

구강편평세포암종에서  
예후 표지인자로서의 HuR과 BIRC2 발현

연세대학교 대학원  
치 의 학 과  
김 희 경

구강편평세포암종에서  
예후 표지인자로서의 HuR과 BIRC2 발현

지도 차 인 호 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2009년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 희 경

# 김희경의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2009년 12월 일

## 감사의 글

논문을 마무리하고 감사의 글을 쓰는 지금 이 순간이 참으로 기쁩니다. 이 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 세심한 배려를 해주신 차인호 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 예리한 지적으로 논문의 짜임새를 더해주신 박광균 교수님, 김진 교수님, 김형준 교수님, 남옹 교수님께 감사드리며, 관심과 격려를 보여주신 이충국 교수님, 박형식 교수님 이하 구강악안면외과 의국원 여러분에게도 감사드립니다. 항상 많은 의문들을 함께 고민하면서 일깨워준 차정단 박사님, 이생금 박사님에게도 깊은 감사를 드립니다. 특별히 후배 김현실 교수가 보여준 마음과 배려에 무한한 고마움을 표현하고 싶습니다.

대학원에 입학하는 것이 좋겠다는 아버지의 적극적인 권유가 없으셨다면 아마도 이 논문은 없었으리라는 생각이 듭니다. 아버님께 깊이 감사를 드립니다. 그리고 지금의 이 기쁜 시간을 맞을 수 있도록 따뜻한 사랑으로 끊임없이 배려해준 남편 정의방과 내게 너무나도 소중한 딸 연재에게 마르지 않을 사랑과 고마움으로 이 논문을 바칩니다.

# 차 례

그림 차례 .....	iii
표 차례 .....	iv
국문요약 .....	v
I . 서론 .....	1
II. 연구재료 및 방법 .....	4
1. 연구재료 .....	4
2. 연구대상 .....	4
3. 연구방법 .....	6
1) 세포배양 .....	6
2) 단백질 추출 .....	7
3) 웨스턴 블럿 .....	8
4) 면역조직화학적 염색 .....	8
5) 면역조직화학적 분석 .....	11
6) 통계학적 분석 .....	11
7) Leptomyycin B 처리 .....	11
8) HuR siRNA 처리 .....	12
III. 연구결과 .....	13
1. HuR단백질의 세포질내 발현과 BIRC2단백질의 발현 .....	13
2. HuR단백질의 세포질내 발현과 임상병리학적 요소 간의 관련성 .....	15
3. BIRC2단백질의 발현과 임상병리학적 요소 간의 관련성 .....	17

4. 생존율 분석 .....	19
5. HuR단백질의 세포질내 발현과 BIRC2단백질의 발현 간의 관련성 .....	23
IV. 고찰 .....	25
V. 결론 .....	28
참고문헌 .....	30
Abstract .....	40

## 그림 차례

Figure 1. Immunohistochemical staining of the human embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR. ....	9
Figure 2. Immunohistochemical staining of BIRC2 .....	10
Figure 3. Expression of the human embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR and BIRC2 is illustrated in human oral cancer cell lines, normal and OSCC tissues. ....	14
Figure 4. Kaplan-Meier survival plot for histological grade( $p<0.050$ ), clinical stage( $p<0.121$ ), cytoplasmic HuR( $p<0.566$ ), and BIRC2( $p<0.154$ ). ....	21
Figure 5. Effect of LMB and HuR small interfering RNA (siRNA) on expression of BIRC2 protein in oral cancer cell lines. ....	24

## 표 차례

Table 1. Characteristics of oral cancer cell lines .....	4
Table 2. Characteristics of 95 patients with oral squamous cell carcinoma .....	5
Table 3. Expression of cytoplasmic HuR and BIRC2 in oral squamous cell carcinomas. ....	15
Table 4. Association of cytoplasmic HuR expression with clinicopathologic variables in 95 patients with oral squamous cell carcinoma. ....	16
Table 5. Association of BIRC2 expression with clinicopathologic variables in 95 patients with oral squamous cell carcinoma. ....	18
Table 6. Univariate survival analysis (Cox regression model) for overall survival of 95 patients with oral squamous cell carcinoma. ....	20
Table 7. Multivariate survival analysis (Cox regression model) for overall survival of 95 patients with oral squamous cell carcinoma. ....	22
Table 8. Association of cytoplasmic HuR expression with BIRC2 expression in 95 patients with oral squamous cell carcinoma. ....	23

# 국문요약

## 구강편평세포암종에서 예후 표지인자로서의 HuR과 BIRC2 발현

**연구배경 :** 구강편평세포암종은 세포의 증식, 분화 및 사멸을 조절하는 데에 중요한 역할을 하는 유전자가 담배, 술, 구강위생, 바이러스 등의 환경적 요인과 복합적으로 작용하여 발생되는 돌연변이들이 축적되어 발병되며, 암화과정(carcinogenesis)에서 암유전자, 종양억제유전자, 사이토카인, 성장인자 등이 중요한 역할을 할 것이라는 보고들이 있다. 이러한 암화인자들의 mRNA 반감기는 약5-30분 이내로 비교적 짧아서, mRNA의 안정성 여부가 구강편평세포암종의 발생에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다.

mRNA 3'UTR 영역의 AU-rich element(ARE)와 결합하여 mRNA를 안정화시키는 HuR은 세포의 성장, 분화, 대사, 이동, 노화와 관련된 유전자들의 조절인자로서, 주로 핵에 분포되어 있다가 핵내 존재하는 ARE를 포함하고 있는 mRNA에 결합해서 세포질내로 이동하여 mRNA의 파괴를 억제하는 것으로 생각되고 있다. 세포질에서의 HuR 발현은 만성염증, 심혈관계 질환, 임 등의 발병과 밀접하게 관련되어 있고, 특히 암세포의 세포질에서 특징적으로 과발현된다. 현재 악성뇌종양, 난소암, 대장암, 유방암, 폐암, 위암 그리고 두경부암과 관련하여서도 악성 타액선종양, 두경부 편평세포암종에서 HuR이 세포질에서 과발현된다고 보고되고 있다. 또한, 세포사멸을 억제하는 BIRC2의 mRNA 3'UTR 영역에도 제 1형의 ARE가 많이 존재하는 것으로 알려져 있고, 간암, 폐암, 구강암, 속질모세포종(medulloblastoma), 아교모세포종(glioblastoma), 췌장암 등과 같은 많은 암에서 BIRC2의 DNA 증폭(amplification)과 같은 변이가 관찰된다는 보고가 있다.

본 연구의 목적은 구강암 세포주와 한국인의 구강편평세포암종 조직에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 확인하고, 구강암 환자의 임상 병리학적 요소 및 생존율을 관찰하여 구강암의 예후인자로서의 가능성을 알아보

고자 한다. 또한, 구강편평세포암종 조직의 면역조직화학적 분석과 구강암 세포주를 이용한 실험을 통하여 두 단백질 발현의 상호관련성을 알아보고자 한다.

**연구재료 및 방법** : 구강암 세포주 HSC-2, HSC-3, Ca9-22, YD-9, YD-10B, YD-32, YD-38, 그리고 1994년 1월부터 2002년 12월까지 9년 동안 연세대학교 치과대학병원 구강악안면외과에서 원발성 구강편평세포암종으로 수술한 환자 95명을 대상으로 하였다. 첫째, 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 확인하기 위하여, 구강암 세포주는 웨스턴 블러트을 시행하였으며 구강편평세포암종 조직은 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 또한, 정상조직 1예와 임의적으로 선택한 구강편평세포암종 조직 4예를 선택하여 웨스턴 블러트을 시행해서 BIRC2 단백질의 발현을 재확인하였다. 둘째, HuR 단백질의 세포질내 발현 및 BIRC2 단백질의 발현과, 구강편평세포암종 환자의 임상병리학적 요소 및 생존율과의 관련성을 관찰하기 위하여, 구강편평세포암종 환자의 면역조직화학적 소견, 발병부위, 성별, 나이, 조직병리학적 등급, 종양의 크기, 경부임파절 전이, 임상적 병기, 생존기간을 확인하여 통계학적 분석을 하였다. 셋째, HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현간의 상호관련성을 알아보기 위하여, 구강편평세포암종 조직의 면역조직화학적 소견을 통계학적 분석을 하였으며, 구강암 세포주는 Leptomycin B 및 HuR siRNA 처리 실험을 하여 웨스턴 블러트 분석을 하였다.

**결론** : 인체의 여러 다른 암에서처럼, 한국인의 구강편평세포암종에서도 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 관찰할 수 있었다. HuR 단백질의 세포질내 발현은 생존율과 관련이 있는 것으로 관찰되어 예후표지인자가 될 수 있을 것으로 생각된다. BIRC2 단백질의 발현은 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직 모두에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 관련이 있는 것으로 관찰되었으며, 구강암 세포주를 이용한 실험을 통하여 HuR 단백질의 세포질내 발현에 의해 BIRC2 단백질의 발현이 영향을 받는 것을 관찰한 바 향후 두 단백질들 간의 관련성에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

---

핵심되는 말 : 구강편평세포암종, HuR, BIRC

# 구강편평세포암종에서 예후 표지인자로서의 HuR과 BIRC2 발현

연세대학교 대학원 치의학과

김희경

(지도 차인호 교수)

## I. 서 론

구강암은 인종, 지역 및 사회경제적 여건에 따라 발생빈도의 차이가 있지만, 세계적으로 빈발하는 10대 암 중의 하나이다.<sup>1)</sup> 우리나라 중앙암등록본부 보고에 의하면 2005년 구강암 발생자는 1199건이었으며, 남자가 전체 구강암의 63%로 여자에 비하여 약 2배 정도 많이 발생하였고, 연령별로는 60대가 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하였다. 발생 부위별로는 혀에 발생하는 설암이 가장 많아 전체 구강암의 1/3정도를 차지하였다.<sup>2)</sup> 구강내 발생하는 모든 악성종양의 90% 이상을 차지하는 구강편평세포암종은 전 세계적으로 매년 40만명이 발병하고 있고<sup>3)</sup> 우리나라에서 매년 10만명당 남자 1.7명, 여자 0.7명이 구강편평세포암종으로 사망하고 있다.<sup>4)</sup>

정상 상피세포가 암세포로 변환하는 과정에서 암유전자, 종양억제유전자, DNA 수복유전자, 세포성장관련인자, 그리고 사이토카인 등 여러 유전자들의 지속적인 변이가 나타나는데, 최근 구강편평세포암종의 주된 치료 실패요인이 유전자의 돌연변이에 기인하는 것으로 밝혀져 암 관련유전자에 대한 연구의 중요성이 커지면

서<sup>5)</sup> 외부변화에 대해 빠르게 반응하는 mRNA 및 관련단백질의 발현조절에 대한 관심이 높아지고 있다.<sup>6)</sup>

진핵세포 내에는 다양한 mRNA 안정화 기전이 존재하며, mRNA 3'UTR 영역의 AU-rich element(ARE)는 mRNA 안정화와 관련된 대표적인 요소이다.<sup>7-10)</sup> ARE는 adenylate(A)와 uridylate(U)염기로 구성되는 영역으로 성장인자, 종양억제유전자, 사이토카인, 그리고 림포카인 등의 mRNA에 많이 존재하며, 이들 단백질들의 중요성으로 인해 정상 및 종양세포 모두의 성장에 중요한 조절기전으로 여겨진다.<sup>8,9,11-14)</sup> 제1형은 AUUUA 및 U가 풍부한 mRNA으로 c-fos나 c-myc mRNA에 존재하며, 제2형은 AUUU의 반복과 하나의 A를 포함하는 경우로 IL-2나 TNF- $\alpha$  mRNA에 존재한다. 제3형은 AUUUA 없이 U만이 다수 존재하는 유형으로 c-jun mRNA가 여기에 속한다.<sup>11,13-16)</sup> ARE매개 mRNA 조절기전은 KSRP, TTP, BRF2, 및 hnRNP D (AUF 1)의 ARE결합단백질이 관여하는 mRNA의 분해기전과 초파리의 ELAV (embryonic lethal abnormal visual system)와 관련된 HuR (HuA), HuB, HuC, HuD 등에 의한 mRNA의 안정화기전이 작용한다.<sup>16-20)</sup> HuR은 조직에 광범위하게 발현하며 HuR의 발현은 ARE영역을 포함하는 mRNA의 안정화에 기여한다.<sup>16)</sup> HuR은 오랫동안 세포의 성장, 분화, 대사, 이동, 노화와 관련된 유전자들의 조절인자로서 인식되어 왔으나, 이의 종양 발생과 관련된 연구는 현재 악성 뇌종양, 난소암, 대장암, 유방암, 폐암 및 위암 등에서 과발현되며, 특정유전자들의 mRNA를 조절하는 것으로 보고되고 있다.<sup>16,21-25)</sup> 주로 핵에 분포되어 있다가 핵내 존재하는 ARE를 포함하고 있는 mRNA에 결합해서 세포질내로 이동하여 mRNA의 파괴를 억제하는 것으로 생각되고 있다.<sup>16,26,27)</sup>

BIRC2는 세포사멸을 억제하는 단백질로 알려져 있으며, caspase의 억제와 결합에 의해 세포사멸 (apoptosis)을 억제한다.<sup>28-30)</sup> 또한 간암, 폐암, 구강암, 속질모세포종(medulloblastoma), 아교모세포종(glioblastoma), 췌장암 등과 같은 많은 암에서 BIRC2의 DNA 증폭 (amplification)이 관찰되었다.<sup>31-35)</sup> BIRC2 mRNA 3'UTR 영역에 제 1형의 형태인 ARE가 많이 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>

이에 본 연구에서는 구강편평세포암종에서의 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현에 대하여, 첫째, 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직에

서 발현을 확인하고자 한다. 둘째, 구강편평세포암종 환자의 임상병리학적 요소들과의 연관성 및 생존율을 관찰하여 구강암의 예후인자로서의 가능성을 알아보고자 한다. 셋째, 구강편평세포암종 조직의 면역조직화학적 분석과 구강암 세포주를 이용한 실험을 통하여 두 단백질 발현의 상호관련성을 알아보고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구재료

본 실험에서는 the Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)에서 분양 받은 구강편평세포암종 세포주 HSC-2, HSC-3, Ca9-22와 연세대학교 치과대학 구강종양연구소에서 분양 받은 구강편평세포암종 세포주 YD-9, YD-10B, YD-32, YD-38을 사용하였다. HSC-2는 구강저에, HSC-3와 YD-10B는 혀에, Ca9-22, YD-32, 그리고 YD-38는 치은에, YD-9은 협점막에 발생한 구강편평세포암종에서 유래된 세포들이다.<sup>37,38)</sup> (Table 1)

Table 1. Characteristics of oral cancer cell lines.

Cell Line	Gender/Age	Primary site	Pathologic Dx.
HSC-2	M/69	Mouth	SCC
HSC-3	M/64	Tongue	SCC
CA9-22	M	Gingiva	SCC
YD-9	M/56	Buccal cheek	SCC, MD
YD-10B	M/67	Tongue	SCC, MD
YD-32	M/35	Gingiva	SCC, PD
YD-38	M/67	Lower gingiva	SCC, MD

SCC, Squamous cell carcinoma; MD, Moderately differentiated; PD, Poorly differentiated.

### 2. 연구대상

1994년 1월부터 2002년 12월까지 9년 동안 연세대학교 치과대학병원 구강악안면외과에서 원발성 구강편평세포암종으로 수술 받은 95예를 대상으로 하였다. 추적기간은 1-157개월로 평균 73개월이었고 연령은 27세부터 83세까지로 평균 연령

이 60세이었다. 조직병리학적 등급은 2000년 WHO 분류법에 따라 고등도의 분화(G1), 중등도의 분화(G2), 저등도의 분화(G3)로 분류하였고 임상적 병기는 2002년 AJCC Cancer staging에 근거한 TNM분류법에 따라 분류하였다. (Table 2)

Table 2. Characteristics of 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

<b>Characteristic</b>	<b>cases, n (%)</b>
<b>Tumor location</b>	
mouth floor	4 (4.2)
Tongue	23 (24.2)
Gingiva	61 (64.2)
Buccal cheek	6 (6.3)
Lower lip	1 (1.1)
<b>Gender</b>	
M	72 (75.8)
F	23 (24.2)
<b>Age, y</b>	
<60	41 (43.2)
≥60	54 (56.8)
<b>Histological grade</b>	
G <sub>1</sub>	32 (33.7)
G <sub>2</sub>	49 (51.6)
G <sub>3</sub>	14 (14.7)
<b>T Stage</b>	
T <sub>1</sub>	13 (13.7)
T <sub>2</sub>	28 (29.5)
T <sub>3</sub>	11 (11.6)
T <sub>4</sub>	43 (45.2)
<b>Lymph node metastases</b>	
Negative	62 (65.3)
Positive	33 (34.7)
<b>Clinical stage</b>	
I	11 (11.6)
II	21 (22.1)
III	18 (18.9)
IV	45 (47.4)

### 3. 연구방법

첫째, 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 확인하기 위하여, 구강암 세포주는 배양해서 단백질을 추출하여 웨스턴 블럿을 시행하였으며 구강편평세포암종 조직은 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 또한, BIRC2 단백질의 발현은 정상조직 1예와 임의적으로 선택한 구강편평세포암종 조직 4예를 선택하여 웨스턴 블럿을 시행해서 재확인하였다. 둘째, HuR 단백질의 세포질내 발현 및 BIRC2 단백질의 발현과, 구강편평세포암종 환자의 임상병리학적 요소 및 생존율과의 관련성을 관찰하기 위하여, 구강편평세포암종 환자의 면역조직화학적 소견, 임상기록, 수술기록, 병리조직학적 소견을 검토하여 면역조직화학적 분석, 발병부위, 성별, 나이, 조직병리학적 등급, 종양의 크기, 경부임파절 전이, 임상적 병기, 생존기간을 확인하여 통계학적 분석을 하였다. 셋째, HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현간의 상호관련성을 알아보기 위하여, 연구대상 환자의 구강편평세포암종 조직의 면역조직화학적 소견을 분석하여 통계학적 분석을 하였다. 또한, 구강암 세포주에 Leptomycin B 및 HuR siRNA 처리 실험을 하였다. Leptomycin B 처리는 웨스턴 블럿을 시행하여 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현이 잘되었던 구강암 세포주 HSC-3, Ca9-22, 그리고 현재 여러 실험에서 많이 사용되면서 BIRC2 발현이 많이 확인되어 있는 YD-10B를 선택하였으며, HuR siRNA 처리는 transfection이 잘되는 구강암 세포주 HSC-3, YD-10B를 선택하여 배양을 하고 단백질을 추출하여 웨스턴 블럿 분석을 하였다.

#### 1) 세포배양

구강암세포주 HSC-2, HSC-3, 그리고 Ca9-22은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100U/ml of penicillin, 그리고 100 $\mu$ g/ml of streptomycin이 들어 있는 배양액에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다.

구강암세포주 YD9, YD10B, YD32, 그리고 YD38은 DMEM에 calcium-free F12, 10% fetal bovine serum(Hyclone), 26.8mM sodium bicarbonate (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), 50pM tri-iodothyronine (Sigma), 127 pM cholera toxin (Sigma), 1.9pg/ml of hydrocortisone (Sigma), 12.7 $\mu$ g/ml of insulin (Sigma), 12.7 $\mu$ g/ml of transferrin (Sigma), 100U/ml of penicillin, 그리고 100 $\mu$ g/ml of streptomycin이 첨가된 keratinocyte 배양액에 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다.

## 2) 단백질 추출

세포내의 단백질을 추출하기 위해서, 배양된 세포들을 cold PBS로 씻어준 후 500 $\mu$ L의 cold lysis buffer (50mM Tris, pH 7.5, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], pH 8.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 $\mu$ g/mL aprotinin, 10 $\mu$ g/mL leupeptin, 1mM Phenylmethysulphonylfluoride[PMSF], 2mM Sodium orthovanadate [NaVO<sub>4</sub>], and 50mM Sodium Fluoride [NaF])를 넣고 20분 동안 얼음에 방치한 후 4°C에서 13,000rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액 (세포내 단백질)을 분리하였다.

세포질내 단백질과 핵내 단백질을 분리 추출하기 위해서, 또 다른 배양된 세포에 protease 억제제가 들어있는 cold hypotonic lysis buffer (10mM N-[2-hydroxethyl] piperazine-NA-2-ethanesulfonic acid [HEPES] [pH 7.9], 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM dithiothreitol, 50mM NaF, and 10mM KCl)을 넣고 20분 동안 얼음에 넣고 방치한 후 4°C에서 10,000rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액 (세포질내 단백질)을 조심스럽게 분리한 후, 아래에 가라앉아 있는 층에 다시 protease 억제제가 들어 있는 ice-cold lysis buffer (10mM HEPES [pH 7.9], 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 25% glycerol, and 420mM NaCl)를 넣고 30분 동안 얼음에 넣고 방치한다. 그런 다음 4°C에서 14,000rpm으로 30분 동안 원심 분리하여 상층액 (핵내 단백질)을 옮긴다. 이렇게 얻어진 각 단백질들은 Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)를 통해 정량을 하여 웨스턴 블럿 분석에 이용하였다.

### 3) 웨스턴 블럿

추출된 단백질들은 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용하여 분리하였다. 전기영동 후, 젤에 있던 단백질들을 polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 옮겼다. PVDF상의 단백질에 일차 항체들인 HuR (3A2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA), BIRC2 (A-13; Santa Cruz), 그리고 Actin(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)을 처리한 후 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 세척 후, 이차 항체인 Anti-mouse immunoglobulin G horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad Laboratories) 또는 anti-rabbit IgG를 1시간 동안 실온에서 처리한 후 수세한다. ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 처리하여 X-ray film (Fuji, Minamoto, Tokyo, Japan)으로 현상한 후 분석하였다.

### 4) 면역조직화학적 염색

보관된 파라핀 조직에서 HuR와 BIRC2의 발현여부와 양상을 알아보기 위하여 EnVision-HRP detection system (Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. 슬라이드에 부착한 3 μm두께의 조직 표본을 탈파라핀한 후 재수화하였다. 항원을 재생하기 위하여 TE buffer (pH 9.0)에 담가 4분간의 열처리를 가한 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 10분간 반응시켜 내인성 과산화효소 (endogenous peroxidase)의 활성을 억제하였다. PBS 완충액에 5분간 수세한 뒤 차단혈청 (blocking serum)에 작용시켜 비특이성 단백의 반응을 차단하였다. 일차항체 (HuR 1:100, BIRC2 1:800)를 희석하여 조직위에 떨어뜨린 후 30분간 반응시켰다. PBS 완충액으로 중화시킨 후 다시 이차항체를 떨어뜨리고 30 분간 반응시킨 후 PBS 용액으로 5 분씩 3 회 세척하였다. Diaminobenzidine (DAB) 발색제로 항원항체복합체를 염색하였다. 혜마톡실린(Mayer's hematoxylin)으로 대조염색을 하였다

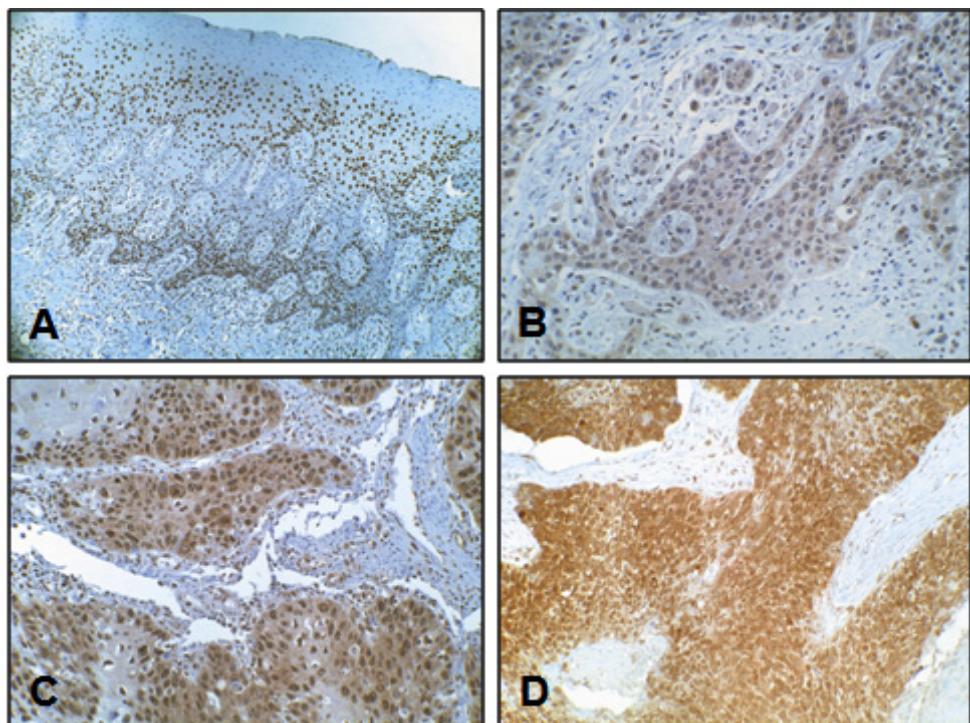


Figure 1. Immunohistochemical staining of the human embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR.. HuR was expressed in normal human epithelial cells(A, 100x) and in cytoplasm of human oral squamous cell carcinoma (B, 1+, 200x; C, 2+, 200x; and D, 3+, 200x).

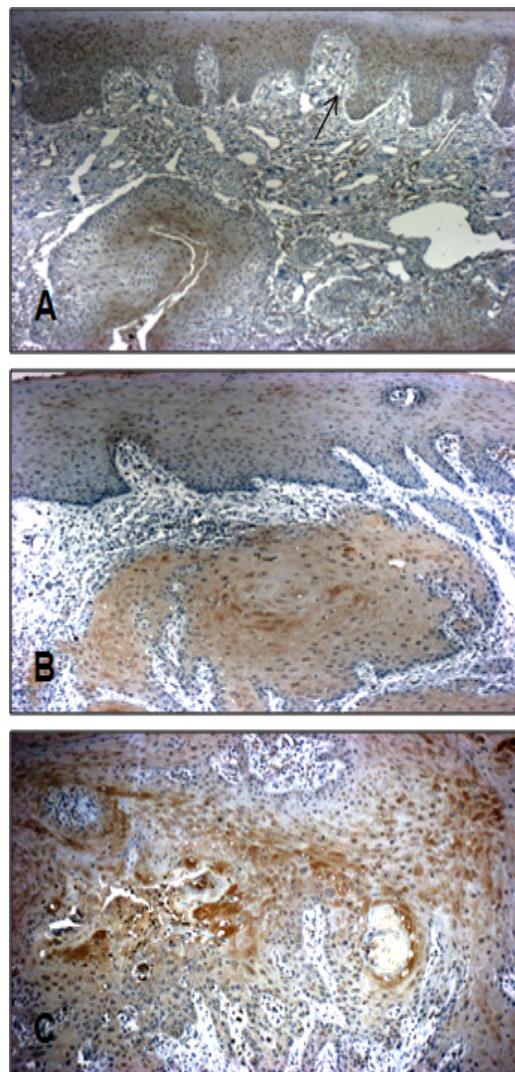


Figure 2. Immunohistochemical staining of BIRC2. BIRC2 was expressed in human oral squamous cell carcinomas (A, 1+, 100x; B, 2+, 200x; and C, 3+, 200x). Arrow indicates BIRC2 expression in normal human epithelial cells.

## 5) 면역조직화학적 분석

광학현미경으로 관찰하였을 때 HuR과 BIRC2 발현은 조직표본 내 종양세포의 세포질이 암갈색으로 염색되면 양성으로, 핵만 푸르게 염색되면 음성으로 평가하였다. 종양세포 영역에 염색된 부위가 전혀 없으면 0, 25%이하이면 1+, 25-50%이면 2+, 50-75%이면 3+, 75%이상이면 4+로 점수화하였다. 통계학적 분석시 염색된 부위가 없는 0을 단백질 발현에서의 음성으로, 나머지 점수들은 양성으로 평가하였다. 또한 염색의 강도도 염색이 되지 않는 경우에 0, 약한 염색(weak staining)에 1+, 중등도의 염색(moderate staining)에 2+, 강한 염색(strong staining)에 3+로 점수화한 후 (Figure 1, 2), 0을 단백질 발현에서의 음성으로, 나머지 점수들을 양성으로 평가하여 통계학적 분석을 하였다. 면역반응정도(immunoreaction score)는 염색된 범위 (5단계)와 강도 (4단계)의 합으로 0에서 3+까지는 저발현 (Low Expression Group, LEG)으로, 4+에서 7+까지는 고발현 (High Expression Group, HEG)으로 분석에 적용하였다.

## 6) 통계학적 분석

HuR 단백질 및 BIRC2 단백질의 발현과 임상병리학적 요소간의 연관성은 Chi-square test로 검정하였다. 생존기간은 수술한 날로부터 사망일까지 혹은 생존자의 마지막 내원일까지의 기간으로 하였고, 마지막 내원일자는 2007년 12월 31일 까지로 정하였다. 생존율은 Kaplan Meier method로 산정하고, log rank test로 비교하였다. 생존율에 영향을 주는 예후인자는 univariate & multivariate Cox Regression test로 분석하였다. 통계처리는 SPSS 13.0 프로그램 (SPSS, Chicago, IL USA)을 이용하였으며, 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

## 7) Leptomycin B 처리

핵에 존재하는 HuR 단백질이 세포질내로 이동되지 않도록 하기 위해서, 단백질과 mRNA가 핵에서 세포질로 이동하는 것을 억제하는 물질인 Leptomycin B

(LMB)를 사용하였다.<sup>39-41)</sup> 구강암 세포주 HSC-3, Ca9-22, 그리고 YD10B를 배양한 다음 LMB를 0.1, 0.5, 그리고 1.0 ng/ml 농도로 처리한 후 배양기에 넣고 다시 배양하였다.

### 8) HuR siRNA 처리

HuR 단백질의 발현을 억제하기 위해서, HuR siRNA를 Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen Life Technologies, carlsbad, CA, USA) 제조회사의 방법대로 Transfection하였다. 구강암 세포주 HSC-3, YD10B가 60mm plate에서 70-80% 성장하면 serum-free OPTI-MEM 배양액에 lipofectamine과 HuR siRNA 플라스미드를 처리한 후 5시간 동안 배양한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액을 첨가한 다음 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 48시간 더 배양하였다.

### III. 연구결과

#### 1. HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현

HuR 단백질은 구강암 세포주 7예 모두의 세포질에서 다량 발현되는 것을 관찰하였으며(Figure 3A), 구강편평세포암종 조직 95예 중 68예 (71.6%)에서 세포질에 발현되는 것을, 95예 중 44예 (46.3%)에서 세포질에 고발현되는 것을 관찰하였다(Table 3).

BIRC2 단백질은 구강암 세포주 HSC-3, CA9-22, YD-32에서는 다량 발현되었다. 구강암 세포주 HSC-2, YD-10B, YD-38에서는 미량이지만 발현을 확인할 수 있었으나, 구강암 세포주 YD-9에서는 발현을 확인할 수 없었다(Figure 3A). 구강편평세포암종 조직 95예 중 91예 (95.8%)에서 발현되는 것을, 95예 중 87예 (81.1%)에서 고발현되는 것을 관찰하였다(Table 3). 또한 정상조직 1예와 임의적으로 선택한 구강편평세포암종 조직 4예를 선택하여 웨스턴 블러트을 시행해서 재확인한 결과, 4예 모두에서 정상조직과는 확연히 다르게 다량의 BIRC2 단백질이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 3B).

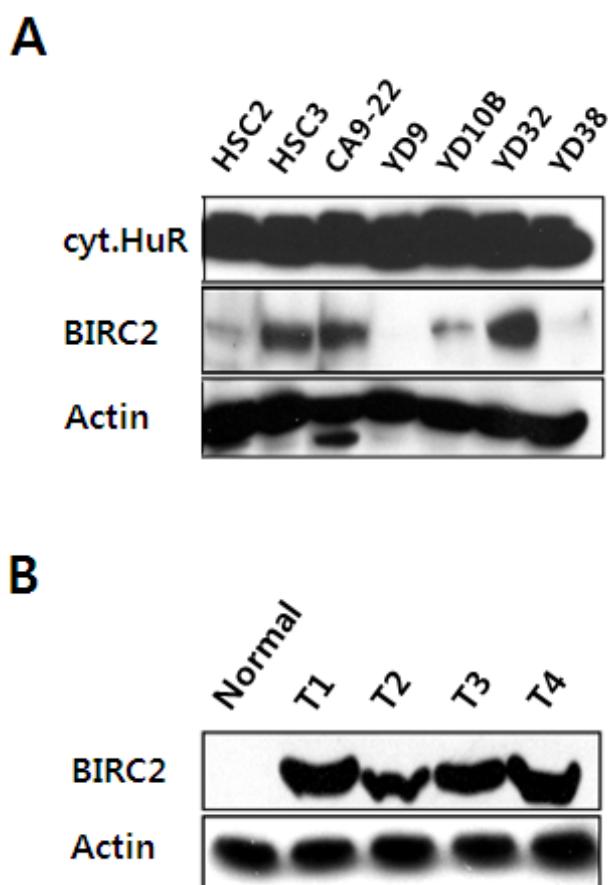


Figure 3. Expression of the human embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR and BIRC2 is illustrated in human oral cancer cell lines, normal and OSCC tissues. Total lysates from oral cancer cells were resolved by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. The protein levels of cytoplasmic HuR and BIRC2 were assessed by Western blot analysis. Actin (ACTINA) was used as a loading control.

Table 3. Expression of cytoplasmic HuR and BIRC2 in oral squamous cell carcinomas.

	OSCCs, N(%)
<b>Cytoplasmic HuR expression</b>	
Negative	27(28.4)
Positive	68(71.6)
<b>Cytoplasmic HuR expression</b>	
LEG (0-3)	51(53.7)
HEG (4-7)	44(46.3)
<b>BIRC2 expression</b>	
Negative	4(4.2)
Positive	91(95.8)
<b>BIRC2 ex[ression</b>	
LEG (0-3)	18(18.9)
HEG (4-7)	87(81.1)

## 2. HuR 단백질의 세포질내 발현과 임상병리학적 요소 간의 관련성 (Table 4)

HuR 단백질의 세포질내 발현은 경부임파절로 전이가 된 경우 (27예/33예, 81.8%)에 전이가 되지 않은 경우 (41예/62예, 66.1%)보다 발현율이 더 높았으나, 통계적 유의성은 없었다 ( $p=0.083$ ).

HuR 단백질의 세포질내 고발현은 성별 ( $p=0.064$ )은 남자에서, 조직학적 등급 ( $p=0.053$ )은 분화도가 낮을수록 고발현율이 더 높았으나 통계적 유의성은 없었다.

Table 4. Association of cytoplasmic HuR expression with clinicopathologic variables in 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

Clinicopathologic variable	N	Cytoplasmic HuR expression					
		Negative	Positive	P	Low	High	P
All OSCC	95	27(28.4%)	68(71.6%)		51(53.7%)	44(46.3%)	
Age (y)				0.300			0.580
<60	41	10(24.4%)	31(75.6%)		22(53.7%)	19(46.3%)	
≥60	54	17(31.5%)	37(68.5%)		29(53.7%)	25(46.3%)	
Gender				0.500			0.064
Male	72	21(29.2%)	51(70.8%)		35(48.6%)	37(51.4%)	
Female	23	6(26.1%)	17(73.9%)		16(69.6%)	7(30.4%)	
Histological grade				0.446			0.053
G1	32	10(31.3%)	22(68.8%)		20(62.5%)	12(37.5%)	
G2	49	15(30.6%)	34(69.4%)		27(55.1%)	22(44.9%)	
G3	14	2(14.3%)	12(85.7%)		4(28.6%)	10(71.4%)	
T category				0.940			0.509
T1	13	4(30.8%)	9(69.2%)		5(38.5%)	8(61.5%)	
T2	28	9(32.1%)	19(67.9%)		17(60.7%)	11(39.3%)	
T3	11	3(27.3%)	8(72.7%)		7(63.6%)	4(36.4%)	
T4	43	11(25.6%)	32(74.4%)		22(51.2%)	21(48.8%)	
LN metastases				0.083			0.462
Negative	62	21(33.9%)	41(66.1%)		34(54.8%)	28(45.2%)	
Positive	33	6(18.2%)	27(81.8%)		17(51.5%)	16(48.5%)	
Clinical stage				0.458			0.797
I	11	4(36.4%)	7(63.6%)		5(45.5%)	6(54.5%)	
II	21	8(38.1%)	13(61.9%)		13(61.9%)	8(38.1%)	
III	18	3(16.7%)	15(83.3%)		10(55.6%)	8(44.4%)	
IV	45	12(26.7%)	33(73.3%)		23(51.1%)	22(48.9%)	
Location				0.131			0.224
Mouth floor	4	3(75.0%)	1(25.0%)		3(75.0%)	1(25.0%)	
Tongue	23	7(30.4%)	16(69.6%)		14(60.9%)	9(39.1%)	
Gingiva	61	17(27.9%)	44(72.1%)		33(54.1%)	28(45.9%)	
Buccal cheek	6	0(00.0%)	6(100.0%)		1(16.7%)	5(83.3%)	
Lower lip	1	0(00.0%)	1(100.0%)		0(00.0%)	1(100.0%)	

### 3. BIRC2 단백질의 발현과 임상병리학적 요소 간의 관련성 (Table 5)

BIRC2 단백질의 발현과 통계적 유의성이 있게 관련되는 임상병리학적 요소를 관찰할 수는 없었으나, BIRC2 단백질의 고발현은 종양의 크기 ( $p=0.017$ ), 임상적 병기 ( $p=0.025$ ), 그리고 발병부위 ( $p=0.005$ )와 통계적 유의성이 있게 고발현율이 높았다. 종양의 크기에 따라 T1에서 53.8% (7예/13예), T2에서 75.0% (21예/28예), T3에서 90.9% (10예/11예), T4에서 90.7% (39예/43예)로 종양의 크기가 클수록 BIRC2 단백질의 고발현율이 증가되는 경향을 보였으며, 임상적 병기 (clinical stage)에서도 I기에서 54.5% (6예/11예), II기에서 71.4% (15예/21예), III기에서 83.3% (15예/18예), IV기에서 91.1% (41예/45예)로 병기가 진행될수록 BIRC2 단백질의 고발현율이 증가되었다. 발병부위는 치은에서 발생한 경우에 고발현율이 높은 것을 관찰할 수 있었다.

Table 5. Association of BIRC2 expression with clinicopathologic variables in 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

Clinicopathologic variable	N	BIRC2 expression					
		Negative	Positive	P	Low	High	P
<b>All OSCC</b>	95	4(4.20%)	91(95.8%)		18(18.9%)	77(81.1%)	
<b>Age (y)</b>				0.581			0.553
<60	41	2(4.90%)	39(95.1%)		8(19.5%)	33(80.5%)	
≥60	54	2(3.70%)	52(96.3%)		10(18.5%)	44(81.5%)	
<b>Gender</b>				0.677			0.548
Male	72	3(4.20%)	69(95.8%)		14(19.4%)	58(80.6%)	
Female	23	1(4.30%)	22(95.7%)		4(17.4%)	19(82.6%)	
<b>Histological grade</b>				0.341			0.797
G1	32	0(0.00%)	32(100%)		7(21.9%)	25(78.1%)	
G2	49	3(6.10%)	46(93.9%)		8(16.3%)	41(83.7%)	
G3	14	1(7.10%)	13(92.9%)		3(21.4%)	11(78.6%)	
<b>T stage</b>				0.533			0.017
T1	13	0(0.00%)	13(100%)		6(46.2%)	7(53.8%)	
T2	28	2(7.10%)	26(92.9%)		7(25.0%)	21(75.0%)	
T3	11	1(9.10%)	10(90.9%)		1(9.10%)	10(90.9%)	
T4	43	1(2.30%)	42(97.7%)		4(9.30%)	39(90.7%)	
<b>LN metastases</b>				0.433			0.346
Negative	62	2(3.20%)	60(96.8%)		13(21.0%)	49(79.0%)	
Positive	33	2(6.10%)	31(93.9%)		5(15.2%)	28(84.8%)	
<b>Clinical stage</b>				0.480			0.025
I	11	0(0.00%)	11(100%)		5(45.5%)	6(54.5%)	
II	21	2(9.50%)	19(90.5%)		6(28.6%)	15(71.4%)	
III	18	1(5.60%)	17(94.4%)		3(16.7%)	15(83.3%)	
IV	45	1(2.20%)	44(97.8%)		4(8.90%)	41(91.1%)	
<b>Location</b>				0.150			0.005
Mouth floor	4	1(25.0%)	3(75.0%)		2(50.0%)	2(50.0%)	
Tongue	23	2(8.7%)	21(91.3%)		8(34.8%)	15(65.2%)	
Gingiva	61	1(1.6%)	60(98.4%)		5(8.2%)	56(91.8%)	
Buccal cheek	6	0(0.0%)	6(100%)		3(50.0%)	3(50.0%)	
Lower lip	1	0(0.0%)	1(100%)		0(0.0%)	1(100%)	

#### 4. 생존율 분석

단변량 분석에서 연구대상 환자 (95예)의 5년 생존율은 68.4%였다. 임상병리학적 요소 중 조직병리학적 등급 ( $p=0.050$ )만이 5년 생존율과 통계적 유의성이 있었으며, G1에서 81.3%, G2에서 63.3%, G3에서 57.1%로 분화도가 낮을수록 생존율이 감소하고, 위험도 [1.67(95% CI, 0.92-2.85)] 역시 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 종양의 크기에 따라서 T1에서 92.3%, T2에서 67.9%, T3에서 72.7%, T4에서 60.5%로 크기가 커질수록 5년 생존율은 감소되고 위험도는 높아졌으나, 통계적으로 유의성은 없었다 ( $p=0.174$ ). 그 밖의 다른 임상병리학적 요소들, HuR 단백질의 발현, 그리고 BIRC2 단백질의 발현 모두 단변량 분석에서는 5년 생존율과 통계적 유의성은 없었다(Table 6, Figure 4).

다면량분석을 위해, 단변량분석에서  $P$ 값이 0.2이하로 나온 임상병리학적요소들, HuR 단백질의 발현, 그리고 BIRC2 단백질의 발현을 분석에 사용하였다. 그 결과 조직병리학적 등급( $p=0.004$ )과 HuR 단백질의 세포질내 고발현된 경우 ( $p=0.044$ )에서 통계적 유의성을 보였다(Table 7).

Table 6. Univariate survival analysis (Cox regression model) for overall survival of 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

Clinicopathologic variable	N	5-y survival %	HR (95% CI*)	P
<b>Age (y)</b>			0.79(0.38-1.65)	0.530
<60	41	70.7		
≥60	54	66.7		
<b>Gender</b>			0.93(0.40-2.17)	0.869
Male	72	68.1		
Female	23	69.6		
<b>Histological grade</b>			1.67(0.99-2.85)	0.050
G1	32	81.3		
G2	49	63.3		
G3	14	57.1		
<b>T stage</b>			1.35(0.96-1.89)	0.174
T1	13	92.3		
T2	28	67.9		
T3	11	72.7		
T4	43	60.5		
<b>LN metastases</b>			1.31(0.63-2.71)	0.473
Negative	62	71.0		
Positive	33	63.6		
<b>Clinical stage</b>			1.30(0.90-1.87)	0.121
I	11	90.9		
II	21	61.6		
III	18	83.3		
IV	45	60.0		
<b>Cytoplasmic HuR expression</b>			1.29(0.55-3.00)	0.566
Negative	27	74.1		
Positive	68	66.2		
<b>Cytoplasmic HuR expression</b>			0.85(0.41-1.75)	0.852
LEG	51	66.7		
HEG	44	70.5		
<b>BIRC2 expression</b>			21.75(0.02-30902.05)	0.406
Negative	4	100		
Positive	91	67.0		
<b>BIRC2 expression</b>			2.31(0.70-7.62)	0.169
LEG	18	83.3		
HEG	77	64.9		

CI\*, confidence interval

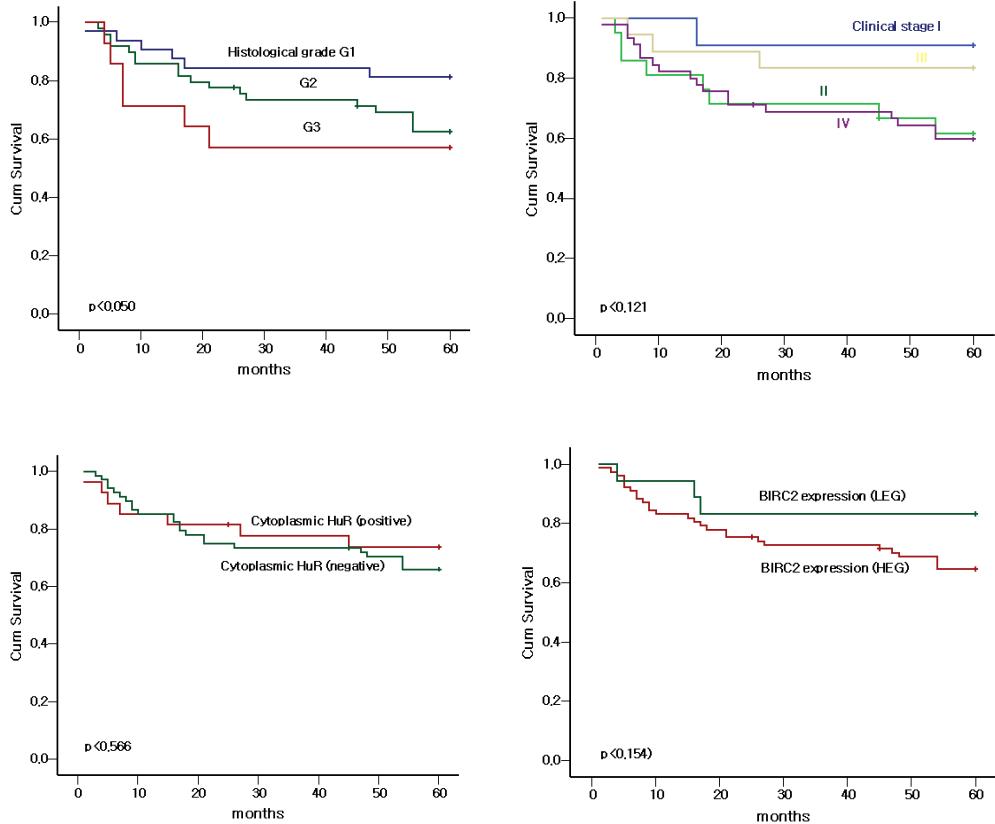


Figure 4. Kaplan-Meier survival plot for histological grade ( $p < 0.050$ ), clinical stage ( $p < 0.121$ ), cytoplasmic HuR ( $p < 0.566$ ), and BIRC2 ( $p < 0.154$ ).

Table 7. Multivariate survival analysis (Cox regression model) for overall survival of 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

<b>Clinicopathologic variables</b>	<b>Multivariate analysis</b>	
	<b>RR (95% CI*)</b>	<b>P</b>
<b>Histologic grade</b>		
G1, G2, vs G3	2.71(1.37-5.35)	0.004
<b>T stage</b>		
T1, T2, T3, vs T4	4.29(0.48-38.55)	0.193
<b>Clinical stage</b>		
I, II, III, vs IV	0.10(0.01-1.40)	0.088
<b>Nuclear HuR expression</b>		
Negative vs Positive	1.58(0.34-7.31)	0.558
<b>Cytoplasmic HuR expression</b>		
Negative vs Positive	0.52(0.15-1.73)	0.283
Low expression (0-3) vs High expression (4-7)	2.80(1.03-7.61)	0.044
<b>BIRC2 expression</b>		
Negative vs Positive	0.00(0.00-0.00)	0.937
Low expression (0-3) vs High expression (4-7)	0.84(0.22-3.15)	0.795

\*CI, confidence interval

## 5. HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현 간의 관련성

구강편평세포암종 조직에서 HuR 단백질의 세포질내 발현은 BIRC2 단백질의 발현(67예/91예, 73.6%,  $p=0.035$ ) 및 고발현 (60예/77예, 77.9%,  $p=0.007$ )과 통계적 유의성이 있게 관련되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Table 8).

이에 3'UTR 영역에 ARE부분을 많이 갖고 있는 BIRC2의 발현이 HuR에 의해 조절되어진다는 가설 하에 구강암 세포주 YD10B, HSC-3, Ca9-22에 LMB 처리를 시행하고, 구강암 세포주 YD10B, HSC-3에 HuR siRNA 처리를 시행하여 구강편평세포암종에서의 통계결과를 비교확인 해보았다. 그 결과, LMB 처리를 한 구강암 세포주 모두에서 LMB 농도가 증가되면, 즉 HuR 단백질이 핵에서 세포질로 이동되는 양이 감소될수록 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰하였다. (Figure 5A). 그리고, HuR siRNA 처리를 하여 HuR 기능이 억제된 세포주 모두에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현이 모두 감소되는 것을 관찰하였다 (Figure 5B).

Table 8. Association of cytoplasmic HuR expression with BIRC2 expression in 95 patients with oral squamous cell carcinoma.

Clinicopathologic variable	N	Cytoplasmic HuR expression					
		Negative	Positive	P	Low	High	P
All OSCC	95	27(28.4%)	68(71.6%)		51(53.7%)	44(46.3%)	
BIRC2 expression				0.035			0.058
Negative	4	3(75.0%)	1(25.0%)		4(100.%)	0(0.00%)	
Positive	91	24(26.4%)	67(73.6%)		47(51.6%)	44(48.4%)	
BIRC2 expression				0.007			0.067
LEG	18	10(55.6%)	8(44.4%)		13(72.2%)	5(27.8%)	
HEG	77	17(22.1%)	60(77.9%)		38(49.4%)	39(50.6%)	

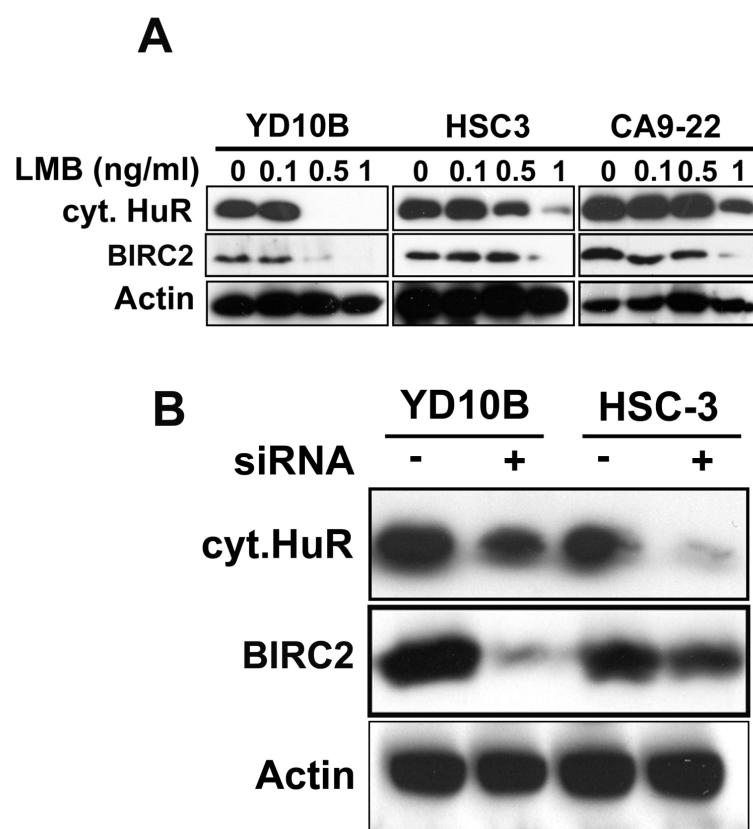


Figure 5. Effect of LMB and HuR small interfering RNA (siRNA) on expression of BIRC2 protein in oral cancer cell lines. A, YD10B, HSC-3, and CA9-22 cells were treated with LMB for 24 hrs after HuR, BIRC2 and actin were detected by immunoblotting. B, HuR small interfering RNA (50–150 nmol/L) inhibited HuR and BIRC2 protein expression in YD10B and HSC-3 cells as detected by immunoblotting.

## IV. 고 칠

지난 20년간 세포유전학적 혹은 분자생물학적 기법 등으로 암발생에 관여하는 다양한 종류의 암유전자와 종양억제유전자가 발견되었다.<sup>42-45)</sup> 구강편평세포암종의 암화과정(carcinogenesis)에서, 다양한 암유전자(oncogene), 종양억제유전자(tumor suppressor gene), 염색체변이, 호르몬, cytokine, 그리고 성장인자 등이 중요한 역할을 할 것이라고 보고되고 있다.<sup>42-47)</sup> 특히, 두경부의 발암과정에서 다양한 변화를 갖는 암화 관련 유전자로 p16, p53, PTEN, Rb, cyclin D1, p63, EGFR 등이 보고되고 있다.<sup>48-54)</sup> 구강편평세포암종의 암화인자들은 mRNA 반감기가 약 5-30분 이내로 비교적 짧은 것이 특징이며, 이를 mRNA의 안정성 여부가 구강편평세포암종 발생에 중요한 요인으로 알려져 있다.<sup>55-59)</sup> 결과적으로 mRNA 반감기의 미세한 차이로 세포내 mRNA 양이 1000배까지 차이가 날 수 있으며, 이러한 변화는 궁극적으로 생성되는 단백질의 양에 영향을 미치게 된다.<sup>55,56,60-62)</sup>

세포질에서의 HuR 단백질 증가는 만성염증, 심혈관계 질환, 암 등의 발병과 밀접하게 관련되어 있으며, 특히 암에서 두드러진 특징으로 종양세포의 세포질에서의 HuR 발현은 인체의 발암과정과 관련된 단백질의 발현을 조절하는데 있어서 중심적 역할을 할 것으로 여겨지며, 또한 치료를 위한 표적이 될 수 있으리라 생각되고 있다.<sup>9,61-65)</sup> 두경부암과 관련하여서도 악성타액선종양과 두경부편평세포암종에서 HuR단백질 발현이 증가한다고 보고되었다.<sup>41,58,59)</sup> 또한, 세포사멸을 억제하는 유전자로 알려져 있는 BIRC2도 구강편평세포암종의 암화과정 뿐만 아니라 다양한 암들에서 발현 변화를 갖는다는 보고들이 있다.<sup>68-72)</sup> 본 연구에서도 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직 모두에서 확인한 결과, HuR단백질은 모든 구강암 세포주의 세포질에서 다량 발현되었고, 구강편평세포암종 조직의 세포질에서는 95예 중 68예 (71.6%)에서 발현되었으며, 95예 중 44예 (46.3%)에서는 고발현되는 것을 확인하였다. BIRC2 단백질은 구강암 세포주 HSC-3, CA9-22, YD-32에서 발현되는 것을, HSC-2, YD-10B, YD-38에서는 미량이지만 발현되는 것을 관찰할 수 있었으나, YD-9에서는 발현을

관찰할 수는 없었다. YD-9는 종양억제유전자인 p53이 발현되는 세포주이며 p53은 세포사멸을 유도하므로 세포사멸을 억제하는 BIRC2가 동시에 발현되지는 않은 것으로 생각된다. 구강편평세포암종 조직에서는 BIRC2 단백질이 95예 중 91예 (95.8%)에서 발현되었으며, 95예 중 87예 (81.1%)에서 고발현되는 것을 확인하였다. 또한 BIRC2는 정상조직 1예와 임의적으로 선택한 구강편평세포암종 조직 4예를 선택하여 웨스턴 블러트을 시행해서 재확인을 해본 결과, 정상조직에서는 전혀 발현이 되지 않은 것과는 다르게 구강편평세포암종 조직 4예 모두에서 BIRC2 단백질이 다량 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

구강편평세포암종의 수술 후 예후를 결정하는 요소 중에서 환자의 나이와 성별, 종양의 위치, 임파절로의 전이 정도는 밀접한 관계가 있으며 종양의 크기나 암 치료방법과는 비교적 연관성이 적다는 보고가 있는 반면, 종양의 위치와 크기, 임파절로의 전이 정도, DNA content, 그리고 화학요법에 반응하는 정도가 구강편평세포암종에서 예후를 판단하는데 가장 중요하다는 보고도 있다.<sup>6,73-77</sup>.

본 연구에서는 BIRC2 단백질의 고발현과, 임상병리학적 요소 중 종양의 위치 ( $p<0.005$ ), 종양의 크기 ( $p<0.017$ ), 임상적 병기 ( $p<0.025$ )가 연관성이 있는 것을 확인 할 수 있었다. BIRC2 단백질의 고발현률이 치은에 발생한 종양 조직에서, 종양의 크기가 클수록, 그리고 임상적 병기가 진행될수록 증가되는 것을 관찰하였다.

구강편평세포암종은 악성도가 높은 편에 속하지만 초기에 발견되면 80-90%의 5년 생존율을 보이나 환자의 절반이상이 3기 이상 진행된 후 발견되기 때문에 생존율도 낮고 예후도 나쁜 편으로, 5년 생존율도 지난 30년 동안 약 50% 정도에서 개선되지 않고 있다. 본 연구에서의 대상 환자(95예) 전체의 5년 생존율은 68.4% 이였으며, 기존에 연구보고들보다는 높게 나타났다. 5년 생존율과 연관성을 갖는 임상병리학적 요소들로는 조직병리학적 등급의 분화도가 낮을수록 생존율 (57.1%) 이 감소하고, 위험도 [1.67 (95% CI, 0.99-2.85)] 역시 높아지는 것을 관찰할 수 있었으며, 통계적으로도 유의성을 보였다 ( $p<0.05$ ). 또한, 종양의 크기가 커질수록 5년 생존율이 감소하고, 위험도도 높아지는 것을 관찰할 수 있었으나, 통계적으로 유의성은 보이지 않았다 ( $p<0.174$ ). HuR 단백질의 발현과 BIRC2 단백질의 발현은 단변량 분석에서 5년 생존율과 통계적 유의성을 보이지 않았다. 그러나 다변량 분

석 결과에서는 조직병리학적 등급( $p<0.004$ )과 HuR 단백질의 세포질내 발현( $p<0.044$ )에서 통계적 유의성을 보였으며, 이 두 요소들은 구강편평세포암종에서 독립적인 요소로 예후를 판단하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

HuR은 세포의 성장, 분화, 대사, 이동, 노화와 관련된 유전자들의 안정화 조절 인자로 인식되어져 있고 인체의 다양한 부위에서 발생되는 암조직의 세포질에서 발현되는 것이 증명되면서 특정유전자들의 mRNA 조절에 대한 연구가 진행되어 졌다.<sup>10,24,25,78-80)</sup> HuR이 3'UTR 영역에 ARE을 갖고 있는 cyclin, VEGF (vascular endothelial growth factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), c-myc, interleukins, p21, p27, p53 등에 결합하여 이를 mRNA의 안정화에 관여하는 것으로 보고되고 있다<sup>10,16,25,81-85)</sup>. 다양한 암조직에서 발현되고 있는 BIRC2 역시 3'UTR 영역에 제 1 형의 형태인 ARE가 많이 존재하는 것으로 알려져 있으며, BRF1의 조절을 받는다는 보고가 있다.<sup>36,68,71)</sup> 본 연구에서는 HuR 단백질의 세포질내 발현이 BIRC2 단백질의 발현 ( $p<0.035$ )과, 그리고 BIRC2 단백질의 고발현 ( $p<0.007$ )과 유의성 있게 연관되어 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과를 토대로 3'UTR 영역에 다량의 ARE 부분을 갖고 있는 BIRC2가 HuR에 의해 조절되는지에 대한 실험을 구강암 세포주를 이용하여 시행하였다. 핵으로부터 세포질내로 mRNA 이동을 억제하는 약물로 알려져 있는 LMB를 구강암 세포주에 처리하여 HuR 단백질의 세포질내 발현이 영향을 받는지, 또한 이로 인해 BIRC2 단백질의 발현이 영향을 받는지를 확인한 결과, LMB 처리를 한 구강암 세포주 모두에서 농도 의존적으로 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 또한, HuR 기능을 억제한 실험 결과에서도 HuR siRNA 처리한 구강암 세포주 모두에서 BIRC2 단백질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 이들 결과로 보아, 구강편평세포암종의 세포질에 발현되는 HuR단백질은 BIRC2 mRNA 3'UTR 영역의 ARE 부분과 결합하여, 안정화 기전을 통해 BIRC2 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 생각된다.

## V. 결 론

구강암 세포주 HSC-2, HSC-3, Ca9-22, YD-9, YD-10B, YD-32, 그리고 YD-38과, 1994년 1월부터 2002년 12월까지 9년 동안 연세대학교 치과대학병원 구강악안면 외과에서 원발성 구강편평세포암종으로 수술 받은 95예를 대상으로 하였다. 구강암 세포주와 구강편평세포암종 환자에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 관찰하여 환자의 임상병리학적 요소 및 생존율과의 연관성을 분석하고, HuR 단백질의 세포질내 발현이 BIRC2 단백질의 발현에 미치는 영향에 대한 분석 및 실험으로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HuR 단백질은 구강암 세포주 7예 모두에서, 구강편평세포암종 조직 71.6%에서 세포질내에 발현되었으며, BIRC2 단백질은 구강암 세포주 7예 중 HSC-2, HSC-3, CA9-22, YD10B, YD32, YD-38에서, 구강편평세포암종 조직 95.8%에서 발현되었다.
2. HuR 단백질의 세포질내 발현과 통계적 유의성이 있게 관련이 있는 임상병리학적 요소는 없었으며, BIRC2 단백질의 고발현은 임상병리학적 요소 중 발병부위 ( $p=0.005$ ), 종양의 크기( $p=0.017$ ), 임상적 병기( $p=0.025$ )와 통계적 유의성이 있게 관련이 있었다
3. 다변량분석 결과, 생존율은 조직병리학적 등급( $p=0.004$ )과 HuR 단백질의 세포질내 발현농도( $p=0.044$ )와 관련이 있었다.
4. 구강편평세포암종 조직에서 HuR 단백질의 세포질내 발현은 BIRC2 단백질의 발현( $p=0.035$ ) 및 고발현( $p=0.007$ )과 통계적으로 유의성이 있게 관련이 있었으며, 구강암 세포주에서의 LMB 및 HuR siRNA 처리 실험 결과, HuR 단백질의 세포질내 발현이 BIRC2 단백질의 발현에 영향을 주는 것을 관찰하였다.

위의 결과를 종합하면, 인체의 여러 다른 암에서처럼, 한국인의 구강편평세포암종에서도 HuR 단백질의 세포질내 발현과 BIRC2 단백질의 발현을 관찰할 수 있

었다. HuR 단백질의 세포질내 발현은 생존율과 관련이 있는 것으로 관찰되어 예후표지인자가 될 수 있을 것으로 생각된다. BIRC2 단백질의 발현은 구강암 세포주와 구강편평세포암종 조직 모두에서 HuR 단백질의 세포질내 발현과 관련이 있는 것으로 관찰되었으며, 구강암 세포주를 이용한 실험을 통하여 HuR 단백질의 세포질내 발현에 의해 BIRC2 단백질의 발현이 영향을 받는 것을 관찰한 바 향후 두 단백질들 간의 관련성에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. Daisuke Sano, Jeffrey N. Myers : Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:645-62
2. 보건복지가족부, 국가암등록사업 연례 보고서(2005년 암발생, 1993-2005년 암생존 현황), 2008
3. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari ST. :Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg* 2008;19:1699-702
4. An SY, Jung EJ, Lee M, Kwon TK, Sung MW, Jeon YK, Kim KH. : Factors related to regional recurrence in early stage squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2008;1:166-70
5. Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, Gebhart E, Efferth T. :Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:317-29
6. Anke Doller, Josef Pfeilschifter, Wolfgang Eberhardt :Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular Signalling* 2008;20:2165-73
7. Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolin A. :Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 2003;195:356-72
8. Trzaska D, Dastych J. :Role of AURE sequences in the regulation of mRNA stability. *Postepy Biochem* 2005;51:28-35
9. Eberhardt W, Doller A, Akool el S, Pfeilschifter J. :Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* 2007;114:56-73
10. Nguyen-Chi M, Morello D. :Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation. *Med Sci (Paris)* 2008;24:290-6

11. Chen CY, Shyu AB. :AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995;20:465-70
12. Otake Y, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Spicer EK, Fernandes DJ. :Drug-induced destabilization of bcl-2 mRNA: a new approach for inducing apoptosis in tumor cells. *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5:616-22
13. Gingerich TJ, Feige JJ, LaMarre J. :AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev* 2004;5:49-63
14. Khabar KS. :The AU-rich transcriptome :more than interferons and cytokines, and its role in disease. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:1-10
15. Barreau C, Paillard L, Osborne HB. :AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 2005;33:7138-50
16. Brennan CM, Steitz JA. :HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:266-77
17. Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C. :Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1279-88
18. Dean JL, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. :The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* 2004;16:1113-21
19. Linker K, Pautz A, Fechir M, Hubrich T, Greeve J, Kleinert H. :Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res* 2005;33:4813-27
20. Winzen R, Thakur BK, Dittrich-Breiholz O, Shah M, Redich N, Dhamija S, Kracht M, Holtmann H. :Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Mol Cell Biol* 2007;27:8388-400

21. Champelovier P, Pautre V, Elatifi M, Dupre I, Rostaing B, Michoud A, Berger F, Seigneurin D. :Resistance to phorbol ester-induced differentiation in human myeloid leukemia cells :a hypothetic role for the mRNA stabilization process. *Leuk Res* 2006;30:1407-16
22. Denkert C, Koch I, von Keyserlingk N, Noske A, Niesporek S, Dietel M, Weichert W. :Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer :association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol* 2006;19:1261-9
23. Brosens LA, Keller JJ, Pohjola L, Haglund C, Morsink FH, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M, Giardiello FM, Ristimaki A, Offerhaus GJ. :Increased expression of cytoplasmic HuR in familial adenomatous polyposis. *Cancer Biol Ther* 2008;7:424-7
24. Brennan SE, Kuwano Y, Alkharouf N, Blackshear PJ, Gorospe M, Wilson GM. :The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res* 2009;69:5168-76
25. Ishimaru D, Ramalingam S, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Dellis S, Tholanikunnel BG, Fernandes DJ, Spicer EK. :Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1354-66
26. Peng SS, Chen CY, Xu N, Shyu AB. :RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* 1998;17:3461-70
27. Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, Schneider RJ, Snider MD, Nagy LE, Hatzoglou M. :Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J Biol Chem* 2002;277:41539-46
28. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. :The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997;16:6914-25

29. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. :Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 2003;17:1487-96
30. Wang Y, Zhou Q, Wang S, Zhang J. :Homocysteine-induced apoptosis of endothelial cell and its antagonism by folic acid :the roles of caspase3, c-IAP1 and c-IAP2. *Wei Sheng Yan Jiu* 2004;33:310-3
31. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. :The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59
32. Ekedahl J, Joseph B, Grigoriev MY, Muller M, Magnusson C, Lewensohn R, Zhivotovsky B. :Expression of inhibitor of apoptosis proteins in small- and non-small-cell lung carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2002;279:277-90
33. Vaziri SA, Grabowski DR, Tabata M, Holmes KA, Sterk J, Takigawa N, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R. :c-IAP1 is overexpressed in HL-60 cells selected for doxorubicin resistance :effects on etoposide-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2003;23:3657-61
34. Tenev T, Zachariou A, Wilson R, Ditzel M, Meier P. :IAPs are functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* 2005;7:70-7
35. O'Donnell JD, Johnson NC, Turbeville TD, Alfonso MY, Kruk PA. :BRCA1 185delAG truncation protein, BRAt, amplifies caspase-mediated apoptosis in ovarian cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2008;44:357-67
36. Lee SK, Kim SB, Kim JS, Moon CH, Han MS, Lee BJ, Chung DK, Min YJ, Park JH, Choi DH, Cho HR, Park SK, Park JW. :Butyrate response factor 1 enhances cisplatin sensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2005;117:32-40
37. Eun Ju Lee, Jin Kim, Seoung Ae Lee, Eun-Jung Kim, Yong-Chan Chun, Mi Heon Ryu and Jong-In Yook :Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two

- mucoepidermoid carcinoma cells. Experimental and Molecular medicine. 2005;37(5):379-90
38. Kim EJ, Che ZM, Park YJ, Hwang YS, Kim KY, Jung da W, Jeon NK, Choi YW, Lee EJ, Kim J :Morphogenesis and biological significance of spindle cell transformation in a spindle cell carcinoma. *Cancer letters* 2009;275(1):61-71
  39. Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y. :Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export :inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* 1997;4:139-47
  40. Menendez S, Higgins M, Berkson RG, Edling C, Lane DP, Lain S. :Nuclear export inhibitor leptomycin B induces the appearance of novel forms of human Mdm2 protein. *Br J Cancer* 2003;88:636-43
  41. Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F. :HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *Br J Cancer* 2009;100:1943-8
  42. Todd R, Wong DT. :Oncogenes. *Anticancer Res* 1999;19:4729-46
  43. Saiz-Rodriguez A. :Molecular basis of oral cancer. *Med Oral* 2001;6:342-9
  44. Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. :p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004;33:292-9
  45. Ghosh S, Ghosh A, Maiti GP, Alam N, Roy A, Roy B, Roychoudhury S, Panda CK. :Alterations of 3p21.31 tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma :Correlation with progression and prognosis. *Int J Cancer* 2008;123:2594-604
  46. Lese CM, Rossie KM, Appel BN, Reddy JK, Johnson JT, Myers EN, Gollin SM. :Visualization of INT2 and HST1 amplification in oral squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12:288-95

47. Tanuma J, Hiai H, Shisa H, Hirano M, Semba I, Nagaoka S, Kitano M. :Carcinogenesis modifier loci in rat tongue are subject to frequent loss of heterozygosity. *Int J Cancer* 2002;102:638-42
48. Gemma A. :Genomic alterations in preneoplastic lesions. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:2451-7
49. Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. :Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 2003;16:692-9
50. Poetsch M, Lorenz G, Bankau A, Kleist B. :Basaloid in contrast to nonbasaloid head and neck squamous cell carcinomas display aberrations especially in cell cycle control genes. *Head Neck* 2003;25:904-10
51. Perez-Ordonez B, Beauchemin M, Jordan RC. :Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59:445-53
52. Aissat N, Le Tourneau C, Ghoul A, Serova M, Bieche I, Lokiec F, Raymond E, Faivre S. :Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;62:305-13
53. Tsui IF, Poh CF, Garnis C, Rosin MP, Zhang L, Lam WL. :Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. *Int J Cancer* 2009;125:2219-28
54. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN, Shah PM, Verma RJ. :Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma :A multivariate analysis. *Head Neck* 2009
55. Dufourny B, van Teeffelen HA, Hamelers IH, Sussenbach JS, Steenbergh PH. :Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol* 2000;166:329-38
56. Eberhardt W, Akool el S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J. :Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9

- expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem* 2002;277:33518-28
57. De Siervi A, Marinissen M, Diggs J, Wang XF, Pages G, Senderowicz A. :Transcriptional activation of p21(waf1/cip1) by alkylphospholipids :role of the mitogen-activated protein kinase pathway in the transactivation of the human p21(waf1/cip1) promoter by Sp1. *Cancer Res* 2004;64:743-50
  58. Cho NP, Han HS, Soh Y, Son HJ. :Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with cytoplasmic HuR expression in salivary mucoepidermoid carcinoma but not in pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36:297-303
  59. Cho NP, Han HS, Soh Y, Lee KY, Son HJ. :Cytoplasmic HuR over-expression is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Pathology* 2007;39:545-50
  60. Hachiya M, Suzuki G, Koeffler HP, Akashi M. :Irradiation increases expression of GM-CSF in human fibroblasts by transcriptional and post-transcriptional regulation. *Exp Cell Res* 1994;214:343-50
  61. Pshenichkin SP, Wise BC. :Okadaic acid increases nerve growth factor secretion, mRNA stability, and gene transcription in primary cultures of cortical astrocytes. *J Biol Chem* 1995;270:5994-9
  62. Winzen R, Kafert S, Preiss B, Mylius-Spencker HA, Resch K, Holtmann H. :Interaction between themRNA of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor and cellular proteins. Possible involvement in post-transcriptional regulation of receptor expression. *J Biol Chem* 1996;271:13461-7
  63. Misquitta CM, Chen T, Grover AK. :Control of protein expression through mRNA stability in calcium signalling. *Cell Calcium* 2006;40:329-46
  64. Lee SY, Kang EJ, Hur GY, Jung KH, Jung HC, Kim JH, Shin C, In KH, Kang KH, Yoo SH, Shim JJ. :Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits cigarette smoke solution-induced mucin production in human airway

- epithelial (NCI-H292) cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;291:L84-90
65. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Beliveau R. :Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. Leuk Res 2007;31:1277-84
  66. Di Mari JF, Saada JI, Mifflin RC, Valentich JD, Powell DW. :HETEs enhance IL-1-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;293:G719-28
  67. Kang DG, Jeong MH, Ahn Y, Chae SC, Hur SH, Hong TJ, Kim YJ, Seong IW, Chae JK, Rhew JY, Chae IH, Cho MC, Bae JH, Rha SW, Kim CJ, Jang YS, Yoon J, Seung KB, Park SJ. :Clinical effects of hypertension on the mortality of patients with acute myocardial infarction. J Korean Med Sci 2009;24:800-6
  68. Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, Albertson DG. :Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. Oncogene 2005;24:4232-42
  69. de Graaf AO, van Krieken JH, Tonnissen E, Wissink W, van de Locht L, Overes I, Dolstra H, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. :Expression of C-IAP1, C-IAP2 and SURVIVIN discriminates different types of lymphoid malignancies. Br J Haematol 2005;130:852-9
  70. Kempkensteffen C, Hinz S, Christoph F, Kollermann J, Krause H, Schrader M, Schostak M, Miller K, Weikert S. :Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance. Int J Cancer 2007;120:1081-6
  71. Zhou J, Liu M, Zhai Y, Xie W. :The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells. Mol Endocrinol 2008;22:868-80

72. Ma O, Cai WW, Zender L, Dayaram T, Shen J, Herron AJ, Lowe SW, Man TK, Lau CC, Donehower LA. :MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer Res* 2009;69:2559-67
73. Gallegos-Hernandez JF, Hernandez-Hernandez DM, Flores-Diaz R, Sierra-Santiesteban I, Pichardo-Romero P, Arias-Ceballos H, Minauro-Munoz G, Alvarado-Cabrero I. :The number of sentinel nodes identified as prognostic factor in oral epidermoid cancer. *Oral Oncol* 2005;41:947-52
74. Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR, Myoung H. :Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol* 2006;42:208-17
75. Walvekar RR, Chaukar DA, Deshpande MS, Pai PS, Chaturvedi P, Kakade A, Kane SV, D'Cruz AK. :Verrucous carcinoma of the oral cavity :A clinical and pathological study of 101 cases. *Oral Oncol* 2009;45:47-51
76. Nemeth Z, Szigeti K, Mathe M, Szabo G, Velich N, Suba Z. :Effect of induction chemotherapy changes of laminin and syndecan expression in oral squamous cell carcinomas :a prospective, randomized, clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Craniofac Surg* 2005;16:205-12
77. Fuwa N, Kodaira T, Furutani K, Tachibana H, Nakamura T, Nakahara R, Tomoda T, Inokuchi H, Daimon T. :Intra-arterial chemoradiotherapy for locally advanced oral cavity cancer: analysis of therapeutic results in 134 cases. *Br J Cancer* 2008;98:1039-45
78. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH. :HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* 2001;61:2154-61
79. Deschenes-Furry J, Belanger G, Mwanjewe J, Lunde JA, Parks RJ, Perrone-Bizzozero N, Jasmin BJ. :The RNA-binding protein HuR binds to

- acetylcholinesterase transcripts and regulates their expression in differentiating skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2005;280:25361-8
80. Woo HH, Zhou Y, Yi X, David CL, Zheng W, Gilmore-Hebert M, Kluger HM, Ulukus EC, Baker T, Stoffer JB, Chambers SK. :Regulation of non-AU-rich element containing c-fms proto-oncogene expression by HuR in breast cancer. *Oncogene* 2009;28:1176-86
81. Rajasingh J, Bord E, Luedemann C, Asai J, Hamada H, Thorne T, Qin G, Goukassian D, Zhu Y, Losordo DW, Kishore R. :IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression. *FASEB J* 2006;20:2112-4
82. Wang S, Zhang J, Zhang Y, Kern S, Danner RL. :Nitric oxide-p38 MAPK signaling stabilizes mRNA through AU-rich element-dependent and -independent mechanisms. *J Leukoc Biol* 2008;83:982-90
83. Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. :IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. *Circ Res* 2009;104:e9-18
84. Tong X, Pelling JC. :Enhancement of p53 expression in keratinocytes by the bioflavonoid apigenin is associated with RNA-binding protein HuR. *Mol Carcinog* 2009;48:118-29
85. Topisirovic I, Siddiqui N, Orollicki S, Skrabaneck LA, Tremblay M, Hoang T, Borden KL. :Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Mol Cell Biol* 2009;29:1152-62

## **ABSTRACT**

### **Expression of HuR and BIRC2 & its prognostic significance in oral squamous cell carcinoma**

Kim, Hee Kyeong

Dept. of Dentistry

The Graduate School

Yonsei University

The expression of cytoplasmic HuR has been noted in several cancer types, where it may contribute to the increased BIRC2 expression observed during carcinogenesis.

To assess the prognostic significance of the cytoplasmic HuR and BIRC2 expression in cases of oral squamous cell carcinoma (OSCC), the expression patterns of HuR and BIRC2 were observed via immunohistochemistry analyses of 95 OSCC samples and immunoblotting of 7 oral cancer cell lines and the correlation between the cytoplasmic HuR and BIRC2 expression, clinicopathologic factors, and overall survival were analysed. In the 95 tumor tissues, positive cytoplasmic HuR expression in 71.6%, high levels of HuR expression in 46.3%, positive BIRC2 expression in 95.8% and high levels of BIRC2 expression in 81.1% were noted. Overall survival was significantly associated with high cytoplasmic HuR expression ( $p=0.044$ ), and high BIRC2 expression was

significantly associated with T stage ( $p=0.017$ ), clinical stage ( $p=0.025$ ), and tumor location ( $p=0.005$ ). Our results suggest that the positive cytoplasmic HuR expression may be prognostic factor in OSCC.

And the positive cytoplasmic HuR expression was significantly associated with positive BIRC2 expression ( $p=0.035$ ) or high level of BIRC2 expression ( $p=0.007$ ) in the 95 tumor tissues. The correlation between the expressions of cytoplasmic HuR and BIRC2 was investigated with immunoblotting of the oral cancer cell lines treated with HuR small interfering RNA (siRNA) and Leptomycin B (LMB). The inhibition of HuR expression by siRNA or LMB caused a reduction in the BIRC2 expression in YD10B and HSC-3 oral cancer cells. Our results suggest that the cytoplasmic expression of HuR is associated with BIRC2 expression in OSCCs and HuR can regulate BIRC2 expression in oral cancer cell lines. Further studies will be required to determine the relation between HuR and BIRC2.

---

Key words : oral squamous cell carcinoma, HuR, BIRC2