

자궁경부암의 방사선치료 및 방사선험암화학 병용치료에 따른 유전자발현 조절양상

가천의과대학교 방사선종양학과*, 분자생물학연구소†, 고려대학교 의과대학 생화학교실†, 방사선종양학교실§

이규찬* · 김명곤† · 김주영* · 황유진† · 최명선§ · 김철용§

목적 : 동시에 대량으로 유전자발현 양상을 검사할 수 있는 cDNA microarray 기법을 이용하여 자궁경부암에서 특징적으로 나타나는 유전자발현 양상을 알아보고, 방사선치료 및 방사선험암화학요법 병용치료시의 유전자발현 변화양상을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법 : 자궁경부 편평상피암으로 확진된 후 근치목적 방사선치료를 단독으로 시행한 8명과 항암화학요법을 병행한 8명에서 채취한 종양조직을 대상으로 하고, 정상 자궁경부 3례를 대조군으로 하였다. 조직 생검은 치료 전과 외부 방사선치료 16.2~27 Gy에 두 번하였다. 항암화학요법을 병용한 경우, 5-FU 1,000 mg/m²을 제 1일부터 5일까지 정주하고, cisplatin 60 mg/m²을 제 1일에 정주하였다. cDNA microarray는 종양조직에서 추출한 total RNA를 역전사(reverse transcription)방법을 이용하여 [P-33]을 표지한 cDNAs를 제작, nylon membrane에 hybridization하였다. 이후 membrane을 phosphor-imager screens에 옮겨 1~5일 동안 노출시킨 후 이미지를 스캔하였다. 유전자의 발현 정도는 각 스팟(spot)들의 방사능 강도로 나타나는데, 각 스팟의 픽셀(pixel)을 Arrayguage[®]를 사용하여 산출한 후 엑셀 파일로 저장하였다. 유전자의 발현정도 비교는 원 자료(original data)를 Z-변환을 통해 보정(normalized)한 후 Z-ratio 값을 산출하여 시행하였다.

결과 : 대조군에 비해 자궁경부암에서 Z-ratio 2.0 이상으로 유의한 발현증가를 보인 유전자들은 integrin-linked kinase, CDC28 protein kinase 2, Spry 2, ERK 3 등 15개로 주로 세포성장과 증식, 세포주기, 신호전달 등에 관련된 유전자들이었으며, Z-ratio -2.0 이하의 유의한 발현감소는 G protein-coupled receptor kinase 6외 6개였다. 방사선 단독치료를 시행한 후 Z-ratio 2.0 이상 발현이 증가한 것은 cyclic nucleotide gated channel외 3개의 Expressed sequence tags (EST)들이었고, Z-ratio -2.0 이하의 발현감소를 보인 것들에는 치료전 종양세포에서 발현이 증가되었던 세포성장과 증식, 세포주기, 신호전달 등에 관련된 유전자들이 포함되었다. 방사선치료와 항암화학요법을 병용했을 때는 방사선 단독치료에 비하여 세포성장과 증식 및 신호전달 관련 유전자들이 상대적으로 높게 발현되었으며, 이외에도 혈관형성(angiopoietin-2), 면역반응(formyl peptide receptor-like 1), DNA 손상회복에 관련된 유전자(cAMP phosphodiesterase)의 발현은 증가되고 세포고사(death associated protein kinase)에 관련된 유전자는 발현 감소를 보였다.

결론 : 자궁경부암에서 분열과 증식 및 신호전달에 관여하는 여러 종류의 유전자들 발현이 동시다발적으로 증가되어 있다는 것과 방사선치료를 시행하면 이들 유전자의 발현이 감소하여 종양세포의 분열과 증식이 저해된다는 것을 확인하였다. 방사선 단독치료와 항암화학요법 병용치료를 비교하면 그 유전자 발현양상이 다르므로 향후 이번 연구에서 나타난 유전자들에 대한 추가 연구가 필요하며, 이는 개별화된 맞춤형 치료법을 개발하는데 기초자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심용어 : 자궁경부암, cDNA microarray, 유전자발현, 방사선치료, 방사선험암화학 병용치료

서 론

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-003-F00162).

이 논문은 2003년 1월 27일 접수하여 2003년 3월 3일 채택되었음.

책임저자: 김철용, 고려대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 02)920-5516, Fax: 02)927-1419
E-mail: kcyro@korea.ac.kr

자궁경부암은 전세계적으로 여성암의 12%를 차지하여 두 번째 호발 암이며, 우리나라에서도 최근 감소하는 추세이기는 하나 여전히 전체 여성암의 20% 정도를 차지하여, 위암, 유방암과 함께 대표적인 악성종양이다.^{1,2)} 병기 IIB로 국소 진행된 경우에도 약 2/3의 환자들이 방사선치료 단독으로 완

치될 수 있으나, 치료 전에 이를 각 개인별로 식별해 낼 수 없기 때문에 현재로서는 부작용과 합병증을 감수하면서 방사선치료와 함께 항암제 병용요법을 모든 대상 환자에게 시행하는 것이 표준적 치료로 정립 되어가는 실정이다.^{3,4)} 전통적 기법인 병기, 암종의 크기, 침윤정도, 조직학적 유형, 림프절 전이유무 등의 예후인자를 분석하여 어느 정도 치료 결과를 예측할 수는 있지만, 같은 치료를 실시하고도 완치가 되는 경우와 실패하는 경우의 이유는 규명할 수 없었다. 만약 이를 사전에 미리 예측할 수 있는 방법이 개발된다면, 방사선 조사선량의 조절과 항암제 병용 여부 및 최적의 약제 선택 등을 골자로 하는, 최소의 치료로 최대의 치료효과를 얻고 독성은 최소화하는 개별화된 맞춤형 치료법(individualized therapy)을 각 환자에게 시행할 수 있게될 것이다.

한 장의 슬라이드 위에 수천개의 cDNA를 집적(spotting)하여 동시에 대량으로 유전자발현 양상을 검사할 수 있는 cDNA microarray는 각 질환에 특이한 유전자를 분리, 규명하고, 질병 특이 단백질을 발굴하는 등의 기능적 연구를 가능하게 할 뿐만 아니라, 나아가 유전자 진단 및 치료 등에 광범위하게 이용될 전망이다.^{5,6)} 현재 cDNA microarray를 통하여 악성 림프종, 유방암 등에서 형태학적 종양분류의 한계를 넘어 분자생물학적 분류의 가능성을 제시하고 있다.^{7,8)}

이에 본 연구자는 정상 자궁경부 조직과 자궁경부 편평상피암 환자의 종양 조직을 대상으로 Membrane with P-33 probes를 이용한 Human cDNA microarray를 실시하여 자궁경부암에서 특징적으로 나타나는 유전자발현 양상과 방사선치

료에 따른 변화 및 방사선 단독치료와 항암화학요법 병용치료시의 유전자발현 변화양상을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

병리조직 검사로 자궁경부 편평상피암으로 확진된 후 근치목적 방사선치료를 시행받는 환자를 대상으로 하였다. 병기에 대한 특별한 제한은 두지 않았으나, 진단시 원격전이가 있는 경우는 제외하였다. 실험에 사용하는 검체의 채취 시기는 어떠한 치료도 시행 받지 않은 상태인 치료 전 시점과 외부 방사선 치료 시작 후 조직 흡수선량이 16.2~27 Gy가 된 시점인 2~3주 사이에 시행하였다. 검체는 암종 중 괴사가 없고, 출혈이 심하지 않은 부위에서 채취하였으며, 즉시 cryotube에 담아 deep freezer에 -80℃로 동결보관 하였다가 RNA 추출 시 일괄 사용하였다. 근치목적 방사선치료를 단독으로 시행한 8명과 항암화학요법을 병행한 8명에서 각각 채취한 조직을 실험대상으로 하였으며, 정상 자궁경부를 3례 생검하여 대조군으로 사용하였다(Table 1).

2. 방사선조사 및 항암화학요법

방사선치료는 외부 방사선치료와 강내치료(Intracavitary Brachytherapy)로 구성되었다. 외부 방사선 치료는 고에너지 방사선인 10 MV X-ray을 사용(Clinac 2100 C/D, Varian, USA) 하여 전 골반부위에 전후좌우 4문조사를 시행하되, 일일 선

Table 1. Patient and Tumor Characteristics

| Case | Chemotherapy | Age | Stage | Tumor size (cm) | Lymph node | CEA | SCC | Radiation dose at 2nd biopsy (Gy) |
|------|-----------------|-----|-------|-----------------|------------|-------|------|-----------------------------------|
| 1 | — | 47 | IIB | 6.3 | — | 1 | 2 | 21.6 |
| 2 | — | 62 | IIB | 4.2 | — | 2.4 | 9.7 | 26 |
| 3 | — | 40 | IIA | 1.8 | — | 2.3 | 0.1 | 24 |
| 4 | — | 63 | IIB | 5.0 | — | 2.41 | 8.6 | 23.4 |
| 5 | — | 61 | IIA | 5.1 | — | 1.63 | 13 | 25.2 |
| 6 | — | 63 | IB | 5.3 | — | 341.9 | 9.5 | 27 |
| 7 | — | 68 | IB | 5.2 | Pelvic | 1.8 | 1.7 | 23.4 |
| 8 | — | 72 | IIB | 5.0 | Pelvic | 5.2 | 3.4 | 16.2 |
| 9 | FP [†] | 41 | IIA | 5.2 | Periaortic | 2.9 | 5 | 25.2 |
| 10 | FP | 60 | IIIB | 6.5 | Pelvic | 2.8 | 19.7 | 27 |
| 11 | FP | 53 | IIB | 4.2 | — | 1.5 | 13.8 | 23.4 |
| 12 | FP | 47 | IIB | 5.9 | — | 13.5 | 0.4 | 23.4 |
| 13 | FP | 64 | IIB | 3.5 | Pelvic | 2.09 | 0.9 | 27 |
| 14 | FP | 65 | IIB | 4.5 | — | 1.89 | 4.1 | 21.6 |
| 15 | FP | 56 | IIB | 6.7 | — | 16.5 | 4 | 25.2 |
| 16 | FP | 37 | IIB | 8.0 | Periaortic | 8.39 | 13.9 | 27 |

*CEA: Carcinoembryogenic antigen, [†]SCC: Squamous-cell carcinoma antigen, [‡]FP: 5-Fluorouracil and cisplatin combination chemotherapy

량 1.8~2 Gy씩 주 5회 시행하여 주당 9~10 Gy를 조사하였다. 전골반에 36~45 Gy를 조사한 후, 중앙차폐를 실시하고, 강내치료를 시행하였다. 강내치료는 [Ir-192] 동위원소를 사용하는 고선량률(High dose rate) 근접치료기(micro-Selectron, Nucletron, Netherlands)로 1회 4~5 Gy씩 5~6회 총 24~30 Gy를 시행하였다. 필요시 외부치료로 골반측벽에 9~10 Gy를 추가하였다. 항암화학요법을 방사선치료와 병용한 경우, 방사선치료 시작일에 항암제가 동시에 투여되도록 하였다. 항암화학요법은 5-Fluorouracil 1,000 mg/m²을 제 1일부터 5일까지 정주하고, cisplatin 60 mg/m²을 제 1일에 정주하여, 3주간격으로 총 6회 시행하였다.

3. 방사선 단독치료 및 항암화학요법 병용치료시 자궁경부암의 조직학적인 특성

실험 대상 및 대조군의 생검된 조직이 본 실험에 적합한지를 확인하기 위하여 광학현미경하의 조직학적 특성을 살펴보았다(Fig. 1). 방사선치료를 약 2주간 시행한 후 채취한 자궁경부암종 조직에서 단일 세포괴사는 있었으나 광범위한

부위의 괴사는 관찰되지 않았고, 주로 방사선조사에 의한 세포사를 시사하는 변화가 보였다(Fig. 1C). 대부분의 종양세포들에서 세포질의 부종(swelling) 및 종대(hypertrophy)가 관찰되었고 세포의 경계가 불분명해졌다. 세포질 내에 다양한 크기의 공포(vacuolization)가 생성되었으며 핵은 비대(nuclear hypertrophy), 농축, 용해되는 등 형태가 불규칙하게 변성된 변화를 보여 세포사의 보조적 소견이 관찰되었다. 일부의 세포에서는 핵의 분절이 관찰되어 세포고사(apoptosis)를 시사하는 소견도 보였다. 방사선 단독치료시와 항암화학요법 병용치료시의 조직학적 소견을 비교하면 양자간에 뚜렷한 감별점이 없는 유사한 소견을 보였다(Fig. 1D).

4. RNA 분리

생검을 통해 얻은 대상 조직 약 50 mg에서 균질화(homogenization)시킬 수 있는 기기(Tissue · Tearor homogenizer; Biospec product, Inc)로 total RNA를 추출하였다. 전체 RNA를 분리하기 위하여 사용한 용기는 먼저 ribonuclease (RNase)를 제거하였는데, 유리 제품은 고압 증기 멸균기로

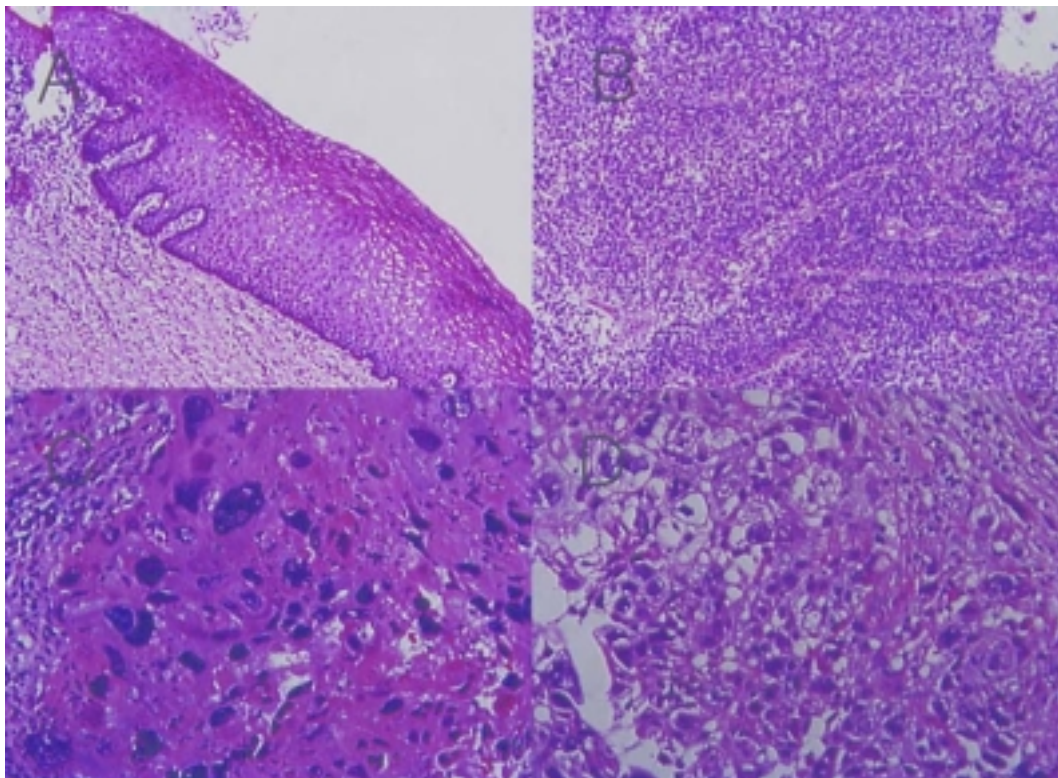


Fig. 1. Radiation change of the cervical cancer in hematoxylin and eosin stain. (A) Control: normal cervix tissue ($\times 100$). (B) Invasive squamous cell cancer of the cervix, pre-treatment ($\times 100$). (C) Radiation therapy alone at 23.4 Gy ($\times 200$) demonstrating cytoplasmic swelling and vacuolization with nuclear hypertrophy. (D) Concurrent chemo-radiation therapy at 23.4 Gy ($\times 200$) with cell death change similar to radiation therapy alone.

40분 이상을 처리하여 사용하였다. 시약을 만들기 위하여 필요한 멸균 증류수는 강력한 단백질 분해제인 diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma, St Louis, MO, USA)를 0.1% 처리하여 멸균한 물을 사용하였다. 전체 RNA 추출을 위해 RNA lysis solution (4.2 M guanidine isothiocyanate, 0.75 M sodium citrate, 10% sarcosyl) 500 μ L를 첨가하고, citrate-saturated phenol (Bio-ner, Equilibrated Phenol A, pH 4.3 \pm 0.2) 500 μ L, chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) 300 μ L을 첨가하여 잘 혼합하였다. 이것을 얼음에서 30분간 처리한 후 14,000 rpm으로 4°C의 냉장 상태에서 10분간 원심분리(Micro-17R plus, Micro high speed centrifuge, Hanil)하여 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담고 Isopropanol (Merck)을 동일량 첨가하여 10~20회 정도 혼합한 후 -20°C에서 1시간 이상 냉각시켰다. 이를 4°C의 냉장에서 14,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 RNA 침전물을 얻었다. 75% ethanol 1 mL로 침전물을 2회 세척한 후 heating block에서 ethanol을 건조시켰다. 최종적으로 추출한 RNA 침전물을 RNase-free water (DEPC로 전처리한 멸균 증류수)로 용해하여 260 nm에서 흡광광도계(spectrophotometer-DU650; Beckman, Somerset, NJ, USA)로 농도를 측정하였다.

생검을 통해 얻은 각 조직에서 위와 같은 방법으로 각각의 전체 RNA를 얻은 후, cDNA microarray를 위해 정상자궁경부조직 3례, 방사선 단독치료 전 8례, 방사선단독치료 중 8례, 방사선-항암화학요법 병용치료 전 8례, 병용치료 중 8례 등의 5개 군으로 pooling을 하였는데, 각 pool은 개별 환자의 유전자 농도비를 일정하게 하면서 전체 RNA의 농도가 5 μ g/10 μ L이 되도록 준비하였다.

5. 방사성동위원소-멤브레인을 이용한 종양 cDNA microarray

5개의 군으로 나누어 준비한 전체 RNA pool 각각에 대하여 역전사(reverse transcription) 방법을 이용하여 [P-33]으로 표지한 cDNAs를 제작하였다. 이 과정을 간단히 요약하면, 3~10 μ g의 total RNA를 reverse transcription 반응 (5X first strand PCR buffer, 1 μ g of 24-mer poly dT primer, 4 μ L of 20 mM each dNTP excluding dCTP, 4 μ L of 0.1 μ M DTT, 40 U of RNase inhibitor, 6 μ L of 3,000 Ci/mmol [P-33] dCTP to a final volume of 40 μ L) 하였고, 반응혼합물은 65°C에서 5분간 방치한 후 42°C에서 3분간 반응하였다. Superscript reverse transcriptase (Life Technologies, specific activity: 200,000 U/mL) 2 μ L를 첨가하고 42°C에서 30분간 방치하여 1차 반응을 시행하였고 이후 2 μ L의 Superscript reverse transcriptase를 2차로 첨가하고 동일한 온도에서 30분간 추가로 2차 반응을 하

였다. 이후 0.5 M EDTA 5 μ L를 첨가한 후 10 μ L의 0.1 M NaOH를 추가하고 65°C에서 30 분간 반응하여 잔여 RNA들을 제거하였다. 최종적으로 25 μ L의 1 M Tris (pH 8.0)를 넣어 최종산물을 중화하고 Bio-Rad 6 purification columns (Hercules, CA)를 사용하여 정제하였다. 최종산물의 방사능은 시료당 $5 \times 10^6 - 3 \times 10^7$ cpm이었다.

종양 cDNA microarray nylon membrane은 미국 국립보건원(National Institutes of Health) 노화연구소(National Institute on Aging)의 DNA microarray unit에서 제작된 것을 사용하였다. 이 멤브레인은 Research Genetics사에서 구입한 15,000개의 human cDNA 클론들(RG 15K[®])로부터 제작되었는데, 여기에는 분화(differentiation), 발달(development), 증식(proliferation), 변형(transformation), 세포주기(cell cycle progression), 면역반응(immune response), 전사 및 번역 인자(transcription and translation factors), 발암유전자(oncogenes), 및 세포성장과 유지에 관련된 여러 가지 분자(molecules) 등이 포함되어있다. 한 장의 멤브레인에 1,200여개의 cDNA들이 좌·우 두 패널로 직접되어, 실험의 재현성과 안정성비교를 할 수 있게 구성되었다.

cDNA microarray 실험과정은 박 등⁹⁾이 발표한 기법을 따라 시행하였다. Microarray 멤브레인을 10 μ L의 10 mg/mL human Cot 1 DNA (Life Technologies)와 10 μ L of 8 mg/mL poly dA (Pharmacia, NJ)가 포함된 총 4.0 mL Microhyb (Research Genetics) 용액에 전처리 하였다. Cot 1과 poly dA는 95°C에서 5 분간 방치한 후 첨가하였다. 전처리 용액을 42°C에서 4시간 처리하여 준비된 멤브레인에 10⁷ cpm/mL의 heat-denatured (95°C, 5 분) probes를 첨가하고 42°C에서 17시간 동안 반응하였다. Hybridized된 멤브레인은 2X SSC와 0.1% SDS가 함유된 세척액으로 3번 닦아내고 실온에서 15분간 방치하였다. 이후 멤브레인을 phosphorimager용 imaging plates에 옮겨 1~5일 동안 표지된 방사능의 강도에 따라서 차등을 두어 노출시켰다. 노출된 Imaging plates는 FLA-8000[®] (Fuji Photo Film Co)으로 50 μ m resolution을 갖고 스캔하였다. Microarray 이미지는 적절한 크기로 잘라 정돈하거나 회전시켜 L-Processor[®] (Fuji Photo Film Co)에서 분석하였다. 각 스팟(spot)들의 방사능 강도가 유전자의 발현정도를 나타내는데, 각 스팟의 픽셀(pixel)을 Arrayguage[®] (Fuji Photo Film Co.)를 사용하여 산출한 후 엑셀파일(Microsoft, Seattle, WA)로 저장하였다. 각 유전자의 발현정도는 원 자료(original data)를 Z-변환을 통해 보정(normalized)한 Z score로 표현되는데, 이는 각 유전자가 전체유전자의 평균강도에서 얼마나 떨어져 있는가를 나타내 주는 것으로서 표준편차가 그 단위가 된다. 이후 각 유전자의 발현정도 상호 비교는 각 유전자의 발현

의 차를 Z-Difference로 표현한 후, 이를 다시 Z-Difference의 표준편차로 나눈 Z-ratio 값을 산출하여 시행하였는데 그 계산식은 다음과 같다.

$$Z = \frac{\log_{10}[\text{raw intensity}] - \log_{10}[\text{mean raw intensity}]}{\text{standard deviation } \log_{10} [\text{raw intensity}]}$$

$$\text{Z-Difference} = Z (\text{gene 1}) - Z (\text{gene 2})$$

$$\text{Z-Ratio} = \text{Z-Difference} / \text{standard deviation (Z-Difference)}$$

특정 유전자에 대하여 산출된 Z-ratio 값이 2.0 이상인 경우 95% 신뢰구간에서 의미있게 증가한 것을 의미하며, -2.0 이하이면 의미있게 감소한 것을 나타낸다. 유전자의 발현 정도에 따른 유전자분류 기법인 클러스터그램(clustergram)은 Eisen 등의 방법을 이용하였다.¹⁰⁾

결 과

전체 유전자에 대한 클러스터그램(clustergram)에서 붉은색은 발현 증가, 녹색은 발현 감소, 검은색은 중간을 나타낸다 (Fig. 2). 실험의 재현성과 안정성을 확인하기 위해 cDNA가 좌·우 두 패널로 배열 되었던 멤브레인에서 얻은 클러스터그램은 동일한 유전자에 대해서 두개의 컬럼(column)으로 그 발현정도가 표현되는데, 본 실험 결과 각각의 유전자에 대한 중복실험결과 각각의 컬럼의 색상이 거의 일치(R² value >0.95)하여 실험의 안정성이 높다고 판단되었다.

1. 자궁경부암의 특징적 유전자 발현 양상

대조군에 비해서 자궁경부 편평상피암에서 Z-ratio 값이 2.0 이상으로 유의한 발현 증가를 보인 유전자들에는 세포성장 및 증식에 관여하는 유전자인 integrin-linked kinase (ILK), tyrosine phosphatase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, casein kinase I gamma 2, interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), 68 kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase alpha 등이 포함되었고, 세포주기 관련 유전자인 CDC28 protein kinase 2, cell division protein kinase 8, 신호전달에 관여하는 유전자인 Sprouty 2 (SPRY2), lipid-activated protein kinase PRK2, serine kinase SRPK 2, ERK 3 등이 포함되었다 (Table 2). 그 외에 G-단백신호전달 관련 유전자인 G protein-coupled receptor HM74 등이 포함되었다. Z-ratio 값이 -2.0 이하로 발현감소를 보인 유전자들은 상대적으로 적었으며, 여기에는 G-단백 수용체 활성화에 관여하는 G protein-coupled receptor kinase 6가 포함되었고, 그 외에 cyclic nucleotid gated channel (CNCG)와 5개의 Expressed sequence tags (EST)

들이 포함되었다.

2. 자궁경부암의 방사선치료에 따른 유전자 발현 양상

자궁경부암에 대해서 방사선치료를 시행하기 전과 방사선 단독 치료 중의 유전자 발현 변화양상을 살펴보면, Z-ratio 2.0 이상으로 유의하게 발현이 증가한 경우는 CNCG와 3개의 EST들로서 이들은 그 기능이 아직 밝혀지지 않은 것들이었다. 방사선 치료 중 유전자 발현이 Z-ratio -2.0 이하로 유의한 감소를 보인 것들에는 세포성장 및 증식에 관여하는 유전자들인 ILK, tyrosine phosphatase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, casein kinase I gamma 2, IRAK, 68 kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase alpha 등과 세포주기 관련 유전자인 CDC28 protein kinase 2, cell division kinase 8 및 신호전달에 관여하는 유전자인 Diacylglycerol kinase delta, Sprouty 2 (Spry2), lipid-activated protein kinase PRK2, serine kinase SRPK 2, ERK 3 등이 포함되어 종양세포에서 발현이 증가되었던 세포 증식과 신호전달 관련 유전자들의 발현이 방사선 조사로 인하여 의미있게 감소되었다 (Table 2). 또한 포도당 대사에 관여하는 Phosphofructokinase 등과 G-단백신호 전달에 관여하는 retinal S-antigen, GTP binding protein (ARL3) 등도 방사선 조사로 인하여 의미있게 감소하였다.

3. 자궁경부암의 방사선 단독치료 대비 항암화학요법 병용치료시의 유전자 발현 양상

방사선치료와 항암화학요법을 병용했을 때 방사선 단독치료에 비하여 Z-ratio 2.0 이상의 발현증가를 보인 유전자들에는 세포 성장과 증식에 관여하는 유전자들인 ILK, casein kinase I gamma 2, 68 kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase alpha, tyrosine phosphatase, serine-threonine phosphatase (PP5), Protein tyrosine phosphatase (receptor-type, zeta polypeptide 1) 등과 세포주기 관련 유전자인 cell division protein kinase 8, CDC28 protein kinase 2 및 신호전달 관련 유전자들인 Sprouty 2 (SPRY2), ERK3, sds22-like mRNA, phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit alpha isoform, TAK1 binding protein 1 (TAB1), serine kinase SRPK2, Diacylglycerol kinase delta, Ins P35-phosphatase, Protein tyrosine phosphatase (non-receptor type 1) 등이 포함되어 방사선 단독치료에서는 그 발현이 감소되었던 유전자들의 발현이 상대적으로 증가하는 양상을 보였다 (Table 2). 또한 암유전자인 K-ras oncogene, 암억제 유전자인 protein phosphatase 2A B56-beta (PP2A), protein phosphatase PP2A 65 xD, regulatory subunit alpha isoform 등과 혈관형성에 관여하는 angiopoietin-2의 발현도 증가하였다. G-단백신호전달에 관여하는 G protein-cou-

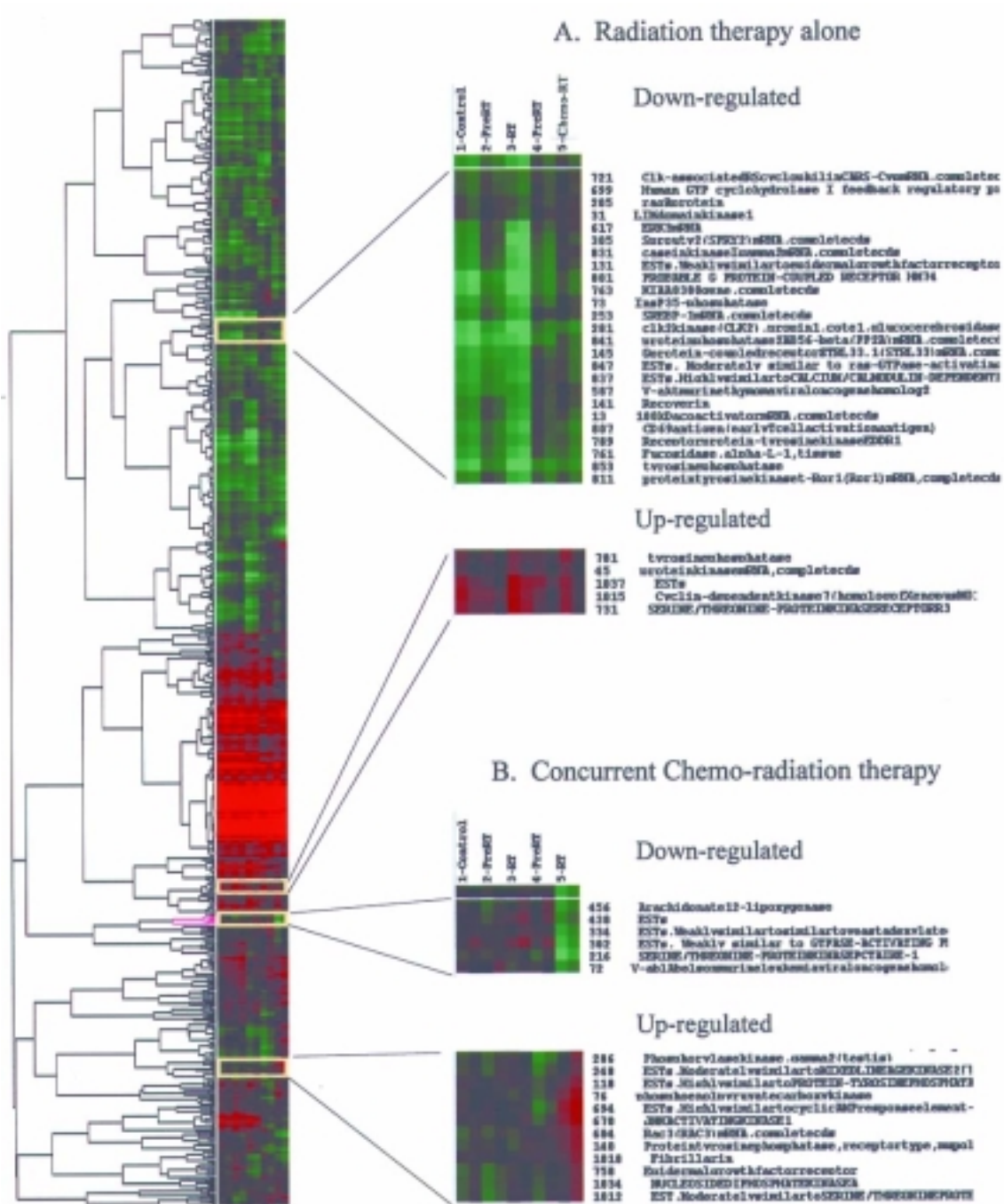


Fig. 2. Molecular portrait of the genes of the cervical cancer compared to the normal cervix and its alteration with radiation therapy or concurrent chemo-radiation therapy. Cluster analysis was performed on Z-transformed microarray data by using shareware from Michael Eisen's lab. Each gene is represented by single row of colored boxes and each experimental sample is represented by a single column (duplicated for each column); 1-Control; 2-Cervical cancer, pre-treatment; 3-Radiation therapy alone; 4-Cervical cancer, pre-treatment; 5-Concurrent chemo-radiation therapy. The entire clustered image is shown on the left. Full gene names are shown for coordinately expressed clusters containing genes altered in radiation therapy alone (A), and concurrent chemo-radiation therapy (B). These clusters also contain uncharacterized genes and genes with no altered expression.

Table 2. Classified Expression Profile of Genes in Cervical Cancer Compared to Control and Its Alteration with Radiation Therapy Alone or Concurrent Chemo-radiation Therapy

| Classification | Gene | Z-ratio | | | |
|--|---|--|-----------|-----------|------|
| | | Cervical cancer* | RT alone† | Chemo-RT‡ | |
| Cell growth and proliferation | Integrin-linked kinase | 2.43 | -3.00 | 3.21 | |
| | Tyrosine phosphatase | 2.40 | -2.85 | 2.47 | |
| | Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 | 2.15 | -2.58 | 2.20 | |
| | Casein kinase I gamma 2 | 2.08 | -2.42 | 2.79 | |
| | Interleukin1 receptor-associated kinase | 2.03 | -2.56 | | |
| | 68 kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase alpha | 2.05 | -2.31 | 2.74 | |
| | AXL receptor tyrosine kinase | | | -4.82 | |
| | Serine-threonine phosphatase (PP5) | | | 2.02 | |
| Cell cycle | Protein tyrosine phosphatase (receptor-type, zeta polypeptide1) | | | 2.53 | |
| | CDC28 protein kinase 2 | 2.32 | -2.78 | 3.38 | |
| | cell division protein kinase 8 | 2.02 | -2.20 | 3.92 | |
| Signal transduction | Sprouty 2 | 2.37 | -3.04 | 2.73 | |
| | serine kinase SRPK 2 | 2.06 | -2.51 | 2.23 | |
| | ERK 3 | 2.03 | -2.36 | 2.56 | |
| | sds22-like mRNA | | -2.18 | 2.55 | |
| | Lipid-activated protein kinase PRK2 | 2.16 | -2.88 | | |
| | Diacylglycerol kinase delta | | -2.28 | 2.00 | |
| | Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1 | | | -2.40 | |
| | Casein kinase 1 alpha 1 | | | -2.42 | |
| | Lysosomal Acid phosphatase 2 | | | -2.50 | |
| | phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha isoform | | | 3.16 | |
| Glucose metabolism | TAK1 binding protein1 (TAB1) | | | 2.04 | |
| | Ins P35-phosphatase | | | 2.24 | |
| | Protein tyrosine phosphatase (non-receptor type1) | | | 2.06 | |
| | Phosphofructokinase | | -2.27 | | |
| | Glucose-6-phosphatase | | | 2.06 | |
| | phosphorylase-kinase beta subunit | | | 2.49 | |
| | G protein-coupled receptor HM74 | 2.15 | | 2.86 | |
| | G protein-coupled receptor kinase 6 | -2.05 | | | |
| | Retinal S-antigen | | -2.21 | | |
| | GTP binding protein (ARL3) | | -2.35 | | |
| G-protein related | G protein alpha transducing activity polypeptide 1 | | | -2.12 | |
| | G protein-coupled receptor kinase GRK 4 | | | -2.42 | |
| | Regulator of G protein signaling (RGS13) | | | 2.33 | |
| | K-ras oncogene | | | 2.32 | |
| | Oncogene | Protein phosphatase 2A B56-beta (PP2A) | | | 2.00 |
| | | Protein phosphatase PP2A, 65 xD regulatory subunit alpha isoform | | | 2.78 |
| | Angiogenesis | Angiopoietin-2 | | | 2.90 |
| | Immune reaction | Formyl peptide receptor-like 1 | | | 2.41 |
| NKG2-D type II integral membrane protein | | | | 2.04 | |
| DNA repair | cAMP phosphodiesterase | | | 3.04 | |
| Apoptosis | Death-associated protein-kinase | | | -2.40 | |

* Cervical cancer: genes with increased expression as Z-ratio 2.0 or above, or decreased as -2.0 or below compared to normal control

† Radiation therapy alone in cervical cancer: genes with increased expression as Z-ratio 2.0 or above, or decreased as -2.0 or below compared to pre-treatment cervical cancer

‡ Concurrent chemo-radiation therapy in cervical cancer: genes with increased expression as Z-ratio 2.0 or above, or decreased as -2.0 or below compared to radiation therapy alone

pled receptor HM74, regulator of G protein signaling (RGS13)과 포도당 대사에 관여하는 Glucose-6-phosphatase, phosphorylase-kinase beta subunit, Phosphoenolpyruvate carboxykinase 등과 면역반응에 관여하는 Formyl peptide receptor-like 1, NKG2-D

type II integral membrane protein 등의 발현도 증가하였다. DNA 손상의 회복(repair)에 관여하는 cAMP phosphodiesterase의 발현도 증가하였다.

방사선 단독치료시 보다 병용치료에서 유전자 발현이 Z-ratio -2.0 이하로 감소된 것에는 G-단백신호전달에 관여하는 Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha transducing activity polypeptide 1, G protein-coupled receptor kinase GRK 4 등과 세포 증식에 관여하는 AXL receptor tyrosine kinase, 신호전달에 관여하는 serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1, Casein kinase 1 alpha 1, lysosomal Acid phosphatase 2 등이 포함되었다(Table 2). 세포고사(apoptosis)에 관여하는 death-associated protein (DAP)-kinase의 발현도 감소하였으며, 그 외에 기능이 아직 정확히 밝혀지지 않은 EST들이 포함되었다.

고안 및 결론

특정 질환에는 수많은 종류의 유전자들의 발현이 증가 혹은 감소되고 있으며, 이들이 복잡하게 얽혀 서로 영향을 주고 있으므로, 이들 전체의 동시다발적인 발현 양상을 한꺼번에 밝혀내는 것이 필요하다. 그러나 기존의 생화학, 분자생물학적 방법은 개별 유전자에 대한 실험을 각각 진행해야 하므로 동시다발적인 유전자 발현양상을 파악하기가 매우 어려웠다. cDNA microarray는 과거 불가능해 보였던 ‘유전자 전체’를 대상으로한 유전자 조절 양상에 대한 연구를 일괄적으로 시행할 수 있는 획기적 기법이다.¹¹⁻¹³ 현재까지 알려진 3만 6천여개의 인간 유전체 염기서열 중 그 기능을 알고 있는 유전자는 약 10%에 불과한데, cDNA microarray를 통하여 기존에 알려진 유전자 중 암과의 관련성을 새로이 찾을 수 있고, 기능을 알지 못하던 EST와 종양의 상관관계를 알게되면 새로운 암관련 유전자를 발굴할 수 있는 것이다.¹⁴

현재까지 흔히 사용되는 cDNA Microarray를 기술적인 측면에서 분류하여 보면, 첫째 Glass with fluorescent probes, 둘째 Membrane with colorimetric probes, 셋째 Membrane with [P-33] probes 등 크게 3가지로 나누어 질 수 있다. 본 연구에서 시행한 방사성동위원소 [P-33] probes를 이용한 종양 cDNA Microarray의 특징은 소량의 total RNA를 추출할 수밖에 없는 실험조건에서도 적용이 가능하여 임상에서 얻어진 인간의 검체와 같이 소량의 재료를 분석할 수 있으며, Glass with fluorescent probes를 이용한 상품화된 kit에 비하여 저렴한 비용으로 실험을 진행할 수 있고, 일반적인 생화학, 분자생물학적인 방법을 이용한 실험들을 확인, 증명하는 보조적

인 수단으로서의 이용이 가능하다는 점이다.

현재까지 자궁경부암에 대한 microarray 연구는 미진한 실정으로 많은 연구가 필요하다고 판단되었다. 특히 방사선치료에 따른 유전자 발현 양상에 대해서는 세포주(cell line) 및 임상에서 얻은 자궁경부암 조직을 이용한 방사선 반응성 연구가 몇몇 보고되었을 뿐이다.^{15, 16}

이번 cDNA microarray 연구 결과, 정상자궁경부에 비하여 자궁경부암에서 의미있게 발현이 증가된 유전자들은 주로 세포성장과 증식, 세포주기, 신호전달 등에 속하는 것이었다(Table 2).

Integrin linked kinase (ILK)는 세포를 세포외간질(extracellular matrix)에 고정하는 역할을 하는 막단백질인 integrin의 세포내 domain에 작용하여 신호전달을 매개하는 serine-threonine protein kinase계 효소로서, 많은 정상조직에서 발현되고 있으며, 최근 종양의 생성, 성장, 침윤, 전이, 신생혈관형성 등에 관여하는 것으로 밝혀지면서 그 유전자 연구에 많은 주목을 받고 있다.¹⁷⁻¹⁹ ILK가 과발현되면 glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)를 인산화 시켜 이의 활성을 감소시켜 베타카테닌(β -catenin)이 핵내로 이동하게 되고 lymphoid enhancer binding factor 1과 결합하여 각종 cyclin들의 전사를 유도하며, 또한 activating protein-1을 활성화함으로써 종양세포의 침윤(invasion)과 증식(proliferation)을 유발한다.^{20, 21} 이와 함께 protein kinase B (PKB/Akt)를 인산화 시켜 이를 활성화하여 세포고사(Apoptosis)를 억제하고, VEGF의 활성화와 함께 angiogenesis에도 관여한다.²² 암억제유전자인 PTEN (phosphatase and tensin homolog detected on chromosome 10)의 변이가 있는 PTEN mutant 세포에서는 ILK의 활성이 항상 증가되어있는 것이 밝혀졌으며, 이와 같이 ILK의 활성이 증가되면 세포외간질과의 접촉이 없이도 세포분열이 가능해지는 anchorage-independent cell cycle progression을 촉진하여 종양형성과 침윤을 유발하게 된다. 현재까지 인체의 유방암, 전립선암, 뇌종양, 대장암 등에서 ILK의 활성 증가와 종양의 악성도(malignancy) 사이의 연관성이 보고되었다.²³⁻²⁵ 전립선암 환자 100례를 대상으로 한 한 보고에 따르면 종양의 분화가 나쁠수록 ILK의 활성이 높았고, ILK 면역화학염색의 강도와 5년 생존율간에 역상관계가 있음이 보고되었다.²⁴ 그러나 자궁경부암에서는 ILK의 활성도에 대한 보고가 아직 없으며, 자궁경부암종을 이용한 Achary 등과 Kitahara 등의 microarray 결과에서도 언급되지 않았는데, 이는 그들이 사용한 cDNA 목록 가운데 ILK 유전자가 포함되지 않았기 때문으로 추측된다.^{15, 16} 이번 연구 결과 ILK의 Z-ratio가 2.43으로 그 발현이 유의하게 증가하였음이 처음 밝혀져 향후 이에 대한 확인연구 및 임상적

의의 등에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

세포의 증식과 분화에 관여하고 있는 타이로신 인산화과정은 protein tyrosine kinase와 tyrosine phosphatase의 상반되는 활성도에 좌우된다. 타이로신 인산화 능력이 일부 암유전자의 주요한 기능의 하나로 알려졌는데, 인산화여부와 효소활성의 증가 및 세포변형능력의 획득이 서로 인과관계가 있는 것으로 밝혀져 있다.^{26, 27)} Receptor tyrosine kinase (RTK)의 주요기능은 정상적인 세포의 생명현상 뿐만 아니라, RTK signaling을 통해 종양세포의 발생과 증식에도 관여하는 것으로 알려졌다.²⁸⁾ Tyrosine phosphatase는 단순히 kinase의 역기능으로서 탈인산화과정에만 관여하는 것이 아니라 tyrosine phosphatase의 활성도에 따라 RTK의 기능을 감소시키거나, 리간드(ligand)로 유도된 RTK의 활성화를 억제하는 것으로 밝혀졌다.^{29, 30)} 현재까지 약 60여 종이 발견되었으며, 세포막에 수용체 기능을 가진 tyrosine phosphatase도 다수 발견되었으나 기능은 아직 밝혀지지 않았다.³¹⁾ 자궁경부암에서의 tyrosine phosphatase의 활성도에 대해서는 아직 명확하지 않으며, 이번 연구를 통해 Z-ratio 2.40의 발현강도로서 증가된 양상을 보여 향후 이에 관한 연구를 진행할 필요성이 있겠다.

Cdc 28은 cdc2와 상동성을 가지고 기능적으로 거의 같은 cycline dependent kinase (CDK)의 일종으로서, 이는 세포주기 G2/M의 진행을 위해서 필수적이다. Cdc2의 Tyr 15 잔기가 protein phosphatase인 Cdc25에 의해 탈인산화되어 활성화되면 cyclin B와 결합하고 세포주기는 분열기(mitosis)로 진행하게 된다.³²⁾ 정상적으로 CDK는 세포주기의 변화에 큰 영향을 받지 않고 항상 일정한 양이 안정적으로 발현되고 있는데, 간혹 growth factor의 자극에 의해 그 발현이 약간의 영향을 받기도 하는 것으로 알려져 있다.³³⁾ 본 연구결과 자궁경부 편평상피암에서 Cdc 28의 Z-ratio 2.32로서 정상 자궁경부 세포에 비해 유의하게 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었는데, 이는 Z-ratio 2.02인 cell division protein kinase 8과 함께 종양 세포에서의 왕성한 세포분열을 시사해준다고 판단되었다.

Sprouty (Spry)는 초파리 (*Drosophila*)의 fibroblast growth factor와 epidermal growth factor (EGF)의 신호전달을 막는 길항인자로 처음 발견된 후 Ras/MAP kinase pathway를 방해하는 것으로 알려졌다.³⁴⁾ Spry 2는 RTK 신호전달에 대한 보편적인 억제인자로 알려졌었는데, 120-kDa의 proto-oncogenic protein인 c-Cbl과의 상호작용에 따라 조절기능을 향상시킬 수도 있고 감소시킬 수도 있는 양면적인 기능을 가진 것이 밝혀졌다.³⁵⁾ Spry 2의 aminoterminal domain과 c-Cbl의 격리(sequestration)에 의해 EGFR의 ubiquitination과 분해(degradation)를 저해함으로써 Spry 2는 EGFR 신호전달을 증폭한다는 보고가 있

었다.³⁶⁾ 즉 Spry 2가 c-Cbl를 매개로한 수용체의 기능감소(receptor down regulation)를 저해함으로써 EGFR 신호전달을 특이적으로 증폭한다는 것이다.³⁶⁾ 다양한 종양세포에서 발현이 증가되는 것으로 보고된 EGFR은 자궁경부암에서도 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는데, 이번 연구에서는 Spry 2가 Z-ratio 2.37로 발현 증가되어, EGFR 신호전달을 증폭하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

이외에도 Ras signal의 down stream에서 작용하는 MAP (mitogen activated protein) kinase인 ERK 3 (extracellular signal regulated kinase 3) 역시 Z-ratio 2.03으로 증가되었는데, ERK의 활성이 지속적으로 유지되어 충분한 양의 cyclin D1을 합성하려면 Integrin과 growth factor signaling을 동시에 받아야하는 것으로 알려졌는데, 본 연구결과 ILK의 발현증가와 Spry 2를 통한 growth factor signaling의 증폭 등이 동시에 작용하여 ERK의 활성이 증가되었을 것으로 생각된다.

방사선치료를 약 2주간 시행하여 18~27 Gy를 조사한 후에 실시한 조직생검에서 관찰되는 자궁경부암종의 병리학적 소견에서 단일 세포의 괴사는 있었으나 광범위한 부위의 괴사는 관찰되지 않았고, 주로 방사선조사에 의한 세포사(cell death)를 시사하는 소견이 관찰되어 본 실험을 통한 유전자 발현실험을 진행하는데 지장이 없다고 판단되었다. 방사선조사에 따른 유전자 발현 양상을 살펴보면 종양세포에서 증가되었던 세포성장과 증식, 세포주기, 신호전달 관련 유전자들이 전반적으로 감소되는 경향을 나타내었다(Table 2). Spry 2, ILK, tyrosine phosphatase, ERK 3, cell division protein kinase 8 등의 Z-ratio가 각각 -3.04, -3.00, -2.85, -2.36, -2.20으로서 많은 감소를 나타내어 방사선에 의해 종양세포의 분열과 증식이 크게 저해되고 있음을 확인할 수 있었다.

방사선치료와 항암화학요법을 병용한 경우, 방사선 단독치료를 비하여 유전자 발현 정도가 Z-ratio 2.0 이상으로 증가된 것이 Angiopoietin-2, K-ras oncogene, cAMP phosphodiesterase 등을 포함하여 32개였고, Z-ratio -2.0 이하로 감소된 것은 AXL receptor tyrosine kinase, G protein-coupled receptor kinase GRK 4 등 14개로서 매우 다양한 발현양상을 보였다. 여기에는 세포의 성장과 증식 및 신호전달에 관련된 유전자들이 일부 포함되었는데, 이는 병용치료의 경우 이들 유전자의 발현이 치료 후에도 여전히 높았다는 의미가 아니라, 방사선 단독치료에 비해서 상대적으로 높았다는 의미로서 해석상주의를 요한다. 일반 조직학적 소견으로는 방사선치료 단독과 항암화학요법 병용 치료시의 차이를 구별할 수 없었으나, 유전자 발현양상에는 큰 차이를 보여, 유전자 수준에서의 작용기전에 많은 차이가 있음을 시사하였다. 특히 Angiopoietin-

2, NKG2-D type II integral membrane protein, cAMP phosphodiesterase 등 혈관형성, 면역반응, DNA 손상회복에 관련된 유전자의 발현 증가와 death-associated protein (DAP)-kinase 등 세포고사에 관련된 유전자의 발현 감소는 방사선 단독치료와 병용치료의 차이를 설명할 수 있는 변화로 추측되었으며, 향후 이에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각되었다.

Angiopoietin-2는 vascular endothelial growth factor (VEGF)와 함께 종양조직에서 혈관신생성에 관여하는 것으로 보고되었다. Angiopoietin-1이 Tie 2 수용체에 효능제로 작용하여 혈관의 성숙(maturation)과 안정화(stabilization) 및 재형성(remodeling)을 유도하여 주변세포 및 세포 외 기질과 이상적인 결합을 형성한 완벽한 혈관을 만드는 작용을 하여 성체조직에 널리 발현되고 있는 반면, angiopoietin-2는 Tie 2 수용체에 길항제로 작용하여 angiopoietin-1의 기능을 차단하고 국부적인 혈관의 불안정화를 유도한다.³⁷⁾ 고형암에서 기존의 정상(host) 혈관은 angiopoietin-2의 작용으로 불안정화 되고 혈관내피세포의 세포고사가 일어나게 되며, VEGF가 angiopoietin-2과 함께 존재하면 종양혈관이 새로이 생성되는 것이다.³⁸⁾ 방사선치료와 항암제 병용치료시 방사선 단독치료의 경우보다 angiopoietin-2의 발현이 Z-ratio 2.90으로 증가되고 VEGF의 발현 증가는 없었는데, 따라서 병용치료의 경우 종양혈관들의 흡수와 퇴화가 방사선치료 단독보다 더욱 빨리 진행되리라고 추측하였다.

결론적으로 cDNA microarray를 이용하여 자궁경부 편평상피암에서 세포성장과 증식에 관여하는 유전자, 세포주기 관련 유전자, 신호전달 관련 유전자 등의 발현증가를 일괄적으로 확인할 수 있었다. 이에 따라 자궁경부암의 분열과 증식은 ILK에 의한 신호시작, Spry 2에 의한 신호의 증폭, MAPK signaling의 활성화 증가, Cdc 2 및 cell division kinase 등에 의한 세포분열의 증가 등 여러 유전자의 다발적 활성화 증가가 관여하리라고 유추 할 수 있었다. 방사선치료 후에는 종양세포에서 발현이 증가되었던 세포성장과 증식 및 신호전달 관련 유전자들의 발현이 유의하게 감소되어, 종양세포의 분열과 증식이 저해되고 있음을 확인하였다. 방사선 항암화학 병용치료의 경우, 방사선 단독치료에 비해 세포성장과 증식 및 신호전달 관련 유전자들의 발현이 상대적으로 증가하였고, 혈관형성(angiopoietin-2), 면역반응(formyl peptide receptor-like 1), DNA 손상회복(cAMP phosphodiesterase)에 관련된 유전자 등의 발현은 증가되고, 세포고사(DAP-kinase)에 관련된 유전자는 발현감소를 보이는 등 유전자 수준에서의 작용 기전이 달랐다. 향후 이번 연구에서 나타난 유전자들에 대한 추가

연구가 필요할 것이며, 방사선 단독치료와 항암제 병용치료에 따른 유전자 수준에서의 차이점과 그 기전연구를 더욱 진행하면 궁극적으로 개별화된 맞춤형 치료법의 개발이 가능할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80:827-841
2. Central Cancer Registry Center in Korea · Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. Annual report of the central cancer registry in Korea (1999. 1.~1999. 12.) April, 2001
3. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*. 1999; 340:1137-1143
4. Kang OC, Choi EK, Chung WK, et al. Concurrent chemoradiotherapy in locally advanced carcinoma of the uterine cervix. *J Korean Soc Ther Radiol* 1998;16:311-323
5. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
6. Wang K, Gan L, Jeffery E, et al. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 1999;229:101-108
7. Bertucci F, Houlgatte R, Benziene A, et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2981-2991
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511
9. Park GH, Choe J, Choo HJ, Park YG, Sohn J, Kim MK. Genome-wide expression profiling of 8-chloroadenosine- and 8-chloro-cAMP-treated human neuroblastoma cells using radioactive human cDNA microarray. *Exp Mol Med* 2002;34(3):184-193
10. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863-14868
11. Villaret DB, Wang T, Dillon D, et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope* 2000;110:374-381
12. Shirota Y, Kaneko S, Honda M, Kawai HF, Kobayashi K. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 2001; 33:832-840
13. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and perfor-

- mance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet* 1999;8:1715-1722
14. **Yoo HS.** 21C Frontier Cancer Genome Project of Korea. *J Korean Cancer Asso* 2001;33(S):4
 15. **Achary MP, Jaggernauth W, Gross E, Alfieri A, Klinger HP, Vikram B.** Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet Cell Genet* 2000;91:39-43
 16. **Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakamura Y.** Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 2002;4(4):295-303
 17. **Yoganathan TN, Costello P, Chen X, et al.** Integrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1115-1119
 18. **White DE, Cardiff RD, Dedhar S, Muller WJ.** Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* 2001;20(48):7064-7072
 19. **Scandurro AB, Weldon CW, Figueroa YG, Alam J, Beckman BS.** Gene microarray analysis reveals a novel hypoxia signal transduction pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001;19(1):129-135
 20. **D'Amico M, Hult J, Amanatullah DF, et al.** The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J Biol Chem* 2000;275(42):32649-32657
 21. **Dedhar S, Williams B, Hannigan G.** Integrin-linked kinase (ILK): a regulator of integrin and growth-factor signaling. *Trends Cell Biol* 1999;9(8):319-323
 22. **Yoganathan N, Yee A, Zhang Z, et al.** Integrin-linked kinase, a promising cancer therapeutic target: biochemical and biological properties. *Pharmacol Ther* 2002;93(2-3):233
 23. **Persad S, Attwell S, Gray V, et al.** Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3207-3212
 24. **Graff JR, Deddens JA, Konicek BW, et al.** Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 2001;7(7):1987-1991
 25. **Marotta A, Tan C, Gray V, et al.** Dysregulation of integrin-linked kinase (ILK) signaling in colonic polyposis. *Oncogene* 2001;20(43):6250-6257
 26. **Zwick E, Bange J, Ullrich A.** Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 2001;8(3):161-173
 27. **Ostman A, Bohmer FD.** Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* 2001;11(6):258-266
 28. **Majercakova P.** Role of protein phosphorylation in the development of tumors. *Sb Lek* 2000;101(3):215-228
 29. **Chernoff J.** Protein tyrosine phosphatases as negative regulators of mitogenic signaling. *J Cell Physiol* 1999;180(2):173-181
 30. **Fischer EH.** Cell signaling by protein tyrosine phosphorylation. *Adv Enzyme Regul* 1999;39:359-369
 31. **Bixby JL.** Ligands and signaling through receptor-type tyrosine phosphatases. *UBMB Life* 2001;51(3):157-163
 32. **Smits VA, Medema RH.** Checking out the G(2)/M transition. *Biochem Biophys Acta* 2001;1519(1-2):1-12
 33. **Arellano M, Moreno S.** Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29(4):559-573
 34. **Gross I, Bassit B, Benezra M, Licht JD.** Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation. *J Biol Chem* 2001;276(49):46460-46468
 35. **Egan JE, Hall AB, Yatsula BA, Bar-Sagi D.** The bimodal regulation of epidermal growth factor signaling by human Sprouty proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(9):6041-6046
 36. **Wong ES, Fong CW, Lim J, et al.** Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signaling. *EMBO J* 2002;21(18):4796-4808
 37. **Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al.** Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284(5422):1994-1998
 38. **Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, et al.** Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 2002;109(6):777-785

Abstract

Gene Expression Profiles in Cervical Cancer with Radiation Therapy Alone and Chemo-radiation Therapy

Kyu Chan Lee, M.D.^{*}, Meyoung-kon Kim, M.D.[†], Jooyoung Kim, M.D.^{*}
You Jin Hwang, Ph.D.[†], Myung Sun Choi, M.D.[§] and Chul Yong Kim, M.D.[§]

^{*}Department of Radiation Oncology, [†]Laboratory of Molecular Biology, Gachon Medical School, Incheon,
[†]Departments of Biochemistry, [§]Radiation Oncology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Purpose: To analyze the gene expression profiles of uterine cervical cancer, and its variation after radiation therapy, with or without concurrent chemotherapy, using a cDNA microarray.

Materials and Methods: Sixteen patients, 8 with squamous cell carcinomas of the uterine cervix, who were treated with radiation alone, and the other 8 treated with concurrent chemo-radiation, were included in the study. Before the starting of the treatment, tumor biopsies were carried out, and the second time biopsies were performed after a radiation dose of 16.2~27 Gy. Three normal cervix tissues were used as a control group. The microarray experiments were performed with 5 groups of the total RNAs extracted individually and then admixed as control, pre-radiation therapy alone, during-radiation therapy alone, pre-chemoradiation therapy, and during-chemoradiation therapy. The ³³P-labeled cDNAs were synthesized from the total RNAs of each group, by reverse transcription, and then they were hybridized to the cDNA microarray membrane. The gene expression of each microarrays was captured by the intensity of each spot produced by the radioactive isotopes. The pixels per spot were counted with an Arrayguage[®], and were exported to Microsoft Excel[®]. The data were normalized by the Z transformation, and the comparisons were performed on the Z-ratio values calculated.

Results: The expressions of 15 genes, including integrin linked kinase (ILK), CDC28 protein kinase 2, Spry 2, and ERK 3, were increased with the Z-ratio values of over 2.0 for the cervix cancer tissues compared to those for the normal controls. Those genes were involved in cell growth and proliferation, cell cycle control, or signal transduction. The expressions of the other 6 genes, including G protein coupled receptor kinase 6, were decreased with the Z-ratio values of below -2.0. After the radiation therapy, most of the genes, with a previously increase expressions, represented the decreased expression profiles, and the genes, with the Z-ratio values of over 2.0, were cyclic nucleotide gated channel and 3 Expressed sequence tags (EST). In the concurrent chemo-radiation group, the genes involved in cell growth and proliferation, cell cycle control, and signal transduction were shown to have increased expressions compared to the radiation therapy alone group. The expressions of genes involved in angiogenesis (angiopoietin-2), immune reactions (formyl peptide receptor-like 1), and DNA repair (cAMP phosphodiesterase) were increased, however, the expression of gene involved in apoptosis (death associated protein kinase) was decreased.

Conclusion: The different kinds of genes involved in the development and progression of cervical cancer were identified with the cDNA microarray, and the proposed theory is that the proliferation signal starts with ILK, and is amplified with Spry 2 and MAPK signaling, and the cellular mitoses are increased with the increased expression of Cdc 2 and cell division kinases. After the radiation therapy, the expression profiles demonstrated the evidence of the decreased cancer cell proliferation. There was no significant difference in the morphological findings of cell death between the radiation therapy alone and the chemo-radiation groups in the second time biopsy specimen, however, the gene expression profiles were markedly different, and the mechanism at the molecular level needs further study.

Key Words: Uterine cervix cancer, cDNA microarray, Gene expression, Radiation therapy, Chemo-radiation therapy