

한국인 대장암에 있어서 전이관련 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 일반외과학교실, ¹미생물학교실
및 ²의과학연구소

배 옥 석 · 전 소 영² · 서 성 일¹

= Abstract =

Expression of Tumor Metastasis Related Genes in Korean Colorectal Cancers and Cell Lines

Ok Suk Bae, M.D., So Young Chun²
and Seong Il Suh, M.D.¹

Department of Surgery, ¹Microbiology and ²Institute for
Medical Science, Keimyung University, Taegu, Korea

We studied the expressions of E-cadherin, MMP-7 and CD44v in colorectal cancer and their corresponding normal mucosa using RT-PCR. From the 26 patients whom a comparative study of clinical and histopathological data is available, MMP-7 and CD44v were significantly enhanced in cancer and their metastatic tissues, compared with their normal mucosa. E-cadherin did not reveal any difference between cancer and normal mucosa. The relationship between these genes and colorectal cancer development can not be confirmed by this study, however CD44v and MMP-7 may be associated with metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer, CD44v, MMP-7, E-cadherin

서 론

대장암은 조기에 발견하면 근치할 수 있으나 대장암 발견 당시에 전이가 된 대장암의 근치는

책임저자 : 배옥석, 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 동산의료원 일반외과(우편번호: 700-310)
(Tel: 053-250-7308, Fax: 053-250-7322)

*본 논문의 요지는 1996년도 대한외과 추계학술대회 및 1997년 일본대장항문학회에서 발표되었음.

*본 연구는 1995년도 계명대학교 비자연구기금으로 이루어졌음.

기대하기 어렵다. 위종양과 달리 대장암은 대장내시경검사가 시간이 많이 소요될 뿐 아니라 검사로 인한 환자의 고통도 수반되므로 일반적인 정기검사가 이루어지지 않아 이미 대장암이 발견될 때에는 진행된 경우가 많다. 대장암은 종양부위의 철저한 제거와 주위 전이 임파선의 꽉청과 원이부전이의 적절한 치료와 동시에 수술 후 화학, 면역요법, 방사선치료 등으로 치료할 수는 있으나 근치를 기대하기는 어렵다. 종양의 전이성을 예측하고 이를 제어할 수 있는 방법이 있다면 진행성 대장암 뿐 아니라 모든 종류의 고형종양을

근치시킬 수 있을 것이다.

암전이는 한가지 요소에 의하여 유발되는 것이 아니며 무엇이 대장암의 전이와 직접적인 관련이 있는지 모르고 있다. 암이 전이를 유발하려면 신체의 여러가지 방어 기전을 극복하고 암세포가 성장하기 좋은 조직에착상하므로써 전이가 이루어진다. 최근 발달된 분자생물학적 기법으로 암의 유전적 원인이 많이 밝혀지고 있을 뿐 아니라 진단, 예후측정에도 응용되고 있고 유전자 치료로까지 발전하고 있다. 대장암의 종양화에는 *k-ras*, *p53*, DCC 유전자 등의 변이가 관련이 있는 것으로 알려져 있고 전이과정에서는 *nm23* 유전자 등이 관련 있는 것으로 알려져 있으나 저자의 연구결과 *nm23* 유전자의 변이율과 진행성대장암과의 관계를 확인할 수 없었다.^{13,14)}

저자 등은 일반적인 암의 전이와 관련이 있는 것으로 알려진 세포 유착과 관련된 E-cadherin, 암세포가 주위조직으로의 침윤과정에 관련이 있는 것으로 추정되는 MMP-7, 최근에 암의 전이와 관련이 있는 lymphocyte homing receptor인 CD44 등의 유전자를 대상으로 이들 유전자들과 대장암과의 관계, 병기, 종양분화도와의 관계를 연구하여 대장암의 유전자치료, 종양전이 억제의 가능성, 종양 조기진단, 종양 침윤억제, 전이예측 판정지표 획득의 가능성을 연구하고자 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1) 각종조직 수집

계명대학교 의과대학 외과학교실에서 대장종양절제술과 임파선পার্কেট술을 시행한 26명의 대장암 환자로부터, 수술직후 종양조직상연에서 적어도 7 cm 이상 떨어진 곳에서 대장정상점막조직을 분리한 후 종양인접조직, 전이조직과 종양조직을 분리하였다. 위의 조직들을 분리후에 액체질소통에 보관하여 12시간 이내에 RNA를 분리하였다. 세포주는 4종류의 SNU 대장암세포주와

HT29 세포주를 본 실험에 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum, glutamine 및 HEPES가 함유된 RPMI 1640 배양액(Gibco)을 이용하여 실시하였다. 계대배양시 Trypan blue dye 추출방법으로 세포생존율을 산정하였고 생존세포수가 $6 \times 10^5/ml$ 되도록 배양하였다.

2) RNA 분리

세포주는 RNazolB 방법으로 추출하였다. RNazolB 방법에 따라 6 ± 10^7 세포주당 RNazolB 2 ml를 첨가하여 분리하였고 각종조직은 Chomzynski 및 Sacchi 방법에 따라 조직 약 300 mg을 guanidium isocyanate buffer와 혼합 후 ultraturax로 완전히 분쇄한 다음 phenol-chloroform-isoamylalcohol 혼합액을 첨가 후 얼음에서 15분간 둔후 원심분리하고 상층액을 추출하여 이 액에 동량의 isopropanol을 혼합한 후 -70°C 에서 10분 또는 -20°C 에서 1시간 방치한 후 원심침전하였다. 부유액을 조심스럽게 제거한 다음 남아있는 RNA pellet을 100% ethanol로 용해시킨 후 원침시키고 70% ethanol로 재용해시킨 다음 speed-vac에서 건조시키고 RNA의 순도를 UV spectrometer로 측정한 후 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되게 DEPC water에 용해시킨 다음 -20°C 에 보관하였다.

3) 역전사 중합효소 반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 및 E-cadherin, MMP-7, CD44s, CD44v의 Oligonucleotide primers

Perkin Elmer Cetus사의 kit 사용법에 따라 각 조직의 RNA 2 μg , 10×PCRbufferII, MgCl₂, RNase inhibitor에 CD44, MMP-7, E-cadherin의 downstream primer를 혼합하여 실온에서 10분, 42°C에서 60분 두어 cDNA를 합성한 후 99°C에서 5분, 5°C에서 5분간 두어 역전사반응을 정지시켰다. 생성된 cDNA를 사용하여 10×PCRbufferII, MgCl₂, AmpliTaq DNA polymerase에 각 유전자의 upstream primer를 혼합한 후 95°C에서 1분, 55°C에

서 1분 그리고 72°C에서 1분으로 35회 PCR 반응으로 증폭시켰다. 각각의 유전자를 검색하기 위한 primer는 Table 1과 같다.

4) 전이유전자 발현유무 조사방법

대장암조직 및 대장암 세포주에서 MMP-7, E-cadherin 및 CD44 변이형 등의 전이 관련 유전자의 발현 유무를 연구하기 위하여, CD44의 변이형의 발현유무는 Suh등⁷⁾의 방법에 의하여 실시하였으며 E-cadherin 및 MMP-7의 발현은 반정량적 RT-PCR법을 이용하여 이들 유전자의 발현 유무 그리고 정도를 조사하였다. 반정량적 RT-PCR을 이용한 MMP-7 및 E-cadherin유전자 발현의 정량적 분석을 위해 PCR의 적정 cycle 수 및 적정 RNA 농도를 확인하였으며, HT-29 세포주로부터 RNA를 분리한 다음 oligo-dT(16 mer)를 이용하여 역전사시킨 후에 PCR cycle 수 및 역전사 시킨 RNA 농도를 달리하여 PCR 조건을 획득하였다.

5) RT-PCR 산물의 검색

(1) 전기영동에 의한 검색: 생성된 RT-PCR 산물 10 μl를 취하여 5% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 X-ray film에 -20°C에서 15시간 감

Table 1. Primers used in this study

Primer		Sequence (5'-3')	
GAPDH	S	CGTCTTCACCACCATGGAGA	
	AS	CGGCCATCACGCCACAGTTT	
E-cadherin	S	GTAACCGATCAGAAATGACAA	
	AS	CCACATTCTGTCACTGCTAC	
MMP7	S	AGATGTGGAGTGCCAGATGT	
	AS	TAGACTGCTACCATCCGTCC	
CD44s	S	GACACATATTGCTTCAATGCTTCAGC	
	AS	GATGCCAAGATGATCA	
CD44v	S	GCCATTCTGGAAT	
	AS	TTGATGAGCACTAGTGCTACAGCA	
		TCCTGCTTGATGACCTCGTCCCAT	

*S and AS represent sense and antisense primers, respectively.

광시킨 후 현상하였다. 현상된 film의 band는 Gel Documentation system(Bio-Rad lab.)으로 density를 측정하였다. Autoradiograph상 나타난 E-cadherin, MMP-7의 density를 각각 GAPDH의 density로 나누어 relative index(RI)를 구하였다(Fig. 3B).

6) 유전자발현과 종양병기와의 비교분석

각 전이유전자의 발현 양상과 종양의 분화도,

A

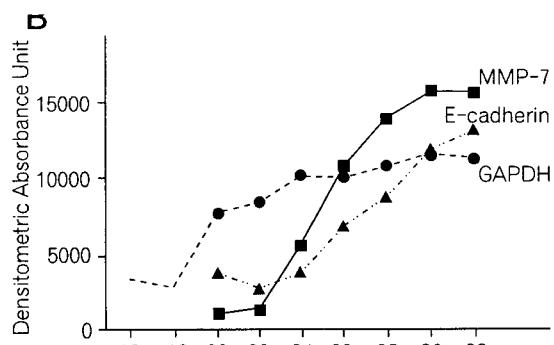
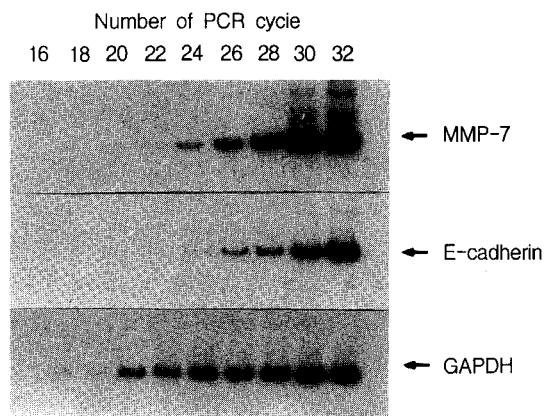


Fig. 1. Correlation between the number of PCR cycles and MMP-7, E-cadherin and GAPDH mRNA levels in HT-29 cell line. Total RNAs extracted from HT-29 were reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT. The PCR cycles examined were from 16 to 32. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed(A). The levels of amplification were correlated by densitometry(B).

병기를 비교분석하고 이 유전자들이 실제 환자의 임상에 적용할 가능성이 있는지를 분석하였다.

7) 통계적 분석

통계학적인 검증을 위하여 SAS program을 이용한 Chi-square 방법으로 $p < 0.05$ 이하의 유의수준으로 통계학적인 유의성을 검정하였다.

결 과

적정한 PCR cycle 수를 결정하기 위하여 역전사시킨 RNA 농도를 50 ng으로 하여 16~32 cycle의 PCR을 실시한 결과 GAPDH는 20~28 cycle, E-cadherin은 24~30 cycle, 그리고 MMP-7은 22~28 cycle에서 적정한 증폭비를 보여 GAPDH는 22 cycle 그리고 E-cadherin 및 MMP-7은 25 cycle로 결정하였다(Fig. 1). 이렇게 결정한 PCR cycle수가 역전사시킨 RNA 농도에 비례하여 RT-PCR의 산물이 증가하는지를 확인한 결과 역전사시킨 RNA 농도 50 ng까지는 적정 증가비를 나타내었다. MMP-7 및 E-cadherin의 발현 정도를 알아보기 위하여 상기에서 결정한 PCR cycle 수 및 역전사시킨 RNA 농도를 이용하여 반정량적 RT-PCR을 실시하고 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였으며 autoradiography를 실시한 후(Fig. 3A) 각 표본조직의 MMP-7 및 E-cadherin의 RT-PCR 산물의 농도를 gel documentation system을 이용하여 측정한 다음 각각의 GAPDH의 농도값으로 나눈 결과(Fig. 3B), MMP-7 및 E-cadherin 발현은 정상조직에 비해 대장암조직 및 대장암 주변조직에서 증가된 양상을 보였다. MMP-7은 17예의 정상조직에서는 1예(6%), 대장암조직에서는 17예 중 13예(76%), 대장암 주변 조직 10예 중 4예(40%), 그리고 전이암조직 6예 중 4예(67%)에서 발현을 볼 수 있었으며 발현의 정도는 정상에 비해 대장암에서 유의하게 증가($p=0.001$)됨을 보여(Table 2), MMP-7은 주로 암조직 및 전이암조직에서 발현이 이루어 질을 알 수 있어 암지표유전자로 사용될 수 있을 가능성이 있음을 시사하고 있다.

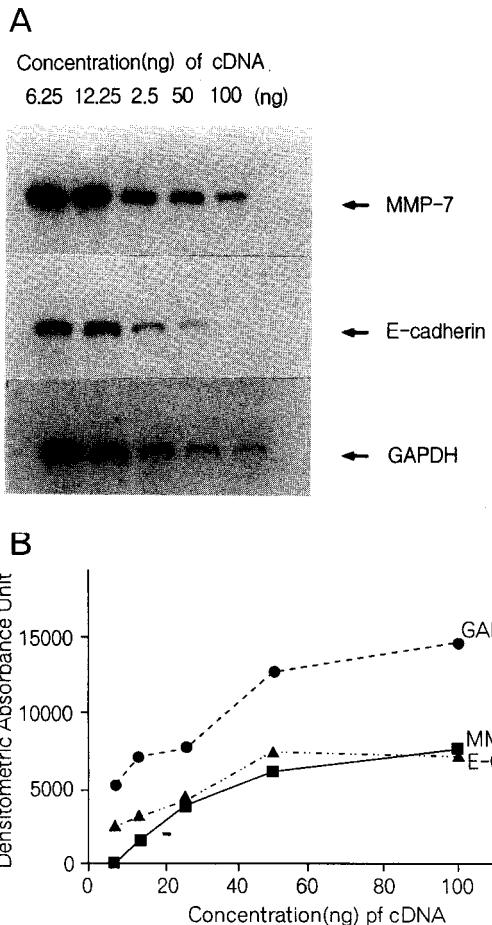


Fig. 2. Correlation between the amounts of total RNAs and the amplified MMP-7, E-cadherin and GAPDH cDNAs. Total RNAs (100, 50, 25, 12.5 and 6.25ng) extracted from HT-29 cells were reversed transcribed into cDNAs by using oligo-DT. The resulting cDNAs were further amplified by PCR (22 cycles for GAPDH, 25 cycles for E-cadherin and 25 cycles for MMP-7). PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and auto-radiographed(A). The levels of amplification were correlated by densitometry(B).

E-cadherin은 17예의 정상조직에서는 4예(23%), 대장암조직에서는 17예 중 8예(47%), 대장암 주변 조직 10예 중 5예(50%), 그리고 전이암조직 6

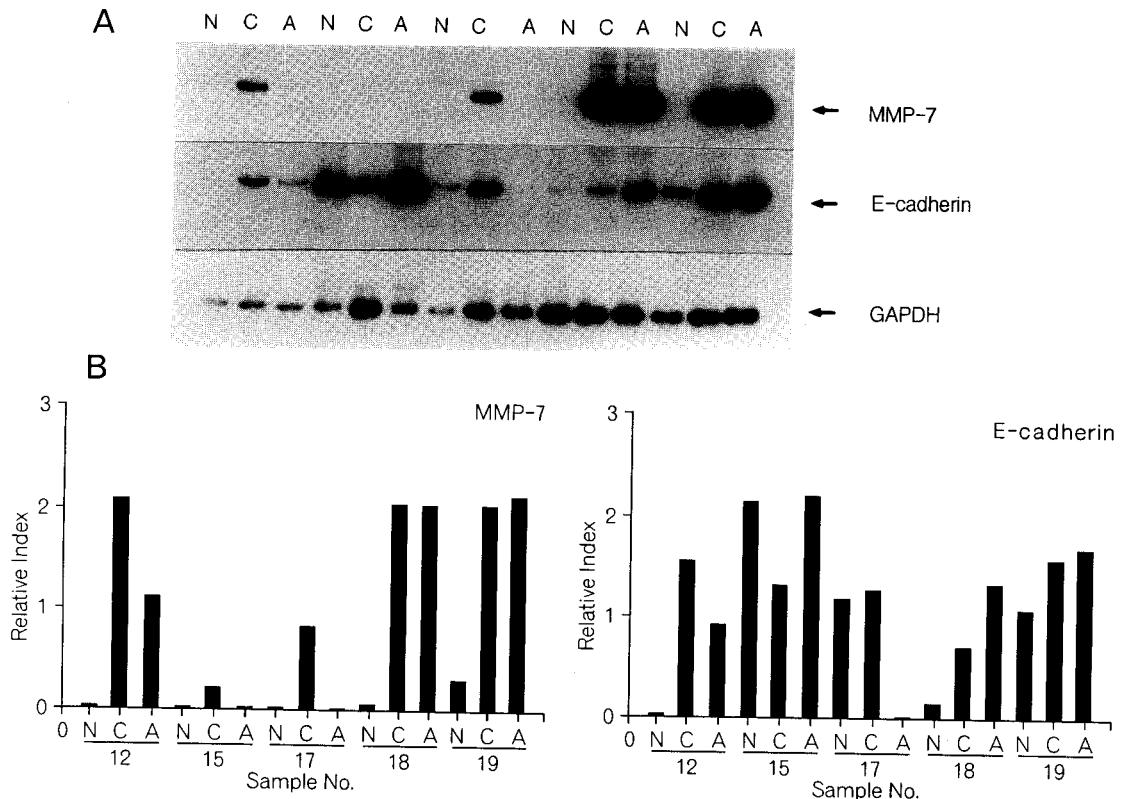


Fig. 3. Expression of MMP-7 and E-cadherin in colorectal cancer tissues(A). Total RNAs(50ng) were reverse transcribed into cDNA by using oligo-dT. PCR was carried out 22 cycles for GAPDH, 25 cycles for E-cadherin and 25 cycles for MMP-7. PCR products were electrophoresed on 6% polyacrylamide gel and then the gel was subjected to drying and autoradiographed(A). The levels of amplification were correlated by densitometry(B). The relative index defined arbitrarily the ratio of the densities (MMP-7/GAPDH or E-cadherin/GAPDH).

예 중 1예(17%)에서 발현을 볼 수 있었으며 발현의 정도는 MMP-7의 발현정도와 유사하게 주로 암조직에서 발현이 증가되어 있지만(Table 2) 유의성이 없어 암지표 유전자로 사용하기에는 부적합을 알 수 있었다. 대장암 조직에서 CD44 변이형의 발현 유무를 조사한 결과(Fig. 5 및 Table 2), CD44v의 발현은 26예의 정상조직에서는 5예(19%), 대장암조직에서는 26예 중 19예(73%)로 유의하게 발현이 증가되었다($p=0.001$). 대장암 주변 조직은 19예 중 7예(37%), 그리고 전이암조직은 6예 중 5예(83%)에서 발현을 볼 수 있었다. 대장암세포주(HT-29, SNU-C1, -C2A, -C4 및 -C5)에 있어서 CD44v를 조사한 결과(Fig. 6) 4종(80%)의

세포주(HT-29, SNU-C1, SNU-C2A 및 SNU-C5)에서 발현을 볼 수 있었다. 대장암세포주에 있어서 E-cadherin은 5종 세포주(100%) 전부에서 그리고 MMP-7은 3종(60%)의 세포주(HT-29, SNU-C1 및 SNU-C5)에서 발현을 나타내었다(Fig. 6).

고 칠

종양세포는 비정상적인 세포성장과 비정상적인 세포이동이 그 특징이며 세포의 종양화과정에는 Vogelstein 등¹¹⁾이 1988년도에 대장암의 종양화과정에 여러종류의 oncogene과 antioncogene의 연관성을 발표하였으나 종양전이에 대한 유전자변

Table 2. Clinical features and results of RT-PCR analysis against CD44S, CD44V, E-cadherin(E-cad) and MMP-7 in 26 colorectal cancer patients

Patient No.	Age/Sex	Location ¹⁾	Stage ²⁾	Tissue ³⁾	E-cad	MMP-7	CD44S	CD44V
1	45/F	C	C	N	NT ⁴⁾	NT	+	-
				C	NT	NT	+	+
				A	NT	NT	+	-
2	60/M	C	C	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	+	
				A	NT	+	+	
3	41/F	R	C	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	-	
				A	NT	+	+	
4	59/M	C	C	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	-	
				A	NT	+	-	
5	74/F	C	C	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	+	
				A	NT	+	-	
6	78/M	C	B	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	-	
				A	NT	+	-	
7	67/F	R	B	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	+	
				A	NT	+	-	
8	65/M	C	B	N	-	-	+	-
				C	+ (↑)	+ (↑)	+	+
				A	-	-	+	+
9	52/F	C	B	N	-	-	+	-
				C	+ (↑)	-	+	+
				A	+ (↑)	-	+	-
10	45/F	R	B	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	-	
				A	NT	+	-	
11	64/F	R	B	N	NT	NT	+	-
				C	NT	+	+	
				A	NT	+	+	
12	51/F	R	B	N	-	-	+	-
				C	+ (↑)	+ (↑)	+	+
				A	+ (↑)	+ (↑)	+	-
13	54/F	R	C	N	-	-	+	-
				C	-	-	+	
				A	-	-	+	
14	35/M	R	B	N	-	-	+	-
				C	-	+ (↑)	+	+
				A	-	-	+	-
15	48/F	C	C	N	+	-	+	+
				C	+ (↑)	+ (↑)	+	+
				A	+ (↑)	+ (↑)	+	+

Table 2. Continued

Patient No.	Age/Sex	Location ¹⁾	Stage ²⁾	Tissue ³⁾	E-cad	MMP-7	CD44S	CD44V
16	55/M	R	B	N	-	-	+	-
				C	-	+(↑)	+	+
				A	-	-	-	-
17	53/M	C	B	N	+	-	+	-
				C	+	+(↑)	+	+
				A	-	-	+	-
18	40/F	C	D	N	+	-	+	+
				C	+(↑)	+(↑)	+	+
				A	+(↑)	+(↑)	+	+
19	48/F	C	C	N	+	-	+	+
				C	+(↑)	+(↑)	+	+
				A	+(↑)	+(↑)	+	+
20	70/M	R	C	N	-	-	+	-
				C	-	-	+	+
				M	-	+(↑)	+	+
21	50/M	C	C	N	-	-	+	+
				C	-	-	+	+
				M	-	+(↑)	+	+
22	61/F	C	C	N	-	-	+	-
				C	-	+(↑)	+	+
				M	-	+(↑)	+	+
23	41/M	C	B	N	-	+	+	+
				C	-	+	+	-
				M	-	+(↑)	+	+
24	60/M	C	B	N	-	-	+	-
				C	-	+(↑)	+	-
				M	-	+(↑)	+	+
25	50/F	C	B	N	-	-	+	-
				C	-	-	+	+
				M	-	-	+	-
26	37/F	R	C	N	-	-	+	-
				C	+(↑)	+(↑)	+	+
				M	+(↑)	-	+	+

¹⁾C, colon; R, rectum, ²⁾stages are presented according to the Dukes'classification, ³⁾N, normal; C, cancer; A, cancer adjacent tissue; M, metastatic tissue, ⁴⁾NT, not tested; +, detected by RT-PCR; -, not detected by RT-PCR; (↑), increased expression of mRNA compared to normal control.

이는 밝혀내지 못했으며 nm23 유전자와 CD44 유전자 변이가 종양화와 전이에 관련된 기전은 아직 확실하지 않다. 유착요소, 효소, 성장인자, 면역세포 그외 분자구조물 등 다양한 조건들이 종양전이와 관련 있으며 종양전이는 크게 다음 3가지 단계로 이루어진다. 첫단계는 종양세포가

laminin이나 fibronectin 등과 같은 유착요소들에 의하여 기질에 유착되고 두번째 단계는 종양세포가 분비하는 가수분해효소(hydrolytic enzymes)에 의하여 기질분해가 일어나며 세번째 단계는 종양세포의 유주인자(motility factor)나 host chemotactic factor에 의하여 종양세포가 전이하는 것이다.

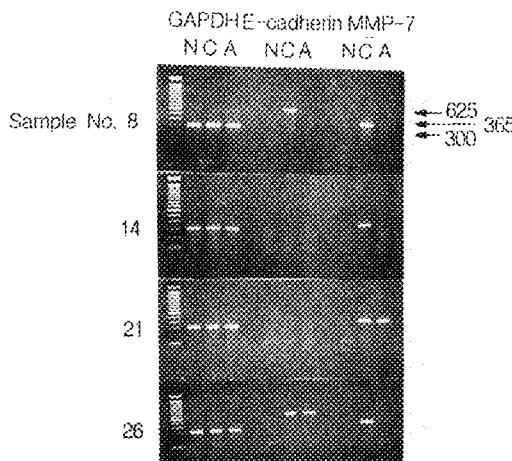


Fig. 4. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification products from normal colorectal mucosa(N), colorectal adenocarcinomas(C) and cancer adjacent tissues(A). The PCR products obtained with primers for GAPDH, E-cadherin and MMP7 were resolved on 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

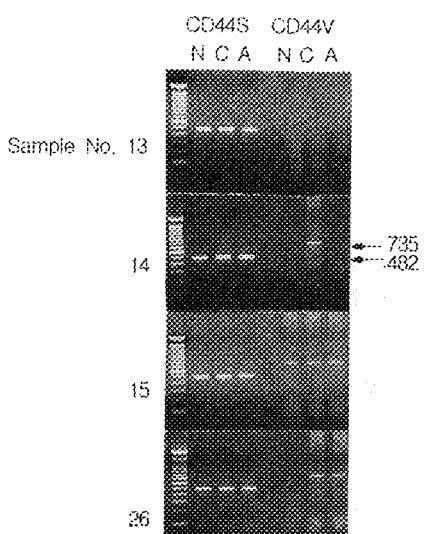


Fig. 5. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification products from normal colorectal mucosa(N), colorectal adenocarcinomas(C) and cancer adjacent tissues(A). The PCR products obtained with primers for CD44S and CD44V were resolved on 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

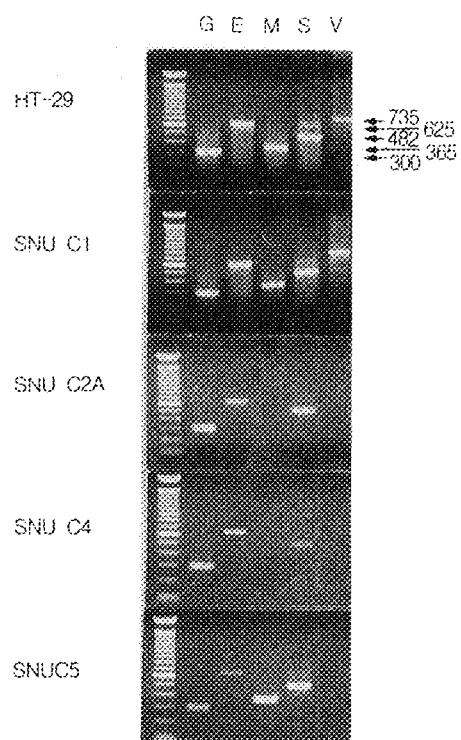


Fig. 6. Electrophoretic analysis of RT-PCR amplification products from HT-29 and SNU colorectal cancer cell lines. G, E, M, S and V represent GAPDH, E-cadherin, MMP-7, CD44S and CD44V respectively. The PCR products obtained with primers for GAPDH, E-cadherin, MMP-7, CD44S and CD44V were resolved on 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. PCR cycles of GAPDH, E-cadherin and MMP-7 were 22, 25 and 25, respectively.

CD44 유전자 산물은 glycoprotein의 일종으로서 lymphocyte homing receptor로 알려져 있다. 이 유전자는 20개 정도의 exon을 가지고 있고 이중 10개의 exon이 alternative splicing을 이루고 있으며 이 변이형이 종양화, 종양전이와 관련이 있는 것으로 알려져 있으므로 이 변이유전자 발현의 경색을 통해 종양표지자로서의 역할 가능성을 검색하기 위하여 저자들이 대장암 20례에서 이 CD44v의 발현율을 조사한 결과 이 유전자의 변이율을 90%로 보고한 바 있다.⁹ Matsunura, Tarin 등^{1,10}은

체액에서 CD44 유전자 산물을 검사하여 이 유전자가 종양 비침습적 조기진단과 종양세포의 전이 가능성에 대한 검사에 유용함을 시사하였다.

그러나 CD44v로 종양표지자로서 사용할 경우 문제점으로는 정상조직에서도 양성을 보이고 있다는 점이다. 본 연구에 의하면 진행성대장암에서는 73.0%의 양성을 보이는 CD44v 유전자는 정상조직에서도 19.2%의 양성을 보이고 있다. Gotley 등³⁾은 CD44v_{2~10}이 정상대장 crypt epithelium의 crypt base에서 발현됨을 보고하고 있고, Fox 등²⁾은 위장관계의 crypt epithelium에서 약한 발현을 보고하고 있고 다양한 정상조직에서도 CD44v이 발현됨을 보고했다. CD44v 발현의 변화는 여러 장기마다 지금까지의 결과가 일정하지 않다. Seelentag 등^{6,7)}은 인체피부종양의 CD44v 발현변화는 종양침습이나 전이와 관계가 없고 오히려 종양세포 분화도의 정도와 연관이 있는 것으로 보고하였고 간세포와 담도상피의 종양화는 CD44v 산물의 발현 변화와 관계있는 것으로 보고하였으며, Rodriguez 등⁵⁾은 CD44 exon10 variant의 발현이 대장암의 원이부전이와 관련이 있는 것으로 보고하였다. 이들 변이형의 발현으로 대장암의 원이부전이와 대장종양화간의 직접적인 관계를 확인하기는 어렵고 실제 환자의 대변에서 RNA를 추출하는 과정의 어려움 등을 고려하면 이 변이유전자의 종양표지자로서의 응용은 문제가 많은 것으로 사료될 수 있다. 그러나 종양조직에서의 발현율이 높은 것을 고려해볼 때 대장종양화와 전이과정 및 종양표지자로서의 응용성에 관한 연구는 변이형 각각의 exon 부위의 연구가 더 병행되어야 할것으로 사료된다.

종양세포가 대장점막에서 발생하여 대장의 장막을 침습하여 주위 임파선 또는 혈행으로 전이 되기 위해서는 기저막의 교원성조직과 세포외기질이 분해 또는 파괴되어 종양세포의 이동이 용이하게 되어야 종양세포의 침습이 가능하다. 세포외기질은 laminin, type4 collagen과 glycoprotein으로 이루어져 있으며 전이차단을 위한 방어총

역할을 한다. 종양이 진행될수록 기질성분의 분해에 의하여 혈청수치가 증가하므로 이들의 종양 진단 전이표지자로서의 역할도 가능하리라 생각된다. Yudoh 등¹²⁾은 뼈와 연부종양에서 laminin, type4 collagen과 type3 procollagen peptide의 혈중 농도가 전이가 없는 환자보다 전이가 있는 환자에서 현저히 증가된 것을 보고하였고 전이진단 탐지자로서의 유용가능성을 시사하였다.

Matrix metalloproteinase는 세포외기질을 용해시켜 종양침습과 종양전이를 조장시키고 metalloproteinase의 조직억제물질들은 세포외기질의 종양침습을 억제시키며 전이를 차단시키는 것으로 알려져 있다. 저자들은 본 실험에서 MMP-7 발현율이 정상대장조직보다 종양조직에서 통계적으로 유의하게 높아진 것을 확인하였다(Fig. 3). MMP-7 이외에도 MMP-2와 MMP-9은 위악성종양에서 임상병리적인 결과와 연관없이 환자의 예후와 관련이 있는 것으로 Sier 등⁸⁾은 보고하고 있다. 그러므로 이 유전자의 역할을 차단하거나 저해할 수 있으면 종양침습을 억제하여 원이부전이의 방지에 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

세포간의 연결을 유지시키므로써 종양침습 억제기능을 가지고 있는 E-cadherin의 발현감소는 역분화와 종양세포침습과 관련이 있는 것으로 알려져있다. E-cadherin 자체만으로 세포간의 유착을 유발하기보다는 E-cadherin-catenin-actin cytoskeleton 구조가 세포 유착을 일으키는 중요한 역할을 하며 이 구조는 인산화에 의하여 분해되어 질 수 있다. Becker 등¹⁾은 위암에서 exon 8번 또는 9번의 결손을 보고했으며 장형또는 혼합형보다 미만형의 위암에서 높은 변이율을 보고하며 이 유전자의 변이가 위암의 악화와 전이에 관련이 있는 것을 시사하고 있다. 그러나 저자들은 대장암에서 종양조직과 정상조직간의 E-cadherin의 현저한 발현차이를 확인할 수 없었다. 종양조직 절취시에 대장점막과 근층에서 주로 절취하였는데 이것과 CD44 발현이 관련있는지는 차후 대장 장막과 종양인접조직과 이 유전자와의 관계에 대한

연구를 통해 알아볼 필요가 있다고 사료된다.

CD44v가 Duke 병기 B, C, D, 대장의 다양한 위치에서 모두 발현되어 종양의 위치 분화도 병기에 따른 차이는 본 연구에서는 확인할 수 없으므로 이 CD44v 유전자와 종양표지자 사용가능성, 환자 예후와의 관계를 확인하기 위해서는 더 많은 임파선, 타장기조직과 대장암조직과의 연관성을 연구할 필요가 있고 또한 각종 CD44v exon 부위에 대한 집중적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

CD44v의 발현이 종양의 진행, 전이와 관련이 있는 것으로 생각되며 종양의 위치, 분화도와 Duke Stage에 따른 차이는 본 연구로서는 확인할 수 없었다. CD44 변이형 exon 부위와 종양조직에서의 발현과의 관계에 대한 연구는 계속 필요하리라 사료된다.

전이와의 연관성을 E-cadherin으로서는 확인할 수 없으나 MMP-7은 정상세포에서보다 종양세포에서 현저히 발현빈도가 많은 것으로 보아 대장의 종양화, 전이와의 연관성을 의심케 한다. CD44v, MMP-7의 발현과 종양재발에 의한 환자예후와의 관계유무에 대한 연구는 암의 조기진단 및 전이 예후판정에 도움을 줄 뿐 아니라 종양표지자로서의 역할에도 응용되리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, et al: *E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas*. *Cancer Res* 54: 3845, 1994
- 2) Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al: *Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms*. *Cancer Res* 54: 4539, 1994
- 3) Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, et al: *Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumor progression in colorectal cancer*. *Br J Cancer* 74: 342, 1996
- 4) Matsumura Y, Tarin D: *Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation*. *Lancet* 340(8827): 1053, 1992
- 5) Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, et al: *CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants*. *Int J Cancer* 64(5): 347, 1995
- 6) Seelentag WK, Flury R, Schmid M, et al: *Expression of CD44 isoforms in normal human liver and also in regenerative and neoplastic liver changes*. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79: 144, 1995
- 7) Seelentag WK, Gunthert U, Saremaslani P, et al: *CD44 standard and variant isoform expression in human epidermal skin tumors is not correlated with tumor aggressiveness but down-regulated during proliferation and tumor de-differentiation*. *Int J Cancer* 69(3): 218, 1996
- 8) Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S, et al: *Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma*. *Br J Cancer* 74: 413, 1996
- 9) Suh SI, Baek WK, Park JW, et al: *Identification of CD44 splice variant in korean colorectal cancers and cell lines*. *J Kor Med Sci* 10(3): 169, 1995
- 10) Tarin D, Matsumura Y: *Deranged activity of the CD 44 gene and other loci as biomarkers for progression to metastatic malignancy*. *J Cell Biochem* 17G: 173, 1993
- 11) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al: *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. *N Eng J Med* 319: 525, 1988
- 12) Yudoh K, Matsui H, Kanamori M, et al: *Serum levels of laminin, type4 collagen and type3 procollagen peptide as markers for detection of metastasis*. *Jpn J Cancer Res* 85: 1263, 1994
- 13) 배옥석: 결장 직장 악성종양 전이조직의 유전자특성. *대한장항문병학회지* 10: 387, 1994
- 14) 배옥석: 진행성대장암의 nm23유전자 이종접합성결손. *대한장항문병학회지* 10: 375, 1994