

두경부 편평세포암종에서 CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 유전자 다형성 및 p53 과발현*

한양대학교 의과대학 이비인후과학교실
태 경 · 박혜경 · 이승환 · 김경래 · 이형석

= Abstract =

The Relationship between the Polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 and p53 Overexpression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Kyung Tae, M.D., Hye Kyung Park, M.D., Seung Hwan Lee, M.D.,
Kyung Rae Kim, M.D., Hyung Seok Lee, M.D.

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Background and Objectives : Individual genetic susceptibilities to chemical carcinogens have been recognized as a major important host factors in human cancers. The cytochrome P450 family (CYPs) and glutathione-S-transferase (GST) have been reported to be associated with risks to the smoking-related human cancers. Inactivation of tumor suppressor genes like p53 play a key role in tumor progression. The purpose of this study is to demonstrate an association between p53 overexpression and the prevalence of the genetic polymorphisms of CYP1A1 and GSTs in Korean head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Materials and Methods : The polymorphisms of CYP1A1 and GSTs were analyzed by PCR and PCR-RFLP in 98 Korean head and neck squamous cell carcinoma patients. The expression of p53 was analyzed by immunohistochemistry with anti-p53 Ab (DO7).

Results : Overexpression of p53 detected in 45.9% of HNSCC. The odds ratio for p53 overexpression in GSTM1 (-), GSTT1 (-), GSTP1 (val/val) and CYP1A1 (val/val) were 1.53, 1.83, 1.17 and 1.47, respectively. Among the combined genotypes, the odds ratio of the CYP1A1 val/val, GSTM1 (-), CYP1A1 ile/ile, GSTT1 (-), and CYP1A1 val/val, GSTT1 (-) were 2.0, 2.34 and 4.68, respectively.

Conclusion : Based on our results, it might be suggested that p53 overexpression is slightly increased in GSTM1 (-), GSTT1 (-), GSTP1 val/val, CYP1A1 val/val genotypes. The further study is needed to evaluate the relationship and mechanism between the p53 overexpression and the specific CYP1A1 and GSTs genotypes.

KEY WORDS : p53 · CYP1A1 · GSTs · Head and neck cancer.

서 론

두경부 영역의 악성종양은 흡연과 음주가 중요한 발암인자로 알려져 있으며, 대부분의 환경적 발암물질은 복합적

인 효소 반응에 의해 대사되며, 이러한 대사작용은 유전자에 의해 결정되어진다. 즉, 노출된 발암물질을 대사하는데 있어서의 개개인의 효과성(effectiveness)이 악성종양에 대한 개인의 감수성에 영향을 미치게 된다¹⁾.

대부분의 환경적 발암물질(environmental carcinogens)

*이 논문은 2001년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

교신저자 : 태 경, 470-701 경기도 구리시 교문동 249-1 한양대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (031) 560-2363 · 전송 : (031) 566-4884 E-mail : kytae@hanyang.ac.kr

대상 및 방법

은 활성화 과정(phase I)과 비활성화 과정(phase II)을 포함한 복합적인 효소작용에 의해 대사된다. 활성화 과정에 의해 활성화된 발암물질은 DNA와 결합하여 DNA adduct를 형성하여 DNA의 손상 및 변이를 일으켜 암을 야기한다. 한편으로 활성화된 발암물질은 비활성화 과정에 의해 비활성화 되므로, 활성화 과정 대사효소(CYPs)와 비활성화 과정(phase II) 대사 효소(GST, NAT)의 활성화도의 균형에 따른 DNA adduct 양에 의해 암 발생의 위험도가 결정된다²⁻⁵⁾.

CYP1A1 유전자는 arylhydrocarbon hydroxylase의 활성화도와 관계가 있는 cytochrome P450 family의 한 효소군으로, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)에 의한 활성화도 실험에 의해 다형성이 있음이 증명되었다⁶⁻⁸⁾. 최근의 많은 연구에서 CYP1A1 유전자의 cloning이 가능하면서 PCR-RFLP 방법에 의한 다형성이 최소한 2군데, Msp I 제한효소 인식 부분(3'-flanking 부위)과 exon 7에 있음이 알려져 있으며 인종간에 차이가 있음이 보고되었다⁶⁻⁹⁾.

GSTs는 glutathione과 세포독성과 유전자독성을 가지고 있는 호지질복합체(lipophilic compounds)의 반응을 촉매하는 다기능 단백질이며¹⁰⁾, 화학적 발암물질의 비활성화에 관여한다. GSTs의 기능은 정상조직과 종양조직에 있어서 10배 이상 차이가 있는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

암억제유전자인 p53의 변이는 인체암 중 가장 흔한 유전자 변화로 알려졌으며 실험을 통해 p53 유전자 결핍 생쥐는 태어난 지 수 주 후에 암이 여러 장기에서 발생하는 것을 밝혔으며, p53은 정상세포가 암세포로 변환되는 것을 막는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

Kawajiri 등은 일본인의 폐암 환자에 있어서 p53 변이율과 CYP1A1 val allele이 유의한 연관성이 있어 담배와 연관된 암의 발생에 있어 발암물질의 대사유전자와 암억제 유전자 변이가 강한 연관이 있을 것으로 보고하였다¹²⁾. Jeffery 등¹³⁾은 환자-대조군 실험으로 CYP1A1, p53, GSTM1, GSTT1, GSTP1의 유전자 다형성과 두경부 편평세포암의 발생 위험도와 통계학적 유의한 연관관계가 없다고 보고하였다. Philip 등⁵⁾은 p53 변이가 GSTM1과 CYP1A1 등의 대사효소의 특정 유전자형과 연관이 있음을 보고하였으며 또한 흡연군에서 p53 변이가 높았으며 흡연의 p53 변이에 대한 상대적 위험도는 2.8(1.1~7.2)이라 보고하였고 흡주양이 증가할수록 p53의 발현이 증가함을 보고하였다.

저자들은 한국인 두경부 편평세포암종 환자에서 p53 과발현과 CYP1A1, GSTM1, GSTT1, 및 GSTP1의 유전자 유형을 조사하여 이들 유전자의 유형에 따른 p53 과발현의 상대적 위험도를 분석하여 두경부 편평세포암종의 발생에서 암억제유전자인 p53과 발암물질 대사유전자의 다형성의 연관관계를 알아보려 하였다.

1. 대 상

한양대학교의료원 이비인후과에 내원한 환자 중에서 병리조직학적으로 편평세포암종으로 진단받은 두경부암 환자 98명을 대상으로 하였다. 암의 원발부위는 후두암이 52예, 구강 및 구인두암이 35예, 하인두암이 9예, 기타 2예였다. 환자의 연령분포는 27세에서 81세로 평균 59세였고, 성별 분포는 남자가 82명, 여자가 16명이었다. 암환자군 중 흡연경력이 없었던 경우가 14예, 흡연경력이 있었던 경우가 84예 였으며, 흡연자 중 흡연량을 40갑*연수(하루 흡연갑수×흡연년수)를 기준으로 분류하였을 때¹⁴⁾ 고용량 흡연자는 34예, 저용량 흡연자는 50예 였다. 암환자군 중 비흡주군은 28예, 음주력이 있었던 경우가 70예이었고 소주를 기준으로 한 음주양에 따라 0.1~20잔*년은 저용량 음주군, 20~40잔*년은 중등도 음주군, 40잔*년 이상은 고용량 음주군으로 분류하였을 경우 각각 32예, 17예, 21예였다⁹⁾.

2. 방 법

환자의 말초 혈액을 채취하여 실험재료로 사용하였으며 말초 혈액은 EDTA 항응고제가 들어있는 튜브에 넣어 -70℃에 보관한 후 실험에 사용하였다. 말초혈액으로 부터의 DNA 추출은 Wizard™ Genomic DNA purification system(Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하였다.

1) CYP1A1 Msp I 및 exon 7 다형성 결정

CYP1A1 Msp I 제한효소 인식부위는 유전자의 다형성 분석은 중합효소 연쇄반응-제한효소절편길이에 다형현상(PCR-RFLP, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)에 의해 분석하였으며, CYP1A1의 Msp I 제한효소 인식부위 다형성을 위한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

CYP1A1 Msp I site(Hayashi 등¹⁵⁾);

Forward : 5' -CAG TGA AGA GGT GTA GCC-GCT-3'

Backward : 5' -TAG GAG TCT TGT CTC ATG-CC-3'

2% agarose gel에서 전기 영동하여 제한 효소에 의한 인식 부위 유무에 따라 CYP1A1의 Msp I 제한효소 인식 부위의 다형성을 결정하였다. 제한 효소 처리전의 중합효소반응 산물의 염기 크기는 340bp이며 두개의 allele 모두에 제한 효소의 인식부위가 있으면 140, 200bp 크기의 band가 나타나며(m2/m2 type), 한개의 allele에만 있으면 340, 200, 140bp 크기의 band가 나타나고(m1/m2 type) 두개의 allele 모두에 제한 효소의 인식부위가 없을 때는

340bp의 band만이 나타난다(Fig. 1).

CYP1A1의 exon 7 다형성은 대립인자-특이중합반응 (allelic specific polymerase chain reaction) 방법을 이용하였다. 즉 forward primer의 3'-말단부위에 다형성을 나타내는 염기 배열의 차이로 primer를 제작하고 backward primer를 공통으로 사용하여 두쌍의 반응을 동시에 일으켜 PCR 반응 유무에 따라 다형성을 결정하였다.

CYP1A1 exon 7(Kihara 등¹⁶⁾ ;

Forward : CYP1A1 (Ile)

5' -CGG AAG TGT ATC GGT GAG-ACCA-3'

CYP1A1 (Val)

5' -CGG AAG TGT ATC GGT GAG-ACCG-3'

Backward : 5' -GTA GAC AGA TCT AGG CCT-CA-3'

Denaturation은 95°C에서 1분, annealing은 60°C에서 1분간 총 35cycle 반응시켰다. 두 개의 PCR 반응의 유무에 따라 AA(Ile/Ile), AG(Ile/Val), GG(Val/Val) 유전자 유형으로 나누었다. 중합효소반응 산물의 염기 크기는 200bp

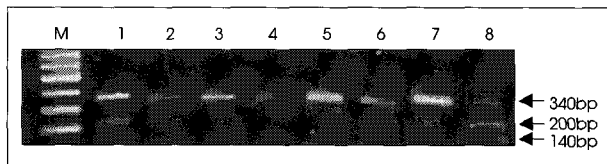


Fig. 1. Genotypes of CYP1A1 Msp I. Lane 2, 3, 4, 5, 6, 7 : homozygous m1/m1. Lane 1 : heterozygous m1/m2. Lane 8 : homozygous m2/m2.

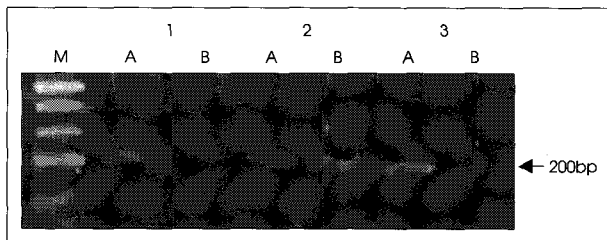


Fig. 2. Genotypes of CYP1A1 Exon 7. Lane 1, 3 : homozygous Ile/Ile. Lane 2 : heterozygous Ile/Val.

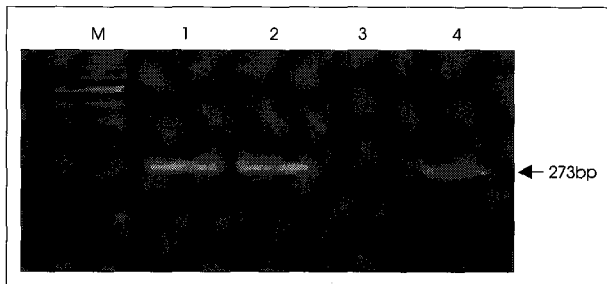


Fig. 3. Genotypes of GSTM1. Lane 1, 2, 4 : GSTM1(+) : homozygously and heterozygously present allele. Lane 3 : GSTM1(-) : homozygously null allele.

이며 A(Ile) primer를 이용한 중합효소반응에서만 band가 나타나면 Ile/Ile 유형이고 B(Val) primer를 이용한 중합효소반응에서만 band가 나타나면 Val/Val 유형이며 A(Ile), B(Val) 모두에서 band가 나타나면 Ile/Val 유형이 된다 (Fig. 2).

2) GSTM1 유전자 다형성 결정

Comstock 등¹⁷⁾의 방법을 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR) 유무에 따라 유전자 다형성을 결정하였다. GSTM1의 결손 부위 다형성을 위한 중합효소반응은 94°C에서 5분간 반응시킨후, denaturation이 95°C에서 10초, annealing이 60°C에서 20초, 그리고 extension이 72°C에서 45초로 30cycles을 시행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 중합효소반응산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 중합효소반응 유무를 확인한 후 273bp band가 있으면 GSTM1(+)로, band가 없으면 GSTM1(-)로 분류하였다(Fig. 3).

GSTM1 primer(Comstock 등¹⁷⁾ ;

Forward : 5' -GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG-C-3'

Reverse : 5' -GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG-G'-3'

3) GSTT1 유전자 다형성 결정

Warwick 등¹⁸⁾의 방법을 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR) 유무에 따라 다형성을 결정하였다. GSTT1의 결손 부위 다형성을 위한 중합효소반응은 94°C에서 5분간 반응시킨후, denaturation이 95°C에서 10초, annealing이 60°C에서 20초, 그리고 extension이 72°C에서 45초로 30 cycles을 시행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 중합효소반응산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 중합효소반응 유무를 확인한 후 480bp band가 있

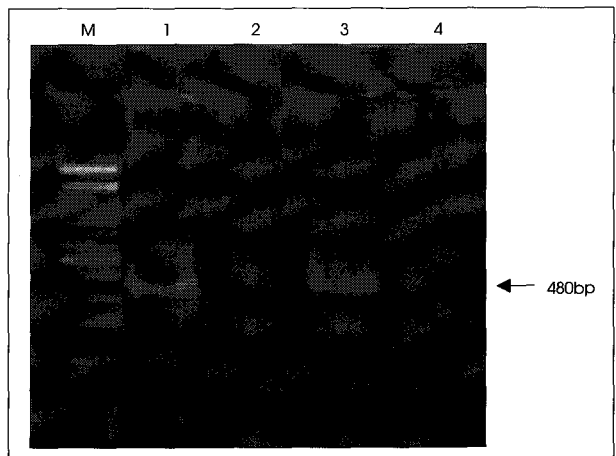


Fig. 4. Genotypes of GSTT1. Lane 1, 3 : GSTT1(+) : homozygously and heterozygously present allele. Lane 2, 4 : GSTT1(-) : homozygously null allele.

으면 GSTT1(+)로, band가 없으면 GSTT1(-)로 분류하였다(Fig. 4).

GSTT1 primer(Warwick 등¹⁸⁾ ;

Forward : 5' -TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC-TC-3'

Reverse : 5' -TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'

4) GSTP1 유전자 다형성 결정

유전자의 다형성을 중합효소 연쇄반응-제한효소 절편 길이 다형현상(PCR-RFLP)에 의해 분석하였다. 중합효소반응은 94°C에서 3분간 반응시킨후, denaturation이 95°C에서 15초, annealing이 61°C에서 30초, 그리고 extension이 72°C에서 60초로 30cycles을 시행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 연장반응을 시켰다. 중합효소반응산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 329bp의 중합효소연쇄반응 산물의 유무를 확인하였다. 중합효소반응 유무를 확인한 후 중합효소반응 산물 15 μ l, 1 \times enzyme buffer, Alw26I 효소 0.5 μ l를 총 20 μ l에 맞춘 후에 37°C에서 1일간 부양하였다. 부양후 65°C에서 20분간 가열하여 제한효소를 불활성화시킨후 2% agarose gel에 전기영동하여 제한효소에 의한 인식 부위 유무에 따라 GSTP1 다형성을 결정하였다. Alw26I 제한효소 처리전의 중합효소반응 산물의 염기 크기는 329bp이며, 두 개의 대립유전자 모두에 제한효소의 인식 부위가 있으면 113bp, 216bp 크기의 2가지 band가 나타나고(Val/Val), 한 개의 대립유전자에만 있으면 329bp, 216bp, 113bp 크기의 3가지 band가 나타나고(Ile/Val), 두 개의 대립유전자 모두에 제한효소의 인식 부위가 없을 때에는 329bp의 band 만이 나타난다(Ile/Ile)(Fig. 5).

GSTP1 primer(Hayashi 등¹⁵⁾ ;

Forward : 5' -GTA GTT TGC CCA AGG TCA AG-3'

Reverse : 5' -AGC CAC CTG AGG GGT AAG-3'

5) p53 과발현

조직검사 혹은 수술 후 얻어진 조직의 파라핀 블록을 4

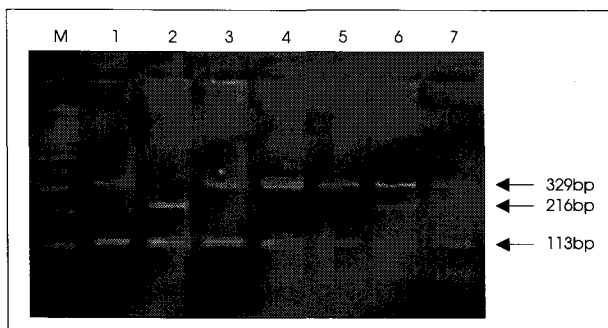


Fig. 5. Genotypes of GSTP1. Lane 1, 3, 4, 5, 7 : homozygous Ile/Ile. Lane 2 : homozygous Val/Val. Lane 6 : heterozygous Ile/Val.

μ m의 두께의 연속 절편으로 만들어서 L-lysine coated slide에 고정하여 실험에 이용하였다. p53 단백질의 발현 정도를 알기 위하여 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 사용하였다. 면역조직화학 염색은 조직 슬라이드를 65°C 보온기에서 밤새 incubation을 시행하였으며, xylene으로 20분간 2회 담그어 탈 파라핀 과정을 거쳤다. 그 후 100%, 90%, 70%, 30%의 ethanol에 각 10분, 5분, 5분, 5분씩 처리하여 흡수를 유도하였다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 메탄올과 과산화수소를 1 : 4로 혼합한 용액에 15분간 반응시킨후 phosphate-buffered saline(이하 PBS, pH 7.0)에 3회 세척하였다. 다음 슬라이드를 citric acid(pH 6.0)용액에 담가서 microwave에서 10분 정도 가열하고 30분 정도 상온에서 식힌 후 PBS에 3회 세척하였다. Blocking 항체를 도포하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 PBS에 3회 세척하였다. 그 후 p53 항체(DO7, NeoMarkers, CA, USA)를 슬라이드에 도포하고 37°C에서 30분을 반응시킨 후 PBS로 세척하였으며, Avidin-biotin complex를 도포하여 37°C에서 30분을 반응시킨 후 세척하였다. 마지막으로 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)로 발색시킨 후에 헤마톡실린으로 대조염색 시행하고 고정한 후 봉입하였다.

결과는 광학 현미경 400배 시야에서 각 슬라이드를 대상으로 종양이 있는 부분을 찾아서 핵이 갈색으로 염색되어있는 세포를 양성으로 하고 염색상이 없거나 주변의 비특이적 반응과 차이가 나지 않는 경우를 음성으로 판독하였다. p53의 발현양상은 주로 세포의 핵에서 관찰되었으며 같은 종양 내에서도 구역에 따라 양성과 음성인 부분이 혼재해 있는 양상을 보였다(Fig. 6). p53 발현 정도를 반정량적인 방법으로 측정하였는데 각 세포를 기준으로 0(no expression)~+3(highest expression)의 단계로 나누었으며 Weighted

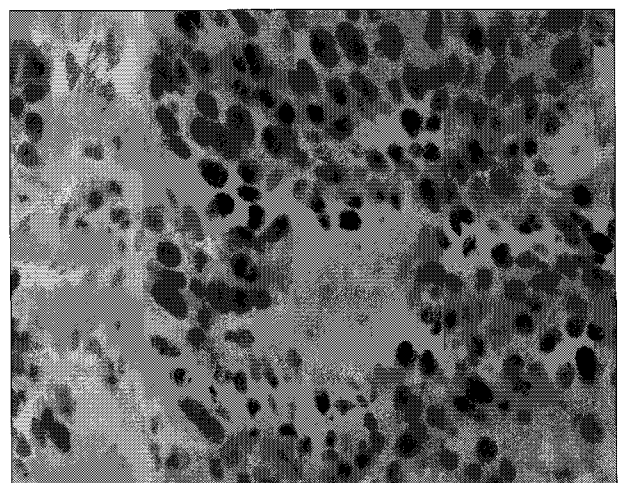


Fig. 6. Immunohistochemical staining of p53 in HNSCC. The positive immunoreactivity is localized in the nucleus(DAB, Hematoxylin stain, \times 400).

mean index(WMI)를 구하였다. 이는 염색된 정도에 따라서 가중치를 두어 이를 합산한 후 모든 종양세포로 나눈 값이다. p53 과발현의 cut-off point로 WMI 0.1 이상의 경우를 p53양성이라 판정하였다.

6) 상대적 위험도 분석 및 통계처리

환자를 성별, 연령, 발생위치, 흡연 유무, 흡연량, 음주 유무, 음주량에 따라 분류하였으며, 흡연량은 40갑*년수(하루 흡연갑수×흡연년수)를 기준으로 저용량 흡연군과 고용량 흡연군으로 분류하였다. 음주양에 따라 소주를 기준으로 0.1~20잔*년(하루 음주량*음주년수)은 저용량 음주군, 20~40잔*년은 중등도 음주군, 40잔*년 이상은 고용량 음주군으로 분류하였다. 유전자 다형성의 빈도와 유전자 유형의 조합에 따른 p53과발현의 상대적 위험도를 비교 분석하였으며 흡연력, 음주력과 p53 과발현의 연관성을 비교하였다. GSTs, CYP1A1의 다형성 분포 차이에 따른 p53 과발현의 관계를 평가하기 위해 Chi-Square test를 사용하였으며 모든 통계처리는 SPSS program(SPSS Inc, Chicago, IL, U.S.A.)를 이용하였다. p<0.05인 경우를 의미있게 판정하였다.

결 과

1. p53 과발현

98명의 두경부 편평세포암종 환자군에서 p53 과발현이 없는 군 [p53(-)]과 p53 과발현이 있는 군 [p53(+)]은 각각 53명(54.1%), 45명(45.9%)이었다.

2) GSTM1 유전자 다형성과 p53 과발현

98명의 두경부 편평세포암종 환자군에서 GSTM1(-)과 GSTM1(+)은 각각 60명(61.2%), 38명(38.8%)이었다. GSTM1(+)군에서는 p53(+)-군의 빈도가 15명(33.3%),

Table 1. Correlation between p53 overexpression and GSTM1 genotypes in head and neck cancer patients

| p53 | GSTM1 (%) | | Total (%) | p-value |
|------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| | GSTM1 (+) | GSTM1 (-) | | |
| p53 (-) | 23 (43.4) | 30 (56.6) | 53 (100) | 0.308 |
| p53 (+) | 15 (33.3) | 30 (66.7) | 45 (100) | |
| Odds ratio | 1.53 | | | |
| 95% CI | 0.67-3.50 | | | |

Table 3. Correlation between p53 overexpression and GSTP1 genotypes in head and neck cancer patients

| p53 | GSTP1 (%) | | | Total (%) | p-value |
|------------|-----------|-----------|---------|------------|---------|
| | Ile/Ile | Ile/Val | Val/Val | | |
| p53 (-) | 34 (64.1) | 17 (32.1) | 2 (3.8) | 53 (100.0) | 0.953 |
| p53 (+) | 29 (66.0) | 13 (29.5) | 2 (4.5) | 44 (100.0) | |
| Odds ratio | 0.90 | | | | |
| 95% CI | 0.37-2.15 | | | | |

GSTM1(-)군에서 p53(+)-군이 30명(66.7%)으로 GSTM1(-)군에서 p53 과발현이 많았으나, 통계학적 유의성은 없었다(p=0.308)(Table 1). GSTM1(-)의 p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 GSTM1(+)-을 기준으로 1.53(95% CI, 0.67-3.50)이었다.

3) GSTT1 유전자 다형성과 p53 과발현

98명의 두경부 편평세포암종 환자군에서 GSTT1(-)과 GSTT1(+)은 각각 61명(62.9%), 36명(37.1%)이었고 1명의 환자는 missing되었다. GSTT1(+)-군에서는 p53(+)-군의 빈도가 13명(29.5%), GSTT1(-)-군에서 p53(+)-군이 31명(70.5%)으로 GSTT1(-)-군에서 p53 과발현이 많았으나, 통계학적으로 유의하지 않았다(p=0.160)(Table 2). GSTT1(-)-의 p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 GSTT1(+)-을 기준으로 1.83(95% CI, 0.79-4.26)이었다.

4) GSTP1 유전자 다형성과 p53 과발현

98명의 두경부 편평세포암종 환자군에서 GSTP1의 3가지 유전자 유형 Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val이 각각 63명(64.9%), 30명(31.0%), 4명(4.1%)이었고 1명의 환자가 missing되었다. GSTP1(Ile/Ile)-군에서 p53(+)-군의 빈도가 29명(66.0%), GSTP1(Ile/Val)-군에서 p53(+)-군이 13명(29.5%), GSTP1(Val/Val)-군에서 p53(+)-군이 2명(4.5%)으로 GSTP1(Ile/Ile)-군에서 p53 과발현이 많았으나, 통계학적으로 유의하지 않았다(p=0.953)(Table 3). p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 GSTP1(Ile/Ile)-을 기준으로 GSTP1 Ile/Val은 0.90(95% CI, 0.37-2.15), GSTP1 Val/Val은 1.17(95% CI, 0.16-8.85)이었다.

5) CYP1A1 Msp I, Exon 7 유전자 다형성과 p53 과발현

98명의 두경부 편평세포암종 환자군에서 CYP1A1 Msp

Table 2. Correlation between p53 overexpression and GSTT1 genotypes in head and neck cancer patients

| p53 | GSTT1 (%) | | Total (%) | p-value |
|------------|-----------|-----------|------------|---------|
| | GSTT1 (+) | GSTT1 (-) | | |
| p53 (-) | 23 (43.4) | 30 (56.6) | 53 (100.0) | 0.160 |
| p53 (+) | 13 (29.5) | 31 (70.5) | 44 (100.0) | |
| Odds ratio | 1.83 | | | |
| 95% CI | 0.79-4.26 | | | |

I의 3가지 유전자 유형 m1/m1, m1/m2, m2/m2은 각각 32명(32.7%), 50명(51.0%), 16명(16.3%)이었다. CYP1A1 Msp I m1/m1군에서 p53(+)는 17명(37.8%), m1/m2군에서 p53(+)는 22명(48.9%), m2/m2군에서 p53(+)는 6명(13.3%)으로 m1/m2군에서 p53과발현 빈도가 높았으나 통계학적 연관성은 없었다($p=0.549$) (Table 4). p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 CYP1A1 msp I m1/m1을 기준으로 m1/m2는 0.69(95% CI, 0.28~1.69), m2/m2는 0.53(95% CI, 0.16~1.81)이었다.

CYP1A1 Exon 7의 3가지 유전자 유형 Ile/Ile, Ile/Val, Val/Val은 각각 50명(51.0%), 39명(39.8%), 9명(9.2%)이었다. CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile군에서 p53(+)의 빈도는 23명(51.1%), Ile/Val군에서 p53(+)의 빈도는 17명(37.8%), Val/Val군에서 p53(+)의 빈도는 5명(11.1%)으로 Ile/Ile군에서 p53 과발현의 빈도가 높았으나 통계학적 연관성은 없었다($p=0.810$) (Table 5). p53 과발현에 대한

상대적 위험도(odds ratio)는 CYP1A1 exon 7의 Ile/Ile을 기준으로 Ile/Val은 0.91(95% CI, 0.39~2.11),이고 Val/Val은 1.47(95% CI, 0.35~6.12)이었다.

6) CYP1A1 Exon 7 및 GSTs 유전자 다형성 조합에 따른 p53 과발현

p53 과발현과 CYP1A1 Exon7과 GSTM1의 유전자 조합간에 유의한 통계적 연관성은 없었다($p=0.702$) (Table 6). CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile, GSTM1(+) 유전자 조합형을 기준으로 p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 CYP1A1 Exon 7 Ile/Val, GSTM1(+)이 1.23(95% CI, 0.21~7.15), CYP1A1 Exon 7 Val/Val, GSTM1(-)이 2.00(95% CI, 0.11~35.80)로 다소 높은 경향을 보였다.

p53 과발현과 CYP1A1 Exon7과 GSTT1의 유전자 조합간에 유의한 통계적 연관성은 없었다($p=0.437$) (Table 7). CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile, GSTT1(+)을 기준으로 p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 CYP1A1

Table 4. Correlation between p53 overexpression and CYP1A1 Msp I genotypes in head and neck cancer patients

| p53 | CYP1A1 Msp I (%) | | | Total (%) | p-value |
|------------|------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| | m1/m1 | m1/m2 | m2/m2 | | |
| p53(-) | 15(28.3) | 28(52.8) | 10(18.9) | 53(100.0) | 0.549 |
| p53(+) | 17(37.8) | 22(48.9) | 6(13.3) | 45(100.0) | |
| Odds ratio | 1 | 0.69 | 0.53 | | |
| 95% CI | | 0.28-1.69 | 0.16-1.81 | | |

Table 5. Correlation between p53 overexpression and CYP1A1 exon 7 genotypes in head and neck cancer patients

| p53 | CYP1A1 exon 7 (%) | | | Total (%) | p-value |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| | Ile/Ile | Ile/Val | Val/Val | | |
| p53(-) | 27(51.0) | 22(41.5) | 4(7.5) | 53(100.0) | 0.810 |
| p53(+) | 23(51.1) | 17(37.8) | 5(11.1) | 45(100.0) | |
| Odds ratio | 1 | 0.91 | 1.47 | | |
| 95% CI | | 0.39-2.11 | 0.35-6.12 | | |

Table 6. Correlation between p53 overexpression and combined CYP1A1 exon 7, GSTM1 genotypes in head and neck cancer patients

| Exon7 GSTM1 | Ile/Ile | | Ile/Val | | Val/Val | | Total (%) | p-value |
|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|---------|
| | GSTM(+) | GSTM(-) | GSTM(+) | GSTM(-) | GSTM(+) | GSTM(-) | | |
| p53(-) | 14(26.4) | 13(24.5) | 8(15.1) | 14(26.4) | 1(1.9) | 3(5.7) | 53(100) | 0.702 |
| p53(+) | 16(35.6) | 7(15.6) | 6(13.3) | 11(24.4) | 2(4.4) | 3(6.7) | 45(100) | |
| Odds ratio | 1 | 0.50 | 1.23 | 0.75 | 0.78 | 2.00 | | |
| 95% CI | | 0.07-3.14 | 0.21-7.15 | 0.11-5.10 | 0.13-4.68 | 0.11-35.80 | | |

Table 7. Correlation between p53 overexpression and combined CYP1A1 exon 7, GSTT1 genotypes in head and neck cancer patients

| Exon7 GSTT1 | Ile/Ile | | Ile/Val | | Val/Val | | Total (%) | p-value |
|----------------|----------|-----------|-----------|-----------|---------|------------|-----------|---------|
| | GSTT(+) | GSTT(-) | GSTT(+) | GSTT(-) | GSTT(+) | GSTT(-) | | |
| p53(-) | 14(26.4) | 13(24.5) | 7(13.2) | 15(28.3) | 2(3.8) | 2(3.8) | 53(100) | 0.437 |
| p53(+) | 8(18.2) | 14(31.8) | 5(11.4) | 12(27.2) | 0(0) | 5(11.4) | 44(100) | |
| Odds ratio | 1 | 2.34 | 1.34 | 1.37 | UD | 4.68 | | |
| 95% CI | | 0.74-7.37 | 0.32-5.61 | 0.43-4.38 | | 0.74-29.83 | | |

UD : undefined

Table 8. Correlation between p53 overexpression and combined CYP1A1 exon 7, GSTP1 genotypes in head and neck cancer patients

| Exon7 GSTP1 | Ile/Ile | | | Ile/Val | | | Val/Val | | Total (%) | p-value | |
|----------------|----------|-----------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|-----------|---------|---------|
| | Ile/Ile | Ile/Val | Val/Val | Ile/Ile | Ile/Val | Val/Val | Ile/Ile | Ile/Val | | | Val/Val |
| p53(-) | 20(37.8) | 7(13.2) | 0(0) | 10(18.9) | 10(18.9) | 2(3.7) | 4(7.5) | 0(0) | 0(0) | 53(100) | 0.637 |
| p53(+) | 15(34.1) | 6(13.6) | 1(2.3) | 11(25) | 5(11.4) | 1(2.3) | 3(6.8) | 2(4.5) | 0(0) | 44(100) | |
| Odds ratio | 1 | 1.08 | UD | 1.26 | 0.63 | 0.63 | 0.95 | UD | UD | | |
| 95% CI | | 0.30-3.91 | | 0.43-3.71 | 0.18-2.25 | 0.05-7.67 | 0.18-4.91 | | | | |

UC : undefined

Exon 7 Ile/Ile, GSTT1(-)가 2.34(95% CI, 0.74~7.37), CYP1A1 Exon 7 Ile/Val, GSTT1(+)이 1.34(95% CI, 0.32~5.61), CYP1A1 Exon 7 Ile/Val, GSTT1(-)이 1.37(95% CI, 0.43~4.38), CYP1A1 Exon 7 Val/Val, GSTT1(-)이 4.68(95% CI, 0.74~29.83)로 다소 높은 경향을 보였다.

p53 과발현과 CYP1A1 Exon7과 GSTP1의 유전자 조합간에 유의한 통계적 연관성은 없었다(p=0.637)(Table 8). CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile, GSTP1 Ile/Ile을 기준으로 p53 과발현에 대한 상대적 위험도(odds ratio)는 CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile, GSTP1 Ile/Val은 1.08(95% CI, 0.30~3.91), CYP1A1 Exon 7 Ile/Ile, GSTP1 Val/Val은 대상수가 작아 측정할 수 없었고, CYP1A1 Exon 7 Ile/Val, GSTP1 Ile/Ile은 1.26(95% CI, 0.43~3.71)였다.

7) p53 과발현과 흡연과의 관계

두경부 편평세포암 환자군에서 비흡연군(14예,14.3%)에 비해 흡연군(84예,85.7%)이 많았다. 비흡연군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 6명(42.9%), 8명(57.1%)으로 p53(+)-군이 다소 많았으며, 흡연군은 40갑*년을 기준으로 저용량 흡연군과 고용량 흡연군으로 분류하였고 저용량 흡연군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 29명(58%), 21명(42%)이었고, 고용량 흡연군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 18명(53%), 16명(47%)으로 흡연군에서 예상과는 달리 p53(-)군이 다소 많았으나 흡연과 p53과발현은 유의관계가 없었다(p=0.595).

8) p53 과발현과 음주와의 관계

두경부 편평세포암 환자군에서 비음주군(28예,28.6%)에 비해 음주군(70예,71.4%)이 많았다. 비음주군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 15명(53.6%), 13명(46.4%)으로 p53(-)군이 다소 많았으며, 저용량 음주군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 17명(53.1%), 15명(46.9%)이었고, 중등도 음주군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 8명(47.1%), 9명(52.9%)이었고, 고용량 음주군에서 p53(-)군과 p53(+)-군은 각각 13명(61.9%), 8명(38.1%)이었으며 음주여부 및 음주량과 p53 과발현의 유의한 연관관계는 없었다(p=0.734).

고 찰

암의 발생은 개개인의 유전적 요소와 외부 또는 내부에 노출된 환경적 요소와의 상호 작용에 의해 발생하는 것으로 생각되고 있다¹⁾. 두경부 편평세포암의 발생에 있어서도 유전적 인자가 개인간의 감수성 차이에 영향을 준다¹⁹⁾.

환경적 발암물질(environmental carcinogens)은 활성화 과정(phase I)과 비활성화 과정(phase II)을 포함한 복합적인 효소작용에 의해 대사되며, 이들 두 과정의 효소의 활성화도 균형에 의해 발암 물질의 활성화도가 결정되고 암 발생에서 개인의 감수성의 차이가 결정된다²⁻⁴⁾.

CYP1A1 유전자는 cytochrome P450 family의 한 효소군으로, Msp I 제한효소 인식 부분(3'-flanking 부위)과 exon 7에서 다형성이 알려져 있으며 인종간에 차이가 있다. 두경부암에서 CYP1A1 유전자 다형성과 개인의 유전적 감수성과의 연관에 대한 연구에 의하면 유럽인에서 발생한 후두암 및 두경부암종에서 CYP1A1 유전자의 다형성과 개인의 유전적 감수성과는 연관이 없는 것으로 보고되었다¹⁸⁾. CYP1A1 Msp I 제한효소 인식부위 다형성은 폐암의 개인의 유전적 감수성과의 연관성에 있어 인종에 따라 다른 결과를 보이는데 일본인에서는 m2/m2 유형을 m1/m1 유형과 비교했을 때 3.1배의 상대적 위험도를 보였다. 역시 CYP1A1 exon7에서의 다형성과 폐암의 개인적 유전적 감수성과의 관계에 있어서도 인종간에 차이가 있는데 일본인 폐암에서의 연구에 의하면 CYP1A1 Val/Val 유형이 Ile/Ile 유형과 비교하여 2.97배의 상대적 위험도가 있다 하였다²⁾⁶⁻⁸⁾. 한국인의 두경부암 환자에서 CYP1A1 Msp I m1/m1군과 비교했을 때 m1/m2군이 1.39배, m2/m2군이 1.63배의 상대적 위험도를 보였으며²⁾ CYP1A1 Ile/Ile군과 비교했을 때 Ile/Val군이 0.90배, Val/Val군이 2.68배의 상대적 위험도를 보였다⁹⁾.

GSTs는 활성화된 발암물질을 해독하는 비활성화 과정(phase II) 효소군중의 하나이며, α (GSTA), π (GSTP), θ (GSTT), μ (GSTM), σ (GSTS) 등의 5가지 군으로 분류할 수 있으며, GSTM1, GSTT1과 GSTP1 등에서 유전자 다형성이 보고되고 있다¹⁴⁾.

GSTM1은 μ 군에 속하며 benzopyrene, styrene-7,8-oxide, trans-stilbene 등의 발암물질을 비활성화시키는 역할을 하며²⁰, GSTM1 유전자의 기능적 대립인자가 결손된 경우에는 GSTM1 효소의 기능이 없어 [null genotype, GSTM1(-)] 흡연과 관련된 암발생의 확률이 높다는 보고가 있다¹⁻⁷.

GSTT1은 θ 군에 속하며 epoxybutanes, ethylene oxide, halomethanes, methyl bromide 등의 발암물질을 비활성화시키는 역할을 하며²⁰, GSTM1과 마찬가지로 기능적 대립인자가 결손(deletion)된 경우 [null genotype, GSTT1(-)]에 GSTT1 효소의 기능이 없어 흡연과 관련된 암발생의 확률이 증가할 수 있다는 보고들이 있으나 아직 논란의 여지가 있다¹⁾³⁾⁷⁾¹⁴⁾²⁰.

GSTP1은 π 군에 속하며 Board 등⁴)에 의해서 exon 5 (codon 105)와 exon 6(codon 114)에서 유전자 다형성이 처음으로 보고되었다. codon 105에서의 A : T→G : C 전이(transition)에 의해 isoleucine에서 valine으로의 아미노산 치환이 일어나며⁴, GSTP1(Ile/Ile), GSTP1(Ile/Val) 및 GSTP1(Val/Val)의 3가지 유전자형으로 분류할 수 있다. GSTP1도 다른 군과 마찬가지로 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)의 epoxides, ethacrynic acid, acrolein 등의 발암물질을 비활성화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁾¹⁹⁾²¹.

1번 염색체에 위치하는 GSTM1 유전자는 여러 인종에서 큰 차이없이 약 20~50%에서 결손(deletion)되는 것으로 보고되고 있다⁴⁾⁵⁾²⁰. GSTM1 유전자 결손형에서는 GSTM1 효소의 활성도가 없으므로 GSTM1(-) 유형은 흡연과 관련된 암발생의 확률이 높아진다는 보고가 있으며⁴⁾⁵ 본 연구에서는 GSTM1(-)가 61.2%의 빈도를 보였다.

GSTT1 유전자 결손(deletion)에 의한 GSTT1(-)의 유전자형은 서양인에서는 약 20%로 보고되었으며²², Rebbeck 등²⁰)에 의하면 동양인에서 GSTT1 유전자의 결손(deletion)은 약 60%로 서양인에 비해 높게 나타났으나, 아직 GSTT1 유전자 다형성이 두경부암의 유전적 감수성에 미치는 영향에 대해 일치된 결과는 없다. 본 연구에서는 GSTT1(-)는 62.9%로 Rebbeck 등의 보고와 유사하였다.

GSTP1은 π 군에 속하며 Board 등⁴)에 의해서 exon 5 (codon 105)와 exon 6(codon 114)에 있어서 유전자 다형성이 처음으로 보고되었다. wild-type인 Ile/Ile 유형 및 Ile/Val와 Val/Val의 3가지 유전자형으로 분류할 수 있으며, 본 연구에서는 Ile/Ile, Ile/Val, Val/Va의 3가지 유전자형이 각각 64.9%, 31.0%, 4.1%의 빈도였다.

암억제 유전자인 p53 유전자 돌연변이는 두경부 편평 세포암의 약 40~60%에서 일어나는 것으로 알려져 있다²³. p53의 기능은 세포주기의 조절, 전사의 조절 및 세포 분화

의 조절이다. p53 유전자의 point mutation(점변이)에 의해 mutant p53 단백질이 생성되며 mutant p53은 중앙 억제 기능을 잃어버려 암발생에 관여하는 것으로 알려져 있으며 사람에서 p53의 변이는 exon 5, 6, 7, 8에서 흔한 것으로 알려졌다¹¹.

지금까지 두경부암종에서 p53의 발현이나 변이에 관한 많은 연구가 있었는데 Field 등²⁴)은 두경부 편평세포암종에 있어 흡연과 p53의 발현정도가 관련성이 있음을 보고하였고, Boyle 등²⁵)은 두경부편평세포암종에서 중앙이 진행할수록 p53 변이의 빈도가 높아진다고 보고하였다. 본 연구에서 면역조직화학법에 의한 p53 과발현은 45.9%로 다른 문헌 보고와 유사하였다²⁶.

일본인의 폐암에서 p53 변이율과 CYP1A1 val/val과는 의미있는 연관성이 있으나 GSTM1(-)와는 연관성이 없다는 보고가 있으며¹² Philip 등⁵)은 p53 변이에 대한 GSTM1(+), CYP1A1(Val)의 상대적 위험도는 GSTM1(-)와 비교하여 2.7(95% CI, 1.1~6.8), CYP1A1(Val)의 상대적 위험도는 CYP1A1(Ile)과 비교하여 2.4(95% CI, 0.7~7.7)이었고, CYP1A1(val)과 GSTM1(+), CYP1A1(val) 유전자 조합의 상대적 위험도는 6.0(1.2~29.7)으로 p53 변이가 GSTM1(+), CYP1A1(val) 유전자형과 연관 있음을 보고하였다. 또한 흡연군에서 p53 변이가 많이 나타났으며 흡연의 p53 변이에 대한 상대적 위험도는 2.8(1.1~7.2)으로 흡연이 p53 변이와 연관된 하나의 인자로 보고하였다⁵.

본 연구에서 p53 과발현에 대한 GSTM1(-)의 상대적 위험도는 GSTM1(+), GSTT1(-)의 상대적 위험도는 GSTT1(+), GSTP1(Val/Val)의 상대적 위험도는 GSTP1(Ile/Ile)과 비교하여 1.17(95% CI, 0.16~8.85)로 GSTM1(-), GSTT1(-), GSTP1(Val/Val) 유전자형이 p53 과발현의 위험도가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. CYP1A1 Exon7과 GSTs의 유전자 조합에서는 CYP1A1 Exon7 Val/Val, GSTM1(-)의 상대적 위험도는 CYP1A1 Exon7 Ile/Ile, GSTM1(+), CYP1A1 Exon7 Val/Val, GSTT1(-)의 상대적 위험도는 CYP1A1 Exon7 Ile/Ile, GSTT1(+), CYP1A1 Exon7 Val/Val, GSTM1(-) 및 CYP1A1 Exon7 Val/Val, GSTT1(-) 유전자 조합이 p53 과발현의 위험도가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

Greenbalt 등²⁷)은 흡연은 여러 가지 발암물질을 포함하여 구강암, 후두암, 폐암 등을 유발하며 특히 구강암은 담배의 수용성 N-nitrosamine에 의한 p53 유전자의 염기치환에 의한 돌연변이로 암이 유발된다고 보고하였다. 본 연구

에서 흡연과 p53 과발현과의 상관관계를 알아보기 위하여 크게 비흡연군과 흡연군으로 분류하고 흡연군을 40 packs/year 이하의 저흡연군, 그 이상의 고흡연군으로 구분하였는데 흡연여부 및 흡연량은 p53 과발현과 유의한 연관관계가 없었다. 본연구에서 음주여부나 음주량도 p53 과발현과 연관성이 없었는데 향후 지속적인 추가 연구로 대상수를 늘려 p53과 흡연 및 음주와의 연관성에 대한 보다 정확한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

98예의 한국인 두경부 편평세포암 환자에서 발암물질대사효소 CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1의 유전자 다형성에 따른 p53 과발현의 관계를 분석한 결과 통계학적 유의성은 없었지만 GSTM1(-), GSTT1(-), GSTP1(val/val), CYP1A1(val/val) 유전자형에서 p53 과발현의 상대적 위험도가 각각 1.53, 1.83, 1.17, 1.47로 높았으며 유전자 조합형의 경우 CYP1A1 val/val, GSTM1(-) 조합, CYP1A1 ile/ile, GSTT1(-) 조합, CYP1A1 val/val, GSTT1(-) 조합에서 p53 과발현의 상대적 위험도가 각각 2.0, 2.34, 4.68로 높았다.

본 연구의 결과로 미루어 CYP1A1 val/val, GSTM1(-), GSTT1(-), GSTP1(val/val) 유전자형에서 p53 과발현이 잘 발생하며 두경부 편평세포암종의 발생이 증가할 것으로 추측할 수 있으며 향후 발암물질대사효소 특정 유전자형과 p53 유전자 변이의 연관관계 및 상호작용기전을 밝히려는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심 단어 : p53 · CYP1A1 · GSTs · 두경부 편평세포암.

References

- 1) Matthis C, Bockmuhl U, Jahnke V, et al : Polymorphism in cytochrome P450, CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers : studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics*. 1998 ; 8 : 91-100
- 2) Shin CS, Ahn KS, Tae K, et al : Genetic susceptibility of CYP1A1 and GSTM1 to the risk for Korean head and neck squamous cell carcinoma patients. *Korean J Otolaryngol*. 1999 ; 42 : 202-208
- 3) Board PJ : Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am J Hum Genet*. 1981 ; 33 : 36-43
- 4) Board P, Coggan M, Johnston P, et al : Genetic heterogeneity of the human glutathione transferase : a complex of gene families. *Pharmacol*. 1990 ; 48 : 357-369
- 5) Philip L, Sabina NS, Qing R, et al : p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco

- use. *Carcinogenesis*. 1998 ; 19 : 509-514
- 6) Oude Ophuis MB, van Kieshout EM, Roelofs HM, et al : Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer*. 1998 ; 81 : 936-943
- 7) Nakachi K, Imai K, Hayashi S, et al : Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res*. 1991 ; 51 : 5177-5180
- 8) Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, et al : Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1 : A study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis*. 1994 ; 15 : 1785-1790
- 9) Ko KM, Ahn KS, Tea K, et al : Genetic polymorphism of cytochrome P4501A1 exon 7 and glutathione S-transferase M1 in the head and neck squamous cell carcinoma patients. *Korean J Otolaryngol*. 1999 ; 42 : 1405-1412
- 10) Watson MA, Stewart RK, Smith BJ, et al : Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis (Lond.)*. 1995 ; 16 : 2125-2128
- 11) Harris AL : Mutant p53-the commonest genetic abnormality in human cancer? *J pathol*. 1990 ; 162 : 5-6
- 12) Kawajiri K, Eguchi H, Nakachi K, et al : Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res*. 1996 ; 56 : 72-76
- 13) Jeffrey E, McWilliams, Adam JE, Tomasz MB, et al : Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk. *Head Neck*. 2000 ; 22 : 609-617
- 14) Mark Welfare, A. Monesola Adeokun, Margaret F. Bassendine, Ann K. Daly : Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1999 ; 8 : 289-292
- 15) Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K : Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem*. 1991 ; 110 : 407-411
- 16) Kihara M, Noda K : Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis*. 1995 ; 16 : 2331-2336
- 17) Comstock KE, Sanderson BJ, Claflin G, Henner WD : GSTM1 gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1990 ; 18 : 3670
- 18) Warwick A, Sarhanis P, Redman G, et al : Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia : Interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis*. 1994 ; 15 : 2841-2845
- 19) Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, et al : The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism : effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics*. 1998 ; 8 : 1-6
- 20) Rebbeck TR : Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer suscep-

- ptibility. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 1997 ; 6 : 733-743
- 21) Park JY, Stimson P, Schantz, Jordan C, Stern, et al : Association between glutathione S-transferase π genetic polymorphisms and oral cancer risk. *Pharmacogenetics.* 1999 ; 9 : 497-504
- 22) Oude Ophuis MB, van Keshout EM, Roelofs HM, et al : Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphism in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer.* 1998 ; 82 (5) : 936-943
- 23) Choi G, Lee JS, Yoo DH, et al : p53 mutation patterns in primary head and neck squamous cell carcinomas and their metastatic neck nodes. *Korean J Otolaryngol.* 1998 ; 41 : 906-912
- 24) Field JK, Spandidos 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 : 573-581
- 25) Boyle JO, Hakim J, Koch W, et al : The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993 ; 53 : 4477-4480
- 26) Kihara M, Kubota A, Furukawa M, Kimura H : GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. *Cancer Letters.* 1997 ; 12 : 257-262
- 27) Greenbalt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC : Mutations in the p53 tumor suppressor gene : Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 4855-4878