

자궁경부암에서
IL-5와 TNF- α 의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

이 대 우

자궁경부암에서
IL-5와 TNF- α 의 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

이 대 우

자궁경부암에서
IL-5와 TNF- α 의 발현

지도교수 김 영 태

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 대 우

이대우의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

감사의 글

부족한 제가 많은 분들의 격려와 도움으로 논문을 완성하게 되었습니다. 연구의 계획에서 완성에 이르기 까지 각별한 노고와 관심, 믿음으로 이끌어 주신 김영태 교수님과 논문 준비에 세심한 지도를 베풀어 주신 박순정 교수님, 임종백 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

자료 수집을 위해 함께 노력해 준 부인암 클리닉 선생님들과 실험을 도와준 강명화 연구원에게도 감사 드립니다. 그리고 여러 가지로 관심과 성원을 보내준 장시영, 홍종욱, 남은지 선생님께도 고마운 마음을 전합니다.

끝으로 언제나 저에게 든든한 지원자가 되어 주시는 양가 부모님과 인생의 동반자로서 항상 큰 힘이 되어주는 사랑하는 청미, 그리고 이 세상에서 제게 가장 큰 보물인 두 아들 수형이와 재형이에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씬

차례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 연구대상 및 방법	9
1. 연구대상	9
2. 연구방법	9
가. 자궁경부 세척액검체에서의 IL-5와 TNF- α 측정	9
나. 말초혈액 내 호산구 측정	10
다. 자궁경부의 HPV DNA titers 측정	10
3. 통계 및 분석	11
III. 결과	12
1. 대상환자	12
2. 자궁경부 세척액검체에서의 IL-5와 TNF- α 농도	12
3. 자궁경부 병변의 IL-5와 TNF- α 의 상관성	15
4. 자궁경부암에서 호산구와 cytokine 농도의 상관성	17
5. 자궁경부암에서 HPV DNA titers와 cytokine 농도의 상관성	17
IV. 고찰	20
V. 결론	26
참고문헌	27
영문요약	32

그림 차례

그림 1. Distribution of IL-5 (pg/ml) concentrations in cervicovaginal washing fluids in controls (n=10), CIS (n=6) and cervical carcinoma (n=20).....	14
그림 2. Distribution of TNF- α (pg/ml) concentrations in cervicovaginal washing fluids in controls (n=10), CIS (n=6) and cervical carcinoma (n=20)	14
그림 3. Cytokine ratios of IL-5:TNF- α in controls, CIS and cervical carcinoma.....	15
그림 4. Correlations between IL-5 and TNF- α concentrations in controls, CIS and cervical carcinoma.....	16
그림 5. Correlations between eosinophil counts and IL-5, TNF- α in cervical carcinoma.....	18
그림 6. Correlations between HPV DNA titers and IL-5, TNF- α in CIS and cervical carcinoma.....	19

표 차례

표 1. Demographic and clinical characteristics in controls, CIS and cervical carcinoma.....	12
표 2. Concentrations and ratios of cytokine in controls, CIS and cervical carcinoma.....	13

자궁경부암에서 IL-5와 TNF- α 의 발현

자궁경부암은 정상상피에서 자궁경부상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)을 거쳐 침윤암으로 진행되는 다단계의 과정을 거친다. 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV) 감염이 자궁경부암의 원인으로 알려져 있었지만, HPV의 일차적인 감염으로부터 자궁경부암이 발생하기까지 오랜 기간이 소요되므로 이 과정에 여러 다른 인자들이 영향을 미칠 것으로 생각되어왔다.

특히 자궁경부암의 발생과정 중에 일어나는 면역학적 반응을 살펴보면 자궁경부상피내종양의 발생 및 지속적인 HPV 감염과 관련하여 T helper (Th)1 면역반응은 감소하지만 Th2 면역반응은 증가하는 것이 보고되었다. 또한 자궁경부 이형성증과 침윤암에서 interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)의 생성이 감소되고 interleukin-10 (IL-10)의 생성이 증가하는 결과가 보고되었다.

대조적으로 다른 연구에서는 자궁경부암과 고등급 상피내종양에서 Th2 cytokine 뿐만 아니라, Th1 cytokine인 TNF- α , IL-12의 증가가 관찰되었다. 이는 자궁경부암의 발생을 Th2 cytokine 이동 현상만으로는 설명할 수 없으며, 증가된 TNF- α 의 생성은 숙주의 약화된 면역반응의 결과로서 자궁경부암이나 고등급 상피내종양의 경우 이미 손상된 면역반응 체계로 인해 Th1과 Th2 cytokine 사이의 상관성이 미약한 것이라는 결과도 보고 되었으나 Th2

cytokine의 일종인 IL-5에 대한 연구논문은 전무한 상태이다.

다양한 종양조직 내에서 호산구의 침윤이 발견되고 호산구에 대한 chemokine 기능을 하는 IL-4가 항 종양효과를 나타내며, IL-5가 Th2 면역반응과 관련하여 항 종양효과를 보이는 사실을 통해 호산구를 분화, 증식시키는 기능을 하는 IL-5의 발현을 측정하는 것이 자궁경부암에서 항 종양기능을 알아보는데 도움이 될 것이라고 생각된다.

이번 연구에서는 정상 자궁경부조직과 자궁경부 상피내암 (carcinoma in situ of the uterine cervix, CIS), 자궁경부암 조직 사이에 IL-5와 TNF- α 의 발현을 측정하여 자궁경부암 발생과정에서의 Th1 면역반응과 Th2 면역반응의 상관관계 및 자궁경부 병변에 따른 cytokine 농도차이와 병변내에서의 cytokine의 상관관계에 대해 알아보았다. 이를 통해 자궁경부병변의 cytokine 측정이 자궁경부 발암과정 중에 나타나는 국소 면역반응의 변화에 대한 표지자로서 유용성이 있는지 알아보려고 하였다.

자궁경부 조직검사상 진단받은 20명의 자궁경부암 환자와 6명의 자궁경부 상피내암 환자 그리고 10명의 정상 대조군을 대상으로 하였으며 자궁경부 세척액검체를 얻은 후 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 IL-5와 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 또한 HPV DNA titers 및 말초혈액 내 호산구에 대한 검사도 함께 시행하였다.

자궁경부암과 자궁경부 상피내암, 대조군에서 IL-5 농도의 중위값은 각각 25.5 pg/ml, 12.5 pg/ml, 10.0 pg/ml이었으며, TNF- α 농도의 중위값은 6.0 pg/ml, 5.5 pg/ml, 4.0 pg/ml로 나타났다. IL-5

의 경우 자궁경부암군에서 자궁경부 상피내암이나 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 차이를 보였다($p=0.031$, $p<0.001$). 하지만 TNF- α 의 경우에는 세 군 사이의 유의한 차이가 없었다. 또한 각 병변의 IL-5와 TNF- α 의 상관성 비교에서는 모두 유의한 상관성을 보이지 않았다. IL-5:TNF- α ratios 비교에서는 병변이 진행할수록 증가하는 소견을 보였지만 통계학적으로 유의하지는 않았다. 자궁경부암군에서 호산구의 개수와 IL-5의 농도 사이에는 통계학적으로 유의한 상관성을 나타냈으나($p=0.026$), HPV DNA titers와 cytokine 사이에는 유의한 상관성이 관찰되지 않았다. 전체 대상군의 33명(91.7%)에서 인유두종바이러스에 감염되어 있었다.

결론적으로 자궁경부암군에서 IL-5 농도의 증가와 IL-5:TNF- α ratios 값이 증가하는 경향을 보였으며, 이는 Th2 면역반응이 자궁경부암에서 더 활성화된다는 것을 알 수 있었다. 또한 종양조직 내에서 많이 관찰되는 호산구의 침윤이 자궁경부암군에서 발현이 증가하는 IL-5와 상관성이 있다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 통해 자궁경부 세척액검체를 이용한 IL-5의 측정이 자궁경부 발암과정에서 국소 면역반응의 변화를 알아보는 유용한 표지자가 될 수 있으며 이러한 결과들을 바탕으로 cytokine을 이용하여 Th1 면역반응으로 전환시키는 치료방법이 응용될 수 있을 것이라 생각된다.

핵심 되는 말: cytokine, IL-5, TNF- α , 자궁경부암

자궁경부암에서 IL-5와 TNF- α 의 발현

<지도교수 김 영 태>

연세대학교 대학원 의학과

이 대 우

I. 서론

자궁경부암은 우리나라 여성에서 발생하는 생식기 악성종양 중 가장 높은 발생빈도를 나타내며 한해 3000 명 이상의 환자가 발생하는 질환이다.¹ 또한 자궁경부의 정상상피에서 상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)을 거쳐 침윤암으로 진행되는 다단계의 과정을 거친다.^{2,3}

그 동안 인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV) 감염이 자궁경부암의 대표적인 원인으로 잘 알려져 있었지만, 이러한 HPV 감염만으로는 자궁경부암의 발생과정을 설명하기에 충분하지 않았다. HPV 에 의한 감염자중 70-90% 정도는 일시적인 감염이고, 10-30% 정도가 지속적인 감염상태를 나타내며 이중 1% 미만에서 자궁경부암으로 진행된다.^{4,5} 이렇듯 HPV 의 일차적인 감염으로부터 자궁경부암이 발생하기까지 오랜 기간이 소요되므로 암의 발생기전에 여러 인자들이 영향을 미칠 것으로 추측되어왔다.⁶

세포매개성 면역계를 구성하는 주요세포는 대식세포(macrophage) 와 T 림프세포이며, 대식세포는 interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 같은 cytokine 을 생성하며 T 림프세포는 표면 항원에 따라 CD4-T cell 과 CD8-T cell 로 나누어진다. CD4-T cell 은 생성하는 cytokine 에 의해 T helper (Th)1 cell 과 Th2 cell 로 구분되며 Th1 cell 은 IL-2, tumor necrosis factor-beta (TNF- β), interferon-gamma (INF- γ)를 주로 분비하여 세포독성 T 림프세포의 분화를 돕고 지연형 면역반응에 관여하며, Th2 cell 은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 을 분비하여 B 림프세포의 작용을 돕고 외부 항원을 제거하는 역할을 한다.⁷ 또한 Th2 cell 은 IL-10 을 통해 다른 cytokine 을 억제하여 면역 반응의 강도를 조절하는 중요한 역할을 한다.

Proinflammatory cytokine 에는 TNF- α , IL-1 α 와 IL-6 등이 있다. 이들은 세포 수용체와 성장요소에 관여하는 유전자의 표현을 조절하여 세포성장과 분화를 유발하는 기능이 있으며, 면역계 세포뿐만 아니라, 각화세포(keratinocyte), 섬유모세포(fibroblast) 및 여러 형태의 종양 세포주에서 분비되어 자가분비 및 측분비의 형태로 세포에 작용한다.^{8,9} 또한, 다른 성장 인자(growth factor)와 함께 작용하여 종양의 신생혈관 형성을 증폭시키는 것으로 알려져 있다.¹⁰

IL-5 는 대식세포나 IL-1, IL-4, IL-6 를 분비하는 T 림프세포의 활성화로 인해 분비되며 B 림프세포와 호산구(eosinophil)의 분화

및 성장에 관여하고 호산구 생성과 성숙, 활성화의 중요 조절인자로 작용한다. 또한 기관지천식이나 알레르기질환, 자가면역질환의 염증 반응과 관련되어 있다. IL- 5 와 관련된 호산구의 침윤은 다양한 종류의 종양조직에서 자주 관찰되며 자궁경부암의 불량한 예후와 관련이 있다는 연구결과도 있다.¹¹

TNF- α 는 활성화된 대식세포에서 생성되는 cytokine 으로서 면역 체계, 염증과 세포분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 종양세포의 파괴나 면역반응저하, 골세포나 결합조직파괴, 혈관신생 등의 기능을 한다.

자궁경부암의 면역반응에 대한 이전 연구에서 Tsukui 등은 자궁경부상피내종양 환자의 말초혈액 내에서 IL-2 의 생성이 감소되어있다는 결과를 최초로 보고하였다.¹² 면역조직학적 분석을 이용한 연구에서 자궁경부상피내종양에서 immunostimulator 인 TNF- α 가 감소되고 immunosuppressive 인 IL-10 이 정상 자궁경부에 비해 증가되어 있었으며, 자궁경부상피내종양의 병변이 더 광범위 할수록 Th1 cytokine 인 IL-2 의 감소와 Th2 cytokine 인 IL-4, IL-10 의 높은 증가를 나타낸다고 하였다.^{13, 14} 또한, Bais 등은 자궁경부병변에 따른 말초혈액 내의 cytokine 분석을 통해 자궁경부 이형성증과 침윤암에서 IFN- γ , TNF- α 가 감소하고 IL-10 이 증가함을 관찰하였다.¹⁵ 이러한 결과들은 자궁경부상피내종양의 발생과 지속적인 HPV 감염에 있어 Th1 면역반응의 감소와 Th2 면역 반응이 증가를 보여주는 것이다. 이런 연구를 바탕으로 고등급 상피내종양에서

자궁경부암으로의 진행과정 중에 나타나는 Th2 cytokine 이동현상을 초기 자궁경부상피내종양 단계에서 Th1 면역반응으로 변환하는 백신의 개발이 자궁경부상피내종양 환자의 치료에 도움이 될 수 있다고 제안하였다. 위의 결과들과는 대조적으로 다른 연구에서는 자궁경부암에서 IL-12, IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-1 β 등이 모두 높은 수치로 측정되었고, Th1 cytokine 인 TNF- α 가 고등급 상피내종양에서 많이 증가하는 것이 보고되었다.^{16,17} 이는 Th1 cytokine 인 TNF- α 와 IL-12 가 증가함을 보여주는 것으로 자궁경부암의 발생을 Th2 cytokine 이동현상만으로는 설명할 수 없으며, TNF- α 의 증가현상은 숙주의 면역반응이 약화되어 나타나는 결과로서 자궁경부암이나 고등급 상피내종양의 경우 면역반응체계가 손상되어 Th1 과 Th2 cytokine 사이에 상관성이 미약하게 나타나는 것이라고 하였다.¹⁷

또한 다양한 종양조직에서 발견되는 호산구의 침윤이 숙주 면역반응에 대한 활성화된 세포반응 때문인지 아니면 단순한 면역반응의 결과인지에 대한 논란이 있었다.¹⁸ 하지만 호산구에 대한 chemokine 기능을 하는 IL-4 가 항 종양효과를 보여주며, 호산구와 관련된 IL-5 가 Th2 면역반응과 함께 항 종양효과를 나타내는 사실을 통해 호산구를 분화, 증식시키는 기능을 하는 IL-5 의 발현을 연구하는 것이 자궁경부암 발암과정에서 cytokine 의 역할을 규명하는 중요한 기전을 제공할 수 있다고 보고되었다.¹⁹

따라서 이번 연구는 자궁경부암과 자궁경부 상피내암 환자군 및 대조군의 자궁경부 세척액검체에서 IL-5 와 TNF- α 의 발현을 측정하여 각 자궁경부 병변의 cytokine 농도차이와 자궁경부 병변내에서의 두 cytokine 의 상관관계에 대해서 알아보고자 하였다. 또한 말초혈액 내 호산구 및 자궁경부 HPV DNA titers 와 두 cytokine 과의 상관관계에 대해서도 알아보고자 하였다. 이를 통해 자궁경부에서 분비되는 cytokine 이 자궁경부 발암과정에서 국소 면역반응 변화에 대한 표지자로서 유용성이 있는지 평가하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

2006년 5월부터 11월까지 연세의료원 세브란스병원 부인암 전문클리닉에 내원하여 시행한 조직검사상 자궁경부 상피내암 (carcinoma in situ of the uterine cervix, CIS)과 자궁경부암으로 진단받은 환자를 대상으로 시행하였으며 만성 자궁경부염이 있는 환자를 대조군으로 하였다.

2. 연구방법

가. 자궁경부 세척액검체 내에서의 IL-5와 TNF- α 측정

자궁경부 세척용액은 5 mL phosphate buffered saline (PBS)을 이용하였으며, 용액 내에는 미생물로 인한 변성을 막기 위해 protease inhibitor cocktail을 추가하였다. [10 mM EGTA, 150 mM NaN₃, 0.01% (wt/vol) leupeptin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.02 M Pefabloc (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)] 이를 사용하여 자궁경부를 세척한 후에 약 3 ml를 흡인하고 4°C에서 10분간 2000 rpm 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 이 검체를 분석할 때까지 -70°C에 보관하였으며, 자궁경부 검체물에 혈액이 섞인 경우는 제외하였다. Cytokine 농도는 human Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) (Biosource International, Inc., Camarillo, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

나. 말초혈액 내 호산구 측정

자궁경부암군에서 일반혈액검사를 실시하여 호산구의 개수를 측정하였다.

다. 자궁경부 HPV DNA titers 측정

HPV DNA 검사는 환자의 질에 멸균된 질경을 넣어 자궁경부를 노출시킨 후, cytobrush (Digene Cervical의 Sampler, Digene Corp., Gaithersburg, MD, USA) 바깥쪽 솔이 자궁외구에 닿을 때까지 약 1-1.5 cm 정도 자궁내구로 삽입 후 반 시계 방향으로 3바퀴 정도 돌려서 자궁경부 세포를 채취하였다. 이렇게 채취된 검체는 먼저 알칼리에 의해 변성되어 단일가닥(single-stranded) DNA로 만든 후, 13종의 고위험군 HPV DNA인 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 그리고 68 아형들의 RNA 소식자(probe)가 함유된 용액에서 교잡반응(hybridization)시켜 RNA=DNA hybrid를 만든다. 이 hybrid를 미리 RNA=DNA hybrid에 대한 단일클론항체(monoclonal antibody)가 표면에 부착된 microplate에 넣어 부동화(fixation)시켰다. 이렇게 항체에 결합된 hybrid에 alkaline phosphatase를 부착시킨 이차면역항체와 화학적 발광체 기질인 Lumiphos 530을 첨가하면, alkaline phosphatase에 의해 기질이 분해되어 빛을 발생하게 한다. 반응에 의해 만들어진 빛을 발광측정기(luminometer: DML 2000, Digene Corp.)로 측정하여 상대적 빛 단위(RLU: relative light unit)로 나타낸 것이다. HPV 16 DNAs 1 pg/mL의

용액이 고위험군 HPV 소식자의 양성 대조군(PC: positive control)으로 이용되었으며, 검사결과는 각 검체물의 상대적 빛 단위를 양성 대조군의 상대적 빛 단위로 나눈 값인 비(RLU/PC ratio)로 나타내었다. 이 값이 1.0 이상이면 HPV DNA 검사 양성으로, 1.0 미만이면 음성으로 간주 하였다.

3. 통계 및 분석

통계적 결과는 중위값(사분위수 범위)으로 표시하였으며, 자궁경부 병변에 따른 cytokine 농도차이 비교는 Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test를 이용하였고, 각 군에서의 cytokine의 상관관계 및 cytokine과 호산구, HPV DNA titers의 상관성 비교는 Spearman analysis를 통해 분석하였다. 통계적 분석은 Prism 5 windows software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 평가하였다.

III. 결과

1. 대상환자

총 36 명의 환자(자궁경부암군 20 명, 자궁경부 상피내암군 6 명, 대조군 10 명)를 대상으로 하였으며 각 군의 median age 는 55 세, 44.5 세, 44 세였고, 인유두종바이러스 감염률은 각각 100%, 100%, 70% 였다 (표 1).

표 1. Demographic and clinical characteristics in controls, CIS and cervical carcinoma

Variables	Controls	CIS	Carcinoma
Subjects	10	6	20
Median age (range)	40.0 (28-58)	44.5 (36-52)	55.0 (33-87)
No. of HPV infection (%)	7 (70)	6 (100)	20 (100)
No. of HPV 16,18 infection	0	4	10

CIS: carcinoma in situ of the uterine cervix

HPV: human papillomavirus

2. 자궁경부 세척액검체에서의 IL-5 와 TNF- α 의 농도

자궁경부 세척액검체에서 측정된 IL-5 의 자궁경부암군(n=20), 자궁경부 상피내암군(n=6), 대조군(n=10) 농도의 중위값(사분위수 범위) 은 각각 22.50 pg/ml(14.25-54.25), 12.50 pg/ml(10.50-19.00),

10.00 pg/ml(7.00-4.50)였다. 각 군 사이에서 통계학적으로 유의한 농도 차이를 보였으며(p=0.001: Kruskal-Wallis test), 특히 자궁경부암군에서 자궁경부 상피내암군과, 대조군에 비하여 높은 IL-5 농도를 나타내었다(p=0.033, p<0.001: Mann-Whitney test). TNF- α 의 자궁경부암군, 자궁경부 상피내암군, 대조군 농도의 중위값(사분위수 범위)은 각각 6.0 pg/ml(2.25-8.00), 5.50 pg/ml (5.00-7.25), 4.00 pg/ml(2.50-9.25)였으며, 각 군 사이의 유의한 차이는 보이지 않았다(p=0.716: Kruskal-Wallis test) (표 2, 그림 1,2).

표 2. Concentrations and ratios of cytokine in controls, CIS and cervical carcinoma

	Controls (n=10)	CIS (N=6)	Carcinoma (n=20)	P
IL-5 (pg/ml)	10.0 (7.00-14.50)	12.50 (10.50-19.00)	25.50 (14.25-54.25)	0.001
TNF- α (pg/ml)	4.00 (2.5-9.25)	5.50 (5.00-7.25)	6.00 (2.25-8.00)	0.716
Ratios of IL-5:TNF- α	2.02 (1.25-3.05)	2.29 (1.83-2.74)	5.23 (2.20-12.88)	0.061

Results were expressed as median (interquartile range)

TNF- α : tumor necrosis factor- α

IL-5: interleukin-5

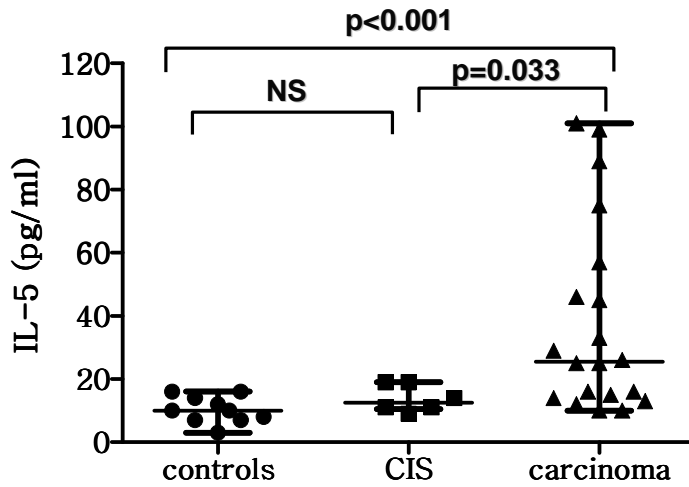


그림 1. Distribution of IL-5 (pg/ml) concentrations in cervico vaginal washings in controls (n=10), CIS (n=6) and cervical carcinoma (n=20)

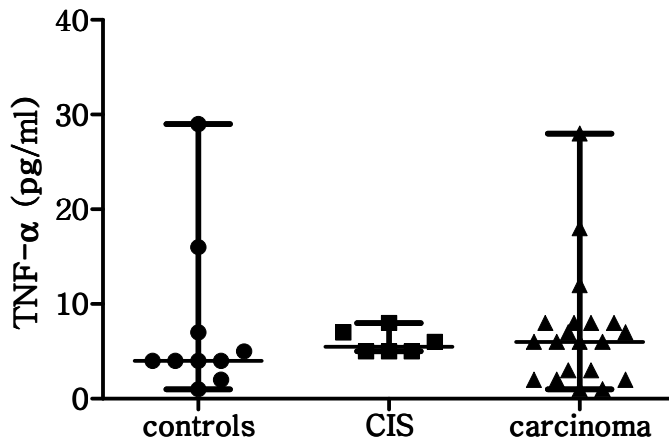


그림 2. Distribution of TNF-α (pg/ml) concentrations in cervico vaginal washings in controls (n=10), CIS (n=6) and cervical carcinoma (n=20)

자궁경부암군, 자궁경부 상피내암군, 대조군 각각의 IL-5:TNF- α ratios 의 중위값(사분위수 범위)은 5.23 pg/ml(2.20-12.88), 2.29 pg/ml(1.83-2.74), 2.02 pg/ml(1.25-3.05)였으며 병변이 진행할수록 값이 증가하는 경향을 보였으나, 각 군 사이의 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p=0.061$: Kruskal-Wallis test) (그림 3).

3. 자궁경부 병변의 IL-5 와 TNF- α 의 상관성

IL-5 와 TNF- α 농도사이의 상관성 비교에서는 자궁경부암군($r=0.249$, $p=0.487$), 자궁경부 상피내암군($r=0.754$, $p=0.086$), 대조군 ($r=0.128$, $p=0.590$) 모두에서 IL-5 와 TNF- α 의 통계적으로 유의한 상관성은 보이지 않았다 (그림 4).

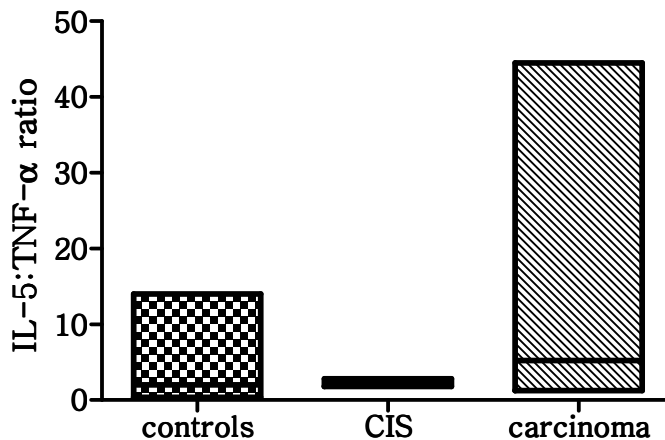


그림 3. Cytokine ratios of IL-5:TNF- α in controls, CIS and cervical carcinoma

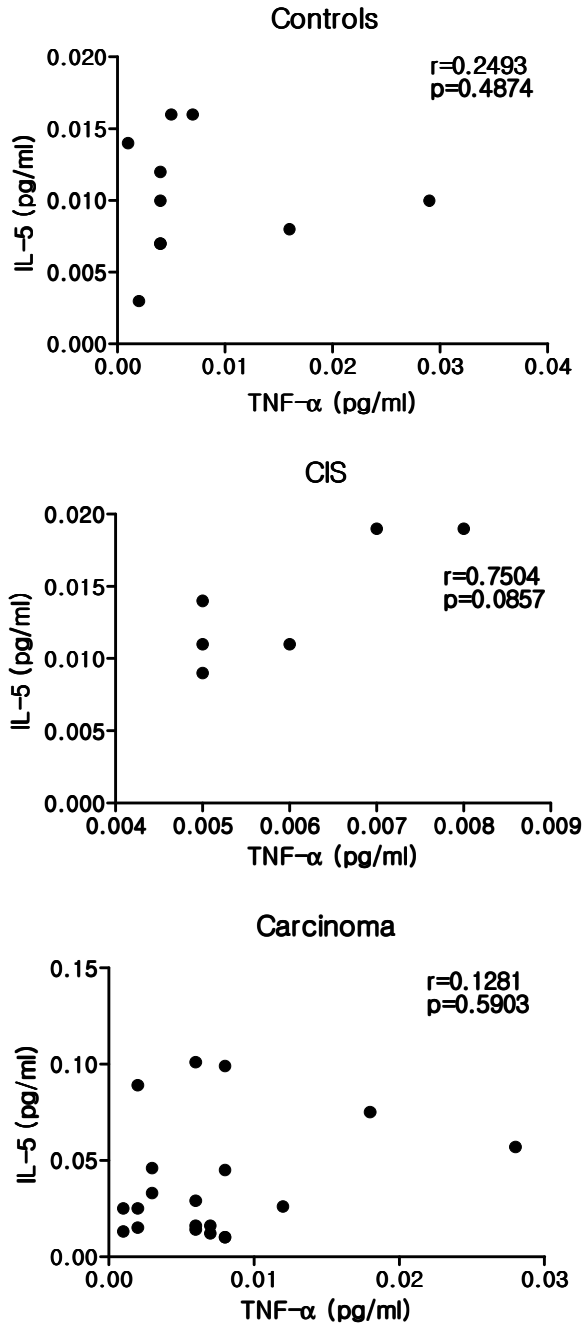


그림 4. Correlations between IL-5 and TNF- α concentrations in controls, CIS and cervical carcinoma

4. 자궁경부암에서 호산구와 cytokine 농도의 상관성

자궁경부암에서 말초혈액 내 호산구의 개수를 측정했던 군(n=17)과 cytokine 농도와의 상관성 비교에서는 IL-5 와 호산구 사이의 통계적으로 유의한 양의 상관성을 관찰할 수 있었으나($r=0.539$, $p=0.026$), TNF- α 는 의미있는 상관성을 보이지 않았다($r=-0.011$, $p=0.966$) (그림 5).

5. 자궁경부암에서 HPV DNA titers 와 cytokine 농도의 상관성

자궁경부암과 자궁경부 상피내암에서 측정한 HPV DNA titers (n=15)와 cytokine 농도와의 상관성 비교에서는 TNF- α ($r=0.191$, $p=0.496$)와 IL-5 ($r=0.297$, $p=0.283$) 모두 통계적으로 유의한 상관성은 보이지 않았다 (그림 6).

HPV DNA 검사상 자궁경부암과 자궁경부 상피내암군의 경우 모든 대상환자가 고위험 HPV 유형에 감염되어 있었으며, 대조군의 경우에는 7 명중 4 명이 고위험 HPV 유형이 감염되었다. 그 중 HPV 16 형, 18 형에 감염된 경우는 대조군에서는 한 명도 없었지만 자궁경부암군과 자궁경부 상피내암군에서는 각각 4 명(66%), 10 명(50%)로 나타났다.

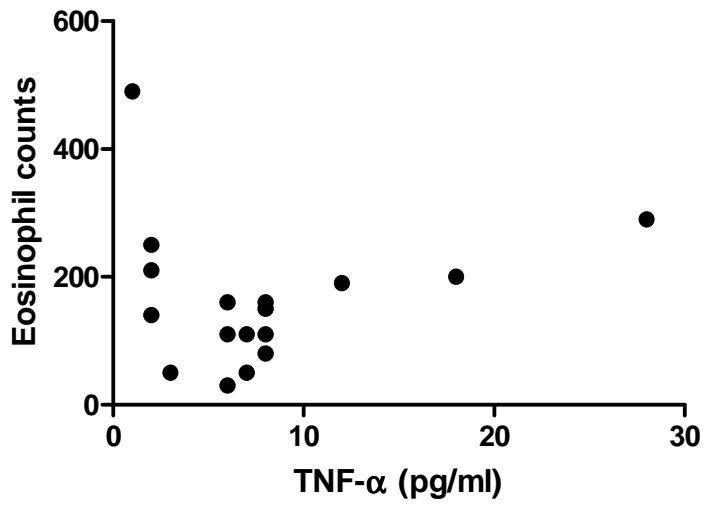
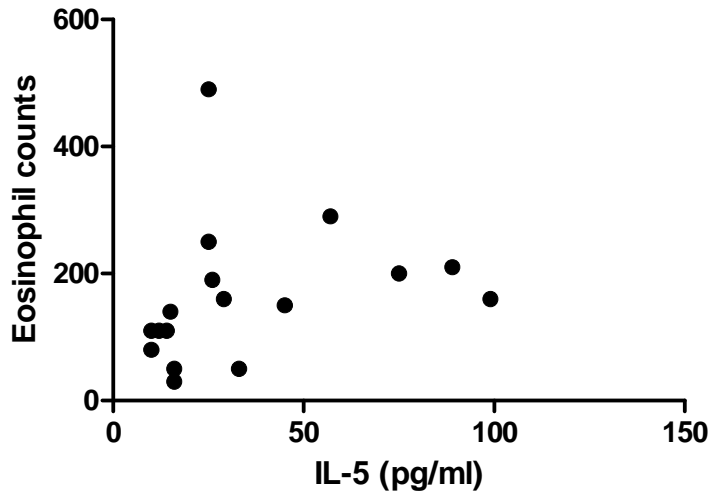


그림 5. Correlations between eosinophil counts and IL-5, TNF- α in cervical carcinoma

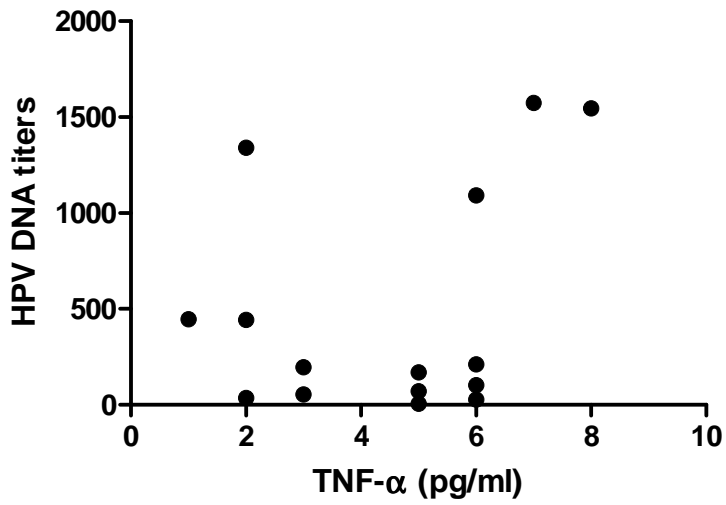
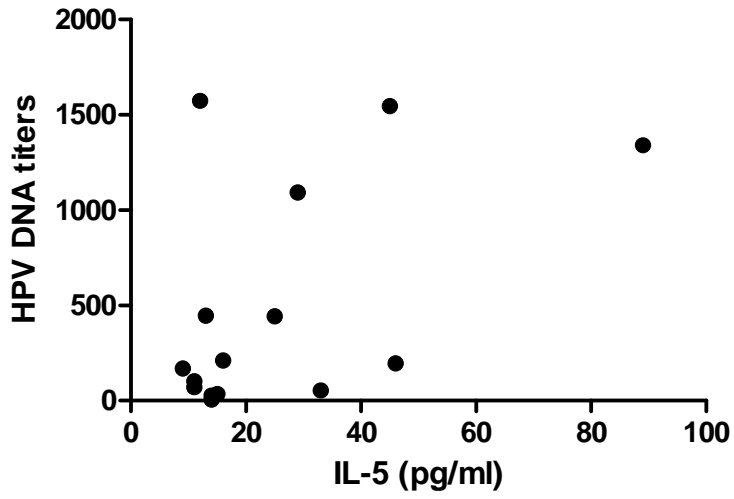


그림 6. Correlations between HPV DNA titers and IL-5, TNF- α in CIS and cervical carcinoma

IV. 고찰

자궁경부암의 발생과 관계된 면역반응 중에서 cytokine에 의한 세포면역반응은 종양에 대한 주된 방어작용을 하고 있다. 세포면역반응은 Th1 cytokine에 의해 활성화되는 반면, Th2 cytokine은 세포면역반응을 억제하는 역할을 하며 자궁경부암의 경우에는 Th1 cytokine에 의한 면역반응이 감소하고 Th2 cytokine에 의한 면역반응은 증가되어 있다고 알려져 있다.^{14,20,21} 하지만 이러한 cytokine에 대한 연구는 주로 말초혈액을 이용한 전신 면역반응에 대한 것들이 많았으며, 직접적인 자궁경부의 국소 면역반응에 대한 결과는 희귀한 상황이다.

본 연구에서는 자궁경부 세척액검체를 통해 Th1 cytokine인 TNF- α 와 Th2 cytokine인 IL-5의 발현을 측정하였으며, 그 결과 자궁경부암군에서 높은 농도의 IL-5를 확인할 수 있었으나, TNF- α 에 대해서는 각 대상군사이의 유의한 차이가 없었고 자궁경부암군에서 증가하는 경향을 나타내었다. Tjong 등도 자궁 경부 세척액검체를 이용한 연구에서 IL-12, IL-10, TNF- α , TGF- β , IL-1 β 가 자궁경부암군에 모두 증가된 결과를 보고하였으며, Azar 등도 고등급 자궁경부 상피내종양군에서 TNF- α 와 IL-10이 함께 증가된 소견을 보고 하였다.^{16,17} 이는 이전의 여러 연구에서 보고된 자궁경부암의 발생과정 중 면역반응에 의한 cytokine 분비가 Th1 cytokine에서 Th2 cytokine으로 이동된다는 것과는 다른 결과이다.

즉 TNF- α 가 초기에는 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하는 면역 반응에 관여하지만 암세포에서는 세포의 증식이 더 빨리 일어나 이러한 cytokine의 기능이 봉쇄된다. 쥐를 이용한 피부암의 발암과정 에 대한 연구에서 TNF- α 의 증가현상이 종양의 성장을 촉진시키는 기능을 한 것처럼 자궁경부 상피세포에서도 같은 역할을 하며 결과적으로 이러한 TNF- α 의 증가는 자궁경부 암의 손상된 면역반응을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.²²⁻²⁴

많은 예에서 자궁경부암 조직에 호산구가 발견되는데 그 중 2-26%에서는 현저하게 높은 호산구의 침윤이 관찰되었다.²⁵⁻²⁸ 이와 같은 연구들은 호산구 침윤이 방사선치료 반응에 대한 예후 인자로서의 가능성을 조사한 것으로 그 결과는 다양하게 보고 되었다. 그 중에서 자궁경부암 조직에서의 호산구 침윤이 환자의 생존예후를 결정하는데 독립인자로 작용하는 것을 보고한 것이 있으며, Lowe 는 자궁경부 조직검사서 현저한 호산구의 침윤이 존재할 경우 자궁경부암에 대한 검사가 필요하다고 설명하였다.^{29,30} 하지만 이러한 호산구의 침윤이 종양상피세포에서의 특이적 반응 인지 아니면 이차적으로 나타나는 또는 다른 조건하 에서 보이는 반응인지에 대해서는 알려진 것이 없다.

자궁경부암에서 호산구가 침윤하는 원인에 대해서 조직괴사로 인한 결과로 생각하였으나, 조직괴사와 호산구의 간질 침윤과는 관련성이 없다는 보고가 또한 존재한다.³¹ 또는 종양세포와 반응 하는 T 림프구의 면역반응으로 인해 분비되는 chemotactic factor

에 의한 것이라고 생각하였다.^{30,31} 그 중 호산구의 분화와 성장에 관여하고 활성화의 중요 조절인자로 작용하는 것이 IL-4 와 IL-5 이다. van Driel 등이 편평세포 자궁경부암에서 면역 조직학적 검사를 통해 호산구의 침윤과 IL-4, INF- γ 의 발현을 비교한 연구에서 호산구의 침윤이 존재하는 조직에서 IL-4 양성인 세포가 상대적으로 높게 나타났는데, 이는 종양세포에서 Th2 면역반응이 주로 일어나며, 이로 인해 세포면역 반응을 조절하는 Th1 면역반응이 저하되고 결과적으로 조직검사상 호산구 침윤이 있는 자궁경부암 환자의 예후가 불량한 것과 관련이 있을 것이라고 보고 하였다.¹¹ 이번 연구에서도 Th2 cytokine 인 IL-5 이 자궁경부암군에서 대조군이나 자궁경부 상피내암군에 비해 유의하게 높은 발현을 나타냈다. 이는 종양조직 내에서 Th2 면역반응이 상대적으로 우세하다는 것을 추측할 수가 있다. 또한 말초혈액 내의 호산구의 개수와 cytokine 의 상관성 비교를 통해, IL-5 와 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 확인하였다. 물론 조직내의 호산구 침윤과 전신 면역반응으로 나타나는 말초혈액 내 호산구의 개수와 상관성에 대해서는 추가적인 연구가 필요하겠지만 IL-5 가 Th2 면역반응을 통해 호산 구의 성장과 활성화에 작용하며, 종양세포에서 호산구의 침윤을 유도한다고 생각 할 수 있다.

본 연구에서 각 자궁경부병변에 대한 두 cytokine 의 상관성에 대해서도 비교하였는데, 이전 연구에서와 같은 Th2 cytokine 으로의 이동현상을 확인할 수는 없었지만, 자궁경부병변이 진행함에 따라서

IL-5:TNF- α ratios 값이 증가하는 경향을 나타냈다. 이 결과는 종양조직 내에서 Th1 면역반응이 상대적으로 감소하고 Th2 면역반응이 증가하는 것이라고 생각되며 이러한 두 면역반응의 불균형으로 인해 말초혈액 내의 호산구가 증가하는 것으로 추측할 수 있다.

면역반응으로 인한 cytokine의 분비에 영향을 미치는 가장 중요한 요인중의 하나는 염증의 유무이다. 본 연구에서는 환자의 대상균을 조직검사상의 진단을 기준으로 구분하였으며 대조군에서 자궁경부 세포검사상 정상소견을 보이더라도 자궁경부 조직검사에서는 모두 만성 자궁경부염으로 진단을 받았기 때문에 이러한 염증반응에 의한 cytokine 분비의 차이가 결과에 영향을 주었을 가능성이 있다. 이번 연구의 결과에서 대조군의 cytokine 농도가 자궁경부 상피내암군과 유의한 차이를 보이지 않은 것도 이러한 염증반응에 대한 영향으로 추측해 볼 수 있다.

HPV DNA 검사는 자궁경부 세포검사와 함께 자궁경부암의 선별 검사로 이용되고 있다. HPV 감염된 여성의 경우 대부분은 1-2년 내에 자연적으로 사라지는 경우가 많아서 유병율이 높은 20대 여성보다는 30세 이상의 여성에서 시행하는 것을 추천하고 있다. 하지만 고위험 HPV 유형에 감염되고 세포검사상 정상일 경우에는 임상적인 판단이 어려울 경우가 있다. HPV 16형, 18형은 자궁경부암의 발생과 관계된 유형으로 잘 알려진 표지자이지만 자궁경부암의 발생과 관련된 다른 HPV 유형에 대해서는 아직 의견이 일치

되지 않은 상태이다. Sharma 등은 HPV 16형, 18형 감염에 따른 말초혈액 내의 cytokine의 발현을 비교한 연구에서 양성 감염군에서 Th1 cytokine인 IL-2, INF- γ 의 값이 감소하고 Th2 cytokine인 IL-4, IL-10의 값이 증가하는 결과를 나타냈다.³²

또한 HPV의 바이러스 부하(viral load)는 바이러스 복제와의 상관관계에서 지속적인 고위험군의 HPV 감염과 동시에 바이러스 부하가 높은 수치를 보일 때 자궁경부 상피내종양 II 이상의 고등급 병변이나 침윤암과 연관성이 높다는 연구결과가 보고된 바 있다.³³ ³⁴ 하지만 Castle 등은 자궁경부 세포검사상 이상소견을 보인 환자 5000여명의 2년 추적관찰 동안 Hybrid capture II assay에 의해 HPV DNA 양성이 나온 환자들에게서 측정된 viral load 값이 자궁경부 상피내종양 III 이상의 고등급 병변의 발생을 미리 예측하는데 도움이 되지 못하였다고 보고하였다.³⁵ 본 연구에서도 자궁경부암군과 자궁경부 상피내암군에서 고위험 HPV 유형의 감염, 특히 HPV 16형, 18형의 감염이 많은 것을 확인할 수 있었으나 자궁경부암과 자궁경부 상피내암으로 진단받은 환자 15명의 HPV DNA titers와 IL-5, TNF- α 상관성 비교에서는 유의한 상관성을 보이지는 않았다. HPV 감염과 특정 cytokine의 발현에 대해서는 아직 알려진 바가 없지만, HPV 이외의 다른 동시 감염의 가능성으로 인해 결과의 차이가 나타날 수 있으며 정상 대조군에 대한 비교연구가 없는 것이 본 연구의 문제점이라 할 수 있다.

이번 연구는 자궁경부 세척액검체를 통해 국소 면역반응의 결과

로 나타나는 IL-5와 TNF- α 의 발현에 대해 조사한 것으로 자궁경부암에서 Th2 면역반응이 더 활성화된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 종양조직 내에서 많이 관찰되는 호산구의 침윤이 자궁경부암군에서 발현이 증가하는 IL-5와 상관성이 있다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들을 통해 자궁경부 세척액검체를 통한 IL-5의 측정이 자궁경부 발암과정에서 국소 면역반응의 변화를 알아보는 유용한 표지자가 될 수 있으며, 이를 바탕으로 cytokine을 이용하여 Th1 면역반응으로 전환시키는 치료방법이 응용될 수 있을 것이라 생각된다.

물론 본 연구의 결과가 더 많은 검체를 통해 검증되어야 할 것이며, 다양한 자궁경부상피내종양 병변이 포함되지 못한 한계점이 있어 이는 앞으로의 연구에서 보완되어야 할 것이라 생각된다.

V. 결론

이번 연구에서는 자궁경부 세척액검체를 통해 자궁경부암군과 자궁경부 상피내암군, 대조군에서 IL-5와 TNF- α 의 발현을 측정하여 다음과 결과를 확인하였다.

1. 자궁경부암군에서의 IL-5의 발현이 자궁경부 상피내암군이나 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보였으나, TNF- α 의 발현은 각 군간의 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. 각 자궁경부병변에서 두 cytokine 사이의 상관성 비교에서는 통계적으로 유의한 상관성을 보이지 않았다.
3. 자궁경부병변이 진행함에 따라 IL-5:TNF- α ratios 값은 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.
4. 자궁경부암군에서 두 cytokine과 말초혈액 내 호산구 개수와의 상관성 비교에서는 IL-5와 호산구간의 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 확인할 수 있었다.
5. 자궁경부암군과 상피내암군에서 두 cytokine과 HPV DNA titers와의 비교에서는 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

이를 통하여 자궁경부암에서 Th2 면역반응이 더 활성화된다는 것을 추측할 수 있었으며, 또한 종양조직 내에서 많이 관찰되는 호산구의 침윤이 자궁경부암군에서 발현이 증가하는 IL-5와 상관성이 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 자궁경부 세척액검체를 통한 IL-5의 측정이 자궁경부암의 국소 면역반응의 변화를 알아보는 유용한 표지자가 될 수 있다고 생각된다.

참고문헌

1. 대한산부인과학회. 한국 부인암 등록 사업 조사 보고서(2004. 1. 1 - 2004. 12. 31). 대한산부회지 2007;50:28-78.
2. DiSaia PH, WJ. C. Preinvasive disease of the cervix. 6th ed. St. Louis: CVL Mosby; 2002.
3. Richart RM. A modified terminology for cervical intra epithelial neoplasia. Obstet Gynecol 1990;75:131-3.
4. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. J Infect Dis 1995;171:1026-30.
5. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. J Pediatr 1998;132:277-84.
6. Ghaderi M, Nikitina Zake L, Wallin K, Wiklund F, Hallmans G, Lenner P, et al. Tumor necrosis factor A and MHC class I chain related gene A (MIC-A) polymorphisms in Swedish patients with cervical cancer. Hum Immunol 2001; 62:1153-8.
7. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996;17: 138-46.
8. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. Cancer Res 1986;46:1015-29.

9. Castrilli G, Tatone D, Diodoro MG, Rosini S, Piantelli M, Musiani P. Interleukin 1alpha and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells. *Br J Cancer* 1997;75:855-9.
10. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991;53:217-39.
11. van Driel WJ, Kievit-Tyson P, van den Broek LC, Zwinderman AH, Trimbos BJ, Fleuren GJ. Presence of an eosinophilic infiltrate in cervical squamous carcinoma results from a type 2 immune response. *Gynecol Oncol* 1999;74:188-95.
12. Tsukui T, Hildesheim A, Schiffman MH, Lucci J, 3rd, Contois D, Lawler P, et al. Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papilloma virus-derived peptides: correlation with cervical pathology. *Cancer Res* 1996;56:3967-74.
13. Clerici M, Merola M, Ferrario E, Trabattoni D, Villa ML, Stefanon B, et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papilloma virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:245-50.
14. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 1999;116:33-40.
15. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, Ewing PC, Meijer CJ, Snijders PJ, et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine

- pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 2005;58:1096-100.
16. Tjiong MY, van der Vange N, ter Schegget JS, Burger MP, ten Kate FW, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine* 2001;14:357-60.
 17. Azar KK, Tani M, Yasuda H, Sakai A, Inoue M, Sasagawa T. Increased secretion patterns of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol* 2004;35:1376-84.
 18. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989; 57: 503-12.
 19. Rothenberg ME, Luster AD, Leder P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8960-4.
 20. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991;12:256-7.
 21. Scott M, Stites DP, Moscicki AB. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:751-5.
 22. Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha

- deficient mice. *Cancer Res* 1999;59:4516-8.
23. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 1999;5:828-31.
 24. Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Hewer A, Phillips DH, Parker P, et al. Tumour necrosis factor- α mediates tumour promotion via a PKC α - and AP-1-dependent pathway. *Oncogene* 2002;21:4728-38.
 25. Ayhan A, Altintas A, Tuncer ZS, Kucukali T, Yuce K. Prognostic value of mitotic activity, eosinophilic and inflammatory reaction in stage I cancer of the uterine cervix. *Eur J Surg Oncol* 1992;18:264-6.
 26. Bethwaite PB, Holloway LJ, Yeong ML, Thornton A. Effect of tumour associated tissue eosinophilia on survival of women with stage IB carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1993;46:1016-20.
 27. Bostrom SG, Hart WR. Carcinomas of the cervix with intense stromal eosinophilia. *Cancer* 1981;47:2887-93.
 28. Dalal BI, Das KC, Dutta TK, Malakar K. Local and systemic eosinophilia in patients with carcinoma of the uterine cervix undergoing radiation therapy: correlation with radiation response. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1992;4:18-21.
 29. van Driel WJ, Hogendoorn PC, Jansen FW, Zwinderman AH, Trimbos JB, Fleuren GJ. Tumor-associated eosinophilic infiltrate of cervical cancer is indicative for a less effective immune response. *Hum Pathol* 1996;27:904-11.

30. Lowe DG. Carcinoma of the cervix with massive eosinophilia. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95:393-401.
31. Kapp DS, LiVolsi VA. Intense eosinophilic stromal infiltration in carcinoma of the uterine cervix: a clinico pathologic study of 14 cases. *Gynecol Oncol* 1983; 16:19-30.
32. Sharma A, Rajappa M, Saxena A, Sharma M. Cytokine profile in Indian women with cervical intraepithelial neoplasia and cancer cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:879-85.
33. Sun CA, Lai HC, Chang CC, Neih S, Yu CP, Chu TY. The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001;83:95-9.
34. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 2000;355: 2194-8.
35. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1590-7.

Abstract

Expression of IL-5 and TNF- α in cervical carcinoma

Dae Woo Lee

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Tae Kim)

Objective: Immune responses within the cervical micro-environment probably play important roles in viral persistence and in the development of cervical cancer. Inappropriate production of cytokine may induce the local immune response and subsequently contributes to the development and progression of carcinoma. The study aims were to investigate the relationship between the levels of interleukin-5 (IL-5) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the vaginal washing fluids and occurrence of cervical carcinoma.

Methods: Cervicovaginal washing fluids were obtained from 20 patients with cervical carcinoma, 6 patients with carcinoma in situ of uterine cervix (CIS) and 10 control subjects. The amounts of IL-5 and TNF- α was determined by ELISA. Detection of HPV DNA in cervicovaginal washing fluids and eosinophil counts in

peripheral blood for patients with cervical carcinoma were performed.

Results: Thirty three patients (91.7%) were infected by human papillomavirus. In the patients with cervical carcinoma, those with CIS, and the controls, the median IL-5 concentrations in cervicovaginal washing fluids were 25.5 pg/ml, 12.5 pg/ml and 10.0 pg/ml respectively. For TNF- α , the levels were 6.0 pg/ml, 5.5 pg/ml and 4.0 pg/ml respectively. IL-5 levels were significantly higher in patients with cervical carcinoma compared with CIS patients and controls ($p=0.031$, $p<0.001$). But TNF- α was not different among these three groups. No significant correlations between IL-5 and TNF- α in three groups were found. The ratios of IL-5: TNF- α (median values) were 5.23, 2.28 and 2.02 in cervical carcinoma, CIS and controls. In the relation between IL-5 level and eosinophil counts of cervical carcinoma group, a significant correlation was found ($p=0.026$).

Conclusion: The increased levels of IL-5 were observed in patients with cervical carcinoma and the ratios of IL-5:TNF- α were increased in invasive carcinoma. These results may reflect the more active response of Th2 cytokine and uncorrelated levels of IL-5 and TNF- α in cervical carcinoma shows impaired secretion of Th1 and Th2 cytokines. The detection of IL-5 in cervical secretions may be a useful indicator of local immune responses in cervical carcinoma.

Key Words: cytokine, IL-5, TNF- α , cervical carcinoma