

# 자궁내막암조직에서 세포주기 조절단백 G1 cyclins의 발현과 임상적 예후인자와의 상관관계

연세대학교 의과대학 산부인과학교실  
김영태 · 김성훈 · 김재욱 · 이진우 · 박기현

## Correlation between G1 Cyclins Expression and Clinical Prognostic Parameters in Endometrial Carcinoma

Young Tae Kim, M.D., Sung Hoon Kim, M.D., Jae Wook Kim, M.D., Jin Woo Lee, M.D.,  
Ki Hyun Park, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine*

**Objective :** Cyclins D1 and E play important roles in the progression of cell through G1 phase of the cell cycle. Amplification and/or overexpression of the cyclin D1 gene and aberrant expression of cyclin E has been described in various forms of human cancer. However, the role of cyclins D1 and E in endometrial cancer has been poorly defined.

**Methods :** We examined the expression of cyclins D1 and E by Northern blot technique in 33 endometrial carcinoma specimens and 9 control endometrial tissues. In addition, expression of the estrogen and progesterone receptors (ER, PR) was studied by enzyme immunoassay to explore the relationship between cyclins D1 and E and endometrial cancer.

**Results :** We found that cyclin D1 expression showed down-regulated expression in endometrial cancer. Underexpression of cyclin D1 inversely related with ER positivity. However, cyclin E expression was increased in ER positive cancer group. Other clinicopathological prognostic factors were not correlated with cyclins D1 and E expression.

**Conclusion :** Further study based on larger numbers of cases with correlation of cyclins D1 and E status and survival data will be needed to elucidate the use of cyclin expressions as prognostic factor.

**Key Words :** Cyclins D1 and E, Endometrial carcinoma

### 서 론

자궁내막암은 미국이나 유럽선진국에서 높은 빈도를 보이고 있는 질환으로 우리나라에서는 비교적 다른 여성 생식기 암 특히 자궁경부암에 비하여 훨씬 낮은 빈도를 보이고 있지만 최근 급속한 경제 성장에 따른 생활수준의 향상으로 인하여 평균 수명이 길어짐에 따라 발생 빈도가 증가하는 추세이다. 이외에도 의학의 발전에 의한 진단 및 치료 방법의 향상, 그리고 폐경기 증상을 치료하기 위한 호르몬 제제의 사용 증가 등이 자궁내막암의 발생 빈도를 높이는 요인이 되고 있다.<sup>1</sup> 본 교실에서 지난 30년 동안 자궁내막암으

로 진단 및 치료를 받은 환자의 발생 빈도를 살펴보면 1960년대에는 10명(9.9%), 1970년대에는 21명(20.8%), 1980년대에는 28명(27.7%)으로 70년대, 80년대로 갈수록 증가하는 경향을 보였으며 1990년대에는 1996년까지 42명(41.6%)을 경험하여 과거보다 월등히 높은 발생 빈도를 보여 점차로 증가하는 추세임을 알 수 있었다.<sup>2</sup>

이러한 자궁내막암 환자의 70-80% 정도는 암 제1기에 속하며<sup>3</sup> 생존율이 비교적 양호한 편이나 진행된 경우에는 다른 악성 부인과 종양과 같이 불량한 예후를 보인다. 자궁내막암의 예후와 관련되어 지난 20여 년간 많은 연구가 이루어졌으며 특히 1988년 국제산부

인과학회(International Federation of Obstetrics and Gynecology, FIGO)에서 결정한 외과적 병기체계의 도입으로 보다 면밀한 병리조직학적 예후인자에 대한 연구가 가능해졌고 이를 통해 예후인자에 관한 많은 지식이 축적되게 되었다. 여기에는 조직학적 분화도, 세포 형태, 병기, 자궁근층의 침범, 림프절 전이, 복막 세포진, 자궁의 전이 등이 포함된다. 그러나 이러한 예후인자들의 발견에도 불구하고 재발 가능성이 있는 고위험군 환자를 예견하는데 많은 불일치를 보이고 있으며 이러한 이유로 해서 추가적인 예후인자를 찾는 데 많은 노력이 경주되고 있다.<sup>4</sup> 최근에는 눈부신 발전을 보이고 있는 분자생물학의 발달과 더불어 생물학적인 기초를 가진 수많은 예후인자들(biological prognostic parameters)에 대한 연구가 전개되고 있으며 호르몬의존성 종양으로 알려져 있는 자궁내막암에서는 암세포의 호르몬 의존성 및 암의 악성도와 호르몬 대체요법의 반응과 예후를 예측하는 중요한 인자로서 에스트로겐수용체(estrogen receptor, ER) 및 프로제스테론수용체(progesterone receptor, PR)의 정량 및 정성 분석이 시행되어 왔다.<sup>5-9</sup>

세포재생산(cellular reproduction)의 과정인 세포주기는 통상 G1 (gap1) phase, S (synthetic) phase, G2 (gap2) phase, 그리고 M (mitotic) phase로 구성되어 있으며 최근에 와서 이러한 세포주기를 조절하는 인자들에 대한 연구가 종양학분야에서 활발히 이루어지고 있다.<sup>10-13</sup> 세포주기 조절에 관여하는 대표적인 조절인자로는 cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), 그리고 cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs)가 보고되어 있다. 현재까지 포유동물세포(mammalian cell)에서는 8개의 CDK가 알려져 있는데 세포주기의 각 단계에서 작용하는 CDK는 각각 다른 것으로 알려져 있다.

이러한 CDK는 cyclin이라고 불리는 단백질과 결합해야만 활성이 있는 작용을 나타내게 된다. 단순한 CDK subunit만으로는 효소작용(enzymatic activity)을 나타내지 못하고 cyclin과 결합하여 heterodimeric enzyme이 되어야만 비로소 제 역할을 수행하는 것이 규명되어 있다.<sup>14,15</sup> 진핵세포의 세포주기는 DNA 합성을 유도하는 G1 phase와 세포분열을 하게 하는 G2/M phase에 존재하는 2곳의 restriction points (R-point)에서 세포분열이 조절되는 것으로 알려져 있는데 G1/S phase를 조절하는 cyclin을 G1 cyclins (cyclin C, D1-D3, E)이라고 하며 G2/M 이행기를 조절하는 cyclin을 mitotic cyclins (cyclin A, B)로 구분하고 있다.<sup>16-18</sup>

Cyclin A는 DNA 합성시작직전에 출현하여 prophase까지 증가하다가 metaphase에 소멸되며 CDK2와 결합한다. Cyclin B는 S phase 후반부터 증가하기 시작하여 metaphase에 급격한 소멸을 보이며 p34<sup>cdc2</sup>와 결합하고 cyclin C는 G1 중반기부터 발현되는 것으로 보고되고 있다.<sup>19</sup> D type cyclin은 D1-D3가 있으며 이중 D1은 G1 후반기에 가장 발현이 증가하며 CDK2, CDK4 및 CDK5와 결합하여 G1-S transition에 관련된다고 밝혀져 있다. Cyclin E는 G1 phase 중반부터 증가하여 G1 phase 후반 및 S phase 초반에 가장 많은 발현이 이루어지며 CDK2와 결합하는 것으로 알려져 있다.<sup>20-24</sup> 이러한 cyclin들은 암화과정과 관련되어 여러 가지 측면에서 연구가 진행되어오고 있다. 실험실연구를 통해 현재 많은 암유전자들이 성장인자(growth factor)와 세포주기를 연결하여 세포분열기전을 촉진하는 신호전달계의 구성인자임이 규명되었고 반면에 항암유전자들은 세포주기 조절기전에서 브레이크와 같은 역할을 수행함으로써 세포분열을 억제하여 암발생을 억제한다고 알려져 있다.<sup>24,25</sup> 또한 몇 종류의 암에서는 cyclin 유전자의 구조적 변화 혹은 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 몇몇 cyclin은 암유전자로 인식되고 있다. 이러한 예로서는 간암, 부갑상선암(parathyroid adenoma), 유방암을 들 수 있다. 간암에서는 B형 간염 바이러스가 숙주 염색체의 cyclin A 유전자 부위에 삽입되어 있음이 보고되어 있고<sup>23</sup> 부갑상선선종에서는 유전자재배열에 의해 부갑상선 호르몬 유전자(PTH gene)와 연결되어 암을 유발한다고 알려졌던 PRAD1 (parathyroid adenoma 1 gene) 유전자가 cyclin D1 유전자임이 밝혀졌고<sup>24</sup> 유방암에서는 cyclin E 유전자의 증폭과 과발현이 발암과 관계가 있다고 보고되어 있다.<sup>25-27</sup> Zeffass 등(1995)에 의한 NIH 3T3 세포주를 이용한 연구에서는 HPV E7 유전자를 transfection 하게 되면 cyclin E와 cyclin A 유전자의 발현이 증가된다고 발표되었다.<sup>31</sup>

또한 이러한 cyclin의 발현도를 종양의 예후와 관련하여 연구가 진행되고 있는데 Zhang 등(1994)은 cyclin D1의 과발현이 유방암에 있어 유용기능한 종양표지자(tumor marker)라고 보고하였고<sup>32</sup> Nielsen 등(1996)은 cyclin E의 과발현이 유방암의 불량한 예후인자라고 보고하였다.<sup>33</sup> Uhlman 등(1996)은 cyclin D1의 발현이 후두암에 있어 암진행 예측인자로 사용할 수 있다고 주장한<sup>34</sup> 반면에 Ito 등(1998)은 면역조직화학염색법을 사용한 연구를 통해 자궁내막암에서의 cyclin D 및

cyclin E의 과발현이 임상적 예후인자와는 관련성이 적다고 보고하였다는 등<sup>35</sup> 다른 종류의 암연구에서와는 달리 자궁내막암과 cyclin에 대한 연구는 매우 미진한 상황이다.

이에 본 연구자들은 서구화과정과 더불어 우리나라에서 점차 많은 발생빈도를 보이는 자궁내막암조직 RNA level에서의 cyclin의 발현을 호르몬수용체와 연관하여 조사하였으며 그 결과와 임상적 예후인자와의 관련성을 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

연세대학교 의과대학 산부인과학교실에 내원하여 자궁내막암으로 확진된 환자 33명과 양성 부인과 중앙으로 전자궁절제술을 시행받은 대조군 환자 9명의 자궁내막조직을 대상으로 하였다. 자궁내막조직은 수술실에서 0.5×0.5 cm 크기 이상의 조직을 2개 이상으로 나누어 무균적으로 얻어 실험 전까지 영하 70도의 nitrogen tank에 보관하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 에스트로겐수용체 및 프로게스테론수용체의 분석

호르몬 수용체의 측정을 위한 실험방법으로, 적출된 조직은 지방조직, 피사부위 및 혈액성분을 제거한 후 얼음상자에 담아 수송하여 -70℃에 냉동보관하였으며 나머지 조직은 조직병리검사를 의뢰하였다. Cytosol만의 분리를 위해 4℃에서 검체를 1 mM 정도로 잘게 자른 후 250~300 mg 정도의 정량된 검체에 3 ml의 homogenizer buffer (1 mM MTG, 10 mM TRIS, 1.5 mM EDTA, 5 mM EDTA, 5 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>)를 가하고, 빙조상에서 조직 마쇄기(Ultra-Turrax IKA Laobrtechnik)를 이용하여 5초간 마쇄한 후 30초간 휴지하는 방법으로 4~5회 정도 마쇄한 다음 초원심분리기(Ultracentrifuge L8-M, Beckman)로 4℃에서 40,000 rpm으로 1시간 동안 원심시켜 최상층의 지방층과 바닥의 침사를 피해 상층액을 분리하였다.

조직의 cytosol 내의 단백질 정량은 Lowry법으로 측정하였으며 에스트로겐수용체 및 프로게스테론수용체의 정량은 Abbott사의 ER-PR EIA Monoclonal Kit를 이용한 solid phase immunoassay (sandwich method)법으로 측정하였다. 최종 ER 및 PR의 농도(fmole/mg

protein)로 표시하였고 각각 20 fmole/mg protein 이상 일 때를 양성으로 판정하였다.

#### 2) 전체 RNA의 분리

조직(100 mg)을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄한 후, Trizol 1 ml이 들어있는 epi-tube에 옮긴다. 5분간 vortex한 후, chloroform 100 ul을 넣고 다시 5분간 vortex 하고 15,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 수용액층과 페놀층을 분리한다. 상층액만을 다른 tube에 취한 후, 1 vol.의 isopropanol을 넣고 잘 섞어 준다. 이후 -20℃에서 30분 정도 방치한 후 15,000 rpm으로 4℃에서 30분간 원심분리하여 핵산을 침전시킨다. DEPC를 처리한 증류수 1 ml에 재현탁시킨 핵산에 10 M Lithium Chloride를 최종 2 M이 되도록 첨가하고 4℃에서 30분 이상 방치한 후 15,000 rpm으로 4℃에서 30분간 원심분리하여 RNA를 침전시킨다. 이 RNA 침전물을 70% cold-ethanol로 씻어준 후, DEPC를 처리한 증류수 약 30 ul에 녹인다. 이렇게 해서 분리된 전체 RNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 순수도를 알아보고 양을 계산한다.

#### 3) RNA 전기영동

RNA 전기영동은 formaldehyde gel을 사용한다. Formaldehyde와 증류수, 5×gel running buffer (0.1 M MOPS, pH 7.0, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA, pH 8.0)가 1 : 3.5 : 1.1의 비율이 되게 섞어 있는 1% agarose gel을 만들어 10 분간 pre-run을 한 후 사용하며 RNA 시료는 RNA와 formamide, formaldehyde, 5×gel running buffer를 4.5 : 10 : 3.5 : 2의 비율로 섞어 65℃에서 15분간 변성시킨 후 전기영동을 한다. 전기영동이 끝난 후 Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham)에 진공을 이용하여 RNA를 전이시키고(TransVac, Hoefer), 80℃에서 10분간 방치한 후 UV-Crosslinker로 고정시킨다.

#### 4) Northern blot analysis

RNA가 전이된 membrane을 hybridization 용액(50% formamide, 0.25 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA)에 담가 42℃에서 prehybridization시킨다. 4시간이 지난 후 hybridization용액을 새로 넣고 방사능-표지된 probe를 열변성시켜 넣는다. 18시간 이상이 지난

후 hybridization 용액을 버리고 membrane을 용액 I (2 ×SSC, 0.1% SDS)으로 52℃에서 3번, 용액 II (25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)으로 52℃에서 2번, 용액 III (25 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, 1% SDS)으로 52℃에서 2번 씻어준 후 X-ray 필름에 감광시킨다. Autoradiogram은 scanning densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)를 이용하여 각 transcript의 양을 측정하였다.

5) 통계처리

자료의 통계분석은 SPSS (version 11) software를 사용하여 Fisher's exact test,  $\chi^2$  test를 사용하였으며 p<0.05인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 자궁내막암조직과 대조군의 에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체의 양성률

에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체의 농도는 자궁내막암조직에서보다 정상대조군에서 높게 나타났는데 대조군에서 에스트로겐수용체는 100%에서 양성률을 보였고 평균농도는 162.1±13.8 fmole/mg이었던 반면에 자궁내막암에서는 76%에서 양성률을 보였고 평균농도는 98.5±18.2 fmole/mg이었다. 또한 프로제스테론수용체는 정상대조군에서 마찬가지로 100% 양성률을 보였고 평균농도는 211.1±12.8 fmole/mg이었던 반면에 악성조직에서는 67%의 양성률과 평균농도 62.1±3.8 fmole/mg을 보여 대조군과 자궁내막암 조직간의 유의한 차이를 보이지 않았으나 자궁내막암조직에서는 대조군의 정상자궁내막에 비해 호르몬수용체의 농도가 낮게 나타났다.

2. 대상환자에서 cyclin D1과 cyclin E의 발현상태

Northern blot상 9예의 대조군에서는 1.1 kb 크기의 cyclin D1 및 1.0 kb 크기의 cyclin E가 모두 관찰되었다. 그러나 자궁내막암 조직에서는 cyclin D1의 발현이 감소되어 있는 양상을 보였으며 특히 에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체가 음성인 자궁내막암조직에서는 cyclin D1의 발현이 매우 감소되어 있었다. 반면에 cyclin E의 발현은 내막암군에서 높게 발현되어 있음이 관찰되었다(Fig. 1, 2). 이를 densitometer를 이용

하여 transcript의 양을 측정하였을 때 정상대조군에 비해 내막암군에서는 cyclin D1의 양이 감소되어 있는 경향을 보였으며 cyclin E의 경우에는 정상대조군에 비해 침윤암군에서 증가되어 있음이 관찰되었으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다(Fig. 3).

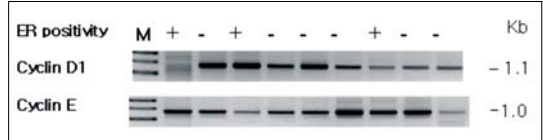


Fig. 1. Northern blot analysis of cyclins D1 and E on endometrial carcinoma correlated with estrogen receptor (ER) positivity.

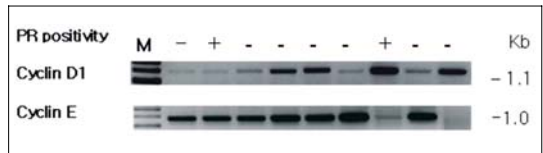


Fig. 2. Northern blot analysis of cyclins D1 and E on endometrial carcinoma correlated with progesterone receptor (PR) positivity.

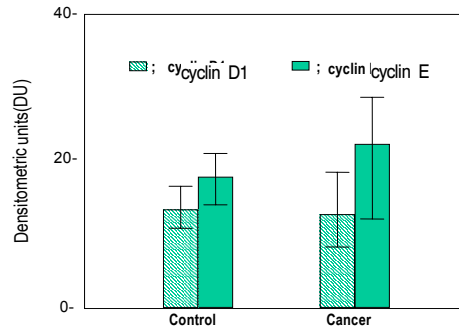


Fig. 3. Densitometric analyses of the relative levels of RNAs

Fig. 3. Densitometric analyses of the relative levels of RNAs.

3. 자궁내막암군에서 cyclin D1의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성

정상대조군의 cyclin D1의 autoradiogram을 densitometer로 분석하였을 때 평균 15 DU (densitometric unit) 이었고 최대값은 19 DU로 나타났다. 이에 15 DU값을 cut-off치로 기준하여 침윤암군에서의 cyclin D1의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 예후인자와

의 관련성을 분석한 결과, 중앙분화도, 자궁근층침범도, 병기, 림프절전이 유무, 세포형태, 프로제스테론 수용체양성률과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 에스트로겐수용체에 따라서는 cyclin D1의 과발현이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다 (Table 1).

4. 자궁내막암군에서 cyclin E의 발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성

대조군의 cyclin E의 autoradiogram을 densitometer로 분석하였을 때 평균 18 DU (densitometric unit)이었고 최대값은 22 DU로 관찰되었다. 이에 22 DU값을 cut-off치로 기준하여 자궁내막암군에서의 cyclin E의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 분석한 결과, 중앙분화도, 자궁근층침범도, 병기, 림프절전이 유무, 세포형태와는 통계적으로

유의한 차이를 보이지 않았으나 호르몬수용체 음성군에서는 cyclin E의 과발현이 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다(Table 2).

고 찰

자궁내막암은 미국이나 유럽의 여러 선진국에서 높은 발생빈도를 보이고 있는 부인암으로서 우리나라에서는 다른 여성 생식기종양 특히 자궁경부암에 비하여 비교적 낮은 빈도를 보이고 있다. 그러나 최근 급속한 경제 성장에 따른 생활 수준의 향상으로 말미암아 평균 생명수명이 신장됨에 따라 점차 발생 빈도가 증가하고 있는 중요한 부인암의 하나로 자리 매김하고 있다. 또한 의학의 전반적인 발전과 더불어 진단 및 치료 방법의 향상, 그리고 폐경기 증상을 치료하기 위한 호르몬 대체요법의 사용 증가 등이 자궁내막암의

**Table 1.** Correlation between cyclin D1 overexpression and clinicopathological prognostic parameters in endometrial carcinoma

Prognostic factors	(N)	Overexpression		P value
		Present	Absent	
Grade				
I	(19)	8	11	NS
II	(11)	2	9	
III	( 3)	1	2	
Myoinvasion				
0	(10)	5	5	NS
< 1/2	(13)	2	11	
≥ 1/2	(10)	6	4	
Stage				
I & II	(22)	9	13	NS
III & IV	(11)	7	4	
LN* involvement				
Negative	(28)	15	13	NS
Positive	( 5)	2	3	
Cell type				
Endometrioid	(28)	16	12	NS
Adenosquamous	( 3)	2	1	
Serous	( 2)	1	1	
ER				
Negative	( 8)	1	7	0.04
Positive	(25)	14	11	
PR				
Negative	(11)	3	8	NS
Positive	(22)	9	13	

\* LN; lymph nodes including pelvic and paraaortic lymph node.

**Table 2.** Correlation between cyclin E overexpression and clinicopathological prognostic parameters in endometrial carcinoma

Prognostic factors	(N)	Overexpression		P value
		Present	Absent	
<b>Grade</b>				
I	(19)	10	9	NS
II	(11)	9	2	
III	( 3)	1	2	
<b>Myoinvasion</b>				
0	(10)	5	5	NS
<1/2	(13)	10	3	
≥1/2	(10)	6	4	
<b>Stage</b>				
I & II	(22)	12	10	NS
III & IV	(11)	7	4	
<b>LN* involvement</b>				
Negative	(28)	16	12	NS
Positive	( 5)	2	3	
<b>Cell type</b>				
Endometrioid	(28)	17	11	NS
Adenosquamous	( 3)	2	1	
Serous	( 2)	1	1	
<b>ER</b>				
Negative	( 8)	7	1	0.03
Positive	(25)	10	15	
<b>PR</b>				
Negative	(11)	9	2	0.02
Positive	(22)	8	14	

\* LN; lymph nodes including pelvic and paraaortic lymph node.

발생 빈도를 높이는 요인이 되고 있다.<sup>1,2</sup> 자궁내막암 환자의 70-80% 정도는 암병기 제 1기에 속하며<sup>3</sup> 생존율이 비교적 양호한 경과를 보이지만 진행암 및 재발암의 경우에는 다른 악성 부인과 종양과 마찬가지로 불량한 예후를 나타내게 된다.

자궁내막암의 예후에 관해서는 지난 사반세기에 걸쳐 많은 연구가 이루어졌으며 특히 1988년 국제산부인과학회(FIGO)에서 결정한 외과적 병기체계의 도입으로 보다 정확한 병리조직학적 예후인자에 대하여 규명되었으며 이를 통해 예후인자에 관한 많은 지식이 축적되게 되었다. 임상병리학적 예후인자로는 조직학적 분화도, 세포 형태, 병기, 자궁근층의 침범, 림프절 전이, 복막 세포진, 자궁외 전이 등이 보고되어 있다. 그러나 이러한 예후인자들의 발견에도 불구하고 재발 가능성이 있는 고위험군 환자를 예견하는데는 아직 연구 결과가 동일한 상황이 아니므로 이러한

이유로 해서 좀더 객관적이며 재현가능성이 높은 추가적인 예후인자를 찾는 데 많은 연구자들이 노력을 경주하고 있다. 최근에는 눈부신 발전을 보이고 있는 분자생물학의 발달과 더불어 생물학적인 기초를 가진 많은 분자(molecule)들에 대한 연구가 폭발적으로 이루어지고 있으며 이러한 생물학적 예후인자(biological prognostic parameter)에 대한 연구가 활발히 전개되고 있으며 특히 에스트로겐 의존성 종양으로 알려져 있는 자궁내막암에서는 암세포의 호르몬 의존성 및 암의 악성도와 호르몬 대체요법의 반응과 예후를 예측하는 중요한 인자로서 에스트로겐수용체(estrogen receptor, ER) 및 프로게스테론수용체 (progesterone receptor, PR)의 정량 및 정성분석이 시행되어 왔다.<sup>4,9</sup>

에스트로겐수용체 및 프로게스테론수용체는 표적 세포(target cell)에 존재하면서 steroid 호르몬과 결합하여 유전자의 발현을 조절함으로써 호르몬작용을 나타

나게 하는 조절단백질이다. 조직내의 특정 수용체를 측정함으로써 그 호르몬 활성도를 미리 예측할 수 있는데 호르몬 기능의 조절을 위해서 수용체의 존재 뿐 아니라 steroid 호르몬이 이러한 수용체에 결합하여 다른 생물학적 기능을 발휘하는지의 여부를 파악하는 것도 매우 중요하다. 즉 에스트로겐에 의해 프로세스테론의 생합성이 증가되는지와 tamoxifen과 같은 항에스트로겐치료에 의해 암세포의 성장이 억제되는지의 여부 등을 평가할 수 있다. 기존에 널리 시행해오던 radioligand binding assay는 tissue homogenate에서 수용체 단백질에 결합하는 radiolabeled 호르몬을 사용하여 측정하는 방법으로, 최소한 250 mg의 검체조직을 필요로 하고 검사시간도 약 7-8일이 소요되며 숙련된 기술과 고가의 비용을 필요로 한다. 더욱이 프로세스테론수용체의 경우는 프로세스테론수용체의 분자구조가 매우 복잡하여 측정이 더욱 어려우며 동일량의 검체, 비용과 검사시간이 소요되고 또한 에스트로겐수용체의 경우에는 수용체 상호작용에 의해 masking 되어 낮게 측정될 수 있음으로써 높은 위양성률을 나타낼 가능성도 있다. 이와 같은 생화학적 분석방법의 단점을 보완할 수 있는 면역 생화학적 분석법의 발전으로 estradiol 항체의 측정과 자연형광 estrogen 또는 synthetic labeled estradiol ligand conjugate 등을 이용하는 방법들이 보고되었다.<sup>5-8</sup>

본 연구에서는 Greene 등에 의해 합성된 특이성이 매우 높은 에스트로겐수용체 및 프로세스테론수용체의 monoclonal antibody (abbott laboratory diagnostic division)을 이용한 ER-PR EIA Monoclonal Kit를 사용하여 이들 수용체를 측정하였다.<sup>5</sup> 효소면역분석법 (enzyme immunoassay)은 다른 두개의 항체 H222와 D547를 이용하며 이들의 두 항체는 서로 다른 항원부위에 결합하게 된다. D547 항체는 anchor antibody로서 세포질내 steroid 수용체 단백질에 결합하며 H222 항체는 enzyme labeled antibody로 일단 polystyrene lead에 붙고 남은 다른 epitope에 부착한다. 이와 같은 monoclonal antibody를 이용한 enzyme immunoassay는 혈중 estrogen에 이미 결합되어 있는 수용체에 관계없이 결합형 및 유리형 모두를 측정하며 binding assay보다 devascularization시 degradation에 영향을 크게 받지 않는 장점을 가지고 있다. Holmes 등은 binding assay와 enzyme immunoassay를 동시에 사용하여 수용체를 측정할 때, 두 검사 방법에서의 결과가 매우 높은 상관관계를 나타내었으나 단점으로는 고농도의 항

estrogen 또는 diethylstilbesterol이 수용체의 위양성률을 증가시킬 수 있다고 하였다.<sup>6</sup> 본 연구에서는 에스트로겐 수용체 양성율이 76% 그리고 프로세스테론 수용체의 양성율은 67%로 나타났는데 이는 다른 연구자들의 결과와 유사한 것으로 나타났다.

최근 연구에서는 자궁내막암의 발암과정에서 up 또는 down regulation되는 세포주기 조절인자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 cyclins, cyclin-dependent kinases (CKDs) 및 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)에 대한 연구가 집중되고 있다. 여러 종류의 암에서는 cyclin유전자의 구조적 변화 혹은 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 몇몇 cyclin은 암유전자로서 인식되고 있다.<sup>10-15</sup> 정상세포와 달리 암세포가 지니는 큰 특징으로 조절상실된 세포주기 및 세포분열을 들 수 있다. 이러한 특징을 바탕으로 암치료에 있어서 기초적인 연구방향들 중에서도 많은 각광을 받고 있는 분야가 세포주기에 관한 것이 되고 있다. 세포의 유사분열은 G1, S, G2, M기로 구성되는 세포주기를 거쳐 이루어지며 이러한 세포주기의 조절에 cyclin 단백질의 합성과 소멸이 중요한 역할을 하고 있음이 규명되게 되었고 이러한 현상은 인간을 위시한 포유류, 조류, 양서류, 어류, 및 단세포동물에 이르기까지 진화적으로 보존되어 있는 현상을 나타내고 있음이 밝혀져 있다.<sup>14</sup> 이러한 cyclin은 세포성장과 분화의 기능을 수행하며 cyclin dependent kinase (CDK)들과 결합하여 작용을 나타내게 된다. 진핵세포의 세포주기는 DNA합성을 유도하는 G1기와 세포분열을 하게하는 G2/M기의 2개의 주된 결정요소(check-point)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는데 G1/S 이행기를 조절하는데 관여하는 cyclin을 G1 cyclin이라 하고 G2/M이행기를 조절하는 cyclin을 mitotic cyclin으로 구분하고 있다. Mitotic cyclin에는 cyclin A, B가 존재하며 G1 cyclin에는 C, D1, D2, D3, E 등이 보고되어 있다. 이들 가운데 cyclin D1이 가장 먼저 밝혀졌는데 이는 부갑상선종양의 유전인자를 재배열함으로써 얻어진 것으로 cyclin D1/PRAD1으로도 불리우고 있으며 인체염색체 11번 장완에 존재하고 있어 bcl-1, int-2 등과 비슷한 위치에 있기 때문에 일부종양에서는 이들 인자와 같이 증폭되는 경우가 보고되고 있다.<sup>19-31</sup>

최근에는 이러한 cyclin의 발현도를 종양의 예후와 관련하여 연구가 진행되고 있는데 Zhang 등(1994)은 cyclin D1의 과발현이 유방암에 있어 유용 가능한 종양표지자(tumor marker)라고 보고하였고<sup>32</sup> Nielsen 등

(1996)은 cyclin E의 과발현이 유방암의 불량한 예후인자라고 보고하였다.<sup>33</sup> Uhlman 등(1996)은 cyclin D1의 발현이 후두암에 있어 암 진행 예측인자로 사용할 수 있다고 주장한<sup>34</sup> 반면에 Ito 등(1998)은 자궁내막암에서의 cyclin D의 과발현을 단백질수준(protein level)에서 면역조직화학염색법(immunohistochemical technique)을 이용한 보고에서 임상적 예후인자와는 관련성이 없다고 보고하였다.<sup>35</sup> 본 연구에서 자궁내막암 환자의 조직을 대상으로 cyclin D1의 과발현과 임상병리학적 예후인자와의 관련성을 조사한 결과에서는 분화도, 병기, 근층침윤, 림프절전이유무, 세포형태 및 PR 양성율 등의 예후인자와는 통계학적으로 유의한 관련성이 나타나지 않았다. 그러나 ER 양성율에 따라서는 통계적으로 유의한 관련성을 보였다. 이는 Milde-Langosch 등(2001)이<sup>36</sup> 자궁내막암 및 자궁내막증식증을 대상으로 Western blotting을 통한 연구보고에서 조직학적 분화도, 임상병기, 호르몬 수용체의 농도와는 cyclin D1의 발현양상이 유의한 상관관계를 나타내지 않았다는 보고와 일치한다. 그러나 마찬가지로 여성호르몬의 영향을 받는 유방암을 대상으로 Kenny 등(1999)이<sup>37</sup> 연구한 결과에서는 cyclin D1 mRNA의 과발현과 ER positivity와는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이며 특히 ER 양성인 환자에서 재발률, 국소재발율, 전이정도 및 사망률과는 밀접한 관계를 나타내지만 환자연령, 폐경유무, 림프절전이유무, 혈관침윤, 종괴크기, 분화도와는 cyclin D1의 발현이 관련성이 없다는 보고와도 본 연구는 연관성을 보인다고 하겠다.

한편 cyclin E의 과발현과 예후인자와의 관련성을 살펴보면 병기, 근층침윤, 분화도, 세포형태, 림프절전이유무 등과는 통계학적으로 유의한 연관성을 나타내지 않았다. 반면에 ER 양성율과 PR 양성율과 cyclin E의 과발현은 통계학적으로 유의하게 나타났는데 이는 Milde-Langosch 등(2001) cyclin 발현도를 연구한 보고와 비슷한 결과를 보였다.<sup>36</sup> 특히 이들은 자궁내막암의 발암과정에 있어 cyclin E가 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고하였다. 그러나 피부암을 대상으로 한 Bito 등(1997)의 보고에서는 premalignant tumor에서는 cyclin E의 과발현이 관찰되지만<sup>38</sup> 편평상피암조직에서는 cyclin E의 발현이 down-regulation되었다는 상반된 연구결과도 보고되어 있으므로 이러한 세포주기 조절인자의 발현상태는 장기 특이성(organ specificity)이 존재할 가능성도 있다고 하겠다. 본 연구에서는 cyclin D1 및 E의 과발현이 자궁내막암의 여러 임상병

리학적 예후인자들과 밀접한 관련성을 나타내지는 않았지만 호르몬 수용체와는 연관성이 있음을 알 수 있었다. 그러므로 cyclin의 발현을 예후인자로 평가하기 위해서는 많은 증례를 통한 장기간의 추적관찰을 통한 생존율에 관한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 대한산부인과학회 종양분과위원회: 한국부인암 등록사업 조사 보고서(1998.1-1998.12.31) 대한산부회지 2001; 44: 426-59.
2. Kim JW, Kim SH, Kim YT, Kim DK. Clinicopathologic and biological parameters predicting the prognosis in endometrial cancer. *Yonsei Med J* 2002; 43: 769-78.
3. Disaia PJ, Creasman WT. Management of endometrial adenocarcinomas Stage I with surgical staging followed by tailored adjuvant radiation therapy. *Clinics in Obstet Gynecol* 1986; 13: 751.
4. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-48.
5. Greene GL, Sobel NB, King WJ, Jensen EV. Immunochemical studies of estrogen receptors. *J Steroid Biochem* 1984; 20: 51-6.
6. Holmes FA, Fritsche HA, Loewy JW, Geitner AM, Sutton RC, Buzdar AU, et al. Measurement of estrogen and progesterone receptors in human breast tumors: enzyme immunoassay versus binding assay. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1025-35.
7. Kadar N, Malfetano JH, Homesley HD. Steroid receptor concentrations in endometrial carcinoma: effect on survival in surgically staged patients. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 281-6.
8. Kauppila A, Friberg LG. Hormonal and cytotoxic chemotherapy for endometrial carcinoma. Steroid receptors in the selection of appropriate therapy. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1981; 101: 59-64.
9. Kauppila A, Kujansuu E, Vihko R. Cytosol estrogen and progesterone receptors in endometrial carcinoma of patients treated with surgery, radiotherapy, and progesterin. *Clinical correlates. Cancer* 1982; 50: 2157-62.
10. Hartwell L. Twenty-five years of cell cycle genetics. *Genetics* 1991; 129: 975.
11. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503.
12. Hartwell L, Culotti J, Pringle J, Reid B. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974; 183: 46.
13. Hartwell L, Mortimer K, Culotti J, Culotti M. Genetic



- control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of *cdc* mutants. *Genetics* 1973; 74: 267.
14. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991; 66: 1071.
  15. Bartek J, Staskova Z, Draetta G. Molecular pathology of the cell cycle in human cancer cells. *Stem Cells* 1993; 1(suppl 1): 51.
  16. Gong J, Ardel T, Traganos F. Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 1994; 54: 4285.
  17. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821.
  18. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Baeck J. Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene* 1994; 9: 707.
  19. Lock LF, Wickramasinghe D. Cycling with CDKs. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 404.
  20. Lam EWF, Morris JDH, Davies R, Crook T, Watson RJ, Vousden KH. HPV 16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J* 1994; 13: 871.
  21. Callender T, Naggari A, Lee MS. PRAD-1(CCND 1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994; 74: 152.
  22. Jeffrey PC, Russo AA, Polyak K. Crystal structure of a cyclin A-CDK2 complex at 2.3 Å: Mechanism of CDK activation by cyclins. *Nature* 1995; 376: 313.
  23. Wang J, Chenivesse X, Henglein B. Hepatitis B virus integrated in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990; 343: 555.
  24. Motokura T, Bloom T, Kim HG. A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512.
  25. Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1112.
  26. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB. Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 380.
  27. Muller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bart J, Eilers M, et al. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2945.
  28. Thomas T, Thomas TJ. Regulation of cyclin B1 by estradiol and polyamines in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 1077.
  29. Kurzrock R, Ku S, Taipaz M. Abnormalities in the PRAD(CYCLIN D1/BCL-1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer* 1995; 75: 584.
  30. Cho NH, Kim YT, Kim JW. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int. J Gynecol. Pathol* 1997; 16: 339.
  31. Zerfess K, Schulze A, Spitzkovsky D. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 1995; 69: 6389.
  32. Zhang SY, Caamano J, Cooper F. Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 695-8.
  33. Nielsen NH, Arnerl C, Emdin SO. Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to estrogen receptor status. *Br J Cancer* 1996; 74: 874-80.
  34. Uhlman DL, Adams G, Dennis K. Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Res* 1996; 56: 2199-205.
  35. Ito K, Sasano H, Yoshida Y. Immunohistochemical study of cyclin D and E and cyclin dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18(3A): 1661-4.
  36. Milde-Langosch K, Bamberger AM, Goemann C, Rossing E, Rieck G, Kelp B, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins in endometrial carcinomas: correlations with hormone receptor status and clinicopathologic parameters. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 537-44.
  37. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2069-76.
  38. Bito T, Ueda M, Ito A, Ichihashi M. Less expression of cyclin E in cutaneous squamous cell carcinomas than in benign and premalignant keratinocytic lesions. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 305-8.

## 국문초록

**목적 :** 서구화과정과 더불어 우리나라에서 점차 많은 발생빈도를 보이는 자궁내막암조직 RNA level에서의 cyclin의 발현을 호르몬수용체와 연관하여 조사하였으며 그 결과와 임상적 예후인자와의 관련성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

**연구 방법 :** 연세대학교 의과대학 산부인과학교실에 내원하여 자궁내막암으로 확진된 환자 33명과 양성 부인과 종양으로 전자궁절제술을 시행받은 대조군 환자 9명의 자궁내막조직을 대상으로 에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체를 효소면역분석법으로 조사하였으며 세포주기인자중에서 cyclin D1과 cyclin E의 발현을 연구하였다.

**결과 :** 자궁내막암조직과 대조군의 에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체의 양성률을 조사한 결과에서 에스트로겐수용체 및 프로제스테론수용체의 농도는 자궁내막암조직에서보다 정상대조군에서 높게 나타났는데 대조군에서 에스트로겐수용체는 100%에서 양성률을 보였고 평균농도는  $162.1 \pm 13.8$  fmole/mg이었던 반면에 자궁내막암에서는 76%에서 양성률을 보였고 평균농도는  $98.5 \pm 18.2$  fmole/mg이었다. 또한 프로제스테론수용체는 정상대조군에서 마찬가지로 100% 양성률을 보였고 평균농도는  $211.1 \pm 12.8$  fmole/mg이었던 반면에 악성조직에서는 67%의 양성률과 평균농도  $62.1 \pm 3.8$  fmole/mg을 보여 대조군과 자궁내막암 조직간의 유의한 차이를 보이지 않았으나 자궁내막암조직에서는 대조군의 정상자궁내막에 비해 호르몬수용체의 농도가 낮게 나타났다. 내막암군에서의 cyclin D1의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 제예후인자와의 관련성을 분석한 결과, 종양분화도, 자궁근층침범도, 병기, 림프절전이 유무, 세포형태, 프로제스테론수용체양성률과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고 에스트로겐수용체에 따라서는 cyclin D1의 과발현이 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다. cyclin E의 transcript의 과발현양상과 임상병리학적 제예후인자와의 관련성을 분석한 결과에서도 종양분화도, 자궁근층침범도, 병기, 림프절전이 유무, 세포형태와는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 호르몬수용체 음성군에서는 cyclin E의 과발현이 통계학적으로 유의하게 높게 나타났다.

**결론 :** cyclin D1 및 E의 과발현이 자궁내막암의 여러 임상병리학적인 예후인자들과 밀접한 관련성을 나타내지는 않았지만 호르몬 수용체와는 연관성이 있음을 알 수 있었다. 그러므로 cyclin의 발현을 예후인자로 평가하기 위해서는 많은 증례를 통한 장기간의 추적관찰을 통한 생존율에 관한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

**중심단어 :** 자궁내막암, 세포주기, cyclin D1, cyclin E