대부종콜포회지 제9권 제4호 1998
Vol. 9, No. 4, Dec., 1998

인유두종 바이러스 관련 악성질환의 병인론 추적에 있어 PCR-SSCP 방법의 유용성

서울대학교 의과대학 산부인과학교실
김재원 · 송용상 · 박노현 · 강순범 · 이효표

=Abstract=

Usefulness of PCR-SSCP for tracing the pathogenesis of human papillomavirus-associated malignancy

Jae Weon Kim, M.D., Yong Sang Song, M.D., Noh Hyun Park, M.D.,
Soon Beom Kang, M.D., Hyo Pyo Lee, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University

Purpose: To set up more simplified detection method for human papillomavirus (HPV) sequence polymorphism which could be used for the study of HPV-related pathogenesis, route of infection, and many other epidemiologic studies.

Materials and Methods: One hundred and thirteen cases of uterine cervical tissues containing HPV 16 DNA confirmed by polymerase chain reaction (PCR) from Korean women were subjected to investigate the URR gene mutations. PCR-amplified products were sequenced by the fluorescent dideoxy termination method and opposite strand sequencing was performed as required. The results obtained from sequencing were analysed to find the most hypervariable segment which contains the greatest number of variants and subjected to PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis.

Results: Among the length of nucleotide position (np) from 7175 to 24, we found 60 sites (60/815=7.36%) of base substitutions. Segment from np 7743 to 24 was the most hypervariable and contain 20 kinds of variants. In this segment, C-to-T mutation at position 24, G-to-A at 7842, and T-to-C at 7781 were more frequently found than other sites. By comparing sequencing results with PCR-SSCP, we found 15 patterns distinguishable each other. All of the mobility shift occurred in the PCR-SSCP pattern could be accounted for by the base substitutions and nearly all of the DNA sequencing results observed were reflected as alterations in the PCR-SSCP patterns.

Conclusions: We have assigned the hypervariable segment in one portion of URR which could be used as PCR-SSCP analysis. Identification of HPV polymorphism by PCR-SSCP is potentially useful for elucidating a number of epidemiologic questions such as the pathway of viral spread and so on.

Key Words: HPV 16, URR Variants, PCR-SSCP, Molecular epidemiology

*책임저자 : 이효표, 서울시 종로구 연건동 28, 서울의대 산부인과학교실, 110-744
이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

인유두종 바이러스(Human papillomavirus, HPV) 감염의 결과로 발생하는 악성 질환 중 대표적인 자궁경부암은 여성에게 가장 흔히 발생하는 암으로 전세계적으로 매년 약 46만 명의 신환이 발생한다[1]. 우리 나라 여성에서도 1998년 보건복지부 한국중앙암등록 사업 연례 보고서(1996.1. 1996.12.)에 의하면 자궁경부암이 7,245명으로 전체 여성암의 22.1%에 달하는 등 발생 빈도 1위를 차지하고 있어 여성 보건에 중대한 문제가 되고 있다[2].

다른 바이러스와는 달리 HPV는 바이러스 배양이 어려워 바이러스 자체가 유효하지 않아서 바이러스 캡시드에 대한 항체에 기초한 혈청학적 형분류 방법이 쓰일 수 없고, 따라서 현재 HPV 유전형(genotype) 분류는 DNA 염기서열의 유사성에 따르고 있다.[3] 이러한 분류법에 따라 현재까지 70 여종 이상의 HPV 유전형이 밝혀져 있으며, 이 중 생식기 감염을 일으키는 것은 30 여종, 자궁경부암 발생과 관련된 것이 20 여종으로 알려져 있다. 이 중 HPV 16형은 자궁경부암 조직에서 가장 흔히 발견되는 유전형이다. 정상 자궁경부 세포진 검사 결과를 보이는 여성에서 HPV의 감염율은 대상집단 및 적용된 검색방법에 따라 다르기는 하나 5-40% 정도로 추정되고 있다[4]. 이와 같은 HPV의 중요성에도 불구하고 HPV 관련 질환의 병인론 및 감염 경로와 같은 기본적인 문제에도 논란이 있는 실정이다. 예를 들면 모체에서 태아로의 수직 감염 여부, 성적 전파의 직접적인 증거, 숙주의 면역 반응에 의한 감염 방지, 동일 환자에서 감염의 확산, 잠복 감염 등이 그 것이다. 위와 같은 문제에 대한 해답을 얻기 위해서는 '간편화된 HPV 검출체계'에 의한 바이러스 감염 진단법이 필수적이다. '감염이 있다'라는 명백한 정보를 얻으려면 미량의 바이러스도 검출할 수 있어야 하며 또한 확인하고자 하는 바이러스 유전체(genome)를 개별 검출할 수 있어야 감염 경로의 추정이 가능해진다. 첫 번째 조건을 만족시키기 위해서는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 유용하며 두 번째 조건은 염색체 서열분석을 통한 개별 변체의 확인으로 가능하나 많은 시간과 노력을 요한다. 최근 HPV의 계통수 분석을 통한 연구는 이의 해결 방법을 시사하고 있다. 즉, HPV 유전체가 상호 구분이 가능한 꼬리표(tag)을 가질 경우 통상적인 염기서열 분석 방법보다는 보다 간편한 방법의 적용이 가능한데 자연발생적인 점변이가 그러한 꼬리표의 역할을 할 수 있다는 것이다. DNA 바이러스인 HPV의 점변이는 매우 느린 속도(약 12,000년에 한 염기가 변함)로 일정부위에서 단계적으로 발생하는 것으로 알려져 있어[5] 이를 분자역학 연구에 이용할 가능성이 시사되고 있다[6]. 현재까지의 연구 결과로는 HPV 16 유전체중 상류 전사조절부위(upstream regulatory region, URR)가 기능소실을 동반하지 않으면서 점변이 빈도가 높아 최적의 정보를 제공하는 것으로 알려져 있다[7]. 이에 본 연구에서는 단일 염기의 점변이도 확인이 가능한 PCR-SSCP 방법으로 HPV 관련 질병의 병인론 연구에 적용할 수 있는 간편한 HPV 유전자 다형성 검출계를 정립하고자 하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교병원 산부인과에서 자궁경부암으로 진단된 환자와 양성 부인과 질환으로 수술 받은 환자를 대상으로 수술 전에 자궁경부 세포 채취 기구를 이용하여 얻어진 탈락세포와 수술 후 얻은 자궁경부조직 총 432개(정상 : 307예, 암 : 125예)를 본 연구의 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

자궁경부암으로 진단된 환자와 자궁근종 등의 양성질환으로 수술 받는 환자의 자궁경부 조직을 수술장에서 직접 채취하여 각각 0.5 X 0.5 cm 크기로 자른 후 냉동 보관통에 넣어 -70℃ 질소 탱크에 보관하였다. 이 때 자궁경부암 환자의 경우 일부를 잘라 동결조직 검사하여 암조직임을 검증하였다. 검체에서 DNA의 추출은 통상 사용하는 PCI 방법을 적용하였고 PCR을 이용하여 HPV 16 DNA 감염 여부를 검색하였다[8]. HPV DNA 검색의 양성 대조군으로서는 HPV 16의 감염이 증명되어 있는 CaSki 자궁경부암 세포주 (ATCC, Virginia)및 HPV 16 integrated plasmid를 사용하였고(from E.-M. de Villiers,

Heidelberg, Germany) 음성 대조군으로는 C33A 세포주를 사용하였다.

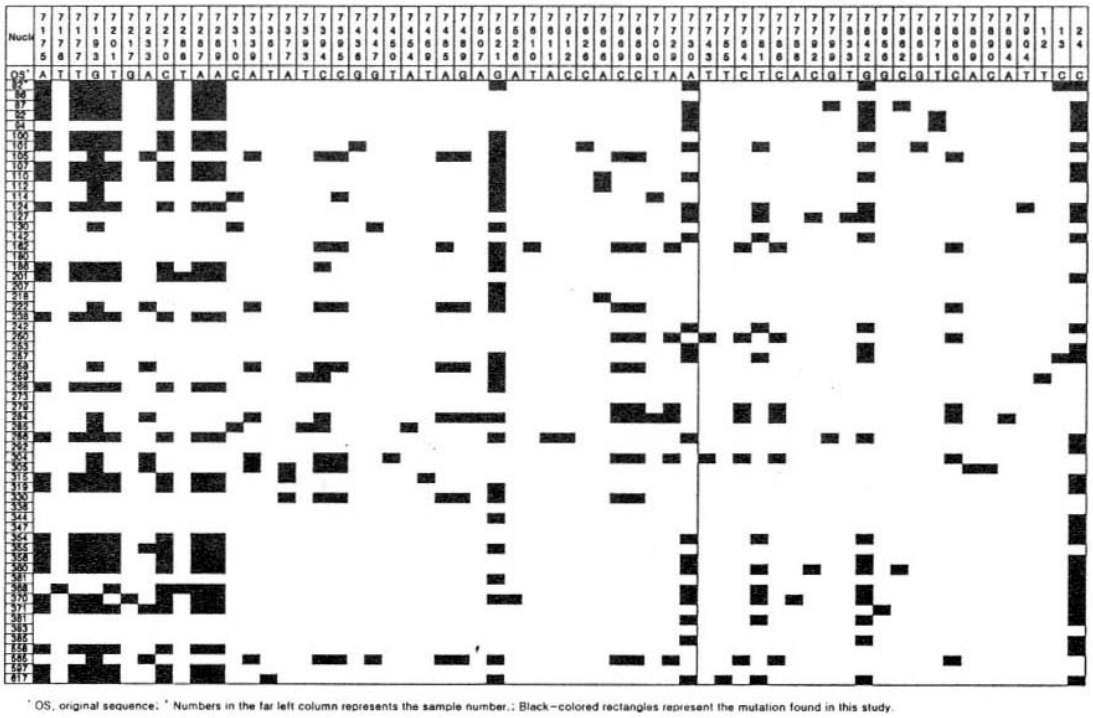
Table 1. List of primer sequences used for PCR-directed sequencing and PCR-SSCP analysis of HPV 16 URR

Primer sequence		Nucleotide position	Amplimer size(bp)
For PCR-directed sequencing			
1st PCR	GCA GAC CTA GAT CAG TTT CC	7007-7026	
	TCC TCC TCT GAG CTG TCA TT	646-665	1564
2nd PCR			
URR-1	AAC GAA AAG CTA CAC CCA CC	7089-7108	
	GCC AAA AAG CAT GCA ACC GA	7460-7479	371
URR-2	ACC TAC TAA TTG TGT TGT GG	7341-7360	
	ACA AGC CAA AAA TAT GTG CC	7702-7721	380
URR-3	CTT GCC AAC CAT TCC ATT GT	7586-7605	
	ATA CTA ACC GGT TTC GGT TC	7954-7973	387
URR-4	GTA AAA CTG CAC ATG GGT GT	7834-7853	
	ACA GCA TAT GGA TTC CCA TC	269-288	360
For PCR-SSCP			
	TGG CTT GTT TTA ACT AAC CT	7714-7733	
	TCG GTT CAA CCG ATT TCG GT	35-54	246

Fig 1. Design of primers for sequence analysis of HPV

URR 전 부위의 염기서열을 분석하기 위하여 nested PCR을 시행하고(Table 1, Fig. 1) 여기에서 얻어진 산물을 이용하여 다음 방법으로 염기서열 분석을 시행하였다. 정제된(Promega, Madison, WI, USA) PCR 산물 10-25 ng/ul를 사용하며 ABI kit의 교안에 따라 총 반응액 량을 20 ul로 하였다.(Applied Biosystems, Inc. Perkin Elmer Co.) 시발체는 주로 sense 쪽을 사용하였고 Cycle sequencing 반응은 Gene Amp PCR system(model 9600, Perkin Elmer, Foster city, USA)를 사용하였으며 미리 96℃까지 예열시켰다가 10초동안 온도를 유지한 후 다시 96℃에서 30초, 50℃에서 15초 마지막으로 60℃에서 6분간 총 25회 반복 반응시켰다. 반응되지 않은 뉴클레오타이드는 Centri-sep(Princeton separations, Adephia, NJ, USA)을 사용하여 제거하였으며 여기에서 얻어진 반응 산물은 Speed Vac (Savant Instrument, Farmingdale, NY, USA)에서 건조시켰다. 그 후 5ul의 탈이온화된 포름아미드(50 mM EDTA, pH 8.0(5:1)에 녹였다. 겔은 4.75% polyacrylamide gel을 사용하였고 검체를 부하한 후 30 W의 전압으로 12시간 전기영동한 후 ABI 373 Sequence 프로그램(version 1.2.1 Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA, USA)을 사용하여 결과를 분석하였다.

PCR-SSCP를 시행하기 위한 시발체의 제작을 위하여 다음과 같이 작업하였다. 우선 본 연구에서 나타난 염기 서열 결과를 기존에 보고된 원형과 비교하여 변이가 발견된 부분을 염기서열 위치(nucleotide position, np)와 함께 각 검체별로 표로 작성하였다(Table 2). PCR-SSCP 분석을 위한 최종 산물은 그 크기가 200 bp 내외일 경우가 가장 민감도가 높다는 경험에 근거해서 7175번부터 시작해서 24번까지 순차적으로 200 bp 내외의 구획을 설정·이동시키면서 각 구획에서 나타나는 변체의 경우 수를 세었다. 이 중에 가장 많은 변체가 나타나는 구획을 선정하고 이 구획이 충분히 포함되도록 PCR-SSCP용 시발체를 선정하였다. PCR-SSCP는 다음과 같이 시행하였다. 100 ㎕의 반응 혼합액을 만들며, 이에는 1.0 ㎍의 DNA와 1X PCR buffer(25 mM Tris-HCl pH 8.4, 17 M ammonium sulphate, 8 mM MgCl2, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.02% gelatin) 10 ㎕, 상류 및 하류 시발체는 각각 0.25 ㎛M, 100 ㎛M의 각 dNTP, 5 unit Taq polymerase를 포함하였다. 변성은 94℃에서 75초간, 접합은 60℃에서 75초간, 연장은 72℃에서 2분간 시행하고 전체 35 주기를 시행하였다. 마지막 주기에서는 72℃에서 10분간 연장 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응용액 5 ㎕를 1.0 % SDS/10mM EDTA 20 ㎕로 희석하고, 20 mM NaOH



* OS, original sequence; † Numbers in the far left column represents the sample number.; Black-colored rectangles represent the mutation found in this study.

Fig 2. Sequencing results and selection of the most hypervariable segment within URR which is well fit to the requirement of sensitive PCR-SSCP analysis. Shaded portion represent the segment for and analysed by PCR-SSCP

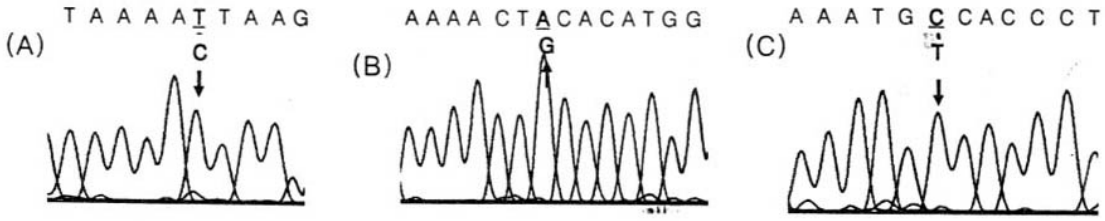


Fig 3. Swquence analysis of PCR products of HPV type 16 URR from uterine cervical tissues. ABI electrpherogram shows base substitution at nucleotide 24(A)(C to T), 7842(B)(G to A), and 7781(C)(T to C) respectively. Arrows denote changed sequences which are underlined.

를 포함하는 sequencing stop solution (98 % deionized formamide, 10 mM EDTA, 0.025 % xylene cyanol FF, 0.025 % bromophenol blue)으로 한번 더 희석하였다. 이후 80℃에서 3 분간 처리후 얼음에서 빨리 식혔다. 10% glycerol을 포함한 6% polyacrylamide 겔에 3 ㎕를 넣은 후, 4℃에서 50 W로 4 시간 동안 전기영동하였다. Gel을 vacuum-heater에서 말린 후, Kodak X-Omat AR film(Eastman Kodak, rochester, NY)을 사용하여 -70℃에서 10 36시간 동안 노출한 후 필름을 현상하였다. 이와 같이 하여 DNA band 이상 유무를 정상 대조군과 비교·분석하였고 변이가 확인된 검체를 대상으로 PCR-SSCP 결과와 sequencing 결과를 비교하여 일치 여부를 검토하였다.

III. 결　　과

정상 자궁조직 검체 307예 중 43예(14.0%), 침윤성 자궁경부암 125예 중 70예(56.0%)에서 HPV 16 DNA가 검출되었다. HPV 16이 검출된 113예의 검

Table 2. DNA sequence analysis of HPV 16 variants from nucleotide positions 7743 to 24.

Pattern	Nucleotide position																					Samples (n=113)	
	7743	7755	7764	7781	7786	7788	7792	7799	7833	7842	7856	7862	7867	7881	7886	7889	7890	7894	7904	7912	7913	7924	No.	%
Reference	T	T	C	T	C	A	C	G	T	G	G	C	G	T	C	A	C	A	T	T	C	C	36	31.9
Variant 1	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	5	4.4
Variant 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	20	17.7
Variant 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	C	T	—	—	—	—	—	3	2.6
Variant 4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	2	1.7
Variant 5	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	7	6.2
Variant 6	—	—	—	C	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	11	9.7
Variant 7	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	G	T	2	1.7
Variant 8	—	—	—	—	—	—	—	—	A	—	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	T	3	2.6
Variant 9	—	—	T	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	7	6.2
Variant 10	—	—	—	—	—	—	—	A	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	2	1.7
Variant 11	—	—	—	C	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	T	1	1.6	
Variant 12	—	—	—	—	—	—	—	A	—	A	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	T	2	1.7
Variant 13	G	—	T	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	—	—	—	—	—	3	2.6
Variant 14	—	—	—	C	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	T	1	1.6
Variant 15	—	—	T	—	T	—	—	—	—	—	—	—	—	G	—	—	C	—	—	—	1	1.6	
Variant 16	—	—	—	C	—	G	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	2	1.7
Variant 17	—	G	—	C	—	—	—	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	2	1.7
Variant 18	—	—	—	C	—	—	—	—	A	—	—	C	—	—	—	—	—	—	—	—	T	1	1.6
Variant 19	—	—	—	C	—	—	A	—	G	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	T	1	1.6
Variant 20	—	—	—	C	—	—	T	—	—	A	—	A	—	—	—	—	—	—	—	—	T	1	1.6

* —, identical sequence of reference was obtained at this nucleotide position.

체를 대상으로 하여 URR 부위의 염기서열 분석을 시행하였다. 염기 서열 분석의 대상이 된 URR 부위 (np 7156 65)중 7175번부터 24번 위치에 이르기까지 모두 60 군데에서 변이가 발견되었고 (60/815, 7.36%) Fig. 2(자료의 일부만 나타냄)를 사용하여 분석한 결과 np 7743 24 (bp 187) 구획이 가장 많은 20 종류의 변체를 보였다(Table 2).

분석 결과 HPV 16형이 양성으로 확인된 113예 중 1985년 Seedorf 등이 독일 여성의 자궁경부암 조직에서 밝힌 염기서열을 보인 경우는 자궁경부암에서는 단지 9예(12.9%), 정상 자궁경부 조직의 경우도 4예(9.3%)에서만 참고형을 보였고 각각 나머지 61예(87.1%), 39예(90.7%)에서 1 12 뉴클레오타이드에 걸친 다양한 형태의 염기서열 변이를 보였으며 병리학적 진단에 따른 차이는 보이지 않았다(Fig. 3).

분석 대상이었던 np 7175 7377 구획은 11종, 7193 7395는 16종, 7217 7395는 17종, 7310 7521은 15종, 7483 7700은 9종의 변체가 나타났다. 7719 37 구획은 22종으로 가장 많은 변체가 보였으나 7743 24 구획에 비하여 단지 한 가지 변체가 많을 뿐이고 범위가 224 bp에 달하기 때문에 선정되지 않았다.

7743 24 구획을 대상으로 PCR-SSCP를 시행한 결과 15 가지 유형의 bands가 관찰되었다(Fig. 4). SSCP에서 나타나는 bands 양상과 염기서열 분석 결과를 비교한 결과 변체 1, 3, 14는 각각 같은 band로 나타났고 변체 4, 5, 8 및 변체 9, 15, 변체 10, 12도 각각 유사한 bands 양상을 보여 염기서열의 차이가 PCR-SSCP상 반영되지 못함을 알 수 있었다(Table 3). 이를 제외하고는 SSCP에서 동일한 bands를 보인 검체는 염기서열 분석 결과에서도 모두 동일한 결과를 보였다. 표 2에서 보는 바와 같이 SSCP 상에 보이는 검체에 따른 bands의 차이는 참조 유형에 비하여 1 5 곳의 염기서열 변화(base substitution)에 기인한 것으로 나타났으며 DNA 염기서열의 변화는 모두 다양한 SSCP bands로서 나타났다.

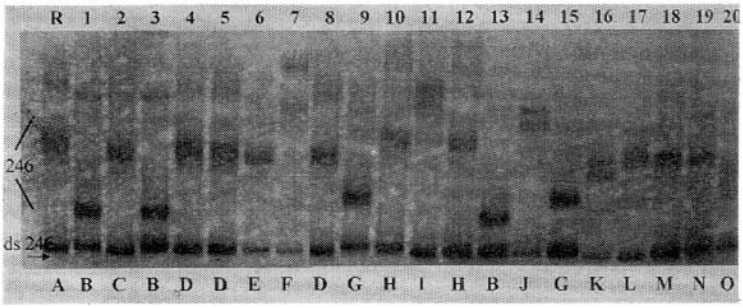


Fig 4. Single-strand conformation polymorphism(SSCP) analysis of HPV 16 URR region form uterine cervical tissues. The SSCP pattern of 246-bp products are shown here. Lane R, the reference sequence; lanes 1-20, 20 kinds of variants, lower row represents the SSCP patterns. Lanes 1, 3, and 14(A); lanes 4, 5, and 8(D); lanes 9, 15(G); lanes 10, 12(H) show similar pattern respectively. Except these, we found 15 patterns distinguishable each other.

Table 3. Comparison of PCR-SSCP and DNA sequence analysis of HPV 16 URR variants from nucleotde positions 7743 to 24.

	Mutation pattern
PCR-SSCP	Pattern B
Variant 1	——————————————G ———————
Variant 3	——————————————C T —————
Variant 14	G —T —T ——————————G ———————
PCR-SSCP	Pattern D
Variant 4	——————————T ——————————T
Variant 5	——————————A ——————————T
Variant 8	——————————A ———C ———————T
PCR-SSCP	Pattern H
Variant 9	——T —T ——————————G ———————
Variant 15	——T —T ——————————G ——C ————
PCR-SSCP	Pattern G
Variant 10	————————A —A ——————————T
Variant 12	————————A —A —A ——————————T

Ⅳ. 고 찰

중합효소 연쇄반응-단일쇄 형태구조 다형성(single strand conformational polymorphism) 방법은 Orita 등[9]이 처음 발표한 방법으로 3차원적인 구조(conformation)의 차이에 따른 전기영동상의 이동 거리의 변화를 검출하는 방법이다. 전기영동상에서 검체의 이동 거리는 무게뿐만 아니라 3차원적인 구조에 따라서도 달라진다. PCR-SSCP 방법은 이 원리를 이용하여 손쉽게 유전자의 변이를 검출하는 방법으로 가장 많이 사용된다. 대략적인 방법은 변이를 찾고자 하는 유전자를 PCR로 증폭하고 이 산물을 알칼리 또는 열로 처리하여 이중쇄를 단일쇄로 만든다. 이 후 급속히 냉각시키면 단일쇄 DNA 분자 자체에서 염기쌍이 형성되면서 각각의 염기서열의 차이에 따라 고유의 3차원적 구조를 띠게 된다. 이 산물의 구조를 그대로 유지하면서 전기영동하면 정상의 DNA와는 다른 이동 거리를 나타내게 된다. 이상 bands가 보이는 경우는 증폭된 DNA에 돌연변이가 있거나, 증폭된 DNA에 유전자 다형성이 있거나, 같은 DNA 서열에서도 두 가지 또는 그 이상의 3차원적인 구조를 갖는 경우를 생각할 수 있다. 본 연구에서는 113예의 임상 검체에서 원형을 포함한 21개의 HPV 16 URR 부위의 변체가 발견되었다. Chan 등[10]은 HPV 16 URR 부위의 일부를 검색하여 38개의 변이를 보고한 바 있고 Icenogle 등[11]은 12개의 변이를 보고한 바 있다. 이런 기존의 보고에서 검색한 HPV 유전자 부위는 본 연구에서 검색한 부위와는 차이가 있고, 검체도 다양한 국가에서 수집한 것이기 때문에 검색된 변이도 다양했던 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 246 bp 길이의 PCR 산물을 이용하여 SSCP를 시행하였는데 통상적으로 PCR-SSCP에서는 200 bp 내외에서 70 95% 정도의 가장 높은 민감도를 보이는 것으로 알려져 있다. PCR 산물의 크기가 클 경우에는 변이를 감지하는 민감도가 떨어지는 것으로 알려져 본 연구에서 검출해낸 SSCP 양상과 염기서열 변이 결과와의 일부 불일치가 나타난 한 가지 원인인 것으로 생각된다.

HPV 유전자의 다형성에 대해서는 다양한 연구가 진행되어 왔으며 생식기 감염 HPV의 유전자 다형성 즉, 변체에 대한 연구는 주로 HPV-16, -18를 대상으로 염기서열에 관한 정보를 분석하고 유전형내

(內) 및 유전형간(間) 계통발생학적 관계를 규명하는데 초점을 맞추어 왔다[10-25]. 염기서열의 변화에 따른 생물학적 특성의 변화 및 질병과의 관련성에 관한 연구는 주로 E2, E6, E7 및 L1 ORFs 에 대한 것이었다[10,15,21-23]. HPV 16 변체는 서로 접촉이 없는 멀리 떨어진 지역에서 거주하는 사람들 사이에서 동일한 변체가 발견되는 것으로 보아 매우 안정적인 염기서열을 갖는 것으로 보인다. HPV 16의 경우 계통발생학적으로 E (European), As (Asian), AA (Asian-American), Af1 (African-1), Af2 (African-2)로 명명된 다섯 분지로 나우어져 있다[10,13,17]. 최근 연구에 의하면 이 다섯 분지에 대표적인 변체는 지역적으로 빈도의 차이는 있으나 전세계적으로 모든 인구 집단에서 발견된다[25]. 이러한 HPV 변체의 지역적 분포의 차이는 선조로부터 전래된 변체이거나 인종 집단에 따라 변체가 선택된 결과로 설명된다. HPV 16 게놈중 여러 부분(URR, E6, L1, L2)에 대한 변체 연구에 의하면 변체간 재조합은 극히 드물어서 실제로는 발생하지 않는 것으로 믿어진다[11]. 이 결과는 게놈중 어느 한 부분의 염기서열 변이를 다른 부분의 변이에 대한 표식자로 사용할 수 있음을 의미한다. 염기서열이나 아미노산 변이가 잘 발생하는 부분이 있으며[10] HPV 16 URR, L2 의 변이가 가장 흔하고 L1 부분은 가장 잘 보존되어 변이가 드문 것으로 되어 있다. 또한 HPV 유전형 12개(HPVs 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, MM9, MM4)를 대상으로 한 연구에 의하면 유전형간 다양성을 보이는 부분이 유전형내 다양성을 보이는 부분과 일치하여 변체 성립에 관여하는 요소가 유전형 성립에 관여하는 것과 같음을 나타낸다. Ho 등은 성상대자간에 특이 HPV 변체의 확인으로 HPV의 전파경로를 보고한 바 있고[17] 유사한 연구로서 Franco 등[6]은 변체 분석을 통하여 지속적인 감염과 새로운 HPV 감염을 구분하는 연구를 보고한 바 있다. 이러한 점변이 분석을 적용할 때 먼저 고려되어야 할 점은 변체 분석방법의 신뢰성이 연구대상 집단 내에서의 HPV 변체의 실제적인 유병율에 달려 있다는 점이다[26]. 즉, 대상 집단에서 한가지 주된 변체가 우세할 경우에는 이 변체 검출로 감염의 지속이나 전파를 분석하는데 설득력이 떨어진다. 또한 변체분석의 대상이 되는 유전자 부위는 최대한의 정보를 얻을 수 있도록 최적화되어야 하였다. 현재까지의 연구 결과로는 HPV 16 유전형의 유전체중 URR 부위가 기능소실을 동반하지 않으면서 점변이 빈도가 높아 최적의 정보를 제공하는 것으로 알려져 있어[7] 본 연구에서도 HPV 16 유전자중 URR 부위를 선택하여 실험을 진행하였다.

본 연구를 통하여 연구자들은 자궁경부암 등 HPV 관련 악성질환의 발생에서 중심적인 역할을 하는 HPV 16형의 URR 부위에서 PCR-SSCP 방법을 확립함으로서 향후 HPV 관련질환의 분자역학적 연구의 유용한 수단으로 사용될 것으로 기대된다. HPV 감염의 유병율이 높기 때문에 통상적인 방법으로는 HPV의 전파 경로를 추적하기가 어려웠으나 본 연구에서 밝혀진 바와 같이 PSC-SSCP 방법은 염기 서열 분석상 동일한 변이를 보이는 검체가 같은 bands 유형을 보이며 PCR-directed 혹은 cloned sequencing 방법에 비하여 다량의 시료를 손쉽고 빠르게 처리할 수 있는 장점이 있어 관련 연구의 재현성 및 편의성을 높일 수 있을 것이다. 따라서 향후 본 연구에서 확립된 PCR-SSCP 방법을 사용함으로서 바이러스 배양의 어려움으로 인하여 현재까지 밝혀지지 않거나 논란의 대상이 되는 문제 - HPV 잠복감염, 조기 전이의 진단, 동일 환자 내에서의 감염의 확산 가능성, 숙주의 면역 반응에 의한 감염 방지기전, 암세포에서의 HPV의 군상 분석, 감염 경로의 추적 - 등의 규명에 발전이 기대하며, 이를 바탕으로 한 HPV 관련질환들의 예방 및 치료 원칙 수립에 도움이 되리라 믿어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 HPV 16형이 검출된 자궁경부암조직 및 정상 자궁경부조직을 대상으로 효과적인 분자생물학적 꼬리표로 사용가능한 HPV 16 URR 부위에서 PCR-SSCP 및 PCR-directed sequencing 방법을 사용하여 염기서열 변이 검출의 정확도를 비교하였다. 분석의 대상이 되었던 113예중 단 13예에서만 원형의 염기서열이 발견되었으며 총 60부위의 변이 및 다양한 변체가 발견되었고 PCR-SSCP의 band 유형으로 변체 여부를 비교적 정확히 판별할 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서는 PCR-SSCP로도 손쉽게 점변이도 구분할 수 있음을 확인하였으

며 이 방법을 응용하면 HPV 바이러스 배양의 어려움으로 밝혀지지 않거나 많은 논란의 대상이 되고 있는 HPV 병인론 및 감염경로의 규명에 큰 도움이 되리라 사려된다.

-Reference-

1. NIH Consensus Development Conference on Cervical Cancer, April 1-3. 1996. Press release, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.
2. 대한민국 보건복지부. 한국중앙암등록 사업 연례보고서(1996.1. 1996.12.). 보건복지부 1998.
3. DeVillers EM. Heterogeneity of the human papillomavirus group. J Virol. 1989;63:4898-4903.
4. Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(7):2436-2440.
5. Ong CK, Chan SY, Canpo MS. Eolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. J Virol. 1993;67:424-6431.
6. Franco EL, Villa LL, Rahal P, Ruiz A. Molecular variant analysis as an epidemiological tool to study persistence of cervical human papillomavirus infeciton. J Natl Cancer Inst 1994;86(20):1558-1559.
7. Xi LF, Demers W, Kiviat NB, Kuypers J, Beckmann AM, Galloway DA. Sequence variation in the noncoding region of human papillomavirus type 16 detected by single-strand conformation polymorphism analysis. J Infect Dis 1993;168(3):610-617.
8. 김재원, 기선호, 박노현, 송용상, 강순범, 이효표. 자궁경부암 환자에서 융합 단백 ELISA를 이용한 혈청내 인유두종 바이러스 16형 E7 항체 검사. 대한산부회지 40(9):1981-1989; 1997.
9. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86(8): 2766-2770.
10. Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. J Virol 1992;66(4): 2057-2066.
11. Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. Virology 1991;184(1): 101-107.
12. Fujinaga Y, K Okazawa, Y Ohashi, Y Yamakawa, M Fukushima, I Kato, K Fujinaga. Human papillomavirus type 16 E7 gene sequence in human cervical carcinoma analysed by polymerase chain reaction and direct sequencing. Tumor Res 1990;25:85-91.
13. Ho L, SY Chan, V Chow, T Chong, SK Tay, LL Villa, HU Bernard. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. J Clin Microbiol 1991;29:1765- 1772.
14. Eschle D, M Drst J, ter Meulen, J Luande, HC Eberhardt, M Pawlita, L Gissmann. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. J Gen Virol 1992;73:1829-1832.
15. Ter Meulen J, AC Schweigler, HC Eberhardt, J Luande, HN Mgaya, M Muller, C Bleul, V Ulken, H Ikenberg, M Pawlita. Sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 18 in tumor and non-tumor patients and antibody response to a conserved epitope. Int J Cancer 1993;53:257-259.
16. Icenogle JP, M Laga, D Miller, RA Tucker, WC Reeves. Genotypes and sequence variants of human papillomavirus DNAs from human immunodeficiency virus type 1-infected women with cervical intraepithelial neoplasia. J Inf Dis 1992;166:1210-1216.
17. Ho L, SK Chan, HU Bernard. Sequence variation of human papillomavirus type 16 from couples suggest transmission with low infectivity and polyclonality in genital neoplasia. J Inf Dis 1993;168:83-89.
18. Ong CK, SY Chan, MS Campo, K Fujinanga, P Mavromara, H Pfister, SK Tay, J Ter Meulen, LL Villa, HU Bernard. Evolution of Human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. J Virol 1993;67:6424-6431.
19. Smits HL, KF Traanberg, MRL Krul, PR Prussia, CL Kuiken, MF Jebbink, JAFW Kleyne, RH van den Berg, B Capone, A de Bruyn, J ter Schegget. Identification of a unique group of human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. J Gen Virol 1994;75:2457-2462.
20. Pushko P, T Sasagawa, J Cuzick, L Crawford. Sequence variation in the capsid protein genes of human papillomavirus type 16. J Gen Virol 1994;75:911-916.
21. Fujinaga Y, K Okazawa, A Nishikawa, Y Yamakawa, M Fukushima, I Kato, K Fujinaga. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias. Virus Genes 1994;9:85-92.
22. Hecht JL, AS Kadish, G Jiang, RD Burk. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. Int J Cancer 1995;60:369-376.
23. Ellis JRM, PJ Keating, J Baird, EF Hounsell, DV Renouf, M Rowe, D Hopkins, MF Duggan-Keen, JS Bartholomew, LS Young, PL Stern. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. Nature (Medicine) 1995;1:464-470.
24. Heinzel PA, CY Chan, L Ho, M O'Connor, P Balaram, MS Campo, K Fujinaga, N Kiviat, J Kuypers, H Pfister, BM Steinberg, SK Tay, LL Villa, HU Bernard. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. J Clin Microbiol 1995;33:1746-1754.
25. Yamada T, CM Wheeler, AL Halpern, ACM Stewart, A Hildesheim, SA Jenison. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence ananlysis of the E6, L2, and L1 coding segments. J Virol 1995;69:7743-7753.
26. Myers G, Baker C, Wheeler C, Halpern A, McBride A, Doorbar J, eds. Human papillomaviruses 1996 : a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 1996.