

## 자궁경부암에서 종양진행과 E-cadherin/ $\alpha$ -catenin 발현이상에 관한 연구

한림대학교 의과대학 산부인과학교실, \*병리학교실  
김정식 · 허진숙 · 김홍배 · 심정원\* · 전현아 · 이근영 · 강성원

### A Study on the Abnormal Expression of E-Cadherin/ $\alpha$ -Catenin during Tumor Progression in Squamous Carcinoma of Uterine Cervix

Jung Shick Kim, M.D., Jin Sook Heo, M.D., Hong Bae Kim, M.D., Jung Woen Shim, M.D.\*,  
Hyun A Jun, M.D., Keun Young Lee, M.D., Sung Won Kang, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, \*Department of Pathology, Hallym University,  
KangNam Sacred Heart Hospital, HanKang Sacred Heart Hospital, Seoul, Korea

**Objective :** E-cadherins are a family of transmembrane glycoproteins involved in epithelial specific and calcium-dependent intercellular adhesion. E-cadherin function is regulated by its associated cytoplasmic protein,  $\alpha$ -catenin, which links E-cadherin to the actin-based cytoskeleton. This study is to determine what lack and difference in expression of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin between benign, CIS, and invasive carcinoma of uterine cervix.

**Methods :** 89 tissue specimens were obtained by punch biopsy, conization, and hysterectomies. Sections were classified according to FIGO staging as benign cervix, carcinoma in situ, invasive cervical carcinoma. The expression of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin was examined immunohistochemically with monoclonal antibodies. What degree in expression of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin in three group was investigated. The  $\chi^2$  test was used to assess the statistical significance of this study.

**Results :** The correlation between the altered expression of E-cadherin/ $\alpha$ -catenin and the histopathologic diagnosis was statistically significant.

**Conclusion :** According to this result, we found that the distribution and intensity in expression of E-cadherin and  $\alpha$ -catenin is altered during tumor progression of cervical carcinoma.

**Key Words :** E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, Cervical carcinoma

## 서 론

인간의 암에서는 상피세포들이 변형되고 성장조절이 되지 않아 기저막을 통과하고 그 밑의 중간엽(mesenchyme)을 침습한다.<sup>1</sup> 이러한 침습은 유전자발현의 변화로 인한 종양세포와 숙주조직사이에서 세포간 부착이상으로 해석된다.<sup>2</sup>

세포 표면에 존재하는 당단백질(glycoprotein) 대부분이 세포부착분자(cell adhesion molecule)이다. 이들을 크게 immunoglobulin (Ig) superfamily, integrin

superfamily, cadherin family 3가지로 나눈다.<sup>3</sup> E-cadherin은 거의 모든 상피세포에 존재하는 막간단백질(transmembrane protein)로서 세포질 영역(domain), 세포외 영역(domain), 그리고 막간 domain으로 구성되며(Fig. 1) calcium 의존적으로 세포부착에 관여한다.<sup>4</sup> E-cadherin은 종양세포의 침습을 억제하는 특성을 갖는다. 이를 입증하는 것으로서 암에서는 E-cadherin 유전자 돌연변이로 인해 발현이 감소되거나 없어진다. 그래서 침습적이고 미분화된 병리적 변화가 일어난다.<sup>5</sup> E-cadherin의 기능은 세포질내 단백질인  $\alpha$ -,  $\beta$ -,

$\tau$ -catenins에 의해 조절된다. Catenins을 사이에 두고 actin과 E-cadherin이 연결된다. Catenins이 정상적으로 E-cadherin과 연결되야 E-cadherin이 정상적으로 세포 간 부착기능을 수행한다(Fig. 1). 실제로 cadherin의 세포외 domain이 손상되지 않더라도 catenin이 붙는 세포질 domain이 없어진 경우 cadherin은 세포부착능력을 상실하게 된다.<sup>6</sup>

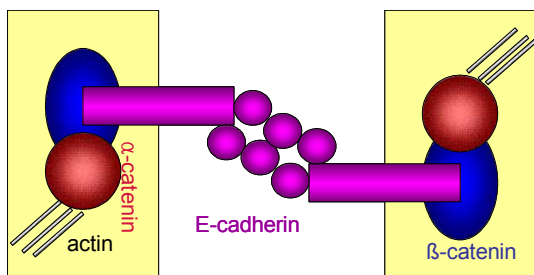


Fig. 1. E-cadherin/α-catenin-mediated cell adhesion.

자궁경부에서 암이 발생하는 과정은 정상자궁경부, 상피내 이행성증을 포함하는 양성자궁경부로 부터 상피내암, 침윤암에 이르기까지 여러 단계를 거치게 된다.<sup>7</sup> 본 저자는 면역조직화학법을 이용한 염색을 통해 양성자궁경부와 상피내암, 침윤암에서 E-cadherin과 α-catenin의 발현양상에 관한 정보를 얻어 통계적으로 분석하고 이 결과를 토대로 임상적 의미를 찾고자 한다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1999년부터 2001년까지 강남성심병원에서 자궁경부 병변이 의심되는 부위에서의 편치생검, 원추절제술, 또는 자궁적출술을 시행한 환자들 중 그 병리조직학적 소견이 자궁경부상피내암과 침윤암인 것으로 밝혀진 각각 100명을 연구 대상으로 선정하였다. 대조군으로 Pap 도말검사를 통해 자궁경부암이 아닐 것으로 생각되고 자궁근종, 자궁탈출증, 골반내 염증등의 이유로 자궁적출술을 시행한 경우에서 실제로 병리조직학적 소견이 자궁경부암 또는 자궁 경부 상피 내 종양이 아닌 양성 자궁질환 100예를 모았다. 이중 면역조직염색이 용이할 것으로 판단되는 표본의 block의 절편을 자궁경부상피내암 24예, 침윤암 43예, 양성자궁경부 22예를 만들었다.

### 2. 방법

#### 1) 면역조직화학염색

파라핀 포매조직을 두께 4-5 μm 절편으로 박절하고 xylene으로 5분간 3회 탈파라핀 시킨 후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 흡수시켰다. 조직 절편에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하였다. 절편을 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세 후 비특이적 항원을 제거하기 위해 30분간 염소혈청과 반응시켰다. 여분의 용액을 제거한 후 일차항체로 E-cadherin (monoclonal 1:50, Zymed Co.)과 α-catenin (monoclonal 1:50, Zymed Co.)을 실온에서 2시간 동안 작용시켰다. 일차항체 반응 후 절편을 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체(1:300, Zymed Co.)와 작용시킨 후 통상적인 avidin-biotin complex법으로 20분간 반응시켰다. 발색제는 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)를 사용하였고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하여 glycerol gelatin으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 2) 면역조직화학염색 결과 판정

종양세포의 발현정도가 광학현미경하에서 인접한 정상 상피세포와 같은 정도로 염색되거나 각 조직 절편에서 종양세포의 70% 이상에서 양성으로 염색된 경우를 정상발현(normal)으로, 염색이 되지 않거나(negative) 양성염색이 70% 미만이거나(low-positive), 양성으로 발현되더라도 핵내에 발현되거나 세포질에 주로 발현된 경우(heterogeneous)를 이상발현(abnormal)으로 판정하였다.

### 3. 결과

본 연구에서 저자는 양성자궁경부, 상피내암, 침윤암에서의 E-cadherin 및 α-catenin의 면역조직화학적 발현양상의 차이를 조사하였다(Fig. 4-7).

E-cadherin은 22예의 양성자궁경부에서 세포막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 19예, 낮은 양성을 보이는 경우가 1예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우는 없었고, 음성염색인 경우가 2예를 보였고, 24예의 자궁경부상피내암에서는 세포막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 12예, 낮은 양성을 보이는 경우가 5예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우가 3예, 음성염색인 경우가 4예를 보였으며, 43예의 침윤암에서는 세포

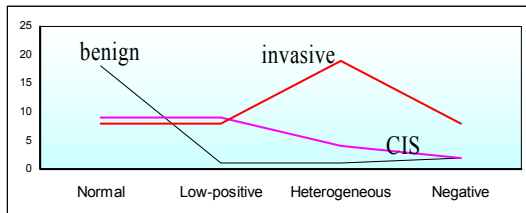
막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 10예, 낮은 양성을 보이는 경우가 8예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우는 20예, 음성염색인 경우가 5예를 보였다 (Table 1, Fig. 2).

**Table 1.** E-cadherin immunoreactivity in cervical tissue

Morphology	Normal	Abnormal		
		Low-positive	Heterogeneous	Negative
Benign (N=22)	19	1	0	2
CIS (N=24)	12	5	3	4
Invasive (N=43)	10	8	20	5

Normal: membrane staining; Negative: No staining; Low-positive: <70%; Heterogeneous: Cytoplasmic staining.

$\alpha$ -catenin은 22예의 양성 자궁 경부에서 세포막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 18예, 낮은 양성을 보이는 경우가 1예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우가 1예, 음성염색인 경우가 2예로 나타났고, 24예의



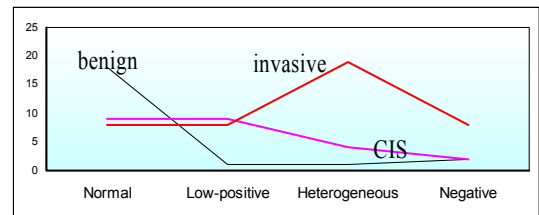
**Fig. 2.** E-cadherin immunoreactivity in cervical tissue normal: membrane staining; negative: no staining; low-positive: <70%; heterogeneous: cytoplasmic staining.

자궁경부상피내암에서는 세포막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 9예, 낮은 양성을 보이는 경우가 9예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우는 4예, 음성염색인 경우가 2예를 보였으며, 43예의 침윤암에서는 세포막에 균일한 양상으로 염색된 경우가 8예, 낮은 양성을 보이는 경우가 8예, 이종(異種, heterogeneous)염색인 경우가 19예, 음성염색인 경우가 8예를 보였다 (Table 2, Fig. 3).

**Table 2.**  $\alpha$ -catenin immunoreactivity in cervical tissue

Morphology	Normal	Abnormal		
		Low-positive	Heterogeneous	Negative
Benign (N=22)	18	1	1	2
CIS (N=24)	9	9	4	2
Invasive (N=43)	8	8	19	8

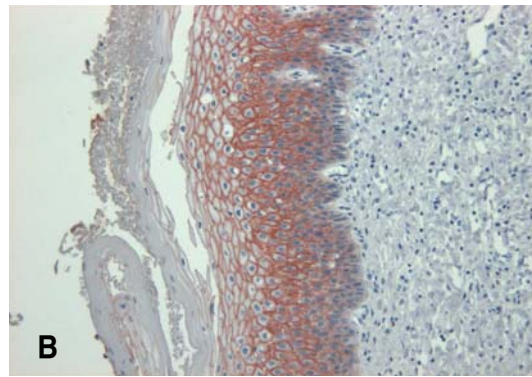
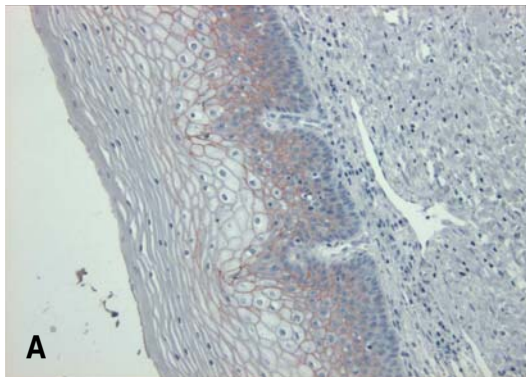
Normal: Membrane staining; Negative: No staining; low-positive: <70%; Heterogeneous: Cytoplasmic staining.



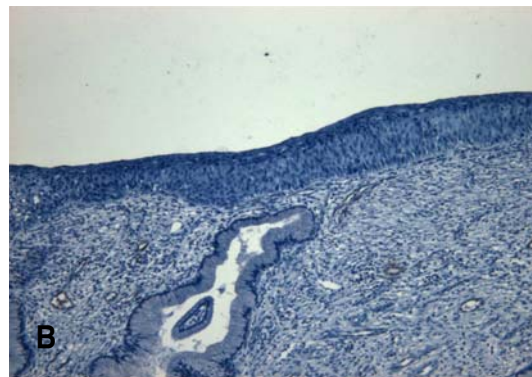
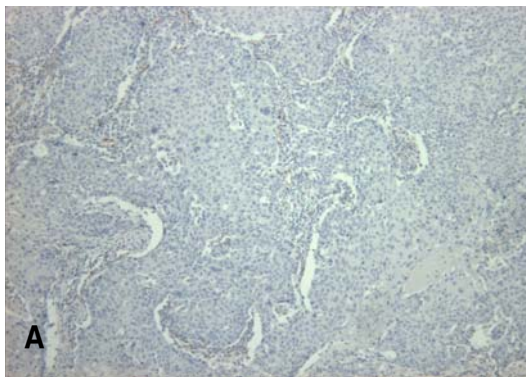
**Fig. 3.**  $\alpha$ -catenin immunoreactivity in cervical tissue normal: membrane staining; negative: no staining; low-positive: <70%; heterogeneous: cytoplasmic staining.

E-cadherin/ $\alpha$ -catenin 발현과 조직학적 진단간의 상관관계는 통계학적 의미가 있었다( $p < 0.0001$ ). 즉, 자궁경부가 양성질환, 상피내암, 침윤암으로 진행될수록 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin의 발현이 소실되거나 낮아짐을 관찰하게 되었고 이로 인해 세포간 부착의 결함이 생기고 암의 침습성이 일어남을 알게 되었다.

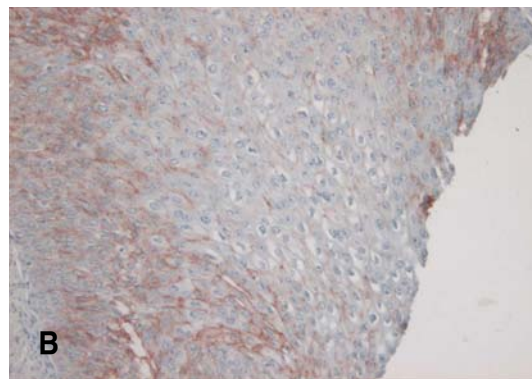
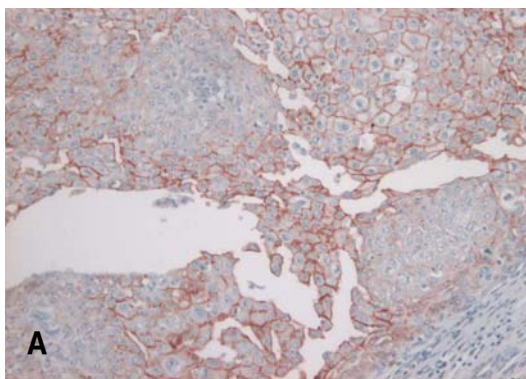
자궁경부암의 1차적인 원인은 인유두종바이러스 (Human papillomavirus) 16, 18형의 감염이다. 그 바이러스의 종양단백질인 E6와 E7은 세포주기, apoptosis, 유전체 통합(genome integrity)을 조절하는데 관여하는 세포단백질과 상호작용하여 이를 비활성화시킨다. 그러나 암의 다인자적인 속성 때문에 인유두종 바이러스에 감염된 세포가 완전히 암세포로 전환하기 위해서 숙주 유전자 기능의 또 다른 변화가 일어나야만 한다. 여러 변화들 중 세포간 부착 기능 이상이 종양세포의 침습성 및 전이에 있어서 중요할 것으로 사료되어 최근에 세포부착분자인 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.<sup>5</sup>



**Fig. 4.** Normal expression for E-cadherin (A) &  $\alpha$ -catenin (B) was preserved showing uniform and membranous staining pattern.

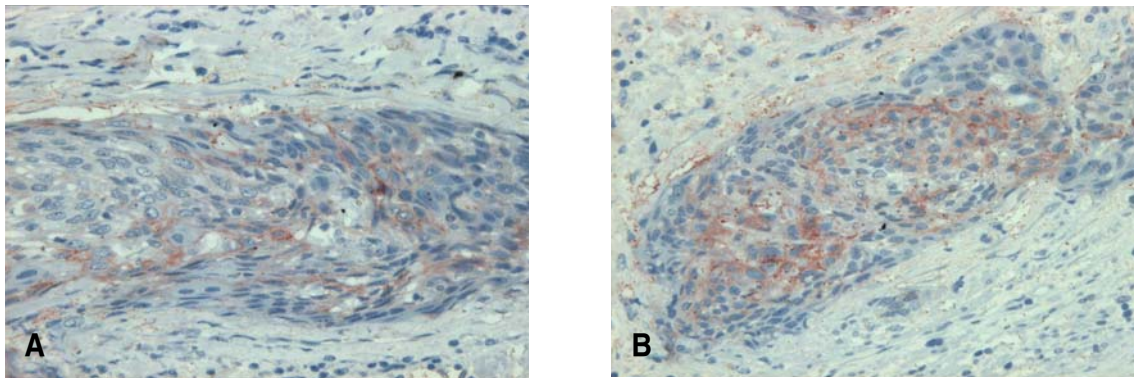


**Fig. 5.** In negative immunoreaction for E-cadherin (A) & carcinoma cells showed no immunoreaction but the adjacent normal mucosa showed prominent membranous expression.



**Fig. 6.** In low positive immunoreaction for E-cadherin (A) &  $\alpha$ -catenin (B), carcinoma cells showed less than 70% positivity.





**Fig. 7.** In heterogeneous immunoreaction for E-cadherin (A) &  $\alpha$ -catenin (B), carcinoma cells showed cytoplasmic reaction.

Cadherin은 723-748의 아미노산으로 구성되어 있다. 단일막간 domain에 의해 아미노말단 세포의 domain과 카르복시말단 세포질 domain으로 나뉜다 (Fig. 1). cadherin은 E-cadherin (epithelial cadherin 또는 uvomorulin), N-cadherin (neural cadherin), P-cadherin (placental cadherin), L-CAM (liver cell adhesion molecule)으로 분류되며 서로 결합특이성을 갖고, 배아시기에는 서로 다른 시-공간형태(spatio-temporal pattern)로서 형태발생에 있어서 중요한 역할을 한다.<sup>1,3,8</sup> 이중 E-cadherin은 120 kD 세포표면당단백으로서 상피세포 특이적인 세포간의 부착에 필수적인 요소가 된다.<sup>1,6</sup> 다른 부착계는 비활성화되더라도 cadherin이 작용하는 한 세포간 부착에는 거의 영향을 미치지 않는다.<sup>8</sup> 그만큼 E-cadherin이 세포간 부착에 있어서 중요한 입자가 된다. Human E-cadherin은 polyclonal antibody를 사용하여 1983년 Damsky에 의해 처음으로 cell-cell adhesion molecule 120/80으로 확인되었다.<sup>12</sup> 본 저자는 human E-cadherin에 특이성을 갖는 monoclonal antibody를 사용하여 면역화학조직염색을 시행하였다.

1989년 Behrens는 여러 가지 암세포계의 침습성을 조사하기 위해 collagen assay를 시행하였다. 이 실험에서 E-cadherin이 있는 세포계는 대개 collagen gel을 침습하지 않지만, E-cadherin이 없는 세포계에서는 침습성이 있음을 알게 되었다. 그리고 또 다른 실험을 통해 E-cadherin complement DNA transfection에 의해 유방암을 예방할 수 있음도 입증하였다. 여러 실험을 통해 항체로 cadherin을 억제하면 종양세포에 의한 정상조직 침윤이 자주 발생을 알게 되었다.<sup>8</sup> 이런 사실로

미루어 E-cadherin은 종양억제와 침윤억제분자로서 기능을 하는 것으로 예견될 수 있고, 자궁경부 질환 및 자궁경부암을 포함한 다양한 상피조직에서도 암이 발생하는 동안에 기능적으로 이상이 일어남을 알 수 있다.<sup>2</sup> 그러므로 E-cadherin 발현은 인간암세포의 분화와 침습성을 보여주는 결정적 단서이고 E-cadherin이 생체내에서 종양세포의 침습을 예방하는 데에 역할을 할 수 있음을 주장하였다.<sup>1</sup>

악성종양에서는 몇몇 부착분자들에 의해 일어나는 부착상호작용이 크게 변화하여 세포-세포간 그리고 세포-세포의 기질간의 상호작용의 변화를 일으킨다.<sup>6</sup> 암 전이의 초기단계는 세포들이 원발종양종괴로부터 떨어지는 것이다.<sup>8</sup> 여러 상피기원의 종양들에서 E-cadherin의 down-regulation이 발견된다.<sup>6</sup> catenin은 cadherin과 연관된 세포질내 단백질로서 세포 골격에 적절히 고정되기 위해서는 E-cadherin과 연결되어야만 하고, E-cadherin의 결합기능을 위해서도 필요하다(Fig. 2).  $\alpha$ -catenin의 기능을 상실하면 정상적인 E-cadherin도 기능적으로 불활성화 된다.<sup>9</sup>

이를 토대로 cadherin adhesion systems의 이상을 일으키는 기전을 3가지로 요약하면 첫째, E-cadherin발현이 down regulation되고 그것이 돌연변이를 일으킬 때,<sup>11</sup> 둘째,  $\alpha$ -catenin을 포함한 catenins의 이상 또는 소실, 셋째,  $\beta$ -catenin의 phosphorylation 같은 생화학적 변화를 들 수 있다.<sup>10,11</sup>

$\alpha$ -catenin은 E-cadherin의 세포내 domain에 연결되어 있기 때문에 본 저자는 자궁경부암으로의 진행 동안 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin이 정량적, 그리고 정상적으로 변화하는지를 입증하기 위해서 양성자자궁경부질환,

자궁경부상피내암, 침윤성암에서 이들 분자의 발현 정도를 조사하였다.

형태적으로 중층편평상피에서 종양으로의 전환과 관련된 가장 중요한 현상은 정상적 성숙의 소실이다. 자궁경부는 편평상피의 종양으로의 진행을 보여주는 일종의 생체모델이 된다. 정상자궁편평상피는 정해진 순서로 성숙되는데, 여러 가지 모양의 핵이 나타나고, 핵과 세포질 비율이 변화하면서 정해진 양상의 성숙 과정이 깨어지고 자궁경부상피내 종양이 일어나게 된다.<sup>1</sup> 자궁경부상피내 종양에서 보이는 분화와 상피구조의 결함은 본 저자가 이 연구에서 다루고 있는 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin같은 부착분자의 발현 또는 기능 이상 때문이다.

E-cadherin이 자궁경부상피의 기저층으로부터 중층과 표층으로 갈수록 발현이 감소하는 것은 중층상피의 상피벗음(desquamation)과정에 이 분자가 관련됨을 나타내고 조직구조를 유지하는 데에도 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 편평상피화생부위는 E-cadherin이 상피전체에서 균일하지 않은 분포를 보이고, 미성숙 편평상피보다 덜 진하게 면역염색된다.<sup>6</sup> E-cadherin의 활성도 소실이 종양세포의 일반적인 특성은 아니지만 암으로의 전환에 의해 발현이 영향을 받을 수 있다. 또 다른 흥미로운 관찰은 암세포에서 세포 경계와 더불어 세포질에서도 E-cadherin이 발현되었고, 반면에 정상 세포의 세포질에서는 발현되지 않았다는 것이다.<sup>12</sup>

어떤 실험적 자료에서 E-cadherin이 전이에도 관련 있음을 보여주고 있다. 전이된 병변에서의 염색양상과 강도가 일차적인 종양(primary tumor)에서 보이는 것과 거의 같았다. 이것으로 미루어 부착능력의 소실이 전이를 촉진하는 한 요소도 될 수 있음을 알 수 있었다.<sup>12</sup>

이처럼 정상세포와 암세포 사이에는 분명한 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin발현차이를 보이고 있으며 이로 인해 암의 침습성에 차이를 보일 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113(Pt 1): 173-85.
2. Hart IR, Saini A. Biology of tumour metastasis. *Lancet* 1992; 339: 1453-7.
3. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 237-52.
4. Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, et al. Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1995; 176: 151-9.
5. Denk C, Hülsken J, Schwarz E. Reduced gene expression of E-cadherin and associated catenins in human cervical carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 1997; 120: 185-93.
6. Carico E, Atlante M, Bucci B, Nofroni I, Vecchione A. E-cadherin and  $\alpha$ -catenin expression during tumor progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 80: 156-61.
7. De Boer CJ, van Dorst E, van Krieken H, Jansen-van Rhijn CM, Warnaar SO, Fleuren GJ, et al. Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix. *Am J Pathol* 1999; 155(Pt 2): 505-15.
8. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451-5.
9. Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-cadherin and integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 481-6.
10. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996; 77(Pt 8): 1605-13.
11. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 806-11.
12. Inoue M, Ogawa H, Miyata M, Shiozaki H, Tanizawa O. Expression of E-cadherin in normal, benign, and malignant tissues of female genital organs. *Am J Clin Pathol* 1992; 98(Pt 1): 76-80.

## 국문초록

**목적 :** E-cadherins은 상피특이적이고 칼슘 의존적 세포간 부착에 관여하는 막간 당단백질군에 속한다. E-cadherin의 기능은 그것과 세포질에서 연결되는  $\alpha$ -catenin에 의해 조절된다.  $\alpha$ -catenin은 actin과 E-cadherin을 연결시킨다. 이 연구는 E-cadherin a/ $\alpha$ -catenin의 발현이 양성자궁질환, 상피내암, 침윤암에서 어떤 차이를 보이는지 알아보는 것이다.

**연구 방법 :** 89개의 조직표본을 편치생검, 원추 절제술, 자궁적출술에 의해 얻었다. 절편은 FIGO staging에 따라 양성 경부, 상피내암, 침윤암으로 분류되었다. E-cadherin/ $\alpha$ -catenin의 발현은 monoclonal antibody로 면역조직화학 염색을 하여 조사하였다. 세 군간의 E-cadherin/ $\alpha$ -catenin의 발현양상을 조사했다. 통계적 의미를 조사하기 위해  $\chi^2$  test를 이용했다.

**결과 :** E-cadherin에서는 정상염색(normal), 낮은 양성(low-positive), 이종(異種, heterogeneous)염색, 음성(negative) 염색 결과가 양성 질환인 경우 각각 19, 1, 0, 2예, 상피내암인 경우 12, 5, 3, 4예, 침윤암인 경우 10, 8, 20, 5예를 보였다.  $\alpha$ -catenin에서도 양성 질환인 경우 각각 18, 1, 1, 2예, 상피내암인 경우 9, 9, 4, 2예, 침윤암인 경우 8, 8, 19, 8예를 보였다. 조직검사와 E-cadherin과  $\alpha$ -catenin의 발현강도와 분포사이에 통계적으로 의미있는 상관관계( $\chi^2$  test,  $p<0.0001$ )를 보였다. 즉 양성질환 보다 상피내암, 침윤암일 수록 두 물질의 비정상적인 발현양상을 관찰할 수 있었고, E-cadherin/ $\alpha$ -catenin의 발현도 변화와 조직학적 진단간에 상관관계가 있었다.

**결론 :** 이 결과에 따라 저자는 자궁경부암에서 종양진행에 따라 E-cadherin/ $\alpha$ -catenin의 발현에 있어서 분포와 강도가 변화함을 알게 되었다.

**중심단어 :** E-cadherin,  $\alpha$ -catenin, 자궁경부암