부인종양 제16권 제3호 2005
Vol. 16, No. 3, September, 2005

침윤성 자궁경부암에서 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 cyclin B1과 D1의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 여성생명과학연구소, 부인암 전문 클리닉
김영태·자오민·김희연·강명화·김재욱·김성훈·김재훈·김상운·윤보성

목적 : Cyclin은 세포주기 조절에 관여하는 단백질 중요한 단백질 중에 하나이다. 세포주기 조절에 관여하는 cyclin과 CDK 복합체 발현에 이상이 생기면 여러 가지 암이 유발되는 것으로 보고되고 있다. 본 연구는 자궁경부암에서 cyclin B1과 D1의 발현 양상을 정량적으로 측정하였다.

연구 방법 : 신선 자궁경부 조직은 본원에서 2002년 3월부터 2005년 2월까지 수술적 치료를 받은 환자를 대상으로 하여 얻었다. 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응과 Western blot analysis를 이용하여 각각 cyclin B1과 D1의 mRNA 및 단백질 발현 양상을 확인하였다.

결과 : Cyclin B1 mRNA 발현은 자궁경부암 조직에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높았다(p=0.019). 그러나, cyclin D1 mRNA 발현은 자궁경부암 조직과 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.967). Western blot analysis를 이용한 단백질 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상도 비슷한 결과를 보였다.

결론 : 본 연구자들은 침윤성 자궁경부암에서 cyclin B1 mRNA 과발현을 확인함으로써 자궁경부암의 발암과정에 있어 cyclin B1이 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

중심단어 : Cyclin B1, Cyclin D1, 자궁경부암, 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응

서 론

자궁경부암은 전세계적으로 여성암 중에서 2번째로 많으며,[1] 우리나라에서도 부인암 중 가장 높은 발생빈도를 차지하는 암으로 여성 보건 관리 차원에서 매우 중요한 질환이다. 자궁경부암의 발생에는 고위험군 인유두종 바이러스 감염이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[2] 그러나, 인유두종 바이러스에 감염된 많은 여성 중 소수만이 침윤성 자궁경부암으로 진행되는 것으로 보아 인유두종 바이러스 감염 이외에 다른 여러 인자들이 자궁경부암 발암기전에 영향을 미치는 것으로 생각되어지고 있다.[3,4] 이 중 세포주기 조절에 관여하는 cyclin 단백질 발현에 이상이 생기면 암이 유발되는 것으로 보고되고 있다.[5]

Cyclin의 종류에는 현재까지 17가지(A, B1-2, C, D1-3, E1-2, F, G1-2, H, I, K, T1-2, H)가 알려져 있다. 이들은 cyclin box로 알려진 아미노산 보존유전자를 공유함으로써 cyclin dependent kinases (CDKs)와 결합하여 작용을 나타내고, destruction box가 관여하여 소멸되게 된다.[6,7] Cyclin은 활성화되는 단계에 따라 그룹화된다. G1 cyclins에는 cyclin D와 cyclin E가 있으며, 이들은 G1 세포주기에서 활성화되어 G1-S 세포주기 진행을 조절한다. Cyclin A는 S 세포주기 및 G2 세포주기 후반기에 활성화되는 반면, cyclin B는 G2 세포주기에 활성화되어 세포분열을 조절한다. 이러한 cyclin 발현에 있어 조절이 잘못되게 되면 비정상적인 세포 성장과 암 변성이 일어나게 된다.

세포주기 조절에 관여하는 여러 cyclin과 CDK 복합체 중에서 cyclin D1과 CDK 4, 6 복합체, cyclin B1과 CDK 1 복합체가 특히 관심의 대상이 되고 있는데, 전자는 직

논문접수일 : 2005년 7월 26일
교신저자 : 김영태, 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 산부인과학교실
전화 : 02) 2228-2230·전송 : 02) 313-8357
E-mail : ytkchoi@yumc.yonsei.ac.kr

접 G1-S 세포주기 진행에 관여하고 후자는 G2-M 세포주기 checkpoint 감시를 제어함으로써 DNA 합성과 세포증식에 꼭 필요한 요소로 작용한다.[7-9] S 세포주기 초기에는 cyclin B1의 발현이 적지만 G2-M 세포주기 이행기에는 최고조에 이르게 되어 세포들이 유사분열을 일으키게 되고 p53이 활성화되면 cyclin B1의 작용이 억제되어 G2-M 세포주기가 정지된다고 알려져 있다.[7,10,11] 암세포 genome에서 chromosome 11q13 전위(translocation)나 유전자 증폭을 통해 종종 cyclin D1이 파괴된 것을 확인할 수 있다. 약 50%의 포유류에서 발생하는 암들에서 cyclin D1 단백질이 과발현됨이 보고되었다.[12,13] 방광암, 난소암 등 다른 여러암들에서 cyclin D1의 mRNA 전사가 증가되는 것은 유전자 재배열 및 증폭 등의 분자학적 이상으로 인한 것으로 추정되어지고 있다.[14] 본 연구자들의 이전 실험에서는 자궁경부암에서 면역조직화학염색법을 이용하여 cyclin D1의 유전자 변형과 단백질 발현에 대하여 연구 보고한 바 있다.[15]

과거 여러 연구자들이 자궁경부암 환자에서 cyclin D1, E, A의 발현을 확인하고자 RT-PCR 및 면역조직화학염색법을 통해 신선 조직이나 포르말린 고정 조직으로 실험을 하였으며 RT-PCR 및 면역조직화학염색법으로 자궁경부암 조직에서 cyclin 발현에 관한 자료를 얻을 수 있었으나 이러한 방법만으로는 특이성이 부족하고 반정량적인 결과만 얻을 수 있다.[15-17] 그러나, 유전자 발현 분석은 예민성, 정확성, 재현성이 요구 되어진다.

따라서 본 연구자들은 정상 자궁경부 조직과 자궁경부암 조직에서 예민성과 특이성을 높이기 위해 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응(quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 이용한 mRNA 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상과 Western blot analysis를 이용한 단백질 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상을 연구하고자 하였으며 이를 통해 자궁경부암의 발암과정에서 나타날 것으로 예상되는 cyclin 발현 이상을 연구함으로써 자궁경부암의 진단과 치료에 도움이 되는 잠재적 표지물질로서의 cyclin의 역할을 규명하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 환자군 선정

신선 자궁경부 조직은 본원에서 2002년 3월부터 2005년 2월까지 수술적 치료를 받은 환자를 대상으로 하여 얻었다. 침윤성 자궁경부암 조직 41예를 실험군으로 정상 자궁경부 조직 10예를 대조군으로 선정하였다. 39예의 침윤성 자궁경부암 환자들의 중앙 연령값은 53.5세(29-80세) 였고, 임상적 병기는 각각 Ⅰ기 9예(22.0%), Ⅱ기 27예(65.9%), Ⅲ기 5예(12.1%)로 Ⅱ기가 가장 많았다. 세포형에 따라 분류하면 상피 세포암이 37예(90.2%), 선암이 4예(9.8%) 였다. 침윤성 자궁경부암 41예에서 전부 인유두종 바이러스 감염이 확인되었고, 인유두종 바이러스 종류에는 4, 11, 14, 16, 18, 33, 35, 45, 58, 63, 69 등이 있었다.

2. 실험 방법

1) 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현

본원에서 시행한 수술에 의해 얻어진 자궁경부암 조직과 대조군을 질소 탱크에 보관하고 임상적 병기에 따라 암조직을 선택한 후 RNA를 분리하였다. 실험을 위한 검체를 액체 질소 내에서 막자사발을 이용하여 분쇄시킨 후 전체 RNA extraction kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 1 μg의 RNA는 oligo dT를 primer로 해서 역전사를 실시하였다. 역전사를 통한 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)의 합성은 역전사 효소(reverse transcriptase, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)를 이용하였으며 이때의 상태는 70℃에서 5분, 37℃에서 60분, 70℃에서 10분을 사용하였다. 합성된 상보적 DNA는 -20℃에 사용전까지 보관하였다. 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응은 ABI 7,700 PRISM Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 수행되었다. 준비된 역전사 중합효소 연쇄 반응 생산물에 primer로 cyclin B1, D1 그리고 housekeeping gene인 glyceraldehydes 3 phosphate-dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. 이 때 GAPDH는 내부대조군(internal control)으로 사용되었다. Primer로 사용된 cyclin B1, D1 그리고 GAPDH는 Applied Biosystems에서 구입하여 사용하였으며 이들의 염기 순서는 Table 1에 표시되어 있다.[18,19] 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응은 총 50 μl 내에서 1× TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 primer 그리고 probe을 섞어서 만들었다. 이것을 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 넣었다. 사용한 thermal cycler parameters는 첫번째 단계로 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 그리고 두번째 단계로 denaturation을 위해 95℃에서 15초, annealing과 extension을 위해 60℃에서 1분, 이 과정을 50 cycles 반복하였다. 역전사 중합효소 연쇄 반응에는 2개의 primer가 필요한데, 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에는 이들 primer 사이에 형광이 부착된 primer가 하나 더 필요하였다. 그리고, 이 형광 primer의 5'쪽에는 TaqMan probe인 FAM™이라는 형광물질이 (GAPDH 경우는 VIC 형광물질), 3'쪽에는 TAMRA™ 라는 물질을 가졌다. 이들은 가까이 있을 때는 TAMRA™가 FAM™의 형광을 상쇄시켜 탐지할 수 없지만, 떨어지면 FAM™의 형광을 탐지할 수 있다. 따라서, DNA 중합효소(DNA polymerase)의 핵산분해효소 역할(nuclease activity)에 의하여 중합효소 연쇄 반응 과정 중 모형(template) 중간에 붙어있는 형광 primer가 분해되어 FAM™의 형광이 나타나고 형광의 강도는 cycle이 증가할수록 세졌다. 따라서, 표준시료와 비교하면 증폭되는 양을 정확하게 정량할 수 있다. 실시간 정량 중합효소 연쇄 반응의 결과는 ABI PRISM Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해서 comparative CT (threshold cycles) 방법으로 다음과 같이 계산하였다.[20]

$\triangle C_T$ (sample) = C_T (target gene)- C_T (GADPH),
$\triangle\triangle C_T$ = $\triangle C_T$ (tumor sample)-$\triangle C_T$ (internal control)
relative expression = $2^{-\triangle\triangle CT}$

여기서 내부대조군 HeLa 세포주를 사용하였다. 이러한 방법에 따라 자궁경부암 조직과 대조군에서의 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현 정도를 측정하였다.

2) Western blot analysis를 이용한 cyclin B1과 D1의 단백질 발현

막자사발을 통해 분쇄시킨 자궁경부 조직 샘플들과 HeLa 세포주에 용해 완충제(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 넣고 용해 완충제 내에서 얼음에 10분 배양한 후에 4℃ 원심분리기에서 14,000 rpm으로 가라앉힌 상층액을 통해 cell extraction을 얻었다. 단백질 정량은 Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 이렇게 얻은 단백질은 환원제를 포함하는 mini-SDS-PAGE gel (8-10%)에 전기영동을 통해 분리시켰다. 전기영동 후 gel을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 상온에서 blotting 한 후 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)로 2시간 상온에서 blotting 하였다. 4℃에서 일차 항체 즉, cyclin B1 mAb, cyclin D1 mAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 그리고 GADPH mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 하룻밤 처리하였고, TBST 세척 완충제로 10분씩 3번 씻었다. 세척 후 이차 항체 anti-mouse IgG 또는 goat-polyclonal IgG (horseradish peroxidase conjugated antibody, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, USA)를 상온에서 1시간 처리하였고, TBST로 20분씩 3번 씻었다. 일차, 이차 항체는 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)에 1:1000으로 희석하여 사용하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Table 1. The sequences of primer and probe of cyclin B1, D1

Cyclin B1	Forward primer	5'-CTC CTG TCT GGT GGG AGG A-3'
	Reverse primer	5'-CTG ATC CAG AAT AAC ACC TGA-3'
	Probe	5'-FAM™-AGA GTG GAG TTG TGC TGG CT-TAMRA™-3'
Cyclin D1	Forward primer	5'-CTG GCC ATG AAC TAC CTG GA-3
	Reverse primer	5'-GTC ACA CTT GAT CAC TCT GG-3'
	Probe	5'-FAM™-AGA AGC GTG TGA GGC GGT AGT AGG A-TAMRA™-3'
GAPDH	Forward primer	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
	Reverse primer	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
	Probe	5'-VIC®-CAA CGT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA™-3'

reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) Ⅰ,Ⅱ를 1:1로 섞어 membrane과 1분 정도 반응시켰다. Hyper X-ray film에 30초, 1분, 5분 노출시켜 얻은 결과에서 단백질 양의 정량화를 위해 레이저 농도계(laser densitometer)와 Image Reader LAS-1000 Lite software (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

3. 자료 분석

자료분석은 서술적 통계를 사용하였으며 independent-sample T test, One way ANOVA, logistic 회귀 분석, Mann-Whitney U test, Kruskal?Wallis test를 이용해 처리하였고, 통계 분석은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. p-value가 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 자궁경부암 조직과 대조군에서 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의한 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현 분석

신선한 대조군과 자궁경부암 조직에서 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현을 측정하기 위해서 TaqMan 방법론에 근거한 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 cyclin B1과 D1의 mRNA 정량은 GAPDH와의 상대적 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 값의 강도로 구하였다. Cyclin B1 mRNA 발현은 자궁경부암 조직에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높았고(p=0.019), 자궁경부암 조직 내에서 임상적 병기가 진행될수록 감소하는 경향을 보였다(p=0.074). Cyclin D1 mRNA 발현은 자궁경부암 조직과 대조군 간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(p=0.967), 자궁경부암 조직 내에서 cyclin B1과는 달리 임상적 병기가 진행될수록 증가하는 경향을 보였다(p=0.488) (Table 2).

2. 자궁경부암 조직에서 cyclin B1과 D1발현 및 림프절 전이와의 상관성

본 연구자들은 41예의 자궁경부암 환자에서 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현과 림프절 전이와의 상관성을 조사하였다. 자궁경부암 조직을 림프절 전이 여부에 따라 두 군으로 나누었을 때 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의한 cyclin B1과 D1의 mRNA $2^{-\triangle\triangle CT}$ 값 평균은 림프절 전이를 보인 군(n=17)에서 각각 2.60±3.91과 1.20±1.66 였고, 림프절 전이를 보이지 않은 군(n=24)에서 각각 0.29±0.28과 7.60±9.28로 림프절 전이를 보인 군이 통계적으로 유의하게 발현 차이를 나타내었다 (p=0.006, p=0.012) (Table 3).

3. 자궁경부암 조직과 대조군에서 Western blot analysis에 의한 cyclin B1과 D1의 단백질 발현 분석

본 연구에서는 자궁경부암 조직에서 Western blot analysis로 cyclin B1과 D1의 단백질 발현을 측정하였다 (Fig. 1). Cyclin B1 단백질 densitometer 값의 평균은 자

Table 2. Expression of cyclin B1 and D1 in the cervical tissue

Tissue	Cyclin B1	Cyclin D1
	$2^{-\triangle\triangle CT}$ value (mean±SD)	$2^{-\triangle\triangle CT}$ value (mean±SD)
Control (n = 10)	0.03±0.05	3.22±2.29
Cervical cancer (n=41)	0.59±0.72[a]	3.29±4.63[b]
Stage Ⅰ (n=9)	0.76±0.68	2.17±2.33
Ⅱ (n=27)	0.57±0.76	3.24±4.32
Ⅲ (n=5)	0.23±0.39	6.66±10.48

[a]; p=0.019 (cervical cancer vs. control)
* p value of cyclin B1 in different stage; 0.074
[b]; p=0.967 (cervical cancer vs. control)
* p value of cyclin D1 in different stage; 0.488

Table 3. Relationship between cyclin B1, D1 expression and lymph node metastasis in cervical cancer

Tissue	Cyclin B1	Cyclin D1
	$2^{-\Delta\Delta CT}$ value (mean±SD)	$2^{-\Delta\Delta CT}$ value (mean±SD)
Lymph node metastasis (n=17)	2.60±3.91	1.20±1.66
No lymph node metastasis (n=24)	0.29±0.28[a]	7.60±9.28[b]

[a]; p=0.006 (lymph node metastasis vs. No lymph node metastasis)
[b]; p=0.012 (lymph node metastasis vs. No lymph node metastasis)

Table 4. The protein analysis of cyclin B1 and D1 by Western blot analysis

Tissue	Cyclin B1 (mean±SD)	Cyclin D1 (mean±SD)
Control (n=10)	0.21±0.11	0.27±0.16
Cervical cancer (n=41)	0.33±0.11[a]	0.32±0.20[b]

[a]; p=0.031 (cervical cancer vs. control)
[b]; p=0.554 (cervical cancer vs. control)

궁경부암 조직에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높은 반면(p=0.031), cyclin D1 단백질 densitometer 값의 평균은 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.554) (Table 4, Fig. 2).

Fig. 1. Western blot assay of cyclin B1 and D1 in normal and cervical cancer tissue. Protein extracts were separated by 10% SDS-PAGE, transferred from the gel to PVDF membranes, and immunoblotted with cyclin B1 and D1 monoclonal antibodies (HeLa: HeLa cell line; C: control tissue; T1-4: tumor sample).

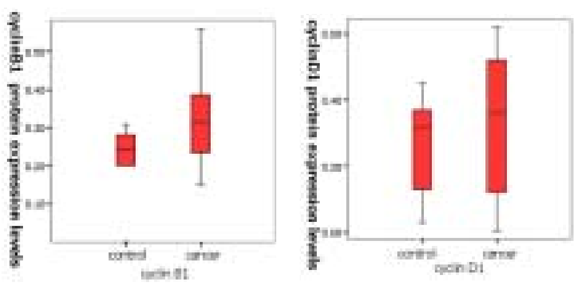

Fig. 2. Boxplot graphs demonstrating the cyclin B1 and cyclin D1 protein expression in normal cervix and cervical carcinoma (Western blot assay). The lines across the boxes represent the medians. The small circles identify outliers and extreme values.

고 찰

본 연구에서 신선한 자궁경부암 조직의 cyclin B1 및 D1 mRNA 발현을 측정하기 위해 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용하였다. 역전사 중합효소 연쇄 반응은 mRNA로부터 역전사 과정을 통해 얻어진 상보적 DNA를 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 증폭하는 방법으로 RNA 검사의 예민도를 높이고 소량의 RNA로부터 염기서열을 분석할 수 있어 유전자 발현 분석에 있어서 유용한 방법으로 많이 사용되고 있다. 역전사 중합효소 연쇄 반응은 Nothern blot assay나 ribonuclease protection assay에 비하여 훨씬 예민하기 때문에 적은 조직에서도 RNA의 발현 정도를 정확하게 분석할 수 있다는 장점을 가진다.[20,21]

최근까지 알려진 연구결과에 의하면 인유두종 바이러스이 감염이 자궁경부암을 유발하는 바이러스로 밝혀져 있다.[2] 그 발암기전은 정확히 밝혀져 있지 않으나, 인유두종 바이러스 감염시 인유두종 바이러스의 일부 유전자가 세포의 염색체에 삽입되어 인유두종 바이러스가 발현하는 E6, E7 단백질을 합성하게 되고 이들이 세포내의 p53, RB 등의 단백질에 결합하여 기능의 소실을 가져와 세포주기조절을 교란시킴으로써 발암과정에 관련한다고 알려져 있다.[5,22] p53, RB 등은 cyclins, CDKs, CDK inhibitors (CKIs) 등과 더불어 세포주기조절 기전

의 이상을 야기하여 암발생을 유도할 수 있다.[12,23]

Cyclin은 세포분열의 각 주기에서 그 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 CDK와 결합하여 작용을 나타낸다.[12] 이러한 cyclin과 CDK 발현에 있어 조절이 잘못되게 되면 비정상적인 세포 성장과 암 변성이 일어나게 된다.

Cyclin B1은 CDK1 (p34cdc2)과 작용하여 G2-M 세포주기 이행을 조절한다고 알려져 있다.[13,24] 최근 다양한 암들, 즉 유방암, 식도암, 대장암, 전립선암, 두경부암 등에서 cyclin B1의 과발현이 연구되었으며,[12,13,23,24] 일부 보고에서는 cyclin B1 발현이 암의 악성도 지표로서 중요한 역할을 한다고 하였다.[25,26] 시험관내에서 cyclin A, E, 그리고 D1은 cyclin B1 촉진제(promoter)를 활성화시킨다. 저위험군 및 고위험군 HPV 바이러스에 감염된 LSIL과 HSIL 에서 cyclin B 과발현이 보고되었다.[22] Kanai 등은 침윤성 자궁경부암에서 cyclin B 과발현뿐만 아니라 CDK 1 과발현도 동시에 나타남을 확인하였다.[27] 아직 자궁경부암에서 cyclin B1의 역할에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없고, 임상 병리학적 요소와의 상관성에 대해서 연구된 논문은 전무한 상황이다. 본 연구에서는 cyclin B1 mRNA 및 단백질 발현이 자궁경부암 조직에서 대조군보다 증가되었고, 자궁경부암 조직 내에서 임상적 병기가 진행될수록 감소하는 경향을 보여 자궁경부 발암과정의 초기에 중요한 역할을 할 가능성을 시사하였다. 그러나 cyclin B1 발현과 각 임상 병리학적 예후 인자들(조직세포형, 임상적 병기, 환자 나이) 간에는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

D-type cyclin은 30분 이하의 대단히 짧은 반감기를 가지며 이들의 과발현은 성장인자를 유도하고 D-type cyclin의 합성에 장애가 생기면 성장인자와 상관없이 세포주기를 진행하여 발암과정에 관여하게 된다고 하였다.[28,29] Cyclin D1은 염색체 11q13에 위치하고 있으며 유방암, 식도암, 대장암, 두경부암, 폐암, 간암, 방광암, 피부암 등 여러 암에서 이 부위의 유전자 증폭이 보고되었다.[12,13,23,24] Cyclin D1 과발현과 임상 병리학적 요소들과의 상관성에 관한 연구들도 있는데, 일부 유방암이나 후두상피암에서 cyclin D1 과발현과 임상 병리학적 요소들이 상관성이 있다고 보고된 반면, 다른 연구에서는 유방암이나 방광암에서 아무런 상관성이 없다고 보고되었다.[30,31] 본 연구에서는 cyclin D1의 mRNA 발현이 자궁경부암 조직에서 대조군보다 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 본 연구 결과는 이전의 연구들과는 차이를 나타내는데 cyclin의 mRNA 발현을 보기 위한 정량적 방법이 이전 실험들에서 쓰인 면역조직화학염색법, 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응, Western blot analysis 등의 반정량적인 방법들과 상이하였다는 점과 연구방법 및 분석이 다르기 때문으로 사료된다. Cyclin D1 발현과 각 임상 병리학적 예후 인자들간에는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

식도암, 췌장암, 갑상선암, 그리고 폐암 등 여러 연구들에서 cyclin B1과 D1의 발현 양상과 예후와의 연관성이 있다고 보고되었다.[12,13,23,24] 그러나, 자궁경부암에서 cyclin B1과 D1의 유전자 변형과 임상적 림프절 전이와의 연관성에 관한 연구 보고는 전혀 없는 상황이다. 본 연구에서는 logistic 회귀 분석을 통해 자궁경부암에서 cyclin B1과 D1의 발현 이상과 림프절 전이와의 유의한 상관성을 확인하였다. 림프절 전이를 보인 자궁경부암 환자에서 cyclin B1는 과발현되었고, cylicn D1은 낮게 발현되었다. 림프절 전이는 자궁경부암의 발암 과정에서 후기에 나타나는 현상으로 림프절 전이가 있는 경우 5년 생존율이 50% 낮아지는 것이 보고되면서 자궁경부암에 있어서 림프절 전이는 중요한 예후 인자로 알려졌다.[32] 본 연구 결과로 cyclin B1의 과발현은 림프절 전이를 유도하고, cyclin D1은 림프절 전이를 억제하는 것으로 추정된다. 일반적으로 다른 부위의 편평 상피암에서는 cyclin D1의 과발현이 나쁜 예후와 연관되어 있다고 밝혀졌다. 그러나, 자궁경부암에서 cyclin D1 발현이 감소하기 때문에 질병 예후와 관련된다고 주장하기는 어려울 것이다. 본 연구에서는 림프절 전이를 보이지 않은 군에서 림프절 보이는 군에 비해 cyclin D1 mRNA가 과발현되는 것으로 보아 cyclin D1의 과발현이 좋은 예후와는 연관성이 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구자들은 침윤성 자궁경부암에서 cyclin B1 mRNA 과발현을 확인함으로써 자궁경부암의 발암 과정에 있어 cyclin B1이 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 또한 cyclin B1이 림프절 전이를 유도하는 것으로 추정되는 결과를 확인하였다. Cyclin D1은 반대로 림프절 전이를 억제하는 역할을 할 것으로 추정되며, 초기 자궁경부 상피암에서, cyclin D1 발현은 불량한 예후를 예측하는데 있어 유용한 표지물질로 사용될 수 있

을 것으로 사료된다. 그러나, 더 많은 수의 조직표본과 생존 여부를 추적관찰한 자료를 바탕으로 생존률에 관한 연구가 뒷받침되어야 cyclin, CDK, 그리고 CDKI와 자궁경부암의 상관관계를 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Nationwide cancer registry. Annual report of the Korean Ministry of Health and Welfare 1999; 1: 112-31.
2. Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 690-8.
3. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res 2004; 64: 3878-84.
4. Park SH, Kim YT, Kim JW, Kim JH, Kim SH, Yoon BS, et al. Correlation between SCC antigen and the prognosis of cervical cancer patients following concurrent. Koean J Gynecol Oncol 2005; 16: 123-32.
5. Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of Cell-Cycle Regulatory Proteins in Gynecological Cancer. J Cell Physiol 2003; 196: 224-44.
6. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Herod J, Innes J, Prime W, Herrington CS. Overexpression of cyclins A and B as markers of neoplastic glandular lesions of the cervix. Gynecol Oncol 2004; 92: 628-34.
7. Clarke B, Chetty R. Cell Cycle Aberrations in the Pathogenesis of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. Gynecol Oncol 2001; 82: 238-46.
8. Ito M. Factors controlling cyclin B expression. Plant Mol Biol 2000; 43: 677-90.
9. Semczuk A, Jakowicki JA. Alterations of pRb1-cuclin D1-cdk4/6-p16 INK4A pathway in endometrial carcinogenesis. Cancer Lett 2004; 203: 1-12.
10. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 2147-52.
11. King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. Cell 1994; 79: 563-71.
12. Champeme MH, Bieche I, Lizard S, Lidereau R. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1995; 12: 128-33.
13. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. Cancer Res 1992; 52: 2980-3.
14. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. Endocrinology 2004; 145: 5439-47.
15. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. Int J Gynecol Pathol 1997; 16: 339-47.
16. Kim YT, Cho NH, Ko JH, et al. Expression of cyclin E in placentas with hydropic change and geststional trophoblastic diseases implications for the malignant transformation of trophoblasts. Cancer 2000; 89: 673-9.
17. Cho NH, Ahn HJ, Kim YT, Kim JW. Correlation of G1 cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors relative to human papillomavirus infection in the uterine cervical lesions. Int. J. Surgical. Pathol 1999; 7: 61-71.
18. Jones CD, Darnell KH, Warnke RA, Zehnder JL. Cyclin D1/cyclin D3 ratio by real-time PCR improves specificity for the diagnosis of mantle cell lymphoma. J Mol Diagn 2004; 6: 84-9.
19. Qiu C, Yu M, Shan L, Snyderwine EG. Allelic imbalance and altered expression of genes in chromosome aq11-2q16 from rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo 4,5-b]pyridine. Oncogene 2003; 22: 1253-60.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods 2001; 25: 402-8.
21. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods 2001; 25: 386-401.
22. Lukas J, Muller H, Bartkova J, et al. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. J Cell Biol 1994; 125: 625-38.
23. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. Science 1994; 264: 436-40.
24. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science (Washington DC), 1996; 274: 1672-7.
25. Banerjee SK, Weston AP, Zoubine MN, Campbell DR, Cherian R. Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma: relationship to cell death, proliferation, and transformation. Am J Pathol 2000; 156: 217-25.
26. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. Cancer Res. 2000; 60: 4000-4.
27. Kanai M, Shiozawa T, Xin L, Nikaido T, Fujii S. Immunohistochemical detection of sex steroid receptors, cyclins, and cyclin-dependent kinases in the normal and neoplastic squamous epithelia of the uterine cervix. Cancer 1998; 82: 1709-19.
28. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. Gynecol Oncol 1999; 73: 223-8.
29. Cheung TH, Yu MM, Lo KW, Yim SF, Chung TK, Wong

YF. Alteration of cyclin D1 and CDK4 gene in carcinoma of uterine cervix. Cancer Lett 2001; 166: 199-206.
30. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. Int J Cancer 1994; 57: 353-61.
31. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, et al. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. Clin Cancer Res 1996; 2: 175- 80.
32. Heaps JM, Berek JS. Surgical staging of cervical cancer. Clin Obstet Gynecol 1990; 33: 852-62.

Cyclin B1 and D1 expression in invasive cervical cancer

Young Tae Kim, Min Zhao, Hee Yeon Kim, Moung Hwa Kang, Jae Wook Kim, Sung Hoon Kim, Jae Hoon Kim, Sang Wun Kim, Bo Sung Yoon

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Institute of Women's Life science, Women's Cancer Clinic, Seoul, Korea

Objective : Cyclin is a family of regulatory proteins that play a key role in controlling the cell cycle. Abnormalities of cell cycle regulators, including cyclins and cyclin dependent kinases (CDKs), have been reported in malignant tumors. This study was undertaken to quantitatively detect cyclin B1 and D1 in cervical cancer.

Methods : A quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis were used to analyze the expression of cyclin B1, D1 mRNA and proteins, respectively, in fresh invasive cervical cancer (n=41) and normal cervix tissue (n=10).

Results : There was significantly greater cyclin B1 expression in invasive cervical cancer than in normal cervix tissue (p=0.019). However, cyclin D1 expression was not significantly different (p=0.967). A Western blot analysis yielded similar results.

Conclusion : Our results were consistent with the concept that up-regulation of cyclin B1 expression occurred in cervical cancer and an aberrant expression of cyclin B1 might play an important role in cervical carcinogenesis.

Key Words : Cyclin B1, Cyclin D1, Cervical cancer, Real-time RT-PCR