

두경부 편평상피세포암과 백반증에서 p53과 mdm-2의 면역조직화학적 연구

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실

김용주 · 정환우 · 황찬승 · 양훈식

= Abstract =

Immunohistochemical study of p53 and mdm-2 in Squamous Cell Carcinoma and Leukoplakia of Head and Neck.

Yong Joo Kim, M.D., Hwan Woo Jung, M.D.
Chan Seung Hwang, M.D., Hoon Shik Yang, M.D.

*Department of Otolaryngology-HNS, College of Medicine,
Chung-Ang University, Seoul, Korea*

The mutation of p53 is the most common genetic alteration found in human cancers and has oncogenic properties. mdm-2 is a recently discovered that controls the p53 activity by binding of its protein, so negative feedback loop has been suggested in which p53 induces mdm-2 expression.

The purpose of this study was to analyze the expression of p53 in leukoplakias, mdm-2 in squamous cell carcinomas, and relationship between p53 and mdm-2 expression in leukoplakias and squamous cell carcinomas.

The results were as follows :

- 1) The p53 was expressed 33.4% in leukoplakias.
- 2) The mdm-2 was expressed 8.3% in leukoplakias and 22.7% in squamous cell carcinomas.
- 3) The expression rate of p53 was higher in specimens negative for mdm-2 than in specimens positive for mdm-2, but there was not significant relationship between p53 and mdm-2 expression.

In conclusion p53 was thought to participate in early phase of oncogenesis, and mdm-2 was thought to have a role as a oncogene in squamous cell carcinoma of head and neck. Though there was not significant relationship between p53 and mdm-2 expression, mdm-2 was thought to inhibit p53 activity.

Key Words : mdm-2, p53, Leukoplakia, Squamous cell carcinoma.

교신저자 : 황찬승(Chan Seung Hwang, M.D.)

140-013 서울특별시 용산구 한강로3가 65-207 중앙대학교 의과대학 용산병원 이비인후과학교실

Tel : 02) 748-9827, Fax : 02) 792-6642

I. 서 론

편평상피세포암은 두경부암 가운데 가장 흔한 상피세포암으로써 주로 흡연과 음주에 의하여 유발되며, 암의 전구단계로 알려져있는 백반증(leukoplakia)은 이형성증의 정도에 따라 1-40%¹⁾에서 암으로 진행되는 것으로 알려져 있어 임상적으로 중요한 의의를 갖는다. 암유전자의 활성화 및 암억제유전자의 비활성화는 발암기전에 중요한 역할을 하며 그중 p53은 암의 발생에 있어 가장 흔하게 관찰되는 유전적 이상으로 알려져 있다. p53은 세포주기의 조절 및 증식을 억제하거나, 세포고사(apoptosis)를 통한 세포사멸을 유발하여 암세포의 증식을 억제하고, p53의 돌연변이는 단일 염기의 점변이(point mutation), 대립유전자의 결실(deletion), 바이러스성 암유전자 단백질과의 결합을 통해 여러 암종을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁾. mdm-2(mouse double minute 2)는 p53의 N-terminal에 결합하여 세포주기 G1의 후기를 정지시키는 p53의 기능을 제어함으로써 암을 유발시키는 암유전자로 알려져 있으며 주로 육종(sarcoma)이나 방광암, 유방암 등에서 발견되어지고 두경부 편평상피세포암에서 mdm-2에 대한 발현이나 p53과의 연관성에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자들은 백반증에서 p53의 발현여부를 통해 p53이 암의 초기과정에도 관여하는지의 여부와 mdm-2가 두경부 편평상피세포암에서도 표현되는지, 또한 두경부 편평상피세포암에서 p53과 mdm-2 사이에 어떠한 연관성이 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대 상

1992년부터 1996년까지 중앙대학교 이비인후과학교실에서 조직검사로 진단된 편평상피세포암 22례와 백반증 12례, 총 34례를 대상으로 하여 파라핀 조직을 이용한 면역조직화학적 연구를 시행하였다. 연령분포는 21세에서 84세로 평균연령은 65.5세였으며 남녀비는 7.7 : 1이었다.

2. 방 법

1) p53의 검출

(1) 전처리

파라핀 절편을 5 μ m 두께로 잘라 L-lysine으로 처리된 슬라이드에 부착한 후 100% xylene으로 탈파라핀화 시킨후 100%, 90%, 80% 에칠알코올에 각기 5분간 처리하여 증류수로 함수화시켰다. 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에 20분간 처리하고 0.05M TBS(Tris Bufferd Saline) 완충용액으로 5분씩 3회 세척후 0.01M citric acid에 담궈서 microwave oven으로 5분간 가열하고 실온에서 30분간 식힌 후, 다시 microwave oven으로 5분간 가열한 후 0.05M TBS 완충용액으로 5분간 3회 세척하였다. 비특이적 항원-항체 반응을 억제하기 위하여 정상 염소혈청으로 1시간 반응시켰다.

(2) LSAB법

일차항체는 단클론성 항체(clone DO-7, Novocastra Lab., Ltd. Newcastle, U.K.)로 정상형(wild type)과 변이형(mutant type)의 p53 유전자를 확인할 수 있는 항체로서, 1 : 30으로 희석하여 실온에서 하룻밤 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 다음 biotin과 결합된 이차항체를 15분간 반응시킨후 streptavidin-horseradish peroxidase를 15분간 반응시켰다. AEC chromogen 용액으로 발색시켜 Meyer's hematoxyline으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 양성반응의 양상은 중앙세포의 핵에 국한되어 담갈색으로 염색된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2).

2) mdm-2의 검출

p53과 동일한 과정을 통해 1 : 20으로 희석한 단클론성 항체에 양성반응은 핵에 황갈색으로 염색된 것을 관찰하였다(Fig. 3, 4).

3) 통계학적 검증

p53 발현과 mdm-2 발현의 연관성은 Fishers Exact Test를 사용하였다.

III. 결 과

1. 백반증과 편평상피세포암에서 p53과 mdm-2의 양성 발현율

백반증 12례 가운데 p53의 양성발현은 33.4%,

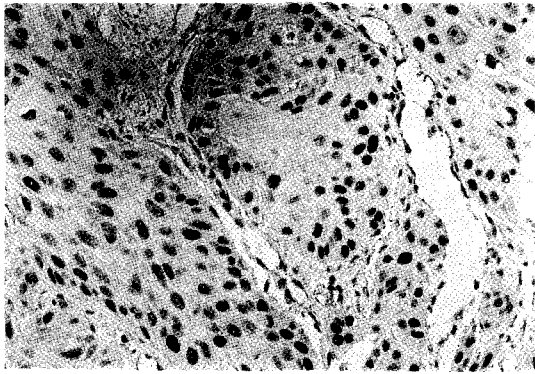


Fig. 1. Immunohistochemical staining for p53 in mild dysplasia (LSAB method, $\times 100$).

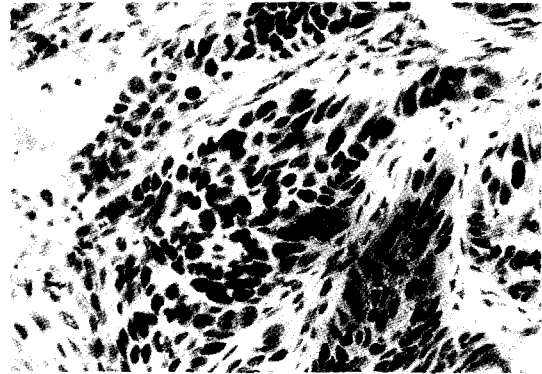


Fig. 2. Immunohistochemical staining for p53 in squamous cell carcinoma (LSAB method, $\times 200$).

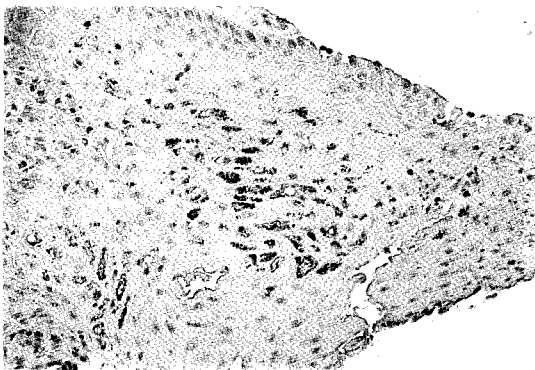


Fig. 3. Immunohistochemical staining for mdm-2 in mild dysplasia (LSAB method, $\times 200$).

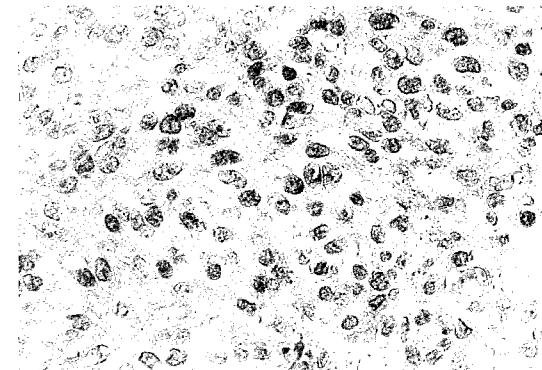


Fig. 4. Immunohistochemical staining for mdm-2 in squamous cell carcinoma (LSAB method, $\times 400$).

mdm-2의 양성발현은 8.3%, 편평상피세포암 22례 가운데 p53의 양성발현은 45%, mdm-2의 양성발현은 22.7%였다(Table 1).

2. 백반증의 분화도에 따른 p53과 mdm-2의 양성발현율

백반증 12례중 과각화증(Hyperkeratosis) 50%, 경도 이형성증(Mild dysplasia) 41.6%, 중등도 이형성증(Moderate dysplasia) 8.3%였으며 고도 이형성증(Severe dysplasia)을 보인 경우는 없었다. p53에 양성을 보인 4례의 백반증 가운데에 과각화증 50%, 경도 이형성증 25%, 중등도 이형성증 25%를 보였으며 mdm-2에 양성을 보인 1례는 경도 이형성증을 보인 경우였다(Table 2).

3. 백반증과 편평상피세포암에서 mdm-2와 p53 발현사이의 상관관계

백반증과 편평상피세포암에서 mdm-2에 양성 발현을 보이면서 p53에 양성발현을 보인 경우는 16.6%, 음성 발현을 보인 경우는 83.4%였다

mdm-2에 음성발현을 보이면서 p53에 양성 발현을 보인 경우는 46.7%, 음성발현을 보인 경우는 53.3%였다. mdm-2 양성발현을 보인 83.3%에서 p53의 발현이 없었으나 mdm-2와 p53 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3).

IV. 고 찰

암의 발생은 암유전자의 활성화 또는 암억제유

Table 1. Positive expression rate of p53 and mdm-2 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of head and neck.

	Leukoplakia	Squamous cell ca
p53	33.4%(4/12)	45%(10/22)
mdm-2	8.3%(1/12)	22.7%(5/22)

Table 2. Positive expression rate p53 and mdm-2 according to cellular degree of leukoplakia.

	p53	mdm-2
Hyperkeratosis	50%(2/4)	
Mild dysplasia	25%(1/4)	100%(1/1)
Moderate dysplasia	25%(1/4)	
Severe dysplasia	0%(0/4)	

Table 3. Relationship between mdm-2 and p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of head and neck.

	mdm-2(+)	mdm-2(-)
p53(+)	1(16.6%)	13(46.7%)
p53(-)	5(83.4%)	15(53.3%)

(P>0.05)

전자의 비활성화에 의해 유발되는 것으로 알려져 있으며 유방암, 대장암, 폐암 등에서 흔히 발견되는 p53이 암의 발생에 있어 가장 빈번한 유전자 변이로 알려져 있다. p53은 17번 염색체의 단완(17p13)에 위치하며 p53에 의해 표현되는 정상형 p53(wild type)은 53kd의 핵단백질로 구성되며 세포주기중 G1단계에서 S단계로의 이동을 억제하여 세포의 증식과 변형을 조절하거나²⁾ 세포고사(apoptosis)를 통하여³⁾ 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 정상형 p53은 하나의 염기가 다른 염기로 치환되는 점변이(point mutation)의 형태를 통해 유전자의 기능을 상실하거나⁴⁾ SV 40, Adenovirus, HPV와 같은 DNA tumor viral oncogene과의 결합, 또는 세포유전자

mdm-2를 통한 표현 단백질과의 결합을 통하여 정상형 p53 유전자 기능이 상실되는 것으로 알려져 있다²⁾ 반면에 돌연변이형 p53에 의하여 표현되는 변이형 p53(mutant type)은 정상 단백질의 기능을 상실하고 오히려 세포의 형질전환 및 증식을 유도하는 암유전자로 작용한다. 정상형 p53 유전자에서 표현된 정상형 p53은 세포내에서 반감기가 6-10분으로 짧아 매우 낮은 농도로 유지되므로 면역조직화학적염색으로 검출될 수 없으나 돌연변이형 p53 유전자에 의하여 표현되는 변이형 p53 단백질은 정상 p53보다 반감기가 길어 세포내에 축적되며 면역조직화학적 염색으로 검출될 수 있다^{5,6)}. 그러므로 암세포에서 면역조직화학적 염색으로 p53 단백을 검출할 수 있다는 것은 세포내 p53의 변이가 있음을 의미하며⁶⁾ 두경부 편평상피세포암에서도 p53의 점변이와 이에 의한 변이형 p53의 과표현이 보고되고 있어 양자간에는 높은 상관관계가 있다고 알려져 있다^{7,8)}.

두경부 영역에서 백반증은 암으로 진행해 가는 전구 단계로 알려져 있고 약 1-40%에서 암으로 발전하는 것으로 보고되고 있으며 이들에 대한 생물학적 표식인자와 이를 통한 예후측정인자를 알아보려 Wood 등⁹⁾은 p53을 이용하였으며 이명진 등¹⁰⁾은 p53에 양성을 보인 중증의 이형성증에서 침윤암으로 변이하여 두경부암에서 예후측정인자로 작용할 수 있다고 보고하였다. 또한 Dolcetti 등¹¹⁾에 따르면 p53의 발현은 임상적 병기나 생존율, 예후 등의 임상적 소견과는 직접적인 연관은 없으나 이형성세포 및 정상으로 보이는 세포에서도 양성 발현을 나타내는 것으로 보아 암으로 진행해가는 초기 변화에 관여할 것이라고 보고하였고, 본 연구에서도 백반증에서 암으로 발전한 경우는 없었으나 33.4%에서 p53에 양성발현을 보여 암의 초기 단계에도 p53이 관여함을 입증할 수 있었다.

원발성 두경부암에서 면역조직화학적 염색에 의한 p53의 발현 빈도는 40-60%^{12,13)}로 보고되고 있어 암 발생에 있어 p53이 관여하는 것은 사실이나 p53이 임상적, 병리학적 소견과 일치하는지에 대하여는 많은 논란의 대상이 되고 있다. 최 등¹⁴⁾은 설과 편도 편평상피세포암에서 13.8%의 양성발현을 보고하였고 암의 크기가 4cm 이상일

때 p53에 양성인 경우가 많았으나 임상적, 병리 조직학적 분화도와는 연관성이 없다고 하였다. 그러나 김 등¹⁾에 의하면 후두암에서 원발부위의 병기가 증가함에 따라 p53 양성 반응이 의미있게 증가하는 결과를 보고하면서 p53이 후두암의 예후인자로 작용할 수 있다고 하였다.

mdm-2 유전자는 쥐의 암세포에서 증폭되어지는 유전자로 사람에서는 12q13-14¹⁵⁾에 위치하고 90kda의 분자량을 가지는 490개의 아미노산으로 구성된 유전자로서 세포주기 G1의 억제와 세포고사 기능을 가지는 p53의 역할을 비활성화 시켜 p53의 기능을 조절하는 암유전자로 알려져 있다.^{16,17,18,19)}

Carlos 등²⁰⁾은 연조직육종(soft tissue sarcoma)에서 mdm-2의 양성발현은 37%, mdm-2 발현시 p53이 함께 발현되는 경우는 10.6%로 보고하였고 Barberschi 등¹²⁾은 신장 이행세포암에서 mdm-2의 양성발현은 50%, p53의 양성발현은 75%, mdm-2와 p53이 함께 발현되는 경우는 25%로 보고하면서 mdm-2가 p53에 결합하여 하나의 복합체를 형성하여 p53의 기능을 억제하게 되고 두 유전자사이에는 유의한 상관관계가 있음을 주장하였다. 그러나 Leach 등²¹⁾은 mdm-2와 p53사이의 발현사이에는 상관관계가 없다고 보고하기도 하였다. 또한 mdm-2 단독으로 예후측정인자로의 가능성에 대하여는 보고된 바가 없으나 Carlos 등²⁰⁾에 따르면 mdm-2와 p53에 과표현된 10.6%의 육아종에서 가장 나쁜 예후를 보여 이들이 예후측정인자로서 작용할 수 있을 것이라 보고하였다.

저자들은 두경부 편평상피세포암에서 22.7%의 mdm-2 양성발현이 관찰되었고 백반증과 편평상피세포암에서 mdm-2에 양성발현을 보인 16.6%만이 p53의 양성발현을 보였고 83.4%에서는 p53의 발현이 관찰되지않는 점을 보아 mdm-2가 p53의 발현을 억제하는 유전자로 작용한다는 사실을 알 수 있었으나, 더 많은 증례와 파라핀 조직을 이용한 제작시 처리 방법이나 고정제에 대한 기술적 단점을 보강하기 위하여 신선동결조직을 이용하는 것이 mdm-2와 p53의 보다 더 정확한 결과를 얻을수 있을 것이라 생각된다. 항후암의 초기 변화에 관여하는 mdm-2의 역할과 계

속적인 추적관찰을 통한 예후측정인자로서의 역할에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

백반증 12례와 편평상피세포암 22례를 대상으로 mdm-2와 p53을 이용한 면역조직화학적염색을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 백반증에서 p53의 양성발현은 33.4%로 p53이 암의 초기 단계에도 관여함이 관찰되었다.
- 2) 편평상피세포암에서 mdm-2의 양성발현은 22.7%로 두경부 편평상피세포암에도 mdm-2가 발현됨을 알 수 있었다.
- 3) 백반증과 편평상피세포암에서 mdm-2의 양성발현시 p53의 양성발현은 16.6%, p53의 음성발현은 83.3%로 mdm-2가 p53의 발현을 억제하는 암유전자로 생각되나 통계적 유의성은 없었다 (P>0.05).

References

1. Kim SH, Chung DH: *Expression of p53 and nm23-H1 protein in laryngeal squamous cell carcinoma. Korean J Otolaryngol.* 1996; 39: 265-272
2. Stenger JE, Mayr GA, Mann K, Tegtmeyer P: *Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. Mol. Carcinog.* 1992; 5: 102-106
3. Levine AJ, Momand J, Filay CA: *The p53 tumor suppressor gene. Nature.* 1993; 351: 453-456
4. Field JK, Spnididos DA, Malliri A: *Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of head and neck. Br J Cancer.* 1991; 64: 573-577
5. Stenger CA, Hinds PW, Levine AJ: *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell.* 1989; 57: 1083-1093

6. Lane DP, Benchimol S: *Oncogene or anti-oncogene. Genes Dev.* 1990; 4: 1-8
7. Masetro R, Dolcetti R, Gasparotto D: *High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. Oncogene.* 1992; 7: 1159-1166
8. Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, et al: *Assessment of p53 protein expression in normal, benign, malignant oral mucosa. J Pathol.* 1992; 166: 389-394
9. Wood MW, Medina JE, Thompson GC: *Accumulation of the p53 tumor suppressor gene product in oral Leukoplakia. Otolaryngol Head and Neck Surg.* 1994; 111: 758-763
10. Lee MJ, Cha CI, Cho SH, Byun JY, Ahn HW, Lee JH: *Role of p53 protein as a prognostic predictor in oral and laryngeal papilloma. Korean J Otolaryngol.* 1996; 39: 1596-1604
11. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, et al: *p53 Overexpression is an early event in the development of human squamous cell carcinoma of the larynx. Genetic and prognostic implication. Int J Cancer.* 1992; 52: 178-182
12. Brachman DG, Graves D, Vokes E: *Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in head and Neck Cancer. Cancer Res.* 1992; 52: 4832-4836
13. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, et al: *The roll of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol.* 1993; 119: 1118-1122
14. Choi G, Kim MS, Choi JO, Hwang SJ, Yoo HK: *p53 expression in squamous cell carcinoma of tongue and tonsil. Korean J Otolaryngol.* 1993; 36: 752-757
15. Burden AD, Stables GI, Campell I, Thompson W, Mackie RM: *mdm-2 is not induced by p53 in human keratinocyte in vivo. J Cutan Pathol.* 1996; 23: 25-29
16. Barberschi M, Girlando S, Fellin G, Graffler U, Luciaris L, Dalla PP: *Expression of mdm-2 and p53 protein in transitional cell carcinoma. Urol Res.* 1995; 22: 349-352
17. Cathay AF: *The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell grown. Molecular Cell Biology.* 1993; 13: 301-306
18. David CO, Vincent M, Jamil M, Jiandong C, Cathlean R, Arnold JL: *Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. Oncogene.* 1993; 8: 2353-2360
19. Jiandong C, Xiandgwei WU, Jiayuh L, Arnold JL: *mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. Molecular and Cellular Biology.* 1996; 16: 2445-2452
20. Carols CC, Esher L, Marija D, Maria RD, Daphna P, James MW, et al: *Molecular abnormalities of mdm-2 and p53 genes in adult soft tissue sarcoma. Cancer Research.* 1994; 54: 794-799
21. Leach FS, Ookino T, Meltzer P, Burrel M, Olinger JD, Smith S, et al: *p53 mutation and mdm-2 amplification in soft tissue carcinoma. Cancer Res.* 1993; 53: 2231