

자궁경부 상피세포암의 암화과정에 따른 인유두종 바이러스 감염과 Telomere 길이 및 Telomerase의 활성화

계명대학교 의과대학 산부인과학교실,* 미생물학교실,** 의학유전연구소*** 및 의학연구소****
박종하* · 이태성**** · 차순도* · 조치흠* · 추영애* · 백원기**** · 서성일**** · 서민호****

= Abstract =

Telomere Length and Telomerase Activation in Carcinoma of the Cervix related to Human Papilloma Virus(HPV) Infection

Jong-Ha Park,* Tae-Sung Lee,**** Soon-Do Cha,* Chi-Heum Cho,* Young-Ae Choo,*
Seong-Il Suh,**** Won-Ki Baek,**** Min-Ho Suh****

Departments of Obstetrics and Gynecology, Microbiology,** Institute for medical genetics*** and
Institute for Medical Science,**** School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea*

E6 and E7 proteins produced by oncogenic HPV bind to the protein products of cellular tumor suppressor genes p53 and Rb, respectively. This mechanism has been suggested to contribute to the oncogenesis of HPV-infected carcinoma. The cells which are blocked the function of p53 and pRb protein continue to divide by bypassing M1 stage known as antiproliferative mechanism but telomeres, the genetic elements at the ends of chromosomes, continue to shorten until the telomeres are so short that further replication is prevented(M2 stage). But telomeres can be maintained if telomerase is derepressed, giving rise to a immortal cell. The present study has been investigated the presence of HPV, telomere length and telomerase activation in cervical carcinomas. HPV DNA were detected by polymerase chain reaction in 17 of 19 precancerous lesions and cervical carcinoma specimens; HPV16 was detected in 12 cases, HPV18 in one case, HPV33 in two cases, and HPV58 in two cases. Overall, the prevalence of HPV was 89.5%. To study the difference of telomere length in cervical carcinomas and each normal counterpart, DNAs were digested with HinfIII and RsaI to liberate the terminal restriction fragments(TRF). TRFs were resolved on agarose gels and detected by hybridization to the telomeric probe. This result indicated that there were no significant difference of TRF length in samples tested except two cases. TRF length of one carcinoma specimen was found to be significantly increased as compared with normal counterpart, but the other was found to be significantly

decreased. Telomerase activity was detected in 4 of dysplasia specimens(5 cases), all of carcinoma in situ(CIS), and 6 of 8 invasive carcinoma. Overall, telomerase activity was detected in 84%. The degree of telomerase activity was high in 2 of dysplasia, 3 of CIS, and 3 of invasive carcinoma. And then there was no apparent association between HPV types and levels of telomerase activity. However, telomerase activity was depressed in invasive carcinoma as compared to dysplasia and CIS.

These results suggest that HPV may be a possible causative agent in cervical carcinoma. In addition, telomerase activation may be necessary for the immortalization of cells and the progression of malignancy in cervical carcinoma.

Key words : Cervix carcinoma, Human papilloma virus, Telomerase

I. 서 론

인유두종 바이러스(Human papilloma virus, 이하 HPV)의 감염이 대부분의 자궁경부암 조직에서 확인되면서 자궁경부암의 발생 원인이 성관계에 의해 전파되어지는 HPV가 중요한 원인으로 생각되고 있다.^{3,4)} HPV의 유전자 중 특히 E6 및 E7 유전자들이 자궁경부암 조직에서 발현이 지속적으로 이루어지고 있다. E6 단백질은 항암 유전자 중 하나인 p53 유전자산물과 결합하여 ubiquitin-dependent proteolytic system을 통한 p53 단백질의 파괴를 유도한다.^{5,6)} p53단백은 주로 세포의 성장억제 및 분화에 관련함이 알려져 있는데 이는 p53 단백질에 의해 유도된 p21 단백질이 cyclin dependent kinase(이하 CDK)-cyclin 복합체의 기능을 억제하여 세포가 G1 세포주기에서 S 세포주기로의 이행을 저지한다고 밝혀져 있다.⁷⁻⁹⁾ 그러므로 HPV 감염이 일어나면 E6 단백질에 의해 p53 단백질의 기능이 소실되므로 세포는 G1 세포주기에 머물지 못하고 S 세포주기로 이행될 수밖에 없다.¹⁰⁾ 그리고 세포는 p53 단백질 외에 세포주기 조절에 망막모세포종 유전자 산물(retinoblastoma protein, 이하 pRB)로 알려진 또 하나의 조절인자를 가지고 있다. 이 또한 HPV에 의해 발현이 유도된 E7 단백질에 의해 그 기능이 소실되어진다. 즉, E7 단백질은 pRB 단백질과 결합하여 전사인자의 일종인 E2F-related protein을 pRB 단백질로부터 유리시켜, 그 결과 세포는 G1 세포주기에 머물지 못하여 S 세포주기로 이행할 수밖에 없다. 그러므로 HPV 감염에 의한 E6 및 E7 단백질의 발현은 mortality stage 1(M1)이라고 알려진 성장억제기전에 관여하는 p53 및 pRB 단백질의 기능을 억제하게

되고¹¹⁾ 이에 따라 세포는 정상적인 세포분열 및 성장조절에 가장 중요한 G1 세포주기에 머물지 못하고 지속적으로 세포분열이 이루어질 수밖에 없다는 것이 현재까지 HPV 감염과 자궁경부암 발생의 관계를 설명하고 있다.

그러나 HPV에 의해 감염된 세포는 M1 성장억제기전의 상실에 의해 정상세포에 비해 수명은 연장되거나 무작정 계속 분열을 할 수는 없다. 왜냐하면 인체의 모든 세포는 선상 이중나선의 DNA를 가지기 때문에 분열에 따른 염색체 복제시 3' 말단이 완전히 복제되지 못해 염색체의 말단에 위치하는 DNA 및 단백질 복합체, 즉 염색체 단말소립(telomere)이라고 알려진 구조물의 길이가 점점 짧아지게 되는 end-replication problem을 가지고 있기 때문이다.¹²⁾ 염색체 단말소립은 염색체의 적절한 위치선정, 구조 및 기능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 수백 또는 수천 개의 TTAGGG 염기서열이 일렬로 반복된 구조를 하고 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 염색체 단말소립은 정상적으로 염색체 말단을 보호하는 역할을 하는데, end-replication problem으로 인해 세포분열을 할 때마다 15-200여 개의 핵산소실이 일어난다. 세포의 지속적인 분열에 따른 염색체 단말소립의 소실은 세포가 염색체의 손상이 왔음을 인지하여 p53 및 p21 단백을 활성화시켜 더 이상의 분열을 하지 못하게 한다고 알려져 있다.⁹⁾ 그러므로 염색체 단말소립은 세포 분열수를 나타내는 mitotic clock, 즉 세포 수명을 계측하는 센서 역할을 할 것으로 생각되고 있다.¹⁶⁾ 그러나 배세포와 같은 세포에서는 RNA-protein complex인 텔로메레이즈(telomerase)에 의해 이러한 문제점이 극복되어진다.¹⁶⁻¹⁸⁾

HPV 감염이나 다른 이유에서 p53 단백질 및 pRB

단백의 기능이 소실되면 M1에 머물지 않고 세포는 계속적으로 분열하여 결국에는 염색체 단말소립의 길이가 분열할 수 없을 정도로 짧아지게 되어 Mortality stage 2(이하 M2)라 불리는 성장억제기 전에 의해 더 이상 세포 분열이 진행되지 못하게 된다. 만약 이때 텔로메레이즈가 재활성화되면 세포는 M2 성장억제기전을 벗어나 지속적으로 분열하는 세포가 될 것이다. 그러므로 HPV 감염에 의해 감염된 세포가 암세포로 되기 위해서는 M2 성장억제기전을 벗어나야만 하고 그러기 위해서는 텔로메레이즈의 재활성이 따라야 할 것으로 생각할 수 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 확립된 100여 종의 세포주 및 원발성 암의 85-90%에서 텔로메레이즈의 활성을 볼 수 있어 텔로메레이즈는 세포 노화를 방지하여 지속적으로 분열할 수 있도록 하여 결국 암화에 관여할 것으로 생각하고 있다.^{17,19,20)}

본 연구는 자궁경부암의 진행단계인 자궁경부 이형증, 상피내암 및 침윤암을 대상으로 하여 HPV 감염 여부 및 HPV 형별을 조사하고 이에 따른 염색체 단말소립의 길이 및 텔로메레이즈의 활성 정도를 조사하여 이형증, 상피내암 그리고 침윤암의 HPV 형별의 차이, 텔로메레이즈의 활성 여부 및 활성도의 차이 그리고 염색체 단말소립 길이의 변화에 대하여 조사하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 대상

계명대학교 동산의료원 산부인과학교실에 내원한 환자로부터 질확대경하에서 이상소견을 보이는 조직 및 주변의 정상 자궁경부 조직을 채취하여 영하 80도에 보관하면서 병리조직학검사 결과 자궁경부 이형증, 상피내암 및 침윤암으로 확진된 19예의 조직을 본 실험에 사용하였다.

2. 자궁경부암 조직으로부터 DNA 분리

300mg 정도의 조직에 조직 100mg당 1ml의 extraction buffer(10mM Tris-0.1 M EDTA, pH 8.0) 액을 넣어 ultraturrax homogenizer(IKA Co. Germany)로 15,000-20,000rpm에서 3-5분 정도 조직을 파쇄시키고 RNase와 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 각각 최종 농도 20 μ g/ml 및 0.5%(W/V)로 섞은 후 37℃에서 1시간 동안 진탕하였다. 여기에 최종

농도 100 μ g/ml의 proteinase K를 넣고 섞은 후 50℃에서 3시간 진탕하였다. 이것을 Tris-saturated phenol, phenol/chloroform/isoamyl-alcohol mixture, 및 chloroform/isoamyl-alcohol mixture로 각 1회씩 처리하여 제단백 과정을 실시 후 상층액을 뽑아 0.2 volume의 10 M ammonium acetate와 2 volume의 ethanol을 넣어 DNA를 침전시켰다. 그 후 유리봉으로 DNA를 건져 내어 70% ethanol로 세척한 다음 10mM Tris-1mM EDTA액에 DNA를 녹여 ultra-violet spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정 후 4℃에 보관하면서 사용하였다.²¹⁾

3. 자궁경부암 조직으로부터 단백질 분리

Kim 등²⁰⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 자궁경부암 조직 100-200mg을 phosphate-buffered saline (PBS, 10mM HEPES-KOH, pH7.5, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM DTT)으로 1-2회 세척 후에 500 μ l의 lysis buffer(10mM Tris-Cl, pH7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 0.1mM PMSF, 5mM 2-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol) 상에서 분쇄기로 분쇄한 후 얼음에서 30분간 방치한 다음 12,000 \times g로 30분간 원심하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. 자궁경부암으로부터 HPV 감염 유무 및 형별 검색

3종류의 PCR primer를 Toh 등²²⁾의 방법에 따라 제작하여 사용하였다. 암발생과 연관이 있다고 알려진 고위험도 HPV형인 16형, 18형, 31형, 33형, 52b형, 58형 등의 E6/E7의 open reading frame(ORF)를 증폭하기 위해서 5'TGTCAAAAACCGTTGTGTCC3'(CP-1) 및 5'GAGCTGTCGCTTAATTGCTC3'(CP-2)를 사용하였으며, HPV 16형의 E7 ORF를 선택적으로 증폭하기 위해서는 5'GCAACCAGAGACAACTGATC3'(SP16-1) 및 5'ATTGTAATGGGCTCTGTCG3'을 사용하였으며 그리고 HPV 18형의 E7 ORF를 선택적으로 증폭하기 위해서 5'TCACGAGCAATTAAGCGACT3' 및 5'CTGAGCTTTCTACTACTAGC3'을 사용하였다. CP-1 및 2로 증폭된 PCR산물은 제한효소 AvaII에 의해서 HPV 16형(157 및 81bp), HPV 18형(172 및 96bp), 그리고 HPV 33(136 및 108bp)이 구별되며, RsaI에 의해서는 HPV 31형(119 및 114bp), BglIII에 의해서는 HPV 52b

(175 및 55bp), 그리고 AccI에 의해서는 HPV 58형 (126 및 118bp) 등의 형별을 알 수 있다. HPV 16 및 18의 양성 대조군으로 Caski 및 Hela 세포주의 DNA를 이용하였다.²³⁾

5. Telomerase Repeat Amplification Protocol(TRAP)

먼저 0.1 μ g의 Cx primer(5'CCCTTACCCTTA CCCTTACCCTAA3')를 0.2ml tube에 넣은 후 Speed-Vac(Savant Co)을 이용하여 완전히 말린 다음 10 μ l의 액체 상태의 AmpliWax(Perkin Elmer)를 넣는다. AmpliWax가 완전히 굳은 다음 5X TRAP buffer(100mM Tris-Cl, pH 8.3, 7.5mM MgCl₂, 315mM KCl, 0.025% Tween20, 5mM EGTA, 50 mg bovine serum albumin, 50 μ g/ml T4g32 protein), 0.1 μ g의 Ts primer(5'AATCCGTCGAGCAG AGTT3'), 50mM의 deoxyribonucleotides, 2 unit의 Taq polymerase(Perkin Elmer), 0.3 μ l의 α -32P-dCTP(Amersham Co., 10 μ Ci/ μ l), 그리고 6 μ g의 상기방법으로 추출한 단백질을 넣은 후 실온에서 10분간 두었다. 그 후 thermal cycler(GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer)에 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 그리고 72°C에서 1분 30초로 하여 총 27회 실시하였다.²⁰⁾ 그런 후 상기 반응액을 15% non-denaturing polyacrylamide gel상에서 전기영동 후 말린 다음 자가방사기록법을 실시하였다. Size marker는 γ -³²P-ATP(Amersham Co., 10 μ Ci/ μ l)로 5'-end label한 100bp DNA ladder(GibcoBRL)을 사용하였다. 양성 대조군으로 HT-29 세포주를 이용하였으며 활성 정도의 판정은 이태성 등²⁾의 방법에 따랐다.

6. Telomere restriction fragment(TRF) 길이 검색

분리된 DNA 5 μ g을 제한효소 RsaI 및 HinfIII로 37°C에서 12시간 처리 후 0.8% agarose와 Tris-borate-EDTA buffer를 사용하여 수평형 전기영동 장치로 10 volt에서 24시간 전기영동하였다. 전기영동된 gel을 0.2 N HCl solution에서 10분 진탕한 후 증류수에 잠시 씻고 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl 용액에 1시간 진탕 후 20×SSC(sodium chloride-sodium citrate) 액으로 nitrocellulose membrane (0.45 μ m pore size)으로 15시간 Southern transfer를 실시하였다. Blotting된 filter는 80°C 진공 오븐에서 90분간 baking하여 고정시킨 후 비닐봉지에 넣고

sealing 다음 테시케이터에 보관하다가 hybridization을 시행하였다. Hybridization은 nitrocellulose filter에 0.75M sodium chloride, 0.075M sodium citrate, 0.1% SDS, 0.02% polyvinyl pyrrolidone, 0.02% Ficoll 400, 0.02% bovine serum albumin, 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide를 함유한 용액을 넣고 48°C에서 16시간 prehybridization을 실시하고 그 다음에 digoxigenin(DIG) oligonucleotide tailing kit(Boehringer Mannheim GmbH)를 이용하여 DIG를 표지한 (TTAGGG)₄를 넣고 48°C에서 24시간 hybridization을 실시하였다. Hybridization 후 필터를 4×SSC 용액으로 실온에서 20분, 그리고 같은 용액으로 48°C에서 30분 세척한 다음 DIG-luminescent detection kit(Boehringer Mannheim GmbH)를 이용하여 DIG로 표지된 probe를 실온에서 x-ray 필름에 노출하여 검출하였다.²⁴⁾ TRF 길이는 GS360 scanning densitometer(Hoefer scientific Instruments)를 사용하여 밀도계(densitometer)상 가장 높은 수치를 나타내는 곳을 평균치로 하였다.

III. 결 과

자궁경부암 조직의 HPV 감염 유무 및 감염형을 조사하기 위하여 먼저 CP primer로 PCR을 실시한 결과 전암 병소와 침윤암 전체 19예 중 17예(89.5%)에서 240-270bp 정도 크기의 HPV DNA가 증폭되었으며 감염형을 알아보기 위하여 SP16 및 SP18 primer로 PCR을 실시한 결과, HPV 16형이 12예(63%)로 나타났으며 그리고 HPV 18형 1예(5.3%)로 나타났다(Fig. 1 및 Table 1). SP16 및 18 primer에 의해 증폭되지 않은 4예는 CP primer로 증폭된 DNA가 제한효소 Acc I 및 Ava II에 의해 절단되어 HPV 58형 및 33형이 각각 2예(10.5%)임이 확인되었다(Fig. 1, Table 1). CP에 의해 증폭되지 않은 2예는 HPV의 감염이 없는 것인지 아니면 다른 형별인지는 알 수 없었다. 각각의 전암 병소와 침윤암 병소주변의 정상 조직으로부터 DNA를 분리한 후 CP primer로 증폭하여 HPV 감염 여부를 조사하였으나 모든 예에서 감염을 볼 수 없었다. 자궁경부암 조직의 염색체 단말소립의 길이를 알아보기 위하여 DNA를 제한효소 Hinf III 및 RsaI으로 절단 후 전기영동하여 Southern blot한 다음 (TTAGGG)₄를 이용하여 검색한 결과 정상 조직에

비해 대부분의 경부암 조직의 염색체 단말소립의 길이가 정상에 비해 다소 짧아져 있었으나 유의한 차이는 볼 수 없었다(Fig. 2 및 Table 1).

Table 1. HPV type, telomere length(Kb), and telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma

Sample	Age	Histology* (stage)	HPV types	Telomere length(normal)	Telomerase** activity
1.	40	DM	33	NT	low
2.	43	DS	UD	5.4(5.2)	low
3.	33	DS	16	4.2(4.2)	UD
4.	27	DS	16	5.6(6.7)	high
5.	44	DS	58	6.6(6.6)	high
6.	39	CIS	UD	6.5(6.9)	low
7.	39	CIS	16	NT	low
8.	35	CIS	16	5.4(5.8)	high
9.	36	CIS	16	4.0(4.9)	high
10.	50	CIS	16	NT	low
11.	37	CIS	33	5.8(5.8)	high
12.	55	SI(I a)	16	4.2(4.2)	low
13.	39	SI(I a)	18	4.3(4.7)	UD
14.	34	SI(I a)	58	9.5(5.7)	high
15.	53	SI(I b)	16	4.1(4.9)	high
16.	50	SI(I b)	16	3.8(3.7)	low
17.	52	SI(II a)	16	NT	low
18.	56	SI(II a)	16	4.1(4.1)	high
19.	57	SI(II a)	16	2.9(4.1)	UD

* DM, dysplasia moderate ; DS, dysplasia severe ; CIS, carcinoma in situ ; SI, squamous cell carcinoma invasive : NT, Not taken : UD, Undetectable. Stages are presented according to the FIGO classification.

** The degree of telomerase activity was measured by Lee et al.²⁾

Fig. 1. (A) PCR on DNA samples obtained from the cervical dysplasia, carcinoma in situ and invasive carcinoma tissues. Nineteen DNA samples were first screened for the presence of HPV using CP-PCR and then CP-positive samples were done for presence of HPV16 or 18, using SP16 or SP18-PCR. (B) CP-PCR products of CP-positive and SP16/18-negative samples were digested by restriction enzyme Avall and AccI and electrophoresed. S represents 100bp ladder size marker.

특히 sample 14번은 정상에 비해 염색체 단말소립의 길이가 유의하게 증가된 양상을 보였고 sample 19번은 정상에 비해 유의하게 짧아진 양상을 보였다(Fig. 2 및 Table 1). 텔로메레이즈의 활성을 알아보기 위하여 TRAP를 실시한 결과 16예(84%)에서 텔로메레이즈의 활성이 있었으며 3예에서는 검출되지 않았다(Fig. 3). 암의 진행 단계에 따른 변화로는 5예의 이행중에서 4예, 6예의 상피내암에서 6예 전부, 그리고 8예의 침윤암에서는 6예에서 활성을 보였다. 텔로메레이즈의 활성의 차이에 따른 염색체 단말소립의 길이의 유의한 증감은 볼 수 없었다. HPV 형별에 따른 텔로메레이즈 활성

Fig. 2. Southern blot analysis of telomere repeat analysis in normal cervix, dysplasia, carcinoma in situ and invasive carcinoma using a digoxigenin-labeled(TTAGGG)₄ as a probe. Size marker are indicated on the right(kilobase, KB). N, normal cervix ; C, invasive carcinoma ; CIS, carcinoma in situ ; D, dysplasia.

Fig. 3. TRAP assay for telomerase activity in cervical dysplasia, carcinoma in situ and invasive carcinoma. N, C and S represent negative control, positive control and size marker, respectively.

정도는 HPV 16형의 경우 총 12예 중 5예에서는 다소 활성이 높았고 5예에서는 다소 낮았으며 2예에서는 활성을 볼 수 없었으며 그리고 HPV 18형 1예에서는 활성을 볼 수 없었다. 이외의 HPV 33형 2예 중 1예는 활성이 높게 다른 1예는 낮은 활성을 보였으며 HPV 58형 2예에서는 활성 정도가 높게 나타났다(Table 1).

IV. 고 찰

HPV가 자궁경부암 발생에 중요한 역할을 한다고 알려지면서 약 70개 이상의 HPV 형별이 있음이 보고되어 있는데, 이 중 HPV6 및 11형은 주로 자궁경부의 양성종양과 관련이 있으며 그리고 HPV16, 18, 31, 33, 52b, 및 58형 등은 악성종양과 관련이

높은 것으로 알려지고 있다.²⁵⁻²⁸⁾ 그러므로 정상 조직 또는 자궁경부암 조직에서 HPV 감염 유무, 특히 형별확인인 자궁경부암의 발생에 있어서 HPV의 역할을 밝히는데 중요할 것으로 생각되고 있다. 최근에 개발된 중합효소 연쇄반응을 이용한 HPV 검출 방법은 민감도뿐만 아니라 정확성이 높아 현재 HPV 감염 진단법으로 널리 이용되고 있다. 일반적으로 HPV 유전자는 감염이 일어난 세포 DNA에 주로 HPV DNA의 E1/E2 유전자 부위가 절단되어 들어가게 되는데 특히 HPV16 및 18형의 E6/E7 유전자의 발현의 조절에 관여하는 E2 유전자의 파괴로 인해 E6/E7 유전자의 발현 조절이 되지 않아 암 발생과 관련이 높은 E6 및 E7 유전자 산물이 과다하게 생겨나게 된다.²⁹⁾ 이렇게 과다하게 생성된 E6 및 E7 단백질은 p53 및 pRB 단백질의 기능을 억제시켜 세포주기가 조절되지 않아 암이 발생할 것으로 보고되고 있다.³⁰⁾

본 연구에서 PCR을 이용하여 HPV 감염 유무를 조사한 결과 각 병소 주변의 정상 조직에서는 HPV 감염을 확인할 수 없는데 비하여 자궁경부암 및 전암조직 총 19예 중 17예(89.5%)에서 감염이 확인되어 약 90% 이상의 자궁경부암 조직에서 HPV가 검출된다는 Howley³¹⁾ 및 zur Hausen⁴⁾과 비슷한 빈도를 보여 우리나라도 자궁경부암의 발생이 HPV와 상당한 관계가 있음을 시사한다. 그리고 자궁경부암과 가장 밀접한 관계가 있다고 알려진 HPV16 및 18형이 각각 12예 및 1예로 전체 감염의 76%를 차지하여 김승철 및 이효표¹⁾의 보고와 비슷한 빈도를 나타내었으며, 이외 HPV 33형 및 58형이 각각 2예씩 확인되었다. 본 실험에 이용한 자궁경부 조직의 2예(10.5%)에서 HPV 감염이 확인되지 않았는데 이

는 감염자체가 없었는지 아니면 본 실험에 사용한 PCR primer로 검출할 수 없는 형별인지는 알 수 없었다.

HPV에 의해 감염된 세포는 HPV의 E6 및 E7 단백질에 의하여 세포분열, 분화 및 성장 조절에 중요한 G1 세포주기 조절에 관련하는 p53 및 pRB 단백질의 기능 저하가 초래되어 G1 세포주기에 머물지 못하고 S 세포주기로 이행됨에 따라 계속 분열할 수밖에 없어 자궁경부암으로 진행된다고 알려져 있다.³¹⁾ 한편 자궁경부암 발생의 고위험군으로 알려진 HPV16 및 18형에 감염된 자궁경부조직 중 극히 소수에서 암으로 진행되며 HPV를 감염시켜 만든 각질 생성 세포주에서도 HPV의 감염을 유발한 다음 지속적인 재대배양 후에 또는 보조적인 암유전자 주입에 의해 암세포로 진행되는 것으로 보아 자궁경부암의 발생이 HPV 단독 감염만으로 이루어 질 수도 있겠지만 세포 내의 어떤 다른 변화가 동반되어야 됨을 시사한다.³¹⁾ 인체의 모든 세포는 선상이 중나선구조의 DNA를 가지므로 분열에 따른 염색체 복제시 3'말단이 완전하게 복제되지 못하는, 즉 염색체 단말소립이라고 알려진 DNA 구조물의 길이가 점점 짧아지는 end-replication problem을 가지고 있는데^{12,14,15)} HPV에 감염된 자궁경부세포도 예외일 수는 없다. 염색체 단말소립은 end-replication problem으로 인해 매번 복제시 15-200여 개의 핵산이 소실되며 세포의 지속적인 분열로 인해 염색체 단말소립이 어느 정도로 짧아지게 되면 세포는 DNA에 손상이 왔음을 인지하여 더 이상 분열을 하지 않게 된다. 이는 주로 p53 유전자의 활성화와 관련이 있는데 DNA 손상에 의해 유도된 p53 단백질에 의해 p21이라는 CDK inhibitor의 발현이 유도되어 pRB 단백질의 인산화에 관여하는 CDK를 억제하여 세포를 G1 세포주기에 머물도록 한다고 알려져 있다.^{7,9,18)} 때로는 바이러스에 의해 형질전환된 세포주는 M2 세포 성장억제기전을 거치지 않고 바로 immortal cell로 되는 것을 볼 수 있는데 이러한 세포주는 염색체 단말소립의 길이 보존에 관여하는 텔로메레이즈라는 효소를 발현하고 있으며 또한 염색체 단말소립의 길이가 더 이상 단축되지 않음을 볼 수 있다.¹¹⁾

Counter 등³²⁾은 텔로메레이즈의 활성화는 인체의 세포가 immortal cell로 되기 위해서는 필수적이며 또한 텔로메레이즈가 암화 과정에 관여할 것이라고 제안하였다. 그러나 대부분의 암세포는 자신의

DNA 손상을 인지하지 않는다고 생각되고 있다. 즉, 염색체 단말소립이 거의 소실된 암세포의 염색체는 오히려 유전자의 전좌, 재배열, 중복 등이 용이하여 암화가 더 용이하게 될런지도 모른다. 하지만 현재까지 보고된 바에 의하면 대부분의 정상세포는 텔로메레이즈가 비활성화 되어 있으며 그리고 90% 이상의 암세포에서 텔로메레이즈가 활성화되어 있는 것으로 보아^{20,33,34)} 정상세포가 M2 성장억제기전을 벗어나 암세포로 되기 위해서는 텔로메레이즈 활성화에 의해 충분한 길이의 염색체 단말소립이 있어야 할 것으로 생각되고 있다.

HPV가 감염된 세포는 G1 세포주기에 머물도록 하는데 관여하는 p53 및 pRB 단백질의 기능을 저하시키기 때문에 지속적으로 분열이 가능하게 되고 이에 따른 염색체 단말소립의 길이는 지속적으로 짧아지게 된다. 아마도 염색체 단말소립이 단축된 세포의 대부분은 사멸할 것이고 단지 텔로메레이즈가 활성화된 세포만 선택적으로 살아 남아 불멸의 암세포로 진행될 것으로 생각되고 있어 자궁경부암 조직의 염색체 단말소립의 길이 및 텔로메레이즈 활성을 조사하였다. 염색체 단말소립의 길이는 자궁경부이형종의 경우에는 정상대조군과 거의 비슷하였으나 1예에서 감소되어 있었으며, 상피내암의 경우는 비슷한 양상을 보였다. 침윤성 자궁경부암의 경우는 1예(sample 14번)에서는 유의한 증가 그리고 1예(sample 19번)에서는 유의한 감소가 관찰되어 암화 정도에 따른 염색체 단말소립의 길이의 차이는 관찰할 수 없었다. 염색체 단말소립 길이의 보존에 관여하는 텔로메레이즈 활성을 조사한 결과 정상 조직에서는 30%에서 그리고 암조직에서는 84%에서 활성이 관찰되었는데, 이는 이태성 등²⁾이 암조직의 80%에서 활성을 보고한 결과와 비슷한 빈도를 나타내어 텔로메레이즈 활성화와 자궁경부암의 발생과 상당히 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다. 감염된 HPV 형별에 따른 텔로메레이즈 활성 정도는 HPV 16형의 경우는 총 12예 중 5예에서는 다소 활성이 높게 나타났으며 5예에서는 다소 낮았으며 2예에서는 활성을 볼 수 없었다. 그리고 1예의 HPV 18형에서도 활성을 볼 수 없었다. 이외의 HPV 33형(2예)에서는 1예는 활성이 높게 다른 1예는 낮은 활성을 보였으며 HPV 58형(2예)의 경우에는 활성이 높게 나타나 HPV 형별에 따른 텔로메레이즈 활성의 차이는 없는 것으로 보인다. 비활성되어 있는 텔로메레이즈가 M2 세포 성장억제기전을

벗어나는데 필요할 것으로 생각되고 있지만 정상 세포가 암세포로 이행되는 시점에서 활성화 되는지, 아니면 암세포가 죽지 않고 계속 생존하는데 필요한지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서 총 19예에서 텔로메레이즈의 활성을 조사한 결과 11예의 이형증 및 상피내암의 경우에는 5예에서는 다소 높은 활성을, 5예에서는 다소 낮은 활성을 그리고 1예에서는 활성을 관찰할 수 없었고 그리고 8예의 침윤성 경부암의 경우에는 3예에서 다소 높은 활성을, 3예에서는 다소 낮은 활성을 그리고 2예에서는 활성을 관찰할 수 없었으나 대상 조직의 84%에서 나타난 텔로메레이즈의 활성은 텔로메레이즈와 암화는 아주 밀접한 관계가 있다고 사료된다. 그러나 자궁경부암의 암화 과정의 발전단계인 이형증, 상피내암과 침윤성자궁경부암 세포에서 텔로메레이즈 활성도의 차이를 관찰할 수 없는 것으로 보아 자궁경부암에서는 암화 과정에서 텔로메레이즈의 다른 기전이 있을 것으로 보이며 향후 이의 규명을 위한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

자궁경부암의 원인은 아직까지 명백히 밝혀져 있지 않으나 근래에 인유두종 바이러스(HPV)의 감염과 상당히 밀접한 관계가 있음이 알려지고 있다. 그리고 최근 텔로메레이즈라 불리는 염색체 말단에 위치하는 염색체 단말소립의 보존에 필요한 효소가 대부분의 암에서 활성화되어 있음이 보고되어 있다. 본 연구는 자궁경부이형증, 상피내암 및 침윤암을 대상으로 하여 HPV 감염 여부 및 HPV 형별을 조사하고 이에 따른 염색체 단말소립의 길이 및 텔로메레이즈의 활성 정도를 관찰하여 이형증, 상피내암 그리고 침윤암간의 감염이 일어난 HPV 형별의 차이, 텔로메레이즈의 활성도의 차이 및 염색체 단말소립 길이의 변화에 대하여 조사하였다. 중합효소 연쇄반응을 이용하여 HPV 감염 유무를 조사한 결과 총 19예 중 17예(89.5%)에서 감염이 확인되었으며 고위형군으로 알려진 HPV 16 및 18형이 전체 감염의 76%를 차지하여 우리나라도 자궁경부암의 발생이 HPV와 상당한 관계가 있음을 시사한다. 염색체 단말소립의 길이는 자궁경부이형증 및 상피내암의 경우는 정상 조직과 거의 비슷한 길이를 보는

데, 특히 침윤성 자궁경부암의 경우는 1예(sample 14번)에서는 유의한 증가 그리고 1예(sample 19번)에서는 유의한 감소가 관찰되었다. 그러나 암화 정도에 따른 염색체 단말소립의 길이의 차이는 관찰할 수 없었다. 이러한 염색체 단말소립 길이의 보존에 관여하는 텔로메레이즈 활성을 조사한 결과 16예에서 텔로메레이즈의 재활성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 정상대조군과 암조직 간의 염색체 단말소립 길이의 증가 또는 감소에 따른 활성의 정도의 차이에는 연관성이 없으며 또한 감염된 HPV 형별에 따른 염색체 단말소립 길이의 차이도 관찰할 수 없었다. 본 실험에서 텔로메레이즈의 활성도는 이형증 및 상피내암 11예 중 5예에서 다소 높은 활성을, 5예에서는 다소 낮은 활성을 그리고 1예에서는 활성을 관찰할 수 없었다. 침윤성 자궁경부암 8예 중 3예에서는 다소 높은 활성을 보였으나 3예에서 다소 낮은 활성을 나머지 1예에서는 활성을 볼 수 없었다. 이상의 결과로 자궁경부암과 HPV 감염 그리고 텔로메레이즈 재활성과는 밀접한 관계가 있다고 생각된다. 그러나 자궁경부암의 암화 진행 과정에 따른 텔로메레이즈 활성도의 차이가 없는 것은 자궁경부암의 암화 과정에 텔로메레이즈 이외의 다른 기전이 있을 것으로 생각된다.

- References -

1. 김승철, 이효표 : 자궁경부암에서 human papillomavirus(type 16/18)의 검출 및 human papillomavirus E6 유전자의 발현에 관한 연구. 대한암학회지 1995;38(4): 656-683.
2. 이태성, 서성일, 백원기, 박종욱, 차순도, 최병길, 서민호 : 한국인 자궁경부암과 telomerase의 활성과의 관계. 대한암학회지 1996;28(4):733-738.
3. Howley PM : Role of the human papillomaviruses in human cancer. Cancer Res 1991;51(18):5019-5022.
4. Zur Hausen H : Human papilloma viruses in the pathogenesis of anogenital cancer. Virology 1991;184(1):9-13.
5. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, et al. : The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 1993;75(3):495-505.
6. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. :

- The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63(6):1129-1136.
7. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. : WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54(5):1169-1174.
 8. Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean F, et al. : Cdk-interacting protein 1 directly binds with PCNA and inhibits replication catalyzed by the DNA polymerase δ holoenzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(18):8655-8659.
 9. Harper JW, Elledge SJ : Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6(1):56-64.
 10. Hartwell L: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cell. *Cell* 1992;71(4):543-546.
 11. Wrights WE, Shay JW : Time, telomeres and tumors: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Biochem Sci* 1995;5(8):293-297.
 12. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, et al. : Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;225(4):951-960.
 13. Blackburn EH: Structure and function of telomeres. *Nature* 1991;350(6319):569-573.
 14. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. : Telomeric length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(21):10114-10118.
 15. Lingner J, Cooper JP, Cech TR : Telomerases and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* 1995;269(5230):1533-1534.
 16. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, et al. : Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells : loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(21):9857-9860.
 17. De Lange T : Activation of telomerase in human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(8):2882-2885.
 18. Harley CB, Villeponteau B : Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1995;5(2):249-255.
 19. Counter CM, Botelho FM, Wang P, et al. : Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 1994;68(5):3410-3014.
 20. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011-2015.
 21. Blin N, Stafford DW: A general methods for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976;3(6):2303-2306.
 22. Toh Y, Kuwano H, Tanaka S, et al. : Detection of human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase chain reaction. *Cancer* 1992;70(9):2234-2238.
 23. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, et al. : Simultaneous detection and typing of genital human papilloma virus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1991;72(Pt5):1039-1044.
 24. Kitada T, Seki S, Kawakita N, et al. : Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211(1):33-39.
 25. Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, et al. : A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 1986;321(6067):246-249.
 26. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, et al. : Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987;79(4):671-677.
 27. Shimoda K, Lorincz AT, Temple GF, et al. : Human papilloma virus type52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 1988;69(11):2925-2928.
 28. De Villiers EM : Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 1989;63(11):4898-4903.
 29. Cooper GM : *Oncogenes*. 2nd ed, Boston, Jones and Bartlett publishers, 1995;26-27.
 30. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, et al. : Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992;12:197-217.
 31. Munger K : Host-viral gene interactions in cervical cancer. *Contemp OB/GYN* 1995;40(4):27-37.
 32. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. : Te-

- telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO J 1992;11(5):1921-1929.
33. Nilsson P, Mehle C, Remes K, et al. : Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. Oncogene 1994;9(10):3043-3048.
34. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al. : Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. Nature Med 1995;1(3):249-255.
-