

DMBA로 유도된 햄스터 협낭암종에서 ras 유전자 변이에 관한 연구

송선철 · 김경욱 · 이재훈 · 김창진*

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 순천향대학교 의과대학 병리학교실*

Abstract

STUDY ON MUTATION OF RAS GENE IN DMBA INDUCED CARCINOMA OF HAMSTER BUCCAL POUCH

Sun-Chul Song, Kyung-Wook Kim, Jae-Hoon Lee, Chang-Jin Kim*
Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Dankook University
*Department of Pathology, College of Medicine, Soonchunhyang University**

Alterations in the cellular genome affecting the expression or function of genes controlling cell growth and differentiation are considered to be the main cause of cancer.

Over 30 oncogenes can be activated by insertional mutagenesis, single point mutations, chromosomal translocations and gene amplification.

The ras oncogenes have been detected in 15~20% of human tumors that include some of the most common forms of human neoplasia and are known to acquire their transforming properties by single point mutations in two domains of their coding sequences, most commonly in codons 12 and 61.

The ras gene family consists of three functional genes, N-ras, K-ras and H-ras which encode highly similar proteins of 188 or 189 amino acid residues generically known as P21. ras proteins have been shown to bind GTP and GTP, and possess intrinsic GTPase activity.

Experimental study was performed to observe the mutational change of the ras gene family and apply the results to the clinical activity.

36 Golden Syrian Hamster each weighing 60~80g were used and painted with 0.5% DMBA by 3 times weekly on the right buccal cheek(experimental side) for 6, 8, 10, 12, 14 and 16 weeks.

Left buccal cheek (control side) was treated with mineral oil as the same manner of the right side. The hamsters were sacrificed on the 6, 8, 10, 12, 14 & 16 weeks.

Normal and tumor tissues from paraffin block were completely dissected by microdissection and DNA from both tissue were isolated by proteinase K/phenol/chloroform extraction. Segments of the K-ras and H-ras gene were amplified by PCR using the oligonucleotide primers corresponding to the homologous region (codon 12 and 61) of the hamster gene, and then confirmational change of ras genes was observed by SSCP and autosequencing analysis.

The results were as follows :

1. Malignant lesion could be found in the experimental side from the experimental six weeks.
2. One hamster among six showed point mutation of the H-ras codon 12(G→A transition) at the experimental 10 and 14 weeks.
3. One of six at 6 weeks, two of six at 8 weeks and one of six at 12 weeks revealed the confirmational change of the H-ras codon 61(A→T transversion).
4. The incidence of point mutation of H-ras codon 12 and 61 were 5.5%(2 of 36) and 11%(4 of 36) respectively.
5. Point mutation of the K-ras could not be seen during the whole experimental period.

Form the above results, these findings strongly support the concept that H-ras oncogenes may have the influence of the DMBA induced carcinoma of hamster buccal pouch.

I. 서 론

인체에서 발생하는 전체 암종의 약 3%를 차지하고 있는 구강암은 주로 편평상피 암종으로 원인이나 치료가 뚜렷이 제기되지 않고 있는 대표적 질환 중의 하나이다¹⁾.

1929년 Boveri가 암은 유전자적 요소의 변화에 의해 발생된다

송 선 철

330-716, 충남 천안시 신부동 산7-1

단국대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

SSun-Chul Song

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Dankook University

san 7-1, Shinbu-Dong, Chon-An, Chung-Nam, 330-716, Korea

Tel. 82-417-550-1991 Fax. 82-417-551-8988

고 최초로 보고하고 그 후 Nowell과 Hungerford가 만성 골수성 백혈병(Chronic Myelogenous Leukemia : CML) 환자에게서 22번 염색체와 9번 염색체가 상호전좌(reciprocal translocation) 된 philadelphia(ph¹) 염색체를 보고한 이래⁵⁻⁶⁾, 종양발생에 대한 한가지 기전의 설명으로 분자 생물학적 개념에서 세포의 성장과 분화를 조절하는 유전자의 기능이나 발현에 영향을 미치는 세포의 게놈(genome)에 변화가 야기되면 암이 발생된다고 이해되기 시작하였고, 여러 암종에서 변화된 유전자의 실체를 알아내고 이러한 유전자가 암 발생과정(carcinogenesis)에 어떤 역할을 하는가를 규명해 내고자 하는 것이 암종에 대한 최근의 연구 흐름이다⁷⁾.

약 30개 이상의 유전자가 세포성장과 증식을 조절하는 경로에 관여된다고 보고되고 인간이나 동물에서 발생되는 종양에서 이러한 유전자가 존재하여 실체를 규명하는 것이 가능해졌고 전형적인 종양세포의 특징을 나타내고 있어 일반적으로 종양유전자(oncogene)라 불리우고 이러한 종양유전자와 상대적인 위치(counter part)에 있는 정상세포의 유전자를 전 종양유전자(proto-oncogene)라 부르고 있다⁸⁻¹¹⁾. 종양유전자는 약 20년 전에는 몇 개만 존재한다고 알려지다가 현재는 약 30개 이상의 실체가 규명되고 있다. 이러한 종양유전자들은 삽입변이(insertional mutagenesis), 점변이(point mutation), 염색체 상호전좌(chromosomal translocation) 그리고 유전자 증폭(gene amplification) 등에 의해 암종을 일으키게 되는데^{12,13)} 이중 ras 유전자의 변이가 동물모델에서 뿐만 아니라 사람의 악성종양에서도 제일 흔히 관찰되어 약 15~20%의 비율로 나타나고 있다¹⁴⁾.

위에서 육종을 일으키는 retrovirus의 일종이라고 생각되었던^{15,16)} ras 유전자는 H-ras, K-ras 및 N-ras의 3종류로 구성되어 있으며, 각각의 ras 유전자는 188개 혹은 189개의 amino acid chain으로 구성된 분자량 21KD인 단백질로 알려져 있고 guanosine 5'-triphosphate(GTP)와 guanosine 5'-diphosphate(GDP)에 높은 친화력을 보이며 GTPase activity를 갖고 있다¹⁷⁻¹⁹⁾.

ras 유전자의 점변이는 인간에서 발생하는 대장암, 폐암, 췌장암, 유방암, 간암, 방광암, 신장암 및 백혈병 등 다양한 종양에서 나타나고 주로 codon 12, 13 혹은 61에서 일어나고 있다²⁰⁾.

실험동물에서 암유발물질(carcinogen)을 이용해서 악성종양을 유발시킬수 있는 방법이 소개된 이후로 점막에서 암을 유발시키고자 하는 시도가 많이 이루어져 Salley는 점막성 암종의 유발을 위해서는 햄스터 협낭(Hamster Buccal Pouch : HBP)이 가장 이상적인 동물 모델이라고 소개하였고^{21,22)} pyrene 화합물로 조직단백과 강한 결합을 하여 강력한 발암효과를 유발시키는 9,12-dimethyl benzanthracene(DMBA)을 미네랄 오일을 용매로 하여 사용한 경우에 효과적인 암발생이 나타나 대표적 암유발물질로 이용하고 있다²³⁾.

인체에서 혹은 실험동물의 구강에서 발생한 구강암에 대한 ras 유전자 점변이에 대한 연구는 드물어 본 연구에서 햄스터 협낭에 DMBA를 정기적으로 도포하여 암을 유발시킨 후 ras 유전자의 유전적 변화를 관찰하여 얻어진 결과를 임상에 응용하여 구강암 환자의 조기진단 및 예방과 치료에 도움이 되고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험동물 및 수술 방법

체중 60~80g의 웅성 햄스터를 실험동물로 사용하였다. 실험군으로 햄스터의 우측 협낭에 미네랄 오일에 녹인 0.5% DMBA를 0.2ml씩 주 3회 도포하였고, 대조군으로 좌측협낭에는 미네랄 오일만을 같은 방법으로 도포하면서 도포 6주, 8주, 10주, 12주, 14주 및 16주째에 6마리씩 희생하였다.

2. 연구방법

(1) 조직학적 관찰

희생 후 좌우 협낭 점막을 절제하여 차가운 4% paraformaldehyde에 8시간 고정 후 통상적인 방법에 의해 파라핀 포매를 만들었다. 이 포매에서 4 μ m의 절편을 만들어 통상적인 방법으로 hematoxylin-eosin염색을 하여 종양발생 유무를 관찰하였다.

(2) DNA추출

암세포와 정상세포에서 각각 DNA를 추출하기 위하여 microdissection 방법으로 암 조직과 정상조직을 구분하고 각각의 파라핀 포매에서 5개의 7 μ m절편을 만들어 통상적인 방법으로 탈파라핀하고 degraded alcohol로 함수시킨 후 조직을 건조시켰다. 건조된 조직을 10X 현미경하에 28 게이지 바늘로 암조직과 정상조직을 긁어 (Fig. 1, 2, 3 & 4) 300 μ l의 digestion buffer (50mM Tris HCl, pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween 20, 400 μ g proteinase K)가 들은 1.5ml Eppendorf tube에 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 24시간 부란하였다. 부란 후 proteinase K의 활성을 억제하기 위하여 97 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하였고 그 후 phenol chloroform으로 DNA를 추출하였다. 추출과정은 65 $^{\circ}$ C의 0.5% sodium sarcosine의 buffer-saturated phenol을 300 μ l 씩 시료에 넣어 vortex시켜 homogenous emulsion을 만든 3500g로 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 깨끗한 Eppendorf tube에 옮긴 후 이에 300 μ l의 chloroform isoamylalcohol을 첨가하여 vortex로 잘 섞은 후 역시 3500g로 원심분리하였고, 이 과정을 3회 반복하였다. 그 후 상층액을 새 tube에 옮긴 후 1/10 volume의 3M sodium acetate와 2X volume의 100% ethanol을 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 -70 $^{\circ}$ C에 1시간 방치하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 3500g로 5분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 침전물을 70% cold ethanol로 수세 후 재 원심분리하여 DNA를 침전시키고 DNA pellet을 공기 중에 건조시킨 후 멸균 증류수로 용해시켰다.

추출한 DNA의 순도는 photometer로 260nm와 280nm의 파장에서 수치를 읽어 이 수치의 비 260/280가 1.8 이상인 DNA를 시료로 사용하였고 순도가 이 수치 이하인 경우에는 phenol/chloroform추출을 다시 하였다²⁴⁾.

이렇게 추출한 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

(3) Polymerase Chain Reaction(PCR) Amplification

PCR 반응을 위한 primer는 hamster K-ras는 exon 1의 codon 12와 13을 포함하는 부위로 이를 위한 sense primer는 5'-TTATTGTAAG GCCTGCTGAA-3', antisense primer는 5'-GCAGCGTTACCTCTAT CGTA-3' 이었고 증폭산물은 142bp이었다. 한편 exon 2의 codon 61의 sense primer는 5'-CTCCTACAGGAAACAAGTAG-3', antisense primer는 5'-GGTGAATATCTTCAAATGATT-3' 로 증폭산물은 167bp이었다. Hamster H-ras Exon 1의 codon 12의 sense primer는 5'-AAGCTTAGTGGTGGTGGGCGC-3', antisense 5'-TGGTTCTGG ATCAGCTGGAT-3'이었으며, 증폭산물은 68 bp이었고, exon 2의 codon 61의 sense primer는 5'-GACTCC-TACCGGAAACAGGT-3', antisense primer는 5'-CTG-TACTGATGGATGTCTTC-3'이었으며 증폭산물은 175bp이었다²⁵⁾(Table 1). PCR 조건은 20 μ l의 반응으로 1x PCR buffer에 dNTP 250mM, 각각의 primer 10pM, DNA/modified DNA 50ng, 1.25mM MgCl₂, Taq polymerase 0.5U들을 넣어 반응시켰고 반응조건은 95°C에서 5분 반응 후 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 반응시키고 이 과정을 35회 반복하였다. 그 후 72°C에서 5분 연장한 후 반응을 종결하였다. 이렇게 반응시켜 얻은 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동 하여 각각의 bp를 확인하였다^{26,27)}.

(Abbreviation ; T : Thymine, A : Adenine, C : Cytosine, G : Guanine)

(4) Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP)에 의한 점변이 검사.

각각의 PCR증폭 산물 10 μ l에 0.2M NaOH, 20 mM EDTA의 alkaline denaturing solution 1 μ l를 넣은 후 42°C 수조에 5분간 처치하여 double strand DNA를 single strand DNA로 변성시켰다. 그 후 빨리 얼음에 넣어 single strand가 고유의 conformation으로 바뀌게 한 후 0.5% bromophenol blue, 0.5% xylene cyanol in formamide로 구성된 loading solution 1 μ l를 섞어 loading 하였다. 5%의 acrylamide gel을 사용하여 상온에서 200V에서 15mA정도로 3시간 전기영동 하였다. 그 후 ethidium bromide로 염색하여 UV광 하에서 관찰하였다²⁸⁾. 정상과 종양에서의 PCR 산물을 비교하여 정상에 비하여 다른 band shift를 보인 종양은 점변이가 있는 것으로 이

를 확인하기 위하여 autosequence를 시행하였다.

(5) Autosequencing Analysis

PCR 증폭산물의 염기서열 분석은 ABI 310 autosequencer(Perkin Elmer USA)를 이용하였다. 방법은 Bigdye terminator 기법으로 제조회사의 instruction에 의하여 진행하였다. 즉 순수 정제된 PCR 산물을 20~30ng/ μ l, primer 1 pmol/ μ l로 농도를 조정 후 20 μ l의 PCR 반응을 시행하였다. 반응 조건은 D/W 6.8 μ l, reaction mixture 8 μ l, PCR 산물 2 μ l (30ng/ μ l), primer 3.2 μ l를 각각 혼합하여 96°C에서 15초 반응 후 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분씩의 반응을 25회 반복 후 반응을 마쳤다. 이 PCR 산물을 다시 깨끗한 Eppendorf tube에 DNA 20 μ l와 멸균증류수 80 μ l을 넣은 후 이에 다시 3M의 sodium acetate 10 μ l와 250 μ l의 100% ethanol과 잘 섞어 실온에서 5분간 방치한 후 다시 실온에서 3500g로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전 DNA를 말렸다. 그 후 template suppression reagent 25 μ l를 섞어 3분간 vortex한 후 96°C에서 3분간 처리하였고 그 후 바로 얼음에 3분간 넣었다. 이렇게 처리한 시료를 autosequencer의 setup tube에 넣어 기계 조작을 하였다.

III. 연구결과

1. 종양발생

DMBA도포 6주부터 편평상피세포층의 증식이 관찰되고 부위에 따라서는 심한 이형성(dysplasia)내지 암종의 발생이 관찰되었다. 암종의 양상은 유두상 증식으로부터 상피아래로 증식하는 모양에 걸쳐 다양한 양상을 보였다(Fig. 5, 6). 10주부터는 상피의 진층이 두터워지고 세포들이 심한 이형성을 보이는 암종이 관찰되었다(Fig. 7, 8). 이러한 암종들은 실험 14주부터는 국소적으로 침윤소견을 보이는 침윤성 암으로 발전된 양상을 보였다(Fig. 9, 10).

2. Microdissection에 의한 DNA 추출

현미경 하에 종양조직과 정상조직을 구분하여 microdissection으로 얻은 파라핀 포매절편에서 추출한 DNA는 1% agarose gel 전기영동상에 smear pattern을 보였는데 이는 조직이 paraformalde-

Table 1. Primer Sequence of Oligonucleotide

K-ras	Exon 1 codon 12	Sense	5'-TTATTGTAAGGCCTGCTGAA-3'	142bp
		Antisense	5'-GCAGCGTTACCTCTATCGTA-3'	
	Exon 2 codon 61	Sense	5'-CTCCTACAGGAAACAAGTAG-3'	167bp
		Antisense	5'-GGGAATATCTTCAAATGATT-3'	
H-ras	Exon 1 codon 12	Sense	5'-AAGCTTAGTGGTGGTGGGCGC-3'	68bp
		Antisense	5'-TGGTTCTGGATCATCAGCTGGAT-3'	
	Exon 2 codon 61	Sense	5'-GACTCCTACCGGAAACAGGT-3'	175bp
		Antisense	5'-CTGTAAGTGGATGTCTTC-3'	

Abbreviation : T : Thymine

A : Adenine

C : Cytosine

G : Guanine

hyde에 고정된 것이고 또한 paraffin block 제작 시 여러 단계의 유기용매에 조직이 접촉되었기 때문에 DNA가 분절(fragmentation)된 결과인 것이었다. 그러나 이러한 분절된 DNA들도 300bp이하의 DNA를 PCR로 증폭하는 데는 어려움이 없었다 (Fig. 11).

3. Ras 유전자들의 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR증폭 산물들을 1% agarose gel에 전기영동하여 각각 고유의 bp에 해당되는 단일 band를 확인하였다. 즉 K-ras codon 12를 포함하는 exon 1 부위의 증폭산물의 bp는 142bp로 확인하였고,

codon 61 부위를 포함하는 exon 2 부위의 bp는 167bp로 확인되었다. 한편 H-ras유전자의 codon 12를 포함하는 exon 1의 증폭산물은 63bp로 확인되었으며, codon 61을 포함하는 exon 2의 증폭산물은 175bp로 각각 확인 할 수 있었다. 단일 band로 증폭된 각각의 PCR산물들은 SSCP로 비교하였다(Fig. 12).

4. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

검체중 변이 변화를 보인 예는 6주 실험군, 8주 실험군, 10주 실험군, 12주 실험군 및 14주 실험군에서 각각 1예, 2예, 1예, 1예, 및 1예 이었다.

Table 2. Confirmation of Change by DNA Sequencing

	K-ras		H-ras	
	codon 12	codon 61	codon 12	codon 61
6 주				CAA→CTA(Q→L) (n=1)
8 주				CAA→CTA(Q→L) (n=2)
10 주			GGA→GAA(G→D) (n=1)	
12 주				CAA→CTA(Q→L) (n=1)
14 주			GGA→GAA(G→D) (n=1)	

Abbreviation : Q : Glutamine L : Leucine G : Glycine D : Aspartic acid

Table 3. Mechanism of Activation/ Deactivation of Mammalian ras P21 Proteins

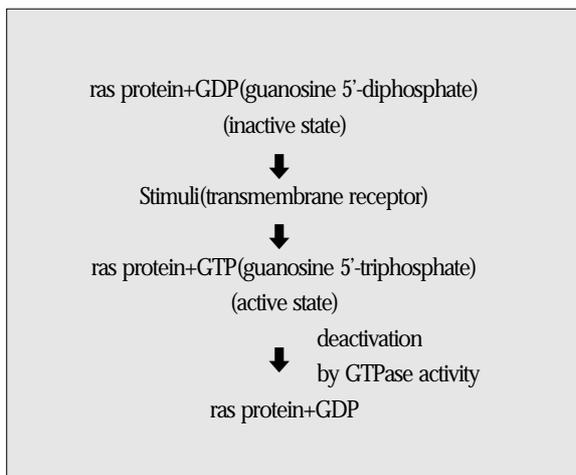
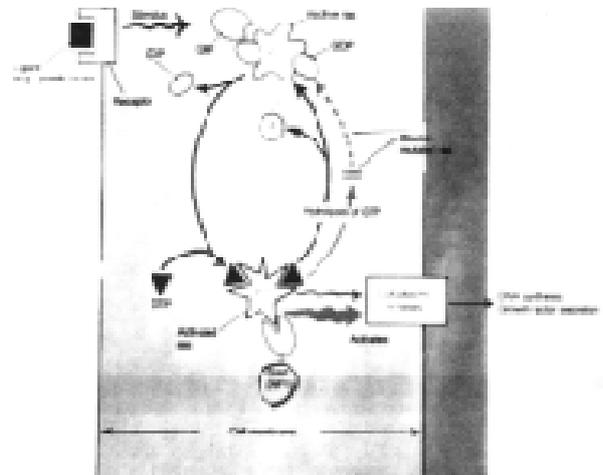


Table 4. Model for Action of ras genes



Abbreviation :
GRF : guanine nucleotide releasing factors
GAP : GTPase activating proteins

5. DNA Sequencing에 의한 점변이의 확인

SSCP에서 변이 변화를 보인 예들의 염기서열 분석 결과 6주와 8주의 3예에서는 H-ras codon 61에 CAA가 CTA로 A가 T로 transversion 되어 있었고, 한편, 10주와 14주에 변이 변화를 보인 예들에서는 GGA가 GAA로 점변이 되어 G가 A로 transition 변화를 보였다. 한편, 모든 예에서 K-ras 유전자의 점변이는 관찰되지 않았다(Table 2, Fig. 13, 14).

IV. 총괄 및 고찰

영양부족이나 철 결핍성 빈혈 등의 내인성 인자와 흡연, 음주, 자외선 및 방사선조사 그리고 human papillomavirus같은 감염성 인자등과 같은 암유발 물질에 노출되어 야기되는 구강암은 전체 암종의 3~5%를 차지하면서 95% 이상이 편평세포암종으로 아직 까지도 원인과 치료가 뚜렷이 제시되지 않고 있는 대표적 질환 중의 하나이다¹⁴.

1960년에 Newell과 Hungerford가 혈액암의 일종인 만성백혈병 (Chronic Myelogenous Leukemia : CMC) 환자에게서 9번 염색체와 22번 염색체가 상호전좌(reciprocal translocation)된 philadelphia(ph¹) 염색체를 보고한 이후⁵⁻⁶⁾ 암의 발생을 유전자 변이로 이해하기 시작하였다. 즉 암이란 유전자 질환으로 열성 혹은 우성변이, DNA 재배열, 점변이 및 유전자들의 생화학적 기능의 변화 등에 의해 발생된다고 생각하고, 정상적으로 세포의 성장과 분화를 조절하는 전 종양유전자(proto-oncogene : 종양유전자와 counter part 개념의 정상세포 유전자)의 이상으로 세포성장의 조절작용이 무너지면서 종양성 성장을 일으킨다고 한다. 원인 유전자인 종양유전자는 어떤 세포유전자가 변한 것이고 이러한 변화를 일으키는 기전은 무엇이고 종양유전자와 전 종양유전자가 세포의 성장과 분화에 어떤 영향을 미치고 종양유전자와 암종의 종류에 따른 관계 등을 규명하고자 하는 시도가 현재 암 연구의 흐름을 이루고 있다²⁰.

이러한 분자생물학적 연구방법에 의하여 인간에게서 발생하는 암종이나 실험적으로 유도된 암종에서 종양 유전자의 활성화와 암억제 유전자(tumor suppressor gene)의 기능저하가 암 형성 과정(carcinogenesis)에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀지고 있다. 종양억제 유전자는 세포의 성장과 게놈(genome)의 변이를 억제시켜 클론(clone)의 팽창을 저지하는 기능을 갖고 있으며 p53, 망막모세포종(retinoblastoma : Rb) 억제 유전자등이 대표적 종양억제 유전자로 알려지고 있으며³⁰ 종양유전자는 약 20년 전에는 몇 개만 알려지다가 현재는 c-erb-B1, c-myc, c-myb, ras gene family, int-1, int-2, c-abl, c-erb-B2, ac1-1, bcl-2, neu, pim, c-mos 및 myc gene family 등 약 30개 이상의 실체가 규명되고 있고³¹⁾ 인간에서 발생하는 종양의 약 20%에서 정상의 세포를 암종으로 전환시킬수 있는 종양유전자를 갖고 있고 이들중 대부분은 ras gene family의 점변이에 의한 것이라고 밝혀졌다⁷.

취에서 육종을 일으키는 retrovirus의 일종이라고 생각되었던¹⁵⁾ ras 유전자는 오늘날에는 동물뿐만 아니라 인간에게서도 발견

되어지고 더 나아가서는 새, 곤충, 연체동물, 식물, 곰팡이 및 이스트 등에서도 발견되고 있다³²⁾. ras 유전자군은 1번 염색체에 위치하고 있는 N-ras, 11번 염색체에 위치하고 있는 H-ras(Harvey Sarcoma Virus), 그리고 12번 염색체에 위치해 있는 K-ras(Kirsten Sarcoma Virus)의 3가지 유전자로 구성되고 각각의 ras 유전자는 188개 혹은 189개의 amino acid chain으로 구성된 분자량 21KD인 단백질(p21)로 유전자 정보가 암호화된 4개의 exon 을 가지고 있으며 guanosine 5'-triphosphate(GTP)와 guanosine 5'-diphosphate에 높은 친화력을 보이며 GTP를 가수분해시킬 수 있는 기능을 갖고있다(GTPase activity)^{17-19,33)}.

3개의 ras 유전자 중 어느 하나 유전자의 12, 13 혹은 61 codon 에서 점변이가 일어나면 활성화된 유전자(activation gene)가 되어 암종을 유발시키는데 인간에서 발생하는 암종에서 이러한 ras 유전자의 점변이가 췌장암에서는 80%(K-ras), 장에서는 50%(K-ras), 폐에서는 30%(K-ras), 갑상선에서는 50%(H-ras, K-ras, N-ras), 방광암에서는 50%(H-ras), 신장암에서는 90%(H-ras), 백혈병에서는 30%(N-ras)이상의 비율로 나타나고 있다²⁰.

정상상태 즉 휴지기 상태에서 ras 단백질(P21)은 비활성화 상태로 GDP와 결합되어 있다가 세포막 수용체에서 다른 단백질로부터 자극을 받으면 GDP가 GTP로 치환되어 구조적 변화를 일으켜 활성화 상태가 되어 DNA 합성 등의 정상적인 활동을 하고 이러한 작용이 끝나면 ras 단백질이 고유기능으로 갖고 있는 GTPase activity에 의해 GTP를 가수분해시켜 ras 유전자가 GDP와 결합하게 되어 비활성화 상태가 된다(Table 3). 즉 세포막으로부터 자극이 들어오면 guanine nucleotide releasing factors(GRF)가 ras 단백질에 붙어있는 GDP를 떼어내고 GTP를 붙게하여 활성화 상태가 되어 DNA 합성등의 정상적인 작용을 하고 ras 단백질이 갖고 있는 GTPase activity와 GTPase의 기능보다 100배정도의 힘을 갖고 있는 분자량 120KD인 GTPase activating proteins(GAP)에 의해 GTP가 빨리 가수분해되어 P21에 GDP가 붙어 비활성화 상태가 되어 정상의 ras 단백질이 되는데 P21 단백질에 점변이에 의한 변화가 야기되면 GAP가 ras 단백질에 달라붙지 못하여 가수분해가 거의 일어나지 못하여 ras 단백질의 활성화가 계속 유지되어 세포의 성장이 지속되는 종양이 형성되게 된다²⁴⁻³⁰⁾(Table 4).

1954년 Salley가 처음으로 햄스터를 대상으로 편평세포 암종을 발생시킨 후²⁾ pyrene 화합물로 조직단백과 강한 결합을 하며 강력한 발암효과를 유발하는 DMBA를 햄스터 협낭에 도포하는 방법이 구강암 발생의 모델로 이용되고 있으며, DMBA는 대표적 화학적 암 유발물질로 알려져 있다²⁰.

Balmain과 Pragnell이 처음으로 DMBA로 유도된 쥐 피부의 암종에서 변형된 H-ras 유전자의 존재를 보고한 이후³⁷⁾, 대부분의 화학적 암유발물질이 변이 유발물질로 작용된다고 믿어지고 있다³⁸⁾. 화학적 암유발 물질이 DNA염기를 변화시키는데 이러한 변화는 alkyl-guanosine transferase나 DNA polymerase 등에 의해 원상복귀 되어 정상으로 환원되나 이러한 효소들의 복구능력의 한계, DNA polymerase가 변형되어 잘못된 정보를 갖고 있는 O⁶-methylguanine을 adenine으로 인식하는 오류등으로 ras 유전자의

변이가 야기되는 것이다³⁹⁾.

ras 유전자의 점변이를 검색하는 방법으로는 생쥐의 NIH/3T3 세포가 종양세포로 형질전환된 것을 알아보기 위해 transfection assay가 처음으로 이용되다가^{40,42)}, 많은 수의 종양분석에는 한계가 있어 ras 유전자 변이가 대다수 일어난다고 알려진 codon 12, 13 및 61을 증폭시킨 후 SSCP를 시행한 후 DNA 염기서열을 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다^{43,47)}.

본 연구에서는 종양유무를 관찰하기 위한 조직학적 표본을 만든 후 Greer 등²⁴⁾의 방법으로 파라핀 포매조직에서 DNA를 추출하여 Saiki 등²⁰⁾이 제안한 방법으로 PCR 증폭을 시켜 SSCP를 시행한 후 Perkin Elmer사의 지시에 따라 염기서열을 분석하였다.

본 실험의 조직학적 관찰에서 DMBA 도포 6주째 실험군에서 편평상피세포층의 증식과 이형성이 관찰되면서 시간이 경과함에 따라 두터워지고 14주에는 침윤소견을 보이는 침윤성 암으로 발전된 양상을 보여 비슷한 실험방법으로 햄스터 협낭점막 유도 종양과정을 보고한 Eisenberg⁴⁸⁾와 김 등⁴⁹⁾의 결과와 유사하였다.

사람에서 K-ras 종양유전자는 염색체 12번의 짧은 팔에 위치하며⁵⁰⁾ codon 12에서의 돌연변이가 전체 K-ras 점변이의 70~80%, codon 13에서 20%, codon 61에서 2~4%의 점변이가 보고되어⁵¹⁾ K-ras의 변이는 codon 12, 13, 61에서 거의 모든 변이가 일어남을 알 수 있었고 codon 12에서의 점변이는 췌장암, 대장암, 직장암 등에서 70~80% 이상의 변이를 보인다는 연구^{52,53)}를 통하여 본 실험 구강암에서 codon 12, 61에서 K-ras 유전자의 점변이를 실험 전 기간에 걸쳐서 발견할 수 없었다는 사실을 간접적으로 입증할 수 있었다.

실험군을 대상으로 한 H-ras 유전자의 codon 12와 61에서의 점변이가 6주에서 1예, 8주에서 2예, 10주, 12주 및 14주에 각각 1예씩 약 15~20%의 비율로 나타나 실험동물을 대상으로 한 Chang 등⁵⁴⁾의 보고(8마리 중 3예로 37%)나 인도인의 구강암을 대상으로 하여 관찰한 (57 포본 중 20예로 35%) Saranathe 등⁵⁵⁾의 결과와 비슷하거나 약간 낮은 수치를 보였다. 실험군 10주와 14주 codon 12에서 GGA가 GAA로 즉 G→A로 치환되어 glycine이 aspartic acid로 변하는 transition 변화(같은 praline 계통)를 보였고, 만Á 실험군 6주, 8주 codon 61에서 CAA가 CTA로 즉 A→T로 치환되어 glutamine이 leucine으로 변하는 transversion 변화(purine 계통에서 pyrimidine 계통으로)를 보여 다른 연구 보고^{39,56-58)}들과 유사하였다.

정상조직에서 전암단계를 거쳐 암이 진행되어 나가는 단계에 따른 연구로는 Albino 등⁵⁹⁾과 Vousden과 Marshall⁶⁰⁾은 각각 흑색종과 임파종에서 ras 유전자의 활성화를 관찰하지 못하고 전이된 조직에서 발견하여 ras gene의 활성화 단계는 후기 단계라 주장하였으나, 본 연구에서는 실험 6주, 8주에서 H-ras 유전자 codon 61에서 변화를 보여 Bos 등⁵¹⁾과 Zarbl 등⁵⁶⁾의 초기 단계 쪽으로 의견을 같이하고 있다.

특히 Bos 등은 활성화된 ras 유전자가 immortalized cell 혹은 양성종양세포를 악성종양세포로 변화시키는 첫 단계의 세포로 작용하고 여기에 한 개 혹은 그 이상의 유전자 변이가 첨가되어 악성종양으로 진행되는 것 같다고 제안하였다.

1986년 Land 등이 처음으로 쥐 태아의 fibroblast를 대상으로 해서 두 개의 전 종양 유전자의 상호작용에 대해 연구한 이래 Husain 등⁶¹⁾은 햄스터 협낭 상피세포에 DMBA를 도포하여 암을 유발시키는 과정에서 단지 H-ras 유전자만 활성화 시킨다고 완전한 형태의 암이 형성되지 않는다는 것을 관찰하여 어느정도 발암과정이 진행되면 H-ras 유전자 뿐만 아니라 c-erb-B 유전자가 활성화되어야 완전한 암의 형태가 형성됨을 보고하였고 또한 이러한 두가지 유전자 외에 다른 전 종양유전자나 종양억제 유전자가 관여된다는 다단계 반응에 의한 암형성과정을, Mckay 등⁶²⁾은 종양의 특징이 나타나려면 일정수의 ras 유전자 변이가 일어나야 된다는 critical concentration 개념을, 그리고 Bos는²⁰⁾ ras 유전자의 활성화 이외에 다른 어떤 변화가 관여된다고 각각 주장하였다.

결론적으로 부위별 암종에 따라 ras 유전자의 변화의 빈도는 차이가 있지만 인간에서 발생하는 대부분의 암종에서 ras 유전자의 점변이가 일어나는데 아직까지 알려지지 않은 어떤 유전자와 ras 유전자 활성화의 차이에 의해 ras 유전자 활성화의 유무와 빈도가 달라지며 이러한 차이는 암종을 유발시키는 발암물질에 조직이 얼마만큼 예민하게 반응하느냐에 따라 결정된다고 사료되어 이에 대한 상세하고도 폭넓은 연구가 이루어져야 암에 대한 궁극적 치료가 이루어지리라 생각된다.

V. 결 론

암 발생에 있어 한가지 기전으로 종양유전자 혹은 종양억제 유전자의 변화, DNA 재배열, 변이 및 유전자들의 생화학적 기능의 변화등에 의해 암이 발생할 수 있다고 설명된다.

지금까지 밝혀진 30여개의 종양유전자 중 ras 유전자 점변이가 동물 모델에서 뿐만아니라 사람의 악성종양에서도 제일 흔히 관찰되어 약 15~20%의 비율로 나타나고 있다. 부위별 암종에 따라 ras 유전자 점변이 빈도는 차이가 있지만 H-ras, K-ras 및 N-ras 유전자의 codon 12와 61에서 변이가 일어나고 있다.

인체에서 혹은 실험동물의 구강에서 발생한 구강암에 대한 ras gene 점변이에 대한 연구를 통하여 구강암 환자의 임상적 응용을 목적으로 체중 60~80g의 웅성 햄스터를 실험동물로 하여 우측 협낭에 0.5% DMBA를 주 3회, 대조군으로는 좌측 협낭에 미네랄 오일만을 같은 방법으로 도포하면서 실험 6, 8, 10, 12, 14 및 16주째 각각 6마리씩 희생시켜 유발된 실험군 종양에서 ras 유전자의 점변이를 PCR 후 SSCP 및 염기서열 분석으로 연구하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 햄스터 구강협낭에 DMBA를 도포시 6주후부터 암종이 발생되었다.
2. H-ras 유전자의 codon 12에서의 변이는 각 실험군 6마리중 10주 및 14주에서 한마리씩 점변이를 보였고, 이 변이는 GGA→GAA로 변하는 G→A의 transitional mutation을 보였다.
3. H-ras 유전자의 codon 61에서의 변이는 각 실험군 6마리중 6주에서 1마리, 8주에서 2마리 및 12주의 1마리에서 CAA→CTA로 변하는 A→T의 transversional mutation을 보였다.

4. H-ras 유전자의 점변이는 condon 12에서 5.5%, codon 61에서 11%의 발생율을 보였다.
5. 전 실험군에서 K-ras 유전자의 변이는 관찰되지 않았다.
이상의 결과를 종합해보면 DMBA로 유도된 햄스터 협낭암종의 발생에 H-ras 유전자의 점변이가 관련이 있는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Smith CJ: Epidemiology and aetiology. Malignant tumors of the mouth, jaws and salivary glands edited by Langdon JD and Henk JM. London, Edward Arnolds : 1, 1995.
2. Ruddon RW : Cancer biology. 3rd ed., New York, Oxford University -press : 133, 1995.
3. Cotran RC, Kumar V, Collins T : Pathologic Basis of Disease, 6th edition, WB Saunders : 760, 1999.
4. Paz IB : Human papillomavirus(HPV) in head and neck cancer. Cancer 79 : 595, 1997.
5. Nowell PC, Hungerford DA : A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132 : 1497, 1960.
6. Rowley GD : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature 243 : 290, 1973.
7. Barbacid M : ras genes. Annu Rev Biochem 56 : 779, 1987.
8. Bishop JM : Cell 42 : 23, 1985.
9. Varmus HE : Annu. Rev. Genet 18 : 553, 1984.
10. Marshall CJ : RNA Tumor Viruses 2 : 487, 1984.
11. Barbacid M : Oncology , Lippincott : 3 1986.
12. Weinberg RA : Science 230 : 770, 1985.
13. Bishop JM : Trends Genet 1 : 245, 1985.
14. Guerrero I, Pellicer A : Mutational activation of oncogenes in animal model systems of carcinogenesis. Mutation Res 185 : 293, 1987.
15. DeFeo D, Gonda MA, Young HA, et al : Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. Proc Natl Acad Sci. USA 78 : 3328, 1981.
16. Ellis RW, DeFeo D, Shih TY, et al : The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. Nature 292 : 506, 1981.
17. McGrath JP, Capon DH, Smith EY, et al : Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed. Nature (London) 304 : 501, 1983.
18. Shimizu K, Birnbaum D, Rulcy MA, et al : Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line. Nature(London) 304 : 497, 1983.
19. Shimizu KM Goldfarb Y, Guard M, et al : Three human transforming genes arc related to the viral ras oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 80 : 2112, 1983.
20. Bos JL : ras oncogenes in human cancer. cancer Research 49 : 4682, 1989.
21. Salley JJ : Histologic changes in hamster cheek pouch during early hydro-carbon carcinogenesis, J.D. Res. 36 : 48, 1957.
22. Salley JJ : Experimental careinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster, J.D. Res. 33 : 253, 1954.
23. Avran G : Drug action, wiley Intl. ed., 667-702, 1974.
24. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB : PCR amplification from paraffin embedded tissues : Effect of fixative and fixation time. Am. J. Clin Pathol 95 : 117, 1991.
25. Jacoby RF, Lior X, Teng BB, et al : mutations in the K-ras oncogene preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. J Clin Invest 87 : 624, 1991.
26. Saiki RK, Gelfnad OH, Stoffel S, et al : Primer-directed enzymatic amplification on DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487, 1988.
27. Barch DH, Jacoby RF, Brasitus TA, et al : Incidence of Harvey ras oncogene point mutations and their expression in methylbenzylnitrosamine induced esophageal tumorigenesis carcinogenesis 12 : 2377, 1991
28. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc natl Acad Sci USA 86 : 2766, 1989
29. Bos JL : The ras gene family and human carcinogenesis Muta. Res. 195 : 255, 1988
30. Myers EN, Suen JY : Cancer of the head and neck. WB Saunders : 782, 1996.
31. Bishop JM : The molecular genetics of cancer. Science 235 : 305, 1987
32. Chardin P : The ras superfamily proteins Biochemie 70 : 865, 1988
33. Capon DH, Chen EY, Levinson AD, et al : Complex nucleotide sequences of the T 24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. Nature(London) 302 : 33, 1983.
34. Robbins, Cortan RC, Kumar V : Pathologic basis of disease, 5th Edition, W.B Saunders : 262, 1995.
35. McCormick F : ras GTPase activating protein : signal transmitter and signal terminator. Cell 56 : 5, 1989.
36. Trahey M, McCormick F : A Cytoplasmic protein stimulates normal N-ras P21 GTPase. Science 238 : 542, 1987.
37. Balmain A, Pragnell IB : Mouse skin carcinomas induced in vivo by chemical carcinogenes have a transforming H-ras oncogene. Nature 303 : 72, 1983.
38. Singer B, Kusmierek JT : Chemical mutagenesis. Ann Rev. Biochem 51 : 655, 1982
39. Walker GC : Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia Coli. Microbiol. Rev 48 : 60, 1984.
40. Shih C, Weinberg RA : Isolation of transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell 29 : 161, 1992.
41. Krontiris T, Cooper GM : Transforming activity in human tumor DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 78 : 1181, 1982.
42. Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, et al : Human tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. Cell 27 : 467, 1981.
43. Bos JL, Verlaan-de Vries, Jansen M, et al : Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. Nucleic Acids Res. 12 : 9155, 1984.
44. Verlaan-de Vries, Bogaard M, Van den Elst ME et al : A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. Gene 50 : 313, 1986.
45. Saiki R, Sharf S, Faloona F, et al : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (Wash. DC), 230 : 1350, 1985.
46. McMahan G, Davis E, Wogan GN : Characterization of c-Ki-ras oncogene alleles by direct sequencing of enzymatically ampoified DNA from carcinogen-induced tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 4974, 1987.
47. Collins SJ : Direct sequencing of amplified genomic fragments documents N-ras point mutations in myeloid leukemia. Oncogene Res. 3 : 117, 1988.
48. Eisenberg E : Neoplasia following cessation of DMB applicoition to hamster buccal pouch. J Deat Res 56 : 1430, 1997.
49. Kim JW, Kim KW, Shim JJ : Study on tenascin Expression in Experimentally induced carcinoma of hamster buccal pouch Abstr. KAOMS 37th : 115, 1996.
50. Vogelstin B, Fearon ER, Kern SE, et al : All elotype of colorectal carcinoma. Science 244 : 201, 1989.
51. Bos JL, Fearon ER, Halmilton SR, et al : Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327 : 293, 1987.
52. Park WC, Jeon HM, Chang SK, et al : Point mutation of K-ras oncogenes by pairde PCR and gel electrophoresis in human colorectal cancers. JKSS 44 : 1, 1993.
53. Ryu JW, Kim KH, Kim SH, et al : Study of point mutation c-k-ras oncogene in codon 12 and P53 suppressor gene in codon 175 in

- colorectal cancer. JKSS 46 : 834, 1994
54. Chang KW, Lin SC, Steven Koos : P53 and H-ras mutations in chemically induced hamster buccal pouch carcinomas. Carcinogenesis 17 : 595, 1996.
55. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, et al : High Frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. Cancer 63 : 573, 1991.
56. Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, et al : Direct mutagenesis of H-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-Methylurea during initiation of mammary carcinogenesis rats. Nature 15 : 382, 1985.
57. Barbacid M : Mutagenes, oncogenes and cancer. Trends in Genetics 2 : 188, 1986.
58. Balmain A, Brown K : Oncogene activation in chemical carcinogenesis. Adv cancer Res 51 : 147, 1988
59. Albino Ap, Strange R Le, Oliff AI, et al : Transforming ras genes from melanoma. Nature 308 : 69, 1984.
60. Vousden KM, Marshall CJ : Three different activated ras genes in mouse tumours evidence for oncogene activation during progression of a mous lymphoma. EMBO J. 3 : 913, 1984.
61. Kwong YY, Husain Z & Biswas DK : C-Ha-ras gene mutation and activation precede pathological changes in DMBA-induced in vivo carcinogenesis. Oncogene 7 : 1481, 1992.
62. McKay LA, Peterson HR, Brown D, et al : N-ras and human cancer. Anti cancer Res. 6 : 483, 1986.

사진부도 설명

- Fig. 1. Normal stratified squamous epithelium and keratin layer were noted(H&E, ×100).
- Fig. 2. Normal epithelium and keratin layer were completely dissected by microdissection(H&E, ×100).
- Fig. 3. Squamous cell carcinoma in situ was noted (H&E, ×100).
- Fig. 4. The nest of tumor cells was completely dissected by microdissection (H&E, ×100).
- Fig. 5. Experimental 6 weeks showed epithelial proliferation with dysplasia (H&E, ×100).
- Fig. 6. Experimental 8 weeks showed papillary carcinoma (H&E, ×100).
- Fig. 7. Experimental 10 Weeks showed hyperchromatic and enlarged nuclei (H&E, ×100).
- Fig. 8. Experimental 12 weeks showed squamous cell carcinoma confined to the mucosa (H&E, ×100).
- Fig. 9. Experimental 14 weeks showed nests of squamous cell carcinoma invading deep in the stroma (H&E, ×100).
Arrow indicated tumor nests in the stroma.
- Fig. 10. Experimental 16 weeks showed nests of squamous cell carcinoma with focal keratinization (H&E, ×100).
Arrow indicated tumor nests in the stroma.
- Fig. 11. DNA extracted from paraffin block revealed fragmentation by smear pattern on agarose gel electrophoresis.
- Fig. 12. K-ras and H-ras PCR products showed specific single bands to appropriate sizes.
- Fig. 13. K-ras PCR product did not show band shift between normal and tumor tissue.
The PCR products of H-ras codon 61 and 12 revealed different band shift between tumor and normal tissue.
- Fig. 14. Electropherogram of H-ras codon 12 showed point mutation of G→A from normal to tumor.
H-ras codon 61 revealed point mutation of A→T.

Abbreviation :

- H&E : Hematoxylin & Eosin
St. Sq. Epi. : Stratified Squamous Epithelium
Ca : Carcinoma in Situ
Inv. Ca. : Invasive Carcinoma
SM : Size Marker
C : Cytosine
A : Adenine
G : Guanine
T : Thymidine

사진부도 ①

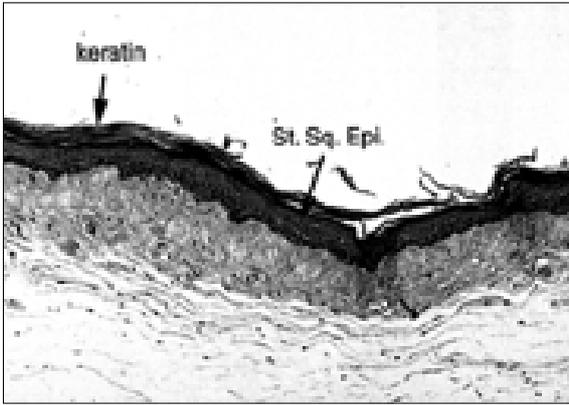


Fig. 1

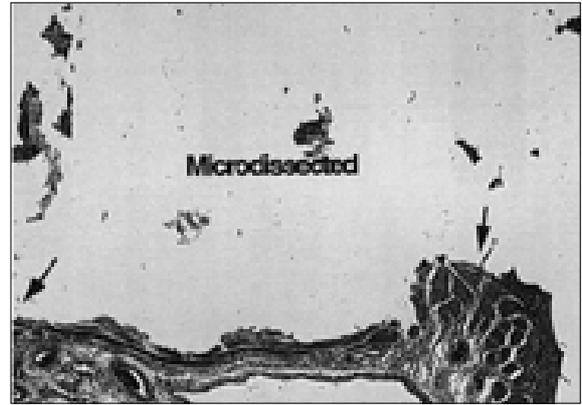


Fig. 2

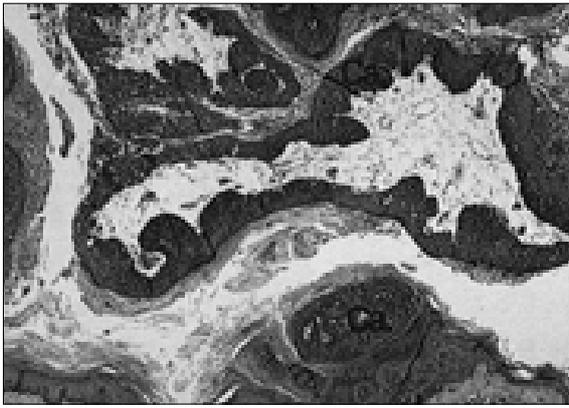


Fig. 3

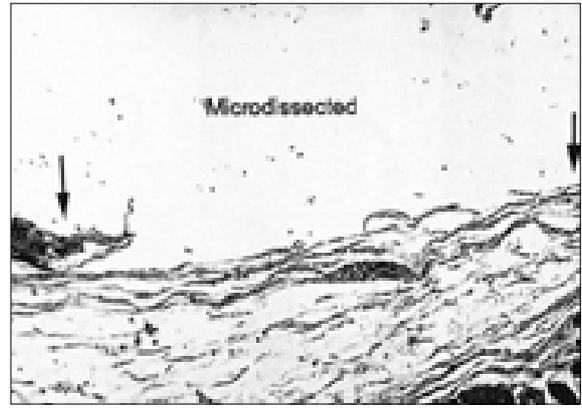


Fig. 4

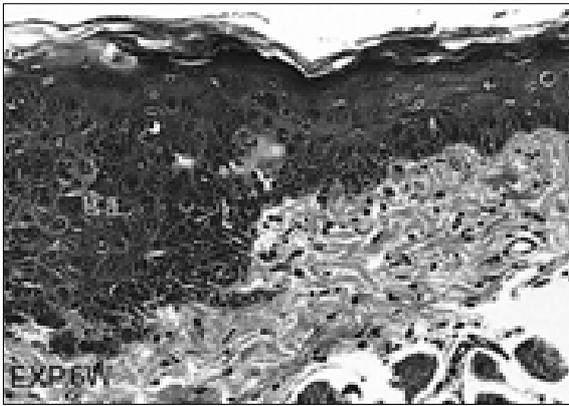


Fig. 5

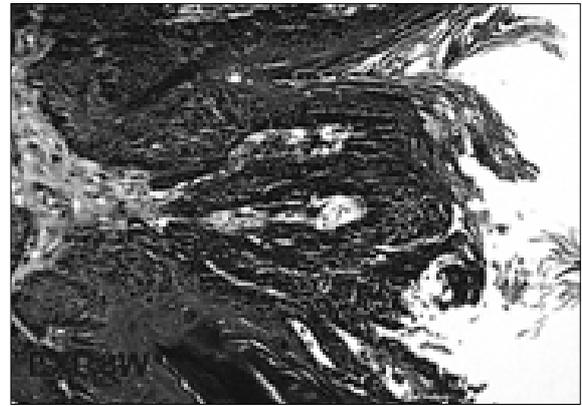


Fig. 6

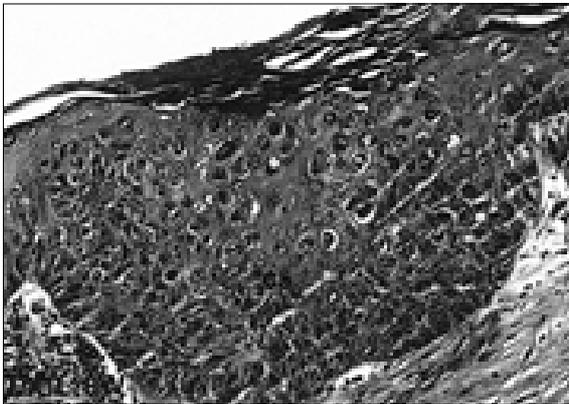


Fig. 7

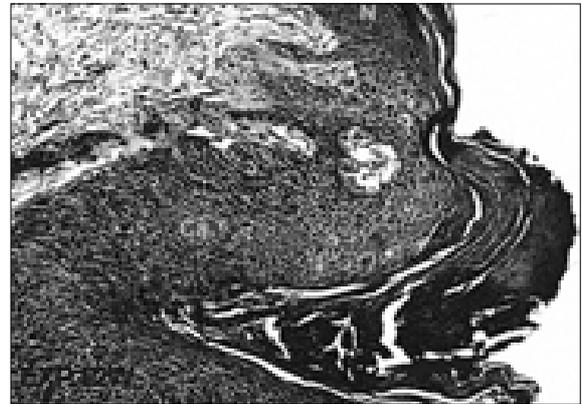


Fig. 8

사진부도 ②

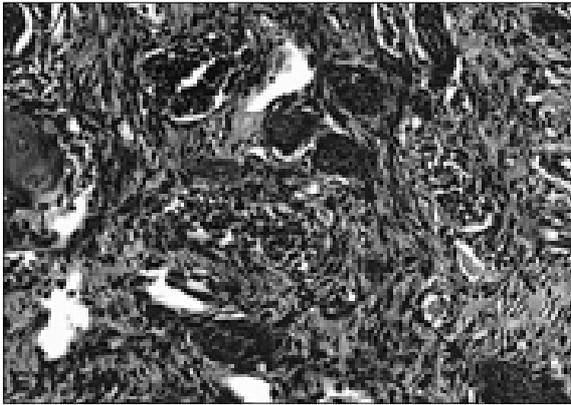


Fig. 9

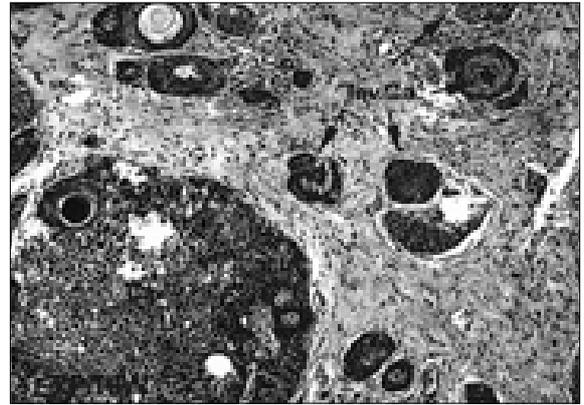


Fig. 10

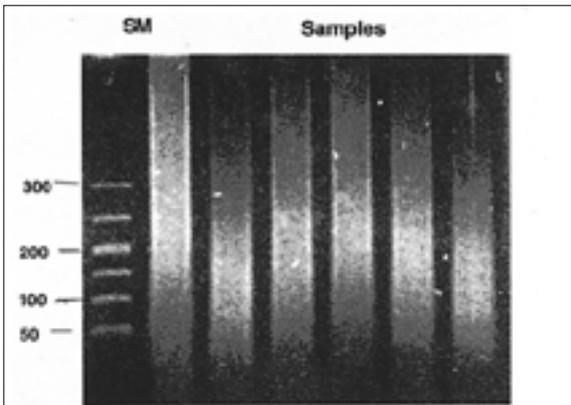


Fig. 11

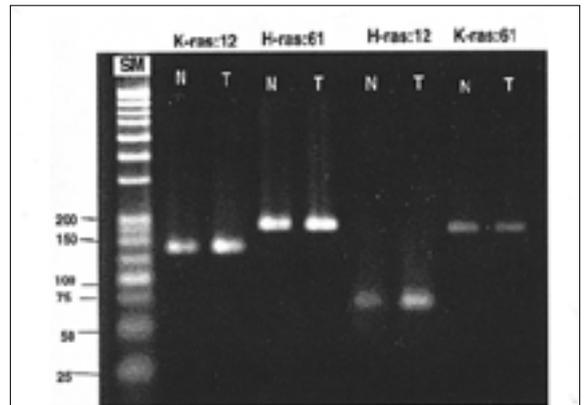


Fig. 12

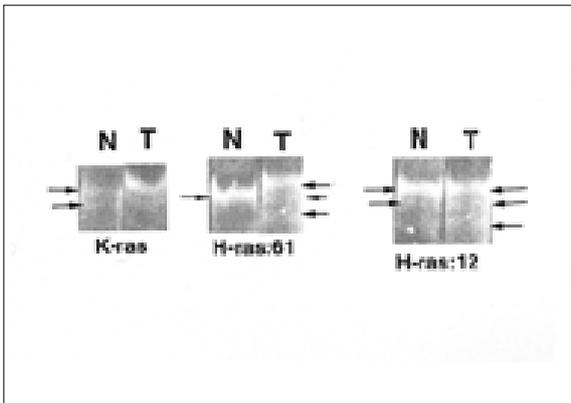


Fig. 13

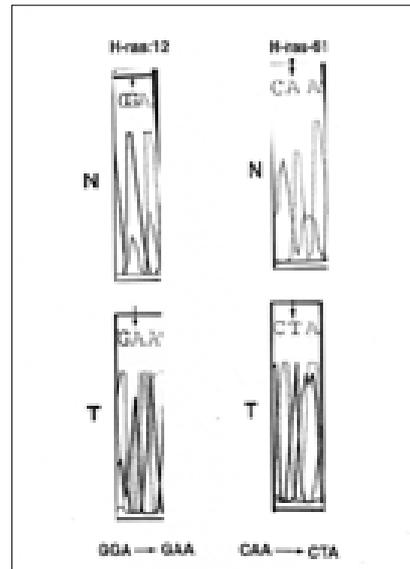


Fig. 14