

후두암종 및 비인두암종에서 p53 유전자와 Epstein-Barr 바이러스에 관한 연구

한림대학교 의과대학 병리학교실, ¹고려대학교 병리학교실

남은숙 · 김덕환 · 신형식 · 박영의 · 김영식¹ · 김인선¹

Epstein-Barr Virus and p53 in Laryngeal and Nasopharyngeal Carcinomas

Eun Sook Nam, Duck Hwan Kim, Hyung Sik Shin, Young Euy Park,
Young Sik Kim¹, and Insun Kim¹

Department of Pathology, College of Medicine, Hallym and ¹Korea University, Seoul 134-701, Korea

To investigate the correlation between EBV infection and p53 overexpression in laryngeal carcinomas (LC) and nasopharyngeal carcinomas (NPC) in Korea, we analyzed 37 laryngeal squamous cell carcinomas and 33 nasopharyngeal (11 squamous cell and 22 undifferentiated) carcinomas. We used the immunohistochemistry and polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) for p53 overexpression and p53 gene mutation, respectively, and EBER-1 *in situ* hybridization and PCR using primer for EBNA-1 and EBNA-2 type 1 and 2 for prevalence and the subtype of EBV. The results were as follows; 1) The p53 expression was found in 43.2% of squamous cell LCs, in 54.6% of squamous cell NPCs and in 22.7% of undifferentiated NPCs. The p53 gene mutation was detected in 6 of 23 squamous cell LCs and 3 of 14 undifferentiated NPCs. 2) EBV was detected more frequently in undifferentiated NPCs (95.5%) than in squamous cell NPCs (63.6%) and squamous cell LCs (37.0%). Only type 1 was found in squamous cell LCs and NPCs, whereas both type 1 and type 2 were detected in undifferentiated NPCs. 3) There was no difference according to EBV infection (EBV+ ; 7 cases, EBV- ; 7 cases) in the cases with p53 protein overexpression but mutation. From the above results, it can be concluded that squamous cell LCs and NPCs are associated with both p53 and EBV, whereas undifferentiated NPCs are more closely associated with EBV than p53. In Korea, both type 1 and 2 are detected in undifferentiated NPCs. Also, our result suggests that EBV infection does not seem to contribute to p53 overexpression. The interrelationship between EBV infection and p53 remains to be further defined. (Korean J Pathol 1998; 32: 551~562)

Key Words: Laryngeal carcinoma, Nasopharyngeal carcinoma, p53, EBV

서 론

종양억제 유전자인 p53은 인체 암과 관계되는 가장 흔한 유전자 이상으로 인체암의 약 반 수에서 p53의 돌연변이가 관찰된다.^{1,2} 두경부암종에서도 p53은 가장 흔히 변형을 보이는 유전자로 조직재료와 검출방법에 따

라 비정상적인 p53 유전자 산물이 33%에서 100%까지 존재한다고 한다.³ p53의 돌연변이에 의한 종양억제유전자로서 p53의 기능소실이 종양발생에 중요한 단계이며 약 87%정도가 과돌연변이로서 중심부의 소수성 영역에서 일어나고 exon 5와 9사이에 많다.⁴ p53 돌연변이가 일어나는 hot spot는 종양의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있으며 두경부암종에서 p53 돌연변이는 주로 exon 5와 exon 7에서 일어난다고 하나⁵ 미분화비인두암종에서는 비교적 p53 돌연변이가 드물다.⁶ 저자들은 돌연변이 p53을 검출하기 위해 형태학적인 관찰이 가능한 면역조직화학검사와 국소적인 유전자 이

접 수: 1998년 1월 12일, 게재승인: 1998년 5월 28일

주 소: 서울시 강동구 길동 445번지, 134-701

강동성심병원 해부병리과, 남은숙

ISSN : 0379-1149

상을 검출하기에 더 예민한 방법인 PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism) 방법으로 후두암종과 비인두암종에서 p53 단백질 발현율과 p53 유전자 돌연변이 빈도를 측정하였다.

한편 Epstein-Barr virus (EBV)는 Herpes virus에 속하는 이중 나선형의 DNA 바이러스로서 두경부 종양 중 비인두의 미분화암종에서는 거의 100% 검출되고 비인두의 편평상피 세포암종에서 25~72%, 비인두외의 두경부암종에서도 0~68.2%에서 검출되는 것으로 보고되고 있다.⁷⁻⁹ EBV는 핵단백질인 EBNA 2, 3A, 3B, 3C의 DNA 염기배열의 차이를 근거로 두가지 형태의 아형으로 분류하는데¹⁰ 지역적으로 차이가 있어 북미와 유럽, 아시아에서는 1형이 흔하고 아프리카와 알래스카 에스키모에게는 2형이 더 많은 것으로 알려져있고 두 아형이 동시에 중복감염이 된 경우도 보고되어 있으나¹¹ 국내에서는 두경부암종에서 EBV의 아형분류에 대한 연구가 미미한 실정이다. 본연구에서는 EBV-encoded small RNA (EBER)에 대한 소식자를 이용한 *in situ* hybridization 방법과 DNA 중합효소연쇄반응을 이용하여 viral DNA를 동정하였고 Epstein-Barr 바이러스가 확인된 예에서 EBV의 두가지 아형 중 어느 아형에 속하는지 확인하였다. 또한 p53 단백질이 SV 40의 T 항원, adenovirus E1b 유전자 산물 및 papilloma virus E6 종양 단백질 등과 함께 Epstein-Barr 바이러스 핵항원인 EBNA 5와 Z 단백질과 결합하여 상호 작용한다는 보고가 있어¹²⁻¹⁶ 두경부암종 중 비인두암종에서 p53 단백질 발현 및 p53 유전자 돌연변이가 EBV 감염과 관련이 있는지 알아보려고 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구 재료

연구재료는 1985년 1월부터 1995년 12월 까지 고려대학교 의과대학 안암병원에서 절제되어 진단된 후두암종 37예와 비인두암종 33예로 총 70예이며 후두암종은 모두 편평세포암종이었고 성문상악암종 24예, 성문암종 13예였다. 비인두암종은 편평세포암종 11예와 미분화암종 22예였다.

2. 연구 방법

1) p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색: 통상적인 면역조직화학적 염색법으로 일차항체는 쥐에서 만들어진 단클론성 항체 (Clone DO7, Signet, USA)로써 야생형과 돌연 변이형에 모두 반응할 수 있는 항체로 1 : 50으로 희석하여 사용하였고 이차 항체 및 발색은 Dako사의 Labelled streptavidin biotin kit를 사용하여 3,3-diaminobenzidine tetrachloride(DAB)로 발색하였다. 간략하면 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 슬라이드에 부착시켜 탈파라핀 및 함수과정을 거친 후 Citrate buffer에 슬라이드를 넣고 microwave oven에서 3분간 3회 끓인 후

0.05% saponin 용액으로 상온에서 30분간 전처리하였다. 3% 과산화수소액으로 30분간 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 다음 0.05M Tris buffer (pH 7.6)로 세척하고 정상혈청으로 20분간 비특이적 결합반응을 억제시켰다. 일차 항체를 가하고 4°C 냉장고에서 밤새 반응시켰다. Biotin과 결합된 이차항체에 20분간 반응시키고 세척한 후 streptavidin-horseradish peroxidase 용액을 가하고 20분간 반응시켰다. H₂O₂를 함유한 DAB용액에서 10분간 발색시켰다. Harris hematoxylin으로 15초간 대조 염색하고 탈수 후 봉입하였다. 결과 판정은 광학 현미경을 이용하여 p53 단백질 발현이 강하게 양성으로 염색된 부위를 선정하여 400배율 시야에서 2000개의 종양세포 중 양성 세포핵의 백분율을 산출하여 전혀 염색이 안된 경우나 5% 미만이면 음성, 5% 이상 50% 이하이면 (1+), 51% 이상이면 (2+)로 하였다.

2) p53 유전자에 대한 PCR-SSCP방법:

(1) 파라핀 포매조직에서 DNA추출: 파라핀 블록을 각각 10 μ m 두께로 2조각씩 박절한 후 1.5 ml tube에 넣은 다음 파라핀을 제거하기 위해 xylene 1 ml을 가한 후 5분동안 방치하였다가 12,000 rpm으로 7분간 원심분리하는 과정을 3회 반복한 후 무수에탄올 1 ml를 각각 가하고 5분간 방치한 후 7분간 원심분리하는 과정을 3회 반복하고 상온에서 완전히 시료를 건조시켰다. G'nome kit (Bio 101, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였는데 우선 cell suspension solution 0.9 ml, RNase 25 μ l, cell lysis/denaturing solution 50 μ l를 차례로 가한 후 잘 혼합하여 55°C에 15~30분간 방치하였다. 다시 protease 12.5 μ l를 가하고 잘 혼합하였다. Proteinase K 200 ug을 가한 후 55°C에서 24시간 방치하였다가 G'nome kit 중 saltout mixture 250 μ l를 가하고 10분동안 얼음에서 방치한 후 원심분리하여 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 버리고 상온에서 완전히 말려서 DNA pellet을 얻은 다음 100 μ l TE buffer로 녹인 후 DNA양을 측정하였다가 -20°C에 보관하여 template DNA로 사용하였다.

(2) 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction): p53은 exon 5, exon 6, exon 7, exon 8부위에 대해 PCR을 실시하였다. 증폭시킬 각 DNA 2 μ l (200~400 ng), 0.2 mM dNTP, 증류수, 10x buffer, 0.25 U Taq polymerase를 가하여 25 μ l되게 한 후 thermal cycler (Perkin Elmer 2, 400)을 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 60°C까지 25~45초, 72°C에서 30초간의 반응을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. PCR 양성대조군으로 추출한 DNA에서 β -globin에 대한 PCR을 동시에 실시하였다. 각 유전자에 대한 유전자 서열은 다음과 같다.

p53 exon 5 sense : 5' TACTCCCCTGCCCTCAACAA 3'
 antisense ; 5' CATCGCTATCTGAGCAGCGC 3'
 exon 6 sense ; 5' GCTTGGCCCCTCCTCAGCAT 3'
 antisense ; 5' CTCAGGCGGCTCATAGGGCA 3'
 exon 7 sense ; 5' TCTGACTGTACCACCATCCA 3'
 antisense ; 5' CTGGAGTCTTCCAGTGTGAT 3'
 exon 8 sense ; 5' TGGTAATCTACTGGGACGGA 3'
 antisense ; 5' CGGAGATTCTTCTCTCTGT 3'

(3) **Single stranded conformational polymorphism (SSCP)**; PCR산물을 10 μ l를 취해 끓이면서 변성시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음, 5% glycerol을 포함한 12% polyacrylamide gel에서 250 V로 5시간 전기영동한다. 전기영동이 끝난 gel은 10% 에탄올로 10분간 고정시킨후 은 염색 방법으로 DNA single strand pattern을 확인한다. 먼저 gel을 1% nitric acid에서 3분 담근 다음 증류수 100 ml을 가해 세척한다. 다시 0.2% silver nitrate용액 100 ml상에서 20분간 반응시킨 후 발색용액 (0.28 M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde)에서 band가 뚜렷이 보일때까지 반응시킨다. 양성대조군으로 정상인의 혈구세포에서 분리한 DNA를 이용하여 SSCP band 양상을 비교검토하였다.

3) Epstein-Barr virus encoded RNA-1 (EBER-1)에 대한 in situ hybridization 방법:

(1) **기구 및 시약 처리**; 모든 기구는 121°C 에서 15분간 고압멸균한 후 95% ethanol로 헹구고 3% H₂O₂에 10분간 담 구어 둔다. 마지막으로 0.1% diethylpyrocarbonate/distilled water (DEPC/DW)로 씻는다. DEPC/DW 는 증류수를 고압멸균하여 DEPC가 0.1%되도록 하루밤정도 녹였다.

(2) **실험방법**; 4~5 μ m 두께로 박절한 조직절편을 lysine으로 처리한 유리 슬라이드에 부착시킨 후 탈파라핀 합수화 과정을 거친 다음, 공기중에서 유리 슬라이드를 말린 후 핵산이 잘 노출될 수 있도록 proteinase K (10 μ g/ml)에 37°C에서 20~30분간 반응시킨 후 0.1% DEPC/DW 용액으로 세척하였다. 95%와 99% ethanol에 순차적으로 탈수과정을 거친 다음 실온에서 말렸다. 교잡반응은 DAKO사의 FITC로 표지된 EBER-1에 대한 oligonucleotide probe 1~2 방울을 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 37°C humidified chamber에서 2시간 반응시킨 다음 T1 완충액(0.1% Triton X-100을 함유한 0.005M Tris 완충액)에서 1시간 동안 담가놓아 coverslip이 떨어지도록 하였다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 20% 정상가토혈청을 함유한 완충액에 10분간 담가놓은 후 3% bovine serum albumin과 0.005M Tris 완충액으로 100배 희석한 항-FITC/Alkaline phosphatase 시약을 실온에서 30분간 반응시켰다. T1 완충액으로 세척한 후 발색제가 조직에 잘 침투해서 반응하도록 하는 alkaline

substrate 완충액 (MgCl₂와 NaCl을 함유한 pH 9.0인 Tris 완충액)에서 5분간 반응시켰다. 발색제로 사용한 nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolphosphate (BCIP)와 내재성 alkaline substrate를 억제하기 위해 추가한 levamisole (1 μ l/ml)의 혼합용액을 alkaline substrate 완충액으로 50배 희석하여 만든 용액에 30분에서 1시간 동안 반응시킨 후 T1 완충액으로 세척하였다. Ethyl green으로 30분간 대조염색 한 후 흐르는 물에 세척하고 봉입하여 검경하였다.

4) Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)에 대한 중합효소연쇄반응:

(1) **파라핀 포매조직에서 DNA 추출**; 파라핀 포매조직으로부터 DNA 추출 방법은 상기 기술한 방법과 동일하다.

(2) **Epstein-Barr virus 존재확인**과 아형분류를 위한 primer 선택; 사용한 각각의 primer는 다음과 같다.

EBNA-1	sense 5' TGATAACCATGGACGAGGAC 3'
	antisense 5' CTTCAAGTTGCATGGCTGC 3'
EBNA-2 common	sense 5' AGGGATGCCTGGACACAAGA 3'
	antisense 5' TGTGCTGGTGCTGCTGGTGGT 3'
EBNA-2 type 1	sense 5' AGGGATGCCTGGACACAAGA 3'
	antisense 5' TGGTGACAGAGGTGACAAAT 3'
EBNA-2 type 2	sense 5' AGGGATGCCTGGACACAAGA 3'
	antisense 5' YYGAAGAGTATGTCCTAAGG 3'

(3) **중합효소연쇄반응**; p53의 돌연변이검사를 위해 추출된 DNA에서 β -globin 유전자에 대한 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응을 시행하여 DNA가 잘 추출된 검체에서 EBNA-1, EBNA-2 1형, EBNA-2 2형, EBNA-common에 대한 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. Eppendorf tube에 10x dNTP 2 mM, 10x PCR buffer, 15 mM MgCl₂, Taq polymerase 1unit/25 μ l의 PCR반응액을 넣고 200~500 ng template DNA와 본 연구에서 사용 될 primer를 각각 가하여 최종적으로 반응액을 25 μ l로 하였다. 중합효소반응의 조건은 처음에 95°C에서 5분간 denaturation한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 반복한 후 마지막에 72°C에서 5분간 extension을 하였다. 아형분류를 위한 대조로는 B95-8 cell line을 type 1 양성대조로, Jijoye cell line을 type 2 양성대조로 사용하였다. 음성대조로는 template DNA를 가하지 않은 반응액을 사용하였다.

(4) **PCR산물의 확인**; 얻어진 중합효소 반응산물을 20 μ g ethidium bromide가 함유된 1.2% agarose gel에 loading dye와 함께 10 μ l씩 각각 부가한 후 100 V에서 20~25분간 전기 영동시킨 다음 UV transilluminator 로 band를 확인하고 polaroid 사진기로 촬영하였다.

5) **통계처리**: 의학통계 프로그램인 BMDP의 Chi-

square test 및 Fisher's-exact test로 p value를 구하였다.

결 과

1. 후두암종 및 비인두암종에서 p53 단백 발현물 및 유전자 돌연변이 빈도

1) 면역조직화학검사로 검출된 p53 단백 발현물: 후두의 편평세포암종 37예 중 p53 단백질이 2+ 양성으로 발현된 예는 4예, 1+ 양성으로 발현된 예는 12예로 모두 16예에서 양성이었으며 43.2%의 발현율을 나타내었다 (Table 1). 염색은 주로 핵내에서만 관찰되었으며 2+양성인 경우 강하게 균질으로 염색되었고 1+ 양성인 경우는 계개로 염색되는 경우가 많았으며 염색의 강도가 약하였다. 주위의 정상점막과 염증세포에서는 염색되지

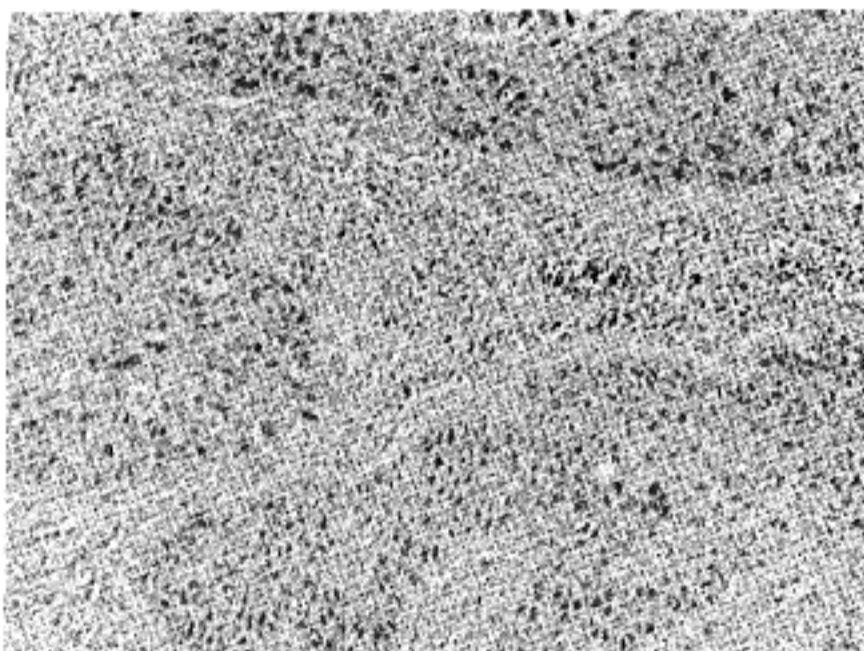


Fig. 1. Immunohistochemical stains for p53 protein. The brown nuclear stains are seen in most tumor cells (2+) of squamous cell carcinoma of larynx (ABC method).

않았다 (Fig. 1). 조직학적등급에 따른 차이를 보면 고도 분화암종은 2+ 양성인 예가 1예, 1+ 양성인 3예로 양성으로 발현된 경우는 총 4예 (40%)였으며, 중등도 분화암종 중 2+ 양성인 3예, 1+ 양성인 9예로 양성발현을 보인 예는 총 12예 (44.4%)였다. 발생부위에 따른 차이를 보면 성문상악암종은 2+ 양성인 3예, 1+ 양성인 5예로 총 8예 (33.4%)였으며 성문암종은 2+ 양성인 1예, 1+ 양성인 7예인 총 8예 (61.5%)로 성문상악암종보다 양성율이 높았으나 후두암종에서 조직학적 분화도와 발생부위에 따른 p53단백의 발현율에는 통계학적인 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

비인두암종 33예 중 p53 단백질에 2+ 양성인 3예, 1+ 양성인 8예로 양성발현을 보인 경우는 모두 11예 (33.3%)였고 후두암종에서보다 발현율이 낮았으나 통계학적인 의의는 없었다 ($p > 0.05$) (Table 2). 비인두의 편평세포암종에서는 2+ 양성인 2예, 1+ 양성인 4예로 총 6예 (54.5%)가 양성이었으며 미분화비인두암종 중 2+ 양성인 1예, 1+ 양성인 4예로 총 5예 (22.7%)에 해당하였다. 비인두암종 중 미분화암종보다 편평세포암종에서 p53 단백질의 발현율이 의미있게 높았다 ($p < 0.05$).

세포유형에 따른 차이를 보면 후두와 비인두의 편평세포암종 총 48예 중 22예 (45.8%)에서 양성반응을 보인 반면 미분화암종에서는 22예 중 5예 (22.7%)만이 양성으로 편평세포암종에서의 발현율보다 낮았으며 약한 통계학적인 의의가 있었다 ($p = 0.0652$).

2) PCR-SSCP 방법으로 검출된 p53 유전자 돌연변이: 중합효소연쇄반응법에 의해 exon 5, 6, 7, 8 에서 모두 유전자 증폭이 잘 되어 SSCP를 시행할수 있었던 예는 후두암종 23예, 비인두암종 14예로 총 37예였다. 본 실험에서 p53 돌연변이는 모두 9예 (24.3%)에서 발견되었으며 exon 5에 6예, exon 7에 3예가 관찰되었으며 두개 이상의 exon에서 발견된 경우는 없었고 exon 6과 exon

Table 1. p53 protein overexpression and gene mutation in squamous cell carcinomas of larynx

	No. of cases	Immunohistochemical stain of p53 protein			No. of positive cases(%)	P	PCR-SSCP		
		-	+	++			Exon 5	Exon 7	No. of mutation/total(%)
Histologic grade									
WD	10	6	3	1	4(40.0)	NS	3	1	4/7(57.1)
MD	27	15	9	3	12(44.4)		1	1	2/16(12.5)
Site									
Supra	24	16	5	3	8(33.4)	NS	2	1	3/14(21.4)
Glottic	13	5	7	1	8(61.5)		2	1	3/9(33.3)
Total(%)	37	21(56.8)	12(32.4)	4(10.8)	16(43.2)		4	2	6/23(26.0)

WD: well differentiated, MD: moderately differentiated, Supra: supraglottic carcinoma, Glottic: glottic carcinoma, PCR-SSCP: polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism, P: p value, NS: non significant

Table 2. p53 protein overexpression and gene mutation in nasopharyngeal carcinomas

Histologic type	No. of cases	Immunohistochemical stain of p53 protein			No. of positive cases(%)	P	PCR-SSCP		
		-	+	++			Exon 5	Exon 7	No. of mutation/total(%)
SCC	11	5	4	2	6(54.5)	<0.05	0	0	0/2(0)
UC	22	17	4	1	5(22.7)		2	1	3/12(25.0)
Total(%)	33	22(66.7)	8(24.2)	3(9.1)	11(33.3)	NS ^a	2	1	3/14(21.4)

SCC: squamous cell carcinoma, UC: undifferentiated carcinoma, P: p value, NS^a: Non significant in p value of p53 expression between laryngeal vs nasopharyngeal carcinoma

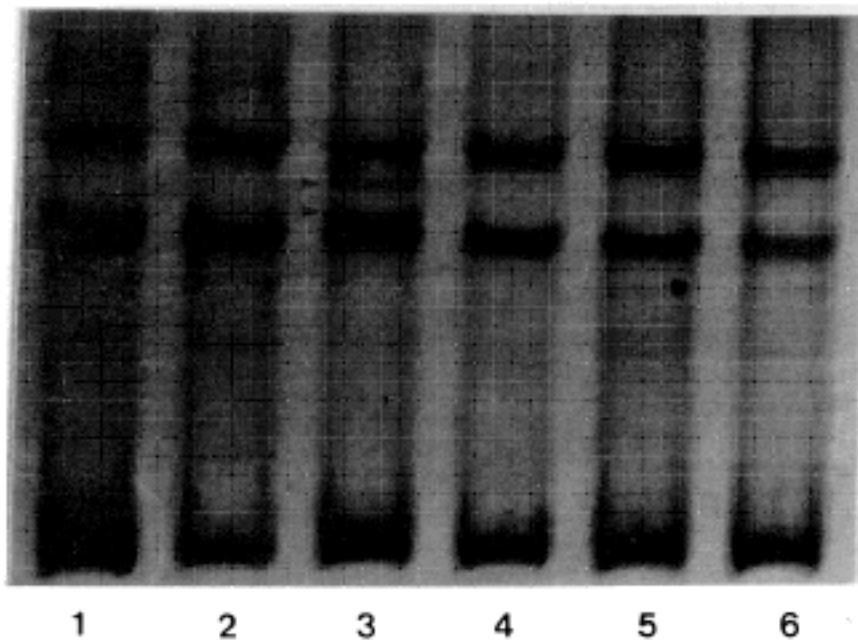


Fig. 2. Detection of p53 gene mutations by PCR-SSCP analysis for exon 5. Arrowheads in lane 3, denote the bands with mobility shift relative to control electrophoresis (Lane 1,2; normal control, Lane 3 to 6; squamous cell carcinoma of larynx).

8에서는 돌연변이가 관찰되지 않았다.

후두암종에서 p53 돌연변이가 총 6예 (26.0%)에서 관찰되었고 exon 5에 4예, exon 7에 2예 발견되었으며 비인두암종에서 p53 돌연변이는 미분화암종에서만 3예 (21.4%)에서 관찰되었는데 이는 exon 5에 2예, exon 7에 1예였다 (Table 1, Table 2, Fig. 2).

3) 면역조직화학염색에 의한 p53 단백질 발현율과 PCR-SSCP방법에 의한 p53 유전자 돌연변이 검출률과의 차이: 본 연구에 사용된 총 70예 중 면역조직화학검사에서 p53 단백질의 발현율은 38.6%였으며 PCR-SSCP방법으로 검출된 돌연변이 빈도는 24.3%였다. 면역조직화학검사에서 p53 단백질에 양성으로 발현되고 동시에 PCR-SSCP방법에서 돌연변이가 검출된 경우는 총 37예 중 1예로 2.7%였으며, 두 검사 모두에서 음성반응을 보인 예는 14예로 37.8%로 두 검사의 일치율은 40.5%였다.

2. 후두암종 및 비인두암종에서 EBV 양성률과 아형분류

1) 후두암종에서 EBV 양성률 및 아형분류: 후두암종 중 EBV가 확인된 예는 37예 중 10예로 37.0%에 해당되었으며 그 중 2예가 1형으로 분류되었으며 조직학적 등급과 부위에 따른 차이는 없었다 (Table 3).

조직학적 등급에 따른 차이를 보면 고도분화암종 3예 (30.0%)에서 EBER-1에 대한 *in situ* hybridization에 양성이었으며 염색은 주로 세포핵에서 양성반응을 보였는데 핵소체를 제외한 부위에 강하게 염색되었으며 주위 정상점막과 염증세포에서는 음성이었다. 중합효소연쇄 반응법에 의한 EBV의 동정 및 아형분류는 10예 모두에서 EBNA-1에 유전자 증폭이 되지 않았다. 중등도 분화암종은 EBER-1에 4예만이 양성반응을 보였고 이 중 3예와 EBER-1에 음성반응을 보였던 3예에서 EBNA-1에 유전자 증폭이 되었으며 EBNA-2 type1에 증폭된 경우가 2예로 type 1으로 분류되어 EBV가 확인된 예는 총 7예 (25.9%)였으며 고도분화암종보다 양성율이 낮았으나 통계적 의의는 없었다 ($p > 0.05$).

발생부위에 따른 차이를 보면 성문상역암종에서는 6예에서 EBER-1에 양성반응을 보였고 이 중 3예에서 EBNA-1에 증폭이 되었고 EBER-1에 음성이었던 2예에서 EBNA-1에 양성 반응을 보였고 EBNA-2 type 1에 2예가 증폭되어 type 1으로 분류되었으며 EBV가 확인된 예는 총 8예 (33.2%)였다. 성문암종은 EBER-1에 1예에서 양성반응을 보였고 EBNA-1에서도 EBER-1에 음성이었던 1예에서 증폭을 보였으나 EBNA-2에는 증폭을 보이지 않았다. EBV가 확인된 예는 총 2예 (15.4%)였고 성문상역암종보다 양성율이 낮았으나 유의성은 없었다 ($p > 0.05$).

2) 비인두암종에서 EBV 양성률 및 아형분류: 비인두암종 총 33예 중 EBV가 확인된 예는 28예 (84.8%)로 후두암종의 EBV 양성률 (37.0%)보다 의미있게 높았으며 ($p < 0.05$), type 1이 6예, type 2가 5예였다 (Table 4). 편

Table 3. Positivity and subtype of EBV in squamous cell carcinomas of larynx

Histologic grade	No. of cases	EBER-1	EBNA-1	EBNA-2		No. of positive cases(%)	P
				type 1	type 2		
WD	10	3	0	-	-	3(30.0)	NS
MD	27	4	6	2	-	7(25.9)	
Site							NS
Supra	24	6	5	2	-	8(33.2)	
Glottic	13	1	1	-	-	2(15.4)	
Total(%)	37	7(18.9)	6(16.2)	2	-	10(37.0)	

SCC: squamous cell carcinoma, WD: well differentiated, MD: moderately differentiated, Supra: supraglottic carcinoma, Glottic: glottic carcinoma, P: p value, NS: non significant

Table 4. Positivity and subtype of EBV in nasopharyngeal carcinomas

Histologic type	No. of cases	EBER-1	EBNA-1	EBNA-2		No. of positive cases(%)	P
				type 1	type 2		
SCC	11	7	1	1	-	7(63.6)	<0.05
UC	22	20	12	5	5	21(95.5)	
Total(%)	33	27(81.8)	13(39.4)	6	5	28(84.8)	<0.05 ^a

SCC: squamous cell carcinoma, UC: undifferentiated carcinoma, P: p value, ^a: p value of EBV positivity between laryngeal vs nasopharyngeal carcinoma

평세포암종은 EBER-1에 7예가 양성반응을 보였고 그 중 1예에서 EBNA-1에 양성이었다고 EBNA-2 type 1에 증폭을 보여서 7예 (63.6%)에서 EBV가 확인되었다. 미분화암종 중 20예가 EBER-1에 양성이었으며 (Fig. 3). 그 중 11예와 EBER-1에 음성되었던 1예에서 EBNA-1에 유전자 증폭이 있었고 이 중 EBNA-2 type 1에 5예, EBNA-2 type 2에 5예가 증폭되어 1형과 2형이 각각 5예씩으로 분류되었다 (Fig. 4). 미분화암종에서 EBV가 확인된 예는 총 21예(95.5%)에 해당되었으며 편평세포암종에서보다 의미있게 높았다 (p<0.05).

3) 편평세포암종과 미분화암종에서 EBV 양성률의 차이: 후두와 비인두의 편평세포암종 총 48예 중 17예 (35.4%)에서 EBV가 확인되었고 1형만 3예 분류되었으나 미분화암종에서는 22예 중 21예 (95.5%)로 편평세포암종에 비해 의미있게 높았으며 (p<0.05), 1형과 2형이

각각 5예씩 분류되었다.

4) EBER-1에 대한 *in situ* hybridization과 DNA 중합효소 연쇄반응에 의한 EBV DNA 동정과의 차이: 총 70예 중 EBER-1에 양성율은 54.3%였고 EBNA-1에서 양성률은 27.1%였다.

EBER-1에 양성되었고 EBNA-1에도 증폭을 보인 예는 15예로 21.4%였으며 두 검사에서 모두 음성반응을 보인 예는 32예 (45.7%)로 일치율은 67.1%였다.

3. EBV 양성 종양에서 p53 발현과의 상관관계

후두암종 중 EBV가 확인된 10예 중 면역조직화학검사에서 p53 단백질은 4예 (40.0%)에서 발현되었으며 EBV에 음성인 27예에서는 12예 (44.4%)에서 p53 단백질이 발현되었다. 비인두의 편평세포암종 중 EBV가 확인된 7예 중 p53 단백질은 4예 (57.1%)에서 발현되었고 EBV가

음성인 4예에서는 2예 (50.0%)에서 발현되었다. 비인두 미분화암종 중 EBV가 확인된 21예 중 p53 단백질에 양성인 예는 4예 (19.1%)였고 EBV가 음성인 1예에서도 p53 단백질이 발현되었다. 후두 및 비인두의 편평세포암종과 미분화암종에서 EBV양성 유무에 따른 비정상 p53 발현 유무의 차이는 통계학적인 의의는 없었다 ($p > 0.05$). p53 단백질 발현은 있었으나 PCR-SSCP 방법에서 p53 돌연변이가 검출되지 않았던 예 중 EBV가 양성파 음성인

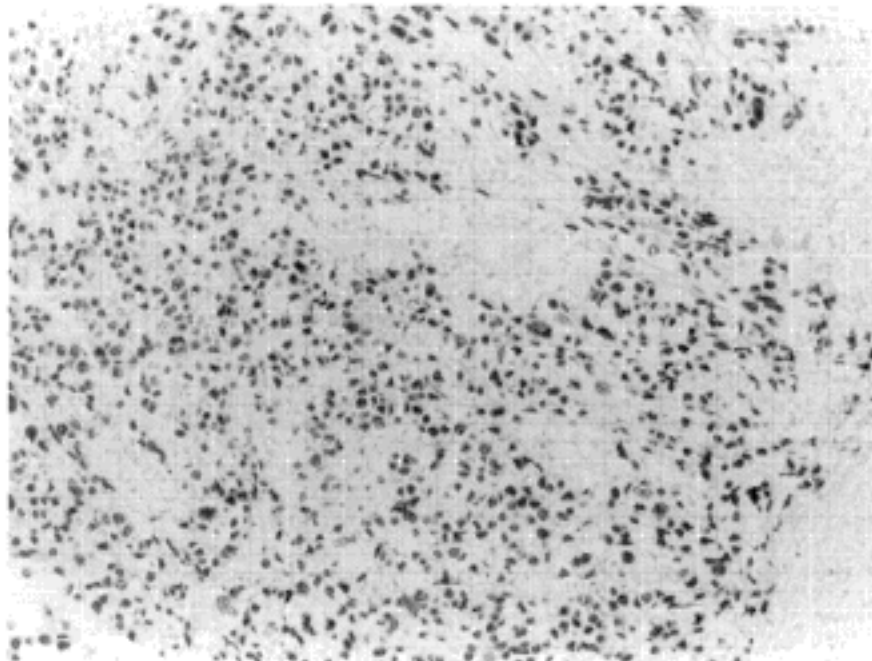


Fig. 3. EBER-1 *in situ* hybridization. Dark EBER-1 hybridization signals are seen in the nuclei of tumor cells of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma.

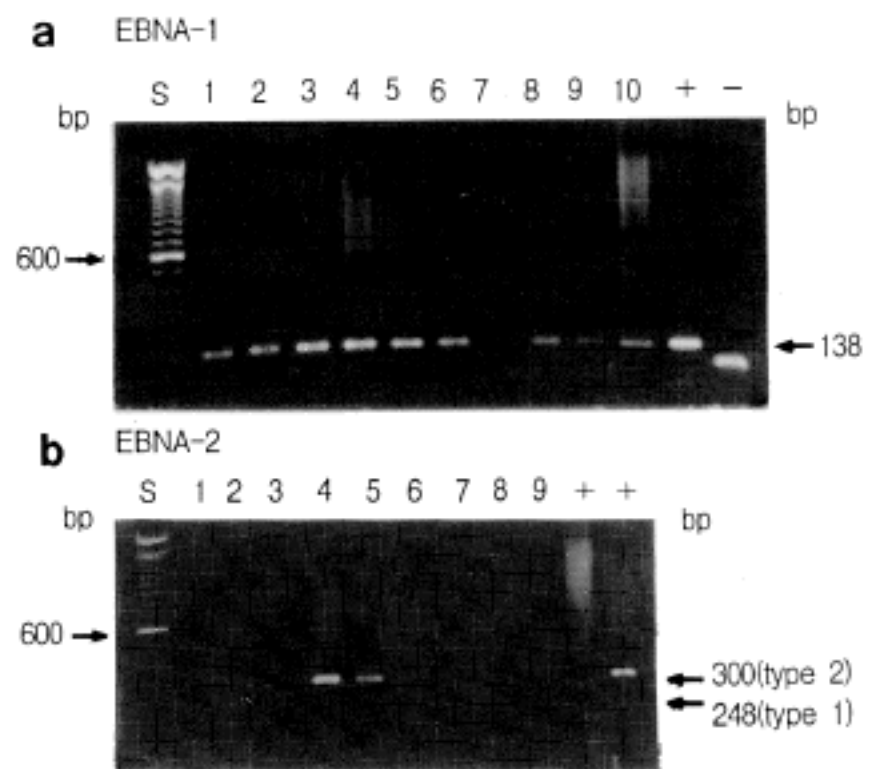


Fig. 4. PCR detection and subtyping of EBV; PCR amplifications using primer EBNA-1, EBNA-2 type 1, EBNA-2 type 2 were performed. Products were analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. a: EBNA-1. lane 1 to 10; undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. All cases generate 138 bp fragment. lane (+); positive control, lane (-); no DNA. b: EBNA-2. lane 1 to 9; undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, Lane 4,5,6 generate 300 bp fragments (type 2) and lane 3 generates 248 bp fragment (type 1). lane (+); positive control for type 1 (B95-8 cell line), lane (+); positive control for type 2 (Jijoye cell line).

Table 5. Correlation between EBV positivity and p53 overexpression/mutation

	p53 Protein	EBV No(%)				P
		+		-		
Laryngeal SCC	+	4(40.0)	M+0 M-3 ^a	12(44.4)	M+1 M-5 ^b	NS
	-	6(60.0)	M+2 M-1	15(55.6)	M+3 M-8	
Nasopharyngeal SCC	+	4(57.1)	M+0 M-1 ^a	2(50.0)	M+0 M-1 ^b	NS
	-	3(42.9)	M+0 M-0	2(50.0)	M+0 M-0	
Nasopharyngeal UC	+	4(19.1)	M+0 M-3 ^a	1(100)	M+0 M-1 ^b	NS
	-	17(80.9)	M+3 M-5	0(0)	M+0 M-0	

SCC: squamous cell carcinoma, UC: undifferentiated carcinoma, P: p value, M+: No of cases with p53 mutation, M-: No of cases without p53 mutation, ^a: cases showing EBV positivity with p53 overexpression but p53 mutation, ^b: cases showing EBV negativity with p53 overexpression but p53 mutation, NS: non significant

있던 예는 각각 7예였다 (Table 5).

고 찰

p53 유전자는 17p13.1에 위치하며 11개 exon으로 구성되어 있고 그 산물인 p53 단백질은 393개의 아미노산으로 이루어져 있는 핵내 인단백으로 기본적으로 전사조절자로서 기능을 하며 세포주기조절, 유전자 복구, apoptosis 유발, 유전자의 감시체계 등에 관여한다.¹⁷ 반면에 돌연변이형 p53 유전자 산물은 정상 p53 단백질의 기능을 상실하고 오히려 형질전환 및 증식을 유도하는 암 유전자로 작용하기도 한다.¹⁸ 종양에서 p53 유전자 산물을 불활성화시키는 기전을 요약하면 첫째 가장 흔히 돌연변이를 통하여, 둘째 바이러스 종양유전자 산물과 복합체를 형성하여, 셋째 mdm 2와 같은 세포내 종양유전자 산물과 연관되어, 넷째 최근에 기술된 것으로 p53 단백을 세포질 내에 국한시켜 핵내로의 유입을 방지하는 기전을 통하여 이루어진다고 한다.¹²

p53 돌연변이의 방식은 p53 유전자의 부분적 또는 전체적 소실, 점 돌연변이, 틀이동 돌연변이 (frame shift mutation) 및 삽입 등 다양한 방식을 취할 수 있으며 이중 제일 빈번한 것은 과오 점 돌연변이이다. 점 돌연변이는 p53 단백을 구성하고 있는 393 개의 아미노산 중 exon 5와 exon 9 사이에서 빈번히 이루어지며 장기, 조직 또는 종양의 유형에 따라 유전자의 서로 다른 부위에서 돌연변이를 보이기 때문에 종양의 발생환경 및 발암물질을 규명하는 역학연구에 도움을 줄 수 있다.² 두경부암에서는 exon 5와 7이 hot spot로 알려져 있다.⁵

p53 유전자 돌연변이를 검출하는 방법은 17번 염색체의 단완에 대한 RFLP (restriction fraction length polymorphism) 분석으로 LOH (loss of heterozygosity)를 보거나 SSCP 방법으로 검색하여 유전자 염기서열검사를 시행하는 방법이 있다. PCR-SSCP 방법은 이중나선구조인 DNA를 끊어서 변형시킨 한 가닥의 선 구조를 급격히 냉각하면 상보성이 있는 가닥을 찾지 못하고 2차 구조를 형성하게 되는데 이 유전자들간에 염기서열에 변화가 있으면 서로 다른 구조를 형성하게되면서 이동전위에 차이가 생기기 때문에 점 돌연변이, 탈락, 혹은 LOH와 같은 국소적인 유전자 이상을 검출하기에 빠르고 간편한 방법이다.¹⁹ 직접 유전자염기서열분석은 유전자 돌연변이를 확실히 확인하는 방법이지만 유전자 검체의 모든 exon을 염기서열 분석하는 것은 많은 시간과 노력이 요구된다. PCR-SSCP방법에 의해 검출된 이동전위가 DNA 염기서열 분석법에서 검출되는 유전자 돌연변이와 상응한다고 하며,²⁰ 면역조직화학적 검사법과 함께 유전자 이상을 screening 하는데 상호보완적으로 사용하면 돌연변이 검출의 민감성과 특이성을 높일 수 있다.²¹ 정상형의 p53 단백질의 반감기는 10~20분 정도로 짧는데 비해 변이형 p53 단백질은 수 시간의 반감기를 갖는 안정된 입체구조로 변화하여 면역조직화학적 검사에서 검출되

며 시행이 용이하고 형태학적인 관찰이 가능하다는 장점이 있다.²²

두경부암종에서도 p53은 가장 흔히 변형을 보이는 유전자로 그 돌연변이 산물이 33%에서 100%까지 표현되고 있으며³ 특히 두경부암종의 발암물질로 알려진 흡연 및 알코올과 상관관계가 깊다고 하며²³ 점막의 이형성증에서 p53 발현이 증가되어 비교적 초기 발암과정에서부터 돌연변이 p53이 발현된다고 한다.²⁴ p53 종양억제 유전자의 변이가 있는 두경부암종 환자에서 예후가 더 불량하다는 보고도 있고²⁵ 종양의 진행에 따라 발현율이 상승한다는 보고도 있으나 일반적으로 임상병리학적 예후 인자들과 관련이 되지는 않는다고 알려져 있다.^{24,26} 국내에서도 두경부암종에 대한 p53 연구는 활발하며 주로 p53 단백질에 대한 면역조직화학적 검사방법으로서 p53 단백질 발현율이 31.3%에서 66.7%까지 보고되고 있다.^{27,28}

본 연구 중 후두암종에서 p53 단백질 발현율은 43.2%로 국내 보고와 비슷하며 조직학적인 분화 등급과 종양발생부위에 따라 p53 단백질 발현율에 차이는 없었다. 후두암종 중 PCR-SSCP방법으로 검사한 p53 돌연변이는 시행이 가능했던 23예 중 exon 5에 4예, exon 7에 2예로 6예(26%)에서 검출되었다. 외국에서 PCR-SSCP 방법으로 시행된 p53 돌연변이 검출률 중 신선동결조직을 사용한 경우 (23~75%)^{24,29~31} 및 파라핀포매조직을 사용한 경우 42%³² 및 49%³³ 와비교하여 다소 낮은편에 속했다. SSCP의 민감성은 PCR 산물의 길이와 염기구조에 따라, primer의 종류에 따라, gel의 성분이나 전기영동 조건에 따라 좌우되기 때문에 실험기관간의 차이는 다양하여 비교하기가 어렵다.³⁴ PCR-SSCP 방법과 면역조직화학적 염색법을 동시에 시행한 경우를 살펴보면 Calzolari등³²은 면역조직화학적 염색법에서 p53 단백질이 41%에서 발현되고 PCR-SSCP방법에서 42%에서 돌연변이가 관찰되어 71%의 일치율을 보였으며 Ahomadegbe등²⁶은 85%의 일치율을 보고하였다. 본 연구에서 면역조직화학적 검사로는 38.6%에서 p53 단백질이 발현되었으며 PCR-SSCP방법으로 24.3%에서 p53 유전자 돌연변이가 관찰되었으며 두 검사 사이에 40.5%가 일치하였는데 이는 Calzolari등³²의 결과와 비슷하였다. p53 단백질발현과 PCR-SSCP 방법간의 불일치의 원인으로서는 p53 유전자가 과오 점 돌연변이 이외의 기전 즉 야생형 p53의 촉진자의 변화로 p53 단백질이 과표현 되거나, 세포종양유전자나 바이러스 종양유전자와의 결합에 의해 야생형 p53 단백질이 안정화되어 면역조직화학적 염색에서 위양성이 초래될 수 있으며 반면에 정지유전부호 (stop codon)를 유발하는 무의미 돌연변이 (nonsense mutation), 유전자 소실, 틀 돌연변이로 인하여 p53 단백질이 생기지 못하는 경우에는 면역조직화학적 검사에서 위음성이 될 수 있다. 또한 사용된 exon 5-8 외의 장소에서 유전자변이가 있는 경우는 PCR-SSCP에서 위음성이 초래될 수 있다.^{21,22,31,32}

비인두암종에서 p53 돌연변이는 10% 이내로 드문 것

으로 보고되어 있으나 Sheu³⁵과 Porter³⁶은 비인두암종에서 면역조직화학 염색에 의한 p53 단백질 발현율은 95%와 75%로 각각 보고하고 있어 돌연변이가 드문데도 p53 단백질이 과표현되는 원인으로, 비인두에 거의 100% 감염되는 EBV 바이러스 유전자 산물과의 관계가 p53 단백을 안정화시키는 원인이 될 것으로 추측하였다. 본연구에서 면역조직화학 검사로 시행한 p53 단백질에 대한 발현율은 후두암종 (43.2%)에 비해 비인두암종의 발현율 (33.3%)은 낮았으며 또한 비인두암종 중 편평세포암종 (64.5%)보다 미분화암종 (22.7%)에서는 발현율이 의미있게 낮았다. 이는 Sheu³⁵나 Porter³⁶이 보고한 p53 단백질 발현율보다 낮았지만 부분적인 양성표현을 증명하였다. 비인두암종에서 PCR-SSCP의 시행이 가능하였던 14예 중 exon 5에 2예, exon 7에 1예로 3예 (21.4%)에서 돌연변이가 관찰되어 Chang³⁰ 결과 (20%)와 비슷하였으며 Sun⁶의 보고 보다는 높았다.

Epstein-Barr 바이러스는 1964년에 최초로 Epstein³⁷에 의해서 Burkitt 림프종에서 처음 발견되었으며 그 후 단핵세포증가증, Hodgkin 림프종, 말초 T 세포 림프종, 장기이식환자에서 발생한 림프종 등의 림프증식성 질환 외에 비인두암종, 구강의 모반백반과도 관련이 있는 것으로 알려져 있고^{38,39} 최근 흉선, 타액선, 폐, 자궁경부, 피부, 위, 이하선등에서 발생한 림프상피종양 암종 (lymphoepithelioma-like carcinoma)에서도 EBV의 유전자 발현이 확인되고 있다.⁴⁰ EBV를 검출하는 방법으로 전자현미경을 이용한 세포내 virion의 확인, 항체를 이용한 면역조직화학 염색법, Southern blot hybridization, *in situ* hybridization (ISH), polymerase chain reaction (PCR) 등의 방법이 있다. 이 중 ISH법은 감염된 세포나 세포내 위치를 형태학적으로 확인할 수 있는 장점이 있으며 본 연구에 사용된 ISH의 목표가 된 EBER는 EBER-1과 EBER-2가 있으며 아직 기능은 잘 알려져 있지 않으나 잠복감염시 세포당 10⁷개까지 특이하게 양이 증가하는 RNA로 세포내에서 La단백질과 결합하여 안정된 2차 구조를 형성하여 핵 내에 리보핵산단백으로 존재하여 포르말린 고정된 파라핀 포매조직에서도 ISH 시행시 핵막의 안쪽에 염색되어 임상적으로 유용하게 사용될 수 있다.⁴¹ 그러나 각 세포에 50~200개 이상의 바이러스 유전자가 있어야 검출이 가능하기 때문에 Southern blot hybridization 이나 PCR에 비하여 민감도가 떨어진다는 단점이 있다.⁴² 중합효소 연쇄반응은 소량의 검체에서 특정 DNA 염기서열을 찾아내는 강력한 방법으로 Murono⁴³은 비인두암종에서 EBER에 대한 ISH 방법과 함께 EBV-DNA에 대한 PCR방법으로 EBV 검출률을 비교해본 결과 42예 중 40예에서 두 결과가 일치하였으며 Guterman⁴⁴은 ISH 방법이 더 검출률이 높았고 종양세포에 국한하여 존재하는 것을 증명할 수 있으며 더 쉽고 빠른 방법이라고 하였다. 본 연구에서 EBV는 후두의 편평세포암종에서는 37%, 비인두의 편평세포암종에서는 63.6%였으며 미분화비인두암종에서는 84.8%로

의미있게 높았고 EBER-1에 대한 ISH방법을 이용한 검출률(54.3%)이 EBNA-1에 대한 PCR 결과 (27.1%)에 비해 검출률이 더 높았으며 두 검사사이에는 67.1%의 일치율이 있었는데 이는 포르말린 고정 포매조직에서 DNA 추출의 어려움, 추출된 DNA의 분절과 Taq 중합효소 활성억제물질의 작용에 기인한다고 생각된다.

EBV의 잠복 감염시 항상 존재하는 EBNA-1을 primer로 EBV 존재유무를 확인하고 EBNA-2를 encoding 하는 U₂ 영역의 염기서열의 차이를 이용하여 각각의 primer를 제조한 다음 유전자 증폭을 시행하여 증폭된 유전자 산물의 크기로 쉽게 EBV의 아형분류가 가능하다.⁴⁵ 이 두가지 아형은 잠복감염시 발현되는 바이러스 유전자의 염기서열의 차이 뿐만 아니라 B 림프구를 변형시키는 능력도 차이가 있어 type 1이 type 2 보다 변형능력이 더 높아 면역 저하 환자나 세포면역에 이상이 있는 호지킨 병에서는 type 2 EBV가 더 자주 검출되고 일차성 악성 림프종에서는 type 1 EBV가 많다.⁴⁶ 또한 지역에 따라 아형에 차이가 있으며 북미와 유럽, 아시아에서는 type 1이 흔하고 아프리카에서는 type 2가 더 많은 것으로 보고되고 있으며 미국에서는 두가지 아형이 다 존재하는 것으로 보고되어서 두 아형이 동시에 중복 감염이 될 수 있는 가능성을 시사하였다.¹¹ 국내에서 아형분류에 대한 연구는 아직 미미한 실정이며 고등⁴⁷의 연구에 따르면 악성림프종 72예 중 21예 (29.2%)에서 EBV 양성을 보였고 이 중 type 2 EBV가 대부분이었다고 한다. 위장관의 선암종 및 악성 림프종에 대한 김등⁴⁸의 연구에서도 위장에서는 type 1과 type 2가 검출되었고 소장 및 대장에서는 type 2만 검출되어서 발생부위와 암종의 유형에 따라 EBV 아형에 차이가 있는 것을 시사하였다.

비인두암종에서는 Nadal⁴⁹과 Henderson⁵⁰이 EBV가 비인두암종의 발암성 바이러스로서의 가능성을 시사한 이래 비인두암종 뿐 아니라 비인두외의 두경부암종에 대해서도 EBV에 대한 연구가 활발하며 국내에서도 비인두암종에서 EBV 발현율이 79.2%, 85.2%로 보고되었다.^{51,52} 두경부암종에 대한 국내에서의 아형분류는 아직 찾아볼 수 없었으며 일본과 중국에서는 type 1이 많은 것으로 보고되어있다.¹¹ 본 연구에서 아형분류로는 후두암종에서는 type 1만 2예 검출되었고 비인두암종에서는 type 1이 6예, type 2가 5예 검출되어 Kunimoto⁴⁵이 미분화비인두암 13예 중 type 1이 12예, type 2가 1예 분류한 결과보다 본 연구에서는 type 2가 더 많이 분류되었다.

p53의 발암기전 중 바이러스 종양 유전자와의 연관성이 대두되고 있으며¹²⁻¹⁶ 그 중 EBV와의 관련성을 규명하기 위한 연구들이 활발하다. B 세포의 전환에 필요한 EBNA 5는 p53 단백질과 결합하여 p53/EBNA 5 복합체를 형성하며,¹⁵ 야생형 p53 단백질이 EBV의 잠복 감염에서 세포용해기로 전환시키는 역할을 한다고 알려진 BZLF-1 (EBV Z 단백질)과 p53 단백질과의 상호작용을 통하여 세포 용해기의 바이러스복제를 조절하고 Z 단백질은

정확한 기전은 알려지지 않았지만 야생형 p53의 발암 억제기능을 억제하므로써 발암에 기여한다고 한다.¹⁶ Burkitt 림프종에서 p53 유전자 돌연변이가 EBV 양성 및 음성인 경우에서 모두 검출되었으나⁵³ EBV 관련 비인두암종에서는 p53 유전자 돌연변이가 드물다고 보고되었는데⁶ 이는 두 질환에서 표현되는 EBV 유전자 항원이 서로 다른데 기인하리라고 추측한다. Efert⁵⁴은 18예의 원발성 비인두암종에서 한 예에서도 p53 돌연변이가 없었으며 15예의 전이된 비인두암종에서는 2예에서 돌연변이가 검출되었고 nude mouse에 제대배양된 비인두암종에서는 9예 중 6예에서 돌연변이가 관찰되어서 비인두암종의 초기발암단계에는 관여하지 않으나 종양 증식능력을 강화시키는 것으로 생각했다. 그러나 Niedobitek⁵⁵와 Chang³⁰의 비인두암종에서의 연구에 의하면 EBV와 p53 유전자 사이의 관련은 발견되지 않았다고 하였다. 본 연구에서 편평세포암종 중 p53 단백질 발현율은 EBV 양성 유무에 따른 차이가 없었으며 비인두암종에서는 EBV가 양성인 종양 중 19.1%에서 p53이 발현되었고 EBV가 음성인 경우 1예에서도 p53 단백질 발현되었지만 후자가 1예 뿐이었기 때문에 통계학적인 유의성은 없었다. p53 단백질 발현이 있었으나 PCR-SSCP에서 돌연변이가 검출되지 않았던 예 중 EBV 양성 및 음성이 각각 7예 씩으로 같았으며 면역조직화학염색에서 p53 단백질 발현의 원인으로 EBV 유전자 산물은 관련이 없는 것으로 생각하였다.

결 론

한국인의 후두암종 및 비인두암종에서 p53 종양억제 유전자와 Epstein-Barr virus의 상호연관성을 규명하기 위하여 37예의 후두암종과 33예의 비인두암종을 대상으로 면역조직화학적검사와 PCR-SSCP 방법으로 p53 단백질 발현과 돌연변이를 조사하였고, EBV를 동정하기 위해서는 EBER-1에 대한 *in situ* hybridization과 EBNA-1에 대한 PCR을 시행하였으며 바이러스의 아형은 EBNA-2 1형과 2형에 대한 PCR을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 편평세포 후두암종에서 p53 단백질 발현율은 43.2%였고 6예에서 유전자 돌연변이가 관찰되었으며 비인두암종 중 편평세포암종에서의 p53 발현율 (54.5%) 이 미분화암종에서의 발현율 (22.7%)보다 유의있게 높았으며 미분화암종 중 3예에서 유전자 돌연변이가 관찰되었다.

2) 후두암종에서의 EBV 양성율은 37.0%였고 비인두암종에서의 EBV 양성률은 84.8%로 비인두암종에서 유의있게 높았으며 미분화암종에서의 EBV 양성률 (95.5%) 은 후두와 비인두의 전체 편평세포암종에서의 양성률 (35.4%)에 비해 유의있게 높았다. 후두와 비인두의 편평세포암종에서는 1형만 분류되었으나 미분화암종에서는 1형과 2형 모두 검출되었다.

3) p53 단백질 발현이 있었으나 p53 돌연변이는 없었던 예들 중 EBV 양성 및 음성이 각 7예씩으로 EBV 양성 유무에 따른 차이는 없었다.

이상의 결과를 요약하면 한국인의 후두와 비인두에서 발생한 편평세포암종에는 p53 유전자와 Epstein-Barr 바이러스가 유사한 빈도로 관련되었으며 비인두의 미분화암종에서는 p53 유전자보다 Epstein-Barr 바이러스가 더 높은 상관관계를 갖고 있었고 1형과 2형이 모두 검출되었다. 면역조직화학 검사에서 p53 단백질 발현의 원인으로 EBV는 관련이 없는 것으로 생각되며 p53 유전자와 Epstein-Barr 바이러스의 관계는 좀 더 자세한 분자생물학적인 방법으로 규명할 필요가 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. The molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders, 1995; 94-8.
- Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 1993; 329: 1318-27.
- Brachman DG. Molecular biology of head and neck cancer. Semin Oncol 1994; 21: 320-9.
- Levine AJ, Monand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. Nature 1991; 351: 453-6.
- Bron L, Monnier P. Molecular alteration in head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngology 1995; 20: 291-8.
- Sun Y, Hegamyer G, Cheng YJ, et al. An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6516-20.
- Raab-Traub N. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. Semin Cancer Biol 1992; 3: 297-307.
- Leung SY, Yeun ST, Chung LP, Kwong WK, Wong MP, Chan SY. Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas. Am J Surg Pathol 1995; 19: 994-1001.
- Pathmanathan R, Prasad U, Chandrika G, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Undifferentiated, nonkeratinizing and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Am J Pathol 1995; 146: 1355-67.
- Sixbey JW, Shirley P, Chesney PJ, Buntin DM, Resnick L. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. Lancet 1989; 11: 761-5.
- Abdel-Hamid M, Chen JJ, Constantine N, Massoud M, Raab-Traub N. EBV strain variation; geographic distribution and relation to disease state. Virology 1992; 190: 168-75.
- Bargonetti J, Friedmon PN, Kern SE. Wild type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequence adjacent to the SV 40 origin of replication. Cell 1991; 65: 1083-90.
- Yew PR, Berk AJ. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus E1B 55 Kd protein. Nature

- 1992; 357: 82-8.
14. Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM. Interaction of the HPV 16 E6 oncoprotein with wild type and mutant p53 protein. *J Virol* 1992; 66: 5100-10.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7491-5.
 18. Hinds P, Finlay CA, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 1989; 63: 739-46.
 19. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
 20. Murakami Y, Hayashi K, Sekiya T. Detection of aberrations of the p53 alleles and the gene transcript in human tumor cell lines by single-stranded conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 1991; 51: 3356-61.
 21. Kujino M, Dosaka-akita H, Kato M, Kinoshita I, Akie K, Kawakami Y. Simultaneous use of the PCR-SSCP method and immunohistochemistry for increasing the detection efficacy of p53 abnormalities in human lung cancer. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 319-24.
 22. Melhem MF, Law JC, El-Ashmawy L, et al. Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers. *Am J Pathol* 1995; 146: 1170-7.
 23. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712-7.
 24. El-Naggar AK, Lai S, Luna MA, et al. Sequential p53 mutation analysis of pre-invasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 64: 196-201.
 25. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, et al. p53 expression; predicting recurrence and secondary primary tumor in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 519-29.
 26. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein expression in normal epithelium and in early noninvasive lesions. *Oncogene* 1995; 10: 1217-27.
 27. 백정환, 유경호, 정철희, 노미숙, 홍숙희. 두경부 편평상피암에서 p53표현양상에 관한 면역조직학적 연구. *한이인지* 1995; 38: 407-12.
 28. 서재홍, 이미숙, 윤신의. 두경부 종양에서의 암억제 인자인 p53에 대한 연구. *대한병리학회지* 1996; 30: 576-86.
 29. Brachman DG, Graves D, Vokes E, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 62: 4832-6.
 30. Chang YS, Lin YJ, Tsai CN, et al. Detection of mutations in the p53 gene in human head and neck carcinomas by single stranded conformational polymorphism analysis. *Cancer Lett* 1992; 67: 167-74.
 31. Xu AL, Chen YT, Huvos AG, et al. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of the head and neck without apparent gene mutation. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 83-92.
 32. Calzolari A, Chiarelli I, Blanch S, et al. Immunohistochemical vs Molecular biology methods; complementary techniques for effective screening of p53 alterations in head and neck cancer. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 7-11.
 33. Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, Magnusson A, Mehle C, Ross G. A non-random deletion in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 1381-6.
 34. 김종순, 이재혁, 이민철, 박창수, 정상우. 돌연변이형 p53의 검색을 위한 면역조직화학적 방법과 PCR-SSCP의 비교연구. *대한병리학회지* 1998; 32: 21-8.
 35. Sheu LF, Chen A, Tseng HH, et al. Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 380-6.
 36. Porter MJ, Field JK, Lee JC, Leung SF, Lo D, Van Hasselt CA. Detection of the tumor suppression gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res* 1994; 14: 1357-60.
 37. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-5.
 38. Katz BZ, Raab-Traub N, Miller G. Latent and replicating forms of the Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 1989; 160: 589-98.
 39. Young LS, Lau R, Rowe M. Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy cell leukoplakia. *J Virol* 1991; 65: 2868-74.
 40. Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM. The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 308-15.
 41. Glickman JN, Hawe JG, Steitz JA. Structural analysis of EBER 1 and EBER 2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr infected cells. *J Virol* 1988; 62: 902-11.
 42. Akao I, Sato Y, Mukai K, et al. Detection of Epstein-Barr

- DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Laryngoscope* 1991; 101: 279-83.
43. Muroso S, Yoshizaki T, Tanaka S, Takeshita H, Park CS, Furukawa M. Detection of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 1997; 107: 523-6.
 44. Guterman KS, Hair LS, Morgello S. Epstein-Barr virus and AIDS-related primary central nervous system lymphoma, viral detection by immunohistochemistry, RNA in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Clin Neuro-pathol* 1996; 15: 79-86.
 45. Kunimoto M, Tamuro S, Tabata T, Yoshi 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.
 46. Boyle MJ, Sewell WA, Sculley TB, et al. Subtype of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1991; 78: 3004-11.
 47. 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.
 48. 김영식, 박설희, 김인선. 위장관 선암종 및 악성림프종에서 Epstein-Barr 바이러스 동종 및 아형분류에 관한 연구. *대한 병리학회지* 1997; 31: 847-61.
 49. Nadal JB. Viral particles in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 1976; 87: 1932-37.
 50. Henderson BE, Louie EW, Jing JS, Alena B. Epstein Barr virus and nasopharyngeal carcinoma: Is there an etiologic relationship? *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 1393-8.
 51. 서장수, 이태윤, 배성호, 김성광, 최원희, 손경락. 비인강암 조직에서 중합효소 연쇄반응에 의한 Epstein-Barr virus DNA 검출. *한이인지* 1993; 36: 185-92.
 52. 민헌기, 정광윤, 최종욱, 김인선, 노영수, 임현준. 비인강암 종과 후두편평상피세포암종에서 Human papilloma virus와 Epstein-Barr virus의 검출양상과 의의. *한이인지* 1996; 39: 273-81.
 53. Farrel PJ, Allan GJ, Shanahana F, Vousden KH, Crook T. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *EMBO J* 1991; 10: 2879-87.
 54. Efert P, McCoy M, Abdel-Hamid U, Flynn K, Zhang Q, Busson P, Tursz T, Liu E, Raab-Traub N. Alteration of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 1992; 66: 3768-75.
 55. 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.
-