 로 나타났다. 후두암 및 구강암은 대조군에 비해서 수치가 증가되어 있었으나 Mann-Whitney 검정에 의하면 후두암( $P=0.373$ )이나 구강암( $P=0.09$ )은 모두 진행된 암에서 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

| Group       | N  | Min   | Max    | Average | SD     |
|-------------|----|-------|--------|---------|--------|
| Oral cavity | 15 | 145.0 | 1197.2 | 559.34  | 297.15 |
| Larynx      | 16 | 250.7 | 863.5  | 554.28  | 190.20 |
| Control     | 12 | 261.1 | 624.9  | 423.14  | 126.81 |

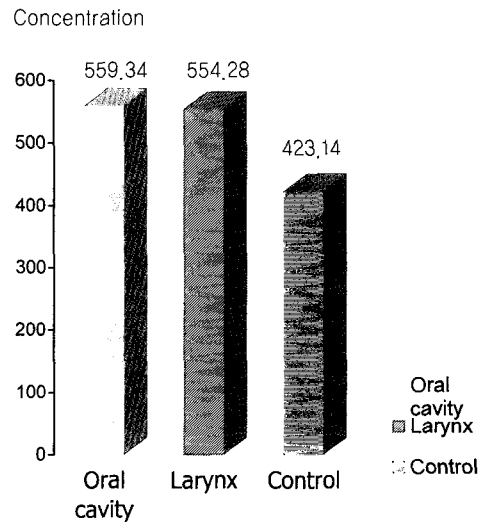


Fig 2. Concentration of ICAM-1 (ng/mL)

### IV. 고 찰

최근에 ICAM-1이 암으로의 전환과 전이성 병변으로의 진행에 있어서 암세포의 활동성 및 내피세포에의 유착, 혈관 신생과 관련이 있음이 밝혀진 후에 ICAM-1에 대한 관심이 커져 왔다.<sup>3)6)</sup> 접착 분자는 악성 종양으로의 변형(neoplastic transformation)과 종양의 전이에 cellular cohesive interaction이 결정적 역할을 한다. 접착분자는 종양세포의 운동성(motility)을 용이하게 하고, 종양세포가 내피세포에 부착되게 하고, 전이된 위치에서 신생혈관 생성을 유도하며, 암에 대해 숙주의 면역 반응이 잘 되게

한다.<sup>3)6)</sup>

ICAM-1은 분자량이80-110 kDa인 당단백이고, 면역글로불린 superfamily의 monomeric, trans-membrane 분자이며, lymphocyte function associated ag-1(LFA-1) 분자의 ligand이다. membrane 접착 복합체-1의 2개의 ligands는 접착 및 혈관을 통과하여 이동한다<sup>5)</sup>. ICAM-1은 염증조직과 악성종양에서 아주 중요한 역할을 한다.<sup>13)</sup> T 임파구가 혈관 내피세포에 부착될 때 ICAM-1과 LFA-1 사이에서 결합이 이루어진다.<sup>14)</sup> 즉 interferon, IL-1, tumor necrosis factor 등의 cytokine이 염증부위에서 분비되고 이들은 세포를 활성화시켜 숙주세포(host cell)의 표면에 ICAM-1을 포함한 접착 분자들을 발현시킨다.<sup>15)</sup>

한편, 최근 후두암에서 혈청 ICAM-1과 SA의 농도가 증가한다는 연구 결과가 있었으며 이들 인자(parameter)들이 질병의 진행도와 의미 있는 상관성을 보였으며, 특히 전이암과 국소암에서 모두 증가되어 있었고 병기와도 비례하여 증가하였다.<sup>16)</sup> Wollenberg등<sup>5)</sup>은 두경부 편평상피 세포암에서 혈청 ICAM-1의 농도가 높게 측정되었고, 특히 진행된 병기의 암환자에서 ICAM-1이 더욱 높게 측정되었다고 보고하였다. 혈청 ICAM-1 농도는 몇몇 carcinoma에서 현저히 증가되었고, 병기 및 예후와 관련이 있었다.<sup>17)</sup> 또한, 최근 연구에서 E-cadherin, E-selectin, ICAM-1등의 접착분자가 염증질환 및 악성 흑색종, 위장관 종양, 임파선암, 간암등에서 증가하는 것으로 알려졌다.<sup>6)</sup> 이렇게 ICAM-1이 증가되는 기전에 대해 여러 가지 가설이 제기되고 있다. 세포 표면에서의 접착분자가 효소에 의해 분열(enzymatic cleavage)되어 ICAM-1 수치가 혈청에서 상승되거나, 세포막간 도메인(transmembrane domain)이 없는 변이된 형태로서 ICAM-1을 분비하는 것 등이 그 예이다. 대개 악성 상피조직에서 나온 혈청 ICAM-1이 암환자의 주된 ICAM-1일 것이다.<sup>6)</sup>

이와는 달리 앞의 결과와 다른 결과가 나온 연구들도 있다. Ura등<sup>18)</sup>은 우리 연구와 다르게 간으로 전이되는 경우에 혈청 ICAM-1이 오히려 반비례하여 감소됨을 보고하였고, Yasoshima등<sup>19)</sup>은 실험 동물의 전이성 위암세포에서 혈청 ICAM-1을 측정하였는데 역시 전이암에서 혈청 ICAM-1의 수치가 감소되어

있었다. Liu<sup>20)</sup>등은 비인강암, 구강암, 후두암환자의 혈청에서 ICAM-1을 측정하였고, 그의 연구에서는 구강암 및 후두암에서는 ICAM-1이 높지 않았고, 비인강암 환자에서만 의미 있게 높았다.

암조직에 면역염색을 하면 혈청 ICAM-1은 암세포 외에 암세포근처의 섬유아세포등의 기질 세포(stromal cell)에서도 높게 나타난다. 이것은 종양세포가 T세포를 활성화시켜 cytokine(IFN- $\gamma$ )를 생산하게 되며, 이는 종양세포 뿐만 아니라 종양주변의 섬유아세포에서도 ICAM-1의 강한 발현을 나타내게 된다. 암환자에서 ICAM-1의 농도가 높다는 것은 암세포와 주변세포에 대해 숙주의 면역 반응이 비교적 활발히 나타나는 것으로 생각할 수 있다. ICAM-1은 염증성 질환등의 양성 질환에서도 약간 상승되어 있는 것으로 보아 종양세포 외에도 종양에 immunoreactive한 세포에서도 생성되는 것으로 생각된다. 전이된 종양세포에서 나온 ICAM-1 항원은 암세포에 세포독성 세포(cytotoxic cell)와 자연 독성 세포가 부착하는 것을 막는다. 즉, 암세포는 세포 독성 세포와 자연 독성 세포의 감시를 벗어나 숙주의 immunosurveillance system에서 탈출하게되어 결국은, 접착분자가 암의 전이를 진행시킨다.<sup>9)</sup>

한편 종양 세포의 표면의 당단백질과 당지질은 암세포에서 세포간 인식과 항원성, 세포 접착 및 침습성 등을 나타내는데 큰 역할을 하는 탄수화물 분포를 변화시킨다. Sialic Acid(SA)는 neuraminic acid의 아세틸화된 유도체로(acylated derivative)로 포유류에 널리 분포한다. SA는 당단백질과 당지질(glycolipid)에서 비환원성 탄수화물기(non-reducing end of carbohydrate chains)의 종말 요소(terminal component)이다. SA는 당단백질과 당지질의 주요한 구성물 이기 때문에 최근 연구들은 암환자에서 정상 대조군 보다 더 높음을 보고하고 있다. Krecicki<sup>7)</sup>의 연구에 의하면 sialic acid가 급성기 반응 단백질(acute phase reactive protein)의 한 종류로 후두암에서 특이적으로 증가하였고, 후두암 환자에서 유용한 예후 인자임을 주장하였다. 특히 지질과 결합한 SA의 혈중 농도는 질환의 진행 정도, 전이정도 및 재발 여부와 상관관계가 있다고 보고 되었다. Maria등<sup>21)</sup>은 악성 흑색종의 진행정도에 따라서 SA가 증가함을 보고하였다. 그 밖에도 혈청 SA의 농도는

대장암, 위암, 두경부암, 후두암에서 증가되는 것으로 알려졌고, 질환이 진행된 경우에서 더 높게 측정되었다. 이번 연구에서도 SA가 진행된 구강암 및 후두암에서 정상 대조군 보다 유의하게 증가 되어 있음을 알 수 있었다

## V. 결 론

진행된 구강암과 후두암에서 정상 대조군에 비하여 SA는 의미있게 증가하였으며 ( $p < 0.01$ ), 진행된 구강암과 후두암에서 ICAM-1은 정상 대조군에 비해 증가하였으나 통계학적으로 유의성은 없었다. 앞으로 환자군을 더 확보하여 각 병기별로 차이를 살핀다면 SA는 종양의 표지자로서 의미를 가질 수 있을 것이다.

## References

1. Curran AJ, Jonathan CI, Gullane PJ. *Cancer of larynx, paranasal sinuses and temporal bone. Essential Otolaryngology, 7th ed. Upper Saddle River New Jersey : Appleton & Lange 1999;549-72.*
2. Kimura Y, Fujieda S, Takabayashi T, Tanaka T, Sugimoto C, Saito H. *Conventional tumor markers are prognostic indicators in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Lett 2000;155:163-8.*
3. Benekli M, Gullu IH, Tekuzman G, Savas MC, Hayran M, Hascelik G, et al. *Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin levels in gastric cancer. Br J Cancer 1998;77:267-71.*
4. Dwivedi C, Dixit M, Hardy RE. *Plasma lipid-bound sialic acid alterations in neoplastic diseases. Experientia 1990;46:91-7.*
5. Wollenberg B, Jan NV, Sutier W, Hofmann K, Schmitt UM, Stieber P. *Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. Tumor Biol 1996;18:88-94.*
6. Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, et al. *Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with color-ectal cancer. Br J Cancer 1998;77:1857-63.*
7. Krecicki T, Leluk M. *Acute phase reactant proteins—an aid to monitoring surgical treatment of laryngeal carcinoma. J Laryngol Otol 1992;106:613-15.*
8. Nakata B, Hori T, Sunami T, Ogawa Y, Yashiro M, Maeda K, et al. *Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 in gastric cancer. Clin Cancer Res 2000;6:1175-9.*
9. Banks RE, Gearing AJH, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. *Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (vcam-1) in human malignancies. Br J Cancer 1993;68:122-4.*
10. Bhatavdekar JM, Vora HH, Patel DD. *Serum sialic acid forms as markers for head and neck malignancies. Neoplasma 1988;35:425-34.*
11. Winzler RJ. *Determination of serum glycoproteins. Methods Biochem Anal 1958;2:279-311.*
12. Schutter EMJ, Visser JJ, van Kamp GJ, Mensdorff-Pouilly S, van Dik W, Hilgers J, et al. *The utility of lipid-associated sialic acid(LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. Tumor Biol 1992;13:121-132.*
13. Barton, RW, Rothlein R, Ksiazek J, Kennedy C. *The effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 on phorbol-ester-induced rabbit lung inflammation. J Immunol 1989;143:1278-82.*
14. Haskard D, Cavender D, Beatty P, Springer T, Ziff M. *T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanism demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. J Immunol 1986;137:2901-4.*
15. Rothlein R, Czajkowski M, O'Neill MM, Marlin SD, Mainolfi E, Merluzzi VJ. *Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines: regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. J. Immunol 1988;141:1665-70.*
16. Akcay F, Taysi S, Uslu C, Dogru Y, Gumustekin K. *Levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and total sialic acid in serum of patients with laryngeal cancer. Jpn J Clin Oncol 2001;31(12):584-8.*

17. Tsujisaki M, Imai K, Hirata H, Hanzawa Y, Masuya J, Nakano T, et al. *Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. Clin Exp Immunol 1991;85:3-8.*
18. Ura H, Denno R, Hirata K. *Correlation between nm23 protein and several cell adhesion molecules in human gastric carcinoma. Jpn J Cancer Res 1996;87:512-7.*
19. Yasoshima T, Denno R, Kawaguchi S, Sato N, Okada Y, Ura H, et al. *Establishment and characterization of human gastric carcinoma lines with high metastatic potential in the liver: changes in integrin expression associated with the ability to metastasize in the liver of nude mice. Jpn J Cancer Res 1996;87:153-60.*
20. Liu CM, Sheen TS, Ko JY, Shun CT. *ulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in head and neck cancer. Br J Cancer 1999;79:360-2.*
21. Maria RR, Paloma SP, Jose HM. *Serum sialic acid in malignant melanoma patients : An ROC Curve Analysis. Anticancer Res 1999;19:3619-22.*