

Human Papillomavirus Type 16 및 18에 감염된 자궁경부암 환자에서 Proliferating Cell Nuclear Antigen 측정에 관한 연구

건국대학교 의과대학 산부인과학교실

김 수 념

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실* 및 생화학교실**

박찬규 · 김호근* · 김경섭**

= Abstract =

The Assessment of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Cervical Carcinoma Patients Infected with Human Papillomavirus Types 16 and 18

Soo Nyung Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, KonKuk University College of Medicine

Tchan Kyu Park, M.D., Ho Guen Kim, M.D.* and Kyung Sup Kim, M.D.**

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

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a nuclear protein associated with the cell proliferative state. The relationship between the presence of human papillomavirus (HPV) and proliferative indices (PI) was studied. Determination of PI was done by immunohistochemical staining via the avidin-biotin-complex immunoperoxidase method and HPV 16 and HPV 18 status by Southern blot hybridization on paraffin-embedded material from 49 patients with carcinoma of the uterine cervix.

HPV 16 was present in 15 cases, HPV 18 was observed in 6 cases, and both HPV 16 and HPV 18 were found in 4 cases. There was significant correlation between PI and HPV types. PI was $59.7 \pm 9.0\%$ in HPV 16 positive lesion, $67.4 \pm 10.6\%$ in HPV 18 positive lesion, $79.4 \pm 4.2\%$ in both HPV 16 and HPV 18 positive lesion, and $57.5 \pm 16.9\%$ in HPV negative lesion.

Among cervical adenocarcinomas, PI was $72.5 \pm 14.9\%$ in HPV 16 or HPV 18 positive lesion, as compared to $39.8 \pm 15.1\%$ in HPV negative lesion. No correlation was found between HPV-DNA positivity and PI in relation to clinical stages, histologic types, and lesion size.

Key Words: Cervical carcinoma, PCNA, Human papillomavirus

' 본 연구는 대한암연구재단 연구비의 지원으로 이루어진 것임.

서 론

연구대상 및 방법

최근 생식기의 인유두종 바이러스(human papillomavirus, HPV)가 자궁경부에서 암을 유발하는 중요한 병원체로 보고되고 있으며¹⁻¹⁴⁾ DNA hybridization 방법에 의해 밝혀진 HPV type 중에서 특히 HPV type 16 및 18이 발암 잠재력을 가지며 침윤성 자궁경부암과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있으나¹⁵⁻²⁷⁾ 그 발암 기전에 대해서는 정확히 규명된 바 없으며 HPV type 16 및 18 DNA의 출현은 자궁경부암 환자의 생존율에 영향을 미치지 않는다고 보고되어 있다²⁸⁻³¹⁾.

자궁경부암에서 aneuploidy 정도가 심할수록 예후가 나쁘다고 보고되어 있으며 또한 DNA aneuploidy는 자궁경부 HPV 병소가 악성으로 이행되는 위험을 예시한다고 보고된 바 있으나³²⁻³⁵⁾ HPV DNA와 DNA ploidy간에 연관성은 없다고 보고되어 있다^{30,31,36,37)}.

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)는 세포증식과 관련이 있는 자가항원으로서 세포주기 중 특히 S phase에서 주로 합성되며 DNA 복제에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다³⁸⁻⁴⁷⁾. PCNA를 이용한 세포증식능 측정은 악성종양의 예후측정에 유용하다고 보고된 바 있으며⁴⁸⁻⁵¹⁾ Oka 등(1992)⁵²⁾은 진행된 자궁경부암 환자에서 예후인자로서 의의가 있다고 보고하였다. HPV에 감염된 자궁경부 조직에서 PCNA를 이용하여 세포증식능을 측정함으로써 HPV의 type에 따른 발암잠재력의 예견 및 예후측정에 도움이 되리라고 여겨진다.

이에 저자들은 자궁경부암 환자에 있어서 Southern blot hybridization 기법을 이용하여 HPV type 16, 18의 출현을 조사하고, PCNA를 이용한 세포증식능을 측정함으로써 자궁경부암의 병기, 조직학적 세포형태, 병소의 크기, 임파절 전이 등 임상 및 병리학 적 예후인자에 따른 세포증식능 변화를 비교 분석하여 HPV type 16 및 18이 자궁경부 조직에서 암을 유발하는 기전에 있어서 종양세포의 증식과 연관성이 있는지를 조사하고 HPV type 16 혹은 type 18 양성 병소에서의 예후 측정에 기여하고자 하였다.

연구 대상은 치료전 병리조직학적 검사로 진단된 자궁경부상피내암 10예 및 침윤성 자궁경부암 39예로 1기 5예, 2기 23예, 3기 9예, 4기 1예이었고 병기별 환자의 평균 연령은 차이가 없었다(Table 1).

상기 대상 환자에서 치료 전에 자궁경부조직을 생검하여 Southern blot hybridization 기법을 이용하여 HPV type 16 및 18 DNAs를 검출하고 PCNA를 이용한 세포증식능을 측정하여 자궁경부암의 병기, 병소의 크기, 조직학적 세포형태, 골반임파절 전이 등 임상 및 병리학 적 예후인자에 따른 세포증식능 변화를 비교하여 통계학적 분석을 시행하였다.

1) Human Papillomavirus Type 16 및 18 DNAs의 검출

(1) 자궁경부 조직에서 고분자 DNA 분리: 자궁경부 생검 조직을 액체질소에 급속냉동시킨 후 Sambrook 등(1989)⁵³⁾이 기술한 방법으로 고분자 DNA를 분리하였다.

(2) Dot blot hybridization: 자궁경부 조직에서 분리한 고분자 DNA(1~5 µg)를 0.2N NaOH 농도에서 변성시킨 다음 2N ammonium acetate pH 4.5 용액을 1/10 부피로 첨가하여 중화시키고, 이 용액에 20x SSC 용액을 동량 첨가하여 시료를 준비하였다. 10x SSC로 평형을 시킨 nylon membrane을 slot blot 장치에 넣어 장치한후 시료를 slot에 가지고 진공펌프에 연결하여 slot blot하였다. 이렇게 준비한 membrane은 80°C에서 2시간 구운 후에 [³²P]

Table 1. Study group characteristics

| Group | No. | Mean age |
|--------------------|-----|----------|
| Carcinoma in situ | 10 | 46 |
| Invasive carcinoma | 39 | |
| I | 5 | 46 |
| II | 23 | 50 |
| III | 9 | 51 |
| IV | 1 | 58 |
| Not known | 1 | |

로 표지된 HPV 16 및 18 DNA를 표지자로 이용하여 hybridization하였다. Hybridization이 끝나면 2xSSC, 0.5% SDS 용액으로 상온에서 2회 세척하고, 0.5xSSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 30분 세척하였다. 상온에서 membrane을 건조시킨 후에 -70°C에서 24시간 동안 X-ray 필름에 감광시켰다.

(3) Southern blot hybridization: 자궁경부 조직에서 분리한 고분자 DNA(10 µg)를 여러 제한효소로 완전히 절단한 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동한 다음 Southern(1975)¹⁰⁾이 기술한 방법에 따라 nylon membrane에 DNA band를 옮긴다. 이렇게 준비한 membrane은 80°C에서 2시간 구운 후에 [³²P]로 표지된 HPV 16 및 18 DNA를 표지자로 이용하여 hybridization한다. Hybridization이 끝나면 2xSSC, 0.5% SDS 용액으로 상온에서 2회 세척하고, 0.5xSSC, 0.1% SDS 용액으로 65°C에서 30분 세척하였다. 상온에서 membrane을 건조시킨 후에 -70°C에서 24시간 동안 X-ray 필름에 감광시켰다.

2) PCNA에 대한 면역조직화학적 염색

포르말린 고정 파라핀 포매조직을 재차 hematox-

ylin-eosin 염색을 하여 진단을 확인하고 5~6 µm 두께의 연속절편을 만들어 xylene으로 탈파라핀하고 알콜로 함수시킨 다음 메탄올에 0.3% 과산화수소를 첨가하여 30분간 처리하여 내인성 과산화효소(peroxidase)의 작용을 억제시켰다. Phosphate buffered saline(PBS)에서 3회 세척한 후 2% 정상 염소혈청(goat serum)을 가하여 30분간 반응시켰다. 일차 항체로 1:10으로 희석시킨 PC10을 가한 다음 상온에서 1시간 반응시키고 PBS에서 10분간씩 3회 세척한 다음 1:200으로 희석시킨 biotin과 결합된 이차항체(biotinylated anti-mouse IgG)를 가하고 상온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 3회 세척 후 avidin-biotin-complex(ABC) peroxidase를 가하여 30분간 반응시켰다. 각 단계간에 조직절편을 PBS 용액으로 3회 세척하였다. PBS에 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride와 0.02% hydrogen peroxidase를 혼합한 용액을 가하여 2분간 반응시켰다. Chromogen으로 AEC(3-amino-9-ethyl-carbazole)을 사용하여 발색시키며 염색 결과 핵이 진한 적색으로 염색된 세포를 양성으로 판독하였다. 광학현미경하에서 총 세포수에 대한 PCNA 양성세포 수의 백

Fig. 1. PC10 immunostaining of squamous cell carcinoma of the uterine cervix, showing many positive cells.

분율을 구하여 세포증식능을 측정하였다.

3) 통계학적 분석

HPV type, 자궁경부암의 병기, 병소의 크기, 조직학적 세포형태, 골반임파절 전이에 따른 세포증식능의 비교는 t 검정법, 분산분석법, Mann-Whitney U 검정법을 사용하였으며 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 인 경우로 판정하였다.

결 과

침윤성 자궁경부암에서 자궁경부 기질내로 침습한 편평상피 암세포 대부분의 핵 내에 PCNA가 양성 반응을 보였다(Fig. 1).

자궁경부암의 병기, 조직학적 세포형태, 병소의 크기, 임파절 전이에 따라 세포증식능을 비교한 결과 의의있는 차이가 없었다(Table 2).

HPV type별 분포는 16 양성군(16+) 15예, 18 양성군(18+) 6예, 16 및 18 양성군(16&18+) 4예, 16 및 18 음성군(16/18-) 24예이었으며 HPV type에 따른 세포증식능은 16+ 군에서 $59.7 \pm 9.0\%$, 18+ 군에서 $67.4 \pm 10.6\%$, 16&18+ 군에서 $79.4 \pm 4.2\%$, 16/18- 군에서 $57.5 \pm 16.9\%$ 로서 HPV type에 따라 의의있는 차이가 있었다(Fig. 2).

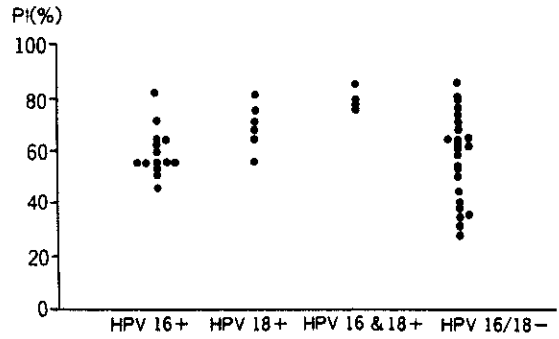


Fig. 2. PI in relation to HPV types.

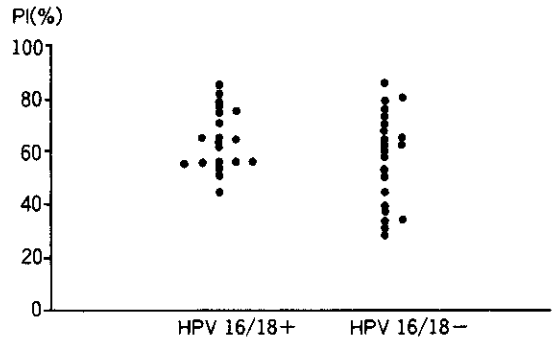


Fig. 3. PI in relation to HPV-DNA positivity.

Table 2. PI in relation to patient characteristics

| | No. | PI% |
|------------------------|-----|-------------|
| Stage | | |
| 0 | 10 | 66.7 ± 11.2 |
| I-II | 28 | 61.2 ± 15.9 |
| III-IV | 10 | 55.4 ± 13.9 |
| Histologic type | | |
| Squamous | 42 | 62.4 ± 12.9 |
| Adenocarcinoma | 7 | 53.8 ± 22.2 |
| Tumor size | | |
| < 4 cm | 27 | 60.8 ± 16.9 |
| ≥ 4 cm | 22 | 58.0 ± 14.6 |
| Lymph node | | |
| Positive | 3 | 59.2 ± 7.7 |
| Negative | 12 | 58.3 ± 16.6 |

Table 3. Correlation of HPV 16 and HPV 18 positivity with PI in relation to patient characteristics

| | No. | HPV 16/18 | |
|------------------------|-----|-------------|-------------|
| | | Negative | Positive |
| Stage | | | |
| 0 | 10 | 71.1 ± 8.3 | 60.1 ± 12.8 |
| I-II | 28 | 54.2 ± 18.8 | 66.5 ± 11.1 |
| III-IV | 10 | 48.2 ± 13.2 | 62.5 ± 11.4 |
| Histologic type | | | |
| Squamous | 42 | 56.7 ± 15.7 | 64.6 ± 10.7 |
| Adenocarcinoma | 7 | 41.4 ± 18.0 | 72.5 ± 14.9 |
| Tumor size | | | |
| < 4 cm | 27 | 62.1 ± 18.0 | 64.1 ± 11.2 |
| ≥ 4 cm | 22 | 51.0 ± 13.6 | 65.7 ± 12.0 |
| Lymph node | | | |
| Positive | 3 | 53.7 ± 0.0 | 64.6 ± 8.7 |
| Negative | 12 | 65.2 ± 14.7 | 70.4 ± 11.4 |

HPV 16 혹은 18 양성군(16/18+)과 HPV 16 및 18 음성군(16/18-)으로 나누어 세포증식능을 조사한 결과 16/18+ 군에서 $64.7 \pm 11.2\%$, 16/18- 군에서 $57.5 \pm 16.9\%$ 로서 두 군간에 세포증식능의 유의한 차이는 발견할 수 없었다(Fig. 3).

임상적 병기, 조직학적 세포형태, 자궁경부 병소의 크기, 임파절 전이 여부에 따라 HPV 16/18+ 군과 16/18- 군에서 세포증식능을 조사한 결과 선암인 경우 HPV 16/18- 군에서 $39.8 \pm 15.1\%$, 16/18+ 군에서 $72.5 \pm 14.9\%$ 로 16/18+ 군에서 16/18- 군에 비하여 현저히 증가되었으나 예 수가 적어 통계학적으로 유의는 구할 수 없었다(Table 3).

고 찰

과거 chlamydia trachomatis, 거대세포 바이러스(cytomegalovirus) 및 단순포진 바이러스(herpes simplex virus)등과 자궁경부암의 발생과의 관련성에 관한 많은 역학적인 연구 보고들이 있어 왔으나^{6,55-63} 직접적인 연관성을 규명하지 못하였으며 최근 HPV가 종양원성 바이러스로서 자궁경부암을 유발하는 중요한 병원체로 보고되어져 왔으며¹⁻¹⁴ DNA의 cloning과 hybridization 방법의 개발로 60여종의 HPV가 발견되었으며 HPV types 중에서 types 6, 11, 42, 43, 44는 생식기 사마귀 혹은 자궁경부 경증이 형증에서 주로 발견되는 저위험군에 속하며 types 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56등은 중중도 위험군으로 분류되며 HPV type 16 및 type 18은 강한 발암 잠재력을 가지며 자궁경부 상피내종양 및 침윤성 자궁경부암과 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다.^{4,8,10-27}

자궁경부암은 한국 여성에서 부인암을 포함한 모든 암중 그 발생빈도가 가장 높으며⁶⁴ 최근 국내에서도 자궁경부암과 HPV에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다.^{37,65-71} 자궁경부에서 HPV에 의한 종양형성 과정 및 그 발암 기전에 대해서는 정확히 규명된 바 없으며 HPV type 16 및 18 DNA의 출현은 자궁경부암 환자의 생존율에 영향을 미치지 않으며 병기, 골반임파절 전이 등 자궁경부암의 임상 및 병리학적 예후인자들과 연관성이 없다고 보고되어 있다.^{11,14,28-31} 1982년 Zur Hausen⁷²은 HPV가 다른 발암 인자 혹은 변이 유발소에 의해 유발되는 발암과정에 민감한 세포군들

을 생성함으로써 자궁경부암의 유발인자로서 작용할 수 있음을 시사하였다.

종양세포의 증식을 및 DNA 합성물은 악성종양의 중요한 예후인자로 보고된 바 있으며^{73,74} 악성종양에서 세포증식을 측정함으로써 종양의 진단 및 예후측정에 이용하고자 하는 연구가 최근 세계적으로 진행되고 있다.^{75,76}

종양세포의 DNA content(ploidy)는 여러 종류의 악성종양에서 치료효과 판정 및 예후측정에 유용하다고 보고되어 있으며⁷⁷⁻⁸¹ Jakobsen(1984)⁸¹은 자궁경부암 환자에서 aneuploidy 정도가 심할수록 예후가 나쁘다고 보고하였으며 비정상 DNA content는 자궁경부 상피내종양의 악성화와 발암잠재력에 영향을 준다는 보고도 있다.^{32,33}

Chacho등(1990)⁸⁴은 생식기 condyloma에서 HPV의 감염은 DNA ploidy에 중요한 영향을 줄 수 있다고 시사하였으며 DNA aneuploidy는 자궁경부 HPV 병소가 악성으로 이행되는 위험을 예시한다고 보고된 바 있으나³⁵ HPV DNA와 DNA ploidy간에 연관성은 없다고 보고되어 있다.^{30,31,36,37}

종양세포의 증식을 측정하기 위하여 유식세포분석기, thymidine labelling index, bromodeoxyuridine labelling, AgNOR 기법 및 KI-67 면역염색법 등 다양한 방법이 시행되고 있다.^{46,47,62-67} Thymidine 이나 bromodeoxyuridine을 이용한 radiolabelling은 방사능 동위원소 및 신선 조직을 사용해야 하는 단점이 있다.⁷⁵ PCNA 면역염색법은 유식세포분석기와 달리 특별한 고가의 장비가 필요치 않으며 조직의 형태학적 분석이 가능하다는 장점이 있으며 방사선 동위원소를 필요치 않는다.⁶⁹ Ki-67 항체를 사용하는 방법은 신선 조직에서만 가능한 단점이 있으나 PCNA 염색법은 포르말린 포매조직에서도 염색이 가능하므로 후향적 연구에 이용될 수 있으며 Ki-67 염색법과 유사한 판정결과를 보인다고 보고된 바 있다.⁶⁹

PCNA는 1978년 Miyachi 등⁸⁶에 의하여 증식세포에 국한된 핵항원(nuclear antigen)으로 최초로 기술된 바 있으며 cyclin 또는 DNA polymerase δ auxiliary factor로 알려져 있다.⁹¹⁻⁹³ PCNA는 세포증식과 관련이 있는 분자량 36 kDa의 자가 항원이며 세포주기 중 특히 S phase에서 주로 합성된다고 보고되어 있다.^{38,47} 증식세포 외에도 암세포 등 변형된

세포에서 PCNA의 함성이 증가된다는 보고가 있으며^{46, 45, 50, 89, 94} Prelich등(1987)⁸⁸은 PCNA가 DNA 복제에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 1987년 Ogata등⁹⁵은 PCNA에 대한 단세포군 항체인 19A2 (IgM)을 개발하였으며 Waseem등(1990)⁹⁶은 anti-PC10(IgG2a isotype)을 개발하였다. PC10은 파라핀 포매조직 표본에서 PCNA를 인식할 수 있다는 장점이 있으므로 최근 세포증식능의 측정에 이용되고 있다. PCNA를 이용한 세포증식능 측정은 악성종양의 예후측정에 유용하다고 보고된 바 있으며⁴⁷⁻⁵¹ Hall등(1990)⁸⁹은 악성종양의 종류에 따라 PCNA gene expression이 과도하게 나타난다고 보고하였다. PCNA 양성 세포의 비율은 유식세포분석기에 의하여 검출되는 S phase 세포의 비율보다 높다고 보고되어 있다⁴⁵. Oka등(1992)⁹²은 PCNA를 이용한 세포증식능이 진행된 자궁경부암 환자에서 예후인자로서 의의가 있다고 보고하였다.

본 연구에서 자궁경부암의 병기, 조직학적 세포형태, 병소의 크기, 임파절 전이 등 임상 및 병리학적 예후인자에 따라 세포증식능을 비교한 결과 유의있는 차이가 없었는데 이는 Brown등⁸⁶, Nakano 및 Oka⁸⁷, 강 등⁹⁷의 연구보고와 유사한 결과를 보였다.

Kenter등(1992)⁸⁶은 자궁경부 편평상피암에서 HPV 16의 감염은 DNA index에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서 HPV 16 양성군, 18 양성군, 16 및 18 양성군, 16 및 18 음성군에 따라 세포증식능은 $59.7 \pm 9.0\%$, $67.4 \pm 10.6\%$, $79.4 \pm 4.2\%$, $57.5 \pm 16.9\%$ 로서 HPV type에 따라 유의있는 차이가 있었으며 특히 HPV 16 및 18 모두 양성인 경우에 세포증식능이 가장 증가되었다. Demeter등(1994)⁸⁵은 생식기 및 후두에서 HPV 감염 병소의 PCNA 양성도를 측정하여 HPV genotype과 상관관계가 없다고 보고하였다.

Leminen등(1991)⁹⁰은 자궁경부선암에서 HPV type 16 및 18 감염여부에 따라 S-phase 비율을 조사한 결과 유의있는 관련성이 없었다고 보고하였는데 본 연구에서 HPV 16 혹은 18 양성군과 HPV 16 및 18 음성군으로 나누어 세포증식능을 조사한 결과 유의한 차이는 발견할 수 없었으며 선암인 경우 HPV 16 혹은 18 양성군에서 세포증식능이 증가되었으나 예 수가 적어 통계학적 의의는 구할 수 없었다.

결 론

자궁경부암에서 Southern blot hybridization 기법을 이용하여 HPV type 16 및 18 DNAs를 검출하고 PCNA를 이용한 세포증식능을 측정하여 임상 및 병리학적 예후인자에 따른 세포증식능 변화를 비교한 결과 자궁경부암의 병기, 조직학적 세포형태, 병소의 크기, 임파절 전이에 따라 세포증식능은 유의있는 차이는 없었으나 HPV type에 따라 유의있는 차이가 있었다.

세포증식능은 HPV 16 및 18의 type에 따라 차이가 있다고 여겨지며 HPV 16 혹은 18 양성군과 HPV 16 및 18 음성군간에는 유의한 차이는 발견할 수 없었다. HPV type 18이 HPV type 16에 비하여 자궁경부 종양세포의 증식의 정도가 심하며 HPV 18 감염시 고위험군으로 추측되나 HPV 18의 예 수가 적으므로 향후 더 많은 연구대상으로 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H: *A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3812, 1983
- 2) Syrjanen K: *Human papillomavirus lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. Obstet Gynecol* **62**: 617, 1983
- 3) Crum CP, Ikenberg H, Richart RM, Gissmann L: *Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. New Eng J Med* **310**: 880, 1984
- 4) Gissmann L: *Papillomavirus and their association with cancer in animals and in man. Cancer Surv* **3**: 163, 1984
- 5) Syrjanen K: *Current concepts on human papillomavirus infections in the genital tract and their relationship to intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Obstet Gynecol Surv* **39**: 252, 1984
- 6) Guignon FB, Paraskevas M, Brunham R: *The association of sexually transmitted diseases with cervical intraepithelial neoplasia: a case-control study.*

- Am J Obstet Gynecol* **151**: 185, 1985
- 7) Burk RD, Kadish AS, Calderin S, Romney SL: Human papillomavirus infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization: correlation with biopsy results and Papanicolaou smear. *Am J Obstet Gynecol* **154**: 982, 1986
 - 8) Barrasso HRK, Coupez F, Ionesco M, Brux DJ: Human papilloma viruses and cervical intra-epithelial neoplasia: the role of colposcopy. *Gynecol Oncol* **27**: 197, 1987
 - 9) Reid R, Greenberg M, Jenson AB, Husain M, Willet J, Daoud Y, Temple G, Stanhope CR, Sherman AI, Phipps GD, Lorincz AT: Sexually transmitted papilloma viral infections: I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* **156**: 212, 1987
 - 10) McCance DJ, Campion MJ, Clarkson PK, Chesters PM, Jenkins D, Singer A: Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix. *Br J Obstet Gynecol* **92**: 1101, 1985
 - 11) Maxwell CA: The epidemiology of human papillomavirus infection in relation to cervical cancer. *Cancer Surv* **7**: 481, 1988
 - 12) Wilczynski SP, Bergen S, Walker J, Liao S, Pearlman L: Human papillomavirus and cervical cancer: analysis of histopathologic features associated with different viral types. *Hum Pathol* **19**: 697, 1988
 - 13) Gordon AN, Bornstein J, Kaufman RH, Estrada RC, Adams E, Adler Storthz K: Human papillomavirus associated with adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix: analysis by in situ hybridization. *Gynecol Oncol* **35**: 345, 1989
 - 14) Lancaster WD, Castellano C, Santos C, Delgado G, Kurman RJ, Jenson AB: Human papillomavirus DNA in cervical carcinoma from primary and metastatic sites. *Am J Obstet Gynecol* **154**: 115, 1986
 - 15) Gissman L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnurch HG, zur Hausen H: Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 560, 1983
 - 16) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO* **3**: 1151, 1984
 - 17) Crum CP, Mitao M, Levine RU, Silverstein S: Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. *J Virol* **54**: 675, 1985
 - 18) Schneider AM, Kraus H, Schuhmann R, Gissmann L: Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. *Int J Cancer* **35**: 443, 1985
 - 19) Syrjanen K, de Villiers EM, Vayrynen M, Mantylarvi R, Parkkinen S, Saarikoski S, Castren O: Cervical papillomavirus infection progressing to invasive cancer in less than three years. *Lancet* **1**: 510, 1985
 - 20) Beaudenon S, Kremsdorf D, Croissant O, Jablonska S, Wain-Hobson S, Orth G: A novel type of human papilloma viruses associated with genital neoplasias. *Nature* **321**: 246, 1986
 - 21) Lorincz AT, Temple GF, Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster WD: Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* **79**: 671, 1987
 - 22) McCance DJ: Human papillomavirus infections in the aetiology of cervical cancer. *Cancer Surv* **7**: 499, 1988
 - 23) Shimoda K, Lorincz AT, Temple GF, Lancaster WD: Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* **69**: 2925, 1988
 - 24) Lorincz AT, Quinn AP, Goldborough MD, McAllister P, Temple GF: Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancer. *J Gen Virol* **70**: 3099, 1989
 - 25) Ambros RJ, Kurman KJ: Current concepts in the relationship of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification to precancerous squamous lesion of the uterine cervix. *Semin Diagn Pathol* **7**: 158, 1990
 - 26) Day PJR, Bevan IS, Gurney SJ, Young LS, Walker MR: Synthesis in vitro and application of biotinylated DNA probes for human papilloma virus type 16 by utilizing the polymerase chain reaction. *Biochem J* **267**: 119, 1990
 - 27) Kiviat NB, Koutsky LA, Critchlow CW, Lorincz

- AT, Cullen AP, Brockway J, Holmes KK: *Prevalence and cytologic manifestations of human papilloma virus(HPV) types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, and 56 among 500 consecutive women. Int J Gynecol Pathol 11: 197, 1992*
- 28) Baird PJ: *The causation of cervical cancer: II. The role of human papilloma and other viruses. Clin Obstet Gynecol 11: 19, 1984*
- 29) Wickenden C, Malcolm AD, Coleman DV: *DNA hybridization of cervical tissues. Crit Rev Clin Lab Sci 25: 1, 1987*
- 30) Leminen A, Paavonen J, Vesterinen E, Wahlström T, Rantala I, Lehtinen M: *Human papillomavirus types 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. Am J Clin Pathol 95: 647, 1991*
- 31) Kenter GG, Cornelisse CJ, Jiwa NM, Aartsen EJ, Hermans J, Mooi W, Heintz APM, Fleuren GJ: *Human papillomavirus type 16 in tumor tissue of low-stage squamous carcinoma of the uterine cervix in relation to ploidy grade and prognosis. Cancer 71: 397, 1993*
- 32) Fu YS, Reagan JW, Richart RM: *Definition of precursors. Gynecol Oncol 12: 220, 1981*
- 33) Lorinz A, Reid R: *Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. Curr Opin Oncol 1: 123, 1989*
- 34) Chacho MS, Eppich E, Wersto R, Koss LG: *Influence of human papillomavirus on DNA ploidy determination in genital condylomas. Cancer 65: 2291, 1990*
- 35) Perticarari S, Presani G, Michelutti A: *Flow cytometric analysis of DNA content in cervical lesions. Path Res Pract 185: 686, 1989*
- 36) Jarrell MA, Heintz N, Howard P, Collins C, Badger G, Belinson J, Nason F: *Squamous cell carcinoma of the cervix: HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. Gynecol Oncol 46: 361, 1992*
- 37) 박찬규, 김수녕: 생식기 인유두종 바이러스(Human Papillomavirus) Type 16 및 Type 18에 감염된 자궁경부종양 환자에서 Flow Cytometry를 이용한 DNA 분석에 관한 연구. *대부종콜포회지 4: 47, 1993*
- 38) Bravo R, Celis JE: *A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. J Cell Biol 84: 795, 1980*
- 39) Bravo R, Celis JE: *Gene expression in normal and virally transformed mouse 3T3B and hamster BHK21 cells. Exp Cell Res 127: 249, 1980*
- 40) Bravo R, Celis JE: *Human proteins sensitive to neoplastic transformation in cultured epithelial and fibroblast cells. Clin Chem 28: 949, 1982*
- 41) Celis JE, Celis A: *Cell cycle dependent variation in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. Proc Natl Acad Sci USA 82: 3262, 1985*
- 42) Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM: *Expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 166: 209, 1986*
- 43) Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R: *Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. Science 240: 1544, 1988*
- 44) Morris GF, Mathews MB: *Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. J Biol Chem 264: 13856, 1989*
- 45) Kamerow HN, Perchick A, Burstein DE: *Immunocytochemical detection of cyclin, a proliferation-associated protein, in cytologic preparations. Acta Cytologica 35: 491, 1991*
- 46) Landberg G, Roos G: *Antibodies to proliferating cell nuclear antigen as S-phase probes in flow cytometric cell cycle analysis. Cancer Res 51: 4570, 1991*
- 47) Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA: *The assessment of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction(flow cytometric analysis) and prognosis. Histopathology 18: 21, 1991*
- 48) Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, Tan E, Bush H: *Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and human malignant tumor nucleolar antigens(HMTNA) in nucleoli of human hematological malignancies. Blut 46: 133, 1983*
- 49) Takasaki Y, Robinson WA, Tan EM: *Proliferating cell nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukemia. JNCI 73: 655, 1984*
- 50) Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM: *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 111: 841, 1987*
- 51) Yu CCW, Hall PA, Fletcher CDM, Campjohn

- RS, Waseem NH, Lane DP, Levison DA: *Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen may be a good indicator of prognosis in haemangiopericytomas. J Pathol* 161: 342, 1990
- 52) Oka K, Hoshi T, Arai T: *Prognostic significance of the PC10 index as a prospective assay for cervical cancer treated with radiation therapy alone. Cancer* 70: 1545, 1992
- 53) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989*
- 54) Southern EM: *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol* 98: 503, 1975
- 55) Rawls WE, Tompkins WAF, Melnick JL: *The association of herpesvirus type 2 and carcinoma of the uterine cervix. Am J Epidemiol* 89: 547, 1969
- 56) Aurelian L, Strandberg JD, Melendez LV, Johnson LA: *Herpes virus-Type 2 isolated from cervical cancer cells grown in tissue culture. Science* 174: 704, 1974
- 57) Catalano LW Jr, Johnson LD: *Herpesvirus antibody and carcinoma in situ of the cervix. JAMA* 217: 447, 1971
- 58) Josey WE, Nahmias AJ, Naib ZM: *The epidemiology of type 2 (genital) herpes simplex virus infection. Obstet Gynecol Surv* 27: 295, 1972
- 59) Coleman DV, Morse AR, Beckwith P, Anderson MC, Gardner SD, Knowles WA, Skinner GRB: *Prognostic significance of herpes simplex virus antibody status in women with cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Br J Obstet Gynaecol* 90: 421, 1983
- 60) Hare MJ, Taylor-Robinson D, Cooper P: *Evidence for an association between chlamydia trachomatis and cervical intraepithelial neoplasia. Br J Obstet Gynecol* 89: 489, 1982
- 61) Hart H, Springbatt A, Norval M: *Lack association of cytomegalovirus antibody level with carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Obstet Invest* 14: 300, 1982
- 62) Schachter J, Hill EC, King EB, Coleman VR, Jones P, Meyer KF: *Chlamydia trachomatis and cervical neoplasia. J Am Med Assoc* 248: 2134, 1982
- 63) Vonka V, Kanka J, Roth Z: *Herpes simplex type II and cervical neoplasia. Adv Cancer Res* 48: 149, 1987
- 64) 보건사회부: *한국인 암등록 조사자료 분석 보고서 (1982.1-1987.6.30). 대한암학회지* 21: 151, 1989
- 65) 최동희, 박찬규, 김경섭, 김진홍, 김윤수: *자궁경부 상피내종양 및 침윤성 자궁경부암과 Human Papillomavirus type 16 및 type 18 DNA의 상호 연관성에 관한 연구. 대한산부회지* 32: 1264, 1989
- 66) 강순범, 박만철, 안기범, 이경희, 이효표, 장윤석, 박재갑, 박상철, 송계용: *Human Papilloma Virus Type 16 양성 유무에 따른 자궁경부암의 임상양상 및 예후 인자에 관한 연구. 대한산부회지* 33: 929, 1990
- 67) 류기성, 송승규: *자궁경부암 환자에서 핵산 교잡법을 이용한 인간 유두종 바이러스 검색. 대부종물포회지* 1: 72, 1990
- 68) 박연, 김민수, 정기욱, 정재훈, 김광혁: *자궁경부암에서 Human Papillomavirus DNA Detection Kit (ViraPap) 및 Southern Blot Hybridization을 이용한 Human Papillomavirus 감염의 진단. 대한산부회지* 35: 1501, 1992
- 69) 한상균, 김승조: *여성 생식기내의 인유두종 바이러스 양성 여부에 따른 자궁경부암의 발생위험 예측. 대부종물포회지* 2: 18, 1991
- 70) 김승철, 김학순, 송주철, 강서옥, 차영범, 한인권, 문인걸, 한원희, 박종택: *자궁경부 종양(Cervical Neoplasia)의 Scrape 표본에서 종합효소연쇄반응을 이용한 Human Papillomavirus의 검출. 대한산부회지* 35: 1269, 1992
- 71) 이한우, 김영태, 염범우, 이규환: *자궁경부암에서 c-myc 및 H-ras 종양유전자 관련단백의 발현과 Human Papilloma Virus의 검색에 관한 연구. 대한산부회지* 37: 128, 1994
- 72) Zur Hausen H: *Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. Lancet* 2: 1370, 1982
- 73) Meyer JS, Hickson B: *Advanced stage and early relapse of breast carcinomas associated with high thymidine labeling indices. Cancer Res* 39: 4042, 1979
- 74) Meyer JS: *Growth and cell kinetic measurements in human tumors. Pathol Annu* 16: 53, 1981
- 75) Oosterwijk E, Warnaar SO, Zwartendijk J, Van der Veide EA, Fleuren GJ, Cornelisse CJ: *Relationship between DNA ploidy, antigen expression and survival in renal cell carcinoma. Int J Cancer* 42: 703, 1988
- 76) Quinn CM, Wright NA: *The usefulness of clinical measurements of cell proliferation in*

- gynecological cancer. Int J Gynecol Pathol* **11**: 131, 1992
- 77) Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU: *Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors. Cancer* **62**: 521, 1988
- 78) Korenaga D, Okamura T, Saito A, Baba H, Sugimachi K: *DNA ploidy is closely related to tumor invasion, lymph node metastasis and prognosis in clinical gastric cancer. Cancer* **62**: 309, 1988
- 79) Winkler HZ, Rainwater LM, Myers RP, Farrow GM, Therneau TM, Zincke H, Leiber MM: *Stage D1 prostatic adenocarcinoma: significance of DNA ploidy patterns studied by flow cytometry. Mayo Clin Proc* **63**: 103, 1988
- 80) Britton LC, Wilson TO, Gaffey TA, Cha SS, Wieand HS, Podratz KC: *DNA ploidy in endometrial carcinoma: major objective prognostic factor. Mayo Clin Proc* **65**: 643, 1990
- 81) Jakobsen A: *Prognostic impact of ploidy level in carcinoma of the cervix. Am J Clin Oncol* **7**: 475, 1984
- 82) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreeff M, Freireich EJ: *Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res* **43**: 3982, 1983
- 83) Meyer JS, Coplin MD: *Thymidine labeling index, flow cytometric S-phase measurement and DNA index in human tumor. Am J Clin Pathol* **89**: 586, 1988
- 84) Sasaki K, Matsumura K, Tsuju T, Shinozak F, Takahashi M: *Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. Cancer* **62**: 989, 1988
- 85) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himer G, Pigeon F, Adnet JJ: *Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. Histochem J* **18**: 5, 1986
- 86) Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY: *Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki67. Br J Cancer* **57**: 178, 1988
- 87) Nakano T, Oka T: *Transition of Ki-67 index of uterine cervical tumors during radiation therapy. Cancer* **68**: 517, 1991
- 88) Prehlich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B: *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. Nature* **326**: 517, 1987
- 89) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP: *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol* **162**: 285, 1990
- 90) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM: *Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol* **121**: 2228, 1978
- 91) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI: *Identity of the proliferating nuclear antigen and cyclin. Nature* **309**: 374, 1984
- 92) Celis JE, Madsen P, Nielsen S, Celis A: *Nuclear patterns of cyclin(PCNA) antigen distribution subdivide s-phase in cultured cells-some applications of PCNA antibodies. Leuk Res* **10**: 237, 1986
- 93) Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H: *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature* **309**: 515, 1987
- 94) Chan PK, Frakes R, Tan EM: *Indirect immunofluorescence studies of proliferating cell nuclear antigen in nucleoli of human tumor and normal tissues. Cancer Res* **43**: 3770, 1983
- 95) Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM: *Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. Exp Cell Res* **168**: 476, 1987
- 96) Waseem NH, Lane DP: *Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA): structural conservation and detection of a nucleolar form. J Cell Science* **96**: 121, 1990
- 97) 강재성, 김인선: 자궁경부 편평상피암에서 *Proliferating Cell Nuclear Antigen* 양성도에 관한 연구. *대한산부학회지* **23**: 755, 1991
- 98) Demeter LM, Stoler MH, Broker TR, Chow LT: *Induction of proliferating cell nuclear antigen in differentiated keratinocytes of human papillomavirus-infected lesions. Hum Pathol* **25**: 343, 1994