

## 위장관 선암종 및 악성 림프종에서 Epstein-Barr 바이러스 동정 및 아형에 관한 연구

인하대학교 의과대학 병리학교실\* 및 고려대학교 의과대학 병리학교실

김 영 식\* · 박 설 희 · 김 인 선

### Detection and Subtyping of Epstein-Barr Virus in Gastrointestinal Adenocarcinomas and Malignant Lymphomas

Young Sik Kim, M.D.\*, Seol Hee Park, Ph.D. and Insun Kim, M.D.

Department of Pathology, Inha\* and Korea University College of Medicine, Ansan, Korea

Epstein-Barr virus (EBV) has been linked to a spectrum of neoplastic conditions, including Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease, lymphoepithelioma-like carcinomas and malignant lymphomas in immunocompromised state. To determine the prevalence and the subtype of EBV in gastrointestinal malignancies, fifty cases of adenocarcinomas and seventeen cases of malignant lymphomas were analyzed by EBERs *in situ* hybridization and polymerase chain reaction using primers for EBNA-1, EBNA-2A and EBNA-2B, on the paraffin sections. In addition, immunohistochemical stain for p53 protein was performed to investigate the potential role of EBV infection on tumor suppressor gene, p53, during tumorigenesis. EBER was detected in 6 of 26 gastric adenocarcinomas, 2 of 24 colon adenocarcinomas, and 8 of 17 malignant lymphomas. EBER was more prevalent in malignant lymphoma arising in the intestine (6/6) than in the stomach (2/11), and was detected in both B and T cell phenotypes. EBNA-1 was positive in 11 of 16 EBER positive cases and the subtyping was possible in 8; both type 1 and 2 were detected in gastric cancers, whereas only type 2 was found in intestinal neoplasms. In adenocarcinomas the high rate of p53 protein overexpression was found in both EBER positive (8/8) and negative cases (32/42), whereas the positive rate was higher in EBER positive cases (7/8) than in EBER negative cases (4/9) of malignant lymphomas. From the results, it can be concluded that EBV infection and the p53 tumor suppressor gene are independently associated in a significant portion of the gastrointestinal malignancies, but the mechanism of action remains to be elucidated. (Korean J Pathol 1997; 31: 847~861)

**Key Words:** Epstein-Barr virus, GI tract, p53, EBER, EBNA-2

접 수: 199년 월 일, 게재승인 199년 월 일  
주 소: 경기도 안산시 고잔동 516, 우편번호 425-020  
고려의대 안산병원 병리과, 김영식

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1996년도 인하대학교 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## 서 론

Epstein-Barr 바이러스 (EBV)는 1964년에 최초로 Epstein등<sup>1</sup>에 의해서 Burkitt림프종에서 배양한 림프 모세포주에서 전자 현미경으로 herpes-like virus particle을 증명함으로써 종양과 관련된다는 사실이 알려졌다. 그 이후로 비인두암종 (nasopharyngeal carcinoma), Hodgkin병, 말초 T세포 림프종, 림프종양 육아종증 (lymphomatoid granulomatosis) 및 장기이식 환자에서 발생하는 림프증식성 질환과 연관이 있고<sup>2-4</sup>, 양성질환인 전염성 단핵구증 (infectious mononucleosis) 과 구강 모반 백반 (oral hairy leukoplakia)에서도 원인으로 생각되어지고 있다<sup>5-7</sup>. 최근에는 흉선, 타액선, 폐, 자궁경부, 피부, 위 등의 림프상피종양 암종 (lymphoepithelioma-like carcinoma)에서도 EBV의 유전자 발현을 확인하였고<sup>8-17</sup>, 이런 EBV관련 림프상피종양 암종은 서구인보다 아시아인에서 발생 빈도가 높다고 한다<sup>18-19</sup>. 따라서 EBV는 역학적, 혈청학적, 분자생물학적 연구에 의하면 여러 림프증식성 질환뿐 만 아니라, 상피성 종양에서도 원인 인자로서 작용하거나 연관이 있다고 말할 수 있다.

위선암종인 경우는 심한 림프구 침윤을 동반한 분화가 나쁜 아형인 림프상피종양 암종이 EBV와 연관이 있는 것으로 알려져 왔지만<sup>20</sup>, 최근에는 뚜렷한 림프구 침윤이 없고, 분화 정도가 다양한 위선암종에서도 EBV DNA가 발견된다는 보고가 있으나<sup>21</sup>, 국내에서는 위선암종이 가장 발생 빈도가 높은 암종인데도 불구하고 아직 이에 대한 연구가 미미한 실정이다. EBV는 핵 단백질인 EBNA 2, 3A, 3B, 3C의 DNA 염기서열의 차이를 근거로 두가지 형태의 아형으로 분류하는데<sup>22,23</sup>, 이 두가지 아형은 바이러스 유전자의 염기서열 차이 뿐 만아니라 B 림프구를 변형시키는 능력도 차이가 있다고 알려졌고<sup>24</sup>, 북미와 유럽에서는 A형 (EBV-1)이 흔하고 아프리카에서는 반대로 B형 (EBV-2)이 더 많은 것으로 보고되어왔다. 그러나 최근 연구에 따르면 미국에서도 두가지 아형이 다 존재하는것으로 보고되어서 두아형이 동시에 중복 감염이 될 수 있는 가능성을 시사하고 있다<sup>25,26</sup>.

한편, 인체 암종에서 가장 흔히 돌연변이를 보이는 종양 억제유전자 산물인 p53 단백질은 simian virus 40, adenovirus, papilloma virus등과 직접 결합하

여 상호 작용하는 것으로 알려졌으며<sup>27-29</sup>, 최근에는 EBV의 Z Epstein-Barr virus replication activator (BZLF1)와 EBNA-5가 야생형 p53과 직접 결합하고 상호 작용한다는 보고도 있어서<sup>30,31</sup>, EBV의 발암기전에서 종양 억제유전자인 p53과의 연관성이 대두되고 있다.

본 연구에서는 EBV와 연관성이 대두되고 있는 위선암종 및 위장관 악성림프종을 대상으로 이들 종양과 EBV와의 연관성을 밝히고 더 나아가 국내에서의 EBV 아형 양상을 조사함으로써 발암과 더 관련성이 높은 A형 EBV가 B형에 비해 어느 정도 악성 종양과 관련이 있는지 알고자 하였다. 또한, EBV와 종양 억제유전자인 p53과의 연관성 여부도 밝히고자 하였다. 한편, 대장의 선암종은 EBV 연관성이 보고되어 있지 않지만 EBV가 실제로 발암에 관여하는 바이러스가 아니라 어느 장기나 종양에 국한되지 않는 단지 passenger 바이러스인지를 알기 위해 연구 대상에 포함시켰다.

이를 위해 위와 대장의 선암종과 악성림프종에서 EBV-encoded small RNA (EBER)에 대한 소식자를 이용한 *in situ* hybridization 방법과 DNA 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction)을 이용하여 viral DNA를 동정하고 EBV가 확인된 예에서 EBV의 두가지 아형중 어느 아형에 속하는지 확인하였다. 또한, 암억제유전자인 p53 유전자 산물에 대한 면역조직화학 염색을 이용하여 p53 유전자 산물의 과발현과 EBV 발현과의 연관성 유무를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

1991년 2월부터 1994년 12월까지 고려대학교 의과대학 안암병원에서 위와 대장의 선암종과 악성림프종으로 절제되어 진단된 예들의 외과병리보고서와 H&E 염색된 유리 슬라이드를 재검토하여, 여러 유형의 위선암종 26예, 대장선암종 24예, 위장관 악성림프종 17예를 선택하였다. 악성림프종인 경우는 2예의 위내시경 생검 조직이 포함되었다. 위선암종은 WHO 분류법에 따라 세분하였고, 이 26예중 종양세포 주위를 침윤하는 림프구의 양이 전체 종양세포보다 많고, 특징적으로 종양세포들이 수포성 핵과 뚜렷한 핵소체를 가지며, 풍부한 세포질과 세포질의 경계가 불분명한 림프구 침윤이 많은 위선암

종 내지는 림프상피종양 암종<sup>38</sup>을 포함해서 10예를 인위적으로 포함시켰다. 대장의 선암종은 분화도에 따라 세분하였으며, 악성림프종은 면역조직화학 염색 결과에 근거하여 B형과 T형 악성림프종으로 분류하였다.

## 2. 연구방법

### 1) Epstein-Barr virus encoded RNA (EBERs)에 대한 *in situ* hybridization 방법:

(1) 기구 및 시약의 처리; 모든 기구는 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 95% ethanol로 씻은 다음 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분간 담구어 놓았다. 마지막으로 0.1% diethylpyrocarbonate/distilled water (DEPC/DW)로 씻었다. DEPC/DW는 증류수를 고압 멸균하여 DEPC가 0.1% 되도록 하루밤 정도 녹였다. 특히 실험 도중 실험자의 손에 RNA분해효소가 묻을 수 있으므로 실험할 때마다 항상 일회용 비닐 장갑을 자주 교환하여 사용하였다. 또한 사용하였던 기구는 따로 분리하여 보관하고 RNA실험 시에만 사용하였다.

#### (2) 실험 방법:

① 조직절편의 함수화 과정. 4~5  $\mu$ m 두께로 박절한 조직 절편을 lysine으로 처리된 유리 슬라이드에 부착시켰다. 조직 절편을 xylene으로 탈파라핀 시킨 후 99%와 95% ethanol에 각각 순차적으로 함수화 과정을 거친 다음, 공기중에서 유리 슬라이드를 말린 후 0.1% DEPC/DW용액에 담가 놓았다.

② 교잡반응을 위한 전처리. 핵산이 잘 노출될 수 있도록 proteinase K (10  $\mu$ g/ml)에 37°C에서 20~30분간 반응시킨 후 0.1% DEPC/DW 용액으로 세척하였다. 95%와 99% ethanol에 순차적으로 탈수 과정을 거친 다음 공기 중에 말렸다.

③ 교잡반응. DAKO사의 FITC로 표지된 EBERs에 대한 oligonucleotide probe 1~2 방울을 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 37°C humidified chamber에서 2시간 반응시켰다. 0.1% Triton X-100을 함유한 0.05M Tris 완충액에서 1시간 동안 담가 놓아 coverslip이 떨어지도록 하였다.

④ 검출 과정. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 20% 정상가토혈청을 함유한 완충액에 10분간 담가 놓은 후, 3% bovine serum albumin과 0.1% Triton X-100을 함유한 0.05M Tris 완충액으로 100배 희석한 항-FITC/Alkaline phosphatase 시약을 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.1% Triton X-100을 함유한 0.05

M Tris 완충액으로 세척한 후 발색제가 조직에 잘 침투해서 반응하도록 하는 alkaline substrate 완충액 (MgCl<sub>2</sub>와 NaCl을 함유한 pH 9.0인 Tris 완충액)에서 5분간 반응시켰다. 발색제로 사용한 nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) 과 내재성 alkaline substrate를 억제하기 위하여 추가한 levamisole (1  $\mu$ l/ml)의 혼합 용액을 alkaline substrate 완충액으로 50배 희석하여 만든 용액에 30분~1시간동안 반응시킨 후 0.1% Triton X-100을 함유한 0.05M Tris 완충액으로 세척하였다. Ethyl green으로 30분간 대조 염색 시킨 후 흐르는 물에 세척한 다음 봉입하여 검경하였다.

### 2) Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)에 대한 polymerase chain reaction:

(1) 파라핀 포매 조직에서 DNA 추출; 파라핀 블록을 각각 5  $\mu$ m 두께로 2조각씩 박절한 후 1.5 ml tube에 넣은 다음 파라핀을 제거하기 위해 xylene 1 ml을 가한 후 5분동안 방치한 다음 12,000 rpm으로 7분간 원심분리를 하였다. 이런 과정을 3회 반복하였다. 무수에탄올 1 ml 각각 가하고 5분간 방치한 후 7분간 원심 분리를 하였다. 역시 이런 과정을 3회 반복하였다. 알코올을 제거하기 위해 상온에서 완전히 시료를 건조시켰다. G'nome kit (Bio101, CA, USA) 중 cell suspension solution 0.9 ml 가하고 잘 혼합한 후, RNase 25  $\mu$ l를 가하고 잘 혼합한 후 cell lysis/denaturing solution 50  $\mu$ l를 가한 후 55°C에 15~30분간 방치하였다. 다시 protease 12.5  $\mu$ l를 가하고 잘 혼합하였다. Proteinase K 200  $\mu$ g를 가한 후 55°C에서 24시간 방치하였다. G'nome kit중 saltout mixture 250  $\mu$ l를 가하고 10분동안 얼음에서 방치한 후 10분간 원심 분리한 다음 상층액을 15 ml tube에 옮겼다. 이 tube에 2 ml TE buffer와 8 ml 무수에탄올을 가하고 -20°C에서 1시간동안 방치한 후 15분간 1500 rpm으로 원심분리한 다음 상층액을 버렸다. 상온에서 완전히 말려서 DNA pellet을 얻어 100  $\mu$ l TE buffer로 녹인 후 2  $\mu$ l를 취하여 O.D.를 측정하고 나머지는 -20°C에 보관하여 template DNA로 사용하였다.

### (2) EBV의 존재 확인과 아형 분류를 위한 primer 선택:

① EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1). EBNA-1은 일반적으로 비인두암종과 Burkitt 림프종에서 존재하는 바이러스 핵항원으로 이 유전자를

이용하여 일차적으로 EBV의 존재 유무를 확인하였다. 사용한 primer의 염기 서열은 다음과 같다.

② EBNA-2 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-2). EBV는 EBNA-2의 유전자 영역인 U2 영역의 염기서열 차이에 따라 제 1형과 제 2형으로 분류할 수 있다. 따라서 U2 영역에서 염기 서열이 아형들 사이에 공통적으로 보존된 부분을 이용하여 consensus primer로 EBNA-2를 확인하고 이 영역에서 염기의 결손으로 인하여 생기는 차이를 이용하여 만든 type-specific primer를 이용하여 아형 분류를 하였다.

각각의 primer는 다음과 같다.

③  $\beta$ -globin

(3) Polymerase chain reaction; 실험을 시행하기에 앞서 각각의 조직에서 DNA가 잘 추출되었는지 확인하기 위하여 모든 세포에 존재하는  $\beta$ -globin 유전자에 대한 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응법을 시행하였다.

$\beta$ -globin이 확인된 검체에서 EBNA-1, EBNA-2A, EBNA-2B, EBNA-common (명지대학교 생명공학과 제

공)에 대한 중합효소연쇄반응을 시행하였는데 Eppendorf tube에 10x dNTP 2 mM, 10x PCR buffer, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase 1 unit/25  $\mu$ l의 PCR 반응액을 넣고 200~500 ng template DNA와 본 연구에서 사용될 primer를 각각 가하여 최종적으로 반응액을 25  $\mu$ l로 하였다. 중합효소 반응의 조건은 처음에 95°C 5분간 denaturation한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복한 후 마지막에 72°C에서 5분간 extension를 하였다. 아형 분류를 위한 대조로는 B95-8 cell line을 제 1형 양성대조로, Jijoye cell line은 제 2형 양성대조로 사용하였다. 음성대조로는 template DNA를 가하지 않은 반응액을 사용하였다.

(4) PCR 산물의 확인; 얻어진 중합효소 반응산물을 20  $\mu$ g ethidium bromide가 함유된 1.2% agarose gel에 loading dye와 함께 10  $\mu$ l씩 각각 loading한 후 100 volt에서 20~25분간 전기 영동시킨 다음 UV transilluminator로 band를 확인하고 polaroid 사진기로 촬영하였다.

EBNA-1	Sequence	Amplification size
Sense	5'-TGA-TAA-CCA-TGG-ACG-AGG-AC-3'	138 bp
Antisense	5'-CTT-CAA-GTT-GCA-TTG-GCT-GC-3'	
EBNA-2	Sequence	Base positions(amplification size)
For general PCR(EBNA-2 common)		
Sense	5'-AGG-GAT-GCC-TGG-ACA-CAA-GA-3'	1814 ~ 1834
Antisense	5'-TGT-GCT-GGT-GCT-GCT-GGT-GGT-3'	2334 ~ 2415(602 bp)
For type 1-specific PCR(EBNA-2 type 1)		
Sense	5'-AGG-GAT-GCC-TGG-ACA-CAA-GA-3'	1814 ~ 1834
Antisense	5'-TTG-TGA-CAG-AGG-TGA-CAA-AT-3'	2041 ~ 2061(248 bp)
For type 2-specific PCR(EBNA-2 type 2)		
Sense	5'-AGG-GAT-GCC-TGG-ACA-CAA-GA-3'	1814 ~ 1834
Antisense	5'-TTG-AAG-AGT-ATG-TCC-TAA-GG-3'	2093 ~ 2113(300bp)
$\beta$ -globin	Sequence	Amplification size
For amplifiability of extracted DNA		
Sense	5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'	268 bp
Antisense	5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'	

3) p53 유전자 산물에 대한 면역조직화학 염색:

(1) 조직 처리; 10%중성 포르말린에 고정후 통상적인 방법으로 파라핀 포매된 블럭으로부터 4 μm 두께의 절편을 만들어 p53 유전자 산물에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

(2) 일차 항체; 사용되는 p53에 대한 일차 항체는 쥐에서 만들어진 단클론성 항체 (Clone DO7, Signet, USA)로써 야생형과 돌연변이형에 모두 반응할 수 있는 항체로 1:50으로 희석하여 사용하였다.

(3) 이차 항체 및 발색; 이차 항체 및 결합 항체는 DAKO사의 Labelled streptavidin biotin kit를 사용하여 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB)로 발색하였다.

(4) 염색 방법; 파라핀 절편을 슬라이드에 부착시켜 56°C 부란기에 처리하고 탈파라핀 및 함수후 증류수에 담구었다. Citrate buffer에 슬라이드를 넣고 microwave oven에서 3분간 3회 끓인후 0.05% saponin 용액으로 상온에서 30분간 전처리하였다. 3% 과산화수소액으로 30~40분간 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 다음 0.05M Tris buffer (pH 7.6)으로 세척하고 정상 혈청으로 2시간동안 비특이적 결합 반응을 억제시켰다. 일차 항체를 가하고 -4°C에서 24시간 반응시켰다. Biotin과 결합된 이차 항체에 20분간 반응시키고 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase용액을 가하고 15분간 반응시켰다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (DAB)용액에서 2~20분간 발색시켰다. Harris hematoxylin으로 15초간 대조 염색하고 탈수 후 봉입하였다.

(5) 결과 판정 및 통계 처리; 광학 현미경을 이용하여 p53단백 발현이 강하게 양성으로 염색된 부위를 선정하여 400배율 10개 시야에서 2000개의 종양 세포중 양성 세포핵의 백분율을 산출하여 전혀 염색이 안된 경우는 음성, 10% 미만이면 (+), 10%이상 50% 이하이면 (++), 51% 이상이면 (+++)로 하였고, 최종적으로 (++) 이상인 경우를 양성 반응으로 판정하였다<sup>73</sup>.

통계 처리는 통계 프로그램인 SAS를 이용하여 EBV가 검출된 종양군과 검출되지 않은 종양군으로 나누어 각각의 p53에 대한 염색 결과 양성의 유무가 통계학적으로 차이가 있는지를 조사하기 위해 비모수적 통계 기법의 하나인 Fisher's exact test를 시행하였다.

결 과

1. 위선암종 및 악성림프종에서 EBV 양성률과 아형 분류

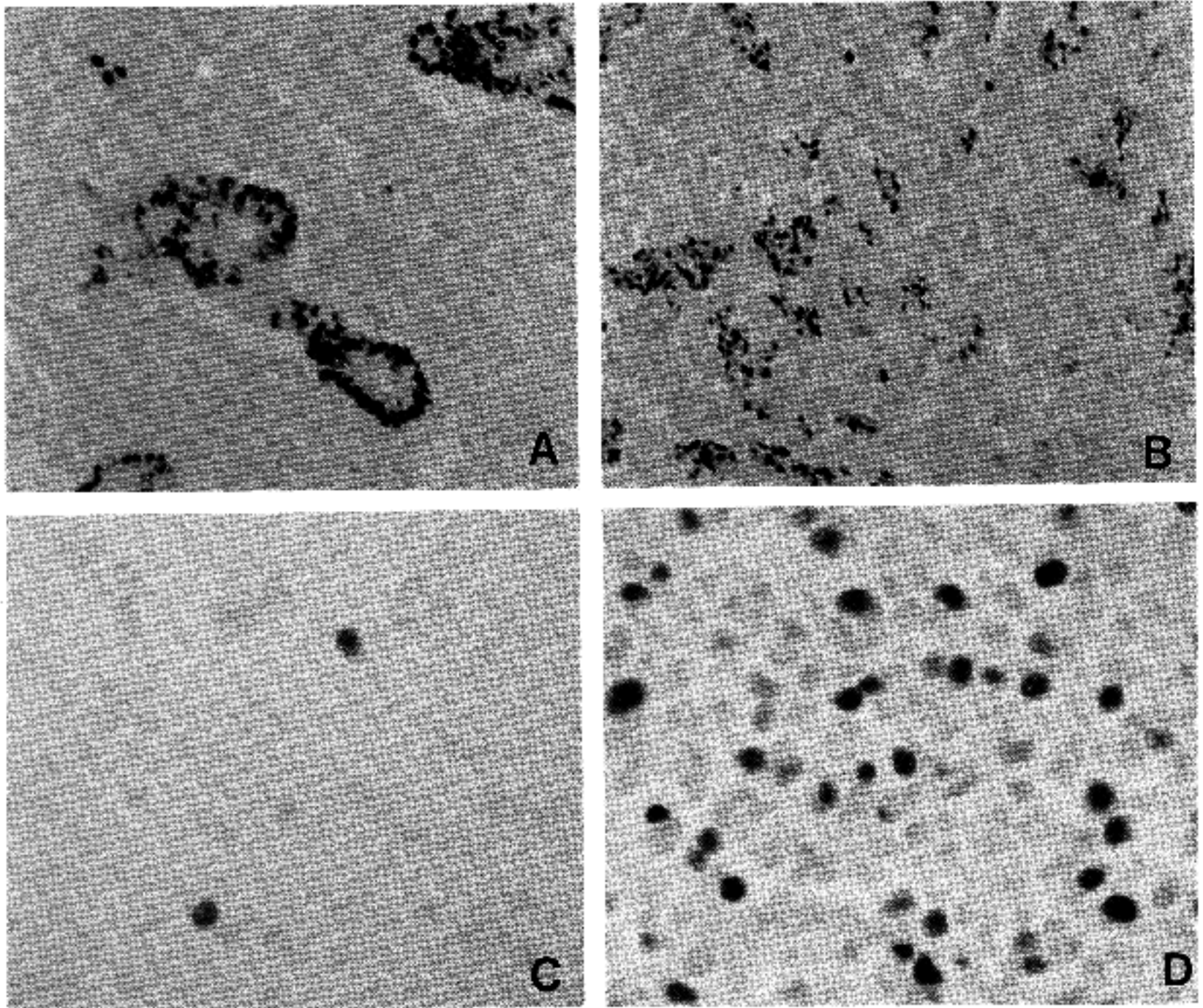
검색한 26예의 위선암종중 6예에서 EBER-1에 대한 *in situ* hybridization에서 23%의 EBV 양성률을 보였다 (Table 1, Fig. 1). 염색은 세포핵에서 양성 반응을 보였는데 주로 핵막과 핵소체를 제외한 부위에 강하게 염색되었다. EBV 양성인 선암종 환자의 나이는 34세부터 61세까지로 평균 50세이었고 남자가 4명이고 2명은 여자였다. 발생 부위는 유문동에 2예, 체부에 2예, 유문동-체부에 1예, 위저부에 1예로 다양했다.

EBV 양성인 위선암종 6예중 조직학적 유형을 보면, 관상형의 중등도 분화암이 2예, 고도분화성의 관상형이 1예, 저분화형이 2예, 그리고 반지세포형 (signet-ring cell type)이 1예였다. 그러나 5예의 점액형에서는 모두 음성이었다. 림프구 침윤이 심한 림프상피종양형 (lymphoepithelioid type)은 10예중 3예 (33%)에서 양성이었고 그 염색 정도가 아주 강하였으며, 다른 유형에서는 매우 적은 세포만이 양성 반응을 보였다. 정상적인 점막이나 열증 세포에는 모두 음성이었다. 한편, 중합효소 연쇄반응법에 의한 EBV의 동정 및 아형 분류는 EBER에 양성인 6예중 5예에서만 EBNA-1에 유전자 증폭이 되었고, EBNA-2A에 증폭된 경우가 2예로 제 1형으로 분류되었으

Table 1. Positivity for EBER-1 in gastrointestinal adenocarcinoma and malignant lymphoma

	No of cases	No. of positive cases(%)
Stomach		
Adenocarcinoma	26	6( 23%)
Malignant lymphoma	11	2( 18%)
Ileum		
Malignant lymphoma	1	1(100%)
Colon		
Adenocarcinoma	24	2(8.3%)
Malignant lymphoma	5	5(100%)
Total	67	16(23.9%)





**Fig. 1.** EBER-1 *in situ* hybridization in gastrointestinal neoplasms. Dark EBER-1 hybridization signals are seen in the nuclei of tumor cells. A: Well differentiated gastric adenocarcinoma, B: Lymphoepithelioma-like gastric adenocarcinoma, C: Adenocarcinoma of colon, D: Malignant lymphoma of colon, T cell type (A, B:  $\times 100$ , C,D:  $\times 200$ , ABC method).

며, 조직학적으로 모두 저분화형이었다. 또 EBNA-2B에는 1예에서 양성이어서 EBV 제2형으로 분류되었다 (Table 2, Fig. 2).

위에서 발생한 악성 림프종 11예중에서 각각 유분동과 체부에서 발생한 2예에서 EBERs에 대한 *in situ* hybridization에 양성 반응을 보였고 모두 미만성대세포형이었다, 1예는 B 세포형이었고, 나머지 1예는 T 세포형이었다. T 세포 림프종인 1예에서는 다른 예보다 비교적 약한 반응을 보였다. 중합효소 연쇄반응법에 의한 EBV의 농정 및 아형 분류는 EBER 양성인 2예중 1예에서만 EBNA-1에 유전자 증폭이 되었고 EBNA-2에는 모두 증폭이 되지 않아서 아형

을 분류할 수 없었다 (Table 3).

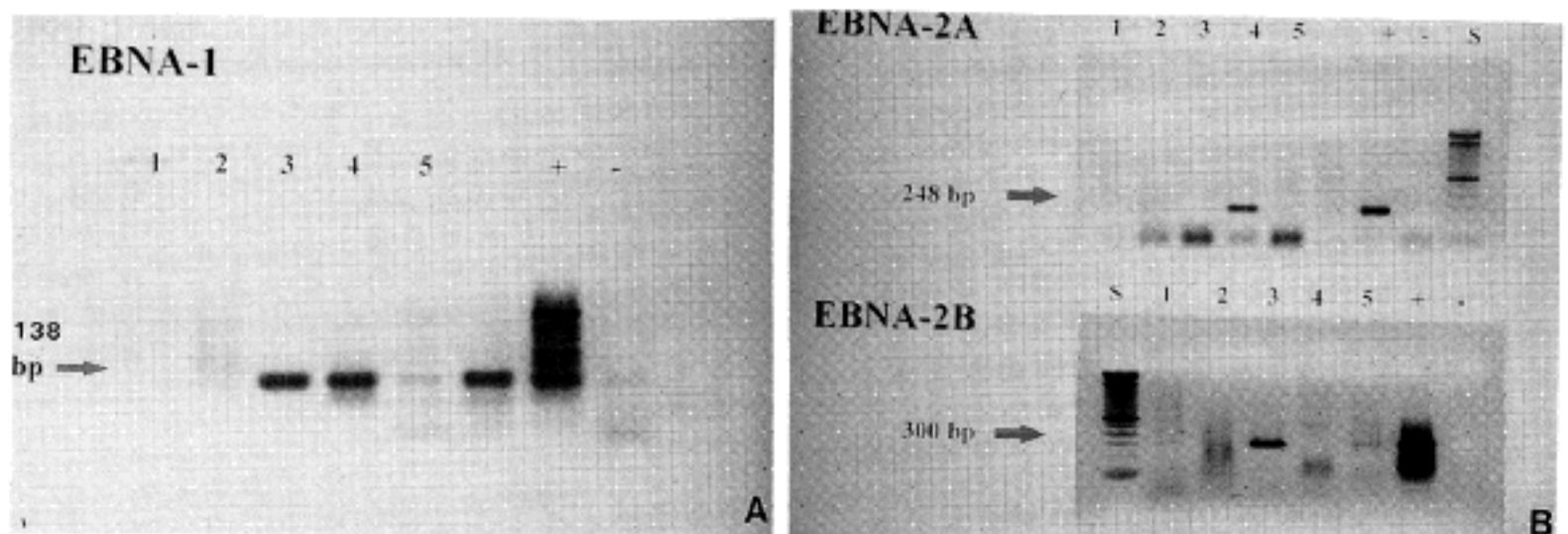
## 2. 대장 선암종 및 악성림프종에서 EBV 양성률과 아형 분류

대장의 선암종 24예중 각각 우측 대장과 S상 결장에서 발생한 2예에서 EBERs에 대한 *in situ* hybridization과 EBNA-1 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응에 대해 8.3%의 EBV 양성률을 보였다 (Fig. 1). 이 2예 모두 EBNA-1에 대한 중합효소 연쇄반응에 유전자 증폭을 보였고 이중 1예에서 EBNA-2B에 유전자 증폭을 보여서 EBV 제 2형으로 분류할 수 있었다 (Table 4, Fig. 2).

**Table 2.** Subtypes of EBV in EBER-1 positive gastric adenocarcinoma

	No. of cases	EBER-1	EBNA-1	EBNA-2 type 1: type 2
<b>Gastric Adenocarcinoma(WHO)</b>				
Tubular, WD	5	1	1	0 : 1
Tubular, MD	5	2	1	0 : 0
PD	6	2	2	2 : 0
Mucinous	5	0	0	0 : 0
Signet ring cell	5	1	1	0 : 0
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>2 : 1</b>
<b>Gastric Adenocarcinoma</b>				
Non-LEC	16	3	3	0 : 1
LEC	10	3	2	2 : 0

LEC: Lymphoepithelioma-like carcinoma, WD: Well-differentiated, MD: Moderately differentiated, PD: Poorly differentiated



**Fig. 2.** PCR detection and subtyping of EBV in gastrointestinal neoplasms. PCR amplifications using primer EBNA-1, EBNA-2A and EBNA-2B were performed. Products were analysed by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Lanes indicate as follows. *Lane 1:* malignant lymphoma of colon [EBNA-1 (-), EBNA-2A (-), EBNA-2B (+)], *Lane 2* [EBNA-1 (-), EBNA-2A (-), EBNA-2B (-)], *Lane 4* [EBNA-1 (+), EBNA-2A (+), EBNA-2B (-)], *Lane 5* [EBNA-1 (+), EBNA-2A (-), EBNA-2B (+)]: gastric adenocarcinoma, *Lane 3:* nasopharyngeal carcinoma [EBNA-1 (+), EBNA-2A (-), EBNA-2B (+)], *Lane (+):* B95-8 cell line, *Lane (-):* no DNA, *Lane S:* 100bp DNA ladder.

한편, 회장에서 발생한 악성림프종 1예와 우측 대장에서 발생한 악성림프종 5예는 EBERs에 대한 *in situ* hybridization에 모두 양성이어서 100%의 EBV 양성률을 보였고 이중 3예는 비교적 국소적으로 약하게 반응을 보였다. EBV에 양성인 6예 모두 미만성 대세포형이었고, 회장에서 발생한 1예를 포함한 3예는 B 세포형이고 1예는 T 세포형이었다. 나머지 2예는 세포형이 결정되지 못한 증례이었다. EBNA-1에 대한 중합효소 연쇄반응에서 EBER에 양성인 6

예중 4예에서 양성이었고, EBNA-2B에 대해서도 EBER 양성인 6예중 3예에서 양성을 보여 EBV 제 2형으로 분류되었다. 그러나 EBNA-2A에 대한 중합효소 연쇄반응은 모든 예에서 음성이었다 (Table 3).

### 3. EBERs에 대한 *in situ* hybridization과 DNA 중합효소 연쇄 반응에 의한 EBV DNA 동정과의 차이

본 연구에 사용된 총 67예 중 16예에서 EBERs에

Table 3. Subtypes of EBV in EBER-1 positive malignant lymphoma of gastrointestinal tract

	No. of Cases	EBER-1	EBNA-1	EBNA-2 type 1: type 2
Stomach				
B cell	7	1	0	0 : 0
T cell	3	1	1	0 : 0
non T, non B	1	0	0	0 : 0
Ileum				
B cell	1	1	1	0 : 1
Colon				
B cell	2	2	1	0 : 1
T cell	1	1	0	0 : 1
non T, non B	2	2	1	0 : 1
Total	17	8	4	0 : 4

Table 4. Subtypes of EBV in EBER-1 positive colonic adenocarcinoma

	No. of Cases	EBER-1	EBNA-1	EBNA-2 type 1: type 2
Colonic Adenocarcinoma				
WD	6	0	0	
MD	10	1	1	0 : 1
PD	4	0	0	
Mucinous	4	4	1	0 : 0
Total	24	2	2	0 : 1

WD: Well-differentiated, MD: Moderately differentiated, PD: Poorly differentiated

대한 *in situ* hybridization에 양성 반응을 보여서 23.9%의 양성률을 보였고, 이에 반해 EBV DNA에 대한 중합효소 연쇄반응법에서는 11예에서 유전자 증폭을 보여 16.4%의 양성률을 보였다. 그러나 EBV DNA에 대한 중합효소 연쇄반응법에서 양성을 보인 11예중 3예는 EBNA-1에 대한 중합효소 연쇄반응에는 유전자 증폭이 되었지만 EBNA-2A와 EBNA-2B에는 유전자 증폭이 되지 않았고, 이와 반대로 대장의 악성림프종 2예에서는 EBNA-1에 대해서는 음성이었으나 EBNA-2B에 대한 중합효소 연쇄반응에는 양성이었다 (Table 3).

#### 4. EBV 양성 종양에서 p53 발현과의 상관 관계 (Table 5, Fig. 3, 4)

돌연변이형 p53단백에 대한 면역조직화학 염색에

서 대부분의 위장관 선암종은 종양세포의 핵에 강한 염색반응을 보인 반면 악성림프종은 선암종에 비해 약하게 염색되었고 종양세포와 혼재되어 있는 정상세포와 구별이 힘들어서 돌연변이형 p53 발현율을 계산하는데 어려움이 있었다. 일부 종양에서는 종양세포의 핵에 염색이 되지 않고 세포질에 염색된 경우도 있었고 종양간 p53단백 발현율에서 심한 차이를 보여 전혀 염색이 안된 경우도 13예가 있었다.

위 선암종에서 EBV에 양성인 6예는 p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색에서 모두 양성으로 염색되어서 100%의 발현율을 보였다. 이에 반해 EBV에 음성인 20예는 2예에서 전혀 염색이 되지 않고 1예에서는 전체 종양세포중 10% 미만에서 양성으로 염색되어서 p53 발현율이 85%로 EBV에 양성인 선암종인 경우보다 p53 발현율이 낮았다 (p value= 0.585).



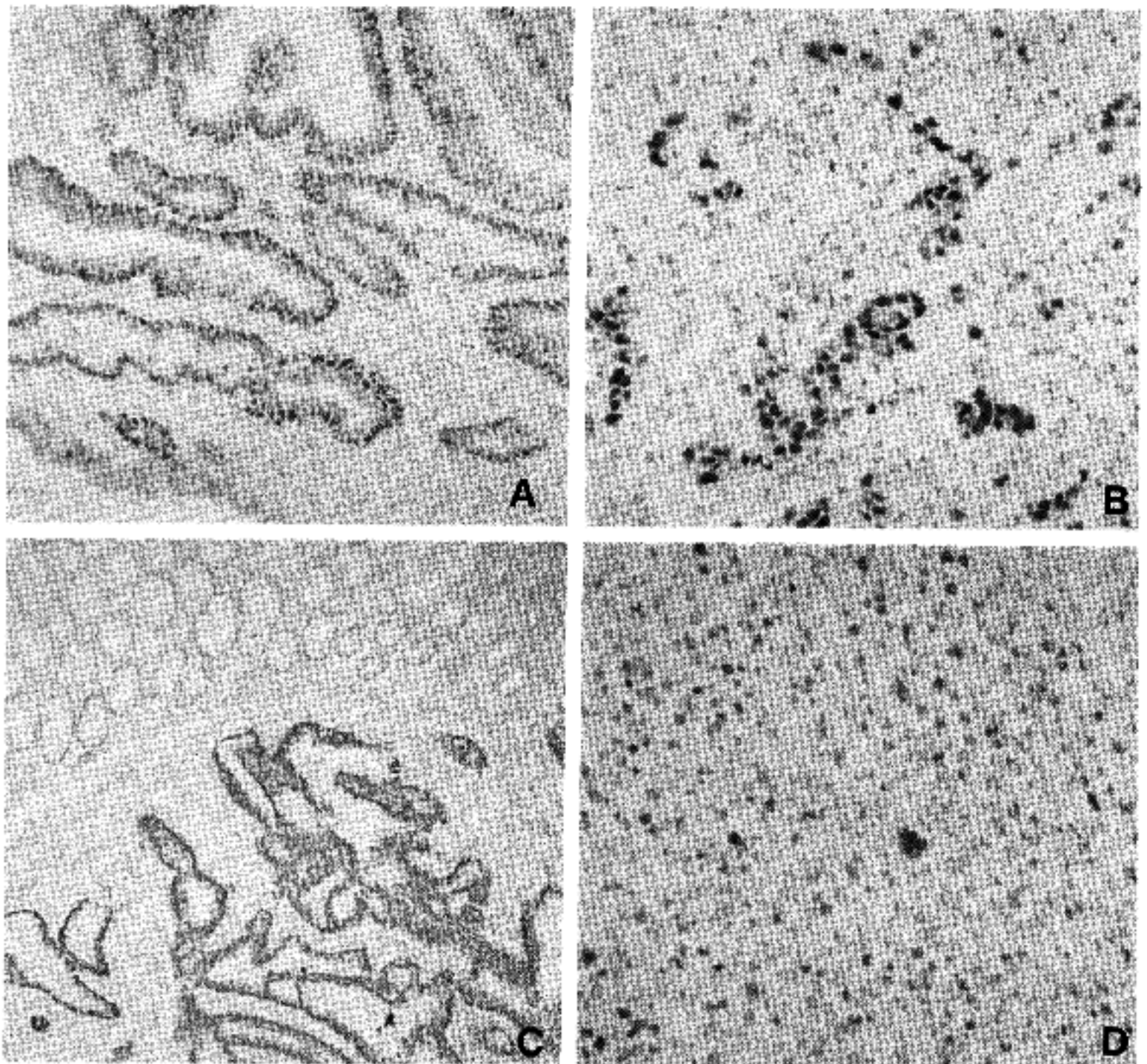
**Table 5.** Expression rate of p53 protein in gastrointestinal neoplasms

	EBER-1 positive					EBER-1 negative					p-value
	(-)	(+)	(++)	(+++)	rate(%)	(-)	(+)	(++)	(+++)	rate(%)	
<b>Adenocarcinoma</b>											
Stomach	0	0	1	5	(100%)	2	1	2	15	(85.0%)	0.585
Colon	0	0	0	2	(100%)	6	1	3	12	(68.2%)	0.554
<b>Malignant Lymphoma</b>											
Stomach	0	0	0	2	(100%)	5	0	1	3	(44.4%)	0.088
Colon	1	0	1	4	(83.3%)						

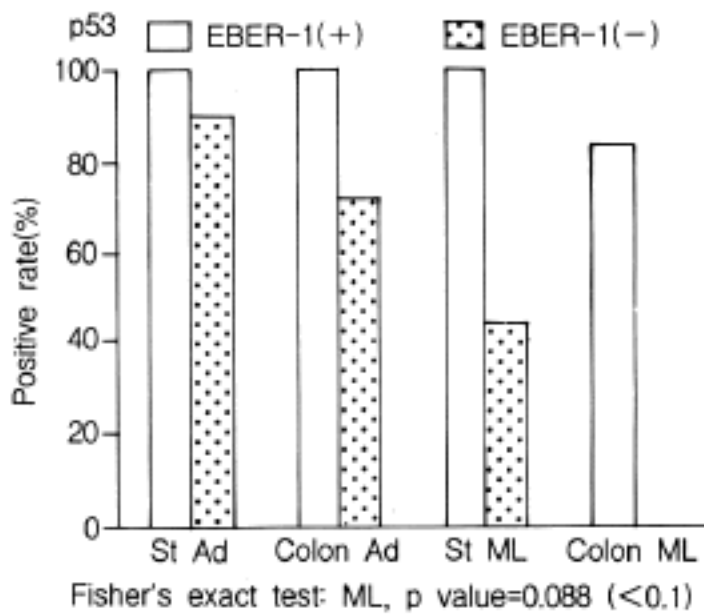
Staining score: ( - ) 0% of p53 positive cells, ( + ) < 10%, ( ++ ) 10~50%, ( +++ ) > 50%

Positive expression rate: expression rate of cases with more than ( + )

Fisher's exact test: (p-value < 0.1)



**Fig. 3.** Immunohistochemical stains for p53 protein. Most tumor cells show diffuse brown nuclear staining. A: EBV positive gastric adenocarcinoma, B: EBV-negative gastric adenocarcinoma, C: EBV negative adenocarcinoma of colon, D: EBV positive malignant lymphoma of colon. (A:  $\times 100$ , B, D:  $\times 200$ , C:  $\times 40$ , ABC method)



**Fig. 4.** p53 expression rate according to tumor types. EBV positive malignant lymphomas reveal higher expression rate of mutant p53 than EBV negative ones (St: Stomach, Ad: Adenocarcinoma, ML: Malignant lymphoma).

대장의 선암종에서 EBV에 양성인 2예에서 각각 90%와 98%로 p53 면역조직화학 염색에 강양성을 보였고 EBV 음성인 선암종은 EBV 양성 선암종에 비해 낮은 68.2%의 발현율을 나타냈다 (p value=0.554). 위 및 대장의 선암종에서 EBV 검출 유무에 따른 p53의 발현 유무의 차이는 통계학적 의의는 없었다 (Fisher's exact test,  $\alpha = 0.05$ ).

위에서 발생한 악성림프종은 EBV에 양성인 2예에서 모두 p53에 강양성을 보여서 100%의 발현율을 보였고, EBV에 음성인 악성림프종은 44.4%의 낮은 발현율을 나타냈다. 회장 (ileum)을 포함한 대장의 악성림프종은 6예 모두 EBV에 양성으로 1예를 제외하고 5예에서 p53에 양성으로 염색되어 83.3%의 p53 발현율을 보였다. 위 및 회장을 포함한 대장의 악성림프종에서 EBV 검출 유무에 따른 p53의 발현 유무의 차이는 통계학적으로 의의가 있었다 (Fisher's exact test,  $\alpha = 0.1$ , p value=0.08).

### 고 찰

본 연구에서는 일차적으로 EBV에 잠복 감염된 세포가 종양 세포인지 아니면 암종 주변에 침윤하는 림프구인지를 광학 현미경하에서 EBERs *in situ* hybridization을 이용하여 확인하고 양성 교잡 신호를 보이는 종양에서 EBNA-1, EBNA-2A와 EBNA-2B를 이용하여 다시 재동정하고 아형 분류를 하였다. 본

연구에 사용된 *in situ* hybridization의 목표가 된 EBER는 EBV의 잠복 감염시 세포당  $10^7$ 개까지 특이하게 양이 증가하는 RNA로 EBER-1과 EBER-2로 존재하는데 각각 165와 169 nucleotide로 짧은 길이를 가진다. EBER는 세포내에서 La 단백질과 결합하여 안정된 2차 구조를 형성하기 때문에 포르마린 고정된 파라핀 포매 조직에서도 비교적 안정적으로 존재한다. 또한 EBER는 핵안으로 이동하여 ribonucleo-protein으로 존재하기 때문에 EBER *in situ* hybridization에서 양성일 경우 세포의 핵막의 안쪽에서 염색되는 것을 관찰할 수 있다. 단백질을 만들지 않는 이 EBER의 기능은 아직까지 알려지지 않았지만, EBV 검출에 임상적으로 유용하게 사용되고 있다<sup>32-34</sup>.

EBV는 최소한 84개의 유전자들로 이루어진 하나의 큰 복합 유전자로 이들중 11개의 유전자가 잠복 감염과 관련이 있으며 다시 이들 11개 유전자중 EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3 (3A), EBNA-5 (LP), EBNA-6 (3C)와 LMP (Latent membrane protein, LMP-1) 등 6개 유전자가 숙주 세포를 죽이지 않고 무한정 자랄 수 있도록 하는데 필요한 유전자로 밝혀졌다<sup>34</sup>. EBNA-1 단백질은 DNA의 특정 염기 서열에 결합하는 단백질로 바이러스의 latent replication origin인 oriP의 TGGATAGCATATGCTATCCA 염기 서열에 결합하여 주로 EBV의 잠복 감염을 유지시키는 역할을 하는 것으로 알려졌다. 또한 다른 EBNA 단백질들을 활성화시켜서 숙주 세포의 무한정 증식에도 기여하는 역할도 한다. 이 EBNA-1은 Burkitt 림프종, 비인두 암종, Hodgkin병, 림프증식성 질환등에 모두 발현되는 유일한 바이러스 단백질이다. EBNA-2는 DNA와 결합하지 않는 일종의 전사 인자 (transcription factor)로 LMP-1 유전자와 EBNA 유전자들의 촉진자 (promoter)를 활성화시켜서 림프아세포주에서 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려졌고 또한 CD21, CD23, c-fgr등과 같은 B 림프구의 성장과 조절에 필요한 세포 유전자들을 활성화시킨다고 한다. LMP-1은 세포변형 실험에서 유일하게 직접 암유전자로 작용한다고 밝혀졌고, 또한 이것은 programmed cell death인 apoptosis를 억제하고, CD23과 intercellular adhesion molecule인 ICAM-1, LFA-1과 LFA-3등을 활성화시킨다고 한다. 현재까지 알려진 EBV 유전자 산물중 세포 변형에 가장 중요한 유전자로는 EBNA-2와 LMP-1을 들수 있다<sup>34,35</sup>.

중합효소 연쇄반응은 소량의 검체에서 특정 DNA

염기 서열을 찾아내는 강력한 방법으로 EBV의 잠복 감염시 항상 존재하는 EBNA-1을 primer로 EBV를 재동정하고 EBV 제 1형과 제 2형의 차이점인 EBNA-2를 encoding 하는 U2영역의 염기 서열의 차이를 이용하여 각각의 primer를 제조한 다음, 중합효소 연쇄반응을 이용한 유전자 증폭을 시행하였다. 결과는 증폭된 산물의 크기로 쉽게 판정할 수 있어서 EBV의 아형 분류가 가능하다<sup>37</sup>.

위에서 발생한 선암종 26예에 대해 EBERs 소식자를 이용한 *in situ* hybridization를 시행한 결과 6예에서 양성 교잡 신호가 관찰되어서 23%의 EBV 양성들을 보였는데 이것은 미국의 Shibata와 Weiss등<sup>21</sup>이 발표한 위선암종의 EBV 양성률 16% (22/138)와 일본의 Tokunaga등<sup>38</sup>이 보고한 6.9% (69/999)보다 더 높은 EBV 양성률을 보였다. 이러한 결과는 아마도 본 연구에서는 연구 대상 수가 적고, 위선암종중에서도 EBV 양성률이 높은 것으로 알려진 림프상피종양 선암종이 10예로 인위적으로 많이 포함되었기 때문이라고 생각된다.

EBV 양성인 위선암종 6예의 조직학적 유형을 보면, 관상형의 중등도 분화암이 2예, 고도분화성의 관상형이 1예, 저분화형이 2예, 그리고 반지세포형이 1예였다. 그러나 5예의 점액형에서는 모두 음성이었다. 본 연구에서는 26예의 위선암종중에는 종양 세포들 주위에 많은 림프구 침윤을 동반한 관상형과 저분화 암종중에서 림프상피종양 암종으로 분류된 10예가 포함되어 있는데 그중 3예에서 EBV양성을 보였다. 위에서 EBV의 연관성은 처음에는 타액선, 폐, 흉선에서와 마찬가지로 림프상피종양 암종에서만 보고되었으나<sup>15-17,19,20</sup> 최근에는 Shibata등<sup>21,38</sup>이 림프구 침윤이 없는 유형에서도 EBV와 연관성을 보고하였다. 본 연구에서도 림프구 침윤이 있는 암종뿐만 아니라 심지어는 반지세포형에서도 EBV가 확인되었고 이는 외국의 최근 연구 결과와 일치하는 소견이다. 따라서 위의 선암종에서는 조직학적 유형에 관계없이 EBV와 연관되는 것을 알 수 있고, EBV양성인 6예중 3예가 림프구 침윤이 많은 유형이나 림프상피종양 암종이어서 이런 유형에서 더 빈번히 EBV와 연관성을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

위선암종의 중합효소 연쇄 반응에 의한 EBV 아형 분류에서 *in situ* hybridization에 양성 교잡 신호를 보였던 6예중 4예에서만 EBV 아형 분류가 가능하였다. 아형 분류가 되지 않은 경우를 보면, 관상

형 위선암 1예에서는 EBNA-1과 EBNA-2 primer에 대해 모두 유전자 증폭이 되지않았고, EBER 양성인 반지세포형 위선암은 EBNA-1에 대해 유전자 증폭이 되었지만 EBNA-2A와 EBNA-2B에 음성 소견을 보여서 아형을 분류할 수 없었다. 아형 분류가 가능한 4예를 살펴 보면 관상형이면서 림프상피종양형 1예, 저분화형이면서 림프상피종양형 1예와 저분화형 1예등 3예에서 EBNA-1과 EBNA-2A에 유전자 증폭이 되어서 제 1형으로 분류되었다. 그리고 분화가 좋은 관상형 1예에서 EBNA-1과 EBNA-2B에 유전자 증폭이 되어 제 2형으로 분류되었다. 따라서, 위선암에서는 제 1형 EBV가 제 2형 보다 더 많이 검출되는 것을 알 수 있었다. 이런 결과는 위선암종에 대한 외국의 연구 결과가 없어서 비교하기 힘들지만 미국의 Sixbey등<sup>26</sup>이 건강한 성인과 면역 저하 환자의 타액에서 한 연구 결과는 제 1형과 제 2형이 거의 같은 빈도로 검출되었고 두 아형을 동시에 가진 경우도 있다고 보고하였다. 반면에, 최근 일본의 Kunimoto등<sup>37</sup>은 건강한 성인과 다양한 형태의 편도선염 환자의 타액을 이용한 연구에서는 EBV 제 1형이 전체 대상의 20~44%로 1~6%의 제 2형 보다 훨씬 많다고 보고하였고 중복 감염된 경우는 없었다고 하였다. 이런 결과는 EBV의 아형이 지역적으로 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 본 연구 결과 위선암종에서는 제 1형 EBV가 제 2형 보다 많이 검출되었고 제 2형도 1예에서 발견되었다. 그러나 중복 감염을 보인 예는 없었다. Rickinson등<sup>24</sup>은 제 1형 EBV가 제 2형 보다 좀더 효과적으로 숙주 세포를 계속해서 증식시킨다고 보고하였는데, 이런 점에서 위선암종에서 제1형이 많이 검출된다는 사실은 20% 내외의 높은 EBV 양성률과 더불어 위선암종의 발암 과정에서 EBV의 관련성 여부에 시사하는 바가 크다. 그러나 본 연구대상 증례수가 너무 적고 위선암종에서 EBV가 위선암종이 발생한 후 감염된 것이 아니라 발암 과정에 관여한다는 사실을 증명하기 위해서는 이에 대한 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

위의 악성림프종에서 EBV 양성률을 보면 11예중 2예 (18%)로 선암종의 빈도에 비해 높지 않았으며 1예는 T 세포형이었다. 면역저하 환자에서 발생한 악성림프종이 아닌 위에서 발생한 일차성 악성림프종에서 EBV의 연관성에 관한 연구는 매우 적는데 독일의 Otto등<sup>39</sup>은 55예중 3예 (5.5%)에서 EBV 양성



물을 보고하였다. 최근에는 홍콩의 Hui 등<sup>40</sup>이 위에서 발생한 악성림프종 61예중 11예 (18%)에서 EBER 양성을 보고하였는데 11예중 9예가 B 세포형이었고 나머지 2예가 T 세포형이었다고 한다. 또 B 세포형은 대부분 미만성 대세포형이었고 서양에 비교적 흔한 형으로 알려진 mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)형은 한 예도 없었다고 한다. 국내에서는 이 등<sup>41</sup>이 28예중 8예의 양성률 (29%)을 보고하였는데 이들 28예중 T 세포형 1예에서도 EBV 양성을 보고하였다. 정상 성숙 T 림프구는 정상 B 림프구와는 달리 EBV의 세포내 침입에 필요한 CD21 분자를 가지고 있지 않으며, 비록 T 림프구를 EBV DNA로 transfection 시키면 EBV의 replication은 유지하나<sup>42</sup>, T 림프구는 EBV의 숙주 세포가 아닌 것으로 알려져 왔다. 1988년에 Jones 등<sup>43</sup>은 3예의 EBV와 연관된 T 세포형 악성림프종을 보고하였는데 흥미롭게도 이중 2예에서의 종양 세포에서 정상 T 림프구에는 없는 CD21 분자를 가지고 있었다고 한다. 이러한 국내의 결과와 본 연구 결과를 비교해 보면 연구 대상 수는 적었지만 외국에 비해 국내의 악성림프종에서 EBV 양성률이 다소 높은 것을 알 수 있고, B 세포형 뿐만 아니라 T 세포형에서도 EBV가 검출되는 것을 확인하였다.

위에서 발생한 악성림프종의 아형 분류는 EBER에 양성인 2예중 1예에서는 EBNA-1에 유전자 증폭이 되었으나 2예 모두에서 EBNA-2A, EBNA-2B에 중합효소 연쇄반응에 유전자 증폭이 되지 않아서 아형 분류를 할 수 없었다. 이와같은 결과가 파라핀 포매된 조직에서의 DNA 추출에서의 가장 큰 문제인 DNA의 분절때문인지는 알 수 없으나 이에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

대장의 선암종 24예중 2예에서 EBERs *in situ* hybridization에 약한 양성 반응을 보였으나 EBNA-1을 primer로 이용한 중합효소 연쇄반응에서 2예 모두 유전자 증폭이 되어 8.3%의 EBV 양성률을 보였다. 그리고 1예에서 EBV 제 2형으로 분류되었다. 이러한 결과는 국내외의 연구가 거의 없어서 비교할 수 없지만 대장의 선암종에서도 위의 선암종보다는 적은 빈도지만 EBV가 검출되었다는 사실에 주목할 필요가 있다고 생각된다.

한편 회장을 포함한 대장의 악성림프종 6예에서 모두 EBV가 검출되었고 그중 4예에서 EBV 제2형으로 분류되었다. 국내에서 이 등<sup>41</sup>의 연구에 의하면

회장에 발생한 악성 림프종 9예중 1예 (11%)에서 EBER에 양성되었고 대장의 악성림프종 8예중 3예 (38%)에서 EBV 양성을 보였다. 악성림프종을 포함한 145예의 림프증식성 질환을 대상으로한 고등<sup>44</sup>의 연구에 따르면 악성림프종 72예중 21예 (29.2%)에서 EBV 양성을 보였고 이중 제2형 EBV가 대부분이었다고 보고하였다. 위장관 악성림프종 10예중 장관에서 발생한 T 세포형 악성림프종 1예에서 EBER에 양성 교잡 신호를 보였고 제 2형으로 분류되었다. 이러한 보고는 본 연구 결과와 일치되는 소견으로 제 1형이 제 2형 EBV보다 숙주 세포의 증식 능력이 커서 면역 저하 환자나 세포 면역의 이상이 있는 Hodgkin병에서는 제 2형 EBV가 주로 검출되고 일차성 악성림프종에는 제 1형 EBV가 많을 것이라는 단순한 예상과 반대의 결과이다. 본 연구에서도 위선암종은 주로 제 1형 EBV가 제 2형EBV보다 많이 검출된 반면에 대장의 악성림프종에서는 주로 제 2형 EBV가 검출되었다. 이러한 양상이 단순히 EBV의 아형이 침범하는 장기에 따라 다르고 발암 과정에 어떤 차이가 있는지 아니면 단순히 지역적으로 차이가 있는지를 아는 것은 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

위장관의 선암종과 악성림프종에서 EBV 동정하는데 있어 대부분의 연구에서는 중합효소 연쇄 반응법이 *in situ* hybridization보다 민감도에 있어 높은 방법이라고 보고를 하였지만 중합효소 연쇄 반응법에 의한 EBV 동정은 위장관의 병변에 흔히 침윤하는 림프구에서도 양성으로 검출될 수 있으므로 일차적으로 EBERs *in situ* hybridization으로 일차 검사를 하는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 오히려 중합효소 연쇄반응이 민감도에서 다소 낮았는데 이는 포르마린 고정 파라핀 포매 조직에서의 DNA추출의 어려움, 추출된 DNA의 분절과 Taq 중합효소 활성 억제 물질의 작용에 기인한다고 생각된다.

p53 종양억제 유전자의 돌연변이는 대장암, 폐암, 유방암등을 포함한 여러 인체 종양에서 볼 수 있는 가장 흔한 유전자의 이상이다. 여러가지 원인에 의한 야생형 p53 유전자의 돌연변이는 암 억제 기능을 상실하게되고 결국 종양 발생에 기여한다고 알려져있다<sup>45</sup>. EBV 연관 종양들에서 EBV의 유전자 산물과 p53 유전자의 돌연변이와의 상관 관계를 간접적으로나마 알기위해 EBV와 관련된 암종과 관련되지 않은 종양들 간의 돌연변이형 p53 단백질의 축적



정도를 비교하였다. 연구 결과, 위장관의 선암종 및 악성림프종에서 EBV가 양성인 종양이 EBV가 검출되지 않은 종양에 비해 p53 발현율이 높았으나, EBV가 검출된 선암종은 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 한편, 외국의 연구에서 보면, 홍콩의 Lo등<sup>46</sup>은 비인두암종 38예에서 모든 예에서 p53의 돌연변이를 발견할 수 없었다고 보고하였고, 1994년 Edward등<sup>47</sup>은 Burkitt 림프종과 EBV관련 악성림프종을 대상으로 한 연구에서 Burkitt 림프종은 p53 돌연변이가 관찰되었지만 면역저하 환자에서 발생한 대부분의 B 세포형 악성림프종에서는 p53의 돌연변이를 보이지 않았다고 한다. 최근에는 야생형 p53 단백질이 EBV의 잠복 감염에서 세포 용해기로 전환시키는 역할을 한다고 알려진 transcriptional activator인 EBV Z 단백질 (BZLF-1)과 단백질간의 직접적인 상호 작용을 통해서 세포 용해기의 바이러스 복제를 조절한다고 알려졌다. 야생형 p53 단백질이 lytic viral origin (ori-Lyt)의 중요한 부위에 직접 결합하여 Z 단백질의 EBV 재활성화를 억제하며, 반대로 Z 단백질은 현재까지 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 야생형 p53의 발암 억제기능을 억제하므로써 발암에 기여한다고 한다<sup>31</sup>. 따라서 EBV양성 종양과 p53 유전자의 돌연변이의 직접적인 상관 관계는 희박하고 오히려 야생형 p53 단백질과 EBV의 BZLF-1과의 상호 작용에 관심이 집중되고 있다. 이러한 연구 결과는 본 연구에서 EBV가 검출된 위장관 선암종과 EBV 음성인 선암종과의 돌연변이형 p53 단백질 발현율이 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않은 점에 비추어 본 연구 결과와 어느 정도 일치하는 사실이라고 할 수 있다. 그러나 본 연구 결과로 위장관의 선암종이 p53의 돌연변이와 무관하다고 단정짓기는 힘들다. 왜냐하면 위장관의 선암종은 EBV 감염 유무와 상관 없이 p53의 돌연변이를 흔히 동반하는 암종으로 알려져 있을 뿐 아니라 p53단백에 대한 면역조직화학 염색과 p53 유전자의 돌연변이가 반드시 일치하지 않기 때문이다. 따라서 EBV양성 종양과 돌연변이형 p53의 상관 관계를 밝히려면 보다 정확한 p53유전자에 대한 염기서열 분석법을 시행할 필요가 있다.

## 결 론

한국인의 위장관에서 발생하는 선암종 및 악성림

프종에서 EBV의 연관성을 규명하기 위해 26예의 위선암종과 11예의 악성림프종, 24예의 대장선암종과 6예의 악성림프종을 연구 대상으로 하였다. EBV를 동정하기 위해 파라핀 포매 조직을 이용한 EBV encoded RNA (EBERs)에 대한 *in situ* hybridization을 시행한 다음, 바이러스의 아형을 분류하기 위해 EBNA-1, EBNA-2A 및 EBNA-2B에 대한 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 또한 EBV의 유전자 산물과 암억제 유전자인 p53의 상호 관계를 규명하기 위해 p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 선암종은 위선암 26예 중 6예에서 EBV가 검출되어 대장선암의 24예 중 2예에서보다 EBV 양성률이 높은 반면, 악성 림프종에서는 장관 (6/6)에서 양성률이 위장 (2/6)에서 보다 높았다.

2) EBV 아형은 위장에서는 제1형과 제2형이 검출되었고, 소장 및 대장에서는 제2형만 검출되었다.

3) 위장관 암종에서 EBV를 검출하는데는 EBERs *in situ* hybridization이 중합효소 연쇄 반응 검사보다 비교적 쉽고 검출률이 높지만, 아형 분류를 위해서는 중합효소 연쇄 반응 검사를 함께 시행하여야 한다.

4) 위장관 선암종에서는 EBV 양성여부와 p53 단백질의 발현율 사이에는 차이가 없었으나 악성림프종에서는 EBV 양성 암종에서 p53단백 발현율이 높았다.

이상의 성적으로 한국인에서 발생하는 위장관의 선암종과 악성림프종의 일부에서는 EBV가 발암 기전에 관여할 수 있다는 가능성을 시사하며, 발생 부위와 암종의 유형에 따라 EBV 아형의 차이가 있는 것으로 생각되나 발암억제유전자인 p53과 EBV의 관계는 더욱 규명할 필요가 있다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-5.
2. Rowe M, Gregory C. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. In: Klein G ed. *Advances in viral oncology*, Vol 8 (Tumorigenic DNA Viruses). New York, NY: Raven Press, 1989: 237-58.
3. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med* 1990; 323: 1723-8.

4. Busson P, McCoy R, Sadler RI. Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1992; 66: 3257-62.
5. Young LS, Lau R, Rowe M. Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J Virol* 1991; 65: 2868-74.
6. Gilligan K, Rajadurai P, Resnick L. Epstein-Barr virus small nuclear RNAs are not expressed in permissively infected cells in AIDS-associated leukoplakia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8790-4.
7. Su I-J, Hsieh H-C. Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA: A clinicopathologic and molecular analysis. *Blood* 1991; 77: 799-808.
8. Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, et al. Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Engl J Med* 1985; 312: 1296-9.
9. Mcgruire LJ, Huang DP, Teoh R, Arnold M, Wong K, Lee JCK. Epstein-Barr virus genome in thymoma and thymic lymphoid hyperplasia. *Am J Pathol* 1988; 131: 385-90.
10. Saw D, Lau WH, Ho JHC, Chan JKC, Ng CS. Malignant lympho-epithelial lesion of the salivary gland. *Hum Pathol* 1991; 139: 469-74.
11. Krishnamurthy S, Lanier AP, Dohan P, Lanier JF, Henle W. Salivary gland cancer in Alaskan natives, 1966-1980. *Hum Pathol* 1987; 18: 986-96.
12. Mills SE, Austin MB, Randall ME. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the uterine cervix: a distinctive, undifferentiated carcinoma with inflammatory stroma. *Am J Surg Pathol* 1985; 9: 883-9.
13. Swanson SA, Cooper PH, Mills SE, Wick MR. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the skin. *Mod Pathol* 1988; 1: 359-65.
14. Butler A, Colby TV, Weiss L, Lombard C. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 1982; 13: 632-9.
15. Burke AP, Yen TSB, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990; 3: 377-80.
16. Min K, Holmouist S, Peiper SC, O'Leary TJ. Poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma (lymphoepithelioma-like carcinomas) of stomach. Report of three cases with Epstein-Barr-virus genome demonstrated by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 219-27.
17. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinoma with intense lymphoid infiltration. *Am J Pathol* 1991; 139: 469-74.
18. Gaffey MJ, Weiss LM. Viral oncogenesis: Epstein-Barr virus. *Am J Otolaryngol* 1990; 1: 375-81.
19. Weiss LM, Gaffey MJ, Shibata D. Lymphoepithelioma-like carcinoma and its relationship to Epstein-Barr virus. *Am J Pathol* 1991; 96: 156-8.
20. Watanabe H, Enjoh M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976; 38: 232-43.
21. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
22. Adldinger HK, Delius H, Freese UK, Clarke J, Bornkamm GW. A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* 1985; 141: 221-34.
23. Zimmer U, Adldinger MV, Lenoir GM, et al. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986; 154: 55-6.
24. Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987; 61: 1310-7.
25. Young LS, Yao QY, Rooney CM, et al. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* 1987; 68: 2853-62.
26. Sixbey JW, Shirley P, Chesney PJ, Buntin DM, Resnick L. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet* 1989; ii: 761-5.
27. Bargonetti J, Friedman PN, Kern SE. Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequence adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 1991; 65: 1083-90.
28. Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus E1B 55 Kd protein. *Nature* 1992; 357: 82-8.
29. Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM. Interaction of the HPV16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant p53 proteins. *J Virol* 1992; 66: 5100-10.
30. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, 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. 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.
32. Glickman JN, Howe JG, Steitz JA. Structural analyses of EBER 1 and EBER 2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 1988; 62: 902-11.
  33. Wu T-C, Mann RB, Epstein JI, et al. Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* 1991; 138: 1461-69.
  34. Farrel PJ. Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends Microbiol* 1995; 3: 105-9.
  35. Cohen JI, Tosato G, Meier J, Straus SE. Epstein-Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis, Management. *Ann Int Med* 1993; 118: 45-58.
  36. Langnecker R, Druker B, Roberts TM, Kieff F. An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol* 1991; 65: 3681-91.
  37. Kunimoto M, Tamura S, Tabata T, Yoshie O. One-step typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: predominance of type 1 in Japan. *J Gen Virol* 1992; 73: 455-61.
  38. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr Virus in Gastric Carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-4.
  39. Otto G, Kirchner TH, Seidl S, Muller-Hermelink HK. Primary gastric lymphoma is rarely associated with Epstein-Barr virus. *Virch Arch B Cell Pathol* 1993; 64: 287-91.
  40. Hui PK, Tokunaga M, Chan WY, Chi SN, Chow J, Lee JCK. Epstein-Barr associated gastric lymphoma in Hong Kong Chinese. *Hum Pathol* 1994; 25: 947-52.
  41. Lee SS, Kim CW, Jang JJ. Epstein-Barr virus in primary gastrointestinal lymphoma in non-immunocompromised patients. *Proceedings of the Fourth Korean-Japanese Lymphoreticular Workshop* 1993; 407-16.
  42. Stevenson M, Volsky B, Hedenskog M. Immortalization of human T lymphocytes after transfection of Epstein-Barr virus DNA. *Science* 1986; 233: 980-4.
  43. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318: 733-41.
  44. Ko YH, Lee JD. Distribution and subtypes of Epstein-Barr virus in non-neoplastic and neoplastic lymphoid tissue. *Proceedings of the Fourth Korean- Japanese Lymphoreticular Workshop* 1995; 397-405.
  45. Batsakis JG, El-Naggar AK. p53, Fifteen years after discovery. *Adv Anat Pathol* 1995; 71-88.
  46. Lo KW, Mok CH, Huang DP, et al. p53 mutation in human nasopharyngeal carcinomas. *Anticancer Res* 1992; 12: 1957-64.
  47. Edwards RH, Raab-Traub N. Alterations of the p53 Gene in Epstein-Barr Virus-Associated Immunodeficiency-Related Lymphomas. *J Virol* 1994; 1309-15.
-