대부종콜포회지 제9권 제3호 1998
Vol. 9, No. 3, Sep., 1998

자궁경부 종양 환자에서 자궁경부 조직 및 혈청의 Epidermal Growth Factor Receptor 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실 · 병리학교실*
김승철 · 서지현 · 김수연 · 문혜성 · 김향미 · 손영수 · 한운섭*

=Abstract=

Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Tissue and Serum of the Patients with Cervical Neoplasia =A Preliminary Study=

Seung Cheol Kim, JI Hyun Suh, Su Yeon Kim, Hye Sung Moon, Hyang Mee Kim, Young Soo Son, Woon Sup Han*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

Background: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in the tissue of various malignancies including carcinoma of the breast, lung, esophagus, cervix, and ovary. In patients with cervical neoplasia, there may be a relationship between the expressions of EGFR in cervical neoplastic tissue and serum.

Methods: The expression of EGFR was determined in cervical tissues from 23 cervical intraepithelial neoplasia (CIN) patients and 16 invasive cervical carcinoma patients using immunohistochemical staining and the level of serum EGFR ECD (extracellular domain) was measured in serum from 17 CIN patients and 14 cervical carcinoma patients using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Results: The expression of EGFR in cervical tissue was significantly increased as normal cervical tissue progressed to CIN then to invasive cervical carcinoma (p=0.009). And the mean level of serum EGFR according to the histologic diagnosis of normal cervix, CIN, invasive cervical carcinoma was 23.18±1.92 fmol/ml, 23.49±8.95 fmol/ml, and 30.46±19.72 fmol/ml, respectively. The mean level of serum EGFR was higher in invasive cervical carcinoma than that of normal cervix or CIN. But there was no significant statistical difference (p=0.471). Also the mean level of serum EGFR according to the intensity of immunohistochemical staining in negative (-), weakly positive (+), positive (++), and strongly positive (+++) staining was 19.36± 3.12 fmol/ml, 20.99±3.59 fmol/ml, 29.08±16.86 fmol/ml, and 24.34±10.35 fmol/ml, respectively. The mean level of serum EGFR in positive (++) and strongly positive (+++) staining was higher than in negative (-) staining, but there was no significant statistical difference (p=0.450).

Conclusions: The authors believe that the expression of EGFR in cervical neoplastic tissue could be used as a marker for reflecting the malignant transformation of cervical epithelial cells. Although the mean level of serum EGFR in invasive cervical carcinoma was higher than in normal cervix and CIN, and the mean level of serum EGFR in positive (++) and strongly

* 이 논문은 1996년도 이화여자대학교 이화의료원 임상연구비에 의하여 연구되었음

positive (+++) immunohistochemical staining was higher than in negative (-) staining, there was no significant statistical difference, possibly due to the limited number of cases in this preliminary study. So, the authors believe that the level of serum EGFR may have a similar role as a tumor marker like the EGFR expression in cervical neoplastic tissue. This study should be continued further with more cases and the relationship between the level of serum EGFR and prognostic parameters of uterine cervical carcinoma need to be analyzed.

Keywords: CIN, Cervical carcinoma, EGFR, Serum, ELISA, Immunohistochemical staining, Tumor marker

Ⅰ. 서 론

세포의 성장과 증식에 관련된 여러 성장인자 중 Epidermal growth factor(EGF)는 생쥐(mouse)의 하악 타액선에서 처음으로 분리되었으며,[1] 분자량 6045 dalton의 열에 안정한 polypeptide로서 세포의 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다.[2] 이러한 EGF가 유사분열물질(mitogen)로서 작용하여 세포성장을 일으키기 위해서는 먼저 세포표면에 위치하는 EGF receptor (EGFR)에 결합하여야 한다.[3]

EGFR은 분자량(Mr) 170,000의 transmembrane glycoprotein으로서 여러 종류의 세포에 존재하는데, 외음부 편평상피 세포암에서 유래된 A431 세포주에서 EGFR이 다량 발현됨이 알려지면서, A431 세포주로부터 처음 분리되었으며,[4-8] v-erb-B oncogene에 의하여 생성되는 변형단백질(transforming protein)과 높은 homology를 지니는 것으로 알려져 있다.[9] EGFR 유전자는 7번 염색체에 위치하고 있으며,[10] EGFR은 3 개의 domain으로 구성되어 있는데, cystein이 풍부한 external ligand- binding domain (extracellular domain: ECD)과 transmembrane domain, 그리고 tyrosine kinase 활성을 지니는 internal domain으로 되어 있다.[7,9,11-13] 그 기능은 paracrine 방법으로 유사분열물질인 EGF가 EGFR에 결합하면 EGFR의 내세포 tyrosine kinase 영역의 자동인산화(autophosphorylation)를 일으켜,[14,15] EGF의 신호를 세포막을 지나 세포액(plasma) 내로 전달하게 되며, 그 결과 세포의 전해질 이동, 형태학적 변화 등을 유발하여 결국 세포의 유사분열을 일으켜 세포를 성장, 증식시키는 것으로 알려져 있다.[3,16]

여러 종양에서 이와 같은 EGFR의 발현에 관한 연구결과로서 폐암, 유방암, 뇌종양 조직 등에서 EGFR이 정상 조직에서보다 과발현되고 있으며, 편평상피 세포암에서 EGFR이 다른 암종에 비하여 훨씬 높게 발현됨이 보고된 바 있다.[17-19] 따라서 EGFR의 종양 표지물(tumor marker)로서의 가능성에 관심이 모아지면서 EGFR의 과발현이 종양의 악성도(aggressiveness)와 관련이 있다는 연구결과들이 보고되었다.

Pfeiffer 등[20]은 EGFR을 방사선 수용체결합 측정법으로 측정한 결과, 침윤암 조직에서 정상 조직에 비하여 EGFR이 높게 발현됨을 보고하였고, EGFR의 과발현은 나쁜 예후와 관련이 있어, 림프절 전이가 있을 경우 없는 경우보다 EGFR 발현이 증가되어 있다고 하였다. 또한 Kristensen 등[21]도 자궁경부 편평상피 세포암에서 면역 조직화학적 방법으로 EGFR의 발현을 조사하였으며, Kimmig 등[22]은 2-color flow cytometry를 이용하여 EGFR을 정량적으로 측정하였는데, 이들 모두 EGFR은 종양의 악성도(aggressiveness)를 예측하는 데 유용한 도구로 생각되며 EGFR의 과발현은 불량한 예후와 관련이 있다고 한다.

Kim 등[23]은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하여 자궁경부암 조직에서 EGFR을 정량적으로 측정한 결과 자궁경부암의 예후인자 중에서 종양의 크기 이외의 다른 예후인자들과는 상관관계가 없었으나 EGFR이 자궁경부암의 종양발생 및 악성화에 있어서 중요한 역할을 하며, EGFR의 측정이 자궁경부암의 종양 증식능을 평가할 수 있는 새로운 임상적 지표로서의 사용가능성을 제시하고 있다. 김과 이[24]도 자궁경부 조직에서 면역 조직화학적 염색법을 이용하여 자궁경부 종양의 EGFR 발현도를 분석한 바, EGFR 발현의 증가는 자궁경부 상피세포의 악성화를 반영하는 종양표지물로서의 가능성이 있음을 연구 발표한 바 있다.

Choi 등[25]은 위암환자의 혈청에서 ELISA를 이용하여 EGFR ECD를 측정하여 분석한 바 위암환자에서 정상인에 비하여 유의하게 혈청 EGFR의 농도가 높았으며, 77.5%의 높은 혈청 EGFR 양성률을 보이며, 따라서 혈청 EGFR은 위암환자의 진단, 예후의 판단, 수술후 환자의 추적, 항암요법에 대한 반응의 평가 등에 이용될 수 있는 가능성을 제시하고있다. Partanen 등[26]도 asbestosis가 동반된 폐암환자에서 ELISA를 이용하여 혈청 EGFR을 측정하였는데, 정상인에 비하여 환자군에서 EGFR ECD가 유의하게 증가되어 있다고 한다.

그러나 아직까지 자궁경부 종양환자에서 혈청 EGFR의 발현에 관한 연구는 국내외적으로 보고된 바 없으며, 더욱이 혈청 EGFR 농도와 자궁경부 종양 조직에서의 EGFR 발현과의 상관관계를 분석한 연구는 아직 시도된 바가 없다.

자궁경부 종양은 자궁경부 상피세포의 정상적인 증식 및 성장조절 기전의 실조에 의하여 자궁경부 상피세포들이 미성숙 세포들로 대치되고, 더 나아가 세포 이형증을 거쳐 상피내암과 침윤암으로 점차 진행되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 과정에 관련되는 성장인자와 같은 생물학적 지표를 측정하여 종양의 성상 및 예후와의 상관관계를 알 수 있다면 이는 임상에 있어 가장 효과적인 환자의 치료 계획을 세우고 생존율을 향상시키는 데 큰 도움이 될 수 있을 것이다.

이에 저자는 첫째, 면역 조직화학적 염색을 이용하여, 병리과에 보관된 자궁경부 종양 조직의 포르말린고정 파라핀 포매 조직에서의 EGFR 발현 양상을 보고, 이것이 자궁경부 편평상피 세포의 악성화와 어떠한 연관성이 있는지를 알아보고자 하였으며 둘째, human EGFR quantitative ELISA assay kit (Oncogene Science, Unicondale, USA)를 이용하여 혈청 EGFR ECD를 측정하여 혈청 EGFR과 조직 EGFR 발현 사이에 어떠한 상관관계가 있는지를 분석함으로써 혈청 EGFR이 자궁경부암에서 새로운 종양표지물(tumor marker)로 이용될 가능성을 본 예비적 연구를 통하여 알아보고자 하였다.

Ⅱ. 연구 내용 및 방법

1. 연구 대상 및 연구재료

1) 연구 대상

이화여자대학교 부속 목동병원 산부인과에서 자궁경부암으로 진단된 환자 18예(미세침윤성암: 3예, 침윤성암: 15예)와 자궁경부 상피내종양(CIN)으로 진단된 환자 24예(CIN Ⅰ: 6예, CIN Ⅱ: 3예, CIN Ⅲ: 15예)를 대상군으로 하였으며, 양성 질환으로 전자궁적출술을 받고 정상 자궁경부 조직임이 진단된 환자 9예를 대조군으로 하였다.

이 중 자궁경부 조직의 EGFR 발현을 보기 위한 면역 조직화학적 염색은 자궁경부 상피내종양 1예, 침윤암 2예를 제외한 총 48예에서 시행되었으며, 혈청 EGFR 농도의 측정은 대조군 환자 5예, CIN 환자 17예, 자궁경부암 환자 14예에서 측정되었다.

2) 연구 자료

병리과에 보관되어 있는 포르말린고정 파라핀 포매 자궁경부 조직의 절편을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 시행하였으며, 연구 자료로서의 적절성을 확인하기 위하여 파라핀 절편의 제작과 동시에 Hematoxyline Eosine 염색을 시행하여 병리 조직학적 진단을 면역 조직화학적 염색 전에 미리 확인하였다. 또한 같은 환자에서 혈액 5 cc를 채취하여 원심분리한 혈청을 EGFR 농도 측정에 이용하였다.

2. 연구 방법

1) 조직에서의 EGFR의 면역 조직화학적 염색

Avidin/Biotin immunoperoxidase 방법을 이용하였으며, VECTASTAIN Elite ABC KIT(mouse IgG, Catalog No: PK-6102; Vector Laboratory, USA)를 사용하였다. EGFR에 대한 primary antibody로는 ICN Biochemical 사의 anti-EGFR 400 MT MAb를 사용하였다. Peroxidase substrate solution의 준비는 같은 Volume의 0.02% hydrogen peroxide(made in distilled water)와 0.1% diaminobenzidine tetrahydrochloride (made in 0.1M Tris buffer, pH 7.2)를 동량으로 섞는다. 이 substrate solution은 광선에 노출되거나 hydrogen peroxide의 존재 하에서 아주 불안정하기 때문에 좋은 결과를 얻기 위해서는 사용 직전에 준비한다. 파라핀 절편의 면역 조직화학적 염색 과정은 아래와 같다.

① 파라핀 포매괴의 조직절편을 xylene과 graded alcohol series(100 75%)로 탈파라핀(deparffinization)

및 함수(hydration)시킨다.

② 증류수로 5분간 세척한다.

③ 내인성 peroxidase 활성을 억제하기 위하여 조직을 0.3% H2O2 in methanol에 30분간 배양(incubation)한다.

④ 20분간 phosphate buffered saline 용액으로 씻는다.

⑤ 1차, 2차 항체의 비특이적 결합을 억제하기 위하여 절편을 1:20으로 희석된 normal blocking serum (horse serum)으로 20분간 배양한다.

⑥ Excess serum을 blot한다.

⑦ Buffer로 희석(1:40)한 primary antiserum (EGFR monoclonal antibody)으로 실온에서 2시간 동안 배양한다.

⑧ Slide를 buffer(PBS)로 10분간 세척한다.

⑨ Buffer로 희석(1:100)한 biotinylated secondary antibody(biotinylated horse anti-mouse IgG antiserum) 용액에 30분간 배양한다.

⑩ Slide를 buffer로 10분간 세척한다.

⑪ VECTASTAIN ABC Reagent(avidin-biotin-peroxidase complex)에 30분간 배양한다.

⑫ Slide를 10분간 buffer로 세척한다.

⑬ Peroxide substrate solution에 2 7분간 배양한다.

⑭ 5분간 흐르는 수돗물에 씻는다.

⑮ Mayer Hematoxyline 용액으로 대조염색을 한다.

? 80% glycerol gelatin에 mounting 한다.

? 숙련된 병리과 의사 3인에 의하여 면역 조직화학적 염색 결과를 판독한다. 판독시 면역반응을 시각적 강도(visual intensity)에 따라 반정량적 등급(semiquantitative grading)을 주어 면역반응이 거의 없는 경우를 음성(-)으로 하고, 매우 강한 반응의 경우를 강양성(+++)으로 하여 음성(-), 약양성(+), 양성(++), 강양성(+++)의 4개 subgroup으로 나누어 판독하였다.

2) 혈청 EGFR 농도의 측정

혈청 EGFR ECD의 측정은 mouse monoclonal capture antibody와 rabbit polyclonal detector antibody를 이용하는 sandwich ELISA 방법으로 human EGFR quantitative ELISA assay kit(Oncogene Science, Unicondale, USA)를 이용하였으며 측정과정은 다음과 같다.

① 준비한 혈청에 normal mouse serum을 첨가하여 10%로 희석한다.

② 먼저 준비한 plate의 각각의 well 안에 1× wash buffer 200 μℓ로 세척한 후 37℃에서 배양(incubation)한다.

③ 각 well 안에 있는 내용물을 제거하고 sample과 7개의 EGFR standard(0 80 fm/ml)를 첨가한 후 well을 plastic wrap으로 감싼 후 37℃에서 3시간 동안 반응시킨다.

④ 각 well 안의 내용물을 제거한 후 wash buffer 300 μℓ로 5회 세척한다.

⑤ 실온에서 각 well 안에 Detector antibody 100 μℓ를 첨가한 후 plastic wrap으로 감싸서 1시간 동안 실온에서 반응시킨다.

⑥ Conjugate diluent로 희석된 50× Working conjugate를 각 well안에 100 μℓ씩 넣은 후 plastic wrap으로 감싼 후 30분간 실온에서 반응시킨다.

⑦ ④번 과정을 반복한 후 Substrate diluent로 희석한 Working substrate 100 μℓ를 넣은 후 실온, 암실에서 1시간 동안 반응시킨다.

⑧ Stop solution 100 μℓ를 첨가한 후에 spectrophotometric plate reader에 의해 파장 490 nm에서 absorbance를 읽어 검체의 EGFR 농도를 산출한다.

3. 통계 분석

면역 조직화학적 염색상 EGFR 발현도의 조직진단에 따른 차이는 Chi-square test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였으며, 조직진단 및 면역 조직화학적 염색상 염색강도의 차이에 따른 혈청 EGFR 농도의 차이의 유의성 검정은 Kruskal- Wallis test를 이용하였다. 모든 통계처리는 personal computer와 SAS program을 이용하였고, $p<0.05$인 경우를 통계적으로 유의한 기준으로 하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 자궁경부 조직에서 EGFR의 면역 조직화학적 염색

자궁경부 조직의 EGFR 발현을 보기 위한 면역조직화학적 염색은 자궁경부 상피내종양 1예, 침윤암 2예를 제외한 총 48예에서 시행되었는데, 염색결과는 다음과 같았다(Table 1).

Table 1. Immunohistochemical staining for EGFR in CIN and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Histologic diagnosis	Number of cases	EGFR staining(%)				Total positive ratio(%)
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
Normal	9	3(33.3)	6(66.7)	0(0.00)	0(0.00)	6/9(66.7)
CIN	23	5(21.7)	5(21.7)	7(30.4)	6(26.1)	18/23(78.3)
Invasive Ca.	16	0(0.00)	3(18,8)	7(43.8)	6(37.5)	16/16(100.0)

(-): Negative; (+): weakly positive; (++): positive; (+++): strongly positive
Chi-square=16.96, p=0.009

대조군인 정상 자궁경부 편평상피는 EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색에서 편평상피층 중 주로 기저층 세포에서 양성 반응을 보였는데, 33.3%(3/9)에서 음성(-)이였으며, 66.7%(6/9)에서 약양성(+)을 보였다. CIN의 경우, 기저층 세포와 중간 상피층 세포 및 이형성 병변 부위에서 EGFR 염색 양성 반응을 보였는데, 21.7%(5/23)에서 음성(-), 21.7%(5/23)에서 약양성(+), 30.4%(7/23)에서 양성(++), 26.1%(6/23)에서 강양성(+++)을 보였다. CIN에서 강양성(+++)을 보인 6예는 모두 상피내암(squamous cell carcinoma in situ)이었다. 침윤성암(미세침윤성암 3예 포함)경우, 0.0%(0/16)에서 음성(-), 18.8% (3/16)에서 약양성(+), 43.8%(7/16)에서 양성(++), 37.5%에서 강양성(+++)을 보였다. 이때 강양성(+++)을 보인 6예는 모두 미세침윤성암이 아닌 침윤성암이었다(Fig. 1-4).

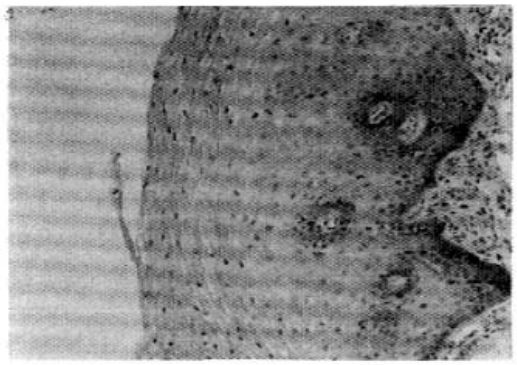

Fig. 1. Weakly positive(+) staining for EGFR in normal cervix. Immunohistochemical staining (×100).

본 연구 결과로 볼 때, 자궁경부 종양 조직에서 EGFR의 발현은 정상 조직에 비하여 유의하게 증가됨을 알 수 있으며, 또한 자궁경부 이형상피증에서도 중간 상피층에서 EGFR이 계속 발현되는 것으로

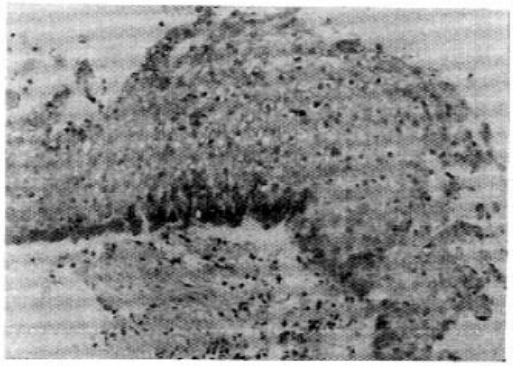

Fig. 2. Weakly positive(+) staining for EGFR in mild dysplasia. Immunohistochemical staining ×100.

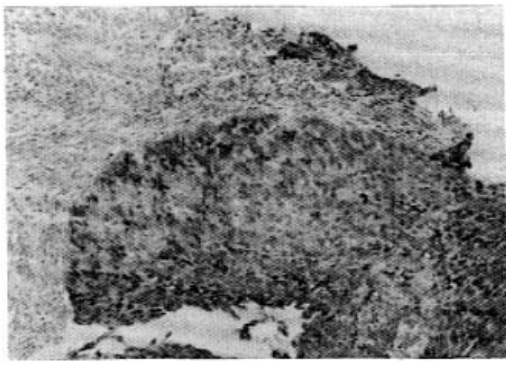

Fig. 3. Positive staining(++) for EGFR in carcinoma in situ. Immunohistochemical staining ×100.

보아 종양발생의 초기부터 EGFR의 발현이 증가하여 세포분화에 관계할 것으로 추측된다.

또한 자궁경부에서 정상 조직, CIN, 침윤성암으로 진행되면서 EGFR의 발현은 통계적으로 유의하게 증가됨(Chi-Square=16.96, P=0.009)(Table 1)을 알 수 있었다. 따라서 자궁경부 종양 조직에서 EGFR 발현도는 자궁경부 병변의 악성화를 반영하는 지표(tumor marker)로서 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 4. Strongly positive(+++) staining for EGFR in invasive carcinoma. Immunohistochemical staining ×100.

2. 혈청 EGFR의 발현

자궁경부의 조직학적 진단별 환자혈청 EGFR의 평균 농도를 보면 Table 2와 같았다. 정상 자궁경부 조직의 경우 23.18±1.92 fmol/ml, CIN의 경우 23.49±8.95 fmol/ml, 침윤성암의 경우 30.46±19.72 fmol/ml로 정상의 경우와 CIN의 경우 평균 농도에 거의 차이가 없었으나, 침윤성암의 경우 정상 및 CIN의 경우보다 혈청 EGFR이 높게 발현됨을 알 수 있었다. 그러나 통계적으로 세 그룹간에 유의한 차이는 없었다(Table 2: Kruskal-Wallis Test: Chi-square =1.5061, p=0.471).

Table 2. Serum EGFR levels according to histologic diagnosis in patients with CIN and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix

Histologic diagnosis	Number of cases	Serum EGFR(fmol/ml) (Mean±SD)
Normal	5	23.18±1.92
CIN	17	23.49±8.95
Invasive Ca.	14	30.46±19.72

Ca.: carcinoma; SD: Standard Deviation
Kruskal-Wallis Test: Chi-square=1.5061, p=0.471

한편 자궁경부 조직에서 면역 조직화학적 염색상 염색반응의 강도에 따른 혈청 EGFR의 평균 농도를 보면, 음성(-)의 경우 19.36±3.12 fmol/ml, 약양성(+)의 경우 20.99±3.59 fmol/ml, 양성(++)의 경우 29.08±16.86 fmol/ml, 강양성(+++)의 경우 24.34±10.35 fmol/ml로 양성(++) 및 강양성(+++)에서 정상의 경우보다 혈청 EGFR 농도가 높았으나 역시 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 3: Kruskal-Wallis Test: Chi-square=2.6430, p=0.450).

Table 3. Serum EGFR levels according to the grades of immunohistochemical staining of EGFR in cervical tissues

Immunohisto chemical staning	Number of cases	Serum EGFR(fmol/ml) (Mean±SD)
(-)	5	19.36±3.12
(+)	8	20.99±3.59
(++)	11	29.08±16.86
(+++)	10	24.34±10.35

(-): Negative; (+): weakly positive; (++): positive; (+++): strongly positive
Kruskal-Wallis Test: Chi-square=2.6430, p=0.450

Ⅳ. 고 찰

세포의 성장과 증식에 관여하는 성장인자에 관한 관심이 고조되면서 특히 Epidermal growth factor에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.[27] EGF는 생쥐(mouse)의 하악 타액선(submaxillary gland)에서 처음으로 분리되었으며,[1] 인간에서는 소변에서 최초로 확인된,[2] 53개의 아미노산으로 구성된 분자량 6045 dalton의 열에 안정한 single polypeptide chain으로서 세포성장을 자극하는 것으로 알려졌다.[2,28,29]

EGFR은 가장 잘 규명된 성장인자 수용체 중의 하나로 다른 성장인자 수용체의 범례로서 많이 인용되고 있다. EGFR은 인간 편평상피 세포암에서 유래된 세포주인 A-431 세포에서 최초로 분리되었으며,[29] Carpenter & Zendegui 등[6]은 EGFR이 in vivo 혹은 in vitro 에서 증명되지 않은 유일한 세포는 조혈기관의 세포들이라고 보고하였다.

EGFR은 분자량(Mr) 170,000의 transmembrane glycoprotein으로서 여러 종류 세포에 존재하고,[3,16,30] 1186개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 세포막에 존재하는 부위에 따라 세포막외 부위(external domain), 세포막 부위(transmembrane domain), 세포질 부위(cytoplasmic domain) 등의 3 부위로 구분된다. EGFR의 세포막 부위에는 protein- kinase를 활성화

시킬 수 있는 부위가 존재한다.[27,31] EGF가 세포들에서 유사분열인자(mitogen)로 작용하여 세포성장을 일으키기 위해서는 먼저 세포표면의 EGF receptor (EGFR)에 결합하여야 한다.[3] EGFR에 EGF가 결합하게 되면 그 결합체는 세포질 내로 함입(endocytosis)된 후, 세포질 내의 lysosome에 의하여 분해된다.[32,33] EGFR의 기능은 유사분열인자인 EGF와 결합하여 EGF의 신호(signal)가 세포막을 지나 세포액(plasma)으로 전달되게 된다. 그 결과 전해질 이동(ion transport), 형태 변화(morphologic change) 등을 일으키는 여러 수용체(receptor)들이 유발되어 세포의 유사분열을 일으킨다.[3,16]

EGFR의 발현은 radioligand binding assay,[20,34,35] immunocytochemistry,[36-39] 그리고 flow-cytometric assay,[40] enzyme immunoassay[23] 등이 이용되어 왔는데 이러한 방법들을 이용한 연구에서 암세포와 정상 세포를 비교한 바, 암세포에서 EGFR의 발현이 높이 증가됨을 보고하여 EGFR의 종양표지자로서의 가능성이 시사되었고 이를 발암현상에 연관하여 연구하게 되었다.[36]

외음부 편평상피 세포암 유래 세포주인 A431 세포에서 EGFR이 다량 발현됨이 보고되었는데, A-431 세포내의 EGFR은 전 세포단백질 양의 0.2%를 차지하며 다른 어떠한 세포나 조직에 비하여 EGFR의 양이 20 200배 정도 많은 것으로 알려져 있다.[5,41]

그 후, EGFR의 종양표지자(tumor marker)로서의 가능성을 알기 위하여 폐암, 유방암, 뇌종양, 위암 등에서의 EGFR 발현에 관한 연구들이 시행된 바 정상 조직에 비하여 EGFR이 증가됨이 확인되었다.[17,19,42-44] Hendler 등[17]은 폐암의 EGFR 발현에 관한 연구에서, 편평상피 세포암 11예 중 11예(100%) 모두 EGFR이 양성을 보였으나, 선암(adenocarcinoma), 소세포암(small cell carcinoma) 및 분류가 불가능한 암에 있어서는 EGFR의 양성률이 극히 낮아 EGFR이 편평상피 세포암에 있어서 뛰어난 종양표지물(tumor marker)이 될 수 있음을 시사하였다. 김과 이 등[24]의 연구에서도 자궁경부 편평상피 세포암 조직에서 EGFR의 양성률은 대조군에 비하여 유의하게 높았으나, 2예의 소세포암에서는 모두 EGFR의 발현이 음성인 연구 결과를 보고한 바 있다.

한편 유방암의 성장조절에 EGF와 EGFR이 관련되어 있어 EGFR이 존재하는 경우 재발률이 높으며,[45] 난소암에 있어서는 EGFR이 존재하는 경우 항암제에 대한 반응이 좋다는 연구 결과 보고도 있다.[46] 그러나 난소암에서 EGFR의 발현이 종양의 분화도나 병기(stage) 등과는 통계적으로 유의한 상관관계가 없다는 연구 결과도 보고되고 있다.[47]

최근 자궁경부암에서 EGFR의 발현과 암의 예후 사이에 어떠한 관계가 있을 것인지에 관한 연구 발표가 있었는데, 한 등[48]은 자궁경부암의 종양 크기가 3 cm 이상인 경우에 3 cm 이하일 때보다 EGFR의 발현이 유의하게 증가되어 있으며, 또 림프절 전이가 없을 때보다 림프절 전이가 있는 경우 유의하게 증가되어 있어 EGFR의 측정이 질환의 악성화 정도와 진행과정을 예측하는 데 도움이 될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. Kim 등[23]도 자궁경부암에서 EGFR level을 enzyme- linked immunosorbent assay를 이용하여 측정하였는데 환자의 나이, 폐경여부, 조직학적 세포유형, 임상 병기 등과는 유의한 상관관계가 없었으나 종양의 크기가 4 cm 이상인 경우에 4 cm 이하인 경우에 비하여 유의하게 높은 수치를 보였다고 한다. 또한 Kristensen 등[21]도 초기 자궁경부 편평상피 세포암에서 면역 조직화학적 방법으로 EGFR의 발현을 평가하는 것이 종양의 악성도(aggressiveness)를 예측 평가하는 데 유용한 도구가 될 수 있다고 하였다.

그러나 Scambia 등[49]은 EGFR의 발현이 stage III IV와 같은 진행된 암보다 stage I II와 같은 초기 암에서 더 높게 나타나며(median values; 7.8 fmol/ml protein for stage I II vs 4.2 fmol/ml protein for stage for III-IV, p=1.013), 예후인자 및 생존율, 무병생존율, 재발위험도 등과 EGFR level은 연관성이 없어, EGFR이 자궁경부암에서 예후인자로서의 역할을 하지 못한다고 발표하고 있다.

따라서 아직 EGFR의 예후인자로서의 역할에 대한 최종 판단을 내리기에는 앞으로 더 많은 연구 결과들이 필요하다고 생각되나, EGFR이 자궁경부 상피세포의 악성화(malignant transformation)와 자궁경부암발생(tumorigenesis)과 밀접한 연관성이 있다는 사실은 의심이 없이 받아들여지고 있다.[23,24,48,50,51]

Hunts 등[18]은 편평상피암 세포에서 EGFR의 발현이 증가되는 것은 EGFR 유전자가 증폭되어 EGFR의 생성이 증가하기 때문이라고 하였으며, 이는 암

유전자(oncogene)가 증폭되어 암유전자 산물이 증가하는 원리와 같을 것이라 하였다. 이를 뒷받침하는 것으로 EGFR이 AVE-H(Avian erythroblastosis virus의 strain)의 v-erb-B oncogene과 구조적으로 70% 정도 homology를 지님이 보고된 바 있다.[9] 그러나 v-erb-B oncogene은 EGF와 결합하지 않음이 밝혀져 EGFR의 발현은 v-erb-B oncogene보다는 ras 또는 myc oncogene의 표현과 더 관련이 있을 것이라 생각되고 있다.[36]

김과 이[24]의 연구에서 상피내암은 EGFR의 면역조직화학적 염색에서 80%의 양성률을 보였으며, 미세침윤성암은 71.4%, 침윤성암은 80%로 대조군인 정상 자궁경부에서 16.7%, 자궁경부 이형상피증에서 60%에 비하여 유의하게 더 높은 양성률을 보여, 악성화된 자궁경부 편평상피암 세포에서 EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색반응은 유의하게 증가한다고 하였는데, 본 연구에서도 정상 자궁경부 조직, CIN, 침윤성 자궁경부암으로 진행되면서 조직내 EGFR의 면역염색반응은 유의하게 증가함을 보였다.

Gullick 등[36]은 난소암, 외음부암, 자궁경부암 등 10예를 대상으로 EGFR 발현에 관한 연구를 시행한 바 2예의 자궁경부 편평상피 세포암 모두에서 EGFR 양성임을 발표하였으며, EGFR 발현의 증가와 자궁경부 상피세포의 악성화는 상관관계가 있다고 한 Yamasaki 등[50] 및 Rha 등[52]의 연구 결과는 본 연구의 결과와 서로 부합되는 결과를 보이고 있다.

EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색상, 암세포에서도 염색반응이 음성으로 나오는 원인에 대하여 Yasui 등[53]은 위선암(gastric adenocarcinoma)을 대상으로 한 실험에서 EGFR의 양성률이 낮은 것은 선암에 있는 EGFR의 이질성에 기인할 수 있을 것이라고 하였다. 그러나 본 연구에서는 자궁경부의 선암을 연구 대상으로 포함하지 않았으며, 침윤성암에서 면역 조직화학적 염색상 염색반응이 음성으로 나온 예는 한 예도 없었다.

최근 Choi 등[25]은 위암환자의 혈청에서 ELISA를 이용하여 EGFR ECD(extracellular domain)의 농도를 측정하여 분석한바 위암환자에서 정상인에 비하여 유의하게 혈청 EGFR의 농도가 높았으며(681±226 fmol/ml vs 440±46 fmol/ml; $p<0.0001$), 위암환자의 77.5%에서 EGFR의 농도가 cutoff value(정상 대조군 평균+2SD 이상)보다 높게 나타나, 위암환자의 진단, 예후의 판단, 수술 후 환자의 추적, 항암요법에 대한 반응의 평가 등에 EGFR의 농도가 이용될 수 있는 가능성을 발표하였다. Yoshida 등[44]에 의하면 EGFR 유전자가 증폭(amplification)된 미분화(poorly differentiated) 위암에서 EGFR 유전자의 발현이 증가됨을 보이며 동시에 EGFR 및 EGF의 immunoreactivity가 강하게 나타난다고 하였다. 따라서 자궁경부암과 같은 부인암에서도 혈청 EGFR의 예후인자로서 역할 가능성에 대한 연구가 반드시 필요하다고 생각된다. 그러나 아직까지 자궁경부 종양 환자에서 혈청 EGFR의 발현 양상에 관한 연구는 국내외적으로 보고된 바 없었으며, 더욱이 혈청 EGFR 농도와 자궁경부 종양 조직에서의 EGFR 발현과의 상관관계를 분석한 연구는 시도된 바가 없었다.

본 연구의 결과로 볼 때, EGFR은 정상 자궁경부의 상피에도 존재하고 있음을 알 수 있으며, 자궁경부 상피 조직의 EGFR 발현의 증가는 자궁경부 상피세포의 악성화(malignant transformation)와 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

한편 통계적인 유의한 차이는 보이지 않았으나, 침윤성암 환자에서 정상 또는 CIN 환자보다 혈청 EGFR의 농도가 높고, 면역 조직학적 염색반응도에 따른 혈청 EGFR 농도도 음성(-)인 경우보다 양성(++)/강양성(+++)의 경우 혈청 EGFR이 높게 발현됨을 볼 때, 본 연구에서 연구 대상자 수가 적었던 관계로 통계적으로 유의한 차이가 없게 나왔을 가능성이 있다고 생각되며, 조직 EGFR의 면역 조직화학적 염색반응도처럼 혈청 EGFR도 자궁경부암에서 종양표지물로서의 역할을 할 가능성이 매우 크다고 판단된다.

따라서 앞으로 더 많은 예를 대상으로 본 연구를 지속하고, 나아가 자궁경부암 환자에서 여러 예후적 인자(prognostic parameter)들과 혈청 EGFR 농도와의 상관관계 분석이 이루어져야 할 것이다.

Ⅴ. 결 론

저자는 이화여자대학교 부속 목동병원 산부인과에서 자궁경부암으로 진단된 환자 18예(미세침윤성 편평상피 세포암: 3예, 침윤성 편평상피 세포암: 15예)와 자궁경부 상피내종양(CIN)으로 진단된 환자

24 예(CIN Ⅰ: 6예, CIN Ⅱ: 3예, CIN Ⅲ: 15예)를 대상군으로 하고, 양성 질환으로 전자궁적출술을 받고 정상 자궁경부 조직임이 진단된 환자 9예를 대조군으로 하였다. 이 중 자궁경부 조직의 EGFR 발현을 보기 위한 면역 조직화학적 염색은 자궁경부 상피내종양 1예, 침윤성암 2예를 제외한 총 48예에서 시행하였으며, 혈청 EGFR 농도의 측정은 대조군 환자 5예, CIN 환자 17예, 침윤성암 환자 14예에서 측정하여 예비적 연구 결과를 아래와 같이 얻었다.

1) 정상 자궁경부에서 EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색반응은 음성(-)이 33.3%(3/9), 양성이 66.7%(6/9)였다. 면역 조직화학적 염색반응이 양성인 경우, 기저층 세포에서 주로 양성 반응을 보였다.

2) CIN에서 EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색반응은 음성(-)이 21.7%(5/23), 약양성이 21.7% (5/23), 양성(++)이 30.4%(7/23), 강양성(+++)이 26.1%(6/23)이었다. 양성 반응은 기저층 세포와 중간상피층 세포 및 이형성 병변 부위에서 주로 보였으며, CIN에서 강양성(+++)을 보인 6예는 모두 상피내암이었다.

3) 침윤성암에서 EGFR에 대한 면역 조직화학적 염색반응은 음성(-)이 0.0%(0/16), 약양성(+)이 18.8%(3/16), 양성(++)이 43.8%(7/16), 강양성(+++)이 37.5%(6/16)였으며, 미세침윤성암에서는 강양성(+++)이 없었다.

4) 자궁경부의 조직학적 진단에 따른 혈청 EGFR의 평균농도를 보면 정상:23.18±1.92 fmol/ ml, CIN: 23.49±8.95 fmol/ml, 침윤성암: 30.46±19.72 fmol/ml로, 정상과 CIN 사이에 차이는 없으며, 침윤성암에서 정상 및 CIN보다 높았다. 그러나 통계적으로 그룹간에 유의한 차이는 없었다(p=0.471).

5) 면역 조직화학적 염색반응의 강도에 따른 혈청 EGFR의 평균 농도를 보면, 음성(-): 19.36±3.12 fmol/ml, 약양성(+):20.99±3.59 fmol/ml, 양성(++): 29.08±16.86 fmol/ml, 강양성(+++): 24.34±10.35 fmol/ml로 양성(++) 및 강양성(+++)에서 음성(-)의 경우보다 농도가 높았으나 역시 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.450).

본 예비적 연구 결과로 볼 때, 자궁경부 종양 조직에서 EGFR의 발현은 정상 조직에 비하여 유의하게 증가되어 있으며, 정상 조직, CIN, 침윤성암으로 진행되면서 조직의 EGFR 발현은 통계적으로 유의하게 증가됨(p=0.009)을 볼 때, 자궁경부 조직에서 EGFR의 발현도는 자궁경부 상피세포의 악성화(malignant transformation)를 반영하는 지표로서 이용될 수 있을 것이다.

한편 통계적 유의한 차이는 없었으나, 침윤성암 환자에서 정상 또는 CIN에서보다 혈청 EGFR의 농도가 높았으며, 면역 조직학적 염색반응이 음성(-)인 경우보다 양성(++)/강양성(+++)인 경우 혈청 EGFR이 높게 발현됨을 보였다. 본 예비적 연구에서 연구 대상자 수가 적었던 것을 고려할 때, 자궁경부 종양에서 혈청 EGFR은 조직의 EGFR 발현도처럼 하나의 종양표지물로서의 역할을 할 가능성이 매우 높다.

따라서 향후 더 많은 예를 대상으로 본 연구를 지속하고, 자궁경부암의 예후인자(prognostic parameter)들과 혈청 EGFR과의 상관관계를 분석함이 요구된다.

- References-

1. Cohen S: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the Newborn animal. J Biol Chem 1962; 237:1555-65.
2. Cohen S: Carpenter G. Human epidermal growth factor: Isolation and chemical and biological properties. Proc Nat Acad Sci USA 1975;72:1317-21.
3. Carpenter G: The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. Mol Cell Endocrinol 1983;31:1-19.
4. Cohen S: The epidermal growth factor(EGF). Cancer 1983;51:1787-91.
5. Merlino GT, Xu YH, Ishii S et al: Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. Science 1984;224:417-9.
6. Carpenter G, Zendegui JG: Epidermal growth factor, its receptor and related proteins. Exp Cell Res 1986;164:1-10.
7. Carpenter G: Receptors for EGF and other polypeptide mitogens. Ann Rev Biochem 1987; 56:881-91.
8. Yarden Y, Ullrich A: Growth factor receptor tyrosine kinase. Annual Rev Biochem 1988;57:443-78.
9. Downward J, Yardan Y, Mayes E et al: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. Nature 1984; 307:521.
10. Kondo I, Shimizu N: Mapping of the human EGFR on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. Cytogenet Cell Genet 1983;35(1):9-7.
11. Torado GJ, Fryling C, De Larco JE: Transforming

growth factor produced by certain tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:5258-62.
12. Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C et al: A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. J Biol Chem 1982;257:1523-31.
13. Chen WS, Lazar CS, Poenie M et al: Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. Nature 1987; 328:820-3.
14. Cohen S, Carpenter G, King L: Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interaction. J Biol Chem 1980;258:4834-42.
15. Schreiber AB, Libermann JA, Lax I et al: Biological role of epidermal growth factor-receptor clustering. J Biol Chem 1983;258:846-53.
16. Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A et al: Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. CRC Crit Rev Biochem 1983;14:93-111.
17. Hendler FJ, Ozanne BW: Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. J Clin Invest 1984;74:647-51.
18. Hunts J, Udea M, Ozawa S et al: Hyperproduction and gene amplification of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinomas. Jpn J Cancer 1985;76:663-6.
19. Sainsbury JRC, Farnon JR, Needham CK et al: Epidermal growth factor of early recurrence of and death from breast cancer. Lancet 1987;20:1398-402.
20. Pfeiffer D, Stellwag B, Pfeiffer A et al: Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 1989;33:146-50.
21. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM et al: Evaluation of the prognostic significance of cathesin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. Cancer 1996;78(3):433-40.
22. Kimmig R, Pfeiffer D, Landsmann H et al: Quantitative determination of the epidermal growth receptor in cervical cancer and normal cervical epithelium by 2-color flow cytometry: evidence for down-regulation in cervical cancer. Int J Cancer 1997;74(4):365-73.
23. Kim JW, Kim YT, Kim DK et al: Expression of epidermal growth factor receptor in carcinoma of the cervix. Gynecol Oncol 1996;60(2):283-7.
24. **김승철, 이효표. 자궁경부암에 있어 표피성장 인자 수용체의 발현에 관한 면역 조직화학적 연구. 대한산부회지** 1990;33(11):1495-504.
25. Choi JH, Oh JY, R SK et al: Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of gastric carcinoma patients. Cancer 1997;79(10):1879-83.
26. Partanen R, Hemminki K, Koskinen H et al: The detection of increased amounts of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor in serum during carcinogenesis in asbestosis patients. J Occup Med 1994;36:1324-8.
27. Hunter EJ, Cooper JA: Protein tyrosine kinase. Am Rev Biochem 1985;54:897-902.
28. Savage CR, Inagami T, Cohen S: The primary structure of epidermal growth factor. J Biol Chem 1972; 247:7612-21.
29. Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S: Epidermal growth factor: physical and chem -ical properties. J Biol Chem 1972;247:5928-34.
30. Adamson ED, Rees AR: Epidermal growth factor receptors. Mol cell Biochem 1981;34:129-52
31. Ushiro H, Cohen S: Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor activated protein kinase in A431 cell membranes. J Biol Chem 1980; 255:8363-5.
32. Haigler H, Ash JF, Singer SJ et al: Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. Proc Natl Acad Sci USA 1978;75:3317-21.
33. Haigler HT, McKanna JA, Cohen S et al: Direct visualization on of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431.J Cell Biol 1979;81:382-95.
34. Battaglia F, Scambia G, Pacini PB et al: Epidermal growth factor receptor expression in gynecological malignancies. Gynecol Obstet Invest 1989;27:42-4.
35. Kohler M, Janz I, Wintzer HO et al: The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. Anticancer Res 1989;9:1537-47.
36. Gullick WJ, Marsden JJ, Whittle N et al: Expression of epidermal growth factor receptors on human cervical, ovarian, and vulval carcinoma. Cancer Res 1986;46:285-92.
37. Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A et al: Expression of epidermal growth factor receptor and Her-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. Obstet Gynecol 1990;76:381-7.
38. Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaki T et al: Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. Gyncol Oncol 1991;40:147-51.
39. Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ et al: Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma. J Clin Pathol 1993;46:149-53.
40. vanDem PA, Lowe DG, Watson JV et al: Multiparameter flow-cytometric quantitation of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 oncoprotein in normal and

neoplastic tissues of the female genital tract. Gynecologic Oncol 1991;42:256-64.
41. Stoscheck CM, Carpenter G: Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A-431 cells. J Cell Physiol 1984;120:296-306.
42. Cerny T, Barnes DM, Hasleton P et al: Expression of epidermal growth factor receptor(EGF-R) in human lung tumors. Br J Cancer 1986;54:265-9.
43. Veale D, Ashcroft T, Marsh C et al: Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 1987;55:513-6.
44. Yoshida K, Tsuda T, Matsumura T et al: Amplification of epidermal growth factor receptor(EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1989;57(5):285-90.
45. Fitzpatrick SL, Brightwell J, Wittliff JL et al: Epidermal growth factor by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progestin receptor levels. Cancer Res 1984;44:3448-53.
46. Bauknecht T, Rounge M, Schwall M et al: Occurrence of epidermal growth factor receptors in human adnexal tumors and their prognostic value in advanced ovarian carcinomas. Gynecol Oncol 1988;29:147-57.
47. Owens OJ, Stewart C, Brown I et al: Epidermal growth factor receptors(EGFR) in human ovarian cancer. Br J Cancer 1991;64(5):907-10.
48. 한구택, 이형근, 유원순. 자궁경부 종양에서 p53, proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA), c-myc 및 Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)의 발현. 대한산부회지 1997;40(1):2680-90
49. Scambia G, Ferrandina G, Distefano M et al: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is not related to the prognosis of cervical cancer. Cancer Lett 1998;123 (2):135-9.
50. Yamasaki M, Mauro T, Akahori T et al: Immunohistochemical studies on epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Acta Obstet Gynaec Jpn 1988;40:51-61.
51. Ruck and Paulie: The epidermal growth factor receptor is involved in autocrine growth of human bladder carcinoma cell lines 1997;17(3c):1925-31.
52. Rha KH: A study on the expression of the epidermal growth factor receptor in the malignant lesions of the uterine cervix. 1989(A thesis for Phd).
53. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J et al: Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. Cancer Research 1988;48:137-41.