

인간 자궁경부암조직에서 세포주기 조절단백 G1 Cyclins의 발현이 임상적 예후인자에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 산부인과학교실 · 연세대학교 생물학과*

김영태 · 최병훈 · 김재욱 · 고재홍* · 최은경

=Abstract=

Effect of G1 Cyclins Expression on Clinical Prognostic Parameters in Cervical Carcinoma

Young Tae Kim, Byung Hoon Choe, Jae Wook Kim, Jae Hoong Ko*,
Eun Kyoung Choi

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Department of Biology, Yonsei University

Alterations in the expression of genes that control the cell cycle may be of critical importance in tumorigenesis and malignant transformation. The major regulatory events leading to cell proliferation occur in G1 phase of cell cycle, and the deregulated expression of G1 cyclins is related to oncogenesis. Cyclins D1 and E play important roles in the progression of cell through G1 phase of the cell cycle. Amplification and/or overexpression of the cyclin D1 gene and aberrant expression of cyclin E has been described in various forms of human cancer. However, the role of cyclins D1 and E in cervical cancer has been poorly defined. In this study, we examined the expression of cyclins D1 and E by Northern blot technique and the status of human papillomavirus(HPV) type 16 and 18 by polymerase chain reaction in 25 cases of cervical carcinoma to explore the relationship between cyclins D1 and E and cervical cancer. We found cyclin D1 expression showed down-regulated expression in cervical cancer but cyclin E expression was increased in cancer group. Other clinicopathological prognostic factors were not correlated with cyclins D1 and E expression. Further study based on larger numbers of cases with correlation of cyclins D1 and E status and survival data will be needed to elucidate the use of cyclin expressions as prognostic factor.

Key Words: Cyclins D1 and E, Cervical cancer

I. 서론

세포재생산(cellular reproduction)의 과정인 세포주기는 통상 G1(gap1) phase, S(synthetic) phase, G2(gap2) phase, 그리고 M(mitotic) phase로 구성되어 있

으며 최근에 와서 이러한 세포주기를 조절하는 인자들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁻⁴⁾ 세포주기 조절에 관여하는 대표적인 조절인자로는 cyclins, cyclin-dependent kinases(CDKs), 그리고 cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKIs)가 보고되어 있다. 현재까지 포유동물세포(mammalian cell)에서는 8

본 연구는 1998학년도 연세대학교 의과대학 일반교수연구비에 의해 이루어졌음.

개의 CDK가 알려져 있는데 세포주기의 각단계에서 작용하는 CDK는 각각 다른 것으로 알려져 있다.(Fig. 1)

이러한 CDK는 cyclin이라고 불리우는 단백질과 결합해야만 활성이 있는 작용을 나타내게 된다. 단순한 CDK subunit만으로는 효소작용(enzymatic activity)을 나타내지 못하고 cyclin과 결합하여 heterodimeric enzyme이 되어야만 비로소 제 역할을 수행하는 것이 규명되어있다.^{5,6)} 진핵세포의 세포주기는 DNA합성을 유도하는 G1 phase와 세포분열을 하게 하는 G2/M phase에 존재하는 2곳의 restriction points (R-point)에서 세포분열이 조절되는 것으로 알려져 있는데 G1/S phase를 조절하는 cyclin을 G1 cyclins (cyclin C, D1-D3, E)이라고 하며 G2/M 이행기를 조절하는 cyclin을 mitotic cyclins (cyclin A,B)로 구분하고 있다.⁷⁻¹²⁾ Cyclin A는 DNA합성시작직전에 출현하여 prophase까지 증가하다가 metaphase에 소멸되며 CDK2와 결합한다. Cyclin B는 S phase후반부터 증가하기 시작하여 metaphase에 급격한 소멸을 보이며 p34^{cdc2}와 결합하고 cyclin C는 G1 중반기부터 발현되는 것으로 보고되고 있다.¹³⁾ D type cyclin은 D1-D3가 있으며 이중 D1은 G1후반기에 가장 발현이 증가하며 CDK2, CDK4 및 CDK5와 결합하여 G1-S transition에 관련된다고 밝혀져 있다. Cyclin E는 G1 phase중반부터 증가하여 G1 phase후반 및 S phase초반에 가장 많은 발현이 이루어지며 CDK2와 결합하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁻²¹⁾

이러한 cyclin들은 암화과정과 관련되어 여러 가지 측면에서 연구가 진행되어오고 있다.²²⁻³⁰⁾ 실험실 연구를 통해 현재 많은 암유전자들이 성장인자(growth factor)와 세포주기를 연결하여 세포분열기전을 촉진하는 신호전달계의 구성인자임이 규명되었고 반면에 항암유전자들은 세포주기 조절기전에서 브레이크와 같은 역할을 수행함으로써 세포분열을 억제하여 암발생을 억제한다고 알려져 있다.²⁴⁻²⁸⁾ 또한 몇 종류의 암에서는 cyclin 유전자의 구조적 변화 혹은 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 몇몇 cyclin은 암유전자로 인식되고 있다. 이러한 예로서는 간암, 부갑상선암(parathyroid adenoma), 유방암을 들 수 있다. 간암에서는 B형 간염 바이러스가 숙주 염색체의 cyclin A 유전자 부위에 삽입되어 있음이 보고되어 있고¹⁸⁾ 부갑상선선종에

Fig 1. CDK-cyclin complex in mammalian cell

서는 유전자재배열에 의해 부갑상선 호르몬 유전자(PTH gene)와 연결되어 암을 유발한다고 알려졌던 PRAD1(parathyroid adenoma 1 gene)유전자가 cyclin D1 유전자임이 밝혀졌고¹⁹⁾ 유방암에서는 cyclin E 유전자의 증폭과 과발현이 발암과 관계가 있다고 보고되어 있다.²²⁻²⁴⁾ Zerfass 등(1995)에 의한 NIH 3T3 세포주를 이용한 연구에서는 인유두종바이러스(human papillomavirus, 이하 HPV)의 E7 유전자를 transfection하게 되면 cyclin E와 cyclin A유전자의 발현이 증가된다고 보고되었다.³¹⁾

또한 이러한 cyclin의 발현도를 종양의 예후와 관련하여 연구가 진행되고 있는데 Zhang 등(1994)은 cyclin D1의 과발현이 유방암에 있어 유용 가능한 종양표지자(tumor marker)라고 보고하였고³²⁾ Nielsen 등(1996)은 cyclin E의 과발현이 유방암의 불량한 예후인자라고 보고하였다.³³⁾ Uhlman 등(1996)은 cyclin D1의 발현이 후두암에 있어 암진행 예측인자로 사용할 수 있다고 주장한³⁴⁾ 반면에 Ito 등(1998)은 자궁내막암에서의 cyclin D 및 cyclin E의 과발현이 임상적 예후인자와는 관련성이 없다고 보고하였다.³⁵⁾ 그러나 다른 종류의 암연구에서와는 달리 현재 자궁경부암과 cyclin에 대한 연구는 매우 미진한 상황으로 자궁경부암 세포주를 이용한 Kurzlock의 연구에서 cyclin D1의 과발현과 유전자 재배열이 보고된 것²⁶⁾과 단백질 수준(protein level)에서의 cyclin D1 및 cyclin E의 발현도를 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)을 이용한 연구 등²⁷⁾으로 한정되어 있는 실정이다.

이에 본 연구자들은 우리나라에서 가장 많은 빈

도를 보이는 침윤성 자궁경부암에서 RNA level에서의 cyclin의 발현을 고위험군 HPV와 연관하여 조사하였으며 그 결과와 임상적 예후인자와의 관련성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구 대상

1997년 1월부터 1998년 11월까지 연세대학교 의과대학 산부인과에 비정상 세포진을 주스로 내원한 환자중 질확대경 조준하 자궁경부 생검술에서 침윤성 자궁경부암으로 확진된 25명 그리고 대조군으로 조직학적으로 만성자궁경부염이 판명된 5명의 환자를 대상으로 한다. 자궁경부조직은 부인암 검진센타에서 자궁경부 biopsy forcep으로 0.5 x 0.5cm크기 이상의 조직을 무균적으로 얻어 실험 전까지 영하 70도의 nitrogen tank에 보관한다.

2. 연구 방법

가) DNA추출 및 고위험군 HPV 검색

Microcentrifuge tube에 10 μ g의 자궁경부조직을 200 μ l의 lysis완충용액에 섞어 넣는다. 30초 동안 vortexing 후 40 μ l silica 용액(100% silicon dioxide at pH 2.0)에 혼합 후 용액을 실온에 10분 동안 방치 후 10초 동안 12000G로 원심분리하여 상층액을 제거한다. 검체물을 연속하여 500 μ l washing 완충액(5M Guanidium thiocyanate, 0.1 M TrisHCl at pH 6.4)에 넣어 혼합하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 이 과정을 두 번 연속한다. 800 μ l, 70% 에탄올을 첨가하여 원심분리를 하며 역시 2번 반복한다. 검체를 800 μ l 아세톤에 혼합 후 원심분리한 후 10분 동안 65°C에서 말린다. 50 μ l H₂O에 녹인 후 10분 동안 65°C에서 배양한다. 검체물 (aliquots of crude lysate and purified DNA)은 8g/l agarose gel에 전기영동을 한 후 ethidium bromide에 염색한다. 각 반응은 2 μ l template DNA, 각 primer 당 10 pmole (2 μ l), 4 μ l (10mM)의 dNTP, 0.1 μ l (0.2 unit) Taq polymerase, 5 μ l 10x buffer과 34.9 μ l의 증류수를 포함한다. nested PCR을 위해 cycling 과정을 두 번 거친다. 사용하는 outer primer를 첫째 cycling(변수)은 95°C에 3분 동안 1회, 94°C에서 1분, 50°C에서 1.5분, 72°C에서 2분을 35회 반복하고 추가로 72°C에서 5분을 DNA thermal

cycler에서 반응시킨다(Perkin Elmer Cetus). 첫 번 PCR에서 나온 1 μ l을 2번째 cycling을 한다. PCR을 위해 사용된 primer는 HPV 16과 18을 동시에 증폭할 수 있는 consensus primer로 HP1; 5'-ACCGAAA ACGGTTGAACCGAAAACGGT, HP2; 3'-AATAATG TCTATATTCACCT-AATT를, 사용하여 95°C에서 3분 동안 1회 반응 후, 94°C에서 1회, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분 동안 30회를 반복하며 72°C에서 마지막 5분을 1회 시행한다. 외측과 내측의 nested PCR의 primer는 HPV16에 특이한 primer로 HPV161; 5'-ATGTTTCAGGACCCACAGGA, HPV162; 3'-CCT CACGTCGCAGTAACTGT를 HPV18에 특이한 primer로는 HPV181; 5'-ATGGCGCGCTTTGAGGATC C, HPV182; 3'-GCATGCGGTATACTGTCTCT의 sequences를 각각 사용하였다(Takara사 제품). β -globin(268bp)은 negative control로 모든 assay에 포함되어지고 양성대조군으로 cloned HPV DNA를 사용한다.

나) 전체 RNA의 분리

조직(100mg)을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄한 후, Trizol 1ml이 들어있는 epi-tube에 옮긴다. 5분간 vortex 한후, chloroform 100 μ l을 넣고 다시 5분간 vortex 하고 15,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 수용액층과 페놀층을 분리한다. 상층액만을 다른 tube에 취한 후, 1 vol. 의 isopropanol을 넣고 잘 섞어 준다. 이후 -20°C에서 30분 정도 방치한 후 15,000rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 핵산을 침전시킨다. DEPC를 처리한 증류수 1ml에 재현탁시킨 핵산에 10 M Lithium Chloride를 최종 2M이 되도록 첨가하고 4°C에서 30분 이상 방치한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 RNA를 침전시킨다. 이 RNA 침전물을 70% cold-ethanol로 씻어준 후, DEPC를 처리한 증류수 약 30 μ l에 녹인다. 이렇게 해서 분리된 전체 RNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 순수도를 알아보고 양을 계산한다.

다) RNA 전기영동

RNA 전기영동은 formaldehyde gel을 사용한다. Formaldehyde와 증류수, 5×gel running buffer (0.1 M MOPS, pH 7.0, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA,

pH 8.0)가 1 : 3.5 : 1.1의 비율이 되게 섞여 있는 1% agarose gel을 만들어 10 분간 pre-run을 한 후 사용하여 RNA 시료는 RNA와 formamide, formaldehyde, 5×gel running buffer를 4.5 : 10 : 3.5 : 2의 비율로 섞어 65℃에서 15분간 변성시킨 후 전기영동을 한다. 전기영동이 끝난 후 Hybond-N+ membrane (Amersham)에 진공을 이용하여 RNA를 전이시키고 (TransVac, Hoefer), 80℃에서 10분간 방치한 후 UV-Crosslinker로 고정시킨다.

라) Northern blot analysis

RNA가 전이된 membrane을 hybridization 용액 (50% formamide, 0.25M NaHPO₄, 0.25M NaCl, 1mM EDTA, 7% SDS, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA)에 담가 42℃에서 prehybridization시킨다. 4시간이 지난 후 hybridization용액을 새로 넣고 방사능-표지된 probe를 열변성시켜 넣는다. 18시간 이상이 지난 후 hybridization 용액을 버리고 membrane을 용액 I (2× SSC, 0.1% SDS)로 52℃에서 3번, 용액 II (25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)로 52℃에서 2번, 용액 III (25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 1% SDS)으로 52℃에서 2번 씻어준 후 X-ray 필름에 감광시킨다. Autoradiogram은 scanning densitometer(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)를 이용하여 각 transcript의 양을 측정하였다.

마) 방사능-표지 probe 제조

Random primed DNA labelling kit (Boeringer Mannheim)를 이용한다. DNA 50 ng을 100℃에서 5분간 변성시킨 후 hexanucleotide mix를 붙인 다음 Klenow fragment를 이용하여 [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol)로 DNA를 표지시킨다. 반응은 37℃에서 40분간 시켰으며 반응이 끝난 후, spin-컬럼 (QIAGEN)을 사용하여 방사능-표지 (radio-labelled)된 probe 만 순화하여 사용한다. 방사능-표지 probe는 사용 직전에 10 분간 끓인 후 곧바로 얼음에 넣은 후 (열변성) 사용한다.

바) 통계처리

자료의 통계분석은 SPSS (version 8.0) software를 사용하여 Fisher's exact test, χ^2 test를 사용하였으며

p<0.05인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 침윤암군에서 HPV 감염상태

대상조직들은 착공생검 혹은 자궁경부 원추절제술을 통해 얻어졌으며 squamous cell carcinoma(SCC) 19예, adenocarcinoma 4예, adenosquamous cell carcinoma 2예이었다. SCC는 keratinizing type이 11예이었고 8예는 non-keratinizing type이었다. PCR을 이용한 HPV 검사를 시행했으며 모든 예에서 negative control로 β -globin의 증폭(amplification)이 동시에 행해졌다. HPV는 16형이 18예(72%)에서 검출되었으며 18형은 6예(24%)에서 확인되었으며 16형과 18형이 동시에 감염된 경우는 3예가 있었다.

2. 대상환자에서 cyclin D1과 cyclin E의 발현상태

Northern blot상 5예의 대조군에서는 1.1 kb 크기의 cyclin D1 및 1.0 kb 크기의 cyclin E가 모두 관찰되었다. 그러나 침윤성 자궁경부암 조직에서는 cyclin D1의 발현이 감소되어 있는 양상을 보였으며 특히 HPV type 16 및 type 18 감염이 확인된 자궁경부암조직에서는 cyclin D1의 발현이 매우 감소되어 있었다. 반면에 cyclin E의 발현은 침윤암군에서 높게 발현되어 있음이 관찰되었다(Fig. 2, 3). 이를 densitometer를 이용하여 transcript의 양을 측정하였을 때 정상대조군에 비해 침윤암군에서는 cyclin D1의 양이 감소되어 있는 경향을 보였으며 cyclin E의 경우

Fig 2. Northern blot analysis of cyclins D1 and E on cervical cancer correlated with HPV-16 positivity

Fig 3. Northern blot analysis of cyclins D1 and E on cervical cancer correlated with HPV-18 positivity

에는 정상대조군에 비해 침윤암군에서 증가되어 있음이 관찰되었으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.(Fig. 4)

3. 침윤암군에서 cyclin D1의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성

정상대조군의 cyclin D1의 autoradiogram을 densitometer로 분석하였을 때 평균 16DU(densitometric unit)이었고 최대값은 18DU로 나타났다. 이에 18DU 값을 cut-off치로 기준하여 침윤암군에서의 cyclin D1의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 분석한 결과, 임상병기, 병소의 크기, 임파절전이 유무, HPV 감염상태와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 세포형태에 따라서는 cyclin D1의 과발현이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다.(Table 1)

4. 침윤암군에서 cyclin E의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성

대조군의 cyclin E의 autoradiogram을 densitometer로 분석하였을 때 평균 19DU(densitometric unit)이었고 최대값은 21DU로 관찰되었다. 이에 21DU값을 cut-off치로 기준하여 침윤암군에서의 cyclin D1의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 분석한 결과, 임상병기, 병소의 크기, 임파절전이 유무, 및 세포형태와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 고위험 HPV에 감염

되어 있는 예에서는 cyclin E의 과발현이 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다.(Table 2)

IV. 고찰

한국 여성암발생 및 사망수에 있어서 수위의 빈도를 보이고 있는 자궁경부암은 보건복지부 1997년도 보고에서 전체암발생의 21.1%를 차지하고 있어 높은 암발생율을 보이고 있으며 전체 여성생식기종양발생의 4분의 1이상을 차지하고 있다.³⁶⁾ 또한 전 세계적으로도 매년 50만명 이상의 환자가 보고되는 여성암으로서 가장 발생 빈도가 높으며 이로 인한 사망도 매년 20 만건 이상으로 나타나기 때문에 임상적으로 극복해야될 과제가 많은 중요한 질병이다.³⁷⁾ 지난 수십여 년간의 역학·생물학·유전학적 연구를 통해 자궁경부암 발생에 HPV의 감염이 주요한 원인으로 알려져 있다. 자궁경부암 발생에 HPV와의 인과관계를 보여주는 역학적 연구에서 Cam-pion 등(1986)은 2년 이상 정도 자궁경부이형증(mild

Table 1. Correlation between cyclin D1 overexpression and clinicopathological prognostic parameters in cervical carcinoma

Category	(N)	Overexpression		
		Present	Absent	P value
Stage				
I & II	(12)	6	6	NS
III & IV	(13)	7	6	
Cell type				
Squamous	(19)	7	12	<0.05
Others*	(6)	5	1	
Lesion size				
< 4cm	(10)	4	6	NS
≥ 4cm	(15)	7	8	
LN** involvement				
Negative	(10)	6	4	NS
Positive	(15)	7	8	
HPV 16/18				
Negative	(7)	3	4	NS
Positive	(18)	8	10	

* Includes adenosquamous cell carcinoma and adenocarcinoma.

** LN; lymph node including pelvic and paraaortic lymph node

Fig 4. Densitometric analyses of the relative levels of RNAs

Table 2. Correlation between cyclin E overexpression and clinicopathological prognostic parameters in cervical carcinoma

Category	(N)	Overexpression		
		Present	Absent	P value
Stage				
I & II	(12)	5	7	NS
III & IV	(13)	6	7	
Cell type				
Squamous	(19)	8	11	NS
Others*	(6)	3	3	
Lesion size				
< 4cm	(10)	6	4	NS
≥ 4cm	(15)	7	8	
LN** involvement	ent			
Negative	(10)	6	4	NS
Positive	(15)	8	7	
HPV 16/18				
Negative	(7)	2	5	<0.05
Positive	(18)	16	2	

* Includes adenosquamous cell carcinoma and adenocarcinoma.

** LN; lymph node including pelvic and paraaortic lymph node

cervical dysplasia)이 있는 환자에서 고도 자궁경부이형증(severe cervical dysplasia)으로 진행된 환자의 85%가 HPV 16형과 HPV 18형에 감염되어 있다고 하였으며³⁸⁾ 또한 고위험군 HPV 16형과 HPV 18형의 자궁경부암이 있는 환자에서는 비감염군보다 적게는 11배 많게는 116배나 높게 고도 자궁경부이형증으로 진행된다고 보고하였다.^{39,40)} 현재까지 HPV는 약 80여종이 분리되어 보고되어 있는데 이들 HPV중에서도 악성종양 발생의 고위험군(high risk type)으로 구분되어 있는 HPV 16형과 HPV 18형은 70-80%이상의 자궁경부암조직에서 발견되고 있다. 그리고 이러한 고위험군 HPV DNA의 일부가 생체 전사(in vitro transfection)한 실험실 연구에서 세포의 불멸화(immortalization)가 유도되는 것이 밝혀졌기 때문에 HPV가 자궁경부암의 발생에 있어 깊은 관련이 있는 것이 규명되었다.^{41,42)} 본 연구에서도 침윤성 자궁경부암환자의 조직에서 중합효소연쇄반응법을 이용하여 검사한 결과 72%에서 고위험 HPV의 감염을 확인하였으며 이는 다른 연구자의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.^{41,42)}

그러나 자궁경부암에 있어서 고위험군 HPV에 의한 발암기전에 관한 많은 연구결과가 보고되어 있으나 HPV 감염단독만으로는 암화(carcinogenesis)에 이르지 못하는 것으로 알려져 있다. HPV 감염에서 전구병소인 자궁경부이형증(cervical dysplasia)을 거쳐서 자궁경부암(carcinoma)으로 진행되는 과정에서 유전자조절의 상태 및 병리학적 경로는 아직 확실하게 규명되어 있지 못한 상태이다. 그러므로 최근 연구에서는 자궁경부암에서 HPV에 의해 up 또는 down regulation되는 세포주기 조절인자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 cyclins, cyclin-dependent kinases(CDKs), 및 cyclin-dependent kinase inhibitors(CDKIs)에 대한 연구가 집중되고 있다. 몇 종류의 암에서는 cyclin유전자의 구조적 변화 혹은 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 몇몇 cyclin은 암유전자로 인식되고 있다.

정상세포와 달리 종양세포가 가지고 있는 큰 특징으로 조절상실된 세포주기 및 세포분열을 들 수 있다. 최근 암치료를 있어서 기초적인 연구방향속에서도 많은 각광을 받고 있는 분야가 세포주기에 관한 것이 되고 있다. 세포의 유사분열은 G1, S, G2, M기로 구성되는 세포주기를 거쳐 이루어지며 이러한 세포주기의 조절에 cyclin 단백질의 합성과 소멸이 중요한 역할을 하고 있음이 규명되게 되었다. 이러한 cyclin은 세포성장과 분화의 기능을 수행하며 cyclin dependent kinase(CDK)들과 결합하여 작용을 나타내게 된다. 진행세포의 세포주기는 DNA합성을 유도하는 G1기와 세포분열을 하게하는 G2/M기의 2개의 주된 결정요소(check-point)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는데 G1/S 이행기를 조절하는데 관여하는 cyclin을 G1 cyclin이라 하고 G2/M이행기를 조절하는 cyclin을 mitotic cyclin으로 구분하고 있다. Mitotic cyclin에는 cyclin A, B가 존재하며 G1 cyclin에는 C, D1, D2, D3, E등이 보고되어있다. 이들 가운데 cyclin D1이 가장 먼저 밝혀졌는데 이는 부갑상선종양의 유전인자를 재배열함으로써 얻어진 것으로 cyclin D1/PRAD1으로도 불리우고 있으며 인체염색체 11번 장완에 존재하고 있어 bcl-1, int-2 등과 비슷한 위치에 있기 때문에 일부종양에서는 이들 인자와 같이 증폭되는 경우가 보고되고 있다.

최근에는 이러한 cyclin의 발현도를 종양의 예후와 관련하여 연구가 진행되고 있는데 Zhang 등

(1994)은 cyclin D1의 과발현이 유방암에 있어 유용 가능한 종양표지자(tumor marker)라고 보고하였고³²⁾ Nielsen 등(1996)은 cyclin E의 과발현이 유방암의 불량한 예후인자라고 보고하였다.³³⁾ Uhlman 등(1996)은 cyclin D1의 발현이 후두암에 있어 암진행 예측인자로 사용할 수 있다고 주장한³⁴⁾ 반면에 Ito 등(1998)은 자궁내막암에서의 cyclin D 및 cyclin E의 과발현이 임상적 예후인자와는 관련성이 없다고 보고하였는데³⁵⁾ 본 연구에서는 자궁경부암을 대상으로 cyclin D1의 과발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 조사한 결과에서는 임상병기, 병소 크기, 임파절전이유무 및 고위험 HPV 감염상태등의 예후인자와는 통계학적으로 유의한 관련성이 나타나지 않았다. 세포형태에 따라서는 통계적으로 유의한 관련성을 보였는데 이는 본 연구자들이 단백질수준(protein level)에서 면역조직화학염색법(immunohistochemical technique)을 이용한 보고에서와 마찬가지로 결과를 나타내었다.²⁷⁾ 또한 cyclin E의 과발현과 예후인자와의 관련성을 살펴보면 임상병기, 병소의 크기, 세포형태, 임파절 전이유무등과는 통계학적으로 유의한 연관성을 나타내지 않았다. 반면에 고위험 HPV에 감염된 침윤암군에서는 cyclin E의 과발현이 높게 나타났는데 이는 Southern과 Herrington(1998)의 자궁경부 상피내종양환자에서 저위험 HPV와 고위험 HPV를 구분하여 cyclin 발현도를 연구한 보고와 유사한 결과를 보였다.⁴³⁾ 이들의 in vivo 결과에 따르면 HPV 6형, 11형 등의 저위험 HPV 감염과는 달리 HPV 16형, 18형 등의 고위험 HPV 감염이 확인된 병변에서는 cyclin D1의 발현이 매우 down-regulation되고 반면에 cyclin E의 발현은 up-regulation되었다고 보고하였다. 그러나 피부암을 대상으로 한 Bito 등(1997)의 보고에서는 premalignant tumor에서는 cyclin E의 과발현이 관찰되지만⁴⁴⁾ 편평상피암조직에서는 cyclin E의 발현이 down-regulation되었다는 상반된 연구결과도 보고되어 있으므로 이러한 세포주기 조절인자의 발현상태는 장기 특이성(organ specificity)이 존재할 가능성도 있다고 하겠다.

V. 결론

본 연구자들은 1997년 1월부터 1998년 11월까지 연세대학교 의과대학 산부인과학교실에 내원하여 침윤성 자궁경부암이 확진된 25명 그리고 대조군으로 조직학적으로 만성자궁경부염이 판명된 5명을 대상으로 다음의 결과를 얻었다.

1. 침윤암군에서 HPV 감염상태는 PCR을 이용한 HPV 검사를 시행했으며 HPV는 16형이 18예(72%)에서 검출되었으며 18형은 6예(24%)에서 확인되었으며 16형과 18형이 동시에 감염된 경우는 3예가 있었다.
2. 대상환자에서 cyclin D1과 cyclin E의 발현상태는 Northern blot상 5예의 대조군에서는 1.1 kb 크기의 cyclin D1 및 1.0 kb 크기의 cyclin E가 모두 관찰되었다. 그러나 침윤성 자궁경부암 조직에서는 cyclin D1의 발현이 감소되어 있는 양상을 보였으며 특히 HPV type 16 및 type 18 감염이 확인된 자궁경부암조직에서는 cyclin D1의 발현이 매우 감소되어 있었다. 반면에 cyclin E의 발현은 침윤암군에서 높게 발현되어 있음이 관찰되었다.
3. 침윤암군에서 cyclin D1의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 살펴보면 임상병기, 병소의 크기, 임파절전이 유무, HPV 감염상태와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 세포형태에 따라서는 cyclin D1의 과발현이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다.
4. 침윤암군에서 cyclin E의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성에서는 임상병기, 병소의 크기, 임파절전이 유무, 및 세포형태와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 고위험 HPV에 감염되어 있는 예에서는 cyclin E의 과발현이 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다.

결론적으로 본 연구에서는 cyclin E의 과발현이 자궁경부암의 종양발생화에 영향을 미치며 고위험 HPV 감염이 cyclin E의 과발현과 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 예후인자들과의 관련성은 적은 것으로 나타나 예후인자로 사용하기에는 추적관찰을 통한 생존율에 관한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

-참고문헌-

- Hartwell L: Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* 1991;129:975.
- Nurse P: Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503.
- Hartwell L, Culotti J, Pringle J et al : Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974;183:46.
- Hartwell L, Mortimer K, Culotti J et al : Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of cdc mutants. *Genetics* 1973;74:267.
- Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer. *Cell* 1991;66:1071.
- Bartek J, Staskova Z, Draetta G et al: Molecular pathology of the cell cycle in human cancer cells. *Stem Cells* 1993;1(suppl 1) :51.
- Gong J, Ardel B, Traganos F et al: Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 1994;54:4285.
- Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer[Review]. *Science* 1994;266:1821.
- Lukas J, Pagano M, Staskova Z et al: Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene* 1994;9:707.
- Morisaki T, Uchiyama A, Yuzuki D et al: Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54:1113.
- Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P: Association of the human Papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 1993;13:6537.
- Doeberitz MK, Rittmuller C, Aengeneyndt F et al: Spitkovsky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6-p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 1994;68:2811.
- Lock LF, Wickramasinghe D: Cycling with CDKs. *Trends Cell Biol* 1994;4:404.
- Lam EWF, Morris JDH, Davies R et al: Watson RJ, Vousden KH. HPV 16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J* 1994;13:871.
- Callender T, Naggar A, Lee MS et al: PRAD-1(CCND 1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:152.
- Jeffrey PC, Russo AA, Polyak K et al: Crystal structure of a cyclin A-CDK2 complex at 2.3 Å: Mechanism of CDK activation by cyclins. *Nature* 1995;376:313.
- Marx J: How cells cycle toward cancer. *Science* 1994;263:319.
- Wang J, Chenivess X, Henglein B et al: Hepatitis B virus integrated in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990;343:555.
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, et al: A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991;350:512.
- Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN et al: Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:709.
- Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer, cyclin D and CDK inhibitors come to age. *Cell* 1994;79:573.
- Keyomarsi K, Pardee AB: Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1112.
- Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E et al: Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:380.
- Muller H, Lukas J, Schneider A et al: Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2945.
- Thomas T, Thomas TJ: Regulation of cyclin B1 by estradiol and polyamines in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:1077.
- Kurzrock R, Ku S, Taipaz M: Abnormalities in the PRAD(CYCLIN D1/BCL-1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer* 1995;75:584.
- Cho NH, Kim YT, Kim JW: Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int. J Gynecol. Pathol* 1997;16:339.
- Lukas J, Muller H, Bartkova J et al: DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol* 1994;125:625.
- Dulic V, Lees E, Reed SI: Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 1992;257:1958.
- Kreipe H, Parwaresch R: A closer look at the cell cycle. *Virch Arch [A] Pathol Ana Histopathol [Editorial]* 1993;422:341.
- Zerfess K, Schulze A, Spitkovsky D et al: Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1995;69:6389.
- Zhang SY, Caamano J, Cooper F et al: Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;102:695-8.
- Nielsen NH, Amerl C, Emdin SO et al: Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to estrogen receptor status. *Br J Cancer*. 1996;74:874-80.

34. Uhlman DL, Adams G, Dennis K et al: Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Res* 1996;56:2199-205.
35. Ito K, Sasano H, Yoshida Y et al: Immunohistochemical study of cyclin D and E and cyclin dependent kinase(cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:1661-64.
36. 보건복지부 발표 (1997) : 한국인 암등록 조사자료 분석보고서 1995.1.1.-12.31.
37. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: vol 64. Human Papillomaviruses 1. IARC, Lyon.
38. Campion MJ, McCance DJ, Cuzick J: Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic and virological study. *Lancet* 1986; 2: 237.
39. Koustky LA, Holmes KK, Critchlow CW et al: A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992: 327: 1272.
40. Rozendaal L, Walboomers JMM, Van Der Linden JC et al: PCR-based high risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer* 1996;68:766-9.
41. Zur Hausen: Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human cancers. *Cancer Res* 1989;49:4677-81.
42. Lorincz AT, Temple GF, Kurman UJ et al: Oncogenic association of specific papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 671-7.
43. Southern SA, Herrington CS: Differential cell cycle regulation by low- and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Res* 1998;58:2941-5.
44. Bito T, Ueda M, Ito A et al: Less expression of cyclin E in cutaneous squamous cell carcinomas than in benign and premalignant keratinocytic lesions. *J Cutan Pathol* 1997;24:305-8.