

위암, 대장암 및 간암 세포주에서 p16^{INK4A} 단백질 발현

¹연세대학교 원주의과대학 미생물학교실, ²연세대학교 의과대학 미생물학교실,
³연세대학교 원주의과대학 기초의학연구소, ⁴관동대학교 의과대학 미생물학교실

최선주^{1,3} · 김수기^{1,3} · 김세종² · 고춘명^{1,3} · 박윤선⁴

The p16^{INK4A} Expression in Stomach Cancer, Colon Cancer and Hepatoma Cell Lines

Sun Ju Choi, M.D.^{1,3}, Soo Kie Kim M.D., Ph.D.^{1,3}, Se Jong Kim, M.D., Ph.D.²
Choon Myung Koh, Ph.D.^{1,3} and Yoon-Sun Park, M.D.⁴

¹Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Yonsei University;

²Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University;

³Institute of Basic Medical Sciences, Wonju College of Medicine, Yonsei University;

⁴Department of Microbiology, Wonju College of Medicine, Kwandong University

Purpose: The p16^{INK4A} gene encodes a specific inhibitor of cell cycle progression. In recent years, genetic deletion and altered expression of p16^{INK4A} gene were frequently showed in many human cancers. So, the p16^{INK4A} gene is considered as tumor suppressor gene. However, there has been a few data for the p16^{INK4A} in gastric cancer, colon cancer, and hepatoma. So, we investigated the genetic deletion and altered expression of p16^{INK4A} in gastric cancer, colon cancer and hepatoma cell lines.

Materials and methods: The homozygous deletion of p16^{INK4A} was examined by using PCR and the protein expression of p16^{INK4A} by using Western blotting in cancer cell lines established from Korean patients: stomach cancer, colon cancer and hepatoma cell lines. **Results:** Homozygous deletion of p16^{INK4A} was detected only 1 stomach cancer cell line out of 13 cell lines examined. The p16^{INK4A} was detected in 3 of 13 cancer cell line. These results showed the low frequency of p16^{INK4A} homozygous deletion and high frequency of p16^{INK4A} expression alteration in stomach cancer, colon cancer and hepatoma cell lines.

Conclusion: In this study, it may be suggested that the altered p16^{INK4A} expression as well as p16^{INK4A} gene deletion play important role in oncogenesis. Further studies to determine the mechanism of p16^{INK4A} gene inactivation are expected.

Key Words: Cancer cell line, p16^{INK4A} homozygous deletion, p16^{INK4A} expression

서 론

모든 암의 발생 과정에서 세포 성장 조절 기전의 변화는 필수적이며 실제로 몇몇의 세포 주기 조절 유전자는 암유전자(oncogene) 또는 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)로서 역할을 직접 수행한다(1,2). 이런 사실은 세포 주기 조절 인자가 암 발생 과정과 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있다. 종양발생에 기여할 것으로 추정되는 세포주기조절인자로는 세포주기진행을 유도하는 cdk4, cyclinD와 세포주기의 진행을 억제하는 p53, p21, pRB, p16^{INK4A} 등이 대표적이다(3,4). 이 중에서 p16^{INK4A}는 9p21에 존재하는 유전자로서 cdk4 inhibitor인 p16^{INK4A}를 encoding하고 있는데 최근 몇년간 비 소세포성 폐암, 신경교종, 백혈병, 방광암을 비롯한 여러 종류의 암세포에서 결손이 일어나는 경우가 많다고 보고되고 있다(5~11). p16^{INK4A} 유전자가 결손된 경우 상대적으로 cyclinD-cdk4 복합체 형성이 증가하여 pRB 기능의 손실을 초래하게 된다. p16^{INK4A} 유전자의 결손은 세포 종류에 따라 다르게 나타나 정상세포종, 신경교종, 흑색종, 유방암, 백혈병에서는 60~80%의 높은 결손율을 보인 반면에 대장암이나 신경아세포종에서는 10%이하의 낮은 결손율이 보고되었다(12). 또한 일부 암 세포주에서는 유전자 결손이 없음에도 불구하고 p16^{INK4A} mRNA나 p16^{INK4A} 단백질 발현이 일어나지 않는 것이 보고되었다(13). 그리고 p16^{INK4A} 유전자가 결손되어 있는 세포에 이 유전자를 삽입해 준 경우에 세포의 성장이 정지된다는 보고가 있어 암의 치료에 이용할 가능성도 제시되고 있다(14~16).

현재 p16^{INK4A} 단백질 발현 과정에 관한 많은 연구는 p16^{INK4A} 유전자 결손이 비교적 많은 정상세포종, 흑색종, 비 소세포성 폐암 등을 대상으로 하고 있다(17~19). 그러나 서구에서 발생 빈도가 높지 않은 위암, 간암 등에 대해서는 p16^{INK4A} 유전자 결손에 대한 연구가 많지 않으며(20), 대장암 세포에서는 p16^{INK4A} 유전자 결손은 없고 단백질 발

현의 이상이 있다는 것만 보고된 바 있다(13). 즉 p16^{INK4A} 결손이 적은 일부 암종과 우리나라에서 발생 빈도가 높은 암을 대상으로한 p16^{INK4A} 유전자 및 그 단백질 발현에 대한 연구는 미진한 실정이며 특히 우리나라 환자로부터 수립된 세포주를 대상으로 한 연구 결과는 아직 미미하다.

이에 본 연구에서는 우리나라 환자로부터 수립된 세포주 중에서 위암, 대장암 그리고 간암 세포주를 대상으로 p16^{INK4A} 유전자 결손 여부와 p16^{INK4A} 단백질 발현을 조사함으로써 상기 암종 발생 과정에서 p16^{INK4A}의 관련성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1) 세포주 및 세포주 배양

실험에 사용한 암세포주로는 위암 세포주 4주(SNU-1, SNU-5, SNU-16, MKN-45), 대장암 세포주 4주(SNU-C1, SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5) 그리고 간암 세포주 5주(SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-449, SNU-475)로서 일본의 위암환자로부터 수립된 MKN-45는 원자력병원에서 분양받았고 그외의 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다(21,22). p16^{INK4A} 유전자 검출 및 단백질 검출의 양성 대조군으로는 정상 성인의 말초 혈액 림프구와 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주를 사용하였으며, 음성 대조군으로는 유방암 세포주인 MCF-7 세포주를 사용하였다(23).

세포주 배양은 75 cm² 조직배양용기(Corning, Corning, NY, USA)에 열비동화시킨 10% 우태아 혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 100 IU/ml의 penicillin, 50 µg/ml의 gentamicin이 첨가된 RPMI 1640(Gibco BRL) 배지를 사용하였으며 5% CO₂가 함유된 37°C 항온 항습기에서 배양하였다.

2) 배양 세포 및 혈액에서 DNA 분리

단층배양한 각 세포주를 인산완충용액(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM

KH₂PO₄)으로 2회 세척하였다. 각 플라스크를 2.5% 트립신으로 처리하여 세포가 떨어진 것을 확인한 후 10% 우태아 혈청이 포함된 배지로 부유시키고 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. Tris-EDTA 완충용액(TE 완충용액; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)으로 세포를 부유시킨 후 세포부유액 1 ml당 10 ml의 추출용액(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA, 20 µg/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS)을 첨가하고 37°C에 1시간 처리하였다. Proteinase K용액을 100 µg/ml이 되도록 첨가한 후 50°C 수조에서 3시간 동안 반응시켰다. 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 섞은 후 상온에서 5000×g로 15분간 원심분리하고 수용액층과 유기용매층을 분리하여 수용액층을 얻었다. 이 과정을 2회 반복한 뒤 DNA용액에 3 M sodium acetate 용액을 1/10 부피로 첨가하고 4°C에 보관되어 있는 2.5배 용량의 에탄올을 넣어 DNA를 침전시키고 70% 에탄올로 세척하고 건조시켰다. TE 완충용액을 첨가하여 DNA가 충분히 녹을 때까지 4°C에서 보관한 후 분광 광도기로 260 nm파장에서 흡광도를 측정, 정량하여 실험에 사용하였다(Blin 및 Stafford, 1976). 양성 대조군으로 사용한 림프구를 얻기 위하여 정상 성인에서 채취한 말초 혈액 20 ml을 헤파린이 들어있는 시험관에 받은 후 Ficoll-Hypaque가 들어있는 시험관에 중첩하였다. 2000 rpm 으로 15분간 원심분리하여 림프구층을 수거하고 1500 rpm 으로 5분간 원침하여 사용하였다(24).

3) 중합 효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)

p16^{INK4A} 유전자 exon2의 일부 염기서열로 primer를 제작하였으며 primer의 염기서열은 다음과 같다(25).

5' primer: 5'-GGAAATTGGAAACTGGAAGC-3'

3' primer: 5'-CTGCCATCATCATCATGACCTG-3'

세포에서 분리한 DNA와 10배의 PCR buffer

(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.4, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), 0.2 mM dNTP, primer, 2 unit Taq polymerase(Promega, Madison, WI, USA), 5% dimethylsulfoxide를 섞은 후 상층에 mineral oil을 덮었다. 이 시료를 thermal cycler에 넣고, 첫 번째 주기는 94°C에서 3분, 72°C에서 1분, 58°C에서 1분 시행한 후 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분의 조건으로 35주기를 시행하여 p16^{INK4A} 유전자를 증폭시켰다. 반응이 끝난 후 각 시료에 mineral oil과 동량의 chloroform을 넣고 15초간 잘 섞어준 후 원심분리하여 PCR 산물을 분리하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동하고 (100V, 40분) 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색하여 PCR 증폭산물을 관찰하였다(26).

4) 배양 세포에서 핵 단백질 분리

단층 배양된 세포를 차가운 인산완충용액으로 2회 세척하고 세포를 수확한 후 두 번 더 세척하였다. 15초간 원심분리하여 세포 침전을 얻은 후 0.1% NP-40이 첨가된 20 µl의 저장성 완충액(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin)을 넣어 부유시키고 얼음속에 10분간 정치하였다. 교반기로 15초간 잘 섞은 후 4°C에서 10분간 원심분리하여 침전물을 수거하였다. 고장성 완충액(20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin) 20 µl를 넣어 부유시킨 후 얼음속에 15분간 정치하였다. 다시 교반기로 15초간 섞은 후 4°C에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 영하 70°C에 보관하였다가 실험직전에 녹여서 단백질 검출에 사용하였다(27). 단백질 정량은 우혈청 알부민(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 표준액으로 하여 Bradford방법으로 정량하여 사용하였다(28).

5) Western blotting

정량된 핵 단백질 추출액 50 µg을 10~20% con-

tinuous gradient SDS- polyacrylamide gel에서 125 V로 110분간 전기영동하였다. Gel을 transfer buffer로 미리 적신 nitrocellulose membrane(Micron Separation Inc, MA, USA)에 올려놓고 100 V로 50분간 transfer하였다. 이 membrane을 5% 탈지분유와 0.1% tween-20이 포함된 Tris 완충용액(TBST; 25 mM Tris, pH 7.6, 192 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 넣어 실온에서 1시간 동안 흔들어 주면서 blocking하였다. 3% 우혈청 알부민이 함유된 TBST에 10 µg/ml의 마우스의 항-사람 p16^{INK4A} 항체(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 첨가하고 nitrocellulose membrane을 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 흔들어준 후 TBST로 3회 가볍게 헹구어내고 10분씩 3회 세척하였다. Nitrocellulose membrane

을 horse-radish peroxidase가 결합된 토끼의 항-마우스 IgG 항체(Sigma)를 2만배 희석한 용액에 넣고 실온에서 한시간 반응시킨 후 TBST로 15분간 1회, 5분씩 3회 세척하였다. ECL kit(Amersham, Chalfont, England)를 사용하여 X-선 필름(Amersham)에 20분간 감광시켰다(29).

결 과

1) 위암, 대장암 및 간암 세포주에서 p16^{INK4A} 유전자 검출

위암, 대장암 및 간암 세포주의 DNA를 분리한 후, 분광광도계로 260 nm파장에서 농도를 측정하여 실험결과 확립된 최적의 조건으로 PCR을 시

Fig. 1. Homozygous deletion to the p16^{INK4A} gene in the stomach cancer, colon cancer, hepatoma cell line DNAs. Genomic DNA extracted from the cell lines were subjected to PCR analysis using primers for p16^{INK4A} exon 2 as described in materials and methods. (A) Stomach cancer cell lines. Lane 1, 123 bp ladder marker; lane 2, HeLa; lane 3, MCF-7; lane 4, SNU-1; lane 5, SNU-5; lane 6, SNU-16; lane 7, MKN-45; lane 8, lymphocyte (B) Colon cancer cell lines. Lane 1, 123 bp ladder marker; lane 2, HeLa; lane 3, MCF-7; lane 4, SNU-C1; lane 5, SNU-C2A; lane 6, SNU-C4; lane 7, SNU-C5; lane 8, lymphocyte (C) Hepatoma cell lines. Lane 1, 100 bp ladder marker; lane 2, lymphocyte; lane 3, MCF-7; lane 4, SNU-182; lane 5, SNU-387; lane 6, SNU-398; lane 7, SNU-449; lane 8, SNU-475.

행하였다. 각 실험군마다 양성 대조군으로 정상 성인의 말초 혈액 림프구에서 분리한 DNA와 HeLa 세포주의 DNA를 사용하였고, 음성 대조군으로 MCF-7 세포주의 DNA를 사용하였다. PCR을 시행한 후 그 산물을 전기영동하여 관찰한 결

과 위암 세포주에서 SNU-1, SNU-5, MKN-45에서는 167 bp의 PCR 산물이 관찰되었으나 SNU-16에서는 예상되는 크기의 PCR 산물이 생성되지 않았다. 대장암 세포주인 SNU-C1, SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5와 간암 세포주인 SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-449, SNU-475에서 모두 167bp의 PCR 산물을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

2) p16^{INK4A} 단백질 발현 조사

HeLa 세포주를 이용하여 p16^{INK4A} 단백질의 검출을 위하여 필요한 단백질 양을 표준화하였다. 각 lane별로 HeLa 세포주 핵 단백을 4 µg, 8 µg, 16 µg, 32 µg, 64 µg씩 가한 후 Western blotting을 시행한 결과 16 µg이상에서 16 kDa에 해당하는 크기의 band를 관찰할 수 있었고, MCF-7 세포주 핵 단백을 32 µg, 64 µg 가한 경우에는 band가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

Fig. 2. Expression of p16^{INK4A} protein in HeLa and MCF-7 cell lines. Nucleus extract from HeLa and MCF-7 cell cultures were analysed by Western blotting. Lane 1, HeLa, 4 µg; lane 2, HeLa, 8 µg; lane 3, HeLa, 16 µg; lane 4, HeLa, 32 µg; lane 5, HeLa, 64 µg; lane 6, MCF-7, 32 µg; lane 7, MCF-7, 64 µg.

Table 1. p16^{INK4A} expression in stomach cancer, colon cancer and hepatoma cell lines

	Cell lines	p16 ^{INK4A} gene	p16 ^{INK4A} Protein
Control	HeLa	+	+
	MCF-7	-	-
	Lymphocyte	+	ND*
Stomach cancer	SNU-1	+	-
	SNU-5	+	-
	SNU-16	-	-
	MKN45	+	+
Colon cancer	SNU-C1	+	+
	SNU-C2A	+	-
	SNU-C4	+	-
	SNU-C5	+	-
Hepatoma	SNU182	+	+
	SNU-387	+	-
	SNU-398	+	-
	SNU-449	+	-
	SNU-475	+	-

*not done

Fig. 3. Expression of p16^{INK4A} protein in the stomach cancer, colon cancer, hepatoma cell line. Nucleus extract from stomach cancer, colon cancer, hepatoma cell cultures were analysed by Western blotting with anti-p16^{INK4A} antibody as described in materials and methods. (A) Stomach cancer cell lines. Lane 1, HeLa; lane 2, MCF-7; lane 3, SNU-1; lane 4, SNU-5; lane 5, SNU-16; lane 6, MKN-45 (B) Colon cancer cell lines. Lane 1, HeLa; lane 2, MCF-7; lane 3, SNU-C1; lane 4, SNU-C2A; lane 5, SNU-C4; lane 6, SNU-C5 (C) Hepatoma cell lines. Lane 1, HeLa; lane 2, MCF-7; lane 3, SNU-182; lane 4, SNU-387; lane 5, SNU-398; lane 6, SNU-449; lane 7, SNU-475.

대상 세포주들에서 얻은 핵 단백질의 농도를 정량한 후 각각 50 μ g씩 취하여 Western blotting을 시행하였다. 위암 세포주중 SNU-1, SNU-5, SNU-16에서는 16 kDa의 band를 관찰할 수 없었으며 MKN-45에서는 낮은 intensity를 갖는 band가 나타났다. 대장암 세포주중 SNU-C1에서만 16 kDa의 band를 관찰할 수 있었고 그 이외에 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5에서는 band가 나타나지 않았다. 간암 세포주중 SNU-182에서만 16 kDa에 해당하는 band를 확인할 수 있었으나 그 이외에 SNU-387, SNU-398, SNU-449, SNU-475에서는 band가 나타나지 않았다(Fig. 3, Table 1).

고 찰

암세포주에서 9p21의 동형 접합체 결손이 관찰되고 이 부분에 결손된 유전자가 p16^{INK4A} 단백을 만든다는 사실이 밝혀짐에 따라 암억제 유전자로서 p16^{INK4A} 유전자의 역할에 대해 관심이 모아졌다. 현재 p16^{INK4A} 유전자 결손이 많은 암세포를 대상으로 하여 p16^{INK4A} 단백질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 대장암과 같이 p16^{INK4A} 보다는 p53, K-ras, DCC 등 암 발생 기전에 관여하는 다른 유전자 이상이 주로 나타나는 암이나, 위암이나 간암과 같이 서구에서는 비교적 적게 발생하는 암을 대상으로 한 연구 결과는 아직 미미하다(30~32). 특히 우리나라 암환자로부터 얻은 암세포주를 이용한 결과는 많지 않은 실정이다(25). 그러나 세포 주기에 작용하기 위해서는 유전자로부터 단백질 발현이 필수적이며, 유전자 결손이 나타나지 않더라도 단백질 발현에 이상이 있다면 이러한 단백질은 암발생 과정에 관여한다고 할 수 있다. 따라서 p16^{INK4A} 유전자 결손이 없거나 낮은 빈도로 일어나는 암세포주를 대상으로 한 p16^{INK4A} 단백질 발현의 조사는 암발생 과정에서 p16^{INK4A} 단백질의 역할 연구에 기본적인 과정이다.

본 연구에서는 우리나라 환자로 부터 수립된 위암, 대장암 및 간암 세포주를 대상으로 p16^{INK4A} 유전자 동형 접합체 결손이 있는지 조사하기 위

하여 종합 효소 연쇄 반응을 시행하였다. 위암 세포주인 SNU-16에서는 PCR 산물이 검출되지 않아 p16^{INK4A} 유전자 결손이 확인되었고, 그 외에 다른 대상 세포주에서는 예상되는 167 bp의 PCR 산물이 검출되어 p16^{INK4A} 유전자 결손율은 10% 이하(1/13)로 낮게 나타났다. 이는 대부분의 암세포주에서 p16^{INK4A} 유전자 결손율이 50~70%에 이른다는 보고와 비교할 때 상당히 낮은 결손율이었다(11,12). 그러나 위암에서 9번 염색체의 이형 접합성 결손이나 p16^{INK4A} 유전자 동형 접합체 결손이 낮은 빈도로 일어난다는 기존의 보고와는 일치하는 결과를 보였다(33,34). 또한 대장암에서 p16^{INK4A} 유전자 결손이 관찰되지 않았다는 보고나, 간암에서 p16^{INK4A} 유전자 결손이 낮은 빈도로 일어났다는 보고와도 일치하는 것이다(11,35). 그러나 본 연구에서 사용한 primer는 p16^{INK4A} 유전자 exon2의 일부로서 암세포주에서 가장 많이 결손된 부분이라고 알려져 있지만, 이것이 p16^{INK4A} 유전자를 모두 증폭할 수는 없으므로 실제의 결손율은 더 높을 가능성도 배제할 수 없다(12). 또한 대부분의 p16^{INK4A} 유전자 결손이 homozygous deletion으로 일어난다고 알려져 있지만 heterozygous deletion까지 검출한다면 결손율은 더욱 높게 나타날 수도 있을 것이다(36).

p16^{INK4A} 유전자가 존재하더라도 궁극적으로는 p16^{INK4A} 단백질 발현 유무가 세포 주기 조절 기전에 중요하므로 Western blotting을 이용하여 대상 암세포주들의 p16^{INK4A} 단백질 발현 양상을 조사하였다. 대상 세포주들 중에서 대장암 세포주인 SNU-C1과 간암 세포주인 SNU-182에서만 양성 대조군과 비슷한 intensity를 보이는 band가 검출되었다. 또한 위암 세포주인 MKN-45에서는 양성 대조군에 비해 1/4이하의 density를 보이는 band가 검출되었고 그 외의 세포주에서는 단백질이 검출되지 않았다. 이 결과를 종합하면 위암 세포주에서는 4주중 1주에서, 대장암 세포주에서는 4주중 1주에서, 간암 세포주에서는 5주중 1주에서만 p16^{INK4A} 단백질이 발현되어, 전체 대상 세포주 13주중 3주에서 p16^{INK4A} 단백질이 발현되었다. 그러나

양성대조군과 비슷한 강도의 단백질 발현된 것은 13주중 2주로, 결국 13주중 11주에서는 단백질 발현의 이상이 있었다. 이는 PCR 시행 결과 p16^{INK4A} 유전자 결손 빈도가 낮았던 점에 비추어 볼 때 단백질 발현 이상이 상당히 높은 빈도로 일어남을 보여준다. 전립선암이나 방광암, 신경교종암을 비롯한 몇몇 세포주에서도 p16^{INK4A} 유전자 결손은 낮은 빈도로 나타남에도 불구하고 p16^{INK4A} 단백질 발현 이상이 높게 나타나는 경우가 보고된 바 있다(35,37,38). 또한 대장암 세포주에서 p16^{INK4A} 유전자 결손은 나타나지 않았으나 단백질 발현 이상은 높은 빈도로 나타났다는 보고가 있었다(13).

이상의 PCR 결과와 Western blotting 결과를 보면 PCR 산물이 검출되지 않은 SNU-16은 p16^{INK4A} 단백질도 검출되지 않았고, 이는 p16^{INK4A} 유전자 결손에 의한 것이다. PCR에 의한 유전자 증폭이 양성 대조군과 비슷한 정도로 잘 일어난 세포주 중에서 대장암 세포주인 SNU-C1과 간암 세포주인 SNU-182는 단백질 대조군과 비슷한 정도로 강하게 검출되어 단백질 발현에 이상이 없었다. 반면 위암 세포주인 SNU-1, SNU-5, MKN-45와 대장암 세포주인 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 및 간암 세포주인 SNU-387, SNU-398, SNU-449, SNU-475는 PCR에 의한 유전자 증폭이 잘 일어났으나 단백질이 검출되지 않아 이들은 p16^{INK4A} 유전자 결손 이외의 다른 기전에 의해 단백질 발현의 이상이 초래되었다고 생각된다. p16^{INK4A} 유전자 불활성화 기전으로는 promotor region의 유전자 변이나, CpG 부분의 과메틸화(hypermethylation), 비정상적인 전사 산물의 발생 등이 있을 수 있다(39). 실제로 p16^{INK4A} 유전자 결손이 적으면서 p16^{INK4A} 단백질 발현 이상이 많이 관찰되는 식도암, 폐암, 대장암, 방광암 및 전립선암에서 CpG 부분의 과메틸화가 50~90% 이상의 높은 빈도로 관찰된다는 보고가 있어 CpG 메틸화는 p16^{INK4A} 유전자 불활성화에 중요한 기전으로 생각되고 있다(35,37,40,41).

본 실험 결과 우리나라 환자로부터 수립된 위암, 대장암 및 간암 세포주에서 p16^{INK4A} 유전자 결손은 낮은 빈도로 관찰되었으나, 단백질 발현

이 안되거나 적은 양이 발현되는 경우는 많이 나타났다. 이 결과는 위암, 대장암, 간암의 종양화 과정에서 p16^{INK4A} 단백질 발현 이상이 관여됨을 시사한다. 그러나 일부 보고에 의하면 p16^{INK4A} 유전자 결손은 암조직보다는 암세포주에서 빈번히 일어난다고 하여 이것이 In vitro adaptation과정에서 수반되는 변화일 가능성이 제시되고 있어 차후에 암세포주를 대상으로 한 연구가 수행되어야 할 것이다. 또한 앞으로 상기 암종에서의 p16^{INK4A} 유전자 불활성화 기전에 관한 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

위암, 대장암 및 간암의 종양화 과정에서 p16^{INK4A} 유전자 결손과 함께 p16^{INK4A} 단백질 발현의 이상이 관여할 것으로 생각되며 앞으로 암조직을 이용한 연구가 수행되어야 하며 암조직에서도 의의있는 결과를 얻는다면 p16^{INK4A} gene inactivation 과정에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Weinber RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-3717.
- Carlos CC. Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-560.
- Hirai H, Roussel MF, Kato J, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p18 and p19, are specific inhibitors of cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2672-2681.
- Hirama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; 6: 841-854.
- Olopade OI, Jenkins RB, Ransom DT, Malik K, Pomykala H, Novori T, Cowan JM, Rowley JD, Diaz MO. Molecular analysis of deletions of the short arm of chromosome 9 in human gliomas. *Cancer Res* 1992; 52: 2523-2529.
- Noriomi M, Tsai YC, Lerner SP, Olumi AF, Spruck CH III, Mirella GZ, Nichols PW, Skinner DG, Peter AJ. Role of chromosome 9 in human bladder cancer.

- Cancer Res 1993; 53: 5093-5095.
7. Ruppert JM, Tokino K, Sidransky D. Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9. *Cancer Res* 1993; 53: 5093-5095.
 8. Merlo A, Gabrielson A, Askin F, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 640-642.
 9. Ogawa S, Hirano N, Sato N, Takahashi T, Hangaishi A, Tanaka K, Kurokawa M, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. Homozygous loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor(p16) gene in human leukemia. *Blood* 1994; 84: 2431-2435.
 10. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature* 1993; 366: 704-707.
 11. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tartigian SV, Stockert E, Day RSI, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 265: 436-440.
 12. Nobori T, Muria K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-756.
 13. Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain S, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. Mutational and altered expression of p16^{INK4A} in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11045-11049.
 14. Serrano M, Gomez-Lanoz E, Depinho RA, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16^{INK4A}. *Science* 1995; 267: 249-252.
 15. Enders GH, Koh J, Missero C, Rostgi AK, Harlow E. p16 inhibition of transformed and primary squamous epithelial cells. *Oncogene* 1996; 12: 1239-1245.
 16. Maelandsmo GM, Florenes VA, Horig E, Oyjord T, Engebraten O, Holm R, Borresen AL, Fodstad O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclinD1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *Br J Cancer* 1996; 73: 909-916.
 17. Reed JA, Loganzo F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Gledening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, Albino AP. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995; 55: 2713-2718.
 18. Gledening JM, Flores JF, Walker GJ, Stone S, Albino AP, Fountain JW. Homozygous loss of the p15INK4B gene (and not p16INK4 gene) during tumor progression in a sporadic melanoma patient. *Cancer Res* 1995; 55: 5531-5535.
 19. Shapiro GI, Park JE, Edward CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; 55: 6200-6209.
 20. Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996; 56: 2405-2410.
 21. Park JG, Oie HK, Sugarbaker PH, Henslee JG, Chen TR, Johnson BE, Gazdar A. Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 6710-6718.
 22. Park JG, Lee JH, Kang MS, Park KJ, Jeon YM, Lee HJ, Kwon HS, Park HS, Yeo KS, Lee KU, Kim ST, Chung JK, Hwang YJ, Lee HS, Kim CY, Lee YI, Chen TR, Hay RJ, Song SY, Kim WH, Kim CW, Kim YI. Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 62: 276-282.
 23. Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinases 4 inhibitor p16INK4A. *Cancer Res* 1994; 54: 5816-5820.
 24. Niku SD, Hoon DSB, Cochran AJ, Morton DL. Isolation of lymphocytes from clotted blood. *J Immunol Methods* 1987; 105: 9-14.
 25. 이태윤, 박전환, 김수기, 김성광. 일차위암세포배양 및 위암세포주에서 암억제유전자 CDKN2의 결손, 변이, 및 발현이상의 검출. *대한면역학회지* 1996; 18: 123-134.
 26. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
 27. Dignam JD, Lobovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acids Res* 1988; 11: 1475-1489.
 28. Weiner GJ, Kaminski MS. Anti-idiotype antibodies recognizing stable epitopes limit the emergence of idiotype variants in a murine lymphoma. *J Immunol* 1990; 144: 2436-2445.
 29. Hunkapiller MW, Lujan E, Ostrander F, Hood LE. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis.

- Methods Enzymol 1983; 91: 227-236.
30. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, Van Trimmen P, Ledbetter DH, Baker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* 1989; 244: 217-221.
 31. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.
 32. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 709-767.
 33. Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Terada M. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 203: 1090-1095.
 34. Sakata K, Tamura G, Maesawa C, Suzuki Y, Terashima M, Saioh K, Eda Y, Suzuki A, Sekiyama S, Satodate R. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 9 without p16 gene mutation in gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 333-335.
 35. Herman JG, Merio A, Mao L, Lapidus RG, Issa JJ, Davidson NE. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995; 55: 4525-4530.
 36. Xu L, Sgroi D, Sterner CS, Beauchamp RL, Pinney DM, Koel S, Ueki K, Rutter JL, Buckler AJ, Louis DN, Gusella JF, Ramesh V. Mutational analysis of CDKN2(MTS1/p16^{INK4A}) in human breast carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 5262-5264.
 37. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995; 55: 4531-4535.
 38. Nishikawa R, Furnari FB, Lin H, Arap W, Berger MS, Cavenee WK, Huang HS. Loss of p16^{INK4A} expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1941-1945.
 39. Jones PA, Buckley JD. The role of DNA methylation in cancer. *Adv Cancer Res* 1990; 54: 1-23.
 40. Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, Baylin SB, Issa JP. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57(16): 3370-4.
 41. Wong DJ, Barrett MT, Stoger R, Emond MJ, Reid BJ. p16^{INK4a} promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1997; 57(13): 2619-22.