

## cDNA Microarray 기술로 동정된 난소 암 종의 c-IAP1 유전자 과 발현

계명대학교 의과대학 산부인과학 교실<sup>1</sup> · 미생물학 교실<sup>2</sup> · 병리학 교실<sup>3</sup> · 삼양 제넥스  
연구소 유전자 치료그룹<sup>4</sup> · 경북대학교 의과대학 병리학 교실<sup>5</sup>  
조치홍<sup>1</sup> · 이태성<sup>1</sup> · 차순도<sup>1</sup> · 백원기<sup>2</sup> · 서성일<sup>2</sup> · 서민호<sup>2</sup> · 박관규<sup>3</sup> · 정년철<sup>4</sup> ·  
배인수<sup>4</sup> · 곽정식<sup>5</sup>

### -ABSTRACT-

#### Overexpression of c-IAP1, a Member of the Inhibitor of Apoptosis, Identified by cDNA Microarray Technique in Ovarian Carcinomas

Chi Heum Cho<sup>1</sup>, M.D., Tae Sung Lee<sup>1</sup>, M.D., Soon Do Cha<sup>1</sup>, M.D.,  
Won Ki Baek<sup>2</sup>, M.D., Seong Il Suh<sup>2</sup>, M.D., Min Ho Suh<sup>2</sup>, M.D.,  
Kwan Kyu Park<sup>3</sup>, M.D., Neon Cheol Jung<sup>4</sup>, PhD, In Soo Bae<sup>4</sup>, PhD,  
Jyung Sik Kwak<sup>5</sup>, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology<sup>1</sup>, Microbiology<sup>2</sup>, Pathology<sup>3</sup>, Keimyung University School  
of Medicine, Taegu, Korea Gene Therapy Group, Research Institution of Samyang Genex Co.  
Taejun, Korea<sup>4</sup> Department of Pathology, Kyungpook National University, Taegu, Korea<sup>5</sup>

**Objective:** Programmed cell death or apoptosis is a fundamental event in the developmental and homeostatic processes of all multicellular organisms. In this study, we preliminarily evaluated comparative patterns of gene expression between ovarian carcinoma and normal ovary by cDNA microarray analysis(Clontec Laboratory, Inc.). We identified the overexpression of c-IAP1 in ovarian carcinomas compared with normal ovary. This finding was obtained using RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) and immunohistochemical stains in large scale.

**Methods:** Twelve epithelial ovarian carcinoma tissues, 5 normal ovarian tissues from benign gynecologic disease and 2 benign ovarian tumors were examined for the presence of c-IAP1 by RT-PCR and immunohistochemical stain.

**Results:** All cases of ovarian carcinoma tissues were positive and 2 normal ovarian tissues were negative for c-IAP1 by RT-PCR assay. Two of 5 positive normal ovarian tissues were weakly positive compared with positive ovarian carcinoma tissues. The source of the c-IAP1 expression was further examined by immunohistochemical studies. c-IAP1 was detectable in all ovarian carcinoma tissues which were positive by immunohistochemical staining. Expression of c-IAP1 in normal ovarian tissue was localized exclusively in the corpus luteum. There was no expression in normal ovarian stroma cells for c-IAP1 protein.

**Conclusion:** These findings suggest that c-IAP1 is produced by ovarian tumors in vivo and that association between antiapoptosis and tumor generation may be clinically relevant. Expression of c-IAP1 in corpus luteum suggest that may be involved in ovarian follicular development and atresia.

**Key words:** Ovarian carcinoma, c-IAP1

난소 암은 "Silent killer" 라고 불리울 만큼 조기진단  
이 어렵고 또한 사망률이 높은 여성 생식기 암중의 하나

이다. 우리나라에서는 여성 생식기 암중에서 자궁경부  
암 다음으로 많은 번도를 차지하며 서서히 증가 추세에

있다.<sup>1</sup> 미국의 통계를 보면 난소 암은 1996년에 26,000명의 새로운 환자가 발생했으며 이 암으로 인해 15,000명의 환자가 사망했다고 보고되어 있다.<sup>2</sup> 또한 난소 암은 미국 여성 암 사망 중 4위를 차지할 만큼 무서운 병이다. 이러한 이유는 난소 암은 다른 암과는 달리 조기발견이 어렵고 또한 적절한 조기 진단 방법이 개발되지 못했기 때문이다. 대부분 환자들이 난소 암에 대한 증상을 호소하여 병원에 내원 할 때는 약 70%에서 진행된 3기 내지 4기의 상태로 진단된다.<sup>3</sup> 난소 암을 조기 진단하게 되면 5년 생존율이 약 95% 정도에 이르게 되나 진행된 3기, 4기에는 30% 이하로 떨어지게 된다.<sup>4</sup> 난소 암에 대한 수술 및 항암 요법의 개발로 인해 생존율의 증가가 보고되어 있지만 전체적으로는 큰 변화가 없는 실정이다.<sup>5</sup> 따라서 난소 암의 발생원인을 밝히고 조기진단을 시행할 수 있다면 사망율을 낮추는데 기여하게 될 것이다.

그동안 난소 암이 발생하는 원인을 규명하기 위한 많은 연구가 있어 왔으나 아직까지는 정확한 발생원인을 규명하지 못하고 있다. 또한 분자 생물학의 발달로 난소 암의 원인, 발생요인 및 유전자의 변화 등에 관한 다방면의 연구가 이루어지고 있지만 정확한 규명은 되어 있지 않다. 그러므로 저자는 모든 정상적인 사람 중에서도 난소 암을 발생시킬 수 있는 요인을 가지는 사람이 있을 것이며, 유전학적으로 차이가 나는 변수가 존재할 것으로 생각되어 난소 암 환자와 정상 사람의 난소에서 분자유전학적 차이점을 찾아내어 난소 암의 진단과 치료에 도움이 될 수 있는 정보를 얻기 위해 이 연구를 계획하였다.

보고에 의하면 모든 종류의 암화 과정에 있어서 많은 인자들이 복잡하게 관여되고 있으며 이것은 촉진 또는 억제 인자의 많은 변화가 동반 되어있다. 난소 암의 경우에는 정상적인 난소와 많은 차이가 존재한다고 유추할 수 있다. 이것을 분자생물학적인 방법으로 분석하면 더욱 뚜렷한 차이점과 유사점을 발견 할 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지 사람의 유전자는 분자생물학의 발달과 human genome project 등의 노력으로 천 여종의 유전자가 밝혀져 있지만 유전자 각각의 기능적 및 생물학적 역할에 대해서는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.<sup>6</sup> 최근에 개발된 cDNA microarray (DNA chip) 기술의 개발로 여러 가지 환경 및 서로 다른 종류의 세포에서 유전자들의 상호발현 차이를 빠른 시간에 동시에 연구할 수 있게 되었다.<sup>7,8</sup> cDNA microarray의 장점은 세포 유전자 발현의 변화를 한 시점에서 많은 유전자를 대상으로 연구하여 분석 할 수 있다는 것이다. 그러므로 cDNA microarray 기술을 이용하여 정상 난소조직과 난소 암 조직의 유전자 차이의 분석은 588종의 암 유전자, 항 암 유전자, 세포주기 관련 유전자, apoptosis 관련 유전자, 세포내 신호 전달계

관련유전자와 전사인자, 세포접합물질, cytokine, 성장인자 등의 유전자를 대상으로 정상 난소조직과 암 조직에서 mRNA를 분리하여 cDNA microarray법으로 분석하였다.

정상 난소와 난소 암 조직에서 유전자 발현을 분석한 결과 apoptosis inhibitor인 c-IAP1이 증가하는 양상을 발견하였다. c-IAP1은 1995년에 처음 소개된 것으로 baculovirus에서 동정된 inhibitor of apoptosis protein(IAP)의 일종으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 이후 c-IAP1과 관련된 몇몇 연구가 있었지만 지금까지 그 기능이 정확하게 알려져 있지 않고 있으며 또한 난소 암과의 관련성에 대해서도 조사가 전무한 상태이다.

저자는 cDNA microarray 기술을 이용하여 난소 암과 정상 난소조직에서 동정해본 결과 c-IAP1의 의미 있는 증가를 관찰하였고, 적은 예의 난소 암에서 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)법으로 분석하여 유의한 결과를 얻었으며 이러한 것을 토대로 하여 많은 난소 암 조직과 정상 난소 조직에서의 유의성을 RT-PCR과 면역조직화학적 분석을 통해 RNA와 단백질 수준에서 검증하여 관련성을 밝히고자 이 연구를 시도하였다.

## 연구 대상 및 방법

난소 암 조직과 정상 난소 조직을 cDNA microarray 기술을 이용하여 588가지의 유전자의 발현을 비교분석하고 c-IAP1이외에 다른 유전자에도 이전에 모르는 연관성이 있는지 비교 검토하고 개별적 차이를 비교 분석하였다. c-IAP1이 많은 수의 난소 암과 정상세포에서도 같은 결과를 도출하는지를 RT-PCR방법으로 RNA 수준에서 검정하였다. c-IAP1의 증가가 의의가 있다면 단백질에서도 같은 결과를 보이는지 면역조직화학적 분석방법으로 확인하였다.

### 1. 연구대상

1) 상피성 난소 암 12예와 양성 난소 낭종 2예, 정상 난소 5예를 대상으로 하였다.

2) cDNA microarray 분석을 위해 AtlasTM cDNA expression arrays ( Clontec Laboratories, Inc. )를 이용하였다.

3) RT-PCR을 위한 primer는 219bp로 합성하여 실험하였다.

4) 면역조직화학적 염색의 항체는 c-IAP1 폴리클론항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)를 이용하였다.

### 2. 방법

난소 암 조직과 정상 난소 조직에서 각각 total RNA를 분리하고 이어 oligo dT를 사용하여 mRNA만을 분리하였다. 분리된 mRNA를 사용하여 588종류의 유전자 발현을 cDNA microarray법으로 분석하고 발현의 변화를 보이는 유전자 c-IAP1을 발견하였다. 발견된 c-IAP1을 대상으로 primer(219bp)를 합성한 후 난소 암 조직 12례와 정상 난소 조직 5례, 양성 난소 낭중 2례에서 RT-PCR과 면역조직화학적 분석을 통해 다시 발현의 변화를 확인하였다. 위의 모든 실험은 다음과 같은 방법으로 시행하였다.

#### 1) mRNA 분리

RNAzol B (Bioteck laboratories, Inc)를 사용하여 total RNA를 분리한 후 mRNA만을 분리하였다

##### 1-1) Total RNA 분리

조직 100 mg에 RNAzol B를 2 ml 넣고 homogenizer로 15,000 rpm에서 3분 정도 조직을 파쇄시키고, 세포 주는 3.5 cm petri dish당 1 ml의 RNAzol B를 넣고 3-4번 피펫을 통과시킨 후, 세포 용해액 2 ml당 0.2 ml의 chloroform을 넣고 15초간 잘 혼합하고 4°C로 15분 원심하여 상층액을 새튜브로 옮긴 후 동량의 2-propanol을 넣고 -70°C에 2시간 방치하였다. 이를 12,000 rpm에서 4°C로 15분 원심하여 RNA침사를 얻은 후 75% cold ethanol로 세척하고 Speedvac concentrator (Savant Co, USA)에서 5분간 건조시킨 다음 여기에 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 중류수 100 μl를 넣어 녹인 후 UV spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정하고 -70°C에 보관하였다<sup>11</sup>.

##### 1-2) Total RNA에서 mRNA 분리

Oligotex mRNA kit (QIAGEN Co, USA)를 사용하여 분리하였다.

##### 2) cDNA probe 준비

###### 2-1) cDNA 합성

분리한 1 μg의 poly-A RNA로 <sup>32</sup>P-labelled first strand cDNA를 합성하였다. Poly-A RNA에 alpha <sup>32</sup>P-dATP와 MMLV reverse transcriptase를 혼합하고 thermal cycler를 사용하여 70°C에서 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다.

###### 2-2) Column Chromatography로 표지된 cDNA probe를 분리

CHROMA SPIN-200 DEPC-H<sub>2</sub>O column을 사용하여 <sup>32</sup>P-labeled cDNA를 unincorporated <sup>32</sup>P-nucleotides와 0.1Kb 이하의 small cDNA fragment에서 분리하였다.

##### 3) Hybridization for cDNA microarray analysis

준비된 cDNA probe로 cDNA microarray membrane (Clontec Laboratories, Inc.)에 hybridization을 시행하였다. Hybridization은 hybridization chamber를 사용하여 68°C에서 시행하였다. SS DNA (salmon sperm DNA)를 포함하

는 hybridization solution으로 68°C에서 30분간 prehybridization 후, denaturation시킨 labeled cDNA probe (약 200 μl, 2.5X10<sup>6</sup> cpm)를 포함하는 hybridization 용액으로 68°C에서 hybridization을 시행하였다(overnight). Wash solution (SDS + SSC solution)으로 세척하고 autoradiogram을 시행하여 유전자의 발현 차이를 Atlas Human Array (Clontec Laboratories, Inc.)를 이용하여 분석하였다.

#### 4) RT-PCR

cDNA 합성은 분리된 RNA 2 μg을 oligo dT(16 mer)를 사용하여 40 μl 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 μg, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1mM dATP, 1mM dTTP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1 U/μl RNase inhibitor(Perkin-Elmer Co.), 2.5 U/μl MuLV reverse transcriptase(Perkin-Elmer Co.), 2.5 μM oligo d(T)16로, 반응 조건은 42°C 1시간, 99°C 5분, 50°C 5분으로 하였다. PCR은 10X reaction buffer(15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 μl와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 μl씩, 그리고 30 μM sense(5'-CCGGAAAGA ATAGAACATGGCAC-3') 및 antisense primer(5'-ACAGCTT CAGCTTCTTGCAG-3')를 각각 1 μl를 넣은 mixture에 1 μl의 반응시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase(Perkin-Elmer Co.)를 넣은 후 중류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 증층 한 후 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 μl를 1% agarose gel에 전기 영동 한 후 관찰하였다.

#### 5) 면역조직화학적 염색

조직에서 c-IAP1 단백의 증명을 위해 4 μm 두께의 파라핀 절편을 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 1시간동안 방치한 후 xylene과 계열알코올로 탈 파라핀 및 함수를 하였다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 PBS(phosphate buffered saline, pH7.2)로 수세하였다. 그 후 포르말린 고정으로 조직 내에 감주어진 항원을 노출시키기 위해 1% zinc sulfate-용액에 담구어 microwave 오븐을 이용하여 15분간 가열하였다. 실온에서 20분간 식힌 후 30분간 normal horse serum(Vectastain Elite Kit)을 가한 후 항체인 c-IAP1 폴리클론 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA)를 1:10으로 회석하여 2시간동안 37°C에서 반응 시켰다. PBS로 수세하고 peroxidase-conjugated streptavidin(Dako, USA) 1:500을 37°C에서 15분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 10-20분간 실온에서 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대비 염색을 한 후

광학현미경으로 관찰하였다. 염색된 조직의 판독은 광학 현미경 하에서 c-IAP1 단백의 면역조직화학적 반응은 종양세포의 세포질에 갈색으로 전하게 염색된 경우에 한해서 양성반응으로 하고, 먼저 100배 시야의 저 배율에서 염색된 부분을 선택한 후 400배 시야에서 염색된 세포가 전체세포의 10% 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

## 결 과

난소 암 종과 정상 난소 각각 2예를 cDNA microarray 를 통해 발현의 변화를 비교한 결과 난소 암 조직에서 apoptosis 관련 원자인 c-IAP1이 3배, RAD는 2배의 과 발현이 관찰되었다. 이외에 전사인자에서는 ARD1 과 DNA-binding protein inhibitor ID2 의 발현 증가가 난소 암 종에서 2-3배 있었다. 수용체에서의 변화에서는 IL-4 receptor alpha chain, calcitonin receptor, alpha-catenin이 난소 암 종에서 3배 과 발현이 있었고, cell-cell communication인자에서는 IL-4, IL-13의 발현 증가가 각각 2배, 3배 난소 암 종에서 관찰되었다. 이전에 관계가 규명된 유전 인자를 제외하고 새롭게 관찰된 c-IAP1, ARD1과 ID2 에 대해 사전 검증을 RNA수준에서 RT-PCR로 시행하여 ARD1과 ID2는 유의성을 볼 수 없었고, c-IAP1은 유의성이 있었다.(Fig. 1)

난소 암 환자의 평균연령은 50.2세(34-63세), 정상 난소 환자의 평균 연령은 41.8세(27-48세) 이었고, 난소 암 종의 병기는 1기가 1예, 3기가 10예, 4기가 1예 이었다. 조직학적으로는 점액성 난소 종양이 2예, 장액성 난소종 양이 9예, 자궁내막양 난소 암이 1예 이었고 양성 난소 낭종은 점액성 난소낭종 1예, 자궁 내막종이 1예 이었다.(Table 1)

c-IAP1의 RNA 수준에서의 검정을 위해 RT-PCR을 시행하였다. 적정 cycle수와 적정 RNA농도를 결정하기 위하여 cycle수를 달리하면서, 그리고 template RNA농도를 달리하면서 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 GAPDH는 25 cycle, c-IAP1은 35 cycle의 PCR이 적정할 것으로 나타났다. 난소 암 12예 중에서 전 예에서 c-IAP1의 발현을 관찰할 수 있었고, 정상난소 조직 5예 중 c-IAP1이 2예에서 관찰 되었고, 2예에서는 약하게 발현되었으며, 양성 난소 낭종에서는 자궁내막종에서 발현이 관찰 되었으나 점액성 난소 낭종에서는 발현이 없었다.(Fig. 2, 3)

면역조직화학적 방법으로 단백질 수준에서의 검증을 시도하여 12예의 난소 암 종의 전 예에서 c-IAP1의 항체에 대한 과 발현이 관찰되었고(Fig. 4a-d), 5예의 정상 난소 조직에서는 4예에서 발현을 관찰할 수 있었으나 모두가 황체에만 국한되어 나타났으며(Fig. 4e), 정상 난소 기

질조직과, 초기 난포에서는 발현되지 않았다.(Fig. 4f,4g) 양성 난소 낭종 2예중 점액성 낭종에서는 발현이 없었으며(Fig. 4h), 자궁 내막종에서는 국소적인 발현을 보였다.(Fig. 4i, 4j)

## 고 칠

모든 종류의 암화 과정은 다발적인 요인에 의해 다양한 단계를 거치면서 발생한다고 생각하고 있다. 이중 Apoptosis는 세포분화, 노화, 암화 또는 세포증식의 조절이라는 역할을 하게 되는 것을 알게 되었다. 1972년에 처음으로 Apoptosis에 대한 개념이 보고되었지만 처음에는 병태 생리학적인 개념으로 생각하였고 그후 apoptosis 관한 많은 연구가 진행되어 암화과정의 조절인자로 크게 작용한다는 것을 알게 되었다.<sup>12</sup>

Apoptosis는 세포가 DNA 손상을 받았을 때 작동되고, 복구되지 않으면 세포사를 초래하는 기능을 가지고 있다. 그러나 이 조절인자의 돌연변이가 일어나면서 세포는 악성변화를 겪게되고 결국에는 암으로 되는 것이다.

Fig 1. cDNA microarray analysis in ovarian carcinoma tissue and normal ovarian tissue

Table 1. Comparisons between ovarian carcinoma and normal ovary

| variables                   | ovarian carcinoma<br>(N = 12) | normal ovary<br>(N = 7) |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Mean age(year)<br>(range)   | 50.2<br>(34-64)               | 41.8<br>(27-48)         |
| Histologic type             |                               |                         |
| Malignant epithelial tumors |                               |                         |
| Serous cystadenocarcinoma   | 9                             |                         |
| Mucinous cystadenocarcinoma | 2                             |                         |
| Endometrioid carcinoma      | 1                             |                         |
| Benign epithelial tumors    |                               |                         |
| Mucinous cystadenoma        |                               | 1                       |
| Endometriosis               |                               | 1                       |
| Normal ovary                |                               | 5                       |
| Stage ( FIGO )              |                               |                         |
| I                           | 1                             |                         |
| III                         |                               | 10                      |
| IV                          | 1                             |                         |

N ; Number of patients,

FIGO ; International Federation of Gynecology and Obstetrics

대표적인 억제 조절인자인 p53은 DNA가 손상된 세포를 쉬게 하고 다시 원상복구 시키지만, 이 손상이 회복될 수 없을 때는 p53이 증가하면서 apoptosis를 유발시킨다. 반대로 암의 약 50%에서 p53의 변이가 관찰되어 apoptosis가 일어나지 못하는 것을 증명하였다.<sup>13</sup> Apoptosis 억제인자인 bcl-2는 세포의 이형성과 암화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup> 난소암에서 bcl-2는 암화과정에서 중요한 역할을 하며, Bax와 bcl-2를 이용하여 난소암의 예후를 예측하는데 사용하고자 하는 노력이 있었다.<sup>15</sup>

본 연구자는 근래에 새롭게 개발된 cDNA microarray 기술을 바탕으로 난소 암종과 정상 난소조직에서의 유전자 발현 변화를 588 종류의 암유전자, 항암 유전자, 세포주기 관련 유전자, apoptosis 관련 유전자, 세포내 신호 전달계 관련 유전자와 전사인자, cell adhesion molecule, cytokine, 성장인자 등의 유전자를 대상으로 비교 분석하여, 많은 의의 있는 결과를 보았지만 그 중에서 apoptosis 관련 유전자에서 c-IAP1의 차이를 발견하였다. c-IAP1은 1995년에 처음으로 baculovirus의 apoptosis inhibition protein으로 발견되었다.<sup>16</sup> Baculovirus 단백 p35는 invertebrate와 포유류세포에서 바이러스에 의해 매개되는 apoptosis를 억제하고, 이것은 숙주면역체계에서 바이러스에 감염된 세포의 제거를 억제시키는 기능을 가진다고 보고하고 있다.<sup>16,17</sup> 이러한 것은 serine protease의 Interleukin-1  $\beta$  Converting Enzyme(ICE) family의 억제를 통해 TNF와 FAS에 의해 매개되는 apoptosis를 차단하게 된다.<sup>18,19</sup> 이 baculovirus p35단백의 두 개의 mammalian homologs가 존재하는데 이것이 IAP 1과 2이다. c-IAP1은

Fig 2. RT-PCR analysis of c-IAP1 and GAPDH mRNA expression in epithelial ovarian carcinomas. Lane 1 - 9: serous cystadenocarcinoma, lane 10,11: mucinous cystadenocarcinoma, lane 12 : endometrioid carcinoma.

Fig 3. RT-PCR analysis of c-IAP1 and GAPDH mRNA expression in normal ovarian tissues. Lane 1: endometriosis, lane 2 - 6: normal ovary, lane 7: mucinous cystadenoma

apoptosis의 신호를 전달하는데 관여하는 물질로 알려져 있으며, tumor necrosis factor receptor(TNFR)와는 직접적

- Fig 4a. Ovarian mucinous cystadenocarcinoma. Many tumor cells show strong positive cytoplasm for c-IAP1 protein (X 400).
- Fig 4b. Ovarian serous cystadenocarcinoma. Many tumor cells show strong positive cytoplasm for c-IAP1 protein (X 400).
- Fig 4c. Ovarian endometrioid carcinoma. Many tumor cells show strong positive cytoplasm for c-IAP1 protein (X 400).
- Fig 4d. Ovarian serous cystadenoma, borderline malignancy. Many tumor cells show strong positive cytoplasm for c-IAP1 protein (x 100).
- Fig 4e. Normal ovary. Corpus luteum shows positive cells in their cytoplasm for c-IAP1 protein. The stroma of the ovary is exclusively negative (X 100).
- Fig 4f. Normal ovary. The stromal cells show negative for c-IAP1 protein (X 100).
- Fig 4g. Normal ovary. Early follicular cells show negative for c-IAP1 protein (X 100).
- Fig 4h. Ovarian mucinous cystadenoma. Lining columnar epithelial cells show negative for c-IAP1 protein (X 200).
- Fig 4i. Ovarian endometriotic cyst. The endometrial glandular epithelial cells show positive for c-IAP1 protein (X 150).
- Fig 4j. The stroma of the ovary is negative for c-IAP1 protein (X 150).

으로 관여하지는 않으나 downstream에서 관여하여 TNF가 매개하는 apoptosis를 효과적으로 차단하며 TNFR2와 관련 있는 것으로 알려져 있다. TNFR1은 TNF와 ligands 결합 함으로써 세포내에 apoptosis 신호를 전달한다. TNF는 TNFR1, TNFR2의 세포 표면과 반응하여 pleiotropic inflammatory 와 immunoregulatory response 를 매개하는 cytokine 이다. 여기에서 TNFR1은 TRADD와 연관해서 cytoplasmic death domain을 형성하여 NF-  $\kappa$  B activation 과 programmed cell death를 유도하고, TNFR2는 TNFR associated factors(TRAF)와 heterocomplex를 이루어 두 개의 IAP1, 2가 TNFR의 recruitment를 매개한다고 밝혀져 있다<sup>20</sup>. 또한 TNFR2는 death domain을 가지고 있지

않으며, apoptosis를 유발하지도 않는다. 그러므로 IAP는 apoptosis에 antagonize 한다고 생각하고 있다. 최근에는 IAP가 v-Rel oncprotein의 antiapoptotic을 매개하는 역할을 하는 것으로 생각하고 있다.<sup>21</sup> 암 유전자인 v-Rel(Rel/NF-  $\kappa$  transcription factor family)은 암을 유발시키고 apoptosis를 방해하는 역할을 한다.<sup>22</sup> IAP는 ICE에 의해서 과발현 되며, apoptosis를 억제하는 역할을 하고 또한 v-Rel mediated transformation 과정동안 유도되어 apoptosis를 억제하는 기능을 가진 것으로 보고되고 있다.<sup>21</sup> 결론적으로 NF-  $\kappa$  B의 antiapoptotic기능은 TRAF1과 TRAF2에 의해 IAP들이 caspase의 작용을 차단하여 일어난다고 하겠다<sup>22</sup>. 이러한 것으로 볼 때 연구자가 예비실험으로

시행한 난소 암에서의 c-IAP1의 증가는 암화 과정에서 의미 있는 것으로 받아들여지며, 현재까지 난소 암과의 관계를 규명한 보고가 없으므로 연구해 볼 만한 가치가 있는 것으로 생각되었다.

RT-PCR을 이용하여 mRNA의 발현을 난소 암종과 정상 난소 조직에서 비교해본 결과 난소 암에서는 전 예에서 c-IAP1의 발현이 나타났고, 정상 난소 조직에서는 7 예 중 3예에서는 뚜렷한 발현이 있었고, 2예에서는 미약한 발현이 관찰되었으며, 2예에서는 발현이 없었다. 정상 난소에서의 발현은 난소에서는 정상적으로 배란이 이루어지므로 난포의 성장과 퇴화에서 apoptosis가 관여함으로 나타나는 것으로 유추 할 수 있다. 또한 조직에서의 무작위 채취로 인해 난포나 황체가 포함되지 않는 부분을 실험한다는 것이 힘들다고 생각된다. 이러한 것을 뒷받침해주는 보고로 난포의 생성과 퇴화에 있어 쥐의 granulosa 세포에서 IAPs의 과 발현을 증명하였다.<sup>23</sup> 이외의 다른 보고에서도 난포 및 황체에서 난포의 선택과정과 황체의 퇴화과정에서 apoptosis가 관계한다고 하여 저자의 결과를 뒷받침해 주고 있다.<sup>24,25</sup>

그러므로 조직에서의 c-IAP1의 발현되는 위치를 밝혀내고 단백질 수준에서의 검증을 위해 면역조직화학적 염색을 시행하여 분석하였다. 난소 암 조직은 모두가 상피성 난소 암이었고 장액성, 점액성 및 자궁내막양 암종의 모든 암세포에서 뚜렷이 침착되는 것을 관찰하였다. 1예를 제외한 모두가 3기 이상의 난소 암종이었으며, 3기 난소암 중 1예는 경계성 난소 암 종이었으나 여기에도 과 발현이 있었다. 정상 난소 조직에서는 RT-PCR로 발현이 보인 경우는 황체에서만 발현 되었으나, 정상 난소 기질이나 초기 난포에서는 모두가 발현이 없었고, 양성 점액성 낭종에서도 발현을 보이지 않았다. 난소 암에서 모두가 발현된 것으로 보아 c-IAP1이 난소 암종의 암화 과정에서 한 부분을 차지한다는 것으로 유추 할 수 있다. 정상 난소 조직에서의 출현은 황체에서만 국한되었으며 이것은 여러 연구보고에<sup>23,26</sup> 의해 알려졌듯이 난포의 생성 및 황체의 형성에서 apoptosis와 관련된 유전자의 발현과 관계 있다고 하겠다.

연구결과로 보아 난소 암종의 암화 과정에서 c-IAP1이 관여한다는 것을 증명하게 되었고, 이것을 바탕으로 하여 난소암의 치료에 있어서 항암제 투여시 변화를 관찰하여 미치는 영향을 평가할 수 있으며 c-IAP1 억제제의 개발로 새로운 항암치료법을 모색할 수 있겠다. 또한 조기발견의 인자로 사용할 수 있다면 난소 암의 사망률을 감소시킬 수 있으리라 예상된다. 문자생물학적으로는 apoptosis의 기전을 좀더 명확하게 밝혀 새로운 억제유전자의 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

#### -참고문헌-

1. 조치홍, 차순도, 이태성, 서영숙. 최근 20년간 여성 생식기 암 발생 양상의 변화. 대한산부회지 1998;41:2113-8.
2. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. CA Cancer J Clin 1996;46:5-27, 1996.
3. International Federation of Gynecology and Obstetrics Cancer Committee. Staging announcement. Gynecol Oncol 1994;55:383.
4. Averette HE, Janicek MF, Manek HR. The national cancer data base report on ovarian cancer. Cancer 1996;76:1096-103.
5. McGuire WP, Hoskins WI, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N Engl J Med 1996;334:1-6.
6. Aaronson JS, Eickman B, Blevins RA, Borokowski JA, Myerson J, Imran S, et al. Toward the development of a gene index to the human genome: An assessment of the nature of high-throughput EST sequence data. Genome Res 1996;6:829-845.
7. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis : Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:10614-19.
8. Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. Genome Res 1996;6:639-45.
9. Zhao N, Hashida H, Takashashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High density cDNA filter analysis: A novel approach for large-scale quantitative analysis of gene expression. Gene 1995;166:207-13.
10. Rothe M, Pan MG, Henzel WT, Merrill AT, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signalling complex contains two novel proteins related to baculovirus inhibitor of apoptosis protein. Cell 1995;83:1243-52.
11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-9.
12. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.
13. Sheets EE, Yeh J. The role of apoptosis in gynaecological malignancies. Ann Med 1997;29:121-6.
14. Nuñez G, Clarke MF. The bcl-2 family of protein : regulators of cell death and survival. Trends in Cell Biol 1994;4:399-403.
15. Max D, Binder C, Meden H, Lenkte T, Zeimek T, Hiddemann T, et al. Differential expression of apoptosis associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer. Anticancer Res 1997;17:2234-40.
16. Beldler DR, Tewari M, Friesen PD, Poiter G, Dixit VM. The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. J Biol Chem 1995;270:16526-8.
17. Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the *Ceenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. Nature 1995;377:248-51.
18. Hay BA, Wolff T, Rubin GM. Expression of baculovirus p35 prevents cell death in Drosophila. Development 1994;120:2121-9.
19. Bump BA, Hackett M, Huguenin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, et al. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science 1995;269:1885-8.
20. Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13973-8.
21. You M, Ku PT, Hrdlickova R, Bose HR Jr. ch-IAP1, a member of inhibitor of apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncprotein. Mol Cell Biol 1997;17:7328-41.
22. Wang CY, Mayo MW, Komeluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr : NF-KappaB antiapoptosis : induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science 1998;281:1680-3.
23. Li J, Kim JM, Linston P, Li M, Mijazaki T, Mackenzie AE, et al. Expression of inhibitor of apoptosis proteins(IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. Endocrinology 1998;139: 1321-8.
24. Kim JM, Boone DL, Auyeung A, Tsang BK. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated

- with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary. *Biol Reprod* 1998;58:1170-6.
25. Yuan W, Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3148-55.
26. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S, et al. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 1998;58:739-46.

-국문초록-

**목적:** 세포사는 모든 다세포 유기체의 진화와 항상성을 유지하는 기본적인 활동이다. 이런 세포사에 억제작용이 있다면 세포는 무한 증식을 하여 암화로 이루어 질것이다.

cDNA microarray 분석을 통해 난소 암 종과 정상 난소 조직에서 588개의 유전자를 비교하여 c-IAP1의 유의한 증가를 난소 암 종에서 관찰하였고, 이것을 많은 예에서 RNA와 단백질 수준에서 검증을 시도하였다.

**연구방법:** 1997년 1월부터 1998년 8월까지 계명대학교 산부인과에서 수술한 환자 가운데서, 난소 암 환자 12예, 양성 난소 낭종 2예, 난소 병변 외에 요인으로 자궁적출술이나 근종제거술시에 일측 난소를 제거한 5예를 대상으로 하였다. 연구방법은 RT-PCR과 면역 조직화학염색을 시행하여 비교 분석하였다.

**결과:** 저자들은 난소 암에서 apoptosis 억제인자인 c-IAP1이 암화 과정에 관여하는지를 규명해보기 위하여 RT-PCR과 면역조직화학적 분석을 이용하여 RNA와 단백질 수준에서 검증한 뒤 다음과 같은 결과를 얻었다.

RT-PCR 분석으로 12예의 난소 암 종 조직의 전 예에서 c-IAP1의 과 발현을 나타내었고, 정상 난소 조직 5예 중에 2예에서는 과 발현이 있었고, 2예에서는 미약한 발현을 보였다. 양성 난소 낭종에서는 자궁내막종에서 발현이 있고, 점액성 낭종에서는 발현이 없었다.

조직 내에서의 유의성을 보기위해 면역조직화학적 분석을 시행하여 12예의 난소암 종에서 전 예에서 발현이 관찰되었고, 정상 난소조직에서는 5예 중 4예에서 확체에 국한되어 발현이 있었으나 정상 난소 기질조직이나 초기 난포에서는 발현을 관찰할 수 없었다. 양성 난소 낭종에서는 자궁내막종에서 발현이 있었으며, 점액성 낭종에서는 발현이 관찰되지 않았다.

**결론:** 이상의 연구 결과로 보아 apoptosis 억제인자인 c-IAP1은 난소 암 종의 암화 과정에서 중요한 역할의 일부를 하는 것으로 사료된다.

**중심단어:** 난소 암 종, c-IAP1