

간세포암종에서 p53 유전자의 돌연변이

영남대학교 의과대학 병리학교실, ¹계명대학교 의과대학 소아과학교실

최 원 희 · 이 상 락¹

p53 Mutation in Hepatocellular Carcinomas

Won Hee Choi, and Sang Lak Lee¹

Department of Pathology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu;

*¹Department of Pediatrics, College of Medicine,
Kaemyung University, Daegu, Korea*

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common primary malignant tumor of the liver in Africa and Asia. The p53 gene has been found in association with many human cancers including HCC. The prevalence and features of p53 mutations in HCC vary significantly between different geographic areas, may be due to different causing factors. An analysis of p53 gene mutation by PCR and direct DNA sequencing method is most accurate but time consuming difficult process so that only one study with 13 HCC patients has been reported in Korean literature.

Methods: The status of exons 5, 6, 7, 8 of the p53 gene was analyzed in 20 HCC tumor tissues and 20 non-tumor bearing liver tissues from 20 HCC patients using PCR and direct DNA sequencing. DNA was separated and extracted from formalin fixed paraffin embedded tissues.

Results: Abnormalities of the p53 gene were found in six out of 20 HCC but none from 20 non-tumor bearing tissues. By direct DNA sequencing, mutations of the p53 gene were found in 5 cases among 6 PCR amplified products. All were G deletions in exon 7 (14,073 bp) on the 249th codon with frame shift. In one case, the site of mutation was not found on the examined exon 5-8.

Conclusion: Although total number of observation was small, but the characteristic feature, location of p53 gene mutation occurred in Korean HCC shown in this study may be utilized importantly in the diagnosis and treatment of HCC in Korea when the number of study will expanded.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, PCR, Direct DNA sequencing, p53 gene mutation

서 론

간세포암종은 염증과 간세포 재생이 지속적으로 일어나는 만성간염이나 간경변 환자에서 호발하며 간세포 재생이 지속되는 동안에는 세포증식이 계속하여 일어나므로 세포의 성장과 분화에 관련되는 다양한 유전자들은 자극을 받거나 억제된다.^{1,2)} 그러나 간세포암종 발생의 분자 유전학적 기전과 진행과정에 관련되는 주요 인자들은 아직 밝혀지지 않은 부분이 많다.

p53 종양억제 유전자는 핵 인산화 단백질질을 만들어 DNA와 결합해 전사인자로 작용하며 야생형 p53 단백질은 DNA 손상이 있을 때 세포분열을 정지시킴으로써 유전적 결함이 생기는 것을 방지하지만 변형되지 않은 정상세포에서는 반감기가 짧고 그 양이 적어 검색하기가 어렵다. 변이형 p53 단백질은 정상적인 종양억제기능을 방해하여 세포 변형을 촉진시키며 반감기가 길어 종양세포의 핵내에 축적되며,³⁾ 그 변이는 인체의 암종에서 가장 흔히 관찰된다.^{4,5)}

암조직에서 p53 유전자의 이상을 검출하는 방법으로 통상적인 면역조직화학적 염색법(Immunohistochemistry, IHC)과 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)에 근거한 단일가닥구조다형검사법(Single strand conformation polymorphism, SSCP), 제한효소 절편장다형법(Restriction fragment length polymorphism, RELP), 겔 전기영동법 및 DNA 직접염기서열 결정법(DNA direct sequencing) 등의 방법들이 있다. 그중 DNA 염기서열 결정법이 정확하지만 시간과 노력이 많이 들며 대부분 신선조직이 요구되기 때문에 널리 쓰이지 못하고 있다. 선별검사 목적으로는 일반적인 IHC나 전술한 여러 방법들이 이용되어 왔으나 정확도가 떨어져 연구 결과의 편차가 많아 그 의의에 대해 상당한 논란이 있다.⁶⁾

간세포암종에서의 p53 유전자 돌연변이의 발생은 나라에 따라 그 빈도의 차이가 많으며 양성 또한 나라와 지역에 따라 상당히 다르다.^{5,7)} 한국에서는 간세포암종에서의 p53 유전자에 대한 연구들이 거의 대부분 면역조직화학적 분석이거나,⁸⁾ 유세포 측정법에 의한 것들이다.^{9,10)} 간조직에서

핵산 수준의 암발생기전에 대한 연구는 극히 미미하여 Kang등¹¹⁾이 20예의 환자 간조직에서 PCR-SSCP와 DNA 염기서열 결정법을 시행하여 13예의 간세포암종 중 2예(15%)에서 p53 유전자의 돌연변이를 검색한 연구 하나 뿐으로 이를 비교 분석할 수 있는 다른 연구는 전무한 실정이다. 또한 간세포암종 조직의 대부분이 다량의 비 종양성 간질조직과 암세포의 괴사를 흔히 동반하므로 DNA 염기서열 결정법을 시행하기에 충분한 대상을 구하기가 쉽지 않다.

본 연구는 후향적 검색이 가능하고 적합한 실험대상을 선택하기 쉬운 파라핀에 포매된 간세포암종의 조직을 이용해 PCR과 DNA 직접염기서열 결정법으로 핵산 수준에서 간세포암종의 p53 유전자 돌연변이의 발생빈도 및 돌연변이된 염기서열의 변형양상을 관찰함으로써 우리 나라 간세포암종에서 유전자적 변화의 특성을 알아보고자 시행하였다.

재료 및 방법

1) 연구대상 및 재료

실험군으로 영남대학교 의과대학 부속병원 해부병리과에 의뢰, 진단된 간세포암종 증례 중 보존상태가 양호하여 분자유전학적 연구에 적절한 20예를 무작위로 택했으며, 대조군으로는 간세포암종에 인접한 부분으로 종양이 아닌, 20부위를 취한 후 총 40예에서 각각 exon 5, 6, 7, 8에 대하여 중합효소 연쇄 반응을 시킨 후 추출되는 반응산물을 직접 염기서열 결정법으로 분석하였다.

2) 연구방법

(1) 병리조직학적 검색: 간세포암종의 병리조직학적 유형분류는 WHO 분류법(1978)에 따랐으며 간 종양세포의 분화도에 대한 등급 분류는 Edmondson-Steiner 등급분류법(1954)을 따랐고 각각 아래와 같다.

간세포암종의 병리조직학적 유형분류(WHO 분류법)

- 육주형(Trabecular type)
- 위선형(Pseudoglandular type)
- 치밀형(Compact type)
- 경화형(Scirrhous type)

간종양세포의 분화도에 대한 등급 분류(Edmondson-Steiner 등급 분류법)

- Grade I: very well differentiated tumor lesions with minimal cytologic atypia and architectural distortion
- Grade II: large tumor cells with abnormal nuclei and eosinophilic cytoplasm
- Grade III: even more cytologically variable tumor cells
- Grade IV: anaplastic tumors

(2) 분자유전학적 분석

① **DNA 추출;** Sakamoto등(1986)의 방법으로 실시하였는데 파라핀 포매조직을 10 μm로 자른 후 현미경아래에서 미세절편으로 종양세포가 90% 이상이 되도록 종양부위를 분리해 E튜브(ependorf tube)에 담았다. 파라핀을 제거하기 위해 xylene 1 ml를 넣어 섞은 뒤 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 xylene만 버리는 과정을 2~3회 반복하였다. 그 후 100%와 70% ethanol을 이용해 동일한 방법으로 2~3회 시행하였다. 40°C 진공 건조기에서 5분간 말린 후 1배 RSB완충액(1M Tris-HCl pH 7.4, 5 M EDTA) 500 μl와 SDS(sodium dodecyl sulfate) 50 μl를 첨가, 섞어준 뒤 단백분해 효소(proteinase K) 5 μl를 첨가하여 37°C 진탕수조에서 48시간 방치해 조직이 완전 용해된 다음 5 M NaCl 50 μl와 P1용액(phenol+tris완충액)을 동량 보충, 혼합하여 13,000 rpm으로 10분간 원심분

리하고 상층액을 E튜브에 옮겨 동일한 방법으로 P2용액(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) 및 P3용액(chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1)으로 처리하였다. Absolute ethanol 1 ml를 넣어 -70°C에서 30분간 둔 후 13,000 rpm으로 30분간 원심분리한 뒤 ethanol을 버리고 70% ethanol을 1 ml로 수세하여 alcohol만 제거한 다음 40°C 진공건조기에서 10분간 말린 후 1배 TE (Tissue Extraction; Tris+EDTA) 완충액(pH 7.4) 20 μl에 용해시켜 4°C에서 보관하였다. DNA 함량은 분광광도계로 측정된 후 DNA 형광계(Hoefer Scientific Instrument, Model TKO 100, U.S.A.)를 이용해 재 측정 하였다. 그 후 Gene Clean II Kit (Bio 101, U.S.A.)를 이용해 DNA를 정제하고 100 mg/μl의 농도가 되도록 조절하였으며, 추출된 DNA는 2% agarose gel에서 전기영동하여 존재를 확인하였다.

② **p53 유전자의 exon 별 중합효소 연쇄반응 및 DNA 용출;** Sambrook 등(1989)의 방법을 사용하였으며 총 50 μl의 용량으로 시행하였다. M튜브(microcentrifuge tube)에 10배 Taq 완충액 5 μl, 각각의 exon별 primer 5 μl씩, 2.5 mM dNTP 4 μl, Taq 중합효소(250 μ/ml, Promega, U.S.A.) 5 μl 및 검체 DNA 5 μl를 넣고 증류수로 50 μl가 되게 조절하였다. 동량의 mineral oil을 첨가하여 DNA 증폭장치(thermal cycler : Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 95°C에서 1분, 60°C (exon 5, 6번) 혹은 55°C (exon 7, 8번)에서 1분 및 72°C에서 1분간 35회 시행한 후 72°C에서 5분간

Table 1. Primers of exon 5, 6, 7, 8 used for amplification and analysis of p53 genomic DNA

Amplified region	Exon size base pair	Primer sequence (5' to 3')	Amplified size base pair	(T)°C
Exon 5	183	5-1: 5'TGCAG AATTC TGACTG3'	459	60
		5-2: 5'TTCAA CTCTG TCTCCT3'		
Exon 6	114	6-1: 5'GATCA AGCTT CCAGA3'	459	60
		6-2: 5'GACCC CAGTT GCAAAC3'		
Exon 7	111	7-1: 5'GTGTT GTCTC CTAGG TTGGC3'	188	55
Exon 8	135	7-2: 5'GTCAG AGGCA AGCAG AGGCT3'	213	55
		8-1: 5'TATCC TGAGT AGTGG TAATC3'		
		8-2: 5'AAGTG AATCT GAGGC ATAAC3'		

T: Annealing temperature.

더 반응시켰다. Primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

반응 종료 후 chloroform으로 mineral oil을 제거한 뒤 2% agarose gel에 중합효소연쇄반응산물 5 μ l를 염색액(loading dye)과 섞어서 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 확인하였다.

이 agarose gel에서 원하는 부위의 band를 적출하여 TE 완충액에 20분간 투석하고 3초간 전극을 걸어 TE 완충액을 제거한 후 P2용액을 동량으로 처리하여 ethanol로 탈수하고 0.8 μ l glycogen을 넣은 뒤 -70°C 에서 30분간 방치하였다. DNA 침전을 확인한 다음 70% ethanol로 수세하고 13,000 rpm으로 3분간 원심 분리한 후 10분간 건조하였다.

③ p53 유전자의 염기 서열 결정; Sanger와 Coulson(1975)의 방법을 이용하였다. 염기 서열 결정 검체(중합효소 연쇄반응 산물 2 μ l+primer 2 μ l+5배 중합효소 완충액 2 μ l+10% NP-40 2 μ l+중류수 2 μ l)를 3분간 끓는 진탕에 넣었다. 꺼낸 즉시 얼음 속에 10분간 정취하였다. 여기에 혼합 전 용액(0.1M DTT 1 μ l+1배 labelling 혼합액 2 μ l+ ^{35}S dATP 0.5 μ l) 3.5 μ l와 효소 희석액(중합효소 0.25 μ l+희석완충액 1.75 μ l) 2 μ l과 Mn 완충액 1 μ l를 혼합한 후 이 혼합액 3.5 μ l씩을 GATC를 표시한 다음 M튜브에 각각 넣은 뒤 ddNTP 혼합액을 2.5 μ l씩 넣어 섞었다. 37°C 에서 10분간 둔 다음 꺼내어 정지 용액 4 μ l씩을 점적한 후 85°C 에서 3분간 열처리하여 반응을 종료하였다. 염기서열 결정 반응액 각 5 μ l씩을 6% polyacrylamide gel을 사용한 T7 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (Amersham Life Science, U.S.A.)에 점적하였다.

염기서열 결정장치(sequencing apparatus)는 Nucleic acid sequencing system (38 \times 50 cm, BioRad, U.S.A.)을 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 여과종이로 옮겨 gel 건조기로 80°C 에서 60분간 건조시키고 -70°C 에서 2일간 X선에 노출시킨 뒤 자가방사기록(autoradiography) 후 현상하여 염기서열을 결정하였다.

결 과

실험군 20예의 간세포암종 환자 중 남자는 17예(85%)였고 여자는 3예(15%)로 남녀비는 17 : 3

Table 2. Age, sex, histopathologic type, and grade of differentiation in hepatocellular carcinomas

Case No.	Age (years)	Sex	Histopathologic type	Grade
1	66	M	T	II
2	49	F	T	I
3	58	M	C	III
4	42	M	C	II
5	60	M	T	II
6	51	M	T	II
7	39	M	T	II
8	48	M	C	III
9	43	M	P	II
10	66	M	C	III
11	63	M	T	I
12	48	M	P	II
13	61	F	C	II
14	59	M	C	III
15	42	M	T	II
16	54	M	T	II
17	48	M	T	I
18	56	M	T	II
19	46	F	T	II
20	60	M	T	I

T: Trabecular type, C: Compact type, P: Pseudoglandular type.

이었다. 환자의 진단 당시 연령은 39세에서 66세 사이였고 평균 연령은 53세였다(Table 2).

병리조직학적 검색 중 WHO분류법에 의한 조직병리학적 유형은 육주형(trabecular type)이 12예(60%)로 가장 많았으며, 치밀형(compact type)이 6예(30%), 위선형(pseudoglandular type)이 2예(10%)의 순이었으며 경화형(scirrhous type)은 관찰되지 않았다(Fig. 1, Table 2).

종양세포의 분화도에 의한 Edmondson-Steiner 등급 분류법에 따른 검색상으로는 2등급(Grade II)이 12예(6%)로 가장 많았고 1등급(Grade I)과 3등급(Grade III)이 각각 4예(20%)씩이었으며 4등급(Grade IV)은 관찰되지 않았다(Fig. 2, Table 2).

분자유전학적 분석을 위해 실험군 20예와 대조군 20예 총 40예 모두 exon 5, 6, 7 및 8에 대해 중합효소 연쇄반응과 DNA 염기서열 결정법을 시행

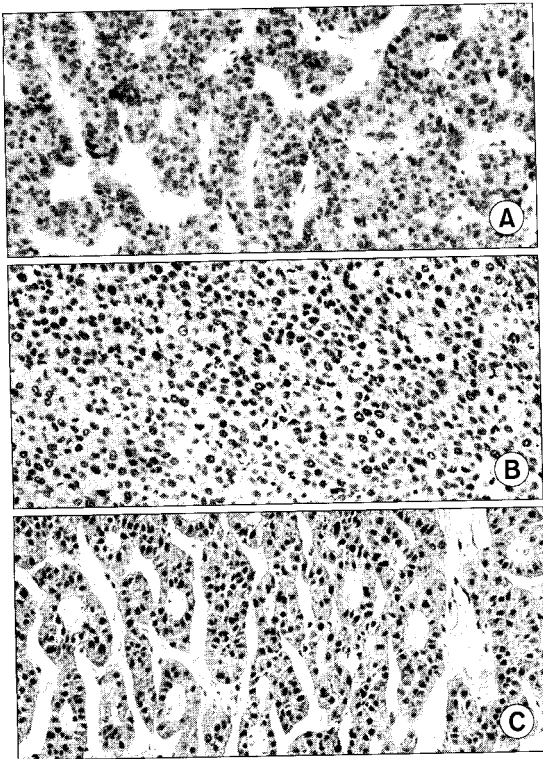


Fig. 1. Representative histopathologic types by WHO classification in hepatocellular carcinomas: A (case No. 1) shows trabecular type, B (case No. 10) is compact, and C (case No. 12) is pseudoglandular type.

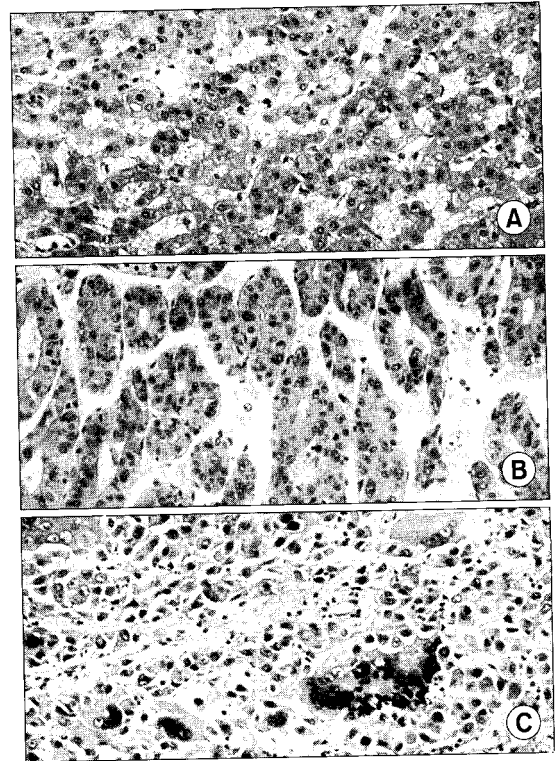


Fig. 2. Representative grades of tumor cell differentiation by Edmondson-Steiner's classification in hepatocellular carcinomas: A (case No. 2) shows grade I, B case (case No. 7) is grade II, and C (case No. 14) is grade III.

한 결과 간세포암종 20예 중 6예(30%)에서 p53의 변이 유전자가 검출되었으며 대조군에서는 전혀 검출되지 않았다(Table 2).

이 6예에 대한 DNA 직접 염기서열 분석결과는 5예(25%)에서 p53 유전자의 돌연변이가 관찰되었는데 5예 모두 exon 7부위의 제 14073번째 염기인 G가 결손(deletion)되었다(Fig. 3). 그러나 p53변이 유전자가 검출된 6예 중 1예(case No. 19)는 본 연구에서 시행한 exon 5~8에서는 p53 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

간세포암종은 간의 원발성 악성종양 중 가장 많으며,^{12,13)} 우리 나라를 포함한 동남아시아와 아프리카 지역에서는 매우 흔하다.¹⁴⁾ 우리 나라에서는 B형 간염 바이러스(HBV)의 감염빈도가 높고

간세포암종의 발생률도 높아서 남자에서 2번째, 여자에서 4번째로 흔하며, 간세포암종 환자수가 지난 10년 동안 꾸준히 증가하여 남자 10만명당 30.5명, 여자 10만명 당 7.6명으로 추정된다.¹⁵⁾ 특히 40세에서 60세 까지 중·장년기에서의 발생률이 남자 10만명당 74.8명, 여자 10만명당 15.6명으로 발생빈도에 있어서 높은 나라에 속한다.¹⁶⁾ 본 연구 역시 대상을 무작위로 선택했음에도 거의 대부분이 40세에서 60세 사이로 이에 부합했다.

인체종양은 종양유전자의 활성화와 종양억제 유전자의 비활성화로 발생할 수 있으며 종양억제 유전자에는 retinoblastoma (Rb)유전자, p53 유전자 및 Wilms' tumor (WT1) 유전자 등이 있다. 이 중 p53 유전자 변이의 평균 발생빈도는 70% 정도이지만 carcinoid 폐암에서는 관찰되지 않으나,¹⁷⁾ 원발성 악성 흑색종에서는 97%까지 나타내는 등 그 차이가 많다.¹⁸⁾ 간세포암종에서 p53 유전자 변이

Table 3. Mutation of p53 gene in hepatocellular carcinomas (case No. 1-20) and control group (case No. 21-40)

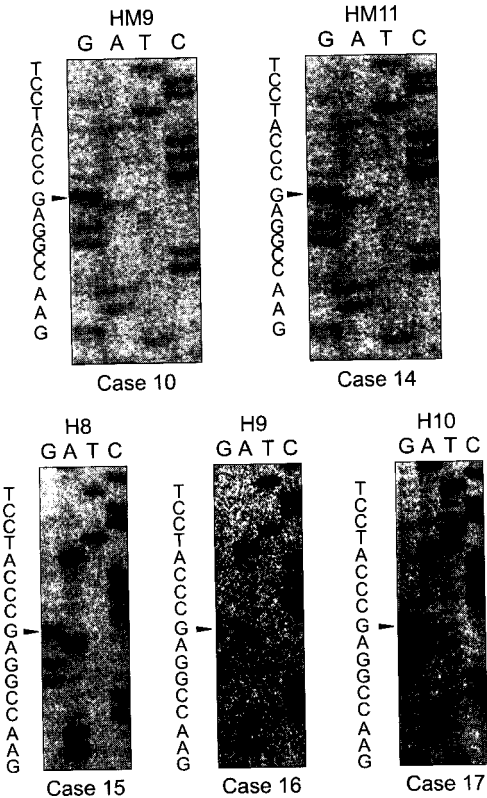
Case No.	Mutation	Content of mutation		
		Exon	No. of bp	Base change
1	ND			
2	ND			
3	ND			
4	ND			
5	ND			
6	ND			
7	ND			
8	ND			
9	ND			
10	Detection	7	14073	AGGG→AGC
11	ND			
12	ND			
13	ND			
14	Detection	7	14073	AGGG→AGC
15	Detection	7	14073	AGGG→AGC
16	Detection	7	14073	AGGG→AGC
17	Detection	7	14073	AGGG→AGC
18	ND			
19	Detection	ND		
20	ND			
21~40	ND			

ND: Non-detection, bp: Base Pair

의 발생 빈도는 미국에서의 10% 이하부터 일본의 20~30%와 중국 및 남아프리카에서의 56%까지 아주 다양하다. 높은 발생빈도를 나타내는 이 연구들은 B형 간염이 유행하며 aflatoxin이 식품에 오염되어 있는 나라들이 대부분으로 간세포암종의 30~60%에서 특징적으로 codon 249 변이를 나타내며,^{5,19,20} 이와는 대조적으로 낮은 빈도를 나타내는 연구들에서는 p53 유전자 변이가 codon 249부위에서는 검색되지 않거나 드물어서,^{13,21} 간세포암종에서 p53 유전자 변이가 높게 발견되는 지역과 낮은 빈도를 나타내는 지역으로 나누기도 한다. 본 연구에서 돌연변이를 관찰할 수 없었던 1예는 실험에 사용된 exon에서는 검색되지 않았으나 DNA 직접 염기서열 결정법의 정확성을 고려할 경우 연구에 사용된 exon 외의 exon에 존재할 것으로 생각되므로 20예 중 6예에서 검출되어 30%의 빈도를 나타낸 바, 우리 나라에서의 간염 발생빈도를 감안할 때 간세포암종에서 p53 유전자 변이가 비교적 높게 나타나는 지역에 부합하

는 것으로 사료되었다. 또, 본 연구에서는 정확한 검사기법에 의한 p53 유전자 돌연변이의 발생빈도와 그 변형 양상에 중점을 두었기 때문에 간세포암종의 위험인자인 HBV와 aflatoxin 등의 임상적 여러 지표와의 연관성에 대해서는 비교분석하지 않았으나 추후 연구되어야 할 과제로 생각된다.

p53 유전자의 돌연변이의 검출빈도가 연구자에 따라 다른 이유는 여러 가지로 설명되고 있는데,²² 첫째로 표본의 제작과정에 따른 차이로 간질세포나 염증세포 또는 혈관이 풍부한 종양조직은 변이된 유전자를 가진 세포의 비율이 상대적으로 낮아지므로 돌연변이 검출이 쉽지 않고, 둘째, 적용한 실험 방법의 민감도에 따라서도 영향을 받을 수 있다. 셋째로 또 다른 중요한 요인은 DNA의 크기인데 Sheffield등²³은 분절의 크기가 클수록 검출률은 낮아진다고 보고하고 있다. 본 연구의 대상인 간조직 역시 간질세포와 혈관이 풍부하고 종양조직의 괴사도 흔하여 분자 유전학



Reported Sequence:
 5'-GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAAC-
 ACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGA-
 ACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACTGG-
 AAGACTCCAG-3'

Read Sequence:
 5'-GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAAC-
 ACATGTGTAACAGTTCCTGCATGGGCGGCATGA-
 ACCGGAGGCCCATCCTCACCATCATCACTGGA-
 AACTCCAG-3'

Fig. 3. DNA sequencing of PCR-amplified p53 gene of the case No.10, 14, 15, 16, and 17 hepatocellular carcinomas show G deletion in human p53 exon 7.

적 연구가 많지 않은 원인의 하나로 생각되었다. 암조직에서 p53 유전자의 이상을 검출하는 방법 중 통상적으로 많이 사용되는 IHC에 의해 검출되는 p53 단백질의 발현은 손상된 DNA나 바이러스 단백질에 의해서 야생형 p53 단백질이 축적될 수도 있으므로,²⁴⁾ 반드시 p53 유전자의 이상을 의미하는 것은 아니며 또한 조직의 고정과 슬라이드 제작과정 중 p53 유전자의 이상으로 형성되는 비정상단백질의 항원성이 떨어질 경우 IHC로

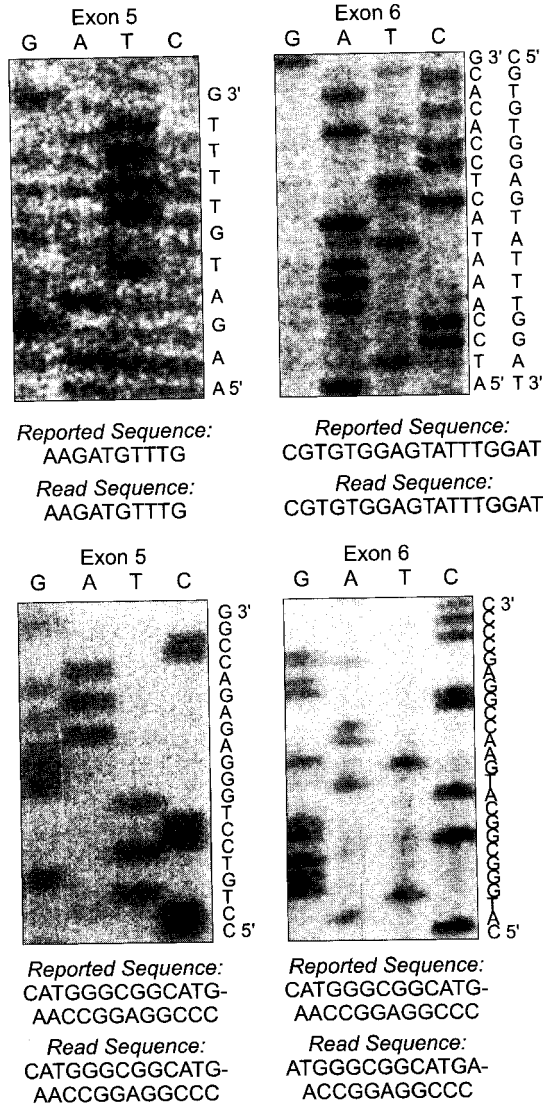


Fig. 4. DNA sequencing of PCR-amplified p53 gene of the case No.19 hepatocellular carcinoma shows that the site of mutation was not found on the examined exons(5-8).

는 나타나지 않을 수도 있으므로 반대로 IHC에 의해 p53 단백질이 발현되지 않았다고 해서 p53 유전자의 이상이 없다고 단정할 수도 없다.²⁵⁾ PCR-SSCP 검사법 또한 간단하고 200 bp 이하의 작은 PCR 산물에서도 하나의 염기변화를 찾을 수 있는 민감한 방법이지만 만일 돌연변이의 위치가 실험에서 증폭시키는 부위에 없다면 PCR-SSCP 분석만으로 돌연변이의 유무를 장담할 수 없어

음성으로 나타날 경우, DNA 수준에서 유전자 돌연변이가 없다가보다는 이 검사법의 한계로 볼 수 있다.²⁶⁾ 또 양성으로 나타남에도 불구하고 p53 유전자의 변이가 음성인 경우도 있는데 이는 missense, 또는 nonsense변이나 intronic insertional 변이 또는 결손 등의 심한 돌연변이가 있을지라도 만들어진 비정형단백질의 항원성이 떨어져 검출이 안되거나 점 돌연변이가 일어났어도 아미노산은 변하지 않아서 단백질형성에 이상이 없을 가능성이 있다.²⁷⁾ PCR-RFLP 검사법 또한 선별검사법의 일종이다. 따라서 p53 유전자의 변이는 IHC나 PCR-SSCP 또는 PCR-RFLP 검사법보다는 PCR 증폭 산물을 직접 sequencing하여 DNA의 이상을 검출하는 DNA 염기서열 결정법이 더 정확한 기법으로,²⁰⁾ 유전자의 구조이상을 확인하는데 이용되며 돌연변이의 유무 및 그 변형 양상을 직접 확인할 수 있지만 시간과 노력 및 비용이 많이 든다는 단점이 있어 통상적으로 사용하지는 않는다. 그러나, 보다 더 정확한 검사법이므로 본 연구에서는 이 방법을 적용했다.

p53 유전자의 활성화된 돌연변이는 exon 5, 6, 7, 8부위에 대부분 존재하여 그 양상은 점 돌연변이부터 결손에 이르기까지 다양하다.²⁸⁾ 간세포암에서 p53 유전자 돌연변이의 양상은 보고자들마다 다르나 일반적으로 간세포암의 발생빈도가 비교적 낮은 지역에서는 인체의 다른 암들에서 나타나는 것처럼 exon 2부터 exon 10까지 걸쳐 고루 분산되어서 나타나고,^{7,12)} 그 양상 또한 다양하다.^{4,21,28)} 한편 HBV와 aflatoxin이 간세포암의 주요 발생요인인 남아프리카와 중국에서는 간세포암의 거의 절반에서 p53 유전자의 codon 249에 G가 T로 전위되는 양상으로 나타나며,³⁰⁾ 이러한 결과는 aflatoxin이 세균과 쥐에서 간세포암을 유발시킬 때 G가 T로의 전위를 우선적으로 야기 시키기 때문에 aflatoxin 같은 외인성 발암인자로 인한 결과일 가능성이 높은 것으로 본다. 그 외에도 C가 T로 바뀌거나 G가 C로, 또는 G가 A로의 전위를 보고한 연구도 있다.²⁰⁾

우리 나라에서 간세포암종 조직을 대상으로 핵산 수준에서 p53 유전자 돌연변이를 연구했던 유일한 보고¹⁾에서는 13예 중 2예(15%)에서 p53 단백질의 변이유전자를 검출했으며, 그 유형이 1예는

codon 274에서 T가 G로(GTT→GGT), 또 다른 1예는 codon 154에서 G가 T로 전위(GGC→GTC)된 것이다. 그러나 본 연구에서는 돌연변이가 검출된 5예는 모두 exon 7에 존재한 14,073번째 염기인 G가 결손된 것으로 야생형과의 동질성을 비교해보면 결손으로 인한 frame shift 때문에 249번에서 260번까지 단백질의 서열이 달라져서 단백질 수준에서 야생형과 다른 변이가 나타난 것으로 생각된다. 유전적으로 볼 때는 이 변이가 생긴 부위가 p53 유전자 구조 중 sequence-specific DNA 결합부위에 해당하므로 이 변이가 간세포암의 발생 이전에 어떠한 영향을 주었을 수도 있을 것으로 생각된다. 또한 PCR에서 반응산물이 추출되었으나 DNA 직접 염기 서열 결정법상 p53 유전자의 돌연변이를 관찰할 수 없었던 예는 우선 야생형 p53단백질이 보다 안전한 구조로 바뀌었을 가능성과,³⁰⁾ 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서 얻은 DNA의 원하는 부위가 손상되었을 가능성을 생각해 볼 수도 있으나 본 연구에서는 exon 5, 6, 7, 8을 제외한 나머지 exon에 존재할 가능성이 더 큰 것으로 사료된다.

결과적으로 간세포암종에서 종합효소 연쇄반응 및 DNA 직접 염기 서열 결정법을 시행한 결과가 동·서양에서 발표된 기존의 연구결과와 비교해 볼 때, p53 유전자 돌연변이의 발생빈도는 같은 아시아 내의 B형 간염 발생 빈도가 비교적 높은 나라의 보고들과 유사했으나, 검색된 돌연변이 염기서열의 변형양상이 exon 5에서 8까지 시행한 본 연구에서 검출되지 않은 1예를 제외한 5예 모두 G의 결손을 나타내어 기존의 여러 보고에서 대부분의 돌연변이 양상이 G와 T의 전이임을 비교해볼 때,^{4,7,12,21,28,30)} 이와는 다른 뚜렷한 특징이 있음을 알 수 있었다.

따라서 본 연구는 검체의 수가 적고 HBV 등 임상적 연구가 병행되지 않았음으로 인한 대표성의 여부와 그 결과가 모두 동일한 양상으로 나타났다는 데에 논란의 여지가 있을 수 있겠으나 두 차례에 걸쳐 재 실험을 해 본 바, 본 결과를 재검증할 수 있었다. 그러므로 우리 나라의 간세포암종은 미국 등 서구와 비교해서 p53 유전자 돌연변이의 발생빈도가 더 높고 같은 아시아 내에서도 돌연변이 염기서열의 변형양상과 간세포암종

의 생물학적 행태나 분자 유전적 양상도 서로 상이할 수도 있다는 그 가능성과 후향적 검사가 가능한 파라핀 포매조직을 대상으로 간세포암종의 분자생물학적 연구를 하였다는데 그 의미가 있다.

향후 여러 유형의 간염 및 기타 임상적 지표들과의 연계 분석과, 본 연구에서 검색했으나 분석을 하기에는 그다지 많지 않은 증례 수로 비교할 만한 대상이 부족했던 광학현미경적 병리조직검색 및 많은 추적조사와 연구로 교차 검증된다면, 간세포암종에서 치료 및 예후에 대한 지표로서 p53 유전자 돌연변이의 의의를 분명히 할 수 있을 것으로 사료되며, 또한 이러한 자료의 축적이 앞으로 한국 간세포암종의 치료와 예후에 중요한 역할을 하게 될 것으로 기대한다.

참고 문헌

- 1) Makino R, Hayashi K, Sugimura T. C-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or cyclohexamide treatment. *Nature* 1984; 310: 697-704.
- 2) Alcorn HA, Feitelberg SP, Brenner DA. Transient induction of C-jun during hepatic regeneration. *Hepatology* 1990; 11: 909-917.
- 3) Harris CC, Hollstein M. Clinical implication of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327.
- 4) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- 5) Irene OL, Srivastava G, Chung LP, Tsang SWY, Matthew MT. Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma in Hong Kong Chinese people. *Cancer* 1994; 74: 30-37.
- 6) Battifora H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. *Hum Pathol* 1994; 25: 435-437.
- 7) Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 6358-6364.
- 8) Jang WY, Kim DS, Kim KK, Lee TS, Kim CY, Kim HJ. The aberrant expression of p53 protein in liver cells carcinoma. *Korean J Pathol* 1995; 29: 607-617.
- 9) Kim SS, Park SG, Han DS, Hun MH. Analysis of DNA ploidy pattern of hepatocellular carcinoma with comparison between flow cytometric and image cytometric study. *Korean J Pathol* 1992; 26: 1-9.
- 10) Oh YL, Kim YI. Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Pathol* 1993; 27: 581-589.
- 11) Kang YK, Kim CJ, Kim WH, Kim HO, Kang GH, Kim YI. p53 mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver. *Virchows Arch* 1998; 432: 24-32.
- 12) Volkmann M, Hofmann WJ, Muller M, et al. p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene* 1994; 9: 195-204.
- 13) Bourdon JC, D'Errico A, Paterlini P, Grigioni W, May E, Debuire B. p53 protein accumulation in European hepatocellular carcinoma is not always dependent on p53 gene mutation. *Gastroenterology* 1995; 108: 1176-1182.
- 14) Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma: a worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 962-972.
- 15) Kim SE, Baek DG, Do CH, et al. Natural history and prognostic factors in hepatocellular carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 1988; 20: 363-370.
- 16) Kim JS. Current status and transition of death causes I korean population. *J Korean Med Assoc* 1993; 36: 271-278.
- 17) Iggo R, Gatter K, Bartek J. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-679.
- 18) Akslen LA, Morkve O. Expression of p53 protein in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 1992; 52: 13-16.
- 19) Unsal H, Yakicier C, Marcais C, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 92: 822-826.
- 20) Varley JM, Brammar WJ, Lane DP, Swallow JE, Dolan C, Walker RA. Loss of chromosome 17p13 sequences and mutations of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene* 1991; 6: 413-421.
- 21) Kazachkov Y, Khaoustov V, Yoffe B, Solomon H, Klintmalm GB, Tabor E. p53 abnormalities in hepatocellular carcinoma from United States patients: analysis of all 11 exons. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2207-2212.
- 22) Levine AJ, Moman J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
- 23) Sheffield VC, Beck JS, Kweitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-

- 332.
- 24) Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-318.
- 25) Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, Barnes DM, Millis RR. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994; 69: 26-314.
- 26) Hayashi K. PCR-SSCP: a model for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 1992; 9: 73-89.
- 27) Ishioka C, Sato T, Gamoh M, et al. Mutations of the p53 gene, including an intronic point mutation, in colorectal tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 901-906.
- 28) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-708.
- 29) Diamantis ID, McGandy C, Chen TJ, Liaw YF, Gudat F. A new mutational hot-spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *J Hepa* 1994; 20: 553-556.
- 30) Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumor suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-661.
-