

결장 직장 악성종양 전이조직의 유전자 특성

계명대학교 의과대학 외과학교실, 외과학 연구소

배 옥 석

= Abstract =

Genetic Characteristics of Metastatic Colorectal Cancer

Ok Suk Bae, M.D.

*Departments of General Surgery, Institute for medical Science
School of Medicine Keimyung University Taegu, 700-310*

Colorectal cancers are characterised by an ability to invade surrounding tissue and form distant metastasis. To study metastatic behaviour of colorectal cancer at molecular genetic level, author has investigated P53 exon5, K-ras codon 12 mutation and nm23H1 gene. Tumor were obtained from either colorectal surgical tissues or biopsies from liver metastasis. Analytical methodologies included PCR-SSCP, PCR amplification with specifically degined primers and Southern blot. It was found that 25% (2 of 8) of the metastatic tumors have K-ras codon 12 mutation, as well as 20% (2 of 10) of them exhibited suspicious loss of heterozygosity of nm23 gene, whereas no mutational changes were detected in P53 exon 5.

This result suggest P53 exon 5 gene may not have direct relation with colorectal cancer metastasis. Further studies are needed to elucidate metastatic behaviour of the colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer, P53 exon 5, K-ras codon 12, nm23H1

서 론

대장 악성종양은 주위조직 또는 원이부에 전이하는 특성이 있다. 종양 조직에 의한 국소 전이는 절제등에 의하여 치유될 수 있으나, 종양 주위 임파선에 또는 원이부임파선이나 간장 폐장 등에 전이가 있을 경우에 항암제 면역제등을 사용하지만 근치가 불가능하며 전이에 의한 사망율이 높다. 종양전이는 종양세포가 원발소에서 조직 장애물을 관통하여 타부위로 이전하는

과정의 기전이 아직 정확히 밝혀지지 않고 주요 연구 대상으로 남아 있다. 저자는 대장암과 관련된 K-ras, P53 exon 5 유전자와 전이 관련유전자 nm23H1 유전자로 전이와 이들 유전자가 관련이 있는지를 연구해 보았다.

연구 대상

1992년 10월부터 1994년 10월까지 본원에 입원하여 결장 직장암으로 수술 받은 환자에서 수술직후에 절제한 종양조직중 원이부 임파선에 전이가 확인된 6예와 간전이 확인된 10예를 대상으로 상용하는 정상조직과 유전자변이를 비교해 보았다.

*본 논문은 1992년도 동산의료원 특수과제 연구비에 의해 이루어졌음.

**본 논문의 요지는 1994년도 추계 대한 외과학회에서 구연되었음.

재료 및 방법

1) 수술직후 절제하여 액체질소 탱크에 보관해둔 대장 정상조직, 종양조직과 간전이조직에서 Blin & stafford 방법으로 DNA를 추출

2) 변형된 primer에 의한 K-ras codon 12 mutation 검색, codon 12번 부위가 HpaII에 의하여 절단될 수 있도록

primers
5' TAA ACT TGT GGT AGT TGG AGC C 3'
5' TCT ATT GTT GGA TCA TAT TC 3'
를 한국생공에 의뢰 제작된 primers를 사용하여 K-ras 유전자를 증폭시킨후 HpaII 제한효소로 37°C에서 절단 후 4% Meta-Phor gel에 전기영동하여 band의 수와 크기로 변이를 검색하였다.

3) PCR-SSCP 방법으로 P53 exon 5변이의 유무를 검색하기 위하여

primers
5' GGA TCC ATC TGT TCA CTT GTG CCC TG 3'
5' GAA TTC AAC CAG CCC TGT CGT CTC TC 3'

를 사용하여 PCR 혼합액을 alpha³²P-dCTP를 혼합하여 만들고 혼합액 9.5 μl와 대상 DNA를 0.5 μl를 넣고 PCR 10 μl중 1 μl에 9 μl의 formamide dye를 첨가 95°C에서 3~5분간 denaturation한 후 열음에 5분간 둔후, 6% polyacrylamide gel에서 4°C로 cooling하면서 전기영동하고 전조시킨 후 autoradiograph를 시행하였다.

4) Southern blot 방법에 의한 nm23H1 유전자 변이 검색

일본의 Nakasaki 대학으로부터 기증받은 recombinant DNA로 부터 nm23H1을 분리하여 탐지자를 제작한 후 정상, 종양, 간전이 조직의 genomic DNA 10 μg을 BglII 제한효소에 24시간 처리한 후 1% agarose gel에 전기영동하고 filter에 이전시킨 후 nm23-H1 probe로 hybridization 하였다.

결 과

1) 간전이조직의 K-ras codon12 변이는 8예중 2예(25%)이었다(Fig. 1).

2) 주위에 전이가 확인된 종양조직 6예에서 P53 exon5의 변이는 없었다(Fig. 2).

3) nm23H1 정상조직, 종양조직과 간전이 조직의

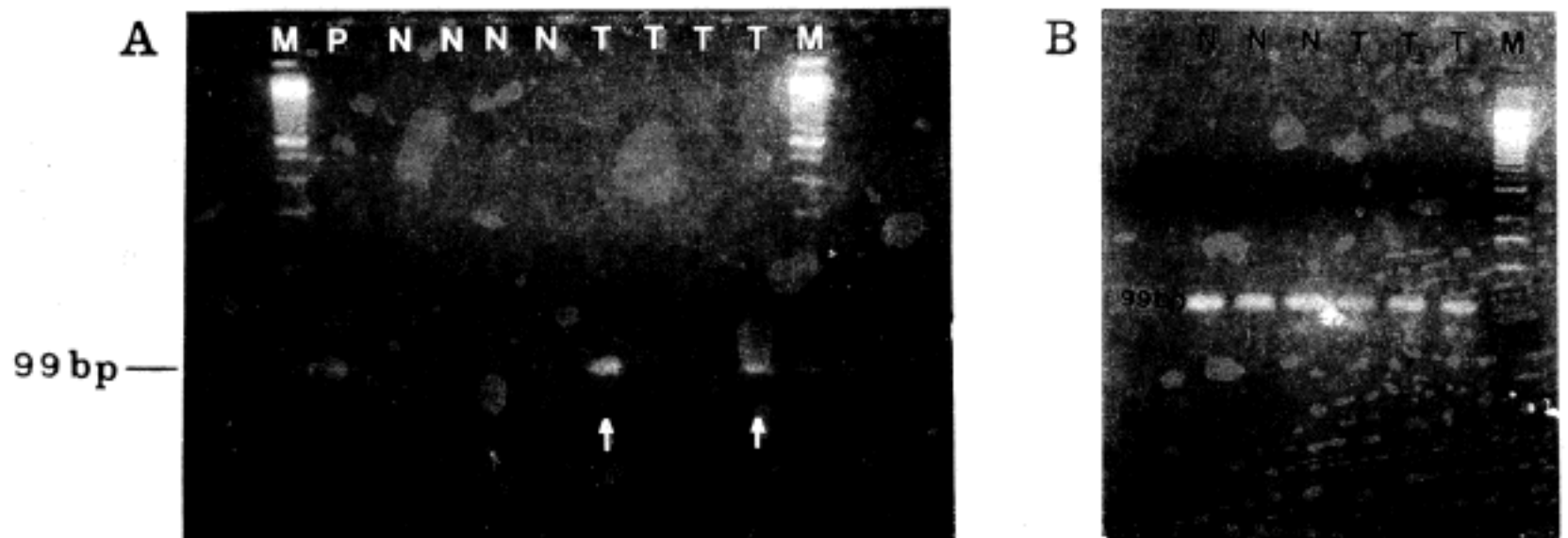


Fig. 1. Screening of metastatic liver tissue for mutant K-ras 12 codon. 1 μg of genomic DNA prepared from colon normal mucosa tissues (N) and metastatic liver tissues (T) was amplified using specifically designed primers.

PCR product was electrophoresed on a 3% Nusieve agarose gel (B).

The amplified product (20 μl) was digested with Hpa II restriction endonuclease and electrophoresed on a 4% meta-Phor gel (A).

P: Control (PCR product) M: 100 Size Marker Arrow: mutation

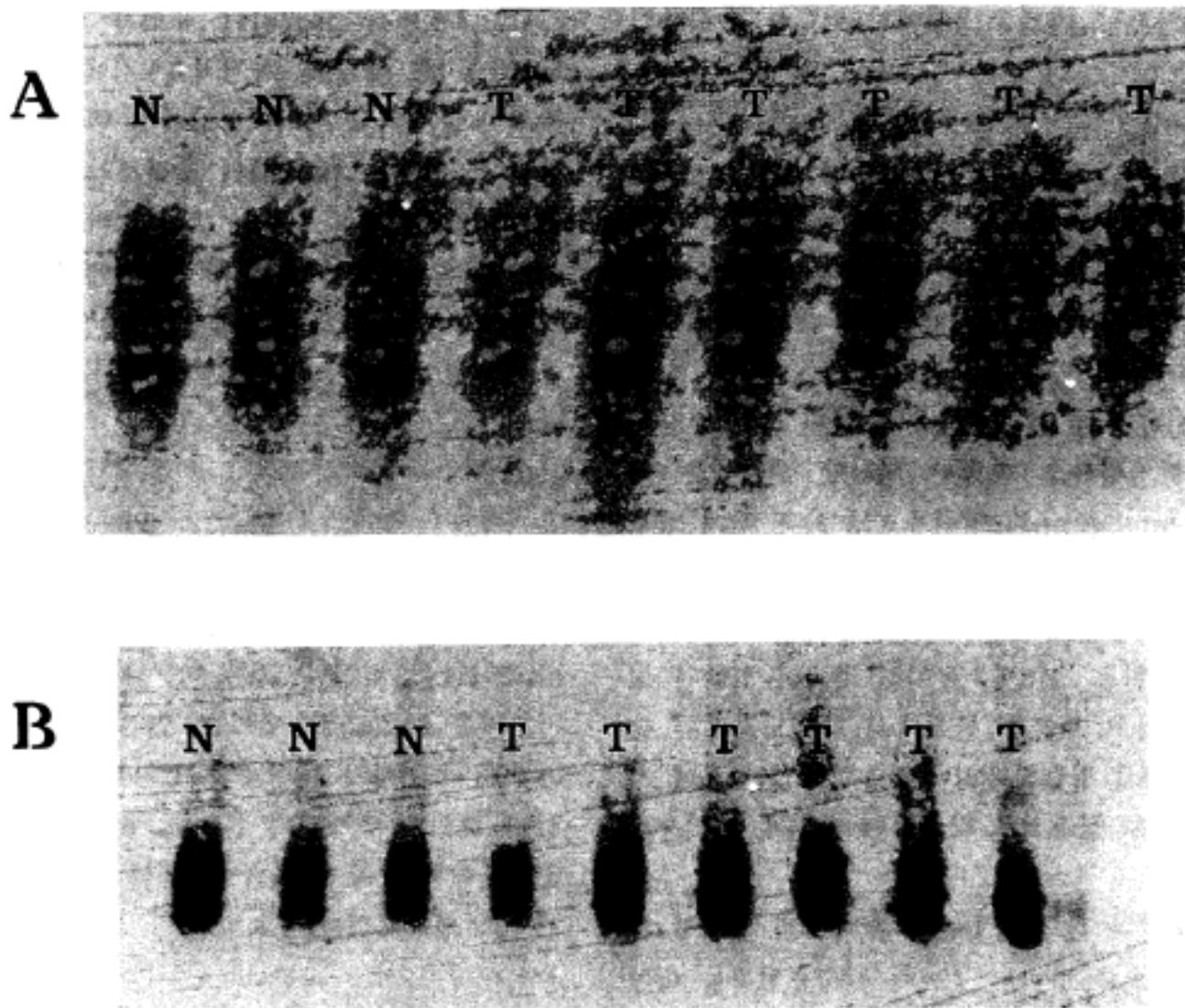


Fig. 2. PCR-SSCP analysis of point mutation in exon 5 of P53 gene. Genomic DNA from colonic normal mucosa tissues (N) and colorectal cancer tissues (T) was subjected to PCR-SSCP analysis. No mutational change in cancer tissues.

A and B are two independent experiments with same samples.

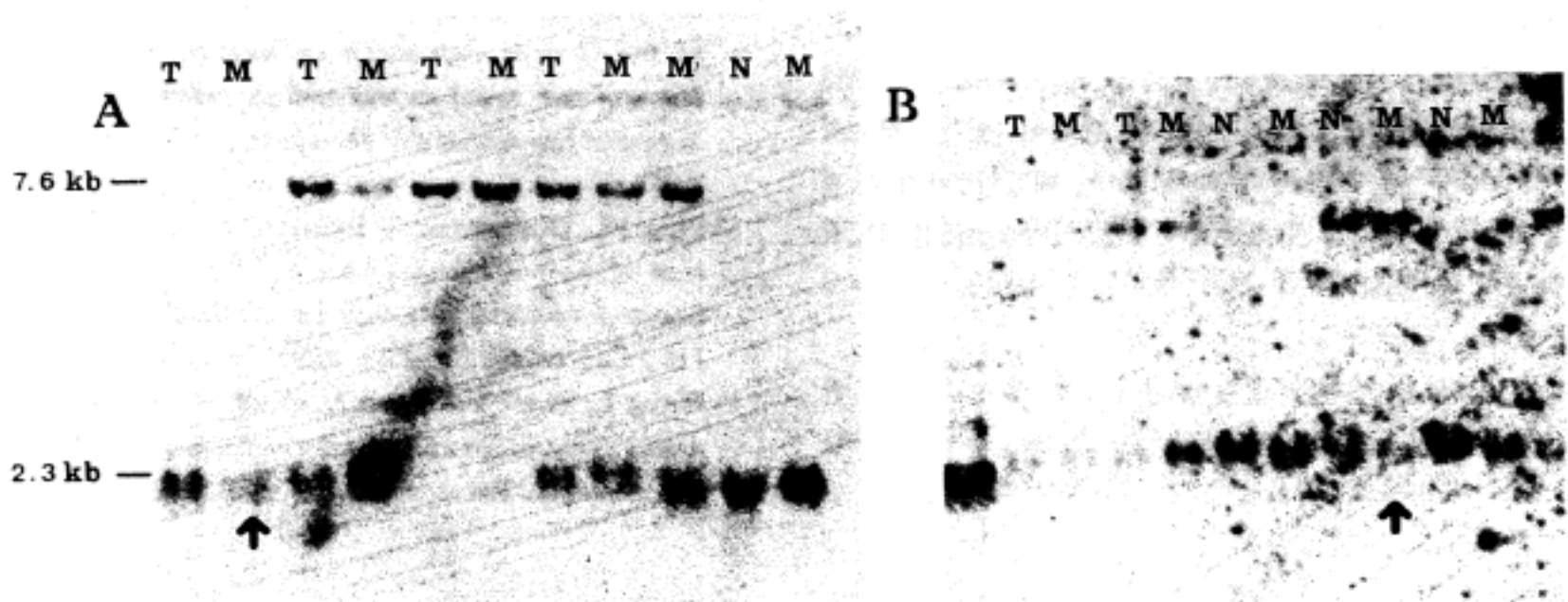


Fig. 3. Southern blot analysis of DNA from colorectal cancer tissues (T), metastatic liver tissues (M) and their corresponding normal mucosa (N). The 2, 3 kilobase allele of the nm23H1 gene was found to be reduced in liver metastatic tissues.

A and B are independent experiments

Arrow: position of allelic deletion.

비교결과, 전이조직 10예중 2예에서 변이를 발견하였다(Fig. 3).

고 안

대장암이 전이가 발생하기 전에 조기에 발견이 되면 근치가 가능하지만 주위 임파선 장기 또는 원이부에 전이가 발생하게 되면 근치가 어렵다.

전이를 확인하게 하는 것으로는 종양의 크기 종양의 침윤도 조직학적점사로 확인이 되지만 최근에는 핵 DNA의 양, oncogene의 변이등으로 차후 전이 가능성을 검사하려는 연구가 진행되고 있다. 전이는 한개 또는 다수의 세포가 주위 조직 혈류 임파액으로 침윤하여 분열 증식하고, 이 세포들이 분리되어 혈류나 임파액으로 들어가고 새로운 환경에서 타세포들과의 충돌, 빠른 혈류에서 혈관벽과의 충돌, 면역기능 등에 적응하여 생존한 후 혈관외로 탈출하여 장기에 전이하게 된다.

저자는 대장암과 관련이 있는 유전자에서 진행성 대장암 조직과 간으로 전이된 조직에서 세유전자를 대상으로 실험하였다. Puig등³⁾은 대장암 99예중 K-ras codon 12번 변이가 32예 13번 변이가 7예로 보고하였으며 Astler Coller 분류와 종양의 위치와는 관계가 없는 것으로 보고하였다. 저자의 실험에서 8예중 2예(25%)에서 codon 12번이 변이 되었으므로 K-ras 유전자 변이가 전이와는 직접적인 관계가 없는 것으로 사료된다. 대장암 억제유전자로 알려진 wild형의 P53는 선종에서 암으로의 이행과 관련이 있는 것으로 Fearon등¹⁾에 의하여 알려져 왔다. 대장암 환자의 정상대장조직과 암조직 6쌍에서 P53의 exon5를 PCR로 증폭시켜 SSCP한 결과 변이등의 차이를 발견하지 못했다.

종양세포가 전이와 관련된 유전자중 전이 억제에 관련된 가장 흥미있는 유전자로는 Steeg등이 연구한 nm23 유전자로 Wang등⁴⁾은 전이가 확인된 대장암

8예중 4예에서 nm23H1 유전자 변이를 보고했으며 Haut등²⁾은 종양화 과정의 초기에서 nm23 유전자 표현이 증가되고 전이대장암에서 더 증가된 것을 보고하였다. 저자는 nm23H1 유전자가 간전이조직 10예중 2예(20%)에서 2.3kb 부위에 의심스러울만한 이중접합성 결손을 보였다. 종양조직에서 간으로의 전이 과정에 nm23H1의 관련유무를 본 실험결과로는 확인할 수 없으며 더 많은 실험연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

전이조직에서 K-ras codon 12번의 변이가 25% nm23H1의 변이가 20%, 전이가 확인된 종양조직에서 P53 exon5의 변이는 없는 것으로 보아, P53 exon5 유전자가 대장종양 전이와의 직접적인 관계는 없는 것으로 추정되며 K-ras, nm23H1 두 유전자와 종양전이와의 관계 유무에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) Fearon ER, Vogelstein B: *A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell* 61:759-767, 1990
- 2) Haut M, Steeg PS, Willson JKV, et al: *Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. J of NCI* 83:712-716
- 3) Puig PL, Olschwang S, Delattre O, et al: *Association of Ki-ras Mutation with differentiation and tumor-formation pathways in colorectal carcinoma. Int J Cancer* 49:220-223, 1991
- 4) Wang L, Patel U, Ghosh L, et al: *Mutation in the nm23 Gene is associated with metastasis in colorectal cancer. Ca Research* 53:717-720, 1993