

인체 방광상피세포암에서의 Telomerase Activity

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이동현 · 양승철 · 홍성준 · 정병하 · 정윤형

=Abstract=

Telomerase Activity in Transitional Cell Carcinoma of Bladder

Dong Hyeon Lee, Seung Choul Yang, Sung Joon Hong, Byung Ha Chung
and Yoon Hyung Chung

From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Telomeres are the specialized structures at the end of all eukaryotic chromosomes that are thought to give important functions in protecting genomic DNA from degradation and deleterious recombination events. The enzyme telomerase maintains a constant telomere length observed in immortalized cells, allowing unlimited cell proliferation. Various cancer cells express telomerase activity. We analyzed telomerase activity in bladder tumors and normal tissues. Bladder tumor tissues and normal mucosa of 25 patients were obtained during transurethral resection of bladder (TURB) or after radical cystectomy. Telomerase activity was analyzed using telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay which is based on polymerase chain reaction (PCR) technique. Twenty-three of 25 bladder tumor tissue were transitional cell carcinomas and remains were urothelial hyperplasia and inverted papilloma, respectively. We observed telomerase activity in 22 of 23 bladder cancer tissues (95.7%); only one did not express telomerase activity. Telomerase activity was not detected in all normal tissues except one, which was obtained from a patient with carcinoma in situ. Urothelial hyperplasia and inverted papilloma did not express telomerase activity.

Our data demonstrates that the majority of human bladder cancers obtained from patients with transitional cell carcinoma expressed telomerase activity whereas urothelial hyperplasia and inverted papilloma did not. It indicates that telomerase activity may be an important role in carcinogenesis.

Key words: Telomere, Telomerase activity, Bladder transitional cell carcinoma

서 론

Telomere는 유핵세포의 염색체 말단에 존재하여 genomic DNA의 끊어나거나 결손을 방지하는 기능을 가지고 있는 DNA의 한 구조이다^{1,2}. 세포가 유사분열을 거듭 할 수록 그 길이는 짧아져 어느 한계 이상 telomere의 길이가 짧아지면 염색체의 말단과 말단 사이에 융합이 일어나 세포는 아폽토시스에 이른다.

인간의 정상 세세포에도 역시 염색체의 말단에
접수일자 : 1997년 7월 3일

5~15 kbp 정도의 telomere가 존재하며 1회 유사분열시 약 50~100 bp가 소실된다. 그러나 반일 세포가 지속적으로 안정된 telomere의 길이를 유지할 수 있다면 그 세포는 영구히 생존 할 수 있으며 이런 현상이 간세포와 일부 종양 세포에서 증명되었다. 이 불멸생존의 세포들에는 telomerase라는 ribonucleoprotein이 있어 이것이 telomere를 일정 길이 이상으로 유지시켜 세포가 영구히 생존할 수 있게 한다고 한다³.

최근 여러 가지 종양세포에서 telomerase 활성도가 발견되고 있으나 방광종양의 telomerase 활성도에 대한 보고는 극히 드물고 국내에서는 아-

직 보고된 바 없어 본 연구에서는 방광전막세포와 방광종양세포에서 telomerase 활성도를 측정하기 위해 telomeric-repeat amplification protocol (TRAP)⁴을 이용하여 telomerase의 활성도 유무를 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. 조직 표본의 준비

방광종양으로 진단 받고 내시경하 방광종양 절제술을 시행한 25명의 환자에서 종양조직 및 정상방광 조직을 수술 중 또는 수술 후 재취하여 즉시 액체질소에 냉동 보관하였다.

2. 세포 추출물의 준비

각 조직표본을 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척 후 4°C에서 원심분리하고 PBS를 제거한 다음 다시 500 μl의 세척용 완충용액 [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 1 mM BME]으로 세척한 후 4°C, 1500 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 세척 완충용액을 제거한 후 50~200 μl의 ice-cold lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM BME, 0.1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochlorine (AEBSF), 0.5% 3-[(-cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propanesulfonate, and 10% glycerol]를 조직표본의 크기에 따라 증가하고 조직을 homogenizer로 간 후 30분간 염유 위에 놓아두었다. 이 후 용해물을 4°C, 1,6000 rpm에서 30분간 원심분리하여 인이진 상청액을 500 μl microtube로 떠서 액화질소 속에서 순간 냉동시킨 후 각 조직표본과 세포 추출물을 -80°C에서 보관하였다. 세포 추출물의 단백질 농도는 Bradford 단백질定量법⁵으로 3 mg/ml의 농도로 회색하였다.

3. Telomerase Assay

Telomerase의 짐출은 현재 주로 쓰이고 있는 polymerase chain reaction (PCR)을 근간으로 한 TRAP 을 이용하였다. 간략하게 기술하면 각 추출물에 50 μl의 TRAP 혼합물 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.05% Tween, 1 mM EGTA, 50 μM deoxynucleotide triphosphates, 0.5 μM T4 gene 32 protein, and 0.1 mg/ml BSA)과 2.5 unit 의 Taq polymerase (Bioneer, Seoul), 0.1 μM의 TS oligonucleotide (5'-AATCCGTGAGCAGAGTT-3'),

Table 1. Patients characteristics

Pathology and Stage	No. Patients
Transitional cell carcinoma	
Ta	5
T1	10
T2 or higher	7
CIS	1
Urothelial hyperplasia	1
Inverted papilloma	1
Total	25

그리고 0.3 μl의 [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham, Buckinghamshire, UK)를 섞어 상온에서 30분간 방치하여 TS primer가 붙게 하고 CX primer (5'-CCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTTA-3')를 넣고 PCR을 하였다.

PCR은 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 45초간, 마지막 cycle에서는 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분간 31 cycle을 시행하였으며 양성 대조군으로 telomerase 활성도가 증명된 T-24 bladder cancer cell line의 세포 추출물을 사용하였으며 유성 대조군으로 세포 추출물이 없는 lysis buffer를 사용하였다.

PCR 생성분은 15% nondenaturing acrylamide gels에서 전기영동 시킨 후 autoradiography 법으로 현상하였다.

결 과

1996년 6월부터 동년 9월까지 연세대학교 의과대학 부속병원에 방광종양으로 진단 받고 내시경하 방광종양절제술을 시행 받은 25명의 환자로부터 전마조직과 종양조직을 얻었으며 이를 환자의 평균나이는 61.7세 (54~89) 였다. 25례 중 방광이행상피암이 23례, 양성종양이 2례 있었으며 양성종양은 요로상피 과형성 (urothelial hyperplasia) 1례 및 도립유두종 (inverted papilloma) 1례 였다. 23례의 방광이행상피암을 병기에 따라 분류하면 Table 1과 같다.

방광이행상피세포암 23례 중 1례를 제외한 22례에서 telomerase 활성도가 있었으며 이 1례는 grade 1, Ta 병기의 방광이행상피세포암이었다. Telomerase 활성도를 보인 22례는 종양의 악도가 증가할 수록 telomerase 활성도가 높게 나타나는 경향을 보였다 (Figure).

방광점막조직에서는 25례 중 24례에서 telom-

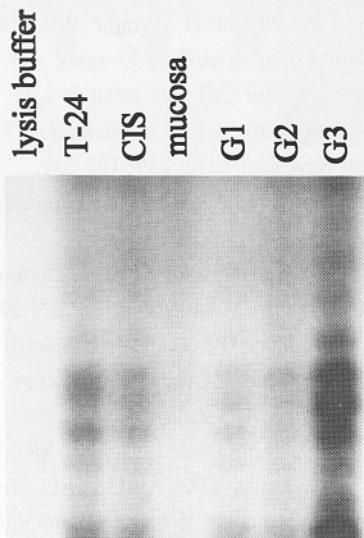


Figure. The representative results of a TRAP assay. Telomerase activity is detected in bladder cancer tissues of all tumor grades and CIS but not in bladder mucosa. Telomerase activity is tend to increase according to tumor grade. Extracts of a T-24 human bladder cancer cell line having telomerase activity were used as the positive standard and lysis buffer as the negative standard.

erase 활성도가 없었으며 telomerase 활성도가 있었던 1례는 carcinoma in situ (CIS)가 있었던 환자였다.

양성종양인 요로상피 과형성과 도립유두종에서는 telomerase 활성도가 나타나지 않았다 (Table 2).

고 찰

인간과 모든 다른 척추동물들에 있어서 telomeric DNA는 TTAGGG 염기의 반복으로 되어 있으며 정상 체세포는 매 복제마다 50~100 bp가 소실된다^{6~8}. 이러한 DNA 말단의 점진적인 소실은 Watson⁹과 Olovnikov¹⁰에 의해 밝혀졌는데 그들은 DNA polimerase α 가 RNA primer로부터 5'에서 3'의 방향으로 DNA를 합성할 때 RNA primer는 바로 제거되므로 5' 말단의 DNA 문자가 모두 복제되지 않는 것을 발견하였다. 따라서 정상 체세포에서 연속적인 비복제 telomere 염기는 세포 분열시 정상 염색체의 말단부 소실을 막지하는 완충 지대 역할을 한다. 또한 telomere의 길이로 유사분열의 횟수를 알 수 있으며 여러 차례 유사분열을 한 노후 세포에 있어 능동적 세포사망을 유발시켜 정상 체세포가 여러 번의 복제로 인해 축

Table 2. Telomerase activity in bladder mucosa and tumor tissues

Samples	Telomerase Activity		Total
	Positive	Negative	
Normal mucosa	1	24	25
Bladder TCC tissues	22	1	23
Inverted papilloma	0	1	1
Urothelial	0	1	1

적된 유전자의 변화나 염색체의 불안정성으로 인해 암세포로 변하는 것을 방지한다^{7,11}.

Telomere 길이의 감소는 위험기 (crisis phase)에 다다라 세포의 수명이 끝날 때까지 복제시마다 지속적으로 일어난다. 위험기가 되면 염색체의 말단과 말단 사이에 융합이 일어나 세포는 사망하게 되는데^{3,12} 이 시기의 telomere 길이는 매우 짧다. 만일 어떤 세포가 이 위험기를 극복할 수 있다면 영구히 생존할 수 있으며 그러한 경우 정상에 비해 짧지만 안정된 telomere 길이를 유지해야하고 무제한적인 복제 능력을 가져야 한다. 이러한 일들이 대장암¹³, 배혈병¹⁴, 자궁내막 선암¹⁵, 신경모세포종¹⁶, 신세포암¹⁷, 난소암¹⁸ 등 몇몇 인간 종양세포에서 증명되었으며 이것은 세포의 불멸생존이 정상세포에서 종양세포로의 진행에 중요한 사건임을 제시한다. 짧지만 안정된 telomere의 길이는 telomerase라는 효소에 의해 유지된다¹⁹. Telomerase는 telomere 염기순서에 상보적인 mRNA 주형을 포함하는 역전사효소인데 이 RNA 주형은 새로 복제된 DNA 말단의 telomere 염기에 telomerase가 작용하게 하여 말단 DNA 문자가 복제되지 않아 발생하는 telomere 염기의 소실을 보상한다²⁰.

배아세포나 생식세포를 제외하고는 사람의 정상 체세포에서 telomerase 활성도가 없는 것으로 알려져 있으며^{11,12} 최근 난소암이나 전립선암 등 몇몇 인간의 종양세포에서 PCR을 이용한 telomerase 활성도가 발견되면서 telomerase의 재활성이 대부분의 종양발생에 있어서 필수적이며 밝혀지고 있다. 현재 영구 생존 세포에 있어서 telomerase의 활성도가 계속 입증되고 있으나 방광 종양 세포에서의 telomerase 활성도에 대한 보고는 드물다.

본 연구에서는 대부분의 방광상피세포암에서 telomerase 활성도가 존재하였고 조직병리소견과 비교해 보았을 때 종양의 악성도가 높을수록 그

활성도는 증가하는 추세를 보여 Kubota 등²¹의 보고와 일치하였다. Telomerase 활성도가 발견되지 않은 1례는 조직병리학적 병기 Ta, grade 1의 이행상피세포암으로 이는 분석과정에서 telomerase가 비활성화 된 것으로 생각된다.

1례의 CIS 환자의 방광점막세포에서 telomerase 활성도가 발견되었는데 이는 방광점막조직을 채취하는 과정에서 일부 종양세포가 함께 포함된 것으로 생각된다. 그러나 나머지 다른 방광점막세포에서는 telomerase 활성도가 존재하지 않음을 알 수 있었으며 양성종양인 도自律종이나 요로상피 과형성에서는 telomerase 활성도가 없었는데 이는 종양으로의 진행에 있어서 telomerase 활성도가 매우 중요한 역할을 할 것이라는 사실을 뒷받침해 주고 있다. 또한 telomerase 활성도의 분석이 조직병리학적 소견 이외에 양성종양과 악성종양을 객관적으로 구분할 수 있는 또 하나의 방법으로 향후 많은 도움이 되리라 생각된다.

REFERENCES

- Zakian VA. Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 1989; 23: 579-603.
- Zakian VA. Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 1995; 270: 1601-7.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
- Kim NW, Piatyszek NA, Prows KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 239: 197-201.
- Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomere shortening may contribute to aging and cancer: perspective. *Mol Cell Diff* 1994; 2: 1-21.
- Watson JD. Origin of Concatemeric T7 DNA. *Nature New Biol* 1972; 239: 197-201.
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. *J Theor Biol* 1973; 41: 181-90.
- Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-82.
- Wright W, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 1992; 8: 193-7.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990; 346: 458-60.
- Adamson DJA, King DJ, Hailes NE. Significant telomere shortening in childhood leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 61: 204-5.
- Smith JK, Yeh G. Telomere reduction in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1833-7.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ishikawa T, Matsuura T. Length of telomeric repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and other biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 159-64.
- Mehle C, Ljungberg B, Roos G. Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 236-41.
- Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2900-4.
- Counter CM, Botelho P, Wang P, Harley CB, Bacchetti S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphocyte. *J Virol* 1994; 68: 3410-4.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase is a ribonucleic protein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-9.
- Lin Y, Miyamoto H, Fujimami K, Uemura H, Hosaka M. Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2:929-32.