

위의 증식성 병변에서 동소교잡법에 의한 Telomerase mRNA 및 RNA 성분의 검출

김미숙 · 정상우

전남대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2001년 4월 11일
게재승인 : 2001년 7월 20일

책임저자 : 김 미 숙
우 501-190 광주시 동구 학동 5
전남의대 병리학교실
전화: 062-220-5670
Fax: 062-225-0480
E-mail: magda@altair.chonnam.ac.kr

*이 논문은 전남대학교병원 임상연구소 연구비(2000년도)의 지원으로 이루어졌음.

In Situ Detection of mRNA and RNA Component of Human Telomerase in Proliferative Lesions of the Stomach

Mi Sook Kim and Sang-Woo Juhng

Department of Pathology, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

Background : Proliferative lesions of the stomach were investigated by *in situ* hybridization using RNA probes for telomerase components and compared with the results by TRAP (telomeric repeat amplification protocol) assay. **Methods** : RNA probes for hTR (human telomerase RNA component) and hTERT (mRNA coding for a catalytic subunit of human telomerase) were made by cloning and *in vitro* transcription. The probes were applied for *in situ* hybridization in 23 cases of adenocarcinoma of the intestinal type and adjacent dysplasia, and in the normal and metaplastic mucosa of the stomach. **Results** : Telomerase activity by TRAP was positive in all cases of adenocarcinoma, most cases of dysplasia, and many cases of normal mucosa. hTR *in situ* hybridization showed positive staining in the adenocarcinoma cells, dysplastic cells, a few cells in the proliferation zone of the normal mucosa, and a few infiltrated lymphocytes. hTERT showed positive staining in the same cells. **Conclusions** : Telomerase is expressed in most cases of dysplastic lesions and is thought to be acquired in the early steps of carcinogenesis. The expression is noted in a few cells of the normal proliferative zones and the infiltrated lymphocytes, emphasizing the importance of *in situ* detection of telomerase at the cell level.

Key Words : Telomerase, Polymerase chain reaction, mRNA, *In situ* hybridization

악성 종양 세포는 종양유전자¹와 종양억제유전자² 등 다양한 유전자 변이를 가지고 있다. 따라서 전암단계 병변의 세포도 일련의 유전자 변이에 의해 암종 세포로 발달하여 간다고 생각한다. 그러나 전암단계 병변의 임상·병리학적 의미를 이해하고 유전자 변이를 해석하기 위해서는 전암단계 병변의 속성을 먼저 검토하여야 할 것이며, 그 중에서도 침윤성이나 전이성 이전에 표현될 것으로 기대되는 불멸성을 먼저 검토하여야 할 것으로 생각한다.

인체 세포의 불멸성에 대하여는 비교적 최근에 알려진 TRAP (telomeric repeat amplification protocol)의 방법으로 telomerase 활성을 측정함으로써 연구하고 있다.^{3,4} 저자들⁵도 자궁 경부의 증식성 병변의 불멸성을 TRAP으로 조사 보고하였다. 그러나 고등급 이형성 병변과 암종 조직에서만뿐만 아니라 저등급 이형성 병변과 양성 상피조직도 TRAP에 강한 양성 반응을 보여, 다른 연구자들의 보고^{3,4}와는 달리 TRAP을 이용한 불멸성

연구에는 한계가 있음을 알 수 있었다. 따라서 증식성 병변의 불멸성을 검색하기 위해서는 분자생물학적 TRAP 반응과 함께 동소교잡법(*in situ* hybridization)으로 형태학적 구조를 유지한 상태에서 telomerase의 발현을 관찰하는 것이 필요하다고 생각한다.

Telomerase는 RNA-단백 복합체(riboprotein)로서 아직까지 조직의 어느 세포에서 telomerase가 발현되는지를 관찰할 수 있는 좋은 항체가 없다.⁶ 저자는 telomerase의 발현을 형태학적으로 확인하기 위해서 직접 핵산 probe를 만들어 사용하였다.

위 선암은 우리나라에서 가장 빈도가 높은 악성 종양이므로 조기 진단과 전단계 병변에 대한 관심도가 높다. 저자들은 위 선암과 그 전단계 병변을 대상으로 TRAP 방법에 의해 telomerase 활성을 조사하고 저자들이 만든 핵산 probe를 이용한 동소교잡법으로 telomerase의 세포내 소체를 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료와 방법

연구 대상

고등급 이형성 상피병변이나 암종으로 진단 받은 후 외과적으로 절제된 위를 병리조직학적으로 검색하여 장형 위선암으로 확인된 23예를 대상으로 하였다. 23예 중 조기위암은 3예, 진행성 위암은 20예였으며, 분화도에 따라서는 고분화암이 11예, 중등도 분화암이 8예, 저분화암이 4예였다. 각 예에서 암소와 함께 정상 또는 장화생성 점막이나 이형성 병변을 보이는 조직을 선택하였다. 정상 또는 장화생성 점막은 23예 모두에 포함되었으며, 그 중 분문에서 발생한 2예에서는 식도 점막이 포함되었다. 이형성 병변은 7예에 포함되었고 5예가 저등급, 2예가 고등급 이형성 병변이었다.

TRAP 방법은 신선 조직을 필요로 하고, telomerase의 동소교잡법과 증식능 측정을 위한 면역조직화학 염색은 파라핀 포매 조직에서도 가능하므로, 각 조직에서 동결 절편과 파라핀 포매 절편을 만들었다. 신선 조직의 동결 절편을 헤마톡실린 에오신으로 염색한 후 광학현미경으로 병변을 확인하였다. TRAP을 시행하기 위한 동결 절편을 얻은 다음 남은 조직을 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀으로 포매하였고, 동소교잡법과 면역조직화학 염색을 위한 절편을 만들었다.

TRAP 반응

신선 조직으로부터 CHAPs buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol)로 단백을 분리한 후 이전의 방법⁵에 따라 TRAP을 시행하였다. 즉, 분리된 단백질에 들어 있는 telomerase로 forward primer에 telomere의 반복 서열을 붙인 후 reverse primer를 첨가하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)으로 증폭하였고, 증폭 산물을 6% acrylamide에서 전기영동하여 은염색으로 띠(band)를 관찰하였다. forward primer와 reverse primer의 염기서열은 각각 다음과 같았다.

Forward primer 5' AAT CCG TCG AGC AGA GTT 3'
Reverse primer 5' GCG CGG [CTT ACC]₃ CTA ACC 3'

RNA Probe의 제작

TRAP에 의해 양성으로 나온 HeLa 세포주로부터 guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 방법⁷으로 total RNA를 분리한 후, human telomerase의 RNA 성분(hTR)⁸과 단백질 성분 중의 catalytic subunit를 coding하는 mRNA (hTERT)⁹에 대하여 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-

polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하였다. RT-PCR에 사용된 primer의 염기서열은 각각 다음과 같았다.

Forward Primer (hTR) 5' CCG CCT TCC ACC GTT CAT TC 3'
Reverse Primer (hTR) 5' CAA CTC TTC GCG GTG GCA GT 3'
Forward Primer (hTERT) 5' AAG TTC CTG CAC TGG CTG ATG AG 3'
Reverse Primer (hTERT) 5' TCG TAG TTG AGC ACG CTG AAC AG 3'

hTR은 168 bp, hTERT는 377 bp 크기의 중합효소연쇄반응 산물이 형성되었다. RT-PCR로 얻어진 산물을 pGEM-T Easy Vector (Promega, Wisconsin, U.S.A.)에 삽입하여 cloning한 후 염기서열을 확인하였다(ABI 377, ver 3.0, Perkin-Elmer, California, U.S.A.). 정확한 염기서열의 DNA가 삽입된 vector를 제한효소 NcoI (Promega, Wisconsin, U.S.A.)이나 SpeI (Roche, Mannheim, Germany)으로 처리하여 선형으로 만든 후, DNA 의존성 RNA 중합효소 SP6나 T7로 *in vitro* transcription을 시켜 각각 sense와 antisense RNA probe를 만들었다. 이때 전사반응 혼합물에 digoxigenin-UTP를 첨가하여 새로 합성되는 RNA를 표지하였다.

동소교잡법

파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 잘라 젤라틴으로 처리한 유리 슬라이드 위에 놓고 40°C에서 하룻밤 건조시켰다. xylene으로 파라핀을 제거하고 함수시킨 후 0.3% Triton X-100과 proteinase K (20 μg/mL)로 처리하여 probe의 침투력을 증가시켰다. 4% paraformaldehyde로 4°C에서 5분 동안 후고정하고 0.2 N HCl에 10분간 반응시켰다. 0.25% 무수 빙초산이 포함된 0.1 M triethanolamine buffer에서 아세틸화 시킨 후 에탄올에서 탈수 과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 교잡완충액(40% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1x Denhardt's solution, 4x SSC, 10 mM dithiothreitol, 1 mg/mL yeast t-RNA, 1 mg/mL salmon sperm DNA)에 digoxigenin으로 표지된 RNA probe를 1:10으로 희석한 후 조직 위에 떨어뜨리고 55°C에서 하룻밤 동안 교잡시켰다. 2x SSC에서 닻개를 제거한 후 50% formamide가 함유된 2x SSC로 55°C에서 30분간 진탕하면서 수세하였다. 2x SSC로 같은 온도에서 20분간 수세한 후, 상보적 결합을 이루지 않은 RNA probe를 제거하기 위하여 RNase A 20 μg/mL (Sigma, St. Louis, U.S.A.)로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 0.2x SSC로 55°C에서 20분씩 두 번 수세하였고 교잡 반응을 일으킨 RNA probe를 면역조직화학 염색법으로 검출하였다. 과산화효소나 alkaline phosphatase가 부착된 항 digoxigenin 항체(Roche, Mannheim, Germany)를 부착한 후 각각 DAB (3,3-diamino-benzidine)나 NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)로 발색시켰다. 음성 대조 목적으로 sense probe에 대해서도 동일하게 교잡법을 시행하여 antisense probe의 특이성을 확인하였다.

증식능 검색

파라핀에 포매된 조직을 함수 과정과 수세 과정을 거친 후 PCNA (proliferative cell nuclear antigen) 항체(DAKO, Copenhagen, Denmark)를 작용시키고 PBS로 수세하였다. Biotin이 붙은 이차 항체와 avidin-biotin-alkaline phosphatase 복합체를 결합시킨 후 FRT (fast red TR salt/naphthol phosphate)로 발색시켰다. 헤마톡실린으로 약하게 대조염색하여 telomerase 발현 양상과 비교하였다.

결 과

TRAP

TRAP 반응은 장형 위선암 23예 모두와 이형성증 병변 7예 중 저등급 이형성증 1예를 제외한 6예에서, 정상 조직 23예 중 14예에서 양성이었다. 양성으로 관찰된 예에서는 50 bp에서 시작되어 6 bp 차이를 갖는 전형적인 ladder pattern이 관찰되었으며, 띠의 수는 38-52개였다(Fig. 1). PCR 산물은 진한 띠와 함께 매우 약한 띠가 1-2개 관찰되었는데, 이것은 STR (short tandem repeat)을 포함한 DNA를 증폭할 때 출현하는 slippage라고 해석되었다. 정상 또는 장화생성 조직과 이형성증 병변에서는 위선암중에 비해 띠의 진하기가 약하였고, 수도 다소 적었다.

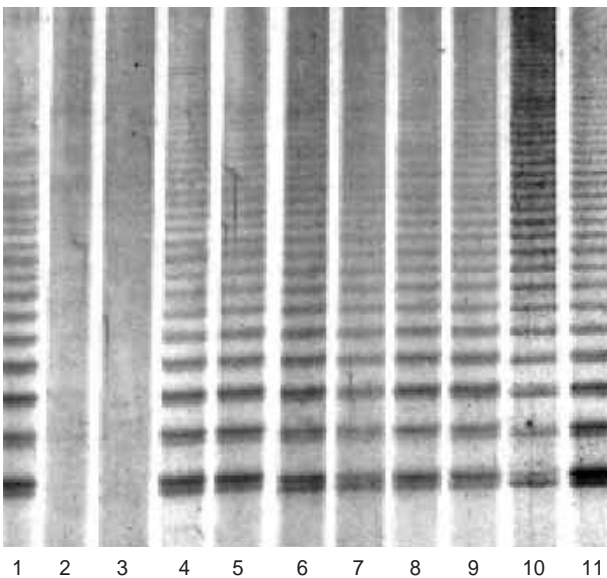


Fig. 1. Results of telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay. Lane 1: Positive control (HeLa cells), Lanes 2-3: Negative control, Lanes 4-5: Normal gastric mucosa, Lanes 6-9: Dysplasia, Lanes 10-11: Adenocarcinoma.

동소교잡법

암종의 경우, telomerase의 RNA 성분인 hTR은 핵질과 핵소체 및 세포질에서 관찰되었다(Fig. 2-5). 전반적으로 핵소체와 세포질에서의 염색이 강하였고 핵질에서의 염색은 약하였다.

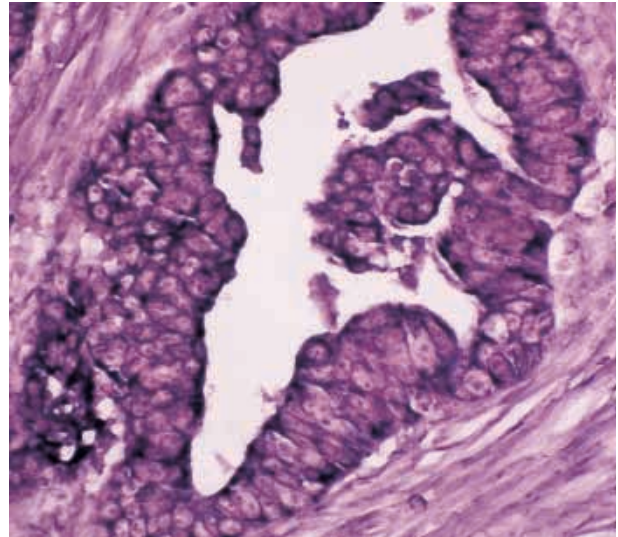


Fig. 2. *In situ* hybridization for human telomerase RNA component (hTR) in well differentiated adenocarcinoma of intestinal type. Positive reaction is noted in the karyoplasm, nucleoli, and cytoplasm. Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT-BCIP) chromogen.

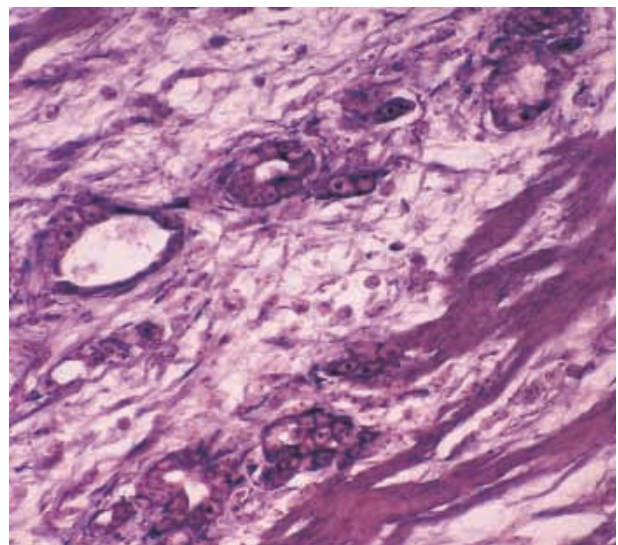


Fig. 3. *In situ* hybridization for human telomerase RNA component (hTR) in moderately differentiated adenocarcinoma of intestinal type. Positive reaction is noted in the infiltrated lymphocytes as well as in the carcinoma cells invading the muscle layer. Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT-BCIP) chromogen.

세포질의 염색은 핵막 주변에서 더 강하였으며 하나의 세포에서도 강하고 약한 부분이 있었다. 거의 모든 암종 세포가 양성 반응을 보였으나 같은 예에서도 강하게 염색되는 부분과 약하게 염색되는 부분도 있었다. 근층으로 깊이 침윤한 암종 세포가 강한 양성 반응을 보이기도 하였으며(Fig. 3), 내강 쪽의 암종 세포

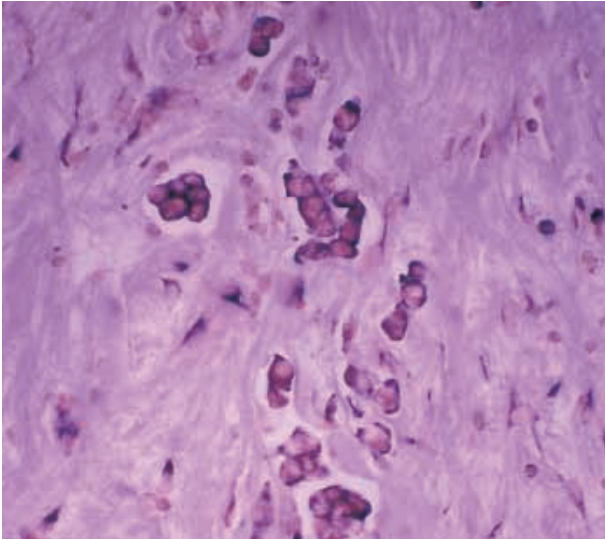


Fig. 4. *In situ* hybridization for human telomerase RNA component (hTR) in poorly differentiated adenocarcinoma of intestinal type. Positive reaction is noted in the infiltrated lymphocytes as well as in the carcinoma cells. Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT-BCIP) chromogen.

가 강한 양성 반응을 보이기도 하여, 침윤의 깊이나 분화도에 따른 염색 강도의 차이를 인정하기 어려웠다(Fig. 2-4). 이형성의 경우, 2예의 고등급 이형성 병변과 5예의 저등급 이형성 병변 중 3예가 양성 반응을 보였다. 이형성 병변의 염색 소견은 암종 세포에서와 비슷하였으나 염색 강도는 더 약하였다. 정상

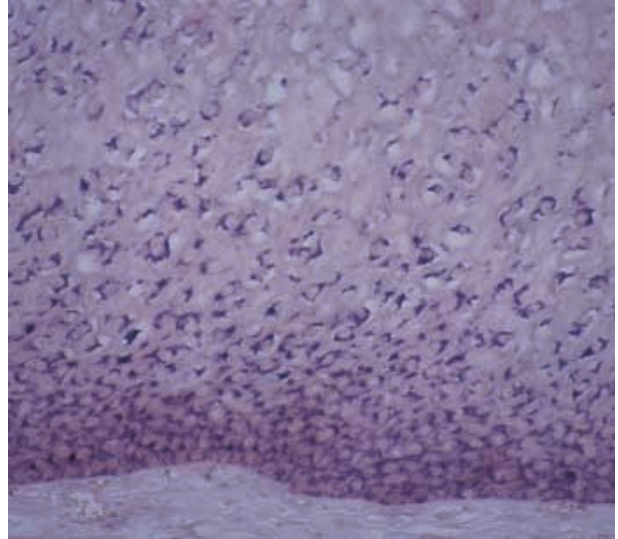


Fig. 5. *In situ* hybridization for human telomerase RNA component (hTR) in normal esophageal mucosa. The basal and parabasal cells show positive reaction in the perinuclear cytoplasm. Nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT-BCIP) chromogen.

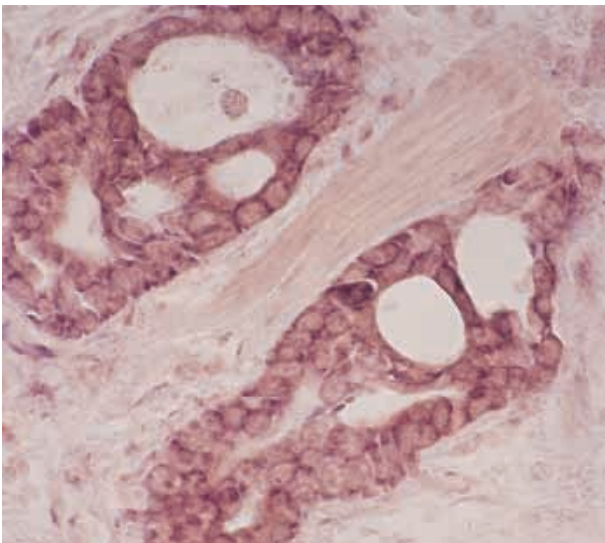


Fig. 6. *In situ* hybridization for mRNA coding for a catalytic subunit of human telomerase (hTERT) in moderately differentiated adenocarcinoma of intestinal type. Positive reaction is noted in the cytoplasm of the carcinoma cells. 3,3-diamino-benzidine (DAB) chromogen.

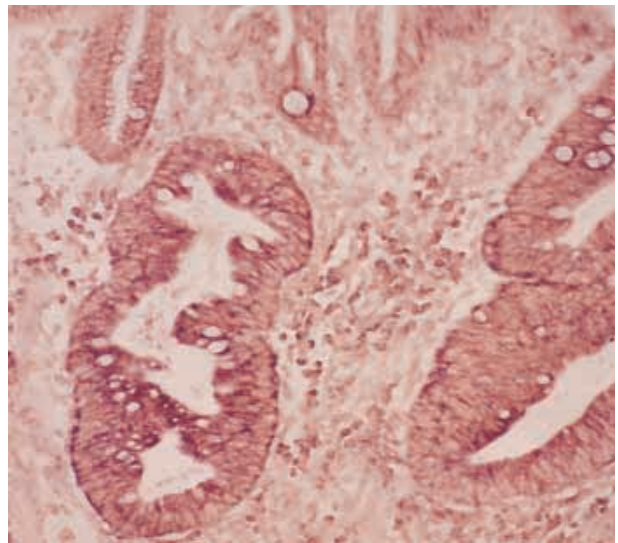


Fig. 7. *In situ* hybridization for mRNA coding for a catalytic subunit of human telomerase (hTERT) in low grade dysplasia. The dysplastic cells show weak positive reaction in the cytoplasm. 3,3-diamino-benzidine (DAB) chromogen.

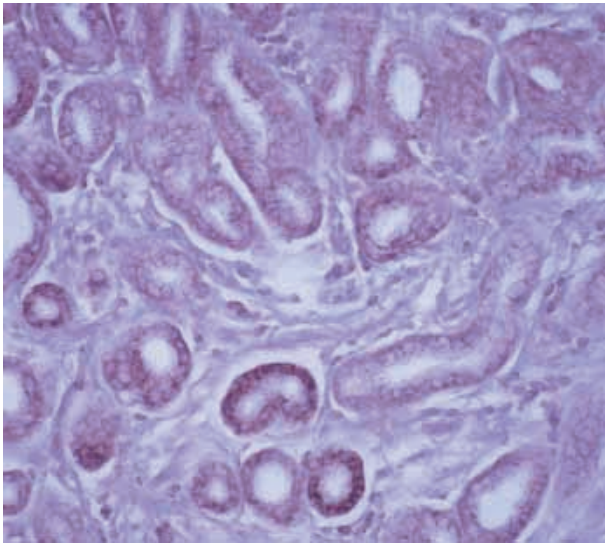


Fig. 8. *In situ* hybridization for mRNA coding for a catalytic subunit of human telomerase (hTERT) in intestinal metaplasia. A few cells in the proliferative zone show weak positive reaction in the cytoplasm. 3,3-diamino-benzidine (DAB) chromogen.

과 장화생성 위점막의 경우에는 23예 중 7예에서 증식대의 일부 세포가 약한 양성 반응을 보였으며, 2예의 정상 식도 점막에서는 기저층과 방기저층에 있는 편평상피세포가 비교적 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 5). 비상피세포 중에서는 간질 조직에 침윤한 림프구가 강한 양성 반응을 보였다(Fig. 3, 4).

Telomerase의 mRNA인 hTERT는 주로 핵막 주변의 세포질에서 관찰되었다(Fig. 6-8). mRNA는 RNA 성분에 비해 다소 약하게 염색되었으나 hTR 양성 세포는 hTERT에 대해서도 양성 반응을 보였다. 암중 세포(Fig. 6), 이형성 세포(Fig. 7), 정상과 장화생성 점막의 증식대 세포(Fig. 8) 및 주변의 간질 조직에 침윤한 림프구(Fig. 6-8)가 양성 반응을 보였다. hTR과 마찬가지로 hTERT도 암중 세포에서 강하게 염색되었고 이형성증 세포나 정상 또는 장화생성 세포에서는 약하게 염색되었다. Probe의 특이성을 확인할 목적으로 sense probe로도 똑같이 동소교잡법을 시행하였던 바, 모두 음성 반응을 보였다.

PCNA

PCNA 염색은 종양 세포, 이형성증 세포, 정상 또는 장화생성 점막의 증식대에 있는 세포에서 양성 반응을 보여 telomerase와 PCNA의 양성도 사이에는 순상관 관계가 있었다. 그러나 telomerase의 hTR이나 hTERT에 양성인 경우에, 상피세포 집단의 거의 모든 세포가 양성 반응을 보인 반면, PCNA 염색에서는 양성인 세포와 음성인 세포가 섞여 있었다(Fig. 9). 간질에 출현하는 림프구 중 telomerase의 hTR과 hTERT에 양성인 세포는 거의 대부분 PCNA 음성이었다.

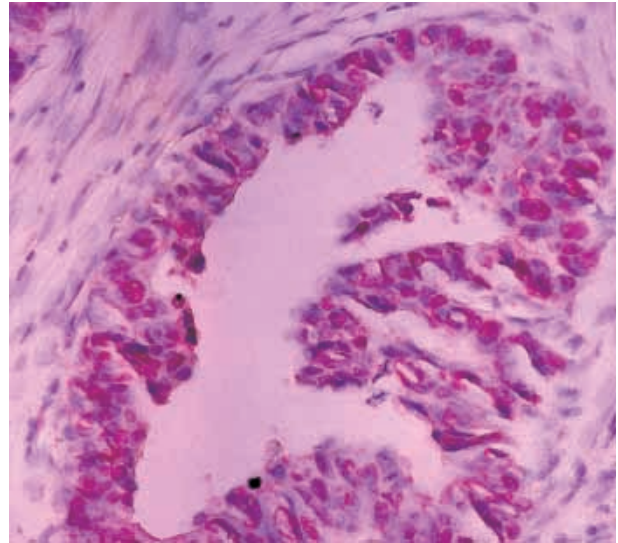


Fig. 9. Immunohistochemistry for proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in well differentiated adenocarcinoma of intestinal type. Many cells show positive reaction in the nuclei, but cells with negative reaction are intermixed. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) chromogen and hematoxylin-counterstaining.

고 찰

진핵세포의 염색체는 RNA primer를 시작으로 하여 DNA polymerase δ 에 의해 leading strand가 합성되고 DNA polymerase α 에 의해 lagging strand가 합성됨으로써 복제된다. 이때 새로 만들어진 DNA strand의 가운데에 있는 RNA primer는 RNase에 의해 분해되고 repair system에 의해 DNA로 대체되어 염색체의 복제가 완료된다. 그러나 lagging strand의 5' 말단에 위치한 RNA primer는 RNase에 의해 분해되어도 더 이상 뒤따라오는 합성 가닥이 없어 DNA로 대체되지 못한다. 그 결과, 새로 복제된 염색체는 양쪽 3' 말단에 single strand overhang을 가지게 되고 이는 exonuclease에 의해 분해된다. 따라서 염색체가 복제되는 세포분열 때마다 염색체의 양쪽 말단은 50 bp 내지 200 bp씩 짧아지게 되며 이를 end replication problem¹⁰이라고 한다. End replication problem 때문에 일단 분화된 세포는 지속적으로 세포분열을 하지 못하는 것으로 알려져 있다. 즉 telomere의 길이가 세포분열의 횟수를 헤아리는 mitotic clock의 기능을 하는 것이다.

진핵세포는 end replication problem을 telomere라는 구조로 어느 정도 해결하고 있다. Telomere는 진핵세포 염색체의 양쪽 말단에 있는 DNA와 단백질의 복합체로서, 그 DNA는 guanine nucleotide가 많은 반복서열로 되어 있다. 사람 염색체의 telomeric DNA의 반복서열은 TTAGGG이다.

진핵세포 염색체의 말단에 telomeric DNA의 서열을 붙이는 효소가 telomerase로서, 이것은 RNA를 가지는 단백질, 즉 RNA-단백 복합체이다. 세포내 telomerase의 존재는 TRAP을

이용한 활성도 측정으로써 관찰할 수 있다.^{3,4} 지금까지 많은 연구가 TRAP 양성 반응이 악성 종양 세포에서만 나타난다고 보고하였으나, 자궁 경부의 상피성 병변을 대상으로 한 저자들의 보고⁵나 다른 연구자들의 보고¹¹에 의하면 TRAP은 비악성 상피성 병변에서도 양성 반응을 보임이 확인되었다. 저자들의 본 연구에서도 TRAP에 의한 telomerase 활성이 선암 조직뿐 아니라 이형성 조직과 정상 또는 장화생성 조직에서도 관찰되어 이전의 결과를 재확인해 주었다.

TRAP은 신선 조직의 단백 추출물을 이용하므로 TRAP의 결과만 가지고는 어느 세포가 telomerase 활성을 가지는지를 알 수 없다. 어느 세포가 telomerase 활성을 가지고 있는지는 telomerase의 단백 성분에 대한 항체로 면역조직화학 염색을 시행하거나, telomerase의 RNA 성분 또는 telomerase 단백을 만드는 mRNA 성분에 대한 핵산 probe로 동소교잡법을 시행하여 형태학적으로 관찰하여야 할 것이다.

Dhaene 등⁶은 telomerase의 단백 성분에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 결과와 telomerase의 mRNA에 대한 RT-PCR의 결과가 일치하지 않으며 간질 세포도 telomerase 항체에 양성인 것으로 보아, 지금까지는 telomerase에 대한 믿을 만한 항체가 없는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 항체 대신 telomerase의 RNA 성분(hTR)과 단백 성분 중의 catalytic subunit를 coding하는 mRNA (hTERT)에 대한 핵산 probe를 만들어 동소교잡법으로 telomerase 양성 세포를 관찰하였다.

핵산 probe에는 DNA probe와 RNA probe가 있으나 RNA probe를 만드는 것이 더 효율적이다. 또한 deoxyribose에 비해 ribose는 puckering되는 위치가 다르므로, 표적 RNA와 RNA probe가 상보적으로 결합하여 만들어진 RNA-RNA 복합체는 RNA-DNA 복합체보다 더 안정적이어서 높은 특이성을 갖는 조건에서 교잡시킬 수 있다.¹² 이런 이유로 본 연구에서는 RNA probe를 만들어 사용하였다.

본 연구 결과 hTR은 핵질과 핵소체 및 세포질에서 관찰되었으며, 전반적으로 핵소체와 세포질에서 강하게 염색되었고 핵질에서 약하게 염색되었다. Telomerase의 작용 부위가 핵질 내이므로 telomerase의 RNA 성분도 핵질 내에 국한되어 출현할 것으로 생각되었으나, 실제로 강한 양성 반응을 보인 것은 핵소체와 핵막 주위의 세포질이였다. 이러한 소견은 염기서열이 다른 RNA probe를 사용하여 동소교잡법으로 관찰한 다른 연구자들의 성적^{13,14}과도 비슷하였다. Telomerase의 RNA 성분이 핵내에서 만들어져 어떻게 processing되는지 잘 알려져 있지 않으나, hTR의 양성 부위는 RNA 성분의 processing과도 관련되어 있을 것으로 생각한다. 핵소체가 강한 양성 반응을 보인 것도 telomerase의 RNA 성분의 processing에 핵소체가 관여한다는 보고¹⁵와 연관지어 생각해볼 수 있다.

동소교잡법에 의한 telomerase RNA 성분의 양성 반응은 거의 모든 암종 세포에서 관찰되었으나, 같은 예에서도 강하게 염색되는 부분이 있었고 약하게 염색되는 부분이 있었다. 이러한

차이는 반복하여 동소교잡법을 시행하여도 똑같이 재현되므로 염색 과정 때문에 생기는 차이라기보다는 암종 세포의 이질성에 의한 것으로 생각되었다. hTR의 다른 염기서열에 대한 probe를 만들어 동소교잡법을 시행한 다른 연구^{16,17}에서도 이와 같은 이질성이 보고되고 있다.

Telomerase에 있어서는 RNA 성분의 발현과 단백 성분을 coding하는 mRNA의 발현 사이에 차이가 없는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 따라서 어느 성분에 대한 probe를 사용해서라도 동소교잡법으로 telomerase의 발현을 조사할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 telomerase의 hTR과 hTERT에 대한 RNA probe를 만들어 동소교잡법을 시행하였다. 그 결과 hTERT는 주로 세포질에서 관찰되었으며, 양성 반응을 보이는 세포는 hTR에 대해서도 양성 반응을 보여 두 가지 probe가 같은 결과를 보였다. 그러나 hTERT에 대한 probe를 사용했을 때 염색 정도가 더 약해서 판독하기 어려운 경우가 있었다. 세포 내의 RNA 중, mRNA의 반감기가 가장 짧고 안정적이지 못하기¹⁸ 때문이라고 생각할 수 있었다. 따라서 telomerase의 mRNA보다는 RNA 성분에 대한 probe를 이용하여 동소교잡법을 시행하는 것이 더 좋다고 생각한다.

본 연구 성적은 암종 세포뿐만 아니라 이형성증의 세포, 정상 및 장화생 점막 증식대의 세포 및 반응성으로 침윤한 림프구도 telomerase의 hTR이나 hTERT에 대해 동소교잡법상 양성 반응을 보였다. 본 연구에서 이형성증 조직이나 정상 조직이 TRAP에 양성 반응을 보인 것도 이 때문이라고 생각한다. 이러한 결과는 telomerase의 활성이 악성 종양 세포뿐만 아니라 상피조직의 줄기세포¹⁹나 조혈조직의 전구세포, 배아세포 및 활성화된 B 림프구와 T 림프구^{20,21}에서도 관찰된다는 보고와 일치하는 소견이었다.

악성 종양의 속성으로서 높은 증식성, 불멸성, 침습성, 그리고 전이성을 들 수 있다. 전암단계 병변은 악성 종양의 속성을 부분적으로 가지고 있을 것이며 침습성과 전이성은 전암단계 병변의 후기에 획득할 것으로 예상되기 때문에, 전암단계 병변의 본태를 이해하기 위해서는 먼저 증식능과 불멸성을 파악할 필요가 있다. 본 연구에서는 위의 선암 병변과 함께 출현한 이형성증 병변 7예 중 저등급 이형성증 1예를 제외한 6예와 정상 조직 23예 중 14예에서 TRAP 양성 반응을 볼 수 있었다. 또한 고등급 이형성증 병변 2예 모두와 5예의 저등급 이형성증 병변 3예, 그리고 23예의 정상 위점막 중 7예에서 동소교잡법에 의한 telomerase 양성 반응을 볼 수 있었으며, 이형성도가 높을수록 양성 반응을 보이는 세포의 수가 많고 염색 강도가 강한 경향을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 telomerase 활성이 초기 전암단계에서부터 획득되는 것임을 보여 준다. 본 연구에서와는 다른 핵산 probe를 이용하여 위의 증식성 병변에서 telomerase의 mRNA 성분에 대한 동소교잡법을 시행한 Hiyama 등²²도 telomerase 양성 반응이 전암단계에서 획득된다고 보고하고 있다.

본 연구에서는 DNA polymerase δ 의 보조 성분인 PCNA를

면역조직화학적으로 염색하여 증식 세포를 관찰하였다. Telomerase의 hTR이나 hTERT에 대한 동소교잡법에서 양성 반응을 보이는 상피세포소는 PCNA에 양성 반응을 보이는 세포가 많아 telomerase와 PCNA는 양의 상관관계를 보였다. 그러나 telomerase 반응이 양성인 경우 거의 모든 세포가 양성 반응을 보이나 PCNA는 일부 세포만 양성 반응을 보였고, 활성화 림프구는 telomerase에만 양성 반응을 보여 PCNA보다는 telomerase가 보다 세포 구조에 구성적으로 발현된다고 생각할 수 있었다.

참고문헌

- Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88: 333-46.
- Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043-50.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 23: 2011-5.
- Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2595-7.
- 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.
- Dhaene K, Wauters J, Weyn B, Timmermans JP, van Marck E. Expression profile of telomerase subunits in human pleural mesothelioma. *J Pathol* 2000; 190: 80-5.
- Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, *et al.* hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 1997; 90: 785-95.
- Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase. *Biological and clinical importance.* *Clin Chem* 1997; 43: 708-14.
- Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM, *et al.* Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 1997; 50: 110-7.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; 10: 27-8.
- Chang LY, Lin SC, Chang CS, Wong YK, Hu YC, Chang KW. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 389-96.
- Ozaki S, Harada K, Sanzen T, Watanabe K, Tsui W, Nakanuma Y. *In situ* nucleic acid detection of human telomerase in intrahepatic cholangiocarcinoma and its preneoplastic lesion. *Hepatology* 1999; 30: 914-9.
- Pederson T. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3871-6.
- Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998; 153: 857-64.
- 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; 229: 229-34.
- Sachs AB. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 1993; 74: 413-21.
- Hiyama E, Hiyama K, Tatsumoto N, Shay JW, Yokoyama T. Telomerase activity in human intestine. *Int J Oncol* 1996; 9: 453-8.
- Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, *et al.* Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-5.
- Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9082-6.
- Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, *et al.* In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1187-94.