

# DMBA 유도 햄스터 협낭 발암모델에서 세포증식 및 사멸과 p63 발현의 관계 분석

박지현 · 이원덕 · 민철기 · 강진한 · 명 훈 · 이종호 · 김명진

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:219-227)

## THE RELATIONSHIP OF P63 EXPRESSION WITH CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN DMBA-INDUCED HAMSTER BUCCAL POUCH CARCINOGENESIS

Jee-Hyun Park, Won-Deok Lee, Chul-Gi Min, Jin-Han Kang, Hoon Myung,  
Jong-Ho Lee, Myung-Jin Kim

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Seoul National University*

**Purpose:** Abnormalities in the p53 gene are regarded as the most consistent genetic abnormalities detected in head and neck squamous cell carcinogenesis. Two new members of the p53 gene family, p73 and p63 have recently been identified. They share considerable sequence homology with p53 in the transactivation, DNA binding, and oligomerization domains, indicating possible involvement in carcinogenesis. Disruption of the homeostatic balance between proliferation and apoptosis is widely believed to contribute to human oral carcinogenesis. The aim of this study was to analyze expression of p63 in squamous cell carcinogenesis and to compare with immunohistochemical markers representing cell proliferation and apoptosis.

**Materials and Methods:** Using the Syrian hamster oral cancer model, the fraction of apoptotic (apoptotic index-AI), proliferating (mitotic index-MI) and p63 expressing keratinocytes were examined at normal, dysplastic and malignant oral epithelium using the TUNEL assay, PCNA and p63 immunostaining.

**Results:** p63 significantly increased between normal and dysplastic epithelium and between dysplastic and malignant epithelium. PCNA significantly increased between normal and dysplastic epithelium and between normal and malignant epithelium. However, increase between dysplastic and malignant epithelium, though still increasing, was not statistically significant. The percentage of TUNEL positive cells increased from normal to dysplastic epithelium and returned to normal keratinocyte level in the malignant epithelium. However, differences between tissue types were not significant. The ratio of MI:AI increased significantly only in the dysplastic-malignant epithelial transition. The increase of p63 expression closely reflected the change in the MI:AI ratio during oral carcinogenesis.

**Conclusion:** The p63 may be associated with the regulation of epithelial proliferation and apoptosis in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. Further study is required to investigate which p63 isoforms are involved in hamster buccal pouch carcinogenesis.

**Key words:** p63, PCNA, Apoptosis, Hamster, DMBA

## I. 서 론

p53 유전자의 변이는 구강암과 두경부암을 포함하는 인간의 암종에서 가장 흔한 유전자 변화로 여겨지고 있다<sup>1,2</sup>. 오랫동안 p53 유전자의 homolog가 없는 것으로 알려져 왔으나, 최근에 p63과 p73이라는 새로운 p53 유전자 family가 발견되었으며, 이

들은 구조적, 기능적으로 p53과 높은 상동성을 보인다<sup>3</sup>.

p63 유전자는 염색체 3q27-29 상에 지도화 되어있고, 여러종류의 다른 암종에서 잦은 발현을 보인다<sup>4,8</sup>. 그리고 p53과 유사하게 p63도 최소한 과발현 될 때에는 p53 반응 유전자를 활성화하고, 세포사멸을 유도하여 세포성장을 막는 것으로 보고되고 있다<sup>9</sup>.

p63에 관한 다른 연구들을 살펴보면, murine p63의 선택적 파괴는 신생아의 죽음을 초래하며<sup>10</sup>, 동형접합체의 경우에는 사지 및 두개안면 부위의 발육과 구강 및 식도 등 편평상피세포의 분화에 심각한 결손을 보인다<sup>11</sup>. 예를 들면 생쥐에서 p63의 불활성화는 피부의 층별 분화와 분화 표지자의 발현 결손을 유발한다. 또한 이런 생쥐에게는 치아, 모낭, 유선, 누선 및 타액선의 결손을 보인다<sup>10</sup>. 따라서 이러한 사실들은 p63이 태아

### 김명진

110-744 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

### Myung-Jin Kim

Department of OMFS, College of Dentistry, Seoul National University

28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, # 110-744, South Korea

Tel: 82-2-2042-2632 Fax: 82-2-766-4948

E-mail: myungkim@plaza.snu.ac.kr

형성기 동안 외배엽 분화에 필수적이라는 사실을 설명해준다. 게다가 p63은 각질세포의 줄기세포에서도 발견되어왔다<sup>12)</sup>. 줄기 세포가 악성 암종 형성에 관여한다고 보고되고 있는 사실에 비추어 본다면<sup>13)</sup>, 이는 p63 유전자가 상피암종 발생의 연구를 위해서 실제로 매우 중요하다는 사실을 알려준다.

p53과의 높은 구조적 상동성 때문에 p63도 전암병소 및 악성 병소에서 세포의 증식과 분화를 조절하는 역할을 할 것이며, 종양억제 기능을 할 것이라고 추측되었다. 그러나 p53과 다르게 p63 유전자의 돌연변이는 인간의 암종과 종양 세포주에서 매우 드물게 나타난다<sup>14,18)</sup>. 오히려 여러종류의 암종에서 p63 유전자 증폭과 단백질 과발현이 보다 자주 발견되었다<sup>6, 16, 18-22)</sup>. p63이 자발적인 종양 발생에 관여한다는 보고는 아직 없지만 p63 유전자의 증폭이 종양형성과 관련있을 가능성이 있다. 따라서 암종에서 p63 발현에 관한 연구는 암종 발생 및 성장을 이해하는데 중요한 정보를 제공해 줄 것이라고 생각된다.

세포증식과 세포사멸 과정은 인간의 구강암 발생에 관여하는 중요한 기전이다<sup>23)</sup>. 증식세포핵항원(PCNA; proliferating cell nuclear antigen)은 세포증식 특히 활동적으로 DNA를 복제하는 세포에 관련되며, 면역조직화학염색을 통해서 세포증식을 평가하는데 널리 사용되고 있다. 그러나 악성 변화를 보이는 인간의 구강상피에서 세포사멸에 관한 초기 연구결과는 다양했다. Birchall 등은 처음으로 세포 수준에서 정상상피에서 이형성상피로 가는 과정에서 세포사멸 비율이 증가하여 상피내암종에서 최고를 보이며, 악성 구강상피에서는 각질세포의 세포사멸 비율이 현저히 감소한다고 하였다<sup>24)</sup>. 그러나 악성변화 과정동안 구강상피의 세포분열은 계속하여 증가한다. 따라서 이는 세포증식을 하는 각질세포와 세포사멸을 하는 각질세포의 비율 차이를 점점 뚜렷하게 하는 결과가 된다. 이러한 발견은 Ravi 등의 다른 연구에서도 지지되었다<sup>25)</sup>. 이후의 연구에서 Birchall 등은 인간의 구강암 발생 과정동안 세포사멸의 비율은 일정하며, 반면 세포분열의 비율은 계속 증가한다고 보고하였다<sup>26)</sup>. 그러나 인간의 암종 발생 과정에서 세포사멸의 중요성과 그 분자구조적 기전은 아직 명확히 이해되어지고 있지 않다.

화학적으로 발암 유도된 Syrian 햄스터 협낭 모델은 인간의 구강암 동물실험 모형으로 잘 알려져 있다<sup>27)</sup>. 시리안 햄스터의 점막에 화학적 발암 유도체인 DMBA(9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene)의 지속적 도포는 시간이 지남에 따라 진행되는 병소를 유발한다(세포증식, 이형성, 상피내암종, 편평상피세포암). 인간의 구강암종 발생에 관련된 여러가지 생화학적 및 분자구조적 변화들이 햄스터 모델에서 잘 재현되어 왔다<sup>28, 29)</sup>. 하지만 햄스터 협낭 발암모델이 인간의 구강암종 발생에서 나타나는 세포사멸 형태의 변화와 p63 발현 변화를 반영하는지는 거의 알려진 바가 없다.

실험적 구강암 발생 과정에서 p53 homolog인 p63의 발현이 아직 완전히 이해되지 않았고, p63의 면역조직화학염색 발현 양상과 세포증식 및 세포사멸 비율을 비교한 보고가 없다. 이에 이번 연구에서 DMBA 유도 햄스터 협낭 발암모델에서 p63

발현에 관한 연구와 더불어 p63의 면역조직화학염색 발현양상을 PCNA의 면역조직화학염색을 이용한 세포증식 비율 및 세포사멸 비율과 함께 비교해보고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 조직표본

생후 4주에서 5주 사이의 24마리 수컷 Syrian golden 햄스터들을 네 그룹의 실험군과 한 그룹의 대조군으로 나누었다. 실험군은 한 그룹당 다섯마리의 햄스터로 구성되었으며, 대조군은 네마리의 햄스터로 구성되었다. 새로운 환경에 적응을 위한 시간인 약 1주 후부터 실험군의 모든 햄스터 양쪽 협낭에 mineral oil에 용해하여 0.5%의 농도로 희석한 DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene)를 매일 면봉으로 도포하였다. 대조군의 햄스터들은 양쪽 협낭에 mineral oil만을 같은 방법으로 도포하였다. 한번에 약 0.2ml의 용액이 햄스터 양쪽 협낭의 내측면에 도포되었다.

4주, 8주, 12주, 16주 후에 각각 한그룹의 실험군 5마리와 대조군 중 한마리씩을 동시에 희생시켰다. 햄스터 양쪽 협낭을 채취하여 육안으로 관찰한 뒤 점막의 변형을 막기 위해 스티로폼에 핀으로 고정하였다. 협낭 점막 표본은 10% 포르말린에 고정한 다음 통법에 의해 파라핀에 포매하여 파라핀 절편을 제작하였다. DMBA를 도포한 협낭 조직은 H&E 염색 결과에 따라 정상조직(n=14), 이형성조직(n=15), 편평상피세포암(n=11)의 세 그룹으로 나누었고, mineral oil만을 도포한 협낭 조직은 H&E 염색 결과 모두 정상 조직 소견을 보였으므로, 하나의 대조군으로 분류하였다(n=8).

### 2. H&E 염색 및 면역조직화학염색

H&E(hematoxylin-eosin) 염색과 p63 및 PCNA의 면역조직화학염색을 위해 각 조직표본을 4 $\mu$ m로 연속 절단하였다. Mouse monoclonal anti-p63 (Santa Cruz biotechnology, LSAB Kit: DACO), rabbit polyclonal anti-PCNA (Santa Cruz biotechnology)을 일차항체로 사용하였고, PCNA 염색을 위해서 anti-rabbit immunoglobulin (DAKO)을 이차항체로 사용하였으며, 조직표본은 전형적인 방법으로 처리되었다.

p63 단백질 발현은 DNp63 (Clone 4A4; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 amino terminus에 있는 amino acids 1-205에 대항해서 만들어진 p63 antibody (a mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>)을 이용하여 평가했는데, 제조사의 설명에 따르면 이 항체는 파라핀 포매 조직을 포함하는 면역조직화학염색에서 모든 인간 및 쥐의 p63 variant에 반응한다고 한다.

p63, PCNA의 염색 세포수의 비율은 대표적인 부분의 각 조직을 200배 확대한 현미경상에서 두 명의 실험자에 의해 최소한 500개의 세포를 평가하여 결정하였다.

### 3. TUNEL assay

Apoptosis 연구를 위해서 Apoptag kit(Roche Molecular Biochemicals, Germany)을 이용한 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling) technique이 이용되었고, 조직표본은 제조사의 지시에 따라 처리되었다.

Apoptosis를 보이는 세포수의 비율은 대표적인 부분의 각 조직을 200배 확대한 현미경상에서 두 명의 실험자에 의해 최소한 500개의 세포를 평가하여 결정하였다.

### 4. 통계학적 분석

각 조직 표본은 두 명의 독립적인 실험자에 의해 평가되었다. 두 평가자들 사이의 결과는 paired t-test로 신뢰도 분석을 하였으며, 그 결과 두 실험자 사이에 높은 상관계수를 보였기 때문에 두 수치의 평균으로 이후 통계를 구하였다. 정상조직, 이형성조직, 편평상피세포암에서 각각 염색방법별로 평균과 표준편차를 구하였다. 같은 염색방법 내에서 조직 변화에 따른 통계학적 비교는 일단 ANOVA를 이용하여 분석하고 유의하게 차이가 있을 경우 LSD를 이용하여 사후 분석을 하였다. PCNA, TUNEL assay 결과와 p63 발현과의 비교분석은 Pearson

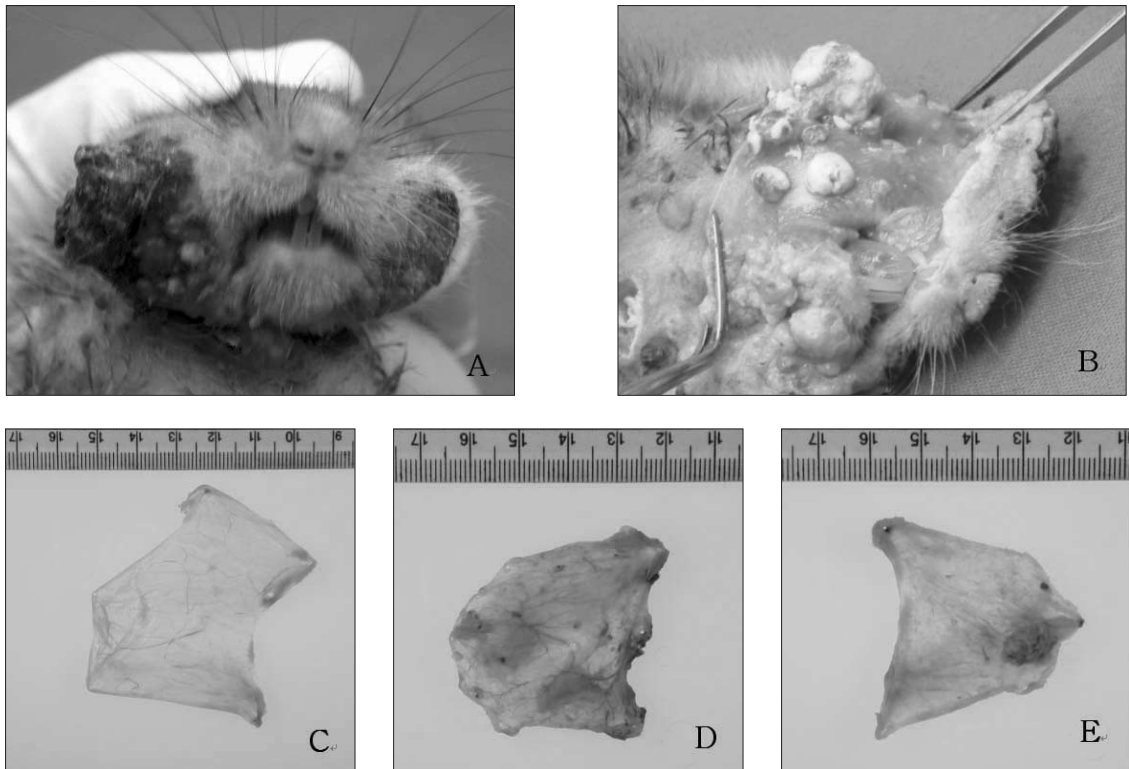
correlation coefficient를 이용하였다. 모든 통계학적 분석은 SPSS(SPSS Korea, ver 10.0) 프로그램을 이용하였다.

## III. 연구 결과

육안적 소견상 mineral oil만을 도포한 대조군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았으며, 4주와 8주동안 DMBA를 도포한 협낭에서는 부분적으로 하얗고 불규칙한 조직면을 갖는 점막의 두께가 약간 증가한 소견을 보였다. 12주간 DMBA를 도포한 협낭에서는 90%에서 종괴 형성을 보였고, 16주간 DMBA를 도포한 협낭에서는 100%에서 종괴 형성과 임파절 전이를 보였다(Fig. 1).

### 1. H&E 염색

H&E 염색 결과 mineral oil을 도포한 협낭 조직에서는 특별한 조직학적 변화가 관찰되지 않았고, 4주간 DMBA를 도포한 협낭 조직에서는 부분적으로 과각화가 관찰되었다. 8주간 DMBA를 도포한 조직에서는 과각화 뿐 아니라 부분적으로 상피이형성이 관찰되었으며, 12주와 16주간 DMBA를 도포한 조직에서는 편평상피세포암이 발견되었다(Fig. 2-A, B, C).

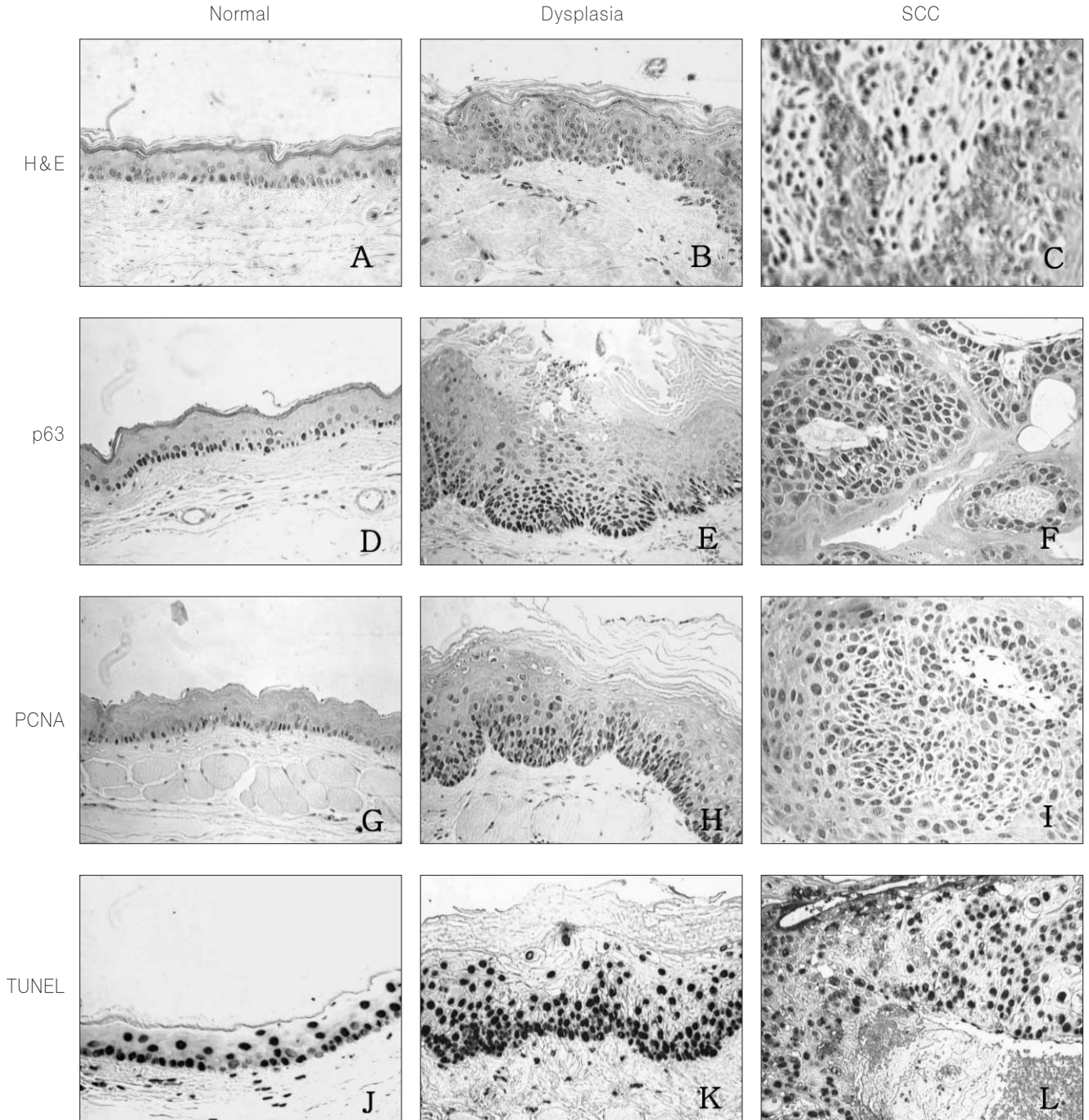


**Fig. 1.** In 16-week DMBA-treated buccal pouches of hamster, cancer mass formation was observed(A). To obtain tissue for biopsy, the buccal pouches were dissected and exposed(B). In buccal pouch tissues after fixation at cardboard to prevent distortion, very thin normal mucosa in 4-week DMBA-treated group(C), whitish and thickened dysplastic mucosa in 8-week DMBA-treated group(D) and cancer mass formation in 12,16-week DMBA-treated groups(E) were seen.

2. p63 면역조직화학염색

p63의 염색은 대부분 중앙 세포의 핵에 국한되어 나타났으며, 아주 드물게 세포질의 약한 염색을 보였다. 세포질의 약한

염색을 보이는 경우는 양성 염색의 판정에 포함시키지 않았다. 정상상피에서 p63의 양성 염색은 주로 기저 및 방기저 세포에 국한되어 나타났으며(Fig. 2-D), 이형성상피에서는 보다 상부로 연장되었고, 악성상피에서는 양성 핵 염색을 보이는 세

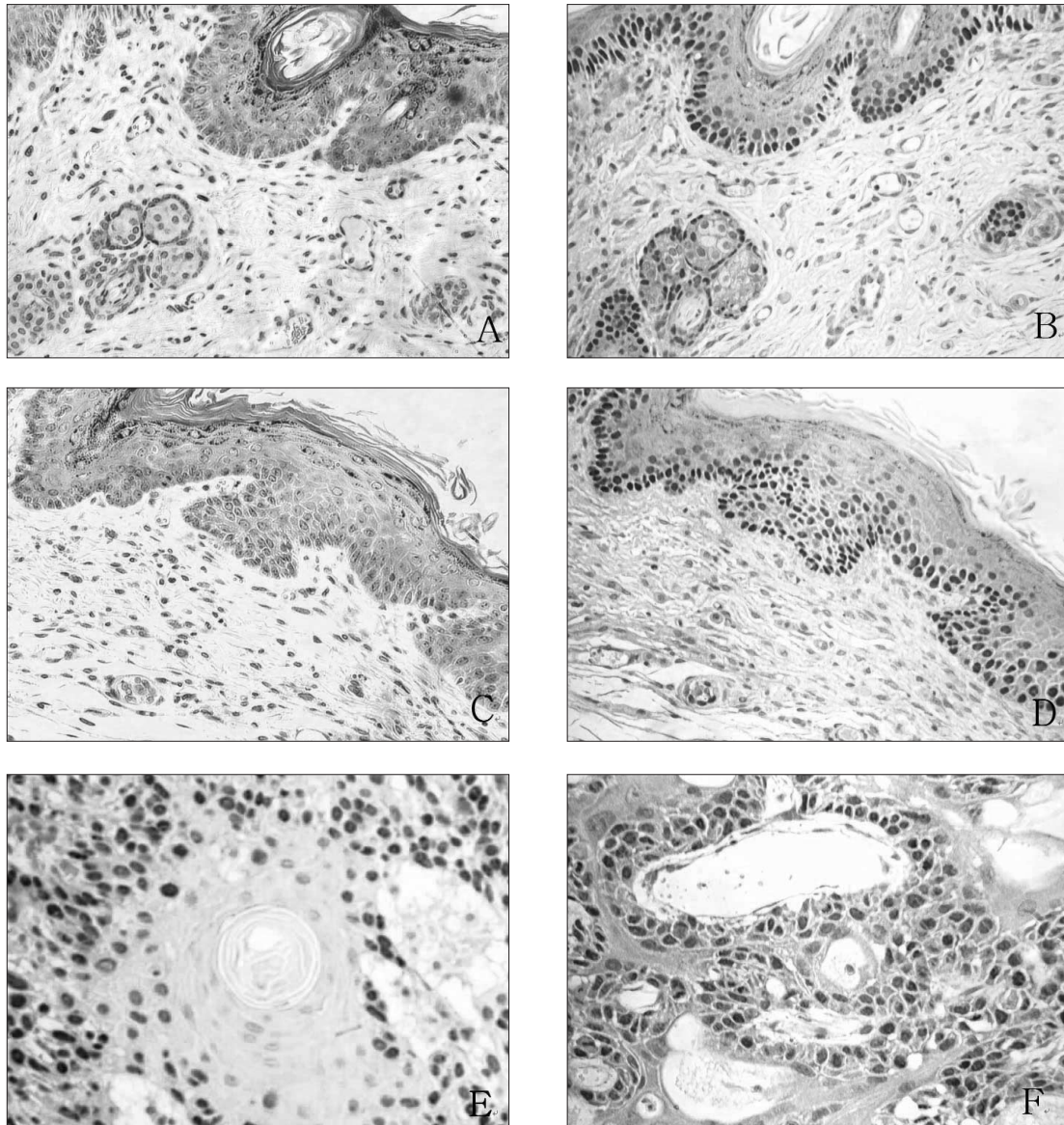


**Fig. 2.** Immunolabeling of hamster oral epithelium. p63, PCNA and TUNEL assay in three groups (normal, dysplastic and SCC hamster oral epithelium) were examined. In H&E stain(A,B,C), carcinogenesis in a time-dependent manner was observed. In normal epithelium of hamster buccal pouch model, nuclear positivity for p63 and PCNA was mainly observed in basal and suprabasal cell layer(D,G). In dysplastic(E,H) and SCC(F,I) epithelium a higher percentage of randomly distributed p63- and PCNA-immnostaioned cells was showed. The percentage of apoptotic cells by TUNEL assay increased at the normal-dysplastic epithelial transition(J,K) but dropped in the SCC epithelium(L). (Original magnification x 200)

포가 전체 상피층에 불규칙하게 분포되어 있었다(Fig. 2-E, F).

H&E 염색에서보다(Fig. 3-A, C) p63 면역조직화학염색에서(Fig.3-B,D) 간질로 침습하는 소수의 세포들이나 작은 악성 세포군집을 보다 쉽게 발견할 수 있었다. 잘 분화된 암종에서 p63의 발현은 keratin pearl 주변세포에서는 나타나지 않았으며(Fig. 3-E), 반대로 분화도가 낮은 종양에서는 p63의 발현이 조직 전체에 고루 퍼진 보다 일정한 양상을 보였다(Fig. 3-F).

p63 양성 염색을 보이는 각질세포의 비율은 햄스터 발암 전 과정에 걸쳐 증가하였다. 정량적으로 p63 발현은 정상상피에서 이형성상피로 이행될 때 유의하게 증가하였으며 ( $P<0.001$ ), 이형성상피에서 악성상피로 이행될 때에도 유의하게 증가하였다 ( $P<0.002$ ). 그러나 대조군과 정상조직 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $P<0.39$ )(Fig. 4). 실험자들간에 상관계수는 0.983 이었다.



**Fig. 3.** Easier detection of small foci invaded into stroma in p63 immunostaining(B,D) was observed than in H&E staining(A,C). And in better differentiated squamous cell carcinomas(E), p63 was not expressed in surrounding cells of keratin pearl, whereas more uniform and homogeneous immunoreactivity was seen in less differentiated tumors(F). (Original magnification x 200)

3. PCNA 면역조직화학염색에 의한 세포분열지수(MI)

증식세포 비율 즉 세포분열지수는 햄스터 발암 전과정에 걸쳐 증가하였다. 정상상피에서 PCNA의 발현은 주로 기저세포에 나타났으며, 이형성상피 및 악성상피에서는 보다 상부로 퍼지고 무질서한 경향을 보였다(Fig. 2-G, H, I).

정량적으로 정상상피와 이형성상피 사이에서와 (P<0.001) 정상상피와 악성상피 사이에서의 (P<0.001) 세포분열지수 증가는 통계적으로 유의하였다. 그러나 이형성상피에서 악성상피

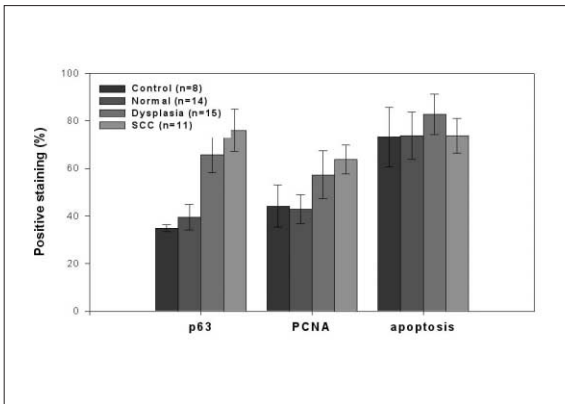


Fig. 4. Quantitation of p63, PCNA and apoptosis staining by tissue type in hamster buccal pouch oral cancer model. The percentage of p63 labeling keratinocytes significantly increased for each stage of carcinogenesis. PCNA labeling increased significantly from normal to dysplastic epithelium, but not from dysplastic epithelium to SCC although increasing. The changes of percentage of apoptosis were not different significantly.

로 이행시 세포분열지수는 증가 했지만, 통계적으로 유의하지는 않았다 (P<0.057). 그리고 대조군과 정상상피간의 세포분열지수는 통계적으로 다르지 않았다 (P<0.84)(Fig. 4). 실험자들간에 상관계수는 0.938 이었다.

4. TUNEL assay에 의한 세포사멸지수(AI)

세포사멸 비율 즉 세포사멸지수는 정상상피에서 이형성상피로 이행시 증가하였고, 이형성상피에서 악성상피로 이행시에는 감소하였다(Fig. 4). 그러나 이 변화는 통계적으로 유의하지 않았다. TUNEL 양성 염색 세포들의 비율은 정상상피와 악성상피에서 비슷했으나, 분포는 악성상피에서 상피 전체에 걸친 보다 무질서한 양상을 보였다(Fig. 2-J,K,L). 실험자들간에 상관계수는 0.986 이었다.

5. 세포분열지수(MI) 및 세포사멸지수(AI)와 p63 발현의 관계 분석

최종적으로 햄스터 발암 과정에서 PCNA(MI), TUNEL(AI) assay, p63 발현 비율 변화와 MI:AI값의 변화를 비교분석하였다. MI:AI값은 이형성상피에서 악성상피로 이행될 때에만 유의한 증가를 보였다 (P<0.035)(Fig. 5a). p63의 발현 양상은 종양의 증식세포 비율 즉 세포분열지수와 밀접한 관계가 있었고 (Pearson r=0.69, p<0.001), p63의 염색성 증가는 전 발암 과정에 걸쳐서 MI:AI값의 변화를 아주 잘 반영하는 것으로 나타났다 (Pearson r=0.65, p<0.01)(Fig. 5b).

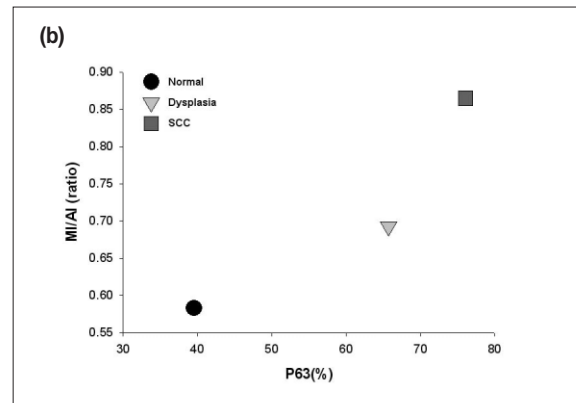
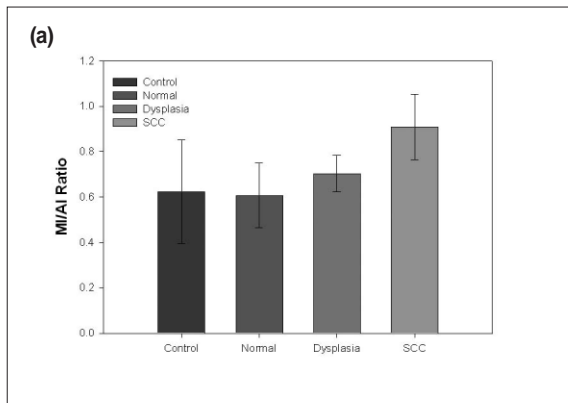


Fig. 5. Comparison of labeling patterns. (a) PCNA/apoptosis (MI/AI). The ratios of PCNA(mitotic index-MI) and TUNEL(apoptotic index-AI) fractions of keratinocytes in control, normal and dysplastic epithelium were not different significantly, however malignant oral epithelium showed a significant increase in the MI:AI ratio (P<0.035). (b) MI/AI vs p63 expression in normal, dysplastic and SCC hamster oral epithelium. The increase of p63 immunoexpression closely reflected the change of the MI:AI ratio during oral carcinogenesis(P<0.01).

## IV. 고 찰

인간 두경부 영역의 편평상피세포암에서 p63 발현에 관한 연구들은 찾아볼 수 있었으나<sup>4,6,30</sup>, 햄스터 협낭 발암모델 등 실험 동물을 이용한 p63 발현에 관한 연구는 별로 없었다<sup>31</sup>. 또한 실험적 발암 과정에서 p63의 발현과 세포증식 면역화학 표지자인 PCNA와 apoptosis와의 관계에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다. 따라서 이번 연구가 DMBA 유도 햄스터 협낭 발암모델에서 p63 발현과 PCNA 및 apoptosis와의 관계에 대한 최초의 연구라고 생각된다.

p73은 최초로 발견된 p53 homolog이고<sup>32</sup>, p63은 Schmale과 Bamberger에 의해 두번째로 발견된 p53 homolog이며, 처음에는 KET이라고 불렸다<sup>33</sup>. 이후 다른 연구에서도 p63의 존재가 밝혀졌는데, CUSP<sup>34</sup>, p40<sup>35</sup>, p73L<sup>36</sup>, p51<sup>15</sup>, p63<sup>37</sup> 등 여러가지 다른 이름으로 알려졌다. p73과 p63은 구조적, 기능적으로 p53과 높은 상동성을 가진다<sup>14,15,33,35,37</sup>. 따라서 처음에는 p73과 p63도 p53처럼 종양억제기능을 가진 유전자로 생각되었다. 그러나 인간의 암종과 종양 세포주에서 p63 유전자 돌연변이는 거의 없는 반면<sup>14,18</sup>, 유전자 증폭 또는 p63 단백질의 과발현이 두경부<sup>16,22</sup>, 비인두<sup>21</sup>, 방광<sup>20</sup>, 구강<sup>6</sup>, 자궁<sup>18</sup>, 피부<sup>19</sup> 등 여러가지 암종에서 보다 자주 발견되었다. 따라서 p73과 p63은 인간의 암발생에서 발암 유전자 역할을 하는 것으로 생각되었다. 햄스터 협낭 발암모델에서 p63 발현을 연구한 이번 연구의 결과도 p63의 발암 기능을 시사하면서 위의 견해와 일치함을 보였다.

p53과 다르게 p63 유전자는 C-terminal 종말의 세가지 다른 splicing과 두개의 다른 promoter를 통해 최소한 여섯개의 다른 transcript를 갖는다<sup>15,33,35,37</sup>. p63은 transactivating domain을 갖는 TA isoform과 transactivating domain을 갖지 않는 ΔN 또는 truncated isoform의 두 그룹으로 나뉜다<sup>38</sup>. 여섯개의 다른 transcript들은 각각 p53과 비슷한 기능 또는 반대 기능을 하는 이중 성격을 갖는다고 보고되고 있다. TA isoform은 p53과 비슷하게 종양억제 기능을 보이는 반면 ΔNp63(p40) isoform은 p53과 반대하는 기능 즉 종양유발효과를 가지고 있다고 보고되고 있다<sup>16,37</sup>.

Suliman 등은 p53이 결손된 생쥐의 구강과 식도 편평상피에서 ΔNp63의 과발현을 보임으로써 종양에서 p63 과발현에 대해 유전자 증폭이 아닌 다른 분자구조적 기전을 제시했다<sup>39</sup>. 이 연구 결과는 wild-type p53-protein의 과발현이 양과 시간 의존적으로 ΔNp63 isotype의 감소를 유발한다는 사실을 보고한 Ratovitski 등에 의해서 다시 한번 확인되었다<sup>40</sup>. 흥미롭게도 어떤 형태의 p53 돌연변이에서는 ΔNp63을 감소시키는 기능이 유지되는 반면 다른 형태의 p53 돌연변이에서는 ΔNp63을 감소시키는 기능이 상실되는 것으로 나타났다<sup>40</sup>. 따라서 앞으로 암발생에서 p53 돌연변이의 어떤 형태가 p63의 상대적 과발현에 관계가 있는지 연구하는 것도 흥미로운 것이다.

이번 연구에서는 transactivating isoform과 truncated isoform의 구분 없이 모든 p63 isoform들을 인식하는 단클론성 항체를 사용하였다. 그러나 Truncated isoform이 피부, 자궁, 질 점막 및 요로상피, 호흡기 상피, 전립선 등 여러가지 정상상피의 기저세

포<sup>37,41</sup>)에서 뿐만 아니라 두경부 암종을 포함하는 여러형태의 암종<sup>16,21,22</sup>)에서 보다 자주 발현된다. 이번 연구에서 구강 및 식도의 편평상피세포암에서 관찰되었던 전반적인 p63의 과발현을 실험 동물모델을 통해 재확인할 수 있었고<sup>6,42</sup>, 여기에 추가적으로 p63 발현 양상을 보다 정밀하게 묘사하였다. 햄스터 협낭의 발암 과정에 관여하는 특정 p63 isoform의 존재와 분포를 설명하기 위해서는 TA isoform과 ΔN isoform에 특이하게 결합하는 p63 항체나 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 연구분석이 필요할 것이다.

H&E 염색 표본을 관찰한 결과 하나의 조직 표본에 다른 발암 단계를 보이는 병소가 공존했기 때문에 조직 표본들의 각 부위를 정상상피, 이형성상피, 편평상피세포암 조직으로 다시 재그룹화 하였다. 예를 들면 12주간 DMBA를 도포한 협낭 조직 표본에는 이형성상피와 편평상피세포암이 동시에 관찰되었다. 정상상피군은 염증반응 및 과각화등의 어떤 조직 변화도 보이지 않는 표본으로 하였다. 이형성상피군은 정도에 따라 경도, 중등도, 심도의 이형성상피군으로 세분화 하지는 않았으며, 따라서 여기서 이형성상피군은 주로 중등도 이형성 변화를 보이는 상피군으로 하였다. 같은 조직에서 p63, PCNA 면역조직화학염색 및 TUNEL assay 모두에서 양성 염색 세포를 판별하는 것이 가능한 표본을 선택하였으므로 표본수가 제한되었다. Mineral oil을 도포한 햄스터 협낭 조직의 모든 표본에서 어떤 특이한 조직학적 변화도 관찰되지 않았으므로, 모두 하나의 대조군으로 하였다.

우리는 전암 병소에서 침습적 편평상피세포암으로 변하는 발암 과정에서 p63의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, p63 양성핵 세포의 분포가 정상상피에서는 기저 및 방기저층에 국한되는 반면 이형성상피로 진행할수록 위쪽으로 연장되며, 상피내암종 및 악성상피에서는 상피층 전체에 분포하는 것을 알 수 있었다. 이는 인간의 구강 점막<sup>4,6,30</sup>과 식도암<sup>42</sup>)에서 관찰되었던 이전의 연구와 일치하는 결과였다. 또한 이 결과는 p63의 발현이 기저세포 및 암종의 증식성과 관련있다는 가설을 지지한다. p63 양성핵 세포의 분포는 PCNA의 양성 염색 양상과 비슷했지만, p63의 염색성이 PCNA의 염색성 보다 특히 기저세포층에서는 더 강했다. 따라서 p63 면역조직화학염색 표본의 경우에 H&E 염색이나 PCNA 면역조직화학염색의 경우보다 편평상피세포암에서 간질로 침습하는 작은 세포군집을 보다 용이하게 발견할 수 있었다. p63 면역염색에서 악성 세포의 미세침윤 여부를 보다 정확하고 쉽게 판단할 수 있다는 점에서 p63의 또다른 가치를 알 수 있다.

p63 염색성은 덜 분화된 암종에서 보다 일정하고 균일한 양상을 보였으며, 잘 분화된 암종에서 keratin pearl의 주변 세포에서는 p63 발현이 나타나지 않았다. 이는 p63이 구강 점막에서 분화억제 역할을 한다는 가설을 지지하면서 과분화된 편평상피에서 p63 발현이 감소한다고 보고한 바 있는 Snizek 등의 연구 결과와 일치한다<sup>43</sup>. 그리고 두경부, 피부, 자궁경부의 편평상피세포암에서는 높은 수준의 p63 발현이 보고되나<sup>16,19,44</sup>, 여러 부위의 선암종에서는 p63이 거의 발현되지 않거나 아주 미

약하게 발현된다<sup>5)</sup>. 따라서 미분화된 편평상피세포암과 다른 기원의 암종을 감별 진단하는 데에 p63이 중요한 면역조직화학 표지자로서의 역할을 할 수 있다는 가설은 타당성 있어 보인다. 만약 앞으로의 연구에서 p63이 편평상피세포 기원의 암에서만 선택적으로 발현된다고 밝혀지면, 미분화된 전이성 암종에서 p63의 염색성을 확인하여 원발성 병소의 편평상피세포 기원여부를 판단하는 데 도움이 될 것이다.

구강상피에서 증식하는 각질세포의 비율을 결정하기 위한 많은 연구들이 있었다. 이전의 연구들은 Syrian 햄스터 동물모델에서 증식세포의 표지자로 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), bromodeoxyuridine (BrdUrd), histone (H3) mRNA, morphology<sup>45)</sup> 등을 이용하였다. 각각의 표지자가 서로 다른 세포주기의 단계를 인식하기 때문에 절대적인 증식세포의 수나 비율을 나타내기 보다는 상대적인 반응성에 따라 서로 다른 결과를 나타낸다. PCNA는 세포증식의 좋은 표지자이며, PCNA의 발현은 세포분열지수와 밀접한 관련이 있다. 최근의 연구에서 보여주듯이 PCNA는 발암 단계에 따른 표지자이기보다 세포증식성을 나타내는 표지자로 더 적당하다<sup>46)</sup>.

이번 연구에서 나타난 PCNA의 면역 염색 양상은 인간과 햄스터의 구강암에서 연구되었던 이전의 연구 결과와 일치한다<sup>47)</sup>. 발암 단계에서 증식하는 세포는 그 수 뿐만 아니라 분포 위치도 변한다. 증식세포의 비율은 정상상피에서 이형성상피, 또 침습성 편평상피세포암으로 진행함에 따라 증가한다. 또한 증식세포는 정상상피의 기저층 및 방기저층에, 이형성 말기나 악성상피에서는 전체 상피층에 분포한다.

두경부 종양에서 apoptosis와 관련된 유전자의 연구는 보다 드물며, 구강암종의 발생과정에서 apoptosis를 보이는 각질 세포의 비율에 관련한 연구의 결과는 다양하다. 인간의 구강상피가 정상 조직에서 악성 조직으로 진행되는 동안 세포사멸지수(AI)의 변화는 일정하다<sup>26)</sup>, 증가한다<sup>48)</sup>, 감소한다<sup>25)</sup>, 이형성상피까지는 증가하다가 악성상피로 변하면서 급격히 감소한다<sup>24)</sup> 등 논란이 많다. 이러한 결과의 다양성은 조직의 다양성에 기인하는 것으로 생각된다. 이번 연구의 결과는 Birchall 등이 1995년에 보고한 결과와 일치한다<sup>24)</sup>. 세포사멸의 비율이 정상상피에서 이형성상피로 진행시에는 증가했지만, 악성상피세포로 변하면서 정상 상피조직 수준으로 감소하였다. 따라서 MI:AI의 비율은 악성상피에서만 급격히 증가하였다. 이 결과는 햄스터 협낭 발암모델에서 초기에는 세포사멸이 세포증식에 비례하여 증가하지만, 악성상피에서는 세포증식과 세포사멸의 균형이 파괴되어 세포증식 비율이 세포사멸 비율을 훨씬 능가한다는 것을 보여준다.

이번 연구에서 p63의 면역염색 양상은 PCNA 및 PCNA/apoptosis 비율과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 햄스터 협낭 발암모델에서 p63, PCNA 그리고 apoptosis와의 관계를 설명하는데 충분하지는 않다. 그리고 이번 연구에서 어떻게 p63이 이런 과정에 관여하는지는 명확히 이해되지 않았다. 하지만 이러한 결과는 p63이 발암 과정에서 세포주기 조절 및 세포사멸에 관여한다는 사실을 추측할 수 있게 해준다

## V. 결 론

햄스터는 구강암 발생과정에서 p63 발현과 세포증식 및 세포사멸의 불균형을 연구하는 데 유용한 동물 실험 모델인 것으로 생각된다. DMBA 유도 햄스터 협낭 발암모델에서 p63의 발현이 정상상피에서 이형성상피, 악성상피로 진행됨에 따라 점점 증가하는 것으로 보아 p63이 편평상피세포암의 발생에 관여할 것이며, 또한 p63의 발현 양상이 PCNA 발현양상 및 PCNA/apoptosis의 비율과 밀접한 관련이 있는 것은 p63이 발암 단계에서 세포증식 및 세포사멸의 조절과 관련있을 것이라는 사실을 추측하게 한다. 앞으로 p63의 정확한 작용기전 및 p63의 isoform들에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Donehower LA, Bradley A: The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155(2):181-205.
2. Rowley H, Sherrington P, Helliwell TR, Kinsella A, Jones AS: p53 expression and p53 gene mutation in oral cancer and dysplasia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118(1):115-123.
3. Kaelin WG Jr: The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(7):594-598.
4. Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK: Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol* 2002;33(2):158-164.
5. Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al: p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):494-501.
6. Nylander K, Coates PJ, Hall PA: Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer* 2000;87(3):368-372.
7. Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, et al: Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 2002;161(4):1199-1206.
8. Wu M, Wang B, Gil J, Sabo E, Miller L, Gan L, et al: p63 and TTF-1 immunostaining. A useful marker panel for distinguishing small cell carcinoma of lung from poorly differentiated squamous cell carcinoma of lung. *Am J Clin Pathol* 2003;119(5):696-702.
9. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr: p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 1997;389(6647):191-194.
10. Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A: p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398(6729):708-713.
11. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al: p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398(6729):714-718.
12. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al: p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3156-3161.
13. Morris RJ, Coulter K, Tryson K, Steinberg SR: Evidence that cutaneous carcinogen-initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res* 1997;57(16):3436-3443.
14. Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC: Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res* 1999;59(17):4165-4169.
15. Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, et al: Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 1998;4(7):839-843.
16. Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, et al: AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc*



- Natl Acad Sci U S A 2000;97(10):5462-5467.
17. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y: p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999;6(12):1154-1161.
  18. Nishi H, Isaka K, Sagawa Y, Usuda S, Fujito A, Ito H, et al: Mutation and transcription analyses of the p63 gene in cervical carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15(6):1149-1153.
  19. Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H: Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;113(6):1099-1105.
  20. Park BJ, Lee SJ, Kim JI, Lee CH, Chang SG, Park JH, et al: Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 2000;60(13):3370-3374.
  21. Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O' Nions J, Allday MJ: High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* 2000;19(30):3439-3444.
  22. Yamaguchi K, Wu L, Caballero OL, Hibi K, Trink B, Resto V, et al: Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000;86(5):684-689.
  23. Polverini PJ, Nor JE: Apoptosis and predisposition to oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10(2):139-152.
  24. Birchall MA, Winterford CM, Allan DJ, Harmon BV: Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B(6):380-383.
  25. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR: De novo programmed cell death in oral cancer. *Histopathology* 1999;34(3):241-249.
  26. Birchall M, Winterford C, Tripconi L, Gobe G, Harmon B: Apoptosis and mitosis in oral and oropharyngeal epithelia: evidence for a topographical switch in premalignant lesions. *Cell Prolif* 1996;29(8):447-456.
  27. Shklar G: Experimental oral pathology in the Syrian hamster. *Prog Exp Tumor Res* 1972;16:518-538.
  28. Shklar G: Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. *J Dent Res* 1999;78(12):1768-1772.
  29. Gimenez-Conti IB, Shin DM, Bianchi AB, Roop DR, Hong WK, Conti CJ, et al: Changes in keratin expression during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Cancer Res* 1990;50(14):4441-4445.
  30. Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A: Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2002;99(1):22-28.
  31. Chen YK, Hsue SS, Lin LM: Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *Oral Dis* 2003;9(5):235-240.
  32. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90(4):809-819.
  33. Schmale H, Bamberger C: A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 1997;15(11):1363-1367.
  34. Augustin M, Bamberger C, Paul D, Schmale H: Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mamm Genome* 1998;9(11):899-902.
  35. Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D: A new human p53 homologue. *Nat Med* 1998;4(7):747-748.
  36. Senoo M, Tsuchiya I, Matsumura Y, Mori T, Saito Y, Kato H, et al: Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Delta Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br J Cancer* 2001;84(9):1235-1241.
  37. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al: p63, a p53 homologue at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2(3):305-316.
  38. Little NA, Jochemsen AG: p63. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(1):6-9.
  39. Suliman Y, Opitz OG, Avadhani A, Burns TC, El-Deiry W, Wong DT, et al: p63 expression is associated with p53 loss in oral-esophageal epithelia of p53-deficient mice. *Cancer Res* 2001;61(17):6467-6473.
  40. Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D: p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1817-1822.
  41. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, et al: p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 2000;157(6):1769-1775.
  42. Glickman JN, Yang A, Shahsafaei A, McKeon F, Odze RD: Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. *Hum Pathol* 2001;32(11):1157-1165.
  43. Sniezek JC, Matheny KE, Burkey BB, Netterville JL, Pietenpol JA: Expression of p63 and 14-3-3sigma in normal and hyperdifferentiated mucosa of the upper aerodigestive tract. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;126(6):598-601.
  44. Wang TY, Chen BF, Yang YC, Chen H, Wang Y, Cviko A, et al: Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. *Hum Pathol* 2001;32(5):479-486.
  45. Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K, Bao Y, Zen H, Sugita A, et al: Telomerase activation and cell proliferation during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1999;25(3):164-168.
  46. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL: Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2407-2414.
  47. Todd R, Chou MY, Matossian K, Gallagher GT, Donoff RB, Wong DT: Cellular sources of transforming growth factor-alpha in human oral cancer. *J Dent Res* 1991;70(5):917-923.
  48. Birchall MA, Schock E, Harmon BV, Gobe G: Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study. *Oral Oncol* 1997;33(6):419-425.