

Identification of Differentially Expressed Genes in Human Small Cell Lung Carcinoma Using Subtractive Hybridization

Seung-Ju Ahn^{1*}, Jae-Kyoung Choi^{2*}, Young Mi Joo¹, Min-A Lee¹, Pyung-Rak Choi¹, Yeong-Mi Lee¹, Myong-Shin Kim¹, So-Young Kim¹, Eun-Hee Jeon¹, Byung-In Min¹ and Chong-Rak Kim^{1†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, and

²Department of Biology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Lung cancer is a leading cause of cancer death worldwide; however, despite major advances in cancer treatment during the past two decades, the prognostic outcome of lung cancer patients has improved only minimally. This is largely due to the inadequacy of the traditional screening approach of diagnosis in lung cancer, which detects only well-established overt cancers and fails to identify precursor lesions in premalignant conditions of the bronchial tree. In recent years this situation has fundamentally changed with the identification of molecular abnormalities characteristic of premalignant changes; these concern tumour suppressor genes, loss of heterozygosity at crucial sites and activation of oncogenes. Basic knowledge at the molecular level has extremely important clinical implications with regard to early diagnosis, risk assessment and prevention, and therapeutic targets. In this study we used a "cap-finder" subtractive hybridization method, "long distance" polymerase chain reaction (PCR), streptavidin magnetic beads mediated subtraction, and spin column chromatography to detect differential expression genes of human small cell lung carcinoma. We have now isolated ninety two genes that expressed differentially in the human small cell lung carcinoma cells and analyzed of 12 clones with sequencing, nine cDNAs include tapasin (NGS-17) mRNA, BC200 alpha scRNA, chromosome 12q24 PAC RPCI3-462E2, protein phosphatase 1 (PPPICA), translocation protein 1 (TLOC1), ribosomal protein S24 (RPS24) mRNA, protein phosphatase (PPEF2), cathepsin Z, MDM2 gene and three novel genes. They may be oncogenesis-related proteins.

Key Words: Oncogene, Subtractive hybridization, Small cell lung carcinoma

서 론

폐암은 선진국에서 내장암 중 가장 빈발하는 암이고 (Lands et al., 1998), 최근 우리나라에서도 폐암의 발생빈도가 증가되고 있어 1992년 사망원인에 대한 통계연보에 의하면 악성 신생물에 의한 사망 중 폐암이 위암과 간암에 이어 3위를 차지하며 위암과 간암은 최근 들어 정체를 내지는 감소 추세이나 폐암은 증가하는 추세이며, 증가속도가 매우 빠르다고 한다. 폐암은 90~95%가 기관지 상피에서 기원하는 기관지암 (bronchogenic carcinoma)이며, 나머지 5~10%가 기관지 유암

(bronchial carcinoid), 세기관지 폐포암 (bronchioloalveolar carcinoma) 및 기타의 암으로 구성 된다 (Dail, 1994). 기관지암은 조직학적 유형에 따라 편평상피암 (squamous cell carcinoma) · 선암 (adeno carcinoma) · 소세포암 (small cell carcinoma) · 대세포암 (large cell carcinoma) 등으로 구분된다.

소세포암종은 대기관지 또는 주기관지의 폐중심부에서 발생하며 폐변연부에서도 간혹 발생한다. 소세포암종의 종양 세포는 일반적으로 작은 원형 또는 방추형세포로서 림프구와 형태가 유사하나 림프구보다 2~3배 큰 편이고, 세포질 양이 적은 것이 특징이다 (Dail, 1994). 소세포암종은 다른 유형의 기관지 암종에 비해서 전이의 시기나 속도가 빠르고, 원격 장기로의 전이도 빨라서 예후가 아주 나쁜 편에 속한다. 그러나 이 종양의 항암화학요법이나 방사선조사에 민감하게 반응하기도 한다. 이 종양의 육안 소견은 회백색을 띄며, 기관지 벽을 따라서 점막의 병소가 먼저 발견되는 경우도 있다. 소세포암종은 주위조직을 직접 침윤하여 확산되는 경우가 많고, 다른 선암종 등의 종양은 혈관을 통한 전이를 많이 하는데 비해 소세

*논문 접수: 2004년 7월 12일

수정재접수: 2004년 8월 16일

†Corresponding author: Chong-Rak Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Tel: 8255-320-3215, Fax: 8255-334-3426

e-mail: bioxgeny@inje.ac.kr

*These authors contributed equally to this work

포암종은 주로 림프관과 혈관을 통하여 확산된다.

폐암은 조기진단이 매우 중요하여 주기적인 흉부X선 촬영과 객담검사를 시행하더라도 폐암의 조기진단이 잘 되지 않기 때문에 사망률을 줄일 수 없다고 한다. 따라서 암의 조기진단, 조직학적 분류, 치료효과의 판정 그리고 재발의 조기발견 등의 목적으로 종양표지자들이 개발되어 왔는데, 현재 임상에서 사용 가능한 폐암의 종양표지자는 carcinoembryonic antigen (CEA), squamous cell carcinoma antigen (SCC 항원) 및 neuronal specific enolase (NSE) 등이 있으며 폐암의 세포형에 따라 CEA는 선암에, NSE는 신경내분비계 세포 (Marangos et al., 1979) 혹은 APUD (amino precursors uptake and decarboxylation) 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있어 특히 미분화 소세포 폐암 진단과 치료 반응을 평가하는 표지로 가치가 보고되어 있다 (Pamies et al., 1996).

본 연구는 종양, 특히 소세포 폐암의 유전자 동정을 통하여 특이적으로 발현되는 유전자를 규명하고 세포내 위치와 기능을 파악하고자 하였다. 또한 발현되는 유전자의 특이성 여부를 확인하여 소세포 폐암의 진단에 암 표지 자로써 뿐만 아니라 질병의 예후 측정인자로써 가치가 있는지 알아보았다. 그 방법으로 암 세포에서 특이하게 발현되는 유전자를 cloning하기 위해서 PCR-based subtractive hybridization을 이용하였다. 완전한 길이의 cDNA를 합성하기 위하여 'Capfinder' cDNA 합성방법과 합성된 cDNA를 증폭하기 위하여 'long distance PCR'방법을, 차별적으로 발현되는 유전자를 효과적으로 분리하기 위하여 'biotin-streptavidin' magnetic isolation system을, 짧은 DNA를 제거하기 위하여 'Sephacryl S-400' spin column을 이용하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA isolation

종양의 일부와 정상으로 인정되는 부위의 일부를 절제하여, 각각의 무게를 측정 후 액체질소 속에서 마쇄하고 이를 핵산분리를 위한 Chomczynski의 방법 (Chomczynski, 1993)에 따라 Tri Reagent (Sigma, T-9424)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA pellet을 50 μ l의 TE buffer에 녹인 후 DNA 혼입을 제거하기 위하여 최종 농도 0.5 μ g의 DNase를 37°C에서 30분간 처리하였으며, phenol : chloroform : isoamyl alcohol (PCI) 및 chloroform : isoamyl alcohol (CI)를 처리하였다. 분리된 total RNA의 ratio는 흡광도 260/280에서 1.8 이상을 사용하였다.

2. cDNA 합성

1) Tester cDNA 합성

폐암조직의 total RNA 1 μ g과 5'-cap primer 10 pmole, 3'-oligo

primer 10 pmole을 70°C에서 2분간 변성시킨 후 얼음에 두어 냉각시키고 5X 1st strand buffer 4 μ l와 10 mM dNTP mix 1 μ l, 20 mM DTT 1 μ l, RNAsin 20 u (Promega, N251A), SuperscriptII (Gibco BRL, 18064-014) 200 u를 첨가하여, 최종 부피 20 μ l로 만든 후 42°C에서 2시간 반응시키고 72°C에서 7분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 합성된 cDNA 10 μ l를 주형으로 5'-cap primer 10 pmole, 3'-oligo primer 10 pmole, 10 mM dNTP mix 2 μ l, Advantage PCR buffer, Advantage Polymerase Mix (Clontech, 8417-1)를 첨가하여 최종 부피 100 μ l로 PCR (Perkin Elmer 2400)을 실시하였다. PCR 조건으로 95°C 3분, 95°C 20초 63°C 1분, 68°C 6분간 25 cycle, 68°C 7분 실시하였다.

2) Driver cDNA 합성

정상 폐 조직의 cDNA 합성을 위해 total RNA 4.5 μ g과 oligo (dT)₁₅ 0.5 μ g를 68°C에서 3분간 변성시킨 후 얼음에 두어 냉각시키고 MMLV buffer와 10 mM dNTP mix 1 μ l, RNAsin (Promega, N251A) 40 u, MMLV (Promega, M1701) 역전사 효소 200 u를 첨가시켜, 최종 부피 25 μ l로 만든 후 42°C에서 2시간 반응시키고 72°C에서 7분간 가열하여 효소를 불활성화하였다. 합성된 cDNA 4 μ l를 주형으로 random hexamer (Promega, C118A) 1.5 μ g과 Advantage PCR buffer, 2 mM dNTP [0.2 mM Biotin-21-dUTP (Clontech, 5021-1), 1.8 mM dTTP, 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP] 5 μ l, Advantage Polymerase Mix (Clontech, 8417-1)를 첨가하여 최종 부피 50 μ l로 PCR (Perkin Elmer 2400)을 실시하였다. PCR 조건으로 95°C 3분, 95°C 20초, 37°C 1분 30초, 68°C 3분간 45 cycle, 68°C 7분 실시하였다. 이런 driver DNA를 6개의 tube에 나누어 PCR 증폭하여 각각의 subtractive hybridization에 2개 tube씩 사용하였다.

3. Subtractive hybridization

Tester PCR 산물 100 μ l와 driver PCR 산물 100 μ l를 섞고 3 M sodium acetate (pH 5.8)을 20 μ l, 100% 에탄올 550 μ l를 첨가하여 -20°C에서 2시간 보관 후에 침전 시켰다. 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전된 pellet에 70% 에탄올을 첨가하여 세척하고, 상온에서 건조한 후 tester/driver mix인 pellet에 멸균수 50 μ l를 첨가하여 완전히 녹였다. Tester/driver mix를 98°C에서 5분간 변성시키고 65°C로 미리 데워둔 12X SSC/1% SDS 50 μ l (최종농도: 6X SSC/0.5% SDS)를 첨가하여 최종 부피 100 μ l로 곧바로 65°C water bath에서 18시간 반응시켰다. Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (SA-PMPs; Promega, Z5481)는 0.5X SSC 300 μ l로 3번 세척하고 침전물을 최종 100 μ l의 0.5X SSC에 부유시켰다. 그리고 400 μ l의 멸균수와 최종 농도 0.6 mg의 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles/0.5X SSC 100 μ l, 그리고 hybridized tester/driver DNA mix를 첨가하고 최종 부피 600 μ l로 상온에서 10분간 SA-PMPs 입자와 biotinylated DNA와 결합시켜 SA-PMPs 입자

를 자석으로 가라앉히고 상층 액을 새 tube에 옮겼다. 상층 액의 0.1배의 3 M sodium acetate와 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 2시간 보관 후에 원심분리 하여 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 상온에서 건조시키고 50 µl의 멸균수로 녹여 1차 subtraction 산물을 얻었다. 다시 50 µl의 첫 번째 subtracted sample을 주형 DNA로 하여 앞의 tester DNA PCR 증폭과정과 동일하게 100 µl 반응액에서 10 cycle 증폭하였다. 또다시 biotinylated driver DNA 100 µl와 첫 번째 subtracted sample을 tester PCR 증폭산물 95 µl를 섞고 첫 번째 subtractive hybridization 방법과 동일한 방법으로 2차 subtractive hybridization을 실시하고 2차 subtraction 산물 (50 µl)을 다시 10 cycle PCR을 실시하였다. 증폭된 2차 subtraction 산물 95 µl와 biotinylated driver DNA 100 µl를 섞고 동일한 방법으로 3차 subtractive hybridization을 실시하였다. 최종 3차 subtraction 산물을 또다시 100 µl 반응액에서 15 cycle PCR을 실시하였다. PCR 증폭은 PCR 과정 중에서 생기는 변이를 줄이기 위해 총 60 cycle를 초과하지 않았다.

4. 클로닝

cDNA의 3'-end에 A-tailing이 되는 것을 이용하여 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 하였다. 연결반응은 pGEM-T easy 벡터 (Promega, A3600) 2 µl, 10X T4 DNA ligase buffer 1 µl, 3차 subtracted sample 3 µl, T4 DNA ligase (Promega, M1801) 3 u를 첨가한 최종부피 10 µl를 4°C에서 밤새 반응시켰다. 각각의 연결 반응한 시료 5 µl를 숙주 대장균 JM109 E. coli에 calcium chloride를 이용한 방법으로 형질 전환하여 선별배지인 ampicillin이 첨가된 LB배지에 40 µl의 X-Gal과 4 µl의 IPTG를 도말 한 후 접종하였다. 나타난 white colony를 모두 creaking하여 플라스미드의 크기를 관찰하고 ligation 유·무를 확인하여 총 92개의 시료를 선별하고 QIAprep Spin Miniprep kit (27106)를 이용하여 플라스미드를 분리하였다. 대략 큰 DNA가 ligation되었다고 판단된 53개의 시료를 선별하였고 이를 벡터의 SP6 promoter의 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5. Dot blot

1) DNA probe 제작

Subtraction하기 전의 tester PCR 산물과 driver PCR 산물을 dot blotting하기 위한 probe의 주형으로 사용하였다. 각각의 tester와 driver PCR 산물 50 ng을 섞어 100°C에서 3분간 가열하여 변성시킨 후 얼음에 두고 얼음 위에서 500 µM dNTPs 2 µl, 10 mg/ml BSA 2 µl, labeling buffer (Promega, U1151) 10 µl, [α -³²P]dCTP (50 µCi, 3,000 Ci/mmol) 5 µl, Klenow enzyme (Promega, M2201) 0.1 u를 섞고 37°C에서 2시간 30분간 반응시킨 후, 100°C에서 2분간 가열하여 반응을 종결하고 0.5 M EDTA 2 µl를 첨가하였다. 그리고 trichloroacetic acid (TCA)침전 방법으

로 합성된 probe의 효율을 측정하고, 나머지는 실험을 위해 -20°C에 보관하였다.

2) Vacuum transfer

Bio-Dot Microfiltration 장치 (Bio-Rad, 170-6545)의 manual을 참고하여 tester probe hybridization과 driver hybridization을 위하여 membrane 2장을 준비하였다. 선별한 53개 시료의 DNA 400 ng을 EcoRI처리하여 200 ng을 membrane에 첨가하기 전에 최종 부피 25 µl에 최종 농도 0.4 M NaOH/10 mM EDTA를 첨가하고 100°C에서 10분간 가열하여 변성시킨 후 곧바로 얼음 위에 두어 냉각 시켰다. 이어서 2 M ammonium acetate 25 µl를 첨가하여 중화시켜 사용하였다. 그리고 Hybond-N⁺ membrane (Amersham Life Science)은 6X SSC에 적신 후 Bio-Dot Microfiltration 장치에 설치하고 멸균수 500 µl로 membrane을 2회 반복 수화 시켰다. 변성시킨 53개의 시료를 Bio-Dot Microfiltration 장치에 첨가하고 부드럽게 진공 감압하여 membrane에 이동시키고 2X SSC 500 µl로 한번 행했다. 이어서 Bio-Dot Microfiltration 장치에서 membrane을 꺼내어 2X SSC에 행균 후 UV-crosslinker를 사용하여 고정시켰다.

3) Hybridization

18X SSC 2.5 ml와 20% SDS 187.5 µl, 50X Denhardt's solution 750 µl, 10 mg/ml herring sperm DNA 75 µl, 0.5 M EDTA 15 µl를 첨가하여 최종 부피 7.5 ml로 한 후 transfer한 membrane을 hybridization bottle에 첨가하고 hybridization oven에서 회전시키면서 68°C에서 4시간 pre-hybridization 시켰다. 각각의 tester probe 15 µl와 driver probe 40 µl를 미리 100°C에서 5분간 가열하여 변성시키고 얼음에서 식힌 후 pre-hybridization이 끝난 용액에 첨가하고 hybridization oven에서 회전시키면서 68°C에서 24시간 hybridization시켰다. Washing buffer I (2X SSC, 0.5% SDS) 18 ml로 행균 다음 다시 washing buffer I 18 ml로 상온에서 천천히 회전시키면서 5분간 washing하였다. Washing buffer II (0.1X SSC, 0.5% SDS) 18 ml를 첨가하여 hybridization oven에서 회전시키면서 68°C에서 20분간 2번 세척하였다. 세척이 끝난 membrane을 3M filter paper위에서 건조시키고 비닐 랩으로 봉한 후 X-ray film을 덮어 -70°C에서 24시간 감광시켰다.

6. 조직의 처리

절취한 조직은 즉시 10% neutral buffered formalin에 고정된 후 자동침투기 (Sakura ETP-1200, Japan)에서 70%, 80%, 95%, 무수알콜 세 단계로 탈수를 하고 xylene 세 단계, 파라핀 세 단계를 거쳐 포매기 (Bivimed, Germany)에서 포매를 한 다음 박절기 (Reichert-Jung, Germany)에서 4 µm의 절편을 만들어 유리 slide에 부착 시켜 염색 준비를 하였다.

7. MDM2 면역조직화학 염색을 위한 표본

소세포 폐암으로 진단한 환자의 블록 중 p53에 양성인 조

직 10예와 양성대조조직으로 osteosarcoma 2예, breast intraductal carcinoma 2예를 박절하여 capillary gap slide (DAKO, A/S BioTech Solutions, USA)에 부착 시켰다.

8. H & E staining

박절된 절편을 탈파라핀 한 후 합수과정을 거쳐 핵염색으로 hematoxylin (Muto, Japan), 세포질염색으로 eosin (Muto, Japan) 염색을 한 후 95% 알콜부터 무수알콜로 탈수 및 탈색을 하고 xylene에서 투명과정을 거쳐 봉입하였다.

9. Immunohistochemical staining

Hematoxylin과 eosin으로 염색하여 조직학적 검색을 하였던 조직에서 소세포 폐암의 확진을 위해서 면역조직화학적으 cytokeratin, chromogranin A, NSE를 염색하였고 MDM2는 소 세포 폐암에서 과발현 여부를 확인하기 위해 실시하였다. 염

색방법은 avidin과 biotin 사이의 강한 결합력을 원리로 채택 하고 있는 ABC방법으로 하였는데 일차항체 pan-cytokeratin은 MNF116 (DAKO, Denmark) 단클론항체를, chromogranin A는 DAK-A3 (DAKO, Denmark) 단클론항체를, NSE에 대한 항체로는 BBS/NC/VI-H14 (DAKO, Denmark) 단클론항체를 각각 실온에서 1:100으로 희석 사용하였다. MDM2의 과발현을 보기 위한 일차항체로는 anti-human MDM2 protein clone SMP14 를 1:40으로 희석 사용하였다. 염색방법은 우선 파라핀 조직절편을 4 µm 두께로 잘라서 크실렌에서 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 1분씩 담구어 합수시키고 증류수로 세척하였다. 3% 과산화수소수를 조직절편 위에 떨어뜨려 30분간 실온에 둔 후 PBS로 세척하였다. MDM2의 경우 전처리로서 pH 6.0의 citrate buffer에서 극초단파를 이용하여 10분간 끓였다. Cytokeratin과 chromogranin A, NSE는 1:100으로 희석된 단클론 1차 항체와 실온에서 하룻밤 반응시

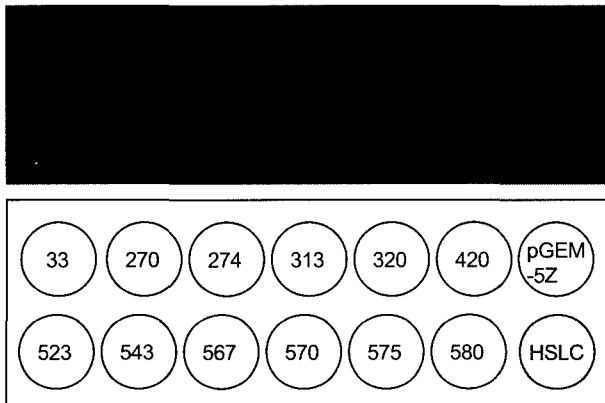


Fig. 1. Dot blot analysis of cancer-specific genes using radio-labeled probes prepared from the small cell lung cancer tissue (tester cDNA). pGEM-5Z plasmid and human small lung cancer cDNA (HSLC) were included as negative and positive control respectively.

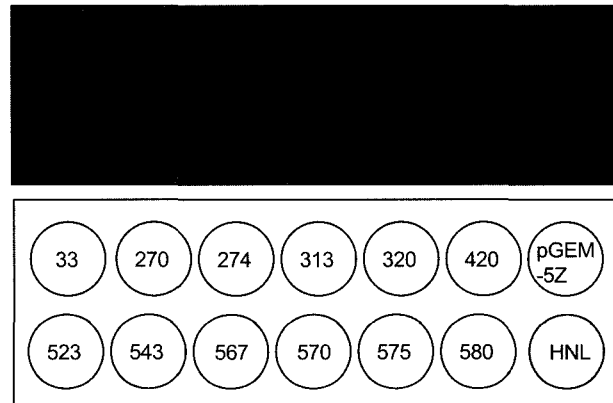


Fig. 2. Dot blot analysis of cancer-specific genes using radio-labeled probe prepared from the normal lung tissue (driver cDNA). pGEM-5Z plasmid and human normal lung cDNA (HNL) were included as negative and positive control respectively.

Table 1. Isolation of differentially expressed mRNA in small lung cancer

Clone No.	Gene description	Identity (%)	GenBank ID
SLC 270	Tapasin (NGS-17)	100	AF029750
SLC 274	BC200 alpha scRNA	100	AF020057
SLC 320	Protein phosphatase 1, catalytic subunit (PPP1CA)	100	XM_040090
SLC 570	Cathepsin Z	100	AF136276
SLC 575	Protein phosphatase, calcium-binding domain 2 (PPEF2)	100	M_003413.4
SLC 313	Chromosome 12q24 PAC	98	AC003029
SLC 567	Ribosomal protein S24	97	M_005862.1
SLC 543	Translocation protein 1(TLOC1)	91	M_002971.1
SLC 523	MDM2 gene	86	AF144029
SLC 033	Novel		
SLC 420	Novel		
SLC 580	Novel		

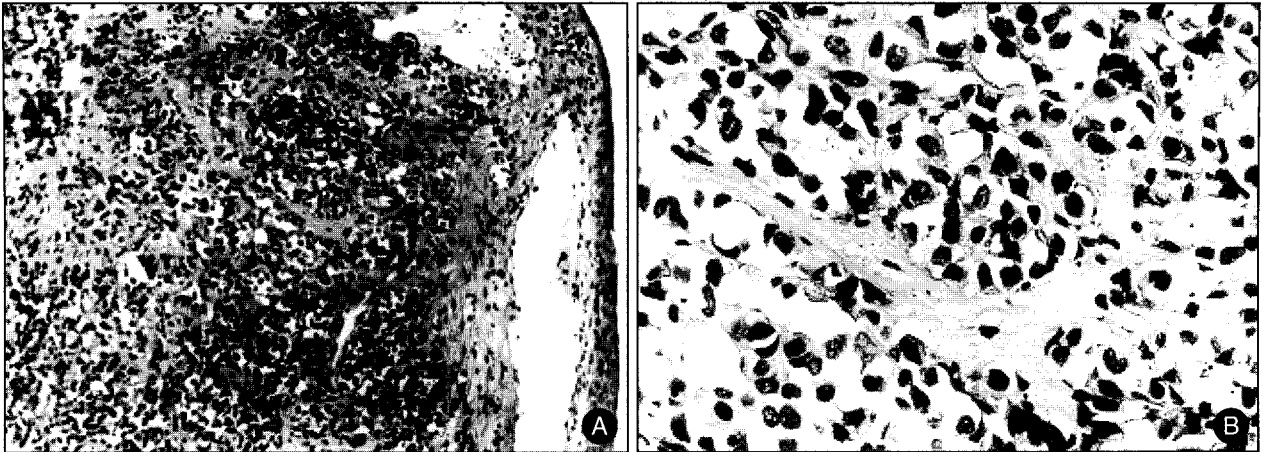


Fig. 3. Small cell lung carcinoma stained with hematoxylin and eosin. (A) Tumor consisting of loose nests and diffuse sheets of small hyperchromatic cells infiltrating the subepithelial tissue of the bronchus ($\times 100$). (B) High power view of the tumor showing round to oval hyperchromatic nuclei with no distinct chromatin pattern and scanty amount of cytoplasm ($\times 400$).

키고 MDM2는 실온에서 1:40으로 희석한 단클론 1차 항체를 냉장압소에서 하룻밤 반응시킨 후 PBS로 세척하고, biotin과 결합된 2차 항체 (biotinylated goat anti-Mouse IgG)를 실온에서 45분간 반응시키고 난 후 PBS로 세척하였다. Avidin-biotinyl peroxidase complex를 실온에서 30분간 반응시키고 PBS로 씻은 후 발색제인 AEC를 첨가하였다. Hematoxylin에 3분간 대조염색 후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검정하였다.

결 과

1. 소세포암 특이 유전자의 동정

Dot blot으로 양성을 확인한 클론 중 12개를 vector의 SP6-primer로 LI-COR 4200 series를 이용한 자동염기서열 분석기를 이용하여 분석하였으며, 그 결과를 NCBI의 GenBank에서 Blast검색하였다 (Fig. 1, 2). 270번 클론의 염기서열을 검색한 결과 homo sapiens tapasin (NGS-17) mRNA와 100%, 274번 클론은 BC200 alpha scRNA와 100%, 313번 클론은 homo sapiens chromosome 12q24 PAC RPCI3-462E2와 98%, 523번 클론은 homo sapiens MDM2 gene과 86%, 543번 클론은 homo sapiens translocation protein 1 (TLOC1)과 91%, 567번 클론은 ribosomal protein S24 (RPS24) mRNA와 97%, 575번 클론은 protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 2 (PPEF2)와 100%의 상동성을 보였고, 33번과 420번, 580번 클론은 새로운 유전자로 판단하였다 (Table 1).

2. Small cell lung carcinoma

1) H & E staining

기관지의 상피하부를 침윤한 미만성의 느슨한 판상배열을

한, 작고 농염된 핵을 가진 종양세포가 관찰되었다. 고배율 소견으로는 소량의 세포질을 가지며 등글거나 타원형이며 뚜렷하지 않은 염색질을 가진 핵의 세포가 관찰되었다 (Fig. 3).

2) Immunohistochemical staining

상피성 종양의 감별을 위해 실시한 pan-cytokeratin immunostain상에서 세포질은 dot형태로 적갈색의 강한 양성을 보였다. 신경내분비기원성 종양의 동정을 위해 chromogranin A immunostain과 NSE immunostain상에서도 또한 대부분의 세포질은 적갈색의 면역반응 양성을 보였다.

3. MDM2 발현의 면역조직화학적 확인

MDM2의 발현을 보기 위해 총 10예의 소세포 폐암조직을 염색하였는데 2예만이 양성으로 나타났으며 그 중 1예는 종양조직 전체에 걸쳐 diffuse하게 염색반응을 보였으나 종양 세포전체에 고르게 반응을 하지 않고 가장자리의 세포가 좀더 강한 반응을 보였으며 나머지 1예는 국소적인 양성반응을 보였는데 2예 모두 핵과 세포질에서 MDM2가 발현되었다. 양성대조조직에서는 breast carcinoma 1예에서만 반응이 나타났는데 intract내의 종양조직에서 multifocal하게 반응을 보였다 (Fig. 4, 5).

고 찰

소세포 폐암은 전형적으로 폐의 중심부에서 발생하며 때로 변연부에 위치할 때도 있다 (Saccomanno et al., 1974; Weng et al., 1992; Richardson et al., 1993). 광학현미경상 소견만으로 종양의 본태를 알기 어려운 경우 또는 예후나 치료의 지침을 위해서는 면역조직화학 염색을 시행한다 (Niklinski et al., 1995; Amaral Medes et al., 1999). 본 연구에서 관찰한 소세포 폐암은

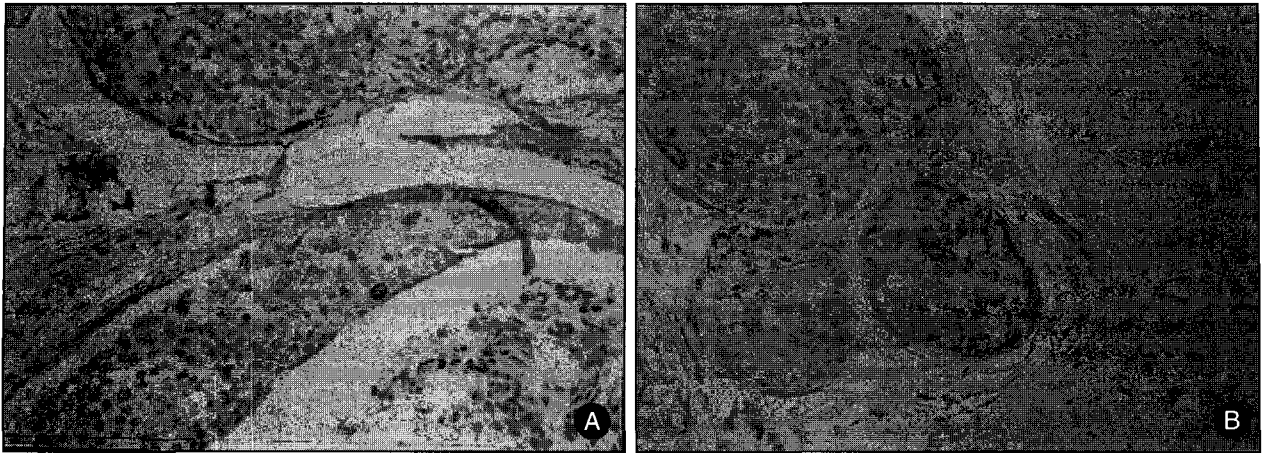


Fig. 4. Breast intraductal carcinoma stained with MDM2. The intraductal carcinoma of the breast shows positive cytoplasmic reaction of scattered tumor cells against anti-MDM2 antibody ($\times 200$, A and B).

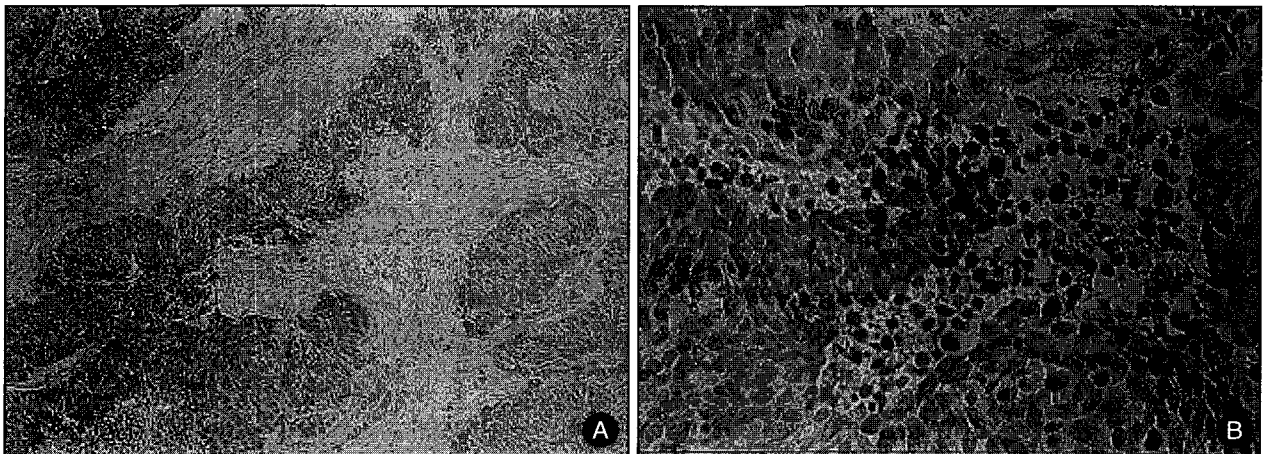


Fig. 5. Small cell lung carcinoma stained with MDM2. (A) The small cell carcinoma of the lung shows positive reaction on the edges of the tumor nests against anti-MDM2 antibody ($\times 40$). (B) High power view of figure A shows granular cytoplasmic reaction of the tumor cells (ABC, $\times 200$).

현미경적 소견으로 lymphocyte를 닮은 작고 둥글거나 타원형의 세포의 관찰이 특징적이었다. 핵내 염색체분포는 가는 과립상이거나 매우 과염성이며 핵내 핵소체는 불분명하였고 유사분열상이 빈번하게 관찰되며 세포질은 매우 작아서 핵의 테두리 모양을 하는 전형적인 소세포 폐암이었다. 현재 소세포 폐암종에 대한 특이적인 표지자로는 cytokeratin (Moll et al., 1982), chromogranin A (Earl et al., 1987), NSE (Shimizu et al., 1983) 등으로 알려져 있다. 이에 따라 본 연구에서는 소세포 폐암 동정을 위해 기본 염색으로 H&E, 표지자에 대한 면역조직화학염색으로 cytokeratin, chromogranin A 및 NSE를 하였다. 이상의 폐종양 동정을 위한 면역조직화학염색 반응의 결과로 볼 때 본 실험에 사용된 조직은 전형적인 소세포 폐암으로 확인되었다. 그러나 현재 임상적으로 이용되는 종양관련 marker에는 본 실험에 이용된 marker 외에도 호르몬 수용

체 등 여러 가지가 있으나 신경내분비성 종양인 소세포 폐암의 예후를 예견하거나 조기진단 등에 특이적인 marker는 현재 없다.

소세포 폐암 조직으로 세포내 유전자의 동정과 새로운 표지자를 발견하기 위해 본 연구에서는 현미경 및 면역조직화학적으로 확립 진단된 소세포 암조직으로 subtractive hybridization을 이용하여 새로운 유전자의 탐색을 하였다. 선별된 clone을 driver probe로 dot blot한 결과로 미루어 보았을 때 false positive clone이 나타나지 않음을 확인 하였으며, positive clone의 염기서열 분석한 결과 3개의 클론은 상동성이 있는 유전자가 보고 된 바가 없는 새로운 유전자였다. 나머지 9개의 클론들은 상동성이 있는 유전자이었는데 그것들은 signal transduction에 관련유전자로 MDM2 와 protein phosphatase 1, cathepsin Z 이었으며, 새로운 단백질합성에 관련된 유전자로 ri-

bosomal protein S24, translocation protein 1과 tapasin, 그리고 기능이 알려지지 않은 유전자로 BC200과 chromosome 12q24 PAC로 나타났다.

본 연구에서는 실험결과 발견된 12종의 유전자 중 인체 발암과정에 밀접한 관계가 있다고 이미 알려진 p53과 복합체를 형성하여 발암과정 및 예후 측정인자로서 연구가 진행 중인 MDM2 단백질의 발현을 확인하였다. 면역조직화학적 염색을 이용한 소세포 폐암의 진단에 이용된 MDM2 (Murine Double Minute, clone 523)는 주로 p53 tumor suppressor activity를 조절하는 기능을 가진 종양유전자이며 (Momand et al., 2000), p53 protein degradation rate를 직접 조절하는 것이 주된 기능으로 생각된다 (Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Midgley et al., 1997).

일반적으로 유전자발현 단백질의 조직, 세포내 위치 확인을 위해서는 면역조직화학 반응을 시행하며 본 연구에서 사용한 소세포 폐암에서 나타난 MDM2의 발현이 다른 환자의 소세포 폐암에서도 발현되는지 보기 위해 p53에 양성되었던 조직 10예를 무작위로 선정하여 면역조직화학 염색을 하였다. 총 10예의 소세포 폐암조직과 양성반응을 보기 위한 대조조직 표본으로 2예의 osteosarcoma, 2예의 breast carcinoma조직을 염색을 하였다. 그 결과 2예의 소세포 폐암과 1예의 breast carcinoma조직이 양성반응을 보였는데 이는 총 32예의 소세포 폐암조직에서 2예의 양성반응 결과를 보고한 Stefanaki 등과 유사한 결과를 보였다 (Stefanaki et al 1998). 양성반응을 보인 소세포 폐암 2예 중 1예는 종양조직 전체에 걸쳐 diffuse하게 염색되어 강한 양성반응을 보여 MDM2가 강하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 이와는 달리 양성대조조직으로 breast의 경우 intraduct에 위치한 종양세포에서 단독적으로 multifocal하게 강한 반응을 보였으며 핵과 세포질 모두에 걸쳐 반응하는 양상을 보였다. 이러한 발현양상의 차이는 원인을 알 수 없으나 장기에 따른 차이로 추측된다. 또한 음성으로 판정한 나머지 8예의 소세포 폐암 조직도 염색반응이 없었던 것은 아니나 강한 양성반응에 비해 너무 약한 반응을 보여 음성으로 판정하였다. 이러한 차이는 환자 개인의 병기, 전이 여부, 항암치료경력, 재발여부 등의 차이에 의한 것으로 생각되며 본 연구에서는 단순히 같은 소세포 폐암에서 MDM2의 공통적인 발현여부만 확인하였다. 이상의 결과로 볼 때 본 연구의 소세포 폐암에서도 MDM2가 발현됨이 확인되었다. 그러나 많은 종양에서 예후측정인자로서 MDM2의 면역화학조직학적 연구가 이루어지고 있는데 비해 소세포 폐암에 대한 보고는 별로 없다. 이런 점에서 소세포 폐암에 있어 MDM2의 발현과 예후에 대한 지속적인 연구로서 그 관계를 규명한다면 소세포 폐암의 진단 및 예후 인자로서 매우 유용할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Amaral Medes JJ, Pluygers E. Use of biochemical and molecular biomarkers for cancer risk assessment in humans: In Perspectives on biologically based cancer risk assessment. 1999. Kluwer Academic/Plenum.
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993. 15: 532-534, 536-537.
- Dail DH. *Pulmonary pathology*. 1994. Springer Verlag.
- Earl U, Bulmer JN, Briones A. Placenta accreta: An immunohistological study of trophoblast populations. *Placenta*. 1987. 8: 273-282.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997. 387: 296-299.
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 1997. 420: 25-27.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997. 387: 299-303.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics. 1998. *CA Cancer J Clin*. 1998. 48: 6-29.
- Marangos PJ, Schmechel D, Parma AM, Clark RL, Goodwin FK. Measurement of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) isoenzymes of enolase in rat, monkey and human nervous tissue. *J Neurochem*. 1979. 33: 319-329.
- Midgley CA, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*. 1997. 15: 1179-1189.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982. 31: 11-24.
- Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 2000. 242: 15-29.
- Niklinski J, Furman M. Clinical tumour markers in lung cancer. *Eur J Cancer Prev*. 1995. 4: 129-138.
- Pamies RJ, Crawford DR. Tumor markers. An update. *Med Clin North Am*. 1996. 80: 185-199.
- Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol*. 1993. 20: 105-127.
- Saccomanno G, Archer VE, Auerbach O, Saunders RP, Brennan LM. Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer*. 1974. 33: 256-270.
- Shimizu A, Suzuki F, Kato K. Characterization of alpha alpha, beta

beta, gamma gamma and alpha gamma human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases (alpha gamma, beta gamma and alpha beta) from homodimeric forms. *Biochim Biophys Acta*. 1983. 748: 278-284.

Stefanaki K, Rontogiannis D, Vamvouka C, Bolioti S, Chaniotis V, Sotsiou F, Vlychou M, Delidis G, Kakolyris S, Georgoulas V, Kanavaros P. Immunohistochemical detection of bcl2, p53,

mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res*. 1998. 18: 1167-1173.

Weng SY, Tsuchiya E, Kasuga T, Sugano H. Incidence of atypical bronchioloalveolar cell hyperplasia of the lung: Relation to histological subtypes of lung cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992. 420: 463-471.