

## 위암 환자의 혈액에서 Telomerase 활성도 검출의 의의

대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>진단검사의학과교실

정순재 · 박기호 · 유용운 · 박성환 · 이한일 · 주대현 · 박기혁 · 최동락 · 전창호<sup>1</sup>

### Detection of Peripheral Blood Telomerase Activity from Gastric Cancer Patients

Soon Jal Jung, M.D., Ki Ho Park, M.D., Young Woon Yu, M.D., Sung Hwan Park, M.D., Han Il Lee, M.D., Dae Hyun Joo, M.D., Ki Hyuk Park, M.D., Dong Rak Choi, M.D. and Chang Ho Jeon, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Surgery and <sup>1</sup>Laboratory Medicine, Daegu Catholic University School of Medicine, Daegu, Korea

**Purpose:** Telomerase activity is generally absent in primary cell cultures and normal tissues. Telomerase is known to be induced upon immortalization or malignant transformation of human cells. Telomerase activity can be increased in immature lymphocytes and activated lymphocytes, but it is not detected in the peripheral blood of normal persons. The authors analyzed peripheral blood telomerase from patients of gastric cancer to evaluate the possibility of using it for diagnosis and as a prognostic factor.

**Materials and Methods:** We obtained blood samples from 11 inflammatory patients and 64 gastric cancer patients. The telomerase activity was measured using the [PCR-ELISA] method. The results were correlated with the T, N, M stage, cell differentiation, vascular, neural, and lymphatic invasion, tumor size, and tumor location.

**Results:** In the 11 inflammatory patients, telomerase activity was not detected while in the gastric cancer patients, a positive rate of 28.1% was noted. The peripheral telomerase activity was not related with tumor size, tumor site, lymphatic and vascular invasion, stage, or histologic differentiation.

**Conclusion:** The peripheral blood telomerase activity for patients of gastric cancer can be utilized as a marker for the diagnosis of not only advanced gastric cancer, but also relatively early stage gastric cancer, but not as a prognostic factor. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2003;3:201-205)

**Key Words:** Telomerase, Peripheral blood, Gastric cancer  
**중심 단어:** 텔로머라제, 말초혈액, 위암

### 서 론

위암은 우리나라에서 악성 종양 중 발생률이 가장 높으며, 이 중 조기위암은 수술 후 5년 생존율이 90% 이상의 좋은 예후를 보이는 암이다. 위암의 연구는 한편으로는 조기 진단 및 정확한 술 전 병기 결정과 다양한 방법의 맞춤형 치료 방법에 대해, 또 한편으로는 술 전에 환자의 예후를 알리고 하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 아직까지 내시경이나 상부 위장관 조영술 같은 위에 대한 직접적인 검사를 제외하고는 암의 조기 진단이나 술 전에 환자의 예후를 알 수 있는 비침습적 진단방법은 많지가 않으며 그 정확도 역시 임상적용에는 무리가 있다. Telomere는 진핵세포 염색체의 양단에 존재하고 수백, 수천개의 TTAGGG 염기 서열의 반복과 단백질로 구성되어 있으며, 염색체의 안정성을 유지하고 유전정보를 보존하는 역할을 한다.(1) Telomere는 세포분열시 마다 복제되지 못하고 길이가 짧아져 결국 소실되고 불완전한 DNA 복제를 유발해 세포사가 일어난다.(2) Telomerase는 RNA와 단백질로 구성되어 있는 RNA 의존성 DNA 중합효소로 telomere를 합성함으로써 그 길이를 유지하여 세포노화와 세포사를 막아주는 역할을 한다고 알려져 있다.(3-5) Telomerase는 정상세포에서는 그 활성도가 미약해 거의 검출되지 않으며, 암 등의 불멸세포에서 검출되어 암의 생성 및 성장원인의 하나로 거론되고 있다.(6) 위암에서도 암 발생 초기에 유전자가 불안정해지고 telomere가 짧아지며, telomerase 활성도가 증가한다.(7,8) 또한 조직에서의 telomerase 활성도는 위암의 진행이나 전이와도 관련이 있는 것으로 알려져 위암 발생에 중요한 과정으로 보고되고 있다.(9-11) 여러 학자들의 보고에 의하면 Telomerase 활성도가 증가되어 있는 위암은 증가되지 않은 위암보다 일반적으로 aneuploid patterns, 간 등의 전이가 많고 생존율이 낮은 경향이 있다고 한다.(12,13) 또 Telomerase는 미성숙 임파구의 자극을 받아 활성화된 임파구 등에서

책임저자 : 정순재, 대구 남구 대명 4동 3056-6  
대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, 705-718  
Tel: 053-650-4056, Fax: 053-624-7185  
E-mail: eensu@cu.ac.kr

접수일 : 2003년 11월 12일, 게재승인일 : 2003년 11월 18일  
본 논문의 요지는 2003년 추계 위암학회에 포스터로 발표하였음.

활성도가 증가할 수 있으나, 일반적으로 암이 아닌 단순 염증성 질환 환자의 말초혈액 임파구에서는 검출되지 않는 것으로 알려져 있다.(14,15) 이와 같이 위암조직에서 telomerase 활성도 측정에 관한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 위암환자의 혈액에서 telomerase 활성도를 측정한 연구는 찾아보기 어렵다. 따라서 저자들은 한국인에서 많은 위암 환자를 대상으로 혈중 telomerase 활성도를 측정하여 위암에서 진단적 적용 가능성을 검토해 보고자 하였다

**방 법**

건강검진 센터를 방문하여 정상으로 판정된 19인의 혈중 telomerase 활성도를 대조군으로 하였으며, 대조군의 평균 나이는 51.0+22.2세이며 성비는 남자 10명, 여자 9명이었다. 대조군 19명의 평균 telomerase 활성도는 0.07+0.03으로 나타났다. 따라서 활성도가 0.13을 초과하는 경우 양성으로 판정하였다. 대상군으로는 2000년 9월부터 2001년 3월까지 대구가톨릭의료원을 방문하여 위암으로 진단 받아 수술을 시행한 64명을 대상으로 하였다. 또 백혈구 활성화에 따른 혈중 telomerase 활성도 변화를 관찰하기 위하여 혈액 검사 상 백혈구가 10,000/ $\mu$ l 이상인 11명의 비종양성 환자 혈액을 각각 대상으로 하였다.

수술 전에 환자들의 혈액 5 ml를 채혈하여 즉시 실험실로 이송하였으며, 적혈구 용해시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 사용하여 적혈구를 제거하였다. 단핵세포층에 200 $\mu$ l의 CHAP lysis buffer를 주입하여 세포를 용해시키고, 16,000 g로 원심하여 상층액 160 $\mu$ l를 취하여, 검사 당일까지 영하 70°C에서 보관하였다.

Telomerase 활성도 측정은 Telo TAGGG telomerase PCR Elisa 시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 이용하여 시약 설명서에 의거하여 효소면역 검사법으로 telomerase 활성도를 측정하였다.

비종양성 환자는 telomerase 활성도의 증가 유무만을 확인하였고, 종양성 환자의 telomerase 활성도는 종양의 크기 및 위치, 침윤도, 림프관 전이 정도, 원격전이 정도, 병리학적 분화도, 림프관, 혈관, 신경 침윤 정도 등과 비교하였으며, 림프관, 혈관, 신경 침윤 정도는 광학 현미경적 소견으로 3 단계로 분류하였다.

본 연구는 본원의 임상시험위원회의 승인을 득하여 실시하였으며, 실험 대상자의 동의를 취득하였다. 실험결과와 상관관계 검증은 Chi-Squire test를 이용하였고 p-value는 0.05 미만을 통계학적으로 유의한 것으로 하였다.

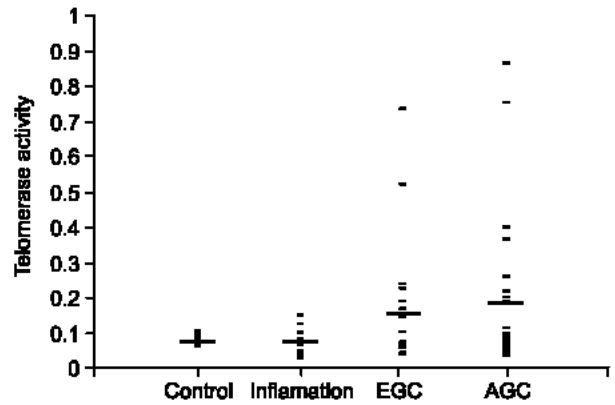
**결 과**

**1) 대상 환자 분석**

64명의 종양성 대상 환자의 평균 연령은 56.2+13.0세이

**Table 1.** Characteristics of neoplastic & non-neoplastic patients

	Neoplastic	Non-neoplastic
Number	64	11
Mean age	56.2+13.0	55.1+22.6
Male : Female	1.9 : 1	1 : 1.2
Stage		
IA	24 (37.5%)	
IB	11 (17.2%)	
II	13 (20.3%)	
IIIA	8 (12.5%)	
IIIB	0	
IV	8 (12.5%)	



**Fig. 1.** The distribution of telomerase activity in control and patients with inflammation, EGC, and AGC

며, 남녀의 성비는 1.9 : 1이었다. 조기위암이 27명(42.2%), 진행성 위암이 37명(57.8%)이었고, 환자의 병기별로는 IA 24명(37.5%), IB 11명(17.2%), II 13명(20.3%), IIIA 8명(12.5%), IV 8명(12.5%)로 각각 나타나 제 II 병기 이하가 75%를 차지하였다. 11명의 비종양성 환자의 평균 연령은 55.1+22.6세이며, 남녀의 성비는 1 : 1.2이었다(Table 1).

**2) Telomerase 활성도의 분석**

대조군의 평균 telomerase 활성도는 0.07+0.03이었고, 비종양성 염증 환자는 0.08+0.01로 나타나 약간의 차이를 보였으나(P<0.05) 대조군의 mean+2SD 범위 안에 모두 포함되어 있었다. 조기 위암 환자의 평균 telomerase 활성도는 0.17+0.31이었고, 진행성 위암 환자는 0.20+0.43으로 나타나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05)(Fig. 1).

**3) Telomerase 활성도 양성률**

비종양성 환자는 telomerase 활성도가 양성으로 나타나

**Table 2.** Positive rate of telomerase activity in 64 gastric cancer patients

Positive	Negative	Total
18 (28.1%)	46 (71.9%)	64

**Table 3.** Positive rate of telomerase activity according to the mean tumor size, location, EGC & AGC

	Positive	Negative	P-value
Mean tumor size	3.73+2.18	4.00+2.25	.670
Site			.284
Upper thirds	2 (66.7%)	1 (33.3%)	3 (100%)
Middle thirds	3 (21.4%)	11 (78.6%)	14 (100%)
Lower thirds	13 (27.7%)	34 (72.3%)	47 (100%)
EGC	9 (33.3%)	18 (66.7%)	27 (100%)
AGC	9 (24.3%)	28 (75.7%)	37 (100%)
Total	18 (28.1%)	46 (71.9%)	64 (100%)

EGC = early gastric cancer, AGC = advanced gastric cancer.

에가 11명 중 한 예에서도 없었다. 중앙성 환자는 64명 중 18명에서 양성으로 나타나 평균 양성률은 28.1%였다(Table 2).

**4) 중앙성 환자의 telomerase 양성률 분석**

측정된 telomerase 활성도 양성률과 중앙의 크기 및 위치, 침윤도, 림프절 전이 정도, 원격전이 정도, 병리학적 분화도, 림프관, 혈관, 신경 침윤 정도 등과 비교한 결과 의미있는 상관관계를 보이는 인자는 없었다(Table 3, 4).

**고 찰**

Telomere는 진핵세포 염색체의 양단에 존재하고 수백, 수천개의 TTAGGG 염기 서열의 반복과 단백질로 구성되어 다른 DNA가 염색체 말단에 잘못 결합하는 것을 막아주어 염색체의 안정성을 유지하는 역할을 한다. 정상세포에서의 세포분열에서는 DNA 복제 시 telomere는 복제되지 않고 세포분열마다 50~200개의 핵산염기 소실되어 길이가 짧아져 염색체의 안정성이 소실되어 세포사에 이르게 된다. 그러나 암세포는 세포사 없이 지속적인 세포분열이 일어나는데 여기에는 telomere를 복제하는 telomerase가 관여하는 것으로 밝혀졌다. Telomerase는 RNA와 단백질로 구성되어 있는 RNA 의존성 DNA 중합효소로 세포분열 시마다 짧아지는 telomere를 지속적으로 보충함으로써 염색체의 안정성을 유지할 수 있으며, 세포사로부터 벗어나 지속적인 세포분열

**Table 4.** Positive rate of telomerase activity according to the lymphatic, neural & vascular invasion & the stage

	Positive	Negative	p-value
Lymphatic invasion			.603
None	11 (26.9%)	30 (73.1%)	
Mild	5 (26.3%)	14 (73.7%)	
Severe	2 (50%)	2 (50%)	
Vascular invasion			.650
None	13 (28.3%)	33 (71.7%)	
Mild	5 (31.2%)	11 (68.8%)	
Severe	0	2 (100%)	
Neural invasion			.988
None	12 (28.6%)	30 (71.4%)	
Mild	5 (27.8%)	13 (72.2%)	
Severe	1 (25%)	3 (75%)	
Stage			.904
IA	6 (25%)	18 (75%)	
IB	4 (36.3%)	7 (63.7%)	
II	3 (23.1%)	10 (76.9%)	
IIIA	2 (25%)	6 (75%)	
IIIB	0	0	
IV	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Histology			.392
Differentiated	8 (32%)	17 (68%)	
Undifferentiated	10 (25.6%)	29 (74.4%)	

을 일으키는 것으로 알려졌다.

원발성 암세포가 혈액에 유리되기 위해서는 신생혈관이 생성되어야 하고, 또한 기저막을 뚫고 모세혈관으로 이동되어 비로소 전신혈액에 나타나게 된다.(16) 따라서 혈액에서 유리된 암세포를 검출하는 것은 암의 초기에는 잘 이루어지지 않을 것이다. 최근 분자생물학 진단기법의 발달로 혈중에 유리되는 소량의 암세포를 검출할 수 있게 되었다.(17-19) 이는 암의 치료 후 잔존세포 유무를 확인하는 minimum residual disease 검출에 응용하게 되었고, 또한 혈액 내 암세포 존재의 확인에도 사용하게 되었다. 저자들은 위암 환자를 대상으로 혈중 telomerase 활성도를 측정하여 위암의 진단과 예후 인자로서의 가능성을 검토하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

일반적으로 telomerase 활성도는恶性肿瘤 환자의 경우 각종 체강액에서 약 60~90%의 민감도와 90%의 특이도를 나타낸다고 하였으며, 말초혈액에서는 음성으로 알려져 있다.(14,15,20) 또 Soria 등(21)과, Tatsuma 등(22)과, Gauthier 등(23)은 각각 유방암, 간암, 폐 및 대장암 환자들의 말초혈액에서 telomerase 활성도를 측정하여 70~80%의 민감도를 보인다고 하였다. 본 연구 결과에 따르면 중앙성 환자의 말

초 혈액에서 28.1%의 양성률을 보이는 반면 비종양성 환자의 말초혈액에서는 활성도가 양성인 예가 없어 높은 특이도를 나타내었다. 이는 말초혈액에서 암세포의 존재를 확인하는 데, telomerase 활성도 측정을 사용할 수 있으며, 또한 말초혈액에서 telomerase 활성도가 관찰되면 종양세포의 존재를 의심할 수 있다는 것을 의미한다. 그러나 말초혈액에서 telomerase 활성도가 증가되어 나타난다고 해서 이것이 위암으로 진단할 수 없는 문제점을 가지고 있다. 이는 여러 암의 말초혈액에서 telomerase 활성도 측정에 대한 많은 연구를 통하여 개선해야 할 과제로 남아 있다. 따라서 본 검사가 위암의 조기진단이나 비침습적 위암 진단 기술로 적용하는 것은 불가능하나 말초혈액을 이용한 비특정 암의 일반적인 검사 방법으로는 그 의미가 있다고 할 수 있으며 위암도 여기에 포함된다 하겠다. 위암 환자들의 말초혈액에서 telomerase 활성도는 28.1%의 양성률을 나타내었는데 이는 Table 3, 4에서와 같이 조기 위암에서 33.3%, 진행성 위암에서 24.3%의 양성률을 나타내었고, 병기별로는 IA 25%, IB 36%, II 23%, IIIA 25%, IV 37.5%로 암의 병기와 상관없는 고른 양성률을 나타내 암의 예후를 판정하는 데는 그 의의가 없으나 비교적 초기의 위암에서도 임상 적용을 고려해 볼 수 있다 하겠다.

위암 조직에서 telomerase는 85~90% 정도의 높은 양성률을 보이며, 대부분의 종양세포에서 telomerase는 평균 85%의 양성률을 보이므로, 각종 체액에서 암세포의 존재여부를 확인하는 데 널리 활용될 수 있다.(20) 또 위암 환자들은 대부분이 내시경을 통하여 진단할 수 있으나, 혈액으로 검출할 수 있는 기법이 개발되면 더 많은 사람들을 조기에 진단할 수 있을 것이다. 최근 CEA, c-MET 및 hTERT 등의 mRNA를 대상으로 한 역전사 중합효소 연쇄반응법을 이용하여 혈액에서 위암을 검출하려는 노력이 계속되고 있다.(24,25) 이러한 방법들이 아직은 민감도가 높진 않지만 머지않아 혈액을 이용한 암 조기 진단법이 개발될 수 있을 것이다. 특히 중합효소연쇄반응 후 PGAE 전기영동보다는 효소면역반응으로 telomerase 활성도를 측정하는 방법은 검사실에서 쉽게 사용할 수 있는 유용한 telomerase 측정법이라 할 수 있다. 혈액에서 단핵구를 2시간 이내에 분리하여 보관해야 한다는 점 이외에는 검사시 특별한 제한요소가 없어 telomerase 활성도를 이용한 말초혈액에서 암 검출 노력은 임상적 유용성이 기대된다 하겠다.

## 결 론

한국인에서 많은 위암 환자를 대상으로 혈중 telomerase 활성도를 측정하여 위암의 진단과 예후 인자로서의 가능성을 검토하였다. 비종양성 백혈구 증가군의 혈액에서 telomerase 활성도는 증가되지 않아 암 환자에 대한 높은 특이도를 나타내었다. 64명의 위암 환자 중 18명에서 양성으로

나타나 평균 양성률은 28.1%였다. 진행성 위암뿐만 아니라 조기위암에서도 같은 수준의 양성률을 보여 비교적 초기의 암에서도 적용할 수 있는 검사로 생각된다. 환자의 나이, 성별, 종양의 크기, 위치, 병기, 병리학적 분화도 등에서 통계학적으로 의미있는 증가요인은 없는 것으로 나타나 예후 판정에는 그 의의가 없는 것으로 생각되며, 여기에는 생존율에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Blackburn EH, Szostak JW. The molecular structure of centromere and telomeres. *Annu Rev Biochem* 1984;53:163-194.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10114-10118.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43:405-413.
- Harly DB, Futcher AB, Greider CW. Telomerases shortening during aging of human fibroblast. *Nature* 1990;345:458-460.
- Hastie ND. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990;346:866-868.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harly CB, West MD, Ghay JW. Specific association of human telomerases activity with immortal cells and cancer. *Science* 1990;266:2011-2015.
- Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35 Suppl 12: 111-115.
- Tahara E, Semba S, Tahara H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23(3):307-315.
- Ahn MJ, Noh YH, Lee YS, et al. Telomerase activity and its clinicopathological significance in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1997;33(8):1309-1313.
- Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:43-49.
- Jong HS, Park YI, Kim S, Sohn JH, et al. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 1999;86(4):559-565.
- Okusa Y, Shinomiya N, Ichikura T, Mochizuki H. Correlation between telomerase activity and DNA ploidy in gastric cancer. *Oncology* 1998;55(3):258-264.
- Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995;55(15):3258-3262.
- Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(9):5147-5152.
- Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM, et al. Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor

- mast-cell lines. *J Immunol* 2001;166(11):6647-6656.
16. Fidler IJ. Molecular biology of cancer: Invasion and metastasis. In: Devita, Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles & practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997;135-139.
  17. Mori M, Mimori K, Ueo H, et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68(6):739-743.
  18. Burchill SA, Selby PJ. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. *J Pathol* 2000;190(1):6-14.
  19. Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998;82(8):1419-1442.
  20. Hess JL, Highsmith WE Jr. Telomerase detection in body fluids. *Clin Chem* 2002;48(1):18-24.
  21. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999;5(5):971-975.
  22. Tsuma T, Goto S, Kitano S, Lin YC, Lee CM, Chen CL. Telomerase activity in peripheral blood for diagnosis of hepatoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(9):1064-1070.
  23. Gauthier LR, Granotier C, Soria JC, et al. Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity. *Br J Cancer* 2001;84(5):631-635.
  24. Noh YH, Im Griwou, Ku JH, Lee YS, Ahn MJ. Detection of tumor cell contamination in peripheral blood by RT-PCR in gastrointestinal cancer patients. *J Korean Med Sci* 1999;15:623-628.
  25. Shin JH, Chung J, Kim HO, et al. Detection of cancer cells in peripheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour-specific mRNAs. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16 Suppl 2:137-2144.
-