

위암의 조직학적 유형과 암유전자 발현과의 관계

—Southern Blot Analysis와 면역조직화학적 분석—

동아대학교 의과대학 병리학교실 및 생화학교실*

정진숙·김인후*

Expression of Cellular Oncogenes in Gastric Carcinoma Related with Its Histologic Subtype

—Southern blot analysis and immunohistochemistry—

Jin Sook Jeong, M.D. and In Hoo Kim M.D.*

Departments of Pathology and Biochemistry*, Dong-A University College of Medicine

To search biologic characteristics of gastric carcinoma, one of the most common cancer in Korea, the author examined the alterations in DNA level and the expression of Ha-ras gene and c-myc gene in 20 primary tumors. Amplification of c-Ha-ras DNA was detected in 4(40%) of 10 patients who showed histologic subtype of relatively differentiated adenocarcinoma, but rearrangement of c-Ha-ras DNA was absent. Neither augmentation nor deletion of the c-myc DNA was observed.

Higher expression of the ras p21 in tumor cells was noted in more differentiated tumor cells rather than poorly differentiated cases. One mucinous carcinoma, two signet ring cell carcinomas and one papillary carcinoma did not disclose expression of p21. The expressions of c-myc oncogene product were variable and were not correspond to the expressions of ras p21. A tendency that poorly differentiated tumor cells had higher expression of c-myc oncogene was suggested.

(Korean J Pathol 1992; 26: 543~551)

Key Words: Gastric carcinoma, Ha-ras, c-myc, DNA amplification, Immunohistochemistry

서론

위암은 전세계적으로 빈도가 높은 암 중에 하나지만¹⁾ 위암의 발생원인이나 기전등에 대한 연구는 아직도 미진한 상태이다. 구미에 비하여 한국인이나 일본인에게 위암의 발생이 높은 이유로는 주로 식이습관의 차이등과 같은 환경인자에 그 발생기전을 맞추어 설명

하여 왔다. 그러나 한국인 위암의 평균 발생연령은 50세 전후로서 미국인에 비해서는 14세, 일본인에 비해서는 7세가 낮다는 보고¹⁾나 한국인에서와 같이 저연령층에서 발생한 위암은 미국이나 일본에 비하여 미분화형 암종이 더 많다는 점등은 위암의 발생기전을 환경인자만으로 설명하기에는 불충분하다. 이는 일반적으로 대부분의 암은 그 발생과 병변의 진행과정에 있어서 일련의 유전자적 변화가 포함된다는 가설이 위암의 경우에도 존재한다는 것을 시사하고 있다²⁾. 그러나 위암의 경우에는 종양의 DNA 표본이 주위 정상 간질 세포들의 DNA에 의해 심하게 오염되어 있고, 종양세포의 기원이 이질성을 나타내기때문에 유전자적 변화를 연구하기가 어려웠다. 최근에 분자적 유전공학기술이 발달됨에 따라서 위암의 발생기전에 대한 접근이

접 수: 1992년 2월 24일, 게재승인: 1992년 9월 9일
주 소: 부산시 서구 동대신동 3가 1번지, 우편번호 602-103
동아대학교 의과대학 병리학교실, 정진숙

*이 논문은 1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 지방대육성 학술연구조성비에 의하여 연구 되었음.

조금씩 가까워지고 있다. 저자는 한국인에서의 위암이 차지하는 높은 비중을 감안하여 그 발생기전에 대한 기초연구의 하나로서 첫째, 적출된 위암조직의 분화에 따른 조직학적 분류를 시도하고, 둘째, 위 절제조직의 암조직 부위에서 추출된 암유전자들의 DNA 재배열과 증폭 유무에 대한 연구를 시행하며, 셋째, 그에 입각하여 위암의 조직학적 유형에 따른 암유전자들의 단백질발현 증가유무에 대하여 관찰분석하고자 한다. Collaborative carcinogenesis theory에 입각하여 세포핵 내에 존재하면서 세포분열과 핵단백질 생성에 관여하는 암유전자중의 하나인 c-myc와 세포막 근처에 존재하면서 세포막에 전달되는 G단백질과 유사하며 형질도입 신호조절에 관여하는 암유전자로 알려져 있는 ras를 대상으로 한 암유전자의 분자생물학적 분석을 통해 기본자료를 얻고자한다.

재료 및 방법

1. 연구재료

연구대상은 1991년 3월부터 1991년 10월까지 동아대학교 부속병원에서 적출된 위암조직 20예이다. 성별, 나이를 조사하고 육안적인 분류는 Borrmann분류법에 준하였으며, 조직학적 유형은 WHO 분류법에 의하여 분석하였다. 그 외에 종양의 발생부위 및 림프절 전이에 대해 조사하였다. 위 절제술에 의해 적출된 위에서 종양조직을 채취하여 포르말린에 고정시킨 후 파라핀 블록 제작에 사용하였고, 신선 종양조직 중 과사가 비교적 적은 부위를 얻어 isopentane에 담구어서 -135°C의 deep freezer에 보관하였다.

2. 시 약

[α -³²P]-dCTP(3,000Ci/mmol)는 NEN사에서 구입하였고, 제한효소들은 IBI사와 Boeringer Mannheim사 제품들을 주로 사용하였다. ABC kit은 Vector사에서 구입하였다. v-Ha-ras p21에 대한 affinity purified rat Ig G(Ab-1)와 pan-ras p21에 대한 affinity purified mouse Ig G는 Oncogene Science사에서, 그리고 c-myc 단백질에 대한 affinity purified Ig G1은 CRB사에서 구입하여 사용하였다. 기타 일반 시약들은 Sigma사와 Merk사에서 구입하였다.

3. 암유전자의 검색

1) 세포성 암유전자: ATCC사에서 pEJ 6.6(c-Ha-ras)와 pmyc 12.7(c-myc)을 구입하여 사용하였다.

2) Genomic DNA 추출: -135°C에 보관되어 있는 위암조직들을 추출 완충액에서 균질화한 후 proteinase K로 처리하였다. Phenol-chloform 추출법에 의해 고분자량의 DNA를 추출하여 U.V.260 nm

에서 O.D.를 측정한 후 알콜 침강을 시행하였다.

3) Southern blot analysis: 각 DNA 표본에 대하여 일정한 양(20 μ g)의 DNA를 0.7% agarose large gel에 부하하여 30 voltage에서 18시간 경과 후 nylon membrane(0.45 μ m pore size)에 전이하였다. Membrane을 37°C에서 1시간동안 건조시킨 후 80°C의 진공오븐에서 구웠다. Church 잡종교배 완충액으로 전잡종교배를 시행한 후 Nick 변위방법에 의하여 준비된 ³²P-labeled probe를 잡종교배하였다. 잡종교배한 nylon membrane을 카세트에 옮긴 다음, -70°C에서 3일간 X선 필름에 노출시킨 뒤 고정 과정을 거쳐서 관찰하였다. 잡종교배과정은 먼저 c-Ha-ras probe로서 관찰한 후 nylon membrane을 100 mM NaOH로서 씻어서 증류수로 중성화하여 다시 c-myc probe로서 이 과정을 반복 하였다.

4) Probe DNA 제조: 세포성 암유전자 probe의 제조는 Maniatis등의 방법⁴⁾을 이용하였다.

4. 조직학적 및 면역조직화학적 검사

적출된 암조직을 10% 중성 완충 포르말린에 고정하였고, 조직처리 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작하였으며, 6 μ m의 두께로 잘라서 H-E 염색을 하였다. 그리고 이 파라핀 블록을 이용하여 암유전자 단백질에 대한 면역조직화학적 검사를 avidin-biotin complex (ABC)-immunoperoxidase법⁵⁾을 사용하여 시행하였다. 포르말린고정 후 파라핀 포매된 조직에 대한 암유전자 단백질에 대한 ABC-immunoperoxidase법의 시도는 이미 널리 행해져 왔다. 5 μ m의 두께로 박절된 조직절편을 histoclear와 xylene을 3:1의 비율로 섞은 용액에서 탈파라핀화한 후 제함수시켰다. 내인성 peroxidase의 활동을 억제하기 위하여 3% hydrogen peroxide in methanol을 30분간 처리하였다. Phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 비특이성 결합반응을 감소시키기 위해 blocking serum을 20분간 도포한 후 제거하였다. 일차항체를 처리하여 15시간이상 방치하였다. PBS로 세척 후 각각에 대한 이차항체를 1시간동안 반응시켰다. 신선하게 제조된 ABC-linked peroxidase 용액을 30분간 반응시킨 후 발색을 위하여 AEC, 0.01% hydrogen peroxidase, Tris buffer 50 mmol/l, pH 7.2를 양성반응이 인지될 때까지 도포하였다. Hematoxylin으로 후염색한 후 광학현미경 하에서 면역반응의 감도와 분포에 대해서 관찰하였다. 분포는 미만성과 국소성으로 나누었으며, 반응정도는 음성(-), 약양성(1+), 양성(2+), 강양성(3+)으로 구분하였다. 음성대조군에 대해서는 일차항체 처리과정을 생략하였다.

5. 통계처리

SAS 프로그램을 이용하였다.

결 과

1. 위암조직의 유형에 대한 조사결과

20예의 위암환자에서 남녀비는 14:6이었으며, 연령 분포는 34세에서 74세에 걸쳐 있었다. 종양의 위치는 위유문부 13예, 위체부 4예, 위분문부 1예, 그리고 미만성인 경우가 2예였다. Borrmann분류에 따라서는 III형(궤양침윤형)이 13예로 제일 많았고, I형(궤양 균상발육형)이 3예, IV형(미만성 침윤형)이 2예였으며, 조기위암종은 2예로 이는 모두 IIc+III형을 나타내었다. 조직학적 유형은 20예 중 15예가 관상선암종으로서 저분화형이 6예로 제일 많았고 중등도분화형은 4예였으며, 잘 분화된 형은 1예였다. 나머지 5예는 인환세포암종 2예, 점액성암종 1예, 유두상암종 2예였다. 진행성 암종의 위벽 침윤범위는 1예를 제외하고는 모두 위 주위 연부조직까지 침윤되어 있었으며, 조기

위암종은 2예 모두 점막하층까지 침범되어 있었다. 1예를 제외하고는 모든 진행성 암종에서 주위 림프절 전이가 있었으며 2예에서는 간 전이를 함께 관찰할 수 있었고 조기위암종 2예에서는 림프절 전이가 없었다 (Table 1).

2. 암유전자 검색에 대한 연구결과

보관되어있던 20예의 위암조직 중 3예는 심한 조직 변성으로 인하여 DNA추출이 불가능하였다. Nylon membrane에 probe DNA를 각기 잡종교배시킨 결과 7예(No. 10, 11, 12, 13, 14, 17, 19)는 DNA 전이나 잡종교배가 미약하였다. 10예에서 잡종교배 band를 관찰할 수 있었는데 요약하면 요약하면 Table 2와 같다. c-Ha-ras probe에 대하여는 뚜렷한 한개의 band를 나타내었으며, 4예(중례 4, 7, 8, 9)에서 DNA의 증폭을 나타내었다(Fig. 1). c-my probe에 대해서는 세개의 band를 나타내었으나, DNA의 증폭

Table 1. Cases of stomach cancer

Case	Sex	Age	Tm location	Gross	Hist.type & grading	Invasion depth	Lymph node metastasis
1	M	70	diffuse	B-IV	TA, PD	perigastric	+
2	F	43	body, LC	B-III	SRC	perigastric	+
3	F	45	antrum, AW	B-III	TA, PD	inner muscle	+
4	M	60	antrum, GC	B-III	TA, PD	perigastric	+
5	M	62	antrum, AW	B-III	TA, MD	perigastric	+
6	F	57	antrum, AW	B-III	TA, PD	perigastric	+
7	F	57	cardia, AW	B-I	Papillary Ca	perigastric	+
8	M	72	body, LC	B-III	TA, PD	perigastric	+
9	M	57	antrum	B-III	TA, PD	perigastric	+
10	M	67	antrum, LC	B-III	TA, MD	perigastric	+
							c liver
11	F	74	antrum, LC	B-I	Papillary Ca	perigastric	+
12	M	69	antrum, AW	B-III	Mucinous Ca	perigastric	+
							c liver
13	M	51	antrum, AW	EGC IIc+III	TA, PD	submucosa	-
14	M	65	antrum, diff	B-III	TA, PD	perigastric	+
15	M	58	antrum, AW	B-I	TA, WD	perigastric	+
16	M	59	body, AW	B-III	TA, MD	perigastric	+
17	M	67	diffuse	B-IV	TA, MD	perigastric	+
18	M	49	antrum, GC	B-III	SRC	perigastric	-
19	F	34	antrum, LC	EGC IIc+III	TA, PD	submucosa	-
20	M	35	body, AW	B-III	TA, PD	perigastric	+

Tm: tumor, M: male, F: female, B: Borrmann, TA: Tubular adenocarcinoma AW: anterior wall, GC: greater curvature, LC: lesser curvature, PD: poorly differentiated, MD: moderately differentiated, WD: well differentiated, SRC: signet ring cell carcinoma

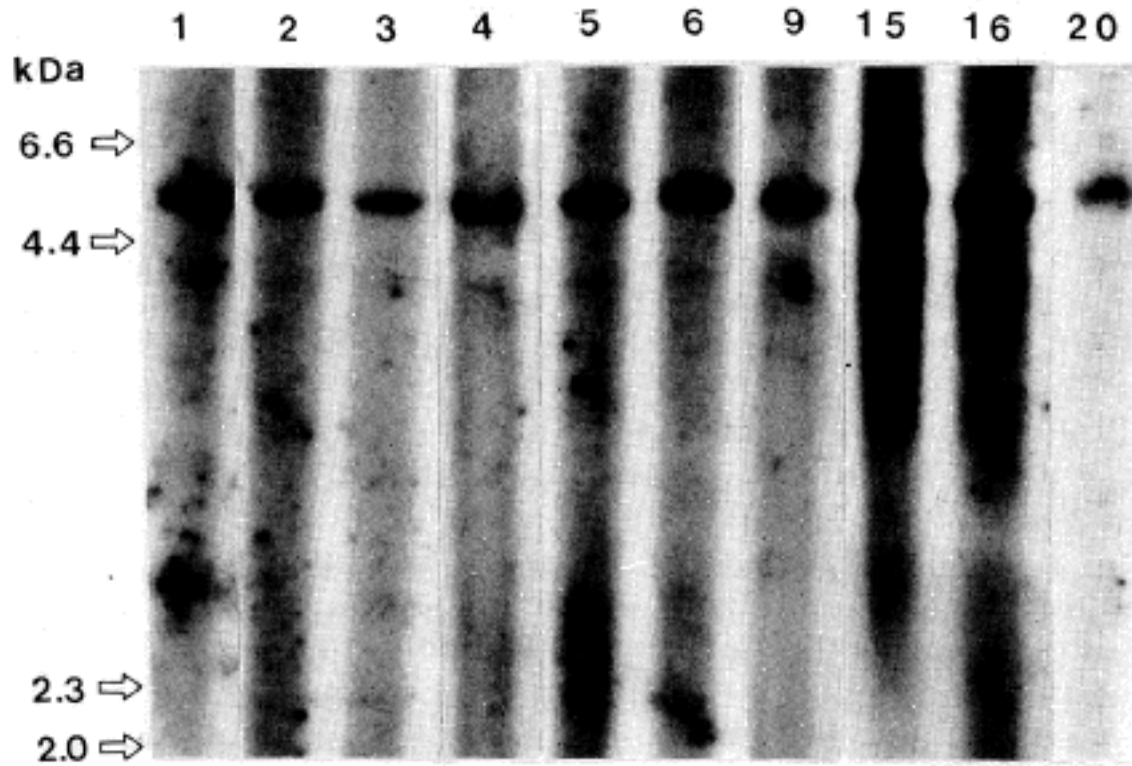


Fig. 1. Southern blot analysis for c-Ha-ras in stomach cancer. DNAs(20 μ g per lane) from tumors were digested with ECoR I, underwent electrophoresis, and were blotted onto a nylon filter. The filter was hybridized to c-Ha-ras probe. The amplified c-Ha-ras DNA are detected in lanes 4, 9, 15, 16. Any unusual bands are not identified.

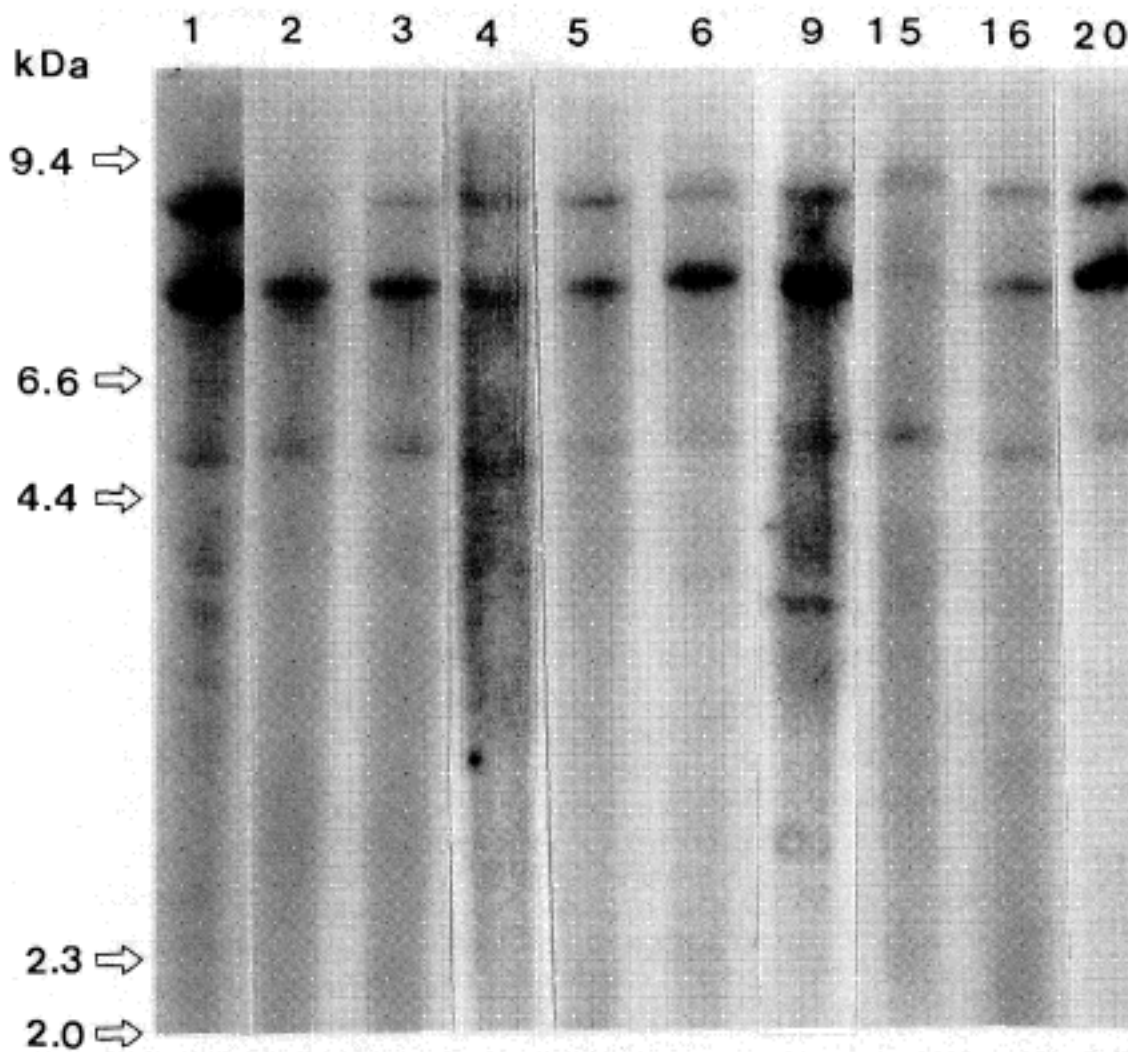


Fig. 2. Southern blot analysis for c-myc in stomach cancer. The same method as Fig. 1. The nylon filter was hybridized to c-myc probe. Any unusual bands or gene amplifications are not seen.

Table 2. Southern blot analysis with c-Ha-ras and c-myc in stomach cancer

oncogene	Case																		
		1	2	3	4	5	6	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20	
c-Ha-ras	Am	-	-	-	+	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND		
	Ra	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-		ND	ND	-	
c-myc	Am	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	-	
	Ra	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	-	

Am: Gene Amplification, Ra: Gene Rearrangement, ND: Not detected

Table 3. Immunohistochemical analysis of ras p21 and c-myc proteins

Antibody	Case																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
v-Ha-ras		-	-	-	++	+	-	-	-	-	---	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-
Pan ras					++	+	-	-	-	-	*	-	-	-	-	+	-	++	-	++	-
c-myc		+	*	-	++	+	-	---	-	-	-	+	+-	-	-	+	-	+	-	-	-

+*: +---

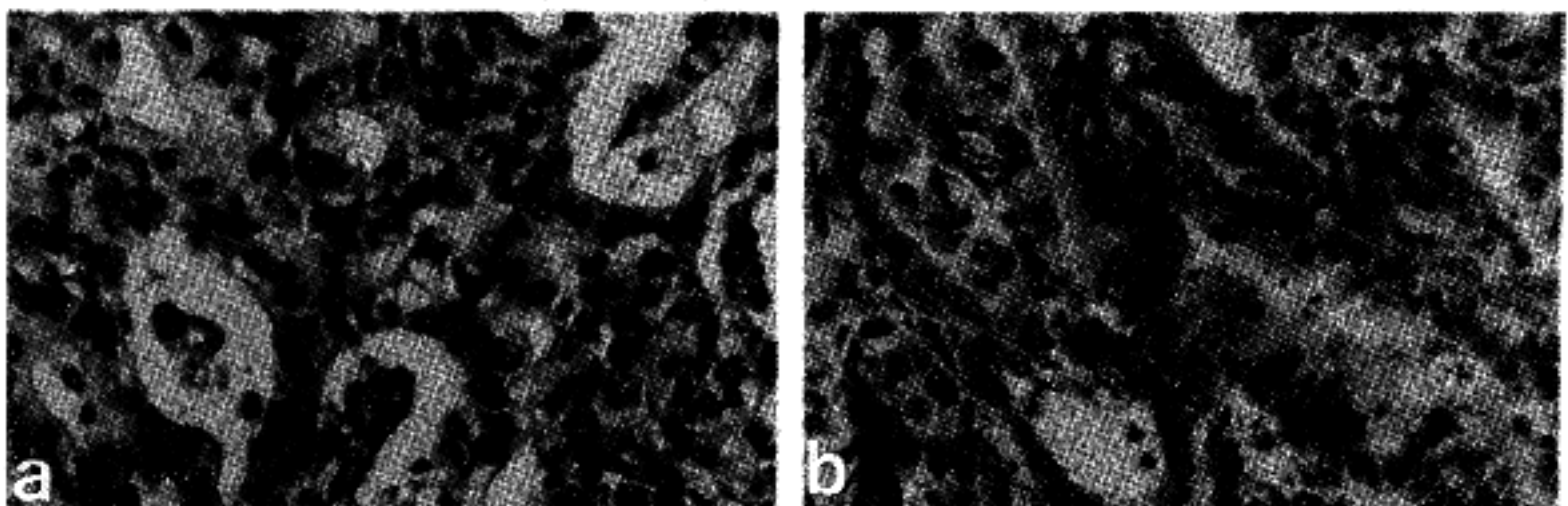


Fig. 3. An antibody specific to v-Ha-ras p21 was used for ABC-immunoperoxidase staining. Hematoxylin was used for counterstaining. A positive reaction is demonstrated by reddish brown cytoplasmic staining. a: Moderately differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with intense(3+), b: Well differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with definite(2+).

은 관찰할 수 없었다(Fig. 2). c-Ha-ras와 c-myc에 대한 DNA 제배열에 의한 다른 크기의 잡종교배는 본 예들에서는 관찰할 수 없었다.

3. 면역조직화학적 검색 결과

ras p21과 c-myc 단백질에 대한 위암조직의 반응은 모두가 극소적인 분포를 나타내었으며, 반응정도에 대한 결과는 Table 3과 같다. v-Ha-ras 단백질에 대

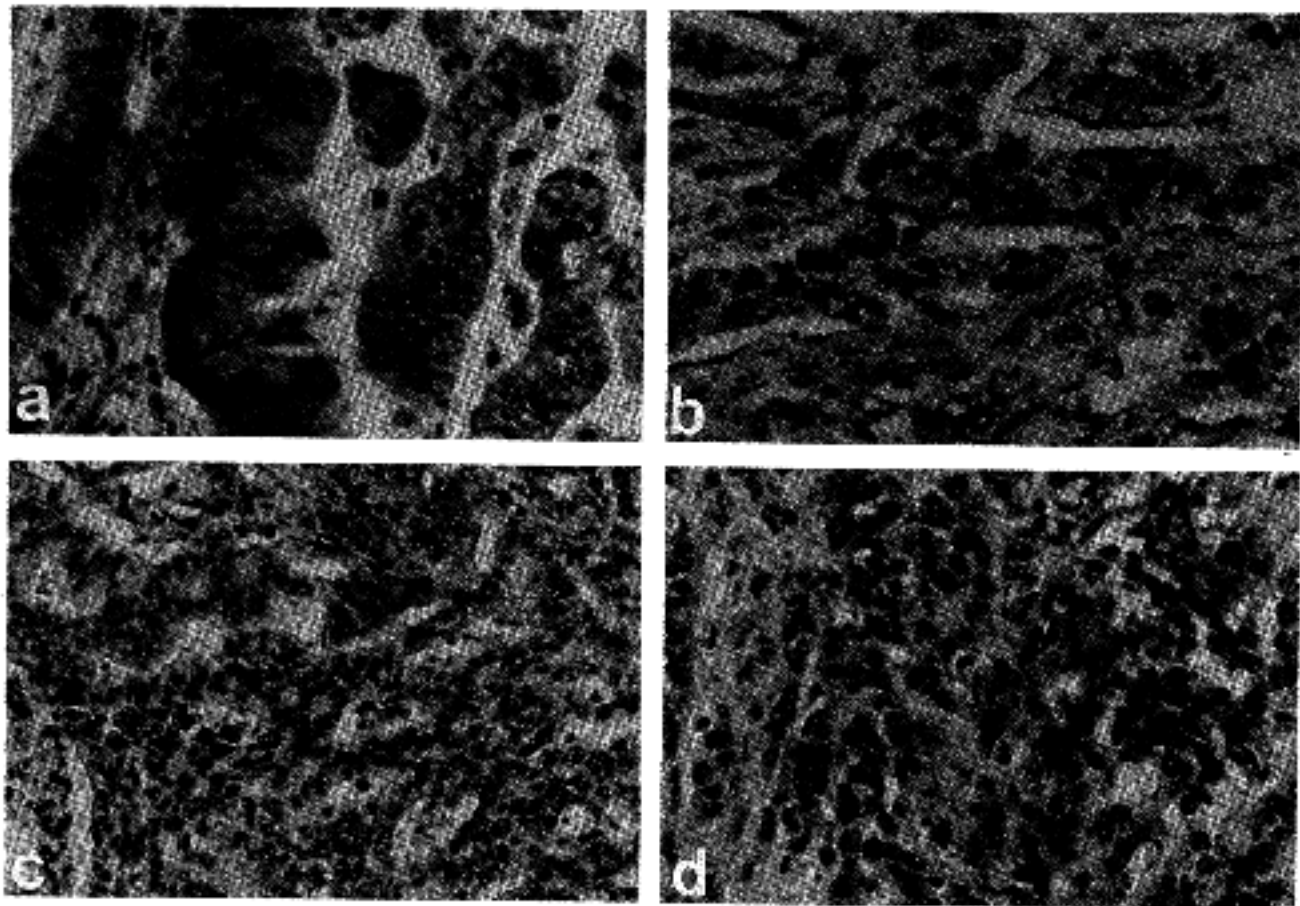


Fig. 4. ABC-immunoperoxidase staining for pan-ras p21. a: Well differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with intense(3+), especially at cellular membrane. b: Moderately differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with intense(3+), showing granular pattern. c: Moderately differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with definite(2+), showing heterogenous staining. d: Poorly differentiated tubular adenocarcinoma of stomach, showing detectable but weak(1+) intensity.

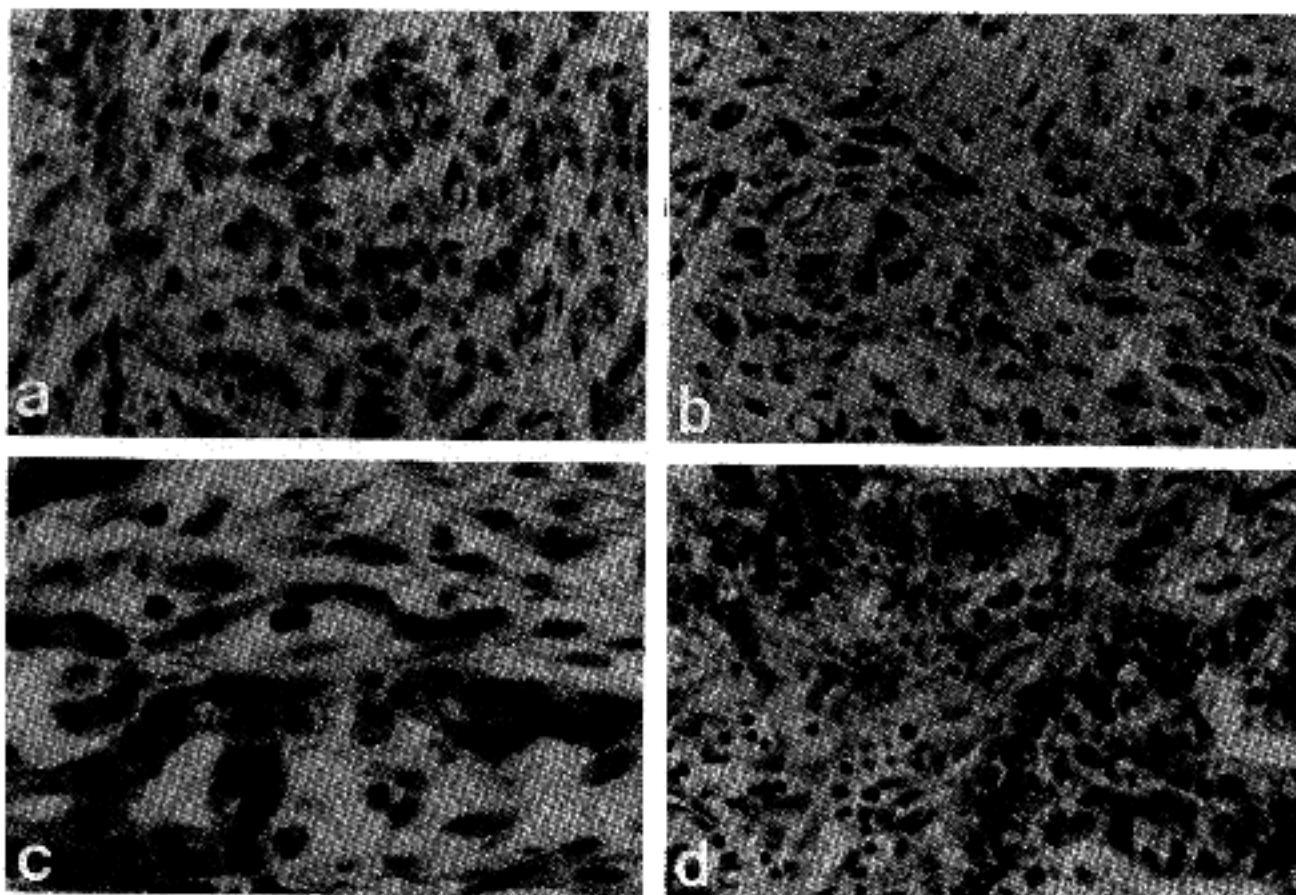


Fig. 5. ABC-immunoperoxidase staining for c-myc protein. a: Poorly differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with intense(3+), homogenous cytoplasmic staining. b: Moderately differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with weak(1-) cytoplasmic reaction. c: Poorly differentiated tubular adenocarcinoma of stomach with weak(1-) cytoplasmic reaction. d: Papillary carcinoma of stomach with detectable but weak(1+) nuclear staining.

Table 4. DNA amplification and product expression of oncogenes in histologic subtypes of stomach cancer

Histologic subtype (Number of cases)		ras p120	c-myc protein
TA (15)	WD(1)	■	▲
	MD(4)	△	△
		□ ●○	■□
PD(10)	△△ ●○	□□ ●○	
Papillary carcinoma(2)			△ ○
SRC(2)			
Mucinous(1)			○

TA: Tubular adenocarcinoma, WD, MD, PD: well, moderate and poorly differentiated, SRC: Signet ring cell carcinom, △: + of protein expression, □: ++ of protein expression, ○: +++ of protein expression, Black filling: with DNA amplification

해서 양성, 약 양성 반응을 보인 예는 각각 1예, 3예, 3예였으며 3예에서 음성이었다(Fig. 3a 및 3b). Pan-ras 단백질에 대해서 강양성, 양성, 약양성 반응을 보인 예는 각각 2예, 5예, 3예였다(Fig. 4a-4b). v-Ha-ras 단백질의 발현과 Pan-ras 단백질의 발현이 거의 일치하였지만, 2예에 있어서 Pan-ras 단백질만의 발현을 관찰할 수 있었던 것은 v-Ha-ras 이외의 ras계 암유전자 단백질들의 발현으로 인한 반응이라고 사료되어진다. 그리고 c-myc 단백질에 대해서는 각각 4예, 8예, 1예의 강양성, 양성 및 약양성 반응을 나타내었다. c-myc 단백질에 대한 반응은 세포질 또는 핵위에 양성을 나타내었다(Fig. 5a-5d). 동일한 예에서도 부위에 따라서 다소 반응정도의 차이가 있었다.

4. 위암의 형태학적 소견에 따른 암유전자 및 암유전자 단백질의 발현

관상선암종 15예에서 DNA 검색이 가능한 10예 중 4예가 c-Ha-ras 암유전자 DNA의 증폭을 나타내었으며, 잘 분화된 형, 중등도분화형, 저분화형이 각각 1예, 1예, 2예였다. 이들은 그 분화가 좋은 선암종에서 나타나는 소견을 보였으나 통계적 의의는 없었다 (Mantel-Haenszel Chi-Square Scores=1.274, p=0.259). ras 단백질에 대한 발현은 잘 분화된 형이 1예 중 1예, 중등도 분화형이 4예 중 4예 그리고 저

분화형이 10예 중 4예였다. 관상선암종의 분화가 잘된 암종일수록 ras 단백질에 대한 반응의 정도가 강한 소견을 보였으며 이는 통계적으로도 유의한 결과를 보였다 (MH Chi-Square, Ridit Scores = 5.771, p = 0.016). c-myc 암유전자에 있어서 본 예들에 대한 변화는 관찰할 수 없었으며, c-myc 단백질에 대한 반응은 잘 분화된 형이 1예 중 1예, 중등도 분화형이 4예 중 3예 그리고 저분화형이 10예 중 5예에서 양성반응을 나타내었다. 그 단백질의 발현은 저분화형일수록 강한 소견을 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다 (Mantel-Haenszel Chi-Square, Ridit Scores = 1.543, p=0.214). 2예의 유두상암종과 1예의 점액성 암종에 대해서는 c-myc 단백질의 발현만을 관찰할 수 있었으며 2예의 인환세포암종에서는 이 암유전자들의 DNA변화 및 그 단백질 발현을 관찰할 수 없었다. 조직학적 유형에 따른 암유전자 DNA 증폭 및 암유전자 단백질의 발현에 대해 요약하면 Table 4와 같다.

2예의 조기위암종 중 1예에서 ras 단백질의 발현을 관찰할 수 있었고, 1예의 내근육층까지 침범한 진행성 암종에서는 c-myc 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으나 그 예가 소수여서 진행성 암종과의 비교관찰은 할 수 없었다.

림프절 전이가 없었던 3예 중 1예에서 ras 단백질의 발현만을 관찰하였으며 림프절 뿐만아니라 간 전이를 한 2예 중 1예에서는 ras 단백질의 강한 발현을, 다른 1예에서는 c-myc 단백질의 발현을 나타내었다.

고 찰

종양의 발생과정은 세포내외의 유전자외적 인자(epigenetic factor)와 유전자적 인자(genetic factor)에 의하여 다단계에 걸친 생물학적 상호작용의 축적에 의하여 이루어진다⁵⁻⁷⁾. 특히, 유전자적 견지에 있어서는 정상세포에 존재하며 이들 세포의 분화와 증식에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자(proto-oncogene)가 retroviral transduction(viral oncogene)이나 세포 내에서 일어나는 돌연변이에 의해서 이루어지는 세포성 암유전자의 활성화에 대한 연구가 주로 있어왔다. 이들 암유전자 연구에 있어서 실험동물과 배양세포주 등이 주된 실험대상이 되어 왔으나, 최근에는 인체내 종양의 발생기전에 대한 접근을 위하여 많은 인체내 종양에 대한 암유전자 연구⁸⁾가 행해져왔다. 암유전자의 활성화는 유전자의 점상 돌연변이, 전위, 치환 등의 재배열에 의한 암유전자 단백질 구조의 변화 또는 세포내 암유전자 DNA의 증폭, 그리고 유전자 발현의 증가에 의한 단백질의 양적 증가에 의하여 나타난다. 본 연구는 위암조직에서 암유전자를 대상으로 DNA 수준에서는 southern blot analysis를 시행하여 DNA 증폭 또는 재배열 유무등의 DNA변화에 대한 관찰을 시도하였고, mRNA추출은 거의 이루어지지 않아서

파리핀 블록을 이용한 면역조직화학적 검색을 통하여 단백질 발현의 증가유무를 관찰하였다.

그 단백질이 형질막 내면에 존재하면서 세포막 신호 전달부위를 조절하여 정상세포에서는 세포분화 및 증식에 관여하는 것으로 알려져있는 ras계 암유전자는 신경아 세포종에서 활성화된 N-ras 단백질이 처음으로 검출된 이후^{9,10)}, 이들 ras 단백질의 발현이 유방암¹¹⁾, 전립선암¹²⁾과 방광암¹³⁾ 등에서 암세포의 분화도, 침윤성 및 전이유무에 따라 다양하다고 알려져 왔다. 위암발생의 유전자적 기전에 있어서 ras계 암유전자는 점성돌연변이에 의한 것이 주로 연구되어 왔다^{14~16)}. 본 연구의 암유전자 검색에 있어서는 c-Ha-ras 암유전자 DNA의 점성 돌연변이 등의 유전자 재배열은 관찰할 수 없었고 그 검색이 가능했던 10예 중 4예에 있어서 DNA증폭을 관찰할 수 있었다. ras단백질의 발현은 그 예가 많지는 않으나 관상선암종 중에서 잘 분화된 형에서 강한 반응정도를 나타내는 소견을 보여 이는 이 및 유¹⁷⁾의 결과와 다소 일치점을 나타내었다. 이 및 유¹⁷⁾는 또한 림프절에 전이된 위암종에 있어서 ras 단백질의 발현이 전이가 없는 위암종보다 증가되어 있다고 하였으나 본 연구는 대부분이 림프절 전이가 있는 진행성 위암종이어서 대조분석을 하지 않았다.

세포핵에 존재하면서 세포분열과 핵단백질 생성을 조절하는 단백질을 만들어 내는 c-myc암유전자는 위암에 있어서 그 단백질 발현이 증가된 경우는 주로 진행성 암종이며 특히 복강내 파종과 밀접한 관계가 있어서 이 c-myc 단백질의 발현이 위암의 예후를 결정하는 생물학적인 지표로서 중요하다고 Ninomiya 등¹⁸⁾은 주장하였다. 본 연구결과에서도 c-myc 단백질의 발현은 ras 단백질의 발현과 비교하여 볼 때 저분화형의 선암종 그리고 예후가 좋지 않은 점액성암종에서 관찰할 수 있었고 조기위암종에서는 관찰할 수 없어서 Ninomiya 등¹⁸⁾의 연구와 유사한 점을 나타내었다. 그리고 N-myc 암유전자인 경우는 신경아세포종과 망막아세포종에서 10배~30배 이상의 암유전자 DNA의 증폭을 볼 수 있다¹⁹⁾고 하였고 N-myc 암유전자 DNA의 증폭은 종양의 stage와 조직학적 유형과의 관계에서 보면 좋지 않은 예후를 나타내는 경향이 있다고 하였으나 위암조직에 대한 본 연구에서는 c-myc 암유전자 DNA의 증폭은 관찰할 수 없어서 조직학적 유형과의 관련성을 찾을 수 없었다.

관상선암종 중 6예에서 ras 및 c-myc 단백질의 발현을 관찰할 수 있었으나 8예에서는 한 종류의 그 암유전자의 단백질 발현을 관찰할 수 있었다. 각 암유전자의 DNA, RNA 및 단백질에 대한 연구는 많이 이뤄져 왔으나 이 두 암유전자의 상호 관련성에 대한 연구는 없었다. 본 저자는 그 역할이 다른 군에서 두 암유전자를 선택하여 DNA 및 단백질 수준에 대한 변화와 위암의 조직학적 유형과의 관계에 대한 분석을 시

도하였으나 의의가 없었다.

본 연구에 있어서 ras 암유전자 DNA의 증폭과 그 암유전자 단백질 발현에 있어서의 부분적 불일치점, Ha-ras 단백질의 발현과 c-myc 단백질의 발현에 있어서의 상이점 그리고 c-myc 암유전자 DNA의 증폭을 관찰할 수 없었던 점 등은 이들 암유전자의 활성화가 종양발생과정에 있어서 어떻게 유발이 되며 어느 단계에서 일어나는지 등이 확실치 않으며 ras나 myc 암유전자의 점성돌연변이 혹은 유전자 증폭만이 발암과정의 절대조건이 아닐 뿐 아니라 이러한 현상이 일어난다고 하여도 그것만으로 종양발생이 이루어질 수 없다²⁰⁾고 알려져 있는 사실을 뒷받침해 준다. 이는 위암발생과정 단계에 있어서 이들 ras나 myc 암유전자 외에 시기상으로 여러 종류의 암유전자 활성화가 관여할 것으로 생각되며 또한 위암세포 주위에 있는 비종양 세포들의 활성화에 의하여 일어나는 다양한 생물학적인 반응들이 영향을 미칠 수 있다고 사료된다.

또한, Weinberg²¹⁾가 유전자의 기능을 소실함으로써 암유전자의 계속적인 활성화를 유도하여 암세포로 전환시키는 종양억제 유전자의 존재를 제창한 이래 인체내 종양의 발생기전을 밝히는데 있어서 많은 연구들이 있어 왔다. 골육종, 유방암, 방광암 그리고 폐암 등에서 RB1종양억제유전자에 대한 연구²²⁾가 행해져 왔고, 최근에는 p53종양 억제 유전자에 대한 연구^{22,23)}가 신경교 성상세포종, 유방암, 장암, 폐암 및 골육종 등에서 있어 왔다.

종양발생 및 진행에 있어서의 유전자적 기전은 암유전자의 활성화와 종양억제유전자의 기능상실 및 유전자발현 조절에 의한 일련의 혹은 동시발생의 중합적으로 축적되는 생물학적인 현상의 결과로서 나타난다고 사료된다. 위암발생에 대한 유전자적 변화에 의한 기전에 대한 연구가 국내외적으로 이루어지고 있으나 미진하며 특히 종양억제인자에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 저자는 본 연구를 통하여 southern blot analysis를 이용한 DNA 증폭 및 재배열 유무와 암유전자 단백질 발현에 대한 면역조직화학적 검색을 기준화하였으며 현재 mRNA 수준에서의 검색과 polymerase chain reaction을 이용한 분석을 암유전자 뿐아니라 p53 종양억제유전자에 시도하고 있다. 발달된 분자생물학적 기법을 토대로하여 DNA, mRNA 및 단백질에 이르는 분자적인 연구는 위암뿐 아니라 인체내 종양들의 종양발생기전을 밝히는데 도움을 주며 나아가서는 그 치료 및 예후에 있어서도 중요한 기틀이 될 것으로 사료된다.

결 론

위암에 있어서 암유전자 DNA의 증폭 및 재배열 유무와 암유전자 단백질 발현의 증가유무에 대한 관찰을 통하여 위암발생의 분자적 기전을 연구하기 위하여

20예의 위암조직을 대상으로 Ha-ras와 c-myc에 대하여 southern blot analysis와 avidin-biotin complex(ABC) immunoperoxidase법을 이용하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) c-Ha-ras 암유전자 DNA의 증폭을 10예 중 4예(40%)에서 관찰하였고, 이들은 비교적 분화가 좋은 관상선암종에 해당하였다.

2) c-my 암유전자 DNA의 증폭은 관찰할 수 없었다.

3) DNA 재배열은 관찰할 수 없었다.

4) ras p21의 발현은 20예 중 9예(45%)였으며, 분화가 좋은 관상선암종조직에서 저분화된 형보다 증가된 양상을 보였고 점액성암종과 인환세포암종에서는 관찰할 수 없었다.

5) c-myc 단백질의 발현은 다양한 정도로 양성반응을 나타내었으나 ras p21의 발현과는 부분적으로 일치하였으며, 저분화형 관상선암종에서 증가되는 소견을 보였고 점액성암종 그리고 유두상암종에서 반응을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구에 있어서 probe DNA 제조 및 southern blot analysis 과정에 도움을 주신 생화학 교실의 박용양 선생님과 원고정리에 도움을 주신 병리학 교실의 강인영 선생님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 석동수, 주종은, 임인숙, 홍숙희. 위암의 통계학적 관찰과 병리조직학적 분류의 문제점에 대하여. 대한소화기 병리학회잡지 1987; 19: 86-94.
- 2) Hirohashi S, Suginura T. Genetic alterations in human gastric cancer. Cancer 1991; 3: 419-52.
- 3) 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 1981; 29: 577-80.
- 4) Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: CSH, 1989; 1.21-1.32.
- 5) Wigler M, Perucho M, Goldfarb M. Three different transforming ras oncogene in human tumors. In: Vande Woude GF, Levine AJ, Topp WC, Watson JD (eds), Oncogenes and viral Genes. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, 1984; 419-23.
- 6) Russel P, Nurse P. Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided. Cell 1986; 45: 781-2.
- 7) Kelly K, Cochran BM, Stiles CD, et al. Cell-specific

- regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogenes and platelet-derived growth factors. Cell 1983; 35: 603-10.
- 8) Slamon DJ, Delcarnion JB, Verma IM, Cline MJ. Expression of cellular oncogene in human malignancies. Science 1984; 34: 581-6.
- 9) Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of human N-ras gene. Cell 1983; 34: 581-6.
- 10) Shimizu K, Goldfarb M, Surard Y, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras genes. Proc Nat Acad Sci USA 1983; 80: 2112-6.
- 11) 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 1984; 81: 5227-31.
- 12) Pulciani S, Santos E, Lauves AV, et al. Oncogenes in solid human tumors. Nature 1982; 300: 359-42.
- 13) Viola MV, Fomowitz FB, Oravez S, et al. ras Oncogene p21 expression increased in premalignant lesion and high grade bladder carcinomas. J Exp Med 1985; 161: 1213-8.
- 14) Miki H, Ohmori M, Perantoni AO, Enomoto T. K-ras activation in gastric epithelial tumors in Japanese. Cancer Lett 1991; 58: 107-13.
- 15) Kihana T, Tsuda H, Hirota T, et al. Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 308-14.
- 16) Deng GR, Liu XH, Wang JR. Correlation of mutations of oncogene c-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. Oncogene Res 1991; 6: 33-8.
- 17) 이광민, 유주용. 위암조직의 Ha-ras p21에 대한 면역조직화학적 연구. 대한병리학회지 1990; 24: 1-9.
- 18) Ninomiya I, Yonemura Y, Matsumoto H, et al. Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. Oncology 1991; 48: 149-53.
- 19) Tsuda T, Obara M, Hirano H, et al. Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastomas. Cancer 1987; 60: 820-6.
- 20) Duesberg PH. Activated proto-oncogenes: sufficient or necessary for cancer? Science 1985; 288: 699-77.
- 21) Weinberg RA. The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. Science 1985; 230: 770-6.
- 22) Bishop JM. Molecular Themes in Oncogenesis. Cell 1991; 64: 235-48.
- 23) Levine AJ. Tumor suppressor genes, the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. Biochim Biophys Acta 1990; 1031: 119-36.