

## 비인두암종에서 Epstein-Barr Virus 유전자 산물, Bcl-2 및 p53 단백질의 발현에 관한 연구

부산 메리놀병원 해부병리과 및 부산대학교 의과대학 병리학교실\*

윤 선 희 · 서 강 석\* · 이 창 훈\*

### Expression of Epstein-Barr Virus Gene Products, Bcl-2 and p53 Proteins in Nasopharyngeal Carcinomas

Sun Hee Yoon, M.D., Kang Suek Suh M.D.\* and Chang Hun Lee, M.D.\*

Department of Anatomic Pathology, Pusan Maryknoll Hospital  
Department of Pathology, Pusan National University College of Medicine\*

The authors studied EBV genome expression in 40 conventionally processed samples of nasopharyngeal carcinomas (NPC), using in situ hybridization for EBERs and immunohistochemistry for LMP, Bcl-2 and p53 proteins. The NPCs consisted of 6 keratinizing squamous cell carcinomas (KSCs), 13 nonkeratinizing carcinomas (NKC) and 21 undifferentiated carcinomas (UC). The results were summarized as follows: 1) EBERs were expressed in 80.0% of all the NPCs (32/40). As for the subtypes, they were detected in 92.3% of NKCs (12/13), in 90.5% of the UCs (19/21), and in 16.7% of the KSCs (1/6). In positive cases, the nuclei of tumor cells displayed uniformly strong staining. 2) LMP was expressed in 10.0% of all the NPCs (4/40), all of which were UC. The LMP expression in the UCs was not correlated to the expression of EBERs, Bcl-2 and p53 proteins. 3) Bcl-2 protein was detected in 85.0% of all the NPCs (34/40). As for the subtypes, they were detected in 92.3% of the NKCs (12/13), in 90.5% of the UCs (19/21), and in 50.0% of the KSCs (3/6). 4) p53 protein was detected in 75.0% of all the NPCs (30/40). As for the subtypes, they were detected in 81.0% of the UCs (17/21), in 69.2% of the NKCs (9/13), and in 66.7% of the KSCs (4/6). 5) In the NPCs the expression of EBER showed a significantly positive correlation with that of p53 or Bcl-2 protein. The above results indicate that the association of EBV with NPC is chiefly with poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. Additionally, carcinomas commonly display widespread, strong immunoreactivity of Bcl-2 and p53 proteins over tumor cells. In conclusion, these observations indicate that the EBV-association in NPC appears to contribute to the overexpression of tumor-related genes during carcinogenesis. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 723~734)

**Key Words:** Nasopharyngeal carcinoma, EBERs, LMP, p53 protein, Bcl-2 protein

접 수: 1997년 1월 17일, 게재승인: 1997년 4월 24일  
주 소: 부산시 서구 아미동 1가 10, 우편번호 602-739  
부산대학교 의과대학 병리학교실, 이창훈

## 서 론

비인두암종은 특히 아시아의 남동부권에서 흔히 발생하는 악성종양으로, 최근 이 암종의 역학적, 병인론적 그리고 생존율에 관계된 여러가지 인자들에 관한 연구가 보고되고 있다<sup>1</sup>. 비인두암종의 원인적 인자로는 유전적 감수성<sup>2</sup>, Epstein-Barr virus(EBV) 감염<sup>3</sup>, 식이적 요인 등<sup>4</sup>을 들 수 있다.

EBV는 생체내에서 림프계 및 일부 상피 세포들에 친화성을 보이는 172 kb의 이중 나선구조를 가진 DNA 바이러스로서 전 세계인구의 90%이상에서 혈청학적으로 EBV 항체에 양성을 보일 정도로 상당한 편재성 감염을 보이는데 통상 원발성 감염은 무증상으로 소아기때 일어나고 이후 지속적인 잠복성 감염을 보인다<sup>5</sup>. EBV는 인체에서 다양한 양성 및 악성 질환의 발생과 연관되어 있는데 대표적 질환으로는 전염성 단핵구증, 지리적 제한성을 보이는 Burkitt 림프종, 비인두암종 등을 들 수 있고<sup>6</sup> 이들 외에도 면역결핍 환자에서 발생하는 B세포 비호지킨 림프종<sup>7</sup>, 호지킨 림프종<sup>8</sup>, 말초 T세포 림프종<sup>9</sup>, 타액선의 미분화암종<sup>10</sup>, 위암종등<sup>11</sup>이 있다.

발암인자로서의 EBV에 대한 끊임없는 관심으로 세포수준에서 바이러스의 존재를 증명할 수 있는 신속하며 감수성과 특이성이 높은 검사방법의 필요성이 증대되었고, Southern blotting<sup>12</sup>, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)<sup>13</sup>, in situ hybridization(ISH)<sup>13,14</sup> 등 몇가지 기술적 방법들이 소개된 바 있다. 이들중 ISH는 파라핀 포매 조직절편에서 조직의 구조적 특성이 보존된 채 세포학적 수준에서 손쉽게 EBV를 검출할 수 있음으로 최근에 많이 이용되는 방법이다.

비인두암종에서 EBV의 잠복감염과 관련하여 발현되는 단백질은 EBV 핵항원-1(EBNA-1)과 잠복성 막 단백질(latent membrane protein, LMP)으로 알려져 있다<sup>15</sup>. EBV 감염을 증명키 위한 DNA-ISH의 경우 EBV 핵산은 한 세포당 바이러스 지놈(genome)의 복제 수가 매우 적어 기술적으로 증명하기 어렵고 감수성도 떨어진다. 1986년 Howe와 Steitz<sup>16</sup>는 EBV에 감염된 세포에서 riboprobe를 이용하여 EBV encoded small RNAs(EBERs)를 검출하는 RNA-ISH 방법을 소개하였다. EBERs은 모든 EBV 잠복감염에서 다량(세포당 10<sup>7</sup> 전사)으로 생산되는 non-translated small viral RNAs로 그 기능이 불명확하지만, 잠복감염중에 일관성이 있고 풍부하게 발현되는 점으로 미루어

EBV 감염에서 이상적이고 안정적 표지자로 간주할 수 있다<sup>17</sup>. EBER 유전자는 EBER 1과 2가 있는데 각각은 166개와 179개의 nucleotides로 이루어져 있다. 이들은 세포의 핵내에서 cellular La(lupus antigen) 단백질과 EBER associated protein(EAP)과 결합되어 있다<sup>17,18</sup>. LMP는 EBNA-2와 함께 시험관내에서 성장형질변화(growth transformation)에 중요한 역할을 하며, EBV와 연관된 비인두암종에서도 발암과정에 중요한 기능을 하는 물질로 주목되고 있다<sup>19</sup>. 이 단백질은 386개의 아미노산으로 구성되고 62 kDa의 분자량을 가지는 세포막 횡단(transmembrane) 분자이다. 신호전달(signaling) 분자 또는 세포표면 수용기로서의 역할이 추정되는데 단클론성 항체(CS 1~4)가 개발되어 면역조직화학적 방법으로 검출이 가능하다<sup>20</sup>.

*bcl-2* 유전자는 t(14;18) 염색체 전위를 보이는 여포성 B세포 림프종에서 최초로 확인된 암유전자로<sup>21</sup>, Bcl-2 단백질의 과발현은 B 림프구의 전구세포<sup>22</sup>, 기억세포 및 면역글로블린 분비 B 세포의 생존을 촉진하고, B 세포의 계획된 세포사(programmed cell death)를 차단하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>23</sup>. Burkitt 림프종의 세포주(cell line)에서 *bcl-2* 유전자의 과발현은 EBV 잠복 유전자 특히 LMP의 발현과 상관관계가 있다<sup>24</sup>. 즉 LMP가 Bcl-2 단백질의 과발현을 유도하여 세포들에 지속적 삶을 보장해 줌으로써, 발암과정의 지속적 영향을 받게 한다는 것이다.

몇개의 확정된 비인두암종 세포주의 유전학적 검사에서 이 암종은 염색체 17p13을 포함한 다수의 염색체 부위에서 유전적 이상을 보였다<sup>25</sup>. 염색체 17p13.1에 위치한 p53 유전자는 종양억제 유전자로서 그 산물인 p53 단백질은 세포증식의 조절에 주로 관여하는 핵내 단백질이다<sup>26</sup>. 많은 상피성 종양에서 p53 단백질은 과발현될 수 있는데, 대부분 돌연변이형이며 주로 점 돌연변이(point mutation)에 의한<sup>27</sup>. 그러나 비인두암종의 생검 검체들에서 단일쇄 형태 다형성(single strand conformation polymorphism,SSCP) 분석을 하면 점 돌연변이는 10%이하로 검출된다고 한다<sup>28</sup>. 즉 비인두암종에서 p53단백의 과발현은 유전자 돌연변이의 결과가 아닌 야생형 p53 단백질 자체의 변형된 기능을 시사하여 주는 소견일 수 있다. 실제로 EBV 감염시 EBV는 p53과 결합할 수 있는 최소한 2개 이상의 단백질의 발현을 결정하는 것으로 알려져 있다<sup>29,30</sup>.

저자들은 EBV와 비인두암종간의 연관성에 대한 풍부한 외국 보고들에 반해 국내 보고는 희귀한데 착안하여 EBV와 비인두암종간의 연관성에 대하여

검토하고, 아울러 최근 많은 관심을 보이는 종양 관련 유전자 단백질 Bcl-2와 p53 단백질의 발현을 조사하여 이 암종의 발암 및 진행과정의 이해에 도움을 얻고자 본 연구를 시도하였다.

### 재료 및 방법

본 연구는 1987년 1월부터 1996년 7월까지 부산 대학교병원에서 생검으로 진단된 비인두암종 40예를 대상으로 하였다. 이들 비인두암종 40예를 WHO (World Health Organization) 조직학적 분류기준<sup>3)</sup>에 따라 재분류하였던 바 각화성 편평세포암종(keratinizing squamous cell carcinoma, KSC)이 6예, 비각화성 암종(nonkeratinizing carcinoma, NKC)이 13예, 그리고 미분화암종(undifferentiated carcinoma, UC)이 21예였다. KSC는 종양세포들에서 명백한 각화성향을 보이는 경우에, NKC는 종양세포들에서 뚜렷한 각화성향이 없으면서 중층(stratified) 배열과 함께 세포간의 경계가 분명한 경우에, 그리고 UC는 종양세포들이 주로 합포성(syncytial) 배열을 보이면서 세포간의 경계가 불분명한 미분화성 세포들인 경우에 이루어졌다.

각 증례들에서 환자들의 진단시 연령분포는 Fig. 1과 같다. 환자연령의 중간치(연령분포)는 UC가 47.0세(16~65), NKC가 48.0세(29~75), 그리고 KSC가 63.5세(49~70)로 환자연령의 중간치는 UC가 가장 낮은 양상을 보였고, 남녀비는 UC가 1:1.1, NKC가 12:1, 그리고 KSC가 5:1로서 한정된 증례이나 NKC와 KSC에서 남자에 우세한 발생 양상을 보였다. 각 증례들에서 대표적인 파라핀 블록을 한개씩 취한

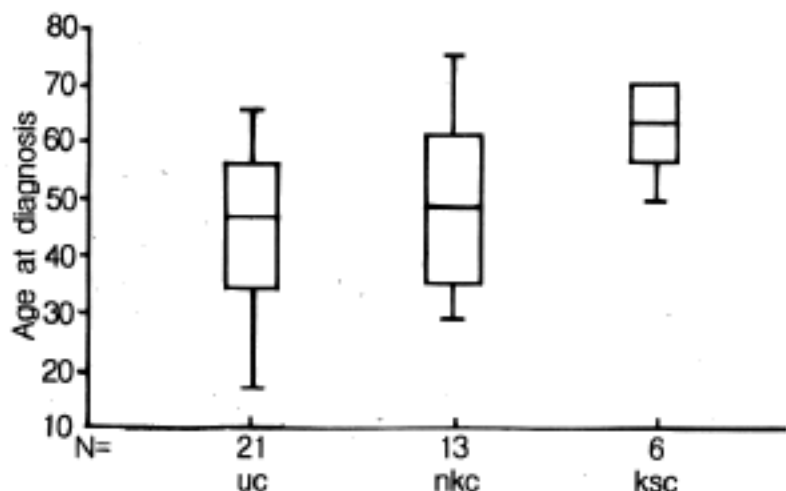


Fig. 1. Box and Whisker plot showing age distribution of nasopharyngeal carcinoma patients at diagnosis(UC, Undifferentiated carcinoma; NKC, Nonkeratinizing carcinoma; KSC, Keratinizing squamous cell carcinoma).

후 각 블록에서 4 $\mu$ m 두께의 연속 절편을 5장씩 잘라서 헤마톡실린-에오진 중염색, EBERs을 위한 ISH 염색, 그리고 LMP, p53, Bcl-2 단백질을 위한 면역조직화학 염색을 각각 실시하였다.

#### 1. In situ hybridization(ISH)

본 연구에서 EBERs을 검출키 위해 사용된 probe (Research Genetics, Huntsville, AL)는 3' 말단에 다수의 biotin 분자가 결합된 oligonucleotide probe로서 EBV 감염의 초기에 나타나는 작은 polyadenylated RNAs인 EBER-1과 EBER-2에 모두 상보적 염기서열을 가지는 분자이다. EBER-ISH의 과정을 요약하면 다음과 같다.

4  $\mu$ m 두께의 파라핀 조직절편을 Probe-On Plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)에 부착시켜 xylene (100°C에서 2분간 4회)으로 탈파라핀하고 실온에서 100% 알코올로 6회 수세시켜 xylene의 제거와 함께 조직을 탈수시켰다. 동결건조된 oligo probe 10  $\mu$ g에 Brigati probe diluent(Research Genetics) 20  $\mu$ g를 분주하여 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 농도의 원액(stock solution)을 만들고, 원액에서 5  $\mu$ l를 추출하여 이것을 Brigati probe diluent 5  $\mu$ l에 섞어 EBER working stock probe(0.5  $\mu$ g/ml)를 만들었다.

Pepsin(Research Genetics) 용액으로 조직을 처리하여(100°C에서 3분간 반응) 핵산을 노출시킨 후 EBERs probe와 중합반응을 시켰는데, 중합반응은 85°C에서 4분간, 65°C에서 20분간, 그리고 50°C에서 10분간 반응시켰고 각 반응후 반응산물의 안정화를 위해 실온에서 냉각시켰다. 비특이적 결합을 한 probe를 제거키 위해 Post Hybe Wash(Research Genetics)로 5분간 4회 세척을 하고, streptavidin alkaline phosphatase detection system(Research Genetics)을 50°C에서 10분간 적용 후 발색촉진제(chromogen enhancer)인 probe lock으로 실온에서 1회 수세시켰다. 발색은 stable Fast Red TR/NP chromogen 용액으로 50°C에서 10분씩 2회 적용하였다. 수도물로 수세 후 Mayer 헤마톡실린으로 15초간 대조염색한후 universal mount(Research Genetics)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 2. 면역조직화학적 염색

면역조직화학적 염색에 들어가기 앞서 염색 반응을 향상시키기 위해 파라핀 포매 절편들을 10 mmol/l의 citrate buffer(pH 6.0) 1 리터가 담긴 유리용기에 넣어 전자렌지(Samsung RE-400B, 700W)를 이용하여 "강"(100% 출력)에서 5분 끓인 후 5분간 식히고 다

시 "강"에서 5분간 끓인 후 식히는 항원성 회복 기법 (antigen retrieval technique)을 실시하였다.

면역조직화학적 염색은 supersensitive biotin-streptavidin(SSB-SA)법을 응용한 universal LSAB<sup>®</sup> kit, HRP (Dako, Carpinteria, CA)를 사용하였고, 그 세부과정은 문헌<sup>32</sup>에서 소개된 일반적 기법과 동일하였다.

일차항체들은 Bcl-2 단백질에 대한 생쥐 단클론성 항체(Mo Ab 124; Dako, Carpinteria, CA), p53단백에 대한 생쥐 단클론성 항체(Mo Ab DO-7; Dako, Carpinteria, CA), 그리고 LMP-1에 대한 생쥐 단클론성 항체(CS 1-4; Dako, Carpinteria, CA)를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 각각 1:50, 1:50, 그리고 1:200으로 희석하여 염색에 이용하였다. 반응 후 발색과정으로 diaminobenzidine(DAB)을 5분간 적용시켰고, Mayer 헤마톡실린 용액으로 1분간 대조염색을 시행한 후 현미경으로 관찰하였다. 음성대조군은 염색시 일차항체 대신 정상 면양 혈청을 적용한 것을 제외하면 전과정을 실험예들과 동일하게 하였다. 양성대조군으로 이용한 조직으로는 Bcl-2 단백질의 경우 정상 편도조직, p53 단백질은 p53 양성 결장 암종조직, 그리고 LMP는 LMP 양성 비인두암종의 조직이었다.

### 3. 염색결과의 판독 및 통계분석

모든 증례에서 염색 결과는 2명의 병리의사에 의해 각각 독립적으로 판독되었고, 이견이 발생한 예들에 대해서는 다안 현미경을 사용하여 의견의 일치를 보았다. 면역조직화학적 염색의 경우 각 증례들에서 Bcl-2 단백질은 세포질에서, p53 단백질은 핵에서, 그리고 LMP는 세포질 및 세포막에서 각각 갈색의 염색반응을 보이는 경우를 양성반응으로 하였고, 염색성적은 양성반응의 빈도성적(frequency score)과 강도성적(intensity score)을 종합한 반정량적 방법을 사

용하였다. 빈도성적에서 각 증례는 종양세포들의 10% 이내에서 양성반응을 보이는 경우에 음성으로, 10% 이상에서 양성반응을 보이는 경우에 양성으로 판정하였다. 양성예들에서 양성반응의 강도성적은 양성 대조군의 양성반응 강도를 고려하여 "+", "++", 그리고 "+++"로 구분하였다.

ISH 반응은 각 증례들에서 핵인을 제외한 세포의 핵영역에서 진홍색의 과립상 반응이 보이는 경우를 양성으로 판정하였다.

통계분석은 비인두암종의 각 유형에 따른 EBERs, LMP, Bcl-2 단백질, 및 p53 단백질 발현의 유의성을 판정하기 위해  $\chi^2$  분할표 검증과 Fisher의 정확확률 검증을, 그리고 비인두암종에서 각 표지자간의 발현의 상관관계를 위해 Spearman의 서열상관계수 검증을 이용하였다. 각 검증에서 유의수준은  $p=0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1. ISH(EBERs)

비인두암종 40예중 EBERs의 양성률은 80.0%(32/40)였다. 각 유형별로는 UC가 90.5%(19/21), NKC가 92.3%(12/13), 그리고 KSC가 16.7%(1/6)의 양성률을 보여, UC와 NKC는 KSC에 비해 현저히 높은 양성률을 보였다(Table 1), 각 유형간 EBERs의 발현율은 유의한 차이를 보였다( $p<0.05$ ). 각 암종의 양성예들에서 양성반응의 강도성적은 UC에서 "+"가 1예, "++"가 7예, "+++"가 11예로, NKC에서 "+"가 1예, "++"가 4예, "+++"가 7예로, 그리고 KSC에서 "+++"가 단지 1예로 나타났으며(Table 2), 강도성적의 분포는 유형에 따른 상관관계가 인정되지 않았다( $r_s=0.0437$ ,  $p>0.05$ ).

Table 1. Expression of EBERs, LMP, p53 and Bcl-2 proteins in nasopharyngeal carcinomas

Subtype	Case No.	Positive(%)			
		EBERs <sup>†</sup>	LMP	p53	Bcl-2 <sup>†</sup>
UC	21	19(90.5)	4(19.0)	17(81.0)	19(90.5)
NKC	13	12(92.3)	0(0.0)	9(69.2)	12(92.3)
KSC	6	1(16.7)	0(0.0)	4(66.7)	3(50.0)
Total	40	32(80.0)	4(10.0)	30(75.0)	34(85.0)

Abbreviations: Refer to Fig. 1.

<sup>†</sup>,  $p<0.05$

비인두암종의 각 유형에서 EBERs 양성예들의 소견은 대동소이하였는데, 종양세포의 양성반응은 미반성으로 균등한 분포를 보였고, 종양세포의 핵내에서 핵인을 제외한 핵영역에서 진홍색의 과립상 염색반응을 보였다(Fig. 2). 간혹 국소적으로 EBERs이 종양세포의 세포질내에서도 관찰되었는데, 이는 EBERs 자체가 리보솜에서 일어나는 단백질합성의 해독(trans-

lation) 과정의 조절에 어떤 역할을 할 것이라는 가정도 할 수 있지만, 염색과정에서 내인성 alkaline phosphatase에 의한 위양성의 가능성도 배제할 수 없으므로, 핵 염색만을 양성반응으로 간주하였다.

EBERs 양성예들 중 UC의 2예와 NKC의 3예에서는 이형성(dysplastic) 변화를 보인 비인두 점막상피에서도 암종과 동일한 양성반응을 보였다(Fig. 3).

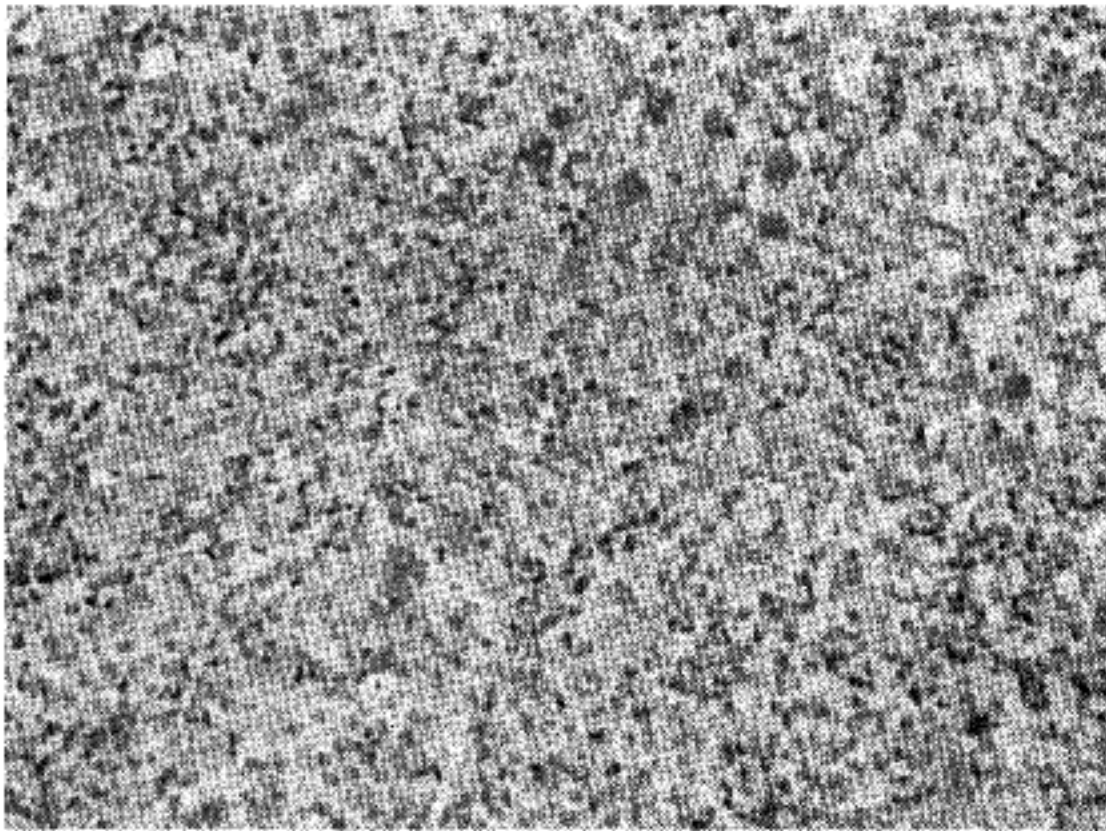


Fig. 2. In situ hybridization for EBERs in undifferentiated carcinoma. Tumor cells exhibit strong positive reaction with bright red color in their nuclear areas other than nucleoli(EBERs,  $\times 200$ ).

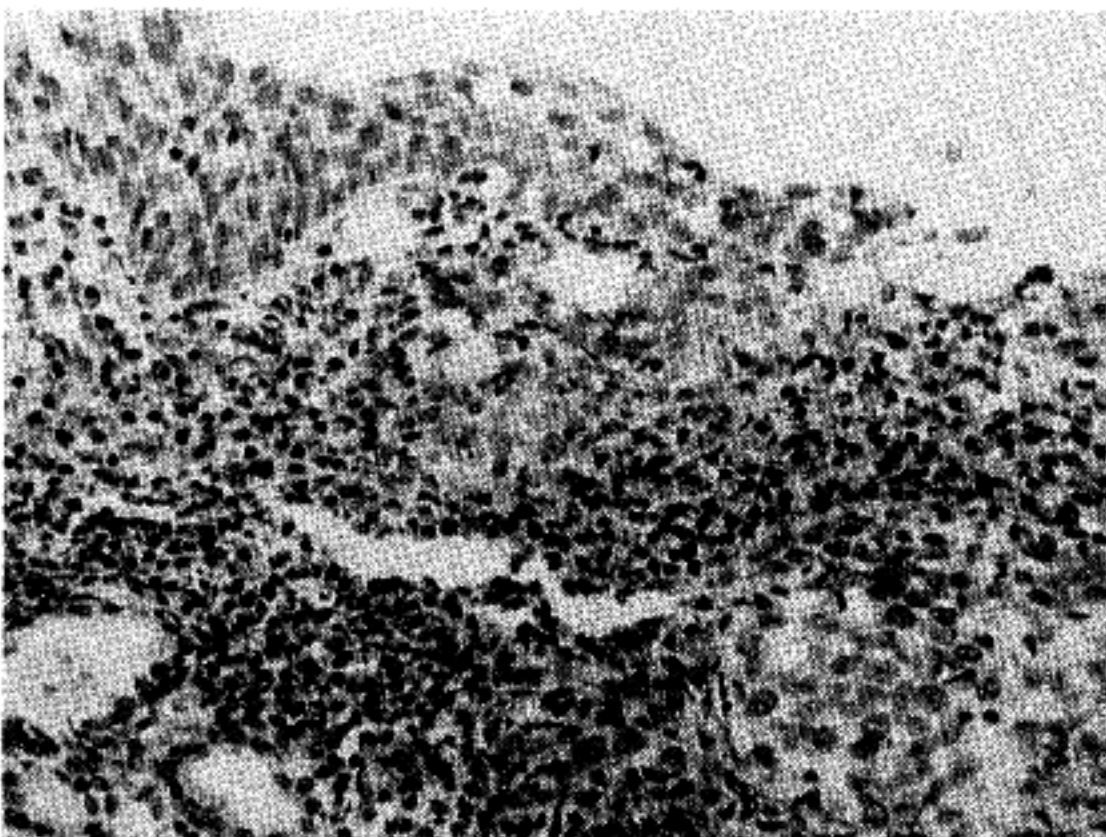


Fig. 3. In situ hybridization for EBERs in nonkeratinizing carcinoma. Dysplastic epithelium over carcinoma also displays some EBER-positive cells(EBER,  $\times 100$ ).

**Table 2.** Intensity score of EBERs positive cases in nasopharyngeal carcinomas

Subtype	Case No	EBERs		
		+	++	+++
UC	19	1	7	11
NKC	12	1	4	7
KSC	1	0	0	1
Total	32	2	11	19

Abbreviations: Refer to Fig. 1.  
 $r_s=0.0437(p>0.05)$ .

**Table 3.** Intensity score of p53 positive cases in nasopharyngeal carcinomas

Subtype	Case No.	p53		
		+	++	+++
UC	17	3	8	6
NKC	9	2	2	5
KSC	4	1	0	3
Total	30	6	10	14

Abbreviations: Refer to Fig. 1.  
 $r_s=0.1622(p>0.05)$ .

## 2. 면역조직화학적 소견

비인두암종 40예에서 실시한 p53 단백질, Bcl-2 단백질, 그리고 LMP에 대한 면역조직화학적 염색의 성적은 다음과 같다.

**1) p53 단백질:** 비인두암종 40예중 p53 단백질의 양성률은 75.0%(30/40)였다. 각 유형별로는 UC가 81.0%(17/21), NK가 69.2%(9/13), 그리고 KSC가 66.7%(4/6)의 양성률을 보여, UC가 가장 높은 양성률을 보였으나(Table 1), 각 유형간 p53 단백질의 발현율은 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ). 각 암종의 양성예들에서 양성반응의 강도성적은 UC에서 "+"가 3예, "++"가 8예, "+++"가 6예로, NK에서 "+"와 "++"가 각각 2예, "+++"가 5예로, 그리고 KSC에서 "+"가 1예, "++"가 0예, "+++"가 3예로 나타났으며(Table 3), 강도성적의 분포는 유형에 따른 상관

**Table 4.** Intensity score of Bcl-2 positive cases in nasopharyngeal carcinomas

Subtype	Case No.	EBERs		
		+	++	+++
UC	19	3	8	8
NKC	12	1	4	7
KSC	3	1	1	1
Total	34	5	13	16

Abbreviations: Refer to Fig. 1.  
 $r_s=0.0596(p>0.05)$ .

관계가 인정되지 않았다( $r_s=0.1622, p>0.05$ ).

대부분의 양성예들에서 p53 단백질은 종양세포의 핵에 한정되어 갈색의 과립상 반응을 보였고, 흔히 종양세포내에서 불균등하게 분포되는 반응을 보였다(Fig. 4).

**2) Bcl-2 단백질:** 비인두암종 40예중 Bcl-2 단백질의 양성률은 85.0%(34/40)였다. 각 유형별 양성률은 UC가 90.5%(19/21), NK가 92.3%(12/13), 그리고 KSC가 50.0%(3/6)를 보여, EBERs과 마찬가지로 UC와 NK는 KSC에 비해 현저히 높은 양성률을 보였고(Table 1), 각 유형간 Bcl-2 단백질의 발현율은 유의한 차이를 보였다( $p<0.05$ ). 각 암종의 Bcl-2 단백질 양성예들에서 반응의 강도성적은 UC에서 "+"가 3예, "++"와 "+++"가 각각 8예로, NK에서 "+"가 1예, "++"가 4예, "+++"가 7예로, 그리고 KSC에서 "+", "++", "+++"가 각각 1예로 나타났으며(Table 4), 강도성적의 분포는 유형에 따른 상관관계가 인정되지 않았다( $r_s=0.0596, p>0.05$ ).

대부분의 양성 증례들에서 Bcl-2 단백질은 종양세포의 세포질에 한정되어 갈색의 과립상 반응을 보였고, 종양세포내에서 양성반응은 비교적 균등하게 분포되는 반응을 보였다(Fig. 5).

**3) LMP:** 비인두암종 40예 중 LMP의 양성률은 10.0%(4/40)였다. 양성을 보인 4예는 모두 UC였고, 이들 4예는 EBERs와 p53 단백질의 경우 모두 양성을, Bcl-2 단백질의 경우는 2예에서 양성을 보였는데, 양성반응의 강도성적은 EBERs에서 "++"가 1예, "+++"가 3예, p53 단백질에서 "+"와 "++"가 각각 1예, "+++"가 2예, 그리고 Bcl-2 단백질에서 "++"가 2예였다. UC 21예에서 LMP의 발현과 EBERs( $r_s=0.1574$ ,

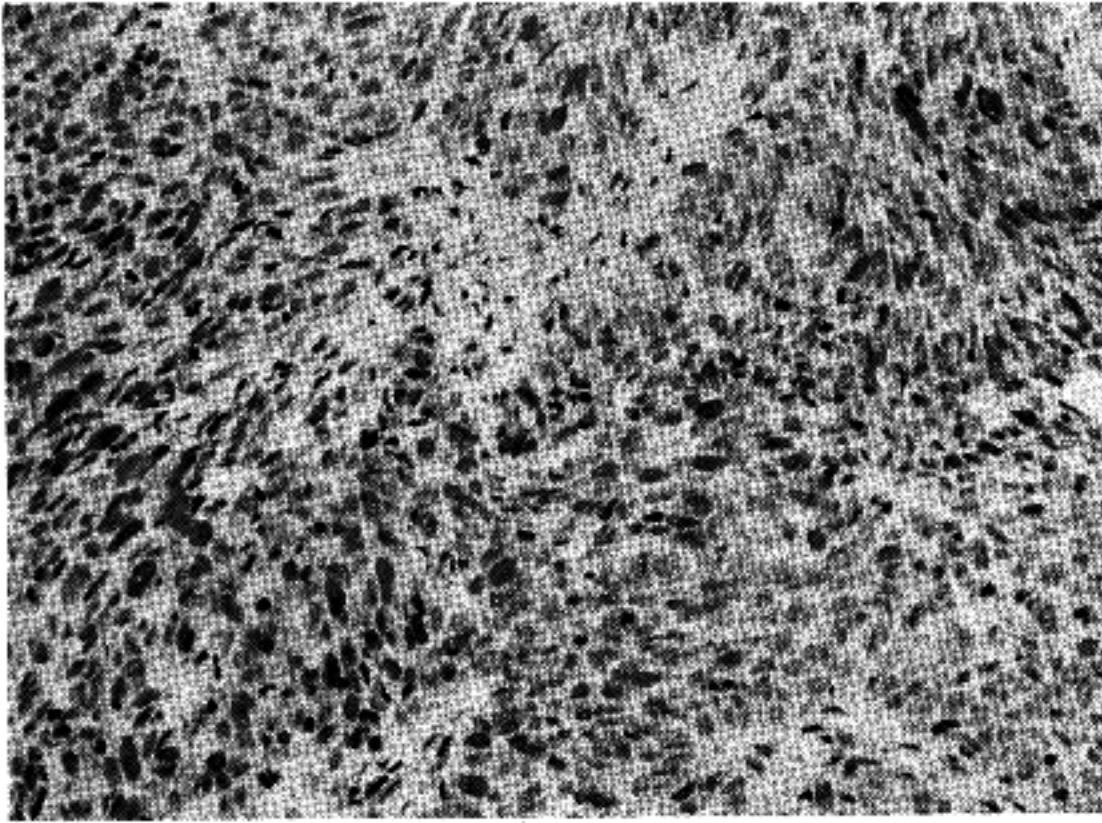


Fig. 4. Immunoreactivity for p53 protein in nonkeratinizing carcinoma. Tumor cells exhibit strong positive reaction in their nuclei, but the reaction is rather uneven in distribution(p53,  $\times 200$ ).

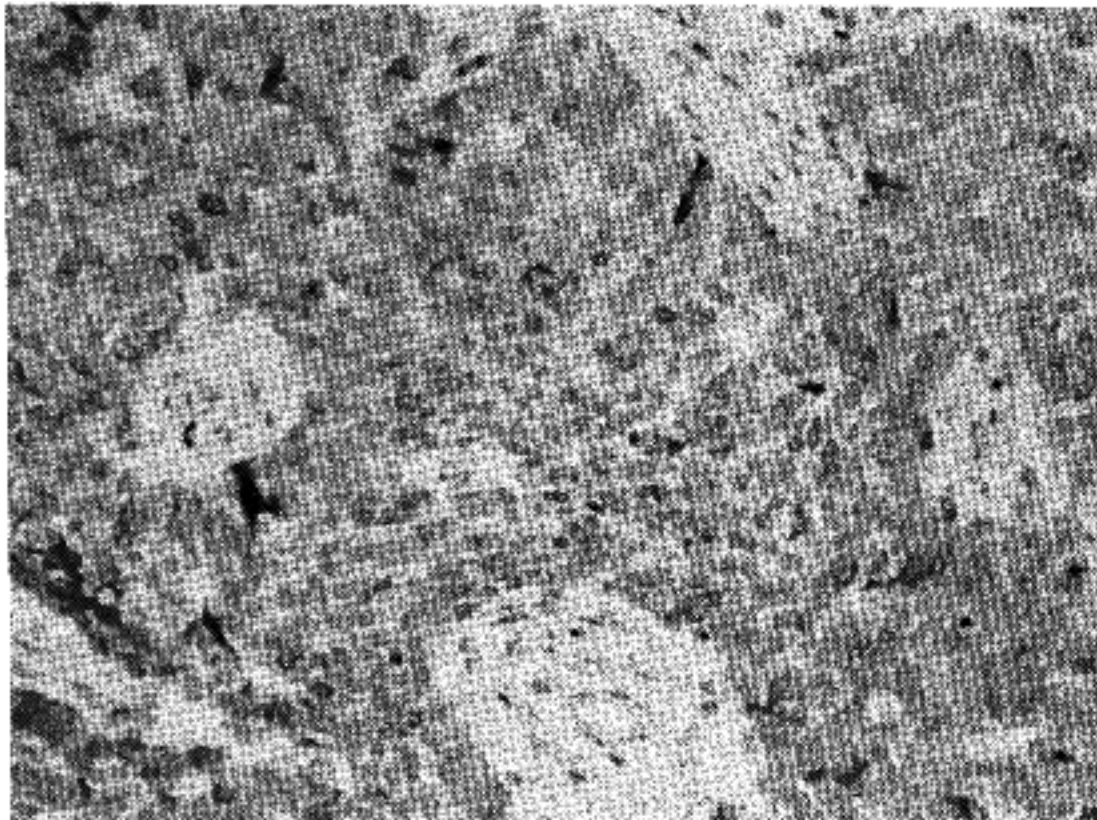


Fig. 5. Immunoreactivity for Bcl-2 protein in nonkeratinizing carcinoma. Tumor cells exhibit strong positive reaction in their cytoplasm, and the reaction is even in distribution(Bcl-2,  $\times 200$ ).

$p > 0.05$ ), Bcl-2 단백질( $r_s = 0.1574$ ,  $p > 0.05$ ), 그리고 p53 단백질( $r_s = 0.2353$ ,  $p > 0.05$ )의 발현간에는 유의한 상관관계가 없었다. 양성반응은 국소적으로 소수의 종양 세포들에서 세포질과 세포막에서 경도 내지는 중등도의 강색의 과립상 염색반응을 보였고(Fig. 6), 염색상의 분포에 있어서 특이한 소견은 관찰되지 않았다.

### 3. EBERs과 p53 및 Bcl-2 단백질 발현의 상관관계

비인두암종 40예에서 EBERs, p53 그리고 Bcl-2 단백질의 양성 및 음성 발현의 상관관계는 Table 5와 6에서 보는 바와 같다. EBERs과 p53 단백질의 양성 일치율은 65.0%(26/40)이고 음성 일치율은 10.0%(4/40)

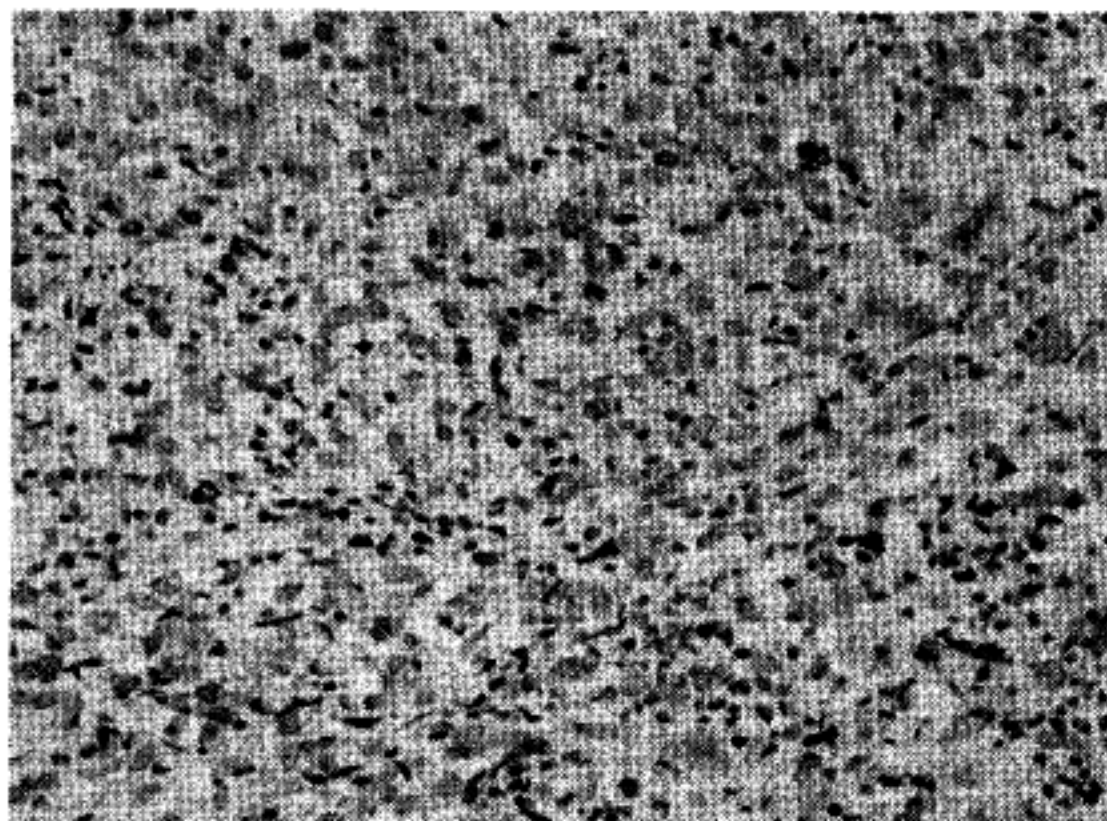


Fig. 6. Immunoreactivity for LMP in undifferentiated carcinoma. Tumor cells exhibit focally weak positive reaction in their cytoplasm (LMP, ×200).

Table 5. Correlative expression of EBERs and p53 protein in nasopharyngeal carcinomas

EBERs	p53		Total
	Positive	Negative	
Positive	26	6	32
Negative	4	4	8
Total	30	10	40

Note: Observed agreement is 75.0% ( $\kappa < 0.4$ ).

로서 관측치의 일치도(observed agreement)는 75.0% (30/40)였으나, 일치도의 통계학적 의의는 낮았다( $\kappa = 0.29$ ). EBERs과 Bcl-2 단백질의 양성 일치율은 72.5% (29/40)이고 음성 일치율은 7.5% (3/40)로서 관측치의 일치도는 80.0% (32/40)였으나, 역시 일치도의 통계학적 의의는 낮았다( $\kappa = 0.31$ ).

### 고 찰

EBV는 비인두에 발생하는 분화가 나쁜 또는 미분화암종과 주로 연관되는데, 이들 종양의 거의 100%에서 바이러스 지놈이 검출된다<sup>6</sup>. 건강인에서 감염된 경우 바이러스는 B 림프구 구획(compartment)에서 잠복감염의 형태로 일생동안 지속되거나, 조건

Table 6. Correlative expression of EBERs and Bcl-2 protein in nasopharyngeal carcinomas

EBERs	Bcl-2		Total
	Positive	Negative	
Positive	29	3	32
Negative	5	3	8
Total	34	6	40

Note: Observed agreement is 80.0% ( $\kappa < 0.4$ ).

에 따라 증식성(replicative) 감염의 형태를 취하기도 한다<sup>33</sup>. 시험관내에서 정상 B 림프구에 EBV를 감염시키면 림프구는 심장변형과 함께 무한한 증식 능력을 보이는 림프모구양 세포계(lymphoblastoid cell lines, LCLs)로 전환될 수 있는데, 이 경우 바이러스는 6개의 핵항원(EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C 그리고 leader protein), 3개의 잠복성 막단백(latent membrane proteins; LMP-1, -2A, -2B) 그리고 2개의 EBERs들을 발현시킨다고 한다<sup>34</sup>. 이들 단백질의 기능적인 면에 대하여는 거의 알려져 있지 않으나, 이들중 EBNA-2와 LMP는 숙주세포의 형질변화 과정과 연관되어 있다<sup>35,36</sup>. EBV 감염시 바이러스 유전자의 발현은 종양 또는 세포의 기원에 따라 다소 차이를 보인다. 즉 EBV 감염에 의해 심장 형질변화를 보이는 LCLs의



경우는 상기한 단백질 모두를 발현하는데 반해<sup>34</sup>, Burkitt 림프종의 경우 EBNA-1만을 발현하고, 기타 단백질은 극히 낮은 또는 검출할 수 없을 정도의 양으로 발현하고<sup>35</sup>, 비인두암종의 경우 Western blot 분석시 EBNA-1과 LMP만이 검출될 수 있다<sup>36</sup>. 한편 이러한 발현 단백질에 비해 EBERs은 잠복감염된 한 세포 당  $10^7$  복제수(copies)를 가질 정도로 양적으로 풍부한 핵내 유전자 전사물이면서<sup>17</sup>, 포르말린 고정 에 저항성이 있는 ribonucleoprotein의 형태로 존재하므로 여러 가지 조직이나 종양에서 비교적 안정적으로 EBV 감염을 증명할 수 있는 유용한 표지자로 최근 널리 사용되고 있다<sup>37</sup>. 감염된 세포들에서 EBERs은 이처럼 풍부히 존재하나, 이들의 정확한 기능은 잘 알려져 있지 않다.

EBV가 숙주세포를 감염시킬 때는 CD21이라는 특수한 수용기가 필요한데, 이 수용기는 구인두, 자궁경부 상피세포, 정지기 B 림프구에서 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>38</sup>. 감염세포에서 유도되는 변화는 세포 표면항원(CD23, CD39, CD70 등) 및 부착 분자(LFA 1, ICAM 1, LFA 3 등)의 상향조절(upregulation)<sup>39</sup> 그리고 세포내 원종양유전자(proto-oncogene)의 활성화<sup>40</sup> 등이다.

본 연구에서 비인두 암종 40예의 EBERs 양성률은 80.0%(32/40)였고, 각 유형별로는 UC가 90.5%(19/21), NKC가 92.3%(12/13), 그리고 KSC가 16.7%(1/6)로서 Hamilton-Dutoit와 Pallesen<sup>41</sup>이 UC 86예에서 95%(82/85)의 EBERs 양성률을, 그리고 Wu등<sup>42</sup>이 비인두 암종에서 보고한 EBERs의 연구 성적들과 유사하였다. 각 유형간에 EBERs의 발현은 유의한 차이를 보였으나, 양성예들에서 염색 강도성적(+ ~ +++)의 분포는 유형에 따른 상관관계가 없었다. 양성예에서 양성반응의 강도와 분포는 같은 조직절편내의 세포들간에도 다소의 차이를 보였는데, 이러한 소견은 EBERs의 복제수가 세포에 따라 다양하다는 것을 지시하는 소견으로 여겨진다. 양성예들중 UC의 2예, NKC의 3예에서는 생검조직에 포함된 이형성변화를 보이는 상피에서도 다양한 정도의 EBERs 양성반응을 보여 비인두암종에서 EBV 감염은 발암과정의 초기에 어떤 영향을 미칠 것으로 보였다.

저자들의 성적에서 LMP의 양성률은 10.0%(4/40)로서 양성인 4예 모두 UC였고, 이들은 EBERs과 p53 단백질에는 4예 전부, 그리고 Bcl-2 단백질에는 2예에서 양성이었다. UC 전예에서 LMP의 발현과 EBERs, Bcl-2 단백질, 그리고 p53 단백질의 발현사이에는 유의한 상관관계가 없었다. EBERs 양성인 비인두암종의

12.5%(4/32)에서 LMP의 양성을 보인 본 연구의 성적은 EBV 양성 비인두암종의 50%이하에서 LMP 양성을 보고하였던 Klein<sup>43</sup>의 보고와 비교할 때 다소 낮은 양성률인데, 이는 사용한 방법의 기술적 한계에 기인할 수도 있을 것이다.

Sheu등<sup>44</sup>은 비인두암종 101예의 생검 검체를 대상으로 한 p53 단백질의 면역조직화학적 검사에서 95.0%(96/101)의 양성률을 보고하면서, p53 단백질의 과발현이 비인두암종의 발암과정과 밀접한 연관성이 있음을 시사하였다. 본 연구에서 p53 단백질은 비인두암종 40예중 75.0%(30/40)의 양성률을 보였다. EBERs과 p53 단백질의 발현에 있어서 양성 일치율은 65.0%(26/40)이고 음성 일치율은 10.0%(4/40)로서 관측치의 일치도는 75.0%였으나, 일치도의 통계학적 의의는 낮았다( $\kappa=0.29$ ). Zhang등<sup>29</sup>과 Szekely등<sup>30</sup>은 EBV 관련 암에서 p53 단백질의 과발현은 EBV 감염에 의해 발현되는 단백질인 BZLF1과 EBNA-5 등과 야생형 p53 단백질이 복합물 형성으로 안정화됨으로써 야생형이 과발현된 것<sup>29,30</sup>이라는 주장을 한 바 있다. 본 연구의 성적에 비취볼 때 이들의 의견은 설득력 있는 것으로 보이지만 PCR 및 SSCP에 의한 p53 유전자의 돌연변이 유무에 대한 연구가 차후 보완되어야 할 것으로 보인다. Sheu등<sup>44</sup>은 또한 암종과 이형성 병변이 공존하는 24예중 19예에서 두 병소 공히 p53 단백질의 과발현을 보여 비인두암종에서 p53 단백질의 과발현 시기는 발암과정의 초기에 일어날 것이라고 하였지만, 본 연구의 비인두암종 생검조직예들에서는 이형성 상피조직이 거의 포함되어 있지 않아 이 점에 대한 분석은 곤란하였다. 한편 Niedobitek등<sup>45</sup>은 비인두암종의 생검조직에서 p53 단백질의 과발현은 9예의 EBV 음성 편평세포암종중 5예에서 그리고 13예의 EBV 양성 미분화암종중 9예에서 양성 소견을 관찰하고 p53 단백질의 과발현과 EBV 감염과는 밀접한 관련성이 없다고 하였다. 본 연구에서 비인두암종의 각 유형별로는 UC가 81.0%(17/21), NKC가 69.2%(9/13), 그리고 KSC가 66.7%(4/6)의 양성률을 보여 UC가 가장 높은 양성률을 보였으나, 각 유형간 p53 단백질의 발현은 유의한 차이가 없었다.

시험관내 연구의 결과<sup>24</sup>에 따르면 LMP는 Bcl-2 단백질의 과발현을 유도할 수 있다고 하였으나, 임상적으로 생체조직내에서도 이러한 기전이 작동하는지는 확인되지 못하고 있다<sup>46</sup>. 본 연구의 비인두암종 40예 중 Bcl-2 단백질의 양성률은 85.0%(34/40)였고, 유형별로는 UC가 90.5%(19/21), NKC가 92.3%(12/13), 그리고 KSC가 50.0%(3/6)의 양성률을 보여서 유형

들간 Bcl-2 단백질의 발현사이에는 유의한 차이가 인정되었다. EBERs과 Bcl-2 단백질의 발현에 있어서 양성 일치율은 72.5%(29/40)이고 음성 일치율은 7.5%(3/40)로서 관측치의 일치도는 80.0%였으나, p53의 경우와 마찬가지로 일치도의 통계학적 의의는 낮았다( $\kappa=0.31$ ). LMP와 Bcl-2 단백질의 발현간에는 상관관계가 없었다. 후자의 성적은 시험관내의 성적<sup>24</sup>과 이견을 보이는 것으로 Bcl-2 단백질의 과발현이 LMP와 무관한 독립적 현상일 수 있음을 추정케 한다. Martin 등<sup>47</sup>은 EBV 감염시 LMP에 의한 Bcl-2 단백질의 과발현은 일부 B 세포 계통에 국한될 뿐, 비 B 세포나 상피세포에서는 해당되지 않는다는 연구성적<sup>48</sup>을 보고한 바 있다. 본 연구에서 Bcl-2 양성반응은 전종양세포들에 균등하게 발현되는 점으로 미루어 비교적 발암과정의 초기에 이 단백질의 과발현이 이루어져 종양의 분화 및 진행에 영향을 미쳤을 것으로 여겨진다.

결론적으로 미분화 및 분화가 나쁜 비인두암종의 대부분에서 기존의 보고들<sup>33,37</sup>과 일치되는 EBV 감염의 밀접한 연관성을 확인할 수 있었고, EBV 감염의 산물과 Bcl-2 및 p53 단백질은 이 암종에서 종양발생의 초기 즉, 이형성과정의 어떤 단계에서부터 작용하였을 것으로 추정된다. Bcl-2 및 p53 단백질의 과발현은 EBERs의 발현과 어느정도의 일치도를 보여 차후에 EBV 감염이 이들의 발현에 미치는 영향에 대한 분자생물학적 접근방법은 흥미로운 학문적 작업이 되리라 사료된다.

## 결 론

저자들은 부산대학교병원에서 생검으로 진단된 비인두암종 40예를 대상으로 in situ hybridization 반응과 면역조직화학적 염색을 실시하여 EBERs, LMP, Bcl-2 및 p53 단백질의 발현정도를 평가하였다. WHO의 조직학적 분류기준에 의거하여 분류한 비인두암종의 유형별 증례수는 각화성 편평세포암종(KSC) 6예, 비각화성 암종(NKC) 13예, 그리고 미분화암종(UC) 21예였으며, 본 연구에서 얻어진 성적은 다음과 같다.

1) 비인두암종에서 EBERs의 발현율은 80.0%(32/40)였다. 유형별로는 NKC가 92.3%(12/13), UC가 90.5%(19/21), 그리고 KSC가 16.7%(1/6)의 순이었고, 발현율에 있어서 유형들간에는 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

2) 비인두암종에서 LMP의 발현율은 10.0%(4/40)였

고 양성예는 모두 UC였다. UC 21예에서 LMP의 발현과 EBERs, Bcl-2 및 p53 단백질의 발현간에는 유의한 상관관계가 없었다( $p > 0.05$ ).

3) 비인두암종에서 Bcl-2 단백질의 발현율은 85.0%(34/40)였다. 유형별로는 NKC가 92.3%(12/13), UC가 90.5%(19/21), 그리고 KSC가 50.0%(3/6)의 순이었고, 발현율에 있어서 유형들간에는 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ). 양성예들에서 양성반응은 전종양세포들에서 균등하게 분포하였다.

4) 비인두암종에서 p53 단백질의 발현율은 75.0%(30/40)였다. 유형별로는 UC가 81.0%(17/21), NKC가 69.2%(9/13), 그리고 KSC가 66.7%(4/6)의 순이었고, 발현율에 있어서 유형들간에는 유의한 차이가 없었다( $p > 0.05$ ).

5) 비인두암종 40예에서 EBERs과 p53 단백질의 발현, 그리고 EBERs과 Bcl-2 단백질의 발현간에는 어느정도의 일치도를 보였으나, 통계학적 의의는 낮았다( $\kappa < 0.4$ ).

이상의 성적에 의거하여 비인두암종에서 EBV 감염은 미분화 내지는 분화가 나쁜 유형의 대부분에서 강한 연관성을 보이고, p53과 bcl-2 유전자들은 비인두암종의 대부분에서 광범위하고 높은 빈도로 과발현되며, EBERs과 p53 그리고 EBERs과 Bcl-2 단백질의 발현성적에 있어서 어느정도 일치되는 현상은 EBERs이 비인두암종의 발암과정에서 일어나는 Bcl-2와 p53 단백질의 과발현에 기여할 것이라고 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Ablashi DV, Levine PH, Prasad V, Pearson GR. Fourth International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. Application of field and laboratory studies to the control of NPC. *Cancer Res* 1983; 43: 2375-8.
2. Lu SJ, Day NE, Degos L, et al. Linkage of a nasopharyngeal carcinoma susceptibility locus to the HLA region. *Nature* 1990; 346: 470-1.
3. de-The G, Zeng Y. Population screening of EBV markers: Toward improvement of nasopharyngeal carcinoma control, in Epstein MA, Achong BG, (eds): *The Epstein-Barr virus: Recent Advances*. Bedford: MA Heinemann, 1986: 236-47.
4. Yu MC. Nasopharyngeal carcinoma: Epidemiology and dietary factors. *IARC Sci Publ* 1991; 105: 39-47.
5. Miller G. Epstein-Barr virus biology, pathogenesis, and medical aspects. In: Fields BN, Knippe DM, eds. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990:

- 1921-57.
6. zur Hausen H, Schutte-Holthausen H, Klein G, et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumour and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056-8.
  7. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, et al. AIDS-related lymphomas. Histopathology, immunophenotype and association with Epstein-Barr virus as demonstrated by in-situ nucleic acid hybridisation. *Am J Pathol* 1991; 138: 149-63.
  8. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Zhou XG. The association of Epstein-Barr virus(EBV) with T cell lymphoproliferation and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field. *Adv Cancer Res* 1993; 62: 179-239.
  9. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. A survey of Epstein-Barr virus(EBV) gene expression in sporadic non-Hodgkin's lymphomas: detection of EBV in a subset of peripheral T cell lymphomas. *Am J Pathol* 1992; 140: 1315-25.
  10. Hamilton-Dutoit SJ, Therkildsen MH, Nielsen NH, Jensen H, Hansen JPH, Pallesen G. Undifferentiated carcinoma of the salivary gland in Greenlandic eskimos: demonstration of Epstein-Barr virus DNA by *in-situ* nucleic acid hybridisation. *Hum Pathol* 1991; 22: 811-5.
  11. Shibata D, Weiss DM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
  12. Su IJ, Hsieh HC, Lin KH, et al. Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr virus DNA: A clinicopathologic and molecular analysis. *Blood* 1991; 77: 799-808.
  13. Rouah E, Rogers BB, Wilson DR, Kirkpatrick JB, Buffone GJ. Demonstration of Epstein-Barr virus in primary central nervous system lymphoma by the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Hum Pathol* 1990; 21: 545-50.
  14. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 502-6.
  15. Young LS, Dawson CW, Clark D, et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1988; 69: 1051-65.
  16. Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small-RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9006-10.
  17. Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 805-9.
  18. Toczysky DPW, Steitz JA. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs(EBERs). *EMBO J* 1991; 10: 459-66.
  19. Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 1990; 345: 447-9.
  20. Gaffey MJ, Weiss LM. Viral oncogenesis: Epstein-Barr virus. *Am J Otolaryngol* 1990; 11: 375-81.
  21. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around J<sub>H</sub> on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
  22. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature(London)* 1988; 335: 440-2.
  23. Nunez G, London L, Hockenberry D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144: 3602-10.
  24. Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107-15.
  25. Yao K, Zhang HY, Zhu HC, et al. Establishment and characterization of two epithelial tumour cell lines (HNE-1 and HONE-1) latently infected with Epstein-Barr virus and derived from nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 45: 83-9.
  26. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
  27. Bartek J, Bartkova J, Voitesek B, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699-703.
  28. Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, et al. Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1992; 66: 3768-75.
  29. Zhang Q, Gutsch D, Kenney S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: Implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1929-38.
  30. Szekely L, Selivanova G, Magnusson K, Klein G, Wiman KG. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded

- nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5455-9.
31. Shanmugaratnam K, Sobin L. Histological typing of upper respiratory tumours, in International Histological Typing of Tumours, no. 19. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1978: 32-3.
  32. Warnke R, Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies. A biotin-avidin-horseradish peroxidase method. J Histochem Cytochem 1980: 771-6.
  33. Yao QY, Ogan P, Rowe M, Wood M, Rickinson AB. Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus-carriers. Int J Cancer 1989; 43: 67-71.
  34. Kieff E, Leibowitz D. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knippe DM, eds. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990: 1889-920.
  35. Rowe DT, Rowe M, Evan GI, Wallace LE, Farrell PJ, Rickinson AB. Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-depleted membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. EMBO J 1986; 5: 2599-607.
  36. Fahraeus R, Li Fu H, Ernberg I, et al. Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 1988; 42: 329-38.
  37. Glickmann JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. J Virol 1988; 62: 902-11.
  38. Cooper NR, Bradt BM, Rhim JS, Nemerow GR. CR2 complement receptor. J Invest Dermatol 1990; 94: 112S-7S.
  39. Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB. Down regulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlines tumour cell escape from virus-specific T cell surveillance. J Exp Med 1988; 167: 1811-24.
  40. Cleah MSC, Ley TJ, Tronick SR, Robbins KC. *fgf* proto-oncogene mRNA induced in B lymphocytes by Epstein-Barr virus infection. Nature 1986; 319: 238-40.
  41. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridisation. Histopathology 1994; 25: 101-11.
  42. Wu TC, Mann RB, Epstein JI, et al. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. Am J Pathol 1991; 138: 1461-9.
  43. Klein S. Viral latency and transformation: The strategy of Epstein-Barr virus. Cell 1989; 58: 5-8.
  44. Sheu LF, Chen A, Tseng HH, et al. Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. Hum Pathol 1995; 26: 380-6.
  45. Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P, Smallman LA, Jones EL, Young LS. P53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. J Pathol 1993; 170: 457-61.
  46. Tao Q, Srivastava G, Loke SL, Ho FCS. Lack of correlation between expression of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein and bcl-2 oncoprotein expression in vivo. J Clin Pathol 1994; 47: 589-91.
  47. Martin JM, Veis D, Korsmeyer SJ, Sugden B. Latent membrane protein of Epstein-Barr virus induces cellular phenotypes independently of expression of Bcl-2. J Virol 1993; 67: 5269-78.
  48. Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, et al. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF- $\kappa$ B activation and to induction of cell surface markers. J Virol 1994; 68: 5602-12.
-