

유방의 전암성 병변과 암종에서 조직내 교잡법을 이용한 Telomerase mRNA의 발현

배영경 · 김동석 · 이수정¹ · 권광보¹

영남대학교 의과대학 병리학교실
일반외과학교실

접 수 : 2000년 9월 9일
게재승인 : 2000년 12월 29일

책임저자 : 배 영 경
우 705-717 대구시 남구 대명5동 317-1
영남대학교의료원 해부병리과
전화: 053-620-3324
Fax: 053-622-8432
E-mail: ykbp@medical.yeungnam.ac.kr

*본 연구는 2000년 영남대학교 교비 자유
공모과제 연구비의 지원으로 이루어졌음.

Telomerase mRNA Expression by *In Situ* Hybridization in Pre-malignant Lesions and Carcinomas of the Breast

Young Kyung Bae, Dong Sug Kim, Soo Jung Lee¹ and Koing Bo Kwun¹

Departments of Pathology and ¹General Surgery, Yeungnam University College of Medicine
Daegu, Korea

Background : Telomerase is a ribonucleoprotein, DNA polymerase that synthesizes telomere repeats onto chromosomal ends and maintains telomere length. Telomerase activity has been detected in a broad range of human malignant neoplasms, but not in normal somatic cells. So, activation of telomerase may represent an essential step in the malignant transformation of cells. However, the expression of telomerase in premalignant lesions remains relatively unexplored. This study was conducted to investigate the reactivation of telomerase in the carcinogenesis of human breast tissue. **Methods :** *In situ* hybridization for the telomerase RNA component (human telomerase mRNA; hTR) was used in a normal breast tissue (n=41), florid ductal hyperplasia (FDH) (n=10), atypical ductal hyperplasia (ADH) (n=3), ductal carcinoma *in situ* (DCIS) (n=44) and invasive carcinoma (n=33). hTR expression in relation to p53 status and the pathologic parameters in breast cancer was also studied. **Results:** Expression of hTR was demonstrated in 13 samples (31.7%) of normal breast tissues, 4 (40%) of FDH, 3 (100%) of ADH, 42 (95.5%) of DCIS, and 33 (100%) of invasive carcinoma. The rate of hTR expression of ADH was significantly different from that of FDH ($p < 0.05$), and there were no differences in hTR expression rates among ADH, DCIS and invasive carcinomas. There was no correlation between hTR expression and nuclear grade, tumor size, and p53 status in invasive carcinomas. **Conclusion :** These results suggest that telomerase activation may be an early event and an essential step in the carcinogenesis of human breast tissue, and that telomerase has no correlations with p53 status and prognostic parameters.

Key Words : Telomerase, *In Situ* hybridization, Breast, p53

Telomerase는 핵산-단백질 복합체(RNA-protein complex)로 telomeric DNA 3' 끝부분에서 telomere를 합성하는 telomere terminal transferase이다.¹ Telomerase 효소의 mRNA 부위는 telomere를 합성할 때 telomeric 반복의 특정 부위에 대한 주형(template)으로 작용한다.² Telomere는 염기서열 (TTAGGG)_n의 반복으로 이루어져 있으며, 염색체 끝부분에 위치하여 염색체에 일어나는 재조합이나 융합, 그리고 분해효소에 의한 소실로부터 염색체를 보호함으로써 염색체 말단 부위를 안정화시키는 기능을 한다. 그리고 개체마다 약간의 차이는 있으나 사람의 경우 길이가 대략 5-15 kb 정도이며, 3' 끝부분에서의 불완전한 복제로 인하여 세포가 분열할 때마다 50-200 bp

씩 소실된다.³ Telomerase 활성은 분화된 체세포에서는 나타나지 않지만,⁴ 조혈세포의 간세포,⁵ 배아세포,⁶ 그리고 불멸성 세포주(immortal cell line)와 대부분의 암종에서 측정되어,⁷ telomerase의 활성화가 세포의 불멸성 획득과 악성 종양의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다.

1995년 Rhyu⁸는 정상 체세포에서는 telomerase가 불활성 상태이기 때문에 세포분열이 일어날 때마다 telomere 길이가 점점 짧아져 어느 수준에 도달하면 세포사(M1기)가 일어나지만, p53이나 Rb 같은 세포주기 조절유전자의 소실이나 돌연변이가 일어나면 세포는 M1기에 접어들지 않고 지속적인 분열이 가능해져 telomere는 점점 소실되고 그 기능을 상실하여 염색체 재조

합이나 융합 등이 일어난 결과 유전적으로 불안정한 상태(chromosomal instability)가 된다고 하였다. 그리고 이 때 대부분의 세포는 사멸하지만(M2기), telomerase 활성화가 일어난 세포는 과도하게 변형된 염색체 말단부가 안정되면서 불멸화된 클론을 생성하여 지속적인 증식이 가능하게 된다고 하였다.⁸

상피기원 종양은 대개 일련의 형태학적 변화를 거친 전암 병변이 선행하며 이로부터 일정기간이 경과하여 암으로 진행한다고 알려져 있다. 현재까지 위의 이형성 상피병변과 대장의 선종,⁹ 자궁경부의 이형성 상피병변,¹⁰⁻¹² 재생성 간결절,¹³ 그리고 유방의 상피증식성 병변¹⁴에서 telomerase 활성화에 대한 연구가 있어 왔다.

본 연구에서는 유방의 개화성 관상피증식, 비정형 관상피증식, 관상피내암종, 그리고 침윤성 암종을 대상으로 조직내 교잡법(*in situ* hybridization)을 이용하여 hTR (human telomerase mRNA) 발현을 관찰함으로써, 유방암 발생의 어느 단계에서 telomerase 효소의 활성이 나타나는지 알아보려고 하였다. 그리고 조직학적으로 같은 병변이라 하더라도 순수 관상피내암종과, 침윤성 암종 주변에 동반된 관상피내암종과 같이 동반 병변 유무에 따른 hTR 발현 정도와, 종양세포의 핵등급,^{15,16} 종양의 크기, p53 단백질 발현 유무 등과 같은 병리조직학적 인자들과 hTR 발현과의 관련성을 알아보려고 하였다.

재료와 방법

재료

1997년 1월부터 2000년 1월 사이에 영남대학교 의과대학 부속병원에서 유방 종괴로 수술한 환자 가운데 58명의 환자로부터 얻은 조직 표본을 대상으로 하였다. 조직은 병리 진단을 위해 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정 후 통상적으로 제작한 파라핀 블록을 이용하였다. 그리고 이들 환자로부터 얻은 정상 조직 41예, 개화성 관상피증식 10예, 비정형 관상피증식 5예, 관상피내암종 44예, 침윤성 암종 33예에 대하여 연구를 시행하였다. 정상 조직 41예 중 5예는 상피증식성 양성 질환 환자로부터 얻은 조직이었으며, 14예는 관상피내암종, 그리고 22예는 침윤성 암종 주변의 정상 조직이었다. 관상피내암종은 20예가 순수 관상피내암종이었고 24예는 침윤성 암종 주변에 동반된 관상피내암종이었다. 환자 1명당 1-4개의 파라핀 블록이 연구에 사용되었고, 정상 조직의 경우 병변의 주변에 있는 조직을 이용하였다.

방법

조직내 교잡법

hTR 발현을 관찰하기 위해 telomerase mRNA에 특이하게

반응하도록 제작된 fluoresceinated oligonucleotide probe (telomerase RNA probe, BioGenex, U.S.A.)를 사용하였고, 모든 과정은 Super Sensitive ISH Detection System (DA030SS, BioGenex, U.S.A.)을 이용하여 반응산물을 관찰하였다. RNase 오염을 막기 위해 모든 시약의 제조에 DEPC (diethylpyrocarbonate)를 0.01% 농도로 첨가한 증류수를 사용하였고 RNase block을 첨가하였으며, hybridization까지 전 과정은 장갑을 착용하고 시행하였다. 먼저 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절한 다음 0.01%의 DEPC 수조에 띄운 뒤 positively charged glass slide (Probe On Plus, Fisher Scientific, U.S.A.)에 부착하여 실온에서 건조하였다. 그런 다음 xylene에 10분, 5분씩 2회, 100% 에탄올에 2분씩 2회, 95%, 70%, 50% 에탄올에 각각 1분씩 적용시켜 파라핀을 완전히 제거하였다. 그 뒤 각 슬라이드당 300 μ L의 proteinase K를 조직이 충분히 젖도록 떨어뜨려 실온에서 15분 동안 반응한 다음 1×PBS 용액으로 5분간 수세하였다. 그리고 증류수, 50%, 70%, 100% 에탄올에 각각 10초씩 적용하여 탈수하였다. 실온에서 약 5분간 건조한 후 prehybridization solution을 1-2방울 가하고 덮개 유리를 씌운 후 습기 있는 상자에 슬라이드를 넣고 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. 이어서 덮개 유리를 제거하고 100% 에탄올에서 3분씩 2회 세척하였다. 실온에서 약 5분간 건조시킨 다음 20-40 μ L의 probe를 조직에 가하고 95°C oven에 10분 동안 넣어 mRNA의 U자형 고리나 다른 이차적 구조를 제거한 뒤 37°C에서 14시간 동안 교잡을 시행하였다. 그 다음 2×SSC (saline-sodium citrate) 용액에 5분간 2회, 1×SSC 용액에 5분간 차례로 수세하였다. 그런 다음 protein block, Link 1 (mouth anti-fluorescein antibody), Link 2 (biotinylated F(ab)2 fragments of anti-mouse immunoglobulins), Label (alkaline phosphatase-labeled streptavidin)을 차례대로 각각 20분 동안 반응시킨 후 각 단계가 끝날 때마다 1×PBS 용액으로 3분간 3회 세척하였고, 마지막으로 BCIP/NBT substrate를 가하여 나타나는 발색 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 매 실험마다 fluoresceinated poly(A) oligonucleotides를 소식으로 이용한 양성 대조염색과 probe 대신 hybridization solution만 사용한 음성 대조염색을 시행하였다. 세포의 핵에 발색되며 주위 배경보다 확실히 진하게 염색된 경우를 양성으로 판독하였다. 암종의 경우 hTR을 발현하는 세포 수와 발현 강도에 따라 두 군으로 나누어 비교하였다. 즉 종양 세포의 50% 이상에서 병변에 침윤된 림프구의 발현 강도와 같거나 그 이상의 강한 발현을 보이는 군과, 종양 세포의 50% 미만에서 강한 발현을 나타내거나 대부분의 종양 세포가 중등도의 발현을 나타내는 군으로 구분하였다.

p53 단백질에 대한 면역조직화학염색

파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절한 뒤 avidin-biotin complex 방법을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 절편을

슬라이드에 부착시킨 뒤 60°C 배양기 안에 넣고 30분 동안 전처리한 뒤 100% xylene에 5분씩 4회, 100% 에탄올에 5분씩 2회, 95% 에탄올에 5분, 그리고 75% 에탄올에 5분씩 처리한 뒤 흐르는 물에 5분 동안 세척하였다. 항원의 노출이 잘 되게 121°C, 15 Lb에서 5분 동안 고압 멸균한 뒤 실온에 20분 동안 두었다. 그 뒤 증류수를 5분 동안 도포한 다음 메탄올과 30% 과산화수소수 혼합용액을 15분 동안 도포하고 다시 증류수에 5분 동안 둔 뒤, Tris-buffered saline (TBS)으로 5분씩 3회 처리하고 blocking serum을 10분 동안 반응시켰다. 1차 항체인 p53 단백 (DO-7, antihuman mouse monoclonal antibody, Novo Cas-tra, U.S.A.)을 100배 희석하여 도포한 뒤 4°C 냉장고에 하룻밤 넣어두었다. 2차 항체인 biotin이 결합된 연결항체(primary rabbit/mouse antibody, LSAB kit, DAKO Company, U.S.A.)를 30분 동안 반응시킨 뒤 TBS로 5분씩 3회 세척하였고, streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) 용액을 떨어 뜨리고 실온에서 30분 방치한 뒤 다시 TBS에 5분씩 3회 세척하였다. 발색제인 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)을 10분 동안 반응시킨 뒤 흐르는 물에 5분 동안 씻고 Meyer's hematoxylin용액으로 대조염색하였다. 세포의 5% 이상에서 핵에 적색으로 뚜렷하게 염색되는 경우를 양성으로 하였다.

통계 처리

통계학적 유의성 검증은 SPSS 8.0을 이용하여 Fisher's exact test로 하였고, 유의수준은 p값 0.05 미만으로 설정하였다.

결 과

조직학적 유형에 따른 hTR 발현(Fig. 1)

정상 조직

hTR 발현은 정상과 증식된 상피세포의 일부, 그리고 종양세포 및 조직에 침윤된 염증세포에서 관찰되었다. 간질세포나 혈관내피세포는 음성이었고, 림프구는 항상 강한 발현을 나타내어 hybridization 상태의 내부 기준(internal control)으로 삼았다.

정상 조직 41예 중 13예(31.7%)에서 hTR 발현이 관찰되었다. 상피증식성 양성 질환 환자에서 얻은 5예는 모두 hTR 음성인 반면, 관상피내암종과 침윤성 암종 주변의 정상 조직은 36예 중 13예(36.1%)에서 hTR 발현이 관찰되었다. 이는 각각 4예(28.6%)와 9예(40.9%)로 침윤성 암종으로 진행할수록 주변 정상 조직에 hTR이 발현되는 빈도가 증가하는 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없었다.

개화성 관상피증식

개화성 관상피증식 10예 중 4예(40%)에서 hTR 발현이 관찰되었다. 상피증식성 양성 질환에 동반된 4예 중 2예(50%)와

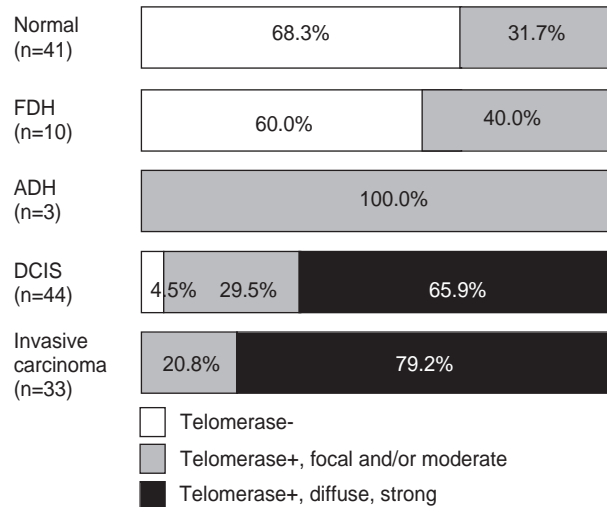


Fig. 1. hTR expression rates according to histologic types (FDH: florid ductal hyperplasia, ADH: atypical ductal hyperplasia, DCIS: ductal carcinoma *in situ*).

침윤성 암종에 동반된 5예 중 2예(40%)에서 hTR 발현이 관찰되었으며, 관상피내암종과 동반된 개화성 관상피증식 1예는 음성이었다. 따라서 개화성 관상피증식의 경우 동반된 조직학적 유형과 hTR 발현과의 관련성은 없었다(p>0.05).

비정형 관상피증식

비정형 관상피증식 5예 중 2예는 절편을 제작하는 과정에서 병변이 소실되어 연구에 이용할 수 없었다. 나머지 3예는 침윤성 암종 환자들에서 얻은 조직으로 모든 예(100%)에서 hTR 발현이 관찰되었다.

관상피내암종

관상피내암종의 경우 44예 중 42예(95.5%)에서 hTR이 발현되었는데(Fig. 2), 그 중 29예(65.9%)에서 강하게, 나머지 13예(29.5%)에서 중등도로 발현되었다. 순수 관상피내암종 환자들에게서 얻은 20예의 조직에서는 18예(90%)가 양성으로, 이 중 10예(50%)가 강하게, 그리고 8예(40%)가 중등도로 발현되었다. 침윤성 암종을 동반한 관상피내암종의 경우 24예(100%) 모두에서 hTR 발현이 나타났는데 19예(79.2%)에서 강하게, 5예(20.8%)에서 중등도로 발현되어, 동일한 관상피내암종이라 하더라도 침윤성 암종과 같이 있는 경우 hTR 발현이 더 많은 세포에서 강하게 나타나는 경향이 있었으나 통계학적 의의는 없었다(p=0.07). 관상피내암종 44예의 핵등급¹⁷은 1, 2, 3등급이 각각 3예(6.8%), 8예(18.2%), 33예(75%)로, 각 등급의 3예(100%), 8예(100%), 31예(93.9%)에서 hTR 발현이 관찰되었다. 그러나 발현 강도를 보면 1등급은 3예 모두(100%)에서, 2등급은 6예(75%)에서, 그리고 3등급은 20예(60.6%)에서 강하게 발현되었

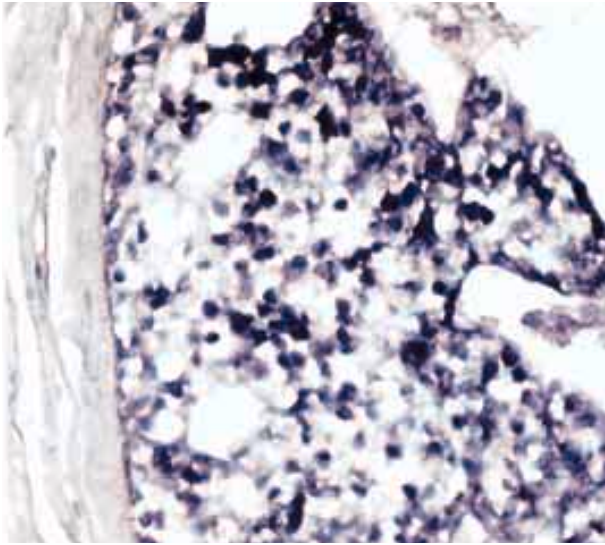


Fig. 2. Human telomerase mRNA expression in ductal carcinoma *in situ*. Most tumor cells show diffuse and strong expression.

으나 핵등급에 따른 hTR 발현의 유의한 차이는 없었다.

침윤성 암종

침윤성 암종 33예의 조직학적 소견은 침윤성 관암종 30예, 침윤성 미세유두상 암종 2예, 그리고 점액성 암종 1예로, 33예(100%) 모두에서 hTR 발현이 관찰되었으며(Fig. 3), 19예(79.2%)에서 강하게, 그리고 5예(20.8%)에서 중등도로 발현되어 관상피내암종에 비해 좀더 높은 발현 강도를 나타내었다. 침윤성 관암종에서 핵등급¹⁸에 따른 hTR 발현을 비교해 보면 1등급은 한 예도 없어 결과를 얻을 수 없었고, 2등급은 7예 가운데 6예(85.7%)에서, 그리고 3등급은 23예 가운데 16예(69.6%)에서 강한 발현이 관찰되었으나, 핵등급에 따른 hTR 발현 정도의 유의한 차이는 없었다. 종양의 크기에 따른 hTR 발현을 보면, 종양의 크기가 2 cm 이하인 예는 12예, 2 cm 보다 크고 5 cm 이하인 예가 15예, 그리고 5 cm 보다 큰 예가 5예로, 각각 9예(75%), 10예(66.7%) 및 3예(60%)에서 강한 발현이 나타나 종양의 크기에 따른 hTR 발현 정도의 유의한 차이는 없었다. 동일 환자에서 관상피내암종과 침윤성 암종 부위가 함께 연구 대상에 포함된 예는 모두 24예로 이 중 23예(95.8%)가 두 부위에서 동일한 발현 정도를 나타내었는데, 18예는 강하게, 그리고 5예는 중등도로 발현되었다. 나머지 한 예는 관상피내암종 부위에서 침윤성 암종에 비해 강한 발현이 나타났다.

침윤성 암종에서 p53 단백질과 hTR 발현과의 관계

침윤성 암종 33예 중 32예에서 p53 단백질에 대한 면역조직화학염색을 시행하였으며, 이 중 13예(40.6%)가 양성이었다. p53

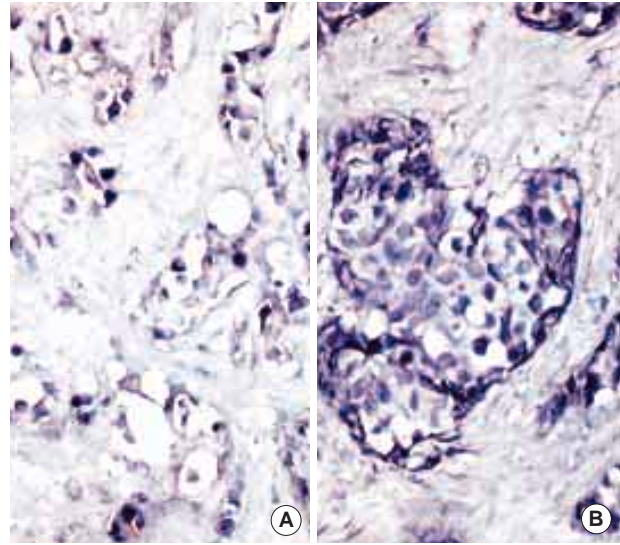


Fig. 3. Human telomerase mRNA expression in invasive ductal carcinoma. Tumor cells show focal (A) and diffuse (B) expression.

단백 결과에 따른 hTR 발현을 비교해 보면, p53 단백질 음성인 군의 14예(73.7%)와 양성인 군의 8예(61.5%)에서 강한 발현을 나타냈으나 두 군 사이에 유의한 차이는 없었다.

고찰

최근까지 조직 내의 telomerase 활성을 측정하는 방법으로 주로 polymerase chain reaction-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay)이 이용되어 왔다.^{9-13,17-19} 그러나 TRAP assay는 신선한 조직이나 동결조직의 전체를 사용하므로 세포 수준에서의 telomerase 활성을 알 수 없는 단점이 있다. 본 연구에서는 TRAP assay의 이러한 단점을 보완하기 위하여 조직내 교잡법을 이용하여 hTR 발현 정도를 관찰함으로써 telomerase 활성을 간접적으로 알고자 하였다. 이에 따라 정상 조직의 31.7%, 개화성 관상피증식의 40%, 비정형 관상피증식의 100%, 관상피내암종의 95.5%, 그리고 침윤성 암종의 100%에서 hTR 발현이 관찰되었다. 본 연구에서 유방암종의 경우 hTR 발현율이 TRAP assay에 의한 telomerase 활성 양성률 73%-95.2%^{7,17-20}보다 높았으며, 정상 조직에서 암종으로 갈수록 hTR을 발현하는 세포 수가 증가하였고 발현 강도도 높았다.

Kolquist 등²¹은 hTR 발현이 telomerase 활성의 대리표지자가 된다고 하였지만, hTR 발현 정도와 TRAP assay로 측정된 활성 사이의 정확한 관련성은 아직 밝혀져 있지 않다. 그러나 TRAP assay를 통한 telomerase 활성 양성률이 hTR 발현율^{14,21}에 비해 낮은 이유 가운데 하나로, TRAP assay를 시행할

때 검체 채취가 부적절하여 생기는 위음성을 꼽을 수 있다. Hoos 등²²은 25예의 유방암중에서 각 증례당 같은 수의 종양 세포를 채취하여 TRAP assay로 측정된 결과, 정도의 차이는 있으나 모든 예에서 telomerase 활성이 관찰되었다고 하였다. Carey 등²³도 침윤성 유방암중을 대상으로 TRAP assay를 이용하여 telomerase 활성을 측정된 결과 22%에서 음성이었으며, 음성인 군들을 미세절단술로 순수 종양세포만을 분리하여 TRAP assay로 다시 측정하니 telomerase 활성이 음성인 예는 5%에 불과하다고 하였다. Heine 등²⁴은 TRAP assay를 이용한 일부 연구^{7,25,26}에서 연구 대상 암종의 5-50%에서 telomerase 활성이 음성으로 나타난 것은 telomerase 활성 또는 upregulation이 암세포의 특징인 불멸성의 필수조건이라는 이론에 적합하지 않은 결과라고 하였다. 그러나 Heine 등²⁴이 위암 조직을 대상으로 연구를 시행한 결과 TRAP assay에서는 13예 중 8예에서 양성인 반면, 조직내 교잡법에서는 13예 모두에서 강한 발현을 나타내어 이제까지 TRAP assay를 이용한 연구들에서 일부 암종들이 telomerase 음성으로 나타난 것은 TRAP assay의 방법론적인 문제에 의한 것으로서, hTR에 대한 조직내 교잡법은 암세포를 증명하는 유용한 방법이라고 하였다. 한편 telomerase는 열과 RNase에 아주 민감한 효소로 조직 보관이 부적절하였을 때 위음성이 나올 수 있다. 종괴 전체 조직을 검체로 사용할 경우 이것은 매우 이질적인 세포들로 구성되어 있으므로 연구 대상이 되는 세포들만을 채취해야 한다는 현실적인 어려움이 있다. Heine 등²⁴은 hTR 발현을 telomerase 활성 존재와 동일하게 생각하여 telomerase 활성이 전사 단계에서 조절될 가능성을 전혀 고려하지 않았다. 그러나 Carey 등²³이 TRAP assay의 검체로 인한 오차를 최소화한 결과 음성률이 현격히 감소하였다는 사실을 보면, TRAP assay를 이용한 연구에서는 연구 대상이 되는 병변의 적절한 채취와 실험군마다 측정할 세포들이 동량으로 포함되도록 세심하게 주의를 기울여야만 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 telomerase 효소의 전사와 활성 사이를 조절하는 기전의 유무를 밝히는 것이 hTR 발현과 telomerase 활성 사이의 정확한 관련을 아는 데 필수적이라고 생각한다.

본 연구에서는 정상 조직의 경우 양성 질환으로부터 얻은 조직에서는 모두 hTR 발현이 관찰되지 않았으나 암종 환자의 종양 주변에서 채취한 정상 조직의 36.1%에서 약하거나 중등도의 hTR 발현이 관찰되었다. TRAP assay를 이용한 연구에서도 종양 주변 정상 조직에서 telomerase 활성이 나타났는데, 그 빈도는 조직과 종양의 종류에 따라 0-37.5%로 다양하다.^{7,18,26} 유방의 경우는 0-10%로^{7,17,18} 본 연구 결과에 비해 낮았다. 이와 같이 종양 주변 정상 조직에서 hTR 발현이 나타난 것은 종양 세포 등에서 분비한 성장인자로 자극을 받은 증식기의 반응성 세포에서 나타나는 현상일 수도 있고, 아니면 형태학적으로는 아직 정상 모습을 하고 있지만 종양발생과정 중 악성의 잠재성을 획득한 불멸화된 세포에서 나타나는 발현일 가능성도 있다.²⁷ 따

라서 이러한 세포들을 대상으로 분자생물학적 방법을 이용해 유전자 변화를 관찰한다면 도움이 될 것으로 생각한다.

Kolquist 등²¹은 조직내 교잡법에 의한 hTR 발현이 증식기의 정상 상피세포 뿐만 아니라 종양 조직 내에 침윤된 활성화된 림프구에서도 강하게 나타나는 것은 telomerase 활성이 세포의 불멸화를 의미한다기보다 세포 증식의 표지자일 가능성을 시사하는 것이라고 하였다. 그러나 대장 상피세포에서의 발현이 미미하고 재생 능력이 왕성한 간세포에서는 hTR 발현이 관찰되지 않은 점 등은 telomerase의 복잡한 생리적 기능을 추측케 한다고 하였다.

본 연구에서 흥미로운 점은 개화성 관상피증식과 비정형 관상피증식 사이의 현저한 발현을 차이인데, 비정형 관상피증식의 경우 증례 수가 적다는 제한점이 있지만 모든 예에서 hTR 발현이 관찰되어 암종과 차이가 없었다. 개화성 관상피증식은 일반인과 비교해서 1.5-2배 높게 유방 암종이 발생한다고 알려져 있지만,²⁸ hTR 발현율을 볼 때 악성 종양의 속성을 아직 완전히 갖지 않을 것으로 생각한다. 비정형 관상피증식이란 양성 관상피증식과 관상피내암종의 소견을 동시에 가지고 있으나 관상피내암종의 소견을 완전히 만족하지 못하는 증식성 병변으로, 관상피내암종의 진단 기준은 저자들마다 약간의 차이가 있다. 본 연구에서는 Tavassoli와 Norris²⁹가 제시한 관상피내암종의 진단 기준을 따랐다. 비정형 관상피증식은 일반인에게서보다 4-5배 높게 침윤성 유방 암종을 발생시키고 장기간 추적시 약 10%에서 침윤성 유방 암종이 발생하는 잘 알려진 전암단계 병변이다.²⁹ 그러나 비정형 관상피증식은 병변의 크기가 작고 대개 다른 질환을 검색할 때 우연히 발견되는 특성이 있으므로 TRAP assay를 통한 연구는 불가능하다. 실제로 본 연구에 포함된 비정형 관상피증식 병변의 크기도 아주 작아, 선정된 증례 중 2예가 절편을 만드는 과정에서 병변 부위가 소실되었다. 따라서 본 연구와 같이 조직내 교잡법을 이용하거나 미세절단술을 이용하여야만 분자생물학적 연구가 가능하다. 본 연구에서 발현 강도의 차이는 있지만 양성률만 비교한다면 암종과 차이가 없는 것으로 나타나, telomerase 활성화가 암발생에 선행한다는 Rhyu⁸의 이론에 부합한다고 보았으나, 연구 대상이 된 증례 수가 적으므로 앞으로 많은 증례에 대한 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각한다.

전암 병변으로 널리 인정되고 있는 자궁경부의 이형성 상피병변과 상피내암종, 침윤성 암종을 대상으로 한 연구에서도 정도의 차이는 있지만 telomerase 활성의 양성률이 세 병변에서 큰 차이가 없는 것으로 나타나, telomerase 활성화는 전암 병변에서 일어날 것으로 주장하고 있다.¹⁰⁻¹² 본 연구에서 관상피내암종과 침윤성 암종은 각각 95.5%와 100%에서 hTR 발현이 관찰되어, 대부분의 암종이 telomerase 활성을 나타낼 것이라는 Rhyu⁸의 이론에 비교적 부합하는 결과를 보였다. 그러나 본 연구에서 2예의 관상피내암종이 hTR 음성으로 나타난 것처럼 드물게는 형태학적으로 명백한 악성 종양이지만 telomerase 활성

이 음성인 경우도 있을 것으로 생각한다. 이러한 경우 telomerase 활성을 조절하는 기전의 존재나 telomere 길이를 안정화시키는 다른 기전의 존재를 고려해 볼 수 있으나,²⁵ 본 연구 결과만으로는 확실히 알 수 없다.

Yashima 등¹⁴은 암중에서 hTR 발현에 상당한 이질성이 있음을 관찰하였다고 하였으나, 본 연구에서는 관상피내암종과 침윤성 암종 부위에서 hTR은 이질성이 거의 없이 미만성으로 강하게 발현되었다. 폐 암종과 유방 암종을 대상으로 hTR 발현을 관찰한 연구를 보면 침윤성 암종에 인접한 상피내암종 부위에서 국소적으로 hTR 발현이 증가하여 hTR의 up-regulation은 침윤성 암종의 발생을 예견할 수 있는 표지자가 될 것이라고 하였다.^{14,30} 그러나 본 연구에서는 주위와 확실히 대비되는 국소적인 hTR 발현의 증가는 관찰할 수 없었다. 관상피내암종의 경우 침윤성 암종 주변에 동반된 관상피내암종이 침윤성 암종을 동반하지 않은 순수 관상피내암종에 비해 hTR이 더 많은 세포에서 강하게 발현되는 경향을 보였지만, 통계학적으로는 의미 없는 차이여서 본 연구 결과로는 telomerase 활성과 침윤과의 관련성을 증명할 수 없었다.

hTR 발현은 종양 세포의 핵등급과 종양의 크기 등과 같은 조직학적 예후인자들과의 유의한 관련이 없었는데, Bednarek 등¹⁸도 유방 암종에서 TRAP assay로 측정된 telomerase 활성은 림프절 전이 상태, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 상태, 종양의 크기, S-phase fraction, ploidy, 병기 등과는 관련이 없다고 하였다.

Roos 등²⁰은 p53 단백질 양성인 군에서 음성인 군보다 telomerase 활성이 유의하게 높았다고 하였으나, 본 연구에서는 p53 단백질 상태와 hTR 발현 강도와는 관련이 없는 것으로 나타났다. p53 단백질 상태와 hTR 발현이 관련이 없다는 연구 결과에 대한 가능성으로는, M1기를 탈출하기 위한 세포주기 통제불능(cell cycle deregulation) 상태는 p53 유전자 변이에만 의존하는 것이 아니라 Rb 유전자, cyclin dependent kinase, cyclin, cyclin dependent kinase inhibitor 등과 같은 세포주기 조절인자들이 상호 작용하여 telomerase 활성을 유도하기 때문인 것으로 보인다.¹⁹ 그러나 hTR 발현과 세포주기 조절인자 및 조직학적 예후인자들과의 관련성에 대해서는 telomerase 효소의 전사와 활성에 이르는 기전이 명확하게 밝혀진 후 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론적으로 유방에서 hTR은 종양 주변 정상 조직 및 개화성 관상피증식의 일부 세포에서 발현되었으며, 비정형 관상피증식의 경우 관상피내암종 및 침윤성 암종과 마찬가지로 대부분의 세포가 hTR 발현을 나타내어, telomerase 활성화 및 불멸성 획득이 전암 병변인 비정형 관상피증식에서 일어나는 것이라 판단된다. 이에 따라 hTR 발현은 암으로 진행되는 데 필수적인 요소임을 알 수 있었다. 그리고 암중에서 hTR 발현은 p53 단백질 발현 및 종양 세포의 핵등급과 종양의 크기와 같은 병리조직학적 예후 인자들과 관련이 없었다.

참고문헌

- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-9.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, *et al.* Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 1996; 13: 433-9.
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, *et al.* Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-5.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173-9.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-94.
- Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, *et al.* Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1245-51.
- Pao CC, Tseng CJ, Lin CY, *et al.* Differential expression of telomerase activity in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1932-7.
- Shroyer KR, Thompson LC, Enomoto T, Eskens JL, Shroyer AL, McGregor JA. Telomerase expression in normal epithelium, reactive atypia, squamous dysplasia, and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 153-62.
- Kim HS, Lee YJ, Kim MS, Ko HM, Juhng SW. Assay of proliferative activity, clonality and immortality of precancerous lesions of the uterine cervix. *Korean J Pathol* 1999; 33: 652-61.
- Hytioglou P, Kotoula V, Thung SN, Tsokos M, Fiel MI, Papadimitriou CS. Telomerase activity in precancerous hepatic nodules. *Cancer* 1998; 82: 1831-8.
- Yashima K, Milchgrub S, Gollahon LS, *et al.* Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 229-34.
- Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, *et al.* Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 1995; 345: 1154-7.
- Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma: a reproducibility study. *Cancer* 1994; 73: 2765-70.
- Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, *et al.* Telomerase activity in

- human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-22.
18. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnston DA, Aldaz CM. Analysis of telomerase activity in breast cancer: Positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-6.
 19. Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 549-54.
 20. Roos G, Nilsson P, Cajander S, Nielsen NH, Arnerlov C, Landberg G. Telomerase activity in relation to p53 status and clinico-pathological parameters in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 343-8.
 21. Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, *et al.* Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nat Genet* 1998; 19: 182-6.
 22. Hoos A, Hepp HH, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallwiener D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int J Cancer* 1998; 79: 8-12.
 23. Carey LA, Hedican CA, Henderson GS, *et al.* Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 435-40.
 24. Heine B, Hummel M, Demel G, Stein H. Demonstration of constant upregulation of the telomerase RNA component in human gastric carcinomas using in situ hybridization. *J Pathol* 1998; 185: 139-44.
 25. Morii K, Tanaka R, Onda K, Tsumanuma I, Yoshimura J. Expression of telomerase RNA, telomerase activity, and telomere length in human gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 830-4.
 26. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, *et al.* Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-62.
 27. Zheng PS, Iwasaka T, Yokoyama M, Nakao Y, Pater A, Sugimori H. Telomerase activation in in vitro and in vivo cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 222-6.
 28. Hutter RVP. Is 'Fibrocystic disease' of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 171-3.
 29. Tavassoli FA, Norris HJ. A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer* 1990; 65: 518-29.
 30. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, *et al.* Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 2373-7.