

## 난소암에서 cyclin B1 및 D1 발현과 임상 예후 인자들과의 관련성

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 부인암 전문 클리닉

김희연·김재욱·김영태·강명화·김재훈·김성훈·김상운·윤보성

### Relationship between the expression of cyclin B1, D1 and the various prognostic factors in ovarian carcinoma

Hee Yeon Kim, M.D., Jae Wook Kim, M.D., Young Tae Kim, M.D., Mounghwa Kang, M.S.,  
Jae Hoon Kim, M.D., Sung Hoon Kim, M.D., Sang Wun Kim, M.D., Bo Sung Yoon, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine,  
Women's Cancer Clinic, Seoul, Korea

**Objective:** The objective of this study was to evaluate the relationship between the expression of cyclin B1, D1 and the various prognostic factors in ovarian carcinoma.

**Methods:** In this study, fresh ovarian tissue samples were obtained from 41 patients treated surgically at our institute from March of 2002 to February of 2005. These included 36 ovarian carcinomas and 5 normal ovarian tissues that were served as the control. Quantitative real-time RT-PCR and Western blot analysis were used in detecting the expression of mRNA and protein of cyclin B1, D1, respectively.

**Results:** The mean  $2^{-\Delta\Delta CT}$  values of cyclin B1 and D1 mRNA in ovarian carcinoma tissues obtained through quantitative real-time RT-PCR were  $5.83\pm 12.03$ ,  $17.60\pm 22.20$ , respectively, and the mean values in the control were  $0.55\pm 0.35$ ,  $0.50\pm 0.26$ , respectively. The results showed difference in the expression, but were not statistically significant ( $p=0.67$ ,  $0.07$ , respectively). If the mean densitometer value of cyclin B1 and D1 protein in the control obtained by Western blot analysis was 1, the mean values in ovarian carcinoma tissues were higher, but were not statistically significant ( $1.30\pm 0.73$ ,  $1.81\pm 1.28$ , respectively) ( $p=0.76$ ,  $0.06$ , respectively). The expression of cyclin B1, D1 and various prognostic factors was not statistically related.

**Conclusion:** Our results showed that the expression of cyclin B1 and D1 in ovarian carcinoma tissues was higher than in the normal control. This suggested that cyclin B1, D1 and the tumorigenesis and the degree of malignancy was closely related. But the expression of cyclin B1, D1 and various prognostic factors was not statistically related. Further studies based on the correlation between cyclin and response to treatment or survival rate are needed to support cyclin as a prognostic factor of ovarian carcinoma.

**Key Words:** Ovarian carcinoma, Cyclin B1, Cyclin D1, Prognostic factors

## 서 론

난소암은 보건복지부에서 시행한 한국 중앙 암 등록

사업 연례보고서에 의하면 2003년 여성 10대 암 중에 하나이며,<sup>1</sup> 현재까지 부인암에 있어서는 중요한 사망 원인의 하나로 보고되었다. 난소암은 대개의 경우 증상이 없어 진행된 병기에 발견되며, 외과적 수술과 보조항암 화학요법 등의 여러 치료법들을 시행하더라도 여전히 완치가 힘들고 재발이 잘 되어 다른 부인암에 비해 사망

접수일 : 2005. 7. 29.  
주관책임자 : 김재욱  
E-mail: jaewookkim@yumc.yonsei.ac.kr

률이 높다고 하였다.<sup>2-4</sup>

난소암의 예후 인자로는 외과적 병기, 조직학적 분화도, 혈청 내 CA-125,<sup>5,6</sup> 잔류암의 크기, 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사 등<sup>7,8</sup>이 알려져 있고, 이 중 잔류암의 크기와 외과적 병기가 가장 중요시되고 있다.<sup>9-12</sup> 그러나, 상기 인자들만으로 난소암의 임상적 예후를 정확히 알기란 어려우므로<sup>9,10-12</sup> 종양세포 생물학에 근거한 새로운 예후 인자의 확인이 필요하다고 생각이 된다.

암의 특징은 세포주기 조절에 변화가 생기는 것인데,<sup>13</sup> 최근 유전 및 생화학적 연구의 결과로 포유동물의 여러 가지 세포주기와 관련된 단백질이 알려졌고 인간 난소암에서 이들의 발현 양상에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다.<sup>14,15</sup> 세포주기는 G1, S, G2, M 주기로 구성되며 이런 세포주기 조절에 cyclin 단백질의 합성과 소멸이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup> Cyclin은 세포분열의 각 주기에서 그 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 cyclin dependant kinase (cdk)들과 결합하여 작용을 나타낸다고 하였다.<sup>14</sup> 이런 cyclin의 종류에는 현재까지 17가지 (A, B1-2, C, D1-3, E1-2, F, G1-2, H, I, K, T,...)가 알려져 있다. 세포주기 조절에 관여하는 여러 cyclin과 cdk 복합체 중에서 cyclin D1과 cdk4,6 복합체, cyclin B1과 cdc2 복합체가 특히 관심의 대상이 되고 있는데, cyclin D1은 직접 G1-S 주기 진행에 관여하고 cyclin B1은 G2-M 주기 checkpoint 감시를 제어함으로써 DNA 합성과 세포 증식에 꼭 필요한 요소로 작용한다고 밝혀졌다.<sup>13,15</sup> 이러한 cyclin과 cdk 발현에 있어 조절이 잘못되게 되면 비정상적인 세포 성장과 암 변성이 일어난다는 것을 뒷받침하는 여러 연구 결과들이 있다.<sup>16-21</sup> Cyclin D1은 염색체 11q13에 위치하고 있으며 유방암, 식도암, 대장암, 두경부암, 폐암, 간암, 방광암, 피부암 등 여러 암에서 이 부위의 유전자 증폭이 보고되었다.<sup>13-15</sup> Cyclin B1도 최근 다양한 암들, 즉 유방암, 식도암, 대장암, 전립선암, 두경부암 등에서 과발현이 보고되었으며,<sup>16-21</sup> 일부 연구에서는 cyclin B1 발현이 암의 악성도 지표로서 중요한 역할을 한다고 하였다.<sup>19,20</sup> 그러나 아직 난소암에서 cyclin B1의 역할에 대해서는 정확히 밝혀진 바가

없다.

난소암에서 cyclin 등과 같이 세포주기와 관련된 유전자의 이상발현이 예후에 어떠한 영향을 미치는지는 불명확하므로 임상 병리학적 요소와 어떠한 연관이 있는지 밝히는 것이 중요할 것이다. 아직까지 난소암에서 단백질 수준 및 RNA 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상을 임상 예후 인자와 관련지어 연구한 논문은 전무한 실정이다. 이에 본 연구자들은 난소암에서 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 mRNA 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상과 Western blot analysis를 이용한 단백질 수준에서의 cyclin B1과 D1의 발현 양상을 연구하고 또한 이것과 여러 임상 병리학적 예후 인자 즉, 난소암의 외과적 병기, 혈청 내 CA-125, 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사 등이 상관관계가 있는지 알아보려고 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 환자군 선정

신선한 난소 조직은 본원 산부인과에서 2002년 3월부터 2005년 2월까지 수술적 치료를 받은 환자를 대상으로 획득하였고, 난소암 조직 36예를 실험군으로 정상 난소 조직 5예를 대조군으로 선정하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용한 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현

본원에서 시행한 수술에 의해 얻어진 난소암 조직과 대조군을 질소 탱크에 보관하고 수술적 병기에 따라 암 조직을 선택한 후 RNA를 분리하였다. 실험을 위한 검체를 액체 질소 내에서 막자사발을 이용하여 분쇄시킨 후 전체 RNA extraction kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리된 1 µg의 RNA는 oligo dT를 primer로 해서 역전사를 실시하였다. 역전사를 통한 상보적 DNA (complementary

DNA, cDNA)의 합성은 역전사 효소 (reverse transcriptase, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA)를 이용하였으며 이때의 상태는 70°C에서 5분, 37°C에서 60분, 70°C에서 10분을 사용하였다. 합성된 상보적 DNA는 -20°C에 사용전까지 보관하였다. 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응은 ABI 7700 PRISM® Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 수행되었다. 준비된 역전사 중합효소 연쇄 반응 생산물에 primer로 cyclin B1, D1 그리고 housekeeping gene인 glyceraldehydes 3 phosphate-dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. 이 때 GAPDH는 내부대조군 (internal control)으로 사용되었다. Primer로 사용된 cyclin B1, D1 그리고 GAPDH는 Applied Biosystems에서 구입하여 사용하였으며 이들의 순서는 Table 1에 표시되어 있다. 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응은 총 50 µl 내에서 1× TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 primer 그리고 probe를 섞어서 만들었다. 이것을 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 넣었다. 사용한 thermal cycler parameters는 첫번째 단계로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 그리고 두번째 단계로 denaturation을 위해 95°C에서 15초, annealing과 extension을 위해 60°C에서 1분, 이 과정을 50 cycles 반복하였다. 역전사 중합효소 연쇄 반응에는 2개의

primer가 필요한데, 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에는 이들 primer 사이에 형광이 부착된 primer가 하나 더 필요하였다. 그리고, 이 형광 primer의 5'쪽에는 TaqMan probe인 FAM™이라는 형광물질이 (GAPDH 경우는 VIC® 형광물질), 3'쪽에는 TAMRA™ 라는 물질을 가졌다. 이들은 가까이 있을 때는 TAMRA™가 FAM™의 형광을 상쇄시켜 탐지할 수 없지만, 떨어지면 FAM™의 형광을 탐지할 수 있다. 따라서, DNA 중합효소 (DNA polymerase)의 핵산분해 효소 역할 (nuclease activity)에 의하여 중합효소 연쇄 반응 과정 중 모형 (template) 중간에 붙어있는 형광 primer가 분해되어 FAM™의 형광이 나타나고 형광의 강도는 cycle이 증가할수록 세졌다. 따라서, 표준시료와 비교하면 증폭되는 양을 정확하게 정량할 수 있다. 실시간 정량 중합효소 연쇄 반응의 결과는 ABI PRISM® Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해서 comparative C<sub>T</sub> (threshold cycles) 방법으로 다음과 같이 계산하였다.

$$\Delta C_T (\text{sample}) = C_T (\text{target gene}) - C_T (\text{GADPH}),$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{tumor sample}) - \Delta C_T (\text{internal control})$$

$$\text{relative expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

여기서 내부대조군 HeLa 세포주를 사용하였고, 이러한 방법에 따라 난소암 조직과 대조군에서의 cyclin B1 과 D1의 mRNA 발현 정도를 측정하였다.

**Table 1.** The sequence of primers and probes of cyclin B1, D1

Cyclin B1	Forward primer	5' -CTC CTG TCT GGT GGG AGG A-3'
	Reverse primer	5' -CTG ATC CAG AAT AAC ACC TGA-3'
	Probe	5' -FAM™-AGA GTG GAG TTG TGC TGG CT-TAMRA™-3'
Cyclin D1	Forward primer	5' -CTG GCC ATG AAC TAC CTG GA-3
	Reverse primer	5' -GTC ACA CTT GAT CAC TCT GG-3'
	Probe	5' -FAM™-AGA AGC GTG TGA GGC GGT AGT AGG A-TAMRA™-3'
GAPDH	Forward primer	5' -GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
	Reverse primer	5' -GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
	Probe	5' -VIC®-CAA CGT TCC CGT TCT CAG CC-TAMRA™-3'

2) Western blot analysis를 이용한 cyclin B1과 D1의 단백질 발현

막자사발을 통해 분쇄시킨 난소 조직 샘플들과 HeLa 세포주에 용해 완충제 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 넣고 용해 완충제 내에서 얼음에 10분 배양한 후에 4°C 원심분리기에서 14000 rpm으로 가라앉힌 상층액을 통해 cell extraction을 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 blotting 한 후 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)로 2시간 상온에서 blotting 하였다. 4°C에서 일차 항체 즉, cyclin B1 mAb, cyclin D1 mAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 그리고 GADPH mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 하룻밤 처리하였고, 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 처리하였고, 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, Buckinghamshire, UK) I, II를 1:1로 섞어 membrane과 1분 정도 반응시켰다. Hyper X-ray film에 30초, 1분, 5분 노출시켜 얻은 결과에서 단백질 양의 정량화를 위해 레이저 농도계 (laser densitometer)와 Image Reader LAS-1000 Lite software (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

3) 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사

본원에서 시행한 수술에 의해 얻어진 난소 조직 샘플들로 유세포 분석법을 이용하여 DNA 정량검사를 하였

다. 0.2 g의 신선한 조직을 phosphate buffered saline (PBS)에 넣은 후 100 µm nylon mesh로 여과하여 얻었고 세포부유액에 다시 PBS를 넣고 원심분리해서 얻은 세포 침전물을 다시 PBS로 세척한 후에 혈구계 (hemocytometer)로 세포수를 계산하였다. Vindelov 시약으로 세포 1×10<sup>4</sup>개/mL를 염색하여 FACScanner (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)로 유세포 분석을 시행하였다. DNA 배수성 및 합성기 분율은 Python-based Hierarchical. Environment for Integrated Xtallography (PHENIX) flow system을 통해 산출하였다. DNA histogram 상에서 서로 다른 G0/G1 peak가 2개 이상 나타나며 peak를 구성하는 세포의 최소 10%가 aneuploid cells일 때를 비배수성으로 정의하였다. 변이계수 (coefficient of variation)은 5% 이내인 histogram을 적합한 것으로 판정하였다. DNA index (DI) 값은 정상조직의 DNA 함량에 대한 검체 조직의 DNA 함량의 비로 0.94-1.04일 때를 이배수성으로 정의하였고 이 기준에서 제외되는 검체는 비배수성으로 정의하였다.

4) 방사면역측정법을 통한 혈청 내 CA-125

혈청 CA-125 값은 방사면역측정법 (radioimmunoassay)을 이용하여 처음 난소암을 진단받은 시점에서 측정하였다. 정상범위는 35 U/mL 이하로 하였다. 혈청 CA-125 값은 35 U/mL를 기준으로 35 U/mL 이상인 군과 이하인 군 두 군으로 분류하였다.

3. 자료 분석

자료분석은 서술적 통계를 사용하였으며 두 그룹간의 비교 분석에는 Wilcoxon Rank Sum test, 세 그룹 이상간의 비교분석에는 Kruskal Wallis test와 Pearson 상관계수를 이용해 처리하였고, 통계 분석은 SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. P-value가 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 임상 소견

난소암 조직 36예를 실험군으로 정상 난소 조직 5예를 대조군으로 선정하였다. 36예의 악성 난소암 환자들의 중앙 연령값은 54.5세 (18-71세) 였고, 50세 이상인 환자는 66.7% 였다. 수술적 병기는 각각 I기 5예 (13.9%), II기 4예 (11.1%), III기 24예 (66.7%), IV기 3예 (8.3%)로 III기가 가장 많았다. 병리조직학적 분화도는 grade 1이 3예 (8.3%), grade 2가 8예 (22.2%), grade 3이 25예 (69.5%) 였다. 세포형에 따라 분류하면 장액성 (serous)이 22예 (61.1%)로 제일 많았고, 점액성 (mucinous) 4예 (11.1%), 투명세포성 (clear cell) 4예 (11.1%), 그 외 기타 세포형이 6예 (16.7%) 였다. 림프절 전이는 14예 (38.9%) 에서 있었고 잔류암의 크기는 2 cm를 기준으로 구분하였을 때 2 cm 보다 큰 경우가 11.1%에 해당하였다. 혈청 내 CA-125 값이 35 U/mL 초과로 높았던 경우는 29예 (80.6%), 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사 상 배수성을 보인 경우가 15예 (41.7%) 였다 (Table 2).

2. 난소암 조직과 대조군에서 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의한 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현 분석

신선한 대조군과 난소암 조직에서 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현을 측정하기 위해서 TaqMan<sup>®</sup> 방법론에 근거한 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용하였다. 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의한 cyclin B1과 D1의 mRNA 정량은 GAPDH와의 상대적  $2^{-\Delta\Delta CT}$  값의 강도로 구하였는데 난소암 조직에서의 평균은 각각  $5.83 \pm 12.03$ 과  $17.60 \pm 22.20$  였고, 대조군은 각각  $0.55 \pm 0.35$ 과  $0.50 \pm 0.26$ 로 두 군간에 차이를 보이거나 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 3) (Fig. 1) ( $p=0.67$ ,  $p=0.07$ ).

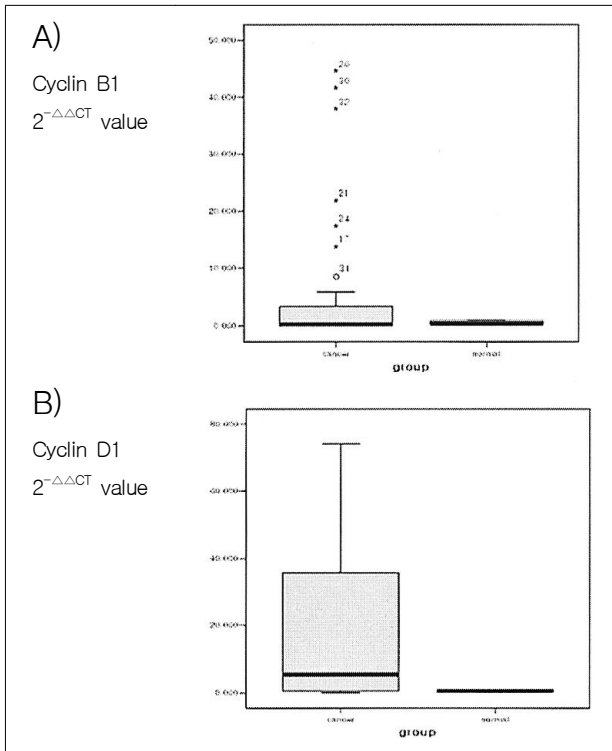
Table 2. Clinico-pathological characteristics

	No. of patients	%
Age (years)		
Median	54.5	
Range	18-71	
Stage		
I	5	13.9
II	4	11.1
III	24	66.7
IV	3	8.3
Grade		
1	3	8.3
2	8	22.2
3	25	69.5
Histopathology		
Serous	22	61.1
Mucinous	4	11.1
Clear cell	4	11.1
Others	6	16.7
Lymph node metastasis		
Positive	14	38.9
Negative	22	61.1
Residium (cm)		
≤2	32	88.9
>2	4	11.1
CA-125 (U/mL)		
≤35	7	19.4
>35	29	80.6
DNA flow cytometry		
Diploidy	15	41.7
Aneuploidy	21	58.3

Table 3. mRNA expression of cyclin B1 and D1 in ovarian tissue by quantitative real-time RT-PCR

	n	Cyclin B1*	Cyclin D1*
Control	5	$0.55 \pm 0.35$	$0.50 \pm 0.26$
Ovarian carcinoma	36	$5.83 \pm 12.03$	$17.60 \pm 22.20$

\*;  $2^{-\Delta\Delta CT}$  value (mean±SD)



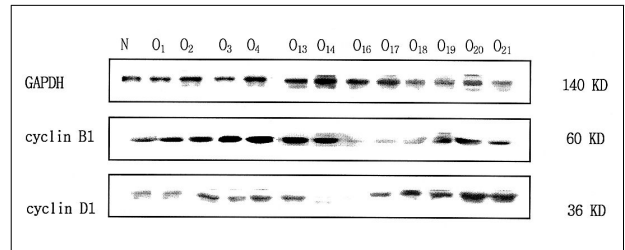
**Fig. 1.** Boxplot graphs demonstrating cyclin B1 and D1 mRNA expression in ovarian carcinoma tissue and control.

The lines across the boxes represent the medians and the whiskers extend to the highest and lowest values, excluding outliers. The small circles and asterisks identify outliers and extreme values.

- A) mRNA expression of cyclin B1 in ovarian carcinoma tissue and control
- B) mRNA expression of cyclin D1 in ovarian carcinoma tissue and control

3. 난소암 조직과 대조군에서 Western blot analysis에 의한 cyclin B1과 D1의 단백질 발현 분석

본 연구에서는 난소암 조직에서 Western blot analysis로 cyclin B1과 D1의 단백질 발현을 측정하였다 (Fig. 2). 대조군에서 cyclin B1과 D1의 단백질 densitometer 값을 1로 보았을 때, 난소암 조직에서의 평균은 각각  $1.30 \pm 0.73$ 과  $1.81 \pm 1.28$ 로 대조군보다 높으나 통계적으로 유의하지 않았다 ( $p=0.76$ ,  $p=0.06$ ).



**Fig. 2.** Protein analysis of cyclin B1 and D1 in ovarian carcinoma tissue and normal by Western blot analysis. N; control, O; ovarian carcinoma tissue

4. 난소암 조직에서 cyclin B1 및 D1 발현과 임상 병리학적 예후 인자들과의 상관성

본 연구자들은 36예의 난소암 환자에서 cyclin B1과 D1의 mRNA 및 단백질 발현과 임상 병리학적 예후 인자들과의 상관관계를 보았다. 난소암 조직을 나이 50세 미만과 이상인 두 군으로 나누었을 때 실시간 정량 역전사 증합효소 연쇄 반응에 의한 cyclin B1의 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  값 평균은 각각  $6.02 \pm 0.16$ 과  $5.73 \pm 0.45$ 였고, Western blot analysis에 densitometer 값 평균은 각각  $1.46 \pm 1.23$ 과  $1.23 \pm 1.10$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 4) ( $p=0.71$ ,  $p=1.00$ ). Cyclin D1의 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  값 평균은 각각  $22.67 \pm 18.38$ 과  $14.99 \pm 5.28$ 였고, Western blot analysis에 densitometer 값 평균은 각각  $1.76 \pm 1.79$ 과  $1.84 \pm 1.67$ 로 나타나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 5) ( $p=0.54$ ,  $p=0.96$ ). 그 외 임상 병리학적 예후 인자인 수술적 병기, 조직학적 분화도, 세포형, 림프절 전이 여부, 잔류암 크기, 혈청 내 CA-125, 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사와 cyclin B1, D1의 mRNA 및 단백질 발현도 역시 상관관계를 보이지 않았다 (Table 4, 5).

**Table 4.** Correlations between expression of cyclin B1 and clinico-pathological factors

	No. of pts.(%)	Cyclin B1			
		RT-PCR*	p	Western blot <sup>†</sup>	p
<b>Age (years)</b>					
<50	12 (33.3)	6.02±0.16	NS	1.46±1.23	NS
≥50	24 (66.7)	5.73±0.45		1.23±1.10	
<b>Stage</b>					
I	5 (13.9)	7.91±10.81	NS	1.15±0.41	NS
II	4 (11.1)	5.31±6.09			
III	24 (66.7)	2.99±9.08			
IV	3 (8.3)	13.76±21.03		2.94±1.72	
<b>Grade</b>					
1	3 (8.3)	5.82±10.02	NS	0.94±0.18	NS
2	8 (22.2)	2.44±4.68			
3	25 (69.5)	6.79±14.61		1.43±0.80	
<b>Histopathology</b>					
Serous	22 (61.1)	4.63±11.51	NS	1.44±0.85	NS
Mucinous	4 (11.1)	6.49±8.28			
Clear cell	4 (11.1)	5.79±10.72			
Others	6 (16.7)	0.17±0.09		1.28±0.33	
<b>LN metastasis</b>					
Negative	14 (38.9)	0.55±1.02	NS	1.23±0.41	NS
Positive	22 (61.1)	8.15±13.86		1.34±0.85	
<b>Residium (cm)</b>					
≤2	32 (88.9)	4.41±9.71	NS	1.16±0.51	NS
>2	4 (11.1)	10.79±17.98		1.73±1.12	
<b>CA-125 (U/mL)</b>					
≤35	7 (19.4)	10.97±16.53	NS	1.26±0.67	NS
>35	29 (80.6)	4.59±10.68		1.31±0.76	
<b>DNA flow cytometry</b>					
Aneuploidy	15 (41.7)	8.35±14.26	NS	1.46±0.89	NS
Diploidy	21 (58.3)	1.87±5.78		1.09±0.40	

\*;  $2^{-\Delta\Delta CT}$  value (mean±SD)

<sup>†</sup>; DV - densitometer value (mean±SD)

NS; not significant

**Table 5.** Correlations between expression of cyclin D1 and clinico-pathological factors

	No. of pts.(%)	Cyclin D1			
		RT-PCR*	p	Western blot <sup>†</sup>	p
<b>Age (years)</b>					
<50	12 (33.3)	22.67±18.38	NS	1.76±1.79	NS
≥50	24 (66.7)	14.99±5.28		1.84±1.67	
<b>Stage</b>					
I	5 (13.9)	53.10±25.19	NS	1.36±0.99	NS
II	4 (11.1)	11.12±13.94			
III	24 (66.7)	11.59±16.04			
IV	3 (8.3)	28.68±24.29		3.01±1.72	
<b>Grade</b>					
1	3 (8.3)	17.22±29.17	NS	1.15±0.87	NS
2	8 (22.2)	9.10±13.95			
3	25 (69.5)	18.86±24.24		1.74±1.13	
<b>Histopathology</b>					
Serous	22 (61.1)	17.66±21.91	NS	2.23±1.45	NS
Mucinous	4 (11.1)	23.62±26.16			
Clear cell	4 (11.1)	28.76±0.41			
Others	6 (16.7)	0.04±0.02		0.49±0.07	
<b>LN metastasis</b>					
Negative	14 (38.9)	17.08±20.10	NS	2.04±1.65	NS
Positive	22 (61.1)	17.87±23.56		1.71±1.11	
<b>Residuum (cm)</b>					
≤2	32 (88.9)	14.22±22.43	NS	1.73±1.24	NS
>2	4 (11.1)	29.78±17.76		2.09±1.47	
<b>CA-125 (U/mL)</b>					
≤35	7 (19.4)	10.86±19.21	NS	1.77±0.56	NS
>35	29 (80.6)	19.52±22.98		1.83±1.43	
<b>DNA flow cytometry</b>					
Aneuploidy	15 (41.7)	17.58±21.83	NS	1.87±1.06	NS
Diploidy	21 (58.3)	17.71±24.01		1.74±1.58	

\*;  $2^{-\Delta\Delta CT}$  value (mean±SD)

<sup>†</sup>; DV - densitometer value (mean±SD)

NS; not significant

## 고 찰

난소암은 대개의 경우 증상이 없어 진행된 병기에 발견되며, 외과적 수술과 보조항암화학요법 등의 여러 치료법들을 시행하더라도 여전히 완치가 힘들고 재발이

잘 되어 다른 부인암에 비해 사망률이 높다고 하였다.<sup>2-4</sup>

난소암의 예후 인자로는 외과적 병기, 조직학적 분화도, 혈청 내 CA-125,<sup>5,6</sup> 잔류암의 크기, 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사 등<sup>7,8</sup>이 알려져 있으나, 난소암



의 임상적 예후를 정확히 알기란 어려우므로 암세포 생물학에 근거한 새로운 예후 인자의 확인 필요성이 강조되고 있다. Welsh<sup>22</sup> 등은 정상과 종양성 난소 조직을 대상으로 상피성 난소암의 표지자가 될 수 있는 후보물질을 찾기 위하여 oligonucleotide microarray 및 역전사 증합효소 연쇄 반응을 이용하여 CD24, HE4 및 LU가 난소종양에 특이한 유전자임을 밝히기도 하였다.

일반적으로 발암 과정 및 종양의 유지과정에는 세포 주기에 관여하여 세포의 증식과 성장을 도와주는 종양 유전자 (oncogene)와 세포의 성장과 증식을 억제하는 종양억제유전자 (tumor suppressor gene) 그리고 세포 고사 (apoptosis)를 조절하는 유전자 등이 관여한다고 밝혀졌다. 세포가 증식할 때 증식촉진인자인 유사분열 물질 (mitogen)들의 최종 목표 중 하나가 cyclin이다. 세포주기 조절에 있어 cyclin 단백질의 합성과 소멸이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>23,24</sup> Cyclin은 세포분열의 각 주기에서 그 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 cdk들과 결합하여 작용을 나타낸다고 하였다.<sup>14</sup> 세포주기 조절에 관여하는 여러 cyclin과 cdk 복합체 중에서 cyclin D1과 cdk4,6과 cyclin B1과 cdc2가 특히 관심의 대상이 되고 있는데, 전자는 직접 G1-S 주기 진행에 관여하고 후자는 G2-M 주기 checkpoint 감시를 제어함으로써 DNA 합성과 세포 증식에 꼭 필요한 요소로 작용한다고 밝혀졌다. 이러한 cyclin과 cdk 발현에 있어 조절이 잘못되게 되면 비정상적인 세포 성장과 암 변성이 일어난다는 것을 뒷받침하는 여러 연구 결과들이 있다.<sup>16-21</sup> 여러 가지 암에 있어 cyclin 단백질의 이상발현이 보고되었다.<sup>13,16-19,32</sup>

D-type cyclin은 30분 이하의 대단히 짧은 반감기를 가지며 이들의 과발현은 성장인자를 유도하고 D-type cyclin의 합성에 장애가 생기면 성장인자와 상관없이 세포주기를 진행하여 발암과정에 관여하게 된다고 하였다.<sup>25</sup> Cyclin D1과 E는 G1 주기에서 활성화되어 G1-S 주기 이행을 조절한다고 알려져 있다.<sup>26</sup> Cyclin D1은 염색체 11q13에 위치하고 있으며 유방암, 식도암, 대장암, 두경부암, 폐암, 간암, 방광암, 피부암 등 여러 암에서 이 부위의 유전자 증폭이 보고되었다.<sup>13-15</sup> 특히, 유방암

의 경우 종양의 15-20% 정도에서 염색체 11q13에 유전자의 증폭이 있다는 연구 결과도 있고 면역조직화학적 연구에서는 유방암의 80% 정도에서 cyclin D1의 과발현이 있음이 발표되었다.<sup>15</sup> 최근 악성 난소암의 14-59%에서 cyclin D1 mRNA의 과발현이 보고되기도 했다.<sup>4,27-29</sup> Barbieri<sup>29</sup> 등은 Western blot analysis와 역전사 증합효소 연쇄 반응을 이용하여 양성, 경계성 및 악성 난소암 조직에서 cyclin D1의 발현 차이를 연구하였는데, 1997년 연구에 의하면 총 33예의 난소암 환자를 대상으로 양성 조직에서는 cyclin D1이 발현되지 않고 경계성 난소암 조직에서 대다수 발현되어 악성 난소암 조직에서 과발현되는 것을 확인하였고, 1999년 연구에서 악성 난소암 조직에서 cyclin D1이 과발현되는 것을 재차 확인하였고, 생존률과 상관있다고 보고하였다. Bali<sup>30</sup> 등은 면역조직화학적 검사로 134예의 상피성 난소암 조직에서 cyclin D1의 과발현을 확인하였고, 독립적으로 생존률과 관련된다고 주장하였다. Masciullo<sup>4</sup> 등은 cyclin D1과 cdk4 유전자의 과발현이 서로 연관성이 있으며, cyclin D1 발현이 난소암의 분화도, 호르몬 수용체 여부와 연관성이 있다고 밝히기도 했다. Cyclin D1 과발현과 임상 병리학적 요소들과의 상관성에 관한 연구들도 있는데, 일부 유방암<sup>30</sup>이나 후두상피암<sup>31</sup>에서 cyclin D1 과발현과 임상 병리학적 요소들이 상관성이 있다고 보고된 반면, 다른 연구에서는 유방암<sup>32</sup>이나 방광암<sup>33</sup>에서 아무런 상관성이 없다고 보고되었다. 본 연구에서는 cyclin D1의 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  및 densitometer 값 평균이 난소암 조직에서 대조군보다 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았고, 각 임상 병리학적 예후 인자와 cyclin D1의 발현간에 상관관계가 없는 것을 확인하였다.

Cyclin B1은 cdk1 (p34cdc2)과 작용하여 G2-M 주기 이행을 조절한다고 알려져 있다.<sup>34-36</sup> S 주기 초기에는 cyclin B1의 발현이 적지만 G2-M 주기 이행기에는 최고조에 이르게 되어 세포들이 유사분열을 일으키게 되고 P53이 활성화되면 cyclin B1의 작용이 억제되어 G2-M 주기가 정지한다고 알려져 있다.<sup>37,38</sup> 최근 다양한 암들, 즉 유방암, 식도암, 대장암, 전립선암, 두경부

암 등에서 cyclin B1의 과발현이 연구되었으며,<sup>16-21</sup> 일부 보고에서는 cyclin B1 발현이 암의 악성도 지표로서 중요한 역할을 한다고 하였다.<sup>19,20</sup> Soria 등<sup>19</sup>은 비소세포성 폐암에서 cyclin B1의 과발현을 보고했고, 생존율과 관련이 있어 예후 인자로서 가치가 있다고 하였다. Kawamoto 등<sup>16</sup>은 면역조직학적 검사로 양성 유방 조직, 전암성 유방 조직, 악성 유방암 조직에서 각각 cyclin B1의 발현을 측정함으로써 유방의 발암과정에 cyclin B1이 역할을 할 것으로 추정하기도 했다. Innocente<sup>39</sup> 등은 인간 난소세포에서 cyclin B-dependent G2 check point가 난소암의 악성화를 예방하는 역할을 한다고 제시하였다.<sup>34</sup> 하지만 아직 난소암에서 cyclin B1의 역할에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없고, 임상 병리학적 요소와의 상관성에 대해서 연구된 논문은 없다. 본 연구에서는 cyclin B1의 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  및 densitometer 값 평균이 난소암 조직에서 대조군보다 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았고, 각 임상 병리학적 예후 인자와 cyclin B1의 발현간에 상관관계가 없는 것을 확인하였다.

본 연구에서 신선한 난소 조직의 cyclin B1 및 D1 mRNA 발현을 측정하기 위해 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응을 이용하였다. 역전사 중합효소 연쇄 반응은 mRNA로부터 역전사 과정을 통해 얻어진 상보적 DNA를 중합효소 연쇄 반응을 이용하여 증폭하는 방법으로 RNA 검사의 예민도를 높이고 소량의 RNA로부터 염기서열을 분석할 수 있어 유전자 발현 분석에 있어서 유용한 방법으로 많이 사용되고 있다. 역전사 중합효소 연쇄 반응은 Northern blot assay나 ribonuclease protection assay에 비하여 훨씬 예민하기 때문에 적은 조직에서도 RNA의 발현 정도를 정확하게 분석할 수 있다는 장점을 가진다고 알려져 있다. 그러나 중합효소 연쇄 반응 과정 중 기하급수적인 증폭이 일어나기 때문에 중합효소 연쇄 반응 효율의 아주 작은 차이도 최종적인 결과에 큰 영향을 미치기 때문에 역전사와 중합효소 연쇄 반응 증폭의 효율의 차이를 최소화 할 수 있는 실험의 조건을 신중하게 선택해야 할 것이다.

본 연구에서는 cyclin B1과 D1의 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  및

densitometer 값 평균이 난소암 조직에서 대조군보다 증가되어 cyclin B1과 D1이 난소의 종양형성과 악성도에 관여할 것으로 추정되나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다. Cyclin이 난소암에서 예후 인자로서 가치가 있는지 평가하려면 발현 양상과 치료제에 대한 반응, 생존율 등을 연관시킨 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea. Central Cancer Registry Center in Korea. Republic of Korea. Ministry of Health and Welfare; 2003.
2. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 1993; 329: 1550-9.
3. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.
4. Masciullo V, Scambia G, Marone M, Giannitelli C, Ferrandina G, Bellacosa A, et al. Altered expression of cyclin D1 and CDK4 genes in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 74: 390-5.
5. Sigurdsson K, Alm P, Gullberg B. Prognostic factors in malignant epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 1983; 15: 370-80.
6. Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: a North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol* 1996; 7: 361-4.
7. Friedlander ML, Hedley DW, Swanson C, Russell P. Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 282-90.
8. Meyer JS, Gersell DJ, Yin S. Cell proliferation in ovarian carcinoma: superior accuracy of S-phase fraction (SPF) by DNA labeling index versus flow cytometric SPF, lack of independent prognostic power for SPF and DNA ploidy, and limited effect of SPF on tumor growth rate. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 466-76.
9. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1138-50.
10. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61: 334-9.
11. Eisenhauer EA, Gore M, Neijt JP. Ovarian cancer: should we be managing patients with good and bad prognostic factors in the same manner? *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 1: 9-15.
12. Clark TG, Stewart ME, Altman DG, Gabra H, Smyth JF. A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 944-52.
13. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* (Washington DC) 1996; 274: 1672-7.
14. Champeme MH, Bieche I, Lizard S, Lidereau R. 11q13 amplification in local recurrence of human primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 12: 128-33.

15. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YJ, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-3.
16. Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol* 1997; 150: 15-23.
17. Wang A, Yoshimi N, Ino N, Tanaka T, Mori H. Overexpression of cyclin B1 in human colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 124-7.
18. Murakami H, Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1999; 434: 153-8.
19. Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 2000; 60: 4000-4.
20. Allan K, Jordan RC, Ang LC, Taylor M, Young B. Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 216-20.
21. Dutta A, Chandra R, Leiter LM, Lester S. Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 5386-90.
22. Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1176-81.
23. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9: 1149-63.
24. D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8132-41.
25. Ohshima K, Haraoka S, Fujiki T, Yoshioka S, Suzumiya J, Kanda M, et al. Expressions of cyclin E, A, and B1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: not suppressed by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression. *Pathol Int* 1999; 49: 506-12.
26. Ito M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol* 2000; 43(5-6): 677-90.
27. Worsley SD, Ponder BA, Davies BR. Overexpression of cyclin D1 in epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 189-95.
28. Hung WC, Chai CY, Huang JS, Chuang LY. Expression of cyclin D1 and c-Ki-ras gene product in human epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 1996; 27: 1324-8.
29. Barbieri F, Cagnoli M, Ragni N, Pedulla F, Foglia G, Alama A. Expression of cyclin D1 correlates with malignancy in human ovarian tumours. *Br J Cancer* 1997; 75: 1263-8.
30. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994; 57: 353-61.
31. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, et al. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 175-80.
32. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 69: 92-9.
33. Bringuer PP, Tamimi Y, Schuurung E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* 1996; 12: 1747-53.
34. Pines J, Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 1990; 346: 760-3.
35. Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 1994; 13: 3772-81.
36. Pines J, Hunter T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 1989; 58: 833-46.
37. Hwang A, McKenna WG, Muschel RJ. Cell cycle-dependent usage of transcriptional start sites. A novel mechanism for regulation of cyclin B1. *J Biol Chem* 1998; 273: 31505-9.
38. Park M, Chae HD, Yun J, Jung M, Kim YS, Kim SH, et al. Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Res* 2000; 60: 542-5.
39. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM. p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2147-52.

---

= 국문초록 =

**목적:** 난소암에서 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응 (quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, quantitative real-time RT-PCR)을 이용한 cyclin B1과 D1의 mRNA 발현과 Western blot analysis를 이용한 cyclin B1과 D1의 단백질 발현을 연구하고 또한 이것과 여러 임상 예후 인자들과의 상관관계를 알아보려고 하였다.

**연구 방법:** 본원 산부인과에서 2002년 3월부터 2005년 2월까지 수술적 치료를 받은 환자를 대상으로 연구를 시행하여 신선한 난소암 조직 36예, 정상 난소 조직 5예를 얻었다.

**결과:** 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응에 의한 난소암 조직에서의 cyclin B1과 D1 mRNA  $2^{-\Delta\Delta CT}$  값의 평균은 각각  $5.83\pm 12.03$ 과  $17.60\pm 22.20$  였고, 대조군은 각각  $0.55\pm 0.35$ 과  $0.50\pm 0.26$ 로 두 군간에 차이를 보이나 통계적으로 유의하지 않았다 ( $p=0.67$ ,  $p=0.07$ ). Western blot analysis에 의한 cyclin B1과 D1 densitometer 값을 대조군에서 1로 보았을 때, 난소암 조직은 각각  $1.30\pm 0.73$ 과  $1.81\pm 1.28$ 로 두 군간에 차이를 보이나 통계적으로 유의하지 않았다. ( $p=0.76$ ,  $p=0.06$ ) Cyclin B1과 D1의 mRNA 및 단백질 발현은 임상 병리학적 예후 인자인 난소암의 외과적 병기, 혈청 내 CA-125, 유세포 분석법을 통한 DNA 정량검사 등과 통계적으로 상관관계를 보이지 않았다.

**결론:** 본 연구에서는 cyclin B1과 D1의 mRNA 및 단백질 발현이 난소암 조직에서 대조군보다 증가되어 cyclin B1과 D1이 난소의 종양형성 (tumorigenesis)과 악성도에 관여할 것으로 추정되었다. 그러나 cyclin B1과 D1의 mRNA 및 단백질 발현은 임상 병리학적 예후 인자들과 통계적으로 상관관계를 보이지 않았다. Cyclin이 난소암에서 예후 인자로서 가치가 있는지 평가하려면 발현 양상과 치료제에 대한 반응, 생존율 등을 연관시킨 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

**중심단어:** 난소암, Cyclin B1, Cyclin D1, 예후 인자

---