

한국인 산발적 진행성 대장암의 유전자변이

제명대학교 의과대학 일반외과학교실, 면역학교실*, 미생물학교실** 및 의과학연구소***

라중호 · 배옥식 · 김인숙*** · 전소영*** · 박종욱* · 최병길* · 서민호** · 서성일** · 박성대

Gene Mutations of Sporadic Advanced Colorectal Cancer in Korean Patients

Jung Ho Rha, M.D., Ok Suk Bae, M.D., In Sook Kim***, So Young Chun***,
Jong Wook Park, M.D., Byung Kil Choe, M.D., Min Ho Suh, M.D.,
Seong Il Suh, M.D., and Seong Dae Park, M.D.

Departments of Surgery, Immunology, Microbiology,***

*Keimyung University School of Medicine and Institute for Medical Science***, Taegu, Korea*

=Abstract=

To elucidate the molecular basis of advanced colorectal cancer in Korean patients, genetic alterations of *K-ras*, *p53*, and *nm23H1* genes in primary colorectal cancer tissues were studied. Eighty tumors and their adjacent mucosa were examined for mutations on *K-ras* codon 12 by the method of RFLP analysis, using specifically designed primers. *K-ras* codon 12 mutations were observed in 25%(20/80) of tumors examined. We have examined 30 cases of human colorectal cancers for the presence of *p53* gene mutations in exon 5, 7, and 8 of the *p53* gene by single strand conformation polymorphism(SSCP) and restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis. Surprisingly, mutation rate of *p53* gene was low in mutational hot spots. In addition, there were silent mutations in exon 8(codon 273).

To gain some information on the biologic progression of metastatic colorectal cancer, we have investigated *nm23H1* gene by slot blot, PCR-SSCP and PCR-RFLP methods. The 15% (3 of 20) of them exhibited suspicious mutation of *nm23H1* gene, whereas in 3 of the 10 colon neoplasms, the *nm23* expression was further increased in cancer tissues when compared with their adjacent mucosa. This study suggests different rate of gene mutation between Korea and western countries, therefore *p53* hot spots(codon 175, 248, 273) may not be useful for genetic diagnosis and gene therapy purposes. Further studies are needed to obtain information regarding the relationship between advanced colorectal tumors and their genetic behavior.

Key Words : Colon cancer, *K-ras*, *p53*, *nm23H1*

*본 논문은 라중호의 박사학위 논문임.

서론

대장암은 구미에서 발생빈도가 높지만 우리나라에서도 소화기암 중 위암, 간암 다음으로 발생빈도가 점차 증가하는 추세이다. 대장암의 발생원인은 크게 환경적 요인과 유전적요인으로 대별할 수 있으며 대장암은 대장상피세포에서 선종 종양단계에 의한 암화과정에 여러 유전자의 이상이 복합적으로 관련되어 있다는 사실이 잘 알려져 있다. 최근 유전자를 이용하여 종양의 진단과 치료, 종양예방에 응용하고자 하는 연구가 지속되고 있으며 특히 빠르고 정확하게 또 인체에 해를 주지 않으면서 대장암과 관련된 유전자를 응용하는 방법을 연구하는 것이 중요하다.

모든 염색체의 이상이 대장암과 관련이 있을수 있으나 특히 염색체 5, 17, 18번의 유전자 손실과 또한 protooncogene의 활성화가 대장암의 유전자변이에 관련이 있는 것으로 생각된다. Fearon & Vogelstein *et al*(1988)이 아래 표(Fig 1.)와 같은 대장암화의 유전자 모델을 제시하였으나 전이과정의 관련유전자는 밝혀지지 않았으며 nm23H1유전자에 의한 유방동 타장기에서 전이억제역할 및 환자예후예측에 대한 연구는 전전이 있었으나 대장암과의 관련유무는 아직 확실하지 않다.

대장암의 근치를 위해서는 조기진단에 의한 치료가 가장 효과적이나 조기진단을 위한 비침습적인 방법이 없고 지금까지 대장암의 검진방법인 임혈검사방법은 감수성이 낮고 대장조영술은 전 대장을 검사할 수 있는 장점은 있으나 진단율이 대장내시경보다는 감소된다.

대장내시경은 정확도는 높으나 검사시 불쾌감과 고통을 유발하고 난해한 기술적인 문제뿐 아니라 맹장부위까지 내시경으로 검사할 수 있는 성공률이 술자마다 차이가 있다. 이들 검사방법은 집단검진 방법으로는 각각의 방법마다 문제를 내포하고 있으므로 쉽고 간편하며 빠르게 대장암을 집단 검진하는 방법의 개발이 필요할 것이다. 이에 저자들은 대장암의 유전자 변이를 집단 검진 방법의 하나로 개발할 목적으로 첫째, 한국인환자에서의 대장암화 초기 중기 전이과정에 관련된 K-ras, p53, nm23H1 유전자변이의 근거 자료를 확인하고, 둘째 이들 유전자를 이용한 임상적응용의 가능성유무를 타진한 다음 차후 유전자를 이용한 진단 치료 방법의 개발을 목적으로 있다. 최근 유전자 검사방법에 의한 진단방법의 개발과 암의 치료를 위한 유전자 치료가 시도되고 있으나 고형종양에는 아직 적용되지 않고 있지만 차후 고형종양유전자치료도 가능하리라 사료된다. 지금까지 이들 유전자변이의 결과는 서양연구에 의존되어 있으며 독자적인 우리나라의 유전자변이율의 연구는 미흡한 가운데 있고 또한 이들 유전자변이의 임상적응용은 초기 단계이다. 따라서 한국인 진행성 대장암의 유전자 변이율을 확인하고 대장암의 유전자진단방법과 유전자치료에 응용될 수 있을 것으로 사료되는 K-ras, p53 유전자와 종양전이억제유전자로 연구되어지고 있는 nm23H1 유전자와 환자대장암조직과의 관계유무를 검색하여 대장직장암근치에 도움을 주고자 한다.

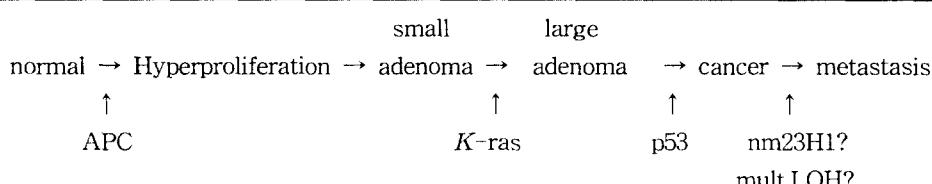


Fig. 1. Neoplastic progression in the colon : Adenoma to Carcinoma

재료 및 방법

각종조직에서 DNA와 RNA 추출

1994년 4월부터 1996년 12월까지 2년 6개월 동안 동산의료원 외과에서 수술한 결장직장암 환자 80례에서 수술직후 정상조직은 종양상연 10 cm 이상의 부위에서 점막을 채취하고 종양 조직은 암중심부의 암조직만 정확하게 채취한 후 일부는 병리조직학적 검사를 시행하고 일부는 액체질소탱크에 DNA, RNA추출을 위하여 보관하여 두었다.

1. DNA 추출

DNA 추출은 Blin and Stafford(1976)방법에
준하여 각종 조직에서 추출하였다.

조직 100mg당 1ml의 extraction buffer액을 첨가하여 ultraturax homogenizer로 약 15,000 rpm에서 얼음으로 차갑게 하면서 조직을 파쇄하였다. RNase와 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 첨가한 후 37°C에서 약 1시간동안 진탕한 후 proteinase K를 100 μ g/ml로 되어 첨가하고 동량의 phenol chloroform isoamyl alcohol을 혼합한 후 1분에 15-20번 회전시켜 30분간 제단백후 1000rpm에서 20분간 원심분리후에 2/10 vol 3M sodium acetate와 2vol ethanol로 DNA를

침전시킨 후 유리봉에 DNA를 부착시켜 70%, 95%, 95% ethanol에 각각 1-2분간 정제시킨 후 10mM Tris-1mM EDTA용액에 용해시킨 다음 재차 phenol-chloroform으로 제단백처리를 하였다. 다시 같은 방법으로 DNA를 침전시킨 후 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0 용액에 용해시킨 다음 ultraviolet spectrometer에 농도 순도를 측정한 후 4°C에 보관하였다.

2 RNA 추출

RNA 추출은 Chomczynski & Sacchi(1987)방법에 준하여 추출하였다.

RNA분리는 400mg 분량의 조직에 guanidium thiocyanate buffer를 4ml 넣고 ultraturax homogenizer로 15,000 rpm에서 얼음에 차갑게 하면서 조직을 분쇄시켰다. Phenol chloroform isoamylalcohol로 처리한 후 원심분리하여 상층액을 추출후 동량의 isopropanol을 첨가하여 1시간동안 -70°C에 위치한 후 4°C에서 15분간 원심분리하고 상층액을 버린 다음 RNA침사물에 75% ethanol 1ml를 첨가하여 세척하고 원심분리한 후 ethanol을 제거하고 실온에서 건조시킨 다음 DEPC(diethylpyrocarbonate) 500μl를 넣어 -20°C에서 보관하였다. 상온에서

21 GGAGCT codon12 78
 5' _____ GGAGC/C codon12 _____ 3'
 ↑

Fig. 2. DNA sequences of specifically designed oligonucleotide primers for *K-ras* codon 12 and its location in the *K-ras* gene.

The nucleotide substitution was made to generate *MspI* endonuclease site at the end of sense primer.

Arrow indicates substituted nucleotide.

용해시킨 후 농도를 측정한 다음 dry ice에서 냉각시키고 vacuum dry 시킨후 DEPCwater에 용해시킨 다음 -20°C에 보관하였다.

K-ras 변이검색

1. Primer 제작 및 검색방법.

K-ras codon 12번의 변이를 검색하기 위하여 sense primer의 마지막 부위를 Haliassos *et al*(1989)이 발표한 MspI 제한효소에 의해 절단이 가능한 변형된 primer를 한국생공회사

에 주문하여 사용하였다(Fig. 2). 95°C 1분 1 cycle, 95°C 90초, 56°C 90초, 74°C 90초, 74°C 5분, 40 cycles 방법으로 exon 1번 부위를 PCR로 증폭한 다음 MspI 제한효소로 37°C에서 3시간, 2시간 두번 절단하고 4% meta-phor gel에 전기영동하고 restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 관찰하였다.

2. 대변에서 DNA 검출

Ratto *et al*(1996)의 방법을 응용하였다.

대장직장암으로 진단된 환자에서 대변을 채

Exon 5 (codon 175)

5' GGATCCATCTGTTCACTTGTGCCCTG 3'
5' GAATTCAACCAGCCCTGTCGTCTCTC 3'

Exon 7 (codon 248)

5' GAATTCAGGGGTCAAGCGGAAGCAGA 3'
5' GGATCCAGGCGCACTGGCCTCATCTT 3'

Exon 8 (codon 273)

5' GGACCTGATTCCCTTACTGC 3'
5' TTTGGCTGGGAGAGGAGCT 3'

Exon 5 285bp (HhaI restriction enzyme site 13155, 13204, 13222)

12996	13204	13281
5' _____	GTGAGGCG/CTGCCCTC_____	3'
	codon 175	

Exon 7 218bp (HpaII restriction enzyme site 14069)

13960	14069	14178
5' _____	GCATGAAC/C G GAGG_____	3'
	codon 248	

Exon 8 315bp (MaeII restriction enzyme site 14485)

14402	14485	14717
5' _____	TTTGAGGTA/C G TGT_____	3'
	codon 273	

Fig. 3. Oligonucleotide primer pairs to amplify each exon in the p53 gene and its recognition sequences of restriction endonuclease.

취하여 -20°C 에 일시 보관하였다가 변 100mg 당 lysis buffer 300 μl 를 첨가후 가시에 여과시킨 다음 12,000rpm에서 2분간 원심분리하였다. Proteinase K를 45°C 에서 2시간 처리한 후 phenol chloroform isoamylalcohol을 처리하고 상층액을 추출한후 다시금 여과처리하고 proteinase K를 처리하였다. Ethanol로 DNA를 침전한 후 원심분리하여 상층액은 버리고 Tris-EDTA용액으로 녹인 다음 4°C 에 보관하였다.

p53변이검색

1. Polymerase Chain Reaction

Codon 175, 248, 273을 포함하는 각각의 primer를 제작한 후 reaction mixture로 종류수 67.5 μl , 10X reaction buffer 10 μl , dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 8 μl , AmpliTaq 0.5 μl , upstream primer 2 μl , downstream primer 2 μl 로 100 μl 를 혼합한 후 상층에 mineral oil을 덮은 후 DNA thermal cycler(Perkin Elmer Cetus)를 사용하여 DNA를 증폭시켰다.

2. PCR-RFLP

p53 변이가 호발하는 codon 175, 248, 273번의 변이를 검사하기 위하여 각 codon 부위에 적합한 제한효소를 선택하였다. Exon 5번부위를 95°C 3분 1 cycle, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분 30 cycles, 72°C 5분 1 cycle로 증폭하고 codon 175번은 HhaI 제한효소로 절단하였다. Exon 7번은 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분 30 cycles로 증폭 후 codon 248번은 HhaII 제한효소로 처리하였다. Exon 8번은 94°C 1분 60°C 1분 72°C 1분 30 cycles로 증폭 후 codon 273번은 MaeII 제한효소를 사용하여 PCR-RFLP로 검색하였다(Fig 4).

3. PCR-SSCP

PCR-SSCP는 Orita *et al*(1989)의 방법을 사용하였다.

Exon 5번부위는 PCR-RFLP와 같은 방법으로 생성된 PCR 산물 2 μl 에 98% formamide, 10mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.5% xylene cyanol용액을 10배 혼합한 후 혼합액 3 μl 를 85°C 에서 2분간 가열후 바로 얼음에 차

갑게 하고 10% glycerin을 함유한 6% polyacrylamide gel에 차게 하면서 30W, 6시간동안 전기영동하였고 exon 8, 9는 제한효소를 사용하지 않고 같은 방법으로 전기영동하고 gel을 전조시킨 후 autoradiography를 시행하였다.

nm23H1 유전자변이 검색

1. nm23H1 탐지자 제작

일본 나카사키대학에서 제공받은 nm23H1 c-DNA가 cloning된 recombinant DNA를 EcoR1과 BamH1으로 분리하고 전기영동하여 nm23H1 band부위를 절제 분리 후 gel에서 c-DNA를 추출하고 nick-translation 방법으로 $\alpha^{32}\text{P}$ 를 nm23H1유전자에 부착시켜 탐지자를 제작하였다.

2. nm23H1 RNA Slot blotting

Minifold II slot blot 장치(S & S, Germany)에 denaturation된 대장암과 정상대장점막조직의 RNA를 formamide로 denaturation 시킨후 4 μg , 2 μg , 1 μg 을 각각 주입 후 nitrocellulose filter에 blotting 시킨 후 데시케이트에 보관하여 두었다가 hybridization 용액을 넣고 42°C 에서 18시간 prehybridization을 실시한 후 $\alpha^{32}\text{P}$ 를 nm23H1 탐지자를 혼합하여 42°C 에서 24시간 hybridization을 실시하였다. Nitrocellulose filter를 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 세척 후 약 24시간동안 autoradiography를 실시하였다.

3. nm23H1 PCR-RFLP 및 PCR-SSCP

변이발생이 예상되는 부위 전후에 primer 부위를 선택한 후 한국생공회사에 의뢰하여 primer를 제작하였다. 95°C 1분, 42°C 1분, 72°C 2분, 35 cycles 방법으로 nm23H1 유전자 특정부위를 PCR로 증폭시킨 후 PCR-SSCP 방법과 PstI를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 변이를 검색하였다(Fig 4).

통계방법

K-ras 변이의 통계학적인 검증을 위하여 SAS system을 이용한 Chi-Square 방법으로 95%의 유의수준에서 통계학적 유의성 검증을 하였다.

from 277 to 474 bp(198bp)

- (A) 5' GTGAAATACATGCACTCA 3'
- (B) 5' GATCTCCTCTCTGCACT 3'

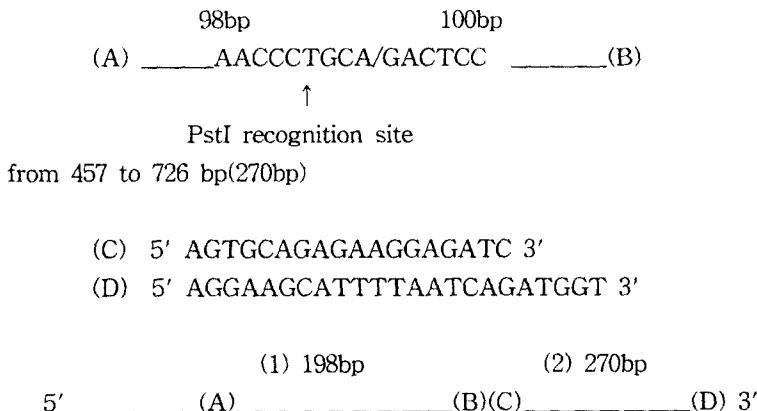


Fig. 4. DNA sequences of oligonucleotide for the nm23H1 gene.

DNA fragment corresponding to (1) 198bp was cut with PstI for RFLP analysis of the nm23H1 mutation.

DNA fragment corresponding to (2) 270bp was subjected to the SSCP analysis for the nm23H1 gene.

결과

대장암환자 조직에서의 K-ras유전자 변이

80명의 대장암환자에서 genomic DNA를 추출한 후 modified primer를 이용하여 codon 12번의 변이를 관찰하면 정상조직은 21bp, 78bp로 2개의 띠(band)를 형성하지만 변이조직은 99bp로 한 개의 띠로 확인되었다. 실험결과는 다음과 같다.

종양 및 전이조직은 20/80(25%), 정상대장조직은 2/37(5%)이었으며 병기별로는 Duke B 4/18(22%), Duke C 13/46(28%), Duke D 3/16(19%), 부위별로는 대장 14/59(24%) 직장 6/21(29%)이었다(Fig. 5).

종양조직이 정상대장점막조직보다도 통계학적으로 유의하게 발생빈도가 높은 것을 확인하였으나($p=0.012$) 종양분화도와 종양위치 Duke 병기에 따른 K-ras 유전자변이빈도와의

차이는 통계학적으로 유의하지 않음을 확인하였다($p>0.05$).

대장암환자의 대변에서의 유전자변이

환자대변 5례중 3례는 DNA를 분리하였으나 3례 모두에서 변이는 확인되지 않았다.

p53 유전자 변이

Codon 175번은 HhaI 제한효소로 절단시에 3부위에 절단이 일어나므로 정상조직은 4개의 띠가 나타나며 codon 248번은 HpaII로, 273번은 MaelII로 절단시에 각각 한군데 절단 되므로 정상조직은 2개의 띠를 형성하게 된다. Exon 5번부위는 일반적인 gel에서 전기영동하였으나 적은 크기의 띠를 확인하기가 난해하여 6% acrylamide gel에서 전기영동하였고 exon 7, 8번은 PCR-SSCP 방법을 시행한 결과 변이율은 exon 5번은 3/15(20%), codon 175는 0/15(0%), exon 7번은 5/15(33%),

codon 248은 5/30(17%), exon 8번은 SSCP로 변이를 확인할 수 없었으며, codon 273은 SSCP결과

와 같이 결과를 분석해 볼때 1/10(10%)이 변이가 발생된 것으로 추정되었다(Fig. 6, 7, 8, 9, 및 10).

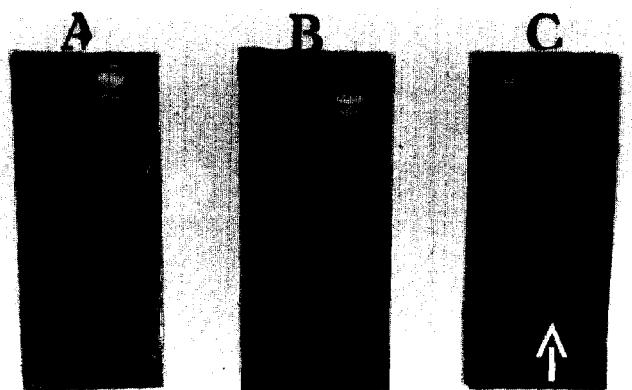


Fig. 5. Screening of colorectal cancer tissue for the mutation at *K-ras* codon 12.

One μg of genomic DNA prepared from normal mucosa tissues(N) and colorectal cancer tissues(T) was amplified using specifically designed primers.

The amplified product($10\mu\text{l}$) was digested with *Msp*I restriction endonuclease and electrophoresed on a 4% meta-phor gel.

Arrows indicate the observed mutations in tumor samples which was not affected by the *Msp*I restriction endonuclease.

A, B, C are independent experiments.

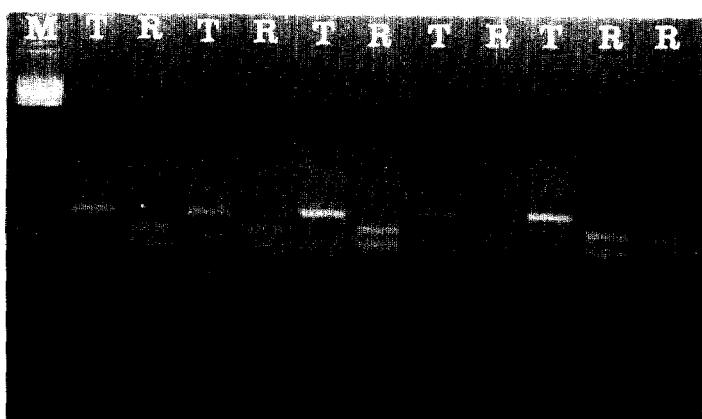


Fig. 6(A). Screening of colon cancers for mutant codon 175 of p53.

One μg of genomic DNA from colon cancer tissues and their colonic mucosa was amplified.

PCR product was digested with *Hha*I restriction endonuclease and electrophoresed on a agarose gel.

T, colon cancer R, digested PCR product of colon cancer.

M, 100base DNA ladder size marker.

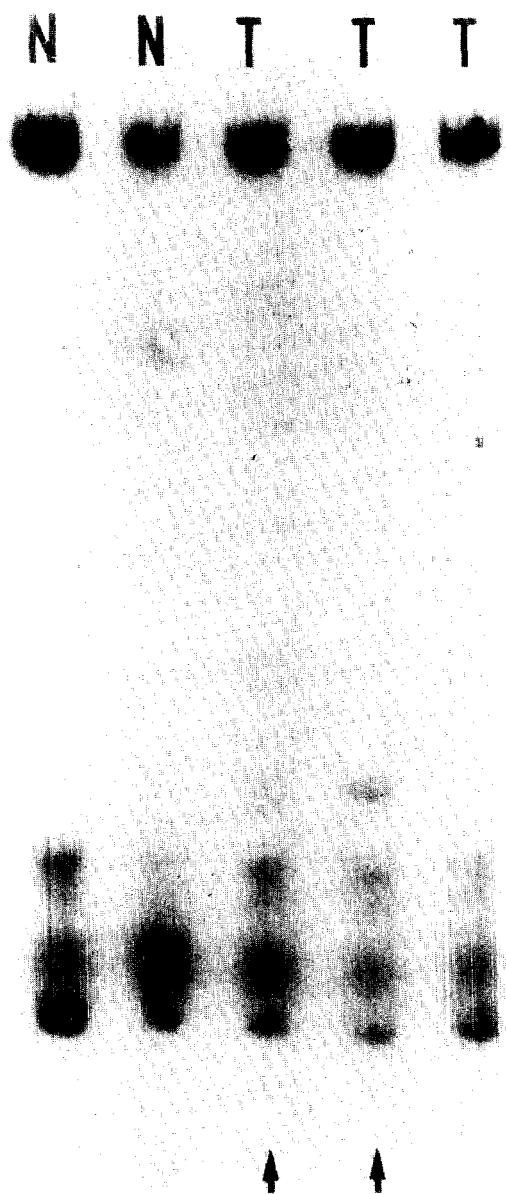


Fig. 6(B). Screening of colon cancers for mutant codon 175 of the p53.

One μ g of genomic DNA from colon cancer tissues and their colonic mucosa was amplified.

PCR product was digested with HhaI restriction endonuclease and electrophoresed on a 6% acrylamide gel.

N, normal colonic mucosa : T, colon cancer.

Arrow, mutation.



Fig. 7. Representative results of PCR-SSCP analysis of exon 7 of p53 gene in a patient with colorectal carcinoma.

PCR product was denatured and electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel at 4°C.

N, colonic mucosa : T, cancer.

Arrow, mutation.

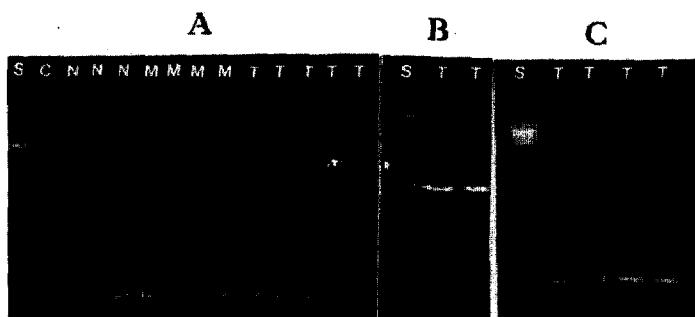


Fig. 8. Screening of colon cancers for the mutant codon 248 in the p53 gene.

One μ g of genomic DNA from colon cancer tissues and their adjacent mucosa was amplified.

PCR product was digested with HpaII restriction endonuclease and electrophoresed on an agarose gel.

A, B, C are independent experiments.

C, undigested PCR product of colon cancer.

N, colonic mucosa : M, metastatic lymph node : T, colon cancer.

S, 100bp DNA ladder size marker : Arrow, mutation.

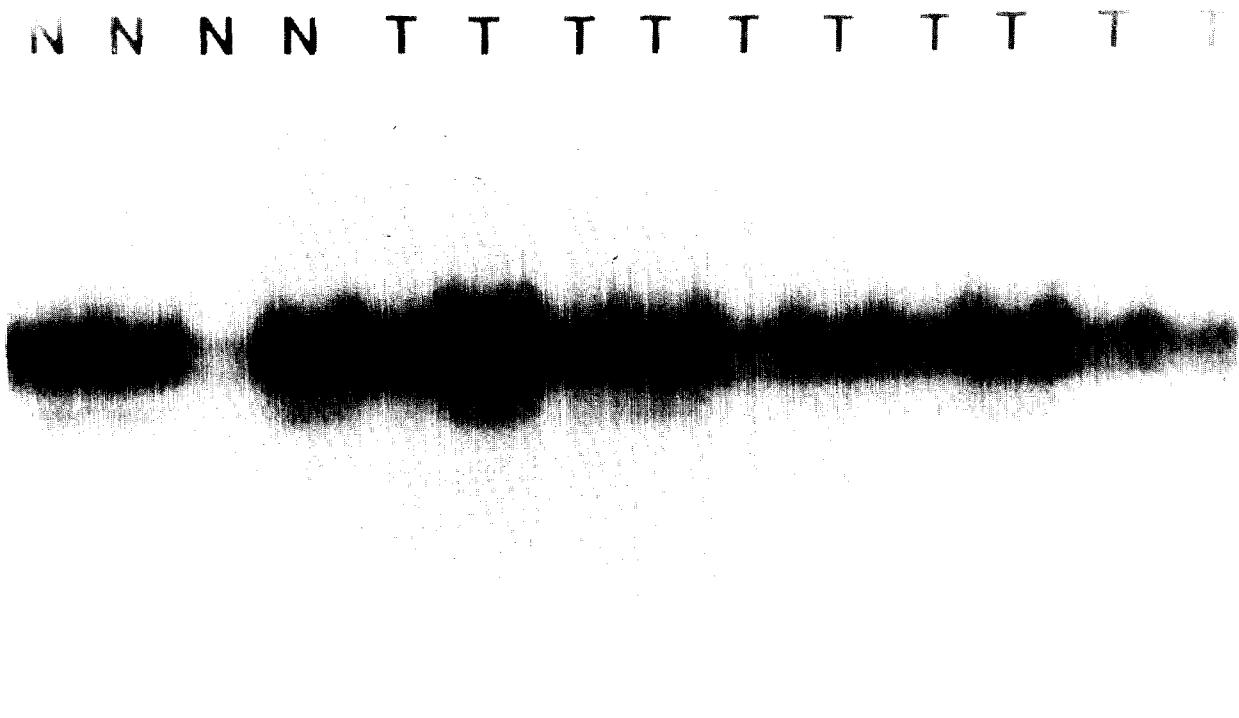


Fig. 9. Representative results of PCR-SSCP analysis of the exon 8 of the p53 gene in patients with colorectal carcinoma.

PCR product was denatured and electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel at 4°C.
N, colonic mucosa : T, cancer.

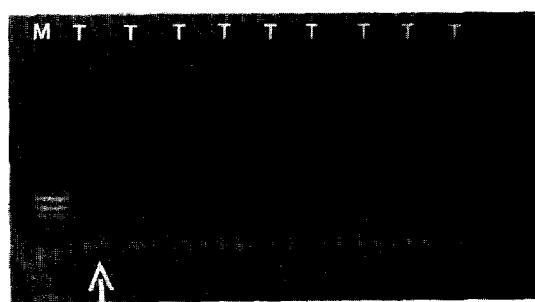


Fig. 10. Screening of colon cancer for the mutation at the codon 273 of the p53.

One μ g of genomic DNA from colon cancer tissues and their adjacent mucosa was amplified.

PCR product was digested with MaeII restriction endonuclease and electrophoresed on an agarose gel.

T, digested PCR product of colon cancer.

M, 100bp DNA ladder size marker : Arrow , mutation.

nm23H1 변이

PCR-SSCP 방법은 분절의 크기가 크면 변이 검색이 어려우므로 변이가 예상되는 부위를 2분절 198bp, 270bp로 나누어 전반부 base 277번에서 474bp까지 198base를 PstI으로 절단할 경우 단 한부위에서만 절단되므로 100bp 와 98bp로 2분절이 예상되고 후반부는 SSCP 방법으로 457bp에서 726bp까지는 PCR-SSCP

분석을 하였으며 $\alpha^{32}\text{P}$ 를 nm23H1유전자에 부착시켜 탐지자를 제작한 후 RNA slot blotting으로 대장암환자 20례를 대상으로 관찰하였다. nm23H1변이는 SSCP에서 3/20(15%)의 변이율을 확인하였고 PstI을 사용한 RFLP 방법에서는 2/20(10%)의 변이율을 보였으나 slot blot에서는 10례중 3례에서 오히려 종양조직에서 nm23H1의 발현이 증가되었다(Fig. 11, 12, 및 13).



Fig. 11. Screening of colon cancers for the mutant nm23H1 gene.

One μg of c-DNA from colon cancer tissues and their adjacent mucosa was amplified.

PCR product was digested with PstI restriction endonuclease and electrophoresed on a 2% agarose gel.

N, colonic mucosa : T, colon cancer

S, 100bp DNA ladder size marker : Arrow, mutation.

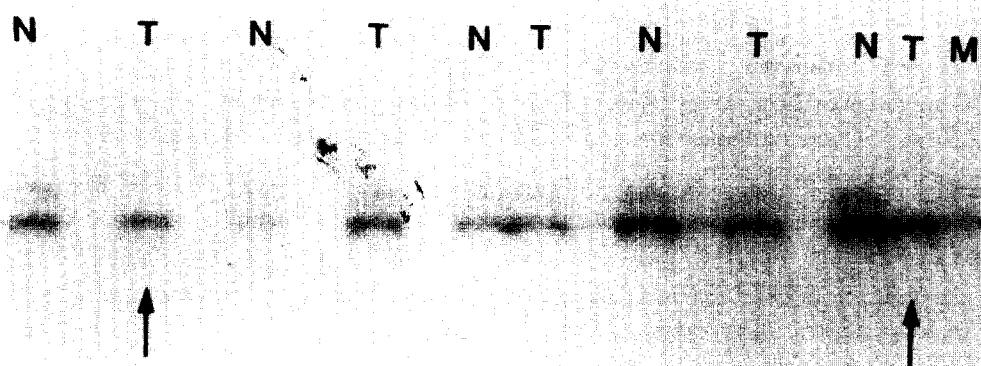


Fig. 12. Representative results of PCR-SSCP analysis of the nm23H1 gene in patients with colorectal carcinoma.

PCR product was denatured and electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel at 4°C.

N, colonic mucosa : T, cancer : M, metastatic tissue.

Arrow, mutation.

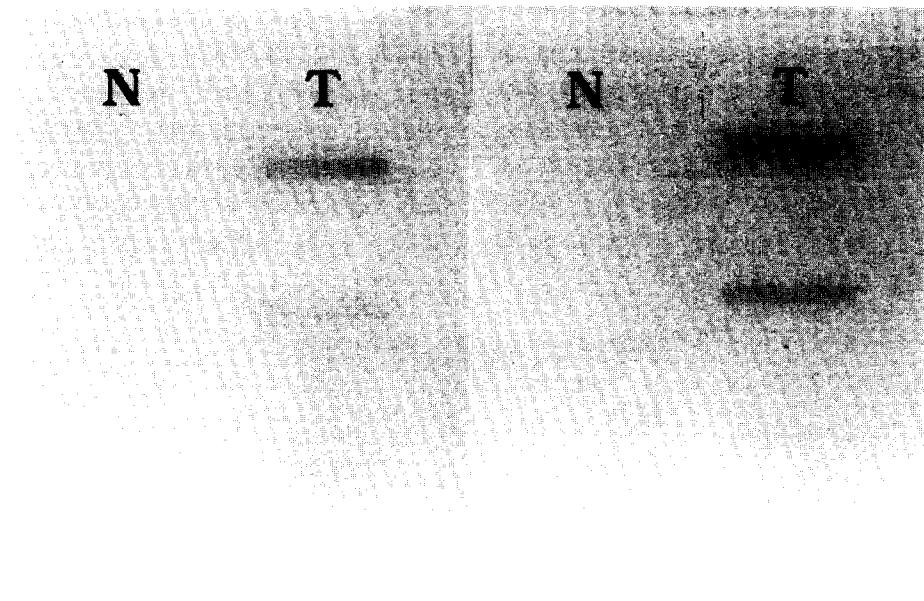


Fig. 13. Slot blot analysis of total RNA from colon cancer tissues and their adjacent colonic mucosa probed with $\alpha^{32}\text{P}$ d-CTP labelled nm23H1 gene.

The nm23H1 expression was further increased in cancer tissues when compared with their adjacent mucosa.

N, colonic mucosa : T, tumor.

고 칠

*K-ras*는 12p에 위치해 있으며 이 *K-ras* 변이는 대장선종에서 악성종양으로 진행되는 단계에서 발생하며 Vogelstein *et al*(1988)은 1 cm 이상의 선종에서는 58%, 1 cm 이하의 선종은 9%, 암종은 47%의 변이율을 보고하였다. Codon 12, 13, 61번 부위에 호발하지만 그중에서도 12번의 변이빈도가 가장 많다. Codon 12번의 변이를 이용하여 대장암의 조기진단에 응용하고자 대변에서 DNA를 채취하여 *K-ras* 변이 유전자를 검출하기 위한 방법으로 변이 가능성 있는 모든 변형 primer를 사용하여 PCR 방법으로 검사하거나 방사능을 사용하여 하이브리드형성(hybridization)방법으로 암의 조기진단을 시도해 왔으나, 이 방법들은 검사과정이 복잡하여 임상에 응용하기에는 문제점이 많으므로 저자들은 방사능물질사용이 필요하지 않고 단 1쌍의 변형된 primer를 이용하여 *K-ras* 변이를 확인하는 변이검색을 시도하였

다. 이 방법에 의하면 정상조직은 21bp와 78bp로 2개의 띠(band)를 형성하며 변이조직은 99bp로 한 개의 띠를 확인하므로 빠르고 안전하며 간단하게 대장암을 확인할 수 있었다 (Fig 5).

저자들은 이 방법으로 종양조직이 80예 중 20예(25%)로 정상대장점막조직보다도 유의하게 변이가 높은 것을 확인하였다($p=0.012$). Laurent-Puig *et al*(1991)은 선종잔유물을 가진 고분화점액성암에서 변이 발생빈도가 가장 높다고 보고했으나 저자들은 종양분화도, 종양위치, Duke 병기에 따른 *K-ras* 유전자변이빈도와의 차이는 통계학적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다($p>0.05$).

*K-ras*에 의한 검사방법의 문제점은 변이율이 예상보다 상당히 낮고 대변에서의 DNA 검출의 난해한 기술적인 문제점에 있다. *K-ras*를 이용하여 대변에서의 암조기검진 방법은 비침습적이고 방사능을 사용하지 않으므로 안전하고 빠른 시간내에 검사할 수 있는 장점은

있으나 기술적인 문제에서 어려움이 많은 것으로 생각된다. Sidranski *et al*(1992)과 Ratto *et al*(1996)은 대변에서의 *K-ras* codon 12의 변이는 25례중 10례(40%)를 보고하였으나 codon 13번의 변이는 1례도 없음을 보고하였다. Takeda *et al*(1993)은 mutant-allele specific amplification(MASA)방법에 의해 변이를 검색하여 변이검색율이 높은 것을 보고했고 Losi *et al*(1992)은 codon 12, 13번의 변이를 방사능을 사용하지 않고 PCR을 이용하여 검색하기 위하여 primer를 9종류 만들어서 실험한 결과 71%의 높은 변이율을 발표했고, 박우찬등(1993)은 paired PCR, double PCR 방법으로 70%의 codon 12번 변이율을 관찰하였다. 그러나 이 방법들은 다양한 primer의 제작이 필요하고 시간이 많이 소요되어 집단검진방법으로는 부적합하여 임상에 응용하기는 부적절한 것으로 생각된다. 차후 다양한 변형 primer를 이용하여 대변에서 *K-ras* 변이를 특이성과 감수성이 높은 검사방법의 개발로 검색율을 높이는 방법의 연구가 대장암의 조기진단에 도움을 주리라 사료된다.

p53 유전자는 염색체 17p에 위치해 있는 종양억제유전자로 대장암화과정에는 후기에 연관성이 있고 다양한 장기의 종양화와 관련되어 있다(Takahashi *et al*, 1989; Oda *et al*, 1992; Yoshimoto *et al*, 1992; Campbell *et al*, 1993). Nigro *et al*(1989)은 다양한 장기에 이 유전자의 변이발생을 보고했을 뿐 아니라 변이 호발 codon부위를 발표했고 Baker *et al*(1990)은 p53의 변이가 호발되는 부위로서 codon 132-145, codon 171-179, codon 239-248, codon 272-286 부위들을 보고 했으며 이 부위의 변이가 대장종양화에 중요한 역할을 하는 것을 발표했다. 저자들은 변이가 가장 호발하는 부위 codon 175, 248, 273번의 대장암조직 변이율을 확인하고 이를 변이호발부위와 대장암의 진단 치료를 위한 특정 부위의 관계 가능성을 확인하기 위한 검색을 시도하였다. Codon 175 번은 HhaI 제한효소로 절단시에 3부위에 절단이 일어나므로 정상조직은 4개의 띠가 나타나며 일반적인 겔에서 전기영동하였으나 적은

크기의 띠를 확인하기가 난해하여 6% acrylamide gel에서 전기영동하였다. Codon 248, 273번은 한군데 절단 되므로 정상조직은 2개의 띠를 형성하게 된다. 변이호발 부위뿐 아니라 각 exon 부위의 변이를 확인하기 위하여 SSCP 방법을 행한 결과 변이율은 exon 5번은 3/15 (20%), codon 175는 0/15(0%), exon 7번은 5/15(33%), codon 248은 5/30(17%), exon 8번은 확인되지 않았으며 codon 273은 1/10 (10%) 이었다. Coles *et al*(1992)은 유방암에서 이 유전자의 변이가 다양한 부위에서 발생하고 codon 175, 194, 273, 280 부위에서 약 25%의 변이가 발생하는 것을 보고하였지만 확실한 호발부위가 없는 것을 보고하였다. 그러므로 저자들의 실험결과와 같이 분석해볼 때 p53의 유전자변이가 다양한 부위의 codon에서 일어나는 것으로 추정할 수 있으며 지금까지 보고되어 온 변이보다 호발부위의 변이율이 낮으므로 대장암 진단방법이나 유전자치료목적으로 이 codon부위들을 사용하기는 어려울 것으로 사료된다. Poller *et al*(1997)은 p53발현이 환자의 예후측정에는 도움을 주지 못한다고 보고하였으나 p53를 이용하여 환자의 예후 종양재발을 측정하기 위하여 상당한 연구가 필요하리라 생각되며 wild형 p53를 이용한 유전자치료의 가능성을 연구하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

nm23 유전자는 전이억제유전자로 Igawa *et al*(1994)은 전립선암에서 진행성종양에서 발현율이 높고 세포증식과 이 유전자의 발현과의 관계를 발표했으며 Wang *et al*(1993)은 대장암에서 변이율 50%를 보고했고 Haut *et al*(1991)은 이 유전자가 정상대장점막에도 발현되나 대장암초기에 발현이 증가되며 전이성 대장암에서 발현이 더욱 증가 되는 것을 보고하고 대장암의 전이억제가능성과의 관련유무가 없는 것으로 보고하였으며 배옥석등(1994)은 환자의 대장암조직에서 nm23H1유전자 이종접합성결손(loss of heterozygosity)을 1/13 (8%)로 보고했고 본 연구에서 변이율이 10%로 대장암에서 변이율이 낮은 것을 관찰하였다.

그러므로 이 유전자와 대장암과의 관계는

그 기전이 명확하지 않는 것으로 사료된다. Kantor *et al*(1993)은 유방암세포가 이 유전자의 발현으로 운동능력감소를 유발되는 것을 보고했으나 이 유전자의 발현이 흑색종 유방 종양전이 억제에 관련이 있는 것으로 보고되고 있고 환자의 예후와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Bevilacqua *et al*, 1989; Hennessy *et al*, 1991; Leone *et al*, 1991). 대장암에서 이 유전자의 관련유무를 확인하기 위하여 SSCP 방법은 분절의 크기가 크면 변이 검색이 어려우므로 변이가 예상되는 부위를 2분절 198bp, 270bp로 나누어 전반부는 PstI으로 절단하여 RFLP방법으로 후반부는 SSCP방법으로 실험하였다. Base 277번에서 474번까지 198base를 PstI으로 절단할 경우 단 한부위에서만 절단되므로 100bp와 98bp로 2분절이 예상된다(Fig 11). 20례중 2례에서만 분절이 일어나지 않아 이 부위의 변이가 의심이 되었으며 457bp에서 726bp까지는 PCR-SSCP 분석을 하여 20례중 3례(15%)에서 변이가 의심이 되었다. Slot blot에서는 종양조직에서 오히려 발현이 증가되어 대장암에서 이 유전자의 종양화와 전이억제 역할을 확인할 수 없었다. nm23H1 유전자가 종양세포에 미치는 영향의 검색을 위하여서 차후 이 유전자산물등의 기능에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되며 p53유전자는 면역조직화학검사 방법에 의한 재발예후인자의 검색방법과 정상 p53 유전자를 이용한 유전자치료의 개발이 바람직할 것으로 사료된다. p53을 임상에 응용하기 위하여 p53과 세포분화, 세포자연사, 세포주기, p53변이에 영향을 주는 유전자등과의 관계에 대한 연구가 필요하고 nm23H1 유전자의 변이율이 낮아 이 유전자의 대장종양전이억제 역할은 확인되지 않았으므로 차후 이 유전자의 기능과 점변이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

한국인 진행성대장암의 분자생물학적인 원인을 규명하기 위하여 대장암화와 관련된 유전

자종 선종에서 악성종양으로 이행되는 단계의 K-ras유전자와 종양억제유전자로 알려진 p53와 전이억제유전자인 nm23H1유전자와 대장암과의 관계를 확인하고 이들 유전자의 변이가 임상적 응용의 지표인자로서 사용될 가능성유무에 대한 연구를 하였다.

K-ras codon 12번의 변이를 확인하기 위하여 sense primer를 변형시킨 후 PCR-RFLP방법으로 변이율을 관찰한 결과 K-ras유전자의 종양에서의 변이율은 20/80(25%)이었으며 종양 병기와 종양위치에 따른 차이는 확인하지 못했고 환자대변 5례중 3례에서 DNA는 분리하였으나 변이는 검출되지 않았다. p53 exon 5, 7, 8번은 PCR-RFLP, PCR-SSCP방법으로 연구하여 exon 5번은 3/15 (20%), p53 codon 175는 0/15(0%), exon 7은 5/15(33%), codon 248은 5/30(17%), exon 8번은 확인이 되지 않았으며 codon 273은 1/10(10%)이 변이가 발생한 것으로 추정되었다. 서구의 변이호발부위의 변이율보다 낮은 변이율을 보였으며 특히 codon 273번의 변이율이 현저히 낮았다.

진행성 대장암의 종양진행과 전이에 대한 유전자와의 관계를 연구하기 위하여 nm23H1유전자의 변이를 PCR-SSCP, PCR-RFLP방법으로 관찰하여 3/20(15%)의 변이율을 관찰하였으며 slot blot한 결과 이 유전자의 발현이 3/10 (30%)에서 대장정상점막조직보다도 종양조직에서 발현이 증가되었다. 본 연구의 결과로 한국인과 서양인의 대장암관련 유전자의 변이율은 차이가 있는 것으로 사료되며 유전자진단과 치료목적으로서 p53 codon 175, 248, 273번을 이용하는 것은 바람직하지 않을 것으로 생각되고 대장암 근치를 위하여 진행성대장암과 이들 유전자와의 관계에 대한 연구가 계속 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

박우찬, 전해명, 장석균, 주상용:인체 대장직장암에서 쌍-중합효소 연쇄반응 및 전기영동법에 의한 K-ras 암유전자 codon 12의 점돌연변이. 대한외과학회지 1993;44(1):1-9.

- 배옥석:진행성 대장암의 nm23유전자 이종접합 성결손. 대한대장항문병학회지 1994;10(4): 375-377.
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et al:p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990;50:7717-7722.
- Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS:Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989;49: 5185-5190.
- Blin N, Stafford DM:A general methods for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976 ;3:2303-2308.
- Campbell C, Quinn AG, Ro YS et al:p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *J Invest Dermatol* 1993;100:746-748.
- Chomczynski P, Sacchi N:Single step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
- Coles C, Condie A, Chetty U, Stel M, Evans J, Prosser J:p53 mutations in breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:5291-5298.
- Fearon ER, Vogelstein B:A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- Haliassos A, Chomel JC, Tesson L et al: Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res* 1989;17(9):3606.
- Haut M, Steeg PS, Willson JKV, Markowitz SD:Induction of nm23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:712-716.
- Hennessy C, Henry JA, May FEB, Westley BR, Angus B, Lennard TWJ:Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer : An association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:281-285.
- Igawa M, Rukstalis DB, Tanabe T, Chodak GW:High levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54: 1313-1318.
- Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR:Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res* 1993;53:1971-1973.
- Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O et al:Association of K-ras mutation with differentiation and tumor formation pathways in colorectal carcinoma. *Int J cancer* 1991; 49:220-223.
- Leone A, Flatow U, King CR et al:Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991;65: 25-35.
- Losi L, Benhattar J, Costa J:Stability of K-ras Mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1992;28A(6/7):1115-1120.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al:Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342:705-708.
- Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M, Hirohashi S:p53 mutation spectrum in hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 1992 ;52:6358-6364.
- Orita M, Suzuki Y, Hayashi K:Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase

- chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-879.
- Poller DN, Baxter KJ, Shepherd NA:p53 and Rb1 protein expression : Are they prognostically useful in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1997;75(1):87-93.
- Ratto C, Flamini G, Sofo L *et al*:Detection of oncogene mutation from neoplastic colonic cells exfoliated in feces. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1238-1244
- Sidranski D, Tokino T, Hamilton SR *et al*:Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256:102-105.
- Takahashi T, Nau MM, Chiva I *et al*:p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-494.
- Takeda S, Ichii S, Nakamura Y:Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele specific amplification. *Hum Mutat* 1993;2: 112-117.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR *et al*:Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
- Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S:Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 1993;53:717-720.
- Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Saito S, Itakura M:Role of p53 mutations in endocrine tumorigenesis : Mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Cancer Res* 1992;52:5061-5064.