한이인지 : 제 38 권 제 9 호 1995

7, 12-Dimethylbenzanthrancene로 유도된 햄스터의 협낭암모델에서 p53 변이 단백의 발현과 Proliferating Cell Nuclear Antigen에 의한 세포증식능의 변화*

경북대학교 의과대학 이비인후과학교실, 계명대학교 의과대학 병리학교실,
후난의과대학 이비인후과학교실

박준식† · 이상숙†† · 謝民强†††

= Abstract =

p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Immunoreactivity of Dimethylbenzanthracene (DMBA)-induced Syrian Hamster Buccal Pouch Squamous Cell Carcinomas*

June-Sik Park, M.D.,† Sang-Sook Lee, M.D.,†† Min-Qiang Xie, M.D.†††
†Department of Otolaryngology, Kyungpook National University, ††Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea, and †††Department of Otolaryngology, Hunan Medical University, Changsha, P.R. China

Squamous cell carcinoma(SCC) of Syrian golden hamster buccal pouch is the best animal model that is histogenetically and morphologically similar to events involved in the development of SCC in human oral cavity. Mutation of the p53 gene is a common event in many human cancers and is also found in certain rodent tumors. Thirty-five SCCs of the buccal pouch of Syrian hamster induced by topical treatment of 7, 12-dimethylbenzanthrancene (DMBA) for 16 weeks were sectioned and examined for potential alterations of p53 expression and PCNA by immunohistochemical methods. Twenty normal control hamsters without DMBA treatment and 25 each hamsters with DMBA treatment for 4 and 8 weeks were also examined. In the mucosa of normal control animals, there was no p53 expression. In hyperplastic mucosal lesions(4 weeks DMBA exposure), the p53 positivity was limited to the basal cell layer and in dysplastic lesions(8 weeks DMBA exposure), the p53 positivity was expanded to the parabasal and superficial layers. In SCCs, p53 staining was diffusely positive in all 35 hamsters. The staining patterns and distribution for p53 protein immunostaining were similar to those of the PCNA staining.

These results suggest that p53 and PCNA alterations occur in a multistep fashion during Syrian hamster oral cavity carcinogenesis. Since mutation of the p53 gene and increased PCNA activity appear to be an important step in the pathogenesis of DMBA-induced hamster cheek

* 이 연구는 1994년도 경북대학교 병원 연구비의 지원으로 이루어졌음.
논문접수일:1995년 4월 28일
심사통과일:1995년 5월 19일

pouch SCC, one may surmise that similar pathogenetic changes may occur in human oral cavity SCC. Therefore, p53 alteration and PCNA positivity can be utilized for risk assessment and may serve as biomarkers for oral carcinogenesis in both Syrian hamsters and humans. (**Korean J Otolaryngol 38 : 9, 1995**)

KEY WORDS : p53 · Proliferating cell nuclear antigen · Squamous cell cancinoma model · Syrian golden hamster.

서 론

종양이 형성되는 암발생의 생태를 잘 이해하고자 동물 모델계가 사용되고 있다. Syrian golden 햄스터의 협낭에서 7, 12-dimethylbenzanthrancene(DMBA) 도포로 발생한 편평세포암종은 사람의 구강암의 대표적인 발암 모델로 사용된다[30]. 이는 사람의 두경부 조직, 특히 구강에서 생기는 전구암 병소와 편평세포암종과 대단히 유사하다고 알려져 있다.

p53 유전자는 유방암, 직장암, 폐암등 사람에서 발생하는 대부분의 악성 종양에서 가장 흔히 변이되는 종양억제 유전자다[11)14)]. p53 유전자는 사람의 제 17 번 염색체의 단완에 위치하여[13)21)] 세포증식을 조절하는 53kD의 핵 인단백질을 encode하며[16)] 세포 주기 중 특히 G0 상에서 G1 상으로 이행에 관여한다고 알려져 있다[15)]. 대부분의 정상세포에서는 낮은 치의 p53 mRNA를 발현하여 p53 단백은 거의 검출되지 않으며, p53 mRNA농도가 높은 정상적으로 분열하는 세포도 거의 단백을 검출할 수 없는데 이는 아마 정상세포에서 p53의 아주 짧은 반감기때문으로 생각된다[5)]. 야생형(wild-type) p53 유전자는 종양억제능력을 갖고 있으나 p53의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하게 된다. 전환 세포들(transformed cells), 세포주와 종양내에서 이러한 p53 유전자의 변이가 생기면 비로소 암유전자로 작용하여 성장능력의 변화를 초래하는 단백질을 생성하며, 궁극적으로 악성종양의 발생에 도달하는 것으로 알려져 있다[8)]. 이때 p53 유전자의 변이로 생성된 p53 생성물은 구조적으로 안정되어 세포에 축적하게 되며 이런 안정화된 비정상적 p53 단백을 p53 항체를 이용한 면역염색에 의해 검출할 수 있다[17)32)].

종양의 증식력을 측정하는 것은 종양의 진단뿐만 아니라 치료 및 예후 판정에 있어서 중요하다. 현재까지 여러 학자들에 의해 종양 세포의 증식 정도를 직접 또는 간접적으로 측정하는 방법이 연구되어 왔다[12)35)]. 최근 proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 단클론성 항체가 개발되어 통상적으로 제작된 파라핀 블록의 조직절편에도 적용이 가능하여 악성종양의 증식능을 측정할 수 있게 되었다[10)22)].

최근 보고들에 의하면 사람에 생기는 두경부암에서 p53 유전자의 변이가 관찰되고[26)] 세포의 증식능이 증가됨이 보고되고 있으나[27)] 아직 햄스터의 협낭암 실험 모델에서는 이들 유전자 및 세포의 증식능에 대한 연구가 드물다. 이에 저자는 햄스터 협낭에서 DMBA 도포로 유도된 암의 세포학적, 분자생물학적 변화를 이해하고자 암 발생 시기별로 대표적 종양 억제유전자인 p53 유전자의 변이 단백의 발현정도를 규명하고 동시에 종양의 증식 표지자로 알려져 있는 PCNA의 변화를 면역조직학적 방법에 의해 분석해 보고져 한다. 이들 분석은 향후 구강암의 병태를 이해하고 질병의 예방 및 예방화학요법을 평가하여 치료를 개선하는데 유용하게 사용되리라 생각된다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

4~6주 사육하여 건강이 양호하다고 인정되는 체중 100gm정도의 햄스터를 골라 실험에 제공하였다. 실험동물은 다음과 같이 대조군과 실험군으로 나누어 Table 1에서와 같이 실험군은 광유(Sigma, USA)에 0.5%의 농도로 희석한 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA ; Sigma, USA)를 주 3 회 우측 협낭에 붓으로 도포하였다. 좌측 협낭은 아무 처리를 하지 않았다. 대조군은 양측 협낭에 아무 처리를 하지 않았다(Table 1).

1) 대조군 : 5마리씩 0, 4, 8, 16주에 도살하였다.

2) 실험군 : 제1실험군 : DMBA도포 4주후 햄스터 25마리를 도살하였다.

제2실험군 : DMBA도포 8주후 햄스터 25마리를 도살하였다.

제3실험군 : DMBA도포 16주후 햄스터 30마리를 도살하였다.

2. 방 법

1) 육안 및 광학현미경적 연구

도살후 양측 협낭을 거꾸로 뒤집어 협낭 점막의 육안검사를 하고 사진을 찍은 후 절제하였다. 절제된 협낭은 광학현미경 검사를 위해 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하였다. 조직학적 검색을 위해 파라핀에 포매된 조직편을 5μm 두께로 잘라 통상적인 방법에 의해 헤마톡실린-에오신 염색을 실시하여 점막의 병변을 광학현미경하에서 검색하였다. 이때 점막의 병변중 과형성, 이형성, 유두종과 편평세포암종의 현미경 소견의 기준은 Table 2와 같다.

2) p53과 PCNA의 조직내 면역조직학적 검색

햄스터 협낭조직내 p53과 PCNA 항원의 분포를 알기 위하여 ABC(avidin biotin peroxidase complex) 방법을 사용하였다. 포르말린으로 고정하여 파라핀에 포매한 햄스터의 협낭조직편을 5μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착한후 하루밤 37℃ 부란기에 방치하였다. 실렌 용액에 담구어 30분간 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 70% 알코올과 증류수에 단계적으로 함수하였다. 조직내 존재하는 내인성 페록시다아제를 차단하기 위해 메탄올과 30% 과산화수소가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 Na_2HPO_4 1.48gm과 KH_2HPO_4 0.43gm과 NaCl 7.2gm을 1000ml의 증류수에 용해하여 만든 phosphate buffered saline, 0.01M, pH 7.2 (PBS)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 인해 조직내 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01M citrate 완충액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 10분간 가열하였다. 0.01M citrate 완충액은 0.1M citric acid 9ml와 0.1M sodium citrate 41ml를 전체 양이 500ml가 되게 희석한 후 pH 6.0으로 조정하여 사용하였다. 실온에서 20분가량 식힌 후 37℃에서 30분간 정상 말혈청, 1 : 200(Vectastain Elite kit, U.S.A.)을 가해 비특이 반응을 차단시켰다. 일차 항체로는 p53 DO7 단클론성 항체(Novocastra, U.K.), PCNA PC 10 단클론성 항체(Novocastra, U.K.)를 1 : 500~1 : 1000 비율로 희석하여 37℃에서 1~2시간 동안 반응시

Table 1. Protocol for DMBA-Induced carcinogenesis of hamster buccal pouch mucosa

Group	No. of animal	DMBA in mineral oil	Time of survival
Control	20	No Treatment	0, 4, 8, 16 wks
Experimental (1)	25	0.5%	4 wk
Experimental (2)	25	0.5%	8 wk
Experimental (3)	30	0.5%	16 wk

Table 2. Histopathology of epithelial proliferative lesions produced in the hamster buccal pouch following exposure to DMBA

Classification	Definition
1. Hyperplasia	A proliferative lesion with acanthotic and hyperkeratotic squamous epithelium. Cytological atypia cannot be seen
2. Dysplasia	A lesion in which part of the thickness of the epithelium is replaced by atypical cells showing big,often irregular and darkly stained nuclei, associated with loss of polarity and regular stratification. Mitoses are often found and occasionally are abnormal
3. Papilloma	A benign neoplasm composed of papillary processes with a core of fibrous tissue covered by stratified squamous epithelium
4. Squamous cell carcinoma	Neoplastic cells are characteristically arranged in sheets and cords of squamous cells with the features of malignancy. Frequent keratin pearl formations are also seen

켰다. PBS로 수세후 2차 항체로 biotinylated anti-mouse IgG, 1 : 200(Vectastain Elite kit, U.S.A.)를 가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후 avidin-biotin peroxidase complex, 1 : 200(Vectastain Elite kit, U.S.A.)를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 6mg의 3, 3′-diaminobenzidine tetrachloride(DAB, Sigma, USA)를 10ml의 0.05M Tris 완충액, pH 7.6에 용해한 후 사용직전에 신선한 1% H2O2를 0.1ml 첨가하여 만든 용액에 담구어 10~20분간 실온에서 발색시키고 Mayer 헤마톡실린으로 대조염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

양성 대조군으로서는 사전 연구에서 각 항체에 대해 양성으로 알려진 폐의 편평세포암종 조직절편을 사용하고 음성 대조군으로서는 일차항체 대신에 PBS를 사용하여 동일한 방법으로 면역조직화학 염색을 시행하였다. 염색결과의 판독은 p53과 PCNA항체를 사용한 경우 핵에 갈색으로 염색되면 양성으로 간주하였다.

성 적

1. 육안 소견

대조군의 햄스터의 협낭의 점막은 아주 얇고 투명했다. 제1실험군(4주)에서 우측 햄스터의 협낭점막이 약간 두꺼워져 있었고 좀더 희고 투명도가 감소했다. DMBA 도포후 8주째 도살한 제2실험군 햄스터의 우측 협낭는 더욱 두꺼워져 표면이 거칠어 쉽게 피가 났으며 전체적으로 협낭의 크기가 줄어들어 거의 늘어나지 않았다. 간혹 작은 돌기모양의 출현을 볼 수 있었다. 편평세포암의 발생을 보기 위해 16주째 도살한 제3실험군의 햄스터의 모든 예에서 육안적으로 여러 크기의 튀어나온 종괴가 우측 협낭에 관찰되었다. 좁쌀크기부터 1.2cm에 이르는 유두상 종괴가 군데군데 관찰되었다. 대부분의 경우 협낭은 크기가 아주 줄어들고 전체적으로 두꺼워져 쉽게 피가 났다. 실험군중 아무 처치도 하지 않은 좌측협낭은 눈에 띌만한 변화는 없었다.

2. 광학현미경 소견

대조군의 햄스터 협낭는 3~4층의 세포로 구성된 정상점막의 구조를 보였다. DMBA 도포후 4주만에 도살한 제1실험군 햄스터의 협낭 점막은 과각화증와 함께 세포층도 다소 수적으로 증가된 과형성의 소견을 보였다. DMBA를 도포후 8주째에 도살한 제2실험군 햄스터의 협낭 점막은 심한 세포수의 증식과 함께 역시 증가된 각질층을 볼 수 있었다. 곳곳에 커진 비정형성 세포가 상당한 극성의 소실과 함께 점막의 기저층에 경계해 관찰되었다. 비정형성 세포는 핵이 크고 다양하며 과염색되었으며 세포간격이 넓어 졌다. 어떤 곳에서는 이런 비정형성 세포들이 점막의 상부쪽으로 이동하는 소견도 보였다. 때로는 유두종의 형성도 관찰되었다.

DMBA를 도포후 16주째에 도살한 제3실험군 햄스터의 협낭 점막에 흔히 관찰되는 좁쌀 모양부터 비교적 큰 용종성 종괴는 잘 분화된 편평상피 종양세포로 구성되어 흔히 각화 진주양 형성을 보였으며 종양세포사이에는 섬유성 간질조직이 존재하였다. 종양세포는 제2실험군보다 더욱더 이형성이 심해서 심한 기저 세포의 증식과 극성의 상실, 흔한 유사 분열수, 세포내/세포간격이 넓어 졌다. 곳에 따라 분화가 나쁜 종양세포군과 상피하 간질로 침윤하는 종양세포들도 관찰되었다.

3. p53 단백의 면역조직학적 검색

대조군인 정상 햄스터의 협낭에서는 p53이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 제1실험군인 과형성 소견을 보이는 협낭 병소에서 p53은 소량 기저층에 관찰되었다(Fig. 2). 상피의 상층에는 p53 양성 세포는 발견되지 않았다. 제2실험군인 이형성를 보이는 협낭 병소에서 p53이 기저층 및 부기저층에 국소적으로 염색되었다(Fig. 3). 전체적으로 p53의 염색된 세포의 수가 증가되는 경향을 보였다. 협낭 상피의 이형성 정도가 심해질수록 양성세포수가 많아져 상피내암종에서는 상피의 전층에 걸쳐 나타나기도 하였다. 제3실험군인 편평세포암종의 햄스터 협낭에서 p53의 염색되는 범위가 더욱 넓어져 잘 분화된 경우 종양 자체보다는 종양세포경계에 더욱 강하게 염색되었다(Fig. 4). 곳에 따라서 하부조직으로 침범하는 종양세포들의 전방경계에 염색되었다(Fig. 5, 6). 면역조직학적 기법에 의해 p53 변이는 햄스터의 전기암병소인 과형성부터 나타나기 시작하여 이형성기를 거쳐 편평세포암종으로 진행될수록 발현 빈도가 증가되어 이 종양의 비교적 초기에 p53 변이가 생겨 DMBA로 유도된 햄스터의 편평세포암종의 발생 및 진전에 p53 유전자의 변이가 관여함을 알 수 있었다.

4. PCNA의 면역조직학적 검색

대조군인 정상 햄스터의 협낭에서는 PCNA가 주로

기저층에 줄로 선 양상으로 염색되었다(Fig. 7). 제1실험군인 과형성을 보이는 협낭상피에서 PCNA은 기저층과 약간 부기저층에서 관찰되었다(Fig. 8). 상피의 상층에는 PCNA 양성 세포는 발견되지 않았다. 제2실험군(이형성군)에서는 PCNA양성세포수가 많아져 주로 기저층과 부기저층에 존재하였다(Fig. 9). 전구암 병소라고 생각되는 기저층에 위치하는 비정형세포군에서도 염색되었다. 이형성 정도가 심해질수록 양성세포수가 많아져 상피내암종에서는 상피의 전층에 걸쳐 나타 나기도 하였다. 제3실험군인 편평세포암종의 햄스터 협낭점막은 PCNA이 기저층 및 부기저층뿐만 아니라 상피층까지 미만성으로 염색되어 세포의 증식대가 위쪽으로 이동한 인상을 주었다(Fig. 10). 때때로 관찰되는 상피내암종병소에서는 상피 전층의 세포가 PCNA에 염색되었다. 잘 분화된 편평세포암종의 햄스터 협낭에서 경우 종양 자체보다는 종양세포경계에 더욱 강하게 염색되었다(Fig. 11, 12). 하부조직으로 침범하는 작은 종양세포소들의 경계에 더욱 강하게 염색되었다.

전체적으로 대조군의 정상조직보다 실험군의 전구암병소에서 PCNA 양성인 세포수가 더 많았다. 전구암병소중 이형성이 중등도 이상인 경우 더욱 더 증가된 양상을 보였다. 그러나 과형성, 과각화증, 이형성과 유두종에서 매우 다양한 PCNA의 발현을 보였다. 편평세포암종에서 전구암병소보다 더욱 높은 치의 PCNA 양성세포를 보여 병변이 암으로 진행될수록 종양세포의 증식능도 높아짐을 알 수 있었다.

고 찰

구강의 실험종양은 1927년 Bonne이 타르(tar)에 의한 구강상피암 발생을 보고한 이래 1954년 Salley[24]가 최초로 DMBA를 이용하여 햄스터 협낭 점막에 편평세포암종을 실험적으로 발생시켰고 1961년 Morris[18]에 의해 이 시술이 확립했으며 표준화되었다. Syrian 햄스터는 여러 생물모델중 선택된 종으로 구강암의 발생에 햄스터의 협낭암모델을 이용한 연구에 광범위하게 이루어 지고 있다[30]. 햄스터의 DMBA에 의한 협낭암 모델은 완전한 암 발생 모델로서 DMBA도포후 1주부터 과형성이 생기고 7주부터 이형성이 생기며 11주부터 종양이 형성된다고 알려져 있다. 본 실험에서는 DMBA 도포후 4주째 도살한 햄스터의 협낭 점막에서 과형성의 소견을 보였으며 8주째 햄스터에서는 이형성를 16주째에는 편평세포암종이 관찰되었다.

편평세포암종은 구강 등 두경부에 생기는 암중 가장 흔한 암으로 최근 미국과 북유럽에서 구강암의 빈도가 증가하고 있다[9]. 두경부의 편평세포암종의 처치가 개선되고는 있지만 치료의 발전이 생존률 증가에 기여했다는 증거는 아직 없는 실정이다. 두경부의 편평세포암종을 예방하고 조기 발견을 위해서는 이런 종양의 병인을 좀 더 깊이 이해하고 위험도를 인지하기 위한 생화학적 또는 유전학적 표지자의 개발이 시급하다[9].

두경부암은 발암물질노출에 기인되는 유전자 변이 및 형태적 변화의 축적에 의해 다단계 과정에 의해 발생된다고 제안되고 있다[7]. 우성 암유전자(oncogene)의 변이, 종양억제유전자의 변이 또는 소실과 성장 요소와 그들 수용체들의 발현 이상을 포함하는 분자생물학적 변화들이 상기도의 암세포에서 확인되었다[23]. 두경부 조직부위에 다발성의 독립된 원발암이 생기고 수년이 경과된 후에도 제2의 원발암이 발생하는 것으로 보아 '영역 암화 (field cancerization)'이 존재함을 알수 있다[28][31]. 즉 영역 전체를 통해 발암물질에 수반된 변화가 생길 수 있음을 의미한다. 그리고 암이 생기기 전 단계에 영역에 암전기병소가 존재함은 종양이 다단계 과정으로 이루어짐을 시사하는 소견이다[7]. 다단계 종양발생과정 동안 유전자의 변이가 축적되어 조직내 표현형의 변화를 야기한다. 이런 표현형 변화는 쉽게 조직학적으로 인지되고 세포증식과 분화의 조절이상(dysregulation)이 수반된다[27]. p53 단백은 53kD의 polypeptide로 DNA종양 바이러스인 SV40의 우성 변형 암유전자인 T항원에 결합된 숙주 단백으로 처음 발견되었으며[16] Oren[21], Isobe등[13]에 의해 사람의 제17번 염색체의 단완에 p53 유전자가 위치함을 알게 되었다. p53 유전자는 암유전자로 간주되어 왔으나, Finlay등[8]에 의하여 정상 p53 유전자는 종양억제능력을 가진다고 제시되어 졌다. 야생형 p53이 없거나 비활성화되어 본래의 기능을 상실하거나 과오 돌연변이에 의해 악성 변형이 되어 종양을 형성하는데 기여하게 된다[16]. Crawford[5]에 의하면 대부분의 정상세포들은 낮은치의 p53 mRNA를 발현하나 p53단백은 검출되지 않으며 p53 mRNA 농도가 높은 정상적으로 분열하는 세포에서 직접 분석해도 거의 단백을 검출할 수 없는데 이는 아마 아주 짧은 반감기 때문으로 생각된다. 이러한 p53 유전자의 변이가 일어날 경우 p53 단백에

입체 형태적 변화를 일으켜 반감기가 더 길어져 세포내 단백이 축적되면 특수한 항체에 의해 검출하게 된다[17)32)]. 과오 돌연변이을 보이는 p53 또는 야생형 p53의 과발현은 사람의 p53에 대한 항체에 의한 면역조직화학 기법에 의해 규명할 수 있음이 보고되었다[33)]. 변이 p53는 또한 세포의 증식을 촉진하여 궁극적으로 악성 종양의 발생에 도달하는 것으로 알려졌다.

p53 종양 억제 유전자의 변이는 사람의 충실성 종양에서 가장 흔히 발생하는 유전학적 사건이다[11)14)]. 두경부 편평세포암종에서도 p53 단백의 변이 또는 증가된 발현이 약 42%에서 보고되었다[19)]. Shin등[26)]에 의하면 두경부 조직의 병변이 진행됨에 따라 p53 발현의 양이 점차 증가하고 역시 발현 부위의 변화도 수반되어 p53 발현은 종양주변의 정상 점막의 소수에서 기저층에만 관찰되었으나 과형성과 이형성에서 부기저층과 상부층으로 면적이 확대되었음을 보고하였다. p53 발현은 두경부 암 발생의 극히 초기에서 나타날 수 있어 위험도 측정의 훌륭한 표지자가 될 수 있어 예방적 화학요법의 시도에서 중간 생물표지자로 사용가능할 것이다[26)]. 이와 같이 p53 유전자는 두경부암 발생과정중 특정시기에 활성화되어 한 조절표지자로 작용할 것이다. 이러한 시기를 안다면 두경부암이 발생될 위험성이 높은 백반(leukoplakia) 같은 병소에서 암 생길 위험도를 측정하고 암 예방조치에 대한 반응을 아는데 사용될 것이다[26)]. 본 실험에서도 DMBA로 처치한 군에서 과형성 시기부터 p53 발현이 기저층에서 나타나기 시작하여 이형성, 상피내암종을 거쳐 편평세포암종으로 발전하면서 p53 단백의 발현이 증가되고 발현 면적 또한 넓어 졌다. 이런 소견은 두경부암 발생의 극히 초기에 특히 발암물질에 노출된 상피에 p53 발현의 이상이 나타나기 시작함으로서 이는 영역암화의 개념을 지지하는 소견이 된다. 정상에서 과형성, 이형성과 편평세포암종으로 되면서 p53 발현이 빈도와 양에서 계속 증가되어 두경부 종양이 다단계 과정으로 생김을 의미한다. p53 유전자 변경의 시기는 종양마다 달라 상기도, 식도나 폐종양은 초기에 생긴다[3)]. 반면 대장, 난소와 갑상선 암에서는 p53의 비활성화는 종양진전과 수반된 비교적 늦은 시기에 생긴다[17)]. 전암성의 병소에 증가된 p53 발현이 p53변이 때문인지 독 노출에 대한 세포의 반응인지 아직 완전히 규정되지 않았다[26)].

두경부 종양형성에 p53 변이의 결과는 확실히 정립 안되었으나 한가지 가능성으로는 p53 변경이 지놈의 불안정을 초래하여 종양발생에 필요한 후속 유전자 사건의 축적을 가속화시킨다는 것이다[34)]. p53 변이나 소실이 악성 표현형을 유지하는데 중요한 역할을 하는듯 하다. 왜냐하면 transfection이나 retroviral 유전자의 형질 도입으로 세포에 야생형 p53을 주입하면 악성표현형의 소견을 반전시키기 때문이다[23)].

두경부 종양 형성에 세포 증식능을 알 수 있는 PCNA 항원의 발현이 종양의 발생 시기동안 점진적으로 증가되었다[27)]. PCNA는 DNA polymerase δ 보조단백질으로서[2)] DNA 복제와 밀접한 관계가 있고 세포의 증식기중 S 상에서 가장 높게 분포하는 것으로 알려져 있으며[1)] Ogata등[20)]이 PCNA를 분리함으로서 이에대한 단일 클론항체를 이용한 연구가 진행되어 왔다. 근자에 들어서는 Hall등[10)], Robbins등[22)]에 의해 면역조직화학 염색에 사용될 수 있는 단일 클론항체가 개발됨으로서 악성종양의 증식능력을 조직학적으로 관찰할 수 있게 되었다.

조직내 세포의 증식은 DNA flow cytometry나 bromodeoxyurine를 결합한 세포의 수를 측정함으로 알 수 있다[12)35)]. PCNA 분석으로 세포증식의 조절 부전을 측정할 수 있는 장점이 있어 발암물질에 의해 유도되는 암 발생과정을 이해하는데 중요한 도구가 될 수 있다[27)]. PCNA에 대한 항체는 DNA 복제와 수반된 DNA polymerase δ의 보조 인자를 인지한다[2)]. PCNA는 G1, S와 초기 G2상에 있는 대부분의 증식하는 세포에서 발현된다[1)]. 조직내 PCNA 분석으로 PCNA 의 양적 측정뿐 아니라 유사한 조직학상 양상을 보인 경우에서 증식의 조절 부전의 차이를 알 수 있으며 특수한 유전자형 혹은 표현형변화의 정도를 동시에 측정할 수 있는 장점이 있다[27)]. 본 실험에서 DMBA로 처리한 햄스터 실험군을 대조군과 PCNA 발현을 비교했더니 병소의 조직학적 진전과 PCNA발현 사이에 놀랄만한 상관관계가 발견되었다. 과형성에서 이형성로 진행될수록 이형성에서 편평세포암종이 될 수록 더 높은 증식능을 가져 더 많은 PCNA를 발현하여 이는 '영역 암화' 가설을 지지하는 소견이 됨을 알 수 있었다. 그리고 PCNA발현은 증식 조절 부전의 정도를 알 수 있는 유용한 생물표지자가 된다. 발암물질에 반복 노출되는 전조직 부위가 다발성, 독립된 종양발생의 병소를 일으킬 위험성이 증가된다. 이런 악성 병소는 동시에 또는 시간이 경과한 후 이시성으로 생길 수 있다[25)]. 예를 들면 두경부의 원발암을 가진

환자가 두번째 원발암을 일으킬 위험성이 5~40%로 보고되었다[29]. 같은 조직학적 양상을 보임에도 PCNA 발현의 큰 정도의 이질성이 관찰되어 PCNA 발현이 통상적 조직검색외의 부가적 생물학적인 정보를 줄 수 있다. PCNA 발현이 상기도의 조직내 암전구 병소의 표지자로 보고되었다[4]. 본 실험의 결과 DMBA 도포로 유도된 햄스터협낭의 과형성 병소에서는 PCNA는 주로 기저층에서 발현되나 이형성부터 부기저층에 PCNA가 발현되기 시작하여 암이 되면서 점막의 전층에 걸쳐 PCNA 발현을 보였다. 그리고 이형성같은 전기암 병소가 침윤성 암과 거의 같은 정도의 증식능이 관찰되었다. 이는 사람의 구강상피내 전구암 병소중 정상과 과형성 병소에서는 PCNA는 기저층에서 발현되나 모든 이형성, 상피내암종과 침윤성 암에서 부기저층에 PCNA가 발현되어 이형성와 부기저층 PCNA 발현과 상당히 높은 관계가 있다는 보고[4]와 일치되는 소견이다. 또한 이형성같은 전기암 병소가 침윤성 암과 거의 같은 정도의 증식능을 보임은 종양발생전에도 어떤 유전자의 변화가 생김을 추측하게 해 준다. 결론적으로 PCNA는 두경부암에서 다단계 발암를 더 잘 이해하는 유용한 생물표지자가 될 수 있을 것이다.

본 실험의 결과를 종합해 보면 DMBA도포로 인하여 햄스터 협낭에 정상점막부터 과형성, 이형성 및 편평세포암종의 발생을 시기별로 관찰할 수 있었다. 이는 두경부암의 '영역 암화'과 '다단계 과정'를 지지하는 소견임을 알 수 있었다. 또한 햄스터의 협낭암 발생에 p53 변이가 세포증식능의 증가와 수반되어 암발생의 비교적 초기부터 나타나 p53 변이와 증가된 PCNA 증식능은 두경부암의 발생 위험도를 측정할 수 있는 한 중요한 표지자가 된다고 생각되었다.

요 약

사람의 구강암의 발생기전을 밝히고자 햄스터의 협낭암모델을 이용한 연구가 광범위하게 이루어 지고 있다. 두경부의 편평세포암종을 예방하고 조기 발견을 위해서는 이런 종양의 병인을 좀더 깊이 이해하고 위험도를 인지하기 위한 생화학적 또는 유전학적 표지자의 개발이 필요한 실정이다. 본 실험의 결과를 종합해 보면 DMBA도포로 인하여 햄스터 협낭에 정상점막부터 과형성, 이형성 및 편평세포암종의 발생을 시기별로 관찰할 수 있었다. 이는 두경부암의 '영역 암화'와 '다단계 과정'을 지지하는 소견임을 알 수 있었다. 면역조직학적 기법에 의해 p53 변이는 햄스터의 전기암 병소인 과형성부터 나타나 병변이 이형성를 거쳐 편평세포암종으로 진행될수록 빈도가 증가되어 이 종양의 비교적 초기에 p53 변이가 생겨 DMBA로 유도된 햄스터의 편평세포암종의 발생 및 진전에 p53 유전자의 변이가 관여함을 알 수 있었다. 세포의 증식능을 알 수 있는 PCNA 양성인 세포수는 대조군의 정상조직보다 실험군의 전구암 병소에서 더 많았다. 전구암 병소중 이형성이 중정도 이상인 경우 더욱 많이 염색되었다. 그러나 과형성, 과각화증, 이형성와 유두종에서 매우 다양한 PCNA의 발현을 보였다. 편평세포암종에서 전구암 병소보다 더욱 많은 수의 PCNA 양성세포가 관찰되어 병변이 진행될수록 종양의 증식능도 높아짐을 알 수 있었다. 이와 같이 햄스터의 협낭암 발생에 p53 변이가 세포증식능의 증가와 수반되어 암발생의 비교적 초기부터 나타나 p53 변이와 증가된 PCNA 증식능은 두경부암의 재발이나 제2원발암의 발생 위험도를 측정할 수 있는 한 중요한 표지자가 된다고 생각되었다.

References

1) Almendral JM, Huebsch D, Blundell Pa, et al : *Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin : Homology with DNA-binding proteins. Proc Natl Acad Sci USA 84 : 1575-1579, 1987*
2) Bravo R, Rainer F, Blundell PA, et al : *Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase-delta. Nature 326 : 515-520, 1987*
3) Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, et al : *Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Res 53 : 1676-1683, 1993*
4) Coltrera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, et al : *Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, p53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue. Am J Pathol 141 : 817-825, 1992*
5) Crawford L : *The 53,000 dalton cellular protein and its role in transformation. London, Academic, 1983*
6) Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al : *Participation of*

p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature 312 : 646-649, 1984

7) Farber E : *The multistep nature of cancer development. Cancer Res 44 : 4217-4223, 1984*
8) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ : *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57 : 1083-1093, 1989*
9) Grandis JR, Tweardy DJ : *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res 53 : 3579-3584, 1993*
10) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al : *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections : An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 162 : 285-294, 1990*
11) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al : *p53 mutations in human cancers. Science 253 : 49-53, 1991*
12) Hoshino T, Nagashima T, Murovic J, et al : *Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. Cytometry 6 : 627-632, 1985*
13) Isobe M, Emanuel BS, Givol D, et al : *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 320 : 84-85, 1986*
14) Jones PA, Buckley JD, Henderson BE, et al : *From gene to carcinogen : a rapidly evolving field in molecular epidemiology. Cancer Res 51 : 3617-3620, 1991*
15) Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, et al : *Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 7491-7495, 1992*
16) Lane DP, Benchimol S : *p53 : oncogene or anti-oncogene? Genes & Dev 4 : 1-8, 1990*
17) Marshall CJ : *Tumor suppressor genes. Cell 64 : 313-326, 1991*
18) Morris AL : *Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. J Dent Res 40 : 3-15, 1961*
19) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al : *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 342 : 705-708, 1989*
20) Ogata K, Kurki P, Celis JE, et al : *Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. Exp Cell Res 168 : 475-486, 1987*
21) Oren M : *The p53 cellular tumor antigen : gene structure, expression and protein properties. Biochim Biophys Acta 823 : 67-78, 1985*
22) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, et al : *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111 : 841-845, 1987*
23) Roth JA : *New approaches to treating early lung cancer. Cancer Res 52(suppl) : S2652-S2657, 1992*
24) Salley JJ : *Experimental carcinogenesis in cheek pouch of the Syrian hamster. J Dent Res 33 : 253-262, 1954*
25) Shibuya H, Hisamitsu S, Shioiri S, et al : *Multiple primary cancer risk in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer 60 : 3083-3086, 1987*
26) Shin DM, Kim J, Ro JY, et al : *Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. Cancer Res. 54 : 321-326, 1994*
27) Shin DM, Voravud N, Ro JY, et al : *Sequential upregulation of proliferating cell nuclear antigen in head and neck tumorigenesis : a potential biomarker. J Natl Cancer Inst 85 : 971-978, 1993*
28) Slaughter DL, Southwick HW, Smeikal W : *"Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium : Clinical implication of multicentric origin. Cancer 6 : 963-968, 1953*
29) Snow GB, De Vries N, Van Zandwijk N, et al : *Secondary primary cancers in the lung in head and neck cancer patients : A challenge. Eur J Cancer Clin Oncol 23 : 883-886, 1987*
30) Solt DB, Polverini PJ, Ray S, et al : *Early neoplastic commitment of hamster buccal pouch epithelium exposed biweekly to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. Carcinogenesis 9 : 2173-2177, 1988*
31) Strong MS, Inceze J, Vaughan CW : *Field cancerization in the aerodigestive tract-its etiology, manifestation, and significance. J Otolaryngol 13 : 131-136, 1984*
32) Thomas DW : *p53 in tumor pathology : can we trust immuno-cytochemistry? J Pathol 166 : 329-330, 1992*
33) Tominaga O, Hamelin R, Revikos Y, et al : *p53*

from basic research to clinical applications. Clin Rev Oncog 3 : 257-282, 1992

34) Weinert T, Lydall D : *Cell cycle check points, genetic instability and cancer. Semin Cancer Biol 4 : 129-140, 1993*

35) Wilson GD, McNally NJ, Dunphy E, et al : *The labeling index of human and mouse tumors assesses by bromodeoxyuridine staining in vitro and in vivo and flow cytometry. Cytometry 6 : 641-647, 1985*

☐ Legends for Figures ☐

Fig. 1. No p53-positive cells are seen in the normal stratified squamous epithelium of the hamster buccal pouch in untreated control animals(Immunohistochemistry for anti-p53, ×400).

Fig. 2. In the early phase of carcinogenesis after DMBA application for 4 weeks, increased thickness of the mucosal epithelium or acanthosis, accompanied by hyperkeratosis was seen. There were a few p53-positive cells mostly in the basal layer(Immunohistochemistry for anti-p53, ×400).

Fig. 3. At 8 weeks after DMBA application, multiple foci of dysplastic cells, made up of large hyperchromatic nuclei, prominent nucleoli, associated with loss of polarity and regular stratification, and occasional mitotic figures were found. p53-positive nuclear staining is found in the big, dysplastic cells in the basal layer, extending to the suprabasal layers (Immunohistochemistry for anti-p53, ×400).

Fig. 4. Well differentiated squamous cell carcinoma at 4 month treatment with DMBA showing sheets and nests of cancer cells with large, hyperchromatic nuclei and abundant keratin pearl formations. There are many p53-positive cells mainly in the outer layers of cancer nests and sheets in the well differentiated squamous cell carcinoma(Immunohistochemistry for anti-p53, ×100).

Fig. 5. p53-positive cells were also diffusely distributed in the front edge of invasive small cancer nests in the moderately differentiated squamous cell carcinoma (Immunohistochemistry for anti-p53, ×100).

Fig. 6. The higher magnification of the positive nuclear staining of tumor cells by p53 monoclonal antibody(Immunohistochemistry for anti-p53, ×400).

Fig. 7. Many PCNA-labeled cells are seen only in the basal layer of the control hamster buccal mucosal epithelium(Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×400).

Fig. 8. PCNA-labeled cells were located mostly in the basal layer, extending parabasal layer of buccal mucosa, showing hyperplasia in 4 week DMBA treatment(Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×100).

Fig. 9. PCNA-labeled cells in the basal layer of dysplastic hamster mucosa at 8 weeks of DMBA application increased in number, extending to the upper layer of mucosa (Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×400).

Fig. 10. PCNA-labelled cells were diffusely distributed in the entire thickness of the mucosa in the case of moderately differentiated squamous cell carcinoma(Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×100).

Fig. 11. PCNA-labeled cells are present mainly in the outer layers of cancer nests and sheets in the well differentiated squamous cell carcinoma, induced by DMBA treatment for 16 weeks (Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×100).

Fig. 12. The higher magnification of the positive nuclear staining of tumor cells by PCNA monoclonal antibody(Immunohistochemistry for anti-PCNA, ×400).

□박 준 식 외 사진부도 ①□

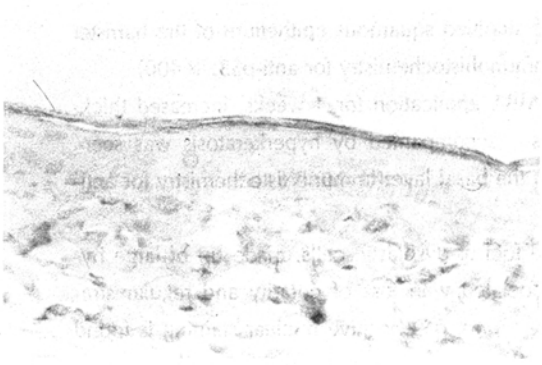

Fig. 1.

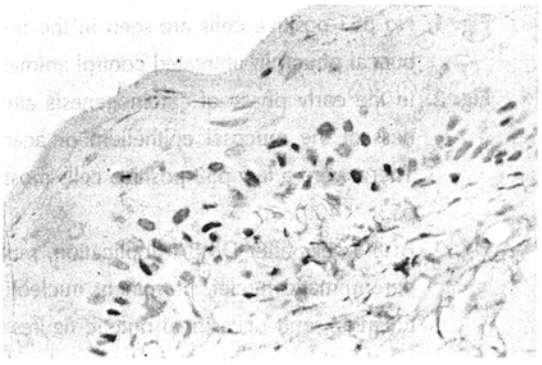

Fig. 2.

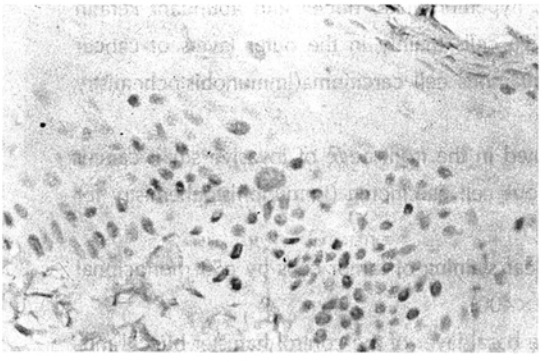

Fig. 3.

Fig. 4.

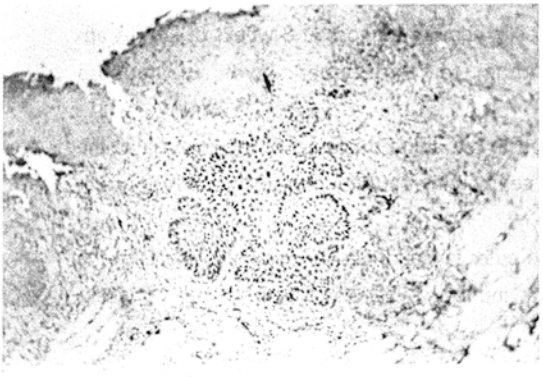

Fig. 5.

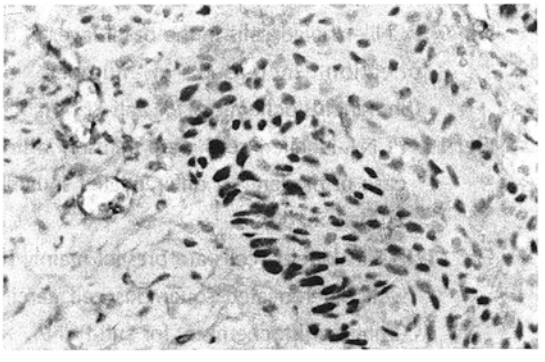

Fig. 6.

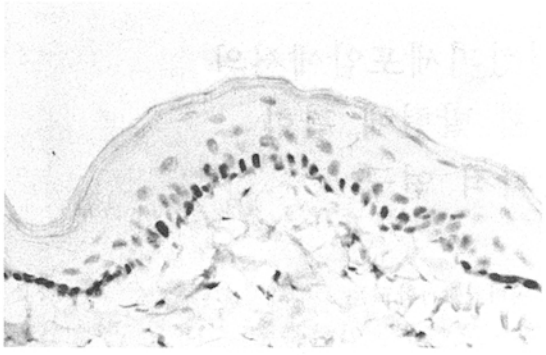

Fig. 7.

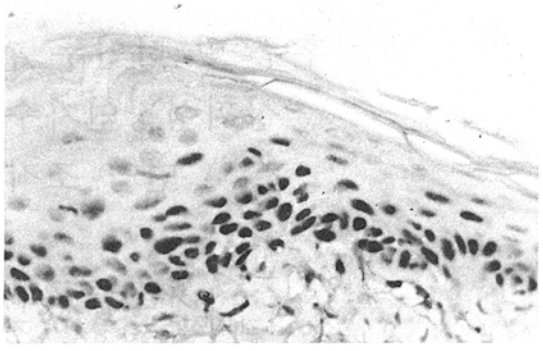

Fig. 8.

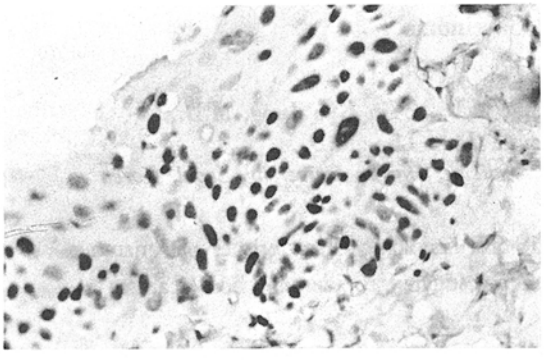

Fig. 9.

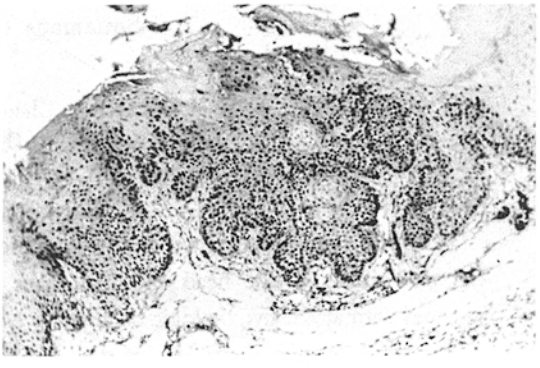

Fig. 10.

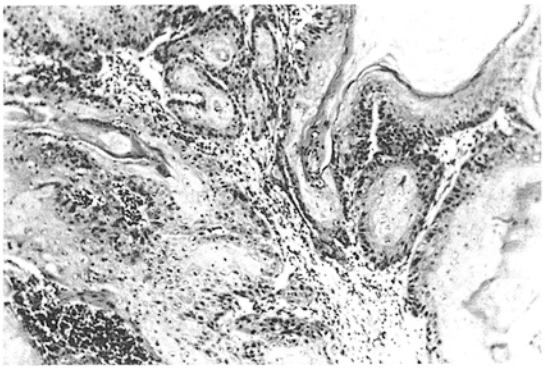

Fig. 11.

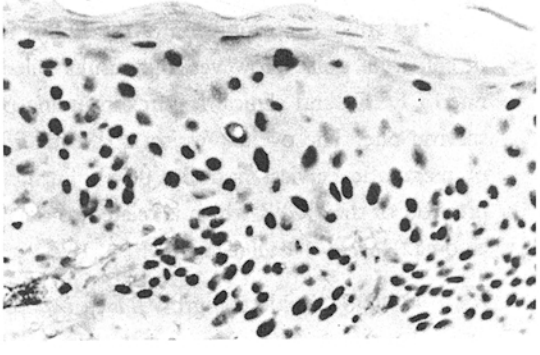

Fig. 12.