

면역조직화학법에 의한 자궁경부암 및 자궁경부 상피내종양의 p53 단백질검출

원광대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*

김홍곤 · 최기욱 · 홍기연 · 이희섭 · 민부기 · 김기석 · 문형배*

= Abstracts =

The Detection of the p53 Protein in Cervical Cancer and CIN by Immunohistochemistry

Heung Gon Kim, M.D., Gi Uk Choi, M.D., Gi Youn Hong, M.D., Hee Sub Rhee, M.D.

Bu Kie Min, M.D., Ki Suck Kim, M.D., Hyung Bae Moon, M.D.*

*Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology**

School of Medicine, Wonkwang University, Iri, Korea

The cell cycle is composed of a series of steps which can be negatively or positively regulated by various factors.

p53 gene aberrations are common in human malignancies, and recent studies suggest that in cervical carcinoma p53 function is inactivated either by complex formation with human papilloma virus (HPV) E6 product or by gene mutation.

To study the expression of p53 gene in the cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia, immunohistochemistry for the p53 protein was done in the 47 cases of squamous cell carcinoma, 6 cases of adenocarcinoma and 32 cases of cervical intraepithelial neoplasia.

1. The p53 protein was detected in the 31% of cervical intraepithelial neoplasia (10/32 cases).
2. The p53 protein was detected in the 55% of invasive cervical cancer (29/53 cases).
3. By the histologic type of cervical cancer, the p53 protein was detected in the 57% of squamous cell carcinoma (27/47 cases) and 33% of (2/6 cases) adenocarcinoma.

The p53 protein was more frequently detected in the squamous cell carcinoma than in the adenocarcinoma.

4. By the staging in cervical cancer, the p53 protein was detected in the 31% of stage 0, 50% of stage I a, 50% of stage I b, 75% of stage II a and 50% of stage II b.

Key words : CIN, Cervical Cancer, p53.

I. 서 론

암은 세포내 유전자 이상을 초래하여 세포가 정상적인 조절을 벗어나 성장과 분화의 균형이 깨어져 발생한다. 암 발생에 있어서 종양 유전자는 양성적인 기능을 가지고 있는 반면 종양 억제 유전자는 음성적인 기능을 가지고 있으며, 정상 상태에서는 이 두 종류의 유전자가 적절히 균형을 이루고 정상 세포의 성장과 분화를 조절한다.

종양 유전자 및 종양 억제 유전자들이 발암과정에 많은 역할을 하고 있음이 밝혀져 있고, 유전자 이상은 종양 유전자의 과도한 발현, 전좌 및 돌연변이에 기인한 활성화나 종양 억제 유전자의 결손 또는 돌연변이에 의한 불활성화에 의하여 초래되며 특히 종양 유전자들의 활성화와 종양 억제 유전자의 돌연 변이성 비활성화는 발암 과정에서 흔히 보여지는 소견이다.¹⁻⁴⁾

종양 억제 유전자 중 가장 주목받는 p53 유전자는 염색체 p17에 위치하며, 53kd의 핵 인단백질 농도가 증가하는 현상이 발견되어 Crawford 등⁵⁾은 일종의 발암 유전자로 생각하였다. 정상 p53 유전자는 세포 성장의 조절에 관여하며 이의 불활성화가 암의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 종양 유전자 myc와 ras에 의해 유도된 일차 세포의 형질 전환을 저지시키는 능력이 있으며, 다만 한쪽의 대립 인자만 돌연변이가 일어나도 세포의 암유발을 저지시킬 수 없으므로 p53 유전자는 일종의 우성 음성 조절 유전자이다.⁶⁾

자궁 경부암은 우리 나라 여성에서 가장 많이 발생하는 악성 종양으로서 여성암의 22.0%를 차지한다. 이에 저자들은 자궁경부암 및 자궁경부 상피내종양에서 p53 단백질 발현 빈도를 알아보기 위하여 본 연구를 시도하였다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1992년 1월부터 1994년 6월 사이에 원광대학교 의과대학 산부인과학교실에서 광범위 자궁적출술 및 펀치 생검에 의하여 얻어진 조직을 10% 중성 포르말린에 고정, 파라핀 포매한 후 헤

마토시린에오신 염색을 시행하여 병리 조화적으로 자궁경부암으로 진단된 편평 상피암 47예, 선암 6예, 자궁경부 상피내종양 32예를 선정하여 본 연구 대상으로 하였다.

2. p53 단백질의 면역 조직학적 염색

연구 대상이 된 조직 중 헤마토실린-에오신 염색상 종양세포가 가장 저명하게 관찰되는 파라핀 포매괴를 선택하여 4um 두께로 박절하여 poly-L-lysine이 도포된 슬라이드에 부착하여 xylene으로 탈 파라핀 시킨 후 알코올 및 증류수로 함수시켰으며, p53 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 하기 위하여 LSAB-HRP 방법(DAKO, USA)을 이용하였으며 일차 항체로서 p53 CD-10(DAKO, USA, 1:50 희석)을 사용하였다. 일차 항체 대신 동량의 tris buffer를 이용한 것을 음성 대조 염색으로 하였으며, 양성 대조로서는 염색성이 확실한 위 선암을 이용하였다.

3. 염색 결과 판정

염색 결과의 판정은 고배율 광학 현미경하에서 핵 내에 적색 혹은 적갈색의 뚜렷한 염색상이 관찰되는 경우를 p53 단백질 양성으로 판정하였으며, 헤마토실린 에오신 염색 슬라이드와 비교 관찰하여 병소와 병소 주위를 구분하여 양성 또는 음성세포로 판정하였다. 병소 내에서 관찰되는 세포 중 1% 이상에서 양성세포가 관찰된 경우 양성으로 판정하였다.

4. 병기의 분류

종양의 침범정도, 현미경적 소견, 내진 소견, 자궁경 조직, 골반벽 국소 림프절 전이, 원격전이 여부에 따라 FIGO 분류법에 의해 0, Ia, Ib, IIa 및 IIb기로 병기를 나누었다.

III. 성 적

1. 자궁경부 상피내종양에서 p53 단백질 발현빈도 : 자궁경부 상피내종양 1과 2(CIN I & 2)에서는 각각 10예 중 3예(30%)에서 p53 단백질 양성을 보였으며, 자궁경부 상피내종양 3(CIN 3)에서는 12예

중 4예(33%)에서 양성 소견을 보였다(Table 1, Fig. 1~2).

Table 1. Positivity of the p53 protein in the CIN* and invasive cancer of the cervix.

	Total	p53 negative	p53 positive	Positivity (%)
CIN 1	10	7	3	30
CIN 2	10	7	3	30
CIN 3	12	8	4	33
Invasive Carcinoma	53	24	29	55

* CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia

2. 자궁 경부암에서 p53 단백 발현 빈도 : 침윤성 자궁 경부암 53예 중 29예(55%)에서 p53 단백 양성 소견을 보였다(Table 1, Fig. 3~5).

3. 조직학적 유형에 따른 자궁 경부암의 p53 단백 염색 결과 : 침윤성 자궁 경부암의 조직학적 유형에 따른 p53 단백 발현율은 편평상피암 47예 중 27예(57%)에서, 선암 6예 중 2예(33%)에서 양성소견을 보여 선암에 비하여 편평상피암에서 높은 발현율을 보였다(Table 2).

4. 임상 기별에 따른 자궁 경부암의 p53 단백 발현빈도 : 자궁 경부 상피내 종양(0기) 32예 중 10예

Table 2. Positivity of the p53 protein in the cervical cancer by histologic classification.

Type	Total	p53 negative	p53 positive	Positivity (%)
Squamous Cell Carci- noma	47	20	27	57
Adenoc- arcinoma	6	4	2	33

(31%), I a기 8예 중 4예(50%), I b기 24예 중 12예(50%), II a기 8예 중 6예(75%), II b기 14예 중 7예(50%)의 p53 단백 발현 양성률을 보여 임상기별에 따른 발현 정도의 차이는 없었다(Table 3).

Table 3. Positivity of the p53 protein in the cervical by clinical classification.

Stage	Total	p53 negative	p53 positive	Positivity (%)
0	32	22	10	31
I a	8	4	4	50
I b	24	12	12	50
II a	8	2	6	75
II b	14	7	7	50

IV. 고 찰

세포 주기는 여러 가지 인자에 의해 음성 및 양

Fig. 1. A photomicrography shows positive reaction of the p53 in the moderate dysplasia of the uterine cervix(400×, immunohistochemical stain for p53)

Fig. 2. A photomicrography shows positive reaction of the p53 in the carcinoma in situ of the uterine cervix(200×, immunohistochemical stain for p53)

Fig. 3. A photomicrography shows positive reaction of the p53 in the microinvasive carcinoma of the uterine cervix(200×, immunohistochemical stain for p53)

Fig. 4. A photomicrography shows positive reaction of the p53 in the invasive carcinoma of the uterine cervix(200×, immunohistochemical stain for p53).

Fig. 5. A photomicrography shows positive reaction of the p53 in the adenocarcinoma of the uterine cervix(400×, immunohistochemical stain for p53).

성으로 조절될 수 있는 일련의 단계로 구성된다. 음성 조절기 중 가장 중요한 것이 p53 단백질로 돌연변이에 의해 p53의 변성 또는 불활성화되거나 DNA 종양 바이러스의 종양발생 생성물과 상호작용에 의해 암을 일으킬 수 있다.⁷⁾

p53의 돌연변이가 폐, 난소, 유방, 위, 뇌, 결장, 직장, 방광 및 자궁경부암 등 인간 암에서 가장 많은 유전적 변성을 일으키나 최근까지 p53의 정상적인 기능에 대하여는 잘 알려져 있지 않다. p53은 원래 Simian 바이러스 40(SV 40)에 의해 야기된 전환 세포의 추출물인 대 T 항원으로 처음 발견되어 종양 항원으로 분류되었다.^{8,9)} 그 후 ras 발암 유전자와 협동한다고 하여 발암 유전자로 분류되었다가^{10,11)} 지금은 세포 성장과 분열을 음성적으로 조절하는 종양 억제 유전자로 알려져 있다.

두 개 이상의 다른 종양억제 유전자가 같은 종양에서 비활성화 될 수 있고 같은 종양 억제 유전자가 다른 종양에서 비활성화 될 수도 있다.¹⁴⁾ 종양 억제 유전자는 세포주기 조절, 신호 전달도입, 맥관형성과 발육에 관여하며 종양억제 유전자가 항암 치료에 해결의 열쇠로 작용할 것으로 제안하고 있다.³⁾

종양 억제 유전적 기전은 세포와 전신성 상호작용에 있으며 세포에서는 종양억제 유전자의 결손 또는 돌연변이에 의한 종양성 변형 위험도이고, 전신성 상호작용으로는 스테로이드 호르몬, 성장인자, cytokines 등이 접합부 연결을 통하여 세포사이의 의사소통, 면역 감시기구, 맥관형성의 조절, 종양침

습의 조절 등이 있다.²⁾

최근에 p53은 G1-S 전이의 세포 주기에 밀접한 관련성이 보고되어 왔다.¹²⁾ 정상 p53 유전자는 DNA 손상 후에 S상에 들어감을 지연시키며 돌연변이 p53은 DNA 손상시 수선 전에 S상에 들어갈 수 있다고 보고하고 있다.¹³⁾

p53 단백질은 wild형과 돌연변이형으로 구분되며 wild형의 p53 단백질은 정상 세포에서도 출현되나 반감기가 매우 짧아 면역조직 화학염색법으로는 거의 발현되지 않으며^{14,15)} 면역조직 화학염색법에 의해 염색되는 p53 단백질은 반감기가 긴 돌연변이형이 대부분이며 이는 종양의 진행 정도, 전이 여부 및 환자의 예후와 관계가 있다고 보고되고 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾ wild형 p53 유전자는 세포를 변형시킬 수 없으나 돌연변이 p53 유전자나 다른 발암 유전자에 의한 변형을 억제시키며²⁰⁾ wild형 p53 기능의 소실은 자궁경부암의 편평 세포암종이나 선암종 발생에 필수적이다.

자궁경부암에서 p53 단백질 발현 빈도를 보면 본 연구에서는 55%에서 양성률을 보여 박 등²¹⁾ 50%, 권 등²²⁾ 48.4%, 장 등²³⁾ 58.7%와 유사한 성적을 보이나 김 등²⁴⁾ 79.4%, Crook 등²⁵⁾ 75% 보다는 낮고 이 등²⁶⁾ 33.3%, 이 등²⁷⁾ 36.7%, Gitsch 등²⁸⁾ 23% 보다는 높은 양성률을 보였다.

조직학적 분류에 따른 p53 단백질 발현을 보면 편평 상피암 57%, 선암 33%의 양성률을 보여 권 등²²⁾ 편평상피암 48.4%, 선암 23.5%, 김 등²⁴⁾ 편평상피암 79.4%, 선암 22.2%, 박 등²⁹⁾ 편평상피암

67%, 선암 24%와 유사한 성적을 보여 자궁경부암에서 p53 단백질 발현율은 선암에 비하여 편평상피암에서 훨씬 높은 양성률을 보이는 것을 알 수 있다.

임상병기별 분류에 의한 p53 단백질 발현은 본 연구에서는 0기 31%, Ia기 50%, Ib기 50%, IIa기 75%, IIb기 50%를 보였으며, 권 등²²⁾ I기 66.7%, II기 50.0%, III기 및 IV기 66.7%로 임상병기별 분류에 따른 P53 단백질 발현 정도의 차이는 없었다.

자궁경부암의 병인론에 종양 발생성 인유두종 바이러스 감염이 원인적 인자로 알려져 왔으며 인유두종 바이러스 16, 18, 31, 33, 39형과 자궁 경부암과의 관련성이 보고되어 왔다.³⁰⁾ 이러한 바이러스들은 두 개의 변형 유전자 E₆와 E₇ 단백질을 생성하며 E₇는 망막모세포종 감수성 유전자 생성물과 결합한다.²¹⁾ 인유두종 바이러스 E₆ 변형 단백질은 p53 단백질과 결합하고 분해를 증가시켜 p53 기능을 소실시킨다.^{31~33)} p53의 비활성화가 자궁 경부 발암 과정에 중요한 역할을하며 인유두종 바이러스 감염 또는 p53 돌연변이에 의하여 일어난다. 인유두종 바이러스 감염이나 p53 점 돌연변이에 의한 p53 비활성화가 대부분 자궁경부암에서 발생한다.

자궁경부암에서 p53의 비활성화는 두 가지 기전에서 일어날 수 있으며 첫째 종양발생성 인유두종 바이러스에 의한 자궁경부 상피세포의 감염에 의해 p53이 E₆ 단백질과 결합하여 p53 기능이 소실되거나 둘째 p53의 돌연변이가 인유두종 바이러스 감염 없이도 비활성화 되어 초래된다.³⁴⁾

원발성 자궁경부암에서 변형 인유두종 바이러스의 유병율은 80~90%로 보고하고 있으며^{35~37)} p53 돌연변이와 인유두종 바이러스 양성 사이의 역관계를 Crook 등³⁸⁾이 처음 발표한 후 유사한 보고를 하고 있다.²⁵⁾ p53 단백질 돌연변이가 인유두종 바이러스 음성 자궁경부암에서 보다 나쁜 예후를 부분적으로 설명하고 있다.^{35,39)}

인유두종 바이러스 양성 자궁경부암에서는 고위험 인유두종 바이러스에 의해 생성된 E₆ 종양 단백질이 wild형 p53과 결합하여 이 항종양 단백질의 분해를 촉진시킨다. 인유두종 바이러스 음성 자궁경부암에서는 p53 유전자의 과오 돌연변이가 필요하고 그 후 정상 p53 기능의 소실이 자궁 경부 발암 현상을 일으킨다.

이상의 결과로 자궁경부암에서 P53 단백질 발현은 선암에 비하여 편평상피암에서 높은 발현율을 보이고 있으며, 임상 기별에 따른 발현 정도의 차이는 없었으며, 발암 생성 과정과 예후와의 관계 등은 향후 이에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

세포 주기는 여러 가지 인자에 의해 음성 및 양성으로 조절될 수 있는 일련의 단계로 구성된다.

p53 유전자 이상이 인간의 악성 종양에서 흔히 보이며 자궁경부암에서 p53 기능이 유전자 돌연변이 또는 인유두종 바이러스 E6 생성물에 의하여 비활성화 되는 것을 보고하고 있다.

자궁경부암과 자궁경부 상피내종양의 p53 단백질 발현에 관한 연구를 하기 위하여 편평상피암 47예, 선암 6예, 자궁경부 상피내종양 32예를 p53 단백질에 대한 면역 조직화학적 염색을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 자궁경부 상피내종양 32예 중 10예(31%)에서 p53 단백질 양성 소견을 보였다.
2. 자궁경부암 53예 중 29예(55%)에서 p53 단백질 양성 소견을 보였다.
3. 자궁경부암의 조직학적 분류에 따른 p53 단백질 발현은 편평상피암 57%(27/47 cases), 선암 33%(2/6 cases)를 보였다. p53 단백질 발현은 선암에 비하여 편평상피암에서 높은 발현율을 보였다.
4. 임상 병기별 분류에 의한 p53 단백질 발현은 0기 31%, Ia기 50%, Ib기 50%, IIa기 75%, IIb기 50%를 보였다.

- References -

1. Green MR : When the products of oncogenes and antioncogenes meet, Cell. 1989 ; 56 : 1~3.
2. Knudson AG : Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes, Cancer Res. 1985 ; 45 : 1435~1443.
3. Sager R : Tumor suppressor genes : The puzzle and the promise, Science 1989 ; 246 : 1406~1412.
4. Schwab H : Genetic principles of tumor suppressor, Biochem, Biophys, Acta. 1989 ; 949 : 48~64.

5. Crawford LV, Pim DC, Gurney EH, et al. : Detection of common feature in several human tumor cell line a 53,000 dalton protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981 ; 78 : 41~45.
6. Hinds P, Finlay C, Levine A J : Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with ras oncogene and transformation, *J Viro.* 1989 ; 63 : 739~746.
7. Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene, *Nature.* 1991 ; 351 : 453~456.
8. Linzer DIH, Levine AJ : Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells, *Cell* 1979 ; 17 : 43~52.
9. Lane DP, Crawford LV : T- antigen is bound to a host protein in SV40-trans formed cells, *Nature.* 1979 ; 278 : 261~263.
10. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, et al. : Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells, *Nature.* 1984 ; 312 : 646~649.
11. Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D. And Rotter, V : Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature.* 1984 ; 312 : 649~651.
12. Hartwell L : Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells, *Cell* 1992 ; 71 : 543~546.
13. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, et al. : Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res* 1991 ; 51 : 6301~6311.
14. Reihaus E, Kohler M, Kraiss S, et al. : Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells, *Oncogene.* 1990 ; 5 : 137~145.
15. Iggo R, Gatter K, Bartek I, et al. : Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer, *Lancet.* 1990 ; 335 : 675~679.
16. Lamb P, Crawlford I : Characterization of the human p53 gene, *Mol Cell Biol.* 1986 ; 6 : 1379~1385.
17. Hinds PW, Finlay CA, Levine AJ : Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation, *J Virol* 1989 ; 63 : 739~746.
18. Oka K, Nakano T, Arai T : p53 CM1 expression is not associated with prognosis in uterine cervical carcinoma, *Cancer.* 1993 ; 72 : 160~164.
19. Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, et al. : Assessment of p53 protein expression in normal benign and malignant oral mucosa, *J Pathol.* 1992 ; 166 : 389~394.
20. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, et al. : Wild-type p53 can inhibit oncogene mediated focus formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989 ; 86 : 8763~8767.
21. 박노현, 박창수, 송용삼, 강순범, 이효표 : 자궁경부암 원발 병소와 전이 림프절에서 p53 유전자 및 인유두종바이러스 감염 상태에 관한 연구, *대한산부인과학회 제74차 추계학술대회지* 1994 : 71.
22. 권경익, 이태성, 서영옥, 이상숙 : 원발성 자궁경부암 환자에서 암 억제유전자인 p53 유전자 변이 발현의 임상병리학적인 의의, *대한산부인과학회 제74차 추계학술대회지* 1994 : 72.
23. 장미경, 이선경, 이주희, 김승보, 이재현 : 자궁경부암에서 p53의 발현과 인유두종 바이러스 감염에 관한 연구, *대한산부인과학회 제74차 추계학술대회지* 1994 : 73.
24. 김희정, 정순희 : 자궁경부암종에서 p53 발현도와 DNA 분석의 비교, *대한병리학회 추계학술회 초록집* 1994 ; 28 : A75.
25. Crook T, Wrede D, John A, et al. : Clonal p53 mutation in primary cervical cancer association with human papillomavirus negative tumours, *Lancet* 1992 ; 339 : 1070~1073.
26. Lee SS, Bae JY, Chang ES : Human papillomavirus and p53 expression in cervical adenocarcinoma, *The Korean Journal of Pathology.* 1994 ; 28(Suppl) : A76.
27. 오 찬, 오민정, 이낙우, 염범유, 이규완, 구병삼 : 자궁경부 편평상피암에서 p53 관련 단백질의 발현과 Human Papilloma Virus type 16의 검색에 관한 연구, *대한산부인과학회 제74차 추계학술대회지* 1994 : 74.
28. Gitsch G, Kainz C, Joura E, et al. : Mutant p53 product in patients with stage III cervical cancer, *Anticancer Research.* 1992 ; 12 : 2241~2242.
29. Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL, et al. : p53 mutations in HPV negative-cervical carcinoma, *Oncogene.* 1994 ; 9 : 205~210.
30. zur Hausen H, Schneider A : The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. In : Howley PM, Salzman NP, editors. *The papovaviridae. vol 2. Papillomaviruses.* New York : Plenum Press. 1987 : 245~263.
31. Werness BA, Levine AJ, Howley PM : Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53, *Science.* 1990 ; 248 : 76~79.
32. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, et al. : The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell.* 1990 ; 63 : 1129~1136.
33. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, et al. : Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992 ; 11 : 3045~3052.
34. Paquette RL, Lee YY, Wilczynski SP, et al. : Mutation of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma, *Cancer.* 1993 ; 72 : 1272~1280.

35. Riou G, Favre M, Jeannel D, et al. : Association between poor prognosis in early stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA, *Lancet*. 1990 ; 335 : 1171~1174.
36. Zhang WH, Coppleson M, Rose BR, et al. : Papillomavirus and cervical cancer : a clinical and laboratory study, *J Med Virol*. 1988 ; 26 : 163~174.
37. van den Brule AJC, Snijders PJF, Gordijn RLJ, et al. : General primermediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas, *Int J Cancer*. 1990 ; 45 : 644~649.
38. Crook T, Wrede D, Vousden KH : p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell lines, *Oncogene*. 1991 ; 6 : 873~875.
39. Higgins GD, Davy M, Roder D, et al. : Increased age and mortality associated with cervical carcinomas negative for human papillomavirus RNA, *Lancet*. 1991 ; 338 : 910~913.