

# 구강편평세포암에서 telomerase 활성도의 임상적 연관성에 관한 연구

심유진 · 김명진\* · 남동석\*\* · 이종호\*

SNU 치과의원

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실\*

서울대학교 치과대학 치과교정학교실\*\*

## Abstract

### CLINICAL IMPLICATIONS OF TELOMERASE ACTIVITY IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Yu-Jin Shim, Myung-Jin Kim\*, Dong-Seok Nahm\*\*, Jong-Ho Lee\*

*SNU Private Dental Clinic,*

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

*Department of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul National University\*\**

Telomerase is a ribonucleoprotein that synthesizes telomere repeats. It has been reported that activation of telomerase was associated with immortalization, proliferative activity and carcinogenesis.

Recently, telomerase activity has been extensively studied in many kinds of malignant tumors for clinical diagnostic and/or prognostic utilities. In neuroblastoma, breast carcinoma, gastric carcinoma, non-small cell lung carcinoma, close relationship has been reported between high telomerase activity and lymph node metastasis, tumor aggressiveness and poor prognosis.

The purpose of this study is to investigate the clinical implication of telomerase activity assay as an adjunctive factor in decision-making on neck node management, speedy pre-operative judging on histologic malignancy grading.

Thus we performed semi-quantitative assay of telomerase activity using Telomerase PCR ELISA kit® (Boeringer Mannheim, Germany) and evaluated correlation between telomerase activity and tumor size, neck node metastasis, Anneroth malignancy score and influence of pre-operative chemotherapy on its activity in 27 cases of oral squamous cell carcinomas and 18 cases of normal oral epithelium. Also, correlation between telomerase activities and PCNA indices was evaluated.

The results were obtained as follows:

1. The telomerase activities were detected in 24 specimens out of 27 oral squamous cell carcinoma specimens (88.9%) and in 5 specimens out of 18 normal oral epithelium specimens (27.8%). The mean value of telomerase activities was  $0.9793 \pm 0.3428$  in 24 oral squamous cell carcinoma specimens and  $0.4855 \pm 0.1117$  in 5 normal oral epithelium specimens. The positivity rate and mean value of telomerase activities in oral squamous cell carcinoma specimens were significantly higher than those of normal oral epithelium specimens ( $p < 0.05$ ).
2. There was no significant correlation between total Anneroth malignancy score and telomerase activity ( $p > 0.05$ ), but points of mitosis index and depth of invasion were significantly correlated with telomerase activities ( $p < 0.05$ ).
3. The positive immunohistochemical staining for PCNA (proliferating cell nuclear antigen) was observed in 26 specimens out of 27 oral squamous cell carcinoma specimens and mean value of PCNA indices of 26 specimens was  $53.67 \pm 26.46$ . PCNA indices were significantly correlated with telomerase activities ( $p < 0.05$ ).
4. The mean value of telomerase activities was significantly higher in pathologic T3/T4 group than in T1/T2 group ( $p < 0.01$ ). There was no significant difference of mean value of telomerase activities between pathologic neck node positive group and negative group ( $p > 0.05$ ). Pre-operative chemotherapy significantly lowered the telomerase activities ( $p < 0.05$ ).

## 이종호

110-749 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Jong-Ho Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Seoul National Univ.

28, Yeongun-Dong, Chongno-Gu, Seoul-City, 110-749, Korea

Tel: 82-2-760-3813, Fax: 82-2-706-4948

E-mail: leejongh@yahoo.com

The above results suggested telomerase activity could be used as diagnostic marker and adjunctive parameter for judging on histologic malignancy in oral squamous cell carcinoma.

**Key words** : Oral squamous cell carcinoma, Telomerase activity, PCNA

\* 본 연구는 2000학년도 서울대학교 대학연구센터(구강질환센터) 지원과제(과제번호 00-1-3-5)로 연구비의 일부를 지원 받아 이루어짐.

## I. 서 론

구강편평세포암의 재발은 외과적 수술기법, 방사선치료 및 항암화학요법의 발달에도 불구하고 계속적인 문제가 되고 있으며, 실제로 지난 20년 동안 생존율이 괄목할 만하게 개선되지 않았다<sup>1)</sup>. 최근의 연구는 두경부 암종의 분자생물학적 수준에서의 이해에 초점이 맞추어 지고 있는 추세인데<sup>2)</sup>, 두경부 편평세포암종의 발암과정은 유전적 변이가 축적된 다단계 과정으로 보고 있으며 telomere-telomerase 가설이 발암과정의 진행을 잘 설명할 수 있는 이론으로 설득력을 얻고 있다<sup>3)</sup>.

세포와 암세포를 항상 그리고 분명히 구별할 수 있는 인자(factor)의 확인은 초기진단, 수술적절경계 및 예후의 분석, 치료의 총괄적 확립에 있어서 중요한 의미를 갖는다. 따라서 이러한 종양의 분자생물학적 분석을 임상적으로 응용하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데 Brennan 등<sup>4)</sup>은 수술적절경계의 p53 변이 분석을 통해 종양의 국소적 재발의 예측을 향상시킬 수 있다고 보고한 바 있다. 그러나 이와 유<sup>5)</sup>는 p53이 암종의 증식이나 침윤의 지표로서 한계가 있다고 하였다.

한편 신경모세포종(neuroblastoma)이나 위암종(gastric carcinoma)에 있어서 telomerase 활성도가 높은 경우 예후가 나쁘다고 보고된 이래 telomerase의 활성도를 종양의 진단이나 예후판정에 유용한 분자생물학적 지표(biomolecular marker)로 활용하려는 연구가 주로 유방암이나 결장직장암(colorectal carcinoma), 신경모세포종(neuroblastoma)등에서 활발히 진행되고 있으며 구강편평상피암에서는 보고가 드문 편이다<sup>6,7)</sup>. Albanell 등<sup>8)</sup>은 폐암에서 세포증식율(proliferative rate)이 높고 병기가 높을 수록 telomerase 활성도가 높다고 보고하였다. 한편 입과절 전이와 연관해서 Nawaz 등<sup>9)</sup>은 유방암에서 경부전이 여부와 telomerase 활성도간에 유의성 있는 상관관계를 찾을 수 없었으나, Hoos 등<sup>10)</sup>은 유방암에서 종양 크기, 입과절 전이와 telomerase 활성도간의 유의한 상관관계를 보고하면서 종양의 악성도와 telomerase 활성도와의 밀접한 연관성을 주장하였다. 두경부 편평상피암 영역에서는 Thumher 등<sup>10)</sup>이 16명의 환자를 대상으로 조사한 결과 경부절 전이가 있는 군에서 활성도의 유의성 있는 증가를 보였다고 보고 하면서 telomerase 활성도가 경부전이 치료전략에 영향을 줄 수 있는 지표가 될 수 있다고 하였다.

자기공명영상검사(MRI), 초음파 및 임상적 촉진에 의해 경부전이 확실히 되는 경우의 치료전략에 대해서는 대부분 의견의 일치를 보고 있으나 임상적 NO 경부에 대해서는 많은 논란이 있으며, 원발병소 적출후에 발생하는 경부전이가 생존율을 낮춘다는 것이 보고되었다<sup>11)</sup>. Woolgar<sup>12)</sup>는 술전에 임상적으로 NO 경부인 것으로 판단되었던 152개의 경부 중 32개(21%)의 경부에서 술후 조직학적으로 전이가 관찰되었다고 하면서 술전 경부 예측의 어려움을 보고한 바 있다. 만약 구강편평세포암종에서 telomerase 활성도가 경부전이와 밀접한 관계가 있다고 가정하면 생검표본으로 조직 검사와 telomerase 활성도를 측정하여 술전에 신뢰도 높은 경부전이 예측을 하여 치료전략에 많은 도움을 받게 될 것이다. p53의 분석이 많은 시간이 걸리고 양성율이 50% 정도인 것에

반해 telomerase의 활성도는 구강편평세포암종에서 약 90% 정도의 양성율을 보이고 있고<sup>13)</sup>, 상품화된 kit를 이용할 경우 매우 짧은 시간(약 6-8시간)안에 측정이 가능할 뿐 아니라, 아주 적은 양의 조직으로도 높은 민감도를 가질 수 있어서 임상적 유용성이 높다 하겠다. 또한 Broder의 조직학적 분류법이 예후와 제한된 상관관계를 보인다고 보고된 이래 Anneroth의 조직학적 악성도 분류법(Table 1)이 예후와 밀접한 관계를 가지는 것으로 보고 되고 있는데<sup>14)</sup>, 만약 telomerase 활성도가 Anneroth 악성도 점수(Anneroth's malignancy score)와 관계가 있다면 술전에 종양의 악성도를 미리 예측하여 수술경계등을 결정하는 데 유용한 자료가 될 것이다. 이에 본 연구에서는 18예의 정상구강상피와 27예의 구강편평세포암종으로부터 채취한 종괴에서 telomerase 활성도를 측정 후 Anneroth 악성도 점수, 병리학적 TNM 분류, 항암화학요법 여부등과의 관련성을 조사하여 술전에 치료전략을 세우는 데 유용한 분자생물학적 지표로서의 가능성을 알아보고자 하였으며, 증식성세포핵항원지수(proliferating cell nuclear antigen index, PCNA index)와의 연관성도 함께 조사하였다.

## II. 문헌 고찰

1978년 Blackburn과 Gall<sup>15)</sup>은 Tetrahymena의 DNA를 연구하던 중 염색체의 끝이 일정하게 반복되는(tandemly repeated) DNA 구조물, 즉 종말체(telomere)로 구성되어 있는 것을 발견하였는데, 이것은 리보핵산단백질(nucleoprotein) 구조물로서 염색체를 보호하고 안정시키며 말단 염색체 융합(end-to-end fusion)이나 염색체의 재조합(recombination)을 막고, 핵안에서 염색체를 고정(anchor)시키고 세포분열기에 염색체의 분리에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 염색체 끝은 비전사지역(non-transcriptional region)으로 3개의 영역(3' overhang, telomeric repeats, telomere associated sequence)으로 나누어 진다. 현재로서는 정확히 순수한 telomeric repeat 영역의 길이를 측정할 수 있는 방법은 없으며 첫번째 제한효소 작용점의 원심에 있는 TAS(telomere associated sequence)와 telomeric repeats를 포함하는 terminal restriction fragments(TRF) 개념으로 종말체(telomere) 길이를 평가하고 있다. 사람에서 조직의 종류나 나이에 따라 2-20kb 정도의 길이를 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>. Telomeric DNA는 이중나선 구조로 되어 있으며 loop 형태를 취하고 있고(telomere loop, t-loop), 3' overhang은 150bp 정도의 단일 나선 구조로 되어 있고 이중나선의 telomeric DNA sequence와 일부 상보적인 결합을 하여 이른바 D-loop(displacement loop)를 이루고 있다. 그리고 2개의 Myb 유전자와 관련된 결합단백질 즉 TRF1과 TRF2가 이러한 loop 구조를 안정시키고 있다. TRF1은 t-loop를 안정시키고 telomerase 활성의 음성 조절자(negative regulator)로 알려져 있다<sup>17)</sup>. TRF2의 주기능은 3' overhang을 유지하는데 있으며 이것의 소실은 염색체의 말단 융합(end to end fusion)이나 세포고사(apoptosis)를 일으킨다<sup>18)</sup>.

인간 염색체 말단부위의 분자구조에 대한 연구는 종말체에 아주 가까운 Y 염색체 염기서열에 대한 탐식자(probe)의 개발에

의해 시작되었다. 이러한 소식을 이용하여 Cooke와 Smith는<sup>19)</sup> 생식세포조직(germline tissue)의 종말체가 체세포조직(somatic tissue)의 종말체 보다 길다는 것을 발견하였다. 그 후 인간세포로부터 telomere repeat의 염기서열을 확인하게 되면서 종말체의 길이와 세포노화(cell senescence)와의 상관관계 분석이 가능하게 되었다. Harley 등<sup>20)</sup>이 정상 인간 섬유세포에서 세포분열을 함에 따라 점점 종말체의 길이가 짧아짐을 확인 하였고, 나이드 사람의 피부조직 종말체 길이가 젊은 사람의 것보다 짧다는 것을 알게 되어 이것이 조직배양에서만 일어나는 현상이 아님을 제시하였다. 또한 암조직에서의 종말체 길이가 주위 정상조직의 것보다 짧음을 발견하여 처음으로 암종과 종말체 길이가 관계 있음을 제시하였다<sup>21)</sup>. 이러한 사실을 기초로 하여 1990년도 초반에 연구 모델(telomere-telomerase hypothesis)이 제시되었는데<sup>22)</sup> 가설의 첫 번째 부분은 종말체와 세포노화와의 관계이고, 두 번째 부분은 종말체, telomerase 그리고 암종과의 상호관계에 대한 것이었다. 즉 섬유아세포의 경우 자라는 동안 말단복제문제(end replication problem)와 telomerase의 부재로 인해 종말체가 짧아지게 되는데 반해 생식세포의 경우에는 telomerase의 활성화로 인해 종말체의 길이가 유지된다는 것이다. 종말체의 길이가 계속해서 짧아지게 되면 짧아진 종말체의 길이가 신호가 되어 2개의 종양억제 유전자(tumorsuppressor gene)인 pRb와 p53이 작동하게 되고 세포의 노화에 이르게 된다. 그러나 만약 바이러스 종양유전자(Simian Virus 등)<sup>40)</sup>의 발현에 의해 종양억제유전자의 작동을 피하게 되면 생명을 연장할 수 있게 된다. 이러한 생명 연장 기간 동안 종말체는 점차 짧아지게 되고 세포는 위기를 맞게 되는데, 유전적 불안정성 상태에서 세포증식을 계속하게 되어 2차적인 유전적 변이의 축적과정이 일어나게 되고 최종적으로 암발생으로 이어지게 되는 것으로 추론되고 있다. 그 후 종양의 계속적인 성장을 위해 telomerase 재활성화가 필수적이다<sup>23)</sup>. 최근에 이 가설에 대한 강력한 증거들이 제시되고 있다. 즉 telomerase 음성인 인간 전두부 섬유아세포와 망막색소상피세포에 telomerase 촉매소단위(catalytic subunit)를 발현할 수 있는 매개체(vector)를 유전자전달감염(transfection) 시켰더니 정상 형질을 유지한 채 20회 이상의 복제를 보 이면서 정상 생존기간을 넘어섰다고 보고되고 있다<sup>24)</sup>.

1984년 Greider와 Blackburn<sup>25)</sup>은 염색체 끝에 telomere repeat를 첨가할 수 있는 효소, 즉 telomerase를 발견하였다. Telomerase는 내부에 telomere repeats를 합성할 수 있는 RNA 주형(template)을 포함하고 있으며 역전사효소(reverse transcriptase) 활성을 가진 복합 단백질체이다<sup>26)</sup>. Telomerase에 의해서 종말체가 늘어나는 과정을 살펴보면 먼저 telomerase RNA 주형 부위의 3개의 뉴클레오타이드(nucleotide)가 3' overhang의 마지막 3개의 뉴클레오타이드에 결합한 후 역전사효소의 활성을 통해 종말체의 첨가가 일어난다. 다시 새로운 종말체의 3' overhang으로 telomerase의 전위(translocation)가 일어나고 같은 과정이 반복된다. 최근에 사람에서 telomerase 구성요소의 유전자 클로닝이 가능하게 되었으며 telomerase가 3개의 소단위(subunit)로 구성되어 있음이 밝혀졌는데<sup>27,28)</sup>, 각각 hTR(human telomerase RNA), TP1(telomerase protein 1), hTERT(human telomerase reverse transcriptase)로 명명되었다.

hTR은 종말체 합성을 위한 주형(template)을 포함하고 있으며 역전사효소 반응에 필수적이다. TP1은 telomerase 단백질 구성요소의 일부분이며 생체내(in vivo)에서 telomerase의 활성도를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. hTERT는 역전사 효소활성을 가지고 있는 부분으로서 telomerase의 촉매소단위(catalytic subunit)로 간주되고 있으며 hTR과 TP1-mRNA가 telomerase 양성인 악성종양 뿐만 아니라 telomerase 음성인 조직에도 폭넓게 발현되는데 반해 hTERT-mRNA는 주로 telomerase 양성인 조직에서 발현되는 것으로 볼 때 hTERT가 telomerase의 활성화에 주요 제한요소임을 알 수 있다<sup>29)</sup>. Telomerase의 입체적 구조는 아직 밝혀지지 않았지만 다른 종의 RNA subunit과 단백질로 구성된 chimeric telomerase가 생체내(in vivo) 및 체외(in vitro)실험에서 모두 활성도를 나타내었다<sup>30)</sup>.

지난 몇 년간 거의 모든 종류의 인간 암조직의 telomerase 활성도를 측정해왔는데<sup>31,32)</sup> 비록 종말체 길이와 telomerase 활성도간의 상관관계는 없었지만 대부분의 인간 종양에서 telomerase 활성도가 측정되었다. 위암종이나 자궁경부의 경우에서처럼 악성 진행과 telomerase 활성도의 상관관계가 입증된 경우도 있지만 Hodgkin's lymphoma의 경우는 전혀 활성도가 나타나지 않았고 연조직의 종양의 경우에는 말기의 암종에서만 일부 관찰되었다. 모든 종양의 약 20% 정도가 음성 telomerase 활성도를 보이며 인간 종양세포주(human tumor cell line)에서는 약 40% 정도의 음성도를 보인다<sup>33)</sup> 사실로 인해 종양의 세포성장이 telomerase의 재활성화에 의존한다는 가설에 의문을 가지게 되었고 이에 Bryan 등<sup>34)</sup>은 alternative telomere lengthening mechanism(ALT)라는 가설을 내놓았다. 예를 들어 효모균 세포에서는 주로 telomerase 활성화에 의해 그들의 종말체를 유지하기는 하지만 어떤 상황에서는 유전자재조합통로(recombinational pathways)를 이용하기도 한다<sup>35)</sup>. 이러한 ALT 기전은 간엽종양(mesenchymal tumor)에서 좀더 빈번히 일어나는 것으로 보고되고 있다.

1994년 이전에도 시발체 연장(primer extension)에 의한 telomerase 활성도 측정이 가능했으나 많은 양의 조직을 필요로 했다. 1994년 후반 들어서 TRAP (telomeric repeat amplification protocol) 측정이 개발되면서<sup>36)</sup> 작은 양의 조직으로도 telomerase 활성도 측정이 가능하게 되었다. 그 후 telomerase 활성도 측정을 위한 연구 kit (TRAPeze, Oncor, Gaithersburg, MD / PCR-based ELISA telomerase kit, Boehringer Mannheim, Germany)가 도입되면서 실험실간의 재생성(reproducibility)이 향상되었다 그 후 PCR 억제자(inhibitor) 때문에 내부기준자(internal standard)의 도입<sup>37)</sup>이 요구되었고 telomerase 활성도의 반정량적인 실험이 가능하게 되어 각 실험실간의 비교가 가능하게 되었다.

Ohyashiki 등<sup>38)</sup>은 형광 시발체(fluorescent telomerase primers)와 인사이투 중합효소연쇄반응(in situ PCR)을 이용해 세포진단학적 검체(cytologic specimen) 즉 요검체속의 침강세포(sedimented cells in voided urine), 구강세척액 및 객담(oral rinse and sputum) 및 세침흡입액(fine-needle aspirates)등에서도 telomerase 활성도를 측정할 수 있게 되었다. Telomerase의 주형RNA를 클로닝하게 되면서 파라핀으로 고정된 조직편에서도 인사이투 상보결합(in-

situ hybridization)을 이용하여 telomerase RNA를 측정할 수 있게 되었는데 telomerase 활성도와와의 상관관계가 85-90% 정도인 것으로 보고되고 있다. Yashima 등<sup>39)</sup>은 임파구의 활성으로 인해 가양성 반응이 있을수 있으나 telomerase 활성도 측정과 인사이투 상보결합(in-situ hybridization)을 이용한 hTR(human telomerase RNA)측정을 병용하면 임파질의 미세 전이를 확인하는데 유용할 수 있다고 주장하였다.

유방암, 폐암등에서는 전암병소(preneoplasia)에서도 telomerase 활성도가 측정되었으며 갑상선암, 췌장암, 대장암등에서는 상피암의 초기 90-95%에서 활성도가 측정되었다. 특히 폐암의 경우 흡연자의 조직학적으로 정상적인 상피의 약 15%에서 활성도가 측정되었고 과형성(hyperplasia), 화생(metaplasia), 이형성(dysplasia)에서 점증적으로 telomerase 활성도가 높아지는 것으로 밝혀져 폐암에서의 field cancerization 이론을 강력히 뒷받침 하고 있다<sup>40)</sup>. Telomerase 활성도를 field cancerization 이론에 적용해 보려는 시도는 구강편평세포암에서도 계속 이루어져 왔는데 Mutirangura 등<sup>41)</sup>은 26개의 백반증병소 중 10개의 병소에서 활성도가 측정되었으며 이형성(dysplasia) 정도와 활성도가 관계가 있다고 보고하여 이 이론을 지지하고 있다. 한편 Mao 등<sup>42)</sup>이 병소 주위의 조직에서는 활성도를 보이지 않았다고 보고한데 반해, Curran 등<sup>13)</sup>은 처음으로 병소 주위의 조직학적 정상조직에서 telomerase 활성이 측정되었다고 보고하면서 국소적 재발과 연관 이 있을 가능성을 제시하였다. Patel 등<sup>43)</sup>은 인도에서의 구강암은 서양과는 다른 흡연습관, 즉 담배썩기, 반대흡연(reverse smoking)등으로 인해 특이한 분자생물학적 변이가 있을 것으로 추론하면서 전암병소와 병소주위의 정상구강상피에서 높은 telomerase 활성도가(각각 100%, 74%) 측정되었다고 보고하였는데 이는 field cancerization 이론에 입각하여 보았을 때 흡연습관이 다발성 암 기시부(multiple malignant foci)를 형성하였을 것으로 추측되었다.

### III. 재료 및 방법

#### 1. 재 료

1997년 8월 부터 2000년 4월까지 서울대학교병원 구강악안면외과에서 구강편평세포암으로 병리학적 확진된 27예를 대상으로 하였다. 양성대조군으로 Telomerase PCR ELISA kit<sup>®</sup>(Boeringer Mannheim, Germany)내에 들어있는 telomerase 양성으로 확인된 인간 태생 신장세포주 293(human embryonic kidney cell line 293)을 사용하였고 음성대조군은 RNAase로 처리한 조직을 사용하였다. 27예 중 술전 항암화학요법을 받은 증례는 총 4예였으며 4예 모두 5-fluorouracil과 cisplatin으로 3차례의 술전 항암화학요법을 받았으며 항암화학요법의 결과는 모두 부분반응(partial response)이었다. 병리학적 T병기에 따른 경부전이는 Table 2와 같으며, 부위, 연령 및 TNM 분류는 Table 3과 같다.

27예 모두 원발부위에서 수술직후 침윤종양단(invasive tumor front)으로 생각되는 조직을 채취한 후 생리식염수로 세척하여

혈액세포를 제거하고 액체질소로 급속냉각(shock freezed)한 다음 초저온냉장기(-80°C)에 보관하였다. 각기 일부를 hematoxylin-eosin 염색상에서 현미경으로 관찰하여 종양조직이 50% 이상인 것을 확인하였다. 한편 정상구강상피 18예는 구강내 소수술시 근처에서 염증이 없는 부위를 채취하였으며 연령분포를 보면 20대가 8명, 30대가 1명, 40대가 2명, 50대가 4명, 60대가 2명, 70대가 1명이었으며 평균 연령은 40.3세 였고 성별분포는 남자 9명, 여자 9명 이었다.

#### 2. 방 법

##### 1) 냉동보관된 조직에서 시편채취

미세절단기를 이용하여 냉동시편을 15 $\mu$ m의 크기로 절단한 후 15조각을 200 $\mu$ l의 ice-cold lysis buffer가 들어있는 소독된 튜브에 넣고 얼음에서 30분간 배양(incubation)하였다. 세포 용해질(cell lysate)을 2-8°C에서 16,000g로 20분간 원심분리한 후 조심스럽게 상층액의 175 $\mu$ l를 새로운 튜브에 옮겼다. BCA protein assay kit (Pierce Chemical Co., USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

##### 2) Telomeric repeat amplification protocol (TRAP)

각 튜브에 telomerase 기질(substrate), biotin-labeled P1-TS primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), P2 primer (3'-TCCCATTCCCAT TCCCATTCCC-5') 및 Taq polymerase 등이 함유된 반응혼합물 (reaction mixture) 25 $\mu$ l를 넣은 후 각기 총 단백질 양이 4 $\mu$ g 되도록 시편을 첨가하였다. 총 부피가 50 $\mu$ l가 되도록 소독된 DEPC(diethyl paracarbonate) water를 첨가하였다. 튜브 상층에 물 응집현상(water condensaton)을 막기 위해 mineral oil 20 $\mu$ l를 첨가하였다. GeneAmp 2400 thermal cycler(Perkin Elmer, USA)에 옮긴 후 Table 4와 같이 반응을 시행하였다.

##### 3) 보합결합(Hybridization)과 효소면역측정법(ELISA)

각 샘플에 20 $\mu$ l의 denaturation reagent (sodium hydroxide < 0.5%)를 넣은 후, 증합효소연쇄반응 산물(amplification product)을 5 $\mu$ l 넣고, 10분간 15-25°C에서 배양시켰다. 종말체에 상보적인 digoxigenin표지 소식자 (digoxigenin-labelled detection probe)를 함유한 hybridization mixture 225 $\mu$ l를 넣은후 흔들어(vortexing) 주었다. kit에서 공급한 streptavidin-coated MTP module에 100 $\mu$ l씩의 혼합물을 넣었고 2시간 동안 37°C에서 약 300rpm으로 진탕하면서 배양시켰다. Hybridization buffer를 완전히 제거한 후 washing buffer 250 $\mu$ l로 최소 30초 동안 3번씩 세척한 후 조심스럽게 washing buffer를 제거하였다.

Anit-DIG-POD working solution (Anti-DIG-peroxidase로 표지된 다세포균 항체: final concentration of 10mU/ml)을 100 $\mu$ l씩 넣고, MTP module을 덮개로 덮은 후 15-25°C에서 300rpm으로 흔들면서 30분간 배양하였다. well 안의 용액을 완전히 제거 후 250 $\mu$ l의 washing buffer로 5번씩 세척한 후 washing buffer를 완전히 제거하였다. TMB substrate (peroxidase substrate 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)용액을 100 $\mu$ l씩 첨가한 후 덮개를 덮고 15-25°C에서 발

색반응을 보기 위해 20분간 300rpm으로 흔들어 주면서 배양시켰다. 100 $\mu$ 의 stop reagent를 넣고 발색반응을 종료시켰으며 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 표본의 흡광도에서 음성대조군의 흡광도를 빼값이 0.2이상일 때 telomerase 활성도 양성인 것으로 판정하였다.

4) Silver staining을 이용한 Telomerase-mediated DNA ladder의 확인

TRAP 반응으로 얻어진 산물 20 $\mu$ 에 bromophenol과 xylenol을 함유한 loading dye를 섞었다. 12% non-denaturing polyacrylamide 겔을 이용한 통상의 전기영동을 실시하였다. 겔을 25% iso-propanol, 7% acetic acid에 고정후 70% periodic acid (w/v)에 넣어 5분간 산화(oxidized)시켰다. 산화된 겔을 15분간 8회 수세후 28ml의 0.1N NaOH, 1.25ml의 NH<sub>4</sub>OH, 5ml의 20% silver nitrate, 115ml의 증류수를 혼합한 염색액에서 10분간 염색하였고 다시 증류수에서 10분간 4회 수세하였다. 염색을 마친 겔을 50mg citric acid, 0.5ml의 37% formaldehyde를 함유한 250ml의 정착액에서 밴드가 명확히 나타날 때까지 5분내지 10분간 정착하였다.

5) 증식성세포핵항원 (PCNA)의 면역조직화학적 염색 및 지수 산출

파라핀 포매조직을 박절한 후 배양기에서 탈파라핀하고 100%, 95%, 75%의 에탄올로 함수시켰다. Peroxidase의 활성을 억제하기 위해 3% 과산화수소수로 처리한 후 Tris-buffer(0.05M Tris-HCl buffer, pH 7.4) 용액으로 세척하고 PCNA에 대한 일차 항체(Dako Co., USA)를 작용시켰다. Tris buffer 용액으로 세척하고 biotinylated linked antibody (LSAB kit, Dako Co., USA)에 작용시킨 후 Streptavidin-HRP (Dako Co., USA)로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Zymed Co.,USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색한 후 봉입하였으며 염색된 표본에서 400배 현미경으로 관찰하여 염색반응이 현저한 3개의 시야를 선정하여 사진을 찍은 후 현상하였다. PCNA에 대한 면역조직화학적 염색상에서 중앙세포의 핵이 갈색 내지 진한 적갈색을 보이는 경우를 양성으로 간주하였으며, 각 사진에서 총 중앙세포 중 면역학적 양성반응을 나타내는 세포를 백분율로 산출한 후 3개의 평균값을 구하여 각기 PCNA 지수를 구하였다.

6) 각종 임상병리학적 지표와 통계처리

각 환자의 나이, 성별, 발생부위, 술전 항암화학요법 투여여부를 정리하였다. 병리학적 TNM 분류는 American Joint Committee on Cancer<sup>40)</sup>의 기준을 적용하였고 조직학적 악성도는 Anneroth malignancy grading system<sup>40)</sup>을 이용하였는 바, H&E 이중 염색상에서 심층부에 침윤된 중앙세포의 각화정도, 핵의 다형성, 유사분열지수, 침윤양상, 침윤병기, 염증반응등의 6가지 변수를 각각의 정도에 따라 1~4점으로 측정하여 각각의 편평세포암종에서 총 6~24의 악성도 점수(malignancy score)를 얻었다(Table 1). 통계 처리는 unpaired t-test 와 Mann-Whitney U test를 사용하였고, 정상 구강상피군과 구강편평세포암종군간의 telomerase 양성율의 비

교를 위해 Chi-square test를 사용하였다. 또한 Anneroth 악성도 점수와 telomerase 활성도 간의 상관관계 및 PCNA 지수와 telomerase 활성도 간의 상관관계를 보기위해 Pearson correlation을 사용하였다.

IV. 결 과

정상구강상피 18예 중 5예에서 telomerase 양성반응을 보여 27.8%의 양성율을 보였으며, 양성반응을 보인 5예의 연령분포를 보면 20대에서 3예, 40대와 50대에서 각각 1예의 양성을 보였다. 표본수가 적어서 연령별 양성율의 비교가 어려웠으며 telomerase 평균값은 0.4855 $\pm$ 0.1117이었다. 구강편평세포암종에서는 27예 중 24예에서 양성반응을 보여 88.9%의 양성율을 보였으며, telomerase 평균값은 0.9793 $\pm$ 0.3428 이었다. 연령별 분포는 Table 3과 같다. Chi-square test와 t-test로 통계처리 했을 때 구강편평세포암종의 telomerase 양성율과 평균값이 정상구강상피보다 유의성있게 높았다 (p<0.05).

Anneroth 악성도점수 항목 중 유사분열지수(mitosis index)가 2.5이하인 군과 2.5초과의 군으로 나누었을 때 2.5초과 군의 telomerase 활성도가 유의성 있게 높았다(p<0.05)(Table 5). 침투깊이(depth of invasion) 항목점수가 2.5이하인 군과 2.5초과의 군으로 나누었을 때 2.5초과 군의 telomerase 활성도가 유의성 있게 높았다 (p<0.05)(Table 6). 그러나 전체 Anneroth 악성도점수와는 유의한 상관관계가 없었다 (p>0.05). 악성도점수가 15 이하인 군과, 15 초과인 군으로 나누어서 t-test를 실시하였을 때에도 유의한 차이가 없었다 (Table 7).

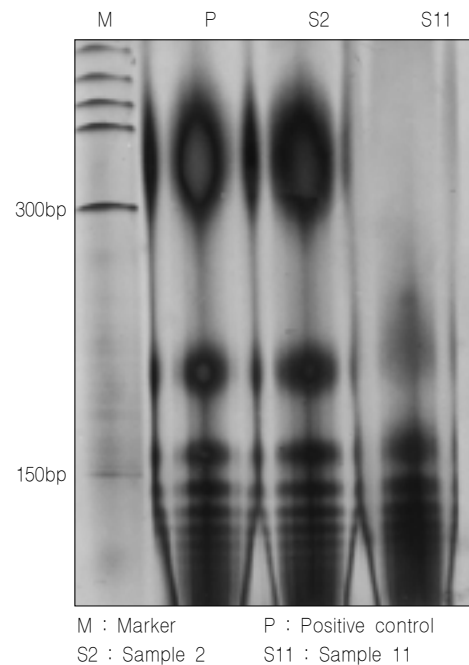
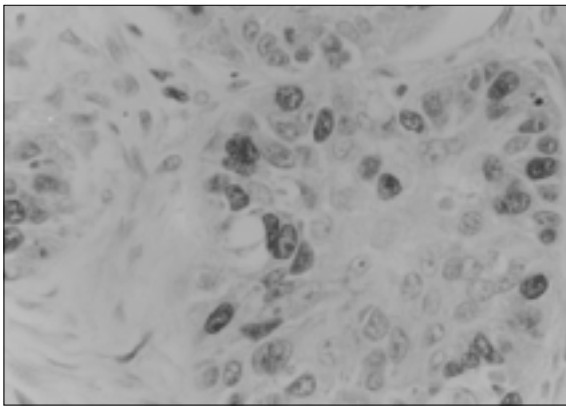
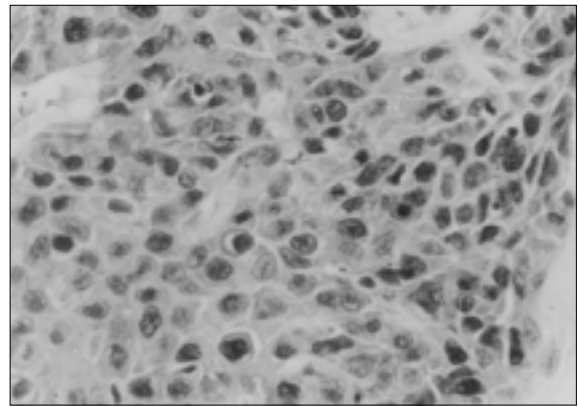


Fig. 1. Telomerase-mediated ladder. Typical 6-bp telomerase-mediated ladder was observed in telomerase-positive sample.



**Fig. 2.** PCNA stain in oral squamous cell carcinoma with PCNA index of 46.55 (x400) Brown stained positive reaction was noted not only in the tumor cells but also in the surrounding stromal tissue.



**Fig. 3.** PCNA stain in oral squamous cell carcinoma with PCNA index of 80.31 (x400) Dark brown stained positive reaction was noted.

**Table 1.** Anneroth malignancy grading system of oral squamous cell carcinoma

Morphologic parameter	points			
	1	2	3	4
Degree of keratinization	Highly keratinized (>50% of cells)	Moderately keratinized (20-50% of cells)	Minimal keratinization (5-20% of cells)	No keratinization (0-5% of cells)
Nuclear polymorphism	Little nuclear polymorphism (>75% mature cells)	Moderately abundant nuclear polymorphism (50-75% mature cells)	Abundant nuclear polymorphism (25-50% mature cells)	Extreme nuclear polymorphism (0-25% mature cells)
Number of mitoses / HPF	0-1	2-3	4-5	>5
Pattern of invasion	Pushing, well-delineated infiltrating borders	Infiltrating, solid cords, bands and/or strands	Small groups or cords of infiltrating cells( n>15)	Marked and wide-spread cellular dissociation in small groups of cells (n<15) and /or in single cells
Stage of invasion (depth)	Carcinoma in situ and /or questionable invasion	Distinct invasion, but involving lamina propria only	Invasion below lamina propria adjacent to muscles, salivary gland and periosteum	Extensive and deep invasion replacing most of stromal tissue and infiltrating jaw bone
Lympho-plasmacytic infiltration	Marked	Moderate	Slight	None

\* HPF = high power field

**Table 2.** Distribution of neck node metastasis according to pathologic T stage

	pT1	pT2	pT3	pT4	Total
No of cases	0/4	2/7	1/4	7/12	10/27

**Table 3.** Telomerase activity, Anneroth malignancy score and PCNA index in 27 cases of oral squamous cell carcinomas

Case	Age & Sex	Site	pT stage	pN stage	AMS	TA	PCNA index
1	58/F	Mn. gingiva	2	0	8.3	0.431	24.45
2	64/F	Mn. gingiva	4	0	15	1.329	78.42
3	63/F	Tongue	2	2b	11	0.941	5.32
4	55/M	Buccal cheek	1	0	9.5	negative	34.67
5	53/M	Tongue	2	0	13	negative	57.21
6	61/F	Mx. gingiva	4	2b	15	1.218	65.89
7	46/M	Mn. gingiva	4	0	11	1.235	28.52
8	71/M	Tongue	4	1	15.8	1.022	87.12
*9	58/M	Retromolar pad	4	2b	16.5	0.869	46.55
*10	64/M	Mx. gingiva	3	0	16.5	0.945	75.78
11	56/M	Buccal cheek	4	1	13.5	1.259	90.36
12	57/M	Palate	1	0	9	0.511	33.54
*13	68/M	Retromolar pad	4	2b	17.5	0.752	40.11
14	58/M	Mx. gingiva	4	0	11.5	1.401	78.99
15	56/F	Tongue	3	0	10.5	1.224	83.21
16	74/F	Mn. gingiva	1	0	7	0.357	23.67
17	37/M	Upper lip	1	0	16.5	0.452	45.56
18	73/M	Palate	4	0	11	negative	0
19	46/M	Mouth floor	2	0	14	0.899	35.85
20	63/F	Tongue	2	2c	17.5	0.826	45.44
21	52/M	Mx. gingiva	3	1	14.5	1.265	80.31
*22	55/F	Mx. gingiva	3	0	18	0.741	32.75
23	46/M	Mn. gingiva	2	0	10	0.841	54.35
24	50/M	Mn. gingiva	4	0	10.5	1.258	80.35
25	64/M	Tongue	2	0	17.5	0.751	51.24
26	59/M	Palate	4	2b	14	1.324	77.34
27	53/M	Mouth floor	4	3	18.5	1.653	92.13

\*: Patients who had undergone pre-operative chemotherapy

Abbreviation : Mx : Maxilla    Mn : Mandible    pT stage : pathologic T stage  
 pN stage : pathologic N stage    AMS : Anneroth malignancy score  
 TA : telomerase activity    PCNA : proliferating cell nuclear antigen

**Table 4.** Protocol of combined primer elongation/amplification reaction

Step	Time	Temperature	Cycle number
Primer elongation	20 min	25°C	1
Telomerase inactivation	10 min	94°C	1
Amplification			30
denaturation	30 sec	94°C	
annealing	30 sec	50°C	
polymerization	90 sec	72°C	
	10 min	72°C	1
Hold		4°C	

**Table 5.** Correlation between mitosis index(MI) and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
Low MI Group	12	0.6976	0.2036
High MI Group	12	1.2610	0.1765

Low MI: MI ≤ 2.5 High MI: MI > 2.5

**Table 6.** Correlation between depth of invasion(DI) and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
Low DI Group	6	0.5572	0.1936
High DI Group	18	1.120	0.2533

Low DI: DI ≤ 2.5 High DI: DI > 2.5

**Table 7.** Correlation between Anneroth malignancy score and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
High AMS Group	9	0.9598	0.3326
Low AMS Group	15	0.9958	0.3640

\* AMS: Anneroth malignancy score

**Table 8.** Correlation between pathologic T stage and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
T1/ T2 Group	9	0.6677	0.2274
T3/ T4 Group	15	1.1663	0.2523

**Table 9.** Correlation between pathologic N stage and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
N- Group	7	1.162	0.234
N+ Group	8	1.170	0.283

\*N-: pathologic node negative N+: pathologic node positive

**Table 10.** Correlation between pre-operative chemotherapy and telomerase activity

	n	mean	Standard deviation
POCT + Group	4	0.8268	0.0978
POCT - Group	11	1.2898	0.1529

\* POCT: pre-operative chemotherapy

TRAP 산물을 전기영동시킨 후 silver staining 했을 때 전형적인 telomerase-mediated ladder를 확인 할 수 있었다 (Fig. 1).

구강편평세포암종 27예 중 26예에서 증식성세포핵항원에 대한 양성염색상을 보였는데 연갈색에서 적갈색까지 다양한 염색상을 보였으며 일부에서는 간질세포에서도 양성염색상을 보였다(Fig. 2, 3). 증례 18의 경우 아주 연한 갈색으로 염색되어 음성염색상을 나타낸 것으로 판정하였다. 증식성세포핵항원지수는 5.32에서 92.13까지의 분포를 보였으며 평균값은 53.67 ± 26.46이었고(Table 3), Pearson Correlation으로 통계처리 했을 때 telomerase 활성도와 유의성 있는 상관관계를 보였다(p<0.05).

병리학적 병기를 T1/T2군과 T3/T4군으로 분류하였을 때 T3/T4군에서 telomerase 활성도가 유의성 있게 높았다(p<0.01) (Table 8). T병기에 따라 경부전이의 차이가 있기 때문에 T3/T4 환자군 내에서만 통계처리 하였는 바, 경부전이 음성군과 양성군으로 나누었을 때, 각 군간 telomerase 활성도는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (p> 0.05) (Table 9). 술전 항암화학요법을 받은 경우, 모두 T3/T4 환자군에 속하므로 이 환자군 안에서 술전 항암제치료군과 술전에 항암제치료를 하지 않은 군으로 나누었을 때, 술전 항암제치료군의 telomerase 활성도가 유의성 있게 낮았다 (p<0.05) (Table 10).



## V. 총괄 및 고찰

편평상피의 세포 교체율(turnover rate)은 매우 높으며 기저세포(basal cell)의 끊임없는 분열은 세포소실을 보상한다. 재생상피(regenerative epithelium)에는 간세포(stem cell)가 존재하는 것으로 생각되고 있으며<sup>46)</sup> 정상상피에서의 약한 telomerase 활성도는 실제로 간세포로부터 유래되는 것으로 추론되고 있다. 본 연구에서는 정상구강상피에서 27.8%의 telomerase 양성율을 보였는데 이에 관해 Liao 등<sup>47)</sup>은 38.5%, Curran 등<sup>13)</sup>은 35%의 양성율을 보고 하였으며 Patel 등<sup>48)</sup>은 74%의 훨씬 높은 양성율을 보고한 바 있다. 그러나 이에 반해 형광발색(fluorescence)을 이용한 방법을 사용한 Sumida 등,<sup>29)</sup>과 Mao 등<sup>42)</sup>은 정상구강상피에서 telomerase 활성이 보이지 않았다고 보고하였다. 이러한 다양한 결과는 실험 방법의 예민도, 조직채취 부위, 채취조직의 염증도와 관계있을 것으로 생각되며 Patel 등<sup>43)</sup>의 주장처럼 field cancerization과도 관계있을 것으로 사료된다. 또한 Matsui 등<sup>49)</sup>은 연령의 증가에 따라서 telomerase 활성이 감소되는 것으로 보고하고 있어서 부위별, 연령별에 따른 세분화된 연구가 필요하다고 하겠다. 본 연구에서는 telomerase 양성을 보인 5예중 3예가 20대의 환자였으며 40대에서 1예, 50대에서 1예가 양성을 보였다.

본 연구에서 구강편평세포암종의 88.9%에서 telomerase 양성도가 관찰되었는데 구강편평세포암종에서 Curran 등<sup>13)</sup>은 90%, Mutirangura 등<sup>41)</sup>은 87.5%, Mao 등<sup>42)</sup>은 90%, Patel 등<sup>43)</sup>은 80%의 양성도를 각기 보고한 바 있다. 문헌에 따라 약간의 차이가 있기는 하지만 대체로 전체 종양의 평균양성도 약 80%보다 높을 뿐 아니라, 간엽성종양이 약 50%정도의 양성도를 보인다는 사실에 비추어 보면, 구강편평세포암에서 telomerase의 활성도가 종양을 유지하는데 중요한 기전이라는 것을 의미하며, 비록 본 연구에서 경부전이를 예측하는 지표로서의 가능성을 입증하는데는 실패했지만 앞으로 telomerase 활성도를 진단인자 또는 예후인자로서 활용하는데 조직학적으로 다른 타종양보다 유리할 수 있음을 암시한다고 할 수 있다. 한편 종양에서 telomerase 음성도를 보이는 원인에 대해서 몇 가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째로 조직 수집과정에서의 문제점이 있을 수 있다. Telomerase는 반감기가 체내(in vivo)상태에서 20시간 이상인 아주 안정적인 효소이지만<sup>40)</sup> 조직 수집 과정에서 RNA template의 손상이 있을 수 있다. 둘째로 악성종양에 존재하는 Taq polymerase inhibitor(PCR inhibitor)로 인해 가음성이 나타날 수 있다<sup>50)</sup>. 셋째로, 종양이 ALT 기전에 의존할 가능성을 생각해 볼 수 있다. 최근 들어 내부기준자(internal standard)의 도입과 실험예민도의 향상으로 가음성의 가능성이 현저히 줄어들었다는 사실과 문헌간 비슷한 음성율이 보고되고 있다는 것을 고려하면 구강편평세포암종에 있어서 telomerase 음성도는 대부분 ALT 기전으로 인한 것이라고 추론 할 수 있다.

본 연구에서 telomerase 활성도의 양성율과 평균값이 정상구강상피와 구강편평세포암종간에 유의성있는 차이를 보임으로서 telomerase 활성도는 구강편평세포암의 진단지표로서 활용될 수 있다고 판단된다. 또한 각 환자간 정상구강상피에서의 활성도

차이가 크므로 구강편평세포암의 연구에서도 Shoji 등<sup>7)</sup>이 제안한 telomerase index(암종조직의 telomerase 활성도 값에서 주위 정상조직의 활성도값을 뺀 후 log를 취함)의 개념이 도입되어야 할 것으로 생각되었으며, 많은 증례의 분석을 통해 정상구강상피, 전암병소, 구강편평세포암을 구별할 수 있는 기준값(cut-off value)을 확립해야 할 것으로 생각되었다.

Sumida 등<sup>29)</sup>은 정상구강상피에서 telomerase 활성도는 관찰되지 않았지만 33%에서 약한 hTERT-mRNA의 발현을 보였다고 하면서 구강편평세포암의 진단인자로서 telomerase 활성도보다 더 예민한 진단지표임을 제시하였다. 본 연구의 경우 중합효소연쇄반응법과 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 반정량적인 방법을 사용하였는데 구강병소의 경우 박테리아나 치태, 혈액, 침 등으로 인한 시편의 오염으로 잘못된 결과를 가져올 가능성이 많으므로 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법(real time RT-PCR)을 이용하여 hTERT-mRNA의 발현을 측정하면 좀더 정량적이고 정확한 연구가 이루어 지리라고 사료되었다. 특히 임파절의 미세전이를 진단하는 경우 많은 시간과 노력이 드는데 비해 TaqMan™ PCR 기계(Perkin Elmer, USA)를 이용하여 정량적으로 hTERT-mRNA를 측정하면 미세전이의 진단에 많은 발전을 가져올 수 있을 것으로 기대된다<sup>51,52)</sup>.

한편 telomerase 활성도가 종양발생(tumorigenesis)에 얼마나 관여 하는지에 대해 많은 논란이 있어왔다. 그러나 1999년에 nature genetics에 발표된 2개의 논문에 의해 telomerase에 의해 유도된 불멸화는 종양발생을 유도하지 않음이 밝혀졌다. Jiang 등<sup>53)</sup>은 정상형질을 가진 인간피부 섬유아세포에서 hTERT를 과발현(overexpression) 시켰는데, 이 세포들은 분열 방주사 억제제(mitotic spindle inhibitor)가 첨가된 배지에서 분열을 멈추었고 정상적인 접촉 억제(contact inhibition)를 보였다. 또한 nude mice의 피하조직에 주입했을 때 종양을 형성하지 않았다. 또한 Morales 등<sup>54)</sup>도 비슷한 결론을 얻었으며, 일반적으로 h-ras 발현만으로도, 배양된 인간 섬유아세포에서 세포노화를 유도하는 것으로 알려져 있는데, telomerase 발현세포는 이러한 h-ras 발현하에서 정상세포처럼 세포노화를 일으켰다. 이는 종말체에 의존하지 않는 세포노화기전이 존재함을 의미한다. Hahn 등<sup>55)</sup>은 비활성형태의 hTERT를 암세포에 주입하였더니 telomerase 활성이 없어졌으며 세포의 분열이 끝나고 세포고사(apoptosis)에 빠졌다고 보고하면서 암종의 유지에 telomerase 활성이 필수적임을 주장했다. 이러한 최근의 실험 결과를 종합해보면 telomerase의 발현은 암의 기시(initiation)에는 관여하지는 않지만 암종이 진행됨에 따라 telomerase 발현군이 생존에 더 유리하므로 이른바 클론선택(clonal selection) 또는 클론확장(clonal expansion)의 과정을 통해 숫적 우위를 점하게 되는 것으로 추론될 수 있다<sup>56,57)</sup>. 본 실험의 결과에서도 병리학적 T 병기에 따라 유의성 있는 telomerase 활성도의 증가가 있었는데 이는 Hoos 등<sup>6)</sup> 및 Curran 등<sup>13)</sup>의 결과와 일치 하며 진행된 구강편평세포암에서 요즈음 연구중인 telomerase 방해자(telomerase inhibitor)가 전보조화학요법(neoadjuvant chemotherapy)의 한 형태로서 효과적인 치료전략이 될 수 있음을 의미한다고 하겠다. 또한 본 연구결과에서 술전 항암제 치료를 받은 군에서 유의성

있게 낮은 telomerase 활성을 보였는데 이것은 항암제가 주로 telomerase 활성을 가진 클론을 공격 했다고 볼 수있으며 Hoos 등<sup>6)</sup>의 결과와 일치한다. 본 증례에서 사용되었던 5-Fluorouracil은 S 세포주기(S phase)에 작용하는 항대사물질로서 증식력이 높은 세포군을 공격하므로, telomerase 활성도가 높은 클론이 증식력이 높다는 것을 반증한다 하겠다. 본 연구의 증례는 술전 항암화학요법을 시행받은 후 4에 모두 부분반응(partial response)을 보였는데 앞으로 항암화학요법의 평가를 완전소멸(complete remission), 부분반응(partial response), 무반응(non-response)으로 나눈 다음 술전 및 술후 telomerase 활성도 변화와의 상관관계를 입증한다면, telomerase 활성도 측정이 항암효과의 평가에 이용될 수 있다고 판단되었다.

증식성세포핵항원(PCNA)은 36kDa의 핵단백으로서 PCNA의 분포와 발현은 DNA 합성과 세포증식과 연관되어 있어서 세포 증식에 대한 연구에서 중요한 지표이다. PCNA는 세포주기 중 G1,G2,M기에 소량이 나타나며 G1 후기에 합성이 증가하기 시작하여 S기의 중기내지 말기에 최대치에 도달하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCNA 지수가 5.32에서 92.13까지 다양하게 나타났으며, 평균지수는  $53.67 \pm 26.46$ 로 Tsuji 등<sup>58)</sup>의 결과( $43.9 \pm 3.3$ ) 및 이와 유<sup>5)</sup>의 결과( $41.49 \pm 2.51$ )와 비슷하나 문헌간 차이가 많았다. 또한 본 연구에서 PCNA 지수와 telomerase 활성도간의 유의한 상관관계가 있었는데 Funakoshi 등<sup>59)</sup> 및 Yokoyama 등<sup>60)</sup>의 결과와 일치하나 Okusa 등<sup>61)</sup>의 결과와는 다르다. 본 연구의 이러한 결과는 Telomerase 활성도가 암종의 기시(initiation)보다는 세포의 증식력과 밀접한 관계가 있다는 많은 저자들<sup>53,57)</sup>의 의견을 뒷받침 한다고 하겠으며, 논란이 있으나 세포증식성지표들이 종양의 악성도와 상관관계가 있다는 보고가 있으므로 telomerase 활성도가 종양의 예후지표가 될 수 있는 가능성을 간접적으로 시사한다고 할 수 있다. 한편 Liao 등<sup>47)</sup>은 구강편평세포암에서 Ki-67 지수와 telomerase 활성도간의 유의성있는 상관관계를 보고하였다.

Telomerase 활성도와 종양의 예후와 연관시키려는 시도가 이루어지고 있는데 예를 들어 비교적 예후가 좋은 것으로 알려진 수막종(meningioma)의 경우 재발과 활성도간의 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다<sup>62)</sup>. 신경모세포종(neuroblastoma), 백혈병(leukemia), 유방암, 위장관암중에서도 높은 telomerase 활성도와 나쁜 예후간의 상관관계가 있는 것으로 보고 되고 있다<sup>63,64)</sup>. 특히 telomerase 활성도가 없거나 아주 낮은 stage 4s 신경모세포종의 경우 종양이 저절로 퇴행되는 것으로 보고되고 있어 종말체를 유지 할 수 없을 정도의 낮은 telomerase 활성도는 좋은 예후와 관련이 있다는 것을 의미하였다<sup>65)</sup>. Schneider-Stock 등<sup>66)</sup>도 연조직의 육종에서 telomerase 활성도가 예후와 연관이 있음을 주장하였다. 그러나 이에 반하여 Savre-Train 등<sup>67)</sup>은 종양세포주(tumor-derived cell line)의 연구에서 telomerase의 활성도가 주기적으로 발현함을 보고하였는데 이는 활성도가 예후인자가 되기 어려움 의미하는 것이다. 두경부 편평세포암중에서는 Thumher 등<sup>10)</sup>이 경부전이와 높은 telomerase 활성도와 관계있음을 보고한 바 있으나 표본수가 작고 T 병기에 따른 경부전이를

연구한 것이 아니라 단순히 경부전이 음성군과 양성군의 telomerase의 활성도를 비교한것이어서 신뢰도가 떨어진다고 생각되었다. 본 연구에서는 경부전이와의 유의성 있는 상관관계를 입증할 수 없었는데, 본 연구의 증례수가 작고, 구강편평세포암의 경우 성별, 나이, 원발부위에 따라 경부 전이율의 많은 차이가 있음<sup>68)</sup> 생각할 때 많은 증례를 대상으로한 세분화된 연구가 필요하다고 생각되었다.

Shoji 등<sup>7)</sup>은 결장직장암(colorectal carcinoma)에서 telomerase 지수와 종양의 혈관침범(venous invasion)은 높은 상관 관계가 있었으며 간으로의 전이와도 상관관계가 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 Anneroth 악성도점수 항목 중 유사분열지수와 침투깊이가 telomerase 활성도와 유의한 상관관계가 있었는데, 종양의 표면적경보다 종양의 두께(tumor thickness)가 더 중요한 예후지표임을 감안할 때<sup>69)</sup> 이 결과는 제한적이거나 telomerase 활성도가 종양의 악성도를 예측하는 데 도움을 줄 수 있는 지표라고 생각되었다. 한편 Anneroth 악성도점수 항목 중에 염증반응이 있는데 염증이 심할수록 숙주의 저항(defense mechanism)이 강한 것으로 해석하여 악성도점수가 낮아지는데 반해, telomerase 활성도의 측정에 있어서는 순수한 종양조직 주위의 많은 임파구의 활성으로 인해 오히려 활성도가 증가하여 서로 상반되는 결과를 가져오게 되므로 전체 악성도점수와 유의한 상관관계를 떨어뜨리는 한 원인이 되었다고 생각되었다. 또한 구강편평세포암은 클론 이질성(clonal heterogeneity)이 심하기 때문에 적어도 침윤종양단(invasive tumor front)의 3군데서 telomerase의 활성도가 측정되었어야 했다는 점에서 앞으로 전향적(prospective)인 연구가 필요하다 하겠다.

## VI. 결 론

본 연구는 구강 편평세포암중에서 telomerase 활성도의 임상적 연관성을 알아보고자, 정상구강상피 18예와 구강편평세포암중으로 확진된 27예에서 Telomerase PCR ELISA kit<sup>®</sup>(Boeringer Mannheim, Germany)를 이용한 반정량적(semi-quantitative) 방법으로 telomerase 활성도를 측정하고 이것의 임상병리학적 지표와의 연관성을 조사하였으며, 증식성 세포핵항원 지수(proliferating cell nuclear antigen index, PCNA index)와의 연관성도 함께 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Telomerase 양성율은 정상구강상피에서 27.8% (5/18), 구강편평세포암중에서 88.9% (24/27)였으며 평균값은 각각  $0.4855 \pm 0.1117$ ,  $0.9793 \pm 0.3428$ 이었다. 구강편평세포암중의 telomerase 양성율과 평균값이 정상구강상피보다 유의성있게 높았다 ( $p < 0.05$ ).
2. Anneroth 악성도점수 항목 중 유사분열지수(mitosis index)와 침투깊이(depth of invasion)가 telomerase 활성도와 유의한 상관관계가 있었으며 ( $p < 0.05$ ), 전체 Anneroth 악성도점수와는 유의한 상관관계가 없었다 ( $p > 0.05$ ).
3. 구강편평세포암중 27예 중 26예에서 증식성세포핵항원에 대한 양성 염색상을 보였으며 증식성 세포핵항원 지수의 평균

값은  $53.67 \pm 26.46$ 이었고, telomerase 활성도와 유의성 있는 상관관계를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

4. 병리학적 병기를 T1/T2군과 T3/T4군으로 분류하였을 때 T3/T4군에서 telomerase 활성도가 유의성 있게 높았으며 ( $p < 0.01$ ), T3/T4 환자군을 병리학적으로 경부전이 음성군과 양성군으로 나누었을 때, 각 군간 telomerase 활성도는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 ( $p > 0.05$ ). 또한 T3/T4 환자군내에서 술전 항암제치료군과 술전에 항암제치료를 하지 않은 군으로 나누었을 때, 술전 항암제치료군의 telomerase 활성도가 유의성 있게 낮았다 ( $p < 0.05$ ).

이상의 결과를 종합해 볼 때, 구강편평세포암에서 telomerase 활성도는 진단지표로 활용될 수 있는 가능성을 보여 주었으며 또한 증양의 악성도를 예측하는데 있어서 보조적 지표로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

### 참고문헌

- Deleyiannis FWB, Weymuller Jr EA: Quality of life in patients with head and neck cancer. In Myers EN, Suen JY: Cancer of the head and neck. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1996, 904-916.
- Califano J, Van der Reit P, Westra W: Genetic progression model for head and neck cancer: implication for field cancerization. *Cancer Res* 21:2488-2492, 1996.
- Artandi SE, DePinho RA: A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 10:39-46, 2000
- Brennan JS, Mao L, Hruban R : Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332:429-435, 1995.
- 이진환, 유선열 : 구강 편평세포암종에서 p53 단백질과 증식성 세포핵항원 발현에 대한 면역조직화학적 연구. *대한구강악안면외과 학회지* 24:411-420, 1998.
- Hoos A, Hepp HH , Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D: Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* 79:8-12, 1998.
- Shoji Y, Yoshinaga K, Inoue A, Iwasaki A, Sugihara K: Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 88(6): 1304-1309, 2000.
- Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E: High telomerase activity in primary lung cancer: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 89:1609-15, 1997.
- Nawaz S, Hashizumi TL, Markham NE, Shroyer AL, Shroyer KR: Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastasis. *Am J Clin Pathol* 107:542-547, 1997.
- Thurnher D, Knerer B, Formanek M, Kornfehl JI: Non-radioactive semiquantitative testing for expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour. *Acta Otolaryngol* 118:423-427, 1998.
- McGuirt WF Jr, Johnson JT, Myers EN, Rothfield R, Wagner R : Floor of mouth carcinoma: the management of the clinically negative neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:278-282, 1995.
- Woolgar JA: Pathology of the N0 neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37:205-209, 1999.
- Curran AJ, St Denis K, Irish J, Gullane PJ, MacMillan C, Kamel-Reid S: Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:784-788, 1998 .
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E: New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 18:43-437, 1989.
- Blackburn EH, Gall JG: A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120:33-53, 1978.
- Greider CW: Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65:337-36, 1996.
- van Steensel B, de Lange T: Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385:740-743, 1997.
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T: TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusion. *Cell* 92 : 401-413, 1998.
- Cooke HU, Smith BA: Variability at the telomeres of human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1:213-219, 1986.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW: Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature* 345: 458-460, 1990.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC: Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346: 866-868, 1990.
- Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW: Telomerase, cell immortality and cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 59:307-315, 1994.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW: Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11(5): 1921-1929, 1992.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C , Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE: Extension of life span by introduction of telomerase into normal cells. *Science* 279: 349-352, 1998.
- Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-413, 1985.
- Greider CW, Blackburn EH: A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337, 1989.
- Kilan A, Bowtell DDL, Abud HE, Hime GR, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA: Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6:2011-2019, 1997.
- Greider CW: Telomeres and senescence: The history, the experiment, the future. *Curr Biol* 8:R178, 1998.
- Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K, Sugita A, Tanioka H, Ueda N: Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions. *Int J Cancer* 80:1-4, 1999.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L: Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8:177-180, 1998.
- Shay JW, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787-791, 1997.
- Yan P, Coindre JM, Benhattar J, Bosman FT, Guillou L: Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. *Cancer Res* 59:3166-3170, 1999.
- Bryan TM, Englezou A , Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR: Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 4240-4248, 1995.
- Bryan TM, Engezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR: Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3:1271-1274, 1997.
- Nakamura TM, Cooper JP, Cech TR : Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* 282:493-496, 1998.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2014, 1994.
- Wright WE, Shay JW, Peatyszek MA: Modification of telomeric repeat amplification protocol results in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res* 23: 3794-3795, 1995.

38. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K, Ebihara Y, Kato H, Wright WE, Shay JW: Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* 57: 2100-2103, 1997.
39. Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM, Virmani AK, Brown D, Shay JW, Gazdar AF: Expression of telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant nodes. *J Clin Pathol* 50: 110-117, 1997.
40. Shay JW: Telomerase in cancer: Diagnostic, prognostic, and Therapeutic implication. *Cancer J Sci Am May4 suppl* 1 S26-34, 1998.
41. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekanan S : Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56:353, 1996.
42. Mao L, El-Naggar AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S: Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 56:5600-5604, 1996.
43. Patel MM, Patel DD, Parekh LJ, Raval GN, Rawal RM, Bhatavdekar JM, Patel BP, Patel PS: Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer. *Oral Oncol* 35: 510-515, 1999.
44. American Joint Committee on Cancer: Manual for staging of cancer, 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1992.
45. Anneroth G, Batsakis J, Luna M: Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scan J Res* 95: 229-249, 1987.
46. Williams ED, Lowes AP, Williams D, Williams GT: A stem cell niche theory of intestinal crypt maintenance based on a study of somatic mutation on colonic mucosa. *Am J Pathol* 141:773-776, 1992.
47. Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M: Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol* 36(4):347-52, 2000.
48. Matsui M, Miyasaka J, Hamada K, Ogawa Y, Hiramoto M, Fujimori R, Aioi A: Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *J Dermatol Sci* 22(2):80-87, 2000.
49. Holt SE, Aisner DL, Shay JW, Wright WE: Lack of cell cycle regulation of telomerase activity in human cells. *Proc Nat Acad Sci* 94:10687-10692, 1997.
50. Kyo S, Kunimi K, Uchibayashi T, Namiki M, Inoue M: Telomerase activity in human urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 107:555-560, 1997.
51. Sumida T, Hamakawa H, Kayahara H, Zen H, Sogawa K, Tanioka H, Ueda N: Clinical usefulness of telomerase assay for the detection of lymph node metastasis in patients with oral malignancy. *Arch Pathol Lab Med* 124:398-400, 2000.
52. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Furuya D, Kobayashi D, Hirata K, Watanabe N: Establishment of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays for human telomerase-associated genes. *Clinica Chimica Acta* 290:17-127, 2000.
53. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP: Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21: 111-114, 1999.
54. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW: Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21: 115-118, 1999.
55. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinber RA: Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5: 1164-1170, 1999.
56. David G: Telomerase expression and cancer: a controversy finally put to rest? *Clin Genet* 55:305-308, 1999.
57. Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, Reznikoff CA: Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13677-13682, 1997.
58. Tsuji T, Miura Y, Wen S, Li X, Kanekawa K, Sasaki F, Shinozaki F: The clinical significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 24:221, 1995.
59. Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Doi K : Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 37(2):177-83, 2000.
60. Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Niwa K, Tamaya T: Telomerase activity in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 4(2):173-7, 1998.
61. Okusa Y, Shinomiya N, Ichikura T, Mochizuki H: Correlation between telomerase activity and DNA ploidy in gastric cancer. *Oncology* 55(3):258-64, 1998.
62. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC Jr, Wright WE, Shay JW: Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28:416-420, 1997.
63. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Iwama H. : Clinical implication of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 2:7999-8031, 1996.
64. Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW: Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 89:1874-1881, 1997.
65. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Yokohama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW: Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1(3):249-255, 1995.
66. Schneider-Stock R, Rys J, Jaeger V, Niezabitowski A, Kruczak A, Sokolowski A, Roessner A : Prognostic significance of telomerase activity in soft tissue sarcomas. *Int J Oncol* 15:775-780, 1999.
67. Savre-Train I, Gollahon LS, Holt SE: Clonal heterogeneity in telomerase activity and telomere length in tumor-derived cell lines. *P.S.E.B.M.* 223:379-388, 2000.
68. Woolgar JA: Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/ oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37:175-180, 1999.
69. Woolgar JA: T2 carcinoma of the tongue: the histopathologist's perspective. *Br J Oral Maxillofac Surg* 37:187-193, 1999.