

## 난소 상피 종양에서 G1/S 세포주기 조절단백의 변화

김지연<sup>1</sup> · 김활웅<sup>1</sup> · 최경운<sup>1,2</sup> · 이창훈<sup>1</sup>  
설미영<sup>1</sup> · 강현정<sup>1</sup> · 신동훈<sup>1</sup>

부산대학교 의과대학 병리학교실, <sup>2</sup>의학연구소

접 수 : 2006년 5월 15일  
게재승인 : 2006년 7월 13일

책임저자 : 최 경 운  
우 602-739 부산시 서구 아미동 1가 10  
부산대학교 의과대학 병리학교실  
전화: 051-240-7714  
Fax: 051-242-7422  
E-mail: kuchoi@pusan.ac.kr

\*이 논문은 2006년도 부산대학교 의학연구소  
연구비(2006-46)에 의하여 연구되었음.

### Alteration of G1/S Cell Cycle Regulatory Proteins in Ovarian Epithelial Tumors

Jee Yeon Kim<sup>1</sup>, Hwal Woong Kim<sup>1</sup>, Kyung Un Choi<sup>1,2</sup>, Chang Hun Lee<sup>1</sup>,  
Mee Young Sol<sup>1</sup>, Hyun Jeong Kang<sup>1</sup> and Dong Hoon Shin<sup>1</sup>

Department of <sup>1</sup>Pathology and <sup>2</sup>Medical Research Institute, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

**Background :** Disturbances of the cell cycle regulatory proteins are key events underlying the development and/or progression of human malignancies. The aim of this study was to evaluate the expression of G1/S cell cycle regulatory proteins in ovarian epithelial tumor. **Methods :** We simultaneously evaluated the expression of cyclin D1, cyclin E, CDK4, CDK2, p16, Rb, E2F1, p53 and the Ki67 labelling index (LI) by immunohistochemical methods in 148 cases of ovarian epithelial tumor of the benign (n=47), borderline (n=29), and malignant type (n=72). **Results :** The expression of cyclin E, CDK2, p16, Rb, E2F1, p53 and the Ki67 LI gradually increased from the benign type, through the borderline type, to the malignant tumors. Between the borderline and malignant tumors, the increased expression of cyclin E, E2F1, and p53, and the decreased expression of Rb were significantly associated with malignancy. The reduced Rb expression and the increased E2F1 expression were correlated with the FIGO stage and the histologic grade in the malignant ovarian epithelial tumors. **Conclusions :** Cyclin E, E2F1, and p53 overexpressions and the loss of Rb are the important components during carcinogenesis of ovarian epithelial tumors. Our results suggest that increased expression of E2F1 should be considered as a new parameter for the prognosis of patients with malignant ovarian epithelial tumors.

**Key Words :** Ovary; Epithelial Neoplasm; Cell cycle; E2F1 transcription factor

난소 종양은 여성 생식기계 종양의 약 30%를 차지하며, 특히 난소 상피에서 발생하는 악성 종양은 여성 생식기계 악성 종양 가운데 발생 빈도와 사망률이 가장 높다.<sup>1</sup> 난소 상피에서 발생하는 종양의 주요 조직학적 유형으로는 장액성, 점액성, 자궁내막모양, 그리고, 투명세포형이 있고, 조직학적 소견과 더불어 국소 침윤성, 전이 능력에 따라 양성, 경계성, 악성으로 나뉜다. 경계성 상피 종양은 전체 상피 종양의 10-20% 정도를 차지하며, 대부분은 양성 종양과 같은 진행을 보인다. 난소에 한정된 경계성 상피 종양의 경우 5년 생존율이 95% 이상인 것으로 알려져 있지만, 15-30%에서 침윤성 암으로 진행하고 나쁜 예후를 보일 수 있다.<sup>1</sup>

난소 상피에서 발생하는 악성 종양, 즉 난소상피암의 발생하는 과정은 불행하게도 아직 정확하게 알려져 있지 않다. 난소상피암이 양성 그리고 경계성 종양과는 무관하게 새로(de novo) 발생한다는 기전은 특히 고등급의 장액성 암종에서 강조된다. 이는 p53 돌연변이가 양성과 경계성 종양에서 거의 발견되지 않지

만 악성 종양에서 흔히 발견되는 점과,<sup>2,3</sup> cDNA 미세배열법을 이용한 유전자 발현 연구에서 난소의 경계성 종양이 고등급 악성 종양과 유전자 발현 변화에 차이를 보인다는 점<sup>4</sup> 등에 근거하고 있다. 그러나, 한편으로 난소 상피 종양이 양성, 경계성, 그리고 악성으로 진행된다는 주장이 난소상피암 발생과정을 설명하는 중요한 기전으로 자리하고 있다. 난소상피암에서 양성으로 보이는 상피가 함께 관찰되는데, 점액성은 74%, 자궁내막모양형은 46%, 투명세포형은 39%, 그리고 장액성은 15%에서 동반된다고 하여 이러한 주장을 뒷받침하고 있고,<sup>5</sup> 특히 K-ras 돌연변이가 점액성 양성, 경계성, 악성 종양에서 나타나는 양상은 난소 종양의 진행 모델을 지지하고 있다.<sup>6</sup> 실제로 기본적인 조직소견에 의존하여 양성과 경계성, 그리고 경계성과 악성 난소 상피 종양을 진단하는 것은 쉽지 않으며, 이들을 감별하기 위한 조직학적 진단 기준을 객관화하려는 노력과 더불어 다양한 분자생물학적 시도가 이루어지고 있다.

세포주기 조절곤란(dysregulation)은 인체에서 발생하는 여러 종양의 발생과정을 분자생물학적 수준에서 설명하려는 시도 속에서 연구가 이루어져 왔으며, 실제 많은 세포주기 조절인자들이 종양을 진단하고 예후를 측정하는 데 이용되고 있다. p53은 DNA 손상 시 증가하여 세포 주기 정지를 일으키는 대표적인 종양 억제 유전자로서 난소암의 발생 과정에 기여하는 것으로 인정되고 있다.<sup>2,3</sup> 세포주기 조절에는 cyclin, cyclin dependent kinase (CDK) 및 CDK 억제인자(CDK inhibitor, CDKI) 등이 관련된다. G1/S 세포주기에서 cyclin D1에 의해 활성화된 CDK4는 Rb를 불활성화하고 이에 E2F 전사인자가 유리되면서 G1기에서 S기로 진행되는데, p16은 주로 cyclin D1/CDK4의 활성을 억제하여 세포주기의 진행을 방해한다. Cyclin E는 G1기 말기에 발현되어 CDK2와 결합하여 S기로의 진행을 촉진하게 된다. 이 과정에 작용하는 CDKI로는 p16 외에도 p15, p21, p27 등이 있다. 연구자들은 난소상피암의 발생 및 진행 과정에서 G1/S 세포주기 조절단백들이 하는 역할을 규명하고자 시도하고 있는데 실제 나타나는 결과들은 다양하다. 그러나, 이러한 G1/S 세포주기 조절단백의 발현 양상을 난소 상피기원의 양성, 경계성 및 악성 종양에서 모두 살펴보고 분석한 예는 많지 않다.<sup>3,7-12</sup>

본 연구에서 저자들은 G1/S 세포주기 조절단백인 cyclin D1, cyclin E, CDK4, CDK2, p16, Rb, E2F1, 그리고 p53의 발현 양상을 난소의 양성, 경계성 및 악성 종양에서 면역조직화학염색을 실시하여 모두 관찰하였다. 그리하여 이들과 난소 종양의 진행 사이의 관련성을 알아보고, Ki67 면역조직화학염색도 병행하여 이들 세포주기 조절인자들이 세포증식에서 어떠한 역할을 하는지도 알아보고자 한다. 더불어 이들 단백질과 난소상피암에서 FIGO 병기 및 종양의 조직학적 등급의 상관관계를 살펴 예후 인자로서 유용성을 추정해보고자 한다.

## 재료와 방법

### 연구 재료

1998년 1월부터 2004년 8월까지 부산대학교병원에서 수술로 절제된 난소 상피 종양 중 보존상태가 양호한 148예를 대상으로 하였다. 증례의 연령 분포는 15세부터 82세(평균 46.8세)까지였다. 헤마톡실린 에오신염색 표본들을 WHO 분류에 따라 분류한 결과 양성 종양 47예, 경계성 종양 29예, 그리고 악성 종양 72예였다. 양성 종양은 장액성이 24예, 점액성이 23예였고, 경계성 종양은 장액성이 7예, 점액성이 22예였으며, 악성 종양은 장액성, 점액성, 자궁내막성, 투명세포, 그리고 미분화암종이 각각 26예, 15예, 11예, 16예, 그리고 4예였다. 악성 종양은 Silverberg 종양 등급 체계<sup>13</sup>에 의하여 등급을 I, II, III로 분류하였는데, 저등급(G1) 23예, 중등급(G2) 38예, 고등급(G3) 11예였다. FIGO 분류법에 따라 병기를 정하였으며, FIGO 병기 I기는 26예, II기는

8예, III기가 31예, 그리고 IV기가 7예였다. 각 증례의 대표적인 파라핀 포매괴를 선택하였고, 악성 종양의 경우 조직배열 슬라이드를 제작하였다.

### 조직배열 블록 제작

모든 슬라이드를 재검경하여 괴사나 출혈이 없고 조직이 잘 보존된 부위를 슬라이드에 표시하였다. 그런 다음 해당 부위를 다시 블록에 표시한 후 채취하였는데, Beecher instrument (Silver Springs, MD, USA)를 이용하였으며, 2 mm 직경의 펀치로 모두 두 장의 조직배열 블록을 제작하였다. 블록의 표면을 고르게 하고, 코어 조직과 블록 사이의 파라핀 결합이 충분히 이루어지도록 45°C에서 1시간 둔 후 뒤집어 약간의 무게를 주면서 다시 10분 동안 유지한 다음 블록을 4°C에 두어 파라핀이 잘 응고될 수 있도록 하였다. 블록 제작 후 한 장의 헤마톡실린 에오신 슬라이드를 만들어 공여 조직과 비교하였다.

### 면역조직화학검사

두 장의 조직배열 슬라이드에서 각각 4 μm 두께의 절편을 얻어 크실렌으로 탈파라핀한 후 여러 농도로 희석한 알코올로 씻어냈다. 그런 다음 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)에 넣고 가압증기멸균기(autoclave)에서 120°C로 15분간 가열하여 항원성을 증가시켰다. 내인성 과산화효소가 작용하지 않도록 3% 과산화수소수를 이용하여 30분간 처리하였다. 면역조직화학염색은 Vectastain ABC elite kit (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다. 먼저 5% 정상염소혈청으로 비특이적인 항원-항체반응을 억제한 후, 일차항체인 cyclin D1 (Lab Vision, USA), cyclin E (Lab Vision, USA), cdk4 (Santa Cruz, CA), cdk2 (Lab Vision, USA), p16 (Lab Vision, USA), Rb (Dako, USA), E2F-1 (Santa Cruz, CA), p53 (Dako, USA), Ki-67 (Dako, USA)를 1:100으로 희석하여 사용하였다. 발색은 Diaminobenzidine (DAB)로 하였으며 대조염색은 Mayer 헤마톡실린을 이용하였다.

각 항체에 대한 양성 대조군으로 cyclin D1은 유방암종 조직, cyclin E는 태반 조직, cdk4는 정상 피부 조직, p16와 p53은 대장암종 조직, cdk2, Rb, E2F-1, Ki67은 편도 조직을 각각 이용하였다. 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 PBS를 사용하였다.

종양세포의 핵에 갈색으로 염색될 때 양성으로 판정하였고, 각 증례에서 양성으로 염색된 세포와 전체 종양 세포의 비율을 관찰하였다. 단, p16의 경우 세포질에 염색이 동반된 것도 함께 양성으로 판정하였다. 양성세포의 출현율에 따라 점수를 매겼는데, 0-10%인 경우 0점, 11-24%인 경우 1점, 25-49%인 경우 2점, 50-74%인 경우 3점, 그리고 75% 이상인 경우를 4점으로 하였다. 이 중 10% 이하로 염색된 것은 음성, 11% 이상으로 염색된 경우를 양성으로 분류하였다. Ki67은 양성세포의 핵분열을 계산하

여 Ki67 표지지수(Ki67 labeling index, LI)로 하였다.

### 통계학적 분석

통계학적 처리는 SPSS version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) 통계프로그램을 이용하여 Pearson  $\chi^2$  검정과 일원배치 분산분석을 하였고, Pearson 상관분석을 통하여 변수들의 상관

**Table 1.** Expression status of G1/S cell cycle regulatory proteins in ovarian epithelial tumors

	Score*	No of patients (%)			p value
		Benign	Borderline	Malignant	
		47	29	72	
Cyclin D1	0	35 (74.5)	13 (44.8)	62 (86.1)	0.081
	1	9 (19.1)	11 (37.9)	3 (4.2)	
	2	2 (4.3)	5 (17.2)	6 (8.3)	
	3	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)	
	4	1 (2.1)	0 (0)	0 (0)	
Cyclin E	0	42 (89.4)	25 (86.2)	12 (16.7)	0.000
	1	1 (2.1)	4 (13.8)	13 (18.1)	
	2	4 (8.5)	0 (0)	13 (18.1)	
	3	0 (0)	0 (0)	12 (16.7)	
	4	0 (0)	0 (0)	22 (30.6)	
CDK4	0	44 (93.6)	22 (75.9)	54 (75.0)	0.026
	1	2 (4.3)	7 (24.1)	10 (13.9)	
	2	1 (2.1)	0 (0)	4 (5.6)	
	3	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)	
	4	0 (0)	0 (0)	3 (4.2)	
CDK2	0	33 (70.2)	15 (51.7)	33 (45.8)	0.031
	1	7 (14.9)	7 (24.1)	18 (25.0)	
	2	2 (4.3)	4 (13.8)	5 (6.9)	
	3	5 (10.6)	3 (10.3)	6 (8.3)	
	4	0 (0)	0 (0)	10 (13.9)	
p16	0	26 (55.3)	15 (51.7)	25 (34.7)	0.012
	1	9 (19.1)	10 (34.5)	18 (5.0)	
	2	5 (10.6)	3 (10.3)	9 (12.5)	
	3	4 (8.5)	0 (0)	12 (16.7)	
	4	3 (6.4)	1 (3.4)	8 (11.1)	
Rb	0	3 (6.4)	3 (10.3)	29 (40.3)	0.000
	1	3 (6.4)	6 (20.7)	13 (18.1)	
	2	21 (44.7)	7 (24.1)	7 (9.7)	
	3	15 (31.9)	8 (27.6)	16 (22.2)	
	4	5 (10.6)	5 (17.2)	7 (9.7)	
E2F1	0	41 (87.2)	15 (51.7)	30 (41.7)	0.000
	1	6 (12.8)	12 (41.4)	14 (19.7)	
	2	0 (0)	2 (6.9)	13 (18.1)	
	3	0 (0)	0 (0)	12 (16.7)	
	4	0 (0)	0 (0)	3 (4.2)	
p53	0	47 (100)	27 (93.1)	8 (11.1)	0.000
	1	0 (0)	2 (6.9)	17 (23.6)	
	2	0 (0)	0 (0)	11 (15.3)	
	3	0 (0)	0 (0)	17 (23.6)	
	4	0 (0)	0 (0)	19 (26.4)	
Ki67 LI		0.83±1.71	7.86±9.11	21.03±21.43	0.000

\*Immunohistochemical stain score 0, 0-10%; 1, 11-24%; 2, 25-49%; 3, 50-74; 4, ≥75%.

관계를 평가(correlation coefficient,  $\gamma$ )하였다. 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 정하였다.

### 결 과

G1/S 세포주기 조절단백들의 면역조직화학염색 결과는 Table 1과 Fig. 1, 이들과 난소상피암에서 FIGO 병기 및 종양의 등급 사이에 어떠한 관련이 있는지는 Table 2, 그리고, 이들 단백 간의 상관관계 분석은 Table 3에 정리하였다. 난소 종양의 조직학적 유형에 따른 차이는 보이지 않았다.

#### Cyclin D1의 발현

Cyclin D1은 양성 상피 종양 중 12예(25.5%)에서, 경계성 종양 중 16예(55.2%)에서, 악성 종양에서는 10예(13.9%)에서 발현되어 양성, 경계성, 악성 종양 간에 통계학적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다( $p=0.081$ ). 그렇지만 경계성 종양에 비해 악성 종양의 예들에서는 유의하게 발현율이 감소하였다( $p=0.008$ ).

#### Cyclin E의 발현

Cyclin E는 양성 상피 종양 중 5예(10.6%)에서, 경계성 종양 중 4예(13.8%)에서 발현된 반면, 악성 종양의 경우 60예(83.3%)에서 발현되어 통계학적으로 유의하게 발현 빈도가 증가하였고 양성 세포의 출현율도 높았다( $p=0.000$ ). 특히 cyclin E는 경계성 종양과 악성 종양 종양에서의 발현율에 의미 있는 차이를 보였다( $p=0.000$ ). 그러나, 악성 종양의 조직학적 등급이나 FIGO 병기에 따른 유의한 차이는 없었다.

#### CDK4의 발현

CDK4의 경우 양성 상피 종양 중 3예(6.4%)에서, 경계성 종양 중 7예(24.1%)에서, 악성 종양은 18예(25.0%)에서 발현되었

**Table 2.** Correlation of G1/S cell cycle regulatory proteins with the FIGO stage and the histologic grade of malignant ovarian epithelial tumors

		FIGO stage	Histologic grade
Cyclin D1	p value (C.C)	0.771 (-0.035)	0.430 (-0.094)
Cyclin E	p value (C.C)	0.710 (0.045)	0.148 (0.172)
CDK4	p value (C.C)	0.031 (-0.254)	0.086 (-0.204)
CDK2	p value (C.C)	0.020 (-0.263)	0.294 (-0.125)
p16	p value (C.C)	0.283 (0.128)	0.065 (0.274)
Rb	p value (C.C)	0.000 (-0.422)	0.010 (-0.301)
E2F1	p value (C.C)	0.001 (0.384)	0.008 (0.308)
p53	p value (C.C)	0.221 (0.146)	0.218 (0.147)

C.C., correlation coefficient,  $\gamma$ .

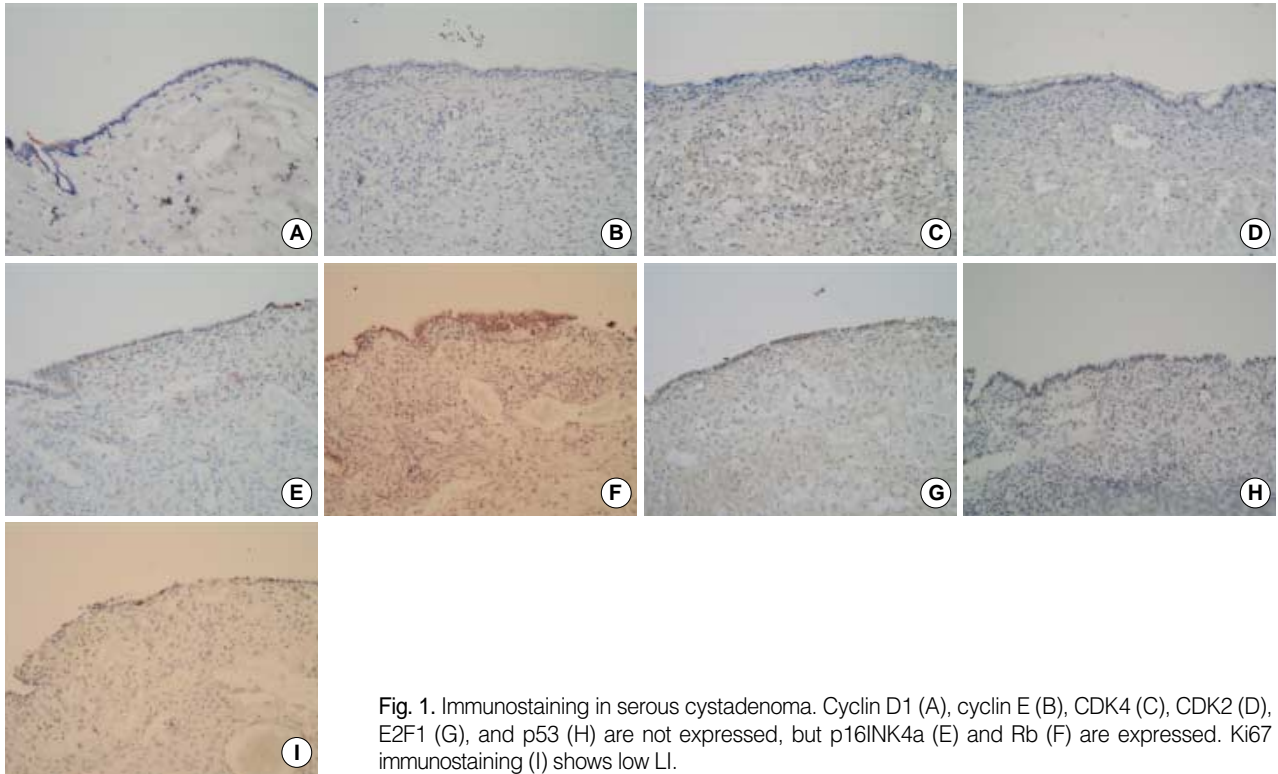


Fig. 1. Immunostaining in serous cystadenoma. Cyclin D1 (A), cyclin E (B), CDK4 (C), CDK2 (D), E2F1 (G), and p53 (H) are not expressed, but p16INK4a (E) and Rb (F) are expressed. Ki67 immunostaining (I) shows low LI.

Table 3. Correlation among G1/S cell cycle regulatory proteins

		CyclinD1	Cyclin E	CDK4	CDK2	p16	Rb	E2F1	p53
CyclinD1	p	-	-	-	-	-	-	-	-
	C.C								
CyclinE	p	0.045							
	C.C	-0.165	-	-	-	-	-	-	-
CDK4	p	0.211	0.003	-	-	-	-	-	-
	C.C	0.103	0.247						
CDK2	p	0.455	0.000	0.000					
	C.C	-0.062	0.477	0.361	-	-	-	-	-
p16	p	0.852	0.000	0.254	0.027				
	C.C	-0.016	0.319	-0.094	0.182	-	-	-	-
Rb	p	0.206	0.072	0.315	0.257	0.032			
	C.C	0.012	-0.148	0.083	0.094	-0.176	-	-	-
E2F1	p	0.782	0.000	0.517	0.014	0.001	0.156		
	C.C	-0.023	0.461	0.054	0.201	0.263	-0.117	-	-
p53	p	0.133	0.000	0.049	0.213	0.002	0.046	0.000	
	C.C	-0.124	0.587	0.162	0.103	0.258	-0.164	0.456	-
Ki67 LI	p	0.069	0.000	0.462	0.028	0.001	0.011	0.000	0.000
	C.C	-0.150	0.436	0.061	0.181	0.278	-0.209	0.596	0.506

C.C., correlation coefficient,  $\gamma$ .

다. CDK4 발현은 양성, 경계성, 악성 종양으로 진행할수록 약한 상관관계를 보였다( $p=0.026$ ,  $\gamma=0.221$ ).

### CDK2의 발현

CDK2는 양성 상피 종양 중 14예(29.8%), 경계성 종양 중 14예(48.3%), 그리고 악성 종양 중 39예(54.2%)에서 발현되어 양

성, 경계성, 악성 종양으로 진행할수록 발현율이 증가하는 양상을 보여 약한 상관관계를 보였다( $p=0.031$ ,  $\gamma=0.224$ ).

### p16의 발현

p16은 양성 종양 47예 중 21예(44.7%)에서 발현되었고, 경계성 종양은 29예 중 14예(48.3%)에서 발현되어서 별다른 차이를

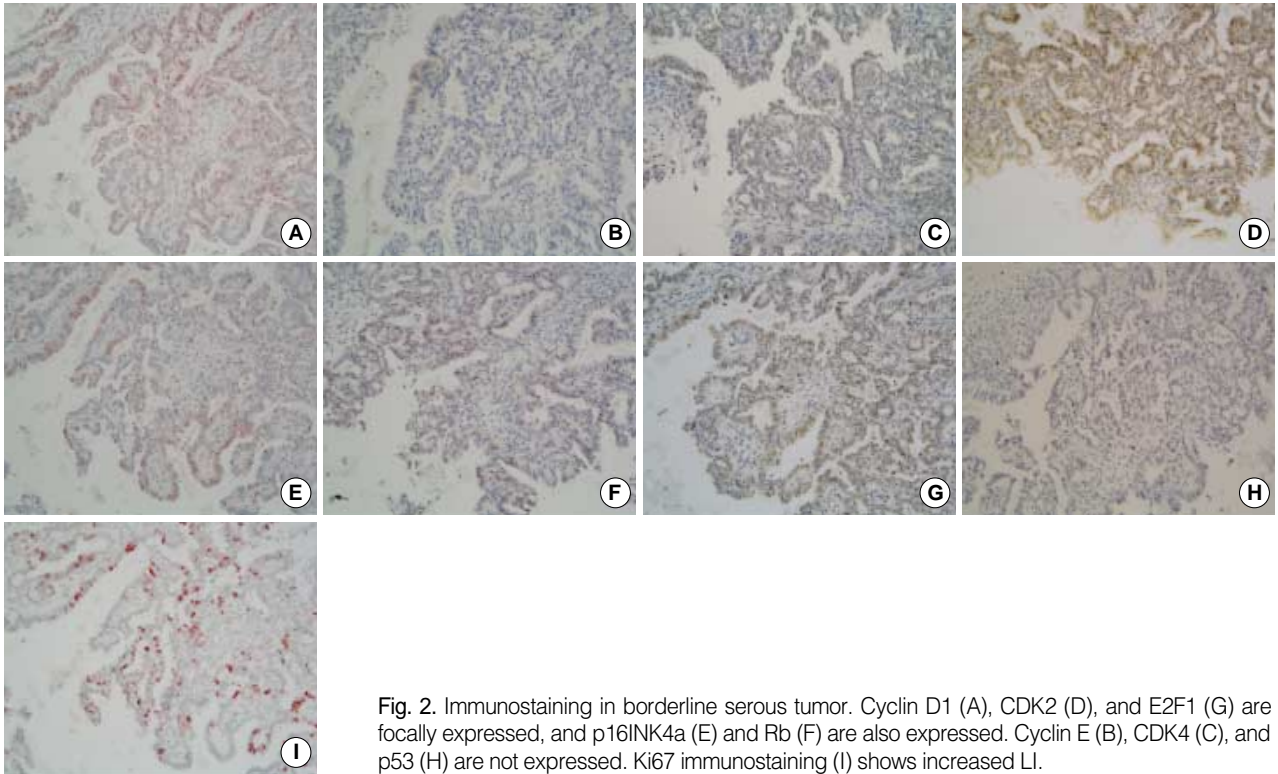


Fig. 2. Immunostaining in borderline serous tumor. Cyclin D1 (A), CDK2 (D), and E2F1 (G) are focally expressed, and p16INK4a (E) and Rb (F) are also expressed. Cyclin E (B), CDK4 (C), and p53 (H) are not expressed. Ki67 immunostaining (I) shows increased LI.

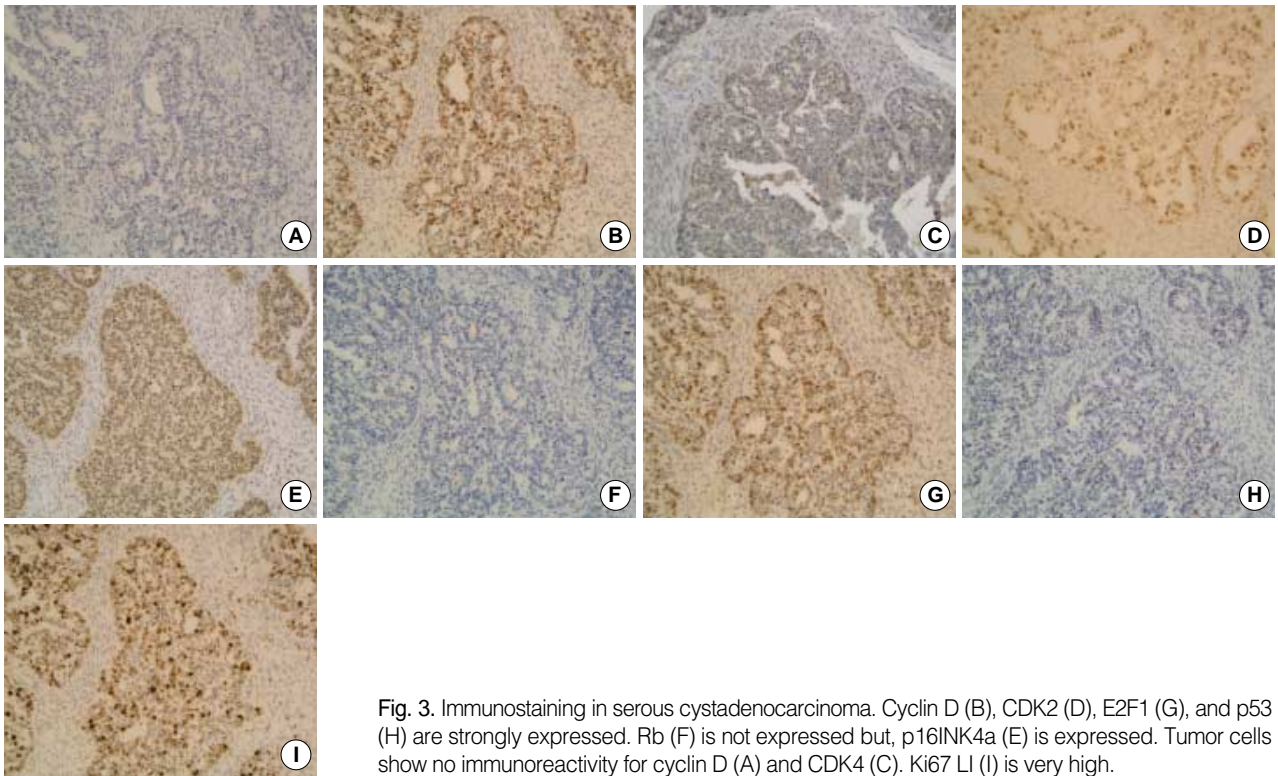


Fig. 3. Immunostaining in serous cystadenocarcinoma. Cyclin D (B), CDK2 (D), E2F1 (G), and p53 (H) are strongly expressed. Rb (F) is not expressed but, p16INK4a (E) is expressed. Tumor cells show no immunoreactivity for cyclin D (A) and CDK4 (C). Ki67 LI (I) is very high.

보이지 않았다. 그러나 악성 종양에서는 72예 중 47예(65.3%)에서 양성반응을 보여 발현율이 증가하는 양상을 보였다(p=0.012).

**Rb의 발현**

Rb의 발현은 양성 종양에서 3예(6.4%), 경계성 종양에서 3예

(10.3%), 그리고 악성 종양에서 29예(40.3%)가 음성을 보여 난소 종양 진행에 따라 뚜렷하게 발현율이 떨어졌다( $p=0.000$ ). 특히 경계성 종양과 악성 종양에서의 발현율에 뚜렷한 차이를 보였다( $p=0.021$ ). 악성 종양에서는 Rb가 조직학적 등급이 높고 FIGO 병기가 진행될수록 발현율이 떨어져 뚜렷한 역상관관계를 보였다( $p=0.010$ ,  $\gamma = -0.301/p=0.000$ ,  $\gamma = -0.422$ ).

**E2F1의 발현**

E2F1의 경우 양성 종양에서는 6예(12.8%), 경계성 종양에서는 14예(48.3%)가 양성을 나타냈으며, 악성 종양에서는 42예(58.3%)가 양성을 보여 종양의 진행과 E2F1 발현 증가가 뚜렷한 상관관계를 보였다( $p=0.000$ ,  $\gamma = 0.459$ ). 특히 경계성 종양과 악성 종양에서의 발현율에 유의한 차이가 나타났다( $p=0.005$ ). E2F1은 악성 종양에서 조직학적 등급이 높고 FIGO 병기가 진행될수록 유의하게 발현율이 증가하였다( $p=0.001$ ,  $\gamma = 0.384/p=0.008$ ,  $\gamma = 0.308$ ).

**p53의 발현**

p53의 발현은 양성 종양에서 모두 음성이었고, 경계성 종양에서는 2예(6.9%)에서 양성, 악성 종양에서는 64예(98.9%)에서 양성을 보여 통계학적 상관성이 뚜렷하였다( $p=0.000$ ,  $\gamma = 0.703$ ). 그러나, 악성 종양에서 조직학적 등급과 FIGO 병기 사이의 상관관계는 뚜렷하지 않았다.

**Ki67 표지지수**

Ki67 표지지수는 양성 종양에서 평균  $0.83 \pm 1.71$ , 경계성 종양에서  $7.86 \pm 9.11$ , 그리고 악성 종양에서  $21.03 \pm 21.43$ 으로 뚜렷이 증가하였다( $p=0.000$ ,  $\gamma = 0.504$ ). 그러나 악성 종양에서 조직학적 등급이나 FIGO 병기와의 상관관계는 없었다. 다른 세포주기 조절단백과의 관련성을 살펴보면, Ki67 표지지수는 cyclin E와 E2F1 및 p53 발현 증가와 뚜렷한 상관관계를 나타내었다( $p=0.000$ ,  $\gamma = 0.436/p=0.000$ ,  $\gamma = 0.596/p=0.000$ ,  $\gamma = 0.506$ ).

**세포주기 조절단백 발현 간의 상관관계**

Cyclin D, cyclin E, CDK4, CDK2, p16, pRb, E2F1 및 p53의 상관관계는 Table 3과 같다. Cyclin E는 CDK2와 함께 발현율이 증가하는 양상을 보였고, p16, E2F1, p53과도 유의한 상관관계를 보였다. p53은 cyclin E뿐만 아니라 E2F1과 유의하게 발현율이 함께 증가하였다. 이들 중 cyclin E, E2F1, 그리고 p53은 모두 경계성 종양에서 악성 종양으로 진행할 때 특히 의미 있게 발현율이 증가하였다.

**고찰**

세포주기는 cyclin와 CDK, 그리고 CDKI에 의해 조절되고, 세포주기의 조절곤란은 종양의 발생과 진행에 영향을 미친다. 난소 상피 종양과 관련해서는 세포주기의 주요한 조절단계인 G1/S 세포주기에 관여하는 다양한 인자들이 연구되고 있다. 앞서 언급한 p53뿐만 아니라, p16-cyclin D1/CDK4-Rb 경로(Rb 경로)는 G1/S 세포주기에서 중요한 역할을 한다. 난소상피암에서 Rb 경로를 구성하는 각각의 인자들의 발현 빈도와 상관관계는 일관되게 보고되지 않지만, 어떤 구성 요소에 의한 변화든 Rb 경로의 변경은 난소상피암 발생 과정과 밀접한 관련이 있다.<sup>14,15</sup> Cyclin E의 경우 난소상피암의 발생 과정에서 일어나는 중요한 사건으로 보고되었고, CDK2 발현과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>3,7-9</sup> 그러나, 이들 G1/S 세포주기 조절단백들을 난소암에서 독립적인 예후인자로서 사용할 수 있을지는 명확하지 않다.

저자들은 이제까지 주로 난소의 악성 종양에서 개별적으로 이루어지던 G1/S 세포주기 조절단백들의 발현에 대해 난소의 양성, 경계성 및 악성 종양 모두를 포함하여 cyclin D1, cyclin E, CDK4, CDK2, p16, Rb, E2F 및 p53 단백질의 발현 양상을 종합적으로 평가해보고자 하였다. 본 연구에서 이들 단백질의 발현율은 양성, 경계성 및 악성 종양에서 통계학적으로 의미 있는 차이를 나타내어 난소 상피 종양의 발생 및 진행에 관여한다고 볼 수 있겠다.

G1/S 세포주기 조절을 담당하는 주요 인자 중 하나인 Rb 경로를 구성하는 cyclin D1, CDK4, p16 및 Rb 단백질의 발현은 난소상피암에서 다양하게 보고되는데, 이는 면역염색 양성 판정의 기준(cut-off value), 사용한 항체의 종류, 항원성 증가 단계를 포함한 면역조직화학염색 방법이 다양하다는 점에 기인하는 면이 있다. 난소상피암에서 cyclin D1의 발현율은 1.6-13%로 대체로 낮고, 난소상피암의 진행과 전이 등에서의 어떠한 역할을 하는지도 명확하지 않다.<sup>9-12,14-16</sup> CDK4에 대한 연구는 부족하지만 난소상피암에서 면역조직화학염색으로 Kusume 등<sup>14</sup>은 15.3%의 양성률을, 그리고 Hashiguchi 등<sup>15</sup>은 27.1%의 양성률을 보고하였다. 본 연구에서는 악성 종양에서 cyclin D1과 CDK4의 양성 발현이 13.9%와 25%였고, cyclin D1의 경우 경계성 종양보다 악성 종양에서 의미 있게 발현율이 감소하였다. 이러한 결과는 Worlsey 등<sup>11</sup>과 Kwon 등<sup>12</sup>의 연구 결과와 일치하였는데, 이들은 cyclin D1 발현의 조절곤란이 난소 상피 종양이 발생하는 초기에 일어나는 것으로 설명하였다. 그러나, 인체의 많은 종양에서 cyclin D1의 발현이 암 발생과정에서 중요한 역할을 한다는 점을 볼 때 이러한 결과는 cyclin D1이 난소상피암 발생 과정에서는 별다른 역할을 하지 않을 것이라는 추측을 가능케 한다. 또한 한편으로 본 연구에서는 p16의 발현이 경계성 종양보다 악성 종양에서 증가하면서 cyclin D1의 발현을 억제했을 가능성이 높다. 이러한 추측은 CDK4의 발현을 역시 경계성 종양과 악성 종양에서 별다른 차이를 보이지 않은 점으로 뒷받침된다. p16은

cyclin D1/CDK4 복합체에 의한 Rb의 인산화를 억제하여 세포 주기 진행을 방해하므로 종양 억제 유전자로 알려져 있고, 난소 상피암에서 면역조직화학염색상 11-50%가 발현이 소실된다고 알려져 있다.<sup>14,15,17</sup> 난소 상피의 양성, 경계성, 악성 종양에 대한 p16 단백 발현을 비교 연구한 논문 역시 드문 실정이다. Shigemasa 등<sup>17</sup>은 양성 종양에 비해 경계성 및 악성 종양에서 p16의 단백 발현이 의미 있게 증가하였다고 보고하여 본 연구와 일치하는 결과를 보여주고 있고, p16이 증가했음에도 세포주기의 진행이 억제되지 않는 이유는 p16의 조절을 받는 세포주기 조절인자들의 결합으로 이들이 p16의 조절범위를 벗어났거나 p16에 특정 내인성 단백질이 결합하여 p16이 CDK4에 결합하여 억제하는 기능을 방해했을 것이라고 설명한다. 본 연구에서는 경계성 종양에서 악성 종양으로 진행되는 과정에서 p16 단백질의 발현이 증가하면서 cyclin D1/CDK4의 활성성이 떨어지는 것으로 보이지만, Rb 단백질의 발현은 여전히 의미 있게 소실되는 것으로 보아 Rb 단백질이 p16의 조절에서 벗어나 지속적인 기능 소실을 보이는 것으로 추측된다. 따라서, 결과적으로 E2F1의 발현 증가가 나타나고 p16의 발현 증가도 지속되는 것으로 보인다. 이와 같이 Rb 경로의 변화와 Rb 경로의 최종 전사인자인 E2F1의 과발현은 난소 종양 발생 과정에 중요한 역할을 한다. 특히 난소 종양에서 E2F1 발현에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았는데 Dong 등<sup>18</sup>이 난소암 연구 중 일부 예에서 Western blot을 이용하여 E2F1 단백 발현을 관찰한 보고가 있다. E2F1은 또한 인체의 다른 암과 관련된 연구에서 종양의 발생 및 억제와 모두 관련된다는 상반된 보고가 있다. 따라서, E2F1은 조직 및 종양 특이적으로 세포의 증식 또는 세포 자멸사에 관여하여 종양을 발생시키거나 억제하는 것으로 이해되고 있다.<sup>19-22</sup> 본 연구에서 E2F1은 난소 종양의 진행에 따라 그 발현이 증가하고 Ki67 LI와도 뚜렷한 상관관계를 보였다. 이러한 결과로 보아 E2F1은 세포 증식을 유도하여 난소 종양의 발생과 진행에 기여하는 것으로 추측된다. 그리고 E2F1은 난소상피암에서 FIGO 병기와 조직학적 등급이 높아질수록 발현율이 증가하는 양상을 보여 예후인자로서 사용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

G1/S 세포주기의 후기에 발현되는 cyclin E는 CDK2와 복합체를 형성하여 세포주기 진행을 돕는다. Cyclin E는 Rb 인산화로 유리된 E2F1 전사인자에 의해 전사가 유도되기도 하지만, 또한 cyclin E/CDK2 복합체가 Rb를 인산화하여 E2F1을 활성화시키기도 한다. Cyclin E는 인체의 다른 여러 장기에서 종양 발생 과정에 기여하는 것으로 알려져 있고,<sup>23</sup> 난소암의 1/2-2/3 이상에서 단백 과발현이 있으면서 양성에서 경계성, 그리고 악성 종양으로 진행할수록 점차 발현이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>3,7-9</sup> 또한 cyclin E의 발현은 CDK2와 상관관계를 보인다.<sup>3,8</sup> 본 연구에서도 같은 양상을 보여서 cyclin E 발현이 난소 종양 발생에 중요한 요소임을 지지하고 있다. 그러나, cyclin E가 난소 종양의 예후에 미치는 영향에 대해서는 이견이 있으며, 본 연구에서는 cyclin E가 난소암에서 FIGO 병기나 조직학적 등급과

상관성을 보이지 않아 예후인자로서의 가능성은 보여주지 못하고 있다.

p53은 세포주기 조절에 관여하고 잘 알려진 종양 억제 유전자로서 난소암을 비롯한 인체의 악성 종양의 50% 이상에서 변화를 보이며,<sup>2,3,16</sup> p53 면역염색성은 p53 유전자의 변화를 잘 반영하는 것으로 알려져 있다. 특히 난소에서는 p53 면역염색성이 양성 및 경계성 종양에서는 거의 발현되지 않는 데 반해 악성 종양에서는 대부분 발현 증가를 보이는데,<sup>2,3</sup> 본 연구의 결과와 잘 일치한다. p53과 다른 세포주기 조절인자의 상관관계에 대한 연구는 대개 p53과 관련된 CDKI인 p21과 p27에 대하여 이루어졌다.<sup>16</sup> 이들 연구에 따르면, p53과 다른 세포주기 조절인자들은 역상관관계를 보인다고 하며, 일부 연구에서는 난소암에서 p53 이상과 함께 cyclin E 과발현이 나타난다고 하였다.<sup>3,7</sup> 본 연구에서도 p53은 cyclin E뿐만 아니라 E2F1와 뚜렷한 상관관계를 보이며 증가하였고, 이러한 경향은 경계성 종양과 악성 종양 사이에서 더욱 뚜렷하였다. 또한 Ki67 LI의 증가와도 상관관계가 뚜렷하게 나타나 이들 인자들이 난소 상피의 악성 종양 발생 과정에서 세포 증식을 유도하는 중요한 역할을 한다고 볼 수 있겠다.

종합하면, 난소 상피 종양의 면역조직화학염색법을 이용한 G1/S 세포주기 조절단백에 대한 연구 결과, 양성에서 경계성, 그리고 악성으로 갈수록 cyclin E, CDK2, p16, E2F1은 점진적으로 발현율이 증가하는 양상을 보였다. 경계성과 악성 종양 간에 p53 단백 발현 증가와 Rb 단백질 발현의 소실이 두드러졌고, cyclin E와 E2F1의 발현 증가 역시 뚜렷한 상관관계를 보였다. Cyclin D1과 CDK4의 발현을 역시 양성에서 경계성 종양으로 진행될수록 의미 있게 증가하였으나, 악성 종양에서는 오히려 감소하거나 큰 차이를 보이지 않았다. Ki67 LI 역시 양성, 경계성, 악성으로 갈수록 의미 있게 증가하였고, cyclin E, E2F1, p53 발현 증가와 상관관계가 뚜렷하였다. 결론적으로 본 연구 결과, 난소 상피 종양의 발생 과정에서 G1/S 세포주기 조절에 중요한 Rb 경로에서 Rb 단백질이 조절범위에서 벗어나 기능이 소실된 결과 활성화된 E2F1 전사인자와 G1/S 세포주기 후기에 cyclin E/CDK2의 도움으로 세포주기는 진행되고 세포는 증식하는 것으로 나타났다. 그러므로 되먹임 기전으로 증가된 p16은 cyclin D1/CDK4를 억제할 수 있을지는 모르나, Rb 단백질은 여전히 조절되지 않는 것으로 볼 수 있다. 따라서, cyclin D1과 CDK4는 경계성 종양 발생에 기여한다고 추측할 수 있으나, 난소상피암 발생에서의 별다른 역할을 하지 않을 것이라 여겨지고, 난소상피암 발생에서 일어나는 G1/S 세포주기의 조절곤란은 p53 단백질과 함께 cyclin E 및 E2F1 발현 증가와 Rb 단백질의 소실이 주된 역할을 할 것으로 생각된다. 특히 난소 상피 종양에서 E2F1에 대한 보고는 드물어서 본 연구를 통해 E2F1의 난소상피암 발생과정에서 E2F1이 하는 역할과 예후인자로서의 가능성을 제시하고자 한다.

## 참고문헌

- Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. In: Seidman JD, Russell P, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2002; 791-810.
- Kupryjanczyk J, Bell DA, Dimeo D, Beauchamp R, Thor AD, Yandell DW. p53 gene analysis of ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 387-92.
- Lee H, Park G, Jung JH, *et al.* Diagnostic approach using the expression profiling of the p53 tumor suppressor gene and its related proteins in ovarian epithelial tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 453-61.
- Bonome T, Lee JY, Park DC, *et al.* Expression profiling of serous low malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* 2005; 65: 10602-12.
- Puls LE, Powell DE, DePriest PD, *et al.* Transition from benign to malignant epithelium in mucinous and serous ovarian cystadenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1992; 47: 53-7.
- Caduff RF, Svoboda-Newman SM, Ferguson AW, Johnston CM, Frank TS. Comparison of mutations of Ki-RAS and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 323-8.
- Blegen H, Einhorn N, Sjovall K, *et al.* Prognostic significance of cell cycle proteins and genomic instability in borderline, early and advanced stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10: 477-87.
- Sui L, Dong Y, Ohno M, *et al.* Implication of malignancy and prognosis of p27<sup>KIP1</sup>, cyclin E and cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 56-63.
- Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, *et al.* Expression of cell cycle regulators of p57<sup>KIP2</sup>, cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. *Hum Pathol* 2001; 32: 808-13.
- Scott IS, Heath TM, Morris LS, *et al.* A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens. *Br J Cancer* 2004; 90: 1583-90.
- Worsley SD, Ponder BA, Davies BR. Overexpression of cyclin D1 in epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 189-95.
- Kwon SY, Chang ES, Kwon KY, Park KK, Kim SK. Expression of p27<sup>KIP1</sup> and cyclin D1 in serous epithelial ovarian tumors. *Korean J Pathol* 2001; 35: 220-5.
- Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19: 7-15.
- Kusume T, Tsuda H, Kawabata M, *et al.* The p16-cyclin D1/CDK4-pRb pathway and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4152-7.
- Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Nishimura S, Suzuki T, Kawamura N. Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients. *Hum Pathol* 2004; 35: 165-75.
- Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5168-77.
- Shigemasa K, Hu C, West CM, *et al.* p16 overexpression: a potential early indicator of transformation in ovarian carcinoma. *J Soc Gynecol Investig* 1997; 4: 95-102.
- Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, *et al.* Reduced expression of retinoblastoma gene product (pRB) and high expression of p53 are associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 407-15.
- Rabbani F, Richon VM, Orlov I, *et al.* Prognostic significance of transcription factor E2F-1 in bladder cancer: genotypic and phenotypic characterization. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 874-81.
- Bramis J, Zacharatos P, Papaconstantinou I, *et al.* E2F-1 transcription factor immunoreactivity is inversely associated with tumor growth in colon adenocarcinomas. *Anticancer Res* 2004; 24: 3041-7.
- Kim HY, Lim HM, Lee TJ, Park SJ, Cha SJ, Kim BG. The immunohistochemical expression of DNA topoisomerase II- $\alpha$  and E2F-1 in the breast carcinoma and their relationship with clinicopathologic factors. *J Korean Surg Soc* 2003; 64: 93-100.
- Ebihara Y, Miyamoto M, Shichinohe T, *et al.* Overexpression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Dis Esophagus* 2004; 17: 150-4.
- Jung JH, Park GS, Lee MA, *et al.* Expressions of cyclin E-pathway proteins (cyclin E, cdk2, p21, p27, p57) and their prognostic significance in non-small cell lung carcinomas. *Korean J Pathol* 2006; 40: 24-31.