

위암에서 E-cadherin과 β -catenin 발현과 유전자 돌연변이에 관한 연구

고려대학교 의과대학 병리학교실

김광일 · 박성혜 · 한선애 · 채양석 · 김인선

E-cadherin and β -catenin Expression and Mutation in Gastric Carcinomas

Kwang Il Kim, M.D., Sung-Hye Park, M.D., Sun-Ae Han, M.D., Yang-Seok Chae, M.D. and Insun Kim, M.D.

Department of Pathology, Korea University Medical College, Seoul, Korea

Purpose: When cancer cells invade the stroma, they should be dissociated from the adjacent cells at first. E-cadherin and β -catenin constitute an important protein complex associated with cellular adhesion, development, and differentiation, especially in epithelial cells. The role of E-cadherin and β -catenin in gastric carcinogenesis were studied.

Materials and Methods: The expression of E-cadherin and β -catenin in gastric adenocarcinomas by using immunohistochemical staining and the mutation by using polymerase chain reaction- single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) and sequencing were performed in 40 adenocarcinomas and 5 dysplasia of stomach. Thirteen cases, which had lymph node metastasis, were also included for immunohistochemical staining.

Results: Inappropriate cytoplasmic and/or nuclear expression of a E-cadherin- β -catenin complex was more frequent in poorly differentiated, diffuse type signet ring cell carcinomas than in well-differentiated, intestinal type adenocarcinomas ($P < 0.05$). However, the expression was not related with clinical stage or lymph node metastasis. Mutation of E-cadherin was detected in 4 cases by using PCR-SSCP, whereas mutation of β -catenin was detected in 2 cases.

Conclusion: E-cadherin and β -catenin seem to be important in gastric carcinogenesis, especially in poorly differentiated diffuse type. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2001;1: 202-209)

Key Words: Gastric carcinoma, E-cadherin, β -catenin, Immunohistochemistry

중심 단어: 위암, E-cadherin, β -catenin, 면역조직화학 염색

서 론

위선암은 우리 나라 남자에 발생하는 암종 중 가장 높은 빈도를 차지하고 있다. 위암의 예후를 결정하는 가장 중요한 인자는 TNM병기이고 다음이 조직학적 유형인데, 그 중 임상병기는 종양의 침윤도와 림프절 및 원격 전이 여부에 따라 결정된다. 위선암의 조직학적 분화도는 분류법에 따라 차이가 있지만 WHO 분류에 의한 인환세포형(signet ring cell type), Lauren 분류법의 미만형(diffuse type), 그리고 Ming 분류법의 침윤형(infiltrative type)이 일반적으로 예후가 나쁘며,(1,2) Goseki 등은 점액분비가 많은 경우에 예후가 더 나쁜 것으로 보고하였다.(3) 종양세포 특히 상피세포암의 세포들이 전이하기 위해서는 종양세포들은 개개의 세포로 분리되어야 침윤하기가 용이하고, 이는 세포성장과 관련된 성질로 잘 알려져왔다.(4,5) 이 과정에서 가장 중요한 기전은 cadherin family에 의한 세포 사이의 결합조절이다. Cadherin은 칼슘이온 의존성이 있는 고착물질(adhesion molecule)로서 같은 cadherin끼리 동종 결합하는 성질을 가지고 있다.(6)

Cadherin 중 상피세포에 존재하는 E-cadherin은 세포질 안에 있는 catenin과 복합체를 이루어 zonula adherens를 이루고 actin과 결합함으로써 여러 세포들이 특정 구조를 유지할 수 있게 한다.(7) 이들 고착물질의 결합은 암의 분화도와 침윤성과 잘 연관된다는 사실이 알려져 E-cadherin은 침윤 억제인자로서의 기능을 갖고 있다고 간주한다.(8-10)

Catenin은 α , β , γ 세 종류가 있고, 이 중 β -catenin은 E-cadherin과 직접 결합하여 α -catenin이 세포골격과 결합하도록 매개하는데,(11,12) 만일 β -catenin에 변이가 생기면 E-cadherin- β -catenin- α -catenin 결합에 이상이 생겨 상피세포의 극성을 상실하게 된다.(13) 더욱이 β -catenin은

책임저자 : 김인선, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
고려대학교 의과대학 병리학교실, 136-701
Tel: 02-920-6373, Fax: 02-923-1340
E-mail : iskim@korea.ac.kr

이 연구는 KRF-98-021-F00136-F-0415에 의해 이루어졌음.
접수일 : 2001년 9월 13일, 게재승인일 : 2001년 12월 10일

wingless (wnt) 신호전달체계에 관여하여 T-cell factor (Tcf)-lymphoid enhancer factor (Lcf) family와 결합하여 c-myc과 cyclinD1을 활성화시켜 세포 증식에 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되었다.(14-16) 또한 β -catenin의 기능은 APC 유전자와 GSK3 β 복합체에 의해 인산화되어 소실되지만 APC유전자나 β -catenin의 돌연변이는 이를 방해하여 세포 질이나 핵 내에 β -catenin이 축적되면 면역효소염색으로 검출이 가능하게된다.(17)

Cadherin과 catenin에 대한 연구는 대장, 유방, 난소, 위, 식도, 췌장, 전립선 등에 발생한 상피세포 암종에서 이들 단백질의 발현양상과 돌연변이에 대한 연구가 있고,(18-21) 국내에서도 위암을 비롯한 몇몇 암종에서 E-cadherin과 β -catenin의 변화에 대한 연구가 있으며,(22-25) Park 등은 특히 β -catenin의 돌연변이가 장형에서만 관찰된다는 사실을 보고하면서 위암의 미만형과 장형의 발생에서 β -catenin의 작용기전이 서로 다를 것이라는 사실을 보고한 바 있다.(26) 그러나 조직학적 유형과 림프절 전이에 따른 두 유전자의 발현과 돌연변이에 대한 연구는 별로 없는 실정으로 저자들은 한국인에서 가장 흔히 발생하는 위선암에서 E-cadherin과 β -catenin에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 임상병기와 조직학적 분화도에 따른 발현양상의 차이와 원발 병소와 전이 병소에서의 발현양상을 비교 검토하고, 파라핀 포매조직에서 종양 세포를 선택적으로 미세 박절하여 변이 양상을 분석함으로써 이들의 발현이 상피암종의 분화와 전이 과정에 관여하는지 알아보고자 하였다.

방 법

1) 연구 재료

1994년 10월부터 1997년 12월까지 고려대학교 의료원에 입원하여 위선암으로 진단을 받아 절제되었던 검체의 슬라이드를 재검토하여, 병변의 대표성을 갖고 종양과 정상 혹은 만성 위축성 위염의 소견을 보이는 점막이 함께 있는 40예와 위 내시경과 점막 절제술을 통해 위 점막 이행성증으로 진단 받은 5예의 파라핀 블록을 선택하였다. 수술 당시 또는 치료 도중에 제거되었던 13예의 전이 림프절의 파라핀 포매 조직도 본 연구에 포함하였다.

2) 연구 방법

(1) 조직학적 분류: 원발성 병변은 Lauren 분류법(27)에 따라 장형(intestinal type)과 미만형(diffuse type)으로 분류하고, 장형은 다시 고 분화, 중등도 분화, 저 분화 암으로 세분하였다. 또한, 암 종양의 침윤 정도에 따라 점막하층까지 침윤한 군, 장막하층까지 침윤한 군, 장막층 이상 침윤한 군으로 나누었고, 전이가 있는 군과 없는 군을 구분하였다.

전체 40예의 위선암 중 장형 29예는 고 분화암종 7예, 중등도 분화암종 8예, 저 분화암 종 14예였고, 미만형 암으로 분류된 예는 11예였다. 침윤 정도에 따른 분류에는 조기위암이 23예, 고유 근육 층 이상 침윤한 예가 17예였다. 림프절 전이가 있는 예는 13예였으며, 이중 조기위암이 5예, 진행성 위암이 8예였다.

(2) 면역조직화학 염색: 절제되어 통상적인 과정을 거쳐 진단된 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 절편하여 탈파라핀과 합수 과정을 거쳐 증류수로 수세하였다. 3% 과산화수소수로 10분간 처리하고 Tris완충 용액(pH 7.4)으로 씻어 낸 다음 citrate 완충 용액(pH 6.0)을 압력솥에 넣고 충분히 압력이 오를 때까지 끓인 후 슬라이드를 넣고 2분간 가열하였다. E-cadherin (Zymed, San Francisco, CA)과 β -catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY)에 대한 항체를 각각 1 : 100과 1 : 120으로 희석하여 첨가하고, 1시간 동안 반응시켰다.

Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) Kit (Dako A/S, Copenhagen, Denmark)를 이용하여 biotinylated anti-mouse antibody와 Streptavidin-peroxidase 용액을 차례로 15분씩 반응시키고 Tris 완충액으로 씻은 다음 H₂O₂-3,3'-diaminobenzidine 용액으로 발색하고 Harris hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(3) 면역조직화학염색의 판정: 정상 대조군으로 위암 주변의 종양이 없는, 비교적 정상에 가까운 상피세포 부위를 이용하여 정상 위 점막 상피세포와 같은 막 염색성을 보이는 경우를 정상으로 하고 세포질 염색이나 핵 염색을 보이거나 염색이 소실된 경우를 이상 발현으로 간주하였다. 림프절 전이가 있는 증례들은 원발 병소의 면역염색 양상을 비교하였다. 면역염색 양상은 세포막 염색성을 소실한 정도에 따라 90% 이상의 세포들이 정상 상피세포와 같은 막 염색성을 보이는 경우만을 양성으로 하고 막 염색성이 90% 미만인 경우와 세포질이나 핵에 염색된 경우를 이상 발현으로 간주하였다.

(4) 종양세포 미세 박절과 DNA 추출: 통상적인 방법으로 포르말린 고정, 파라핀 포매된 조직을 6 μ m 두께의 연속절편으로 만들어 H&E염색을 하되 cover slide를 덮지 않았다. 이 슬라이드를 2% glycerol 용액에 2분간 담가두었다가 꺼내어 슬라이드의 바닥을 닦은 후 현미경하에서 저배율로 관찰하면서 29 G 세침을 이용하여 정상조직과 종양조직으로 나누어 미세 박절을 하였다. 슬라이드로부터 미세 박절해낸 정상조직과 종양조직을 각각 DNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% Tween 20, 0.1 mg/ml proteinase K)가 들어있는 1.5 ml Eppendorf tube에 넣은 후, 52°C water bath 에서 2일 동안 방치 시켰다. 반응이 끝난 시료는 끓는 물에 10분간 방치하여 proteinase K의 반응을 불활성화 시킨 후, spectrophotometer로 DNA농도를 측정한다. 다음 -20°C에 보관하였다.

(5) PCR-SSCP를 이용한 변이 관찰: E-cadherin과 β -

catenin에 대한 PCR을 위해 DNA 200ng을 template로 사용하여 0.2 mM dNTP, 10×buffer, 10 pmols/μl primer, 1.25 U Taq polymerase 및 10μM의 primer를 가하여 25μl 되게 한 후, PCR thermal cycler (Perkin Elmer 2400)을 사용하여 E-cadherin의 경우 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 반응을 40회 반복하였고, β-catenin의 경우 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초의 반응을 역시 40회 반복하여 PCR을 수행하였다. β-catenin의 경우는 nested PCR을 시행하였다. E-cadherin의 primer는 exon 6, 7, 8, 9를 사용하였고, β-catenin은 exon 3을 사용하였다. 각 primer들에 대한 염기 서열은 Table 1과 같다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

4μl의 PCR 산물과 formamide loading dye (95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.05% bromphenol blue, and 0.05% xylene cyanol) 4μl를 취해 98°C에서 3분간 끓여 불활성화 시킨 후, 얼음으로 급히 냉각시킨 다음, 12% polyacrylamide gel (30% acrylamide stock, 0.5×TBE)에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 은 염색을 하였다. 은 염색을 위해서 먼저 10% ethanol로 10분간 고정시킨 후, gel을 1% nitric acid에서 3분간 담근 다음 증류수로 신속히 세척하였다. 다시 0.2% silver nitrate 용액에서 20분간 반응시킨 후, 발색용액(0.28 M sodium carbonate, 0.019% formaldehyde)에서 band가 뚜렷이 보일 때까지 반응시킨 후 10% glacial acetic acid로 반응을 중지시켰다. 양성 대조군으로는 정상인의 백혈구에서 분리한 DNA를 시료로 하여 PCR을 시행하였고 SSCP band 양상을 비교하여 유전자변이 여부를 검색하였다.

Table 1. Primer sequences of E-cadherin and β-catenin for PCR-SSCP

Primers	Sequence (5'-3')
E-cadherin for PCR	
Exon 6 Forward	TCCTCATCAGAGCTCAAGTC
Reverse	GGGTCCAAGAACCTAAGAG
Exon 7 Forward	TGCCAGTCCCAAAGTGCAG
Reverse	TCCACACCCTCTGGATCCTC
Exon 8 Forward	AGGTGGCTAGTGTTCCTGG
Reverse	CCTTTCTTTGGAAACCCTCTAA
Exon 9 Forward	GACACATCTCTTGCTCTGC
Reverse	GGACAAGGGTATGAACAGCT
β-catenin for nested PCR	
Exon 3 1st Forward	TTCAATGGGTACACAGATTC
1st Reverse	CTAACTTTTGTAGTTCAAAGTGC
2nd Forward	TCTACTAATGCTAATACTGTTTCG
2nd Reverse	ATTCTGACTTTCAGTAAGGCAATG

SSCP = single strand conformation polymorphism.

(6) 염기서열 분석: PCR을 통해 얻어진 DNA는 재증폭과 정제 과정을 거쳐 자동분석기(Autoassembler 1.0, Perkin Elmer, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 결정하였고, 분석은 DNA-star 프로그램(Madison, Wisconsin, U.S.A.)을 사용하였다.

(7) 통계분석: E-cadherin과 β-catenin의 발현 양상과 조직학적 분화도, 침윤정도, 림프절 전이 여부와의 상관성은 chi-square test와 Spearman 상관계수를 이용하였고 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의하다고 보았다.

결 과

1) E-cadherin과 β-catenin에 대한 면역조직화학 염색

정상 점막 상피세포에서 E-cadherin 과 β-catenin은 모두 세포의 측면과 기저부를 따라 막성으로 강하게 염색되었고, 내강 쪽에 가까운 부분은 상대적으로 약한 염색성을

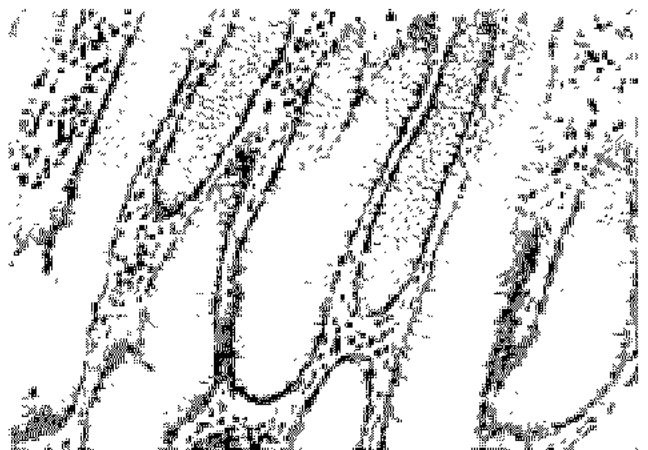


Fig. 1. Membranous staining of E-cadherin in the normal gastric epithelial cells (ABC stain, ×200).

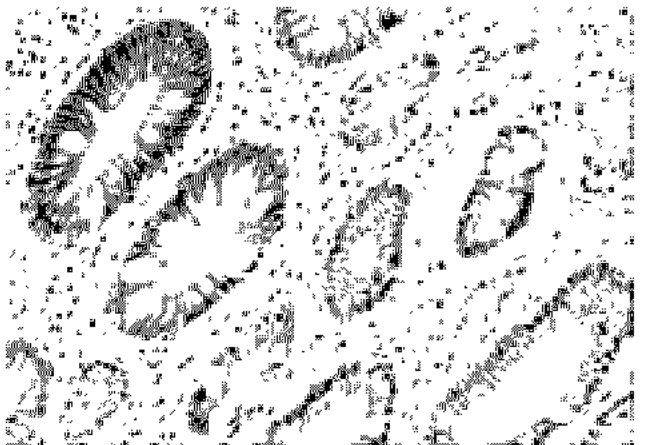


Fig. 2. Membranous staining of β-catenin in the normal gastric epithelial cells (ABC stain, ×200).

보였다(Fig. 1, 2). 이러한 염색성은 만성 위축성 위염이나 장형 화생 세포, 점막 이형성 조직에서도 같은 양상을 보였다. 주변 간질 세포나 혈관 등에서는 전혀 염색성을 보이지 않았다.

조직학적 분화도에 따른 염색성 비교는 Table 2와 같다. 장형 선암 중 7예의 고 분화 암종의 경우 E-cadherin은 5예에서, β -catenin은 전 예에서 정상 점막세포와 같은 막성 염색을 유지하였다(Fig. 3). 2예에서는 E-cadherin에 이상 염색 소견을 보였다. 8예의 중등도 분화 암종에서는 E-cadherin과 β -catenin에 대해 각각 3예(37.5%)와 2예(25.0%)에서 이상 염색성을 보였다. 14예의 저분화 암종 11예(78.6%)와 10예(71.4%)에서, 그리고 11예의 미만형 암종에서는 10예(90.9%)와 8예(72.7%)에서 각각 E-cadherin과 β -catenin에 대해 이상 염색성을 보였다. 이와 같이 조직학적 분화도에 따른 면역 염색성 변화에서 E-cadherin과 β -catenin 모두 장형보다는 미만형에서, 장형에서는 분화도가 나쁠

수록 세포막 염색성의 소실을 보였고 이는 통계학적으로 유의하였다($P < 0.05$). 어떤 증례에서는 분화도에 상관없이 세포질이나 핵에 이상 염색성을 보이는 것도 관찰되었는데, E-cadherin은 세포질 염색성을, β -catenin은 세포막이나 핵 염색성을 모두 보였다(Fig. 4). 특히 미만형 선암종을 구성하고 있는 인환세포(signet ring cell)들은 막 염색성이 유지된 것들부터 완전히 소실된 것까지 다양한 범위의 염색성을 보여 주었다(Fig. 5, 6). 일반적으로 한 종양 내에서도 분화도가 다른 선암 세포들은 서로 다른 염색성을 보였다.

종양의 침윤깊이에 따른 염색성의 차이는 Table 3과 같다. 23예의 조기위암 중 E-cadherin과 β -catenin에 대해 16예(69.6%)와 11예(47.8%)에서 이상 염색을 보였다. 10예의 진행성 위암의 경우에는 8예(47.1%)와 9예(52.9%)에서

Table 2. Abnormal expression of E-cadherin and β -catenin according to the histologic type

Tumor type	Total	E-cadherin (%)	β -catenin (%)
Intestinal	29	16 (55)	12 (41)
WD	7	2 (29)	0 (0)
MD	8	3 (38)	2 (25)
PD	14	11 (79)	10 (71)
Diffuse	11	10 (91)	8 (73)
p value		<0.05	<0.05

WD = well differentiated; MD = moderately differentiated, PD = poorly differentiated.

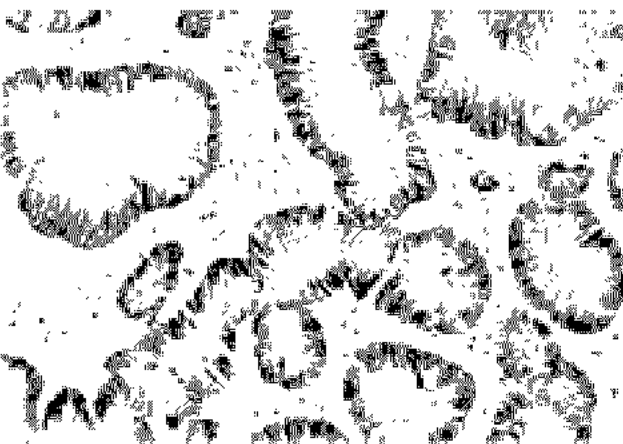


Fig. 3. The preserved membranous staining of E-cadherin in well differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC stain, $\times 200$).

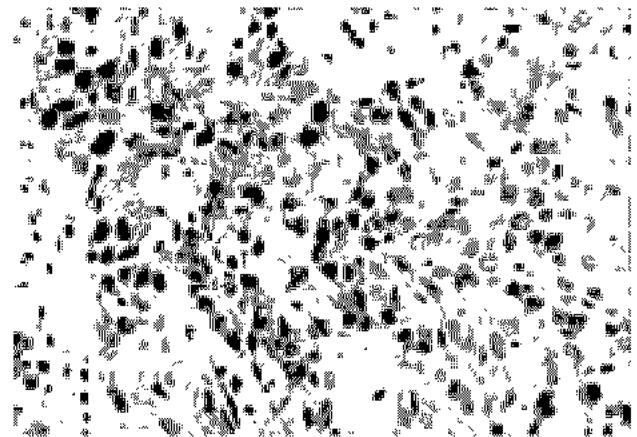


Fig. 4. Abnormal nuclear and cytoplasmic staining of β -catenin in poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach (ABC stain, $\times 400$).

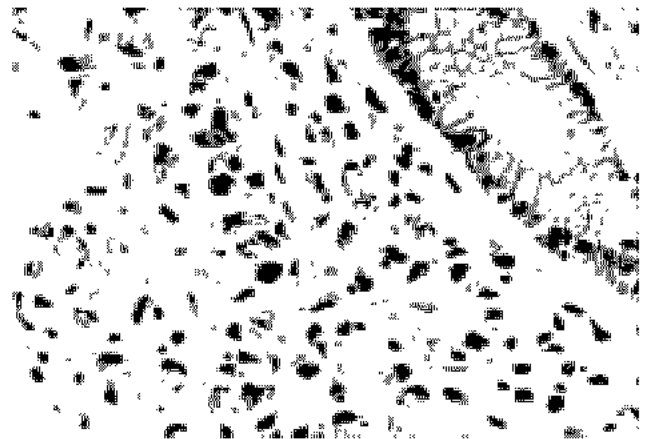


Fig. 5. The complete loss of E-cadherin expression in signet ring cells of diffuse type adenocarcinoma of the stomach (ABC stain, $\times 400$).

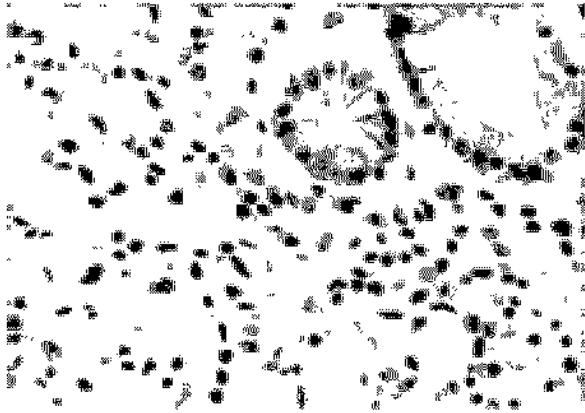


Fig. 6. The cytoplasmic dot-like staining of β -catenin in signet ring cells of diffuse type adenocarcinoma of the stomach (ABC stain, $\times 400$).

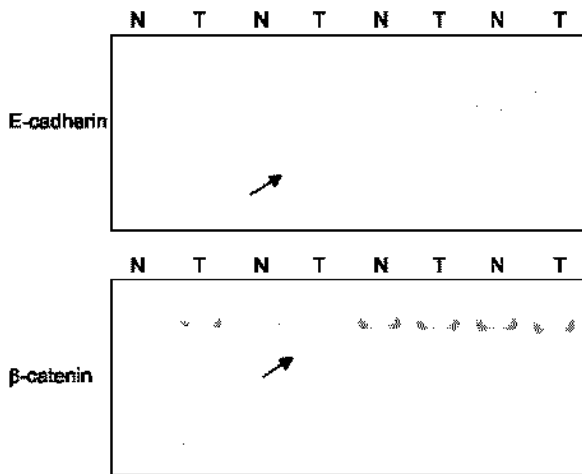


Fig. 7. Aberrant bands indicated by arrows represent mutational band for E-cadherin exon 6 (upper), and β -catenin exon 3 (lower) (PCR-SSCP with silver stain). N; Normal control tissue, T; Tumor tissue

각각 E-cadherin과 β -catenin에 대해 이상 염색성을 보여 통계학적으로 의의 있는 차이는 없었다.

40예의 위선암 중 림프절 전이가 있었던 경우는 13예였다. 림프절 전이가 있는 원발 종양사이의 염색성 차이, 그리고 같은 환자의 원발 병소와 전이 병소에서의 염색성 차이는 관찰되지 않았다($P > 0.05$).

2) E-cadherin과 β -catenin 유전자 돌연변이

유전자 돌연변이 검사는 위암의 40예와 이형중 5예에서 시행하였는데 E-cadherin은 exon 6, 7, 8, 9에 대한 돌연변이 검사 결과 위암의 4예에서 exon 6에서 비정상적인 띠가 관찰되었다(Fig. 7). 이들 중 2예는 인환세포형으로

Table 3. Abnormal expression of E-cadherin and β -catenin according to the invasion depth

Invasion depth	Total	E-cadherin (%)	β -catenin (%)
Mucosa or submucosa	23	16 (70)	11 (48)
More than muscle proper	17	8 (47)	9 (53)
p value		>0.05	>0.05

E-cadherin염색이 음성이었던 예였고, 2예는 중등도와 저분화도에 해당하였으며 염색성도 감소되기는 하였으나 완전 소실을 보이지는 않았다. β -catenin 유전자 exon 3에 대한 검사에서는 위암 2예에서만 비정상적인 띠가 관찰되었는데 1예는 인환 세포형이었고 다른 예는 저분화도의 선암으로 염색성이 음성이었다(Fig. 7). 그러나 양성인 예가 적어 통계적 의의는 검증할 수 없었다.

돌연변이를 보인 6예를 sequencing한 결과 E-cadherin에 이상을 보였던 4예 중 3예에서만 완전한 검사가 가능하였는데 이들은 2예에서는 deletion (AAC \rightarrow AVC, CTT \rightarrow CTV)을 보였고 1예에서는 deletion (CTT \rightarrow CTV)과 point mutation (CAG \rightarrow CAA)을 보였다.

고 찰

Cadherin과 catenin은 세포간 결합이나 세포골격 유지에 중요한 역할을 하는 물질로 그 동안 다양한 세포 암종에서 종양의 진행 정도와 이들의 발현 양상과의 상관 관계에 대한 연구가 있어왔다.(18-25) Cadherin의 기능을 억제하는 항체를 처리하면 침윤하지 않던 종양 세포들이 침윤하는 성질을 갖게된다는 사실로부터, cadherin이 암세포의 침윤을 억제하는 역할을 한다는 것을 알게 되었다.(8) Cadherin은 catenin과 복합체를 형성하고, 이는 다시 세포골격과 결합함으로써 태아 발생 과정에서 세포의 운동성에 관여하여, 세포의 이동과 세포의 모양을 형성하는 데 기여한다.(28)

본 연구에서 E-cadherin과 β -catenin 단백질의 발현은 암종의 분화가 나뉠수록 면역염색 정도가 감소함을 보였으며, 침윤정도가 깊을 수록 면역염색 양상이 감소하는 경향을 나타냈는데, 이는 이전의 연구에서 밝혀진 바와 같이 이상 단백질 생성에 의한 것으로 생각되고 있다.(10) 이상 단백질의 생성은 이 물질들의 유전자 변이나 이형결합형 소실 등에 의한 결과로 밝혀져 있으나, 다른 기전도 관여할 것으로 생각되고 있다. 예를 들면, Hepatocyte growth factor (HGF)나 Epidermal growth factor (EGF)와 같은 transmembrane protein tyrosine kinase에 대한 ligand들이, 세포에 cadherin이 발현되었다 하더라도 catenin과 같은 cadherin과 상호결

합하는 단백을 인산화 시킴으로써 기능을 상실시킬 수 있다는 것이다.(29)

E-cadherin 유전자는 16p22.1에 위치하며, 그 동안 다양한 변이와 이형접합성 소실이 보고되었다. 특히 미만형 혹은 인환세포 암종에서의 변이율이 높은 것을 볼 수 있는데, 결국 E-cadherin이 미만형 위 선암종의 형성에 깊이 관여하는 것으로 여겨진다.(30-32) 즉, 종양세포간의 결합력이 완전히 소실됨에 따라 선 모양의 조직학적 구조가 상실됨으로서 미만형이나 인환 세포와 같은 형태학적 특징을 보이게 된다고 해석된다. Muta 등(30)은 인환세포가 다형성이나 이형성의 정도가 약하므로 암발생의 초기단계에 관여할 것으로 생각하였다. 같은 실험에서 이들은 22예의 위암 증례 중 4예(18%)에서 변이를 관찰하였는데, 본 연구에서는 40예의 위암 미만형 11예 중 2예(18%)와 장형 29예 중 2예(7%)에서 돌연변이가 관찰되었는데 이는 기존의 서구의 빈도보다 낮다. Machado 등(31)은 26예의 위암 중 12예(46.2%)에서 15종의 E-cadherin 유전자 돌연변이를 발견하였다. 특히 장형에서는 돌연변이가 관찰되지 않았고 미만형 위암에서는 70%, 혼합형에서 83.3%를 보여 E-cadherin의 돌연변이가 미만형 위암종의 형태학적 특성과 관계된다는 사실을 보고하였다. Becker 등 (32)은 26예의 미만형 암종 중 50%, 혼합형의 14%에서 E-cadherin 유전자의 돌연변이를 보고하였으나, Stone 등 (33)은 10명의 가족성 위암환자와 96명의 비가족성 위암환자에서 E-cadherin 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않았다고 보고하여 위암의 발생기전에 관여하는 인자들이 좀 더 다양함을 시사하는 것으로 생각된다.

E-cadherin은 β -catenin과의 결합을 통해 세포골격 단백질과 연결되어 있기 때문에 세포막에서 β -catenin의 발현 여부는 각종 암종에서 예후와 관계있는 것으로 알려져 있다. 또한 β -catenin은 wnt signalling pathway에 관여하여 핵 전사에도 작용한다는 사실도 보고되었다.(34,35) 본 연구의 면역효소 염색에서 β -catenin이 선암 세포에서 세포질이나 핵에 염색성을 보인 점은 이상 단백질의 생성 결과라고 생각할 수 있겠다. 유사한 연구결과로 Valizadeh 등(36)이 대장에 생긴 선종성 용종에서 β -catenin이 세포질과 핵에 염색이 되는 것을 보고하면서, 이는 변이된 APC단백의 존재와 관련이 있다고 하였다. 결론적으로 cadherin이 정상적인 기능을 상실함에 따라 종양의 증식과 진행이 용이하게 되는데, 이는 cadherin 단백질이 세포막에 삽입되지 못하고 세포질에 존재하면서 β -catenin과 결합하지 못하게 되면 β -catenin은 대신 Tcf와 Lef-1과 같은 전사요소에 작용하여 신호전달체계에 관여하기 위해 핵으로 이동한다고 해석할 수 있다. 본 연구 결과 β -catenin이 세포질이나 핵 염색을 보인 증례들은 대부분 E-cadherin의 염색이 감소되어 있었는데 이는 Bailey 등의 결과와 유사하였다.(19) 세포질 안의 β -catenin 양은 wnt-1과 APC의 상반

된 작용에 의해 조절되는데 wnt-1은 β -catenin의 세포질 내 축적을 초래하는 반면,(37) APC는 β -catenin과 결합하고 분해하여 β -catenin의 양을 감소시킨다. 만일 세포질에서 β -catenin이 부적절하게 증가하면 serine-threonine kinase인 GSK-3 β 의 증가를 초래해 β -catenin아미노기 말단과 APC를 인산화시켜 β -catenin과의 결합을 견고히 하고, 다시 ubiquitin-proteasome경로에 의해 β -catenin이 파괴되어 세포질 내 양이 조절된다.(38) 따라서 APC유전자의 변이나 β -catenin, 특히 아미노 말단을 포함하고 있는 exon3의 돌연변이 및 소실 유무가 세포 결합력에 영향을 줄 수 있으며 지금까지 보고된 부위도 모두 이 부위에서 발생하였다.(39-41) 위암의 경우 대장암에 비해 APC와 β -catenin 유전자의 변이 빈도가 낮고, 보고 예도 적어 아직 대장암과의 차이를 알 수 없다. Park 등(26)이 43예의 비가족성 위선암 중 7예에서 β -catenin 유전자의 돌연변이를 보고하면서 장형 위선암과 β -catenin의 돌연변이와의 관계를 강조하였으나 본 연구에서는 장형과 미만형 각각의 1예에서 관찰되어 Park 등의 보고와 차이가 있었다.

E-cadherin과 catenin 단백질의 상피세포 종양에서의 발현 양상과 종양의 분화정도 및 예후와의 연관성에 대한 연구 결과는 다양하다. Jawhari 등(18)은 위암에서 E-cadherin, β -catenin 및 v-catenin 등의 발현과 종양세포의 분화도에 관련성이 있고, 특히 β -catenin이 독립적인 예후인자로 작용함을 보고하였다. 국내에서는 김 등(22)이 위선암종에서 E-cadherin의 면역조직화학 염색 양상이 종양 세포의 분화가 나뉠수록 감소한다고 하였다. 그러나 Grabsch 등 (42)은 β -catenin의 발현 감소나 세포질 또는 핵 염색과 조직학적 유형, 종양의 진행 및 예후와는 관련이 없음을 보고하였다.

본 연구에서는 cadherin과 catenin의 발현 양상이 원발병소와 전이 병소 모두에서 차이가 없었는데 경우에 따라 림프절이나 복강내로 전이할 때 염색성이 나타날 수 있다고 한다. 이는 원발 병소에서 전이하기 위해 일시적으로 소실되었던 cadherin-catenin 복합체의 성질이 종양세포가 이차 병소에서 착상할 수 있기 위해서는 재 발현하여야 하기 때문으로 해석하고 있다.(43)

본 연구에서 E-cadherin과 β -catenin의 면역조직화학 염색 양상은 모두 종양 세포의 분화도와 밀접한 관계를 갖고 있었으며, 이러한 소견은 한 종양 조직내의 분화도가 다른 세포들 사이에서도 관찰할 수 있었다. 세포질이나 핵 염색 등과 같은 이상 염색을 보이는 경우에서 cadherin이나 catenin의 유전자 변이 또는 이 복합체와 관련된 다른 물질들을 함께 연구하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

한국인에 가장 흔한 위 선암을 대상으로 E-cadherin과

β -catenin의 변화를 연구한 결과 이들 단백질은 정상 위점막에서 세포막을 따라 발현하였고 암종에서는 장형보다 미만형에서 발현이 감소하였으며 장형에서는 분화가 나뉠수록 발현이 감소하였다. 유전자 돌연변이의 빈도는 비교적 낮아 이들 유전자의 돌연변이가 이외의 다른 기전도 위선암 발생에 관여하리라 생각한다.

REFERENCES

- Ota K, Sobin LG. Histological typing of gastric and esophageal tumours. International histological classification No. 18. World Health Organization, Geneva. 1977.
- Jarvi O, Nevalainen T, Ekfors T. The classification and histogenesis of gastric tumors. Excerpta Medica International Congress Series No. 354:228-34, 1974.
- Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. Gut 1992; 33:606-612.
- Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. Biochim Biophys Acta 1989;989:65-84.
- Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. Cell 1986;47:487-489.
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. Cell 1988; 54:993-1001.
- Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. Trends Genet 1993;9:317-321.
- Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. J Cell Biol 1989;108:2435-2447.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J Cell Biol 1991;113:173-185.
- Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. Am J Pathol 1991;139:17-23.
- Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4246-4250.
- Peifer M. Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection. Trends Cell Biol 1992;5:224-229.
- Oyama T, Kanai Y, Ochiai A, Akimoto S, Oda T, Yanagihara K, Nagafuchi A, Tsukita S, Shibamoto S, Ito F, Takeichi M, Matsuda H, Hirohashi S. A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and α -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. Cancer Res 1994;54:6282-6287.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. Science 1997;275:1787-1790.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 1998;281: 1509-1512.
- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature 1999;398:422-426.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. Science 1996;272:1023-1026.
- Hiscox S, Jiang WG. Expression of E-cadherin, α , β and γ -catenin in human colorectal cancer. Anticancer Res 1997;17: 1349-1354.
- De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, Peterse JL, Van de Vijver MJ, Litvinov S, Van Roy F, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. J Pathol 1997;183:404-411.
- Davies BR, Worsley SD, Ponder BA. Expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. Histopathology 1998;32:69-80.
- Jawhari A, Jordan S, Poole S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJ. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. Gastroenterology 1997;112:46-54.
- 김지연, 설미영, 이선경. 위선암종에서 E-cadherin의 발현에 관한 면역조직화학적 연구. 대한병리학회지 1997;31:745-753.
- 강행지, 박찬필, 박찬급. 유방암종에서 E-cadherin세포부착분자의 발현과 암종의 조직학적 분화도 및 수용체와의 상관관계에 대한 연구. 대한병리학회지 1997;31:1172-1179.
- 홍숙희, 노미숙. 위선암종에서 E-cadherin과 p53 단백질의 발현. 대한병리학회지 1999;33:80-87.
- 팽성숙, 장희진, 서정일. 결직장선암종에서 p53, E-cadherin, nm23, CD44의 발현양상과 종양의 맥관형성의 의미. 대한병리학회지 1997;31:314-325.
- Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY. Frequent somatic mutations of the β -catenin gene in intestinal-type gastric cancer. Cancer Res 1999;59:4257-4260.
- Lauren P. The two histological main types of main types of gastric carcinoma. Diffuse and so called intestinal type carcinoma. Acta Pathol Microbiol Scand 1988;64:31-49.
- Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development 1988;102: 639-655.

29. Jouanneau J, Tucker GC, Boyer B, Valles AM, Thiery JP. Epithelial cell plasticity in neoplasia. *Cancer Cells* 1991;3: 525-529.
30. Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S. E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:843-848.
31. Machado JC, Soares P, Carneiro F, Rocha A, Beck S, Blin N, Bex G, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. *Lab Invest* 1999;79:459-465.
32. Becker KP, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994;54: 3845-3852.
33. Stone J, Bevan S, Cunningham D, Hill A, Rahman N, Peto J, Marossy A, Houlston RS. Low frequency of germline E-cadherin mutations in familial and nonfamilial gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;79:1935-1937.
34. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382: 638-642.
35. Hulshen J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1993;127:2061-2069.
36. Valizadeh A, Karayiannakis AJ, el-Hanry I, Kmiot W, Pignatelli M. Expression of E-cadherin-associated molecules (α -, β -, and γ -catenins and p120) in colorectal polyps. *Am J Pathol* 1997;150:1977-1984.
37. Inomata M, Ochiai A, Akimoto S, Kitano S, Hirohashi S. Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1996; 56:2213-2217.
38. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J Biol Chem* 1997;272:24735-4738.
39. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:1130-1134.
40. Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997;57:4478-4481.
41. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. β -catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 1999;59:1442-1444.
42. Cowley GP, Smith ME. Modulation of E-cadherin expression and morphological phenotype in the intravascular component of adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1995;60:325-329.
43. Grabsch H, Takeno S, Noguchi T, Hommel G, Gabbert HE, Mueller W. Different patterns of beta-catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Histopathology* 2001;39:141-149.