

자궁경부종양에서 survivin, caspase 3 및 p53 단백 발현과 Ki-67 표지자수와 비교 분석

차지영¹ · 조태일¹ · 박태양¹ · 소재성¹ · 최세경¹ · 박언섭²

성애병원 산부인과¹, 중앙대학교 의과대학 병리학교실²

목적 : 자궁경부의 상피내종양과 암종의 생물학적 성상과 연관성을 알기 위해 survivin, caspase 3, p53 단백질의 발현 정도와 Ki-67 항체를 이용한 세포 증식능과의 관계를 관찰하였다.

연구 방법 : 인체 자궁경부의 상피내종양(저등급 31예, 고등급 32예)과 침윤성 암종 31예를 대상으로 파라핀 포매조직을 이용하여 survivin, caspase 3, p53 단백, 그리고 Ki-67에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

결과 : 저등급 상피내종양에서 고등급, 그리고 침윤성 암종으로 진행할수록 survivin, p53 단백, 그리고 Ki-67 표지자수는 통계학적으로 유의하게 증가하였다. Caspase 3는 고등급 상피내종양에서 상대적으로 증가하는 경향을 보였다. 저등급과 고등급 상피내종양에서 survivin, caspase 3, 그리고 p53 발현 유무와 Ki-67 표지자수는 관련성이 없었다. 그렇지만 침윤성 암종에서는 p53이 Ki-67 표지자수가 평균값 이상인 군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다.

결론 : 자궁경부의 상피내종양에서 암종으로의 진행에 survivin 단백, p53단백, Ki-67 표지자수의 순차적 상승이 유용한 표지자수가 되며, caspase 3는 저등급 상피내종양에서 고등급 상피내종양의 진행에 caspase 3 과발현이 부분적으로 관여한다고 생각된다. 침윤성 암종에서는 p53이 세포증식능과 연관성이 있었다.

중심단어 : Survivin, Caspase 3, p53, Ki-67, 자궁경부종양

서 론

자궁경부 암종의 전암성병변으로 알려져 있는 자궁경부 상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia; CIN)은 편평상피 기저층에 비정형세포들의 침범정도에 따라 저등급 자궁경부 상피내종양(low grade cervical intraepithelial neoplasia; LGCIN), 고등급 자궁경부 상피내종양(high grade cervical intraepithelial neoplasia; HGCIN)으로 구분되며, 일반적으로 점차 진행되어 악성으로 형질전환이 일어나 자궁경부 암종으로 진행

된다고 알려져 있다. 그렇지만 일부에서는 전암성 병변이 진행하지 않거나 또는 진행되더라도 진행속도가 일정치 않아 종양의 정확한 생물학적 성상을 알기 위해서는 많은 연구가 필요한 실정이다. 결국 전암성 병변에서 악성으로 형질 전환된 세포의 핵심적 특징은 자율적인 세포증식과 사멸회피이며 여기에는 세포증식과 사멸을 조절하는 일련의 기능의 조절이상 이 필연적이다.¹

세포증식에 관여하는 대표적 인자인 Ki-67 항원은 비 히스톤 핵 단백질로 세포주기의 휴지기 세포를 제외한 모든 세포주기에서 발현되는 세포의 증식능을 반영하는 대표적인 단백질이다.² 따라서 Ki-67에 대한 항체로 면역조직화학 염색을 시행하면 종양조직의 증식정도를 객관적으로 판정할 수 있다.

세포증식의 이상뿐만 아니라 세포사멸의 억제로 인한 세포의 수명연장이 악성종양의 발생과 진행에 영향을 미친다고 알려져 있다.¹ 최근 caspase 의존성 및 비의

논문접수일 : 2007년 10월 29일 채택일 : 2008년 2월 11일

교신저자 : 박언섭, 516-756 서울시 동작구 흑석동 221번지
중앙대학교 의과대학 병리학교실
전화 : 02) 820-5679 · 전송 : 02) 813-5387
E-mail : esp@cau.ac.kr

이 논문은 2007년도 중앙대학교 교내학술연구비의 지원에 의해 이루어졌다.

존성 작용기전을 통하여 세포자멸사를 억제하는 새로운 단백질이 발견되었는데 그 중의 하나인 survivin은 가장 대표적인 것으로 세포자멸사의 억제와 더불어 세포주기 중 G2-M기에 발현되어 유사분열방추의 미세관의 활성을 조절한다.³ 따라서 survivin의 과발현은 손상된 세포의 이상 증식을 초래해 발암과정에 관여하며 일부에서는 화학요법으로 유도되는 종양세포의 자멸사를 survivin이 억제시켜 항암치료에 저항을 유발하기도 한다.⁴

Caspase 3는 시스테인 단백질분해군의 일환으로 세포 내에서는 비활성 효소원으로 존재하지만 다양한 자극에 의해 DNA가 손상되면 종양억제 유전자인 p53이 발현되고 그에 따라 caspase 3가 활성화되어 세포자멸사 신호전달에 중요한 조절자로 작용하며 최근에는 전암성 병변이나 암종에서 caspase 3의 이상발현에 의한 세포자멸사의 억제가 암화과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁵

한편 wild-type p53 유전자는 세포주기와 세포자멸사를 조절하는 대표적 종양 억제 유전자로, 그 유전적 산물인 p53 단백질은 손상된 세포를 세포주기 중 G1기에 머물게 하여 손상된 DNA를 복구시킨다. 그렇지만 DNA의 손상이 심할 경우엔 실행 caspase 3에 의해 유도된 엔도뉴클리아제를 활성화시켜 세포자멸사가 유도된다. 또한 p53 단백질은 survivin 유전자의 전사를 억제시키는 것으로 보고되어 있는데, p53의 기능상실이 인체의 다양한 악성종양에서 survivin의 과발현을 유도시킨다는 보고도 있다.⁶

자궁경부 암종에서 Ki-67에 대한 연구는 자궁경부 상피내종양의 이형성 정도와 연관성이 있어 상피내종양의 등급결정 뿐만 아니라 암종으로의 진행에 대한 예측인자로 효과적으로 활용될 수 있다.⁷ 또한 Survivin과 caspase 3, 그리고 변이형 p53 단백질의 발현은 자궁경부 상피내종양과 암종에서의 발현양상은 연구자에 따라 다르게 보고되어 있고, 각 병변에서 Ki-67 표지인자와의 비교는 보고되어 있지 않았다.

이에 저자들은 생검이나 수술적으로 절제한 자궁경부의 상피내종양과 침윤성 편평세포암종에서 survivin, caspase 3, 그리고 p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 실시하고, 자궁경부 병변의 각 단계에서 어떻게 발현되는지를 알아보고자 하였다. 또한 이들 단백질의 발현과 Ki-67을 이용한 세포증식능과 비교하여 상피내암종에서

악성종양으로의 진행에 관련된 예측인자로의 유용성을 확인하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

2002년 3월부터 2007년 3월까지 중앙대학교병원에서 자궁경부의 편치생검, 원추생검으로 획득한 저등급 자궁경부 상피내종양(LGCIN) 32예, 고등급 자궁경부 상피내종양(HGCIN) 31예, 침윤성 편평세포암종으로 자궁적출술을 받은 31예 중 파라핀 보관상태가 좋은 포매 조직을 이용하였다.

2. 연구방법

1) 면역조직화학 염색

파라핀 포매조직을 두께 4-5 μm 으로 절편으로 박절하고 xylene으로 파라핀을 제거시킨 후 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 조직 절편에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고, 절편을 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세 후 비특이적 항원을 제거하기 위해 30분간 염소 혈청과 반응시키고 여분의 용액을 제거하였다. 일차항체로 Ki-67 (clone MIB-1, 1 : 100, DAKO Co, USA), p53 (clone s95, 1 : 100, Lab vision Co, USA), survivin (clone Ab-6, 1 : 100, Labvision, USA), 그리고 caspase-3 (clone ab 4051, 1 : 50, Abcam, USA) 단일 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시키고, TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체(Zymed, South San Francisco, CA, USA)를 작용시킨 후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시켰다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)를 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하여 glycerol gelatin으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 면역조직화학 염색 판독

Survivin, caspase 3, 그리고 p53 단백질은 각 병변에서 염색되는 세포의 수가 10% 이상에서 강하게 염색되는 경우를 양성으로 판정하여 양성군과 음성군으로 분류하였다. Ki-67은 저배율에서 염색이 잘 된 부위 세 군데를 선

택한 다음 고배율($\times 400$)에서 종양세포 1000개 이상을 세어 염색된 핵의 수의 백분율을 구하여 Ki-67 표지자수로 나타내었다.

3) 통계학적 분석

자궁경부 상피내종양과 침윤성 암종에서 survivin, p53, caspase 3 단백 발현은 Chi-square test를 통한 경향분석을 실시하였고, 분류된 병변에 따른 Ki-67 표지자수의 차이를 보기 위해 ANOVA를 시행하였고 Tukey법을 사용하여 사후 검정을 실시하였다. 또한 분류된 각각의 자궁경

부 상피병소에서 Ki-67 표지자수에 따른 survivin, p53과 caspase 3 단백발현의 차이는 student t-test를 실시하였다. 모든 분석은 Window용 SPSS (version 12.0) 통계 프로그램을 이용하여 p값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. Survivin, caspase 3, 그리고 p53 단백 발현
자궁경부 상피내종양(CIN)과 침윤성 암종(squamous

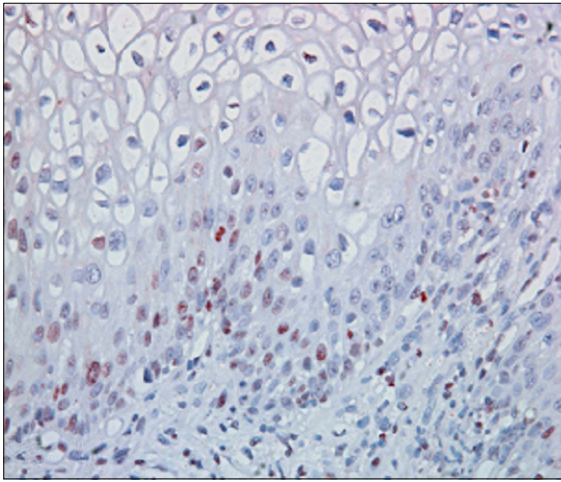


Fig. 1. A low-grade cervical intraepithelial neoplasia showing survivin-positive cells scattered in the lower third of cervix ($\times 200$).

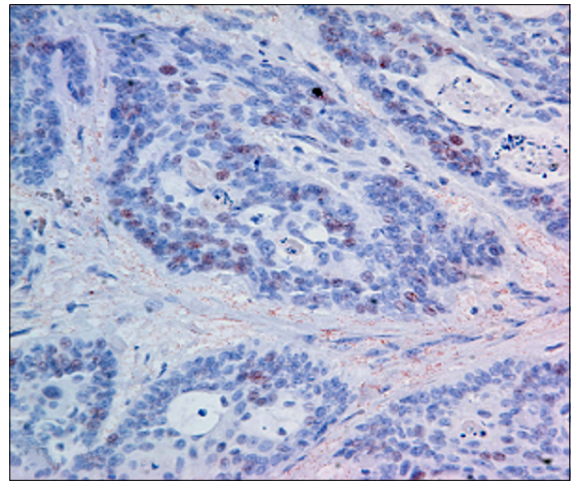


Fig. 3. Nuclear immunoreactivity of p53 in a poorly differentiated invasive squamous cell carcinoma of cervix ($\times 200$).

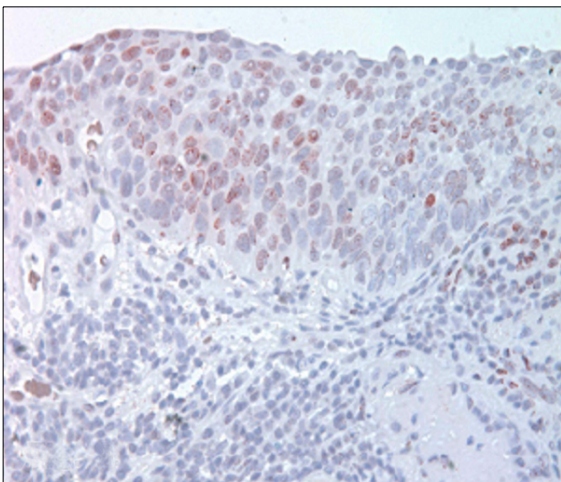


Fig. 2. A high-grade cervical intraepithelial neoplasia showing nuclear and cytoplasmic staining of caspase 3 ($\times 200$).

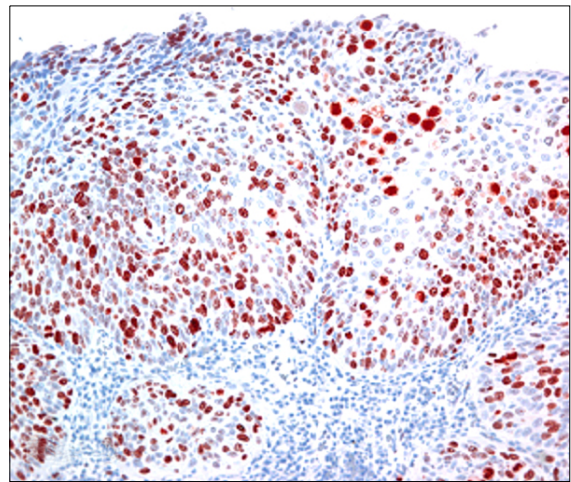


Fig. 4. Immunostaining of Ki-67 showing nests of squamous cell carcinoma ($\times 200$).

cell carcinoma; SCC)에서 survivin 단백질에 대한 염색 결과는 저등급 CIN에서는 32예 중 14예(43.7%), 고등급 CIN 병변에서는 30예 중 18예(60%), 침윤성 암종에서는 31예 중 22예(70.9%)의 발현율을 보여 전암성 단계에서 암종으로 진행할수록 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였다(Fig. 1, $p=0.019$). Caspase 3는 저등급 CIN에서는 32예 중 4예(12.5%), 고등급 CIN에서는 30예 중 16예(53.3%), 침윤성 암종에서는 31예 중 11예(35.5%)가 양성으로 나타나 저등급에서 고등급으로 진행할 경우 발현이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2, $p=0.051$). p53 단백질에 대한 염색결과는 저등급 CIN에서는 32예 중 6예(18.7%), 고등급 CIN에서는 30예 중 12예(37.5%), 침윤성 암종에서는 31예 중 16예(51.6%)에서 발현되어 편평상피내종양에서 암종으로 진행되는 과정에서 통계학적으로 유의하였다($p=0.042$, Fig. 1-3, Table 1).

2. 자궁경부 상피내종양과 침윤성 암종에서 Ki-67 표지 지수

자궁경부 CIN과 침윤성 암종에서 Ki-67 표지지수는 저등급 CIN에서는 6-23.3% (평균값 $13.6\pm 4.7\%$)까지 염

Table 1. Expression of survivin, caspase 3 and p53 protein in the squamous neoplasia of uterine cervix

Histologic diagnosis	No	No (%) of positive cases		
		Survivin	Caspase 3	p53
Low-grade CIN	32	14 (43.7)	4 (12.5)	6 (18.7)
High-grade CIN	30	18 (60.0)	16 (53.3)	7 (23.3)
Invasive SCC	31	22 (70.9)	11 (35.4)	13 (41.9)
p value		0.019	0.051	0.042

CIN; cervical intraepithelial neoplasia, SCC; squamous cell carcinoma

Table 2. Ki-67 index in the squamous neoplasia of uterine cervix

Histologic diagnosis	No	Ki-67 index mean \pm S.D. (%)
Low-grade CIN	32	13.6 ± 4.7 (6~23.3)
High-grade CIN	30	34.7 ± 14.3 (11.5~61)
Invasive SCC	31	66.5 ± 20.9 (23.2~90.5)
p value		0.000

CIN; cervical intraepithelial neoplasia, SCC; squamous cell carcinoma

색되었고, 고등급 CIN에서는 11.5-61% (평균값 $34.7\pm 14.3\%$)이었다. 또한 침윤성 암종에서는 23.2-90.5% (평균값 $66.5\pm 20.9\%$)로 분류된 병변이 Ki-67 표지지수는 유의한 차이가 있었다($p=0.000$, Fig. 4, Table 2).

3. 저등급 및 고등급 자궁경부 상피내종양과 침윤성 암종에서 survivin, caspase 3 그리고 p53 단백질 발현에 따른 Ki-67 표지 지수와의 관계

저등급 CIN에서 survivin, caspase 3, 그리고 p53 양성군과 음성군에서 Ki-67 표지 지수를 비교한 결과, 각각 13.30 ± 5.19 , 14.09 ± 3.75 ; 12.78 ± 5.59 , 13.98 ± 4.25 ; 13.00 ± 2.06 , 13.70 ± 5.14 으로 survivin, caspase 3, 그리고 p53 발현 유무에 따른 Ki-67 표지 지수의 차이는 없었다(Table 3). 또한 고등급 CIN에서 survivin, caspase 3, 그리고 p53 양성군과 음성군에서 Ki-67 표지 지수는, 각각 36.66 ± 15.39 , 30.14 ± 11.91 ; 35.19 ± 12.43 , 32.43 ± 15.45 ; 38.41 ± 13.28 ,

Table 3. Relationship between Ki-67 labelling index and survivin, caspase 3, and p53 in low grade cervical intraepithelial neoplasia

Expression state	Ki-67 index	p value
Survivin (n=32)		0.659
Positive (n=14)	13.30 ± 5.19	
Negative (n=18)	14.09 ± 3.75	
Caspase 3 (n=32)		0.500
Positive (n=4)	12.78 ± 5.59	
Negative (n=28)	13.98 ± 4.25	
p53 (n=32)		0.747
Positive (n=6)	13.00 ± 2.06	
Negative (n=26)	13.70 ± 5.14	

Table 4. Relationship between Ki-67 labelling index and survivin, caspase 3, and p53 in high grade cervical intraepithelial neoplasia

Expression state	Ki-67 index	p value
Survivin (n=30)		0.237
Positive (n=18)	36.66 ± 15.39	
Negative (n=12)	30.14 ± 11.91	
Caspase 3 (n=30)		0.628
Positive (n=16)	35.19 ± 12.43	
Negative (n=14)	32.43 ± 15.45	
p53 (n=30)		0.071
Positive (n=7)	38.41 ± 13.28	
Negative (n=23)	28.87 ± 14.12	

Table 5. Relationship between Ki-67 labelling index and survivin, caspase 3, and p53 in squamous cell carcinoma of uterine cervix

Expression state	Ki-67 index	p value
Survivin (n=31)		0.634
Positive (n=22)	68.52±20.50	
Negative (n=9)	63.94±27.68	
Caspase 3 (n=31)		0.431
Positive (n=11)	65.62±22.42	
Negative (n=20)	72.85±20.73	
p53 (n=31)		0.000
Positive (n=13)	74.50±17.73	
Negative (n=18)	43.44±17.77	

28.87±14.12으로 나타나 저등급 CIN에서와 마찬가지로 통계적 유의성은 없었다(Table 4). 침윤성 암종에서 survivin 양성인 22예와 음성인 9예의 Ki-67 표지자수를 비교한 결과, 각각 68.52±20.50, 63.94±27.68이었고, caspase 3 양성군과 음성군에서는 각각 65.62±22.42, 72.85±20.73으로 나타나 음성군에서 상대적으로 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그렇지만 Ki-67 표지자수는 p53 양성군에서 74.50±17.73, 음성군에서는 43.44±17.77로 나타나 두 인자간의 밀접한 연관성을 보였다(p=0.000, Table 5).

고 찰

본 연구는 자궁경부의 전암성 병변으로 알려진 CIN과 침윤성 암종의 생물학적 성상을 알아보기 위해 각각의 병변에서 세포자멸사 조절인자인 survivin, caspase 3, 그리고 돌연변이형 p53 단백질의 발현을 관찰하였다. 아울러 종양성 병변의 진행도와 밀접한 관련이 있는 세포증식 표지자인 Ki-67 지수와 상관관계를 비교 분석하였다.

Survivin은 세포자멸사를 억제시키는 단백질로 세포자멸사를 억제하는 기전으로는 첫째, 세포자멸사 과정에 작용하는 효소인 caspase 3과 caspase 9의 활성을 직접 억제하거나⁸ 둘째, 세포주기 조절인자인 CDK4와 결합하여 survivin-CDK4 복합체를 형성하여 caspase 3를 간접적으로 억제하여 세포자멸사를 차단한다고 알려져 있다.⁹ 종양발생과정에서 survivin의 역할은 대장암의 경우 샘종의 저등급에서 고등급 이형성의 샘종, 그리고 암종으로 진행할수록 의미 있게 증가되었고,¹⁰ B형 간염바이

러스 산물인 X 단백질(HBX)이 간암발생과정에서 survivin의 발현을 증대시킨다는 연구결과는¹¹ 암형성 과정에서 지속적으로 survivin의 기능이 있음을 시사하는 소견이라 생각된다. 자궁경부종양에서 survivin의 발현은 정상에서는 전혀 발현되지 않고 자궁경부 상피내종양과 상피암종에서 survivin의 발현은 저등급 CIN에서 60%, 고등급 CIN에서는 81%, 그리고 침윤성 암종에서는 99%의 발현을 보여 발암과정의 초기부터 관여하며, 특히 survivin 발현이 사람 유두종바이러스 고위험군과 관련이 있다고 하였다.¹² 또한 survivin은 상피내종양에서 78%, 침윤성 암종에서 100% 발현된 점으로 보아 자궁경부암 발생과정에 survivin의 이상 발현이 주 역할을 한다고 하였다.¹³ 그렇지만 일부에서는 survivin을 이용한 면역조직화학 염색에서 저등급 CIN에서 80%, 고등급 CIN에서는 60%, 그리고 편평상피암종에서는 오히려 발현이 40%에서 발현을 보여 종양이 진행할수록 발현이 감소된다는 상반된 연구결과도 있다.¹⁴ 이렇게 발현율의 차이를 보이는 것은 연구자들에 따라 양성에 대한 판정기준이 20% 이상¹³, 단순히 국소적으로 5% 이상에서 약 반응을 보이는 경우에도 양성으로 판정하는^{12,14} 등 평가 방법에 의한 차이뿐만 아니라, 사용한 일차항체의 항원결정부위의 차이 등이 있을 것으로 생각되었다. 본 연구에서는 그 중간단계인 10% 양성세포를 양성으로 판정한 결과 저등급 CIN에서 43.7%, 고등급 CIN에서는 60%, 그리고 편평상피암종에서는 70.9%로 병변이 진행할수록 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 자궁경부 상피내종양의 등급이 진행할수록 survivin은 세포자멸사 억제를 통해 자궁경부암종의 발달에 관여함을 의미한다고 생각되었다.

Caspase 3는 caspase 계열 중 Fas 매개 세포자멸사에 가장 중요한 역할을 하며, 정상 세포의 세포질에 전효소 형태로 존재해 있으며 Fas 자극에 의해 단백질분해되거나 어떤 경우에는 스스로 단백질분해과정으로 거쳐 활성화되면서 세포자멸사 과정을 진행시킨다.¹⁵ 전암성 병변이나 암종에서 Caspase 3의 발현은 활성형 또는 비활성형에 따라 다양하게 발현되는 것으로 보고되어 있다. 유방의 경우 Caspase 3 발현은 전암성 병변에서 침윤성 암종으로 진행할수록 증가하고 세포자멸사 정도와 유의한 연관성이 있어서 caspase 3가 유방암종의 진행에 관여한다고 연구도 있다.¹⁶ 본 연구에서는 저등급 CIN에서 cas-

pase 3 발현은 12.5%, 고등급 CIN 53.5%, 그리고 침윤성 암종에서는 35.4%의 발현을 보였다. 그렇지만 caspase 3의 발현이 저등급 SIL에서 73%, 고등급 CIN에서 95%, 그리고 침윤성 암종에서는 77%의 발현을 보고하여¹⁷ 본 연구에 비해 상대적으로 발현율이 높았다. 이러한 차이는 일차항체가 다클론항체이기 때문에 발현이 상대적으로 증가할 수 있다고 생각되었다. 본 연구에서 상대적으로 고등급 CIN에 비해 침윤성 암종에서 caspase 3 발현이 감소되었는데 이것에 대한 해석은 고등급 CIN에서는 악성종양으로 형질전환이 본격적으로 일어나 부적절한 변이세포의 제거를 위해 caspase 3 합성이 증가하고 세포자멸사가 많음을 나타낸다 할 수 있고, 침윤성 종양에서 고등급 CIN에 비해 상대적으로 caspase 3의 발현이 저해지는 것은 악성으로 진행함에 따라 세포증식을 극대화시키고 이러한 세포의 생존능력을 증가시키기 위해 세포자멸사를 선택적으로 차단하기 때문으로 생각된다.

p53 유전자는 사람의 악성종양에서 가장 흔히 변이되는 유전자로 주 기능은 세포주기와 세포자멸사를 조절한다. 유전자 산물인 p53 단백질은 손상된 세포 DNA의 정상으로 복구와 경우에 따라 손상이 심한 경우 계획된 세포자멸사를 유도함으로써 변이세포의 반복적인 복제에 의한 종양발생을 억제시킨다.¹⁸ 따라서 발암과정이나 암의 진행과정에 p53 조절기능의 상실로 인한 유전적 불안정성이 주 요인이다. 항원-항체를 이용한 면역조직화학염색으로 검출되는 p53 단백질은 대부분의 경우 p53 유전자의 과오돌연변이로 생성된 돌연변이형 p53 단백질이 정상 야생형 p53보다 안정한 상태로 있어서 세포 핵내에 축적되어 관찰되는 경우와, 다른 하나는 외부 자극에 의해 DNA 손상이 있을 경우 생리적 반응으로 p53 단백질이 핵내에서 증가하는 경우이다.¹⁹ 자궁경부 암종에서의 발암현상은 인간 유두종 바이러스와 밀접한 관련이 있는데, 고위험형인 HPV 18형의 유전자 산물인 E6 종양단백이 E3 ubiquitin ligase인 E6AP와 상호 작용하여 p53 단백질의 분해를 촉진시켜 돌연변이와 같은 효과를 나타낸다.^{19,20} 또한 최근에는 E6 유전자산물이 p53 유전자와 독립적으로 혈관내피세포성장인자(VEGF) 발현을 조절하여 저등급에서 고등급, 그리고 침윤성 암종으로 진행시킨다는 보고도 있다.²¹ 자궁경부의 편평세포암종이나 CIN에서 p53 발현에 관한 연구는 연구자에 따라 다양하고 반대되는 보고도 있다. Lie (1999) 등은 고등급 CIN에

서는 30%에서 p53에 국소적으로 발현되었고 발현 정도와 사람 유두종 바이러스 감염은 무관하다고 하였다.²² 또한 Holm (1993) 등은 자궁경부 상피내종양에서 p53 단백질 발현이 음성으로 나타났기 때문에 p53 단백질 발현이 자궁경부 암종의 초기변화는 아니라고 주장하였다.²³ 그렇지만 Chen과 Looi (2002) 등은 p53 단백질 발현은 저등급 CIN에서 100%, 고등급 CIN에서는 74.2%, 그리고 침윤성 암종에서는 70.1%에서 발현되었고, 저등급 CIN에서 더 발현이 높은 것은 고등급 CIN과 침윤성으로 진행하면서 E6 단백질에 의한 p53 단백질이 파괴되는 것으로 해석하였다.²⁴

본 연구에서 p53 단백질 발현은 저등급 CIN에서 18.7%, 고등급 CIN에서는 23.3%의 발현, 침윤성 암종에서는 41.9%의 발현율을 보여 기존의 연구결과와^{25,26} 유사하였다. 이와 같이 자궁경부 상피내병변과 침윤암에서 p53 표현이 다른 이유는 사람 유두종 바이러스 감염 여부, E6 종양단백에 의한 p53 단백질 파괴 정도, 또한 검체 고정 시간 등에 의한 항원의 표출성 정도, 사용한 항체의 등 다양한 원인이 있을 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 점들을 종합하여 볼 때 자궁경부의 전암성 병변과 암종에서 p53 단백질은 연관성이 있으나 침윤성 암종으로 이행과의 상관관계는 불분명하며 p53 유전적 변이 이외에 다른 요인들도 관여하는 것으로 생각된다.

Ki-67은 핵내 단백질로 G0와 초기 G1기를 제외한 모든 세포주기에서 발현되며 세포의 증식능을 반영한다.⁷ 자궁경부 편평상피종양에서 Dellas (1997) 등은 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급이 높을수록 비례적으로 Ki-67 표지指수가 증가하며,²⁷ Kruse (2001) 등은 Ki-67은 CIN의 등급과 유관하게 나타나는 표지指수라고 하였다.⁷

본 연구결과 평균 Ki-67 표지指수값은 저등급 CIN에서 13.6%, 고등급 CIN에서는 34.7%, 그리고 침윤성 암종에서는 66.5%로 종양으로 진행할수록 통계적으로 유의하게 증가하였다.

Survivin, caspase 3, 그리고 p53 단백질 발현 유무에 따른 Ki-67 표지 指수값을 분석한 결과 저등급 CIN 군과 고등급 CIN에서 survivin, caspase 3, 그리고 p53 발현 유무와 Ki-67 표지指수의 차이는 없었다. 또한 침윤성 암종에서도 survivin과 caspase 3 발현과 Ki-67 표지 指수와는 상관관계가 불분명할 것으로 미루어 survivin

과 caspase 3의 발현 여부는 세포의 증식력과 관련이 없는 것으로 생각되었다. p53단백에 양성인 군은 침윤성 암종에서 Ki-67 표지자수가 음성인 군에 비해 통계적으로 유의하게 한 상관관계를 보였는데 이는 Bar (1996) 등이 보고한 결과와 일치하였다.²⁸ 이러한 결과로 p53 유전자의 돌연변이는 암으로 형질 전환된 세포의 증식을 억제하지 못하기 때문에 Ki-67 표지자수가 증가할 것으로 추정할 수 있으며, 따라서 종양의 악성도를 반영하는 보조수단으로 의의가 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab V, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
- Altieri DC, Marchisio C. Survivin apoptosis: An interrelation between cell death and cell proliferation in cancer. *Lan Invest* 1999; 79: 1327-33.
- Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1076-81.
- Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1984-8.
- Miraz A, McGuirk M, Hockenbery TN, Wu Q, Ashar H, Black S. Human survivin is negatively regulated by wild type p53 and participates in p53 dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2613-22.
- Kruse AJ, Baak JP, Jansen EA, Kjelleveid KH, Lovsiet K, Bergh J, et al. Ki-67 predicts progression in early CIN. Validation of a multivariate progression risk mode. *Cell Oncol* 2004; 26: 13-20.
- Sela B. Survivin: Anti-apoptosis proteins and a prognostic markers for progression and recurrence. *Harefuah* 2002; 141: 103-7.
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-5.
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiyang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 974-7.
- Zhang X, Dong N, Yin L, Cai N, Ma H, You J. Hepatitis B virus X protein upregulates survivin expression in hepatocellular tissues. *J Med Virol* 2005; 77: 374-81.
- Branca M, Giorgi C, Santini D, Bonito LD, Ciotti M, Costa S, et al. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 113-21.
- Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of survivin and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res* 2002; 22: 805-8.
- Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Enomoto T, Gianani R, Thomson LC, et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 738-44.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvasen G, Thornberry NA, Wong WW. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-6.
- Vokkala M, Paakko P, Soini Y. Expression of caspase 3, 6, and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer* 1999; 81: 592-9.
- Cheung TH, Chung TK, Lo KW, Krajewski S, Reed JC, Wong YF. Apoptosis-related proteins in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2002; 86: 14-8.
- Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: Can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 1994; 172: 1-4.
- Wells SI, Aronow BJ, Wise TM. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papilloma virus-positive cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7093-8.
- Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanism of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 2007; 98: 1505-11.
- Clere N, Belmont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, et al. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces vascular endothelial growth factor 121 transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Exp Cell Res* 2007; 313: 3239-50.
- Lie AK, Skarsvarg S, Skomedal H, Haugen OA, Holm R. Expression of p53, MDM2, and p21 proteins in high-grade cervical intraepithelial neoplasia and relationship to human papilloma virus infection. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 5-11.
- Holm R, Skomedal H, Helland A, Kristensen G, Boresson AL, Nesland JM. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant and malignant tissue of cervix uteri. *J Pathol* 1993; 169: 21-6.
- Chen PL, Looi LM. p53 immunohistochemical expression: Message in cervical carcinogenesis. *Pathology* 2002; 34: 326-31.
- Carrilho C, Gouveia P, Cantel M, Akbeto M, Buane L, David L. Characterization of human papillomavirus infection, p53 and Ki-67 expression in cervix cancer of Mozambican women. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 303-11.

26. Ikuta A, Saito J, Mizokami T, Nakamoto T, Yasuhara M, Nagata F, et al. Correlation p53 expression and human papilloma virus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical cancer. *Cancer Detet Prev* 2005; 29: 528-36.
27. Dellas A, Schulthesis E, Holzgreve W, Oberholzer M, Torhours J, Gudat F. Investigation of the bcl-2 and c-myc exprssion in relation to the Ki-67 labelling index in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 212-8.
28. Bar JK, Harlozinska A, Markowska J, Nowak M. Studies on tumor proliferation using monoclonal antibody, Ki-67 and expression of p53 in cancer of the uterine cervix. *Eur J Gynecol Oncol* 1996; 17: 378-80.

=ABSTRACT=

Analysis of expression of survivin, caspase 3, and p53 protein in cervical neoplasia comparing with Ki-67 index

Ji-Young Cha¹, Tai-Il Cho¹, Tae-Yang Park¹, Jae-Sung So¹, Se-Kyoung Choi¹, Eon-Sub Park²

Department of Obstetrics and Gynecology, Sungae Hospital¹, Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University², Seoul, Korea

Objective : The aim of this study was to determine the role of survivin, caspase 3, p53 and Ki-67 expression in the carcinogenesis of cervical carcinoma and aggressiveness of cervical intraepithelial neoplasia (CIN).

Methods : The pathology specimens of 94 patients with a diagnosis of Low grade CIN (31 cases), High grade CIN (32 cases) and squamous cell carcinoma (31 cases) were evaluated immunohistochemically for the expression of survivin, caspase 3, p53 and Ki-67 in paraffin sections.

Results : Survivin, p53 and Ki-67 expressions were progressively increased in accordance with the increasing degree of malignancy, but caspase 3 immunoreactivity was higher in high grade CIN than in low grade CIN and invasive cervical cancers. There was no significant difference between Ki-67 index and survivin, caspase 3 and p53 expression with the increasing degree of malignancy. The Ki-67 index was closely related to p53 overexpression in invasive cervical carcinoma group.

Conclusion : A sequential increase of survivin, p53, and Ki-67 was observed in paralleling the progression of grade of CIN and cervical cancer. In addition, caspase 3 expression increased proportionally to the low-grade CIN to high grade CIN.

Key Words : Survivin, Caspase 3, p53, Ki-67, Cervical neoplasia

Address reprint requests to Eon-Sub Park
Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University
221, Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 516-756, Korea
Tel : 82-2-820-5679, Fax : 82-2-813-5387, E-mail : esp@cau.ac.kr