대 한 골 관 절 종 양 학 회 지
J. of Korean Bone & Joint Tumor Soc.
Volume 7, Number 2, June, 2001

골육종의 생화학적 표지자에 관한 연구

한양대학교 의과대학 정형외과학교실

이창우 · 조우진 · 조재림 · 김태승 · 황건성

목 적 : 골육종 환자의 조직과 혈청에서 DNase, RNase, 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase 및 amylase 활성도를 측정하여 그 활성도의 변동을 보았고 이들 효소가 골육종의 표지자로 이용될 수 있는지 알아보았다.

대상 및 연구방법 : 골육종 환자의 혈청과 종양조직은 12예로부터 얻었으며, 이에 대한 대조조직은 동일 환자의 정상부위에서 채취하였다. 조직 추출액을 얻어서 핵산, 단백함량, 그리고 효소 활성도의 측정에 사용하였다. DEAE-cellulose chromatography에 의해 골육종 조직의 acid DNase, neutral RNase, RNase inhibitor와 단백을 분리하고 그활성도와 단백함량을 측정하였다.

결 과 : 골육종 조직의 acid DNase, RNase, 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase 활성도는 유의하게 상승하였고, 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다. neutral RNase의 활성도가 특히 높았으며, RNase inhibitor는 neutral RNase와 복합을 이루면서 그 활성도가 유의하게 증가하였다. 혈청 neutral RNase 활성도가 유의하게 상승하였다. DEAE-cellulose column chromatography에 의해 acid DNase는 단일효소로서, 그리고 neutral RNase는 5개의 isozyme으로 분리되었다.

결 론 : 이들 효소의 병용이 골육종의 생화학적 표지자로서 이용될 수 있을 가능성을 시사하였다. 또한 혈청 neutral RNase활성도의 측정이 골육종의 생화학적 표지자로서의 역할을 시사하였다. acid DNase와 neutral RNase가 골육종의 발생과 억제과정에 작용하고 있을 가능성을 시사하였다.

색인 단어 : 골육종, 생화학적 표지자

서 론

암환자의 암조직과 혈청을 비롯한 체액에서 핵산과 단백 함량 그리고 일부 효소활성도가 변동되며 이 효소활성도의 변동 양상이 암의 생화학적 표지자로 이용될 뿐만 아니라 암의 본태를 이해하는 데 중요하다[8,13,17]. DNase는 DNA를 분해하는 효소로서 이중 산성 DNase(DNase II)는 DNA의 가수분해뿐만 아니라 DNA 융합(integration)과 재조합

※통신저자 : 김 태 승
서울특별시 성동구 행당동 17
한양대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel : 02) 2290-8485, Fax : 02) 2290-3774, E-mail : kimts@hanyang.ac.kr

(recombination)에 관여하며[28] 암의 발생에도 중요한 역할을 한다[29]. 대부분의 암조직에서 이 효소활성이 유의하게 상승하지만, 혈청에서는 산성 DNase 활성이 검출되지 않아 이 효소가 암의 지표로는 이용되지 못하고 있다. RNase는 사람의 여러 조직과 혈청을 비롯한 체액에 널리 분포되어 있고 그 활성도 자체도 높게 나타난다. 대부분의 암환자의 암조직에서 RNase 활성도가 변동되며, 혈청에서 이 효소활성이 유의하게 상승하므로 생화학적 표지자로 이용될 수 있다[8,16,20,23]. 대부분의 암조직에서 RNase는 단일효소로 존재하지 않고 다수의 isozyme 형태로 나타나며 암에 특이한 RNase isozyme이 분리되고 이것이 암의 본태를 이해하는데 중요하다[6].

핵산분해 효소의 산물인 nucleotide의 대사에 관여하는 효소로 알려진 5'-nucleotidase는 nucleotide의 탈인작용을 촉매하는 효소로서 이 효소활성도가 일부 암조직 및 암환자의 혈청에서 유의하게 상승하며[11,22] 특히 전이성 간암의 진단에 유용하게 이용된다. Alkaline phosphatase는 유기인 화합물의 탈인작용을 촉매하는 효소로서 골질환 환자의 골조직 및 혈청에서 이 효소활성도가 변동되며 이들 골질환의 표지자로 이용된다[2]. Amylase는 당질을 가수분해 하는 효소로서 암세포의 glycogen 대사에 관여하며 암세포 증식의 energy 공급에 중요한 역할을 한다. 일부 암조직과 암환자의 혈청에서 amylase 활성도가 유의하게 상승하여 생화학적 표지자로 이용된다[21,24,26].

본 연구에서는 골육종 환자의 골육종조직과 혈청에서 DNase, RNase, 5-nucleotidase, alkaline phosphatase 및 amylase 활성도를 측정하여 그 활성도의 변동을 보았고 이들 효소가 골육종의 표지자로 이용될 수 있는지 알아보았으며 골육종 조직에서 핵산분해 효소를 분리 정제하여 그 성상을 추구하였다.

연구 대상 및 방법

실험재료로 사용한 골육종 환자의 혈청과 종양조직은 한양대학병원에 입원한 골육종 환자 12예로부터 얻었으며 종양조직은 수술에 의해 진행암의 중심부에서 절취하였고 이에 대한 대조조직은 동일 환자의 종양 병소로부터 멀리 떨어진 정상 부위에서 채취하였다. 채취한 골조직은 우선 aluminum oxide mortar와 pestle에 의하여 분말로 마쇄한 후 완충액(0.01M tris-HC1, pH 7.2)을 가하여 혼합 추출하여 균등액을 만들었고 이를 4℃에서 10,000 r.p.m으로 15분간 원심분리하여 골조직 추출액(상청액)을 얻었으며 이를 핵산과 단백함량 그리고 효소활성도의 측정에 사용하였다.

DNA 함량은 diphenylamine 반응방법으로 측정하였고[3], 표준 deoxyribonucleotide로 AMP(Calbiochemical Co.)를 사용하였다. RNA 함량은 orcinol 반응방법에 의해 측정하였고, 표준 ribonucleotide로 AMP(Sigma Chemical Co.)를 사용하였다. 단백함량은 Lowry 등의 방법으로 측정하였고 Bovine plasma albumin(Armour Pharmaceutical Co.)을 표준단백으로 사용하였다. DNase와 RNase 활성도는 산에 불용인 polynucleotide로부터 산에 용해되는 oligonucleotide로 변하는 양을 자외선 분광측정 방법으로 측정하여 정하였다. Acid DNase는 pH 5.5(acetate 완충액)에서 기질로서 double stranded(ds) DNA(Worthington Biochemical Co.)를 사용하였고 neutral DNase는 pH 7.5(tris-HCl 완충액)에서 ds DNA 를 사용하였으며 alkaline DNase는 pH 9.2(glycine-KOH 완충액)에서 single stranded(ss) DNA(열변성된 DNA)를 사용하여 활성도를 측정하였다. RNase 활성도는 polycytidylate(poly C; Sigma Chemical Co.) 또는 RNA(Worthington Biochemical Corp.)를 기질로 사용하여 acid RNase는 pH 6.0에서, neutral RNase는 pH 7.5에서 alkaline RNase는 pH 9.2에서 측정하였다. DNase와 RNase 활성도는 37℃에서 60분간 산에 용해되는 oligonucleotide 1 μM(mole)를 유리하는 활성도를 1 unit로 표시하였다. RNase inhibitor 활성도는 total RNase 활성도(free RNase 활성도와 inhibitor bound RNase 활성도의 합; PHMB 존재하에서 측정한 RNase 활성도)로부터 free RNase 활성도(PHMB 없이 측정한 RNase 활성도)를 빼낸 활성도로 표시하였다[12]. 5'-Nucleotidase 활성도는 이 효소에 의하여 pH 7.5(tris-HC1 완충액)에서 AMP(Sigma Chemical Co.)로부터 유리되어 나오는 무기인의 양을 측정하여 정하였고[22], 이 무기인의 양은 Fiske와 SubbaRow 방법[7]에 의하여 측정하였다. 5'-Nucleotidase 활성도는 37℃에서

60분간에 무기인 1 μM을 유리하는 활성도를 1 unit로 표시하였다. Alkaline phosphate 활성도는 pH 8.6(barbiturate 완충액)에서 beta-glycerophosphate로부터 유리되어 나오는 무기인의 양을 측정하여 정하였다[2]. Alkaline phosphatase 활성도는 37℃에서 60분간에 무기인 1 μM을 유리하는 활성도를 1 unit로 표시하였다. Amylase 활성도는 soluble starch(Sigma Chemical Co.)가 이 효소에 가수분해 되어 나오는 maltose의 양을 3,5-dinitrosalicylic acid(E. Merck Co.)반응방법으로 측정하였으며[1], 이 효소 활성도는 37℃에서 60분간에 soluble starch를 가수분해하여 maltose 1 μM을 유리하는 활성도를 1 unit로 표시하였다.

DEAE-cellulose column chromatography에 의해서 골육종조직의 acid DNase, neutral RNase, RNase inhibitor와 단백을 분리하였다. DEAE-cellulose(Sigma Chemical Co.) column(1.0×12 cm)에 골육종조직 추출액(10%) 6.0 ml를 가하고 0.01M와 1.0M NaCl 사이의 용액으로 순차적으로 추출하였다. 추출한 각분액(각 2.0 ml)에서 DNase, RNase, RNase ingibitor 활성도와 단백함량을 측정하였다.

통계적 방법으로는 Student T-test를 사용하였다.

결 과

1. 골육종 조직의 핵산과 단백함량

골육종 조직 DNA, RNA와 단백함량은 유의하게 상승하였고 골육종의 지표로서 이들 핵산과 단백함량의 양성율도 높게 나타났다(50% 이상)(Table 1).

2. 골육종 조직의 DNase 활성도

골육종 조직의 neutral DNase와 alkaline DNase 활성도는 유의하게 변동되지 않았으나 acid DNase 활성도는 대조 골조직의 것에 비해 현저하게 상승(약 3.6배 상승) 하였으며 골육종의 표지자로서 이 효소활성도의 양성율이 높게 나타났다(80%)(Table 2).

3. 골육종 조직의 RNase와 RNase inhibitor 활성도

골육종 조직의 acid, neutral 및 alkaline RNase 활성도는 대조 골조직의 것에 비해 현저하게 높게 나타

Table 1. Nucleic acid and protein contents in osteosarcoma tissue

	Control	Osteosarcoma	p value	Positive rate
Number of specimen	(10)	(10)		
DNA(μM/g wet weight)	8.1±3.5	15.8±5.0	p<0.05	6/10(60%)
RNA(μM/g wet weight)	17.5±5.1	23.0±7.0	p<0.05	5/10(50%)
Protein(mg/g wet weight)	16.4±5.1	30.1±8.8	p<0.05	7/10(70%)

The positive rate was expressed as number of positive results per total number of specimens in group(percent positive in parentheses). Positive result was determined when the parameter for osteosarcoma tissue was higher than the upper limit(mean+2SD) in the control

Table 2. Activity and positive rate of DNases in osteosarcoma tissue

	Number of specimen	Acid DNase	Neutral DNase	Alkaline DNase
			(unit/g wet weight)	
Control	(10)	1.41±0.6	0.32±0.17	0.28±0.13
Osteosarcoma	(10)	5.0±1.8	0.30±0.16	0.22±0.08
p value		p<0.01	NS	NS
Positive rate		8/10(80%)	1/10(10%)	2/10(20%)

DNase activity was measured at pH 5.5(acetate buffer) with double stranded(ds) DNA as substrate for acid DNase, at pH 7.5(tris-HCI buffer) with ds DNS for neutral DNase and at pH 9.2(glycine-KOH buffer) with single stranded(ss) DNA for alkaline DNase. The positive rate was determined as described in the legend of Table 1.

났고(3.4배 이상) 골육종의 표지자로서 이들 효소 활성도의 양성율도 높게 나타났다(67% 이상). 골육종조직에서 이들 3개의 RNase 중에서 neutral RNase 활성도가 가장 높게 나타났고 대조조직의 것에 비해 활성도의 증가도도 neutral RNase에서 가장 크게 나타났다(Table 3). 골육종조직의 neutral RNase는 기질로서 RNA보다 poly C에 높은 활성을 보이고 RNA/poly C 활성도비는 작게 나타났다(RNA/poly C 활성도비 =0.10). 골육종조직의 RNase inhibitor 활성도는 그 자체가 아주 낮아 inhibitor/RNase 활성도비가 0.04에 불과하였으나 대조 골조직의 것에 비해 높게 나타났으며 골육종의 표지자로서 RNase inhibitor 활성도의 양성율도 높게 나타났다(75%)(Table 4).

4. 골육종 조직 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase 및 amylase 활성도

골육종 조직의 5'-nucleotidase와 alkaline phosphatase 활성도는 대조 골조직의 것에 비해 유의하게 상승(각 42%와 45% 상승)하였고 골육종의 표지자로서 이 효소들의 양성율은 50% 이었다(Table 5). 대조 골조직의 amylase 활성도는 아주 낮거나 검출되지 않았고 본 연구의 대상이 된 골육종조직 10

Table 3. Activity and positive rate of RNases in osteosarcoma tissue

	Number of specimen	Acid RNase	Neutral RNase	Alkaline RNase
			(unit/g wet weight)	
Control	(12)	82±15	542±75	455±70
Osteosarcoma	(12)	280±171	2850±1550	2325±1065
p value		p<0.01	p<0.01	p<0.01
Positive rate		8/21(67%)	10/12(83%)	10/12(83%)

RNase activity was measured with poly C as substrate at pH 5.5 for acid RNase, at pH 7.5 for neutral RNase and at pH 9.2 for alkaline RNase. The positive rate was expressed as described in the legend of Table 1.

Table 4. Activity of neutral RNase toward poly C and RNA and RNase inhibitor activity in osteosarcoma tissue

	Number of specimen	RNase activity		RNase inhibitor activity	Ratio	
		Poly C	RNA		RNA/poly C	inhibitor/RNase
Control	(12)	542±75	56±11	24±19	0.10	0.04
Osteosarcoma	(12)	2850±1550	281±82	125±32	0.10	0.04
p value		p<0.01	p<0.01	p<0.01		
Positive rate		10/12(83%)	10/12(83%)	9/12(75%)		

RNase activity was measured at pH 7.5 with poly C or RNA as substrate and inhibitor activity was measured with poly C substracting(free) RNase activity(determined in the absence of PHMB) from total RNase activity(in the presence of PHMB). The positive rate was expressed as described in the legend of Table 1.

Table 5. 5'-Nucleotidase and alkaline phosphatase activities in osteosarcoma tissue

	Number of specimen	5'-Nucleotidase	Alkaline phosphatase
Control	(10)	15.4±5.1	62.2±10.5
Osteosarcoma	(10)	21.9±6.0	90.5±16.1
p value		p<0.05	p<0.05
Positive rate		5/10(50%)	5/10(50%)

5'-Nucleotidase activity was measured at pH 7.5 with 5'-AMP as substrate and alkaline phosphatase activity at pH 8.6(barbiturate buffer) with beta-glycerophosphate. The positive rate was expressed as described in the legend of Table 1.

예 중 8예에서도 amylase 활성도가 아주 낮거나 검출되지 않았다. 그러나 골육종조직 2예에서 아주 높은 효소활성을 보였다(Table 6).

5. 골육종 환자 혈청 효소활성도

본 연구대상이 된 혈청 효소 중에서 acid DNase 활성도는 혈청에서 검출되지 않았고(연구결과 표시되지 않음), 혈청 골육종조직 5'-nucleotidase와 alkaline phosphatase 활성도는 골육종 환자의 혈청에서 변동되지 않았다. 골육종 환자의 혈청 neutral RNase 활성도는 유의하게 상승(76% 상승) 하였고 골육종의 표지자로서 이 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다(60%)(Table 7).

6. 골육종 조직 nuclease의 분리와 성상

DEAE-cellulose column chromatography에 의해 골육종 조직의 acid DNase는 단일효소로 분리되었고 대조 골조직의 것에 비해 크게 나타났다(Table 8). 그리고 골육종 조직에서 분리정제된 acid DNase는 ds DNA에 높은 활성을 나타내고 ss DNA에 대한 활성은 낮아 ds DNA에 대한 활성도의 22%에 불과하였다. 기질로서 poly C와 RNA에 대한 활성을 나타내고 있지만 이는 acid DNase 정제 preparation에 RNase의 contamination에 기인된 것으로 생각된다(Table 9). 골육종조직의 RNase는 5개의 isozyme(isozyme I, IV-VII)으로 분리되며 이중 2개의 isozyme(I, V)은 크게 나타났고 2개의 isozyme (VI, VII)은 대조 골조직에서 분리되지 않았다. 그리고 대조 골조직에서 분리된 RNase isozyme II와 III는 골육종조직에서 분리되지 않았다. 골육종조직에서 분리된 isozyme 중에서 그 활성도가 크게 나타난 isozyme I과 V는 기질로서 RNA 보다 poly C에 높은 활성을 나타내어 RNA/poly C 활성도비가 낮게 나타났고 이 isozyme과 결합하고 있는 inhibitor 활성도도 크게 나타났다(Fig.1, Table 8).

고 찰

골육종 조직에서 DNA, RNA 및 단백함량이 유의하게 상승하였으며 골육종의 표지자로서 이들 핵산과 단백함량의 양성율도 높게 나타났다. 이는 골육종 조직 핵산과 단백함량이 이 육종의 생화학적 지표의 하나로 이용될 수 있음을 시사한다. 실험적으로 암을 일으킨 동물의 종양조직과 사람의 일부

Table 6. Amylase activity in osteosarcoma tissue

	Number of specimen	amylase	p value	Positive rate
Control	(10)	5.2±1.3		
Osteosarcoma	(10)			
no amylase	(8)	6.1±2.0	NS	0(0/8)
amylase producing	(2)	310.8 512.6		100(2/2)

Amylase activity was measured at pH 7.5(phosphate buffer) with soluble starch as substrate.

Table 7. Activities and positive rates of neutral RNase, 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase in serum of patients with osteosarcoma

	Number of specimen	Neutral RNase	5'-Nucleotidase	Alkaline phosphatase
Control	(10)	1013±396	0.26±0.08	0.87±0.21
Osteosarcoma	(10)	1787±323	0.31±0.10	1.01±0.30
p value		$p<0.05$	NS	NS
Positive rate		6/10(60%)	2/10(20%)	3/10(30%)

RNase activity was measured at pH 7.5 with poly C as substrate, 5'-Nucleotidase at pH 7.5 with 5'-AMP and alkaline phosphatase at pH 8.6 with beta-glycerophosphate. The positive rate was expressed as described in the legend of Table 1.

Table 8. Activities of acid DNase and neutral RNase in isozymes isolated by a DEAE-cellulose column chromatography from osteosarcoma tissue

	Control						Osteosarcoma					
	DNase	RNase					DNase	RNase				
isozyme	ds DNA	Poly C	RNA	Inhibitor	RNA/Poly C	Inhibitor/RNase	ds DNA	Ploy C	RNA	Inhibitor	RNA/Poly C	Inhibitor/RNase
		(unit/ml)						(unit/ml)				
I	–	4.8	0.4	2.5	0.08	0.52	–	141.5	10.2	35.6	0.07	0.25
II	0.6	5.2		1.2	0.23		2.3	–	–	–		
III	–	16.1		3.2		0.20	–	–	–	–		
IV	–	4.5		2.1		0.47	–	8.2		2.8		0.34
V	–	12.1	0.8	4.7	0.07	0.39	–	61.2	2.6	20.1	0.04	0.33
VI	–	–	–	–		6.0	–	10.0		13.2		1.32
VII	–	–	–	–		7.3	–	16.8		12.8		0.76

Activities of DNase, RNase and RNase inhibitor were measured as described in the legends of Table 2 and 4.

암조직(비뇨기상피 세포암과 자궁경부암 조직)에서 핵산과 단백함량이 유의하게 증가하며 이것이 이들 암의 생화학적 표지자로 이용되며 암조직에서 일어나는 조직증식에 선행되어 나타나는 DNA, RNA 및 단백합성의 증가에 기인된다[18,27].

골육종조직에서 neutral 및 alkaline DNase 활성도는 그 활성도 자체가 아주 낮았고 대조 골조직의 것에 비해 변동되지 않았으나 acid DNase는 그 활성도가 DNase중에서 가장 크게 나타났고 대조조직의 것에 비해 유의하게 상승하였으며 골육종의 표지자로서 이 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다. 이는 골육종조직의 acid DNase가 생화학적 표지자로 이용될 수 있음을 시사하였으나, 골육종 환자의 혈청에서 DNase활성이 검출되지 않았으며 이는 이 효소가 골육종의 임상적 표지자로 이용될 수 없음을 말한다. DEAE-cellulose column chromatography에 의해 골육종조직의 acid DNase는 단일 효소로 분리되며 활성화 되었는데 이 분리된 acid DNase는 기질로서 ss DNA보다는 ds DNA를 선호한다. 골육종조직의 acid DNase에 의한 ds DNA 분해산물에 대한 연구에 의하면 이 효소에 의한 DNA 분해산물의 대부분이 oligodeoxyribonucleotide이 확인되었다. 이 골육종조직에서 분리정제된 acid DNase가 활성화 되었고 ds DNA에 높은 활성을 나타내며 그 성상이 endonuclease 인 것으로 보아 골육종조직 acid DNase가 골육종의 발생과정에서 중요한 역할을 하리라는 가능성을 나타낸다. 자궁경부암 조직에서 분리된 acid DNase 활성도가 현저히 상승하였고 그 성상이 정상 대조조직의 효소의 성상과 다르며 ds DNA 만을 특이하게 절단하고 그 성상이 endonuclease인 것으로 보아 이 효소가 자궁경부암의 원인으로 알려진 human papilloma virus DNA의 일부를 자궁경부 세포 chromosomal DNA 속으로 융합시켜 자궁경부암 세포화 하는데 중요한 역할을 한다고 시사되었다.

또하나의 핵산분해 효소인 RNase 활성도가 골육종 환자의 혈청과 육종조직에서 상승하며 골육종의 표지자로서 이 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다. 그리고 골육종조직에서 RNase와 복합을 이루고 있는 RNase inhibitor 활성도도 유의하게 상승하였다. 이는 골육종조직에서 상승한 RNase가 혈류로 유출되어 혈청 RNase 활성도가 상승하였음을 의미하며 이 효

Table 9. Substrate specificity for acid DNase isolated from osteosarcoma tissue

Polynucleotide	Control		Osteosarcoma	
	Activity	Relative activity	Activity	Relative activity
	(nmole/ml/hr)	(%)	(nmole/ml/hr)	(%)
ds DNA	620	100	2540	100
ss DNA	155	25.0	568	22.4
RNA	198	31.9	112	4.4
Poly C	425	68.5	225	8.9
Poly I + poly C	0	0	0	0

Nuclease activity was measured at pH 5.5 with polynucleotides as shown above. Relative activity was expressed as percent taking nuclease activity with ds DNA as 100%.

소와 이것과 결합하고 있는 RNase inhibitor활성도가 골육종의 생화학적 표지자로 이용될 수 있음을 시사한다. 대부분의 암환자의 혈청에서 RNase 활성도가 상승하므로 혈청 RNase 활성도의 측정은 암의 임상적 표지자로 이용될 수 있다고 한다[4,5,13,17,19,23]. 골육종조직의 RNase는 DNase와는 달리 단일효소로 나타나지 않고 5개의 isozyme으로 분리되었으며 이중 2개의 isozyme 은 정상대조 골조직에서 찾아볼 수 없었고 2개의 isozyme은 크게 나타났고 정상대조 골조직에서 분리된 2개의 isozyme이 골육종조직에서 분리되지 않았다. 이는 RNase isozyme이 골육종에 특이한 효소이고 육종조직에서 소실되거나 활성화 되었음을 알려주며 골육종조직의 RNase와 이것과 결합하고 있는 RNase inhibitor가 골육종의 발생과 억제과정에서 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. RNase inhibitor는 RNase를 특이하게 저해하는 단백으로서[12] polyribosome의 안정에 작용하며 단백합성의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있지만[14,15] 암의 발생과 억제작용을 갖고 있는 것으로 알려진 RNase를 특이하게 저해함으로서 이차적으로 암의 발생과정에 조절적인 작용을 나타낼 가능성이 있다.

5'-Nucleotidase는 nucleotide를 가수분해하여 nucleoside와 phosphate를 생성하는 효소로서 이 효소는 대부분의 조직에 존재하며 세포내에서 원형질과 결합되어 있고 세포막의 표적 효소로서 이용된다[10,25]. 암세포에서 이 효소활성도의 변동과 성상의 변화가 초래된다고 하는데 이는 정상세포가 암세포로 변할 때 세포막의 구조와 그 성분의 변화가 일어나 그 결과 세포막에 결합되어 있는 이 효소의 활성이 변동되고 그 성상의 변화가 나타난다고 하며 이 5'-nucleotidase의 변화를 관찰함으로써 세포막의 변화를 추정할 수 있다고 한다[9]. 골육종조직의 5'-nucleotidase 활성도는 유의하게 상승하였고 이 골육종의 지표로서 이 효소활성도의 양성율도 높게 나타났으나 혈청 효소활성도는 변동되지 않았다. 이는 이 효소가 골육종의 생화학적 표지자로 유용될 가능성을 보여주었으나 임상적 표지자로는 이용되지 못함을 시사한다.

골질환 환자의 병변부위 골조직의 alkaline phosphatase 활성도가 변동될 뿐만 아니라 혈청의 이 효소활성도도 변동되며 이것이 골질환의 표지자로 이용된다고 한다. 골육종조직의 alkaline phosphatase 활성도는 유의하게 상승하였고 골육종의 표지자로서 이 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다. 이는 골육종조직의 alkaline phosphatase가 이 육종의 생화학적 지표의 하나로 이용될 수 있음을 의미한다. 그러나 골육종 환자의 혈청 효소활성도는 변동되지 않았다.

Amylase는 당질을 분해하는 효소로서 일부 암환자의 암조직과 혈청을 비롯한 체액에서 이 효소활성도가 상승하며 암의 생화학적 표지자로 이용된다[21,24,26] 정상대조 골조직에서 amylase 활성은 검출되지 않거나 아주 낮게 나타나고 본 연구대상이 된 10예의 골육종조직에서 8예에서는 amylase 활성도가 아주 낮았고 2예에서 현저하게 높은 활성을 보였다. 이는 골육종조직의 amylase 활성도가 골육종의 생화학적 지표로 이용될 수 있는 가능성을 보이나 대부분의 골육종조직에서 amylase 활성도가 아주 낮아 이 효소가 골육종의 표지자로 이용되기는 어렵다. 골육종조직에서 amylase 활성도가 제한되어 나타나는 이유는 불명이나 이 효소활성의 증가를 통해

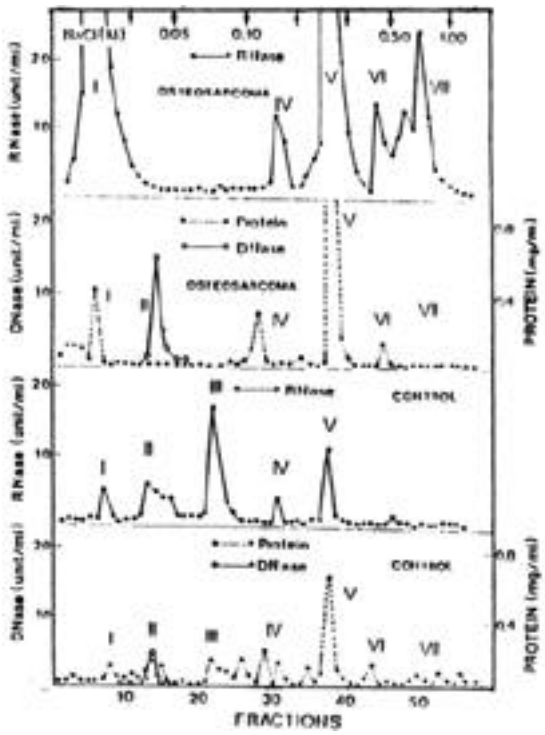

Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography for acid DNase, neutral RNase and proteins in extract from osteosarcoma tissue.

서 골육종 세포에서 amylase에 의한 glycogen 분해를 촉진하여 골종양 세포화 하는데 필요한 energy 공급을 이루고 있다고 생각된다.

결 론

골육종의 생화학적 표지자를 알아내기 위하여 골육종 환자의 골육종 조직과 혈청에서 deoxyribonuclease(DNase), ribonuclease(RNase), 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase와 amylase 활성도를 측정하여 대조 골조직과 대조 혈청의 것과 비교하였다. 그리고 이중 효소활성도의 상승이 크게 나타난 핵산분해 효소인 acid DNase와 neutral RNase를 골육종조직에서 분리정제하여 이들 효소의 성상을 추구하였다.

골육종조직의 acid DNase, RNase, 5'-nucleotidase와 alkaline phosphatase 활성도는 유의하게 상승하였고 골육종의 표지자로서 이들 효소활성도의 양성율도 높게 나타났다. Amylase 활성은 연구대상이 된 10례중 2례에서 검출되었고 나머지 8례와 대조 골조직에서는 검출되지 않았다. 골육종조직의 RNase중에서 가장 높은 활성을 나타내는 neutral RNase는 기질로서 RNA 보다는 poly C에 높은 활성을 보여 분비성 효소의 성상을 나타내고 이와 복합을 이루고 있는 RNase inhibitor 활성도도 유의하게 증가하였다. 이는 이들 효소의 병용이 골육종의 생화학적 표지자로 이용될 수 있음을 시사한다.

골육종 환자의 혈청에서 acid DNase 활성은 검출되지 않았고 5'-nucleotidase와 alkaline phosphatase 활성도는 변동되지 않았으며 neutral RNase 활성도는 유의하게 상승하였고, 골육종의 표지자로서 RNase 활성도의 양성율도 높게 나타났다. 이는 혈청 neutral RNase 활성도의 측정이 골육종의 임상적 표지자의 하나로 이용될 가능성을 보여준다. DEAE-cellulose column chromatography에 의해 골육종조직의 acid DNase는 단일효소로 분리되었고 neutral RNase는 5개의 isozyme으로 분리되었다. 분리정제된 acid DNase는 활성화 되었고 single stranded DNA 보다는 double stranded DNA에 높은 활성을 보였다. 골육종 조직에서 분리된 5개의 RNase isozyme 중에서 2개의 isozyme이 골육종에 특이한 효소로 나타났다. 이는 acid DNase와 neutral RNase가 골육종의 발생과 억제과정에 작용하리라는 가능성을 시사한다.

REFERENCES

1) **Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl M** : Enzymes as biochemical reagents(alpha-amylase). In Bergmeyer, H.U.(Editor): Methods of enzymatic alalysis. volume 1, p432, Academic Press, Inc., New Yor, 1974.
2) **Bodansky M** : Hawk's physiological chemistry(Oser BL ed.)-Determination of serum phosphatase activity. 14th edition. TATA McGraw-Hill Publishing Co., Ltd., New Dehli, p118, 1976.
3) **Burton K** : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 315-323, 1956.
4) **Catalona WJ, Chretien PB, Matthews WJ, Tarpley JL** : Serum ribonuclease in urologic cancer: Relation to host immunocompetence. *Urology*, 1:577-

581, 1973.

5) **Chretien PB, Metthews W, Twomey PL** : Serum ribonucleases in cancer: Relation to tumor histology, *Cancer,* 31:175-179, 1973.
6) **Chung HS, Lee YS, Koh JK** : Isolation and nature of neutral RNases in tumor tissues. *J. Hanyang Med. Coll,* 10:705-715, 1990.
7) **Fiske GH, SubbaRow YJ** : Hawk's physiological chemistry(Oser BL ed.)-Determination of inorganic phosphorus. 14th edition. TATA MCGraw-Hill Publishing Co., Ltd. New Dehli, p112, 1976.
8) **Hishiki S, Sakaguchi S, Kanno T** : Clinical significance of acidic pI isoenzyme of ribonuclease in human serum. *Clin Chem. Acta,* 136:155-164, 1984.
9) **Ikehara Y, Takahashi K, Mansho K, Eto S, Kato K** : Contrast manifestation of alkaline phosphatase and 5'-nucleotidase in plasma membranes isolated from rat liver and ascites hepatoma. *Biochim Biophys Acta,* 470:202-211, 1977.
10) **Johnsen S, Stokke T, Prydz H** : HeLa cell plasma membrances. I. 5'-Nuccleotidase and ouabainsenssitive ATPase as maarkers for plasma membrances. *J. Cell. Biol,* 63:357-3363, 1974.
11) **Kim NH, Yasmineh WG, Freier EF, Goldman AI, Thelogides A** : Value of alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase and glutamate dehydrogenase activity measurements(single and combined) in serum in diagnossis of metastasis to the liver. *Clin Chem,* 23:2034-2038, 1997.
12) **Kiyohara H, Menjo M** : Ribonuclease and ribonuclease inhibitor in the human pancreas. *Gastroenterol. Jph,* 18:468-473, 1983.
13) **Kottel RH, Hoch SO. Parsons RG, Hoch JA** : Serum ribonuclease activity in cancer patients. *Br. J. Cancer,* 38:280-286, 1978.
14) **Kumagai H, Igarashi K, Takayama T, Watanabe K, Sugimoto K, Hirose S** : A microsomal endoribonuclease from rat liver. Biochim. *Biophys Acta,* 608:324-331, 1980.
15) **Kumagai H, Igarashi K, Tanaka K, Tanaka K, Nakao H, Hirose S** : A microsomal exonuclease from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta,* 566:192-199. 1979.
16) **Maor D, Klein ME, Kenady DE, Chretien PB, Mardiney MR** : Carcinoma of the lung and cigarette smoking. Effect on serum ribonuclease activity. *JAMA,* 239:2766-2768, 1978.
17) **Nakane H, Yoshida M, Murakami T** : Assesment of the clinical usefulness of serum ribonuclease assays: and indicator for the detection of panceratic cancer. *Gastroenterol. Jph,* 14:55-62, 1979.
18) **Park JS, Kim YS, Koh JK** : Acid deoxyribonuclease as a biochemical marker for human cancer. *J. Hanyang Med. Coll,* 15:37-52, 1995.
19) **Peterson LM** : Serum ribonuclease in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. US,* 76:2603-2634, 1979.
20) **Reddi KK, Holland JF** : Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. US,* 73:2308-2310, 1976.
21) **Sandiford JA, Chiknas SG** : Hyperamylasemia and ovarian carcinoma. *Clin. Chem,* 25:948-950, 1979.
22) **Segal HL, Brenner BM** : 5'-nucleotidase of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem,* 235:471-474, 1960.
23) **Sheid B, Lu T, Pedrinan L, Nelson JH Jr** : Plasma ribonuclease. A marker for the detection of ovarian cancer. *Cancer,* 39:2204-2208, 1977.
24) **Shimamura J, Fridhandler L, Berk JE** : Unusual isoamylase in cancer-associated hyperamylasemai, *Cancer,* 38:2121-2126, 1976.
25) **Trams EG, Lauter CJ** : On the sidencess of plasma membrane enzymes. *Biochim Biophys Acta,* 345:180-197, 1974.
26) **Warshaw AL, Lee KH** : Characterisitic alterations of serum isoenzymes of amylase in diseases of liver, pancreas, salivary gland, lung and genitalia. *J. Surg. Res,* 22:362-369, 1977.
27) **Watson JD** : Molecular biology of gene-The viral origins of cancer as a hereditary change. 3rd edition WA Benjamin Menlo Park, p642, 1976.
28) **Yamanaka M, Tsubota Y, Anai M, Ishimatsu K, Okumura M, Katsuki S, Takagi T** : Purification and properties of acid deoxyribonucleases of human gastric mucosa and cervix uteri. *J. Biol, Chem,* 249: 3884-3889, 1974.
29) **Yoon DK, Koh JK, Kim DS** : A study of enzymes involved in nucleic acid degradation in human uterine cancer tissue-Purification and properties of DNase II from human cervical cancer cells. *Kor. J. Biochem,* 12:1-8, 1980.

Abstract

Biochemical Markers for Osteosarcoma

Chang Woo Lee M.D., Woo Jin Cho M.D., M.D., Jae Lim Cho M.D., Tai Seung Kim M.D. and Kuhn Sung Whang M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Hanyang University, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : To investigate biochemical markers for osteosarcoma, activities of deoxyribocuclease(DNase), ribonuclease(RNase), 5'-nucleotidase, alkaline phosphatase and amylase were determined in the osteosarcoma tissue and serum of patients with osteosarcoma. Also studied were DNase, RNase in osteosarcoma tissue, isolating the enzymes from the sarcoma tissue and investigating the sarcoma specific enzymes.

Materials and Methods : The experimental tissue and serum were obtained from twelve patients with osteosarcoma. The control group were obtained from the normal healthy tissue of the same patients. The tissue were centrifugalized to obtain extracts. The extracts were analized for the estimation of nucleic acid, protein contents and enzyme activities. And then each enzymes were isolated and analized by DEAE-cellulose chromatography and estimated for activities.

Result : Activities of acid DNase, RNase, 5'-nucleotidase and alkaline phosphatase were significantly increased in osteosarcoma tissue. Neutral RNase in osteosarcoma tissue was shown to bo highly active, exhibiting secretory form of RNase inhibitor associated with the RNase was also increased. In the serum of patients with osteosarcoma, RNase activity was significantly increased. DEAE-cellulose column chromatographical analysis revealed that acid DNase was isolated as a single enzyme and neutral RNase as five isozymes in osteosarcoma tissue.

Conclusion : The results indicated that combination of these enzymes could be used as markers for osteosarcoma. The results indicated that acid DNase and neutral RNase might play a role in genesis of sarcoma and suppression of sarcoma.

Key Words : Osteosarcoma, Biochemical marker

Address reprint requests to
Tai Seung Kim, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Hanyang University College of Medicine
#17 Hangdang-dong, Sungdong-gu, Seoul Korea
Tel : 82-2-2290-8485, Fax : 82-2-2290-3774, E-mail : kimts@hanyang.ac.kr