

## 침윤성 자궁경부암에서 annexin II의 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실  
문 혜 성 · 이 유 선 · 정 혜 원

**목적** : Annexin II는 암의 전이와 진행에 관여하는 인자로서, 자궁경부암에서 annexin II의 발현에 관하여 알아보고자 하였다.

**연구 방법** : 33예의 침윤성 자궁경부암 환자와 11예의 자궁경부상피내종양 환자, 11예의 정상 자궁경부 조직에서 QC-PCR과 western blot analysis를 이용하여 annexin II mRNA와 protein의 발현을 비교하였다.

**결과** : 자궁경부암에서의 annexin II mRNA의 발현은 정상 자궁경부, 자궁경부상피내종양에 비해 통계적으로 유의하게 높았으며, 나이, 임상병기, 조직병리학적 유형, 암종의 크기, 림프절 전이, SCC-Ag 농도에 따라서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Annexin II 단백질은 정상 자궁경부와 자궁경부상피내종양보다 자궁경부암에서 높게 발현되었으며 임상병기가 진행될수록 발현이 감소하는 양상을 보였다.

**결론** : Annexin II mRNA 및 단백질의 과발현은 자궁경부암의 진행과 관련이 되고, 자궁경부암의 암화과정의 생물학적인 표지자로 가능성이 제시되어질 수 있을 것으로 사료된다.

**중심단어** : 자궁경부암, Annexin II

## 서론

맥관형성(angiogenesis)과 전이(metastasis)는 암의 진행에서 가장 중심이 되는 두 과정이다.<sup>1</sup> 맥관형성은 기존의 혈관에서 신생혈관이 형성되는 과정으로 이 과정은 내피세포의 이동, 증식, 분화와 함께 세포의 기질의 단백질 분해과정 등의 다양한 과정에 의해 일어나며, 암의 성장과 영양 제공에 중요한 역할을 담당한다.<sup>2</sup> 이러한 맥관형성 단계는 자궁경부암을 포함한 고형성 종양의 성장 및 전이에 있어 매우 중요한 과정이며, 종양세포 및 종양 주위의 기질세포에서 분비되는 다양한 세포외 기질을 분해하는 다양한 단백질 분해효소 및 맥관형성 인자들이 관여하여 혈관내피세포의 증식과 이동을 유

도, 신생혈관을 유도한다.<sup>3</sup>

자궁경부암은 진행된 병기와 림프절 전이 등과 같이 나쁜 예후 인자들의 유무에 따라서 생존율이 달라진다. 세포의 증식, 세포외기질의 분해에 관여하는 인자, 세포 부착분자, 단백질분해효소와 다양한 사이토카인 등이 암의 진행에 관여하게 된다.<sup>4-9</sup> 암의 진행에 관여하는 단백질 및 인자들에 대한 연구가 되고 있으나 자궁경부암의 침윤과 전이에 관여하는 유전자나 단백질에 대한 연구는 아직 활발치 않은 상황이다.

암의 침윤은 암세포로 인하여 정상조직의 재형성과정에 장애가 생기는 과정으로, 복잡한 단백질분해효소들이 세포외기질을 분해하는 것이 암의 침윤에서 중요한 과정이다.<sup>10</sup> 여기에 관여하는 단백질 분해효소로는 plasminogen activator system, metalloproteinase, cysteine proteinase 등이 존재하는데, plasminogen/plasmin system이 이 효소들 중에서도 주요한 성분을 구성한다. Plasminogen은 plasminogen activator에 의해 분해되어 plasmin을 형성하게 되고 여기서 생성된 plasmin은 여러 가지 경로로 맥관형성을 촉진시킨다.<sup>11</sup> Plasmin은 세포외 기질에

논문접수일 : 2006년 12월 11일 채택일 : 2007년 1월 30일

교신저자 : 문혜성, 158-710 서울시 양천구 목동 911-1

이화여자대학교 의과대학 목동병원 산부인과

전화 : (02) 2650-5033 · 전송 : (02) 2647-9860

E-mail : mhsmhs@ewha.ac.kr

본 연구는 학술진흥재단의 지원에 의하여 이루어진 것임(KRF 2005-042-E0081).

결합되어 있던 bFGF (basic fibroblast growth factor)와 같은 성장인자들을 유리시키고 TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) 및 내피세포 분화인자들을 활성화시키게 된다.<sup>12</sup> 또한 laminin, fibronectin, proteoglycan과 같은 기질을 분해시키고, 맥관형성을 촉진하는 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다.<sup>13</sup> 이러한 과정을 통해 맥관형성, 세포침입, 세포이동 등이 촉진되게 된다.<sup>14</sup> 이 과정에서 annexin II는 plasminogen 및 tissue-type plasminogen activator의 수용체로서 작용하여 plasmin의 형성을 매개하는 단백질이기 때문에 암의 진행과 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>1</sup> 최근의 연구들에서 annexin II는 세포의 증식, 맥관형성과 암세포의 침입을 자극한다고 알려지고 있으며<sup>15-17</sup> 따라서 고형성 암에서 annexin II의 발현이 중요한 역할을 할 것으로 생각되어지고 있다.

이에 본 연구에서는 정상 자궁경부와 자궁경부상피내종양, 자궁경부암조직에서 Annexin II mRNA와 protein의 발현을 연구함으로써 Annexin II mRNA와 protein의 발현이 자궁경부암의 암화과정에 관여하는지를 알아보고자 하였으며 또한 자궁경부암에서의 Annexin II mRNA 발현이 임상적 병기나 조직학적 유형, 림프절 전이, SCC-Ag 수치들과 같은 예후인자와 상관관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1999년 9월부터 2002년 3월까지 이화의료원 부속 목동병원을 내원한 환자 중 조직병리학적 검사에 의해 침윤성 자궁경부암으로 진단 받은 환자 33예와 11예의 자궁경부상피내종양 조직, 11예의 정상자궁경부 조직을 대상으로 하였다. 조직은 자궁 경부 병변이 아닌 자궁근

종이나 난소질환으로 자궁적출술을 시행한 환자에서 정상 자궁경부 조직을 채취하였고 자궁경부상피내종양이나 자궁경부암으로 진단받은 여성에서 자궁경부 암조직은 조직생검, 원추생검술, 광범위 자궁적출술 등의 수술을 시행할 때 자궁경부상피내종양 조직이나 자궁경부암 조직을 채취하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) RNA와 protein 추출

정상 자궁경부, 자궁경부상피내종양 및 경부암 생검 조직에서 다음과 같이 전체 RNA와 protein을 분리하였다. 조직의 혈액제거를 위하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 조직 100 mg당 1 ml의 RNA-STAT-60 (Tel-Test "B" Inc., Friendswood, TX)를 넣은 후 균질화하였다. RNA-STAT-60 1 ml당 500  $\mu$ l의 chloroform을 넣고 원심분리 후 상층액을 채취하여 isopropanol 500  $\mu$ l에 넣어 침전시킨 후 침전물을 75% ethanol로 한번 세척한 후 공기중에서 말려 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 물에 녹였다. RNA의 순도 및 양은 분광광도 분석기로 측정하였다. 조직을 sonicator로 분쇄하여 4°C lysis buffer (Introne, Korea)에 30분간 반응시킨 후 원심분리하고 상층액을 얻어 단백질을 추출하여 BCA method로 단백질을 정량하였다.

#### 2) QC PCR (quantitative competitive PCR)

(1) 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오타이드 시발체(oligonucleotide primer)의 설계

Annexin II의 염기서열을 National Institute of Health 산하의 National Center for Biotechnology Information의 Gene Bank Database (NM\_004039)에서 얻은 후 OLIGO 5.0 primer analysis software (National Bioscience, Ply-

Table 1. The sequence of annexin II oligonucleotide primer

mRNA	Primer 5'-3'	Size (bp)	Position on mRNA
Annexin II	Upstream	ACGCTGGAGTGAAGAGGAAA	477
	Downstream	TGTTAGCTGGAAGCATGGTG	1130-1121
	Competitor	TGTTAGCTGGAAGCATGGTGC	248
		ATACAGCCGATCAGCAAAA	881-862

mouth, MN)을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 시발체 (oligonucleotide primer)를 고안하였다. 올리고 뉴클레오타이드 시발체의 염기서열 및 mRNA에서의 위치는 Table 1과 같다.

## (2) 역전사(reverse transcription)

역전사 증합요소 연쇄반응에는 Gen Amp RNA PCR kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 사용하였다. 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, IX PCR buffer II, dNTP 1 mmol/L, 2.5 µl/L oligo deoxythymidine, 20 IU ribonuclease inhibitor, 50 IU Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 포함한 역전사용 혼합물 19 µl에 1 µl당 1 µg이 되게 희석한 RNA 1 µl를 넣은 후 역전사하였다. 역전사는 DNA thermal cycler 960 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)을 이용하여 42°C에서 15분, 99°C에서 5분 반응시켜서 4°C로 냉각시킨 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였다. 음성대조는 RNA 1 µl 대신 DEPC로 처리한 증류수 1 µl를 넣고 역전사하였다.

## (3) Annexin II competitive와 target cDNA의 합성

자궁경부암 조직에서 추출한 RNA로부터 역전사 후 얻은 cDNA에 정상 3',5'-시발체(primer)를 넣고 증합 효소연쇄반응을 통하여 477 bp의 Annexin II target DNA를 얻은 후 agarose gel에 전기영동시키고 Promega사의 DNA purification kit으로 cDNA를 추출하였다. Competitive cDNA를 만들기 위하여 정상 3',5'-시발체 접합 부위 사이의 염기 서열 중에서 3'-floating primer를 고안한 후 정상 5'-시발체와 함께 반응시켜서 target cDNA를 얻는 방법과 같은 방법으로 cDNA를 추출하였다. 이렇게 만들어진 competitive cDNA는 248 bp의 크기가 되었다.

## (4) Standard curve 작성과 competitive PCR

Annexin II의 표준곡선(standard curve)은 일정한 양의 competitive cDNA (10 fmol)와 점차 감소시킨 양의 target cDNA를 동시에 증폭하여 만든다. 표준곡선은 1.9 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer II, 0.2 mmol/l deoxy-NT, 2.5 U Taq-polymerase을 포함한 100 µl PCR 혼합용액과 0.2 µmol/L의 시발체를 반응시킨 후 DNA thermal cycler 9,600 (Perkin-Elmer, Foster City, CA)으로 95°C 5분간 모든 단백질을 변성시켜서 94°C 1분, 58°C 45초, 72°C 1분

으로 35주기 반응시키고 마지막 주기는 72°C 7분 연장 (elongation)시킨 후 4°C로 냉각시켰다. Ethidium Bromide (EtBr)로 염색한 1% agarose gel에 표준곡선 및 표본 PCR 산물 25 µl씩을 100 bp의 DNA ladder marker와 함께 전기영동시킨 후 Bio-Rad사의 Gel-Doc 1000 system의 자외선 (UV) 농도계로 gel blot을 분석하였다. 표준곡선에 사용한 각각의 target cDNA의 양과 target cDNA/competitive cDNA의 gel blot 농도의 비를 log로 전환하여 표준곡선을 얻었다. 이 표준곡선은 반복해서 얻어졌으며,  $y=b+mx$ 로 표현될 수 있어서 이로부터 농도를 알 수 없는 표본의 cDNA 양을 계산해 내었다. 각 환자에서 얻어진 두 개 이상의 RT 표본을 QC PCR 하였는데 두 개의 오차는  $\pm 5\%$  미만이었다.

## 3) Western blotting

각각의 조직에서 얻은 protein lysate 50 µg에 검체량과 동량의 2X sample buffer (100 mM Tris HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)를 첨가하였다.

검체를 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였는데 stacking gel에서는 50 mA로 2시간, separating gel에서는 100 mA로 2시간 시행하였다. 전기영동 후에 젤을 PVDF membrane에 붙인 후 50 mA에서 단백질을 밤새 이전(transfer)시켰다.

PVDF membrane을 차단 완충제(2% nonfat dry milk, 0.05% Triton X-100 in PBS) 6 ml에 담근 후 실온에서 2시간 흔들면서 반응시킨 후 각각의 희석된 일차항체(Annexin II 1 : 1,000, ABCam, Cambridge, UK; GAPDH 1 : 1,000, FIT Gerald, MA, USA) 6 ml에 넣고 같은 방법으로 1시간 30분 동안 반응시켰다. 완충제 용액(PBS/0.05% Tween20)으로 세척한 후 희석된 이차항체 goat anti-mouse IgG (Santa Cruz, CA, USA) 6 ml에 같은 방법으로 1시간 반응시켰다. 완충제 용액으로 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하였다.

## 3. 통계분석

통계분석은 SPSS 11.0을 이용하여 Anova test와 Spearman correlation test, logistic regression analysis를 하였고, p값이 <0.05에서 통계적으로 유의하다고 보았다.

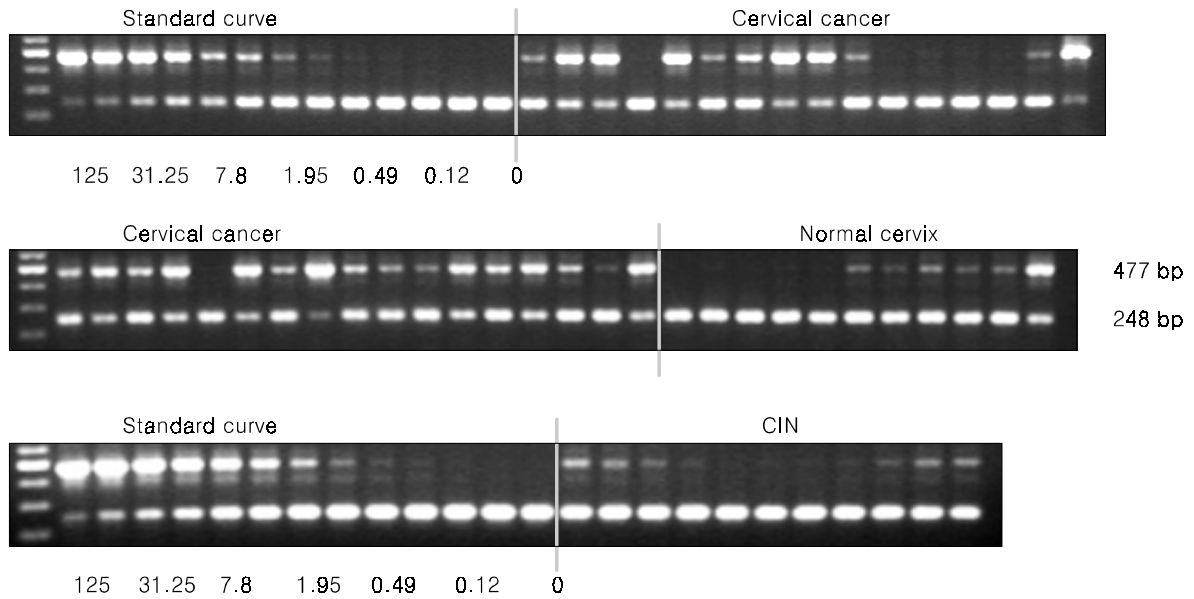


Fig. 1. QC PCR of annexin II in cervical cancer, normal cervix and CIN. It show agarose gel stained with ethidium bromide. Declining amounts of target cDNA in standard curve were coamplified with 10 fmol of competitive cDNA.

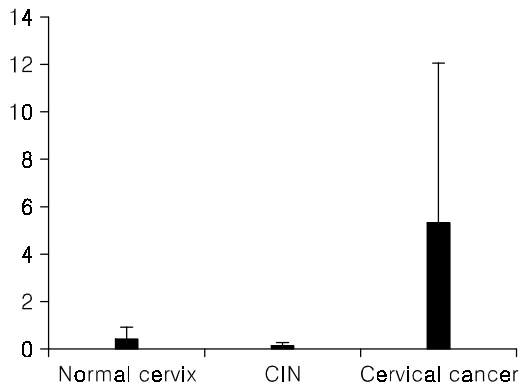


Fig. 2. The expression of annexin II mRNA in normal cervix, CIN and cervical cancer ( $p < 0.05$ ).

## 결 과

1. 정상자궁경부와 자궁경부상피내종양, 자궁경부암에서의 Annexin II mRNA의 발현

RT-PCR을 한 결과 정상 자궁경부와 자궁경부상피내종양, 자궁경부암 모두에서 477 bp크기의 Annexin II mRNA가 발현되었다.

2. Annexin II mRNA의 정량 분석

QC-PCR을 한 결과 모든 정상 자궁경부와 자궁경부상

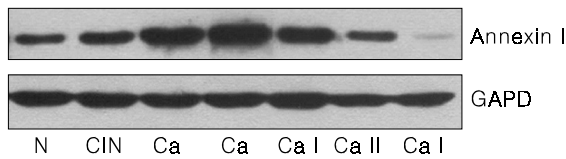
Table 2. Association between the clinicopathologic factors and the expression of annexin II mRNA in cervical cancer

Clinicopathological factors	Finding	Cases (n=33)	Annexin II mRNA (p-value)
Age		60.4 ± 13.9	
Stage	I	10	NS
	II	14	
	III	4	
	IV	5	
Pathology	Squamous, large cell keratinizing	10	NS
	Nonkeratinizing	21	
	Adenocarcinoma	2	
Tumor size	<4 cm	17	NS
	>4 cm	16	
Lymph node	Negative	16	NS
	Positive	17	
SCC-Ag (ng/ml)	<2	18	NS
	>2	15	

p value < 0.05 by Spearman correlation test.

NS; not significant.

피내종양, 자궁경부암 표본에서 target과 competitive 두 개의 band가 보였다(Fig. 1). 표준곡선을 이용하여 mRNA를 정량한 결과 자궁경부암에서의 Annexin II의 발현은



**Fig. 3. Western blot analysis of annexin in normal cervix, CIN and cervical cancer. The expression of annexin II was decreased according to the stage of cervical cancer.**

정상 자궁경부, 자궁경부상피내종양에 비해 통계적으로 유의하게 높았다( $p < 0.05$ , Fig. 1, 2).

### 3. 자궁경부암에서의 Annexin II mRNA 분석

자궁경부암에서 Annexin II mRNA의 발현은 나이, 임상병기, 조직병리학적 유형, 암종의 크기, 림프절전이, SCC-Ag 농도에 따라서는 통계적으로 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ , Table 2).

### 4. Annexin II 단백질의 발현

Annexin II 단백질은 정상자궁경부와 자궁경부상피내종양 보다 자궁경부암에서 높게 발현되었으며 임상병기가 진행될수록 발현이 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3).

## 고 찰

자궁경부암은 한국 여성의 암종에서 가장 높은 빈도를 차지하는 고형성 암으로 여러 가지 진단방법에 의해 조기 진단 및 치료가 가능해지고 있다. 자궁경부암의 발생 및 진행에는 임상적 병기, 병소의 크기, 간질조직 및 결합조직의 침윤정도, 림프절 전이 등이 관련한다. 최근 자궁경부암의 발생 및 전이에는 맥관형성, 즉 새로운 혈관을 만들어내는 과정이 중요하며,<sup>18</sup> 여기에 관여하는 여러 가지 인자들이 연구되어지고 있다. 맥관형성 과정은 성인에 있어서 세포수복이나 생리주기 동안 여성의 생식세포에서도 정상적으로 일어나지만, 종양세포의 성장과 전이 과정에 있어 매우 중요하다.<sup>19</sup> 고형성 종양은 종양주위의 이미 존재하고 있던 혈관에서 신생혈관을 형성하여 성장에 필요한 성분들을 공급받으며, 구조적으로 취약한 신생혈관은 종양세포가 쉽게 침윤하여 전이가 일어난다.<sup>20</sup> 맥관형성을 촉진하는데 관여하는 여러 가지 인자는 종양세포와 주위 기질 및 염증세포에서 분비되어 종양의 성장에 중요한 영향을 주는데, 조직내 발

현정도와 혈장내 농도가 증가할수록 종양의 재발 및 전이가 많아 그 종양의 악성도 및 예후와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>21</sup>

암의 진행과 전이는 암환자의 이환율과 사망률을 증가시키는 주원인이기 때문에, 암의 침윤과 전이를 조절하는 인자들에 대한 연구를 함으로써 암의 예후를 더 잘 예측할 수 있을 것이다. 암의 침윤은 복잡한 조직의 재형성 과정으로써 세포외 기질의 분해가 결정적인 과정이다. 이러한 세포외 기질의 분해에는 여러 가지 단백질 효소들이 관여하게 되는데, 여기에는 plasminogen/plasmin system, collagenase와 stromelysin과 같은 metalloproteinase, 그리고 cathepsin B와 같은 cysteine protease 등 여러 효소들이 존재한다.<sup>10</sup> 이중에서도 plasminogen activator system이 암에서 맥관형성을 조절하는데 중심적인 역할을 하며, 이 system의 구성요소에는 urokinase와 plasminogen, urokinase cell-surface receptor uPAR과 plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) 및 type 2 (PAI-2)가 포함되어 있고 이러한 인자들이 다양한 조직에서 암화 과정에 관여한다고 알려져 있다.<sup>22</sup>

Plasminogen은 tissue-type plasminogen activator (t-PA)와 urokinase plasminogen activator (u-PA)에 의해 분해되고 활성화되어 plasmin을 형성하게 된다.<sup>23</sup> Plasmin은 성장인자들을 활성화시키고 세포외 기질의 분해, 세포의 이동, 조직의 재형성 및 맥관형성 등의 여러 생물학적인 과정에서 결정적인 역할을 하게 되며 이러한 과정으로 암의 성장과 전이가 이루어지게 된다. 따라서 plasmin의 활성화도 및 plasminogen을 활성화시키는 u-PA의 역할이 암의 진행에서 중요한 역할을 한다.<sup>24</sup> Plasminogen이 세포표면에 붙어있는 t-PA와 u-PA에 의해 활성화되어 plasmin이 형성되는 과정에서 여러 단백질들이 plasminogen 및 t-PA의 공동 수용체로서 작용하게 되는데 이러한 단백질 중 하나가 annexin II이다.<sup>25</sup> Annexin II는 세포질 내 인지질과 칼슘결합단백으로서 내피세포에서 t-PA 및 plasminogen의 공동수용체로 작용하여 t-PA에 의한 plasmin의 생성을 촉진함으로써 새로운 혈관을 만들어내고 암의 진행과 전이에 관여하게 된다.<sup>26</sup> 암세포는 이러한 생물학적인 활성을 통해 가속적인 종양의 증식과 전이를 할 수 있게 된다. 따라서 자궁경부암의 진행에서 종양의 맥관형성을 일으키는 plasminogen/plasmin 경로 및 여기에 관여하는 단백질들이 중요한 예후 인자임이 시

사되고 있다.

Plasminogen/plasmin 경로에 관여하는 단백질들, uPA, PAI-1, uPAR과 같은 단백질들의 과발현이 암의 나쁜 예후와 연관되어 있다고 여러 연구에서 보고되어 있다.<sup>10</sup> 전립선암,<sup>27</sup> 난소암, 자궁내막암,<sup>28</sup> 두경부암<sup>29</sup> 및 대장암<sup>30</sup> 환자의 혈장 uPA 수치가 정상 대조군에 비하여 증가되어 있다고 하였으며, 유방암 환자에서는 암이 더 진행될수록 혈장 uPA의 증가 정도가 유의하게 높다고 하였다.<sup>31</sup> 또한 흑색종,<sup>32</sup> 신경모세포암,<sup>33</sup> 췌장암에서는 t-PA의 과발현이 암의 증식과 맥관형성을 촉진시킨다고 하였다.<sup>16</sup> 사람의 췌장암 세포의 표면에서 t-PA가 annexin II와 직접 반응하는 것을 면역형광염색을 통하여 밝혀내었으며,<sup>16</sup> 췌장암에서 annexin II의 과발현이 암의 침입과 전이에 중요하다고 하였다.

유방암에서 비침윤성 유방암세포주 MCF-7은 plasminogen을 활성화시키지 못하는 반면에, 침윤성, 전이성 유방암 세포주 MDA-MB231은 효과적으로 plasminogen을 활성화시킨다고 하였다.<sup>34</sup> 이러한 연구들에 의해 침윤성 암에서의 plasmin의 역할이 제시되었으며, 유방암에서 세포 표면의 annexin II에 의해 plasmin이 발현되고 이어서 세포외기질이 분해되며 세포의 침입과 이동이 일어나서 암의 성장과 전이가 일어난다고 보고되었다.<sup>1</sup>

중화항체로 annexin II를 차단하는 경우 암의 성장이 억제되었다는 연구가 있으며,<sup>35</sup> 이는 annexin II에 의해 매개되는 plasmin의 형성이 암의 침윤에 중요한 역할을 함을 시사하였다. 또한 antisense annexin II vector를 human HeLa cell 세포핵내에 주입함으로써 annexin II 발현을 down regulation 시켜 세포분열과 증식이 억제되는 것을 보여줌으로써 annexin II가 DNA 합성과 세포의 증식에서 중요한 역할을 함을 밝혔다.<sup>36</sup>

고형성암 발생에 있어 annexin II의 발현 정도와 종양의 침윤과의 상관관계에 대한 임상적인 연구는 여러 암에 대하여 이루어지고 있으나 부인암에서는 그 발현을 연구한 보고가 없어 이에 저자는 정상 자궁경부와 자궁경부상피내종양, 자궁경부암에서의 annexin II mRNA와 단백질의 발현에 대하여 연구하였으며 정상자궁경부와 자궁경부상피내종양보다 자궁경부암에서 annexin II mRNA와 단백질이 높게 발현됨을 발견하였다. 유방암의 암화 과정에서 annexin II의 역할에 대한 연구에서, annexin II에 대한 면역 염색을 해서 정상조직과 증식성

유방조직은 음성반응을 보였으나, 침윤성 유방암 조직과 상피내 암종에서는 강한 염색강도를 보인다고 하였다.<sup>1</sup> 또한 비전이성 유방암 세포주인 MCF-7에서는 annexin II 유전자와 단백질의 발현이 보이지 않은 반면에 전이성, 침습성 세포주인 MDA-MB231 세포주에서는 annexin II 유전자와 단백질이 발현되었다고 하였다.<sup>1</sup> 이처럼 본 연구에서는 annexin II mRNA와 단백질이 자궁경부암에서도 발현이 유의하게 높게 나타났다. 이로써 자궁경부암의 암화과정에 annexin II mRNA와 단백질의 발현이 중요한 역할을 함을 시사한다고 하겠다.

Annexin II는 성장조절유전자로서 35 kDa의 단백질로 발현하여 생체내에서 신호전달, 세포막의 융합, 세포 부착, DNA 합성 등 다양한 역할을 하며, 종양의 미세환경에서 단백분해/반단백분해의 균형을 조절하는데 전환적인 역할을 하는데, 이러한 균형이 깨짐으로써 종양이 침입성, 맥관형성 능력을 갖게 되어 전이가 가능해지는 것이다.<sup>1</sup> Annexin II의 발현은 인간의 여러 암에서 증가된다고 알려져 있다.<sup>37</sup> 두경부암에서의 국소전이는 나쁜 예후를 시사하는 주요인자인데, 원발성 암조직 세포와 전이된 림프절 세포에서 발현되는 단백질을 비교하였는데, 비전이성 세포주에 비해 전이성 세포주에서 annexin I과 II가 각각 4.7배, 3.2배 과발현됨을 볼 수 있었다. 또한 전이성 암세포주의 표면에서 annexin II는 높은 발현 정도를 보여 collagen, tenascin-C, fibrin 등과 같은 세포외기질 단백질과 상호 작용을 해서 세포외기질의 분해를 촉진시킨다고 하였다.<sup>36</sup> 또한 대세포암종과 대장암 세포주에서 전이성이 낮은 세포에서 보다 전이성 세포의 표면에서 annexin II의 발현 정도가 더 높다고 하였다.<sup>38</sup> 여러 암에서 annexin II의 과발현이 암의 전이와 상관관계가 있다고 보고한 것과는 달리 본 연구에서는 자궁경부암에서의 annexin II mRNA의 발현은 림프절 전이와 관계가 없는 것으로 나타났다.

자궁경부상피내종양과 초기자궁경부암에서의 맥관형성에 대한 연구에서 미세혈관밀도를 비교하였는데, 대조군인 정상자궁경부조직과 자궁경부상피내종양(CIN) 1과 CIN2 사이에는 미세혈관밀도에 차이를 보이지 않은 반면, CIN3, 미세침윤암 및 초기 병기의 자궁경부암에서는 대조군에 비해 미세혈관밀도가 유의하게 높다고 하였다.<sup>39</sup> 이는 신생혈관형성이 자궁경부암의 초기 암화과정을 촉진시키는데 관여함을 시사하며 따라서

annexin II의 발현정도와의 연관될 것으로 생각된다. 본 연구에서 annexin II 단백질은 자궁경부상피내 종양보다 자궁경부암에서 높게 발현되었으며, 임상병기가 진행될 수록 발현이 오히려 감소하는 양상을 보였는데, 이는 자궁경부암의 암화과정 중, 자궁경부상피내종양에서 자궁경부암으로 진행되는 과정에서 annexin II가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 따라서 자궁경부암에서는 annexin II 발현이 전이보다는 신생혈관형성을 촉진시킴으로써 초기 암화과정으로 진행하는데에 중요한 역할을 함을 시사하였다.

신장암에서 annexin II의 발현을 본 연구에서는 annexin II가 세포의 분화도 및 임상적 결과와 연관이 있다고 하였다. Annexin II에 대한 면역염색에서 저악성도 암인 grade I에서는 세포막에서만 약한 양성을 보였으나, grade II 및 III 암에서는 세포막 및 세포질에서 강한 양성을 보여 annexin II의 발현정도와 종양의 grade가 상관관계가 있음을 보임으로써 신장암의 예후를 예측하는 표지자로 볼 수 있다고 하였다.<sup>40</sup> 신장암에서 annexin II의 발현이 종양의 grade, 분화도와 유의한 상관관계가 있는 것과는 달리 본연구에서는 annexin II mRNA의 발현은 조직병리학적유형뿐만 아니라, 나이, 임상적 병기, 암종의 크기, SCC-Ag 농도에 따라서는 유의한 차이가 없었는데 이것은 계속적인 연구가 필요할 것이다. 여러 연구에서 볼때 annexin II는 암의 전이 및 침습과 연관된 중요한 단백질로 생각되며, 현재 annexin II의 신생혈관형성에서의 역할에 대한 자세한 분자학적인 과정의 연구가 계속되고 있다.

결론적으로 자궁경부암에서 annexin II의 과발현은 plasmin을 생성시키고 세포의 기질 단백질의 균형을 깨어 맥관형성을 촉진시켜 암화과정을 일으킨다고 하겠다. 앞으로 자궁경부암의 암화과정에 대한 연구는 계속되어야 할 것으로 보이며, annexin II의 맥관형성, 전이, 암의 진행을 조절하는 정확한 기전을 규명한다면 자궁경부암에서 annexin II가 생물학적 표지자로서 암의 진행을 예측하는데 유용할 것이며, 자궁경부암의 치료에도 효과적인 표적이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: Selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 146-56.
- Moscattelli D, Rifkin DB. Membrane and matrix localization of proteases; A common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1988; 948: 67-85.
- Brown LF, Dezube BJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Yancopoulos GD. Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietin 1,2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angi-sarcoma. *Am J Pathol* 2000; 156: 2179-83.
- Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, et al. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* 2003; 63: 1927-35.
- Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang X, et al. Discovery of Ca (2+)-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 2004; 23: 1291-9.
- Cheng Q, Lau WM, Chew SH, Ho TH, Tay SK, Hui KM. Identification of molecular markers for the early detection of human squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Br J Cancer* 2003; 86: 274-81.
- Van Trappen PO, Ryan A, Carroll M, Lecoer C, Goff L, Gyselman VG, et al. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 537-44.
- Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, et al. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res* 2003; 62: 6959-65.
- Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Hui KM. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 98: 419-26.
- Stephen RW, Brunner N, Janicke F, Schmitt M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res* 1998; 52: 99-111.
- Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-4.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor- $\beta$ : Biological function and chemical structure. *Science* 1986; 233: 532-4.
- Pendurthi UR, Nguyen M, Andrade-Gordon P, Petersen LC, Rao LVM. Plasmin induces Cyr61 gene expression in fibroblasts via protease-activated receptor-1 and p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent signalling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1421-6.
- McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, et al. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 2003; 198: 863-8.
- Chiang Y, Rizzino A, Sibenaller ZA, Wold MS, Vishwanath JK. Specific down regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell*

- Biochem 1999; 199: 139-47.
16. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut* 2004; 53: 993-1000.
17. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, et al. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2004; 113: 38-48.
18. Suh JG, Moon HS, Kim SS, Min BJ, Sung SH. The expression of vascular endothelial growth factor  $\beta$ 1 in cervical cancer. *Korean J Obstet Gynecol* 2000; 43: 1913-20.
19. Maisonpierre PC, Suri C, John PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, A natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 227: 55-60.
20. Folkman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis-dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
21. Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: Possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61: 2145-53.
22. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: Coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 613-20.
23. Hajjar KA. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb Haemost* 1995; 74: 294-301.
24. Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 1995; 74: 167-71.
25. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: Identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 1991; 30: 1682-91.
26. Cesarman GM, Guevara CA, Hajja KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem* 1994; 269: 21198-203.
27. Heinert G, Kirchheimer JC, Christ G, Pfluger H, Binder BR. Plasma urokinase-type plasminogen activator correlates to bone scintigraphy in prostate cancer. *Eur Urol* 1988; 15: 256-8.
28. Saito K, Nagashima M, Iwata M, Hamada H, Sumiyoshi K, Takada A. The concentration of tissue plasminogen activator and urokinase in plasma and tissues of patients with ovarian and uterine tumors. *Thromb Res* 1990; 58: 355-66.
29. Leung KC, Tung Y, Ali M, Lau WN. Measurement of urokinase-type plasminogen activator activity in sera of nasopharyngeal carcinoma patients by an immunocapture assay. *Cancer Lett* 1991; 58: 355-66.
30. Huber K, Kirchheimer JC, Sedlmayer A, Bell C, Ermler D, Binder BR. Clinical value of determination of urokinase-type plasminogen activator antigen in plasma for detection of colorectal cancer: Comparison with circulating tumor-associated antigen CA 19-9 and carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1993; 53: 1788-93.
31. Grondahl-Hansen J, Agerlin N, Munkholm-Larsen P, Bach F, Nielsen LS, Dombrowsky P, et al. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for urokinase-type plasminogen activator and its application to plasma from patients with breast cancer. *J Lab Clin Med* 1988; 111: 42-51.
32. Bizik J, Lizonava A, Stephens RW. Plasminogen activation by t-PA on the surface of human melanoma cells in the presence of alpha 2-macroglobulin secretion. *Cell Regul* 1990; 1: 895-905.
33. Neuman T, Stephen RW, Salanen EM. Induction of morphological differentiation of human neuroblastoma cells is accompanied by induction of tissue-type plasminogen activator. *J Neurosci Res* 1989; 23: 274-81.
34. Devy L, deGroot FM, Blacher S, Hajitou A, Beusker P. Plasmin-activated doxorubicin prodrugs containing a spacer reduce tumor growth and angiogenesis without systemic toxicity. *FASEB J* 2004; 18: 565-7.
35. Sharma MR, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiostatin-induced inhibition of endothelial cell proliferation/apoptosis is associated with the down-regulation of cell cycle regulatory protein cdk5. *J Cell Biochem* 2004; 91: 398-409.
36. Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 319-26.
37. Chiang Y, Rizzino A, Sibenaller ZA, Wold MS, Vishwanatha JK. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 1999; 199: 130-47.
38. Yeatman TJ, Updyke TV, Kaetzel MA. Expression of annexins on the surfaces of non-metastatic and metastatic human and rodent tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 37-44.
39. Triratanachai S, Niruthisard S, Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-stage uterine cervical squamous cell carcinoma: Clinical significance. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 575-80.
40. Zimmermann U, Woenckhaus C, Pietschmann S, Junker H, Maile S, Schultz K, et al. Expression of annexin II in conventional renal cell carcinoma is correlated with Fuhrman grade and clinical outcome. *Virchows Arch* 2004; 445: 368-75.



## The annexin II expression in invasive cervical cancer

Hye-Sung Moon, Yu Sun Lee, Hye Won Chung

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

---

**Objective :** The aim of this study was to determine annexin II expression in cervical cancer.

**Methods :** In Ewha Womans University Mokdong Hospital, normal and cervical cancer tissues were obtained from healthy women (n=11), from patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN, n=11) and from patients with cervical cancer (n=33). The expressions of annexin II mRNA and protein were examined by quantitative competitive-PCR and by western blot analysis. Annexin II mRNA and protein expressions were examined with respects to the clinical characteristics including tumor sizes and cancer stages.

**Results :** The expression of annexin II mRNA in cervical cancer was higher than that in the normal cervix, and CIN ( $p<0.05$ ). Annexin II mRNA expression was not correlated with cervical cancer stage, or size of the tumor ( $p>0.05$ ). The expression of annexin II protein in cervical cancer was higher than that in CIN but its expression was decreased according to the cervical cancer stage.

**Conclusion :** Our results suggest that overexpression of annexin II mRNA and protein may be a biologic marker of cervical carcinogenesis.

**Key Words :** Cervical cancer, Annexin II

---