

자궁경부 종양에서 인유두종 바이러스 감염과 Cyclin D1 발현에 대한 연구

순천향대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*
김민관 · 김희범 · 이슬기 · 선우재근 · 김창진* · 배동한

Human Papillomavirus Infection and Expression of Cyclin D1 in the Uterine Cervical Neoplasia

Min Kwan Kim, M.D., Hee Bum Kim, M.D., Seul Kee Lee, M.D. Jae Gun Sunwoo, M.D., Chang Jin Kim, M.D.*, Dong Han Bae, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology* College of Medicine,
Soonchunhyang University, Chunan, Korea

About 80 subtypes of human papilloma viruses(HPVs) were known, and they were divided into two groups as "high-risk HPVs" and "low-risk HPVs" according to their oncogenic potentialities. Even though the precise pathogenic mechanism of uterine cervical cancer were not elucidated, HPV has been considered as a strong candidate for the cause.

The cell cycles are tightly regulated by several cyclins and cyclin dependent kinases. Cyclin D1 is known to regulate cell cycle progression at the G1-S phase checkpoint, and its overexpression in human cells is expected to drive the cells through the G1-S phase transition, thus contributing to oncogenesis.

In this study, using total of 50 cases of CIN I, II, III and invasive carcinoma, HPVs were typed by DNA microarray and the expressions of cyclin D1 were studied by immunohistochemistry.

The results were as follows:

1. Among a total of 50 cases, HPV infection was noted in 39 cases(78%). The HPV 16 were 17 cases(34%), HPV 58, 8 cases(16%) and HPV 52, 4 cases(8%).
2. Among a total of 50 cases, cyclin D1 negative expression was in 18 cases(36%), while positive expression was in 32 cases(64%).
3. Among 39 cases of HPV infection, low expression of cyclin D1 was observed in 36 cases(92.3%), while over-expression of cyclin D1 was noted in 3 cases(7.7%)($p < 0.05$).

Above results show that the most frequent HPV type in uterine cervical squamous neoplastic lesion was HPV 16 and the next one was HPV 58. The mixed infection of HPV types were not infrequent. And low expression of cyclin D1 was observed in the lesion infected by high risk HPV, which suggests that the high risk HPVs would affect the amplification of cyclin D1 gene but the gene may produce a modified protein that is not stained with ordinary method or lost the ability to produce cyclin D1.

Key Word : HPV, cyclin D1

인유두종 바이러스는 이중선상 DNA바이러스로 1989년 zur Hausen⁽¹⁾이 처음으로 인유두종 바이러스 감염이 자궁경부 종양과 관련 있다는 연구가 발표된 후로 이 바이러스와 종양 발생과의 관련에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 이들 바이러스는 병변의 종류에 따라 양성 종양의 일종인 유두종을 일으키는 저 위험군(HPV 6, 11)과 상피암종을 일으키는 고 위험군(HPV 16, 18)등의 2개의 소 군으로 나누기도 하며⁽²⁾ 현재까지 약 80종의 인유두종 바이러스가 알려졌다. 이들 중 30여 아형이 여성생식기에 감염을 일으키나 13여 아형이 자궁경부 종양 발생과 관련 있는 것으로 알려졌다. 이러한 연구들로 볼 때 매우 다양한 아형의 인유두종 바이러스 감염에 의하여 여성생식기 종양이 발생됨을 알 수 있으나, 지금까지의 HPV와 자궁경부암 발생과의 관계에 대한 연구는 주로 고 위험군으로 알려진 HPV 16과 HPV 18형에 대한 연구이며 다른 고 위험군 바이러스에 대한 연구는 드문 실정이다.

HPV에 의한 자궁경부 종양 발생기전은 고 위험군 바이러스의 단백질 E6와 E7이 관여하는 것으로 알려졌으며 이들 단백질은 암억제 유전자인 p53의 분해를 촉진시키거나 세포주기 조절에 관여하는 retinoblastoma 단백질(pRb) 혹은 cyclin 단백질과의 작용으로 세포주기 조절을 위해 시키는 것으로 알려졌다. 이런 cyclin 단백질 중 cyclin D는 반감기가 30분 이내로 매우 짧으나 이들의 발현은 성장인자에 의하여 조절되며 세 종류의 cyclin D(D1, D2, 및 D3) 중 cyclin D1은 특이한 cyclin-dependent kinase(CDK: CDK2, CDK4, CDK5)와 결합하여 전체적인 세포주기를 조절하는 G1기에서 S기로 진행되는 변환점에서 세포주기의 진행을 조절하는 기능을 갖고 있다^(4,5). cyclin D1은 말단 부위의 염기서열이 pRb와 결합하는 HPV E7의 유전자 부위와 상동성을 갖기 때문에 pRb와 결합하여 세포주기를 방해하여 HPV의 발암과정에 관여한다.^(6,7) 그러나 cyclin D1은 인유두종 바이러스의 감염 종류에 따라 저 위험군 HPV에서 92%의 높은 발현율을 보이고 고 위험군 HPV 감염에서는 13%의 낮은 발현을 보이고 있다⁽⁸⁾.

이에 본 연구에서는 75예의 자궁경부 상피내종양 및 침윤암을 대상으로 다양한 HPV 감염을 DNA microarray 기법으로 검사하고 또한 cyclin D1 발현을 면역조직화학적 방법으로 검사하여 자궁경부 종양 발생요인으로 HPV 감염과 cyclin D1 발현과의 관계를 조사하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

순천향대학교 천안병원 산부인과에서 2000년 3월부터 2001년 2월까지 자궁경부상피 종양 및 침윤암으로 진단된 자궁경부 생검 혹은 자궁절제 조직 75예 중 파라핀 블록에서 DNA를 추출하여 HPV에 대한 PCR 시행하여 추출한 DNA의 질이 양호한 50예를 선택하여 본 연구의 대상으로 삼았다. 총 50예의 평균 연령은 52세이었고, 이 중 CIN I 6예, CIN II 12예, CIN III 8예 및 침윤암이 24예이었다.

2. 방법

(1) DNA chip에 의한 HPV 아형 검사.

a. DNA 추출

파라핀 블록을 7 μ m로 절편을 만든 후 탈 파라핀 및 합수 과정을 거쳐 hematoxylin-eosin염색을 하였다. 염색된 조직을 40배 현미경 시야에서 병변을 미세절제하여 1.5ml Eppendorf tube에 넣었다. 이곳에 500 μ l의 proteinase K digestion buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.5% sodium dodecyl sulfate; 1 mM CaCl₂; 및 100 μ g/ml muscle glycogen)을 넣어 55°C-60°C에 24시간 처리하였다. 또한 RNase I 0.5 μ l를 첨가하여 37°C에서 15분간 부란시킴으로써 오염된 RNA를 제거하였다. Protein PPT Buffer(Solution 3) 70 μ l를 첨가하고 얼음에서 5분간 부란시킨 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 분해된 단백질과 RNA 및 기타 부유물을 제거하였다. 상층액을 취하여 새 시험관에 옮기고 isopropanol을 200 μ l 첨가하여 15,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 분해된 단백질과 RNA 및 기타 부유물을 제거하였다. 상층액을 취하여 새 시험관에 옮기고 isopropanol을 200 μ l 첨가하여 15,000rpm에서 10분간 원심 분리 하여 DNA를 침전시켰으며, 70% ethanol을 이용하여 남아있는 isopropanol을 제거하고 공기 중에서 침전물을 말렸다. 그 후 멸균된 3차 증류수를 이용하여 20 μ l에 DNA를 녹여 4°C에서 보관하였다.

b. HPV DNA genotyping

검체의 인유두종 바이러스 아형을 검사하기 위하여 HPV DNA chip(바이오메드랩, Seoul, Korea) 키트를 사용하였고 키트의 설명서에 제시한 방법을 따랐다.

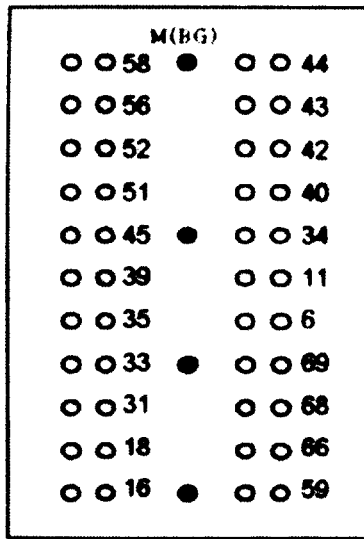


Fig. 1. The format of HPV DNA chip.
M: Position Marker BG: β -globin.

HPV DNA chip 구성은 Fig. 1과 같다. 상기 방법에 의해 추출된 DNA를 주형으로 하여 키트에서 제공하는 시발제 (HPV primer 1: 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3', HPV primer II: 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3', β -globin PC03: 5'-TGC ACC TGA CTC CTG AGG GAA GTC TGC CG-3', β -globin PC04: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CCT TCG CCC AC-3')를 이용하여 HPV는 아형 검사를 위하여 증폭하였고 β -globin은 DNA 증폭 여부를 판단하기 위해 (+) control로 증폭하였다. 유전자 절편의 증폭을 위한 반응액 조성으로 50 μ l reaction 시 10X PCR buffer (Mg²⁺ free, TaKaRa) 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 8 μ l, Primer I, 25 pmole/ μ l 0.5 μ l, primer II, 25 pmole/ μ l 0.5 μ l, dNTP (2 mM dATP, dTTP, dGTP, 1.0 mM dCTP) 혼합액 1 μ l, 25 nmol Cy5-dUTP 0.1 μ l, taq DNA polymerase (TaKaRa, 5 U/ μ l) 2 U, template 2 μ l를 각각 첨가하였다. PCR 온도의 조건으로 우선 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기변성을 시행하였다. 그 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 수행하기를 5주기 실시 후 다시 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 수행하기를 5주기 실시 후 다시 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 15초간 30주기를 수행하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 유지시킨 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 보관하여 교잡반응(hybridization)에 이용하였

다. 교잡반응은 증폭된 검체 DNA (HPV PCR product 10 μ l + β -globin PCR product 5 μ l + 멸균수 25 μ l)에 4 μ l (1/10 vol.)의 DNA 변성용액 (3 N NaOH)을 가한 후 실온에서 5분간 방치한다. 1 M Tris-HCl (pH 7.2) 2 μ l (1/20 vol.)와 DNA 변성용액 (3 N HCl) 4 μ l (1/10 vol.)를 가한 후 얼음 위에서 5분간 방치한다. 12X SSPE 50 μ l (100 μ l volume의 cover slip의 경우), 10% SDS 0.5 μ l를 가하여 잘 섞는다. 이를 HPV DNA chip에 가하여 40 $^{\circ}$ C에서 습도를 유지하며 반응시킴으로써 반응 형광이 나타나도록 유도하였다. 그 후 3X SSPE buffer에서 2분간 수세하고, 다시 1X SSPE buffer에서 2분간 수세하였다. 결과는 DNA chip scanner (GSI Lumonics, Scanarray lite, Ottawa, Canada)를 이용하여 판독하였다.

(2) 면역조직화학적 염색

파라핀 블록을 4 μ m로 절편을 만들어 통상과정을 거쳐 함수 하였다. 이들 절편을 0.1 M citrate buffer (pH 6.0)에 담근 후 microwave oven에서 15분간 끓였다. 그 후 실온에서 서서히 식힌 후 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)로 3회 3분씩 수세하였다. 비 특이적 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide 용액을 methanol에 만들어 이에 30분간 실온에 반응 시켰다. 그 후 비 특이성 면역반응을 감소시키기 위해 정상 염소혈청을 조직에 30분간 실온에서 반응 시켰다. 잔여 혈청을 제거 한 후 cyclin D1에 대한 일차 항체 (Novocastra, UK)는 4 $^{\circ}$ C에 6-8시간 반응 시켰다. 그 후 PBS로 3회 수세하고 다시 biotinylated antimouse goat serum (BioGenex, USA)에 역시 실온에서 30분간 반응 시켰다. 다시 PBS로 3회 수세 후 streptavidin labeled peroxidase (Biogenex, USA)에 실온에서 30분 반응시킨 후 PBS로 3회 수세하였고 그 후 diaminobenzidine (DAB)으로 발색하였다. 그 후 흐르는 물로 수세 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 음성 대조군은 일차 항체 대신 정상 생쥐혈청을 반응시킨 후 그 이후 과정은 동일하게 시행하였으며 양성 대조군은 cyclin D1 발현이 현저한 후두암종 조직을 이용하였다.

Cyclin D1 염색이 균일한 부위를 택하여 종양세포 중 5% 이하의 염색을 보인 경우: 0, 5% - 30%: +, 31% - 60%: ++, 61% 이상을 +++로 판독하여 -/+은 저

발현군, ++/+++은 과 발현군으로 분류하였다. 통계적 처리는 χ^2 Fisher exact test를 시행하여 각 군 간의 유의성을 검정하였고 p값이 0.05 미만인 경우를 유의성이 있다고 평가하였다.

결 과

(1) HPV typing

각 예마다 DNA microarray의 반응이 관찰되었고 이러한 반응은 강한 특이성을 보였다 (Fig. 2). 특히 중복 감염된 예들은 DNA microarray의 검사 결과 용이하게 발견할 수 있었다. 50예 중 HPV 감염 양성인 39예 (78%), 음성이 11예(22%)이었으며, 감염 양성 예 중

HPV 16이 17예(34%), HPV 58이 8예(16%)이었고, HPV 18형은 관찰되지 않았다. HPV 양성 중복감염이 4예(8%)에서 관찰되었다. 이외의 아형이 6예(12%)이었다 (Table 1). CIN I에서는 HPV 음성과 HPV 양성을 비교해 볼 때 음성은 83.3%, 양성인 16.7% ($p < 0.05$)로 HPV 음성이 유의성 있는 것으로 나타났다. 반면, CIN II 이상의 종양에서는 총 44예 중 음성이 6예 (13.6%) 양성인 38예(86.4%)로 역시 유의성 있는 소견을 보였다. 각각의 HPV 아형에 따른 분포를 보면 HPV 16형이 전체의 34%, 58형이 16% 및 52형이 8%이었고, 본 연구의 DNA microarray로 검출되는 22종의 HPV 아형 이외의 기타 아형도 12%에서 관찰되었다.

Fig. 2. Laser scanning results of HPV DNA chip.

Table 1. HPV types according to the uterine Cervical Neoplastic Lesions.

Lesions	HPV Types						
	Negative	16	58	52	33+35	40+44	Others
CIN I (n=6)	5(83.3)	1(16.7)	-	-	-	-	-
CIN II (n=12)	2(16.7)	5(41.6)	2(16.7)	-	-	1(8.3)	2(16.7)
CIN III (n=8)	-	1(12.5)	4(50)	-	-	1(12.5)	2(25)
Inv. Ca. (n=24)	4(16.7)	4(16.7)	2(8.3)	4(16.7)	2(8.3)	-	2(8.3)
Total (n=50)	11(22)	17(34)	8(16)	4(8)	2(4)	2(4)	6(12)

Inv. Ca. : invasive carcinoma

() : %

(2) Cyclin D1면역조직화학적 염색

정상 자궁경부 상피세포에서의 cyclin D1 발현은 대부분이 suprabasal cell에 국한되었으며 suprabasal cell 위층의 분화된 세포에서는 발현되지 않았다 (Fig. 3). 그러나 HPV 16형에 감염된 한정된 예의 CIN II, III에서는 cyclin D1의 발현이 현저히 감소되었다 (Fig. 4). 반면 HPV 음성인 CIN II, III에서 cyclin D1의 발현이 증가하였다 (Fig. 5). 침윤암에서 cyclin D1의 발현 증가가 관찰되었는데, 이는 주로 종양이 간질로 침범하는 침범부 위에서 관찰되었다 (Fig. 6).

전체적으로 볼 때, cyclin D1 음성은 18예(36%)이었고, 양성인 32예(64%)이었다. Cyclin 발현의 비교를 음성 및 +군의 저 발현군과 ++이상의 과 발현군으로 비교할 때, HPV 음성 11예 중 저 발현군이 6예(54.5%), 과 발현군이 5예(45.5%)로 두 군 중 통계적 차이는 없었다. 반면 HPV 양성인 군에서의 cyclin D1 저 발현과 과 발현을 비교할 때, HPV 양성인 39예 중 저 발현이 36예(92.3%), 과 발현이 3예(7.7%)로 두 군 사이에 통계적으로 유의 있는 차이가 있었다 (Table 2).

Fig. 3. The cyclin D1 was expressed mainly in the suprabasal cells.
(cyclin D1, ABC, peroxidase, X100)

Fig. 4. The cyclin D1 was expressed in the CIN III, while it was expressed in the suprabasal cells of neighboring normal epithelium.(cyclin D1, ABC, peroxidase, X100)

Fig. 5. The cyclin D1 was strongly expressed in the CIN II. (cyclin D1, ABC, peroxidase, X100)

Fig. 6 The cyclin D1 was strongly expressed in nuclei of the cell nests invading the stroma. (cyclin D1, ABC, peroxidase, X100)

Table 2. Cyclin D1 expression according to the HPV Types.

HPV types	Cyclin D1 expression			
	-	+	++	+++
Negative (n=11)	1(9.1)	5(45.4)	3(27.3)	2(18.2)
HPV 16 (n=17)	8(47.1)	8(47.1)	1(5.8)	-
HPV 58 (n=8)	4(50)	3(3.75)	1(12.5)	-
HPV 52 (n=4)	2(50)	1(25)	1(25)	-
HPV 33+35 (n=2)	1(50)	1(50)	-	-
HPV 40+44 (n=2)	-	2(100)	-	-
Others (n=6)	2(33.3)	4(66.7)	-	-
Total (n=50)	18(36)	24(48)	6(12)	2(4)

() : %

-/+ : 저발현군

++/+++ : 고발현군

고 찰

자궁경부암종은 세계적으로 발생빈도가 5위이며⁽⁹⁾, 부인과 여성의 악성종양 중 3위의 빈도를 차지하는 비교적 흔한 종양으로⁽¹⁰⁾, 이의 발병 원인인 인유두종바이러스의 아형들의 DNA 염기서열은 상이하나 구조적으로 볼 때 전 아형 모두 동일한 3부위를 갖고 있다. 즉 첫째는 특정한 단백질질을 만들지 않는 약 1000bp 부위로 이 부위는 주로 바이러스의 증식과 바이러스 단백질의 전사(transcription)를 담당하며, 둘째는 바이러스의 초기 전사부위(early gene), 셋째는 바이러스 후기 전사부위(late gene) 등의 세 부위를 공통적으로 갖고 있다. 이들

초기 전사부위에서 만들어지는 단백질(early proteins)은 E1, E2, E4, E5, E6, E7이 있고 후기 전사부위는 L1 및 L2 단백을 만든다. 지금까지 악성 종양 발생기전이 잘 알려진 인유두종 바이러스 아형은 -16과 -18로 이들 바이러스에 감염된 모든 사람이 악성 종양으로 발전하는 것이 아니며, 악성 종양으로 발전된다 하여도 감염 후 종양 발생까지 5년 -20년의 오랜 잠복기가 필요하다. 따라서 이러한 고 위험의 인유두종 바이러스 감염에 의하여 악성 종양이 발생하기 위하여서는 다른 보조인자들이 필요하다⁽¹¹⁾. 인유두종 바이러스 감염에 의한 악성 종양 발생에 E6와 E7 바이러스 단백질이 중요한 역할을 하는데, 이 바이러스가 세포에 감염하여 숙주유전자와 결합된다. 이때

E6와 E7 유전자만 온전히 숙주유전자에 끼어 들게 되고 다른 단백 만드는 유전자는 발현 될 수 없도록 서로 떨어져 들어가게 된다. 이러한 과정으로 만들어진 E6와 E7 단백질은 세포주기 조절을 와해시키는 한편 암억제 유전자 산물인 p53과 Rb1과 결합하여 이들의 작용을 억제함으로써 악성 종양을 일으키는 것으로 알려졌다^(11, 12). 그러나 이 외에 이들 단백질이 ras나 fos등의 다른 암 발생단백 (oncoprotein) 등과 상호 작용하여 암을 일으킨다고도 한다⁽¹³⁾.

지금까지 알려진 인유두종 바이러스 아형감염 검사는 중합효소연쇄반응(PCR)법, PCR 후 제한효소 처리하여 PCR 산물의 잘리는 모양으로 관찰하는 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism), 및 PCR 산물을 직접 전기영동 분석 후 동형검사를 하는 방법 등이 있으나 이들 간에 각각 장단점이 있다. 이들 방법 중 최근에 개발된 DNA microarray는 비 특이적인 교차반응의 가능성이 있는 단점이 있으나 복합 감염 시 이를 비교적 정확히 검출할 수 있는 장점이 있다. 그러나 감염 바이러스 아형의 종양 발생기전을 알기 위하여서는 염기서열에 의한 바이러스 아형 검사가 중요하리라 생각된다. 본 연구 결과 중 특이한 것은 일반적으로 알려진 내용과 달리 18보다 58아형이 더 많이 관찰되었는데 이러한 결과는 Chan 등⁽¹⁴⁾이 홍콩 여성을 대상으로 한 연구에서 58아형이 16아형에 이어 두 번째(23.8%)의 감염빈도를 보인다는 연구 결과와 비슷하며 또한 Sasagawa 등⁽¹⁵⁾은 16아형이 HSIL과 편평상피암에서 가장 감염 빈도가 높았고, 다음으로는 HSIL에서 58아형이 15%, 편평상피세포암에서는 52아형이 12%를 차지하여 동양에서는 18형보다 58형은 52형의 감염이 서구에 비하여 많았다고 하였다. 또한 Liaw 등⁽¹⁶⁾은 중국 여성을 대상으로 한 연구에서 서구에서와 달리 52아형과 58아형이 자궁경부암 발생과 관련 있다고 하였다. 이들 결과와 본 연구 결과를 종합하여 볼 때, 비록 본 연구 대상에 수가 적지만 우리나라 여성에서 자궁경부 종양발생과 관련된 인유두종 바이러스 아형은 서구의 아형과 상이할 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 우리나라 여성에서의 16아형 이외의 고 위험군 바이러스 감염에 대한 역학적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 인유두종 바이러스의 중복 감염은 바이러스 감염 39예 중 4예(10.2%)에서 관찰되었다. 이들은 CIN II, III 2예에서 40, 44아형과 침

윤성암 2에서 33, 35아형에 의한 중복 감염이었는데 40아형과 44아형은 저 위험군의 바이러스이며 33아형과 35아형은 고 위험군 바이러스로, 침윤암에서 고 위험군 바이러스의 중복 감염이 관찰되었다. 이러한 결과는 Sasagawa 등⁽¹⁵⁾의 연구에서 고 위험군의 중복 감염이 자궁경부 상피 종양의 등급이 높아짐에 따라 증가되었다는 보고와 일치하는 것이다.

정상적으로 세포주기(cell cycle)는 각 주기에 특징적으로 작용하는 cyclin이란 물질과 cyclin 의존성 활성 물질들(cyclin dependent kinase CDKs)에 의하여 오차 없이 조절된다. 그러나 이러한 물질들에 의한 조절에 이상이 오면 세포주기가 제어 없이 돌아 세포분열이 증가되며, 따라서 종양으로 발전될 수 있다. 세포주기 중 중요한 부위는 G1기에서 S기로 이행하는 부위로 이 부위를 조절하는 cyclin은 cyclin D이며, 중요한 암 억제유전자인 p53과 pRB가 이 부위의 세포주기를 제어해 줌으로 종양 발생을 억제해 준다⁽¹⁷⁾. 즉 세포 주기 중 G1에서 S기로의 진입은 세포가 일단 G1기에서 S기로 넘어가면 세포주기의 다음 단계들 (G2 및 M)은 쉽게 진행 할 수 있기 때문에 전체적인 세포주기를 조절하는데 매우 중요하다. 세포가 성장에 필요한 어떤 자극을 받으면 G1 초기에 CDK4 및 CDK6와 결합하는 cyclin D의 합성이 증가된다. 그리고 cyclin E는 G1기의 후기에 생성되어 CDK2와 결합한다. 이렇게 만들어진 cyclin D와 cyclin E의 CDK결합체인 D/CDK4, D/CDK6 및 E/CDK2는 pRB를 인산화시킨다. 인산화가 미흡한 pRB는 전사인자의 일종인 E2F와 강하게 결합되어 있는데 cyclin/CDK 복합체는 pRB를 인산화 시킴으로써 pRB로부터 E2F를 유리하게 하고 이렇게 유리된 E2F는 핵과 반응하여 세포주기를 진행하는데 필요한 물질을 전사하도록 유도한다. 따라서 cyclin D의 과 발현은 세포 주기의 진행을 촉진시키기 때문에 다양한 종양 발생의 한 원인이 되고 있다. HPV와 cyclin D1과의 관계를 보면 cyclin D1의 CDK binding 특색이 고 위험군 HPV E5와 유사하기 때문에 HPV E7과 CDK가 결합하고 이 복합체가 pRB를 인산화 함으로 cyclin D1과 무관하게 세포주기를 교란시킴으로 암 발생을 유도한다 (Fig. 5). 그러나 cyclin D1유전자의 증폭, 재배열 및 과 발현이 다양한 종양에서 관찰되고 있으며 악성종양의 예후와도 관련이 있다^(18, 19). 시험관 내 실험에 의하면 고 위험군의 인유두종 바이러스의

E6과 E7은 세포의 유전자에 변이를 유도하며 세포주기에 관여하는 단백질과 결합하여 세포주기를 교란하여 세포분열을 빠르게 진행시킴으로 바이러스 스스로가 증식될 뿐 아니라 악성종양으로 진행되게 한다(8, 21, 22).

Fig. 5. The cyclin D1 was strongly expressed in the CIN II. (cyclin D1, ABC, peroxidase, X100)

Cyclin D1 발현의 비교를 음성 및 + 군의 저 발현군과 ++ 이상의 과 발현군과 비교할 때, HPV 음성 11예 중 저 발현군이 6예(54.5%), 과 발현군이 5예(45.5%)로 두 군 중 통계적 유의 있는 차이는 없었다. 반면 HPV 양성인 군에서의 cyclin D1 저 발현과 과 발현을 비교할 때, HPV양성인 39예 중 저 발현이 36예(92.3%), 과 발현이 3예(7.7%)로 두 군 사이에 통계적인 유의성이 있었다 ($p<0.05$). 또한 침윤암에서 cyclin D1의 과 발현은 주로 종양이 간질로 침범된 부위에서도 관찰되어 cyclin D1 과 발현이 종양의 진행과 관련 있음을 시사해 주고 있다.

Shirley등(8)은 자궁경부 종양 중 저 위험군의 바이러스에 감염된 예 중 92%에서 cyclin D1의 과 발현이 관찰되었으며, 고 위험군 바이러스 감염예에서는 이의 과 발현이 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 연구결과는 이들의 연구결과와 비교해 볼 때 비록 빈도수의 차이는 있으나 일반적으로 같은 경향을 보여주고 있다. 고 위험군 바이러스 감염시 cyclin D1의 과 발현 없이 악성종양으로 진행되는 과정은 고 위험군 바이러스의 E7 단백질이 Rb 단백질과 결합하여 전사인자인 E2F를 유리 및 전사를 증가시켜 cyclin D1 없이 세포주기가 제어 없이 도는 것으로 설명되고 있다.(6) 이와 반하여 저 위험군 바이러스 감염시 cyclin D1의 발현이 증가되는 데 이는 저 위험군 바이러

스 E7이 Rb단백과의 결합력이 고 위험군 바이러스 E7에 비하여 약하기 때문에 주로 cyclin D1에 의하여 세포주기가 빨리 진행되기 때문이다(23).

이상의 결과를 종합하면 자궁경부 상피 종양에서 HPV 감염 중 HPV 16형이 제일 많았고 다음이 58형이었으며 중복 감염도 드물지 않는 것으로 나타났다. 이러한 이유는 기존의 검사법으로 검출하기 어렵거나 할 수 없었던 아형을 HPV DNA chip의 사용으로 쉽게 검출 할 수 있었던 것으로 생각되나 좀 더 크고 다양한 모집단을 대상으로 하는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 cyclin D1의 발현은 HPV 감염이 동반된 종양에서 관찰되나 고 위험군의 HPV 감염 시 cyclin D1의 발현이 되지 않는 것으로 보아 고 위험군의 HPV가 cyclin D1 gene의 증폭에는 관계하나 이 증폭된 gene은 면역조직학적 염색에 발현이 되지 않는 변형된 단백을 생산하거나 생산능력을 상실한 것으로 사료된다. 이에 향후 HPV에 감염된 조직에서 cyclin D1 gene 증폭과 cyclin D1의 발현의 상관관계에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Zur Hausen H. Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. *Cancer Res* 1989;49:4677-81
2. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD. Human papillomavirus infection of the cervix. Relative risk associations of fifteen common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79:328-337
3. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhause J. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436-40
4. Matsushima H, Roussel M, Ashmun RA. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;65:701-13
5. Winston JT, Pledger WJ. Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and independent mechanism. *Mol Cell Biol* 1993;4:1133-44
6. Lukas J, Muller H, Barkova J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cells requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol* 1994;125:625-38
7. Imai Y, Matsushima Y, Sugimura T. Purification and characterization of human papilloma- virus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the

- underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *J virol* 1991;65:4966-72
8. Shirley A, Southern C, Simon H. 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
9. Pisani P, Parkin DM, M Munoz, N Ferlay J. Cancer and infection estimates of the attributable fraction in 1995. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1997;6:387-400
10. 국립암센터 99년 암등록 현황
11. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7
12. Werness BA, Levine AJ, Howley PM Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 with p53. *Science* 1990;248:76-79
13. Mansur CP, Androphy EJ Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochem. Biophys Acta* 1993;1155:323-45
14. Chan PK, Li WH, Chan MY. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med virol* 1999;59:232-8
15. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papilloma- virus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epid Biom Prev* 2001;10:45-52
16. Liaw KL, Hsing AW, Schiffman MH. Human papillomavirus type 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women. *Int J Cancer* 1997;73:775-6
17. Sherr C J Cancer cell cycles. *Science* (Washington DC) 1996;274:1672-7
18. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo SL. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 1996;2:175-80
19. Xu L, Davidson BL, Murty VV. TP53 gene mutations and CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1994;59:383-7
20. Martin LG, Demers GW, Galloway DA. Disruption of the G1 /S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin. *Eur J Virol* 1988;72:975-85
21. Frattini MG, Hurst SD, Lim HB, Swaminathan S, Laimins LA. Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *ENBO J* 1997;16:318-31
22. Thomas JT, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint *J Virol* 1998;72:1131-7
23. Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 zinc-binding proteins. *J Virol* 1989;63:1404-7

■ 국문 초록 ■

인유두종 바이러스는 지금까지 약 80여종이 발견되었으며 발암능력에 따라 저 위험군과 고 위험군으로 나뉘어져 있고 자궁경부 종양에서 가장 강력한 원인으로 고려되고 있으나 정확한 병리발생학적 과정이 밝혀져 있지 않다. 세포주기는 몇몇의 cyclin과 cyclin dependent kinase에 의하여 엄격히 조절된다. Cyclin D1은 G1-S시기에 세포주기의 진행을 조절하며 인간세포에서 과 발현은 G1기에서 S기로 이행하는 시기에 세포를 조정하여 종양형성에 기여하는 것으로 알려졌다. 본 연구에는 자궁경부 상피내 종양과 침윤암 등 50예를 대상으로 HPV 아형을 구분하였으며 cyclin D1 발현을 검사하여 자궁경부에서 HPV의 발암과정에 cyclin D1 발현관계를 조사하였다.

1. 감염 양성 예 중 HPV 16이 17예(34%), HPV 58이 8예(16%)이었고, HPV 18형은 관찰되지 않았으며 중복 감염이 4예(8%)이었다. 그 외의 아형이 6예(12%)이었다.
2. 총 50예 중 cyclin D1 음성은 18예(36%)이었고, 양성은 32예(64%)이었다.
3. HPV 양성인 39예 중 cyclin D1의 저 발현이 36예(92.2%), 고 발현이 3예(7.7%)로 두 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다. ($p < 0.05$)

이상의 결과를 종합하면 자궁경부 상피종양에서 HPV 감염 중 HPV 16형이 제일 많았고 다음이 58형이었으며 중복 감염도 드물지 않은 것으로 나타났다. 또한 cyclin D1의 발현은 HPV 감염이 동반된 종양에서 관찰되나 고 위험군의 HPV 감염 시 cyclin D1의 발현이 되지 않는 것으로 보아 고 위험군의 HPV가 cyclin D1 gene의 증폭에는 관계하나 이 증폭된 gene은 면역조직학적 염색에 발현이 되지 않는 변형된 단백을 생산하거나 생산능력을 상실한 것으로 사료된다. 이에 향후 HPV에 감염된 조직에서 cyclin D1 gene 증폭과 cyclin D1 단백 발현의 상관관계에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.