

위 이형성 상피 병변의 클론성에 대한 분자병리학적 연구

전남대학교 의과대학 ¹외과학교실, 병리학교실

최호수 · 김미숙 · 박재우 · 박창수 · 김영진¹ · 정상우

Clonality Assay of Dysplastic Epithelial Lesions of the Stomach

Ho Soo Choi, M.D., Mi Sook Kim, Ph.D., Jae Woo Park, M.D., Chang Soo Park, M.D., Young-Jin Kim, M.D.¹ and Sang-Woo Juhng, M.D.

Departments of ¹Surgery and Pathology, College of Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Purpose: Dysplasia or flat adenoma of the stomach is regarded as a precancerous lesion. However, the frequency and the evolutionary process of malignant transformation of gastric dysplasia are still debated. In order to see whether the lesion was a monoclonal or a polyclonal proliferation, clonality was assayed by X-linked HUMARA polymorphism.

Materials and Methods: DNA was extracted from the paraffin-embedded tissue of 16 consecutive cases of endoscopic biopsy, eight of which supplied both dysplastic and nondysplastic tissue for comparison. HUMARA was amplified by PCR with or without pretreatment with methylation-sensitive restriction enzyme, *Hpa*II. The amplification products were electrophoresed on polyacrylamide gel and silver-stained.

Results: Among the 16 cases, 13 cases were informative and 3 cases noninformative. Of the 13 cases, one case showed skewed lyonization, rendering 12 cases to be analyzed further. A monoclonal band pattern was noted in 2 cases, and a polyclonal band pattern in 10 cases. A review of the histopathologies of the monoclonal and the polyclonal cases did not reveal features discriminating the two groups.

Conclusion: These results suggest that gastric dysplasia is a disease entity heterogeneous in the genetic level, and

many cases may be non-neoplastic. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2001;1:129-135)

Key Words: Stomach, Dysplasia, Clonality, HUMARA
중심 단어: 위, 이형성증, 클론성, 안드로젠 수용체

서 론

위의 이형성증은 dysplasia 또는 flat adenoma라고 진단되고 있으나 아직까지도 이형성증의 생물학적 양태(biological behavior)에 대해서는 논란이 많다. 이형성증은 광학현미경상 위장 점막의 흡수형 세포와 비슷한 세포들로 구성되어 있고 관상 또는 융모상 구조를 가지므로 대장의 선종과 유사하나 내시경적으로는 주로 평탄하게 다소 융기되어 있으며 gyrus 모양 또는 결절성 모양의 표면을 가져 대장의 선종과는 다른 소견을 보인다. 대장 선종은 전암단계의 병변으로서 선종에서부터 암종으로 진행되는 단계가 잘 알려져 있으나(1-3) 위의 이형성증이 어느 정도의 빈도로 어떤 단계를 거쳐 암종으로 진행되는지는 아직도 불분명하다.(4) 위의 이형성증에서부터 암종이 발생하는 빈도는 3.5%에서부터 30.8%로 보고자에 따라 크게 다른 것도(5) 이형성증의 본태에 대한 의견이 다양함을 의미한다고 볼 수 있다.

전암단계의 병변이 암으로 진행되는 과정은 병변의 진행상태를 경시적으로 추적하거나 각 단계 병변 사이의 형태학적 및 세포역학적 spectral continuity를 관찰하는 방법(6)도 있으나 보다 직접적인 방법은 분자생물학적 방법에 의해 암유전자나 암억제유전자의 변화를 관찰하는 것이라고 생각한다. 대장의 경우 정상 점막 상피가 과증식과 선종의 단계를 지나 암종으로 진행되는 과정에 ras 유전자와 같은 암유전자의 돌연변이와 APC, DCC, p53 유전자와 같은 암억제유전자의 상실 또는 돌연변이가 관여하는 분자생물학적 모델이 제시되어 있다.(7)

위점막의 이형성 병변이 암종의 전단계 병변인지 또는 paraneoplastic lesion인지를 고찰하기 위해서 24예의 이형성 위점막 병변과 34예의 위암종 병변을 대상으로 하여 PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand confor-

책임저자 : 정상우, 광주광역시 동구 학동 5번지
전남대학교 의과대학 병리학교실, 501-190
Tel: 062-220-5670, Fax: 062-225-0480
E-mail: swjuhg@chonnam.ac.kr

본 연구는 1996년도 학술진흥재단 지원 연구비에 의해 연구되었음.

접수일 : 2001년 7월 10일, 게재승인일 : 2001년 9월 7일

mation polymorphism) 방법으로 p53 유전자의 돌연변이를 관찰한 연구에 의하면 돌연변이는 위 이형성증 병변의 전체 24예 중 1예에서만 확인되었다. 이는 돌연변이형 대조용 조직을 얻기 위해 같은 방법으로 시행한 위암종 조직 34예 중 13예가 돌연변이를 보인 것에 비하여 매우 낮은 빈도이었다.(8)

위의 암종에 비해 이형성증에서 p53 유전자의 돌연변이가 매우 낮은 빈도로 관찰된 것은 p53 유전자의 돌연변이가 이형성증의 후기나 암종의 단계에서 발생할 것임을 시사해 줄 수도 있으나, 병리조직학적으로 진단된 이형성증의 모든 예가 과연 종양성 병변인지에 대해 의문을 갖게 한다. 종양성 병변은 단클론성의 세포로 구성되므로 위의 이형성증을 대상으로 클론성을 조사하여 위 이형성증이 종양성 병변인지 아닌지를 밝히는 것은 의미 있는 연구과제라고 생각한다.

방 법

1) 클론성 검색의 원리

정상 여자의 세포핵에 있는 X 염색체는 모성 X 염색체 (X_m)와 부성 X 염색체(X_p)의 2개로 짝지어 있으며 그 중 하나는 배아기에 비활성화된다.(9-10) 비활성화는 무작위로 일어나므로 비종양성 조직에는 X_m 또는 X_p가 비활성화되어 있는 세포들이 섞여 있다. 그러나 단클론성 증식을 하는 종양성 조직에는 X_m이 비활성화된 세포만이 존재하거나 X_p가 비활성화된 세포만이 존재한다. 따라서 X 염색체의 비활성화 패턴으로 클론성을 추정할 수 있다.

X 염색체의 장완에 위치하는 human androgen receptor (HUMARA) 유전자는 CAG의 short tandem repeat (STR)와 인접한 upstream의 두 군데에 5'-CCGG-3'의 염기서열을 가지고 있다.(11) 5'-CCGG-3'은 methylation에 의해 영향받는 제한효소 HpaII의 절단부위이며 5'-CCGG-3' 염기서열 중 cytosine residue는 X 염색체가 비활성화될 때 methylation된다. 따라서 비활성화된 X_m 또는 X_p 염색체의 HUMARA 유전자는 HpaII에 의해 절단되지 않으나 활성화 상태에 있는 X_m 또는 X_p 염색체의 HUMARA 유전자는 HpaII에 의해 절단된다.(12) 그러므로 HpaII로 작용시킨 후 HpaII의 절단부위와 STR 부위를 포함하도록 primer를 합성하여 PCR (polymerase chain reaction, 연쇄중합반응)을 시키면 비활성화된 HUMARA 유전자의 경우 PCR 산물이 만들어지나 활성화 상태에 있는 HUMARA 유전자의 경우에는 PCR 산물이 만들어지지 않는다. 다클론성 조직은 비활성화된 X_m 또는 X_p를 갖는 세포가 섞여 있으므로 HpaII 전처리 후 PCR를 시행하면 informative case의 경우 길이가 다른 두가지 PCR 산물을 관찰할 수 있으나 단클론성 조직은 비활성화된 X_m 또는 X_p 하나만을 갖는 세포로 구성되어 있으므로 HpaII 전처리 후 PCR를 시행하면 한 가지

만의 PCR 산물을 관찰할 수 있다(Fig. 1).

실제 인체의 종양 조직에는 종양세포 이외에도 비종양 세포가 존재하므로 단클론성 종양 조직이라고 하더라도 두가지 PCR 산물이 관찰된다. 그러나 종양세포와 비종양 세포가 섞여 있는 경우에도 HpaII 처리 전후에 PCR을 시행하여 band의 density를 비교함으로써 종양 조직의 단클론성을 판별할 수 있다.

2) 대상

전남대학교병원 위내시경 검사 file을 검토하여 내시경 소견상 평탄 용기형의 병변을 보이고 주위에 궤양이나 침윤성 병변이 없으며 내시경적 조직검사를 시행하여 병리 검사상 dysplasia 또는 flat adenoma로 진단된 예 중에서 여자 환자의 조직 표본 16예를 선택하였다.

3) DNA 추출

Hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 이형성증 부위와 비이형성증 부위를 구분한 후 파라핀 포매 조직에서부터 10µm 두께의 절편 약 40개를 만들었다. 절편을 xylene으로 두 번 처리하여 파라핀을 제거하고 무수 ethanol로 씻은 후 남은 조직을 건조시켰다. 건조시킨 조직에 400 µl

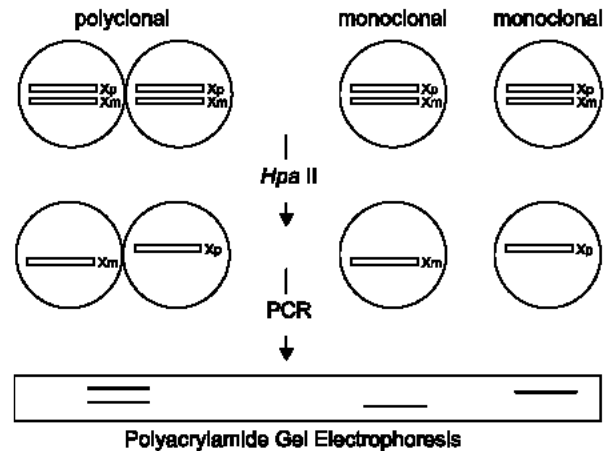


Fig. 1. Clonality assay by HUMARA polymorphism. Polyclonal tissue consists of the cells of two populations: one with inactivation of maternal X-chromosome (X_m) and the other with inactivation of paternal X-chromosome (X_p). On the other hand, monoclonal tissue consists of the cells of single population where either maternally or paternally derived X-chromosome is inactivated. Since X-chromosome inactivation involves methylation of DNA, treatment by methylation-sensitive restriction enzyme, HpaII, breaks the activated X-chromosomes and subsequent PCR yields two DNA bands in case of polyclonal tissue and one DNA band in case of monoclonal tissue. Open rectangles represent inactive X-chromosomes.

의 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 최종 pH 8.2]와 10 μ l의 proteinase K (20 mg/ml)를 가하고 54°C에서 약 24시간 흔들며 주면서 단백을 분해시켰다. 단백 분해 후 포화 식염수 100 μ l를 가하고 진탕 후 14,000 rpm으로 15분간 원침시켰다. 상층액에 2배 용적의 무수 ethanol을 가하고 -20°C에서 약 12시간 유지하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 14,000 rpm으로 15분간 원침시켜 분리하고 75% ethanol로 씻어 건조한 후에 100 μ l의 증류수에 용해시켰다.

4) 제한효소 단절

추출한 DNA 중에서 1 μ g을 취하여 *HpaII* (Boeinger-Mannheim) 20 U를 가하고 37°C에서 12시간 동안 작용시켰다. 대조 목적으로 나머지 DNA 중 1 μ g을 취하여 *HpaII* 대신에 증류수를 넣어 같은 방법으로 처리하였다.

5) 연쇄증합반응

Sense primer와 antisense primer는 *HpaII*의 절단부위와 CAG 반복서열을 포함하게끔 결정하였으며 그 염기서열은 다음과 같다.

5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3': Sense primer
5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3': Antisense primer

이 primer set를 이용하여 연쇄증합반응을 일으키면 *HpaII*에 의해 단절되지 않은 경우, HUMARA 유전자내

CAG의 반복횟수에 따라 255~315 bp 크기의 PCR 산물이 생성된다.

0.2 ml Eppendorf tube에 30 μ l의 PCR 반응 혼합물[PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 각 primer 30 pM, dNTP 250 μ M, template DNA 200 ng, DNA polymerase (DynaZyme, Finnzymes OY) 1.5 U]을 넣어 반응시켰다. PCR은 Perkin-Elmer 2400 증폭기를 이용하였으며, denaturation은 94°C에서 45초, annealing은 63°C에서 30초, extension은 72°C에서 30초씩 29회 반복하였다. 반응 종료 후 PCR 산물 15 μ l를 2.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 조사기로 관찰하여 PCR 산물을 확인하였다.

6) Polyacrylamide gel electrophoresis

7 M Urea를 함유하는 6% polyacrylamide gel에서 정압 850 V로 5시간 전기영동을 하였고 은염색법(13)으로 DNA의 band를 염색하였다.

결 과

연구대상 16예의 연령, 병리조직학적 등급, 그리고 클론성은 Table 1과 같다. 연령은 42세부터 72세 사이이었다. 병리조직학적으로 5예는 경도와 중등도의 이형성증 소견을 보였고, 8예는 중등도의 이형성증 소견을 보였으며, 3예는 대부분 중등도의 이형성증 소견을 보였으나 부분적

Table 1. Clinicopathological features and clonality of 16 cases of gastric dysplasia

Case	Age (yrs)	Grading	Clonality	Remarks
1	54	Moderate	P	
2	71	Moderate, Severe	P	
3	47	Moderate, Severe	P	Homozygosity/PCR bias
4	58	Moderate	P	Homozygosity/PCR bias
5	51	Moderate	P	
6	68	Moderate	P	
7	?	Moderate	P	Homozygosity/PCR bias
8	74	Moderate	M	
9	67	Mild, Moderate	M	
10	42	Moderate, Severe	P	
11	78	Moderate	P	
12	59	Moderate	Skewed	
13	47	Mild, Moderate	P	
14	54	Mild, Moderate	P	
15	42	Mild, Moderate	P	
16	67	Mild, Moderate	P	

P = polyclonal; M = monoclonal.

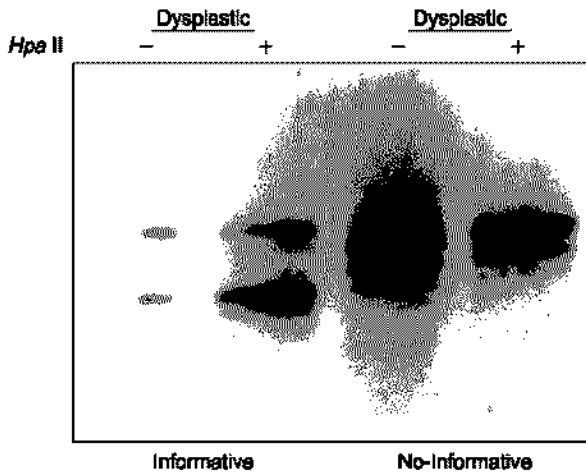


Fig. 2. Comparison of informative and noninformative case. An informative case shows two discrete bands of PCR products regardless of *HpaII* digestion, whereas a noninformative case shows a single band. Also noted are shadow bands near the main bands due to slippage of DNA polymerase. *HpaII* - denotes PCR products without enzyme pretreatment and *HpaII* + does PCR products with enzyme pretreatment.

으로 심한 이형성증이 동반되었다. 16예 중 8예에서는 이형성증 조직만을 검색대상으로 하였고(Case 1~8), 8예에서는 이형성증 조직과 주위의 비이형성증 조직을 구분하여 검색대상으로 하였다(Case 9~16).

PCR 산물은 16예 중 13예에서 뚜렷한 2개의 band를 보였고 각 band의 density는 비슷하여 informative case의 비율은 약 81%이었다. 3예는 *HpaII*로 전처리하지 않은 PCR 산물에서도 하나의 뚜렷한 band와 매우 약한 band를 보여 동형접합성(homozygosity) 또는 PCR bias(Mutter와 Boynton 1995)로 생각되었으며 noninformative case이었다(Fig. 2). PCR 산물은 진한 band와 함께 매우 약한 band가 1~2개 관찰되었으며 STR을 포함한 DNA를 증폭할 때 출현하는 slippage (14)라고 해석되었다. 비이형성증 조직에서부터 추출한 DNA를 대상으로 하였을 때 *HpaII*로 전처리하지 않은 PCR 산물의 density는 일반적으로 *HpaII*로 전처리한 PCR 산물의 density보다 진하였으나 PCR 시행시 각 sample이 들어있는 tube내 target DNA의 양을 일정하게 할 수 없어 *HpaII*로 전처리한 PCR 산물의 density가 *HpaII*로 전처리하지 않은 PCR 산물의 density보다 더 진한 경우도 있었다. 그러나 informative case의 경우, 비이형성증 조직의 DNA는 *HpaII*의 전처리에 관계없이 각 lane에 출현하는 두 개의 band의 진하기가 비슷하여 클론성을 비교할 수 있었다.

13예의 informative case중 1예에서는 비이형성증 조직에서부터 추출한 DNA를 *HpaII*로 전처리한 후 증폭하였을

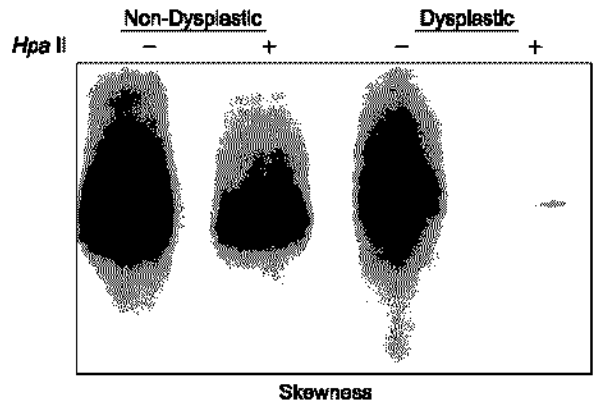


Fig. 3. Skewed lyonization (Case 12). PCR products of DNA extracted from the nondysplastic tissue show two discrete bands without *HpaII* pretreatment but one band with *HpaII* pretreatment. Monoclonal band pattern of PCR products of DNA extracted from the dysplastic tissue can be due to non-random methylation, rendering the case equivocal in clonality.

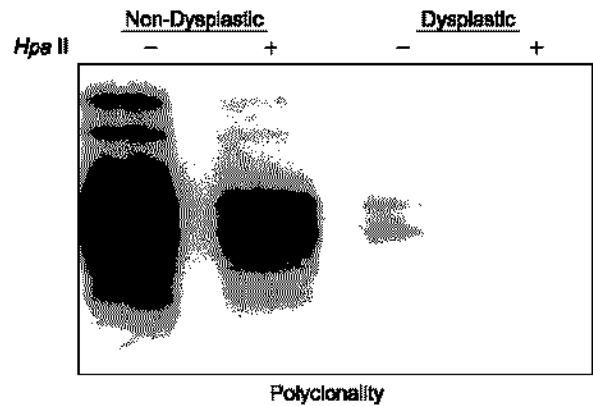


Fig. 4. The polyclonal band pattern (Case 13). The two main bands of PCR products with *HpaII* pretreatment have densities similar to each other as those without *HpaII* pretreatment.

때 두 개의 band중 한 band의 density가 크게 낮아져 skewness를 보였다(Case 12, Fig. 3). 따라서 연구대상 16예 중 3예는 noninformative case이었고 1예는 skewed lyonization을 보여 12예에서만 클론성의 검토가 가능하였다.

이형성증 조직에서 추출한 DNA를 증폭하였을 때 *HpaII*의 전처리에 관계없이 각 lane에 출현하는 두 개의 band의 density가 비슷한 다클론성의 예는 10예이었다(Fig. 4). 이형성증 조직의 DNA를 *HpaII*로 전처리한 후 증폭하였을 때 두 개 band중 한 개가 band의 density가 뚜렷하게 낮아져서 단클론성의 band 형태를 보여준 예는 2예이었다(Case 8, 9; Fig. 5). 그중 1예는 비이형성증 조직을 얻을 수

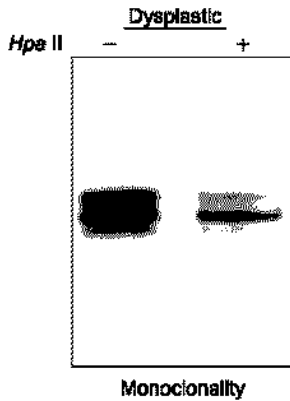


Fig. 5. Monoclonal band pattern (Case 8). The two bands of PCR products without *Hpa*II pretreatment have densities similar to each other, whereas one of the two bands of the PCR products has a decreased density by *Hpa*II pretreatment.

없어 skewed lyonization의 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다.

단클론성과 다클론성의 band 형태를 보이는 이형성증 병변을 후향적으로 재검토하였으나 임상 및 병리조직학적 소견상 차이를 인정하기 어려웠다.

고 찰

조직의 단클론성은 일반적으로 종양성 증식을 의미하며 따라서 증식성 조직의 클론성은 종양발생을 구명하기 위한 방법으로 꾸준히 연구되어 왔다. 특히 악성종양의 전단계 병변으로 간주되고 있는 병변의 종양성은 악성화의 빈도와도 관련될 것이므로 병변의 클론성을 조사함으로써 전암단계 병변의 생물학적 양태를 추정할 수 있을 것으로 생각한다.

전통적으로 조직의 클론성은 핵형(karyotype)을 조사하여 공통적인 염색체 이상을 관찰하는 방법이 이용되어 왔으나 핵형의 조사에는 많은 노력이 들고 결과가 뚜렷하지 않아 실제적이라고 보기 어렵다. 근래에는 전통적인 핵형의 조사 대신에 FISH (fluorescent *in situ* hybridization)에 의한 염색체 이상을 관찰함으로써 클론성을 검색하기도 하나 이 방법도 대체로 신선한 표본을 필요로 하고 적용 범위가 제한되어 있다는 점에서 역시 실제적이라고 보기 어렵다. 이러한 이유 때문에 최근에는 분자생물학적 기법에 의한 클론성 조사가 모색되고 있으며 그중 X 염색체가 가지는 다형성의 검색이 많이 이용되고 있다.

X 염색체의 다형성은 X_m 과 X_p 의 유전자 또는 유전자 산물을 조사함으로써 알 수 있다. 유전자 산물로는 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)의 동위효소(isoenzyme)를 들 수 있으나 G6PD의 동위효소를 조사하기 위

해서는 신선한 조직을 필요로 하며, 모성 또는 부성의 G6PD 동위효소는 같은 경우가 많으므로 유용성이 떨어진 다. 이에 비하여 X 염색체의 유전자중 X_m 과 X_p 에서의 분자구조가 다른 유전자는 다형성을 검색하기 위한 분자생물학적 표지자로 이용될 수 있다. X 염색체의 다형성을 검색하기 위한 분자생물학적 표지자의 유용성은 특정 인구 집단에서 X_m 과 X_p 사이에 차이를 보이는 빈도가 높아야 하고(즉, 이형접합성-heterozygosity-을 보이는 informative case가 많아야 하고), 검색 방법이 비교적 단순하여야 한다. 그와 같은 유전자로는 phosphoglycerokinase (PGK)나 hypoxanthinephosphoribosyl transferase (HPRT),(15) 그리고 최근에 보고된 human androgen receptor (HUMARA)를 들 수 있다.(16-17)

HUMARA 유전자내의 CAG 반복횟수가 X_m 과 X_p 에서 같은 동형접합성 상태의 noninformative case도 있을 수 있으나 서구에서의 연구에 의하면 그 빈도가 10% 이하로 낮다고 보고되어 있어서 HUMARA 유전자의 다형성에 의한 클론성의 검색이 최근에 활발하게 검토되고 있다. 본 연구에서는 16예 중 3예인 약 20%에서 noninformative case가 관찰되어 서구에서보다는 높은 빈도를 보였다. 이와 같은 차이가 민족간의 차이를 의미하는지는 더 많은 예를 대상으로 조사하여보면 알 수 있겠으나 HUMARA 유전자의 다형성은 PGK나 HPRT 유전자의 다형성보다 더 크다고 볼 수 있었다. Noninformative case는 동형접합성 때문으로 알려져 있으나 HUMARA와 같이 GC (guanine-cytosine) 서열이 많은 염기서열의 중폭시에는 한가지 대립인자(allele)의 중폭이 주로 일어나는 PCR bias 때문에 noninformative case가 발생할 수 있다고 보고되어 있다.(18)

지금까지 HUMARA 유전자를 포함하여 X-연관 다형성을 이용한 클론성의 검색은 주로 신선 조직에서 추출한 DNA를 대상으로 하고 있다. 그러나 파라핀에 포매된 조직에서 추출한 DNA를 대상으로 할 경우 후향적 연구가 가능하게 되어 유용성이 크게 증가한다. 본 연구에서는 PCR 산물의 크기가 255~315 bp 사이가 되도록 primer set를 결정하여 파라핀에 포매된 조직에서도 클론성의 검색이 가능하도록 하였으며 연구대상 16예 모두에서 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

개체에 따라서는 생리적인 X 염색체의 비활성화가 X_m 또는 X_p 의 어느 한쪽에 치우쳐 일어나는 경우가 드물지만 있다(skewed lyonization). 이런 경우에는 X 염색체의 비활성화 패턴에 의해 클론성을 검색하는 것이 불가능하다. 이런 이유로도 동일환자에서 종양조직과 함께 비종양조직을 대조검색하는 것이 필요하다. 본 연구에서 이형성증 조직과 비이형성증 조직을 함께 검색한 8예 중 1예에서 skewed lyonization을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 noninformative case 3예와 skewed lyonization을 보인 1예를 제외한 12예 중 10예가 다클론성의

band 패턴을 보였으며 2예가 단클론성의 band 패턴을 보였다. 단클론성의 band 패턴을 보인 2예 중 1예는 이형성증 조직과 비이형성증 조직을 함께 검색한 예로서 단클론성 증식 병변이라고 인정할 수 있었으나 1예는 이형성증 조직만을 검색한 예로서 skewed lyonization의 가능성을 완전히 배제할 수 없어 단클론성 증식 병변이라고 단정하기는 어려웠다. 그러나 이와 같은 연구적저은 위 이형성증이 단클론성 또는 다클론성의 병변으로서 유전자 수준에서 보았을 때 병리조직학적으로 진단된 위 이형성증은 두가지의 이질적 증식 병변으로 구성되어 있다고 추정할 수 있을 것이다.

위장관 암종의 전단계 병변에 대한 클론성은 주로 대장의 선종을 대상으로 연구되어 있으나 단클론성(19) 또는 다클론성(20) 등 이견이 있다. 이와 같은 이견은 클론성을 검색하는 방법의 차이 때문이라고 생각된다. 클론성은 증양의 발생과정을 유추하는데 중요하므로 본 연구에서와 같이 최근의 분자생물학적 기법을 포함한 몇 가지 방법으로 클론성을 비교 검토할 필요가 있다.

백서 장관 점막에서 각각의 선구조는 태생기에는 다클론성의 상피세포로 구성되어 있으나 출생 2주 후에는 하나의 간세포(stem cell)에서부터 유래한 단클론성의 상피세포로 대체된다.(21) 사람의 장관 점막에서도 각각의 선구조는 단클론성의 상피세포로 구성되어 있다.(20) 선상피세포의 단클론성은 노화(22)나 돌연변이 유발물질의 투여(23)에 의해 다클론성으로 바뀔 수 있다. 따라서 위 이형성증의 다클론성이 각각의 선구조에 따라서는 어떤 클론성을 갖는지 microdissection을 하여 조사할 필요가 있을 것이다.

위암종은 우리 나라에서 가장 높은 발현 빈도를 보이는 악성 종양이며, 병리학적으로는 흔히 장형과 미만형으로 구분된다.(24) 우리 나라를 포함하여 위암종이 빈발하는 지역에서는 장형 위암종이 많다. 따라서 장형 위암종은 환경적 요인에 의해 발생하는 것으로 생각되며 그 원인과 전단계 병변(precancerous lesion)에 대해서 국내외의 많은 연구보고를 볼 수 있다. 장형 위암종의 전단계 병변으로는 장형화생,(25,26) 위축성 위염,(27) 선종,(28,29) 그리고 이형성증(30) 등이 알려져 있다. 이 중에서도 대장 선종이나 자궁 경부의 이형성증이 암종의 전단계 병변으로 인식됨에 따라 위에서도 선종 또는 이형성증이 위암종의 전단계 병변일 가능성이 제시되고 있다. 그러나 위의 선종 또는 이형성증으로부터 위암종에 이르는 과정은 아직도 불분명하다. 따라서 본 연구에서처럼 위암종의 전단계 병변이 단클론성의 종양성 병변인지의 여부부터 구명할 필요가 있다.

본 연구에서와 같이 병변의 클론성을 검색하는 것은 위의 이형성증 외에 여러 가지 악성종양의 전단계 병변에서도 중요한 의미를 가지므로 널리 활용될 수 있을 것이다.

또한 다발성 종양이 발생하는 경우나 선천성 종양이 발생하는 경우에도 병변의 클론성을 검색함으로써 종양발생 과정을 구명하는데 도움을 줄 것이다.

결 론

위의 이형성 상피병변인 dysplasia 또는 flat adenoma는 위암종의 전단계 병변으로 간주되고 있으나 위의 이형성증이 어느 정도의 빈도로 어떤 단계를 거쳐 암종으로 진행되는지는 아직도 분명하지 않다. 이 연구는 위 이형성증이 종양성 병변인지 아닌지를 추정하기 위하여 이형성증 병변의 클론성을 HUMARA 유전자의 X-연관 다형성을 이용하여 조사하였다. 여성에서 병리조직학적으로 dysplasia 또는 flat adenoma로 진단된 연속 16예의 파라핀 조직으로부터 DNA를 추출하였다. 추출한 일부 DNA는 methylation-sensitive restriction enzyme인 HpaII로 처리하지 않고 HUMARA 유전자를 증폭하였고, 일부 DNA는 HpaII로 처리한 후 증폭하였다. 증폭산물을 polyacrylamide gel에 전기영동시킨 후 은염색하여 band의 다형성을 관찰하였다. 대조목적으로 8예에서는 이형성증 병변 주위의 정상 또는 염증성 병변 조직을 같은 방법으로 관찰하였다. 위의 이형성증 16예 중 3예는 noninformative case이었고 13예는 informative case이었다. Informative case 13예 중 1예는 skewness를 보여 클론성을 확인하기 어려웠다. 12예 중에서 단클론성의 band 형태를 보인 예는 2예이었으며 10예는 다클론성의 band 형태를 보였다. 단클론성을 보인 이형성증 증예와 다클론성을 보인 이형성증의 증예, 그리고 skewness를 보인 증예 사이에서 병리조직학적 차이를 인정하기 어려웠다. 이상의 성격으로 위의 이형성증은 단클론성 또는 다클론성을 보여 유전자 수준에서 보았을 때 서로 다른 질환이 혼합된 이질적 질환군임을 알 수 있었고, 위 이형성증의 많은 경우는 비종양성 병변일 것으로 추정되었다.

REFERENCES

1. Baker SJ, Fearon ER, Nigro M, et al. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221.
2. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990;50:7717-7722.
3. Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52:3965-3971.
4. Sakurai S, Sano T, Nakajima T. Clinicopathological and

- molecular biological studies of gastric adenomas with special reference to p53 abnormality. *Pathol Int* 1995;45:51-57.
5. Hirota T, Okada T, Itabashi M, et al. Histogenesis of human gastric cancer with special reference to the significance of adenoma as a precancerous lesion. In: Ming SC, ed. Precursors of gastric cancer. New York: Prager Co, 1984;233-252.
 6. Juhng SW, Park DH, Lee JS, Cho KH. An image analytical study on the structural spectrum of intestinal metaplasia-dysplasia-carcinoma of the stomach. *Korean J Pathol* 1993; 27:50-57.
 7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model of colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
 8. Kim TD. Genotyping and phenotyping of p53 mutation in dysplastic epithelial lesions of the stomach. Doctoral Thesis, Chonnam University Graduate School, 1996.
 9. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 1972;47:1-35.
 10. Lyon MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1989;36:119-130.
 11. Tilley WD, Marcell M, Wilson JD, Michael JM. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:327-331.
 12. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM. Methylation *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Genet* 1992;51:1229-1239.
 13. Bassam BJ, Anolles GC, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991;196:80-83.
 14. Mutter GL, Boynton KA. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1411-1418.
 15. Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20:211-215.
 16. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin human tumors. *Science* 1985;227:642-645.
 17. Busque L, Zhu J, DeHart D, Griffith B, Willman C, Carroll R. An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Res* 1994;22:697-698.
 18. Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE. Langerhans' cell histiocytosis (histiocytosis X) - a clonal proliferative disease. *N Engl J Med* 1994;21:154-160.
 19. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-197.
 20. Novelli MR, Williamson JA, Tomlinson IPM, et al. Polyclonal origin of adenomas in an XO/XY patient with FAP. *Science* 1996;272:1187-1190.
 21. Schmidt GH, Winton DJ, Ponder BA. Development of the pattern of cell renewal in the crypt-villus unit of chimaeric mouse small intestine. *Development* 1988;103:785-790.
 22. Fuller CE, Davies RP, Williams GT, Williams ED. Crypt restricted heterogeneity of goblet cell mucus glycoprotein in histologically normal human colonic mucosa: A potential marker of somatic mutation. *Br J Cancer* 1990;61:382-387.
 23. Williams ED, Lowes AP, Williams D, Williams GT. A stem cell niche theory of intestinal crypt maintenance based on a study of somatic mutation in colonic mucosa. *Am J Pathol* 1992;141:773-776.
 24. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and the so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
 25. Jass JR. Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1980;33:801-810.
 26. Lei D-N, Yu J-Y. Types of mucosal metaplasia in relation to the histogenesis of gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108:220-224.
 27. Imai T, Kubo T, Watanabe H. Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1971;47:179-195.
 28. Kamiya T, Morishita T, Asakura H, Miura S, Munakata Y, Tsuchiya M. Long-term follow-up study of gastric adenoma and its relation to gastric carcinoma. *Cancer* 1982;50: 2496-2503.
 29. Hirota T, Itabashi M, Takizawa C, Kim BK, Fujimoto T. Clinicopathological characteristics of gastric adenoma and its significance as a precancerous lesion. I to Cho 1987;22:657-884.
 30. Ming S-C, Bajitai A, Correa P, et al. Significance and pathologic criteria. *Cancer* 1984;54:1794-1801.