Changes of Plasma Levels of Antioxidative Vitamins and its Clinical Significance in Uterine Cervical Neoplasia of Korean Women

Jae Wook Kim, M.D., Eun Kyoung Choi, M.D.*, Young Tae Kim, M.D.,
Dong Kyu Kim, M.D., Soo Yeon Kim, Ph.D.+,
Hae Yeon Chung, Ph.D.+, Yang Cha Lee-Kim, Ph.D.+

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Yonsei University *
Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, PoChun Cha University+;
Department of Food & Nutrition, Yonsei University+

Objectives: Several lines of epidemiological studies have demonstrated a relationship between high intake of foods rich in antioxidant nutrients such as, carotenoids, tocopherols, and vitamin C and a reduced risk of cervical cancer but no available study was performed in Korea ever since. The purpose of this study was to investigate the plasma levels of antioxidant vitamins between cervical neoplasia patients and normal control, to observe the relationship between the level of plasma antioxidant system and various clinicopathological factors of cervical cancer and to evaluate the value of prognostic factors.

Patients and Methods: A cross-sectional sample of 180 women including 90 normal control specimens was recruited from Nov. 2000 to Jan. 2001 at YUMC. Plasma levels of antioxidant vitamins were analyzed by reverse-phase high pressure liquid chromatography and and these results were correlated with various clinicopathological factors of cervical cancer.

Results: Plasma levels of antioxidant vitamins such as lutein, β-carotene, lycopene and zeaxanthin were significantly lower in women with CIN and cervical cancer compared to those levels of control. However, in terms of comparison between CIN and cervical cancer, only the level of α-tocopherol showed significant differences. The changes in plasma levels of antioxidant vitamins showed no significant correlation with the prognostic factors of cervical cancer.

Conclusions: These findings suggest a potential protective role of plasma antioxidative vitamins in the pathogenesis of CIN and carcinoma of the cervix. But these changes neither could
distinguish the causal relationships nor could show a significant correlation between several antioxidant vitamins with the prognostic factors of cervical cancer. Further researches are needed to clarify the mechanism of the protective effect.

key words : cervical neoplasia, antioxidant vitamins

I. 서 론

자궁경부암은 우리나라에서 가장 높은 여성생식기 암이자 전체 여성의 암 중에서 약 12%를 차지하는 중요한 종양으로 1999년 보건복지부 중앙암 등록사업 연례 보고서에 의하면 1년에 약 4,000명의 새로운 환자가 발생하고 있는 국민보건상 매우 중요한 질병이다.1

현재 자궁경부암의 발생に関して는 인유두종 바리亞스에 의한 성적 접촉성 감염물질 모델이 가장 널리 인정되고 있으나2 이의 발생과 진행에는 흡연이나 영양상태 등의 여러 가지 인자들이 개입되는 것으로 밝혀지고 있다. 대체로 자궁경부암은 사회경제적으로 낮은 계층 및 개발도상국에서 더 많이 발생하는 것으로 알려져 있으며 비타민 A, 카로틴, 염산, 비타민 C등이 자궁경부암의 발생에 있어서 보호적인 역할을 한다는 주장이 단편적으로 제기되었으나 주목을 받지 못했던 중 최근 들어 산소스트레스 및 항산화, 영양상에 관한 관심이 높아지면서3-7 이 분야의 연구가 활기를 띄게 되었다.3

영세 내에서는 일상생활 중 풍부하게 섭취되는 큰 활성 산소화합물 (reactive oxygen species, ROS) 혹은 활성 질소화합물 (reactive nitrogen species, RNS)이 불가피하게 생성되며 이들은 세포내의 DNA나 기타 핵산 등을 반응하여 산화적 손상 및 변이를 유발함으로써 종양의 발생에 관여하는 치명적인 돌연변이를 야기할 수 있는 것으로 알려졌다. 이 러한 산화촉진물 (pro-oxidants)에 반해 항산화 비타민은 산화촉진물질을 제거하는 스케이저 역할을 하여 핵산의 산화적 손상을 방지하며 나아가 종양의 발생을 낮추는 것으로 보고되고 있다.36

개발도상국이나 빈곤계층에서 자궁경부암이 많은 것은 아마도 식이 내 치명의 양 및 자유기온 비타민의 섭취 및 홍수량과 관계 있는 것으로 보이며 1999년 Nagata등이 156명의 일본여성을 대상으로 한 연구에서 혈장 내 알파 카로틴이 자궁경부 상피내 증양에 대해 보호적 효과를 가진다고 한 것은 우리나라 식생활이나 인종 및 DNA구조가 유사한 일본 여성에 대한 연구로서4-10 어느 정도 참고할 가치가 있다고 본다. 그러나 아직까지 한국 여성의 자궁경부암 환자들의 혈중 항산화 비타민 농도에 대한 연구는 보고된 바 없으며 이것이 정상 여성의 경우와 어떻게 다를지, 나아가 이들이 자궁경부 상피내 종양의 진행이나 침윤성 자궁경부암의 예후와 어떤 관계를 가지는지에 대한 연구결과는 아직 찾아볼 수 없다.

이에 자궁경부 상피내 종양과 침윤성 자궁경부암 환자에서의 혈장 내 항산화 비타민의 농도를 알아보아 정상여성에서의 경우와 비교하여 차이가 있는지 조사하고 또한 자궁경부암 환자에서의 임상적 예후 인자와는 어떻게 관련이 되는지 연구하려는 목적이 있으며 이 연구를 위한 연구계획을 수립하고 실시하여 결과를 보고하고자 하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 연구대상

2000년 11월 1일부터 2001년 1월 31일까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스병원 신부인과에서 조직학적 검사를 통해 침윤성 자궁경부암 및 자궁경부 상피내 종양으로 진단받은 환자 90명을 대상으로 하였다. 대상 환자들은 모두 질환대처 자궁경부조직검사에 의해 조직학적으로 진단받았으며 침윤성 자궁경부암으로 진단받은 환자들은 이후에 병기결정을 위한 기초검사를 시행하며 병기를 결정하고 수술 또는 방사선을 통하여 치료하였다.
일기관동안 양성 자궁병변으로 자궁적출술을 받은 후 조직학적으로 자궁경부에 이상이 없는 여성 90명의 혈액을 같은 방법으로 채취, 처리하여 대조군으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 검체의 분리

환자 및 대조군 모두 공복상태에서 청원을 통해 체험하였으며 항산화 영양소의 과다를 최소화하기 위해 음식을 이용하여 차분한 상태로 체험 후 1시간 내내 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 검체온도는 -70℃에서 냉동보관 하였다.

2) 항산화 비타민 농도 측정

혈장내의 지생성 항산화 비타민인 α-tocopherol, γ-tocopherol, β-carotene, lycopene, cryptoxanthine, zeaxanthine 및 lutein의 농도를 다음과 같은 방법을 통하여 측정하였다. 200μl의 혈장에 chloroform과 methanol의 비율이 2:1로 된 용액과 0.9% NaCl을 가한 후 1분간 vortex하여 4℃, 2500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이 때 retinyl acetate를 internal standard로 사용하였다. 원심분리 후 chloroform층을 취하여 후드가 장착된 쌍방기내에서 nitrogen으로 chloroform을 휘발시키고 동시에 aqueous 층은 1g/l의 hexane를 가하여 vortex한 후 4℃, 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 hexane층을 chloroform extract에 더하고 중량기 내에서 nitrogen으로 회합하였다. 150μl ethanol로 재주입시킨 extract 50μl를 HPLC system에 주입하였고 수용성 항산화 비타민인 ascorbic acid 분석은 0.75M metaphosphoric acid로 채혈 당일에 분리한 PRP 혈장의 단백질을 제거한 후 2.4-dinitrophenylhydrazine method를 이용하여 HPLC system으로 분석하였다. 이 모든 실험과정은 자원성 이 차단된 상태에서 실시하였다.

가. HPLC system

HPLC system은 reverse phase system으로서 2개의 waters 510 pumps(Waters, Milford, MA), WISP 710 autosampler, Waters 991 photodiode array detector, C18 Novapak 3.9 × 15 cm column(Waters, Milford, MA)으로 구성되고 mobile phase는 solvent A(CH3CN : THF : d-H2O= 50: 30: 20)와 solvent B(CH3CN : THF : d-H2O= 50: 44:6)를 이용하였다. Flow rate 는 1.2 ml/min이었으며 gradient procedure는 처음 10분 동안 solvent A에서 solvent B로 100% 전환시키고 그 후 6분 동안 solvent B를 통과시키고 난 후 4분 동안에 solvent A로 100% 전환하였다. 다음 2분 동안 solvent A를 통과시키면서 평형을 유지시켰다. Waters 991 photodiode array detector의 파장을 carotenoid 분석을 위해서는 450 nm, ascorbate 분석을 위해서는 520 nm, 그리고 α-tocopherol, γ-tocopherol 분석을 위해서는 292 nm에서 분석하였다.

다. Peak identification

Ascorbate, carotenoids, α-tocopherol, γ-tocopherol의 peak 규명을 위해서는 이들의 각각의 표준용액을 HPLC로 분석하여 retention time을 구하고 검체물을 주입하였을 때 각각의 retention time에 대응하는 peak를 표준용액을 첨가하여 동일 peak임을 확인하였다.

다. Quantification

혈장의 ascorbate, carotenoids 및 α-tocopherol, γ-tocopherol의 정량을 위해 표준 ascorbate, α-tocopherol, α-tocopherol acetate, γ-tocopherol acetate 및 β-carotene를 동일한 양의 ethanol에 양을 증가시키며 용해시켜 표준용액을 만들었고 각 표준 용액을 HPLC system으로 측정하여 표준곡선을 얻었다. 혈장의 각 비타민 양은 HPLC chromatogram의 peak area와 대응되는 standard의 response factor에 의해 계산하고, 혈장으로부터 비타민의 측출 및 서로의 취급과정에서 소실되는 양은 internal standard인 tocophenyl acetate의 회수율로 보정하였다.

3. 통계학적 분석

통계학적 분석을 위하여 SPSS 9.0 for windows 프로그램을 사용하였으며 대조군 및 자궁경부 상피내증 양자군, 침윤성 자궁경부암 환자군간의 항산화효소 및 비타민 농도의 차이를 검정하기 위하여 independent samples t-test를 적용하였으며 침윤성 자궁경부암의 예후인자와의 관계를 검정하기 위하여 one way ANOVA test 및 independent samples t-test를 적용하였다. 검정은 양측검정을 원칙으로 하였으
원 본 누 락
원 본 누 락
IV. 고찰

자궁경부암은 전 세계적으로 여성암 중에서 2위, 대부분의 개발도상국에서는 여성암 중 1위를 차지하고 우리나라에서도 가장 혼란 여성 생식기 암으로 자궁암에 대한 예방 및 치료차원에서의 연구가 활성화되어야 하는 것이 보건학적 및 예방 의학적으므로 매우 중요한 의미를 지닌다.7 다행히도 자궁경부암은 두었던 전구병변이 존재하고 있으며, 이 전구병변단계에서부터 비교적 긴 기간에 걸쳐 침윤으로 진행할 뿐 아니라 신별검사로 비교적 간단한 자궁경부 세포검 검사를 널리 이용하여 초기에 발견할 수 있고 전량병변에 대한 효과적인 치료가 존재하여 비교적 쉽게 전암병변단계에서 병을 완치할 수 있다. 그러나 만일 이러한 자궁경부암의 초기단을 통한 방법이 아닌, 설치로 자궁경부암을 예방할 수 있는 방법, 즉 자궁경부암의 발병률을 낮출 수 있는 어떤 의학적 및 예방적인 방법이 있다면 이는 국민보건적, 예방의학적 측면에서 매우 바람직한 일이 될 것이며 치료의 의학에서 초기단의 의학적 가치에 의한 의학적 의료의 방향에도 부합하는 일이 될 수 있을 것이다.

인유두종 바이러스의 역할이 자궁경부 상피세포

에서의 종양생성과관에서 필요불가결한 요소라는 주장8은 현재 정설로 받아들여지고 있으나 인유두종 바이러스 감염만으로는 자궁경부암을 초래하지는 못한다. 시아물의 성병관리에 대사는 환자의 프로토키스 연구에서, 인유두종 바이러스에 감염된 환자의 약 28%만이 자궁경부 상피암 종양이 발생하며9 이 결과로 볼 때 다른 인자들, 예를 들어 환경이나 산화적 스트레스 혹은 체내 항산화체계의 약화 등이 인유두종 바이러스 감염상태에서 자궁경부 상피암 종양으로 진행되는 과정을 조절한다는 주장이 가능하다. Potischman 등은 실험내외의 비타민, 특히, carotenoids, ascorbate, retinol 등이 농도가 통계적으로 유의하게 자궁경부암 환자의 혈중에서 정상 대조군에 비해 감소되어 있다고 주장하였으며, 그 밖의 여러 연구들에서도 자궁경부암이나 자궁경부 상피암의 환자의 혈중에서 정상 대조군에 비해 항산화체계에 관여하는 다양한 비타민의 농도가 감소되어 있음을 주장하였다. 그러나 한국여성을 대상으로 항산화비타민의 혈당농도를 비교한 연구는 아직 시도된 바 없었다.

본 연구에서 HPLC system을 사용하여 혈장 농도

를 측정한 항산화비타민은 provitamin A carotenoids

인 β-carotene과 cryptoxanthin, non-provitamin A

carotenoids인 zeaxanthin, lycopene, lutein 및 α-
tocopherol, γ-tocopherol 등의 지속성 항산화비타민

과 수용성 항산화물질인 ascorbate였다. 전체적으로

환자군과 대조군으로 크게 대상군을 나누었을 때, 환자군에서의 항산화체계의 관여하는 비타민의 혈강 농도는 대조군에서의 농도보다 다양한 정도로 감소하는 양상을 보여주었으며 lutein, β-carotene, lycopene, zeaxanthin의 경우는 통계적으로 유의한 차이를 보였다. Pro-vitamin A이면서 자체의 독특한 항산화작용을 나타내는 β-carotene는 세포분화 과정

에 영향을 주어 이상세포가 생기는 것을 막는 것으로 알려졌으나 lycopene이나 zeaxanthin 등의 그 밖의 carotenoids의 항산화 작용에 의한 보호작용 기전에 관해서는 구체적으로 알려지지 않았다. 혈장 lutein 및 α-tocopherol 농도가 Palan 등3이 발표한 바와 같이 U-shaped curve를 보이는 것은 비록 그 차이가 통계적으로 유의한 차이가 아니지만 주목할 만하다. α-tocopherol의 경우도 Potischman 등3을 간

은 소견을 보고한 바 있다. 여러 연구자들의 논문

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tocopherol (mean ± S.D.) (μg/ml)</th>
<th>Ascorbate (mean ± S.D.) (μg/dl)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>α-tocopherol</td>
<td>γ-tocopherol</td>
</tr>
<tr>
<td>8.04±3.06</td>
<td>0.74±0.25</td>
</tr>
<tr>
<td>7.93±2.26</td>
<td>0.79±0.28</td>
</tr>
<tr>
<td>8.65±2.91</td>
<td>0.79±0.64</td>
</tr>
<tr>
<td>7.94±2.85</td>
<td>0.74±0.27</td>
</tr>
<tr>
<td>8.27±3.05</td>
<td>0.88±0.44</td>
</tr>
<tr>
<td>7.92±2.04</td>
<td>0.72±0.31</td>
</tr>
<tr>
<td>8.19±3.18</td>
<td>0.85±0.33</td>
</tr>
<tr>
<td>8.39±3.01</td>
<td>0.82±0.38</td>
</tr>
<tr>
<td>7.79±2.59</td>
<td>0.77±0.31</td>
</tr>
</tbody>
</table>

* 양페이지 Table 3. 오른쪽 이어서*
3,13-14등에 의하면 자궁경부암에서의 영양학적 원인들을 중양형성과정에서 초기에는 영양을 주나 비교적 후기, 또는 침윤성 자궁경부암으로 발전한 다음에는 영양이 그치지 않다고 하였으며, 본 연구의 결과에서도 영양학적 요소들은 대개 정상 대조군에서 자궁경부 상피내 중양에 이르는 단계에서부터 동계적으로 유의한 하강변화가 있었으나 자궁경부 상피내 중양에서 침윤성 자궁경부암으로 진행하는 단계에 있어서는 변화가 미미하였으며 침윤성 자궁경부암의 발생 이전에 선행되어 항산화체계의 변화가 가 있는 것으로 보인다. 또한, 영양학적 요소들은 침윤성 자궁경부암의 예후인자들이동계적으로 유의한 연관관계를 보이지 않아 아직 환자의 생존을 분석이 이루어지지 않은 상태지만 관찰의 예후와 혈장 비타민 d 노르와는 연관관계가 불명확한 것으로 생각된다. 아마도 이 항산화체계에 관여하는 침윤성 비타민들은 지질 과산화물의 chain-propagating lipid peroxyl 및 alkoxyl radical intermediate에 대해 수소 원자를 주어 연쇄반응을 중단시키고 peroxyl 라디컬을 원위의 산화되지 않은 지질로 돌려놓으므로 단백질, 지질 및 DNA에 대한 손상을 방지하고 또한 과산화물에 의한 면역체계의 약화를 방지함으로써 종양생성과정의 초기단계에서의 숙주의 방어를 강화시키는 것으로 보인다.13

이상의 결과는 자궁경부 상피 내 중양 및 침윤성 자궁경부암에서 혈장의 항산화체계에 관여하는 영양소의 수치가 떨어지는 3,13-14등에 의한 연구결과와 일치하나 아직 이 소견이 각각의 영양소의 섭취가 부족한 사람에게서 자궁경부 중양이 잘 발생할 수 있다는 인과관계를 입증할 수는 없다. 바이러스 감염에 의한 영증이나 홍역의 영향, 기타 알려지지 않은 여러 가지 원인에 의해 생겨난 과산화물들이 정상적인 조건에서 다 해독하지 못할 정도로 과량으로 생겨나거나 혹은 항산화체계가 약화됨으로써 체내에서의 pro-oxidation과 anti-oxidation의 균형이 깨져 보다 많은 oxidative stress를 추게 되고 이 과정에서 과산화물의 해독에 관여하는 이들 비타민의 농도가 감소하는 것으로 추측할 수도 있다. Nagata 등4이 retinol이나 carotenoids를 많이 섭취하는 사람과 동계적으로 의미있는 차이는 없는 것으로 하여 그황지 않은 사람에 비해 자궁경부중양이 많이 생기는 경향이 있다고 주장하면서 아마도 환자군에서 혈장 retinol이나 carotenoids가 감소하는 현상은 종양 형성과정에 있어서의 원인이라고 보는 결과일 수 있다고 하였던 것은 이 소견을 뒷받침해 줄 수 있는 주장이다. 자궁경부암 예방에 대한 항산화 비타민 섭취의 효과는 많은 역학 연구17,18 결과에서 보호적인 역할이 있는 것으로 알려졌고 있으나 복합적인 식품이 아닌 정제된 단일 항산화 물질 섭취를 통한 효과에 대한 결론은 복용량을 중심으로 한 충분한 검토가 필요한 분야로 아직까지는 논란의 여지가 많다. 예를들어 Giuliano 등1998년 발표한 바에 따르면 비록 영양학적 복합영양 향자의 혈장에서 발견되지 않지만 현재 시도되고 있던 5개의 영양학적 기본물을 정 phase III chemoprevention 연구 중 topical retinoic acid trial을 제외한 4개는 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다. 이로 이루어 볼 때 아직 자궁경부증강 환자에게 항산화 비타민을 섭취함으로써 치료에 도움을 얻는다는가 versus 첫만적인 항산화 비타민을 투여하면 자궁경부암이 예방될 수 있다는 주장은 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 비록 대조군에 비해 자궁경부증강 환자군에서 항산화체계에 관여하는 침윤성 비타민인 lutein, β-carotene, lycopene, zeaxanthine 등의 카로티노이드계 비타민과 a-tocopherol, v-tocopherol 농도가 동계적으로 의의있는 변화를 보여 자궁경부증강성형성과정에서 혈장 항산화체계의 변화가 어떤 역할을 한다고 생각할 수는 있으며, 혈장내 항산화 비타민은 종양형성의 초기과정에서 ROS 및 RNS에 의한 생체내 macromolecule들을 지방질, 단백질 및 DNA의 손상을 줄여주는 역할을 함으로써 종양에 대해 보호작용을 할 수 있을 것으로 생여되며 이제에 대한 원인-결과 관계의 입증을 위해서는 추후 연구가 필요하고 또한 항산화 비타민이 침윤성 자궁경부암 환자의 예후인자로서 역할을 할 수 있을 것인지에 대하여는 더욱이 많은 예를 중심으로 항산화체계에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.


목적: 몇몇 종류의 조리 및 조제 도구 연구에 의하면 일부의 지용성 비타민 및 비타민 C등이 풍부한 음식을 먹는 것이 자궁경부암에 대하여 보호적인 역할을 한다고 알려져 있으나 아직까지 한국 여성들 대상으로 자궁경부암 환자에서의 혈청 항산화 체계에 대한 연구 및 그 기초가 되는 지용성
비타민에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 정상 여성과 자궁경부 상피내증양이나 침윤성 자
궁경부암과의 비타민 이도의 차이 및 침윤성 자궁경부암의 예후와의 연관성에 대하여 알아보고 이들
의 결과가 추후 독립적인 예후인자로서 가치가 있는지를 평가하고자 본 연구에 착수하였다.

대상환자 및 방법: 2000년 11월에서 2001년 1월에 걸쳐 정상 대조군 90명과 자궁경부증양 환
자군 90명의 혈액을 채취하여 혈청 항산화체계의 변화를 측정하였다. 혈청 항산화 비타민 농도는 HPLC
system을 사용하여 측정하였고 이후 얻어진 결과를 자궁경부암의 예후인자들과 연관시켜 보았다.

결과: Carotenoids 중 cryptoxanthin을 제외한 lutein, β-carotene lycopene, zeaxanthin 등은 정상대
조군에 비하여 자궁경부상피내증양 및 침윤성 자궁경부암 환자군에서 의미있게 감소되어 있는 결과
을 보였다. Ascorbate도 정상대조군에 비하여 자궁경부상피내증양 및 침윤성 자궁경부암 환자에서 낮
은치를 보였으나 통계적인 의미는 없었다. 또한 lutein과 α-tocopherol을 제외한 모든 항산화 비타민
의 평균 혈청농도는 상피내증양에서 보다 침윤성 자궁경부암 환자에서 낮은치를 보였으나 통계적인
의미는 없었다. 오히려 α-tocopherol의 경우에는 침윤성 자궁경부암 환자에서 자궁경부상피내증양 환
자보다 통계적으로 의미있게 높은 치를 보였다.

결론: 자궁경부 상피내증양 및 침윤성자궁경부암과 정상 대조군 사이에서 몇몇 항산화 비타민
의 농도에서 유의한 변화가 관찰되어 자궁경부 증양의 형성과정에서 이들의 변화가 어떤 역할
을 할 것으로 생각되었다. 또한 항산화 비타민과 침윤성 자궁경부암의 예후인자들과는 의미있는 연
관성을 보이지 않았다. 따라서 이들간에 연관성을 입증하여 예후인자로서의 가치를 알기 위해서는 항
산화체계를 비롯한 여러 인자들과 더 많은 환자를 대상으로한 연구가 필요할것으로 생각된다.

중심의어: 자궁경부증양, 항산화 비타민