

방사선치료가 시행된 자궁경부암환자에서
Hypoxia Inducible Factor - 1 α 및
세포주기관련 인자의 발현

연세대학교 대학원
의 과 학 과
표 주 연

방사선치료가 시행된 자궁경부암환자에서
Hypoxia Inducible Factor - 1 α 및
세포주기관련 인자의 발현

지도교수 조 남 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

표주연

표주연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2007 년 6 월 일

감사의 글

이 작은 논문이 완성되기까지 얼마나 많은 사람들의 관심과 배려와 사랑이 함께했는지 그저 놀라움과 기쁨을 감출 수가 없습니다. 가장 먼저 항상 감사할 일들로 삶을 풍성하게 이끌어 주시는 하나님께 감사 드립니다. 늘 뜨거운 열정과 세심한 배려와 통찰력으로 지도해 주시며 끝까지 할 수 있다는 자신감을 불어넣어 주신 조남훈 교수님, 아낌없는 조언을 해주시고 더 나은 방향으로 지도해주시며 격려를 아끼지 않으신 김영태, 조재호 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

포기하려 했을 때 큰 힘이 되어 주신 홍순원 교수님, 부족 하지만 작은 일 하나까지 배려해주시고 격려해 주신 양우익 교수님과 김세훈 교수님 및 여러 교수님께도 감사 드립니다. 또한 조언을 아끼지 않고 자신감을 갖게 해 준 소중한 선배인 석재연, 권지은, 이윤희 선생님, 힘든 가운데서도 고민을 함께 해주고 큰 힘이 되어준 동기인 김현기, 박종필 선생님과 김상겸, 최준정, 김민주, 김도경, 정요셉 선생님께 그리고 바쁜 업무에도 가르침과 조언을 아끼지 않은 병리학 교실 여러분들께도 감사의 마음을 전합니다.

한결 같은 믿음과 헌신적인 섬김과 기도로서 지켜봐 주시는 사랑하는 어머니, 항상 보고 싶지만 천국에서 기뻐하실 아버지, 사랑하는 동생들과 윤섭에게도 사랑과 기쁨의 마음을 전합니다.

저자 씀

차 례

국문요약

I. 서론	2
II. 재료 및 방법	7
1. 환자군 설정 및 임상정보 수집	7
2. 병리학적 검색 및 tissue microarray 의 제작	8
3. 면역조직화학 염색 및 결과 판정	9
4. 통계학적 분석	11
III. 결 과	12
1. 임상정보	12
2. 조직학적 소견	14
3. 면역조직화학 염색 결과	15
4. 자궁경부암의 임상적, 병리학적 인자와 면역조직화학 염색 결과 비교	20

5. 자궁경부암의 생존에 영향을 미치는 예후 인자 분석	
.....	21
IV. 고찰	23
V. 결론	26
참고문헌	27
영문요약	32

그림 차례

Figure 1. Histologic type of cervical carcinoma	14
Figure 2. Expression of HIF - 1 α in cervical carcinoma.....	17
Figure 3. Expression of cyclin A1 and cyclin B1 in cervical carcinoma.....	18
Figure 4. Scatter diagram of HIF - 1 α & cyclin B1.....	19
Figure 5. Scatter diagram of cyclin A1 & cyclin B1.....	19
Figure 6. Overall survival of uterine cervical carcinoma according to pelvic lymph node metastasis.....	21

표 차례

Table 1. The distribution of patients according to clinical characteristics.....	13
Table 2. Chi-square tests of clinical, pathological factors and HIF-1 α	20
Table 3. Survival analysis of clinical factors & immunohistochemical markers for HIF - 1 α	22

국문요약

방사선치료가 시행된 자궁경부암환자에서 hypoxia inducible factor - 1 α 및 세포주기관련 인자의 발현

종양저산소 상태를 반영하는 내적 인자 중 하나인 hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)는 조직 내 저산소상태에서 과발현 되며, 2 기말 이상의 자궁경부암의 경우 HIF-1 α 의 발현이 방사선치료의 실패 및 나쁜 예후와 관련이 있다는 보고가 있다. 또한 HIF-1 α 전사인자가 세포주기의 조절에도 영향을 준다고 한다.

이번 연구에서는 1994 년부터 2005 년까지 자궁 경부 생검 결과 자궁 경부암으로 진단받고 방사선치료를 시행한 743 명의 환자들 중 병리학적 검색이 충분하고 가능한 57 명의 자궁경부 조직을 이용하여 tissue microarray 를 제작하고, HIF-1 α 와 세포주기 조절인자인 cyclin A1 및 cyclin B1 의 면역조직화학염색을 시행하여 이들의 발현을 살펴보고, 자궁경부암의 임상적, 병리학적 특징과의 관계 및 예후와의 관계를 알아보았다.

면역화학염색 결과 HIF-1 α 의 종양 내 평균 발현율은 42.8%로 조직 내 발현양상은 괴사에 인접한 종양세포에서 양성반응을 보이고 종양세포의 등지의 크기가 클 수록 발현강도가 증가하며 전방의 침윤성 변연부에서 특히 강한 발현을 보였다. HIF-1 α 와 세포주기인자의 발현 모두 방사능치료 예측인자 혹은 예후 인자로서의 의미는 확인할 수 없었다.

결론적으로 HIF-1 α 의 방사선치료 전 치료 반응성 및 예후 평가의 지표로서의 의의는 없지만 같은 병기 내에서도 조직 내 HIF-1 α 발현의 다양성을 확인할 수 있었다.

핵심되는 말: 자궁경부암, 방사선치료, HIF-1 α , cyclin A1, cyclin B1

방사선치료가 시행된 자궁경부암환자에서
hypoxia inducible factor - 1 α 및 세포주기관련 인자의 발현

<지도교수 조남훈>

연세대학교 대학원 의학과

표 주 연

I. 서 론

자궁경부암은 최근 상대적 빈도가 감소하는 추세를 보이지만 한국여성에서 발생하는 전체 악성 종양 중 5 위를 차지하고 있으며¹, 2기말 이상의 진행된 병기의 환자에서는 근치적 수술이 불가능 하거나 수술 적 치료 시 높은 국소 재발률을 보이기 때문에 방사선 치료 가 주된 치료 방법으로 사용된다.

방사선 치료를 시행하는 여러 장기의 고형성 종양에서 저산소 (hypoxia) 상태인 부위가 존재한다는 것을 산소자를 이용하여 조직

내의 산소농도를 측정하여 알아냈고, 종양저산소 상태가 방사선치료 후의 나쁜 결과와 직접적인 연관이 있음을 밝힌 바 있다. 자궁경부암 뿐 만 아니라 두경부 종양 등에서 방사선 치료의 효과 및 예후와 관련이 있는 다른 여러 요인들도 알려져 있으며, 특히 종양저산소 상태는 치료의 저항성 증가, 높은 침투력 및 전이력을 갖는, 낮은 생존율을 보이는 악성 암과의 연관성이 높다고 알려져 있다. ²⁻⁷

종양저산소 상태와 관련하여 소개된 바 있는 내적 인자 중 하나인 hypoxia inducible factor 1 α (HIF - 1 α) ⁸ 는 과발현 시 여러 암에서 치료 실패 및 사망률과 연관성을 보인다고 소개되고 있다. ⁹ HIF - 1 는 종양세포가 세포 내 저산소 상태일 때 이에 대한 적응과 관련하여 혈관신생 (angiogenesis), 당전달(glucose transport) 및 적혈구생성(erythropoiesis)에 필요한 주요 단백질을 부호화하는 표적 유전자에 대한 전사인자로 세포 내 산소 박탈 (O_2 deprivation)에 대해 생리적으로 반응하여 산소 항상성 (O_2 homeostasis)을 조절하게 된다. HIF - 1 는 α - 소단위와 β 소단위로 구성된 이질이합체 (heterodimer)이다. β - 소단위는 전위에 대해서 예민하게 반응하며,

α - 소단위는 산소농도에 예민하게 반응하여 정상 산소상태에서는 hif - 1 α 단백질 수분 안에 분해 되지만 저산소 상태에서는 안정화 되고 상향 조절되어 높게 유지 된다. ¹⁰

이러한 종양내 저산소 상태를 잘 반영하는 HIF - 1 α 단백질 과발현 될수록 종양세포들이 저산소 상태에 잘 견디게 되어, 방사선 치료의 성적은 좋지 않으며, 결국 나쁜 예후와 관련 있을 것이라는 예측을 하게 되었고, 두경부암 및 자궁경부암에서 방사선치료 전의 생검 조직에서 HIF - 1 α 단백질 과발현 될수록 예후가 나쁘다는 연구들이 나오고 있다. ^{9, 11 - 12}

세포의 증식은 cyclin 과 cyclin-dependent kinase(cdk)로 구성된 단백질복합체에 의해 조절되는 세포주기와 관계되며, 이들 단백질복합체 중 S 기와 관련된 cyclin A1 과 G₂/M 기의 cyclin B1 이 과발현 되는 경우 자궁경부암의 나쁜 예후와 연관성이 있다는 보고가 있다. ¹⁵⁻¹⁶

세포주기 조절과 관련하여서 세포내 저산소 상태일 때 세포의 증식이 영향을 많이 받게 되는데, 이는 p53 경로를 통한 세포예정사 과정의 하나로 또는 G₁/S 기의 경계선에서 증식이 지연됨으로써

조절된다고 한다. ¹⁸ 저산소 상태에서 G₁ 기에서의 세포 증식의 지연은 cyclin 과 cdk 로 구성된 단백질복합체의 활성도가 떨어지면서 retinoblastoma protein(Rb)이 저인산화 되어 세포주기의 진행이 어려워지면서 일어난다고 보고하고 있다. ¹⁹

이들 세포주기와 HIF-1 α 의 상관관계는 Nobuhito Goda 등은 *in vitro* 에서 생쥐의 배아섬유모세포와 비장의 B 림프구의 두 가지 세포에서 HIF-1 α 와 p53 을 대상으로 이중발현저하 세포주를 만들고 정상산소상태와 저산소 상태에서의 세포주기억제현상을 관찰 하였으며 HIF-1 α 가 없는 세포주는 저산소 환경에서도 세포의 증식이 계속되었고, 세포내 저산소 상태와 관련하여 HIF - 1 α 전사인자가 세포주기 지연의 주요한 조절인자라고 하였다. ²⁰

자궁 경부암의 방사선 치료를 시행한 환자의 조직표본을 이용한 세포주기 조절과 HIF-1 α 의 상관관계에 관한 연구는 아직 시도된 바 없다.

이번 연구에서는 방사선치료의 예민도 표지자로서의 HIF - 1 α 의 발현과 세포주기 조절인자인 cyclin A1 및 cyclin B1 의 발현을 면역화학염색을 통해 알아보고, cyclin A1 및 cyclin B1 과 HIF-

1a와의 연관성과 미리 알려진 자궁경부암의 방사선치료와 관련한
예후인자 중 병기, 종양의 크기와 림프선의 전이 여부 등과의
상관관계를 확인하고자 하며 아울러 치료 반응성 및 예후 평가의
지표로서 가치가 있는지 살펴보고자 한다.¹⁴

II. 재료 및 방법

1. 환자군 설정 및 임상 정보 수집

연세대학교 의과대학 부속 신촌 세브란스 병원에서 1994 년부터 2005 년까지 자궁 경부 생검 결과 자궁 경부암으로 진단받고 방사선치료를 시행한 743 명의 환자들 중 병리학적 검색이 충분하고 가능한 57 예를 대상으로 하였다. 환자의 임상 기록지를 참고하여 진단 당시의 나이, 종양의 크기 및 림프절 전이 여부, International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO)병기, 방사선 소견, 방사선 치료의 기간, 농도, 추적 관찰 기간, 재발 혹은 사망 여부, 동반된 합병증의 유무 및 종류 등을 조사하였다.

2. 병리학적 검색 및 tissue microarray 의 제작

1) 병리조직 염색 및 관독

편치생검 또는 원추 생검한 자궁경부 조직을 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀 포매하고 4 μm 의 두께로 박절하여 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였다. 광학 현미경 검색을 통해 조직학적 타입, 분화도, 종양괴사 등의 조직학적 소견을 관찰하였다.

2) Tissue microarray 의 제작

10% 중성 포르말린에 12 시간 이상 고정 후 일련의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 보관된 조직을 이용하였고, 각 증례의 대표적인 파라핀 블록의 종양조직에서 조직 심을 취하여 tissue microarray (TMA)를 제작하였다. 조직 심의 직경은 2mm 로 하고 하나의 파라핀 블록에 42 개의 조직 심이 포함되도록 제작하였다.

3. 면역조직화학 염색 및 결과 판정

TMA 블록과 대표적인 파라핀 블록을 4 μm 의 두께로 박절하여 오븐에서 파라핀을 녹인 후 자일렌으로 파라핀을 완전히 제거하였다. 에틸 알코올로 단계적으로 함수하였고, 조직 절편을 0.3% 과산화수소수에 10 분간 담근 후 pH 6.0 의 구연산 완충액에 담가 극 초단파에 15 분간 처리하여 실온에서 식혔다. 1:100 으로 희석한 일차 항체인 항 HIF - 1 α , cyclin A1, cyclin B1 항체를 상온에서 약 30 분간 반응시킨 후, 냉장고에서 12 시간 배양하였다. EnVision kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)를 이용한 EnVision 항체 복합체 방법으로 면역과산화효소 염색을 시행하였다. 3,3-diaminobenzidine tetrachloride chromogen (DA B)으로 발색한 후 헤마톡실린으로 대조염색 하였다.

HIF - 1 α 은 종양세포의 세포핵에 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 판정하여, 염색의 정도와 강도에 따라서 종양세포의 밀도가 높고 염색이 잘된 3~5 개의 고배율 (x400) 현미경 시야에서 500 개의 종양세포 중에서 핵 및 세포질에 염색되는 경우를 양성으로 판정하여 그 양성인 세포의 수를 세어 백분율을 구하였고

전체 종양의 10% 미만에서 양성 반응을 나타내는 경우를 1+, 10%이상 50%미만에서 약양성 및 중등도 양성 반응을 나타내는 경우는 2+, 50% 이상에서 양성반응을 나타내는 경우는 3+로 판독하였다.

Cyclin A1 과 cyclin B1 도 종양세포의 밀도가 높은 3~5 개의 고배율 (x400) 시야에서 500 개의 종양세포 중에서 핵 및 세포질에 염색되는 경우를 양성으로 판정하여 그 양성인 세포의 수를 세어 백분율을 구하였다.

Cyclin A1과 Cyclin B1은 정상 상피세포에 양성반응을 보이는 30% 미만까지를 음성군으로 분류하였고, 30% 이상에서 염색된 경우를 양성군으로 분류하였다.

4. 통계학적 분석

SPSS 프로그램 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA, ver.13.0)을 이용하여 임상적 인자 (진단 당시 연령, 종양의 크기, 모양, 병기, 재발 여부)와 면역조직화학 염색 인자간의 관계는 chi-square 검정 또는 Fisher' s exact 검정으로 분석하였다. 각 임상적, 면역조직화학적 인자들과 생존율과의 관계는 단변량 분석하였고, Multivariate Cox proportional hazard model을 이용하여 다변량 분석하였다. 생존기간은 진단 당시 날짜로부터 자궁경부암으로 인한 사망일 까지를 개월로 계산하였다.

III. 결과

1. 임상정보

암상 자료는 Table 1에 요약하였다. 연령분포는 31세에서 79세까지였으며, 평균 나이는 58.75세였다. 57예 중 34예는 진단 당시 FIGO stage가 2기 이상이었으며, 4예에서 골반임파선전이 있었다. 대부분의 경우(50예)에서 종양은 침윤형 이었다. 추적 관찰 기간은 14개월에서 108개월로 평균 추적 관찰 기간은 51.4개월이었다. 방사선 치료 후 55에서는 완전완화(complete remission) 되었고, 2예에서 부분완화 되었다. 추적 관찰 기간 중 5예에서 재발하였으며, 3예가 자궁 경부 및 질에서의 국소 재발이었다. 합병증이 생긴 경우는 모두 18예였다.

Table 1. The distribution of patients according to clinical characteristics

Clinical factor	No. of patients	Median	Range
Age (yr)	57	58.75	31-79
Gross type			
exophytic	7		
infiltrative(endophytic)	50		
Size (cm)			
1-3	37	3	1-10
≥ 4	20		
FIGO ¹ stage			
IB	23		
IIA-IIB	31		
IIIA-IIIV	2		
IVA	1		

¹ FIGO: International Federation of Gynecologists and Obstetricians

2. 조직학적 소견

조직학적 유형은 51예에서 편평세포암종 이었고, 6예는 샘암종 이었다. 편평세포암종 중 44예는 대세포형 이었으며, 이 중 14예에서 각화현상을 보였다 (Fig. 1).

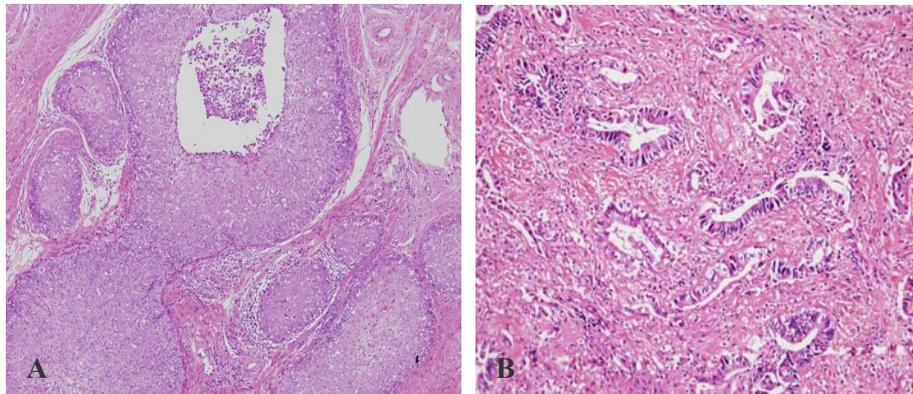


Fig. 1. Histologic type of cervical carcinoma. A. Invasive squamous cell carcinoma, non-keratinizing type. (Hematoxylin-eosin, x100) B. Invasive adenocarcinoma, moderately differentiated, mixed endocervical and intestinal type. (Hematoxylin-eosin, x100)

3. 면역조직화학 염색 결과

자궁경부의 생검 또는 원추 생검된 조직으로 면역화학염색을 시행한 결과 HIF - 1 α 의 종양세포에서의 표현율은 3%에서 96%까지였고, 평균은 $42.77 \pm 35.7\%$ 였다. HIF - 1 α 는 종양세포뿐만 아니라 외자궁경부, 내자궁경부, 및 기질의 혈관내피세포에서도 핵에 염색되었으며 (Fig. 2A), 기질의 혈관에서는 위치에 따라서도 다양하게 나타났다으나 혈관의 직경이 작을수록 더 강하게 염색되는 양상을 보였다. 정상 자궁경부세포는 염색되지 않았으나 (Fig. 2B) 자궁경부샘의 비종양성 증식이 있는 부위에서는 예비세포 (reserve cell)에만 염색되었고 (Fig. 2B), 자궁경부의 샘암종에서는 강하게 염색되었다 (Fig. 2C). 외자궁경부의 정상 편평상피 세포층에서는 parabasal cell 과 intermediate cell에서만 염색되었고, 발암과정의 자궁목상피내종양(cervical intra-epithelial neoplasia), 상피내암종의 경우 대부분의 종양세포가 강하게 염색되었다. 침윤성 암종에서는 종양세포의 괴사가 동반된 경우와 침윤방향에 따른 위치 및 종양세포의 등지의 크기에 따라 다양한 염색 양상을 보였다. 괴사된 종양세포에서는 염색되지 않았으나 괴사부위 주변의 종양세포에서 약양

성을 보였다 (Fig. 2D). 침윤성 종양의 전방 변연부는 강하게 염색되었고 (Fig. 2E & F), 종양세포의 등지의 크기가 클 수록 발현의 정도와 강도가 증가하였다 (Fig. 2G). 이러한 HIF - 1 α 의 염색 양상은 종양저산소 상태를 반영하는 내적 인자로서의 기능을 반영한다고 볼 수 있다.

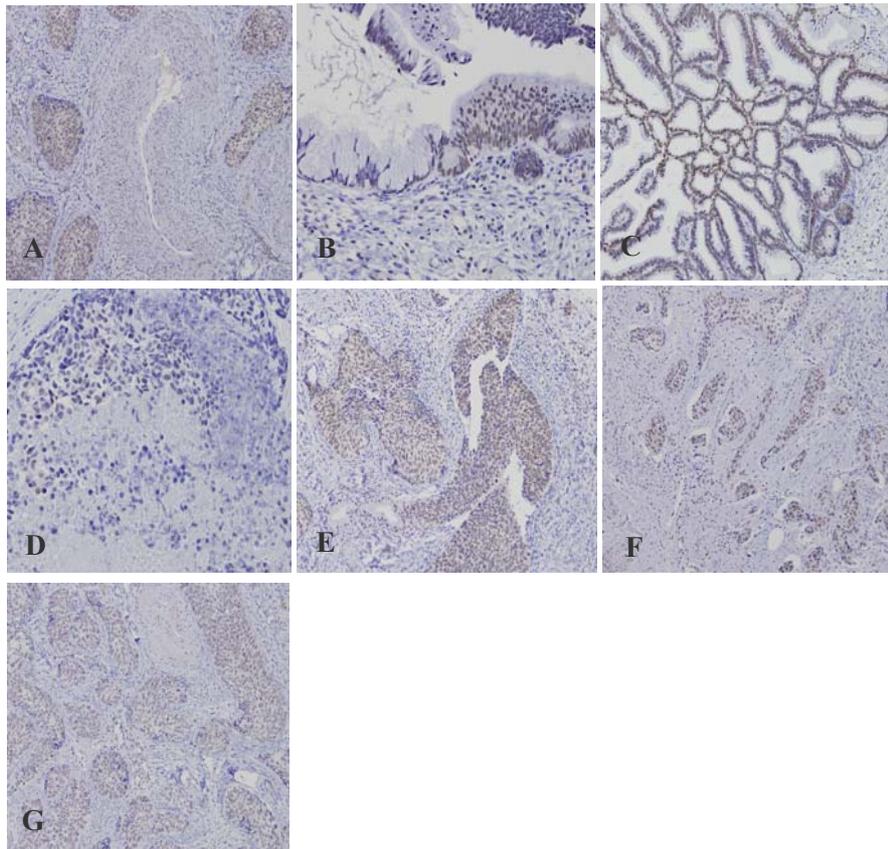


Figure 2. Expression of HIF-1 α in cervical carcinoma. A: Blood vessel & tumor cell nests (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x100). B: Endocervical gland and proliferative lesion (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x100). C: Endocervical adenocarcinoma (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x100). D: Necrotic area (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x200). E & F: Invasive front margin (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x100). G: Variable tumor cell nests (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, x100). (HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 α)

cyclin A1은 핵과 세포질에서 발현되었으며 5%에서 100%까지 발현 되었으며, 평균은 $41.77 \pm 31.8\%$ 였다. cyclin B1도 cyclin A1과 유사 하게 3%에서 100%까지 발현되었으며, 평균은 $42.95 \pm 36.3\%$ 였다 (Fig. 3).

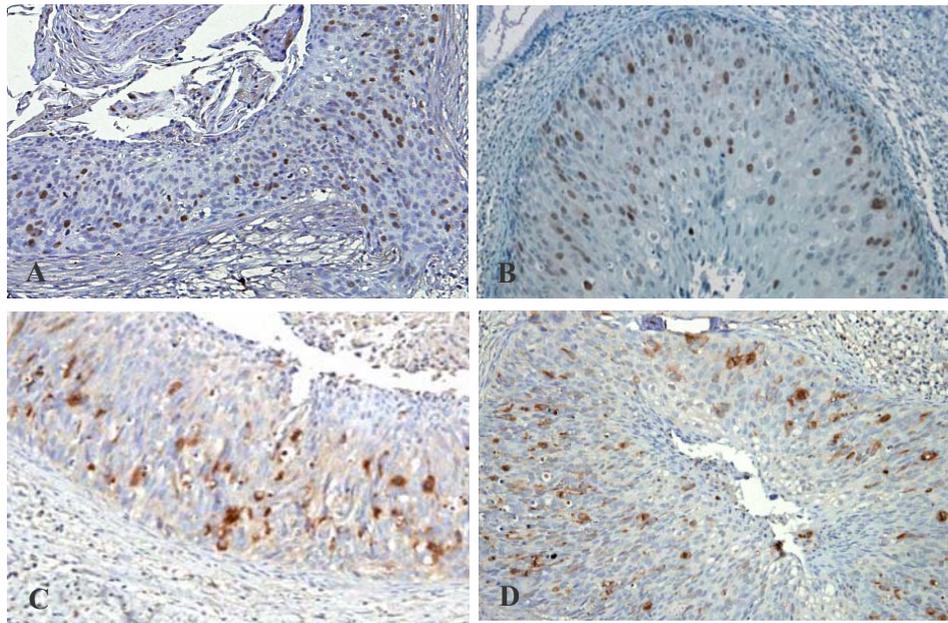


Fig. 3. Expression of cyclin A1 and cyclin B1 in cervical carcinoma. Cyclin A1 (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen, A & B, x200), cyclin B1 (Diaminobenzidine tetrachloride chromogen C & D, x200) show nuclear and cytoplasmic expression.

면역조직화학 염색 인자들은 HIF - 1a와 cyclin B1(Fig. 4), cyclin A1과 cyclin B1이 서로 양의 상관관계를 보였다(Fig. 5).

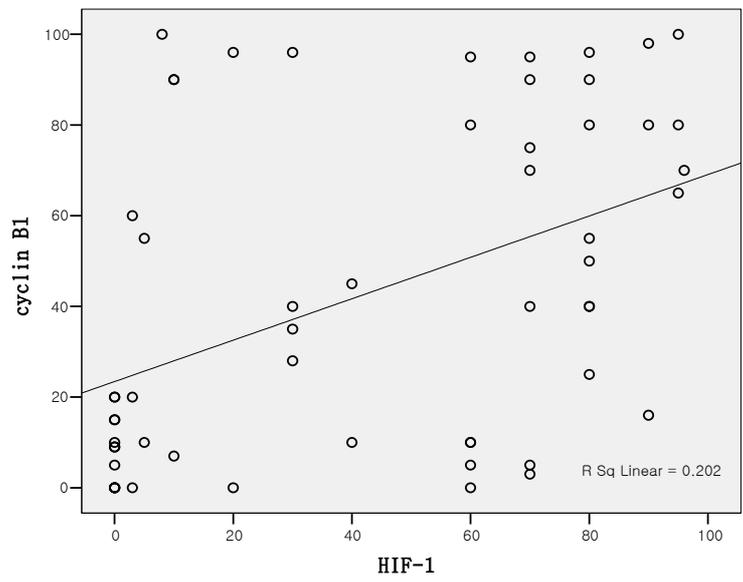


Fig. 4. Scatter diagram of HIF-1a & cyclin B1.
Correlation coefficient 0.449, $p < 0.05$.

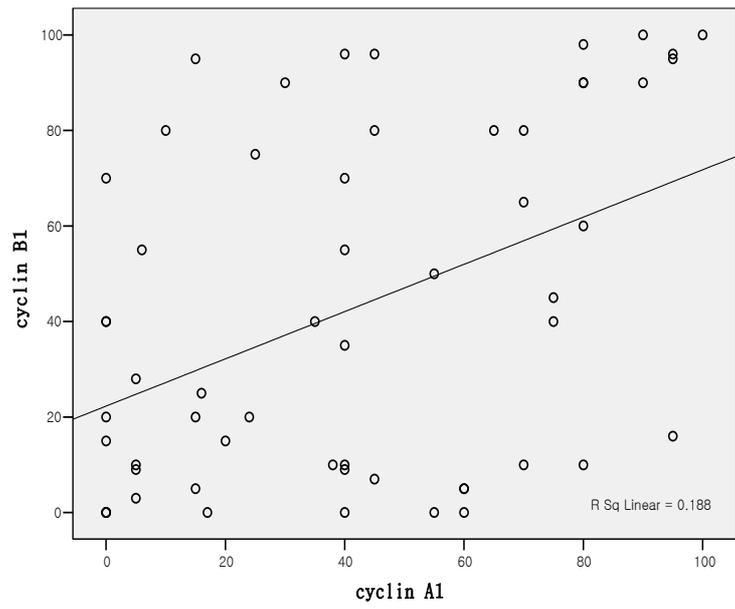


Fig. 5. Scatter diagram of cyclin A1 & cyclin B1.
Correlation coefficient 0.434 $p < 0.05$.

4. 자궁경부암의 임상적, 병리학적 인자와 면역조직화학 염색 결과 비교

HIF - 1 α 는 종양이 돌출형인 경우보다 함몰형인 경우에서 더 많이 발견되었다 ($p = 0.024$). 다른 임상적인 인자와 병리학적 인자와는 통계적으로 유의하지는 않았다 (Table 2). Cyclin A1 및 cyclin B1 과 임상적, 병리학적 인자들과도 통계적으로 유의하지 않았다.

Table 2. Chi-Square tests of clinical, pathological factors and HIF-1 α

Variables	P-value
Histologic type	0.430
Tumor shape	0.024 *
Tumor size(<4/ \geq 4)	0.087
Endocervical extension	0.141
FIGO stage(<III A/ \geq III A)	0.229
Complication(N/Y)	0.099
Response to radiotherapy	0.242

* $p < 0.05$

5. 자궁경부암 환자의 생존에 영향을 미치는 예후 인자 분석

Log-rank 검정으로 단변량 분석을 한 결과, 생존율은 골반임파선전이 있는 경우(Fig. 6)와 FIGO stage가 IIIA 이상인 경우 낮았다. Cyclin A1이 음성이거나 15%미만 이하에서 발현한 경우, cyclin B1도 음성이거나 30% 미만에서 발현한 경우는 생존율이 낮은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 3).

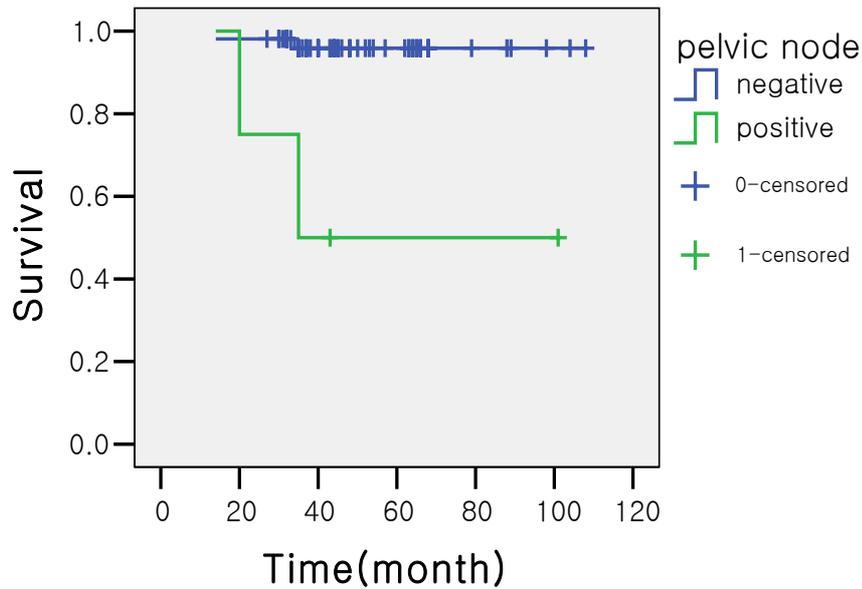


Fig. 6. Overall survival of uterine cervical carcinoma according to pelvic lymph node metastasis. Kaplan-Meier method, log rank test. P=0.001

Table 3. Survival analysis of clinical factors & immunohistochemical markers for uterine cervical carcinoma (Log rank test)

	Variables	P-value
Clinical factors	Age	0.824
	Histologic type	0.135
	Tumor shape	0.319
	Tumor size(<4/≥4)	0.068
	Endocervical extension	0.272
	Hemoglobin level	0.294
	FIGO stage(<III A/≥ III A)	0.043*
	N stage (pelvic node -/+)	0.001*
	Complication(N/Y)	0.139
Immunohistochemical markers	HIF - 1 α	0.532
	Cyclin A1(<15%/≥ 15%)	0.100
	Cyclin B1(<30%/≥ 30%)	0.273

* p<0.05

Multivariate Cox proportional hazards model을 이용하여 다변량 분석을 한 결과, 생존율에 영향을 미치는 임상적 인자로는 N stage가 있었으며, 면역조직화학적 인자는 통계적으로 유의하지 않았다.

IV. 고찰

국소적 진행성자궁경부암환자에서 종양내 산소상태와 HIF-1 α 의 발현 정도와의 관계, 예후인자로서 의미를 지직한 연구는 소수이지만 진행되어 왔다. HIF-1 α 의 종양에서의 발현 양상은 자궁경부암을 포함한 거의 대부분의 고형성 종양에서 다양하고 이질적이라고 보고하고 있으며, Katherine 등²⁴도 여러 종류의 종양 및 정상조직에서의 HIF-1 α 의 발현에 대해 면역화학염색, Western blot, 동소부합결합 (in situ hybridization)으로 검사한 결과 다른 연구에서처럼 종양부위에서의 HIF-1 α 의 발현 정도와 강도는 다양하다고 하였다. 또한 정상조직에서의 발현이 종양에 비해 현저히 떨어진다는 점은 HIF-1 α 의 종양의 진단적 또는 치료적 지표로서의 의미를 생각해 볼 수 있다는 지적을 하기도 하였다. 본 연구에서도 자궁외경부의 정상 중층편평상피와 자궁내경부의 원주상피에는 염색이 되지 않았지만 인유두종바이러스 감염 및 전암 병변에서는 염색되었으며, 자궁경부암 조직에서는 다양한 염색 양상을 보였다.

Haugland 등은 종양내저산소상태 일수록 HIF - 1 α 발현이 증가 하지만 예후 인자로서의 통계적인 유의성은 없다고 하였으나¹⁷, Bachtary 등은 오히려 HIF - 1 α 가 과발현 될수록 나쁜 예후 인자로서 유의한 결과를 보였다고 하였다.

이후에도 Burri 등은 병기 IB-IVA 의 78예를 대상으로 한 연구에서 환자의 94%에서 HIF - 1 α 가 발현되었으며 Kaplan-Meier 생존분석에서 강하게 발현 될수록 나쁜 예후를 보인다고($p=0.01$, log-rank) 하였으며¹², Mayer 등은 38예의 자궁경부 편평세포암에서 HIF - 1 α 의 발현이 산소농도와 상관없이 없으며 이에 종양저산소 상태를 반영하는 지표로서의 의미가 없고, 예후인자로서의 의미도 없다고 하였다.²³

이렇게 여러 연구의 결과들이 서로 다른 것에 대해 Haugland 등은 HIF - 1 α 가 조직 내 산소상태의 변화에 빨리 반응하는 특성 상 생검된 검체의 고정 시간 및 고정 용액의 차이에 따라 HIF - 1 α 의 발현이 달라진다는 지적을 한 적이 있으며¹⁷, HIF - 1 α 의 산소농도에 따른 변화의 민감한 정도가 환자마다 다를 수 있다는 점, 한 종양에서도 부위마다 염색의 정도와 강도가 다른 점, 이에 대한 염색의 판정의 차이, 환자 군의 자궁경부암의 조직학적 타입의 분포가 연구

표본마다 다른 점 등으로 설명할 수 있을 것이다.

이번 연구에서도 57예 중 51예 (89%)가 편평세포암종 이었고, 37예에서 TMA를 이용하여 면역화학염색을 진행하였다. 면역화학염색결과와 생존율과는 연관성이 없다는 결과를 얻었으나 위에서 설명한 대로 여러 연구에서도 일치된 결과를 보이지 않은 점을 감안하면 이러한 결과도 의미를 부여할 만할 것이다.

세포주기 관련인자로서 자궁경부암에서의 과발현이 나쁜 예후와 관련 있다고 알려진 cyclin A1과, cyclin B1은 본 연구에서 HIF-1 α 와 마찬가지로 정상조직에서도 염색되며 종양세포에서도 부위마다 다양한 양상으로 발현되었다. 그리고 기대했던 바와 달리 염색결과와 생존율과는 연관성이 없다는 결과를 얻었다. HIF-1 α 와 cyclin B1의 발현이 서로 연관성을 보인 것은 (상관계수=0.446) 종양의 증식이 활발한 부위일수록 저산소상태일 가능성이 높고 이에 HIF-1 α 가 과발현될 것이라는 점을 설명할 수는 있지만, 전사인자가 세포주기 지연의 주요한 조절인자일 것이라는 연구와는²⁰ 다른 결과이다. 이렇게 여러 연구들에서 상반된 결과를 보이는 점은

앞으로의 대규모의 연구가 더 필요하다는 것을 반증하는 것이기도 하다.

V. 결론

자궁경부암에서 조직내 산소상태를 반영하는 인자인 HIF-1 α 는 방사능 치료반응 혹은 자궁암 생존율과 연관성은 없었으나, 침윤성 병변에 따라 조직 내에서 다양하게 발현함으로써 종양저산소 상태를 반영하는 내적 인자로서의 기능을 반영한다고 볼 수 있다.

참고 문헌

1. Ministry of Health and Welfare. 2002 Annual Report of the Korea Central Cancer Registry.
2. Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996; 41:31-9.
3. Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, et al. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;14:831-8.
4. Höckel M, Vorndran B, Schlenger K, Bausmann E, Knapstein PG. Tumor oxygenation: A new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1993;51:141-9.
5. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumour hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-15.
6. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a positive factor in solid tumor growth, *Cancer Res* 2000;60:4010-5.

7. Vordermark D, Brown JM. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther Onkol* 2003;179:801-11.
8. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:198-206.
9. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6.
10. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551-78.
11. Rofstad EK, SundfØr K, Lyng H, Tropé CG. Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis. *Br J Cancer* 2000;83:354-9.
12. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1 α with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:494-501.

13. Van de Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92:40-6.
14. Shin KH, Ha SW, Yoo KY. Analysis of pretreatment prognostic factors in stage IIB carcinoma of the uterine cervix. *J Kor Soc Ther Radiol* 1992;10:227-36.
15. Shiohara S, Shiozawa T, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, Kurai M, et al. Expression of cyclins, p53, and ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease. *Virchows Arch* 2005;446:626-33.
16. Cerciello F, Hofstetter B, Fatah SA, Zaghoul M, Odermatt B, Bodis S, et al. G₂/M cell cycle checkpoint is functional in cervical cancer patients after initiation of external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1390-8.
17. Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, Fyles AW, Milosevic M, Hill RP, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 α in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:854-61.
18. Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE. Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* 1998;18:2845-54.

19. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G₁/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 2001;276:7919-26.
20. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia, *Mol cell Biol* 2003;23:359-69.
21. Bachtary B, Schindl M, Pötter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2234-40.
22. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 2004;10:8405-12.
23. Mayer A, Wree A, Höckel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1 α protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of uterine cervix. *Cancer Res* 2004;64:5876-81.

24. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-21.

Abstract

Expression of hypoxia inducible factor-1 α with cell-cycle related genes in cervical cancer patients treated with radiotherapy

Ju Yeon Pyo

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Nam Hoon Cho)

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is an intrinsic marker of tumor hypoxia and overexpressed in hypoxic state. This is associated with local failure of radiotherapy and poor prognosis of cervical carcinoma. And the transcription factor HIF-1 is a major regulator of cell cycle during hypoxia.

Among 743 patients with uterine cervix cancer treated with RT between 1994 and 2005, biopsies from 57 patients were available for immunohistochemistry and tissue microarray. The immunohistochemical results of HIF-1 α , cyclin A1, and cyclin B1 were compared with clinical parameters, pathological findings by univariate and multivariate analysis.

The mean expression of HIF-1 α was 42.8%, which was predominantly expressed in tumor cells adjacent to the necrotic foci. The larger tumor cell nests and invasive front margins showed comparatively intense immunoreactivity. There was no correlation of HIF-1 α , cyclin A1 and cyclin B1 expression with clinic and histological factors such as stage, size, histologic type and patient's survival. In the present study, HIF-1 α expressed with marked intratumoral heterogeneity had neither powerful predictor of radioresistance nor poor prognostic marker in cervical cancer patients treated with radiotherapy.

Key word: cervix cancer, radiotherapy, hypoxia-inducible factor-1 α , cyclin A1, cyclin B1