

위암 조직내 Metallothionein의 면역 세포화학적 연구

양 승 하¹, 신 길 상, 김 완 중*
순천향대학교 ¹의과대학 병리학교실, 자연과학대학 생명과학부

Immunocytochemical Localization of Metallothionein in Gastric Adenocarcinoma

Seung-Ha Yang¹, Kil-Sang Shin and Wan-Jong Kim*

¹Department of Pathology, College of Medicine, Department of Life Science,
College of Natural Science, Soonchunhyang University, Chungnam, Asan, 336-745, Korea

(Received November 29, 2002; Accepted December 10, 2002)

ABSTRACT

Metallothionein(MT) is a family of ubiquitous, low molecular weight (6,000~7,000 D), cysteine rich (30~35%) inducible protein with a high affinity to metal ions and has no aromatic amino acids and histidine. Some of the known functions of MT include detoxification of heavy metals and alkylating agents and neutralization of free radicals. Also, this protein has been reported to involve in tumor pathophysiology and therapy resistance. MT expression may affect a number of cellular processes including gene expression, apoptosis, proliferation and differentiation. Many reports on the physiological and biochemical properties of MT have been published, but ultrastructural reports on the localization of MT in human gastric cancer tissues are extremely rare.

The present study was undertaken to examine the ultrastructural features and the localization of MT within the gastric adenocarcinoma.

Ultrastructures of gastric cancer cells were characterized by the high nuclear cytoplasmic ratio, the interdigitation between cells, the irregular nucleus containing much heterochromatin and the wide distribution of free ribosomes in the cytoplasm. Immunohistochemical reaction for MT was prominent in the gastric adenocarcinoma. And the immunogold labellings were more prominent within the nucleus than the cytoplasm. Particularly, immunogold particles were numerous seen at nucleolus or nucleolar associated heterochromatin. These results suggest that MT expression by gastric cancer cells is associated with cell proliferative activity and is possibly synthesized in the cytoplasm, and then the protein is transported into the nucleus to participate in any transcriptional steps.

Key words : Gastric adenocarcinoma, Immunogold labelling, Metallothionein (MT), Ultrastructure

이 논문은 2001년도 순천향대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Wan-Jong Kim, Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Chungnam, Asan, 336-745, Korea. Ph.: 041-530-1251, FAX: 041-530-1256, E-mail: wjkim56@suh.ac.kr

Copyright © 2002 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

Metallothionein(MT)은 1957년 Margoshes와 Vallee에 의해 말의 신장 피질부에서 규명된 금속과 결합하고 있는 단백질로써, 대부분 진핵세포내에 분포하고, 특히 척추동물의 간, 신장 및 장에 많이 분포하고 있다. 또한 MT는 주로 2가 양이온들인 카드뮴, 아연 혹은 구리와 결합하고 있는 것으로 알려져 있으며, 분자량이 6,000~7,000 dalton 정도인 저 분자량의 단백질로 주로 세포질 내에 분포하고 있다. 전체 아미노산의 22~23% 정도가 시스테인들로 이루어져 있으며, 방향족 아미노산 혹은 히스티딘이 존재하지 않는 것으로 밝혀져 있다(Danielson & Huang, 1982; Dunn et al., 1987; Naganuma, 1997). 사람의 경우 이 유전자군의 염색체 좌위는 16q13인 것으로 알려져 있고, 이 단백질의 iso-form들로서 모든 기관들에 분포하는 MT-1과 MT-2가 있고, 뇌에서 주로 발현되는 MT-3, 그리고 중층 편평상피조직에 분포하는 MT-4 등이 있다(Liberman et al., 1983; Ghosal & Jacob, 2000; Simpkins, 2000).

MT의 기능은 중금속의 해독작용이나 미량원소의 항상성에 관여하는 것으로 널리 알려져 연구되기 시작하였으나, 최근에는 대사과정의 산물로 생성되는 free radical을 제거하는 기능이나, 세포 간의 G1 및 S기에 구리이온 등을 세포질에서 핵내로 수송함으로써 DNA 합성과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Deung et al., 1994; Liu et al., 1998; Jayasurya et al., 2000; Waalkes, 2000).

최근에 이 단백질은 여러 유형의 암 조직들에서 발현이 증가하고, 항암제에 의한 저항성을 나타내는 데 관여하는 것으로 알려져 있다(Kondo, 1995). 사람의 방광암 생검 조직에서 MT-3의 합성이 유도되고, 암의 진행정도에 비례하여 이 단백질의 발현이 증가하기 때문에, 이 MT-3가 사람의 방광암에 대한 생물지표(biomarker)가 될 수 있을 것이라는 보고가 있다(Sens et al., 2000). 성상세포종(astrocytic tumor), 신장세포암(renal cell carcinoma) 혹은 위장관암(gastrointestinal cancer)의 경우 종양이 진행 단계에 따라 MT

조직화학적 염색성이 상대적으로 증가하며, 이 단백질의 발현 정도가 예후를 결정하는 요인이 될 수 있다고 보고하기도 하였다(Hiura et al., 1998; Miyazaki et al., 1998; Muramatsu et al., 2000; Tomita, 2000). 한편, 본 연구자들은 흰쥐를 대상으로 하여, 실험적 공간을 부분 절제한 후 재생되는 시간에 따라 MT가 발현되는 양상을 RT-PCR과 세포 면역화학적으로 조사하였던 결과, MT-mRNA는 재생 12시간, MT 단백질은 24시간이 경과한 후에 가장 높게 발현되었으며, 세포질에 비해 핵에서 보다 많은 반응산물인 금입자들이 분포하고 있음을 보고한 바 있다(Han et al., 1998; Kim & Shin, 2001). 국내외적으로, 현재까지 중금속에 노출된 조직이나 다양한 종류의 암조직에서 MT 분포에 관하여 면역화학적 방법을 통하여 이루어진 결과들은 대부분 광학현미경적 수준에서만 이루어져 왔을 뿐, 전자현미경 수준에서 금입자 표지법으로 조사된 경우는 매우 드물다.

한편, 위암(gastric cancer)은 암-관련 질환에 대한 사망률에서 2, 3위를 차지할 정도로 흔한 편이며, 대부분은 선암(adenocarcinoma)으로서 그 조직학적 특징이 다양하고, 여전히 임상 및 기초의학 분야에서 많은 연구가 이루어지고 있는 대상이다. 대부분 종양의 경우와 마찬가지로 위암의 치료와 예후를 규정짓는 인자는 진단시 악성도(grade)에 의존적 경향을 나타내며, 위장관암(gastrointestinal cancer)의 경우 종양이 진행 단계에 따라 MT 조직화학적 염색성이 상대적으로 증가하는 경향을 보이기 때문에, 암 조직내 이 단백질의 발현 정도가 암의 치료 및 예후를 결정하는 요인이 될 수 있을 것이라는 보고(Janssen et al., 2000)도 있는 바, MT의 분포와 정량적 관찰은 위암의 진행도를 추정하는 기초자료가 될 것으로 판단된다.

본 연구는 MT가 세포분열 혹은 세포증식과 연관이 있다는 보고들을 기초로 하여, 위암 조직에서 MT의 분포를 미세구조적 특징과 더불어 조직화학 및 면역 세포화학적으로 조사함으로써, 위암 조직 및 세포내 MT의 반응 정도와 localization을 추적하고, 이러한 결과들을 MT의 기능과 연관지어 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구의 재료로 사용된 위 조직은 순천향대학교 천안병원에서 위암으로 판정되어 수술받은 환자들로부터 얻어냈다.

통상적인 광학현미경 표본제작과정에 의해 만들어진 표본에서 파라핀을 제거하고, 1차 항체로서는 mouse monoclonal IgG antibody E9 (DAKO사)를 사용하여, ABC (Avidin-biotin peroxidase complex) 법으로 면역조직화학 염색을 실시하였다.

위암 세포의 미세구조를 관찰하기 위하여 통상적인 투과 전자현미경 표본을 제작하였다. 즉, 적출된 조직을 4% glutaraldehyde와 1% OsO₄에 고정한 후, 세척하여 Epon 혼합액에 포매하고, 초박절편을 제작하였다. Uranyl acetate와 lead citrate로 전자염색하여 투과 전자현미경 (JEOL-1010)으로 관찰하였다.

세포내 MT의 분포와 위치를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 면역-금 입자를 표지하는 면역 세포화학적 방법을 실시하였다. 반응액의 침투가 용이하도록 표본의 크기를 1 mm³ 이하로 세절하여 4°C에서 2% paraformaldehyde-0.5% glutaraldehyde 용액에 2시간 동안 고정한 후, sodium cacodylate buffer로 세척하고, ethanol 농도 상승순으로 탈수한 후 LR White 혼합액에 포매하여 중합시켰다. 블록을 LKB ultramicrotome으로 초박절편한 후 nickel grid 위에 mount하여 반응액들로 처리하였다. 우선 항체에 대한 비특이적 반응을 막기 위해 토끼 혈청으로 20분간 처리하고, 50배 희석된 MT에 대한 1차 항체를 4°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 immunogold buffer로 세척하고, immunogold buffer로 희석시킨 10 nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG를 2시간 동안 처리하였다. Uranyl acetate와 lead citrate로 대조 염색하여, 투과 전자현미경 (JEM-1010 TEM)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Metallothionein (MT)은 아연, 구리 및 2가 금속 이온들과 결합하는 저분자량의 단백질로서, 세포내에서

이러한 이온들의 저장, 수송 혹은 대사에 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며, 중금속에 대한 독성 완화작용이나, 이온화 방사선이나 알킬화합물에 대한 보호작용을 나타내는 것으로도 잘 알려져 있다. 이 단백질은 여러 성장인자들과 같은 세포 내적 요인이나, 중금속 노출과 같은 세포외적 요인에 의해 합성이 유도되는 것으로도 알려져 있다. 특히, MT는 실험동물들의 경우, 초기 발암과정에서 암세포의 apoptosis를 억제하는 기능도 있는 것으로 알려져 암의 발생이나 진행도에 대한 생물학적 지표(biological marker)로서 활용될 가능성이 있다는 보고도 있다. 즉 본 연구는 MT가 여러 종류의 세포들에서 분열 혹은 증식과 연관이 있다는 보고들을 기초로 하여, 사람의 위암 조직에서 미세구조적 특징과 더불어 이 단백질의 분포를 조직화학 및 면역 세포화학적으로 조사함으로써, 위암 조직 및 세포내 MT의 반응성과 분포를 조사하고, 이러한 결과들이 암의 진행 혹은 악성도와 어떠한 관계가 있는지를 살펴보고자 하였다.

위암 조직내에서 관찰되는 몇몇 유형의 세포들의 미세구조는 중앙세포의 분화 정도에 따라 다양한 소견을 보였다. 대부분의 경우에서 관찰되는 특징들로서, 세포간 공간이 비교적 넓게 존재하고 있었고, 인접한 암세포들 사이에서 서로 세포질 돌기들에 의해 교합(interdigitation)하는 모습을 관찰할 수 있었다. 핵은 불규칙한 모양을 하고, 핵막의 두 층이 분리되어 있었으며, 핵세포질비(nuclear cytoplasmic ratio)가 크고, 이질염색질이 발달하고 있었다. 또한, 세포질 내에서는 크기가 작은 미토콘드리아도 많이 분포하였고, 다수의 유리 리보솜들이 세포질내에 집적되어 있었으며, 조면소포체와 공포들도 종종 나타나고 있었다. 이와 같은 위암 세포에서의 미세구조는 빠르게 증식하는 미분화세포들의 특징과 유사한 것으로 판단된다.

한편, MT에 대한 면역 조직화학 및 세포화학적 실험에 사용한 mouse monoclonal IgG antibody E9는 사람, 흰쥐 및 말에서 MT isoform I과 II에 대해 공통적인 epitope을 지니는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 면역반응에 대한 확인은 1차 항체를 사용하지 않은 실험대조군을 설정하여 조사하였는데 이 대조군에서는 어떠한 반응성도 나타나지 않았다. 위암 조직

내의 MT의 분포(localization)와 반응성(reactivity)을 알아보기 위하여 면역 조직화학적 방법으로 표본을 제작하여 관찰하였던 바, 정상 위 조직내의 상피층의 일부 세포들과 모세혈관 내피세포들에서 항-MT에 의한 양성반응을 볼 수 있었으며, 다른 부위들에서도 반응이 나타나기는 하였으나, 그 정도가 비교적 약한 것으로 조사되었다. 위암 조직내에서는 특히 상피층에서 MT에 대한 양성반응이 뚜렷이 증가하여 있었으며, MT의 반응성은 주로 핵에 집중되어 뚜렷이 관찰되었는데, 이러한 결과는 다른 암 조직들을 관찰하였던 다른 연구 결과들과 비교될 수 있는 것으로 판단된다(Kuroda et al., 1995; Nguyen et al., 2000). 또한, immunogold labelling을 이용한 면역 세포화학적 방법으로 MT의 localization이 세포내 어떤 소기관에 집중되어 있으며, 어느 정도의 density (gold particles의 수)를 나타내는지에 관해서도 조사하고자 하였다. 세포 면역화학적 관찰 결과, MT의 존재부위를 나타내는 금 입자들은 정상 세포들에서는 그 수가 매우 적었고, 핵과 세포질에서 비슷한 비율을 하는 것으로 관찰되었다. 위암 세포들을 대상으로 관찰한 결과 MT에 대한 금 입자의 분포는 크게 증가하였으며 핵과 세포질에서 모두 존재하였으나, 입자의 밀도는 핵에서 더욱 뚜렷한 것으로 관찰되었다. 특히 핵내에서 금 입자들은 주로 인에 집중되어 분포하는 경우가 많았으며, 핵막의 내부 핵 층판 부위 혹은 이질염색 부위에 다수 존재하는 경향을 보였다. 이러한 결과들은 MT가 세포질에서 합성되어, 핵내로 수송된 후 세포 증식 단계의 전사과정에 관여하기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구자들이 수행하였던 연구에서 재생 중인 간 조직에서 MT mRNA의 발현은 MT 단백질의 농도가 증가하는 시기보다 12시간 정도 선행되어 일어남을 관찰할 수 있었는데, 이러한 사실로 미루어 암조직에서도 MT 유전자의 발현은 발암초기에 일어날 것으로 생각된다(Saika, 1992; Miyazaki et al., 1998; Xu et al., 2000; Kuroda et al., 2002).

MT가 위암 세포에서 증가하는 것으로 조사된 본 연구는 앞으로 MT의 세포 증식과 연관된 기능을 규명하기 위한 기초연구로서, 이후 여러 유형의 암조직에서 암의 진행정도 및 세포유형에 따른 이 단백질의 발현 정도와 분포 위치 등을 연구할 필요성이 있

는 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Danielson KG, Ohi S, Huang PC: Immunohistochemical localization of metallothionein in rat liver and kidney. *J Histochem Cytochem* 30(10): 1033-1039, 1982.
- Deung YK, Kim DH, Kim WJ: A study on the protective roles of metallothionein in cadmium treated rat liver. *J Wonju College Med* 7: 50-60, 1994. (Korean)
- Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ: Metallothionein. *Proceed Soc Exp Biol Med* 185: 107-119, 1987.
- Ghoshal K, Jacob ST: Regulation of metallothionein gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 357-384, 2000.
- Han SC, Kil YC, Kim WJ: Cytochemistry on regeneration of rat liver. *Soonchunhyang J Nat Sci* 4(2): 285-291, 1998. (Korean)
- Hiura T, Khalid H, Yamashita H, Tokunaga Y, Yasunaga A, Shibata S: Immunohistochemical analysis of metallothionein in astrocytic tumors in relation to tumor grade, proliferative potential, and survival. *Cancer* 83(11): 2361-2369, 1998.
- Janssen AM, Duijn W, Oostendorp MM, Kruidenier L, Bosman CB, Griffioen G, Lamers CB, Krieken JH, Velde CJ, Verspaget HW: Metallothionein in human gastrointestinal cancer. *J Pathol* 192(3): 293-300, 2000.
- Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG: Correlation of metallothionein expression with apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 82(6): 1198-1203, 2000.
- Kim WJ, Shin KS: Metallothionein Induction in Liver Regeneration Stimulated by Partial Hepatectomy. *Kor J Biol Sci* 5: 263-266, 2001.
- Kondo Y, Woo ES, Michalska AE, Choo KH, Lazo JS: Metallothionein null cells have increased sensitivity to anti-cancer drugs. *Cancer Res* 55(10): 2021-2023, 1995.
- Kuroda K, Aoyama N, Tamura T, Sakashita M, Maekawa S, Inoue C, Wambura C, Shirasaka D, Minami R, Maeda S, Kuroda Y, Kasuga M: Variation in MT expression in early stage depressed type and polypoid type colorectal tumors. *Eur J Cancer* 38: 1879-1887, 2002.
- Lieberman MW, Beach LR, Palmiter RD: Ultraviolet radiation induced metallothionein 1 gene activation is associ-

- ated with extensive DNA demethylation. *Cell* 35 : 207-214, 1983.
- Liu J, Liu Y, Habeebu SS, Klaassen CD: Metallothionein (MT) null mice are sensitive to cisplatin induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 149(1): 24-31, 1998.
- Miyazaki H, Naitoh Y, Nakahashi Y, Yanagitani S, Kuno K, Ueno Y, Okajima A, Inoue K: Induction of metallothionein isoforms in rat hepatoma cells by various anticancer drugs. *J Biochem* 124(1): 65-71, 1998.
- Muramatsu Y, Hasegawa Y, Fukano H, Ogawa T, Namuba M, Mouri K, Fujimoto Y, Matsuura H, Takai Y, Mori M: Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses. *Anticancer Res* 20(1A): 257-264, 2000.
- Naganuma A: Metallothionein. *Nippon Rinsho* 55(5): 1091-1095, 1997.
- Nguyen A, Jing Z, Mahoney PS, Davis R, Sikka SC, Aggawal KC, Abdel AB: In vivo gene expression profile analysis of metallothionein in renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 160(2): 133-140, 2000.
- Saika T: Immunological study of induction of metallothionein in bladder cancers. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 83(5): 643-649, 1992.
- Sens MA, Somji S, Lamm DL, Garrett SH, Slovinsky F, Todd JH, Sens DA: Metallothionein isoform 3 as a potential biomarker for human bladder cancer. *Environ Health Persp* 108(5): 413-318, 2000.
- Simpkins CO: Metallothionein in human disease. *Cell Mol Biol* 46(2): 465-488, 2000.
- Tomita T: Metallothionein in pancreatic endocrine neoplasms. *Mol Pathol* 13(4): 389-395, 2000.
- Waalkes MP, Rehm S, Cherian MG: Repeated cadmium exposures enhance the malignant progression of ensuing tumors in rats. *Toxicol Sci* 54(1): 110-120, 2000.
- Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X: Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Comm* 278(2): 318-325, 2000.

< 국문초록 >

사람의 위암 조직을 미세구조와 metallothionein (MT)에 대한 면역 조직 및 세포화학적 방법으로 조사하였던바, 다음과 같은 결과를 얻어냈다.

위암 세포들은 핵 세포질비가 정상세포에 비해 크고, 불규칙한 핵과 이질염색질의 분포가 증가하였으며, 세포질내에서 유리리보솜의 분포가 뚜렷이 증가하였다.

면역 조직 및 세포화학적 방법으로 MT의 발현을 조사하였던 결과, 이 단백질은 위암조직의 암세포에서 반응성이 높게 나타났으며, 주로 핵 부위에 집중되는 경향을 보였으며, 특히 이질염색질과 인 부위에서 면역 금입자들이 주로 분포하는 것으로 관찰되었다.

이러한 결과들은 위암 세포의 미세구조가 미분화세포들이 나타내는 일반적인 특징과 비교되었으며, 위암 세포에서 MT가 증가하는 현상은 이 단백질이 세포질에서 합성되어 핵내로 수송된 후, 세포 증식을 위한 전사과정에 관여할 것임을 시사하는 것이다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Immunohistochemistry of metallothionein (MT) in the moderately differentiated gastric adenocarcinoma, showing overall MT positive reaction. ABC reaction. $\times 100$
- Fig. 2.** Immunohistochemistry of metallothionein (MT) in the well differentiated gastric adenocarcinoma. The reaction products are more prominently observed at the glands. ABC reaction. $\times 100$
- Fig. 3.** Ultrastructure of the gastric adenocarcinoma cells. The nuclear cytoplasmic ratio is high and the nuclei contain much heterochromatin. Free ribosomes are also fully distributed. Col; collagen fibers, IS; intercellular space
- Fig. 4.** Ultrastructure of the gastric adenocarcinoma cells. The oval nucleus has a prominent nucleolus and clumps of heterochromatin. Rough endoplasmic reticulum is severely swelled. BL; basal lamina, Eu; euchromatin, No; nucleolus, RER; rough endoplasmic reticulum
- Fig. 5.** Immunogold labelling for MT in the normal gastric cell. The immunogold particles (arrows) are moderately distributed at both the nucleus and the cytoplasm.
- Fig. 6.** Experimental control without treatment of anti MT in the gastric adenocarcinoma cell. No immunogold particle indicating the localization of reaction product appears.
- Fig. 7.** Immunogold labelling for MT in the gastric adenocarcinoma cell. The immunogold labellings (arrows) are more obvious at the nucleus.
- Fig. 8.** Immunogold labelling for MT in the gastric adenocarcinoma cell. Numerous immunogold particles (arrows) are mostly distributed at heterochromatin.
- Fig. 9.** Immunogold labelling for MT in the gastric adenocarcinoma cell. Numerous immunogold particles (arrows) are obviously distributed at nucleolus.





