대한병리학회지 1995; 29: 502~510

자궁경부의 선암종에서 Polymerase Chain Reaction에 의한 Human Papillomavirus DNA 16/18의 검색

계명대학교 의과대학 병리학교실, 계명대학교 대학원 공중보건학과*

이 상 숙·박 남 조*·윤 종 국*

Detection of Human Papillomavirus DNA 16/18 in Cervical Adenocarcinomas by Polymerase Chain Reaction

Sang Sook Lee, M.D., **Nam-Jo Park*** and **Chong-Guk Yoon***

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine and
Department of Public Health*, Keimyung University Graduate School

Twenty-five paraffin-embedded tumor tissues were analyzed for detection of HPV 16 and 18 in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction with type specific primers and by non-radioactive Southern blot hybridization for confirmation

The suitability of paraffin-embedded tissue as PCR material was confirmed by successful amplification of 100% of cervical specimens with human β - globin specific primer. Eighty four percent of the cervical adenocarcinoma tissues were positive for HPV 16 and/or 18. HPV 16 positive rate was 68%, HPV 18 was 60%. The double infection with HPV 16 and 18 was found in 44%. Three cases of the negative specimen in PCR for each type of HPV DNA 16 and 18 were positive in Southern blot hybridization. The total positive rate was 92% for HPV 16 and/or HPV 18, HPV 16 positive rate was 80%, HPV 18 was 72%. The double infection with HPV 16 and 18 was 60%.

These results suggest that the pattern of HPV types 16 and 18 is closely associated with carcinogenesis of cervical cancers. HPV type 18 appears to be preferentially related to cervical adenocarcinoma and the poor prognosis of these patients. Therefore, determination of HPV DNA type in cervical carcinoma patients is important in treatment and prognosis. **(Korean J Pathol 1995; 29: 502~510)**

Key Words: Human papillomavirus DNA 16/18, Polymerase chain reaction, Cervix adenocarcinoma

접 수:1994년 10월 13일, 게재승인:1995년 12월 26일
주 소:대구시 중구 동산동 194, 우편번호 700-310
계명대학교 의과대학 병리학교실, 이상숙

서 론

한국인에서의 자궁경부암은 여성에 발생하는 악성 종양중에서 최근까지도 가장 높은 빈도를 보이는 종양으로서 조기발견과 적절한 치료를 통하여 근치가 가능한 질환이다[1].

인체유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)의 DNA가 자궁경부암 조직에서 흔히 검출되고 배양세포에서 HPV DNA에 의한 변형활성(transformation activity)이 밝혀져 자궁경부암에서 HPV의 역할이 중요시되고 있다[2]. HPV는 현재까지 약 60 여종 이상의 아형(subtype)이 보고되어 있고 그 중 약 20 여종이 인체의 생식기관에 감염되는 것으로 알려져 있는데 그 중 HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35형 등이 자궁경부의 병변과 관련된다[2]. 생식기에 생기는 콘딜롬(condyloma)과 경도의 자궁경부 이형증(dysplasia)에는 HPV 6 또는 11형 혹은 HPV 6과 11형이 함께 주로 나타나는 반면에 자궁경부상피내암(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)과 침윤성 자궁경부암에서는 HPV 16형이 가장 많으며 그 밖에 HPV 18, 31, 33, 35 형 등이 검출되고 있어 병소내의 HPV 유형을 밝혀야 할 필요성이 생기게 되었다[3]. HPV 감염의 진단은 육안검사, 질경검사, 세포학적 검사, 조직학적 검사, 면역조직화학검사, 전자현미경적 검사 등에 의해 이루어 지나 HPV 감염의 확진 및 HPV 유형의 결정은 생검조직내에서 HPV DNA의 존재를 규명함으로써 가능하다[2]. 이를 위해서는 HPV DNA probe를 사용하는 Southern blot, dot blot filter in situ hybridization, in situ hybridization 등의 각종 nucleic acid hybridization 기법을 이용할 수 있다[4,5]. 최근 분자생물학의 급속한 발달에 힘입어 각종 질병에 대한 진단과 치료에 분자생물학적 방법이 개발되어 사용되는데[6] 그중 하나인 중합 효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)법은 HPV DNA의 검출과 동정에 강력한 연구 수단으로 이용되고 있다[7]. PCR 법은 빠르고 간편하며 각종 hybridization 법에 비하여 고감도의 분석이 가능하므로 소량의 가검물, 임상 적출물을 사용하여 아주 희소한 유전자를 검사할 경우에도 이용되는 장점을 갖고 있으며 최근에는 유전자의 존재유무의 검색뿐만 아니라 특정유전자의 소실(deletion), 돌연변이(mutation), 유전자 서열 다양성(genomic sequence variation), 유전자 클로닝(gene cloning), 유전자발현의 반정량적 측정(semiquantitative analysis of gene expression) 등에 다양하게 개발되어 사용되고 있다[6]. 최근에 Shibata 등[8]에 의해 paraffin 포매조직을 이용한 PCR이 가능하여 오랜 기간 보관된 축적된 자료를 이용할 수 있게 되었다[9].

자궁경부암과 관련되어 특히 주목되고 있는 HPV DNA 16과 18은 7.9 kb 크기의 두줄고리 구조로 되어 있는데[10] E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2의 단백코드영역으로 나누고 이들 중 변형활성이 있는 부분은 E6, E7 영역이며 암조직에 존재한다[10,12]. 현재 PCR법이 적용되는 HPV 유형은 6, 11, 16, 18, 33, 형 등이며 primer 합성은 E6 영역이 가장 많이 이용되고 그밖에 LCR(long control region), E1, E2, E5, E7 영역을 이용하기도 한다[7,13,17].

한국인 자궁경부암환자의 자궁경부도말표본을 PCR 기법을 이용하여 검색한 결과 HPV DNA 16과 18형의 검출율은 각각 88.9%와 18.5%로서 HPV 16형이 HPV 18에 비하여 5배정도 높게 나타나 이들 양 HPV형이 자궁경부암의 발생과 깊은 관계가 있음이 밝혀졌다[19]. 한편 자궁경부선암(cervical adenocarcinoma)은 전체 자궁경부암중의 5~10%의 낮은 발생빈도를 보이지만 점차로 증가하는 추세이고[19] 자궁경부의 편평세포암과는 달리 종양의 발생부위가 자궁경부의 내측(endocervical canal)이어서 조기발견이 어렵고 방사선치료의 효과도 낮으며 그 예후도 나쁘다고 알려져 있다[20]. 자궁경부의 선암을 대상으로 한 연구는 드물지만 몇몇 보고된 바에 의하면 HPV DNA의 검출율이 편평세포암에 비하여 다소 낮으며[21] 특이한 점은 HPV 16형의 출현이 HPV 18형 보다 적거나 혹은 비슷하다는 것이다[21,24]. 이에 저자들은 1992년에서 1993년 사이 계명대학교 동산의료원 해부병리과에 보관된 자궁경부의 생검조직중 선암으로 진단된 환자의 paraffin 포매조직 25 예로부터 추출한 DNA를 재료로 하여 PCR을 이용한 HPV 16과 18형의 DNA의 분포를 알고자 다음과 같은 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1992년에서 1993년 사이 계명대학교 동산의료원 해부병리과에 보관된 자궁경부의 생검조직중 침윤성 선암으로 진단된 환자의 paraffin 포매조직 25예를 대상으로 하였다. 환자의 나이 분포는 26세에서 76세사이로 평균연령은 50.8 세였다.

2. DNA 추출

Formalin 고정후 paraffin으로 포매된 생검조직으로

부터 일부에에서 포함된 편평상피암의 조직을 미리 칼로 제거한 후 박편절단기를 사용하여 7 μm 두께로 1~2 조직절편을 분리하여 1.5 ml Eppendorf tube (E-tube)에 담았다. 이때 시료들간의 상호 오염을 방지하기 위하여 조직절단에 사용하는 칼은 한 시료를 자른후 xylene으로 깨끗이 닦았으며 이하의 실험에 사용되는 시약 및 모든 기구는 1회용 또는 소독하여 사용하였다. 1 ml의 xylene으로 2회 탈파라핀하고 0.5 ml absolute ethanol로 pellet을 2회 세척한 후 2~3 방울의 acetone을 가한 다음 58℃에서 15 분간 방치하였다. 건조된 시료를 300 μl digestion buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20)에 완전히 resuspend 한후 200 μg/ml 농도로 proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany)를 가하여 55℃에 하루밤(16~18시간) 동안 방치하였다[8,9]. 2배의 phenol/chloroform (1 : 1)용액을가하여 잘 섞고 DNA 용액을 추출하는 과정을 2회 거쳐서 얻어진 DNA 용액에 0.1배의 7.5 M ammonium acetate와 2배의 cold absolute ethanol을 가하여 잘 섞은 다음 deep freezer에서 alcohol precipitation하였다. 분리된 pellet을 70% ethanol로 세척하고 건조 시킨 후 pellet 형태로 얻어진 DNA를 15 μl 증류수에 완전히 녹여서 spectrophotometer로 DNA의 농도를 측정한 다음 PCR 반응에 사용하였다[25].

3. Polymerase Chain Reaction

1) Primers: DNA integrity 측정용(internal amplification control)으로서 human β-globin specific primer(한국생공)를 사용하고 HPV 16 및 18형 DNA의 검출에는 각 유형의 HPV DNA의 primer(한국생공)를 사용하였다(Table 1).

2) Controls: Positive control로서 β-globin PCR에는 정상인의 혈액에서 DNA를 추출하여 사용하고 HPV PCR에는 각형의 HPV PCR에는 각 형의 HPV plasmid DNA를 분리하여 사용하였다[25,26]. Negative control은 template DNA 대신에 소독된 증류수를 동량으로 사용하였다. 이 과정에서는 실험시료에 대한 control DNA의 오염을 방지하기 위하여 DNA 분리작업과 PCR 반응을 위한 작업은 각각 다른 장소에서 시행하였다.

3) Polymerase chain reaction 방법: 반응액 총량을 시료당 25 μl로 하여 reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.001% gelatin), 각각 20 μM 씩의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer Mannheim, Germany), primer (β-globin은 1 μM, HPV DNA는 0.5 μM를 각각 사용), 0.1~1 μg template DNA 및 1.2 units Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A)와 증류수를 차례로 혼합하고 20 μl mineral oil로 반응액을 덮은 후 94℃ 1분(denaturation), 55℃ 1분(annealing), 72℃ 1분 30초(extension), 30회로 program된 automatic thermal cycler (PERKIN ELMER 480)에서 PCR을 시행하였다. PCR 산물의 일부 (5 μl)를 취하여 1.5% agarose gel에서 100 volts로 30분간 전기영동(electrophoresis)하고 0.5 μg/ml ethidium bromide 용액에 염색하여 ultra- violet light 하에서 DNA 증폭 여부를 확인한 다음 Polaroid (Fuji FP-3000 B)로 촬영하여 결과를 남겼다.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used in PCR

Sequence(5'-3')	Genomic location	Size of amplified product(bp)
Type specific primers		
HPV 16		
1: GCAAGCAACAGTTACTGCGACGT	E6	340
2: GCAACAAGACATACATCGACCGG		
HPV 18		
1: GAAGATCTCATATGCATGGACCTAAG	E7	340
2: CGGAATTCTGATCATTACTGCTGGGATGC		
β-globin		
1: CAACTTCATCCACGTTCACC		
2: GAAGAGCCAAGGACAGGTAC		268

4. Nonradioactive Southern Blot Hybridization

1) DIG-dUTP labeled HPV 16, 18 DNA probe 의 준비: 먼저 HPV 16, 18형의 plasmid DNA를 얻기 위하여 다음의 실험을 행하였다. 4℃에 보관해 두었던 HPV 16, 18형의 plasmid DNA(경북대 유전공학과 제공)를 calcium chloride procedure[26]에 따라 Escherichia coli(E coli)에 transformation 시킨 다음 LB (Luria-Bertani)배지에서 배양하였다. E coli로부터 lysis by alkali 방법으로 plasmid를 분리하여 pellet 상태로 HPV 16, 18형의 plasmid DNA를 얻고 각각 80 μl의 증류수에 완전히 녹인 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 plasmid DNA의 분리상태를 확인한 다음 spectrophotometer로 분리된 DNA의 농도를 측정하였다. 그 중의 일부를 취하여 제한효소(restriction enzyme)를 처리하고 (Table 2) 0.8% agarose gel에 전기영동하여 vector 및 plasmid DNA 의 상태를 다시 점검한 후 그 결과를 polaroid로 촬영하여 남겼다. 분리해 낸 HPV plasmid DNA의 농도는 HPV 16과 18은 각각 약 1700 μg/m과 약 800 μg/ml로 나타났다. HPV plasmid DNA로 PCR을 시행한 결과는 agarose gel electrophoresis에서 각각 340 bp에 분명한 band를 보였다.

위의 과정으로 얻은 HPV 16, 18형의 plasmid DNA를 template DNA로 하여 다음과 같이 PCR을 시행하였다. 반응액 총량은 HPV 16, 18형 각각 100 μl로 하여 그에 따른 각 반응요소들의 양을 조절하는 외에는 모든 실험조건을 실험시료와 동일하게 하였다. PCR 반응의 결과를 확인하고 남은 약 90 μl DNA 용액으로부터 alcohol precipitation으로 증폭된 HPV DNA를 회수하고 30 μl 증류수에 녹여 농도를 측정하였다.

각각의 영역(HPV 16형은 E6, HPV 18형은 E7)에서 340 bp 크기로 증폭된 HPV 16, 18형의 DNA를 사용하여 digoxigenin-labeled deoxyuridine triphosphate (DIG-dUTP)를 이용한 random primed DNA labeling 방법으로 DIG DNA Labeling & Detection Kit Non-radioactive (Boehringer Mannheim, Germany)에서 지시하는 대로 HPV 16, 18형 각각의 DIG-dUTP labeled DNA probe (최종농도 약 15 μg/μl)를 만들었다.

2) Southern blot hybridization 방법: Agarose gel에 담긴 증폭된 HPV 16, 18형 DNA를 Southern transfer 방법을 따라[30] nitrocellulose(NC) paper로 이전하고 UV light를 통하여 DNA bands가 완전히 옮겨 졌음을 확인한 후 3 MM paper로 NC paper를 잘 싸서 80℃에서 2시간동안 baking한 다음 이후의 Southern filter hybridization 및 immunological detection 과정을 다음과 같이 시행하였다. DNA probe를 포함하지 않은 hybridization 용액 (5×SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-lauryl sarcosine, 0.02% SDS)속에 NC paper를 담그고 68℃에 방치하는 prehybridization 과정에서는 반응의 감도를 높이기 위하여 반응시간을 3 시간으로 길게 하였고 hybridization 과정에서는 DIG-dUTP labeled DNA probe의 사용 농도를 hybridization 용액 1 ml당 100 ng으로 높였으며 68℃방치는 16시간으로 충분하게 하였다. 세척용액으로 NC paper를 충분히 씻은 다음 antidigoxigenin alkaline phosphatase conjugate 용액내에서 반응시킨 후 X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)와 NBT(nitroblue tetrazolium salt)를 기질 용액으로 사용하여 발색반응을 하였다. 이 과정에서는 NC Paper상에 나타나는 자색의 색소침착을 가장 효과적으로 검출하기 위하여 연속적으로 상태를 관찰하여 약 30분에서 90분에 걸쳐 발색시간을 조절하였다. NC paper를 80℃에 1시간동안 baking하고 마른상태에서 사진으로 결과를 남겼다.

Table 2. Genomic HPV plasmid used in hybridization

Type	Vector	Cloning site	Size of insert(bp)
HPV 16	pGEM I(2.9kb)	Bam HI	7902
HPV 18	pBR 322(4.4kb)	Eco RI	7857

결 과

1. Human β-globin specific primer를 사용한 PCR

자궁경부선암조직 25예는 human β-globin primer에

Table 3. HPV 16 and HPV 18 positivity by PCR and Southern blot hybridization

PCR	Southern	Blot hybridization
HPV 16	17/25(68%)	20/75(80%)
HPV 18	15/25(60%)	18/25(72%)
HPV 16 or 18	21/25(84%)	23/25(92%)
HPV 16 & 18	11/25(44%)	15/25(60%)

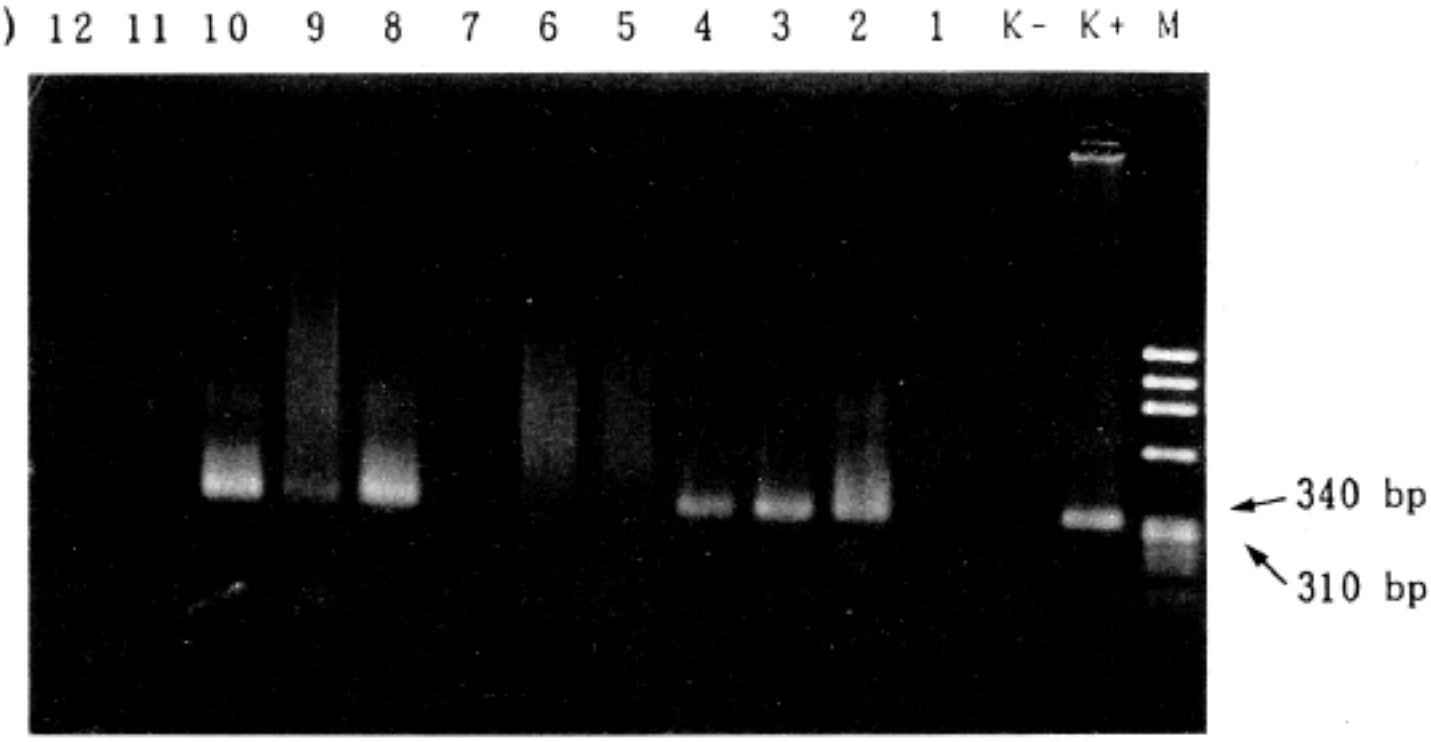

Fig. 1. Polymerase chain reaction with HPV 16 specific primer from the E6 region(A) with subsequent Southern blot hybridization to a DIG-dUTP labeled probe(B). Lane M, size marker: K+, positive control, HPV 16 in pGEM-: K-, negative control. The length of the amplification product was 340 base pairs. Case no 2, 3, 4, 8, 9, & 10 were positive for HPV 16. Case no 6, 11 & 12 were positive for Southern blot hybridization (B), whereas negative for PCR(A).

대하여 모든 양성반응을 보여 100% 증폭된 결과를 나타내었다. Negative control은 음성반응을 보였으며 positive control은 양성으로 결과를 나타내었다.

2. HPV 16, 18형의 specific primer를 사용한 PCR

자궁경부선암조직 25예중 84%(21/25)가 HPV 16 또는 18형에서 양성으로 검출되었으며 그 중 HPV 16형은 68%(17/25), 18형은 60%(15/25)로 각각 양성반응의 결과를 보이는 한편 44%(11/25)가 HPV16 및 18형에 중복감염된 것으로 나타났다. Negative control은 음성으로 positive control은 양성으로 결과를 보였다(Table 3, Fig. 1, 2).

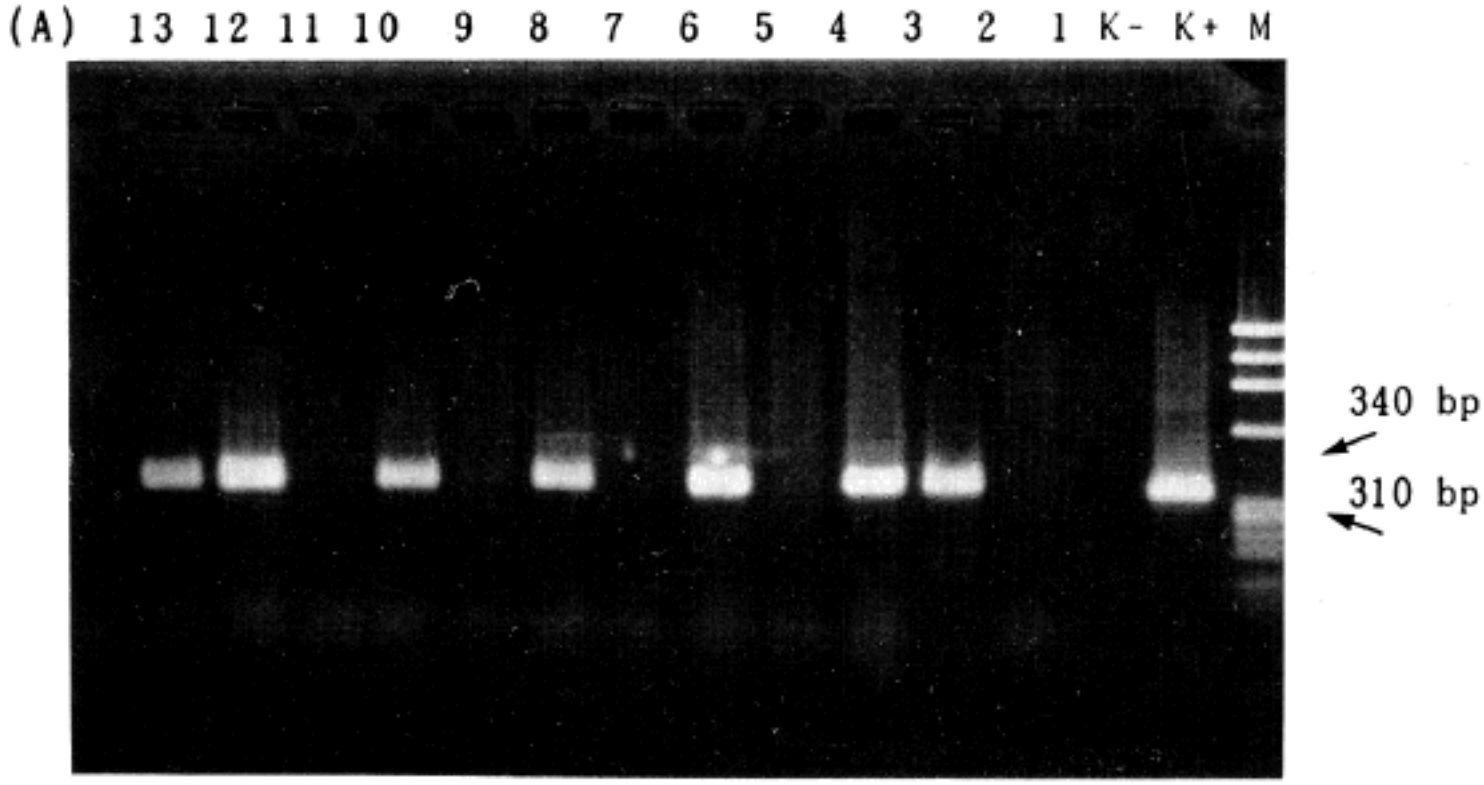

Fig. 2. Polymerase chain reaction with HPV 18 specific primer from the E7 region (A) with subsequent Southern blot hybridization to a DIG-dUTP labeled probe (B). Lane M, size marker: K+, positive control, HPV 18 in pBR 322: K+, negative control. The length of the amplification product was 340 base pairs. Case no 2, 3, 5, 7, 9, 11 & 12 were positive for HPV 18. Case no 4, 8 & 10 were positive for Southern blot hybridization (B), whereas negative for PCR(A).

3. Non-radioactive Southern Blot Hybridization

Positive 및 negative control은 PCR의 결과와 Southern blot hybridization의 결과가 일치하였고 HPV 16, 18형의 경우는 PCR 반응의 결과 agarose gel에서 양성으로 나타난 동일한 위치에 Southern blot hybridization에서도 자색의 색소침착 현상을 보이는 한편 PCR 반응에서 음성의 결과를 보인 예들 중에서 HVP 16, 18형의 각각 3예씩 색소침착을 나타내었다. 결과적으로 자궁경부선암조직 25예중 92%가 HPV 16 또는 18형에서 양성으로 나타났고 그 중 HPV 16형은 80%, HPV 18형은 72%의 증가된 검출율을 보였으며 60%가 HPV 16과 18형에 중복감염된 것으로 나타났다(Table 3).

고 찰

1974년에 자궁경부암의 원인인자로 HPV가 거론된 이후 많은 연구들이 자궁경부암과 HPV의 관계를 보고하고 있다[2]. 이들 연구의 결과를 보면 병소에 출현하는 HPV 유형이 병변의 진행상태와 밀접한 상관이 있으며 자궁경부암의 경우에는 특히 HPV 16, 18형이 높은 빈도로 출현한다는 사실을 알 수 있다[16,27].

자궁경부암에 대한 지금까지의 연구들은 주로 편평세포암을 위주로 이루어져 왔고 HPV DNA를 검색하기 위한 기법으로 ISH를 많이 이용하였는데 이들의 결과에 의하면 병변이 'high risk'의 CIN으로 진행할수록 HPV 16, 18형의 출현빈도가 증가하며 편평세포암에서는 HPV 16형이 18형보다 높은 빈도로 나타난다[4]. 최근에 들어서 PCR법을 이용하여 HPV DNA를 검색한 연구보고들에 의하면 PCR의 장점은 ISH법에 비하여 검출율이 훨씬 더 높지만[18] 매우 민감한 검사법이어서 시료들간의 오염이 원인이 되어 위양성(false positive)의 결과를 낼수 있으므로 실험의 전과정에 걸쳐 임상시표의 오염을 방지하기 위한 세심한 주의가 요구되고 있다. 이를 위해서는 실험에 사용되는 시약 및 기구를 철저히 소독하고 양성 및 음성대조군을 반드시 사용하여야 한다. 이 실험에서는 PCR 결과가 negative control에서 음성으로 positive control에서는 양성으로 반응이 나타나는 한편 자궁경부선암 조직의 DNA integrity 측정을 위해 사용한 human β-globin specific primer의 경우에서 25예가 모두 증폭됨으로써 paraffin 포매조직이 PCR 검사법의 좋은 재료가 될수 있음을 알 수 있었다.

한편 자궁경부선암에서 HPV 16, 18형 DNA의 검색에 대한 연구는 대단히 작은 실정이며[21,24,28,30] 이들의 보고에서 주목 할만한 사항은 자궁경부선암의 경우에는 특히 편평세포암에 비하여 HPV 18형의 출현률이 현저히 높다는 점이다. Leminen등[21]은 자궁경부선암 환자를 대상으로 하여 ISH기법으로 HPV 16, 18 DNA를 검색하여 전체적으로 18%의 HPV DNA를 검출했는데 그 중 HPV 16형이 2%, HPV 18형이 14%, 중복감염이 2%로 나타나 HPV 18형이 HPV16형에 비하여 월등히 높게 출현하였으며 따라서 HPV 18형이 자궁경부선암에 밀접하게 관계됨을 보고하였다. 또한 Cooper등[29]도 자궁경부선암의 생검재료에서 HPV 16, 18 DNA를 검색하여 53%의 양성률중 HPV 18형이 80%로 16형에 비하여 우세함을 보고하고 있다. 이와는 달리 Milde-Langosch등[24]은 25예의 원발성 자궁경부선암을 대상으로 consensus와 type specific primers를 사용하여 PCR을 실시하여 64%에서 HPV 16형 및 HPV 18형 DNA를 검출해 내는 한편 자궁경부선암의 가장 많은 종양형태인 endocervical 세포형에서 HPV가 80%의 검출율을 보이고 HPV 16, 18형이 비슷한 빈도로 나타나는 반면에 endometrioid 세포형의 자궁경부선암에서는 HPV 16형이 우세함을 밝힘으로서 HPV 18형이 자궁경부선암에 특별한 관련성이 적음을 보고하고 있다. PCR을 이용한 다른 연구자들[30,31]도 자궁경부의 선암에서 HPV 16 DNA를 높은 비율로 검출해 냄으로써 검출방법의 민감도가 결과에 영향을 미침을 시사하고 있다. 이러한 결과들은 HPV 16, 18형의 종양의 형태와 성상에 영향을 미침을 시사하는 것이며 따라서 자궁경부선암과 HPV16, 18 형의관련성에 대한 연구의 필요성이 더욱 강력히 요구되고 있는 실정이다. 이 실험의 결과 자궁경부 선암조직의 PCR에서 HPV DNA 양성률이 92%로서 HPV 16과 HPV18 DNA가 각각 80%와 72%로 비슷한 빈도를 나타내었다. 자궁경부선암조직의 PCR 반응에서 양성을 보인 예들이 Southern blot hybridization의 결과 모두 양성으로 나타나 PCR 반응에서 위양성을 보인 예는 없었음을 알 수 있었다. 한편 PCR에서 음성으로 나타났던 선암조직중에서 HPV 16, 18형이 각각 3예씩 양성반응을 보여 전체적으로 HPV 16, 18 DNA의 양성율은 92%로 증가되었고 HPV 16형은 80%, 18형은 72%로 증가되었으며 중복감염의 경우도 60%로 나타났다. 이는 PCR과 Southern blot hybridization의 민감도 차이에 따른 결과로 해석할 수 있다. 이는 Milde-Langosch등[24]의 endocervical 세포형의 선암의 결과와 유사함을 알 수 있고 HPV 18형의 출현이 편평세포암보다 상대적으로 높아 자궁경부선암에서는 편평세포암보다 HPV 18형의 DNA가 현저하게 높은 빈도로 출현한다는 여타 보고들의 결과에 일치함을 알 수 있다. 본 연구에서는 HPV 16과 18의 중복감염이 지금까지의 보고 보다 높은 빈도로 나타났는데 이는 PCR의 민감도에 따른 방법상의 결과인듯하여 동시에 HPV 16은 모든 자궁경부암의 암발생 초기에 관여하며 HPV 18형은 특히 선암에서 더욱 흔히 관여하는 것으로 추정된다.

이 연구의 결과를 요약하면 자궁경부선암 환자의 paraffin 포매 생검조직에서 PCR에 의한 HPV 16, 18 DNA의 검출율은 92%였으며 HPV 16과 18형이 각각 80%, 72%로 비슷한 빈도를 보였다. 따라서 HPV 감염이 자궁경부의 선암에서 병인학적으로 중요한 역할을 하며 특히 HPV 18형이 자궁경부종양의 조직양상과 생물학적 성상에 밀접한 관련을 가질 것이라는

사실을 확인할 수 있었으며 아울러 HPV DNA 검색에 paraffin block내 조직을 이용한 PCR과 non-radioactive Southern blot hybridization 법을 병행해서 사용하면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되어진다.

결 론

자궁경부선암에 존재하는 HPV 16, 18형 DNA의 빈도를 검색하고자 자궁경부선암으로 진단된 환자 25명의 paraffin 포매 생검조직을 대상으로 하여 PCR을 시행하고 nonradioactive Southern blot hybridization으로 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

자궁경부선암조직에서 human β-globin specific primer를 사용한 PCR 반응의 결과는 25예 모두에서 양성으로 나타나 paraffin 포매조직이 PCR 검사법의 좋은 재료가 됨을 알 수 있었다. 자궁경부의 선암조직에서 HPV 16형은 68%, 18형은 60%의 양성률을 나타내었고 HPV 16형과 18형이 중복감염된 경우는 44%였다. Southern blot hybridization의 결과 PCR 반응에서 음성을 보인 조직 예에서 HPV 16, 18형이 각각 3예씩 양성으로 나타나서 전체적인 HPV DNA의 검출율은 92%로 증가되었고 HPV 16형은 80%, HPV 18형은 72%의 양성률을 보이고 중복감염은 60%로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 장은숙. 여성생식기계. 병리학, 대한병리학회편, 고문사. 1990: 998-1007.
2. Syrjanen K, Gissmann L, Koss LG. Papillomaviruses and Human Disease. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1987: 1-39.
3. Durst 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 1983; 80: 3812-5.
4. 이상숙, 김기권, 정재홍, 진승원, 손우익. 자궁상피내암종 및 침윤성 편평상피암에서의 in situ hybridization에 의한 human papillomavirus DNA의 검색. 대한병리학회지 1990; 24: 16-26.
5. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98: 503-17.
6. 서민호. 암의 분자생물학적 진단. 계명의대 논문집 1991; 10: 289-306.
7. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells 1989; 7: 209-14.
8. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. J Exp Med 1988; 167: 225-30.
9. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, A guide to methods and applications, San Diego: Academic Press, 1990: 153-8.
10. Broker TR, Chow LT, Chin MT, Rhodes CR, Wolinsky SM, Whitbeck A, Stoler MH. A molecular portrait of human papillomavirus carcinogenesis. Cancer Cells 1989; 7: 197-208.
11. Jullian EH, Dhellemmes C, Saglio O, Chavinie J, Pompidou A. Improved detection of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical scrapes by a multiplex polymerase chain reaction: A 4% prevalence among 120 French women with normal cytology. Lab Invest 1993; 68: 242-7.
12. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM,Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. Hum Pathol 1992; 23: 117-28.
13. Della Torre G, Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Pasquini G, De Palo G, Pierotti MA, Rilke F, Della Porta G. HPV DNA in intraepithelial neoplasia and carcinoma of the vulva and penis. Diagn Mol Pathol 1992; 1: 25-30.
14. Evander M, Boden E, Bjersing L, Rylander E, Wadell G. Oligonucleotide primers for DNA amplification of the early regions 1, 6, and 7 from human papillomavirus types 6, 11, 16, 18, 31, and 33. Arch Virol 1991; 116: 221-33.
15. Ferre F, Garduno F. Detection of human papillomavirus types 6/11, 16 and 18 using the polymerase chain reaction. Cancer Cells 1989; 7: 15-8.
16. Park JS, Namkoong SE, Han SK, Nha DJ, Lee HY, Kim, SJ. Comparison of L1 consensus primers with E6 type specific primers for detection of human papillomavirus in praraffin sections of cervical neoplasia. J Korean Med Sci 1993; 8: 60-7.
17. Ting Y, Manos MM. Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, A guide to methods and applications, San Diego: Academic Press,

1990; 356-67.
18. Lee HP, Park NH, Moon HS, Kim, JH, Song YS, Kang SB. Association of oncogenic human papillomaviruses (HPV 16, 18) in CIN and cervical cancer. Seoul J Med 1993; 34: 207-13.
19. Wilczynski SP, Walker J, Liao S, Bergen S, Berman M. Adenocarcinoma of the cervix associated with human papillomavirus. Cancer 198; 62: 1331-6.
20. Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E: Tumors of the Cervix, Vagina, and Vulva. Atlas of Tumor Pathology, Third Series, Fascicle 4, Washington. AFIP, 1992.
21. Leminen A, Paavonen J, Vesterinen E, Wahlstrom T, Rantala I, Lehtinen M. Human papillomavirus types 16 and 18 in adenocarcinoma of the uterine cervix. Am J Clin pathol 1991; 95: 647-52.
22. Nielsen AL. Human papillomavirus type 16/18 in uterine cervical adenocarcinoma in situ and adenocarcinoma: A study by ISH with biotinylated DNA probes. Cancer 1990; 65: 2588-93.
23. Young FI, Ward LM, Brown LJR. Absence of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma determined by in situ hybridization. J Clin Pathol 1991; 44: 340-1.
24. Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Loning T, Stegner HE. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. Hum Pathol 1993; 24: 590-4.
25. Towner, Paul. Purification of DNA. In: Essential Molecular Biology. A Practical Approach, Vol I. TA Brown, IRL PRESS, 1991.
26. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
27. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. Hum Pathol 1992; 23: 117-28.
28. Smotkin D, Berek JS, Fu YS, Hacker NF, Major FJ, Westtstein FO. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. Obstet Gynecol 1986; 68: 241-4.
29. Cooper K, Herrington CS, Lo ES-F, Evans MF, McGee JO. Integration of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. J Clin Pathol 1992; 45: 382-4.
30. Bijersing L, Rogo K, Evander M, Gerdes U, Stendahl U, Wadell G. HPV 18 and cervical adenocarcinomas. Anticancer Res 1991; 11: 123-8.