

후두암중에서 Epstein-Barr 바이러스 DNA와 Bcl-2 단백질의 검색

계명대학교 의과대학 병리학교실, 경북대학교 의과대학 이비인후과학교실*
이상숙 · 박남조 · 박준식*

= Abstract =

Detection of Epstein-Barr Virus DNA and Bcl-2 Protein in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

Sang-Sook Lee, M.D., Nam-Jo Park, M.D., June-Sik Park, M.D.*

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea
Department of Otolaryngology,* Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea

Objectives : Epstein-Barr virus(EBV) is a B-lymphotrophic virus with a tumorigenic potential. EBV infection has been recognized as the main cause of nasopharyngeal carcinoma and Burkitt's lymphoma. Bcl-2 protein expression is known to be up-regulated by the EBV-latency associated antigen latent membrane protein(LMP). The aim of this study was to determine the incidence of EBV in squamous cell carcinomas of the larynx and the relationship between the presence of EBV and bcl-2 expression.

Patients and Methods : From January 1994 to December 1997, 35 patients with primary squamous cell carcinoma of the larynx were studied. EBV genome DNA was surveyed by polymerase chain reaction(PCR) assay and then compared the results of in situ hybridization(ISH) for EBER1 using digoxigenin-tailed oligonucleotide probe. The expression of bcl-2 protein was studied by immunohistochemistry(IHC) using bcl-2 monoclonal antibody.

Results : By PCR, EBV genome was detected in 22 of 35(62.9%) squamous cell carcinomas of the larynx. Nineteen of 35 cases(54.3%) showed a positive nuclear staining for EBER1 in tumor cells by ISH. Three cases showed positivity in inflammatory cells by ISH and one of them showed a positive staining of both tumor cells and inflammatory cells. Eighteen of 32 specimens(62.5%) were positive for bcl-2 protein. There was no significant correlations between the presence of EBV DNA and bcl-2 expression.

Conclusions : It could be concluded that high incidence of EBV in the laryngeal cancer tissue may indicate a probable role of EBV in the development of laryngeal carcinoma.

KEY WORDS : Epstein-Barr virus · Larynx neoplasm · Polymerase chain reaction · In situ hybridization · Bcl-2 oncoprotein.

서 론

후두암은 두경부에서 가장 흔한 암으로 대부분이 편평상피암이다. 후두암의 90%는 남자에서 생기고 60~70대에

본 논문은 1998년 동산의료원 특수과제 연구비에 의해 이루어졌음.
교신저자 : 이상숙, 700-712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 병리학교실
전화 : (053) 250-7483 · 전송 : (053) 250-7852
E-mail : sangsook@dsmc.or.kr

호발한다. 후두암의 호발부위는 성문역에서 60~65%에서 생기고 성문상부, 나머지 5%가 성문하부에 발생한다. 후두암은 흡연과 술이 원인으로 간주되어진다¹⁾. 각종 바이러스가 두경부의 편평상피암의 발생에 관련됨이 알려 지고 있다. 특히 비인두암과 Epstein-Barr virus(EBV)와의 강한 연관관계가 존재함이 밝혀 졌다²⁾. 후두암에서도 human papilloma virus(HPV)를 비롯한 각종 바이러스에 대한 연구들이 행해지고 있다. 후두암과 HPV와의 연구에서 정상 후두에서 HPV DNA의 잠복이 흔히 관찰되었으나 후두

암속에 존재하는 HPV DNA는 잠복성 HPV를 반영하여 이 암종의 암화과정에 중요한 역할을 하지 않음이 알려졌다³⁾. 후두암을 포함한 두경부암의 많은 수에서 EBV를 발견하였고 일부에서는 EBV와 HPV에 동시 감염되어 아마 이 두 바이러스의 동시 작용의 가능성을 시사하고 있다⁴⁾. 후두의 편평상피세포암의 경우 Kiarias 등⁵⁾은 33%에서 EBV 제놈이 검출되었다고 보고하였고, 남 등⁶⁾은 37%의 EBV 양성율을 보고하였다.

Bcl-2는 여포성 림프종에서 t(14:18) 염색체의 전위를 보이는 암유전자로서 bcl-2 단백질의 과발현으로 B 림프구의 변천단계에서 B 세포의 고사(apoptosis)를 억제하여 B 세포 림프종을 유발하는 것으로 알려져 있다⁷⁾. EBV가 감염된 Burkitt 림프종의 세포주에서는 EBV의 잠복막단백(latent membrane protein, LMP)가 bcl-2의 발현을 상향조절하여 세포들의 고사를 억제하여 종양을 만든다는 보고가 있다⁸⁾.

이에 저자들은 후두의 편평상피암종에서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 방법과 Epstein-Barr virus encoded RNA-1(EBER-1)에 대한 in situ hybridization(ISH)을 이용하여 EBV의 발현 빈도를 검색하고, 또한 bcl-2의 면역조직화학을 실시하여 EBV 유무와 bcl-2 발현간의 연관성을 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1994년부터 1997년까지 생검이나 수술로 적출되어 병리조직학적으로 후두의 편평상피암종으로 진단된 환자 35명의 파라핀 포매조직을 대상으로 하였다. 환자는 모두 남자였고 연령분포는 47세부터 78세까지로 평균 연령은 63세였다. 그중 11명이 성분상악, 11명이 성문역, 나머지는 기타부위에서 발생하였다. 조직학적으로 고도분화암종은 18예였고 중등도분화암종은 17예였다.

2. 연구 방법

1) EBV BamHI W region에 대한 PCR

(1) 파라핀 포매조직에서 DNA 추출

파라핀 포매조직으로부터 DNA를 얻는 방법은 Wright 등⁹⁾의 방법을 따랐으며 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 조직을 8 μ m 두께로 박절하여 5편 정도를 1.5mL tube에 취하였다. 이때 시료들간의 교차오염을 방지하기 위해 박절기 날은 깨끗이 유지하였다. 파라핀을 제거하기 위해 xylene 1mL을 넣은 후 30분간 방치하였다가 10000rpm으로 7분간 원심분리하는 과정을 2회 반복한 후 무수알코올로

조직 pellet을 2회 세척한 후 56 $^{\circ}$ C에서 30~40분간 건조시켰다. Digestion buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20)를 조직 pellet의 크기에 따라 50~300 μ l를 넣어 잘 섞어준 다음 proteinase K를 200 μ g/ μ l의 농도가 되도록 가한 후 하루 밤(16~18시간) 방치하였다. 다음날 phenol 추출법과 에탄올 침전법으로 DNA pellet을 얻은 다음, 그 양에 따라 15~30 μ l의 증류수에 녹여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

(2) 중합효소연쇄반응

반응액을 50 μ l로 하여 반응완충액(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH9.0 at 25 $^{\circ}$ C, 0.1% Triton X-100)과 dNTPs를 각각 200 μ M, 1.5mM의 MgCl₂, sense, antisense primer 각각 0.8 μ M와 추출한 DNA 1~2 μ l를 넣고 중합효소를 제외한 분량을 증류수로 보충한 후 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 기존의 proteinase를 변성시킨 후 중합효소 2units를 넣어 반응시킨다. 94 $^{\circ}$ C 2분간의 초기 변성 과정을 거친 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 45초의 주기로 40주기를 시행하고 마지막 주기 후 72 $^{\circ}$ C 5분간 더 반응시켰다.

사용한 primer는 Coates 등¹⁰⁾을 참고하였고 그 서열은 다음과 같다.

EBV1 : 5'CACTTTAGAGCTCTGGAGGA3',

EBV2 : 5'TAAAGATAGCAGCAGCGCA3'

양성 대조군으로 Raji 세포주를 이용하였고 음성 대조군으로 DNA 대신 증류수를 사용하였다. 모든 PCR 반응은 GeneAmp PCR system 9600 thermocycler(Perkin-Elmer, Foster City, CA)를 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동후 EtBr 염색으로 확인하였다.

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

2% 3-aminopropyltriethoxysilane(APES, Sigma, St. Louis, MI)와 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC, Sigma, St. Louis, MI)로 전처리한 유리 슬라이드 위에 4 μ m 두께의 조직절편을 붙여 60 $^{\circ}$ C 오븐에 하루밤 두어 조직절편을 슬라이드에 밀착시켰다. 다음날 조직절편이 붙은 슬라이드를 xylene에 5분씩 세 번 담구어 파라핀을 제거한 후 100% 에탄올에 2분씩, 95% 에탄올에 2분씩 각각 두 번 담구어 흡수한 후 DEPC-water로 씻어 내었다. 조직 절편 위에 10 μ g/ μ l의 proteinase K(Roche, Mannheim, Germany)를 적당량 넣고 30분간 두어 세포질 및 핵의 단백질 부분을 제거하고 DEPC-water로 두 번 수세하였다. 0.4% Paraformaldehyde로 후고정하고 상온에서 glycine 처리를 한 후 95% 알코올로 씻은 후 공기에 건조시켰다. EBER-1에 상보적인 30mer oligonucleotide를 Jat 등¹¹⁾을 참고로 하여

바이오니아에 주문합성하였고 oligonucleotide tailing kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 digoxigenin을 표지하여 probe로 사용하였다. Prehybridization은 hybrid 결합 혼합물에서 probe를 제외한 용액을 가한 후 37°C의 수조에서 2시간동안 반응시켰다. 주된 hybridization은 적당량의 hybrid 결합 혼합물을 조직절편 위에 놓은 후 37°C의 수조에서 하룻밤(약 20시간)동안 두어 반응시켰다. 이때 hybrid 결합 혼합물의 최종농도는 50% formamide(Sigma, St. Louis, MI), 4×SSC(0.6M NaCl, 60mM sodium citrate, pH7.0), 5×Denhardt's solution, 5mg/ml salmon sperm DNA(Sigma, St. Louis, MI), 그리고 0.3ng/μl digoxigenin-labelled probe로 구성하였다. 조직절편 위에 각각 30μl의 hybrid 결합 혼합물을 놓고 덮개유리를 덮은 후 고무풀로 봉하였다. 다음 날 결합되지 않은 probe를 씻어내기 위해 37°C에서 2×SSC로 10분간 두 번, 0.1×SSC로 10분간, 그리고 실온에서 0.1×SSC로 5분간 각각 수세한후 blocking reagent(0.5% bovine serum albumin)와 30분간 반응시켰다. 발색반응을 위해 anti-digoxigenin Fab alkaline phosphatase(Roche, Mannheim, Germany, 1 : 500)와 30분간 결합시킨 후 70% dimethylformamide(Roche, Mannheim, Germany)에 각각 5% 농도로 녹인 nitroblue tetrazolium(NBT, Roche, Mannheim, Germany) 및 5-bromo-4-chloroindolyl phosphate(BCIP, Roche, Mannheim, Germany)로 1~8시간 동안 반응시키고 methyl green으로 대조염색하였다. 음성 대조군으로 동일한 조직절편을 사용하여 주된 hybridization시 hybrid 결합 혼합물에서 probe를 제외한 용액과 반응시켰으며 그 밖에 실험군과 동일한 방법으로 실시하였다. 광학 현미경으로 관찰하여 세포질 혹은 핵에 미반성으로 암청색의 발색이 있으면 양성으로 판정하였다.

3) Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학법

전처리한 유리 슬라이드 위에 4μm 두께의 조직절편을 붙여 60°C 오븐에 하룻밤 방치한 후 xylene 용액에 5분간 3번 담궈 파라핀을 제거하고 100% 에탄올, 90% 에탄올, 75% 에탄올에 단계적으로 흡수하였다. 조직에 존재하는 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 메탄올과 30% 과산화수소가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 30분간 처리하고 PBS(phosphate buffered saline, pH7.2)로 3번 수세하였다. 조직에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01M citrate buffer 용액에 담궈어 microwave 오븐으로 10분간 가열하였다. 실온에서 식힌 후 증류수 및 PBS로 수세하였다. 일차항체로 단클론성 항체(MAb 124 : DAKO Glostrup, Denmark)를 1 : 50으로 희석하여 조직에 적당량 가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 PBS로 세척하고

이차항체로는 biotinylated anti-mouse immunoglobulin (DAKO LSAB kit, Glostrup, Denmark)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 다시 PBS로 수세한 후 streptavidin-peroxidase conjugate(DAKO LSAB kit, Glostrup, Denmark)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시키고 PBS로 수세한 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-H₂O₂ 용액(Biogenex, San Ramon, CA)으로 암시아에서 10~20 분간 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다. 음성대조군으로 동일한 조직절편을 사용하여 단클론항체대신 PBS와 반응시킨 후 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

3. 결 과

1) PCR 방법에 의한 EBV-DNA 검색

후두암 35예를 대상으로 EBV에 대한 PCR을 실시한 결과 22예에서 양성으로 나타나 62.9%의 높은 양성율을 보였다. 분화도에 따른 결과는 고도분화암종 18예중 14예에서 양성으로 나타났고 중등도분화암종 17예중 8예에서 양성으로 나타나 분화도가 좋을수록 EBV 감염율이 높았다 (Fig. 1). 발생부위에 따른 차이는 없었다.

2) ISH 방법에 의한 EBER-1 RNA 검색

EBER-1 RNA에 대한 ISH을 실시한 결과 19예(54.3%)에서 양성으로 나타났다. 이중 13예는 고도분화암종이었고

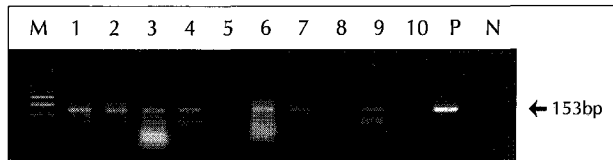


Fig. 1. Analysis of Epstein-Barr virus DNA using polymerase chain reaction(PCR) and gel electrophoresis. M, size marker(100 bp ladder); P, positive control(Raji cell line); N, negative control (distilled water); lanes 1-10, laryngeal squamous cell carcinoma. PCR product was not detected in the lanes 5, 8, and 10.

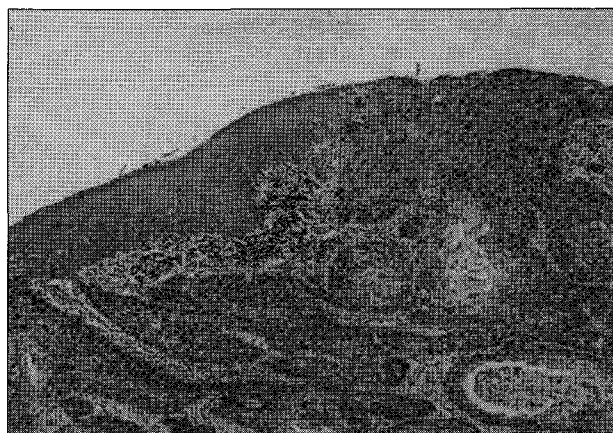


Fig. 2. Microphotograph showing well-differentiated squamous cell carcinoma of the larynx(Hematoxylin & eosin, X100).

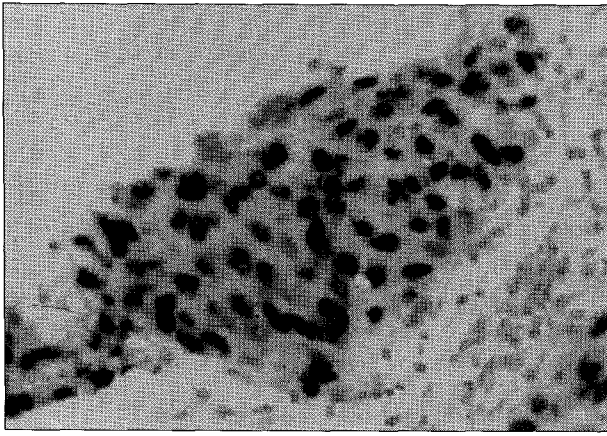


Fig. 3. In situ hybridisation using a digoxigenin-labelled EBER probe. The nuclei of the malignant epithelial cells are strongly positive($\times 100$).

6예는 중등도분화암종이었다(Fig. 2). PCR 결과와 마찬가지로 고도분화암종에서 높은 양성율을 보였다. 양성으로 나타난 19예중 17예에서 종양세포의 핵에서 강한 양성반응을 보였고(Fig. 3), 나머지 2예는 염증세포에서만 양성반응을 보였다. 종양세포에서 양성반응을 보인 17예중 1예에서는 종양세포와 염증세포 모두에서 양성으로 나타났으며 다른 1예에서는 정상상피에도 양성으로 나타났다.

3) EBER-1에 대한 ISH과 PCR에 의한 EBV DNA 동정과의 비교

ISH과 PCR에 의한 EBV 검색 결과에서 양성 일치율은 51.4%(18/35)이고 음성 일치율은 34.2%(12/35)로서 일치도는 85.7%였다. PCR에서 양성이지만 ISH에서 음성으로 나타난 경우는 4예가 있고, 반대로 PCR에서 음성이고 ISH에서 양성인 경우가 1예였다.

4) 면역조직화학법에 의한 bcl-2 단백질의 발현

Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학법을 실시한 결과 실험이 가능했던 32예 중 20예(62.5%)에서 양성으로 나타났다. Bcl-2에 양성인면서 PCR이나 ISH에서 양성인 경우가 12예였고, Bcl-2에 양성이고 PCR이나 ISH에서 음성인 경우는 8예였다. Bcl-2에 음성이고 PCR나 ISH에서도 음성인 경우가 6예였다.

고 찰

본 연구에서 후두암 35예를 대상으로 EBV에 대한 PCR을 실시한 결과 62%의 양성율을 보였다. EBER에 대한 소식자를 이용한 ISH을 실시한 결과 19예(54%)에서 양성으로 나타났다. 이 연구결과는 Kiarias 등⁹⁾이 보고한 33% 또는 남 등⁶⁾이 보고한 37%의 EBV 검출율보다 높은 수치이다. 이는 일부 연구방법의 차이나 연구재료의 제한점들에 기인

한다고 생각된다.

EBV는 172 kilobase 크기의 DNA gamma herpes virus로서 아프리카 Burkitt 림프종에서 처음으로 분리된 후, 비인두암뿐만 아니라 도립유두종의 반수에서 EBV가 발견되고¹²⁾ 그 밖에 조직이식후 발생하는 림프증식성 질환이나 Hodgkin 림프종, 말초 T 세포 림프종 등 많은 악성종양과의 연관성이 보고되었다¹³⁻¹⁶⁾.

EBV는 일차 감염후 polyclonal episomal형으로 B 림프구에 잠복한다. 그러나 EBV와 수반한다고 알려진 Burkitt 림프종, Hodgkin 림프종과 각 장기에 생기는 lymphoepithelioma에서는 clonal episomal 형으로 존재한다. 이런 사실은 EBV 감염이 종양 발생에 선행하여 암 형성에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. EBV는 EBV 핵항원(EBNAs)와 LMPs를 포함한 여러 개의 바이러스 단백을 필요로 하는 복잡한 과정을 통하여 B 림프구를 immortalize 할 수 있다. EBNA-2는 B 림프구의 변형에 중요함이 알려졌다¹⁷⁾.

본 연구에서 ISH에 의해 양성으로 나타난 19예의 후두암 중 17예에서 종양세포에서 EBER-1 mRNA가 발현되었다. 또한 그 중 1예에서는 정상상피에도 양성으로 나타났다. Cheng 등¹⁸⁾은 EBV 관련 질환의 증거가 없는 사람의 부검에서 후두 6예중 5예에서 EBV의 잠복감염을 확인 보고한 바 있다.

후두암의 분화도와 EBV의 발현과 비교하여 보면 본 연구의 결과 종양의 분화도가 좋을수록 EBV 감염율이 높은 것으로 나타났다. 사람의 각화세포(keratinocyte)에서 EBV의 LMP-1은 상피성장을 조절하지 못하고 분화를 억제한다¹⁹⁾²⁰⁾. 상피세포는 그 결과로 악성 변형의 특징인 정상 상피세포가 갖는 접촉억제(contact inhibition)능력의 상실, 상피의 방추화(spindling), 여러 층의 세포층으로 증식하는 경향 및 cytokeratin 발현의 감소를 초래한다. 더구나 분화 신호에 대한 세포 반응의 저하를 보인다. 따라서 형태적으로 EBV가 수반된 대부분의 종양은 특징적 조직학적 소견인 림프구 침윤의 배경하에 미분화된 악성세포들의 syncytial nests로 구성된 lymphoepithelioma의 양상을 주로 보이게 되는데 이 과정중 LMP-1의 역할을 종양의 미분화된 형태로부터 유추할 수 있다.

그러나 본 연구의 결과 후두암 편평상피암의 분화도가 좋을수록 EBV 감염율이 높았다. 이는 대부분의 후두의 편평상피암은 분화도가 높고 반면 lymphoepithelioma의 양상을 보이는 경우는 매우 드물어 부위에 따른 다른 양상을 추측해 볼 수 있다. 또한 EBV가 위의 분화가 잘 된 선암종에도 보고되어 EBV가 항상 lymphoepithelioma의 양상을 보이는 조직형에만 국한해서 발견되지 않음을 알 수 있었다²¹⁾.

본 연구에서 후두암의 발생부위에 따른 EBV의 빈도차이는 볼 수 없었다.

본 연구의 결과에서 ISH과 PCR에 의한 EBV 검색의 양성 일치율은 51.4%(18/35)이고 음성 일치율은 34.2%(12/35)로서 일치도는 85.7%였다. PCR에서 양성이지만 ISH에서 음성으로 나타난 경우는 4예가 있고, 반대로 PCR에서 음성이고 ISH에서 양성인 경우가 1예 있었다. 병리과에서 연구목적으로 쉽게 사용할 수 있는 파라핀 포매조직을 이용하여 최근 EBV가 만드는 EBER-1과 EBER-2를 사용하는 ISH 방법은 바이러스 감염 분포와 정도를 세포 수준에서 검색할 수 있다는 장점이 있다. EBER-1과 EBER-2은 La(lupus antigen) 단백질과 EBER 단백질과 결합하여 핵 내 리보핵산으로 존재하여 포르말린으로 고정된 파라핀 포매조직을 임상적으로 유용하게 사용할 수 있다. 그러나 각 세포당 50~200개 이상의 EBER-1과 EBER-2 유전자가 있어야 ISH로 검출이 가능하여 민감도가 southern blot이나 PCR에 비해 낮다는 단점이 있다²²⁻²⁴⁾. EBV의 특성과 다양한 악성종양과의 연관성으로 볼 때 특이적이고 민감하며 신속한 검출방법이 필요한 실정이다.

EBV 감염과 Bcl-2 암유전자의 상호작용으로 EBV가 잔존하거나 바이러스와 수반된 다양한 암종의 병인에 역할을 한다고 추정되고 있다. B 림프구에서 LMP-1의 발현은 bcl-2 발현을 상향조절하여 고사를 방지한다. Bcl-2의 발현이 고사를 억제하고 세포수명을 연장하게됨은 널리 알려져 있다²⁵⁾. 또한 EBV가 감염된 Burkitt 림프종의 세포주에서는 EBV의 LMP가 bcl-2의 발현을 상향조절하여 세포들의 고사를 억제하여 종양이 형성된다는 보고가 있다²⁶⁾. 본 연구에서 후두의 편평상피암을 대상으로 면역조직화학적으로 bcl-2 단클론 항체를 이용하여 발현여부를 관찰한 32예 중 20예에서 양성으로 나타났다. Bcl-2에 양성이면서 PCR이나 ISH에서 EBV가 양성인 경우가 12예였고, Bcl-2에 양성이고 PCR이나 ISH에서 EBV에 음성인 경우는 8예였다. Bcl-2에 음성이고 PCR나 ISH에서도 EBV가 음성인 경우가 6예였다. EBV에 따른 bcl-2의 상향조절은 관찰되지 않았다. 이는 bcl-2 발현은 EBV 존재와는 별 관련성이 없음을 의미한다. 이러한 저자들의 연구결과는 Lu 등²⁷⁾과 Kouvidou 등²⁸⁾과 일치하는 소견이나 이는 차후에 더욱 많은 예의 후두암을 대상으로 한 연구에 의해 보완되리라 기대된다.

결 론

후두암은 두경부에서 가장 흔한 암으로 대부분이 편평상피암이다. 저자들은 후두의 편평상피암종 35예를 대상으로 EBV의 발현 빈도를 알고자 EBV DNA에 대한 PCR을 실시한 결과 62.9%의 양성율을 보였다. EBER-1에 대한 소식자를 이용한 ISH을 실시한 결과 54.3%에서 양성으로 나

타났다. 후두의 편평상피암의 분화도가 높을수록 EBV 감염율이 높았으나 종양의 발생부위에 따른 차이는 볼 수 없었다.

후두의 편평상피암종에서 EBV 유무와 bcl-2 발현간의 연관성을 알아 보고자 bcl-2 단백질에 대한 면역조직검사상 62.5%에서 bcl-2의 발현이 관찰되었으나 EBV에 따른 bcl-2의 상향조절은 관찰되지 않았다. 이는 bcl-2 발현은 EBV 존재와는 별 관련성이 없음을 의미한다. 이러한 저자들의 연구결과는 차후 더욱 많은 예의 후두암을 대상으로 한 연구에 의해 보완되리라 기대된다.

References

- 1) Muir C, Weiland L : *Upper aerodigestive tract cancers. Cancer.* 1995 ; 75 : 147
- 2) Wu T-C, Mann RB, Epstein J, et al : *Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma : A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. Am J Pathol.* 1991 ; 138 : 1461-1469
- 3) Wenig BM : *General principles of head and neck pathology. In : Harrison LB, Sessions RB, Hong WK. Head and Neck Cancer. A Multidisciplinary Approach. 1 ed., Lippincott-Raven, 1999*
- 4) Tyan YS, Liu ST, Ong WR, Chen ML, Shu CH, Chang YS : *Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 53
- 5) Kiaris H, Ergazaki M, Segas J, Spandidos DA : *Detection of Epstein-Barr virus genome in squamous cell carcinomas of the larynx. Int J Biol Markers.* 1995 ; 10 : 211-215
- 6) 남은숙 · 김덕환 · 신형식 · 박영의 · 김영식 · 김인선 : 후두암종 및 비인두암종에서 p53 유전자와 Epstein-Barr 바이러스에 관한 연구. *대한병리학회지.* 1998 ; 32 : 551-562
- 7) Wang D, Liebovitz AD, Kieff E : *An Epstein-Barr virus membrane antigen expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. Cell.* 1985 ; 43 : 831-40
- 8) 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 : 1107-1115.
- 9) Wright DK, Manos MM : *Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In : Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, A guide to methods and applications, San Diego : Academic Press, 1990 : 153-158*
- 10) Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangoro HO, Slavin G : *Simplified procedures for applying polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. J Clin Pathol.* 1990 ; 44 : 15-118
- 11) Jat P, Arrand JR : *In vitro transcription of two Epstein-Barr virus specified small RNA molecules. Nucleic Acids Res.* 1982 ; 10 : 3407-3425.

- 12) Macdonald MR, Le KT, Freeman J, Hui MF, Cheung RK, Dosch HM : *A majority of inverted sinonasal papillomas carries Epstein-Barr virus genomes. Cancer. 1995 ; 75 : 2307*
- 13) Katz BZ, Raab-Traub N, Miller G : *Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. K Infect Dis. 1989 ; 160 : 589-597*
- 14) Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al : *Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N Engl J Med. 1989 ; 320 : 502-506*
- 15) Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, et al : *Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma. Lancet. 1990 ; 335 : 128-130*
- 16) Su IJ, Hsieh HC, Lin KH, et al : *Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA : A clinicopathologic and molecular analysis. Blood. 1991 ; 77 : 799-808*
- 17) Kieff E, Liebowitz D : *Epstein-Barr virus and its replication. In : Fields BN, Knipe DM, et al, eds. Fundamental virology. 2nd edn. New York : Raven Press, 1991 : 897-928*
- 18) Cheng WY, Chan AC, Loke SL, Srivastava G, Pittaluga S, Lim LY, Ho FC : *Latent sites of Epstein-Barr virus infection. Am J Clin Pathol. 1993 ; 100 : 502-506*
- 19) Dawson CW, Rickinson AB, Young LS : *Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. Nature. 1990 ; 344 : 777-780*
- 20) Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G : *Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. Nature. 1990 ; 345 : 447-449*
- 21) Shibata D, Weiss LM : *Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. Am J Pathol. 1992 ; 140 : 769-774.*
- 22) Howe JG, Steitz JA : *Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA. 1986 ; 83 : 9006-9010*
- 23) Glikman JN, Howe JG, Steitz JA : *Structural analyses of EBEB1 and EBEB2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. J Virol. 1988 ; 62 : 902-911.*
- 24) Akao I, Sato Y, Mukai K, et al : *Detection of Epstein-Barr virus DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissue of nasopharyngeal carcinoma using polymerase chain reaction and in situ hybridization. Laryngoscope. 1991 ; 101 : 279-283.*
- 25) Hokenbery D, Nunez G, Milliam C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ : *Bcl-2 in an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature. 1990 ; 348 : 334-336.*
- 26) 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 : 1107-1115.*
- 27) Lu QL, Elia G, Lucas S, Thomas JA : *Bcl-2 protooncogene expression in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer. 1993 ; 53 : 29-35*
- 28) Kouvidou CH, Kanavaros P, Papaioannou D, et al : *Expression of bcl-2 and p53 proteins in nasopharyngeal carcinoma. Absence of correlation with the presence of EBV encoded EBEB1-2 transcripts and latent membrane protein-1. J Clin Pathol Mol Pathol. 1995 ; 48 : M17-M22.*