DBpia

자궁경부암에서 인유두종바이러스 감염과 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a} 유전자 돌연변이 검색

Mutational Analysis of p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a} in Human Cervical Carcinomas

저자 (Authors)
서성일, 최은주, 백원기, 서민호, 조치흠, 이태성, 차순도
Seong-Il Suh, Eun-Joo Choi, Won-Ki Baek , Min-Ho Suh, Chi-Heum Cho, Tae-Sung Lee, Soon-Do Cha

출처 (Source)
The Journal of the Korean Society for Microbiology 33(4), 1998.8, 415-423 (9 pages)

발행처 (Publisher)
대한미생물학회
The Korean Society For Microblology

URL
http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01489922

APA Style
서성일, 최은주, 백원기, 서민호, 조치흠, 이태성, 차순도 (1998). 자궁경부암에서 인유두종바이러스 감염과 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a} 유전자 돌연변이 검색. The Journal of the Korean Society for Microbiology, 33(4), 415-423.

이용정보 (Accessed)
계명대학교
114.71.5.213
2016/01/07 17:14 (KST)

저작권 안내
DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.
이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information
The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.
You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

大韓微生物學會誌 第33卷 第4號 1998
J. Korean Soc. Microbiol., Vol. 33, No. 4, 1998

자궁경부암에서 인유두종바이러스 감염과 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a} 유전자 돌연변이 검색

계명대학교 의과대학 미생물학교실[1], 산부인과학교실[2], 의과학연구소[3], 의학유전연구소[4]

서성일[1,3,4] · 최은주[2] · 백원기[1,3] · 서민호[1,3,4] · 조치흠[2,3] · 이태성[2,3] · 차순도[2,3]

=Abstract=

Mutational Analysis of p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a} in Human Cervical Carcinomas

Seong-Il Suh[1,3,4], Eun-Joo Choi[2], Won-Ki Baek[1,3], Min-Ho Suh[1,3,4], Chi-Heum Cho[2,3], Tae-Sung Lee[2,3] and Soon-Do Cha[2,3]

Departments of Microbiology[1], Obstetrics and Gynecology[2], Institute for Medical Science[3] and Institute for Medical Genetics[4], Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Human papillomavirus (HPV) infection has been implicated to be an important causative factor for the development of cervical carcinoma. p53 gene mutation is common in human malignancies, and it is suggested that p53 function is inactivated either by complex formation with HPV E6 product or by gene mutation in cervical carcinoma. Forty-six cervical carcinoma samples were evaluated for the presence of mutations in p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a} genes with polymerase chain reaction (PCR), single stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis and DNA sequencing. The status of HPV infection in tumor tissues was analysed by PCR. Forty-two of 46 cervical carcinomas showed HPV infection. In four HPV-negative cervical carcinomas there was no abnormal mobility-shifted band in PCR-SSCP analysis of p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a}. However, two out of 42 HPV infected cervical carcinomas showed abnormal mobility shifted band in p16^{INK4a} exon 3, and subsequent analysis of them revealed that mutations were not in coding region but in 3' untranslated region (UTR) of exon 3. These results suggest that HPV-negative carcinoma may arise via a pathway independent of p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a} mutational inactivation. But it remains to be determined whether disruption of the 3'UTR of p16^{INK4a} mRNA leads to an increased risk for cervical carcinomas.

Key Words: Cervical carcinoma, p53, p21^{WAF1}, p16^{INK4a}, Mutation analysis, HPV

서 론

자궁경부암의 원인은 아직까지 잘 알려져 있지는 않으나 최근에 인유두종바이러스 (human papilloma virus, HPV)의 감염과 상당히 밀접한 관계가 있음이 보고되고 있다[13,32]. HPV감염에 의한 자궁경부의 암화 과정은 특히 고위험군으로 알려진 HPV 16 및 18형의 E6 및 E7단백질이 p53 및 Rb 항암단백질의 기능을 저해함으로써 이루어진다고 알려져 있다. 즉, E6는 ubiquitin-dependent proteolytic system에 의한 p53의 파괴를 촉진시키

접수 : 1998년 5월 25일, 게재결정 : 1998년 9월 9일

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

고, E7은 전사인자의 일종인 E2F를 조절하고 있는 Rb와 결합하여 E2F 억제기능을 소실시키므로써 과도한 세포분열을 유도하여 암화를 가속화시킨다고 알려져 있다[11,27,28]. p53은 주로 세포의 성장억제 및 분화에 관련한다고 알려져 있으며 이는 p53에 의해 발현이 유도된 p21^{WAF1}이 Rb 인산화에 관여하는 cyclin-dependent kinase (CDK)를 억제하여 이루어진다고 알려져 있다[7,8,10]. 그러므로 HPV감염이 초래되면 E6에 의해 p53의 기능이 소실되고 결국 Rb의 인산화가 촉진되어 세포는 G1세포주기에 머물지 못하고 S세포주기로 이행된다. 한편 p53 항암유전자는 HPV의 E6 뿐만 아니라 돌연변이 등에 의해서도 그 기능이 상실됨이 알려져 있는데 50% 이상의 대부분의 암에서 p53 돌연변이가 관찰된다[12,17]. HPV의 E7은 Rb의 기능을 억제함으로써 Rb에 의해 조절되는 E2F가 활성화되어 세포는 지속적으로 S세포주기로 이행하게 된다. 그러면 HPV의 감염이 없는 자궁경부암의 발생원인은 무엇일까라는 의문이 생기게 된다. 최근에 HPV가 감염되어 있는 자궁경부암세포주에서는 p53의 돌연변이를 거의 관찰할 수 없으나 HPV감염이 없는 경우에는 p53의 돌연변이의 빈도가 다소 관찰되고 있으며, HPV의 감염이 없는 자궁경부암이 예후가 더 나쁨이 보고되고 있다[6,16,26,31]. 자궁경부암이 E6에 의한 p53의 비활성화에 의해 초래된다면, HPV감염이 없는 자궁경부암은 p53의 돌연변이 혹은 p53에 의해 발현이 유도되어 세포주기조절에 중요한 역할을 하는 p21^{WAF1}유전자의 변이 등에 의해 초래될 수 있을 것이다. 아울러 p21^{WAF1}과 마찬가지로 CDK활성억제에 관여하며 여러 종류의 암에서 높은 빈도로 결손 또는 변이가 관찰되는 multiple tumor suppressor gene의 하나인 p16^{INK4a}유전자[14,20,29]의 변이 또한 자궁경부암의 발생과 관련이 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 자궁경부암을 대상으로 하여 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a}유전자의 변이를 검색하고 이러한 유전자의 변이와 HPV감염 유무와의 관계에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험대상

계명대학교 동산의료원 산부인과학교실에 내원한 환자로부터 콜포스코피하에서 이상소견을 보이는 조직 및 주변의 정상 자궁경부 조직을 채취하여 영하 80℃에 보관하면서 병리조직학검사 결과 자궁경부암으로 확진된 46례의 조직을 본 실험에 사용하였다.

2. 자궁경부암 조직으로부터 DNA분리

300 mg 정도의 조직에서 Blin 등[2]의 방법으로 DNA를 분리하고 10 mM Tris- 1 mM EDTA액에 DNA를 녹여 ultra-violet spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정 후 4℃ 에 보관하면서 사용하였다.

3. 자궁경부암으로부터 HPV 감염유무 및 형별 검색

자궁경부암으로부터 HPV 감염유무 및 형별 검색은 Toh 등[27]에 따라 시행하였다. 암 발생과 연관이 있다고 알려진 고 위험도 HPV형인 16형, 18형 및 31형, 33형, 52b형, 58형 등의 E6/E7 유전자의 open reading frame (ORF)을 증폭하기 위해서 CP-S 및 CP-AS를 사용하였다. CP-S 및 CP-AS로 증폭된 PCR산물은 제한효소 *Ava*II에 의해서 HPV16형 (157 및 81bp), HPV18형 (172 및 96bp), 그리고 HPV33 (136 및 108bp)이 구별되며, *Rsa*I에 의해서는 HPV31형 (119 및 114bp), *Bgl*II에 의해서는 HPV52b (175 및 55bp), 그리고 *Acc*I에 의해서는 HPV58형 (126 및 118bp) 등의 형별을 알 수 있다. HPV16 및 18의 양성대조군으로 Caski 및 HeLa세포주의 DNA를 이용하였다[9]. 본 실험에 사용한 primer 염기서열은 Table 1에 나타내었으며, beta-actin의 primer는 실험자들이 고안하여 사용하였다.

4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR은 5 μl의 10X reaction buffer (15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl)와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0.25 μCi의 α-^{32}P dCTP, 그리고 20 mM sense 및 antisense primer를 각각 1 μl를 넣은 mixture에 100 ng의 자궁경부암 DNA와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin Elmer Co.)를 넣은 후 증류수로 50 μl로 용량을 맞추고 30 μl의 mineral oil을 중층한 다음 DNA thermal cycler (Perkin Elmer Co.)를 사용하여 PCR을 시행하였다.

5. PCR-SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) 분석

PCR-SSCP 분석은 Orita 등[21]의 방법에 준하여

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primer*	Sequence (5'→3')	Reference
HPV		Toh et al[30]
CP-S	TGTCAAAAACCGTTGTGTCC	
CP-AS	GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	
$p16^{INK4a}$		
exon1-S	GAAGAAAGAGGAGGGGCTG	Kamb et al[14]
exon1-AS	GCGCTACCTGATTCCAATTC	
exon2-S	GGAAATTGGAAACTGGAAGC	Kamb et al[14]
exon2-AS	TCTGAGCTTTGGAAGCTCT	
exon3-S	GGATGTTCCACATCTTTG	Cheng et al[5]
exon3-AS	ATGAAAACTACGAAAGCGGG	
$p21^{WAF1}$		Chedit et al[4]
exon2-S	CGGGATCCGGCGCCATGTCAGAACCGGC	
exon2-AS	CGGAATTCCATGCTGGTCTGCCGCCG	
p53		Buchman et al[3]
exon5-S	GGATCCATCTGTTCACTTGTGCCCTG	
exon5-AS	GAATTCAACCAGCCCTGTCGTCTCTC	
exon7-S	GAATTCAGGGGTCAGCGGCAAGCAGA	
exon7-AS	GGATCCAGGCGCACTGGCCTCATCTT	
exon8-S	GGACCTGATTTCCTTACTGC	
exon8-AS	TTTGGCTGGGGAGAGGAGCT	
β-actin-S	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	
β-actin-AS	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	

*S and AS represent sense and antisense primers, respectively

실험하였다. 먼저 PCR을 시행하고 합성된 PCR product 1 μl를 9 μl의 98% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol 용액과 잘 섞고 90℃에서 2분간 둔 후 6% non denaturing polyacrylamide gel에서 cooling system을 사용하여 10℃를 유지하면서 TBE buffer로 10 Watt, 16시간 전기영동하였다. 전기영동된 gel은 Whatmann filter paper상에서 gel dryer를 사용하여 건조시킨 후 autoradiography를 시행하여 돌연변이 유무를 확인하였다. 특히, $p16^{INK4a}$ exon 2의 경우는 PCR산물을 *Sma*I 제한효소로 절단한 후 SSCP를 실시하였다. PCR-SSCP상 mobility-shift band가 있는 경우는 mobility-shift가 일어난 band를 절단한 후 증류수에 녹인 다음 이것을 template로 하여 PCR를 실시하였다. 그런 후 PCR산물을 pGEM-T vector (Promega Co.)로 cloning한 다음 DNA 염기서열 분석을 실시하였다.

6. DNA염기서열 분석

Plasmid DNA를 Promega사의 Wizard plus mini-prep DNA purification system으로 분리하고, USB사의 Sequenase version 2.0 kit를 사용하여 dideoxy chain termination 방법을 이용하여 DNA염기서열 분석을 실시하였다.

결 과

자궁경부암 조직의 HPV감염 유무와 형별을 조사하기 위하여 여러 형의 HPV를 동시에 증폭할 수 있는 CP primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 총 46개 검체 중 42개 검체 (91%)에서 HPV의 감염이 확인되었으며 (Fig. 1), CP primer에 의

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

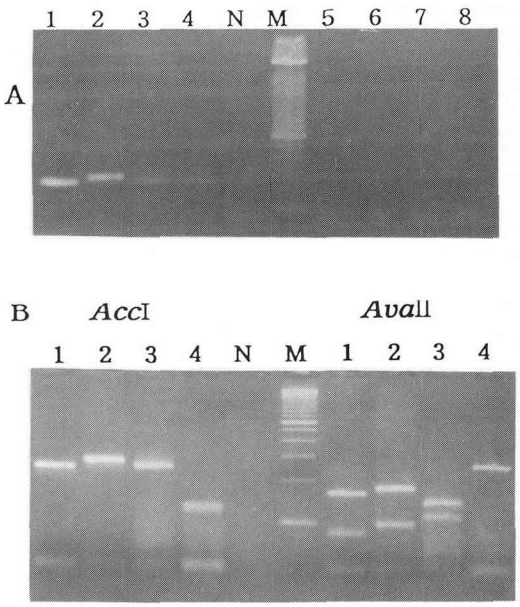

Figure 1. (**A**) HPV typing by PCR using CP primers on DNAs obtained from cervical carcinoma samples. (**B**) PCR products obtained with CP primers were digested by restriction enzyme *Acc*I and *Ava*II. These results indicate; lane 1: HPV type 16; lane 2: type 18; lane 3: type 33; lane 4: type 58 and lane 5 - 8: HPV-negative. M represents 100bp molecular size marker, N represents negative control.

해 증폭된 PCR 산물을 제한효소 *Ava*II로 절단하여 조사한 결과 HPV 16형은 39개 검체 (85%)에서 그리고 HPV 18형은 1개의 검체 (2%)에서 감염이 확인되었다. 그리고 SP16 및 18 primer로 증폭되지 않은 2개의 검체는 CP primer로 증폭된 PCR 산물을 *Ava*II 및 *Acc*I으로 절단한 결과 HPV 33형 및 58형의 감염이 확인되었다 (Fig. 1 및 Table 2). HPV 16형 및 18형 이외의 형별 감염이 확인된 2례와 HPV감염이 확인되지 않은 4례에서 p53유전자 exon 5, 7 및 8, p21^{WAF1}유전자 exon 2, 그리고 p16^{INK4a}유전자의 exon 1, 2 및 3의 돌연변이 유무를 PCR-SSCP방법을 이용하여 조사한 결과 (Fig. 2, 3 및 Table 2), 상기 유전자의 변이는 관찰할 수 없었다. Multiple tumor suppressor gene의 하나로 알려진 p16^{INK4a}유전자의 이상이 여러 종류의 암에서 관찰되는데 자궁경부암에 대한 보고는 거의 없어 46개의 전체 검체에 대하여 p16^{INK4a}유전자의 변이를 조사하였다 (Fig. 4, Fig. 5). p16^{INK4a} 유전자의 exon 1 및 2는 PCR-SSCP상 이상이 없었으나 exon 3에 있어서는 2례 즉, HPV 16형 1례

Table 2. The state of p53, p21^{WAF1}, and p16^{INK4a} of cervical carcinoma

HPV type (No.)	p53	p21^{WAF1}	16^{INK4a}
HPV negative (4)	W[1)]	W	W
HPV positive (42)			
type 33 (1)	W	W	W
type 58 (1)	W	W	W
type 16 (39)	NT[2)]	NT	BA[3)](1)/PM[4)](1)
type 18 (1)	NT	NT	BA (1)

[1)] W, normal
[2)] NT, not tested
[3)] BA, the base alterations of p16^{INK4a} exon 3 in 2 of 39 samples of HPV type 16 infected cervical carcinomas tested
[4)] PM, polymorphism of p16^{INK4a} exon 3 in 1 of HPV infected cervical carcinomas tested

(sample 16번) 그리고 18형 1례 (sample 9번)에서 mobility shift가 있는 band가 관찰되어 DNA 염기서열 분석을 실시하였다. 2례 전부에서 exon 3의 3'untranslated region (3'UTR)에 염기서열의 변이가 관찰되었는데 정상 조직의 염기서열과 비교한 결과 sample 16번은 533번째 염기 A가 G로, 그리고 sample 9번은 580번째 염기 C가 T로 치환되어 있음을 확인하였다. 그리고 sample 16번의 540번째 염기 G가 C로 되어 있었는데 이는 정상 조직에서도 나타나는 다형현상으로 확인되었다.

고 찰

HPV의 감염에 의한 자궁경부암의 발생은 HPV의 E6 및 E7단백질에 의해 p53 및 Rb항암단백질의 불활성화에 의해 이루어진다고 알려져 있으며[11,18,19,27,28] HPV감염이 없는 자궁부암의 원인은 아직까지 알려지지 않은 여러 종류의 원인이 있을 것으로 추측되고 있다.

본 실험은 가장 높은 빈도의 감염율을 보이며 고위험군으로 분류된 HPV 16형 및 18형이 감염되지 않은 자궁경부암에서 p53유전자의 돌연변이 여부와 p53에 의해 발현이 유도되는 p21^{WAF1}유전자의 이상을 함께 조사하였다. 또한 multiple tumor suppressor유전자[14,20,29]로 알려진 p16^{INK4a}유전자의 이상은 HPV감염유무에 관계없이 조사하

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

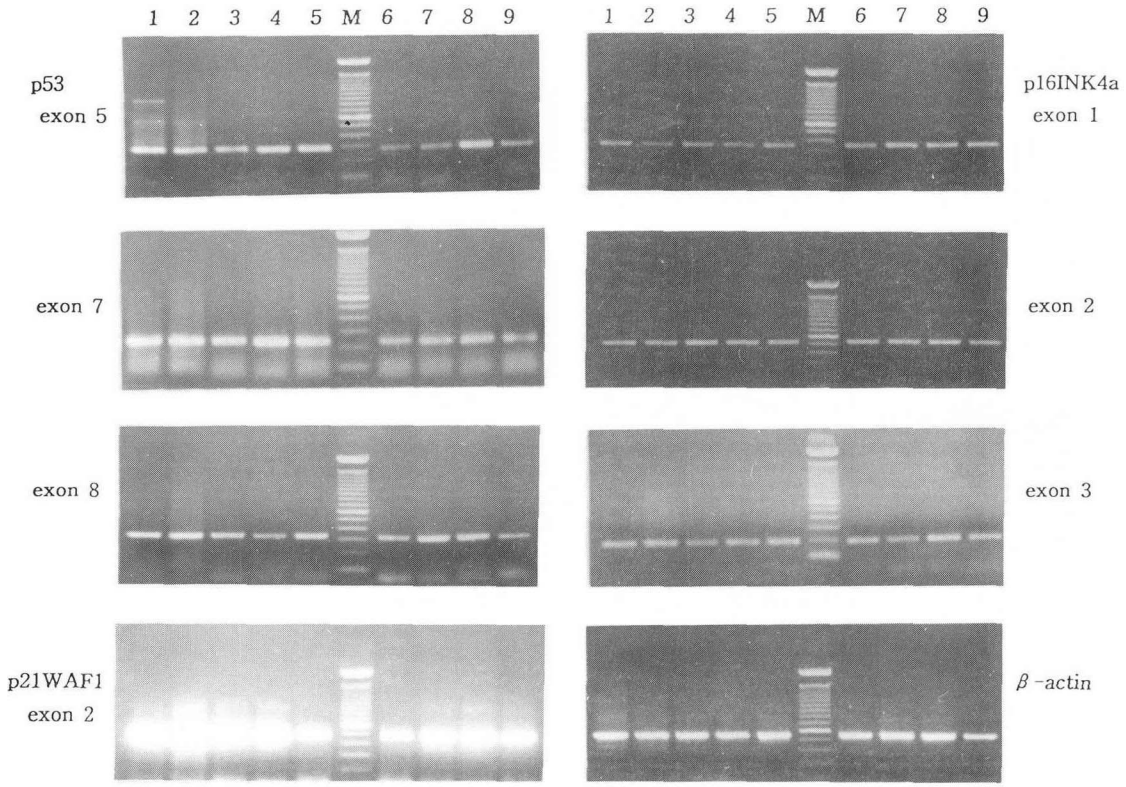

Figure 2. Electrophoretic analysis of PCR amplification products of $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$, p53 and β-actin genes from cervical carcinoma samples. M represents 100bp molecular size marker. Lane 1: HPV type 16 sample; lane 2: HPV type 18; lane 3: HPV type 33; lane 4: HPV type 58 and lane 5 - 9: HPV-negative samples.

였다. 46례의 자궁경부암 조직에 HPV감염 유무와 형별을 조사하기 위하여 먼저 DNA를 분리한 다음 CP primer를 이용하여 PCR을 실시한 후 여러 종류의 제한효소를 처리한 결과 42례 (91%)에서 감염이 확인되었으며 HPV감염이 없는 경우는 4례 (9%)였다. 이는 약 90% 이상의 자궁경부암조직에서 HPV가 검출된다는 보고[1,13,32]와 비슷한 빈도를 보여 우리나라도 자궁경부암의 발생과 HPV감염이 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 감염이 확인된 42례 중 16형이 39례 (85%) 그리고 18형, 33형 그리고 58형이 각각 1례 (2%)가 확인되어 HPV 16형이 가장 높은 빈도의 감염율을 나타내었다. 이러한 HPV 16형의 감염률은 김 등[1]이 보고한 75.4%에 비해 다소 높은데 이는 김 등이 사용한 immunohistochemistry 법보다 PCR의 검출예민도 및 특이도가 높기 때문인 것으로 생각된다. HPV 33형 (1례) 및 58형 (1례) 그리고 HPV 감염이 없는 자궁경부암 (4례)에서 p53, $p21^{WAF1}$ 그리도 $p16^{INK4a}$유전자의 이상을 알아보기 위하여 PCR-SSCP 분석을 실시한 결과 (Fig. 3) mobility shift의 이상을 보인 band는 확인할 수 없어 본 연구에 사용된 HPV 음성 자궁경부암의 병인은 p53, $p21^{WAF1}$ 그리고 $p16^{INK4a}$유전자의 이상과는 관계가 없는 것으로 사료된다. Kessis 등[15], Park 등[22], Paquette 등[23]의 보고에서도 자궁경부암에서 p53유전자 이상의 비율은 HPV감염 유무에 관계없이 상당히 낮은 빈도로 나타나며 또한 HPV 음성 자궁경부암의 병인에는 p53 이외의 유전자가 관련할 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서 $p16^{INK4a}$ 유전자의 이상 유무는 HPV감염 유무에 관계없이 46례의 검체 전체에 대하여 조사하였는데 $p16^{INK4a}$의 exon 1 및 2는 PCR-SSCP 분석 결과 이상이 없었으나, exon 3에 있어서는 2례 즉, HPV 16형 1례 (sample 16번) 그리고 18형 1례 (sample 9번)에서 mobility shift가 있는 band가 관찰되어 DNA 염기서열 분석을 실시하였다. 2례 전부에서 exon 3의 coding region이 아닌 3'untranslated region (3'UTR)에 염기서열의 변이가 관찰

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

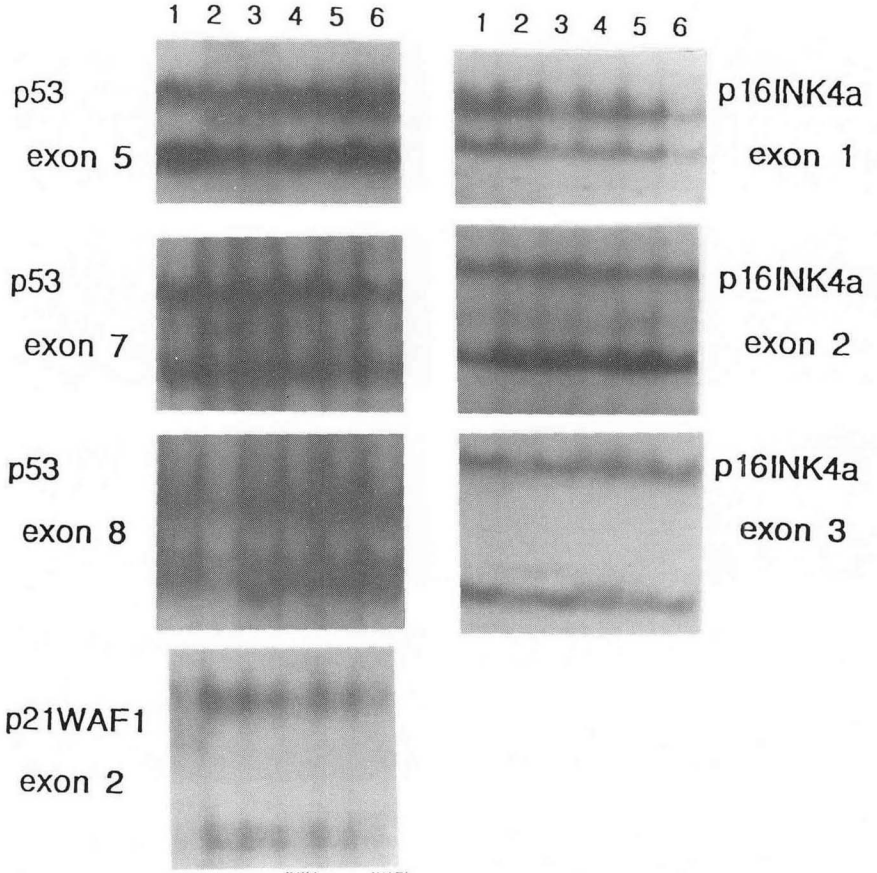

Figure 3. PCR-SSCP analysis of p16^{INK4a}, p21^{WAF1} and p53 genes. Lane 1: HPV type 33 sample; lane 2: HPV type 58 and lane 3 - 6: HPV-negative samples.

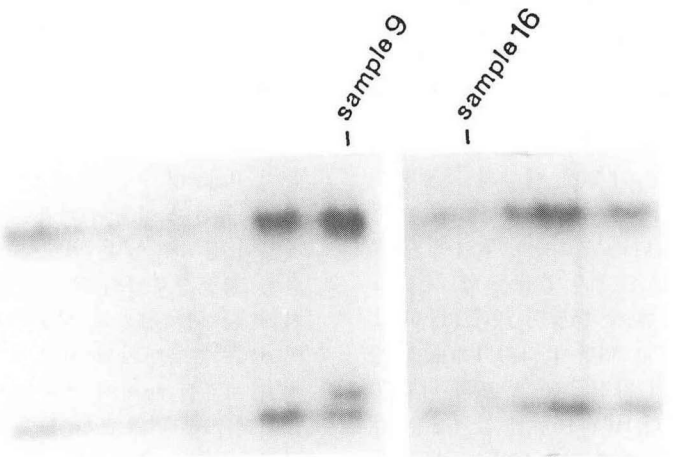

Figure 4. PCR-SSCP analysis of p16^{INK4a} exon 3 in HPV type 16 and 18 positive samples. A shifted SSCP patterns were observed in samples 9 (HPV type 18 positive) and 16 (HPV type 16 positive).

되었는데 정상 조직의 염기서열과 비교한 결과 sample 16번은 533번째 염기 A가 G로, 그리고 sample 9번은 580번째 염기 C가 T로 치환되어 있음을 확인하였다. 그리고 sample 16번의 540번째

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

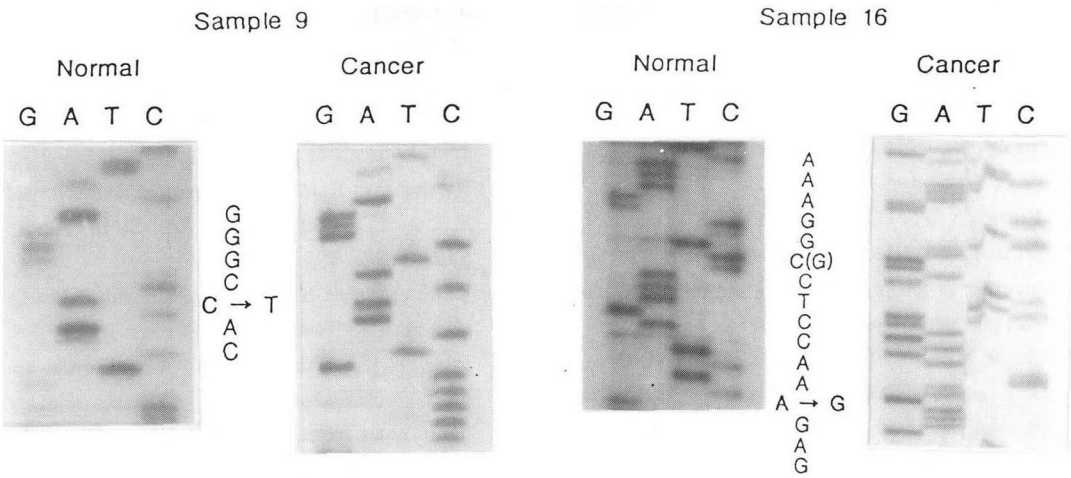

Figure 5. Sequencing of p16^{INK4a} exon 3 DNA from SSCP-positive samples 9 and 16. Bands with a shifted SSCP migration pattern were excised, DNAs were reamplified, cloned into pGEM-T vector and subjected to DNA sequence analysis. One base substitution was observed at nucleotide 580 (C → T) in sample 9 and at nucleotide 533 (A → G) in sample 16 compared with that of normal counterparts. The base substitution at nucleotide 540 in sample 16 is found to be normal polymorphism.

염기 G가 C로 되어 있었는데 이는 다형현상으로 확인되었다. 이러한 3'UTR의 염기서열의 변화가 p16^{INK4a} mRNA의 안정성에 문제를 끼친다는 보고는 아직 없으나 Rastinejad와 Blau[24]그리고 Rastinejad 등[25]이 tropomyocin mRNA의 3'UTR이 세포분열 및 종양형성을 억제하며 분화를 촉진한다고 보고한 바 있다. p16^{INK4a} 유전자 또한 세포의 성장 및 분화의 조절에 관여함으로 p16^{INK4a} 유전자의 3'UTR의 염기서열 돌연변이도 발암과정에 관여할 수도 있기 때문에 향후 p16^{INK4a}유전자의 3'UTR의 기능에 대한 연구를 진행하여야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 자궁경부암을 대상으로 하여 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a}유전자의 변이 여부를 알아보고 이러한 유전자의 변이와 HPV감염 유무와의 관계에 대해 조사하였다.

총 46례의 자궁경부암 조직으로부터 DNA를 분리한 다음 PCR방법으로 HPV 감염유무 및 형별을 결정한 결과 42례에서 감염이 확인되었다. 이중 4례에서는 HPV감염이 없었으며 HPV 16형 감염이 39례에서 확인되었고, 18형, 33형 그리고 58형 감염이 각각 1례에서 확인되었다. HPV 33 및 58형의 감염이 확인된 2례와 HPV감염이 되지 않은 4례에서 p53 항암유전자 그리고 p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a}유전자의 돌연변이 유무를 PCR-SSCP 및 DNA염기서열 결정방법을 통하여 검색한 결과 DNA염기서열의 이상은 볼 수 없었다. 여러 종류의 암에서 유전자 변이의 빈도가 높은 p16^{INK4a} 유전자의 변이를 전체 46례의 검체에서 조사한 결과, HPV 16형의 감염이 확인된 1례 (sample 16번) 그리고 18형의 감염이 확인된 1례 (sample 9번)에서 p16^{INK4a}유전자 exon 3의 3'untraslated region (3'UTR)에서 돌연변이가 관찰되었는데, sample 16번은 533번째 염기 A가 G로, 그리고 sample 9번은 580번째 염기 C가 T로 치환되어 있음을 확인하였다. 그리고 sample 16번의 540번째 염기 G가 C로 되어 있었는데 이는 동일인의 정상조직의 염기서열과 비교한 결과 다형현상으로 확인되었다. 이상의 결과로 볼 때 본 연구에서는 HPV 비감염 자궁경부암의 발생은 p53, p21^{WAF1} 및 p16^{INK4a}유전자의 이상과는 상관관계가 없는 것으로 보이며, HPV감염군에서의 p16^{INK4a}의 3'UTR의 염기 변이와 자궁경부암 발생과의 관계는 앞으로 규명해 볼 필요가 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1) 김승철, 이효표: 자궁경부암에서 human papillomavirus (type 16/18)의 검출 및 human pa-

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

pillomavirus E6유전자의 발현에 관한 연구. 대한산부인과학회지 **38:** 656-683, 1995.

2) Blin N, Stafford DW: A general methods for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **3:** 2303-2306, 1976.

3) Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP: A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* **70:** 245-252, 1988.

4) Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D: A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region on the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene* **9:** 3021-3024, 1994.

5) Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Buckler AJ, Testa JR: p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* **54:** 5547-5551, 1994.

6) Crook T, Wrede D, Vousden KH: p53 mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines. *Oncogene* **6:** 873-875, 1991.

7) 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* **54:** 1169-1174, 1994.

8) Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean F, Pan Z-Q, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J: Cdk-interacting protein 1 directly binds with PCNA and inhibits replication catalyzed by the DNA polymerase d holoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91:** 8655-8659, 1994.

9) Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K: Simultaneous detection and typing of genital human papilloma virus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* **72**(Pt5): 1039-1044, 1991.

10) Harper JW, Elledge SJ: Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **6:** 56-64, 1996.

11) Hartwell L: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cell. *Cell* **71:** 543-546, 1992.

12) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein D, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* **253:** 49-53, 1991.

13) Howley PM: Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res* **51**(18 Suppl): 5019s-5022s, 1991.

14) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264:** 436-440, 1994.

15) Kessis TD, Slebos RJ, Han SM, Shan K, Bosch XF, Munoz N, Hedrick L, Cho KR: p53 mutations and mdm2 amplification are uncommon in primary carcinomas of the uterine cervix. *Am J Pathol* **143:** 1398-1405, 1993.

16) 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 polymorphysm analysis and sequencing. *Anticancer Res* **14:** 177-181, 1994.

17) Levine AJ, Momand J, Finlay CA: The p53 tumor suppressor gene. *Nature* **351:** 453-456, 1991.

18) Munger K: Host-viral gene interactions in cervical cancer. *Contemp OB/GYN* **40:** 27-37, 1995.

19) Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, et al: Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* **12:** 197-217, 1992.

20) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* **368:** 753-756, 1994.

21) Orita M, Suzuki Y, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphysms using polymerase chain reaction. *Genomics* **5:** 874-879, 1989.

22) Paquette R, Lee YY, Wilczynski SP, Karmakar A, Kizaki M, Miller CW, Koeffler HP: Mutations of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. *Cancer* **15:** 1272-

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)

1280, 1993.

23) Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, Miller CW, Koeffler HP: p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. *Oncogene* **9:** 205-210, 1994.

24) Rastinejad F, Blau HM: Genetic complementation reveals a novel regulatory role for 3' untranslated regions in growth and differentiation. *Cell* **72:** 903-917, 1993.

25) Rastinejad F, Cornboy MJ, Rando TA, Blau HM: Tumor suppression by RNA from the 3'untranslated region of alpha-tropomyosin. *Cell* **75:** 1107-1117, 1993.

26) Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G: Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* **335:** 1171-1174, 1990.

27) 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* **75:** 495-505, 1993.

28) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63:** 1129-1136, 1990.

29) Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366:** 704-707, 1993.

30) Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, Baba K, Matsuda H, Sugimachi K, Mori R: Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* **70:** 2234-2238, 1992.

31) 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 Carcinogenesis* **4:** 171-175, 1991.

32) zur Hausen H: Human papilloma viruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184:** 9-13, 1991.

계명대학교 | IP: 114.71.5.213 | Accessed 2016/01/07 17:14(KST)