

위의 저등급 점막 관련 림프조직 림프종에서 *Helicobacter pylori* 치료에 따른 p16 메틸화의 변화

김영아 · 박성신 · 이보영 · 김유선¹
송인성¹ · 김철우²

서울대학교 의과대학 병리학교실
¹내과학교실, ²암연구소

접 수 : 2001년 10월 30일
게재승인 : 2002년 1월 17일

책임저자 : 김 철 우
우 110-799 서울시 종로구 연건동 28
서울대학교 의과대학 병리학교실
전화: 02-740-8267
Fax: 02-765-5600
E-mail: cwkim@plaza.snu.ac.kr

Methylation Analysis of p16/INK4A in Gastric Low-Grade Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas after *Helicobacter pylori* Eradication Therapy

Young A Kim, Sung-Shin Park, Bo Young Lee, You Sun Kim¹, In Sung Song¹ and Chul Woo Kim²

Department of Pathology, ¹Internal Medicine, and ²Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Inactivation of p16 has been associated with promoter region hypermethylation in different types of malignancies, including non-Hodgkin's lymphomas (NHLs). This loss of p16 was found frequently in cases of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. Recent studies indicate that promoter hypermethylation is often an early event in tumor progression, and it has been reported that p16 methylation could be a marker of disease progression in the follow-up of NHLs. **Methods :** To investigate the usefulness of p16 methylation in the diagnosis and follow-up of gastric low-grade MALT lymphomas, we analyzed methylation status of p16 using methylation-specific polymerase chain reaction methods in the sequential biopsy specimens of 13 patients with gastric low-grade MALT lymphomas undergoing *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Results :** Five of thirteen cases showed p16 hypermethylation upon diagnosis. In four of five methylation positive cases, abnormal methylation was detected in the specimen even after the treatment, although there were no histologic evidence of disease. This methylation disappeared in the later samples of two of the cases, and they have remained in complete remission. Immunohistochemically, the loss of p16 protein expression was detected in one of three methylation-positive cases, and in none of the methylation-negative cases. **Conclusions :** These results suggest that p16 methylation is relatively frequent in low-grade gastric MALT lymphomas, and it may have clinical applications in the management and follow-up of low-grade gastric MALT lymphomas.

Key Words : Lymphoma-Mucosa-Associated Lymphoid Tissue-Genes, p16-DNA Methylation

위에 발생하는 악성 림프종은 한국인에서 전체 비호지킨림프종의 20% 정도를 차지하는 질환으로 림프절 이외의 장기에 발생하는 악성 림프종 중에 가장 흔하고, 그 중에서도 위에서 발생하는 빈도는 소장이나 대장에 비하여 더 흔하다.¹ 특히 위 점막의 점막 관련 림프조직(mucosa-associated lymphoid tissue: MALT)에서 유래한 B-세포 림프종인 저등급 MALT 림프종은 1983년 Isaacson 등²이 처음 기술하였는데, 현재 명백한 하나의 질병으로 광범위하게 받아들여지고 있으며 Revised European-American Lymphoma Classification of lymphoid neo-

plasms (REAL classification)³에서도 'marginal zone B-cell lymphoma, extranodal type'이라는 아형으로 분류되어 있다. MALT 림프종은 림프절에서 발생한 림프종과는 달리 오랜 기간 동안 원발장기에 국한되어 있으며 주로 다른 림프절 이외의 장기로 전이하는 것으로 알려져 있다.

이러한 위의 저등급 MALT 림프종의 발생에서 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)에 의한 감염은 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 위의 저등급 MALT 림프종 환자의 90% 이상에서 *H. pylori*에 의한 위염이 동반되어 있으며 *H. pylori* 항균 치

료에 의해 종양이 소멸된다고 보고되고 있다.^{4,5} 하지만 *H. pylori*에 의한 위염 시 관찰되는 다클론성 림프구의 침윤과 달리, 저등급 MALT 림프종에서는 면역글로불린 중쇄와 경쇄 유전자의 단클론성 재배열이 보이고, 간혹 저등급에서 고등급 MALT 림프종으로의 전환이 동반된다. 그러나 내시경으로 생검된 작은 조직에서 반응성 림프구의 침윤과 저등급 림프종의 감별이 어렵고, *H. pylori* 항균 치료로 종양이 소멸하지만 그 치료 효과의 판정을 위해서는 장기간의 추적 관찰이 요망되며 재발을 예측할 수 있는 기준에 대해서도 확립된 바가 없다는 문제가 있다. 또한 저등급 MALT 림프종의 발생과 진행에 관여하는 분자유전학적인 이상과, 이러한 이상이 *H. pylori*의 치료에 의해 어떻게 변하는지에 대해서는 밝혀진 것이 없다.

한편, *p16*은 cyclin-dependent kinase (CDK)-4의 억제자로 종양억제유전자의 일종으로 생각되고 있으며 많은 종양 세포주와 사람의 종양에서 불활성화가 보고되고 있다.^{6,7} 이 유전자의 발현이 감소되면 CDK의 활성도가 증가되고 결과적으로 RB 단백질의 인산화가 증가되어 세포 성장이 촉진된다. *p16*의 불활성화는 주로 유전자의 소실이나 탈락 그리고 메틸화에 의해 일어난다. 비호지킨림프종에서는 유전자의 소실이나 변이보다는 주로 메틸화에 의한 *p16*의 비활성화가 보고되고 있으며,⁸⁻¹⁰ *p16* 유전자의 비활성화는 저등급 림프종에서보다 고등급 림프종에서 높은 빈도로 관찰되고 있어 림프종의 악성 변환에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{8,11,12} 한편 MALT 림프종의 경우 다른 림프종에 비해 *p16* 유전자의 메틸화가 특히 높은 빈도로 관찰되어 *p16* 유전자의 메틸화에 의한 비활성화가 MALT 림프종의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.⁹ 최근의 연구들에 의하면 촉진자 위치의 메틸화는 종양 발생에서 비교적 초기 단계에 관여하는 것으로 나타나,¹³⁻¹⁵ *p16*의 메틸화를 임상적으로 이용하려는 노력들이 이루어지고 있다. *p16*의 메틸화로 폐암을 조기 진단하거나,¹⁴ 비호지킨림프종 환자에서 질병의 추적 관찰의 표지자로 이용하여 치료 효과의 판정 및 재발의 조기 발견에 이용할 수 있다는 보고가 있다.¹⁶

이에 저자들은 *p16* 메틸화를 위의 저등급 MALT 림프종의 진단 및 치료 후 추적 관찰에 이용할 수 있는지 알아보기 위하여, 위의 저등급 MALT 림프종 환자 13명을 대상으로 *H. pylori* 항균 치료를 행한 후 전향적인 추적 관찰을 통하여 치료 전과 치료 후, 그리고 지속적인 추적 관찰 기간 동안의 병리조직학적인 소견의 변화와 아울러 *p16* 유전자의 메틸화에 의한 불활성화 정도를 비교하였다.

재료와 방법

대상

1996년부터 서울대학교병원에서 저등급 MALT 림프종으로

진단받은 환자 13명을 전향적으로 추적 관찰하였다. 13명의 환자 중 10명의 환자에서 병기 결정을 위한 검사가 가능하였다.

진단된 환자들은 모두 omeprazole, amoxicillin, 그리고 clarithromycin으로 구성된 3제요법을 1주일간 투여받았다. 이후 추적 관찰 기간 동안 림프종이 재발한 경우에는 omeprazole, clarithromycin, tetracycline, derol로 구성된 4제요법을 투여받았다.

각 환자는 *H. pylori* 항균 치료가 끝난 후 제균과 관해를 확인하기 위해 위내시경과 생검을 주기적으로 시행하였다. 생검은 병변부 외에도 *H. pylori*를 평가하기 위해 전정부와 상체부 두 군데에서 시행하였고 전정부에서는 CLO test (rapid urease test)를 동시에 시행하였다. 조직학적으로 관해의 소견을 보일 때까지는 2개월 간격으로, 관해가 온 이후로는 6개월 간격으로 위내시경과 생검을 통해 추적 관찰하였다.

병리조직학적 검사

내시경으로 생검된 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 고정 한 후 파라핀 포매하고 4 μ m 두께로 박절하여, HE 염색과 *H. pylori*를 평가하기 위하여 Warthin-Starry 염색 혹은 modified Giemsa 염색을 시행하였다.

저등급 MALT 림프종의 진단은 이미 알려진 기준¹⁷에 의거하여 행하였다. 또한 추적 관찰 기간 동안 연속되는 생검 조직의 조직학적 소견의 변화를 평가하기 위하여 이미 알려진 체계⁴에 의하여 림프종의 진단을 등급화하였다. 이에 따르면 3등급까지는 반응성 림프구 침윤을, 4등급과 5등급은 종양성 림프구 침윤을 의미한다. 한편, 그 밖의 소견은 1996년 개정된 Sydney system¹⁸에 의거하여 분석하였으며, Sydney system에서 등급을 결정하는 변수에 포함되어 있지 않지만 림프세포의 존재 유무도 함께 분석하였다.

p16 유전자에 대한 메틸화특이 중합효소연쇄반응과 면역글로불린 유전자의 재배열 검사

메틸화-특이 중합효소 연쇄반응을 위해서 13명의 환자들로부터 얻은 37개의 파라핀 포매된 내시경 생검 조직에서 비정형 림프구의 침윤이 현저한 조각들만을 절제하였다. 크실렌에서 탈파라핀한 후 에탄올로 함수시키고 50 μ L의 proteinase K 완충액 (0.5% Tween20, 1 mM EDTA pH8.0, 50 mM Tris pH 8.5)에 넣어 밤새 55°C에 방치한 후, proteinase K를 불활성화시키기 위하여 100°C에서 10분간 유지하였다. 각 생검 조직에서 함께 생검된 정상 위 조직을 음성 대조군으로 이용하였다. 메틸화 특이 중합효소연쇄반응을 위한 bisulfite에 의한 변형은 이전의 보고¹⁹와 동일한 방법을 사용하였다. 이 변형된 DNA를 재료로 하여 중합효소연쇄반응을 일으켰다. 사용한 길잡이의 염기서열은 다음과 같다.

p16 methylated: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGA-

TCGC-3'
 5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'
 p16 unmethylated: 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGA-
 TTGT-3'
 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'

반응 혼합물은 주형 DNA로 bisulfite에 의해 변형된 DNA 50 ng, 5 pmol 길잡이 1 μL, 2 mM dNTP 2 μL, 10× PCR reaction buffer 2 μL (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% glycerol), Taq polymerase (Takara: 5 U/0.1 μL) 0.1 μL에 증류수를 첨가하여 20 μL로 하였다. Ericomp사의 thermal cycler를 이용하여 94°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 30초간 변성, methylated형은 65°C에서, unmethylated형은 60°C에서 30초간 소환, 72°C에서 30초간 연장하여 28주기 시행하고 마지막 주기 후 72°C에서 10분간 더 연장했다. 반응산물에서 5 μL를 취하여 2% agarose gel에서 100 V로 20-30분간 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색한 다음 자외선 조명기에서 DNA 띠를 확인하였다. 메틸화를 확인하기 위하여 메틸화 특이 제한효소인 BstUI (New England Biolabs, Beverly, U.S.A.) 10 units를 반응 산물 10 μL와 4시간 동안 반응시킨 후 에탄올에 침전시켜 전기영동을 하여 관찰하였다. 또한 p16 메틸화가 일어난 경우 자동분석기(ABI PRISM 377, Foster City, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

면역 글로블린 유전자의 재배열에 대한 검사는 11명의 환자로부터 얻은 20개의 치료 전과 치료 후의 내시경 생검 동결 조직으로 DEXPAT DNA isolation kit (Takara, Kyoto, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 사용한 길잡이의 염기서열은 이전의 보고와 동일하다.²⁰

FR3A: 5'-ACACGGC(C/T)(G/C)TGTATTACTGT-3'
 LJH: 5'-TGAGGAGACGGTGACC-3'
 VLJH: 5'-GTGACCAGGGT(A/G/C/T)CCTTGCCCC-
 CAG-3'

반응 혼합물은 주형 DNA 1-3 μg, 5 pmol 시발체 0.5 μL, 2 mM dNTP 2 μL, 10× PCR reaction buffer 2 μL, Taq polymerase (Takara: 5 U/0.1 μL) 0.1 μL에 증류수를 첨가하여 20 μL로 하였다. Ericomp사의 thermal cycler를 이용하여 94°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 소환, 72°C에서 1분간 연장하여 30주기 시행하고 마지막 주기 후 72°C에서 10분간 더 연장했다. 반응산물에서 1 μL를 취하여 두 번째 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다. 두 번째에는 94°C에서 5분간 초기 변성을 시킨 후 94°C에서 1분간 변성, 55°C에서 1분간 소환, 72°C에서 1분간 연장하여 20주기 시행하고 마지막 주기 후 72°C에서 10분간 더 연장했다. 2% agarose gel에서 100 V로 20-30분간 전기영동을 시행하여 DNA를 확인한 후, 12% polyacrylamide gel에서

100 V로 3시간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 조명기에서 관찰했다.

면역조직화학 검사

p16에 대한 면역조직화학 검사는 6명의 환자들로부터 얻은 12개의 파라핀 포매된 내시경 생검 조직으로 실시하였다. 5 μm 두께로 절편을 얻어 60분간 건조시킨 후 크실렌에 5분씩 3회 침수하여 파라핀을 제거하였다. 100%, 90%, 70% 알코올에 총 5분간 처리한 다음 0.3% 과산화수소에 10분간 처리하였다. 구연산 완충액에 침수시킨 채로 저주파에 의한 항원 회복 과정을 15분간 거친 후, mouse anti-p16/INK4 (monoclonal, 1:100, PharMingen, San Diego, U.S.A.) 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차 항체 반응 후 결합이 안된 항체를 인산염 완충액으로 수세하고 biotin이 결합된 이차 항체로 20분간 반응시킨 다음 인산염완충액으로 수세하였다. 과산화효소가 결합된 streptavidin 용액을 20분간 반응시킨 후 수세하고, 발색제 (diaminobenzidine)에 반응시키고 헤마톡실린으로 대조염색하였다. 핵에 확실하게 염색된 경우를 양성으로 판정하였고 중앙 세포의 대부분에서 핵에 염색이 되지 않은 경우를 음성으로 판독하였다.

결 과

임상소견 및 병리조직학적 소견

각 환자들의 임상 및 조직학적 소견은 Table 1에 요약하였다. 13명의 환자 중 남자는 6명, 여자는 7명이었고 환자들의 진단 당시 연령 분포는 27세에서 66세까지였으며 평균 연령은 48세였다. 모든 환자는 비특이적인 상복부 증상을 호소하였고 내시경 소견은 대부분이 궤양 혹은 미란이었으나, 정상 소견인 경우도 2명에게서 관찰되었으며 십이지장궤양이 2명에게서 동반되어 있었다. 병변의 위치는 전정부가 8명, 하체부가 4명, 체부 중간 1/3이 1명이었다. 병기 결정을 위한 검사가 가능했던 10명 모두 내시경초음파검사상 병변은 위의 점막과 점막하층에 국한되어 있어 병기는 IE₁ (stage IE₁)이었다. 위 생검 조직의 현미경적 소견에서 비정형세포의 점막고유층 침윤과 림프상피성 병변이 잘 관찰되었고 진단 당시 13명 모두에게서 *H. pylori*가 검출되었다. 림프종의 등급은 이 중 11예가 5등급이고 2예가 4등급이었다. *H. pylori* 항균치료를 의해 13명 모두 *H. pylori*가 박멸되었으나 조직학적인 관해는 11명에게서 일어났으며 (84.6%) 조직학적 관해가 일어나는 데 걸린 기간은 1-5개월 (평균 2.7개월)이었다. 치료 후 생검 조직에서는 위생이 이전의 중앙 세포 침윤에 의해 파괴되어 많이 소실되고, 림프구의 군집이 없이 형질세포만이 흩어진 채로 관찰되는 '빈 점막고유층

Table 1. Clinical, histologic and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement data on 13 patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas who were treated with *H. pylori* eradication therapy

Case	Sex	Age	Endoscopic appearance	Topo	Stage	Grade at Dx	H.p	IgH rearr at Dx	Mo of F/U	Mo of regression	Final grade	IgH rearr after Tx
1	F	52	Single ulcer	LB	1E	5	2+	M	36	34	0	M
2	F	27	Erosion	LB	1E	5	2+	M	22	21	1	P
3	F	45	Ulcer scar	A	1E	5	3+	P	22	19	0	P
4	M	41	Erosion	LB	1E	4	3+	ND	17	3	1	ND
5	M	46	Erosion	A	1E	5	3+	P	12	9	0	P
6	F	58	Single ulcer	MB	1E	5	1+	M	24	20	5	M
7	F	66	Erosion	A	1E	5	1+	M	34	33	0	M
8 ^a	M	61	AGC type III	A	1E	5	2+	P	2	a	a	ND
9	M	37	Single ulcer	A	1E	5	3+	ND	25	21	0	ND
10	M	37	Single ulcer	LB	1E	5	3+	P	21	16	0	P
11	F	39	Erosion	A	1E	5	2+	P	14	11	0	P
12	F	48	Normal mucosa	A	1E	5	2+	P	9	7	4	P
13 ^b	M	63	Normal mucosa	A	1E	4	2+	M	3	b	b	M

Topo: topography, Dx: diagnosis, H.p: *Helicobacter pylori*, IgH: immunoglobulin heavy chain gene, rearr: rearrangement, Mo: months, Tx: treatment, F/U: follow-up, AGC: advanced gastric carcinoma, A: antrum, LB: low body, M: monoclonal, P: polyclonal, ND: not done.

^a: case 8-This patient developed a high-grade transformation and underwent surgical treatment.

^b: case 13-This patient was lost in the follow-up before the complete remission.

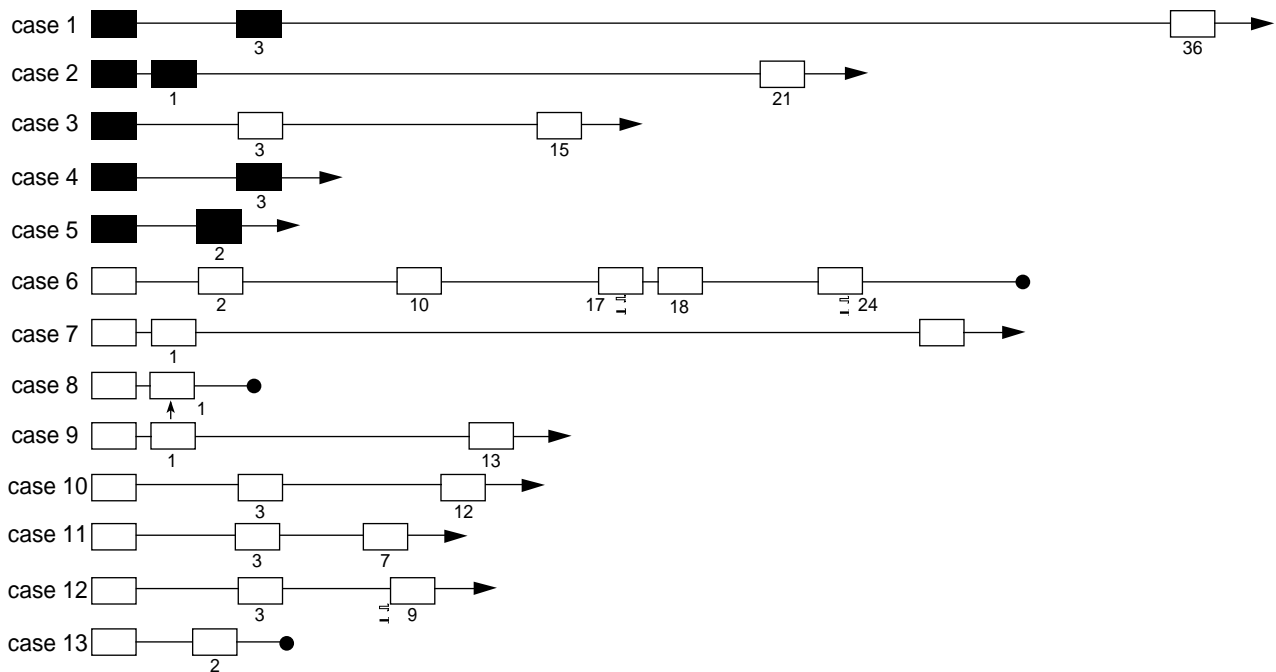


Fig. 1. Follow-up of thirteen cases of gastric low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with p16 methylation status is illustrated. Black squares represent p16 methylation and white squares no methylation. Follow-up periods are also presented below the squares. Open arrow means relapse and solid arrow means high-grade transformation.

(empty lamina propria)’이라 불리는 소견을 볼 수 있었다.²¹ *H. pylori*는 전 예에서 치료 후 소실되었으며 림프종의 등급은 5 예에서 0등급, 7예에서 1등급, 그리고 4예에서 2등급으로 관찰되었다. 본 연구에 사용된 림프종의 등급과 개정된 Sydney system에 의한 병리학적 변수와 비교해 볼 때 림프종의 등급이 높을수록 *H. pylori* 균의 밀도와 증성구 및 단핵구의 침윤 정도

그리고 림프여포의 수가 높게 관찰되었다. 한편, 치료에 반응하지 않은 2명 중 1명(증례 8)은 고등급 림프종으로의 전환이 일어나 수술을 받았으며, 나머지 1명(증례 13)은 완전 관해가 일어나지 않은 상태에서 추적 관찰에서 누락되었다. 11명의 완전 관해가 일어난 환자들의 평균 추적 관찰 기간은 17.6개월(3-34개월)이었으며 이 중 9명의 환자가 이 기간 동안 관해 상태를

유지하였다(81.8%). 나머지 2명의 환자가 *H. pylori*의 재감염과 함께 재발하였는데 그중 한명(증례 6)은 처음 치료 후 18개월 만에 재발하여 재차 *H. pylori*에 대한 항균 치료를 받아 재관해가 왔으나 다시 15개월 후 두번째로 재발하여 수술을 받았다. 다른 1명(증례 12)은 치료 후 7개월 만에 조직학적으로 재발하였으나 위내시경 소견상 별 이상소견을 보이지 않아 2개월 후 위내시경과 함께 추적 생검을 한 결과 다시 조직학적인 관해를

보였다.

면역글로불린 유전자의 재배열과 p16의 메틸화

면역글로불린 유전자의 재배열에 대한 결과는 Table 1에 정리되어 있다. 면역글로불린 유전자에 대한 재배열에 대한 검사는 11예에서 가능하였으며 이 중 5예에서 진단 당시 단클론성 재배열을 확인할 수 있었다. 치료 후에는 이들 중 1예에서 단클론성 재배열이 소실되었고 3예에서는 계속 단클론성 재배열이 관찰되었으며 나머지 1예는 치료 후 조직에 대한 검사가 이루어지지 못했다. 치료 전 단클론성 재배열이 관찰되지 않은 6예 중 치료 후 조직에 대한 검사가 이루어진 5예 모두에서 역시 단클론성 재배열이 보이지 않았다.

p16 유전자에 대한 메틸화-특이 중합효소연쇄반응 결과는 Fig. 1에 정리되어 있다. 치료 전, 즉 저등급 MALT 림프종으로 진단받을 당시 p16의 메틸화가 관찰된 예는 모두 5예로 38.5%이었으며 8예(61.5%)는 관찰되지 않았다. 메틸화는 중앙부위에서만 관찰이 되었으며 정상 위 조직에서는 관찰되지 않았다(Fig. 2). *H. pylori* 항균치료 후 2-3개월 이내에는 조직학적으로는 모두 관해의 소견을 보였으나 5예 중 4예에서 지속적으로 메틸화가 관찰되었고 1예에서만 메틸화가 소실되었다. 이러한 메틸화는 2예에서 36개월과 23개월이 지난 후에야 소실되었다. 치료 전 메틸화가 관찰되던 4예는 모두 치료 후에도 메틸화가 관찰되지 않았다. 고등급으로 전환이 일어난 한 예에서는 p16의 메틸화가 일어나지 않았으며, 재발하였던 두 증례

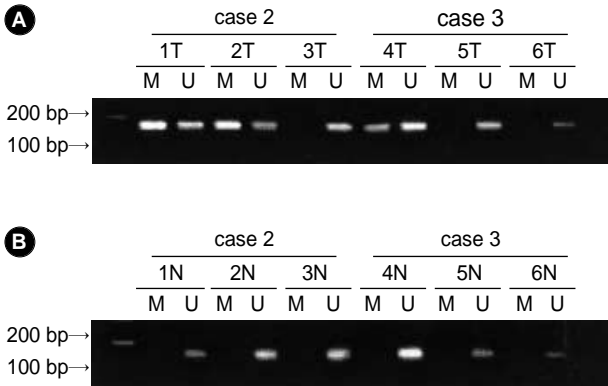


Fig. 2. Methylation status of p16 are analysed by methylation specific polymerase chain reaction (PCR) method. (A) DNA extracted from tumors and (B) DNA extracted from the corresponding normal tissues of sequential biopsies of case 2 and case 3. A PCR product of the appropriate molecular weight (151 bp for U, 150 bp for M) indicates the presence of unmethylated (U) and/or methylated (M) p16 alleles in that sample (T: tumor sample, N: normal sample).

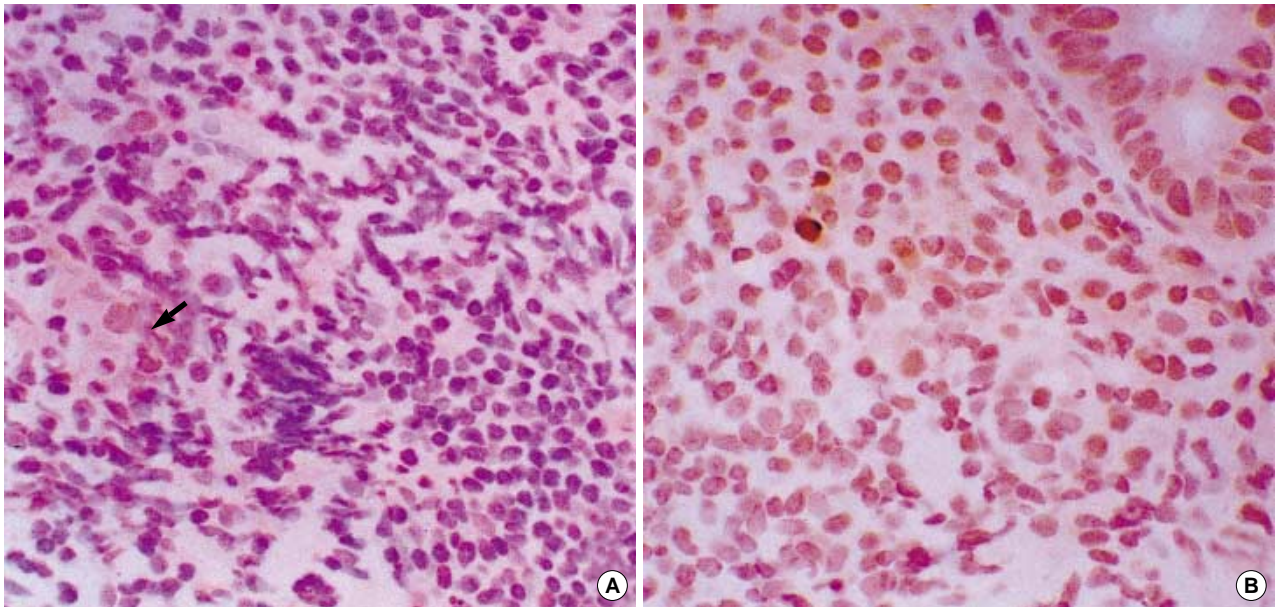


Fig. 3. Immunohistochemical analysis of p16 expression in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas shows no p16 immunoreactivity in most of the tumor cells (A, case 2, methylation-positive) in contrast to background epithelial cells. Arrow indicates lymphoepithelial lesion. (B) Strong nuclear p16 immunostaining is noted in tumor cells and normal epithelial cells (case 10, methylation-negative).

모두 *p16*의 메틸화가 관찰되지 않았다. 메틸화-특이 중합효소연쇄반응에 의한 *p16* 유전자의 메틸화는 메틸화 특이 제한효소인 *Bst*UI로 소화시켜 확인할 수 있었으며, 메틸화가 관찰된 모든 예에 대해 염기서열을 분석한 결과 모든 CpG 위치에서 메틸화를 확인할 수 있었다.

또한, *p16*의 메틸화가 관찰된 예와 그렇지 않은 예 사이에는 조직학적으로 림프종의 등급이나, 개정된 Sydney system에 의한 병리학적 변수들에 있어 별다른 차이를 보이지 않았다.

면역조직화학 염색

p16 메틸화에 의한 *p16* 단백질 소실을 확인하기 위하여 6명의 환자로부터 얻은 12개의 파라핀 포매된 내시경 생검 조직에 대해 *p16* 면역조직화학 염색을 시행하였다. *p16* 메틸화가 양성인 3개의 증례 중 1개의 증례에서 단백질 소실을 확인할 수 있었고, *p16* 메틸화가 관찰되지 않은 9개의 증례에서는 모두 단백질이 관찰되지 않았다(Fig. 3).

고찰

위에서 발생한 저등급 MALT 림프종은 림프절에서 발생한 림프종과는 다른 많은 특징을 가지고 있다. 조직화된 림프조직이 없는 위에서의 림프종의 발생은 *H. pylori* 감염에 의한 후천성 MALT의 형성으로부터 시작되며 *H. pylori* 항균 치료에 의해 종양이 소실된다고 보고되었다.^{4,5,22} 또한 종양이 *H. pylori* 감염에 의해 면역학적으로 반응성 성장을 보여 상당히 오랜 기간 동안 원발부위에 국한되어 있다. 이러한 임상적인 특징 외에도 위의 저등급 MALT 림프종은 많은 분자유전학적인 연구들에서도 림프절에 발생한 림프종과는 차이를 보인다. 림프절에 발생한 림프종에서 흔히 관찰되는 *t*(14:18), *t*(11:14)나 *t*(8:14) 등의 유전체 전위는 잘 나타나지 않으며, trisomy 3나 *t*(11:18) 등이 많이 관찰되고 *c-myc* 유전자의 재배열보다는 점돌연변이가 일어나는 것으로 보고되었다.²³

림프종의 발생에 있어 *p16* 유전자의 불활성화 방식은 변이보다는 소실이나 메틸화에 의한 것이며, 비호지킨림프종에서 *p16*의 메틸화는 15-46% 정도로 보고되고 있다.⁸⁻¹² 위의 MALT 림프종에서도 *p16* 유전자의 소실은 드물게 관찰되어 저등급 MALT 림프종에서는 관찰되지 않고 고등급 MALT 림프종에서만 14%로 관찰되었다.²⁴ 그러나, *p16*의 메틸화는 비교적 높게 관찰되어 저등급 MALT 림프종의 44%와 고등급 MALT 림프종의 전 예에서 관찰되었다는 보고가 있다.⁹ 본 연구에서는 38.5% (13예 중 5예)의 저등급 MALT 림프종에서 메틸화가 관찰되었으며 1예의 고등급 MALT 림프종으로 전환된 경우에는 메틸화가 관찰되지 않았다. 본 연구에 앞서 위의 비호지킨림프종으로 절제된 경우를 대상으로 *p16*의 메틸화를 관찰한 연

구에서도, 저등급 림프종의 57% (7예 중 4예)와 고등급 림프종의 75% (16예 중 12예)에서 *p16*의 메틸화를 관찰할 수 있었다.

이전의 연구들^{8,10-12}은 *p16* 유전자의 비활성화가 림프종의 악성 변환에 관여하는 것으로 보고하고 있다. 하지만 그러한 연구들이 대상으로 삼은 저등급 림프종은 만성 림프구성 백혈병, mantle cell lymphoma 그리고 여포성 림프종으로, *p16* 유전자의 변화가 4-6%로 관찰되었으며 모두 탈락이나 돌연변이에 의한 것이었고 메틸화는 관찰되지 않았다. 이와는 대조적으로 본 연구와 Martinez-Delgado 등에 의한 연구⁹에서는 저등급 MALT 림프종에서 *p16* 메틸화가 각각 38.5%와 44%로 나타났다. 한편, 최근의 연구들에 의하면 많은 종양에서 촉진자 위치의 메틸화는 비교적 종양발생의 초기 단계에 관여하는 것으로 나타나고 있다.¹³⁻¹⁵ 이와 같은 사실을 종합해 본다면 위에 발생한 저등급 MALT 림프종에서 *p16* 메틸화는 고등급으로의 전환에 관여한다기보다는 림프종 발생의 초기 단계에 관여한다고 하겠다.

아울러 이러한 *p16*의 메틸화를 임상적으로 이용하려는 노력이 이루어지고 있다. *p16*의 메틸화로 폐암을 조기 진단하거나,¹⁴ 비호지킨림프종 환자에서 질병의 추적관찰의 표지자로 이용하여 치료 효과의 판정 및 재발의 조기 발견에 이용할 수 있다는 보고가 있다.¹⁶ 본 연구에서도 *H. pylori*에 대한 항균 치료를 행한 후 *p16* 메틸화의 변화를 관찰하였다. 치료 후에는 이전에 메틸화를 보이던 5예 중 3예에서 메틸화가 소실되었다. 메틸화는 치료 직후 조직학적으로는 관해의 소견을 보일 때에도 대부분 양성으로 나타나다가 관해 상태를 오래 유지하는 경우 소실됨을 관찰할 수 있었다. Martinez-Delgado 등¹⁶은 마찬가지로 *p16*의 메틸화가 조직학적 관해 후 어느 정도 지속되다가 사라지는 것을 보고하였고, Savio 등²¹은 이와 유사하게 면역글로블린의 단클론성 재배열이 조직학적인 관해 후 길게는 28개월까지도 지속됨을 보고한 바 있다. 이러한 조직학적 관해와 분자유전학적 관해와의 차이에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 다만 메틸화 특이 중합효소연쇄반응이 0.1%의 종양 세포도 감지해 낼 수 있는 민감한 방법임을 감안해 볼 때, 메틸화가 조직학적 소견에 비해 종양 세포의 잔존을 조금 더 민감하게 반영하고 있다고 볼 수 있을 것이다. 또, 2예의 메틸화가 지속적으로 관찰된 예들은 소실된 예에 비해 추적 관찰 기간이 짧은 것을 알 수 있다(각각 4.5개월과 27개월). 이로 미루어 볼 때 *p16* 유전자의 메틸화가 지속적으로 관찰된 증례들도 장기적으로 추적 관찰하여 보면 메틸화가 소실될 가능성이 있다고 하겠다. 혹은 이전의 다른 연구에서처럼 지속적으로 메틸화가 관찰되는 것이 질병이 좀더 진행하고 있는 것을 반영한다고 할 수도 있을 것이다.¹⁶ 이에 대해서는 조금 더 오랜 기간 추적 관찰이 요망된다.

한편 *p16*에 대한 면역조직화학 염색에서는 *p16* 메틸화가 양성인 3개의 증례 중 1개의 증례에서만 단백질 발현의 소실을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 *p16* 메틸화와 면역조직화학 염색과의 불일치는 다른 연구에서도 관찰된 바 있다.²⁵ 이러한 불일치에

대한 설명으로는 몇 가지를 생각해 볼 수 있겠다. 먼저 본 연구에서 사용된 메틸화-특이 중합효소연쇄반응은 메틸화-특이 제한효소를 이용하는 방법에 비해 무척 예민하여 단 0.1%의 메틸화된 p16 대립유전자도 검출할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 중앙에서 0.1%의 중앙 세포만이 메틸화된 DNA로 구성된 경우라면 메틸화-특이 중합효소연쇄반응으로는 메틸화가 검출되지만, 면역조직화학 염색으로는 대다수의 중앙 세포들에서 p16 단백 발현을 관찰할 수 있을 것이다. 그 밖에도 p16 유전자의 부분적인 메틸화나 한쪽 대립유전자만의 메틸화도 생각해 볼 수 있을 것이다. 그러나 본 연구에서 p16 메틸화가 관찰된 모든 예는 염기서열 분석을 해 보았을 때 모든 CpG 위치에서 메틸화를 관찰할 수 있었으므로 부분적인 메틸화는 본 연구에는 해당되지 않는다고 하겠다. 하지만 모든 메틸화가 관찰된 증례에서 비메틸화가 동시에 관찰된 것을 생각한다면 정상 조직이 함께 포함되었을 가능성과 함께 한쪽 대립유전자만의 메틸화의 가능성도 있다고 하겠다. 아울러 본 연구에서 면역조직화학 염색이 가능했던 생검 조직이 메틸화를 확인한 예에 비해 상대적으로 적어 정확한 비교는 어려우며 앞으로 조금 더 많은 증례를 통해 확인해 보아야 할 것이다.

한편, 면역글로불린의 단클론성 재배율은 45.5%에서 관찰되었고 이는 이전의 보고²¹된 69.2%에 비해 다소 낮았다. 면역글로불린의 단클론성 재배율은 위음성률이 30% 정도로 높아^{21,26} 조직학적으로 림프종을 의심한 경우에 한해 보조적으로 사용하는 것이 권장되고, 위내시경 생검상 림프종의 진단은 병리조직학적 소견이 가장 중요하다고 한 이전의 보고들^{21,22}을 본 연구에서도 확인할 수 있었다.

요약하면, 위의 저등급 MALT 림프종 환자에서 p16 유전자의 메틸화는 다른 림프종에 비해 비교적 높게 관찰되었으며, *H. pylori*에 대한 항균 치료로 조직학적 관해가 오면 메틸화도 소실되었다. 이상의 사실로 미루어 볼 때 p16 메틸화는 저등급 MALT 림프종의 발생의 초기 단계에 관여한다고 생각되며, 치료 후 치료 효과 판정과 이후의 추적 관찰에 보조적으로 이용될 수도 있을 것으로 생각되나 재발이나 고등급으로의 전환과의 관계 등에 대해서는 앞으로 좀 더 많은 연구가 요망된다고 하겠다.

참고문헌

- Ko YH, Kim CW, Park CS, *et al.* REAL classification of malignant lymphomas in Republic of Korea: incidence of recently recognized entities and changes in clinicopathologic features. Hematolymphoreticular Study Group of the Korean Society of Pathologists. Revised European-American lymphoma. Cancer 1998; 83: 806-12.
- Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. Cancer 1983; 52: 1410-6.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-92.
- Wotherspoon AC, Dogliani C, Diss TC, *et al.* Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993; 342: 575-7.
- Roggero E, Zucca E, Pinotti G, *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* infection in primary low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. Ann Intern Med 1995; 122: 767-9.
- 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.
- 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.
- Herman JG, Civin CI, Issa JJ, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4b} and p16^{INK4a} characterize the major types of hematological malignancies. Cancer Res 1997; 57: 837-41.
- Martinez-Delgado B, Fernandez-Piqueras J, Garcia MJ, *et al.* Hypermethylation of a 5' CpG island of p16 is a frequent event in non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia 1997; 11: 425-8.
- Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P. Frequent methylation silencing of p15^{INK4b} (MTS2) and p16^{INK4a} (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. Blood 1999; 94: 1773-81.
- Pinyol M, Cobo F, Bea S, *et al.* p16^{INK4a} gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of Non-Hodgkin's lymphomas. Blood 1998; 91: 2977-84.
- Villuendas R, Sanches-Beato M, Martinez JC, *et al.* Loss of p16^{INK4a} protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. Am J Pathol 1998; 153: 887-97.
- 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.
- Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, *et al.* Aberrant methylation of p16^{INK4a} is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11891-6.
- Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. *In situ* detection of the hyper methylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 12754-9.
- Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, *et al.* Hypermethylation of p16^{ink4a} and p15^{ink4b} genes as a marker of disease in the follow-up

- of non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol* 2000; 109: 97-103.
17. Isaacson PG, Spencer J, Finn T. Primary B-cell gastric lymphoma. *Hum Pathol* 1986; 17: 72-82.
 18. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-81.
 19. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 9821-6.
 20. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 192-6.
 21. Savio A, Franzin G, Wotherspoon AC, *et al*. Diagnosis and post-treatment follow-up of *Helicobacter pylori*-positive gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: histology, polymerase chain reaction, or both? *Blood* 1996; 87: 1255-60.
 22. Neubauer A, Thiede C, Morgner A, *et al*. Cure of *Helicobacter pylori* infection and duration of remission of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1350-5.
 23. Zucca E, Roggero E, Pileri S. B-cell lymphoma of MALT type: a review with special emphasis on diagnostic and management problems of low-grade gastric tumours. *Br J Haematol* 1998; 100: 3-14.
 24. Neumeister P, Hoefler G, Beham-Schmid C, *et al*. Deletion analysis of the *p16* tumor suppressor gene in gastrointestinal mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Gastroenterology* 1997; 112: 1871-5.
 25. Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of *p16* hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000; 80: 689-95.
 26. Rudolph B, Bayerdorffer E, Ritter M, *et al*. Is the polymerase chain reaction or cure of *Helicobacter pylori* infection of help in the differential diagnosis of early gastric mucosa-associated lymphatic tissue lymphoma? *J Clin Oncol* 1997; 15: 1104-9.