대한외과학회지 : 제 63 권 제 3 호
Vol. 63, No. 3, September, 2002

□ 원 저 □

간세포암에서의 Genetic Instability와 5, 8, 13, 17번 염색체에서의 Microsatellite 변이에 대한 연구

고려대학교 의과대학 외과학교실 및 [2]병리학교실, [1]한림대학교 의과대학 병리학교실

이경범 · 조성진[1] · 최상룡 · 김영철 · 원남희[2] · 서성옥

Genetic Instability and Microsatellite Alterations of Chromosome 5, 8, 13, 17 in Hepatocellular Carcinoma

Kyung Bum Lee, M.D., **Seong Jin Cho,** M.D.[1], **Sang Yong Choi,** M.D., **Young Chul Kim,** M.D., **Nam Hee Won,** M.D.[2] and **Sung Ock Suh,** M.D.

Purpose: Neoplastic development is a multistep process that involves the accumulation of genetic alterations in proto-oncogenes, DNA repair genes, and tumor suppressor genes. Molecular studies in carcinoma have shown the high frequency of loss of heterozygosity (LOH) in some specific chromosome regions, but LOH on the HCC chromosome has not been thoroughly investigated in Korea. LOH is considered to be phenotypes of genomic instability. We investigated the genetic instability and microsatellite alterations of chromosome 5, 8, 13 and 17 in hepatocellular carcinoma (HCC).
Methods: Microsatellite alteration analysis was performed using polymerase chain reaction with 12 polymorphic microsatellite markers (BAT26, D5S123, D5S346, D8S254, D8S261, D8S262, D13S153, D13S159, D13S171, D17S250, D17S796, TP53) in 37 surgically resected HCCs and their respective non-tumorous counterparts. Pairs of tumorous part and normal tissue in the same patient were compared and then the size of microsatellite markers was measured.
Results: MSI was detected in 3 samples and LOH was detected in 51 samples of 37 cases. Fractional allelic loss (FAL) was above 0.2 in 10 cases and was correlate with high grade of HCC. we could detect only 1 case of LOH in D8S254 marker, which was advanced cancer. Markers D5S123 and D5S346 showed 2 and 3 cases of LOH, respectively. Markers D8S262, D17S250 and D17S796 had LOH and were significantly correlated with tumor grade.
Conclusion: According to the results, our data revealed that specific LOH, rather than MSI, may be involved in hepatocarcinogenesis. LOH may be a useful tool for following HCC patients because the high frequency of LOH correlates with poor prognosis of HCC. **(J Korean Surg Soc 2002;63:220-226)**

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Microsatellite instability, Loss of heterozygosity
중심 단어: 간세포암, 현미부수체 불안정성, 이형접합성 소실

Departments of Surgery and [2]Pathology, College of Medicine, Korea University, [1]Department of Pathology, College of Medicine, University of Hallym, Seoul, Korea

서 론

간세포암(Hepatocellular carcinoma: 이하 HCC)은 간의 악성 종양 중에서 가장 흔한 종양(*1*)이지만 최근까지도 종양생물학적 연구 및 예후와 관련된 임상적인 연구가 미흡한 실정이다. HCC는 바이러스성 간염이 빈발하는 지역에서 많이 발생한다. HCC의 정확한 발암기전은 밝혀져 있지 않지만, 간염에서처럼 지속적인 간 내의 염증이 전암병변을 유발하고, 암으로까지 발전하는 것으로 여겨지고 있다.(*6,8*) HCC는 종양 발생 위치적 특성상 증상발현이 늦고 특이 종양표지자의 부재로 임상적으로 늦게 발견되는 경향이 있어서 외과 수술의 발전에도 불구하고 예후는 여전히 나쁘다고 할 수 있다. 또한 HCC는 분자종양학적 및 종양생물학적인 연구가 미흡하여 조기진단이나 수술 후의 임상적 치료에 도움을 주는 예후 인자를 판별하는 데 제한점들이 많다.

최근 들어 분자생물학의 발전으로 DNA 분석을 포함한 분자수준에서의 발암기전을 밝히려는 노력이 있어 왔다. 이중 현미부수체(Microsatellite)를 이용하는 경우가 많은데 현미부수체는 2 3개의 염기쌍으로 이루어진 반복적 DNA

책임저자 : 서성옥, 서울시 구로구 구로동 80번지
㉾ 152-703, 고려대학교 구로병원 외과
Tel: 02-818-6045, Fax: 02-859-5941
E-mail: hs9798@yahoo.co.kr
접수일 : 2002년 6월 18일, 게재승인일 : 2002년 7월 31일
본 논문은 2000년 고려대학교 의과학연구원 연구비(2000-G05)의 지원에 의해 이루어졌음.
2002년 춘계외과학회에서 구연 발표된 내용임.

염기서열로서 신체의 모든 염색체에 고루 분포하고 있으며, DNA 복제가 이상이 있을 때 Microsatellite의 크기가 커지거나 줄어드는데 이를 현미부수체 불안정성(microsatellite instability: 이하 MSI)이라고 하며, 이는 DNA mismatch gene의 이상으로 DNA 복제 시 발생하는 오류를 수정하지 못하기 때문이라고 알려져 있다.

1990년대 초에 MSI가 암종의 발병에 기여한다는 연구 결과들이 나오기 시작하면서 다양한 소화기 암종에서도 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 유전성 비용종성 대장암(hereditary nonpolyposis colorectal cancer: HNPCC) 같이 대장암이 다발성으로 발생하는 질환에서 DNA 부정합 수복체계(mismatch repair system)에 관련되는 유전자의 변이가 MSI와 연관된다는 사실이 규명되었다.(*5,12,18,19*) 그러나, 여러 저자들에 의해서 유전자 불안정성과 종양억제 유전자의 상관관계가 없음이 밝혀지면서 아직까지도 정확한 서로간의 연관성에 대해서는 논란이 많다. 이에 본 연구에서는 간암을 대상으로 일반적으로 많은 암종의 발생과 진행에 관련된 것으로 알려진 염색체에서의 현미부수체 표지자(microsatellite marker)를 사용하여 이형접합성 소실(Loss of heterozygosity: 이하 LOH)과 DNA 복제 이상을 나타내주는 MSI를 검출하고 이들 결과를 임상적 소견과 병리학적 예후 인자들과 비교하였다.

방 법

1) 연구 대상

고려대학교 부속 안암병원에서 1995년 1월부터 2000년 6월까지 간암으로 수술 받은 증례 중 수술 전에 간동맥 화학색전술을 받지 않고, 파라핀 블록 상태가 양호한 조직 37예를 연구대상으로 하였다. 암종의 부위는 종양 세포의 분포가 60% 이상이 되는 파라핀 블록에서, 비암종 부위는 종양에서 멀리 떨어져 위치한 정상 조직을 선정하였다.

2) 실험 방법

(1) 병리조직학적 검색 및 검사: 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 선택하였다. 37예의 간암은 광학현미경으로 조직학적 등급을 Edmondson Steiner 방식으로 재분류하였으며, 종양의 크기는 International Working Party 방식인 3 cm을 기준으로 그 이하를 소간세포암(Small hepatocellular carcinoma: 이하 소간암), 3 cm를 초과한 경우를 진행성 간세포암(Advanced hepatocellular carcinoma: 이하 진행성 간암)으로 구분하였다.(*10*)

모든 증례의 병리 조직은 2명의 해부병리 전문의가 재판독을 실시하였고 WHO와 UICC에서 규정한 조직학적 등급과 TNM staging에 따라 임상 정보를 정리하고 이외에도 종양의 림프관 또는 혈관 침윤 여부 및 종양의 조직학적 및 육안적 성장 형태 등을 정리하였다.

(2) 분자생물학적 방법

① 시료의 채취와 DNA 분리; 총 37예의 파라핀 포매 조직 중 종양 조직과 정상 조직에서 각각 8 μm 두께로 자른 절편 1매씩을 유리 슬라이드에 부착시켜 H&E 염색을 하였다. H&E 염색된 슬라이드를 cover glass가 없는 상태로 xylene을 첨가한 후 40배 광학현미경 시야에서 관찰하면서 30 guage 주사 바늘로 각각 약 1,000여 개 이상의 종양 세포와 정상 세포를 긁어내는 미세절제술을 시행하여 DNA extraction buffer가 들어 있는 각각 다른 1.5 ml eppendorf tube에 분리하여 모았다. 이 때 정상 세포와 종양 세포가 혼재되어 있는 부분과 괴사가 있는 부분은 제외하였다. 시료를 모은 eppendorf tube에 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)로 200배 희석된 proteinase K stock solution (20 mg/mL)을 처리하여 수조에서 50°C로 하루 동안 보관하여 단백질을 파괴한 후 반응이 끝난 시료는 10분간 끓는 물에 담가 proteinase K의 반응을 불활성화시켰다. 그 후 4°C에서 냉장 보관하면서 중합효소연쇄반응(이하 PCR) 수행 시 template DNA로 사용하였다.

② 현미부수체 변화(Microsatellite abnormality) 분석; 분석하려는 현미부수체 표지자는 BAT26, D5S123, D5S346, D8S254, D8S261, D8S262, D13S153, D13S159, D13S171, D17S250, D17S796, TP53 등 12가지로 GIBCO사(USA)에서 제작된 것을 사용하였으며, 염기 서열은 Table 1과 같다.

우선 종양 세포와 정상 세포들에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 각각 PCR을 시행하였으며, 각각의 PCR 용액은 주형 DNA 1 μl, 0.2 mM dNTP, 10x buffer, 10 pmol/μl primer, 1 U Taq polymerase에 증류수를 가하여 12 μl로 되게 하였고, PCR은 각 표본에 대하여 35 내지 40주기를 반복 실시하였다. 모든 반응은 thermal cycler (Perkin Elmer Cetus 9700, USA)에서 시행하였다. 기본적으로는 각 주기당 변성반응은 94°C에서 30초, 결합반응은 55 60°C에서 30초, 연장반응은 72°C에서 40초씩 시행하고 마지막 주기의 연장반응은 72°C에서 10분간 반응시키고, 증폭된 PCR 산물 3 μl를 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

이후 3 μl의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 3 μl를 취해 98°C에서 5분간 끓여 변성시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음 3 μl를 취해 전기영동에 사용하였다. 전기영동을 1,400 V에서 1시간 반 동안 시행한 후 gel을 은 염색하였다. 은 염색은 binding solution에 의해 gel이 붙어 있는 유리판 쪽을 그대로 염색용기에서 10% acetic acid로 30분간 고정시킨 후, 증류수로 3분씩 2회 반복하여 세척하고, silver nitrate 용액에서 30분간 반응시킨 다음 증류수에서 신속히 세척을 한 후, sodium carbonate 용액에서 띠가 뚜렷이 보일 때까지 발색시킨 후, 앞

Table 1. DNA sequences of the microsatellite primers

Microsatellite markers	Sequences
BAT26	(f) 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'
	(r) 5'-AACCATTCAACATTTTTAACCC-3'
D5S123	(f) 5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3'
	(r) 5'-GGACTTTCCACCTATGGGAC-3'
D5S346	(f) 5'-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3'
	(r) 5'-AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3'
D8S254	(f) 5'-TGCCGGACATACATTAGTGA-3'
	(r) 5'-TTGTAAACACCACAAGCAGG-3'
D8S261	(f) 5'-TGCCACTGTCTTGAAAATCC-3'
	(r) 5'-TATGGCCCAGCAATGTGTAT-3'
D8S262	(f) 5'-AGCTCAAAAGCGAAGGTGAT-3'
	(r) 5'-GGCAACAAAGTGAGATCCTG-3'
D13S153	(f) 5'-AGCATTGTTTCATGTTGGTG-3'
	(r) 5'-CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC-3'
D13S159	(f) 5'-AGGCTGTGACTTTTAGGCCA-3'
	(r) 5'-CCAGGCCACTTTTGATCTGT-3'
D13S171	(f) 5'-CCTACCATTGACACTCTCAG-3'
	(r) 5'-TAGGGCCATCCATTCT-3'
D17S250	(f) 5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3'
	(r) 5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'
TP53	(f) 5'-TGGATCCTCTTGCAGCAGCC-3'
	(r) 5'-TP53.A2 AACCCTTGTCCTTACCAGAA-3'
D17S796	(f) 5'-CAATGGAACCAAATGTGGTC-3'
	(r) 5'-AGTCCGATAATGCCAGGATG-3'

Table 2. Clinicopathologic findings of HCC

Clinicopathologic parameters	No. of cases
Sex	
Male	34
Female	3
Age	
Below 55	15
Over 55	22
Tumor size	
Small HCC	10
Advanced	27
Tumor grade	
I	3
II	14
III	20
Cirrhosis	
Yes	28
No	9
Lymphatic emboli or vascular invasion	
Positive	14
Negative	23

과정에서 사용한 고정액 10% acetic acid를 혼합하여 반응을 중지시킨 후 띠의 소실여부를 관찰하였다.

③ 결과판정과 통계처리

가) **LOH 판정**: Gel상의 band를 밀도측정기를 이용하여 측정하고 정상 조직에 비해 종양조직에서 50% 이상의 소실이 있는 경우를 LOH로 판정하고 정상조직에 비해 추가 띠가 생긴 경우는 MSI로 판정하였다. 실험결과 중 동형접합성을 보이는 경우와 종양세포와 대조군 세포 중 어느 하나에서라도 PCR이 되지 않아 유전자 변이를 확인할 수 없는 경우(non-informative)는 제외시켰다.

나) **FAL (fractional allelic loss)의 계산**: 각 표본에서 각 현미부수체 표지자에 대한 LOH를 구하고 LOH 검출 marker수를 informative marker들의 수로 나누어서 구하였다.

다) **통계학적 분석**: 통계분석은 SPSS window 통계 프로그램을 사용하였다. 각 표본에서 각 현미부수체 표지자에 대한 LOH와 MSI의 빈도를 백분율로 분석하고, p53 유전자 돌연변이 및 면역조직화학 검사 결과와 함께 제반 임상 소견 및 예후인자들 간의 비교는 Student's T-test와 chi-square test, Fisher's Exact test를 사용하였으며, 유의도는 5%에서 P-value를 판정하여 인자들 간의 상관관계를 규명하였다.

결 과

1) 임상 및 조직학적 소견

총 37예의 남녀 성비는 남성 34명, 여성 3명으로 남성이 많았으며, 연령별로는 최저 연령이 34세, 최고령은 74세로 평균 연령은 62.3세였다(Table 2). 종양 주변에 간경변증을 동반한 예는 28예이었다. 종양의 크기별로는 소간암이 10예였으며, 조직학적 분화도는 III등급이 20예(54%)로 가장 많았으며, I등급이 3예(8.1%)였다.

2) Microsatellite abnormality 검출 결과

(1) 간암에서의 Microsatellite instability 검출: 37예의 간암 중 3예(8.1%)에서 MSI를 보였고, D5S123, D13S171, D17S250 표지자에서 각각 1개씩 검출되었다. BAT26을 포함한 다른 표지자에서는 MSI가 검출되지 않았고, 또한 비종양부분에서도 MSI는 검출되지 않았다. 이 3예의 증례들은 임상적으로 모두 크기 10 cm 이상의 종양이었고, 조직학적 분화도는 통계학적 유의성은 없었다(Table 3).

(2) 간암에서의 Loss of heterozygosity 검출: 간암에서의 Informative 증례는 D8S254에서 30예, D8S261에서 28예, D8S262에서 30예, D17S250에서 33예, TP53에서 28예, D17S796에서 35예 등이었으며, D5S123, D5S346의 LOH 변

Table 3. Results of microsatellite abnormality

Marker	Informative cases	LOH	MSI	LOH (%)
BAT26	34	0	0	0
D5S123	32	2	1	6.3
D5S346	30	3	0	10.0
D8S254	30	1	0	3.3
D8S261	28	4	0	25.0
D8S262	30	8	0	26.7
D13S153	26	4	0	15.4
D13S159	27	5	0	18.5
D13S171	30	5	1	16.7
D17S250	33	4	1	12.1
TP53	28	9	0	32.1
D17S796	35	6	0	17.1
Total		51	3	

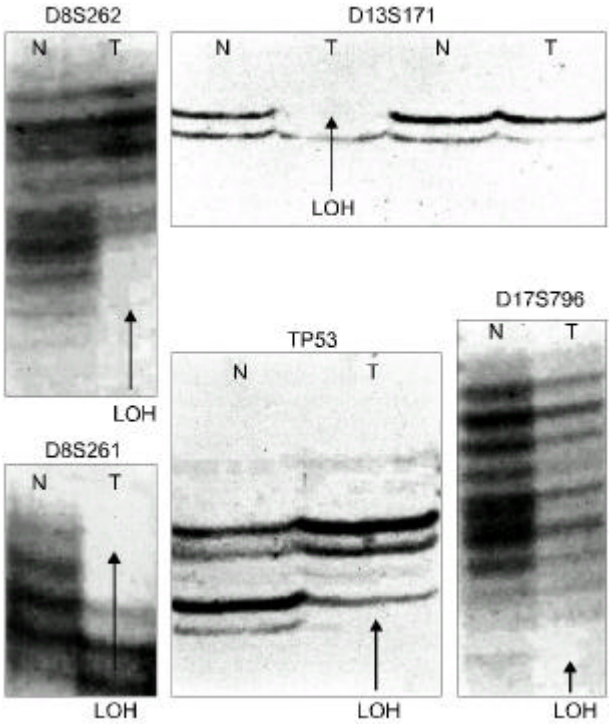

Fig. 1. Loss of heterozygosity (LOH) in each primers.

Table 4. Clinicopathologic features of the FAL value above 0.2

Clinicopathologic features		No. of cases
Tumor size	Small HCC	0
	Advanced HCC	10
Grade	I II	2
	III	8
Cirrhosis	Yes	9
	No	1
LN/VV invasion	Yes	7
	No	3

이는 각각 32, 30예의 informative 증례 중 2예, 3예에서만 LOH가 검출되어 본 실험에서 연구된 표지자 중 D8S254 다음으로 적은 빈도의 LOH 소견을 보였다. 검출된 수가 적어 통계학적인 유의성은 없지만, LOH가 검출된 증례들은 모두 진행성 간암이었다. D8S254의 LOH 변이는 30예의 informative 증례 중 1예에서만 LOH가 검출되어 본 실험에서 연구된 표지자 중 가장 적은 빈도의 LOH 소견을 보였다. 이 증례는 조직학적 소견 상 pseudoglandular pattern을 보이는 고분화성 간암(Grade 1)이었다. D8S261의 LOH 변이는 28예의 informative 증례 중 4예에서 LOH가 검출되었으며, 이 증례들은 통계학적으로 유의성 있는 공통적인 임상적 특성은 없었으나, 4예 중 3예가 분화도 3등급이었으며, 림프관 색전이나 혈관 침범의 소견이 있었다. D8S262의 LOH 변이(Fig. 1)는 30예의 informative 증례 중 8예에서 LOH가 검출되어 본 실험에서 연구된 표지자 중 TP53 다음으로 많은 빈도를 보였으며, 8번 염색체의 표지자 중 가장 많은 빈도의 LOH 소견을 보였다. 임상적으로는 8예 중 6예가 분화도 2등급이었으며, 통계학적으로 유의성이 있었다(P=0.047). D13S153, D13S159, D13S171의 LOH 변이는 각각 26, 27, 30예의 informative 증례 중 4, 5, 5예씩 LOH가 검출되었다. 임상적으로는 특별한 유의성은 없었다. D17S250의 LOH 변이는 33예의 informative 증례 중 4예에서 LOH가 검출되었으며, 임상적으로는 4예 모두 종양의 크기가 9 cm 이상이었고, 간경변증을 동반하고 있었으며, 이는 통계학적으로 유의성이 있었다(P=0.041). TP53의 LOH 변이(Fig. 1)는 28예의 informative 증례 중 9예에서 LOH가 검출되어 본 연구에서 사용된 표지자 중 가장 많은 빈도의 LOH를 보였다. 이 9예 중에서 고분화성 간암은 한 예도 없었고, 2예만이 분화도 2등급이고, 나머지 7예는 모두 3등급이었다. 또한 한 예만 제외하고는 모두 진행성 간암이었고, 간경변증을 동반하고 있었다. D17S796의 LOH 변이는 35예의 informative 증례 중 6예에서 LOH가 검출되었으며, 이들 모두 진행성 간암이었고 이는 통계학적으로 유의성이 있었다(P=0.034)

(3) FAL value가 0.2 이상인 결과(Table 4): 전체 37예 중 10예였고, 10예 모두 진행성 HCC였고, 이 중 9예가 간경변을 동반하고 있었으며, 8예에서 분화도가 3등급이었다. 또한 7예에서 혈관 침범 또는 림프관 색전의 소견을 보였다. 또한 12개 표지자에서 LOH 또는 MSI가 전혀 보이지 않는 증례는 10예(27%)였다.

고 찰

간암은 지역에 따라 발병빈도의 차이를 보이는데 간염바이러스의 감염률이 높은 우리나라를 비롯해 일본, 중국 및 아프리카에서 높은 발생률을 보인다.(*19,27*) 간염바이러스가 간암 발생의 원인이라는 사실은 역학적 연구를 통해 정립이 되었으나 아직도 정확한 분자적 기전은 밝혀지지 않은 상태이다. 그러나, 최근 들어 간암과 선종성 결절과의 연관성이 보고되고 있고 선종에서 간암으로의 진행에서 유전자의 변이를 예측하는 보고가 많다.(*2,6,7*) 일반적으로 암의 발생에는 다수의 유전자가 관여한다고 알려져 있다. 또한 많은 암관련 유전자들이 염색체에서의 위치가 규명되면서 염색체 이상과의 상관성을 찾으려는 노력들이 진행되어 왔다. 또한 암의 발생에 있어서 다단계 발암 기전이 밝혀지고 있다.(*4-8,11*) 현미부수체에 대한 연구가 이런 노력들 중 하나인데 현미부수체는 짧고 반복적인 DNA염기서열로서 2 3개의 염기쌍이 15 30번 반복적으로 나타나는 것을 말한다.(*12,13*) 현미부수체는 모든 염색체에 분포하고 주로 유전자가 아닌 non-coding DNA에 위치하며, 불안정성이 커서 DNA복제 중 소실이 쉬운 것으로 알려져 있다. 이런 특징을 이용하여 암유전자의 변화를 현미부수체 좌위의 돌연변이(Mutated microsatellite loci)로 파악할 수 있겠고, 이 돌연변이를 검출하는 기법으로 LOH와 MSI를 사용한다. MSI는 정상과 비정상조직을 비교하여 유전자의 다형성을 파악하는 것으로서 원인은 DNA mismatch repair gene의 이상으로 알려져 있다. 종양의 발생에는 종양억제 유전자가 중요한 역할을 하는데 이 유전자의 불활성화는 대립유전자의 소실이나 돌연변이에 의해서 이루어진다. 그리고, LOH는 대립유전자의 소실을 나타내므로, 염색체의 다형성 표지자 중 LOH는 간접적으로 종양억제 유전자의 존재를 표시한다고 알려져 있다.(*8,16,17,19,20,23*) 또한 Tsopanomichalou 등(*18*)은 LOH는 간암에서 뿐만이 아니라 지방간과 간경화 등에서도 발생하며 이러한 병변에서도 암억제 유전자가 관여함을 보고하였다.

간암에서의 LOH 빈도가 높은 염색체는 5q ,9p, 11p, 13q, 16q, 17p 등이 알려져 있다.(*17,19,22,24,25*) 저자들은 이 중 5, 13, 17번 염색체의 LOH 및 MSI와 담도암에서 최근 연구가 활발한 8번 염색체의 표지자를 이용하여 LOH를 검출해 보았다.

간암에서 12개의 표지자를 사용하여 연구한 결과 MSI가 3개가 검출된 것에 비해 LOH는 총 51개가 검출되어 간암에서는 MSI가 거의 일어나지 않는 것으로 보인다(Table 3). 한편 12개 표지자에 단 1개의 LOH 또는 MSI도 보이지 않은 증례는 10예(27%)이었다. 또한 HCC에서 17번 염색체의 TP53좌위에서 allelic loss가 흔하다(*22*)고 알려져 있는데 이 실험에서도 마찬가지로 가장 높은 검출률(32.1%)을 보였다. LOH의 검출이 많다는 것은 간암에서는 종양억제 유전자의 소실 기전이 주요 발암 기전으로 작용하는 것으로 판단되며, MSI는 간세포암 발생 기전에 거의 기여하지 않는 것으로 보인다.(*14,16,17,19,20,23,24*)

각 표본에서 각 현미부수체 표지자에 대한 LOH를 구하고 LOH 검출 marker수를 informative marker들의 수로 나누어서 FAL (fractional allelic loss) value를 구하였다.(*9*) 어떤 표지자가 LOH 비율이 높은가를 파악할 수 있기 때문에 각 표지자당 LOH rate는 중요하다. 그러나 각 샘플에 따라 non-informative 케이스들이 많으므로 각 케이스들로 보면 객관적이지 못하다. 따라서 각 케이스들을 기준으로 보자면 가급적 많은 표지자를 검사하여 각 표본에서 LOH 발생을 FAL value로 나타내는 것도 임상적으로는 의미가 있겠다. FAL value를 측정해 보았을 때 0.2 이상인 증례는 총증례 수 37예 중 10예이었으며, 이들은 우선 10예 모두 진행성 간암이었고, 1예만 제외하고는 모두 간경변을 동반하고 있었으며, 2예를 제외하고는 분화도가 3등급이었다. 또한 3예를 제외하고는 림프관 색전이나 혈관 침범의 소견을 보였다. 한편 12개 표지자에 단 1개의 LOH 또는 MSI도 보이지 않은 증례는 10예(27%)이었다.

저자들의 결과에서 20% 이상의 LOH를 보인 것은 D8S261, D8S262, TP53이었다. Fujiwara 등은 8번염색체의 8p21-22 위치에 종양억제 유전자로 여겨지는 PRLTS유전자가 존재한다고 하였는데, Sheu 등(*19*)은 8p21.3 위치의 D8S282에서 14.3%의 LOH만을 관찰하였고, Nagai 등이 D8S277에서 42%의 LOH를 보고하였는데 이는 인종적 차이 혹은 사용한 표지자가 다른 점, 다른 병기에서의 연구가 원인일 가능성이 있다고 보고하였다.(*19*) 저자들의 연구에서는 8번 염색체 표지자에서 LOH빈도가 높아 일본과 비슷한 결과를 얻었다. 다른 문헌(*26*)에 의하면 간세포암에서는 D8S254 표지자에서는 LOH 소견이 거의 없고 D8S262 표지자에서 많은 LOH의 빈도를 보이며, 담관암에서는 D8S254의 LOH 변이가 8번 염색체 표지자 중에서는 가장 많은 LOH의 소견을 보이고, D8S262는 가장 적은 빈도의 LOH 소견을 보인다고 보고가 되고 있다는 점에서 이 두 표지자는 간세포암과 담관암을 감별하는 데 유용성이 있는지를 좀 더 조사하여야 할 것이다.

17번 염색체에 있는 *p53* 종양억제 유전자(Tumor suppressor gene)는 핵내에 존재하는 인 단백질로, 이 단백질이 세포 내에 축적됨에 따라 cell replication system은 억제되어 손상된 DNA를 복구할 시간적 여유를 가지게 된다고 알려져 있다.(*3,9*) 간암 조직에서의 종양억제유전자인 p53의 변이에 대한 연구도 국내외에서 활발히 진행되고 있다.(*3,9,27*) 정 등(*27*)의 국내보고에 따르면 간암환자에서 16.7%의 *p53* 유전자의 변이가 보고되었는데, 또한 이들은 병기가 진행함에 따라 돌연변이율이 증가한다고 하였다. Sheu 등(*19*)은 17번 염색체에서 D17S796 표지자가 간암환자들 중 39.3%

에서 LOH가 검출되었다고 했고, 종양의 크기가 LOH 빈도의 증가와 관련이 있다고 보고하였다. 반면 저자들은 이 표지자에서의 LOH가 17.1%로 보다 훨씬 낮은 검출을 보였다. 17번염색체의 LOH (D17S250, TP53, D17S796)는 각각의 표지자마다 12.1%, 32.1%, 17.1%의 비교적 높은 검출을 보였으나 *p53* 유전자의 변이와의 상관성은 실험하지 못하였다. 추후 이를 증명하기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

간암의 종양생물학적 연구를 위해 HCC 37예를 대상으로 MSI와 LOH를 통한 현미부수체의 변이 상태를 검출해본 결과를 바탕으로 다음과 같이 결론을 내릴 수 있겠다. 첫째로, 간세포암에서는 MSI가 3예로 적게 검출되고 LOH가 총 51예에서 검출되어 종양억제 유전자의 소실 기전이 주요 발암 기전으로 작용할 것으로 판단되며, MSI는 간세포암 발생 기전에 기여하지 않을 것으로 보인다. 다만, 본 연구에서 MSI가 검출된 3예 모두 종양의 크기가 10 cm 이상이었다. 둘째로, FAL value가 높은 증례들은 주로 저분화성 종양으로 혈관 또는 림프관 색전이 있는 특성을 보여 LOH 검출률이 높을수록 불량한 예후를 보이는 것으로 판단되며, 임상적 응용이 가능하리라 생각된다. 또한, 간세포암에서는 D8S254 표지자에서는 LOH 소견이 3%로 나왔고, D8S262 표지자에서는 26%의 LOH의 빈도를 보였으며, 이 두 표지자는 간세포암과 담관암을 감별하는 데 유용한 것으로 판단된다. 마지막으로, 17번 염색체에서의 LOH (D17S250, TP53, D17S796)가 빈번하게 발생하는 결과로 17번 염색체에 *p53* 유전자 혹은 다른 종양억제 유전자가 있을 것으로 가정할 수 있겠다.

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 EMatsumata 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, 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(6):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, 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, 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, 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) Tsopanomichalou 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, 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, 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, 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, et al. Frequent allelic loss on chromosome 9 in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 1999; 81:319-24.
26) Kawaki J, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yoshidome H, et al. Allelic loss in human intrahepatic cholangiocarcinoma: correlation between chromosome 8p22 and tumor progression. Int J Cancer 2000 Oct 15;88(2):228-31
27) Jeong JH, Lee KS, Cho YH. A Study of the p53 Tumor Suppressor Gene Mutations in Hepatocellular Carcinomas in Korean Patients). J Korean Surg Soc 1998;55:726-36.