

자궁경부 상피내 종양과 침윤성 암종에서 Apoptosis와 bcl-2 및 PCNA 발현에 관한 연구

전북대학교 의과대학 병리학교실 및 산부인과교실*

정명자 · 장규윤 · 강명재 · 이동근 · 오병찬*

Expression of Apoptosis, bcl-2, and PCNA in Uterine Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Carcinoma

Myoung Ja Chung, M.D. Kyu Yun Jang, M.D. Myoung Jae Kang, M.D.
Dong Geen Lee, M.D. and Byung Chan Oh, M.D.*

Department of Pathology and Obstetrics and Gynecology*,
Chonbuk National University Medical School, Chonbuk, Korea

This study was undertaken to know the extent of apoptosis, expression of bcl-2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in uterine cervical intraepithelial neoplasia (CIN; 15 cases) and invasive carcinoma (27 cases) and to evaluate them as a prognostic marker. Apoptosis was analysed by using the in situ apoptosis detection kit and bcl-2 and PCNA were detected by the immunohistochemical method. The results were as follows: Apoptotic indices (AI) in the invasive carcinoma (mean: 4.3) were 10-times higher than that in the CIN (mean: 0.43). Bcl-2 was expressed 60% of the cases in the dysplastic cells of the CIN II and CIN III, 33.3% of cases in the invasive carcinoma and were not expressed in the CIN I except basal cells. The expression of the PCNA was increased by the grades of CIN and was strong in invasive carcinoma. The mean survival time of the patient with invasive carcinoma was significantly decreased in the higher AI index (above 4.3) than in the lower AI index (below 4.3). There was no significant correlation between the extent of apoptosis and the expression of bcl-2. According to the above results, AI are able to be used as an independent prognostic marker in the invasive cervical carcinoma, and bcl-2 and PCNA have an important role in the tumorigenesis of uterine cervical carcinoma. (Korean J Pathol 1997; 31: 1180~1189)

Key Words: Apoptosis, bcl-2, PCNA, Uterine cervical intraepithelial neoplasia, Uterine cervical carcinoma

접 수: 1997년 3월 19일, 게재승인: 1997년 7월 31일
주 소: 전주시 덕진구 금암동 산 2-20, 우편번호 560-182
전북대학교 의과대학 병리학교실, 정명자

ISSN : 0379-1149

본 논문은 1996년도 임상공동 연구비 지원에 의해서 이루어졌음.

서 론

종양의 성장 속도는 종양세포의 증식능과 사멸에 의해서 좌우된다.^{1,2} 종양세포의 증식능은 유사분열 정도를 알아보는 것부터 nucleolar organizer region을 염색을 통해서 알아보거나, 증식세포핵 항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)에 대한 면역염색등으로 측정한다. 반면 세포사멸은 두 가지로 구분되는데 그 하나는 세포들이 허혈과 같은 강력한 외부자극 때문에 사망하는 괴사이고, 다른 하나는 apoptosis로 세포내 기전에 의해서 사멸하는 것이다. 괴사와는 달리 apoptosis는 연속적인 생화학적, 형태학적 특징을 갖는 계획되어진 세포사멸이다.³ Apoptosis의 조절은 태생기 발달동안의 형태발생 (morphogenesis)과 성인에서 조직의 항상성 유지에 중심적 역할을 하나 일부장기의 종양성 전환 (neoplastic transformation)에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{4,5} 근래 분자학적인 기전의 발달로 인하여 apoptosis가 일어난 세포를 효소반응을 이용하여 관찰할 수 있게 되었다.⁶ Apoptosis를 조절하는 가장 잘 알려진 유전자는 bcl-2와 p53 이다.^{7,8}

Bcl-2는 미토콘드리아 내막과 핵막, 소포체등에 존재하는 단백질로⁹ 다양한 자극에 의해 유발된 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있고 주로 여포성 림프종에서 추시되어 왔으나^{10,11} 최근에는 상피암에서도 bcl-2의 발현이 보고되고있다.¹²⁻¹⁷ Apoptosis 정도와 악성 종양 환자의 예후 사이의 관련성에 대한 연구는 폐의 비 소세포암종,¹⁸ 위장관암종,¹⁹ 방광의 이행상피암종등²⁰에서 연구되어왔고 대부분의 연구에서 apoptosis수가 증가할수록 환자의 생존기간이 짧고 종양이 더 빨리 진행한다고 하였다.

PCNA는 세포주기의 G1 후기부터 S기에 걸쳐 세포 핵내에 축적되는 핵단백질로 DNA합성과 세포증식의 조절에 필수적인 보조물질로 알려져 있다.²¹

자궁 경부암종은 전암병변, 상피내암, 미세침윤암의 단계를 거쳐 침윤과 전이를 일으키는 단계적 진행을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 진행은 종양세포의 증식과 사멸을 조절하는 일련의 과정에 의해 조절될 것으로 생각된다. 자궁 경부암종은 우리나라 여성에서 가장 흔한 암으로 알려져 있지만 아직까지 이들에 대한 apoptosis와 bcl-2, PCNA에 대한 연구는 찾아보기가 어려웠다. 따라서 자궁경부암종을 대상으로 세포의 사멸과 증식에 대해 알아보는 것은 자궁 경부암종의 병인을 이해하거나 이들이 자궁경부암종의 예후에 어떠한 영향을 미치는지

에 대한 의미있는 연구가 될 것으로 생각되었다. 본 연구는 자궁경부의 상피내 종양과 침윤성 암종을 대상으로 이들 병변의 진행에 따른 apoptosis의 정도와 bcl-2단백 발현 정도 및 세포증식능의 차이를 알아보고 또한 각 병변에서 apoptosis와 bcl-2의 상호 관련성을 추시하고자 한다. 그리고 침윤성 자궁경부암종의 예후 결정에 중요한 인자인 임상병기에 따른 이들의 발현 정도의 차이를 알아보고 추적조사가 가능한 예들을 대상으로 생존기간과 apoptosis정도 및 bcl-2, PCNA단백발현과의 관계를 추시하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1990년 3월 부터 95년 8월까지 전북대학교 병원에서 편치생검, 원추생검, 또는 자궁 적출술로 얻어진 자궁 경부조직에서 자궁경부 상피내 종양과 침윤성 종양으로 진단된 예를 대상으로 하였으며, 침윤성 암종의 경우 추적검사를 위해 1990년 3월 부터 1993년 3월까지의 진단된 예를 대상으로 하였다.

2. 병리조직학적 검색

1) 병리조직학적 분류: H&E염색 표본을 재검토하여 상피내 종양과 침윤성 암종을 분류하였다. 상피내 종양은 상피세포 성숙도의 결여와 기저세포양 또는 미분화 세포가 상피를 차지하는 비율에 따라 I, II, III 등급으로 분류하였고 각각 5예씩을 택하였다. 침윤성 암종은 기저막을 뚫고 하방으로 5 mm 이상 침범한 예로 정의하였고 모두 27예를 대상으로 하였다.

2) 임상 병기에 따른 분류: 침윤성 암종으로 진단 받은 환자는 환자의 임상 기록지를 참고하여 FIGO 분류법에 따라 임상 병기를 나누었으며 병기 I은 5예, 병기 II는 13예, 병기 III은 6예, 병기 IV는 3예였다.

3. PCNA, bcl-2 및 apoptosis에 대한 염색 및 판정

1) Apoptosis에 대한 염색 및 판정: Apoptosis에 대한 염색은 TACS in situ apoptosis detection kit (Trevigen, Gaithersburg, USA)를 이용한 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling (TUNEL)방법에 의해서 apoptosis가 일어나고 있는 세포나 apoptotic bodies 를 관찰하였다.⁶

Apoptosis에 대한 염색 결과는 apoptosis가 일어나고 있는 세포의 핵이나 apoptotic bodies에 갈색으로 염색되는 경우를 양성으로 하였고 1000개의 종양 세포중에서 양성인 이들의 수를 세어 백분율을 구

해서 apoptotic index (AI)로 표시하였다.

양성 대조군으로는 아급성 림프절염로 진단받은 림프절 조직을 이용하였다.

2) PCNA와 bcl-2에 대한 면역조직화학 염색: PCNA에 대한 면역 염색은 단클론 항체 PC10 (DAKO, Copenhagen, Denmark)을 이용하였고 bcl-2에 대한 면역염색은 일차항체 bcl-2 (DAKO, Copenhagen, Denmark)를 이용하였고, microprobe-detection system (Biomedica Corp, Foster city, LA)을 이용하여 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)에 의한 immunoperoxidase 염색을 시행하였다.²²

PCNA에 대한 염색 결과는 종양세포의 핵에 갈색으로 염색되는 경우를 양성반응으로 판정하였고 염색되는 정도에 따라 다음과 같이 등급을 나누었다. 등급 0; 종양세포에 염색이 안된 경우, 등급 1; 종양세포의 25%까지 염색된 경우, 등급 2; 종양세포의 50%까지 염색된 경우, 등급 3; 종양세포의 75%까지 염색된 경우, 등급 4; 종양세포의 75%이상이 양성인 경우.

Bcl-2에 대한 염색결과는 종양세포의 핵이나 세포질에 갈색으로 염색되는 세포가 전체 종양세포의 10% 이상일 때를 양성으로 분류하였다.

4. 통계학적 검증

통계처리가 가능한 항목과 그 결과에 대해서는 Fisher's exact test를 이용하여 통계처리를 하였고 단, 침윤성 암종에서 AI와 생존기간 사이의 관계는 Log Rank test를 이용하였다.

결 과

본 연구는 자궁경부의 상피내 종양과 침윤성 암에서 AI와 bcl-2 및 PCNA의 발현정도를 알아보려고 하였다. 연구에 이용된 상피내 종양은 15예이고, 침윤성암종은 27예였다. 이들의 연령 분포는 상피내 종양이 26~69세로 평균연령은 44.6세이고, 침윤성 암종은 30~78세로 평균연령은 52.8세로서 침윤성 암종 환자의 발생연령이 높았다. 상피내 종양과 침윤성 암종 각각에서 연구결과를 보면 다음과 같다.

1. 상피내 종양

1) AI: 상피내 종양에서 AI는 0~1.5까지 관찰되었으며 AI의 평균값은 0.43 ± 3.91 이었다. AI는 CIN I 과 CIN II 에서는 0~0.5까지 였고 CIN III에서는 0.5~1.5까지로 CIN I 과 CIN II에 비해 CIN III에서 AI가 높게 관찰되었다 (Fig. 1). 또한 정상 자궁경부

점막 조직 중 각질화되어 사멸해가는 가장 표층의 세포들에서 갈색으로 염색되는 소견이 관찰되었다.

2) Bcl-2: 상피내 종양 15예중 6예에서 bcl-2가 양성 (40%)을 보였고 양성반응은 각 등급의 이형성 세포에서 관찰되었다. 즉 등급별로 bcl-2발현 양상을 보면 CIN I의 경우 5예중 2예에서 기저층에만 양성 반응을 보여 정상대조군과 차이가 없어 음성반응으로 하였다. CIN II의 경우 5예중 3예에서 중간층까지 양성인 세포가 관찰되었으며 CIN III의 경우 5예중에서 3예에서 표층까지 양성인 세포를 관찰할 수 있었다.

3) PCNA: PCNA의 경우 상피내 종양의 침범 정도와 일치하여 양성인 세포들이 관찰되었으며 CIN I의 경우 방기저층까지 CIN II의 경우 중간층까지 CIN III의 경우 표층까지 양성인 세포들이 관찰되었다 (Fig. 2).

4) AI와 bcl-2의 관계: 상피내 종양에서 AI와 bcl-2의 관계를 보면 Table 1과 같으며 bcl-2에 양성인 6예 중 4예에서 AI값이 평균값 (0.43) 이하이고, bcl-2에 음성인 9예중 6예의 AI가 평균값 이하로 이들 사이에 상관관계는 없었다 ($P > 0.05$).

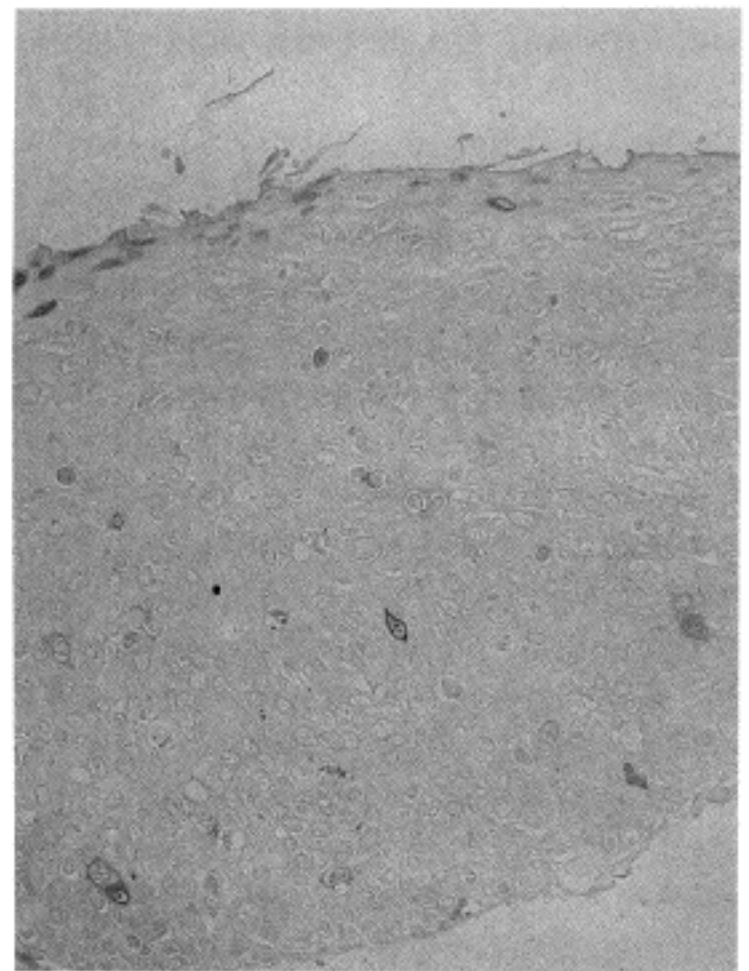


Fig. 1. Apoptosis in cervical intraepithelial neoplasia III (CIN III). Some apoptotic nuclei are scattered in epithelial lesion (TUNEL).

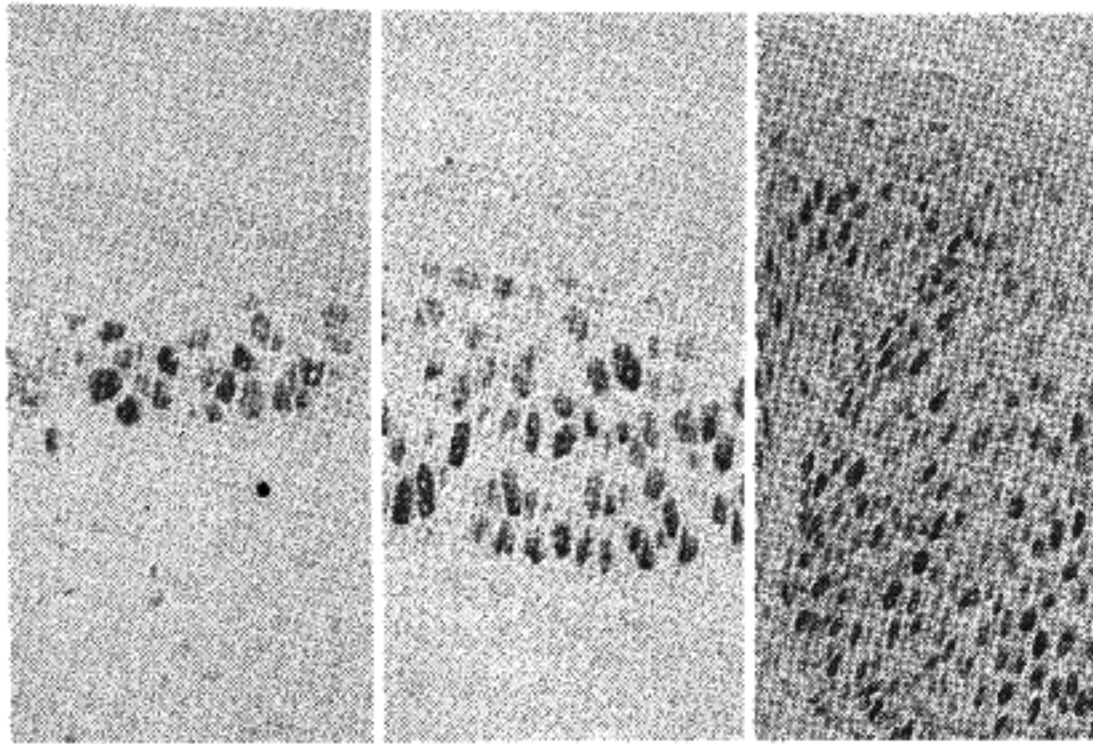


Fig. 2. Immunohistochemical stain for PCNA in cervical intraepithelial neoplasia (I-III). Expression of PCNA was increased according to the grades of CIN.

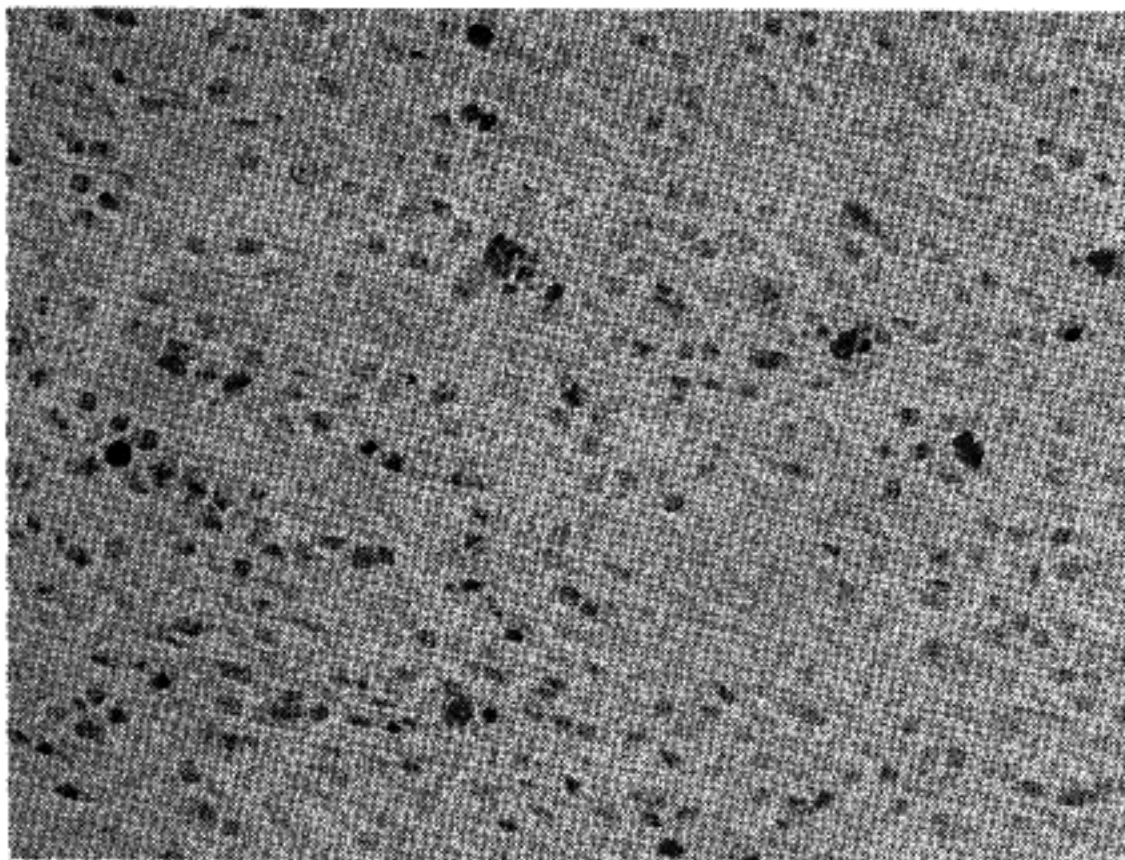


Fig. 3. Apoptotic cells in invasive cervical carcinoma. High AI was showed in the tumor cells (TUNEL).

2. 침윤성 암종

침윤성 암종 27예를 대상으로 임상병기에 따른 apoptosis와 bcl-2, PCNA단백에 대한 염색 결과는 Table

2와 같다.

1) AI: 27예의 침윤성 암종에서 관찰된 AI는 1.5 ~ 9.0까지 다양하였으며 (Fig. 3) 그 평균값은 4.3 ± 1.95 로 상피내 종양의 0.43 ± 3.91 에 비해 10배 높았

다 ($P < 0.01$). 임상적 병기에 따른 AI의 차이는 병기 I이 4.7 ± 1.84 , 병기 II는 3.9 ± 2.06 , 병기 III은 4.4 ± 1.65 , 병기 IV는 4.4 ± 0.55 로 임상병기에 따른 AI의 차이는 없었다 ($P > 0.05$).

2) **Bcl-2:** 침윤성 암종 27예중 9예에서 bcl-2에 양성 반응 (33.3%)을 보였다 (Fig. 4). 임상병기에 따른 bcl-2의 발현을 보면 병기 I은 5예중 1예 (20%), 병기 II는 13예중 5예 (38.5%), 병기 III은 6예중 2예 (33.3%), 병기 IV는 3예중 1예 (33.3%)에서 양성 반응을 보여 임상병기에 따른 bcl-2 발현의 차이는 없었다 ($P > 0.05$).

3) **PCNA;** 침윤성 암종의 PCNA에 대한 염색은 27예중 2예를 제외하고는 모두 종양세포의 50% 이상에서 PCNA에 양성 반응을 보였고 (Fig. 5), 2예는 25% 미만에서 양성반응을 보였다.

Table 1. Correlation of bcl-2 expression and apoptosis in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma (number of cases)

	No	bcl-2 +	bcl-2 -	P value
CIN				$P > 0.05$
AI < 0.43	10	4	6	
AI > 0.43	5	2	3	
Invasive Ca				$P > 0.05$
AI < 4.3	15	6	9	
AI > 4.3	12	3	9	

No; number, AI; apoptotic index, Ca; carcinoma

4) **AI와 bcl-2의 관계:** Bcl-2와 AI사이에 유의한 상관관계는 없었고, bcl-2가 양성인 경우 AI의 평균 값은 3.6 ± 1.89 이고 bcl-2가 음성인 경우는 4.6 ± 1.36 으로 bcl-2가 양성인 경우 apoptosis가 적게 일어났지만 통계학적인 의의는 없었다 ($P > 0.05$).

침윤성 암종에서 AI와 bcl-2의 관계를 보면 Table 1과 같다.

5) **생존기간과 AI 및 bcl-2와의 관계:** AI와 생존기간과의 관계를 보면 5년이상 생존한 12명의 환자중에서 AI가 4.3이하인 경우가 10명이고, 5년이내에 사망한 6명중 AI가 4.3 이하인 경우가 2명으로 AI가 낮은 경우 높은 생존기간과 유의한 상관관계를 보였다 ($P < 0.05$). 위의 소견을 SPSS프로그램을 이용하여 AI와 생존기간사이의 관계를 그래프로 표시하면 Fig. 6과 같다.

Bcl-2와 생존기간과의 관계를 보면 5년 이내에 사망한 6명중 4명이 bcl-2에 음성이었고 5년 이상 생존한 12명중 6명에서 bcl-2가 양성으로 bcl-2와 생존기간과는 상관관계가 없었다 ($P > 0.05$).

고 찰

종양의 발생에는 암유전자의 활성화와 암억제 유전자의 불활성이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 암유전자를 3군으로 분류하는데 제 1군은 myc, ras, abl과 같은 종양 유전자로서 세포의 성장과 증식을 촉진하는 유전자이며, 제 2군은 p53과 Rb로 세포의 성장과 증식을 억제하는 유전자이고, 제 3군은 주로 계획되어진 세포사멸 (apoptosis)

Table 2. Apoptosis and expression of bcl-2 and PCNA according to FIGO stage

Stage	No	AI		P	bcl-2 + (%)	P	PCNA			
		mean	SD				1+	2+	3+	4+
I	5	4.7	1.84	$P > 0.05$	1 (20)	$P > 0.05$			3	2
II	13	3.9	2.06		5 (38.5)		2	7	4	
III	6	4.4	1.65		2 (33.3)			3	3	
IV	3	4.4	0.55		1 (33.3)			1	2	
Total	27	4.3	1.95		9 (33.3)		2	14	11	

No; number, AI; apoptotic index, SD; standard deviation, bcl-2 +; bcl-2 positive PCNA; 0: no positive cell, 1: < 25% of tumor cells are positive, 2: 25-50% of tumor cells are positive, 3: 51-75% of tumor cells are positive, 4: > 75% of tumor cells are positive, P; P value



Fig. 4. Immunohistochemical stain for bcl-2 in invasive cervical carcinoma. Diffuse cytoplasmic staining was noted in infiltrated tumor cells.

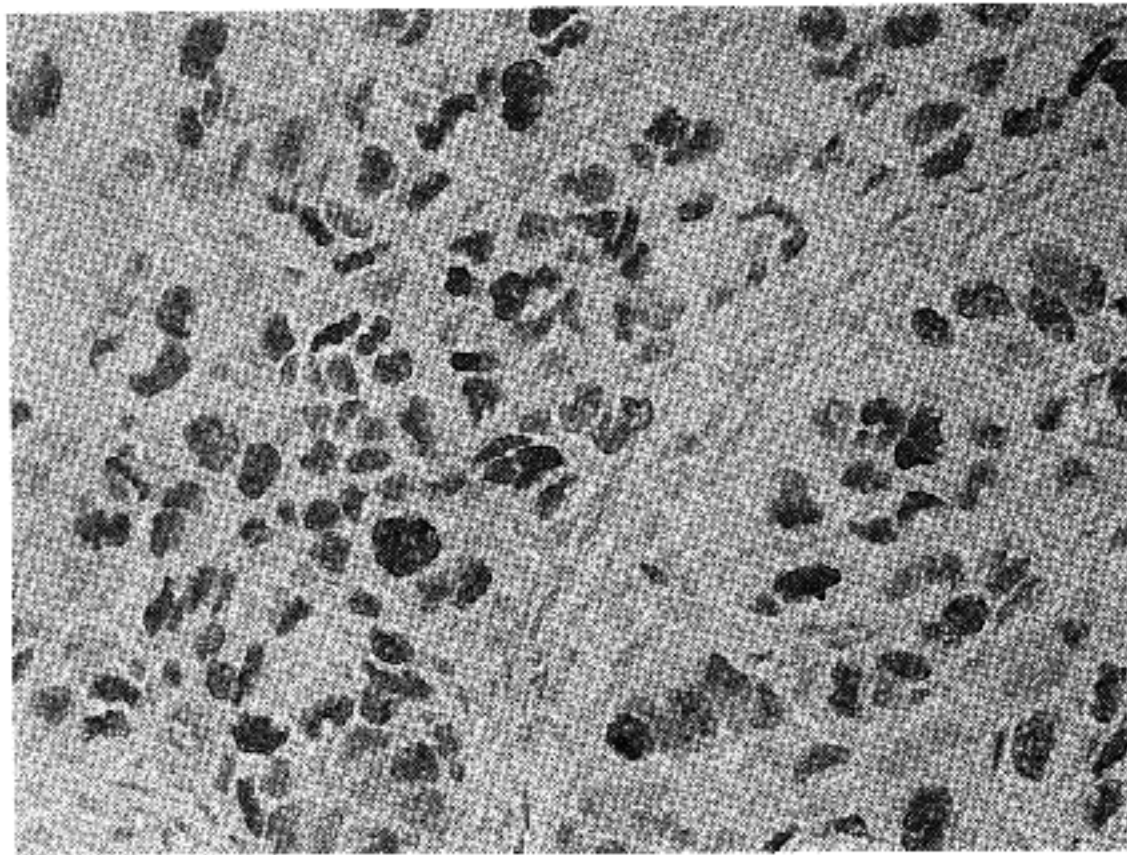


Fig. 5. Immunohistochemical stain for PCNA in invasive cervical carcinoma. Most tumor cells showed diffuse nuclear staining.

에 관여하는 bcl-2와 같은 유전자를 포함하고 있다.²¹ Apoptosis때 보이는 형태학적 변화는 염색질의 응집 (condensation)이 일어난 후 핵이 여러조각으로 나뉘고 각각의 조각은 세포질로 싸여있으며 이때 세포

질 안에는 핵 조각과 세포내 소기관이 포함되어 있는데 이것을 apoptotic bodies라고 하며, H&E염색상에서는 조각난 핵과 이것을 싸고 있는 강한 호산성의 세포질로 구성되어있다. 또한 apoptosis는 세포내

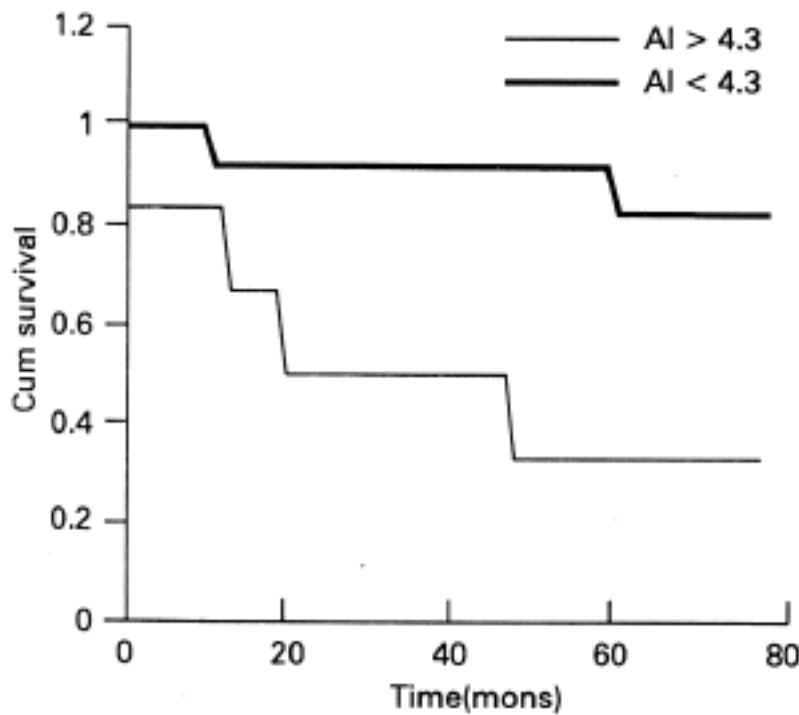


Fig. 6. The patient with AI greater than 4.3 showed significantly shorter survival time than the patients with AI of 4.3 or less.

Cum; cumulative, mons; months ($P < 0.05$)

물질이 세포밖으로 유출되지 않기 때문에 괴사와는 달리 주변에 염증반응을 유발하지 않는 것으로 되어있다.²⁴ Apoptosis에 대한 검색은 광학현미경적인 관찰에 의존하여 왔으나 이들은 그 크기가 작고 침윤한 림프구와 감별이 어려운 단점이 있었다. 그래서 최근에는 apoptic bodies를 검출할 수 있는 특수 염색법이 개발되었고 in situ end-labeling (ISEL)법이나,⁶ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling (TUNEL)방법,²⁵ 등을 이용하여 보다 정확하게 apoptosis를 검색할 수 있게 되었다. 그리고 생화학적으로 apoptotic 세포의 중요한 소견은 endonuclease의 활성으로 DNA가 180-200bp의 조각으로 나누어 진다는 것이다. 또한 최근에는 apoptosis를 조절하는 유전자들이 밝혀졌는데 이들 중 가장 잘 알려진 것이 bcl-2와 p53이다.

Bcl-2는 생리적으로나 종양 발생에 있어서 apoptosis의 억제를 통하여 세포의 죽음을 조절하는 원종양유전자로 알려져있으며, 미토콘드리아의 내막과 핵막, 소포체 등에 위치하는 분자량 26kD의 단백질이다. Bcl-2의 종양유전자로서의 역할은 여포성 B 림프종에서 잘 연구되어 왔는데 14번과 18번 염색체의 상호전좌로 인하여 bcl-2 유전자가 면역글로블린 중쇄유전자와 융합유전자를 형성하고 이로 인해 bcl-2 단백질이 과도하게 만들어지고 B 림프구의 apoptosis를 억제하여 종양을 발생시키는 것으로 알려져 있다.²⁶⁻²⁷

그러나 최근에는 t (14;18)뿐만아니라 다른 기전에 의해서도 bcl-2단백의 과발현이 일어날 수 있다고 하였으나 그 정확한 기전에 대해서는 아직 밝혀지지 않고있다. 최근에는 bcl-2와 아미노산 서열이 유사한 유전자군이 밝혀졌는데 이중 일부는 apoptosis를 억제하고, 일부는 apoptosis를 조장하는 것으로 알려져 있다. 이중에서 Bax 유전자에 의해 발현되는 단백질은 이들 군의 중심적 조절자의 역할을 한다고 하였다. 그리고 bcl-2 단백질은 생리적 기능을 수행하기 위해서는 다른 단백질과 결합을 해야되는데 가장 잘 알려진 단백질이 Bax이다.²⁸ Bax 단백질은 세포사멸의 촉진자 (promotor)로 알려져 있으며 그 기능은 bcl-2와 heterodimerization 됐을 때 증화된다고 하였다.²⁹⁻³⁰

그리고 apoptosis 자극에 대한 세포의 상대적 민감도는 Bax:bcl-2나 다른 antiapoptotic bcl-2집단에 있는 단백질에 의해 조절될 것이라고 하였다.²⁹ 결국 Bax 표현의 감소는 bcl-2단백의 과발현과 같게된다. Bcl-2 단백질의 과발현이 일어나는 기전에는 t (14;18)이외에 아마도 bcl-2의 posttranslation 단계의 조절장애가 있을 것이라 하였고 이런 이론은 bcl-2 mRNA와 bcl-2 단백질발현 사이에 불일치가 관찰되는 것으로 지지를 받고 있다.^{31,32}

Bcl-2단백의 과발현은 여포성 림프종 이외에 다른 여러 종류의 림프종과 백혈병, 호즈킨 림프종등^{33,34}에서 보고되고 있을 뿐 아니라 비 림프계조직인 상피암에서도 제한적이지만 보고되고 있다. Hockenbery 등³⁵에 따르면 재생하는 원조세포에서 유래된 모든 조혈계 세포에서 bcl-2를 발현하지만 일부 비림프계 조직중에서도 bcl-2를 관찰할 수 있었는데 선상피 조직과, 장시간 생존하는 원조세포를 갖는 피부나 장관 조직, 신경조직과 같은 오랜 수명을 갖는 비주기성 세포들이라고 하였다. 상피기원의 암종에서 bcl-2에 대한 연구는 유방암,³⁶ 폐암,¹² 위암,¹⁵ 전립선암³⁷ 등에서 이루어져 있으며 자궁경부암에서는 연구된 예가 드물고 특히 apoptosis와 bcl-2의 관련성에 관한 연구는 찾아보기가 힘들었다. 따라서 우리나라 여성에서 가장 흔한 암인 자궁경부암을 대상으로 자궁경부암의 발생에 대한 이들의 역할과 자궁경부암의 예후와의 관련성을 추구하고는 것은 의미가 있는 일이라 생각되어 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서 침윤성 암의 경우 AI의 평균값이 4.3 ± 1.95 로 상피내 종양의 0.43 ± 3.91 에 비해 10배나 높았다. 그리고 침윤성 암 환자중 18예에서 추적조사가 가능하였는데 이중 7명이 5년 이내에 사망하였고 11명이 5년 이상 생존하였다. 생존한 11명중 10예의 AI값이 평균값 미만이었으며 5년 이내에 사망

한 7명중 5명의 AI값이 평균값 이상으로 AI값이 낮을수록 생존기간이 길게 나타났다. 이러한 결과는 다른 상피암에서 얻어진 결과와 유사하였는데, Ulla 등¹⁸은 폐에 발생한 비소세포암을 대상으로 종양조직은 비종양조직에 비해 apoptosis가 2배정도 많이 발생하고 apoptotic index가 높을수록 생존 기간이 짧다고 하였다. Baretton 등¹⁹도 결직장암의 경우 apoptosis가 적은 환자에서 종양의 진행이 느렸다고 하였고, Lipponen과 Aaltomaa도²⁰ 방광의 이행상피암에서 유사한 결과를 보고하였다.

본 연구에서 bcl-2의 발현은 상피내 종양 15예중 6예에서 양성 반응 (40%)을 보였고 침윤성 암의 경우 27예중 9예에서 양성 반응 (33.3%)을 보여 상피내 종양에서 약간 높았다. 이러한 결과는 이형성 병변과 같은 전암성 병변에서 암으로 진행되는 단계적 진행을 하는 것으로 잘 알려진 위암이나 직장암을 대상으로 bcl-2 발현의 차이를 알아본 연구에서도 관찰되었는데 위의 선종과 암종에서 각각 81%와 72%, 결직장암의 선종과 암종에서는 각각 86%와 67%로 bcl-2의 과발현을 보여 암발생중 조기에 관련된 사건임을 시사하였다.^{19,28} 예후인자로써 bcl-2의 역할에 대한 연구는 B세포 림프종과 몇몇 상피암에서 이루어졌는데 B 세포 림프종의 경우 낮은 등급에서 높은 등급으로 진행할 때 bcl-2발현이 소실된다 하였고, 상피암의 경우 bcl-2가 양성인 경우 예후가 좋았다고 하였다.¹²

본 연구에서 침윤성 암의 경우 임상병기에 따른 AI나 bcl-2 단백질발현에서는 차이가 없었다. 또한 bcl-2의 발현과 생존기간과의 관계를 보면 5년 이내에 사망한 6명중 4명이 bcl-2에 음성이었고 5년 이상 생존한 12명중 6명에서 bcl-2가 양성으로 bcl-2와 생존기간과는 유의한 상관관계가 없었다 ($P > 0.05$). Bcl-2는 apoptosis를 억제하여 종양 발생에 기여하는 것으로 알려져 있었는데 본 연구의 결과도 AI평균값이 bcl-2가 양성인 종양에서 3.6 ± 1.36 이고 bcl-2가 음성인 종양에서는 4.6 ± 1.89 로 bcl-2가 양성인 경우 AI값이 낮았으나 통계학적인 의의는 없었다 ($P > 0.05$). Bcl-2와 apoptosis 관계에 대해서는 앞으로 많은 연구가 요망되며, bcl-2 이외에 apoptosis와 관련된 다른 유전자와의 관계에 대해서도 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

PCNA에 대한 염색은 상피내 종양의 경우 종양의 등급이 증가 할수록 양성인 세포가 증가하여 종양세포의 증식능이 상피내 종양의 진행에 관여함을 알 수 있었다. 침윤성 암에서는 27예중 25예에서 종양세포의 반 수 이상이 PCNA에 양성을 보여 침윤

성 자궁경부암의 높은 세포증식능을 알 수 있었다. 하지만 종양의 대부분에서 PCNA 발현율이 높아 임상병기에 따른 변화나 예후인자로써의 역할은 불분명하였다.

결 론

자궁경부의 상피내 종양과 침윤성 암을 대상으로 종양의 발생과 진행에 apoptosis나 bcl-2종양유전자의 발현 양상의 변화, 종양세포의 증식능이 어떻게 관여하는 지를 알아보고 이들이 자궁경부암의 예후에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 자궁경부의 상피내 종양 15예와 침윤성 암 27예를 대상으로 apoptosis정도 및 bcl-2와 PCNA발현과의 관계를 알아보았으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 상피내 종양에서 AI는 0.43 ± 3.91 이고 침윤성 암에서는 4.3 ± 1.95 로 침윤성 암에서 apoptosis가 많이 일어남을 알 수 있었다.

2) 상피내 종양에서 bcl-2 단백질발현은 등급 II와 III에서 모두 60%였고 CIN I에서는 기저세포에서만 발현되었다.

3) PCNA의 경우 상피내 종양의 등급이 증가함에 따라 PCNA에 양성인 세포들이 의의있게 증가하였다.

4) 침윤성 암종 18예중 AI와 생존기간과의 관계를 알아본 결과 AI가 낮을수록 평균수명이 의의있게 높았다.

5) 침윤성 암에서 PCNA의 경우 27예중 25예가 50%이상의 세포에서 양성 반응을 보였다.

6) 상피내 종양과 침윤성 암에서 bcl-2 단백질발현과 AI사이에 통계학적으로 상관 관계는 없었다.

이상의 결과로 상피내 종양에서 bcl-2 단백질의 과발현과 세포의 증식능의 증가는 자궁경부암의 발생에 관여할 수 있다고 사료되었고 침윤성 암에서 AI는 하나의 예후 결정인자로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-36.
2. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.

4. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-96.
5. Chandler D, el Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of bcl-2 protooncogene in the fetal and adult human kidney: Evidence of contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Hum Pathol* 1994; 25: 789-96.
6. Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12.
7. Lane DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; 362: 786-91.
8. Korsmeyer SJ. Bcl-2: An antidote of programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; 15: 105-10.
9. Hockenbery DM, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
10. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5214-8.
11. Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 1987; 2: 3-7.
12. Pezzella F, Turley H, Tungekar MF, et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 690-4.
13. Ben Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinoma of the lung express the bcl-2 protein. *Am J Pathol* 1994; 145: 1036-40.
14. Doglioni C, Deitos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G. The prevalence of bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Arch* 1994; 424: 45-51.
15. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1995; 75: 2209-13.
16. Pilotti S, Collini P, Del Bo R, Cattoretti G, Pierotti MA, Rilke F. A novel panel of antibodies that segregates immunocytochemically poorly differentiated carcinoma from undifferentiated carcinoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 1054-64.
17. Kuwashima Y, Uehara T, Kishi K, Shiromizu K, Matsuzawa M, Takayama S. Immunohistochemical characterization of undifferentiated carcinoma of the ovary. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: 672-7.
18. Ulla T, Eerola AK, Rainio P. Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 5595-602.
19. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenoma and carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 255-64.
20. Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173: 333-9.
21. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* 1987; 326: 515-7.
22. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
23. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogene: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
24. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 5th. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 18-9.
25. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
26. Yunis JJ, Oken N, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982; 307: 1231-6.
27. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t (14:18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229: 1390-3.
28. Yin XM, Oltval ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH 2 domain of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369: 321-3.
29. Oltval ZN, Miliman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
30. Hanada M, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC. Structure-function analysis of bcl-2 protein: identification of conserved domains important for homodimerization with bcl-2 and heterodimerization with bax. *J Biol Chem* 1995; 270: 11962-9.
31. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter

- KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene is not specific for the 14:18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-32.
32. Chleq Deschamps CM, LeBrun DP, Huie P, et al. Topographical dissociation of BCL-2 messenger RNA and protein expression in human lymphoid tissues. *Blood* 1993; 81: 293-8.
33. Cobally N, Grogen L, Keane M, Devaney DM, Dervan PA, Carney DN. Bcl-2 rearrangement in Hodgkin's disease and reactive lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 756-60.
34. Said JW, Pinkus GS, Lonès MA, Preston M, Shintaku IP. Expression of bcl-2 oncogene protein in malignant lymphomas, including Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype. *Appl Immunohistochem* 1993; 1: 108-14.
35. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-5.
36. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-9.
37. Segal NH, Cohen RJ, Haffeejee Z, Savage N. Bcl-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 616-8.
38. Lauwers GY, Scott GV, Hendricks J. Immunohistochemical evidence of aberrant bcl-2 protein expression in gastric epithelial dysplasia. *Cancer* 1994; 73: 2900-4.
-