

간암종에서 9p, 13q, 16q 염색체의 Microsatellite 변이에 대한 연구

고려대학교 의과대학 병리학교실 및 ¹외과학교실

조성진 · 김남렬¹ · 민연기¹ · 조용걸¹ · 조민영¹ · 서성욱¹ · 염범우 · 원남희

Microsatellite Alterations of Chromosome 9p, 13q, 16q in Hepatocellular Carcinoma

Seong Jin Cho, M.D., Nam Ryeol Kim, M.D.¹, Youn Ki Min, M.D.¹, Yong Geul Joh, M.D.¹, Min Young Cho, M.D.¹, Sung Ock Suh, M.D.¹, Bom Woo Yeom, M.D. and Nam Hee Won, M.D.

Purpose: Hepatocellular carcinoma (HCC) patients are asymptomatic and the tumor remains in an unresectable state until the tumor progresses. Recently much efforts for elucidation of the early hepatocarcinogenesis have been made, and for this purpose it is very crucial to investigate the genetic abnormalities. We evaluated microsatellite alterations of five markers from chromosome 9, 13, 16 and investigated the relationships with the clinicopathological parameters in HCC.

Methods: The microsatellite alteration analysis was performed using polymerase chain reaction with five polymorphic microsatellite markers (D9S171, D9S1747, D13S156, D16S419, D16S3106) in 40 surgically resected HCCs and their respective non-tumorous counterparts.

Results: D9S171, D9S1747, D13S156, D16S419, D16S3106 abnormalities were detected in 20.0%, 14.3%, 50.0%, 32.4% and 22.6%, respectively. Loss of heterozygosity (LOH) of D9S171 correlated well with higher tumor histologic grade and LOH of D13S156, D16S419 and D16S3106 correlated well with increased tumor size. Microsatellite instability (MSI) was found in two markers, D13S156, D16S419.

Conclusion: As a result, we concluded that alterations in microsatellites of various chromosomes may contribute to the hepatocarcinogenesis and tumor progression. Especially LOH of chromosome 13 and 16 are considered to correlate with tumor progression. (*J Korean Surg Soc* 2001;61:305-311)

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Microsatellite, Loss of heterozygosity

중심 단어: 간세포암종, 극소위체, 이형접합소실

Departments of Pathology and ¹Surgery, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

서 론

국내에서 간암이 위암에 이어 폐암과 비슷한 발생 빈도를 보임에 따라(1) 간암 환자들에 대한 새로운 차원의 진단과 진료가 요구되고 있다. 간세포암종(hepatocellular carcinoma: 이하 간암)의 발견은 일차적으로 영상 진단에 의존하게 되므로 간암으로 진단될 때에는 상당히 진행되어 있다. 일반적으로 종양의 발생에는 복수의 유전자 이상의 한 종양 세포내에서 종양의 진행 단계에 따라 차례로 축적되는 것으로 알려져 있다. 최근 만성 간염, 간경변증에서 이형성 결절(dysplastic nodule)이 발생되고 이 병변이 간암의 전구 병변임이 규명되면서 간암의 경우에도 p53 등 일부 유전자를 대상으로 다단계 발암 기전이 제시되고는 있으나(2-6) 다른 장기의 종양처럼 체계화된 기전의 정립은 이루어지지 않은 상태이다. 또한 영상 진단과 간 침생검 병리 진단으로 간암이나 결절성 병변의 검출률이 높아지고는 있지만, 이 같은 검사 체계만으로는 만성 간염이나 간경변증이 있는 환자에서 높은 비율로 발생하는 소간세포암종(small hepatocellular carcinoma: 이하 소간암)과 이형성 결절의 감별이 어렵다.(7)

따라서 다른 암종에 비해 조기 발견이 여의치 않은 간암의 조기 진단과 더불어 간암의 수술 또는 화학항암요법 치료 후 추적 진료 시에도 간암의 재발을 감시하고 간질환의 지속적인 관리를 위한 종양 생물학적인 연구는 절실하다. 이에 영상 의학의 발달로 검출률이 높아진 간암의 초기 병변인 이형성 결절과 크기 3 cm 이하의 소간암에서 분자적 차원으로 여러 유전자 이상을 검출하는 시도는 임상적으로도 매우 유용할 것으로 판단된다. 특히 암 억제 유전자는 세포주기 조절을 비롯하여 전사 인자 발현, 세포 증식 및 신호전달 체계 등의 과정을 조절하여 종양의

책임저자 : 원남희, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
☎ 136-705, 고려대학교 의과대학 안암병원 해부병리과
Tel: 02-920-5590/6142, Fax: 02-920-5590
E-mail: nhwon@yahoo.co.kr

접수일 : 2001년 8월 9일, 게재승인일 : 2001년 8월 30일
본 논문은 2000년도 고려대학교 의과대학 연구비(2000-G05)의 지원에 의해 이루어졌음.

발생을 억제하는 것으로 알려져 왔으며, 간암에서는 이 암억제 유전자의 불활성화를 야기시키는 대립 유전자의 결손이 많은 빈도로 여러 염색체에서 일어나므로 그 결손 여부가 임상적으로도 중요시 되고 있다.(8,9)

그간 간암의 발생에 관여하는 암 억제 유전자를 발견하려는 연구가 국내외적으로 진행되어 왔으나 간암은 타 장기의 종양에 비하면 대립유전자 결손(loss of heterozygosity: LOH) 및 극소위체 불안정성(microsatellite instability: MSI)에 대한 연구가 비교적 드문 실정이다. 이에 초기 및 진행성 간암에 대한 신뢰성 있는 표지자의 모색은 간암 발병의 예측 혹은 수술과 항암요법 치료 후의 예후 추정 등의 환자 관리에 매우 유용할 뿐만 아니라 진행성 간암과 소간암, 이형성 결절 같은 전암 병변 및 비종양성 결절성 병변을 감별하는데 도움을 주는 표지자의 검색을 가능케 할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 간암의 악성화와 종양의 진행성 성장에 관여하는 것으로 알려진 16번 염색체의 LOH를 중심으로 9, 13번 염색체에서 여러 microsatellite marker를 사용한 LOH 및 MSI를 규명하고 간암의 임상적 특성 및 중요 예후인자와의 연관성을 분석하여 한국인 간암의 진행 단계에서의 분자병리적 특성을 파악하려고 한다.

방 법

1) 연구 대상

고려대학교 안암병원에서 1995년 1월부터 2000년 9월까지 간암으로 진단받고 외과적 간 부분 절제술을 시행한 환자 중 수술 전에 간동맥 화학색전술을 받지 않고 파라핀 블록 상태가 양호하고 비암종 조직을 포함하고 있는 40예를 연구대상으로 하였으며, 각 예를 크게 종양과 비종양 부위 등으로 구분하고 비종양 부위를 대조군으로 하였다.

2) 방법

(1) 병리조직학적 검색: 모든 검체는 10% 중성 포르말린에 양호하게 고정된 후 통상 병리진단을 위한 처리과정을 거친 파라핀 포매 조직을 이용하였으며 각 예에서 암종과 비암종 부위가 포함된 파라핀 블록을 선택하여 hematoxylin and eosin 염색을 시행하였다. 40예의 간암은 광학현미경으로 조직학적 등급을 Edmondson Steiner 방식으로 재분류하였으며, 종양의 크기는 International Working Party 방식(10)인 3 cm를 기준으로 그 이하를 소간암, 3 cm를 초과한 경우를 진행성 간암으로 구분하였다.

(2) Microsatellite alteration 분석:

① DNA 추출: DNA는 모두 파라핀 블록에서 획득하였으며, 각 예당 암종과 비암종 부분의 2개 부위의 파라핀 포매 조직을 10µm 두께의 연속 절편으로 만들어 파라핀

을 제거한 후 H&E 염색을 한 후, 슬라이드를 2% 글리세롤 용액에 2분간 담가두었다가 광학현미경으로 관찰하면서 미세절제기를 이용하여 슬라이드상의 순수 암종과 비암종을 조직을 No. 11 scarpel로 끊어내고 각각 1.5 ml eppendorf tube에 넣었다. 이 때 슬라이드가 바뀔 때마다 조직이 서로 오염되지 않도록 알콜 솜으로 충분히 칼을 닦아냈으며, 증례가 바뀔 때마다 오염을 방지하기 위해 새로운 칼을 사용하였다. 그 후 eppendorf tube는 0.1 mg/ml proteinase K를 처리한 후 52°C waterbath에서 1일간 보관하였다. 그 후 proteinase K의 반응을 불활성화시킨 후, 분광광도계로 DNA 농도를 측정 한 후 -20°C에서 냉장 보관하면서 이 중 일부를 취하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다.

② LOH 및 MSI 분석: 분석하려는 각 9, 13, 16번 염색체의 microsatellite marker 5가지는 D9S171, D9S1747 (9p21), D13S156 (13q)와 D16S419, D16S3106 (16q)이었고, 염기 서열은 아래와 같으며 GIBCO사(USA)에서 제작된 것을 사용하였다(Table 1). 그리고 암종, 비암종 부위에서 추출한 DNA를 주형으로 각각 PCR을 시행하였다. 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1µl, 0.2 mM dNTP, 10x buffer, 10 pmol/µl primer, 1U Taq polymerase (BioGrand, Seoul)에 증류수를 가하여 12µl로 되게 하였다. PCR은 각 표본에 대하여 30내지 45주기를 반복 실시하였으며, 모든 반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, USA)에서 시행하였다. 각 주기 당 변성 반응은 기본적으로 93°C에서 30초, 결합반응은 56°C에서 30초, 연장 반응은 72°C에서 40초씩 시행하였으며, 각 표지자 당 다소의 온도 보정을 실시하였고, 증폭 주기도 다소 차이를 두었다. 마지막 주기에서 연장반응은 72°C에서 10분간 이루어졌다.

성공적으로 이루어진 PCR 산물 중 4µl를 취해 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, 95% formamide, 0.05% xylene cyanol를 첨가 후 90°C에서 반응시킨 후, 급히 냉각시킨 다음 전기영동을 실시하였다. 이 때 gel loading에 사용된 7 M 요소를 포함하는 6% poly-

Table 1. Primers used in microsatellite analysis study

D9S171	forward 5'-AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT-3'
	reverse 5'-ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT-3'
D9S1747	forward 5'-GGCTTTCTCTCTTTTGTCTC-3'
	reverse 5'-GGAATAAATCAGGCTACCAGG-3'
D13S156	forward 5'-ATTAGCCCAGGTATGGTGAC-3'
	reverse 3'-GCTGTGGTATGAGTTACTTAAACAC-3'
D16S419	forward 5'-ATTTTAAAGGAATGTAAAGNACACA-3'
	reverse 5'-GACGTTAGACCAGGAGTCAG-3'
D16S3106	forward 5'-GAGACCTACAGTCTTTTGCATTTAC-3'
	reverse 5'-TTTTGAAGCTGAGCAGAAGG-3'

acrylamide gel은 한 쪽 유리판을 sigmacoat (Sigma, USA)로, 다른 쪽 유리판을 binding solution (Bioneer, Korea)으로 coating한 후 제작하였으며, 각 유리판 당 12예의 암종, 비암종 부위의 PCR 산물을 loading하였다. 전기영동은 1,400 V에서 2시간 동안 시행하였으며, 은 염색(silver staining)을 시행하였다. 은 염색은 유리판을 10% acetic acid로 30분간 처리한 후, 증류수로 세척하고, silver nitrate 용액으로 반응시킨 후 증류수로 수세한 다음, sodium carbonate 용액에서 band가 명료하게 나타날 때까지 발색시켰고, 그 후 band의 양상을 관찰하였다. 단, PCR 반응 후에 이루어진 모든 전기 영동 및 은 염색은 2회 반복 실시해서 밴드의 일치 여부를 자체 검증했다. 한편 PCR이 이루어지지 못한 경우에는 2회 반복 실험 후에도 PCR 증폭이 되지 않거나 homozygous 밴드 패턴을 보이는 증례들은 non-informative case로 처리했다.

(3) **결과판정:** 밀도측정기를 이용하여 gel에 loading되어 있는 band를 측정하고 정상 band와 비교하여 중앙에서 명백한 band 소실이 있거나 최소한 50% 이상의 소실이 있

는 경우를 LOH로 판정하였고 정상에 비해 band가 새롭게 생긴 경우를 MSI로 판정하였다. 이 때 PCR 산물을 얻을 수 없는 증례, 동형접합성을 보이는 경우와 그리고 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우는 non-informative로 처리하고 결과 분석에서 제외하였다.

(4) **결과판정:** 각 표본에서 각 microsatellite marker에 대한 LOH와 MSI의 빈도를 백분율로 분석하고, 임상 소견 및 예후인자들과의 상관관계를 χ^2 검정을 이용하여 구하였다.

결 과

1) 임상 정보 및 조직병리학적 소견

병리조직학적 검사 결과 총 40예의 증례 중 성별로는 남성 37예, 여성 3예이었다. 중앙 주변에 간경변증을 동반한 예는 28예이었다. 40예의 간암 중 소간암은 12예, 진행성 간암은 28예이었다. 조직학적 분화도는 Edmondson-Steiner I 등급이 4예(10.0%), II 등급이 16예(40.0%), III 등급이 20예(50.0%)이었고, IV 등급은 없었다. 또한 비중앙 부분으로 간경변증을 동반한 예는 28예(70.0%)이었다. 한편 림프관 색전(lymphatic emboli)이나 혈관 침범의 소견을 보인 예는 14예(35.0%)이었으며, II 등급 암종 16예 중 5예(31.3%), III 등급 암종 20예 중 9예(45.0%)이었으며, I 등급 암종 중 색전이나 혈관 침범의 소견을 보인 예는 한 예도 없었다. 그러나 색전, 혈관 침범 소견을 보인 예 14예 중 단 2예만이 소간암이었으며(16.7%), 나머지는 모두 진행성이었고(42.9%) 이는 통계학적으로 유의하였다(p=0.032) (Table 2, Fig. 1).

2) LOH, MSI 검출 결과

(1) **일반적인 특성:** 40예의 간암 중 informative case를 얻

Table 2. Clinicopathologic findings of hepatocellular carcinomas (%)

Vascular invasion or lymphatic emboli	(+)	(-)
Tumor size		
<3 cm (n=12)	2 (16.7)	10 (83.3)
>3 cm (n=28)	12 (42.9)	16 (57.1)
Tumor grade		
I (n=4)	0 (0)	4 (100.0)
II (n=16)	5 (31.3)	11 (68.7)
III (n=20)	9 (45.0)	11 (55.0)

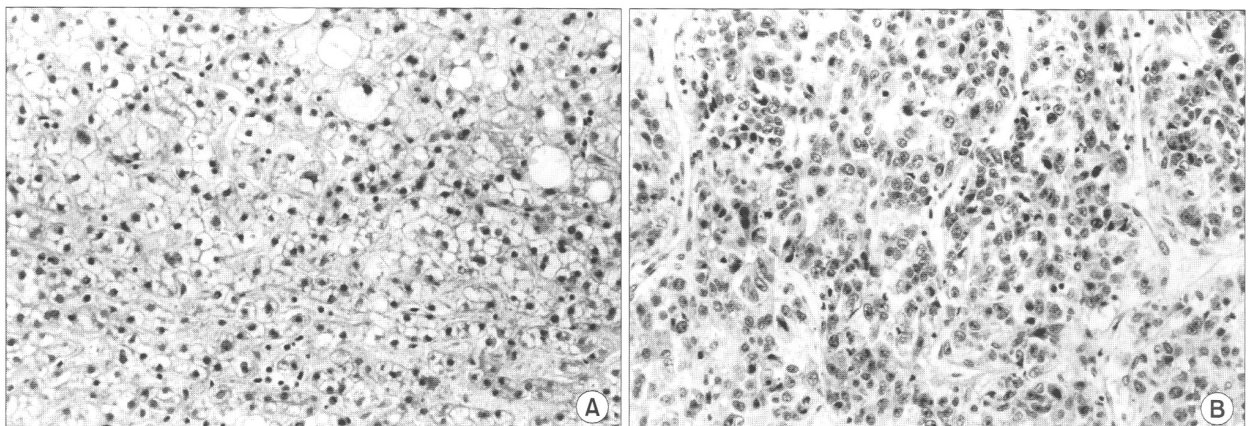


Fig. 1. (A) Histologic finding of grade I HCC shows well-differentiated tumor and is similar to the architecture of normal liver. Fatty metamorphosis is also found (H&E, $\times 100$). (B) Histologic finding of grade III HCC shows poorer differentiation (H&E, $\times 200$).

Table 3. Microsatellite alterations (LOH and MSI) according to the histopathologic features (%)

Histopathologic features	LOH or MSI				
	D9S171	D9S1747	D13S156	D16S419	D16S3106
Tumor size					
< 3 cm	2/10 (20.0)	1/7 (14.3)	4/10 (40.0)	2/11 (18.2)	1/9 (11.1)
> 3 cm	4/20 (20.0)	2/14 (14.3)	12/22 (54.5)	10/26 (38.5)	6/22 (27.3)
Tumor grade					
I	0/3 (0.0)	0/2 (0.0)	2/4 (50.0)	1/4 (25.0)	0/3 (0.0)
II	1/12 (8.3)	3/9 (33.3)	6/12 (50.0)	3/14 (21.4)	2/11 (18.2)
III	5/15 (33.3)	0/10 (0.0)	8/16 (50.0)	8/19 (42.1)	5/17 (29.4)
V. invasion or lym. emboli*					
(+)	2/10 (20.0)	1/8 (12.5)	5/11 (45.5)	5/12 (41.7)	3/11 (27.3)
(-)	4/20 (20.0)	2/13 (15.4)	11/21 (52.4)	7/25 (28.0)	4/20 (20.0)
Total [†]	6/30 (20.0)	3/21 (14.3)	16/32 (50.0)	12/37 (32.4)	7/31 (22.6)

* = vascular invasion or lymphatic tumor emboli; [†] = number of cases with LOH or MSI/number of informative cases.

을 수 없었던 2예를 제외한 38예 중에서 5개 염색체 표지자(D9S171, D9S1747, D13S156, D16S419, D16S3106)에서의 microsatellite 변이율은 각각 20.0%, 14.3%, 50.0%, 32.4%, 22.6% 이었으며, 총 28예에서 LOH 및 MSI가 검출되었고, 이들 5가지 표지자에 모두 음성인 경우는 10예이었다.

(2) **9p 염색체 표지자 변이:** D9S171는 30예에서 informative 증례를 얻을 수 있었으며 그 중 6예에서 LOH가 검출되었으나 MSI 소견은 보이지 않았다. 소간암과 진행성 간암에서 각각 2예, 4예에서 LOH가 검출되었으며, 이들 변이 중 D9S171의 경우 III 등급이 33.3%이었고, II 등급이 8.3%이어서 등급이 높아질수록 LOH 검출률이 높았다(p=0.030). 그러나 다른 예후인자들간의 상관관계는 없었다. D9S1747 표지자에서는 21예에서 informative 증례를 얻었고, 그 중 3예에서만 LOH가 검출되었으며 예후인자들과의 상관관계는 없었다(Table 3).

(3) **D13S156 변이:** D13S156는 32예에서 informative 증례를 얻을 수 있었으며 그 중 16예(50.0%)에서 LOH 및 MSI 소견을 보였다(Fig. 2). D13S156 변이는 소간암과 진행성 간암에서 각각 4개(40.0%), 12개씩(54.5%) 검출되었으며, 소간암에서 검출된 4개의 변이 중 3개와 진행성 간암에서 검출된 12개의 변이 중 6예는 MSI이었고, 총 16개의 변이 중 MSI가 차지하는 비율은 56.3%로 다른 표지자에 비해 의미있게 높은 비율로 검출되었다. D13S156에서의 LOH는 소간암에서 1예(10.0%), 진행성 간암에서 6예(27.2%)의 비율로 검출되었다(p=0.025). MSI 검출은 소간암에서 3예(30.0%), 진행성 간암에서 6예(27.2%)로 소간암에서 MSI의 변이 비율이 오히려 높게 검출되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 조직학적 분화도에 따른 D13S156 변이는 LOH

Table 4. Clinicopathologic findings of D13S156 microsatellite alterations (%)

Histopathologic features	LOH	MSI
Tumor size		
< 3 cm (n=12)	1/10 (10.0)	3/10 (30.0)
> 3 cm (n=28)	6/22 (27.2)	6/22 (27.2)
Tumor grade		
I (n=4)	0/4 (0.0)	2/4 (50.0)
II (n=16)	4/12 (33.3)	2/12 (16.7)
III (n=20)	3/16 (18.8)	5/16 (31.3)

경우 I 등급에서는 전혀 검출되지 않았으며, II, III 등급에서 각각 33.3%, 18.8%가 검출되어 II 등급에서 가장 많은 변이를 보였다. MSI의 변이는 I, II, III 등급에서 각각 50.0%, 16.7%, 31.3%에서 검출되었으나 유의성은 없었다(Table 3, 4).

(4) **16q 염색체 표지자 변이:** D16S419와 D16S3106 표지자의 분석에서 informative 증례는 각각 37예, 31예이었고 그 중 각각 10예, 7예에서 LOH를 보였으며(27.0%, 22.6%), D16S419 표지자는 2예에서 MSI의 소견을 보여 총 12예의 변이를 보였다(32.4%). D16S419 표지자는 12개의 변이 중 2예(18.2%)는 소간암이었으며, 10예(38.5%)는 진행성 간암에서 검출되었고, D16S3106 표지자는 소간암에서 1예(11.1%), 진행성 간암에서 6예(27.3%)의 LOH가 검출되어 이 16q 염색체의 표지자들은 진행성 암종일수록 그리고 종양의 크기가 클수록 microsatellite 변이가 큰 경향을 보였다(p=0.040, p=0.046). 분화도별로는 D16S419의 경우 12

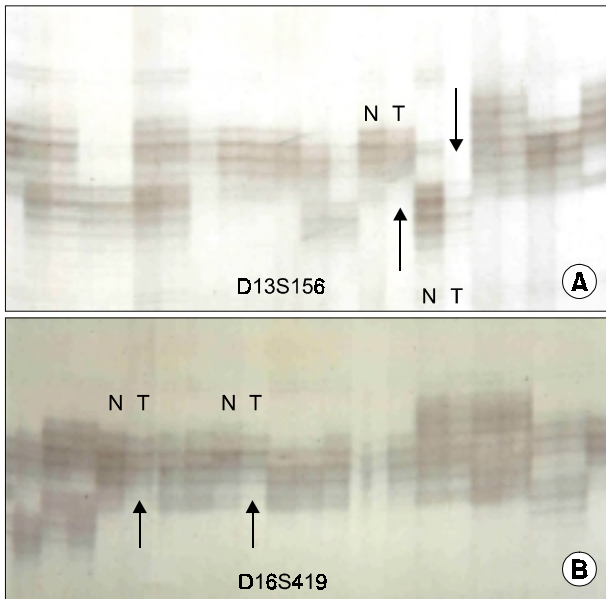


Fig. 2. Representative results of loss of heterozygosity in HCC. DNA from HCC (lane T) and non-tumor counterpart (lane N) of the same patient was amplified by polymerase chain reaction with microsatellite primers D13S156 (A) and D16S419 (B). Tumor DNA showed a disappearance of one allele at the microsatellite loci (arrow).

예의 변이 중 8예가 III 등급이며(42.1%), II 등급 21.4%, I 등급 25.0%로 III 등급에서 가장 많은 변이의 특성을 보였으나, 통계학적인 유의성은 없었다. D16S3106의 경우 분화도 등급이 높을수록 변이율이 높아지는 경향이 있었으나 유의성은 없었다. 한편 이들 16번 염색체 변이는 중앙림프 색전 및 혈관 침범을 보인 군에서 더 높은 변이율을 보였으나 유의성은 없었다(Table 3, Fig. 2).

고 찰

간암 발생의 주요 원인인자로서 간염 바이러스 감염이 알려져 있으나 간암 발생의 분자적 기전은 아직 정립되어 있지 않다. 일반적으로 암 발생에는 복수의 발암유전자나 암억제 유전자의 이상이 한 종양 세포내에서 여러 단계에 걸쳐 축적 내지는 발현되는 것으로 입증되고 있다. 동시에 많은 발암화 관련 유전자들의 염색체상에서의 위치가 규명되면서 염색체 이상과의 상관성을 밝히려는 많은 연구들이 진행되어 왔다.(11) 이 중에서 암억제 유전자의 불활성화에 대한 기전을 대립유전자의 결손으로부터 극소위 좌위의 돌연변이(mutated microsatellite loci) 형태로 파악할 수 있으며, 이 돌연변이를 검출하는 기법으로 LOH와 MSI 표지자를 사용한다. 즉 microsatellite 변이는 microsatellite DNA 염기서열의 다양한 돌연변이로 야기되는 것

이며 microsatellite는 DNA 복제 중에 소실되기 쉬운 것으로 어느 특정 유전자의 DNA 보다 불안정성이 있으며, 주로 유전자가 아닌 non-coding DNA에 위치하는 특성이 있다. Microsatellite는 세대간에 걸쳐 잘 유지되며 복수 염기서열의 단순한 반복 구조이자 다형성(polymorphism)이 심하고 한 쌍의 대립 유전자 내에서도 염기 반복 배열 수가 차이가 나는 특성이 있어서 primary gene mapping과 genetic linkage analysis에 사용되어 왔고, 또한 LOH의 검출로 염색체에서의 어느 특정 부분의 결손(allelic loss)과 MSI를 파악할 수 있다.(4,8,12,13)

최근 간암에서의 microsatellite DNA의 다형성에 대한 많은 연구로 염색체 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 22번 염색체 등에서의 LOH를 규명하는 작업들이 이루어져 왔으며,(9,14-23) 이들 보고들과 마찬가지로 본 연구에서도 9, 13, 16번 염색체에서의 microsatellite 변이들이 상당히 검출되었다. D16S419 표지자의 경우 본 연구에서는 32.4%의 LOH 검출률을 보여 50%의 LOH가 검출된 Sheu 등(19)의 보고보다는 낮은 결과를 보였지만 종양의 크기와 변이율이 의미있는 상관성을 보였고 또한 분화도 II, III 등급간에 유의한 변이 차이가 있었다. 이 같은 결과는 16번 장완 염색체에서의 allelic loss가 간암의 진행과 관련된다는 Tsuda 등(24)의 보고와 부합되었다. 다만 본 연구에서 사용된 D16S419 좌위에서의 allelic imbalance는 32.4%로서 16번 염색체에서의 allelic imbalance가 60% 이상이 검출되었다는 D16S498 좌위에서의 보고(23)와 비교하면 낮은 비율을 보이는데, 아마도 본 연구가 방사성 동위원소 표지자를 사용하지 않아 검출률이 다소 낮았을 가능성과 informative 증례들이 다소 많았기 때문으로 판단된다.

D13S156 표지자의 경우에는 50.0%의 microsatellite 변이 검출이 있었으나 MSI의 검출률이 LOH보다 많았으며 이는 Sheu 등(19)과 Piao 등(20)의 보고와 차이가 있는 결과였다. 이 표지자에서는 MSI의 경우 오히려 소간암에서 더 많이 검출되었으며, 다만 LOH만을 볼 때에는 소간암에서는 단 1예만이 검출되었고, 분화도별로도 I 등급에서는 검출되지 않았으므로 이 표지자는 I 등급의 소간암을 감별할 때 유용할 것으로 판단되지만 향후 더 많은 검체를 대상으로 한 연구와 인종적 차이에 따른 변이 양상에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

9번 염색체 표지자중의 일종인 D9S171은 p16 암억제 유전자와 관련있는 좌위로 본 연구에서는 20.0%의 검출율을 보여 35.7%의 결과를 얻은 Liew 등(25)의 보고에 비해 다소 낮은 결과를 보였으나, Baek 등(26)의 보고와 비슷한 결과를 보였다. 또한 분화도 III 등급에서 높은 비율로 검출되어 간암의 분화도와 통계적으로 유의성이 있었다. 이상의 microsatellite alteration 결과를 종합해 볼 때 이들 5가지 표지자에 의해서 변이가 확인되지 않은 증례는 모두 10예 (25.0%)이었다.

이상의 결과로 간암의 발생과 진행에 많은 다양한 염색체 및 유전자의 변이가 관여하는 것으로 생각되며, microsatellite 표지자가 많이 적용될수록 변이 검출률이 높아지므로 발암기전 연구에 있어서 각 염색체별로 더 많은 표지자에서의 변이를 검출하는 것이 요구된다.

결 론

간암에서 9, 13, 16번 염색체에서의 LOH 및 MSI의 양상을 규명하기 위해서 외과 수술적으로 적출된 간암 조직 40예를 대상으로 하여 분자생물학적인 방법으로 다음과 같은 결과를 얻었다. 소간암은 12예, 진행성 간암은 28예이었으며, 40예의 HCC 중 5개 염색체 표지자(D9S171, D9S1747, D13S156, D16S419, D16S3106)에서의 microsatellite 변이율은 각각 20.0%, 14.3%, 50.0%, 32.4%, 22.6% 이었고, 총 28예에서 LOH 및 MSI가 검출되었고, 이들 5 가지 표지자에 모두 음성인 경우는 10예이었다. D9S171 LOH는 종양의 분화도와 연관성이 있었고, D13S156 변이는 MSI가 LOH와 유사하게 검출되었으며, LOH는 종양의 크기와 관련이 있었다. D16S419는 종양의 크기가 클수록 유의성 있는 변이를 보였다.

이상들의 결과로 간암의 발생과 진행에는 다양한 인자들의 발현 및 돌연변이가 관여하는 것으로 보이며, 간암에서 보다 많은 염색체에서의 LOH 및 MSI와 다양한 유전자 변이를 조사하면 간암의 유전학적 이상과 다양한 임상 소견들과의 연계성을 규명하고 진단하는데 기여할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- 1) Central Cancer Registry Center in Korea. Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. 2001 (1999.1-1999.12).
- 2) Eguichi A, Nakashima O, Okudaira S, Sugihara S, Kojiro M. Adenomatous hyperplasia of the liver in the vicinity of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992;15:843-8.
- 3) Tanaka S, Toh Y, Adachi E, Matsumata T, Mori R, Sugimachi K. Tumor progression in hepatocellular carcinoma may be mediated by p53 mutation. *Cancer Res* 1993;53:2884-7.
- 4) Kusano N, Shiraishi K, Kubo K, Oga A, Okita K, Sasaki K. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* 1999;29:1858-62.
- 5) Kwon KW, Park YN, Park CI. p21 protein expression and cell proliferation activity in human multistep hepatocarcinogenesis. *Kor J Pathol* 2000;34:325-30.
- 6) Sakamoto M, Hirohashi S, Shimosato Y. Early stage of multistep hepatocarcinogenesis. *Human Pathol* 1999;22:172-8.
- 7) Ferrel L, Wright T, Lake J, Roberts J, Asher N. Incidence and diagnostic features of dysplastic nodules vs small hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver. *Hepatology* 1992;16:1372-81.
- 8) Kawai H, Suda T, Aoyagi Y, Isokawa O, Mita Y, Waguri N, et al. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology* 2000; 31:1246-50.
- 9) Teeguarden JG, Newton MA, Dragan YP, Pitot HC. Genome-wide loss of heterozygosity analysis of chemically induced rat hepatocellular carcinomas reveals elevated frequency of allelic imbalances on chromosomes 1, 6, 8, 11, 15, 17, and 20. *Mol Carcinog* 2000;28:51-61.
- 10) International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesion. *Hepatology* 1995;22:983-93.
- 11) Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49:3713-21.
- 12) Weisenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, et al. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992;359:794-801.
- 13) Bluteau O, Legoix P, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. PCR-based genotyping can generate artifacts in LOH analyses. *Biotechniques* 1999;27:1100-2.
- 14) Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Kaneto H, Sasaki S, Ohmura T, et al. Infrequent widespread microsatellite instability in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2000;16:543-7.
- 15) Chung MY, Wu JC, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, Chiang H. Preferentially deleted chromosome region 9p21 in large hepatocellular carcinomas. *Int J Mol Med* 2000;5:521-4.
- 16) Bando K, Nagai H, Matsumoto S, Koyama M, Kawamura N, Tajiri T, et al. Identification of a 1-Mb common region at 16q24.1-24.2 deleted in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:38-44.
- 17) Koyama M, Nagai H, Bando K, Ito M, Moriyama Y, Emi M. Localization of a target region of allelic loss to a 1-cM interval on chromosome 16p.13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:951-6.
- 18) Tsopanomalou M, Kouroumalis E, Ergazaki M, Spandidos DA. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in human non-neoplastic hepatic lesions. *Liver* 1999;19:305-11.
- 19) Sheu JC, Lin YW, Chou HC, Huang GT, Lee HS, Lin YH, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer* 1999;80:468-76.
- 20) Piao Z, Kim H, Malkhosyan S, Park C. Frequent chromosomal instability but no microsatellite instability in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2000;17:507-12.
- 21) Gariboldi M, Pascale R, Manenti G, De Miglio MR, Calvisi D, Carru A, et al. Analysis of loss of heterozygosity in neoplastic nodules induced by diethylnitrosamine in the resistant BFF1 rat strain. *Carcinogenesis* 1999;20:1363-8.

- 22) Bando K, Nagai H, Matsumoto S, Koyama M, Kawamura N, Onda M, et al. Identification of a 1-cM region of common deletion on 4q35 associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:284-9.
- 23) Piao Z, Park C, Kim JJ, Kim H. Deletion mapping of chromosome 16q in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 80:850-4.
- 24) Tsuda H, Zhang W, Shimosato Y, Yokota J, Terada M, Sugimura T, et al. Allelic loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:6791-4.
- 25) Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Lau WY, Hin LY, et al. Frequent allelic loss on chromosome 9 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:319-24.
- 26) Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, et al. p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:60-68.
-