

한국인 폐암 환자에 대한 p53 및 Rb유전자의 다형성 분석

한양대학교 의과대학 내과학 교실, 유전학 교실*

이경상, 손장원, 양석철, 윤호주, 신동호, 박성수, 이정희, 이춘근*, 조윤희*

= Abstract =

Analysis of p53 and Retinoblastoma(Rb) Gene Polymorphisms in Relation to Lung Cancer in Koreans

Kyung Sang Lee M.D., Jang Won Sohn, M.D., Suck Chul Yang, M.D.,
Ho Joo Yoon M.D., Dong Ho Shin M.D., Sung Soo Park M.D., Jung Hee Lee M.D.,
Chun Geun Lee M.D.*, Youl Hee Cho M.D.*

Department of Internal Medicine & Genetics, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea*

Background : The p53 and retinoblastoma(Rb) tumor suppressor genes are associated with the pathogenesis of several types of human cancer. Substantial proportion of the primary lung cancers or cell lines have been reported to have the p53 and/or the Rb gene mutations. But, so far there is no report on the analysis of the Rb gene polymorphism as one of the genetic susceptibility marker. This study was undertaken to establish the gene frequencies of the polymorphic genotypes of the p53 and Rb genes in Koreans to evaluate the possible involvement of these genotypes as a risk factor of lung cancer.

Methods : In this study 145 controls without previous and present tumor history and 128 lung cancer patients were subjected to analysis. The two intragenic polymorphisms of the p53 gene(exon 4/AccII, intron 6/MspI) and one intron 17/XbaI polymorphism of the Rb gene were analysed by the method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms(PCR-RFLPs). The genotype of the intron 3/16 bp repeat polymorphism of p53 was determined by PCR and direct gel electrophoresis.

Results : There were no significant differences in the genotype distributions of the p53 gene between lung cancer patients and controls. But heterozygotes(Arg/Pro) of the exon 4/AccII polymorphisms were slightly over-represented than controls, especially in the Kreyberg type I cancer, which was known to be associated with smoking. The intron 3/16 bp duplication and the intron 6/MspI polymorphisms were in complete linkage disequilibrium. About 95% of the individuals were homozygotes of the common alleles both in the 16 duplication

*본 논문의 초록은 1996년 ATS주관인 International Conference에서 구연 발표 하였음.

and MspI polymorphisms, and no differences were detected in the genotype distributions between lung cancer patients and controls.

Overall genotype distributions of the Rb gene polymorphisms between lung cancer patients and controls were not significantly different. However, the genotype distributions in the Kreyberg type I cancer were significantly different from those of controls ($p = 0.0297$) or adenocarcinomas ($p = 0.0008$). It was noticeable that 73.4% of the patients with adenocarcinomas were heterozygotes (r1/r2) whereas 39.2% of the Kreyberg type I cancer were heterozygous at this polymorphisms. In the lung cancer patients, significant differences were also noted between the high dose smokers and low dose smokers including non-smokers ($p = 0.0258$). The relative risk to Kreyberg type I cancer was significantly reduced in the individuals with the genotype of r1/r2 (odds ratio = 0.46, 95% C.I. = 0.25-0.86, $p = 0.0124$).

The combined genotype distribution of the exon 4/AccII of the p53 and the intron 17 Rb gene polymorphisms in Kreyberg type I cancers were significantly different from dose of controls or adenocarcinomas. The highest odds ratio were observed in the individuals with the genotypes of Arg/Pro and r2/r2 (odds ratio = 1.97, 95% C.I. = 0.84-4.59) and lowest one was in the patients with Arg/Arg, r1/r2 genotype (odds ratio = 0.54, 95% C.I. = 0.25-1.14).

Conclusion : The p53 and the Rb gene polymorphisms modulate the risk of smoking induced lung cancer development in Koeans. However, the exact mechanism of risk modulation by these polymorphism remains to be determined. For more discrete clarification of associations between specific genotypes and lung cancer risk, the evaluations of these polymorphisms in other ethnics and more number of patients will be needed.

Key words : p53 & retinoblastoma gene polymorphism, Lung cancer

서 론

인체가 흡연을 비롯한 여러가지 화학적 발암원에 노출 되었을때 실제 특정 암을 일으키는데는 발암원 자체가 가진 성질이나, 노출정도 등도 중요한 인자지만, 각 개인이 가진 유전적 감수성의 차이에 의해서도 크게 영향을 받는다¹⁾. 최근 흡연과 밀접한 관계를 갖고 있는 폐암의 발생에서 이러한 개인간 유전적 감수성 차이에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다^{2~5)}. 흡연과 관련된 폐암의 발생에서 유전적 감수성을 결정하는 대표적인 인자로는 cytochrome P450(CYP) 1A1 및 2E1, glutathione S-transferase(GST)과 같은 약물대사 효소가 관련되어 있으며, 이들 효소의 유전자 다형성에 기인된 발현(expression)의 차이에 따라 개인간 폐암발생의 유전적 감수성에 차이가 나타나는 것

으로 밝혀지고 있다^{6,7)}.

이들 약물대사에 직접적으로 관련되는 효소 유전자 이외에도 p53과 같은 항암유전자의 다형성도 흡연관련 폐암과 같은 특정 암에서 유전적 감수성을 결정하는 또다른 인자로 알려져 주목을 받고 있다^{8,9)}. p53 유전자의 codon 72(exon 4/AccII) 다형성 분석에서 정상인 집단에 비해 흡연관련 폐암군에서 특정 유전자형(Pro/Pro allele)의 빈도가 유의하게 높게 관찰 되었으며, 특히 최근 codon 72 다형성과 p53 유전자의 intron 3 부위의 16bp 반복 다형성을 함께 분석한 결과 두 다형성중 특정 반수체형(haplotype) 빈도가 흡연관련 폐암및 대장암 집단에서 유의하게 높다고 보고 되었다^{10,11)}. 이와 같은 항암유전자 다형성에 대한 분석은 다른 약물대사 효소의 유전적 다형성 분석과 함께 앞으로 유전적 감수성 결정에 크게 도움

을 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다.

그러나, 유전자 다형성은 인종에 따른 유전자 구성의 차이로 인해 그 유전인자 빈도와 분포등에서 차이가 적지않게 존재하고 있어, 한국인의 흡연 관련 폐암 발생에서도 상기한 바와 같은 결과를 보일지는 의문이다. 현재까지 폐암과 관련하여 CYP1A1, GST1 유전자 분석은 비교적 많이 이루어져 왔으나, 그 분석 대상이 서양인과 일본인과 같은 몇몇 인종에 대해서 제한적으로 진행되어 왔을뿐 한국인에 대해서는 현재까지 전혀 연구가 되어 있지 않은 실정이다. 흡연관련 폐암의 발생과 p53 항암유전자 다형성과의 연관성은 일본인에서 Kawajiri 등⁹⁾이 처음 보고 한 후, 역학적 연구의 초기단계에 있으며 지금까지의 연구결과도 보고자간 또는 인종간에 적지않은 차이가 있다.

폐암을 비롯한 많은 암에서 p53 및 Rb 항암 유전자의 구조적 변이 및 단백질 발현의 이상에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있다^{12~15)}. 특히 흡연과 밀접한 관련이 있는 폐암의 발생에서 Rb 유전자의 변이 및 단백질 발현 이상이 높은 빈도로 검출되었다^{12,16~18)}. 따라서 Rb 항암 유전자도 p53 항암 유전자 같이 폐암의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 사료되나 p53과는 달리 현재까지 Rb 유전자 다형성을 폐암 발생의 유전적 감수성을 분석하는 표지(marker)로 이용한 연구는 국제적으로 보고된 바 없다.

지금까지 알려진 p53 유전자 다형성은 여러 exon 들^{19~22)} 및 intron들에^{9,23,24)} 존재하며, Rb 유전자의 경우 주로 intron에 존재하는 다형성이 보고 되어 있다^{25,26)}. 본 연구는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)을 이용, 한국인 폐암 환자군 및 대조군에 대해 상기한 p53 및 Rb 유전자의 다형성을 분석함으로써 이들 항암 유전자의 다형성과 한국인 폐암 발생과의 연관성이 있는지를 규명하고자 하였다. 또한, 흡연 습관에 대한 설문조사를 통해 흡연과 관련된 폐암(Kreyberg type I)의 발생과 p53 및 Rb 항암유전자의 특정 유전자형과의 연관 여부를 밝히고자 계획 하였다.

대상 및 방법

가. 대상집단의 선정 및 설문조사

한양대학병원에 내원한 폐암환자중 조직학적 진단으로 확정된 환자군 128명과 개인병력상 이전 또는 현재 어떤 종양에도 이환되지 않은 145명의 대조군을 연구대상으로 하였으며 환자 및 대조군 모두 개인면접을 통한 검사의 승낙과 흡연습관에 대한 설문조사를 병행하였다.

Table 1. Polymerase chain reaction primer sequences used in this study

Gene	polymorphisms	Primer sequences	References
p53	exon 4/Acc II	5'- AAT GGA TGA TTT GAT GCT GTC CC-3' 5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT GGC-3'	Kawajiri et al.,1995
p53	intron 3/ 16bp repeat	5'-GCA GAG ACC TGT GGG AAG CGA-3' 5'-GAG CAG TCA GAG GAC CAG GTC-3'	Birgander et al.,1995
p53	intron 6/MspI	5'-AGG TCT GGT TTG CAA CTG GG-3' 5'-GAG GTC AAA TAA GCA GCA GG-3'	McDaniel et al.,1994
RB	intron17/XbaI	5'-TTC CAA TGA AGA ACA AAT GG-3' 5'-GCA ATT GCA CAA TCC AAG TT-3'	McGee et al.,1990

나. 유전자 다형성 분석

p53 유전자는 exon 4에 위치하는 AccII(codon72), intron 6에 존재하는 MspI, intron 3의 16bp 반복 다형성에 대해서, Rb 유전자는 intron 17의 XbaI 다형성에 대하여 분석 하였다(Table 1). 대조군 및 환자군으로부터 개인당 3ml의 말초혈액을 채혈하여 실험의 재료로 하였다. p53 유전자의 16bp 반복 다형성을 제외한 유전자 분석은 중합효소연쇄반응-제한 효소절편길이 다형현상(PCR-RFLPs)을 이용 하였으며, 16bp 반복 다형성은 중합효소연쇄반응 후 전기영동으로 직접 분석하였다.

1) 말초혈액으로부터 DNA 분리 및 정제
Wizard™ Genomic DNA purification kit(Pro-mega, Madison, USA)를 사용하여 1ml의 말초혈액 으로부터 회사가 제공해준 방법에 따라 DNA를 추출 정제하였다.

2) 중합효소연쇄반응

중합효소연쇄반응은 Premix-Top PCR kit(바이오니아, 서울, 대한민국)를 이용하였다. 유전자 특이 primer들(Table 1) 각각 20pmole(0.2ul)과 genomic DNA 0.2 μ g (1 μ l) 및 증류수를 혼합하여 20 μ l 용량으로 맞추어 혼합한후 30 μ l의 mineral oil (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 상층에 첨가하여, DNA Thermal Cycler 480(Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)를 이용 중합효소연쇄 반응을 시켰다. Table 1에 나타난 바와 같이 p53의 exon 4/AccII, intron 6/MspI 다형성 및 Rb유전자의 intron 17/XbaI 다형성에 대한 분석은 PCR 반응후에 이중 5 μ l을 새 microfuge tube에 옮긴후 각각 적합한 제한효소 Sunit로 처리한 후 2% agarose 겔에 전기영동하여 각 개인의 유전자형을 결정하였다. p53 유전자의 16bp 중복 다형성은 증폭된 DNA 3 ~ 5 μ l를 직접 8% polyacrylamide 겔에 전기영동한 후 silver staining 으로 유전자형을 결정하였다.

다. 통계분석

대조군과 환자군과의 유전인자 분포의 차이는 2 \times 2 또는 2 \times 3 contingency table을 이용한 χ^2 검정으로 분석 하였으며, 특정 유전자형에 대한 상대위험률(relative risk)은 교차비(odds ratio)를 구하여 비교 분석 하였다. 통계분석에는 True Epistat V5.2 (Richardson, Texas, USA) 프로그램을 이용하였다.

결 과

가. p53 유전자의 exon 4/AccII 다형성

대조군 및 환자군에 대한 분석에서 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 다형적인 3가지 유전자형(Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro)형이 관찰되었다. 대조군 및 환자군에 대한 종합적인 분석결과는 Table 2에 요약하였다. 대조군에서 관찰된 Arg과 Pro 유전자 빈도는 각각 0.66, 0.34 였으며, 대조군과 환자군 모두

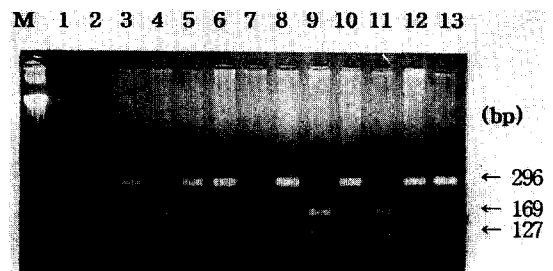


Fig. 1. Detection of the exon 4/AccII polymorphism of the p53 gene in 13 individuals. PCR-amplified products(296bp) containing the polymorphic region of p53 gene were digested with AccII restriction enzyme and were electrophoresed in 2% agarose gel. Lanes 4, 7, 9 and 11 are the homozygotes of (+) restriction site(Arg/Arg); lanes 5, 6, 8 and 13 are the homozygotes of (-) restriction site(Pro/Pro); the other lanes are the heterozygotes at this polymorphic site(Arg/Pro). M, 123 bp ladder marker.

Table 2. Distribution of different genotypes of the exon4/AccII polymorphism of the p53 gene in controls and lung cancer patients

Populations	Genotypes(%)			Total(%)	p ¹
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro		
Controls	63(43.5)	64(44.1)	18(12.4)	145(100)	
male	45(45.5)	41(41.4)	13(13.1)	99(100)	
female	18(39.1)	23(50.0)	5(10.9)	46(100)	0.6240 ^a
Lung cancer	50(39.4)	67(52.8)	10(7.9)	127(100)	0.2631
<u>Sex</u>					
male	39(38.6)	55(54.5)	7(6.9)	101(100)	
female	11(42.3)	12(46.2)	3(11.5)	26(100)	0.6529 ^a
<u>Histology</u>					
squamous cell ca.	16(34.0)	26(55.3)	5(10.6)	47(100)	0.4059
small cell ca.	14(48.3)	15(51.7)	0(0.0)	29(100)	0.0304
Kreyberg type I ²	30(39.5)	41(54.0)	5(6.6)	76(100)	0.2431
adenocarcinoma	18(47.4)	16(42.1)	4(10.5)	38(100)	0.8942
others	1(14.3)	5(71.4)	1(14.3)	7(100)	
					0.4544 ^b
<u>Smoking History</u>					
non-smokers	13(35.1)	19(51.4)	5(13.5)	37(100)	0.6495
low-dose smokers ³	13(43.3)	15(50.0)	2(6.67)	30(100)	0.5123 ^c
high-dose smokers ³	20(41.7)	25(52.1)	3(6.3)	48(100)	0.2928 ^c
<u>Age</u>					
≤ 55	29(47.5)	26(42.6)	6(9.8)	61(100)	0.8072
> 55	20(31.8)	39(61.9)	4(6.4)	63(100)	0.0512
					0.0978 ^d

¹, values are obtained from the χ^2 test by 2×3 contingency table comparing different genotypes with controls.

², comprising squamous and small cell carcinomas

³, smoking amounts are less than 30 pack-years (1 pack-year = 20 cigarettes per day in one year).

⁴, smoking amounts are above 30 pack-years.

^a, comparing between male and female; ^b, comparing between Kreyberg type I and adenocarcinoma; ^c, comparing with male controls;

^d, comparing between younger(≤ 55) and older(> 55) age groups

rdy-Weinberg 평형에 적합하였다(대조군, $\chi^2=0.78$, $p=0.9617$; 환자군, $\chi^2=3.7277$, $p=0.51$). 전반적인 유전자형의 분포는 환자군과 대조군에 유의한 차이가 없었다. 폐암 환자군에서 대조에 비해 Arg/Pro 유전자형은 높고, Pro/Pro 유전자형은 낮게 관찰되었으나 통계적으로 유의하지는

않았다. 조직학적으로 흡연과 관계가 깊은 Kreyberg type I군과 저흡연자군에서 대조군에 비해 Arg/Pro 유전자형은 높고, Pro/Pro 유전자형은 상대적으로 낮게 관찰되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 Kreyberg type I 군중 소세포 폐암의 경우 Arg/Pro 유전자형의 빈도가 높고 Pro/Pro 유전자

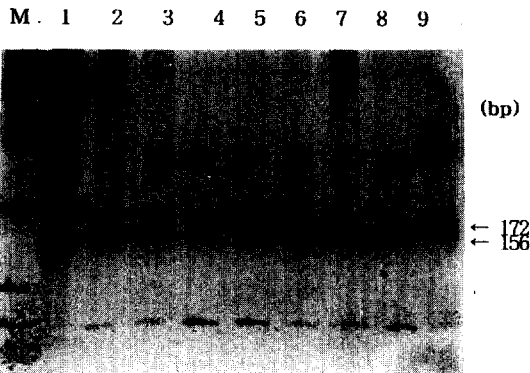


Fig. 2. Detection of the 16bp repeat polymorphism of the p53 gene for 9 individuals. PCR - amplified products were electrophoresed in 8% polyacrylamide gel and were detected with silver staining. Lane 9 is the heterozygote(156/172) whereas the other lanes are the 156bp homozygotes(156/156). 172bp homozygote was not observed in this study population. M, molecular size marker of 100 bp ladder.

형은 관찰되지 않았으며, 대조군과 유의한 차이를 보였다($p = 0.0304$). 폐암환자군에서 성(sex)별 및 흡연량의 구분에 의한 유전자형의 분포에도 유의한 차이가 없었다. 그러나, 연령별 유전자형 분포에서 55세 이하의 저연령층 환자군은 대조군과 유의한 차이가 없었으나 55세 이상의 고 연령층 환자군의 경우 Arg/Pro 유전자형의 빈도가 두드러지게 높았으며, 통계적으로 경계값의 유의수준을 보였다($p = 0.0512$).

나. p53 유전자의 intron 3/16bp 중복 다형성

Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 156bp 동형접합체와 156bp와 172bp의 이형접합체만 관찰되었으며, 172bp 동형접합체는 관찰되지 않았다. 대조군 및 환자군에 대한 종합적인 분석결과는 Table 3에 제시한 바와 같다. 156bp와 172bp 대립인자 빈도는 각각 0.98, 0.22였으며 대조군 및 환자군 모두 Hardy-

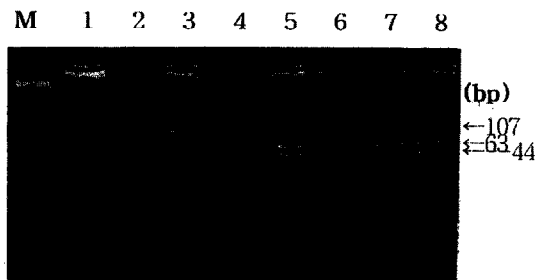


Fig. 3. Detection of the intron 6/MspI polymorphism of the p53 gene in 8 individuals. PCR-amplified products(107bp) were digested with restriction enzyme MspI and were electrophoresed in 3% NuSieve agarose gel(FMC), Lanes 1, 4-8 are the homozygotes(m1/m1); lanes 2 and 3 are the heterozygotes(m1/m2) at this polymorphic site. M, 100bp ladder marker.

Weinberg 평형에 적합하였다(대조군, 환자군: $\chi^2 = 0.0012$, $p = 0.9722$).

전반적인 유전자형의 분포에서 환자군과 대조군은 유의한 차이가 없었다. 폐암환자군에 대한 성별, 연령별 구분에 따른 유전자형의 분포도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 폐암의 조직학적 구분에서도 Kreyberg type I 군과 대조군 또는 폐 선암종군 사이에 유의한 차이가 없었다.

다. p53 유전자의 intron 6/MspI 다형성

본 연구대상의 대조군 및 환자군에 대한 분석에서 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 m1 동형접합체와 m1/m2 이형접합체만 관찰되었으며, m2/m2 동형접합체는 관찰되지 않았다. 대조군 및 환자군에 대한 종합적인 분석결과는 Table 4에 요약하였으며, 대조군에서 관찰된 m1과 m2 유전자 빈도는 16bp 중복 다형성에서와 같이 0.98, 0.02였으며, 대조군 및 환자군에서의 유전자형 분포는 모두 Hardy-Weinberg 평형에 적합하였다(대조군: $\chi^2 = 0.0012$, $p = 0.9722$; 환자군: $\chi^2 = 0.0013$, $p = 0.9717$). 대조군

Table 3. Distribution of different genotypes of intron3/16bp repeat polymorphism of the p53 gene in controls and lung cancer patients

Populations	Genotypes(%)		Total(%)	p ¹
	156/156	156/172		
Controls	138(95.2)	7(4.8)	145(100)	
male	95(96.0)	4(4.0)	99(100)	
female	43(93.5)	3(6.5)	46(100)	0.6793
Lung cancer	121(94.5)	7(5.5)	128(100)	0.9719

¹, values are obtained from the χ^2 test by 2x2 contingency table comparing different genotypes with controls.

Table 4. Distribution of different genotypes of intron 6/mspI polymorphism of the p53 gene in controls and lung cancer patients.

Populations	Genotypes(%)		Total(%)	p ¹
	m1/m1	m1/m2		
Controls	138(95.2)	7(4.8)	145(100)	
male	95(96.0)	4(4.0)	99(100)	
female	43(93.5)	3(6.5)	46(100)	0.6793
Lung cancer	117(94.4)	7(5.7)	124(100)	0.9796

¹, values are obtained from the χ^2 test by 2x2 contingency table comparing different genotypes with controls.

및 환자군 모두에서 intron 3의 16bp 중복 다형성과 완전한 연관관계를 보여 주었다. 따라서 16bp 중복 다형성에서와 같이 전반적으로 대조군 및 환자군의 유전자형 분포에 유의한 차이가 없었으며, 환자군의 성별, 조직학적 및 흡연량에 따른 구분에서도 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

라. Rb 유전자의 intron 17/XbaI 다형성

Fig. 4에 제시된 바와 같이 환자군 및 대조군에서 세 가지 다형적인 유전자형(r1/r1, r1/r2, r2/r2)이 관찰 되었다. 대조군에서의 r1, r2의 유전자 빈도는 각각 0.50, 0.50 였으며, 대조군 및 환자군 모두 Hardy-Weinberg 평형에 적합하였다(대조군: $\chi^2 = 3.7822$, $p = 0.1509$; 환자군: $\chi^2 = 0.2962$, p

$= 0.8623$). 대조군 및 환자군에 대한 종합적인 분석 결과는 Table 5에 제시한 바와 같다.

대조군 및 환자군에서 유전자형의 분포는 전반적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 환자군에서 조직학적으로 흡연과 관련이 깊은 Kreyberg type I 군은 대조군($p = 0.0297$) 또는 폐 선암중군($p = 0.0008$)과 유전자형의 분포에서 유의한 차이를 보였다. Kreyberg type I 군에서는 폐 선암중군에 비해 동형접합체(r2/r2 또는 r1/r1) 빈도가 높고 이형접합체(r1/r2) 빈도는 39.2%로 유의하게 낮았다. 폐 선암중군에서는 이형접합체 빈도가 73.4%로 높았으나 대조군과 유의한 차이는 없었다. 또한 고흡연자군에서의 유전자형의 분포는 비흡연자를 포함한 저흡연자군의 유전자형 분포와는 유의한 차이를 보였으며($p = 0.0258$), 이형접합체 빈도가 40%로 낮게 검출되었다.

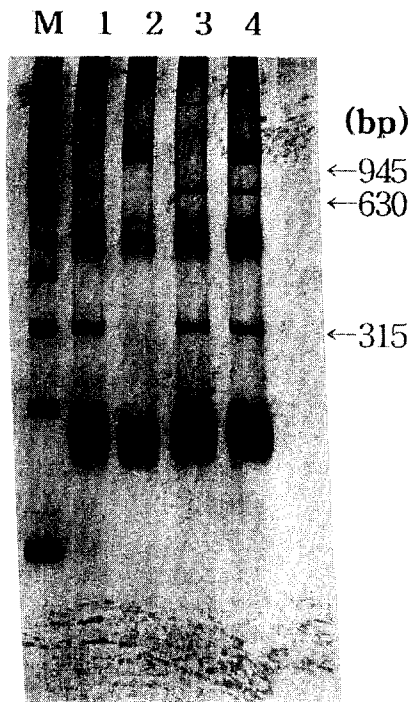


Fig. 4. Detection of intron 17/XbaI polymorphism of the Rb gene in 4 individuals. PCR-amplified products(945bp) were digested with XbaI restriction enzyme and electrophoresed in 8% polyacrylamide gel and detected with silver staining. Lane 2 is the homozygote of the (-) restriction site(r1/r1); lane 3 is the homozygote of the (+) restriction site(r2/r2); lanes 1 & 4 are the heterozygotes(r1/r2). M, molecular size marker of 100bp ladder.

마. 폐암환자의 조직학적 구분과 흡연과의 연관성

본 연구 대상 폐암 환자중 조직학적으로 흡연 관련 폐암(Kreyberg Type I) 환자는 82.6%가 흡연력을 가지고 있었으며, 17.4%가 비흡연자였다. 특히 49.3%에서는 30pack-years 이상의 고흡연자들이었다. 이에 반해 폐 선암종군의 환자는 59.5%가 비흡연자였고 고흡연자 비율은 24.3%에 불과 하였다(Fig. 5). 통계

적으로 흡연량에 있어 Kreyberg type I 군과 폐 선암종군 사이에 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$).

고 찰

p53 유전자는 폐암을 비롯한 대부분의 악성종양의 발암기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 폐암에서는 활성화된 benzo(α)pyrene에 의해서 p53 특정부위의 돌연변이가 호발하며³¹⁾, 이 유전자내의 결실(deletion) 또는 돌연변이는 항암기능의 장애를 초래하여 암의 악성화를 유발시킨다^{27, 28)}. 또한 희귀하지만 Li-Fraumeni 증후군과 같은 가족적으로 암이 다발하는 유전병의 경우 생식세포에서 발생한 p53 유전자 돌연변이가 암의 발생을 증가시키는 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려졌다²⁹⁾. 이러한 관점에서 정상 p53 유전자의 codon 72부위의 아미노산인 Arg(CGC)이 Pro(CCC)로 대체된 다형적 변이가 암의 발생에서 어떤 역할을 할 수 있을지는 관심의 대상이며 아직까지는 확실하게 구명된 바가 없다.

본 연구 결과, 폐암 환자군에서 p53의 exon 4 유전자형의 분포가 정상대조군과 유의한 차이는 없었으나, 이형접합체인 Arg/Pro 유전자형의 빈도가 높게 증가된 반면 Pro/Pro 유전자형의 빈도는 낮게 나타났다. 특히 조직학적으로 흡연과 관련되는 폐암(Kreyberg type I)에서 이 Arg/Pro 유전자형의 증가가 두드러졌으며, 소세포 폐암의 경우 Pro/Pro 유전자형이 전혀 검출되지 않았다. 이 결과는 특정 p53의 exon 4 다형성과 폐암사이에 연관관계를 검출하지 못했던 Wetson 등⁸⁾의 보고는 물론 폐암환자군에서 정상대조군에 비해 Pro/Pro 유전자형이 차지하는 비율이 전반적으로 높다는⁹⁾ 이전의 보고와도 차이를 보여 주목된다. 흡연자군 특히 고흡연자군에서보다 저흡연자군에서 그 차이가 심하게 나타난 것으로 미루어 이 유전자형이 한국인의 흡연관련 폐암발생의 감수성 결정에 중요한 역할을 하거나, 최소한 중요한 역할을 하는 다른 유전자와 밀접한 연관관계에 있을 것으로 추정된다.

Table 5. Distribution of different genotypes intron 17/XbaI polymorphism of the Rb gene in controls and lung cancer patients.

Populations	Genotypes(%)			Total(%)	p ¹
	r1/r1	r1/r2	r2/r2		
Controls	30(21.3)	82(58.2)	29(20.6)	141(100)	
male	21(22.1)	58(61.1)	16(16.8)	95(100)	
female	9(19.6)	24(52.2)	13(28.3)	46(100)	0.2895 ^a
Lung cancer	28(22.2)	66(52.4)	32(25.4)	126(100)	0.5749
<u>Sex</u>					
male	23(23.2)	49(49.5)	27(27.3)	99(100)	
female	5(18.5)	17(63.0)	5(18.5)	27(100)	0.4523 ^a
<u>Histology</u>					
squamous cell ca.	12(26.7)	19(42.2)	14(31.1)	45(100)	0.1593
small cell ca.	10(34.5)	10(34.5)	9(31.1)	29(100)	0.0655
Kreyberg type I ²	22(29.7)	29(39.2)	23(31.1)	74(100)	0.0297
adenocarcinoma	3(7.7)	29(73.4)	7(18.0)	39(100)	0.0792
others	2(33.3)	3(50.0)	1(16.7)	6(100)	
					0.0008 ^b
<u>Smoking History</u>					
non-smokers	5(17.1)	24(60.0)	9(22.9)	38(100)	0.0757 ^c
low-dose smokers ³	3(8.7)	18(60.9)	8(30.4)	29(100)	0.0779 ^c
high-dose smokers ⁴	14(28.9)	19(40.0)	14(31.1)	47(100)	0.0258 ^d
<u>Age</u>					
≤ 55	9(15.0)	36(60.0)	15(25.0)	60(100)	0.5335
> 55	18(28.6)	28(44.4)	17(27.0)	63(100)	0.1922
					0.1317 ^e

¹, values are obtained from the χ^2 test by 2x3 contingency table comparing different genotypes with controls.

², comprising squamous and small cell carcinomas

³, smoking amounts are less than 30 pack-years (1 pack-year = 20 cigarettes per day in one year).

⁴, smoking amounts are above 30 pack-years.

^a, comparing between male and female ; ^b, comparing between Kreyberg type I and adenocarcinoma ; ^c, comparing with high-dose smokers ; ^d, comparing between high dose smokers and low-dose smokers comprising non-smokers. ^e, comparing between younger(≤ 55) and older(> 55) age groups.

최근 Birgander 등¹⁰⁾은 스웨덴인에 대한 폐암 환자의 집단분석에서 p53 유전자의 exon 4 다형현상만으로는 폐암발생의 유전적 감수성과 관련된 유전자형

을 검출할 수 없었으나, intron 3의 16bp 반복과 intron 6의 MspI 다형부위를 함께 분석한 결과 폐암 환자군에서 특정 반수체형(haplotype)이 유의하게

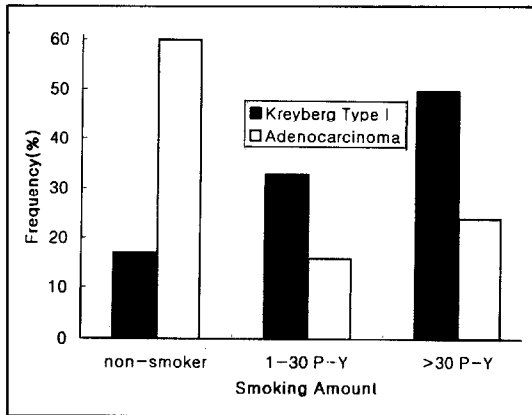


Fig. 5. Histogram showing the associations between histologic types of the lung cancer and smoking amount. P-Y ; pack-years.

증가된 것을 보고하였다. 그러나, 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 한국인의 경우 서양인과는 달리 intron 3의 16bp 반복 다형성의 172bp 대립인자 또는 intron 6의 MspI 다형성의 m1 대립인자 빈도(2%)가 너무 낮아, 이들 다형성이 한국인의 폐암발생의 유전적 감수성을 결정하는데 중요한 역할을 하지는 않을 것으로 사료된다. 이것은 특정암의 발생에 대한 유전적 감수성의 차이가 인종적인 차이에 의해서도 영향을 받을 수 있음을 시사해준다. 또한, 일본인에 대한 집단분석에서도 172bp 대립인자 빈도는 1.4%로 서양인의 14.5% 보다 훨씬 낮게 나타나³⁰⁾ 본 연구결과와 비교될 만하다. 서양인에 대한 분석에서 172bp 대립인자는 흡연관련 폐암의 발생을 줄이는 보호적인 작용을 한다고 알려져 있다. 따라서, 만일 exon 4/AccII 다형성이 흡연관련 폐암발생에 중요한 역할을 한다면, 한국인이나 일본인과 같은 동양인에서 서양인에서 보다는 172bp의 빈도가 현저하게 적으므로 그 연관성이 뚜렷이 나타날 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 측면에서 본 연구결과가 일본인을 대상으로한 Kawajiri 등⁹⁾의 결과와 다르게 나타난 것은 주목할 만하며, 앞으로 그 기전을 규명할 필요성이 크다고 사료된다.

Rb 유전자 다형성에 대한 분석 결과 폐암 환자중

흡연과 관련이 많은 Kreyberg type I 군에서의 유전자형의 분포가 대조군 또는 폐 선암중군의 유전자형 분포와는 유의한 차이를 보였다. 대조군에 비해 Kreyberg type I 군에서는 이형접합체(r1/r2) 빈도가 유의하게 낮은 반면($p = 0.0124$), r1 또는 r2 동형접합체 빈도가 높아 동형접합체인 경우 폐암에 이환될 수 있는 상대위험율은 1.5배 이상 증가되었다. 폐 선암중 또는 기타 암의 유전자형 분포는 정상 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, Kreyberg type I과는 달리 오히려 이형접합체 빈도의 증가가 두드러졌다(odds ratio = 1.77 ; 95% C.I. = 0.81-3.91). 또한 30 pack-years 이상의 고흡연자군에서 이형접합체 빈도가 낮고 r1 또는 r2 동형접합체 빈도가 높아 유전자형과 흡연량과의 상관관계가 있음을 시사해주고 있다.

이러한 결과로 볼 때 본 연구에서는 Rb 유전자중 기능적인 의미가 적은 intron 부위의 다형성에 대한 분석이므로 Rb 유전자형이 직접 폐암의 발생에 관계되기보다는 흡연관련 폐암 발생에서 중요한 역할을 하는 다른 유전자 또는 인자와 연관관계에 있을 것으로 사료된다. 장래에 유전자형에 따른 폐암발생이 Rb 유전자 또는 단백질 변이에 관련된 것인지 아니면 다른 인자에 의한 것인지를 규명하기 위해서는 다형성에 대한 유전자형 분석과 함께 폐암조직에서의 Rb 유전자 변이 및 단백질 발현을 분석할 필요가 있다.

폐암의 발생에서 Rb 유전자의 구조적 이상 및 Rb 단백질의 발현 이상에 대해서 많이 보고 되어 왔다. 특히 조직학적으로 소세포 폐암에서 Rb 유전자의 이상이 호발하며^{12,16,17)}, 기타의 폐암에서도 Rb 단백질 발현에 이상이 있는 것으로 보고 하고 있다¹⁸⁾. 이들의 보고는 폐암의 발생에 Rb 유전자 또는 단백질이 중요한 역할을 할 것임을 시사해준다. 그러나 지금까지의 보고에서 Rb 유전자를 폐암발생의 유전적 감수성을 결정하는 하나의 위험인자 또는 표지로서 분석한 연구는 없다. 이러한 관점에서 본 연구 결과는 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합해 보면, p53 유전자의 다형성

보다는 Rb 유전자의 다형성이 한국인의 흡연관련 폐암 발생의 유전적 감수성 결정에 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되며, 앞으로 보다 명확한 연관 관계 구명을 위해서는 다른 인종 및 더 많은 수의 환자군에 대한 분석이 요망된다.

요 약

연구배경 :

p53 및 망막모세포 암종(Rb) 항암 유전자는 인체의 여러 임종의 발암 과정에 관련되는 것으로 잘 알려져 있다. 또한 최근에 p53 등의 유전자 다형성이 암 발생에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 Rb 유전자 다형성이 폐암 발생에 영향을 주는지는 아직 보고된 바가 없어 이들 유전자의 다형성의 빈도 및 흡연 관련 폐암과 이들 유전자의 다형성과의 관계를 알아 보고자 했다.

방 법 :

한국인 폐암 환자 발생의 유전적 감수성을 결정하기 위하여 128명의 폐암 환자군과 145명의 대조군에 대한 p53 유전자(exon 4 및 intron 6 부위) 및 망막모세포 암종(retinoblastoma, Rb) 유전자(intron 17 부위)의 다형성을 분석하였다. p53 유전자의 16bp 반복 다형성을 제외한 유전자 분석은 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이 다형현상(PCR-RFLPs)을 이용하였으며, 16bp 반복 다형성은 중합효소연쇄반응 후 전기영동으로 직접 분석하였다.

결 과 :

p53 유전자의 exon 4/AccII 다형성 : 대조군 및 환자군에 대한 분석에서 다형적인 3가지 유전자형(Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro)이 관찰되었으며, Arg과 Pro 유전자 빈도는 각각 0.66, 0.34 였다. 폐암 환자군에서는 대조군에 비해 Arg/Pro 유전자형은 높고, Pro/Pro 유전자형은 낮게 관찰 되었으나 통계적으로 유의 하지는 않았다. 조직학적으로 소세포 폐암의 경우 유전자형의 분포가 대조군과 유의한 차이를 보였다.

p53 유전자의 intron 3/16bp 중복 다형성 : 대조군과 환자군에서 156bp 동형 접합체와 156bp와 172bp의 이형 접합체만이 관찰되었으며, 172bp 동형 접합체는 관찰되지 않았다. 156bp와 172bp 대립인자의 빈도는 각각 0.98, 0.02로 172bp 대립인자의 빈도가 아주 낮았다. 전반적으로 폐암 환자군과 대조군간의 유전자형 분포에는 유의한 차이가 없었다.

p53 유전자의 intron 6/MspI 다형성 : Intron 3의 16bp 중복 다형성과 완전 연관 관계에 있었으며, m1 동형접합체와 m1/m2 이형접합체만 관찰 되었다. 16bp 중복 다형성에서와 같이 m1, m2의 유전인자의 빈도는 각각 0.98, 0.02 으로 MspI 절단부위가 없는 m2 대립인자의 빈도가 아주 낮았다. 전반적으로 폐암환자군과 대조군간의 유전자형 분포에는 유의한 차이가 없었다.

Rb 유전자의 intron 17/XbaI 다형성 세가지 다형적인 유전자형(r1/r1, r1/r2, r2/r2)이 관찰 되었으며, 대조군에서 r1, r2의 유전자 빈도는 각각 0.50, 0.50 이었다. 유전자형의 분포가 조직학적으로 흡연 관련 폐암군(Kreyberg type I)과 대조군 또는 폐 선암종군 사이에는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). Kreyberg type I 군에서는 폐 선암종군에 비해 동형접합체(r2/r2 또는 r1/r1) 빈도가 높고 이형접합체(r1/r2) 빈도는 유의하게 낮은 반면, 선암군에서는 이형접합체 빈도가 73.4%로 특징적으로 높았다. 또한 고흡연자군에서의 유전자형의 분포는 비흡연자를 포함한 저흡연자군의 유전자형 분포와 유의한 차이를 보였으며($p = 0.0258$), 이형접합체의 빈도가 유의하게 낮게 검출되었다. 따라서 Rb 유전자의 유전자형이 이형접합체인 경우 흡연관련 폐암 발생 위험이 감소되며, 동형접합체일 경우는 상대적으로 발생 위험이 증가되는 것으로 판단된다.

결 론 :

이상의 결과를 종합해보면, p53 유전자의 다형성 보다는 Rb 유전자 다형성이 한국인의 흡연관련 폐암발생의 유전적 감수성 결정에 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되며, 앞으로 보다 명확한 연관관계 규명을 위

해서는 다른 인종 및 더 많은 수의 환자군에 대한 분석이 요망된다.

참 고 문 헌

1. Nebert DW : Role of genetics drug metabolism in human cancer risk. *Mut Res* 247 : 267, 1991
2. Nakachi K, Imai K, Hayashi S-I, Watanabe J, Kawajiri K : Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 51 : 5177, 1991
3. Nakachi K, Imai K, Hayashi S-I, Kawajiri K : Polymorphism of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in Japanese population. *Cancer Res* 53 : 2994, 1993
4. Nakachi K, Hayashi S-I, Kawajiri K, Imai K : Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphism with adenocarcinoma of the lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis* 16(9) : 2209, 1995
5. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Rannug A : Genetic susceptibility with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1 : A study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 15(6) : 1785, 1994
6. Idle JR : Is environmental carcinogenesis is modulated by host polymorphism? *Mutation Res* 247 : 259, 1991
7. Omenn GS : Future research directions in ecogenetics. *Mutation Res* 247 : 283, 1991
8. Wetson A, Perrin LS, Forrester K, Hoover RN, Trump BF, Harris CC, Caporaso NE : Allele frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Preven* 1 : 481, 1992
9. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S-I : Germ line polymorphism of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis* 14(6) : 1085, 1993
10. Birgander R, Sjalander A, Rannug A, Alexandrie A-K, Sundberg MI, Seidegard J, Tornling G, Beckman G, Beckman L : P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*, 16(9) : 2233, 1995
11. Sjalander A, Birgander R, Athlin L, Stenling R, Rutegard J, Beckman L, Beckman G : P53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 16(7) : 1461, 1995
12. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, Johnson BE, Sakaguchi AY, Naylor SL, Lee WH, Lee EY : Altered structure & expression of human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 50 : 3067, 1990
13. Mori N, Yokota J, Akiyama T, Sameshima Y, Okamoto A, Mizoguchi H, Toyoshima K, Sugimura T, Terada M : Variable mutations of the RB gene in small-cell lung carcinoma. *Oncogene* 5 : 1713, 1990
14. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : P53 mutations in human cancers. *Science* 253 : 49, 1991
15. Knudson AG : Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 10914, 1993
16. Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ : Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241 : 353, 1988
17. Linardopoulos S, Gonos ES, Spandidos DA : Abnormalities of the retinoblastoma gene structure in human lung tumors. *Cancer Lett* 71 : 67, 1993
18. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA,

- Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C, Slamon DJ : Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The lung cancer study group. *Oncogene* 8 : 1913, 1993
19. Ahuja HG, Testa MP, Cline MJ : Variation in the protein coding region of the human p53 gene. *Oncogene* 5 : 1409, 1990
20. Carbone, Chiba I, Mitsudomi T : Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6 : 1691, 1991
21. Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagaki N, Wong A, Wasserman R, Womer RB, Biegel JA : Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene* 9 : 327, 1994
22. Felly-Bosco E, Wetson A, Cawley HM, Bennet WP, Harris CC : Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet* 53 : 752, 1993
23. McDaniel T, Carbone D, Takahashi T, Chumakov P, Chang EH, Pirolo KF, Yin J, Meltzer SJ : The MspI polymorphism in the intron 6 of p53(TP53) detected by digestion of PCR products. *Nucleic Acids Res* 19 : 4796, 1991
24. Hahn M, Serth J, Fislage R, Wolfes H, Allhoff E, Jonas U, Pingoud A : Polymerase chain reaction detection of a highly polymorphic VNTR segment in intron 1 of the human p53 gene. *Clin Chem* 39 : 549, 1993
25. Bookstein R, Lai C-C, To H, Lee W-H : PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma(RB) gene. *Nucleic Acids Res* 18 : 1666, 1990
26. McGee TL, Cowley GS, Yandell DW, Dryja TP : Detection of the XbaI RFLP within the retinoblastoma locus by PCR. *Nucleic Acids Res* 18 : 207, 1990
27. Ulrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, Apella E : The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 267 : 15259, 1992
28. Suzuki H, Takahashi T, Kuroishi T, Suyama M, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R : P53 mutations in non-small cell lung cancer in Japan : association between mutations and smoking. *Cancer Res* 52 : 734, 1992
29. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH : Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 : 1233, 1990
30. Hiyama K : Duplication polymorphism within the third intron of the p53 gene is a rare event in Japanese population. *Jpn J Hum Genet* 39 : 193, 1994
31. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B : Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252 : 1708, 1991