대한산부회지 제44권 제4호 2001
Vol. 44 No. 4 April 2001

자궁경부암종에서 인유두종 바이러스 감염, p16INK4A와 p18INK4C유전자 변이 및 세포주기조절 단백의 발현

계명대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실* 및 미생물학교실†
권경익 · 김상표* · 서성일† · 황미열* · 백원기† · 권건영* · 이상숙* · 조치흠 · 차순도

=ABSTRACT=

Alterations of p16INK4A and p18INK4C, Human Papillomavirus infections and Expression of the Cell Cycle Associated Proteins in Cervical Carcinomas

Kyung Ik Kwon, M.D., Sang Pyo Kim, M.D.*, Seong Il Suh, M.D.†,
Mi Yeul Hwang, Ph.D.*, Won Ki Baek, M.D.†, Kun Young Kwon, M.D.*,
Sang Sook Lee, M.D.*, Chi Heum Cho, M.D., Soon Do Cha, M.D.
Departments of Obstetrics and Gynecology, Pathology, and Microbiology†,*
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Objective : We analyzed the gene status of p16INK4A, p18INK4C, the expression of cell cycle associated proteins (p16INK4A, p18INK4C, cyclin D1, CDK4, pRb, and p53), and human papillomavirus (HPV) infection to investigate whether the inactivation of these genes participated in carcinogenesis, and to evaluated the expression of cell cycle associated proteins and HPV infections.

Methods : We examined forty-one primary cervical carcinomas (17 adenocarcinomas, 13 keratinizing squamous cell carcinomas, and 11 nonkeratinizing squamous cell carcinomas) using PCR, comparative multiplex PCR, PCR-SSCP, methylation-specific PCR, and immunohistochemistry.

Results : Ninety percent of cervical carcinomas showed HPV infection. HPV type 16 was detected in 41% and HPV type 18 was found in 44%. Homozygous deletions at p16INK4A gene were observed in 2 cases, but the mutation of p16INK4A and alterations of p18INK4C gene were not detected. The promoter hypermethylation for p16INK4A in nine cases (31%) of 29 cervical carcinomas was found. Expression of p16INK4A protein was observed in 93% and p18INK4C protein expression was noted in 78%. Positive immunostaining for cyclin D1 was only identified in 5%, whereas positive immunostaining for CDK4 was observed in 95%. Expression of pRb protein was found in 93% and p53 protein in 24% of cervical carcinomas.

Conclusion : These results suggest that high risk HPV infections and methylation of the p16INK4A promoter region seem to play an important role in the pathogenesis of cervical carcinomas. Alterations of p18INK4C gene and cyclin D1-CDK4 pathway does not contribute significantly in the cervical carcinogenesis.

Key Words : p16INK4A, p18INK4C, Human papillomavirus infection, Cell cycle associated protein, Cervical carcinoma

인유두종 바이러스(human papillomavirus, HPV)의 감염은 편평세포암종 및 선암종을 포함하는 자궁경부암종의 발생에 중요한 인자로 알려져 있고 85% 이상의 자궁경부암종에서 HPV 16 및 18을 포함하는 고위험군 HPV 감염이 동반된다.[1] HPV가 자궁경부암종을 유발하는 기전은 고위험군 HPV의 E6 및 E7 단백이 각각 p53 및 pRb 항암단백의 기능을 저해함으로서 정상세포가 G1 세포주기에 머물지 못하고 S세포주기로 이행되어 발생된다고 생각되고 있다.[2,3]

접수일 : 2000. 11. 14.
주관책임자 : 차순도

각종 암발생에서 p16INK4A, cyclin, cyclin dependent kinase (CDK) 4/6, retinoblastoma (pRb) 및 p53 유전자 등을 포함하는 세포주기조절 유전자들의 이상이 보고되어 있다.[4-8] 그 주된 변화는 p16INK4A 유전자 이상과 발현의 소실, cyclin D 및 CDK4/6 단백의 과발현, pRb의 기능소실 및 p53 유전자 변이 등으로 대별할 수 있다. 특히 염색체 9번의 단완에 위치 (9p21) 하고 있는 p16INK4A 유전자는 세포주기의 G1에서 S기 이행을 억제하는 기능을 가지고 있으며 악성흑색종, 폐암, 대장암 및 백혈병 등에서 유전자 결손, 점돌연변이, promoter의 CpG island의 메칠화(methylation)로 의한 비활성화가 알려져 있다.[9-11] 또한 1p32에 위치하면서 cyclin D과 CDK4/6 복합체 형성을 저해하는 p18INK4C 유전자의 변이가 신경아세포종, 악성흑색종 및 악성 회돌기종양 등에서 관찰되고 있다.[12-14] 최근에 Cheung 등[15]은 자궁경부암종의 93%에서 염색체 1번의 이형접합성 소실 (loss of heterozygosity)을 보고한 것으로 보아 1p32에 위치하는 p18INK4C 유전자의 이상이 동반될 수 있을 것으로 추정된다.

일반적으로 암화과정에 관여하는 세포주기조절 단백은 G1/S checkpoint에 관여하는 단백이 가장 중요한데 세포증식촉진 단백인 cyclin D1의 경우 CDK 4/6와 결합하여 pRb 항암단백을 인산화 시킴으로서 pRb 단백과 결합하고 있던 전사조절인자인 E2F를 유리시켜 세포가 G1 세포주기에서 S기로 이행되도록 유도한다.[16,17] 이 과정에서 CDK 4/6와 결합하여 CDK에 의한 pRb 단백의 인산화를 억제하는 단백인 p16INK4A와 p18INK4C는 CDK 억제자들로서 pRb 단백의 기능을 보호하는 역할을 담당한다.[18] p53 유전자는 인간의 암종을 유발하는 가장 흔한 표적 유전자로 알려져 있으며 이 유전자에 점돌연변이가 발생하면 mutant type p53 단백을 발현하여 암발생에 관여하는 것이 알려져 있다. 그러나 mutant type p53 단백에 비해 wild type의 p53 단백은 p21WAF1을 활성화시켜 CDK 기능 억제 및 pRb의 인산화를 억제를 통해서 세포의 종말 분화, apoptosis 및 노화를 유발한다.[19,20]

본 연구는 상기의 문헌적인 지견을 바탕으로 하여 침윤성 자궁경부암종의 종양조직에 있어서 고위험군 HPV 감염 유무와 p16INK4A 및 p18INK4C 유전자의 이상과 발현을 조사하여 이들 유전자와 자궁경부암종 발생과의 관계를 알아보고자 하였으며 이와 더불어 p16INK4A 유전자에 결손 및 돌연변이가 없는 경우에는 메칠화 빈도를 조사하였다. 그리고 세포주기조절 단백들인 pRb, cyclin D1, CDK4 및 p53의 발현을 면역조직화학염색으로 검색하여 HPV 형별 및 조직학적 유형에 따른 발현의 변화를 밝히고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구의 대상은 계명대학교 동산의료원 산부인과학교실에 내원하여 병리조직학적 검사 결과 자궁경부암종으로 확진된 41례의 조직을 사용하였다. 총 41례는 13례의 생검 및 28례의 자궁적출술 종양조직을 이용하였으며 병리조직학적 유형은 17례 선암종(adenocarcinomas, AD)과 13례 각질화형 편평세포암종(keratinizing squamous cell carcinomas, KSCC) 및 11례 비각질화형 편평세포암종(nonkeratinizing squamous cell carcinomas, NSCC)였다. 환자의 나이 분포는 28-72세 사이로서 평균 46.7세였으며 자궁적출술을 받은 4례가 술전 화학요법을 시행하였고 임상적인 자궁경부암 병기는 Ia2 1례, Ib 14례, Ib1 10례, Ib2 8례, IIa 5례 및 IIb 3례 였다.

2. 연구방법

1) 자궁경부암종 조직으로부터 DNA 분리

300 mg 정도의 생검조직과 자궁 적출술 후 만들어진 파라핀 블록에서 Blin와 Stafford[21]의 방법으로 DNA를 분리하고 10 mM Tris-1 mM EDTA액에 DNA를 녹여 ultraviolet spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정한 후 4℃에 보관하면서 사용하였다.

2) 자궁경부암종으로부터 HPV 감염유무와 형별 검색

자궁경부암종으로 부터 HPV 감염유무 및 형별 검색은 Toh 등[22] 방법을 사용하였다. 자궁경부암종 발생과 밀접한 관계가 있다고 알려진 고위험군 HPV형인 16형, 18형, 31형, 33형, 52b형 및 58형 등의 E6/E7 유전자의 open reading frame (ORF)을 증폭하기 위해서 censensus primer (CP)-S 및 CP-AS를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. HPV 16형의 E7 유전자의 ORF를 선택적으로 증폭하기 위해서는 specific primer (SP)16-S 및 SP16-AS를 사용하였으며 HPV 18형의 E7 유전자의 ORF을 선택적으로 증폭하기 위해서 SP18-S 및 SP18-AS를 사용하였다. CP-S 및 CP-AS로 증폭된 PCR 산물은 제한효소 *Ava*II에 의해서 HPV 16형(157 및 81 bp), HPV 18형(172 및 96 bp), 그리고 HPV 33(136 및 108 bp)이 구별되며, *Ras*I에 의해서는 HPV 31형(119 및 114 bp), *Bgl*II에 의해서는 HPV 52b형(175 및 55 bp), 그리고 *Acc*I에 의해서는 HPV 58형(126 및 118 bp) 등의 형별을 알 수 있다. HPV 16 및 18형의 양성대조군으로 Caski 및 Hela 세포주의 DNA를 이용하였다.[23] 본 실험에 사용한 primer염기서열은 Table 1과 같다.

3) PCR을 이용한 p16INK4A 및 P18INK4C 유전자 결손 검색

p16INK4A 및 p18INK4C 유전자의 동형접합성 결손 (homozygote deletion)유무를 파악하기 위해서 p16INK4A exon 1α 및 2와 p18INK4C exon 2 및 3a-1에 대한 primer를 이용하여 PCR을 실시하였으며 이때에 양성 대조군으로는 암종이 없는 정상조직으로부터 DNA를 분리하여

Table 1. Primer sequence used for this experiment

Primer	Sequence	Reference
HPV		Toh et al.[22]
CP-S	5'TGTCAAAAACCGTTGTGTCC3'	
CP-AS	5'GAGCTGTCGCTTAATTGCTC3'	
HPV 16		Toh et al.[22]
SP16-S	5'GCAACCAGAGACAACTGATC3'	
SP16-AS	5'ATTGTAATGGGCTCTGTCCG3'	
HPV 18		Toh et al.[22]
SP18-S	5'TCACGAGCAATTAAGCGACT3'	
SP18-AS	5'CTGAGCTTTCTACTACTAGC3'	
PseudoMTAP		
sense	5'AGGGACCTCGTTTTATCTCTTGA3'	
antisense	5'CTAGCATTTTCTTTCGGGGTCTG3'	
p16INK4A exon 1α		Kamb et al[5]
sense	5'GAAGAAAGAGGAGGGGCTG3'	
antisense	5'GCGCTACCTGATTCCAATTC3'	
p16INK4A exon 2		
sense	5'GCTCTGACCATTCTGTTCTC3'	
antisense	5'CAGATCATCAGTCCTCACCT3'	
p18INK4C exon 2		Pohl et al.[14]
sense	5'TGATCGTCAGGACCCTAAAG3'	
antisense	5'CTGCAGCGCAGTCCTTCC3'	
p18INK4C exon 3a-1	'	Iolascon et al.[12]
sense	5'AGGATTCTACCATTTCTACTTCTTT3	
antisense	5'GTAAAGTGTCCAGGAAACCT3'	
APEX		
sense	5'CCTTTCGCAAGTTCCTGAAG3'	
antisense	5'AACCTGTCAGCCAGTGGCAC3'	

사용하였다. p18INK4C exon 2 및 3a-1에 대한 PCR은 comparative multiplex PCR을 이용하였으며 이는 각 exon에 대한 primer와 정상적인 대조유전자(control gene)를 같이 PCR하는 방법이다. 본 실험에서 정상 대조유전자로서 14q11.2-14q12에 존재하는 apurinic/apyrimidinic endonuclease (APEX) 유전자를 사용하였으며 annealing 온도가 62 °C에서 53 °C까지 단계별로 내려가는 touch down PCR을 시행하였다. 그리고 염색체 3번(3q28)에 위치한 pseudo-MTAP 유전자에 대한 PCR을 실시하여 추출한 DNA 상태를 검증하였다. 본 실험에 사용된 PCR용 primer는 Table 1과 같다.

4) PCR-SSCP (single strand conformational polymorphism) 분석

PCR-SSCP 분석은 Orita 등[24]의 방법에 준하여 p16INK4A exon 2 및 p18INK4C exon 2 및 3a-1의 돌연변이 유무를 검색하였다, 먼저 PCR을 시행하고 합성된 PCR 산물 1 μl를 9 μl의 98% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol 용액과 잘 섞고 90°C에서 2분간 둔 후 6% non denaturing polyacrylamide gel에서 cooling system을 이용하여 10°C를 유지하면서 TBE buffer로 10 watt에서 16시간 전기영동을 하였다. 전기영동된 gel은 Whatmann filter paper상에서 gel dryer를 사용하여 건조시킨 후 autoradiography를 시행한 다음 돌연변이 유무를 확인하였다.

5) p16INK4A 유전자 promoter의 CpG island에 메칠화 유무 검색

Herman 등[25]의 methylation-specific PCR방법에 준하여 메칠화 유무를 검색하였다. 이용가능한 29례에서 추출한 DNA를 sodium bisulfite, hydroquinone 및 sodium hydroxide와 반응시킨 후 deamination을 유도하여 메칠화 되어 있지 않는 cytosine을 uracil로 변화시켰다. 그 다음에 Wizard DNA purification kit (Promega Co., USA)를 이용하여 DNA를 순수 분리한 후 sodium hydroxide로 desulfonation시킨 다음 ethanol로 침전시켜 PCR을 실시하였다. p16INK4A 유전자의 promoter의 CpG island에 메칠화가 되어 있는 DNA를 증폭하기 위해서 p16MM-S (5'TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC3') 및 p16MM-AS (5'GACCCCGAACCGCGACCGTAA3')를 primer로 이용하였으며, 메칠화되어 있지 않는 DNA를 증폭하기 위해서는 p16UM-S (5'TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT3') 및 p16UM-AS (5'CAACCCCAAACCACAACCATAA3')를 primer로 사용하였다.

6) p16INK4A, p18INK4C, cyclin D1, CDK4, pRb 및 p53 단백 발현에 대한 면역조직화학염색

면역조직화학적 관찰 위하여 대표적인 종양조직의 파라핀 포매조직을 5 ㎛ 두께로 박절한 후 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간 동안 방치한 후 xylene과 계열에탄올로 탈파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 효소의 차단을 위해 메탄올과 30% H_2O_2를 9:1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직내 감추어진 항원을 들어내기 위해 1% zinc sulfate 용액에 담근 뒤 microwave 오븐을 이용하여 5분간 2회 가열하였다. 실온에서 20분 가량 식힌 후 1% 정상 마혈청(normal horse serum, Vectastain kit, USA)으로 37°C에서 30분간 둔 후 적절히 희석된 30 μl의 p16(1:100, polyclonal, Santa Cruz, CA, USA), p18(1:100, IgG2a monoclonal, Santa Cruz, CA, USA), cyclin D1(1:100, IgG2a kappa monoclonal, DAKO, CA, USA), CDK4(1:100, polyclonal, Santa Cruz, CA, USA), pRb(1:500, IgG1 monoclonal, PharMingen, CA, USA) 및 p53(1:100, IgG2b monoclonal, Novocastra, CA, USA)에 대한 일차항체들을 조직절편위에 놓고 coverslip을 덮은 다음 37°C에서 2시간 반응시켰다. PBS로 세척 후 이차항체(biotinylated anti-mouse IgG, Vectastain Elite kit, USA)를 가하여 37°C에서 30분간 둔 후 PBS로 수세하였다. Avidin-biotin peroxidase complex (Vector, USA)을 1:200으로 조직절편위에 적당량 놓은 후

37°C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 수세하고 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)-H_2O_2용액으로 10-20분간 실온에서 발색시키고 Meyer's hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 관찰하였다. p16INK4A, p18INK4C 및 pRb에 대한 양성대조군으로는 편도선 조직을 사용하였고 cyclin D1, CDK4 및 p53에 대한 양성대조군으로는 사전 실험에 의해 각각의 일차항체들의 발현이 증명된 위장관 암종 조직을 사용하였으며 음성대조군은 일차항체 대신 PBS을 사용하여 위의 동일한 과정에 의해 염색을 시행하였다. 결과의 판독은 전체 종양세포의 핵에서 5% 미만으로 염색되면 음성, 5-50% 사이에서 염색되면 국소성 발현 및 50% 이상에서 염색되면 미만성 발현으로 판정하였다.

결 과

1. 고위험군 HPV 감염유무와 형별 결정

침윤성 자궁경부암종을 대상으로 하여 HPV 감염 유무와 형별을 조사하기 위하여 자궁경부암종 조직으로부터 DNA를 추출한 다음 여러 형의 HPV를 동시에 증폭할 수 있는 CP primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 총 41례 검체 중에서 37례(90%)의 검체에서 HPV 감염이 확인되었으며, 고위험군으로 알려진 HPV 16형 및 18형의 감염 빈도를 조사하기 위하여 CP primer로 증폭이 확인된 검체에서 SP16 및 18 primer로 PCR을 실시한 결과 HPV 16형이 17례(41%) 그리고 HPV 18형이 18례(44%)에서 감염이 확인되었다(Fig. 1). 그 외 2례는 CP primer로 PCR을 실시한 후 여러 종류의 제한효소로 절단하여 HPV 형별을 분석한 결과 1례는 HPV 52b형 그리고 나머지 1례는 HPV 33형 및 16형의 복합감염이 확인되었다(성적미제시). 17례의 AD의 경우는 HPV 18형 감염이 11례로 가장 높았고 16형이 5례 그리고 1례에서는 HPV 감염이 관찰되지 않았다. 11례의 NSCC의 경우는 HPV 16형 감염이 4례로 가장 높았고, 18형이 3례, 그리고 52b 및 16형과 33형의 복합감염이 각각 1례 확인되었다. 13례의 KSCC의 경우는 HPV 16형이 8례로 가장 높은 빈도의 감염을 보였고, 18형이 4례 그리고 1례에서는 HPV감염을 관찰할 수 없었다(Table 2).

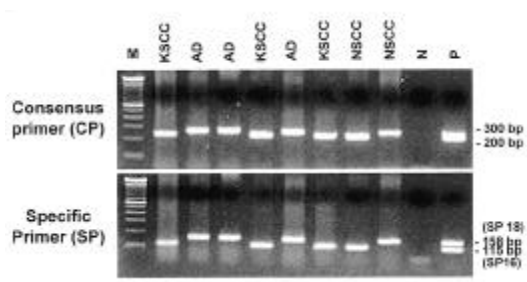

Fig. 1. PCR on DNA samples obtained from the cervical carcinomas. Fouty one DNA samples were screened for the presence of HPV using CP-PCR and then CP-positive samples were done for presence of HPV 16 or 18, using SP16 or SP18-PCR. M, molecular size marker; AD, adenocarcinomas; NSCC, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; KSCC, keratinizing squamous cell carcinomas; N, no template; P, positive control.

Table 2. Results of HPV typing in cervical carcinomas

Tumor types(n)	HPV-16 (%)	HPV-18 (%)	Other types (%)	HPV negative
AD(17)	5	11	0	1
NSCC(11)	4	3	2†	2
KSCC(13)	8	4	0	1
Total(41)	17(41)	18(44)	2(5)	4

AD, adenocarcinomas; NSCC, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; KSCC, keratinizing squamous cell carcinomas.
† one of HPV-52b and one of simultaneous HPV-16 and -33 infection

2. p16INK4A 및 p18INK4C유전자 결손 및 돌연변이 검색

CDK 억제자인 p16INK4A와 p18INK4C 유전자의 결손유무를 알아보기 위하여 comparative multiplex PCR을 실시하였으며 동시에 pseudo-MTAP 유전자에 대한 PCR을 실시하여 추출한 DNA상태를 검증하였다. 그 결과 HPV 16형 및 HPV 52b형에 감염된 NSCC 2례(5%)에서 p16INK4A 유전자의 결손이 관찰되었으며(Fig. 2) p18INK4C 유전자는 결손을 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 아울러 이들 두 유전자의 돌연변이 유무를 알아보기 위하여 PCR-SSCP를 실시한 결과 p16INK4A 유전자의 exon2에 돌연변이가 있다고 알려진 HL60세포를 제외하고는 mobility shift가 있는 검체를 확인할 수 없었다(성적미제시).

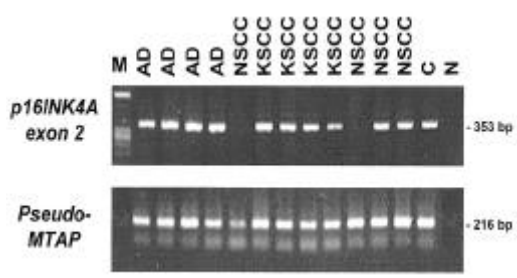

Fig. 2. Detection of homozygous deletions of p16INK4A gene is noted in the cervical carcinomas. M, molecular size marker; AD, adenocarcinomas; NSCC, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; KSCC, keratinizing squamous cell carcinomas; C, normal DNA control; N, no template.

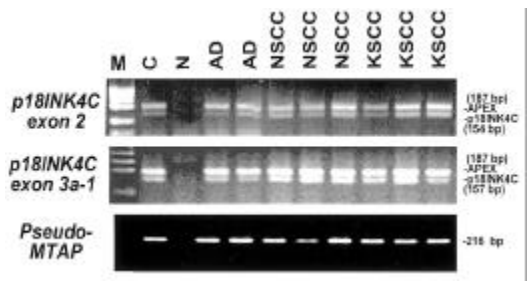

Fig. 3. Comparative multiplex PCR for p18INK4C exon 2 and exon 3a-1 (154 bp and 157 bp) and control (APEX gene fragment, 187 bp). No homozygous deletion of p18INK4C gene is noted in the cervical carcinomas. M, molecular size marker; C, normal DNA control; N, no template; AD, adenocarcinomas; NSCC, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; KSCC, keratinizing squamous cell carcinomas.

3. p16INK4A 유전자 promoter의 CpG island에 메칠화유무 검색

p16INK4A 유전자 promoter부위의 메칠화를 알아보기 위하여 이용가능한 29례에 대한 methylation-specific PCR를 실시한 결과 9례(31%)에서 메칠화가 관찰되었다(Fig. 4). 이들은 4례의 AD, 2례 KSCC 및 3례 NSCC로 구성되었다.

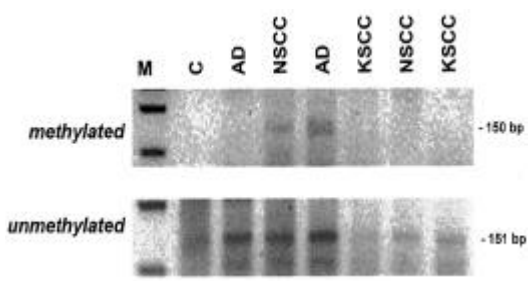

Fig. 4. Methylation-specific PCR analysis of the p16INK4A promoter in the cervical carcinomas was performed. Reverse images of the ethidium bromide stained gels are displayed. M, molecular size marker; C, bisulfite treated DNA obtained from fibroblast; AD, adenocarcinomas; NSCC, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; KSCC, keratinizing squamous cell carcinomas.

4. p16INK4A, p18INK4C, cyclin D1, CDK4, pRb 및 p53 단백 발현에 대한 면역조직화학 분석

면역조직화학염색을 이용하여 세포주기조절 유전자의 단백 발현을 조사한 결과 p16INK4A 단백은 미만성 발현이 AD 13례를 포함하여 24례(59%), 국소성 발현이 14례 및 음성인 경우가 3례 였고 p16INK4A 유전자의 결손이 있는 2례는 각각 음성 및 국소성 발현을 보였으며 p16INK4A 유전자 promoter 부위의 메칠화가 되어 있는 9례 중 6례에서 국소성 발현 및 음성이 관찰되었다. HPV 형별에 따른 p16INK4A 단백의 발현은 HPV 16형 감염이 확인된 17례 중 15례(88%)에서 관찰되었고 HPV 18형 감염을 보인 18례 중 18례(100%)에서 확인되었다. p18INK4C 단백은 미만성 발현을 보인 경우가 선암종 12례를 포함하여 25례(61%)에서 관찰되었고 국소성 발현이 7례 및 음성이 9례 였다. HPV 16형 및 18형 감염에 따른 p18INK4C 단백의 발현은 각각 17례 중 13례(76%)와 18례 중 13례(73%)에서 확인되었다(Table 3, Fig. 5). Cyclin D1 단백은 2례(5%)에서만 발현을 보인 것에 비해 CDK4단백은 미만성 발현 30례를 포함한 39례(95%)에서 발현을 보여 상반된 결과를 볼 수 있었다(Table 4, Fig. 5). pRb 단백은 HPV형별과 관계없이 38례(93%)에서 국소성 발현을 보였고 HPV 감염이 없는 4례에서 3례는 국소성 발현, 나머지 1례는 음성을 나타내었다. p53 단백은 선암종 17례 를 포함한 31례(76%)에서 음성을 보였으며 국소성 발현은 10례(24%)에서 관찰되었다(Table 5, Fig. 5). 특히 p53 단백에 국소성 발현을 보인 증례는 10례 중에 7례가 HPV 16형 감염이 동반된 KSCC였으며 HPV 18형 감염이 동반된 경우나 AD에서는 p53단백 발현을 볼 수 없었고 HPV에 감염이 없는 4례에서는 2례가 국소성 발현, 나머지 2례는 음성을 보였다.

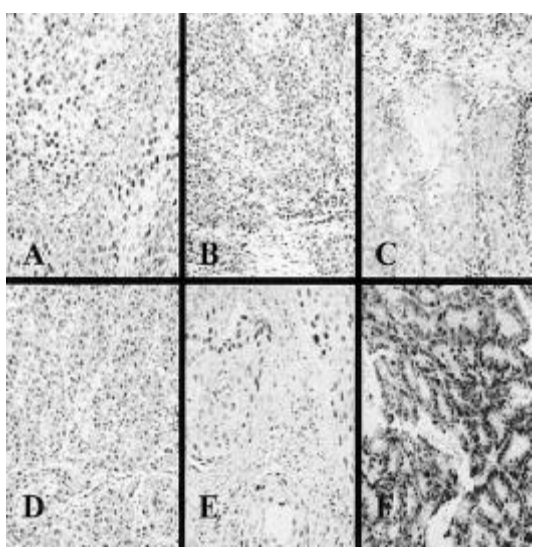

Fig. 5. Immunohistochemistry for (A) p16 (>50%), (B) p18 (>50%), (C) cyclin D1 (<5%), (D) CDK4 (>50%), (E) p53 (5-50%), and (F) pRb (5-50%). Nuclear staining is present (ABC method. A-F, original magnification x100).

Table 3. Results of immunohistochemical analysis of p16 and p18 in association with HPV types and histological subtypes

HPV types(n)	Diffuse po. p16/p18	Focal/scattered po. p16/p18	Negative p16/p18
HPV 16(17)	9(A,3; N,2; K,4)/ 9(A,4; N,1; K,4)	6(A,2; N,1; K,3)/4(A,1; N,1; K,2)	2(A,0; N,1; K,1)/4(A,0; N,2; K,2)
HPV 18(18)	11(A,9; N,1; K,1)/ 10(A,7; N,1; K,2)	7(A,2; N,2; K,3)/3(A,1; N,0; K,2)	0(A,0; N,0; K,0)/5(A,3; N,2; K,0)
Other types (2)	1(A,0; N,1; K,0)/ 2(A,0; N,2; K,0)	0(A,0; N,0; K,0)/4(A,0; N,0; K,0)	1(A,0; N,1; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)
HPV negative (4)	3(A,1; N,1; K,1)/ 4(A,1; N,2; K,1)	1(A,0; N,1; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)
Total (41)	24(A,13; N,5; K,6)/25(A,12; N,6; K,7)	14(A,4; N,4; K,6)/7(A,2; N,1; K,4)	3(A,0; N,2; K,1)/9(A,3; N,4; K,2)

A, adenocarcinomas; N, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; K, keratinizing squamous cell carcinomas; Po, positive.
Diffuse, >50% immunoreactive for tumor nuclei; Focal/scattered, 5-50% immunoreactive for tumor nuclei; Negative, <5% immunoreactive for tumor nuclei.

Table 4. Results of immunohistochemical analysis of cyclin D1 and CDK 4 in association with HPV types and histological subtypes

HPV types(n)	Diffuse po. p16/p18	Focal/scattered po. p16/p18	Negative p16/p18
HPV 16(17)	0(A,0; N,0; K,0)/ 11(A,3; N,1; K,7)	1(A,0; N,0; K,1)/5(A,2; N,2; K,1)	16(A,5; N,4; K,7)/ 1(A,0; N,1; K,0)
HPV 18(18)	0(A,0; N,0; K,0)/ 14(A,10; N,1; K,3)	1(A,0; N,0; K,1)/4(A,1; N,2; K,1)	17(A,11; N,3; K,3)/0(A,0; N,0; K,0)
Other types (2)	0(A,0; N,0; K,0)/ 2(A,0; N,2; K,0)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	2(A,0; N,2; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)
HPV negative (4)	0(A,0; N,0; K,0)/ 3(A,1; N,1; K,1)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	4(A,1; N,2; K,1)/ 1(A,0; N,1; K,0)
Total (41)	0(A,0; N,0; K,0)/30(A,14; N,5; K,11)	2(A,0; N,0; K,2)/9(A,3; N,4; K,2)	39(A,17; N,11; K,11)/2(A,0; N,2; K,0)

A, adenocarcinomas; N, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; K, keratinizing squamous cell carcinomas; Po, positive.
Diffuse, >50% immunoreactive for tumor nuclei; Focal/scattered, 5-50% immunoreactive for tumor nuclei; Negative, <5% immunoreactive for tumor nuclei.

Table 5. Results of immunohistochemical analysis of pRb and p53 in association with HPV types and histological subtypes

HPV types(n)	Diffuse po. p16/p18	Focal/scattered po. p16/p18	Negative p16/p18
HPV 16(17)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	16(A,5; N,4; K,7)/7(A,0; N,0; K,7)	1(A,0; N,0; K,1)/ 10(A,5; N,4; K,1)
HPV 18(18)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	17(A,10; N,3; K,4)/0(A,0; N,0; K,0)	1(A,1; N,0; K,0)/ 18(A,11; N,3; K,4)
Other types (2)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	2(A,0; N,2; K,0)/ 1(A,0; N,1; K,0)	0(A,0; N,0; K,0)/ 1(A,0; N,1; K,0)
HPV negative (4)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	3(A,0; N,2; K,1)/2(A,0; N,1; K,1)	1(A,1; N,0; K,0)/2(A,1; N,1; K,0)
Total (41)	0(A,0; N,0; K,0)/0(A,0; N,0; K,0)	38(A,15; N,11; K,12)/ 10(A,0; N,2; K,8)	3(A,2; N,0; K,1)/31(A,17; N,9; K,5)

A, adenocarcinomas; N, nonkeratinizing squamous cell carcinomas; K, keratinizing squamous cell carcinomas; Po, positive.
Diffuse, >50% immunoreactive for tumor nuclei; Focal/scattered, 5-50% immunoreactive for tumor nuclei; Negative, <5% immunoreactive for tumor nuclei.

고 찰

자궁경부암종의 발생은 여러 가지 원인과 관련이 있음이 보고되고 있지만 현재로는 HPV 감염이 가장 큰 원인으로 알려지고 있다. 성생활의 홍보와 위생상태의 호전 및 검진의 증가 등으로 자궁경부암종의 발생이 과거에 비해 낮아지고 있다지만 아직까지 여전히 여성생식기의 가장 높은 빈도로 발생되고 있다.[26]

HPV 감염에 의한 자궁경부의 암화 과정은 HPV의 E6 및 E7 단백이 세포주기조절에 중요한 p53 및 pRb의 기능저해로 인해 생겨남이 알려져 있다.[2,3] p53의 기능은 다양하지만 세포주기 관점에서는 CDK 억제자인 p21WAF1의 발현을 증가시켜 CDK2 및 CDK4/6의 활성을 저해하여 세포를 G1 세포주기에 머물게 하는 기능이 있다.[27] 만약 HPV 감염으로 인해 E6 단백이 p53 단백의 파괴를 초래하게 되면 G1 세포주기조절 이상으로 세포는 암화과정을 거칠 수 밖에 없다. 또한 HPV 감염이 발견되지 않는 자궁경부암종의 경우, 약 50% 이상에서 p53 유전자의 돌연변이가 관찰된다는 보고를 참고해 볼 때 궁극적으로 자궁경부암종의 발생은 p53과 상당히 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.[28] pRb 또한 p53과 마찬가지로 G1 세포주기조절과 밀접한 관계가 있다. pRb는 전사조절인자인 E2F와 복합체를 형성한 상태로 E2F의 활성을 저해하여 세포를 G1 세포주기에 머물도록 유도한다.[29] 그러나 HPV 감염으로 인해 E7 단백이 pRb와 결합하게되면 E2F는 pRb로부터 유리되어 여러 종류의 유전자의 전사, 특히 G1-S 세포주기 이행에 관련된 유전자의 발현을 촉진하게 된다.[30] 그러므로 G1 세포주기조절은 세포에서 아주 중요하며 암화억제기능이 있다. 그러나 HPV의 E6 및 E7은 각각 p53 및 pRb의 기능을 저해시키기 때문에 HPV감염 세포는 암화과정을 거칠 수 밖에 없다. 본 연구에서는 한국인 여성의 자궁경부암종을 대상으로 하여 HPV 감염율 및 HPV 형별을 조사한 결과 총 41례 중 37례, 즉 90%의 높은 빈도로 HPV 감염율을 보여 HPV와

자궁경부암종의 관계는 아주 밀접함을 한번 더 확인 할 수 있었다. 고위험군으로 알려진 HPV 16 및 18형 감염을 조사한 결과 HPV 감염이 확인된 37례 중 16형이 17례 및 18형이 18례가 관찰되어, HPV 16 및 18형 감염이 자궁경부암종의 발생과 가장 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었으며 이는 현재까지 발표된 보고와 일치한다.[1] 특히 17례의 AD 중 11례(65%)에서 HPV 18형의 감염이 확인되었지만 KSCC의 경우는 총 13례 중 8례(62%)에서 HPV 16형의 감염이 확인되어 AD와 KSCC간에 감염된 HPV 형별의 뚜렷한 차이가 관찰되었다. 이러한 결과는 Zehbe와 Wilander의 보고[31]와 일치하지만 아직까지 암종의 조직학적 유형과 감염을 유발한 HPV 형별의 차이에 대한 관계는 잘 모르고 있는 실정이다. 또한 AD에서 HPV 16형 및 18형이 거의 비슷한 비율로 감염된다는 기존의 여러 보고들[32,33]과는 차이가 있어 더욱 더 많은 증례에 대한 연구를 시행하여 조직학적 유형에 따른 HPV 형별 감염율의 차이를 규명해야 할 필요성이 있다.

CDK 억제자의 결손 및 돌연변이 또한 여러 종류의 암발생과 상당히 밀접한 관계가 있음이 알려져 있다. 이 중에서도 염색체 9p21에 위치한 p16INK4A 유전자의 결손 및 돌연변이가 가장 흔함이 보고되어 있다.[5,9,10] p16INK4A 단백질은 CDK4/6의 활성을 억제하여 pRb의 인산화를 저해함으로서 G1 세포주기조절에 관여하고 있다. 본 연구에서는 p16INK4A 유전자의 이상과 자궁경부암종과의 관계를 알아보기 위하여 암조직으로 부터 분리한 DNA를 이용하여 p16INK4A 유전자의 exon 1α 및 exon 2에 대한 PCR을 실시하였다. 이 때 분리한 DNA의 상태를 검증하고자 염색체 3번에 위치하는 pseudo-MTAP 유전자에 대한 PCR을 함께 시행한 결과 HPV 16 및 52b에 감염된 NSCC 2례에서만 p16INK4A 유전자의 결손이 관찰되었다. 아울러 돌연변이 유무를 알아보고자 PCR-SSCP를 시행한 결과 p16INK4A 유전자의 exon2에 돌연변이가 있다고 알려진 HL60 세포의 경우에만 mobility shift를 관찰할 수 있었고 자궁경부암종에서는 mobility shift의 이상을 보인 band는 확인할 수 없었다. 그러므로 p16INK4A 유전자의 결손 및 돌연변이는 자궁경부암종과 관계가 적을 것으로 생각된다.

최근에 유전자의 promoter부위 메칠화가 유전자의 발현을 저해하여 결손 및 돌연변이와 유사한 효과를 나타냄이 알려져 있다.[11,34] 본 연구에서 p16INK4A 유전자 promoter 부위의 메칠화를 29례에서 조사한 결과 9례(31%)에서 관찰되어 자궁경부암종에서 p16INK4A 유전자의 promoter 메칠화에 의한 불활성화가 암종발생에 어느정도 기여할 것으로 생각되며 이는 최근에 Wong 등[35]의 보고와 비슷한 결과이다.

면역조직화학염색에서 통해서 p16INK4A 단백 발현을 분석한 결과 미만성 발현이 AD 13례를 포함하여 24례(59%)였고 국소성 발현이 14례(34%)에서 관찰되었으며 p16INK4A 유전자의 결손이 있는 2례는 각각 음성 및 국소성 발현을 보였다. 또한 p16INK4A 유전자 promoter 부위의 메칠화가 되어 있는 9례 중 6례에서 국소성 발현 및 음성이 관찰되었다. 이는 Sano 등[36]의 보고와 일치하는 소견이며 면역조직화학적으로 p16INK4A 단백 발현의 저하를 보이는 경우에는 p16INK4A 유전자의 결손이나 돌연변이보다 promoter의 메칠화에 기인할 가능성이 많을 것으로 생각된다. 그리고 HPV 18형 감염이 확인된 18례의 자궁경부암종의 경우에서는 p16INK4A단백 발현이 18례 전부에서 관찰되었지만 HPV 16형의 경우에서는 17례 중 15례(88%)에서 관찰되어 p16INK4A 단백 발현의 경미한 차이가 있었다. 이는 어떤 이유에서 발현의 차이를 나타내는지 알 수 없으며, 향후 HPV 형별에 따른 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. p16INK4A와 유사한 기능을 보이는 p18INK4C 유전자의 결손 및 돌연변이가 여러 종류의 암에서 관찰됨이 보고[12-14]되고 있어 본 연구에서도 자궁경부암종과 p18INK4C 유전자의 이상유무도 함께 조사하였다. Comparative multiplex PCR을 시행하여 결손 유무를 관찰한 결과 모든 검체에서 p18INK4C 유전자의 exon2 및 exon3a-1의 증폭이 관찰되어 자궁경부암종과 p18INK4C 유전자의 결손과는 연관이 없음을 알 수 있었다. 또한 PCR-SSCP상 mobility shift를 보인 경우도 관찰할 수 없어 돌연변이도 자궁경부암종과는 관계가 없음이 규명되었다. 그러나 면역조직화학염색상 9례(22%)에서 p18INK4C 단백 발현을 관찰할 수 없었는데, 이는 p16INK4A 유전자와 같이 p18INK4C 유전자에서도 promoter부위의 메칠화에 의한 단백 발현 저하의 가능성을 암시한다고 생각된다. Cyclin D1은 CDK4/6와 결합하여 CDK4/6의 활성에 기여하며 여러 종류의 암종에서 cyclin D1과 CDK4의 과발현이 보고되고 있다.[37] 본 연구에서 cyclin D1과 CDK4에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 cyclin D1은 5%에서만 발현을 관찰할 수 있었고 CDK4의 경우는 95%에서 발현을 보여 자궁경부암종과 cyclinD1-CDK4의 경로를 통한 암화와는 관계가 적을 것으로 생각된다. Cyclin D1의 발현이 잘 관찰되지 않은 것은 아직까지 그 기전을 알 수는 없지만 아마도 HPV의 E7 단백이 저인산화 pRb와 결합하여 cyclin D1-CDK4/6-pRb 경로의 조절이상으로 cyclinD1의 발현과 관계없이 E2F에 의해 G1 세포주기에서 S기로의 이행이 가능한 결과로 판단된다. 면역조직화학염색상 93%의 암조직에서 pRb의 국소성 발현을 볼 수 있어 이는 E7 단백에 의해 비활성화된 상태로 발현되는 것으로 생각된다. p53 단백의 발현은 10례를 제외한 31례(76%)에서 관찰할 수 없었는데, 이는 HPV의 E6 단백과 결합된 p53 단백이 ubiquitin 의존성 단백분해계에 의해 파괴된 결과로 추정해 볼 수 있다.[38] 특히 HPV 18형이 감염된 증례와 AD의

경우에는 p53 단백 발현이 음성을 나타내었고, p53 단백이 국소성으로 발현된 총 10례에 가운데 7례가 HPV 16형의 감염이 확인된 KSCC 및 HPV 감염이 없는 2례로 구성되어 결과적으로 HPV 18형이 HPV 16형에 비해 p53 파괴효과가 상대적으로 더 높다는 것을 시사하지만 현재로는 정확한 기전을 알 수 없는 실정이다. 또한 p53 단백이 면역조직화학적으로 발현되는 경우 wild type의 p53 단백의 발현 및 mutant type이 동시에 발현되었을 가능성이 많다. 그러나 p53 단백이 과발현 양상을 보일 때에 p53 유전자의 이상이 항상 동반되는 것이 아니라는 보고[39]도 있어 p53 단백 발현과 p53 유전자의 변이에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 HPV 감염이 없는 4례 중 2례에서 p53 단백의 발현을 관찰할 수 있었고 1례에서 pRb 단백의 발현을 볼 수 없었다. 이는 HPV 감염이 없는 자궁경부암종에서 p53과 pRb 유전자의 돌연변이가 흔히 동반된다고 보고[40]되어 있어 면역조직화학염색에서 p53 단백 발현 및 pRb 단백의 발현소실이 관찰되었을 가능성이 많다. 따라서 HPV 음성 자궁경부암종의 경우에는 HPV 감염에 의한 암화기전과는 달리 p53 및 pRb의 이상이 초래되었을 것으로 기대된다.

이상의 결과를 살펴보면 자궁경부암종의 병인은 예전의 보고와 동일하게 HPV의 감염이 주된 원인임을 알 수 있었다. 그리고 p16INK4A 유전자의 이상은 일부의 자궁경부암종에서 결손보다 promoter부위의 메칠화에 의해서 불활성화되어 암화와 연관성이 있을 것으로 생각되며 p18INK4C 유전자의 이상 및 cyclin D1-CDK4의 경로에 의한 암화과정과 자궁경부암종은 밀접한 관계가 없을 것으로 사료된다. 그리고 HPV 16형 감염보다 HPV 18형이 E6 단백에 의한 p53 단백파괴를 잘 초래할 가능성이 있을 것으로 생각된다. 앞으로 자궁경부암종에서 HPV 감염에 따른 cyclin D1 및 CDK4 유전자 이상과 발현 양상의 변화 및 HPV 음성인 증례에 대한 pRb와 p53 유전자 변이에 대하여 심도 깊은 연구가 진행되어야 하며 G1 세포주기에 관여하는 특정 유전자 및 단백의 이상 유무도 함께 밝혀야 할 것으로 생각된다.

- 참고문헌 -

1. Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. Cancer Res 1991; 51 Suppl 18: 5019s-22s.
2. Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, et al. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5320-4.
3. Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. Oncogene 1995; 10: 261-8.
4. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2775-9.
5. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994; 264: 436-40.
6. He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS 3rd, et al. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. Cancer Res 1994; 54: 5804-7.
7. He J, Olson JJ, James CD. Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. Cancer Res 1995; 55: 4833-6.
8. Welcker M, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Enhanced protein stability: a novel mechanism of D-type cyclin over-abundance identified in human sarcoma cells. Oncogene 1996; 13: 419-25.
9. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 1995; 55: 4525-30.
10. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat Med 1995; 1: 686-92.
11. Woodcock DM, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. DNA methylation in the promoter region of the p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) gene in human breast tumours. Br J Cancer 1999; 79: 251-6.
12. Iolascon A, Giordani L, Moretti A, Tonini GP, Lo Cunsolo C, Mastropietro S, et al. Structural and functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in neuroblastoma. Pediatr Res 1998; 43: 139-44.
13. Platz A, Hansson J, Ringborg U. Screening of germline mutations in the CDK4, CDKN2C and TP53 genes in familial melanoma: a clinic-based population study. Int J Cancer 1998; 78: 13-5.
14. Pohl U, Cairncross JG, Louis DN. Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. Brain Pathol 1999; 9: 639-43.
15. Cheung TH, Chung TK, Poon CS, Hampton GM, Wang VW, Wong YF. Allelic loss on chromosome 1 is associated with tumor progression of cervical carcinoma. Cancer 1999; 86: 1294-8.
16. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. Cell 1991; 65: 1053-61.
17. Verma IM, Vogt PK. Oncogenes: 20 years later. Genes Dev 1995; 9: 1289-301.
18. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 1995; 9: 1149-63.
19. Shao ZM, Dawson MI, Li XS, Rishi AK, Sheikh MS, Han QX, et al. p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. Oncogene 1995; 11: 493-504.
20. Zeng YX, el-Deiry WS. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. Oncogene 1996; 12: 1557-64.
21. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res 1976; 3: 2303-8.
22. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, et al. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. Cancer 1992; 70: 2234-8.
23. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. J Gen Virol 1991; 72: 1039-44.
24. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989; 5: 874-9.
25. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 9821-6.
26. Chung GT, Huang DP, Lo KW, Chan MK, Wong FW. Genetic lesion in the carcinogenesis of cervical cancer. Anticancer Res 1992; 12: 1485-90.
27. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res 1994; 54: 1169-74.
28. Kurvinen K, Tervahauta A, Syrjanen S, Chang F, Syrjanen K. The state

of the p53 gene in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative genital precancer lesions and carcinomas as determined by single-strand conformation polymorphism analysis and sequencing. Anticancer Res 1994; 14: 177-81.
29. Beijersbergen RL, Bernards R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. Biochim Biophys Acta 1996; 1287: 103-20.
30. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 934-7.
31. Zehbe I, Wilander E. Human papillomavirus infection and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. J Pathol 1997; 181: 270-5.
32. Lee MF, Chang MC, Wu CH. Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. Int J Gynaecol Obstet 1998; 63: 265-70.
33. Ferguson AW, Svoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. Mod Pathol 1998; 11: 11-8.
34. Otterson GA, Khleif SN, Chen W, Coxon AB, Kaye FJ. CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'deoxycytidine. Oncogene 1995; 11: 1211-6.
35. Wong YF, Chung TK, Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, et al. Methylation of p16INK4A in primary gynecologic malignancy. Cancer Lett 1999; 136: 231-5.
36. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. Pathol Int 1998; 48: 580-5.
37. Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. Curr Opin Genet Dev 1993; 3: 5-10.
38. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 1993; 75: 495-505.
39. Helland A, Holm R, Kristensen G, Kaern J, Karlsen F, Trope C, et al. Genetic alterations of the TP53 gene, p53 protein expression and HPV infection in primary cervical carcinomas. J Pathol 1993; 171: 105-14.
40. Wrede D, Tidy JA, Crook T, Lane D, Vousden KH. Expression of RB and p53 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. Mol Carcinog 1991; 4: 171-5.

=국문초록=

목적 : 자궁경부암종에서 HPV감염과 p16INK4A 및 p18INK4C 유전자 이상과 발현을 조사하고 pRb, cyclin D1, CDK4 및 p53의 발현을 검색하여 자궁경부암종과의 연관성을 조사하고자 하였다.

방법 : 총 41례의 자궁경부암종을 대상으로 PCR, comparative multiplex PCR, PCR-SSCP, methylation-specific PCR 및 면역조직화학염색을 시행하였다.

결과 : HPV 감염은 90%에서 확인되었고, HPV 18형 감염이 44%, HPV 16형이 41%에서 관찰되었다. p16INK4A 유전자 결손은 5%에서 관찰되었으며 promoter부위의 메칠화는 29례 중 9례(31%)에서 확인되었다. p16INK4A 유전자의 돌연변이 및 p18INK4C 유전자의 이상은 관찰할 수 없었고, p16INK4A 및 p18INK4C의 발현은 각각 93%와 78%에서 관찰되었다. Cyclin D1은 5%에서만 발현을 보인 것에 비해 CDK4은 95%에서 발현을 보여 상반된 결과를 보였고 pRb의 발현은 93%에서 발현을 볼 수 있었다. p53 단백에 대한 발현은 24%에서 관찰되었다.

결론 : 자궁경부암종에서 HPV 감염이 종양발생에 가장 중요한 요인이며 p16INK4A 유전자 promoter부위의 메칠화가 종양발생에 일부분 기여할 것으로 생각되고, p18INK4C 유전자의 이상과 cyclin D1-CDK4의 경로에 의한 암화과정은 자궁경부암종과 연관성이 없는 것으로 판단된다.

중심단어 **: p16INK4A, p18INK4C, 인유두종바이러스, 세포주기조절단백, 자궁경부암종**