

## 자궁경부암 세포주에서 세포주기조절 유전자들의 발현

계명대학교 의과대학 <sup>1</sup>산부인과학교실, <sup>2</sup>미생물학교실, <sup>3</sup>면역학교실

안중걸<sup>1</sup> · 이태성<sup>1</sup> · 조재위<sup>2</sup> · 백원기<sup>2</sup>  
서성일<sup>2</sup> · 서민호<sup>2</sup> · 박종욱<sup>3</sup> · 차순도<sup>1</sup>

### Expressions of Cell Cycle Control Genes in Human Uterine Cervical Cancer Cells

Jung Geol Ahn, M.D.<sup>1</sup>, Tae Seong Lee, M.D.<sup>1</sup>, Jae We Cho, M.D.<sup>2</sup>  
Won Ki Baek, M.D.<sup>2</sup>, Seong Il Suh, M.D.<sup>2</sup>, Min Ho Suh, M.D.<sup>2</sup>  
Jong Wook Park, M.D.<sup>3</sup> and Soon Do Cha, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Obstetrics and Gynecology, <sup>2</sup>Microbiology, and <sup>3</sup>Immunology,  
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

**Purpose:** Recently, many aspects of biological functions of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), CDK inhibitors and Rb gene have been reported, and the cell cycle control genes are considered to act important roles in tumorigenesis. In this study, the expression patterns of major cell cycle control genes (cyclin A, B, C, D1, E, E2F, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1</sup> and Rb) in various human cervical cancer cells were analysed to elucidate the impacts of the cell cycle control genes on the carcinogenesis of human cervical cancer.

**Materials and Methods:** The expression patterns of major cell cycle control genes in HT-3, C33-A, HeLa, C4-II, SiHa and CaSki human uterine cervical cancer cells were analysed by using western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Results:** In most of the cervical cancer cells tested, the overexpressions of cyclin A, E, E2F and markedly decreased expression of Rb tumor suppressor proteins were observed. By comparing RNA and protein expressions in each cancer cells, the mechanisms of increased expressions of cyclin A, E and decreased expression of Rb were elucidated as post-translational controls.

**Conclusion:** The cervical carcinogenesis caused by the altered expressions of the major cell cycle control genes can be hypothesized as follows: overexpressions of cyclin E and A cause acceleration of Rb phosphorylations and E2F overexpression; increased E2F function accelerates G1/S transition of the cells; compensatory increase of p16<sup>INK4a</sup> expression cannot stop the cells in G1 phase because Rb expression is severely decreased;

---

책임저자 : 차순도, 대구시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 산부인과학교실, 700-712

Tel: 053-250-7509, Fax: 053-250-7599, E-mail: c2580@dsmc.or.kr

접수일 : 1999년 8월 4일, 게재승인일 : 1999년 11월 18일

consequently, loss of Rb function, G1 shortening, inappropriate cell division and decreased function of the maintenance of genomic stability occur. In addition to these alterations, loss of p53<sup>WT</sup> functions further accelerate instability of genome and decrease the susceptibility to cell death. Furthermore, overexpression of Bcl2 protects these abnormal cells from apoptosis. All these derangements of cell cycle control should contribute to the human cervical carcinogenesis.

**Key Words:** Cervix neoplasm, Tumor cell lines, Cell cycle control genes

## 서 론

세포의 외부환경에 성장인자가 충분할 때는, 성장인자가 세포막의 수용체를 자극하고, 그 결과 세포 내 신호전달 체계가 활성화되어 핵 내에 성장 촉진신호가 도달하면 세포는 신호를 인지하여 G1기에서 S기로 들어가서 DNA가 복제된 후 G2기를 거쳐서 M기로 들어가 두 개의 세포로 분열한 후 다시 G1기로 들어가서 다음 번 세포 분열을 위한 신호를 기다리게 된다(1,2).

현재까지 알려진 암화과정의 원인인자로는 세포외부의 과다한 mitogen의 작용, 세포내 암 유전자들의 비정상적 활성에 의한 과다한 신호전달, 혹은 종양바이러스의 암단백질들의 작용 등이 있다(3). 그러나 세포분열의 궁극적 조절은 cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), CDK inhibitors (CKIs), Rb항암단백질 등에 의한 세포주기조절에 의해 결정되기 때문에, 만일 세포주기 조절인자들의 기능에 불균형이 초래된다면 과다한 세포분열이 초래되어 암화과정에 접어들게 될 것이다(3~5).

이와 같이 세포주기 조절과 암 발생과는 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되며, 암 발생의 기전을 더욱 깊이 설명하기 위해서는 암세포와 정상 세포사이에서 세포주기조절이 어떻게 변화되어 있는가를 분자생물학적 및 세포생물학적 수준에서 연구함이 필수적이다(6). 그러나 암세포의 세포주기 변화에 대한 연구는 현재 개개의 세포주기 조절인자에 대한 개별적 연구보고들만 있을 뿐이며 조절인자들을 종합적으로 비교분석한 연

구는 찾아보기 힘든 실정이다.

이러한 지견을 바탕으로 이 연구에서는 자궁경부암 발생기전의 일부를 세포주기조절 차원에서 규명하고자 각종 자궁경부 암세포주를 이용하여 RNA 및 단백질 차원에서 cyclin A, cyclin D1, cyclin E, E2F, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1</sup> 및 Rb 등을 포함한 세포주기 조절인자들의 발현을 조사하고 이들의 상호관련성을 종합적으로 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 세포주 배양

인간 자궁경부암 세포주인 HT-3, C33-A, HeLa, C4-II, SiHa 및 CaSki 세포들은 미국 ATCC에서 분양받아 사용하였는데, HT-3, C4-II, SiHa 및 CaSki 세포들은 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI-1640 배양액을 이용하여 36°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였고, HeLa세포는 10% fetal calf serum이 함유된 F-10 배양액을 이용하여 36°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. C33-A 암세포는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 DMEM high glucose 배양액을 사용하여 36°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### 2) Trypan blue 배제 실험

0.4% trypan blue 염색액 50 μl에 세포배양액 50 μl를 넣고 섞은 후 hemocytometer에 접종하고 1분 후 trypan blue가 배제된 밝은 세포수를 세어 생존 세포수를 계수하였으며, 두 개의 시료를 각각 계수후 그 평균치를 취하였다.

### 3) Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 Western blot 분석

자궁경부 암세포주에서 각종 세포주기 조절단백질의 발현을 조사하기 위하여 배양된 세포들에 세포용해 완충액(10 mM Tris-Cl (pH7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase 억제 혼합액을 넣고 얼음에서 30분간 둔 후 원심분리하여 상층액을 취한 후 Biorad제품의 단백질 정량 kit로 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose 필터(Millipore제품, Immobilon)로 전기이동(electrotransfer)을 시행하였다. 전기이동된 필터를 Blotto용액(5% 탈지분이 함유된 TBS-T 완충액)에 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 진탕(shaking)하였다. Blotto용액을 제거하고 일차항체 용액(실온)에 2시간 두고 TBS-T

완충액으로 씻은 다음 이차항체 용액(실온)에서 1시간 두었다. 이를 다시 TBS-T 완충액으로 세척한 후 Enhanced Chemiluminescence 시약(ECL, Amersham제품)으로 발광시키고 autoradiography를 실시한 후 나타난 band를 densitometer로 정량하였다. 일차항체들은 미국 Santa Cruz (cyclin A, cyclin D1, cyclin E, E2F-1, p16, p21, Bcl2), Pharmingen (Rb, p21) 및 Oncogene Science (cyclin D1, p21)제품을 사용하였다.

### 4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

자궁경부 암세포주에서 각종 세포주기 조절유전자들의 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. RNA 분리는 RNazol B를 사용하여 분리한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 중류수에 녹인 후 자외선 분광비색계로 농도 및 순도를 측정한 후 사용하였다. cDNA합성은 분리된 RNA 2

Table 1. DNA sequences of PCR primers used in this study

Name		PCR primer sequences	Product size (bps)
GAPDH	Sense	5-CGTCT TCACC ACCAT GGAGA-3	300
	Antisense	5-CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT-3	
Cyclin A	Sense	5-CAGAA TGAGA CCCTG CATTG GGCTG-3	615
	Antisense	5-CAGAT TTAGT GTCTC TGGTG GGTTG-3	
Cyclin B	Sense	5-CCATT ATTGA TCGGT TCATG CAGA-3	585
	Antisense	5-CTAGT GGAGA ATTCA GCTGT GGTG-3	
Cyclin C	Sense	5-CCTGT ATTAA TGGCT CCTAC ATGTG TG-3	510
	Antisense	5-GGTTG CCATC TCTTT TCTCT CATCG A-3	
Cyclin D1	Sense	5-ACCTG GATGC TGGAG GTCTG-3	402
	Antisense	5-GAACT TCACA TCTGT GGCAC A-3	
Cyclin E	Sense	5-GGAAG GCAAA CGTGA CCGTT-3	638
	Antisense	5-GGGAC TTAAA CGCCA CTTAA-3	
p16 <sup>INK4a</sup>	Sense	5-ATGGAGCCTTCGGCTGACT-3	464
	Antisense	5-GAGCCTCTCTGGTTCTTCA-3	
Rb	Sense	5-ATGTCAGAGAGAGAGCTTGG-3	579
	Antisense	5-GTGCACTCTGTTCTGACCT-3	
p53 <sup>WT</sup>	Sense	5-GCCATCTACAAGCAGTCACA-3	554
	Antisense	5-TTCAGCTCTCGGAACATCTC-3	
p21 <sup>WAF1</sup>	Sense	5-CGGGATCCGGGCCATGTCAGAACCGGC-3	509
	Antisense	5-CGGGAATTCGTGGCGGATTAGGG-3	

$\mu\text{g}$ 을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40  $\mu\text{l}$  용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응 혼합액의 조성은 RNA 2  $\mu\text{g}$ , 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/ $\mu\text{l}$  RNase 억제제(Perkin-Elmer제품), 2.5 U/ $\mu\text{l}$  MuLV 역전사 효소(Perkin-Elmer제품), 2.5  $\mu\text{M}$  oligo dT (16 mer)로, 반응 조건은 42°C 1시간, 99°C 5분, 5°C 5분으로 하였다. PCR은 10X 반응 완충액(15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5  $\mu\text{l}$ 와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1  $\mu\text{l}$ 씩, 그리고 30  $\mu\text{M}$  sense 및 antisense primer를 각각 1  $\mu\text{l}$ 를 넣은 혼합물에 1  $\mu\text{l}$ 의 반응시킨 cDNA 반응 혼합액과 2.5 단위의 Taq 중합효소(Perkin Elmer제품)를 넣은 후 종류수로 50  $\mu\text{l}$ 로 용량을 맞추고 30  $\mu\text{l}$ 의 mineral oil을 중층한 후 DNA thermal cycler (Perkin Elmer제품)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10  $\mu\text{l}$ 를 1% agarose gel에 전기영동하고 사진촬영을 한 후 densitometer로 DNA band를 분석하였다. RT-PCR에 사용된 각종 유전자들의 primer염기서열은 Table 1과 같다.

## 결 과

### 1) 자궁경부 암세포주에서 cyclin A, D1, E 및 E2F-1 단백질의 발현

Cyclin A단백질은 실험에 사용한 모든 자궁경부 암세포주에서 강한 발현을 보였다. Cyclin D1 단백질도 대부분의 암세포주에서 강한 발현을 보였으나, HT-3는 약한 발현을 보였다. Cyclin E단백질은 CaSki를 제외한 모든 암세포주에서 매우 강한 발현을 보였고, E2F-1 단백질은 대부분의 암세포주에서 강한 발현을 보였으나 C33-A는 다소 약한 발현을 보였다(Fig. 1).

### 2) 자궁경부 암세포주에서 p16<sup>INK4a</sup>, Rb 및 p21<sup>WAF1</sup> 단백질의 발현

p16<sup>INK4a</sup> 단백질은 C33-A, SiHa 및 CaSki세포에

Fig. 1. Western blot of cyclin A, D1, E and E2F-1 cell cycle control proteins in human cervical cancer cells. Lane 1: HT-3; lane 2: C33-A; lane 3: HeLa; lane 4: C4-II; lane 5: SiHa; lane 6: CaSki.

Fig. 2. Western blot of p16<sup>INK4a</sup>, Rb and p21<sup>WAF1</sup> tumor suppressor proteins in human cervical cancer cells. Lane 1: HT-3; lane 2: C33-A; lane 3: HeLa; lane 4: C4-II; lane 5: SiHa; lane 6: CaSki.

서 현저한 발현증가를 보였다. Rb단백질은 SiHa를 제외하고는 대부분이 약한 발현을 보였는데, HeLa 및 CaSki세포에서는 발현을 거의 볼 수 없었고, HT-3 및 C33-A도 매우 약한 발현을 보였다. p21<sup>WAF1</sup> 단백질은 본 실험조건하에서는 검출되지 않았다(Fig. 2).

### 3) 자궁경부 암세포주에서 Bcl2단백질의 발현

Bcl2단백질은 HeLa세포에서 현저한 발현증가를 보였고, C33-A에서도 뚜렷한 발현을 보였으나 나머지 암세포주에서는 발현을 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

**Fig. 3.** Western blot of Bcl<sub>2</sub> anti-apoptotic proteins in human cervical cancer cells. Lane 1: HT-3; lane 2: C33-A; lane 3: HeLa; lane 4: C4-II; lane 5: SiHa; lane 6: CaSki.

#### 4) 자궁경부 암세포주에서 cyclin A, B, C, D1 및 E RNA의 발현

GAPDH는 RNA정량 대조군으로서, band의 밝기가 동일하였다. Cyclin A RNA는 모든 암세포주에서 비슷한 발현을 보였다. Cyclin B RNA는 CaSki를 제외한 모든 암세포주에서 강한 발현을 보였으며, cyclin C RNA는 HT-3 및 C33-A에서 강한 발현을 보였다. Cyclin D1 RNA는 SiHa에서 현저한 발현감소를 보였다. Cyclin E RNA는 대부분의 암세포주에서 비슷한 발현을 보였으나 CaSki에서는 현저한 발현감소를 보였다(Fig. 4).

#### 5) 자궁경부 암세포주에서 p16<sup>INK4a</sup>, Rb, p53<sup>WT</sup> 및 p21 RNA의 발현

p16<sup>INK4a</sup> RNA는 모든 암세포주에서 강한 발현을 보였다. Rb RNA는 C4-II를 제외한 모든 암세포주에서 현저한 발현감소를 보였다. p53 RNA는 SiHa에서 현저한 발현감소를 보였다. p21<sup>WAF1</sup> RNA는 대부분의 암세포주에서 비슷한 발현을 보였으나 C33-A에서는 현저한 발현감소를 보였다 (Fig. 5).

#### 6) Cyclin D1, E, A 및 E2F 세포주기 조절인 자들의 RNA 및 단백질 발현 비교

Cyclin D1의 경우, RNA의 발현은 뚜렷한 증가가 없거나, SiHa와 같이 약한 발현을 보이는데도 불구하고, 단백질은 대부분의 암세포주에서 강한 발현을 보였다. Cyclin E의 경우에도 RNA의 발현은 뚜렷한 증가가 없거나, CaSki와 같이 약한 발현을 보이는데도 불구하고, 단백질은 대부분의 암

**Fig. 4.** RT-PCR of cyclin A, B, C, D1, and E mRNAs in human cervical cancer cells. Lane 1: HT-3; lane 2: C33-A; lane 3: HeLa; lane 4: C4-II; lane 5: SiHa; lane 6: CaSki

**Fig. 5.** RT-PCR of p16<sup>INK4a</sup>, Rb, p53 and p21<sup>WAF1</sup> mRNAs in human cervical cancer cells. Lane 1: HT-3; lane 2: C33-A; lane 3: HeLa; lane 4: C4-II; lane 5: SiHa; lane 6: CaSki

세포주에서 매우 강한 발현을 보였다. Cyclin A의 경우에도 RNA의 발현은 뚜렷한 증가가 없는데도 불구하고, 단백질은 대부분의 암세포주에서 매우 강한 발현을 보였다. E2F-1 단백질도 모든 자궁경부 암세포주에서 강한 발현을 보였다(Fig. 6).

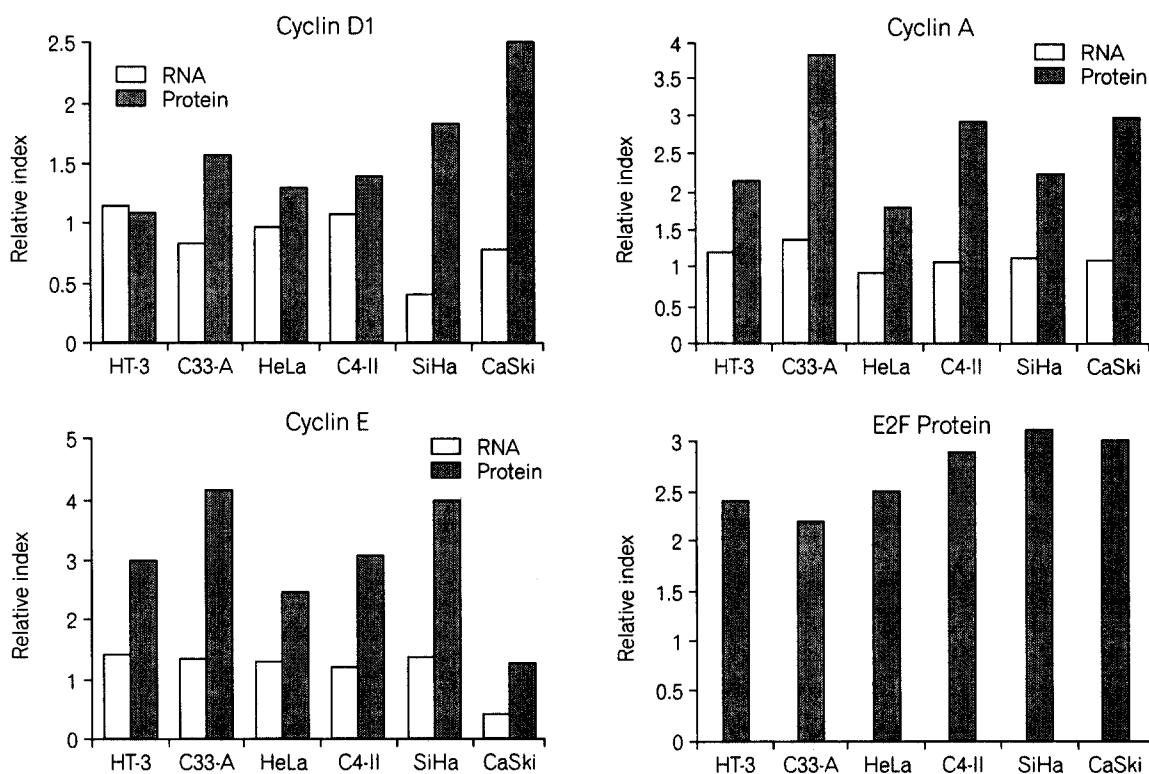


Fig. 6. Cyclin D1, E, A and E2F expressions in human cervical cancer cells. HT-3, C33-A, HeLa, C4-II, SiHa and CaSki: human cervical cancer cells

### 7) p16<sup>INK4a</sup>, Rb 및 p21<sup>WAF1</sup> 세포주기 조절인 자들의 RNA 및 단백질 발현 비교

p16<sup>INK4a</sup>의 경우, 모든 암세포주에서 RNA와 단백질이 강한 발현을 보였다. Rb의 경우, HT-3, C33-A, HeLa 및 CaSki에서는 RNA는 소폭의 발현감소를 보였으나 단백질은 현저한 발현감소를 보였으며, C4-II는 RNA발현에는 변화가 없었으나 단백질은 소폭의 발현감소를 보였고, SiHa는 RNA발현은 소폭의 감소를 나타내었으나 단백질은 오히려 소폭의 발현증가를 보였다. p21<sup>WAF1</sup> RNA발현은 C33-A에서는 현저한 발현감소를 보였으나 대부분의 암세포주에서는 비슷한 발현을 보였으며, 단백질의 발현은 본 실험조건하에서는 검출되지 않았다(Fig. 7).

### 8) 자궁경부 암세포주에 있어서 현저한 발현 변화를 보이는 세포주기 조절인자들

실험에 사용한 모든 자궁경부 암세포주에서 cyclin A 단백질과 E2F-1 단백질의 뚜렷한 증가를 볼 수 있었고, 대부분의 자궁암세포주에서 cyclin E단백질의 현저한 증가와 Rb단백질의 현저한 감소를 볼 수 있었다. 그리고 SiHa 및 CaSki에서는 cyclin D1의 현저한 증가도 볼 수 있었다. Bcl2는 C33-A와 HeLa에서 현저한 증가를 볼 수 있었고, 그외의 세포주에서는 현저한 감소를 볼 수 있었다(Table 2).

## 고 찰

세포가 분열하기 위해서는 세포가 G1기에서 S

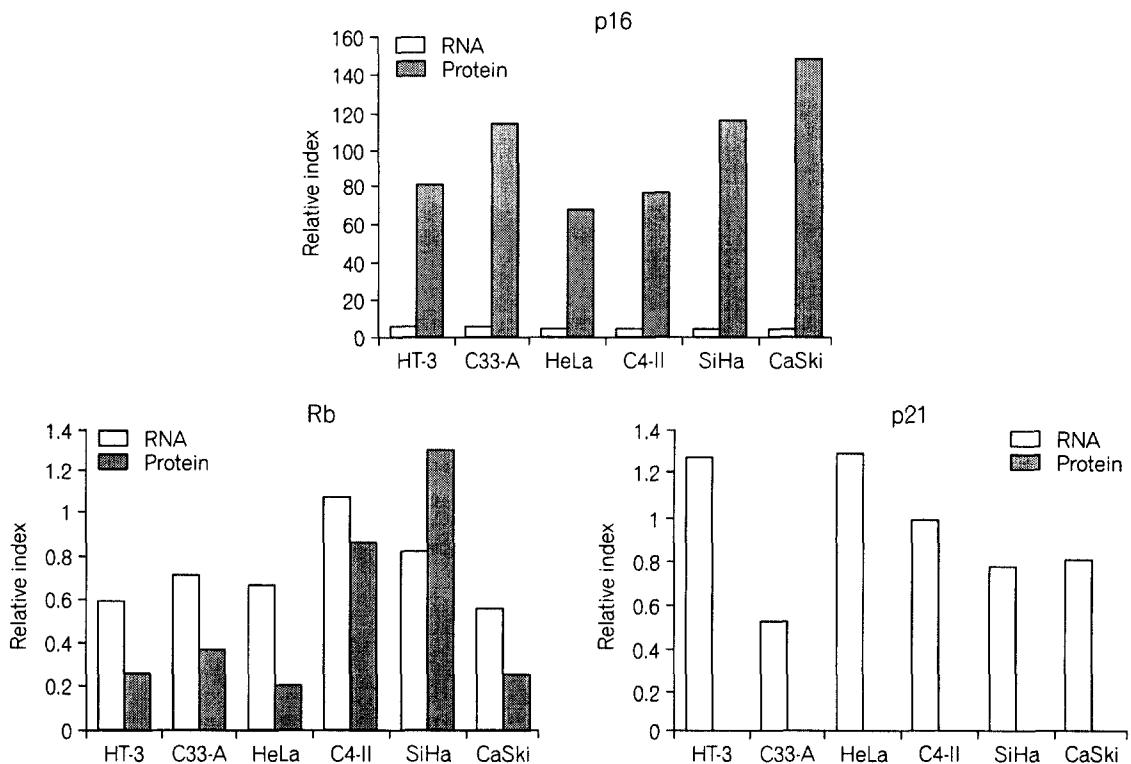


Fig. 7.  $p16^{INK4a}$ , Rb, and  $p21^{WAF1}$  tumor suppressor gene expressions in human cervical cancer cells. HT-3, C33A, HeLa, C4-II, SiHa and CaSki: human cervical cancer cells

Table 2. Major cell cycle control proteins showing remarkable changes of the expressions in human cervical cancer cell lines

Name of cells	Names of cell increased	Cycle proteins decreased	Bcl2	p53*	Types of infected HPV*
HT-3	cyclin A, E, E2F	Rb	decreased	mutated	—
C33-A	cyclin A, E, E2F	Rb	increased	mutated	—
HeLa	cyclin A, E, E2F	Rb	increased	wild type	HPV-18
C4-II	cyclin A, E, E2F	Rb	decreased	wild type	HPV-18
SiHa	cyclin A,D1,E,E2F	—	decreased	wild type	HPV-16
CaSki	cyclin A, D1, E2F	Rb	decreased	wild type	HPV-16

\*data from Munger K et al., 1992 (Reference 23)

기로 이행되어야 하며, 이때 G1기 말기의 제한점을 통과해야 한다. 제한점을 통과한 세포는 더 이상의 mitogen자극 없이도 세포분열을 완성하게 된다(7). DNA 복제의 시작과 S기의 시작은, CDK들과 결합하여 kinase 기능을 가지는 G1 cyclin들에

의해 조절을 받는다(2). G0기의 세포가 세포분열 주기로 진입하게 되면, G1기 동안 cyclin D와 cyclin E가 순차적으로 합성되며(8), 이들은 S기 진입의 속도를 결정하는 중요한 인자로 알려져 있다(9).

세포주기조절에 관련된 연구로 인하여 세포성장을 조절하고 있는 분자적 기전이 서서히 밝혀지고 있다. Rb항암단백질은 S기 진입에 필요한 E2F와 같은 전사인자들과 결합하여 이를 억제하는데, R point에서 Rb가 인산화됨으로써 S기 진입에 필요한 유전자를 활성화시키는 E2F 등의 전사인자 방출을 야기하여 Rb에 의한 세포성장 억제기전이 해제됨이 보고되었다(10~12). 그리고 세포성장 촉진인자인 cyclin D와 E는 CDK 4, 6 혹은 2와 결합하여 Rb항암단백질을 인산화함으로써 Rb를 불활성화시킨 결과 E2F 등의 전사조절인자가 활성화되어 세포가 S기로 이행하게 됨이 보고되었다(2,13,14). 세포성장 억제인자인 p27<sup>KIP1</sup>, p15<sup>INK4b</sup> 및 p16<sup>INK4a</sup> 등의 CDK inhibitors(CKIs)들은 CDK4 혹은 2에 결합하여 CDK에 의한 Rb의 인산화를 억제시켜 Rb의 기능을 보호하며, DNA손상으로 활성화된 p21<sup>WAF1</sup>도 CDK기능을 억제하여 Rb의 인산화를 억제시킨다는 사실이 보고되었다(15,16).

현재까지 알려진 암화과정의 원인인자로는 세포외부의 과다한 mitogen의 작용, 세포내 암유전자들의 비정상적 활성에 의한 과다한 신호전달, 혹은 종양바이러스의 암단백질들의 작용 등이 있다(3). 그러나 세포분열의 궁극적 조절은 세포주기조절에 의해 결정되며, 인간 유두종바이러스를 비롯한 각종 DNA종양바이러스가 생산하는 암단백질들의 주요 대상도 Rb, p53<sup>WT</sup> 및 cyclin 등의 세포주기 조절인자임이 보고됨에 따라, 암의 발생과 세포주기 조절과는 밀접한 관계가 있을 것으로 생각되고 있다(6,17,18).

이 연구에서는 우리나라에서 큰 비중을 차지하고 있는 자궁경부암의 발암기전을 세포주기조절 차원에서 규명하기 위하여 각종 cyclin들과 Rb, E2F, 16<sup>INK4a</sup>, p53<sup>WT</sup> 및 Bcl2 등의 발현을 조사하였다. Cyclin A단백질은 실험에 사용한 모든 자궁경부 암세포주에서 강한 발현을 보였고, cyclin D1 및 cyclin E 단백질도 대부분의 암세포주에서 강한 발현을 보였다. Rb단백질은 SiHa를 제외하고는 대부분이 약한 발현을 보였고, E2F-1단백질은

모든 암세포주에서 강한 발현을 보였다. p16<sup>INK4a</sup> 단백질은 C33-A, SiHa 및 CaSki세포에서 현저한 발현증가를 보였으며, p21<sup>WAF1</sup> 단백질의 발현은 본 실험조건 하에서는 검출되지 않았다. Bcl2단백질은 HeLa 및 C33A세포에서 현저한 발현증가를 보였으며, 나머지 암세포주에서는 발현을 거의 볼 수 없었다. 이러한 현상들을 종합해보면 자궁경부암에서는 Rb항암단백질의 발현이 현저히 감소되므로써 세포는 G1기에서 S기로의 이행이 촉진되게 되며, 소량 발현된 Rb마저 cyclin A, D1 및 E의 과발현으로 인해 인산화가 촉진되어 불활성화되고 E2F가 과발현되므로써, G1-S 이행이 더욱 촉진될 것으로 판단된다. 이러한 상황을 보상하고자 p16<sup>INK4a</sup>이 증가되지만, p16<sup>INK4a</sup>의 G1정지효과는 Rb가 정상적으로 발현될 때에만 유효하며 이미 Rb가 현저히 저하된 상태에서는 발암억제 효과를 발휘할 수 없게 되므로, 결국 과다한 세포분열이 발생될 뿐 아니라, G1기의 단축으로 인해 유전자 손상을 감시할 기회를 상실하므로써 유전자 손상이 촉진되어 암화과정이 촉진될 것으로 생각된다. 이때 Bcl2가 과발현되는 세포들은 apoptosis억제를 통하여 암세포 생존이 더욱 유리해 질 것으로 판단된다.

활성화된 Rb가 없는 암세포에서 p16<sup>INK4a</sup> 발현이 현저하게 증가되는 현상은 외국의 연구자들의 보고에서도 찾아볼 수 있다(19~21). p16<sup>INK4a</sup>은 cyclin D의 존성 kinase의 Rb인산화를 억제하기 위하여 cyclin D의 존성 kinase의 상부 단계에서 작용하는데, Rb가 불활성화될수록 p16<sup>INK4a</sup>이 증가하는 것으로 알려져 있다(20,21). 이때 cyclin D의 존성 kinase도 임무를 완전히 수행하기 위하여 더 높은 역치에 도달하여야 하며, p16<sup>INK4a</sup>은 이러한 kinase의 소량 증가에 의한 Rb의 불필요한 인산화를 막기 위한 완충제로 작용할 것으로 생각된다(6).

자궁경부암에서 cyclin증가의 원인을 조사하기 위해 세포주기 조절인자들의 RNA 및 단백질 발현을 서로 비교분석한 결과, cyclin A, D1 및 E의 경우, RNA의 발현은 서로 비슷하거나 약한 발현을 보이는데도 불구하고, 단백질은 대부분의 암세

포에서 강한 발현을 보여서, cyclin증가의 기전은 전사조절차원에서의 RNA합성의 증가가 아니고, 단백질 분해의 저하로 인한 단백질 수명연장, 즉 post-translational control일 것으로 추정된다. 외국의 연구자들도 cyclin D의 경우 post-translational control에 의해 조절받는다고 보고하였다(22).

Rb의 경우, HT-3, C33-A, HeLa 및 CaSkI에서는 RNA는 소폭의 발현감소를 보였으나 단백질은 뚜렷한 발현감소를 보였으며, C4-II는 RNA발현에는 변화가 없었으나 단백질은 소폭의 발현감소를 보여서 자궁암에 있어서 Rb감소의 원인도 일부는 RNA합성감소에 있지만, 주로 단백질 분해촉진 때문일 것으로 추정된다. p16<sup>INK4a</sup>의 경우, 모든 자궁암세포에서 RNA와 단백질의 발현이 뚜렷히 증가되어 있어서 p16<sup>INK4a</sup>의 증가기전은 전사조절차원에서의 RNA합성증가 때문일 것으로 생각된다.

## 결 론

자궁경부암에서는 G1정지를 담당하는 핵심인자인 Rb항암단백질의 발현이 현저히 감소되므로써 세포는 G1기에서 S기로의 이행이 촉진되게 되며, 소량 발현된 Rb단백질 마저 cyclin E, A 및 D1의 과발현으로 인해 인산화가 촉진되어 불활성화되고 E2F가 과발현되므로써 세포는 S기로의 이행이 더욱 촉진되게 될 것으로 판단된다. 이러한 상황을 보상하고자 일부세포에서는 p16<sup>INK4a</sup>의 발현이 증가하지만, p16<sup>INK4a</sup>의 G1정지효과는 Rb가 정상적으로 발현될 때에만 유효하며 이미 Rb가 현저히 저하된 상태에서는 발암억제 효과를 발휘할 수 없게 되고, 결국 과다한 세포분열이 발생될 뿐 아니라, G1기의 단축으로 인해 유전자 손상을 감시할 기회를 상실하므로써 유전자 손상이 축적되게 되어 암화과정이 촉진되게 될 것으로 생각된다. 이때 HeLa나 C33-A와 같이 Bcl2가 과발현되는 세포들은 apoptosis억제를 통하여 암세포생존이 더욱 유리해질 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Hunter T. Braking the cycle. *Cell* 1993;75:839-841.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73:1059-1065.
- Verma IM, Vogt PK. Oncogenes: 20 years later. *Genes Dev* 1995;9:1289-1301.
- Marx J. How cells cycle toward cancer. *Science* 1994; 263:319-321.
- Wang JY, Knudsen ES, Welch PJ. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* 1994;64: 25-85.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.
- Pardue AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-608.
- Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991;66:1217-1228.
- Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 1993;259: 1908-1912.
- Nevins JR. E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncproteins. *Science* 1992;258:424-429.
- Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:135-141.
- Sherr CJ. The ins and outs of RB: Coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 1994b;4:15-18.
- Chellappan S, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991;65:1053-1061.
- El-Deiry WS, Harper JW, O'connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-1174.
- Peter M, Herskowitz L. Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 1994;79:181-184.
- Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell

- cycle control. *Cell* 1995;81:323-330.
18. Han SW, Kim HY, Park KM, Lee MS, Kim HJ, Kim YD, Suh HS. Reduced expression of p27 correlates with high grade malignancy and is associated with poor clinical outcome in human breast cancer. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:492-498.
19. Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 1993;7:1572-1583.
20. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16<sup>INK4</sup>. *Cancer Res* 1994;54:5816-5820.
21. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-CDK complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16 tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1995;14:503-511.
22. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato J. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14: 2066-2076.
23. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surveys* 1992; 12:197-217.