

대장의 증식성 용종 환자에서 바이오칩을 이용한 유전자 발현의 초기 선형적 연구

건국대학교 의과대학 외과학교실, ¹내과학교실, ²병리학교실, ³해부학교실, ⁴의료생명대학 생명공학과

박웅채 · 김경래 · 성무경 · 왕준호¹ · 이재동¹ · 김상윤² · 박승화³ · 최동국⁴ · 김찬길⁴

A Pilot Study as the Biochip Based Gene Expression Profiling in Patients with Hyperplastic Colonic Polyp

Ung Chae Park, M.D., Kyong Rae Kim, M.D., Moo Kyung Seong, M.D., Joon Ho Wang, M.D.¹, Jae Dong Lee, M.D.¹, Sang Yoon Kim, M.D.², Seung Hwa Park, Ph.D.³, Dong Kug Choi, Ph.D.⁴, Chan Gil Kim, Ph.D.⁴

Departments of Surgery, ¹Internal Medicine, ²Pathology, ³Anatomy, College of Medicine, ⁴Department of Biotechnology, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju, Korea

Purpose: A microarray-based gene expression analysis may offer a rapid and efficient means for assessing. However, the molecular genetic change in nonneoplastic colonic polyp is still poorly understood. To elucidate the molecular genetic basis, We now report the results of our initial microarray data to analyze the genom pattern in patients with hyperplastic polyps of colon. **Methods:** 36 samples (18 pairs of colonic polyps and normal colonic mucosa were) harvested from colonoscopic biopsy. 3 of 18 colonic polyps were pathologically identified as the serrated type of hyperplastic polyp. We used the oligonucleotide microarray technique for analysis of the expression profiles of serrated polyps and normal mucosa. For the identification of differentially expressed genes, SAM (Significance Analysis of Microarray) package method was used. The result was analysed by using global normalization, intensity dependent normalization and block-wise normalization. **Results:** Polypectomy specimens microscopically showed the pathologically characteristic serration with a saw-teeth like luminal border (branching of the crypts). 8 genes including RHEB (Ras homolog enriched in brain), WASF2 (WAS protein family, member 2), TYRPI (Tyrosinase-related protein 1), VSXI (Visual system homeobox 1 homolog),

ROSI (V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1), WEE1 (WEE1 homolog), TEC (Tec protein tyrosine kinase), TNFRSF10A (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a) in serrated polyp were up-regulated by more than 10 times as compared with normal colonic mucosa. On the other hand, 6 genes including SIAT7D (Sialyltransferase 7D), DRD1 (Dopamine receptor D1), SIAT1 (Sialyltransferase 1), ITSNI (Intersectin 1), TNFSF12 (Tumor necrosis factor superfamily, member 12), CHES1 (Checkpoint suppressor 1) were down-regulated by less than a tenth of the expression as compared with normal colonic mucosa. **Conclusions:** Serrated polyps as a subset of hyperplastic colonic polyps were analyzed with the oligonucleotide microarray technique. We authors could identify 14 genes (8 up-regulated and 6 down-regulated genes) that showed the significant change of expression as compared with normal colonic mucosa. Specifically, we believe that current study will serve as a fundamental base to offer a bioinformative characteristics of the serrated colonic polyp in future clinical applications. **J Korean Soc Coloproctol 2006;22:241-249**

Key Words: Hyperplastic colonic polyp, Serrated polyp, Gene expression

대장 증식성 용종, 거치상 용종, 유전자 발현

서 론

유전자의 발현은 특정 유전자의 mRNA 양을 측정함으로써 간접적으로 알 수 있으며 이제까지의 분자생물학 기술은 어떤 질환이나 자극에 대해 한개 내지는 몇 개 유전자들의 표현을 연구할 수 있었다. 이에 반해

접수: 2006년 1월 10일, 승인: 2006년 8월 11일
책임저자: 박웅채, 380-704, 충북 충주시 교현동 620-5번지
건국대학교 의료원 충주병원 외과 대장항문클리닉
Tel: 043-840-8824, Fax: 043-848-0865
E-mail: ungchaepark@dreamwiz.com

상기 논문은 온라인으로 접수된 논문임.
본 논문은 2004년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

Received January 10, 2006, Accepted August 11, 2006
Correspondence to: Ung Chae Park, Department of Surgery, College of Medicine, Konkuk University, 620-5, Gyoheon-dong, Chungju 380-704, Korea.
Tel: +82-43-840-8824, Fax: +82-43-848-0865
E-mail: ungchaepark@dreamwiz.com

microarray 법은 수백 내지는 수천 종류의 유전자들의 표현이 증가되었는지 또는 감소되었는지를 한번의 반응으로 알 수 있다. 이것은 종래의 방법들과 비교해 볼 때, 처리할 수 있는 양이 많고 시간을 절약할 수 있다는 측면에서 매우 획기적인 기법이라 할 수 있다.¹ 1995년 Schena 등²의 연구진은 유전자의 발현을 양적으로 측정하기 위하여 바이오칩을 사용한 microarray 법을 사이언스 지에 처음 발표하였다. 이 기법을 이용한 종양 연구는 그동안 계속되어 왔으나 인간 게놈 프로젝트가 완성됨에 따라 유전체 수준에서 대량으로 유전자 발현을 연구하려는 필요성이 대두되면서 더욱 주목을 받게 되었다.

대장에서 발견되는 대부분의 용종은 비종양성인 단순 증식에 의한 돌출로 이루어진 증식성 용종(hyperplastic polyp)이다. 과형성 용종이라 불리어 왔던 이것은 최근에 용어 사용의 개선이 필요하다는 의견에 따라 증식성 용종으로 부르기를 권장하고 있는데, 비신생물 용종으로 악성의 잠재성이 없어서 임상적 중요성이 없다는 것이 정설로 받아들여져 왔다.³ 그러나 1980년대 후반부터는 하부 대장의 증식성 용종이 상부 대장의 선종성 용종의 표지자라는 연구 결과들이 보고되었으며 일부 연구 보고들에서는 대장 선종과 유전 역학적으로 뿐만 아니라 해부학적 분포의 특성을 공유하고 있어서 선종성 용종 이전 단계의 전구 질환으로 여겨지고 있다.⁴ 이것은 종래에 매우 잘 알려진 “선종-암 연결현상(hyperplastic epithelium - dysplasia - adenoma - carcinoma sequence)”이 있다는 것을 의미하며, 여기에는 중간 단계에서 거치상 용종이 나타나는 소위 “거치상 경로(serrated pathway)”가 관여한다는 주장이 있다.⁵

본 연구를 착안하게 된 배경은 발달된 분자 생물학 적의 기법을 증식성 용종에 적용하고자 함에 다름 아니다. 국내에는 기존의 분자생물학 기술(Northern blot, RT-PCR, RNase protection assay, nuclear run-on assay)을 이용하여 밝혀진 용종에서의 유전자 변이들이 있기는 하지만 증식성 용종에 대한 microarray 연구 결과는 잘 알려져 있지 않다.

이에 저자들은 대장 내시경을 통해 얻어진 대장의 증식성 용종 중에서 조직학 소견이 거치상 용종(serrated polyp)으로 나타나는 검체의 유전자 발현 분포를 알기 위해 바이오칩을 이용한 분자 표지자 또는 표적을 찾고자 하였다.

방 법

본 연구에서는 병리 조직학적으로 거치상 증식성 용종으로 확인된 18쌍(18명 환자의 대장 용종 및 정상 점막 조직)의 검체를 시료 분리하여 사용하였다. 대장 내시경 검사에서 발견된 용종은 올가미로 절제하는 것을 원칙으로 하였으며 생검 검자로 최소 75% 이상을 절제하였다. 용종 조직의 절반은 진단을 위해 병리 조직 검사를 시행하고 나머지 절반은 RNA 파손을 막기 위한 방법으로 RNA later (Ambion Inc. Austin, USA)에 담근 후 4°C 이하에서 냉장 보관한 다음날 액체 질소 용기에 급속 냉동한 후 실험실로 운반하였다. 이 중에서 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA)분석을 통하여 RNA 상태가 양호한 3쌍의 검체를 대상으로 microarray 분석 및 GeneSpring 프로그램을 이용한 클러스터링 분석을 수행하였다.

사용된 바이오칩은 Genoscreen Platinum Biochip Human cancer 3.0 K (Genoscreen, Ansan, Korea) oligochip이었다. 이것은 Qiagen Operon에서 제공하는 Array-Ready Oligo set의 human cancer oligo set을 기본으로 이미 알려진 유전자(2,959개)와 기능이 알려지지 않은 EST 유전자(81개)가 점적되어 있으며, 바이오칩의 정도관리와 표준화를 위하여 3가지 종류의 spike control sample (24개)과 negative control 3X SSC (6개)들이 블록에 분산하여 점적되어 있다.

1) 형광 DNA 표지와 혼성화

전체 RNA는 Trizol 시약(Gibco BRL, USA)을 이용하여 병리조직학적으로 확인된 증식성 용종 검체 5예에서 추출하였다. 전체 RNA 30µg에 역전사 혼합물인 400U Superscript RNase H-reverse transcriptase (Gibco BRL, USA), oligo (dT)18, 0.5 mM dATP, dTTP, 0.2 mM dCTP, 0.1 mM Cy3 또는 Cy5로 표지된 dCTP(NEN Life Science, USA)를 첨가하여 총 30µl의 형광 표지된 cDNA 탐색자를 합성하였다. 역전사 반응 후 5µl의 반응 정지액(0.5M NaOH/50 mM EDTA)을 넣고, 65°C에서 10분간 처리하였다. cy3, cy5로 형광 표지된 cDNA는 에탄올 침전을 통해 농축한 후 12µl의 혼성화 용액(2X Denhardt's solution, 4.5% SDS, 1X SSC, 1 mM EDTA, 0.25 M Na2HPO4, 0.05 mg/ml yeast tRNA)을 이용하여 각각 녹여준다. 합성된 두 개의 cDNA를 똑같은 양으로 섞어서 95°C에서 2분간 변성시킨 후 45°C에서 20분간 처리하였다. cDNA 혼합물을 3000개의 DNA

가 집적되어 있는 슬라이드 글라스(GenoCheck, Korea)로 넣어준 후, cover 슬립(22×22 mm)을 덮고 혼합물이 글라스에 잘 분포되도록 하였다. 슬라이드를 반응



Fig. 1. Serrated type of hyperplastic polyp. Polypectomy specimen shows increased number and size of the glands. Serration and saw-teeth like luminal border (branching of the crypts) are characteristic. Nuclei of the glandular cells are not dysplastic. Compare the smooth luminal border of usual hyperplastic glands without serration in the other case (right lower box)(H&E, ×100).

chamber에 넣어준 후 62°C에 14시간 동안 혼성화 시켰다, 상온에서 2X SSC, 0.1% SDS용액을 이용하여 2분간 먼저 세척한 후, 1X SSC 용액에서 3분간, 그리고, 0.2X SSC 용액에서 2분간 세척하였다.

2) 스캐닝과 이미지 분석

혼성화가 끝난 후 슬라이드의 스캐닝은 GenePix 4000 B scanner (Axon, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 이미지 분석은 GenePix Pro 3.0 (Axon, CA, USA)와 GeneSpring (Silicon genetics, CA, USA)의 분석 프로그램을 사용하였으며 개별 spot의 분석은 GenePix에 내장된 알고리즘을 이용하여 수행하였다.

DNA chip의 data를 실험하는 sample 및 labeling dye의 특성, 실험에서의 variation을 보정하고 data의 신뢰성을 위해 normalization을 실시하였으며 본 실험에서는 intensity 및 localization-dependent normalization을 시행하였다. 결과의 표준화를 위해 양성 대조 유전자(*A. thaliana* genes and Amp genes)를 각 슬라이드에 점적하여 그 신호를 사용하였다. 데이터의 정확성을 높이기 위해 signal/noise의 값이 100 이하가 되는 값은 데이터에서 제외시켰다. 실험 결과의 통계학적 정확성을 확인하기 위해 SAM

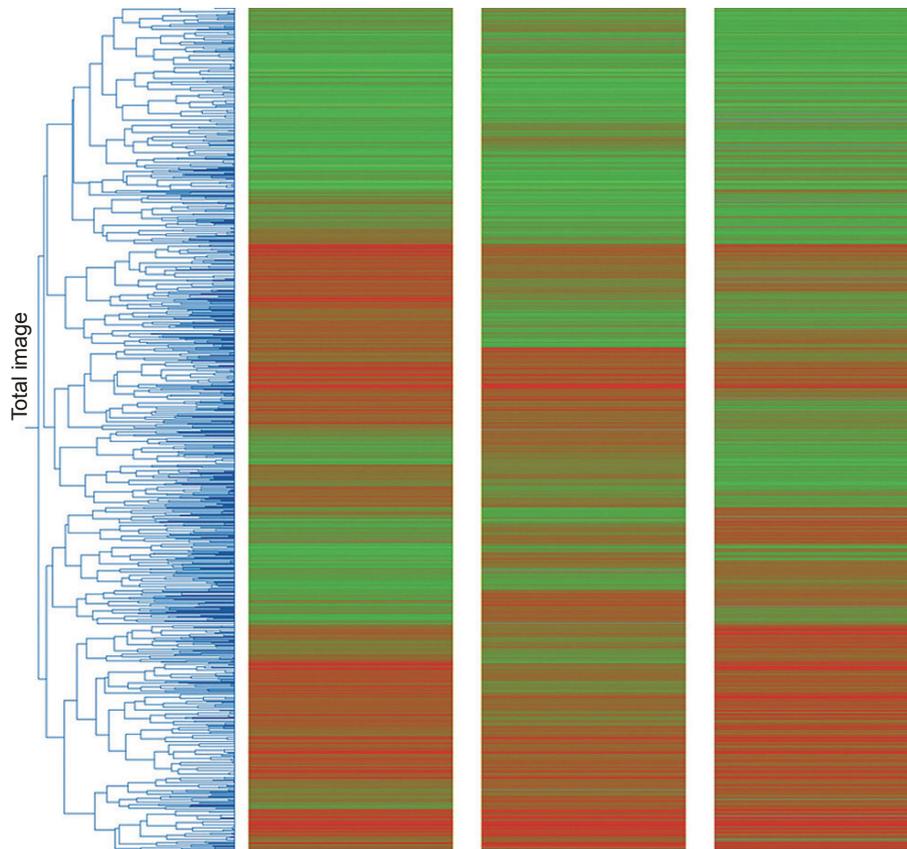


Fig. 2. Scanning and image of expression profiles in patients with serrated polyps. SAM (significance analysis of microarray) package method for identification of differentially expressed genes. Green colored section corresponds to down-regulated gene expression. Red colored section corresponds to up-regulated gene expression.

(Stanford Univ., CA, USA) 프로그램을 이용하였으며 실험 결과는 원격차단(distant cutoff)이 1.5 배수의 변화를 보일 때 통계적으로 유의하였고 cutoff 상관 계수는 0.95였다.

3) 통계분석

t-test는 실험군과 대조군 사이의 통계적 차이를 결정하기 위해 사용되었으며 다면 비교의 경우, 유의수준은 Bonferroni 조정법을 따랐다.

결 과

병리 조직 소견에서 증식성 용종의 톱니형 형태를

보이는 거치상 용종(Fig. 1)으로 확인된 3명의 환자는 모두 남자였으며 평균 연령은 평균 64 (60~68)세였다. 용종의 크기는 모두 1 cm 이하였으며 평균 크기는 0.6 (0.5~0.9) cm였다. 용종의 유전자 분석을 위해 단계적 무리 연산법(hierarchical clustering algorithm)을 사용한 스캔 영상 (Fig. 2)에서 과발현된 유전자들은 붉은 색깔로, 저발현된 유전자들은 녹색으로 나타났다.

Oligonucleotide microarray의 배열막에 점적된 3,096 개의 유전자 중 67개(2.2%)의 유전자들에서 정상 점막과 비교하였을 때 유의한 증가 혹은 감소를 보였다. 발현의 차이를 보인 유전자들 중 34개는 정상 점막의 것들과 비교하였을 때 과발현된 양상을 보였고 33개는

Table 1. Expression profiles of serrated polyps

Gene	GenBank number accession	Expression* pattern	Fold change	Chromosome location	Description
SIAT7D	NM_014403	Repressed	<0.1	9q34	Sialyltransferase 7D ((alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase)
DRD1	NM_000794	Repressed	<0.1	5q35.1	Dopamine receptor D1
SIAT1	NM_003032	Repressed	<0.1	3q27-q28	Sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
ITSN1	NM_003024	Repressed	<0.1	21q22.1-q22.2	Intersectin 1 (SH3 domain protein)
TNFSF13	NM_003809	Repressed	<0.1	17p13.1	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
CHES1	NM_005197	Repressed	<0.1	14q24.3-q32.11	Checkpoint suppressor 1
ZBTB7	NM_015898	Repressed	0.11	19p13.3	Zinc finger and BTB domain containing 7
PDCD4	NM_014456	Repressed	0.12	10q24	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
MT3	NM_005954	Repressed	0.15	16q13	Metallothionein 3 (growth inhibitory factor (neurotrophic))
SPIB	NM_003121	Repressed	0.15	19q13.3-q13.4	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
SIAH2	BC013082	Repressed	0.17	3q25	Seven in absentia homolog 2 (Drosophila)
NUP62	NM_016553	Repressed	0.19	19q13.33	Nucleoporin 62 kDa
E2F3	NM_001949	Repressed	0.19	6p22	E2F transcription factor 3
RARA	NM_000964	Repressed	0.20	17q21	Retinoic acid receptor, alpha
HRB2	NM_007043	Repressed	0.25	12q21.1	HIV-1 rev binding protein 2
EXT1	NM_000127	Repressed	0.27	8q24.11-q24.13	Exostoses (multiple) 1
HBA1	NM_000558	Repressed	0.27	16p13.3	Hemoglobin, alpha 1
CSK	NM_004383	Repressed	0.34	15q23-q25	C-src tyrosine kinase
LBX1	NM_006562	Repressed	0.35	10q24	Transcription factor similar to D. melanogaster homeodomain protein lady bird late
LILRB5	NM_006840	Repressed	0.36	19q13.4	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5
LOC63928	NM_022097	Repressed	0.36	16p12.1	Hepatocellular carcinoma antigen gene 520
CDH5	NM_001795	Repressed	0.37	16q22.1	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)
RAB22A	NM_020673	Repressed	0.39	20q13.32	RAB22A, member RAS oncogene family
ADAMTS8	NM_007037	Repressed	0.39	11q25	A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 8

*Expression profiles comparing with normal control mucosae were significantly up-regulated (induced) or down-regulated (repressed) in polyps by using the oligonucleotide microarray technique.

저발현된 양상을 보였다(Table 1). 이 중에서 10배 이상으로 현저하게 과발현된 유전자는 모두 8개로 RHEB (Ras homolog enriched in brain), WASF2 (WAS protein

family, member 2), TYRP1 (Tyrosinase-related protein 1), VSX1 (Visual system homeobox 1 homolog), ROS1 (V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1), WEE1

Table 1. Continued

Gene	GenBank number accession	Expression pattern	Fold change	Chromosome location	Description
BENE	U17077	Repressed	0.41	2q13	BENE protein
MARK3	NM_002376	Repressed	0.46	14q32.3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
NDN	NM_002487	Repressed	0.47	15q11.2-q12	Necdin homolog (mouse)
GPNMB	NM_002510	Repressed	0.48	7p15	Glycoprotein (transmembrane) nmb
KRT19	NM_002276	Repressed	0.48	17q21.2	Keratin 19
MYLK	NM_053025	Repressed	0.49	3q21	Myosin, light polypeptide kinase
FHL1	NM_001449	Repressed	0.49	Xq26	Four and a half LIM domains 1
SLC20A2	NM_006749	Repressed	0.49	8p12-q21	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2
PPP2R5B	NM_006244	Repressed	0.49	11q12-q13	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56)
TGIF	NM_003244	Induced	2.04	18p11.3	TGFB-induced factor (TALE family homeobox)
MAP17	NM_005764	Induced	2.05	1p33	Membrane-associated protein 17
HDAC1	NM_004964	Induced	2.06	1p34	Histone deacetylase 1
PLA2G2A	NM_000300	Induced	2.12	1p35	Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
EPHB2	AF025304	Induced	2.23	1p36.1-p35	EPH receptor B2
MMP12	NM_002426	Induced	2.29	11q22.3	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
ITGA6	NM_000210	Induced	2.29	2q31.1	Integrin, alpha 6
EPHB3	NM_004443	Induced	2.30	3q21-qter	EPH receptor B3
ENC1	NM_003633	Induced	2.33	5q12-q13.3	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
PHB	NM_002634	Induced	2.51	17q21	Prohibitin
SSBP2	NM_012446	Induced	2.53	5q14.1	Single-stranded DNA binding protein 2
IFITM1	NM_003641	Induced	2.58	11p15.5	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
CASP1	NM_033292	Induced	2.77	11q23	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease
SOD1	NM_000454	Induced	2.80	21q22.1	Superoxide dismutase 1
CCL11	NM_002986	Induced	2.82	17q21.1-q21.2	Chemokine (C-C motif) ligand 11
SPINK1	NM_003122	Induced	2.89	5q32	Serine protease inhibitor, Kazal type 1
MCM5	NM_006739	Induced	3.12	22q13.1	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5
IGFBP2	NM_000597	Induced	3.27	2q33-q34	Insulin-like growth factor binding protein 2, 36 kDa
FLJ39616	NM_016534	Induced	3.34	12q24.12	Apoptosis-related protein PNAS-1
AKAP8	NM_005858	Induced	3.42	19p13.1-q12	A kinase (PRKA) anchor protein 8
EOMES	NM_005442	Induced	3.63	3p21.3-p21.2	Eomesodermin homolog (Xenopus laevis)
ENTPD5	NM_001249	Induced	4.15	14q24	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
RASA1	NM_002890	Induced	4.18	5q13.3	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
LCN2	NM_005564	Induced	4.68	9q34	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)
MMP3	NM_002422	Induced	5.08	11q22.3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
GLS2	NM_013267	Induced	9.40	12q13	Glutaminase 2 (liver, mitochondrial)
RHEB	NM_005614	Induced	> 10	7q36	Ras homolog enriched in brain
WASF2	NM_006990	Induced	> 10	1p36.11-p34.3	WAS protein family, member 2
TYRP1	NM_000550	Induced	> 10	9p23	Tyrosinase-related protein 1
VSX1	NM_014588	Induced	> 10	20p11.23-p11.22	Visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish)
ROS1	NM_002944	Induced	> 10	6q22	V-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1 (avian)
WEE1	X62048	Induced	> 10	11p15.3-p15.1	WEE1 homolog (S. pombe)
TEC	NM_003215	Induced	> 10	4p12	Tec protein tyrosine kinase
TNFRSF10A	NM_003844	Induced	> 10	8p21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a

Table 2. Summarized results of gene expression before and after normalization

Gene	Specimen #1	Specimen #2	Specimen #3	Normalized specimen #1	Normalized specimen #2	Normalized specimen #3	Fold change
SIAT7D	-6.58	-4.38	-4.98	0.01	0.05	0.03	0.03*
DRD1	-5.75	-4.58	-4.34	0.02	0.04	0.05	0.04*
SIAT1	-4.92	-5.49	-3.47	0.03	0.02	0.09	0.05*
ITSN1	-4.79	-5.29	-3.56	0.04	0.03	0.08	0.05*
TNFSF13	-4.94	-5.03	-3.21	0.03	0.03	0.11	0.06*
CHES1	-5.05	-4.41	-2.51	0.03	0.05	0.18	0.09*
RHEB	2.73	2.81	4.53	6.65	6.99	23.15	12.26 [†]
WASF2	2.81	3.32	4.57	6.99	9.98	23.73	13.57 [†]
TYRP1	2.75	5.53	2.61	6.73	46.11	6.07	19.64 [†]
VSX1	4.31	5.17	4.75	19.88	35.91	26.89	27.56 [†]
ROS1	4.45	5.46	5.03	21.99	44.04	32.64	32.89 [†]
WEE1	3.63	5.89	5.09	12.42	59.11	34.19	35.24 [†]
TEC	2.61	4.75	6.29	6.09	26.92	78.14	37.05 [†]
TNFRSF10A	4.73	5.87	5.59	26.51	58.67	48.49	44.56 [†]

*Down-regulated by less than a tenth of the expression as compared with normal colonic mucosa; [†] Up-regulated by more than 10 times of the expression as compared with normal colonic mucosa.

(WEE1 homolog), TEC (Tec protein tyrosine kinase), TNFRSF10A (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a) 등이었다. 10배 이하로 현저하게 발현이 저하된 유전자는 모두 6개로 SIAT7D (Sialyltransferase 7D), DRD1 (Dopamine receptor D1), SIAT1 (Sialyltransferase 1), ITSN1 (Intersectin 1), TNFSF12 (Tumor necrosis factor superfamily, member 12), CHES1 (Checkpoint suppressor 1) 등이었다(Table 2).

고 찰

기능성 유전체의 분석은 생물 정보학의 발전과 함께 새로운 학문 분야로 떠올랐다. 빠르게는 만나질 만에 수 만개의 표본을 분석할 수 있는 수준으로 진보하였고, 수많은 유전 정보들을 손쉽게 분석하여 목표 질환에 대한 질병 과정을 예측할 수 있을 뿐 아니라 환자 개개인의 유전적 소인에 따른 진단과 치료가 결정되는 소위 “맞춤 의학”의 시대를 기대하게 되었다.² cDNA microarray는 서던 블롯이나 노던 블롯 분석과 같은 배열 기준 부합법(array based hybridization) 원리를 사용한 것으로서 수백 개에서 수천 개의 DNA를 질소 셀룰로오스막이 아닌 슬라이드 유리와 같은 기관 위에 고밀도로 정렬하여 고정한다. 이 분석의 장점은 한번의 실험으로 동시에 많은 수의 유전자들에 대한 발현 변이 양상을 탐색할 수 있으며 또한 유전자의 진

단, 돌연변이, 의약품의 효과 확인 및 질병 진단용 등에 널리 응용될 수 있는 새로운 차원의 HTS (high-throughput screening) 시스템이라고 할 수 있다.⁶

국내에는 기존의 분자생물학 기술들을 이용하여 밝혀진 용종에서의 유전자 변이들이 있기는 하지만 조직병리학적으로 증식성 용종으로 진단된 검체의 유전자 발현 분포를 알기위한 바이오칩 연구 결과는 아직까지 자세히 알려져 있지 않다. 임상에서 환자가 나이가 들어감에 따라 대장내시경을 통해 흔하게 관찰할 수 있는 소형의 용종들이 모두 선종성으로 진행되거나 암화의 과정을 밟는 것은 아니다. 그렇다면 환자에 따라 종양이 되지 못하고 증식성 용종으로 계속 남아 있는 경우와 선종성으로 진행되어 궁극적으로 암화 과정을 밟게 되는 용종은 유전자 발현이 서로 다를 것이라고 생각한다. 이 점이 저자들이 본 연구를 착안한 동기이다.

대장암의 대부분은 이미 존재하고 있던 선종성 용종에서 발생되고, 선종성 용종을 가지고 있는 환자는 일생 동안 10% 정도에서 암성 용종으로 진행된다고 한다.⁷ 대장에서 1 cm 이하로 미세하게 발견되는 대부분의 용종은 비신생화성의 단순증식에 의한 돌출로 이루어진 증식성 용종이다.⁸ 과거에 과형성 용종이라 불리어 왔으나 이제는 증식성 용종으로 불리는 이것은 비신생화성 용종으로 암화의 잠재성이 없어서 임상적 중요성이 없다고 간주되어 왔다. 즉, 종래의 전통

적인 개념으로는 비증양성이고 악성화로 진행되지 않는다는 것이 지배적인 의견이었다.³ 그러나 최근의 보고들^{4,5,9}에서 증식성 용종도 대장의 선종과 비교하였을 때, 분자유전학적뿐만 아니라 해부학적 분포의 특성을 공유하고 있어서 선종성 용종의 전구 질환의 가능성이 대두되었다. 이러한 견해를 뒷받침해주는 근거로서 증식성 용종에서도 암태아성 항원이 증가하고, 종양에서 주로 나타나는 점액소의 당항원인 Tn이 선종성 용종뿐만 아니라 증식성 용종에서도 발현한다는 것을 그 예로 들 수 있다.⁹ Jass¹⁰는 증식성 용종 자체가 신생화성 용종은 아니지만, 대장암을 유발하는 인자들에 의해 유발될 수 있다고 하였다. 그러나 대장 점막의 당단백질 합성과정에서 암과 관련한 신호변경을 초래하는 것이 가능하지만 악성으로의 형질 전환에는 저항성이 있어 증식성 용종이 곧바로 악성 변화를 일으키지는 않는다고 한다. 따라서 증식성 용종과 선종성 용종 및 대장암들이 형태학적으로뿐만 아니라 면역 조직화학적 측면에서도 상호간에 유전적 연속체일 것이라고 제시하였다.^{5,10,11} 이것은 종래에 잘 알려진 “선종-대장암 연결” 이론에 추가적으로 “증식상피 - 이형성 - 선종 - 선암종 연결(hyperplastic epithelium - dysplasia - adenoma - carcinoma sequence)이 있다는 것을 의미한다.

2005년에 Snover 등¹²은 대장의 용종을 증식성 용종, 거치상 선종(serrated adenoma; SA) 및 무경성 거치상 선종(sessile serrated adenoma; SSA) 등으로 분류한 다음, 이 세가지를 통틀어서 “거치상 용종”이라고 불렀다. 본 연구에서 사진으로 제시한 증식성 용종의 조직 소견도 거치상 용종에 해당하며, 창자샘이 확장되어 가지 모양으로 갈라지는 거치상 구조를 저명하게 보여주었다. 거치상 용종은 증식성 용종과 같이 존재하는 혼합형으로 나타나기도 하며 용종 전체가 거치상으로 보이기도 한다. 이러한 소견은 세포의 분화적인 측면 보다는 증식의 조절 양상이 다르기 때문에 발생한다. 특히, SSA는 우측 대장에 많고 대장암과 관련한 생물학적 표지자를 가지고 있다고 한다.¹² 거치상 용종의 조직학적 형태는 선종으로부터 종래의 고전적인 증식성 용종과 닮은 형태까지 다양하게 관찰된다. 최근의 조직학적 연구에서 제안된 세부적인 진단 기준은 1) 비정상적인 증식과 성숙 장애, 2) 창자샘의 확장된 증식 구역, 3) 창자샘 기저부의 확장과 톱니 모양의 구조, 4) 세포 성숙의 감소 등이다.¹³ 본 연구에서도 이 점을 거치상 용종을 구분하기 위한 병리 조직학적인 감별 지침으로 사용하였다.

만일 대장암이 한가지만의 원인이 아닌 별개의 서

로 다른 경로를 따라 발생하는 여러 가지 병인론들을 가지고 있다면 지금까지 알려지지 않은 발생 경로가 있을 것이다. 이중에서도 전술한 조직학적 진단 기준을 충족시키는 용종을 경유하여 암종으로 진행한다는 개념을 “거치상 경로(serrated pathway)”라고 부른다.¹⁴ 대장 점막에서 이와 같은 경로의 출발점으로 가장 빨리 나타난 병소를 변종 창자샘 병소(aberrant crypt foci, ACF)라고 하는데, 이것은 차후에 증식성 용종, 선종 및 거치상 선종 등으로 진행한다고 한다.¹⁵ 이를 알기 위한 근거들은 여러 연구에서 제시되었는데 이 중에서 대표적인 것으로는, 증식성 용종의 보다 증양적인 형태 즉, SSA가 있을 때 micro satellite instability, high type (MSI-H) 대장암과 관련이 있는 BRAF의 돌연변이와 DNA 메틸화가 나타난다는 것이다.^{14,16} BRAF 돌연변이와 DNA 메틸화는 MSI-H 대장암으로 발전하는 거치상 경로의 초기 변화이다. 거치상 선종과 증식성 용종에서 세포자멸의 억제제는 CD95 발현의 감소와 밀접한 관련이 있었으며 이러한 현상이 특징적인 톱니 모양의 구조를 유도한다고 한다.¹⁷ 거치상 선종으로 진행할수록 초기에는 SLC5A8 유전자가 메틸화 되며, 나중에는 유전자 내 CpG 섬의 비정상적이고도 광범한 메틸화가 나타난다.¹⁸ 이와 같은 최근의 연구 결과들은 거치상 선종의 경로를 거쳐 증양으로 발전한다는 소위 “증식성 용종 - 거치상 선종 - 대장암 연결 현상”이라는 가설의 가능성을 뒷받침해주는 결과라 할 수 있다.

본 연구의 분석 결과에서 정상 대장 점막 조직보다 10배 이상으로 과다 발현된 유전자들 중에서 대장암의 형성 과정과 관련이 있다고 타 문헌에서 보고된 유전자들과 일치하는 것들은 ROS (reactive oxygen species), TNFRSF (tumor necrosis factor receptor superfamily 10A) 및 MMP (matrix metalloproteinase) 일원들이다. ROS의 과다한 생성은 주요 유전자에 해로운 영향을 미쳐 DNA 손상 혹은 불안정을 가져오고 소화관 세포의 항상성에 지장을 주어 대장암이 발생하는 다단계 과정 중의 하나에 관여한다고 한다.¹⁹ 만성염증성 질환이 대장암으로 진행되는 것도 이것과 관련되어 있다.²⁰ 대장암 세포주에서 TNFRSF10A의 과다 발현은 p53과 독립적인 세포 자멸사를 유도한다.²¹ 본 연구에서 과다 발현된 MMP3를 포함한 MMP-1, 7, 13 등의 일원들은 대장암의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²² 본 연구에서 십분의 일 수준으로 과소 발현된 유전자들 중에서 증양 형성의 과정과 관련이 있는 것으로 기존에 발표된 유전자들과 일

치하는 것으로는 DRD1 (dopamine receptor D1), SIAT1 (sialyltransferase 1), TNFSF12, CHES1 (checkpoint suppressor 1) 및 PDCD4 (programmed cell death protein 4) 등이다.²³⁻²⁶ 도파민 수용체는 인간의 대장암 세포에서 대사변화를 유도하고 SIAT는 대장암의 생물학적 공격성의 좋은 지표이다.²³ TNFSF¹²은 인체 종양 생성에서 조절유전자로 기능하는 것으로 추론 되지만 자세한 기능은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.²⁴ CHES1은 종양 생성에 중요한 유전자를 억제하며 구강암 환자에서는 이것의 발현이 특징적으로 저하되었음이 증명된 바 있다.²⁵ PDCD4의 발현은 대장암 조직에서 매우 저하되거나 소실되었다고 한다.²⁶

본 연구에서 과다 또는 과소 발현된 유전자들이 증식성 용종의 톱니형 형태 즉, 거치상 용종에서 특이성이 있으며 재현성을 가지고 있는지 여부는 더 많은 증례를 통해 검증할 필요성이 있다. 저자들이 본 연구에서는 시행하지 못하였으나 각 유전자 별로 추후에 시행될 RT-PCR과 면역조직 화학연구를 이용하여 타당도(validation)를 검증해 보아 할 것으로 생각한다. 또한, microarray로 얻은 방대한 유전자 발현 패턴 정보를 다른 연구자들의 결과와 비교하는 문제도 남아있다. 저자들의 논제가 초기 선형적 연구인 이유가 여기에 있다. 이러한 문제점들이 보완된다면 본 연구의 결과는 증식성 용종의 암화 진전에 결정적인 유전자를 발굴할 수 있으며 이를 이용하여 잠재암 환자의 선별이나 치료를 위한 분자생물학적인 유도 지표로 응용할 수 있을 것임을 기대한다.

결 론

대장의 증식성 용종에서 나타나는 거치상 용종의 microarray 분석에서 대장암과 관련된 유전자들이 정상 점막의 것들과 비교하여 유의하게 과다 발현되었거나 과소 발현되었다. 본 연구의 결과는 증식성 용종도 악성화 잠재성을 가질 수 있다는 “거치상 경로”의 가능성을 가늠하는 데에 분자생물학적인 특성으로 활용할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 황일란, 조성원, 함기백. 소화기 질환에서 cDNA microarray 연구의 응용 및 전망. 대한소화기학회지 2003;41:241-49.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995;270:467-70.
- Achord JL. Hyperplastic colon polyps do not predict adenomas. Gastroenterology 1991;100:1142-3.
- Ansher AF, Lewis JH, Fleischer DE, Cattau EL Jr, Collen MJ, O’Kieffe DA, et al. Hyperplastic colonic polyps as a marker for adenomatous colonic polyps. Am J Gastroenterol 1989;84:113-7.
- Rashid A, Houlihan PS, Booker S, Petersen GM, Giardiello FM, Hamilton SR. Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. Gastroenterology 2000; 119:323-32.
- Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, et al. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. Cancer Res 2002;62:233-40.
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 1975;36:2251-70.
- 김재신, 송훤택, 지종대, 변관수, 박영태, 김중극 등. 하부 대장 과형성 용종의 의의. 대한소화기학회지 1993;25: 650-58.
- Itzkowitz SH, Bloom EJ, Lau TS, Kim YS. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. Gut 1992;33:518-23.
- Jass JR. Relation between metaplastic polyp and carcinoma of the colorectum. Lancet 1983;1:28-30.
- Boland CR, Montgomery CK, Kim YS. A cancer-associated mucin alteration in benign colonic polyps. Gastroenterology 1982;82:664-72.
- Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. Am J Clin Pathol 2005;124:380-91.
- Oberschmid BI, Dietmaier W, Hartmann A, Dahl E, Klopocki E, Beatty BG, et al. Distinct secreted Frizzled receptor protein 1 staining pattern in patients with hyperplastic polyposis coli syndrome. Arch Pathol Lab Med 2004;128:967-73.
- Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. Gut 2004;53:1137-44.
- Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. Gastroenterology 2002; 123:862-76.
- Higuchi T, Jass JR. My approach to serrated polyps of the colorectum. J Clin Pathol 2004;57:682-6.
- Tateyama H, Li W, Takahashi E, Miura Y, Sugiura H, Eimoto T. Apoptosis index and apoptosis-related antigen expression in serrated adenoma of the colorectum: The saw-toothed structure may be related to inhibition of apoptosis. Am J Surg Pathol 2002;26:249-56.
- Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim KM. Pro-

- gressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol* 2005;18:170-8.
19. van der Logt EM, Roelofs HM, Wobbes T, Nagengast FM, Peters WH. High oxygen radical production in patients with sporadic colorectal cancer. *Free Radic Biol Med* 2005;39:182-7.
 20. Seidelin JB, Nielsen OH. Continuous cytokine exposure of colonic epithelial cells induces DNA damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:363-9.
 21. Xu SQ, El-Deiry WS. p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:179-90.
 22. Roeb E, Arndt M, Jansen B, Schumpelick V, Matern S. Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:518-24.
 23. Scemama JL, Ruellan C, Clerc P, Clemente F, Ribet A. Dopamine receptors in a human colonic cancer cell line (HT29). Some receptor-related biological effects of dopamine. *Int J Cancer* 1984;34:675-9.
 24. Ho DH, Vu H, Brown SA, Donohue PJ, Hanscom HN, Winkles JA. Soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis overexpression in HEK293 cells promotes tumor growth and angiogenesis in athymic nude mice. *Cancer Res* 2004;64:8968-72.
 25. Chang JT, Wang HM, Chang KW, Chen WH, Wen MC, Hsu YM, et al. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma (OSCC): overexpression of NPM, CDK1 and NDRG1 and underexpression of CHES1. *Int J Cancer* 2005;114:942-9.
 26. Goke R, Barth P, Schmidt A, Samans B, Lankat-Buttgereit B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21 (Waf1/Cip1). *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1541-6.
-