

위 선종 및 선암에서 Trefoil Factor Family 1 단백질의 발현 양상

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실 및 ¹외과학교실

박원상 · 김영실 · 유남진 · 박조현¹ · 유진영 · 이연수 · 이정용

Expression Pattern of the Trefoil Factor Family 1 in Gastric Adenoma and Carcinoma

Won Sang Park, M.D., Young Sil Kim, M.D., Nam Jin Yoo, M.D., Cho Hyun Park, M.D.¹, Jin Young Yoo, M.D., Youn Soo Lee, M.D. and Jung Young Lee, M.D.

Departments of Pathology and ¹Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: The trefoil factor family 1 (TFF1) has a protective effect against gastric mucosal damage induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs or ethanol. In addition, a TFF1 knockout mouse model has exhibited circumferential adenomas with high-grade dysplasia, of which 30% progressed into frankly invasive carcinomas. We tried to determine whether the expression pattern of the TFF1 could be involved in the development of sporadic gastric carcinomas.

Materials and Methods: We examined TFF1 expression in a series of 43 sporadic gastric carcinomas and 18 gastric adenomas by immunohistochemistry.

Results: Strong positive TFF1 staining was identified primarily in the normal gastric mucosa, mainly in the cytoplasm of the superficial and foveolar epithelium. We found TFF1 expression in 55.8% (24 out of 43) of the gastric carcinomas and in 16.7% (3 out of 18) of the gastric adenomas. Statistically, TFF1 immunoreactivity was significantly higher in diffuse-type (82.4%) than in intestinal-type (38.5%) carcinomas ($p=0.0058$, Fisher's exact test).

Conclusion: Our findings provide sufficient evidence that the expression of TFF1 in gastric cancer may simply disclose gastric-type differentiation of neoplastic cells and provide further support for the existence of at least two pathways of malignant transformation of the gastric mucosa: one via intestinal metaplasia and adenomatous dysplasia, leading to

glandular carcinomas with intestinal-type differentiation, and the other via hyperplastic changes or de novo changes, leading to diffuse carcinomas and to a subset of glandular carcinomas displaying gastric-type differentiation. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2001;1:4-9)

Key Words: pS2, Stomach neoplasm, Differentiation

중심 단어: pS2, 위종양, 분화

서 론

위암은 우리 나라를 비롯한 아시아인에서 가장 흔한 암으로 우리 나라에서는 매년 전체 암의 약 21%인 약 16,000명이 새로이 위암 환자로 등록되며 남자 암의 24.4%, 여성 암의 16.3%를 차지하고 있다.(1) 최근 분자생물학적 연구기법이 발달함에 따라 위암의 발생 및 진행에 관련된 여러 유전자와 유전자 산물들이 발견되었고 이들의 역할과 기전을 밝히기 위한 많은 연구들이 진행되고 있으나 위암의 발생과 관련되는 분자생물학적 기전은 아직 잘 모르는 실정이다.

Trefoil factor family (TFF) 펩티드들은 하나 혹은 두개의 삼엽형 모티프(trefoil motif)를 가지는 작은 분자로서, 내부에 6개의 cysteine 아미노산이 3개의 이황결합(disulfide bond)을 하여 특징적인 3개의 고리 구조들을 형성한다. (2) 이 펩티드들은 점액 분비세포들에서 합성되는데 세포 내의 점액 과립(mucus granule) 내에 존재하다가 점액과 함께 상피세포의 표면으로 분비되는 것으로 알려져 있다. (3) 현재까지 사람에서는 3가지 종류의 TFF 단백질이 발견되었는데 이 중 TFF1은 주로 위 점막의 소화(foveola) 및 상피세포에서 주로 생산되며(pS2로도 불리움), TFF2는 위의 점액경세포(mucus neck cell)와 십이지장의 부르너선(Brunner's gland)에서 분비되고(혹은 spasmolytic peptide: SP), intestinal trefoil factor로 불리는 TFF3는 전체 장의 배상세포(goblet cell)에서 주로 분비된다.(4) 사람에서 이들 TFF의 유전정보를 가지고 있는 3개의 유전자는 모두 염색체 21q22.3에 존재하며 55 kb 내에 모여져 있어,(5) 진화론적으로 이들 3개의 유전자가 하나의 유전자에서 복제되

책임저자 : 이정용, 서울 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 137-701
Tel: 82-2-590-1190, Fax: 82-2-537-6586
E-mail: stingray@cmc.cuk.ac.kr

이 논문은 1999년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-99-041-F00075).

접수일 : 2000년 8월 1일, 게재승인일 : 2001년 2월 17일

어 만들어졌다는 가설을 뒷받침하고 있다.

이중 TFF1은 위궤양이나 염증성 장질환과 같은 병변 부위에서 과발현되고,(6,7) 비스테로이드계 소염제나 에탄올에 의한 위 점막의 손상에 대해 방어 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어,(8) TFF1은 성장인자(growth factor)나, 단백질분해효소 억제제(protease inhibitor), 혹은 위 점막을 보호하고 세포 성장을 조절하는 점액의 안정화 요소로 작용하는 것으로 생각되어지고 있다. 하지만 TFF1은 정상 위 점막이나 과증식성 용종(hyperplastic polyp)보다 장화생(intestinal metaplasia)이나 선종에서 낮게 발현되고 있으며,(9) 위암 조직의 50~60%에서는 TFF1의 발현이 소실되는 것으로 밝혀져 있다.(10-12) 이 외에도 TFF1 유전자를 knockout 시킨 마우스에서는 모두 위 점막 전체에서 위 점액의 발현이 소실되었고 현저히 길어진 위 소와(gastric pits)를 관찰할 수 있었다. 5개월 후에는, 모든 마우스들이 전정부 점막 전체를 포함하는 환상(circumferential) 모양의 선종이 생겼고 이들 선종은 고등급 이형성을 보였으며 이들 중 30%는 침습성 암종으로 진행하였다.(13) 저자들은 선종연구에서 선종 18예 중 1예, 위암종 43예 중 7예에서 TFF1 유전자의 체세포 돌연변이(somatic mutation)를 발견하여 보고하였으며,(14) TFF1 유전자가 위치할 21q22 부위에서 이형접합성 상실(Loss of Heterozygosity, LOH)을 검색한 결과 대립형질의 소실을 흔히 관찰할 수 있었다. (15) 이러한 소견은 TFF1이 위암의 발생과 진행에 기여하는 위암 특이적 종양억제유전자(tumor suppressor gene) 중에 하나임을 강력히 시사한다고 하겠다.

이에 저자들은 TFF1 유전자의 단백질 발현양상의 변화가 산발성 위암종 발생 및 진행에 관련이 있는지를 알아보기 위하여 43예의 산발성 위암종과 18예의 선종에서 면역조직화학염색법으로 TFF1 단백질의 발현을 검색하였다.

방 법

1) 재료

가톨릭 의과대학에서 수술로 제거된 산발성 위암종 43예와 선종 18예를 대상으로 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직들을 이용하였다. 모든 환자들에서 위암에 대한 가족력은 없었다. 파라핀 포매조직을 5 μ m 두께로 박절하여 H&E 염색을 시행한 슬라이드를 광학현미경으로 검색하여 위암종을 Lauren 분류(16)에 따라 분류하였는데 장형(intestinal-type)이 26예였으며 미만형(diffuse-type)이 17예였다. 한 슬라이드에 장형과 미만형이 같이 존재하는 경우는 본 연구에서 제외시켰다. 18예의 선종은 핵의 이형성 정도에 따라 고등급 이형성이 있는 11예와 저등급 이형성이 있는 7예로 구분하였다.

2) 면역조직화학염색

TFF1의 발현을 확인하기 위해 사람 TFF1에 대한 쥐의 단클론(monoclonal) 항체(pS2, Clone BC04, Signet Laboratory, Dedham, MA, USA)를 1 : 200으로 희석하여 사용하였다. 발현정도를 높이기 위해 tyramide signal amplification kit (NEN Life Science, Boston, MA)를 사용하였는데, 이 kit에는 정상 혈청, streptavidin-peroxidase 그리고 biotinylated tyramide가 포함되어 있다. 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 박절하여 poly-L-lysine-coated slide 위에 부착시키고 60°C에서 2시간 건조시켰다. 항원 회복(antigen retrieval)을 위해 citrate buffer (0.01 mol/L, pH 5.6)에 탈파라핀된 조직절편이 부착된 슬라이드를 담그고 pressure cooker를 이용하여 microwave (750 W)에 5분간 3회 가열하고 20분간 pressure cooker 안에 유지시켰다. Phosphate-buffered saline (PBS)에 수세한 후 1% 과산화수소수에서 내인성 peroxidase 활성을 억제시켰다. TNT buffer (0.1 mol/L Tris-HCL, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl and 0.05% Tween 20)로 10분간 2번 수세한 후 TNB buffer (0.1 mol/L Tris-HCL, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl and 0.5% blocking reagent)를 처치하였다. PBS로 수세한 후 1 : 200으로 희석된 TFF1 항체를 가하고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이후 biotin과 결합된 이차 항체를 가하고 37°C에서 50분간 반응시킨 후 streptavidin-peroxidase 복합체를 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 다음, biotinylated tyramide를 실온에서 7분간 처리하였다. 각 반응 단계마다 TNT buffer에 5분씩 3번 수세한 후 다음 단계를 실시하였다. 반응산물은 diaminobenzidine (Sigma, St Louis, MO)으로 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색한 다음 흐르는 물에 세척하고 발삼으로 봉합하였다. 결과는 광학현미경으로 3명의 병리의사에 의해 각각 분석되었다.

결 과

TFF1 발현소실이 위암발생에 관여하는지를 조사하기 위해 저자들은 사람 TFF1에 대한 쥐 단클론 항체를 사용하여 위 종양에서 면역조직화학염색을 시행하였다. 면역염색은 다음의 여러 기준에 의해 TFF1 항체의 특이성을 확립하였다. 첫째, 동일 희석배수로 정상 쥐 혈청을 사용하여 면역염색을 하였을 때 모든 세포가 음성이었다. 둘째, 염색 강도는 항체의 희석 배수가 클수록 감소하였다. 셋째, 항TFF1 항체 특이성은 이미 다른 연구자들에 의해서도 검증되었다.(12)

면역조직화학염색상 TFF1 단백질은 정상 위 점막의 상피세포나 종양세포의 세포질에서 양성으로 염색되었고 핵은 완전히 음성이었다(Fig. 1). TFF1은 모든 표본의 정상 위 점막 소와 또는 표면 상피세포의 세포질에서는 강하게 염색되었으나 간질내 섬유모세포와 종양 세포 주위의 림

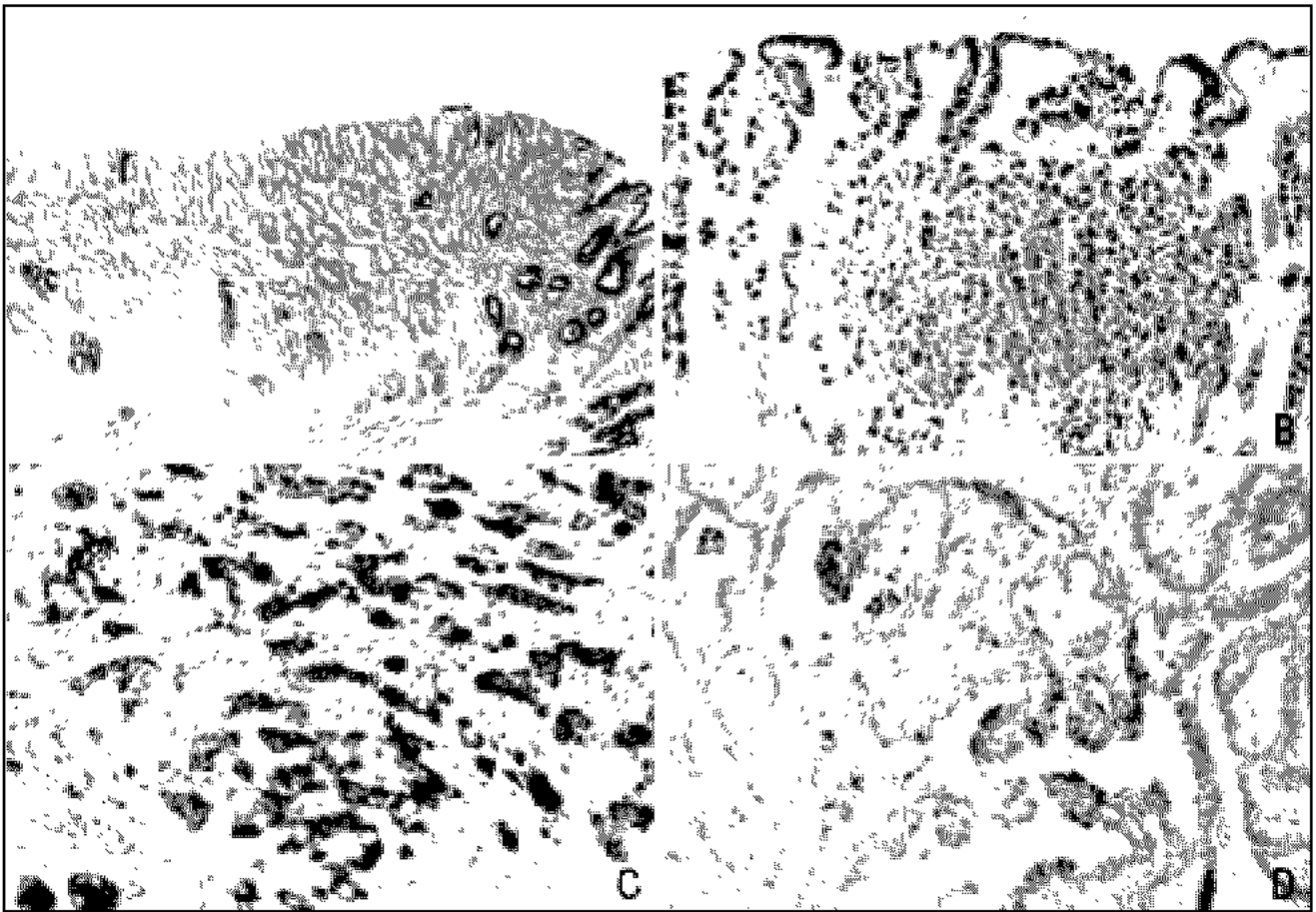


Fig. 1. TFF1 immunostaining in gastric tumors. (A) Negative immunoreactivity of TFF1 in tubular adenoma. Note the intense immunoreactivity in the adjacent normal foveolar and superficial cells of gastric mucosa (original magnification, $\times 100$). (B and C) Immunoreactivity in diffuse-type gastric cancers: all of the gastric cancer cells showed intense immunostaining in signet ring cells of early gastric cancer (B) and undifferentiated tumor cells (C) ($\times 200$). (D) Heterogeneous pattern of TFF1 immunoreactivity in an intestinal-type gastric cancer. Note focal positive staining in 30% to 40% of neoplastic cells ($\times 200$).

프구에서는 염색되지 않았다.(Fig. 1A & 1B) 흥미롭게도 TFF1 발현은 완전 장화생(complete intestinal metaplasia)의 배상세포와 불완전 장화생(incomplete intestinal metaplasia)의 배상세포 및 원주세포 모두에서 발견되었다. 위암종에서는 44.2%(43예 중 19예) 그리고 위선종의 83.3%(18예 중 15예)에서 TFF1의 발현이 음성으로 관찰되었으며, TFF1의 발현이 관찰된 위암종의 55.8%(24예) 그리고 선종의 16.7%(3예)에서는 정상 위점막에 비해 종양조직에서의 TFF1 발현이 다소 감소되어 있었다(Fig. 1). 조직학적 분류에 따르면 미만형 위암 17예 중 14예(82.4%)에서, 그리고 장형 26예 중 10예(38.5%)에서 TFF1의 발현이 관찰되었다. 통계학적 분석에 의하면 TFF1 단백질 발현은 장형보다 미만형에서 유의하게 높게 관찰되었다($p=0.0058$, Fisher's exact test). 하지만 위암종에서 TFF1의 염색성은 종양세포의 조직학적 특성에 따라 매우 다양하여 미만형 위암, 특히 인환세포(signet ring cell)형이나 점액 분비형인 경우에는 대

부분이 강한 양성 반응을 보였으나(Fig. 1B & 1C), 장형 위암의 경우에는 일반적으로 국소적이거나 미약하게 발현되는 양상을 보였다(Fig. 1D).

고 찰

위암종은 아시아에서 높은 빈도로 발생하며 세계적으로 암으로 인한 주된 사망 원인 중의 하나이다. 하지만 많은 연구자들의 노력에도 불구하고 위암 발생에 관여하는 분자생물학적 기전은 아직 불분명하다. TFF1은 특히 위암에서 종양의 발생이나 성장을 억제하는 특성을 가지고 있으나 이 단백질의 정확한 기능은 아직 알려져 있지 않다. 저자들은 ① TFF1 발현이 위의 장화생과 선종에서는 감소되며 위암종의 50~60%에서 완전히 소실된다는 점, ② TFF1 knockout mouse model에서 모든 쥐들이 고등급 이형성을 가진 선종이 발생하며 이중 30%는 침습성 암종

으로 진행한다는 점,(13) ③ TFF1 펩티드의 용량이 증가할수록 형태학적 변화없이 위암세포주의 증식능을 감소시킨다는 점,(17) ④ TFF1 유전자가 위치한 21q22 부위가 위암에서 흔히 결손된다는 증거(14,15) 등에 근거하여 TFF1 유전자의 발현 양상의 변화가 한국인의 산발성 위종양의 발생 및 진행에 관여하리라 생각하게 되었다.

이전의 연구들을 보면, Machado등(9)은 위암종에서 TFF1 발현 소실이 흔히 나타난다고 보고하였다. 또한 한 유전자의 전사를 불활성화시키는 메틸화 연구에서는 TFF1 유전자의 촉진자 메틸화(promoter methylation)가 TFF1 발현이 감소된 위암종 조직이나 장화생에서 발견되는 반면, TFF1 발현이 유지되어있는 암종에서는 촉진자 메틸화가 관찰되지 않는다는 보고도 있다.(18) 이 외에도 저자들은 선행연구에서 18예의 선종 중 1예, 43예의 위암종 중 7예에서 TFF1 유전자의 체세포 돌연변이를 발견하여 보고하였으며(14) TFF1 유전자가 위치한 21q22 부위에 대한 LOH 연구에서 대립형질의 소실이 흔히 관찰되는 것을 확인하였다.(15) 본 연구에서 저자들은 18예 선종 중 15예(83.3%), 43예 위암종 중 19예(44.2%)에서 TFF1 발현의 소실을 관찰하였는데 이러한 결과는 다른 연구자들의 결과들과 일치하며,(10-12) TFF1 단백질 발현의 소실이 위 종양의 발생 초기에 일어난다는 것을 암시한다.

흥미로운 것은 TFF1 발현 빈도가 장형 암종보다 미만형 암종에서 유의하게 높게 나타나는 것인데(Fisher's exact test, $p=0.0058$), 염색 강도도 미만형에서 더 강하였다. 분화적인 면에서 볼 때 위암세포들은 위형 분화(gastric differentiation)를 보이는 소화세포 및 점액소화세포(mucoepithelial cells)와 장형 분화를 보이는 배상세포 및 흡수세포로 구분된다. 일반적으로 장형 위암종의 전암성 병변으로 알려진 선종은 장형 분화를 보이는 세포로 구성되어 있는데 본 연구에서는 선종의 16.7%에서만 TFF1이 발현되었다. 또한 조직화학적, 전자현미경적 연구에서 보면 장형 원주세포들은 장형 위암에서 더 뚜렷하게 나타나며 소화세포나 점액소화세포들은 미만형 위암에서 관찰되고 있다.(19,20) Luqmani등의 연구에 의하면 인환세포암종을 포함한 미분화 위암에서 얻은 두 세포주는 TFF1 mRNA를 발현하는 반면 고분화 위암에서 얻은 두 세포주에서는 TFF1 mRNA의 발현을 관찰할 수 없었다.(11) 이러한 소견들은 TFF1 발현 빈도가 본 연구와 다른 연구에서 보여준 것처럼 선종, 장형 암종, 미만형 암종 사이에서 다른 이유를 뒷받침할 수 있을 것이다.(10-12) 본 연구와 앞서 언급된 연구들의 결과를 종합하면 위암에서 TFF1 발현은 종양세포가 위형 분화를 하는데 중요한 작용을 하고, 위점막 세포의 악성 전환에는 적어도 두 가지 경로가 있다는 것을 의미하고 있다. 하나는 장화생과 선종성 이형성을 거쳐 장형 분화를 보이는 선암종으로 진행되는 경로이며 또 하나는 증식성 변화나 신생(de novo) 변화를 거쳐 미만

형 암종이나 일부의 위형 분화를 보이는 선암종으로 진행되는 경로이다.(9)

TFF1 knockout mouse model의 연구에서 표현형의 변화는 3주된 새끼 때부터 전정부 점막의 비후 및 증식이 시작되어 고등급 이형성이 있는 선종으로 진행되었으며 이중 30%는 5개월 쯤 침습성 암종으로 진행되었다.(13) Wu 등의 연구에 의하면 TFF1 발현 소실은 미만형 위암보다는 장형 위암에서 악성 전환 과정의 초기 단계에 일어남을 관찰할 수 있었다.(21) 본 연구에서 저자들은 장형 위암의 전암성 병변으로 알려진 선종의 16.7%에서는 TFF1 발현을 관찰할 수 있었으나 나머지 예에서는 TFF1의 발현이 완전히 소실되어 있었다. 이러한 결과들을 보면 TFF1 기능의 상실은 위암 특히 장형 위암발생의 매우 초기 단계에 관여하리라는 설명이 합당하다.

위장관계(gastrointestinal system)는 섭취된 음식물이나 발암물질을 포함한 다양한 유해 물질에 의한 손상에 대해 끊임없이 노출되어 있다. 포유동물에서 trefoil 단백질은 점액의 형성과 밀접한 연관성이 있고 위암종에서도 TFF1 발현은 점액성 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(22) 그리고 TFF 펩티드는 위점막 내강 표면의 생리적 방어물로서 점막 방어기전에 관여하는 것으로 보고되어 있으며, TFF1 knockout mouse model의 연구에서는 TFF1 발현 소실로 인해 위점막의 점액이 소실되어 있었다.(13) 이 외에도 이들은 분비된 점액의 생리적 성질을 변화시켜, 정제된 점액을 만드는 실험에서 단당류 축적에 점액분자가 결합함으로써 적절한 밀도와 점도를 증가시킨다.(8) 재결합(recombinant) TFF1을 구강 내 또는 피하로 투여하면 indomethacin에 의한 위손상을 막아주는 것을 볼 수 있었다.(8) 그러므로 TFF1은 위장관 상피를 덮고 있는 점액 겔(gel)을 안정화시키는데 관여할 것으로 생각되어진다. 본 논문에서 보여 준 TFF1 발현의 소실이나 감소는 아마 점막방어벽에 영향을 미쳐 위점막이 발암물질이나 위 손상에 쉽게 노출된다고 할 수 있으며, 이는 결과적으로 위암의 발생과정에 관여하는 종양억제유전자나 암유전자의 유전적 변이가 순차적으로 일어나게 할 것이라고 생각된다.

현재까지 TFF1의 작용 기전에 대하여는 수용체매개반응이 관여할 것으로 생각하고 있으나 확실하지 않다. 단합체형(monomer) 또는 이합체형(dimer) TFF1의 존재는 용량의존성으로 위암세포주의 성장을 감소시켰고,(17) TFF1이 투여된 세포에 TFF1 중화 항체를 첨가하면 세포 증식에 대한 억제 효과가 감소되었다. 이들 소견은 TFF1이 성장 조절 펩티드로 작용할 것이라는 것을 의미한다고 할 수 있으며,(17) TFF1의 이합체형은 단합체형보다 위암세포주의 증식을 큰 폭으로 감소시킨다는 것이 알려져 있다. 2개의 trefoil 영역(domain)을 가지고 있는 TFF2와는 달리 TFF1은 C 말단에 쌍을 이루지 않는 하나의 cysteine 잔

기(residue)를 가지고 있다.(2) 이 cystein 잔기는 자동으로 다른 TFF1과 이합체를 형성하게 되어 위액에서 분리되는 TFF1의 주된 형태가 된다. 이 이합체 형성의 생물학적 활성에 대한 의의가 아직 불분명할지라도 TFF1의 이합체 형성은 TFF1 수용체로 추측되는 곳에 결합하는 것을 촉진하는데 필수적일 것이다. 또한 TFF1 이합체형의 피하주입은 indomethacin에 의한 위 손상에 대해 단합체형보다 더 강력하게 방어할 수 있었으며 상처받은 부위에서 가장 자리 세포의 이동 속도를 증가시키는 강력한 자극제로 작용하였다.(23) TFF1의 기능이 아직 분명하지 않지만 본 연구에서 발견된 발현의 소실은 위 점막방어벽과 수용체매개반응의 파괴를 초래하리라 생각된다.

표본의 수가 적지만 저자들은 TFF1 유전자가 위암의 발생에 있어 위암 특이 종양억제유전자이고 TFF1 발현의 변화는 위암 발생과정의 초기단계에서 일어나며 위암의 조직학적 분화에 중요한 역할을 할 것으로 결론을 내렸다. 하지만 많은 환자 표본에 대한 추후 연구가 이들 초기 관찰들을 입증하는데 중요할 것이며 TFF1의 생물학적 기능을 확인하는 것이 위암의 병인뿐 아니라 위 점막방어기전에 대한 이해를 넓혀 줄 것이다.

결 론

본 연구에서 저자들은 TFF1의 기능 소실이 위암 특히 장형 위암의 발생에서 매우 초기 단계에 관여하리라는 것을 알았다. 이 소견은 TFF1의 발현 소실이 위암의 장형 분화에 관여한다는 충분한 증거를 제시하였으며 위 점막의 악성 전환에 적어도 2가지 경로가 존재한다는 것을 뒷받침하고 있다. 즉 하나는 장화생과 선종성 이행성을 통해 장형 분화를 보이는 선암종으로 진행되는 경로와 또 다른 하나는 증식성 변화나 신생 변화를 통해 미만형 암종 또는 일부의 위형 분화를 보이는 선암종으로 진행되는 경로이다.

REFERENCES

1. Suh CI, Suh KA, Park SH, Chang HJ, Ko JW, Ahn DH. Annual report of the central cancer registry in Korea-1998. J Kor Cancer Assoc 2000;32:827-834.
2. Thim L. A new family of growth factor-like peptides. FEBS Lett 1989;250:85-90.
3. Poulson R. Trefoil peptides. In: Goodlad RA and Wright NA, eds. Bailliere's Clinical Gastroenterology. London: Bailliere Tindall. 1996:113-134.
4. Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio M-C, Thim L. Rolling in the clover: the trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancers. FEBS Lett 1997;408:121-123.
5. Seib T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang K-D, Welter C. The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. Genomics 1997;40:200-202.
6. Wright NA, Poulson R, Stamp G, Van Noordén S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C, Rio MC, Chambon P. Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993;104:12-20.
7. Rio M-C, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, Bellocq JP, Chambon P. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. Gastroenterology 1991;100:375-379.
8. Babyatsky MW, DeBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. Gastroenterology 1996;110:489-497.
9. Machado JC, Carneiro F, Blin N, Sobrinho-Simoes M. Pattern of pS2 protein expression in premalignant and malignant lesions of gastric mucosa. Eur J Cancer Prev 1996;5:169-179.
10. Henry JA, Bennett MK, Piggott NH, Levett DL, May FE, Westley BR. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumours. Br J Cancer 1991;64:677-682.
11. Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio M-C, Chambon P, Ryall G. Expression of the pS2 gene in normal, benign, and neoplastic human stomach. Int J Cancer 1989;44:806-812.
12. Muller W, Borchard F. pS2 protein in gastric carcinoma and normal mucosa: association with clinicopathological study. Eur J Cancer 1996;32:1585-1590.
13. Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wending C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. Science (Washington DC) 1996; 274:259-262.
14. Park WS, Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Kim YS, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. Gastroenterology 2000;119:691-698.
15. Park WS, Oh RR, Park JY, Yoo NJ, Lee SH, Shin MS, Kim SY, Kim YS, Lee JH, Kim HS, Lee JY. Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. Cancer Lett 2000;159:15-21.
16. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histoclinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand 1965;64:31-49.
17. Calnan DP, Westley BR, May FEB, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. J Pathol 1999;188:312-317.
18. Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki

- H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* 149;28:125-134.
19. Fiocca R, Villani L, Tenti P, Solca E, Comagia M, Frigerio B, Capella C. Characterization of four main cell types in gastric cancer: foveolar, mucopeptic, intestinal columnar and goblet cells. A histopathologic, histochemical and ultrastructural study of 'early' and 'advanced' tumor. *Pathol Res Pract* 1987; 182:308-325.
 20. Kushima R, Hattori T. Histogenesis and characteristics of gastric-type adenocarcinoma in the stomach. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;120:103-111.
 21. Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Wang TH, Lin JT. Loss of pS2 protein expression is an early event of intestinal-type gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:278-282.
 22. Machado JC, Nogueira AM, Carneiro F, Reis CA, Sobrinho-Simoes M. Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation: an immunohistochemical study of trefoil peptides (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6). *J Pathol* 2000;190:437-443.
 23. Chadwick MP, May FEB, Westley BR. Homodimerisation and heterooligomerisation of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cystein 58. *Biochem J* 1997;327:117-123.
-