

한국인 위암 세포주에서 세포주기 조절 유전자의 발현

계명대학교 의과대학 ¹일반외과학교실, ²미생물학교실, ³면역학교실
서남대학교 의과대학 ⁴미생물학교실, 부산 보훈병원 ⁵일반외과

임춘철^{1,5} · 김인호¹ · 조재위⁴ · 백원기² · 서성일²
서민호² · 박종욱³ · 강중신¹ · 손수상¹

Expression of Cell Cycle Control Genes in Korean Gastric Cancer Cell Lines

Chun Cheol Lim, M.D.^{1,5}, In Ho Kim, M.D.¹, Jae We Cho M.D.⁴
Won Ki Baek M.D.², Seong Il Suh, M.D.², Min Ho Suh, M.D.²
Jong Wook Park, M.D.³, Joong Shin Kang, M.D.¹
and Soo Sang Sohn, M.D.¹

Departments of ¹Surgery, ²Microbiology and ³Immunology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu; ⁴Department of Microbiology, Seonam University
School of Medicine, Namwon; ⁵Department of General Surgery,
Pusan Veterans Hospital, Pusan, Korea

Purpose: In order to elucidate the roles of the cell cycle control genes in the carcinogenesis of Korean gastric cancer, the expressions of cyclin A, D1, E, p16^{INK4a} and Rb in Korean gastric cancer cells were investigated in this study.

Materials and Methods: The expression patterns of major cell cycle control genes in Korean gastric cancer cells (SNU1, 5, 216, 484, 601, 620, 638, 668, 710) were analysed by using western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: In most of the gastric cancer cells investigated, the overexpressions of cyclin A and hyperphosphorylated Rb, and markedly decreased expression of p16^{INK4a} were observed. Overexpression of cyclin E was also observed in SNU1, 484, 601 and 638 gastric cancer cells.

Conclusion: Considering all these findings, the following model of the gastric carcinogenesis caused by the altered expressions of the cell cycle control genes can be postulated: overexpressions of cyclin A and E cause acceleration of Rb phosphorylation, inactivation of Rb functions and acceleration of G1/S transition of the cells; decreased expression of p16^{INK4a} causes inadequate inhibition of cyclin-CDK and further acceleration of Rb phosphorylation; consequently, Rb inactivation, G1 shortening, inappropriate cell division and decreased function of the maintenance of genomic stability occurs. All these abnormalities should contribute to the carcinogenesis of Korean gastric cancer cells.

Key Words: Stomach neoplasm, Cell cycle control genes

책임저자 : 손수상, 대구시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 일반외과학교실, 700-712

Tel: 053-250-7313, 781-4767, E-mail: sohnss@dsmc.or.kr

접수일 : 1999년 9월 20일, 게재승인일 : 2000년 3월 21일

서 론

위암은 우리나라에서 가장 많이 발생하는 매우 중요한 악성종양이며, 의학자들의 꾸준한 노력으로 인해 진단과 치료에 많은 발전이 이루어졌으나 아직도 해결해야 할 많은 문제점을 가지고 있다(1). 그 중에서도 특히 위암 발생기전에 대한 분자수준에서의 규명은 위암의 진단과 치료 및 예후 결정에 매우 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 기대된다(1~3).

암세포의 가장 중요한 특징 중의 하나는 조절되지 않는 과도한 세포분열이다. 세포가 분열을 하고자 하는 결정은 세포주기의 G1기 후반부를 지나면서 이루어지며, 그 이후에는 세포 외부로부터 오는 성장조절 신호에 관계없이 세포분열을 위한 자율적 프로그램이 수행되게 된다(4). 세포주기 수행의 근본적인 목적은 동일한 DNA를 S주기 동안 결함 없이 복제하여, 동일한 염색체 쌍을 M주기 동안 두 낭세포(daughter cell)로 각각 균등하게 배분하는 데 있다(5,6). G1주기 동안 세포는 세포 외부의 신호에 반응하여 분열을 하기 위한 세포주기를 진행하거나, 세포주기에서 빠져 나와 휴면상태(G0)로 들어가게 된다(4). G1주기 진행은 S, G2, M주기 이행과는 달리, 일반적으로 mitogen들의 자극에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있는데, 암세포의 경우에는 이러한 조절과는 상관없이 계속해서 세포주기를 진행시키는 경향이 있다. 현재까지 알려진 100종류 이상의 암유전자들과 항암유전자들의 신호전달 체계에서의 대부분의 작용은, 지속적인 mitogen 자극 효과와 유사하며, 이들의 신호전달 경로들은 G1주기 통과를 조절하는 기구에 집중되어있음이 밝혀졌다(4,7,8).

이와 같이 세포주기 조절과 암 발생과는 밀접한 관계가 있으며, 암세포에서 특이하게 변화를 보이는 세포주기 조절인자들의 발현분석이 이루어지면, 암 발생의 기전을 더욱 깊이 이해할 수 있고, 새로운 진단용 지표나 예후 판정 지표 개발에 도움을 줄 수 있으며, 암세포에만 선별적인 억

제효과를 나타낼 수 있는 새로운 항암 표적을 제시할 수 있을 것이다(3,6,9). 그러나 우리나라에서 큰 비중을 차지하고 있는 위암에 있어서의 세포주기 조절인자의 발현에 대한 종합적인 연구는 드문 실정이다.

이러한 지견을 바탕으로 이 연구에서는 한국인 위암세포에서 cyclin A, D1, E, p16^{INK4a} 및 Rb 등의 발현을 조사하여 위암 발생과 세포주기 조절인자들과의 상호관련성을 규명함으로써 한국인 위암 발생의 일부 기전을 이해하고자 이 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1) 세포주 및 배양조건

한국인 위암 세포주인 SNU1, 5, 216, 484, 601, 620, 638, 668, 719 및 한국인 대장암 세포주인 SNUC1은 서울대학교 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였으며, 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI-1640 배양액을 이용하여 36°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 정상 피부 섬유아 세포는 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine이 함유된 DMEM high glucose 배양액을 사용하여 36°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

2) 생존세포 수 계수

0.4% trypan blue 50 μ l에 세포 50 μ l를 넣고 섞은 후 hemocytometer에 접종하고 1분 후 세포수를 세어 생존세포 수를 계수하였으며, 두 개의 시료를 각각 계수 후 그 평균치를 취하였다.

3) 단백질 분리, 전기영동 및 Western blotting

각종 세포주기 조절단백질의 발현을 조사하기 위하여 배양된 세포들을 세포용해 완충액(10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA (pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2 M phenyl-methylsulfonyl fluoride, proteinase 억제혼합액을 넣고 얼음에서 30분간 둔 후 원심분리 하여 상층액을 취한 후 Biorad 제품의 단백질 정량 kit로 정량하였

다. 얻어진 단백질을 SDS-PAGE 전기영동하고 nitrocellulose 필터(Immobilon, Millipore 제품, Bedford, U.S.A.)로 전기이동을 시행하였다. 전기이동된 필터를 Blotto용액(5% 탈지분이 함유된 TBS-T 완충액)에 넣어 4°C에서 하루 밤 동안 shaking하였다. Blotto용액을 제거하고 일차항체용액(실온)에 2시간 두고 TBS-T 완충액으로 씻은 다음 이차항체용액(실온)에서 1시간 두었다. 이를 다시 TBS-T 완충액으로 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham 제품, Buckinghamshire, England) 시약으로 발광시키고 autoradiography를 실시한 후 densitometer를 이용하여 정량하였다. 일차항체들은 미국 Santa Cruz사(Santa Cruz, U.S.A.), Pharmingen사(San Diego, U.S.A.) 및 Oncogene Science사(Uniondale, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

4) RNA 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 RNA 정량

각종 세포주기 조절유전자들의 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. RNA 분리는 RNAzol B를 사용하여 분리한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 증류수에 녹인 후 자외선 분광비색계로 농도 및 순도를 측정 후 사용하였다.

cDNA 합성은 분리된 RNA 2 µg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 40 µl 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 2 µg, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 U/µl RNase 억제제 (Perkin-Elmer 제품, Branchburg, U.S.A.), 2.5 U/µl MuLV 역전사 효소(Perkin-Elmer 제품, Branchburg, U.S.A.), 2.5 µM oligo dT (16 mer)로 하였으며, 반응 조건은 42°C 1시간, 99°C 5분, 5°C 5분으로 하였다. PCR은 10×반응 완충액(15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl) 5 µl와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 µl씩, 그리고 30 µM sense 및 antisense primer를 각각 1 µl를 넣은 혼합물에 1 µl의 반응시킨 cDNA 반응 혼합물과 2.5 단위의 Taq 중합효소(Perkin Elmer 제품, Branchburg, U.S.A.)를 넣은 후 증류수를 첨가하여 50 µl로 용량을 맞추고 30 µl의 mineral oil을 증정한 후 DNA thermal cycler (Perkin Elmer 제품, Branchburg, U.S.A.)를 사용하여 PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10 µl를 1% agarose gel에 전기영동하고 사진촬영을 한 후 densitometer로 DNA band를 분석하였다. RT-PCR에 사용된 각종 유전자들의 primer염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Name		PCR primer sequences	Product size (bps)
GAPDH	Sense	5-CGTCT TCACC ACCAT GGAGA-3	300
	Antisense	5-CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT-3	
Cyclin A	Sense	5-CAGAA TGAGA CCCTG CATTG GGCTG-3	615
	Antisense	5-CAGAT TTAGT GTCTC TGGTG GGTG-3	
Cyclin D1	Sense	5-ACCTG GATGC TGGAG GTCTG-3	402
	Antisense	5-GAACT TCACA TCTGT GGCACA-3	
Cyclin E	Sense	5-GGAAG GCAAA CGTGA CCGTT-3	638
	Antisense	5-GGGAC TTAAG CGCCA CTAA-3	
p16 ^{INK4a}	Sense	5-ATGGA GCCTT CGGCT GACT-3	464
	Antisense	5-GAGCC TCTCT GTTTC TTTCA-3	
Rb	Sense	5-ATGTC AGAGA GAGAG CTTGG-3	579
	Antisense	5-GTGCA CTCCT GTTCT GACCT-3	

결 과

1) 한국인 위암 세포주에서 주요 세포주기 조절단백질들의 발현

Cyclin A 단백질은 실험에 사용한 9종의 위암 세포주 중에서 7종이 SNU C1 대장암 세포주나 정상 피부 섬유아 세포주에 비해 강한 발현을 보였고, cyclin D1 단백질은 SNU 638, 668 및 719에서만 강한 발현을 보였다. cyclin E 단백질은 SNU 1, 484, 601 및 638에서 강한 발현을 보였고, p16^{INK4a} 단백질은 실험에 사용한 모든 위암 세포주에서

발현이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 위암 세포주가 80% 포화밀도로 성장할 때와 과포화상태에 이르렀을 때의 Rb 항암 단백질의 발현도를 조사한 결과, SNU 484 및 668을 제외한 모든 암세포들은 80% 포화밀도와 과포화상태 모두의 경우에서 인산화된 Rb, 즉 ppRb의 강한 발현을 보였다(Fig. 2).

2) 한국인 위암 세포주에서 주요 세포주기 조절유전자들의 RNA 발현

Cyclin A 및 cyclin D1 RNA는 대부분의 위암 세포주에서 비슷한 발현을 보였으며, SNU 484 668은 cyclin D1 RNA 발현이 미약하였다. cyclin

Fig. 1. Expressions of various cyclins and p16^{INK4a} proteins in Korean gastric cancer cells analysed by Western blotting. Lane 1: Korean skin fibroblast; lane 2: Korean colon cancer cell (SNU C1); lanes 3-11: Korean gastric cancer cells (lane 3: SNU 1; lane 4: SNU 5; lane 5: SNU 216; lane 6: SNU 484; lane 7: SNU 601; lane 8: SNU 620; lane 9: SNU 638; lane 10: SNU 668; lane 11: SNU 719).

Fig. 2. Expressions of Rb tumor suppressor proteins in Korean gastric cancer cells analysed by Western blotting. Lane 1: Korean skin fibroblast; lane 2: Korean colon cancer cell (SNU C1); lanes 3-11: Korean gastric cancer cells (lane 3: SNU 1; lane 4: SNU 5; lane 5: SNU 216; lane 6: SNU 484; lane 7: SNU 601; lane 8: SNU 620; lane 9: SNU 638; lane 10: SNU 668; lane 11: SNU 719).

Fig. 3. Expressions of various cyclins, p16^{INK4a} and Rb mRNAs in Korean gastric cancer cells analysed by RT-PCR. Lane 1: Korean skin fibroblast; lane 2: Korean colon cancer cell (SNU C1); lanes 3-11: Korean gastric cancer cells (lane 3: SNU 1; lane 4: SNU 5; lane 5: SNU 216; lane 6: SNU 484; lane 7: SNU 601; lane 8: SNU 620; lane 9: SNU 638; lane 10: SNU 668; lane 11: SNU 719).

E RNA는 SNU 1, 5, 216, 601, 620 및 719에서 강한 발현을 보였고, p16^{INK4a} RNA는 SNU 5 및 484를 제외한 모든 위암세포에서 발현이 관찰되지 않았다. Rb RNA는 SNU 1, 5, 620 및 719에서 강한 발현을 보였고, SNU 484, 638 및 668은 발현이 미약하였다(Fig. 3).

3) 주요 세포주기 조절인자들의 RNA 및 단백질 발현 비교

Cyclin D1의 경우, RNA의 발현은 뚜렷한 증가가 없거나, SNU 484, 638 및 668과 같이 발현이 미약한데도 불구하고, 단백질은 상대적으로 강한 발현을 보였다(Fig. 1, 3). cyclin E의 경우, SNU 1 및 601은 RNA와 단백질이 모두 강한 발현을 보였고, SNU 484 및 638에서는 RNA의 발현량에 비해 단백질은 강한 발현을 보였다(Fig. 4). cyclin A의 경우, 모든 위암 세포주에서 RNA의 발현은 비슷하였으나 단백질은 강한 발현을 보였다(Fig. 4). p16^{INK4a}의 경우, SNU 5 및 484를 제외한 대부분의 위암 세포주에서 RNA와 단백질의 발현이 관찰되

지 않았다(Fig. 4). Rb의 경우, SNU 1, 5, 620 및 719와 같이 RNA 발현이 강한 경우와, SNU 216, 484, 638 및 668과 같이 RNA 발현이 미약한 경우 모두에서 Rb 단백질은 강한 발현을 보였다(Fig. 4).

4) 한국인 위암 세포주에 있어서 뚜렷한 발현변화를 보이는 세포주기 조절인자들

SNU 1, 216, 484, 601, 638, 668 및 719에서 cyclin A 단백질의 강한 발현을 관찰할 수 있었으며, SNU 1, 484, 601 및 638에서는 cyclin E 단백질의 강한 발현도 아울러 관찰할 수 있었다. 그리고 실험한 모든 위암 세포주에서 p16^{INK4a} 단백질의 발현을 관찰할 수 없었으며, 과인산화 Rb (ppRb) 단백질의 강한 발현을 관찰할 수 있었다(Table 2).

고 찰

세포분열에 있어서 G1주기 조절에 관한 이해는 암세포가 과연 어떠한 방법으로 세포주기를 계속 진행시키고 있는가를 이해하는데 매우 중요하

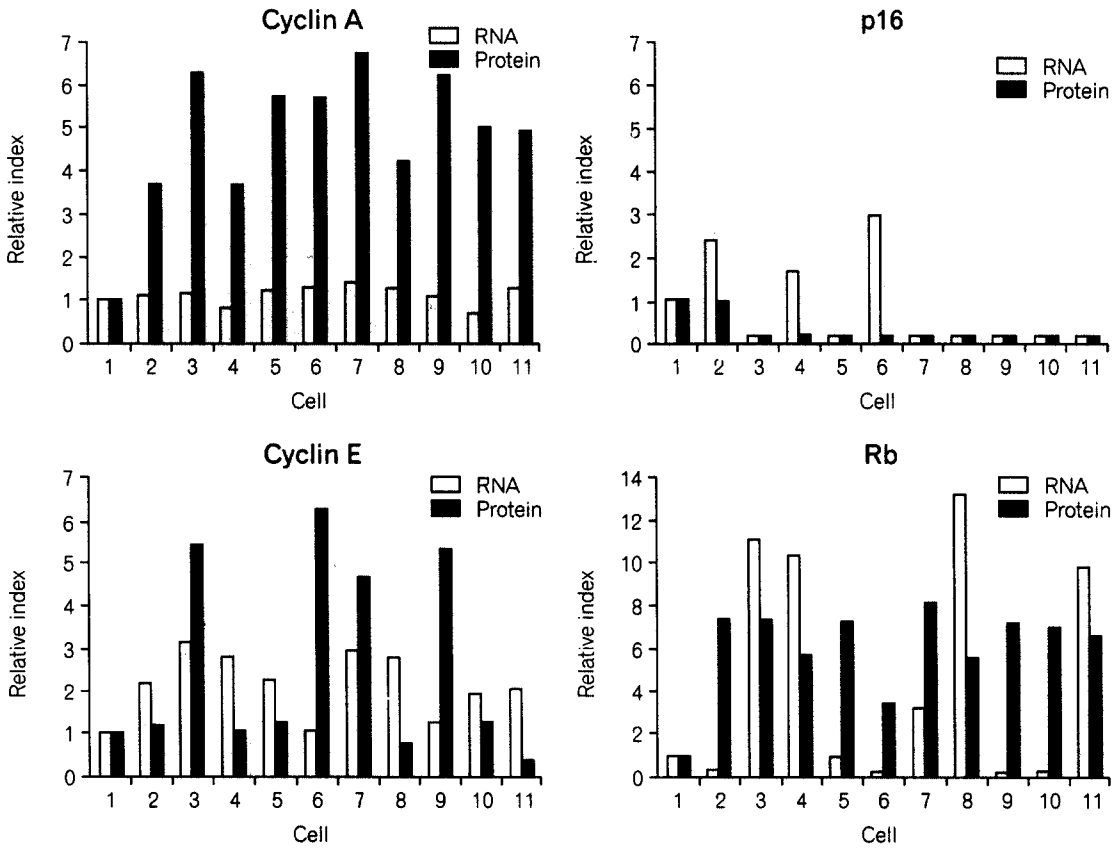


Fig. 4. Comparative analysis of mRNA and protein expression patterns of major cell cycle control genes in Korean gastric cancer cells. 1: Korean skin fibroblast; 2: SNU C1 (Korean colon cancer cell); 3-11: Korean gastric cancer cells (3: SNU 1; 4: SNU 5; 5: SNU 216; 6: SNU 484; 7: SNU 601; 8: SNU 620; 9: SNU 638; 10: SNU 668; 11: SNU 719).

Table 2. Abnormal expression patterns of major cell cycle control proteins in Korean gastric cancer cells

Name of cells	Names of cell cycle control proteins		Phosphorylated Rb	p53*
	increased expression	decreased expression		
SNU1	cyclin A, E	p16 ^{INK4a}	increased	wild type
SNU5		p16 ^{INK4a}	increased	deleted
SNU216	cyclin A	p16 ^{INK4a}	increased	mutated
SNU484	cyclin A, E	p16 ^{INK4a}		mutated
SNU601	cyclin A, E	p16 ^{INK4a}	increased	mutated
SNU620		p16 ^{INK4a}	increased	deleted
SNU638	cyclin A, E	p16 ^{INK4a}	increased	mutated
SNU668	cyclin A	p16 ^{INK4a}	increased	mutated
SNU719	cyclin A	p16 ^{INK4a}	increased	wild type

*data from references 22 and 23

다(6,9). 정상적인 세포주기 조절에 있어서 G1 제어점의 통과와 S주기 진입은 cyclin A, D, E의 순차적인 조절을 받는 cyclin dependent kinase (CDK)들에 의해 조절되는데, CDK 활성화는 cyclin과의 결합을 필요로 하며(4), 적어도 두 종류의 CDK inhibitor (CKI)들에 의해 억제됨이 보고되었다(10). CDK들은 G1주기를 이탈하기 위하여 중요한 기질을 인산화시켜야 하는데, Rb 항암단백질이 그 대표적인 기질로 알려져 있다(5,6). Rb 항암단백질은 S기 진입에 있어서 중요한 유전자들을 활성화시키는 전사조절 인자인 E2F를 매개로 하여 유전자발현을 조절하는데(11), 저인산화된 Rb는 E2F 복합체들과 결합하여 이들을 repressor로 전환시켜 E2F 표적 유전자들의 발현을 억제함이 보고되었다(5,12). Rb가 인산화되면 이러한 E2F들을 유리시키며, 유리된 E2F들은 표적 유전자들을 활성화시키는데, 이러한 Rb 인산화 과정은 cyclin D-의존성 kinase에 의해서 처음으로 유발된 후 cyclin E-CDK2 복합체에 의해서 가속화된다(5,6,9). 그리고 CDK4 와 CDK6에 대한 특이적인 억제 다단백질인 p16^{INK4a}단백질은 직접적으로 cyclin D-의존성 kinase의 활성도를 억제하여 Rb 인산화를 억제함으로써 G1정지를 유도한다(13). Rb 유전자의 직접적인 유전적 손상이나 인산화에 의해 Rb가 불활성화 되면 G1기는 단축되고 세포는 과도한 분열을 초래할 수 있다(5).

이러한 Rb 경로의 파괴는 암 발생에 깊이 관여될 것이다(6,8,9). 또한 p16^{INK4a}이 오직 Rb가 정상인 세포에서만 G1주기 진행을 억제한다는 것은, Rb의 소실과 마찬가지로 p16^{INK4a} 단백질의 소실은 암 발생의 전구인자로 작용함을 의미한다(14,15). 실제로 Rb 경로 이상과 암 발생과의 관계를 조사해보면, 망막아세포종, 소세포폐암, 각종 육종 및 방광암에서 Rb 유전자의 결손이나 돌연변이를 발견할 수 있고(16), 대부분의 자궁암에서 인간 유두종 바이러스(HPV) E7 발현으로 인한 Rb 기능소실을 볼 수 있고(17), 대장암과 자궁암에서 cyclin A, D, E의 과발현을 볼 수 있다(18,19). 그리고 자궁암, 식도암, 폐암, 유방암 및

혜장암 등에서 p16^{INK4a}의 결손 혹은 돌연변이를 볼 수 있다(9,10). 그뿐 아니라 여러 가지 암유전자들의 기능도 결국 G1 cyclin들의 발현을 유도하여 CKI들의 작용을 무력화시켜 계속해서 세포주기가 진행되도록 한다는 사실이 알려졌다(4,7,8).

이와 같이 세포주기 조절과 암 발생과는 밀접한 관계가 있으며, 암 발생의 기전을 깊이 해명하기 위해서는 Rb를 중심으로 그 상류(upstream)와 하류(downstream)의 세포주기 조절인자들의 발현 분석이 필수적이다(6,9). 이 연구에서는 우리나라에서 매우 중요한 위암 발생의 기전을 세포주기 조절차원에서 이해하고자 하였다. 한국인 위암 세포주에 있어서 뚜렷한 발현 변화를 보이는 세포주기 조절인자들로서는 대부분의 위암세포에서 cyclin A 단백질의 강한 발현과, 과인산화 Rb (ppRb) 단백질의 강한 발현을 볼 수 있었고, p16^{INK4a} 단백질의 발현을 관찰할 수 없었다. 그리고 SNU 1, 484, 601 및 638에서는 cyclin E 단백질의 강한 발현도 함께 관찰할 수 있었다.

이러한 사실들을 종합해보면 한국인 위암 세포에서 cyclin A 및 E의 강한 발현으로 Rb 항암단백질의 인산화가 촉진됨으로써 Rb가 불활성화 되고, 그 결과 세포는 G1기에서 S기로의 이행이 촉진되게 될 것으로 판단된다. 또한 p16^{INK4a}의 저하로 인해 cyclin 억제효과가 저하됨으로써, Rb의 인산화가 더욱 가속되게 되어 세포는 S기로의 이행이 더욱 촉진되게 될 것으로 생각된다. 그 결과 과도한 세포분열이 발생되고, G1기의 단축으로 인해 유전자 손상여부를 감시하고 수리하는 기능이 저하되게 됨으로써 유전자 손상이 축적되어 암화과정이 촉진되게 될 것으로 사료된다. 그리고 이 연구에서 나타난 바와 같이 한국인 위암세포들은 여러 가지 세포주기 조절인자들 중에서도 특히 cyclin A와 cyclin E단백질의 강한 발현과 p16^{INK4a} 단백질의 발현소실, 그리고 ppRb의 강한 발현을 보이기 때문에, 향후 위암의 분자적 진단 표지자로서 이들이 활용될 수도 있을 것으로 생각된다.

한국인 위암세포에서 cyclin 발현증가 원인의

일부를 이해하기 위해 cyclin RNA 및 단백질 발현을 서로 비교하여 본 결과, RNA의 발현이 높지 않은데도 단백질은 매우 높게 발현되는 경우가 많아서, cyclin 발현증가의 기전은 전사조절 차원에서의 RNA 합성의 증가가 아니고, 단백질 분해의 저하로 인한 단백질 수명연장, 즉 post-translational control일 것으로 추정된다(3,4,9). 다른 연구자들도 사람의 암에서 cyclin 유전자 자체의 증폭이나 돌연변이는 드물지만 유방암, 대장암, 자궁내막암 및 성인의 급성 림프구성 백혈병 등에서 cyclin 단백질이 비정상적으로 과발현됨을 보고하였고, cyclin 과발현의 원인은 ubiquitin에 의한 단백질 분해가 저하되었기 때문일 것으로 추정하였다(3,9). 아마도 아직 발견되지 않은, 단백질의 분해를 조절하는 항암유전자들 혹은 암 단백질 집단이 존재할 것으로 추정하고 있다(9). cyclin을 비롯한 세포주기 조절 단백질들의 합성과 분해에 관여하여 분해속도를 결정하는 분자기구들을 발견하면 암세포에서의 이들 단백질의 발현변화를 이해하는데 큰 도움이 될 것으로 생각된다(8,9).

한국인 위암세포에서 p16^{INK4a} 발현소실 원인의 일부를 이해하기 위해 p16^{INK4a} RNA 및 단백질 발현을 서로 비교하여 본 결과, SNU 5 및 484를 제외한 대부분의 경우 RNA와 단백질의 발현이 동시에 소실되어 있어서 p16^{INK4a} 발현 저하의 원인은 전사조절 차원 혹은 유전자 결함일 것으로 추정된다. 다른 연구자들의 보고에 의하면, 한국인 위암에서는 p16^{INK4a} 유전자의 돌연변이는 드물며, 5'CpG 위치에 de novo methylation이 발생하여 유전자기능이 불활성화되고, 그 결과 전사조절 차원에서 p16^{INK4a} RNA 합성이 차단되는 경우가 흔한 것으로 보고하였다(2,20~21). 그리고 Lee등(20)의 보고에 의하면 SNU 5 및 484는 p16^{INK4a} 유전자 exon 2의 codon 72와 102에 각각 점돌연변이(point mutation)와 삽입 돌연변이(insertional mutation)가 존재하기 때문에 비정상적인 RNA가 발현됨으로써, 정상적인 p16^{INK4a} 단백질 발현이 불가능함을 알 수 있다.

결 론

Cyclin A 및 E의 증가로 Rb 인산화가 촉진되므로써 Rb가 불활성화되고, 그 결과 세포는 G1기에서 S기로의 이행이 촉진되게 되는데, p16^{INK4a}의 기능저하로 인해 cyclin 억제효과가 저하됨으로써, Rb의 인산화가 더욱 가속되어, 세포는 S기로의 이행이 더욱 촉진되게 된다. 그 결과 과도한 세포분열이 발생되고, G1기가 단축되어 유전자 손상여부를 감시하고 수리하는 기능이 저하됨으로써 위암화 과정이 촉진되게 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kim SK, Baek WK, Suh SI, Suh MH, Kim IH, Sohn SS, Kang JS. Molecular characteristics of tumorigenesis in human gastric carcinomas. *J Korean Cancer Assoc* 1994;26:688-701.
2. Kim JR, Kim SY, Lee BH, Kim SW, Kim HJ, Kim JH. Mutations of CDKN2 (MTS1/p16^{INK4a}) and MTS2/p15^{INK4b} genes in human stomach, hepatocellular, and cholangiocarcinomas. *Exp Mol Med* 1997; 29:151-156.
3. Ahn MJ, Kim BH, Jang SJ, Hong EK, Lee WM, Baik HK, Park HK, Lee CB, Ki M. Expression of cyclin D1 and cyclin E in human gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *J Korean Med Sci* 1998;13:513-518.
4. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73: 1059-1065.
5. Wang JY, Knudsen ES, Weich PJ. The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv Cancer Res* 1994 64: 25-85.
6. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-330.
7. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991;65: 701-713.
8. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:805-814.
9. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-

- 1677.
10. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-1163.
 11. Chellappan S, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991;65:1053-1061.
 12. Weintraub SJ, Chow KNB, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* 1995; 375:812-815.
 13. Serrano M, Hannon GJ, Beach DA. New regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclinD/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707.
 14. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16. *Cancer Res* 1994;54:5816-5820.
 15. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-CDK complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16 tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1995;14:503-511.
 16. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng TC, Yandell DW, Kaye FT, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2775-2779.
 17. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991;254:1167-1173.
 18. Baek WK, Moon SH, Suh SI, Park JW, Bae IS, Choi BK, Suh MH. Expression of cyclin genes in colorectal carcinomas. *J Korean Colo-Proctol Soc* 1996;12:239-246.
 19. Suh SI, Choi EJ, Baek WK, Suh MH, Cho CH, Lee TS, Cha SD. Mutational analysis of p53, p21^{WAF1} and p16^{INK4a} in human cervical carcinomas. *J Korean Soc Microbiol* 1998;33:415-423.
 20. Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alterations of p16^{INK4a} and p15^{INK4b} genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997;80:1889-1896.
 21. Kim JR, Kim SY, Kim MJ, Kim JH. Alterations of CDKN2 (MTS1/p16^{INK4a}) gene in paraffin-embedded tumor tissues of human stomach, lung, cervix and liver cancers. *Exp Mol Med* 1998;30:109-113.
 22. Park JG, Yang HK, Kim WH, Chung JK, Kang MS, Lee JH, Oh JH, Park HS, Yeo KS, Kang SH, Song SY, Kang YK, Bang YJ, Kim YH, Kim JP. Establishment and characterization of human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1997;70:443-449.
 23. Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, DeLee H, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:938-943.