

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine에 의한 흰쥐 방광암 발생 과정에서 세포주기 관련인자 단백(Cyclin D1, A, E, and B1)의 발현

권귀영 · 박언섭 · 봉성근 · 이태진
김미경 · 유재형 · 송계용

중앙대학교 의과대학 병리학교실

Expression of Cyclins (D1, A, E, and B1) in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced Rat Bladder Carcinogenesis

Gui Young Kwon, Eon Sub Park, Sung Geun Bong, Tae Jin Lee, Mi Kyung Kim, Jae Hyung Yoo and Kye Yong Song

Department of Pathology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Cell cycle deregulation plays a major role in chemical multistage carcinogenesis. Therefore, the evaluation of cell cycle proteins is important. **Methods :** In order to induce carcinogenesis in the rat urinary bladder, 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) was administered to male Sprague-Dawley rats for 30 weeks. Expressions of cyclin D1, A, E, and B1 were examined by immunohistochemical stainings. **Results :** Urothelial cell hyperplasia appeared at 5 weeks, followed by papilloma at 10 weeks. Superficial carcinoma was observed at 20 weeks, and invasive carcinoma developed in 40% (4/10) of the rats at 30 weeks. Expressions of cyclin D1 and A increased sequentially from normal mucosa through hyperplasia, papilloma, and carcinoma ($p < 0.01$). Expressions of cyclin D1, B1 and cyclin E were higher in invasive carcinomas than in superficial carcinomas ($p < 0.01$). In contrast, there was no significant difference in the expression of cyclin B1 between hyperplasia, papilloma and superficial carcinoma. **Conclusions :** The present results indicate the important roles of cyclin D1 and A in the development of BBN-induced urothelial carcinoma of rats. Aberrant expression of cyclin B1 and E may contribute to the progression from superficial to invasive bladder cancer rather than tumorigenesis.

Key Words : Cyclins-Carcinogenesis-N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-Rat-Urinary bladder

접 수 : 2003년 5월 31일
게재승인 : 2003년 8월 2일

책임저자 : 이 태 진
우 100-272 서울시 중구 필동 2가 82-1
중앙대학교부속 필동병원 병리과
전화: 02-2260-2094
Fax: 02-2260-2094
E-mail: taejlee@chol.com

화학적 발암물질에 의한 세포의 암화과정은 발암원에 의해 세포의 DNA가 손상 혹은 변형되는 개시단계에서부터 시작되어 점차 활동성이 큰 변이세포로 전환되는 촉진단계를 거쳐, 궁극적으로 암세포의 유전형질을 가지는 클론이 선택적으로 증식하여 종양으로 진행된다.¹ 종양으로 형질전환된 암세포의 핵심적 특징은 지속적이며 자율적인 증식과 사망회피이며 이는 암세포 내 세포주기의 진행과 증식에 관여하는 신호전달체계의 세포자멸사 조절에 이상이 있기 때문인 것으로 해석된다.² 실제로 인체에서 발생하는 각종 악성 종양에서 세포주기와 세포자멸사에 관여하는 여러 구성 인자의 이상이 보고되어 있다.³

세포주기에는 조절단위인 cyclin 계열 단백질과 이들과 결합하여 활성을 나타내는 단백질인 cyclin dependent kinase (CDK 1-6)가 관련된다. 세포주기에서 이들 인자의 작용은 세포의 핵

내에서 cyclin의 증가로 CDK가 Rb 단백을 인산화시키고, 그 결과 Rb 단백질이 억제하고 있던 전사인자인 elongation factor-2 (E2F)가 활성화되어, 세포는 G1기에서 S기로 들어가 증식하게 된다.⁴ 세포주기의 조절인자인 cyclin 계열 단백질은 사람의 유전체에 적어도 11개의 유전자가 있다. 이들은 세포주기의 작용시점에 따라 크게 G1기 cyclin과 G2/M기 cyclin 등 2가지 종류로 분류되며, 각기 다양한 기능으로 세포주기에 따라 발현양상이 변화되어 세포분열을 진행시킨다.⁵

Cyclin 계열 단백질 중에서 G1기의 진행에 필수적인 cyclin D1의 유전자는 11번 염색체 11q13에 위치한다. 세포주기에서 cyclin D1의 과발현은 E2F를 활성화시킴으로써 지속적으로 Rb 단백을 인산화시켜 세포성장이 조절되지 않도록 하여 암의 발생 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁶ 실제로 인체에서 발생되

는 위암중,⁷ 방광암중 등^{8,9} 다양한 종양에서 cyclin D1의 발현 증가가 보고되어 있다. cyclin E는 G1 말기에 발현되어 CDK2와 결합하여 활성을 증가시켜 DNA 복제를 유도한다. 따라서 cyclin E의 발현 증가는, 지속적으로 cyclin E/CDK2 결합체가 Rb 단백을 인산화시킴으로써 유리된 E2F에 의해 세포주기가 비정상적이 되면서 종양으로의 전환이 일어난다.¹⁰ 또한 cyclin A는 DNA 복제가 시작되는 S기에 주로 생산되어 DNA 복제와 전사과정에 관여할 뿐만 아니라 세포의 성장과 형질전환에 관여하는 유전자를 조절한다.¹¹ 한편 cyclin B1은 G2 초기에서 합성되며 염색질의 응축, 핵막의 파괴, 그리고 유사분열 방추체의 조합 등으로 G2-M기의 이행에 주도적으로 작용하는 세포주기 단백질이다.³ 따라서 세포주기에서 cyclin B1에 의존한 G2 check point를 조절하는 것이 악성종양으로의 형질전환을 예방하는 것으로 보고되어 있다.¹²

방광에서 발생하는 요로상피암종은 비뇨기계에서 가장 흔히 관찰되는 악성종양이다. 대부분 표재성으로 존재하지만 상당수에서 재발과 더불어 침윤성 암종으로 진행하며, 이 경우 환자의 50% 이상에서 전이가 일어나 암에 의한 사망률도 비교적 높다.¹³ 따라서 방광암의 발생뿐만 아니라 침윤성 종양세포의 생물학적 성상의 이해에 대한 연구가 필요하며, 실험적 방광암 모델은 방광의 발암과정을 이해하는 데 중요한 연구대상이 된다.

실험적 방광암 모델로는 흰쥐에 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)이나,^{14,15} *N*-4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formide¹⁶를 투여하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다. BBN을 이용한 실험적 방광암 모델은 단순상피세포증식, 유두종 및 요로상피암종 등 인체에서 발생하는 방광암과 형태적으로 유사한 병변이 초래되어 방광암의 가장 이상적 모델로 보고되어 있다.¹⁵

이에 본 연구에서는 흰쥐에 지속적으로 0.05% 농도의 BBN을 투여하여 발생하는 방광암의 형태 변화를 관찰하고, 방광암의 발생 및 진행과정에 세포주기 조절인자 중 G1기의 cyclin D1, cyclin E와 cyclin A, 그리고 G2/M기에 작용하는 cyclin B1 단백질의 발현에 대해서 알아보고자 하였다.

재료와 방법

재료

실험동물

실험에 사용된 동물은 생후 8주 이내의 체중 150-160 gm의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 60마리를 사용하였고, 사료는 시판 고형사료(삼양사료 주식회사, 한국)를 사용하였다. 실험동물은 한 우리에 3마리씩 사육하였고, 환경 적응을 위해 실험 1주일 전부터 동일 조건 하에서 미리 사육시켰다.

발암제

발암제는 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (이하 BBN, Kasei Co, Tokyo, Japan)을 0.05%가 되게 수돗물에 희석한 후 물병을 알루미늄 호일로 채광한 다음 자유로이 먹게 하였다. 발암제 투여기간 동안 별도의 식수는 공급하지 않았다.

방법

실험동물의 구분과 실험기간

실험동물 60마리를 크게 대조군 10마리와 0.05% BBN을 투여한 실험군 50마리로 나누었다. 실험군은 BBN 투여기간에 따라 다시 5주(1군), 10주(2군), 15주(3군), 20주(4군) 및 30주(5군)의 5군으로 분류하였으며, 각 군의 실험동물은 10마리로 각각 해당하는 주에 도살을 실시하였다. 각 군마다 2마리의 대조군을 사용하였으며, 이들에는 처음부터 일반사료와 발암제가 첨가되지 않은 수돗물만을 공급하였다.

일반 조직검사

실험동물의 경추를 탈골시키고 개복한 다음 방광내에 10% 중성포르말린을 주입한 후 충만 상태로 방광을 절제하였다. 고정된 방광을 종으로 2등분한 뒤 육안적으로 형태학적 변화를 관찰한 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매조직을 만들어 5 μ m 두께로 박절하여 hematoxylin eosin염색을 실시하여 광학현미경에서 관찰하였다. 방광병변의 형태학적인 판정은 Ito 등¹⁴의 다음과 같은 판정기준에 따랐다(Table 1).

- (1) 요로상피 과형성: 방광팽만 상태에서 방광상피에 수직인 절면의 세포층수가 국소 또는 미만성으로 4층 이상이고 세포극성은 보존되어 있는 경우를 상피세포 증식으로 판정하였다.
- (2) 요로상피 유두종: 세포층이 4층 이상으로 증식 양상이 결절 또는 섬유혈관성 간질을 가지는 유두모양 증식을 하고, 세포학적으로 핵은 정상보다 크고 불규칙한 염색질을 가지며, 유사분열은 드물고 세포극성은 약간만 소실되는 경우를 유두종으로 판정하였다.
- (3) 요로상피암종: 세포층이 6층 이상으로 세포의 크기와 염색상이 다양해지고, 유사분열이 증가하며, 세포극성이 소실되는 것을 암종으로 하였다. 또한 암세포들이 증식 하지

Table 1. Histological classification of rat urinary bladder lesions during carcinogenesis

1) Normal urothelial epithelium
2) Simple hyperplasia with or without squamous metaplasia
3) Papilloma
4) Urothelial cell carcinoma with or without squamous metaplasia
- Superficial
- Invasive

만 기저막 아래로 침윤하지 않는 경우를 표재성 암종으로 하였고, 암세포가 점막의 기저막을 뚫고 점막고유층이나 근층으로 침범해 들어가는 것을 침윤성 암종으로 판정하였다.

면역조직화학적 염색

파라핀 포매조직을 4-5 μm 두께로 박절하고 크실렌으로 5분간 3회의 탈파라핀 과정을 거친 후, 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 그 후 내인성 과산화 효소의 활성을 억제하기 위해 0.5% hydrogen peroxide에 10분간 처리한 후 증류수로 세척하고, 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수세한 다음 비특이성 반응을 제거하기 위해 30분간 염소혈청으로 처리하였다. 그 다음 여분의 용액을 제거하고 일차항체인 Cyclins (D1, E and A) (Neo Markers Co, Fremont, USA., mouse monoclonal, 1:50)과 Cyclin B1 (Santa cruz Co, Santa cruz, USA, mouse monoclonal, 1:50)을 실온에서 2시간 작용시켰다. 일차항체 반응 후 TBS로 5분간 3회 수세한 다음 biotin이 부착된 이차항체 (Zymed Co, South San Francisco, USA)에 20분간 작용시켰다. Streptavidin과 결합한 과산화 효소 복합체를 가하여 20분간 반응시킨 후, amino-ethyl carbazol로 발색하고 Mayer hematoxylin으로 대조염색하여 글리세린으로 봉입하였다. 면역조직화학적 염색반응의 음성 대조군은 일차 항체를 처리하지 않고 음성대조 시약으로 대체한 방광조직을 이용하였다. 관찰 방법은 1,000개의 세포 중 핵에 진하게 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 판정하고 백분율로 표시하였다.



Fig. 1. A rat bladder treated with BBN for 20 weeks shows multiple papillary tumors with thickening of bladder wall.

통계학적 분석

실험적 방광암 발생과정에서의 cyclin 계열 단백질의 발현율을 알아보기 위해 one-way ANOVA, t-test, 그리고 Fisher's exact test를 이용하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

방광병변의 육안적 소견

흰쥐에 5% BBN을 투여한 후 방광의 육안적 변화를 5주마다 30주 동안 관찰하였다. 실험 10주 후에는 미세한 과립성 병변이 방광바닥에서 일부 관찰되었으나 뚜렷하지는 않았다. 이러한 변화는 시간이 경과하면서 점차 뚜렷해졌고, 실험 20주 후에는 방광벽의 비후를 일으키며 유두모양의 증식을 보이는 암종이 발생되었다(Fig. 1). 실험 30주 후에는 일부에서 암종이 진행하여 방광벽을 침범하는 소견이 관찰되었다.

조직학적 소견

대조군

30주까지의 대조군에 대한 소견은 정상적인 방광의 소견으로 2-3층의 균일한 두께의 세포층을 보였다. 일부에서는 미약한 염증세포의 침윤을 보였으나 그 외에는 특기할 만한 소견이 없었다(Fig. 2A).

실험군

0.05% BBN 투여 후 5주군 모두(10/10)에서 과형성이 관찰되었으며, 방광암의 전단계인 유두종(Fig. 2B)은 10주군에서는 40% (4/10)에서, 15주군은 80% (8/10)에서 관찰되었다. 또한 20주 후에는 30% (3/10)에서 표재성 방광암종이 발생하였고(Fig. 2C), 30주 후에는 실험군 10마리 모두에서 방광암종이 관찰되었는데, 그 중 4예(40%)에서는 방광벽 전체를 침범하는 침

Table 2. Histological changes of the urinary bladder in rats treated with 0.05% BBN

Observation period	No. of rats	No.(%) of rats with			
		Hyperplasia	Papilloma	UCA (S)	UCA (I)
5 weeks	10	10 (100%)	-	-	-
10 weeks	10	6 (60%)	4 (40%)	-	-
15 weeks	10	2 (20%)	8 (80%)	-	-
20 weeks	10	-	7 (70%)	3 (30%)	-
30 weeks	10	-	-	6 (60%)	4 (40%)

UCA (S), urothelial carcinoma, superficial; UCA (I), urothelial carcinoma, invasive.

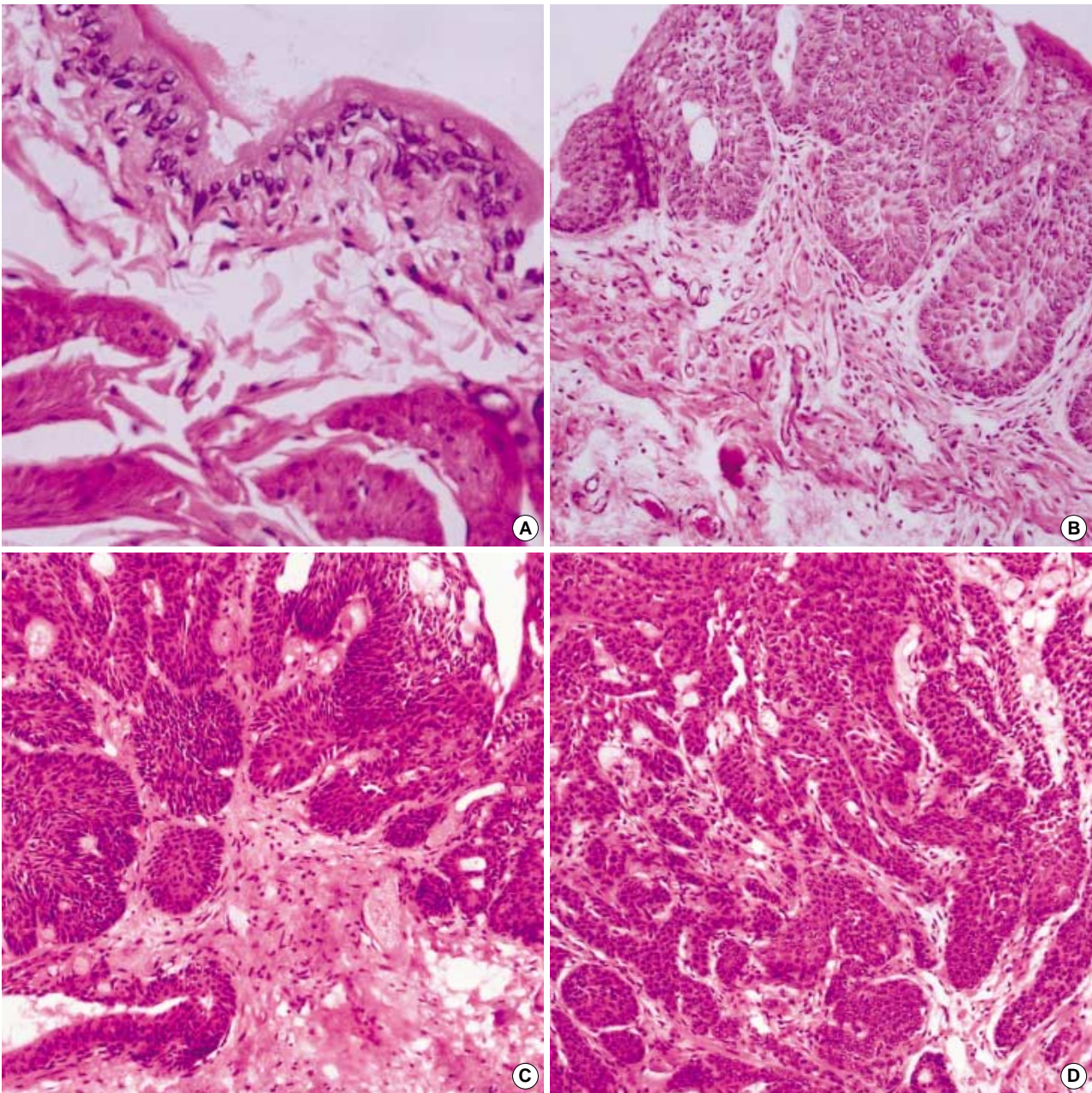


Fig. 2. (A) Normal urinary bladder, (B) papilloma, (C) superficial urothelial carcinoma and (D) invasive urothelial carcinoma. (A-D) Histologic features of the rat urinary bladder treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine.

윤성 암종이었다(Fig. 2D, Table 2).

면역조직화학적 염색에 의한 Cyclin D1, A, E, 그리고 B1 단백질 발현양상 (Table 3, Fig. 3)

Cyclin D1, A, 그리고 Cyclin E 발현은 핵에 국한되어 있었으나, cyclin B1은 일부 침윤성 증양세포에서 핵과 세포질 모두에서 발현되었다. 각 병변에서 cyclin 단백질의 발현은 대조군에서는 거의 발현되지 않았고(Fig. 4A), 실험군에서는 일반적으로 모

두 증가하였으나 증가하는 양상은 다르게 나타났다. Cyclin D1 발현율은 과형성, 유두종(Fig. 4B), 표재성 및 진행성 암종(Fig. 4C)으로 진행할수록 순차적으로 증가하였다($p < 0.01$). Cyclin A의 발현율은 정상 요로상피에서 $0.3 \pm 0.52\%$, 요로상피 과형성에서 $1.3 \pm 0.92\%$, 유두종에서 $2.88 \pm 1.17\%$ 로 발현이 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았다. 그렇지만 표재성 및 진행성 암종에서는 각각 $10.9 \pm 4.63\%$ 와 $23.7 \pm 5.70\%$ 로 암종으로 진행할수록 유의하게 높았다($p < 0.01$). Cyclin B1은 정상상피에서는 거의 발현되지 않았다($< 0.1\%$). 그 뿐만 아니라 BBN

Table 3. Expression ratio of cyclin D1, A, B1 and E in the urinary bladder lesions of rats during 0.05% BBN-induced carcinogenesis

Histologic type	Number	Cyclin D1 (%)	A (%)	B1 (%)	E (%)
Normal	10	1.2±0.95	0.3±0.52	<0.1	0.4±0.31
Hyperplasia	18	10.7±2.51	1.3±0.92	0.4±0.21	3.2±2.01
Papilloma	19	19.3±6.33	2.88±1.17	0.5±0.17	4.5±2.52
UCA (S)	9	34.0±2.47	10.9±4.63 ^a	0.6±0.37 ^b	4.83±0.18
UCA (I)	4	67.5±5.33	23.7±5.70	18.7±4.08	23.4±8.93
p-value		<0.01	^a <0.01	^b <0.01	^c <0.01

UCA (S), urothelial carcinoma, superficial; UCA (I), urothelial carcinoma, invasive. ^aThe cyclin A expression ratio of UCA (I) was significantly higher than that observed in UCA (S). ^bThe cyclin B1 expression ratio of UCA (I) was significantly higher than that observed in normal, hyperplasia, papilloma, and UCA (S). ^cThe cyclin E expression ratio of UCA (I) was significantly higher than that observed in normal, hyperplasia, papilloma, and UCA (S).

투여로 발생된 요로상피 과형성, 요로상피 유두종, 그리고 표재성 암종에서의 발현도 거의 미미하였다. 그러나 침윤성 암종에서는 18.7±4.08%로 발현율이 통계적으로 유의하게 높았다 (Fig. 4D, p<0.01). Cyclin E는 정상 방광상피에 비하여 과형성, 유두종, 그리고 표재성 암종에서 발현율이 증가하였으나, 서로 간의 통계적인 유의성은 없었다. 그렇지만 침윤성 암종에서는 23.4±8.93로 통계적으로 유의하게 높았다(p<0.01).

고찰

화학적 발암물질에 의한 세포의 암화과정은 매우 역동적인 과정으로 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression) 등의 다단계로 구분된다. 이렇게 악성으로 형질 전환된 세포군을 형태학적으로 정확하게 판정하기는 어렵다. 그러나 BBN 투여로 유발시킨 방광암의 경우 단순증식과 전암성 병변으로 인정되고 있는 유두모양의 증식병변인 유두종 등의 과정을 거쳐 인체에서 발생하는 표재성 방광암과 유사하게 요로상피 암종이 발생되며, 이후에는 급격히 침윤성 암종으로 진행된다.¹⁵ 본 연구에서도 0.05% BBN 투여 후 5주에서부터 단순증식인 과형성이 관찰되었으며, 10주 이후부터 유두종이 관찰되었다. BBN 투여 20주 이후에는 표재성 방광암종이 관찰되었고, 30주 이후에는 방광의 전벽을 침윤하는 침윤성 암종이 관찰되었다.

BBN을 투여하는 방법에는 실험동물 위에 직접 주입하는 방법이 BBN의 투여량을 균등하게 할 수 있다는 점에서 가장 이상적이지만, 이 경우 실험동물 수와 기간에 따라 현실적으로 제한이 있다. 본 연구에서는 실험동물을 한 우리에 3마리씩으로 제한하여 30주 동안 수돗물에 BBN을 희석하여 자유롭게 마시게 한 결과, 각 실험동물의 하루 수분 섭취량이 거의 동일하였다. 따라서 실험동물 간의 BBN 투여량에 따른 오차의 범위는 무시하

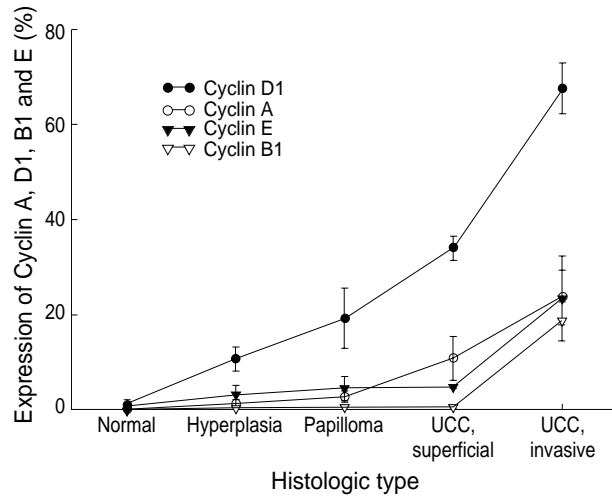


Fig. 3. Comparison of expression rates of cyclin D1, A, E, and B1 among the various lesions in the rat urinary bladder during BBN-induced carcinogenesis.

여도 될 것으로 생각되었다.

세포주기 조절인자에 대한 연구로 정상 세포 주기의 조절 붕괴가 암 발생의 중요한 과정이라고 알려졌고, 실제로 세포주기 조절에 관여하는 여러 구성 성분의 이상이 여러 형태의 인체 종양에서 보고되어 있다.¹⁷ 이러한 세포주기 조절인자의 조절 이상 발현(deregulated expression)은 염색체 전이, 증폭, 전사 후 과정에서의 이상 등에 의해 발생된다.¹⁸ 세포주기 진행과정에서 G1/S 이행 단계가 가장 중요한데, 이 단계에서 특정하게 작용을 나타내는 G1형의 cyclin에는 cyclin D1, cyclin E 그리고 cyclin A가 대표적이다. 이 중 cyclin D1은 종양원성 유전자로 알려져 있는데 이는 cyclin D1 단백질이 변이 혹은 조절붕괴 되면서 제어할 수 없는 세포증식을 유발하기 때문이다.¹⁹ Hinds 등²⁰은 cyclin D1의 cDNA 클론을 세포내로 핵산전달감염 시키면 cyclin D1 유전자가 종양유전자를 보충하게 되는 것을 확인하고, cyclin D1은 보조적으로 작용하는 종양유전자라 기술하였다. 본 연구에서 실시한 정상 방광조직에서 cyclin D1 단백질은 1.2%에서 발현되었으나 과형성에서는 10%로 발현이 증가하였다. 이와 같이 반응성 병변인 과형성에서 cyclin D1이 증가하며, 관찰되는 세포도 주로 기저층에서 집중되는 점으로 미루어 cyclin D1의 발현은 증식하는 세포의 한 성질이라고 생각되었다. 그렇지만 전암성 병변인 유두종에서는 16%, 표재성 방광암에서는 발현율이 26%로 증가하였고, 특히 침윤성 암종에서는 66%로 현저하게 증가한 점으로 미루어, cyclin D1은 흰쥐의 방광암 발생 과정에서 종양 발생의 초기뿐만 아니라 종양이 형성된 후 침윤성 암종으로 진행되는 데에도 영향을 미칠 것으로 추정할 수 있다. 이와 비슷한 결과로서 Shamma 등²¹은 외과적으로 절제된 식도암 병변에서 cyclin D1이 이행성증에서는 정상 상피세포에서와 비슷하게 발현되나, 암종에서는 발현이 현저하게 증가하는 것을 관찰하고, cyclin D1은 발암과정의 초기단계보다 악성으로

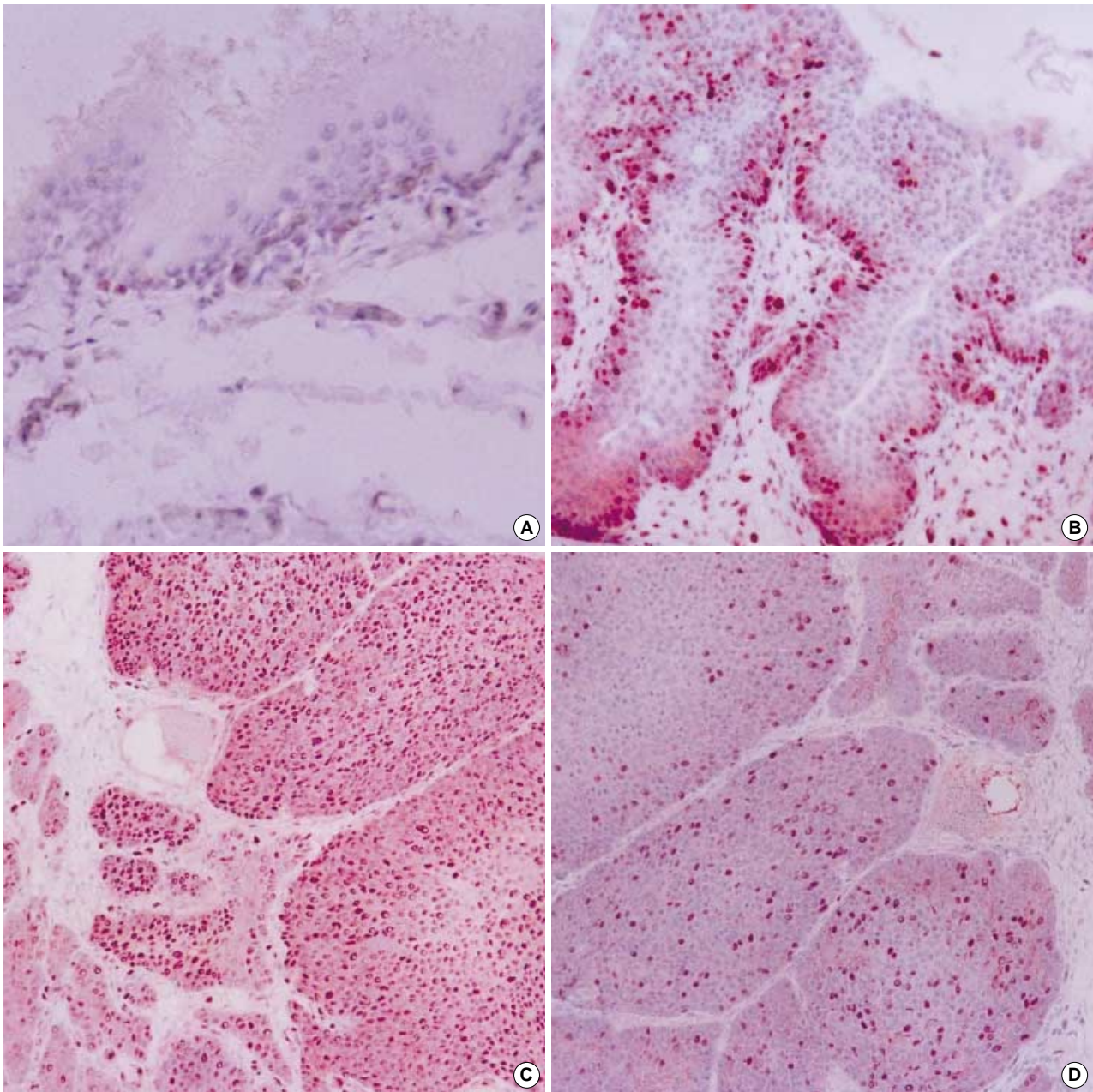


Fig. 4. Immunohistochemical stainings for various cyclins. (A) Epithelial cells of the normal bladder mucosa are almost negative for cyclin B1. (B) In the papillary hyperplastic bladder, epithelial cells of the proliferative basal layer express cyclin D1. (C, D) Cyclin D1 (C) is more frequently expressed in the tumor cell nuclei than cyclin B1 (D) in the invasive urothelial carcinoma.

의 형질 전환이 일어나는 후기 단계에서 집중적으로 조절 이상이 발생된다고 보고하였다. 그렇지만 Shin 등⁹은 방광의 표재성 요로상피암중에서 조기재발과 cyclin D1 단백질의 과발현에 관한 연구를 통해, 종양의 국소재발과는 관련이 있으나 종양의 침윤성과는 무관하다고 하였다. Sgambato 등²²은 오히려 방광암에서 cyclin D1의 발현 저하가 종양의 악성도를 나타내는 고위험군에서 공통적으로 나타나기 때문에, 예후인자로서 가치가 있다는 상반된 보고를 하였다. 따라서 cyclin D1 단백질 발현과 종양의 발생

및 예후와의 관련성은 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각한다.

한편, G1기 cyclin으로 분류되는 세포주기 단백질 중 cyclin E는 G1기 말기에 발현되어 DNA 복제를 유도한다. 또한 Cyclin A는 G1/S기에서 다른 cyclin보다는 상대적으로 짧은 순간에 급격히 증가한다. 따라서 세포주기 과정에서 cyclin E와 cyclin A가 분해되지 않고 비정상적으로 높은 농도를 가지고 있을 경우, 무절제한 세포증식으로 종양발생과정에 관여한다고 알려져 있다.¹⁰ Shamma 등²¹은 외과적으로 절제한 식도암 조직표본에서 cyclin

E의 발현은 정상 상피에서 6%였으나, 이형성증에서 18%, 그리고 암중에서는 통계적으로 유의하게 56%의 발현을 보여 중앙발생과정에서 지속적으로 cyclin E의 발현이상을 보고하였다. 또한 Jiaqing 등²³은 조기위암에서 cyclin E의 과발현은 중앙의 침윤 정도와 더불어 p53 유전자의 발현 빈도와 연관성이 있으며, 조기위암의 진행성 위암으로의 진행가능성에 대한 예측인자로 사용될 수 있다고 하였다. 그렇지만 유방암중에서는 cyclin A 과발현은 유방암에서 중앙의 진행이나 전이와 관련이 있어 불량한 예후인자로 작용하지만, cyclin E는 상관관계가 없다는 보고도 있다.²⁴ 따라서 cyclin E와 A의 과발현의 생물학적 의미는 중앙의 유형에 따라 다르다고 생각되었다. 본 연구에서 cyclin E의 발현은 방광암 발생과정에서 관찰된 과형성에서 3.2%, 유두중에서 4.5%, 표제성 암중에서는 4.8%의 발현을 보여 전암단계 병변과 차이가 없었으나, 침윤성 암중에서는 23.4%에서 관찰되었다. 또한 cyclin A는 과형성에서 1.3%, 유두중에서 2.9%, 표제성 암중에서 10.9%, 그리고 침윤성 암중에서는 23.7%의 발현을 보였다. 따라서 cyclin E는 발암과정에서 암중의 형성보다는 암중 발생후 침윤성 암중으로의 형질전환에 주로 관여하며, cyclin A는 발암과정에서 암중의 형성과 진행에 관여하는 것으로 생각되었다.

DNA가 복제되는 S기에서 실제 세포분열이 일어나기 위한 M기로 진입하기 위해서는 G2기의 cyclin이 중요한 역할을 한다. Cyclin B1은 세포주기의 G2-M기 이행에 주 역할을 하는 조절단백으로, 정상적으로는 일정 작용 후 유비키틴에 의존하여 파괴된다.⁵ 따라서 조절이상으로 인한 지속적인 cyclin B1의 발현은 세포주기의 반복을 의미하며, 중앙발생과정에서 악성중앙으로의 형질전환에 중요한 표지인자로서까지 강조되고 있다.²⁵ 이렇게 중앙세포내 cyclin B1의 발현 증가는 조절 이상으로, cyclin B1이 세포주기의 G2/M기가 지나서도 지속적으로 발현되거나, 또는 cyclin B1 단백질의 생성 후 분해되는 과정에 문제가 발생할 것으로 생각된다. 본 연구에서 cyclin B1은 정상 대조군, 과형성 그리고 유두중에서 거의 발현되지 않았으나(<1%), 침윤성 암중에서는 18.7%의 발현을 보였다. 따라서 cyclin B1은 BBN에 의한 흰쥐의 방광암 발생과정에서, 암발생의 초기보다는 침윤성 암중으로 진행된 경우에 증가한다. 이러한 결과는 Nozoe 등²⁶이 식도의 상피세포암중에서 핵내의 cyclin B1은 침윤성 암중에서 과발현되며 세포의 증식능과 비례 한다는 보고와 부합되는 소견이다. 그렇지만 Geddert 등²⁷은 바렛 식도의 화생-이형성-선암중의 연속적 단계에서 cyclin B1이 주로 초기에 발현된다고 하여 본 연구와 상반되었다. 이러한 차이는 적용 장기, 중앙의 유형, 그리고 면역조직화학염색에 사용한 항체의 차이 등에 의해 생길 수 있다고 판단된다. 또한 본 연구에서 침윤성 암중의 일부에서 cyclin B1이 세포질에서도 과발현되었으나, 세포질에서 발현은 non-mitotic phase이고 오직 mitotic phase에서는 핵에만 발현된다는 Kawamoto 등²⁸의 보고를 고려하면 의미를 부여할 수 없었다.

결론적으로 본 연구에서 cyclin D1과 일부 cyclin A는 중앙발생의 초기부터 지속적인 조절 이상이 관찰되며, cyclin E와 cyclin B1은 표제성 암중에서 침윤성 암중으로 형질전환하는 데에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 각종 중앙 연구에서 세포주기 관련인자인 각종 cyclin 발현을 계수해 이들의 의의를 규명해 나가면, 방광암의 생물학적 성상의 이해에 기여할 수 있을 것이다.

참고문헌

- Pitot H, Sirica AE. The stage of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1976; 605: 191-207.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.
- MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependant kinase and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Cit Rev Eukaryot Gene Exp* 1995; 5: 127-56.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1995; 274: 1672-7.
- Pines J, Hunter T. The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 1994; 13: 3772-81.
- Muller D, Millon R, Lidereau R, et al. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 294-9.
- Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. *Human Pathol* 1999; 30: 1001-3.
- Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumors of the bladder. *Oncogene* 1991; 6: 789-95.
- Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer* 1997; 75: 1788-92.
- Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP, Knickerbocker CJ, DeCaprio JA, Keyomarsi K. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15215-20.
- Brecot C. Oncogene activation of cyclin A. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 11-8.
- Athar M, Kim AL, Ahmad N, Mukhtar H, Gautier J, Bickers DR. Mechanism of ultraviolet B-induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 107-11.
- Abel PD. Prognostic indices in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1988; 62: 103-9.
- Ito N, Hiasa Y, Tamai A, Okamijima E, Kitamura H. Histogenesis of

- urinary bladder tumors induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in Rats. *Gann* 1969; 60: 401-10.
15. Fukushima S, Hirose M, Tsuda H, *et al.* Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 1976; 67: 81-90.
 16. Cohen SM, Wittenberg JF, Bryan GT. Effect of avitaminosis A and hypervitaminosis A on urinary bladder carcinogenicity of *N*-4-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formide. *Cancer Res* 1976; 36: 2334-39.
 17. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumor cell lines. *Oncogene* 1994; 9: 707-18.
 18. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67-108.
 19. Motokura T, Arnold A Cyclins and oncogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1155: 63-78.
 20. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 709-13.
 21. Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, *et al.* Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 16: 261-6.
 22. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, *et al.* Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: Its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2000; 97: 671-8.
 23. Jiaqing L, Hokita S, Xiangming C, *et al.* Role of cyclin E and p53 expression of early gastric cancer. *Gastric Cancer* 1998; 1: 160-5.
 24. Bukholm IR, Bukholm G, Nesland JM. Overexpression of Cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 283-7.
 25. Toyoshima F, Moriguchi T, Wada A, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J* 1998; 17: 2728-35.
 26. Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, Ohga T, Saeki H, Sugimachi K. Significance of cyclin B1 expression as an independent prognostic indicator of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 817-22.
 27. Geddert H, Heep HJ, Gavbbert HE, Sarbia M. Expression of cyclin B1 in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Cancer* 2002; 94: 212-8.
 28. Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: Immunocytochemical and quantitative image analysis. *Am J Pathol* 1997; 150: 15-23.