

결장 선암종에 병발한 선종에서 K-ras 유전자 돌연변이와 K-ras, p16, Cyclin D1, p53 단백질 발현

오화은 · 조성진¹ · 원남희¹ · 이대일¹
김인선¹ · 염범우¹

관동대학교 의과대학 명지병원 해부병리과
¹고려대학교 의과대학 병리학교실

K-ras Gene Mutations and Expression of K-ras, p16, Cyclin D1 and p53 in Synchronous Lesions of The Colon Adenoma-Carcinoma Sequences

Hwa Eun Oh, Seong Jin Cho¹, Nam Hee Won¹, Dale Lee¹, Insun Kim¹
and Bom Woo Yeom¹

Department of Pathology, College of Medicine, Kwandong University, Myongji Hospital, Koyang;
¹Department of Pathology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : The colorectal adenoma-carcinoma sequence represents a well-known paradigm for the sequential development of cancer driven by the accumulation of genomic defects. Although the colorectal adenoma-carcinoma sequence has been well investigated, the studies about tumors of different dignity co-existent in the same patient are rare. K-ras mutation is an early genetic change in colon cancer. The genes involved in the cell cycle such as cyclin D1, p16, and p53 are important in the tumorigenesis of the colon. The aims of this study were to determine K-ras gene mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 in synchronous lesions of the colon adenoma-carcinoma sequences and their possible relationship with K-ras mutation. **Methods :** The materials included 45 colonic adenocarcinomas which were accompanied by adenoma (22 low grade and 26 high grade). By using polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP), we detected K-ras mutation of codon 12. An aberrant K-ras, p16, cyclin D1 and p53 expressions were stained using an immunohistochemical method. **Results :** K-ras mutation was 52.4% (11/21) of high grade adenomas. K-ras expression was 65.4% (17/26) of high grade adenomas. p16 and cyclin D1 expressions were 50% (11/22) and 90.9% (20/22) of low grade adenomas, respectively. p53 expression was 75.6% (34/45) of adenocarcinomas. There were statistical correlations among K-ras, p16 and cyclin D1. **Conclusions :** These results indicate that the ras gene mutation is an early event and the overexpressions of p16, cyclin D1 and p53 are associated with K-ras mutation and expression in adenoma-carcinoma sequences.

Key Words : ras, Protein p16, Cyclin D1, p53, Colorectal neoplasms

접 수 : 2001년 2월 20일
게재승인 : 2001년 7월 20일

책임저자 : 오 화 은
우 412-270 경기도 고양시 덕양구 화정동 697-24
명지병원 해부병리과
전화: 031-962-6900 ext) 713, 704
Fax: 031-969-0500
E-mail: ohe11@hanmail.net

결장암종은 현재 한국인의 10대암 중 하나이며 단백질과 육류 섭취가 많은 식이 습관때문에 점차 증가 추세에 있다.¹ 결장암종은 대부분 결장 선종에서 기원하고 이를 뒷받침하는 기전으로 "선종-암종 연쇄"에 관여하는 유전자들이 Vogelstein 등²에 의해 알려짐에 따라 이에 대한 연구가 활발하다. 즉 암종의 형성 과정에서 APC, ras, DCC, p53 등의 돌연변이 혹은 대립유전자의 소실이 전암 단계에서부터 다단계 과정을 거쳐 암종의 발생을 유도한다.^{3,4} 결장암종의 약 50%에서 돌연변이가 발견되는 K-ras는 성장 인자를 분비하는 세포를 유도하고, 종양 세포가 정상 기질에 부착되지 않고 성장할 수 있도록 하는 유전자로

서 codon 12에서 돌연변이가 가장 흔하다.^{2,5-7} 한편 세포주기를 조절하는 인자 중 세포주기 활성 인자에는 cyclin 계열 단백질과 cyclin dependent kinase (cdk)가 밝혀져 있고, 세포주기 억제 인자로는 p16, p21, p53 단백질이 있다.⁸ Cyclin 계열 단백질 중에서 cyclin D1이 주로 종양의 발생과 관련이 있다고 알려져 있는데, cyclin D-cdk4/6 복합체가 G1/S 이행 단계에서 Rb 단백을 인산화시켜 비활성화함으로써 세포 증식을 유도한다. p16 유전자는 9p21에 위치하고 있으며, cdk4와 6을 억제하여 세포 주기가 G1기에서 S기로 진입하는 것을 방해하는 종양억제유전자이다.⁹ 따라서 활성화된 p16은 S기로의 진행을 막고, ras에 의한

세포 증식을 억제한다.¹⁰ p53 단백질은 p21 단백을 유도시켜 cyclin 계열 단백질 중 주로 cyclin D1-cdk4 복합체를 비활성화 시킴으로써 세포주기를 G1기에 머물게 하여 세포주기를 억제하며, cyclin A를 억제하여 S기로의 진행을 억제하기도 한다.¹¹

따라서 본 연구에서는 결장의 선종과 선암증을 병발한 환자에서 선종의 이형성 등급에 따른 ras 유전자 돌연변이와 암종의 ras 유전자 돌연변이의 빈도를 알아보고, 세포주기 조절 인자인 cyclin D1, p16, p53과 K-ras 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 발현 양상을 비교함으로써, 이들 상호간의 관계와 이들이 선종-암종 연쇄에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

재료

1995년부터 2000년까지 고려대학교 의과대학 부속 안암병원과 1999년부터 2000년까지 관동대학교 의과대학 명지병원에서 직장결장 절제술을 시행하여 얻은 직장결장 암종 조직을 재검토하고, 선종을 동반한 선암증에서 선종을 이형성 등급에 따라 분류하였다. 45예의 선암종과 그에 동반된 22예의 저이형성 선종, 26예의 고이형성 선종 조직을 재료로 하였다.

병리조직학적 검색

직장결장 종양 중에서 슬라이드와 파라핀의 보관 상태가 양호한 45예의 선암종을 고르고 이들의 조직학적 분화도, 전이 여부를 조사하였으며, 병기는 Astler-Coller의 병기를 이용하였다. 직장결장암종의 분화도는 WHO 분류에 의거하여 저분화, 중등도 분화, 고분화, 그리고 점액암종으로 구분하였다. 각각의 선암종에서 동반하고 있는 선종을 이형성 등급에 따라 분류하고, 저등급 이형성 선종과 고등급 이형성 선종으로 구분하였다. 저등급 이형성 선종은 여러 층으로 이루어진 핵이 전체 상피세포 높이의 3/4을 넘지 않으며, 핵의 다형성이 경도이고 심각한 이형성이나 구조적 이상을 초래하지 않는 경우로 하였다. 고등급 이형성 선종은 여러 층으로 이루어진 핵이 전체 상피세포 높이의 3/4을 넘으며, 핵의 다형성이 심하며 심각한 이형성이나 구조적 이상을 초래하는 경우로 하였다.

면역조직화학 염색

K-ras, p16, cyclin D1, p53 면역조직화학 염색

파라핀 블록을 5 μ m 두께로 절편하여 poly-L-lysine-coated slide 위에 조직 절편을 부착하여 60°C에서 2시간 건조시켰다. 탈파라핀과 합수화 과정을 거쳐 160 mL methanol과 3% 과산화수소수 4 mL로 10분 동안 처리하여 내인성 과산화효소를 억

제하였다. 수세 후 citrate buffer에 담가 microwave (750 w)에 2분간 가열하였다. 증류수에 세척하고, Tris buffer (pH 7.6)를 거친 후 실온에서 10분 동안 1:100 fetal calf serum으로 배양한 후, 잔여 혈청은 제거하고 일차 항체를 첨가한 후 실온에서 한시간 동안 반응시켰다. K-ras (Santa Cruz, U.S.A.)는 일차 항체(1:50)를 16시간 동안 반응시켰고, p16 (Santa Cruz, U.S.A., 1:100), cyclin D1 (Santa Cruz, U.S.A., 1:50), 그리고 p53 (Zymed, U.S.A., 1:50)은 한시간 동안 반응시켰다. Tris buffer로 세척한 후 Dako사의 Universal LSAB peroxidase II kit와 3,3-diaminobenzidine tetrachloride을 사용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다.

Cyclin D1, p16 및 p53은 핵에 염색된 것을 양성으로 하였고, K-ras는 세포질과 세포막에 염색된 것을 양성으로 하였다.¹² Cyclin D1, p53 및 K-ras는 양성 반응을 보인 종양 세포가 10% 이상인 경우를 양성으로 하였으며, p16은 양성 반응을 보인 면적이 50% 이상일 때 양성으로 간주하였으며, 면적이 50%가 안 되는 경우는 단백질 소실이 있는 것으로 하였다.

DNA 추출 및 K-ras 돌연변이 검사를 위한 Polymerase chain reaction-Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)

K-ras codon 12의 변이 여부는 PCR-SSCP 방법으로 조사하였다. 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 6 μ m 두께의 연속절편으로 만들어 1.5 mL eppendorf tube에 넣은 후, 파라핀을 제거하기 위해 크실렌 1 mL를 가하였다. 그 다음 60°C에서 10분간 방치한 후 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 이 과정을 2회 반복한 뒤 100% 에탄올 1 mL로 크실렌을 제거하였고, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하며 다시 이 과정을 2-3회 반복한 다음 pellet을 건조시켰다. DNA 분리는 High pure PCR template preparation kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 eppendorf tube의 건조된 조직에 boiling resin 150 μ L를 넣고 proteinase K 5 μ L를 넣은 후 56°C에서 한시간 동안 반응시켰다. 이 tube를 95°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 10분간 방치하고, 다시 10분간 95°C에서 반응시킨 다음, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액 2 μ L를 PCR에 사용하였다.

추출한 DNA 200 ng, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 10 pmole primers, 2.5 U Taq polymerase 및 증류수를 가하여 PCR 혼합액이 25 μ L가 되게 한 후, PCR thermal cycler (Perkin Elmer 2400, U.S.A.)을 사용하여 K-ras codon 12에 대한 유전자 증폭을 시행하였다. 사용한 primer의 염기서열은 아래와 같다.



PCR 조건은 처음 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 44회 반복하고, 마지막에 72°C에서 7분간 extension하였다. PCR 반응의 적절성을 평가하기 위하여 20 µg ethidium bromide가 함유된 1.2% 아가로즈겔에 PCR 산물 3 µL와 loading dye를 섞어 loading 한 후, 100 V에서 20분간 전기영동을 시키고 UV transilluminator로 100-200 bp 사이에 나타나는 band를 확인한 다음 polaroid 사진기로 촬영하였다. DNA marker로 100 bp ladder 5 µL를 loading dye와 섞어 사용하였다.

5 µL의 PCR 산물과 증류수에 denaturing solution (95% formamide, 0.05% bromophenol blue) 5 µL를 넣고 끓는 물에서 3분간 방치한 후 급히 얼음에 식히고, 12.5% polyacrylamide gel에 load하고 150 V로 6시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 10% 에탄올에 10분간 담가 둔 후 1% nitric acid에 3분간 담그고, 0.012 M silver nitrate 용액에 30분간 담가 증류수로 씻어준 후 0.28 M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde 용액으로 발색시켰다. DNA 띠가 적절하게 염색되면 10% 아세트산으로 3분간 고정한 후 증류수로 씻고 셀로판으로 겔을 말려서 보관하였다.

통계학적 분석

통계학적 처리는 SPSS version 7.5 (SPSS Inc., Chicago, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하여 각 지표에 따라 Chi-square test, McNemar test와 Fisher's exact test를 사용하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

임상 및 병리학적 소견

본 연구는 45예의 직장결장 선암종과 각각의 예에 함께 동반하고 있는 22예의 저등급 이형성 선종, 26예의 고등급 이형성 선종을 대상으로 하였다. 환자의 평균 연령은 62.6세였고 남:여 비율은 29:16이었다. 선암종의 분화도는 고분화 선암종이 19예, 중등도 및 저분화 선암종이 각각 19예와 1예, 그리고 점액암종

이 6예였다. 선암종의 Astler-Coller 병기에 따른 분류로는 A3 예, B1 5예, B2 16예, C1 1예, C2 20예였다. 선암종의 위치는 우측 결장이 5예, 맹장이 2예, 상행결장이 2예, 가로창자가 5예, 내림창자가 3예, 구불창자가 7예, 직장이 18예, 직장-구불창자가 1예, 좌측 결장이 2예였다.

정상 조직, 선종 및 선암종에서의 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53의 발현과 K-ras 돌연변이(Table 1, Fig. 1, 2)

K-ras의 돌연변이는 총 82예 중 28.0% (23예)에서 검출되었으며, 저등급 이형성 선종 15% (3/20예)에서, 고등급 이형성 선종 52.4% (11/21예)에서, 그리고 선암종 22.0% (9/41예)에서 나타났다. K-ras 단백질은 정상 조직에서는 20%, 저등급 이형성 선종에서는 27.3%가 발현되어 정상 조직과 차이를 보이지 않았으나, 고등급 이형성 선종에서는 65.4%가 발현되었고 선암종에서는 51.1%가 발현되어 정상 및 저등급 이형성 선종의 발현과 의미 있는 차이를 보였다(p<0.001). p16은 정상조직에서는 모두 발현되는 데 비하여, 저등급 이형성 선종, 고등급 이형성 선종, 선암종에서는 각각 50%, 61.5%, 33.3%가 발현되어 정상에서 저등급 이형성 선종으로 이행되는 단계에서 소실되는 것이 많았다(p<0.001). Cyclin D1은 각각에서 82.2%, 90.9%, 96.2%, 86.7%가 발현되어 선종이나 암종에서의 발현이 정상과 유사하였다. p53은 정상에서는 전혀 발현되지 않고 저등급 이형성 선종에서 고등급 이형성 선종, 그리고 선암종으로 이행함에 따라 40.9%, 69.2%, 75.6%로 그 발현이 증가하였다(p<0.001).

저등급 이형성 선종을 동반한 선암종에서 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53의 발현과 K-ras 돌연변이(Table 2)

K-ras의 경우, 저등급 이형성 선종에서는 발현되지 않고 선암종에서 발현되는 예가 45.5%로 의미 있게 높았다(p<0.05). p16은 저등급 이형성 선종과 선암종 모두에서 발현되지 않는 예가 40.9%로 높았다. Cyclin D1은 저등급 이형성 선종과 선암종 모두에서 발현되는 경우가 86.4%였다(p<0.001). p53은 저등급 이형성 선종에서는 발현되지 않고 선암종에서 발현되는 예가 45.5%이고 모두에서 발현되는 예가 31.8%였다(p<0.05). 저등급 이형성 선종에서 K-ras의 돌연변이를 보이고 선암종에서는 돌연변이를 보이지 않는 경우와, 반대로 저등급 이형성 선종에

Table 1. K-ras mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 in normal, adenoma and adenocarcinoma of the colorectum

| | Normal Positive (%) | Adenoma, low grade Positive (%) | Adenoma, high grade Positive (%) | Adenocarcinoma Positive (%) | p value |
|----------------|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------|
| K-ras mutation | | 3/20 (15) | 11/21 (52.4) | 9/41 (22.0) | <0.05 |
| K-ras | 9/45 (20) | 6/22 (27.3) | 17/26 (65.4) | 23/45 (51.1) | <0.001 |
| P16 | 45/45 (100) | 11/22 (50) | 16/26 (61.5) | 15/45 (33.3) | <0.001 |
| cyclin D1 | 37/45 (82.2) | 20/22 (90.9) | 25/26 (96.2) | 39/45 (86.7) | NS |
| p53 | 0/45 (0) | 9/22 (40.9) | 18/26 (69.2) | 34/45 (75.6) | <0.001 |

Table 2. K-ras mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 protein in adenocarcinomas with low grade adenomas of the colorectum

| | Low adenoma-Ca - : + (%) | Low adenoma-Ca + : - (%) | Low adenoma-Ca + : + (%) | Low adenoma-Ca - : - (%) | p value |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| K-ras mutation | 3/20 (15) | 3/20 (15) | 0/20 (0) | 14/20 (70) | <0.001 |
| K-ras | 10/22 (45.5) | 3/22 (13.6) | 3/22 (13.6) | 6/22 (27.3) | <0.05 |
| p16 | 2/22 (9.1) | 6/22 (27.3) | 5/22 (22.7) | 9/22 (40.9) | NS |
| Cyclin D1 | 2/22 (9.1) | 1/22 (4.5) | 19/22 (86.4) | 0/22 (0) | <0.001 |
| p53 | 10/22 (45.5) | 2/22 (9.1) | 7/22 (31.8) | 3/22 (13.6) | <0.05 |

Ca: carcinoma, Low: low grade.

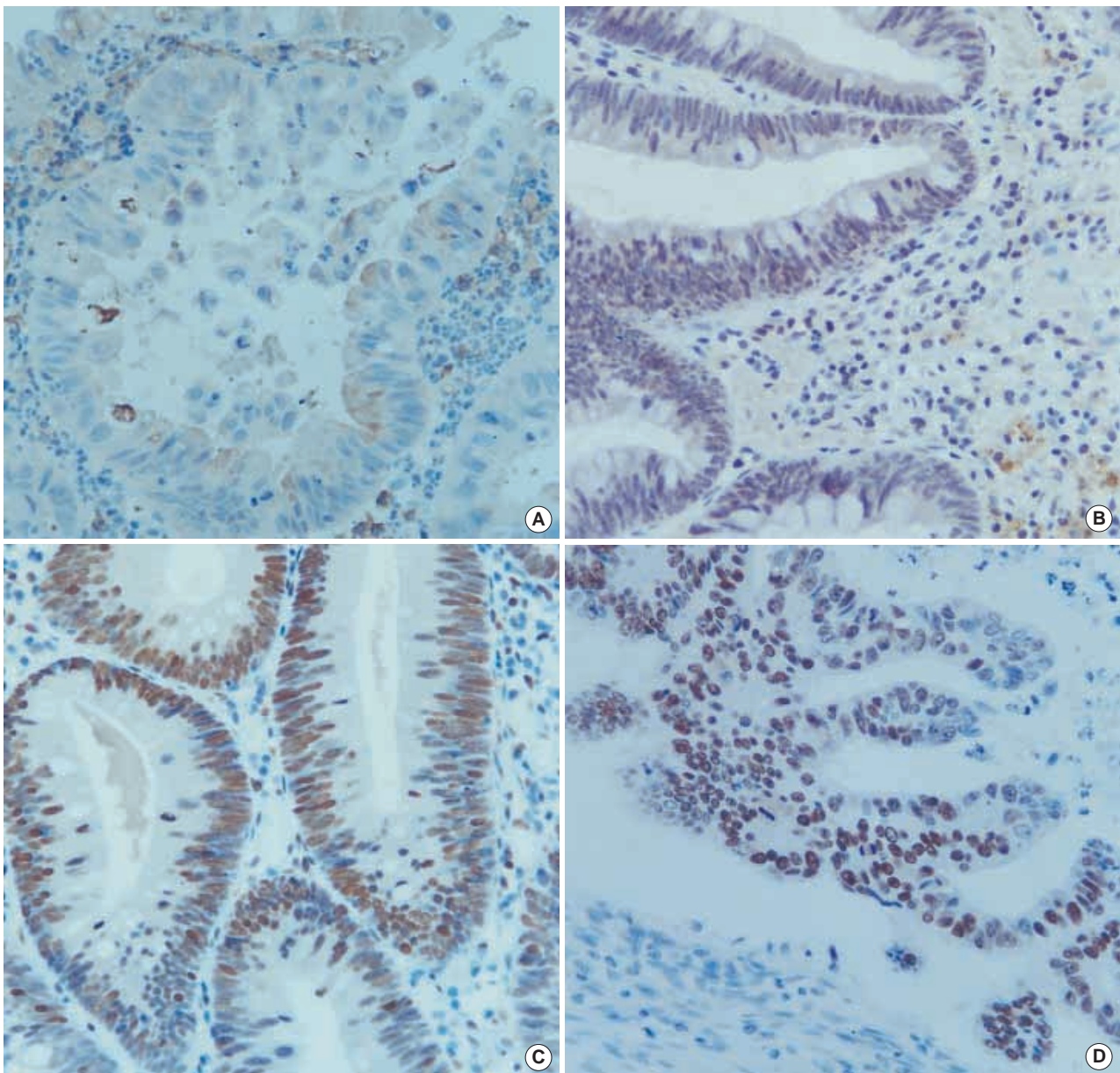


Fig. 1. Immunoreactivity for K-ras (A, strong positive in high grade adenoma), p16 (B, strong positive in low grade adenoma), cyclin D1 (C, strong positive in low grade adenoma) and p53 (D, strong positive in adenocarcinoma).

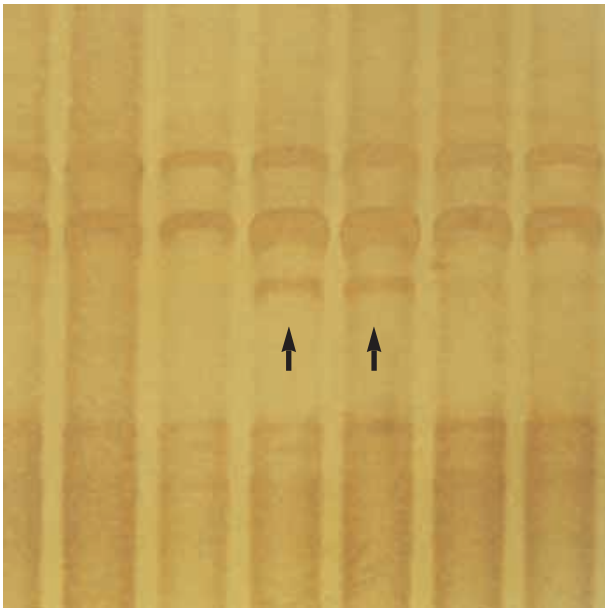


Fig. 2. Detection of K-ras oncogene mutations by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. K-ras codon 12 shows abnormal mobility shifts (arrows).

서 K-ras의 돌연변이를 보이지 않고 선암종에서는 돌연변이를 보이는 경우는 모두 20예 중 3예(15%)였다. 반면 저등급 이형성 선종과 선암종 모두에서 돌연변이를 보이지 않는 경우는 20예 중 14예(70%)였다($p < 0.001$).

고등급 이형성 선종을 동반한 선암종에서 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53의 발현(Table 3)

K-ras, cyclin D1 및 p53 모두에서 고등급 이형성 선종과 선암종 모두에서 발현되는 예가 각각 34.6%, 76.9%, 50%였다. p16은 고등급 이형성 선종에서는 발현되며 선암종에서는 발현되지 않는 예가 38.5%로 가장 높았다. K-ras는 고등급 이형성 선종 21예 중 11예(52.4%)에서 돌연변이를 보여 고등급 이형성 선종의 형성에 기여할 것으로 생각되나, 21예 중 3예(14.3%)는 고등급 이형성 선종에서는 돌연변이를 보이지 않는데 선암종에

서는 보여 고등급 이형성 선종 이후에도 돌연변이가 일어났음을 알 수 있었고, 7예(33.3%)에서는 고등급 이형성 선종과 선암종 모두에서 돌연변이가 일어나지 않았다.

정상 조직, 선종, 선암종에서 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53 상호간의 관련성(Table 4)

정상과 저등급 이형성 선종에서 cyclin D1과 K-ras 단백질 발현 간에 통계학적 관련성을 보였다($p < 0.001$). 고등급 이형성 선종에서는 cyclin D1과 K-ras 단백질 발현 간에($p < 0.01$), p16 단백질과 K-ras 돌연변이 간에($p < 0.05$), p53 단백질과 K-ras 돌연변이 간에($p < 0.05$), K-ras 돌연변이와 K-ras 단백질 발현 간에($p < 0.05$) 관련성을 보였다. 선암종에서는 cyclin D1과 K-ras 단백질의 발현간에, p53과 K-ras 단백질 발현 간에, K-ras 돌연변이와 K-ras 단백질 발현 간에 관련성을 보였다($p < 0.05$). K-ras 돌연변이와 K-ras 단백질 발현의 관계를 보면, K-ras 돌연변이를 보인 23예 중 7예(30.4%)에서는 K-ras 단백질 발현을 관찰할 수 없었고, 16예(69.6%)에서 돌연변이와 단백질 발현이 동시에 관찰되었다. K-ras 돌연변이와 K-ras 단백질의 발현은 고등급 이형성 선종과 선암종에서 의미 있는 관련성을 보였다($p < 0.05$).

선암종에서 병기와 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53간의 관련성(Table 5)

선암종에서 병기에 따른 K-ras 돌연변이와 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53 단백질의 발현의 변화를 비교하면, 각각은 병기와 통계학적으로 유의한 관련성이 없었다.

고찰

ras 종양유전자는 인체 발암과정 중 초기에 작용하는 강력한 종양유전자 중 하나이다. ras 유전자가 결장암종의 선종-암종 연쇄증 초기에 관여할 것이라는 이론이 대두된 이후, 최근에는 ras와 다른 종양유전자와의 관련성을 밝히려는 연구가 이루어지고 있다. 특히 세포주기 조절 인자와의 관련성을 밝히려는 시도

Table 3. K-ras mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 protein in adenocarcinomas with high grade adenomas of the colorectum

| | High adenoma-Ca - : + (%) | High adenoma-Ca + : - (%) | High adenoma-Ca + : + (%) | High adenoma-Ca - : - (%) | p value |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|
| K-ras mutation | 3/21 (14.3) | 8/21 (38.1) | 3/21 (14.3) | 7/21 (33.3) | NS |
| K-ras | 2/26 (7.7) | 8/26 (30.8) | 9/26 (34.6) | 7/26 (26.9) | NS |
| p16 | 2/26 (7.7) | 10/26 (38.5) | 7/26 (26.9) | 7/26 (26.9) | NS |
| Cyclin D1 | 0/26 (0) | 5/26 (19.2) | 20/26 (76.9) | 1/26 (3.8) | <0.001 |
| p53 | 7/26 (26.9) | 5/26 (19.2) | 13/26 (50) | 1/26 (3.8) | <0.005 |

Ca: carcinoma, High: high grade.

Table 4. Correlation between K-ras mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 protein in normal, low grade adenomas, high grade adenomas and adenocarcinomas of the colorectum

| | p16 (%) | | Cyclin D1 (%) | | p53 (%) | |
|---------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| | negative | positive | negative | positive | negative | positive |
| Normal ^a | | | | | | |
| K-ras (-) | 0/45 (0) | 36/45 (80) | 5/45 (11.1) | 31/45 (68.9) | 36/45 (80) | 0/45 (0) |
| (+) | 0/45 (0) | 9/45 (20) | 3/45 (6.7) | 6/45 (13.3) | 9/45 (20) | 0/45 (0) |
| Low grade adenoma ^b | | | | | | |
| K-ras (+) | 3/22 (13.6) | 3/22 (13.6) | 0/22 (0) | 6/22 (27.3) | 3/22 (13.6) | 3/22 (13.6) |
| K-ras mu (+) | 1/3 (33.3) | 2/3 (66.7) | 0/3 (0) | 3/3 (100) | 3/3 (100) | 0/3 (0) |
| High grade adenoma ^c | | | | | | |
| K-ras (+) | 6/26 (23.1) | 10/26 (38.5) | 0/26 (0) | 17/26 (65.4) | 4/26 (15.4) | 13/26 (50) |
| K-ras mu (+) | 3/11 (27.3) | 8/11 (72.7) | 0/11 (0) | 11/11 (100) | 2/11 (18.2) | 9/11 (81.8) |
| Adenocarcinoma ^d | | | | | | |
| K-ras (+) | 12/45 (26.7) | 11/45 (24.4) | 1/45 (2.2) | 22/45 (48.9) | 5/45 (11.1) | 18/45 (40) |
| K-ras mu (+) | 6/9 (66.7) | 3/9 (33.3) | 0/9 (0) | 9/9 (100) | 0/9 (0) | 9/9 (100) |

^a: p value in normal : cyclin D1-ras <0.001, ^b: p value in low grade adenomas : p16-ras NS, cyclin D1-ras <0.001, p53-ras NS, p16-ras mu NS, cyclin D1-ras mu <0.001, p53-ras mu NS, ras-ras mu NS, ^c: p value in high grade adenomas : p16-ras NS, cyclin D1-ras <0.01, p53-ras NS, p16-ras mu <0.05, p53-ras mu <0.05, ras-ras mu <0.05, ^d: p value in adenocarcinomas: p16-ras NS, cyclin D1-ras <0.001, p53-ras <0.05, p16-ras mu NS, cyclin D1-ras mu <0.001, p53-ras mu <0.001, ras-ras mu <0.05, mu: mutation.

Table 5. Correlation between K-ras mutation and expression of K-ras, p16, cyclin D1 and p53 protein in adenocarcinomas according to stage and adenomas of the colorectum

| | Adenoma (%) | Stage A (%) | B1+B2 (%) | C1+C2 (%) | p value |
|----------------|--------------|-------------|--------------|--------------|---------|
| K-ras mutation | 10/41 (24.4) | 1/3 (33.3) | 3/21 (14.3) | 5/21 (23.8) | NS |
| K-ras | 23/48 (47.9) | 1/3 (33.3) | 12/21 (57.1) | 10/21 (47.6) | NS |
| p16 | 27/48 (56.3) | 1/3 (33.3) | 8/21 (38.1) | 6/21 (28.6) | NS |
| Cyclin D1 | 45/48 (93.8) | 3/3 (100) | 18/21 (85.7) | 19/21 (90.5) | NS |
| p53 | 27/48 (56.3) | 2/3 (66.7) | 15/21 (71.4) | 17/21 (81) | NS |

가 있다.¹³ 다단계 발암과정에서 *myc*이나 *cyclin D*의 과발현, 혹은 *p53*의 돌연변이 같은 유전자적 이상이 *ras*의 형질전환을 야기하는 데 필요하다는 이론이 대두되고 있고,^{14,15} *ras*와 *p16* 간의 관계에 대한 연구도 있다.¹⁶ 최근에는 *ras*가 세포 표면에 있는 성장인자 수용기에서 핵으로의 정보를 전달하는 주된 경로의 역할을 한다는 보고도 있다.¹⁶ MacLeod 등에 의하면 *ras*는 AP-1 복합체를 활성화시켜서 DNA methyltransferase를 up-regulate한다고 한다.¹⁷ 이것은 *ras*가 세포형질전환과 DNA 메틸화를 매개하는 역할을 하는 것을 시사하며 *p16*의 메틸화와 불활성화에도 관여한다는 것을 말해 준다.¹⁶ 본 연구에서 K-ras의 발현이 정상 조직과 저등급 이형성 선종에서보다 고등급 이형성 선종에서 의미 있게 높은 것, 그리고 저등급 이형성 선종에서는 발현되지 않으나 선암종에서는 발현되는 예가 많은 점, 그리고 고등급 이형성 선종과 선암종에서 동시에 발현되는 예가 많은 점 등은 모두 K-ras가 저등급 이형성 선종에서 그 다음 단계로 진행되는 데 기여할 것이라는 것을 시사한다고 하겠다. 본 연구에서 K-ras의 돌연변이는 20예의 저등급 이형성 선종 중 3예 (15%)에서, 21예의 고등급 이형성 선종 중 11예(52.4%)에서, 그리고 41예의 선암종 중 9예(22.0%)에서 나타나서, 총 82예 중 23예의 돌연변이를 보여 28.0%였다. 선암종의 경우 22%가

검출되어 다른 논문^{2,5}의 50%에 비해 적었는데, 이것은 PCR 생성물을 정제하는 과정에서 K-ras가 빠져 나가기 때문일 것으로 생각된다. 또 선종에서 선암종으로의 이행 시에 K-ras 돌연변이 이외의 다른 인자가 관여할 것임을 시사하는 것이라 하겠다.

p16 유전자의 불활성화 기전은 돌연변이라기보다는 동종성 소실이나 과메틸화가 주된 기전으로 알려져 있다.¹⁸ *p16* 유전자의 불활성화는 단백 소실이나 불안정한 단백을 만들므로 면역조직화학염색상 중앙 세포의 핵에서 음성을 보이는 것을 의미 있는 것으로 간주하였다. *p16* 유전자의 동종성 소실 빈도는 중앙마다 차이가 있어서 10-70%까지 보고되고 있다.¹⁹⁻²² 본 연구에서 *p16* 단백질이 정상조직에 비해 저등급 이형성 선종에서 의미 있게 소실된 점, 저등급 이형성 선종과 선암종에서 동시에 소실된 예가 많은 점 등은 *p16*의 작용 시기가 저등급 이형성 선종이 되기 이전이라는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

사람의 유전체에는 적어도 11개의 명백한 *cyclin* 유전자가 있고 이들은 3가지 종류로 분류할 수 있다. G1기 *cyclin* (C, D1-3, E, G, H), S기 *cyclin* (A, F), G2/M기 *cyclin* (A, B1-2)가 있고^{23,24} 이들과 결합하여 활성을 나타내는 cdk가 있으며, cdk는 1번부터 6번까지의 아형으로 구분되고, 이들 각각은 세포주기 G1, S, G2, M기에 따라 발현양이 변화되어 세포주기 진

행에 관여한다. 유방암중, 두경부 암중, 식도암중, 간세포암중, 방광암중 등에서 염색체 11q13이 증폭하여 cyclin의 발현이 증가되었음이 보고되었고, 종양세포주를 이용한 연구에서도 cyclin이 종양 형성에 관여한다고 보고되었다.^{25,26} Cordon-Cardo 등¹³은 유방암중과 폐암중 조직을 이용한 cyclin D1 단백질 연구에서 cyclin D1 단백질 발현과 유전자 증폭은 연관성이 있다고 기술하였다. 그러나, Bartkova 등은 cyclin D1 유전자의 증폭 없이 cyclin D1 단백질 발현이 증가하며, cyclin D1 유전자 증폭보다는 cyclin D1 단백질의 과발현이 종양 형성과 더 밀접한 요소일 수 있다고 보고하였다.²⁷ Arber 등²⁸은 결장선종과 선암중에서 cyclin D1의 핵 발현을 34%와 30%로 보고하였고, 정상 조직에서는 핵에서 발현 되지 않고 세포질에 발현되었으며 선암중 주변의 이행성 상피에서는 85%에서 세포질에 발현되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에 의하면 정상 조직에서도 82.2%에서 핵에 발현되었고, 저등급 이행성 선종, 고등급 이행성 선종, 및 선암중에서 각각 90.9%, 96.2%, 86.7%로 발현되어 Arber 등의 연구 결과와는 차이를 보였다. 본 연구 결과에 의하면, cyclin D1 역시 저등급 이행성 선종이 되기 이전 단계에서 역할을 할 것으로 생각된다.

종양 조직에서 p53 단백질 발현에 대한 설명은 크게 두 가지로 할 수 있다. 첫째로, 대부분의 경우는 p53 유전자의 돌연변이로 생성된 p53 단백질이 정상 야생형 p53보다 안정한 상태로 있어서 세포 핵내에 축적된다는 것이다.²⁹ 둘째로, 종양 세포가 세포 손상을 받거나 DNA 손상이 있을 때, 생리적 반응으로 증가한다는 것이다.³⁰ 본 연구에서 p53 단백질은 정상 조직에서는 전혀 발현되지 않았고, 저등급 이행성 선종, 고등급 이행성 선종 그리고 선암중으로 진행하면서 발현이 점차 증가하여 p53은 다단계 암 증기전에서 각 시기마다 어떤 역할을 할 것으로 생각되며, 특히 암중이 되기 바로 전단계에서 그 역할이 클 것으로 생각된다.

선암중에서 병기와 K-ras, p16, cyclin D1 및 p53 단백질의 발현 간에는 통계학적으로 유의한 관련성이 없으므로, 이런 종양 유전자의 발현이나 돌연변이, 세포주기 조절 인자의 발현 정도를 암의 예후 인자로 사용하기에는 어려울 것 같다.

본 연구에서는 K-ras의 돌연변이와 면역조직화학적 방법, 그리고 몇 가지 세포주기 조절 인자의 발현에 대하여 면역조직화학적 방법만을 이용하였기 때문에, 이들 상호간의 정확한 발현 양상을 파악하여 상호 비교하기에는 다소 어려움이 있었다. 좀 더 세밀한 분자 생물학적 방법을 도입하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. Annual report of the central cancer registry of Korea (1998.1.1-1998.12.31). June, 2000.
2. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 1988; 319: 525-32.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model of colorectal carcinogenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
4. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. Curr Probl Cancer 1997; 21: 233-300.
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 1987; 327: 293-7.
6. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 1987; 327: 298-303.
7. Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. Surg Oncol 1992; 1: 275-82.
8. Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. Am J Pathol 1995; 147: 545-60.
9. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 1993; 366: 704-7.
10. Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras induced proliferation and cellular transformation by p16INK4a. Science 1995; 267: 249-52.
11. Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. Pathol Res Pract 1996; 192: 669-75.
12. Jansson DS, Radosevich JA, Carney WP, et al. An immunohistochemical analysis of ras oncogene expression in epithelial neoplasms of the colon. Cancer 1990; 65: 1329-37.
13. Arber N, Hibshoosh H, Yasui W, et al. Abnormalities in the expression of cell cycle-related proteins in tumors of the small bowel. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8: 1101-5.
14. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature 1983; 304: 596-602.
15. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res 1989; 49: 3713-21.
16. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. Gastroenterology 1999; 116: 1063-71.
17. MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. J Biol Chem 1995; 270: 11327-37.
18. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 1995; 55: 4525-30.
19. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator

- potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-40.
20. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-6.
 21. Sibert R, Willers CP, Schramm A, *et al.* Homozygous loss of the MTS1/p16 and MTS2/p15 genes in malignant lymphoma and lymphoblastic cell lines. *Br J Haematol* 1995; 91: 350-4.
 22. Giani C, Finocchiaro G. Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res* 1994; 54: 6338-9.
 23. Pines J, Hunter T. Cyclins and cancer II: cyclin D1 and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-82.
 24. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.
 25. Motokura T, Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1155: 63-78.
 26. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 709-13.
 27. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1994; 568-73.
 28. Arber N, Hibshoosh H, Moss SF, *et al.* Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 1996; 110: 669-74.
 29. Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, *et al.* Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with *ras* in transforming primary rat cells: a component of the hot spot mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1990; 1: 571-80.
 30. Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: Can we trust immunohistochemistry? -Revisited! *J Pathol* 1994; 172: 1-4.