

## 위암종에서 *ras* 유전자 돌연변이와 ERK1, ERK2 단백질의 발현

유진영 · 강석진 · 김병기 · 강창석

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실

### Ras Gene Mutations and Expression of ERK1 and ERK2 Proteins in Stomach Cancer

Jinyoung Yoo, Seok Jin Kang, Byung Kee Kim and Chang Suk Kang

Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background :** We investigated stomach cancers for *ras* abnormalities and expression of ERK1 and ERK2 to determine their significance in the tumor development and/or progression and to evaluate their potential correlation with clinicopathologic parameters. **Methods :** Seventy gastric adenocarcinomas were studied immunohistochemically in paraffin-embedded tissue sections for the expression of ERK1 and ERK2 proteins. All tumors were further analyzed with the use of a polymerase chain reaction technique and a direct sequence analysis procedure for the presence of the mutated *ras* gene. **Results :** ERK1 and/or ERK2 was expressed in 65.7% (46/70) of the tumors; overexpression of ERK1 was observed in 38 (54.3%) tumors, whereas ERK2 was detected in 29 (41.4%). Nine (12.8%) samples demonstrated mutations in the *ras* gene: 4 in H-*ras* and 5 in K-*ras*. Seven of the 9 (77.8%) mutated tumors were of the intestinal type. No association was established between the *ras* abnormalities and the overexpression of ERK1 and/or ERK2. However, the correlation between ERK2 and progression (early vs. advanced) was statistically significant ( $p < 0.05$ ). **Conclusions :** These data indicate that *ras* abnormalities are uncommon events in gastric adenocarcinomas. The majority of *ras* mutations, however, occurred in intestinal-type tumors, supporting the notion of different molecular mechanisms involved between the intestinal- and diffuse-type lesions. Enhanced ERK2 activity may provide assistance in the determination of tumor penetration in these tumors.

**Key Words :** Stomach Neoplasms-Genes, *ras*-MAP Kinase Signaling System

접 수 : 2002년 1월 8일  
게재승인 : 2002년 3월 29일

책임저자 : 강 석 진  
우 442-723 경기도 수원시 팔달구 지동 93  
성빈센트병원 해부병리과  
전화: 031-249-7591  
Fax: 031-244-6786  
E-mail: sjkang@vincent.cuk.ac.kr

*ras* 유전자는 인체 발암 과정 중 초기에 작용하는 강력한 종양유전자 중 하나로서, 비슷한 구조를 가진 세 가지 유전자(H-*ras*, K-*ras*, N-*ras*)로 나뉘어진다. 이들은 각각 서로 다른 암종에 관여하는 것으로 생각되며 모두 p21<sup>ras</sup> 단백을 부호화한다.<sup>1</sup> 정상적으로 p21<sup>ras</sup> 단백질은 삼인산 구아노신 및 이인산 구아노신과 결합 가능하며 GTPase 기능에 의해 비활성화되지만, *ras* 유전자에 돌연변이가 일어나면 활동성 종양유전자로 바뀌어 p21<sup>ras</sup> 단백질의 GTPase 기능이 감소하게 되어 결국 세포 성장을 촉진한다. *ras* 유전자의 돌연변이는 거의 대부분 코돈 12, 13, 61에서 하나의 염기가 교체되어 일어나는데,<sup>2</sup> 이에 관한 연구는 인체 여러 종류의 암종에서 활발히 진행되어 췌장암<sup>3,4</sup>과 대장암<sup>5,6</sup>에서 특히 높은 빈도의 돌연변이를 보이는 것으로 보고되었다. 그러나 위암종에서 *ras* 유전자 연구는 드물어 자료가 제한적인데다가 결과들도 아직 논란의 여지가 많다.

한편 외부 자극에 의한 세포내 신호전달계에는 상호작용을 하는 많은 단백질이 관여하며, 이러한 단백질들의 비정상적인 활성화나 발현은 종양과 밀접한 관련을 가진다. 우선 세포의 증식, 분화, 생존 등을 유발하는 성장인자가 세포막에 존재하는 수용체 티로신 키나아제에 결합하면 active Ras-GTP가 생성되고 이어서 세포질내에서 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달계를 통해 연속적인 단백질 키나아제의 활성화가 일어난다.<sup>7</sup> MAPK 신호전달계의 중추적인 역할을 하는 것으로 생각되는 extracellular signal regulated kinase (ERK)가 활성화되면 핵내로 이동하여 유전자 발현을 증가시킴으로써 결국 세포 성장을 초래한다. ERK 경로는 *ras* 돌연변이가 있는 암세포에서 지속적인 활성을 보임에 따라 *ras* 유전자의 주요 하부 표적으로 여겨진다. 최근 동물 실험에서 비소세포성 폐암의 K-*ras* 돌연변이가 ERK 단백질 발현을 증가시켰다는 보고가 있

으나<sup>8</sup> 인체 암종에서 이들간의 일관성 있는 관계는 아직 확실히 밝혀지지 않았다.

이에 저자들은 위샘암종을 대상으로 *ras* 유전자의 돌연변이 검색 및 ERK 단백질에 대한 면역조직화학 염색을 시행하여 서로의 연관성을 조사하고 조직병리학적 소견들과의 관계를 알아보 고자 하였다.

## 재료와 방법

### 재료

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실 성빈센트병원에서 2001년 1월부터 10월까지 조직학적으로 진단된 위샘암종 70예를 대상으로 하였다. 수술 전에 방사선 요법이나 화학 요법을 받은 예는 연구 대상에서 제외하였다. 모든 조직은 광학현미경 하에서 병리 진단을 확인하고 종양의 위치, Lauren의 분류에 따른 조직학적 아형 및 침윤도에 따라 재분류하였다.

### 방법

#### 면역조직화학 염색

파라핀 포매 조직으로부터 5  $\mu\text{m}$  두께의 절편을 특수 처리된 슬라이드(Poly-L-lysine coated, Probe On Plus Microscopic slides, Fisher Scientific, Pittsburg, U.S.A.)에 부착시킨 다음 80°C 오븐에서 15분간 열처리한 후 크실렌으로 실온에서 2분간 4회 반복 처리하여 파라핀을 제거하였다. 100% 알코올로 10초간 3회 처리하고, 10% citrate buffer (Zymed, San Francisco, U.S.A.)에 담가 120°C의 고압멸균기에 15분간 처리 후 실온에서 20분간 부치하였다. 45°C의 세척 완충액으로 3분씩 3회 세척하고, 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하기 위하여 3% 과산화수소수에 45°C에서 5분간 반응시켰다. 이어서 세척 완충액으로 3회 수세 후 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 1:100으로 희석한 비면역 염소혈청(Zymed, San Francisco, U.S.A.)에 45°C에서 60분간 작용시켰다.

일차 항체는 ERK1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.)과 ERK2 (Santa Cruz)에 대한 단클론 항체들로서 각각 1:50으로 희석하여 45°C에서 30분간 반응시킨 다음, 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin antibody, Dako Co., Ltd., Kyoto, Japan)를 10분간 반응시켰다. 세척 완충액으로 3분씩 3회 수세한 후 streptavidin peroxidase detection system (Zymed)을 이용하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하였고, 다시 수세 후 AEC (3-amino-9-ethyl carbonate)를 이용한 10분간의 발색을 거쳐 Meyer's hematoxylin (Zymed)으로 대조염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결과 판정은 광학현미경 하에서 10% 이상의 종양 세포에서

면역 반응이 핵에 붉은 갈색으로 나타나는 경우를 양성으로 판독하였다. 염색의 강도에 따라 양성을 약양성(+), 중양성(++) 및 강양성(+++)으로 구분하였다.

### *ras* 유전자 돌연변이 검색

통상적인 방법에 따라 포르말린 고정과 파라핀 포매체를 제작해서 HE 염색을 하여 진단한 다음, 파라핀 포매체 중 조직 면적이 1  $\text{cm}^2$  이상으로 괴사나 출혈이 없으며 전체의 80% 이상이 종양 세포로 구성된 포매체만 선택하여 10  $\mu\text{m}$  두께의 연속 절편 5매를 얻어 페놀 추출법으로 DNA를 분리하였다. 크실렌과 에탄올을 이용해서 파라핀을 제거한 검체에 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 단백질분해효소가 포함된 용해 완충액(lysis buffer: 1 M Tris, 0.5 M EDTA, 10% sodium dodecyl sulfate)을 넣어 55°C 수조에서 하룻밤 방치시킨 후 동량의 페놀과 이소아밀알코올을 함유한 클로로포름 혼합액(Phenol:CHCl<sub>3</sub>:Isoamyl alcohol, 25:24:1)으로 2회, 그리고 다시 이소아밀알코올을 함유한 클로로포름(CHCl<sub>3</sub>:Isoamyl alcohol, 24:1)으로 2회 처리하여 수용액 상태의 DNA를 추출하였다. 그 다음 동량의 에테르를 가하여 원침시켜서 상층액을 제거하고, -20°C에 보관한 무수 알콜과 5 M NaCl을 넣어 -20°C에서 12시간 동안 두었다가 다시 원침시킨 후 침전된 DNA를 1x TE 완충액(10 mM Tris, 1 mM EDTA)으로 용해시켜 표적 DNA로 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

H-ras codon 12/13:

5'-CTG-AGG-AGC-GAT-GAC-GGA-ATA-TAA-GC-3'  
(sense)

5'-CTC-TAT-AGT-GGG-GTC-GTA-TTC-GTC-CA-3'  
(antisense)

H-ras codon 61:

5'-TGA-GCC-CTG-TCC-TCC-TGC-AGG-ATT-C-3'  
(sense)

5'-GCC-AGC-CTC-ACG-GGG-TTC-ACC-TGT-A-3'  
(antisense)

K-ras codon 12/13:

5'-ATG-ACT-GAA-TAT-AAA-CTT-GTG-GTA-3'  
(sense)

5'-AC-CTC-TAT-TGT-TGG-ATC-A-3' (antisense)

K-ras codon 61:

5'-TTC-CTA-CAG-GAA-GCA-AGT-AG-3' (sense)

5'-CAC-AAA-GAA-AGC-CCT-CCC-CA-3' (antisense)

조직에서 추출한 DNA 2  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ )에 각 primer 1.6  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 증류수로 전체 양이 10  $\mu\text{L}$ 가 되도록 한 다음, dNTPs (Pharmacia, LKB, Gaithersburg, U.S.A.) 2  $\mu\text{L}$ , Taq

중합효소(Cetus-Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.) 0.25  $\mu$ L, 2  $\mu$ L의 10x McCarthy buffer, 1.2  $\mu$ L의 MgCl<sub>2</sub>를 증류수 4.8  $\mu$ L와 혼합하여 첨가한 후, 94°C에서 5분간의 초기 변성 과정을 거친 다음, 중합효소연쇄반응(MJ Research PTC-100, Watertown, U.S.A.)은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 반응을 35회 반복 시행하고 마지막에는 72°C에서 10분간 방치하였다.

중합효소연쇄반응 산물 중 3  $\mu$ L를 취하여 2% agarose gel에서 80 volt로 20분간 전기 영동 후 자외선 조사기로 증폭된 DNA 띠의 존재 여부를 확인한 다음, QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, U.S.A.)를 이용하여 정제하고 염기서열 분석은 373A DNA 자동 분석기(Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.)를 사용하였다. 모든 검체에서 돌연변이의 유무와 그 확인을 위하여 양쪽 가닥이 함께 검색되었으며 정상 조직으로부터의 검체도 염기서열 분석이 실시되었다.

**통계학적 분석**

통계처리는 SPSS 통계프로그램(version 7.0 for Windows, 서울, 한국)을 이용하여 각 지표에 따라 Chi-square test, Fisher's exact test와 Pierson's correlation으로 검정하였고 유의 수준은 0.05 미만으로 하였다.

**결 과**

총 70예의 위암종 중 17예가 근위부에, 53예가 원위부에 발생하였다. Lauren 분류법에 따라 장형과 미만형으로 나누어 볼 때, 장형이 47예, 미만형이 23예로 장형이 많았으며, 조기 위암이 27예, 진행 위암이 43예였다.

연구 결과는 Table 1과 2에 요약하였다. 면역조직화학 염색상 ERK1이나 ERK2의 발현은 모두 46예(65.7%)에서 관찰되었다. ERK1은 38예(54.3%)에서 핵내 과발현이 있었다(Fig. 1). 그 중 9예(9/17, 52.9%)가 근위부 암종이고 29예(29/53, 54.7%)가 원위부 암종이었으며, 장형이 26예(26/47, 55.3%), 미만형이 12예(12/23, 52.2%)로, ERK1 발현과 암종의 위치나 Lauren 분류에 따른 차이는 보이지 않았다. 또한 조기 위암 27예 중 13예(48.1%)와 진행 위암 43예 중 25예(58.1%)에서 ERK1이 발현하여 침윤도와 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다. ERK2는 29예(41.4%)에서 양성 면역 반응을 보였다(Fig. 2). 근위부 암종의 47.1% (8/17), 원위부 암종의 39.6% (21/53)에서 발현이 있었고, 장형 가운데 46.8% (22/47), 미만형 가운데 30.4% (7/23)가 양성으로, 근위부에서 발생한 암종과 장형 암종에서 ERK2 발현이 더 많았으나 통계적인 의미는 없었다. 한편 조기 암의 25.9% (7/27), 진행 암의 51.2% (22/43)에서 ERK2 과발현이 관찰되었는데, 이는 통계적으로 유의한

**Table 1.** Correlation between ras mutation and expression of ERK1 and ERK2 according to tumor location, subtype and depth of invasion

	Location		Subtype		Depth of invasion	
	Proximal (%)	Distal (%)	Intestinal (%)	Diffuse (%)	EGC (%)	AGC (%)
ras mutation	3/17 (17.6)	6/53 (11.3)	7/47 (14.9)	2/23 (8.7)	4/27 (14.8)	5/43 (11.6)
ERK expression	10/17 (58.8)	36/53 (67.9)	32/47 (68.1)	14/23 (60.9)	14/27 (51.9)	32/43 (74.4)
ERK1	9/17 (52.9)	29/53 (54.7)	26/47 (55.3)	12/23 (52.2)	13/27 (48.1)	25/43 (58.1)
ERK2	8/17 (47.1)	21/53 (39.6)	22/47 (46.8)	7/23 (30.4)	7/27 (25.9)	22/43 (51.2)

EGC: early gastric carcinoma, AGC: advanced gastric carcinoma, p value: ERK2-depth of invasion=0.037, ras-location NS, ras-subtype NS, ras-depth of invasion NS, ERK1-location NS, ERK1-subtype NS, ERK1-depth of invasion NS, ERK2-location NS, ERK2-subtype NS, ras-ERK1 NS, ras-ERK2 NS.

**Table 2.** List of ras mutation-containing cases in gastric adenocarcinomas

	Tumor location	Subtype	Depth of invasion	ras mutation	Immunohistochemistry
					ERK1/ERK2
1	Distal	Intestinal	EGC	H-12/GTC/Val	-/+
2	Proximal	Intestinal	EGC	H-12/GTC/Val	-/-
3	Proximal	Intestinal	AGC	H-12/GTC/Val	+/+
4	Distal	Diffuse	AGC	H-12/GTC/Val	-/-
5	Distal	Intestinal	AGC	K-13/AGC/Ser	-/+
6	Distal	Diffuse	EGC	K-13/AGC/Ser	+/+
7	Distal	Intestinal	EGC	K-61/CTA/Leu	+/-
8	Proximal	Intestinal	AGC	K-61/CGA/Arg	-/-
9	Distal	Intestinal	AGC	K-61/CGA/Arg	+/+

EGC: early gastric carcinoma, AGC: advanced gastric carcinoma.

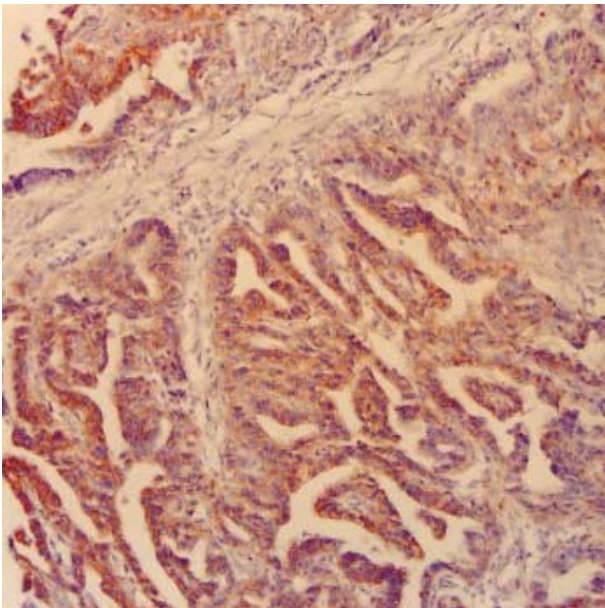


Fig. 1. Immunohistochemical analysis for ERK1. Strong expression is present in the nucleus and cytoplasm of tumor cells.

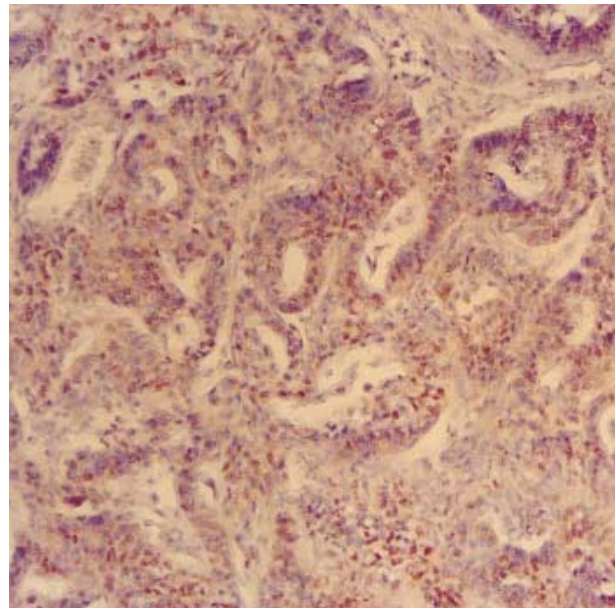


Fig. 2. Immunohistochemistry for ERK2. Many tumor cells show positive immunoreaction in the nucleus.

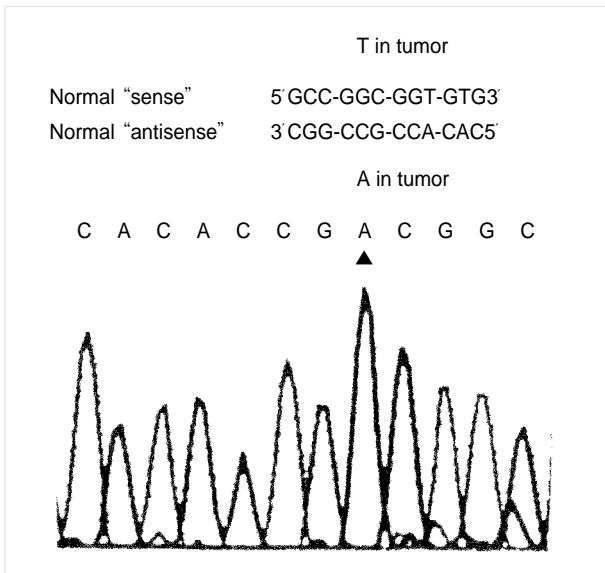


Fig. 3. Demonstration of H-ras mutation in the second base of codon 12 (GGC→GTC) of the sense strand, as indicated by a C-to-A transversion in the antisense strand.

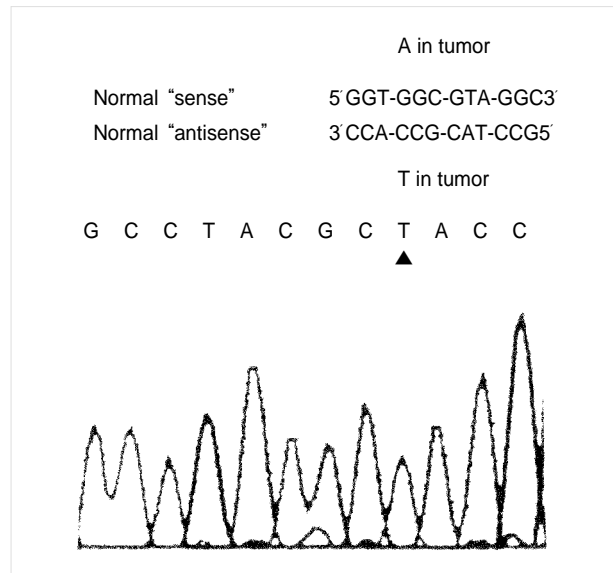


Fig. 4. Demonstration of homozygous mutation in the first position of codon 13 (GGC→AGC) of the sense strand of K-ras, as evidenced by the presence of T in the antisense strand of the sequence.

는 상관관계를 보였다( $p < 0.05$ ).

중합효소연쇄반응 후 아가로스겔 전기영동으로 모든 검체에서 예상되는 크기의 증폭된 DNA 띠를 확인할 수 있었다. 대조군과 70예의 위샘암종을 대상으로 자동 염기서열 분석법으로 H-ras와 K-ras 유전자의 코돈 12, 13, 61을 포함하는 exon을 검색한 결과, 대조군은 모두 정상 염기서열을 보였다. 위샘암종에서는 9예(12.8%)에서 ras 유전자 돌연변이가 관찰되었다. H-

ras 돌연변이는 4예에서, K-ras 돌연변이는 5예에서 관찰되었고, 모든 돌연변이는 하나의 염기 치환으로 이루어졌다. H-ras는 모두 codon 12의 두 번째 염기 G가 T (GGC→GTC)로 치환되어 글리신대신 발린으로 바뀌었다(Fig. 3). K-ras 돌연변이는 2예에서 codon 13의 첫 번째 염기에서 일어나서(GGC→AGC) 정상 글리신이 세린으로 대체되었고(Fig. 4), 3예에서 codon 61의 두 번째 염기가 G나 T로 바뀌어 정상 글루타민이

각각 아르기닌, 류신으로 대체되었다. *ras* 돌연변이를 보인 9예 가운데 7예가 장형, 2예가 미만형으로 장형에서 돌연변이의 빈도가 높았으나 통계적 의의는 없었다. 또한 *ras* 돌연변이와 위샘암종의 위치, Lauren 분류에 따른 아형, 침윤도 사이에는 관련이 없었으며 ERK1이나 ERK2 발현 여부와의 의의 있는 상관관계도 없었다.

## 고찰

*ras* 유전자의 돌연변이는 여러 악성 종양들에서 다양한 빈도로 나타나는데, 특히 췌장암과 대장암에서 높은 빈도로 관찰된다.<sup>3-6</sup> 본 연구에서 *ras* 유전자의 돌연변이는 총 70예의 위샘암종 중 9예(12.8%)에서 관찰되어 다른 소화기관계의 종양들에 비해서 비교적 낮은 발생 빈도를 보였다. 그러나 Lightdale 등<sup>9</sup>은 28%까지 주장하였으며 대체적으로 0-9%에서 돌연변이가 보고된<sup>10-14</sup> 위암에서의 다른 연구자들의 결과와 부합하였다. K-*ras* 돌연변이는 Lee 등<sup>15</sup>은 7.9%로 기술하였는데, 본 연구에서도 K-*ras* 돌연변이는 7.1% (5/70)였다. 이러한 결과로 미루어 돌연변이에 의한 *ras* 유전자 활성화는 위암의 발암과정에 직접적인 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 그러나 다른 기전을 통한 *ras* 유전자의 역할은 배제할 수 없다.

한편 위샘암종에서 암종의 위치나 Lauren 분류법에 의한 아형에 따라 그 발생기전이 다르다는 점이 제시되었다. Lee 등<sup>15</sup>의 연구에 의하면 위의 상부, 중부, 하부에서 발생한 종양 가운데 각각 37.5%, 13.8%, 3%에서 K-*ras* 돌연변이를 발견하여 결국 근위부에서 빈도가 높다고 하였다. 그러나 저자들의 연구에서는 근위부의 17%, 원위부의 13%에서 *ras* 돌연변이가 관찰되어, *ras* 돌연변이와 암종의 위치 사이의 연관성을 밝힐 수 없었다. Nanus 등<sup>16</sup>도 28예의 위샘암종을 대상으로 연구한 결과 2예에서 *ras* 돌연변이가 있었는데, 근위부와 원위부 암종이 각각 1예로 종양의 위치에 따른 *ras* 돌연변이 빈도의 차이는 없다고 하였다. Lauren 분류에 의한 장형 위샘암종은 장형화생을 보이는 위점막으로부터 유래한 것으로 생각되는데 주로 용기형으로 나타나며 팽창성 증식을 주로 한다. 조직학적으로 샘 구조를 이루며 심한 위축성 위염과 장형화생을 동반한다. 반면 미만형은 장형화생이 없는 위장에서 발생하고 궤양형이나 벽이 두꺼워지는 형으로 나타나며 침윤성 성장을 하는데 조직학적으로 분화가 나쁘고 세포들이 날개로 흩어진 양상을 보인다. 최근 세포간의 접착에 중요한  $\beta$ -catenin 유전자가 위샘암종의 장형에서만 돌연변이를 보였다는 연구 결과가 있었고,<sup>17</sup> K-*ras* 돌연변이도 장형에서만 관찰되었다는 보고가 있었다.<sup>18</sup> 그리고 이 두 가지 유형에서 p21<sup>ras</sup> 단백질 발현의 양상도 서로 다르다는 기술이 있었다.<sup>19</sup> 이러한 보고들과 돌연변이가 관찰된 9예 중 7예(77.8%)가 장형인 본 연구 결과로 미루어, 장형과 미만형 암종의 발생 기전에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

지금까지 여러 가지 종양유전자나 종양억제유전자가 인체내 발암 과정에 단독으로 혹은 공동으로 관여하는 것으로 밝혀졌다. 이들 유전자들의 변이, 활성화 또는 비활성은 또 다른 유전자나 단백질에 의한 다단계 활성화 과정을 거쳐 이루어진다. *ras* 유전자는 다양한 종류의 악성 종양의 발생에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. *ras*는 외부의 자극을 받으면 *ras*에서 GDP가 떨어져서 GTP가 붙어 활성화되는데 정상적으로 *ras* 자체가 GTPase 기능을 가지고 있어 활성화되면서 붙었던 GTP를 다시 GDP로 변환시켜 비활성화된다. 그러나 *ras* 유전자에 돌연변이가 일어나면 *ras*의 GTPase 기능이 소실되어 GTP를 GDP로 바꾸지 못해서 계속 활성화 상태로 남게 되고 이후 일련의 신호 전달과정을 통해 핵내의 유전자에 영향을 주는데, 현재까지 밝혀진 과정 중 대표적인 것이 MAPK 신호전달계이다.<sup>7</sup> MAPK 신호전달경로는 세포가 성장인자, 시토킨, 호르몬 및 각종 스트레스 등에 의해 자극을 받을 때 작동해서 세포의 성장, 분화, 면역, 염증 반응 등을 조절하는 중요한 통로이다. 포유동물 세포에서 ERK, JNK/SAPK, p38 등 독립적인 세 가지 경로의 MAPK 신호전달계가 알려졌는데, 이 중 *ras*를 주 신호전달 물질로 사용하는 ERK 경로가 가장 중추적 역할을 하는 것으로 보인다. ERK에는 ERK1과 ERK2 이성체가 있는데 이들은 기질의 특이성에 약간의 차이가 있을 뿐 기능적으로는 같다고 여겨진다. 활성화된 *ras*는 raf, MEKK (MAPK kinase kinase), MEK (MAPK kinase), ERK 들을 차례로 활성화시켜 결국 세포의 분열과 증식을 촉진시킨다.<sup>20-23</sup> 따라서 *ras*에 의해 활성화되는 단백질이나 이후의 신호전달 과정을 규명하는 것은 암종의 증식기전을 밝히는 데 매우 중요하다고 할 수 있다. Ryu 등<sup>24</sup>은 K-*ras* 돌연변이가 있는 췌장암 세포주를 대상으로 MEK 또는 PI 3-kinase 중 어느 경로가 세포 증식에 영향을 미치는지 알아보기 위한 연구에서 *ras*-MEK-ERK 신호전달계가 세포증식을 촉진시켜 발암기전에 관여한다고 보고하였다. 위암종에서 정상 대조군보다 ERK 단백질 발현이 높다는 보고가 있어,<sup>25</sup> 위암종의 발생에서도 ERK 단백질의 역할이 제기되고 있으나, 아직 명확히 알려진 바가 없다. 저자들의 연구에서 ERK1이나 ERK2 또는 동시 발현은 전체 대상 증례의 65.7% (46/70)에서 관찰되어 다른 연구자의 결과와 마찬가지로 높은 빈도를 보였다. 한 가지 주목할 만한 점은 이들 중 89.1% (41/46)에서 *ras* 돌연변이가 없었다는 점이다. 대장암종에서 MAPK 활성화에 관한 최근 연구도 유사한 결과를 보였는데, MAPK 활성을 보인 대상 증례의 75%에서 *ras* 돌연변이가 없었다고 한다.<sup>26</sup> 이는 ERK 발현이 곧 *ras* 돌연변이를 의미하는 것은 아니며, 또 다른 non-*ras* 경로가 있을 가능성을 암시한다. 즉 암종에서 ERK의 활성화, 비활성은 *ras* 유전자와 직접 혹은 간접적으로 연관이 있지만, 없을 가능성도 있으며 이때에는 다른 단백질이나 유전자가 관여할 것으로 생각되는 바, 좀 더 광범위한 연구를 통해 규명되어야겠다.

ERK의 생화학적, 생리학적인 성질에 대한 연구는 매우 급속도로 진행되고 있으나, 임상조직학적 소견들과의 상관관계에 대한

자료는 드물고 제한적이다. MAPK 신호전달계와 임상조직학적 인자들과의 연관 가능성이 대장직장암과 유방암에서 연구되었다. Kuno 등<sup>27</sup>은 대장직장암에서 MAPK 활성화는 나이, 성별, 조직학적 분류, 병기 및 림프절 전이 등과 연관이 없었다고 기술하였다. 반면 유방암에서 ERK1 과발현이 침윤성 증식과 비례하여 증가한다는 보고가 있어<sup>28</sup> 에스트로겐과 무관하게 암세포를 성장시키는 세포변형에 ERK1이 관여하였을 것이라는 가능성을 배제할 수 없다. 저자들의 연구 결과 ERK2는 침윤성과 통계적으로 유의한 상관관계를 보여 위샘암종의 암진행에 ERK2의 역할이 중요함을 시사하였다. 이는 향후 ERK2 발현에 관한 면역조직화학 염색이 침윤성 결정에 중요한 인자로 활용될 수 있음을 제시하는 매우 의의 있는 소견이다. 최근의 보고에 의하면 아교모세포종 연구에서 ERK 활성화이 미세혈관 증식 및 괴사와 관련이 있다고 한다.<sup>29</sup> 이때 중앙 세포와 주위 미세혈관계 사이의 신호전달과정에 아마도 증식한 혈관내피세포에 의해 생성 분비되는 vascular endothelial growth factor (VEGF)가 작용하고 이에 따라 중앙 세포내의 ERK 활성화이 유도되었을 것으로 생각되나, 앞으로 이러한 기전에 대한 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것이다.

이상의 연구 결과 저자들은 위샘암종에서 *ras* 돌연변이에 의한 *ras*-MEK-ERK 경로가 암 발생에 차지하는 비중은 크지 않으며, ERK를 활성화시키는 다른 기전이 있음을 알 수 있었고, 대부분의 *ras* 돌연변이가 장형에서 관찰되어 장형과 미만형 사이에 서로 다른 기전이 관여한다는 점을 확인하였다. 또한 ERK 과발현은 위샘암종의 발생에 중요한 역할을 담당하며, 특히 ERK2는 침윤도와 유의한 상관관계를 보여서 침윤성 결정에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

## 참고문헌

- Bos JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-9.
- Barbacid M. *ras* Genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- Robinson RA. *K-ras* mutations and the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 257-9.
- Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of *ras* gene mutations for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991; 100: 233-8.
- Span M, Moerkkerk PT, de Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of *K-ras* point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996; 69: 241-5.
- Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of *K-ras* mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175: 198-202.
- Davis R. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-6.
- Yano T, Yano Y, Nagashima Y, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase in lung tissues of mice treated with carcinogen. *Life Sci* 1999; 64: 229-36.
- Lightdale CJ, Botet JF, Kelsen DP, Turnbull AD, Brennan MF. Diagnosis of recurrent upper gastrointestinal cancer at the surgical anastomosis by endoscopic ultrasound. *Gastrointest Endosc* 1989; 35: 407-12.
- Jiang W, Kahn SM, Buillem JG, Lu SH, Weinstein IB. Rapid detection of *ras* oncogenes in human tumors: application to colon, esophageal and gastric cancer. *Oncogene* 1989; 4: 923-8.
- Victor T, Du Toit R, Jordaan AM, Bester AJ, van Helden PD. No evidence for point mutations in codon 12, 13, and 61 of the *ras* gene in a high-incidence area for esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1990; 50: 4911-4.
- Fujita K, Ohuchi N, Yao T, et al. Frequent overexpression, but not activation by point mutation, of *ras* genes in primary human gastric cancers. *Gastroenterology* 1987; 93: 1339-45.
- Koshiha M, Ogawa O, Habuchi T, et al. Infrequent *ras* mutation in human gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 163-7.
- Ranzani GN, Renault B, Pellegata NS, et al. Loss of heterozygosity and *K-ras* gene mutations in gastric cancer. *Hum Genet* 1993; 92: 244-9.
- Lee KH, Lee JS, Suh CW, et al. Clinicopathologic significance of the *K-ras* gene codon 12 point mutation in stomach cancer. An analysis of 140 cases. *Cancer* 1995; 75: 2794-801.
- Nanus DM, Kelsen DP, Mentle IR, Altorki N, Albino AP. Infrequent point mutations of *ras* oncogenes in gastric cancers. *Gastroenterology* 1990; 98: 955-60.
- Park WS, Oh RR, Park JY, et al. Frequent somatic mutations of the  $\beta$ -catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 4257-60.
- Miki H, Ohmori M, Perantoni AO, Enomoto T. *K-ras* activation in gastric epithelial tumors in Japanese. *Cancer Lett* 1991; 58: 107-13.
- Czerniak B, Herz F, Gorczyca W, Koss L. Expression of *ras* oncogene p21 protein in early gastric carcinoma and adjacent gastric epithelia. *Cancer* 1989; 64: 1467-73.
- Cobb MH, Hepler JE, Cheng M, Robbins D. The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 261-8.
- Marshall CJ. ERK/MAP kinase kinase kinase, ERK/MAP kinase kinase, and ERK/MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 82-9.
- Segar R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9: 726-35.
- Mitra G, Weber M, Stacey D. Multiple pathways for activation of ERK/MAP kinases. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39: 517-23.
- Ryu JK, Kim J, Chang YH, et al. Role of mitogen activated protein

- kinase and PI 3-kinase on cell proliferation in pancreatic cancer cell lines with *K-ras* mutation. *Korean J Gastroenterol* 2000; 36: 372-82.
25. Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, *et al.* Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 3645-50.
26. Sakakura C, Hagiwara A, Shirahama T, *et al.* Infrequent activation of mitogen-activated protein kinase in human colon cancers. *Hepato-gastroenterology* 1999; 46: 2831-4.
27. Kuno Y, Kondo K, Iwata H, *et al.* Tumor-specific activation of mitogen-activated protein kinase in human colorectal and gastric carcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 903-9.
28. Hori M, Inagawa S, Shimazaki J, Itabashi M, Hori M. Overexpression of mitogen-activated protein kinase superfamily proteins untreated to Ras and AF-1 of estrogen receptor alpha mutation in advanced stage human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 817-26.
29. Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. In situ visualization of intratumor growth factor signaling. Immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinases in glial neoplasms. *Am J Pathol* 1998; 153: 1411-23.