

구강내 백색병소와 편평상피세포암종에서 bcl-2와 NOS₂ 비교발현에 관한 연구

원광대학교 치과대학 구강내과학교실*, 구강병리학교실**

신 민* · 김 은 철**

목 차

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 방법
- III. 연구결과
- IV. 총괄 및 고찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록
- 사진부도

I. 서 론

구강암의 발생은 음주, 흡연, 바이러스 등의 다양한 요인이 관여하여 암 유전자의 활성화나 암 억제 유전자의 불활성화를 포함하는 특이한 유전자 이상에 의한 것으로 생각되고 있다. 최근에는 암종의 발생이 유전자의 다단계의 과정에 의한 것으로 받아들여지고 있으며¹⁾ 이와 연관된 암 유전자, 암 억제 유전자의 이상, 세포 주기 조절 분자에 대해 관심이 부각되고 있다. 종양의 성장 속도는 종양세포의 증식능과 사멸에 의해서 좌우되는데^{2,3)}, 이 중 세포사멸은 두 가지로 구분할 수 있어 첫째는 세포들이 허혈과 같은 강력한 외부자극 때문에 사망하는 괴사이고, 다른

하나 apoptosis로 세포내 기전에 의해서 사멸하는 것이다. 괴사와는 달리 apoptosis는 연속적인 생화학적, 형태학적 특징을 갖는 계획되어진 세포사멸이다⁴⁾. Apoptosis의 조절은 태생기 발달동안의 형태발생(morphogenesis)과 성인에서 조직의 항상성 유지에 중심적 역할을 하나 일부 장기의 종양성 전환(neoplastic transformation)에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 근래 분자학적인 기전의 발달로 인하여 apoptosis가 일어난 세포를 효소반응을 이용하여 관찰할 수 있게 되었다⁵⁾. Apoptosis를 조절하는 가장 잘 알려진 유전자는 bcl-2와 p53이다^{6,7)}. Bcl-2는 생리적으로나 종양 발생에 있어서 apoptosis의 억제를 통하여 세포의 죽음을 조절하는 원종양유전자(protooncogene)로 알려져 있으며, 미토콘드리아의 내막과 핵막, 소포체 등에 위치하는 분자량 26kDa의 단백질이다. Bcl-2의 종양유전자로서의 역할은 여포성 B 림프종에서 잘 연구되어 왔는데 14번과 18번 염색체의 상호 전좌로 인하여 bcl-2유전자가 면역글로불린 중쇄유전자와 융합유전자를 형성하고 이로 인해 bcl-2 단백질이 과도하게 만들어지고 B 림프구의 apoptosis를 억제하여 종양을 발생시키는 것으로 알려져 있다^{8,9)}. 그러나 최근에는 다른 기전에 의해서도 bcl-2 단백질의 과발현이 일어날 수 있다

*이 논문은 1998년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨

고 하였으나(14:18) 그 정확한 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

Bcl-2 단백질의 과발현은 여포성 림프종이외에도 다른 여러 종류의 림프종과 백혈병, 호즈킨 림프종 등^{10,11)}에서 보고되고 있을 뿐 아니라 비 림프계조직인 상피암에서도 제한적이지만 보고되고 있다. 상피기원의 암종에서 bcl-2에 대한 연구는 유방암¹²⁾, 폐암¹³⁾, 전립선암¹⁴⁾등에서 이루어져 있으며 구강암에서의 연구는 아직까지는 많지 않다.

한편, 반응 질소 중간 대사물중의 하나인 Nitric Oxide(NO)는 작고 불안정하며 전하가 없는 free radical로서 신체 여러종류의 세포에서 분비되어 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환계에서는 혈관이완물질로¹⁶⁾, 중추신경계에서는 신경전달물질로¹⁶⁾, 면역계에서는 방어물질¹⁷⁾로서 다양한 생리적인 과정을 중재하는 신호전달 물질로 알려져 있다.

nitric oxide synthetase(NOS)는 L-arginine으로부터 NO의 합성에 관여하는 효소로서 크게 두 종류로 대별되는데¹⁸⁾, 한 종류는 칼슘과 calmodulin에 의존적이며 혈관 내피세포 혹은 신경세포 등에 발현되는 것으로 NOS₁과 NOS₃이 이에 해당된다. 또 다른 한 종류는 칼슘이나 calmodulin 등에 비의존적이며, 염증반응에 발현이 유도될 수 있는 효소로서 NOS₂가 여기에 속한다.¹⁹⁾ 종양에서 NO의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않지만, NO₂는 DNA 나선 손상^{20,21)}을 시키거나, peroxy-nitrite는 oxidative 손상²²⁾과 DNA 변이²³⁾를 일으킨다고 보고되었다. NO는 또한 N-nitrosamines^{24,25)}을 만듦으로써 DNA 변이를 유발하고, DNA repair와 cytochrome p-450 효소군을 억제한다고 하였다.^{19,26)}

최근 인체암에서 3가지 NOS isoform의 발현과 활성이 연구되었는데, NOS 발현이나 활성 증가가 인체 자궁암²⁷⁾, 유방암²⁸⁾, 중추신경종양²⁹⁾에서 관찰되었는데, 자궁암 및 유방암에서 NOS 발현증가는 종양의 분화도와 관계가 있다고 보고되었으며, NOS 발현이 종양의 발생이나 진행에 기여하고, NO는 내피성장 요소로 종양 혈관화^{30,31)}와 종양 혈류³²⁾를 매개한다고 한다. 높은 NO 농도는 감수성이 있는 세포³³⁾에서는 apop-

tosis를 유도하지만 낮은 농도의 NO는 apoptosis로부터 내피세포³⁴⁾를 포함한 많은 세포를 보호하는데, cytokines같은 인자와 저산소증은 상승적으로 작용하기 때문에 NOS₂ 발현을 증가시킨다고 하였다³⁵⁾.

상기의 연구들은 암세포주를 대상으로 한 실험 결과이므로 in vitro에서 변형된 상태를 관찰한 것으로서 본 연구의 대상인 백색 병소와 같은 전암병소와 구강암종에서의 bcl-2와 NOS₂ 발현 비교는 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 구강암 발생 단계에서 대표적인 전암병소인 백반증이나 편평태선과, 구강암 단계에서 apoptosis를 조절하는 분자들에 어떠한 변화를 일으킴으로써 구강내 정상 각화세포를 편평상피 암세포로 분화하게끔 하는지 면역조직화학적 연구 및 Western Blot분석에 의한 단백질 수준에서의 bcl-2 및 NOS₂의 발현을 백색병소 및 암종의 진행 정도와 관련해 비교연구 하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1) 연구대상

1996년 3월부터 1998년 8월까지 원광대학교 치과대학 병원에 구강백색병소 및 구강암중 편평상피세포암으로 진단된 환자중 필요한 정보를 포함한 임상기록이 구비되어있고 백색병소 및 편평상피세포암의 조직양이 충분하여 적절한 검색이 가능한 전암병소중 백반증 10례, 편평태선 9례, 상피이형성 및 상피내암 6례, 구강암중 편평상피세포암 21례를 포함하여 총 46례를 대상으로 하고, 정상구강편평상피 8례를 대조군으로 하였다. 편평상피암종은 Broders 분류를 기준으로 반정량적인 방법에 따라 well-differentiated(WD), moderated differentiated(MD), Poor differentiated(PD)의 3등급으로 분류하였다.

2) 연구방법

가. 조직표본 제작 및 조직학적 검색

조직절편의 제작을 위하여 고정 및 통법에 의

한 수세, 탈수 및 청명과정을 거친 후 파라핀 포매를 하고 Hematoxylin & Eosin 이중염색을 시행한 후 광학현미경으로 100-400배의 배율로 각각 관찰해 본 연구에 적합한 조직을 재검정하였다.

나. 면역조직화학적 염색

면역염색은 LSAB(labelled streptavidin biotin, Dako Co, USA) kit를 이용하였는데 일차항체는 NOS₂(SantaCruz, USA), Bcl-2(Zymed, CO, USA)를 사용하였고 발색은 aminoethyl carbazole(Zymed Co, USA)로 하였다. 염색은 ProbeOn plus 슬라이드(Fisher CO, USA)를 맞대어서 생기는 모세관현상 원리를 이용한 Microprobe system(Fisher Co, USA)으로 실시하였다. 파라핀 절편을 탈파라핀화 및 수화시킨 후 일차항체인 적정비율로 희석해 30분간, 이차항체(anti-mouse IgG, Vector Lab.)를 20분간 반응시켰다. streptavidin alkaline phosphatase로 20분간 처리한 후 AEC로 발색시킨 후 Harrison hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerin으로 도포 후 검경하였다. 음성대조군은 일차 항체 대신 생리식염수를 사용한 후 동일한 방법으로 염색하였다.

다. 면역 조직화학적 염색 결과의 판정

분포 양상을 알아보기 위해 각 부위를 저배율로 관찰하여 염색 양상이 미만성인가 혹은 특정 부위에 국한된 것인가를 판별하고 고배율로 세포의 어느 부위가 양성으로 나타나는 지를 관찰하였다.

반정량적 분석을 위하여 저배율에서 염색의 강도가 비교적 강한 부위를 선택하여 상대적인 발현정도에 따라 세포들의 0%, 5%미만, 5-30%, 30-60%, 60%이상 염색되었을 때 염색 정도를 -(음성)에서 ±(경미), +(약양성), ++(중등도), +++(강양성)까지 5단계로 구분하였다.

라. Western blot analysis

각각의 실험군 및 대조군에서 TRI reagent((Montgomery, USA)로 단백질을 추출한 후

Lowey 방법으로 단백질을 정량분석한 후 각 50 µg을 취하여 SDS-page와 Western blotting에 사용하였다.

protein standard marker(Promega, USA)와 단백질에 동량의 loading buffer를 첨가하고, 95°C에서 denaturation시켜서 8% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동한 후 coomassie brilliant blue 염색을 시행하였다. 전기영동한 gel을 nitro-cellulose membrane(Millipore, USA)에 transfer시켜서, 3% skim milk에 한 시간 동안 blocking 한후 일차항체를 1:1000으로 희석한 후 90분간 반응시켰다. 그후 이차항체(alkaline-phosphatase conjugated anti-rabbit Ig G, Sigma Co)를 1시간 반응시켜 ECL (Amersham, USA) chemiluminescence detection kit를 이용하여 detection하였다.

III. 연구 결과

1) 구강 백색병소와 편평세포암종에서 bcl-2와 면역조직화학적 발현 분포

구강내 백색병소에서 상피층에 따른 Bcl-2의 발현 양상을 관찰해보면 정상 점막인 경우에는 기저층에서 경미한 정도의 발현을 보이고 상피표층으로 갈수록 발현정도가 약해짐을 보였다(그림 1A). 편평태선의 경우는 정상점막에서와 유사하게 미약한 발현양상을 보였으나(그림 2A), 백반증의 경우에는 편평태선에서보다 상피전층에 걸쳐서 유극층을 제외하고 광범위하게 나타났고(그림 3A) 염증세포나 결체조직내 섬유아세포에서는 음성이었다.

CIS의 경우에는 정상점막에 비해 발현이 크게 증가하여 전 상피층에서 양성반응을 보였고 상피표층쪽으로 갈수록 강한 발현을 보여 특히 유극층과 표층에서 중등도의 발현을 보였다(그림 4A). 편평세포암의 경우에는 조직학적 분화도에 관계없이 발현정도가 모든 부위에서 미약하였다(도표 1).

편평세포암에서는 암상피도(cancer island) 중심과 암 변연부(margin)의 경우에는 조직학적 분화도에 관계없이 발현정도가 모두 미약하였으

Table 1. Expression Pattern of Bcl-2 in Oral White Lesions and Cancers

	basal layer	parabasal layer	spinous layer	superficial layer	inflammatory cells	cancer island periphery	cancer island central	cancer margin
Normal mucosa	±	-	-	-	±			
Lichen planus	±	-	-	-	±			
Leukoplakia	+	+	±	+	±			
CIS	+	+	++	++	±			+++
SCC								
Well					±	++	±	±
Moderated					±	±	±	±
Poor					±	±	±	±

+++; more than 50% positive cells, ++; 25-50% positive cells, +; 10-24% positive cells
 ±; 5-9% positive cells, - ; less than 5% positive cells

우에만 중등도의 발현을 보였고 나머지 미분화나(도표 1), 상피도 주변의 경우 분화가 좋은 경 및 중등도는 발현이 거의 없어 분화도가 좋은 경우에만 발현을 보이는 특징을 보였다(그림5A, 5C).

2) 구강 백색병소와 편평세포암종에서 NOS₂의 면역조직화학적 발현 분포

상피층에 따른 NOS₂의 발현은 정상점막(그림 1B)에서는 기저층에서만 경미한 발현을 보이고 극세표층 및 표피층 그리고 결체조직내에서 거의 음성의 발현을 보였으며 편평태선(그림2B)도 정상점막과 유사한 결과를 보였다. 그러나 백반증의 경우(그림3B) 기저와 상기저층에서 약양성의 발현을 보여 정상점막 및 편평태선에 비해 발현증가가 있었고, 상피전층에 걸쳐 발현이 모두 나타났다.

CIS에서는 기저층과 상기저층은 약양성, 유극층과 표층은 중등도로 발현되어 표피층으로 갈수록 강한 발현정도를 나타내었으며(그림 4B) 특히 CIS의 정상경계부에서 이러한 발현은 심도에 달하였다(그림4 D).

편평세포암에서는 분화도와 관계없이 염증세포에서는 중등도의 발현을 보였으나 암상피도

(cancer island) 변연부에서는 분화도가 좋은 암 좋은 경도, 중등도 분화는 중등도 발현, 미분화암 좋은 심도의 발현을 보여 분화도가 나쁠수록 NOS₂ 발현이 증가되었으며 암세포도 중심부와 변연부는 큰 차이가 없었다(그림5B, 5D).

3) 구강백색병소와 편평세포암에서 bcl-2와 NOS₂간의 면역조직화학적 발현빈도

전체 실험대상증례중 Bcl-2와 NOS₂에 10%이상의 양성 발현반응을 보인 증례 수를 관찰해보면 모든 병소에서 NOS₂가 Bcl-2보다 많은 수에서 양성반응을 나타내었다(도표 3).정상점막에서 Bcl-2는 12.5%가 출현한 반면, 백반증(30%)보다는 편평태선(44%)에서 약간 높게 나타났고, CIS에서 67%로 가장 높게 나타났으며, 편평상피암의 경우에는 분화도가 낮을수록 높은 Bcl-2발현정도를 보였다.

한편, NOS₂의 경우에는 정상 점막은 25%로 극히 적었으나 편평태선 및 백반증은 각각 78%, 70%로 유사한 정도를 나타냈으나 CIS 및 상피이형성에서는 100%로 모든 예에서 발현을 보였다. 암종의 경우 분화도에 따른 NOS₂발현은 대체적으로 분화도가 좋은 경우보다(71%) 분화도가 중등도 또는 미분화인경우가 100%, 83%로

Table 2. Expression Pattern of NOS₂ in Oral white lesion & cancer

	basal layer	parabasal layer	spinous layer	superficial layer	inflammatory cells	cancer island periphery	cancer island central	cancer margin
Normal mucosa	±	-		-	+			
Lichen planus	±	-	-	-	+			
Leukoplakia	±	-	-	-	+			
CIS	±	-	-	++	++			++
SCC								
Well					++	+	±	±
Moderated					++	++	+	+
Poor					++	+++	+	+

+++; more than 50% positive cells, ++; 25-50% positive cells, +; 10-24% positive cells
 ±; 5-9% positive cells, -; less than 5% positive cells

Table 3. Number fo Positive Immunohistochemical Expression of Bcl-2 and NOS₂ in White Lesions and Carcinomas

	Bcl-2(%)	NOS-2(%)
Normal Mucosa	1/8(12.5%)	2/8(25%)
Lichen Planus	4/9(44%)	7/9(78%)
Leukoplakia	3/10(30%)	7/10(70%)
Dysplasia or CIS	4/6(67%)	6/6(100%)
SCC		
Well	3/7(43%)	5/7(71%)
Moderated	4/8(50%)	8/8(100%)
Poor	4/6(67%)	5/6(83%)

더 높았다.

4) 구강백색 병소와 편평세포암에서 bcl-2와 NOS₂발현정도와 조직학적 진단간의 상호 관계

Table 4와 Table 5는 면역반응세포들의 백분율을 기반으로 여러구강내 병소에서 bcl-2와 NOS₂의 발현을 종합한 것으로 bcl-2유전자 발현은 정상점막에서는 대부분 음성을 보인 반면 8

례중 1례(12.5%)에서만 경미한 발현을 보인 반면 편평태선과 백반증의 양성례는 대부분 경도 또는 약양성의 발현을 보였다. 상피이형성 또는 상피내암의 경우 총 6례중 4례가 발현을 보였는데 이중 50%는 약양성의 발현을 보인 반면 편평세포암종에서도 대부분 경도 또는 경미의 발현을 보였다.

NOS₂의 발현은 정상점막에서는 대부분 음성을 보인 반면 8례중 2례(25%)에서만 경미한 발현을 보인 반면 편평태선과 백반증의 양성례는 대부분 중등도 또는 경도 발현을 보여 bcl-2보다는 증가된 발현분포를 보였다. 상피이형성 또는 상피내암의 경우 총 6례중 100%에서 발현을 보였는데 대부분 중등도와 경도의 발현을 보여 정상점막에 비해 크게 증가되었다.

편평세포암종에서도 대부분 중등도 또는 경도의 발현을 보여 NOS₂의 발현이 bcl-2의 발현보다 민감함을 알 수 있었다.

5) Western Blot Analysis에 의한 bcl-2와 NOS₂의 발현

백색병소 및 암종에서 각각의 단백질 분리 후 Western blot에 따른 bcl-2단백발현은 정상점막 조직에서도 25/26 kDa의 미약한 band가 관찰되

Table 4. Correlation between histologic diagnosis and degree of bcl-2 expression in oral white lesion and carcinoma

	+++	++	+	±	-
Normal mucosa (8)		0	0	1	7
lichen plnus (9)		1	2	1	5
leukoplakia (10)			2	1	7
Dysplasia or CIS (6)	0	1	2	1	2
SCC					
Well (7)		1	1	1	4
Moderated (8)		1	2	2	3
Poor (6)		1	1	2	2

+++; more than 50% positive cells,
 ++; 25-50% positive cells, +; 10-24% positive cells
 +-; 5-9% positive cells,
 -; less than 5% positive cells

1 2 3 4 5

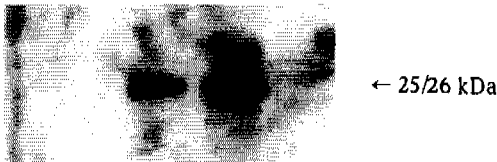


Fig 6. Photographs shows Western Blot Analysis of Bcl-2

있고, 편평태선과 백반증에서 크게 증가되어으나 암종에서는 이들 백반병소보다 감소된 발현을 보였다(그림6).

Western blot상 NOS₂발현도 정상점막에서도 극히 미량의 117kDa 의 밴드가 관찰되었으나 편평태선 및 백반증에서 발현이 증가되었고 분화도가 좋은 암종이 중등도 분화암종보다 발현이 많이 나타났다(그림7)

IV. 총괄 및 고찰

많은 인체암들은 세포증식과 세포사 간에 항상성이 깨짐으로 인해 전체 세포수가 증가하게

Table 5. Correlation between histologic diagnosis and degree of NOS₂ expression in oral white lesion and carcinoma

	+++	++	+	±	-
Normal mucosa (8)		0	0	2	6
lichen planus (9)		2	3	2	2
leukoplakia (10)		2	4	1	3
Dysplasia or CIS (6)	0	2	3	1	
SCC					
Well (7)		1	2	2	2
Moderated (8)		2	2	4	0
Poor (6)		2	2	1	1

+++; more than 50% positive cells,
 ++; 25-50% positive cells, +; 10-24% positive cells
 +-; 5-9% positive cells,
 -; less than 5% positive cells

1 2 3 4 5 6



Fig 7. Photographs shows Western Blot Analysis of NOS₂

되는데^{36,37}, 세포증식의 증가는 구강에서 발생한 편평상피세포암의 소견으로³⁸⁻⁴⁰, 세포증식의 비조절이 구강의 발암과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있고 현재의 암발생에 관한 연구는 세포의 성장과 증식을 증가시키는 기전에 관해 주로 이루어져 세포의 성장과 증식을 억제하여 조절하는 p53과 같은 종양억제 유전자에 대한 연구와 종양발생과정에서 apoptosis역할에 관해 많은 관심의 대상이 되고 있다.

편평세포암을 비롯한 암종의 발암과정에는 많은 종류의 발암유전자가 관여하는데 이러한 유전자들중에서 bcl-2는 여포성 림프종에서 발견된 원종양유전자로서 그 산물인 bcl-2단백은 세

포의 죽음중 한 형태인 apoptosis를 억제하여 그 세포가 오래 살 수 있도록 한다. bcl-2단백의 발현이 증가된다는 것은 계획된 세포사로부터 B세포를 보호한다는 의미로 정상조직의 경우 구강점막, 피부 그리고 장 상피(intestinal epithelium) 등과 같은 많은 비조혈조직의 기저세포에서만 발현되며^{44,45)} 암종에서는 폐암, 갑상선암, 비인두암 및 유방암 등에서 bcl-2의 과발현은 여러 연구에서 증명되었다⁴⁶⁻⁴⁹⁾. 폐암에서 bcl-2단백은 5년생존률과 좋은 임상적 결과와 관계되어 있고⁵⁰⁾, 비호지킨 림프종⁵¹⁾, 전립선암⁵²⁾, 그리고 급성 골수성 백혈병⁵³⁾환자에서 bcl-2단백의 과발현은 치료가 잘 되지 않는 반응과 관련된다고 보고하였다.

본 연구는 편평태선의 경우 전암병소로 보거나 전암병소로 생각하기에는 적절치 않다고 하는 보고도 있어 bcl-2 측면에서의 전암병소 인지를 간접적으로 구강암과의 비교연구로 가능하리라 생각되고 백반증은 구강내에서 발생하는 5% 정도가 평균 5년 이내에 편평상피암으로 이행되고 3-36%에서 편평세포암종으로의 악성전환율이 보고되고 있어 정상구강 상피, 전암병소 상피, CIS등에서 본 연구에서 하고자 한 bcl-2 및 NOS₂ 분석을 통해 전암병소에서의 악성전환 위험성을 평가해 환자에서의 치료지침을 마련할 수 있으리라 생각되어 임상에서 쉽게 접근할 수 있는 면역조직학적 방법과 Western blot analysis를 통해 비교연구 하고자 하였다.

Bcl-2 유전자는 apoptosis의 억제인자로 알려져 있는데, 기저세포암종에서의 bcl-2 유전자의 발현은 대체로 종괴 내부에서 고르게 나타나는 것으로 일치되게 보고되고 있으나, 편평세포암종에서의 발현율은 연구자마다 상반된 결과를 보여준다^{56,57)}. 또한 Jordan 등⁵⁴⁾은 정상상피에서 bcl-2는 기저층 각화세포(keratinocyte)와 dendritic cell에서만 발현된다고 하였으나 본 연구의 정상점막에서는 기저층에서만 경미한 발현을 보여 차이를 보였다.

본 연구에서는 편평태선, 백반증, 상피이형성 및 편평세포암종을 분화도에 따라 분류하여 bcl-2 종양단백 발현양상을 관찰하여 그들의 상

관관계를 알아 보았는데 정상점막에서 Bcl-2는 12.5%가 출현한 반면, 백반증(30%)보다는 편평태선(44%)에서 약간 높게 나타났는데 또한 백반증에서 각각의 단백질 분리 후 Western blot에 따른 bcl-2단백발현은 정상점막조직에서도 25/26 kDa의 미약한 band가 관찰되었고, 편평태선과 백반증에서 크게 증가되어 면역조직화학적 발현과 유사한 소견을 보였고 이러한 전암병소로 여겨져오고있는 편평태선이나 백반증에서의 bcl-2발현정도가 높게 나타난 점은 편평태선에서 상피에 대한 활성화기전을 세포주기 관련 단백질의 활성또는 발현변화의 차원으로 여겨지며 bcl-2가 종양으로의 진행과정에서 일정한 역할을 할 것으로 예상되었다.

본 연구에서 CIS 및 상피이형성에서 bcl-2발현정도가 67%로 가장 높게 나타났으며, Singh 등⁵⁵⁾은 bcl-2발현은 상피의 이형성 정도에 비례한다고 보고하였으나 본 연구는 상피이형성 단계로 구분하지 않았기 때문에 비교할 수는 없지만 이 원종양유전자가 구강종양진행의 초기단계에서 중요한 역할을 할 것으로 제안하였다. Jordan 등⁵⁴⁾도 암종주위의 이형성된 상피층에서 bcl-2단백이 높게, bax는 낮게 발현되었다고 보고하면서 이는 bcl-2와 bax가 편평상피세포암발생에 일정한 역할을 할것으로 예상되며 특히, 이러한 단백질발현의 변화가 상피종양발생과정의 초기에 중요한 역할을 할것이라고 하였다. 또한 세포사의 억제가 상피내암종의 병인에 주된 역할을 하여, 상대적으로 덜 침습하고 천천히 성장하는 경향을 보일 것이라는 가설을 뒷받침 한다⁵⁶⁾.

본 연구에서 편평태선암의 경우에는 분화도가 좋은 경우 43%, 중등도 분화인 경우 50%, 미분화인 경우가 67%로서 분화도가 낮을수록 높은 Bcl-2 발현정도를 보였다. Jordan 등⁵⁴⁾도 중등도 이상의 양성발현을 보인 예는 편평상피세포암종 약 60%였으며, 분화도가 나쁜 암종에서 강한 염색정도(86%)를 보였는데 이는 본 실험에서 미약하지만 분화도가 나뉘수록 bcl-2발현이 증가되는 경향과 일치되는 결과이다.

본 연구의 편평세포암종에서도 분화도에 따라 각각 57%, 50%, 33%는 발현되지 않았는데, 편평

세포암종에 bcl-2 종양단백이 발현되지 않는 것은 apoptosis의 억제가 편평세포암종의 주요한 성장기전이 아니며, 상피내암종과는 다른 기전에 의해 종양의 성장이 일어남을 시사한다. 상피내암종에서의 종양세포는 간세포의 성장을 지나다가 침윤성 종양으로 발전하면서 bcl-2 암유전자가 아닌 다른 암유전자에 의해 세포의 증식속도가 증가하여 종양의 성장을 유발함을 추측할 수 있다. 그러나 아포토시스에는 bcl-2 유전자 외에도 myc, p53, APO-1 유전자 등의 다른 유전자들이 관여하므로 편평세포암의 병인에 세포사의 억제가 관여함을 완전히 배제할 수는 없기 때문에 이에 따른 보완된 연구를 할 필요가 있다고 사료된다⁵⁷⁾.

종양생물학에서 NO의 역할은 아직 잘 알려져 있지 않은데, 고형종양 성장은 종양 혈관의 내피세포, 종양 침윤 면역세포 즉 T 임파구, 대식세포, 종양세포들간의 상호작용에 의해 조절된다고 한다⁵⁸⁾. 이런 in vitro내에서 대부분의 세포들은 NO를 생산한다고 보고되어 왔으며⁵⁹⁻⁶³⁾ 최근 NO합성물은 인간 종양조직에서 나타나며, 자궁암의 종양세포나²⁷⁾ 유방암의 간질²⁸⁾에서 발현된다고 하였다. 또한 원발성 종양조직의 이 효소활성은 종양 grade와 상관관계^{30,31)}가 있다고 보고되며, NO가 이런 종양의 진행에서 긍정적인 작용인지 부정적인 작용인지는 알려지지 않았다.

NOS₂는 Ca²⁺에 비의존적이며 NOS의 inducible form으로서 다양한 세포에서 발현되며 17cen-q12에 위치하고 여러조직들에서 발현되지만, NOS 효소들은 다양한 기전에 의해 광범위하게 조절되고, 세포와 조직분포 등에 따라 기능적 역할이 다르다⁵⁵⁾. 일반적으로 자극인자에 의해서 발현되는 것으로 알려져 있는데 inducible NOS 즉 NOS₂에 의해 만들어진 NO는 면역조절, 국소 및 전신 염증반응, 다양한 세포효소 활성의 조절에 중요한 역할을 한다⁵⁸⁾. 최근의 보고에 의하면 NOS₂는 어떤 조직에서는 내독소나 cytokine 같은 면역학적인 자극을 주지 않는 상태(basal condition)에서도 발현된다고 한다. 즉 NOS₂가 정상 비장, 신장 및 신장세포에서 발현됨이 보고

되었고, NOS의 면역반응성은 난관의 평활근세포와 신장에서 관찰됨이 보고되었다⁵⁹⁻⁶¹⁾. 본 연구에서도 자극을 받지 않는 basal condition인 정상점막에서도 NOS₂ 즉 inducible NOS가 발현됨을 볼 수 있었으나 이런 발현은 상당히 적은 정도였다.

최근 인간 암종에서 NOS의 발현에 관한 연구가 이루어져 NOS의 발현 증가가 자궁경부암종, 유방암 및 중추신경계종양에서 관찰된다고 보고하였다^{28,30)}. 이런 자궁암이나 유방암에서는 발현 증가가 종양의 분화도와 관련있다고 하였고, 이런 NOS농도가 증가하는 특정종양에서, p53변이가 25-40%가 불활성화된다고 한다. 종양에서 NOS발현은 종양관련 NO생성물의 생리적인 역할 즉, NO가 혈관생성작용을 하는 것으로 알려져 있는데, NO는 내피세포 성장인자로, 특히 종양 혈관화를 매개한다고 한다^{31,43)}.

Ambis 등⁶⁴⁾에 따르면 정상조직 주위에는 NOS₂가 경미하게 발현되거나 발현되지 않는 반면 직장 선종에선 약 60%의 뚜렷한 발현을 보이며 종양간엽세포, 내피세포, 종양상피에서 발견되었다고 하였으나 NOS₂의 발현을 찾지 못한 Mochhala⁶⁵⁾ 등의 보고와 차이를 보였고, 직장 발암과정의 모든 시기에 NOS의 발현은 낮거나 없다는 결론을 내렸다.

또한 면역조직학적 발현비율은 NOS₂의 경우에는 정상 점막은 25%로 극히 적었으나 편평태선 및 백반증은 각각 78%, 70%로 유사한 정도를 나타냈으나 Western blot상 NOS₂발현도 정상점막에서도 극히 미량의 117kDa 의 밴드가 관찰되었으며 편평태선 및 백반증에서 발현이 증가되었다. 이런 결과는 비교할수 있는 다른 연구가 없지만 NOS₂ 분석을 통해 전암병소에서의 악성 전환 위험성을 평가해 환자에서의 치료지침을 마련할 수 있으리라 생각되어 Rosbe등⁶⁹⁾은 두경부 편평상피세포암종에서 NOS발현을 연구하여 인후후두점막에는 거의 안된 반면 종양의 초기 성장단계에서는 NOS가 가장 많다고 하여 칼슘 의존 NOS활성을 억제하는 것이 고형종양의 성장을 지연시킬수 있다고 하였으나 본 연구에서 NOS₂는 편평태선과 백반증에서는 정상상피와

거의 차이가 없었고, 이형성 또는 상피내암에서는 전 층에서 발현이 증가되고 편평상피세포암의 상피도 주변 결합조직 염증세포에서 발현이 증가되었고 분화도가 나쁠수록 강하게 발현되어 Rosbe의 연구와 차이를 보였으나 그의 연구는 면역조직화학적 염색이나 Western blot을 한 것이 아니라 NOS대사 산물을 효소적으로 평가한 것이기 때문에 연구결과 차이가 보였다고 여겨진다.

본 연구의 CIS 및 상피이형성에서는 100%로 모든 예에서 NOS 발현을 보였으며 암종의 경우 분화도에 따른 NOS2발현은 대체적으로 분화도가 좋은 경우보다(71%) 분화도가 중등도 또는 미분화인 경우가 100%, 83%로 더 높았는데 Gavilanes등⁷⁰⁾은 NOS²가 두경부 편평상피암종에서 종양세포전체에 걸쳐 발현되며 암진주주위에서 강한 발현을 보이고 NOS²가 종양성장에 상당한 역할을 할 것이라고 하였다.

NOS₂의 발현이 정상 조직에서는 미약하고 종양 발생에 주로 나타나는 점 때문에 향후 연구해야 할 점으로 여겨지며 이는 bcl-2와 상호보완적으로 작용하는 것으로 실제 임상에서 실시하는 조직검사에서 bcl-2와 NOS₂가 예후인자로서 가치가 클 것으로 판단되었으며, 본 연구에서의 증례 수가 많지 않아, 보다 많은 증례로 지속적이고 심도있는 연구가 계속되어야 할 것으로 사료되었다.

그러나 종양생물학에서 NO생성물의 작용은 종양이 진행되는 동안 변화한다고 하는데, 전이성 murine melanoma cell line에서 NO생성물은 순환중인 종양세포의 생존을 감소시키고 조직 침습을 방해한다고 한다^{66,67)}. 전이성 종양세포에서 NO의 작용은 많은 세포에 변화를 주는데, 최근 murine EMT-6 mammary carcinoma cell에서 LPS/IFN에 자극받은 NO생성물은 종양 성장과 폐전을 증가시킨다고 하였다⁶⁸⁾. 따라서 전이성 종양에서 NO의 작용은 p53 유전자를 비롯하여 부가적인 연구를 필요로 하며 원발성 골내암종을 비롯한 악성 구강 종양에서도 NO에 대한 연구가 이루어져야 하며 암유전인자와 여러 가지 기질과의 상관관계 및 면역세포와의 관계

를 밝히는 연구가 장차 진행되어 NO의 다른 역할을 규명하여야 한다.

V. 결 론

apoptosis를 억제하여 종양을 유발하는 원종양유전자 bcl-2와 면역계에서 방어물질로서 작용하는 것으로 알려진 NOS₂가 어떠한 기전에 의하여 구강내 정상 각화세포를 편평상피암세포로 분화하게 하는지를 알아보고자 정상상피, 전암병소인 백반증 및 편평태선, 그리고 상피이형성증과 편평상피세포암등에서 각각의 발현정도를 면역조직화학적염색법과 Western Blot분석법으로 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상점막에서는 bcl-2가 기저세포층, NOS₂는 상피하방의 염증세포에 미약하게 발현되었으며 편평태선 및 백반증에서 발현부위는 큰 차이가 없었다.
2. 이형성 또는 상피내암에서는 bcl-2는 상피전층에서 발현이 증가되었으나, NOS₂에 대한 발현은 표층과 염증세포에서만 증가되었다.
3. 분화도가 좋은 편평상피세포암에서는 주로 bcl-2가 과발현되었고, 중등도 분화이후에는 NOS₂의 발현이 증가되고 bcl-2는 감소되었다.
4. 정상점막에서 Bcl-2는 12.5%가 발현한 반면, 백반증(30%)보다는 편평태선(44%)에서 약간 높게 나타났고, CIS에서 67%로 가장 높게 나타났으며, 암종의 경우에는 분화도에 따라 43%, 50%, 67%로 나타났다.
5. NOS₂의 경우 정상 점막은 발현빈도가 25%이지만 편평태선 및 백반증은 각각 78%, 70%로 증가되었고 CIS 및 상피이형성에서는 100%이며, 암종의 경우 분화도가 좋은 경우보다 (71%) 중등도 또는 미분화인 경우가 100%, 83%로 더 높았다.
6. Western blot에 따른 bcl-2와 NOS₂발현 단백질 발현은 정상점막보다 편평태선과 백반증에서 크게 증가되었다.

따라서 bcl-2는 백색병소 및 전암단계에 주로 증가되다가 편평세포암의 분화도가 나뉠수록 감소되고, NOS₂는 중등도 이후 암중발생이 진행됨에 따라 증가되어 편평세포암종의 발생에 있어서는 bcl-2와 NOS₂등에 의한 상호작용이 종양의 성장 및 진행에 큰 기여를 할수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Mitchell C. Multistage carcinogenesis in pediatric and adult cancer. *Eur J Cancer* 28: 296-298, 1992.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and therapy. *Cancer* 73: 2013-36, 1994.
- Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6, 1994.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57, 1972.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12, 1993.
- Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 362: 786-91, 1993.
- Korsmeyer SJ. Bcl-2: An antidote of programmed cell death. *Cancer Surv* 15: 105-10, 1992.
- Yunis JJ, Oken N, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 307: 1231-6, 1982.
- Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14:18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 229:1390-3, 1985.
- Cobally N, Grogen L, Keane M, Devaney DM, Dervan PA, Carney DN. Bcl-2 rearrangement in Hodgkin's disease and reactive lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 101:756-60, 1994.
- Said JW, Pinkus GS, Lones MA, Preston M, Shintaku IP. Expression of bcl-2 oncogene protein in malignant lymphomas, including Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype. *Appl Immunohistochem* 1: 108-14, 1993.
- Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with estrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 69: 135-9, 1994.
- Pezzella F, Turley H, Tungekar MF. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 329: 690-4, 1993.
- Segal NH, Cohen RJ, Haffejee Z, Savaage N. Bcl-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab Med* 118: 616-8, 1994.
- Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 182: 1683-1693, 1995.
- Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylylation: relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1776-1780, 1996.
- Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem* 272: 4323-4326, 1997.
- Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp* 61: 33-45, 1995.
- Stadler J, Trockfeld F, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, Doehmer J. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3559-3563, 1994.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin C. Nitric oxide. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Com-*

- mun 1988 ; 157 : 87-97.
21. Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric oxide A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989 ; 169 : 1543-1548.
 22. Kennedy LJ, Moore KJr, Caulfield JL, Tannenbaum SR, Dedon PC. Quantification of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem Res Toxicol* 10: 386-392, 1997.
 23. Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 9-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis (Lond)* 16:2045-2050, 1995.
 24. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosation agents. *Chem Res Toxicol* 1: 249-257, 1988.
 25. Wu, Y, Brouet I, Calmels S, Barsch H, Ohshima H. Increased endogenous N-nitrosamine and nitrate formation by induction of nitric oxide synthase in rats with acute hepatic injury caused by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide administration. *Carcinogenesis (Lond)* 14: 7-10, 1993.
 26. Wink DA, Laval J. A DNA repair enzyme is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis(Lond)* 15: 2125-2129, 1994.
 27. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 54: 1352-1354, 1994.
 28. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 72: 41-44, 1995.
 29. Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 55: 727-730, 1995.
 30. Henkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4392-4396, 1995.
 31. Madea H, Noguchi Y, Sato K, Akaike T. Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor. *Jpn J Cancer Res* 85: 331-334, 1994.
 32. Tozer GM, Prise VE, Chaplin DJ. Inhibition of nitric oxide synthase induces a selective reduction in tumor blood flow that is reversible with L-arginine. *Cancer Res* 57: 948-955, 1997.
 33. Nicotera P, Bonfoco E, Brune B. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol* 5: 411-420, 1997.
 34. Dimmeler s, Haendler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein(CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185: 601-607, 1997.
 35. Tzeng E, Kim YM, Pitt BR, Lizonova A, Kovesch I, Billiar TR. Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial apoptosis. *Surgery* 122: 255-263, 1997.
 36. Cohen SM, Ellwein LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249: 1007-1011, 1993.
 37. Williams AC, Browne SJ, Manning AM, Hague A, van der Stappen JW, Paraskeva C. Biological consequences of the genetic changes which occur during human colorectal carcinogenesis. *Sem Cancer Biol* 4: 153-159, 1993.
 38. Coltrera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, Gown AM. 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.
 39. Girod SC, Pape HD, Krueger GR. p53 and PCNA expression in carcinogenesis of the oropharyngeal mucosa. *Oral Oncol Eur J Cancer* 30(B): 419-423, 1994.
 40. Huang Wy, Coltrera M, Schubert M, Morton T, Truelove E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 748-754, 1994.
 41. Girod SC, Krueger G, Pape HD. p53 and Ki67

- expression in preneoplastic and neoplastic lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 22: 285-288, 1993.
42. Kannan S, Chandran GJ, Pillai KR, Mathew B, Sujathan K, Nalinakumary KR, Nair MK. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki-67. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49: 170-175, 1996.
 43. Warnakulasurya KA, Johnson NW. Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 23: 246-250, 1994.
 44. Mukhopadhyay D, Chatterjee R, Chakraborty RN. Cytokinetic studies of oral cancer cells using bromodeoxyuridine labelling in relation to factors influencing prognosis. *Eur J Cancer* 31(B): 32-36, 1995.
 45. Tsuji T, Shrestha P, Yamada K, Takagi H, Shinozaki F, Sasaki K, Maeda K, Mori M. Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: an immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420: 377-383, 1992.
 46. Shin DM, Voravud N, RoJY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst* 85: 971-978, 1993.
 47. 이해경, 이동근, 이호, 심상인. 자궁내막의 조직병리학적 검색 및 bcl-2 발현. *대한병리학 회지* 32: 208-214, 1998.
 48. 조영록, 강유나, 이상숙, 송홍석, 손수상, 김동석. 위의 원발성 림프종에서 bcl-2 및 p53 단백질의 발현. *대한병리학회지* 32: 978-984, 1998.
 49. 조현득, 김영식, 김인선. 유방암에서 안드로겐수용체, bcl-2 단백질, Rb 단백질의 발현과 예후 인자와의 상관관계에 관한 연구. *대한병리학회지* 32: 443-452, 1998.
 50. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371: 534-537, 1994.
 51. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases replication by interaction with PCNA. *Nature* 369: 574-578, 1994.
 52. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang Hui, Casso D, Kobayashi R, and Beach D. p21 is a inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704, 1993.
 53. Serrano M, Hannon GJ, Beech D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/ CDK4. *Nature* 366: 704-707, 1993.
 54. Jordan RCK, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol, Eur Cancer* 32B(6): 394-400, 1996.
 55. Singh BB, Chandler FW, Whitaker SB, Forbes-elson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 692-8, 1998.
 56. Cerrine L, Kerl H. A berrant bcl-2 protein expression provides a possible mechanism of neoplastic cell growth in cutaneous basal-cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 21: 398-403, 1994.
 57. Morales-Ducret CRJ, Rijn MVD, LeBrun DP, Smoller BS. Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 131: 909-12, 1995.
 58. Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1208-1213, 1993.
 59. Ahn KY, Mohaupt GM, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol* 267: F748-F757, 1994.
 60. Bryant CE, Tomlinon A, Mitchell JA, Elliot J, Schmidt HW, Thiemermann C, Gross SS, Wolloughby DA, Vane JR. Inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the rat ovary and fallopian tubes: a possible role in reproductive biology(abstract). *Endothelium* 1, Suppl, S74, 1993.
 61. Tojo A, Gross SS, ZHANG L, Tisher CC, Schmidt HHHW, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of

- nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 4: 1438-1447, 1994.
62. Pagani A, Fisher-Colbrie R, Eder U, Pellin A, Lombart-Bosch A, Bussolati G. Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines. Morphological, immunophenotypic, molecular biological and cytogenetic evidence. *Int J Cancer* 63:738-743, 1995.
 63. Heikinheimo K, Sandberg M, Happonen R-P, Virtanen I, Bosch FX. Cytoskeletal gene expression in normal and neoplastic human odontogenic epithelia. *Lab Invest* 65:688-701, 1991.
 64. Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, Bosco EF, Ogunfusika MO, Oser SM, Kein S, Shields PG, Biliar TR, Harris CC. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenoma: Implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 58:334-341, 1998
 65. Mochhala S, Chhatwal VJ, Chan ST, Ngoi SS, Chia YW, Rauff A. Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis (Lond)* 17: 1171-1174, 1996.
 66. Xie K, Hunag S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 181 : 1333-1343, 1995.
 67. Xie K, Dong Z, Fidler IJ. Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 59: 797-803, 1996.
 68. Edwards P, Cendan JC, Topping DB, Moldawer LL, MacKay S, Copeland EM, III, Lind S. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo. *J Surg Res* 63: 49-52, 1996.
 69. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113 : 541-549,1995.
 70. Gavilanes J, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Perez A, Leza JC, Alvarez-Vicent JJ. Nitric oxide synthase activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 109:148-152, 1999.

-ABSTRACT-

Comparative Expression of Bcl-2 and NOS₂ in Oral White Lesions and Squamous Cell Carcinoma

Min Shin, D.D.S., M.S.D., Ph.D.*, Eun-Cheol Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.**

*Department of Oral Medicine**, *Department of Oral Pathology***, *School of Dentistry, Wonkwang University*

The proto-oncogene bcl-2 confers a survival advantage to cells by blocking programmed cell death (apoptosis). Overexpression of bcl-2 probably plays a role in tumorigenesis, and the expression of the bcl-2 protein has been investigated in many kinds of tumors. An increased expression of nitric oxide synthetase(NOS) has been observed in human colon cancer cell lines as well as in human gynecological, breast, and CNS tumors.

However, there have been only a few reports on the expression of bcl-2 and NOS₂ in oral white lesions and cancer. The aim of this study was to investigate the relationship between the expression of Bcl-2 and NOS₂ and several pathological parameters such as histological types and layers. We reported desregulation of bcl-2 and NOS₂ expression during progression from oral white lesion, lichen planus and leukoplakia to squamous cell carcinoma. The obtained results were as follows:

1. Immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies to bcl-2 oncoprotein and NOS₂ in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections revealed that bcl-2 expression is restricted to the basal cell layer and NOS₂ was mild expressed only in subepithelial inflammatory cells in normal human mucosa. There wasn't specific finding of those in lichen planus and leukoplakia.
2. Bcl-2 immunoreactivity in severe epithelial dysplasia or CIS occurs throughout the epithelium, NOS₂ reactivity in most superficial layer were noted.
3. In well-differentiated squamous cell carcinomas, mostly bcl-2 was overexpressed. In moderated and poor squamous cell carcinomas, the expression of NOS₂ was increased and that of bcl-2 was decreased.
4. The immunoreactivity of bcl-2 was 12.5% of normal mucosa, 30% of leukoplakia, 44% of lichen planus and 67% of carcinoma in situ. In carcinoma, those were 43%, 50% and 67% according to differentiation, respectively.
5. The immunoreactivity of NOS₂ was 25% of normal mucosa, 70% of leukoplakia, 78% of lichen planus and 100% of carcinoma in situ and epithelial dysplasia. In carcinoma, those were higher in moderated(100%) and poor(83%) squamous cell carcinomas than in well differentiated type(71%).
6. The expression of bcl-2 and NOS₂ by Western blot was increased highly in lichen planus and leukoplakia.

Therefore, the expression of bcl-2 was increased in the white and precancerous lesions and that was decreased by differentiation of carcinoma. However, NOS₂ immunoreactivity in carcinoma in situ was lower than those in moderated and poor squamous cell. These findings suggest that the interaction of bcl-2 and NOS₂ may be roled importantly in growth and development of carcinoma.

EXPLANTATION OF FIGURES

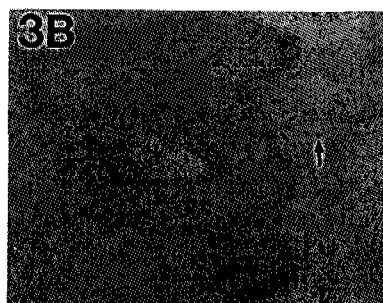
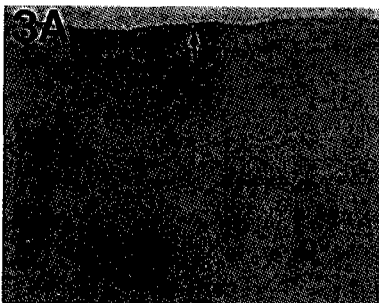
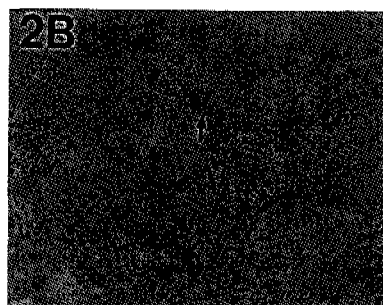
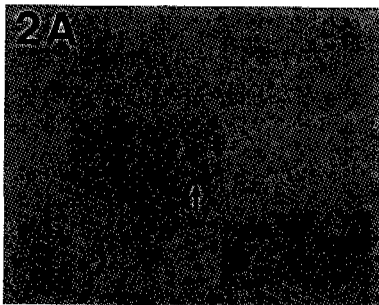
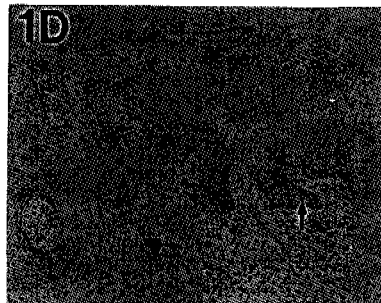
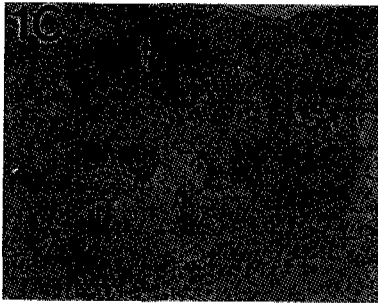
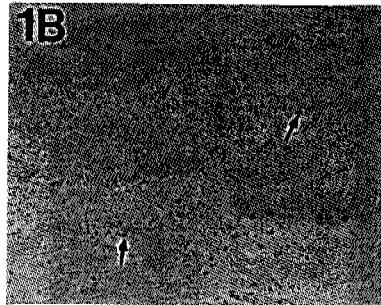
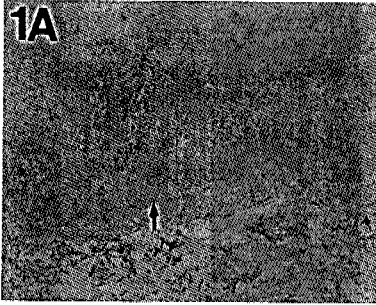
Fig.1-5: Microphotography of immunohistochemical stain for bcl-2 and NOS₂ in oral white lesions and squamous cell carcinoma

- 1A: Weak bcl-2 immunoreactivity in basal cells of normal oral mucosa (×100). 1B: Mild NOS₂ immunoreaction in subepithelial inflammatory cells of normal mucosa was noted (×100)
- 2A, 2C: Basal cell and subepithelial inflammatory cells (2A) or Superficial differentiating cells (2C) or in lichen planus are only faintly reactive for bcl-2. (×40). Minimal NOS₂ (2B, 2D) immunoreactivity were diffuse in inflammatory cells (×200).
- 3A: Leukoplakia showing diffuse immunoreactive for bcl-2 in basal, parabasal and superficial differentiating cells (×200). 3B: Immunoreactivity for NOS₂ in leukoplakia was similar to that of normal mucosa (×200)
- 4A: bcl-2 immunoreactivity in severe epithelial dysplasia or CIS occurs throughout the epithelium, with diffuse and increasing reactivity in sub-epithelial inflammatory cells (×200). 4B: NOS₂ reactivity in most superficial layer were noted (×200).
- 4C: Normal-appearing epithelium in CIS showing minimal for bcl-2 immunoreactivity in basal and parabasal cells (×200), but for NOS₂ (4D) was marked reaction in parabasal and spinous layer.
- 5A: Island of squamous cell carcinoma. Marked bcl-2 immunoreactivity is seen in peripheral cells, diminishing toward center. In addition, a few mononuclear cells in connective tissue show mild bcl-2 immunoreactivity (×200).
- 5B, NOS₂ immunoreactivity in well-differentiated squamous cell carcinoma was noted in inflammatory cells (×200). Rare reaction for NOS₂ in tumor island center was showing (×200). 5C: In moderately differentiated SCC, diffuse reaction for bcl-2 (5C), for NOS₂ (5D) was noted.

Fig. 6 Western blot analysis for the Bcl-2 protein level in oral white lesions and squamous cell carcinoma. Lane 1: marker, 2: normal mucosa, 3: lichen planus, 4: leukoplakia, 5: well differentiated squamous cell carcinoma Cell extract equivalent to 50 ug of total cellular protein of tissue was electrophoresed by 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The protein level of bcl-2 was probed with antibody diluted by 1: 1000. This data shown are from one experiment and representative: however, the similar results were obtained in duplicate experiment.

Fig. 7 Western blot analysis for the NOS₂ protein level in oral white lesions and squamous cell carcinoma. Lane 1: marker, 2: normal mucosa, 3: lichen planus, 4: leukoplakia, 5: well differentiated squamous cell carcinoma Cell extract equivalent to 50 ug of total cellular protein of tissue was electrophoresed by 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The protein level of NOS₂ was probed with antibody diluted by 1: 800. This data shown are from one experiment and representative: however, the similar results were obtained in duplicate experiment.

논문사진부도 ①



논문사진부도 ②

