

후두 편평 세포암에서의 HSP27 발현에 관한 연구

가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실, 생화학교실*

박경호 · 김민식 · 선동일 · 조승호 · 이정화*

= Abstract =

Study on expression of HSP27 in squamous cell carcinoma of larynx

Kyung-Ho Park, MD, Min-Sik Kim, MD, Dong-Il Sun, MD,
Seung-Ho Cho, MD, Jung-Wha Lee, MD*

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Biochemistry*,
The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background and Objective : Heat shock protein(HSP) 27 is a member of the small HSP family that plays a part in the epithelial cell growth and differentiation, wound healing, apoptosis and cell protection against inflammatory cytotoxic mediators. The expression of HSP27 was investigated in normal laryngeal tissue and squamous cell carcinoma of the larynx.

Materials and Methods : We studied expression of HSP27 by Western blot on 20 patients of laryngeal squamous cell carcinoma.

Results : HSP27 expressed in all normal and cancer tissues. In 9 cases(45%), expression of HSP27 more prominent in cancer tissue. Statistically, there were no significant difference in the expression of HSP27 in normal and cancer tissue, clinical stage and tumor differentiation.

Conclusion : 45% of cancer tissues was more prominent than normal tissue. But further studies on expression of HSP27 in laryngeal cancer and relationship with clinical parameter should be done.

Key Words : Heat shock protein 27 . Laryngeal cancer

서 론

세포는 이들이 처한 환경에서 유해한 변화에 대응하는 수 많은 방법들을 발달시켜 왔다. 그 예로 특정 유전자의 발현을 증폭시키거나 또는 영구적으로 변화시켜 적응하여 왔다. 또한 거의 모든 개체들의 세

포들은 온도 상승에 대한 비슷한 반응을 보여 왔는데 이를 초기에 heat shock response라 하였고 이 반응은 선택적으로 heat shock protein을 발현하였다.

Heat shock protein(HSP)은 1962년 Rittosa가 가열한 초파리에서 염색체가 부풀어 지는 것을 관찰하여 처음으로 보고하였고 1973년 Tissieres등에 의하여 이것이 특이한 단백질의 합성과 관계가 있다는 것이 알려지면서 이를 HSP라 하였다¹⁾²⁾. HSP은 분자량에 따라 8kD에서 110kD 사이에 다양하게 존재한다. HSP은 열 자극 외에도 아미노산 유도체, 에탄올, 변성된 단백질, 항암제, 바이러스 감염, 칼슘이온, 호르

교신저자 : 김민식, 가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 이비인후과학교실 동문회 연구기금으로 이루어졌음
전화 : (02) 590-1512 전송 : (02) 595-1354
E-mail : entkms@cmc.cuk.ac.kr

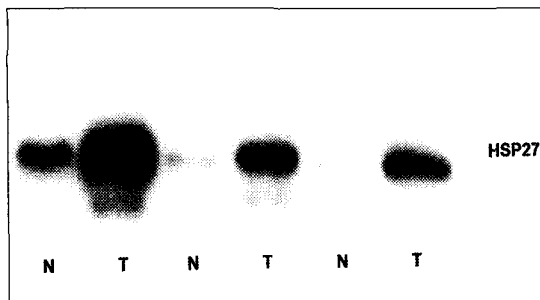


Fig 1. Western blot of HSP27 in normal tissue(N) and tumor(T) shows relative high expression of HSP27 in tumor of case 7, 18, 20.

몬 등 여러 환경적 요인이나 병태 생리학적 스트레스에 의해 반응하여 세포 내에서 발현되어 세포 방어 작용에 관여하여 스트레스 단백질이라고도 알려져 있다³⁾⁴⁾. 또한 세포의 proliferation, differentiation과 oncogenesis에도 주요한 역할을 하는 것으로도 보고되고 있다.

한편 암의 발생은 암 유전자의 활성화나 종양억제 유전자의 비활성화에 의하거나 세포의 성장, 분화 및 증식에 관여하는 여러 성장인자와 수용체들의 상호 불균형에 의해 형질전환이 일어나 종양세포로 발전한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 저 분자량 HSP 그룹에 속하는 HSP27에 대하여 후두의 정상조직과 후두 편평 세포암에서의 발현 양상을 비교 연구 하였다.

대상 및 방법

1995년 1월부터 1997년 10월까지 강남성모병원에서 후두암으로 진단을 받고 수술을 받은 20명의 환자에서 수술시 채취하였던 각각의 정상 후두 조직과 후두암 조직을 대상으로 하였다. 이들 조직은 파라핀 포매 처리하고 남은 조직은 -70℃에 신속히 냉동 보관하였다.

Western blotting 방법에 의한 후두암 조직과 정상 조직에서의 HSP27의 발현 조사

환자에서 적출한 정상조직과 종양조직을 RIPA

Table 1. Results of relative expression of HSP27 in normal and cancer tissue of larynx (G-Glottis, SG-Suraglottis, N-Normal tissue T-Tumor, RE-Relative expression)

No	Sex/Age	TNM stage	Site	Differentiation	RE(T/N)
1	M/67	T3N0M0	G	mod	>1
2	M/72	T3N2bM0	SG	mod	>1
3	M/53	T2N0M0	G	well	>1
4	M/56	T2N0M0	G	well	>1
5	M/47	T4N0M0	SG	poorly	>1
6	M/58	T3N1M0	SG	mod	>1
7	F/56	T1aN0M0	G	well	>1
8	M/73	T1aN0M0	G	mod	≤1
9	M/65	T3N0M0	G	well	≤1
10	M/72	T3N2bM0	TG	mod	≤1
11	M/76	T1bN0M0	G	mod	≤1
12	M/40	T4N0M0	G	well	≤1
13	M/60	T4N0M0	G	well	≤1
14	M/55	T1N0M0	G	mod	≤1
15	M/59	T2N0M0	G	mod	≤1
16	M/57	T2N1M0	G	mod	≤1
17	M/46	T1aN0M0	G	well	≤1
18	M/65	T1aN0M0	G	well	>1
19	M/46	T4N2bM0	SG	mod	≤1
20	M/67	T3N0M0	SG	mod	>1

buffer (150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl pH8.0)에 용해 시킨 뒤 sonification 후 원심 분리하여 상청액을 얻었다.

일정량의 단백질에 해당하는 상청액을 가지고 10% SDS-PAGE를 시행한 뒤 HSP 단일 클론 항체 (Stressgen) 및 peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG (Promega)와 차례로 반응시킨 다음 ECL(Amersham) 반응에 의해 HSP27의 발현 정도를 조사하였다. 발현의 정도는 정상조직의 최소 발현정도를 +로 하고, 각각을 +, ++, +++, ++++으로 분류하였고 각각의 환자의 정상조직과 암조직의 상대적 발현율을 1보다 큰 경우와 1이하로 나누었다. 통계적 분석은 카이 제곱 방법(χ^2)을 사용하였고 P<0.05인 경우를 의미있게 평가하였다.

Table 2. Relative expression of HSP27 in early and advanced cancer

	Relative Expression of HSP27 (Tumor/Normal)	
	>1	≤1
T1, T2 (n=10)	4	6
T3, T4 (n=10)	5	5

Table 3. Relative expression of HSP27 according to differentiation.

	Relative expression of HSP27(Tumor/Normal tissue)	
	>1	≤1
well diff.	4	4
mod. diff.	4	7

Table 4. Relative expression of HSP27 according to N stage

	Relative expression of HSP27(Tumor/Normal tissue)	
	>1	≤1
N0	7	8
N+	2	3

Table 5. Relative expression of HSP27 according to primary site

	Relative expression of HSP27(Tumor/Normal tissue)	
	>1	≤1
Glottis	5	9
Supraglottis	4	1

Table 6. Relative expression of HSP27 according to recurrence

	Relative expression of HSP27(Tumor/Normal Tissue)	
	>1	≤1
Recurrence	1	1
Non-recurrence	8	10

결 과

1) 정상조직과 종양조직에서의 HSP27의 발현

20예의 모든 정상조직과 종양조직에서 정도의 차이를 보였으나 모두 HSP27가 발현되었다(Fig. 1). 정상조직에 대한 종양조직에서의 상대적 발현율을 조사하였으며 종양조직에서 발현이 높은 예는 9예였으며(45%) 나머지는 비슷하거나 낮게 발현되었다(Table. 1).

2) T stage에 따른 HSP27 발현율의 차이

Early T stage (T1, T2) 10예 중 4예에서 상대적 발현율이 1보다 높았으며(40%) 6예에서는 1 이하였다. Advanced T stage (T3, T4) 10예 중 5예에서 발현율이 1보다 높았으며 나머지는 1 이하였다. 그러나 두 군 사이에서는 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$, Table. 2).

3) 분화도에 따른 HSP27 발현율의 차이

Well differentiated cancer 8예 중 4예에서 HSP27 발현율이 1보다 높았으며(50%) 나머지는 1 이하였다. Moderately differentiated cancer 11예 중 4예에서 HSP27 발현율이 1보다 높았으며(36%) 7예는 1보다 낮았다. 역시 두 군 사이에서의 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$, Table. 3).

4) N stage 따른 HSP27 발현율의 차이

N0 17예 중 7예에서 HSP27 발현율이 1보다 높았으며(47%) 나머지는 1 이하였다. N+ 5예 중 2예에서 발현율이 1보다 높았으며(40%) 3예에서 1 이하였다. 역시 두 군 사이에서의 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$, Table. 4).

5) 원발 부위에 따른 HSP27 발현율의 차이

성문암 14예 중 5예에서 HSP27의 발현율이 1보다 높았으며(36%) 9예에서는 1 이하였다. 성문상암 5예 중 4예에서 발현율이 1보다 높았으며(80%) 1예에서 1 이하였다. 두 군 사이에서의 유의한 차이는 없었으나($P > 0.05$, Table. 5) 성문상암에서 높은 경향을 보였다.

6) 암 재발과 관련된 HSP27 발현율의 차이

전체 20예 중 2예에서 재발하였으며 1예에서 HSP27

의 발현율이 1보다 높았으며(50%) 1에서 1이하였다. 재발하지 않았던 18예 중 8예에서 발현율이 1보다 컸으며(44%) 10예에서 1이하였다. 두 군 사이의 유의한 차이는 없었다($P > 0.005$, Table. 6).

고 찰

암의 발생과 각각의 암에 대한 진단, 치료 및 예후 등에 관계된 특성들은 같은 종양에서도 다르게 나타나는데 최근에는 성장인자나 그와 연관된 수용체, 변형된 암 유전자, 암 유전자 단백질, 또는 암 억제 유전자 단백질 등을 종양세포에서 규명하여 종양의 발생 및 예후와의 관계를 밝히려는 노력이 진행되고 있다. 이러한 관점에서 두경부암의 특성 및 자연 경과를 예측할 수 있는 다양한 인자를 찾고자 하는 많은 연구가 분자 생물학의 발전과 더불어 활발히 이루어지고 있다.

HSP와 관련하여 최근 활발한 연구가 이루어지고 있으며 암 발생과 특성에 관한 몇 가지 가설들이 제시되고 있다. 먼저 추정되는 가설은 HSP가 단백질의 상호작용 중에 "molecular chaperones"으로 작용한다는 것이다⁵⁾. 즉 HSP가 변성된 단백질과 결합하여 이들의 재생 또는 소멸에 관여한다는 것인데 이는 여러 proto-oncogene에 의해 만들어지는 m-RNA를 안정화시키는 데에 관여하여 이루어지는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 그리고 HSP의 phosphorylation이 여러 다른 세포의 다양한 signal transduction에 관여한다는 것이다. HSP27은 여러 isoform을 가진 작은 phosphoprotein으로서 unphosphorylated isoform (HSP27A)와 2개의 major phosphoisoforms(HSP27B, HSP27C) 그리고 1개의 minor phosphoisoform(HSP27D)이 있으며 HSP27의 적절한 단백질 보호 작용을 위해서는 phosphorylation의 과정이 필요하다⁴⁾¹¹⁾. 지금까지 알려진 백혈병이나 유방암 등에서의 연구 결과에 따르면 저분자 HSP와 고분자 HSP의 종양 내 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있다. Thor 등은 300명의 유방암 환자에서 악성도가 높은 암에서 HSP27의 발현이 증가한다고 보고하였고 Gastric cancer에서는 HSP27은 나쁜 예후를 보이는 경우에 발현이 많았다고 하였다⁷⁾⁸⁾. Endometrial carcinoma

에서 HSP27의 발현은 종양의 분화도 및 에스트로젠, 프로제스테론 수용체 존재와 연관성이 있으며 Cervical cancer에서는 HSP27은 주로 분화도가 좋은 암종에서 발현된다고 하였다. Tetu 등은 43명의 Malignant fibrous histiocytoma 환자에서 HSP27 발현시 예후가 좋았다고 하였다⁹⁾¹⁰⁾.

두경부 편평 상피암에서 Regina 등에 의하면 HSP27과 HSP70이 low T stage와 연관되어 있으며 대부분의 T4 tumor에서는 HSP가 발현되지 않았다고 보고하였고 tumor grade와 경부전이 또는 생존율과는 연관이 없다고 하였다⁸⁾.

본 연구에서는 모든 종양 조직에서 HSP27의 발현을 관찰할 수 있었으며 Regina 등의 결과와 같이 종양 분화도와 예후와 관련된 경부 전이와 재발율에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 그러나 T stage와 관련하여는 early T와 advanced T stage 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다. 통계적 유의성은 없었으나 종양조직에서 HSP27의 발현이 증가한 것으로 생각되어지며 원발 부위에 따른 HSP27의 발현에서 성문상부암에서 암조직의 상대적 발현율이 높았으며 성문암에서는 상대적 발현율이 낮았다. 표본수의 한계로 통계적 의의는 없었으나 HSP27이 원발 부위에 따라 나타나는 중요한 표식자(marker)로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 통계적 유의성은 없으나 종양조직에서의 HSP27의 발현이 증가하고 성문상암에서 상대적 발현율이 증가한 것으로 생각되며 stage나 분화도에 따른 발현율의 차이는 보이지 않았다. 후두암을 포함한 두경부 편평 상피암에서의 HSP27의 발현기전과 임상 양상과의 관계에 대한 추후 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Reference

- 1) Rittosa FA: *New pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. Experientia. 1962;18:571-3.*

- 2) Thompson AM, Neely JG: *Introduction of heat shock protein in the interdental cells by hyperthermia. Otolaryngol Head Neck Surg. 1992;107(6): 769-74.*
- 3) Lee HM, Lee US, Choi CS, LeeSH: *Expression of HSP72 in nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. Korean J Otolaryngol. 1999;42:1400-4.*
- 4) OS Soldes, RD Kuick, IA Thompson, SJ Hughes, MD Iannettoni, SM Hanash, et al: *Differential expression of HSP27 in normal oesophagus, Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinomas. British Journal of Cancer. 1999;79(34): 595-603.*
- 5) Morimoto RI: *Heat shock: the role of transient inducible responses in the cell damage, transformation, and differentiation. Cancer cells. 1991: 3:295-9.*
- 6) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Richard Hostetter, Karen Cleary, et al: *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature. 1989;342:705-8.*
- 7) Ann Thor, Christopher Benz, Dan Moore II, Eric Goldman, Susan Edgerton, Jacques Landry, et al: *Stress response protein(srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histological, and prognostic correlations. J Natl Cancer Inst. 1991;83:170-8.*
- 8) Regina Gandour-Edwards, Trock BJ, Paul Gumerlock, Donad PJ: *Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998: 118:610-5.*
- 9) Ciocca DR, Steffi Oesterreich, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SAW: *Biological and clinical implication of heat shock 27000 (HSP27): a review. J Natl Cancer Inst. 1993;85:1558-70.*
- 10) Bernard Tetu, Bernard Lacasse, Henri-Louis Bouchard, Real Lagace, Jacques Huot, Jacques Landry: *Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. Cancer Research. 1992;52:2325-8.*
- 11) William J. Welch: *Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol Rev. 1993;72:1063-81.*