

한국인 자궁경부암과 Telomerase의 활성과의 관계*

계명대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 미생물학교실², 면역학교실³ 및 의과학연구소⁴

이태성¹ · 서성일^{2,4} · 백원기^{2,4} · 박종욱^{3,4}
차순도¹ · 최병길^{3,4} · 서민호^{2,4}

= Abstract =

Telomerase Activity in Human Cervical Carcinoma

Tae-Sung Lee, M.D.¹, Seong-Il Suh, M.D.^{2,4}, Won-Ki Baek, M.D.^{2,4}, Jong-Wook Park, M.D.^{3,4}
Soon-Do Cha, M.D.¹, Byung Kil Choi, M.D. and Min-Ho Suh, M.D.^{2,4}

Departments of Obstetrics and Gynecology¹, Microbiology², Immunology³
and Institute for Medical Science⁴, School of Medicine,
Keimyung University, Taegu, Korea

The immortalization of normal eukaryotic cells is often associated with the reactivation of the ribonucleoprotein enzyme telomerase, which adds TTAGGG repeats on to the telomeres of chromosomes and is thought to be present in germ cells but not in normal somatic cells. Recently telomerase activity has been found in most immortalized human cell lines and various cancer tissues, but has not been found in most of normal somatic tissues. In present study, we show that telomerase activation can also occur in human cervical carcinomas. Extracts from 25 human cervical carcinomas and 10 normal cervical tissues were tested for telomerase activity using a recently developed polymerase chain reaction-based telomeric repeat amplification assay. Twenty(80%) of cervical carcinoma tissues were positive for telomerase activity and 3(30%) of normal cervical tissues were also positive. There were no correlation between the level of telomerase activity and degree of malignancy. This result suggests that telomerase activity seems to be uniquely relate to cervical carcinomas and telomerase appears to be repressed in normal tissues but may be reactivated in cervical carcinoms. Thus telomerase activity will be a useful marker for the cervical carcinomas.

Key Words: Telomerase, Cervical cancers

서 론

Telomere는 진핵세포의 염색체 말단에 위치하는

*이 연구는 1995년도 동산의료원 특수과제연구비로 이루어졌음

DNA 및 단백질 복합체로 구성되어 있는 구조물로서 염색체의 적절한 위치설정, 구조 및 기능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{1~3}). DNA복제가 단 방향(5' → 3')으로 일어남에 따라 선상 이중나선 DNA중 한 가닥은 복제시 RNA primer가 필요하므로 염색체의 말단 부위, 즉 telomere부위는 End-replication

problem으로 인해 점점 짧아지게 된다⁴⁾. 그러나 germ cell과 같은 세포에서는 RNA-protein complex인 telomerase에 의해 극복되어진다. 염색체의 telomere는 체세포분열을 할 때 마다 50~200여개의 핵산이 소실됨이 알려져 있는데 이런 telomere의 길이의 단축은 세포 분열수를 나타내는 mitotic clock의 역할을 할 것으로 생각되어진다^{5~7)}. 체세포 분열에 의한 telomere의 길이의 단축은 어떤 신호 경로를 통하는지는 모르지만 세포에 있어서 분열의 중지(Mortality stage I; M1)를 명령하게 되는데, 이에 대한 기전은 아직까지 잘 밝혀져 있지 않은나 아마도 p53 및 Rb유전자 산물이 관여할 것으로 생각되고 있다⁸⁾. 특히 telomere 길이의 단축을 비롯한 여러 인자들에 의해 발생 가능한 세포의 DNA손상은 p53이 인지하여 발현이 유도된 p21에 의하여 cyclin dependent kinase가 억제되어 Rb산물의 인산화를 억제됨으로서 세포의 분열이 억제된다고 알려져 있다⁹⁾. 그러나 일단 암화된 세포들은 지속적으로 분열하기 위해서는 telomere의 길이가 충분치 못함을 인지하여 telomerase를 활성화 시켜야 한다. 이렇듯 telomere 길이의 단축 및 telomerase의 재활성은 암의 생성 및 성장에 많은 부분을 차지하고 있을 것이다. 현재까지 보고된 자료에서도 대부분의 암세포에서 telomerase의 활성을 볼 수 있다^{7, 10~15)}. 그러므로 telomere 및 telomerase는 암발생의 원인 및 암 진단에 응용 가능하며 또한 telomerase의 활성에 표적을 둔 신약의 개발은 상당한 성과를 거둘 것으로 사료된다.

본 연구는 한국인의 자궁경부암을 대상으로 하여 암 세포와 정상세포간의 telomerase의 활성을 조사하여 자궁경부암과 telomerase의 연관성과 종양표지물질(Tumor marker)로서의 가능성을 알아보고자 실시하였다.

연구대상 및 방법

1) 연구 대상

계명대학교 동산의료원에서 수술중 적출된 정상 자궁경부 조직 10예와 자궁경부암 조직 25예를 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 자궁경부암 조직으로 부터 단백질 분리

Kim등¹²⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 자궁경부암 조직 100~200 mg을 phosphate-buffered saline (PBS, 10 mM HEPES-KOH, pH7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT)으로 1~2회 세척후에 500 ul의 lysis buffer(10mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol)상에서 분쇄기로 분쇄한 후 얼음에서 30분간 방치한 다음 12,000×g로 30분간 원침하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3) Telomerase repeat amplification protocol(TRAP)

먼저 0.1 ug의 Cx primer(5'CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA3')를 0.2 ml tube에 넣은 후 Speed-Vac(Savant Co)을 이용하여 완전히 말린 다음 10 ul의 액체상태의 AmpliWax(Perkin Elmer)를 넣는다. AmpliWax가 완전히 굳은 다음 5X TRAP buffer(100 mM Tris-Cl, pH 8.3, 7.5 mM MgCl₂, 315 mM KCl, 0.025% Tween20, 5 mM EGTA, 50 mg bovine serum albumin, 50 ug/ml T4g32 protein), 0.1 ug의 Ts primer(5'AATCCGTCGAGCAGAGTT3'), 50 mM의 deoxyribonucleotides, 2U의 Taq polymerase(Perkin Elmer), 0.3 ul의 ³²P-dCTP(Amersham Co., 10 uCi/ul), 그리고 6 ug의 상기방법으로 추출한 단백질을 넣은 후 실온에서 10분간 두었다. 그런 후 thermal cycler(GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer)에 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 그리고 72°C에서 1분 30초로 하여 총 27회 실시하였다¹⁰⁾. 그런 후 상기 반응액을 15% non-denaturing polyacrylamide gel상에서 전기영동 후 말린 다음 autoradiography를 실시하였다. Size marker는 gamma-ATP로 5'-end label한 100bp DNA ladder(GibcoBRL)을 사용하였다.

결 과

상기의 TRAP방법의 민감도를 알아보기 위하여

즉, telomerase 활성 정도를 검출가능한 단백질 양을 알아보기 위하여 HT-29 대장암 세포주로부터 분리한 단백을 6 ug, 4 ug, 3 ug, 2 ug, 1 ug, 0.5 ug으로 하여 TRAP를 실시한 결과(Fig. 1A) 0.5 ug까지 검출 가능하였다. 또 TRAP방법의 특이성 유무를 알아보기 위하여 6 ug의 분리 단백을 phenol, chloroform, DNase, RNase 및 proteinase K를 처리한 결과(Fig. 1B), DNase처리한 단백질에서만 telome-

rase 활성을 볼 수 있어 telomerase가 ribonucleo-protein complex임을 확인 하였으며 또한 본 실험의 TRAP방법이 특이성이 있음을 알 수 있었다. 자궁경부암에서의 telomerase 활성을 조사한 결과, 25예의 자궁경부암 중 20예(80%)에서 telomerase 활성을 보였다(Fig. 2A). 대조군으로 정상 자궁경부 조직에서의 telomerase 활성을 조사한 결과 10예 중 3예(30%)에서 활성을 볼 수 있었다(Fig. 2B). 치료후

Fig. 1. (A) Sensitivity of TRAP assay for telomerase activity. Lane 1, 0.25 ug of HT-29 cell extract; lane 2, 0.5 ug of HT-29 cell extract; lane 3, 1 ug of HT-29 cell extract; lane 4, 2 ug of HT-29 cell extract; lane 5, 4 ug of HT-29 cell extract; and lane 6 6 ug of HT-29 cell extract. (B) Specificity of TRAP assay for telomerase activity. Lane 1, HT-29 cell extract; lane 2, RNase-pretreated HT-29 cell extract; lane 3, DNase-pretreated HT-29 cell extract; lane 4, phenol-pretreated HT-29 cell extract; lane 5, chloroform-pretreated HT-29 cell extract; and lane 6, negative control omitting TS primer.

Fig. 2. (A) TRAP assay for telomerase activity in cervical cancer tissues (A) and normal cervical tissues (B). P and N represent positive and negative control, respectively.

Table 1. Clinical features and results of telomerase activity against 25 cervical cancer

Patients no	Age	Diagnosis ¹⁾	Stage ²⁾	Telomerase activity	Recurrence	Response for treatment ³⁾
1	48	SLK	IIa	+		R
2	71	SLK	IIb	+		R
3	58	SLNK	IIa	+		R
4	40	SLNK	IIa	+		R
5	39	SLNK	IIa	+		R
6	67	SLNK	IIb	+	+	NR
7	55	SLK	IIIb	+	+	NR
8	53	SLNK	IIIb	+		R
9	50	SLNK	IVb	+		R
10	60	SLK	IIa	+		R
11	39	SLK	IIa	-		R
12	62	SLNK	IIb	+		R
13	34	SLNK	IIb	-	+	NR
14	32	SLK	Ib	+		R
15	60	SLK	IIb	-		R
16	52	SLNK	IIb	+		R
17	60	SLNK	Ib	+		R
18	64	SLNK	IIa	+		R
19	78	SLK	IIIb	+		R
20	47	SLNK	IIb	+		R
21	49	SLNK	Ib	-	+	NR
22	36	SLNK	IIb	-	+	NR
23	43	SLNK	IIIa	+		R
24	62	SLNK	IIa	+		R
25	48	SLNK	Ia	+		R

¹⁾SLK, squamous large cell keratinizing; SLNK, squamous large cell non-keratinizing

²⁾Stages are presented according to the FIGO classification.

³⁾Treatments include surgery, radiation, and chemotherapy. R, response(include complete and partial) and NR, no response.

재발한 5예 중 2예에서는 telomerase 활성을 볼 수 있었으나, 3예에서는 활성을 볼 수 없었으며(Table 1), 병리조직학적 악성도에 따른 telomerase 활성의 차이는 관찰할 수 없었다.

고 찰

Telomere의 길이의 단축은 세포가 더 이상 분열 하지 않도록 하는 biological clock으로 생각되고 있는데 telomerase의 재활성은 M2 stage의 세포가

암세포로 이행된 후 계속 성장 및 분열을 위해 필요하다고 알려져 있다¹⁻⁵⁾. telomere의 길이는 암조직이 정상 조직에 비해 짧음을 보여 telomere의 단축에 따른 telomerase의 재활성은 지속적으로 암세포의 분열 가능성을 의미하고 있다. 현재까지 보고된 바에 따르면 조사한 암의 85~97%에서 telomerase의 활성을 볼 수 있으나 암 주변의 정상조직에서는 활성이 없어 telomerase의 활성은 암과 아주 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다^{7,10-15)}. 본 연구에서는 실험한 25예의 자궁경부암 조직 중 20예(80%)에서 telomerase

활성을 보였는데 비록 실험 대상수가 적지만 상당히 높은 빈도라고 사료된다. 한편 정상 대조군(10예)의 경우 3예(30%)에서 telomerase 활성을 보여 보고된 신체의 다른 부위의 조직에 비해 telomerase의 활성화의 빈도가 높았는데 이는 좀더 많은 대조군을 조사해 볼 필요성이 있다고 생각된다. Telomerase 활성이 없는 5예의 암조직 중 3예는 치료에 잘 반응하지 않고 재발된 경우인데 이는 아마도 암화되는데 있어 어떤 유전자의 비활성이 동반되어 있다고 생각되며 또한 telomere의 길이가 어느 정도 유지되어 있는 세포가 암화된 것으로 사료된다. 그러나 telomerase 자체가 ribonucleoprotein complex이므로 RNA template의 변성에 의한 가능성도 배제하기는 어렵다. Hiyama 등¹⁵⁾은 악성도가 높은 신경육아종에서 telomerase의 활성이 높다고 보고하였는데 본 연구에서는 재발한 경우 5예중 3예에서는 활성을 볼 수 없었으며 2예에서만 활성을 보여 Hiyama 등¹⁵⁾의 결과와는 다소 차이를 보인다.

시험관내에서 세포증식의 저하(노화)가 생체에서 노화를 정확하게 반영하지는 않으나 세포배양을 이용한 노화연구에서 DNA 손상의 중요한 내부적인 요소가 밝혀지고 있다. 정상 섬유아세포는 염색체 말단의 복제에 관여하는 telomerase를 발현하지 않기 때문에 telomere의 길이는 점점 짧아지게 되는데, 이렇게 충분히 짧아진 telomere는 정상세포에 대해 복제능의 노화가 왔음을 시사하여 G1-S checkpoint를 활성화시켜 G1 세포주기에 머물게 한다^{1,2,5,8)}. 그리고 노화 세포에는 다양한 염색체의 이상이 발견되며 이는 telomere와 관련이 깊은 것 같다. 그러므로 정상 노화기전은 chromosome instability를 초래하는 것으로 생각되고 있다^{2,8)}. Telomere의 길이의 단축에 의한 세포분열의 정지신호는 아직까지 잘 밝혀져 있지 않으나 아마도 DNA 손상시 세포주기를 G1에 머물게 하는데 관여한다고 알려진 p53 유전자 산물이 관여할 것으로 생각되고 있다⁸⁾. 특히 telomere 길이의 단축 뿐만 아니라 여러 내외부 인자들에 의해 발생 가능한 세포의 DNA 손상은 p53이 인지하여 p21의 발현을 유도하게 되고 이에 의하여 cyclin dependent kinase가 억제되어 Rb산물의 인산화를 억제함으로써 세포가 G1에서 S세포주기로의 이행이 억제된다고 알려져 있다⁹⁾. 그러나 p53 돌연변이세포에서

p21의 발현이 있는 것으로 보아 p53을 경유하지 않는 경로도 있음이 밝혀지고 있다^{16,17)}. 특히 노화세포인 경우는 cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs) 중에서도 p21^{Waf1}(= senescent cell-derived inhibitor)가 세포의 G1세포주기에 머물게 하는데 관여한다고 알려져 있다^{9,18)}. 그러므로 염색체 이상소견을 보이는 노화세포 뿐만 아니라 정상적인 세포에서 p21^{Waf1}의 이상은 신체에 심각한 문제를 야기할 수 있기 때문에 p21^{Waf1}과 같은 CDKIs들은 암발생 억제와 밀접한 관계가 있으므로 telomerase 활성 유무와 관계를 조사해 볼 필요가 있다고 사료되며 현재 실험 중에 있다.

결 론

염색체의 telomere는 한번 세포분열을 할 때 마다 50~200개 정도의 핵산을 소실하는데 이런 telomere의 길이의 단축은 세포의 분열수를 나타내는 mitotic clock의 역할을 할 것으로 생각되고 있으며 또한 충분히 짧아진 telomere는 정상세포에 대해 복제능의 노화가 왔음을 시사하는 신호로 작용한다고 생각되고 있다. 그러므로 세포가 복제능의 노화를 피하고 또한 무한정 증식하기 위해서는, 특히 암세포의 경우에는 telomere의 보존이 필요함을 뜻하며 이렇게 되기 위해서는 switch off되어 있는 telomerase가 재활성화 되어야 한다. 본 연구는 한국인의 자궁경부암을 대상으로 하여 암세포와 정상세포간의 telomerase의 활성을 조사하여 자궁경부암과 telomerase의 연관성을 알아보고 그리고 종양표지물질로의 가능성을 알아보고자 실시하였다. 25예의 자궁경부암 중 20예(80%)에서 telomerase 활성을 보였으며 대조군으로 정상 자궁경부 조직에서의 telomerase 활성을 조사한 결과 10예 중 3예(30%)에서 활성을 볼 수 있었다. 치료후 재발한 5예 중 2예에서는 telomerase 활성을 볼 수 있었으나, 3예에서는 활성을 볼 수 없었으며 병리조직학적 악성도에 따른 telomerase 활성의 차이는 관찰할 수 없었다. 이상의 결과를 살펴보면 검사한 자궁경부암 조직의 80%에서 telomerase 활성을 보여 telomerase가 자궁경부암과 밀접한 관계가 있다고 생각되며 또한 종양표지물질로의 이용 가치도 상당히 높다고 생각된다. 그러나 실험한 30%의 정

상 조직에서도 telomerase 활성을 보였는데 이는 좀 더 많은 대조군을 조사해볼 필요가 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Blackburn EH: *Structure and function of telomeres. Nature* **350**: 569, 1991
- 2) Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al: *Telomeric length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10114, 1992
- 3) Lingner J, Cooper JP, Cech TR: *Telomerases and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? Science* **269**: 1533, 1995
- 4) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: *Telomere end-replication problem and cell aging. J Mol Biol* **225**: 951, 1992
- 5) De Lange T: *Activation of telomerase in human tumor. Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2882, 1994
- 6) Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, et al: *Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9857, 1994
- 7) Harley CB, Villeponteau B: *Telomeres and telomerase in aging and cancer. Curr Opin Genet Dev* **5**: 249, 1995
- 8) Wrights WE, Shay JW: *Time, telomeres and tumors: is cellular senescence more than an anti-cancer mechanism? Trends Biochem Sci* **5**: 293, 1995
- 9) Harper JW, Elledge SJ: *Cdk inhibitors in development and cancer. Curr Opin Genet Dev* **6**: 56, 1996
- 10) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science* **266**: 2011, 1994
- 11) Counter CM, Botelho FM, Wang P, et al: *Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of epstein-barr virus-transformed human B lymphocytes. J Virol* **68**: 3410, 1994
- 12) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al: *Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. EMBO* **11**: 1921, 1992
- 13) Hanish JP, Yanowitz JL, De Lange T: *Stringent sequence requirement for the formation of human telomeres. Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8861, 1994
- 14) Nilsson P, Mehle C, Remes K, Roos G: *Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. Oncogenes* **9**: 3043, 1994
- 15) Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, et al: *Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. Nature Med* **1**: 249, 1995
- 16) Johnson M, Dimitrov D, Vojta PJ, Barrett JC, Noda A, Pereira-Smith OM, Smith JR: *Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. Mol Carcinog* **11**: 59, 1994
- 17) Jiang H, Lin J, Su Z-Z, Collart FR, Huberman E, Fisher PB: *Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activated p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. Oncogene* **9**: 3397, 1994
- 18) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp Cell Res* **211**: 90, 1994