

pAkt 단백질 발현이 자궁내막암 예후에 미치는 영향*

계명대학교 의과대학 산부인과학교실

남동윤 · 신소진 · 권상훈 · 차순도 · 조치흠

pAkt is a Poor Prognostic Factor for Patients with Endometrial Cancer *

Dong Yoon Nam, M.D., So Jin Shin, M.D.,
Sang Hoon Kwon, M.D., Soon Do Cha, M.D., Chi Heum Cho, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract : The tumor suppressor PTEN acts as a lipid phosphatase, regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-signaling pathway, and modulates cell cycle progression and cell survival. Somatic mutations of PTEN have been reported in a variety of cancers, especially in endometrial carcinoma. To clarify whether and how the PI3K/Akt pathway relates to endometrial carcinoma, the expression of those pathway-related proteins in patients with endometrial carcinoma were examined.

In order to investigate the relationship between phosphorylated Akt (pAkt) expression and prognosis of endometrial cancer patients, 80 patients with endometrial cancer were enrolled. Immunohistochemical analysis and western-blot were performed.

Preliminary, western blot analysis from endometrial cancer cell line (Hec-1A and Ishikawa) and normal endometrial cell lines showed increased expression of pAkt in endometrial cancer cells compared to normal cells. The mean age was 52.3 years. Stage I were 59 cases, stage II were 5 cases, stage III were 9 cases, stage IV were 2 cases, and unknown stage were 5 cases. Of 80 endometrial carcinomas, 37 cases (46%) showed positive immunohistochemical staining of pAkt. The survival rate for pAkt negative case was significantly higher than that for pAkt positive

* A dissertation submitted to the Committee of the Graduate School of Keimyung University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Medical Science, May, 2008

교신저자: 조치흠, 700-712 대구광역시 중구 달성로 216, 계명대학교 의과대학 산부인과학교실

Chi Heum Cho, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Keimyung University School of Medicine
216, Dalseongno, Jung-gu, Daegu, 700-712 KOREA

Tel: +82-53-250-7518 E-mail: c0035@dsmc.or.kr

cases. These results showed that increased expression level of pAkt was significantly different according to potential aggressiveness of endometrial cancer (Spearman's correlation coefficient method $p = 0.05$). The current study demonstrates that pAkt-positive staining is a significant indicator of poor survival for patients with endometrial cancer.

Key Words : Endometrial cancer, gene expression, phosphorylated Akt, prognosis

서론

폐경기 이후의 여성에서 주로 발생하는 자궁내막암은 현재 서구 선진국에서는 가장 흔히 발생하는 여성 생식기암으로서, 2006년 미국에서는 약 41,200명의 신환이 발생하고 7,350명 정도가 사망하였다고 보고하였다[1]. 국내에서는 자궁경부암, 난소암에 이어 3위의 발생 빈도를 보이는 여성 생식기암이며, 1991년 부인암 등록사업을 시작한 이후 꾸준히 증가하여 2002년에는 5배 이상의 가장 현저한 증가를 보이고 있으며, 한국 여성의 점차 서구화되고 있는 생활 형태, 호르몬 노출, 임신 횟수, 초경 연령, 폐경 연령 등의 변화와 관련되어 향후 급속히 증가할 것으로 예상되는 여성 생식기암이다[2]. 우리나라 여성의 자궁내막암 발생 평균 연령은 52 - 56세이며, 가장 흔한 증상은 질출혈로 전체 자궁내막암 환자의 70 - 90%에서 발생한다고 보고하고 있으며, 자궁내막암 환자의 70 - 80% 정도가 진단시 병변이 자궁에 국한된 초기의 상태로 발견되지만, 병기가 높아짐에 따라 적극적인 치료에도 불구하고 생존율은 낮아져 전체 5년 생존율은 약 75%로 감소하여 예후와 관련된 인자를 규명하고 분석하는 것이 중요하다[3,4]. 자궁내막암의 예후인자로서 연령, 세포 유형 및 분화도, 자궁근층의 침윤, 림프관 침범, 자궁협부 경부 침범, 부속기 침범, 림프절 전이, 복강 내 병소 유무, 병소의 크기 및 종양표지자 등이 있으며, 이러한 인자들을 정확히 파악하여 치료하는 것이 자궁내막암의 예후를 증진시키는데 도움이 된다[5].

최근에는 임상병리학적 예후 인자 외에도 분자생물학적 인자와 예후와의 관련성 연구가 많이 진행되고 있다. 이러한 것과 관련하여 자궁내막암에

서 phosphatase and tensin homolog (PTEN) 유전자는 중요한 역할을 하고 있다. PTEN 혹은 mutated in multiple advanced cancers 1 (MMAC-1)은 최근에 밝혀진 종양억제 유전자로 염색체 10q23.2에 위치하고 있다[6]. 이 유전자의 돌연변이는 과오종성 종양과 유방암, 갑상선암 등의 발생을 특징으로 하는 Cowden 질환의 원인으로 알려졌고, 이 외에도 전립선암종, 유방암종, 악성흑색종, 방광암종, 교모세포종, 자궁내막암종 등 많은 악성 종양에서 PTEN의 기능 소실이 관찰되었다[7-11]. 이는 PTEN의 아미노산 영역에 tensin의 유사 구조가 있기 때문이다. PTEN이 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate를 탈인산화시키는 활성을 가지며, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)의 활성화에 의해서 형성된 신호 전달계의 2차 전달자이며, 이는 Akt/PKB 신호전달 경로를 활성화하여 세포의 생존력을 강화시킨다[6,12]. 따라서 PTEN의 기능은 Akt/PKB 신호전달 경로를 제어하여 항암기능을 나타내는 것으로 추측된다[6]. 암세포 생존의 신호전달 체계중 Akt에 의한 전달 체계가 중요한 역할을 하고 있으며, PI3K/Akt 신호 전달 체계를 억제하는 암 억제 유전자가 많은 종류의 암에서 발견되고 있어, Akt의 과발현이 암 발생과 진행에 연관이 있음을 알 수 있다[13]. 그러나 자궁내막암에서 Akt의 활성화와 관계한 예후인자로서의 역할에 대해 아직 정확히 밝혀진 바 없으므로 본 연구자는 Akt의 활성화된 pAKT의 발현과 자궁내막암과의 상관관계를 면역조직화학염색을 이용하여 생존율과의 관계를 규명하고자 이 연구를 계획하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입한 자궁내막암 세포주인 Hec 1A, Ishikawa cell 및 정상 자궁내막 세포주(T-HESCs)를 이용하여 세포주 배양을 통해 실험을 하였으며, NaB와 HDAC-I1 는 Calbiochem 회사(USA)에서 구입하였다. 1993년 1월부터 2003년 12월까지의 본원 산부인과에서 자궁내막암으로 진단받고 자궁적출술을 시행한 환자들 중 병리학적으로 재검토가 가능했던 80명의 환자를 대상으로 하였으며, pAkt에 대한 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 이를 토대로 상관관계 분석 및 생존율 분석을 하였으며, 대상 환자의 평균 추적 기간은 72개월이었다.

2. 일차 세포 배양

세포주에서 자궁내막암과 정상자궁내막에서의 pAkt 발현 분석을 위해 세포주 배양을 하였다. Hec 1A, Ishikawa, 및 T-HESCs 세포주 배양은 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 ham 배양액에서 부유시킨 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 24 - 48 시간 후 배양액을 교환하였다.

3. Western Blot analysis

분쇄한 세포에서 Lysis Buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 원심분리 하여 상층을 취하고 Biorad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 분광광도계 (Du[®] 650, Beckman Coulter Inc., USA)의 595 nm에서 흡광

도를 측정하여 단백질을 정량 하였다. 얻어진 단백질 분획을 전기영동하고 nitrocellulose paper (Immobilin Milipore, UK)로 전기이동 (electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동된 막을 blocking용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 진동시켰다. Blocking용액을 제거하고 pAkt에 대한 일차 항체를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액(실온)에 3시간 동안 반응시킨 후 1×TBS-T 용액(20 mmol/ℓ Tris, 137 mmol/ℓ NaCl, 0.5% Tween-20)으로 10분간 3회 세척하였다. 그리고 이차 항체인 goat polyclonal IgG (Santa Cruz, USA)를 1:1,000으로 희석한 blocking 용액에 nitrocellulose 막을 넣고 2시간 동안 반응시켜 항체를 결합시켰다. 1×TBS-T 용액으로 nitrocellulose 막을 10분간 세 번 세척하여 비특이적으로 결합해 있는 항체를 제거하였다. 세척 후 막에 남아 있는 TBS-T를 제거하고 ECL western blotting detection reagent (Amersham Biosciences, USA)로 검출하였다.

4. 면역조직화학염색

조직에서 pAkt 단백질의 증명을 위해 4 μM 두께의 파라핀 절편을 유리 슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열 알코올로 탈파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직 내에 감추어진 항원을 노출시키기 위해 1% zinc sulfate용액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 15분간 가열하였다. 실온에서 20 분 가량 식힌 후 30분간 normal horse serum (Vector Laboratories, USA)을 가한 후 항체인 pAkt 폴리클론항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:10으로 희석하여 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. PBS로 수세하고 peroxidase-conjugated streptavidin (Dako, USA) 1:500을 37°C에서

15분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydro-chloride)로 10 - 20분간 실온에서 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대비 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 광학현미경상에서 pAkt 단백질에 대한 면역조직화학염색의 판독은 중앙 세포의 세포질에 갈색으로 진하게 염색된 경우에 한해서 양성 반응으로 하였다. 먼저 100배 시야의 저 배율에서 염색된 부위를 선택한 후 400배 시야에서 염색된 세포가 전체 세포의 1% 이하 : -, 1-10% : +, 10 - 50% : ++, 50% 이상 : +++ 로 판정하였다 (Fig. 1).

5. 분석방법

통계학적 분석은 SPSS version 12.0 프로그램을 이용하였고, 자궁내막암의 예후인자와 pAkt와의 상관관계 분석에는 Pearson의 카이제곱 검정을 이용하였으며, 전체 5년 생존율 분석에서는 Kaplan-Meier법과 Log-Rank법을 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 나타내었다.

성 적

1. 환자의 임상병리학적 특징

80명의 자궁내막암 환자들의 평균 연령은 52.3세였으며, 28세부터 73세까지 분포하였다. 병리조직학적 분류상 자궁내막양성선암(endometrioid adenocarcinoma)이 70명(87.5%)으로 대부분을 차지하였으며, 그 외 비자궁내막양성선암(non-endometrioid adenocarcinoma)이 10명(12.5%)이었다. 조직학적 세포분화가 고분화도는 35명(44%), 중분화도는 33명(41%), 저분화도는 12명(15%)을 나타내었다. FIGO의 수술적 병기상 분포를 보면 병기 I이 59명(73.7%)으로서 대부분을 차지하였고, 병기 II는 5명(6.2%), 병기 III은 9명(11.2%), 병기 IV는 2명(2.5%), 병기를 알 수 없는 것이 5명(6.2%)이었다(Table 1).

Table 1. Functional classification of up- or down-regulated genes of kidney in cisplatin treated rats

Clinicopathologic factors	Numbers of patients (%)
Age (n=80)	
mean	52.3
range	28 - 73
Histological type (N=80)	
Endometrioid carcinoma	70 (87.5%)
Non-endometrioid carcinoma	10 (12.5%)
Histologic grade (n=80)	
Grade 1	35 (44%)
Grade 2	33 (41%)
Grade 3	12 (15%)
Surgical stage (n=80)	
Stage I	59 (73.7%)
Stage II	5 (6.2%)
Stage III	9 (11.2%)
Stage IV	2 (2.5%)
Unknown	5 (6.2%)

2. 자궁내막암 세포주에서 pAkt의 발현

자궁내막암 세포주인 Hec 1A, Ishikawa 세포주와, 정상 자궁내막암 세포주인 T-HESCs에서의 Akt와 pAkt의 발현을 분석한 결과 모두에서 Akt의 발현은 보이지만, 활성화된 pAkt의 발현은 자궁내막암 세포주에서만 발현을 보였다 (Fig. 2).

3. pAkt의 발현율

전체 80명의 자궁내막암 환자에서 pAkt의 발현율은 46%이었다. 발현되는 pAkt와 병기와의 상관

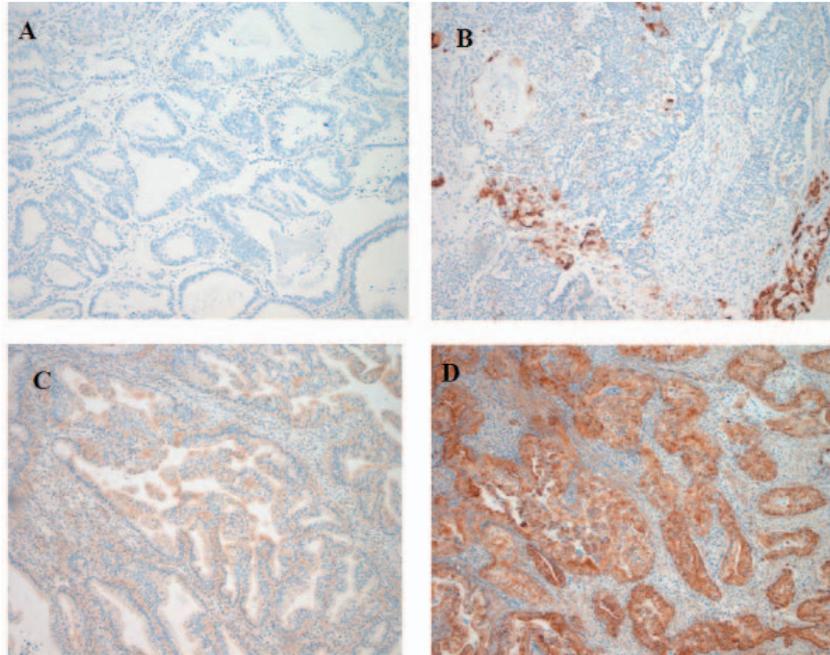


Fig. 1. pAkt expression in endometrial cancer tissue. A, negative staining for pAkt in endometrial carcinoma (X 200). B, 1 positive staining for pAkt in endometrial carcinoma (X 200). C, 2 positive staining for pAkt in endometrial carcinoma (X 200). D, 3 positive staining for pAkt in endometrial carcinoma (X 200).

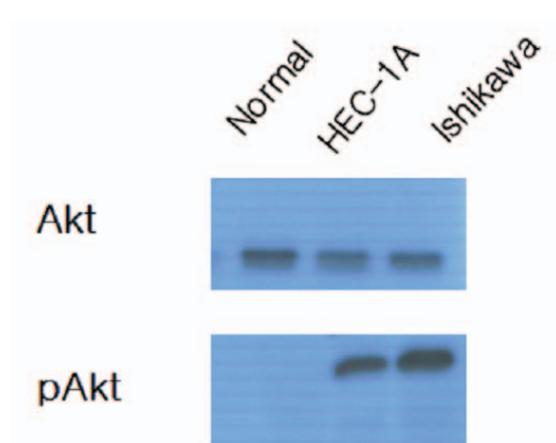


Fig. 2. Western blotting for pAkt in endometrial cancer and normal cell lines. Hec 1A, Ishikawa cells; endometrial cancer, T-HESCs; normal.

관계는 통계적으로 의미가 없었으며, 세포분화도와 비교에서는 세포분화도가 나빠질수록 통계적으로 의미 있게 발현의 증가를 보였다($p=0.042$) (Fig. 3).

4. pAkt의 발현과 생존율과의 상관 관계

pAkt의 발현과 생존율에 있어서 의미있는 예후 관련성이 있는지를 단변량 분석으로 조사하였다. pAkt의 발현과 생존율에는 통계적으로 유의하게 전체 5년 생존율의 감소를 보였다($p<0.05$) (Fig. 4).

고 찰

자궁내막암은 미국이나 유럽의 여러 선진국에서 높은 발생빈도를 보이고 있는 부인 암으로서 우리나라에서는 다른 여성 생식기종양 특히 자궁경부암에 비하여 비교적 낮은 빈도를 보이고 있다. 그러나 최근 급속한 경제 성장에 따른 생활수준의 향상으로 말미암아 평균 생명 수명이 연장되고 점차 발생 빈도가 증가하고 있는 중요한 부인암의 하나로 자리 매김하고 있다. 자궁내막암은 현미경 소견, 임상 양상과 분자유전학적 판단에 따라 두 가지

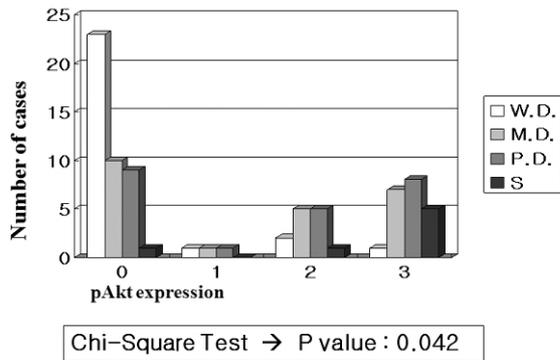


Fig. 3. Comparison of expression of pAkt and tumor grades in endometrial cancer tissues. Correlation between pAkt and tumor grades (p=0.042).

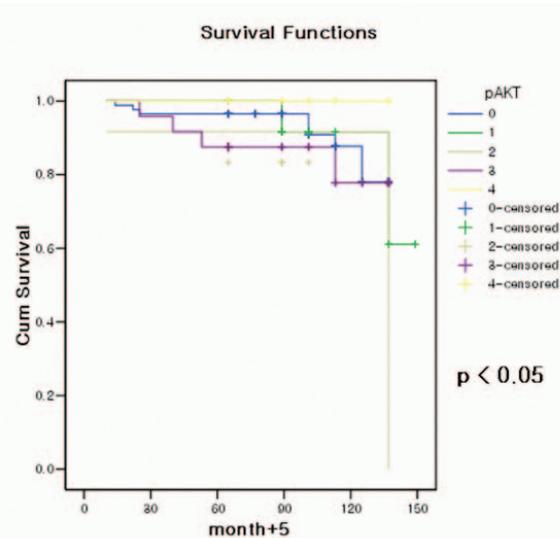


Fig. 4. The survival analysis for pAkt expression in endometrial cancer.

(Type I, II)로 구분된다[14]. Type I 은 전체 자궁내막암의 70 - 80%를 차지하며, 비정상적인 에스트로겐 과자극과 연관성이 있으며 흔히 전암 병소를 거쳐 악성으로 분화되는 양상을 보이며, 좋은 예후를 가진다. 이에 반해 Type II 는 자궁내막암 조직중 endometrioid 를 제외한 papillary serous 나 clear cell 의 조직형태를 가지고, 호르몬자극의 연관성을 가지지 않으며 전암병소를 거치지 않는 특징을 가지며 불량한 예후를 보인다.

암억제 유전자 p53에 의해 전사조절을 받는 것

으로 알려진 억제 유전자 PTEN은 신경교종, 흑색종, 유방암, 전립선암, 폐암 등 여러 악성종양에서 높은 빈도로 변이가 일어난다[7-11]. 또한 PTEN의 과량 발현은 세포의 성장과 종양 형성을 억제하며, 암세포에서의 PTEN 유전자 돌연변이와 발현 억제는 주로 암 형성과정에 영향을 미치는 PI3K 신호전달 경로를 통하여 Akt를 활성화 한다[15]. Akt 신호 전달 체계는 종양형성에 중요한 역할을 한다. Akt는 serine/threonine kinase로, PI3K의 신호 전달 체계 중 Akt는 타이로신 활성화 효소 수용체에 연관되어, PI3K의 인산화에 의하여 활성화된다. Akt는 Bad, forkhead transcription factor, caspase 9와 같은 세포자멸사 전구단백질을 인산화하고 미토콘드리아에서 cytochrome c의 배출을 막고 세포자멸사를 억제하여 세포 생존을 증가시키며, cyclin-dependent kinase inhibitor의 조절로 세포 증식에 관여 한다[13,16,17]. 그러나 현재까지 암세포 억제에 관한 PTEN의 분자수준의 작용 기작 및 그 타겟은 명확하지 않다. PTEN의 작용 기작을 해명하고 이를 특이적으로 조절하는 신약을 개발하는 것은 암 치료제 개발에 있어 매우 유망한 분야로 손꼽힌다. 예컨대 PTEN이 소실되면 Akt 효소가 과도하게 활성화되는데, 이것의 기질로 작용하는 mTOR kinase를 특이적으로 저해하는 rapamycin이나 이것의 유도체인 CCI-779는 임상실험 결과 PTEN이 소실된 종양의 성장을 특이적으로 억제하는데 매우 효과적인 것으로 판명되었다[18]. Akt는 표피 성장 인자(EGF), 인슐린 유사 성장인자-I (Insulin-like growth factor-I), heregulin 등의 성장 인자의 신호 전달 체계 하부(downstream)에 위치하며, 이 성장 인자들은 PI3K/Akt 신호 전달 체계를 통해, 에스트로젠 수용체-alpha 활성화와 호르몬 비의존 성장을 유도한다. 암세포 생존의 신호 전달 체계 중 Akt에 의한 전달 체계가 중요한 역할을 하고 있으며, PI3K/Akt 신호 전달 체계를 억제하는 암 억제 유전자가 많은 종류의 암에서 발견되고 있어, Akt의 과발현 혹은 활성화가 암 발생과 진행에 연관이 있음을 알 수 있다[19-20]. 그러므로 Akt의 과 발현이 자궁내막암의 암화과정에 관여하고, 또한 예

후인자로서의 가능성을 알아보고자 연구를 계획하였다.

pAkt의 발현이 세포주에서는 어떠한지를 보기 위해 정상자궁내막 세포주와 암 세포주를 대상으로 pAkt의 발현을 알아본 결과, 정상에서는 발현이 없었으며 암 세포주에서만 발현을 보여 암화과정에 관여한다는 사실을 확인하였다. 이후 면역 조직화학적 검사를 통해 pAkt의 발현과 예후인자와의 상관관계를 조사하였다. 전체 80명의 자궁내막암 환자에서 pAkt의 발현율은 46% 이었으며, 발현되는 pAkt와 병기와의 상관관계는 통계적으로 의미가 없었고, 세포분화도와의 비교에서는 세포분화도가 나빠질수록 통계적으로 의미 있게 발현의 증가를 보였다($p=0.042$). 이러한 결과의 의미는 Akt의 활성이 많을수록 악성도가 높다고 할 수 있으며, 이전의 연구에서 보여주듯이 PTEN의 변이가 많을수록 불량한 예후를 보이는 것과 동일한 결과를 보였다[21]. 생존율과 pAkt 발현과의 상관관계를 분석하여 pAkt의 발현과 생존율에는 통계적으로 유의하게 전체 5년 생존율의 감소를 보였다($p<0.05$). 본 연구에서는 PTEN의 발현에 따른 pAkt의 발현은 비교하지 않았다. 차후에는 이러한 비교를 통한 생존율의 차이를 보는 것이 중요하겠다.

이상의 결과로 자궁내막암 환자에서 pAkt의 발현은 불량 예후인자로서의 가능성을 제시하였으며, 향후 많은 환자군에서 다기관으로 접근하여 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

이 연구는 자궁내막암에서 Akt의 활성과 관계한 예후인자로서의 역할에 대해 아직 정확히 밝혀진 바 없으므로 본 연구자는 Akt의 활성화된 pAkt의 발현과 자궁내막암과의 상관관계를 면역조직 화학 염색을 이용하여 생존율과의 관계를 규명하고자 이 연구를 계획하였다.

세포주에서 자궁내막암과 정상자궁내막에서의 pAkt 발현 분석을 위해 Hec 1A, Ishikawa, 및 T-HESCs 세포주를 이용하여 세포주에서의 발현

을 분석하였다. 자궁내막암으로 진단받고 자궁적출술을 시행한 환자들중 병리학적 재검토가 가능했던 80명의 환자를 대상으로 하였으며, pAkt에 대한 면역조직학적 검사를 시행하였다. 이를 토대로 상관관계 분석 및 생존율 분석을 하였으며, 대상 환자의 평균 추적 기간은 72개월 이었다. 80명의 자궁내막암 환자들의 평균 연령은 52.3세였으며, 28세부터 73세까지 분포하였다. 병리조직학적 분류상 자궁내막양성선암(endometrioid adenocarcinoma)이 70명(87.5%)으로 대부분을 차지하였으며, 그 외 비자궁내막양 선암(non-endometrioid adenocarcinoma)이 10명(12.5%) 이었다. 조직학적 세포분화도 분류상 세포분화도 1은 35명(44%), 세포분화도 2는 33명(41%), 세포분화도 3은 12명(15%)을 나타내었다. FIGO의 수술적 병기상 분포를 보면 병기 I이 59명(73.7%)으로서 대부분을 차지하였고, 병기 II는 5명(6.2%), 병기 III은 9명(11.2%), 병기 IV는 2명(2.5%), 병기를 알 수 없는 것이 5명(6.2%)이었다. 자궁내막암 세포주인 Hec 1A, Ishikawa 세포주와, 정상 자궁내막암 세포주인 T-HESCs 에서의 Akt와 pAkt의 발현을 분석하여본 결과 모두에서 Akt의 발현은 보이지 않지만, 활성화된 pAkt의 발현은 자궁내막암 세포주에서만 발현을 보였다. 전체 80명의 자궁내막암 환자에서 pAkt의 발현율은 46% 이었다. 발현되는 pAkt와 병기와의 상관관계는 통계적으로 의미가 없었으며, 세포분화도와의 비교에서는 세포분화도가 나빠질수록 통계적으로 의미 있게 발현의 증가를 보였다($p=0.042$). pAkt의 발현과 생존율에 있어서 의미있는 예후 관련성이 있는지를 단변량 분석으로 조사하였다. pAkt의 발현과 생존율에는 통계적으로 유의하게 전체 5년 생존율의 감소를 보였다($p<0.05$).

이상의 결과로 자궁내막암 환자에서 pAkt의 발현은 불량 예후인자로서의 가능성을 제시하였으며, 향후 많은 환자군에서 다기관으로 접근하여 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;**56**:106-30.
2. 대한산부인과학회 중앙분과위원회. 한국 부인암 등록사업 조사 보고서 2002 (2002.1.1-2002.12.31). *대한산부인과학회지* 2004;**47**:1029-70.
3. Oh SH, Jun CY, Kim JW, Park JS, Namkung, Kim SJ. Endometrial carcinoma. Clinicopathologic analysis. *Korean J Obstet Gynecol* 1987;**30**:1661-72.
4. Jeon WJ, Moon EJ, Ryu SY, Kim JH, Kim BG, Park SY. Clinicopathologic characteristics and prognosis of endometrial cancer: A study of 100 cases. *Korean J Obstet Gynecol* 2000;**43**:1616-23.
5. Jonathan SB. *Berek & Novak's gynecology*. 14th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1362-6.
6. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppressor. *Cell* 2000;**100**:387-90.
7. Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet* 1995;**11**:412-5.
8. Carrns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Estellar M, Herman JG, *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997;**57**:4997-5000.
9. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, *et al.* Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature Genet* 1997;**16**:64-7.
10. Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, Rocca-Serra P, Dahia PL, Zheng Z. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 1998;**7**:507-15.
11. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, *et al.* Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997;**57**:3935-40.
12. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998;**273**:13375-8.
13. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;**98**:857-68.
14. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983;**15**:10-7.
15. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr opin Genet Dev* 1998;**8**:49-54.
16. Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:3627-32.
17. Datta K, Franke TF, Chan TO, Makris A, Yang SI, Kaplan DR, *et al.* AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol Cell Biol* 1995;**15**:2304-10.
18. Dancey JE. Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;**16**:1101-4.
19. Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, List HJ, Stoica A. Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Mol Endocrinol* 2003;**17**:818-30.
20. Stoica GE, Franke TF, Moroni M, mueller S, Morgan E, Stoica A. Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2003;**22**:7998-8011.
21. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, *et al.* Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clinic Cancer Res* 2001;**7**:892-5.