

폐암발생과 Glutathione S-transferase M1, T1 및 N-acetyltransferase 1의 유전적다형성과의 연관성에 관한 연구

¹한림대학교 의과대학 내과학교실, ²서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소,
³서울대학교 의과대학 예방의학교실, ⁴서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이승준¹, 박계영², 오연목², 강대희³, 조수현³, 김수웅⁴, 유철규²,
이춘택², 김영환², 한성구², 심영수²

= Abstract =

Association of Genetic Polymorphism of Glutathione S-transferase M1, T1 and N-acetyltransferase 1 with Lung Cancer

Seung-Joon Lee, M.D.¹, Gye-Young Park, M.D.², Yeon-Mok Oh, M.D.², Daehee Kang, M.D.³,
Soo-Hun Cho, M.D.³, Soo-Ung Kim, M.D.⁴, Chul Gyu Yoo, M.D.², Chun Taek Lee, M.D.²,
Young Whan Kim, M.D.², Sung Koo Han, M.D.², Young-Soo Shim, M.D.²

¹Department of Internal Medicine College of Medicine Hallym University,
²Department of Internal Medicine and Lung Institute, ³Preventive Medicine,
and ⁴Urology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : Smoking and high-risk occupation have been known to be the risk factors of lung cancer. The carcinogen-metabolizing enzymes in human body such as glutathione S-transferase M1, T1 and N-acetyltransferase 1 have also been regarded as risk factors in many cancers, because the activities of those enzymes play a role in metabolizing the carcinogen. A case-control study was conducted to evaluate the genetic polymorphism of GSTM1, T1 and NAT1 in lung carcinogenesis in Korean men.

Methods : The histologically proven lung cancer cases were recruited from Seoul National University Hospital. The patients of more than 40-year-old with the nonmalignant urinary tract diseases were recruited as controls from the same hospitals. The informations of demographical characteristics and smoking were obtained by in-

Address for correspondence :

Young Whan Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University.

Yongon-Dong 28, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea

Phone : 02-760-2228 Fax : 02-762-9662 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

terview or chart review and the genetic polymorphisms of GSTM1, T1 and NAT1 were determined by PCR-based assay. The statistical analyses were performed by linear logistic regression.

Results : The number of case-control was 118 and 150, respectively. The smoking history was significantly higher in the lung cancer patients than the controls. The prevalence of GSTM1 null-type was statistically higher(OR=2.25 ; 95% CI=1.12-4.51) in squamous cell carcinoma than other genotypes, but other histologic types were not. The prevalence of GSTT1 null-type were not statistically higher than other genotypes in all histologic types. The fast acetylator of NAT1 was more prevalent than normal(OR=2.13 ; 95% CI=1.04-4.40) in all lung cancer patients.

Conclusion : The null-type of GSTM1 and fast acetylator of NAT1 are associated with development of lung cancer in Korean men. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 471-477)

Key words : Lung cancer, Polymorphism, Glutathione s-transferase, N-acetyltransferase.

서 론

폐암은 우리나라 암사망율의 세 번째를 차지하며¹, 미국이나 전유럽국가의 암발생에서 수위를 차지한다⁴. 폐암의 위험요인으로 제기되는 것 중 흡연은 40세 이상의 성인에서 90%를 설명할 수 있는 것으로 알려져 있으며 이 밖에 고위험직업군, 유전적요인 등이 제기되고 있다². 흡연시 폭로되는 발암물질은 약 50여종이 확인되고 있는데 이들 발암물질이 체내에 들어오면 체내의 대사효소에 의해 해독되거나, 활성화 된다.

Doll and Peto³의 보고에 의하면 인간의 암의 약 80% 정도가 환경 물질의 폭로와 관련이 있다고 하는데, 인간을 포함한 고등동물은 외부물질로부터 자신을 보호하는 기전을 갖고 있어, 외부물질을 대사하고, 해독하는 것이다. 이런 기전에 작용하는 대표적인 체내 효소계로 cytochrome P450s(CYP), glutathione S-transferases(GST), N-acetyltransferase(NAT) 등이 있는데, 이들 효소계의 이상이 외부물질의 해독에 이상을 가져와 암을 유발하는데 기여하리라 여겨지고 있다. 현재까지의 연구 결과에 의하면 이들 효소계는 유전적으로 다형성(genetic polymorphism)이 존재하며, 이들 유전적다형성에 의해 실제 효소계의 표현형(phenotype)이 결정된다. 또한 이와 같은 유전자형의 빈도는 인종별로 상이한 것으로 잘 알려져 있다⁵. 최근에 이들 효소계의 유전적다형성과 여러 질환

과의 관련성을 밝히고자하는 많은 연구가 여러 암들을 대상으로 활발히 진행되고 있다.

폐암의 경우 현재까지의 연구를 종합해보면 GSTM1의 소실형(null type)이 폐암의 위험요인으로 작용하는지에 대한 연구가 가장 활발히 진행되었다. 1986년 Siedegard 등⁷에 의해 폐선암에서 GSTM1의 소실형이 위험인자로 작용함이 보고된 이후에 여러 보고가 있었고, 1995년 McWilliams 등⁸은 이전의 연구를 메타분석한 결과 모든 조직형의 폐암에서 약간의 위험을 상승을 보인다고 보고하였다. GSTT1의 경우는 아직 거의 연구가 되어 있지 않은 실정이며, NAT1의 경우도 마찬가지이다.

본 연구는 폐암에 있어 외부의 독성물질을 해독하는 GSTM1과 GSTT1, 그리고 NAT1의 유전적다형성의 빈도에 대한 연구로서, 폐암의 발생에 있어서 이 세가지 유전자의 빈도를 살펴보고자 하였다. 이를 통해 폐암의 발암기전, 고위험군의 선정, 예방대책의 수립에 유용한 기초자료를 제공해 줄 것으로 생각된다.

대상 및 방법

1. 환자-대조군 모집

환자군은 1998년 2월 1일부터 1998년 9월 30일까지 서울대학교병원 내과에서 병리학적으로 확진된 남

자 폐암 환자로서 과거 악성종양으로 진단받은 과거력이 있는 경우는 제외하였다. 대조군은 40세 이상의 남성으로 서울대학교병원 비뇨기과에 입원한 비암성 비뇨기계 질환자로 하였고, 역시 악성종양으로 진단받은 과거력이 있을 경우 제외하였다.

2. 실험 방법

환자들에 대한 흡연력을 면접이나 병록지를 통해 얻었으며, 시료는 전혈 5cc를 환자의 구두 동의하에 채취하였으며, Qiagen DNA extraction kit(Cat 29106)를 이용하여 DNA를 추출하였다. GSTM1, GSTT1의 유전자형은 β -globin을 내부대조군으로 하여 다중중합효소연쇄반응(multiplex PCR)을 수행하였다⁹. Primer의 염기서열은 β -globin 5'-gaa ctc cct gaa aag cta aag c-3', 5'-gtt ggg gtc aaa tat acg gtg g-3', GSTM1 5'-gaa gag cca agg aca ggt ac-3', 5'-caa ctt cat cca cgt tca cc-3', GSTT1 5'-ttc ctt act ggt cct cac atc tc-3', 5'-tca ccg gat cat ggc cag ca-3' 이었다. PCR 반응의 조성은 dNTP 0.2 mM, Tris-HCl(pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Taq polymerase 1.25 unit(TaKaRa R004A), 각 primer 50 pmole, template 5 microL(200-500 ng/microL)으로 총 50 microL 반응을 하였다. Thermal cycler는 Biorad사의 Gene cycler TM을 사용하여 Deakin 등의 조건⁹을 변형하였는데 94°C 4분, 30회 반복의 94°C 20초, 57°C 20초, 72°C 45초, 다시 72°C 5분으로 수행하였다. 여기서 얻어진 PCR 산물 10 microL를 3% Metaphor agarose gel(FMC BioProducts Cat. 50180)에 적용시킨 뒤 50 Volt에서 1시간동안 전기영동한 후 자외선하에서 PCR 산물을 확인하였다(Fig. 1).

NAT1의 경우 기존에 3개 이상의 유전자형이 알려져 있는데, 염기서열순위 1088번에 점돌연변이(A → T)가 생기면 Mbo II에 의한 DNA 절단이 되지 않는데 이는 NAT1*10이라 명명되며 여러 암의 위험



Fig. 1. The multiplex PCR of GSTM1 and T1.

유전자로 알려져 있다¹⁰. 한편 NAT1*11은 19bp의 염기서열 소실이 존재하는 다형성 말하며, wild type은 Mbo II에 의해 절단되는 NAT1*4이다¹⁰. 이들 유전자형을 Mbo II에 의한 RFLP법으로 확인하였다. NAT1*10이 최소 하나의 DNA 가닥에 존재한 경우는 fast acetylator가 되며, NAT1*4나 NAT1*11만으로 이루어진 다형성은 정상 acetylator가 됨이 알려져 있다¹⁰. Nested PCR법을 이용하였으며¹¹ primer의 염기 서열은 1차반응에서 5'-gat caa gtt gtc aga aga aat cgg-3', 5'-cta gca taa atc acc aat ttc caa g-3', 2차반응에서 5'-gac tct gag tga ggt aga aat-3', 5'-cca cag gcc atc ttt aga a-3'로 하여 GST의 경우와 같은 조성에서 PCR반응을 수행하였다. 반응 온도 및 시간은 25회 반복(2차 PCR시는 35회)의 94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초 및 이후 60°C 10분으로 하였다. 여기서 얻어진 PCR 산물을 MboII(Promega, Cat R6723) 10 units와 혼합하여 37°C에서 최소 4시간 반응시켰다. 반응후 4% Metaphor agarose gel에 50 V, 1시간 전개 후 자외선하에서 확인하였다(Fig. 2).

3. 자료의 분석

자료의 분석은 SAS windows version 6.12를 이용하여 선형로지회귀분석을 수행하여 대응비(odds ratio) 및 95% 신뢰구간을 구하였다.

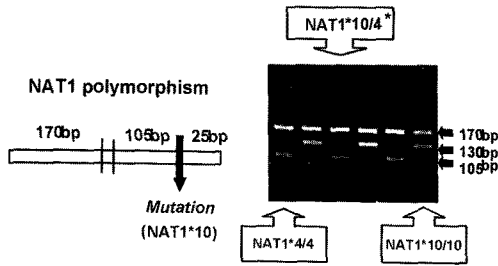


Fig. 2. The NAT1 polymorphisms.
 (*NAT1*10/4 is the heterozygote of NAT1*10 & NAT1*4)

결 과

모집된 환자군은 총 118명이었으며 대조군은 150명이었다. 대조군의 질환은 양성전립선비대증이 55명(37%), 요로계결석질환이 24명(16%), 요로협착이 13명(8.8%), 기타 비암성 비뇨기계질환으로 구성되

었다. 평균연령은 환자 및 대조군에서 각각 61±12.7, 60.4±9.4세로 통계적 차이가 없었으며, 흡연력은 환자 및 대조군에서 각각 85%, 71%로서 환자군에서 높게 관찰되었다(p<0.05). 폐암환자군의 조직학적 구성은 편평상피암이 50명(42.4%), 선암 32명(27.1%), 소세포암 23명(19.5%), 기타가 13명(11.0%)이었다.

GSTM1과 T1의 소실형과 폐암의 위험도 상승을 파악하기 위한 선형로짓회귀분석의 결과는 Table 1과 같은데, 이 때 GSTM1의 소실형이 편평상피암에서 대응비 2.25(95% CI=1.12-4.51)로 의미있는 위험도 상승을 보였다. GSTT1의 소실형은 폐암의 위험도 상승을 보이지 않았다(Table 2). NAT1의 경우 전 폐암환자를 대상으로 했을 때 대응비 2.13(95% CI=1.04-4.40)으로 의미있는 위험도 상승을 보였다. 그러나 조직학적 형태에 따른 분석에서는 의미있는 위험도 상승을 관찰할 수 없었다(Table 3).

Table 1. The genotype of GSTM1 and lung cancer risk

	Case (null/total)	Control (null/total)	OR	95% CI
All histology	70/118	80/150	1.28	0.78-2.08
Non-small cell	62/95	80/150	1.64	0.97-2.79
squamous	14/50	80/150	2.25	1.12-4.51
adenocarcinoma	15/32	80/150	0.99	0.46-2.13
Small cell	8/23	80/150	0.47	0.19-1.17

Table 2. The genotype of GSTT1 and lung cancer risk

	Case (null/total)	Control (null/total)	OR	95% CI
All histology	57/118	77/150	0.89	0.55-1.44
Non-small cell	45/95	77/150	0.85	0.51-1.43
squamous	27/50	77/150	1.11	0.59-2.11
adenocarcinoma	12/32	77/150	0.57	0.26-1.25
Small cell	12/23	77/150	1.03	0.43-2.49

Table 3. The genotype of NAT1 and lung cancer risk

	Case (fast type/total)	Control (fast type/total)	OR	95% CI
All histology	98/118	113/150	2.13	1.04-4.40
Non-small cell	78/95	113/150	1.97	0.92-4.23
squamous	43/50	113/150	2.64	0.97-7.23
adenocarcinoma	25/32	113/150	1.98	0.70-5.64
Small cell	20/23	130/150	3.08	0.75-12.6

고 찰

암의 기전을 밝히려는 최근의 연구들이 암유전자 (oncogene), 암억제유전자 (tumor suppressor gene)의 역할에 대해 집중되어 많은 업적을 남기었다. 폐암의 경우와 같이 외부발암물질에 의한 발암과정에서 있어 개인에 따른 감수성의 차이를 밝히려는 시도는 비교적 최근에 수행되고 있다. 즉 같은 정도의 발암물질에 폭로력을 가졌어도 특정인에서만 암이 발생하는 이유를 밝히려는 연구는 암의 고위험군의 선별에 유용하며 발암과정에서 암유전자, 암억제유전자와의 관련성을 알 수 있으므로 중요한 위치를 차지한다고 생각된다. 체내 대사효소계가 발암과정에서 중요한 위치를 차지하고 있다는 보고는 cytochrome P450s, GST, NAT에 집중되어 연구되고 있는데, 이는 이 대사효소계가 담배에 포함된 발암물질의 체내 대사에서 중요한 역할을 하고 있기 때문이다.

본 연구에서 대조군을 비암성 비노기계 환자로서, 병원 기초 대조군 (hospital-based control)으로서, 이는 폐암이 진단되는 양상과 유사한 질환 중 선택된 것이다. 호흡기계의 다른 질환을 대조군으로 할 경우 만성폐쇄성폐질환과 같은 체내대사효소계와 관련성이 있다고 보고되는 질환자가 임적될 가능성이 있다¹².

GSTM1은 그 유전자의 소실형이 있음이 비교적 일찍 알려져¹³ 이 소실형이 GST를 생성하지 못하여 외부발암물질이 체내에 들어오는 경우 암을 일으킬 것으로 생각되었다. Siedegard 등(1986)은 GSTM1의

소실형이 흡연력이 있는 폐암환자(특히 선암)에서 높게 나타났다고 보고하였으나⁷, 이후의 연구에서는 GSTM1 소실형과 편평상피암이나 선암간에 상관관계가 입증되지 않았다¹⁴. 그러나 Nazar-Stewart 등은 편평상피암의 위험도를 증가시킨다고 보고하였다¹⁵. 최근에 이루어진 10개의 기존연구를 종합한 메타분석의 결과는 폐암의 위험도에 약간의 증가를 보인다고 하였다⁸. 흡연에 의해 유발되는 방광암의 경우도 여러 연구에서 방광암의 위험요인으로 작용함이 알려졌으며, 국내에서도 김현 등은 환자-대조군 연구를 통해 GSTM1의 소실형이 방광암의 위험요인이 됨을 보여주었다³. 소화기계암 및 피부암에도 이 유전자의 소실형이 암의 위험도를 높인다는 보고도 있다⁸. 본 연구의 결과는 GSTM1의 소실형이 폐암중 편평상피암에서 대응비 2.25(95% CI=1.12-4.51)로 의미있는 폐암의 위험도 상승을 보여 주었는데, 이는 기존의 연구와 부합되는 결과로 생각된다. 대조군의 약 반수를 차지하는 이들 소실형이 폐암의 위험요인이 된다는 사실은 흡연에 의한 폐암의 예방적 측면에서 이들이 고위험군이 된다는 사실을 보여주어 의의가 클 것으로 생각된다.

GST의 이형효소인 GSTT1도 소실형이 있음이 알려졌는데¹⁶. GSTT1도 담배에 포함된 methyl chloride나 ethylene oxide와 같은 발암물질의 대사에 관여하여¹⁷ 암에 대한 개인감수성인자로서의 연구가 진행되어 왔다. 사람의 GSTT1과 유사한 작용을 하는 쥐의 GST5-5가 epoxide를 대사하는 것이 알려지면서⁵ GSTT1의 소실형도 흡연과 관련된 암의 위험요

인이 될 가능성이 제기되었다. 그러나 흡연과 관련된 방광암 및 폐암에서 뚜렷한 위험요인으로 작용됨을 보여준 연구는 없다. 본 연구의 결과도 기존의 연구에서처럼 위험도의 증가를 보여주지 않아 GSTT1의 소실형은 발암과정에서 역할을 하지 않을 것으로 생각된다.

NAT의 경우 과거부터 isoniazid와 같은 약제에 대해 대사 정도의 차이가 있다는 사실이 관찰되어 유전적다형성이 있음이 비교적 일찍 알려졌다. NAT2가 이들 약제의 대사속도에 관련있는 것이 알려졌고 과거의 연구는 주로 NAT2와 암과의 관련성을 보고자 하는 연구였다⁵. NAT1은 비교적 최근에 다형성이 존재함이 밝혀졌고, 현재까지의 연구를 보면 NAT1의 fast acetylator와 다른 암과의 관련성에 대해서는 그다지 많은 연구가 되어 있지 않다¹⁸. 그러나 대장 및 직장암과의 관계를 본 연구는 fast acetylator가 대장 및 직장암 환자에서 높은 빈도로 나타나고 있다¹⁹. 최근 Okkels 등²⁰은 NAT1과 2의 동시 이상시 흡연자에서 방광암의 위험을 증가시킴을 보여주었다. 본 연구는 NAT1의 fast형이 폐암의 위험을 증가시킨다는 최초의 보고로 생각된다. 즉 전체 폐암환자를 대상으로 했을 때 NAT1의 fast형이 대응비 2.13(95% CI=1.04-4.40)으로 의미있는 위험도 증가를 보였으며 조직형에 따른 분석에서도 통계적으로 의미있게 나타나지는 않았지만 대응비가 1.97-3.08로 높게 나타났다. 정확한 기전에 대해서는 이후의 연구를 통해 밝혀져야겠지만, NAT1이 흡연과 관련된 폐암 및 방광암에서 중요한 역할을 한다는 사실은 이들 효소계가 발암과정에서 암유전자 등과 상호작용하여 DNA에 손상을 주어 암의 유발에 관여할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 체내 대사효소계에서 중요한 역할을 담당하는 GSTM1의 소실형과 NAT1의 fast형의 빈도는 폐암의 발생과 관련됨을 보여 주었으며, 향후 이들 효소계와 암유전자, 암억제유전자 등과의 상호작용에 대한 연구를 통해 발암과정을 이해하는데 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

발암물질의 체내 대사효소계인 GSTM1, T1과 NAT1의 유전적다형성의 발현 양상이 폐암발생과 연관성이 있는가를 밝히기 위해 환자-대조군 연구를 수행하였다.

방 법 :

서울대병원에서 병리학적 확진받은 환자를 폐암환자군으로, 비암성요계질환으로 입원한 환자를 대조군으로 설정하여, 각 환자에 대한 성, 연령, 흡연력 등을 병력조사나 병록지검토로 얻었으며, 말초혈액을 채취하여 DNA를 분리한 뒤, 다중중합효소연쇄반응을 이용하여 GSTM1, T1의 유전자형을, nested PCR법을 이용하여 NAT1의 유전자형을 결정하였다.

결 과 :

모집된 환자, 대조군은 각각 118명, 150명이었고, 환자군에서 흡연력은 통계적으로 의미있게 높았다($p < 0.05$). GSTM1의 소실형은 비소실형에 비해 편평상피암의 위험을 높였으나(OR=2.25 ; 95% CI=1.12-4.51), GSTT1의 경우는 폐암의 위험인자로 작용하지 않았다. NAT1의 fast acetylator형은 폐암환자전체를 분석했을 때 통계적으로 의미있는 위험도 상승을 보였다(OR=2.13 ; 95% CI=1.04-4.40).

결 론 :

GSTM1의 소실형과 NAT1의 fast형은 폐암발생과 관련성이 있다.

참 고 문 헌

1. 통계청. 사망원인통계연보-1996년, 서울: 일지사; 1997
2. 한용철. 임상호흡기학, 1판. 서울: 일조각; 1990
3. 김현, 김원재, 이형래, 이무송, 김철환, 김로사 등. N-acetyltransferase 2와 glutathione S-transferase mu 및 theta 다형성이 방광암 발생에

- 미치는 영향에 대한 환자-대조군 연구. 예방의 학회지 1998;31(2):275-84
4. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54:594-606
 5. Ponder BAJ, Cavenee WK, Solomon E. *Genetics and Cancer : A Second Look*. New York : CSHL Press;1995.
 6. Doll R, Peto R. *Causes of Cancer*. Oxford : Oxford University Press ; 1981
 7. Seidergard J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 1990;11:33-6
 8. Mc Williams JE, Sanderson BJS, Harris EL, Richert-Boe KE, Henner WD. GSTM1 deficiency is associated with a moderate increase in risk of developing lung cancer. *Proce Am Ass Cancer Res* 1995;36:121-5
 9. Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C et al. GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer. *Carcinogenesis* 1996;17(4):881-4
 10. Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP, Kadulbar FF. Role of aromatic amine acetyltransferases, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res* 1995;55(15):5230-7
 11. Okkels H, Sigsgaard T, Wolf, Autrup H. Arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 polymorphisms in susceptibility to bladder cancer : The influence of smoking. *Cancer Epidem Biomarkers Prev* 1997;6:225-31
 12. Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F, Lamb D, Smith CA. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol* 1997;16(7):356-60
 13. Board PG : Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am J Hum Genet* 1981;33:36-43
 14. Zhong S, Howie AF, Detterer B, Taylor J, Hayes JD, Beckett GJ et al. GSTM locus : use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1991;12:1533-7
 15. Nazar-Stewart V, Motulsky AG, Eaton DL, Eaton DL, White E, Hornung SK et al. The GSTM polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2313-8
 16. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM et al. Human GSTT1 : cDNA cloning and the characterisation of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271-6
 17. Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB et al. The GST supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992;98:87-94
 18. Vatis DP, Weber WW, Bell DA. Nomenclature for NAT. *Pharmacogenetics* 1995;5:1-36
 19. Bell DA, Badawi AF, Lang NP, Ilett KF, Kadulbar FF, Hirvonen A. Polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) polyadenylation signal : association of NAT1*10 allele with higher N-acetylation activity in bladder and colon tissue. *Cancer Res* 1995;55(22):5226-9