

미세절편으로 얻은 위암 조직세포에서 p53 유전자의 돌연변이와 종양단백 발현에 관한 연구

전남대학교 의과대학 외과학교실, 위장관외과, ¹병리학교실

김 철 · 주재균 · 최 찬¹ · 김영진

Comparative Study of p53 Mutation and Oncoprotein Expression in Gastric Adenocarcinoma

Chul Kim, M.D., Jai Kyun Joo, M.D., Chan Choi, M.D.¹ and Young Jin Kim, M.D.

Division of Gastroenterologic Surgery, Departments of Surgery and ¹Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: The p53 tumor suppressor gene is believed to play a pivotal role in preventing the uncontrolled cellular growth characteristic of cancer. Mutation of the p53 gene represent one of the most common genetic alterations in human cancers, and the acquisition of such defects is strongly associated with tumor progression and metastasis. The aim of this study was to evaluate the relation between p53 immunoreactivity and the mutation of p53 gene in gastric adenocarcinoma obtained by laser capture microscope.

Materials and Methods: Formalin fixed paraffin embedded tissue specimens were obtained from 20 patients who underwent surgery for gastric cancer. According to UICC TNM system, 3 of the cases were Ia, 2 cases II, 4 cases IIIa, 5 cases IIIb, and 6 cases IV.

Results: Immunohistochemical staining revealed eight cases as negative (less than 10%), twelve cases as positive (more than 10%). The locations of mutations were as follows; 7 cases had point mutation at exon 4, and 3 cases point mutation at exon 8. There was no mutation at exon 5, 6, 7 and 9. The mutation was observed in 1 case out of 8 p53 oncoprotein negative cases, and 7 cases out of 12 p53 positive cases. The mutation was more common in p53 positive cases ($P < 0.05$), However, there was no significant

correlation between p53 mutation observed by DNA sequencing after laser capture microdissection and expression of p53 oncoprotein.

Conclusion: These result suggest that the expression of p53 oncoprotein not to be related to the mutation of p53 gene at exons 4 through 9 in gastric cancer. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:145-150)

Key Words: Gastric cancer, p53 gene mutation, Laser capture microscope

중심 단어: 위암, p53 유전자 돌연변이, 레이저 포획 현미경

서 론

최근 분자생물학과 면역조직화학적 검사 기법의 놀라운 발전으로 암 조직의 발암과정 연구에서 암의 진단과 예후와 관련 있는 많은 표식자를 발견하였다. 이들 표식자를 이용하여 암화 과정과 암의 생물학적 특성을 밝혀내고, 이를 이용함으로써 암의 조기 진단과 보다 적합한 치료방법을 결정하는데 도움을 주고 있다. p53 암 억제 유전자는 1979년 Lane과 Crawford가 Simian-Virus-40-Transformed cell의 항원과 반응하는 단백질을 발견함으로써 알려졌으며, 제17번 염색체의 단완에 위치하고, 분자량이 53,000 Dalton의 nuclear phosphoprotein을 생성한다. 또한 야생형 p53 단백질은 반감기가 20내지 30분이지만 돌연변이형 p53 단백질은 그 반감기가 더 길어서 4 혹은 5시간을 넘기기 때문에 돌연변이형 p53 단백질이 세포 내에 양이 많아서 면역화학적으로 측정이 가능하다.

p53 돌연변이와 p53 종양단백 발현과의 관계는 오래 전부터 논란이 되었다. Rodrigues 등(1)은 대장암 세포에서 p53 유전자의 변이가 있음에도 면역조직화학법으로 검출하지 못하는 경우가 있다고 하였다. 또한 김 등(2)은 한국에서 흔한 암인 위암에서 면역조직화학적 염색법과 열기서열 검사법을 이용하여 p53 유전자의 돌연변이의 여부와 면역조직화학법으로 검출된 p53 단백질의 발현과의 상관관계를

책임저자 : 김영진, 광주광역시 동구 학 1동 8번지
전남대학교병원 위장관외과, 501-757
Tel: 062-220-6456, Fax: 062-227-1537
E-mail: kimyj@jnu.ac.kr

접수일 : 2003년 8월 18일, 게재승인일 : 2003년 9월 3일

보았는데, 이들 상호간의 상관관계는 일치하지 않은 결과를 발견하였다. 그러나 지금까지는 위암 주위의 간질세포를 배제한 미세절제술로 얻은 위암 조직세포에 p53 유전자의 돌연변이와 p53 종양단백 관계에 대해서는 보고가 없었다.

이에 저자는 미세절제술을 이용하여 위암 조직에서 p53 유전자의 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 돌연변이 여부와 p53 종양단백의 발현 정도와 이들의 상호 관계를 알아보고, 위암 환자의 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 종양의 침윤도, 림프절 전이, 암 병기 등의 병리학적 특성과 p53 유전자의 돌연변이, p53 종양 단백질의 발현과의 연관성을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

방 법

1) 연구 대상

국립 전남대학교병원 외과에서 위암으로 수술을 시행한 20명의 위암 환자를 대상으로 환자의 성별, 조직학적 분류, 암 병기를 조사한 후 p53 면역조직화학적 염색을 시행하고, 미세절제술로 위암 세포를 추출, 이 위암세포에서 염기배열 검사를 시행하여 이들 간의 상관관계를 분석하였다.

2) 미세절제술로 위암 조직세포 추출

Hematoxylin-eosin 염색본을 검토하여 각각의 종양부위를 구분한 후 파라핀 포매조직에서 약 7 μ m 두께의 절편을 제작하였다. 절편을 통상의 방법으로 Hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후, 상온에서 20분간 건조시켰다. 원하는 암세포만 얻기 위하여 레이저 포획 미세절편술(Laser capture microdissection, LCM)을 이용하였다. Film이 피복된 Capture를 사용하여 15 μ m 직경인 레이저를 40 mW로 0.5 ms 동안 사용하여 배 연구대상 슬라이드에서 2,000~4,000개의 암세포를 얻었다(Fig. 1). 조직을 채취할 때, 현미경으로 미리 슬라이드를 관찰하여 90% 이상 암세포만 얻을 수 있는 부위를 선별하여 조직을 채취하였다.

얻어진 조직에서 lysis buffer 30 μ l (0.04% proteinase K, 10

mM Tris-HCl, 1 mM ethyler dianune tetraacetic acid, 1% Tween-20)를 첨가하여 54 $^{\circ}$ C 수조에서 15시간 흔들어 주면서 세포를 분해시켰다. 원심분리기에 넣고 14,000 rpm 속도로 15분 원심분리 후 DNA가 함유된 상층액을 얻어서 증합효소 연쇄반응을(PCR) 하였다.

3) 증합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR)

p53 유전자의 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 염기서열 구조와 위치를 참고로 하여 사람의 p53 유전자에서 각 exon을 포함한 크기가 다른 두 가지 primer를 제작하였으며, DNA의 양이 적은 관계로 nested PCR을 이용하여 유전자를 증폭하였다.

p53 유전자의 exon 4~9구간을 포함한 outer primer와 inner primer를 주문해서 만들었다. 1차 PCR의 반응은 조직에서 취한 template DNA, outer primer 1pmole, 10 \times PCR buffer, 15 mM MgCl₂, dNTP 2 μ mol, Tag DNA polymerase (Superbio Technology, Korea)와 증류수를 이용하여 총 부피가 20 μ l 되게 혼합물을 만들어 1차 PCR을 실시하였다. PCR반응은 95 $^{\circ}$ C, 30초, annealing (각 outer primer별 적정 온도에서 1분) 및 extension (72 $^{\circ}$ C, 1분) 과정을 35회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에 10분 두어 반응을 종료시켰다. 2차 PCR의 용액은 1차 PCR 반응액 2 μ l, inner primer 10 pmol, 10 \times PCR buffer, 15 mM MgCl₂, dNTP 2 μ mol, Tag DNA polymerase (Superbio Technology, Korea)와 증류수를 이용하여 2차 PCR 하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 pre denaturation 과정을 거친 후 denaturation (95 $^{\circ}$ C, 30초), annealing (각 inner primer의 적정 온도에서 1분) 및 extension (72 $^{\circ}$ C, 1분)의 과정을 35회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에 10분 두어 반응을 종료시킨 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 확인한 DNA를 Gel Extraction Kit를 사용하여 DNA를 정제하였다.

4) DNA 염기서열 검사

Gel Extraction Kit를 이용하여 정제된 PCR산물은 Applied Biosystems Prism BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)를 이용하여 Sequencing 하였

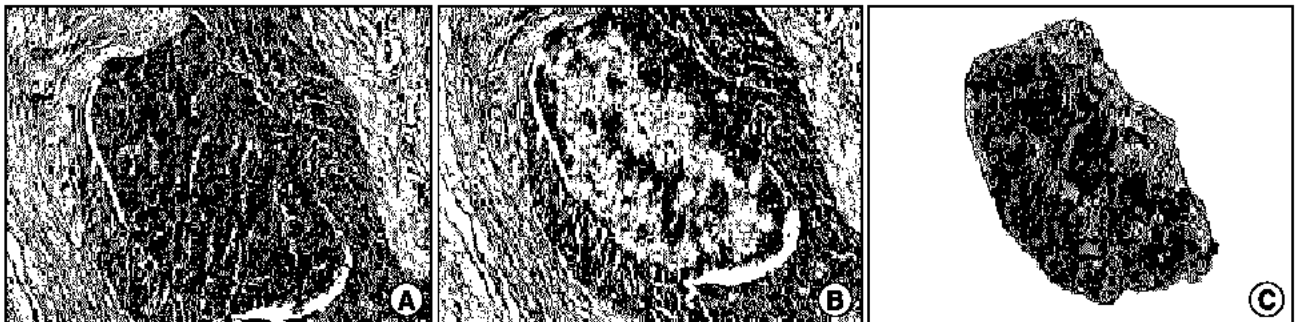


Fig. 1. The LCM of gastric adenocarcinoma sample. A = Before laser capture microdissection; B = Dissected cancer cells; C = After laser capture microdissection.

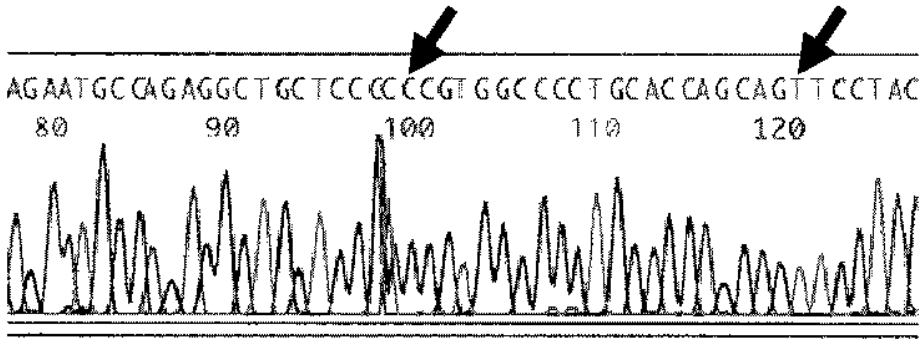


Fig. 2. T to C, A to G in exon 8 of p53 gene.

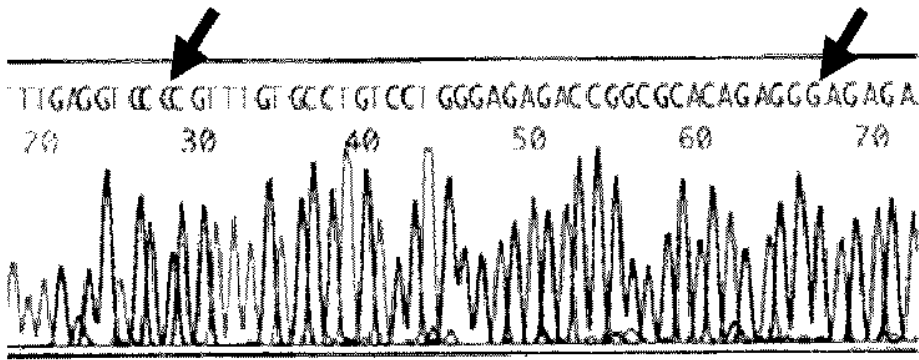


Fig. 3. C to T, C to T in exon 4 of p53 gene.

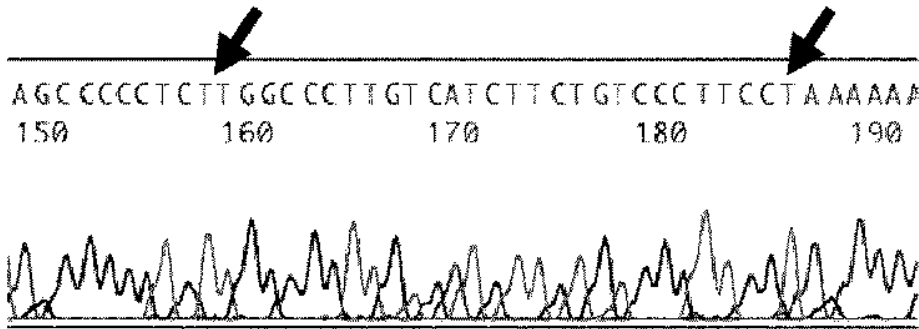


Fig. 4. Insertion of GCTA-CG in exon 4 of p53 gene.

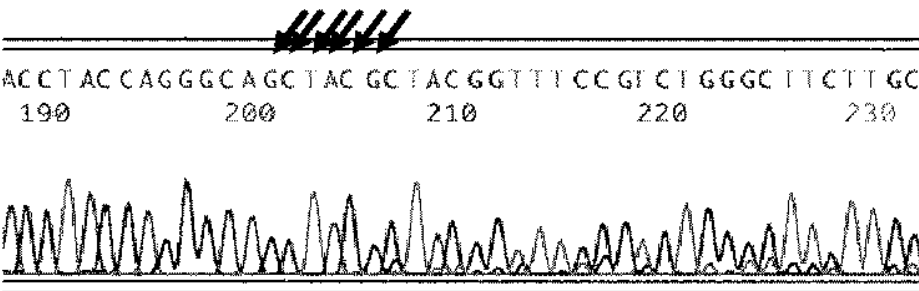


Fig. 5. G to C, C to T in exon 4 of p53 gene.

다. Sequencing을 위한 PCR 반응은 kit에 제공되는 과정을 따라 Thermal cycler (Perkin-Elmer, Foster City, USA)에서 실시하였다. PCR 반응 후 생성된 산물은 100% ethanol과 3 M sodium acetate를 이용하여 정제한 후 17μl의 TSR (template suppression reagent; Applied Biosystems, Foster City, USA)에 녹였으며, 95°C에서 5분간 denaturation 후, 자동염기분석기인 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, USA)로 분석하여 염기서열을 검사하였다(Fig. 2~5).

5) 조직학적 검색 및 면역조직화학적 염색

Hematoxylin-eosin 염색절편을 이용하여 위암선종을 AJCC 암 병기 분류와 조직학적 reference 분류를 하였다. 10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 파라핀 포매괴를 3μm 두께로 박절하여 probe-on 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 다음 면역조직 검색에 사용하였다. 염색은 probe-on 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 microprobe immuno/DNA염색기(Biomedica, Foster CA, USA)를 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈 파라핀과 함수과정을 거쳐 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 1×automation buffer (Biomedica, USA)에 3분간 부착시켰다.

1×automation buffer를 제거한 후 p53 종양단백(Novoca-

tralab, Newcastle, UK)에 대한 일차항체를 희석하여 20분간 부착시킨 후 완충액으로 세척하였다. 일차 항체의 검출을 위한 이차 항체는 biotinylated anti-mouse Immunoglobulin G를 이용하여 10분간 작용시켰다. Sterptavin-alkaline phosphatase의 발색은 완충액으로 수세를 한 후 Fast red TR salt를 이용하였으며 hematoxylin으로 대조 염색을 시행한 수 관찰하였다. 판정기준은 세포핵이 진한 적색으로 염색된 세포가 암세포 중 10% 이하이면 음성으로, 10% 이상이면 양성으로 하였다.

6) 통계학적 분석방법

통계처리는 SAS (Statistical Analysis System)을 이용하여 Anova의 Duncan test를 실시하였다.

결 과

1) 대상군의 임상병리학적 양상

연구대상으로 이용한 20예의 위암 환자 중 남자는 12예, 여자가 8예였으며, 암 병기는 Ia가 3예, II가 2예, IIIa가 4예, IIIb가 5예, IV가 6예였다. 조직학적인 소견은 고분화 선암이 1예, 중등도 분화암이 5예, 저분화암이 12예, 점액성 암이 2예였다(Table 1).

Table 1. Clinicopathologic characteristics of 20 cases and the results of PCR for exon 4, 5, 6, 7, 8, 9 of p53 gene and immunohistochemistry for p53 protein

Case No.	Age/Sex	Histology	p53 protein expression	p53 gene mutation					
				Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9
1	F/68	Poorly	(+)	Mutation					
2	F/55	Poorly	(+)						
3	M/62	Poorly	(+)					Mutation	
4	M/62	Poorly	(+)	Mutation					
5	F/35	Poorly	(+)	Mutation				Mutation	
6	F/52	Poorly	(+)						
7	M/63	Moderately	(-)						
8	M/58	Poorly	(+)						
9	M/72	Poorly	(+)						
10	M/52	Moderately	(+)						
11	F/73	Poorly	(-)						
12	F/71	Moderately	(-)						
13	F/33	Poorly	(+)	Mutation					
14	M/60	Well	(-)	Mutation				Mutation	
15	M/36	Moderately	(-)						
16	F/55	Poorly	(+)	Mutation					
17	M/59	Mucinous	(-)						
18	M/78	Mucinous	(-)						
19	M/59	Moderately	(+)	Mutation					
20	M/64	Poorly	(-)						

2) p53 종양단백 발현과 돌연변이의 양상

면역조직화학적 염색에서 p53 단백질에 양성인 세포가 암세포의 10% 미만인 경우(p53 종양단백 발현이 음성)가 8예, 10% 이상인 경우(p53 종양단백 발현이 양성)가 12예였다. 또한 p53 단백질이 음성인 경우에 돌연변이가 보이는 경우가 총 8예 중 2예로 12.5%였고, 양성인 경우 12예 중 돌연변이가 보이는 경우가 7예로 58.3%로 p53 종양단백이 음성인 경우에 염기서열 검사상 돌연변이가 보이지 않은 경우가 많았다($P < 0.05$)(Table 1).

3) 염기서열과 돌연변이의 양상

자동분석기인 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer를 이용한 암세포의 염기서열 검사에서 p53 단백질이 발현되는 세포에서 exon 4번에 점 돌연변이를 보이는 경우가 7예 있었고, exon 8번에서 점돌연변이를 보이는 예가 3예 있었다. 그러나 exon 5, 6, 7, 9에서는 DNA 염기서열상 돌연변이를 발견할 수 없었다(Table 1).

고 찰

p53 유전자는 17번 염색체의 단원에 위치하는 16~20 kb의 DNA로 11개의 exon으로 이루어져 있다. p53 유전자의 중요한 생화학적 기능의 하나는 세포주기 중 G1에서 정지를 가져와 S기에 돌입하기 전에 핵산의 손상부위를 교정하거나 혹은 세포고사를 유발함으로써 손상된 핵산을 가진 세포의 계속적인 증식을 방지하는 것으로 알려져 있다. 염색체상의 p53 유전자가 결손되거나 돌연변이 등에 의해 그 기능이 소실되는 것이 발암기전의 한가지 요인이라고 생각되고 있다.(3,4) 위암에서의 경우 원발암 병소에서는 20%에서 전이성암에서는 대부분에서 p53 유전자의 이상이 발견된다고 보고하고 있다.(5) 결장 및 직장암에서는 45%에서 발견되고,(6) 간암에서는 31.5%에서 면역조직화학적 방법으로 과발현이 보고되었는데 종양의 크기가 크고, 진행된 경우에서 발현이 증가하여 예후인자로서의 가능성이 시사되고 있다.(7,8)

p53 유전자의 돌연변이를 검색하는 방법으로는 염기서열 확인법, 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법, 면역조직화학 염색 등이 있다.(9-11) 염기서열 확인법은 유전자의 구조 이상을 확인하는데 흔히 이용되고 돌연변이의 유무 및 그 양상을 직접 확인할 수 있는 방법이나 시간과 노력이 많이 드는 단점이 있다. 중합효소연쇄반응-단일가닥구조다형 검사법은 핵산의 구성염기의 차이와 염기서열의 차이에 따라서 전기영동 시 핵산의 이동속도의 차이를 이용하는 방법인데 감수성과 특이성이 높다.(12) 면역조직화학적인 염색은 돌연변이형 단백질의 반감기가 수 시간 혹은 그 이상으로 연장되는 특성을 이용하여 돌연변이형 p53

단백질을 확인하는 방법인데 감수성과 특이성이 낮다. p53 단백질의 염색이 양성인 경우는 p53 유전자에 돌연변이가 있는 경우, p53 단백질이 축적되어 있는 경우 또는 p53 유전자의 작용 경로 하부 유전자의 이상 등에 의한 것이다. 그러나 p53 유전자에 돌연변이가 있는 경우에도 유전자의 소실이나 전체적인 유전자의 이동이 있는 경우는 검출하지는 못한다.(13)

저자의 연구 결과에서도 미세절제술로 얻은 간질세포를 배제한 위암세포에서의 p53 유전자 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 돌연변이와 p53 종양단백 발현이 일치하지 않았다. 이는 p53 종양단백의 발현은 유전자의 돌연변이뿐 아니라 p53 유전자의 작용경로의 하부 유전자의 이상이나 유전자의 소실 혹은 전체적인 이동이 있는 경우일 수 있으며, p53 유전자 exon 1, 2, 3, 10, 11의 돌연변이와 p53 종양단백의 관계는 이 실험에서 제외되었기 때문이라 생각된다.

최근 위암을 직접 DNA 서열 분석에 의하여 31% 환자에서 p53 유전자의 돌연변이를 규명하고, 이러한 돌연변이가 위암 환자의 불량한 예후와 밀접한 관계가 있다는 보고가 있다.(14) 그러나 이러한 검사들은 모두 위암 세포뿐 아니라 주위의 간질세포까지 포함됨으로써 그 정확성이 의문시 되고 있으나 현재까지 미세절제술을 이용하여 직접 위암 세포의 p53 유전자 DNA의 염기서열 분석을 시행한 적은 없었다. 저자의 연구 결과 미세절제술은 원하는 세포만 선택적으로 얻을 수 있어 기존의 실험방법에 비해 미세절제술은 많은 노력이 드는 단점을 갖고 있지만 분자생물학 연구에서 유전자의 검사나 종양세포의 검사에 유용한 방법임을 알 수 있었다. 그리고 위암세포 자체에 대한 연구 결과 p53 종양단백의 발현이나 유전자의 변이 여부는 위암 환자의 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 종양의 침윤도, 림프절 전이, 암 병기와의 연관성을 찾을 수 없었다.

결 론

저자들은 미세절제술을 이용한 핵산의 염기서열 분석으로 위암 환자에서 면역조직화학적 방법을 이용한 p53 유전자 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 돌연변이의 발현정도와 p53 종양단백의 발현과의 관계를 알기 위하여 본 연구를 시행하였다.

본 연구 결과로 볼 때 레이저를 이용한 미세절제술은 분자생물학 연구에서 유전자의 검사나 종양세포의 검사에 유용한 방법임을 알 수 있었고, 위암에서 p53 유전자 종양단백의 발현이 DNA p53 유전자 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 돌연변이와는 반드시 일치하지 않음을 알 수 있었다. p53 유전자 산물의 발현여부는 위암 환자의 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 종양의 침윤도, 림프절 전이, 암 병기와의 연관성을 찾을 수 없었다.

REFERENCES

1. Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:555-559.
2. Kim YJ, Kook JY, Lee JH, Kim HR, Joo JH, Kim DY, Kim SK, Suh SP, Kim JP. Detection of p53 gene mutations in gastric cancers-comparative study of single strand conformational polymorphism migration technique (SSCP) and non-isotopic RNase cleavage assay (NIRCA). *J Korean Cancer Assoc* 1997;29(2):212-219.
3. Myers RM, Latin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA: DNA duplexes. *Science* 1985;230:1242-1246.
4. Harris CC. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 1993;262:1980.
5. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
6. Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Rho JK, De Lee H, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma and tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:938-943.
7. Bell SM, Scott N, Cross D, Sagar P, Lewis FA, Blair GE, Taylor GR, Dixon MF, Quirke P. Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1993;104:57-64.
8. Hsu HC, Tseng HJ, Lai PL, Lee PH, Peng SY. Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. *Cancer Res* 1993; 53:4691-4694.
9. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short term prognosis. *Cancer* 1992;70:2778-2784.
10. Tabor S, Richardson CC. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;86:4767-4771.
11. Orita M, Iwahana M, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2766-2770.
12. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* 1992;97:244-249.
13. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene; Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878.
14. Kim TW, Lee KH, Lee JH, Kang YK, Lee JS, Kim SH, Im SW, Kim JS, Kim J, Kim WK. p53 gene mutation by direct DNA sequencing predicts poor survival in patients with stomach cancer. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32(5):835-843.