

Evaluation of Human Papillomavirus Genotyping from Formalin-fixed Paraffin-embedded Specimens in Cervical Cancers

Hyunwoo Jin*

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

Received July 26, 2014 / Revised August 18, 2014 / Accepted August 20, 2014

Cervical carcinoma is the second leading cause of cancer - related deaths in women around the world, and it is associated with the Human Papillomavirus (HPV) infection. HPV genotyping is important for vaccine policy, etiology, natural history, and epidemiology studies. The use of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues for HPV genotyping by reverse blot hybridization assays (REBA) has not been clearly confirmed in retrospective studies. The aim of this study was to evaluate the usefulness and efficiency of FFPE tissues from cervical cancers for HPV genotyping. HPV genotypes were detected in 52 FFPE tissues from cervical carcinoma specimens by REBA. HPV was detected in 32 (61.5%) of 52 specimens from FFPE, among which 27 (84.4%) harbored single infections and 5(15.6%) contained multiple infections. The HPV single infections (27) were analyzed by high-risk type 18(8), 58(6), 16(5), 33(1), 35(1), 39(1), 56(1) and low risk type 11(2), 6(1), 70(1). The HPV multiple infections (5) included 16/18(2), 18/52(1), 16/56(1), 16/18/33(1). Please consider being more specific here. Do you mean the analysis? Please clarify what you mean by "included." Through this study, it has been determined that the FFPE specimen is feasible and can be used in HPV genotyping, as well as in retrospective studies.

Key words : Cervical cancers, genotyping, human papillomavirus, paraffin-embedded specimens, reverse blot hybridization assay

서 론

자궁경부암은 선진국에서 발생 빈도가 감소하지만, 전 세계적으로 가장 흔한 여성 생식기 암 중 하나이다[18, 21, 22]. 인유두종바이러스(Human papillomavirus, HPV)의 감염이 침윤성 자궁경부암 발생의 주요 원인으로 알려져 있다[1, 10, 23]. HPV는 파포바이러스과 유두종바이러스속에 속하고 DNA를 유전물질로 가지고 있다[3]. HPV 계통은 전체 약 7,900 bp의 크기에 8-10개의 유전자로 구성되어 있다[7]. 외피가 없는 55 nm의 정이십면체 바이러스이고, 사람 외에도 여러 동물에게 유두종을 일으킨다[19]. HPV는 약 200여종의 유전형이 있고 지금까지 170여종에 달하는 유전형의 염기서열이 완전히 밝혀졌다[5].

HPV는 악성 종양의 유발 정도에 따라 고위험군과 저위험군으로 분류한다. 고위험군에 속하는 HPV 유전형은 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82 등이고, 저위험군에 속하는 HPV 유전형은 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72,

81 등이 있다[16]. HPV 유전형에 따라 다른 임상 형태를 보일 수 있다. HPV 유전형 6, 11은 사마귀를 유발하고 특히, 자궁경부암의 약 60~70%에서 HPV 유전형 16(50% 이상)과 18(10~20%)이 검출된다[2, 14, 25]. HPV 유전형 검사는 HPV가 검출된 환자에서 특정 유전형이 지속적 검출여부 및 자궁경부암의 발병 가능성을 세포학적 검사와 함께 추적관찰에 적용할 수 있다. 따라서 HPV의 유전형을 검사하는 것은 의미가 있다.

현재 HPV 유전형을 검사하기 위하여, HPV DNA의 L1, E6, E7 유전자를 이용한 다양한 검사방법들이 개발되어 있다[20]. 실시간 증합효소연쇄반응을 이용한 Anyplex™ II HPV28 Detection kit (Seegene, Seoul, Korea), DNA-DNA 또는 DNA-RNA 교잡반응을 이용한 Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test™ (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA), Mebgen™ HPV kit (MBL, Nagoya, Japan), chip을 기반으로 하는 MyHPV chip® (Mygene, Seoul, Korea), HPV DNA Chip™ kit (BioMedLab, Seoul, Korea), reverse blot hybridization assay를 이용한 INNO-LiPAT™ HPV Genotyping Extra (Innogenetics, Ghent, Belgium), LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), MolecuTech REBA HPV ID® kit (YD Diagnostics, Yongin, Korea) 등의 분자진단검사법이 개발되어 사용 중이다.

많은 HPV 유전형 검사법이 개발되어 있지만 대부분 탈락 세포나 신선한 조직에서 진단목적의 임상적 유용성 평가가 실행되었고, 후향적 연구를 위한 파라핀 조직에서의 유용성은

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-0567, Fax : +82-51-510-0568

E-mail : jjinhw@cup.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

명확하게 밝혀지지 않았다. HPV 유전형에 따른 HPV 백신 전략, 치료법, 고위험군과 저위험군 HPV의 병인론, 암의 발생 기전과 같은 후향적 연구를 하기 위한 검체로써 파라핀 조직은 오랫동안 보관이 가능하고 암세포와 정상세포가 함께 포함되어 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 reverse blot hybridization assay를 이용한 MolecuTech REBA HPV ID[®] kit를 사용하여 파라핀 조직에서의 HPV 유전형 검사의 검출률을 평가하여, 후향적 연구를 위한 유용성을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

포르말린 고정 파라핀 표본

본 연구에 사용한 포르말린 고정 파라핀 표본은 원주기독병원으로부터 공급받았고 대학 기관윤리위원회로부터 승인을 받았다(YWMR-12-4-010). 원주기독병원에 내원한 자궁경부암 환자 중, 세포진 검사에서 HPV가 검출된 총 52개의 자궁경부암 파라핀 조직에서 각 10 μm의 두께로 5장씩 박절하여 1.5 ml 원심분리관에 넣어서 제공받았다.

DNA 추출

박절된 조직절편에서 DNA를 추출하기 위하여 전처리 과정으로 파라핀을 제거하였다. 자일렌 1 ml를 넣고 강하게 진탕하고 12,000 g로 2분간 실온에서 원심분리한 후, 상층액을 버렸다. 그런 다음 에탄올(99.9%) 1 ml를 첨가한 후 진탕하고 12,000 g로 2분간 실온에서 원심분리한 후, 상층액을 버리고 뚜껑을 열어두고 에탄올이 완전히 제거될 때까지 말렸다.

탈파라핀 과정을 완료한 조직에서 DNA를 추출하기 위하여 QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사가 제공한 사용설명서에 따라 수행하였다.

인유두종바이러스 유전형 검사

HPV의 유전형을 검사하기 위하여 MolecuTech REBA HPV ID[®] kit (YD Diagnostics, Yongin, Korea)를 사용하였다. MolecuTech REBA HPV ID[®]는 고위험군으로 알려진 HPV 18종(16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, [59/68], 69, 73)과 중위험군으로 알려진 HPV 34 및 저위험군 HPV 13종(6, 11, 32, 40, 42, 43, 44, 54, 70, 72, 84, [81/87]) 등 총 32종의 HPV 유전자형을 분석할 수 있는 분자진단 kit이다.

추출된 DNA를 주형으로 하여 REBA HPV-ID[®] kit에서 제공하는 primer가 포함된 반응용액을 사용, 유전자 증폭을 위해 one tube nested polymerase chain reaction (PCR)을 시행하고, PCR 증폭 및 교잡반응은 제조사가 제공한 사용설명서에 따라 수행하였다. 또 REBA의 결과 분석은 REBA kit에서 제공한 membrane과 함께 있는 data sheet에 대조선을 맞추고

갈색이나 보라색으로 나타나는 띠의 옆 지표(index)를 읽어 각 HPV 유전형을 확인하였다(Fig. 1).

결과 및 고찰

총 52개의 자궁경부암 환자의 파라핀 조직에서 HPV가 검출된 검체는 32개로 61.5%의 검출률을 나타내었다. HPV가 검출된 32개의 검체에서 단순감염은 27개 검체이고 복합감염은 5개 검체로 나타났다(Table 1). 본 연구에 앞선 선행연구에서는 84개의 파라핀 조직에서 동일한 탈파라핀 과정을 거친 후 Chelex[®] 100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 DNA를 추출하여 MolecuTech REBA HPV ID[®] kit를 사용하여 HPV 유전형 검사를 한 결과, 선행연구 결과를 표시하지 않았지만 3개의 조직에서 HPV (유전형 16, 16, 58)가 검출되어 3.6%의 검출률을 나타내었다. 선행연구에서의 DNA 추출방법에 한계점이 있다고 생각하여 본 연구에서는 QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하고 MolecuTech REBA HPV ID[®] kit를 사용하여 유전형 검사를 실시하여 검출률이 높아진 것으로 생각된다. 다른 연구자의 연구결과를 보면 파라핀 조직에서 HPV 검출률이 38.8%로 나타났다[19]. 파라핀 조직에서 HPV를 검출하기 위하여 DNA를 추출할 경우에 파라핀 조직용 DNA 추출 kit를 사용하는 것이 검출률을 높이는 데 중요한 역할을 한다고 사료된다.

단순감염에서 HPV 유전형의 분포를 보면 고위험군 유전형이 총 23개 검체에서 18 유전형이 8개, 58 유전형이 6개, 16 유전형이 5개, 33, 35, 39, 56 유전형이 각각 1개씩 검출되었고, 저위험군 유전형이 총 4개 검체에서 11 유전형 2개, 6 유전형 1개, 70 유전형이 1개 검출되었다(Table 2). 복합감염에서 HPV 유전형의 분포를 보면 16/18 복합감염이 2건, 16/56 복합감염이 1건, 18/52 복합감염이 1건, 16/18/33 복합감염이 1건 검출되었고 복합감염에서 검출된 HPV 유전형은 모두 고위험군이었다(Table 2). 본 연구 결과 검출된 HPV 유전형은 세계적으로 높은 감염률을 보이는 16, 18과 아시아 지역에서 많은 58 유전형이 가장 많이 검출되었다[6, 13].

고위험군 HPV 감염이 자궁경부암을 유발하지만, 그 외에도 여러 가지 요인이 관련되어 있다[3, 9, 12]. 여성이 일생에 걸쳐 HPV 감염될 가능성이 있지만, 면역 체계에 의해 감염이

Table 1. Detection rate of HPV genotyping in FFPE cervical tissues

	Number (%)		Number (%)
Positive	32(61.5)	Single infection	27(84.4)
		Multiple infection	5(15.6)
Negative	20(38.5)		
Total	52(100)		

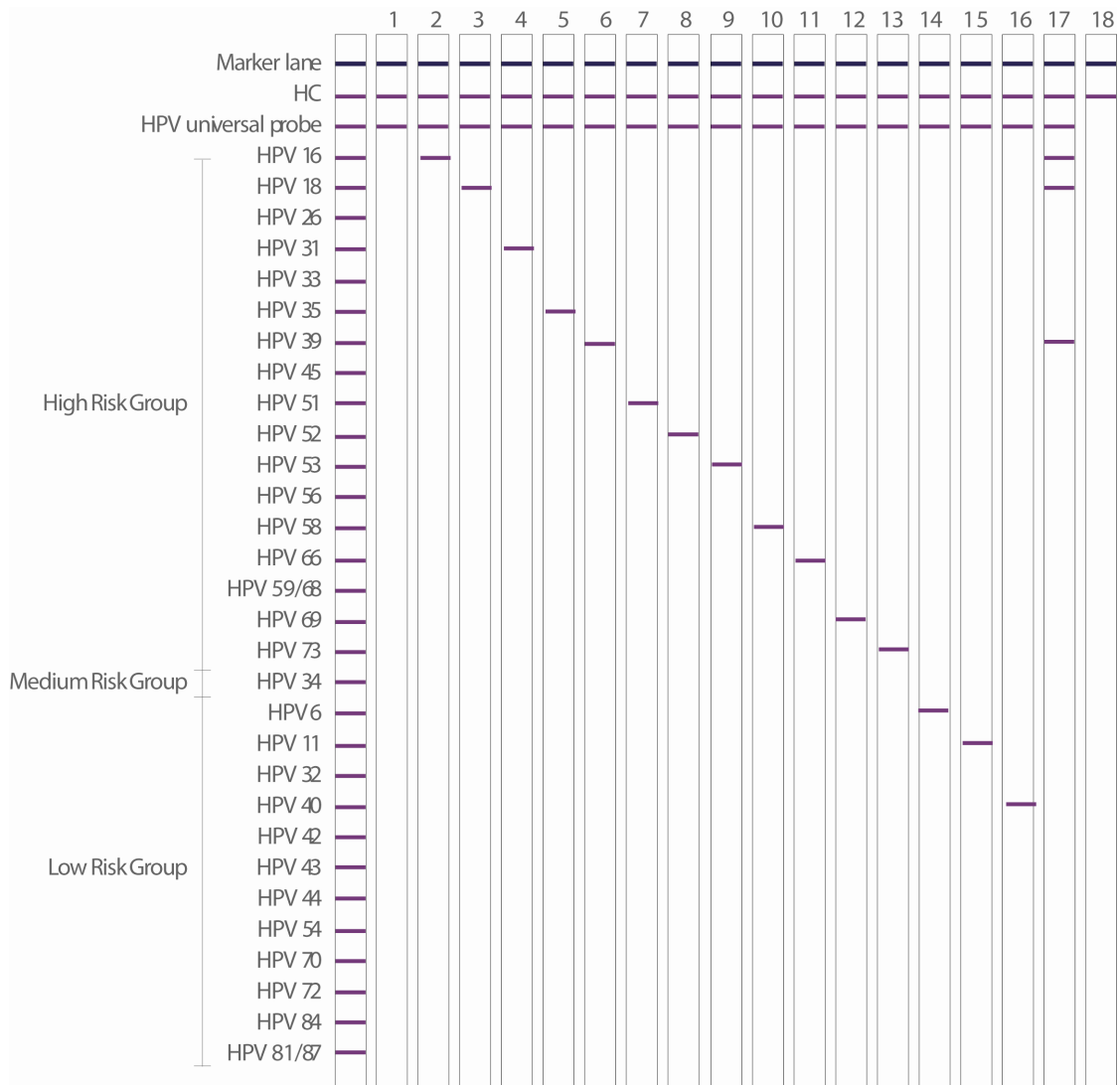


Fig. 1. An example of MolecuTech REBA HPV-ID® genotyping index. Other HPV types out of 32 types (lane 1), single infection of 32 HPV types (lane 2-16), multiple infection of 16/18/39 (lane 17), HPV negative (lane 18).

Table 2. HPV genotype distribution

Infection type	HPV genotype	Number	
Single infection	18	8	
	58	6	
	16	5	
	High-risk	33	1
	35	1	
	39	1	
	56	1	
	Low-risk	11	2
	6	1	
	70	1	
Multiple infection	16, 18	2	
	16, 56	1	
	18, 52	1	
	16, 18, 33	1	

억제되거나 감염을 막지 못해 자궁경부암이 발생할 수도 있다. 암의 발생은 HPV의 감염과 숙주와의 상호작용에 의한 결과로 나타나는 것이다. 특히 자궁경부암의 발병기전은 HPV의 E6와 E7 유전자의 발현과 연관관계가 알려졌다[11]. E6 단백질은 종양억제 단백질로 알려진 p53과 결합하고[24], E7 단백질은 세포주기를 조절하고 pRB 계열과 상호작용하여 암을 유발한다고 알려졌다[8]. 최근에는 miRNA가 세포의 유전자 발현 및 행동의 조절에 관여하여 암의 발달에서 중요한 역할을 한다고 알려졌다[15, 17].

과라핀 조직은 오랜 시간 보존이 가능하고 miRNA 발현양상을 분석할 수 있다[4]. 따라서, 후향적 연구의 측면에서 암이 발병하지 않았지만 고위험군의 HPV가 검출된 환자를 추적 관찰 하고, 어느 시점에서 암이 발병하였을 때, 보관하던 과라핀 조직에서 HPV 유전형과 miRNA 발현양상을 연구하거나 암

의 병인론을 연구하는데 유용할 것으로 사료된다. 또한 자궁경부암 뿐만 아니라, HPV가 유발하는 질암, 외음부암, 두경부암, 구강인두암, 항문암, 음경암 등에도 파라핀 조직을 이용한 HPV와 암의 발생에 관한 연구에 유용할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 부산가톨릭대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

References

- An, H. J., Kim, K. R., Kim, I. S., Kim, D. W., Park, M. H., Park, I. A., Suh, K. S., Seo, E. J., Sung, S. H., Sohn, J. H., Yoon, H. K., Chang, E. D., Cho, H. I., Han, J. Y., Hong, S. R. and Ahn, G. H. 2005. Prevalence of human papillomavirus DNA in various histological subtypes of cervical adenocarcinoma: a population-based study. *Mod Pathol* **18**, 528-534.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K. V. 1995. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* **87**, 796-802.
- Burd, E. M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* **16**, 1-17.
- Chen, Y., Ma, C., Zhang, W., Chen, Z. and Ma, L. 2014. Down regulation of miR-143 is related with tumor size, lymph node metastasis and HPV16 infection in cervical squamous cancer. *Diagn Pathol* **9**, 88.
- Chouhy, D., Bolatti, E. M., Pérez, G. R. and Giri, A. A. 2013. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *J Gen Virol* **94**, 2480-2488.
- Clifford, G. M., Smith, J. S., Plummer, M., Muñoz, N. and Franceschi, S. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* **88**, 63-73.
- Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. 1982. Human papillomavirus la complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* **1**, 231-236.
- Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J. and Vousden, K. 1993. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol* **67**, 2521-2528.
- Frano, E. L., Duarte-Franco, E. and Ferenczy, A. 2001. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* **164**, 1017-1025.
- Hausen, H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**, 690-698.
- Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-350.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C., Wacholder, S., Herrero, R., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Scarpidis, U., Lin, Q. Q., Terai, M., Bromley, R. L., Buetow, K., Apple, R. J. and Burk, R. D. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **93**, 315-318.
- Hong, S. R., Kim, I. S., Kim, D. W., Kim, M. J., Kim, A. R., Kim, Y. O., Kim, H. S., Rha, S. H., Park, G. S., Park, Y. K., Park, Y. W., Park, H. S., Suh, K. S., Shon, J. H., Shin, M. K., Oh, H. K., Yun, K. J., Yoon, H. K., Lee, S. N., Lee, A. W., Lee, H. J., Cho, H. Y., Choi, C. and Jung, W. W. 2009. Prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in Korean women: a multicenter study. *Korean J Pathol* **43**, 342-350.
- Hutchinson, D. J. and Klein, K. C. 2008. Human papillomavirus disease and vaccines. *Am J Health Syst Pharm* **65**, 2105-2112.
- Jiménez-Wences, H., Peralta-Zaragoza, O., Fernández-Tilapa, G. 2014. Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep* **31**, 2467-2476.
- Lai, C. H., Huang, H. J., Hsueh, S., Chao, A., Lin, C. T., Huang, S. L., Chao, F. Y., Qiu, J. T., Hong, J. H., Chou, H. H., Chang, T. C. and Chang, C. J. 2007. Human papillomavirus genotype in cervical cancer: a population-based study. *Int J Cancer* **120**, 1999-2006.
- Lajer, C. B., Garnæs, E., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Therkildsen, M. H., Glud, M., Rossing, M., Lajer, H., Svane, D., Skotte, L., Specht, L., Buchwald, C. and Nielsen, F. C. 2012. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer* **106**, 1526-1534.
- Mazumder, I. D., Singh, R. K., Mitra, S., Dutta, S., Chakraborty, C., Basu, P. S., Mondal, R. K., Roychoudhury, S. and Panda, C. K. 2011. Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression. *Gynecol Oncol* **123**, 597-604.
- Morshed, K., Polz-Dacewicz, M., Szymański, M. and Smoleń, A. 2010. Usefulness and efficiency of formalin-fixed paraffin-embedded specimens from laryngeal squamous cell carcinoma in HPV detection by IHC and PCR/DEIA. *Folia Histochem Cytobiol* **48**, 398-402.
- Ozaki, S., Kato, K., Abe, Y., Hara, H., Kubota, H., Kubushiro, K., Kawahara, E. and Inoue, M. 2014. Analytical performance of newly developed multiplex human papillomavirus genotyping assay using Luminex xMAP™ technology (Mebgen™ HPV Kit). *J Virol Methods* **204**, 73-80.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**, 153-156.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108.
- Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. and Wacholder, S. 2007. Human papillomavirus and cer-

- vical cancer. *Lancet* **370**, 890-907.
24. Thomas, M., Pim, D. and Banks, L. 1999 The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* **18**, 7690-7700.
25. Walbooners, J. M., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. and Muñoz, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-19.

초록 : 자궁경부암 파라핀 조직에서 인유두종바이러스 유전형 검사의 유용성 평가

진현우*

(부산가톨릭대학교 임상병리학과)

자궁경부암은 전세계 여성의 사망원인 2위를 차지하며, 인유두종바이러스 감염과 상관성이 있다. 인유두종바이러스의 백신정책, 병인론, 추적관찰, 역학에서 유전형 검사는 중요하다. 후향적 연구를 위하여 파라핀 조직에서 역교잡반응을 이용하여 인유두종바이러스의 유전형을 검사하는 것은 명확하게 증명된 것은 아니다. 본 연구에서는 자궁경부암 파라핀 조직에서 역교잡반응을 사용하여 인유두종바이러스의 유전형 검사의 유용성을 평가하였다. 총 52개의 자궁경부암 파라핀 조직을 사용하여 역교잡반응을 실시하여 인유두종바이러스의 유전형을 검출하였다. 52개의 파라핀 조직중에서 32(61.5%) 건에서 인유두종바이러스가 검출되었으며, 단순감염이 27(84.4%) 건, 복합감염이 5(15.6%) 건으로 검출되었다. 단순감염에서 인유두종바이러스 유전형은 고위험군 18(8), 58(6), 16(5), 33(1), 35(1), 39(1), 56(1) 유전형과, 저위험군 11(2), 6(1), 70(1) 유전형으로 분석되었다. 복합감염에서 인유두종바이러스 유전형은 16/18(2), 18/52(1), 16/56(1), 16/18/33(1) 유전형으로 검출되었다. 본 연구를 통하여, 파라핀 조직으로 후향적 연구를 위한 인유두종바이러스 유전형 검사가 가능할 것으로 기대된다.