

위암의 p53 종양억제유전자의 변이

계명대학교 의과대학 ¹병리학교실 및 ²일반외과학교실

이상숙¹ · 김상표¹ · 손은주¹ · 황미선¹ · 손수상²

p53 Mutation in Gastric Carcinoma Detected by PCR-SSCP and Direct-Sequencing

Sang-Sook Lee, M.D.¹, Sang-Pyo Kim, M.D.¹, Eun-Joo Sohn, M.S.¹
Mi-Seon Hwang, B.S.¹ and Soo-Sang Sohn, M.D.²

Departments of ¹Pathology and ²Surgery, Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea

Purpose: p53 gene mutations, one of the most common alterations found in human tumors, has also been detected in gastric carcinoma, and shown to have a crucial and early role in gastric carcinogenesis of intestinal type and mainly associated with tumor progression in the cancer of diffuse type. We tried to investigate the frequency of p53 mutations in 27 gastric carcinomas.

Materials and Methods: Fresh tumor tissue from a series of gastric carcinoma was screened for p53 mutations by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) with silver staining and confirmed by direct-sequencing in 27 cases of gastric carcinoma. Immunohistochemical method for p53 protein accumulation was also performed in the same cases.

Results: Immunohistochemistry revealed 20 of 27 cases of gastric carcinoma, positive for p53. PCR-SSCP analysis of p53 exons 5~8 detected mobility shift in 4 out of 20 p53-positive tumors; three from exon 5 and the other from exon 7, respectively. DNA sequencing of exon 5 showed CGC to CAC point mutation in one of three cases; exon 7, ATC to AAC point mutation. It seemed that there was no correlation between genetic alterations of p53 gene detected by PCR-SSCP and expression of p53 protein by immunohistochemistry.

Conclusions: Our results suggest that mutations of the p53 gene are rare genetic events in carcinogenesis of gastric carcinomas. There was discrepancy between mutations screened by PCR-SSCP and overexpressions in immunohistochemical staining.

Key Words: p53 gene mutations, Gastric carcinomas, PCR-SSCP

책임저자 : 이상숙, 대구시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 병리학교실, 700-310

본 논문은 1997년도 계명대학교 비사연구비에 의해 보조되었음.

접수일 : 1998년 3월 16일, 게재승인일 : 1998년 9월 10일

서 론

최근 위암에 대한 분자생물학적 연구가 시도되고 있는데 위암에서 p53의 변이가 초기, 즉 장화생과 선종에서부터 생기기 시작하여 위암발생의 후기인 이형성, 조기암 및 침윤암으로 진행할수록 p53의 변이가 많이 생겨 위암 발생의 후기인 이형성부터 관여함이 알려져 있다(1,2). 그 밖에 p53의 변이와 p53단백의 과발현이 위암에 미치는 임상병리학적 의의 및 예후에 미치는 영향 등에 대해서 연구되고 있다(2~5). 저자들은 108예의 조기위암을 대상으로 면역조직화학적 기법을 사용하여 위암조직내의 p53 단백질의 발현을 연구한 바 있다(6). 저자들이 사전연구 결과를 보면 조기 위암 중 38.0%에서 종양세포의 핵에 비정상적 p53 단백질의 발현을 보였다. 비정상적 p53 단백질의 표현은 위암의 조직학적 유형과 밀접한 관련이 있어 장형위암의 56.7%의 선암세포에서 관찰되었다. 인화 세포암이나, 점액성 선암 또는 미만형의 분화가 나쁜 선암에서는 14.6%의 빈도로 매우 드물게 발현되었다. 이 연구 결과로 미루어 보면 장형과 미만형 위암은 형태가 다른 것과 마찬가지로 분자생물학적 발생기전도 다를 것이라고 추측된다.

유전자변이를 알아내는 방법은 그 변이의 종류와 위치, 염기서열을 알고 있는 경우와 그렇지 않은 경우로 나누어진다. 전자에는 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)(7)나 Allele Specific Oligonucleotide(ASO)(8)를 이용할 수 있고 후자의 경우는 Single-Strand Conformation Polymorphism(SSCP), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)(9), Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TGGE)(10), Heteroduplex Analysis(HA)(11), Chemical Mismatch Cleavage(CMC)(12), RNase A mismatch cleavage(13) 등이 있는데, 이 중 SSCP법이 널리 사용되고 있다. SSCP법은 1989년 Orita 등(14)에 의해 처음 보고되어 PCR 산물을 열변성시킬 때 1차 구조의 차이에 의해서 생기는 단일

쇄의 3차 구조의 차이가 gel 상에서 전기영동했을 때 mobility shift로 나타난다는 것이 그 원리이다. 즉 정상적 DNA나 mutant DNA 간의 서열 차이가 전기영동의 이동양상의 차이를 보여준다는 것이다. SSCP법의 주된 장점은 간편성과 민감도에 있다. PCR 산물의 크기가 200 bp 정도 될 때 70%~95% 가량의 효율을 가진다.

저자들은 위암 27예를 대상으로 DNA 수준에서 p53 종양억제유전자의 변이를 알아보고자 PCR-SSCP에 의한 돌연변이를 검색하고 이를 면역조직화학적 방법에 의한 p53 단백질의 검출과 비교하고 PCR-SSCP에 의해 변이가 있는 예를 선택하여 direct-sequencing을 통해 변이된 코돈의 위치와 아미노산 서열의 변화를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 재료

1993년부터 1997년까지 위암으로 위 절제술을 받은 환자 27명의 침윤성 위암조직을 대상으로 하였다. 면역조직화화학을 위해서는 파라핀으로 포매된 조직 블록을 이용하였고, DNA 추출은 급속 냉동된 조직을 이용하였다. 대상 환자는 남자 19명, 여자 8명으로 연령분포는 40세에서 75세까지 평균연령은 59.7세였다.

Lauren's 분류법에 따른 조직학적 유형은 12예가 장형, 13예가 미만형, 1예가 혼합형, 1예가 점액성이었다.

2) 방법

(1) 면역조직화학적 방법: 면역조직화학적 염색을 시행하기 위하여 자른 4 μ m의 파라핀 절편을 부착제(3-aminopropyltriethoxysaline, APES; sigma, USA)로 전처리한 유리슬라이드에 부착시키고 60°C에서 2시간동안 고정시킨 후 xylene과 계열알코올에서 탈파라핀 및 함수를 시켰다. 내인성 peroxidase의 차단을 위해 메탄올과 30% 과산화수소수가 9:1의 비율로 섞인 용액에서 30분간 처리하고 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.2)로 수세하였

다. 그 후 포르말린 고정으로 인해 조직내 숨겨진 항원을 노출시키기 위해 0.01 M citrate buffer 용액에 담구어 microwave를 이용하여 10분간 가열하여 실온에서 식힌 후 증류수 및 PBS로 수세하였다. 일차 항체인 p53 단클론항체(DO7, Novocastra, U.K.)를 항체 희석액에 1 : 500으로 희석하여 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후 PBS로 수세하고 이차항체인 biotinylated anti-mouse immunoglobulin(DAKO, LSAB kit, USA)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 다시 streptavidin-peroxidase conjugate(DAKO, LSLB kit, USA)로 37°C에서 10분간 반응시키고 PBS로 수세한 후 DAB(diaminobenzidine tetrahydrochloride, Biogenex, USA)로 10~20분간 실온에서 발색시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다. 양성대조군으로서는 사전 연구에서 각 항체에 대해 양성으로 알려진 폐의 편평상피암 조직절편을 사용하였고, 음성대조군으로서는 일차항체 대신에 PBS 만을 도포시켜 동일한 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 염색 결과는 10% 이상, 50% 미만의 종양세포에서 핵내에 갈색 또는 암갈색으로 염색된 경우를 +으로 판독하였고, 50% 이상의 종양세포가 염색된 경우를 ++으로 판독하였다.

(2) DNA 추출: 적출된 조직은 효소작용을 급속히 정지시키기위해 급속 냉동시켰다. 냉동된 조직은 막자사발에서 액화 질소를 떨어뜨리면서 곱

게 간 다음, digestion buffer[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 M EDTA(pH 8.0), 0.5% SDS]를 조직의 10배가 되도록 넣어 잘 섞어준 후 proteinase K(Promega, USA)를 100 µg/ml의 농도가 되도록 가하여 37°C에서 하룻밤(16~18시간) 동안 부란하였다. 다음 날 phenol 추출법과 에탄올 침전법으로 DNA pellet을 얻은 다음, 그 양에 따라 300~500 µl 정도의 증류수에 녹여 사용하였다.

(3) Polymerase Chain Reaction: 반응액 총량을 50 µl로 하여 반응완충액(50 mM Tris-HCl, pH 9.0 at 25°C, 0.1% Triton X-100)과 dATP, dCTP, dGTP, dTTP(Boehringer Mannheim, Germany) 각각 200 µM, 1.5 mM MgCl₂, sense와 antisense primer 각각 0.8 µM과 미리 추출한 DNA를 500 ng을 넣고 증합효소를 제외한 분량을 증류수로 보충한다. 94°C에서 5분간 가열하여 기존의 proteinase를 변성시킨 후 증합효소(Taq polymerase, Promega, USA) 2 unit를 넣어 반응시킨다. 94°C 2분간 초기변성과정을 거친 후 94°C 45초, 60°C 45초, 72°C 45초의 조건으로 35주기를 시행하고 마지막 주기 후 72°C 5분간 더 반응시켰다. 증폭에 사용한 primer는 Table 1과 같으며 한국생공에 주문 합성하였다. 모든 PCR 반응은 GeneAmp PCR system 9600(Perkin-Elmer, USA) thermocycler를 사용하였다

(4) Single-Strand Conformation Polymorphism: PCR 반응액 1 µl에 sequencing stop buffer(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue,

Table 1. Sequence of primers for PCR of p53

Primer	Sequence	Fragment length
p53	sense : TTCCTCTTCCTGCAGTACT	209bp
	antisense : AGCTGCTCACCATCGCTAT	
	sense : GGCCTCTGATTCCCTCACTGA	199bp
	antisense : GCCACTGACAACCACCCTTA	
	sense : TGTTGTCTCCTAGGTTGGCT	139bp
	antisense : CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	
	sense : CCTATCCTGAGTAGTGGTAA	164bp
	antisense : TCCTGCTTGCTTACCTCGCT	

0.05% xylene cyanol FF) 3 μ l를 첨가하여 잘 섞고 끓는 물에서 10분간 변성시킨 후 즉시 얼음에 꽂아 가능한 빨리 전기영동을 하였으며, 이때 3 μ l를 loading하였다. 9% acrylamide gel을 사용하였으며, bis-acrylamide와의 비율은 35 : 1로 하였다. 전기영동 완충액은 1×TBE를 사용하고 400V, 6W 정도의 전류에서 약 2시간 30분동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System(Promega, USA)을 참고하여 은염색을 실시하였다. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 10% acetic acid 용액에서 20분간 가볍게 흔들며 주면서 고정시켰다. 이때의 고정액은 마지막 정지액으로 사용하도록 모아두고 고정이 끝나면 2차 이상의 증류수로 2분간 3차례 수세하고, 0.1% AgNO₃, 0.15% formaldehyde 용액에 30분간 흔들면서 염색시킨다. 다시 증류수로 5~10초정도 간단히 수세하고, 12°C 정도의 3% Na₂CO₃, 0.15% formaldehyde 용액으로 현상하였다. 이때 시간은 DNA band가 보이는 상태를 점검하면서 배경색깔이 너무 검지 않도록 조절하였다. 고정단계에 모아둔 초산용액을 이때 정지액으로 사용하였다. 염색이 끝난 gel은 공기중에서 말려 보관하였다.

(5) Direct-Sequencing: SSCP결과 DNA band의 shift현상이 보인 것만을 선택하여 sequencing을 실시하였다.

Template DNA의 정제는 GENE CLEAN II kit (BIO 101, USA)을 사용하였으며 다음과 같은 방법으로 정제하였다. agarose gel 내의 DNA band를 잘라 3배의 NaI와 0.3배의 TBE modifier를 넣어 55°C에서 10분정도 두어 gel을 완전히 녹인 후 glass milk를 DNA 1 μ g당 5 μ l의 양으로 첨가하여 4°C에 10분간 두었다. 20초 정도 원심분리 후 상층액을 버리고 washing solution으로 3번 수세하고 증류수를 glass milk와 동량으로 넣어 55°C에서 10분정도 둔 후 이를 원심분리하여 상층액을 취했다.

Primer labeling은 [γ -³²P]-ATP로 5'-end labeling을 하여 농도는 2 pmol/ μ l가 되게 하였다. Se-

quencing reaction은 Thermo Sequenase cycle sequencing kit(Amersham, USA)에서 제시한 manual에 따라 수행하였으나 cycling program은 95°C에서 30초, 60°C에서 60초의 조건으로 40주기를 시행하였다. 반응이 끝나면 반응액의 0.5배의 Sequencing stop buffer를 첨가하여 잘 섞고 80°C에서 10분간 denature시킨 후 급속히 얼음에 냉각하여 전기영동하였다. Gel은 1×TBE에 녹인 8 M urea, 6% acrylamide(bis-acrylamide와의 비율은 19 : 1) 60 ml에 10% ammonium per sulfate 150 μ l, TEMED 60 μ l의 조성으로 제조하여 사용하였다. 약 1시간정도 pre-run을 시행한 후 loading한 다음 2000 V, 45 W로 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 10% acetic acid, 10% methanol을 포함한 용액에서 15분동안 fixing 과정을 거친 후 3 MM paper로 옮겨 표면을 wrap paper로 덮어 gel dryer에서 78°C, 1시간동안 진공건조하였다. 건조된 gel은 cassette에 넣고 그 위에 x-ray film을 올려 놓아 γ -³²P의 세기에 따라 2~6시간 정도 -70°C에서 노출시킨 후 현상하였다.

결 과

1) 면역조직화학법에 의한 p53 단백질의 검색

p53 단클론 항체(DO7)를 이용하여 위암조직에서 면역조직화학법을 실시한 결과, 총 27예의 위암중 20예에서 양성으로 나타나 74%의 양성율을 보였다(Fig. 1).

Lauren 분류에 따르면 장형 위암 12예 중 10예(83%)와 미만성 위암 13예 중 9예(69%)에서 p53 단백질의 과발현을 보였다. 그러나 종양세포의 50% 이상에서 p53 단백질의 과발현을 보인 것은 주로 장형 위암이었다(72%).

2) PCR-SSCP에 의한 변이 검색

p53 exon 5에서 3예, exon 7에서 1예로 총 4예(14.8%)에서 양성으로 나타났다(Fig. 2). 하나 이상의 exon에서 양성을 보인 예는 없었다. Exon 5에 양성을 보였던 3예 중 장형 위암이 2예, 미만

Fig. 1. a: Intestinal-type adenocarcinoma of the stomach (H&E, X100), b: Diffuse, strong nuclear positivity of p53 protein in most of the tumor cells in gastric adenocarcinoma(Immunohistochemistry for p53, X100).

Fig. 2. Detection of p53 mutation in exon 5 in lanes 4, 9 and 13 by PCR-SSCP analysis. Lane N, normal control: lane 1 through 15 individual samples.

성 위암이 1예였으며 exon 7에 양성을 보였던 1예는 장형 위암이었다.

3) Direct-Sequencing

SSCP 결과 양성을 보인 예들 direct-sequencing 한 결과 p53 exon 7에서 양성을 보인 장형 위암에서 코돈 232의 ATC가 AAC로 변이되어 이소류신이 아스파라진으로 아미노산이 치환되었다. Exon 5에서 양성을 보인 3예 중 한예의 장형 위암에서는 코돈 175의 CGC가 CAC로 변이되어 아르기닌이 히스티딘으로 치환되었다(Fig. 3)(Table 2). 나머지 2예중 한 예는 SSCP결과에서 아주 희미한 양성 band를 보였고, 예상대로 mutant가닥이 상대적으로 너무 적어 direct-sequencing으로는 돌연변이를 찾지 못했다. 또 다른 예는 PCR 과정부터 반복 실험을 거쳤음에도 불구하고 direct-sequencing

Fig. 3 Direct-Sequencing of PCR-amplified exon 5 of normal and tumor. (SSCP is shown in Fig. 2) shows amino acid substitution (codon 175, CGC→CAC: Arg→His) as indicated.

encing 결과 6 bases가 frame shift된 것으로 판독되었지만 insertion/deletion 부위를 찾지 못하였다. Hinf I으로 RFLP를 시도하였으나 6 bases의 polymorphism을 발견하지는 못했다.

Table 2. Result of p53 immunohistochemistry and PCR-SSCP of exon 5, 6, 7, 8 in 27 gastric cancers

Case	Age	Sex	Histologic classification	IHC*	PCR-SSCP
1	63	F	Mucinous	+	
2	58	M	Intestinal	++	
3	65	M	Intestinal	++	exon 7+ [†]
4	47	M	Diffuse	+	exon 5+
5	67	F	Diffuse	++	
6	72	M	Mixed	-	
7	66	M	Diffuse	-	
8	64	F	Intestinal	-	
9	58	M	Diffuse(neuroendocrine differentiation)	-	
10	40	F	Diffuse	+	
11	58	M	Intestinal	++	
12	75	F	Diffuse	++	
13	62	F	Diffuse	++	
14	66	M	Intestinal	+	
15	53	M	Diffuse(signet ring cell type)	+	
16	50	M	Diffuse	-	
17	63	M	Intestinal	-	
18	69	F	Diffuse	+	
19	64	M	Intestinal	++	exon5+ [†]
20	60	M	Intestinal	++	
21	44	M	Diffuse(signet ring cell type)	-	
22	55	F	Diffuse	+	
23	57	M	Intestinal	++	
24	55	M	Intestinal	+	
25	58	M	Diffuse	+	
26	62	F	Intestinal	++	exon 5+
27	57	M	Intestinal	++	

* Positivity of p53 immunohistochemistry (-, negative; +, < 50% of positive cells; ++, > 50% of positive cells),

[†] Direct-sequencing showed amino acid substitution in codon 232 (ATC→AAC, Ile→Asn), [‡] Direct-sequencing showed amino acid substitution in codon 175 (CGC→CAC, Arg→His).

고 찰

침윤성 위암 27예를 대상으로 면역조직화학법을 이용하여 p53 단백질의 발현을 검색하고 PCR-SSCP과 direct-sequencing을 이용하여 p53 종양억제유전자의 변이를 조사하였다. 면역조직화학법 결과 20예(74%)에서 p53 단백질의 과발현이 관찰되었다. PCR-SSCP결과 4예에서 mobility shift가 관찰되었다. 이들 4예 모두에서 p53 단백질의 과발현

을 보였다. 그러나 면역조직화학법상 p53 단백질의 과발현을 보인 예의 80%에서 PCR-SSCP에서 변화를 관찰할 수 없었다. 각종 종양에서 p53 단백질의 과발현과 p53 유전자 변이와의 관계는 대체로 일치하는 경향이던 몇몇 보고에서는 둘 사이의 상당한 불일치도 보고하고 있다(15,16,17). 본 연구에서도 면역조직화학법에 비해 PCR-SSCP의 양성율이 낮게 관찰되었다. 이는 p53 종양억제유전자의 11개의 exon중에 본 연구에서는 5, 6, 7, 8 등의 부위에서만 검색하였기 때문에 그 외 부위

에서 일어난 변이로 인하여 p53 단백질 안정화되어 번역조각화방법으로 검색되었을 가능성이 있고, SSCP법의 효율이 낮았을 가능성이 있다. SSCP법에 효율에 변화를 주는 요인은 acrylamide 농도, 완충액의 이온강도, 전기영동시킬 때의 전압과 온도, 그리고 glycerol의 농도 등으로 다양하다. 이런 최적조건은 염기서열과 직접 연관이 있기 때문에 각각의 PCR산물에 해당하는 최고의 효율을 얻을 수 있는 조건을 찾을 필요가 있다. 유전자 변이 외에 p53 단백질의 안정화에 영향을 주는 요인으로서는 바이러스감염 등이 이미 보고되었고(18,19), 아직 밝혀지지는 않았지만 p53단백의 대사에 관여하는 물질의 기능이상이나 p53과 결합하여 작용하는 다른 단백질의 이상도 생각해볼 수 있다. p53 단백질에 대한 연구가 계속되고 있고 SSCP법의 민감도나 효율을 높이는 기술이 진보되어 두 방법간의 상호보완이 이루어지리라 기대된다. SSCP 결과 양성을 보인 예를 direct-sequencing한 결과 p53 exon 7에서 양성을 보인 장형 위암에서 코돈 232의 ATC가 AAC로 변이되어 이소류신이 아스파라진으로 아미노산이 치환되었다. Exon 5에서 양성을 보인 3예중 한예의 장형 위암에서는 코돈 175의 CGC가 CAC로 변이되어 아르기닌이 히스티딘으로 치환되었다. 나머지 2예 중 한 예는 SSCP결과에서 아주 희미한 양성 band를 보였고, 예상대로 mutant가닥이 상대적으로 너무 적어 direct-sequencing으로는 돌연변이를 찾지 못했다. 또 다른 예는 PCR 과정부터 반복 실험을 거쳤음에도 불구하고 direct-sequencing 결과 6 bases가 frame shift된 것으로 판독되었지만 insertion/deletion 부위를 찾지 못하였다. Hinf I으로 RFLP를 시도하였으나 6 bases의 polymorphism을 발견하지는 못해서 PCR시 위양성 반응이 의심되었다. 이종(heterogeneous)의 주형을 클로닝하는 데는 확률의 문제가 있지만 가능한 한 많은 가닥을 phagemid에 클로닝하여 단가닥 sequencing을 해볼 필요가 있다고 생각된다.

위암은 한국에서 가장 흔한 암으로서 다른 장기에서 생기는 암, 즉 대장암 또는 유방암에 비교

하면 수년 전까지만 해도 위암에서 생기는 유전자 이상에 대한 정보가 거의 없었다. 대장암의 발생이 ras변이, 5q 소실, 18q 소실과 17p 소실 같은 여러 유전자의 변화가 축적되어 다단계의 과정에 걸쳐 일어남은 잘 알려져 있다. 이런 과정 중에 염색체 5q에 있는 MCC 또는 APC 유전자, 염색체 18q에 있는 DCC 유전자와 염색체 17p에 있는 p53 유전자가 종양억제 유전자로서 중요한 역할을 한다고 간주되고 있다(20).

정상 p53 유전자는 종양억제 능력이 있다고 알려졌고 종양 virus를 포함하는 여러 가지 내부 또는 외부의 요인이 의해 정상 p53이 제대로 기능을 못 하게 되어 사람의 여러 종양을 일으킨다고 알려져 있다(21,22). p53 유전자의 변이는 사람에게 생기는 다양한 악성종양에서 보고되었고 최근 상업적으로 개발된 p53 단구항체를 이용한 번역조각화염색이 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직에서도 가능하게 되어 p53 단백질의 과발현을 조직의 특정 종양세포에서 볼 수 있어 손쉽게 p53 변이 여부의 검색이 가능해 졌다. 저자들의 사전연구 결과를 보면 번역조각화염색 결과 총 108예의 조기 위암 중 41예(38.0%)에서 종양세포의 핵에 비정상적 p53 단백질의 발현을 보였다. 비정상적 p53 단백질의 표현은 위암의 조직학적 유형과 밀접한 관련이 있어 장형의 선암세포에서 흔히 관찰되었다(56.7%)(6). 인환 세포암이나, 점액성 선암 또는 미만형의 분화가 나쁜 선암에서는 매우 드물게 발현되었다(14.6%)(6). 이 연구 결과로 미루어 보면 장형과 미만형 위암은 형태가 다른 것과 마찬가지로 분자생물학적 발생기전도 다를 것이라고 추측된다. 현재까지 진행된 위암에서 보고된 p53 단백질의 과발현의 빈도는 40~60%로서 사람에게 생기는 다른 종양에서와 유사하다. 저자들의 사전 연구에서 p53 단백질은 주로 위의 경부지역의 선구조의 암세포의 핵에서 발현되었고 점막을 통해 다발성으로 나타났다. 또한 p53 유전자의 변이가 질소성 화합물 등 식이성 발암원이나 H. pylori 감염 등에 의한 환경적 요소에 의한 위점막상피의 미세변화에 의해 다발적으

로 생김을 알 수 있다. 또한 암 주변의 위의 정상 선상피세포, 장화생 세포에는 p53 단백질이 발현되지 않았다. 이는 p53 단백질의 과발현이 위암발생의 비교적 늦은 시기에 생김을 의미한다고 생각된다.

장형의 위암은 특히 환경요소와 관계가 있어 *H. pylori* 감염과 동반된 표재성 위염이 진행되어 만성 위염 및 위의 위축이 초래되면 무산증과 함께 위의 비정상적인 미세환경을 초래하여 장화생과 이형성과정을 거쳐 결국 위암, 특히 장형 위암을 일으킨다고 알려져 있다. 반면 PCR-SSCP 분석과 direct-sequencing 분석에 의한 위암의 DNA 수준에서 행한 연구에 의하면 p53 변이는 장화생 또는 이형성 시기부터 생기기 시작하여 암의 반수 이상에서 발견되어 위암 발생의 초기 사건으로 결론지었다(23). 또한 위선종의 30%에서 p53의 변이 특히 G : C to A : T transition의 missense mutation이 발견되어 이는 선종에서 암으로 변하는데 절대적 역할을 함을 시사하였다(24). 위암에서 발견되는 가장 흔한 p53의 변이는 G : C to A : T transition으로 알려져 있다(25). 이런 형의 변이는 nitric acid에 대한 노출과 관련될 뿐 아니라 위암의 가장 주된 형이 된다. 최근에는 SSCP 분석과 direct-sequencing 분석같은 기법들이 널리 응용되어 각종 암의 p53 종양억제유전자의 변이를 밝히는 데 기여하고 있다. 한국내에서도 소수의 SSCP 분석과 direct-sequencing 분석같은 기법들을 이용한 위암의 p53 종양 억제 유전자의 변이에 대한 연구결과가 보고되고 있다. 또한 김등(26)의 연구에 의하면 p53 유전자의 변이는 원발성 위암에서는 비교적 드물고, 위암의 진행에 관여함을 제시하였다.

향후 본 연구를 병리학분야에서 보관된 각종 위암의 파라핀 블록에 적용하여 microdissection 방법을 이용한다면 원하는 부위의 특정 암세포만을 표적으로 하는 세포단위의 특정 유전자의 변화도 알아 낼 수 있으리라 기대된다.

결 론

본 연구에서는 원발성 위암에서의 p53 종양억

제유전자의 변이는 비교적 드문 유전자 이상이라고 생각된다. 면역조직화화법과 PCR-SSCP법의 결과사이에 불일치를 보였는데 이는 p53 유전자의 변이를 연구하는데 이들 주 방법중 어느 하나에만 의존할 수 없음을 뜻한다. 본 연구에서 검색한 exon 이외의 부위에서 변이가 일어나 면역조직화화법에서는 양성이지만 PCR-SSCP에서는 음성으로 나타날 수 있고, p53 유전자의 발현을 조절하는 다른 유전자의 이상으로 p53 단백질의 세포내 안정도를 증가시켜 면역조직화화법에서는 양성으로 나타나고 PCR-SSCP에서 음성으로 나타날 가능성도 있다. 한편으로는 유전자의 변이가 발생하더라도 단백질의 세포내 안정도에 영향을 주지 않는 경우에 PCR-SSCP에서 양성이라도 면역조직화화법으로는 검색할 수 없을 수 있다. 따라서 p53 유전자를 연구함에 있어서 면역조직화화법과 PCR-SSCP법의 상호보완적인 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1995; 36: 848-852.
2. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MI. Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and pre-cancerous adjacent mucosa. *Gut* 1994; 35: 1697-1700.
3. Poremba C, Yandell DW, Huang Q, Little JB, Mellin W, Schmid KW, Bocker W, Dockhorn Dworniczak B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer-a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 1995; 426: 447-455.
4. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, Calistri D, Renault B, Burrel M, Amadori D, Fiocca R, Solcia E. p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 223-231.
5. Ojima H, Maehara Y, Ohno S, Sakaguchi Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Growth pattern and p53 over-expression in patients with early gastric cancer. *Cancer* 1995; 75(6 Suppl): 1454-1459.
6. 이상숙, 김상표, 손수상. 장형 조기 위암에서 p53 단백

- 의 과발현. 대한암학회지 1996; 28: 632-638.
7. Urban T, Ricci S, Grange JD, et al. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 2008-2012.
8. Wallace RB, Johnson MJ, Hirise T, et al. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. Nucleic Acids Res 1981; 9: 879-894.
9. Fisher SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 1579-1583.
10. Scholz RB, Milde LK, Jung R. 1993) Rapid screening for Tp53 mutations by temperature gradient gel electrophoresis-a comparison with SSCP analysis. Hum Mol Genet 1983; 2: 2155-2158.
11. White MB, Carvalho M, Derso D. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphism. Genomics 1992; 12: 301-306.
12. Cotton RGH, Rodrigues NR, Campbell RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and application to the study of mutations. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 4397-4401.
13. Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA: DNA duplex. Science 1985; 230: 1242-1246.
14. Orita M, Youichi S, Seiya T, Hayashi K. Rapid sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989; 5: 874-879.
15. Cesarman E, Inghurami G, Cadburn A, Knowles DM. High levels of p53 protein do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. Am J Pathol 1993; 143: 845-856.
16. Matsushima AY, Cesarman E, Cadburn A, Knowles DM. Post-thymic T cell lymphomas frequently over-express p53 protein but infrequently exhibit p53 gene mutation. Am J Pathol 1994; 144: 573-584.
17. Wynford-Thomas, D. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? J Pathol 1993; 166: 329-330.
18. Tiemann F, Deppert W. Stabilization of the tumor suppressor p53 during cellular transformation by simian virus 40-influence of viral and cellular factors and biological consequences. J Virol 1994; 68: 2869-2878.
19. Inoue H, Kondoh, Sudiro TM, hakura A. Stability of p53 protein in rat cells transformed by various viral transforming genes. Virology 1992; 187: 343-347.
20. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Parakeve C, Markowitz S, Wilson JKV, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 1990; 50: 7717-7722.
21. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. Cell 1991; 64: 313-326.
22. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. Science 1991; 254: 1138-1146.
23. Shiao YH, Rugge M, Correa P. p53 Alteration in Gastric Precancerous Lesions. Am J Pathol 1994; 144: 511-517.
24. Fumio I, Masao O, Haruhiko N. p53 gene mutations in gastric and esophageal cancers. Gastroenterology 1992; 103: 892-896.
25. Renault B, Broek M, Fodde R. Base transitions are the most frequent genetic changes at p53 in gastric cancer. Cancer Res 1993; 53: 2614-2617.
26. Kim JH, Choi JJ. Comparison of p53 gene mutations in paired primary and metastatic gastric tumor tissues. J Kor Med Sci 1993; 8: 187-191.