

## Oligonucleotide Microarray와 cDNA Microarray를 이용한 위암조직의 대단위 유전자 발현 비교

정광화 · 김정규 · 노지현 · 은정우 · 배현진 · 이석형 · 박원상 · 유남진 · 이정용 · 남석우<sup>#</sup>  
가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, 미세절제유전체학 연구소  
(Received March 19, 2007; Revised May 1, 2007)

### Comparison of Expression Profiling of Gastric Cancer by Oligonucleotide and cDNA Microarrays

Kwang Hwa Jung, Jung Kyu Kim, Ji Heon Noh, Jung Woo Eun, Hyun Jin Bae, Sug Hyung Lee,  
Won Sang Park, Nam Jin Yoo, Jung Young Lee and Suk Woo Nam<sup>#</sup>  
*Department of Pathology, College of Medicine, Microdissection Genomics Research Center,  
The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea*

**Abstract** — Gastric cancer is one of the most common malignancies in Korea, but the predominant molecular event underlying gastric carcinogenesis remain unknown. Recently, DNA microarray technology has enabled the comprehensive analysis of gene expression level, and as such has yielded great insight into the molecular nature of cancer. However, despite the powerful approach of this techniques, the technical artifacts and/or bias in applied array platform limited the liability of resultant tens of thousand data points from microarray experiments. Therefore, we applied two different array platforms, such as oligonucleotide microarray and cDNA microarray, to identify gastric cancer related large-scale molecular signature of the same human specimens. When thirty sets of matched human gastric cancer and normal tissues subjected to oligonucleotide microarray, total 623 genes were resulted as differently expressed genes in gastric cancer compared to normal tissues, and 252 genes for cDNA microarray analysis. In addition, forty three outlier genes which reflect the characteristic expression signature of gastric cancer beyond array platform and analytical protocol was recapitulated from two different expression profile. In conclusion, we were able to identify robust large-scale molecular changes in gastric cancer by applying two different platform of DNA microarray, this may facilitate to understand molecular carcinogenesis of gastric cancer.

**Keywords** □ cDNA microarray, oligonucleotide microarray, gastric cancer

위암은 아시아 지역에서 가장 흔한 종양중의 하나이며 특히 우리나라에서는 전체 악성 종양의 약 21%를 차지하고 있고, 종양 발생률에서는 남성(24.2%)과 여성(16.25%)에서 모두 가장 빈도가 높으며 사망률 또한 폐암과 더불어 2위를 차지하고 있는 매우 치명적인 질병의 하나이다.<sup>1)</sup> 지난 수십 년간 많은 연구자들의 종양발생 및 진행에 관련된 분자생물학적 연구결과에 의해 인체 암 발생에 관련된 종양유전자(oncogene) 및 종양억제유전자(tumor suppressor gene)가 알려지게 되었고 결과적으로 이러한 종양유전자 및 종양억제유전자의 복합된 다단계 과정에 의해서

암이 발생된다고 설명되어 지면서 암은 유전자에 의한 질병이라고 정의 내릴 수 있게 되었다.<sup>2)</sup> 하지만 세포주기, 세포사멸사 반응, 세포유착, 그리고 세포내 신호전달 체계 등에 관련된 많은 유전자의 역할 규명에도 불구하고 아직도 일부 특정 종양의 제한된 기전만 연구되었을 뿐 많은 부분이 풀어야 할 숙제로 남아 있다.

한편, 1996년 미국 스탠포드 대학의 Dr. Pat Brown에 의해서 한 번에 수십 개 혹은 수백 개의 유전자 발현을 chip의 형태로 제작한 array에 의해 분석할 수 있는 DNA microarray<sup>3)</sup>기법이 처음 소개된 이후 array제작 기술의 눈부신 발전과 더불어 인간을 비롯한 생쥐, 초파리 등 여러 동물의 전체 유전체 서열이 밝혀지고 여러 동물 모델 또는 인체 시료를 DNA microarray에 적용하여 이들을 전체 유전체 수준에서 발현을 비교 검색함으로써

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-590-4981 (팩스) 02-537-6586  
(E-mail) swnam@catholic.ac.kr

질병을 분류하고, 진단, 예측이 가능하거나 질병에 대해서 환자 개개인의 특성을 고려하여 치료를 선택할 수 있는 맞춤형 치료에 한발 다가갈 수 있는 좋은 연구기법으로 인식되고 있다. 또한 위암의 경우도 세포사멸사 기전, 세포주기, 세포성장 및 신생혈관 형성 등과 같은 종양화 과정에 기여하는 세포내 다양한 신호 전달 시스템에 관여하는 생체 지표물질에 대하여 연구가 많이 진행되어 왔다.<sup>4)</sup> 하지만, 위암의 종양조직에서 전체 유전자 수준에서 유전자 발현을 비교 검색하여 위암 발달과 진행에 관련된 대단위 유전자군을 도출한 연구는 미비한 실정이다. 게다가 DNA chip 기술의 눈부신 발달에도 불구하고 상업용 칩 제작회사의 칩 제작방법이나 연구자가 생산한 칩 등과 같이 사용하는 DNA microarray 종류와 형태에 따라 그 결과가 상당히 다르게 보고되는 경우가 많이 있다.<sup>5)</sup> 따라서 본 연구에서는 두가지의 DNA microarray 형태 즉 oligonucleotide microarray와 cDNA microarray를 이용하여 동일한 위암환자들로부터 적출한 위암조직의 발현을 조사하여 비교 분석함으로써 DNA microarray의 차이에 의한 결과의 오류를 극복하고 두 가지 서로 다른 형태의 DNA microarray로부터 공통적의 발현 변화를 나타내는 대단위 유전자군을 확보하여 위암생성 진행에 관련된 생체지표군을 확보하고자 하였다.

## 실험 방법

### 한국인 위암 조직 및 조직으로부터 RNA 분리

본 연구에 사용된 위암조직은 모두 연세대학교 세브란스 병원에서 위암조직 적출 수술을 받은 30명의 환자로부터 적출된 위장관의 위암조직과 암세포가 존재하지 않는 위점막 조직을 같은 환자로부터 적출하여 정상 및 위암조직을 쌍(pair)으로 하여 각각 RNA를 적출하여 DNA microarray에 적용하였다. oligonucleotide microarray 분석의 경우 30 $\mu$ g의 total RNA를 사용하여 모두 30명의 환자로부터 얻은 종양조직 및 정상 위점막 조직을 적용하였으며, cDNA microarray 분석의 경우 그중 20명만의 환자 조직만을 적용하였다.

### RNA 추출 및 Quality

조직으로부터의 RNA 추출은 Trizol(Invitrogen, Grand Island, NY) 용액을 이용하여 분리하였다. 수확한 세포에 Trizol 1 ml를 첨가하여 세포를 파괴시킨 후 클로로포름을 첨가하여 주고 12,000 $\times$ g, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후에 이소프로판올을 가하고 다시 12,000 $\times$ g, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 얻은 RNA pellet을 공기 중에 말린 후 DEPC처리한 물로 잘 녹여 준 후, 전기영동 gel에서 18S, 28S의 band가 뚜렷하고, 260/280 비율이 1.8 이상인 시료만을 array 분석용으로 보관하였다.

## DNA microarrays and Hybridization

본 실험에 사용된 어레이 칩은 Human 19 K Compugene Oligonucleotide microarray chip과 10 K Human cDNA microarray chip이다. cDNA microarray의 경우 9 K Human Unigene kit(Incycyte, USA)을 그리고 19K 올리고 칩의 경우 19 K Human Oligoset(Compugen Sigma-Genosys, USA)을 구입하여 싱가포르 유전체 연구소(Genome Institute of Singapore, Singapore)에서 제작하였다. Oligonucleotide microarray의 hybridization에서 칩의 질과 실험방법의 재현성은 NIH3T3 세포로부터 유래한 total RNA를 가지고 dye swap 실험에 의해 검증하였다. 정상 위점막 조직 또는 위암조직으로부터 얻은 total RNA 30  $\mu$ g, 또는 Reference RNA UHR(Universal Human Reference RNA; Stratagene, La Jolla, CA) 20  $\mu$ g을 사용하여, Superscript II 역전사 효소(Invitrogen, Grand Island, NY)를 반응시켜서 각각의 cDNA targets를 제작 하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 UHR cDNA는 Cy3(NEN Life Science, Boston, MA)로 표지하였고 HUVEC cDNA targets는 Cy5(NEN Life Science, Boston, MA)로 표지하였다. 이렇게 제작된 프로브는 Microcon YM-30 column(Amicon, Stonehouse, Gloucester, UK)으로 정제를 하여, 올리고 칩과 42°C에서 16시간 이상 hybridization시켰다. 반응이 종료된 후 칩을 세척하여 준 후 GenePix 4000B scanner(Axon Instrument, USA)를 이용하여 이미지를 얻었고 일차적인 데이터 정리 후, BASE 프로그램으로 데이터의 normalization 및 filtering을 실시하였고 Cluster 프로그램을 통하여 clustering을 실시하였다. 또한 cDNA chip의 경우 2~3  $\mu$ g의 total RNA로부터 *In-vitro* transcription(IVT) 방법을 이용하여 RNA를 증폭시킨 후 증폭한 RNA를 같은 방법으로 Cy-dye labelling을 하여 분석을 하였다.<sup>6,7)</sup>

### Hierarchical clustering

스텐포드 대학에서 제공하는 hierarchical clustering이라는 free software를 사용하여 clustering을 실시하였고, clustering한 데이터는 스텐포드 대학에서 제공하는 Treeview 프로그램을 이용하여 이미지로 얻었다. Clustering시 각 lane 위에 가지들은 유전자 발현이 비슷한 것들끼리 연결시킨 것을 의미한다. 붉은색은 reference RNA UHR 보다 유전자 발현이 증대된 것을 의미하고, 초록색은 UHR 보다 유전자의 발현이 감소된 것을 의미한다.

### Filtering and 데이터 분석

스캔하여 얻은 데이터는 background 값보다 최소 1.5배 높은 유전자를 선별하고 normalization 한 다음 각각  $\log_2$  ratio로 변환하여 Non-parametric Wilcoxon Rank T-test를 이용하여 유의성 있는 유전자군을 도출한 다음 cDNA microarray와 oligonucleotide microarray에 의해 발현 변화를 보이는 유전자군을 비교 분석한다.

## 실험 결과

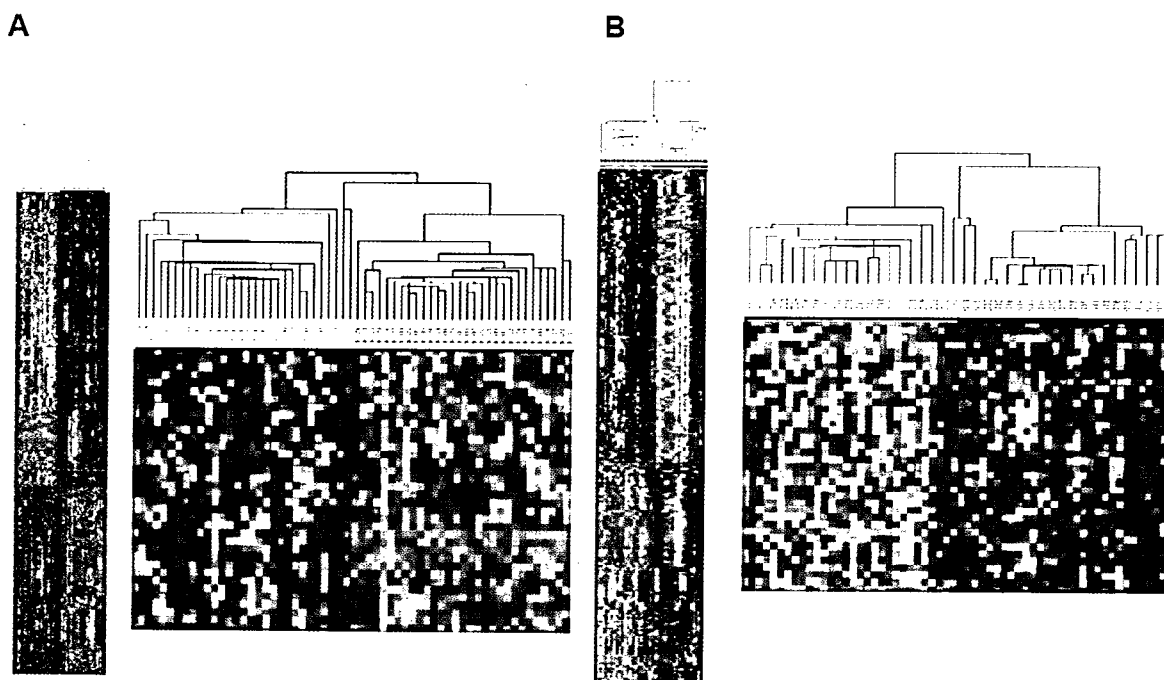
**Oligonucleotide microarray와 cDNA microarray** 이용한 위암조직의 발현 프로파일 비교

위암환자로부터 적출한 위암조직 30례와 동일 조직에서의 정상 위점막 세포조직으로부터 total RNA를 추출하고 oligo-d(T) primer를 이용하여 mRNA 만을 선별적으로 역전사하는 과정에 cy5-dUTP로 표지된 핵산을 첨가하여 19,000여개의 인간 유전자 정보를 포함하는 19 K human oligonucleotide microarray 적용하였으며, 약 9000여개의 유전자 정보를 포함하는 9 K Human cDNA microarray의 경우 total RNA를 IVT 반응을 이용하여 RNA를 증폭한 다음 증폭한 RNA를 동일한 cy5-dUTP로 표지하여 각각 유전자 발현 정도를 분석하였다(Fig. 1). 정상 조직과 비교하여 위암 조직에서 유전자 발현 변화를 나타내는 유전자군을 도출하기 위하여 Non-parametric Wilcoxon Rank T-test 방법으로 각각 oligonucleotide microarray와 cDNA microarray 로 얻은 포괄적 발현 데이터로부터 정상조직에 비하여 최소한 1.5 배이상 발현변화를 나타내고 P값이 0.001 이하인 유전자를 각각 623개(Fig. 1A) 및 252개(Fig. 1B)개 도출한 다음 이들 발현 변

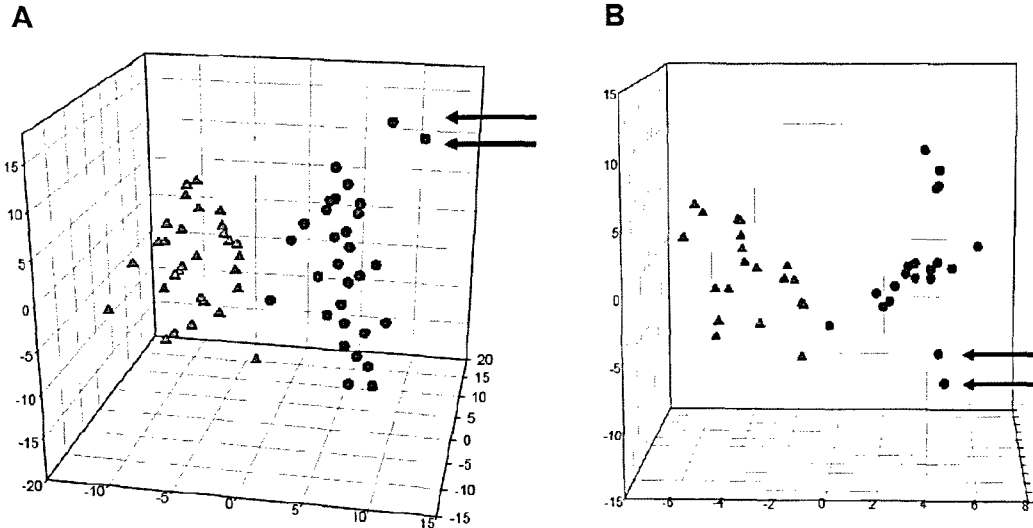
화의 차이를 hierarchical clustering 분석 방법으로 나타내었다. 그림에서와 같이 통계학적으로 종양조직과 정상조직의 차이를 나타내는 유전자 발현 양상역시 뚜렷하게 정상군과 종양조직군 모두 구분되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 oligonucleotide microarray와 cDNA microarray 분석 모두 유사한 분석결과를 나타내었으며 두가지 다른 형태의 array를 사용하여도 정상 조직에 비하여 종양 조직에서는 유전자 발현변화가 크다는 사실로 위점막 세포의 종양화는 많은 유전자 발현 조절 이상이 관여 한다는 사실을 알 수 있었다. 한편 oligonucleotide microarray 결과에서 T22와 T27 시료는 종양조직임에도 불구하고 dendrogram 상에서 정상조직군으로 분류되었으나 실제 발현정도가 종양조직에 유사한 패턴을 보이는 것으로 고려해 볼 때 종양 조직으로 시료를 적출하는 과정에 주변의 정상조직이 혼재 된 것으로 사료된다. 이 같은 사실은 cDNA microarray 결과에서도 같은 T22 시료가 마찬가지로 정상군에 속하면서 종양발현 패턴을 보이는 사실로 확인 할 수 있었다.

### 종양 분류 차이에 의한 유전자 발현 변화

본 연구에 적용된 위암종양 조직 30례에는 2 case가 위장관



**Fig. 1** - Expression profiling of human gastric cancer through oligonucleotide microarray and cDNA microarray. Unsupervised hierarchical clustering of non-cancerous gastric tissues and gastric cancers accurately separate cancer vs normal group with a few exceptions by both oligonucleotide microarray and cDNA microarray analysis. *A*, Thirty samples of gastric cancer with corresponding normal tissue were subjected to expression profiling analysis by using oligonucleotide microarray. Almost all tumors are subclustered in tumor side on dendrogram. However, two (T27, T22) of 30 samples were partitioned in normal grouped, suggesting normal cells contamination in biopsy samples. *B*, Twenty samples of gastric cancer with corresponding normal tissue were subjected to expression profiling analysis by using cDNA microarray. Almost all tumors are subclustered in tumor side on dendrogram excepted one sample as observed in oligonucleotide microarray.



**Fig. 2** – Principle Component Analysis (PCA) segregates different historical class of gastric cancer through expression profiling. Molecular characteristic of gastric stromal tumor and gastric adenocarcinoma by microarray analysis resulted in different pattern of genes involved in carcinogenesis. *A*, The arrows indicates gastric intestinal stromal tumors among thirty samples of gastric cancer. *B*, The arrows indicates gastric intestinal stromal tumors among twenty of gastric cancer.

간질세포종양(gastric intestinal- stromal tumor) 조직으로서 나머지 28개의 위암종(gastric adenocarcinoma)과는 원발 세포가 전혀 다른 위암이다. Fig. 2에서와 같이 정상 조직 및 위암조직으로부터 얻은 유전자 발현 결과를 3차원적인 표현방법인 principle component analysis(PCA)로 재 분석한 결과 그림에서와 같이 공간상에서 정상 조직군(세모 표시)과 위암조직군(원표시)이 각각의 그룹을 이루고 있으나 위장관간질세포종양은 위암종과 분리되어 있다는 것을 결과상에서 관찰 할 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 cDNA microarray 분석에서도 동일한 결과를 관찰 할 수 있었으며, 이는 같은 위암종양 조직이라도 형태학적으로 또는 조직학적으로 다른 형태의 암이면 암발생에 관여 하는 분자생물학적 성상이 전혀 다를 수 있다는 사실을 제시한다고 사료된다.

#### 위암관련 특이 유전자의 발현 양상

DNA microarray에 의한 위암조직에서의 유전자 발현 변화를 검색한 결과 두 종류의 서로 다른 array에서도 정상조직과 뚜렷한 발현 변화를 나타내는 것으로 관찰되었고, 따라서 두 microarray에 공통적으로 발현 변화를 나타내는 유전자군은 분석한 기법 차이에 의한 오류를 포함하지 않는 종양 특이 유전자군으로 활용할 수 있다고 사료된다. 9 K cDNA microarray와 19 K oligonucleotide microarray의 분석결과로 얻어진 종양관련 유전자에서 두 개의 array에 공통으로 선정된 probe중에서 서로 유전자가 동일한 43개의 유전자(Table D)를 선별한 후 hierarchical clustering 한 결과(Fig. 3) 분석한 array에 상관없이 종양조직의 거의 모든 시료에서 정상조직과 비교하여 그 발현이 증가하거나

또는 감소한 것으로 관찰되었다.

#### 고찰 및 결론

본 연구에서는 위암 환자의 종양조직으로부터 분리한 위종양 조직의 포괄적인 유전자 발현을 조사하여 위암 생성 및 발달과정에 관련된 특이 유전자군을 대단위로 도출하기 위하여 DNA microarray 방법을 활용하여 분석하였다. 지금까지 보고된 연구 결과에 의하면 포괄적 유전자 발현 분석법의 장점에도 불구하고 사용하는 array에 따라, 또는 위암환자의 인종 그리고 시료 채취 방법등 연구기법의 차이에 따른 편향적 연구결과가 문제점으로 제시되고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하고 좀 더 신뢰성 있는 종양 특이 유전자군을 확보하기 위하여 동일 시료로부터 각각 cDNA microarray와 oligonucleotide microarray를 독립적으로 수행하였고, hybridization 방법에 있어서도 각각 RNA를 증폭하여 labelling하는 방법과 total RNA로부터 직접 hybridization하는 방법을 적용함으로써 실험방법 차이에 의한 결과의 오류를 극복하고 검증 절차를 거치지 않고 결과를 수용할 수 있는 위암관련 종양 특이유전자를 도출 할 수 있었다.

특히 두 가지 서로 다른 array에 의해 공통적으로 위암특이 유전자군으로 도출된 43개의 유전자들중에는 TFF1(trefoil factor 1), LIPF(gastric lipase), PGC(Pepsinogene C)등과 같이 정상 위 조직의 기능 항상성에 관여하는 유전자가 포함되어 있으며, 특히 TFF1의 돌연변이는 위암발생과 중요한 연관이 있다는 보고가 있어 매우 흥미로운 결과로 사료된다.<sup>8-11)</sup> 또한 COL 10A1(type X collagen alpha1), COL16A(type XVI collagen

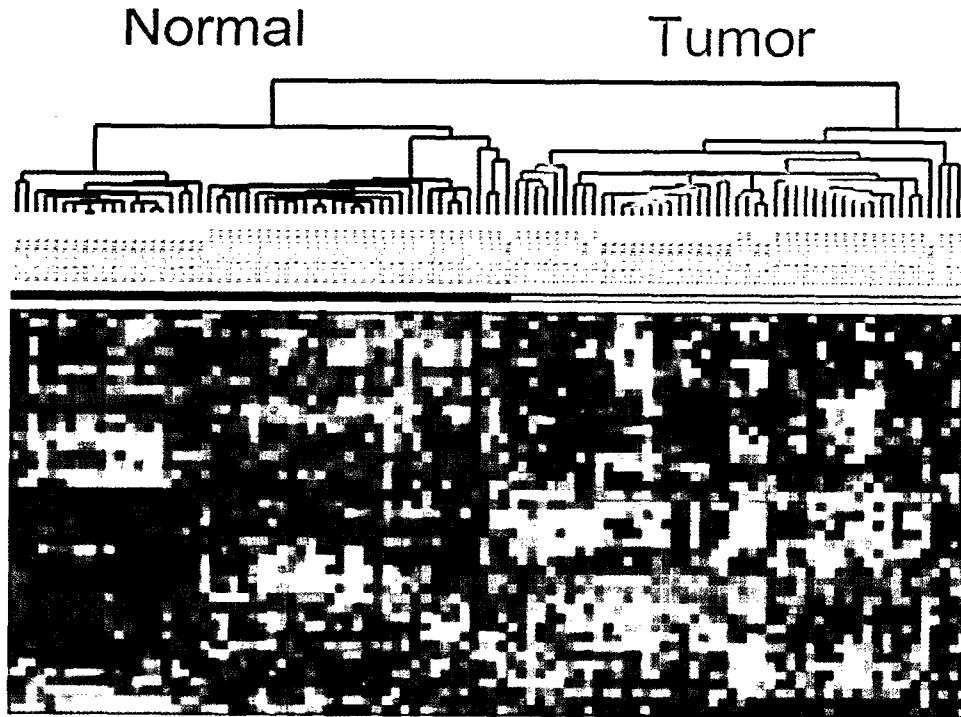
**Table I** – List of differently expressed genes in gastric tumors by cDNA and oligonucleotide microarray analysis

Gene name	Description	Fold change (log2 ratio)
LIPF	UG5 lipase, gastric	4.86
PGC	UG5 progastricsin (pepsinogen C)	3.89
PAP	UG5 pancreatitis-associated protein	3.43
CTSE	UG5 cathepsin E	2.94
KRT20	UG5 cytokeratin 20	2.65
PSCA	UG5 prostate stem cell antigen	2.64
ATP4B	UG5 ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide	2.35
SST	UG5 somatostatin	2.20
ESRRG	UG5 estrogen-related receptor gamma	1.71
GUCY1A3	UG5 guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	1.50
CPA2	UG5 carboxypeptidase A2 (pancreatic)	1.44
COL10A1	UG5 collagen, type X, alpha 1 (Schmid metaphyseal chondrodysplasia)	1.35
GSTA2	UG5 glutathione S-transferase A2	1.29
RNASE4	UG5 ribonuclease, RNase A family, 4	1.22
TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	1.20
COL16A1	UG5 collagen, type XVI, alpha 1	1.03
FBP1	UG5 fructose-1,6-bisphosphatase 1	1.01
CBR1	UG5 carbonyl reductase 1	0.99
DGKD	UG5 diacylglycerol kinase, delta (130 kD)	0.83
DIO2	UG5 deiodinase, iodothyronine, type II	0.83
SERP1	UG5 stress-associated endoplasmic reticulum protein 1; ribosome associated membrane protein 4	0.80
ITGA1	UG5 integrin, alpha 1	0.74
ITGBL1	UG5 integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	0.62
MFAP2	UG5 microfibrillar-associated protein 2	0.48
GEM	UG5 GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle	0.45
GPR30	UG5 G protein-coupled receptor 30	0.44
COL5A2	UG5 collagen, type V, alpha 2	0.40
PRSS11	UG5 protease, serine, 11 (IGF binding)	0.34
SLC25A4	UG5 solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	0.33
ATP5A1	UG5 ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle	0.29
TFF1	UG5 trefoil factor 1 (breast cancer, estrogen-inducible sequence expressed in)	0.29
SRPUL	UG5 sushi-repeat protein	0.27
PGRMC2	UG5 progesterone receptor membrane component 2	0.20
DDAH2	UG5 dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	0.17
TGIF	TGFB-induced factor (TALE family homeobox)	0.13
MMP2	UG5 matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kD gelatinase, 72kD type IVcollagenase)	0.05
CALD1	UG5 caldesmon 1	0.03
PEA15	UG5 phosphoprotein enriched in astrocytes 15	0.01
LGALS1	UG5 lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	-0.53
MAL	UG5 mal, T-cell differentiation protein	-0.58
NID2	UG5 nidogen 2	-0.72
THBS2	Thrombospondin 2	-1.20
CHEK1	UG5 CHK1 (checkpoint, S.pombe) homolog	-1.34

alpha1), ITGA1(integrin alpha1), MMP2(matrix-metallo proteinase 2)와 같이 종양 생성과 진행에 관련되어있다고 알려져 있는 유전자들은 위암 생성 및 진행과 연관성이 매우 높을 것으로 사료된다.<sup>12,13)</sup> 그 밖에 다수의 유전자들도 특정 종양의 발생과 연관되어 그 유전자 발현 조절이 매우 중요하다는 연구보고가 많이 알려져 있다.

위암은 조직학적으로 크게 장형(intestinal type)과 광범위형(diffuse type)으로 나뉘는데 이중 70% 이상이 위샘종(adenocarcinoma)이며 그밖에 점액암종(mucinous carcinoma), 편평상피암종(squamous carcinoma) 등으로 나누고 있으나<sup>14)</sup> 조직학적

차이가 종양 발생의 분자생물학적 차이를 반영하는 것은 아니다, 더구나 위암의 경우 대부분 만성위염에서 장형화생(intestinal metaplasia), 이형성증식(dysplasia), 샘종(adenoma)의 전구암 병변을 거쳐 악성위샘종으로 진행되는 것으로 알려져 있으나, 이와 같은 종양발생의 다단계 과정에서의 분자생물학적 고찰이 이루어지기 위해서는 암 발달 진행에 관련된 대단위 유전자 확보가 필수적이라고 사료된다. 특히 위암의 경우 한국에서는 가장 발생 빈도가 높은 암중에 하나이며 이로 인한 사망률 또한 여타 다른 암에 비하여 가장 높다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에 의하여 제시된 위암특이 유전자군은 이러한 위암발생 기전을 연구



**Fig. 3** – Common outlier genes by recapitulated both oligonucleotide and cDNA microarray partitioned normal and cancer group regardless of difference in microarray analysis and target preparation method. Forth-three outlier genes which are differently regulated in cancer tissues compared to corresponding normal tissue, accurately segregate normal and cancer on hierarchical clustering dendrogram.

하는 중요한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다. 특히 본 연구에서 제시한 cDNA와 oligonucleotide microarray에 의해 공통으로 도출된 위암특이 유전자군은 포괄적 유전자 발현 분석기법에 사용되는 방법과 array에 의해 발생될 수 있는 오차를 극복한 매우 신뢰성 있는 유전자군으로 사료되며 이를 활용하여 위암 관련 기전의 분자생물학적 성상 고찰에 활용한다면 앞으로 위암 생성 및 발전기전의 연구에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 21세기프론티어 프로테오믹스이용기술개발사업단 연구과제(FPR05C3-461) 지원에 의거하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Suh, C. I., Suh, K.-A., Park, S.-H., Chang, H. J., Ko, J.-W. and Ahn, D.-H. : Annual report of the central cancer registry in Korea-1998. *J. Korean. Cancer. Assoc.* **32**, 827 (2000).
- 2) Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. : The multistep nature of cancer. *Trend. Genet.* **9**, 138 (1993).
- 3) DeRisi, J. L., Iyer, V. R. and Brown, P. O. : Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 690 (1997).
- 4) Vauhkonen, M., Vauhkonen, H. and Sipponen, P. : Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **20**(4), 651 (2006).
- 5) Liang, P. and Pardee, A. B. : Analysing differential gene expression in cancer. *Nature Reviews of Cancer* **3**, 869 (2003).
- 6) Park, J. Y., Kim, S. Y., Lee, J. H., Song, J., Noh, J. H., Lee, S. H., Park, W. S., Yoo, N. J., Lee, J. Y. and Nam, S. W. : Application of amplified RNA and evaluation of cRNA targets for spotted-oligonucleotide microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**(4), 1346 (2004).
- 7) Nam, S. W., Park, J. Y., Ramasamy, A., Shevade, S., Islam, A., Long, P. M., Park, C. K., Park, S. E., Kim, S. Y., Lee, S. H., Park, W. S., Yoo, N. J., Liu, E. T., Miller, L. D. and Lee, J. Y. : Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology* **42**(4), 809 (2005).
- 8) Park, W. S., Oh, R. R., Park, J. Y., Lee, J. H., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, H. K., Kim, Y. S., Kim, S. Y., Lee, S. H., Yoo, N. J. and Lee, J. Y. : Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* **119**(3), 691 (2000).
- 9) Park, W. S., Oh, R. R., Park, J. Y., Yoo, N. J., Lee, S. H., Shin, M. S., Kim, S. Y., Kim, Y. S., Lee, J. H., Kim, H. S., An, W. G.

- and Lee, J. Y. : Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. *Cancer Lett.* **159**(1), 15 (2000).
- 10) Sun, X. J., Sun, K. L., Zheng, Z. H., Fu, W. N., Hao, D. M., Xu, H. M. and Li, X. M. : Gene expression patterns in gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* **23**(2), 142 (2006).
- 11) Ning, P. F., Liu, H. J. and Yuan, Y. : Dynamic expression of pepsinogen C in gastric cancer, precancerous lesions and *Helicobacter pylori* associated gastric diseases. *World J. Gastroenterol.* **11**(17), 2545 (2005).
- 12) Anderson, C., Nijagal, A. and Kim, J. : Molecular markers for gastric adenocarcinoma: an update. *Mol Diagn Ther.* **10**(6), 345 (2006).
- 13) Pezet, D., Michel, P., Rebischung, C. and Ychou, M. : Cancer of the stomach. *Gastroenterol Clin Biol.* **30**(Spec No 2), 2S16 (2006).
- 14) Hohenberger, P. and Gretschel, S. : Gastric cancer *Lancet.* **362**, 305 (2003).