

대장암에서 Glucose Transporter Gene의 발현

경희대학교 의과대학 외과학교실, ¹해부병리학교실

이석환 · 박재훈¹ · 김윤화¹ · 오수명 · 윤 충 · 주흥재 · 이기형

Expression of Glucose Transporter Gene in Colorectal Cancer

Suk-Hwan Lee, M.D., Jae-Hoon Park, M.D.¹, Yoon-Wha Kim, M.D.¹
Soo-Myung Oh, M.D., Choong Yoon, M.D., Hoong-Zae Joo, M.D.
and Kee Hyung Lee, M.D.

Departments of Surgery and ¹Anatomical Pathology, Kyung Hee University Hospital, Seoul, Korea

The primary metabolic characteristic of malignant cells is an increased uptake of glucose and its anaerobic glycolysis. Recent studies have demonstrated that facilitative glucose transport across the plasma membrane is mediated by a family of proteins, i.e., glucose transporters. **Purpose:** In order to evaluate the clinicopathologic correlations of glucose transporter genes expressed in colorectal cancer, the author studied the expression of glucose transporter genes in human colorectal cancer and analyzed their expression in normal and malignant colorectal tissues. **Methods:** A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to quantitatively determine the levels of the glucose transporter genes, GLUT1 and GLUT3, from Crohn's diseases (N=2), adenomatous polyps (N=4), and colorectal cancers (N=40) and their normal counterparts. **Results:** The expression of the GLUT1 gene was detected in 50% of the inflammatory colonic mucosae and adenomatous polyp tissues, but the levels of expression were not significantly different from their normal counterparts. Among the 40 colorectal cancer patients, 23 patients (57.5%) showed GLUT1 gene expression and the levels of expression were increased by 1.8 as compared to their normal counterparts ($p < 0.05$). The expression of the GLUT3 gene was detected in almost all tissues examined, and the levels of expression were not significantly different from their normal counterparts. In colorectal cancers, there was correlation between GLUT1 expression, the extent of lymph node involvement and the stage of colorectal cancers ($p < 0.05$). But, the correlation between the expressions of the GLUT3 gene and the clinicopathologic prognostic factors of colorectal cancers could not be determined because almost all tissues showed a GLUT3 gene expression. **Conclusions:** In conclusion, the GLUT1 glucose transporter expression in colorectal cancer was associated with high possibilities of lymph node metastases and poorer prognosis, and the assessment of GLUT1 expression in colorectal cancer would be useful in identifying high risk patients. (JKSCP 2000;16:57-66)

Key Words: Colorectal cancer, Glucose transporter gene, RT-PCR, Prognosis

서 론

암세포를 포함한 모든 세포들은 생명 유지를 위해서

책임저자 : 이기형, 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 부속병원 외과(우편번호: 130-702)
(Tel: 958-8266, Fax: 966-9366)
(E-mail: keehlee@chollian.net)

본 논문의 요지는 1999년도 대한대장항문학회 32차 추계학술대회에서 구연 발표되었음.

본 논문은 경희대학교 의과대학 동문회의 연구비 보조로 조성되었음.

여러 가지 형태의 에너지원이 필요하게 되며 특히 암세포의 경우는 정상세포에 비해 빠른 성장으로 인한 혈관 신생의 부조화로 인해 여러 가지 에너지원 중 포도당을 주 에너지원으로 사용하며 특히 혐기성 해당작용이 왕성하다고 한다. 세포막을 통한 포도당의 촉진수송(facilitative transport)을 위해서는 포도당에 대한 친화력이 있는 당수송체(glucose transporter)라는 단백질에 의해 매개된다고 한다.¹⁻³

현재까지 6종의 당수송체 유전자(glucose transporter gene)가 밝혀져 있으며 각각 GLUT1~5, GLUT7이라고 명명되었다. GLUT6의 경우 유전자는 밝혀졌으나 단백

질로 발현되지 않는 가상유전자(psuedogene)라고 한다.^{4,5} 이들 당수송체들은 동물과 사람 조직에 표현되는 분포 및 그 기능이 모두 상이한 것으로 알려지고 있는데, *GLUT1*의 경우, 쥐에서는 뇌조직, 신장조직, 유선에 발현되는 반면 사람에서는 혈액장벽(blood-brain barrier)의 내피, 간조직, 적혈구, HepG2 hepatoma cell line, 태반 및 태아조직에서 발현되어 적혈구형(erythrocyte type)이라고도 한다. *GLUT3*의 경우, 유전자의 발현은 정상 조직 및 여러 가지 암조직에서 나타나지만 단백질의 발현은 주로 뇌조직이나 태아기 세포 때에 나타난다고 한다.⁶ 이러한 당수송체 유전자의 변화는 암을 비롯한 당뇨병, Huntington 무도병과 같은 여러 가지 질병의 원인으로 알려지고 있다.^{7,8}

Yamamoto등⁹은 소화기암을 대상으로 한 이들 촉진당수송체의 발현을 연구한 결과 대부분의 소화기암 조직에서 *GLUT1*, *GLUT2* 및 *GLUT3*의 발현이 증가되어 있었으며 특히, *GLUT2*의 경우는 주로 간세포암에서 증가되어 있다고 보고하였다. 그러나 *GLUT4*와 *GLUT5*의 경우는 조직의 종류에 따라 발현 양상이 상이하며 암조직에서의 mRNA 발현은 관찰할 수 없어 암화과정과는 관계가 없다고 하였다. 그러나 암세포의 빠른 성장과 *GLUT1*과 *GLUT3* 유전자의 발현이 연관성이 있으며 이들 당수송체의 발현이 암조직의 발달과정 및 암의 생물학적 특성과 연관이 있음을 시사한 바 있다.

또한 당수송체 유전자의 발현은 *ras*나 *src*와 같은 종양유전자나 transforming growth factor- β (이하 TGF- β), platelet-derived growth factor (이하 PDGF)와 같은 성장조절인자에 의해 발현이 조절된다고 하여 정상세포의 암화 과정에 있어서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있으나 아직까지 정확한 생물학적 역할이 규명되지는 않고 있다.¹⁰⁻¹³

대장암은 최근들어 우리나라에서도 그 발생 빈도가 서서히 증가하고 있는 암으로서 암화과정에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대장암과 *GLUT1* 발현과의 관계에 대해 Younes등¹⁴은 *GLUT1* 발현과 대장암의 림프절 전이간의 연관성을 보고했으며, Harber등¹⁵은 *GLUT1* 발현이 대장암의 예후가 불량함을 시사한다고 보고하는 등 *GLUT1* 유전자의 생물학적 특성에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 대장암 조직에서 *GLUT1* 및 *GLUT3*의 발현을 함께 연구한 보고는 없으며, 현재까지 시행된 대부분의 연구 방법은 면역조직화학적 연구들이었다.

저자들은 사람의 대장암 조직에서 이들 당수송체 유전자 중 소화기암에서 전반적으로 발현을 보여 당

수송에 기본적인 역할을 수행한다고 알려진 *GLUT1*과 *GLUT3*의 발현이 나타나는지를 역전사 중합효소연쇄반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR)으로 정량 측정하고, 여러 가지 임상 병리학적 예후인자들과의 연관성을 분석하여 당수송체 유전자의 발현과 대장암의 생물학적 특성간의 관계를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상

병리 조직학적으로 확진된 크론병 환자 2명, 선종성 용종 환자 4명, 대장암 환자 40명을 대상으로 하였고, 대조군인 크론병 2명, 선종성 용종 환자 4명의 남녀 분포는 남자 4명, 여자 2명이었으며 연령의 중앙치는 40세이었다.

대장암 환자 40명의 남녀 분포는 남자 23명(57.5%), 여자 17명(42.5%)이었으며 연령의 중앙치는 58.5세였다.

대장암의 위치에 따른 분포는 결장암 23명(57.5%), 직장암 17명(42.5%)이었으며 암세포의 조직학적 분화도(16)에 따른 분포는 고분화암(well differentiated) 21명(52.5%), 중등도 분화암(moderately well differentiated) 14명(35.0%), 저분화암(poorly differentiated) 3명(7.5%), 점액암(mucinous type) 1명(2.5%), 인환세포암(signet ring cell type) 1명(2.5%)이었다.

대장암의 병기분포는 TNM 병기분류법¹⁷에 따르면, 장벽의 침윤도는 T1에는 없었으며, T2가 5명(12.5%), T3가 34명(85.0%), 그리고 T4가 1명(2.5%)이었다. 림프절 전이여부에 따른 분포는 N0가 23명(57.5%), N1이 10명(25%), N2가 7명(17.5%)이었다. 원격전이여부는 M0가 35명(87.5%)이었으며, 대동맥 주위 림프절 전이가 동반되거나 간전이가 동반된 M1이 5명(12.5%)이었다.

병기분포는 stage I이 3명(7.5%), stage II가 20명(50.0%), stage III가 12명(30.0%), 그리고 stage IV가 5명(12.5%)이었다.

2) 조직의 채취

수술장에서 외과적으로 절제된 조직으로부터 암조직과 정상조직 또는 병변 부위와 정상조직을 채취하여 급속 냉동한 후 RNA를 추출할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

3) RNA 추출

0.5 g의 냉동 조직을 조직 분쇄기로 잘게 분쇄한 후 1 ml solution D (250 g Guanidine Isothiocyanate in 293 ml, 17.6 ml of 0.75 M sodium citrate, 26.4 ml 10% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)에 넣어 조직을 용해시켰다. 100 μ l의 2 M sodium acetate (pH 4.0)를 넣고 잘 혼합한 후 다시 1 ml의 물로 포화된 phenol을 혼합하여 진탕혼합(vortexing)하였다.

여기에 200 μ l의 chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1)을 넣어 10초간 진탕혼합한 후 얼음에 15분간 방치하였다. 15분 후 10,000 \times g, 4°C에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다.

회수된 상층액과 동량의 isopropanol을 잘 혼합한 후 -20°C에서 12시간 방치 후 10,000 \times g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 버린 후 RNA를 100 μ l의 70% ethanol로 세척한 후 공기 중에서 10분간 RNA pellette를 말렸다. 정제한 RNA는 50 μ l의 diethyl pyrocarbonate (DECP)가 처리된 distilled water에 용해시키며 spectrometer (Ultraspec 3000, LKB Pharmacia)로 260 nm와 280 nm의 흡광도로 각각 측정하여 RNA의 함량과 순수성을 평가한 후 RT-PCR을 시행할 때까지 -70°C에 보관하였다.

4) cDNA 합성

각 조직으로부터 얻은 RNA와 oilgo (dT)₁₅ primer를 이용하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

1 μ g RNA에 0.5 μ g oilgo (dT)₁₅ primer, 15 U AMV reverse transcriptase, 5 \times RT buffer (first strand buffer, Gibco-BRL, CA, USA) 4 μ l, 10 mM dNTP mixture 2 μ l, RNase inhibitor 1 U/ μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l에 DECP가 처리된 distilled water를 첨가하여 총용량이 20 μ l가 되도록 혼합하여 상온에서 15분간 방치한 후

42°C에서 30분, 38°C에서 20분 방치하여 cDNA를 합성한 후 82°C에서 10분간 방치하여 역전사효소의 활성을 억제하였다. 제작된 cDNA를 물로 3배 희석하여 정량분석에 이용하였다.

5) GAPDH, GLUT1 및 GLUT3 primer의 제작

Oligonucleotide synthesizer를 이용하여 internal control인 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 PCR 산물이 383 bp의 크기가 되도록 제작하였으며 GLUT1과 GLUT3의 경우 각각 172 bp와 149 bp의 크기가 되도록 제작하였다(Table 1).

6) RT-PCR

분석하고자 하는 유전자는 다음과 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 5'과 3' primer를 각각 5 μ l (20 pmole)씩 넣고 10 \times amplification buffer (Amplif-Taq buffer, Perkin-Elmer, CA, USA) 10 μ l, 각 oligonucleotide의 최종 농도가 1.25 mM이 되도록 dNTP mixture 16 μ l, template cDNA 1 μ l, Taq polymerase 0.5 μ l (10 U/ μ l), distilled water를 첨가하여 총용량이 100 μ l가 되도록 하였다. DNA thermocycler (Perkin-Elmer 9600, CA, USA)로 변성반응(denaturation) 94°C, 30초, 결합반응(annealing) 58°C, 45초, 연장반응(extension) 72°C, 45초로 28, 30, 32, 34 cycle의 PCR을 수행하였다.

7) 정량화(Quantitation)

비교적 역전사 중합효소 연쇄반응법(semi-quantitative RT-PCR)은 대조유전자인 GAPDH를 내부대조군(internal control)으로 이용하여 정상조직과 암조직 사이에 RNA양을 상대적으로 정량화한 후 목표유전자(target gene)인 GLUT1과 GLUT3의 발현 정도를 비교하는 방법으로 최근 PCR법의 정량화를 위해 많이 이용되고 있다. 먼저 대조유전자인 GAPDH를 이용하여 상기 방법의

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR

| Primer | | Sequence | Ref* |
|--------|------------|--------------------------------|------|
| GAPDH | upstream | 5'-AACCATGAGAAGTATGACAACAGC-3' | 18 |
| | downstream | 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3' | |
| GLUT1 | upstream | 5'-GAGCCCAGCAGCAAGCTG-3' | 19 |
| | downstream | 5'-GGCAGGATGCTCTCCCCATA-3' | |
| GLUT3 | upstream | 5'-ACCTCAGAGGGTGGGGCATT-3' | 4 |
| | downstream | 5'-CCAGCTCTGATATTTGCCAT-3' | |

*Ref = reference number

로 PCR을 시행한 후 10 μ l의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 molecular analyst program이 내장된 densitometer (GS-700, Bio-Rad)를 이용하여 밝기를 검사하였다.

밝기에 따라 PCR반응에 들어가는 GAPDH의 cDNA의 양을 조절하여 정상조직과 암조직 사이에 cDNA양을 정량화하였으며, 실험 결과 30~34 cycles 사이에서 PCR product의 양이 logarithmic phase로 증가됨을 확인하였다.

같은 방법으로 target gene인 GLUT1, GLUT3의 primer를 이용하여 유전자 증폭을 시행하여 정상조직과 암조직 사이에 GLUT1, GLUT3 유전자의 발현 정도에 변화가 있는지를 검사하였다.

8) 통계 처리

GLUT1과 GLUT3 유전자의 발현 정도는 상대적인 cDNA의 양을 알고 있는 대조유전자인 GAPDH에 대한 비율로 표시하였다.

SAS for windows[®] 6.12 통계프로그램(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 정상조직과 암조직의 GLUT1과 GLUT3 유전자의 발현 정도를 평균값으로 t-검정으로 비교하였으며, 정상조직과 암조직간의 유전자의 발현 정도에 차이가 있는지를 검정하기 위해 Pearson 상관 분석(Pearson correlation analysis)하여 상관 계수(correlation coefficient)를 구하였다.

임상병리학적 예후인자들과 유전자의 발현 유무간의 비교는 chi-square test로 하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

결 과

1) Glucose transporter gene의 발현 양상

(1) RT-PCR 분석 방법의 유의성 검증: Densitometer를 이용한 PCR product의 정량화가 유의한 지를 검증하기 위하여 대조유전자인 GAPDH cDNA를 희석하여 cDNA의 양을 0.5 μ l, 0.75 μ l, 1.0 μ l, 2.0 μ l를 사용하여 34 cycle의 PCR을 시행하였다. 10 μ l의 PCR product를 2% agarose gel에서 10분간 전기영동하여 밝기를 densitometer로 측정된 결과 cDNA양과 densitometer로 측정된 밝기가 비례하여 증가함을 확인할 수 있어 본 실험에 사용할 수 있는 적절한 방법으로 판단된다(Fig. 1).

(2) GLUT1 cDNA의 발현 양상: 34 cycle의 PCR을 시행한 후 증폭된 GLUT1 gene은 172 bp의 크기로 측정되었다.

대조군인 크론병 환자 2예 중 1예에서 정상조직과 병변조직에서 모두 GLUT1 gene의 발현이 관찰되었으며 정상조직과 병변조직에서 발현된 양은 각각 0.42와 0.46으로 차이가 없었다. 선종성 용종 환자 4예 중 2예에서 GLUT1 gene의 발현이 관찰되었으며 정상조직과 선종성 용종조직의 발현량은 각각 0.62 ± 0.27 , 0.86 ± 0.06 으로 선종성 용종조직에서 발현량이 증가되어 있으나 통계학적으로 유의하지는 않았다(Table 2, Fig. 2).

대장암 환자 40명 중 GLUT1 gene의 발현은 정상조직에서는 22예(55.0%), 암조직에서는 23예(57.5%)에서 관찰되었다. 정상조직과 암조직에서 GLUT1 gene의 발현이 모두 없었던 예는 17예(42.5%)였다.

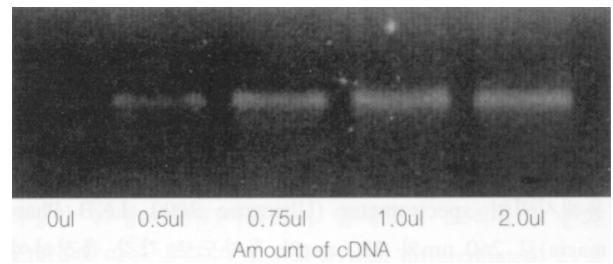


Fig. 1. Validation of internal control (GAPDH) PCR products. The density of PCR products were proportionally increased with the amount of GAPDH cDNA.

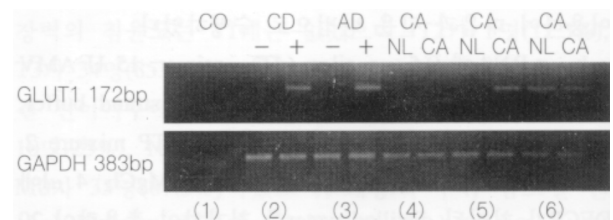


Fig. 2. Expression of GLUT1 gene (172 bp) on various tissue samples. 10 μ l of RT-PCR products from the patients with Crohn's disease (CD), adenomatous polyp (AD), colorectal cancer (CA) patients and endogenous housekeeping standard GAPDH (383 bp) were resolved on 2% agarose gels and stained with ethidium-bromide. Lane 1, blank control; Lane 2 and 3 were from different patients and lane 4~6 were matched tissue samples from the same patient with colorectal cancer. Lane 4, negative for GLUT1 gene expression in both normal (NL) and cancer (CA) tissues; lane 5, negative for GLUT1 gene expression in normal tissue but positive for GLUT1 gene expression in cancer tissue; lane 6, positive for GLUT1 gene expression in both normal and cancer tissues.

Table 2. *GLUT1* gene expression in patients with colorectal cancer

| Materials | Normal tissue | | Lesion | | p value |
|------------------------|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|----------|
| | <i>GLUT1</i> / <i>GAPDHN</i> | (%) | <i>GLUT1</i> / <i>GAPDHN</i> | (%) | |
| Colorectal cancer (40) | 0.42 ± 0.29 | 22 (55.0) | 0.76 ± 0.31 | 23 (57.5) | p < 0.05 |

Table 3. *GLUT3* gene expression in patients with colorectal cancer

| Materials | Normal tissue | | Lesion | | p value |
|------------------------|------------------------------|-----------|------------------------------|------------|---------|
| | <i>GLUT1</i> / <i>GAPDHN</i> | (%) | <i>GLUT1</i> / <i>GAPDHN</i> | (%) | |
| Colorectal cancer (40) | 0.76 ± 0.29 | 39 (97.5) | 0.61 ± 0.17 | 40 (100.0) | N.S. |

N.S. = no significance (t-test)

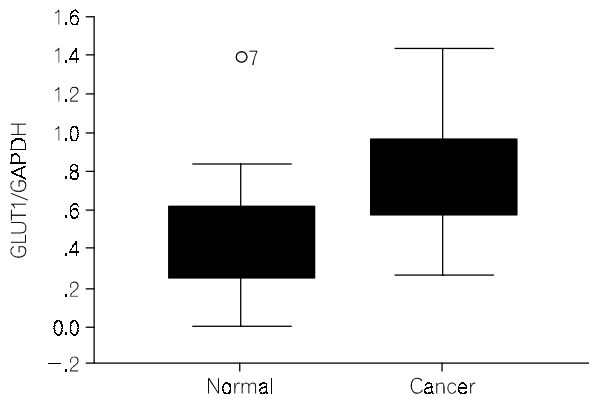


Fig. 3. Diagram of *GLUT1* gene expression of colorectal cancer patients in normal and cancer tissues. The *GLUT1* gene expression of cancer tissues were significantly increased compared with those of normal tissues (Pearson correlation coefficient=0.60, p=0.0001).

GLUT1 cDNA의 발현이 관찰된 예의 정상조직과 암조직의 발현량은 각각 0.42 ± 0.29, 0.76 ± 0.31로 암조직에서 약 1.8배 증가되어 있었으며 통계학적으로도 유의한 차이가 있었다(t-test, p=0.037)(Table 2).

대장암 환자의 정상조직과 암조직간의 발현에 관한 Pearson 상관분석에서는 상관계수(r) 0.60으로 통계학적으로 유의한 상관관계를 보였다(p=0.0001, Fig. 3).

(3) *GLUT3* cDNA의 발현 양상: 34 cycle의 PCR을 시행한 후 증폭된 *GLUT3* gene은 149 bp의 크기로 측정되었다.

대조군인 크론병 환자 2예 모두에서 정상조직과 병변조직에서 *GLUT3* gene의 발현이 관찰되었으며 정상조

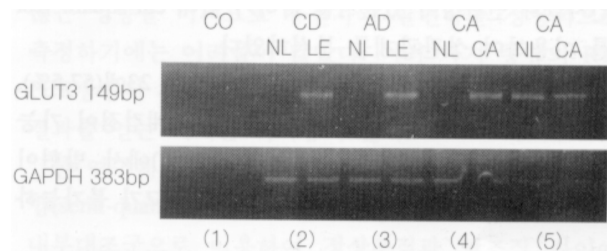


Fig. 4. Expression of *GLUT3* gene (149 bp) on various tissue samples. 10 μl of RT-PCR products from the patients with Crohn's disease (CD), adenomatous polyp (AD), colorectal cancer (CA) patients and endogenous housekeeping standard *GAPDH* (383 bp) were resolved on 2% agarose gels and stained with ethidium-bromide. Lane 1, blank control; Lane 2, positive for *GLUT3* gene expression in both normal (NL) and inflammatory lesion (LE); lane 3, positive for *GLUT3* gene expression in both normal (NL) and adenomatous polyp (LE); lane 4, negative for *GLUT3* gene expression in normal tissue (NL) but positive for *GLUT3* gene expression in cancer tissue (CA); lane 5, positive for *GLUT3* gene expression in both normal (NL) and cancer (CA) tissues.

직과 병변조직에서 발현량은 각각 0.78 ± 0.22과 0.67 ± 0.35로 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 *GLUT1* gene의 경우와는 달리 정상조직에서 더욱 발현이 증가되어 있었다. 선종성 용종 환자 역시 4예 모두에서 *GLUT3* gene의 발현이 관찰되었으며 정상조직과 선종성 용종조직의 발현량은 각각 0.93 ± 0.49, 0.66 ± 0.28로 크론병의 경우와 마찬가지로 정상조직이 선종성 용종조직에 비해 발현량이 증가되어 있었으나 통계학적으로

유의하지는 않았다(Table 3, Fig. 4).

대장암 환자 40명 중 GLUT3 gene의 발현은 정상조직에서는 39예(97.5%), 암조직에서는 전례(100.0%)에서 관찰되었다. 1예에서만 정상조직에서 GLUT3의 발현이 관찰되지 않았다.

GLUT3 gene의 발현이 관찰된 예의 정상조직과 암조직의 발현량은 각각 0.76 ± 0.29 , 0.61 ± 0.17 로 정상대조군과 마찬가지로 암조직에 비해 정상조직에서 GLUT3 gene의 발현이 증가되어 있었으나 통계학적으로 유의한 차이는 발견할 수 없었다(t-test, $p=0.075$)(Table 3, Fig. 5).

2) GLUT1 및 GLUT3 발현 양상과 대장암의 임상병리학적 예후인자와의 상관 관계

대장암 조직에서 RT-PCR법에 의한 GLUT1 및 GLUT3 gene의 발현이 대장암의 여러 가지 임상병리학적 예후인자들과 연관성이 있는지를 밝히기 위해 chi-square test를 이용하여 상관관계를 분석하였다.

GLUT1의 경우, 발현이 있었던 경우가 23예(57.5%), 발현이 없었던 경우가 17예(42.5%)로 통계검정이 가능하였으나 GLUT3의 경우는 전례(100.0%)에서 발현이 있어 대장암의 예후인자들과의 연관성 비교가 불가능하

여 통계 분석에서 제외하였다.

임상 병리학적 예후인자들 중 나이, 성별, 암세포의 조직학적 분화도, 장벽 침윤도, 원격전이 여부 등은 GLUT1 발현군과 비발현군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었으나($p>0.05$), 림프절 전이 정도($p=0.018$), 암의 병기($p=0.006$)는 GLUT1 발현군이

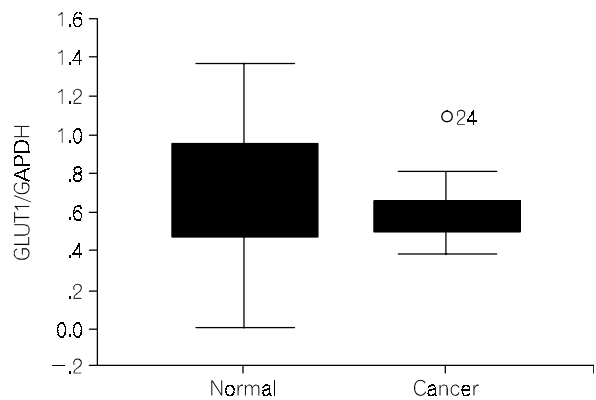


Fig. 5. Diagram of GLUT3 gene expression of colorectal cancer patients in normal and cancer tissues. The expression of GLUT3 gene between normal and cancer tissues were not significantly different.

Table 4. Association of GLUT1 gene expression with clinicopathological characteristics in patients with colorectal cancers

| Clinicopathologic variables | GLUT1 gene expression | | p value | |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------|---------|
| | No (N=17) N (%) | Yes (N=23) N (%) | | |
| Age | 56.5 ± 12.1 | 59.7 ± 11.4 | N.S.* | |
| Sex | male | 8 (47.1) | 15 (65.2) | N.S. |
| | female | 9 (52.9) | 8 (34.8) | |
| Location | colon | 11 (64.7) | 12 (52.2) | N.S. |
| | rectum | 6 (35.5) | 11 (47.8) | |
| Degree of differentiation | differntiated [†] | 16 (94.1) | 19 (82.6) | N.S. |
| | undifferentiated [‡] | 1 (5.9) | 4 (17.4) | |
| Depth of invasion | T1 & T2 | 3 (17.6) | 2 (8.7) | N.S. |
| | T3 & T4 | 14 (82.4) | 21 (91.3) | |
| Extent of lymph node involvement | N0 | 14 (82.4) | 9 (39.1) | p=0.018 |
| | N1 | 1 (5.9) | 9 (39.1) | |
| | N2 | 2 (11.7) | 5 (21.8) | |
| Distant metastasis | M0 | 16 (94.1) | 19 (82.6) | N.S. |
| | M1 | 1 (5.9) | 4 (17.4) | |
| Stage | I & II | 14 (82.4) | 9 (17.4) | p=0.006 |
| | III & IV | 3 (17.6) | 14 (82.6) | |

N.S. = no significance; * = t-test; [†] = well and moderately well differentiated; [‡] = poorly differentiated, mucinous and signet ring cell

비발현군에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 빈도를 보였다(Table 4).

고 찰

포유 동물 세포가 대사기능을 수행하기 위해서는 여러 가지 형태의 에너지원이 필요하며 이 중 포도당은 가장 중요한 에너지원이다.^{1,3} 포도당과 같이 분자량이 큰 물질은 Na^+ 이나 K^+ 과 같이 세포막을 통한 능동적인 확산이 불가능하므로, 세포 내로의 이동은 포도당에 대한 친화력이 있는 수송 단백질을 통해 이루어진다. 현재까지 알려진 포도당의 수송 단백질은 Na^+ -glucose cotransporter와 촉진 당수송체의 두 종류가 밝혀져 있다.²⁰ Na^+ -glucose cotransporter는 Na^+ 이온의 농도 차이에 따라 Na^+ 이온이 세포 내로 이동할 때 포도당을 함께 수송하는 단백질로서 주로 소장 상피세포에서 흡수 작용을 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있는 반면, 촉진 당수송체의 경우는 동물과 사람조직에 표현되는 분포 및 그 기능이 모두 상이한 것으로 알려지고 있다.^{4,6}

촉진 당수송체는 현재까지 6종이 밝혀져 있으며 각각 *GLUT1* ~5, *GLUT7* 등으로 명명되었다. *GLUT1* (erythrocyte type)과 *GLUT3* (brain type)가 당수송의 기본적인 기능을 수행한다고 알려지고 있다. *GLUT2* (liver type)는 주로 간세포에서 포도당의 흡수와 이용에 관여하며 소장 및 신장에서의 포도당 흡수에도 일부 관여한다고 한다. *GLUT4* (muscle/fat type)는 insulin의 영향에 따라 근육과 지방세포에서 포도당의 수송에 관여한다고 하며 *GLUT5* (small intestinal type)은 소장의 상피세포에서 포도당의 흡수에 관여한다고 한다.

또한 *GLUT7*은 간세포의 microsome에서 포도당 대사 과정에 관여하는 것으로 알려지고 있다.^{4,5}

Isselbacher와 Holm등^{2,3}은 암세포가 여러 가지 에너지원 중 포도당을 주에너지원으로 이용하며 전체 에너지 생산의 50% 이상을 차지하며, 암세포의 빠른 성장과 종양 조직의 혈관신생과의 부조화로 인해 혐기성 해당작용이 주를 이룬다고 보고하였다.⁹ 또한 암세포의 포도당 이용 증가는 세포막에 위치한 당수송체를 통하여 매개되며, 당수송체 유전자의 발현은 종양유전자나 성장조절 인자에 의해 조절되어 암화과정과 당수송체의 발현 간에는 밀접한 관계가 있다고 한다.^{2,3} 이와 같은 암세포의 포도당 이용도 증가라는 특성을 응용한 양전자 방출 단층촬영법(positron emission tomography, PET)은 여러 가지 암의 진단과 치료의 지표로 현재 임상에서 폭 넓

게 응용되고 있다.²¹⁻²⁴

암세포의 특성을 연구하는 여러 가지 방법 중 정상세포와 암세포의 여러 가지 생물학적 특성에 관한 비교 연구는 암의 진단과 치료에 많은 기여를 하고 있다. 유전자 분석 연구는 최근 들어 혁신적 발전을 보여 여러 가지 암의 발생 및 진행 과정에 대한 이해를 증진시켰으며 현재 임상적용의 단계까지 발전하고 있다.

특히 mRNA를 이용한 RT-PCR법은 Northern blot 또는 Western blot법에 비해 적은 양의 조직으로도 분석이 가능하다는 점과 다른 검사법에 비해 시간이 적게 걸리고 예민한 검사법이라는 장점들로 인해 최근 들어 임상에서도 유전자 발현을 측정하는 방법으로 많이 이용되고 있다.

RT-PCR법이 유전자의 발현 여부를 밝히는 유용한 검사법이기는 하지만 증폭과정의 지수함수적인 특성(exponential nature)상 증폭 초기의 작은 차이도 결과에 많은 영향을 미치므로 유전자의 발현량을 정량적으로 측정하기에는 어려움이 많았다. 여러 가지 종류의 RT-PCR방법이 제안되었으나 과정의 복잡성 등으로 일관된 결과를 얻는 데에는 어려움이 많다.^{25,26}

본 연구에 사용된 비교적 역전사 중합효소 연쇄반응법(semi-quantative RT-PCR)은 대조유전자인 *GAPDH*를 내부대조군으로 이용하여 정상조직과 암조직 사이에 RNA양을 상대적으로 정량화한 후 목표유전자인 *GLUT1*과 *GLUT3*의 발현 정도를 비교하는 방법으로 유의성 검증 결과 PCR에 사용된 cDNA양과 densitometer로 측정된 밝기가 비례하여 증가함을 확인할 수 있었다.

사람의 *GLUT1* 유전자의 구조는 Mueckler등¹⁹에 의해 처음으로 밝혀졌으며, 암화과정에서의 역할이 당수송체의 수적인 변화라기보다는 기능의 변화라는 사실이 밝혀지면서 활발히 연구되고 있다.

본 연구에서는 *GLUT1*의 발현 정도를 염증조직, 선종성 용종조직 및 암조직에서 모두 정상조직에서의 발현 정도와 비교하였는데, 모든 조직에서 *GLUT1*의 발현을 정량적으로 측정할 수 있었으며(염증조직 50.0%, 선종성 용종 50.0%, 암조직 57.5%), 발현의 정도에 있어서도 비록 통계적으로는 유의하지 않았지만 선종성 용종 조직에서 발현 정도가 높게 나타났다(정상조직 0.62 ± 0.27 , 선종성 용종조직 0.86 ± 0.06).

암조직에서는 정상조직에 비해 *GLUT1*의 발현이 평균 1.8배 증가되어 있었으며 통계적으로 유의한 차이를 보여(정상조직 0.42 ± 0.29 , 암조직 0.76 ± 0.31), 동일환자의 간세포암에서 정상조직에 비해 최고 22배의 *GLUT1* gene의 과발현이 있다는 Su등²⁷의 보고와 일치하였다.

또한 Yamamoto등⁹은 Northern blot의 방법으로 *GLUT1* mRNA의 발현이 정상조직, 암조직 및 전이암 조직에서 있음을 보고하였으나 정량적인 분석은 실시하지 않았다.

그러나 Younes등^{14,28}은 면역조직화학염색법으로 *GLUT1*의 발현을 여러 조직에서 측정하고 결과 대부분의 정상조직과 증식성 용종(hyperplastic polyp)에서는 발현이 없으며 선종성 용종에서는 2~33%에서 발현이 있었다고 하였다.

Younes등의 보고와 본 연구 결과의 정상조직에서 *GLUT1* 유전자 발현에 관한 결과의 차이는 본 연구에서는 *GLUT1* 유전자의 발현만을 연구하였고 Younes등은 *GLUT1* 단백질의 면역조직화학 염색이라는 차이와 측정 방법간의 예민도에 따른 차이라고 여겨지며, 본 연구에서 이용된 RT-PCR방법은 유전자의 발현 유무를 밝히는 가장 예민한 방법으로 알려져 있다.

대장암에서 *GLUT1* 발현 정도는 연구 방법에 따라 다양하게 보고되고 있는데, Northern blot법에서는 67%,⁹ 면역조직화학적 연구방법으로는 83~90%,^{14,15} Western blot법에서는 78%²⁸ 등으로 본 연구의 결과인 57.5%보다는 다소 높게 보고되고 있다.

*GLUT1*의 발현과 암세포의 조직학적 분화도에 관한 보고에 따르면 Younes등¹⁴은 *GLUT1*의 과발현이 고분화암보다는 미분화암에서 더욱 빈번하며 암세포의 림프절 전이와 연관이 있다고 하였으나, Harber등¹⁵은 *GLUT1*의 과발현과 암세포의 조직학적 분화도와는 연관이 없다고 보고하였으며 저자의 경우에는 미분화암 환자들의 수가 12.5%로 절대적으로 부족하여 *GLUT1*의 발현과 암세포의 조직학적 분화도와의 관계에 대한 통계적인 유의성은 찾을 수 없었다.

본 연구에서도 다른 보고들과 같이^{14,15} *GLUT1* 유전자의 발현 유무와 대장암의 림프절 전이 범위($p=0.018$) 및 대장암의 병기($p=0.006$)가 통계학적으로 유의한 상관관계가 있음을 밝힐 수 있었지만 환자들의 추적기간이 짧아 생존율과의 연관 관계는 검증하지 않았다. 그러나 림프절 전이와 진단 당시의 진행된 병기는 환자의 예후와 직접적인 관련이 있으므로 예후에도 나쁜 영향을 미칠 것으로 예상된다.

또한 Younes등²⁹은 *GLUT1* 유전자의 과발현이 비교적 암의 진행과정 후기에 나타난다고 주장하면서 *GLUT1* 유전자 발현은 암세포 내에서 더욱 악성도가 높은 새로운 단일세포군의 출현을 의미한다고 하였다.

GLUT3 유전자와 암의 생물학적 연관성에 관한 주장은 Yamamoto등⁹에 의해 처음 제기되었는데 *GLUT1*과 함께 *GLUT3*의 mRNA가 사람의 모든 조직에서 관찰된

다고 하여 *GLUT1* 및 *GLUT3*가 세포의 포도당 대사과정에서 중요한 역할을 할 것이라고 주장하였다.

그러나 Yamamoto등의 연구에 뒤이은 다른 보고⁶에 의하면 *GLUT3* 당수송체의 발현이 대뇌의 회색질(grey matter)이나 고환 및 정자세포와 같이 대사량이 많고 포도당을 주에너지원으로 사용하는 일부 조직에서만 국한된다고 하였다. 또 다른 보고²⁹에 의하면 비소세포암의 경우 *GLUT3* 유전자의 과발현이 관찰되며 *GLUT1* 유전자의 과발현과도 밀접한 관련이 있다고 한다.

비뇨기계암이나 췌장암 그리고 비소세포 폐암 등 암 조직에서 *GLUT3* 발현율은 21~100%까지 보고되고 있으나 전체적으로는 *GLUT1*보다는 발현율이 낮은 것으로 보고되고 있다.^{9,29,30} 비소세포 폐암을 대상으로 한 *GLUT3*의 발현과 *GLUT1*의 발현에 관한 연구에 의하면, *GLUT3*의 발현은 대개 *GLUT1*의 발현이 있는 경우에 국한된다고 하면서 *GLUT3*의 발현은 더욱 악성도가 높은 것을 의미한다고 보고하였다.²⁹ 본 연구에서는 *GLUT3* 유전자의 발현이 대장의 정상조직, 염증조직, 선종성 용종조직 및 암조직에서 거의 모두 발현되었는데 *GLUT1*과 *GLUT3*의 염기배열이 약 39~65% 정도는 같으며 염기배열의 유사성 역시 50~76%라는 보고⁵에 근거할 때 본 연구에서 나타난 결과가 위양성일 가능성을 배제하기 위해서는 당수송체 단백질의 발현여부에 관한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

암세포에서 당수송체 유전자의 발현이 생기는 기전에 대해서는 *src*나 *ras*와 같은 종양유전자, TGF- β 나 PDGF와 같은 성장조절 인자들 그리고 nitric oxide와 같은 다양한 요소들이 관여하여 일어나는 암의 일반적인 특성이라는 주장¹⁰⁻¹³과, 종양의 빠른 성장에 따른 종양조직 내부의 저산소증으로 인한 적응을 위해 혐기성 해당과정이 증가하여 발현한다는 주장 등이 있다.¹⁵

암세포에서 당수송체 유전자의 생물학적 역할을 보다 확실히 규명하기 위해서는 당수송체 유전자의 발현에 관계하는 여러 가지 요소에 대한 보다 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료되며, 본 연구의 결과 대장암에서 *GLUT1* 유전자의 발현은 대장암의 진행을 의미하는 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

암세포의 경우는 정상세포에 비해 빠른 성장으로 인한 혈관 신생의 부조화로 인해 포도당을 주에너지원으로 사용하며 특히 혐기성 해당작용이 왕성하다고 한다. 최근의 연구에 의하면 당수송체라는 세포막에 위치한

일련의 단백질들이 암세포의 포도당 이용도 증가를 매개한다고 한다.

저자는 대장암조직에서 당수송체의 발현 여부를 역전사 증합효소 연쇄반응법으로 정량 측정하고 대장암의 여러 가지 임상병리학적 예후인자들과 연관성을 밝히고 당수송체 유전자의 발현과 암의 생물학적 특성간의 관계를 알아보기 위하여 병리 조직학적으로 확진된 2명의 크론병 환자, 4명의 선종성 용종증 및 40명의 대장암 환자들을 대상으로 병변조직과 정상조직의 *GLUT1* 및 *GLUT3*의 발현을 측정하였다.

염증조직과 선종성 용종조직에서 *GLUT1*의 발현은 50%에서 관찰되었으나, 발현량은 정상조직과 병변조직 사이에 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 40명의 대장암 환자 중 23명(57.5%)에서 *GLUT1*의 발현이 관찰되었으며, *GLUT1*의 발현량 역시 정상 조직에 비해 1.8배 증가되어 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (정상조직 : 대장암조직 = 0.42 ± 0.29 : 0.76 ± 0.31 , $p < 0.05$).

그러나 *GLUT3* 유전자의 경우에는 정상세포와 암세포에서 전반적인 발현을 보이며 발현량의 차이를 발견할 수 없어 대장암의 생물학적 특성을 반영하는지에 대한 검증은 유보하여야 할 것이다.

*GLUT1*의 과발현을 보인 대장암 환자들은 발현이 없는 환자에 비해 림프절 전이가 있을 가능성이 높으며 또한 병기도 진행되어 있어 *GLUT1* 발현이 대장암 환자의 예후에 나쁜 영향을 미칠 것으로 사료된다.

결론적으로 대장암에서 *GLUT1*의 발현은 림프절 전이의 가능성이 높으며 환자의 예후에도 나쁜 영향을 미치므로 대장암의 진행을 의미하며 대장암의 예후를 예측할 수 있는 유용한 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 대장암에서 *GLUT3*의 발현에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것이다.

REFERENCES

- Weinhouse S. Glycolysis, respiration, and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 1972;32:2007-16.
- Isselbacher KJ. Sugar and amino acid transport by cells in culture-Differences between normal and malignant cells. *N Engl J Med* 1972;286:929-33.
- Holm E, Haggmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* 1995;55:1373-8.
- Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. *J Biol Chem* 1988;263:15245-8.
- Kayano T, Burant CF, Fukumoto H, Gould GW, Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Shows TB, Seino S, Bell GI. Human facilitative glucose transporters: isolation, functional characteristics, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* 1990;265:13276-82.
- Haber RS, Weinstein SP, O'Boyle E, Morgello S. Tissue distribution of human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* 1993;132:2538-43.
- Baroni MG, Oelbaum RS, Pozzilli P, Stocks J, Li SR, Fiore V, Galton DJ. Polymorphisms at the GLUT1 (HepG2) and GLUT4 (muscle/adipocyte) glucose transporter genes and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Hum Genet* 1992;88:557-61.
- Gamberino WC, Brennan WA Jr. Glucose transporter isoform expression in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 1994;63:1392-7.
- Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:223-30.
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transporter messenger RNA are induced by *ras* or *src* oncogenes. *Science* 1987;235:1492-5.
- Rollins BJ, Morrison ED, Usher P, Flier JS. Platelet-derived growth factor regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem* 1988;263:13655-62.
- Hiraki Y, Rosen OM, Birnbaum MJ. Growth factors rapidly induce expression of the glucose transporter gene. *J Biol Chem* 1988;263:13655-62.
- Mischoulon D, Rana B, Kotliar N, Pilch PF, Bucher N, Farmer SR. Differential regulation of glucose transporter 1 and 2 mRNA expression by epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1992;153:288-96.
- Younes M, Lechago LV, Lechago J. Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 1996;2:1151-4.
- Harber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma. A marker for poor prognosis. *Cancer* 1998;83:34-40.
- Jass JR, Sobin LH. Histological typing of intestinal

- tumors. WHO International Histological Classification of Tumors 2nd ed. Berlin-New York: Springer-Verlag; 1989.
17. Fleming I, Cooper JS, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH, Yarbrow JW. AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers; 1997.
 18. Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, Fujimori K, Ohkubo M, Sawada K, Sakiyama S. Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res* 1987;47:5616-9.
 19. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of human glucose transporter. *Science* 1985;229:941-5.
 20. Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13: 198-208.
 21. Lapela M, Leskinen S, Minn HRI, Lindholm P, Klemi PJ, Soderstrom KO, Bergman J, Haaparanta M, Ruotsalainen U, Solin O, Joensuu H. Increased glucose metabolism in untreated non-Hodgkin's lymphoma: A study with positron emission tomography and fluorine-18-fluorodeoxy -glucose. *Blood* 1995;86:3522-7.
 22. Reske SN, Grillenberger KG, Glatting G, Port M, Hildebrandt M, Gansauge F, Berger HG. Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma. *J Nucl Med* 1997;38:1344-8.
 23. Yonekura Y, Benua RS, Brill AB, Som P, Yeh SDJ, Kemeny NE, Fowler JS, MacGregor RR, Stamm R, Christman DR, Wolf AP. Increased accumulation of 2-deoxy-2-[¹⁸F]Fluoro-D-glucose in liver metastases from colon carcinoma. *J Nucl Med* 1982;23:1133-7.
 24. Hamilton E, Fennell M, Stafford DM. Modification of tumor glucose metabolism for therapeutic benefit. *Acta Oncologica* 1995;34:429-33.
 25. Auboeuf D, Vidal H. The use of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction to investigate the *in vivo* regulation of gene expression in small tissue samples. *Anal Biochem* 1997;245:141-8.
 26. Morita Y, Tsutsumi O, Oka Y, Taketani Y. Glucose transporter GLUT1 mRNA expression in the ontogeny of glucose incorporation in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:1525-31.
 27. Su TS, Tsai TF, Chi CW, Han SH, Chou CK. Elevation of facilitated glucose-transporter messenger RNA in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990;11:118-22.
 28. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter GLUT1 in human cancers. *Cancer Res* 1996;56:1164-7.
 29. Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of GLUT1 and GLUT3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 1997;80:1046-51.
 30. Zamora-León SP, Golde DW, Concha II, Rivas CI, Delgado-López F, Baselga J, Nualart F, Vera JC. Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1847-52.
-