KISEP Original Articles
臨床耳鼻：第12卷 第2號 2001
J Clinical Otolaryngol 2001;12:229-233

반전성 유두종에서 p53 유전자의 발현

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실
박성호 · 임도형 · 이강원 · 백상흠 · 홍영호 · 양훈식 · 김춘길 · 김 훈

Expression of p53 Gene in Nasal Inverted Papillomas

Seng Ho Park, MD, Do Hyoung Lim, MD, Kang Won Lee, MD, Sang Heum Paik, MD, Young Ho Hong, MD, Hoon Shik Yang, MD, Chun Gil Kim, MD and Hoon Kim, MD

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

－ ABSTRACT －

Background and Objective：Inverted papilloma is benign lesion of paranasal sinuses, which occupies 0.5 - 4.0% of the neoplasm of nose. Pathologically, it is benign, but frequently invades surrounding tissue, resulting in recurrence. p53 gene is considered to be tumor suppressor gene. By some cause, if there is production of variant of p53, the change in cell cycle induced. In head and neck cancer, some repart variant form of p53 protein is related to progression of tumorogenesis. Human papillomavirus (HPV) is considered as a carcinogenesis of inverted papilloma. In the tumorogenesis of this virus, the mechanism of action is induction of impotence of p53 tumor suppressor gene of host. The purpose of this study is to understand the mechanism of pathogenesis and biologic characteristics of nasal inverted papilloma. **Materials and Method**：Immunohistochemical stain method of inverted papilloma, squamous cell ca in paranasal sinus, and hypertrophied nasal mucosa targeting of change of p53 protein. **Results**：The expression rates of p53 protein were respectively 80%, 17.2%, and 0% in squmous cell carcinomas, inverted papillomas, and inferior turbinate mucosas. The expression rate of p53 protein of inverted papillomas with dysplasia was higher (44.4%) than inverted papillomas without dysplasia (5%). **Conclusion**：By this result, the expression of p53 protein is considered to be related with malignant pontential, resulting in overmultiplication of inverted papillomas. These results showed that p53 play a role as a marker presenting malignancy of inverted papilloma. **(J Clinical Otolaryngol 2001;12:229-233)**

KEY WORDS：Inverted papilloma · p53 · Immunohistochemical technique · Human papillomavirus.

머 리 말

반전성 유두종은 모든 비종양의 0.5 4.0%를 차지하는 부비동의 양성병변으로 특징적으로상피층이 내부의 기질로 손가락 모양으로 자라며 비강측벽에 주로 발생하는데 악성변이는 약 10 50%로 다양하게 보고되고 있다. 흔히 40세 이상의 연령에서 보고되며 증상은 비폐색, 비출혈이 있으며 자발통이나 궤양형성, 전이등은 없고 진단은 생검으로 한다. 또한 병리학적으로는 양성이나 흔히 주변조직에 침투하여 재발이 잦다.[1)]

반전성 유두종의 병인으로 세균과 바이러스 감염, 만성 염증, 알레르기, 흡연, 그리고 직업적 폭로가 추론되

논문접수일 : 2001년 8월 10일
심사완료일 : 2001년 8월 20일
교신저자 : 박성호, 100 - 272 서울 중구 필동 2가 82 - 1
중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 2260 - 2175 · 전송 : (02) 2264 - 2174
E - mail : cauent@hananet.net

며 현재 바이러스 감염과 관련하여 많은 연구보고가 이루어지고 있다.

인간유두종 바이러스(HPV)는 반전성 유두종의 발암화와 관련있는 것으로 알려져 있으며[2] 종양형성에 있어서 작용기전은 숙주세포의 p53 종양억제 유전자를 무력화 시키는 것으로 생각되어 진다.[3]

p53 유전자는 종양 억제자로서 작용한다.[4] 정상형 p53 유전자는 세포주기중 G1 단계에서 세포성장을 억제하고 세포고사를 촉진함으로써 생체내에서 중요한 항증식기능을 갖고 있는 유전자이다.[5] 하지만 어떤 원인에 의해 p53의 변종이 생긴 경우 정상 세포의 성장과 조절기능에 변화가 유발되게 된다. 이런 p53 변종이 두경부 전암병소와 종양에서 높은 비율로 관찰되어 왔다. 따라서 변이성 p53 단백질은 두경부암에 있어 종양발생과 진행에 관련있는 것으로 보고되고 있다.[6]

이에 저자들은 반전성 유두종의 병인을 이해하기 위하여 다양한 악성표현을 나타내는 반전성 유두종, 부비동 종양, 비후된 하비갑개 비점막 조직에서 면역조직화학 염색을 이용하여 p53 단백질의 변화를 조사하여, p53의 전환발현율을 조사함으로써 반전성 유두종의 생물학적 특성을 이해하는데 도움을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실에서 조직검사로 반전성 유두종 및 부비동 편평세포암종으로 진단 받고 내시경하 부비동수술 혹은 보존적 요법으로 치료받은 34명의 환자의 파라핀 포매조직을 이용하였고, 대조군으로는 비알레르기 검사에서 음성반응을 보이고 비후성 비염으로 진단된 5명의 환자의 파라핀 포매된 하비갑개 비점막 조직을 이용하였다.

대상예의 평균연령은 52.4세(24 82세)이었고, 성별 분포는 남녀비는 6.8 : 1로 남자 34례, 여자 5례였다. 대상예의 Hematoxylin - Eosin 슬라이드를 재검토하여 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다.

종양표본을 다음과 같이 분류하였다. 양성, 이형성이 아닌 반전성 유두종(20예), 이형성을 동반한 반전성 유두종(9예), 단독 편평상피세포암(5예), 그리고 대조군으로 비후성 비염(5예)을 사용하였다. 각각의 종양표본은 p53 단백질 과표현과 모든 종양조직에서 정제된 DNA에서 결정된 p53 유전자의 exons 5 9의 변이를 대상으로 염색을 시행하였다.

연구방법

p53 단백에 대한 면역조직화학 염색

각 증례에서 파라핀 절편을 5 μm 두께로 박절하여 조직이 부착된 슬라이드를 60℃ 오븐에서 1시간 처리하고, 100% xylene으로 10분간 탈파라핀 후 100%, 90%, 80% 에탄올로 함수시켰다. 내재성 과산화효소를 제거하기 위하여 2.5% hydrogen peroxide에 30분간 처리하고 조직의 항원발현을 증가시키기 위해 10 mM citric acid에 담궈서 microwave oven으로 5분간 가열하고 실온에서 30분간 식힌 후, 다시 microwave oven으로 5분간 가열한 후 0.05 M Tris buffered saline pH 7.6)으로 10분간 2회 세척하였다. 비특이적 항원 – 항체반응을 억제하기 위하여 정상 염소혈청으로 1시간 반응시켰다. Novocastra사의 p53 monoclonal anti - ody(Clone DO - 7, monoclonal mouse anti - human, 1 : 50)을 p53에 대한 일차항체로 사용하여 실온에서 1시간 반응시킨 다음 TBS 완충용액으로 3회 세척하고 biotin을 붙인 항가토 IgG(Zymed Co)를 2차항체로 30분간 반응시킨 후 TBS로 수세하였다. Strepotavidin peroxidase복합체(Zymed Co)를 10분간 처리한 다음 PAB 용액과 반응시켜 갈색반응이 나타났을 때 증류수로 세척하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학염색의 판독

염색된 모든 조직표본은 저배율(100배 시야)로 염색이 잘 된 부분을 선택하여 고배율(400배 시야)에서 관찰하며 핵에 분명한 적갈색으로 염색이 되는 세포가 전체 종양세포의 5% 이상이면 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석

반전성 유두종, 부비동 편평상피 세포 그리고 비후된

Table 1. Expression rate of p53 protein

	IP* (N=29)	SCC† (N=5)	IT‡ (N=5)
Rate of p53 protein (%)	17.2	80	0

*: inverted papilloma, †: squamous cell carcinma, ‡: inferior turbinate (p<0.05)

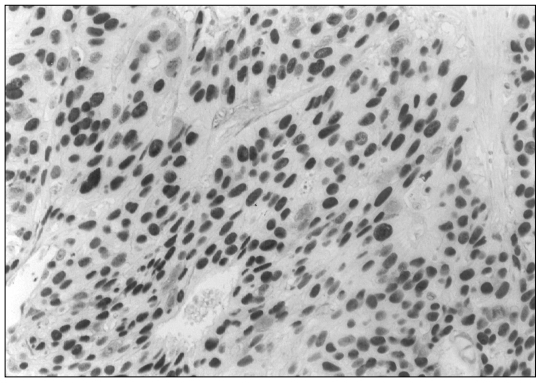

Fig. 1. The nuclei of squamous cell carcinoma of paranasal sinus shows strong positive for p53 in immunohistochemical stain (H & E, ×400).

하비갑개 비점막 조직에서 p53 발현 유무를 조사하였고 각 군간 발현율 양상에 대한 통계학적 분석은 SPSS Version 8.0 통계 소프트웨어를 이용하였다.

결 과

p53 발현율

p53의 발현은 부비강 단독 편평상피세포암에서 5례 중 4례에서 양성반응을 나타내어 발현율이 80% 로 가장 높았고, 반전성 유두종은 29례 중 5례로 17.2%, 하비갑개 점막에서는 0% 순이었으며 각 군간의 통계학적 유의한 차이가 있었다(Table 1).

p53에 대한 면역화학적 염색 양상은 편평상피세포암에서 전반적으로 강하게 염색이 되었으며 주변 정상조직에는 염색이 되지 않았다(Fig. 1). 반전성 유두종에서는 이형성 유무에 따라 각각 약하게 염색되거나 염색되지 않았고(Figs. 2 and 3), 하비갑개 점막에서는 염색이 되지 않았다(Fig. 4).

반전성 유두종에서 세포이형성에 따른 p53 발현율

세포이형성을 동반한 반전성 유두종의 p53의 발현율

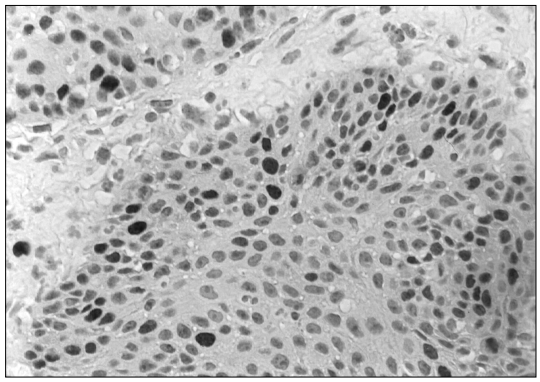

Fig. 2. The nuclei of inverted papilloma with atypia of paranasal sinus shows focal weak positive for p53 in immunohistochemical stain (H & E, ×400).

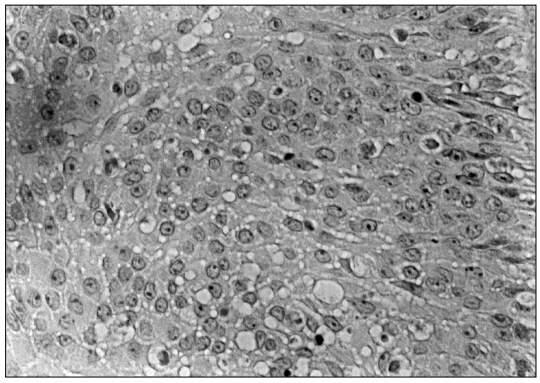

Fig. 3. The nuclei of inverted papilloma without atypia of paranasal sinus shows negative reaction to p53 in immunohistochemical stain (H & E, ×400).

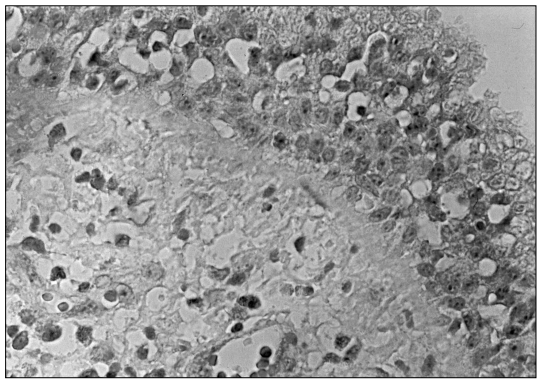

Fig. 4. The nuclei of hypertrophied turbinate of nasal cavity shows negative reaction to p53 in immunohistochemical stain (H & E, ×400).

Table 2. Expression rate of p53 protein in nasal inverted papilloma according to dysplasia

	IP* (N=29)	
	With dysplasia (N=9)	Without dysplasia (N=20)
Rate of p53 protein (%)	44.4	5

*: inverted papilloma (p<0.05)

은 9례 중 4례로 44.4%, 세포이형성을 동반하지 않은 반전성 유두종의 표현율은 20례 중 1례에서 양성반응을 보여 5%로 통계학적으로 유의한 차이가 있었다 (Table 2).

고 찰

반전성 유두종과 연관된 편평상피세포암의 70% 이상은 반전성 유두종이 절제되었던 동일 지역에서 발생하는 종양이다.[7] Caruana 등[8]에 의하면 반전성 유두종과 동반되었던 부비동 편평세포암종의 교차된 해부학적 유사성은 부비동 편평상피세포암의 발생에 있어 반전성 유두종이 근원병변으로 작용할 수 있다는 가설을 낸 바 있다.

암억제유전자로 잘 알려진 정상형 p53 유전자는 17번 염색체에 존재하며 세포주기중 G1 단계에서 세포성장을 억제하고 세포고사를 촉진함으로써 생체내에서 비정상적인 세포증식에 대해 중요한 항증식기능을 갖고 있는 유전자이다.[4] p53은 또한 정상적인 세포증식을 조절하는 기능을 가진다. 그러나 돌연변이나 바이러스 종양원과 결합하여 정상형 p53 유전자의 기능이 소실되면 변이형 p53 단백이 형성되고, 이는 세포고사를 억제하고 종양세포의 증식을 유발한다.[5] Fang 등[9]에 의하면 변이형 p53 단백질은 두경부암에 있어 종양발생과 진행과 관련있는 것으로 보고하였다. 또한 Setzen 등[10]에 의하면 변이형 p53 단백질의 축적은 p53 유전자의 변종이 없는 상태에서 일어나며 상피의 증식능력과 관련되어 있는 것으로 보고하였다.

최근의 연구는 p53 종양억제 유전자가 암종발생에 있어 가지는 중요성에 촛점을 두고 있다. 모든 인간 종양의 약 50%에서 p53 단백질표현이 증가하며 이와 관련된 이주성 p53 유전자를 동반한 p53유전자 변종을 나타낸다.[11] 이러한 p53 변종은 두경부 영역의 전암병소와 종양에서도 높은 비율로 관찰된다.[5]

정상형 p53 단백질은 모든 정상세포에서 낮은 농도로 발견되며 비교적 짧은 반감기를 가지며, 따라서 면역세포화학적인 방법으로는 일반적으로 검출할 수 없는 것으로 되어있다.[10] p53 유전자의 변이는 종종 유전자 산물의 과표현으로 나타나며, 이것은 면역조직화학적 방법으로 검출할 수 있다. Mirza 등[12]은 p53단백의 활성은 또한 인간 유두종 바이러스 E6 유전자 산물, SV40 거대 T 항원 단백과 같은 바이러스에서 유래한 세포단백질과 결합에 의하여 억제될 수 있다고 보고하였다.

이와 관련하여 인유두종 바이러스 type 16, 18의 E7 유전자는 암유전자인 c-myc 유전자 발현을 촉진하고, 암억제유전자 pRB 유전자를 억제함으로써 세포고사를 촉진하며, E6 유전자는 p53과 결합하여 분해시킴으로써 세포고사를 억제하는 것으로 보고되고 있다.[13] 인간 유두종 바이러스 type 16, 18 감염시 E6, E7 유전자 중 어떤 유전자가 세포고사에 우세하게 영향을 미치는지는 규명되지 않았지만, 종양세포의 억제는 p53 유전자가 E7 기능에 비하여 더 우세하게 작용하는 것으로 알려져 있다.[13]

변이성 p53 단백질은 증가된 반감기와 형태적 변화에 대한 보다 큰 안정성을 가지고 있다. 따라서 p53 변종은 p53 중계성 세포고사를 방해함으로써 방사선조사와 다른 항암치료에 저항하게 된다. 그러므로, p53 유전자의 과발현은 암종의 공격성이 증가하고 방사선감수성이 감소하여 예후가 나쁘다는 보고가 있다.[14] 그럼에도 불구하고, 반전성 유두종에서 발생하는 편평상피세포암의 보다 약한 p53의 면역반응의 생물학적 특징은 편평상피세포암 단독으로 발생한 경우와 비교할 때 보다 나은 예후를 나타내는 것으로 보고하였다.[15]

반전성 유두종과 그것에서 기원하는 암종과 타 상피세포암종에 있어 p53 단백질의 양성율과 관련하여 Caruana 등[8]의 보고에 의하면 양성, 이형성을 동반하지 않은 반전성 유두종의 경우 7례 중 0%이었고, 이형성을 동반한 경우 57%이었으며, 편평상피세포암을 동반한 경우 75%의 발현율을 나타낸다고 보고하였다. Mirza 등[12]의 보고에 의하면 30례의 반전성 유두종의 경우 30%의 발현율을 나타낸다고 하였다. Fang 등[9]의 보고

에 의하면 단독 편평상피세포암은 53%, 반전성 유두종에서 기원하는 편평상피세포암의 경우 50%, 반전성 유두종 단독의 경우 0%의 발현율을 각각 나타낸다고 보고하였다. 또한 Setzen 등[10]의 연구에 의하면, 17례의 반전성 유두종에서 41%, 단순 비용종에서도 20례 중 10%의 양성율을 보고 하였다. 하지만 현재 한국에서의 반전성 유두종과 그 관련 군에 있어서 p53의 표현율의 보고는 미미한 바, 지역 특성 암종의 생물학적 특성을 이해하는 데 있어 p53의 표현율의 비교는 의미가 있을 것이다.

본 연구결과에서는 p53의 발현율은 편평상피세포암종에서 현저하게 높았으며 이형성을 동반한 반전성 유두종, 이형성을 동반하지 않은 반전성 유두종, 하비갑개 비점막 순이었다. 이러한 결과로 p53의 발현율이 종양의 악성도와 연관성이 있을 것으로 생각되고, 결국 과다한 세포증식능이 반전성 유두종의 악성화와 연관성이 있을 것으로 사료된다.

이러한 사실은 세포증식과 세포고사에 있어서 p53이 종양의 악성도를 반영할 수 있는 생물학적 표지자로 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다.

맺 음 말

이상의 결과로 본 저자들은 p53 유전자의 발현이 반전성 유두종의 악성화에 중요한 역할을 할 것으로 생각하며 p53 발현율이 비강종양에서 예후인자로서 이용되기는 힘들겠지만 악성도를 반영할 수 있는 생물학적 표지자로서 지표가 될 수 있을 것으로 생각한다.

중심 단어 : 반전성 유두종 · p53.

이 논문은 2001년도 중앙대학교 학술 연구비 지원에 의한 것임.

REFERENCES

1) Lawson W, Ho BT, Shaari CM, Biller HF. *Inverted papilloma: A report of 112 cases. Larygnoscope 1995;105:282-8.*
2) Furata Y, Shinohara T, Sano K, Nagashima K, Inoue K, Tanaka K, *et al. Molecular pathologic study of human papilloma virus infection in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of the nasal cavities and paranasal sinuses. Laryngoscope 1991;101:79-85.*
3) Lasser A, Rothfeld PR, Shapiro RS. *Epithelial papilloma and squamous cell carcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses: A clinicopathological study. Cancer 1976;38:2503-10.*
4) Basu A, Haldar S. *The relationship between Bcl2, Bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death. Mol Hum Reprod 1998;4:1099-109.*
5) Guichard C, Gilain L, Abd-Al Samad I, Piron G, Brugel L, Escudier E, *et al. Epithelial cell proliferation, apoptosis, and apoptosis inhibition in inverted papillomas. Laryngoscope 1998;108:716-20.*
6) Lampertico P, Russel WO, MacComb WS. *Squamous papilloma of the upper respiratory epitheliumm. Arch Pathol Lab Med 1963;7:293-302.*
7) Skolnick EM, Loewry A, Friedman JE. *Inverted papilloma of the nasal cavity. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1966;84:64-7.*
8) Lazarus P, Caruana S. *Screening and typing of human papilloma virus using differential size PCR amplification. Anal Biochem 1996;243:198-201.*
9) Tsai ST, Fang SY, Jin YT, Su IJ, Yang BC. *Analysis of the expression of Fas-L n nasopharyngeal carcinoma tissues. Oral Oncol 1999;35:421-4.*
10) Ingle RR, Setzen G, Koltai PJ, Monte D, Pastore J, Jennings TA. *p53 protein expression in benign lesions of the upper respiratory tract, Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:297-300.*
11) Tsuzuki H, Saito H, Imamura Y, Noriki S, Fukuda M. *Early progression stage of malignancy as revealed by immunohistochemical demonstration of DNA instability. Eur J Histochem 1994;38:291-302.*
12) Mirza N, Kathleen M, Yuichi S, Hans K, David WK. *Identification of p53 and Human Papilloma Virus in Schneiderian Papillomas. J Immunol 1998;150:3902-8.*
13) Scheffner M, Werness BA, Hulbregtse JM, Levine AJ, Howley PM. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 1990;63:1129-36.*
14) Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, *et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 1994;9:3743-51.*
15) Lavertu ED, Cowdell RH, Rang EH. *Nasal cancer in England and Wales: An occupational survey. Br J Ind Med 1981;38:218-24.*