

자궁경부 종양에서 인유두종 바이러스 감염과 p53 코돈 72의 다형성

순천향대학교 의과대학 천안병원 산부인과학교실, *병리과학교실
배동한 · 김종수 · 최승도 · 선우재근 · 신현철 · 남계현 · 김창진*

Human Papillomavirus Infection and Polymorphism of p53 codon 72 in the Uterine Cervical Neoplasia

Dong Han Bae, M.D., Jong Soo Kim, M.D., Seung Do Choi, M.D.,
Jae Gun Sunwoo, M.D., Key Hyun Nam, M.D., Chang Jin Kim, M.D.*

*Department of Obstetrics and Gynecology, *Department of Pathology, University of Soonchunhyang,
College of Medicine Soochunhyang University Chonan Hospital, Chonan, Korea*

Objective : The uterine cervical neoplasia is one of the most frequent gynecologic tumor in Korean women. Though the precise pathogenic mechanisms were not elucidated, human papillomaviruses (HPVs) has been considered as a strong candidate for the cause of uterine cervical neoplasia.

Methods : About 100 subtypes of HPV were known, and they were divided into two groups as “high-risk HPVs” and “low-risk HPVs” according to their oncogenic potentialities. It was known that arginine (Arg) residue at codon 72 of p53 tumor suppressor gene could be used as a marker for the risk of cervical epithelial neoplasia associated human papilloma virus infection. But the notions are still controversial. Studies to date have focused mainly on Caucasians despite marked ethnic variations in both the p53 polymorphism and the different genotypes of human papillomavirus associated with cervical neoplasia. In this study, the p53 codon 72 status in 125 Korean women with cervical neoplasia and 200 Korean healthy women was determined. In addition, the different genotypes of human papillomavirus associated with cervical neoplasia was also determined by DNA Chip.

Results : The most frequent subtypes of HPV associated with uterine cervical neoplasia in Korean women were 16 (25.6%), 58 (16%), other type (10.4%), 52 (10%) and 18 (4.8%) in order of frequency. The polymorphic rate of p53 codon 72 in 200 Korean women was Arg/Ar (47%), Arg/Pro (43%) and Pro/Pro (10%) respectively. The polymorphic rate of p53 codon 72 in HPV associated uterine cervical neoplasia was Arg/Ar (55.5%), Arg/Pro (38.9%) and Pro/Pro (5.50%) respectively, which was not statistically significant compared to the normal control. In 16/18 genotypes associated cervical neoplasia, the polymorphic rate of p53 codon 72 was 44.8% (Arg/Arg), 42.1% (Arg/Pro) and 13.1% (Pro/Pro) respectively, while in 58/52/other type/33/35/40/44 genotypes, it was 36.5% (Arg/Arg), 50% (Ar/Pro), and 13.5% (Pro/Pro) respectively. There was no statistical significance between two groups.

Conclusion : Above results showed that the genotypes of HPV associated with uterine cervical neoplasia in Korean women were different from those of Western countries, and there was not significant difference between the polymorphism of p53 codon 72 and genotypes of HPV associated with uterine epithelial neoplasia.

Key Words : Human Papillomavirus (HPV), Polymorphism of p53 codon 72, Uterine cervical neoplasia

서 론

자궁경부 종양은 우리나라의 여성에 흔한 종양이

다. 이의 원인으로 인유두종바이러스(human papillomavirus: HPV)의 감염이 거론되고 있다.^{1,3} 현재까지 100여종의 인유두종바이러스 유전형이 발견되었고,

이들 중 23여종의 아형이 여성생식기 감염과 관련 있는 것으로 알려졌다. 이들 유전형들은 감염 후 발암능력의 정도에 따라 저 위험 군(6, 11, 42, 43 및 44)과 고 위험 군(16, 18, 31, 33, 50, 56, 58, 64 및 68)으로 나뉘기도 한다. 저 위험 군은 감염 후 생식기에 유두종을 일으키는 반면 고 위험 군은 이와 다르게 감염상피세포를 악성세포로 변형시키는 능력이 있어 자궁경부 상피 암종을 유발한다. 감염 바이러스의 아형은 인종적, 지역적으로 서로 다른 양상을 보인다. 서구에서는 자궁경부 상피 암종과 관련 있는 고 위험군 유전형으로 16, 18형이 알려졌다. 이들 고 위험군 아형들의 종양 단백질 E6와 E7은 세포주기 조절 단백질 p53 및 pRb와 각각 작용하여 이들의 기능을 억제함으로써 암종을 일으키는 것으로 알려졌다.³

암 발생과 관련 있는 유전자의 다형성(polymorphism)은 각 개인의 암 발생 경향과 밀접한 관련이 있다. p53 유전자는 일종의 암 억제 유전자로서 50%의 악성종양 발생이 이 유전자의 이상과 관련 있는 것으로 알려졌다. 근자에는 이 유전자의 다형성과 인유두종바이러스 감염과 관련된 자궁경부 상피종양발생과 밀접한 관련이 보고되고 있다. 즉 코돈 72의 Arg/Arg 동형접합(homozygous)은 Arg/Pro 이형접합(heterozygous)보다 자궁 경부 암종 발생이 7배 정도 높다고 한다.⁴

또한 이러한 유전자의 다형성은 인종마다 많은 차이가 있기 때문에 인종에 따른 연구가 이루어 져야 한다. 지금까지의 연구 방향은 모두 인유두종바이러스 중 고위험군인 16과 18 유전형 감염과 동반된 자궁경부종양과 p53 코돈 72의 다형성과의 관계에 대한 연구이었고 16, 18 유전형 이외의 다양한 고 위험군 바이러스감염과 동반된 자궁경부종양과 p53 코돈 72의 유전자 다형성에 대한 연구는 드문 실정이다.

이에 본 연구에서는 125예의 자궁 경부 상피내종양 및 침윤성 암종을 대상으로 다양한 인유두종바이러스 감염을 DNA chip 이용하여 검사하고 또한 p53 코돈 72의 유전자다형성을 대립유전자 특이중합효소연쇄반응(allele specific polymerase chain reaction)기법으로 검사하여 우리나라 여성에서의 p53 코돈 72 유전자 다형성과 자궁경부종양과 관련이 많은 인유두종바이러스 감염과의 관계를 연구하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

순천향대학교 천안병원 산부인과에서 2000년 3월부터 2003년 3월까지 자궁경부종양 및 침윤 암으로 진단된 자궁경부 생검 혹은 자궁적출 조직 125예를 대상으로 하였다. 이들의 조직에서 DNA를 추출하고 이어 DNA chip을 이용하여 인유두종바이러스 유전형을 검사하였다. 총 125예의 평균 연령은 53.8세 이었고, 이들 중 low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) 30예, high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) 50예, 및 침윤성암이 45예 이었다.

2. 방법

1) DNAChip에 의한 HPV 유전형 검사

DNA 추출은 Paraffin block을 7 um로 절편을 만든 후 탈파라핀 및 함수 과정을 거쳐 hematoxylin-eosin염색을 하였다. 염색된 조직을 40배 현미경 시야에서 병변부위를 미세절제하여 1.5 ml Eppendorf tube에 넣었다. 이곳에 500 µl의 proteinase K digestion buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.5% sodium dodecyl sulfate; 1 mM CaCl₂; 및 100 µg/ml muscle glycogen)을 넣어 55°C -60°C에 24시간 처리하였다. 또한 RNase I 0.5 µl를 첨가하여 37°C에서 15분간 부란시킴으로써 오염된 RNA를 제거하였다. Protein PPT Buffer (Solution 3) 70 µl를 첨가하고 어름에서 5분간 부란시킨 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 분해된 단백질과 RNA 및 기타 부유물을 제거하였다. 상층액을 취하여 새 시험관에 옮기고 isopropanol을 200 µl 첨가하여 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 DNA를 침전시켰으며, 70% ethanol을 이용하여 남아있는 isopropanol을 제거하고 공기중에서 침전물을 말렸다. 그 후 멸균된 3차 증류수를 이용하여 20 µl에 DNA를 녹여 4°C에서 보관하였다.

환자의 말초혈액대신 자궁조직 병변부위 이외 조직에서 위와 같은 방법으로 DNA를 추출하였고, 정상 대조군은 신체건강한 200명의 여성 말초혈액에서 DNA를 추출하였다.

HPV DNA genotyping은 검체의 인유두종바이러스 아형을 검사하기 위하여 HPV DNAChip(바이오메드랩, 서울, 한국)을 사용하였고 성명서에 제시한 방법을 따랐다. HPV DNAChip 구성은 다음과 같다(Fig. 1). 상기 방법에 의해 추출된 DNA를 주형으로 하여 키트에서 제공하는 시발체(HPV primer 1: 5'-TTT GTT

HPVDNAChip Format

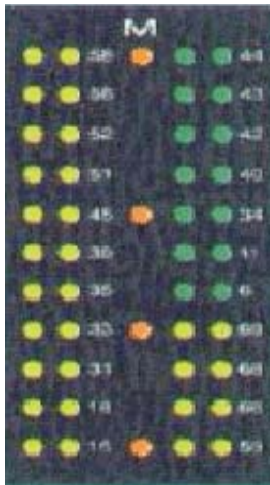


Fig. 1. HPV DNAChip Format.

M: Position marker (β -globin).

High risk HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69.

Low risk HPV: 5, 11, 34, 40, 42, 43, 44.

ACT GTG GTA GAT ACT AC-3', HPV primerII: 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3', β -globin PC03: 5'-TGC ACC TGA CTC CTG AGG GAA GTC TGC CG-3', β -globin PC04: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CCT TGC CCC AC-3')를 이용하여 HPV는 아형검사를 위하여 증폭하였고 β -globin은 DNA 증폭여부를 판단하기 위해 양성대조군으로 증폭하였다. 유전자 절편의 증폭을 위한 반응액 조성은 다음과 같다. 50 μ l reaction 시 10X PCR buffer (Mg^{2+} free, TaKaRa) 5 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 8 μ l, Primer I, 25 pmole/ μ l 0.5 μ l, Primer II, 25 pmole/ μ l 0.5 μ l, dNTP (2 mM dATP, dTTP, dGTP, 1.0 mM dCTP) 혼합액 1 μ l, 25 nmol Cy5-dUTP 0.1 μ l, Taq DNA polymerase (TaKaRa, 5 U/ μ l) 2 U, Template 2 μ l를 각각 첨가하였다. PCR 온도의 조건은 다음과 같다. 우선 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 변성을 시행하였다. 그 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 수행하기를 5주기 실시 후 다시 94에서 1분, 50 $^{\circ}$ C에서 2분 72 $^{\circ}$ C에서 15초간 30주기를 수행하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 유지시킨 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 보관하여 교잡반응(Hybridization) 시 이용하였다. 교잡반응은 증폭된 검체 DNA (HPV PCR product 10 μ l + β -globin PCR product 5 μ l + 멸

균수 25 μ l)에 4 μ l (1/10 vol.)의 DNA 변성용액 (3 N NaOH)을 가한 후 실온에서 5분간 방치한다. 1 M Tris-HCl (pH 7.2) 2 μ l (1/20 vol.)와 DNA 변성용액(3 N HCl) 4 μ l (1/10 vol.)를 가한 후 얼음 위에서 5분간 방치한다. 12X SSPE 50 μ l (100 μ l volume의 cover slip의 경우), 10% SDS 0.5 μ l를 가하여 잘 섞는다. 이를 HPVDNAChip에 하여 40 $^{\circ}$ C에서 습도를 유지하며 반응시킴으로써 반응 형광이 나타나도록 유도하였다. 그 후 3X SSPE Buffer에서 2분간 수세하고, 다시 1X SSPE Buffer에서 2분간 수세 하였다. 결과는 Laser Scanner (GenePix 4000B, Axon Instruments, USA)를 이용하여 판독하였다.

p53 코돈 72 대립유전자특이 연쇄증합효소반응(p53 codon 72 allele specific PCR)의 실험은 Storey 등⁴의 방법을 기본으로 하여 다음과 같이 수정하였다. p53 코돈 72의 arginine 대립유전자 특이 PCR primer는 sense: 5'-TCCCCCTTGCCGTCCCAA-3', antisense: 5'-CTGGTGCAGGGGCCACG-3'이고 이들의 PCR 산물 크기는 142 bp이다. Proline 대립유전자 특이 PCR primer는 sense: 5'-GCCAGAGGCTGCTCCCC-3' antisense: 5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3'이며 이들의 PCR 산물 크기는 178 bp이다. PCR 반응 조건은 총 부피 20 μ l로 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM KCl; 1.5 mM $MgCl_2$; 0.01% gelatin: 각각의 primer 200 pmol; 2 U Taq DNA polymerase; 100 ng 추출 DNA를 섞어 반응시켰다. 반응조건은 2분 동안 94 $^{\circ}$ C에서 2분 거치 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 반응시키고 이를 30회 반복하였다. 그 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치한 후 각 대립유전자 PCR 산물을 섞어 3% agarose gel에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV로 판독하였다.

2) 통계학적 검정

각 실험군간의 대립유전자 빈도를 계산하였고, 유전자형(genotype), 대립유전자형(allelotype) 및 종양과 인유두종바이러스감염과의 관계등은 χ^2 Fisher exact test로 검사하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적 의의로 하였다.

결 과

인유두종바이러스의 특이한 유전형은 DNAChip상에 특이한 반응으로 나타났다(Fig. 2).

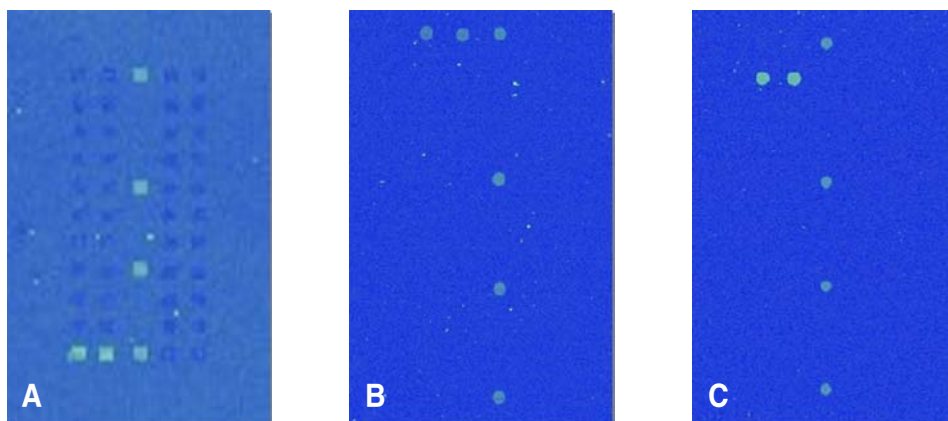


Fig. 2. DNA Chip Scanning results.

a: HPV 16, b: HPV, 58 c: HPV.

Table 1. HPV Genotypes in the Uterine Cervical Neoplastic Lesions

Lesions	HPV Genotypes							
	Neg.	16	58	52	18	33+35	40+44	others
LSIL (n=30)	23 (76.6)	2 (6.7)	-	-	-	-	3 (10)	2 (6.7)
HSIL (n=50)	7 (14)	14 (28)	12 (24)	4 (6)	2 (4)	1 (2)	1 (2)	9 (18)
Inv. Ca. (n=45)	5 (11.1)	16 (35.5)	8 (17.8)	6 (13.3)	4 (8.9)	2 (4.4)	2 (4.4)	2 (4.4)
Total (n=125)	35 (28)	32 (25.6)	20 (16)	10 (8)	6 (4.8)	3 (2.4)	6 (4.8)	13 (10.4)

(): %, LSIL: Low grade intraepithelial lesions, HSIL: High grade intraepithelial lesions, Inv. Ca.: Invasive carcinoma, Neg.: Negative for HPV

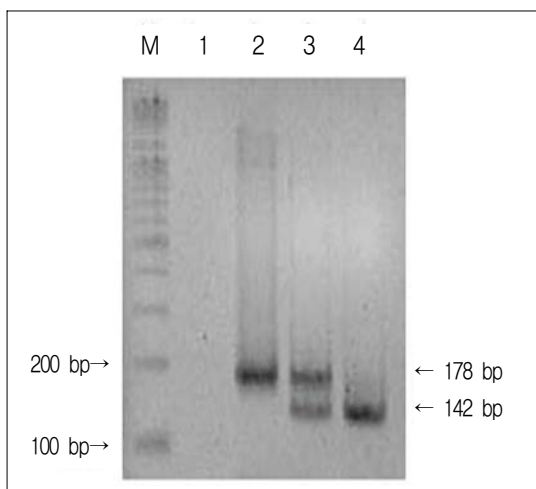


Fig. 3. Allele specific PCR product of p53 codon 72 polymorphism.

line 1: negative, line 2: Pro/Pro homozygous, line 3: Arg/Pro heterozygous, line 4: Arg/Arg homozygous.

총 125예 중 HPV감염 양성예가 90예(72%), 음성예가 35예(28%)이었으며, 감염양성 예 중 HPV 16이 32예(35.5%), HPV 58이 20예(22.2%)이었고, 자궁경부종양과 관련이 많은 HPV 유전형으로 알려진 HPV 18형은 6예(6.6%)이었다. HPV 양성 예 중 중복감염이 9예(7.2%)에서 관찰되었다. 이외의 유전형이 13예(10.4%)로 HPV 58 유전형 다음으로 많은 빈도수를 보였다 (Table 1).

p53 코돈 72의 다형성의 대립유전자 특이 PCR 결과로 Arg/Arg 동형접합형은 142 bp 크기의 band로 나타나고, Pro/Pro 동형접합형은 178 bp 크기의 band로 나타났으며, 이형접합은 각각의 band가 나타났다(Fig. 3).

200명의 건강한 한국여성을 대상으로 한 결과로, Arg/Arg 동형접합형은 94예로 47%, Pro/Pro 동형접합은 20예로 10%, Arg/Pro 이형접합은 86예로 43%이었다. 인유두종바이러스 감염과 동반된 자궁경부상피종양 환자에서의 p53 코돈 72 유전자다형성을 정상 대

Table 2. p53 codon 72 genotype and allele frequency in controls and patients

	Genotypes			Allele frequency	
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
Patients (n=125)	69 (55.2)	46 (36.8)	10 (8)	184 (73.6)	66 (26.4)
HPV infection (n=90)	50 (55.5)	35 (38.9)	5 (5.5)	135 (75)	45 (25)
control (n=200)	94 (47)	86 (43)	20 (10)	274 (68.5)	126 (31.5)

():% p>0.05

Table 3. p53 codon 72 genotype according to the uterine cervical neoplasia

	Genotype			Allele frequency	
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
LSIL (n=30)	18 (60)	10 (33.3)	2 (6.7)	46 (76.7)	14 (23.3)
HSIL (n=50)	26 (52)	20 (40)	4 (8)	72 (72)	28 (28)
Invasive Ca. (n=45)	25 (55.6)	16 (35.6)	4 (8.8)	66 (73.3)	24 (26.7)
Control (n=200)	94 (47)	86 (43)	20 (10)	274 (68.5)	126 (31.5)

():% p>0.05

Table 4. p53 codon 72 genotype and allele frequency in relation to HPV subtype

		Genotype			Allele frequency	
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
HPV genotype	n					
HPV 16	32	15 (46.8)	13 (40.6)	4 (12.5)	43 (67.2)	21 (32.8)
HPV 58	20	9 (45)	8 (40)	3 (15)	26 (65)	14 (35)
HPV 52	10	4 (40)	5 (50)	1 (10)	13 (65)	7 (35)
HPV 18	6	2 (33.3)	3 (50)	1 (16.7)	7 (58.3)	5 (41.7)
HPV 33+35	3	1 (33.3)	2 (66.7)	-	4 (66.7)	2 (33.3)
HPV 40+44	6	1 (16.7)	4 (66.6)	1 (16.7)	6 (50)	6 (50)
Others	13	4 (30.7)	7 (53.8)	2 (15.4)	15 (57.7)	11 (42.3)
Control	200	94 (47)	86 (43)	20 (10)	274 (68.5)	126 (31.5)

():% p>0.05

Table 5. Comparison of p53 codon 72 genotype and allele frequency in different HPV risk groups

	Genotype			Allele frequency	
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
High risk HPV 16/18 (n=38)	17 (44.8)	16 (42.1)	5 (13.1)	50 (65.8)	26 (34.2)
Intermediate risk including other type (n=52)	19 (36.5)	26 (50)	7 (13.5)	64 (61.5)	40 (38.5)
Control	94 (47)	86 (43)	20 (10)	274 (68.5)	126 (31.5)

():% p>0.05

조균과 비교할 때 Arg/Arg 동형접합이 종양환자에서 다소 높은 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다(Table 2). 조직학적 등급에 따른 p53 코돈 72 유전자다형성의 관계는 통계적으로 유의성이 없었다(Table 3).

종양환자에서 동반된 인유두종바이러스 각각의 아형과 대립유전자 빈도를 대조군과 비교해 볼 때, 각 아형에 따른 특이한 차이는 관찰되지 않았다(Table 4).

종양과 동반된 바이러스 아형을 고위험군(16/18)과 중등위험군(58, 52, 33, 35, 40, 44 이외 아형)으로 구분 후 이들에서의 p53유전자 다형성을 비교한 바, 각 군별 통계적 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 5).

고 찰

일반적인 암종 발생 기전 중 하나로 암 억제유전자의 발현감소 혹은 유전자산물의 이상을 들 수 있다. 종양 발생과 관련 있는 암 억제유전자 중 p53유전자는 50%의 각종 악성종양 발생과 관련이 있다. 인유두종바이러스는 자궁 경부 암종 발생과 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 이후 이의 암발생기전에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 이의 발병 원인으로 1989년 zur Hausen⁵이 처음으로 인유두종바이러스 감염이 자궁경부암과 관련 있다는 연구를 발표한 후로 이 바이러스와 종양발생과의 관련에 대한 많은 연구가 이루어졌으며 이의 아형은 지금까지 100여 종이 알려졌다. 이들 아형을 자궁경부상피종양 발생과 관련하여 고위험군, 중등 위험군, 저위험군으로 나누는데, 이러한 각 군의 바이러스 아형은 지역적, 인종적으로 상이한 양상을 보인다. 지금까지 미국과 유럽에서는 자궁경부 상피 암종 발생과 가장 관련 있는 고 위험 군으로 16, 18이 알려졌으나 동양권에서는 이와 상이한 양상이 보고되고 있다. 즉, Chan 등⁶이 홍콩여성을 대상으로 한 연구에서 58유전형이 16유전형에 이어 두 번째(23.8%)의 감염 빈도를 보인다고 하였고, Sasagawa 등⁹은 16 유전형이 HSIL와 편평상피종양에서 가장 감염 빈도가 높았고, 다음 HSL에서는 58유전형(15%), 침윤암중에서는 52 유전형(12%)로 동양에서는 18 유전형 보다 58 혹은 52 유전형의 감염이 서구에 비하여 많았다고 하였다. 또한 Liaw 등⁸은 중국 여성을 대상으로 한 연구에서 서구에서와 달리 52 유

전형과 58 유전형이 자궁경부암 발생과 관련 있다고 하였다. 본 연구에서도 자궁경부종양과 관련 있는 인유두종 바이러스 유전형은 16, 58, 52, 18순의 빈도를 보였다.

인유두종바이러스 감염에 의한 악성종양 발생 기전으로는 E6와 E7 바이러스 단백이 중요한 역할을 하는데, E6와 E7단백은 세포주기 조절을 와해시키는 한편 암 억제 유전자 산물인 p53과 Rb와 결합하여 이들의 작용을 억제함으로써 악성종양을 일으키는 것으로 알려졌다.^{9,10} 이 후 Storey 등⁴은 p53유전자의 코돈 72의 다형성이 인유두종바이러스에 의한 발암기전과 관련 있음을 발표하였다. 즉 p53 코돈 72의 다형성은 동형접합인 Arg/Arg, Pro/Pro 과 이형접합인 Arg/Pro 등이 있는데 이들 중 Arg/Arg 동형접합 p53 단백질은 바이러스 종양 단백질 E6에 의하여 쉽게 분해되기 때문에 종양이 더 쉽게 생길 수 있으며 따라서 p53 코돈 72의 유전자다형성중 동형접합인 Arg/Arg은 인유두종바이러스와 관련된 자궁 경부 상피 암종의 위험 표식자로 활용 될 수 있다고 한다. 그러나 이러한 연구 결과는 연구자들에 따라 서로 상이하기 때문에 여러 논란의 대상이 되고 있다. 미국, 영국, 일본, 체코, 이탈리아, 및 노르웨이 등 여러 지역에서 보고된 바로는 p53 유전자다형성과 인유두종바이러스에 의한 암종 발생과 관련이 없다고 한다.¹¹⁻¹⁶ Storey 등⁴이 영국에서 발표한 후 같은 영국내의 발표^{12,17} 결과가 상이 할 뿐 아니라 심지어는 같은 영국내에서 지금까지의 결과와는 상반된 결과인 Arg 동형접합이 인유두종바이러스에 의한 종양발생을 억제시켜 준다는 보고까지 있다.¹⁸ 또한 스웨덴^{19,20}에서도 서로 다른 결과를 보고하고 있다. 우리나라에서는 백 등,²¹ 김 등,²² 및 김 등²³이 한국인을 대상으로 이와 관련된 발표에서 p53 유전자 다형성과 인유두종관련 자궁경부상피종양 발생과의 관련 가능성을 시사하였다. 그러나 이들의 연구는 인유두종바이러스중 서구에 많은 16/18 아형과 관련된 고등급의 자궁경부상피종양을 대상으로 한 연구였다. 본 연구에서는 서구와 다른 빈도를 보이는 인유두종바이러스 감염을 검사하기 위하여 다양한 아형을 동시에 검사할 수 있는 DNA Chip을 사용하여 아형을 검사하였고 이들의 자궁경부암발생과의 관계와 p53유전자의 다양성을 새로운 각도에서 연구하였다. 본 연구에서 우리나라 여성의 p53 코돈 72의 유전형은 한국에서 보고된 다른 연구자들의 보고와 비슷한 결과이다. 그

리고 서구에서와 달리 우리나라에서 비교적 흔한 58, 52, 33, 34, 42, 44 유전형 등과 p53 유전자다형성과의 관계를 볼 때 정상인 대조 군에 비하여 특이한 차이점이 없었다. 또한 조직학적 유형별 p53 코돈 72 유전자 다형성은 통계적으로 의의가 없었다. 이러한 연구 결과는 한국여성에서는 감염된 인유두종바이러스의 유전형과 관계없이 바이러스관련 자궁경부종양 발생과 p53 유전자 다형성과는 상호 관련이 없음을 시사하는 것이다.

p53 코돈 72 유전자다형성이 존재하는 부위는 proline이 많은 지역으로 이 부위는 세포고사 (apoptosis)에 중요한 역할을 하는 부위이다.^{24,25} 61번 아미노산과 94번 아미노산 사이의 이 부위는 PXXP가 5회 반복되는 지역으로 이 반복지역 한곳에 72번째의 코돈이 존재한다. 61-94 사이의 아미노산이 결여되면 p53단백의 종양세포 성장을 억제하며 따라서 세포고사 기능이 상실된다.²⁶ 따라서 코돈 72에 Pro이 Arg으로 대체되면 세포고사기능의 저하를 초래하여 암 발생이 촉진된다. 최근에는 p53단백과 비슷한 구조와 기능을 갖는 p73 단백질이 발견되었는데, 코돈 72의 Pro이 Arg으로 대체된 p53 이상 단백질은 p73과 결합하여 이의 기능을 억제함으로써 발암을 촉진시킨다. 따라서 Pro/Pro germline 유전형이 체세포 유전형변이(somatic mutation) 일종인 LOH (loss of heterozygosity)에 의하여 Proline 대립유전자가 소실되어 Arg/Pro 이형접합이 된 경우 intermediate risk 혹은 저위험군 인유두종 바이러스 감염시에도 종양발생 위험이 높다고 한다.²⁷ 우리나라의 여성에서 서구와 달리 intermediate risk group인 58, 52, 35, 44 등의 유전형이 자궁경부상피종양 발생과 관련 있는 것으로 나타났는데 이의 원인으로 p53 코돈 72의 다형성부위에 Proline 대립유전자의 소실에 의한 것일 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 따라서 이에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각한다.

이와 같은 연구의 결과로 125예의 자궁경부상피내 종양 및 침윤성암종을 대상으로 우리나라에 많은 다양한 인유두종바이러스 감염을 DNA chip을 이용하여 검사하고 또한 p53 코돈 72의 유전자다형성을 대립유전자 특이증합효소연쇄반응(allele specific polymerase chain reaction)기법으로 검사하여 우리나라 여성에서의 p53 코돈 72 유전자 다형성과 인유두종바이러스 감염과의 관계를 연구하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 한국인 여성에서 자궁경부 종양 발생과 관련이 있는 인유두종바이러스 유전형은 16형(25.6%), 58형(16%), 기타 유전형(10.4%), 52형(10%), 및 18형(4.8%) 순으로 나타났다.

2. 200명의 여성을 대상으로 검사한 p53 코돈 72의 유전자다형성 유전형 빈도는 Arg/Arg, Arg/Pro, 및 Pro/Pro 각각 47%, 43% 및 10%이었다.

3. 인유두종바이러스 감염과 관련된 자궁경부종양에서 p53 코돈 72의 유전자다형성은 Arg/Arg, Arg/Pro 및 Pro/Pro 각각 55.5%, 38.9% 및 5.5%로 대조군의 47%, 43% 및 10%와 비교하여 통계적 의의가 없었다 ($p>0.05$).

4. 상이한 인유두종바이러스 유전형 간 p53 코돈 72의 유전자다형성은 Arg/Arg, Arg/Pro 및 Pro/Pro 각각 16/18 감염군에서 44.8%, 42.1% 및 13.1%이었고, 58/52/기타 유전형/33/35/40/44형 군에서는 36.5%, 50% 및 13.5%로 각 형에따른 대조군의 47%, 43% 및 10%와 비교할 때 상호 특이한 차이가 없었다($p>0.05$).

이상의 결과를 종합해 보면, 우리나라 여성의 자궁경부종양과 관련된 인유두종바이러스 유전형은 16형과 58형으로 서구의 16형과 18형과 비교할 때 상이함을 알 수 있고, 또한 감염된 바이러스 유전형에 따른 종양발생과 p53유전자 코돈 72의 다형성은 바이러스 관련 자궁경부종양 발생과 관련이 없었다.

참고문헌

1. Milde-Langosch K, Riethdorf S, Loning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch* 2000; 437: 227-33.
2. Munoz N: Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19: 1-5.
3. Zur Hausen H. Viruses in human cancer. *Science* 1991; 254: 1167-73.
4. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 1998; 39: 229-34
5. Zur Hausen H. Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 4677-81.
6. Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF. High prevalence of human papillomavirus

- type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. *J Med Virol* 1999; 59: 232-8.
7. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epid Biom Prev* 2001; 10: 45-52.
 8. Liaw KL, Hsing AW, Schiffman MH, You SL, Zhang TY, Burk R, et al. Human papillomavirus type 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women. *Int J Cancer* 1997; 73: 775-6.
 9. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-7.
 10. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
 11. Malcom EK, Barber GB, Boyd JC, Stoler MH. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Med Pathol* 2000; 13:373-8.
 12. Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington S. p53 codon 72 Arg/Pro polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low and high grade squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 1999; 83: 66-9.
 13. Madeline MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, et al. The p53 Arg 72 Pro polymorphism, Human papillomavirus and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2000; 9:225-7.
 14. Nishikawa A, Figimoto T, Akutagawa N, Iwasaki M, Takeuchi M, Fuginaga K, et al. p53 polymorphism (codon 72) has no relation with the development and clinical features of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 402-7.
 15. Tenti P, Vesentini N, Rondo Spauldo M, Zappatore R, Migliora P, Carnevali L, et al. p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2000; 9: 435-8.
 16. Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale A. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 1998; 396: 530-1.
 17. Lanham S, Campbell I, Watt P, Gornall R. p53 polymorphism and the risk of cervical cancer. *Lancet* 1998; 352: 1631.
 18. Rosenthal AN, Hopster A, Hopster D, Jacobs JJ. p53 codon 72 polymorphism in vulval cancer and vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2000; 83: 1287-90.
 19. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 2001; 61: 608-11.
 20. Gustafsson AC, Guo Z, Hu X, Ahmadian A, Brodin B, Nilsson A, et al. Hpv-related cancer susceptibility and p53 codon 72 polymorphism. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 125-9.
 21. Baek WK, Suh SI, Suh MH, Shin DH, Cho CH, Lee TS, et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Korean women. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 65-7.
 22. Kim JW, Lee CG, Park YG, Kim KS, Kim IK, Sohn YW, et al. Combined analysis of germline polymorphism of p53, GSTM1, GSTT1, CYP1A1 and CYP2E1: Relation to incidences rate of cervical carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2082-91.
 23. Kim JW, Roh JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Polymorphism of TP53 codon 72 and the risk of cervical cancer among Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 55-8.
 24. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc natl Acad Sci* 1996; 93: 5335-40.
 25. Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1996; 15: 887-8.
 26. Zhu J, Jiang J, Shou W. Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene* 1999; 18: 2149-55.
 27. Martin MC, Jost CA, Brooks LA. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature Genet* 2000; 25: 47-54.

국문초록

목적 : 자궁경부상피내종양 및 침윤성암종을 대상으로 우리나라에 많은 다양한 인유두종바이러스 감염을 DNA chip을 이용하여 검사하고 또한 p53 코돈 72의 유전자다형성을 대립유전자 특이중합효소연쇄반응(allele specific polymerase chain reaction) 기법으로 검사하여 우리나라 여성에서의 p53 코돈 72 유전자 다형성과 인유두종바이러스 감염과의 관계를 연구하고자 하였다.

연구 방법 : 순천향대학교 천안병원 산부인과에서 2000년 3월부터 2003년 3월까지 자궁경부종양 및 침윤 암으로 진단된 자궁경부 생검 혹은 자궁적출 조직 125예를 대상으로 하였다. 이들의 조직에서 DNA를 추출하고 이어 DNA chip을 이용하여 인유두종바이러스 유전형을 검사하였다.

결과 : 총 125예의 평균 연령은 53.8세 이었고, 이들중 low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) 30예, high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) 50예, 및 침윤성암이 45예 이었다. 1) 한국인 여성에서 자궁경부종양 발생과 관련이 있는 인유두종바이러스 유전형은 16형(25.6%), 58형(16%), 기타 유전형(10.4%), 52형(10%), 및 18형(4.8%) 순으로 나타났다. 2) 200명의 여성을 대상으로 검사한 p53 코돈 72의 유전자다형성 유전형 빈도는 Arg/Arg, Arg/Pro, 및 Pro/Pro 각각 47%, 43% 및 10% 이었다. 3) 인유두종바이러스 감염과 관련된 자궁경부종양에서 p53 코돈 72의 유전자다형성은 Arg/Arg, Arg/Pro 및 Pro/Pro 각각 55.5%, 38.9% 및 5.5%로 대조군의 47%, 43% 및 10%와 비교하여 통계적 의의가 없었다($p>0.05$). 4) 상이한 인유두종바이러스 유전형 간 p53 코돈 72의 유전자다형성은 Arg/Arg, Arg/Pro 및 Pro/Pro 각각 16/18 감염군에서 44.8%, 42.1% 및 13.1% 이었고, 58/52/기타 유전형/33/35/40/44형 군에서는 36.5%, 50% 및 13.5%로 각 형에 따른 대조군의 47%, 43% 및 10%와 비교할 때 상호 특이한 차이가 없었다($p>0.05$).

결론 : 이상의 결과를 종합해 보면, 우리나라여성의 자궁경부종양과 관련된 인유두종바이러스 유전형은 16형과 58형으로 서구의 16형과 18형과 비교할 때 상이함을 알 수 있고, 또한 감염된 바이러스 유전형에 따른 종양발생과 p53유전자 코돈 72의 다형성은 바이러스관련 자궁경부종양 발생과 관련이 없었다.

중심단어 : 자궁경부암, 인유두종바이러스 유전 16, 18, p53 코돈 72