

# 식도의 편평세포암종에서 종합효소 연쇄반응을 이용한 인유두종 바이러스 DNA 검출 및 p53 변이와의 상관관계에 관한 연구

한양대학교 의과대학 병리학교실 및 서울대학교 의과대학 생화학교실\*

김완섭 · 홍은경 · 김인규\* · 박문향 · 이종달

## Polymerase Chain Reaction Analysis of Human Papillomavirus in Esophageal Squamous Cell Carcinoma with its Correlation to p53 mutation

Wan Seop Kim, M.D., Eun Kyung Hong, M.D., In Kyu Kim, M.D.\*  
Moon Hyang Park, M.D. and Jung Dal Lee, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University

\*Department of Biochemistry, Seoul National University College of Medicine .

HPV infection has been implicated strongly in the pathogenesis of human squamous cell carcinoma(SCC). We analysed a series of 28 surgically removed, invasive squamous cell carcinoma of the esophagus by polymerase chain reaction to detect HPV DNA using consensus primers and 8 type-specific primers of HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 51). HPV 6, 31, 35 or 51 DNA were detected in 20 out of 28 cases (71.4%) of the esophageal SCCs. HPV 51 was the most frequently detected type, occurring in 13 out of 28 cases (46.4%). p53 immunohistochemical staining was also performed to demonstrate any relationship to HPV DNA positivity. It showed positivity in 16 out of 28(57.1%) esophageal SCCs, and HPV DNA and p53 positivity were concurrently detected in 11 out of 28 cases of SCCs. There was no significant inverse relation between HPV DNA positivity and p53 expression( $p>0.05$ ). Our results supported HPV involvement in esophageal squamous cell carcinoma, and suggested there may be another pathway not related to the p53-binding pathway in the carcinogenesis of esophageal SCCs by HPV. (Korean J Pathol 1996; 30: 1018 ~ 1026)

**Key Words:** HPV DNA, p53 oncoprotein, Esophagus, Squamous cell carcinoma, PCR

### 서 론

HPV 감염이 자궁 경부를 포함하는 항문 생식기

종양의 주요한 발암원인으로 확립됨에 따라 이와 비슷한 조직학적 구조를 지닌 식도를 비롯한 상부 호흡기 종양 발생의 원인 인자로 HPV 감염에 대한 연구가 최근 몇년간 역학적, 임상적, 병리학적 그리고 분자생물학적 관점에서 집중적으로 연구되고 있다.

HPV는 세에서 사람에게 이르는 많은 고등 척추동물에서 발견되며 인체 유형의 경우 현재까지 약 70개 이상의 유형이 알려져 있다<sup>1</sup>. 이들중 HPV 제 16, 18,

접 수 : 1996년 4월 15일, 게재승인: 1996년 8월 7일  
주 소 : 서울시 성동구 행당동 산 17, 우편번호 133-792  
한양대학교 의과대학 병리학교실, 홍은경

33형은 발암 고위험군으로 항문-생식기 암종이나 이의 전암성 병변 특히 자궁경부의 이형성증, 암종 그리고 자궁경부 암종으로부터 유도된 세포계(cell line)에서 높은 비율로 검출될 뿐만 아니라<sup>2-6</sup>, 피부<sup>7</sup>, 구강<sup>8</sup>, 혀<sup>9</sup>, 후두<sup>10</sup>, 폐종양<sup>11</sup>에서도 존재함이 DNA 보합결합 기술과 증합효소 연쇄반응에 의해 증명된 바 있다. HPV 감염은 식도 유두종에서도 확인되어<sup>12,13</sup> 식도 편평세포암종의 원인적 역할을 할 것이라 추측이 강하게 제기되어 왔다. 식도 편평세포 암종에서도 고위험군인 HPV 제 16, 18형이 검출되었다는 보고가 있다<sup>14-17</sup>. 그러나 편평세포암종을 포함한 식도 병변에서 대부분의 연구는 하나 또는 두가지 유형의 소식자를 이용하였거나 유형 특이성이 없는 공통 소식자를 사용한 것들이어서 어떤 유형의 HPV가 가장 많이 감염되어 있는지 잘 규명되어 있지 않다. 또한 최근 HPV의 발암기전에서 HPV 제 16, 18형이 발현하는 종양단백인 E6가 p53 단백질과 결합함이 생체의 실험에서 증명되었다<sup>18,19</sup>. 즉 HPV가 세포증식을 조절하는 p53 유전자의 정상기능을 저해함으로써 p53 유전자의 돌연변이가 없어도 돌연변이가 발생한 것과 똑같은 효과로 식도 암발생 과정의 일부를 담당하리라는 가정을 할 수 있다.

이에 저자들은 항문 생식기 종양에서 고위험군 내지 중등도 위험군으로 분류되어 있는 제 16, 18, 31, 33, 35, 51형등 6가지 유형과 저위험군 유형이지만 호흡기 및 식도 유두종과 유두종종의 원인으로 알려져 있는 제 6, 11형등 8가지 HPV 유형의 시발체를 이용하여 증합효소 연쇄반응으로 식도 편평세포암종에서의 HPV 발현을 및 호발유형을 규명해 보고자 하였다. 또한 식도의 편평세포암종의 발생에 있어서 HPV 감염과 p53 유전자 변이 여부와의 상관 관계를 규명해 보고자 본 연구를 시도하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 연구 재료

1989년부터 1994년 6월까지 한양대학병원 조직병리과에 조직검사를 위해 의뢰된 식도 편평세포암종 절제조직 28예의 헤마톡실린-에오진 염색 슬라이드를 재검토 한후 이중 고정 및 보존상태가 양호한 파라핀 블록을 선택하였다.

HPV 감염 여부를 알기 위한 양성 대조군으로는 이미 HPV감염이 알려져 있는 자궁 경부 편평세포암종 유래 세포계 CaSKi, SiHa, HeLa(CaSKi는 HPV 16이 200 copies/cell, SiHa는 1-2/cell, HeLa는 HPV 18이 10-50/cell)를 서울대 암연구소내 세포계 은행에서 분

양받아 세포 배양후 증식된 세포의 pellet에서 DNA를 추출하였고, 연구 대상과 동일한 조건을 조성하기 위하여 포르말린 고정과 파라핀 포매과정을 거쳐 파라핀 블록을 만든뒤 양성 대조군으로 이용하였다. 음성 대조군으로는 상피세포 특히 편평상피세포가 혼재되어 있지 않은 간엽성 조직으로만 구성된 파라핀 블록을 이용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) HPV-DNA의 검출 및 증합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR):

(1) 파라핀 포매 조직에서의 DNA추출; 파라핀 절편을 약 20  $\mu$ m 두께로 4~5 절편씩 잘라 1.5 ml Eppendorf tube에 넣은 후 xylene 1000  $\mu$ l를 섞어 파라핀을 용해시켰다. 파라핀 제거를 용이하게 하기 위해 60°C 수조에 약 3분간 담근후 진탕하고 15,000 rpm에서 5분간 원심분리후 상층액을 따라 버렸다. 이러한 과정을 3번 반복 하였다. 95% 에탄올 500~1000  $\mu$ l를 넣어 15,000 rpm에서 1분간 원심분리후 상층액을 따라 버렸다. 이러한 과정을 2번 반복함으로써 남아있는 xylene을 완전히 제거하였다. pellet을 공기중에서 완전히 건조시킨 후 용해용액(50 mM Tris, 0.5M EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0)에 proteinase K(20 mg/ml) 10  $\mu$ l를 넣은 다음 55°C 부란기에서 조직 절편이 완전히 용해되도록 두었다. 그후 동량의 equilibrated phenol을 첨가하고 진탕시킨후 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였고 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 위의 용액과 동량의 chloroform: isoamyl-alcohol을 넣고 다시 진탕시킨후 원심 분리하여, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 3M sodium acetate를 이용하여 DNA를 추출하였다. DNA pellet을 TE 완충액 50  $\mu$ l에 용해시켰다.

(2) 추출된 DNA의 양 측정; TE 완충액에 녹인 DNA를 1:50으로 희석하여 자외선 흡광기를 이용하여 파장 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 계산하였다. 파장 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 A260/A280의 비를 측정하였다.

(3) HPV 공통 시발체(consensus primer)를 이용한 nested PCR반응; 여러 유형의 HPV 검출을 위한 공통 시발체는 HPV의 L1 부위 중 HPV 유전자의 컴퓨터 검색을 통해 상동성이 있는 부분으로 선택하여 20mer로 합성하였다. 반응의 특이도를 높이기 위해 nested PCR을 시행하였으며 이 실험에 사용한 공통 시발체 및 유형-특이성 시발체의 염기 조성은 표1와 같다. 유형-특이성 시발체로는 HPV 16, 18, 31, 33, 35, 51의 6가지 유형을 사용하였으며 이들의 시발체는 L1부위의 컴퓨터 검색을 통해 선택하여 합성하

고, HPV 6과 11은 미국 MBI(Maxim Biotechnology Incorporation, San Francisco, CA)사에서 시판하는 E6 부위에서 합성한 각각 24 mer의 시발체를 사용하였다. OriComp사의 twin block easy cycler system을 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응액의 조성은 DNA 1 µl, 증류수 3.15 µl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>가 포함된 PCR 완충액(10x reaction buffer) 1.0 µl, dNTPs 0.2 µl × 4(20 µM), plus primer 2.0 µl(2 pM), minus primer 2.0 µl(2 pM), Taq polymerase 0.05 µl의 총 10 µl로 하였다. 공통 시발체를 사용하여 모든 검체를 대상으로 PCR을 시행 하였다. 0.5 ml Eppendorf tube에 DNA 1 µl와 9 µl의 PCR 반응액을 넣어 잘 섞어 준 뒤 그 위에 약 2 µl의 광물성 기름으로 덮어주고 PCR 반응을 시행하였다. 제 1차 반응의 첫 cycle은 95°C로 5분간 가열후 45°C 45초로 1회, 72°C 1분 30초로 1회 시행하고, 95°C-42°C-72°C를 각각 30초-45초-1분 30초로 35회 시행하였다. cycle의 마지막에는 72°C로 10분간 사슬 연장을 시행하였다. 제 1차 PCR 반응이 끝난 후 PCR 산물에서 광물성 기름을 제거하기 위해 60 µl의 chloroform용액을 넣은 후 광물성 기름을 제거하였다. PCR 산물을 새 튜브로 옮겨 1:100 희석을 시행하였다. 제 2차 PCR 반응은 희석한 제 1차 PCR 산물을 DNA template로 하고 2차 공통 시발체를 이용하여 반응액을 만들어 동일한 방법으로 시행하였다. 이때 시발체 결합반응의 온도를 48°C로 변환하였다.

**(4) HPV의 유형-특이성 시발체를 이용한 PCR 반응;** 제 1차 PCR 산물을 이용하여 각 유형에 특이한 시발체 즉 HPV 16, 18, 31, 33, 35, 51 6개에 대해 위에 언급한 바와 같이 동일하게 PCR 반응을 시행하였다. E6 유전자에서 합성한 시발체를 이용하여

HPV 6과 HPV 11을 DNA원액을 1:50으로 희석한 용액을 사용하고, 2차 PCR과 동일한 조건하에서 PCR을 시행하였다. PCR 반응이 끝난후 chloroform 60 µl를 혼합하여 광물성 기름을 제거하였다. PCR로 얻은 산물은 ethidium bromide를 섞은 1.5% agarose gel에 loading dye 2 µl와 잘 섞은후 6 µl를 전기영동을 시행하였다. 크기 표시자로  $\phi$ X174/*HaeIII*를 사용하였고 240 bp 주변에서 관찰되는 띠를 양성으로 간주하였다.

**2) p53 종양 단백질의 면역조직화학적 염색:** 실험에 사용한 항체는 wild type과 mutant type을 다 검출할 수 있는 p53-D07 (Novocastra)을 사용하였다. HPV-DNA 검출에 이용한 같은 파라핀 블록을 이용하여 poly-L-lysine으로 피복된 유리 슬라이드에 4 µ의 절편을 만들었다. 탈파라핀 하고 수세후 구연산 완충액(pH 6.0)에 담아서 전자오븐에 30초간 끓였다. 3% 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 5분간 작용시켜 내인성 페록시다제의 작용을 차단시킨후 물로 5분간 세척하였다. pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 담구었으며 이 과정을 2번 시행하였다. 염소혈청(DAKO, goat serum)으로 10분간 작용시켜 비특이적 단백 염색을 차단하였다. p53에 대한 항체는 1:100으로 희석하여 사용하였고 약 1시간 작용시켰다. 다시 pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 2회 씻은 후 이차항체로 바이오틴이 부착된 rabbit anti-mouse IgG link antibody를 15분간 작용시키고 다시 Tris 완충액으로 2회 5분간 세척하였다. Streptoavidin-biotin complex(DAKO, LSAB K681)에 약 15분간 작용시킨후 다시 Tris 완충액으로 2회, 5분간 세척하였다. AEC chromogen으로 5~10분간 발색시키고 수세한 후 Mayer's hematoxylin에 30초간 대조 염색하고 수세하여 글리세린으로 봉입하였다.

Table 1. Base sequences of consensus and type-specific primers

6P 5' AGA CCA GTT GTG CAA GAC GTT TAA 3'	6N 5' GCA CGT CTA AGA TGT CTT GTT TAG 3'
11P 5' AGA CCA GTT GTG CAA GAC GTT TAA 3'	11N 5' AAG GGA AAG TTG TCT CGC CAC ACA 3'
16P 5' GCC ATA TCT ACT TCA GAA AC	16N 5' AGG TGC TGG AGG TGT ATG T
18P 5' CCT GTA CCT GGG CAA TAT GA	18N 5' TTC AGG CGG TGC ACG ATC C
31P 5' GCA ATT GCA AAC ACT GAT AC	31N 5' GGG CTT TTG GGG GGC AGT T
33P 5' TGT ACA CAA GTA ACT AGT GA	33N 5' TTC CTT TGG AGG TAC TGT T
35P 5' GCT GTG TCT TCT AGT GAC AG	35N 5' AGG TTT TGG TGC ACT GGG T
51P 5' CCA CTG CTG CGG TTT CCC CA	51N 5' AGC CTG TGG TGC ACT GGG T
CS1P 5' GCT CAA GGT CAT AAT AAT GG	CSN 5' CGA CCC AAT GGA AAT TGA TC
CS2P 5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC	

P: Plus primer, N: Minus primer, CS1P: Consensus plus primer at 1st PCR, CS2P: consensus plus primer at 2nd PCR

결 과

1. 임상 및 병리학적 소견

28명의 환자 중 남자는 20명(71.4%)이었고 여자는 8명(28.5%)이었다. 환자는 45세에서 72세의 연령분포로 평균 60.8세였으며 조직학적 분화도에 따라 나누면 고분화도가 5예, 중등도 분화도가 20예, 저분화도가 3예였다. 종양의 주변에서 HPV 감염시 관찰되는 공동 세포성 변화를 보인 예가 2예 있었다.

2. HPV유형에 따른 HPV-DNA 검출

중합효소 연쇄반응으로 검출된 HPV의 각 유형을 표 2에 요약하였다. HPV는 28예 중 20예(71.4%)에서 검출되었다. 제 51형이 13예(46.4%), 제 31형이 4예(14.3%), 제 35형이 2예(7.1%), 제 6형이 1예(3.6%), 순으로 검출되었으며 각기 다른 HPV 유형이 두개 이상 중복 검출된 예는 없었다. HPV 제 11, 16, 18, 33형은 모든 예에서 검출되지 않았다. HPV 제 51형 양성인 13예 중 8예(61.5%)가 전기영동상 뚜렷한 띠로 검출되었고 5예(38.5%)는 약한 띠로 검출되었다 (Fig. 1). 종양의 분화도에 따른 HPV-DNA 발현은 고분화도가 5예 중 4예(80%), 중등도 분화도가 20예 중 13예(65%) 그리고 저분화도의 암종은 3예 모두 검출되었다.

3. p53 종양단백의 발현

p53 종양단백의 발현을 표 3에 요약하였다. p53

종양단백은 28예 중 16예(57.1%)에서 양성으로 발현되었다. p53 종양단백의 발현 양상은 소수의 세포가 미약하게 반응하는 것에서부터 대부분의 세포가 강

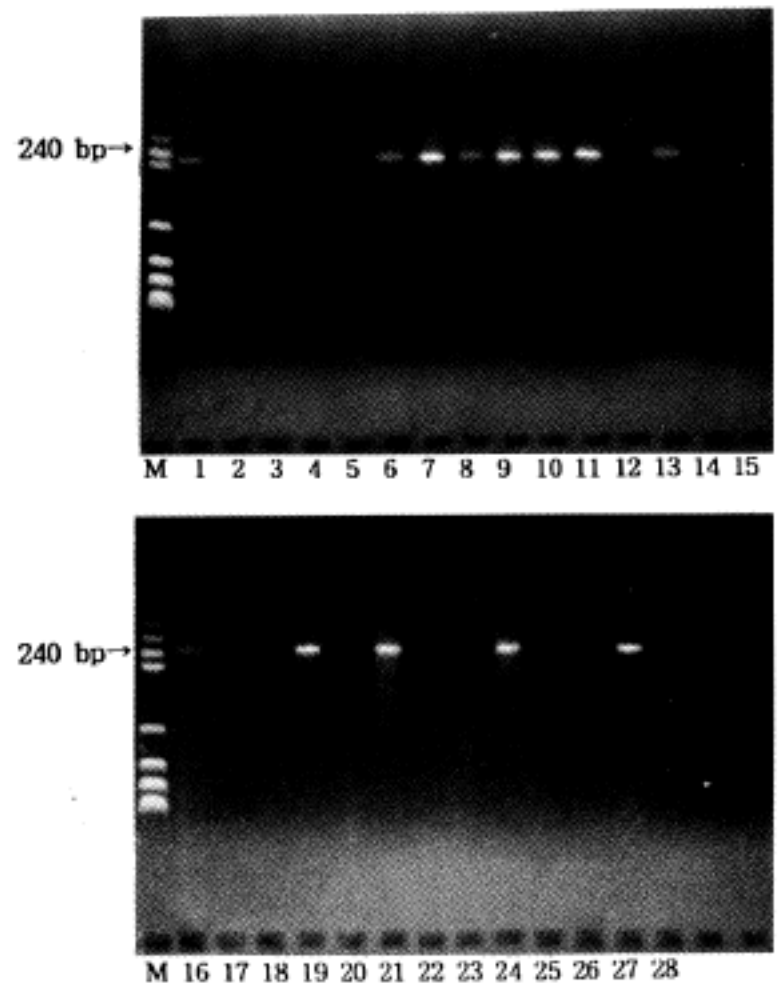


Fig. 1. Results of PCR with HPV type 51 specific primers. 13 cases (lane 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 19, 21, 24 and 27) were positive for HPV type 51 among 28 samples tested. M is  $\phi$ X174/ *HaeIII* size marker.

Table 2. Numbers of HPV positive cases in 28 squamous cell carcinomas of esophagus

HPV type	Degree of histologic differentiation			Total number of cases
	well (5)	moderate (20)	poor (3)	
6	—	—	1	1( 3.6)
11	—	—	—	—
16	—	—	—	—
18	—	—	—	—
31	2	1	1	4(14.3)
33	—	—	—	—
35	—	2	—	2( 7.1)
51	2	10	1	13(46.4)
	4	13	3	20(71.4)



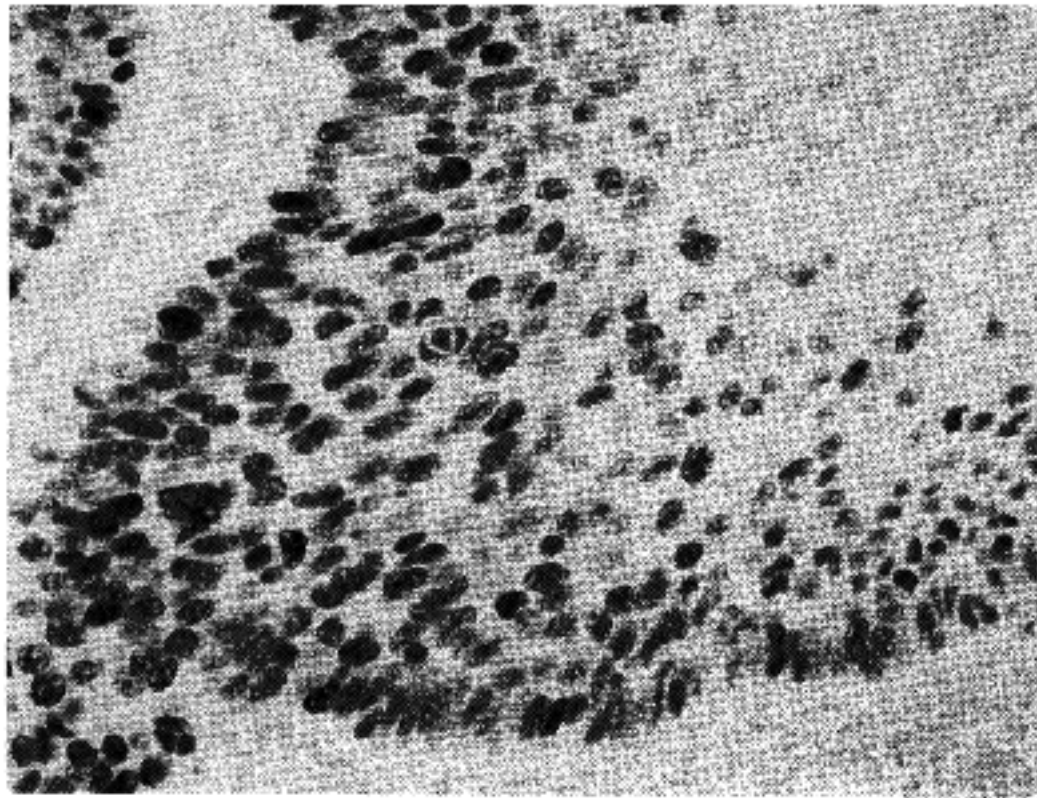


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p53 oncoprotein in moderately differentiated squamous cell carcinoma of the esophagus. Note strong positive reaction in tumor cell nuclei.

Table 3. p53 expression in 28 Squamous cell carcinoma of esophagus

Histologic differentiation	Expression of p53				Total number of cases
	-	-	+	+	
Well	5	-	-	-	5
Moderate	6	2	8	4	20
Poor	1	-	-	2	3
Total	12	2	8	6	28

(p>0.05)

Table 4. Types of HPV-DNA & p53 immunostaining results in squamous cell carcinoma of esophagus

p53	HPV-DNA					Total No. of HPV positive cases(%)
	negative	6	31	35	51	
negative(n=12)	3	-	2	1	6	9(75)
positive(n=16)	5	1	2	1	7	11(69)
	8	1	4	2	13	20(71.4)

(p>0.05)

양성을 보이는 등 매우 다양하게 나타났다. 주위 정상 식도 점막은 p53에 음성이었다. 저자는 임의로 모든 세포가 음성인 경우를(-), 25% 미만의 세포만 양성인 경우를(+), 25~75%의 세포가 양성인 경우를(+ +), 75% 이상의 세포가 양성인 경우를(+ + +)

로 정의하고 그 발현정도를 조사했다. p53은 28예 중 16예(57.1%)에서 양성이었다(Fig. 2). 이중에서(+ + +)는 2예, (+ +)는 8예, (+ + -)는 6예이었다. 종양의 분화도에 따른 p53의 발현에서 고분화도의 암종은 5예 모두 음성으로 나타났고 저분화도의 암종 3예 중

2예에서는 강양성으로 발현되어 통계적 의미는 없지만 분화도가 나빠질수록 p53이 강하게 발현되는 양상을 보였다. 종양의 주변에서 공동 세포성 변화를 보인 부분은 모두 p53에 음성이었다.

#### 4. p53 종양 단백질과 HPV-DNA 검출 사이의 관계

p53 종양단백의 발현과 HPV-DNA 검출과의 상관관계를 표 4에 요약하였다. HPV 양성인 경우 p53 종양단백이 양성인 경우가 28예 중 11예(39.3%), HPV 양성인 경우 p53 음성인 경우가 9예(32.1%)였다. HPV 음성인 경우 p53 양성인 경우가 5예(17.9%), HPV 음성인 경우 p53 음성인 경우가 3예(10.7%)로 나타나 둘 사이에 특별한 상관관계는 없는 것으로 생각되었다( $p>0.05$ ).

## 고 찰

HPV 제놈은 두개의 상이한 영역으로 나눌 수 있는데 초기 영역(early region)은 바이러스의 복제, 전사 그리고 세포 변형을 조절하는 단백질을 발현하고 후기 영역(later region)은 바이러스 외피 단백을 만드는 유전자를 갖고 있다<sup>20</sup>. 초기 부위의 Open reading frame(ORF) E1-E8 중 E2는 virus의 DNA를 직접적으로 통제하는 유전자를 갖고 있으며 E1은 변형된 세포에서 염색체의 복제시 필요한 단백질을 만드는 유전자를 갖고 있다<sup>21</sup>. 세포 변형을 일으키는 변환능력을 가진 부분은 E6와 E7이다. HPV는 편평세포의 핵에 침입하여 숙주와 무관하게 존재하기도 하지만 HPV 16이나 18같은 발암 고위험군 유형들은 숙주 세포의 DNA에 삽입되어 존재한다<sup>22</sup>. HPV DNA가 숙주 염색체에 삽입될 때 흔히 E1 과 E2 유전자의 파괴를 동반하게 되는데 따라서 E2 ORF의 파괴는 E6, E7 유전자의 통제를 상실하게 되어 세포의 증식을 유도하게 된다. 실험적으로 HPV 16의 E1 또는 E2 유전자의 파괴로 바이러스 제놈의 불멸화 능력이 증가함이 확인되었다<sup>23</sup>. 특히 고위험군 HPV 유형의 E6와 E7은 저위험군 HPV 유형의 E6와 E7에 비해 변환 능력이 월등히 높다. HPV E6 단백질은 p53 단백질과 복합체를 형성함으로써 p53 유전자의 기능을 불활성화 시켜서 p53 유전자의 돌연변이와 같은 영향을 나타낸다. SV40 large T항원과 55-kd 단백질 adenovirus E1B에 의해 발현되는 것처럼 실험관 내에서 고위험군의 HPV의 E6 단백질은 종양억제성 세포내 단백질인 p53과 복합체를 형성하여 wild type의 p53 보다도 빠르게 p53의 분해를 촉진할 수 있다<sup>18</sup>.

따라서 p53의 기능을 불활성화 시키고, 이는 변이형 p53과 같은 효과를 나타낸다. E6와 E7은 종양억제 유전자의 산물인 p53과 pRB를 각각 기능적으로 불활성화 시키는데, HPV 양성인 자궁경부암종의 세포계에서 p53과 pRB는 정상인 반면 HPV 음성인 자궁경부암종의 세포계에서 p53과 pRB 유전자(retinoblastoma tumor suppressor gene)는 돌연변이가 관찰되었다. 이러한 실험 결과로 종양억제 유전자인 p53과 pRB의 정상기능의 불활성화가 HPV 음성인 세포계에서는 돌연변이를 일으킴으로서 그리고 HPV 양성인 세포계에서는 HPV 종양단백과의 복합체를 형성함으로써 자궁경부암종의 종양발생 과정에 있어 중요한 과정임을 알 수 있다<sup>24</sup>. E6와 E7이 종양세포성 변화에 중요한 역할을 하고는 있으나 이것만으로는 종양이 발생하지 않고 흡연, 알코올, 방사선 조사 등에 의한 다른 세포학적 변이가 함께 수반되어야 악성 변환이 일어난다<sup>29</sup>. HPV는 현재까지 약 70개 이상의 유형이 알려져 있으며 이들 중 많은 수가 인체에 비교적 특이적인 감염부위를 가지고 있다<sup>1</sup>. 최근 몇년간 HPV가 양성 상피성 병변을 일으키는 것 이외에 편평상피의 전암성 병변 또는 암종 발생의 원인적 역할을 할 것이라는 추측이 강하게 제기되어 왔다. 80%의 자궁경부내 상피종양과 88%의 자궁경부 상피암종에서 HPV DNA를 가지고 있음이 밝혀져 있고 이때 HPV 유형 중 주로 16, 18형이 나타나며 비교적 드물게 HPV 31, 33, 35 등이 발견된다<sup>25-27</sup>. 또한 자궁경부암종으로부터 유도된 세포계인 HeLa, CaSki, SiHa 세포계들은 HPV DNA와 RNA를 발현한다<sup>25,26</sup>. 항문-생식기 병변 이외에도 편평상피 병변이 발생할 수 있는 상부호흡기를 비롯한 다른 장기에서 HPV의 존재를 확인하려는 연구가 계속되었다. 1982년 Syrjanen 등<sup>28</sup>이 식도 병변에서 HPV가 존재함을 처음으로 보고하였다. 이들은 식도암 환자의 40%에서 생식기의 콘딜로마성 병변과 유사한 조직학적 변화를 관찰하고 이중 한 환자의 편평세포 유두종에서 면역조직화학적 염색 방법으로 HPV 단백질 존재함을 관찰 하였다. 이후 식도 편평세포 병변에서 HPV와 관련된 조직학적 변화, HPV 항원 및 HPV DNA를 찾으려는 노력이 계속되었으며 일부 저자들은 HPV를 찾을 수 없다고 하였다<sup>29</sup>. 그러나 최근까지 보고된 대부분의 문헌에는 HPV가 식도의 양성 및 악성을 포함하는 편평세포 병변의 원인적 인자 중 하나일 것이라는 추측을 하고있다. 현재까지 밝혀진 바로는 HPV 유형 중 식도의 병변에서 검출된 것으로는 6, 11, 16, 18, 31, 33 그리고 35등이 보고되어 있으며<sup>15,17,26,30-33</sup> 이중에서 HPV 16, 18형이 가장 흔한 것으로 되어 있다. 그러나 이러한 문헌 보고들은 각각 HPV DNA

의 검출 방법이 다르고 HPV 유형이 구분되어 있지 않거나 주로 제 16, 18형을 중심으로 한 두가지 유형에 국한하여 연구한 경우들이 대부분이다. 그래서 저자는 중합효소 연쇄반응을 이용하여 HPV의 저위험군 6, 11형과 고위험군 16, 18, 31, 33, 35, 51형의 시발체를 사용하여 HPV의 출현빈도를 조사하였다. 중합효소 연쇄반응을 이용하면 검체중의 분석하려는 DNA영역을 수 십만 배로 증폭할 수 있으므로 분석의 민감도를 높일 수 있으며 극미량의 검체로 분석이 가능하다. HPV는 문헌 또는 검출방법에 따라 다소 차이가 있기는 하지만 식도 편평세포암종의 약 50%에서 검출되는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>. 본 실험 결과에서 이전의 연구보다는 HPV가 높은 빈도로 검출되었다. 문헌보고에서는 가장 흔한 고위험군 유형이 HPV 16, 18형으로 알려져 있으나, 본 연구에서는 HPV 51형이 가장 높은 빈도(13예, 46.4%)로 검출되었다. 이것은 지금까지의 문헌상 제 51형을 포함한 보고가 거의 없어서 본 연구 결과가 실제 빈도를 반영하는 결과일 수도 있으나, 비교적 연한 띠로 반응이 나타난 예들은 중합효소 연쇄반응시 제 51형과 상동성이 매우 높은 다른 유형이 포함되어 있을 가능성도 배제할 수 없다. HPV는 엄격한 상태에서 분석되었을때 그 상동성이 50% 이상 차이가 날 경우 다른 유형으로 분류되며 DNA 상동성이 50% 이상이지만 완전히 일치하지 않으면 다른 아형으로 분류한다. 그래서 DNA의 상동성 여부는 reassociation kinetics 방법으로 분류되어 왔다. 그러나 reassociation kinetics 방법으로 분류된 HPV 유형들을 투과 전자현미경으로 heteroduplex 분석을 해보면 서로 다른 유형으로 분류되었던 HPV 유형들간의 상동성이 보다 높게 나타나는 것으로 되어 있고 본 실험에 사용된 HPV 6, 11, 16, 18, 31 사이에는 상당한 DNA 상동성을 가지고 있다. 그러므로 본 실험의 결과에서 HPV 제 51형과 상동성이 높지만, 본 연구에 포함되어 있지 않은 다른 유형의 HPV가 포함되어 있을 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 그리고 비록 한 예에서만 검출되었지만 고위험군의 HPV 이외에 저위험군의 HPV 6형이 1예에서 검출된 것으로 미루어 그 빈도가 매우 낮아 의미를 둘 수는 없지만 HPV 6형도 식도 편평세포암종의 발생과정에 관여할 가능성이 있다.

앞서 언급한 바와 같이 HPV가 암생성을 유도하는 과정은 HPV의 E6 단백질이 p53 단백질과 복합체를 형성하여 p53 단백을 불활성화 시킴으로서 p53 유전자의 변이 없이도 유전자 변이와 똑같은 효과로 암 발생을 일으키므로 HPV 발현율과 p53 양성률은 서로 역비례 관계에 있음이 잘 알려져 있다<sup>34</sup>. 저자들의

연구에서 p53 종양단백은 28예 중 16예(57.1%)에서 양성으로 발현되었다. 정상 p53 단백질은 반감기가 매우 짧아 면역염색으로 검출되기 전에 분해되거나 변이형 p53 단백질은 안정되어 그 반감기가 길어져 면역염색으로 검출된다. 그러나 정상 p53 단백질이 HPV와 같은 발암성 바이러스와 결합하면 정상 p53 단백질보다 급속히 빨리 분해되어 면역 염색으로 검출하는 것은 불가능해진다<sup>34</sup>. 그러므로 본 실험에서 편평 세포암종의 57.1%에서 p53 단백질이 양성으로 발현된 것은 p53 단백질의 돌연변이가 있음을 시사한다. 본 연구에서 HPV 감염과 p53과의 관계는 HPV 감염과 p53 종양단백이 동시에 관찰된 경우는 p53 양성인 16예 중 11예(57.1%)이었으며 p53 음성이었던 12예 중 9예(75%)에서는 HPV가 검출되지 않아 둘 사이에 특별한 상관관계는 없는 것으로 생각되었다( $p>0.05$ ). 이같은 결과는 HPV 감염과 p53의 돌연변이가 명확한 역상관관계를 갖는 자궁경부암 세포계들을 대상으로 한 실험과는 달리 식도의 편평세포암종은 발생기전에 있어 HPV 감염과 유전자 자체의 변이에 의한 p53 단백질의 불활성화는 서로 독립적으로 발생하는 것으로 해석할 수 있으며 식도 편평세포 암종의 발암과정에는 HPV의 작용뿐 아니라 다단계 발암과정의 일환으로 p53 돌연변이를 유발하는 또다른 기전이 작용했으리라 생각된다.

## 결 론

1989년 1월부터 1994년 6월까지 한양대학병원 조직병리과에서 수술로 절제되어 진단된 식도의 편평 세포암종 28예를 대상으로 HPV의 저위험군 제 6, 11형과 고위험군인 제 16, 18, 31, 33, 35, 51형의 각 유형에 특이한 시발체를 사용한 중합효소 연쇄반응으로 HPV 감염여부를 조사하고 p53 종양단백에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) HPV는 28예 중 20예(71.4%)에서 검출되었다. 각 유형별로 살펴보면 제 51형이 13예(46.4%), 제 31형이 4예(14.3%), 제 35형이 2예(7.1%), 제 6형이 1예(3.6%) 검출되었으며 각기 다른 HPV유형이 두개이상 중복 검출된 예는 없었다. HPV 제 11, 16, 18, 33형은 모든 예에서 검출되지 않았다.

2) p53 종양단백에 대한 면역조직화학적 염색의 소견은 다양한 정도로 나타났으며 28예 중 16예(57.1%)에서 발현되었다. HPV 양성이면서 p53 종양단백이 양성인 경우가 28예 중 11예(39.3%), HPV 양성이면서 p53 음성인 경우가 9예(32.1%)였다. HPV 음성이면서 p53 양성인 경우가 5예(17.9%), HPV 음

성이면서 p53 음성인 경우가 3예(10.7%)로 나타나  
들 사이에 특별한 상관관계는 없었다.( $p>0.05$ )

이상의 결과로 HPV 유형중 특히 고위험군인 HPV  
51 유형이 많이 검출된 것으로 보아 식도 편평세포  
암종의 발암과정에 HPV 감염이 한 원인적 역할을  
할 것으로 생각되며 p53 종양단백의 발현이 HPV 감  
염과 상관 없이 나타난 점으로 미루어 식도 편평 세  
포암종의 발생에는 HPV의 작용뿐 아니라 다단계 발  
암과정의 일환으로 p53 돌연변이를 유발하는 또다른  
기전이 작용했으리라 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. de Villiers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989; 63: 4898-903.
2. Drust M, Gissman L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc nat Acad Sci. (Wash)* 1983; 80: 3812-5.
3. Schwarz E, Freese UK, Gissman L, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature (Lond)* 1985; 314: 111-4.
4. Yee C, Krishnan-Hewleft I, Baker CC, Schiegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985; 119: 361-6.
5. Smotkin D, Wettstein FO. Transcription of human papillomavirus-type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Nat Acad Sci (Wash)* 1986; 83: 4680-3.
6. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WB. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J nat Cancer Inst* 1987; 79: 671-7.
7. Grimm M, de Villiers EM, Pawlita M, Neumann C, zur Hausen H. Characterization of a new human papillomavirus type(HPV41) isolated from disseminated warts and the detection of closely related sequences in some squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 1988; 45: 5-9.
8. Maitland IJ, Bromidge T, Cox MF, Crane IJ, Prime SS, Scully C. Detection of human papillomavirus genes in human oral tissue biopsies and cultures by polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1989; 59: 698-703.
9. de Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985; 36: 575-8.
10. Scheurlen W, Stremlau A, Gissman L, Hohn D, Zenner HP, zur Hausen H. Rearranged HPV 16 molecules in an anal carcinoma and in a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1986; 38: 671-6.
11. Syrjanen K, Syrjanen S, Kellokoski J, Mantyjarvi R. Human papillomavirus (HPV) type 6 and 16 DNA sequences in bronchial squamous cell carcinoma demonstrated by in situ DNA hybridization. *Lung* 1989; 167: 33-42.
12. De Borges RJ, Acevedo F, Miralles E, Mijares P. Squamous papilloma of the esophagus diagnosed by cytology : report of a case with concurrent occult epidermoid carcinoma. *Acta Cytol* 1986; 30: 487-90.
13. Hording M, Hording U, Dauggard S, Norrild B, Faber V. Human papilloma virus type 11 in a fatal case of oesophageal and bronchial papillomatosis. *Scand J Infect Dis* 1989; 21: 229-31.
14. Hille JJ, Markowitz K, Margolius KA, Isaacson C. Human papillomavirus and carcinoma of the esophagus. *N Engl J Med* 1985; 312: 1707-9.
15. Kulski J, Demeter T, Sterrett GF, Shilkin KB. Human Papillomavirus DNA in oesophageal carcinoma. (Letter). *Lancet* 1986; 2: 683-4.
16. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Ji H. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinoma in China. *Int J Cancer* 1990; 45: 21-5.
17. Benamouzig R, Pigot F, Quiroga G, et al. Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in Western countries. *Int J Cancer* 1992; 50: 549-52.
18. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
19. Scheffner M, Takahashi T, Huibregste JM, Minna JD, Howley PM. Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild type and mutant human p53 proteins. *J Virol* 1992; 66: 5100-5.
20. Lowy DR, Dvoretzky I, Shober R. In vitro tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature* 1980; 287: 72-4.
21. Ustav M, Stenlund A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991; 10: 449-57.
22. Vousden K. Interaction of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993; 7: 872-9.
23. Romanczuk H, Howely PM. Disruption of either the



- E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3159-63.
24. Munger K, Yee CL, Phelps WC. Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J Virol* 1991; 65: 3943-8.
  25. zur Hausen. Viruses in human cancer. *Science* 1991; 254: 1167-73.
  26. Chang F. Role of papillomavirus. *J Clin Pathol* 1990; 43: 269-76.
  27. Howley PM. Role of the human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res* 1982; 51: 5019-22.
  28. Syrjanen KJ. Histological changes identical to condylomatous lesions found in esophageal squamous carcinomas. *Arch Geschwulstforsch* 1982; 52: 283-92.
  29. Chang F, Janatuinen E, Pikkarainen P, Syrjanen S, Syrjanen K. Esophageal squamous cell papilloma: Failure to detect human papillomavirus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 535-43.
  30. Williamson AI, Jaskiesicz K, Gunning A. The detection of human papillomavirus in oesophageal lesions. *Anticancer Res* 1991; 11: 263-6.
  31. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, et al. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992; 70: 2234-8.
  32. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Wang L, Syrjanen K. Screening of human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinoma by in situ hybridization. *Cancer* 1993; 72: 2525-30.
  33. Politoske E. Squamous papilloma of the esophagus associated with the human papilloma virus. *Gastroenterology* 1992; 102: 668-73.
  34. Scheffner M, Werness B, Huibregste JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papilloma virus type 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.
-