

위암에서 P16 및 hMLH1 유전자의 메틸화

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

성기영 · 전경화 · 송교영 · 김진조 · 진형민 · 김 욱 · 박조현 · 박승만 · 임근우 · 박우배 · 김승남 · 전해명

목적: 위암조직에서 P16과 hMLH1 유전자의 메틸화상태를 검사하여 위암의 발생과정에서의 작용과 유전자의 발현에 미치는 영향과 *Helicobacter pylori*균 감염여부 및 임상병리학적인자와의 연관성을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 위암 신선 동결 절편조직 100예를 대상으로 유전자의 단백질 발현상태는 면역조직화학 염색을 시행하여 확인하였고, 메틸화 상태는 methylation-specific PCR (MSP)과 염기서열분석을 시행하였다.

결과: P16 유전자의 메틸화는 19예(19%)에서 관찰되었고 이 중 18예(94.7%)에서 P16 유전자의 단백질 발현 소실이 있어, P16 유전자의 단백질 발현 소실이 P16 유전자의 메틸화와 연관이 있음을 알 수 있었다(kappa 계수=0.317, P=.0011). hMLH1 유전자의 메틸화는 27예(27%)에서 관찰되었고, 이 중 24예(8.8%)에서 hMLH1 단백질의 소실이 hMLH1 유전자의 메틸화와 연관이 있음을 보여주었다(kappa계수=0.675, P<0.0001). hMLH1 유전자의 메틸화는 나이, 암종의 크기, Lauren 분류와 연관성이 있었다. P16 유전자와 hMLH1 유전자 메틸화 모두 *Helicobacter pylori*균 감염여부와는 연관성이 없었다.

결론: 위암에서 P16 및 hMLH1 유전자의 불활성화에는 DNA 메틸화가 작용을 함을 알 수 있었고, hMLH1 유전자의 메틸화는 나이, 암종의 크기, Lauren 분류와 연관이 있음을 알 수 있었다.

중심 단어: 위암, 메틸화, P16, hMLH1, 유전자

서 론

위암은 우리나라에서 유병률이 높은 암으로 위암의 발생 기전은 다단계 과정으로 이루어지며, 발암 관련 유전자인 다양한 종양유전자(oncogene)와 종양억제유전자(tumor suppressor gene)의 기능 이상 및 그를 초래하는 다양한 유전자적 변화 및 후성적(epigenetic) 변화가 축적되어 암이 발생하

게 된다.(1) 많은 연구가 분자생물학적 연구에서 돌연변이, 결손, 또는 삼입 등의 유전자 변화에 초점을 맞추었으나 최근 유전자의 서열에 영향을 주지 않으면서 유전자의 발현을 억제하고 세포분열 후 그대로 보존되는 후성적 변화에 관심을 갖게 되었다. 최근 악성종양의 발생과정에서 유전자의 메틸화 변화가 관찰됨으로써 이러한 변화가 주요 유전자의 전사 조절기능에 관여하고 악성종양의 지표로 이용할 수 있다는 연구결과들이 발표되었다.(2,3)

이러한 메틸화 여부는 methylation-specific PCR (이하 MSP)에 의해 용이하게 판정할 수 있는데 MSP의 원리는 bisulfite 처리로 메틸화된 시토신은 보존되나 메틸화되지 않은 시토신은 우라실로 뉴클레오타이드가 변화하는 차이를 이용한 것이다.(4) DNA를 bisulfite 처리한 후 메틸화된 DNA와 비 메틸화된 DNA를 구별할 수 있는 각각의 시발체(primer)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 증폭 후 그 산출물을 관찰함으로써 유전자의 메틸화를 민감하게 인지할 수 있다.(5)

과메틸화에 의한 전사 장애가 종양억제유전자의 비활성화를 야기시켜 악성종양을 유발하는 유전자로는 현재 P16, VHL, E-cadherin, RB, APC, hMLH1, APC, BRCA1 등이 있으며,(2,3,6-8) 위암의 경우에는 P15, P16, hMLH1, E-cadherin 유전자 등의 과메틸화가 보고되었다.(9-13) 이들 유전자중 P16은 cyclin D-dependent kinase inhibitor인 세포주기조절 인자로, cyclin D와 CDK4 또는 CDK6와의 결합을 억제하여 Rb의 인산화를 막아 G1/S 시기의 세포 증식을 억제하는 역할을 한다. hMLH1은 DNA 과오수정유전자로 미세위성 불안정성(microsatellite instability)을 야기하여 암세포의 발생에 관여한다. 현재까지 위암에서 P16과 hMLH1 유전자의 과메틸화에 대한 연구가 이루어지고 있으나 위암의 여러 임상병리학적 인자와의 연관성은 밝혀지지 않았다.

본 연구에서는 위암조직에서 P16과 hMLH1 유전자의 메틸화상태를 검사하여 위암의 발생과정에서의 작용과 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하고 위암의 중요한 유발인자인 *Helicobacter pylori* 감염여부 및 위암의 여러 임상병리학적인자의 연관성을 연구하고자 한다.

책임저자: 전해명, 서울시 영등포구 여의도동 62
여의도성모병원 외과, 150-713
Tel: 02-3779-2020, Fax: 02-786-0802
E-mail: hmjeon@catholic.ac.kr

접수일 : 2005년 9월 2일, 게재승인일 : 2005년 9월 14일
본 연구는 가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 임상의학 연구비의 학술연구 보조로 이루어진 것임.

방 법

1) 대상

2002년 2월부터 2003년 8월까지 가톨릭대학교 성모병원에서 위암으로 위절제술을 시행하여 병리조직학적으로 위암으로 최종 진단된 보관상태가 양호한 신선 동결 절편 조직 100예를 이용하였다. 실험군은 나이, 성별, 종양의 크기, 종양의 침윤 정도, 분화도, Lauren 분류, 조직 종류, 림프절 전이 여부, 림프관 및 신경 또는 혈관 침범 여부, 위치, AJCC 분류에 따른 병기, *Helicobacter pylori* 감염여부 등에 따른 메틸화 정도를 비교하였다.

2) 면역조직화학염색

면역염색은 포르말린에 고정시킨 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 잘라서 수행하였고, 일차 항체로는 P16은 P16^{INK4a} kit (Dako, Dacytation, Denmark)를 사용하였고 hMLH1은 BD PharMingen (PharMingen, San Diego, CA) 제품을 사용하였다. 조직 슬라이드를 56°C oven에 30분간 두어서 파라핀을 녹이고 다시 xylene에 10분씩 3번 반복하여 담근다. 이후 합수과정으로 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올에 각각 5분씩 담그고 마지막으로 물에 5분 이상 담귀서 파라핀을 완전히 제거한다. 포르말린 고정액의 알데하이드기에 의해서 차단되어 있는 항원을 노출시키기 위한 전 처리 과정으로 20분간 고압멸균(autoclave)을 수행하였다. 40분간 실온에 방치하고 cold PBS로 5분씩 3번 씻은 후 내인성 과산화효소를 억제시키기 위해서 3% 과산화수소수를 15분간 처리하고, cold PBS로 5분씩 3번 씻어주고, blocking serum으로 30분간 실온에서 방치한다. 이후 일차 항체 (P16 1 : 25, hMLH1 1 : 50)를 처리하여 humidified chamber에 넣어서 4°C에 16시간 방치한다. Cold PBS로 씻어주고 이차 항체 (Zymed laboratoris Inc, San Francisco, USA)를 30분간 실온에서 처리한다. HRP-conjugate (labeling antibody)를 실온에

서 30분간 처리하고 다시 씻어준다. 여기에 발색시약으로 P16은 DAB, hMLH1는 AEC로 염색하고 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

주위 정상 점막조직을 내부 양성 대조군으로 하였으며 P16과 hMLH1 모두 종양 조직 전반에 걸쳐 핵 염색이 관찰되는지를 기준으로 하여, 40배율 한 시야에서 30% 미만의 핵 염색이 관찰되면 음성으로, 30% 이상이면 양성으로 판정하였다.(14) 또한 세포질에서만 발현되는 경우는 모두 음성으로 간주하였다. 판독은 두 명의 독립된 관찰자가 조직을 관찰하여 일치되는 결과를 채택하였고, 결과가 일치되지 않을 경우 그 평균치로 판정하였다.

3) DNA 추출

암조직과 암종에서 최소한 5 cm 떨어진 정상 점막조직에서 각각 DNA를 추출하였으며 DNA 추출은 통상적인 방법을 이용한다. 즉 대상 조직 50 mg을 700 μ l의 핵분해 용액이 첨가된 상태에서 조직 파쇄한 후, 용해질을 옮겨 65°C에서 약 30분간 배양시킨다. 3 μ l RNase 용액을 첨가한 후 37°C에서 약 30분간 배양시킨다. 200 μ l의 단백침전용액을 첨가하고 원심분리 한 후 상층액을 isopropanol과 혼합하였다. 다시 원심분리 후 상층액을 버리고 70% 에탄올을 첨가해 원심분리 후 침전물을 말렸다. 100 μ l의 DNA rehydration solution을 첨가하여 DNA를 용해시켰다. 추출된 DNA 농도는 ultraviolet spectrophoto-meter로 측정하였다.

4) Bisulfite 처리 및 Methylation specific PCR

(1) Bisulfite 처리: 메틸화 DNA와 비메틸화 DNA가 다른 염기 서열을 가지도록 One day MSP Kit (In2gen, Korea)를 사용하여 다음과 같이 변성시켰다. 500 ng의 DNA를 증류수로 100 μ l에 맞춘 후 7 μ l의 3N NaOH를 첨가하였다. 37°C 수조에 10분간 방치 후 bisulfite 처리를 위하여 solution I (In2gen, pH 5.0) 550 μ l를 넣고 50°C에서 16시간동안 방치한 후 DNA 정제를 위하여 원심분리 후 침전액을 70% 에탄올

Table 1. Primer sequence and PCR condition for MSP

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature
P16	mF	TCACCAGAGGGTGGGGCGGACCGC	176 bp
	mR	CCGACCCCGAACCGCGACCG	
	uF	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	151 bp
	uR	CAACCCCAAACCACAACCATAA	
hMLH1	mF	GACGTTTTATTAGGGTCGCGC	132 bp
	mR	CCCTATACCTAATCTATCGTCG	
	uF	TTTTGACGTAGATGTTTTGGGGT	123 bp
	uR	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	

m = methylation; u = unmethylation; F = forward; R = reverse.

로 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 0.02N NaOH/90% Etanol 50 μ l를 넣고 상온에서 5분간 방치한 후 90% 에탄올로 세척 후 원심분리하였다. 침전액의 원심분리 과정을 1회 반복한 후 DNA를 충분히 건조시켜 30 μ l의 TE buffer (10 mM Tris/0.1 mM EDTA, pH 7.5)에 넣어 함수시켰다. 50°C에서 15분간 방치 후 최고속도로 2분간 원심분리 후 상층액을 즉시 사용하거나 -20°C에 보관 후 사용하였다.

(2) PCR 증폭: 시발체의 염기서열, annealing 온도와 생산물이 크기는 Table 1에 정리하였다. 각각의 시발체는 전사 시작 유전자 부위에 대비하여 *P16* 유전자는 메틸화와 비메틸화 모두 -70에서 -47까지, *hMLH1*은 메틸화는 -722에서 -702, 비메틸화는 -704에서 -681까지의 부위에서 반응을 일으키도록 제작하였다. 증폭을 위한 PCR 혼합액은 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 2.5 μ l, 200 mM dNTP 0.5 μ l, 시발체 각각 1 μ M, 주형 DNA 2.0 μ l, Taq polymerase (Solgent, Korea) 0.5U를 섞은 후 최종 산물이 10 μ l가 되도록 증류수를 추가하였다. *P16* 유전자의 DNA 증폭은 95°C에서 2분간 변성시킨 후 95°C 20초, 60.3°C (메틸화) 또는 60°C (비메틸화) 40초, 72°C에서 1분의 조건으로 45회 반응시켰다. 마지막으로 72°C에서 3분간 연장하였다. *hMLH1* 유전자의 DNA 증폭은 annealing 온도를 55°C (메틸화)와 60°C (비메틸화)로 하여 위와 같이 수행하였다. Taq polymerase는 *P16*은 f-Taq polymerase (Solgent, Korea)를 사용하였고, *hMLH1*은 h-Taq polymerase (Solgent, Korea)를 사용하였다. 혈액에서 뽑은 DNA를 변성시켜서 음성 대조군으로 이용하였다.

(3) 증폭된 DNA 확인과 판독: PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고, ethidium bromide로 염색하여 UV-transilluminator에서 확인한 후 폴라로이드 사진기로 촬영하였다. 비메틸화 때만 관찰되는 경우 메틸화 음성으로, 비메틸화 때와 메틸화 때가 같이 관찰되거나 메틸화 때만 관찰되는 경우를 메틸화 양성으로 판독하였다.

5) 염기서열의 분석

DNA 변성여부를 확인하기 위하여 메틸화 및 비메틸화된 DNA의 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 먼저 증폭된 산물을 QIAEX II gel elution system (Qiagen, Hilden, Germany)으로 정제하였다. 염기서열의 분석은 Applied Biosystems 3100A automatic sequencer와 BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Warrinton, United Kingdom)를 이용하였다. 증폭된 DNA 30 ng, BigDye terminator RR mix (PE Applied Biosystems) 1.5 μ l, 각각의 시발체 (primer) 2.5 pmol, 증류수를 섞어 총 10 μ l로 만든다. 반응은 dimethylsulfoxide를 사용하여 96°C에서 20초, 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분의 조건으로 25회 반응시켰다.

6) 통계 분석

각 유전자의 단백질 발현 정도와 메틸화 상태의 관련성은 kappa 계수를 이용한 일치도로 검정하였으며, 각 유전자의 메틸화 상태와 위암의 여러 임상병리학적인자의 연관성은 Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 검정하였다. 단 나이에 대한 연관성은 unpaired t-test를 이용하여 검정하였다. P 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였으며, 통계처리는 가톨릭대학교 의과대학 통계학교실에 의뢰하여 SAS를 이용하였다.

결 과

1) 대상군의 임상병리 양상

대상 환자 100명 중 남자는 65명, 여자는 35명이었고, 평균 연령은 68 \pm 4.8세였다. AJCC 분류에 따른 병기별로는 I기 30명(30%), II기 26명(26%), III기 29명(29%), IV기 15명(15%)이었다. 침윤도별로는 점막 6예(6%), 점막하 8예(8%), 고유근층 20예(20%), 장막하 17예(17%), 장막48예(48%), 복막침범 1예(1%)였으며 림프절 전이가 60명(60%)에서 있었고 40명(40%)에서는 없었다. 분화도 별로는 고분화암 17명(17%), 중분화암 37명(37%), 저분화암 46명(46%)이었으며, Lauren 분류별로는 미만형 31명(31%), 장형 40명(40%), 혼합형 29명(29%)이었다. 조직형 분류별로는 관상세포암종 88예(88%), 점액선암종 5예(5%), 인화세포암종 7예(7%)였으며, 종양의 위치별로는 유문부 62예(62%), 체부 30예(30%), 기저부 8예(8%)였고, 림프관 침범이 64예(64%)에서 있었고 36예(36%)에서는 없었다. 혈관 침범이 10예(10%)에서 있었고 90예(90%)에서는 없었으며, 신경 침범이 60예(60%)에서 있었고 40예(40%)에서는 없었다. *Helicobacter pylori*균의 감염은 27예(27%)에서 있었고 73예(73%)에서는 없었다(Table 2).

2) *P16* 및 *hMLH1*의 면역조직화학 염색 결과와 MSP 결과

P16 유전자의 단백질 발현 소실은 52예(52%)에서 있었고, *P16* 유전자의 메틸화는 19예(19%)에서 관찰되었다(Fig. 1). *P16* 유전자가 메틸화된 19예 중 18예(94.7%)에서 *P16* 유전자의 단백질 발현 소실이 있었으며 반대로 *P16* 유전자가 비메틸화된 81예 중 47예(58%)에서 *P16* 유전자의 단백질이 발현되었다(Table 3, Fig. 2). 이는 *P16* 유전자의 단백질 발현 소실이 *P16* 유전자의 메틸화와 연관이 있음을 보여준다(kappa 계수=0.317, P=0.0011). *hMLH1* 유전자의 단백질 발현 소실은 35예(35%)에서 있었고, *hMLH1* 유전자의 메틸화는 27예(27%)에서 관찰되었다. *hMLH1* 유전자가 메틸화된 27예 중 24예(88.8%)에서 *hMLH1* 유전자의 단백질 발현 소실이 있었으며 반대로 *hMLH1* 유전자가 비메틸화된 73예 중 62예(84.9%)에서 *hMLH1* 유전자의 단백질이 발현되었

Table 2. Correlation of promoter methylation status and clinico-pathological factor in gastric carcinoma

	<i>P16</i> methylation		P value	<i>hMLH1</i> methylation		P value
	Negative	Positive		Negative	Positive	
Sex						
Female	28	7	0.129	23	12	0.753
Male	53	12		50	15	
Age [†]	62.7 ± 11.5	60.4 ± 14	0.458	60.9 ± 12.9	65.8 ± 8.2	0.029
Size*						
≤ 5 cm	13	3	0.819	16	0	0.005
> 5 cm	68	16		57	27	
WHO classification						
Well differentiated	15	2	0.669	12	5	0.813
Moderate differentiated	30	7		26	11	
Poorly differentiated	36	10		35	11	
Lauren's classification						
Intestinal	32	8	0.09	19	21	0.011
Diffuse	22	9		24	7	
Mixed	27	2		22	7	
AJCC						
I	27	3	0.382	21	9	0.812
II	21	5		20	6	
III	21	8		20	9	
IV	12	3		12	3	
Histology						
Tubular	72	16	0.218	64	24	0.858
Mucinous	5	0		3	2	
Signet ring cell	4	3		6	1	
Location of tumor						
Atrum	52	10	0.344	42	10	0.125
Body	24	6		26	4	
Cardia	5	3		5	3	
EGC	12	2	0.129	11	3	0.753
AGC	69	17		62	24	
Tumor invasion						
Mucosa	5	1	0.785	4	2	0.3128
Submucosa	1	7		7	1	
Muscularis propria	18	2		12	8	
Subserosa	14	3		14	3	
Serosa exposure	36	12		36	12	
Peritoneal invasion	1	0		0	1	
Lymph node meta						
Absent	36	4	0.061	29	11	0.926
Present	45	15		44	16	
Lymphatic invasion						
Absent	30	6	0.629	26	10	0.532
Present	51	13		47	17	

Table 2. Continued

Vein invasion*						
Absent	72	18	0.682	64	26	0.279
Present	9	1		9	1	
Neural invasion						
Absent	32	8	0.835	29	11	0.926
Present	49	11		44	16	
<i>H. pylori</i>						
Absent	62	11	0.09	54	19	0.718
Present	19	8		19	8	

P value = chi-square; * = Fisher's exact test; † = unpaired t-test; EGC = early gastric carcinoma; AGC = advanced gastric carcinoma.

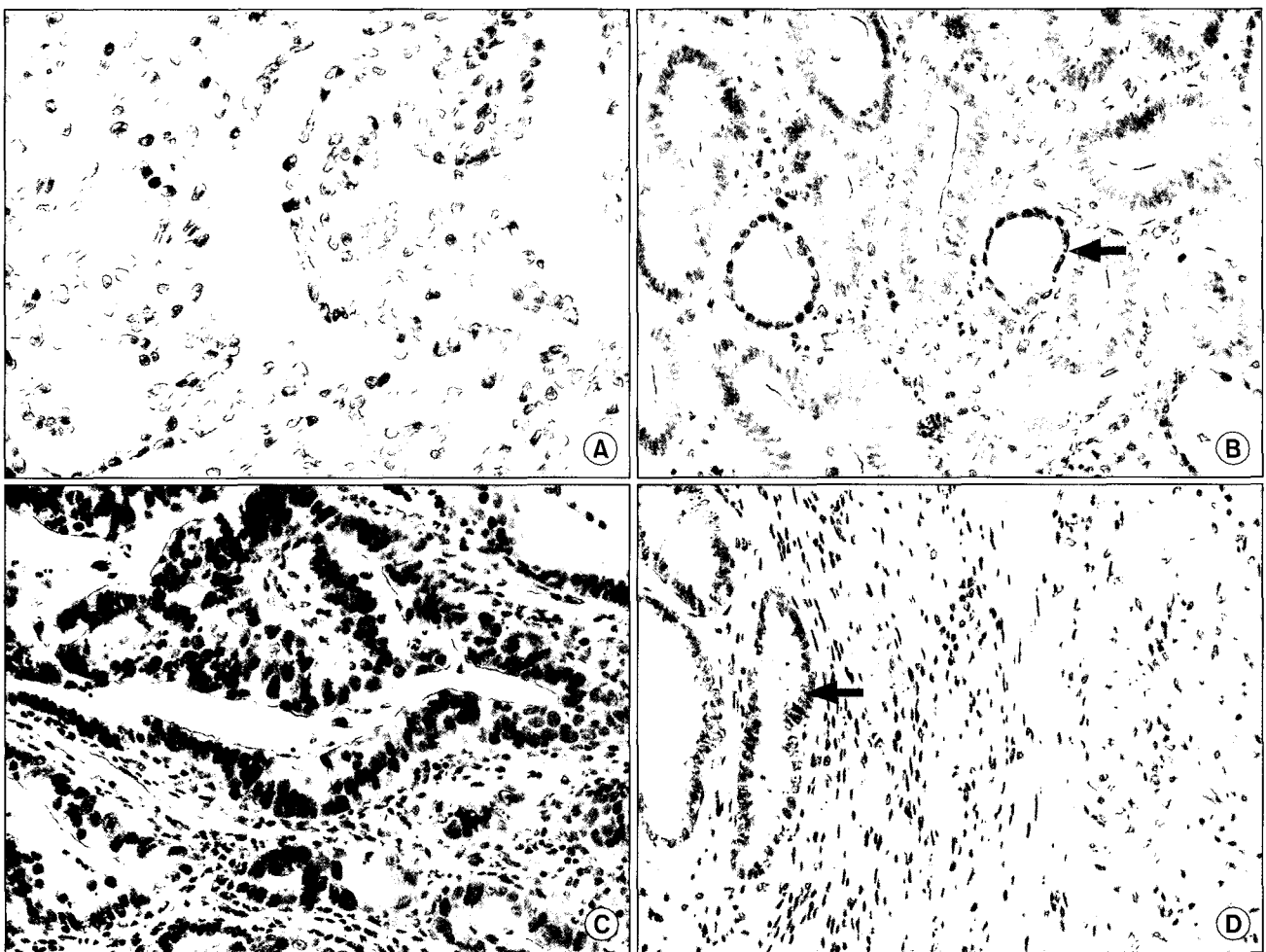


Fig. 1. Immunohistochemical analysis of hMLH1 (A, B) and P16 (C, D) expression in gastric carcinoma. ($\times 200$) (A) Tumor cells in glandular portion had abundant hMLH1 expression. (B) The neoplastic nuclei were shown absence of detectable hMLH1 expression in contrast to its abundance in surrounding normal glandular tissue (arrow). (C) Tumor cells in glandular portion had abundant P16 expression. (D) The neoplastic nuclei were shown absence of detectable P16 expression in contrast to its abundance in surrounding normal glandular tissue (arrow).

Table 3. Frequency of P16 protein loss in gastric carcinoma with P16 hypermethylation

P16 Methylation	P16 Immunostaining		Total
	+	-	
Positive	1	18 (94.7%)	19
Negative	47 (58%)	34	81
Total	48	52	100

(kappa coefficient=0.317, P=0.0011)

Table 4. Frequency of hMLH1 protein loss in gastric carcinoma with hMLH1 hypermethylation

hMLH1 Methylation	hMLH1 Immunostaining		Total
	+	-	
Positive	3	24 (88.8%)	27
Negative	62 (84.9%)	11	73
Total	65	35	100

(kappa coefficient=0.675, P<0.0001)

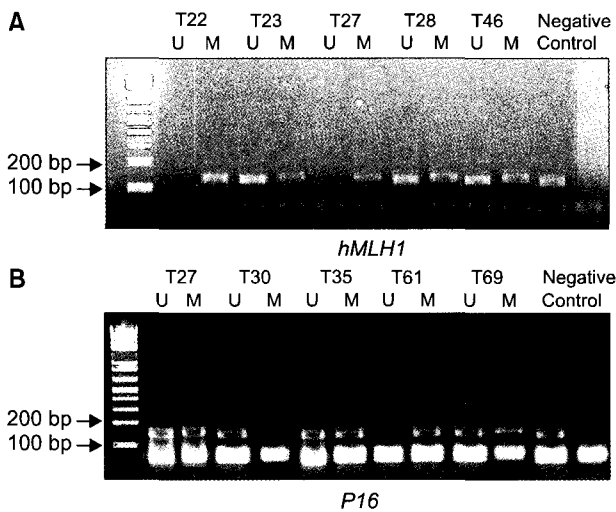


Fig. 2. Methylation analysis of hMLH1 and P16 promoter region in gastric carcinoma. U = unmethylated PCR products; M = methylated PCR products; Negative control = normal serum.

다(Table 4, Fig. 2) 이 또한 hMLH1 유전자의 단백질 발현 소실이 hMLH1 유전자의 메틸화와 연관이 있음을 보여준다 (kappa 계수=0.675, P<0.0001).

비암종 조직에서의 메틸화는 hMLH1의 경우 4예(4%)에서 발생하였으며 이 중 3예에서 동반된 암조직의 메틸화가 없었으며, P16의 경우 10예(10%)에서 발생하였으며 이 중 8예에서 동반된 암조직의 메틸화가 발생하였다.

또한 메틸화된 DNA PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 CpG 부위의 사이토신은 변하지 않았으나 비메틸화된 DNA PCR 산물에서는 모두 싸이민으로 변하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4).

3) P16 및 hMLH1 촉진자 부위 메틸화와 임상병리학적 인자와의 연관성

P16 유전자의 메틸화는 림프절 전이가 많은 경우에 비교적 많이 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었으며(P=0.061), 그 외 어떠한 임상병리학적 인자와도 의미 있는 연관성이

없었다. hMLH1 유전자의 메틸화는 나이가 많은 경우(P=0.029, unpaired t-test), 암종의 크기가 5 cm 이상인 경우(P=0.005, Fisher's exact test), Lauren 분류로는 장형인 경우(P=0.011, Chi-square test)에 많이 발생하였다(Table 2). P16 유전자와 hMLH1 유전자 메틸화 모두 Helicobacter pylori 감염 여부와는 연관성이 없었다.

고찰

DNA 메틸화는 CpG dinucleotide 부위의 cytosine의 5' 부위에 methyl-transferase가 작용하여 5-methylcytosine으로 치환되는 것으로 메틸화된 DNA에 methyl-binding protein (MBP)과 corepressor 분자 및 히스톤 탈아세틸라제(histone deacetylase, HDAC)로 구성된 단백질 결합체가 결합하면 DNA를 둘러싸고 있는 히스톤이 탈아세틸화되고 핵질(chromatin structure)은 더욱 압축되어 전사가 일어나지 못하게 된다.(15,16) 또한 methylcytosine은 저절로 탈아미노화가 일어나 thymine으로 되어 점 돌연변이를 야기할 수 있는데 이 과정이 종양억제유전자에서 일어나면 유전자의 기능 소실을 주로 야기하고,(9,17) 연관된 유전자의 돌연변이를 야기하여 악성종양을 발생시킨다.(3,18)

MSP는 기존의 방법보다 민감도가 높아 0.1%의 메틸화도 인지할 수 있고 소량의 DNA를 사용하여도 메틸화 여부를 확인할 수 있어 많은 수의 검체를 대상으로 하는 실험에 용이하다.(5) 그러나 본 연구에서는 PCR 증폭시 시발체(primer)와 주형(template)을 결합시키는데 필요한 annealing 온도와 MgCl₂의 농도에 매우 민감하게 반응하였다. 또한 아주 소량의 메틸화도 감지 할 수 있어 비특이적 반응을 나타내는 경우가 많아 이의 판정이 어려웠다.

대부분의 정상 조직에서는 CpG가 풍부한 촉진자(promoter)를 가진 유전자 조절부위가 메틸화되어 있지 않으나 악성 종양조직에서는 비정상적인 유전자의 메틸화가 발생하는 것이 대장암, 유방암, 신장암 등에서 보고되었다.(7,19) 위암에서도 여러 유전자의 메틸화가 보고되고 있는데 hMLH1 메틸화는 8~53%로 다양하게 보고되고 있으며,

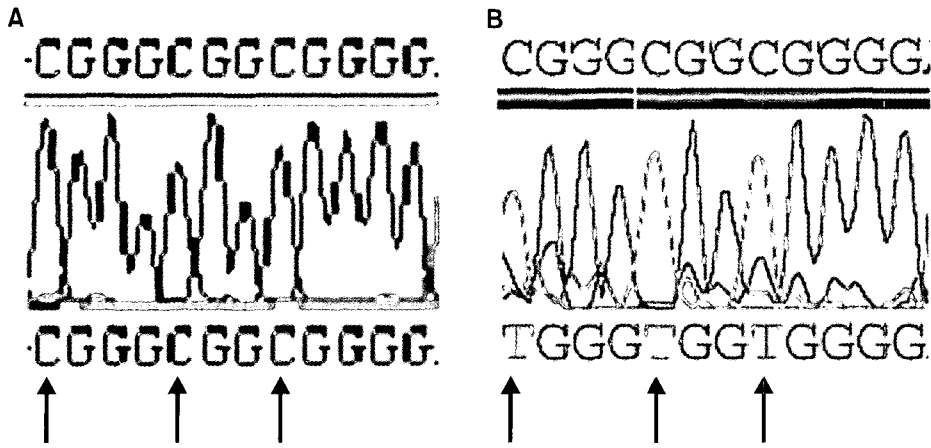


Fig. 3. Sequencing of histogram of the PCR products of methylated (A) and unmethylated (B) *P16*. Cytosines at all CpGs within the methylated DNA PCR product are retained whereas all cytosines were converted to thymines within the unmethylated DNA PCR product.

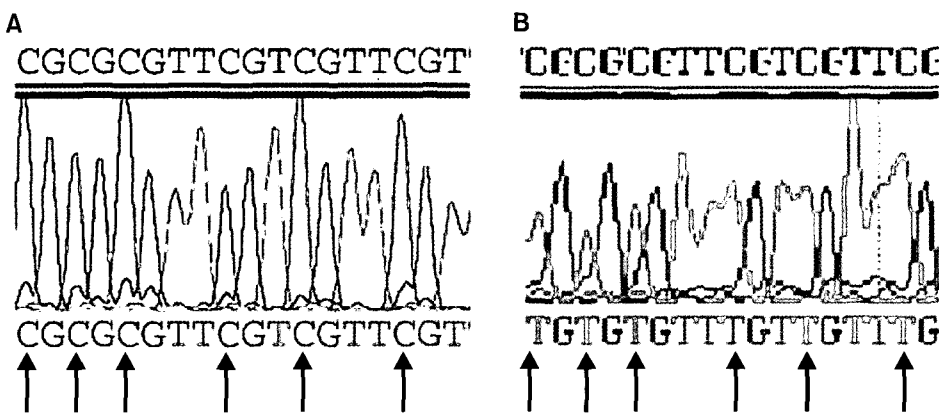


Fig. 4. Sequencing of histogram of the PCR products of methylated (A) and unmethylated (B) *hMLH1*. Cytosines at all CpGs within the methylated DNA PCR product are retained whereas all cytosines were converted to thymines within the unmethylated DNA PCR product.

(13,14,20) Leung 등(10)도 위암에서 *hMLH1* 메틸화의 90%가 단백질 발현소실과 관련이 있음을 보고하였으며 주위의 비암종 조직에서는 *hMLH1*의 메틸화가 발견되지 않아 *hMLH1*의 메틸화가 위암의 발생과정 중 후반기에 작용할 것으로 주장하였다. 그러나 Endoh 등(21)은 암조직에서 메틸화가 발생한 예 중 71%의 정상점막 조직에서 메틸화가 나타나 초기에 작용한다고 주장하였으며, 강 등(22)은 위선종과 장상피화생 조직에서도 발생한다고 보고하여 *hMLH1*의 메틸화가 어떤 단계에서 작용하는지는 아직 논란이 되고 있으며 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 100예 중 27예(27%)에서 *hMLH1*의 메틸화가 나타났으며 이 중 24예(88.8%)에서 *hMLH1* 단백질 발현소실이 나타나 *hMLH1*의 메틸화가 위암에서 *hMLH1* 유전자의 기능 소실에 역할을 함을 알 수 있다. 또한 여러 보고에서 비암종 조직의 *hMLH1*의 메틸화가 다양하게 보고되고 있는데, (13,23) Waki 등(23)은 위암에서 비암종 조직의 24%에서, Endoh 등(21)은 40% 이상에서 메틸화를 보고하였는데 본 연구에서는 4예(4%)에서 메틸화가 발생하였다. 이러한 차이는 다른 시발체를 이용한 실험 방법의 차이인지 대장균의 차이인지 알 수 없다. 또한 본 연구에서 메틸화가 발생한

비암종 조직예 중 3예에서 동반된 암조직의 메틸화가 없었는데 이는 Toyota 등(11)이 보고한 Type A 메틸화 즉 노화에 따른 메틸화일 수도 있고, 정상 조직보다 많은 빈도의 메틸화를 보이는 장상피화생(intestinal metaplasia)이 있었기 때문일 수도 있을 것으로 추측된다. 본 연구에서는 4예 모두 65세 이상이였으며 2예에서 장상피화생이 있었다.

세포주기조절 유전자인 *P16*의 메틸화는 22~65.3%로 다양하게 보고되고 있으며, 메틸화가 *P16* 단백질 소실과 밀접한 관련이 있음을 보고하였다.(13,14,24) 본 연구에서는 100예 중 19예(19%)에서 나타나 비교적 낮게 나타났으며 메틸화된 19예 중 18예(94.7%)에서 *P16* 단백질 발현소실이 나타나, *hMLH1* 유전자와 마찬가지로 *P16* 유전자의 메틸화가 위암에서 *P16* 유전자의 기능 소실에 역할을 함을 알 수 있다. *hMLH1* 유전자와는 달리 *P16* 메틸화가 일어난 10예의 비암종 조직 중 8예에서 동반된 암조직의 메틸화가 발견되었으며, 강 등(22)도 위선종에서 11.5%, 위암에서 42.2%의 메틸화가 발생한 것으로 보아 *P16* 메틸화가 악성 형질전환에 중요한 역할을 한다고 하였다.

본 연구에서 심 등(12)의 보고와 비슷하게 *hMLH1* 유전자에서는 메틸화된 27예 중 3예에서, *P16* 유전자에서는 메틸

화된 19예 중 1예에서 단백질이 발현되었는데, 그 이유로는 유전자 불활성화에 관여하는 특정 CpG 부위가 있고,(25) 유전자 불활성화는 CpG 부위의 메틸화도와 관련이 있으며,(26) 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA가 공존하는 유전자의 hemimethylation이 메틸화된 암종 조직에서 단백질 발현을 야기하기 때문이다.(12) 본 연구에서도 Fig. 2와 같이 메틸화된 DNA와 비메틸화된 DNA가 공존하였으며, 대부분의 메틸화된 예에서 비메틸화된 DNA가 같이 있어 이는 DNA 추출과정에서 정상조직의 DNA도 섞였기 때문이라 생각된다.

또한 유전자의 단백질이 발현되지 않은 예 중 *P16*은 65.4%, *hMLH1*은 31.4%에서 메틸화가 나타나지 않아 유전자의 불활성화가 전적으로 DNA 메틸화에 의해 발생하는 것이 아님을 알 수 있으며 위암의 발생기전을 규명하기 위해서는 유전자변화인 이형 접합성 소실(loss of heterozygosity), 돌연변이(mutation) 등도 함께 연구되어야 하겠다.

본 연구에서는 다른 여러 보고(22,27)와 달리 *hMLH1* 유전자의 메틸화가 위암의 여러 임상병리학적 인자 중 나이, 암종의 크기, Lauren 분류와는 밀접한 연관성이 있었다. 비메틸화된 경우에 비해 메틸화가 발생한 예가 나이가 많았으나, 나이는 다변량 분석시 의미있는 예후 인자가 아니었으며, 노화에 따른 과메틸화의 영향도 배제할 수 없을 것 같다. 암종의 크기나, Lauren 분류와 같은 인자와의 상관 관계로 보아 많은 증례 수를 이용한 연구를 통하여 향후 예후 인자의 하나로도 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 실제 김 등(30)은 Lauren 분류 중 장형에서 메틸화가 많이 발생하였으며, 김 등(28)은 장형에서 5년 생존율이 높다고 보고하였다.

본 연구에서 *P16* 유전자의 메틸화는 위암의 여러 임상병리학적 인자와 통계학적으로 유의한 연관성은 없었으나 림프절 전이가 있는 경우에 많이 발생하였다. 최근 조기 위암의 치료의 한 방법으로 내시경적 점막 절제술(EMR)이 많이 시행되고 있는데 이의 적응증 판단하는데 중요한 것이 림프절 전이 유무이다. 그러나 림프절 전이 유무는 현재 시행되고 있는 복부초음파, 복부 단층촬영술과 내시경 초음파로 정확히 알 수 없다. 따라서 *P16* 유전자의 메틸화는 더 많은 증례를 보강하면 다른 진단 방법과 연계하여 내시경적 점막 절제술의 적응증을 판단하는데 하나의 지표가 될 수 있을 것으로 추측된다.

김 등(33)은 위의 악성림프종에서 *Helicobacter pylori*를 치료한 후 *P16* 유전자의 메틸화가 소실됨을 보고하였는데 본 연구에서 위암의 중요한 유발인자인 *Helicobacter pylori*가 *P16* 및 *hMLH1* 유전자의 불활성화에 미치는 영향을 알아보고자 하였으나 두 유전자 모두 관련이 없었다.

결론

본 연구에서 *P16* 및 *hMLH1* 유전자의 메틸화는 비암종 조직보다 암종 조직에서 많이 발생하고 이들 유전자의 불활성화와 밀접한 관련이 있음이 관찰되어 이들이 위암의 발생에 관여 할 것으로 생각된다. *P16* 유전자의 메틸화는 위암의 여러 임상병리학적 인자와 연관성이 없었으나, *hMLH1* 유전자의 메틸화는 나이, 암종의 크기, Lauren 분류와 연관이 있음을 알 수 있었으며, 더 많은 증례의 보강과 후속적인 연구가 이루어진다면 위암 환자의 예후와 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-272.
2. Baylin SB, Herman GJ, Graff JR, Vertigo PM, Issa JP. Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998;72:141-196.
3. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes age. *Nature Genet* 1999;21:163-167.
4. Fommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1827-1831.
5. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
6. Gonzalaz-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, et al. Methylation of the 5' CpG island of the *P16/CDKN2* tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlated with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-4535.
7. Graff JR, Hermann JG, Lapidus RG, et al. *E-cadherin* expression is silenced by DNA hypermethylation in human and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995;55:5195-5199.
8. Baylin SB, Herman GJ. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-174.
9. Lee YY, Kang SH, Seo JY. Alteration of *p16INK4a* and *p15INK4b* genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997;80:1889-1896.
10. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1* promoter methylation and *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellites instability. *Cancer Res* 1999;59:159-164.
11. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Hermann JG, Baylin SB, Issa JPI. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-8686.

12. Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with *P16* protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000;80:689-695.
13. Leung WX, Yu J, Ender KW, et al. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissue. *Am Cancer Soc* 2001;91:2294-2301.
14. Kim HK, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim HG. Concerted promotor hypermethylation of *hMLH1*, *p16^{INK4A}*, and *E-cadherin* in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003;200:23-31.
15. Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-389.
16. Robertson KD, Tokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolfe AP. DNMT1 forms a complex with *Rb*, *E2F1* *HDAC1* represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000;25:338-342.
17. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the *hMLH1* promotor but no *hMLH1* mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;87:200-203.
18. Laird PW, Jackson GL, Frazeli A, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995;81:197-205.
19. Herman JG, Merio A, Mao L, et al. Inactivation of the *CDKN2/P16/MTS1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancer. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530.
20. Nakajima T, Akiyama Y, Arai T, et al. Age-related hypermethylation of the *hMLH1* promotor in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;94:208-211.
21. Endoh H, Tamura G, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Frequent hypermethylation of *hMLH1* gene promotor in differentiated-type tumors of the stomach with the gastric foveolar phenotype. *Am J Pathol* 2000;157:717-722.
22. Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:2847-2851.
23. Waki T, Tamura G, Tsuchiya, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of E-Cadherin, *hMLH1*, and *p16* genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2003;161:399-403.
24. Oue N, Oshimo Y, Nakayama H, et al. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histologic type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Sci* 2003;94:901-905.
25. Song SH, Jong HS, Choi HH, et al. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate *P16 (INK4a)* expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000;87:236-240.
26. Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994;14:5487-5494.
27. Kim HC, Roh SA, Yook JH, et al. Microsatellite instability and promoter methylation of *hMLH1* in sporadic gastric cancer. *J Kor gastric Cancer Assoc* 2003;3:50-53.
28. Kim JB, Kwon OJ, Oh ST, Yang HK. Results of surgery on 6589 gastric cancer patients and immunochemosurgery as the best treatment of the advanced gastric cancer. *Ann Surg* 1992;216:269-279.

= Abstract =

Methylation of *P16* and *hMLH1* in Gastric Carcinoma

Gi Young Sung, M.D., Kyung Hwa Chun, M.D., Jin Jo Kim, M.D., Hyung Min Chin, M.D., Wook Kim, M.D., Cho Hyun Park, M.D., Seung Man Park, M.D., Keun Woo Lim, M.D., Woo Bae Park, M.D., Seung Nam Kim, M.D. and Hae Myung Jeon, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: We investigated the impacts of the methylation states of the *P16* and the *hMLH1* genes on pathogenesis and genetic expression of stomach cancer and their relationships with *Helicobacter pylori* infection, and with other clinico-pathologic factors.

Material and Methods: In our study, to detect protein expression and methylation status of the *P16* and the *hMLH1* genes in 100 advanced gastric adenocarcinomas, used immunohistochemical staining and methylation-specific PCR (MSP) and direct automatic genetic sequencing analysis.

Results: Methylation of the *P16* gene was observed in 19 out of 100 cases (19%) and in the 18 of those cases (94.7%) loss of protein expression was seen. We were able to show that loss of *P16* gene expression was related to methylation of the *P16* gene (kappa coefficient=0.317, P=0.0011). Methylation of the *hMLH1* gene was observed in 27 cases (27%), and in 24 cases of those 27 cases (88.8%), loss of protein expression was seen, which suggested that loss of protein expression in the *hMLH1* gene is related to methylation of *hMLH1* gene (kappa coefficient=0.675, P<0.0001). Also methylation of the *hMLH1* gene was related to age, size of the mass, and Lauren's classification.

Conclusion: We found that methylation of DNA plays an important role in inactivation of the *P16* and the *hMLH1* genes. The methylation of the *hMLH1* genes is significantly related to age, size of the mass, and Lauren's classification. (J Korean Gastric Cancer Assoc 2005;5:228-237)

Key Words: Gastric carcinoma, *P16*, *hMLH1*, Methylation, Gene