

자궁경부암 세포주에서 Interferon- α 의 세포증식 억제기전에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실, 생화학교실*
양선희 · 김수연 · 문혜성 · 박혜영* · 김승철 · 우복희*

=Abstract=

The Mechanisms of the Antiproliferative Effect by Interferon- α in Cervical Cancer Cell Lines

Sun Hee Yang, M.D., Soo Yeon Kim, M.D., Hye Sung Moon, M.D.,
Hye Young Park, M.D.*, Seung Cheol Kim, M.D., Bok Hee Woo, M.D.
Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Biochemistry, College of Medicine,
Ewha Womans University, Seoul, Korea*

Interferons(IFNs) exhibit an antiproliferative effect on many normal and transformed cells and have in vivo antitumor activity in a variety of cancers. Recent clinical studies have suggested major activity with IFNs, especially in advanced squamous cell carcinoma of the skin and cervix. With the objective of exploring how the IFNs might work in squamous carcinoma cell line, we studied the effect of IFN- α on cervical cancer cell lines.

The effect of IFNs on apoptosis and cell cycle of cervical cancer cell lines(C33A, CaSki, SiHa, HeLa, ME-180) was analysed by flow cytometry in time dependent manner.

Results were as follows:

(1) According to cell count of studied cancer cell lines treated with 2,000 IU/ml IFN- α for 7 days exposure, IFN- α had the antiproliferative effect on all five tested cervical cancer cell lines. Also this antiproliferative effect was confirmed by WST-1 assay. (2) The effect of IFN- α on apoptosis of each culture was analysed by flow cytometry after 3 days and 7 days exposure with 2,000 IU/ml IFN- α . Apoptosis was not induced by IFN- α treatment. (3) The effect of IFN- α on the cell cycle of each culture was analysed by flow cytometry after 3 days exposure with 2,000 IU/ml IFN- α . As compared to control cells, treatment with IFN- α resulted in a higher proportion of cells in S phase with lower portion of cells with G2/M phase. (4) Time course of IFN- α effect on HPV 16 and HPV 18 E6 mRNA levels was evaluated by northern blot analysis. In CaSki cell line, HPV 16 E6 mRNA expression induced by IFN- α was not inhibited. But in HeLa cell line, HPV 18 E6 mRNA expression was inhibited.

IFN- α appears to have the antiproliferative effect on all five tested cervical cancer cell lines and the antiproliferative effect of IFN- α seemed to be induced not by apoptosis but by disruption on specific cell cycle. Also regulation of HPV E6 mRNA expression induced by IFN- α is not directly related to the mechanisms of the antiproliferative effect of IFN- α in cancer cell lines.

Key words: Interferon- α , Antiproliferative effect, Cervical cancer cell lines

I. 서 론

자궁경부암은 전세계적으로 여성 사망의 주요 원인으로, 한국에서도 여성암의 22%를 차지하며, 여성 사망의 두 번째 원인이 되는 중요한 질환이다. 자궁경부암의 원인은 잘 알려져 있지 않으나 최근 분자생물학의 발전에 의하여 자궁경부암의 원인 인자가 인유두종바이러스라는 사실이 알려짐에 따라 자궁경부암과 HPV 감염과의 상관 관계에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁾

현재까지 발견된 HPV는 70 여종으로 모두 인체의 상피조직에서 유두종을 일으키는 병원체로 알려져 있는데, HPV 16, 18, 31, 33, 35 등은 90% 이상의 자궁경부암과 상피내암에서 검출되고 있어 악성종양 발생 고위험군(high risk type)으로 분류되고 있으며, HPV 6과 HPV 11 등은 주로 침구형 콘딜로마(condyloma accuminata)와 같은 양성종양과 비현성 감염(latent infection)에서 검출되어 악성종양 발생 저위험군(low risk type)으로 분류되고 있다.²⁾

Lechner 등³⁾, Heck 등⁴⁾ 그리고 Munger 등⁵⁾에 의하면, HPV E6 단백질은 p53 단백질에 결합하고, HPV E7 단백질은 retinoblastoma(Rb) 단백질과 결합하여 이들 종양억제 단백질의 기능을 불활성화시킴으로써, 자궁경부암의 암화과정에서 중요한 역할을 한다고 하였다.

또한, Matlashewski 등⁶⁾ 및 DiPaola 등⁷⁾은 HPV에 의한 세포의 악성화 과정에서 Ha-ras와 같은 암유전자의 활성화나, 숙주 면역상태의 변화와 같은 숙주요인(host factor)등이 중요한 역할을 한다고 하였다. 그리고 Woodworth 등⁸⁾도 HPV에 의해 변형된 자궁경부의 상피세포에서는 정상 자궁경부 세포들에 비하여 cytokine의 양이 감소되어 있음을 발표하면서, 전신적 또는 국소적 면역에 의한 숙주 방어능력의 변화가 자궁경부암 발생에 있어서 중요한 역할을 한다고 주장하고 있다. Tay 등⁹⁾은 HPV와 관계되는 질환에서 T 림파구(주로 CD4+ 세포)가 결핍(depletion)되어 있음을 보고하였으며, 이 T 림파구의 결핍은 IFN- γ 의 감소와 관계 있다고 하였다. 그리고 Fierbeck 등¹⁰⁾, Schneider 등¹¹⁾ 및 Iwasaka 등¹²⁾도 HPV와 관련된 병변을 IFN- γ 로 국소적으로 치료한 후 병소가 완전히 또는 부분적으로 관해(remission)

됨을 보고한 바 있다. 또한 Lippman 등¹³⁾과 Borden 등¹⁴⁾은 IFNs이 정상세포와 변형된 세포에서 항증식 효과를 나타내고, 생체내에서 편평상피암을 포함한 여러 암에 대해 항암 효과를 지니고 있음을 보고하였으며, Delvenne 등¹⁵⁾도 부분적으로 면역이 결핍된 자궁경부의 HPV 관련 병변에서 유전자 재조합 IFN- γ 를 사용하여 HPV 감염을 치료할 수 있다고 하였으며, 이는 IFN- γ 를 보충하여 증으로써 HPV에 의해 변형된 상피세포의 성장조절 억제기전(negative growth control mechanism)을 회복시키는 것으로 설명하고 있다. 한편, Ikic 등¹⁶⁾은 IFN- α 를 사용하여 콘딜로마 환자에 국소 도포한 결과 90%에서 치료율을 보였다고 하였으며, 자궁경부 상피내암 환자에서는 54%에서 완전 소멸을 보고하였다¹⁷⁾. 그리고 Geffen 등¹⁸⁾은 IFN- α 를 콘딜로마 병변에 직접 주사한 결과, 50%에서 치료율을 보였으며, Vasilyev 등¹⁹⁾은 자궁경부 상피내암 병변에 IFN- α 를 직접 주사한 결과, 29%에서 치료율을 보였다고 하였다. 또한, Reichman 등²⁰⁾에 의하면, IFN- α 를 콘딜로마 환자에 전신 투여하였을 때, 병변의 소멸이 17%에서 있었다고 하였으며, Yliskoski 등²¹⁾과 Schneider 등¹¹⁾은 자궁경부 상피내암 환자에 IFN- α 를 전신 투여하였을 때, 각각 49%와 71%에서 치료율을 보였다고 하였다.

전신적인 투여가 가능한 치료 약제인 IFNs는 항바이러스 성질과 면역 조절, 분화 작용, 항종양 성질 등이 증명되어 자궁경부 상피내암 초기 병변에서 HPV에 감염된 세포의 증식을 억제하는 retinoic acid와 함께 사용되어 병변의 퇴행을 유도하는 치료로서 근래에 시도되어 일부에서 성과가 보고되고 있다²²⁻²⁴⁾. 또한, 최근에는 편평상피암 환자의 치료에서 IFN- α 와 retinoid를 함께 투여하여 치료의 효과를 거두었다는 연구결과들이 많이 보고되고 있다.²⁵⁻²⁷⁾

다단계 암화과정에는 세포성장 조절(cell growth control)의 파괴뿐만 아니라, 세포 사멸(cell death)의 조절 파괴도 중요한 역할을 하게된다. 세포고사에 의한 세포 사멸의 조절은 정상발달에 필수적이며 바이러스 감염, 신경성 퇴행질환, 자가 면역성 질환, 암발생에 대한 중요한 방어수단으로 이해되고 있다. 세포고사는 유전학적으로 조절되는 반응으로 세포질이 재배열되고, 표면에 수포(bleb)가 형성되며, 염색질이 농축되고, DNA 분절(fragmentation)이 일어나는 형태학적인 특징을 보인다. Tamura²⁸⁾,

White²⁹⁾에 의하면, 세포고사 과정은 많은 수의 매우 보존된 유전자(highly conserved gene) 발현에 의해 조절되는데, 어떤 유전자는 세포고사의 촉진 작용을 하며, 어떤 유전자는 세포고사를 억제하는 작용을 하는데 p53, cell cycle dependent kinase(CDK) inhibitor gene p21/WAF1/CIP1, interferon regulatory factor 1(IRF1), interleukin-1 β converting enzyme(ICE) 같은 유전자들이 세포고사의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 HPV에 감염되지 않은 자궁경부암 세포주(C33A)와 HPV에 감염된 자궁경부암 세포주(CaSki, SiHa, HeLa, ME-180)들을 대상으로 IFN- α 의 항증식 효과를 알아보기 위하여, IFN- α 의 처리 후 세포수의 측정 및 WST-1 분석을 실시하였으며, 항증식 효과의 기전을 규명하기 위하여 유세포 측정법을 이용한 세포주기 및 세포고사를 측정하였다. 또한 northern blotting을 이용하여 IFN- α 에 의한 HPV E6 유전자 발현 양상의 변화를 알아보고 그 변화에 따른 항증식 효과에 차이가 있는지를 연구하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 세포배양

자궁경부암 세포주들인 C33A, CaSki, SiHa, HeLa, ME-180 세포주들을 2 mM L-glutamine(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 units/ml penicillin, 100 μ l/ml streptomycin(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; Atlanta Biologicals, Walkersville, Maryland, USA)을 포함한 DMEM/F12(Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) 배지에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 monolayer 배양하였다.

2. 세포 성장 측정

세포 성장을 측정하기 위하여 24 well tissue culture plate에 1.5×10^4 세포를 접종한 후 IFN- α 2,000 IU/ml를 처리하여 7일 동안 24시간마다 대조군과 비교하여 각 well의 DMEM/F12 배지를 제거한 후 phosphate-buffered saline(PBS)로 1번 세척한 다음 trypsin-EDTA를 넣고 세포를 떼어낸 후 haematocytometer로 세포수를 측정하였다.

tometer로 세포수를 측정하였다.

3. WST-1 분석

각 세포주들을 96 well tissue culture plate에 5×10^3 cells/well을 접종한 후 IFN- α 2,000 IU/ml를 처리한 다음 3일 후에 WST-1 reagent (100 \times , Boehringer Mannheim, Germany)를 각 well당 10 μ l/100 μ l씩 넣고 4시간 후 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포고사(apoptosis) 측정

IFN- α 2,000 IU/ml를 처리하고 3일, 7일 동안 성장시킨 각 세포주들을 PBS로 2번 세척한 다음 배지 270 μ l를 넣고 잘 섞은 후 200 μ g/ml 농도의 7-aminoactinomycin D(7-AAD) 30 μ l를 가하고 얼음에 30 분 방치한 후 유세포 측정법으로 세포고사를 측정하였다.

5. 세포주기의 측정

IFN- α 2,000 IU/ml를 처리하고 3일 동안 성장시킨 각 세포주들을 PBS로 2번 세척한 다음 배지 300 μ l를 넣고 잘 풀어준 후 methanol 300 μ l를 가하고 30 분 동안 얼음에 방치하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포를 300 xg에서 5분 동안 원심 분리하여 침전물(pellet)을 취하고 2 mg/ml 농도의 RNase 150 μ l와 0.1 mg/ml 농도의 propidium iodide(PI) 150 μ l를 넣고 30분간 실온에 방치한 다음 유세포 측정법으로 세포주기를 측정하였다.

6. HPV E6 mRNA 추출

100 mm plate에서 배양한 세포주에 RNazol B(Tel-Test, Friendwood, Texas, USA) 800 μ l를 처리한 후 scraper로 모아 1.5 ml 튜브에 넣고 얼음에 5분 동안 방치한 후 chloroform isoamyl alcohol(24:1) 200 μ l를 가한 후 잘 섞고 5분간 얼음에 방치하였다. 이것을 12,000 xg에서 15분간 원심 분리하여 상층 액만을 다른 튜브에 옮겨 isopropanol을 동일부피만큼 넣고 vortex한 후 15분간 얼음에 방치하였다. 다시 이것을 15분간 12,000 xg에서 원심 분리하여 침전물을 모으고 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 후 75% methanol로 세척하고 7,500 xg에서 8분간 원심

분리하여 침전물을 모았다. 이 침전물을 formamide 100 μ l에 녹인 후 RNA 농도를 260 nm에서 분광광도계(spectrophotometer)로 측정하여 계산하였다.

7. HPV E6 mRNA의 역전사 증합효소연쇄반응(RT-PCR)

각 세포주들에서 추출한 RNA를 AMV 역전사효소(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 상보 DNA(complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. 역전사반응은 RNA 1 μ g당 5 mM $MgCl_2$, reverse transcription buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.8, 25 $^{\circ}$ C), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 mM dNTP mixture, 1 unit/ μ l RNasin ribonuclease inhibitor, 15 μ g reverse transcriptase, oligo(dT)15 primer(0.5 μ g/ μ g RNA)를 가해 42 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 배양시켰다. 이렇게 얻은 HPV 16과 HPV 18의 상보 DNA를 증합효소연쇄반응으로 증폭하였다. 증합효소연쇄반응은 TaKaRa TaqTM을 이용하여 수행하였는데, 그 방법은 template DNA 1 μ l에 TaKaRa TaqTM(5 units/ μ l), PCR buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 100 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$), dNTP mixture(2.5 mM each), sense primer(10 pmole/ μ l), antisense primer(10 mole/ μ l)를 각각 넣어 반응시켰다. 여기에 사용된 primer sequence는 HPV 16인 경우 sense 5'-CAAGCAACAGTTA CTGCGACGTG-3', antisense 5'-TCCGGTTCTGCTG TCCAGCTGG-3'을 사용하였고, HPV 18인 경우 sense 5'-TGCCTTAGGTCCATGCATACT-3', antisense 5'-CACGGCGACCCTACATACCT-3'을 합성주문(Bioneer, Korea)하여 사용하였다. 증합효소연쇄반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 7분간 DNA를 predenaturation한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 primer annealing, 62 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension하는 3가지 과정을 35번 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 elongation하는 과정을 거쳐 4 $^{\circ}$ C에서 반응을 끝내고, 이렇게 얻은 증합효소연쇄반응 산물을 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에 DNA size marker와 함께 전기영동 하여 자외선 하에서 HPV 16은 321 base pair(bp), HPV 18은 325 bp band를 확인하였다.

8. HPV 16과 HPV 18의 E6 소식자(probe) 제조

HPV 16과 HPV 18의 소식자는 GeneClean II kit(Bio 101, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 만들었

다. 전기영동 하여 얻은 HPV 16과 HPV 18의 band를 agarose gel에서 자른 후 3배 부피의 6 M sodium iodide(NaI) 용액을 넣고 5분 이상 45 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후 5 μ l의 glassmilk(silica matrix)를 가해 5분 이상 얼음에서 반응시켰다. 이것을 원심 분리하여 상층 액을 제거하고 침전물(glassmilk/DNA complex)에 다시 6 M NaI를 200~400 μ l 가해 45~55 $^{\circ}$ C에서 수분 동안 반응시킨 후 원심 분리하여 상층 액을 제거하였다. 여기에 중화 용액(Tris-acid와 Tris-base의 mixture, pH 7.0~8.5)을 200~700 μ l 가해 수조 동안 원심 분리하여 상층 액을 제거하는 과정을 3번 반복하였다. DNA를 추출하기 위하여 저염 용매제인 Tris-EDTA(TE) 용매제를 glassmilk 양과 동일하게 넣어 45~55 $^{\circ}$ C에서 2~3분간 반응시킨 후 30초 동안 원심 분리하여 DNA가 포함된 상층 액을 새로운 튜브에 넣었다. 이 elution step을 한번 더 반복하여 DNA를 얻었다. 이렇게 얻은 DNA의 농도를 260 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 계산하였다. Digoxigenin(DIG; Boehringer Mannheim, Germany)-labeling은 DNA fragment를 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 denaturation시키고 얼음에 방치한 후 reaction mixture와 DIG-DNA labeling mixture, Klenow 효소를 가해 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후 0.5 M EDTA 0.8 μ l를 가하고 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 DIG labeling 과정을 종결시키고 증류수로 10 ng/ μ l의 농도를 맞추었다.

9. Northern blotting 분석

CaSki 세포주와 HeLa 세포주에 IFN- α 2,000 IU/ml를 처리한 후 0, 6, 24, 48, 72, 96시간 후에 RNazol B를 사용하여 total RNA를 추출하고 northern blot을 시행하였다. formamide에 녹여둔 RNA 16.5 μ g을 MOPS/ NaAc/EDTA buffer와 37% formaldehyde와 함께 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리한 후 얼음에 두었다가 RNA-formaldehyde loading buffer (50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol, EtBr(5 μ g/sample))를 넣은 후 1% formaldehyde agarose gel(0.41 M formaldehyde)에 전기영동(100 volts, 1시간)시켰다. 전기영동 후 transfer solution(3 M NaCl, 8 mM NaOH, 2 mM Sarkosyl, pH 11.4~11.45)으로 downward alkaline transfer method를 이용하여 Hybond막(Boehringer Mannheim, Ger-

many)에 전사하였다. 전사된 막은 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.7-6.8)로 10분간 중화시키고, 80℃에서 30분간 건조시켜서 고정하였다. 다시 이 막은 5×SSC(750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate)로 15분 동안 처리한 후 hybridization bag에 넣어 전보합결합 용액(prehybridization solution)인 0.25 M sodium phosphate buffer(pH 7.2), 1 mM EDTA, 20% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.5% blocking solution을 가해 68℃에서 60분간 반응시켰다. 새로 준비된 bag에 새로운 전보합결합 용액을 넣고 95℃에서 10분간 heat denaturation된 HPV 16과 HPV 18의 DIG-labeled 소식자를 30 ng/ml 넣어 16시간 이상 68℃에서 반응시켰다. 보합결합된 막을 wash(DIG) buffer(20 mM Na₂HPO₄(pH 7.2), 1 mM EDTA, 1% SDS)로 20분간 3회 반복해 세척하였다. DIG-labeled hybridization signal은 DIG luminescent detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 시행하였다. 보합결합된 막을 washing buffer에서 5분간 세척한 후 blocking buffer(1×)로 30분간 blocking하였고, anti-DIG-AP conjugate(75 mU/ml blocking solution)를 가해 30분간 반응시킨 후 washing buffer로 15분 동안 2회 세척하였다. 다시 이 막을 detection buffer(1×) 10 ml에 넣고 5분간 평형시킨 후 CSPD(Boehringer Mannheim, Germany)를 detection buffer에 1:100이 되도록 희석시킨 후 5분간 반응시키고, Whitman 3MM 종이로 물기를 제거한 다음 hybridization bag에 넣어 37℃에서 15분간 반응시킨 후 X-ray film에 37℃에서 2시간 동안 노출시켜 chemiluminescence를 측정하였다.

III. 결 과

1. IFN-α의 자궁경부암 세포주에 대한 항증식 효과

IFN-α 2,000 IU/ml를 연구 대상 자궁경부암 세포주에 처리 후, 7일간 매일 관찰한 결과, IFN-α 처리 후 모든 연구대상 세포주에서 세포수의 현저한 감소를 보였으며(Fig. 1), 배양 사진에서도 감소된 세포수를 관찰하였다(Fig. 2). 또한 WST-1 분석법에 의해서도 항증식 효과를 확인하였으며(Fig. 3), 세포수의 측정 시 trypan blue 염색을 실시한 결과, trypan

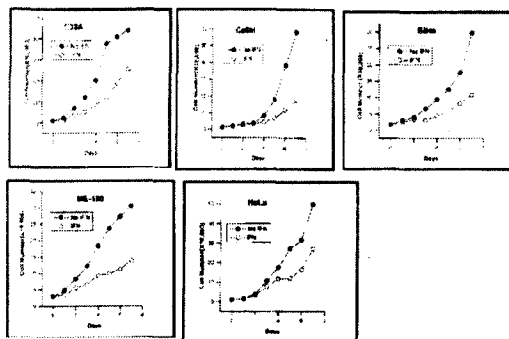


Fig 1. The effect of IFN-α on cell growth of cervical cancer cell lines after 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN-α.

No IFN; without IFN, IFN; with 2,000 IU/ml IFN-α.

Fig 2. Morphology of cervical cancer cell lines after 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN-α, evaluated by phase contrast microscope(X100).

A) C33A, B) CaSki, C) SiHa, D) HeLa, E) ME-180.

No IFN; without IFN, IFN; with 2,000 IU/ml IFN-α.

blue에 염색되는 세포, 즉 사망세포가 차지하는 비율은 모두 5% 미만이었다.

2. 세포고사(apoptosis)의 측정

모든 연구대상 세포주에 IFN-α 2,000 IU/ml를 처리한 후, 배양 3일째와 7일째에 세포고사를 유세포 측정법을 이용하여 측정한 결과, IFN-α는 세포고사를 유발하지 않았다.(Fig. 4, 5, 6, 7, 8)

3. 세포주기의 측정

모든 연구대상의 세포주에 IFN-α 2,000 IU/ml를 처리한 후, 배양 3일째에 세포주기를 유세포 측정법

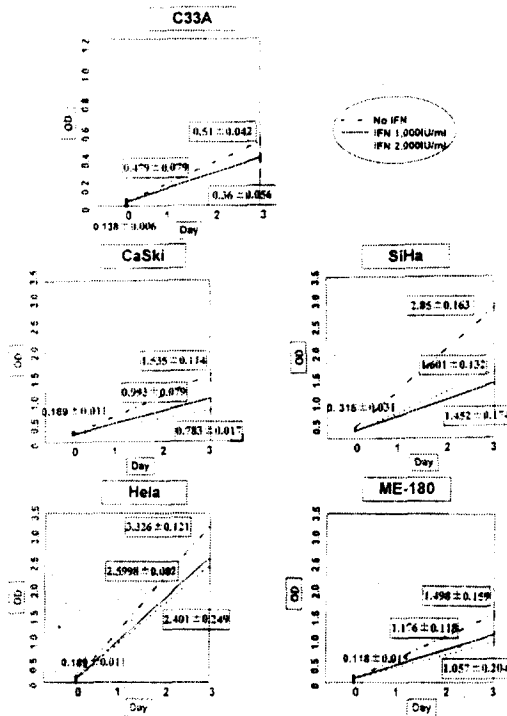


Fig 3. The effect of IFN- α on the cell proliferation of cervical cancer cell lines after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by WST-1 assay. Each value represents the optical density corresponding to the mean of 3 independent experiments and accompanied by standard deviation.

으로 측정 한 결과, 모든 연구대상의 세포주에서 S기 세포의 비율은 증가하는 반면, G2/M기의 세포 비율은 감소함을 보였다.(Fig. 9, 10, 11, 12, 13)

4. HPV 16과 HPV 18에 감염된 자궁경부암 세포주에서 E6 mRNA 발현의 변화

CaSki, HeLa 세포주에서 추출한 E6 mRNA를 northern blotting을 이용하여 시간 별로 측정 한 결과, CaSki 세포주에서는 IFN- α 의 처리에 의하여 E6 mRNA 발현이 억제되지 않았으나(Fig. 14A), HeLa 세포주에서는 IFN- α 의 처리에 의하여 E6 mRNA 발현이 억제되었다.(Fig. 14B)

IV. 고 찰

Interferons(IFNs)는 세포의 성장, 분화를 포함하는

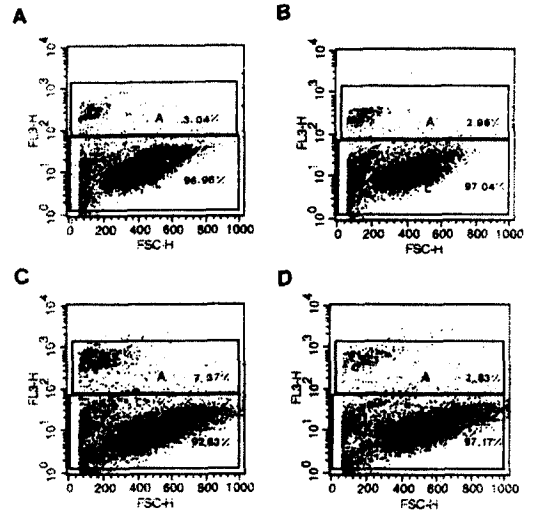


Fig 4. The effect of IFN- α on apoptosis of C33A cell line after 3 days and 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. FL3-H; 7-AAD fluorescence, A; apoptotic cell L; live cell, A) culture 3 days without IFN- α , B) culture 3 days with 2,000 IU/ml IFN- α , C) culture 7 days without IFN- α , D) culture 7 days with 2,000 IU/ml IFN- α .

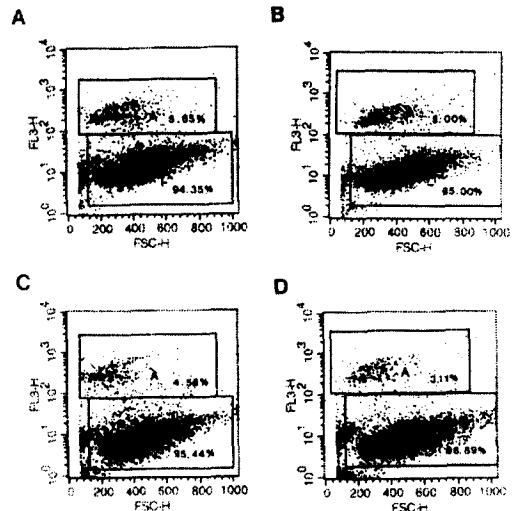


Fig 5. The effect of IFN- α on apoptosis of CaSki cell line after 3 days and 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. FL3-H; 7-AAD fluorescence, A; apoptotic cell L; live cell, A) culture 3 days without IFN- α , B) culture 3 days with 2,000 IU/ml IFN- α , C) culture 7 days without IFN- α , D) culture 7 days with 2,000 IU/ml IFN- α .

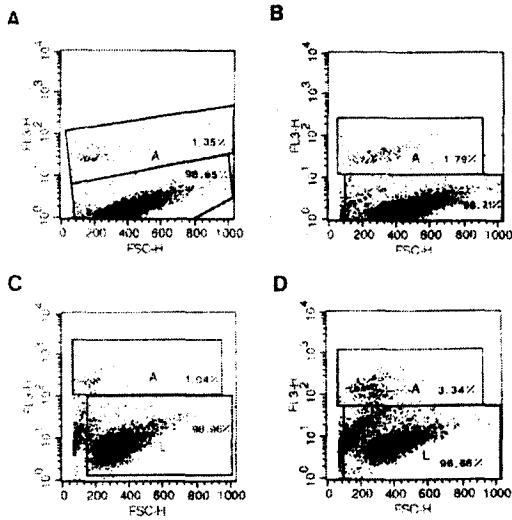


Fig 6. The effect of IFN- α on apoptosis of SiHa cell line after 3 days and 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. FL3-H; 7-AAD fluorescence, A; apoptotic cell L; live cell, A) culture 3 days without IFN- α , B) culture 3 days with 2,000 IU/ml IFN- α , C) culture 7 days without IFN- α , D) culture 7 days with 2,000 IU/ml IFN- α .

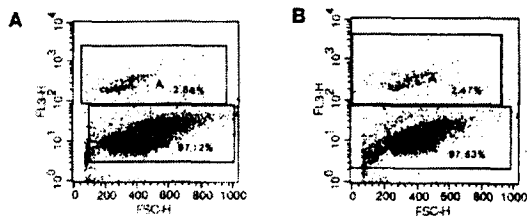


Fig 7. The effect of IFN- α on apoptosis of HeLa cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. FL3-H; 7-AAD fluorescence, A; apoptotic cell L; live cell, A) culture 3 days without IFN- α , B) culture 3 days with 2,000 IU/ml IFN- α .

기본적인 세포기능의 조절에 관여하며, 정상 세포와 변형된 세포에서 항증식 효과를 지니는 것으로 알려져 있다. 그리고 최근 임상 연구결과들에 의하면, IFNs는 암의 예방 및 치료제로서 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 진행된 자궁경부암에서 IFNs의 사용이 치료에 도움이 된다고 보고하고 있으나, 아직까지 IFNs의 작용기전이 확실하게 밝혀지지 않은

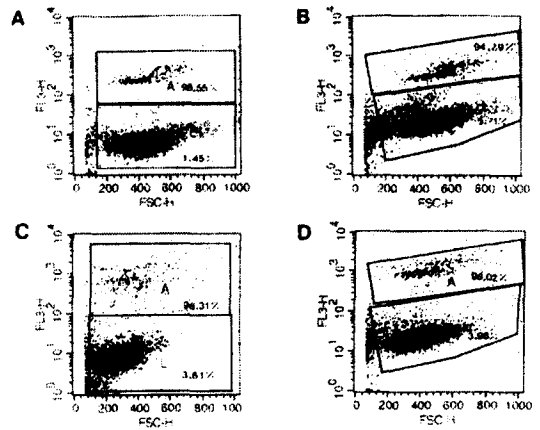


Fig 8. The effect of IFN- α on apoptosis of ME-180 cell line after 3 days and 7 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. FL3-H; 7-AAD fluorescence, A; apoptotic cell L; live cell, A) culture 3 days without IFN- α , B) culture 3 days with 2,000 IU/ml IFN- α , C) culture 7 days without IFN- α , D) culture 7 days with 2,000 IU/ml IFN- α .

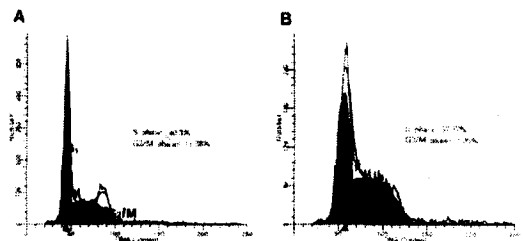


Fig 9. The effect of IFN- α on cell cycle of C33A cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. A) without IFN- α , B) with 2,000 IU/ml IFN- α .

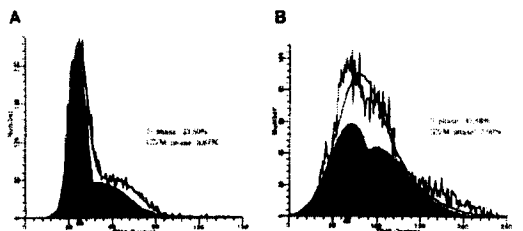


Fig 10. The effect of IFN- α on cell cycle of CaSki cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. A) without IFN- α , B) with 2,000 IU/ml IFN- α .

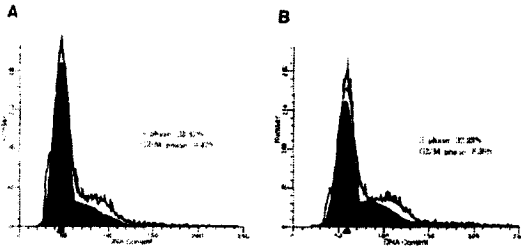


Fig 11. The effect of IFN- α on cell cycle of SiHa cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. A) without IFN- α , B) with 2,000 IU/ml IFN- α .

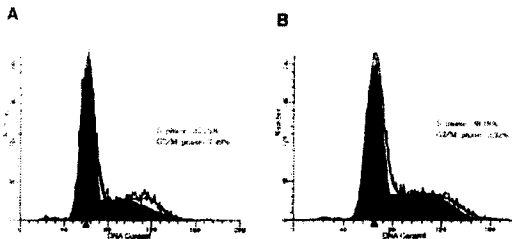


Fig 12. The effect of IFN- α on cell cycle of HeLa cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. A) without IFN- α , B) with 2,000 IU/ml IFN- α .

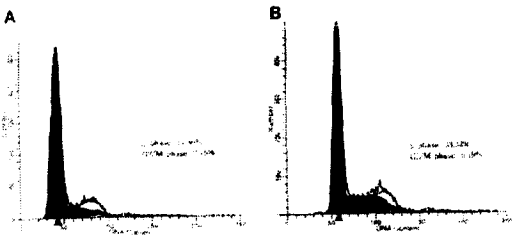


Fig 13. The effect of IFN- α on cell cycle of ME-180 cell line after 3 days exposure to 2,000 IU/ml IFN- α , evaluated by flow cytometry. A) without IFN- α , B) with 2,000 IU/ml IFN- α .

실정이다. 1957년 IFNs가 바이러스 감염에 대한 반응으로 숙주 세포에서 분비된다고 밝혀진 후 IFNs의 항바이러스 성질과 면역 조절, 분화 작용, 항종양 성질 등이 알려져 전신적인 투여가 가능한 치료 약제로서 임상에 쓰이게 되었으며, 최근에는 유전자 재조합 DNA 기술로 박테리아를 이용하여 순수한 IFNs의 합성이 가능하게 되면서 더욱 많은 연구가

Fig 14. The time course of IFN- α effect on HPV 16 and HPV 18 mRNA levels, analysed by northern blotting. Cyclophilin expression was used as housekeeping gene. A: CaSki, B: HeLa. No IFN; without IFN, IFN: with 2,000 IU/ml IFN- α .

진행되었다³⁰⁾. IFNs는 기원 세포와 유발자(inducer)에 따라 여러 종류로 나뉜다. 바이러스와 박테리아 감염 시 분비되는 type I IFN에는 백혈구가 기원인 IFN- α 와 섬유모세포(fibroblast)가 기원인 IFN- β 가 있다. IFN- γ 같은 type II는 특정 항원에 의해 활성화된 T 림파구에 의해 생성된다.³¹⁾

IFNs에 의한 면역 반응의 조절 기전은, Weck 등³²⁾에 의하면 RNA 수준에서 바이러스 단백질의 합성을 억제하는 것에 의해 이루어지며, Lengyel 등³³⁾에 의하면 세포의 분화를 억제하는 것에 의하며, Jones 등³⁴⁾과 Jaffe 등³⁵⁾에 의하면 항원 제공 세포인 대식세포 표면 단백질의 표현 증가 또는 effector cell인 자연 파괴세포(natural killer cell), 세포독성 T 림파구(cytotoxic T lymphocyte)의 효과를 증가시켜 면역 반응이 조절된다고 하였다.

세포의 증식은 주로 성장인자 수용체들에 의한 증식신호 전달경로, 암억제인자들에 의한 경로, 그리고 cytokine이나 종양 억제자(tumor suppressor)에 의한 세포고사 경로간의 공조에 의해 조절되며, 이

공조체제상의 이상으로 인해 변형된 세포가 발생하고 이의 무제한적인 증식에 의해 암이 생성된다³⁶⁾.

HPV DNA는 약 8,000 bp 크기로 8개의 유전자가 밝혀져 있는데, 이중에서 E6와 E7 그리고 E5의 세 유전자가 작용하여 세포를 변형시키며 특히 E6와 E7이 주기능을 갖고 있다. HPV DNA는 진행된 자궁경부암을 제외하고는 대부분 숙주세포의 DNA에 융합되어 발견되는데, 이 융합은 E2 유전자 내부와 근처에서 일어나게 되어 융합이 일어나게 되면 E2 유전자가 파손된다. E2 유전자는 HPV 유전자의 전사 조절자로 *in vitro* 실험에서 E6, E7 암유전자(oncogene)의 발현을 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다. HPV 16과 18의 경우 E6, E7 암유전자를 포함한 early gene을 전사하는 upstream regulatory region(URR)에 p97과 p105 발암 촉진자(promoter) 두 개의 결합장소가 존재하여 E2 유전자가 여기에 결합하면 이들 유전자의 발현을 억제시킨다고 하였으며, E2 유전자의 발현의 손실은 결국 E6와 E7 암유전자의 생성을 증가시킨다고 하였다.³⁷⁻³⁹⁾ HPV E6 단백질은 p53 단백질과 결합하고, HPV E7 단백질은 Rb 단백질과 결합하여 이들 종양억제 단백질의 기능을 불활성화시켜 자궁경부의 암화과정에서 중요한 역할을 한다고 하였다.³⁴⁾ p53 유전자는 p21WAF1/CIP1을 통하여 Rb를 활성화하여 세포의 증식을 억제하고 그 사이에 변이가 생긴 DNA를 교정하게 함으로써 새로이 생성된 세포가 변이 없이 온전한 염색체 DNA를 보유할 수 있게 하는 기능을 하는데, 이 작용이 바로 p53이 종양억제 유전자로서 암의 발생을 막는 G1-checkpoint 기능이다⁴⁰⁾. p53의 종양억제 유전자로서의 또 다른 작용은 이미 유전자 불안정(genomic instability)이 발생하였거나, 암유전자의 발현에 의해 변형된 세포에서 세포고사를 야기하여 그 세포가 죽도록 하는 것이다.⁴¹⁾

IFNs는 세포 표면 수용체와 결합한 후에 일시적으로 전사기능이 증가되는 유전자를 유도하는 것에 의해 목표 세포에 생물학적 활성도를 지닌다^{42,43)}. IFNs가 특수 세포 표면 수용체와 결합한 후에 일시적으로 전사기능이 증가되는 interferon stimulatory gene(ISG)이라 불리는 effector gene에 의해 생물학적 기능을 나타내는데, 세포 성장 조절 역할을 하는 IFN-inducible gene으로 2-5A synthetase 유전자와 protein kinase(PK)등이 있다. 2-5A synthetase는 latent

cellular endonuclease, RNase-L을 활성화시켜 RNA를 선택적으로 분해함으로써 세포 성장 또는 바이러스 증폭 억제를 가져오며, PK는 자가인산화를 하여 protein synthesis initiation factor, eIF-2a를 인산화하여 단백질 생성과 세포 성장을 억제한다.^{42,43)}

Interferon regulatory factor-1(IRF1)은 IFN- α , IFN- β 와 IFN-inducible gene의 발암촉진자 내에서 발견되는 전사 인자로 IRF1 유전자는 cytokine, tumor necrosis factor(TNF), IFNs, prolactin 등에 의해 유발된다. 또한 IRF1의 불활성화는 인간 조혈기관의 악성 종양과 연관되어 있으며, 활성화된 c-Ha-ras 유전자를 지니는 섬유모세포의 DNA 손상 후에 세포고사 유발에 필요한 것으로 알려져 있다.⁴³⁾ 최근에는 mitogen에 의해 활성화된 성숙된 T 임파구의 DNA 손상에 의해 생긴 세포고사에도 IRF1에 의한 것임이 밝혀졌다.²⁸⁾

자궁경부암은 HPV 암유전자들의 작용, 또는 돌연변이(mutation)에 기인한 p53와 Rb, 두 주요 종양 억제인자의 비활성화라고 하는 세포증식억제 경로상의 결손에 의해 야기되는 암의 대표적인 경우라 할 수 있다. 그러나 HPV 자체만으로는 악성 변형을 유발할 수 없으며 자궁경부의 HPV 감염과 동반해서 국소적인 면역체계에 이상이 있음을 몇몇의 연구에서 보여 주었다. 즉, Castello 등⁴⁴⁾과 Tay 등⁴⁵⁾은 HPV가 관계되는 질환에서 많은 Langerhans 세포와 T helper 임파구의 변화가 있음을 보고하였으며, Aiba 등⁴⁶⁾, Fierlbeck 등¹⁰⁾, Okabayashi 등⁴⁷⁾은 HPV에 의해 야기된 질환의 퇴행(regression)시 대식세포, 세포독성 T 임파구 그리고 자연 파괴세포 등을 포함하는 염증세포들의 국소 침윤(infiltration)이 있음을 보고하였다. 이들 염증세포들은 감염이나 손상에 대한 숙주의 반응으로 여러 cytokine들을 생성하는데 HPV에 의해 변형된 자궁경부 세포들은 정상 자궁경부 세포들에 비해 cytokine의 양이 감소되어 있음을 보고하였다⁸⁾. 한편 Tay 등⁴⁵⁾은 HPV와 관계되는 질환에서 T 임파구(주로 CD4+ 세포)가 결핍(depletion)되어 있음을 보고하였으며, 이 T 임파구의 결핍은 IFN- γ 의 감소와 관계가 있다고 하였다. 그리고 Fierlbeck 등¹⁰⁾, Schneider 등¹¹⁾ 및 Iwasaka 등¹²⁾은 HPV와 관련된 병변을 IFN- γ 로 국소적으로 치료한 후 병소가 완전히 또는 부분적으로 관해 됨을 보고한 바 있다. 또한, Lippman 등¹³⁾과 Borden 등¹⁴⁾

은 IFNs이 정상세포와 변형된 세포에서 항증식 효과를 나타내고, 생체 내에서 편평상피암을 포함한 여러 암에 항암 효과를 지니고 있음을 보고하였으며, Delvenne 등¹⁵⁾도 부분적으로 면역이 결핍된 자궁경부의 HPV 관련 병변에서 유전자 재조합 IFN- γ 를 사용하여 HPV 감염을 치료할 수 있었으며, 이는 IFN- γ 를 보충하여 줌으로써 HPV에 의해 변형된 상피세포의 성장조절 억제기전(negative growth control mechanism)을 회복시키는 것이라고 하였다.

한편, Ikic 등¹⁶⁾은 IFN- α 를 사용하여 콘딜로마 환자에 국소 도포한 결과 90%에서 치료율을 보였다고 하였으며, 자궁경부 상피내암 환자에서 하루 4-5회 도포를 4~12주간 계속하여 54%에서 완전 소멸을 보고하고 있다¹⁷⁾. 그리고 Geffen 등¹⁸⁾은 IFN- α 를 콘딜로마 병변에 직접 주사한 결과, 50%에서 치료율을 보였으며, Vasilyev 등¹⁹⁾은 자궁경부 상피내암 병변에 IFN- α 를 직접 주사한 결과, 29%에서 치료율을 보였다고 하였다. 또한, Reichman 등²⁰⁾은 IFN- α 를 콘딜로마 환자에 매일 3X106 IU를 전신 투여하였을 때, 17%에서 병변의 소멸이 있었으며, Yliskoski 등²¹⁾과 Schneider 등¹¹⁾의 보고에 의하면, 자궁경부 상피내암 환자에서 IFN- α 를 전신 투여하였을 때 각각 49%와 71%에서 치료율을 보였다고 하였다.

한편, IFN과 retinoic acid를 함께 사용한 in vitro 실험에서 혈액 암과 몇몇 고형 암에서 상승작용 효과가 증명된 바 있다.^{25,27,48,49)} Lippman 등²⁵⁾은 진행된 자궁경부암에서 최초로 성공적인 비항암적 치료를 보고하였는데, 자궁경부 편평상피암에서 IFN- α 2a(6 million units)를 피하 주사와 13-cis-retinoic acid(13-cRA; 1 mg/Kg)를 경구로 매일 최소 2개월간 투여하여, 13명(50%)에서 큰 반응(병변의 퇴행이 50% 이하일 때)이 있었다고 하였다. 13명중 1명은 완전 관해, 12명은 부분 관해를 보여 주었고, IIb기 이상의 암에서 58% 반응률을, 10 cm 이상 병변의 암에서는 66%의 반응률을 보였다고 하였다.

Lancillotti 등⁵⁰⁾에 의하면, IFN- α 2b와 retinoid가 동시에 사용되었을 경우에 항증식 효과가 증가되었으며, IFNs의 성장 억제 반응(antigrowth response)에 대해 중요한 역할을 하는 것으로 보이는 2-5A synthetase 유전자의 발현도 증가되었다고 하였다. 또한 IFN- α 2b와 retinoid를 동시에 사용했을 경우에 HLA-A2 유전자의 발현을 증가시켰으며, IFNs 유전

자의 전사를 조절하는 IRF1 발현을 일시적으로 증가시켰다고 하였다.

본 연구에서는 Fig. 1에서 IFN- α 2,000 IU/ml를 HPV에 감염되지 않은 세포주와 HPV에 감염된 세포주에 처리하여 배양 7일 동안 세포수를 관찰한 결과, 세포수의 현저한 감소로 항증식 효과를 확인하였다. 배양 사진 상에서도 세포수가 감소된 양상을 관찰하였으며(Fig. 2), 항증식 효과를 객관적으로 볼 수 있는 WST-1 분석법에서도 확인하였다(Fig. 3). 또한 세포수를 측정 시 trypan blue 염색을 실시한 결과, trypan blue에 염색되는 세포, 즉 사망세포가 차지하는 비율은 모두 5% 미만으로 관찰되었다.

Romeo 등⁵¹⁾에 의하면, SiHa 세포주에서는 IFN- α 처리에 의해 항증식 효과 및 세포고사가 유발되었으나, retinoid 처리에 의한 항증식 효과는 별로 없었다고 하였다. 또한, Lancillotti 등⁵⁰⁾은 ME-180 세포주에서 IFN- α 를 단독으로 사용한 경우 항증식 효과 및 세포고사가 유발되었으며, retinoid와 함께 사용한 경우에는 항증식 효과가 더 증가되었다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 모든 연구 대상의 세포주에서 IFN- α 를 처리하기 전후의 세포고사를 측정, 비교한 결과, IFN- α 처리에 의하여 세포고사를 유발하지 않았다(Fig 4, 5, 6, 7, 8). 이와 같이 일치하지 않는 결과의 원인은 향후 지속적인 연구에 의하여 규명되어야 할 것으로 생각된다.

정상이나 변형된 상피세포에서 IFNs의 세포주기에 미치는 영향에 대한 연구는 별로 이루어지지 않았다. Marionnet 등⁵²⁾은 정상과 HPV에 의해 변형된 상피세포에서 cyclosporin A와 IFN- γ 를 4일간 처리한 후, 세포 주기를 유세포 측정법으로 분석하였는데, CaSki 세포주와 HPV에 의해 변형된 상피세포(EK 16, EK 18)에서는 S기의 세포의 비율이 많았고, SiHa, SVK 14b 세포주는 G2+M 기의 세포의 비율이 많았으며, NHK 세포주 및 HeLa 세포주에서는 별 변화가 없음을 보고하였다.

본 연구에서는 모든 연구 대상의 세포주에 IFN- α 를 처리한 후, 배양 3일째에 세포주기를 유세포 측정법으로 측정한 결과, 연구대상 세포주 모두에서 S기 세포의 비율은 증가하는 반면 G2/M기 세포의 비율은 감소함을 보였다(Fig. 9, 10, 11, 12, 13). 이는 IFN- α 처리에 의하여 세포의 주기가 S기에서 G2/M기로의 차단됨을 보여주는 결과이다. 이상의 본 연

구결과로, IFN- α 는 세포고사를 유발하지 않았으며, trypan blue에 염색되는 세포의 수가 5% 미만임을 볼 때, IFN- α 의 항증식 효과는 세포독성에 의한 것이 아니라 세포증식 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

Perea 등⁵³⁾은 IFN- α 처리에 의하여 HeLa 세포주에서 HPV의 E6 유전자의 전사가 억제되어 HPV 18 E6 mRNA의 발현이 억제됨을 보고하고 있다. 본 연구에서도 HPV 16, 18에 감염된 자궁경부암 세포주에서 E6 mRNA 발현의 변화를 보기 위해 CaSki, HeLa 세포주에서 추출한 E6 mRNA를 northern blotting을 이용하여 시간 별로 E6 mRNA 발현을 측정하였는데, 그 결과 HPV 16에 감염된 CaSki 세포주에서는 IFN- α 의 처리에 의하여 E6 mRNA 발현이 억제되지 않았으나, HPV 18에 감염된 HeLa 세포주에서는 IFN- α 의 처리에 의하여 E6 mRNA 발현이 억제되었다(Fig. 14). 그러나, 본 연구에서 HPV에 감염된 CaSki 세포주와 HeLa 세포주 모두 IFN- α 에 의하여 항증식 효과를 보이며, 역시 HPV에 감염되지 않은 C33A 세포주에서도 IFN- α 가 항증식 효과를 지니는 것으로 미루어 볼 때, IFN- α 에 의한 HPV E6 mRNA의 발현 조절은 자궁경부암 세포주에서의 IFN- α 의 항증식 효과 기전과 직접적인 관계는 없는 것으로 판단되었다.

IFNs의 종양세포에 대한 항증식 효과의 작용기전은 아직도 확실히 밝혀지지 못하였고, 본 연구와 다른 연구결과들 사이에 서로 일치하지 않는 부분도 발견되므로, 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다. 또한 IFNs과 다른 제제와의 병합 상용시 항증식 효과의 상승작용 여부 및 이의 작용기전도 앞으로 밝혀져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

저자들은 여러 가지 자궁경부암 세포주(C33A, CaSki, SiHa, HeLa, ME-180)들을 대상으로, IFN- α 의 각 세포주들에 대한 항증식 효과 및 항증식 효과의 기전을 알아보고, 또한 IFN- α 가 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)의 E6 유전자의 발현에 미치는 영향과 그에 따른 항증식 효과의 차이가 있는지를 알아보고자 하였다. 본 연구의 결과는 다음

과 같았다.

(1) IFN- α 를 처리한 후 각 연구대상 세포주를 배양하면서 7일 동안 매일 관찰한 세포 수에 따르면, IFN- α 는 모든 연구대상 세포주에서 항증식 효과가 있었다. 이 항증식 효과는 WST-1 분석법에 의해서도 확인되었다.

(2) 모든 연구대상 세포주에 IFN- α 를 처리한 후 배양 3일째와 7일째에 세포고사(apoptosis)를 유세포 측정법(flow cytometry)을 이용하여 측정한 결과, IFN- α 는 세포고사를 유발하지 않았다.

(3) 모든 연구대상 세포주에 IFN- α 를 처리한 후 배양 3일째에 세포주기를 유세포 측정법을 이용하여 측정한 결과, S기(phase) 세포 비율은 증가하는 반면, G2/M기 세포 비율은 감소하였다.

(4) CaSki와 HeLa 세포주에서 추출한 E6 mRNA를 northern blotting을 이용하여 측정한 결과, CaSki 세포주에서는 IFN- α 처리에 의하여 HPV 16 E6 mRNA 발현이 억제되지 않았으나, HeLa 세포주에서는 HPV 18 E6 mRNA 발현이 억제되었다.

이상의 결과로 볼 때, IFN- α 는 C33A, CaSki, SiHa, HeLa, ME-180 자궁경부암 세포주에서 모두 항증식 효과를 지님을 알 수 있으며, IFN- α 의 항증식 효과는 세포고사의 유발에 의한 것이 아니라, 세포주기의 특정부위를 차단함으로써 이루어지는 것으로 생각된다. 따라서 IFN- α 의 항증식 효과는 세포독성 효과(cytotoxic effect)가 아닌 세포증식 억제효과(cytostatic effect)에 의한 것으로 생각된다. 또한, 자궁경부암 세포주에서의 IFN- α 에 의한 HPV E6 mRNA의 발현 조절은 IFN- α 의 항증식 효과 기전과 직접적인 관련이 없는 것으로 판단된다.

-참고문헌-

1. Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ: Oncogene association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. J Natl Cancer Inst 1987;79:671-7.
2. Zur Hausen H: Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understanding the role of viruses in human cancers. Cancer Res 1989;49:4677-81.
3. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden

- KH: Human papillomavirus E6 protein bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992;11:3045-52.
4. Heck DV, Yee CL, Howley PM, Munger K: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins with human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4442-6.
5. Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Hoeley PM: Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surv* 1992;12: 197-217.
6. Matlashewski G, Schneider J, Bank L, Jones N, Murray A: Human papillomavirus type 16 DNA cooperate with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J* 1987;6:741-6.
7. DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J: Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 1989;4:395-9.
8. Woodworth CD, Simpson S: Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1993;142:1544-55.
9. Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Singer A: Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br J Obstet Gynecol* 1987;94:16-21.
10. Fierlbeck G, Schiebel U, Muller C: Immunohistology of genital warts in different stages of regression after therapy with interferon- γ . *Dermatologica* 1989;179: 191-5.
11. Schneider A, Papendick U, Gissman L, DeVilliers EM: Interferon treatment of human genital papillomavirus infection: importance of viral type. *Int J Gynecol* 1987; 40:610-4.
12. Iwasaka I, Hayashi Y, Yokoyama M: Interferon- γ treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 1990;37:96-102.
13. Lippman SM, Shimm D, Meyskens FL: Non-surgical treatment for non-melanoma skin cancer: retinoids and interferon- α . *J Dermatol Surg Oncol* 1988;14:862-9.
14. Borden FC, Sondel PM: Lymphokines and cytokines as cancer treatment: immunotherapy realized. *Cancer(Philia)* 1990;65:800-14.
15. Delvenne P, Al-Saleh W, Gilles C, Thiry A, Boniver J: Inhibition of growth of normal and human papillomavirus transformed keratinocytes in monolayer and organotypic by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Am J of Pathol* 1995;3:589-98.
16. Ilic D, Oreacanin M, Jusic J, Castar Z: Preliminary study the effect of human leukocyte interferon on condyloma accuminata in woman. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1975;147:258-67.
17. Ilic D, Slinger Z, Beck M, Sons E, Jusic, D: Interferon treatment of uterine cervical precancerous lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981;101:303-8.
18. Geffen JR, Klein RJ, Friedman-Kien AE: Intralesional administration of large doses of human leukocyte interferon for the treatment of condyloma accuminata. *J Infect Dis* 1984;150:612-5.
19. Vasilyev RV, Bokhman JV, Smorodintev AA, Ioviev VI: An experience with application of human leukocytes interferons for the cervical cancer treatment. *Eur J Gynecol Oncol* 1990;11:313-7.
20. Reichman RC, Oakes D, Eonnea W, Dolin R: Treatments of condyloma accuminatum with three different interferon administrated intralesionally: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1990;108: 675-9.
21. Yliskoski M, Saarikoski S, Nethersell A: Systemic alpha interferon treatment. *Gynecol Oncol* 1991;43:55-60.
22. Graham V, Surwit BS, Weiner S: Phase II trial of beta-all- transretinoic acid for cervical intraepithelial neoplasia delivered via a collagen sponge and cervical caps. *West J Med* 1986;145:92-195.
23. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes EM: 13-cis-retinoic acid plus interferon- α 2a; highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of the cervix. *J Natl Cancer Inst* 1986;81:241-5.
24. Weiner SA, Surwit EA, Graham VB: Phase I trial of topically applied trans-retinoic acid in cervical dysplasia; chemical efficacy. *Invest New Drugs* 1986;4:241-4.
25. Lippman SM, Parkinson DR, Itri L, Weber RS, Schantz SP, Hong WK: 13-cis-retinoic acid and interferon- α 2a: effective combination therapy for advanced squamous cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:241-5.
26. Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes EM, Delgadillo MF, Krakoff IH: 13-cis-retinoic acid plus interferon-alpha 2a in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:499-500.
27. Toma S, Palumb R, Vincenti M, Rosso R: Efficacy of recombinant alpha-interferon and 13-cis-retinoic acid in the treatment of squamous cell carcinoma. *Ann of Oncol* 1994;5:463 -5.
28. Tamura T, Ishihara W, Lamphier MS, Oishi I, Taniguchi T: An IRF-1-dependent pathways of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature* 1995;376:96.
29. White E: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Dev* 1996;10:1-15.

30. Knight E Jr: Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:520-3
31. Einhorn S, Strander H: Is interferon tissue-specific? Effect of human leukocyte and fibroblast interferons on the growth of lymphoblastoid and osteosarcoma cell lines. *J Gen Virol* 1977;35:573-7.
32. Weck PK, Apperson S, May L, Stebbing N: Comparison of the antiviral activities of various cloned human interferon alpha subtypes in mammalian cell cultures. *J Gen Virol* 1981;57:233-7.
33. Lengyel P: Biochemistry of interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 1982;51:251-82.
34. Jones CM, Varesio L, Herberman RB, Pestka S: Interferon activates macrophages to produce plasminogen activator. *J Interferon Res* 1982;2:377-86.
35. Jaffe HS, Sherwin SA: The early clinical trials of recombinant human interferon-gamma. In: *interferons as cell growth inhibitors and antitumor factor*. Alan R Liss Inc New York 1986;509-22.
36. 황은성. Cellular transformation in cervical ca. 제2차 HPV 감염과 자궁경부암 심포지움 1997; 25-34.
37. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT: Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65:606-12.
38. Rosl F, Achtstatter T, Bauknecht T, Hutter KJ, Futterman G, Zur Hausen H: Extinction of the HPV 18 upstream regulatory region in cervical carcinoma cells after fusion with non-tumorigenic human keratinocytes under non-selective conditions. *EMBO J* 1991;10:1337-45.
39. McBride AA, Romanczuk H, Howley PM: The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991;266:18411-4.
40. Slebos RJC, Lee MH, Plunkett BS, Keiss TD, Cho KR: P53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5320-4.
41. Werness BA, Levine AJ, Howley PM: Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;76:79.
42. Kerr IM, Stark GR: The control of interferon-inducible gene expression. *FEBS Lett* 1991;285:194-8.
43. Tanaka N, Taniguchi T: Cytokine gene regulation: regulatory cis elements and DNA binding factors involved in interferon system. *Adv Immunol* 1992; 52:263-81.
44. Castello G, Esposito G, Giovanni S, Mora LD, Abate G, Germano A: Immunological abnormalities in patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1986;25:61-4.
45. Tay SK, Jenkins D, Maddox P, Campion M, Singer A: Subpopulations of Langerhans' cells in cervical neoplasia. *Br J Obstet Gynecol* 1987;94:10-5.
46. Aiba S, Rokugo M, Tagami H: Immunohistologic analysis of the phenomenon of spontaneous regression of numerous flat warts. *Cancer* 1986;58:1246-51.
47. Okabayashi, M., Angell, M.G., Budgeon, L.R. and Kreider, J.W. Shope papilloma cell and leukocyte proliferation in regressing and progressing lesions. *Am J Pathol* 1993;142:486-9.
48. Frey JR, Peck R, Bolag W: Antiproliferative activity of retinoids, interferon, and their combination in five human transformed cell lines. *Cancer Lett* 1991;57: 223-7.
49. Peck R, Bollag W: Potentiation of retinoid-induced differentiation of 11L-60 and U937 cell lines by cytokines. *Eur J Cancer* 1991;27:53-7.
50. Lancillotti F, Giandomenico V, Affabris E, Fiorucci G, Romeo G, Rossi GR: Interferon α -2b and retinoic acid combined treatment affects proliferation and gene expression of human cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 1995;55:3158-64.
51. Romeo G, Affabris E: Retinoic acid and interferon induced apoptosis. *Retinoids in oncology* 1996;45:32-5.
52. Marionnet AV, Lizard G, Chignol MC, Chardonnet Y, Schmitt D: Differences in reactivity to cyclosporin A and interferon-gamma of normal and HPV-transformed keratinocytes. *Anticancer Res* 1996;16:257-68.
53. Perea SE, Lopez-Ocejo O, Garcia-Milian R, Arana M: Interferon- α elicits downregulation of human papillomavirus 18 mRNA in HeLa cells by selective repression of endogenous viral transcription. *J of interferon and cytokine res* 1995;15:495-501.