

위암조직의 Ha-ras p21에 대한 면역조직화학적 연구

전주 예수병원 병리과 및 전남대학교 의과대학 병리학교실*

이 광 민 · 유 주 용*

서 론

지금까지 알려진 활성화된 종양유전자로부터 생성된 유전자 단백질질을 생물학적 기능에 따라 분류하면 세포핵에 존재하면서 세포분열과 핵단백 생성에 관여하는 종양유전자단백(C-myc, C-myb 및 C-fos 등), 세포질내 타이로신 부활소(tyrosine kinase) 활성을 증가시키며 성장인자 수용체 구조를 변형시켜 세포의 정상적인 증식 조절기능을 상실케하는 유전자 단백질(C-erb-B, C-fms, C-ras 및 C-mos 등), 성장인자 또는 성장인자 수용체 형성에 관여하는 유전자 단백질(Sis, erb-B1, erb-B2, C-fms, C-ros 및 C-met 등)과 세포막 근처에 존재하면서 세포막에 전달되는 G 단백질(guanine nucleotide-binding protein), 형질도입 신호조절에 관여하는 유전자 단백질(Ha-ras, Ki-ras 및 N-ras) 등으로 구별할 수 있다. 신경아세포종 세포에서 활성화된 N-ras 유전자 단백질이 처음으로 검출된 이래^{1,2)}, 발암 과정에서 종양유전자의 활성이 중요한 인자로 작용할 것으로 암시되었으며 종양유전자 활성화는 종양의 종류와 발생부위에 따라 관여하는 종양유전자의 종류가 다르다고 알려져 있고, N-myc 유전자는 신경세포에 존재하고 신경아세포종과 망막아세포종 세포에서 10~300배 이상 N-myc 유전자 단백질의 증폭을 볼 수 있다. 암세포에서 활성화된 ras 유전자 단백질의 발현은 유방암³⁾, 방광암⁴⁾ 및 전립선암⁵⁾ 등에서 암세포의 분화도, 침윤성 및 전이유무에 따라 다양한 것으로 알려져 있으며, 근래에 DNA 탐침법에 의한 각종 종양유전자 단백질의 양적변동을 종양세포로부터 검출할 수 있게 됨에 따라 세포의 전암성 변화와 종양의 예후 판정에 많은 도움을 줄 수 있는 지표가 될 것으로 기대된다.

이에 저자들은 한국에서 가장 많이 볼 수 있는 위암 조

직에서 암세포내 ras 종양유전자 단백질의 발현양태를 면역조직화학적 방법으로 검색하고 종양의 병리조직학적 양상 및 세포의 분화도 등과 관련지어 검토함으로써 위암 발생과정에서 ras 종양유전자의 역할을 규명코자 Ha-ras 유전자가 활성화될 때 생성되는 Ha-ras p21 단백질에 대한 면역조직화학적 소견을 위암의 조직학적 형태와 림프절 전이병소에서 비교 검토하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 실험대상으로 선정한 위암은 H&E 염색에서 병리조직학적으로 진단이 확정된 경우였으며 위암의 조직학적 분류는 WHO에서 설정한 기준에 따랐다.

관상 선암의 경우 암세포의 분화도에 따라, 잘 분화된 선암(11예), 중등도 분화암(16예)과 미분화된 선암(26예)으로 다시 분류하였고 인환세포 암(12예), 점액성 암(5예)과 유두상 암(3예)으로 분류하였으며 주변림프절에 전이된 세포에 표출된 위암(23예)에서도 원발병소에서와 같이 암세포의 조직학적 양상에 따라 분류하여 관찰하였다.

1. 면역 조직화학적 염색

Avidin과 biotin 사이의 강한 결합력을 이용한 avidin-biotin complex (ABC)에 의하여 immunoperoxidase법⁶⁾으로 위암 조직에서 Ha-ras p21을 염색하였다.

조직을 중성 포르말린에 고정시킨후 파라핀에 포매하여 약 5um두께의 조직절편을 만들어 xylene과 alcohol을 거쳐 중류수로 함수시킨후, 1% periodic acid액으로 15분간 작용시켜 내재성 peroxidase 활성을 억제시켰고, PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, 10 ml, pH 7.6)로 수세하였다. 1차 및 2차 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 조직을 정상 토끼혈청(Vector

Co.)에 15분간 작용시킨 후 1차 항체인 anti-Human-Ha-ras p21 IgG (Oncor Co.)를 PBS로 20배 희석하여 humidity chamber 내에 슬라이드를 넣고 실온에서 16 시간 도포하였고 PBS로 수세하였다. 2차 항체인 산양의 biotinylated horseradish peroxidase H complex (ABC, Vector Co.)를 30분간 반응시킨 후, peroxidase의 기질액인 과산화수소와 발색제인 DAB (diaminobenzidine 4 HCl, Sigma Co.)를 작용시켰다.

핵염색은 methyl green으로 시행했으며, 1차항체 대신 PBS만을 도포시킨 표본을 음성대조로, ras 양성 암세포가 확인된 위암 조직을 양성대조로 하였다.

2. 양성 세포 백분율 및 염색강도 지수 산출

위와 같이 염색된 조직 표본은 판독상의 오차를 줄이기 위하여 병리 전문의 3인이 동시에 검경하였다. 위암의 조직형과 암세포의 분화도에 따라 Ha-ras p21 단백질의 발현양상을 비교할 목적으로 면역 조직화학적 염색에 의한 Ha-ras p21 단백질 양성세포의 백분율은 (양성반응 세포수/총세포수) × 100으로 계산했으며 양성반응 정도에 따라 전혀 반응하지 않는 세포를 0, 약한 양성반응 세포를 1, 중등도 양성 세포를 2, 그리고 강한 양성반응 세포를 3으로 구분하고 각기 구분된 세포들의 백분율을 산출 후 염색강도 지수(staining intensity index; SII)⁷⁾는 [(음성 암세포의 백분율×0) + (약양성 암세포의 백분율×1) + (중등도 양성 암세포의 백분율×2) + (강양성 암세포의 백분율×3)]/100으로 산출하여 반정량 분석을 시행하였다.

성 적

실험방법에서 제시한 바와 같이 위암을 조직학적 형태에 따라 분류하고 위암의 원발 병소와 주위림프절에 전이된 암소를 구분하여 Ha-ras p21단백의 면역 조직화학적 소견을 종합하면 다음과 같다(Fig. 1).

1. 관상 선암

관상 선암에서 암세포의 분화도에 따라 Ha-ras p21에 대한 면역조직화학적 소견을 비교하면 잘 분화된 선암에서 Ha-ras p21 양성세포는 47.0±32.6%이고 중등도 분화 선암에서는 47.1±29.1%로서 미분화된 선암에서 나타난 22.5±26.1%에 비하면 양성세포들의 유의한 증

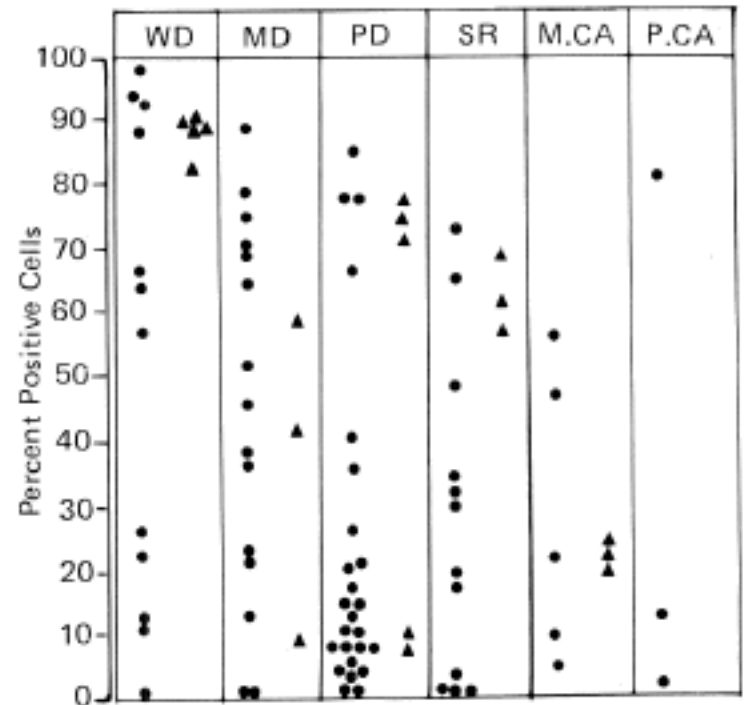


Fig. 1. Percent of Ha-ras p21 positive cells of gastric carcinoma in primary mass (closed circle) and metastatic lymph node (triangle circle) with various histologic types: WD, Well differentiated; MD, Moderately differentiated; PD, Poorly differentiated tubular adenocarcinoma; SR, Signet ring cell carcinoma; M. CA, Mucinous carcinoma; P.CA, Papillary carcinoma. The percentage of positive cells denotes the number of tumor cells scoring Ha-ras p21 positive divided by the total number of tumor cells × 100.

가를 볼 수 있었고($p < 0.01$), 염색강도 지수(SII)에서도 미분화 선암에서 0.4 ± 0.5 인데 비해 잘 분화된 선암과 중등도 분화 선암에 각각 0.7 ± 0.6 및 0.7 ± 0.5 였으며 분화가 잘 된 선암 세포는 미분화 선암에 비해 Ha-ras p21 단백질의 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$) (Table 1). 면역 조직화학적 염색소견에서 Ha-ras p21 양성물질은 잘 분화된 선암에서 미만성으로 출현하고 있으며 일부 양성세포들은 짙게 염색되는 양성물질이 과립상으로 출현하고 양성반응의 강도는 약한 양성세포로부터 강한 양성세포에 이르기까지 다양한 강도를 보이는 세포들이 혼재하고 있었다(사진 1).

미분화 선암에서는 양성과립이 조잡한 과립상으로 출현하고 세포막 주변에 많이 응집되어 있는 것을 볼 수 있으나 암세포내 Ha-ras p21 양성반응은 잘 분화된 선암에 비해 뚜렷하게 감소되었음을 볼 수 있었다(사진 2).

2. 인환세포 암

분화도가 좋은 관상 腺癌($47.0 \pm 32.6\%$)에 비해 인환

Table 1. Immunoperoxidase reactivity for Ha-ras P21 in gastric carcinoma according to histological pattern (73 cases examined)

Histological patterns Immunohistochemical staining for Ha-ras P21	Tubular adenocarcinoma			SR (n=12)	M.CA (n=5)	P.CA (n=3)
	WD (n=11)	MD (n=16)	PD (n=26)			
Percent of Ha-ras P21 positive cell	47.0±32.6 (P < 0.01) ^a	47.1±29.1 (P < 0.01) ^b	22.5±26.1	27.6±25.2	37.8±36.4	32.2±42.2
Staining intensity index (SII)*	0.7± 0.6	0.7± 0.5	0.4± 0.5 (P < 0.05) ^c	0.4± 0.5	0.5± 0.6	0.6± 0.9

ABBREVIATIONS : WD, Well differentiated ; MD, moderately differentiated ; PD, Poorly differentiated ; SR, Signet ring cell carcinoma ; M.CA, Mucinous carcinoma ; P.CA, Papillary carcinoma.

Data given are mean ± SE.

* Estimated same as in table 1.

a : Compared to PD.

b : Compared to PD.

c : Compared to MD.

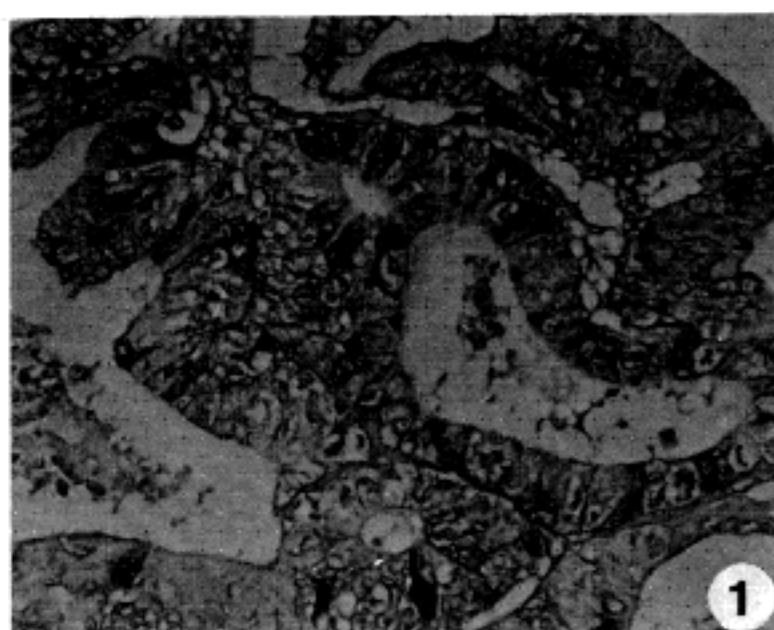


사진 1. Well differentiated tubular adenocarcinoma of stomach in primary mass. Expression of Ha-ras p21 antigen is increased in the cytoplasm of tumor cells with heterogeneous staining intensity. (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, ×200)

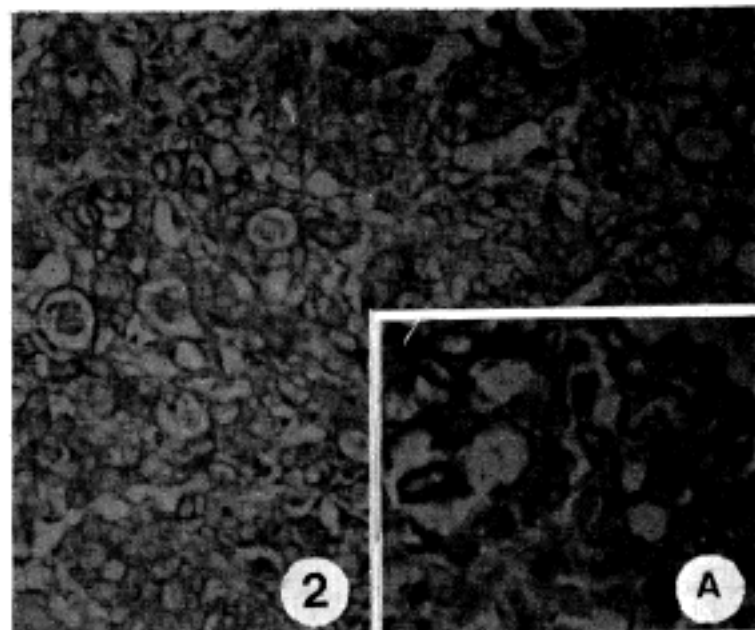


사진 2. Poorly differentiated tubular adenocarcinoma of stomach in primary mass. Immunoreactivity with Ha-ras p21 antibody shows decreased expression compared to well differentiated tubular adenocarcinoma. (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, ×200) (A) Heterogeneous reaction products are present in the cytoplasm of tumor cells (inset). (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, ×400)

세포 암인 경우 Ha-ras p21 양성세포가 27.6±25.2%로서 현저하게 감소되어 있었고 미분화 관상 腺癌(22.5±26.1%)과는 비슷한 양성율을 보였다.

양성반응의 염색강도 지수도 잘 분화된 관상 선암과 중등도로 분화된 선암에서 각각 0.7±0.6 및 0.7±0.5인데 비해 인환세포 암에서는 0.4±0.5로서 감소된 경향이었으며 미분화 관상 선암과는 비슷한 염색강도 지수를 보였다.

면역 조직화학적 염색조건에서 Ha-ras p21 양성반응은 대부분 세포질내에 점액이 적고 소량의 세포질을 갖

는 세포에서 출현하고 있으며 세포질 내부에 점액생성이 풍부하여 핵의 편재가 뚜렷한 전형적인 인환세포에서는 거의 양성반응을 볼 수 없었다(사진 3).

3. 점액성 암

점액성 암에서 Ha-ras p21 양성세포 출현율과 양성반응 강도지수는 각각 37.8±36.4% 및 0.5±0.6으로 중

Table 2. Immunoperoxidase reactivity for Ha-ras P21 of metastatic gastric carcinoma in the regional lymph node (23 cases examined)

Immunohistochemical staining for Ha-ras P21	Tubular adenocarcinoma			SR (n=3)	M.CA (n=3)
	WD (n=5)	MD (n=3)	PD (n=6)		
Percent of Ha-ras P21 positive cell	81.5 ± 10.7 (P < 0.001) ^a	37.3 ± 26.4	39.4 ± 40.2	61.5 ± 27.8	24.4 ± 4.9
Staining intensity index (SII)*	2.3 ± 0.5	0.6 ± 0.4 (P < 0.01) ^b	0.9 ± 1.0	1.0 ± 0.7	0.3 ± 0.2 (P < 0.01) ^c

ABBREVIATIONS : WD, Well differentiated ; MD, moderately differentiated ; PD poorly differentiated ; SR, Signet ring cell carcinoma ; M.CA, Mucinous carcinoma.

Data given are mean ± SE.

* Estimated same as in table 1.

a : Compared to M.CA.

b : Compared to WD.

c : Compared to WD.

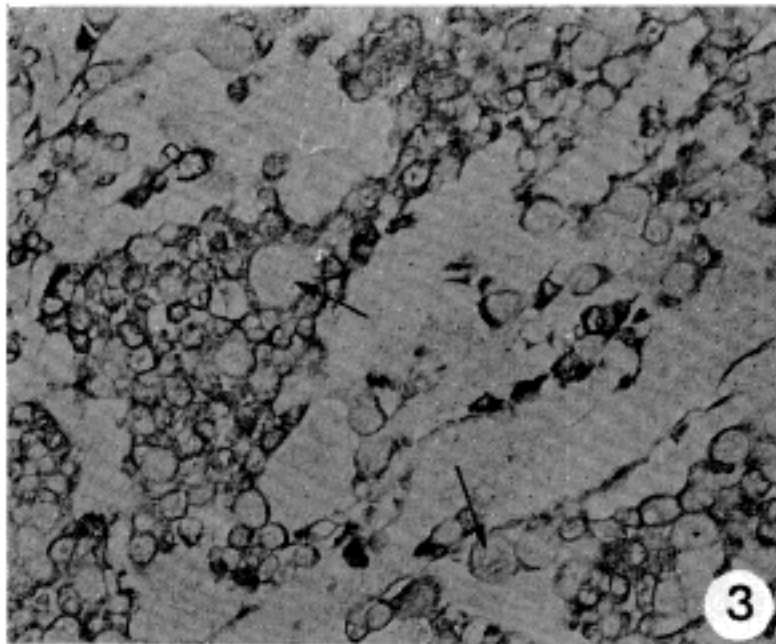


사진 3. Signet ring cell carcinoma in primary mass. Membrane bound-immunoreactivity for Ha-ras p21 is visualized in the majority of immature type signet ring cell rather than mature type signet ring cell (arrow). (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, ×200)

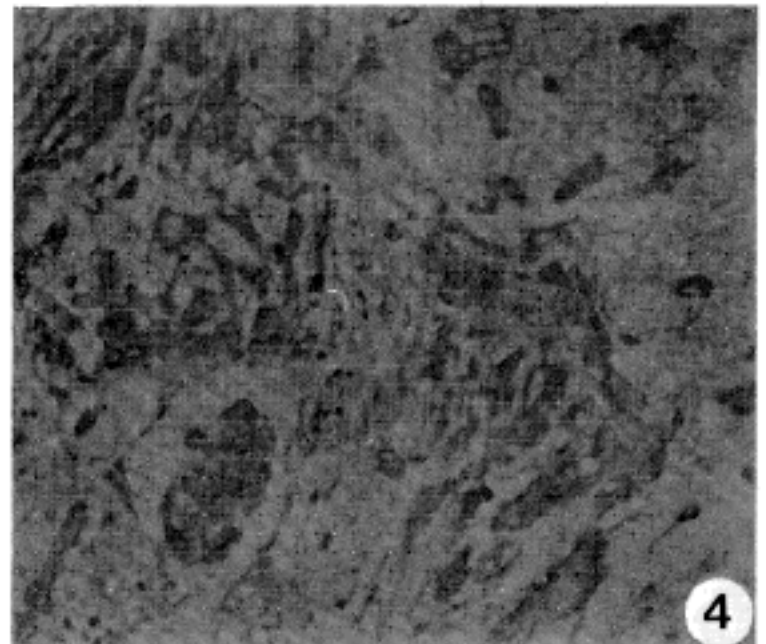


사진 4. Mucinous carcinoma in primary mass. Note faint expression for Ha-ras p21 in the tumor cells with mucin pool background. (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, ×200)

등도 내지는 잘 분화된 관상 선암에 비해 다소 감소된 경향이었으며 인환세포 암과는 유사한 양성세포의 백분율과 염색강도 지수를 보였다(사진 4).

4. 유두상 암

양성세포의 백분율과 면역 조직화학적 양성반응의 강도지수는 각각 32.2±42.2% 및 0.6±0.9이었으며 점액성 암과 비슷한 소견이었다.

5. 림프절 전이 위암

림프절에 전이된 위암의 조직형태에 따라 Ha-ras p21 양성 세포를 비교해 보면, 잘 분화된 관상 선암에서는 양성세포의 백분율이 81.5±10.7%이고 양성반응 염색강도 지수는 2.3±0.5이었으며, 이는 점액성 암의 양성 세포 백분율 24.4±4.9%와 염색강도 지수 0.3±0.2에 비해 현저히 증가된 소견이었다(p<0.01).

중등도 분화 선암에서 Ha-ras p21 양성세포 백분율과 양성반응 염색강도 지수는 각각 37.3±26.4% 및 0.6±

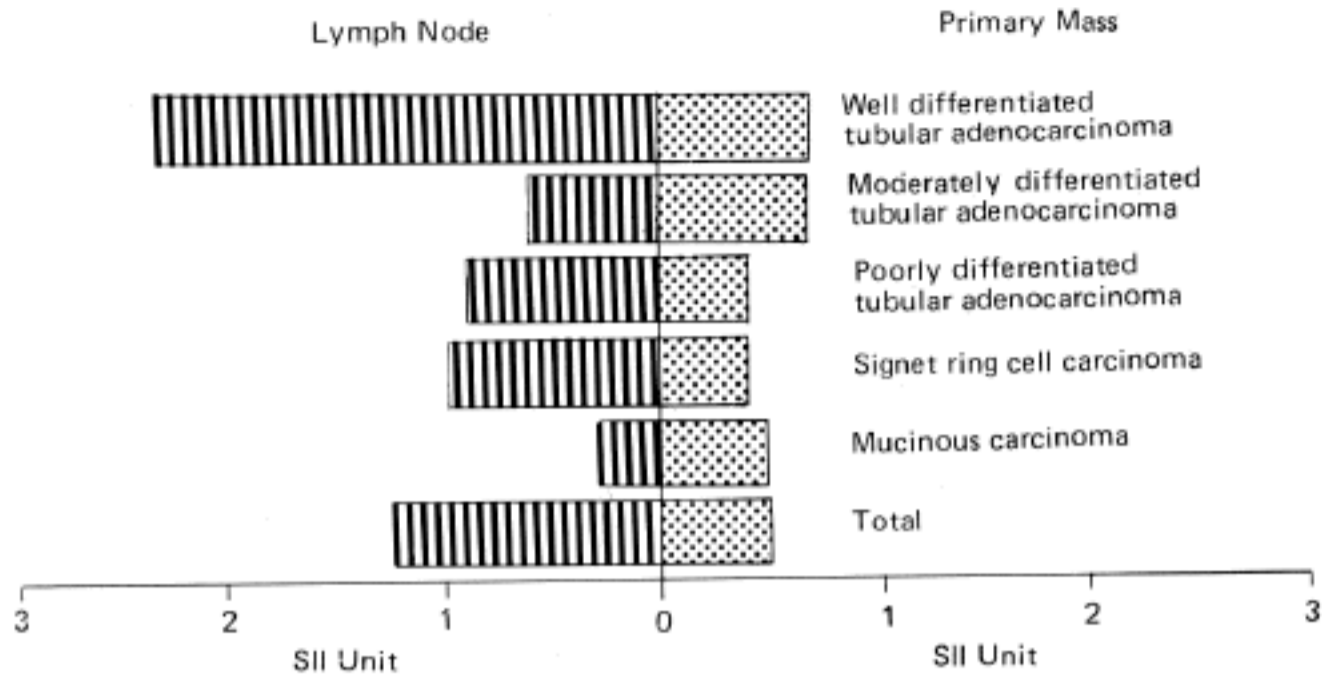


Fig. 2. Comparison of staining intensity index (SII) for immunohistochemical reactivity of Ha-ras p21 between in primary and SII unit estimated same as in table 1.

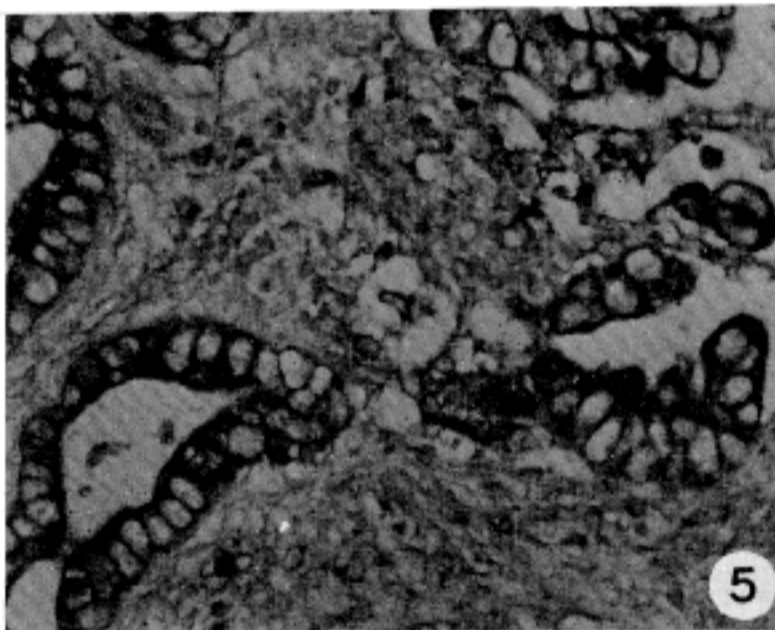


사진 5. Well differentiated tubular adenocarcinoma in the regional lymph node shows markedly enhanced expression of Ha-ras p21. Positive reaction product is present mainly in the luminal cytoplasm with diffuse staining pattern. (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, $\times 200$)

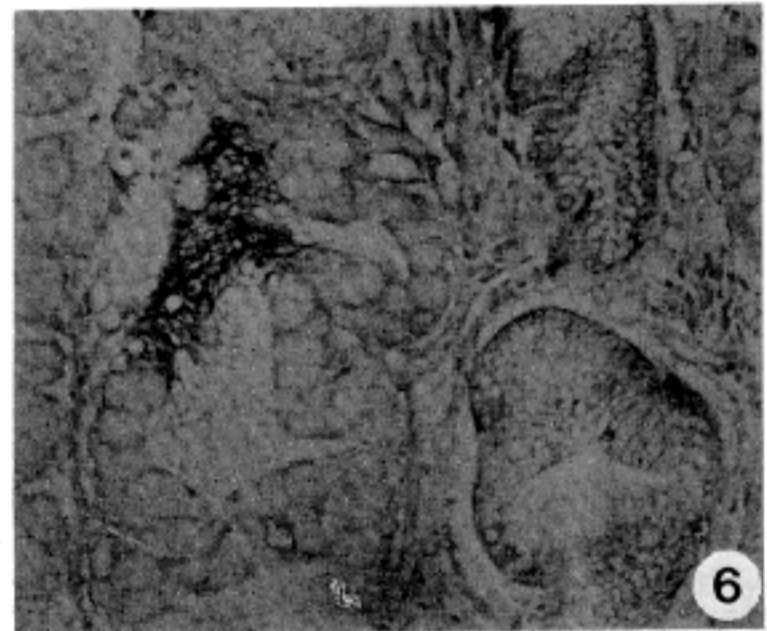


사진 6. Adjacent normal gastric mucosa does not express Ha-ras p21 antigen with focal reaction for ras p21 in the dysplastic goblet cells. (ABC immunoperoxidase method, methyl green counterstain, $\times 200$)

0.4였고 미분화 선암에서는 $39.4 \pm 40.2\%$ 의 양성세포와 0.9 ± 1.0 의 염색강도 지수를 보이고 있으며 이는 잘 분화된 관상 선암에 비해 Ha-ras p21의 유의한 감소를 의미한다($p < 0.01$) (Table 2).

림프절이 전이된 점액성 위암에서 Ha-ras p21 양성세포 백분율은 $24.4 \pm 4.9\%$ 이고 양성반응 염색강도 지수

는 0.3 ± 0.2 로서 잘 분화된 관상 선암에 비하면 점액성 위암세포에서 Ha-ras p21의 현저한 감소가 있었다($p < 0.01$).

위암의 원발병소와 림프절에 전이된 위암조직에서 면역 조직화학적 양성반응에 따라 암세포내에 Ha-ras p21 단백질표현을 비교하면 다음과 같다(Fig. 1, 2).

분화도가 좋은 관상 선암은 원발 암소에서 양성세포 백분율과 염색강도 지수가 각각 $47.0 \pm 32.6\%$ 및 $0.7 \pm$

0.6인데 반하여 림프절 전이암소에서는 양성세포가 $81.5 \pm 10.7\%$, 염색강도 지수는 2.3 ± 0.5 로 원발암소에 비해서 림프절 전이 암소에서 가장 높은 증가를 보였다. 그러나 분화도가 좋지 않은 미분화 선암이나 인환세포 암에서도 원발암소에 비하여 림프절전이 암소에서 Ha-ras p21이 다소 증가되는 경향이었으나 분화도가 좋은 관상 선암에 비하면 경미한 증가를 보이고 있다.

따라서 염색강도 지수를 기준하여 위암의 원발암소와 림프절전이 암소를 비교하면 전체적으로 림프절전이 암소에서 Ha-ras p21이 증가됨을 알 수 있었다.

고 안

세포 종양유전자 활성화는 유전자의 점상 돌연변이, 분자구조의 결손, 염색체 재배열에 의한 암호 단백질구조의 변화와 증폭 또는 전사에 의한 세포내 유전자 단백질의 양적 변동에 의해서 이루어지며, 생활환경에서 끊임없이 노출되고 있는 발암성 화학물질과 방사능은 세포유전자 변이를 유발하고 있다. 그러기에 세포내 종양유전자의 표현변화는 종양 발생과정에서 공통적으로 초래될 수 있는 세포변화라 할 수 있다.

세포내 ras 종양유전자에는 Harvey murine sarcoma virus와 Kirstein murine sarcoma virus에서 전환된 유전자와 동질성인 Ha-ras p21과 Ki-ras, 그리고 신경아세포종에서 전환된 DNA를 이용하여 전사 검출된 N-ras 종양유전자가 있는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서 검출한 Ha-ras p21 단백질은 분자량 21,000 dalton에 해당하는 폴리펩티드로서 활성화된 ras 유전자 암호단백에 들어있고, ras 유전자 암호단백은 형질막 내면에 존재하면서 세포막 암호형질 도입을 조절하여 정상세포에서는 세포분화 및 증식 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다.

그러나 ras 유전자의 점상 돌연변이가 종양 발생과정에서 어떻게 유발되는가는 명확치 않으며 발암 과정에서 ras 유전자의 점상 돌연변이가 필수적인 요건은 아니며 단일 ras 유전자에 점상 돌연변이가 발생해도 그것만으로 종양발생에 충분한 조건이 될 수 없고⁸⁾, 생체내에서 발암과정에 관여하는 종양유전자 변이 또는 활성화는 여러개의 유전자들이 다단계 과정을 거쳐서 활성화 된다고 한다.

Barbacid⁹⁾와 Levison¹⁰⁾은 nitrosomethylurea, di-

methylbenzanthracene으로 유발한 포유동물 유방암과 피부 편평상피 유두종 및 피부암에서 Ha-ras 유전자 활성이 일어나고, 방사능 조사후 발생하는 흉선 림프종에서 Ki-ras 유전자가 활성화됨을 보고하였으며, 사람에서 대장암, 전립선암 그리고 흑색종 등에서의 ras 유전자 활성화는 종양의 진행, 침윤성 및 전이 등과 관련이 있고, 방광에 발생하는 이행 상피암과 편평세포 유두종에서도 초기에 ras 유전자 활성이 일어난다고 알려져 있다⁹⁾.

그러나 세포내부에서 발암효과가 충분히 일어날 수 있는 유전자 표현변화는 수년 이상의 오랜 시간을 필요로 하며 발암과정에서 종양유전자의 활성화는 여러 종류의 종양유전자들이 세포의 발암현상이 진행되는 과정에서 단계적으로 활성화되는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹³⁾.

Augenlicht¹⁴⁾은 대장암에서 비교적 분화도가 좋고 종양 발육속도가 좋은 세포에서 ras 유전자 표현이 증가된다고 보고하였으며, 이는 본 연구에서 가장 분화도가 좋은 관상 선암에서 Ha-ras p21 양성세포 출현율이 높고 면역 조직화학적 양성반응에서 염색강도 지수가 가장 높았던 성적과도 일치한다. Garin Chesta¹⁵⁾과 Gallick¹⁶⁾은 분화가 잘 된 암세포에의 ras 유전자표현은 증가되어 있으나 종말기에 이르면 ras 유전자 표현이 감퇴되고, 초기원발 암소에 비하여 림프절, 간, 폐 그리고 대망 등에 전이된 대장암에서는 ras 유전자 표현이 감소되며, 특히 간장에 전이된 대장암 세포에서 ras 유전자 표현이 감소되어 있다고 주장하고 있는데, 이는 원발암소의 발생장소 그리고 전이된 장기에 따라 세포내 ras 유전자 활성이 다양함을 암시하며 특히 전이된 암소에서는 조직환경에 따라 종양유전자 활성을 억제시키는 억제 유전자의 세포내 활성화도 상관관계가 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 위암세포에 출현하는 Ha-ras p21 단백을 미분화 선암과 인환세포 암에 비해서 분화도가 좋은 관상 선암에서 가장 많이 출현하고 있었으며 이는 ras 유전자활성과 암세포 분화도에 밀접한 연관성이 있음을 암시한다. 위장관 점막에 발생한 선종세포는 정상 점막상피세포에 비해 증식능이 증가되고 세포의 주기시간(cycle time)이 단축되어¹⁷⁾ 암세포에 비해 주기시간이 단축된 선종에서 ras 유전자 활성이 증가한 점으로 미루어 본 실험에서와 같이 분화도가 좋은 위암세포에서 Ha-ras p21 단백질이 증가되고 있음은 미분화 암세포에 비

해서 세포 주기시간이 단축된 암세포에서 ras 유전자 활성이 높다고 생각되며 암세포로 전환되는 초기단계에서 ras 유전자 활성이 높다고 지적한 견해¹⁸⁾와도 연관시킬 수 있다. 인환세포 암에서 Ha-ras p21 단백 양성세포들은 대부분 세포질이 빈약한 적은 세포들에서 볼 수 있고 풍부한 세포질과 함께 핵이 편재되어 있으며 H&E 염색에서 세포질내 점액질 축적이 풍부한 인환세포에서는 대부분 Ha-ras p21 단백 음성반응을 보였다(사진 3). 이는 Ha-ras 유전자 활성이 위암세포에서의 점액 생성 촉진과는 무관함을 암시하고 대장암에서의 소견¹⁴⁾과는 대조적이다.

면역조직화학적 염색소견에서 Ha-ras p21 양성반응을 보이는 암세포들은 양성반응의 강도가 모든 세포에서 균일하지 않고 암소를 형성하는 세포들은 약한 양성반응 세포로부터 강한 양성세포에 이르기까지 불균질성 세포로 구성되어 있음을 볼 수 있었고 특히 미분화 선암에서 뚜렷하다(사진 2).

이와같이 암소내 Ha-ras p21 양성세포들의 불균질성은 세포내 종양유전자 단백질활성은 세포주기의 시기에 따라 다를 수 있음¹⁹⁾을 고려할 때, Go, G1, S 그리고 G2 phase에 있는 세포들이 동일한 암소내에 혼재되었을 때 개개 세포에 따라 양성반응의 강도에 차이가 있을 수 있다.

ras 유전자 활성은 세포환경에 영향을 받을 것이라는 주장^{20,21)}과 함께 Go/G1 phase에는 세포내 c-myc mRNA치가 가장 낮고 성장인자 첨가 후 2시간에는 c-myc mRNA가 증가된다는 사실¹⁹⁾은 세포주기에 따라 유전자 단백질활성에 차이가 있음을 암시한다.

Fromowitz등²²⁾은 내관성 유방암종보다 침윤성 유방암에서 암세포내 ras p21 단백질이 현저히 증가하며 이는 유방암에서 암세포의 주변조직에 대한 침윤성 잠재력과 관련한 것으로 알려졌고 림프절이나 혈관내에 전색을 일으킨 유방암세포에서 ras p21 단백질표현이 증가되고 있음은 유방암의 예후 및 전이상태 등과 관련이 있음을 암시하며 암세포에서의 ras p21 단백질표현은 암환자의 치료 및 예후 판정에 지침이 될 수 있는 가능성을 제시하였다.

저자들의 성적에서도 원발 암소에 있는 세포들의 Ha-ras p21 표현 양성세포에 비해 림프절에 전이된 암세포에서 증가된 경향을 보이고 있으며 특히 분화가 잘 된 관상 선암인 경우 림프절에 전이된 암소에서 Ha-ras

p21 단백 양성세포가 월등히 증가하고 있다. 원발 암소에서도 분화도가 좋은 선암에서 Ha-ras p21 단백 양성세포가 가장 많았으나 림프절 전이암소에서는 분화도가 좋은 선암에서 Ha-ras p21 단백 표현이 훨씬 높은 증가율을 보이고 있음은 ras 유전자 활성이 강한 암세포들이 림프절 전이를 잘 일으킨다고 가정할 때 Ha-ras p21 단백 양성세포들이 림프절내에 집중적으로 전이될 가능성도 있다. 그러나 암세포의 전이 잠재력은 ras 유전자 활성만으로 충분한 설명이 불가능하므로 본 실험만으로 결론지을 수는 없다.

미분화 선암이나 점액성 암에서는 림프절에 전이된 암소에서 Ha-ras p21 단백질이 원발 암소와 유사했고 이는 ras 유전자 활성이 강한 암세포에서 혈관전색 또는 림프절 전이를 잘 일으키는 잠재력이 높다고 가정할 때, 세포분화도와 침윤성 잠재력과는 무관하다고 주장한 Augenlicht¹⁴⁾의 견해와 일치하였다.

Fromowitz등²²⁾은 유방암 소견에서 ras p21 표현단백이 증가될 때 임상적 예후가 좋지 않다고 보고했다. ras p21 단백질의 생물학적 기능은 아직 확실히 규명되어 있지 않으나 지금까지 알려진 사실²²⁾로는 세포막에 존재하는 암호형질도입 G 단백질과 동질단백으로서 GTP (guanosine triphosphate)와 결합하여 세포 증식을 자극상태로 만들고 GTPase에 의한 가수분해에 의해서 생성된 GDP (guanosine diphosphate)와 결합하면 비활동성이환상태로 전환시켜 세포 증식과 정상 분화를 조절할 수 있으나 ras 유전자 점상 변이가 발생하면 이러한 조절기능을 상실하게 된다. 따라서 퇴행성 변화가 심한 미분화 선암이나 점액성 암에서 Ha-ras p21 표현단백이 감소된 것은 초기에 활성화되었던 ras 유전자에 의해서 세포 내부환경의 변화로 ras 유전자 활성이 억제될 가능성도 있다.

본 연구에서 암세포 침윤이 없는 정상 위점막의 위선상피세포 일부가 Ha-ras p21 표현단백 양성반응을 보이고 있음은 암세포로 발전하기 이전에 ras 유전자의 활성화가 이루어질 가능성을 암시하고 있다.

Weinberg²³⁾는 주변에 있는 비종양세포로부터 충분한 종양유전자 억제기능이 없어졌을 때 종양유전자의 지속적인 활성화로 인하여 암세포로 전환한다고 주장하며 억제유전자의 존재를 제창하였다.

근래 횡문근 육종, Wilms종양, 간아세포종과 방광암 등에서 종양세포 표현형을 억제시키는 유전암호가 위치

한 11번과 13번 염색체가 삭제된 사실이 밝혀짐에 따라^{24,25)}, 이들 종양은 분자 유전학적으로 억제유전자의 기능이 상실되어 발생한다고 한다. 따라서 종양 발생과정에서 세포내 종양유전자 활성화는 억제유전자 역할과 상관관계가 있음을 암시하고 종양의 진단 및 치료에 도움을 주기 위해서는 종양유전자에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

위암의 조직학적 형태와 ras 유전자 활성화와의 관련성을 검토하기 위하여 원발암소 73예와 림프절 전이암소 23예를 선정하여 포르말린 고정후 파라핀절편을 제작하여 avidin-biotin complex (ABC) immunoperoxidase 법을 이용하여 위암조직에서 Ha-ras p21에 대한 면역조직화학적 소견을 검토하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 잘 분화된 선암 조직에서는 Ha-ras p21 표현이 항상 증가되어 있었으며 이는 미분화 선암에 비해 유의한 상승을 보였고 점액성 암과 인환세포 암에서는 ras 유전자 표현이 감소되었다.

2) 인환세포 암에서 출현하는 Ha-ras p21 양성반응은 대부분 미성숙 인환세포에서 볼 수 있었고 점액 축적이 많은 성숙 인환세포에서는 잘 나타나지 않는 점으로 미루어 위암 세포에서 ras 유전자 활성화는 암세포로부터의 점액 생성과는 관련이 없음을 의미하였다.

3) 일반적으로 림프절에 전이된 위암 세포에서 Ha-ras p21 표현이 증가되었고 특히 잘 분화된 선암세포에서 더 뚜렷한 경향을 보였다.

참 고 문 헌

- 1) Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M: Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell* 34:581-586, 1983
- 2) Shimizu K, Goldfarb M, Surard Y, Perucho M, Li Y, Kamala T, et al: Three human transforming genes are related to the viral ras genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2112-2116, 1983
- 3) Pulciani S, Santos E, Lauves AV, et al: Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 300:539-542, 1982
- 4) Hand PH, Thor A, Wunderlich D, et al: Monoclonal antibodies with a predetermined specificity detect activated ras gene expression in human mammary

- and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5227-5231, 1984
- 5) Viola MV, Fomowitz FB, Oravez S, et al: ras Oncogene p21 expression increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinomas. *J Exp Med* 161:1213-1218, 1985
- 6) Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:577-580, 1981
- 7) Berger U, Wilson P, McClelland RA, Davidson J, Coombes RC: Correlation of Immunocytochemically demonstrated estrogen receptor distribution and histopathologic features in primary breast cancer. *Hum Pathol* 18:1263-1267, 1987
- 8) Duesberg PH: Activated proto-oncogenes: sufficient or necessary for cancer? *Science* 288:669-677, 1985
- 9) Barbacid M: Mutagens, oncogenes and cancer. *Trends Genet* 2:188-191, 1986
- 10) Levinson AD: Normal and activated ras oncogenes and their encoded products. *Trends Genet* 2:81-84, 1986
- 11) Wigler M, Perucho M, Goldfarb M: Three different transforming ras oncogenes in human tumours. In: Vande Woude GF, Levine AJ, Topp WC, Watson JD, (eds) *Oncogenes and viral Genes*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1984, pp419-423
- 12) Russel P, Nurse P: *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. *Cell* 45:781-782, 1986
- 13) Kelly K, Cochran BM, Stiles CD, et al: Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factors. *Cell* 35:603-610, 1983
- 14) Augenlicht LH, Augeron C, Yander G, Laboisie C: Overexpression of ras in mucus-secreting human colon carcinoma cells of low tumorigenicity. *Cancer Res* 47:3763-3765, 1987
- 15) Garin Chesa PG, Retting WJ, Melamed MR, et al: Expression of p21 ras in normal and malignant tissues: lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3234-3238, 1987
- 16) Gallick GE, Kurzrock R, Kloetzer W, et al: Expression of ras p21 in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:1795-1799, 1985

- 17) Deschner EE, Lipkin M: *Cell proliferation in gastrointestinal cells. Clinics in Gastroenterology* 5:543-547, 1976
- 18) Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, Smith J: *Activation of the mouse cellular Ha-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. Nature* 307:658-660, 1984
- 19) Willman CL, Fenoglio-Preiser CM: *Oncogenes, suppressor genes, and carcinogenesis. Hum Pathol* 18:895-902, 1987
- 20) Thor A, Horan Hand P, Wunderlich D, et al: *Monoclonal antibodies define differential ras gene expression in malignant and benign colonic diseases. Nature* 311:562-565, 1984
- 21) Horan Hand P, Thor A, Wunderlich D, et al: *Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colonic carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA* 81:5227-5231, 1984
- 22) Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al: *ras p21 expression in the progression of breast cancer. Hum Pathol* 18:1268-1274, 1987
- 23) Weinberg RA: *The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. Science* 230:770-776, 1985
- 24) Koufos A, Hansen MF, Copeland NG, et al: *Loss of heterozygosity in mouse embryonal tumors suggests a common pathogenetic mechanisms. Nature* 316:330-334, 1985
- 25) Fearon EL, Feinberg AP, Hamilton SH, et al: *Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. Nature* 305:779-784, 1983

— Abstract —

Immunohistochemical Study on the Ha-ras p21 Expression in the Gastric Carcinoma

Kwang Min Lee, M.D. and Joo Yong Yoo*, M.D.
Department of Pathology, Presbyterian Medical Center
**Department of Pathology, Chonnam University*
Medical School

We have investigated an immunohistochemical

expression of the Human-Ha-ras oncogene product p21 in tumor cells of the primary mass and metastatic lymph nodes with different histological features of gastric cancer by using avidinbiotin complex immunoperoxidase method in formalin-fixed tissue sections from 73 cases of primary tumor mass and 23 cases of metastatic lymph node. Histologic type of the gastric cancer was classified by World Health Organization classification.

The results obtained were as follows:

1) Expression of Ha-ras p21 was consistently increased in the well differentiated tubular adenocarcinoma as compared with poorly differentiated tubular adenocarcinoma ($p < 0.01$), and was substantially decreased in mucinous carcinoma and signet ring cell carcinoma.

2) Signet ring cell carcinoma showed that positive immunoperoxidase reaction for Ha-ras p21 is exhibited in the majority of immature signet ring cell with scant cytoplasm rather than in the mature signet ring cells which have abundant cytoplasm filled with mucin. This findings indicate that mucin production from the tumor cell was not correlated with activation of ras gene in the tumor tissue of gastric carcinoma.

3) In general Ha-ras p21 expression was enhanced in the metastatic tumor cells of the regional lymph node compared with primary tumor, especially it was consistently increased in the well differentiated tubular adenocarcinoma.

Key Words: Human-Ha-ras oncogene, Gastric cancer, Metastatic tumor