

## 인유두종바이러스 검출 및 유형동정을 위한 종합효소연쇄반응 공통 프라이머와 올리고-DNA 칩의 확립

포천중문의과대학교 생명과학 전문대학원, \*분당차병원 산부인과학교실 부인암 종합진료센터  
권지은 · 김연수 · 김승조\* · 나영정\* · 김인호\* · 이선영\* · 고정재 · 이상화

### Establishment of General Primers and Oligo-DNA Chip for the Detection and Typing of Human Papillomavirus

Ji Eun Kwon, Yeon Soo Kim, Seung Jo Kim\*, Young Jeong Na\*,  
In Ho Kim\*, Sun Young Lee\*, Jung Jae Ko, and Sang Hwa Lee  
Graduate School of Life Science and Biotechnology, \*Comprehensive Gynecologic Cancer Center,  
Bundang Cha Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology,  
College of Medicine, Pochon CHA University, Sungnam, Gyeonggi-do, Korea

**Objective :** To establish the use of a HPV oligo-DNA chip for early diagnosis and prognosis assessment in cervical cancer.

**Methods :** HPV PCR general primers and a oligo-DNA chip have been constructed by using HPV genomic sequences on the webs and computer programs. With a total of 344 random cervical scrapes, their efficacies were explored based on pathology.

**Results :** All subjects (n=48) with diagnosis of low squamous intraepithelial lesion (LSIL) were positives for both HPV PCRs and oligo-DNA chip tests, whereas 44 out of 286 subjects (264 cases of NIL and 22 cases of ASCUS) were detected HPV positives. The proportion of each genotypes in HPV positive subjects were 38.0% (HPV-16), 16.3% (HPV-58), 9.8% (HPV-52) and 35.9% (others).

**Conclusion :** This study gives favorable result to establish a novel method using HPV oligo-DNA chip with PCR general primers, based on the clinical trials in random subjects although the scale is small in size. In the future, a diverse of comparative and systematic clinical studies should be followed.

**Key Words :** Human papillomavirus, General primer, HPV oligo-DNA chip, Cervical cancer

## 서 론

자궁경부암은 국내 여성의 10대 호발 암 중 위암 (15.8%)과 유방암 (15.1%)에 이어 3위(10.6%)를 차지하고 있고, 특히 최근엔 20-30대 젊은 여성의 발병률이 크게 늘어 전체 환자의 32%를 차지하는 등 주요 문제로 남아 있다.<sup>1,2</sup> 현재 이는 성 접촉으로 인해 감염되는 인유두종바이러스 (human papillomavirus, HPV)가 주요 인자인 것으로 밝혀지고 있으며,<sup>3</sup> 특히 HPV

의 E6와 E7 단백질이 각각 세포내 종양억제 단백질인 p53과 pRb와 결합하여 이들 기능을 폐기함으로써 발암하는 것으로 보고되고 있다.<sup>4,5</sup>

지금까지 HPV는 E6, E7 또는 L1 유전자의 염기서열에 근거한 120가지 이상의 서로 다른 유형이 발견되고 있는데,<sup>6</sup> 이들 중 하부 생식기에 감염하는 것으로는 HPV-2, -3, -6, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61,

-62, -64, -66, -67, -68, -69, -70, -72, -73, -74등의 45 유형이 있고, 다시 자궁경부암과 관련 정도에 따라 HPV-16, -18, -26, -30, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -53, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -70, -73, -74의 고위험군 (high-risk group)과 HPV-2a, -3, -6, -10, -11, -32, -34, -40, -42, -43, -44, -54, -55, -69, -72의 저위험군 (low-risk group)으로 구분될 수 있다.<sup>7</sup>

현재 자궁경부암과 그 전구병변의 초기 선별을 위해 자궁질경부 세포진의 세포학적 형태에 근거하는 세포도말 검사가 1940년대부터 표준검사로 시행되고 있으며, 이는 자궁경부암 사망률을 크게 감소시키는데 일익을 담당해 왔으나 30~40%의 높은 위 음성이 문제점으로 지적되고 있다. 또한 그 병인학적 인자 HPV DNA에 근거한 분자생물학적 검사로는 미국 다이진 (Digene) 사의 하이브리드 캡처 (hybrid capture)와 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 들 수 있다. 미국 FDA 승인을 받은 전자는 대상 DNA와 RNA 프로브 사이의 액상 상보결합을 항체 효소 발색반응을 통하여 검출하는 방법으로 자궁경부암과 그 전구병변의 초기선별 또는 추적 검사가 가능하나, RNA 프로브를 이용함에 따라 안정성과 오염 가능성의 내재적 취약점을 안고 있다.<sup>8,9</sup> 한편, PCR은 특이 프라이머의 증폭반응에 근거한 민감한 방법으로서 다양한 HPV 유형의 포괄 검출을 위해 많이 이용되고 있는데, 대표적인 프라이머로는 북아메리카와 남아메리카, 그리고 아시아 지역에서의 MY11/MY09, 유럽에서의 GP5+/GP6+와 SPF1/SPF2 등이 있고, 최근에는 개선된 PGMY11/PGMY09가 추가되고 있다.<sup>10,11</sup> 그러나 이들은 HPV의 포괄적 검출에서 유형에 따른 민감도 한계<sup>12,13</sup>를 나타낼 뿐만 아니라, 하이브리드 캡처와 함께 HPV의 감염유형을 구분할 수 없는 단점을 가지고 있다.

최근 한 장의 현미경 슬라이드 위에서 수십~수만 종류의 유전자를 동시에 검사할 수 있는 DNA 칩 방식이 확립되었다. 이는 유전자 발현 해석, 유전자 진단, 유전자 돌연변이, 의약품 스크린 및 질환 진단 등에 널리 응용될 수 있고, 특히 이를 이용한 다양한 HPV의 유형 동정은 자궁경부암의 초기선별뿐 아니라 향후 진행 및 추적 검사에 유용한 것으로 보고되고 있다.<sup>14,15</sup> 그런데, 국내 한 벤처회사는 기존과 완전히 구분되는 새로운 칩 기반 기반기술을 독자적으로 개발하였는데, 이는 종래의 DNA 칩이 프로브의 5' 말단을 아민기로 변형시킨 뒤 기관 유리슬라이드상의 알데히

드와 시프염기 화학반응에 의존하는 반면 단지 9개의 구아닌 염기를 추가적으로 포함한 프로브가 자발적 염기쌍 반응으로 간단히 고정화되는 특징을 갖고 있다.<sup>16,17,18</sup>

따라서 본 연구에서는 자궁경부암 관련 종양원성 HPV를 포괄 검출할 수 있는 PCR 공통 프라이머와 그 종양원성 HPV 유형을 간단히 동정할 수 있는 새로운 칩 기관 활용 올리고-DNA 칩을 개발하여 자궁경부암의 초기 진단 및 관리에 활용하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상

2003년 12월부터 2004년 6월까지 7개월간 포천중문 의과대학교 차병원 부인암센터 외래 진료소를 내원한 334명을 대상으로 자궁질경부 세포진을 채취하여 1/15 M 인산 완충액 15 ml에 담아 4℃ 보관 사용하였다. 또한 모든 대상자는 당일의 세포/조직 병리검사에서 각각 미소병변 (no intraepithelial lesion, NIL) 264건, 비정형세포 (atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS) 22건, 저등급병변 (low squamous intraepithelial lesion, LSIL) 29건, 고등급병변 (high squamous intraepithelial lesion, HSIL) 18건 및 편평 상피세포암종 (squamous cell carcinoma, SCC) 1건으로 조사되었다.

### 2. PCR 공통 프라이머 설계

미국 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 로스 알라모스 HPV 데이터베이스로부터 HPV-6, -11, -16, -18, -26, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -56, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -70, -72, -73의 게놈염기서열을 확보하였다. 이들을 컴퓨터 프로그램 'DNASTAR MegAlign™ 5' (DNASTAR Inc.)를 활용하여 ClustalW법으로 쌍정렬 (pairwise alignment) 및 다중서열정렬 (multiple sequence alignment)을 실행한 후 분류계통도를 작성하고 각 그룹을 대표하는 임의의 유형을 선별한 다음, 다시 컴퓨터 프로그램 'Primer Premier 5' (Biosoft International Co.)를 활용하여 PCR 공통 프라이머를 생성하였다. 이때 프라이머의 길이는 25±2로 설정하였고 산물의 크기는 200bp~550bp로 제한하였다. 또한 모든 프라이머는 HPV의 개별 유형에 대한 가상 증폭실험 (Amplify 1.2, <http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>)을 수행함과

동시에 프라이머의 일부 위치에서는 퇴축염기를 도입하였다.

### 3. PCR DNA 추출과 증폭 반응

모든 PCR은 다음과 같은 사전 DNA 추출 절차를 수행하였다. 즉, 세포액 1 ml를 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후 1 ml의 용액 I (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA)을 첨가하여 완전히 녹인 후 12,000 rpm에서 2분간 원심 침전하였다. 여기에 용액 II (Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.5% SDS) 800  $\mu$ l를 첨가하고 65°C에서 30분간 반응시킨 후 6 M 식염수 300  $\mu$ l와 클로로포름 1 ml를 가하여 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 그 상층액은 2-3배의 에탄올을 첨가하여 원심 분리하였고, 이때 침전 DNA는 TE 완충액 (10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 1 mM EDTA)에 용해하여 냉동 보관하였다. 한편, PCR 증폭 반응은 T1 Thermocycler (Whatman Biometra Corp.)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 0.2 ml PCR 튜브에 주형 DNA 8  $\mu$ l, 프라이머 각 40 pmol, dNTPs 각 200  $\mu$ M, 10X 완충액 및 Taq DNA 중합효소 1단위를 첨가하여 총 반응액을 20  $\mu$ l로 조정하고, 이를 94°C에서 5분간 예비 변성시킨 후 94°C에서 1분 변성, 50°C에서 1분 결합, 그리고 72°C에서 1분 신장의 총 45회를 반복하고 최종적으로 72°C에서 5분간 신장 반응하였다. 이때 HPV의 기존 공통 프라이머인 GP5+/6+ 및 MY11/09는 모든 PCR 조건을 위와 동일하게 하였으나 결합 온도의 경우 각각 55°C와 40°C로 하였고, 또한 대상 시료의 PCR 반응 적합성을 평가하기 위해 GAPDH 유전자 프라이머(CAAGGCTGTAAGCGAGTATATCAAT/CCTTCTTGATGTTATCATATTTGGC)의 PCR 증폭을 동반 수행하였다. 모든 PCR 산물은 분자량 표지 (Promega, Corp.)와 함께 그 5  $\mu$ l를 1.5% 한천 겔 상에서 전기영동 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV 하에서 증폭 여부를 판정하였다.

### 4. 올리고-DNA 칩 제작

먼저 칩 프로브를 설계하기 위해 HPV PCR 공통 프라이머의 증폭 부위 염기서열을 확보한 다음 하나의 연속서열로 배열하고, 컴퓨터 프로그램 'Primer Premier 5'를 활용하여 HPV 유형 특이적 프로브를 확보하였다. 이때 프로브의 길이는 28 $\pm$ 7mer로 제한하였으며, 모든 프로브는 컴퓨터 프로그램 'Amplify 1.2'로 그 특이성을 검증하였다. 그리고 이들 프로브는 5' 말단에

9개의 구아닌 염기를 부가하여 합성하고 BMT D-a chip<sup>TM</sup> 상 (Biometrix Technology)에 집적한 후, HPV PCR 산물의 염기서열 동정으로 확립된 다양한 표준 DNA와 그 특이적 교잡반응으로 최종 선별하였다. 한편 칩의 실제 교잡반응 적합성을 검증하기 위해 GAPDH 특이 프로브를 부가하였다.

### 5. 올리고-DNA 칩 교잡 반응

HPV 칩 유형 동정은 Cy3 (Glen Research Co.) 형광 표지 프라이머로 PCR 증폭 후 다음의 과정을 통해 수행하였다. 즉, PCR 증폭산물 5  $\mu$ l를 95°C에서 3분간 열 변성시킨 후 즉시 얼음 속에서 3분간 방치하고, 교잡 반응액 55  $\mu$ l (20 $\times$ SSC, 90% glycerol, 50 mM phosphate buffer 및 0.1% SDS)를 첨가하여 칩 슬라이드에 적용한 다음 50°C 습윤 배양기에서 15분간 반응시켰다. 그리고 2 $\times$ SSC 용액이 담겨져 있는 30°C 수조에서 1분간 슬라이드를 세척한 후 다시 4 $\times$ SSC 용액으로 옮겨 상온에서 1-3분간 세척하고, 에탄올과 0.1 $\times$ SSC 용액으로 각각 세척 건조하였다. 최종 슬라이드는 컨포칼 레이저 스캐너 (confocal laser scanner, GMS 418 Array Scanner TaKaRa)로 HPV 유형 특이적 위치에서 해당 형광신호를 측정하였다.

## 결 과

### 1. HPV PCR 공통 프라이머의 구축

본 연구에서는 자궁경부 상피 감염 다양한 HPV의 포괄적 검출을 목적으로 컴퓨터 프로그램에 의한 PCR 프라이머를 자동 생성하였고, 이들 프라이머는 일부 위치에서 퇴축 염기를 부가적으로 도입함과 더불어 가상 증폭 컴퓨터 프로그램에 적용하여 총 30유형의 모든 조사 대상 HPV에 대해 총 5등급 중 상위 3등급의 증폭세기를 보이는 한 조의 공통 프라이머를 취하고 GP1F/1R로 명명하였다. 이는 지금까지 보고된 여타 HPV 공통 프라이머와의 기본적 특징 비교 (Table 1)에서 CP- I/II, IU/IWDO, GP1/2, E6C1/2, CONSENSUS의 E1, E6, 혹은 E6-E7와 달리 L1을 증폭 대상으로 하였고, 또한 그 증폭 위치 및 크기에서 HPV-16 기준 6547~6762의 216bp이었는데 이는 L1 목표의 모든 프라이머; MY11/09 (6583-7035, 452bp), PI-1/2 (6583-7035, 452bp), SPF-1/2 (6583-6647, 65bp), PGMY11/09 (6583-7034, 452bp), GP5/6 (6625-6766, 142bp), GP5+/6+ (6624-6766, 143bp), GP11/12 (6625~

**Table 1.** List of PCR primers for the broad detection of genital HPV types

Primers	Sequences (5'-3')	Gene	Position	Size (bp)	Reference
	Forward/Reverse				
GP1F/1R	GCACAHTATTTAATAARCCWTWYTGG /AAYAAAYTGAAATCAWAYTCYTC	L1	6547-6762	216	Current paper
MY11/09	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG /CGTCCMARRGGAWACTGATC	L1	6583-7035	452	Manos et al., 1989
PI-1/2	GCICAGGGICATAAIAATGG /CGTCCIAIIGGAIACGTATC	L1	6583-7035	452	Novelli et al., 1992
SPF-1/2	GCACAGGGCCACAATAATGG /TTTGTACTGTGTGTGATACTAG	L1	6583-6647	65	Kleter et al., 1998
PGMY11/09	CGTCCCAAAGGAAACTGATC /GCACAGGGACATAACAATGG	L1	6583-7034	452	Gravitt et al., 2000
GP5/6	TTTGTACTGTGGTAGATAC /GAAAAATAAACTGTAAATCA	L1	6625-6766	142	Snijders et al., 1990
GP5+/6+	TTTGTACTGTGGTAGATAC /GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	L1	6624-6766	143	de Roda Husman et al., 1995
GP11/12	TTTATCACAGTGGTAGACAA /GTAATATAAAAGAAATTCA	L1	6625-6766	142	Snijders et al., 1990
CP- I /IIIG	TTATCAWATGCCAYTGTACCAT /ATGTTAATWSAGCCWCCAAAATT	E1	1776-1963	188	Tieben et al., 1993
IU/IWDO	TIIRIRIHYTAAACGAAAGT /RTCRWAIGCCAYTGIACCAT	E1	1112-1961	850	Gregoire et al., 1989
GP1/2	TGGTACAATGGGCATATGAT /AATGGCTTTTGAATTTACA	E1	1940-2385	446	Adriaan et al., 1990
E6C1/2	ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAACGGT /AATAATGTCTATATCACTAATT	E6	35-341	307	Yoshikawa et al., 1991
Consensus	TGTCAAAAACCGTTGTGTCC /GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	E6-E7	419-656	238	Yasushi et al., 1992

\* The primers GP1F/1R were basically designed using a computer program 'Primer Premier 5' (Biosoft International Co.).

6766, 142bp)의 각 해당 경우와 일치 구분될 수 있었다. 그러나 좀 더 세부적으로 각 구성 프라이머의 결합위치 또는 염기 서열을 비교해 볼 때 GP1F (순상)은 어떠한 중복도 나타내지 않았으나 GP1R (역상)의 결합위치 6739~6762는 기존 프라이머 중 GP5/6 (6747~6766), GP5+/6+ (6741~6766), GP11/12 (6747~6766)의 해당 경우와 많은 일치를 나타내었다. 하지만 GP1F/1R는 PCR 반응에서 가장 중요한 3' 말단의 경우 GP5/6 및 GP11/12에 비해 8개의 부가적 염기를 내포하고 GP5+/6+에 비해서는 3개의 신규 염기를 추가 포함하는 것으로 나타났다. 따라서 GP1F/1R는 컴퓨터 프로그램에 의존하여 구축한 하나의 HPV 공통 PCR 프라이머로서 비록 그 역상이 일부 기존의 HPV 공통 프라이머와 다수 염기중복을 나타내었으나 적어도 PCR 반응에서 가장 결정적인 3'말단을 새롭게 추가한 점과

그 순상이 완전히 신규인 점을 고려할 때 기존과 구분될 수 있는 한 쌍으로 판단된다.

## 2. HPV PCR 공통 프라이머의 임상 적용

본 연구에서 구축한 GP1F/1R의 실제 HPV 검출효과를 알아보기 위해, 여성암 전문센터에서 모집된 무작위 피검자를 대상으로 세포/조직병리 검사를 수행하고 이와는 독립적으로 동일인의 자궁질경부 세포진에 대해 GP1F/1R 및 대표적인 기존 프라이머 MY11/09와 GP5+/6+의 HPV PCR 검사를 실시하여 그 결과를 비교 분석하였다. 먼저 전체 334명의 피검자 중 병리 결과는 미소병변 264명, 비정형세포 22명, 저등급병변 29명, 고등급병변 18명, 편평 상피세포암종 1명으로 나타났고, 이들은 편위상 미소병변과 비정형세포를 합쳐 정상군으로 설정하고 그 나머지를 비정상군으로

**Table 2.** Comparison of general primers on the PCR detection of HPVs from clinical subjects

Primers	HPV positives (%) of clinical subjects* (n=334)	
	Normal (n=286)	Abnormal (n=48)
GP1F/1R	44 (15.4)	48 (100)
MY11/09	66 (23.1)	47 (97.9)
GP5+/6+	58 (20.3)	48 (100)

\*Clinical subjects were diagnosed with the help of cyto-/histo-pathology. Abnormal included  $\geq$ LSIL (low squamous intraepithelial lesion), whereas normal were ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) or NIL (no intraepithelial lesion)

**Table 3.** List of specific probes for the typing of diverse HPVs

HPV types	Sequences (5'-3')
GAPDH	GGG GGG GGG AAC CTG CCA ATA TGA TAA CAT CAA GAA GG
HPV-6b	GGG GGG GGG CAT CCG TAA CTA CAT CTT CCA CAT ACA CC
HPV-11	GGG GGG GGG ATG TGC ATC TGT GTC TAA ATC TGC TAC AT
HPV-16	GGG GGG GGG TGC TGC CAT ATC TAC TTC AGA AAC TAC ATA
HPV-18	GGG GGG GGG TAC ACA GTC TCC TGT ACC TGG GCA ATA TG
HPV-26	GGG GGG GGG TAA CCT TAC CAT TAG TAC ATT ATC TGC AGC AT
HPV-30	GGG GGG GGG CTA TAT CTG CAA CCA CAC AAA CGT TAT CC
HPV-31	GGG GGG GGG ATG TCT GTT TGT GCT GCA ATT GCA AAC AGT G
HPV-32	GGG GGG GGG TGC TAC TGT AAC AAC TGA AGA CAC ATA CA
HPV-33	GGG GGG GGG ACT TTA TGC ACA AGT AAC TAG TGA CAG TAC AT
HPV-34	GGG GGG GGG TTC AGT TTG TGT AGG TAC ACA ATC CAC AAG TA
HPV-35	GGG GGG GGG TTC TGC TGT GTC TTC TAG TGA CAG TAC ATA
HPV-39	GGG GGG GGG ACC TCT ATA GAG TCT TCC ATA CCT TCT ACA
HPV-40	GGG GGG GGG GCT GCC ACA CAG TCC CCC ACA CCA AC
HPV-42	GGG GGG GGG GTG TGC CAC TGC AAC ATC TGG TGA TAC A
HPV-44	GGG GGG GGG GTG CTG CCA CTA CAC AGT CCC CTC CG
HPV-45	GGG GGG GGG TGC CTC TAC ACA AAA TCC TGT GCC AAG
HPV-51	GGG GGG GGG ACT GCT GCG GTT TCC CCA ACA TTT ACT C
HPV-52	GGG GGG GGG GAC TTT ATG TGC TGA GGT TAA AAA GGA AAG C
HPV-53	GGG GGG GGG CCG CAA CCA CAC AGT CTA TGT CTA CA
HPV-54	GGG GGG GGG GTG CTA CAG CAT CCA CGC AGG ATA GCT T
HPV-56	GGG GGG GGG ACT ATT AGT ACT GCT ACA GAA CAG TTA AGT AAA TA
HPV-58	GGG GGG GGG ATG CAC TGA AGT AAC TAA GGA AGG TAC ATA T
HPV-59	GGG GGG GGG TGT GCT TCT ACT ACT TCT TCT ATT CCT AAT GTA
HPV-61	GGG GGG GGG TTG TAC TGC TAC ATC CCC CCC TGT ATC T
HPV-66	GGG GGG GGG TTA ATG CAG CTA AAA GCA CAT TAA CTA AAT A
HPV-67	GGG GGG GGG TGT TCT GAG GAA AAA TCA GAG GCT ACA T
HPV-68	GGG GGG GGG CAA TTT TAC TTT GTC TAC TAC TAC TGA ATC AG
HPV-70	GGG GGG GGG CAC CGA AAC GGC CAT ACC TGC T
HPV-72	GGG GGG GGG CTG CCA CAG CGT CCT CTG TAT CAG
HPV-73	GGG GGG GGG ACA CAG GCT AGT AGC TCT ACT ACA ACG TAT

\*The probe sequences were constructed based on a computer program 'Primer Premier 5' (Biosoft International Co.).

구분하였다. 이때 GP1F/1R은 GP5+/6+와 더불어 비정상군 모두를 HPV PCR 양성으로 검출하였으나, MY11/09는 단 1건을 예외로 하였다. 또한 병리 정상군 286명에 대해서는 GP1F/1R이 총 44명을 HPV 감염자로 판정한 반면, MY11/09와 GP5+/6+는 다소 높은 66명과 58명을 양성으로 검출하였다 (Table 2). 따라서 GP1F/1R은 비록 제한적 실험으로 인해 충분한 임상적 효과를 지지하기 곤란하지만 적어도 자궁경부 병리 이상의 선택적 검출에서 기존 프라이머와 비교될 수 있는 하나의 HPV 공통 프라이머 확립으로 판단된다.

### 3. HPV 올리고-DNA 칩의 구축과 임상 적용

HPV 올리고-DNA 칩은 자궁경부 상피감염 30유형의 HPV 특이적 프로브와 DNA 추출 양성 대조군으로서 GAPDH 프로브 (Table 3)를 이용하여 Fig. 1a에 제시된 바와 같이 배열 제작하였고, 이는 표준 DNA에 의한 단일, 이중, 삼중 감염의 검출 실험에서 알 수 있듯이 명료한 결과 판독을 나타내었다 (Fig. 1b-d). 이에 334명의 세포진 DNA를 대상으로 병리 진단에 따른 HPV 올리고 DNA칩의 유형동정을 실시하였는데, HPV 감염자는 총 92명 (27.5%)이었고 이들 중 단일과 복합 감염은 각각 80명과 12명으로 나타났다. 전체 감염 HPV 중 유형-16은 38.0%로 가장 높은 빈도를 나타내었으며 다음은 16.3%의 유형-58, 9.8%의 유형-52, 7.6%의 유형-53과 -66, 6.5%의 유형-51 등의 순이었고, 또한 이들 중 고위험군과 저위험군 유형은 각각 102건과 3건으로 나타났다. 한편 각 병리 진단에 따라 살펴보면, HPV 양성은 미소병변 8.7%, 비정형세포

95.5%, 저/고등급병변 및 편평세포암종 100%로 조사되었고 최고 빈도 HPV-16은 24.1~52.2의 분포율 변동을 보였는데 특히 저등급병변의 24.1%에 비해 고등급병변 및 편평세포암종에서는 47.3%로 증가한 대조를 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 HPV 올리고 DNA칩은 자궁경부암 관련 다양한 임상 HPV의 감염 여부, 개별 유형 동정, 복합 감염 유무를 판별할 수 있는 하나의 기술적 확립으로 판단되며, 향후 다양한 비교연구를 통하여 칩의 세부적 기술 점검이 가능할 것으로 고려된다.

## 고 찰

본 연구는 자궁경부암과 그 전구병변의 조기 진단 및 예후 예측에 유용한 HPV 올리고 DNA칩을 확립하는데 그 목적이 있다. 이에 먼저 자궁경부 상피감염 HPV DNA를 포괄 증폭하기 위한 PCR 프라이머 GP1F/1R을 구축하였는데, 이는 여성암센터 외래 진료를 내원한 무작위 334명의 세포진 DNA를 대상으로 한 PCR 실험에서 저급상피이형성증 이상의 환자 모두 (48명)를 HPV 감염자로 선별하였고 무상피병변 264명과 비정형세포 22명을 포함하는 군에서는 44명의 감염자를 검출하였다. 반면 비교로 조사된 기존 프라이머 GP5+/6+와 MY11/09는 저급상피이형성증 이상의 환자에서 MY11/09의 1건을 제외한 모두를 검출하였으나 무상피병변과 비정형세포 군에서는 각각 66명과 58명을 양성으로 검출하였다. 이러한 결과로 볼 때 GP1F/1R은 민감도에서 기존 프라이머와 경쟁할 수

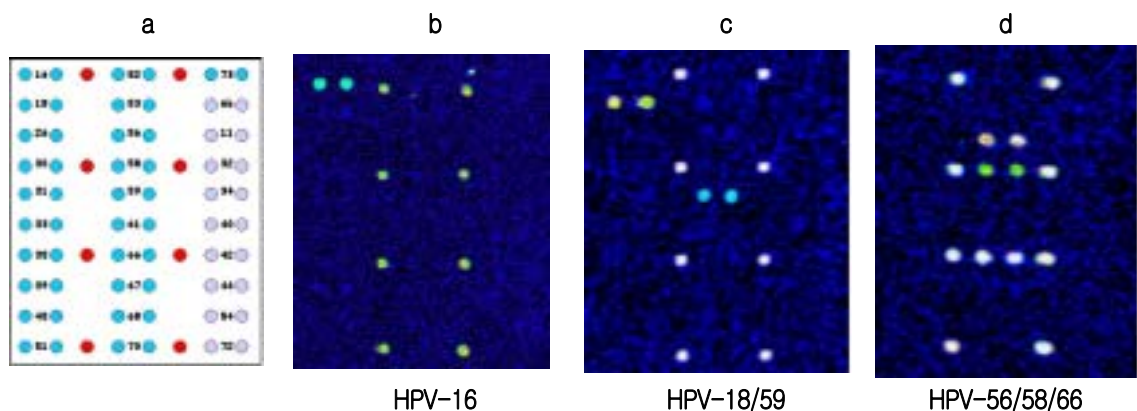


Fig. 1. Tests of HPV oligo-DNA chip to authentic infections. a: array of probes, b: single infection, c: double infection, d: triple infection.

**Table 4.** Genotypes of HPVs amplified in cervical scrapes using the HPV oligo-DNA chip

HPVs	Cyto-/histo-pathology				Total (%) n=334
	NIL <sup>1</sup> (%)	ASCUS <sup>2</sup> (%)	LSIL <sup>3</sup> (%)	HSIL <sup>4</sup> (%)	
	n=264	n=22	n=29	n=19	
High-risk	16	12 (52.2)	7 (33.3)	9 (47.3)	35 (38.0)
	18	1 (4.3)	1 (4.8)	1 (5.3)	4 (4.3)
	26	0	0	0	1 (1.1)
	33	0	1 (4.8)	0	2 (2.2)
	35	0	1 (4.8)	1 (5.3)	3 (3.3)
	39	0	0	0	1 (1.1)
	51	0	2 (9.5)	0	6 (6.5)
	52	1 (4.3)	2 (9.5)	5 (26.3)	9 (9.8)
	53	1 (4.3)	2 (9.5)	1 (5.3)	7 (7.6)
	56	0	0	0	3 (3.3)
	58	3 (13.0)	3 (14.3)	2 (10.5)	15 (16.3)
	59	1 (4.3)	0	0	1 (1.1)
	61	1 (4.3)	0	0	1 (1.1)
	66	0	2 (9.5)	0	7 (7.6)
	68	3 (13.0)	0	0	3 (3.3)
	70	0	0	2 (10.5)	4 (4.3)
Subtotal		23	21	37	102
Low-risk	11	1 (4.3)	0	0	1 (1.1)
	32	0	1 (4.8)	0	1 (1.1)
	72	0	1 (4.8)	0	1 (1.1)
Subtotal		1	2	0	3
Total	Single	22 (8.3)	19 (86.4)	22 (75.9)	80 (24.0)
	MT <sup>4</sup>	1 (0.4)	2 (9.1)	7 (24.1)	12 (3.5)
	Any type	23 (8.7)	21 (95.5)	29 (100)	92 (27.5)

<sup>1</sup>NIL; no intraepithelial lesion, <sup>2</sup>ASCUS; atypical squamous cells of undetermined significance <sup>3</sup>LSIL; low squamous intraepithelial lesion, <sup>4</sup>HSIL; high squamous intraepithelial lesion including 1 case of squamous cell carcinoma.

있고 특이도의 경우 현 조건에서 상대적 우위를 갖는 것으로 보여 지며, 이는 또한 세포도말, 하이브리드캡처, PCR 등의 여타보고 성적; 민감도 36-95%, 특이도 30-95%과 비교 가능한 것으로 판단된다.<sup>19,20,21</sup> 향후 GPIF/IR의 염기서열 교정과 특이도 부분 감소를 무릅쓴 PCR 조건을 채택할 때 HPV 올리고 DNA 칩의 일차 관건인 PCR 증폭의 민감도는 더욱 향상될 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 우리들은 GPIF/IR의 PCR 증폭부위를 대상으로 30유형의 각 특이적 프로브를 구축하고 기존에 비해 제작비용, 분석절차, 결과판독에서 유리한 칩 기반 BMT D-a chip<sup>TM16</sup>을 이용하여 HPV 올리고 DNA 칩을 구축하였는데, 이는 앞과 동일한 334명의 자궁질경부 세포진을 대상으로 병리 진단에 따른 HPV 유형동정을 실시한 결과 27.5%의 전체 감염률, 13.0%의 복합 감염률, 97.1%의 고위험군 유형률, 그리고 38.0%의 HPV-16, 16.3%의 HPV-58, 9.8%의 HPV-52, 7.6%의

HPV-53과 -66, 6.5%의 HPV-51 등의 각 유형 분포율을 구할 수 있었다. 이러한 결과는 비록 서로 다른 피검자 집단과 그 규모의 차이로 정확한 직접 비교가 곤란하지만 일부 HPV 유형동정 관련 선행보고를 참조할 수 있는데, 먼저 Kim<sup>22</sup> 등의 보고 (n=140)에서는 77.8%의 전체 감염률, 조사 군에 따른 12.8-25.7%의 복합 감염률과 96.3%의 고위험군 HPV 유형률, 그리고 41.3%의 HPV-16과 11-13.8% 범위의 HPV-18, -35, -56, -58을 유형별 분포로 조사하였다. 또한 Hwang<sup>23</sup>과 An<sup>24</sup> 등은 234명과 1650명의 피검자를 대상으로 한 각 조사에서 74.1%와 49.8%의 전체 감염률을 보고하였으며 94.9-97.5%의 고위험군 HPV 유형률과 40.8-59.9%의 HPV-16, 4.8-11.5%의 HPV-18, -31, -33, -52, -56, -58을 유형별 분포로 발표하였다. 사실 이들 선행보고는 국내 B사의 동일 칩을 이용하였음에도 불구하고 구체적 성적에서 다소 차이가 있는데 이는 또한 HPV-18을 포함하는 HPV 유형이 국가별, 지역별로 다소 분포 차이가

있다는 보고와 관련될 수 있는 것으로 생각된다. 이들을 종합해 보면 본 HPV 올리고 DNA 칩은 각 HPV 유형의 분포율, 고위험군 유형의 분포율, 복합 감염률 등은 선행 칩과 유사한 경향을 보이는 것으로 판단되나 전체 감염률과 HPV-16의 분포율은 다소 차이가 있는 것으로 보여 진다.

결론적으로, 본 연구는 신규 HPV PCR 공통 프라이머와 그에 따른 올리고-DNA 칩 구축의 전 과정을 실증한 것으로 판단되며, 비록 제한적이지만 무작위 임상 시료를 대상으로 한 다양한 HPV의 검출과 유형 동정의 성적으로 볼 때 향후 다양한 비교 실험은 해당 기술의 세부적 문제점을 충분히 보완할 수 있을 뿐 아니라 자궁경부암 관련 HPV 임상 프로토콜을 제시할 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- 대한산부인과학회 중앙분과위원회. 한국 부인암 등록 사업 조사 보고서 (1998.1~1998.12.31). 대한산부인과학회지 2001; 44: 426-59.
- 대한민국 보건복지부. 한국인의 암등록 조사자료 분석 보고서 (1994. 1. 1~1994. 12. 31). 1996 Feb.
- Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.
- Scheffner M, Takahashi T, Huibregtse JM, Minna JD, Howley PM. Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. *J Virol* 1992; 66: 5100-5.
- Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992; 12: 197-217.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
- Bergeron C, Barrasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomavirus associated with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 641-9.
- Lorincz A. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Papillomavirus Rep* 1996; 7: 1-5.
- Sun S, Ferenczy A, Johnson D, Koulos J, Lungu O, Richart R, Wright T. Evaluation of the Hybrid Capture human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection test. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1432-7.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76: 1057-62.
- Snijders PJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 1990; 71: 173-81.
- Tieken LM, ter Schegget J, Minnaar RP. Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J Virol Methods* 1993; 42: 265-79.
- Lee SA, Kang D, Seo SS, Jeong JK, Yoo KY, Jeon YT, et al. Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA Chip. *Cancer Lett* 2003; 198(2): 187-92.
- Choi BS, Kim O, Park MS, Kim KS, Jeong JK, Lee JS. Genital human papillomavirus genotyping by HPV oligonucleotide microarray in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 2003; 71(3): 440-5.
- 김태선, 송금수, 박재범. 특허법인 코리아나. 신규한 아미노캘릭스아렌 유도체, 그를 이용하여 제조된(자기조립)단분자층, 이를 이용한 올리고 DNA 고정화 방법 및 이에 의해 제조된 DNA 칩. 한국 특허 2002-0031734. 2000 Oct 23.
- 이상화, 고정재, 김연수, 나광훈, 김승조, 차광렬, 유강열. 특허법인 네이트. 중합효소연쇄반응에 의한 다양한 유형의 인유두종바이러스를 검출하기 위한 신규한 피씨알 공통 프라이머와 이를 이용한 검출 방법. 한국 특허 10-2003-53147. 2003 July 31.
- 이상화, 김연수, 유강열, 김승조, 차광렬, 고정재. 특허법인 네이트. 인유두종바이러스 유형 진단 마이크로레이와 키트 및 이의 제조 방법. 한국 특허 10-2003-79352. 2003 Dec 11.
- Franco EL. Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 89-96.
- Sigurdsson K, Arnadottir T, Snorraddottir M, Benediksdottir K, Saemundsson H. Human papillomavirus (HPV) in an Icelandic population: the role of HPV DNA testing based on hybrid capture and PCR assays among women with screen-detected abnormal Pap smears. *Int J Cancer* 1997; 72(3): 446-52.
- Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lorincz AT, Burk RD, et al. Comparison of the hybrid capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J Clin*



- Microbiol 1997; 35(9): 2262-5.
22. Kim CJ, Jeong JK, Park M, Park TS, Park TC, Namkoong SE, et al. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. Gynecol Oncol 2003; 89(2): 210-7.
23. Hwang TS, Jeong JK, Park MS, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. Gyn Oncol 2003; 90: 51-6.
24. An HJ, Cho NH, Lee SY, Kim IH, Lee C, Kim SJ, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. Cancer 2003; 97(7): 1672-80

## 국문초록

**목적 :** 자궁경부암의 조기진단 및 예후예측에 유용한 HPV PCR 올리고-DNA 칩을 확립하고자 하였다.

**방법 :** 인터넷 웹상의 HPV 게놈 염기서열과 컴퓨터 프로그램을 이용하여 HPV PCR 공통 프라이머 및 올리고-DNA 칩을 구축하였으며, 이들은 총 334명의 무작위 임상 세포진을 대상으로 병리결과와 비교 평가하였다.

**결과 :** HPV PCR 공통 프라이머와 올리고 DNA 칩은 저등급병변 이상의 48명 모두를 HPV 양성자로 검출하였고, 무상피병변 264명과 비정형세포 22명을 포함하는 군에서는 44명을 검출하였다. 또한 HPV 올리고-DNA 칩은 이들 감염자 모두에서 HPV-16, HPV-58, HPV-52 및 기타 유형이 각각 38.0%, 16.3%, 9.8%, 35.9%인 것으로 구분하였다.

**결론 :** 본 연구는 비록 제한적 실험이지만 무작위 임상결과에 비추어 볼 때 새로운 HPV PCR 공통 프라이머와 올리고-DNA 칩의 확립으로 판단되며, 향후 다양한 비교 실험과 체계적 임상 연구가 필요한 것으로 생각된다.

**중심단어 :** 인유두종바이러스, 공통 프라이머, HPV 올리고-DNA 칩, 자궁경부암