

## 위선암에서의 유전자 발현

동아대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>약리학교실, <sup>3</sup>외과학교실, <sup>4</sup>병리학교실

이종훈<sup>1</sup> · 최석렬<sup>1</sup> · 한상영<sup>1</sup> · 황태호<sup>2</sup> · 김민찬<sup>3</sup> · 정갑중<sup>3</sup> · 노미숙<sup>4</sup> · 정진숙<sup>4</sup>

### Gene Expression in Gastric Adenocarcinomas

Jong Hoon Lee, M.D.<sup>1</sup>, Seok Ryeol Choi, M.D.<sup>1</sup>, Sang Young Han, M.D.<sup>1</sup>, Tae Ho Hwang, Ph.D.<sup>2</sup>, Min Chan Kim, M.D.<sup>3</sup>, Ghap Joong Jung, M.D.<sup>3</sup>, Mee Sook Roh, M.D.<sup>4</sup>, and Jin Sook Jeong, M.D.<sup>4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Pharmacology, <sup>3</sup>Surgery and <sup>4</sup>Pathology, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

**Purpose:** The cDNA microarray provides a powerful alternative with an unprecedented view in monitoring gene-expression levels and leads to discoveries of regulatory pathways involved in complicated biological processes. Our aim is to explore the different gene-expression patterns in gastric adenocarcinomas.

**Materials and Methods:** By using a cDNA microarray representing 4,600 cDNA clusters, we studied the expression profiling in 10 paired gastric adenocarcinoma samples and in adjacent noncancerous gastric tissues from the same patients. Alterations in the gene-expression levels were confirmed by using Northern blots and reverse-transcription PCR (RT-PCR) in all of 4 randomly selected genes.

**Results:** Genes those were expressed differently in cancerous and noncancerous tissues were identified. 44 (of which 26 were known) and 92 (of which 43 were known) genes or cDNA were up- and down-regulated, respectively, in more than 80% of the gastric adenocarcinoma samples. In cancerous tissues, genes related to gene/protein expression, cell-cycle regulation, and metabolism were mostly up-regulated whereas genes related to the oncogene/tumor suppressor gene, cell structure/motility, and immunology were mostly down-regulated. The semi-quantitative RT-PCR results for the four genes we tested were consistent with the array findings.

**Conclusions:** These results provide not only a new molecular basis for understanding the biological properties of gastric adenocarcinomas but also a useful resource for future development of therapeutic targets and diagnostic markers for gastric adenocarcinomas. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2002;2:213-220)

**Key Words:** Gene expression, cDNA microarray, Stomach cancer

**중심 단어:** 유전자 발현, cDNA microarray, 위선암

## 서 론

위암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성종양 중의 하나이다. 많은 선진화된 국가들에서 위암 발생률은 현저한 감소 추세를 보임에도 불구하고 위암은 전 세계적으로 암에 의한 사망에서 2번째로 흔한 것으로 알려져 있다.(1) 위장의 악성종양과 비종양성 위 상피조직에서 서로 다르게 발현되는 유전자들은 위암의 발생, 진행, 악성화 등에 관여할 것으로 생각된다. 그러나 RT-PCR 등과 같은 기존의 유전학적 연구 방법은 매우 많은 시간을 소모하면서도 전체적인 유전학적 정보를 얻기 어려우며, 제한적인 유전자에 대한 정보만을 얻을 수 있다. cDNA microarray는 유전자 발현에 대한 연구에 있어서 기존의 연구 방법들과는 확연한 차이를 보이며, 유전학적 연구의 강력한 도구로서 복잡한 생물학적 과정에 포함된 조절경로에 대한 연구에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.(2-4) 또한, cDNA microarray를 암 연구에 도입함으로써 약물의 표적, 분자생물학적 진단, 그리고 암의 분자생물학적 분류를 가능케 하는 많은 잠재적 유전자를 인식할 수 있게 될 것으로 기대된다.(5-7)

저자들은 본 연구에서 위선암에서의 유전자 발현을 조사하기 위해 4,600개의 인간 cDNA 분절들을 포함하는 cDNA microarray 슬라이드를 적용하였다. 저자들은 본 연구를 통해 분자생물학적 관점에서의 위장의 종양생성 과정과 악성화 과정에 대한 이해를 넓히고, 위선암 진단의 발전과 함께 치료 및 예방에 대한 분자생물학적 표적들의 인지를 위한 단서들을 구하고자 하였다.

책임저자 : 최석렬, 부산시 서구 동대신동 3가 1번지  
동아대학교의료원 소화기내과, 602-715  
Tel: 051-240-2970, Fax: 051-243-2970  
E-mail: seokca@hanmail.net

접수일 : 2002년 12월 11일, 게재승인일 : 2002년 12월 23일

## 방 법

### 1) 대상

동아대학교 의료원에서 위선암으로 진단받고 수술적 절제를 시행한 환자 10명의 절제 조직으로부터 위선암 조직과 비종양성 상피조직을 얻었다. 수술 전 연구의 목적을 환자에게 설명하고 수술 후의 조직 표본과 임상병리학적 데이터가 연구에 사용될 수 있음에 대한 동의를 문서로 구하였다. 조직은 액체 질소 속에 30분 동안 냉동 동결시킨 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 조직을 얻고 난 후 남은 부위는 10%의 buffered formalin에 고정시키고 paraffin section은 hematoxylin/eosin에 염색하였다. 임상 병기는 American Joint Committee on Cancer와 International Union Against Cancer에 의해 개발된 International TNM system을 이용하여 외과 병리와 임상 정보를 병행하여 결정하였다.

### 2) 방법

(1) **T7-based RNA Amplification and hybridization:** 전체 RNA는 *TRI REAGENT* (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH)를 사용하여 냉동된 조직으로부터 분리하였다. 추출한 RNA는 1 unit의 RNase inhibitor (TOYOBO, Osaka, Japan) 존재하에 10 unit의 DNase I (Roche, Basel, Switzerland)으로  $37^{\circ}\text{C}$ 에 1.5시간 처리하여 남아 있는 genomic DNA를 제거하였다.  $70^{\circ}\text{C}$ 에 10분간 incubation한 후 제조사의 지시에 따라 RNA를 Rneasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)으로 정제하였다. Dnase I으로 처리한 모든 RNA는 T7-based RNA amplification을 시행하였다. 3회의 복제 후 각각의 sample로부터 8~40 $\mu\text{g}$ 의 RNA를 얻었다. 위선암과 비종양성 위점막 조직의 RNA를 2.5 $\mu\text{g}$  씩 나누어 Cy3-dCTP, Cy5-dCTP로 각각 표기한 후 제조사의 지시에 따라 microarray hybridization을 시행하였다.

(2) **cDNA Array:** 10쌍의 위암조직과 비종양조직을 *MAGIC<sup>TM</sup>* microarray (MacroGen Inc., Seoul, Korea)로 분석하였다. 이 microarray는 인간의 유방암 cDNA library로부터 얻은 4600개의 cDNA를 포함하고 있다. Double-stranded cDNA probe를 합성하기 위해 MacroGen에서 제공한 labeling kit를 이용하였다.

(3) **Data Analysis:** Microarray의 결과는 *ImaGene<sup>TM</sup>* analysis software (BioDiscovery Inc., Marina del Rey, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 뚜렷이 표시되지 않거나 뚜렷한 결점이 있는 부분은 분석에서 제외하였다. 남아 있는 spot에서 배경음영을 제외한 후, 비종양조직과 위선암 조직의 mRNA 발현을 나타내는 Cy5-specific channel과 Cy3-specific channel의 발현비를 각각의 spot에서 계산하였다.

비록 cDNA microarray 결과가 각각의 샘플과 기준 표지자 간의 발현 정도의 정확한 비율을 나타내지만 이 과정에

서 얻은 방대한 정보를 분석하기는 어렵다. 이 cDNA microarray 결과로부터 정보를 효율적으로 얻기 위해 Cy-3-fluorescence와 Cy-5-fluorescence 강도의 평균이  $1 \times 10^3$  이하인 gene은 제외하고, 암과 정상 조직 간의 발현비가 적어도 2배 이상인 유전자들을 선택하였다. 그리고 측정값의 표준 편차가 0.5 이하인 유전자들도 제외한 후 마지막으로 모두 2,541개의 유전자가 선택되었다. cDNA microarray를 통해 얻어진 2,541개의 유전자들에 대해 유전자명을 OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)과 PubMed database에서 조사하여 modification of the NCBI Clusters of Orthologous Gene classification과 대조하여 cell cycle regulator, oncogene/tumor suppressor gene, metabolism, cell structure/motility, signal transduction, gene/protein expression, angiogenesis, immunology의 8군으로 분류하였다.

(4) **RT-PCR:** cDNA microarray 결과의 신뢰성을 확인하기 위해 위선암에서 낮게 발현된 두 개의 유전자(*EphA1*; M18391, *CAST*; D16217)와 높게 발현된 두 개의 유전자(*MAN1B1*; NM\_007230, *IFNGR2*; U05875)를 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. 5 $\mu\text{g}$ 의 SuperScript Preamplification System과 oligo (dT) primer를 이용하여 반응부피 20 $\mu\text{l}$ 에서 단일가닥의 cDNA를 합성하여 First Strand cDNA Synthesis System (Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)을 준비하고 이를 80 $\mu\text{l}$  부피로 희석하였다. 합성된 cDNA 1 $\mu\text{l}$ 을 주형으로 하여 유전자 특이적인 primer와 Taq DNA 중합효소를 사용하여  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 2분, 1회 반응시키고,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분으로 하여 25회 반응시켜 PCR을 시행하였다. 목적으로 하는 DNA의 증폭 여부는 PCR 산물을 gel에 전기영동시켜 확인하였고, 또한 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝한 후 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 동일한 양의 주형가닥을 확인하기 위한 internal control로  $\beta$ -actin을 사용하였다.

## 결 과

연구의 대상이 된 위선암 10예의 병리조직학적 특성과 임상병기를 Table 1에 표시하였다. 동일한 위선암 환자의 수술 후 조직에서 얻은 위선암 조직과 비종양성 위조직, 각각 10예를 대상으로 하여 microarray에 표현된 4,600개의 cDNA와 EST (Expressed Sequence Tag) 중에서 2 Log (adenocarcinoma/non-cancerous tissue) 값이 1 이상인 경우와 1 이하인 경우의 2,541개(55.2%)의 유전자를 대상으로 하였다. Microarray에 표현된 대부분의 유전자들을 적용하여 hierarchical clustering algorithm을 이용한 phylogenetic tree를 얻었으나 위선암 조직들에서 Table 1에 표시된 병리조직학적 특성들과 부합되는 위선암의 상세분류는 관찰할 수 없었다(data not shown).

**Table 1.** Histological examination of gastric adenocarcinoma samples

Sample no.	Gender/Age	Location	Differentiation	Depth	Lymph node	Stage
1	M/73	Body	Well	Perigastric	+	IIIA
2	M/70	Antrum	Well	Perigastric	+	IV
3	M/43	Antrum	Well	Perigastric	+	IIIA
4	F/62	Body	Signet ring cell	Perigastric	+	IV
5	F/55	Antrum	Moderately	Mucosa	-	IA
6	M/53	Antrum	Moderately	Perigastric	+	IIIA
7	M/63	Antrum	Poorly	Perigastric	+	IV
8	F/51	Body	Moderately	Perigastric	+	IV
9	F/66	Body	Well	Submucosa	-	IA
10	M/69	Antrum	Moderately	Perigastric	+	IV

**Table 2.** Transcripts highly expressed in adenocarcinoma than in paired normal tissue. Frequency is the number of expression among 10 samples

Function	Accession no.	Gene	2Log(T/N)	Frequency
Metabolism	NM_014018	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein S28 (MRPS28), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	3.20	10
Cell cycle regulator	AF246221	Integral membrane protein 2B	2.73	10
Cell cycle regulator	U09412	Zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	3.17	9
Cell cycle regulator	D14678	Kinesin-like 2	3.05	9
Gene/protein expression	AB014546	Ring finger protein (C3HC4 type) 8	2.88	9
Signal transduction	Y09160	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	2.66	9
Gene/protein expression	NM_016042	CGI-102 protein	2.34	9
Signal transduction	M16660	Heat shock 90 kD protein 1, beta	1.76	9
Cell structure/motility	U80184	Flightless I (Drosophila) homolog	2.81	8
Gene/protein expression	D13641	Translocase of outer mitochondrial membrane 20 (yeast) homolog	2.47	8
Immunology	U05875	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	2.31	8
Metabolism	D16562	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	2.26	8
Metabolism	L06419	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)	2.18	8
Angiogenesis	U03644	CBF1 interacting corepressor	2.09	8
Oncogene/tumor suppressor gene	Y00285	Insulin-like growth factor 2 receptor	2.04	8
Signal transduction	U02680	Protein tyrosine kinase 9	2.00	8
Oncogene/tumor suppressor gene	M14745	B-cell CLL/lymphoma 2	1.98	8
Metabolism	X69433	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP <sup>+</sup> ), mitochondrial	1.76	8
Cell cycle regulator	AF019968	Suppressor of variegation 3~9 (Drosophila) homolog	1.66	8
Metabolism	X12451	Cathepsin L	1.60	8
Gene/protein expression	AJ132712	Nuclear RNA export factor 1	1.59	8
Immunology	AF053004	Class I cytokine receptor	1.37	8
Miscellaneous				
Membrane transport	D16469	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal (vacuolar proton pump), subunit 1	3.38	10
Hematopoiesis	AF054175	Chromosome 14 open reading frame 2	2.23	9
Nutrient transport	AF104032	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 5	2.97	8

2Log(T/N) = 2Log(gastric adenocarcinoma tissue/noncancerous tissue).

**Table 3.** Transcripts highly expressed in normal tissue than in paired adenocarcinoma. Frequency is the number of expression among 10 samples

Function	Accession no.	Gene	2Log(T/N)	Frequency
Metabolism	S69232	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	-2.02	10
Signal transduction	AF146277	CD2-associated protein	-1.65	10
Metabolism	M14328	Enolase 1, (alpha)	-3.32	9
Metabolism	M98045	Folylpolyglutamate synthase	-3.27	9
Cell cycle regulator	U46571	Tetratricopeptide repeat domain 2	-3.14	9
Immunology	L41067	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 3	-2.93	9
Signal transduction	AB037801	Thyroid hormone receptor interactor 8	-2.72	9
Cell cycle regulator	AF206019	REV1 protein	-2.60	9
Signal transduction	AF263541	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4	-2.58	9
Cell structure/motility	M60922	Flotillin 2	-2.46	9
Cell structure/motility	AL031228	Collagen, type XI, alpha 2	-2.43	9
Gene/protein expression	AJ245553	Zinc finger protein	-2.36	9
Gene/protein expression	AF078103	Developmentally regulated GTP-binding protein 1	-2.21	9
Signal transduction	AB040890	KIAA1457 protein	-2.14	9
Immunology	U63336	Human MHC Class I region proline rich protein mRNA, complete CDs	-2.14	9
Cell cycle regulator	M11722	Deoxynucleotidyltransferase, terminal	-1.71	9
Gene/protein expression	AF064493	LIM domain binding 2	-1.53	9
Cell structure/motility	U61234	Tubulin-specific chaperone c	-3.75	8
Immunology	U60800	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	-3.32	8
Oncogene/tumor suppressor gene	AF116508	Ets transcription factor TEL-2b	-2.47	8
Cell structure/motility	AF070523	Vitamin A responsive; cytoskeleton related	-2.38	8
Metabolism	AB018551	Chromosome 16 open reading frame 7	-2.23	8
Immunology	AL117423	Calcium binding atopy-related autoantigen 1	-2.22	8
Immunology	AL049954	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	-2.12	8
Signal transduction	D26069	Centaurin beta2	-2.10	8
Immunology	Y14768	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	-2.00	8
Oncogene/tumor suppressor gene	X14723	Clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	-1.89	8
Oncogene/tumor suppressor gene	NM_000875	Insulin-like growth factor 1 receptor	-1.85	8
Oncogene/tumor suppressor gene	M18391	EphA1	-1.81	8
Immunology	Y08915	Immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	-1.80	8
Angiogenesis	AF035121	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	-1.72	8
Metabolism	AB014547	Myotubularin related protein 4	-1.70	8
Signal transduction	NM_014316	Calcium-regulated heat-stable protein (24kD)	-1.70	8
Oncogene/tumor suppressor gene	D16217	Calpastatin	-1.62	8
Oncogene/tumor suppressor gene	X60114	C-src tyrosine kinase	-1.61	8
Cell cycle regulator	M87338	Replication factor C (activator 1) 2 (40kD)	-1.53	8
Cell structure/motility	M92642	Collagen, type XVI, alpha 1	-1.43	8
Gene/protein expression	U51920	Signal recognition particle 54 kD	-1.43	8
Miscellaneous				
Hematopoiesis	AK001934	HSPC126 protein	-2.44	9
Hemoglobin	V00491	Hemoglobin, alpha 1	-2.67	9
Proliferation	NM_005780	Lipoma HMGIC fusion partner	-1.84	8
Protein degradation	AL050254	F-box only protein 7	-3.20	9
Related to cancer	AB033492	HHDC for homolog of Drosophila headcase	-2.04	8

2Log(T/N) = 2Log(gastric adenocarcinoma tissue/noncancerous tissue).

1) Differentially expressed genes in gastric cancers

모든 위선암 조직에서의 유전자 발현은 다양한 결과를 나타내었다. 그러나, 그런 다양한 유전자 발현에도 불구하고, 2,541개의 cDNA 분절들과 EST 중에서 44개(1.73%)는 8개 이상의 위암조직(>80%)에서 비종양성 조직에 비해 높게 발현되었고, 26개는 알려진 유전자였다. 그리고, 92개(3.62%)는 80% 이상에서 위암조직에 비해 비종양성 조직에서 높게 발현되었으며, 이들 중 43개는 이미 알려진 유전자였다. Gene/protein expression, cell cycle regulator, metabolism 등에 관련된 유전자들은 대개 비종양성 조직에 비해 위선암 조직에서 높게 발현되었고, 반면에 oncogene/tumor suppressor gene, cell structure/motility, immunology 등에 관련된 유전자들은 대개 위선암 조직에 비해 비종양성 조직에서 높게 발현되었다. Table 2와 3에서 8개 이상의 위선암 조직에서 비종양성 조직에 비해 높거나 낮게 발현된 유전자들을 표시하였다.

2) Validation of microarray study

cDNA microarray를 통해 나타난 위선암 조직과 비종양성 위조직에서의 유전자들의 서로 다른 발현의 결과를 확인하기 위해 EphA1;MI18391, CAST;D16217, MAN1B1;NM\_007230, IFNGR2;U05875, 4개의 유전자를 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. 반정량 RT-PCR의 시행 결과는 Fig. 1에서 보는 것과 같이 microarray의 결과와 일치하였다. 이러한 일치의 결과는 위선암의 발생과 진행에 있어서 비종양성 정상 위조직에 비해 위선암에서 높거나 낮게 발현되는 유전자들의

연구에 cDNA microarray를 이용하는 것에 대한 신뢰성과 합리성을 입증할 수 있다.

고찰

고집적 cDNA microarray를 이용한 연구는 한 번의 실험에서 수 천 이상의 유전자 발현을 측정할 수 있다. 각각의 종양의 분자생물학적 특성을 나타내는 개별 유전자들의 수 천의 집합에 대한 이러한 빠른 분석과 매우 다양한 유전자 발현 양상에 대한 해석을 통해 종양의 원인과 행태에 대한 더욱 많은 이해가 이루어 질 수 있을 것으로 생각되고 있다. 암의 유전자 발현 형태는 암 형질의 분자생물학적 측면에 대한 이해를 통해 암 치료에 새로운 측면을 제공해 줄 수 있다. 유전자 발현의 형태에 대한 분석을 통해 현재까지 알려져 있지 않던 악성 종양의 세분화된 분류가 가능해 질 수 있을 것이며, 또한 종양의 합리적인 분류에 있어서도 진전이 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 저자들은 인간 위암암에서 분리한 4,600개의 cDNA를 포함하고 있는 cDNA microarray를 이용하여 위선암 조직과 비종양성 조직에서의 유전자 발현의 차이를 분석함으로써 위선암의 악성화와 진행에 관련된 유전자 정보들의 특징적인 변화들을 알아보고자 하였다. 위선암 조직과 비종양성 조직의 유전자 발현 차이는 비교적 뚜렷하였는데 이는 위선암 조직에서 집적되어 나타난 유전자 발현 형태가 위선암의 특징을 효율적으로 나타낼 수 있음을 의미하는 것으로 생각된다.

본 연구에서 gene/protein expression (RNF8;AB014545, NXF1;AJ132712, TOM20;D13641, RRP40;NM\_016042), cell cycle regulator (SUV39H1;AF019968, ITM2B;AF246221, KNSL2;D14678, ZNF134;U09412), metabolism (ATP5C1;D16562, PLOD;L06419, MRPS28;NM\_014018, CTSL;X12451, IDH2;X69433)에 관련된 유전자들은 비종양성 위조직에 비해 위선암에서 높게 발현되었다.

Ring finger motif은 cysteine-rich Zn<sup>2+</sup>-binding domain을 그 특징으로 하며, 다양한 단백질의 superfamily로 이루어진다.(8,9) Ring finger domain은 단백질-DNA 그리고 단백질-단백질 간의 상호반응에 관련하며, 이들을 토대로 유전자 발현의 조절, 신호 전달, 단백질 분해반응 등을 포함하는 다양한 기본적인 세포 반응 조절에 관련하게 된다.(10-12) 위선암의 발생에서 ring finger 단백질의 역할은 아직 보고되지 않았으나 본 연구에서 위선암에서 비교적 높게 발현되는 결과를 보였다.

미토콘드리아 외막에 위치하는 translocase (Tom20)는 미토콘드리아의 preprotein의 전위 시스템의 주요한 수용체로 알려져 있다. 한편, Bcl-2는 apoptosis의 중요한 저해제로, 주요한 구성 요소로서 미토콘드리아 외막에 삽입되어 있는 carboxy-말단의 소수성 분절을 포함한다. 최근 Bcl-2가 미토콘드리아 외막의 Tom20과 상호 작용함을 보여주는 보고

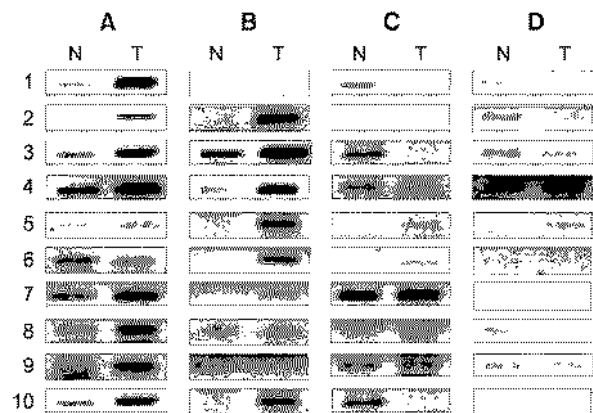


Fig. 1. RT-PCR results for the 4 tested genes in the gastric adenocarcinomas and the paired normal gastric samples. Sample numbers (1 to 10) are shown on the left. N indicates the paired normal tissue; T, tumor tissue. Column A and B show that the higher expression of (A) MAN1B1;NM\_007230, (B) IFNGR2; U05875 in the tumor tissues. The expressions of (C) EphA1; M18391, (D) CAST; D16217 are lower in the tumor tissues.

가 있었다.(13) 위선암의 발생 또는 진행 과정에서 Tom20의 역할은 아직 보고된 바 없으나, Bcl-2와의 상호 작용과 관련하여 위선암에서의 Tom20의 역할은 더 연구될 가치가 있다고 생각된다.

Exosomes은 세포 내 기원의 막성 소포로서, 다양한 기원의 살아있는 세포에 의해 실험적으로 생성, 분비됨이 보고되었다.(14) Exosomes은 종양항원이 항원표지자 세포에 전달되는 데 관여하며, 또한 특정한 면역반응의 자극에도 관여한다. 본 연구에서 위선암 조직에서 높게 발현된 Rrp40은 exosome 복합체의 한 구성요소로,(15) 위선암에서의 종양항원과 관련된 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

Suv39H1 Histone methyl transferase (HMTases)는 포유동물 발달단계를 위한 중요한 epigenetic 조절인자로, pericentric heterochromatin에 의한 silencing에 관여한다.(16) Suv39H1을 제거한 쥐는 남성 감수분열 과정에서 교란된 염색체 상호 반응, 종양 위험성의 증가와 관련된 염색체 불안정성을 보이며, 심각한 생존의 장애를 보인다.(17) 발달 단계에서의 Suv39H1의 제거에 의한 종양 위험성의 증가가 인간의 위선암 발생에 어떤 영향을 미치는지 보고된 바는 없다.

Integral membrane protein 2B (ITM2B)는 caspase-의존성 미토콘드리아 경로를 통해 항상성(homeostasis) 유지에 필수적인 세포괴사(apoptosis)를 유도한다.(18) IL-2에 의해 자극된 T 세포에서의 ITM2B의 짧은 형태(short form)의 발현은 세포괴사를 유도하는 반면,(18) ITM2B의 긴 형태(long form)의 과도한 발현은 세포괴사를 유도하지 않는다고 보고되었다.(19) 본 연구에서 ITM2B의 위선암 조직에서의 과발현이 관찰되었으나, 향후 면역형광염색법 등을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Kinesin 유사 단백질은 세포내 이동에 있어 중요한 역할을 하는 미세관 복합 운동 요소(microtubule-associated motors)로, 체세포분열/감수분열에 있어 spindle 형성과 염색체운동에 관여한다고 여겨지고 있다.(20,21) 망막아세포종(retinoblastomas)으로부터 클로닝된 kinesin 유사 단백질 또는 다른 연관된 유전자들이 망막아세포종(retinoblastomas)의 악성화 진행에 관련하는 종양발생 유전자일 가능성이 보고되고 있으나,(22) 위선암에서의 연관성은 아직 알려지지 않았다.

Cathepsin L은 세포 내 단백질 이화작용에 있어 중요한 역할을 하는 리소솜 시스테인 단백질분해효소이며, 또한 실험에서는 가장 강력한 콜라겐 분해력과 엘라스틴 분해력을 나타내었다. Watanabe 등(23)이 시스테인 단백질분해효소인 cathepsin B와 L이 위암의 증식과 진행에 연관되었다고 보고한 이후, 위암 생성과정에서의 cathepsin B와 L의 역할에 대한 많은 보고가 이루어지고 있다. 조직 침투와 전이를 나타내는 위암에서 cathepsin의 활성이 높게 나타나며, 암 조직에서 cathepsin B 활성이 높은 경우 상대적으로 광범위한 절제적 치료가 필요할 것으로 생각되고 있다.(24) 위암 조직에서의 Cathepsin L은 그 단백질분해 능력에 의해 주위의

세포외부 매트릭스(matrix)의 파괴를 통해 위암 세포의 침투에 있어 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.(25) 1995년, Plebani 등(26)은 cathepsin B와 L이 위암 진행에 있어 중요한 역할을 조직병리를 가지는, 즉 그 예후가 나쁜 위암에서 cathepsin한다고 보고하였다. 전이가 있고, 그 분화도가 낮은, 미분성의이 높게 발현된다. 또한 cathepsin은 암 침투성의 과정에 있어 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 암 전단계에서 암으로의 진행에도 작용하는 것으로 보고되었다.(27) 최근에 들어 원발성 종양의 전이성 잠재력을 나타낼 수 있는 특정한 표식자를 확인하는 것의 중요성은 더욱 높아지고 있다. 최근의 한 보고에 따르면, 정맥 침투를 보이는 위암에서는 그렇지 않은 위암보다 cathepsin L 발현이 더 높게 나타나고, 반면에 림프성 침투를 보이는 위암은 그렇지 않은 것에 비해 cathepsin B 발현이 더 높게 나타난다고 하였다.(28) 이 보고는 전이의 형태에 따른 cathepsin의 역할을 강조하였고, 조기 위암에 있어서의 치료 전략은 cathepsins의 발현 형태나 정도에 따라 변화될 필요가 있다고 결론짓고 있다. 본 연구에서 초기 위암의 평균 cathepsin L의 2 Log (adenocarcinoma/noncancerous tissue) 값은 1.0255이며, 진행성 위암에서는 1.7473으로 비록 통계적 유의성을 보이지는 못했으나 그 발현의 추세는 이전의 보고들과 일치한다.

본 연구에서 oncogene/tumor suppressor gene (TEL2; AF116508, CAST;D16217, EphA1;M18391, IGF1R;NM\_000875, CLU;X14723, CSK;X60114), cell structure/motility (JWA; AF070523, COL11A2;AL031228, FLOT2;M60922, COL16A1; M92642, TBCC;U61234), immunology (AHCYL1;AL049954, CBARA1;AL117423, NFATC3;L41067, SEMA4D;U60800, CAT56;U63336, IGBP1;Y08915, LTB;Y14768)에 관련한 유전자들은 비종양성 위조직에 비해 위선암에서 낮게 발현되었다.

효모에서 TEL2 유전자는 telomere의 길이를 조절하며, subtelomeric region에서 유전자의 silencing에 관여한다.(29) TEL2는 TEL ETS (E26 transformation-specific) family의 포유동물에서의 하위 분류 중 두 번째 분류에 속하는 것으로, 그 원형인 TEL은 인간의 악성 종양들에서 나타나는 다양한 염색체 전이에 관련한다고 보고되었다.(30) 또한 retinoic acid 수용체 α와 bone morphogenic protein-6B (BMP-6) 유전자가 TEL2에 의해 특이적으로 억제됨을 보여, 분화 억제인자로서의 TEL2의 기능을 보고하였다. 인간의 악성 종양에서의 TEL의 역할과 MHC cluster 안에 위치하는 TEL2의 위치 때문에 TEL2는 인간의 악성 종양에서 염색체의 전위에 관련할 것으로 생각된다. 본 연구에서 TEL2는 위선암 조직에서 비종양성 위조직에 비해 낮게 발현되었으나, 위선암의 발생, 진행에서의 TEL2의 역할에 대해서는 추후의 계속된 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Calpastatin (CAST)은 calpain (calcium-dependent cysteine proteolysis)의 억제 인자이다. 칼슘 의존성 단백질분해는 종양

을 가진 동물의 골격근과 심장에서 활성화되며, cancer cachexia를 특징으로 나타내는 근육 단백질의 고이화 반응(hypercatabolic response)을 시작하게 하는 데 관련할 것으로 보고되었다.(31) 또한 calpain은 cell death에 중요한 역할을 한다고 보고되었다.(32) 그들의 연구는 중심부에서 주변부까지의 종양 조직들에 대한 RT-PCR 분석을 통해 calpain과 CAST의 mRNA발현이 변화되어 calpain/calpastatin 비가 증가되었음을 보여주었다. 즉, calpain의 양과 활성이 증가됨을 보여 calpain이 세포사(cell death)에 관여함을 보고하였다. 본 연구에서는 CAST의 발현이 위선암 조직에서 낮게 발현되어 위선암의 진행에서도 CAST의 역할이 있을 것으로 생각된다.

Receptor tyrosine kinase의 Eph family와 그들의 세포 표면 ligand인 Ephrins은 소화기 암을 포함한 다양한 암에서 자주 높게 표현된다.(33) Ephrin A1는 receptor tyrosine kinase인 EphA2에 부착한다. EphA2는 악성 흑색종과 전립선 암세포에서 과발현되는 것으로 보고되었다.(34) 그들의 연구에 의하면 EphA1에 의한 EphA2의 autocrine 자극은 접촉 저해(contact inhibition)를 극복하는 간접적인 성장 신호를 유발할 수 있다. 본 연구에서 EphA1은 위선암에서 낮게 발현되었는데, 접촉 저해와 위선암의 진행과의 관계가 추후 연구되어야 될 것으로 생각된다.

혈청에서의 인슐린양 성장호르몬 1 (insulin-like growth factor 1)의 높은 농도는 유방암, 전립선암, 대장직장암, 폐암의 위험도를 높이는 것과 관계가 있을 것으로 보고되었다.(35) IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor)은 여러 가지 악성 종양으로의 변화 기전에 관련할 것으로 생각된다. IGF1R은 암세포의 성장, 부착, 세포괴사로부터의 보호 등에 관련할 것으로 여겨진다.(36) 본 연구에서 IGF1R은 위선암 조직에서 낮게 발현되었는데 기존의 유방암, 전립선암, 대장직장암, 폐암 등과는 다른 위선암의 역할에 대해 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

T7-based amplification과 cDNA microarray를 통한 위선암에서의 유전자 발현에 대한 본 연구는 위선암에서 비종양성 위조직에 비해 높거나 낮게 발현되는 많은 유전자들을 제시하였다. 고찰에서 이 유전자들의 알려진 기능 일부를 제시하였으나, 아직 위선암에서의 각각의 유전자들의 역할은 대부분 정확하게 밝혀져 있지는 않다. 또한 이 연구는 위암에 있어서 cDNA microarray를 통한 유전자 발현 패턴 인식의 가능성을 보여주고 있어 향후 보다 많은 증례를 통한 대규모 연구가 진행된다면 한국인의 위선암에서의 유전자 발현 패턴을 확보할 수 있을 것으로 생각된다. 비록 본 연구 결과들이 충분하지는 않지만, 여기서 기술된 유전자들은 향후 각각의 유전자들에 대한 위선암의 분자생물학적

측면 및 진단, 치료에 대한 연구가 진행됨에 있어서 새로운 출발점이 될 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E, eds. Trends in cancer incidence and mortality. Lyon, France: IARC Scientific Publications, 1993. (IARC scientific publications no. 102.)
- Pietu G, Alibert O, Guichard V, Lamy B, Bois F, Leroy E, Mariage-Sampson R, Houlgatte R, Soularue P, Auffray C. Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array. *Genome Res* 1996;6:492-503.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10614-10619.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997;278:680-686.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14:457-460.
- Huang F, Adelman J, Jiang H, Goldstein NI, Fisher PB. Identification and temporal expression pattern of genes modulated during irreversible growth arrest and terminal differentiation in human melanoma cells. *Oncogene* 1999;18:3546-3552.
- Backert S, Gelos M, Kobalz U, Hanski ML, Bohm C, Mann B, Lovin N, Gratchev A, Mansmann U, Moyer MP, Riecken EO, Hanski C. Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int J Cancer* 1999;82:868-874.
- Borden KL, Freemont PS. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:395-401.
- Freemont PS. The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 684:174-192.
- Freemont PS. RING for destruction? *Curr Biol* 2000;10:R84-R87.
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000;10:429-439.
- Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000;102:549-552.
- Motz C, Martin H, Krimmer T, Rassow J. Bcl-2 and Porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 2002;323:729-738.
- Schartz NE, Chaput N, Andre F, Zitvogel L. From the anti-

- gen-presenting cell to the antigen-presenting vesicle: the exosomes. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:372-381.
15. Brouwer R, Allmang C, Rajmakers R, van Aarssen Y, Egberts WV, Petfalski E, van Venrooij WJ, Tollervey D, Pruijn GJ. Three novel components of the human exosome. *J Biol Chem* 2001;276:6177-6184.
  16. Vaute O, Nicolas E, Vandell L, Trouche D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 2002;30:475-481.
  17. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001;107:323-337.
  18. Fleischer A, Ayllon V, Rebollo A. ITM2B(s) regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrane potential. *Eur J Immunol* 2002;32:3498-3505.
  19. Fleischer A, Ayllon V, Dumoutier L, Renaud JC, Rebollo A. Proapoptotic activity of ITM2B(s), a BH3-only protein induced upon IL-2-deprivation which interacts with Bcl-2. *Oncogene* 2002;21:3181-3189.
  20. Lai F, Fernald AA, Zhao N, Le Beau MM. cDNA cloning, expression pattern, genomic structure and chromosomal location of RAB6KIFL, a human kinesin-like gene. *Gene* 2000;248:117-125.
  21. Tokai N, Fujimoto-Nishiyama A, Toyoshima Y, Yonemura S, Tsukita S, Inoue J, Yamamoto T. Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle. *EMBO J* 1996;15:457-467.
  22. Chen D, Pajovic S, Duckett A, Brown VD, Squire JA, Gallie BL. Genomic amplification in retinoblastoma narrowed to 0.6 megabase on chromosome 6p containing a kinesin-like gene, RBKIN. *Cancer Res* 2002;62:967-971.
  23. Watanabe M, Higashi T, Hashimoto M, Tomoda I, Tominaga S, Hashimoto N, Morimoto S, Yamauchi Y, Nakatsukasa H, Kobayashi M, et al. Elevation of tissue cathepsin B and L activities in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1987;34:120-122.
  24. Watanabe M, Higashi T, Watanabe A, Osawa T, Sato Y, Kimura Y, Tominaga S, Hashimoto N, Yoshida Y, Morimoto S, et al. Cathepsin B and L activities in gastric cancer tissue: correlation with histological findings. *Biochem Med Metab Biol* 1989;42:21-29.
  25. Chung SM. Variant cathepsin L activity from gastric cancer tissue. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:813-819.
  26. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, Rugge M, Grigioni WF, Nitti D, Naccarato R, et al. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995;76:367-375.
  27. Farinati F, Herszenyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Cardin R, Roveroni G, Rugge M, Nitti D, Grigioni WF, D'Errico A, Naccarato R. Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:2581-2587.
  28. Dohchin A, Suzuki JI, Seki H, Masutani M, Shioto H, Kawakami Y. Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma. *Cancer* 2000;89:482-487.
  29. Benard C, McCright B, Zhang Y, Felkai S, Lakowski B, Hekimi S. The *C. elegans* maternal-effect gene *clk-2* is essential for embryonic development, encodes a protein homologous to yeast Tel2p and affects telomere length. *Development* 2001;128:4045-4055.
  30. Gu X, Shin BH, Akbarali Y, Weiss A, Boltax J, Oettgen P, Libermann TA. Tel-2 is a novel transcriptional repressor related to the Ets factor Tel/ETV-6. *J Biol Chem* 2001;276:9421-9436.
  31. Costelli P, Tullio RD, Baccino FM, Melloni E. Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer* 2001;84:946-950.
  32. Ray SK, Patel SJ, Welsh CT, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3. *J Neurosci Res* 2002;69:197-206.
  33. Nakamoto M, Bergemann AD. Diverse roles for the Eph family of receptor tyrosine kinases in carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2002;59:58-67.
  34. Potla L, Boghaert ER, Armellino D, Frost P, Damle NK. Reduced expression of EphrinA1 (EFNA1) inhibits three-dimensional growth of HT29 colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2002;175:187-195.
  35. Furstenberger G, Senn HJ. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002;3:298-302.
  36. Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 2002;62:2942-2950.