

인유두종 바이러스의 감염 또는 감염되지 않은 자궁 경부 이형성증에서 p53 및 Ki-67의 발현

건국대학교 농축대학원 생물공학과¹, 서울보건대학 임상병리과², 분당제생병원 진단검사의학과³

최숙경¹ · 김태전² · 홍승복³ · 이훈택¹

Expression of p53 and Ki-67 in Cervical Dysplasia with Human Papilloma Virus Infection or Non-infection

Choi, Sook-Kyung¹., Kim, Tai Jeon²., Hong, Seung Bok³., Lee, Hun Taeck¹

*Department of Biotechnology, Graduate School of Agriculture and Animal Science,
Konkuk University, Seoul, Korea¹*

*Department of Clinical Laboratory Science, Seoul Health College, Sungnam, Korea²,
Department of Laboratory Medicine, Bundang Jesang General Hospital, Sungnam, Korea³*

This research focuses on the overall evaluation of tumor protein (p53) and cell growth marker (Ki-67) in their functions as carcinogenic factors in both a HPV-infected group and in a HPV-noninfected group with the precancerous dysplasia of uterine cervix. Histological grades were determined by the H&E staining and the expression level of p53 and Ki-67 were tested by the immunohistochemistry method. The results were as follows. Among the total of 66 cases, p53 (+) was observed in 19 cases (29.0%) from the mild grade group, 22 cases (33.0%) from the moderate grade group, and 19 cases (29.0%) from the severe grade group. The values correlate with the increase of dysplasia intensity in HPV-noninfected group and showed significant correlation ($p < 0.05$), but there were no significant difference from the HPV-infected group. Among a total of 66 cases, the mitotic index of Ki-67 (+) were observed in 19 cases (29.0%) from the mild grade group, 22 cases (33.0%) from the moderate grade group, and 19 cases (29.0%) from the severe grade group. The values were significantly different against dysplasia intensity ($p < 0.05$), but showed no significant difference from HPV infection. After cross comparing the statistical parameters of p53 and ki-67 in their significance, p53 was shown to be statistically significant with Ki-67 while there was no statistically significant difference with Ki-67 ($p < 0.05$). Taken together, tumor protein (p53) and an index of Ki-67 observed in cervical dysplasia and in HPV related dysplasia of cervix uterine did not have any notable significance with HPV infection. The incidence rate of p53, however, had some significant correlation with dysplasia while Ki-67 had no particular statistical significance. As a result, p53 and Ki-67 can be considered as effective diagnostic markers in predicting the disease progression of dysplasia to cervical cancer.

Key Words : Cervical dysplasia, HPV, p53, Ki-67

I. 서 론

자궁경부암은 세계적으로 유방암, 난소암 다음으로 빈번한 여성의 악성종양이며, 한국의 경우에도 자궁경부암은 한국 여성암 중 유방, 위, 대장, 갑상선암 다음으로 발생빈도가 높아 국민 보건 상 중대한 문제가 되고 있다(보건복지부, 2002). 자궁경부암의 진행과정을 보면 악성변화의 첫 단계로 이형성증(dysplasia)이 발생하는데, 이 과정이 지속되면 상피내암(carcinoma in situ, CIS)이 되고 이 상피내암이 다시 침윤암(invasive carcinoma)으로 발전하게 된다. 그 과정은 매우 완만하여 침윤암으로 발전하기까지 약 10년 이상이 걸린다. 이형성증으로 진단된 후 치료를 받지 않을 경우 일부는 침윤암으로 진행하여 사망에까지 이를 수 있는데, 어떤 인자가 상피내 병변을 침윤암으로 진행시키는지에 대해서는 정확히 알려진 바가 없는 실정이다 (Jonathan 등, 1996).

지금까지 자궁경부암의 발생 원인에 대한 역학적 연구에 의하면 조기 성경험, 성생활 배우자의 수, 흡연, 호르몬제의 복용 및 바이러스 감염 등 여러 복합적인 환경요인에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다(Brinton 등, 1987). 그리고 면역기능의 저하나 암유전자와 종양 억제 유전자 등이 암의 발생에 관련이 있을 것으로 추정하고 있다. 이 중에서도 인유두종 바이러스(human papilloma virus, HPV)의 감염이 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 아울러 암유전자의 활성화 및 종양억제 유전자의 불활성화가 암발생에 미치는 영향에 대해서도 HPV와 함께 지속적으로 연구되었다(Drust 등, 1987).

p53 유전자는 인간의 제 17번 염색체의 단완(17q13)에 위치하며 53 kD의 분자량으로서 핵소체 단백질을 암호화하여 세포주기 중 G0기에서 G1기로의 이행에 관여하며 (Benchimol 등, 1985), DNA 수선, 세포자연사(apoptosis)에 관여하여 세포의 증식과 변형을 억제하는 것으로 알려져 있다(Finlay 등, 1988). p53 종양 억제유전자의 돌연변이는 점돌연변이에 의해 일어나며, 변이형 p53단백질은 정상 단백질의 기능을 상실하고 세포의 형질전환 및 증식을 유도하는 암유전자로 작용하여(Hinds 등, 1989) 악성종양을 일으키고, 그 생성물은 구조적으로 안정되어 있으며 세포에 축적되어 p53 항체를 이용한 면역조직화학적 검사로 검출할 수 있다(Banks 등, 1986).

Ki-67은 G0기를 제외한 모든 세포주기를 거치는 모든 세포의 핵에서 발견되는 단백질로, 이 단백질이 발견되는 세포 분획은 세포의 증식상태를 직접적으로 나타내기 때

문에 면역조직화학 염색으로 관찰한 Ki-67의 표지지수는 자궁경부암의 예후와 관련된 인자로 알려졌다(Beronese 등, 1991).

따라서 본 연구는 자궁경부 생검을 통하여 이형성증으로 진단받은 조직을 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하여 이형성증의 조직학적 등급을 평가한 후, HPV 감염이 이형성증의 각 등급에 미치는 영향을 규명하기 위하여 종양단백질인 p53과 세포증식 표지자인 Ki-67을 면역조직화학 염색을 실시하여 발현 양상을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 실험은 2002년 1월부터 2004년 1월까지 분당제생병원 병리과에서 자궁경부생검을 통하여 이형성증으로 진단받은 조직을 사용하였다. 특히 환자의 병력 기록지와 슬라이드 표본을 검사하여 생검 전 약물요법 등의 보조적 치료를 받지 않은 환자의 생검 조직 중 비교적 고정이 잘 된 파라핀 블록을 선택하여 HPV 감염군 33예와 HPV 비감염군 33예를 대상으로 실험하였다.

2. 방 법

1) 병리학적 검사

일반적인 조직표본 제작방법을 통해 만들어진 파라핀 블록을 박절기를 이용하여 4 μ m 두께로 박절하였다. 그리고 xylene에서 탈파라핀과 alcohol에서 함수과정을 거친 후 H&E 염색을 실시하였다. Hematoxylin으로 핵을 염색하였고 eosin으로 세포질을 염색한 후 alcohol에서 탈수과정과 xylene에서 투명과정을 거친 후 canada balsam으로 봉입하였다.

2) 면역조직화학염색

일반적인 조직표본 제작방법을 통해 만들어진 파라핀 블록을 박절기를 이용하여 4 μ m 두께로 박절한 후 항원복구를 위한 과정에서 조직표본의 탈락을 방지하기 위해 3-aminopropyl triethoxysilane으로 처리된 코팅 슬라이드에 절편을 부착시켰다. 표본슬라이드를 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 p53, Ki-67은 항원복구를 위해 pH 6.0 10mM 구연산 완충액에 담가 고압증기 멸균기에서 121

℃ 10분간 처리하였고, HPV는 pH 6.0 10 mM 구연산 완충액에 담가 microwave oven에서 10분간 처리하였다. 10% H₂O₂-methanol을 10분간 처리하여 내인성 인자의 활성을 억제한 다음, 일차 항체인 p53, Ki-67 및 HPV를 사용하여 30분간 실온에서 반응시킨 후, LSAB kit를 사용하여 avidin biotin conjugate법으로 면역조직화학염색을 실시하였다. 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride를 사용하여 발색시킨 후 Harris hematoxylin으로 대조염색을 실시하였고 canada balsam으로 봉입하였다.

3) H&E 염색과 면역조직화학염색의 평가 및 통계분석

H&E염색 표본은 Papanicolaou의 분류법에 의해 핵의 이형성, 핵/세포질의 비율 및 염색질의 상태를 광학현미경으로 관찰하여 이형성증의 등급을 경도(mild), 중등도(moderate) 및 고도(severe)로 분류하였다. 각 등급의 이형성증 조직에서 세포질의 공동을 확인하여 HPV 감염군과 HPV 비감염군으로 구분하였고 면역조직화학 염색으로 재확인하였다. p53과 Ki-67은 광학현미경으로 관찰하여 핵이 갈색의 과립상으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 평가는 통계분석을 위해 다섯 군으로 분류하였다. 각 군은 반정량적인 방법을 사용하여 전체 암조직 중 양성으로 염색된 암조직을 백분율로 나누어 0~5%인 경우 0, 6~30%인 경우 1, 31~50%인 경우 2, 51~75%인 경우 3 그리고 76%이상인 경우는 4로 구분하였다. 통계분석은 SPSS Windows version 8.0 프로그램을 사용하였고, 통계적 유의성은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

III. 결 과

1. 자궁 경부 이형성증(HPV 감염군 및 HPV 비감염군)의 조직학적 검사

H&E 염색표본 슬라이드를 현미경으로 관찰한 결과 HPV 비감염군은 경도 이형성증(mild dysplasia)에서 고도 이형성증(severe dysplasia)으로 진행될수록 핵의 이형성 정도와 핵/세포질의 비율은 증가되었고, 염색질의 상태는 더욱 응집되었으며, 면역조직화학 염색은 모두 음성을 나타냈다(Fig. 1A, B). HPV 감염군은 비감염군보다 핵의 얼룩짐(smudge)과 다핵형성(multinucleation)이 증가되었고, 세포질에 공동세포(koilocyte)와 착각화증(parakeratosis)이 증가되었으며, 면역조직화학 염색에서 모두 양성을 나타냈다(Fig. 1C, D).

2. 자궁경부 이형성증(HPV 감염군 및 HPV 비감염군)의 면역조직화학적 검사

1) p53 단백질의 발현

자궁경부 이형성증(HPV 감염군 및 HPV 비감염군)에서 p53 단백질의 발현을 면역조직화학 염색으로 검사하였다. 염색된 표본 슬라이드를 광학현미경으로 관찰한 결과, p53은 정상 및 간질조직에는 염색되지 않았으나, 이형성증 조직에서는 세포의 핵에 염색되었으며 이형성증의 정도가 진행될수록 염색된 핵의 수가 증가되었다

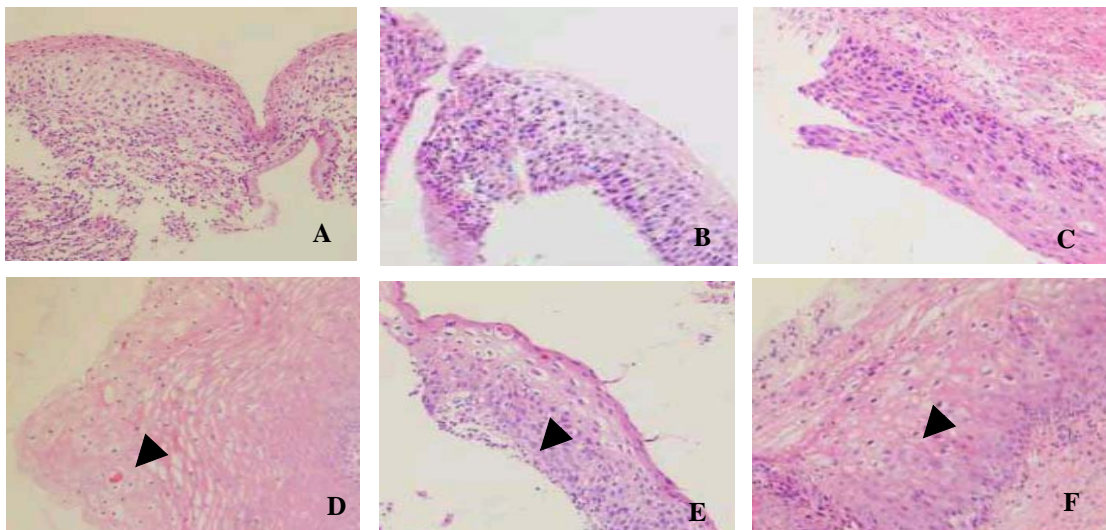


Fig. 1. Hematoxylin & Eosin stainings for grading cervical dysplasia(A, B, C) and HPV-infected dysplasia(D, E, F) (x 100). A; mild dysplasia B; moderate dysplasia C; severe dysplasia, D; mild dysplasia with HPV, E; Moderate dysplasia with HPV and F; severe dysplasia with HPV.

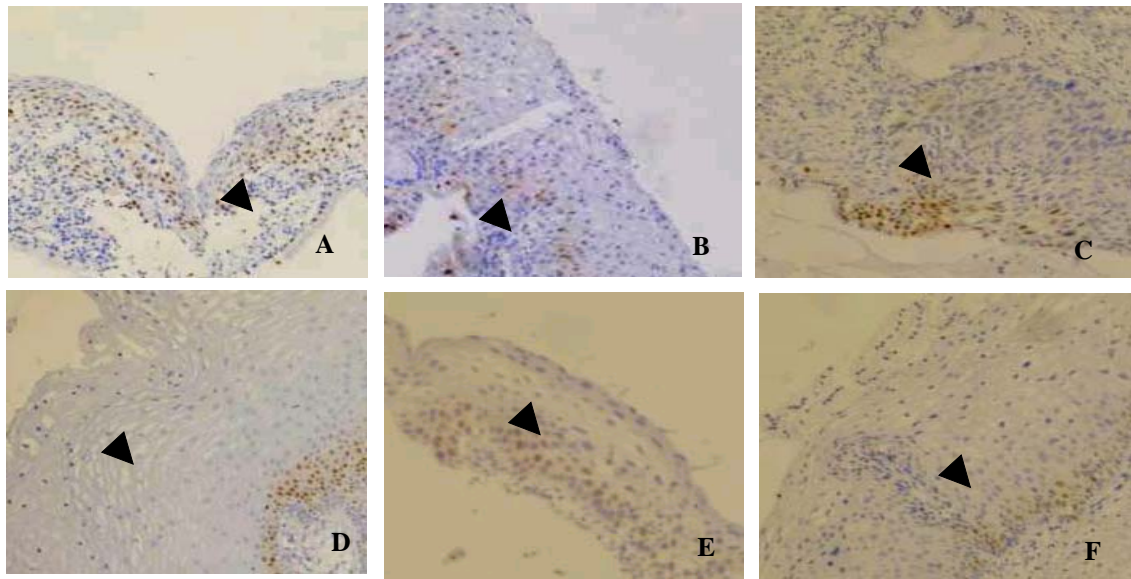


Fig. 2. Immunohistochemical stainings for p53 expression in cervical dysplasia(A, B, C) and HPV-infected dysplasia (D, E, F) (x 100). A; mild dysplasia, B; moderate dysplasia, C; severe dysplasia, D; mild dysplasia with HPV, E; moderate dysplasia with HPV and F; severe dysplasia with HPV.

(Figs. 2A, B, C, D, E, F). 통계적 유의성을 검사하기 위해 전체 이형성증 세포의 핵과 염색된 핵의 수를 백분율로 계산하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 1). HPV 감염군에서는 0의 경우는 3예, 1의 경우는 5예, 2의 경우는 11예, 3의 경우는 8예 그리고 4의 경우 5예로 나타났다. HPV 비감염군에서는 0의 경우는 3예, 1의 경우는 2예, 2의 경우는 15예, 3의 경우는 6예 그리고 4의 경우 7예로 나타났다. p53의 발현률은 이형성증의 정도가 증가할수록 높게 나타났고 유의한 상관관계를 나타냈으나($p < 0.05$), HPV 감염과 유의성은 인정되지 않았다.

2) 유사분열 지수인 Ki-67의 발현

유사분열 지수인 Ki-67의 발현은 모든 이형성증에서

Table 1. Correlation between p53 expression and pathologic parameters in cervical dysplasia

	p53		p-value
	Positive(%)	Negative(%)	
HPV			0.530
Positive	30(91.0)	3(9.0)	
Negative	30(91.0)	3(9.0)	
Dysplasia grade			0.009
Mild	19(29.0)	3(4.5)	
Moderate	22(33.0)	0(0.0)	
Severe	19(29.0)	3(4.5)	

Table 2. Correlation between Ki-67 expression and pathologic parameter in cervical dysplasia

	Ki-67		p-value
	Positive(%)	Negative(%)	
HPV			0.219
Positive	33(100.0)	0(0.0)	
Negative	32(3.0)	1(3.0)	
Dysplasia grade			0.001
Mild	22(33.0)	0(0.0)	
Moderate	21(32.0)	1(2.0)	
Severe	22(33.0)	0(0.0)	

분열시기에 있는 세포의 핵에 염색되었고 이형성증의 정도가 진행될수록 염색된 핵의 수가 증가되었다(Fig. 3A, B, C, D, E, F). Ki-67의 발현율은 Table 2와 같이 HPV 감염군에서 0의 경우는 1예, 1의 경우는 7예, 2의 경우는 9예, 3의 경우는 13예 그리고 4의 경우는 3예가 나타났다. 그리고 HPV 비감염군은 0의 경우 0예, 1의 경우 4예, 2의 경우 12예, 3의 경우 10예 그리고 4의 경우는 7예가 나타났다. 이러한 결과 Ki-67의 발현율은 이형성증의 정도와는 유의한 차이를 보였으나($p < 0.05$), HPV 감염과는 유의성이 없었다(Table 2).

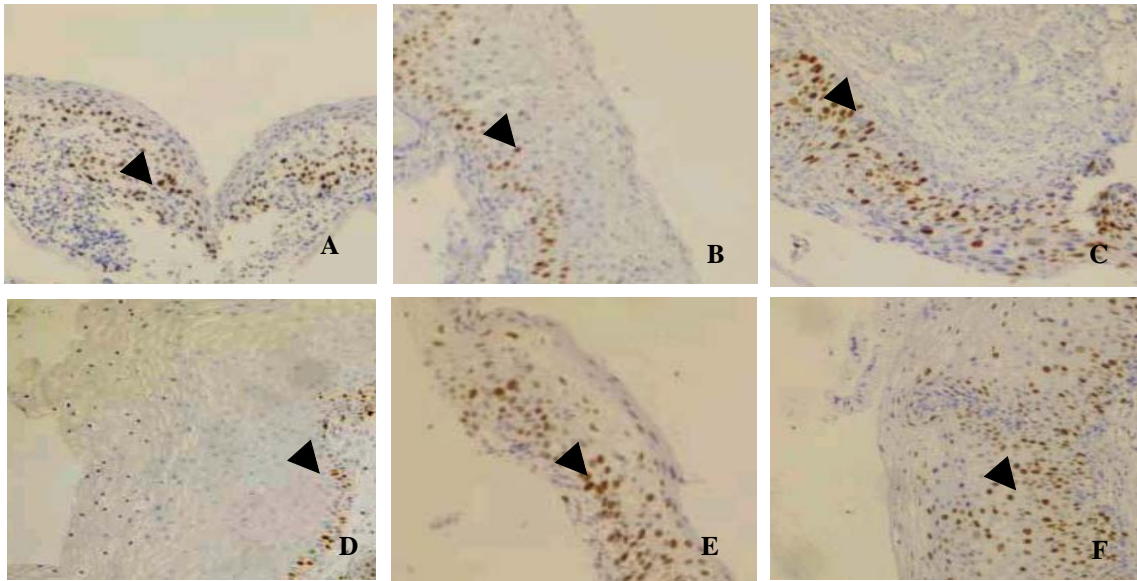


Fig. 3. Immunohistochemical stainings for Ki-67 expression in cervical dysplasia(A, B, C) and HPV-infected dysplasia (D, E, F) (x 100), A; mild dysplasia, B; moderate dysplasia, C; severe dysplasia, D; mild dysplasia with HPV, E; moderate dysplasia with HPV and F; severe dysplasia with HPV.

Table 3. Correlations between expression of p53 and Ki-67 in cervical dysplasia

	p53		Ki-67	
	Positive(%)	Negative(%)	Positive(%)	Negative(%)
p53				
Positive	-	-	63	0
Negative	-	-	3	0
p-value	-		0.001	
Ki-67				
Positive	63	3	51	15
Negative	0	0	0	0
p-value	0.001		0.068	

3) 종양단백질(p53)과 Ki-67 간의 상관관계

경도 이형성증에서 고도 이형성증으로 진행될수록 p53과 Ki-67의 발현률도 증가되었고, 통계적 유의성은 p53은 Ki-67과 유의성이 있었다($p < 0.05$)(Table 3).

IV. 고 찰

자궁경부암은 인유두종 바이러스(HPV) 등이 그 원인

으로 알려져 있지만 아직 적절한 예방법에 대해서는 알려지지 않고 있다. 특히, 종양의 악성도는 그 종양의 특성을 결정하므로 진단 및 치료나 예후 등이 동일 종양에서도 다르게 나타나므로 최근에는 성장인자와 그 수용체들이나 변형된 암유전자, 암유전자 단백질산물, 혹은 암 유전자 단백질산물을 밝히려는 노력이 진행되고 있다 (Ozanne 등, 1986). 이에 최근 많은 종류의 암에서 연구되어지는 종양 유전자에 의해 발현되는 단백질이 자궁경부암에서도 발현되어지며, 특히 p53과 Ki-67 종양단백질들은 세포의 성장과 증식에 관여하므로 자궁경부암에서 이러한 단백질의 발현은 종양의 성장과 예후에 중요한 역할을 한다. 본 연구는 HPV와 관련된 자궁경부의 이형성증에서 종양단백질인 p53과 세포 증식 표지자인 Ki-67을 면역조직화학 염색을 실시하여 이형성증 정도에 따른 발현률과 HPV 감염이 각 인자에 미치는 영향을 연구하였다.

본 연구에서 p53은 이형성증의 정도가 증가 할수록 높게 나타났고 유의한 상관성을 나타냈으나, HPV 감염과는 유의한 차이가 없었다(Table 1). 이러한 결과는 Busby-Earle 등(1994)이 돌연변이와 HPV 감염상태가 항상 일치하는 것은 아니라는 보고와는 차이가 없었다. 그리고 Wrede 등(1991)은 자궁경부암 세포주 중 HPV 16/18형에 감염이 안 된 세포주에만 p53의 과발현이 있으며, p53 유전자의 점돌연변이가 발견된다고 하여, 고위

형 HPV 26/18형과 p53 유전자 변이와의 역상관 관계를 시사하는 보고와 차이가 있었다. 또한 Crook 등(1991)은 세포주를 이용한 실험에서와 마찬가지로 임상적으로도 p53과 HPV 사이에 역상관관계가 있음을 보고하였다. 최근 자궁경부암에서 p53 단백질은 발생기전에 중요한 역할을 한다고 생각되지만, 이것의 과발현은 예후인자로서는 크게 관여하지 않는 것으로 받아들여지고 있다(Hunt 등, 1996). 따라서 p53은 HPV 양성인 자궁경부 이형성증에서 발현이 증가되므로 p53 단백질이 발암과정에 관여하는 것으로 추정되나, 임상적 예후인자와의 상관관계는 관찰되지 않아 예후인자로서는 의미가 적으며 오히려 종양의 크기나, 림프절 침범유무 등의 고전적인 예후인자가 더욱 중요하다고 본다.

본 연구에서 유사분열 지수인 Ki-67의 발현은 모든 이형성증에서 분열시기에 있는 세포의 핵에 염색되었고 이형성증의 정도가 진행 될수록 염색된 핵의 수가 증가되어, Ki-67의 발현율은 이형성증의 정도와는 유의한 차이를 보였으나, HPV 감염과는 유의성이 없었다(Table 4). 이러한 결과는 이형성증의 등급이 높을수록 분열세포가 증가한다는 Konishi 등(1991)의 결과와 일치하였다. 따라서 자궁경부 이형성증 조직에서 Ki-67 양성인 분열기 세포의 분획을 조사하는 것은 병의 진행과정을 예측하는데 뿐만 아니라 진단에도 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

종합적으로 볼 때, 본 연구결과에서 자궁경부암의 전암 단계인 이형성증 중 HPV가 감염되지 않은 이형성증과 HPV가 감염된 이형성증에서 p53과 Ki-67 종양단백질의 발현률은 이형성증이 증가할수록 유의성이 인정되었다. 따라서 본 연구에서 확인한 종양단백질의 발현은 이형성증에서 자궁경부암으로의 진행과정 여부를 진단하고 예후판정 및 치료에 대한 판단기준으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 자궁경부암의 전암단계인 이형성증에서 HPV 감염군과 HPV 비감염군을 대상으로 암발생인자로 추정되는 종양 단백질(p53)과 세포증식 표지자(Ki-67)를 종합적으로 평가하고 HPV 감염이 각 인자에 미치는 영향을 연구하였다. 총 이형성증으로 진단받은 검체 중 HPV 감염군 33예와 HPV 비감염군 33예를 대상으로 H&E염색으로 조직학적 등급을 검사하였고, 면역조직화

학 염색으로 p53과 Ki-67을 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 66예의 이형성증 중 p53의 발현률은 경도가 19예(29.0%)였고 중등도는 22예(33.0%)였으며 고도는 19예(29.0%)로 나타났다. 이형성증의 정도가 증가할수록 높게 나타났고 유의한 상관성을 나타냈으나 ($p < 0.05$), HPV 감염과 유의성은 인정되지 않았다.
2. Ki-67 유사분열지수의 발현은 총 66예 중 경도는 22예(33.0%)였고 중등도는 21예(32.0%)였으며 고도는 22예(33.0%)로 나타났다. 이형성증의 정도와는 유의한 차이를 보였으나 ($p < 0.05$), HPV 감염과의 유의성은 인정되지 않았다.
3. p53과 Ki-67 간의 상관관계를 조사한 결과 유의한 상관성이 있는 것으로 조사 되었다($p < 0.05$).

요약하면 자궁경부 이형성증과 HPV와 관련된 이형성증에서 종양단백질(p53, Ki-67)은 HPV 감염과는 유의성이 없었다. 그러나 p53의 발현률은 이형성증과 유의한 상관성을 나타냈다. 이러한 결과를 종합하면 p53과 Ki-67은 자궁경부 이형성증에서 자궁경부암으로의 이행을 예측 혹은 진단을 하는 데 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Banks L, Matlashewski G, Crawford L. Isolation of human p53 specific monoclonal antibodies and their use in the study of human p53 expression. *Eur J Biochem* 159:529-534, 1986
2. Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic Cell Mol Genet* 11:505-509, 1985
3. Beronese SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol* 95: 30-34, 1991
4. Brinton LA, Hamman RF, Huggins GR. Sexual reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 79:23-35, 1987
5. Busby-Earle RMC, Steel CM, Williams ARW, Cohen B, Bird CC. p53 mutations in cervical carcinogenesis-lov frequency and lack of correlation with human

- papillomavirus status. *Br J Cancer* 69:732-737, 1994
6. Crook T, Wrede D, Vousden KH. p53 point mutation in HPV negative human cervical cell lines. *Oncogene* 6:837-845, 1991
 7. Drust M, Croce CM, Gissmann L. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1070-1079, 1987
 8. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57:1083-1086, 1988
 9. Hinds P, Finlay C, Levine AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63:739-746, 1989
 10. Hunt CR, Hale RJ, Buckley CH, Hunt J. p53 expression in carcinoma of the cervix. *J Clin Pathol* 49:971-974, 1996
 11. Jonathan SB, Eli Ya, Paula AH. Chapter 32 Cervical and Vaginal Cancer. *Novak's Gynecology* 12th Edition p1111-1127, 1996
 12. Konishi I, Fujii S, Nonogaki H. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors, Ki-67 antigen and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix. *Cancer* 68:1340-1350, 1991
 13. Ozanne B, Richards CS, Hendler F. Overexpression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol* 149:9-14, 1986
 14. Wrede D, Tidy JA, Crook T, Lane D, Vousden KH. Expression of RB and p53 protein in HPV-positive and HPV-negative cervical carcinoma cell lines. *Molecular carcinogenesis* 4:171-175, 1991
 15. 보건복지부, 한국인 암등록 사업 연례보고서. 2002