

대장암과 직장암에서 *Adenomatous Polyposis Coli* 유전자와 *p53* 종양 억제 유전자 부위 이형접합성 상실과 예후와의 관계

가톨릭대학교 의과대학 임상병리과 및 병리학교실*

장은덕 · 박원상* · 김병기 · 김선무 · 심상인

Loss of Heterozygosity Affecting the *APC* and *p53* Tumor Suppressor Gene Loci in Colorectal Cancers and Its Prognostic Significance

Eun Deok Chang, M.D., Won Sang Park, M.D.*, Byung Kee Kim, M.D.
Sun Moo Kim, M.D. and Sang In Shim, M.D.

Department of Clinical Pathology and Pathology*
Catholic University Medical College

Development of the human colorectal cancer is associated with several distinct genetic abnormalities involving both dominant-acting oncogenes (*K-ras*, *c-src*) and tumor suppressor genes (*APC*, *DCC*, *p53*) which undergo inactivation or loss. In colorectal tumors, the common molecular alteration is localized in the 17p13 and 5q21 loci encoding the *p53* and the *APC* gene, respectively. The identification of these genes may help the understanding of the pathogenesis of colorectal neoplasia. In order to determine whether the frequency of the genetic alterations varies with sex, age, tumor size, or site, including pathologic parameters, such as degree of differentiation, tumor stage, mucin component, lymphoid reaction, tumor invasion pattern, vein and nerve invasion, lymph node metastasis, and other parameters, such as disease-free survival, distant metastasis and patient outcome, the authors analyzed the loss of heterozygosity (LOH) of the *APC* and the *p53* genes in paraffin-embedded specimens of 48 colorectal cancers by use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. The results were as follows: the LOH affecting the *APC* was found in 15 out of 31 (48.4%) heterozygous patients, while the LOH of the *p53* locus was observed in 11 out of 26 (42.3%) patients. Among 48 patients, the LOH at both the *APC* and the *p53* loci was observed in five (10.4%) patient. No statistically significant associations were found between the LOH of the *APC* gene and the proposed parameters. The relationship between the LOH of the *p53* and the histologic differentiation, lymphoid reaction was significant ($P<0.05$), but survival was not correlated. Statistically significant associations were found between overall survival of the colorectal cancer patients and distant metastasis, Astler-Coller stage, lymphoid reaction, invasion pattern, nerve invasion, vein invasion, lymph node metastasis, and disease free survival. The above results

접 수: 1996년 8월 5일, 게재승인: 1996년 12월 31일

주 소: 수원시 장안구 지동 93, 우편번호 440-060

성빈센트병원 임상병리과, 장은덕

*본 논문은 가톨릭 중앙 의료원 학술 연구 보조비로 이루어졌음.

suggest that the LOH of the *p53* genes could be involved in the progression of colorectal cancers. However, neither the LOH of the *APC* nor that of the *p53* have significant association with survival of the colorectal cancer patients. (Korean J Pathol 1997; 31: 191~200)

Key Words: loss of heterozygosity, *APC* gene, *p53* gene, colorectal carcinoma

머 리 말

한국인에서 대장암은 위암, 폐암, 간암, 자궁경부암 다음으로 많은 빈도를 보이고¹, 식생활의 서구화로 꾸준히 증가하는 추세이다. 이들 대장암의 발생에는 환경요소, 특히 지방과 단백질을 많이 함유한 음식물 섭취와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있으며², 근래에 분자 생물학의 발전에 따라 그 발생과 진행에 있어서 여러 유전인자의 변이가 관찰되고 있다.

대장암 환자의 약 20%에서 5번 염색체에 대립 유전자 결손을 관찰한 이후³, *K-ras* 종양 발생유전자의 점 돌연변이와 종양억제 유전자의 돌연변이 및 결손(5q, 17p, 18q)이 관찰되었다^{4~6}.

종양은 종양발생 유전자의 활성화나, 억제 유전자의 비활성화에 의하여 발생 및 진행이 되는 것으로 알려져 있으며, 특히 *APC*(adenomatous polyposis coli; 대장 선종성 용종증) 유전자, *MCC*(mutated in colon cancer) 유전자, *p53* 유전자와 *DCC*(deleted in colorectal cancer) 유전자 등 종양억제 유전자의 비활성화가 대장상피세포에 종양변형의 원인이 된다고 알려져 있다^{7~9}.

인체암 중에서도 대장암은 작은 선종에서 발생하여 전이성 암에 이르기까지 여러단계의 과정을 밟는 것으로 알려져 있고, *APC* 유전자의 결손은 선종형성 이전에 관찰되며 *p53* 유전자의 변화는 양성 선종에서 악성암으로 전환하는데에 작용한다고 보고되어 있다⁸.

DNA 분석을 하기 위해서 종래의 Southern blot은 동결절편 조직이 필요하고 비교적 많은 양의 DNA가 요구되며 종양조직내에 비종양세포인 기질조직과 염증세포들과의 분리에 문제점이 있어 종양환자의 후향적 추적 관찰에는 적용하기 어려운 점이 있다. Bianchi등¹⁰과 Louis등¹¹은 포르말린으로 고정후 파라핀 포매된 조직절편에서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 DNA를 증폭한 결과 신선 동결조직 절편을 이용한 Southern blot

분석결과와 같은 만족을 얻을 수 있었다고 하였다.

이에 저자들은 추적조사가 가능했던 대장암 환자 48예에서, DNA 양이 적거나 약간의 변성이 있어도 이형접합성의 상실을 찾을 수 있는 중합효소 연쇄반응과 제한효소 절편 다형성(restriction fragment length polymorphism) 방법으로 대장암 조직에서 *APC* 유전자 엑손 11과, *p53* 유전자 엑손 4의 이형접합성 상실여부를 검색하고, 이들과 기존의 대장암의 여러 병리학적 예후 인자 및 임상적 생존율과의 관계를 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험 대상

1988년 1월 부터 1990년 12월까지 대장암으로 절제술을 받은후 병원기록으로 추적조사가 가능했던 48예를 대상으로 하였다. 한 예를 제외하고 모든 예에서 수술후 항암 약물치료를 받았으며, 병원기록으로 생사 여부가 불확실한 환자들은 행정기관에 의뢰하여 확인하였다.

예후인자와의 관계는 Kern등¹²과 Kim등¹³의 방법으로 분류하였다(Table 1). 48예 중 남녀 환자수는 각각 25 및 23명 으로 그 성비가 약 1.1 : 1 이었다. 평균연령은 57세 였고(35세~78세), 그 중에서 60세 이상이 26명(54%)이었다. 크기는 장경 6 cm 미만이 34예(70%)였고 6 cm 이상은 14예(30%)였다. 육안적으로 돌출형은 21예(45%)였고 비돌출형은 27예(55%)였고, 또한 종양의 위치는 비장굴곡부를 중심으로 근위부인 우측대장에 발생한 예가 19예(40%)였고, 직장을 포함한 좌측 대장에 발생한 예가 29예(60%)였다. 추적관찰기간은 3개월에서 83개월로 평균 54개월 이었으며, 사망자수는 총 15예(31%)로, 1년미만에 재발하여 사망한 예는 7예(15%)였다.

2. 방 법

1) 조직분리: 포르말린으로 고정후 파라핀 포매된 블록을 10 μ m 두께로 6~10장의 절편을 얻은후, 이 중 한장은 hematoxylin - eosin 염색을 하여 에타놀에

Table 1. Relationship of clinical and pathological parameters with loss of heterozygosity (LOH) affecting APC and p53 genes in colorectal cancer patients

Parameters		No	APC (LOH/heterozygote)	P-value	p53 (LOH/heterozygote)	P-value
Sex	M	25	5/8	0.3474	6/6	0.3019
	F	23	10/8		6/8	
Age	< 60	22	8/7	0.5934	5/5	0.9748
	≥ 60	26	7/9		7/9	
Size	< 6 cm	34	10/14	0.1656	10/11	0.8395
	≥ 6cm	14	5/2		2/3	
Gross Type	Exophytic	21	4/7	0.3205	7/4	0.1882
	Nonexophytic	27	11/9		5/10	
Site	Right	19	8/5	0.2130	4/4	0.9436
	Left	29	7/11		8/10	
Histologic Differentiation	Well	29	7/10	0.0862	8/7	0.0429
	Moderate	13	4/6		2/7	
	Poor	6	4/0		2/0	
Astler-Coller Stage	B1	5	0/3	0.1195	2/2	0.1623
	B2	26	11/6		6/8	
	C1	2	0/2		0/0	
	C2	12	4/4		4/1	
	D	3	0/1		0/3	
Mucin Component	Absent	32	9/12	0.6713	8/10	0.9690
	Focal	8	3/2		2/3	
	Predominant	8	3/2		2/1	
Lymphoid Reaction	Absent	32	11/12	0.9165	6/13	0.0088
	Occasion	16	4/4		6/1	
Invasion Pattern	Expanding	8	3/2	0.4088	2/2	0.0837
	Mixed	15	4/8		5/1	
	Infiltration	25	8/6		5/11	
Vein Invasion	Present	7	2/3	0.6819	3/3	0.7345
	Absent	41	13/13		9/11	
Nerve Invasion	Present	8	3/3	0.4839	0/4	0.7234
	Absent	40	12/13		12/10	
Lymph node Metastasis	Positive	16	4/7	0.3205	4/3	0.4089
	Negative	32	11/9		8/11	
Adenoma	Associated	6	2/2	0.9436	2/2	0.7913
	None	42	13/14		10/12	
Disease free Survival(Mos)	< 60	22	5/10	0.1044	6/7	0.8213
	≥ 60	26	10/6		6/7	
Distant Metastasis	Yes	13	4/5	0.7787	1/6	0.0620
	No	35	11/11		11/8	
Outcome	Expire	15	3/7	0.3545	3/6	0.5369
	Alive	33	13/8		9/8	

탈수시키고 커버글래스 없이 건조 시킨후 종양세포가 적어도 70%까지 포함된 부위를 현미경하에서 검은 잉크로 표시하고 이 종양조직을 0.2~0.5 cm² 크기로 면도칼로 잘라 내어 1.5 ml의 시험관에 넣었다. 같은 슬라이드내 비 종양조직은 다른 시험관에 분리하여 정상대조군으로 사용하였다. 이형접합성의 상실을 검색하는 것이므로 정상조직에서 동형접합성(homozygote)을 보이는 경우는 이 검색에서 제외시켰다.

2) DNA 추출: Goelz¹⁴의 방법을 단순화 시킨 방법으로 파라핀 절편에서 DNA를 추출 하였다. xylene을 400 μ l 첨가하여 15분간 탈파라핀화 한후 10,000 g로 2분간 원심침전 시킨후 xylene을 피펫으로 제거하고 남은 xylene을 제거시키기 위해서 58°C에 15분간 가열 시키고, 0.5 mM Tris(pH 8.9), 20 mM NaCl, 0.5 mg proteinase K와 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 포함하는 완충액에 58°C에서 밤새 방치하였다. 용해가 잘 되었음을 확인한 다음, 100°C 항온수조에서 10분간 끓이고, 실온에서 식힌후, phenol 250 μ l과 chloroform 250 μ l를 가하여 DNA를 추출하였다. 10,000 g로 10분간 원심침전 시킨후, 상층액을 새로운 시험관에 옮겼다. phenol-chloroform(1:1)으로 한번 더 추출한 후 원심침전 시킨후 100% 에탄올을 가하여 -30°C에서 2시간동안 방치한 다음 4°C에서 10분간 10,000 g로 원심침전시켰다. 용액내에 맑은 흰색의 DNA pellet을 관찰하고 에탄올 용액의 상층액을 버리고 건조시킨 후, 증류수 200 μ l로 용해시켜 사용하였다. 추출된 DNA는 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 그 손상 정도와 순도가 어느 정도 인지를 관찰하였다. DNA의 농도는 광비색계로 260 nm에서 측정하여, 모든 시료의 농도를 50 μ g/ μ l로 조정하였으며 순도는 280 nm에서의 흡광도와 비율로 환산하였다.

3) Primer의 합성: 중합효소 연쇄반응에 사용된 primer는 DNA 합성기(Korea Biotech, Daeduk, Korea)에 의해 합성된 것을 사용하였다. APC 유전자의 LOH 검색에는 엑손 11에서 Rsa I 제한효소(New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A)에 의하여 제한분절 위치를 포함하는 primer를 사용하였는데, upstream primer로 5'-GGACTACAGGCCATTGCAGAA-3'을, downstream primer로 5'-GGCTACATCTCCAAAAGTCAA-3'를 각각 선택하였다^{15,16}. p53 유전자 엑손 4에 대한 LOH 검색에는 Bst U1 제한효소 (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A)에 의한 제한효소 절편 다형성을 보이는 부위가 포함된 부위를 검색하였는데 이때 upstream primer는 5'-CAGATGAAGCTCCC-

AGAA-3'을, downstream primer로 5'-GTGTAGGAGC-TGCTGGTG-3'를 각각 선택하였다¹⁷.

4) 중합효소 연쇄반응 및 Bst U1 소화: 진공건조된 primer에, 10 x 반응 완충용액 2 μ l, 1.25 mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP) 2 μ l, MgCl₂ 0.6 μ l, 증류수 10 μ l와 Taq 중합효소(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, U.S.A) 0.2 μ l 첨가한 용액을 만들었다. 2 μ l의 추출된 DNA(약 200~500 μ g/ml)에 primer를 각각 1.6 μ l씩 혼합하여 95 °C 에서 변성시키고, Taq 중합효소 2 μ l(100 ng/ μ l)를 첨가한 후 증폭시켰다.

APC 유전자의 중합효소 연쇄반응은 중합효소 연쇄반응 증폭기(Ericomp, San Diego, California, U.S.A)로 기본조건에서 30회 주기를 실시하였으며, 각 주기는 95°C에서 1분, 56°C에서 90초, 72°C에서 90초씩 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 8% 폴리 아크릴아마이드 겔상에서 133염기쌍 임을 확인하고, 8 U의 Rsa I 제한효소로 37°C에서 3시간 동안 소화시킨 다음, 8% 폴리 아크릴아마이드 겔에서 120 볼트로 1시간 30분 전기영동을 실시하였다. 전기영동된 겔을 ethidium bromide로 염색한후 자외선 하에서 촬영된 사진에서 띠를 확인하였다.

p53 유전자의 중합효소 연쇄반응의 적정조건은, 95°C 에서 1분, 60°C에서 90초, 72°C에서 90초간 35 주기 실시하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물은 Bst U1 제한효소 8 U로 59°C에서 3시간동안 소화시킨후 8% 폴리 아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였다. 포르말린 고정으로 인하여 일부 파괴된 DNA라 하더라도 APC 유전자 엑손 11과 p53 유전자 엑손4를 성공적으로 증폭시킬 수 있었다.

3. 병리조직학적 분류

APC 유전자와 p53 유전자의 이형접합성 상실여부와 상관없이 48예의 종양을 병리조직학적으로 분류하였다(Table 1). 조직학적 고분화군은, 종양세포의 90% 이상, 중등도 분화군은 30~90%, 저분화 군은 30% 미만에서 선구조를 이루는 경우로 하였다¹³. 종양의 병기 분류는 Laurent-Puig¹⁸과 같이 Dukes의 변형인 Astler-Coller 분류에 의하여, 병기 A는 점막층만 침범한 군, 병기 B1은 근육층을 침범하였으나 통과되지 않은 군, 병기 B2는 근육층을 통과하였으나 주위 림프절 전이가 없는 군, 병기 C1은 근육층을 통과하지 않으나 림프절 전이가 동반된 군, 병기 C2는 근육층을 통과하고 림프절 전이가 함께 동반된 군, 병기 D군은 다른 장기로 전이한 예로 하였다. 종양내 점액 생성 정도는 Wiggers¹⁹의 기준에 의해서, 전혀 생성되지 않은 군, 세포의 점액성분이

50% 미만인 국소적(focal)군과, 50% 이상인 우세군으로 나누었다. 림프구양 반응은, Graham과 Appelman²⁰의 기준을 수정하여 개별적인 림프구 집합이 없는 군, 배중심이 동반되고 림프구 침윤이 현저한 군으로 분류하였다. 종양의 침윤양상은, Jass²¹의 기준을 수정하여 팽창형, 침윤형, 혼합형으로 분류하였다. 혈관내 침범여부, 림프절 전이여부와 선종이 동반된 예로 분류하였다.

4. 통계학적 분석

APC 유전자와 p53 유전자의 이형접합성 상실여부와 병리조직학적 예후 인자들간에, 각각의 비교인자와 환자의 생존 간에 그 유의성을 Crosstab를 사용하여 비교하고, 통계학적인 유의성은 Chi-square test로 검정하고 유의수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

성 적

1. 병리조직학적 분석

조직학적 분화도는, 고분화군이 29예(60%)였으며, 중등도 분화군은 13예(27%)였고, 저분화 군은 6예(13%)였다. 종양의 병기 A는 한예도 없었고, B1은 5예(10%)였으며, B2는 26예(54%)로 가장 많았고, C1은 2예(4%)였고, C2는 12예(25%)였으며, D군은 3예(7%)로 대부분이 간장으로 전이되었다. 종양내 점액 생성 정도는, 전혀 생성되지 않은 군 32예(66%), 국소적 군은 8예(17%), 우세 군은 8예(17%)였다. 림프구양 반응은, 개별적인 림프구 집합이 없는 군의 32예(65%)와, 림프구 침윤이 현저한 군은 16예(35%)였다. 종양의 침윤양상은, 팽창형 8예(17%), 침윤형 25예(52%), 혼합형 15예(31%)였다. 혈관내 침범이 있는 7예(15%)와 없는 41예(85%)와, 림프절 전이가 동반된 예가 16예(33%)였으며, 동반되지 않은 예가 32예(67%)였다. 선종이 동반된 예가 6예(13%)였고 42예(87%)는 동반되지 않았다.

2. APC 유전자의 이형접합성 상실 여부

48예의 대장암과 직장암 환자의 정상 점막조직에서 추출한 DNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시한 다음 Rsa I 제한효소에 대한 인식부위의 여부에 따라 3가지 형태의 띠를 보여주었다(Fig 1). Rsa I 제한효소에 대한 인식부위가 없는 경우에는 133염기쌍이 나누어지지 않고 한 띠만을 나타내고 있었으며, 인식부위가 있는 DNA의 경우에는 85와 48의 염기쌍을 보이는 두띠로 나타났다.

이형접합성을 나타내는 경우에는 하나의 대립형

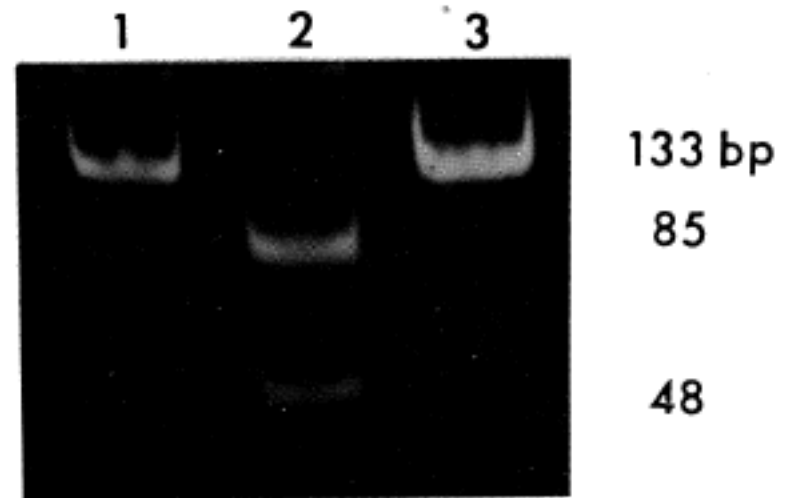


Fig. 1. Three kinds of electrophoretic patterns of PCR products of APC gene digested by Rsa I enzyme. Heterozygotes show 3 bands (133 bp, 85 bp and 48 bp) at lane 1. Digested allele is seen 85 bp and 48 bp bands (lane 2), while undigested allele is seen as single 133 bp band (lane 3).

질 DNA는 인식부위가 없어 나뉘지 못한 133염기쌍과 인식부위가 있는 다른 하나의 대립형질의 85와 48의 염기쌍으로 인해 이들은 3개의 띠를 보여주었다. 이 중에서 3개의 띠를 형성하는 이형접합성을 형성한 예가 48예중 31예(64.6%), 인식부위가 있는 동형접합체는 14예(29.2%), 그리고 인식부위가 없는 동형접합체는 3예(6.2%)였다(Table 3). 정상조직에서 이형접합성을 확인한 31예에서 종양조직에 대한 이형접합성의 상실 검색이 필요하므로 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 그 결과 31예 중 15예(48.4%)에서 이형접합성의 상실을 관찰할 수 있었는데, 6예는 Rsa I에 대한 인식부위가 없었고, 9예에서는 인식부위가 있는 동형접합성을 나타내었다(Fig. 2).

3. p53 유전자의 이형접합성 상실 여부

정상 조직에서 p53 유전자 엑손 4에 대해 중합효소 연쇄반응을 실시하고 Bst U1 제한효소를 소화시킨 결과 이형접합성을 보이는 경우는 3개의 띠를 보여주었는데, Bst U1 제한효소에 대한 인식부위가 없는 대립형질의 66염기쌍 띠와, 다른 대립형질의 이형접합성 환자에서 인식부위가 있는 37과 29염기쌍의 띠를 보였다(Fig. 3). 45예중 26예(57.8%)에서 이형접합성을 나타내었고, 13예(28.9%)에서 제한효소에 대한 인식부위가 있는 동형접합성을 보였고, 반면에 6예(13.3%)에서는 인식부위를 가지지 않은 동형접합성이었다(Table 3). p53 유전자의 이형접합성 상실은, 정상 조직에서 이형접합성을 보인 환자의 암조직에서 Bst U1 제한효소에 대한 인식부위가

Table 2. Relationship of clinical, pathological, and genetic parameters with survival in colorectal cancer patients

	Parameters	No of patients	No of death	P-value
Sex	M	25	8	0.9058
	F	23	7	
Age	< 60	22	6	0.5845
	≥ 60	26	9	
Size	< 6 cm	34	10	0.8395
	≥ 6cm	14	5	
Gross type	Exophytic	21	5	0.3267
	Nonexophytic	27	10	
Site	Right	19	3	0.0614
	Left	29	12	
Histologic Differentiation	well	29	7	0.3718
	moderate	13	5	
	poor	6	3	
Astler-Coller stage	B1	5	1	0.0030
	B2	26	3	
	C1	2	1	
	C2	12	7	
	D	3	3	
Mucin component	Absent	32	12	0.1128
	Focal	8	3	
	Predominant	8	0	
Lymphoid reaction	Absent	32	14	0.0082
	Occasion	16	1	
Invasion pattern	Expanding	8	0	0.0204
	Mixed	15	3	
	Infiltration	25	12	
Vein invasion	Present	7	7	0.0000
	Absent	41	8	
Nerve invasion	Present	8	6	0.0034
	Absent	40	9	
Lymph node metastasis	Positive	16	10	0.0010
	Negative	32	5	
Adenoma	Associated	6	3	0.2895
	None	42	12	
Disease free survival (Mos)	< 60	21	11	0.0053
	≥ 60	27	4	
Distant metastasis	Yes	13	10	0.0000
	No	35	5	
LOH of APC		15	3	0.3545
LOH of p53		11	3	0.5369
Outcome	Expire	15		
	Alive	33		

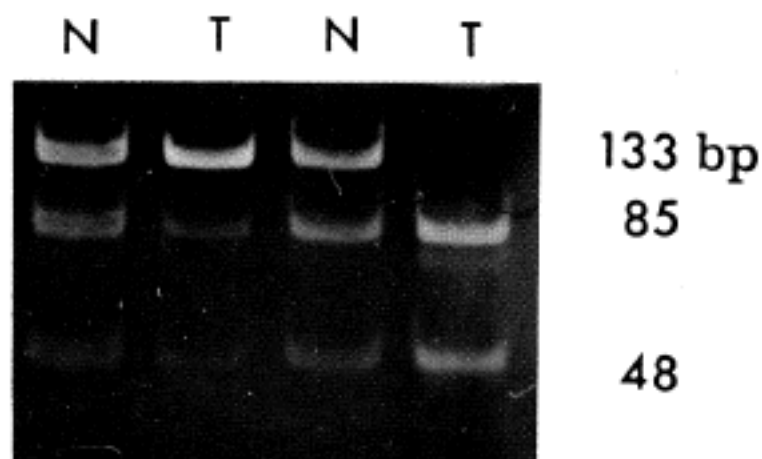


Fig. 2. Photograph of electrophoretic patterns of LOH affecting exon 11 of APC gene. Loss of the undigested allele (band at 133bp) or digested allele (85bp and 48bp) was seen in the tumor DNA, compared with the normal DNA (T: LOH of Colorectal cancer, N: Normal mucosa)

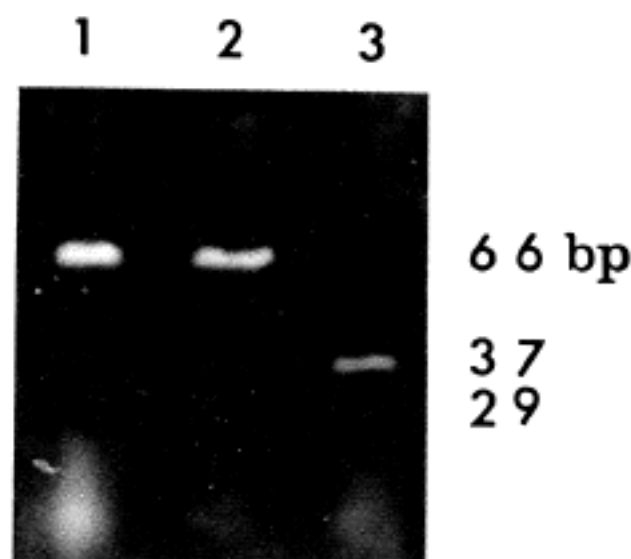


Fig. 3. Photograph of three kinds of electrophoretic patterns of PCR products of p53 exon 4 digested by Bst U1 enzyme. Undigested allele is seen as single 66 bp band, while digested allele as two bands (37 bp and 29 bp)

없는 대립형질이나 인식부위가 있는 대립형질이 상실되었을때로 하였다(Fig. 4). 대장암과 직장암조직 26예 중 11예(42.3%)에서 이형접합성 상실이 관찰되었다(Table 3).

4. 이형접합성 상실과 병리조직학적 소견과 타 예후인자와의 관계

APC 유전자의 이형접합성 상실은 예후인자로서 유의성이 없었고, p53 유전자의 이형접합성 상실은 예후인자중 조직학적 분화도 및 림프구양 반응과

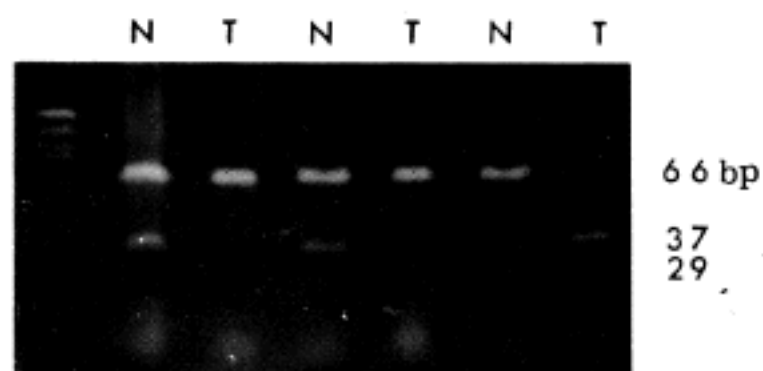


Fig. 4. LOH affecting exon 4 of *p53* gene. Loss of digested allele or undigested allele is seen in DNA extracted from colorectal carcinoma (T: LOH of Colorectal cancer, N:Normal mucosa).

Table 3. Frequency of RFLP type and LOH of *APC* exon 11 and *p53* exon 4 loci in colorectal adenocarcinoma patients

	RFLP type	<i>APCp53</i>
Heterozygotes	31/48 (64.6%)	26/45 (57.8%)
Homozygotes		
Lower, Cut	14/48 (29.2%)	13/45 (28.9%)
Upper, Uncut	3/48 (6.2%)	6/45 (13.3%)
LOH/Heterozygote	15/31 (48.4%)	11/26 (42.3%)

* RFLP : Restriction fragment length polymorphism
LOH : Loss of heterozygosity

유의성($P<0.05$)이 있었다(Table 1).

5. 임상적 및 병리조직학적 예후 인자와 환자의 생존과의 관계

병기, 림프구양 반응, 종양 침범 양상, 혈관과 신경 침윤, 림프절 전이와 무병 생존 기간, 원격 전이 등이 환자의 생존과 유의성이 있었다($P<0.05$)(Table 2).

고 찰

종양의 발생은 종양발생 유전자의 활성화나, 억제 유전자의 비활성화에 의해 발생 및 진행이 되는 것으로 알려져 있으며, 최근 분자 생물학의 발달에 따라 종양발생 및 진행을 세포 수준에서 확인할 수 있게 되었다²². 현재까지 밝혀진 종양억제 유전자로 *APC*, *MCC*, *DCC*, *NF-1*(neurofibromatosis), *Rb*(retinoblastoma), *p53*, *WT*(Wilms' tumor) 유전자등이 알려

져 있다.

암억제 유전자는 정상 성장을 조절하는 단백질을 암호화(encoding)하고, 간접적으로 종양생성을 억제한다. 악성종양에서 적어도 4~5개의 유전자 돌연변이가 관찰되고 보다 적은 수의 돌연변이로 인해서 양성종양이 발생한다고 한다. 또한 이런 변형의 축적 정도에 의해 종양의 생물학적 성질이 좌우된다고 한다^{6,7}. 이들 유전자의 비활성화의 원인으로, 첫째가 대립유전자의 결손, 둘째는 유전자의 촉진자(promotor)에서 점돌연변이가 있으며, 이중 대립유전자의 결손은 이형접합성의 상실로 알게된다⁷. 이형접합성의 상실은 염색체 혹은 그 이하에서의 결손으로 인하여 종양억제 유전자의 대립형질이 비활성화되는 것을 말하며, 이는 새로운 종양억제 유전자의 발견이나 검색에 중요한 방법의 하나이다⁶.

인체암 중에서도 대장암은 유전자 변형의 연구에 좋은 대상이 되어 많은 연구결과가 보고되어 있으며⁸, 선종에서 전이성 암에 이르기 까지 다양한 단계의 종양을 그 연장 선상에서 볼 수가 있기 때문에, 다단계 과정을 밟는 것으로 알려져 있다. 가장 초기 변화에 대해서는 완전히 밝혀져 있지 않지만, 한 주머니의 상피모세포에서 선종이 발생하여 점차 종양 형성을 시작하게 되는, 단세포단위에서 발달된 클론성 전개가 증명되었다²³. Powell등²⁴의 연구에 따르면 직경 0.5 cm의 작은 크기의 선종에서 돌연변이가 보이고 계속해서 악성단계에 이르기 까지 몇번의 돌연변이가 더 있음을 관찰하고 있으며, 또한 Hamilton⁸에 따르면, DNA의 시토신 잔류물의 5번에 위치한 메틸기가 유전자 복사 조절에 중요한 역할을 하는데, 아주 작은 선종에서 DNA 저메틸화를 보이고, 이 과정의 효소인 Cytosine DNA 메틸전이효소가 대장암환자의 점막조직에서 비정상적으로 작용함이 관찰되었다⁶.

APC 유전자는 대장 선종성 용종증과 대장암의 게놈 DNA 에서 돌연변이를 보이는데, 가계조사를 통하여 이들의 염기서열과 위치(5q21)가 이미 알려져 있으며²⁵⁻²⁷, 대장암 이외에도 궤양성 대장염, 폐암, 식도암에서도 이 유전자의 돌연변이는 보고 되고 있다^{16,17,28}. 이것은 가족성 선종성 용종증 환자의 용종조직에서 여러 돌연변이를 보이고 있어, 대장점막이 용종으로 될때 이미 체세포성 돌연변이가 일어났음을 알 수 있다. *APC* 유전자의 결손은 대장암 환자의 약 35%에서 관찰할 수 있었고, 이 유전자의 발견으로 대장암의 병인을 이해하고, 대장암에 유전적 소질이 있는 환자의 진단이나 상담에 도움이 된다고 한다¹².

저자들의 실험에서는 48예중 31예(64.6%)에서 이형접합성이 관찰되었고, 이 중 15예(48.4%)에서 APC 유전자의 이형접합성 상실을 관찰하였다. 선종이 동반된 6예중 2예(33.3%)에서만 이형접합성 상실을 관찰하였다. APC 유전자의 돌연변이는 초기 단계에서 관찰되며 암의 진행에 영향을 미치고 가족성 선종성용종증 환자 뿐만 아니라 산발성 대장암환자의 종양발생에서도 중요한 역할을 함을 알 수 있고, 또한 Powell등²⁴의 보고에서와 같이, 대장암이 양성 선종에서 이형과정을 거쳐 악성암으로 전환되었음을 시사한다.

최근에는 대변에서 관찰되는 종양세포에서 유전자 돌연변이를 검출하는 선별검사가 보고되었으며²⁹, 이경우에 종양이 악성으로 전환되기 전에 초기에 발견할 수 있어 임상적으로 많은 도움이 될 수 있겠다. 본 연구에서 APC 유전자의 이형접합성 상실과 예후인자나 환자의 생존여부와는 관계는 유의성이 없었다.

p53 유전자는 분자량 53 Kilodalton의 유전자 산물로 처음 명명 되었으며, 사합체를 형성하여 DNA의 특수한 뉴클레오티드 염기서열에 결합한다. 17p13에 위치하며, SV40 바이러스에 의해 변형된 세포에서 처음 발견되어서 종양항원으로 분류되기도 하였고, 이후 쥐의 배아섬유아세포에서 ras 암 유전자에 의한 세포의 변형을 촉진하는 것이 확인되어 p53 유전자는 암 유전자로 분류되기도 하였다. 그러나 이후 세포변성을 유발하는 p53 cDNA는 돌연변이를 함유하고 있는 경우임이 확인되었고, 또한 정상형의 p53 cDNA를 변형된 세포에 넣어줄 경우 세포의 성장이 억제되고, 실험동물에서는 종양형성능력이 감소함이 관찰되어 오늘날은 p53 유전자를 종양억제 유전자로 분류하는데 이르지 않는 상태이다³⁰.

정상형의 p53 유전자의 cDNA는 암세포와 같이 변형된 세포를 세포 성장주기의 G1기에서 정지하게 하여 세포성장을 억제하게 한다. 또한 방사선 또는 발암물질 등에 의하여 손상을 받은 세포에 대해서도 G1기에서 성장을 억제하게 하는데 이때에 손상된 DNA를 수선하여 정상으로 만들든지 또는 세포소멸의 길을 가게하여 결과적으로 암 발생을 억제하게 한다⁸. 정상세포에서도 미량이 나타나며, 짧은 반감기(약 20분) 때문에 거의 발현되지 않는다. 그러나 돌연변이형 p53 유전자의 경우는 정상형 p53 유전자의 기능을 억제하며, 나아가서 세포의 변형을 촉진하게 한다. 반감기(약 24시간)가 길어서 종양세포내 핵에 축적되면 면역조직화학염색으로 검출할 수 있으며, 이 돌연변이형은 DNA 결합능력을 상실

한다.

암조직에서 p53 이상을 검출하는 주요한 방법은 핵산에 기초한 염기서열 확인법(nucleotide sequencing), 중합효소연쇄반응-제한효소 절편다형성(PCR-RFLP), 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형(PCR-SSCP) 검사법과 면역조직화학 염색법이 있다. 염기서열 확인법은, PCR 산물을 직접 sequencing 하여 DNA이상을 검출한다.

p53 유전자의 활성화된 돌연변이는 유전자 codon 엑손 5, 6, 7, 8, 9에 해당되는 132에서 281사이 존재하는 것 같다. DNA 돌연변이형은 DNA의 점 돌연변이에서부터 결손에 이르기 까지 다양하다. 활성화된 돌연변이가 꼭 이 부위에 있는 것은 아니지만, 보고된 p53 돌연변이의 95%가 이 부위에 포함되고 있다. 염기서열 확인법은 유전자의 구조이상을 확인하는데 전통적으로 흔히 이용되면서 돌연변이의 유무 및 그 양상을 직접 확인할 수 있는 방법이나 시간과 노력이 많이 든다는 단점때문에 진단적인 목적에서 사용되지 않는다³⁰. 본 실험의 경우에서 대장암 환자의 p53 엑손 4의 대립형질은 Bst UI 효소에 대한 인식부위가 있는 경우가 더욱 많았으며, 이들의 정상조직에서 이형접합성을 보인 26예중 11예(42.3%)의 암조직 DNA에서 이형접합성 상실을 보였다(Table 3). 이러한 결과는 대장암 발생과 진행에 p53 유전자가 밀접한 연관성이 있다는 사실을 뒷받침해 준다고 할 수 있다.

APC 유전자와 p53 유전자에 모두 이형 접합성 상실을 보인 예가 5예(9.6%)로서, 악성 종양발생은 적어도 이들 유전자의 돌연변이와 함께 몇개의 유전자 변형이 축적되었다는 연구⁶를 재확인 할 수 있었다. 즉, 대장암 형성에 단계적으로 작용하는 유전자 이상으로, APC 유전자는 비교적 초기 단계인 선종형성전에 관여하게 되고, 후기 선종 단계에서는 K-ras 종양발생유전자와 18q소실이 관찰되며, 17p결손 및 p53 유전자 결손에 의해 악성으로 전환된다²².

또한 Cohn등³¹의 보고에 의하면, nm23-H1 종양 억제 유전자는 p53 인접부위에 위치(17q21)하며, 대장암의 말기 과정에서 결손이 관찰된다고 하였다.

예후와의 관계에 대한 연구에서, Deans등³²은 암의 생존율에 영향을 주는 요소로 환자의 나이, 조직학적 분화도와 혈관침범이 중요하다고 했다. 환자의 나이가 아주 많거나 또는 젊은 경우 나쁜 예후를 보이는데, 35세 이전에 암종이 발생한 예는 1년 이내에 사망했다고 보고하였다. 본 연구에서도 39세와 35세의 여자에서 1년 이내에 사망한 것으로 보아, 이들 젊은 여자에서 병기가 높은것이 주된 원인이었

다고 추측되나 이에 대해서는 더 이상의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Kem등¹²은 p53 유전자의 이상은 암과 밀접한 관련은 있으나 예후인자나 환자생존과 관계가 없다고 보고하였다. 그러나, p53 단백질의 표현이 예후에 나쁜 영향을 주는 것이 밝혀진 암으로 유방암, 폐암, 대장 및 직장암 그리고 방광암 등이 있다^{33,34}. 본 연구에서도 p53 유전자의 이형접합성 상실과 예후인자중 조직분화도와 림프구양 반응과의 유의성은 관찰할 수 있었으나 생존여부와는 상관성은 없었다. 그러나 대장암 환자의 예후를 추정하는 인자로 임상적으로 널리 이용되며 Jass등²¹의 보고와 같이 본 논문에서도 병기, 림프구 침윤, 종양 침범 양상, 혈관과 신경 침윤, 림프절 전이등과 무병 생존 기간, 원격 전이 등의 인자가 이 환자들의 생존과 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 3).

대장암의 전이에 관련된 유전자로, 최근에 Jen등⁹은 DCC 유전자의 발현을 보고하였으며, 또 다른 유전자의 결손에 의한다는 보고⁶도 있다.

이들 유전자에 대한 연구는 발암원인, 발암과정 등을 규명하는데 큰 진전을 이루고 있으며 또한 암 유전자와 종양억제 유전자간의 상호관계를 정립하는 데에도 큰 기여를 하고 있다. 이러한 연구들을 토대로 현재 임상에서의 이용방안으로 논의되고 있는 내용은 종양억제 유전자의 돌연변이가 암의 전이 또는 진행에 미치는 영향, 예후인자로서의 효용성 그리고 암의 유전자 치료에 대한 이용가능 여부 등이다³⁵⁻³⁷.

맺 음 말

대장암 환자에서 APC 유전자와 p53 유전자의 이형접합성 상실을 검색하고, 이들과 성별, 나이, 종양의 크기 및 위치, 병리적 인자인 조직분화도, 병기, 점액 성분, 림프구양 반응, 종양 침범 양상, 혈관과 신경 침윤, 림프절 전이 등과 무병 생존 기간, 원격 전이 및 생존 여부와의 예후관계를 알아보고자, 48예의 파라핀 포매조직에서 DNA를 추출한 다음, 중합효소 연쇄반응 및 제한효소 절편 다형성의 방법으로, 다음과 같은 결과를 얻었다.

APC 유전자에 대해, 48예중 31예(64.6%)에서 이형접합성을 보였고, 이 중 15예(48.4%)에서 이형접합성 상실을 관찰할 수 있었다. p53 유전자에 대해, 45예중 26예(57.8%)에서 이형접합성을 보였고, 이 중 26예중 11예(42.3%)에서 이형접합성의 상실을 관찰할 수 있었다. 예후와의 관계에서 APC 유전자의

이형접합성 상실은, 어떠한 병리조직학적 예후 인자와도 통계학 적인 의의를 찾을 수 없었다. p53 유전자의 이형접합성 상실은 조직학적 분화도 및 림프구양 반응과 유의성이 있었으나, 환자의 생존과는 유의성이 없었다. 예후인자 중 병기, 림프구양 반응, 종양 침범 양상, 정맥과 신경 침윤, 림프절 전이 등과 무병 생존 기간, 원격 전이 등이 환자의 생존과 연관 되어 통계학적인 의의가 있었다.

이상의 결과로 보아 대장암에서 p53 유전자의 이형접합성 상실은 조직학적 분화도 및 림프구양 침윤반응과 통계학적인 의의를 보였으나, APC 유전자와 p53 유전자의 이형접합성 상실 모두가 이들 환자의 생존과는 무관한 것으로 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Ministry of Health and Welfare. Cancer Registry Programme in the Republic of Korea, Jan. 1, 1993-Dec. 31, 1993. Republic of Korea, March 18, 1995
2. Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8th. ed St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1996: 766.
3. Solomon E, Voss R, Hall V, et al. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. Nature 1987; 328: 616-9.
4. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Eng J Med 1988; 319: 525-32.
5. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 1989; 244: 217-21.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
7. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. Science 1991; 251: 1366-70.
8. Hamilton SR. The molecular genetics of colorectal neoplasia. Gastroenterology 1993; 105: 3-7.
9. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. N Eng J Med 1994; 331: 213-21.
10. Bianchi AB, Navone NM, Conti CJ. Detection of loss of heterozygosity in formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens by the polymerase chain reaction. Am J Pathol 1991; 138: 279-84.
11. Louis DN, von Deimling A, Seizinger BR. A (CA)_n dinucleotide repeat assay for evaluating loss of allelic heterozygosity in small and archival human brain

- tumor specimens. *Am J Pathol* 1992; 141: 777-82.
12. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, et al. Allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA* 1989; 261: 3099-103
 13. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-56.
 14. Goetz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Comm* 1985; 130: 118-26.
 15. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
 16. Boynton RF, Blount PL, Yin J, et al. Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3385-88.
 17. Greenwald BD, Harpaz N, Yin J, et al. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb, and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res* 1992; 52: 741-5.
 18. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O, et al. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 1136-41.
 19. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-95
 20. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Modern Pathol* 1990; 3: 332-5.
 21. Jass JR, Love SV, Northover JMA. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1: 1303-6.
 22. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-21.
 23. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987; 238: 193-7.
 24. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-7.
 25. Bryan TM, Preisinger AC, Smith KJ, Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutation of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-9.
 26. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-9.
 27. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992; 256: 668-70.
 28. D'Amico D, Carbone DP, Johnson BE, Meltzer SJ, Minna JD. Polymorphic sites within the MCC and APC loci reveal very frequent loss of heterozygosity in human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 1996-9.
 29. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-5.
 30. Levine AJ, Moman J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
 31. Cohn KH, Wang F, De Sota La Paix F, et al. Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastasis in colorectal carcinoma. *Lancet* 1991; 338: 722-4.
 32. Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence RAJ. Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 1992; 79: 608-13.
 33. Blount PL, Ramel S, Raskind WH, et al. 17p allelic deletions and p53 protein overexpression in Barrett's adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5482-6.
 34. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-8.
 35. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, et al. Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992; 66: 758-64.
 36. Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton S. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Eng J Med* 1994; 331: 213-21.
 37. Kinzler KW, Vogelstein B. Clinical implication of basic research: cancer therapy meets p53. *N Eng J Med* 1994; 331: 49-50.