

# 자궁경부암에서의 ras Oncogene Product, MHC class II 항원 및 Human Papillomavirus 16/18 DNA의 발현

원자력병원 해부병리과

조 경 자 · 장 자 준

## Expression of ras Oncogene Product, MHC class II Antigen and Human Papillomavirus 16/18 DNA in Carcinomas of the Uterine Cervix

K.J. Cho, M.D. and Ja-June Jang, M.D.

Department of Anatomic Pathology, Korea Cancer Center Hospital

Immunohistochemical study for ras oncogene product(p21) and MHC class II(HLA-DR) antigen, and in situ hybridization for human papillomavirus(HPV) type 16/18 were performed on 50 squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Activated ras and aberrant DR expression were noted in 26 cases(52%) and 11 cases(22%), respectively, without a difference between keratinizing and non-keratinizing types. No direct correlation between ras and DR expression was histologically found. p21 was diffusely distributed with a finely granular pattern in the cytoplasm. Aberrant DR expression was also diffuse, with linear staining along the cell membrane. In situ hybridization revealed HPV type 16/18 DNAs in superficial koilocytotic cells of 4 cases, in which ras or DR expression was not correlated with the presence of HPV DNA. (**Korean J Pathol 1993; 27: 485~490**)

**Key Words:** ras, p21, HLA, MHC, DR, HPV, Cervix, Squamous cell carcinoma

### 서 론

자궁경부암의 발암 기전에 human papillomavirus(HPV)가 관여할 것이라는 사실은 잘 알려져 있다. 그러나 실험적으로 HPV 단독으로는 세포 변형 및 분사를 일으킬 수는 있으나 발암을 유도하기는 어렵다. 최근 oncogene에 관한 관심이 높아지면서, HPV와 관련된 발암 과정에 있어서 여러 가지 oncogene의 역할이 대두되고 있다. 즉 HPV의 세포 변형 능력에는 E6/E7 oncoprotein과 활성화된 ras oncogene과의 협동 작용이 중요하다는 보고들이 있으며<sup>1-3)</sup>, 이 E6 및 E7 oncoprotein은 또한 종양 억

제 유전자 산물인 p53 및 p105-RB와 각각 결합하는 능력이 있어서 이것이 HPV 및 adenovirus, SV 40의 발암 기전의 한 가능성으로 추측된다<sup>4-7)</sup>. ras 유전자군은 signal transduction에 중요한 G protein과 유사한 p21을 생성하는 protooncogene으로서 주로 점돌연변이에 의해 GTPase 활성에 이상이 생기게 되면 oncogene으로서 작용하게 된다. 이 활성화된 p21은 인체 종양에서 가장 흔히 발현되는 oncogene 생성물으로써, 대장, 위장, 식도, 폐 등 여러 장기의 암종에서 증가된 발현이 보고된 바 있다<sup>8-11)</sup>. 한편 면역 반응에서 필수적인 요소인 major histocompatibility (MHC) 항원은 각종 종양 조직에서 비정상적으로 발현되는 경우가 많다<sup>12-16)</sup>. 이 MHC가 발암 과정에 어느 정도 관여할 지는 미지수이나, ras와 myc 등 각종 oncogene 및 adenovirus, hepatitis B virus, cytomegalovirus 등의 virus가 MHC항원의 발현을 변조할 수 있다는 점이 흥미롭다<sup>17,18)</sup>. 본 연구는 자궁

접 수: 1993년 2월 25일, 게재승인: 1993년 5월 8일  
주 소: 서울시 노원구 공릉동 215-4, 우편번호: 139-240  
원자력병원 해부병리과, 조경자

경부의 편평세포암종에서 HPV 16/18 DNA, p21 및 MHC class II 즉 DR 항원의 발현율과, 이들 간의 상관관계를 조사해보고자 하였다.

### 재료 및 방법

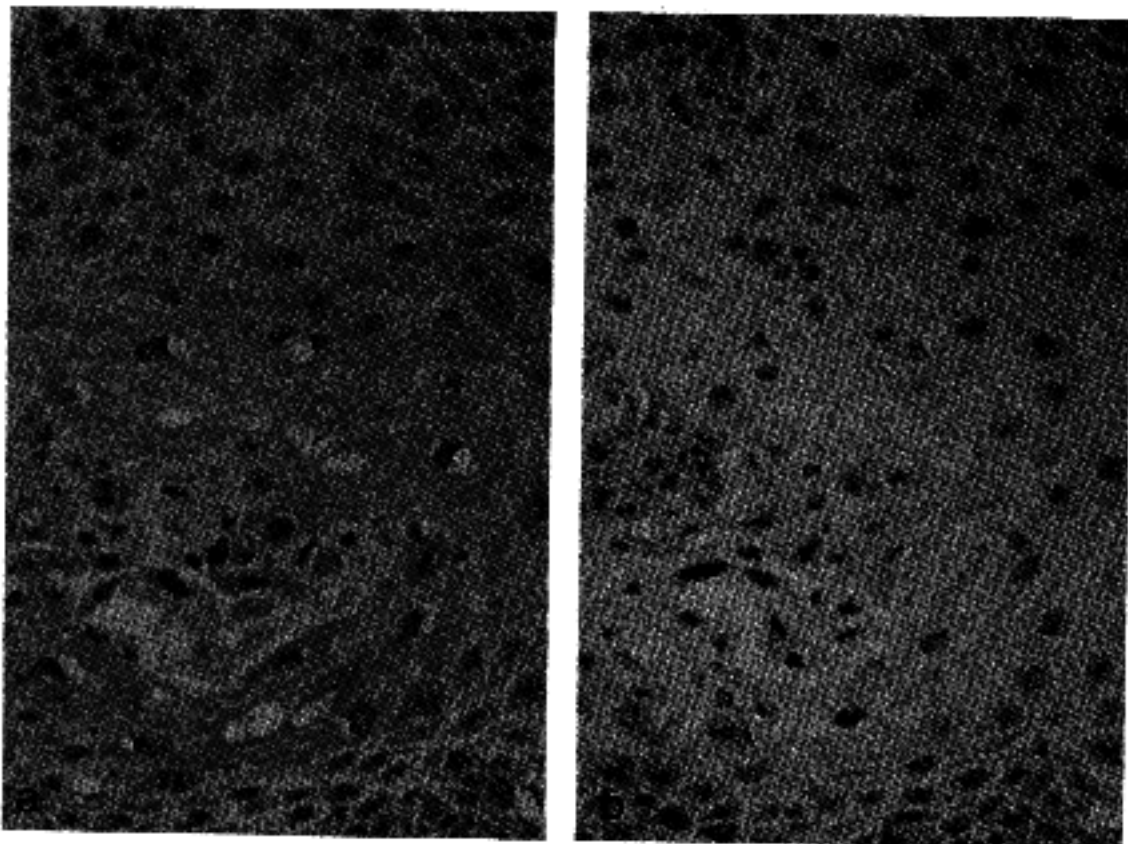
1992년 1월 이후 본원에서 생검에 의해 병리학적으로 자궁경부의 침윤성 편평세포암종의 진단이 이루어진 연속적 종례 50예를 실험 대상으로 선정하고, 이들의 hematoxylin-eosin 염색 슬라이드를 재검색하고 그 유형을 나누었다. 이 중 40예가 비각화형(non-keratinizing large cell type), 10예가 각화형(keratinizing type)에 해당하였다. p21과 DR 항원에 대한 면역조직화학적 염색과 HPV에 대한 in situ hybridization 사상에 모세관 현상을 도입한 microprobe immunostainer를 이용하였다. 면역조직화학적 염색을 위하여 우선 formalin 고정 후 paraffin 포매된 조직을 5µm 두께로 절편한 후 60°C oven에서 1시간 동안 기말하고, histoclear와 xylene을 3:1로 혼합한 dewaxing agent에 60°C에서 3회, 실온에서 1회 처리하여 탈paraffin화하였다. Absolute alcohol에 실온에서 4회 처리하여 함수시키고, 내색성 peroxidase활성을 없애기 위하여 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-methanol을 40°C에서 2분 간 가한 후 buffer로 세척하였다. 다음으로 정삼 차단 협침을 40°C에서 2분 간 가한 후 일차 항체를 40°C에서 10분 간 기렸다. 항체로는 anti-pan-ras antibody(Ab-1)(Oncogene Sci., USA) 및 anti-human HLA DR antibody(Dako, Denmark)를 사용하였고 염색 kit는 AutoProbe III

(Biomedica, USA)를 사용하였다. 세척 후 biotin화된 이차 항체를 40°C에서 5분 간 기리고 다시 세척하였다. Peroxidase reagent에 40°C에서 5분 간 처리하고 세척 후 peroxidase enhancer reagent로 1회 처리하였다. Chromogen을 40°C에서 10분 간 2회 기린 후 종류수는 세척 후 hematoxylin 대조 염색을 하였다. 세척 후 수성 매체로 불인하고 건조시켰다.

In situ hybridization에는 ViraType in situ HPV Probe Set(Digene, USA)와 In situ Hybridization Detection System(Dako, USA)을 사용하였다. 과정을 보면 절편, 탈paraffin 및 함수 후 110°C에서 ribonuclease에 1분, pepsin에 3분, formamide에 2분 처리하였다. HPV type 16/18 DNA probe를 가하고 110°C에서 85°C까지 온도를 낮춰가며 보온과 냉가를 0.5~4분씩 반복하였다. 2X SSC용액으로 세척 후 45°C에서 streptavidin을 10분, biotinylated alkaline phosphatase를 10분 가했다. Alkaline phosphatase enhancer로 1회 처리 후 chromogen을 45°C에서 10분 간 2회 가해 주었다. 그 이후 과정은 면역조직화학적 염색 예와 동일하게 하였다.

### 결 과

ras oncogene에 대하여 전체의 52%인 26예가 양성 반응을 보였다. 이 중 20예는 약양성, 6예는 강양성을 보였고, 미분성 분포로 세포질 내에 과립상으로 염색되는 양상을 보였다(Fig. 1). 비각화형의 50%와 각화형의 60%가 ras 발현을 보이며 조직학적 유형에



**Fig. 1.** Strong intracytoplasmic granular staining for ras(a), and weak positivity for DR(b) in keratinizing type squamous cell carcinoma(ABC stain).

다른 차이가 없었다. 비정상적인 DR 항원 발현은 11예(22%)에서 관찰되었다. 이들의 염색 양상 역시 ras의 경우와 유사했으나, 강한 반응을 보인 몇몇 예에서는 세포막을 따라 선상으로 염색되기도 하였다(Fig. 2). 비정상적 DR 발현을 보인 11예 중 ras 양성인 경우가 8예로서 음성의 경우보다 많았으나, 통계적으로 의미 있는 관계는 보이지 않았다(Table 1). 또한 ras와 DR 모두 나온 예에서 양성으로 염색된 세포들을

조직학적으로 비교 관찰해 보았을 때, 직접적인 연관성을 찾을 수 없었다(Fig. 1, 2). DR 발현은 미각화형의 23% 및 가화형의 20%에서 관찰되어 종양 유형에 따른 차이는 역시 없었다. HPV type 16/18에 대한 in situ hybridization에서는 4예가 양성이었으며, 주로 포세포성 koilocyte에서 국소적으로 양성 반응이 관찰되었다. 이 세포들이 ras 혹은 DR을 특이적으로 발현하는 소견은 찾을 수 없었고(Fig. 3), 4예 중

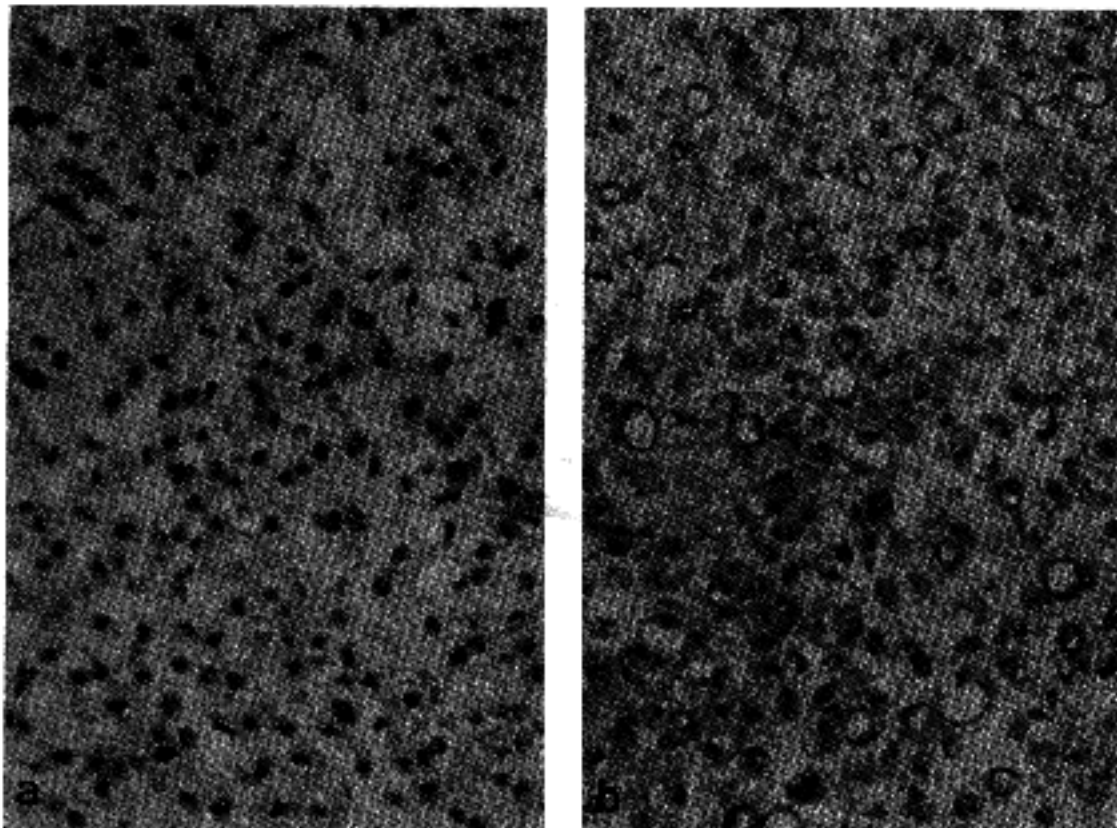


Fig. 2. Weak cytoplasmic reaction for ras(a), and strong staining for DR along the cell membrane(b) in non-keratinizing large cell type carcinoma(ABC stain).

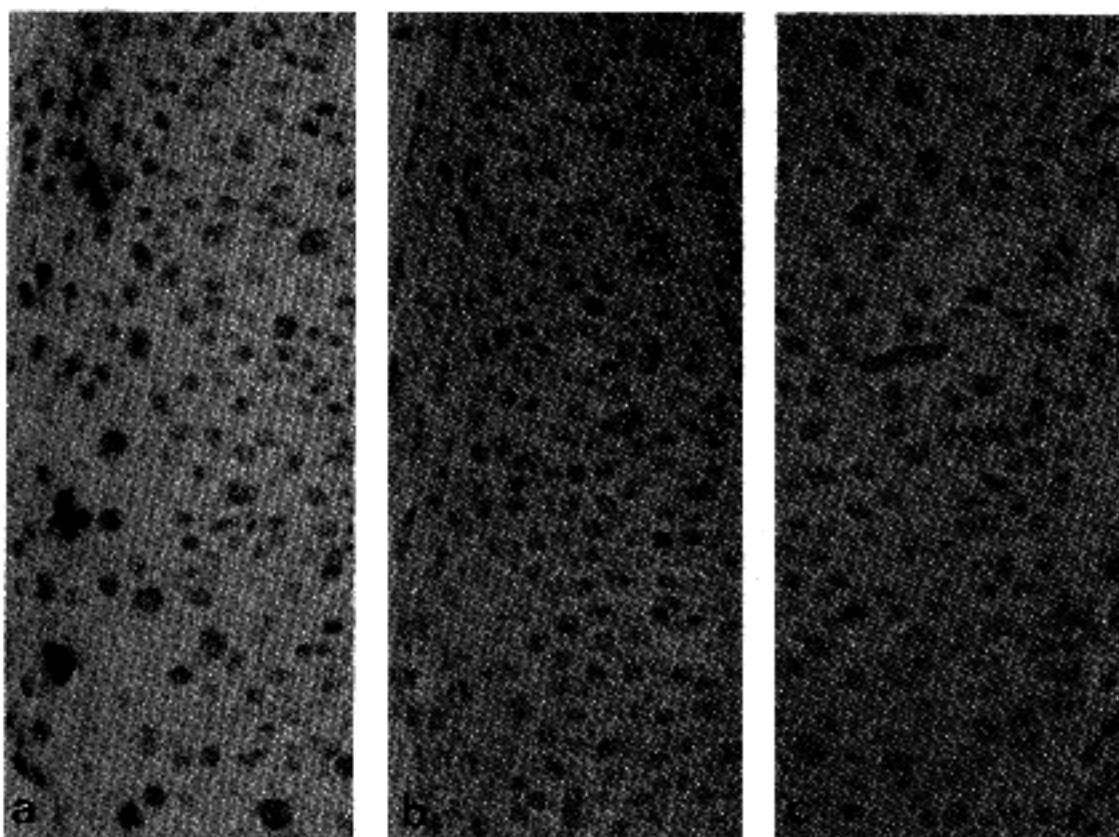


Fig. 3. Presence of HPV type 16/18 DNA(a) did not influence the ras(b) or DR(c) expression of the cells(a: in situ hybridization, b, c: ABC stain).

**Table 1.** Results of immunohistochemical study on ras and DR expression and in situ hybridization for HPV type 16/18 DNA

	HPV(+)		HPV(-)		Total
	ras(+)	ras(-)	ras(+)	ras(-)	
DR(+)		1	8	2	11
DR(-)	1	2	17	19	39
Total	1	3	25	21	50

2에는 ras와 DR 모두 음성, 1에는 ras 양성 DR 음성, 1에는 ras 음성 DR 양성을 보이는 등. 면역조직화학적 결과로는 이 세가지 인자들의 상호 연관성을 찾을 수 없었다(Table 1).

### 고 찰

최근 각종 종양에서의 oncogene 발현에 관하여 많은 연구가 왔으나, 주로 서양에 호발하는 종양에 국한되었고, 우리나라에 많은 자궁경부암에 관한 oncogene 연구는 그다지 활발하지 못하였다. 자궁경부 종양에서의 ras oncogene에 관하여는 상피내암종의 15~50%, 침윤성 암종의 12~80%에서 p21 발현이 관찰되었다는 보고들이 있다<sup>19-24</sup>. ras gene이 상피내 종양(CIN)에서는 grade가 높을수록 발현율이 높으나, CIN III와 미세침윤성 또는 침윤성 암종 간에는 차이가 없었다는 결과는 이 oncogene이 자궁경부 발암의 초기 단계에 관여할 것이라는 추측을 가능하게 한다<sup>19,20</sup>. 자궁경부암의 예후에 미치는 ras oncogene의 영향에 대해서는 이견이 많다<sup>21-23</sup>. 본 연구에서는 침윤성 암종 50예의 52%가 활성화된 p21의 발현을 보여서 Sagae 등의 보고와 유사한 결과를 보였고, 염색양상도 동일하였다<sup>21</sup>.

자궁경부암에는 그 원인 인자로서 HPV가 관여하며 HPV의 종양형성능력은 각종 oncogene과의 상호 작용에 의한다고 최근 밝혀지고 있어서 이들의 관계를 살펴보는 흥미로운 과제이다. HPV의 역할은 주로 발암 과정의 초기 단계의 initiation에 있다고 생각되며 primary rat embryonal cell을 이용한 실험에서 활성화된 ras oncogene와 협조하여 세포 변형을 일으킨다고 밝혀졌다<sup>1-3</sup>. 이는 adenovirus의 E1A protein과 유사한 HPV의 E7 oncoprotein에 의한 작용으로 생각되며<sup>2</sup>, 이 E7 oncoprotein이 RB 유전자 생성물인 p105-RB와 결합하기도 한다<sup>6,7</sup>. 그러나 인체 자궁경부암 발생에서 이들의 상호적 역할은 잘 알려져 있지 않다. 최근 이 등은 자궁경부암 70예에서 80.7%가 중합효소 연쇄반응에 HPV 16/18 양성이었다고 33.3%가 면역조직화학적으로 ras 암유전자를 발현

하였으나, 이들 간에 유의한 관계를 찾을 수 없었다고 하였다<sup>25</sup>. In situ hybridization technique은 Southern blotting이나 polymerase chain reaction에 비해 민감도가 떨어지지만, viral DNA를 함유한 바로 그 세포의 다른 표현형을 비교 관찰할 수 있다는 장점을 가진다. 본 연구에서는, 50예 중 4예만이 HPV 16/18 DNA를 함유하는 것으로 나타나서 민감도가 매우 낮았으나 대조조직의 염색에는 문제가 없었으므로 결과로 채택하였고, 이 HPV 16/18 DNA 양성 세포들과 p21 양성인 세포들 간의 특별한 관계는 관찰할 수 없었다. 이 점에는 종양이 진행하면서 HPV copy는 점점 감소하는 반면 다른 비정상적 표현형의 발현은 증가하는 양적인 불균형도 문제가 된다고 생각된다.

종양 세포에서의 MHC gene의 발현은 종양에 대한 면역 반응에 영향을 미치며, 실험적으로 변형된 세포의 종양형성능력 또는 종양 세포의 전이 능력에 영향을 미칠 수 있는 중요한 표현형이다<sup>26-27</sup>. 이 MHC 항원이 각종 oncogene 및 oncogenic virus에 의해서 변조될 수 있다는 점은 MHC 항원의 발현이 발암 과정의 한 기전으로 관여할 가능성을 시사한다. Adenovirus E1A는 MHC class I 발현을 확실히 감소시키며<sup>17</sup>, E1A와 여러 점에서 작용이 유사한 HPV oncoprotein에서도 이러한 효과를 기대할 수 있다. 또한 ras gene은 interferon에 의한 class II 항원 유도를 현저히 억제한다고 한다<sup>18</sup>. 따라서 자궁경부암의 발암 과정에서, HPV E6/E7과 활성화된 ras gene product의 상호작용이 MHC 발현에 영향을 미칠 가능성을 고려할 수 있다. 그러나 자궁경부암에서 MHC 항원 발현에 관하여 축적된 결과는 소수이다. Connor 등은 자궁경부암의 16%에서 MHC class I 항원 발현이 소실되었으며 이는 종양의 유형, 분화정도, 임상적 병기, HPV 16/18 존재 여부와는 무관하였다고 보고하였다<sup>28</sup>. 자궁경부암에서의 class II MHC 항원 발현에 대한 연구는 거의 없다. 비정상적인 DR 발현은 대장암, 유방암, 폐암, 위암 등에서 보고된 바 있으며, 종양의 분화 정도와 관계가 있다고 한다<sup>13-16</sup>. 본 연구에서 관찰된 자궁경부암의 비정상적 DR 발현 빈도는 11%로서 상기한 장기에서보다 낮았으며, 비각화형과 각화형 간, 즉 분화의 정도에 따른 차이를 보이지 않았다. 또한 ras 및 HPV DNA와 DR 발현 양상을 비교해 보았을 때 p21 또는 HPV DNA의 존재는 비정상적인 DR 항원의 발현에 영향을 미치지 않았다. 이들 세 가지 인자 간의 상관관계는 기대에 미치지 못하는 음성 결과였으나, 자궁경부암에서의 ras oncogene 및 MHC 항원의 발현을 조사하고, 지금까지 확실히 밝혀지지 않은 oncogene과 MHC, HPV와 MHC, HPV와 oncogene의 관계를 유추해 보는 우리나라 여성암 1위인 자궁경부암의 병리 및 병인의 이해에 도움이 되리라고 사료된다.

## 결 론

자궁경부의 편평상피암종 50예를 대상으로, ras oncogene product인 p21 및 MHC class II 항원의 하나인 HLA-DR에 대한 면역조직화학적 염색과 HPV 16/18 DNA에 대한 in situ hybridization을 시행하여 다음의 결론을 얻었다. 전체의 52%와 22%에서 각각 활성화된 ras oncogene product 및 비정상적 DR 발현이 관찰되었고, 조직학적 유형 간에 양성도의 차이는 없었다. 이 두 가지 표현형 간에 면역조직화학적 검색상 직접적인 연관성은 관찰되지 않았고, HPV 16/18가 양성이었던 4예에서, HPV DNA의 존재가 ras gene 또는 DR 항원의 발현에 영향을 미치는 소견은 관찰되지 않았다.

## 참 고 문 헌

- 1) Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. *Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. EMBO J 1987; 6: 1741-6.*
- 2) Phelps WC, Yee CL, Münger K, Howley PM. *The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. Cell 1988; 53: 539-47.*
- 3) Nishikawa T, Yamashita T, Yamada T, Kobayashi H, Ohkawara A, Fujinaga K. *Tumorigenic transformation of primary rat embryonal fibroblasts by human papillomavirus 8 E7 gene in collaboration with the activated H-ras gene. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 1340-3.*
- 4) Werness BA, Levine AJ, Howley PM. *Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 1990; 248: 76-9.*
- 5) Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 1990; 63: 1129-36.*
- 6) Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. *The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 1989; 243: 934-7.*
- 7) Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps W, Harlow E, Howley PM. *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J 1989; 8: 4099-105.*
- 8) Sun X-F, Wingren S, Carstensen JM, Stål O, Hatschek T, Boeryd B, Nordenskjöld B, Zhang H. *ras p21 expression in relation to DNA ploidy, S-phase fraction and prognosis in colorectal adenocarcinoma. Eur J Cancer 1991; 27: 1646-9.*
- 9) Ruol A, Stephens JK, Michealssi F, Segalin A, Chiarelli S, Peracchia A, Skinner DB, Littel AG. *Expression of ras oncogene p21 protein in esophageal squamous cell carcinoma. J Surg Oncol 1990; 44: 142-5.*
- 10) Carneiro F, David L, Sunkel C, Lopes C, Sobrinho-Simões M. *Immunohistochemical analysis of ras oncogene p21 product in human gastric carcinomas and their adjacent mucosae. Path Res Pract 1992; 188: 263-72.*
- 11) Harada M, Dosaka-Akita H, Miyamoto H, Kuzumaki N, Kawakami Y. *Prognostic significance of ras oncogene product in non-small cell lung cancer. Cancer 1992; 69: 7207.*
- 12) Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Marcenaro L, Giacomini P, Russo C. *Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6719-23.*
- 13) Norazmi M-N, Hohmann AW, Skinner JM, Bradley J. *Expression of MHC class I and class II antigens in colonic carcinomas. Pathology 1989; 21: 248-53.*
- 14) Brunner CA, Gokel JM, Riethmüller G, Johnson JP. *Expression of HLA-D subloci DR and DQ by breast carcinomas is correlated with distant parameters of favorable prognosis. Eur J Cancer 1991; 27: 411-6.*
- 15) Redondo M, Concha A, Oldiviela R, Cueto A, Gonzalez A, Garrido H, Ruiz-Cabello F. *Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: Its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. Cancer Res 1991; 51: 4948-54.*
- 16) Teh M, Lee Y-S. *HLA-DR antigen expression in intestinal type and diffuse type gastric carcinoma. Cancer 1992; 69: 1104-7.*
- 17) Maudsley DJ, Pound JD. *Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. Immunol Today 1991; 12: 429-31.*
- 18) Morris A. *Modification of histocompatibility antigen expression in cells expressing activated oncogene: Implications for tumor development. Anticancer Res 1990; 10: 1161-8.*
- 19) Sagae S, Kudo R, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Nihei T, Takeda T, Hashimoto M. *Ras oncogene expression and progression in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix. Cancer 1990; 66: 295-301.*
- 20) Pinion SB, Kennedy JH, Miller RW, MacLean AB. *Oncogene expression in cervical intraepithelial neo-*

- plasia and invasive cancer of cervix. Lancet 1991; 337: 819-20.*
- 21) Sagae S, Kuzumaki N, Hisada T, Mugikura Y, Kudo R, Hashimoto M. *ras oncogene expression and prognosis of invasive squamous cell carcinomas of the uterine cervix. Cancer 1982; 63: 1577-82.*
- 22) Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, Fukuda K, Okuma Y, Yokoyama M, Sugimori H. *Expression of ras oncogene product EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. Gynecol Oncol 1991; 40: 147-51.*
- 23) Symonds RP, Habeshaw T, Paul J, Kerr DJ, Darling A, Burnett RA, Sotsiou F, Linardopoulos S, Spandidos DA. *No correlation between ras, c-myc, and c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. Eur J Cancer 1992; 28A: 1615-7.*
- 24) Pillai R. *Oncogene expression and prognosis in cervical cancer. Cancer Lett 1991; 59: 171-5.*
- 25) 이효표, 송용상, 김종훈 등. 자궁경부암 및 임파절 파라핀 포매조직에서의 ras 암유전자의 발현과 중합효소 연쇄반응을 이용한 자궁경부조직에서의 Human papillomavirus 검색. 대한암학회지 1993; 25: 15-32.
- 26) Hayashi H, Tanaka K, Jay F, Khoury G, Jay G. *Modulation of the tumorigenicity of human adenovirus-12-transformed cells by interferon. Cell 1985; 43: 263-7.*
- 27) Gopas J, Rager-Zisman B, Bar-Eli M, Hämmerling GJ, Segal S. *The relationship between MHC antigen expression and metastasis. Adv Cancer Res 1989; 53: 89-115.*
- 28) Connor ME, Stern PL. *Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. Int J Cancer 1990; 46: 1029-34.*
-