

자궁경부종양에서 p16 유전자의 발현 및 p16 유전자 촉진부위의 메틸화와 인유두종 바이러스 감염에 대한 연구

순천향대학교 의과대학 천안병원 산부인과학교실¹, 병리학교실²,
지역혁신센터 바이러스 연구소³, 제주대학교 의과대학 산부인과학교실⁴
전 섭¹ · 최승도¹ · 배동한^{1,3} · 정동준^{2,3} · 김창진^{2,3} · 신영우⁴

목적 : p16은 pRb를 인산화시키는 cyclin-dependent kinase (CDK)를 억제해서 세포 주기를 감속시키는 종양억제유전자로 자궁경부 악성화에서 p16 유전자 촉진 부위의 메틸화 같은 유전자 이상은 중요한 인자로 연구되어 왔다. 본 연구에서는 자궁경부종양에서 p16 유전자의 발현, 유전자 촉진 부위의 메틸화 그리고 인유두종바이러스를 검사하여 그들이 자궁경부의 악성화 단계에서 서로 어떤 상관관계가 있는지 연구하였다.

연구 방법 : CIN1 30예, CIN2, 3 45예, 침윤암 29예 총 104예의 조직검체를 가지고 p16 유전자의 발현은 면역조직화학염색으로, p16 촉진부위의 메틸화는 메틸화특이 중합효소반응법으로 검사하였고 HPV DNA 검사는 세포검체로 시행된 결과를 검토하였고 결과의 분석은 고위험군 HPV 양성군과 저위험군 양성 혹은 음성군으로 나누어 시행되었다.

결과 : 1. HPV의 유전형에 따른 p16의 발현은 고위험군과 저위험 혹은 음성군에서 병변별로 각각 CIN1, 30% vs 23%, CIN2, 3, 64% vs 58%, 침윤암 80% vs 37%로 나타났으며 CIN에서는 차이가 없지만 침윤암에서는 고위험군의 p16 발현의 빈도가 통계학적으로 유의하게 높았다. 2. HPV의 유전형에 따른 p16 촉진부위의 메틸화는 고위험군과 저위험 혹은 음성군에서 병변별로 각각 CIN1, 23% vs 17%, CIN2, 3, 25% vs 47%, 침윤암 19% vs 87%의 결과를 보여 침윤암에서는 저위험 혹은 음성군에서 메틸화의 빈도가 통계학적으로 유의하게 높았다.

결론 : p16 발현은 CIN과 침윤암의 표지자로서 역할을 할 것으로 사료되며 촉진부위의 메틸화는 고위험군 HPV가 감염되지 않은 자궁경부의 악성화와 관계가 있을 것으로 사료된 바 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어 : 인유두종바이러스, DNA 메틸화, p16 유전자, 자궁경부종양

서 론

자궁경부 종양이 발생하는 과정에서 인유두종바이러스(human papillomavirus; HPV) 감염이 관여하는데 그 기전은 고위험 HPV의 지속적인 감염으로 인해 숙주세포의 염색체안으로 융합(integration)되며 이로 인해 HPV/E2의 E6/E7 종양단백에 대한 조절 능력을 잃어 버리게 되어, E6와 E7이 종양억제 유전자 산물인 p53과 retinoblastoma 유전자 산물(pRb)과 각각 결합하여 조절 불능의 세포 증식을 야기해서 종양이 발생한다고 보고되어

있다.^{1,3} 세포 주기의 조절은 cyclin 유전자들과 cyclin dependent kinase (CDK) 복합체들의 연쇄 작용으로 조절 되는데 p16 유전자는 CDK inhibitor family 중 p15 18 19 와 함께 INK4A family에 속하는 종양억제 조절 기능이 가장 강력한 유전자로서 9번 염색체 단완 21번에 위치하며 CDK 4/6의 억제자로서 CDK 4&6를 억제하여 pRB의 인산화를 방해하여 세포전사인자(cellular transcription factor)인 E2F의 억제가 이루어져 세포주기가 G1 phase에서 정지되는 세포주기 조절기능을 수행하고 있는 것으로 알려져 있다.^{4,5}

p16 유전자의 결손, 돌연변이 같은 유전자 이상은 여러 종양 세포주에서 높은 빈도로 보고되었으며 폐암, 방광암, 신장암, 두경부암 등 여러 원발성 종양에서도 보고되었고 이 유전자에 동형접합성 결손을 쥐에서 일으키

논문접수일 : 2007년 5월 31일 채택일 : 2007년 7월 27일
교신저자 : 배동한, 330-721 충남 천안시 병명동 23-20
순천향대학교 의과대학 천안병원 산부인과
전화 : 041) 570-2151 · 전송 : 041) 571-8228
E-mail : dhanbae@schch.co.kr

면 종양이 잘 발생하는 것으로 보고된 바 있다.^{6,7}

한편 자궁경부 종양에서는 p16 유전자 산물이 자궁경부 이형증이나 자궁경부암의 보조적인 표지로서 수년 전부터 연구되어지고 있으며 다른 종양과는 달리 자궁경부 종양에서는 HPV 감염으로 생성되는 종양단백인 E7에 의해 pRb가 기능적으로 불활성화되어 p16 유전자 발현이 증가한다고 보고되었다.⁸

인체의 많은 유전자들 특히 종양억제유전자의 촉진 부위에는 염기 cytosine이 인산염에 의해 guanine과 결합하고 있는 CpG dinucleotide가 연속해서 수백에서 수천 염기쌍이 나타나는데 이 부위를 CpG island (CGI)라고 한다. 유전자 촉진 부위(promoter region) CGI에 메틸기(methyl)가 결합하면 mRNA 전사가 방해받아서 유전자 발현이 억제된다. 이렇게 메틸화된 세포가 증식 과정에서 DNA를 복제할 때, DNA methyl transferase 1 (DNMT1)은 DNA 주형의 CpG 핵산에 결합되어 있는 메틸기를 인지하고 새로 합성되는 DNA 가닥 내의 CpG 핵산에도 메틸기를 더해 주게 된다. 이러한 유전자 촉진 부위의 과메틸화는 종양의 종류마다 차이가 나며 p16은 위암, 간암, 두부 및 뇌종양 비인두 종양 등 여러 종양에서 돌연변이나 결손에 의하지 않고 촉진 부위의 비정상적인 과메틸화에 의해 유전자 발현이 억제된다고 보고되었다. 자궁경부암에서 p16의 발현이 억제되는 기전 중 돌연변이나 결손 등은 매우 빈도가 낮은^{9,10} 반면에 여러 연구에서 자궁경부 종양화 단계에서 촉진 부위의 과메틸화가 초기에 발생하는 사건으로 보고되었다.^{11,12}

자궁경부 종양에서 p16 유전자의 발현 양상과 고위험 HPV 감염과의 상관관계는 HPV 감염 시에 p16 유전자의 과발현이 일어나는 경향으로 여러 연구에서 보고되었지만 p16 촉진 부위의 과메틸화와 자궁경부 종양화에 관한 연구는 미흡한 편이다.

이에 저자는 자궁경부 종양에서의 종양억제유전자인 p16 유전자의 발현 및 유전자 촉진 부위의 메틸화와 HPV 유전형에 대해서 연구하여 자궁경부 종양의 악성화 단계에서 그들이 서로 어떤 상관관계가 있는지 알아 보았다.

연구 대상 및 방법

2003년 3월부터 2004년 6월까지 본원에서 수술이나

생검으로 진단된 자궁경부상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia; CIN) 1 30예, CIN2,3 45예, 그리고 침윤암 29예 104예의 조직과 세포 샘플을 대상으로 하였고 모든 샘플을 HPV 유전형에 따라서 고위험군과 저위험 혹은 음성군으로 나누어서 연구하였다. 연구대상 환자들로부터 서면 동의를 받았으며 본원의 Institutional Review Board의 승인을 받았다.

1. HPV 유전형

HPV DNA Chip (Genomic tree)을 이용하여 모든 세포 검체의 인유두종 바이러스 유전형을 검사하였다.¹³

HPV의 유전형은 고위험군은 16, 18, 45, 56, 중등도 위험군은 31, 33, 35, 39, 51, 52, 55, 58, 59, 66, 68, 저위험군은 6, 11, 26, 42, 44, 54, 70, 73으로 본 연구에서는 고위험군과 중등도 위험군을 ‘고위험군’, 저위험군과 감염이 안된 음성군을 ‘저위험 혹은 음성군’으로 분류하여 연구하였다.

2. p16의 면역조직화학적 염색

p16 유전자의 단백질 발현을 확인하기 위하여 p16에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 항체는 단일클론 항체로 p16 (Santa Cruz, USA) 1 : 100으로 희석하여 사용하였다. 항원표출을 돕기 위하여 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0용액에 넣어 microwave에서 20분간 끓였으며, 그 후 실온에서 1시간 이상 식힌 후 증류수로 3회 3분씩 수세하였고, 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 메탄올 용액에 3% 과산화수소 용액을 만들어 조직을 30분간 실온에서 반응시켰다. 그 후 역시 증류수로 3회 수세 후 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) 용액에 3분간 담근 후 일차 항체와 실온에서 1시간 반응하였다. 그 후 3회 3분씩 PBS로 세척 후 Fab polymer에 peroxidase가 부착된 PicTure PLUS Kit (Zymed, USA)와 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 역시 PBS로 3회 세척 후 diaminobenzidine으로 발색하였고 다시 증류수로 세척 후 hematoxylin으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3. DNA 추출

종양 세포에서 각각 DNA를 추출하기 위해서 미세분리 방법으로 종양 조직과 정상 조직을 구분하였다. 이를

위하여 파라핀 절편에서 5개의 7 um 절편을 만들어 통상적인 방법으로 탈파라핀하고 graded alcohol로 함수시킨 후 조직을 건조시켰다. 건조된 조직을 40배율의 현미경 하에 24개이지 바늘로 중앙조직과 정상조직을 끊어 50 μl의 lysing buffer (500 mM KCl, 150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM MgCl₂ and 1.5% Tween 20)에 proteinase K (0.5 mg/L)를 넣어 잘 흔든 후 55°C에서 24시간 부란하였다. 그 후 순수한 DNA를 얻기 위하여 동량의 10% Chelex-100 (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, USA) Resin을 첨가한 후 55°C에서 1시간 부란하였고 그 후 10분간 끓였다. 그 후 원심분리하여 Resin을 가라앉히고 상층액을 분리하여 새로운 튜브에 넣고 phenol/chloroform 추출방법으로 추출하여 10 μg glycogen과 함께 100% 에탄올로 침전시켰다. 차가운 70% 에탄올로 씻은 후 침전 DNA를 말렸고 이를 20 μl의 D/W로 녹여 바로 bisulfite modification을 하였다.

4. Bisulfite modification

약 300 ng의 DNA를 30 μl의 증류수로 농도를 조정 한 후 이에 3 μl의 3 M NaOH 용액을 첨가한 후 75°C에서 20분간 부화하였다. 그 후 이를 얼음에 넣어 식힌 후 10 mM hydroquinone (Sigma) 20 μl, 4.8 M sodium bisulfite (Sigma) 500 μl를 넣어 잘 섞은 후 상층에 mineral oil을 넣고 어두운 곳에서 55°C에서 5시간 부화하였다. 이때 hydroquinone과 sodium bisulfite 용액의 산성도는 정확히 5.0으로 맞추었다. 변형된 DNA는 Wizard DNA clean up kit (Promega)로 불순물을 제거한 후 다시 0.3 M NaOH 용액에서 실온에서 10분간 부화하였다. 그 후 에탄올로 침전시키고 세척 후 다시 침전시킨 후 건조시켰고, 건조된 DNA를 20 μl의 증류수로 녹여 PCR 주형으로 사용하였다. 양성 대조군으로 모든 유전자에 메틸화된 DNA (Universally methylated DNA, InterGene, USA)를 사용하여 검체와 함께 반응시켰다.

5. Methylation specific polymerase chain reaction (MSP)

각 유전자의 촉진자 부위의 메틸화를 확인하기 위하여 메틸화 특이 시발체(methylation specific primer; M-primer)와 비메틸화 특이 시발체(Unmethylation specific primer; U-primer)를 제작하여 메틸화 특이 중합효소연쇄

Table 1. Primer sequences and annealing temperature of p16

	5'-3'	annealing temperature
p16-M1	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65°C
p16-M2	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	
p16-U1	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	60°C
p16-U2	CAACCCCAAACCACAACCATAA	

M1,2; primer for methylated DNA, U1,1; primer for unmethylated DNA

반응(Methylation specific PCR)을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 primer의 배열(sequence)과 단련(annealing) 온도는 Table 1과 같다.

중합효소연쇄반응은 20 μl으로 시행하였고 주형 DNA 3 μl, buffer 2 μl, dNTP 1 μl, AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) 0.75 μg을 넣어 touch down 중합효소연쇄반응을 시행하여 30회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분간 연장시켰다. 중합효소연쇄반응산물의 확인은 10% TB acrylamide gel로 확인하였다. 양성대조군의 DNA 주형은 모든 유전자에 메틸화된 DNA (Universally methylated DNA, InterGene, USA)를 함께 bisulfite modification 시킨 DNA를 주형으로 사용하였고, 음성대조군은 DNA 주형 대신 증류수를 사용하였다.

6. 통계학적 분석

통계학적 검정은 SPSS 13.0 version으로 chi square test 와 만일 한 셀의 수가 5 미만인 경우에는 Fisher's exact test를 이용하여 p value 0.05 이하를 의의 있는것으로 해석하였다.

결 과

1. HPV 유전형

104개의 세포 샘플들 중에서 CIN1에서는 고위험군의 HPV가 42.4%, CIN2,3에서는 62.7% invasive ca에서는 72.4%의 결과를 보였다.

2. p16 유전자 발현

p16의 유전자 발현은 주로 기저층의 세포분열이 왕성

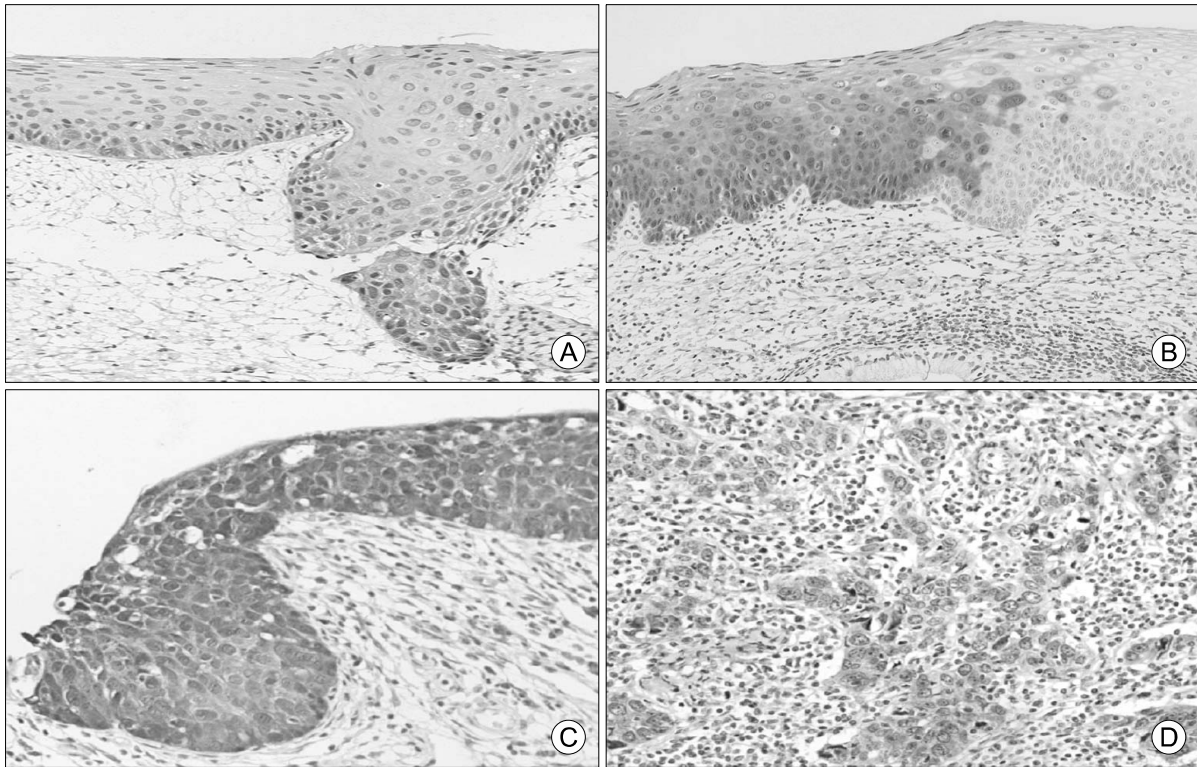


Fig. 1. Immunohistochemistry of p16 in CIN1, CIN2, CIN3, and Invasive SCC. (A) CIN1, the dysplastic cells are positive for p16 (ABC, peroxidase, ×200), (B) CIN2, the dysplastic cells are positive for p16 (ABC, peroxidase, ×200), (C) CIN3, the dysplastic cells are positive for p16 (ABC, peroxidase, ×200), (D) Invasive cancer, shows strong positive reaction for p16 (ABC, peroxidase, ×200).

한 곳에서 발견되었고 핵내와 세포질내에서 모두 발견되었다(Fig. 1). CIN1에서는 8/30 (26%), CIN2,3에서 28/45 (62%), 그리고 침윤암에서 20/29 (68%)의 발현율을 보여 통계학적으로 유의하게 차이가 나는 결과를 보였다. HPV의 유전형에 따른 p16의 발현은 고위험군과 저위험 혹은 음성군에서 병변별로 각각 CIN1, 28% vs 21%, CIN2, 3, 56% vs 61%, 침윤암 80% vs 37%로 나타났으며 CIN에서는 차이가 없지만 침윤암에서는 고위험 HPV군에서 발현이 통계학적으로 유의하게 증가하는 결과를 보였다(Table 2).

화는 CIN1에서 6/30 (23%) CIN2,3 15/45 (33%) 침윤암 11/29 (37%)로 관찰되었고 전체적으로 통계학적인 유의성은 없었으나 HPV의 유전형에 따른 p16 촉진 부위 메틸화는 고위험군과 저위험 혹은 음성군에서 병변별로 각각 CIN1, 21% vs 21%, CIN2,3, 23% vs 44%, 침윤암 19% vs 87%의 결과를 보여 침윤암에서는 저위험 혹은 음성군에서 메틸화의 빈도가 통계학적으로 유의하게 높았다(Table 2).

고 찰

3. p16 유전자 촉진부위의 메틸화

PCR 증폭에 사용된 primer set는 메틸화가 안된 DNA를 증폭하는 U-primer와 메틸화된 DNA를 증폭하는 M-primer를 사용하였고 정상 조직에서는 U-primer에 증폭된 산물이 관찰되었고 종양 조직에서는 M-primer에 증폭된 산물이 관찰되었다(Fig. 2). p16 촉진 부위의 메틸

자궁경부의 발암 과정에서의 HPV의 역할은 종양단백인 E6와 E7이 종양억제 유전자 산물인 p53과 저인산화된(hypophosphorylated) pRb와 결합하여 p16/ cyclinD1/ cdk4/pRb 세포주기 조절 기전에 영향을 미친다.^{14,15} 자궁경부암에서 발생하는 종양단백인 E6로 인한 p53의 기능의 소실은 가장 빈번히 일어나며 가장 잘 특성화되는 후

Table 2. Distribution of p16 expression and methylation according to lesion grade and HPV status

	HPV	p16 exp		p value	p16 met		p value
		+	-		+	-	
CIN1 (n=30)	HR (13)	4 (30%)	9	>0.05*	3 (23%)	10	>0.05*
	LN (17)	4 (23%)	13		3 (17%)	14	
CIN2,3 (n=45)	HR (28)	18 (64%)	10	>0.05†	7 (25%)	21	>0.05†
	LN (17)	10 (58%)	7		8 (47%)	9	
Invasive cancer (n=29)	HR (21)	17 (80%)	4	† <0.05*	4 (19%)	17	† <0.05*
	LN (8)	3 (37%)	5		7 (87%)	1	

HR; high risk HPV group, LN; low risk HPV or negative group, exp; expression, met; methylation, *Fisher's exact test ($p < 0.05$), †chi-square test ($p < 0.05$), †statistically significant

생적인(epigenetic) 사건으로 이러한 p53의 변화는 p21의 기능의 변화를 주어 p16/ cyclinD1/cdk4/pRb 세포주기 조절 기전에 간접적인 영향을 미친다. 이러한 p16/ cyclinD1/cdk4/pRb 세포주기 조절 기전은 세포주기에서 G1-to-S phase 이행의 조절에 중심이 되며 또한 발암과정을 이해하는데도 중요하다.

CDKN2A 산물인 p16은 세포 주기에서 G1 check point를 조절하는 CDK 4/6를 저해하는 종양억제유전자 산물로 cyclin D-CDK4/6 복합체를 억제하여 세포주기의 진행을 억제한다. 또한 pRb는 전사인자인 E2F와 결합하여 E2F-pRb 복합체를 형성하여 G1 phase에서 전사를 억제하는 기능을 수행하는데 cyclin D-CDK4/6 복합체에 의한 인산화 과정 후에 pRb-E2F 복합체에서 pRb가 유리되고 불활성화되면 E2F가 유리되어 CDK를 활성화시키고 목표 촉진자의 전사를 활성화시킨다. 고로 p16과 pRb 기능의 소실은 비정상 세포주기 진행을 야기해서 p16 혹은 pRb가 불활성화될때 세포는 G1 check point에서 잠시 정지했다가 S phase로 진행하게 된다. 그러므로 p16의 기능이 감소되면 비정상적인 세포주기의 진행으로 야기되고 결국은 발암과정과 관계가 된다.

한편 자궁경부 종양에서는 HPV 감염과 관련하여 p16

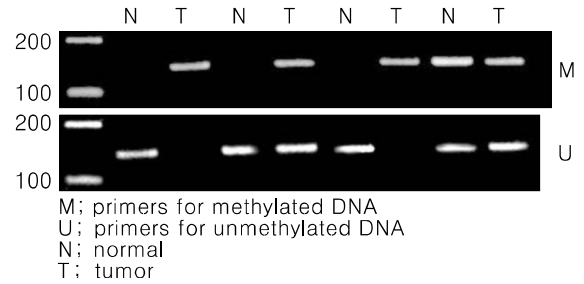


Fig. 2. Analysis of p16 promoter methylation. Methylation specific PCR analysis of the p16 promoter was performed in normal tissue, CINs and invasive cancers. Primer sets used for amplification were designated as unmethylated (U) or methylated (M). Tumor tissue exhibits p16 methylation as 145 bp band in electrophoresis, while normal tissue exhibits unmethylation as 156 bp band in electrophoresis.

유전자의 과발현을 보고한 연구들이 있었는데 Sano 등은 자궁경부암에서 HPV 유전형에 따른 p16 발현을 연구하였는데 고위험 HPV (16,18,31,33,52,58) 양성인 CIN과 침윤암에서 강력한 p16의 발현이 관찰되었고 저위험군 혹은 HPV 음성군에서는 발현이 미약했다고 보고하면서 이러한 p16의 발현의 차이는 고위험 HPV 감염 시에 종양단백인 E7에 의해 기능적인 pRb의 불활성화가 일어나 결국 p16의 과발현을 초래하였고 p16의 발현의 차이는 pRb의 기능적 불활성화의 차이에서 기인한 것이라고 결론지었다.⁸ Hiroyuki 등은 25예의 자궁경부암(21예가 HPV 양성)과 11예의 정상자궁경부에서의 p14와 p16의 mRNA의 발현을 연구하였는데 21예의 HPV 양성군중 17예에서 p16 mRNA의 과발현이 관찰되었고 4예의 HPV 음성 검체 중 3예에서 p16 mRNA의 발현이 감소됨을 관찰하여 HPV 양성 자궁경부암과 p14 p16의 과발현이 관계가 있고 이러한 p16의 과발현은 종양단백인 E7에 의한 pRb의 기능적인 불활성화에 의한다고 보고하였으며, HPV 음성인 자궁경부암의 발생에 있어 p14과 p16의 발현 장애가 원인이 될 수 있을 것이라는 주장을 제시하기도 하였다.¹⁶ Klaes 등에 따르면 HPV의 감염 여부와 관계없이 CIN1, 2, 3, 침윤암에서 세포의 25% 이상이 염색되는 p16의 발현이 각각 87%, 100%, 100%, 96%로 매우 높았고 저위험 HPV에 감염된 CIN1에서는 25% 이상의 발현이 관찰되지 않았다고 보고하였으며 세포도말 검체에서도 p16의 단일클론 항체를 이용하여 p16의 발현을 확인할 수 있어서 p16 유전자 발현이 자궁경부조직

과 세포도말검체에서 종양성 변화를 확인할 수 있는 특정 지표라고 보고하였다.¹⁷ Giarre 등은 HPV 음성인 자궁경부 선암에서 면역조직화학적 방법으로 p16, p21, 그리고 p27의 발현을 연구하였는데 대부분의 종양에서 발현이 미약하거나 없었다고 보고하였다.¹⁸ 이상에서 보면 자궁경부 종양에서 p16의 발현이 감소했다는 보고도 있었으나 대부분의 연구에서 p16의 발현이 증가하는 결과를 보였다.

DNA의 과메틸화에 의해 종양억제유전자의 발현이 억제될 수 있다는 것은 1989년 Horsthemke 등이 RB promoter의 과메틸화를 보고하면서부터이다.¹⁰

1995년에 Herman 등은 악성 종양에서 p16 유전자의 기능을 잃게 되는 2개의 주된 기전은 동형접합성 결손(homozygous deletion)과 CGI의 메틸화에 의한 전사억제로 보고하였다.¹⁹

현재까지 자궁경부암에서 많은 종양억제유전자들이 비정상적인 촉진 부위의 과메틸화로 인해 전사가 억제되어 유전자 발현이 감소됨이 보고되었고²⁰ 그 중 p16 유전자는 세포주기를 조절하는 유전자 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 유전자로 자궁경부암에서 p16의 발현이 억제되는 기전 중 돌연변이나 결손 등은 매우 빈도가 낮게 보고되었다.^{9,21} 1999년 Wong 등은 부인과 악성종양에서의 p16 유전자의 촉진 부위의 메틸화와 동형접합성 결손의 발병률을 연구하였는데 자궁경부암에서 31%/5% 자궁내막암에서 20%/2% 난소암에서 4%/7%로 유전자 촉진 부위의 메틸화를 p16 불활성화의 주된 기전으로 기술하였고 p16의 메틸화는 암의 진행된 병기와 불량한 예후와 통계학적인 연관이 있었다고 기술하면서 p16의 메틸화는 암의 초기 시작보다는 진행과 더욱 관련이 있다고 보고하였다.²² 2004년 Yang 등은 자궁경부암의 조직과 환자의 혈액에서 death-associated protein kinase (DAPK), p16, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 의 세 가지 유전자의 촉진 부위의 메틸화를 검사하였는데 각각 60%, 28.2%, 18.8%의 메틸화를 보였고 세 가지 중 한 가지라도 메틸화를 보인 경우는 75%가 넘는다고 보고하였는데²³ 이는 2002년 Dong 등에 의한 보고와 비슷한 결과이다. Dong 등은 DAPK와 p16의 촉진 부위의 메틸화는 선암보다 편평상피암에서 더 흔하였다고 보고하면서 특정한 유전자의 촉진 부위의 메틸화는 특정 세포에 특이적일 수 있다고 하였다.²⁴ 실

제로 Cohen 등은 RASSF1A의 촉진 부위 메틸화를 연구하였는데 11예의 선암 중 5예에서 메틸화를 보였고 31예의 편평상피암에서는 메틸화를 보이지 않았다고 보고하였다.²⁵

지금까지의 연구 결과를 종합해 보면 자궁경부암에서 p16 유전자의 촉진 부위 메틸화 빈도는 8-42% 정도로 보고되었고, 자궁경부상피내암과 침윤암에서 초기에 일어나지만 진행된 병기의 암에서 빈번히 일어나며 임상적으로는 불량한 예후와 연관이 있는 것으로 보고되었다. 본 교실의 종전의 연구²⁶에서는 p16 유전자 촉진 부위의 메틸화는 CIN에서 17% 침윤암에서는 67%의 빈도를 보인 반면 이번의 연구에서는 CIN1에서 20% CIN2, 3에서 33%, 침윤암에서 37%로 병변의 정도에 따라서 p16 메틸화의 빈도가 통계학적으로 차이가 나지 않는 결과를 보였지만 고위험군 HPV감염 여부에 따라 나누어 분석해 보면 CIN1에서는 차이가 없지만 CIN2, 3부터는 저위험 혹은 음성군에서 메틸화의 빈도가 더 높고 특히 침윤암에서 저위험 혹은 음성군의 메틸화 빈도가 통계학적으로 유의하게 높은 결과를 보인 것은 고등급 병변으로 진행되는 과정에서 p16 유전자의 촉진 부위의 메틸화가 일정한 역할을 했다는 가설을 세울 수 있을 것이다. 이 같은 결과는 Virmani 등의 연구와 유사한 결과이다.²⁷

Hiroshi 등은 자궁경부상피내종양과 침윤암에서 G1 pathway 즉 RB와 p53 pathway의 모든 경로와 HPV 유전형에 대해 연구하였는데²⁸ 그 중 p16의 촉진부위 메틸화와 면역조직화학염색으로 유전자 발현을 관찰하였다. 침윤암 53예 중 p16 유전자 촉진 부위의 메틸화는 9예에서 관찰되었고 메틸화된 9예 중 5예에서 유전자 발현이 관찰되지 않았으며(55%), p16 유전자 발현이 없는 17예에서는 p16의 돌연변이나 결손 그리고 메틸화 등이 관찰되지 않아 p16 소실을 가져오는 또 다른 경로가 있음을 주장하였다.

본 연구에서 촉진 부위의 메틸화와 유전자 발현의 상관관계를 보면 CIN1에서 메틸화가 있었던 6예 중 5예에서(83.3%), 메틸화가 없었던 24예 중 17예에서 유전자 발현이 관찰되지 않았고, CIN2, 3에서는 메틸화가 있었던 15예 중 10예에서(66.6%), 메틸화가 없었던 30예 중 6예에서 유전자 발현은 관찰되지 않았다. 그리고 침윤암에서 메틸화가 관찰된 11예 중 6예에서(54.5%), 메틸화가 없었던 18예 중 3예에서 유전자 발현이 관찰되지 않았

다. 침윤암에서의 일치율은 Hiroshi의 결과와 유사하였다.

고위험군 HPV의 양성률이 자궁경부암에서 72%로 낮은 것은 현재 자궁경부암에서의 감염률과 상당한 차이가 있는데 이는 HPV DNA chip 검사 자체의 오류로 생각할 수 있고 그로 인해 고위험군과 저위험 혹은 음성군으로 나누어 분석하는 것이 제한적이라는 점이 이 연구의 한계점으로 연구를 지속하기 위해서는 반드시 보완이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 CIN과 침윤암을 포함하는 자궁경부 종양에서 HPV 유전형에 따른 종양 억제 유전자인 p16의 유전자 발현과 촉진 부위의 메틸화를 연구하여 다음과 같은 결론을 내렸다.

고위험 HPV 감염 시에 p16 유전자의 발현은 병변이 침윤암으로 진행할수록 증가하는바 p16 유전자 발현은 CIN과 침윤암의 표지자로서 역할을 할 것으로 사료되며 촉진 부위의 메틸화는 고위험군 HPV가 감염되지 않은 자궁경부의 악성화와 관계가 있을 것으로 사료되며 이 같은 가설을 보강하기 위해서는 본 연구의 한계점이 보완된 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 1985; 66: 1515-22.
- Paquette RL, Lee YY, Wilczynski SP, Karmakar A, Kizaki M, Miller CW, et al. Mutation of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. *Cancer* 1993; 72: 1272-80.
- Balsitis SJ, Sage J, Duensing S, Munger K, Jacks T, Lambert PF. Recapitulation of the effects of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene on mouse epithelium by somatic Rb deletion and detection of pRb-independent effects of E7 in vivo. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 9094-103.
- Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour derived p16 alleles encoding proteins defective in cell cycle inhibition. *Nature* 1995; 375: 506-10.
- Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinase, and CDK inhibitors in human cancer. *Dv Cancer Res* 1996; 68: 67-108.
- Caïms P, Mao L, Merio A, Lee DJ, Schwab D, Eby Y, et al. Rate of p16 (MTS1) mutation in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-7.
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, de Pinho RA. Role of the INK4a locus in the tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic protein in cervical and genital lesion. *Am J Pathl* 1998; 153: 1741-8.
- Hirama T, Miller CW, Wilczynski SP, Koeffler HP. p16 (CDKN2/cyclin-dependent kinase-4 inhibitor/multiple tumor suppressor-1) gene is not altered in uterine cervical carcinoma or cell line. *Mod Pathol* 1996; 9: 26-31.
- Greger V, Passrge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83: 155-8.
- Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 584-9.
- Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12754-9.
- Oh TJ, Kim CJ, Woo SK, Kim TS, Jeong DJ, Kim MS, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3272-80.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-9.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-7.
- Hiroyuki K, Takayuki E, Yutaka U, Masami F, Ryuchi N, Yuko U, et al. Correlation between p14/p16 expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Letters* 2004; 213: 31-7.
- Klaes R, Fredrich T, Spitkofski D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001; 92: 276-84.
- Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 17 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 2001; 75: 4705-12.
- Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JJ, Davidson NE, et al. Inactivation of CDKN@/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-30.
- Alfonso DG, Marcela L, Myrna C, Lucely C, Claudia A. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005; 4: 38.
- Kelly MJ, Otterson GA, Kaye FJ, Popescu NC, Johnson BE, Dipaulo JA. CDKN2 in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1995; 63: 226-30.
- Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Nobori T, Yu AL, Yu J, et al. Methylation of p16INK4A in primary gynecolo-

- gic malignancy. *Cancer Letters* 1999; 136: 231-5.
23. Yang HJ, Liu VWS, Wang Y, Chan KYK, Tsang PCK, Khoo US, et al. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 435-40.
 24. Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1982-6.
 25. Cohen Y, Singer G, Lavie O, Dong SM, Beller U, Sidransky D. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2981-4.
 26. Bae DH, Kim MK, Lee CI, Kim CJ. A study on the methylation of p16 gene promoter in the uterine cervical neoplasia. *Korean Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000; 43: 1525-31.
 27. Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 584-9.
 28. Hiroshi T, Yasunori H, Sadako N, Naoki K, Takeshi I, Kumio Y. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 476-85.

A study on the expression of p16 gene, methylation of p16 gene promoter and HPV typing in uterine cervical neoplasia

Seob Jeon¹, Seung Do Choi¹, Dong Han Bae^{1,3}, Dong Jun Jeong^{2,3}, Chang Jin Kim^{2,3}, Young Woo Shin⁴

*Departments of Obstetrics and Gynecology¹, Pathology², RIC Virus Research Institute³,
College of Medicine, Soonchunhyang Cheonan Hospital, Soonchunhyang University, Cheonan,
Department of Obstetrics and Gynecology, Cheju National University Hospital⁴ Jeju, Korea*

Objective : p16 is cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor which decelerates cell cycle by inactivating CDKs that phosphorylate retinoblastoma protein (pRb). In cervical carcinogenesis, abnormality of p16 gene such as methylation of p16 gene promoter was investigated as an important factor. The aims of our study are to investigate the expression of p16 gene, methylation of p16 gene promoter region, and HPV typing in uterine cervical neoplasia.

Methods : A total of 104 samples (CIN1, 30 CIN2, 3 45, invasive cancer, 29) were included. Expression of p16 was analyzed by immunohistochemistry, methylation of p16 gene promoter region was analyzed with methylation specific polymerase chain reaction (MSP) and we examined the result of HPV DNA testing.

Results : 1. In high risk HPV and low risk or negative group, p16 gene expression was observed in CIN1 (30% vs 23%), CIN2, 3 (64% vs 58%) and in invasive cancer (80% vs 37%) respectively. In invasive cancer, p16 gene expression of high risk HPV group was statistically higher than that of low risk or negative group. 2. In high risk HPV and low risk or negative group, p16 promoter methylation was observed in CIN1 (23% vs 17%), CIN2, 3 (25% vs 47%) and in invasive cancer (19% vs 87%) respectively. In invasive cancer, p16 promoter methylation of low risk or negative HPV group was statistically higher than that of low risk or negative group.

Conclusion : p16 gene expression would be marker for CIN and cancer. Methylation of p16 promoter region may be one of the important mechanism for uterine cervical carcinogenesis especially in negative or low risk HPV group. but further studies are needed to reinforce this statement.

Key Words : HPV, DNA methylation, p16 genes, Uterine cervical neoplasms
