

자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과학교실, 불임연구실*, 병리학교실**

한양대학교 의과대학 해부학교실***

김태진 · 김정욱* · 김혜선** · 전이경** · 백두진*** · 임경택 · 정환욱 ·

이기현 · 박인서 · 박종택 · 심재욱

=Abstract=

Association Between Apoptosis and Development of the Cervical Neoplasia

Tae Jin Kim, M.D., Jeong Wook Kim, M.D.,* Hye Sun Kim, M.D.,**

Yi Kyeong Chun, M.D.,** Doo Jin Paik, M.D.,*** Kyung Taek Lim, M.D.,

Hwan Wook Jung, M.D., Ki Heon Lee, M.D., In Sou Park, M.D.,

Chong Taik Park, M.D., Jae Uk Shim, M.D.

Department of Obstetrics & Gynecology, Infertility Research Laboratory, Department of Pathology,**
Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University School of Medicine.*

*Department of Anatomy,*** College of Medicine, Hanyang University*

Apoptosis, including the programmed cell death, is important event in normal cell turnover and maintenance of adult tissues. Apoptosis exerts a homeostatic function in relation to tissues dynamics, as the steady state of continuously renewing tissues achieved by a balance between cell replication and cell death.

This study was undertaken to investigate the association between apoptosis and development of the cervical neoplasia.

Archival cervical samples from normal epithelium (n = 10), low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL, n = 10), high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL, n = 10), microinvasive squamous cell carcinomas (n = 10), and invasive squamous cell carcinomas (n = 10) were evaluated for apoptosis. We used in situ end-labeling of DNA strand breaks by terminal deoxynucleotidyltransferase incorporation of biotinylated deoxyuridine to 3-OH ends of DNA, identified by nickel-avidine-peroxidase. The apoptotic index (sum of apoptotic bodies divided by the total nuclei times 100) significantly decreased ($P < 0.05$) as the degree of neoplasia increased: 3.1 ± 0.9 % in normal epithelium, 5.5 ± 1.4 % in LSIL, 1.6 ± 0.4 % in HSIL, 1.9 ± 0.5 % in microinvasive carcinomas, and 0.6 ± 0.3 % in invasive carcinomas. Compared to normal epithelium, the total cell number per 200x field increased significantly ($P < 0.05$): 379 ± 47 in normal epithelium, 462 ± 228 in LSIL, 670 ± 293 in HSIL, 1035 ± 254 in microinvasive carcinomas, and 1389 ± 247 in invasive carcinomas.

Consequently, these results suggest that progression of cervical carcinogenesis is associated with a decrease in apoptotic index and an increase in the number of the total cell.

Key words: Apoptosis, Apoptotic Index

I. 서론

세포자연사(apoptosis)라는 용어는 세포 수를 조절하는 과정에서 유사분열(mitosis)에 반대되는 개념으로, 생물의 성장과정중에서 자연적으로 일어나는 현상으로 인식되었으나^{1,4)}, 세포자연사의 정확한 기전에 대해 밝혀진 바가 거의 없었으며 다만 세포의 괴사(necrosis)과정과 형태적으로만 다르게 일어나는 것으로 알려졌다. 그 후 Kerr 등⁵⁾이 세포자연사는 괴사로 인한 세포사망과는 다르게 주위조직에 염증을 일으키지 않으며, 세포의 핵에서 염색질(chromatin)이 치밀해지면서 핵막에 작은 덩어리들이 형성되고, 세포질이 농축되면서 세포 표면이 들쭉거리며 꽃가루 모양 돌기들을 형성한다고 발표하였다. 이런 꽃가루 모양 돌기들이 떨어져나와 세포자연사 응축체(apoptotic body)가 만들어지게 되며, 이러한 세포소멸과정을 고대 그리스어로 나뭇잎이 나무에서 떨어진다는 의미를 갖는 “세포자연사 (Apoptosis)”라고 명명하였다. 또한 이러한 세포소멸과정은 여기저기에 흩어져 있는 독립적인 세포에서 일어나지만 매우 급격하게 일어나기 때문에 쉽게 관찰할 수 없다고 보고하였다.

정상적인 성인 조직에서는 조직의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여 세포자연사와 세포의 증식(cell proliferation)이 상호작용을 하고 있으며⁶⁾, 종양의 경우에서도 종양의 성장을 조절하기 위하여 세포자연사와 세포의 증식이 상호작용을 하고 있다⁷⁾. 암의 발생과정은 여러 가지 복합적인 기전이 작용하는데 특히 유전학적으로는 암유전자(oncogenes)와 암억제유전자(tumor suppressor genes)의 역할에 의하여 세포의 증식과 소멸이 변화를 일으키게 된다. 이러한 유전학적인 기능의 장애는 정상적으로는 소멸되어야 할 손상된 세포들의 수명이 연장되고 결국에는 종양으로 발전하게 된다⁸⁻¹¹⁾. 이때 암세포가 될 가능성이 높은 세포에서 세포자연사 활성화(apoptotic activity)의 소실은 암화과정에 영향을 미치게되며, 세포자연사의 활성화는 암세포로의 전환을 예방할 수 있게 된다.^{12,13)}

자궁경부암은 한국에서 여성 생식기의 악성 종양 중에서 발생빈도가 가장 높다. 또한 자궁경부암의 발생단계는 저등급 상피내병변에서부터 상피내암

(carcinoma in situ)을 거쳐 침윤성암으로 발전하며, 저등급 상피내병변 환자를 치료하지 않을 때 1-5%는 결국 침윤성암으로 발전하고,^{14,15)} 상피내암의 경우는 일정기간 추적조사시 70-80%가 침윤성암으로 발전한다는^{16,17)} 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 그러나 이러한 역학적 증거에도 불구하고 각 진행단계에대한 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

이에 저자는 자궁경부암의 발암과정의 단계별 조직에서 면역조직화학적 in situ hybridization기술을 이용하여, 자궁경부암의 발암과정에서 세포자연사의 연관성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 대상 및 방법

1. 실험대상

실험대상은 성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과 외래를 방문하여 원추생검을 시행하였던 환자 중에서 조직학적으로 증명된 정상 자궁경부상피세포(normal cervical epithelium)에서부터 저등급 상피내병변(low-grade intraepithelial lesion), 고등급 상피내병변(high-grade intraepithelial lesion), 미세침윤암(microinvasive carcinomas), 침윤암(invasive carcinomas) 등 각각 10예를 대상으로 하였다.

2. TUNEL 방법에 의한 in situ 세포자연사 판정

원추생검으로 얻은 자궁경부조직을 즉시 10% 중성 포르말린에 고정한 후 자궁경부조직을 12시 방향으로 열어 0.2-0.3cm 두께로 자른 후 파라핀에 포매한다. 파라핀에 포매된 조직을 4-5 μ m 두께로 블록당 3매를 연속 절편하여 슬라이드에 붙인 후 1장은 hematoxylin-eosin염색을 하였고, 2장은 세포자연사를 확인하기 위하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end-labeling (TUNEL) 방법에 의한 in situ apoptosis detection kit (ApopTag; ONCOR USA)를 사용하였다. 먼저 xylene으로 파라핀을 제거하고 Tris buffer (pH 7.6)로 세척한 후 세포에 내재하는 peroxidase를 중화시키기 위해 상온에서 3% H₂O₂가 포함된 methanol에 30분간 처리한 후 ApopTag kit에 포함되어 있는 equilibration buffer로 15분간 처리한 다음 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (TdT)을 첨가한

후 37℃에서 90분간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위하여 반응정지 완충액을 상온에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 3회 세척하였다. 이후 anti-digoxigenin-peroxidase로 37℃에서 30분간 처리한 후 Tris buffer로 세척하고 diaminobenzidine (DAB, 0.1% in PBS)와 0.002% H₂O₂가 포함된 용액으로 10분간 발색시켰다. 발색이 된 조직은 증류수로 세척하고 0.5 % methyl green으로 30분간 대조염색을 시행하였다. 이후 alcohol series를 거쳐 탈수한 후 xylene으로 투명화 시키고 Permount로 봉입하였다. ApopTag kit로 염색된 세포들은 광학현미경하에서 200배율로 세포자연사가 진행중인 세포의 수를 세었으며, 1개의 slide에서 가장 많이 농축된 부위를 5군데씩 선정하여 세포자연사 빈도를 조사하였다. 즉, 100개의 세포당 염색된 세포의 수를 계산하여 세포자연사지수 (Apoptotic Index)로 표시하였다. 통계처리는 student t-test를 이용하였으며 P값이 0.05이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 하였다.

*세포자연사지수(AI)=(세포자연사 용축체/전체 상피세포층내의 핵) x 100

III. 결 과

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과에 내원하여 원추생검을 시행하였던 환자 중에서 조직학적으로 증명된 정상 자궁경부상피조직에서부터 침윤성 자궁경부암까지 각 발전단계의 파라핀 조직을 이용하여 DNA in situ hybridization법에 의해 세포자연사를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Hematoxylin-Eosin 염색조건

정상 자궁경부상피세포층은 기저막에서부터 기저세포층, 부기저세포층, 중간세포층, 표피세포층으로 구성되었다. 기저세포층은 단층 혹은 이중층으로 구성되며 핵은 둥글고 농축된 염색질을 지니며 세포질은 열게 염색되었다. 부기저세포층은 기저세포층의 바로 위에 존재하며 기저세포보다 핵이 약간크고 염색질은 약간 열게 염색되었다. 중간세포층은 부기저세포층의 위에 존재하며 핵은 작고 세포질은 풍부하며 선명하게 염색되었다. 표피세포

층은 가장 위에 존재하며 핵은 작고 둥글며 농축되어있었고 세포질에는 glycogen을 함유하고 있기 때문에 투명하게 염색이 되었다(Fig. 1A). 저등급 상피내병변은 상피세포층이 정상 자궁경부 상피층보다 두꺼워지며 상층 1/3부위에 koilocyte가 많이 분포하고 있었으며, 중간세포층보다 핵은 진하고 2-3배정도 커지고 핵막은 약간 불규칙적으로 변하며 핵주위에 공동화현상(perinuclear halo)이 보였다(Fig. 2A). 고등급 상피내병변은 핵의 모양과 크기가 불규칙적이며 전체 상피세포층에 분포하였다(Fig. 3A). 미세침윤암에서는 핵은 미분화되고 세포질은 호산성이 감소하며 세포들은 기저막을 침윤하여 기질내에 존재하게되며 간혹 세포 분열하는 모습도 관찰되었다(Fig. 4A). 침윤암에서는 핵은 농축되고 핵인은 뚜렷하게 보이며 분열하는 세포들이 많이 보였다(Fig. 5A)

Fig 1A. Normal squamous epithelium of the exocervix (hematoxylin-eosin, x 200) Mature squamous epithelium of the exocervix demonstrating a normal maturation sequence from basal cells to superficial cells. The basal cell layer is 1 to 2 cells thick, and the cells composing this layer have rather scant cytoplasm and oval to cuboidal nuclei with dense chromatin. The cells immediately above the basal layer are parabasal cells which are somewhat larger than the basal cells, and the nuclei have slightly less dense chromatin. The intermediate cells above the parabasal cells have somewhat smaller vesicular nuclei and more abundant cytoplasm with finely granular or clear appearance. The superficial cells contain small, rounded, regular pyknotic nuclei and their cytoplasm are abundant and clear. The cleared cytoplasm indicates glycogen storage.

Fig 1B. Topography of the apoptotic cells in the normal exocervix. Apoptotic cell(arrow). (immunoperoxidase, x 200)

Fig 2B. Topography of the apoptotic cells in the LSIL. Apoptotic cell(arrow). (immunoperoxidase, x 200)

Fig 2A. Low-grade squamous intraepithelial lesion (hematoxylin-eosin x 200) Thickened squamous epithelium shows koilocytotic change in most of the cells in superficial third of the epithelium. The nuclei are somewhat hyperchromatic and irregular and are surrounded by exaggerated perinuclear halo. Cells with decreased size and chromatin condensation are seen.

Fig 3A. High-grade squamous intraepithelial lesion (hematoxylin-eosin x 200) Maturation is absent and nuclear abnormalities including size, shape and chromatin are marked throughout all of the thickness of the epithelium. There are few small cells with more eosinophilic cytoplasm and condensed chromatin, which suggests apoptosis.

2. 세포자연사 관찰소견

정상 자궁경부의 편평상피세포에서는 세포자연사가 진행중인 세포가 전체 상피세포층에 고루 분포하였으며(Fig. 1B), 상피세포의 수는 0.3mm^2 당 379 ± 47 개, 세포자연사 세포수는 11.7 ± 3.8 개, 세포자연사지수는 $3.1 \pm 0.9\%$ 였다(Table 1). 저등급 상피내병변에서의 세포자연사가 진행중인 세포는 대부분 중간층에 위치하였으나 간혹 기저층이나 상층에서 관찰되기도 하였고(Fig. 2B), 상피세포의 수는 0.3mm^2 당 462 ± 228 개, 세포자연사 세포수는

23.0 ± 7.0 개, 세포자연사지수는 $5.5 \pm 1.4\%$ 이었다(Table 1). 고등급 상피내병변에서의 세포자연사 세포는 전체 상피세포층에 고루 분포하였으며(Fig. 3B), 상피세포의 수는 0.3mm^2 당 670 ± 293 개, 세포자연사 세포수는 9.8 ± 2.6 개, 세포자연사지수는 $1.6 \pm 0.4\%$ 이었다(Table 1). 미세침윤암이나 침윤암에서의 세포자연사 세포는 일정한 배열이 없이 중앙 전체에서 골고루 일어나고 있었으며(Fig. 4B, 5B), 각각의 상피세포의 수는 0.3mm^2 당 1035 ± 254 개와 1389 ± 247 개, 세포자연사 세포수는 20.4 ± 8.9 개와 8.5 ± 3.7 개, 세포자연사지수는 $1.9 \pm 0.5\%$

Fig 3B. Topography of the apoptotic cells in the HSIL.
Apoptotic cell(arrow). (immunoperoxidase, x 200)

Fig 4B. Topography of the apoptotic cells in the
microinvasive squamous cell carcinoma.
Apoptotic cell(arrow). (immunoperoxidase, x 200)

Fig 4A. Microinvasive squamous cell carcinoma
(hematoxylin-eosin x 200). All layers of the
epithelium are replaced by the abnormal
squamous cells demonstrating frequent mitotic
figures. A cell with decreased eosinophilic
cytoplasm and condensed chromatin is also
seen.

Fig 5A. Invasive squamous cell carcinoma
(hematoxylin-eosin x 200) Invasive nests of
squamous cell carcinoma reveal crowded
vesicular nuclei with chromatin clumping and
nucleoli. Mitotic figures are numerous and cells
with condensed chromatin are seen.

와 $0.6 \pm 0.3\%$ 이었다(Table 1). 정상 자궁경부상피 세포에서부터 침윤암으로 진행할수록 전체 상피세포수는 증가하였고, 정상 자궁경부세포와 저등급 및 고등급 상피내병변에서의 전체 상피세포수의 증가는 통계적인 유의성은 없었으나, 미세침윤암과 침윤암에서의 전체 상피세포수의 증가는 통계학적인 유의성이 있었다(Table 1). 저등급 상피내병변을 제외한 정상 자궁경부상피세포에서부터 침윤암으로 진행할수록 세포자연사지수(apoptotic index)는 통계적인 유의성이 있게 현저히 감소하였다.(Table 1)

IV. 고 찰

일반적으로 세포자연사는 세포괴사 과정과는 여러 가지 면에서 다른 특징을 나타낸다. 세포괴사 과정이 진행되는 세포는 초기에는 세포질과 세포내의 소기관들, 특히 미토콘드리아가 부풀어오르고 핵의 변화는 미미하다. 그 후에 세포내 소기관들과 세포막이 파괴되면서, 그 내용물들이 세포 밖으로 빠져 나오게 된다. 이러한 형태적인 변화는 세포막의 선택 투과성 조절기전에 이상이 생겨 발생하는 것이다.¹⁸⁾ 그러나 세포자연사 과정의 초기에는 세포사

Table 1. Cell number per 0.3mm² and apoptotic index related to cervical histology

Cervical histology	Cell no. per 0.3mm ²	No. of apoptotic cells	Apoptotic index
Normal	379 ± 47 a	11.7 ± 3.8	3.1 ± 0.9 a
LSIL*	462 ± 228 a	23.0 ± 7.0	5.5 ± 1.4 b
HSIL**	670 ± 293 a,b	9.8 ± 2.6	1.6 ± 0.4 c
Microinvasive cancer	1035 ± 254 b	20.4 ± 8.9	1.9 ± 0.5 c
Invasive cancer	1389 ± 247 c	8.5 ± 3.7	0.6 ± 0.3 d

Values are showed as mean ± SD

* : Low-grade intraepithelial lesion

** : High-grade intraepithelial lesion

a,b,c,d Means within columns with different superscripts differ (P < 0.05)

이의 연결통로(cell junction)나 미세융모(microvilli) 등과 같은 세포막으로 둘러싸인 구조물들이 없어지면서, 세포내에서 세포액이나 이온들이 유출되어 세포질의 응축이 일어나고 핵내의 염색질들이 몇 개의 덩어리로 모인 후 핵이 여러 개의 절편으로 쪼개진 후 세포는 표면이 매끄러운 막으로 둘러싸인 몇 개의 세포자연사 응축체(apoptotic body)로 나누어진다.^{19,20)} 이러한 세포자연사 응축체에는 완전한 형태의 세포내 소기관들과 약간의 핵 절편들이 포함되어 있으며 이웃하고 있는 세포들의 식작용에 의해 잡혀 먹히게 되는데, 이러한 식세포들은 mononuclear-phagocyte system 중의 일부이거나 정상적인 상피세포, 내피세포, 중양세포들이다.²¹⁾ 응축체들은 식작용을 자극하여 식작용 후에 세포질에서 빠르게 분해되는데 이러한 과정은 매우 빨라서 수분 내에 일어나는 것으로 알려져 있으며,²²⁾ 다양한 형태의 응축체들이 탐식되기전 수시간정도 관찰된다고 보고하였다.²³⁾

세포자연사 과정에서 생화학적 변화는 형태적인 변화보다 먼저 일어난다. 즉, 양이온 의존적인 핵산 분해효소가 활성화되는 것이다. 이러한 핵산분해효소의 활성화는 특정한 유전자의 전사나 단백질 합성과는 관계없이 일어나는 것으로 알려져 있으며, 규칙적으로 유전자(DNA)를 절단함으로써 DNA는 180-200 bp 크기의 절편을 형성하게 된다.²⁴⁾ 따라서 이것을 agarose gel 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하면 여러 개의 DNA 분절들이 사다리꼴로 보이는 것을 관찰할 수 있으며, 세포괴사는 무작위적인 DNA 분절화로 인해 전기영동 후에 도말양상을 보이기 때문에 세포자연사에서 일어나는 DNA 분절화양상과 뚜렷하게 구분되어 세포자연사

Fig 5B. Topography of the apoptotic cells in the invasive squamous cell carcinoma. Apoptotic cell(arrow). (immunoperoxidase, x 200)

의 가장 큰 특징이 된다.^{25,26)}

세포자연사의 분자생물학적 기전은 새로운 유전자의 활발한 전사과정을 필요로 한다. 오늘날 여러 동물의 다양한 조직에서 세포자연사를 조절하는 bcl-2, interleukin-1 β -converting enzyme, wild-type p53, Rb gene, c-myc gene 등의 유전자들이 많이 발견되었다. 이들 중 어떤 것들은 세포자연사의 활성화를 위해 필수적인 것들도 있으며 어떤 것들은 그 특유의 기능을 잃어버릴 경우 세포의 소멸을 억제하는 기능을 하기도 한다.^{6,27-31)}

자궁경부중양의 세포자연사와 다른 충실성중양의 세포자연사를 비교하기는 어려운데 그 이유는 다른 충실성중양에서는 전암단계(precancerous lesion)와 침윤암의 단계가 명확히 구분되기 어렵기 때문이다. 현재 발표된 예로는 전립선암의 경우에 양성증식증(benign hyperplasia)부터 침윤암으로 이행하면서 세포자연사지수(apoptotic index)가 증가하며,

특히 예후가 나쁠수록 세포자연사지수가 높다고 보고하였다^{32,33)}. Todd 등³⁴⁾은 renal cell carcinoma에서 tumor grade와 stage가 나쁠수록 세포증식지수(proliferative index)와 세포자연사지수가 증가하며, 이것은 renal cell carcinoma의 예후를 예측하는데 도움이 된다고 발표하였다. Lipponen 등³⁵⁾은 방광암에서도 세포자연사지수가 유사분열지수(mitotic index), tumor grade, DNA aneuploidy 등과 연관성이 있다고 보고하였다. Leoncini 등³⁶⁾은 non-Hodgkin's lymphoma에서도 세포분열지수와 세포자연사지수는 연관성이 있다고 보고하였으며, 특히 high-grade lymphoma가 low-grade lymphoma보다 치료전의 세포자연사의 정도가 심하고 생존율도 나쁜 것으로 보고하였다.

그러나 전립선암과는 다르게 Bedi 등¹³⁾은 정상 대장상피, 선종상피 및 대장암상피를 각 군으로 하여 세포자연사를 조사한 결과 정상 상피보다 암으로 발전함에 따라 세포자연사가 억제되고 있는 현상을 보고하였다. Radinsky 등³⁷⁾은 세포자연사의 정도가 낮은 암세포는 폐 전이의 빈도가 많아진다고 보고하였으며, 세포자연사의 기전의 소실은 암세포가 심한 손상을 받아 더욱 예후가 불량한 상태로 진행한다고 보고하였다. 본 연구에서는 저등급 상피내병변을 제외한 정상 자궁경부상피세포에서부터 침윤암으로 진행할수록 세포자연사지수(apoptotic index)는 현저히 감소하여 Bedi 등¹³⁾의 보고와 유사하였다.

항암치료나 방사선치료는 암세포의 세포자연사를 유발시키며 이것은 암세포의 성장과 미세전이(micrometastasis)를 억제한다.^{38,41)} 항암치료제로는 Retinoids³⁸⁾와 5-FU³⁹⁾가 세포의 성장억제뿐만 아니라 세포의 자연사도 유발시킴을 보여주었다. Ueda 등⁴²⁾은 자궁경부암환자에서 세포자연사지수는 동맥내 항암치료(intraarterial chemotherapy)후에 완전 또는 부분관해가 있었던 환자의 경우가 항암치료를 받지 않았거나 항암치료에 반응이 없었던 환자들보다 현저히 높았으며, 종양내 미세혈관밀집도(intratatumoral microvessel density)는 세포자연사지수와는 반대로 현저히 낮게 나왔다. 그러므로 동맥내 항암치료는 암세포의 신생혈관 생성억제(angiogenesis inhibition)를 유발하며 이것은 세포자연사를 증가하여 암세포의 억제를 조절한다고 보고하였다. Wheeler 등⁴⁰⁾은

자궁경부선암 환자의 자궁경부조직에서 방사선 치료전의 세포자연사지수가 2%보다 높았던 군이 낮은 군보다 생존율이 높다고 보고하였으나, 이와는 반대로 Levine 등⁴¹⁾은 자궁경부암에서 방사선 치료전의 자궁경부조직의 세포자연사지수가 0.48%보다 낮은 군의 5년 생존율이 79%이었으며, 높은 군의 경우는 47%로 세포자연사지수가 낮을수록 예후가 좋다고 발표하였다.

Fernandez 등⁴³⁾은 인유두종 바이러스(HPV)를 감염시킨 각질세포(keratinocyte)에서 발암적 변이가 일어남으로써 형질전환된 세포(transformed cells)는 세포자연사의 억제와 동시에 세포의 증식이 일어나는 경향을 보고하여 자궁경부암의 발암기전에 세포자연사의 억제를 강조하였다. Shoji 등⁴⁴⁾은 자궁경부의 암화과정에서 세포자연사는 암세포의 분화와 진행에 연관이 있지만, HPV 형태 그 자체는 직접적으로 세포자연사를 조절하지는 않는다고 보고하였다. Isacson 등⁴⁵⁾은 HPV에 감염된 부위의 세포자연사는 HPV 형태보다는 세포증식 활성도(proliferative activity)와 연관이 있고, 정상 자궁경부상피의 표층에서는 세포자연사를 관찰할 수 없었으며, HPV에 감염된 저등급 상피내병변(LSIL)의 일부에서는 상피의 중간층 및 표층에서 간혹 세포자연사를 관찰할 수 있었고, 고등급 상피내병변(HSIL)과 편평상피암에서는 전층에서 상당한 양의 세포자연사를 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 최 등⁴⁶⁾은 정상 자궁경부상피에서 세포자연사는 기저층 일부에서 약하게 일어나고 경중 이행성증에서 상피내암까지 이행성증이 증가할수록 세포자연사가 기저층에서 상층으로 이동하며 나타나고, 미세침윤암과 침윤암에서 세포자연사는 종양 전체에서 골고루 일어나며 세포자연사의 비율도 증가하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 저등급 상피내병변에서의 세포자연사 세포는 대부분 중간층에 위치하였고, 정상 자궁경부의 편평상피세포, 고등급 상피내병변, 미세침윤암이나 침윤암에서의 세포자연사 세포는 일정한 배열이 없이 전층에서 골고루 나타나서 상기 문헌보고와 유사하였다. 그러나 저등급 상피내병변에서의 세포자연사지수가 정상 상피에서보다 증가한 원인은 확실하지 않아 보다 많은 대상을 실험해 볼 필요가 있다고 사료된다.

Biscotti 등⁴⁷⁾과 DiTomasso 등⁴⁸⁾은 자궁경부 상피

내선암에서 세포자연사 용촉제와 세포분열수(mitotic figures)가 정상 자궁내경관의 세포보다 의미있게 높다고 보고하였고, Sheets 등⁴⁹⁾은 정상세포에서 암 세포로 진행할수록 전체 상피세포수는 증가하나 세포자연사지수는 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 정상세포에서 침윤성암으로 진행하면서 전체 상피세포수가 증가하였으며, 세포자연사지수는 침윤성암으로 진행하면서 현저히 감소함을 보여 Sheets 등⁴⁹⁾의 보고와 유사하였다. 이것은 세포자연사의 억제에 의해 세포 소멸의 감소가 자궁경부암 발암과정과 연관이 있다고 사료된다. 본 연구의 한계점은 실험을 위해 연속 절편을 만든 조직에서 hematoxylin-eosin 염색과 immunoperoxidase 염색의 세포가 유사하지만 정확하게 일치하지는 못하여, 세포자연사가 발생한 세포의 미세구조를 전자현미경을 이용하여 확인할 수가 없었다. 또한 원추생검을 시행한 조직은 200배를 현미경시야에서는 관찰하여야 할 부위가 너무 넓었고, 동일한 환자에서도 현미경시야를 옮길 때마다 세포자연사 세포수가 일정하지 않고 다양하였다. 따라서 본 연구에서는 전체 조직을 관찰하여 사진을 찍었으며 그 중에서 세포자연사 세포수가 가장 많이 분포한 5군데만을 선택하여 세포자연사지수를 계산하였기 때문에 본 연구결과와 세포자연사지수가 대상 환자의 세포자연사지수를 대치할 수 있는지에 관해서는 확실하지 않으며 향후에 보다 많은 대상을 실험 관찰해 보아야만 할 필요성이 있다. 인간의 악성종양에서 세포자연사를 조절하는 유전적 기전을 알아낼 때까지 세포자연사지수가 인간의 충실성종양의 발생이나 예후에 미치는 영향에 대하여 예측하기는 어렵다. 본 연구를 토대로 더 많은 증례를 분석하고, 나아가 정상 자궁경부상피세포, 이행성세포 및 자궁경부암 세포를 이용한 세포자연사 연구나 PCNA나 Ki-67 항원 등과 같은 세포의 증식 시에만 나타나는 소식자를 이용하여 세포의 증식에 관한 연구를 동시에 한다면, 조직이 증식과 소멸에 따른 균형 속에서 자궁경부암의 발생 기전을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

병원 산부인과 외래를 방문하여 원추생검을 시행하였던 환자 중에서 조직학적으로 증명된 정상 자궁경부상피세포(normal cervical epithelium)에서부터 저등급 상피내병변(low-grade intraepithelial lesion), 고등급 상피내병변(high-grade intraepithelial lesion), 미세침윤암(microinvasive carcinomas), 침윤암(invasive carcinomas) 등 각각 10예를 대상으로, 면역조직화학적 in situ hybridization법으로 관찰하여 자궁경부암의 발암과정과 세포자연사의 연관성에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 자궁경부의 편평상피세포와 고등급 상피내병변에서의 세포자연사는 전체 상피세포층에서 고루 발견되었다.
2. 저등급 상피내병변에서의 세포자연사는 대부분 중간층에 위치하였으며, 간혹 기저층이나 상층에서 관찰되기도 하였다.
3. 미세침윤암이나 침윤암에서의 세포자연사는 일정한 배열이 없이 종양 전체에서 골고루 일어나고 있었다.
4. 정상 자궁경부상피세포에서부터 침윤암으로 진행할수록 자궁경부상피세포내의 전체 세포수는 증가하였고, 정상 자궁경부상피세포와 저등급 및 고등급 상피내병변에서의 전체 상피세포수의 증가는 통계적인 유의성은 없었으나 미세침윤암과 침윤암에서의 전체 상피세포수의 증가는 통계학적인 유의성이 있었다.
5. 저등급 상피내병변을 제외한 정상 자궁경부상피세포에서부터 침윤암으로 진행할수록 세포자연사지수(apoptotic index)는 통계학적인 유의성이 있게 현저히 감소하였다.

이상의 결과들을 근거하여 볼 때, 자궁경부암 발암과정에서 자궁경부상피세포내의 전체 세포수의 증가와 세포자연사지수의 감소가 연관이 있다고 사료된다.

-참고문헌-

1. Steel GG: Cell loss as a factor in the growth rate of human tumors. *Eur J Cancer* 1967;3:381-7.

V. 결 론

본 연구에서는 성균관대학교 의과대학 삼성제일

2. Frindel E, Malaise E, Tubiana M: Cell proliferation kinetics in five human solid tumors. *Cancer* 1968;22: 611-20.
3. Laird AK: Dynamics of growth in tumors and in normal organisms. *Human Tumor Cell Kinetics* (eds. Perry S) Natn Cancer Inst Monogr 1969;30:15-28.
4. Clifton KH, Yatvin MB: Cell population growth and cell loss in the MRG-B mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* 1970;30:658-664.
5. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:289-57.
6. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science(Washington DC)* 1995;267: 1456-62.
7. Kihara S-I, Nehlsen-Cannarella S, Kirsch WM et al: A comparative study of apoptosis and cell proliferation in infantile and adult fibrosarcomas. *Am J Clin Pathol* 1996;106:493-7.
8. Vermes I, Haanen C: Apoptosis and programed cell death and disease. *Adv Clin Chem* 1994;31:177-246.
9. McDonnell TJ: Cell division versus cell death: A functional model of multistep neoplasia, *Mol Carcinogen* 1993;8:209-13.
10. Barr PJ, Tomei LD: Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology* 1994;12:487-93.
11. Canman CE, Kastan MB: Induction of apoptosis by tumor suppressor genes and oncogenes. *Semin Cancer Biol* 1995;6:17-25.
12. Harrington EA, Fanidi A, Evan GI: Oncogens and cell death. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:120-9.
13. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ et al: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Research* 1995;55:1811-6.
14. Copleson M: The origin and nature of premalignant lesions of the cervix uteri. *Int J Gynecol Obstet* 1970;8:539.
15. Oster AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12:186-92.
16. Koss LG, Stewart FW, Foote FW et al: Some histological aspects of behavior of epidermoid carcinoma in situ and related lesions of the uterine cervix. *Cancer* 1963;16:1160-211.
17. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW et al: The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet & Gynecol* 1984;64:451-8.
18. Trump BF, Beerzesky EK, Sato T, Laiho K-U et al: Cell calcium, cell injury and cell death. *Environ Health Perspect* 1984;57:281-7.
19. Lockshin RA, Beaulaton J: Cell death: Questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J* 1981;13:659-66.
20. Morris RG, Duvall ED, Hargreaves AD et al: Hormone-induced cell death. II. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol* 1984;115:426-36.
21. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;8:251-306.
22. Sanderson CJ: The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography. *Proc Roy Soc Lond B* 1976;197:241-55.
23. Graham S, Priore R, Graham M et al: Genital cancer in wives of penile cancer patients. *Cancer* 1979;44: 1869-74.
24. Tapanainen S, Tilly JL, Vihko KK et al: Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: Gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993;7:643-50.
25. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL et al: Chromatin cleavage in apoptosis: Associated with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67-77.
26. Arends ML, Morris RG, Wyllie AH: Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
27. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD et al: Germinal center cells express Bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991;21:1905-10.
28. Reed JC: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
29. Symonds H, Krall L, Remington L et al: P53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994;78:703-11.
30. Clarke AR, Maandag ER, van Roon M et al: Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992;359:328-30.
31. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS et al: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992;69: 119-28.
32. Aihara M, Scardino PT, Truong LD et al: The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1995;75:522-9.
33. Montironi R, Magi Galluzzi C, Scarpelli M et al: Occurrence of cell death (apoptosis) in prostate intraepithelial neoplasia. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:351-7.
34. Todd D, Yang G, Brown RW et al: Apoptosis in renal cell carcinoma: Detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic

- factors. *Human Pathol* 1996;27:1012-7.
35. Lipponen PK, Aaltomaa S: Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994;173:333-9.
 36. Leoncini L, Vecchio MTD, Megha T et al: Correlation between apoptotic and proliferative indices in malignant nonHodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1993;142:755-63.
 37. Radinsky R, Fidler IJ, Prince JE et al: Terminal differentiation and apoptosis in experimental lung metastasis of human oncogenic sarcoma cells by wild type p53. *Oncogene* 1994;9:1877-83.
 38. Oridate N, Lotan D, Mitchell MF et al: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: Implications for chemoprevention. *J Cell Biochem* 1995;23:80-6.
 39. Ueda M, Kumagai K, Ueki K et al: Growth inhibition and apoptotic cell death in uterine cervical carcinoma cells induced by 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1997;71:668-74.
 40. Wheeler JA, Stephens LC, Tornos C et al: Astro research fellowship: Apoptosis as an predictor of tumor response to radiation in stage IB cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1487-93.
 41. Levine EL, Renehan A, Gossiel R et al: Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 1995;37:1-9.
 42. Ueda M, Ueki K, Kumagai K et al: Apoptosis and tumor angiogenesis in cervical cancer after preoperative chemotherapy. *Cancer Res* 1998;58:2343-6.
 43. Fernandez C, Sharrard RM, Talbot M et al: Evaluation of the significance of polyamines and their oxidases in the etiology of human cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1995;72:1194-9.
 44. Shoji Y, Saegusa M, Takano Y et al: Correlation of apoptosis with tumor cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1996;49:134-8.
 45. Isacson C, Kessis TD, Hedrick L et al: Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but not correlate with human papillomavirus type. *Cancer Res* 1996;56:669-74.
 46. 최규연, 남계현, 이순곤등: 자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스의 역할. *대부종콜포회지* 1997;8:250-7
 47. Biscotti CV, Hart WR: Apoptotic bodies: A consistent morphologic feature of endocervical adenocarcinoma in situ. *Am J Surg Pathol* 1998;22:434-9.
 48. DiTomasso JP, Ramzy I, Mody DR: Glandular lesions of the cervix. Validity of cytologic criteria used to differentiate reactive changes, glandular intraepithelial lesions and adenocarcinoma. *Acta Cytol* 1996;40:1127-35.
 49. Sheets EE, Crum CP, Yeh J: Association between cervical neoplasia and apoptosis as detected by in situ nuclear labeling. *Gynecol Oncol* 1996;63:94-100.