

한국인 비소세포폐암에서의 3p의 소실

서울대학교 의과대학 내과학교실¹, 원자력병원 분자종양학연구소², 홍부외과³, 창원대학교 미생물학과⁴

이춘택¹, 김미희², 박경호², 박종호³, 백희종³, 조재일³, 김진규⁴, 김창민²

= Abstract =

Loss of Heterozygosity at 3p in Korean Non-Small Cell Lung Cancer

Choon-Taek Lee, M.D.,¹ Mi Hee Kim,² Kyung Ho Park,² Jong Ho Park, M.D.,³
Hee Jong Baek, M.D.,³ Jae Ill Zo, M.D.,³ Jin-Kyoo Kim, Ph.D.,⁴ Chang-Min Kim, M.D.²

*Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine¹, Seoul Korea
Laboratory of Molecular Oncology², Department of Thoracic Surgery³, Korea Cancer Center Hospital,
Department of Microbiology, Changwon National University⁴, Changwon, Korea*

Purpose : Frequent deletion of 3p in numerous cancer including lung cancer suggests the presence of tumor suppressor gene. 3p has been analysed by RFLP and PCR-LOH of microsatellite locus. In this study, we observed the deletion of 3p in Korean NSCLC by PCR-LOH of 4 microsatellite loci and investigated the clinical significance.

Method : 62 surgically resected NSCLC DNA and normal lung DNA have been analysed by PCR-LOH at three dinucleotide[D3S1228 (3p14.1-14.3), D3S1067 (3p14.3-21.1), D3S1029 (3p21.1-21.3)] and one tetranucleotide[D3S1537 (3p 22-24.2)] repeat microsatellite loci.

Results : Among 59 informative cases, 3p deletion by PCR-LOH at four microsatellite loci was found in 31 patients (52.5%). 3p deletion were found in 55% of squamous cell lung cancer and 47% of adenocarcinoma patients. No significant difference has been found in clinical parameters such as staging, smoking and survival according to the status of 3p deletion.

Conclusion : Deletions in 3p have played an important role in Korean NSCLC though no clinical significance was detected. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 975-983)

Key words : 3p deletion, Non-small cell lung cancer(NSCLC), Microsatellite, PCR-LOH.

서론

폐암은 한국인에서 발생이 급증하고 있는 암으로 특히

남성에서는 위암 다음으로 제 2위의 암 사망원인이 되고 있다¹⁾. 흡연은 가장 널리 알려진 폐암의 발생원 인이며 폐암의 발생과정에는 여러 종양억제유전자 및

암유전자의 변이가 관여한다고 알려져 있다. p53, Rb 및 p16 등이 현재 완전히 밝혀져 있는 종양억제 유전자로 폐암에서도 변이가 많이 발견되어 보고되어 있다. 인체의 염색체중 3번 염색체의 단완인 3p의 부분 소실은 여러 종류의 암에서 관찰되어 종양억제유전자의 존재가 의심되어 수많은 연구가 이루어지고 있다²⁾. 3p의 여러 loci에서의 소실은 Whang-Peng³⁾ 등이 cytogenetics를 이용하여 처음으로 보고된 이후 restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 이용한 여러 연구⁴⁻⁷⁾ 등을 통해 비소세포 폐암의 상당수에서, 소세포폐암에서는 대부분에서 3p의 부분 소실이 관찰되었다⁸⁾. Microsatellite는 2개에서 5개까지의 핵산이 단순 반복(tandem repeat)되는 염색체의 구조로 반복되는 횟수의 차이가 많고 (highly polymorphic) 여러 염색체에 고루 분포되어 있어 이형체의 소실(Loss of Heterozygosity: LOH) 현상을 통해 염색체의 소실(deletion) 연구에 많이 이용되고 있다^{9,10)}.

본 연구에서는 한국인의 비소세포폐암을 대상으로 3p의 4부위의 microsatellite loci 주위를 PCR을 시행한 후 LOH를 관찰하여 3p의 소실을 관찰하고 그 임

상적 의의를 연구하였다.

대상 및 방법

1) 연구대상

1990년 5월부터 1992년 12월까지 원자력병원에서 비소세포폐암으로 진단 받고 수술을 받은 62명의 환자를 대상으로 하였다. 수술로 떼어낸 폐조직에서 정상 폐조직과 현미경의 도움으로 정상 폐조직을 가능한 제외한 폐암조직을 채취하여 -80°C 냉창고에 보관하였다. 대상 환자 중 41명이 squamous cell carcinoma 환자였고 21명은 adenocarcinoma 환자였다. 환자는 1997년 6월까지 임상추적관찰을 하였다. 환자의 특성은 Table 1에 정리하였다.

2) 연구방법

동결폐조직을 파쇄후 proteinase K로 소화후 phenol-chloroform extraction을 이용하여 genomic DNA를 추출한 후 3p의 4개의 microsatellite 부위를 포

Table 1. Clinical characteristics of the NSCLC patients enrolled in this study

Clinical parameter	No
Sex (Male : Female)	53/9
Age	31-73 (62 : median)
Squamous cell/Adenocarcinoma	41/21
Smoker/Non-smoker	50/12
Tumor stage	
T1	1
T2	38
T3	19
T4	3
Lymph node stage	
N0	20
N1	18
N2	24

Table 2. Primer sequences of microsatellite loci of 3p¹¹⁾

Locus	Primer sequences	Products size
D3S1228 (CA) (3p14.1-14.3)	TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG (F) TCTAGGAAAGGGATTAGGAAGGA (R)	84bp
D3S1067 (CA) (3p14.3-21.1)	TCATCTATCTCCCAACTGTTGAG (F) GAGCACTACCTGTTTAAGATAGG (R)	95bp
D3S1029 (CA) (3p21.2-21.3)	ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC (F) TAATTCCCAAATGGTTTAAGGGGAG (R)	168bp
D3S1537 (tetra) (3p22-24.2)	CTATAAAATGGCTATACCCAG (F) CTATTTTTGGACCCAGTAACC (R)	212bp

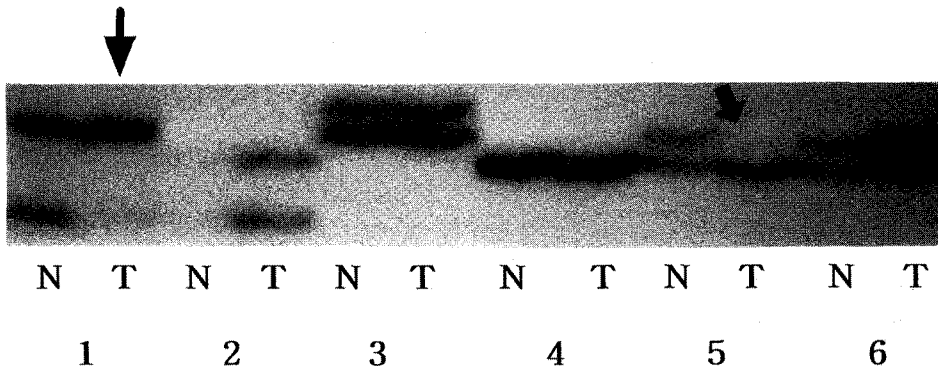


Fig. 1. PCR-LOH of D3S1537 (3p22-24.2) (N : Normal, T : Tumor)

(First pair of N, T showed PCR-LOH. Third pair of N, T were informative case with no LOH. Fourth pair were not informative case. Fifth pair showed PCR-LOH again.)

합하는 4쌍의 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR시 Taq Hot start antibody와 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP를 사용하였으며 각 loci의 PCR에 사용된 primer는 Table 2에 표시하였다¹¹⁾. PCR 생산물은 7M urea (32% foramide : shadow band가 많은 경우에 사용)를 포함한 6% polyacrylamide gel에서 전기영동 후 X-ray film에 노출시켜 현상하였다¹²⁾.

정상 폐조직의 DNA의 PCR 생산물이 두 개의 band를 보이는 경우가 informative한 경우로 이중한 band가 소실되는 경우가 LOH가 있다고 판독하였

다. 한 환자의 DNA에서 4 loci의 PCR을 시행하여 1부위 이상에서 LOH가 관찰되면 3p 소실이 있다고 판단하였다.

결 과

1. 3p deletion의 빈도

총 62명의 환자 중 3p의 4 loci중 어느 한 곳 이상에서 informative를 보인 환자는 59명(squamous cell

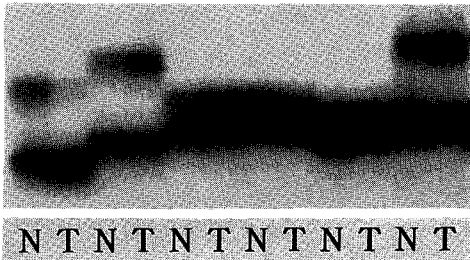


Fig. 2. PCR-LOH of D3S1029 (First pair showed PCR-LOH of tumor DNA).

carcinoma 40명, adenocarcinoma 19명)이었다. 3p의 소실을 보인 환자(4 loci 중 1부위 이상에서 PCR-LOH)는 31명으로 52.5%(31/59)였다(Fig.

1, 2). Squamous cell carcinoma 환자 40명중 22명(55%)에서 3p 소실이 관찰되었으며 adenocarcinoma 환자 19명중 9명(47.3%)에서 관찰되었다. 각 loci의 informative case와 PCR-LOH의 빈도는 Table 3에 표시하였다.

2. 3p 소실 유무에 따른 임상상의 차이

두 군간의 성별 및 T, N stage의 차이는 관찰되지 않았고 흡연자의 비율도 3p 소실군에서 77.7%(24/31), 정상 3p군에서 83.8%(26/31)로 차이가 보이지 않았다(Table 4). 48명의 흡연자중 26명(54%)에서 11명의 비흡연자 중 5명(45%)에서 관찰되어

Table 3. Incidence of informative case and PCR-LOH in each microsatellite loci

	No. of Informative case	PCR-LOH
D3S1228 (3p14.1-14.3)	48/62 (77%)	9/48 (18.7%)
D3S1067 (3p14.3-21.1)	50/62 (80%)	6/50 (12%)
D3S1029 (3p21.1-21.3)	35/62 (56%)	9/35 (25.7%)
D3S1537 (3p22-24.2)	54/62 (87%)	16/54 (29.6%)
Any of above 4 loci	59/62 (95%)	31/59 (52.5%)

Table 4. Characteristics of the patients according to 3p LOH

Factors	3p LOH (31)	Normal 3p (28)
Sex (M : F)	27/4	25/3
Smoker/Non-smoker	26/5	22/6
Squamous cell ca	22	18
Adenocarcinoma	9	10
Tumor stage		
T1	1	0
T2	21	15
T3	7	12
T4	2	1
Node stage		
N0	13	7
N1	7	10
N2	11	11

cf. No statistical significance was found in clinical parameters.

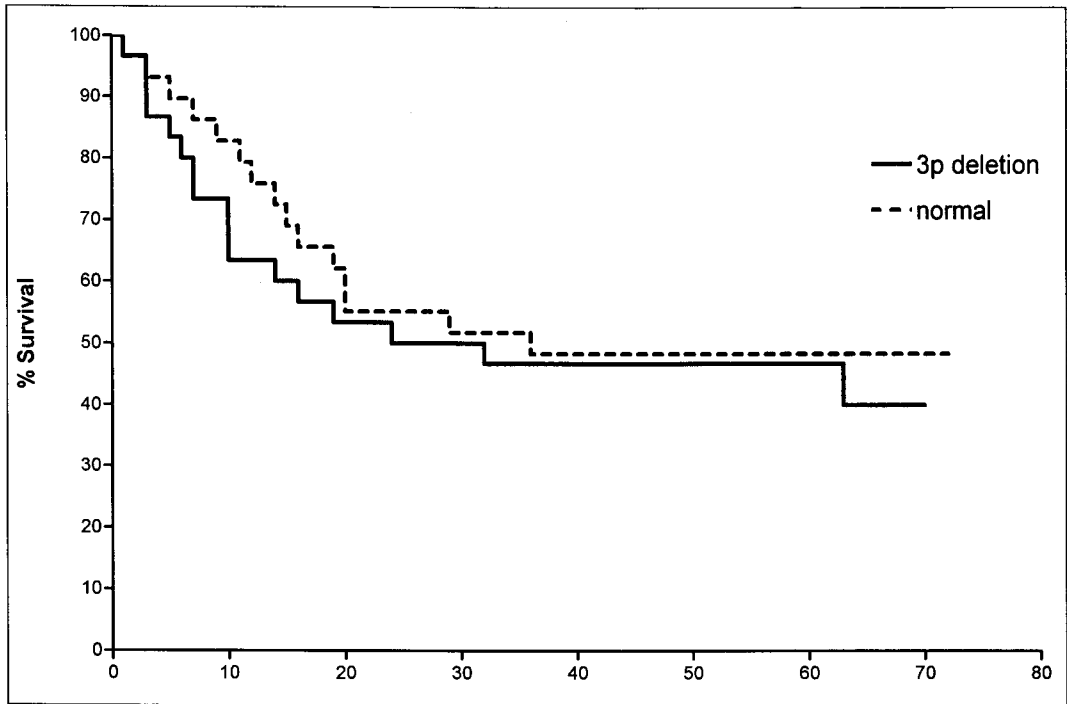


Fig. 3. Survival curve of total lung cancer patients according to the status of 3p deletion (not significant).

두 군의 차이를 발견할 수 없었다.

두 군간의 생존기간에도 차이가 보이지 않았으며 squamous cell carcinoma와 adenocarcinoma로 나눈 군내에서도 3p 소실의 유무는 생존기간에 영향을 끼치지 못 하였다(Fig. 3, 4, 5).

고 찰

본 연구에서는 3p의 4부위의 microsatellite region에서 95%의 환자가 한 부위 이상에서 heterozygosity를 보여 분석이 가능하였으며 그 중 52%에서 LOH를 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 암조직에서 가능한 한 정상 폐조직을 제거하고 DNA를 추출하였으나 정상 DNA의 오염을 완전히 배제할 수는 없었다. 그러므로 두 band의 농도의 상대적인 차이를 비교하여 LOH를 판정하여 오염 정상 DNA에 의한 결

과의 왜곡을 최소화하였다. 또한 microsatellite의 PCR-LOH연구의 최대 문제인 shadow band를 줄이기 위해 PCR시행시 Hot Start Taq antibody를 사용하였고 gel electrophoresis를 시행시 formamide를 gel을 만들 때 사용하여 shadow band의 형성을 최대 억제하였다¹²⁾.

3p는 많은 종류의 암에서 이상이 발견되어 종양억제유전자의 존재가 강력히 의심되고 있어 많은 보고가 이루어지고 있다. 비소세포폐암에서 보고된 결과를 보면 46-94%까지 다양하게 보고되고 있다^{4-6), 13-15)}. 이는 3p가 광범위한 지역이므로 몇 군데 부위를 검사하였는가에 따라 달라질 수 있다. 또한 소세포폐암에서 거의 전 예에서 관찰되고 있다⁶⁻⁸⁾. 본 연구에서는 비소세포폐암을 대상으로 3p의 4부위의 microsatellite locus를 검사하였으며 이 부위는 deletion이 많이 관찰되는 지역으로 알려져 있다¹³⁾. 본 연구의 결과를

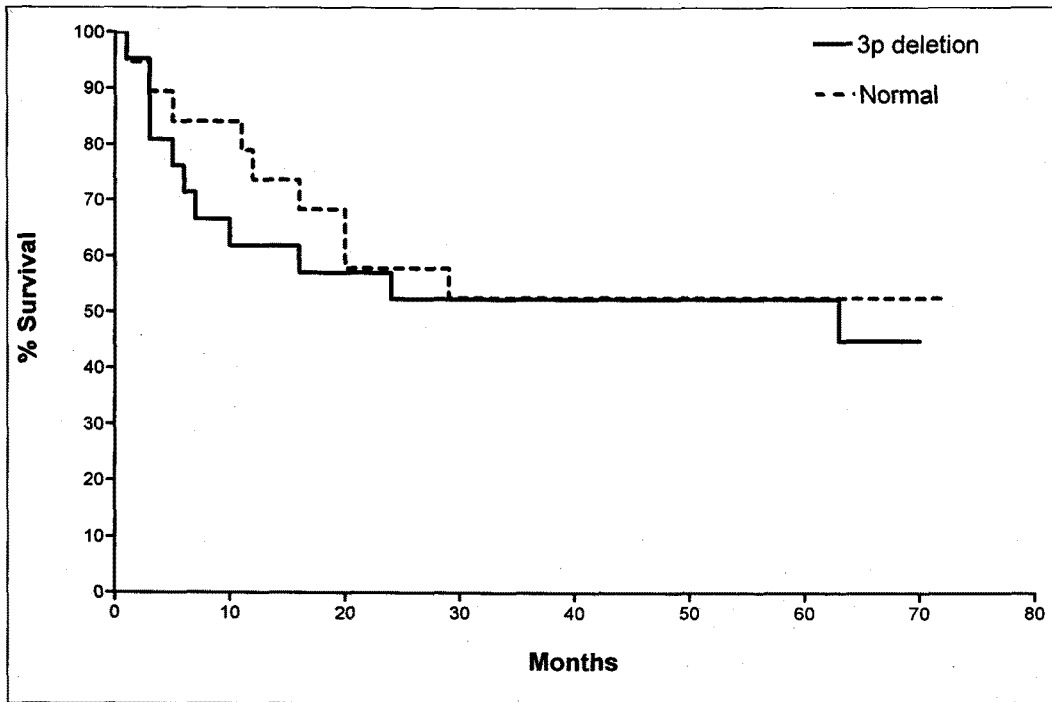


Fig. 4. Survival curve of the patients with squamous cell lung cancer according to the status of 3p deletion (not significant).

보면 squamous cell carcinoma 환자에서 adenocarcinoma 환자보다 좀더 높게 관찰되었으나 (55% vs 47.5%) 통계적으로는 유의하지는 않았다. 여러 연구 결과에서 squamous cell carcinoma에서 보다 높게 관찰되고 있으며¹⁴⁾ 본 연구도 환자수가 늘어나면 그 격차가 늘어나리라 생각된다. 3p deletion 과 흡연과의 연관성도 보고되고 있으나¹⁴⁾ 본 예에서는 48명의 흡연자중 26명(54%), 11명의 비흡연자 중 5명(45%)에서 관찰되어 두 군의 차이를 발견할 수 없었다. 특히 최근 담배의 발암물질로 알려진 benzo(a)pyrene diol epoxide에 의해 3p21.3의 이상이 관찰되어 흡연과의 관련성이 주목을 받고 있다¹⁵⁾. 특히 3p의 소실이 폐암 발생과정의 초기 병변에서 관찰되기 시작한다는 연구와 더불어 폐암 발생의 초기 target으로 인정받고 있다¹⁶⁾. 그 외에 흡연자에서는 정상 기관지 점막에서도 3p, 9p에서 LOH가 관찰된

다는 연구가 있어¹⁷⁾ 이 부위의 소실이 폐암의 발생의 초기에 관여한다는 다른 증거가 되고 있다.

3p 소실의 존재 유무에 따른 환자의 예후에 미치는 영향에 대한 연구도 이루어져 있다. Mitsudomi¹⁴⁾ 및 Horio¹⁸⁾의 연구에 의하면 3p deletion이 있는 경우 예후가 나쁜 경향이 있으며 특히 adenocarcinoma 환자에서 뚜렷하였다. 본 연구의 결과에서는 squamous cell carcinoma 및 adenocarcinoma 환자에서 모두 deletion이 있는 군에서 예후가 나쁘나 통계적인 유의성은 없어 외국의 결과와 차이를 보였다.

요 약

연구배경 :

3p는 종양억제유전자의 존재가 강력히 의심되는 염색체의 부위로 폐암을 비롯한 여러 암에서 변이가 관찰

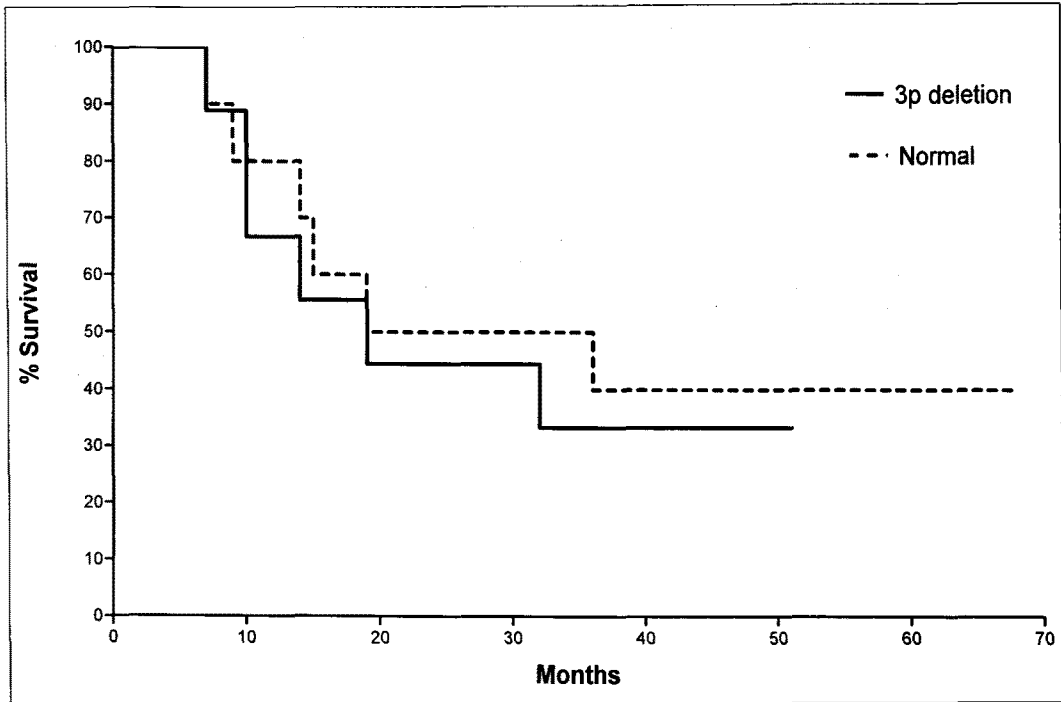


Fig. 5. Survival curves of the patients with adenocarcinoma of lung according to the status of 3p deletion (not significant).

되고 있다. 본 연구에서는 한국인의 비소세포폐암을 대상으로 3p의 4부위의 microsatellite locus에 대한 PCR-LOH를 시행하여 deletion의 빈도를 관찰하고 그 임상적 의의를 알아보고자 하였다.

방 법 :

3p의 3부위의 CA repeat [D3S1228 (3p14.1-14.3), D3S1067 (3p14.3-21.1), D3S1029 (3p21.1-21.3)] 및 1부위의 tetra repeat [D3S1537 (3p 22-24.2)]의 microsatellite를 대상으로 PCR을 시행한 후 polyacrylamide gel에서 전기영동 후 X-ray film에 현상하였다. 정상 폐의 DNA의 PCR product와 폐암 DNA의 PCR product의 band를 비교하여 LOH가 있는 경우를 관찰하였다.

결 과 :

62명의 비소세포폐암환자 중 59명에서 informative case이었고 이중 31명(52.5%)에서 PCR-LOH를 보여 3p의 deletion이 있음을 관찰하였다. 3p dele-

tion의 유무에 따라 환자의 흡연력, 병기 및 병리소견의 차이(squamous cell carcinoma : 55%, adenocarcinoma : 47%)를 관찰할 수 없었다. 또한 3p deletion의 유무는 비소세포폐암환자의 생존기간에도 영향을 주지 못 했으며 squamous cell carcinoma 및 adenocarcinoma로 나눈 군에서도 생존기간에 차이가 없었다.

결 론 :

본 연구의 결과로 3p deletion은 한국인의 비소세포폐암 환자에서 많이 관찰되어 중요 역할을 하고 있으나 임상적인 특징과의 연관성은 관찰할 수 없었다.

참 고 문 헌

1. 이세일, 박홍길, 안돈희, 박찬용, 고재욱, 서창인, 허윤석, 서경애: 한국인 암등록 조사자료 분석보고서, p18, 서울, 대한민국 보건복지부,

- 1996
2. Marshall CJ : Tumor suppressor genes. *Cell* 64 : 313, 1991
 3. Whang-Peng J, Kao-Shan C, Lee E, Bunn P Jr, Carney D, Gazdar AF, Minna JD : A specific chromosome defect associated with human small cell lung cancer : deletion 3p(14-23). *Science (Washington DC)* 215 : 181, 1982
 4. Sato S, Nakamura Y, Tsuchiya E : Differences of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 54 : 5652, 1994
 5. Kok K, Osinga J, Carritt B, Davis M, vanderHout A, vanderVeen A, Landsvater R, deLeij L, Berendsen H, Postmus P, Poppema S, Buys C : Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature(London)* 330 : 578, 1987
 6. Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettingill OS, Graziano S, Sorenson GD, Poiesz B, Minna J, Linehan M, Zbar B : Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small cell carcinoma of the lung. *N Eng J Med* 317 : 1109, 1987
 7. Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Shigimura T : Loss of heterozygosity of chromosome 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 9252, 1987
 8. Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi A : Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small cell lung cancer. *Nature(London)* 329 : 451, 1987
 9. Weber JL, May PE : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44 : 388, 1989
 10. Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Boiocchi M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res* 53 : 5775, 1993
 11. Jones MH, Yamakawa K, Nakamura Y : Isolation and characterization of 19 dinucleotide repeats polymorphism on chromosome 3p. *Human Mol Genet* 1 : 131, 1992
 12. Litt M, Hauge X, Sharma V : Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats : some causes and cures. *BioTechniques* 15 : 280, 1993
 13. Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y, Takahashi T. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7 : 445, 1992
 14. Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Sugio K, Yasumoto K, Sugimachi K, Gazdar AF : Loss of heterozygosity at 3p in non-small cell lung cancer and its prognostic implication. *Clin Cancer Res* 2 : 1185, 1996
 15. Wu X, Zhao Y, Honn S, Tomlinson GE, Minna JD, Hong WK, Spitz MR : Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced 3p21.3 aberrations and genetic predisposition to lung cancer. *Cancer Res* 58 : 1605, 1998
 16. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntyre DD, Minna JD, Gazdar AF : Allele specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA* 273 : 558, 1995
 17. Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF : Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 89 : 1366, 1997

18. Horio Y, Takahashi T, Kuroishi T, Hibi K, Suyama M, Niimi T, Shimokata K, Yamakawa K, Nakamura Y, Ueda R, Takahashi T: Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 53 : 1, 1993