

방사선요법으로 치료한 자궁목의 침윤성 편평세포암종에서 HIF-1 α 단백질 발현

이경자 · 조민선¹ · 김승철² · 문혜성²
박혜숙³ · 이시내¹ · 성순희¹ · 심기남⁴
이경은⁴ · 정성애⁴ · 유권⁴ · 박혜영⁵
박수연⁶ · 유은선⁷ · 서현숙

이화여자대학교 의과대학, 의과연구소
방사선종양학교실, ¹병리학교실
²산부인과학교실, ³예방의학교실
⁴내과학교실, ⁵생화학학교실, ⁶해부학교실
⁷소아과학교실

접 수 : 2005년 4월 14일
게재승인 : 2005년 7월 28일

책임저자 : 조 민 선
우 158-056 서울시 양천구 목6동 911-1
이화여대 부속 목동병원 의과대학 병리학교실
전화: 02-2650-5730
Fax: 02-2650-2635
E-mail: mcho1124@ewha.ac.kr

Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Invasive Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix Treated by Radiotherapy

Kyung-Ja Lee, Min-Sun Cho¹, Seung Cheol Kim², Hae Sung Moon², Hyesook Park³, Shi Nae Lee¹, Sun Hee Sung⁴, Ki-Nam Shim⁴, Kyung Eun Lee⁴, Sung-Ae Jung⁴, Kwon Yoo⁴, Hae-Young Park⁵, Soo-Yeun Park⁶, Eun Sun Yoo⁷ and Hyun Suk Suh

Department of Radiation Oncology, ¹Pathology, ²Gynecology and Obstetrics, ³Preventive Medicine, ⁴Internal Medicine, ⁵Biochemistry, ⁶Anatomy, and ⁷Pediatrics, Medical Research Center, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Background : Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is an intrinsic marker of tumor hypoxia, and this is associated with reduced radiosensitivity. Furthermore, HIF-1 α can increase a tumor's aggressiveness by promoting neoangiogenesis, cell proliferation and survival, and invasion.

Methods : The expression of HIF-1 α was investigated by performing immunohistochemistry on the cervical tissue specimens obtained from 57 patients who had received radiotherapy combined with or without chemotherapy for stages I-III cervical squamous cell carcinoma. The staining results were compared with anemia, the stage, the radiotherapy response and patient survival by univariate and multivariate analysis. **Results :** In 57 patients, the expression of HIF-1 α was seen in the tissue specimens of 46 patients (81.7%). Among them, 25 (54.3%), 14 (30.4%), and 7 (15.2%) of the patients' tissue specimens showed weak, moderate and strong expressions, respectively. Six patients had a partial response after radiotherapy. Twelve patients (21.1%) died of cervical cancer. The increased expression of HIF-1 α was significantly associated ($p < 0.05$) with the disease stage and anemia. There were significant positive correlations between the increased expression of HIF-1 α and the poor response after radiotherapy and the patients' survival. **Conclusions :** The present result suggests that the overexpression of HIF-1 α in the uterine cervix could be used as a prognostic indicator for the patients treated with radiotherapy.

Key Words : Cervix Neoplasms; Carcinoma, Squamous cell; Hypoxia Inducible Factor 1; Immunohistochemistry

자궁목의 편평세포암은 우리나라 여성 암종에서 가장 흔한 암종의 하나로 human papilloma virus (HPV) 감염과 밀접한 연관이 있다. 방사선 치료는 수술과 함께 자궁목암의 표준 치료법으로 국소 진행성 암종에서 가장 효과적인 치료 방법으로 알려져 있다. 방사선이 세포사를 유발하는 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았지만, 알려진 기전 가운데 하나는 방사선이 세포 내 산소 유리기의 형성을 증가시켜 DNA에 손상을 유발하는 것이다. 따라서 종양 조직이 저산소 상태일 때 방사선에 의한 산소 유리기의 감소로 세포사가 감소하며 치료효과도 감소한다. 일반적으로 조직 내 산소 분압이 낮을수록 방사선치료 성적이 떨어지는 것으로 알려져 있다.^{1,2}

Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)는 조직에서 낮은 산소농도에 대한 적응반응에 관여하는 전사인자로서, 적혈구 및 혈관 신생, 당 대사, 세포 성장 및 세포사 조절, 종양세포의 침윤과 전이 등과 관련된 60여 가지 유전자의 발현을 조절한다.^{3,4} HIF-1은 HIF-1 α 와 HIF-1 β 의 두 개의 아단위로 이루어져 있는데, HIF-1 α 아단위가 HIF-1의 활성을 결정한다. HIF-1 α 의 세포 내 농도는 산소농도 및 여러 성장인자와 시토키인에 의해 결정된다.

정상 산소 농도에서는 HIF-1 α 단백질과 von Hippel-Lindau (VHL) 단백질이 결합하고 이에 따라 ubiquitination됨으로써 proteasome에서 분해된다. 이에 반해 저 산소상태에서는 VHL과의 결합이 이루어지지 않아 세포 내에 존속, 축적하여 저 산소

상태에서 세포에 필요한 여러 유전자의 발현을 유도한다.⁵ 따라서 HIF-1 α 단백질의 세포 내 농도는 조직 내 저 산소증의 간접적인 지표로 이용할 수 있다.⁶ 이 외에 HIF-1 α 는 HER2-neu, EGFR 등의 성장인자 및 시토키인,⁷ oncogenes의 활성화,⁸ VHL의 돌연변이,⁹ PTEN의 소실¹⁰ 등에서도 조절된다. 침윤성 자궁목암 환자에서 HIF-1 α 단백질의 발현이 높을수록 방사선 치료 효과 및 생존율이 낮다는 보고가 있다.¹¹⁻¹³

이에 본 연구자는 자궁목 편평세포암에서 HIF-1 α 단백질 발현 정도를 알아보고 이와 방사선 치료효과의 연관성을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

재료

1991년부터 2002년까지 이화여자대학교 부속 동대문 및 목동 병원에서 자궁목의 침윤성 편평세포암으로 방사선 치료를 받은 57예의 환자를 대상으로 하였다. 환자의 연령은 30세부터 77세까지로 평균 연령은 53세였고, FIGO 병기는 I이 10예(17.5%), II 32예(56.1%), III 15예(26.3%)였다. 병기 I의 한 예는 근치적 자궁절제술을 시행했고 나머지는 진단을 위한 조직 생검만을 시행하였다. 57예 중 20예는 방사선요법과 함께 항암화학요법을 시행했다. 환자의 치료 전 혈액 헤모글로빈 농도를 조사하였고, 수치가 11 g/dL 미만인 경우 빈혈이 있다고 하였다.

방사선 요법으로 외부방사선조사는 6 MV 선형 가속기(NEC 1000X, Japan)를 이용한 x-선으로 전 골반강에 매일 전후 2분과 양측 측면의 4분 조사로 매일 180 cGy씩 주 5회 시행하였다. 외부방사선조사 총 선량은 40-50 Gy였으며 45 Gy 이후 골반강의 중앙부에 차폐를 하였다. 골반강 내 조사는 Fletcher-Suit applicator (3 M, USA)를 사용하였으며 Cs-137 밀봉선원을 이용한 저선량으로 point A의 선량은 40-42 Gy로 하였으며 외부조사 후 10일에서 14일 후 1회 혹은 2회 시행하였고 2회 실시하는 경우 2주 간격으로 하였다. 외부 조사와 골반강 내 조사의 총 방사선 선량은 IIB 미만에서는 point A에 80-90 Gy, point B에 50-60 Gy로 하였으며 IIB 이상에서는 point A에 90 Gy, point B에 60-70 Gy를 기준으로 치료하였다.

방사선 치료에 대한 반응은 방사선 조사 후 3개월 후에 임상적인 검사와 자궁목 세포진검사로 평가하였다. 불완전 관해는 방사선 치료 후 3개월 후에도 골반강 내에 암이 남아 있는 경우로 정의하였다. 치료 후 추적검사는 처음 6개월은 1개월 간격, 다음은 3개월 간격으로 2년간, 2년 후에는 6개월 간격으로 시행하였다. 추적검사 방법으로 내진과 자궁목 세포진 검사를 시행하고 1년 간격으로 흉부 방사선 촬영을 시행하였으며 필요에 따라 경정맥 신우조영술 및 골반 전산화 단층촬영을 하였다. 평균 추적관찰 기간은 33.8개월이고 정중 추적기간은 25.0개월(2-120

달)이었다.

면역조직화학 염색

진단에 이용한 생검 조직의 파라핀 포매 표본에 대해 HIF-1 α 단백질에 대한 단클론 항체(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후 항온기에서 60°C로 한 시간 동안 건조시켰다. 그런 다음 xylene으로 파라핀을 제거한 뒤 다단계 농도의 알코올로 탈수시켰다. 항원성 회복을 위해 citrate (pH 6.0) buffer 속에서 극 초단파로 20분간 가열한 후 실온에서 식혔다.

이 후 Bond polymer detection system 시약(Vision biosystems, Mount Waverley VIC, Australia)과 함께 Bond-X automated immunostainer (Vision biosystems)를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 이 과정은 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위한 30분간의 0.3% 과산화수소수 용액 처리 과정과 희석한 일차 항체(1:1,000)로 실온에서 30분간 처리하는 과정과 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색 및 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하는 과정을 포함한다.

면역염색 결과는 반정량적으로 다음과 같이 판독하였다. 먼저 양성으로 염색된 세포의 비율을 판정하였다. 양성인 세포의 수가 10% 미만인 경우를 1점, 10-50%인 경우를 2점, 50-80%인 경우를 3점, 80%인 경우를 4점으로 하였다. 염색 강도는 약한 경우를 1점, 중등도인 경우를 2점, 강한 경우를 3점으로 하였다. 염색 강도에 상관없이 양성인 세포의 비율이 10% 미만이면 음성으로 하였고, 양성인 경우 두 가지 점수를 합하여 3군으로 나눴다. 합이 4, 5인 경우 약하게 발현, 6인 경우 중등도로 발현, 7인 경우 강하게 발현한다고 하였다.

통계학적인 분석

HIF-1 α 단백질 발현 정도와 헤모글로빈 수치, FIGO 병기 사이의 연관성 및 이들과 방사선 치료에 의한 완전 관해 여부, 추적관찰 결과 사이의 연관성을 χ^2 검정을 사용하여 분석하였다. p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 단변량 분석에서 추적관찰 결과와 유의하게 나온 변수를 보정한 상태에서도 HIF-1 α 단백질 발현 정도가 추적관찰 결과와 연관이 있는지는 proc FREQ/CMH option을 이용하여 분석하였다.

결 과

HIF-1 α 단백질 발현

HIF-1 α 단백질은 핵에 염색되었으며, 46예(81.7%)에서 발현되

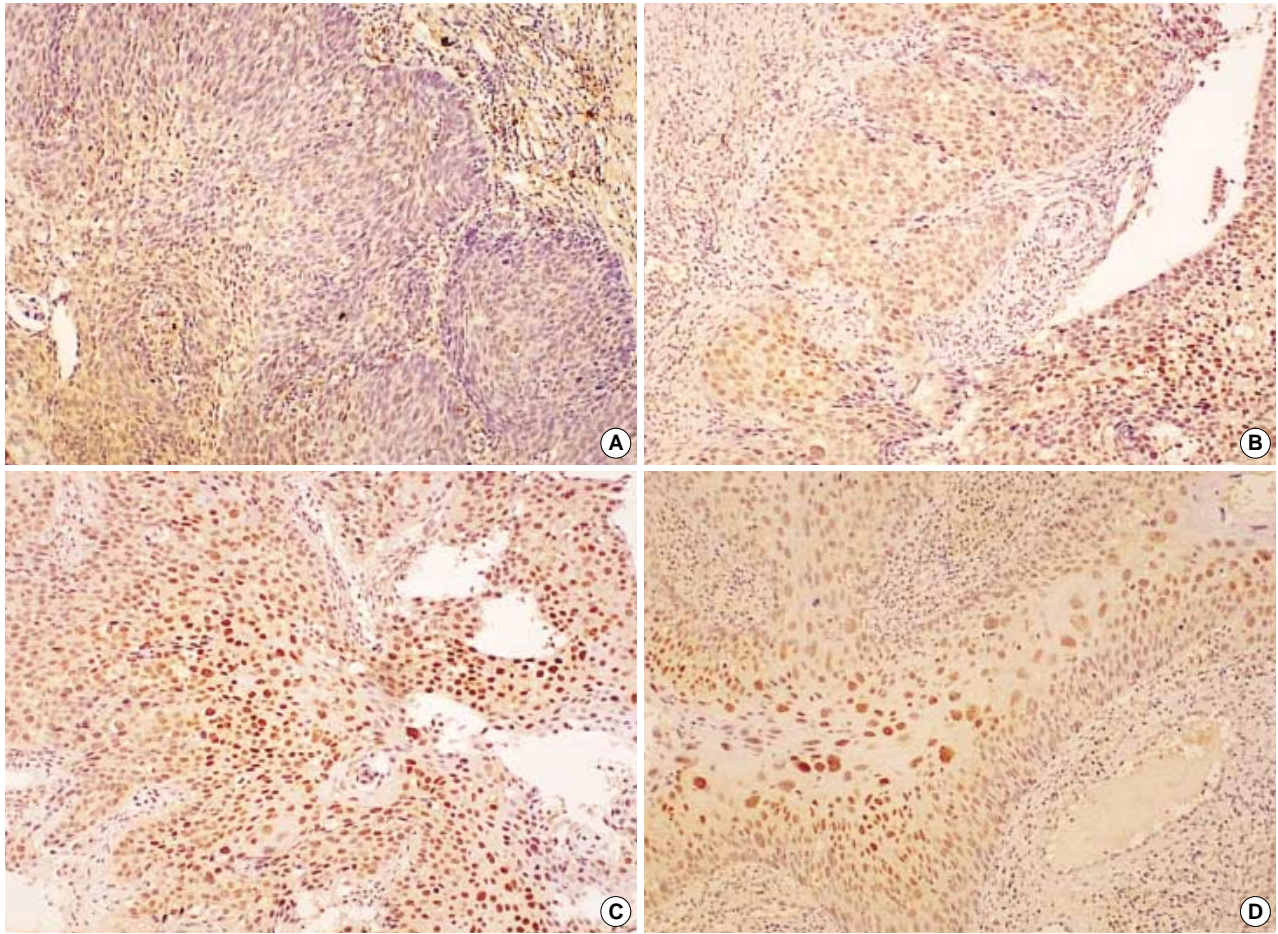


Fig. 1. Immunohistochemical staining with antibody for HIF-1 α protein shows a mild (A), moderate (B), and strong (C) nuclear expression at tumor cells. Mast cells in subepithelial interstitial tissue also show positive reaction (A). Some superficial tumor cells with koilocytotic atypia reveal strong nuclear expression of HIF-1 α (D).

었다. 이 중 25예(54.3%)가 약한 발현을 보였고, 14예(30.4%)에서 중등도, 7예(15.2%)에서 강하게 발현했다(Fig. 1A-C). 자궁의 정상 편평 상피는 발현하지 않았으나 일부에서는 표피의 하층부에서 발현하였다. 생검 조직이어서 괴사소는 거의 없었으며, 따라서 괴사와 HIF-1 α 단백질 발현의 연관관계는 알 수 없었다. 일부에서 종양 군집의 기저층 보다는 중간층 이상에서 양성 반응을 보이는 경향이 있었다. 일부 예에서 HPV에 의한 원반 세포형 변화를 보이는 세포에서 강하게 염색되었다(Fig. 1D).

임상적인 특징과 HIF-1 α 단백질 발현

HIF-1 α 단백질의 발현 정도는 FIGO 병기와 연관이 있어 병기가 올라갈수록 HIF-1 α 단백질의 발현 정도가 높았다(p=0.012). 또한 빈혈과도 연관이 있어 빈혈이 있는 경우 HIF-1 α 단백질 발현 정도가 의미 있게 높았다(p=0.016) (Table 1).

전체 57예 중 51예(90.0%)는 방사선 치료 후 종양이 완전 관해 되었고, 6예(10%)는 불완전 관해되었다. 추적 관찰 결과 12

예(21.1%)가 자궁목암으로 사망하였다.

방사선 치료 후 종양의 관해 결과와 비교해 보았을 때 HIF-1 α 단백질의 발현이 강한 군이 불완전 관해하는 확률이 높았다(p=0.004). 병기나 빈혈 유무는 방사선 치료 반응과 관련이 없었다. 또한 HIF-1 α 단백질의 발현이 강할수록 사망률이 의미 있게 높았으며(p=0.009), 사망률과 경계성 유의수준을 보인 병기를 보정한 상태에서도 HIF-1 α 단백질의 발현과 생존을 간에 유의한(p<0.001) 연관성이 있었다. 사망률과 빈혈 유무, 항암화학요법 유무와는 관련이 없었다(Table 2).

고 찰

본 연구에서 전체 57예의 자궁목 편평세포암종에서 46예(81.7%)가 HIF-1 α 단백질을 발현하였는데, 이 중 25예(54.3%)가 약한 발현을 보였고, 14예(30.4%)가 중등도, 7예(15.2%)가 강하게 발현했다. HIF-1 α 단백질을 많이 발현할수록 빈혈의 존재 및

Table 1. Relationship between HIF-1 α expression and FIGO stage and anemia

	Patients		HIF-1 α expression								p-value	
	n	%	negative		weak		moderate		strong			
			n	%	n	%	n	%	n	%		
Total	57	100	11	19.3	25	43.9	14	24.6	7	12.3	0.012	
FIGO stage												
I	10	17.5	3	30.0	5	50.0	1	10.0	1	10.0		
II	32	56.1	8	25.0	15	46.9	6	18.8	3	9.4		
III	15	26.3	0	0	5	33.3	7	46.7	3	20.0		
Anemia												0.016
No	37	64.9	9	24.3	19	51.4	6	16.2	3	8.1		
Yes	20	35.1	2	10.0	6	30.0	8	40.0	4	20.0		

n, number of cases.

Table 2. Relationship between HIF-1 α expression and clinical profile

	n	RT response				p-value	Follow-up				p-value
		CR		PR			CR		PR		
		n	%	n	%		n	%	n	%	
Total	57	51	89.5	6	10.5	57	78.9	12	21.1	0.009	
HIF-1 α											
negative	11	11	100	0	0	11	100	0	0		
weak	25	24	96.0	1	4.0	22	88.0	3	12.0		
moderate	14	12	85.7	2	14.3	9	64.3	5	35.7		
strong	7	4	57.1	3	42.9	3	42.9	4	57.1		
FIGO stage											0.107
I	10	9	90.0	1	10.0	9	90.0	1	10.0		
II	32	31	96.9	1	3.1	27	84.4	5	15.6		
III	14	11	78.6	4	21.4	8	57.1	6	42.9		
Anemia											0.423
no	37	34	91.9	3	8.1	31	83.8	6	70.0		
yes	20	17	85.0	3	15.0	14	16.2	6	30.0		
Chemotx										0.322	
no	37	32	86.5	5	13.5	28	75.7	9	24.3		
yes	20	19	95.0	1	5.0	17	85.5	3	15.0		

n, number of cases; RT, radiotherapy; CR, complete remission; PR, partial remission; NED, no evidence of disease.

높은 병기와 통계적으로 유의한 상관관계가 있었고 방사선 치료 후 불완전 관해를 보이는 확률 및 사망률이 의미 있게 높았다.

HIF-1 α 단백질 발현과 방사선 치료 및 예후의 상관성은 여러 종양에서 연구해 왔다. 구강인후암,¹⁴ 두경부암,¹⁵ 식도암,¹⁶ 인후두암¹⁷ 등에서 HIF-1 α 단백질 발현이 높을수록 예후가 나쁘다고 보고되어 있다. 자궁목 편평세포암에 대해서도 연구가 이루어져 왔는데 Bachtary 등¹²은 방사선으로 치료한 병기 IB-IIIb의 67예의 자궁목암을 대상으로 한 연구에서 HIF-1 α 가 중등도 또는 고도로 발현되는 경우 방사선 치료에 부분적으로 반응하는 사례가 많고, HIF-1 α 과발현은 생존율에 나쁜 영향을 미치는 예후인자라고 보고하였다. Burri 등¹³은 병기 IB-IVA까지 78예를 대상으로 한 연구에서 마찬가지로 결과를 보고했다.

반대로 Mayer 등¹⁸은 38예의 자궁목 편평세포암에서 HIF-1 α 의 발현과 산소농도가 상관이 없었으며 예후와도 상관이 없다고 보고하였다. 그러나 이들은 기본적으로 수술로 치료한 환자를

대상으로 상관 관계를 살폈으므로 방사선 조사로 치료한 예를 대상으로 한 연구와는 예후인자로서의 역할에 차이가 있을 것으로 생각한다. Birner 등¹¹은 수술로 치료한 병기 IB의 조기 침윤성 자궁목암에서 HIF-1 α 가 과발현되는 경우 생존율이 유의하게 낮았다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 HIF-1 α 가 많이 발현될수록 방사선조사 후 불완전 관해 비율 및 사망률이 통계적으로 유의하게 높았다.

본 연구에서는 자궁목암의 병기가 진행할수록 HIF-1 α 단백질과 발현하는 정도가 통계적으로 유의하게 많았다. HIF-1 α 는 저산소증 뿐만 아니라 여러 성장인자나 시토키인 및 종양유발유전자의 활성화 등에 의해서도 조절되기 때문에, 이것은 병기가 진행함에 따라 종양 내 저산소증 부분이 많아진 결과일 수도 있고, 종양이 진행함에 따라 발생한 유전학적인 변이에 의한 것일 수도 있다. 자궁목암에서 돌연변이나 촉진자의 메틸화로 인한 PTEN 소실,¹⁹ ras의 활성화,²⁰ IGFR의 과발현 등²¹이 보고된 바 있으며

이들은 직간접적으로 HIF-1 α 의 세포 내 농도에 영향을 미칠 수 있다. 증가한 HIF-1 α 단백질은 VEGF의 발현을 증가시켜 혈관 형성을 증가시킴으로써 종양의 성장에 유리하도록 작용하며, 실험적으로도 HIF-1 α 를 결핍시켰을 때 종양의 혈관 형성과 성장이 저해되었다는 보고가 있다.²² 또한 침윤과 전이 등과 관련한 인자들의 발현을 증가시켜 종양을 더 진행시킬 수 있다.²³

HPV의 E6 단백질에 의한 종양억제인자 p53을 불활성화시키는 것은 자궁목암의 중요한 발병 기전의 하나이다.²⁴ HIF-1 α 는 세포 자멸사 기전에 관여하는 p53, bcl-2, Bax 등과 결합하여 세포자멸사를 억제 또는 촉진하는 역할을 할 수 있는데, HIF-1 α 는 wild type p53과 결합, p53을 안정화시켜 저산소증 상태에서 세포 자멸사가 잘 일어나도록 유도하는 역할을 한다.²⁵

고위험군 HPV에 감염된 자궁목 상피세포를 대상으로 한 실험에서 보면 실험 초기에는 저산소증이 p53 발현을 유도하고 세포자멸사도 촉진했으나, 시간이 지남에 따라 추가적인 유전자변이 등에 의해 세포자멸사에 더 많은 저항성을 가지는 세포가 살아 남았다.²⁶ 따라서 자궁목암에서는 E6 단백질에 의해 p53이 불활성화 되어 있기도 하지만 저산소증 자체가 세포 자멸사에 저항적인 세포가 살아남도록 하여 종양의 악성도를 증가시키는 역할을 할 것으로 생각한다.

또한 종양 내 저산소증이 있는 경우 p53 발현이 낮은 세포, 즉 돌연변이성 p53을 발현하는 세포가 선택될 수 있는데,²⁷ 난소 암에서 HIF-1 α 의 발현에 대한 연구에서 보면 p53의 돌연변이와 함께 HIF-1 α 가 과발현되어 있는 예가 세포자멸사가 적고 동시에 생존율이 낮았다.²⁸ 한편 p53은 HIF-1 α 의 ubiquitination을 증가시켜 HIF-1 α 의 분해를 촉진하는 역할을 한다.²⁹ HPV에 감염된 경우 p53이 불활성화되어 있으므로 HIF-1 α 의 세포 내 축적이 용이하며 따라서 종양 저산소증에 더 잘 견딜 수 있을 것이다. 본 연구에서는 일부 예에서 원반 세포형 변화를 보이는 이형성 편평 상피세포의 핵에서 과발현되는 것을 볼 수 있었는데 이것은 p53의 불활성화와 연관되어 있을 수 있다.

본 연구에서 HIF-1 α 단백질을 발현한 예는 81.7%였다. 이 결과는 27.1%가 양성반응을 보인 서 등³⁰의 연구 결과와는 다소 차이가 나지만 다른 이들이 보고한 81.3%¹¹나 94%¹³와는 유사하다. 본 연구에서는 이차 시약으로 polymer를 적용한 시약(Bond polymer detection system)을 사용하여 비교적 깨끗한 염색과 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 혈관과의 거리나 종양의 괴사 부위와의 인접 여부에 따른 HIF-1 α 의 발현 차이 등의 관계는 본 연구에서는 관찰하기 어려웠다. 생검 조직의 크기가 작거나 종양 세포 군집만 떨어져 나오는 경우도 있고 또한 괴사부위가 별로 없었기 때문이다. 그러나 종양이 군집을 이루면서 주변으로 침윤하는 양상이 보이는 경우 군집의 기저층 보다 상층부에서 과발현되는 경향이 있었으며, 이것은 상층부가 혈관에서 떨어져 있는 것을 반영한다고 생각한다.

참고문헌

- Hall EJ. The oxygen effect and reoxygenation. In: Hall EJ, ed. Radiobiology for the radiologist. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1994; 133-52.
- Bristow RG, Hill RP. Molecular and cellular basis of radiotherapy. In: Tannock IF, Hill RP, eds. The basic science of oncology. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2004; 261-88.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med 2003; 9: 677-84.
- Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. Eur J Surg Oncol 2004; 30: 465-8.
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med 2002; 8: 62-7.
- Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: correlation with tumor oxygenation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 53: 854-61.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol 2001; 21: 3995-4004.
- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. J Biol Chem 2002; 277: 40112-7.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 1999; 399: 271-5.
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, et al. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. Genes Dev 2000; 14: 391-6.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. Cancer Res 2000; 60: 4693-6.
- Bachtiary B, Schindl M, Potter R, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. Clin Cancer Res 2003; 9: 2234-40.
- Burri P, Djonov V, Aebbersold DM, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 56: 494-501.
- Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. Cancer Res 2001; 61: 2911-6.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Hypoxia-indu-

- cible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 1192-202.
16. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, *et al.* Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1830-2.
 17. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, *et al.* Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 595-604.
 18. Mayer A, Wree A, Hockel M, Leo C, Pilch H, Vaupel P. Lack of correlation between expression of HIF-1alpha protein and oxygenation status in identical tissue areas of squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Res* 2004; 64: 5876-81.
 19. Harima Y, Sawada S, Nagata K, Sougawa M, Ostapenko V, Ohnishi T. Mutation of the PTEN gene in advanced cervical cancer correlated with tumor progression and poor outcome after radiotherapy. *Int J Oncol* 2001; 18: 493-7.
 20. Mamas IN, Zafiroopoulos A, Koumantakis E, Sifakis S, Spandidos DA. Transcriptional activation of H- and N-ras oncogenes in human cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 941-8.
 21. Steller MA, Delgado CH, Bartels CJ, Woodworth CD, Zou Z. Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in human cervical cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56: 1761-5.
 22. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; 17: 3005-15.
 23. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3: 347-61.
 24. Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 1999; 18: 7690-700.
 25. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagoskonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998; 392: 405-8.
 26. Kim CY, Tsai MH, Osmanian C, *et al.* Selection of human cervical epithelial cells that possess reduced apoptotic potential to low-oxygen conditions. *Cancer Res* 1997; 57: 4200-4.
 27. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.
 28. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1661-8.
 29. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 34-44.
 30. Suh DS, Lee CH, Suh KS, Yoon MS. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α protein in stages I and II squamous cell carcinomas of the uterine cervix: relationship with p53 protein and VEGF expressions. *Korean J Pathol* 2003; 37: 79-86.