대부종콜포회지 제9권 제3호 1998
Vol. 9, No. 3, Sep., 1998

자궁경부암 조직에서 세포회로 조절인자 Cyclin Dependent Kinase(CDK) Inhibitors의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 해부병리학교실*
김영태 · 박상원 · 김재욱 · 조남훈*

=Abstract=

Expression of Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors in Cervical Carcinoma

Young Tae Kim M.D., Sang Won Park M.D.,
Jae Wook Kim., Nam Hoon Cho M.D.*
*Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology,**
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea.

Recent studies have revealed a new family of tumor suppressor genes that directly implicate aberrant cell cycle regulation in tumorigenesis. The general function of these gene products is that they prevent cell cycle progression by directly interfering with cyclin/cyclin dependent kinase (CDK) activation. The importance of these genes is that they are potent inhibitors of CDK and are induced by p53. Among these cell cycle inhibitors, p21WAF1/CIP1 and p16 have been thoroughly studied. However, the role of p21WAF1/CIP1 and p16 in tumorigenesis of the uterine cervix has been poorly defined. We used immunohistochemical techniques to study the expression of these cell cycle inhibitors in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical tissue to explore the relationship between cyclin/CDK inhibitors and cervical carcinoma. Cervical tissues were analyzed from 46 patients with cervical carcinoma, 30 cases with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and 22 control cases who underwent hysterectomy due to benign gynecologic disease at Yonsei University College of Medicine. All CDK inhibitors strongly expressed in the reverse cell hyperplasia and koilocytes, whereas they revealed significantly decreased expression in neoplastic tissues ($p<0.05$). Normal endocervical cells revealed focal and weak expression to all CDK inhibitors but p16 showed no expression in endocervical adenocarcinoma. P16 revealed higher expressions in cases associated with human papilloma virus (HPV) (t-test, $p<0.05$) than in cases lacking any type of HPV. Our results were consistent with the concept that underexpression of CDK inhibitors may play an important role in neoplastic transformation in cervical carcinoma.

Keywords: Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors, Cervical carcinoma

Ⅰ. 서 론

우리 나라에서 침윤성 자궁경부암은 전체 악성 종양의 4분의1 이상을 차지할 정도로 높은 빈도를 나타내는 암으로 선진국으로 진입하고 있는 현재 후진국의 암 발생 모델을 보여주고 있음이 보고되고 있다.[1] 이와 같이 임상적으로도 극복해야 될 과제를 많이 갖고 있는 자궁경부암 영역은 진단 방법 및 처치방침에 있어서 다각적인 치료전략이 수립되어 진행되고 있으며 이에 따른 종양지표 및 예후인자, 추적 검사 등에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근 들어 세포주기(cell cycle)와 종양발생과의 관련성에 대한 많은 연구보고를 통하여 세포주기에 따라

나타나는 단백질 즉 cyclin에 관한 연구가 진행되고 있으며 아울러 cyclin과 결합하는 cyclin dependent kinase(CDK) 그리고 다양한 CDK inhibitor에 대하여 괄목할 만한 연구업적이 보고되고 있다.[2-4] 이들 중 특히 CDK inhibitor는 새로운 종양억제인자(novel tumor suppressor)의 가능성이 검토되고 있어 신체 여러 장기암에서의 이들 CDK inhibitor의 역할에 대해 많은 연구가 진행되고 있으며 현재까지 알려진 CDK inhibitor로는 p21WAF1/CIP1, p14, p15, p16, 그리고 p27 등이 보고되어 있다.[2-3,6] p21WAF1/CIP1은 거의 같은 시기에 여러 연구자에 의해 규명되었기 때문에 WAF1, CIP1, 그리고 SDI1으로도 불리우고 있으며 p53의 활성(activation)에 의해 p21WAF1/CIP1이 작용한다고 보고되어 있으며 여러 종류의 CDK에 작용을 나타냄으로써 universal CDK inhibitor로 알려져 있다.[6] 한편 이보다 더 적은 분자량(low molecular weight CDK inhibitors)의 p16은 1993년 Serrano[12] 및 1994년 Tam[13] 등에 의해서 규명되었으며 특히 CDK4에 특이적으로 결합함으로 cyclinD의 유리를 가져와 세포가 G1 phase에 정지(arrest)하도록 하는 역할을 하고 있음이 밝혀졌다.[14,15] 그러나 이러한 새로운 종양억제인자의 가능성이 검토되고 있는 p21WAF1/CIP1, p16과 부인암과의 연관성에 대한 연구는 초보적인 단계이며 특히 단백질수준(protein level)에서 자궁경부암과 이들 CDK inhibitors와의 연관성에 관한 연구는 미비한 실정이다.[5,6] 이에 본 연구자들은 1995년 6월부터 1996년 3월까지 연세대학교 의과대학 산부인과학교실에 내원한 환자 중 침윤성 자궁경부암이 확진된 46명, 질확대경조준하생검을 시행받고 자궁경부 상피내종양으로 진단된 30명 그리고 대조군으로 조직학적으로 만성 자궁경부염이 판명된 22명을 대상으로 이들에서 새로운 종양억제인자로 알려진 CDK inhibitor의 발현과 지금까지 알려진 예후인자와의 관련성 및 예후적 인자로서의 유용성을 평가하고자 본 연구를 시행하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1995년 6월부터 1996년 3월까지 연세대학교 의과대학 산부인과에 내원한 환자 중 침윤성 자궁경부암이 확진된 46예, 질확대경조준하생검상 자궁경부 상피내종양으로 진단된 30예, 그리고 대조군으로 조직학적으로 만성 자궁경부염이 진단된 22예를 대상으로 하였고 이 연구에서 모든 조직은 방사선요법이나, 화학요법을 시행하기 전에 얻어진 조직들이었다. 선택된 조직들은 질확대경하 조직생검이나 원추생검을 통해 얻어졌고, 모두 p21WAF1/CIP1과 p16을 포함한 CDK 억제제에 대한 면역 조직화학적염색(immunohistochemical stains)을 시행하기 위해 4 μm의 두께로 절단하였다. 한 절편은 hematoxylin-eosin으로 염색하여 현미경 관찰로 각각의 진단을 확증하였고, 4개의 연속적인 절편은 microcentrifuge tube에 담아 polymerase chain reaction을 이용하여 human papilloma virus(HPV) DNA검색을 시도하였다.

2. 연구 방법

A. 면역 조직화학염색법 (Immunohistochemical staining)

조직으로부터 p21WAF1/CIP1과 p16에 대한 immunohistochemical stain을 위한 절편은 poly-L-lysine에 덮여있는 slide를 사용하여 조직이 탈락되는 것을 방지하였으며 xylene을 사용하여 탈 파라핀화, 재수화 과정을 시행하였다. 그 후 2회간 10 mM의 sodium citrate, (pH6.0)를 첨가한후 5분씩 microwave에(700 Watt)가열 후 흐르는 찬물에 넣었다. 모든 slide에 Dako marker를 이용하여 슬라이드에 원으로 표시한 후 slide에 3% hydrogen peroxide에 10분간 반응시켜 endogenous peroxidase의 반응을 봉쇄시켰다. 절편들은 30분간 primary antibodies인 p16(Pharmingen, San Diego, CA, USA 1:100)과 p21WAF1/CIP1(Santa Cruz, CA, USA, 1:20)에 4°C로 하룻밤 동안 반응시켰다. 절편들은 부가적으로 실온에서 biotinylated goat antimouse IgG로 반응시킨 후, 연속하여 30분간 실온에서 ABC reagent(Dako, Carpinteria, CA, USA)와 반응시켰다.

Hematoxylin 대조염색과 함께 Aminoethylcarbazole(AEC)을 chromogen으로 사용하여 발색시켜 갈색으로 핵에만 발색된 세포만을 양성 세포로 간주하였다. 본 연구에서는 p21 index와 p16 index를 사용하였는데 이는 고배율의 현미경하에서 1000개의 세포를 세어 양성세포수를 이의 백분율로 표시한 것이다.

B. 중합효소 연쇄반응법(Polimerase Chain Reaction)

미세원심분리튜브에 10 μm두께의 조직절편을 넣고 탈파라핀화를 위하여 2 ml xylene과 2 ml 100% 에탄올에 넣어 두번씩 탈수하였고, 이후 80% ethanol, 50% ethanol에 10분간 담궈 재수화 과정을 거쳤다. 이후 20분간 증류수에 담근 후, pellet을 10 ml PBS 완충제로 세척 후, 원심분리하여 800 uL lysis buffer(120 gm Guanidium thiocyanate, 0.1M Tris-HCL (pH 6.4) 100 ml, 0.2M EDTA(pH 8.0) 22 ml, and Triton X-100 2.6 ml) 완충액을 혼합하였다. 30초간 vortexing 후 40 uL silica 용액(100% silicon dioxide at pH 2.0)에 혼합 후 용액을 실온에 10분간 반응시킨 후 10초 동안 12000 G로 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 검체물을 연속하여 500 uL washing 완충액(120 gm Guanidium thiocyanate, 0.1M Tris-kHCl 100 ml; pH6.4)에 넣어 혼합하고 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 이과정을 두 번 연속 시행하였다. 800 uL 70% 에탄올을 첨가하여 원심분리하는 과정을 2번 반복한후, 검체물을 800 uL 아세톤에 혼합하여 원심분리 한 후 65℃에서 10분간 건조하여 50 ul H_2O에 녹인후 65℃에서 10분간 반응시켰다. 검체물(aliqout of crude lysate and purified DNA)은 전기영동한 후 ethidium bromide에 염색하였다. 각각의 반응은 2 ul template DNA, 각 primer 당 10 pmole (2 ul), 4 ul(10 mM)의 dNTP, 0.1 ul(0.2 unit) Taq polymerase, 5 ul 10×buffer와 34.9 uL의 증류수를 포함하였다. nested PCR을 위해 cycling 과정을 두 번 시행하였다. 사용한 outer primer를 첫째 cycling(변수)은 3분간 95℃에서 1회, 1분간 94℃, 1.5분간 50℃, 2분간 72℃에서 35회 반복하였고 추가로 5분간 72℃에서 DNA thermal cycler에서 반응시켰다(Perkin Elmer Cetus). 첫 번 PCR에서 나온 1 ul를 2번 cycling한 후 HPV 16과 18의 내측 primer를 사용하여 3분간 95℃에서 1회 반응 후, 1분간 94℃, 1분간 60℃, 1분간 72℃에서 30회를 반복하며 마지막으로 5분간 72℃에서 1회 반응하였다. 외측과 내측의 nested PCR의 primer를 HPV 16과 18형에서 E6 region sequence를 사용하였다. β-globulin(286bp)은 negative control로 모든 assay에 포함되었고, 양성 대조군으로 cloned HPV DNA를 사용하였다(Table 1). 통계학적 분석은 ANOVA test, Student t-test와 Fisher's exact test를 사용하였고 p value가 5% 이하인 경우를 의미있는 것으로 간주하였다($P<0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. 연구 대상군에서의 p21WAF1/CIP1 및 p16의 발현

환자들의 나이는 23세에서 78세이었고, 평균 나이는 54.3세였다. 자궁경부 상피내종양 환자군은 CIN Ⅲ 20예, CIN Ⅱ 5예, CIN Ⅰ 4예이었다. 자궁경부암의 병기에 따른 환자 분포를 살펴보면 stage Ⅱ의 환자가 19예로 가장 많았다. 세포형을 볼 때, 편평상피세포암는 39예이었고, 선암은 5예였다. 환자들의 폐경 유무를 살펴볼 때, 18예의 경우 폐경전이었고, 28예는 폐경 후였다. HPV 16의 감염 여부를 살펴보면 총 98예중 31예에서 감염된 것으로 나타나 31.6%의 감염율을 보였으며 이를 각각의 군으로 대별하여 보면 정상 조직 1예, 자궁경부 상피내종양 10예(30.0%), 편평상피암 20예(51.3%), 그리고

Table 1. Oligonucleotides used as E6 type-specific HPV-16 and HPV-18 primers

Primer	HPV type	sequence (5' ------ 3')	Exon	size(bp)
Consensus		+ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAACGGT -AATAATGTCTATATTCACTAATTE6 307	E6	307
Type-specific	16	+ATGTTTCAGGACCCACAGGA -CCTCACGTCGCAGTAACTGTE6124	E6	124
	18	+ATGGCGCGCTTTGAGGATCC -GCATGCGGTATACTGTCTCT	E6	188

Note. Sequences obtained from EMBL database

선암에서는 관찰할 수 없었다. HPV 18의 E6는 10예의 종양 조직에서 관찰할 수 있었고(10.2%), 정상 조직에서는 살펴 볼 수 없었으며, 1예의 자궁경부 상피내종양(3.3%)에서, 6예의 편평세포암(SCC) (15.4%), 그리고 3예의 선암에서(60%) 살펴볼 수 있었다. HPV DNA 16과 18이 동시에 감염된 것은 41예의 조직에서 발견할 수 있었다.

p21WAF1/CIP1와 p16은 정상 조직의 핵내 모든 층의 세포에서 발견할 수 있었으나, 기저층과 기질세포에서는 발견할 수 없었다(Fig. 1). 자궁경부 상피내종양(CIN) grade 1의 경우 거의 모든 koilocyte에서 염색이 되었으나, high-grade CIN의 경우는 더 옅게 염색되며, random하게 p21WAF1/CIP1와 p16으로 염색되었다. 자궁경부 상피내종양의 경우 grade가 높을수록 p21WAF1/CIP1와 p16의 intranuclear 염색이 연하게 염색된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 편평상피암의 경우 다양한 양상을 나타내지만, p21WAF1/CIP1와 p16의 발현은 상대적으로 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 선암의 경우 다른 양상의 p21WAF1/CIP1와 p16의 발현이 나타내었는데 p21WAF1/CIP1의 경우 다른 군보다 훨씬 강한 발현을 나타내었지만, p16의 발현은 전혀 살펴볼 수 있었다(Fig. 3).

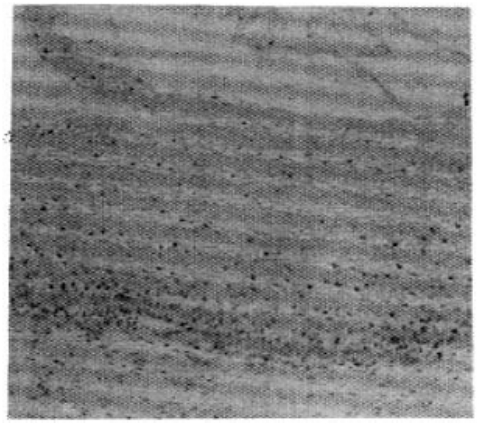

Fig. 1. Immunoreactivity of p16 CDK inhibitor in normal cervical epithelium. All layers except basal epithelium stained with anti-p16 CDK inhibitor antibody (ABC method, 100×).

p21WAF1/CIP1과 p16의 발현을 대조군, 자궁경부 상피내종양군, 침윤성 자궁경부암군을 비교하였을때(Table 2), 침윤성 경부암의 p21과 p16의 발현을 살펴 본 결과 CIN군($P<0.05$)과 대조군($P<0.05$)과 비교시 통계학적으로 유의한 감소를 보였다.

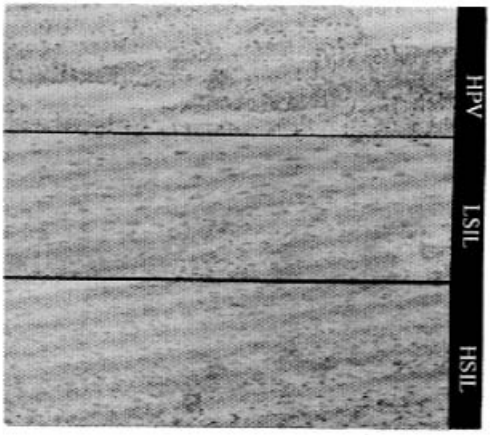

Fig. 2. Immunoreactivity of CDK inhibitors in cervical neoplasia. Immunoreactivity was markedly decreased in high gradee CIN.

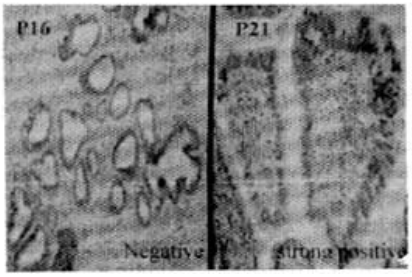

Fig. 3. Immunostaining for CDK inhibitors in invasive cervical carcinoma. Invasive carcinoma showed markedly decreased expression. Adenocarcinoma stained strongly with p21WAF1/CIP1.

Table 2. Expression of CDK Inhibitors in study group

Group	No. of cases	p21 index(%)*	p16 index(%)*
Control	22	64.6±0.3	62.7±1.4
CIN	30	29.8±3.5**	32.1±7.6**
Carcinoma	46	44.3±5.1***	26.2±5.5***

*mean±SE
**$p<0.05$(control vs. CIN)
***$P<0.05$(control vs. carcinoma)
Note. CIN, cervical intraepithelial neoplasia

2. 침윤성 자궁경부암군에서 환자의 연령과 폐경 유무에 따른 p21WAF1/CIP1의 발현

CDK 억제제의 발현과 폐경 유무와의 관계에 있어 폐경 유무는 p21WAF1/CIP1와 p16의 발현에 아무런 연관성을 관찰할 수 있었다(Table 3). 유사하게 환자 연령과 침윤성 자궁경부암 사이에 있어 CDK 억제

제의 발현에도 유의한 차이를 볼 수 없었다.

Table 3. Expression of p21WAF1/CIP1 and p16 in patients with cervical carcinoma according to age and menopausal status

	No. of cases	p21 index)%) (Mean±SE)	p16 index(%) (Mean±SE)
Age(year)			
<50	17	44.7±7.1	32.2±9.5
≥50	29	51.2±6.3	21.9±6.7
Menopause			
Premenopause	18	42.3±6.6	30.2±9.6
Postmenopause	28	56.2±7.2	22.7±5.2

3. 침윤성 자궁경부암군에서 임상적 병기(stage)에따른 p21WAF1/CIP1와 p16의 발현

stage Ⅰ에서는 p21 index와 p16 index의 평균이 각각 38.1%, 27.0%이었고 stage Ⅱ에서는 p21 index와 p16 index가 각각 51.3%, 33.0%로 나타나 통계학적 의의를 찾아볼 수 없었다. 본 연구에서 p21WAF1/CIP1과 p16이 세포 분열에 음성 조절자로 작용하기 때문에 종양 stage와 역상관관계를 기대하였으나 그러나 연구 대상이 적어 통계학적으로 의의가 없었고, 임상적 병기와 CDK 억제제의 발현과의 관계는 통계학적으로 의미없게 나타났다(Table 4).

Table 4. Expression of p21WAF1/CIP1 and p16 in patients with cervical carcinoma according to clinical stage

Stage	No. of cases	p21 index(%) (Mean±SE)	p16 index(%) (Mean±SE)
Ⅰ	18	38.1±7.9	27.0±9.5
Ⅱ	19	51.3±6.9	33.0±7.5
Ⅲ	7	68.0±9.6	45.4±9.6
Ⅳ	2	44.1±7.7	8.3±5.9

4. 침윤성 자궁경부암 종양의 크기와 HPV 감염에따른 p21WAF1/CIP1 및 p16의 발현

침윤성 자궁경부암에서 종양의 크기에 있어 종양의 크기가 4 cm보다 큰 경우와, 4 cm보다 작은 경우로 나누어, CDK 억제제의 발현과 증식성을 비교해 보았을 때 CDK 억제제의 발현과 종양의 크기는 상관관계가 없었다(Table 5). p21WAF1/CIP1의 수치는 HPV 감염의 경우 감소되는 경향을 알 수 있었다. 반대로 p16지수의 경우 HPV 감염이 있는 경우 없는 경우보다 통계학적으로 의미있게 높은 발현율을 보였다.

Table 5. Expression of p21WAF1/CIP1 and p16 in patients with cervical carcinoma according to lesion size and HPV 16/18 positivity

	No. of cases	p21 index(%) (Mean±SE)	p16 index(%) (Mean±SE)
Lesion size			
<4 cm	12	27.4±7.4	38.4±6.6
≥4 cm	34	24.6±8.5	22.1±9.2
HPV 16/18			
Negative	15	49.9±8.7	12.2±5.4
Positive	31	40.7±6.3	35.2±8.0*

*$p<0.05$

5. 조직학적 세포 종류에 따른 p21WAF1/CIP1 및 p16의 발현

조직학적 세포형태에 따른 p21WAF1/CIP1의 발현도를 조사하였을 때 편평상피세포암에 있어서 p16지수의 발현율은 선암에 비해 통계학적으로 의미있게 높게 나타났다($p<0.05$). 39예의 편평상피세포암만을 대상으로 CDK 억제제의 발현은 세포아형 즉 거대각화형(large cell keratinizing type)과 비각화형(large cell nonkeratinizing type) 사이에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 6).

Table 6. Expression of p21WAF1/CIP1 and p16 in patients with cervical carcinoma according to cell type and subtype

	No. of cases	p21 index(%) (Mean±SE)	p16 index(%) (Mean±SE)
Cell type			
Squamous	39	46.5±5.2	28.6±6.1
Adenocarcinoma	5	64.2±5.9	2.9±1.9*
Adenosquamous	2	46.2±12.7	19.4±7.6
Subtype			
LCNK	20	35.6±7.6	28.5±8.7
LCK	19	60.4±6.3	28.8±8.8

*$p<0.05$(squamous vs adenocarcinoma)

Note. LCNK, large cell nonkeratinizing; LCK, large cell keratinizing

Ⅳ. 고 찰

종양유전자는 정상적인 세포의 성장을 조절하는 전암유전자가 돌연변이(mutation), 증폭(amplification), 전좌(translocation)등의 기전으로 활성화 된 것을 말하며, 종양억제유전자는 성장을 억제하는 것이 주 기능이나, 변이나 결손(deletion)에 의하여 기능을 상실하면 악성 종양의 형성을 억제하지 못하는 것으로 알려져 있다.

최근 연구에서 G1-cyclin과 cylcin dependent kinase(CDK) 억제제는 세포분열에 있어 세포주기(cell cycle)의 G1 phase에서 S-phase로 이행하는 과정에 관여 하는 것으로 알려져 있다.[2-4] Cyclin D 단백은 세포주기에서 wild-typed Rb와 기능적 pRb와 상호작용하여 정상 세포 및 종양세포에서 lower level의 초기 G1 phase에서부터 나타나기 시작하여 G1 phase의 중기와 말기에 정점에 도달한 후, G1 phase 말기와 G1/S phase, 그리고 S phase의 초기에서 단백분해가 일어나 S phase 말기에 가장 낮은 농도를 보인다고 보고되고 있다.[18,19] 본 연구자들은 G1 cyclin의 발현과 HPV의 관계를 조사하였는데[21] 이 연구에서 침윤성자궁경부암에서는 cyclin D1의 발현이 현저히 낮은 것을 알 수 있었고, 그에 비해 cylcin E의 발현은 HPV 감염된 경우 높은 발현을 관찰할 수 있었다. 그리하여 본 연구 기관은 cyclin E의 발현이 종양형성 과정에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각하였고, cyclin D 발현의 경우, 특히 HPV 감염된 경우 down regulation 되는 것으로 보고하였다.

최근 연구에 의하면 새로운 종류의 암 억제 유전자가 발견되었는데 이들 유전자에 있어 이상 세포형성을 일으켜 종양형성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이들 유전자 산물의 궁극적인 기능은 세포분열에 있어서 cyclin/cyclin dependent kinase(CDK) 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 가장 먼저 밝혀진 p21은 WAF1, CIP1, SDA1, MDA6, CAP20으로도 알려져 있으며 이 유전자는 염색체 6p에 위치하고 있다.[3,22] P21WAF1/CIP1은 일반적으로 다용도의 CDK 억제제로 알려져 있으며[19,20] 이 유전자는 p53이 DNA의 파손에 대해 반응하면서 발현하는 것으로 알려져 있다.[18] 최신 연구에 의하면 p21WAF1/CIP1이 G1/S CDK-cyclin 복합체에 대해 특이적으로 반응하는 것으로 보고되고 있다.[19,20] 다른 종류의 중요한 단백질로서 16KDa의 물질인 p16 또한 cyclin/CDK 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며 이 단백질은 많은 수의 인간 종양세포군에서 결손되어 있는 것이 발견되었으며 인체종양들에 있어서도 결손이 많이 발견되는 것으로 알려져 있다. P16은 CDK4에 특이적으로 반응하여, 유리 CDK4와 결합하여 cyclin D subunit을 편위 시키는 것으로 알려져 있다.[2,12,13] 또한 p21WAF1/CIP1은 광범위한 조절자(universal regulator)로 작용하여 cyclin-dependent kinase의 기능에 의해 4차 복합체를 이룬다.[2,20] 이에 비해 p16은 특이적으로 cyclin D-dependent kinase complex의 결합을 방해함으로서 기능이 이루어지는 것으로 알려져 있다.[2,16,20]

본 연구에서 CDK 억제제의 발현은 parabasal과 intermediate level에서 관찰되었으나 정상 자궁경부 조직의 표면층과 기저층에서는 관찰되지 않았다. 이러한 관찰을 통해 CDK 억제제는 세포분열을 negative regulation하는데에 중요한 역할을 갖고있는 것으로 생각된다.

p21WAF1/CIP1과 p16이 부인암 발생에 있어서 어떠한 역할을 하고 있는지에 대해서는 연구가 아직도 미흡하다. 현재까지 CDK 억제제들은 세포분열과정을 정지시키는 것으로 알려져 있으며, 이는 성장인자의 결여로 TGF-β(transforming growth factor-β)나 DNA를 파손하여 p53의 발현을 일으킴으로서 작용하는 것으로 알려져있다. 모든 경우에 있어서, 세포는 cyclin/CDK 억제 단백질을 분비하고 DNA의 파손 후에 p53의 활성화로 p21WAF1/CIP1의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. p53은 p21WAF1/CIP1의 발현을 활성화시켜 cyclin/CDK 복합체의 억제로 세포분열과정에 있어서 G1 단계에서 멈추게 된다.

p16 유전자는 이형접합체 결손(loss of heterozygosity)에 의해 종양 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.[16,23] 높은 비율로 p16 유전자의 이형접합체 결손을 여러 종양에서 볼 수 있다.[24,26] 예를 들어 방광암, 뇌암, 폐암, 두경부종양에서 이형접합체 결손을 볼 수 있었으나, p16 유전자의 돌연변이는 몇 몇의 종양 외에는 나타나지 않았다.[14,15,27,28] 이들의 저분자 단백질에 대한 연구는 유전자의 분석으로만 이루어졌으나 immunohistochemical 염색법으로 이루어진 연구는 드문 실정이다.[29,30]

본 연구에서 CDK 억제제, p21WAF1/CIP1와 p16은 자궁경부 상피내종양(CIN)과 침윤성 자궁경부암(ICC)에서 정상 대조군에 비해 낮은 발현율을 나타내었는데 이는 과거에 정상 세포의 증식에 있어 이들 CDK 억제제가 음성 조절자로 작용한다는 과거의 생화학적인 개념이 확인되었다고 할 수 있는 것이다. 그렇지만 아직도 p21WAF1/CIP1의 발현율이 침윤성 자궁경부암에서 자궁경부 상피내종양보다 더 높게 발현하는지는 정확하게는 알려져 있지 않다. 침윤성 자궁경부암의 경우 더 불균질의 세포들이 있어 여러 단계의 분열에 있는 세포들이 존재한다고 생각할 수 있는데 이는 증식하지 않는 종양세포가 기존의 분열하는 세포와 함께 존재하는 것을 의미한다.

자궁경부내구 선암(endocervical adenocarcinoma)에 있어서 p21WAF1/CIP1 발현도와는 달리 p16 index는 다른세포형태 즉, squamous cell type 혹은 adenosquamous cell type에 비해 통계학적으로 유의하게 낮은 발현도를 보였다. 근래에 보고된 바 의하면 뇌암,31) 자궁육종6)에서 p21WAF1/CIP1이 과발현 되었다고 하였으나 지금도 왜 어떤 종류의 암에서는 p21WAF1/CIP1이 높게 발현하는지는 명확하게 설명되지 못하고 있다. 다른 연구자들은6) 자궁경부 내구선암과 자궁내막암의 선암에서 각각 53%와 84%의 p21WAF1/CIP1 발현을 관찰할 수 있었다고 하며 자궁경부 선암에 있어서 p21WAF1/CIP1의 발현이 증가하는 이유는 G1 cyclin의 발현이 선암에 있어 아주 낮게 발현한다는 점에서 관련을 지울 수 있다고 하였다. 본 연구에서 p16과 cyclin D가 선암에서 발현이 낮게 나타난 것은 예상치 않았던 결과이었으나 이는 p16이 cyclin D1과 결합하지 않고 CDK4에 대해 특이하게 반응함으로써 활성화된 cyclin D subunit을 변위시키기 때문이라고 설명할 수 있으며2,12,13) 이 기전에 의하면 p16과 cyclin D는 서로 상관관계가 없는 것으로 되어 있으나, 추후 CDK4와 다른 제반 세포회로 인자에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. p21WAF1/CIP1과 p16은 세포분열과정에 있어 음성 조절역할을 하고 종양세포에서 일시적인 p21WAF1/CIP1의 발현은 세포분열의 억제를 일으킴으로 침윤성 자궁경부암에서 CDK 억제제의 발현과 악성화 정도(malignant potential)와는 역상관관계를 갖는다고 생각할 수 있었으나 본 연구에서는 이와 같은 역상관관계가 관찰되지 않았다. 즉, CDK 억제제의 발현과 임상적 예후인자들(연령, 폐경 유무, 종양의 크기, 임상병기, 세포형태)과는 역상관관계가 나타나지 않았다. p21WAF1/CIP1의 발현 또한 증식력과 상관관계를 찾을 수 없었는데 이와 비슷한 보고는 위암에서도 보고된 바 있는데,4) 이는 암세포의 증식과 진행도가 하나의 세포주기 조절인자에 의해 결정되는 것이 아니고 다양한 음성 조절자 및 양성 조절자의 균형으로 이루어지기 때문이다.

본 연구에서 침윤성 자궁경부암 조직만을 대상으로 p16의 발현을 살펴보았을 때 HPV 감염이 동반된 경우에는 비감염군에 비해 발현도가 더 높게 나타나는 것이 관찰되었다. Cyclin D는 고위험 HPV의 oncoprotein에 의해 치환될 수 있어 pRb를 비활성화시켜 E2F가 결합하여, pRb와 결합하지 않고 유리되어 세포주기를 S-phase로 유도하고 이에 대한 결과로 binary p16-CDK4 복합체가 생성된다. p16은 정상세포에서 negative feedback loop에서 CDK4의 down regulation을 하며12,16,34,35) pRb가 불활성화된 경우 p16의 발현은 증가하고 CDK4의 억제를 가중시킨다.9,12,16,34,35) pRb의 유전적 불활성화는 p16의 발현을 증가시키며 CDK4의 억제를 초래하게 된다.12,16,35) 이와 반대로 p21WAF1/CIP1은 HPV의 감염의 경우에 낮은 발현도를 나타내었는데 이는 고위험 인유두종바이러스에서 유래된 E6 oncoprotein이 p53과 결합하게 되므로 p53 dependent mechanism으로 p21WAF1/CIP1의 발현이 나타나는 것이 억제되어 p21WAF1/CIP1의 발현이 낮게 나타난다고 설명할 수 있다.

결론적으로 본 연구에서 CDK inhibitor인 p21WAF1/CIP1과 p16의 과소발현(underexpression)이 악성화 및 종양발생과정에 있어 중요한 역할을 하고있음을 알수 있었으나, p21WAF1/CIP1 index 및 p16 index는 침윤성 자궁경부암의 예후와는 상관관계가 적은 것으로 사료된다. 앞으로 더 많은 환자를 대상으로 CDK inhibitor의 발현도와 추적 관찰을 통한 생존율에 대한 연구가 뒷받침되어야 확실한 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구자들은 1995년 7월부터 1996년 3월까지 연세대학교 의과대학 산부인과학교실에 내원한 환

자 중 침윤성 자궁경부암이 확진된 46명, 질 확대경 조준화생검을 시행받고 자궁경부 상피내종양으로 진단된 30명 그리고 대조군으로 조직학적으로 만성 자궁경부염이 판명된 22명을 대상으로 단일 항체를 사용한 면역 조직화학염색법(immunohistochemistry)을 이용하여 다음의 결과를 얻었다.

1. p21 index가 대조군에서는 평균 64.6%로 나타났으며 자궁경부암 환자군에서는 평균 44.3%로 감소되어 양 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). 또한 p16 index의 경우에는 대조군에서는 평균 62.7%의 발현을 보였으나 침윤암 군에서는 26.2%로 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보였고 자궁경부 상피내종양 환자군에서는 32.1%를 보여 유의한 차이를 나타내었다($p<0.05$).

2. p21 index를 임상병기별로 살펴보면 병기 Ⅰ에서는 평균 38.1%, 병기 Ⅱ에서는 51.3%, 병기 Ⅲ에서는 68.0%, 그리고 병기 Ⅳ에서는 44.1%를 보여 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 p16 index의 경우에도 임상병기에 따른 통계학적인 유의성은 없었다.

3. 침윤성 자궁경부암 환자군에서 병소 크기별로 구분하여 CDK inhibitor의 발현도를 살펴보면 4 cm 이상군(n=29)에서는 p21 index 및 p16 index가 각각 24.6%, 22.1%를 보였고 4 cm 미만군(n=27)에서는 각각 27.4%, 그리고 38.4%를 보여 유의한 차이는 없었다.

4. 고위험 인유두종 바이러스(HPV 16/18)에 감염된 환자군(n=31)에서의 p16 index는 평균 35.2%, 그리고 비감염군(n=15)에서는 12.2%로 나타나 두 군간 유의한 차이를 보였다.

5. 자궁경부암 환자군에서 p21WAF1/CIP1 및 p16의 발현도를 연령, 폐경 유무상태, 세포형태별로 구분하여 연구한 결과 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다.

결론적으로 본 연구에서는 cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor의 underexpression이 자궁경부암의 종양발생화 및 악성화에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었으며 고위험 인유두종 바이러스감염이 CDK inhibitor 발현과는 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다. 그러나 여러 예후인자들과의 관련성은 적은 것으로 나타나 예후적 인자로 사용하기에는 추적 관찰을 통한 생존율에 대한 연구가 뒷받침되어야 확실한 결론을 내릴 수 있을 것으로 생각된다.

- References -

1. Kim JP, Park IS, Ahn YO et al: 1991 cancer incidence in Seoul, Korea: results of the implementation study of the Seoul cancer registry. J Korean Med Sci 1995; 10:74-84.
2. Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell 1994;78:67-74.
3. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, Kinxler KW, Vogelstein B: Topological control of p21waf1/cip1 expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res 1995;55:2910-9.
4. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokkoxaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach:relationship with p53 status and proliferative activity. J Pathol 1996; 180:122-8.
5. Hirama T, Miller CW, Wilczynski SP, Koeffler HP. p16 (CDKN2 cyclin-dependent kinase-4 inhibitor multiple tumor suppressor-1 gene is not alterred in uterine cervical carcinomas or cell lines. Mod Pathol 1996;9:26-31.
6. Palazzo JP, Mercer E, Kovatich AJ, McHugh M. Immunohistochemical localization of p21waf1/cip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissues. Hum Pathol 1997;27:60-6.
7. Kelley MJ, Otterson GA, Kaye FJ, Popexcu NC, Johnson BE, Dipaolo JA. CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical-carcinoma cell lines. Int J Cancer 1995;63:226-30.
8. Reznikoff CA, Yeager TR, Belair CD, Savelieva E, Puthenveettii JA, Stadler WM. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. Cancer Res 1996;56:2886-90.
9. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang S-C, Pater MM, Pater A. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. Int J Cancer 1997;78:1410-6.
10. Yang X, Jin G, Nakao Y, Ratsmutula M, Pater MM, Pater A. Malignant transformation of HPV 16-immortalized human endocervical cells by cigarrete smoke condensate and characterization of multistage carcinogenesis. Int J Cancer 1996;65:338-44.
11. Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB, Yarbrough WG. Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and associa-

tion with p53, PRAD-1 and HPV. Oncogene 1997; 14:811-8.
12. Serrano M, Hannnon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/Cdk4. Nature 1993;366:704-7.
13. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16 ink4. Cancer Res 1994;54:5816-20.
14. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutation of the MTS1/ CDK4I gene in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res 1994:54:3396-7.
15. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hrubam RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocaricnoma. Nat Genet 1994;8:27-32.
16. Shapiro GJ, Edwards CD, Kobzik L. Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ, Rollins BJ. Reciprocal Rb inactivation and p16 ink4 expression in primary lung cancers and cell lines. Cancer Res 1995;55:505-9.
17. Waga S, Hannnon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature 1994; 369:574-7.
18. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 1993;366:701-4.
19. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell W. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol Biol Cell 1995;6:387-400.
20. Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different models of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. Oncogene 1995;11:1581-8.
21. Cho NH, Kim YT, Kim JW: Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol 1997;6:339-47.
22. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993;75:817-25.
23. Lo KW, Huang DP, Lau KM. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res 1995;55: 2039-43.
24. Kamb A, Gruis N, Feldhaus J, Liu Q, Harshnman K, Tavtigian S, Stockert E, Day R, Johnson B, Skolnick M. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994;264:436-9.
25. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. Nature 1994;368:753-6.
26. Zhang SY, Klein-Szanto AJP, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinomas cell lines than in primary tumors of the head and neck. Cancer Res 1994;54:5050-3.
27. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. Mutations and altered expression of p16INK4 in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11045-9.
28. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, Tokino K, van der Riet P, Blaugrund J, Sidransky D. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumor with 9p loss. Science 1994;265:415-6.
29. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 1996;56:3630-3.
30. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2.MTS1) product p16 INK4 in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. Cancer Res 1995;55:6006-11.
31. Jung JM, Bruner JM, Ruan S, Langford LA, Kyritsis AP, Kobayashi T, Levin VA, Zhang W. Increased levels of p21 WAF1/CIP1 in human brain tumors. Oncogene 1995;11:2021-8.
32. Pines J. Cyclins, Cdks and cancer. Sem Cancer Biol 1995;6:63-72.
33. Vousden KH. Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. Sem Cancer Biol 1995;6:109-16.
34. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerutff AA, Straus M, Bartek J. Aberrations of p16INK4 and retinoblastoma tumor-suppresor genes occur in distinct subsets of human cancer cell lines. Int J Cancer 1995;61:115-20.
35. Yeager T, Stadler W, Belair C, Puthenveettiil J, Olopade O, Reznikoff C. Increased p16 levels correlate with pRb alterations in human urothelial cells. Cancer Res 1995;55:493-7.
36. Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, Yoon H, Komoto Y, Oue T, Kusafuka T, Okada A, Matsuda H. Inverselt correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers:an immunohistochemical study. Int J Cancer 1996;65:442-5.