

Usefulness of p16^{INK4a} Immunocytochemical staining for the Differentiation between Atrophy and ASCUS in Diagnosis of Uterine Cervical Cancer

Hye Ryoung Shin^{1,§,*}, Taekil Eom^{2,§,**} and Wan-Su Choi^{2,3,†,***}

¹Department of Smart Foods and Drugs Graduate School, Inje University, Gimhae 50834, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Gimhae 50834, Korea

³Institute of Digital Anti-aging Healthcare, Inje University, Gimhae 50834, Korea

A Pap smear is the most important screening test for the diagnosis of cervical cancer. However, subjective judgment by the operator cannot be excluded, and replicability may greatly be reduced if uncertain specimens are examined. Examiners often experience difficulties in differentiating atrophy with inflammatory changes and ASCUS when diagnosing squamous epithelial lesions from a pap smear. Reports often vary between cytologists and pathologists, and misdiagnosis may result in delayed follow-ups and advanced diseases. Hence, auxiliary examinations are necessary when confusing results between atrophy and ASCUS are obtained. The importance of p16^{INK4a} activation due to HPV infection, which is an important factor in the outbreak of cervical cancer, has been highlighted. Recent studies have reported that p16^{INK4a} immunocytochemical staining and HPV high-risk type tests using liquid-based cervical specimens are effective to detect the presence of lesions of grade HSIL or higher in patients with ASC-H. However, no research exists on the utility of HPV and p16^{INK4a} tests on the differential diagnosis of atrophy and ASCUS. This study focused on whether p16^{INK4a} immunocytochemical staining and HPV tests can help diagnose borderline lesions between atrophy and ASCUS. The results reported that p16^{INK4a} activation can significantly ($P < 0.001$) differentiate atrophy from ASCUS in atrophic lesions infected with High risk-HPV. Therefore, it may be concluded that p16^{INK4a} immunocytochemical staining is an effective auxiliary test in lesions infected with HR-HPV when atrophic lesions are difficult to differentiate by morphology. Such results are expected to help decide on adequate follow-up and treatment.

Key Words: Bethesda system, Atrophy, ASCUS (atypical squamous cells of undermined significance), ASC-H (atypical squamous cells, excluded HSIL), HSIL (high grade squamous intraepithelial lesion)

서 론

자궁경부암은 전 세계적으로 두 번째로 많이 발생하며 우리나라 여성에서 유방암, 갑상선암, 대장암, 위암, 폐암,

간암에 이어 일곱 번째로 발생하는 암이다(Parkin et al., 1993). 이러한 차이는 우리나라의 경우 국가 암 검진 조기 발견 사업 시행을 통해 자궁암 발생빈도를 줄이는데 중추적인 역할을 했기 때문이다. 또한 세포병리사를 양성 하여 1차적인 선별검사로 자궁경부암의 발생률과 그에

Received: September 6, 2023 / Revised: September 22, 2023 / Accepted: September 22, 2023

* Graduate student, ** Researcher, *** Professor.

§ Hye Ryoung Shin and Taekil Eom contributed equally.

† Corresponding author: Wan-Su Choi. Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, 197, Inje-ro, Gimhae-si, Gyeosangnam-do 50834, Korea. Tel: +82-55-320-3481, Fax: +82-55-334-3426, e-mail: wansuchoi@inje.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

다른 사망률의 감소를 가져왔다(Denny, 2005). 자궁경부암은 자궁경부 상피내 종양(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)이 진행되어 발생되기 때문에 초기에 발견하여 치료하면 암으로의 진행을 예방할 수 있다. 상피내 종양은 비정형세포가 침범한 범위에 따라 3등급으로 분류한다. 상피내 종양 I (CIN 1) 이하는 일반적으로 치료 없이 주기적 검진을 요하고, 상피내 종양 II (CIN 2), 상피내 종양 III (CIN 3) 자궁경부 원추 절제술이나 냉동 요법 등을 통해 치료한다(Rouzier, 2008). 그러므로 자궁경부 병변에 대한 신속하고 정확한 진단은 환자의 치료와 예후에 도움을 줄 수 있다.

자궁경부 상피내 종양의 조기 발견을 위해 실시하는 고전적인 자궁경부 세포진 검사방법이 간단하고 검사 비용도 경제적인 이유로 자궁경부암 선별검사에 있어 유용하게 사용되고 있으며, 근래에는 액상세포검사법(Liquid-based cytology)을 적용하여 자궁세포 도말법의 위음성률을 줄이는데 일조하고 있다. 그러나 세포학적 검사는 주관적인 성격을 완전히 배제할 수 없으며 확실한 감별 및 진단이 어려운 경계 영역의 증례를 진단할 때, 재현성이 크게 떨어질 수 있다(Stoler and Schiffman, 2001; Lee et al., 2008). 이러한 경계 영역을 Bethesda system에서는 비정형 편평상피(ASC-US)와 고등급을 배제할 수 없는 비정형 상피세포(ASC-H)로 분류하였다. 이 중 비정형 편평상피(ASC-US) 고등급 편평 상피내 병변(HSIL) 이상으로 진단되는 비율은 11.6%인데 반해, 고등급을 배제할 수 없는 비정형세포(ASC-H)에서 진단되는 비율은 37.0~40.0%이다(Srodon et al., 2006; Sherman et al., 2001). 특히 위축성(atrophic) 상피세포와 화생상피세포는 고등급 편평 상피내 병변세포와 감별진단이 어려울 수 있다고 보고되었으며(Nucci et al., 2003) 실제 임상에서 위축성 병변(atrophy)을 현미경으로 검경할 때 세포 군집의 중첩 현상, 세포 도말 과정에서 핵의 위축성 변화, 수복, 염증성 이형성, 미성숙 화생 등으로 인해 비정형 편평상피(ASC-US)와 감별 진단에 많은 어려움을 겪고 있다.

인유두종바이러스(human papilloma virus, HPV) 감염은 자궁경부암을 일으키는 주요 원인으로 알려져 있으며, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 같은 분자 진단법을 통한 HPV 검출 여부는 자궁경부암 진단 시 보조적 지표로 많이 활용되고 있다(Lim et al., 2008). HPV는 현재까지 100여 가지가 넘는 종류가 발견되었으며 저위험군(low-risk, LR)-HPV와 고위험군(high risk, HR)-HPV으로 나뉘어 있다. 특히, 자궁경부암에서 고위험군 인유두

종바이러스는 99% 이상 발견되고 있다(Bibbo et al., 2002). 고위험군 인유두종바이러스는 숙주세포의 유전자에 삽입되어 E6, E7 발암 단백질을 발현하는데, E6는 p53 종양 억제단백질의 기능을 억제하고, E7은 retinoblastoma (Rb) 단백질을 비활성화 시켜, 세포주기를 G1 phase에서 S phase로의 이행을 억제하지 못하고 세포가 무한 증식하게 만든다(Muñoz et al., 2003; Keating et al., 2001).

p16^{INK4a}은 세포주기 조절인자로 G1 phase에서 S phase로 이동을 조절한다(Sano et al., 1998). p16^{INK4a}은 Cyclin D와 Cyclin-dependent kinase (CDK)의 복합체 형성을 방해하여 Rb 단백질의 인산화를 억제하는 유전자로, 인산화 되지 않은 Rb는 E2F라는 전사인자(transcription factor)와 안정한 복합체를 이루고 있다. 이러한 복합체는 세포분열과 성장에 필요한 유전자 전사를 잠정적으로 억제하고 세포 주기를 억제한다. 그러나 Rb가 인산화 되면 전사인자인 E2F가 활성화되어 세포증식에 필요한 단백질들의 합성을 유도하고, G1 phase에서 S phase로의 이행을 조절한다(Safwan-Zaiter and Wagner, 2022). HPV의 E7 발암 단백질이 Rb와 결합하면 E2F는 Rb로부터 지속적으로 유리되어 G1 phase에서 S phase로의 이행에 관련된 유전자 발현이 촉진된다(Bringold and Serrano, 2000; Yoshida et al., 1995; Igaki et al., 1995).

p16^{INK4a}은 HPV의 E7 발암 단백질에 의해 음성 되먹임 기전에 의해 발현이 증가되고, 면역세포화학염색 결과에서 발현이 증가된 p16^{INK4a}은 HPV 진단에 도움을 준다(Sano et al., 1998). 또한 세포 내 p16^{INK4a}의 발현 양상은 HPV의 존재 여부를 넘어서 HPV의 활동성을 평가할 수 있는 지표로 활용된다(Stanley, 2002). 최근 자궁경부암 발생 과정에서 주요 원인인 HPV 감염에 따른 p16^{INK4a}의 발현의 중요성이 부각되면서 자궁경부 액상세포 검체로 고위험군 HPV 감염 여부 검사와 p16^{INK4a} 면역세포화학염색이 ASC-H 이상의 병소 유무를 예측하는데 도움이 된다는 보고가 있고, 이 연구들은 CIN2 이상의 증례에서 p16^{INK4a} 과발현이 진단에 도움을 줄 수 있다고 제시한다(Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002; Kim et al., 2003). 그러나 형태학적 진단이 어려운 위축성 병변에서 ASC-US의 감별에 대한 p16^{INK4a} 면역세포화학염색이 임상에서 진단에 도움을 줄 수 있는지에 대한 연구는 보고되지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 자궁경부 액상세포 검사에서 세포학적으로 감별이 어려운 위축성 병변과 ASC-US의 경계 영역을 진단하는데 p16^{INK4a} 면역세포화학염색의 임상적 유용성에 대해 알아보고, HPV 감염의 연관성

에 대해 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

연구 대상

2019년 1월부터 2021년 12월까지 창원한마음병원 산부인과에서 자궁경부 액상세포검사를 받고 atrophy 진단을 받은 100명을 대상으로 하였다.

자궁경부 액상세포검사

자궁경부의 액상세포검사는 Surepath (Tripath imaging, USA) 사용하여 Papanicolaou stain을 실시하여 검사하였다. 연구 대상 환자의 조직 샘플에서 자궁경부암이 잘 발생하는 부위인 transitional zone에서 brush를 이용하여 인위적으로 탈락된 세포 검체를 얻은 다음, brush 부분을 분리하고 세포의 변성을 방지하기 위해 고정액이 첨가된 Sure-Path 전용 용기에 넣어 액상도말 세포검사를 시행하였다.

검체의 균질화를 위하여 Muti-Vial Vortexer를 이용하여 3,000 rpm으로 50초간 균질화 시킨 다음, PreMate Automated accessory (TriPath Imaging, USA)를 이용하여 Prestain density reagent가 담긴 원심 튜브로 옮겨졌다. 그리고 비중액을 넣어 검체의 세포 밀도를 높이고 원심분리를 2회 시행한 뒤 세포의 침사층을 얻었다. 이상의 전처리 과정을 마친 검체는 PreStain chamber로 옮겨져 코팅 슬라이드로 침전시킨 후, 자동염색장치인 AutostainerXL (Leica, Germany)로 papanicolaou 염색을 시행하였다. 핵 염색은 Harris Hematoxylin으로 3분 염색한 후, washing한 다음 0.02% HCl로 핵을 탈색하고, 세포질 염색은 OG6와 EA50 용액에 각 1분간 실시하였다. 그리고 염색이 완료된 슬라이드는 자동 봉입기와 봉입제(Synthetic Mountant, Shandon, USA)를 사용하여 슬라이드를 제작한 후 Aperio AT2 슬라이드 스캐너(Leica, Germany)를 이용하여 스캔하였다. 세포검사의 진단은 세계표준법인 Bethesda system을 통해 결과를 보고하고 있다.

Real-time Polymerase Chain reaction (RT-PCR)을 이용한 HPV 감염 여부 검사

HPV 감염 검사는 외래 검진 과정에서 transitional zone에서 채취된 세포 검체를 이용하여 real-time PCR을 시행하여 감염 여부를 측정하였으며, 다음과 같은 과정을 거쳐서 측정하였다. 우선 검체에서 NimBUS 전처리 장비로 DNA를 추출하고, Anyplex II HPV 28 Detection kit (Seegene,

Korea)를 이용하여 CFX96 Real-time thermocycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 PCR을 진행하였다. Anyplex II HPV 28 Detection kit는 두 개의 primer set를 이용하여 총 28가지의 HPV gene type을 19가지의 HR-HPV type와 9가지의 LR-HPV type으로 정성 및 정량 분석할 수 있다.

자궁경부 액상세포 p16^{INK4a} Immunocytochemistry (IHC)

100명의 atrophy 진단이 나온 환자의 세포 슬라이드를 0.05% HCl에 30분 탈색 후, xylene-100%, alcohol-95% 및 alcohol 과정을 거쳐 수세를 30분 한 후 슬라이드를 완전히 탈색시켰다. IHC에 사용되어진 p16^{INK4a} 항체는 Roche Diagnostict (Rotkreuz, Switzerland)사의 항체를 이용하였으며, 면역염색검사장비(Bond III, Germany)를 사용하여 염색을 실시하였다. IHC의 과정은 항원복구, Primary antibody, Envision/HRP, Substrate-Chromogen (DAB) solution를 10분간 적용시킨 후, Mayer hematoxylin으로 대조염색을 1분간 하였으며, p16^{INK4a} 면역염색결과는 종양세포의 핵과 세포질에 갈색으로 염색되는 상피세포를 세어 판독하였다.

자궁경부조직 p16^{INK4a} Immunocytochemistry

자궁경부조직을 10% Neutral Buffered Formalin (NBF)으로 고정한 후, 자동조직처리기(Sakura, Tissue Tec-5 VIP)를 이용하여 탈수, 투명, 침투 과정을 거친 후, 파라핀 블록을 만들었다. 이후, 4 µm 두께로 박절한 다음 자동면역검사기(Bondmax, Germany)를 사용하여 염색을 실시하였다. p16^{INK4a} 항체(Roche, RTU)를 이용하였으며, 면역염색검사장비(Bond III, Germany)를 사용하여 염색을 실시하였다. IHC의 과정은 항원복구, Primary antibody, Envision/HRP, Substrate-Chromogen (DAB) solution를 10분간 적용시킨 후, Mayer hematoxylin으로 대조염색을 1분간 하였으며, p16^{INK4a} 면역염색결과는 종양세포의 핵과 세포질에 갈색으로 염색되는 상피세포를 세어 판독하였다.

자궁경부조직 H&E 염색

자궁경부 punch 생검 조직을 10% NBF로 고정한 후, 자동조직처리기(Sakura, Tissue Tec-5 VIP)를 이용하여 탈수, 투명, 침투 과정을 거친 다음 파라핀 블록을 만들어 Histocore Multicut 박절기(Leica, Germany)로 4 µm로 박절하였다. 그리고 Tissue Tec Plasma plus 자동염색기(Sakura, Japan)를 이용하여 Hematoxylin & Eosin (Leica, Germany)으로 염색하고, Synthetic Mountant (Leica, Germany)으로 봉입하였다.

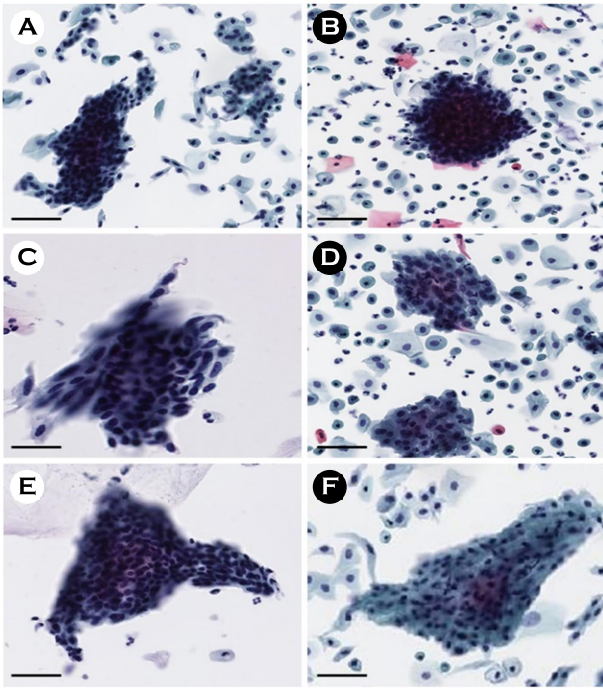


Fig. 1. Representative images of papanicolaou staining in cervical liquid cytology diagnosed with atrophy. (A) Atrophic cluster in which intranuclear chromatin is difficult to distinguish (B) Hyperstained atrophic cluster. (C) Irregularity of the marginal nucleus of the atrophic cluster. (D) Atrophic cluster with enlarged nucleus. (E) Overlapping nucleus atrophic cluster. (F) Atrophic cluster of irregular nuclear membrane. Original magnification: $\times 200$. scale bar = 100 μm .

통계 분석

SPSSWIN 25.0 프로그램을 사용하여 교차분석(chi-square test) χ^2 (P)을 실시하여 집단 간의 차이를 살펴보고 유의 수준 P 는 0.05 미만으로 하였다.

결 과

자궁경부 액상세포검사 진단

자궁경부 액상도말 세포검사에서 atrophy 및 ASCUS의 감별 진단이 현미경을 이용한 판단에서 형태학적으로 atrophy 및 ASCUS의 판단이 어려운 액상세포 슬라이드를 세포병리사와 병리의사의 교차 판독하여 최종적으로 atrophy로 진단된 100명의 환자의 검체를 실험 대상으로 하였다. Fig. 1에서 나타내는 바와 같이 현미경상으로 hyperchromatic cluster의 핵 내에 chromatin의 양상과 핵의 크기와 형태가 ASCUS와 감별하기에 어려움이 있었으나 최종적으로 atrophy로 판단되었다.

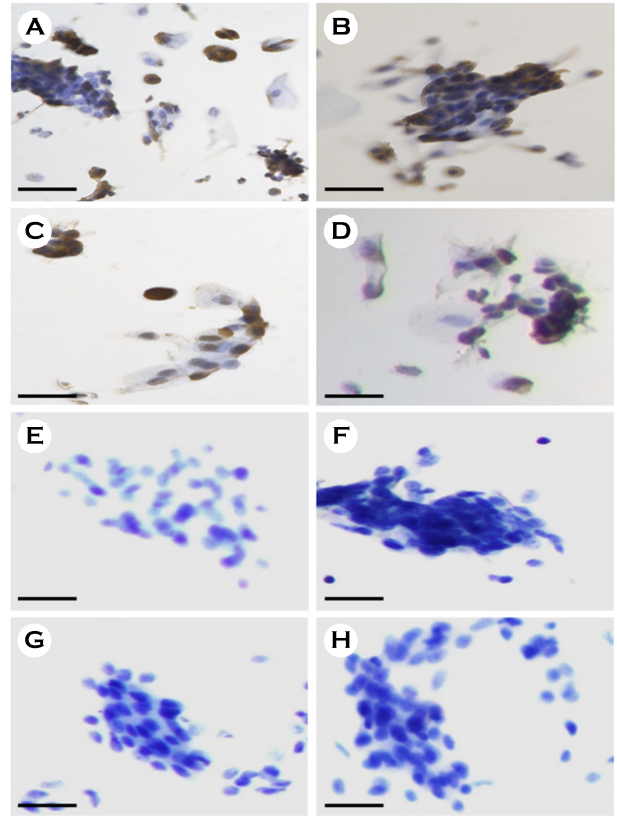


Fig. 2. Representative images of p16^{INK4a} immunostaining in cervical liquid cytology. (A)~(D) Atrophic cluster p16^{INK4a} expression infected with high-risk HPV. (E, F) Atrophic cluster p16^{INK4a} expression infected with low-risk HPV. (G, H) Atrophic cluster p16^{INK4a} expression without HPV infection. Original magnification: $\times 200$. scale bar = 100 μm .

Atrophy에서 p16^{INK4a}의 발현

Atrophy로 판단된 자궁경부 액상세포 검체를 이용하여 0.1% HCl로 탈색 과정을 거친 후, p16^{INK4a} 항체를 이용하여 면역세포화학염색을 실시하였다(Fig. 2). p16^{INK4a}의 발현은 핵과 세포질에서 갈색으로 염색된 상피세포의 수를 현미경(100 \times)에서 세어 10개 이상일 때 p16^{INK4a} 과발현으로 간주하여 양성으로 판독하고, 세포가 전혀 염색되지 않았거나, 염색이 되더라도 염색 강도가 약한 세포만 관찰되거나 10개 미만일 때 음성으로 판독하였으며 Table 1에 나타내었다. 그 결과, atrophy를 나타내는 100개의 검체에서 p16^{INK4a} 발현이 관측되는 양성의 검체는 35개로 나타났으며, 나머지 65개의 검체에서는 p16^{INK4a} 발현이 관측되지 않음을 나타내었다.

Table 1. Proportion positive specimens for p16^{INK4a} expression in liquid-based cytology samples of cervical tissue using immunohistochemical staining methods

Cytology diagnosis	No. of cases	Cytology p16 ^{INK4a}	
		Negative (%)	Positive (%)
Atrophy	100	65 (65%)	35 (35%)

Table 2. Comparative analysis of HPV infection and p16^{INK4a} expression in atrophic lesions from liquid-based cytology specimens of cervical tissue

		p16 ^{INK4a} expression		Total
		Positive (%)	Negative (%)	
Atrophy	HR-HPV	32 (84.2%)	6 (15.8%)	38
	LR-HPV	3 (15%)	17 (85%)	20
	No-HPV	0	42 (100%)	42

HR, High risk; LR, Low risk

Atrophy 검체에서 HPV 감염과 p16^{INK4a} 발현과의 상관관계

Atrophy로 진단된 100개의 검체에서 transitional zone에서 DNA를 채취하여 HPV 감염상태를 확인하기 위하여 HPV에 선택적으로 증폭이 되는 primer를 사용하여 Real-Time PCR 기기를 이용하여 PCR 반응을 진행하여 HPV 감염 여부를 판단하였다(Table 2). HPV 감염을 확인한 결과 p16^{INK4a}이 발현이 관측되는 35개의 검체 중에서 중 HR(high risk, 고위험군) HPV 감염에 대한 양성을 나타내는 검체는 32개의 검체(84.3%)로 나타났으며, 3개의 검체(15%)에서는 LR(low risk, 저위험군) HPV 감염에 대한 양성을 나타내었다. p16^{INK4a}이 발현이 관측되는 검체에서 HPV에 대해서 감염이 나타나지 않는 검체는 존재하지 않음을 확인하였다.

p16^{INK4a}이 발현되지 않은 65개의 검체에서 HR-HPV 양성을 나타내는 검체는 3개의 검체(15.8%)에서 나타내었으며, LR-HPV 양성은 17개의 검체(85%)에서 나타내었다. p16^{INK4a}의 발현이 관측되는 검체와는 다르게 p16^{INK4a}의 발현이 나타나지 않는 검체에서는 42개의 검체에서 HPV에 감염이 되지 않음을 나타내었다. 이와 같이 HR-HPV에 감염을 나타내는 검체에서는 p16^{INK4a}의 발현 비율이 높게 나타났으며, HPV에 감염되지 않은 검체는 p16^{INK4a}의 발현이 관측되지 않음을 나타내었다. 따라서 HR-HPV 감염이 확인된 atrophy에서 p16^{INK4a} 발현은 서로 밀접한 상관관계

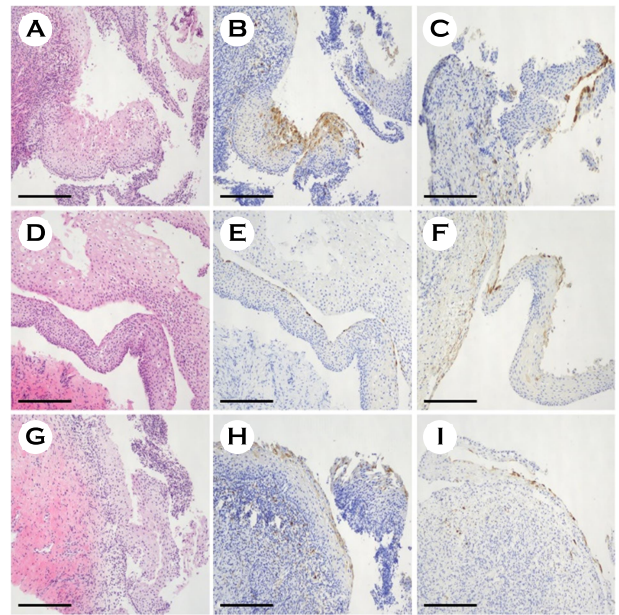


Fig. 3. Representative images of hematoxylin/eosin and immunostaining of p16^{INK4a} expression in atrophic cervical tissue. A, D, G: Hematoxylin & Eosin staining in atrophic cervical tissue infected in high-risk groups. B, C, E, F, H, I: p16^{INK4a} expression in high-risk infected atrophic cervical tissue. Original magnification: $\times 100$. scale bar = 200 μ m.

($P < 0.001$)를 나타났음을 알 수 있다.

HR-HPV 감염된 자궁경부조직의 p16^{INK4a} 발현

HR-HPV에 감염되어 있으면서 atrophy를 가지는 환자의 자궁경부에서 얻어진 15개의 검체를 이용하여 자궁경부조직에서 p16^{INK4a} 발현을 면역조직화학염색을 통하여 분석하였다(Fig. 3). 조직검사 진단 결과 Flat condyloma는 13개의 검체(86.7%)에서 나타났으며, 만성 경부염(chronic cervicitis)은 2개 검체(13.3%)에서 발견되었다. 이 중에서, 13개의 Flat condyloma를 나타내는 검체에서 모두 p16^{INK4a} 발현이 나타남을 확인하였으며, 2개의 만성 경부염으로 진단된 검체에서는 p16^{INK4a} 발현이 나타나지 않았다.

고찰

본 연구에서는 자궁경부암 검사에서 폐경 이후 여성의 atrophy와 ASCUS를 형태학적 세포의 특징만으로 구별하여 감별 진단하기 어려운 경우 p16^{INK4a} 면역화학세포염색 검사를 시행하여 세포검사의 진단을 보완하기 위한 검사 방법으로 유용성을 확인하였다. Atrophy에서 과염색 되어진

세포 균집들은 핵의 chromatin은 관찰이 어렵고, 액상도말 검사법의 과정에서 핵의 모양이 축소되어 자궁경부의 이상소견을 발견하지 못하는 경우가 발생된다. 따라서 환자가 추적 검사의 시기를 놓쳐 자궁경부암의 중증도가 진행된 후 발견될 수도 있기 때문에 atrophy과 ASCUS의 감별이 모호한 경우 진단에 보조적인 검사의 필요성을 느끼고 있는 실정이다. 자궁경부암의 정확한 진단을 위해 세포검사와 병행하여 검사 가능한 바이오 마커들에 연구들이 진행되고 있으며 다양한 바이오 마커들이 제시되고 있다. 위축성 상피세포와 미성숙 화생상피세포는 고등급 편평상피내 병변세포와 세포학적으로 감별이 어려운 경우 세포주기에서 발현되는 세포의 증식능을 반영하는 세포증식의 표지자 Ki-67 면역조직화학염색법이 정확한 진단에 도움이 된다는 보고가 있다(Keating et al., 2001). 또한 다양한 정도의 자궁경부 상피내 종양 환자들을 대상으로 세포주기를 Ki-67, p53 및 p63 발현을 면역염색을 통하여 비교 분석한 결과 CIN II 및 CIN I에 비해 CIN III 환자의 이들 바이오 마커 발현이 유의하게 증가하는 것으로 밝혀졌다. 이 외에도 CIN I에서는 p53과 p63의 발현이 대조군에 비해 훨씬 더 명확히 증가하여, CIN I의 반응성 변화를 구별할 수 있다고 설명하였다(Mitildzans et al., 2016). 또한 Ki-67 전암성 병변 및 자궁경부암에서 Ki-67, p16^{INK4a} 및 p53의 면역조직화학적 발현 평가에 연구에서는 정상적인 자궁경부 상피에서는 최소 p16^{INK4a} 및 Ki-67의 발현이 나타나지 않거나 아주 적은 발현을 보여주나, 병변이 심한 조직에서는 아주 높은 발현을 나타내고 있다고 보고하였다(Silva et al., 2017). 이상에서와 같이 세포주기를 조절하는 다양한 단백질들을 이용하여 자궁경부암 진단에 보조적으로 활용 가능성이 많은 연구 결과들로 제시되어지고 있다.

최근 들어 자궁경부암 검사에서 p16^{INK4a} 발현에 대한 선행연구에서, 조직학적 진단의 grade가 높아질수록 발현율이 증가하여 자궁경부 내의 병변을 감별하는 검사방법으로 유용하다고 보고하였다(Byun et al., 2013; Dona et al., 2012; Schmidt et al., 2011). 또한, HPV에 감염된 자궁경부 병변에서 p16^{INK4a}이 발현이 증가된다고 연구되어져 있으며(Klaes et al., 2001; Keating et al., 2001), p16^{INK4a}의 과발현은 HPV의 감염과 동시에 활동적인 상태에 존재함을 의미한다고 알려져 있다(Stanley, 2002).

이에 본 연구에서는 자궁경부암 검사 환자를 대상으로 액상세포검사를 실시하여 슬라이드표본을 제작하고 세포학적 진단이 어려운 atrophy에서 ASCUS를 감별하기

위한 보조검사로 p16^{INK4a} 면역세포화학검사가 임상적으로 유용한지 알아보고, HPV에 의해 자궁경부암의 암화 과정에서 HPV E6 및 E7 단백질이 p16^{INK4a}의 과발현과의 연관성에 대해 연구를 하였다. Atrophy로 진단이 나간 100명을 대상으로 p16^{INK4a} 면역세포화학염색을 실시한 결과 p16^{INK4a} 발현의 양성인 23건(23%), 음성인 65건(65%)로 조사되었다(Fig. 2, Table 1). 그리고 atrophy으로 진단된 100명의 모두 HPV 감염에 대한 Real time PCR을 실시한 결과 p16^{INK4a} 발현 양성에서 HR-HPV 양성인 38건(84.2%) 나왔고, LR-HPV 양성인 3건(15%), No HPV infection 0건(0%)로 나타났다(Table 2). p16^{INK4a} 발현 음성에서는 HR-HPV 양성인 6건(15.8%), LR-HPV 양성인 17건(85%), No HPV infection 42건(100%)로 나타났다. 이는 HPV 감염 시 HR-HPV 양성일 경우 p16^{INK4a} 발현이 증가하였으며 이는 이전 연구들과 동일한 결과를 보인다(Klaes et al., 2001; Sano et al., 2002; Simonescu et al., 2010).

그리고 atrophy에서 HR-HPV 감염된 환자의 자궁경부 조직검사를 실시한 결과 p16^{INK4a} 발현은 13명으로 86.7%의 양성을 보였다. 그러나 LR-HPV에 감염된 환자들은 자궁경부 조직검사를 실시하지 않아 p16^{INK4a} 발현을 확인할 수 없었다. 카이스퀘어 검중에 의한 유의미성을 살펴보면 Fisher의 정확한 검정을 실시한 결과 HR-HPV 감염이 된 atrophy에서 p16^{INK4a}의 발현은 유의수준 $P < 0.001$ 수준에서 유의하게 나타났음을 알 수 있다. 이는 p16^{INK4a}의 과발현이 고위험군 HPV 감염을 시사하는 표지자로서 사용될 수 있는 가능성을 다시 한번 확인할 수 있었다. 따라서 HR-HPV에 감염이 되었을 때 atrophy에서 p16^{INK4a} 발현은 양성을 보이며 이는 ASCUS의 감별 진단에 도움이 된다는 점을 알려주고 있다. 31명의 자궁경부암 환자에서 얻어진 생체 검체를 이용한 CIN grade와 p16^{INK4a} 및 ki-67 발현과의 상관성을 연구한 결과에서도 고위험군 HPV 감염 시, Ki-67과의 큰 연관성은 보기 어렵지만, p16^{INK4a} 단백질의 발현은 증가한다는 결과를 보고하였으며, 따라서 CIN과 고위험군 HPV 감염의 진단에서 p16^{INK4a}이 효율적인 표지자로 사용될 수 있다고 하였다(Nam et al., 2008). 그리고 자궁경부 액상세포에서 ASC-H 환자에게 p16^{INK4a} 염색을 시행하여 HSIL 이상의 병소에 높은 민감도 80.0%와 특이도 77.8%를 보이며, HPV 검사와 같이 실시한 경우 HSIL 이상의 병소에 민감도 71.2%, 특이도 86.4%로 HSIL 이상의 병소 유무를 예측하는데 유용하다는 연구가 보고되고 있다(Yim et al., 2011). 또한, p16^{INK4a}의 발현 증가 기전은 HPV E7 단백질이 pRb의 비활성을 초래하여 상대

적으로 p16^{INK4a} 발현이 증가한다고 밝혀져서 알려지고 있다(Sakaguchi et al., 1996; Hofmann et al., 1996; Hateboer et al., 1996). 또한 자궁경부암의 주요 원인인 HPV 감염과 관련이 있는 검사법으로 p16^{INK4a}와 Ki-67 면역염색을 병행하여 실시할 경우 양성율이 높아, 자궁경부암 조기 진단의 정확성, 민감도의 증가 시킬 수 있는 있다는 연구가 진행되고 있다(Keating et al., 2001).

이러한 결과를 토대로 자궁경부암 검사 환자를 대상으로 액상세포검사를 이용한 검사에서 p16^{INK4a} 면역세포화학검사를 보조적으로 실시한다면 세포학적 진단이 어려운 atrophy에서 ASCUS를 감별하기 위한 보조검사로서 p16^{INK4a} 면역세포화학검사가 임상적으로 ASCUS 감별에 유용한 보조 수단으로 활용이 가능함을 제시할 수 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korea government (MSIT) (NRF-2020R1C1C1003718, RS-2023-00264369 and RS-2023-00211284).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.R.S. and T.E designed, performed, and analyzed the experiments. H.R.S, T.E and W.-S.C, wrote the manuscript. W.-S.C. conceived, planned, and oversaw the study.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16^{INK4a} antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol.* 2002. 46: 25-29.
- Byun SW, Lee A, Kim S, Choi YJ, Lee YS, Park JS. Immunostaining of p16^{INK4a}/Ki-67 and L1 capsid protein on liquid-based cytology specimens obtained from ASC-H and LSIL-H cases. *Int J Med Sci.* 2013. 10: 1602-1607
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol.* 2000. 35: 317-329.
- Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG.* 2005: 112: 1204-1241.
- Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol.* 2012. 126: 198-202.
- Hateboer G, Kerkhoven RM, Shvarts A, Bernards R, Beijersbergen RL. Degradation of E2F by the ubiquitin proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev.* 1996. 10: 2960-2970.
- Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Wang Z. The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1996. 10: 2949-2959.
- Igaki H, Sasaki H, Tachimori Y, et al. Mutation frequency of the p16/CDKN2 gene in primary cancers in the upper digestive tract. *Cancer Res.* 1995. 55: 3421-3423.
- Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, et al. Ki-67, cyclin E, and p16^{INK4} are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathology.* 2001. 25: 884-891.
- Kim MY, Cho SH, Park MH. Analysis of expression of p63 in cervical neoplasia comparing with other immunohistochemical markers. *Korean J Pathol.* 2003. 37: 333-341.
- Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002. 26: 1389-1399.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, 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: 276-284.
- Lee HK, Kim SN, Khang SK, Kang CS, Yoon HK. Quality control program and its results of Korean Society for Cytopathologists. *Korean J Cytopathol.* 2008. 19: 65.
- Lim HS, Kim MJ, Park KE, et al. The efficacy of a real-time optoelectronic device as a diagnostic tool of over cervical intraepithelial neoplasia 1 lesion. *Korean J of Obstet and Gynecol.* 2008. 19: 107-110.
- Mitildzans A, Arechvo A, Rezeberga D, Isajevs S. Expression of p63, p53 and ki-67 in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Turk J Pathol.* 2016. 33: 9-16.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl J Med.* 2003. 348: 518-527.
- Nam EJ, Kim JW, Hong JW, et al. Expression of the p16^{INK4a} and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papilloma virus infection. *J Gynecol Oncol.* 2008. 19: 162-168.

- Nucci MR, Castrillon DH, Bai H, Quade BJ, Ince TA, Genest DR, Lee KR, Mutter GL, Crum CP. Biomarkers in diagnostic obstetric and gynecologic pathology: A review. *Adv Anat Pathol*. 2003. 10: 55-68.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 1993. 54: 594-606.
- Rouzier R. Management of CIN1. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2008. 37 Suppl 1: S114-120.
- Safwan-Zaiter H, Wagner N, Wagner KD. p16INK4A-More than a senescence marker. *Life*. 2022. 12: 1332.
- Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, et al. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer*. 1996. 65: 442-445.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*. 1998. 153: 1741-1748.
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in and p14ARF is associated with human papillomavirus infection. *Pathol Int*. 2002. 52: 375-383.
- Schmidt D, Beraeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/Ki-67dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology result of rom the Europeane quivocal or midly abnormal Papanicolaou cytolgystudy. *Cancer Cytopathol*. 2011. 119: 158-166.
- Silva DC, Gonçalves A, Cobucci RN, Mendonça RC, Lima PH, Cavalcanti G. Immunohistochemical expression of p16, Ki-67 and p53 in cervical lesions—A systematic review. *Pathol-Res Pr*. 2017. 213: 723-729.
- Simonescu C, Marqaritescu C, Stepan A, Georgescu CV, Niculescu M, Muntean M. The utility of p16, E-cadherin and Ki67 in cervical squamous intraepithelial lesions diagnosis. *Rom J Morphol Embryol*. 2010. 51: 621-626.
- Sherman ME, Solomonm D, Schiffman M. Qualification of ASCUS: A Comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL triage study. *Am J Clin Pathol*. 2001. 116: 386-394.
- Srodon M, Dilworth HP, Ronnett BM. Atypical squamous cells, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion: diagnostic performance, human papillomavirus testing, and follow-up results. *Cancer*. 2006. 25: 32-38.
- Stanley MA. Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Res*. 2002. 89: 241-248.
- Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA*. 2001. 285: 1500-1505.
- Yim KI, Kang YP, Kim TR. The usefulness of p16^{INK4} immunocytochemical staining in ASC-H patient. 2011. 45: 290-295.
- Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, et al. Mutations of p16^{INK4a}/CDKN2 and p15^{INK4b}/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res*. 1995. 55: 2756-2760.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.3.144>

Cite this article as: Shin HR, Eom T, Choi WS. Usefulness of p16^{INK4a} Immunocytochemical staining for the Differentiation between Atrophy and ASCUS in Diagnosis of Uterine Cervical Cancer. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 144-151.