

자궁경부암에서 인유두종 바이러스감염과 표피성장인자 수용체의 과발현이 암발생과 예후에 미치는 영향

서울대학교 의과대학 산부인과학교실

강순범 · 박창수 · 진혜원 · 김종훈 · 박노현 · 송용상 · 이효표

= Abstract =

Clinical Significance of Human Papillomavirus Infection and Epidermal Growth Factor Receptor in Cervical Carcinoma

Soon Beom Kang, M. D., Chang Soo Park, M. D., Hye Won Jeon, M. D., Jong Hoon Kim, M. D.,
Noh Hyun Park, M. D., Yong Sang Song, M. D., Hyo Pyo Lee, M. D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine
Seoul National University Hospital, Seoul, Korea*

Carcinoma of uterine cervix is the most common malignant tumor in Korean women but the pathogenesis of that is not well known. Recently human papillomavirus(HPV), especially type 16 and 18, ras and c-erb-B oncogenes and epidermal growth factor receptor(EGFR) have been known to be implicated in the oncogenesis of cervical carcinoma.

Fifty two women treated for invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix and thirty three normal controls were studied to investigate the role of the infection of HPV type 16, 18 and the expression of EGFR in tumorigenesis and progression of cervical cancer and to investigate the correlation between the infection of HPV and the expression of EGFR in cervical cancer. The presence of HPV DNA was analysed using HPV amplification by polymerase chain reaction(PCR), and the expression of EGFR by immunohistochemical staining. The HPV 16/18 DNA were detected in 40 of 52(76.9%) cervical cancer tissues while in 6 of 33(18.2%) control tissues($p<0.05$). The expression of EGFR was positive in 27 of 52(51.9%) cervical cancer while in none of control tissues ($p<0.05$). The infection of HPV 16/18 and expression of EGFR were not significantly associated with the age, stage, histologic type, lymph node metastases, tumor size, invasive depth of cervical wall and 5-year survival rate.

* 이 연구는 1993년도 서울대학교 의과대학 교육연구재단 산부인과학교실 지정기금 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구임.

There was no significant correlation between HPV positivity and EGFR expression in cervical cancer patients.

These data suggest that HPV infection and EGFR expression might play a role in carcinogenesis but not in the progression or metastasis of cervical cancer.

Key words : human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, cervical cancer, carcinogenesis

I. 서 론

자궁경부암은 우리 나라 여성암 중 여전히 수위를 차지하고 있으나¹⁾ 그 발생기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 하지만 최근 그 발생기전에 관한 가설로서 성적 접촉성 질환 모형(sexually transmitted disease model)이 가장 널리 받아들여지고 있다.

1977년 Meisels 등이 인유두종 바이러스(human papillomavirus, 이하 HPV로 약함)가 자궁경부암의 발생에 중요한 역할을 한다고²⁾ 처음으로 보고한 이후 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 여러 임상 및 분자생물학적 연구에 근거하여 볼 때 HPV는 성적으로 감염, 전파되는 인자로서 자궁경부암 발생에 관여하는 중요한 요인으로 인정되고 있다. 현재까지 60여 종의 HPV형들이 발견되고 있는데, 이들 중 생식기 감염을 일으키는 것으로는 HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33과 35 형 등 20여 종이 보고되고 있다.³⁾ HPV의 감염 여부 검색은 현재까지의 통상적인 혈청학적 검사방법으로 불가능하고, HPV의 시험관내 배양이 어려워서 핵산교잡법(DNA hybridization)과 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR로 약함) 등의 분자생물학적 방법이 이용되고 있다. PCR을 이용한 HPV DNA 검출률은 정상 자궁경부조직에서 6/11 형은 0.0-29.5%, 16/18 형은 0.0-70.0%의 빈도를 보이고, 이형상피세포종에서는 6/11형 0.0-12.5%, 16/18형 11.0-83.0%, 자궁경부암에서는 6/11형 5-29%, 16/18형 57.0-93.0%로 다양한 결과를 보이고 있다.⁴⁻⁶⁾

최근 자궁경부암 환자에 있어 HPV 형의 예후인자로서의 의미에 대해 많은 연구가 시행되고 있으

나 그 결과들은 논란이 많은 상태이다.⁷⁻¹²⁾ 일부 보고자들은 HPV 18형은 미분화, 전이, 빈번한 재발, 급속한 진행 및 불량한 예후와 관계가 있다고 보고하였으나,⁷⁻¹⁰⁾ HPV 음성인 환자의 예후가 양성인 환자들보다 더 나쁘다는 보고들도 있다.¹²⁾

한편, 세포의 성장과 분화에 관여하는 성장인자(growth factor)에 관한 관심이 고조되면서 특히 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, 이하 EGFR로 약함)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹³⁾

표피성장인자(epidermal growth factor, 이하 EGF로 약함)는 생쥐(mouse)의 하악타액선(submaxillary gland)에서 처음 분리되었으며,¹⁴⁾ 53개의 아미노산으로 구성된 비교적 열에 안정된 polypeptide로서 세포의 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 이러한 EGF가 세포 수준에 있어서 유사분열 물질(mitogen)로 작용하여 세포성장을 일으키기 위해서는 먼저 세포 표면의 EGFR에 결합하여야 한다.¹⁶⁾ EGFR은 internal tyrosin kinase domain과 external ligand binding domain으로 구성된 막투과성 당단백(transmembranous glycoprotein)으로서 여러 종류의 세포에 존재하며,¹⁷⁾ EGF와 결합하여 EGF의 신호(signal)를 세포액(cytoplasm)으로 전달하게 된다. 이처럼 EGF가 결합하면 세포는 이온의 이동(ion transport), 형태 변화 등을 일으키면서 여러 수용체(receptor)들이 유발되어 결국 세포의 유사분열을 일으킨다.^{16,18)}

외음부 편평상피암의 유래세포주인 A-431 세포에서 EGFR이 다량 발현됨이 보고된 이래¹⁹⁾ 폐암, 유방암, 뇌종양 등에서의 EGFR 발현에 관한 연구들이 시행된 바 정상조직에 비해서 EGFR이 증가됨을 확인하였고,^{20,21)} 인체종양 중 편평상피암에서

다른 암종에 비하여 EGFR의 양이 훨씬 높게 발현됨을 보고하였다.²²⁾

1989년 Rha 등²³⁾은 알코올에 고정된 신선 생검 조직에서 면역조직화학적 염색(immunohistochemical stain)을 이용한 자궁경부암의 EGFR발현에 관한 연구보고에서 자궁경부 상피의 악성화와 EGFR 발현의 증가가 밀접한 관계가 있다고 보고하였으며, 본 교실의 포르말린 고정 파라핀 포매조직에서의 연구에서도 신선생검 조직에서와 유사한 결과를 얻어 EGFR이 종양표지물질로서의 가능성을 보고하였고, EGFR의 발현 연구에서 포르말린 고정 파라핀 포매조직을 이용한 후향적 연구가 가능함을 시사하였다.²⁴⁾

최근 bovine papillomavirus type 1(BPV-1)의 E5가 EGFR, c-erb-B 및 colony-stimulating factor receptor(c-fms)의 하향조절(downregulation)을 변화시킨다는 보고가 있었다.²⁵⁾ 이 연구에서는 세포표면의 활성화된 EGFR의 반감기가 길어짐을 보고하여 EGFR의 downregulation이 억제됨을 보고하였다. BPV-1의 E5 open reading frame(ORF)이 EGFR을 활성화시킨다는 사실은 거의 확실한 것으로 받아들여지고 있으나, HPV-16 등도 EGFR의 활성화를 통하여 세포 증식을 유발할 수 있는 지에 대해서는 논란이 있다.

이에 저자들은 병리과에 보관된 자궁경부 포르말린 고정 파라핀 포매조직에서 중합효소 연쇄반응을 이용하여 HPV DNA 검사를 실시하고, 면역조직화학적 검사를 이용하여 EGFR의 발현정도를 알아봄으로써 HPV의 감염 및 EGFR의 발현이 자궁경부암의 발생 및 예후에 미치는 영향과, HPV 감염과 EGFR 발현의 상관관계를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

1985년 1월부터 12월까지 서울대학교병원 산부인과에서 수술 받은 추적조사가 가능한 자궁경부암 환자 61명과 정상대조군 42명의 자궁경부 파라핀 포매조직을 이용하여 PCR과 면역조직화학적 검사를 시행하였으며 각 실험에는 대조군으로 특정

HPV 감염이 확인된 세포주들을 동시에 실험하였다. 정상대조군과 자궁경부암 환자군 간에 특정 HPV 감염의 빈도와 EGFR의 발현여부에 따른 암화의 요인으로서의 유의성을 검정하였다. 자궁경부암 환자 경우에는 환자의 의무기록 열람과 함께 통신 및 우편으로 임상결과와 재발여부 및 생존여부를 확인하고, 사망한 경우는 사망원인도 확인하였다.

2. 연구방법

1) 중합효소 연쇄반응을 이용한 HPV 형의 검색 (가) 표본채취

① 고정조직(formalin-fixed) ; 병리과에 보관되어 있는 자궁경부암 병리조직과 자궁근종 등의 양성병변을 가진 정상대조군의 자궁경부 병리조직을 이용하였으며, 조직절편을 얻기 전 미리 병리소견을 재확인하였다. 이 중 암조직이 가장 많이 발견된 파라핀 포매괴(paraffin block)를 10 μ m 두께의 절편으로 잘랐다. 교차오염을 방지하기 위하여 검체 종류를 바꿀 때마다 microtome blade를 xylene으로 세척하였고 검체는 1.5ml eppendorf tube에 넣었다. 채취된 검체의 바로 옆 조직을 채취한 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 병리조직학적 소견을 판독하였다.

② 세포주 ; HPV DNA 검색의 양성 대조군으로서는 HPV 16의 감염이 증명되어 있는 CaSki 자궁경부암 세포주 및 HPV 18의 감염이 증명되어 있는 HeLa 자궁경부암 세포주를 이용하였다. 세포주는 미국의 ATCC(American Tissue Culture Company)로부터 구입하고 fetal bovine serum 10%를 함유한 RPMI 배지에서 배양하여 사용하였다.

(나) 표본에서의 DNA 추출 ; Eppendorf 튜브 xylol 1ml와 함께 넣고 잘 흔든 후 30분간 실온에서 조금씩 흔들면서 탈파라핀화하고, 3-5분 정도 원심분리 시켰다. 각 시료에서 xylol을 피펫으로 제거하였고, 이 과정을 두 번 반복하였다. 100% 에탄올 0.5 ml를 넣은 후 3-5분 정도 원심분리한 후 각 시료에서 에탄올을 피펫으로 제거하였다. 이 과정을 역시 두 번 반복하였다. 일부 표본은 5-10 μ m의 조직절편을 xylene과 에탄올로 처리하고 100 $^{\circ}$ C에 10분간 가열한 후 PCR을 시행하였다.

(다) HPV DNA의 분리 ; HPV 제조합 plasmid를 LS/AD 배지(10g bactotrypton, 5g yeast extra-

ct, 10g sodium chloride, pH 7.5 50 μ g/ml ampicillin)에 OD 600=0.4까지 배양한 후 100 μ g/ml로 되게 chloramphenicol을 첨가하여 12시간 동안 plasmid를 증폭시킨 다음 plasmid를 추출하였다. 얻어진 plasmid를 spectrophotometer로 확인하여 농도 및 순도를 결정하였다.

(라) Oligonucleotides의 합성 ; Primer는 20 base pair(이하 bp라 약함)로, 증폭될 sequence의 길이는 HPV 16의 경우 120 bp, HPV 18의 경우 100bp이고(Table 1), 탈락 자궁경부 세포 DNA의 적합성을 보기 위한 β -globin의 경우 260 bp이며 Clontech (Palo Alto, California, USA)사로부터 공급받았다. 이들 primer들은 HPV 16과 HPV 18의 E6 open reading frame²⁶⁾에서 택하는데, E6 open reading frame 유전자는 인간 자궁경부암 세포주에서 발현(expression)되어 있으며,²⁷⁾ HPV에 의한 세포의 immortalization과 transformation에 관여하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for HPV 16 and HPV 18

HPV type	Sequence (5'-3')	Genomic location	Size of amplified product(bp)
HPV 16 A	: TCAAAAGCCACTGTGTCTG	421-440	120
B	: ACCTTAATGAAAAACGACGA	521-540	
HPV 18 A	: CGTGTCTTGTGATGATCGCA	463-482	100
B	: CGTCGTGGAGTCGTCTCTG	543-562	
β -globin A	: GAAGACCAAGGACAGGTAC		260
B	: CAACCTCATCCAGGTTACCC		

Note : A : upstream primer, B : downstream primer

(마) PCR ; 100 μ l의 반응혼합용액을 만들며, 이에는 1.0 μ g의 DNA와 1.5-4.5mM MgCl₂, HPV primer는 각기 0.25 μ M upstream PCR primer, 0.25 μ M downstream PCR primer, β -globin primer는 0.15 μ M upstream PCR primer, 0.15 μ M downstream PCR primer, 100 μ M의 각 dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 2.5 unit Taq polymerase, 0.01% (w/v) 젤라틴을 포함한다. PCR의 단계는 변성반응(denaturation), 결합반응(annealing), 연장반응(extension) 등의 3단계로 이루어지는데 이를 1주기

(round)라고 하며, 변성반응은 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 결합반응은 56 $^{\circ}$ C에서 15초간, 연장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 시행하고 전체 30주기를 시행한다. 반응혼합용액에는 고온에서 시료의 증발을 방지하기 위하여 100 μ l의 미네랄 오일을 첨가한다. 반응에는 programmable heat block(Hybaidd thermal reactor : Hybaidd Ltd, U. K.)을 사용하여 내장된 프로그램에 의해 각 반응의 온도와 시간이 자동 조절되고 온도변화는 0.1 $^{\circ}$ C 내외로 한다.

(바) 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 ; PCR이 끝난 DNA 용액 중 10 μ l의 시료를 취하여 loading dye와 함께 섞은 다음 8% 폴리아크릴아마이드 겔에서 20 ampere, 1시간 동안 전기영동을 시행한다. 전기영동이 끝난 폴리아크릴아마이드 겔은 1 μ g/ml 농도의 ethidium bromide 용액에서 15분간 염색한 후 자외선투사기(UV transilluminator) 하에서 증폭된 DNA 띠 유무를 관찰하고 ASA 감도 3,000의 흑백 폴라로이드 카메라로 염색된 겔을 촬영하여 즉시 판독한다(Fig. 1, Fig. 3).

(사) Oligonucleotide의 DIG 3'-end-labelling

PCR로 증폭된 HPV 16과 18 DNA의 확인을 위한 DNA 소식자는 40 bp의 oligonucleotide로, 증폭된 HPV DNA 염기서열의 upstream primer와 downstream primer 사이의 염기서열 중에서 취하며(Table 2), Clontech(Palo Alto, California, USA)사로부터 공급받았다. DIG oligonucleotide 3'end labelling kit(BM Biochemica)를 이용하였다. DNA 소식자는 100 pmole 농도로 맞추고 4 μ l 반응완충용액, 4 μ l CoCl₂ 용액, 1 μ l DIG-dUTP/dNTP tailing mixture(10 pmol/l), 1 μ l 50units terminal transferase를 섞은 후 20 μ l로 총량을 조정한 후 endlabelling을 위해 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 한 번 반응시킨 후 얼음에 보관하였다. 반응을 멈추기 위하여 1 μ l 글리코젠 용액, 200 μ l EDTA 혼합 용액 중 2 μ l를 넣었다. 다음으로는 end-labelling된 DNA 소식자의 분리를 위하여 3M NaAc(pH 5.0) 2.5 μ l와 찬 100% 에탄올 75 μ l로 ethanol down시키고 speed vac으로 말린 후 TE 완충용액 100 μ l에 녹여 사용하였다.

(아) DNA hybridization 및 면역학적 발색반응 ; PCR 산물에 0.3 M NaOH를 혼합하고 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 끓여 변성시켜 형성된 single strand DNA를 slot-blotting 방법에 따라 Nylon 막(Boehringer

Fig. 1. PCR amplification of CaSki(HPV 26), HeLa(HPV 18) and neuroblastoma DNA. (A) PCR products after electrophoresis on a 8% polyacrylamide gel and ethidium bromide staining. (B) Slot blot analysis under stringent conditions with DIG labelled oligonucleotide probe.
Lane M : 123 ladder DNA size marker
Lane C : CaSki cell DNA (positive control for HPV 16), 0.1pg
Lane H : HeLa Cell DNA(positive control for HPV 18), 0.1pg
Lane C+H : Mixture of CaSki and HeLa cell DNAs, each 0.1pg
Lane N : Neuroblastoma DNA(negative control for HPV)

Table 2. Sequences of oligonucleotide probes for HPV 16 and HPV 18

HPV type	Sequence(5'-3')	Genomic location
HPV 16	GACAAAAAGCAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGA	461-500
HPV 18	TACCTGGGCACTATAGAGGGCCAGTCCATTCTGCTGCA	483-532

Mannheim Biochemica, Germany)에 옮긴 후 0.4M NaOH용액에서 DNA를 고정시킨다. 이 막을 2× SSC(20× SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na₃ Citrate 2H₂O, pH 7.0)에서 세척한 후 seal-N-save 봉지 안에 넣고 prehybridization 및 hybridization을 실시한다. Prehybridization은 5×SSC, 1%(w/v)의 blocking agent, N-laurylsarcosine 0.1%(w/v), 0.02 % SDS(w/v) 존재하에서 60℃에서 2시간 수행한다. 이후 prehybridization 용액을 제거하고 prehybridization 용액 2.5ml, labelled probe 100pmole/10×10cm를 혼합한 후 60℃에서 12시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 membrane을 hybridization 용액으로부터 조심스럽게 제거하고, 실온에서 2× SSC와 0.1% SDS의 세척용액 속에서 20분간 두 번 세척한다. 면역학적 검사를 이용한 발색반응은

DIG nucleic acid detection kit(BM Biochemica) 설명서대로 시행하였으며 발색반응은 20시간 동안 시행한 후 판독한다.

(자) 탈색과 DNA-DNA rehybridization ; 50℃에서 dimethyl formamide 용액으로 서서히 탈색반응을 유도한 후, 37℃에서 0.2M NaOH/0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 용액에 30분간 소식자를 없앤 후 rehybridization을 전술한 바와 같이 시행한다.

2) 면역조직학적 검사를 이용한 EGFR 발현검사

(가) 표본채취 ; 병리과에 보관되어 있는 자궁경부암 병리조직과 자궁근종 등의 양성병변을 가진 정상대조군의 자궁경부 병리조직을 이용하였으며, 조직절편을 얻기 전 미리 병리소견을 재확인하였다. 이 중 암조직이 가장 많이 발견된 파라핀 포매괴(paraffin block)를 5μm 두께의 절편으로 잘라 검체는 1.5ml eppendorf tube에 넣었다. 채취된 검체의 바로 옆 조직을 채취한 후 hematoxyline-eosin 염색을 하여 병리 조직학적 소견을 판독하였다.

(나) 탈파라핀화 ; 조직절편을 poly-D-lysine이 코팅된 슬라이드에 합착시켰다. Xylol이 들어 있는 수욕기에 넣어 탈파라핀화한 후 100% 알코올에서



Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR products. (A) Normal cervical tissues. (B) Cervical cancer tissues.
Lane M : 123 ladder DNA size marker
Numbers above lanes correspond to specimen numbers

물까지 차례대로 넣어 재탈수화 하였다. 탈수화된 슬라이드의 조직절편은 내인성 peroxidase의 활성을 제거하기 위해 0.3% hydrogen peroxide를 함유하고 있는 메탄올에 30분간 배양하였다. 다음에는 20분간 phosphated-buffered saline(PBS)으로 세척하였다.

(다) 면역조직학적 염색 ; 1차, 2차 항체의 비특

이성 결합을 억제하기 위해 절편을 1 : 20으로 희석된 normal blocking serum(normal horse serum)으로 20분간 배양하였다. 완충용액으로 희석한 1차 항체로 실온에서 2시간 배양하였다. 한편 음성대조군에서는 1차 항체 대신 PBS를 이용하였다. 슬라이드를 완충용액으로 10분간 세척하였다. 1:100으로 희석한 2차항체(biotinylated horse anti-mouse IgG

Fig. 3. Slot blot analysis of PCR products. (A) Normal cervical tissues (B) Cervical cancer tissues. Probes used for hybridization are shown to left of strips. Numbers above lanes are those of patients.

antiserum) 용액에 30분간 배양하였다. Avidinbiotin-peroxidase complex(Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingam, CA)에 30분간 배양하였다. 슬라이드를 10분간 완충용액으로 씻은 후, 동량의 0.04% hydrogen peroxidase(in distilled water)와 0.3% diaminobenzidine tetrahydrochloride(in 0.1M Tris buffer, pH 7.2, Sigma)를 섞어 새로이

만든 peroxidase 기질 용액에서 2-7분간 배양하였다. 5분간 수돗물에 씻은 후 hematoxylin 용액으로 대조염색을 하였다. 음성대조군으로 rat biotinylated IgG를 사용하였다. 80% glycerol gelatin에 mounting 하였다.

(라) 판독 ; 숙련된 병리의 3인에 의해 면역조직화학적 염색결과를 판독하였다. 판독시 면역반응을

Fig. 4. Strongly positive staining for EGFR in large cell keratinizing carcinoma. Immunohistochemical staining (A) $\times 100$, (B) $\times 400$

시각적 강도(visual intensity)에 따라 반정량적(semiquantitative)인 등급을 주어 전혀 반응이 없는 경우를 음성(-)으로 하고, 매우 강한 반응의 경우를 2+로 하여 3군으로 나누어 판독하였다.

3) 통계처리 및 자료분석 ; HPV 감염여부 및 EGFR 발현과 암화의 관계를 보기 위하여 Fisher's exact test, Kendall's tau test를 이용하여 유의성을 검증하였다. HPV 감염여부 및 EGFR 발현정도가 악성 정도와 예후에 미치는 영향을 보기 위하여 위의 통계기법과 Kaplan-Meyer, Generalized Wilcoxon test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 대상환자군의 특성

1985년 1월부터 1985년 12월까지 서울대학교병원 산부인과에서 치료받은 정상대조군 42명과 자궁경부암 환자 61명을 대상으로 하였고, PCR 시행결과 β -globin의 증폭 유무에 따라 DNA의 유용성을 판단하여 자료분석이 가능한 환자의 수는 각각 33, 52예이었다. 연령은 정상대조군이 34-62세 사이로 중간 나이는 43.3세이었고, 자궁경부암 환자군은 36-66세 사이로 중간 나이는 48.9세 이었다. 각각의 병리조직학적 소견은 Table 3과 같다.

2. 예후인자와 HPV 감염 여부와의 상관관계

정상대조군과 자궁경부암 환자군에서 HPV 16 혹은 18형의 감염율은 각각 18.2%(6/33), 76.9%(40/52)로 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

Table 3. Exclusions based on β -globin by PCR and patient profiles

	Control(%)	Cervical carcinoma(%)
Total entries	42	61
Exclusions	9	9
Evaluable	33	52
Histology		
Leiomyoma	14(42.4)	Squamous cell ca. 46(88.5)
Adenomyosis	6(18.2)	Adenoca. 5(9.6)
Ovarian tumor	4(12.1)	Adenosquamous 1(1.9)
Chronic PID	9(27.3)	cell ca.
Age(years)	43.3 \pm 1.3	48.9 \pm 1.5

* : Mean \pm SEM

HPV 16의 감염율은 정상대조군에서 12.1% (4/33), 자궁경부암 환자군에서 71.2%(37/52)로 유의한 차가 있었으나($p < 0.01$), HPV 18의 감염율은 정상대조군에서 9.1%(3/33), 자궁경부암 환자군에서 11.5%(6/52)로 유의한 차가 없었다($p > 0.05$) (Table 4).

Table 4. HPV DNA positivity and EGFR expression

	Number of cases	HPV positive cases No.(%)		
		HPV 16/18	HPV 16	HPV 18
Control	33	6(18.2)	4(12.1)	3(9.1)
Cervix Cancer	52	40(76.9)	37(71.2)	6(11.5)
p value		< 0.001	< 0.001	N. S.
	Number of cases	EGFR expression(%)		
		negative	positive	
Control	33	33(100.0)	0(0.0)	
Cervix Cancer	52	25(48.1)	27(51.9)	
p value		< 0.001		

50세를 기준으로 한 연령에 따라서는 정상대조군과 자궁경부암군 모두에서 HPV 감염률의 차이가 없었다. FIGO 병기 및 조직학적 소견에 따른 HPV 감염률의 차이는 없었다. 병리조직학적 예후인자와의 상관관계를 보면 종양의 크기가 3cm 이하인 경우 HPV 16/18형 감염율이 86.4%(19/22), 3cm 이상인 경우 66.7%(14/21)로 종양의 크기가 작은 경우 HPV 양성률이 높았으나 통계적인 유의성은 없었

다. HPV 16형의 경우 종양의 크기가 3cm 이하인 경우 81.8%(18/22), 3cm 이상인 경우 57.1%(12/21)로 종양의 크기가 작은 경우 HPV 양성률이 유의하게 높았으나 HPV 18형의 경우는 종양의 크기에 따른 차이가 없었다. 림프절 전이 여부에 따라서는 림프절 전이가 없었던 경우 HPV 16/18형은 75% (30/36), 림프절 전이가 있었던 경우 83.3%(10/ 12)로 림프절 전이가 있었던 경우 HPV 양성률이 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. HPV 16형의 경우 림프절 전이 여부에 따른 차이는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 HPV 18형은 각각 7.5%(3/36), 25.0%(3/12)로 림프절 전이가 있는 군에서 HPV 18형의 감염율이 림프절 전이가 없는 군에 비해 유의하게 높았다. 침윤 정도에 따른 HPV 16/18, HPV 16형 감염은 침윤 정도가 깊을수록 감염율이 유의하게 감소하였으나 반대로 HPV 18형은 침윤 정도가 깊을수록 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Table 5).

3. 예후인자와 EGFR 발현과의 상관관계

정상대조군과 자궁경부암 환자군에서의 EGFR은 각각 0%(0/33), 51.9%(27/52)로 자궁경부암에서 통계적으로 유의하게 높게 발현되었으나($p < 0.05$), 50세를 기준으로 한 연령에 따라서는 EGFR 발현에 차이가 없었다($p > 0.05$). 조직학적 소견, 병기, 종양 크기, 림프절 전이여부, 자궁경부 침윤 정도 등의 예후인자에 따라서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$)(Table 6).

4. 자궁경부암에서 HPV 양성유무와 EGFR 발현과의 상관관계

HPV 감염이 있는 경우 EGFR의 발현 음성인 경우가 47.5%, 1(+) 37.5%, 2(+) 15.0%, HPV 감염이 없었던 경우는 각각 50.0%, 33.3%, 16.7%로서 EGFR의 발현 정도가 높을수록 HPV 감염율이 감소하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$)(Table 7).

5. 생존율 분석

HPV 양성유무에 따른 5년 무병생존율을 보면, HPV 음성인 군에서 5년 무병생존율이 38.5%, 양성인 군에서 34.8%로 HPV 음성인 군에서 다소 높

Table 5. HPV DNA positivity according to prognostic factors

	Number of cases	HPV positive cases No.(%)		
		HPV 16/18	HPV 16	HPV 18
Age				
Control				
<50 years	26	5(19.2)	3(11.5)	3(11.5)
≤50 years	7	1(14.3)	1(14.3)	0(0.0)
Cervix cancer				
<50 years	26	20(76.9)	20(76.9)	2(7.7)
≥50 years	26	20(76.9)	17(65.4)	4(15.4)
p value		N. S.		
Stage				
CIS	4	3(75.0)	3(75.0)	0(0.0)
I a	5	4(80.0)	4(80.0)	0(0.0)
I b	15	13(86.7)	13(86.7)	2(13.3)
II a	25	17(68.0)	14(56.0)	3(12.0)
II b	2	2(100.0)	2(100.0)	1(50.0)
III	1	1(100.0)	1(100.0)	0(0.0)
p value		N. S.		
Histology				
Squamous cell ca.	46	39(84.7)	36(78.2)	7(15.2)
Adenocarcinoma	5	3(60.0)	3(60.0)	0(0.0)
Adenosquamous cell ca.	1	1(100.0)	1(100.0)	0 (0.0)
p value		N. S.		
Tumor size (stage I b-III)				
≤3.0cm	22	19(86.4)	18(81.8)	3(13.6)
>3.0cm	21	14(66.7)	12(57.1)	3(14.3)
p value		N. S.	0.0409	N. S.
L/N metastasis (stage I a-III)				
(+)	12	10(83.3)	8(66.7)	3(25.0)
(-)	36	30(83.3)	29(80.6)	3(8.3)
p value		N. S.	N. S.	0.0497
Depth of invasion				
Microinvasive	5	4(80.0)	4(80.0)	0(0.0)
Inner 1/3	11	11(100.0)	11(100.0)	0(0.0)
Middle 1/3	9	8(88.9)	8(88.9)	1(11.1)
Outer 1/3	12	7(58.3)	5(41.7)	3(25.0)
Full thickness	11	7(63.6)	6(54.5)	2(18.2)
Kendall' tau		-0.27666	-0.35480	0.22812
p value		0.0174	0.0034	0.0409

Table 6. EGFR expression according to histologic findings

	Number of cases	EGFR expression			p value
		0	1(+)	2(+)	
Control					
<50 years	26	26(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	N. S.
≥50 years	7	7(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	
Cervix cancer					
<50 years	26	12(46.2)	11(42.3)	3(11.5)	N. S.
≥50 years	26	13(50.0)	8(30.8)	5(19.2)	
Stage					
CIS	4	0(0.0)	0(0.0)	3(75.0)	1(25.0)
I a	5	4(80.0)	4(80.0)	1(20.0)	0(0.0)
I b	15	8(53.3)	8(53.3)	5(33.3)	2(13.3)
II a	25	13(52.0)	13(52.0)	7(28.0)	5(20.0)
II b	2	0(0.0)	0(0.0)	2(100.0)	0(0.0)
III	1	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)
Histology					
Squamous cell ca.	46	25(54.3)	13(28.3)	8(17.4)	N. S.
Adenocarcinoma	5	0(0.0)	5(100.0)	0(0.0)	
Adenosquamous cell ca.	1	0(0.0)	1(100.0)	0(0.0)	
Tumor size					
(stage I b-III)					N. S.
≤3.0cm	22	12(54.3)	9(40.9)	1(4.5)	
>3.0cm	21	9(42.9)	6(28.6)	6(28.6)	
L/N metastasis					
(stage I a-III)					N. S.
(+)	12	5(41.7)	4(33.3)	3(25.0)	
(-)	36	20(55.6)	12(33.3)	4(11.0)	
Cervical invasion depth					
Microinvasive	5	4(80.0)	1(20.0)	0(0.0)	N. S.
Inner 1/3	11	6(54.5)	4(36.4)	1(9.1)	
Middle 1/3	9	5(55.6)	3(33.3)	1(11.1)	
Outer 1/3	12	5(41.7)	3(25.0)	4(33.3)	
Full thickness	11	5(45.5)	5(45.5)	1(9.1)	

Table 7. Relationship between HPV DNA positivity and EGFR expression

		EGFR expression		
Cervix cancer		0	1(+)	2(+)
HPV DNA(-)	12	6(50.0)	4(33.3)	2(16.7)
HPV DNA(+)	40	19(47.5)	15(37.5)	6(15.0)
Kendall' tau : 0.15256		p>0.05		

았으나 통계적으로는 유의하지 않았다(Fig. 5). EGFR 발현유무에 따른 5년 무병생존율 역시 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 6).

IV. 고 찰

자궁경부암은 우리나라 여성암 중 수위를 차지하고 있으나¹⁾ 그 발생기전은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 하지만 자궁경부암의 발생이 성적 접촉, 특히 어릴 때부터 시작된 성적 접촉, 다수의 성배우자 및 고위험 남성배우자에의 노출 등과 연관하다는 역학적 사실은 잘 알려져 있으며²⁰⁾ 현재 성적 접촉성 질환 모델(sexually transmitted disease model)이 가장 널리 받아들여지고 있는 가설이다.

이러한 성적 감염의 원인 미생물로서 과거 Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhea, Trichomonas vaginalis, Treponema pallidum, cytomegalovirus가 제시되었으나 증거를 발견할 수 없었다.³⁰⁾

그러나 1977년 Meisels 등이 처음으로 HPV가 자궁경부암의 발생에 중요한 역할을 한다고 보고한 이래 최근 HPV가 주목되어 이에 대한 연구가 주로 이루어지고 있지만,²⁾ 자궁경부암의 발생에서의 HPV의 역할은 아직 명확히 알려져 있지 않다.

현재까지 약 60여 종의 HPV type들이 발견되고 있는데, 이들 중 생식기 감염을 일으키는 것으로는 HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33과 35형 등 20여 종이 보고되고 있다. 자궁경부암의 발생 원인으로 HPV의 가능성을 뒷받침하는 근거로서 다음과 같은 관

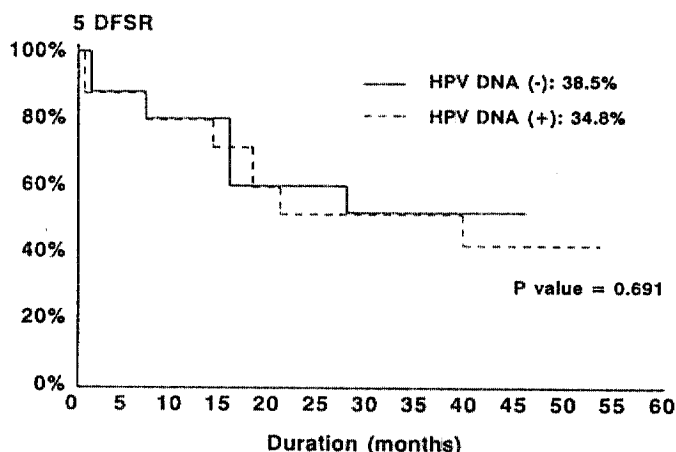


Fig. 5. Five year disease free survival rate (5 DFSR) in relation to HPV DNA positivity

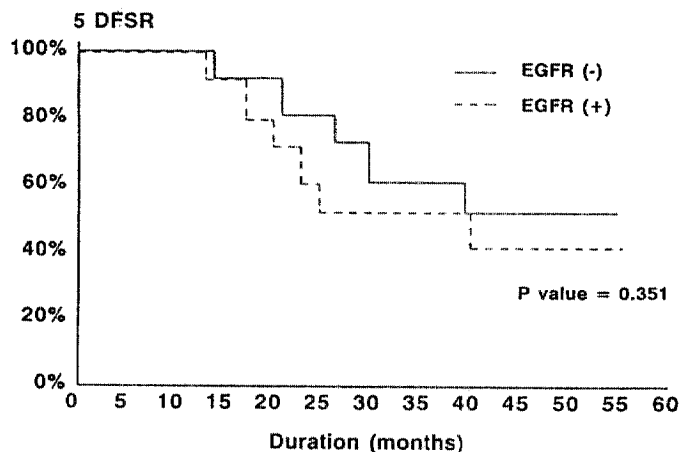


Fig. 6. Five year disease free survival rate (5 DFSR) in relation to EGFR expression

찰들이 보고되고 있다. 첫째, 가축과 토끼에서 papillomavirus는 그것이 감염된 숙주 편평상피의 악성 변형(malignant transformation)을 유발하며,^{31,32)} HPV DNA가 시험관 내에서 쥐의 세포를 형태학적으로 변형시키는 것으로 보고되고 있다.³³⁾ 둘째, 양성 자궁경부질환의 경우 HPV는 대부분 유리상태(episomal state)로 존재하지만 자궁경부암의 경우 대부분 염색체(cellular genome) 내에 융합(integration)되어 있는 것으로 알려져 있다.³⁴⁾ 셋째, HPV 6과 HPV 11이 콘딜로마 등 양성 자궁경부 병변에서 주로 발견되는³⁵⁾ 반면, 자궁경부암 및 자궁경부상피내종양에서는 HPV 16, HPV 18이 주로 발견되며 정상대조군에 비하여 높은 빈도로 발견되는 것으로 보고되고 있다.³⁶⁾ 넷째, 전향적 역학 조사 결과 자궁경부 조직이 HPV 16 및 HPV 18에 감염된 경우 HPV 6 및 HPV 11의 경우보다 자궁경부상피내종양 및 자궁경부암으로 발전할 가능성이 대조군보다 높은 것으로 보고되고 있다.³⁶⁾ 다섯째, 암 유전자와 인유두종 바이러스를 동시에 숙주세포에 삽입했을 때 정상세포가 악성세포로의 형질변환이 빠르다.³⁶⁾ 여섯째, HPV E6, E7 단백질이 p53 같은 암억제유전자의 최종산물과 결합하여 분해함으로써 억제기능을 없앤다.³⁶⁾ 이상의 관찰에 근거하여 어떤 특정 type의 HPV와 자궁경부암이 관련이 있다는 일련의 증거가 있으며 HPV 6, 11은 여성 생식기의 양성병변인 침윤 콘딜로마(condyloma accuminatum)에서 검출되어 자궁경부암 발생의 저위험군(low risk group)으로, HPV 16, 18, 31, 33, 35 등은 자궁경부상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia : CIN) 및 자궁경부암에 주로 관련되어 검출되므로 자궁경부암 발생 고위험군(high risk group)으로 분류되고 있다.³⁶⁾

HPV는 현재까지 통상적인 혈청학적 검사방법이 가능하지 않고 시험관내 배양이 어려우므로, 핵산 교잡법(DNA hybridization)과 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction) 등의 분자생물학적 방법이 이용되고 있다. 자궁경부암에서의 기존의 분자생물학 방법인 DNA hybridization으로 검출한 HPV 16의 검출률은 외국의 경우 32-61%, HPV 18의 검출률은 0-23%로 지역에 따른 차이를 보이고 있다.^{36,41)} 국내에서는 자궁경부암에서 HPV 16은 32-44%, HPV 18은 21-27%의 검출률을 보고하

고 있다.^{42,43)}

정상대조군에서의 HPV 16의 검출률은 외국의 경우 3-20%, HPV 18의 검출률은 0-12%로 보고하고 있으며,⁴⁴⁾ 국내에서 HPV 16, 18의 검출률을 각각 0-4%로 보고하고 있다.^{42,43)}

한편 PCR은 검체로서 일반적으로 사용되는 동결조직 및 세포뿐 아니라 임상적으로 구하기 쉬운 파라핀 포매(paraffin-embedded) 조직에서도 특정 유전자의 검색이 가능하다는 장점이 있어 후향적 연구에도 도움이 될 수 있다.

PCR을 이용한 HPV 검출률을 보면 정상 자궁경부조직에서 6/11형은 0.0-29.5%, 16/18형은 0.0-40.0%의 빈도를 보이고, 이형상피세포증은 6/11형은 0.0-12.5%, 16/18형은 11.0-83.0%, 자궁경부암은 6/11형은 5-29%, 16/18형은 57.0-93.0%로 다양한 결과를 보이고 있다.⁴⁻⁶⁾

이처럼 PCR을 이용한 인유두종 바이러스의 검출률에 차이가 있는 것은 지역적, 환자군 선택의 문제 등이 지적되고 있으나, 특히 검색 방법 자체의 민감성에 기인하는 것으로 믿어지고 있다.

본 연구에서는 정상대조군과 자궁경부암 환자군에서 HPV 감염분포는 각각 18.2%(6/33), 76.9%(40/52)로 본 교실의 다른 연구들이나 다른 연구자들의 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

HPV에 감염된 자궁경부 조직의 예후에 대하여는 현재로서 거의 알려진 바가 없으며 이들 보고도 일치되지 않고 있다. Barnes 등⁷⁾은 Southern blot hybridization을 이용하여 HPV 18 DNA를 검색하여 HPV 18과 자궁경부암의 예후인자들과의 관계에 대해 HPV 18에 감염된 경우 종양의 미분화도가 유의하게 높았으며 나이는 적고 임파선 전이가 높은 경향을 띠었다고 하였다. 또한 Walker 등⁸⁾은 HPV 18에 감염된 자궁경부암의 경우에는 임상병기나 종양의 분화도 등과는 관계없이 2년내 재발률이 높고 진단 이전의 자궁경부도말이 정상이었던 경우도 많아 아마도 병의 진행이 빠른 것이라고 주장하였다. 최근 Riou 등¹²⁾은 HPV 음성군이 양성군에 비해 예후가 더 나쁜 것으로 보고하였으며, 한편 King 등¹¹⁾은 HPV 감염은 환자의 나이, 병기, 분화도, 림프절 전이나 생존율과 관계가 없다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 조직학적 소견 및 임상소견에 따른 예후인자와의 상관관계를 보면 병

기, 림프절 전이 여부, 종양의 크기 등은 HPV 양성률과 상관관계가 없었으나 자궁경부의 침윤 정도가 심할수록 HPV 16 양성률은 유의하게 감소하는 경향이 있었으며, HPV 18은 반대 경향이 있었다. 생존율 분석에서도 HPV 양성유무에 따른 차가 없었다. 본 연구에서 예후인자와의 상관관계 자료와 생존율 분석에서 보여주는 상이성은 적은 환자군의 분석, β -globin 증폭 유무에 따른 DNA 유용성에 근거한 환자군 선택의 bias 및 생존율 추적조사의 미비성으로 인한 것으로 추정되며 더 많은 환자를 대상으로 한 정확한 환자의 추적조사가 필요할 것으로 사료된다.

한편, 세포의 성장과 분화에 관여하는 성장인자(growth factor)에 관한 관심이 고조되면서 특히 표피성장인자 수용체에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹³⁾ EGF는 생쥐(mouse)의 하악타액선(sub-maxillary gland)에서 처음 분리되었으며,¹⁴⁾ 53개의 아미노산으로 구성된 비교적 열에 안정한 polypeptide로서 세포성장을 자극하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 이러한 EGF가 세포들에 있어서 유사분열 물질(mitogen)로 작용하여 세포성장을 일으키기 위해서는 먼저 세포 표면의 표피성장인자 수용체(EGF receptor, EGFR)에 결합하여야 한다.¹⁶⁾

EGFR은 가장 잘 규명된 성장인자 수용체로서 인간 외음부 편평상피암에서 유래된 세포주인 A-431 세포에서 최초로 분리되었으며,⁴⁷⁾ 최근 Carpenter와 Zendegul 등⁴⁸⁾은 EGFR이 in vivo 혹은 in vitro에서 증명되지 않은 유일한 세포는 조혈기관의 세포뿐이라고 보고하였다. 이러한 EGFR은 분자량 170,000달톤의 internal tyrosin kinase domain, transmembrane domain과 external ligand binding domain으로 구성된 막투과성 당단백(transmembranous glycoprotein)으로서 여러 종류의 세포에 존재하며,¹⁷⁾ mitogen EGF과 결합하여 EGF의 신호(signal)를 세포액(cytoplasm)으로 전달하게 된다. 이 A-431 세포내의 EGFR은 전 세포 단백질 양의 0.2%를 차지하며 다른 어떠한 세포나 조직에 비하여 EGFR의 양이 20-200배정도 많은 것으로 알려져 있다.⁴⁹⁾ 또한 EGFR에는 tyrosin kinase를 활성화시킬 수 있는 부위가 존재하며,³⁶⁾ EGFR에 EGF가 결합하게 되면 그 결합체는 세포질 내로 함입된 후 세포질 내의 lysozyme에 의하여 분해된다.³⁶⁾

이처럼 이와 같이 EGFR의 기능은 mitogen EGF가 결합하면 세포는 전해질 이동(ion transport), 형태 변화 등을 일으키면서 여러 수용체(receptor)들이 유발되어 결국 세포의 유사분열을 일으킨다.³⁶⁾

EGFR의 발현은 방사성 동위원소를 이용하여 결합능을 측정하거나¹⁵⁾ blotting technique를 이용한 방법 등이 이용되어 왔는데⁵²⁾ 이러한 방법들을 이용한 연구에서 암세포와 정상세포를 비교한 바, 암세포에서 EGFR의 발현이 증가됨을 보고하여 EGFR의 종양표지자(tumor marker)로서의 가능성이 시사되었고 이를 발암 현상에 연관하여 연구하게 되었다.⁵²⁾

최근 외음부 편평상피암의 유래 세포주인 A-431 세포에서 EGFR이 다량 발현됨이 보고되었으며,¹⁹⁾ EGFR과 oncogen v-erb-B의 산물인 transforming protein 사이에 높은 동질성을 지니고 있음이 밝혀졌다.⁵³⁾ 이어서 EGFR의 종양표지자로서의 가능성을 알기 위하여 폐암, 유방암, 뇌종양 등에서의 EGFR 발현에 관한 연구들이 시행된 바 정상조직에 비해서 EGFR이 증가됨을 확인하였고,^{20,21)} 인체 종양 중 편평상피암에서 다른 암종에 비하여 EGFR의 양이 훨씬 높게 발현됨을 보고하였다.²²⁾ 그러나 EGFR의 발현에 관한 연구는 자궁경부암에서는 별로 이루어지지 않았으며, 특히 임상적 양상과 예후와의 관계에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 자궁경부암의 병태생리도 현재까지 명백히 알려진 바가 없다.

최근 Yamasaki 등⁵⁴⁾은 자궁경부암에서 EGFR이 자궁경부 편평상피의 악성화와 관련이 있다고 보고하였으며, 1989년 Rha 등은 알코올에 고정된 신선 생검조직에서 면역조직화학 염색(immunohistochemical stain)을 이용한 자궁경부암의 EGFR발현에 관한 연구보고에서 자궁경부 상피의 악성화와 EGFR의 발현의 증가가 밀접한 관계가 있음을 보고하였으며, 본 교실에서도 1990년도 자궁경부암의 포르말린 고정 파라핀 포매조직에서 면역조직화학적 염색법을 이용하여 자궁경부암에서의 EGFR의 발현에 관한 연구를 시행하였다. 그 결과 신선생검 조직에서와 유사한 결과를 얻어 EGFR이 종양표지자로서의 가능성을 보고하였고 EGFR의 발현 연구에서 포르말린 고정 파라핀 포매조직을 이용할 수 있음을 알 수 있어 후향적 연구가 가능함을 보고한

바 있다.²⁴⁾

이에 본 연구에서는 병리과에 보관된 자궁경부 포르말린 고정 파라핀 포매조직에서 면역조직화학적 검사를 이용하여 EGFR의 발현 정도를 알아봄으로서 HPV의 감염 및 EGFR의 발현이 자궁경부암의 발생 및 예후에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. EGFR의 세포막 외부 위에 대한 단일항체(monoclonal antibody)인 EGF-R1를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 자궁경부암 환자군에서 정상대조군에 비해서 EGFR의 양성률이 유의하게 높았다($p < 0.01$). 그러나 자궁경부암에서의 EGFR의 양성률과 기존의 예후인자, 즉 연령, 종양의 크기, 자궁경부의 침윤 정도, 임상적 병기 및 림프절 전이 유무와는 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다. 이는 자궁경부암 52예에서 EGFR과 림프절 전이와는 상관관계가 없다고 보고한 Yosinobu 등의 보고와 일치하는 경향을 보이며, 이는 EGFR이 자궁경부암의 초기 암화과정에는 관여하나 진행 및 전이에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 또한 자궁경부 이행증 환자에 있어서 EGFR의 양성을 보인 경우 자궁경부암으로의 진행되는 경우가 많다는 연구보고도 있지만, 본 연구에서 시행한 5년 무병생존율 분석을 보면, EGFR 양성 유무에 따른 생존율의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다(41.7% vs 48%). 이는 EGFR이 이미 진행된 자궁경부암의 예후를 예측하는데 있어서는 효용이 없음을 추측할 수 있게 한다.

여러 연구에서 HPV early gene products인 E6와 E7의 세포내 농도와 자궁경부암 세포의 증식능과는 직접적인 관계가 있다고 보고하였고, 한편 편평상피암 세포주에서 EGFR의 발현율이 성장에 관여한다는 보고들이 있어 HPV early genes이 EGFR 발현을 증가시킴으로서 세포 성장에 영향을 미치는지, 또 영향을 미친다면 그 기전은 무엇인지에 대한 연구가 있어 왔다. 최근 bovine papillomavirus type 1(BPV-1)의 E5이 EGFR, c-erb-B, colony-stimulating factor receptor(c-fms)의 downregulation을 변화시킨다는 보고가 있었다.²⁵⁾ 이 연구에서는 세포표면의 active EGFR의 반감기가 길어짐을 보고하여 EGFR의 downregulation이 억제됨을 보였다. BPV-1의 E5 ORF이 EGFR을 활성화시키는 것을 거의 확실한 것으로 받아들여지고 있으나

HPV-16 등도 EGFR의 활성화를 통한 세포 증식을 유발할 수 있는가는 논란이 되고 있다.

아직 그 기전은 잘 모르지만 HPV 16 E5가 EGFR의 mitogenic signal을 증폭시킨다는 보고도 있으며, Straight 등⁵⁵⁾은 HPV 16 E5이 발현된 각화세포에서 내인성 EGFR의 수가 2-4배 증가함을 보고하며 HPV 16 E5를 발현하는 세포에서 EGFR의 internalization과 ligand는 정상이었으나 endosome내 degradation이 늦어짐을 보고하였다. 한편 Doeberitz 등²⁴⁾은 C4-1 자궁경부암 세포주에서 HPV 18 E6/E7의 다소에 따른 EGFR의 발현 정도를 조사하여 세포의 성장률은 EGFR의 발현 정도보다는 HPV early gene products의 농도와 더 상관관계가 있는 것으로 보고하였고, 이는 EGFR의 과발현이 HPV 양성인 세포에서 성장을 조절하는 주기전이 아니라고 하였다. 또한 Chapman 등⁵⁶⁾은 자궁경부 이행증에서 HPV의 존재와 EGFR 발현과의 상관관계를 알아본 연구에서 이들 사이에 상관관계가 없음을 보고하였고 오히려 세포 성장률은 EGFR보다는 HPV gene product와 상관관계가 있다고 보고하였다. 또한 EGFR은 증식하는 모든 편평상피세포에서 발현되며, 자궁경부 이행증의 악성도와 관련이 있는 것 같다고 보고하였다. 이처럼 HPV와 EGFR과의 상관관계에 대해서는 논란이 많은 상태이다. 본 연구에서도 HPV 감염과 EGFR의 양성률 사이에는 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다.

이상의 결과로 HPV와 EGFR은 자궁경부암의 발생시 독립적으로 관여하는 것으로 사료된다.

V. 결 론

1985년 1월부터 1985년 12월까지 서울대학교병원 산부인과에서 치료받은 정상대조군 42예와 자궁경부암 환자 62예를 대상으로 하였다. 그들의 파라핀 포매괴에서 PCR 시행 결과 β -globin의 증폭 유무에 따라 DNA의 유용성을 판단하여 자료분석이 가능한 환자의 수는 각각 33, 52예이었다. 이들을 대상으로 HPV 감염을 및 EGFR 발현율을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상대조군의 중간 나이는 43.3세(34-62세) 이

었고, 자궁경부암군의 중간 나이는 48.9세(36-66세)이었다.

2. 정상대조군과 자궁경부암 환자군에서 HPV 16 혹은 18형의 감염율은 각각 18.2%, 76.9%로 유의한 차이가 있었다($p<0.001$). HPV 16의 감염율은 정상대조군에서 12.1%, 자궁경부암환자군에서 71.2%로 유의한 차가 있었으나($p<0.001$), HPV 18의 감염율은 정상대조군에서 9.1%, 자궁경부암 환자군에서 11.5%로 유의한 차가 없었다($p>0.05$)

3. 연령, 조직학적 소견, 병기, 종양의 크기 및 림프절 전이 여부에 따른 HPV 감염율의 차이는 없었으나 침윤정도에 따른 HPV 16/18, HPV 16형 감염은 침윤정도가 깊을수록 감염율이 유의하게 감소하였으나 반대로 HPV 18형은 침윤정도가 깊을수록 유의하게 증가하였다($p<0.05$)

4. 정상대조군과 자궁경부암 환자군에서의 EGFR은 각각 0%, 51.9%로 자궁경부암에서 통계적으로 유의하게 높게 발현되었으나($p<0.05$), 연령, 조직학적 소견, 병기, 종양 크기, 림프절 전이여부, 자궁경부 침윤정도 등의 예후인자에 따라서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p>0.05$)

5. HPV 감염이 있는 경우 EGFR의 발현 음성인 경우가 47.5%, 1(+) 37.5%, 2(+) 15.0%, HPV 감염이 없던 경우는 각각 50.0%, 33.3%, 16.7%로서 EGFR의 발현 정도가 높을수록 HPV 감염율이 감소하는 경향이 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$)

6. 정상대조군과 자궁경부암군의 HPV 감염 및 EGFR 발현에 따른 생존율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과로 미루어 HPV의 감염 및 EGFR의 발현은 자궁경부암의 발생에 관여하지만, 일단 발생한 자궁경부암의 진행 및 전이에는 관여하지 않으며, 또한 독립적인 예후인자로서의 역할은 할 수 없을 것으로 사료된다. 또한 HPV와 EGFR는 자궁경부암의 발생시 독립적으로 관여하는 것으로 사료된다.

- References -

1. 보건사회부, 한국인 암등록 조사자료 분석보고서 (1982.7.1.-1987.6.30). 대한암학회지 1989;21:151.
2. Howley PM : The role of papillomavirus in human cancer. In Important Advances in Oncology, DeVital VT Jr, Hellman S and Rosenberg SA, editors, J.B. Lippincott Co. Philadelphia 1987:55.
3. De Villiers EM : Heterogeneity of human papillomavirus group. J Virol 1989;18:32.
4. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, et al. : Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinoma using the polymerase chain reaction. American J Surgical Pathology 1989 ;3:221.
5. Tidy JA, Parry GCN, Ward P, et al. : High rate of human papillomavirus type 16 infection in cytologically normal cervixes. Lancet 1989;i:434.
6. Young LS, BeVan IS, Johnson MA, et al. : The polymerase chain reaction: a new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. Br Med J 1989;298:14.
7. Barnes WG, Delgado RJ, Kurman ES, et al. : Possible prognostic significance of human papillomavirus type in cervical cancer. Gynecol Oncol 1988;29:267.
8. Walker J, Bloss JD, Liao S, et al. : Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. Obstet Gynecol 1989;74:781.
9. Lorincz A, Temple GF, Kurman RJ, et al. : The oncogenic association of specific HPV types with cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst 1987;79:671.
10. Kurman RJ, Schiffman MH, Lancaster W, et al. : Analysis of individual human papillomavirus types in cervical neoplasia : A possible role for type 18 in rapid progression. Amer J Obstet Gynecol 1988; 159:293.
11. King LA, Tase T, Twiggs LB, et al. : Prognostic significance of the presence of human papillomavirus DNA in patients with invasive carcinoma of the cervix. Cancer 1989;63:897.
12. Riou G, Faver M, Jeannel D, et al. : Association between poor prognosis in early stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. Lancet 1990;335:171.
13. Hunter EJ, Cooper JA : Protein tyrosin kinase. Am Rev Biochem 1985;54:897.
14. Cohen S : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid op-

- ening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555.
15. Cohen S, Carpenter G : Human epidermal growth factor : Isolation and chemical and biological properties. *Proc Nat Acad Sci USA* 1975;72:1317.
16. Carpenter G : The biochemistry and physiology of the receptor kinase for epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1983;14:93
17. Stoscheck CM, King LE Jr : Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and its relationship to transforming protein. *J Cell Biochem* 1986;31:135.
18. Schlessinger J, Schreider AB, Levi a; et al. : Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1983;14:93.
19. Merlino GT, Xu YH, Lshii S, et al. : Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A331 human carcinoma cells. *Science* 1984;224:417.
20. Hendler FJ, Ozanne BW : Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 1984;74:647.
21. Sainsbery Jrc, Farnon JR, Needham CK, et al. : Epidermal growth factor of early recurrence and death from breast cancer. *Lancet* 1987;21:1398.
22. Hunts J, Ueda 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.
23. 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 Ph.D).
24. 김승철, 이효표 : 자궁경부암에 있어 표피성장인자 수용체의 발현에 관한 면역조직화적 연구. *대한산부회지* 1990;33:1568.
25. Martin P, Vass WC, Schiller JT, et al. : The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1 receptors. *Cell* 1989;59:21.
26. Seedorf KC, Kranmer M, Durst S, et al. : Human papillomavirus type 16 DNA sequense. *Virology* 1985;145.
27. Cole S, Danos O: Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. *J Mol Biol* 1987;193:599.
28. Vousden KH, Jat PS : Functional similarity between HPV 16 E7, SV 40 large T and adenovirus Ela proteins. *Oncogene* 1989;4:153.
29. Zunzenegui MV, King MC, Coria CF : Male influence in cervical risk. *Am J Epidemiol* 1986;123:302.
30. Lasen PM, Vetner M, Hansen K, Fey SJ : Future trends in cervical cancer. *Cancer Lett* 1988;41:123
31. Lancaster WD, Olson J : Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev* 1982;46:191.
32. Waggoner SE, Woodworth CD, et al. : Human cervical cells immortalized in vitro with oncogenic human papillomavirus DNA differentiate dysplastically in vitro. *Gynecol Oncol* 1990;38:407.
33. Bedel MA, Jones KH, Laimins LA : The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 373 and rat-1 cells. *J Virol* 1987;61:3635.
34. Lehn H, Krieg P, Sauer G : Papillomavirus genomes in human cervical tumors: Analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5540.
35. Gissmann L, Woiunik L, Ikenberg H, et al. : Molecular cloning and characteristics of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 1982;44:393.
37. Schneider A, Meinhardt G, de villiers EM, et al. : Sensitivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPA-DNA hybridization studies. *Diag Cytopathol* 1987;3:250.
38. Matlaschewski G, Schneider J, Banks L, et al. : Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* 1987;61:3635.
39. Werness BA, Levine Aj, Howley PM : Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins and p53. *Science* 1990;248:76.
40. Lorincz AT, Quinn AP, Lancaster WD, et al. : A new type of papillomavirus associated with cancer of uterine cervix. *Virology* 1987;159:187.
41. Kulski JK, Howard MJ, Pixley EC : DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16 or 18 in invasive cervical carcinoma of Western Australian women. *Immunol Cell Biol* 1987;65:77.
42. Park MM, Park JB, Kim SY, et al. : Study on human oncogenes-human papilloma viral genes and several oncogenes in Korean cervical cancer tissues. *J Korean Biochemistry* 1987;19:111.

43. 최영민, 이진용, 박소영 등 : 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용한 자궁경부조직에서의 Human Papilloma-virus DNA의 검색. 대한산부회지 춘계학술대회지 1990;26.
44. Fuchs PG, Girardi F, Pfister H : Human papillo-mavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. Int J Cancer 1988;41:41.
45. de Villiers EM, Wagner D, Schneider A, et al. : Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. Lancet 1987;iii:703.
46. Melchers WJG, Claas HCJ, Quint WGV : Use of the polymerase chain reaction to study the rela-tionship between human papillomavirus and cer-vical cancer. Eur J Clin Microbiol Infect dis 1991; 10:714.
47. Stoscheck CM, Carpenter G : Characterization of the metabolic turnover of epidermal growth factor receptor protein in A431 cells. J Cell Physiol 1984; 120:296.
48. Carpenter G, Zendegui JG : Epidermal growth fa-ctor, its receptor and related proteins. Exp Cell Res 1986;164:1.
49. Ushiro H, Cohen S : Identification of phosphotyro-sine as a product of epidermal growth factor activated protein kinase in A431 cell membrane. J Biol Chem 1980;255:8363.
50. Haigier HT, McKanna JA, Cohen S, et al: Direct visualization of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. J Biol Chem 1979;81:382.
51. Cohen S, Carpenter G : The biochemistry and ph-siology of the receptor kinase for epidermal growth factor. Mol Cell Endocrinol 1983;14:93.
52. Gullick WJ, Marsden JJ, Whittle N, et al. : Expr-ession of epidermal growth factor receptors on hu-man cervical, ovarian and vulvar carcinoma. Ca-ncer Reserch 1986;46:285.
53. Downward J, Yarden Y, Mayes E, et al. : Close similarity of epidermal growth factor receptor and c-erb-B oncogene protein sequence. Nature 1984; 307:521.
54. Yamasaki M, Mauro T, Akahori T, et al. : Immu-nohistochemical studies on epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Acta Obstet Gynecol Jpn 1988;20:149.
55. Straight WS, Hinkle PM, Jewers RJ, et al. : The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregu-lation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. J Virol 1993;67:4521.
56. Capman WB, Lorincz AT, Willett GD, et al. : Ep-idermal growth factor receptor expression and the presence of human papillomavirus in cervical squ-amous intraepithelial lesions. Int J Gynecol Pathol 1992;11:221.