부인종양 제18권 제4호 2007
Vol. 18, No. 4, December, 2007

상피성 난소암에서 Rb 경로의 변화와 E2F-1의 발현

부산대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 병리학교실[2]
김성희[1] · 문수현[1] · 신수일[1] · 서동수[1] · 윤만수[1] · 최경운[2]

목적 : 본 연구는 상피성 난소암에서 Rb 경로의 변화와 E2F-1의 발현의 임상병리학적 중요성을 면역조직화학적 방법으로 평가하였다.

연구 방법 : 수술을 통하여 상피성 난소암으로 진단된 72명의 환자를 대상으로 하여 후향적 연구를 시행하였다.

결과 : pRb 발현은 병기, 조직학적 등급, 유사분열지수와 역상관관계를 보였고, E2F-1의 발현은 진행된 병기, 조직학적 등급과 유사분열지수 그리고 Ki-67 labeling 수치와 상관관계를 보였다.

결론 : 상피성 난소암에서 Rb 경로의 변화와 E2F-1의 발현은 새로운 예후인자로서의 역할에 대한 가능성을 제시한다.

중심단어 : 상피성 난소암, Rb 경로의 변화, E2F-1의 발현

서 론

상피성 난소암의 약 2/3는 진단 시 진행된 병기(stage III 또는 IV)를 보이며 수술적 처치와 항암 요법을 이용한 치료법의 발달에도 불구하고 생존률의 뚜렷한 호전을 보이지 않고 있다.[1] 상피성 난소암의 예후 인자로서 종양의 병기, 종양의 분화도, 복수의 유무, 용적 축소 수술(debulking surgery) 후 잔류 종양의 크기 등이 알려져 있으며,[2] 최근에는 종양 생물학(tumor biology)과 관련하여 상피성 난소암의 예후를 보다 객관적으로 추측할 수 있는 지표를 찾아내려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그 중 종양발생과 진행에 관여하는 세포주기 조절 인자에 대한 연구는 정상 세포주기의 장애가 종양발생에 중요한 역할을 한다는 사실을 보여주고 있다.[3]

포유동물의 세포 증식은 매우 복잡한 세포 주기에 의해 조절된다.[4,5] 세포주기의 진행은 많은 종류의 cyclin뿐 아니라 cyclin-dependent kinase (CDK), CDK inhibitors 등에 의해 조절되며, 또한 핵전사인자인 E2F-1과 같은 세포주기 관련 단백들도 관여한다. 예를 들면, cyclin D1은 CDK4/CDK6과 결합하고 이로 인해 활성화된 CDK4/CDK6은 Rb를 pRb로 인산화시킨다. pRb에서 E2F-1이 유리되면 E2F-1은 전사인자로 활동하여 DNA 합성에 필요한 유전자의 전사를 촉진하고 세포가 G1 phase에서 S phase로 전환하는 것에 기여한다. 이 과정에서 CDK inhibitor인 $p16^{INK4a}$가 CDK4/CDK6의 기능을 방해하여 세포주기의 진행을 조절한다. 이러한 $p16^{INK4a}$-cyclin D1-pRb 경로(Rb 경로)의 변화는 여러 종양에서 연구되어져 왔다.[6,7]

E2F-1은 Rb 경로에서 최종적으로 활성화되는 전사인자로서 E2F-1의 과발현은 위장관계 종양의 진행과 관련 있는 예후인자로서 평가받고 있고,[8-12] 유방암에서 나쁜 예후와의 관련성이 기술되었다.[13-15] 그러나 E2F-1의 발현 증가로 일부 세포에서는 세포자멸사가 유도되고,[16] E2F-1의 발현 저하가 방광암에서는 나쁜 예후와 관련된다는 보고도 있다.[17] 이와 같이 E2F-1이 종양 유전자라는 주장과 종양 억제 유전자라는 주장이 엇갈리는 가운데 최근까지 E2F-1은 종양 발생과 진행에 미치는 영향이 조직 또는 종양 특이적인 것으로 설명되고 있다.

논문접수일 : 2007년 3월 13일 채택일 : 2007년 9월 20일
교신저자 : 윤만수, 602-739 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지
부산대학교병원 산부인과
전화 : 051) 240-7288 · 전송 : 051) 248-2384
E-mail : msyoon@pusan.ac.kr
이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2)년에 의하여 연구되었음.

이에 저자들은 상피성 난소암 조직을 이용하여 조직미세배열법(tissue microarray)으로 조직블록을 제작한 후 여기에 면역조직화학염색을 실시하여 E2F-1 발현과 종양의 임상병리학적 인자들과의 상관관계 및 Rb 경로에 관여하는 cyclin D1, $p16^{INK4a}$, pRb 단백과의 상관관계를 분석하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1998년부터 2004년까지 수술을 통하여 상피성 난소암으로 진단된 72명의 환자를 대상으로 하여 후향적 연구를 시행하였다. 각 증례의 대표적인 파라핀 포매괴를 택하여 조직 배열 슬라이드를 제작하였다.

2. 방법

1) 병리조직학적 검사

상피성 난소암 72예의 H-E 염색표본들은 WHO 분류에 따라 장액성, 점액성, 자궁내막양, 투명세포, 그리고 미분화암종으로 분류하였고 FIGO 분류법에 따라 병기를 정하였다. Silverberg 종양등급체계[18]에 따라 암종의 등급을 I, II, III으로 분류하였고, 두 명의 병리전문의가 광학현미경 하에서 재검경하여 확인하였다.

2) 조직배열 블록 제작

모든 슬라이드를 재검경하여 괴사나 출혈이 없고 조직의 보존이 양호한 부위를 슬라이드에 표시하여 해당 부위를 다시 블록에 표시한 후 조직을 채취하였다. Beecher 기구(Silver Springs, MD, USA)를 이용하여 1 mm 직경의 펀치로 모두 2장의 조직배열 블록을 새로 제작하였다. 블록의 표면을 고르게 하고, 핵심(core) 조직과 공여 블록사이의 파라핀 결합이 충분히 되도록 하기 위해 45°C에서 1시간 둔 후 뒤집어 약간의 무게를 주면서 다시 10분간 둔 다음 4°C에 두어 파라핀이 잘 응고될 수 있도록 하였다. 블록 제작 후 1장의 H-E 슬라이드를 제작하여 공여 조직과 비교하였다.

3) 면역조직화학검사

4 μm 두께의 절편으로 된 2장의 조직배열 슬라이드를 xylene으로 탈파라핀하고 함수과정을 거친 후 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣고 가압증기멸균기(autoclave)에서 120°C로 15분간 가열하여 항원성을 증가시켰다. 내인성 peroxidase의 작용 방지를 위해 3% 과산화수소수를 이용하여 30분간 처리하였다. 면역조직화학염색은 avidin-biotin peroxidase 방법인 Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다. 먼저 5% 정상염소혈청으로 비특이적인 항원-항체반응을 억제시킨 후, 일차항체인 E2F-1 (KH-95; Santa Cruz, CA), pRb (Rb1; Dako, USA), cyclin D1 (SP4; Lab Vision, USA), $p16^{INK4a}$ (JC8; Lab Vision, USA), Ki-67 (MIB-1; Dako, USA)을 1:100으로 희석하여 사용하였다. 발색은 Diaminobenzidine (DAB)로 하였으며 대조염색은 Mayer hematoxylin을 이용하였다.

각 항체에 대한 양성 대조군으로 $p16^{INK4a}$는 대장암종 조직을, cyclin D1은 유방암종 조직을, pRb, E2F-1, Ki-67은 편도암종 조직을 이용하였고, 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 PBS (phosphate buffer solution)를 사용하였다.

3. 면역조직화학염색결과의 판독 및 통계분석

1) 염색판정

종양세포의 핵에 갈색으로 염색될 때 양성으로 판정하였고, 각 증례들에서 양성으로 염색된 세포와 전체 종양 세포의 비율을 관찰하였다. 단, $p16^{INK4a}$의 경우 세포질에 염색이 동반된 경우도 함께 양성으로 판정하였다. 양성세포의 출현율에 따라 0-10%인 경우를 0점, 11-25%인 경우를 1점, 26-50%인 경우를 2점, 51-75%인 경우를 3점, 그리고 76% 이상인 경우를 4점으로 하였다. 이 중 10% 이하로 염색된 경우는 음성, 11% 이상으로 염색된 경우를 양성으로 분류하였다. $p16^{INK4a}$과 pRb는 음성인 경우 비정상적 발현으로, cyclin D1과 E2F-1은 양성인 경우 비율에 따라 발현이 증가한 것으로 해석하였다. Ki-67은 양성세포의 백분율을 계산하여 Ki-67 표지지수(Ki-67 labeling index)로 하였다(Fig. 1).

Rb 경로를 조절하는 $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 중 한 가지이상이 비정상적 발현을 보이는 경우에 Rb 경로 변경(alteration)이 있는 것으로 정의하였고,6 Rb 경로 변경 유무와 E2F-1 단백 발현 양성 여부에 따라 1군부터 4군까지 분류하였는데, 1군; Rb 경로 변경이 없고 E2F-1 단백 발현도 음성인 경우, 2군; Rb 경로 변경은 있으나 E2F-1

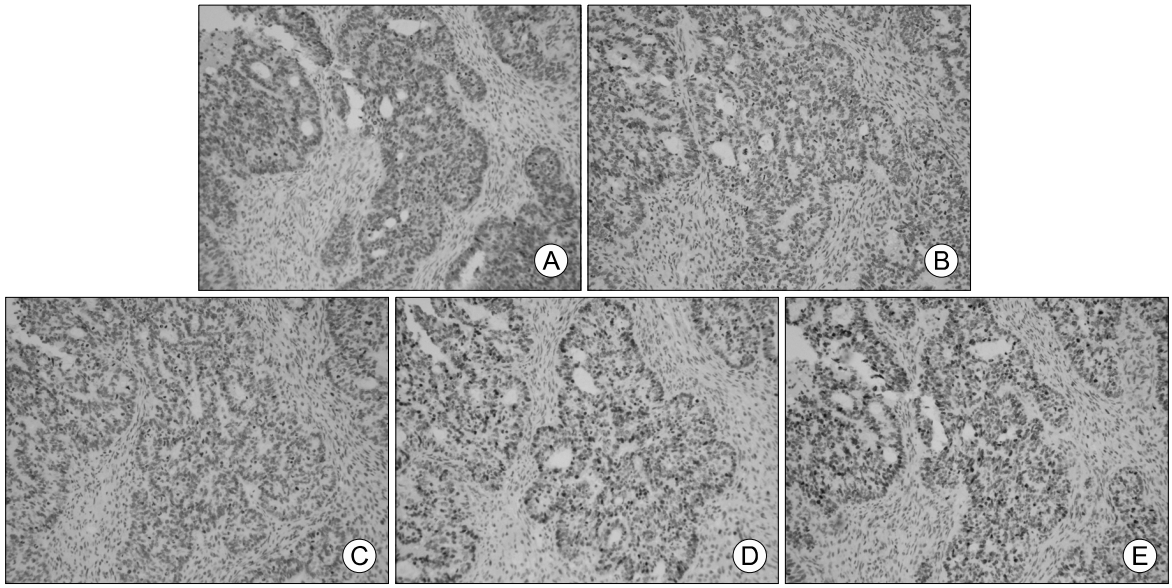

Fig. 1. The immunohistochemical staining (×400) for $p16^{INK4a}$, cyclinD1, pRb, E2F-1 and Ki-67 immunoreactivity. (A) positive $p16^{INK4a}$ immunostaining, (B) negative cyclin D1 immunostaining, (C) negative pRb immunostaining, (D) positive E2F-1 immunostaining, (E) high Ki-67 LI.

단백 발현이 음성인 경우, 3군; Rb 경로 변경이 없으나 E2F-1 단백 발현이 양성인 경우, 4군; Rb 경로 변경이 있고 E2F-1 단백 발현이 양성인 경우로 하였다.

2) 통계학적 분석

Window용 SPSS 10.0을 이용하여 Pearson Chi-square 검정, 일원배치 분산분석, 독립표본 t 검정으로 분석하였고, Pearson 상관분석을 통하여 변수들의 상관관계를 평가(correlation coefficient, γ)하였다. 유의 수준은 $p<0.05$로 정하였다.

결 과

1. 임상 및 병리조직학적 소견

환자의 연령은 15세부터 82세이고 평균 49.3세였다. 72예의 상피성 난소암 중 장액성 26예(36.1%), 점액성 15예(20.8%), 자궁내막양 11예(15.3%), 투명세포암 16예(22.2%), 그리고 미분화암이 4예(5.5%)였다. 또한 FIGO 병기 I은 26예(35.1%), II는 8예(11.1%), III은 31예(43.1%), 그리고 IV가 7예(9.7%)였다. 병기 I과 II를 조기 병기(early stage)로, 병기 III과 IV를 진행 병기(advanced stage)로 분류하였을 때, 조기 병기는 34예(47.2%), 그리

Table 1. Expression of $p16^{INK4a}$ according to clinico-pathologic parameters in epithelial ovarian cancer

	$p16^{INK4a}$ expression					Total	p value
	0	1	2	3	4		
	Negative	Positive					
Stage							
I	10	7	2	5	2	26	0.283
II	2	4	1	1	0	8	
III	11	6	5	5	4	31	
IV	2	1	1	1	2	7	
Grade							
I	13	3	3	6	0	23	0.183
II	9	15	15	4	5	38	
III	3	0	0	2	3	11	
Atypia							
1	5	0	1	3	0	9	0.891
2	11	10	2	6	5	34	
3	9	8	6	3	3	29	
Mitoses							
1	16	6	2	7	0	31	0.006
2	6	10	6	2	4	28	
3	3	2	1	3	4	13	
Size							
<10	11	8	5	7	3	34	0.753
≥10	14	10	4	5	5	38	
Total	25	18	9	12	8	72	

Table 2. Expression of cyclin D1 according to clinicopathologic parameters in epithelial ovarian cancer

	Cyclin D1 Expression					Total	p value
	0	1	2	3	4		
	Negative	Positive					
Stage							
I	23	1	2	0	0	26	
II	6	0	1	1	0	8	0.771
III	26	2	3	0	0	31	
IV	7	0	0	0	0	7	
Grade							
I	18	1	3	1	0	23	0.430
II	35	2	1	0	0	38	
III	9	0	2	0	0	11	
Atypia							
1	6	1	1	1	0	9	0.190
2	30	2	2	0	0	34	
3	26	0	3	0	0	29	
Mitoses							
1	26	1	3	1	0	31	0.286
2	24	1	3	0	0	28	
3	12	1	0	0	0	13	
Size							
<10	27	1	5	1	0	34	0.051
≥10	35	2	1	0	0	38	
Total	62	3	6	1	0	72	

Table 3. Expression of Rb according to clinicopathologic parameters in epithelial ovarian cancer

	Rb expression					Total	p value
	0	1	2	3	4		
	Negative	Positive					
Stage							
I	4	4	3	11	4	26	
II	2	4	1	1	0	8	0.000
III	19	3	3	3	3	31	
IV	4	2	0	1	0	7	
Grade							
I	6	5	2	7	3	23	0.010
II	14	7	5	8	4	38	
III	9	1	0	1	0	11	
Atypia							
1	2	1	1	4	1	9	0.361
2	16	6	3	4	5	34	
3	11	6	3	8	1	29	
Mitoses							
1	7	7	2	12	3	31	0.019
2	14	4	5	2	3	28	
3	8	2	0	2	1	13	
Size							
<10	19	6	2	3	4	34	0.026
≥10	10	7	5	13	3	38	
Total	29	13	7	16	7	72	

고 진행 병기는 38예(52.8%)였다. 종양의 크기는 10 cm 미만이 34예(47.2%), 10cm 이상이 38예(52.8%)였다. 종양의 분화도는 고분화도(G1) 23예(31.9%), 중등도 분화도(G2) 38예(52.8%), 저분화도(G3) 11예(15.3%)였다. 종양 세포의 비정형성(atypia)을 Silverberg 종양등급체계18에 기준하여 1-3점으로 분류했을 경우 1점(약한 비정형성)이 9예(12.5%), 2점(중등도 비정형성)은 34예(47.2%), 3점(심한 비정형성)은 29예(40.3%)였다. 종양 세포의 세포분열수에 따라 10 high power field (HPF) 당 세포분열수가 10개 미만인 경우를 1점으로, 10개 이상 25개 미만인 경우를 2점으로, 25개 이상인 경우를 3점으로 하였는데, 각각 31예(43.1%), 28예(38.9%), 그리고 13예(18%)였다.

2. $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 및 E2F-1 단백 발현과 임상병리학적 인자와의 상관관계

총 72예 중 $p16^{INK4a}$ 단백 발현이 음성인 경우는 25예(34.7%)이고 양성인 경우는 47예(65.3%)이다. $p16^{INK4a}$ 단백 발현은 종양의 등급, 병기, 크기 등의 임상병리학적 인자들과의 상관관계는 없었으나, 종양세포의 세포분열수와 통계학적으로 유의한 상관관계가 있었다(p=0.006, γ=0.323)(Table 1). Cyclin D1 단백 발현은 10예(13.9%)에서 양성이고, 62예(86.1%)에서 음성을 보였는데, 다른 인자들과 통계학적으로 유의한 상관관계는 없었다(Table 2). pRb 단백은 29예(40.3%)에서 음성, 43예(59.7%)에서 양성이었는데, 종양의 등급(p=0.010, γ=-0.301)과 병기(p=0.000, γ=-0.4222)가 높아질수록 통계학적으로 유의하게 발현이 감소하였고, 또한 종양 세포의 세포분열수 증가와 pRb 단백 발현 감소가 유의한 역상관관계를 보였다(p=0.019, γ=-0.276). 그러나, 종양의 크기가 클수록 pRb 단백 발현은 증가하였다(p=0.026, γ=0.263)(Table 3). E2F-1 단백 발현은 42예(58.3%)에서 양성, 30예(41.7%)에서 음성이었고, FIGO 병기(p=0.001, γ=0.384), 종양의 등급(p=0.008, γ=0.308), 세포분열수(p=0.000, γ=0.431)와 뚜렷한 관련성을 보였다(Table 4).

$p16^{INK4a}$ 단백 발현이 pRb 단백 발현과 통계학적으로 유의한 역상관관계를 보였고(p=0.042, γ=0.240), 세포 분열수, Ki-67 표지지수와도 유의한 상관관계를 보였다(p=0.028, γ=0.259). E2F-1 단백 발현 증가는 Ki-67 표지지수의 증가(p=0.000, γ=0.504)와 뚜렷한 상관관계를 보였으나, Rb 경로에 관여하는 $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 단백의 발현과는 상관관계가 없었다(Table 5).

조기 병기(early stage)를 보이는 34예와 진행 병기(advanced stage)를 보이는 38예를 비교한 결과, $p16^{INK4a}$과 cyclin D1은 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나 pRb 단백 발현은 진행 병기인 경우 의미있게 감소하였고, E2F-1 단백 발현은 증가하였다(p=0.002, p=0.000).

Rb 경로 변경이 있는 군이 50예(69.4%), 없는 군이 22예(30.6%)였으며, Rb 경로 변경이 있는 군에서 의미있게 높은 병기를 보였다(p=0.018, γ=0.278)(Fig. 2). 또한 Rb 경로 변경 유무와 E2F-1 단백 발현에 따른 분류에서 1군이 7예(9.7%), 2군이 23예(32%), 3군이 15예(20.8%), 그리고 4군이 27예(37.5%)였는데, 1군과 2군보다 3군과 4군에서 높은 병기(p=0.000, γ=0.431)와 고등급(p=0.014, γ=0.289)에서 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다.

Table 4. Expression of E2F-1 according to clinicopathologic parameters in epithelial ovarian cancer

	E2F-1 expression					Total	p value
	0	1	2	3	4		
	Negative	Positive					
Stage							
I	14	5	5	2	0	26	0.001
II	7	1	0	0	0	8	
III	8	6	8	7	2	31	
IV	1	2	0	3	1	7	
Grade							
I	15	3	4	0	1	23	0.008
II	12	9	7	9	1	38	
III	3	2	2	3	1	11	
Atypia							
1	5	2	1	0	1	9	0.626
2	12	9	5	7	1	34	
3	13	3	7	5	1	29	
Mitoses							
1	18	5	7	0	1	31	0.000
2	12	5	4	6	1	28	
3	0	4	2	6	1	13	
Size							
<10	11	8	5	9	1	34	0.168
≥10	19	6	8	3	2	38	
Total	30	14	13	12	3	72	

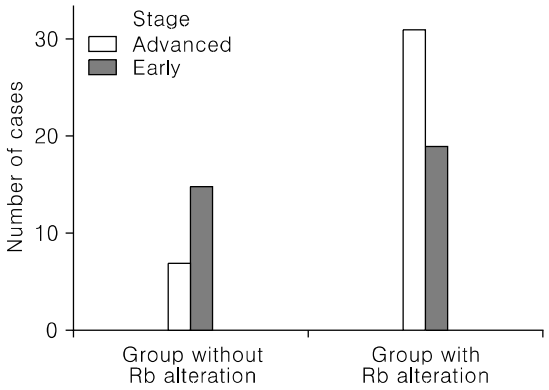

Fig. 2. Association of Rb pathway alteration in epithelial ovarian cancer and tumor stage. early stage (FIGO stage I, II), advanced stage (FIGO stage III, IV).

Table 5. Correlation of expressions of $p16^{INK4a}$, cyclin D1, Rb, E2F-1, and Ki-67 labeling index(LI) in epithelial ovarian cancer

		$p16^{INK4a}$	cyclin D1	Rb	E2F-1	Ki-67 LI
$p16^{INK4a}$	CC	-	-0.090	-0.240	0.205	0.028
	p	-	0.450	0.042	0.085	0.259
cyclin D1	CC	-	-	0.208	-0.100	-0.233
	p	-	-	0.080	0.404	0.087
Rb	CC	-	-	-	-0.007	-0.090
	p	-	-	-	0.955	0.450
E2F-1	CC	-	-	-	-	0.504
	p	-	-	-	-	0.000

CC = Correlation Coefficient (γ)

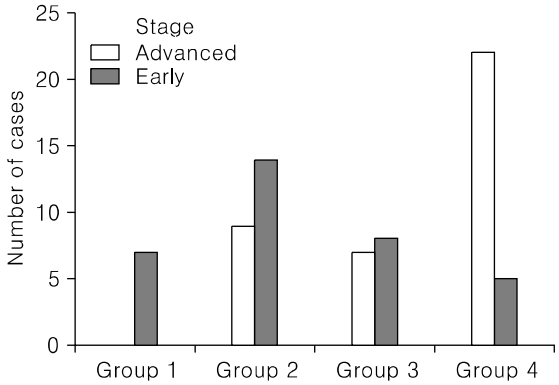

Fig. 3. Association of Rb pathway alteration and E2F-1 expression in epithelial ovarian cancer and tumor stage. early stage (FIGO stage I, II), advanced stage (FIGO stage III, IV). Group 1: negative Rb pathway alteration and negative E2F-1 expression, Group 2: positive Rb pathway alteration and negative E2F-1 expression, Group 3: negative Rb pathway alteration and positive E2F-1 expression, Group 4: positive Rb pathway alteration and positive E2F-1 expression.

이러한 양상은 특히 Rb 경로 변경과 E2F-1 단백 발현을 동시에 보이는 4군에서 더욱 뚜렷하였다(Fig. 3).

고 찰

상피성 난소암에서 pRb 발현 증가가 나쁜 예후와 관련있다는 보고와 함께 pRb 발현 감소로 나쁜 예후를 예측할 수 있어 좋은 예후 인자라고 제안하는 상반된 보고가 있다.[19-21] 이러한 상반된 보고의 원인으로서 첫째, pRb 단백의 면역염색성 소실의 판정 기준(cut-off value)이 완전 소실에서부터 30% 미만인 경우까지로 다양하였고, 둘째, 사용한 항체의 종류가 달랐으며, 셋째 항원성 증가 단계를 포함한 면역조직화학염색 방법이 차이가 있었다. 그러나, 이러한 차이를 고려하더라도 본 연구의 결과를 포함한 상피성 난소암에서 pRb 단백 발현 이상에 대한 보고는 일관되지 않아 상피성 난소암에서 pRb 발현의 역할은 좀 더 확립된 연구가 필요하다고 보여진다. 본 연구에서는 pRb 발현이 전체 상피성 난소암 중 29예(40.3%)에서 소실되는 것과 종양의 등급 및 병기가 높아질 수록 pRb 발현이 의미있게 감소하는 것으로 보아 상피성 난소암에서 pRb 발현이 초기 상피성 난소암의 발생과정과 진행에 관여한다는 것을 지지하고 있다.

$p16^{INK4a}$ 유전자는 염색체 9q21에 위치하며 cyclin D1-CDK4 복합체에 의한 Rb의 인산화를 억제하는 종양억제 유전자로서 그 기능 소실이 암발생에 기여한다.[5] 난소암에서도 $p16^{INK4a}$ 발현의 소실이 11-50%로 보고되어진다.[20-25] 본 연구에서는 25예(34.7%)의 상피성 난소암에서 $p16^{INK4a}$ 소실을 보여 pRb 발현과 역상관관계를 보였는데, 이는 Dong 등[21]의 연구와 일치한다. 그리고 상피성 난소암이 고등급일수록 $p16^{INK4a}$ 발현 증가가 관찰되는데, 이는 $p16^{INK4a}$의 과발현이 난소암에서 나쁜 예후와 관련되어있다는 보고와 일치한다.[24,25] 또한 세포분열수와 Ki-67 표지지수가 $p16^{INK4a}$의 발현 증가와 상관관계가 있었다. Rb 단백의 인산화를 억제하는 $p16^{INK4a}$가 과발현된 것으로 해석되며, pRb 발현과 $p16^{INK4a}$발현이 역상관관계에 있음을 뒷받침하고 있다.

Cyclin D1 유전자는 염색체 11q13에 위치하며 G1에서 S기로의 이행에 필수적인 세포주기 조절 단백이다.[5] Cyclin D1의 과발현은 암의 발생 기전에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 상피성 난소암에서는 면역조직화학염색으로 10-13%에서 cyclin D1의 발현 증가가 보고되고,[6,26,27] 최근 Western blot을 이용하여 상피성 난소암에서 cyclin D1 발현을 검출한 한 연구에서 94.3%의 cyclin D1 발현을 보였고 이는 종양의 병기 및 등급과 상관관계를 보인다고 하여 주목할 만 하지만,[28] cyclin D1의 발현과 상피성 난소암의 임상병리학적 인자들과의 연관성은 밝히지 못하였다. 본 연구에서도 cyclin D1 발현은 10예(13.9%)에서 양성 소견을 보였지만, 여러 가지 임상병리학적 인자들과의 연관성은 보이지 않았다.

이와 같이 상피성 난소암에서 Rb 경로의 변화를 야기하는 $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 단백의 발현에 대한 연구가 다양하게 이루어져 왔지만 이들 각각의 인자들과 임상병리학적 인자들 간의 일관된 결과는 없다. 그러나, Rb 경로를 구성하는 단백 중 한 가지라도 변화된 발현 양상을 보인다면 이는 Rb 경로의 변화를 의미하며 이것은 상피성 난소암의 예후와 관련이 있다.[6,19] Kusume 등[6]은 $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 단백의 발현 양상은 상피성 난소암의 예후와 관련이 없지만, Rb 경로의 변화를 보이지 않는 군에서 Rb 경로의 변화를 보이는 군보다 치료율이 높다고 하였다. 또한 Hashiguchi 등[19]의 연구에서도 Rb 경로의 변화를 보이지 않는 군에서 Rb 경로의 변화를 보이는 군에 비해 생존률이 높았다. 본 연구에서도 Rb 경로의 변화를 보이는 군이 Rb 경로의 변화를 보이지 않는

군에 비해 높은 병기를 보여 이전의 연구들의 결과와 일치된 결과를 보였다. 이는 Rb 경로가 종양에 미치는 영향을 평가할 때 $p16^{INK4a}$, cyclin D1, pRb 단백 각각의 평가보다 이들을 동시에 평가하는 것이 중요하다는 사실을 보여준다.

E2F-1은 Rb 경로의 아래쪽 전사 조절인자(downstream regulator)로 Rb 경로에서 Rb가 인산화되면, pRb/E2F-1 결합체에서 E2F-1이 유리되어 DNA 합성에 필요한 유전자의 전사를 촉진시키고 G1기에서 S기로의 진행을 유도한다. E2F-1과 종양발생에 관한 Hwang 등[8]과 Kim 등[9]의 보고에서 대장암의 경우 암의 병기가 높고 분화도가 나쁠수록 E2F-1 발현이 증가되는 것을 보여주고 있다. 유방암에서도 E2F-1의 발현은 종양의 크기가 크고, 림프절 전이가 있으며, 병기가 진행됨에 따라 E2F-1의 발현이 증가하며, 생존률이 낮게 나타나 예후인자로서의 가치를 보여주고 있다.[13-15] 또한 식도의 편평세포암종에서 E2F-1 발현이 종양의 병기, 림프절 전이 유무와 관련있으며, E2F-1 발현 양성군에서 생존률이 낮아지고, 세포증식지수와 상관관계를 보인다고 보고하였다.[10,11] 그러나, 대장암과 E2F-1 면역염색성에 관한 다른 연구에서는, E2F-1이 대장암에서 세포자멸사에 기여한다고 하였고,[15,29] Rabbani 등[17]은 방광암에서 E2F-1의 종양 억제 역할을 제시하였다. 이와 같이 E2F-1은 세포 증식 또는 세포자멸사를 유도할 수 있고, 이것이 종양의 발생 또는 억제의 역할에 기여한다고 할 수 있으며 이러한 E2F-1의 역할은 조직 및 종양 특이적으로 결정되는 것으로 이해되어지고 있다.

본 연구에서 상피성 난소암의 42예(58.3%)에서 E2F-1 발현 양성을 보였고 이러한 발현은 상피성 난소암의 병기 및 등급과 유의한 상관관계를 보였으며, 특히 암세포의 세포 분열수와 Ki-67 표지지수와 강한 상관관계를 보여, 종양발생 효과(oncogenic effect)와 세포증식과의 관련성을 보여주고 있다.

Rb 단백의 기능 소실에 따른 E2F-1 단백의 전사 인자로서의 역할은 상호 역상관관계에 있음을 알 수 있지만,[12] E2F-1 단백 발현과 Rb 단백 및 Rb 경로의 다른 인자들과의 상관관계가 뚜렷하지 않아 E2F-1 단백 발현이 Rb 경로와 독립적으로 발현될 수 있다고 생각된다.[2,6,9,14] 또한 Rb 단백 역시 E2F-1의 매개 없이 독립적으로 전사 억제의 기능이 있다고 보고되고 있다.[30] 본 연구에서도 E2F-1 발현과 Rb 경로의 변경이 독립적으로 일어나는 2군과 3군이 38예(52.8%)에서 나타나 E2F-1 발현과 Rb 경로의 변경이 이전의 보고들과 같이 독립적으로 일어날 수 있다고 생각되어진다. 그러나 예후와의 연관성은 Rb 경로의 변경이 있고 E2F-1 발현이 동시에 있는 4군에서 뚜렷하므로 Rb 경로를 통한 E2F-1의 발현이 상피성 난소암의 예후에 중요한 영향을 미친다고 생각된다.

본 연구는 상피성 난소암에서 Rb 경로의 변화와 함께 E2F-1의 발현 양상을 면역조직화학염색으로 평가하여 보고하는 것으로, Rb 경로의 변화와 E2F-1 발현이 동반된 경우 진행 병기와 높은 관련성을 보여 이들이 상피성 난소암의 진행에 관련이 있는 것으로 보여진다. 그러나 Rb 경로의 변화와 E2F-1의 발현이 독립적으로 상피성 난소암의 예후에 기여하는 지 여부에 관하여서는 보다 많은 표본들과 보다 많은 임상병리학적 인자들과의 다변량 분석(multivariate analysis)이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Engel J, Eckel R, Schubert-Fritschle G, Kerr J, Kuhn W, Diebold J, et al. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. Eur J Cancer 2002; 38: 2435-45.
2. NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer. JAMA 1995; 273: 491-7.
3. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P, Alsner J, Kirkin AF, Zeuthen J, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. Cancer Res 1996; 56: 5475-83.
4. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. Prog Cell Cycle Res 1995; 1: 9-19.
5. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 1996; 274: 1672-7.
6. Kusume T, Tsuda H, Kawabata M, Inoue T, Umesaki N, Suzuki T, et al. The p16-cyclin D1/CDK4-pRb pathway and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. Clin Cancer Res 1999; 5: 4152-7.
7. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakrayati N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of Rb Pathway Components Are Frequent Events in Patients with Oral Epithelial Dysplasia and Predict Clinical Outcome in Patients with Squamous Cell Carcinoma. Oncology 2005; 68: 314-25.
8. Hwang SI, Lee TJ, Park YG, Ji GC, Lee JH, Chang IT, et al. The immunohistochemical expression of E2F-1 protein and DNA topoisomerase II-α in colorectal cancer and their relationship with clinicopathologic

factors. J Korean Surg Soc 2003; 65: 35-41.
9. Kim SS, Lee TJ, Kim BG, Cha SJ, Park SJ, Lim HM, et al. Expression of p16INK4A, Rb and E2F-1 proteins in colorectal carcinoma. J Korean Surg Soc 2003; 65: 119-25.
10. Yamazaki K, Hasegawa M, Ohoka I, Hanami K, Asoh A, Nagao T, et al. Increased E2F-1 expression via tumour cell proliferation and decreased apoptosis are correlated with adverse prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. J Clin Pathol 2005; 58: 904-10.
11. Ebihara Y, Miyamoto M, Shichinohe T, Kawarada Y, Cho Y, Fukunaga A, et al. Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. Dis Esophagus 2004; 17: 150-4.
12. Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E. Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. Int J Cancer 1999; 17; 535-8.
13. Kim YH, Lim HM, Lee TJ, Park SJ, Cha SJ, Kim BG. The immunohistochemical expression of DNA topoisomerase II-α and E2F-1 in the breast carcinoma and their relationship with clinicopathologic factors. J Korean Surg Soc 2003; 64: 93-100.
14. Kwak KH, Bae BN, Kim KH. Relationship between E2F-1 expression and clinical outcome in node-positive breast cancer. J Korean Surg Soc 2003; 6: 155-60.
15. Zacharatos P, Kotsinas A, Evangelou K, Karakaidos P, Vassiliou LV, Rezaei N, et al. Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. J Pathol 2004; 203: 744-53.
16. Hunt KK, Deng J, Liu TJ, Wilson-Heiner M, Swisher SG, Clayman G, et al. Adenovirus-mediated overexpression of the transcription factor E2F-1 induces apoptosis in human breast and ovarian carcinoma cell lines and does not require p53. Cancer Res 1997; 57: 4722-6.
17. Rabbani F, Richon VM, Orlow I, Lu ML, Drobnjak M, Dudas M, et al. Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 874-81.
18. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. Int J Gynecol Pathol 2000; 19: 7-15.
19. Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Nishimura S, Suzuki T, Kawamura N. Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients. Hum Pathol 2004; 35: 165-75.
20. Tachibana M, Watanabe J, Matsushima Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fujimura M, et al. Independence of the prognostic value of tumor suppressor protein expression in ovarian adenocarcinomas: A multivariate analysis of expression of p53, retinoblastoma, and related proteins. Int J Gynecol Cancer 2003; 13: 598-606.
21. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Cummings MC, Gabrielli BG, Wright GR, et al. Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRB) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer. Int J Cancer 1997; 74: 407-15.
22. Sui L, Dong Y, Ohno M, Goto M, Inohara T, Sugimoto K, et al. Inverse expression of Cdk4 and p16 in epithelial ovarian tumors. Gynecol Oncol 2000; 79: 230-7.
23. Marchini S, Codegoni AM, Bonazzi C, Chiari S, Broggini M. Absence of deletions but frequent loss of expression of p16INK4 in human ovarian tumours. Br J Cancer 1997; 76: 146-9.
24. Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, Gabrielli BG, Cummings MC, Wright RG, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. Int J Cancer 1997; 74: 57-63.
25. Fujita M, Enomoto T, Haba T, Nakashima R, Sasaki M, Yoshino K, et al. Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors. Int J Cancer 1997; 74: 148-55.
26. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res 1994; 54: 6078-82.
27. Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Yee H, Sorich J, Speyer JL, et al. Expression of cell cycle regulators p57 (KIP2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. Hum Pathol 2001; 32: 808-13.
28. Barbieri F, Lorenzi P, Ragni N, Schettini G, Bruzzo C, Pedulla F, et al. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor survival in epithelial ovarian cancer. Oncology 2004; 66: 310-5.
29. Bramis J, Zacharatos P, Papaconstantinou I, Kotsinas A, Sigala F, Korkolis DP, et al. E2F-1 transcription factor immunoexpression is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. Anticancer Res 2004; 24: 3041-7.
30. Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. Nature 1995; 375: 812-5.

Rb pathway alteration and E2F-1 expression in epithelial ovarian cancer

Sung Hee Kim[1], Soo Hyeon Moon[1], Su Il Shin[1], Dong Soo Suh[1], Man Soo Yoon[1], Kyung Un Choi[2]
Departments of Obstetrics and Gynecology[1], Pathology[2], College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Objective : To evaluate the clinicopathological implications of Rb pathway alteration and E2F-1 expression in Epithelial ovarian cancer using immunohistochemical staining.

Methods : Tissue samples (n=72) were collected after staging operation between 1998 and 2004.

Results : In 72 cases, the overall expression of pRb, and E2F-1 were 59.7% (43/72), and 58.3% (42/72), respectively. pRb expression was inversely correlated with stage, histologic grade and mitotic index. E2F-1 expression was correlated with advanced stages, high grade, mitotic index, Ki-67 labeling index (LI).

Conclusion : We suggest that Rb pathway alteration and E2F-1 expression could play roles as a new prognostic factors in Epithelial ovarian cancer.

Key Words : Epithelial ovarian cancer, Rb pathway alteration, E2F-1 expression