

자궁 경부 상피내 종양 및 침윤성 암종에서 telomerase RNA와 caspase-3의 발현

고신대학교 의과대학 병리학교실¹, 산부인과학교실²김 영 옥¹ · 이 천 준²

목적 : 자궁 경부암의 각 단계별로 세포 증식의 불멸성 인자로 알려진 telomerase RNA의 발현을 관찰하고 세포 자멸사 효소인 caspase-3와의 발현의 연관성을 조사하여 telomerase가 자궁 경부암의 발생에 관여하는지를 조사하고 두 인자의 상관성을 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 인체 자궁 경부의 정상 조직 10예와 저등급 이형성 12예, 고등급 이형성 20예, 미세 침윤성 암종 17예, 침윤성 암종 19예를 대상으로 조직내 교잡법으로 telomerase RNA의 발현을, 면역조직화학 염색으로 caspase-3의 발현을 관찰하였다.

결과 : Telomerase RNA는 정상 편평상피의 기저부에서 일부 발현되었으나, 주로 이형성 세포와 암종세포에서 발현되었다. 발현율은 저등급 편평 상피내 병변에서는 41.6%, 고등급 편평 상피내 병변에서는 35.0%, 미세 침윤성 암종에서는 35.2%, 침윤성 암종에서는 57.8%의 발현을 보여 종양이 진행할수록 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). Caspase-3는 저등급 편평 상피내 병변에서는 전혀 발현되지 않았으며, 고등급 편평 상피내 병변에서는 65.0%, 미세 침윤성 암종에서는 76.4%, 침윤성 암종에서는 36.8%로 종양이 진행할수록 증가하다가 후기에는 감소하였으며, 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). 자궁 경부암종에서 telomerase RNA와 caspase-3의 발현은 분명한 상관성을 보이지 않았다. 침윤성 암종군에서 telomerase RNA와 caspase-3의 발현은 종양의 분화 정도, 침윤 깊이, 림프절 전이, 병기 등의 여러 임상 병리학적 인자와는 상관성이 없었으며($p > 0.05$), telomerase RNA의 발현과 종양의 크기는 약한 상관성을 보였다($p = 0.05$).

결론 : 자궁 경부암의 발생에 telomerase RNA가 관여한다고 생각된다. 각 시기별로 telomerase RNA와 caspase-3의 발현은 분명한 상관성은 없었으며, 각 인자의 발현은 임상-병리인자와는 상관성이 없었다.

중심단어 : telomerase RNA, caspase-3, 자궁 경부암

서론

Telomerase는 염색체 끝에서 TTAGGG telomeric repeat DNA를 합성하는 효소이다.¹ 정상 체세포는 세포가 분열함에 따라 염색체 말단의 telomere를 복제할 수 없기 때문에 telomere의 길이는 세포가 분열할수록 점차 짧아지게 된다.² 이는 telomere의 길이를 유지할 수 있도록 하는 효소인 telomerase의 불활성화 때문으로 생각된다.² Telomere의 길이가 계속 짧아지게 되어 어느 시점에 도달하게 되면 세포는 노화나 apoptosis (세포 자멸사)에 빠지게 된다.³ 세포 자멸사는 세포의 증식을 조절하는 또 다른

기전으로 세포 자멸사의 억제로 인한 세포의 생존은 종양 발생과 관련이 있으며, telomerase는 세포의 증식과 노화뿐만 아니라 세포자멸사 동안의 세포 생존에도 중요한 역할을 한다고 생각된다.³ 대부분의 체세포에서는 telomere의 길이를 유지할 수 있는 telomerase가 불활성화되어 있으나 생식세포, 간세포와 종양세포에서는 telomerase가 활성화되어 있다고 알려져 있다.⁴⁻⁶ 지금까지 많은 악성 종양에서의 telomerase의 발현이 보고되고 있어, telomerase의 발현은 악성 종양의 특징인 불멸성의 한 속성으로 알려져 왔다.⁷⁻¹⁰

악성 종양에서의 telomerase의 활성화는 김 등이 RT-PCR법으로 고안한 TRAP (Telomeric Repeat Assay Protocol)법으로 조사되었는데, RT-PCR 법으로는 종양 세포 이외의 주변 세포도 포함될 수 있기 때문에 정확한 telomerase의 발현 세포를 구별하는 데 어려움이 있다.¹¹ 또한, 정상 세포에서도 telomerase의 발현이 보고되어 조

논문접수일 : 2007년 3월 6일 채택일 : 2007년 4월 10일
교신저자 : 이천준, 602-030 부산시 서구 암남동 34번지
복음병원 산부인과
전화 : (051) 990-6463 · 전송 : (051) 244-6939
E-mail : 11000jun@naver.com

직내 교잡법(in situ hybridization)을 이용하면 telomerase의 발현이 어느 세포에서 발현되는지 정확히 알 수 있으나, 자궁 경부암에서의 조직내 교잡법을 이용한 telomerase의 발현에 관한 연구는 소수이다.¹²⁻¹⁶

최근 telomerase가 발현되거나 telomere 길이가 긴 세포인 경우 telomerase가 없는 세포보다 더 오래 생존을 유지하게 되는데 이는 세포 자멸사와 관련된 효소인 endonuclease와 caspase의 불활성화와 관련이 있다고 보고되고 있어, telomerase와 세포 자멸사 관련 효소와의 관련성이 추정된다.¹⁷ Caspase는 10종류 이상의 효소로 구성되어 있는데 이 중 caspase-3가 세포 자멸사 동안에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{18,19} 그러나 아직까지 자궁 경부암에서 telomerase와 caspase-3의 관련성에 관한 보고는 접하지 못하였다.

자궁 경부암은 우리나라 여성 생식기 악성 종양 중 가장 발생 빈도가 높으며 조기 진단과 치료가 가능한 종양이다. 그 발생 단계는 다른 악성 종양에 비해 비교적 잘 알려져 있어 정상 상피에서 상피내 이형성 및 상피내암을 거쳐 침윤성암으로 진행된다고 알려져 있으나, 모든 저등급 상피내 병변이 고등급 상피내 병변과 침윤성 암으로 진행하지는 않아 종양 발생 과정 중 종양의 증식과 사멸을 조절하는 일련의 기능이 존재하리라 생각한다. 그러므로, 자궁 경부암에서 각 단계별로 불멸성의 인자로 알려진 telomerase와 세포자멸사 효소인 caspase-3의 발현을 조사하는 것은 자궁경부암의 발생 및 단계적 과정에서의 세포 증식과 사멸 과정을 이해하는 데 도움이 되리라 생각된다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

2001년 1월부터 12월까지 고신외과대학 복음병원에 서 편치 생검, 원추 생검이나 자궁적 출술로 얻어진 자궁 경부 조직에서 상피내 이형성, 상피내암, 미세침윤성 자궁암, 침윤성 자궁암 68예를 대상으로 하였다. 상피내 이형성은 저등급 편평 상피내 병변(low grade squamous intraepithelial lesion; LSIL) 12예, 고등급 편평 상피내 병변(high grade squamous intraepithelial lesion; HSIL) 20예, 미세 침윤성암(microinvasive squamous cell carcinoma) 17예, 침윤성암(invasive squamous cell carcinoma) 19예였다.

미세 침윤성 암종은 기저막 하방으로 5 mm 이하로 침윤한 경우, 5 mm 이상 침윤한 경우 침윤성 암종으로 정의하였다. 전체 자궁 경부 종양 환자의 연령대는 31-77세로 평균 46.7세였다.

또한 정상 조직으로 자궁근종, 자궁 탈출이나 선근증으로 자궁적출술을 시행한 환자의 자궁 경부 10예를 조사하였다. 10명의 환자의 연령은 37-70세로 평균 46.5세였다.

2. 연구 방법

1) 조직내 교잡법(in situ hybridization)

Telomerase RNA에 대한 연구는 telomerase RNA에 특이하게 반응하도록 제작된 fluoresceinated oligonucleotide probe (telomerase RNA probe, BioGenex, USA)를 이용하였다. 파라핀 블록을 4μm 두께로 박절한 다음 positively charged glass slide에 부착하여 실온에서 건조한 후 xylene에 10분씩 2회, 5분씩 2회, 100% 에탄올에 2분씩 2회, 95%, 70%, 50% 에탄올에 각각 1분씩 담가 파라핀을 완전히 제거하였다. 그 뒤 각 슬라이드당 300μl의 proteinase K를 조직이 충분히 젖도록 떨어뜨려 실온에서 15분 동안 반응한 다음 1XPBS 용액으로 5분간 수세하였다. 그리고 증류수, 50%, 70%, 100% 에탄올에 각각 10초씩 적용하여 탈수하였다. 실온에서 약 5분간 건조시킨 후 prehybridization solution을 1-2방울 떨어뜨리고 덮개 유리를 씌운 후 습기 있는 상자에 슬라이드를 넣고 37°C oven에서 60분 동안 반응시켰다. 이어서 덮개 유리를 제거하고 100% 에탄올에서 3분씩 2회 세척하였다. 실온에서 약 5분간 건조시킨 다음 30μl의 probe를 슬라이드에 가하고 95°C oven에 10분 동안 넣고 37°C에서 15시간 동안 교잡을 시행하였다. 그 다음 2xSSC (saline-sodium citrate) 용액에 5분간 2회, 1xSSC 용액에 5분간 차례로 수세하였다. 그런 다음 protein block, Link 1 (mouse-anti-fluorescein antibody), Link 2 (biotinylated F(ab)2 fragments of anti-mouse immunoglobulins), Label (alkaline phosphatase-labeled streptavidin)을 1-2방울 차례대로 가한 후 각각 20분 동안 반응시킨 후 각 단계가 끝날 때마다 1XPBS 용액으로 3분간 3회 세척하였고, 마지막으로 BCIP/NBT substrate를 가한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 양성 대조군으로는 정상 고환 조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 probe 대신 완충액을 넣어 염색을 시

행하였다.

슬라이드에서 관찰되는 기질의 림프구와 비슷하거나 강하게 발현되면서 종양 세포의 핵에서 5% 이상 발현을 보이는 경우를 양성으로 판정하였다.

2) 면역조직화학염색(immunohistochemistry)

10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직을 4 μ m 두께의 연속 절편을 만든 후 avidin-biotin-complex (ABC) 법을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. Xylene으로 10분간 탈파라핀 과정을 거친 후 알코올로 함수 과정을 시행하고 tris 완충용액(10X Immunoassay buffer, Biomed, CA, USA)에 10분간 세척하였다. 항원성 회복을 위하여 pH 6.0의 citrate buffer 용액에 슬라이드를 담근 후 전자레인지에서 10분간 끓였다. H₂O₂로 내인성 과산화수소의 활성을 억제시킨 후 정상 혈청을 blocking agent를 사용하여 20분간 상온에서 처리하였다. 1 : 70으로 희석한 caspase-3 (Clone 3CSP03, Neomarker, CA, USA) 일차항체를 가한 다음 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 tris 완충 용액으로 수세하고 이차항체로 15분간 처리한 후 다시 tris 완충 용액으로 수세하였다. Streptavidin과 결합한 과산화효소 복합체에 15분간 반응시킨 후 biotin-avidin 특이 결합을 유도하고 다시 tris 완충 용액으로 수세하였다. 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

슬라이드에서 관찰되는 기질의 림프구와 비슷하거나 강하게 발현되면서 종양 세포의 세포질에서 5% 이상 발현을 보이는 경우를 양성으로 판정하였다.

3)통계학적 분석

SPSS (version 11.0) 통계 프로그램을 이용하여 자궁 경부 편평 상피 종양의 등급에 따른 telomerase RNA와 caspase-3의 발현 차이를 알아보려고 하였으며, telomerase RNA와 caspase-3의 연관성을 알아보기 위하여 카파 계수(kappa coefficient)를 구하였다. 카파계수가 0.4 이상 0.75 이하인 경우 약한 상관성을 0.75 이상인 경우 분명한 상관성을 나타내며, -0.4 이상 -0.75 이하인 경우 약한 역의 상관성을, -0.75 이상인 경우 분명한 역의 상관성을 보인다고 판정하였다. 통계학적 유의성에 대하여 χ^2 test를 사용하였고, $p < 0.05$ 일 때 통계학적 유의

성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. Telomerase RNA의 발현(Fig. 1, Table 1)

Telomerase RNA는 세포의 핵에 발현을 보였으며, 정상 자궁 조직 10예 중 1예에서 편평 상피와 선상피, 기질 내의 림프구에서 양성 반응을 보였다. 정상 편평 상피에서는 기저부의 일부 세포에서 발현을 보였으나 그 강도는 이형성이나 침윤성 암종에서보다 약하게 발현되었다. 저등급 편평 상피내 병변에서는 telomerase RNA가 주로 기저부 1/3에서 발현되었고 고등급에서는 등급에 따라 이형성 세포에 주로 발현되었다. 상피내 이형성 병변의 경우 이형성을 보이는 세포에 국한되어 발현되었고, 표층의 정상세포에서는 발현되지 않았다. 발현율은 저등급 편평 상피내 병변에서는 12예 중 5예(41.6%), 고등급 편평 상피내 병변에서는 20예 중 7예(35.0%), 미세 침윤성 암종에서는 17예 중 6예(35.2%), 침윤성 암종에서는 19예 중 11예(57.8%)로 침윤성 암종에서 가장 높은 발현율을 보였다. 편평 상피 종양의 등급이 증가할수록 telomerase RNA의 발현이 높음을 알 수 있었으나 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). 각 군에서 발현 강도는 비슷하게 보였으며 병변내에서의 발현은 다소 균일하게 염색되었다.

2. Caspase-3의 발현 (Fig. 2, Table 1)

Caspase-3는 대부분 세포질에서 발현을 보였으며, 정상 자궁 경부 조직 10예 중 4예에서 편평 상피와 선상피에서 약한 양성 반응을 보였고, 기질내 림프구에서 강한 양성 반응을 보였다. 저등급 편평 상피내 병변에서는 전혀 발현되지 않았으며, 고등급 편평 상피내 병변에서는 20예 중 13예(65%), 미세 침윤성 암종에서는 17예 중 13예(76.4%), 침윤성 암종에서는 19예 중 7예(36.8%)의 발현율을 보였고, 편평 상피 종양의 등급에 따른 통계학적인 유의성은 없었다($p > 0.05$). 종양이 진행할수록 발현율이 높아지는 경향을 보이다가 침윤성 암종의 시기에는 감소하는 경향을 보였다. Caspase-3의 발현 강도는 침윤성 암종군보다 고등급 편평상피내 병변과 미세 침윤성 암종군에서 다소 강하게 발현되었다.

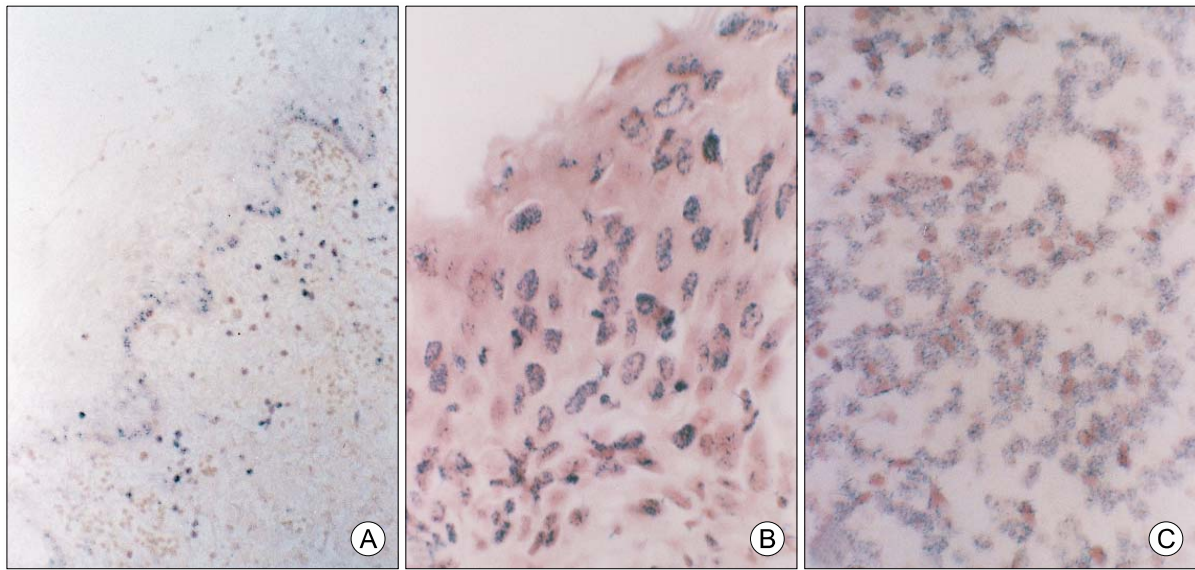


Fig. 1. Telomerase RNA expression in normal (A), severe dysplasia (B), invasive carcinoma (C). Positive reaction in a few basal cells in normal squamous epithelium and lymphocytes in stroma (A) and diffuse reaction in dysplasia (B) and invasive carcinoma cells (C) is noted (In situ hybridization, $\times 100$, $\times 400$, $\times 400$).

Table 1. Expression rate of telomerase RNA and caspase-3 in the squamous neoplasia of uterine cervix

Group	Telomerase	p value	Caspase-3	p value
LSIL	5/12 (41.6%)	NS	0/12 (0%)	NS
HSIL	7/20 (35%)		13/20 (65%)	
MI	6/17 (35.2%)		13/17 (76.4%)	
CA	11/19 (57.8%)		7/19 (36.8%)	

LSIL; low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL; high grade squamous intraepithelial lesion, MI; microinvasive carcinoma, CA; invasive carcinoma, NS; not significant

3. Telomerase RNA와 caspase-3의 발현의 상관성 (Table 2)

두 인자의 상관성을 알아보기 위해 조사한 카파 계수는 전체 자궁 경부암과 각 시기별로 분명한 상관성은 보이지 않았다. 침윤성 암종군의 경우 -0.42의 카파 계수 값을 보여 telomerase RNA와 caspase-3의 발현은 약한 정도의 역의 상관성을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다($p > 0.05$). 저등급 편평 상피내 병변의 경우 kappa 값을 구할 수가 없었으며, 미세 침윤성 암종군과 고등급 편평 상피내 병변에서는 분명한 상관성은 없는 것으로 생각된다.

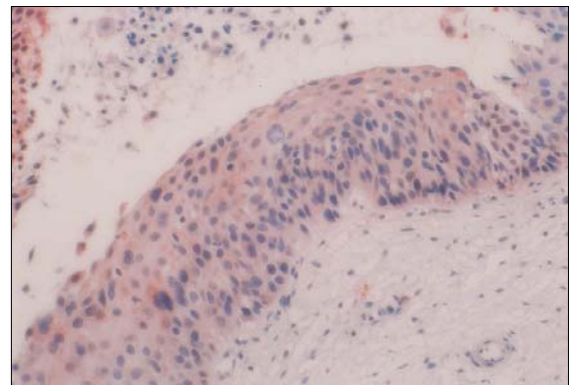


Fig. 2. Immunohistochemical staining for caspase-3. Weak cytoplasmic positivity is seen in severe dysplasia ($\times 200$).

4. 침윤성 암종군에서의 telomerase RNA와 caspase-3의 발현과 임상 병리 인자와의 상관성 (Table 3)

종양의 분화 정도, 자궁 경부의 침윤 정도, 림프절 전이 유무, 병기에 따른 telomerase RNA와 caspase-3의 발현의 상관성은 관찰되지 않았다($p > 0.05$). Telomerase RNA 양성군의 종양의 평균 크기는 3.3 ± 1.3 cm으로 음성군의 평균 크기인 2.0 ± 1.2 cm보다 컸으나 약한 통계학적 유의성($p = 0.05$)을 보였다. Caspase-3의 발현은 telomerase RNA의 발현과는 반대로 caspase-3 양성군의 평균 크기가 $3.0 \pm$

1.4 cm으로 양성군의 평균 크기인 2.3 ± 1.3 cm보다 크기가 컸으나 통계학적인 의의는 없었다($p > 0.05$).

고 찰

Telomere는 염색체 말단 부위에 위치하며 TTAGGG

Table 2. Relationship between telomerase RNA and caspase-3 expression the squamous neoplasia of uterine cervix

Group	Case	Telomerase RNA		Caspase-3		Kappa coefficient
		(-)	(+)	(-)	(+)	
LSIL	12	7	5	12	0	(-)
HSIL	20	13	7	7	13	+0.08
MI	17	11	6	4	13	-0.32
CA	19	8	11	12	7	-0.42
Total	68	37	29	35	33	-0.248

LSIL; low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL; high grade squamous intraepithelial lesion, MI; microinvasive carcinoma, CA; invasive carcinoma

염기 배열의 반복과 단백질 복합체로 구성되며 염색체의 재조합이나 융합, 분해 효소에 의한 소실로부터 염색체를 보호하는 기능을 한다.¹ Telomere는 세포가 분열할 때마다 길이가 짧아지게 되는데, 그 이유는 telomere 부위는 3 끝부분에서 불완전 복제가 일어나서 세포가 분열할 때마다 50-200여개의 핵산이 소실되기 때문이다.² 이러한 과정으로 telomere의 길이가 짧아지다가 어느 시점에 도달하게 되면 세포는 노화가 일어난다.³ Telomerase는 RNA를 주형으로 하여 telomere의 말단을 생성하는 효소로 분화된 체세포에서는 그 활성이 억제되어 있으나 배아세포에서는 telomerase가 활성화되어 지속적인 세포의 증식에 관여한다고 알려져 있다.⁵ 또한 대부분의 불멸성 세포주와 여러 종류의 악성 종양에서 발현되어 telomerase의 발현이 악성 종양의 한 속성으로 생각되고 있다.¹¹ 자궁 경부 암종에서도 TRAP법을 이용한 연구에서 telomerase의 활성이 증가되어 있으며, 인유두종 바이러스와의 관련성이 보고되고 있다.²⁰⁻²² 또한 telomerase의 활성을 조사하는 것이 자궁 경부암의 조기 진단에 유용할 수 있다고 제안되었다.²³⁻²⁵ 그러나, 일부 정상 체세포에서도 telomerase 활성이 있으며, 여성 생식기에서는 세

Table 3. Relationship between telomerase and caspase-3 expressions and clinico-pathologic factors in invasive cervical cancer group

n=19	Telomerase RNA		p-value	Caspase-3		p-value
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Tumor size (cm)						
Mean±SD	2.0±1.2	3.3±1.3	0.05	3.0±1.4	2.3±1.3	NS
Differentiation grade						
Well	4/7 (57.1%)	3/7 (42.8%)	NS	4/7 (57.1%)	3/7 (42.8%)	NS
Moderate	2/6 (33.3%)	4/6 (66.6%)		4/6 (66.6%)	2/6 (33.3%)	
Poor	2/6 (33.3%)	4/6 (66.6%)		4/6 (66.6%)	2/6 (33.3%)	
Invasion depth*						
1/2 ↓	4/7 (57.1%)	3/7 (42.8%)	NS	5/7 (71.4%)	2/7 (28.6%)	NS
1/2 ↑	4/12 (33.3%)	8/12 (66.6%)		7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)	
Metastatic lymph nodes						
Negative	5/12 (41.7%)	7/12 (58.3%)	NS	7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)	NS
Positive	3/7 (42.8%)	4/7 (57.1%)		5/7 (71.4%)	2/7 (28.6%)	
Stage						
Ib	6/12 (50.0%)	6/12 (50.0%)	NS	7/12 (58.3%)	5/12 (41.7%)	NS
Ila	1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)		1/2 (50.0%)	1/2 (50.0%)	
Ilb	1/5 (20.0%)	4/5 (80.0%)		4/5 (80.0%)	1/5 (20.0%)	

*invasion depth of cervical wall, NS; not significant

포의 재생과 관련되어 자궁 내막 세포에서 telomerase가 발현되며, 정상 여성의 자궁 경부 세포검사에서도 12.7%의 telomerase 발현율이 보고되었다.^{12,26} 본 연구에서도 정상 편평상피의 기저부, 일부 선 상피세포와 림프구에서 약한 발현을 보였는데, 세포주기와 관련되어 계속적인 증식이 일어나는 경우 일부 정상세포에서도 telomerase RNA가 발현되는 것으로 해석하였다. Sode 등은 조직내 교잡법을 이용하여 폐, 유방, 난소, 자궁 경부의 악성 종양에서 telomerase RNA의 발현을 조사하고 다른 종양에 비해 자궁 경부암에서의 높은 telomerase의 발현을 보고하였다. 그는 침윤성 자궁 경부암중에서 43%의 발현율을 보고하였으며 본 연구에서도 침윤성 암중의 경우 57.8%의 발현율을 보였다.¹³ 이러한 발현율은 TRAP법을 이용한 연구 결과보다는 낮았는데, TRAP법에서는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포도 포함되기 때문에 조직내 교잡법보다 발현율이 더 높은 것으로 보인다.

Telomerase RNA의 발현은 저등급 편평 상피내 병변에서는 41.6%, 고등급 편평 상피내 병변과 미세 침윤성 암중에서는 각각 35%와 35.2%의 비슷한 발현율을 보였으며 침윤성 암중에서는 57.8%의 가장 높은 발현을 보여 전반적으로는 telomerase의 발현이 종양이 진행할수록 증가한다고 생각되나 통계학적 유의성은 없었다($p > 0.05$). 고등급 편평 상피내 병변과 미세 침윤성 암중에서 저등급 편평 상피내 병변보다 다소 발현율이 감소하였는데, Kyo 등도 TRAP법으로 telomerase의 활성을 조사한 연구에서 경도의 이형성 시기에서 중등도 이형성 시기보다 다소 높은 발현을 보고하여 등급에 따른 약간의 telomerase의 발현의 차이는 있다고 생각된다. Telomerase RNA가 대부분의 정상 편평상피에서는 발현되지 않고 저등급 편평 상피내 병변 시기에서부터 침윤성 암중 시기까지 지속적으로 발현되기 때문에, 자궁 경부암의 초기부터 종양 발생에 관여한다고 생각된다.

세포 자멸사의 신호는 bcl-2를 통하여 미토콘드리아에 전달되어 cytochrome c를 방출하며 Apaf-1-caspase-9 활성화를 유도하고 이 caspase-9는 caspase-3를 활성화하여 세포 자멸사를 유발한다.^{18,19} 지금까지 12개의 caspase가 알려져 있으며 그 중 caspase-3가 가장 중요한 역할을 한다고 알려져 있으나, 악성 종양에서의 caspase-3의 발현은 보고자마다 다양한 결과를 보이고 있다.^{26,27} 종양이 진행할수록 세포 자멸사가 증가하는 것은 일정한 세포

의 수를 유지하거나, 부적절한 분화나 증식을 보인 세포를 제거하기 위한 능동적인 기전으로 설명되며, 이와 반대로 증식과 함께 세포 자멸사가 감소하는 것은 증식과 세포 자멸사의 불균형으로 인해 증식능이 우세하게 발현되는 것으로 이해되고 있다. 본 연구에서는 저등급 편평 상피내 이형성 시기에서는 발현되지 않고 고등급 편평 상피내 이형성부터 발현되어 미세침윤성 암중시기에 가장 높은 발현율을 보였다. 이 시기까지는 부적절한 종양세포의 제거나 일정 세포의 수를 유지하기 위해 증가한 것으로 생각된다. 또한 발현 강도도 침윤성 암중군보다 그 이전 시기에 다소 강하게 발현되는 경향을 보여, 미세 침윤성 암중시기까지 caspase-3가 주로 작용하다가 그 이후에는 감소하는 것으로 해석된다. 침윤성 암중 시기에서 caspase-3의 발현이 감소하는 점은 종양이 성장함에 따라 저산소 등의 악화된 주변 환경에서 생존하기 위해 자멸사 기전이 감소하는 것으로 추정된다.

Holt 등은 telomerase 양성 세포주에서 음성 세포주보다 더 높은 생존능을 보인 반면 caspase-3의 감소를 보여서 telomerase와 caspase-3의 역의 상관성을 주장하였다.¹⁷ 또 다른 보고에 의하면 telomere 근처에 caspase 유전자가 위치해 있는데 telomere의 길이가 긴 경우 이러한 유전자들이 전사 단계에서 불활성되어 있다가, telomerase가 불활성화되거나 telomere의 길이가 짧아지면 caspase-3가 활성화된다고 하여 telomere의 안정화와 세포 자멸사간의 상관성이 있다고 하였다.²⁸ 본 연구에서 시기별 발현 양상을 보면 telomerase RNA 발현율이 높은 경우 caspase-3 발현율이 낮으며, telomerase RNA 발현율이 낮은 경우 caspase-3 발현율이 높아서 두 인자의 발현은 역의 상관성이 추정되었지만 통계학적인 유의한 상관성은 보이지 않았다. 그러나, 침윤성 시기에서는 카파 계수가 -0.42로 약한 정도의 역의 상관성을 보여 두 인자간의 발현 양상은 상반됨을 알 수 있었다.

Telomerase RNA의 발현을 조사하는 것은 자궁 경부의 저등급 편평 상피내 병변을 진단할 때 도움이 될 수 있다. 자궁 경부의 조직 진단 시 저등급 편평 상피내 병변인 경우 기저부에 소수의 세포만이 증식하며 핵의 심한 이형성이 없기 때문에 여러 비종양성 병변과의 감별이 어려워 염증으로 인한 상피 세포의 이형성이나 폐경 이후의 위축성 상피와의 감별이 어려울 수 있다. 이러한 경우 조직내 교잡법으로 telomerase의 발현을 조사한다

면 저등급 편평 상피내 병변과 비종양성 병변을 감별하는데 보조적인 방법으로 이용될 수 있다고 기대된다.

Bonatz 등은 자궁내막암에서 높은 telomerase의 발현은 FIGO 병기와 종양의 재발이나 빠른 진행과 연관성이 있다고 보고하였고, Zhang 등은 자궁 경부암의 초기보다 후기에서 telomerase의 활성이 높게 발현되나, 임상 병리 인자와는 상관성이 없다고 주장하였다.^{29,30} Wisman 등은 자궁경부암에서 telomerase의 활성도와 종양의 등급과는 상관성이 있으나, 생존율, 병기, 종양의 크기, 혈관 침윤, 림프절 전이와는 상관성이 없다고 주장하였다.³¹ 본 연구에서는 telomerase RNA 양성군이 음성군보다 종양의 평균 크기가 크지만 약한 정도의 통계학적 의미를 보였다. ($p=0.05$), 또한 telomerase RNA와 종양의 분화 정도, 자궁 경부의 침윤 정도, 림프절 전이, 병기와의 연관성이 없었으며, caspase-3의 발현도 모든 인자와 연관성이 없었었다 ($p>0.05$). 이전 두 연구 결과와 같이 telomerase RNA의 발현은 예후 인자로의 의미는 없는 것으로 생각되나, 이번 연구 대상 예가 19예로 소수이기 때문에 앞으로 더 많은 예에서 조사되어야 한다고 생각된다.

참고문헌

- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
- Harley CB. Telomeric loss: Mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-82.
- Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, et al. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 1995; 220: 194-200.
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-5.
- Wright W, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay J. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173-9.
- Yasumoto S, Kunitura C, Kikuchi K. Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996; 13: 433-9.
- Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 40: 106-9.
- Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistbe I, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 2373-7.
- Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, et al. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Cancer Res* 2001; 32: 188-95.
- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Conahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, et al. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3317-26.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 23: 2011-5.
- Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-4.
- Sode AI, Going JJ, Kaye SB, Keith WN. Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. *Oncogene* 1998; 16: 979-83.
- Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998; 153: 857-64.
- Forst M, Bobak JB, Gianani R, Kim N, Weinrich S, Spalding DC, et al. Localization of telomerase hTERT protein and hTR in benign mucosa, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the cervix. *Anatomic Pathol* 2000; 114: 726-34.
- Wiaman GB, Jong SD, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, Vries E, et al. Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Hum Pathol* 2002; 31: 1304-12.
- Holt SE, Glinsky VV, Ivanova AB, Glinsky GV. Resistance to apoptosis in human cells conferred by telomerase function and telomere stability. *Mol Carcinog* 1999; 25: 241-8.
- Yuan J, Shaham S, Ledous S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-52.
- Jricke RU, Sprengary ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 9357-60.
- Yashima K, Ashfaq R, Nowak J, Gruenigen VV, Milchgrub S, Rath A, et al. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1997; 82: 1319-27.
- Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Kanaya T, Inoue M. Telomerase activity in cervical cancer is quantitatively distinct from that in its precursor lesions. *Int J Cancer* 1998; 79: 66-70.
- Hopman AHN, Theelen W, Hommelberg DPH, Kamps MAF, Herrington CS, Morrison LE, et al. Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomere gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *J Pathol* 2006; 210: 412-9.
- Kyo S, Takakura M, Ishikawa H, Sasagawa T, Satake S, Tateno M, et al. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res* 1997; 57: 1863-7.
- Zheng PS, Iwasaka T, Zhang ZM, Pater A, Sugimori H. Telomerase activity in papanicolaou smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic

- human papilloma viruses. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 394-8.
25. Kailash U, Soundarajan CC, Lakshmy R, Arora R, Vivekanandhan S, Das BC. Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 1250-7.
 26. Hoshi T, Sasano H, Kato K. Immunohistochemistry of caspase-3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4347-54.
 27. Virkajarvi N, Paakko P, Soini Y. Apoptotic index and apoptosis influencing proteins bcl-2, mcl-1, bax and caspase 3, 6, and 8 in pancreatic carcinoma. *Histopathology* 1998; 33: 432-9.
 28. Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 1992; 8: 919-26.
 29. Bonatz G, Frahm SO, Klapper W, Helfenstein A, Heidorn K, Jonat W, et al. High telomerase activity is associated with cell cycle deregulation and rapid progression in endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Hum Pathol* 2001; 32: 605-14.
 30. Zhang DK, Ngan HY, Cheng RY, Cheung AN, Liu SS, Tsao SW. Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35: 154-60.
 31. Wisman G BA, Knol AJ, Helder MN, Krans M, de Vries E, Hollema H, et al. Telomerase in relation to clinicopathologic prognostic factors and survival in cervical cancer. *Int J Cancer* 2001; 91: 658-64.

Expression of telomerase RNA and caspase-3 in cervical intraepithelial lesions and invasive carcinoma

Young Ok Kim¹, Chun June Lee²

Departments of Pathology¹ and Obstetrics and Gynecology², Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Objective : Telomerase is an RNA-dependent DNA polymerase that synthesizes TTAGGG telomeric DNA. It has been detected in a variety of human malignancies, suggesting that its activity may play a role in the tumorigenic process. Also, maintenance of telomerase activity is associated with increased resistance to apoptosis. Caspase-3 activation has been found to be essential components of the apoptotic pathway.

Methods : To determine whether telomerase is involved in carcinogenesis of uterine cervix and to analyze the relationship between telomerase RNA and caspase-3 expression according to cervical cancer stage, we performed in situ hybridization for telomerase RNA and immunohistochemistry for caspase-3. The materials were 10 normal cervical tissues, 12 low grade intraepithelial lesions (LSIL), 20 high grade intraepithelial lesions (HSIL), 17 microinvasive carcinomas, 19 invasive carcinomas.

Results : Telomerase RNA was weakly expressed in a few basal cells of normal squamous epithelium in uterine cervix. But, high expression rate was noted in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma groups. Expression of telomerase RNA was demonstrated 5 (41.6%) of LSIL, 7 (35.0%) of HSIL, 6 (35.2%) of microinvasive carcinoma, and 11 (57.8%) of invasive carcinoma. Expression of caspase-3 was demonstrated 0% of LSIL, 13 (65.0%) of HSIL, 13 (76.4%) of microinvasive carcinoma, and 7 (36.8%) of invasive carcinoma. Relationship between telomerase RNA and caspase-3 expression according to stage was not seen. Telomerase RNA and caspase-3 expression showed weakly inverse correlation in invasive carcinoma group. Telomerase RNA and caspase-3 expression was not correlated with clinico-pathologic factors, including stage, tumor differentiation, invasion depth, and lymph node metastasis ($p > 0.05$). But, weak correlation between telomerase RNA expression and tumor size was noted ($p = 0.05$).

Conclusion : These data indicate telomerase might be involved in carcinogenesis of uterine cervix. Distinct relationship between telomerase RNA and caspase-3 was not seen according to stage. Expression of telomerase RNA and caspase-3 had no correlation with clinico-pathologic factors.

Key Words : Telomerase RNA, Caspase-3, Uterine cervical cancer