

자궁경부암에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현

연세대학교 의과대학 산부인과학교실

김혜연·김재욱·김세광·김영태·김재훈·김성훈·김상운·윤보성·남은지·조혜진

Expression of Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in cervical carcinoma

Hye Yeon Kim, M.D., Jae Wook Kim, M.D., Sei Kwang Kim, M.D., Young Tae Kim, M.D., Jae Hoon Kim, M.D., Sung Hoon Kim, M.D., Sang Wun Kim, M.D., Bo Sung Yoon, M.D., Eun Ji Nam, M.D., Hye Jin Cho, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: This study was undertaken to quantitatively detect Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in cervical carcinoma and determine the relationship between the expression of mRNA and protein of cell division cycle (Cdc)25 phosphatase and various clinicopathologic prognostic factors of cervical carcinoma.

Methods: 39 patients diagnosed with cervical carcinoma between February 2000 to March 2005 and 10 patients with benign gynecologic disease were enrolled in this study. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis were used to analyze the expression of Cdc25 phosphatase mRNA and protein in fresh invasive cervical cancer tissue and normal cervix tissue.

Results: The mRNA expressions of Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in the cancer tissues were significantly greater than in the control ($p=0.02$, 0.01 , 0.02), respectively. A Western blot analysis yielded same results ($p=0.01$, 0.02 , 0.01). There were also significant relationships between the age and the Cdc25B mRNA expression ($p=0.03$), between the cell type and the Cdc25C mRNA expression ($p=0.04$). However, other clinicopathologic prognostic factors including stage, subtype, SCC Ag level, DNA flow cytometry, lymph node metastasis, lymphovascular space invasion and HPV positivity were not statistically significant.

Conclusion: Our results show that Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C expression levels were significantly greater in cervical cancer patient group than in those of control group. Thus Cdc25 phosphatase might play an important role in carcinogenesis of cervical carcinoma. Further studies based on the correlation between Cdc25 phosphatase and survival rate would be need to support Cdc25 phosphatase as a prognostic factor of cervical carcinoma.

Key Words: Cervical carcinoma, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C, RT-PCR, Western blot analysis

서 론

자궁경부암은 전세계적으로 여성암 중에서 2번째로 많이 발생하며, 한국에서는 부인생식기암 중 가장 높은

발생빈도를 차지하는 암으로 여성 보건 관리 차원에서 매우 중요한 질환이다.¹ 자궁경부암의 발생에는 고위험군 인유두종 바이러스 감염이 중요한 원인인자임이 밝혀져 있다.² 인유두종바이러스 (human papilloma virus, HPV)에 의한 자궁경부암의 발생 기전으로는 고위험군 HPV의 E6 및 E7 암단백이 각각 p53 및 pRb 단백질의 기능을 저해함으로써 정상세포의 세포주기 (cell

접수일 : 2006. 7. 24.
교신저자 : 김영태
E-mail: ytkchoi@yumc.yonsei.ac.kr

cycle) 교란을 유발하는 것이라고 생각되고 있다. 그러나 인유두종 바이러스에 감염된 많은 여성 중 소수만이 침윤성 자궁경부암으로 진행되는 것으로 보아 인유두종 바이러스 감염 이외에 다른 여러 인자들이 자궁경부암 발암기전에 결정적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.^{3,4} 추정되는 다른 기전으로는 유전적 소인 및 면역 기능 이상 등이 있으며, p16^{INK4A}, cyclin, cyclin dependent kinase (CDK) 4/6, retinoblastoma (pRb) 및 p53 유전자 등을 포함하는 세포주기조절 유전자들의 이상이 보고되어 있다.⁵

세포주기는 G1, S, G2, M기로 구성되어 있으며 cell division cycle (Cdc) 25 phosphatase는 이러한 세포주기 중 G2기로부터 유사분열기로 진행하는데 관여하는 중요한 효소로 알려져 있다. Cdc25는 Cdc2의 Tyr15 잔기를 탈인산화 (dephosphorylation)하여 Cdc2를 활성화한다. 즉 후기 G2기에서 Cdc25의 활성화는 증가하고 Wee1의 활성화는 억제되어 Cdc2가 탈인산화된 상태로 활성화됨으로써 세포주기는 유사분열기로 진행하게 되는 것이다.^{6,7} 이 중 세포주기 조절에 관여하는 Cdc25는 세포주기의 진행을 촉진하며, 세포주기 및 분열을 조절하는 등의 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있다. 이와 같은 Cdc25군에는 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 있으며, 세포주기 중 각각 다른 phase에서 cell cycle oscillator 역할을 한다. 이 중 Cdc25A는 G1기에서 checkpoint로 작용하며, Cdc25B와 Cdc25C는 G2/M기의 checkpoint로서 작용한다.^{8,9} 특히 Cdc25A와 Cdc25B는 다양한 암에서 과발현된다고 알려져 있고, 암세포 성장에 매우 중요한 효소로 알려져 있다. 현재까지 뇌종양, 유방암, 후두암, 폐암, 두경부암, 비호지킨성 임파종 등과 연관이 있다는 보고는 많으나 Cdc25C와의 연관성에 관한 연구는 아직 미미한 상황이다.⁹⁻¹⁴ 이러한 Cdc25 phosphatase는 부작용이 매우 적은 항암제로의 개발 가능성이 검토되기 때문에 최근 크게 각광을 받고 있는 enzyme target으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁷ 또한 기존 연구에서는 두경부암, 소세포폐암과 식도암에서 Cdc25A와 Cdc25B의 단백질과 mRNA가 과발현된다고 보고된 바 있으나 현재까지 인간 자궁경부암에서

의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현에 대한 연구는 이루어지지 않은 상태이다.¹⁷

본 연구에서는 정상 자궁경부 조직과 자궁경부암 조직에서 mRNA 수준에서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현 양상과 Western blot analysis를 이용한 단백질 수준에서의 발현 양상을 연구하고자 하였다. 또한 자궁경부암에서 이들 세포주기 조절 인자들의 발현 양상과 임상적 및 병리학적 예후 인자들과의 상관관계를 분석함으로써 예후 인자로서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 역할을 규명하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 환자 선택 및 검체 채취

2000년 2월부터 2005년 3월까지 본원 산부인과를 내원하여 외과적으로 절제하였거나 조직검사를 시행하여 자궁경부암으로 판명된 환자 39예의 신선 자궁경부 조직을 연구 대상으로 하였으며 대조군은 양성 병변 (자궁근종 등)으로 적출한 정상 자궁경부 조직 10예를 대상으로 하였다. 자궁경부암의 임상적 병기는 FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) 분류법에 의거하여 분류하였다. 또한 실험군과 대조군 간에 환자의 연령을 각각 matching하여 비교하였다. 실험군 환자의 평균 연령은 52세였고, 대조군 환자의 평균 연령은 46세로 두 군간의 유의한 차이는 없었다. 39예의 자궁경부암 환자들의 임상적 특징은 Table 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현

본원 산부인과에서 시행한 수술에 의해 얻어진 무균 상태의 자궁경부암 조직과 대조군을 액화 질소탱크에 보관하고 임상적 병기에 따라 암조직을 선택한 후 RNA를 분리하였다.

Table 1. Clinicopathological characteristics of patients

Characteristics	No. of patients (n=39)	%
Age (years)		
≤ 50	19	48.7
>50	20	51.3
Stage		
I	14	35.9
II	22	56.4
III	3	7.7
Cell type		
SCC	35	89.7
Adenocarcinoma	4	10.3
Subtype		
LCK	15	38.5
LCNK	19	48.7
Other	5	12.8
SCC Ag level (ng/mL)		
≤1.0	17	43.6
>1.0	22	56.4
DNA flow cytometry		
Diploidy	27	69.2
Aneuploidy	12	30.8
LN metastasis		
Yes	15	38.5
No	24	61.5
LVSI		
Yes	5	12.8
No	34	87.2
HPV positivity		
Yes	33	84.6
No	6	15.4

SCC: squamous cell carcinoma, SCC Ag: squamous cell carcinoma antigen, LCK: large cell keratinizing type, LCNK: large cell nonkeratinizing type, LN: lymph node, LVSI: lymphovascular space invasion, HPV: human papilloma virus

(1) Total RNA의 추출

Total RNA의 추출을 위하여 500 µL의 Trizol® (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)이 들어 있는 tube에 조직을 0.3 cm cubic 형으로 첨가하였다. Tube를 4°C로 유지한 상태에서 plastic pestle로 조직을 마쇄하여 상온에서 5분간 방치하였다. Total

volume의 10%에 해당하는 50 µL의 chloroform (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)을 첨가하여 15초간 고무 섞어 준 후 4°C에서 14분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액과 동량의 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 고르게 섞었다. 30분간 -70°C에서 방치하거나 -20°C에서 하룻밤 동안 방치한 뒤 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물에 70% ethanol을 첨가한 후 7,500 rpm에서 8분간 원심분리하고 상층액을 버린 다음 공기 중에서 건조시켰다. 이에 DEPC (diethyl pyrocarbonate, Sigma) 증류수 30 µL를 첨가, 55°C에서 10분간 용해시킨 후 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도와 정제도를 측정하고 (UV-1601PC, Shimadzu, Japan), -70°C의 초저온 급속 냉동기에 보관하였다.

(2) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

세포주기 조절인자들의 전사단계 발현양상을 알아보기 위해 total RNA 1 µg을 5× RNA PCR buffer, dNTP (2.5 mM), MgCl₂ (25 mM), oligo dT primer, RNase inhibitor, AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 포함하는 반응용액 속에서 70분 동안 42°C에서 반응시킨 후, 95°C에서 5분간 효소를 불활성화 시켰다 (GeneAmp PCR System 9600). 선행과정에 의해 생성된 cDNA를 주형 (template)으로 중합효소반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다. 동일한 양의 합성된 cDNA에 MgCl₂가 함유된 10× PCR buffer, dNTP (2.5 mM), 각각의 10 pmol primer pairs들을 이용하여 Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 용액 속에 중합 반응을 수행하였다. 최초 94°C에서 1분간 변성 (denaturation)시킨 후, 94°C에서 1분, 각각의 primer sequence에 따라 결정된 annealing 온도에서 1분, 72°C에서 50초 효소 반응시키는 것을 한 cycle로 하여 28회 반복하여 증폭하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 수행하였다. 반응 후 5 µL의 PCR product에 6 × loading buffer (0.25% bromophenol

blue in 40% glycerol) 1 μ 넣은 후, 1-2% agarose gel 에서 전기 영동하여 그 존재를 확인하고, densitometric analysis 과정을 통해 결과를 정량적으로 분석하였다. 실험에 사용된 primer는 GenBank에 등록된 cDNA sequences를 기초로 computer program (DNA STAR, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 GC함량과 구조적 특성이 연구 목적에 적합하도록 고안하였으며, 각각의 생성물들은 GenBank에 등록된 cDNA의 서열과 비교 검증하기 위하여 sequencing을 실행하였다. 염기서열 과 생성물의 크기는 다음과 같았다: Cdc25A-F, 5'-GCCATTCTGATTCTCTTGAC-3'과 Cdc25A-R, 5'-CGGTTGTCAAGGTTTGTAGTTC-3' (272 base pairs, bp); Cdc25B-F, 5'-GCTTCCTCGCCGGTCAACCAC-3' 과 Cdc25B-R, 5'-TTCCCTGCGGCTGGCCCACTC-3' (483 bp); Cdc25C-F, 5'-CTGCTCCTGGAGAGAGACAC-3'과 Cdc25C-R, 5'-ATTCATCTGAAATCTCTTC TGCC-3' (210 bp); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-F, 5'-GGTCCGAGTCAA CGGATTTGGTTCG-3', GAPDH-R, 5'-TCCGACGCC TGCTTCAACCAC-3' (786 bp).

2) Western blot analysis를 이용한 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현

막자사발을 통해 분쇄시킨 자궁경부 조직 샘플들과 HeLa 세포주에 용해 완충제 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 넣고 용해 완충제 내에서 얼음에 10분간 배양한 후 4°C 원심분리기에서 14,000 rpm으로 가라앉힌 상층액을 통해 cell extract를 얻었다.

단백질 정량은 Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다. 이렇게 얻은 단백질은 환원제를 포함하는 mini-SDS-PAGE gel (8-10%)에 전기영동을 통해 분리시켰다. 전기영동 후 gel을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 상온에서 blotting한 후 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)로 2시간 상온에서 blotting하였다. 4°C에서 일차 항체 즉, Cdc25A

mAb, Cdc25B mAb와 Cdc25C mAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 그리고 GAPDH mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 하룻밤 처리하고, TBST 세척 완충제로 10분씩 3번 씻었다. 세척 후 이차 항체 anti-mouse IgG 또는 goat-polyclonal IgG (horseradish peroxidase conjugated antibody, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA, USA)를 상온에서 1시간 처리하고, TBST로 20분씩 3번 씻었다. 일차, 이차 항체는 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)에 1:1000으로 희석하여 사용하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL) reagents (Amersham Life Science, Buckingham-shire, UK) I 과 II를 1:1비율로 섞어 membrane과 1분 정도 반응시켰다. 반응이 완료된 membrane을 암실에서 X-ray film에 30초, 1분, 5분간 노출시켜 얻은 결과에서 단백질 양의 정량화를 위해 Image Reader LAS-1000 Lite software (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

3. 통계 분석

자료분석은 서술적 통계를 사용하였고, 통계학적 결과 분석은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램의 ANOVA test 및 student t-test 등을 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 자궁경부암 조직과 대조군에서 실시한 역전사 증합효소 연쇄반응을 이용한 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현

분리 정제된 RNA를 이용하여 역전사 증합효소 연쇄반응의 방법으로 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현을 측정하였다. GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 internal control로

사용하여 semiquantitative하게 각 유전자의 발현 정도를 비교한 결과 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현이 정상 자궁경부 조직에 비해 자궁경부암 조직에서 유의하게 증가되어 있었다 (Table 2). Cdc25B는 다른 Cdc25 phosphatase와 달리 3종류의 transcript variant 1~3이 있으며, 이중 Cdc25B1은 product size가 525 bp (NM_021873), Cdc25B2는 483 bp (NM_021872)이며 Cdc25B3는 402 bp이다. 본 연구에서는 Cdc25B1과 Cdc25B2의 두 가지 transcript variant를 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

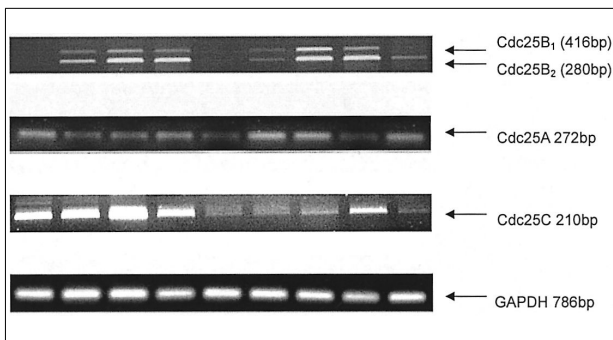


Fig. 1. Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C mRNA expression in cervical tissues by RT-PCR.

2. 자궁경부암 조직과 대조군에서 Western blot analysis를 이용한 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현

환자의 조직으로부터 분리, 정제한 단백질을 이용하여 Western blot analysis를 시행하였다 (Fig. 2). 정상 자궁경부 조직에 비해 자궁경부암 조직에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있었다 (Table 3).

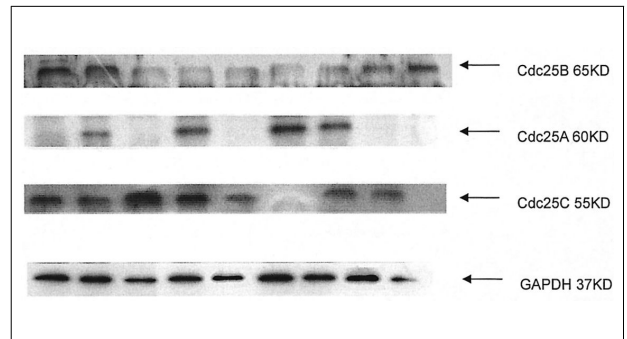


Fig. 2. Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C protein expression in cervical tissues by Western blot.

Table 2. mRNA quantification of Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in cervical tissue

Tissue	Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
		Mean±SD*	
Control (n=10)	0.34±0.26	0.10±0.05	0.43±0.33
Cervical carcinoma (n=39)	0.74±0.52 ^a	0.52±0.27 ^b	1.02±0.55 ^c

^a, p=0.02 (cervical carcinoma vs. control)

^b, p=0.01 (cervical carcinoma vs. control)

^c, p=0.002 (cervical carcinoma vs. control)

*SD: standard deviation

Table 3. Protein quantification of Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C in cervical tissue

Tissue	Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
	Mean±SD*		
Control (n=10)	0.26±0.32	0.22±0.21	0.32±0.26
Cervical carcinoma (n=39)	0.53±0.29 ^a	0.49±0.33 ^b	0.53±0.40 ^c

^a, p=0.01 (cervical cacinoma vs. control), ^b, p=0.02 (cervical cacinoma vs. control)

^c, p=0.01 (cervical cacinoma vs. control)

*SD: standard deviation

Table 4. Correlation between mRNA expression of Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C and various clinicopathological factors

	Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
	Mean±SD		
Age (years)			
≤50	0.89±0.58	0.43±0.26	1.19±0.61
>50	0.59±0.43	0.62±0.25 ^a	0.86±0.45
Stage			
I	0.76±0.65	0.51±0.25	0.94±0.58
II	0.69±0.41	0.54±0.30	1.05±0.57
III	0.92±0.79	0.52±0.15	1.17±0.29
Cell type			
SCC	0.74±0.55	0.53±0.26	1.08±0.54
Adenocarcinoma	0.70±0.28	0.48±0.34	0.50±0.37 ^b
Cell subtype			
LCK	0.87±0.61	0.53±0.32	1.10±0.57
LCNK	0.61±0.49	0.56±0.19	1.00±0.41
Other	0.80±0.32	0.39±0.36	0.91±0.97
SCC Ag level (ng/mL)			
≤1.0	0.85±0.54	0.55±0.24	0.92±0.70
>1.0	0.65±0.50	0.51±0.29	1.10±0.40
DNA flow cytometry			
Diploidy	0.65±0.53	0.54±0.28	1.07±0.58
Aneuploidy	0.94±0.47	0.48±0.25	0.91±0.49
LN metastasis			
Yes	0.82±0.48	0.48±0.24	0.96±0.44
No	0.68±0.55	0.55±0.29	1.06±0.62
LVSI			
Yes	1.02±0.50	0.52±0.29	1.20±0.44
No	0.69±0.52	0.53±0.27	0.99±0.57
HPV positivity			
Yes	0.70±0.54	0.53±0.28	1.00±0.54
No	0.93±0.44	0.48±0.17	1.10±0.66

^a, p=0.03, ^b, p=0.04

SD: standard deviation, SCC: squamous cell carcinoma, SCC Ag: squamous cell carcinoma antigen, LCK: large cell keratinizing type, LCNK: large cell nonkeratinizing type, LN: lymph node, LVSI: lymphovascular space invasion, HPV: human papilloma virus

3. 자궁경부암 조직에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 임상적 및 병리학적 예후인자들과의 상관관계

본 연구에서는 39예의 자궁경부암 환자에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 임상적 및 병리학적 소견과의 상관성을 보았다 (Table 4). 자궁경부암에

서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 임상적 및 병리학적 소견 (환자의 연령, 병기, 세포형태, 세포아형태, 혈청내 SCC Ag 수치, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과, 림프절 전이, 림프혈관 침범, 인유두종 바이러스 감염)과의 상관관계에 있어서 환자의 나이가 50세 이상인 경우에 Cdc25B mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 높았으며 (p=0.03), 세포형

Table 5. Correlation between protein expression of Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C and various clinicopathological factors

	Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
	Mean±SD		
Age (years)			
≤50	0.57±0.31	0.47±0.37	0.60±0.38
>50	0.50±0.28	0.51±0.28	0.46±0.41
Stage			
I	0.54±0.39	0.45±0.31	0.42±0.47
II	0.56±0.23	0.49±0.35	0.58±0.36
III	0.34±0.17	0.71±0.19	0.67±0.12
Cell type			
SCC	0.53±0.30	0.50±0.33	0.50±0.37
Adenocarcinoma	0.60±0.26	0.42±0.30	0.80±0.59
Subtype			
LCK	0.57±0.30	0.42±0.32	0.41±0.39
LCNK	0.49±0.30	0.59±0.32	0.55±0.36
Other	0.60±0.22	0.34±0.32	0.79±0.51
SCC Ag level (ng/mL)			
≤1.0	0.54±0.29	0.41±0.30	0.56±0.46
>1.0	0.53±0.30	0.55±0.34	0.50±0.36
DNA flow cytometry			
Diploidy	0.53±0.30	0.48±0.34	0.54±0.38
Aneuploidy	0.53±0.29	0.53±0.29	0.49±0.46
LN metastasis			
Yes	0.62±0.31	0.48±0.37	0.58±0.46
No	0.48±0.27	0.50±0.30	0.50±0.36
LVSI			
Yes	0.67±0.28	0.59±0.52	0.46±0.26
No	0.51±0.29	0.48±0.30	0.54±0.42
HPV positivity			
Yes	0.53±0.31	0.52±0.32	0.55±0.41
No	0.55±0.16	0.31±0.34	0.43±0.35

SD: standard deviation, SCC: squamous cell carcinoma, SCC Ag: squamous cell carcinoma antigen, LCK: large cell keratinizing type, LCNK: large cell nonkeratinizing type, LN: lymph node, LVSI: lymphovascular space invasion, HPV: human papilloma virus

태에 따라 분류하였을 때 편평상피세포암에서 Cdc25C mRNA 발현 ($p=0.04$)이 통계학적으로 유의하게 높다. 그러나 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C mRNA 발현과 다른 임상적 및 병리학적 예후 인자와는 통계학적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

4. 자궁경부암 조직에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현과 임상적 및 병리학적 예후인자들과의 상관관계

본 연구에서는 39예의 자궁경부암 환자에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현과 임상적 및 병리학적 소견과의 상관성을 보았다 (Table 5). 자궁경부암에서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현과 임상적 및 병리학적 소견 (환자의 나이, 병기, 세포형태, 세포아형태, 혈청 내 SCC Ag 수치, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과, 림프절 전이, 림프혈관 침범, 인유두종 바이러스 감염)과의 상관관계에 있어서 모두 통계학적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

고 찰

자궁경부암은 개발도상국뿐 아니라 전세계적으로 여전히 중요한 건강문제로 남아있다.¹⁸ 특히 후진국 및 우리나라에서는 여성생식기암의 제 1위를 나타내고 있으며 자궁경부암이 전체 국민의 복지에 미치는 영향은 매우 크다고 할 수 있다. 지난 20년간 자궁경부암의 원인에 관한 많은 연구가 이루어져 인유두종 바이러스 감염과 자궁경부암 발생과 연관성이 규명되었다. 현재도 자궁경부암에 대한 발암 기전과 연관된 표적 유전자 단백질들에 대한 연구가 계속되고 있으나 아직까지 명확한 자궁경부암의 발암기전은 밝혀지지 않았다.¹⁹

따라서, 본 연구에서는 정상 자궁경부 조직과 자궁경부암 조직에서 mRNA 수준에서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 발현 양상과 Western blot analysis를 이용한 단백질 수준에서의 발현 양상을 분석하였고, 자궁경부암에서 이들 세포주기 조절 인자들의 발현 양상과 임

상 병리학적 인자들과의 상관관계를 분석함으로써 예후 인자로서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 역할을 규명하고자 하였다.

모든 진핵 생물에 있어 M기의 개시 (mitotic onset)를 조절하는 보편적인 작용기전은 CDK의 효소활성 소단위체 (catalytic subunit)와 cyclin 복합체인 G2/M CDK를 통해 일어나며 Wee1 단백질인산화 효소와 Cdc25 단백질 탈인산화 효소에 의해 조절된다.

Dual specific phosphatase인 Cdc25 family는 세포주기 조절경로와 checkpoint 조절에 관여하는 중요한 세포주기 조절 단백질의 하나로 이것의 과발현이 다양한 종류의 암 발생과 연관되어 있다고 알려져 있다. 이중 Cdc25A는 G1/S기와 G2/M기의 전이를 조절하는데 좀 더 일반적인 역할을 하게 되며, Cdc25B와 Cdc25C는 G2/M기의 조절인자로 Cdk2/cyclin A, Cdk1/cyclin A, 그리고 Cdk1/cyclin B에 작용한다. Cdc25 phosphatases는 세포주기의 각각의 단계에서 발생하는 이온화 방사선 (ionizing irradiation), 적외선 (ultraviolet light, UV), 복제 억제제 (replication inhibitors) 및 DNA 손상 인자들에 대한 반응으로 특이적인 신호를 통합하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.^{19,20} 현재까지 진행된 연구들을 통해 Cdc25A와 Cdc25B는 난소암, 간암, 뇌종양, 유방암, 후두암, 폐암, 두경부암, 비호지킨성 임파종, 대장암 등 다양한 암에서 과발현된다고 알려져 있고 암세포 성장에 매우 중요한 효소로 증명되었다.²⁰ 자궁내막암 역시 Cdc25B 과발현과 연관이 있다고 보고되었다.²¹ 그러나 Cdc25C 과발현과 암발생과의 연관성은 아직 발표된 연구들이 많지 않다. 난소암, 대장암, 소세포 폐암 등에서 Cdc25C의 발현에 대한 연구 결과는 모두 연관성을 보이지 않았다고 보고되고 있다. 특히 Brogini 등은 106명의 난소암 환자를 대상으로 연구한 결과 Cdc25A와 Cdc25B는 거의 대부분의 난소암 환자에서 발현되는데 비해 Cdc25C는 80%의 환자에서만 발현이 되었다고 보고하였다. 또한 Cdc25A와 Cdc25B의 발현이 불량한 예후인자로 작용한다는 것을 알 수 있었다.²²⁻²⁴

본 연구는 자궁경부암에서는 처음으로 Cdc25A,

Cdc25B 및 Cdc25C의 발현에 대한 분석을 시도하였고, 이를 통해 예후 인자로서의 역할을 규명하고자 하였다. 자궁경부암의 예후 인자로 알려진 것들로는 환자의 연령, 임상병기, 암의 조직학적 분류, 병변의 크기, 침윤 깊이, 림프절 전이 등이 있다.²⁵

본 연구 결과에서는 정상 자궁경부 조직에 비해 자궁경부암 조직에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA와 단백질 발현이 유의하게 증가되어 있었으며, 자궁경부암에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 단백질 발현, 임상적 및 병리학적 소견 (환자의 연령, 병기, 세포형태, 세포아형태, 혈청 내 SCC Ag 수치, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과, 림프절 전이, 림프혈관 침범, 인유두종 바이러스 감염) 과의 연관성을 조사한 결과 환자의 연령이 50세 이상인 경우에 Cdc25B의 mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 높았으며, 세포형태에 따라 분류하였을 때 편평상피세포암에서 Cdc25C의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 높았다. 그러나 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 다른 임상적 및 병리학적 예후 인자들 간에는 통계학적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다. 이번 연구의 제한점으로는 연구 대상이 된 자궁경부암 환자수가 39명에 그쳤던 점과 임상적 및 병리학적 예후인자들 중 자궁경부암의 예후를 결정하는 종양크기, 자궁주위조직 침범 여부, 침윤 정도 등을 포함시키지 못한 점을 들 수 있다. 앞으로 자궁경부암 발암기전에서 세포주기 조절인자의 역할을 규명하기 위해서는 보다 더 많은 수의 조직표본과 생존 여부를 추적 관찰한 자료를 바탕으로 생존율에 관한 대규모의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

최근 들어서는 Cdc25 phosphatase 억제를 통해 암세포의 증식을 조절하려는 연구들이 진행되고 있다. 현재까지 NSC663284, NSC95397과 BN82685 등의 quinolone-derived 제제들이 Cdc25 inhibitor로써 알려져 있다.²⁶

본 연구를 종합해 볼 때 결론적으로 침윤성 자궁경부암에서 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C mRNA와 단백질의 과발현을 확인함으로써 자궁경부암의 발암 과정에

있어 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 중요한 역할을 할 가능성을 제시하였다. 그러나 Cdc25 phosphatase에 대한 억제 물질 및 불량한 예후를 예측하는 유용한 표지 물질로서의 가치에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. National Cancer Registry. Annual Report of the Korean Ministry of Health and Welfare 1999; 1: 112-31.
2. Zur Hausen H. Papilloma virus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 690-8.
3. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papilloma virus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. Cancer Res 2004; 64: 3878-84.
4. 박수현, 김영태, 김재욱, 김재훈, 김성훈, 윤보성 등. 동시 항암 화학방사선 치료를 받은 자궁경부암 환자에서 squamous cell carcinoma antigen과 예후와의 상관관계. 대한부인종양 콜포스코피학회지 2005; 16: 123-32.
5. Milde-Langosch K, Riethdorf S. Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. J Cell Physiol 2003; 196: 224-44.
6. Wu W, Fan YH, Kemp BL, Walsh G, Mao L. Overexpression of Cdc25A and Cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. Cancer Res 1998; 58: 4082-5.
7. Kang SH, Bang YJ, Jong HS, Seo JY, Kim NK and Kim SJ. Rapid induction of p21 Waf1 but delayed down regulation of Cdc25A in the TGF-beta-induced cell cycle arrest of gastric carcinoma cells. Br J Cancer 1999; 80: 1144-9.
8. Nurse P. Ordering of S phase and M phase in the cell cycle. Cell 1994; 79: 547-50.
9. Chen X, Prywes R. Serum-induced expression of Cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression. Mol Cell Biol 1999; 19: 4695-702.
10. Galaktionov K, Beach D. Specific activation of Cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. Cell 1991; 67: 1181-94.
11. Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, et al. Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes. Science 1995; 269: 1575-7.
12. Gabrielli BG, De Souza CP, Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA. Cytoplasmic accumulation of Cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. J Cell Sci 1996; 109: 1081-93.
13. Gasparotto D, Maestro R, Piccinin S, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro, S, et al. Overexpression of Cdc25A and Cdc25B in head and neck cancers. Cancer Res 1997; 57: 2366-8.
14. Nishioka K, Doki Y, Shiozaki H, Yamamoto H, Tamura S, Yasuda T, et al. Clinical significance of Cdc25A and Cdc25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus. Br J Cancer 2001; 85:

- 412-21.
15. Kudo Y, Yasui W, Ue T, Yamamoto S, Yokozaki H, Nikai H, et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating Cdc25B phosphatase in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 947-52.
 16. Dixon D, Moyana T, King MJ. Elevated expression of the Cdc25A protein phosphatase in colon cancer. *Exp Cell Res* 1998; 240: 236-43.
 17. Kudo Y, Yasui W, Ue T, Yamamoto S, Yokozaki H, Nikai H, et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating Cdc25B phosphatase in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 947-52.
 18. Raquel C, Ana M, Daniela P, Deolinda P, Rogéria C, André V, et al. Increased risk of cervical cancer associated with cyclin D1 gene A870G polymorphism. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 160: 49-54.
 19. 박종섭. HPV E6, E7 발암단백질과 연관된 자궁경부암의 발생 기전. *생화학·분자생물학소식* 2005; 12: 44-9.
 20. Kristjansdottir K, Rudolph J. Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* 2004; 11: 1043-51.
 21. Wu W, Slomovitz BM, Celestino J, Chung L, Thornton A, Roshak A. Coordinate expression of Cdc25B and ER-alpha in low-grade endometrioid endometrial carcinoma but uncommon in high-grade endometrioid and nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 6195-9.
 22. Brogginì M, Buraggi G, Brenna A, Riva L, Codegoni AM, Torri V, et al. Cell cycle-related phosphatases Cdc25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anticancer Res* 2000; 20: 4835-40.
 23. Hernandez S, Bessa X, Bea S, Hernandez L, Nadal A, Mallofre C, et al. Differential expression of Cdc25 cell-cycle-activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab Invest* 2001; 81: 465-73.
 24. Savitsky PA, Finkel T. Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem* 2002; 277: 20535-40.
 25. Tiltman AJ. The pathology of cervical tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2005; 19: 485-500.
 26. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 185-91.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 자궁경부암에서 세포주기 조절인자인 cell division cycle (Cdc) 25A, Cdc25B 및 Cdc25C 발현 양상을 정량적으로 측정하여 이들이 자궁경부암의 발암과정에서 어떠한 역할을 하는지를 규명하며 아울러, 자궁경부암의 여러 다른 임상적 및 병리학적 예후 인자와 상관관계가 있는지를 연구하고자 하였다.

연구 방법: 본원 산부인과에서 2000년 2월부터 2005년 3월까지 수술적 치료를 받은 환자를 대상으로 하여 신선 자궁경부 조직을 얻었다. 역전사 중합요소 연쇄 반응과 Western blot analysis를 이용하여 각각 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA와 단백질 발현 양상을 확인하였다.

결과: 자궁경부암 조직에서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현은 정상 자궁경부 조직보다 모두 통계학적으로 유의하게 높았으며 ($p=0.02, 0.01, 0.02$), Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 단백질 발현 양상도 자궁경부암 조직에서 정상 자궁경부 조직에 비해 모두 통계학적으로 유의하게 높은 결과를 보였다 ($p=0.01, 0.02, 0.01$). 또한 자궁경부암에서의 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA 발현과 단백질 발현을 임상적 및 병리학적 예후 인자들에 따라 비교한 결과 환자의 연령과 Cdc25B mRNA 발현 ($p=0.03$), 세포 형태와 Cdc25C mRNA 발현 ($p=0.04$) 사이에서는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였으나 그 외의 인자들인 세포아형태, 혈청내 squamous cell carcinoma antigen (SCC Ag) 수치, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과, 림프절 전이, 림프혈관 침범, 인유두종 바이러스 감염 등과는 통계학적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

결론: 본 연구 결과에 따르면 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 대조군인 정상 자궁경부 조직에 비해 자궁경부암 조직에서 통계학적으로 유의하게 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 자궁경부암의 발생기전에 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 중요한 역할을 할 가능성을 제시하였다. 또한 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C의 mRNA와 단백질 발현은 환자의 연령이 50세 이상인 경우에 Cdc25B mRNA 발현이 유의하게 높았으며 ($p=0.03$), 세포형태에 따라 분류하였을 때 편평상피세포암에서 Cdc25C mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 높았다 ($p=0.04$). 그러나, 다른 예후 인자들과는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 향후 Cdc25A, Cdc25B 및 Cdc25C가 자궁경부암의 유용한 예후 인자로 사용되기 위해서는 향후 생존율과 연관된 연구가 추가로 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

중심단어: 자궁경부암, Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C, RT-PCR, Western blot analysis