

p53 Codon 72 다형성과 한국인 여성의 자궁내막증의 연관성에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

허성은 · 심성신 · 이경순 · 문혜성 · 유한기 · 정혜원

Association Study of the Relationship between Endometriosis and Polymorphism of p53 Codon 72

Sung Eun Hur, Soung Shin Shim, Kyung Soon Lee, Hye Sung Moon,
Han Ki Yu, Hye Won Chung

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Ewha Womans' University

Objective: The present study was performed to evaluate the association of p53 codon 72 polymorphism and endometriosis.

Materials and Methods: We investigate 74 women who were operated for endometriosis and 93 women who had no endometriotic lesion proved by operation. Polymerase chain reaction was used to detect p53 codon polymorphisms.

Result: We have found no significant difference between endometriosis and control group in the p53 codon polymorphism. The respective proportion of arginine homozygotes, heterozygotes and proline homozygotes in endometriosis group were 18.9%, 62.2% and 18.9%, respectively, and were 12.9%, 75.2% and 11.9%, respective in the group without endometriosis.

Conclusion: Endometriosis is not associated with p53 polymorphism in Korean endometriosis patients.

Key Words: Endometriosis, p53, Polymorphism, Arginine, Proline

자궁내막증은 가임기 여성의 10~15%를 차지하는 흔한 부인과적 질환이지만 원인과 병태생리는 아직 명확하지 않다. 자궁내막증이 여러 가지 유전자간의 상호작용에 의하여 생기는 다유전적인 질환이며 환경적 요인에 영향을 받는 질환으로 알려져 있으나,¹ 자궁내막증의 발생에 원인이 되는 유전자는 아직 밝혀져 있지 않다.

자궁내막증은 주위 조직으로의 침윤과 다른 장기로의 전파 등 악성 종양과 유사한 점이 있어 암 발

생에 관계되는 유전자가 자궁내막증의 발병에 관여할 것으로 생각된다. 종양 억제 유전자는 세포 성장을 조절하고 암의 발생을 억제하는 중요한 역할을 하는데, 이러한 종양 억제 유전자중 하나인 p53의 유전자 변이는 자궁경부암, 난소암, 방광암, 전립선암 등의 발생과 진행에 관여된다.²⁻⁷ 이와 같은 맥락에서 p53, BRCA1 등 종양 억제 유전자가 위치한 염색체와 HER-2, bcl-2와 같은 종양 형성 유전자가 위치한 염색체들에서의 변성으로 인해 자궁내막증이

주관책임자: 정혜원, 우) 158-710 서울특별시 양천구 목6동 911-1, 이화여자대학교 의과대학 부속 목동병원 산부인과
Tel: (02) 650-5568, Fax: (02) 2647-9860, e-mail: hyewon@ewha.ac.kr
연락처: 허성은, 우) 158-710 서울특별시 양천구 목6동 911-1 이화여자대학교 의과대학 부속 목동병원 산부인과
Tel: (02) 650-5045, Fax: (02) 2647-9860, e-mail: drsarah@ewha.ac.kr

발생된다는 보고가 있었고,⁸ 자궁내막증 조직에서 wild type *p53*이 발현되지 않았다는 연구도 있었다.⁹⁻¹¹

인간에서 *p53*은 두 개의 흔한 다형성 변이체가 있는데, 다형성이 일어나는 codon 72에서 염기서열이 CCC인 경우 proline형, CGC인 경우 arginine형으로 나누어지는데 이것은 cytosine이 guanine으로 바뀌는 단 염기서열 치환에 의한 것이다.¹² 다양한 종양에서 이러한 *p53* 다형성과의 연관관계는 아직 논란이 되고 있다. *p53* arginine (Arg) homozygosity는 암의 위험 인자라는 보고가 있는 반면,¹³ 다른 연구에서 proline (Pro) homozygote가 더 높은 위험인자라고 보고하였고,^{14,15} 암 발생과 *p53* 다형성간에 연관성이 없다는 보고도 있다.^{3,16} 자궁내막증과 *p53* 다형성의 관련성에 관해서는 중국인 여성에서 *p53* Pro homozygosity가 있는 경우 자궁내막증의 발생이 낮았다고 보고되고 있으나,¹⁷ 아직 한국인 여성에서 *p53* 다형성과 자궁내막증의 연관성에 관한 보고는 없었다.

본 연구에서는 종양과 그 발생 및 성장이 유사한 자궁내막증의 발병의 원인이 될 수 있는 유전자로 가임기 한국 여성에서 *p53* codon 72 다형성을 조사하였으며, 유전자형 분석을 통하여 이들의 다형성이 자궁내막증과 관련성이 있는지를 조사하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1996년 9월부터 2002년 3월까지 이화여대 목동병원 산부인과를 방문한 한국인 여성 중 수술을 통해 조직학적으로 자궁내막증을 확인한 환자에서 American Fertility Society (AFS, 1985) 분류에 따라 III기와 IV기인 74명을 대상으로 하였다. 대조군은 자궁내막증 환자군과 연령이 같은 만삭 산모에서 제왕절개술을 통해 자궁내막증이 없음을 육안으로 확인한 여성 93명을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

연구 대상자들의 genomic DNA는 DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 300 μ l의 혈액시료에서 추출하여 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 UV/VIS spec-

trophotometer (DU650, Beckman, CA, USA)로 230 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 계산하였다. 추출된 DNA는 유전자형 검사시까지 -20°C에서 보관하였다.

p53 codon 72의 유전자형은 *p53* Pro 72 primer는 5'-GCC AGA GGC TGC TCC CCC-3'(F)과 5'-CTG GCA AGT CAC AGA CTT-3'(R), *p53* Arg 72 primer는 5'-TCC CCC TTG CCG TCC CAA-3'(F)과 5'-CTG GTG CAG GGG CCA CGC-3'(R)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 하여 결정하였다. 0.1 μ g genomic DNA를 Pro 72 primer와 Arg 72 primer 각각 0.2 μ g, 0.2 mmol/l dNTP, 0.3 U Taq polymerase, 10 mmol/l Tris-HCL (pH 8.0), 50 mmol/l KCL과 2.5 mmol/l MgCl₂를 포함하는 15 μ g의 PCR 혼합액에 첨가하여 GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 Pro 72의 경우 94°C에서 5분, 94°C에서 15초, 52°C에서 20초, 72°C에서 30초를 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. Arg 72의 경우 94°C에서 5분 배양한 후, 94°C에서 15초, 50°C에서 20초, 72°C에서 30초를 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 산물을 ethidium bromide (0.1 μ g/ml)를 포함한 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV하에서 분석하였다. Arg형과 Pro형의 PCR 산물은 각각 141 bp와 177 bp의 band로 나타났다 (Figure 1).

3. 통계분석

자료는 SPSS version 10.0 통계패키지를 사용하여 χ^2 test와 logistic regression analysis의 방법을 통해 여러 가지 유전자들의 다형성과 자궁내막증간의 관련성에 관한 통계적 분석을 시행하였다. p값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

p53 codon 72 다형성은 Figure 1과 같이 나타나 있으며, Arg homozygote, Arg/Pro heterozygote, Pro homozygote의 분포는 자궁내막증 환자에서 18.9%, 62.1%와 18.9%였고 대조군에서 13.3%, 73.4%와 14.3%로 두군 간에 *p53* 다형성에 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Pro/Pro에 비교하여 Arg/Pro나 Arg/

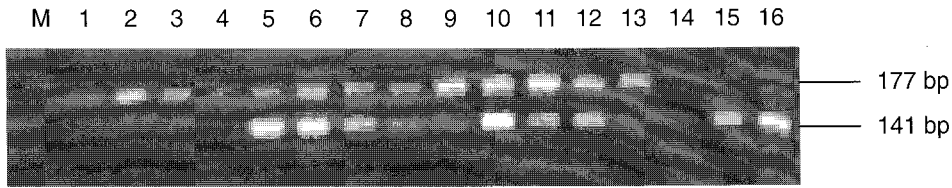


Figure 1. Electrophoresis of the products of PCR showing individual homozygous for *p53* Pro (lanes 1~4), heterozygous for the *p53* Arg/Pro (lane 5~13) and homozygous for *p53* Arg (lane 14~16). M=DNA marker

Table 1. Distribution of *p53* codon 72 polymorphisms in women with and without endometriosis

Status	Women with endometriosis (n=74)	Women without endometriosis (n=93)	χ^2 (p value)	OR (95% CI)
Arg/Arg	14 (18.9%)	12 (12.9%)	NS	0.9 (0.348~2.841)
Arg/Pro or Arg/Arg	60 (81.1%)	82 (87.1%)		1.5 (0.668~3.389)
Arg/Pro	46 (62.2%)	70 (75.2%)		1.7 (0.720~3.802)
Pro/Pro	14 (18.9%)	11 (11.9%)		1.0

Arg 유전자의 위험도 (odds ratio)는 1.5 (95% CI, 0.668~3.389), Arg/Pro 유전자의 위험도는 1.7 (95% CI, 0.720~3.802)로 나타났으나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 1).

고 찰

자궁내막증에 대한 유전적 경향은 이미 여러 연구들을 통해 잘 알려져 있으며, 질환의 진행 정도가 경증부터 중증까지 다양하며 비정형적 형태가 암과 비슷하므로 자궁내막증은 여러 유전자의 복합적인 상호작용과 다양한 환경적인 요인에 영향을 받아 유전된다고 생각된다. *p53* 다형성과 여러 종류의 암과의 연관성에 관하여는 아직 논란이 되고 있다. Arg homozygosity는 인간 유두종 바이러스 관련암의 침윤에 있어 중요한 위험인자가 된다고 알려져 있으나^{4,13,18} Pro homozygosity가 폐와 간암의 위험인자이며 폐암에서 *p53* Arg homozygosity나 Pro homozygosity가 heterozygote 보다 예후가 나쁘다고 보고하여서¹⁵,¹⁹ 이러한 연구 결과의 차이는 조직과 인종간의 다양성에 의한 것으로 생각된다.

자궁내막증은 자궁내막 세포가 자궁내막 이외의 장소에 부착되고 침습하면서 자라나는 생물학적 특성이 암과 비슷하다. 그러므로 암의 발생기전에 관

여하는 *p53*이 자궁내막증의 발생에 관여할 수 있을 것이라는 가정으로 본 연구에서는 자궁내막증 환자에서 *p53* 다형성을 분석함으로써 *p53* 다형성의 자궁내막증 발병에서 역할을 규명하고자 하였다. 본 연구에 의하면 자궁내막증 환자의 *p53* 다형성은 정상 여성에 비해서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 본 연구와는 달리 Chen 등의 연구에서는 중국인 여성에서 *p53* codon 72의 Pro homozygosity와 heterozygosity가 자궁내막증의 고위험인자이며 Arg homozygosity는 저위험인자라고 보고하였다.¹⁷ 이것은 침윤성 방광암이 Pro homozygosity와 밀접하게 연관되어 있고 비침윤성 방광암은 Arg homozygosity와 연관되어 있다는 연구와 일치하는 소견으로 *p53* 다형성이 자궁내막증의 감수성을 예측하는데 유용한 지표가 될 수 있음을 제시하였다. 이와 같이 상반된 결과들을 보이는 것은 *p53* codon 72 다형성 부위의 유전형이 인종에 따라 다양하게 나타날 수 있는 것이 하나의 이유가 될 수 있겠다. 또 다른 이유로 *p53* 유전자에 있어서의 돌연변이는 dioxin 대사과정에 있어서 일어나는 DNA 손상으로 인한 세포유전독성을 증강시키고 이를 복구하는데 장애를 일으켜 서로 상승작용을 하므로²⁰ 연구하는데 있어 자궁내막증의 생리적 또는 병리적 과정에 있어 중요한 위치에 있다고 알려진 면역학적, 환경적 요인 및

이들의 상호 균형적 조절이 고려되어야 *p53* 다형성으로 인한 자궁내막증 발병 예측은 의미가 있다고 할 수 있겠다.

이렇게 유전자 다형성과 자궁내막증과의 연관성에 관하여 연구마다 일치하지 않은 결과를 보이는 이유는 여러 가지가 있다. 첫째, 적절한 대조군 선택 여부인데 한 연구에서 대조군이 임신 초기 유산 후 여성이 포함되었고,²¹ 이는 일반적인 건강한 사람을 대표할 수 없다고 사료된다. 본 연구에서 제시한 대조군은 만삭의 제왕절개술을 통해 자궁내막증이 없음을 육안으로 확인한 여성으로, 이는 건강하면서 정상적인 임신이 가능한 여성을 대상으로 하여 교란 변수를 최대한 줄였다. 또한 자궁내막증 환자와 나이가 비슷한 여성을 대상으로 대조군을 선정하여 이 역시 나이에 의한 교란 변수를 줄이도록 하였다. 두번째로 유전자들은 대상인의 다형성의 빈도와 환경적 위험인자의 노출에 비례하여 질환의 감수성에 영향을 미칠 수 있다. 이것은 오래전부터 제안되어 왔듯이 자궁내막증이 서로 다른 원인을 가진 이질적 상태라는 것을 의미한다. 세번째로 수집된 연구 대상자들이 이질적일 수 있고, 마지막으로 연구 자체가 가진 가능성 있는 문제를 충분히 고려한 연구가 되기 어려우므로 결과가 여러가지 소견으로 나타내게 된다.²²

본 연구에서 저자는 자궁내막증 환자와 대조군의 *p53* codon 72 다형성을 조사하였더니 대조군과 자궁내막증 환자 사이에 있어서 그 빈도에 있어 유의한 차이가 없었다. 그러므로, 이러한 유전자들의 다형성으로 자궁내막증의 발생을 예측하기는 어려운 것으로 생각된다. 본 연구에서 관찰된 자궁내막증과 여러 가지 유전자 조합의 관련성은 좀더 광범위한 연구가 되어야 할 것으로 생각되며, 또한 카페인 섭취, 흡연과 거주지, 개인적 성향 등과 같은 역학적으로도 역시 고려되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kennedy SH. Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15: 308-17.
2. Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, Watson RH, Eng-

- lefield P, Thomas EJ, et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* 1996; 56: 3534-9.
3. Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. *p53* codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* 1998; 352: 871-2.
4. Zehbe I, Voglino G, Wilander E, Genta F, Tommasion M. Codon 72 polymorphism of *p53* and its association with cervical cancer. *Lancet* 1999; 354: 218-9.
5. Kupryjanczyk J, Bell DA, Yandell DW, Scully RE, Thor AD. *p53* expression in ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 671-6.
6. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear *p53* and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 1259-64.
7. Steiner MS, Zhang X, Wang Y, Lu Y. Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde. *Cancer Res* 2000; 60: 4419-25.
8. Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 37-44.
9. Vercellini P, Trecca D, Oldani S, Fracchiolla NS, Neri A, Crosignani PG. Analysis of *p53* and ras gene mutations in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 38: 70-1.
10. Schneider J, Jimenez E, Rodriguez F, del Tanago JG. *c-myc*, *c-erb-B2*, nm23 and *p53* expression in human endometriosis. *Oncol Rep* 1998; 5: 49-52.
11. Horiuchi A, Osada R, Nakayama K, Toki T, Nikaido T, Fujii S. Ovarian yolk sac tumor with endometrioid carcinoma arising from endometriosis in a postmenopausal woman, with special reference to expression of alpha-fetoprotein, sex steroid receptors, and *p53*. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 295-9.
12. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, David P, Banks

- L, Greg M. Two polymorphic variants of wild type *p53* differ biochemically and biologically. *Mol and Cell Biol* 1999; 19(2): 1092-100.
13. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a *p53* polymorphism in the development of human papilloma virus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-34.
 14. Wang NM, Tsai CH, Yeh KT, Chen SJ, Chang JG. *p53* codon 72 arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the Chinese. *Int J Mol Med* 1999b; 4: 249-52.
 15. Yu MW, Yang SY, Chiu YH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. A *p53* genetic polymorphism as a modulator of hepatocellular carcinoma in relation to chronic liver disease, familial tendency, and cigarette smoking in hepatitis B carriers. *Hepatology* 1999; 29: 697-702.
 16. Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL *p53* polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 1998; 396: 530-1.
 17. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distributions of *p53* codon 72 polymorphism in bladder cancer-proline form is prominent in invasive tumor. *Urol Res* 2000; 28: 293-6.
 18. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel *p53* functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Sci U S A* 1996; 93: 15335-40.
 19. Wang YC, Lee HS, Chen SK, Chang YY, Chen CY. Prognostic significance of *p53* codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 1999a; 35: 226-30.
 20. David PM, Geoffrey L, Immaculata DV, Thomas JL, John C, Wain LS, et al. Combinations of the variant genotypes of *GSTP1*, *GSTM1*, and *p53* are associated with an increased lung cancer risk. *Cancer Res* 2002; 62: 2819-23.
 21. Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, Albuissou E, Perriot S, Glowaczower E, et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population. *Mol Hum Reprod* 1997a; 3: 775-80.
 22. Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-48.