

자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스의 역할

순천향대학교 의과대학 산부인과학 교실
최규연 · 남계현 · 이순곤 · 이임순 · 이권해

= Abstract =

The Role of Apoptosis in the Carcinogenesis of the Cervical Cancer

Kyu Yeon Choi, M.D., Kae Hyun Nam, M.D., Soon Gone Lee, M.D.,
Im Soon Lee, M.D., Kwon Hae Lee, M.D.

*Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine,
Soonchunhyang University, Seoul, Korea*

A considerable body of evidence has been accumulated suggesting that invasive squamous cell carcinoma develops from cervical intraepithelial neoplasia(CIN). Most women with invasive cancer of the cervix are from lower socioeconomic groups, have begun heterosexual activity early in life, marry early, are multiparous, and have many sexual partners. Although the epidemiology of the cervical cancer is known well, the pathogenesis of the cervical cancer from CIN is subtle yet.

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

The specific labelling of nick ends of fragmented DNA was used to see the apoptotic cells from normal epithelium of the cervix to invasive cervical cancer. The apoptotic cells were found normally in the parabasal layer of the epithelium. As the grade of CIN increase, the apoptotic cell were found in superficial layer of the cervix and number of the apoptotic cell were increased. In the cervical cancer, the apoptotic cell were found in the cancerous tissues more than in the normal epithelium. This results suggest that the cell proliferation is more important than the inhibition of the apoptosis in the carcinogenesis of the cervical cancer.

Keywords: Carcinogenesis, cervical cancer, apoptosis

I. 서 론

침윤성 자궁경부암이 상피내종양으로부터 발생한다는 증거는 많이 있고, 침윤성 자궁경부암 환

자의 임상적 단면과 침윤전암 단계 환자의 임상적 단면은 비슷한 점이 많다.¹⁾

대부분 침윤성 자궁경부암 환자는 사회경제적 상태가 열악한 환경에서 많이 발생하고, 젊은 나이에 이성간 성교를 시작하거나 다산한 경우, 성

교 상대자가 많은 경우에서 발생한다는 것은 잘 알려진 사실이다.^{2,3)}

저등급 상피내종양 환자를 치료하지 않을 때 1-5%는 결국 침윤성 암으로 발전하고,^{4,7)} 0기암 환자에서 일정 기간 추적 조사시 70-80%가 침윤성 암으로 발전한다.⁶⁻¹⁰⁾ 또한 임상 증상이 없는 미세침윤암에서 임상 증상이 나타나기까지는 평균 10년이 소요된다.¹¹⁾ 이와 같이 자궁경부암 암 발생단계는 저등급 상피내종양에서부터 상피내암을 거쳐 일정 기간이 지난 뒤에 침윤성 암으로 발전한다는 것은 잘 알려진 사실이다.

그러나 이러한 역학적 증거에도 불구하고 각 진행 단계의 기전 에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 아포토시스(일명 예정된 세포사망: programmed cell death)는 정상 세포의 교체(turnover)나 성숙 조직의 유지 외에도 병리적인 자극이나 다양한 약제에 의해서도 유도된다.¹²⁻¹⁴⁾ 일부 종양의 발생기전 중 아포토시스의 억제에 의해 세포의 증식이 일어나는 현상이 보고되기도 한다.¹⁵⁾ 또한 종양 퇴행시에 흔히 아포토시스가 관찰되므로 아포토시스가 종양의 치유 기전에 관여하는 것이 아닌가 추측할 수 있으므로 이에 관한 학자들의 관심이 높다.

이에 본 연구는 자궁경부암의 발암 과정의 단계별 조직에서 면역조직화학적으로 in situ hybridization 기술을 이용해 아포토시스 세포의 분포를 조사하고, 자궁경부암의 발암 과정에 아포토시스의 역할에 대해 규명해 보고자 한다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

자궁경부의 암화 과정을 알아보기 위해 정상 자궁경부상피에서부터 단계적으로 CIN I, CIN II, CIN III 및 미세침윤암, 침윤성암 및 선암 각각 5예씩을 대상으로 하였다. 총 35예 중 15예는 생검, 11예는 원추생검, 9예는 자궁적출술로 얻어졌다.(Table 1)

2. 재료

연구재료는 적출된 조직의 H-E(hematoxylin-eosin)

Table 1. Materials for in situ hybridization

Lesion	Punch biopsy	Conization	Hysterectomy	Total
Normal cervix	3	2		5
CIN I	3	2		5
CIN II	4	1		5
CIN III	2	3		5
Microinvasive Ca		2	3	5
Invasive Ca			5	5
Adenocarcinoma	3	1	1	5
Total	15	11	9	35

Ca : carcinoma

염색 표본을 검토하여 종양이 많이 포함되었고, 파라핀 포매조직의 상태가 양호한 부위를 선택하였다.

3. In Situ Hybridization 염색

방법은 Gavrieli 등^{16,17)}의 기술에 기초를 두었다.

파라핀에 포매된 조직을 4-5 μ m 두께로 블럭당 3매를 연속절편 하여 L-lysine으로 처리된 슬라이드에 붙인 후 염색시마다 사용하였다. 탈파라핀화를 위해 슬라이드를 57 $^{\circ}$ C 전기 오븐에 약 20분간 가열한 뒤, 실온에서 100% xylene에 5분 거친 후 100%, 95%, 75% 에탄올에 5분씩 순차적으로 함수하고 증류수로 2회 세척하였다. 아포토틱 세포를 분리하기 위해 Oncor사의 Apop tag In situ Apoptosis Detection kit를 사용하였다. 조직 내에 비특이적 단백질을 소화하기 위하여 proteinase로 처리하였다. 내인성 Peroxidase의 활성을 제거하기 위하여는 실온에서 20% hydrogen peroxide (H₂O₂)로 5분간 처리하였다. 즉시 인산염 완충 식염수(PBS)로 2회 세척 후, 평형 완충액(equilibration buffer)을 도포한 뒤 약 10-15초 기다린 후 TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소를 각 슬라이드당 54 μ l 도포 후 37 $^{\circ}$ C 습기 있는 인큐베이터에서 약 1시간 보온시켰다. 그 후 즉시 반응정지액을 다시 도포 후 30분간 37 $^{\circ}$ C 습기 있는 인큐베이터에서 반응시켰다. 그 후 실온에서 3회 인

산염 완충 식염수(PBS)로 세척 후 digoxigenin-peroxidase 항체를 적용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 다시 3회 증류수로 세척한 후 0.05% DAB(diaminobenzidine) 용액에서 약 5분간 발색하였다. 발색된 슬라이드를 3회 PBS로 세척 후 대조 염색(counter stain)을 위하여 0.5% methyl green 용액에서 약 30초간 염색한 후 증류수로 2회 세척하고 95%, 100% 에탄올 및 2회 xylene용액에 순차적으로 넣어서 탈색하였다. 최종 염색된 슬라이드는 캐나다 발삼(canada balsam)을 이용, 커버슬라이드로 봉입(mount)하였다.

4. 판독 및 자료 분석

면역 조직화학적 염색결과는 염색강도에 따라 나누지 않고 갈색으로 염색되는 세포만을 아포토틱 세포로 판정하여 분석하였다.

III. 결 과

분열된 DNA in situ labelling에 의한 아포토틱 세포는 정상 경부상피에서 기저층 일부에서만 약하게 관찰되었다(Fig. 1). 자궁경부상피내종양이 진행되면서 아포토시스에 의한 세포사망은 상층으로 이동되어 증가하는 양상을 보였다(Fig. 2, 3). 자궁경부상피내암인 경우 부위에 따라 변화가 심하고 전 층이 아포토시스를 일으키는 세포가 관찰되는 등 자궁경부상피내종양의 정도가 심해질

수록 아포토시스에 의한 세포사망이 증가하였다(Fig. 4). 미세침윤암 및 침윤 암의 경우에는 암조직 전반에 걸쳐 아포토틱 세포가 관찰되는 양상을 보여주었다(Fig. 5, 6). 선암의 경우도 비슷하며, 선암세포 일부에서 정상 경부 선조직과 같이 아포토시스가 발견되었다(Fig. 7). 결과를 종합한 것이 Table 2이다. 이상의 결과로 볼 때 상피내종양에서부터 자궁경부암까지 발암 과정에서 아포토시스가 활발히 일어나는 것으로 보아 자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스가 역할을 할 것으로 추정된다.

IV. 고 찰

자궁경부암은 한국에서 여성암 중 빈도가 가장 높은 악성종양이다. 자궁경부암이 저등급상피내종양(low grade CIN)에서 오랜 기간을 거쳐 0기암 및 미세침윤암으로 발전한다는 사실은 연구자들의 역학적 조사에 의해 증명되었다. 그러나 각각의 단계에서 발암기전에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

아포토시스(apoptosis)라는 용어는 1972년 Kerr 등¹³⁾이 처음 기술한 신조어로 어원은 그리스어이며 뜻은 꽃에서 꽃잎이 떨어지거나 나무에서 나뭇잎이 떨어지는(falling off) 것을 표현하는 단어이다. 비슷한 개념으로 계획된 세포사망(programmed cell death)이 있는데 넓은 의미에서 계획된

Fig. 1. Topography of the apoptotic cells in the normal exocervix (Immunoperoxidase, $\times 100$)

Fig. 2. Topography of the apoptotic cells in the CIN I(Immunoperoxidase, $\times 100$)

Fig. 3. Topography of the apoptotic cells in the CIN II(Immunoperoxidase, $\times 100$)

Fig. 4. Topography of the apoptotic cells in the CIN III(Immunoperoxidase, $\times 100$)

- 자궁경부암의 발암과정에서 아포토시스의 역할 -

Fig. 5. Topography of the apoptotic cells in the microinvasive cervical cancer(Immunoperoxidase, $\times 40$)

Fig. 6. Topography of the apoptotic cells in the invasive cervical cancer (Immunoperoxidase, $\times 100$)

Fig. 7. Topography of the apoptotic cells in the adenocarcinoma of the cervix(Immunoperoxidase, $\times 40$)

Table 3. Summary of the expression and topography of the apoptosis

Lesion	Apoptosis	Distribution
Normal cervix	3/5	basal/parabasal layer
CIN I	4/5	intermediate/superficial layer
CIN II	2/5	intermediate/superficial layer
CIN III	5/5	whole thickness
Microinvasive Ca	5/5	diffuse
Invasive Ca	5/5	diffuse
Adenocarcinoma	2/5	scant

Ca : carcinoma

세포 사멸은 아포토시스의 일종으로 주로 생리적인 현상으로 생체에서 일어나는 경우에 한하여 사용하고, 생리적이거나 병적 자극이나 신생물에 의해서 일어나는 특이한 세포 사멸 형태는 모두 아포토시스라고 한다. 아포토시스의 세포 사멸 형태는 괴사로 인한 세포 사멸과 대조적으로 주위 조직에 염증을 일으키지 않으며, 특이한 형태로 세포 사멸을 한다. 즉 세포들은 크로마틴이 치밀해지면서 핵막에 작은 덩어리들이 형성되고 세포질이 농축(condensation)되면서 세포 표면이 들들 말리어 꽃가루 모양 돌기들이 형성되고, 돌기들이 분리되어 떨어져나와 아포토틱체(apoptotic body)가 만들어진다.¹³⁾

이때 생화학적 특징으로 DNA 분절이 약 200 base pair 단위로 분절된다. 일반적으로 광학현미경에서 아포토시스가 진행되는 세포를 감별하기는 쉽지 않다.¹⁸⁾ 아포토틱 세포 모양은 수분에 국한될 수도 있고,¹⁹⁻²⁰⁾ 다양한 형태의 아포토틱체를 탐식 되기전 수시간 정도 관찰된다.²⁾ 더욱이 DNA 분절(fragmentation)은 조직학적으로 증명된 아포토틱세포 뿐만이 아니라 아포토시스가 일어나는 형태학적인 정상 세포에서도 일어난다.

현재 아포토시스의 증명에 주로 사용되는 genomic DNA의 추출과 전기 영동에 의해 사다리 모양(ladder pattern)은 대량의 세포에서 DNA 분절이 일어나야 증명이 가능하나, 본 연구에 사용된 방법은 Gavrieli¹⁶⁾와 Wijsman¹⁷⁾에 의해 새로 개발된

것으로 조직 형태를 유지하면서 단 한 개의 세포에서 일어나는 아포토틱세포라도 색출할 수 있다. 이 방법의 주된 기전은 분절된 DNA nick ends에 특별히 표지(labeling)하는데 기초한다. 파라핀 포매조직이나 동결 조직 혹은 세포에서도 적용이 가능한 장점이 있다.

일정 시점에서 전체 세포의 2-3%만 아포토시스가 일어나도 24시간이 지나면 전체 용적의 25%가 준다는 보고가 있다.²³⁾ 아포토시스의 DNA분절은 세포 사멸을 이르게 하고, 사멸된 세포는 수 시간 내에 탐식되어 제거된다.²⁴⁾

부인과 영역에서 아포토시스의 연구는 고사낭포(atretic follicle)에서 관찰되며, 성숙되는 완전성숙세포(Graafian follicle)와 대조를 이룬다. 또한 내막에서 월경시 기능층에서도 아포토시스가 관찰된다. 대부분 대장직장암의 발암과정시 양성 선종에서 점차 유전적인 변화가 집합하여 선암으로 발전하는 것은 잘 알려진 사실이다.¹⁶⁾ 이런 정상 대장 상피, 선종 상피, 및 대장직장암 상피를 각 군으로 하여 아포토시스를 유도한 결과 정상 상피보다 암으로 발전함에 따라 아포토시스가 억제되고 있는 현상을 보고하였다.¹⁵⁾

본 연구에서 정상자궁경부 편평상피에서 아포토시스는 주로 부기저층에서 나타나며 부위에 따라 차이를 나타내 주고 있다. 피부 표피에서는 아포토시스가 최상층이나 과립세포층(granular cell layer)에서 일어나는 것으로 보고하여 자궁경부와는 차이를 보였다.²⁵⁾ 정상적으로 자궁외경부(exocervix)상피는 생식 연령에서는 증식(proliferation), 성숙(maturation) 및 표피탈락(desquamation)의 과정을 밟는다. 상피 전층이 새로운 세포로 대체되는 기간은 약 4-5일이며, 이러한 과정은 에스트로겐 여성호르몬 투여에 의해 가속화된다고 보고하였다.^{26,27)} 자궁경부상피내종양이 저등급에서 고등급으로 진행시 아포토틱 세포가 점차 상피상층에서 나타나며 0기암에서는 전층에서 강하게 아포토시스가 일어나고 있다. 전체 세포에서 2-3%만 아포토시스를 일으켜도 24시간이 지나면 세포용적이 25% 준다는 보고에 비추어 보면²³⁾ 0기암에서 세포의 증식과 소멸이 상당히 빨리 일어날 것으로 추측된다. 침윤성암으로 발전시 침윤된 상피에서도 정상상피에 비해 아포토시스가 활발히 일어나

는 것을 관찰할 수 있었다. 세포의 증식과 소멸의 관점에서 종양양적이 증가하는 점을 볼 때 자궁경부암에서는 아포토시스에 의해 세포가 소멸하는 것보다 증식이 더욱 많을 것으로 추측된다.

본 연구에서 정상 자궁경부상피조직에서 이형성증이 증가되면서 조직학적으로는 아포토시스의 층이 정상에 비해 증가하는 양상을 보이고 있다. 조직학적으로 일부 부위에서 아포토시스의 증가가 보이는 것은 세포주에서 연구한 대장암의 연구에서 아포토시스가 억제되는 양상을 보이는 것과는 일치하지 않는다. Ki-67을 이용한 정상 자궁경부 및 이형성증에서 세포의 증식을 연구한 결과를 보면 기저층에서 Ki-67양성을 보이며 이형성증의 정도가 심화되면서 Ki-67의 양성정도가 증가하여 세포의 증식이 증가하는 양상을 보고하여 부위에 따라 증식이 증가하기도 하고 일부에서는 아포토시스가 증가하는 양상을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 일부 학자는 아포토시스를 방어하는 것으로 알려진 bcl-2 단백질발현이 정상 자궁경부상피의 기저층에서 발현되며 이형성증이 증가할수록 증가한다고 보고하여 본 연구와는 상이한 결과를 보고하였다.³⁰⁾ 인유두종 바이러스를 감염시킨 각질세포(keratinocyte)에서 발암적 변이가 일어남으로써 형질전환된 세포(transformed cells)는 아포토시스의 억제와 동시에 증식이 증가하는 경향을 보고하여 자궁경부암의 발암기전에 아포토시스의 억제를 강조하여 본 결과와는 다른 면을 보여주었다.³¹⁾

본 연구를 토대로 더 많은 증례를 분석하고, 나아가 자궁경부 정상 상피세포, 이형성세포 및 자궁경부암 세포를 이용한 아포토시스 억제 여부 연구나 PCNA나 Ki-67 등^{28,29)} 같은 세포가 증식시에만 나타나는 항체를 이용하여 아포토시스를 동시에 연구를 하면 조직의 증식과 소멸에 따른 균형 속에서 자궁경부암의 발생 기전을 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

자궁경부암의 암화과정에서 아포토시스의 역할에 대해 조사하기 위하여 정상자궁경부상피에서

현증 자궁경부암까지 각 발전단계의 파라핀 포매 조직을 이용하여 DNA in situ hybridization법에 의해 면역조직화학적 방법으로 아포토시스를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상자궁경부상피에서 아포토시스는 기저층 일부에서 약하게 일어났다.
2. 경증 이형성증에서 상피내암까지 이형성증이 증가할수록 아포토시스가 기저층에서 상층으로 이동하며 아포토시스의 비율도 증가하였다.
3. 미세침윤암과 현증 침윤암에서 아포토시스는 종양 전체에서 골고루 일어나고 있음을 알 수 있었다.

따라서 자궁경부암 발암과정에서 아포토시스가 활발히 일어나고 있음을 알 수 있었다.

- References -

1. Brinton LA: Epidemiology of cervical cancer-an overview, Munoz N, Bosch FX, Shah K, Meheus A(eds): The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus. Lyon, IARC Scientific Publication 1992;3:23.
2. Graham S, Priore R, Graham M et al.: Genital cancer in wives of penile cancer patients. Cancer 1979;44:1879-1874.
3. Kessler II: Venereal factors in human cervical cancer. Evidence from marital clusters. Cancer 1977; 39:1912-1919.
4. Coppleson M: The origin and nature of premalignant lesions of the cervix uteri. Int J Gynecol Obstet 1970;8:539.
5. Fidler HK, Boyes DA, Worth AJ: Cervical cancer detection in British Columbia. J Obstet Gynecol Br Commonw 1968;75:392.
6. Koss LG: Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Basis. New York, J. B. Lippincott Co 1992.
7. Ostor AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. Int J Gynecol Pathol 1993;12:186-192.
8. Koss LG, Stewart FW, Foote FW et al.: Some histological aspects of behavior of epidermoid

- carcinoma in situ and related lesions of the uterine cervix. *Cancer* 1963;16:1160-1211.
9. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW et al.: The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. *Obstet & Gynecol* 1984;64:451-458.
 10. Kottmeier HL: Evolution et traitement des epitheliomas. *Rev Fran Gynecol & Obstet* 1961;56:821-826.
 11. Report TW: Report of the Task Force of the Department of Health and Welfare of Canada. Cervical Cancer Screening Programs. The Walton Report. *Can Med Assoc J* 1982;127:581.
 12. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68: 251-306.
 13. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
 14. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
 15. Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ et al.: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Research* 1995;55:1811-1816.
 16. Gavrielli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
 17. Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R et al.: A new method to detect apoptosis in paraffian section: in situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytoche* 1993;41:7-12.
 18. Kerr JFR Searle, Harmon BV, Bishop CJ: Apoptosis: In *Perspectives on Mammalian Cell Death*, C.S. Potten, editor, Oxford, Oxford University Press 1987;93-128.
 19. Russel SW, Rosenau W, Lee JC: Cytosis induced by human lymphotoxic. *Ann. J. Pathol.* 1972;69:103-118.
 20. Sanderson CJ: The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 1976;192:241-255.
 21. Mater A: Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 1979;36:179-190
 22. Wyllie AH: Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature(Lond)* 1980;284:555-556.
 23. Bursch W, Paffe S, Putz B et al.: Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats in carcinogenesis(London) 1990;11:847-853
 24. Baringa M: Death gives birth to the nervous system, But How?. *Science* 1993;259:762-763.
 25. Tamada Y, Takama H, Kitamura T et al.: Identification of programmed cell death in normal human skin tissues by using specific labelling of fragmented DNA. *British Journal of Dermatology* 1994;131: 521-524.
 26. Koss LG: *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*, 3rd ed. Philadelphia, J B Lippincott 1979.
 27. Krantz KE: *The anatomy of the human cervix, gross and microscopic*, Blandau RJ, Moghissi K, The biology of the cervix, Chicago, University of Chicago Press 1973.
 28. Bravo R, MacDonald Bravo H: Existence of two population cyclin/PCNA during the cell cycle, association with DNA replication sites. *J Cell Biol.* 1987;105:1549-1554.
 29. Hall PA, Richards MA, Gregory WM et al.: The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1988;154:223-235.
 30. 9th World Congress of Cervical pathology and colposcopy. Abstract. 334. p 134, 137.
 31. Fernandez C, Sharrard RM, Talbot M et al.: Evaluation of the significance of polyamines and their oxidases in the aetiology of human cervical carcinoma. *Br J Cancer* 1995 Nov;72(5):1194-1199.