

□ 원 저 □

비소세포 폐암에서 FHIT 유전자의 발현소실의 임상적의의 및 세포고사 및 세포분열주기에 미치는 영향[†]

원광대학교 의과대학 내과학교실

김학렬, 양세훈, 정은택

=Abstract=

Loss of FHIT Expression in Non-Small Cell Lung Cancer; The Clinical Significance and Effects on Apoptosis and Cell Proliferation Cycle

Hak-Ryul Kim, M.D., Sei-Hoon Yang, M.D. and Eun-Taik Jeong, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Korea

Background : 3p deletion has been shown to be the most frequently occurring change in lung cancers, suggesting the presence of a tumor suppressor gene in this region. Recent attention has focused on a candidate 3p14.2 tumor suppressor gene, FHIT. Therefore, the association of the expression of FHIT, with apoptosis, cell proliferation cycle and the clinicopathological features, including survival, were investigated.

Materials and methods : 83 patients with non-small cell lung cancer, who underwent curative operation, between Jan. 1996 and Aug. 2000, at the Wonkwang university hospital, were analyzed. The expression of the FHIT was identified by immunohistochemical staining, and rate of apoptosis and cell proliferation cycle by flow cytometry.

Results : 43% (36/83) of patients exhibited no FHIT expression. The rates of FHIT loss were 52% (28/54), 22% (5/23), 50% (3/6); 30% (11/37), 48% (16/33), 69% (9/13); 54% (30/56) and 22% (6/27), in squamous cell cancers, adenocarcinomas, large cell cancers, TNM stages I, II and III, smokers and non-smokers, respectively. All the differences in FHIT loss rates, according to the histopathology, TNM stages and smoking habits, were statistically significant. The median survival time and 2-year survival

[†] 본 연구는 2001학년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence:

Eun Taik Jeong, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Wonkwang University,
Sinyong-dong, Iksan, 570-711, Korea

Phone : 063-850-1073 Fax : 063-855-2025 E-mail : jetpul@wonkwang.ac.kr

rate of the FHIT(-) group were 24 months and 44%, and those of the FHIT(+) group were 25 months and 51% ($p>0.05$), respectively. The apoptotic rate of the FHIT(-) and FHIT(+) groups were 50.72 (± 13.93) and 59.38 (± 14.33)%, respectively ($p=0.01$). The S- and G1-phase fractions of the FHIT(-) and FHIT(+) groups were 13.93 (± 7.35) and 51.50 (± 23.15)% and 15.65 (± 6.59) and 54.16 (± 20.25)%, respectively ($p>0.05$).

Conclusion : The loss of FHIT expression was increased to a greater extent with advancing TNM stage, smoking habits and squamous cell cancer compared to the adenocarcinomas. However, no survival differences were found according to the expression of FHIT. The apoptotic rate of the FHIT(+) group was greater than in the FHIT(-) group, but differences in the S- and G1-phase fractions, according to the expression of the FHIT, were not found. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2003, 54:610-620)

Key words : Lung cancer, FHIT, Survival, Apoptosis, Cell cycle.

서 론

인체의 염색체 중 3번 염색체의 단완(short arm, 이하 3p)의 부분적인 결손은 비소세포 및 소세포 폐암에서 흔히 발견되며, 발암의 조기과정인 과형성(hyperplasia)과 이형성(dysplasia) 및 상피내 암종(carcinoma in situ)의 단계에서도 3p의 부분적인 결손이 관찰된다^{1,2}. 3p의 부분적 결손이 이루어지는 부위에 암억제 유전자가 존재하다가 암억제 기능이 소실되어 결과적으로 발암과정을 밝게되리라 추정되며, 최근까지 4개의 뚜렷한 3p 결손부위, 즉 3p12, 3p14, 3p21, 3p24-5가 발견되어, 암억제 유전자 후보로서의 연구가 진행되고 있으나, 현재까지 이렇다할 확실한 암억제 유전자를 발견하지는 못하고 있다. 그러나 3p 결손부위 중 3p14.2에 위치하고 있는 FHIT(fragile histidine triad)유전자가 지금까지의 연구결과 중 가장 유력한 후보로 인식되고 있다. 이 3p14.2 부위는 FHIT 외에도 가족성 투명세포 신세포암(familial clear cell renal cell carcinoma)의 발생과 관련이 높은 염색체 전위 t(3;8)(p14.2;q24.1)의 부위이기도하며,

인체 염색체 중 가장 취약한 부분으로서 주목받는 FRA3B의 위치이기도 하여, 더욱 더 이 부위가 암억제에 중요한 곳이라는 인식이 높아지고 있다^{3,4}(Fig. 1).

저자들은 이러한 염색체에서의 위치 상 특성과 관련이 높은 3p14.2의 FHIT 유전자의 비소세포 폐암에서의 특성을 찾아보고자 하였다. 먼저 면역조직화학 염색법으로 paraffin 고정 폐암 조직에서의 FHIT의 발현 여부를 확인한 후, 병리 조직학적 분류, TNM 병기 그리고 흡연여부에 따른 FHIT 소실을 비교하였으며, FHIT 소실에 따른 비소세포 폐암 환자의 생존율을 비교 분석하였다. FHIT 소실 폐암의 세포주에 FHIT를 주입시키면 세포집락 생성능이 감소됨이 확인됨에 따라⁵, 암세포의 성장의 주요한 요소인 세포고사 및 세포분열에 미치는 FHIT의 영향을 확인하였다. 세포고사의 정도는 유식세포 분석법(Flow cytometry)에 의해서 파악된 DNA histogram상 sub-G₁ peak 이하 부위의 비율로 하였으며 세포분열의 정도는 역시 DNA histogram상에서의 S-phase fraction(이하 SPF)으로 하여 검색하였다.

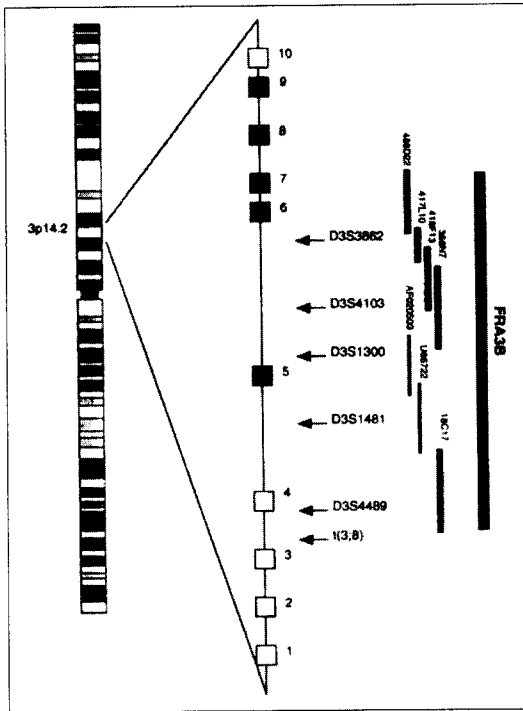


Fig. 1. FHIT gene organization in 3p14.2 contains FRA3B and t(3;8).

대상 및 방법

대상군은 원광대학병원에서 1996년 1월부터 2000년 8월까지 원발성 비소세포 폐암으로 확진 후 치료 목적의 외과적 절제술에 의해 채취되어 paraffin에 보관된 83예의 폐암 조직절편을 사용하였다. 남녀비는 66:17례였고, 중간 연령은 65세였으며, 병리조직학적 분류는 편평상피암 54례, 선암 23례, 대세포암 6례였으며, TNM 병기 I기 37례, II기 33례, III기 13례였으며, 흡연경험군(금연자 포함) 56례, 비흡연군 27례였다(Table 1).

대상 가검물은 paraffin에 보관된 조직을 4 μ m로 절편한 후, histoclear 용액으로 paraffin을 제거한 다음, 100%, 95%, 75%, 50% ethanol에 연속적으로 처리하여 재수화 시킨 후, 비특이적 peroxidase 작용을 차단키 위해 3% H₂O₂로 처리한 후, 증류수에

Table 1. Characteristics of patients

Sex (male : female)	66 : 17
Age (median)	65 years
Histopathology	54 cases
Squamous Carcinoma	23
Adenocarcinoma	6
Large cell Carcinoma	6
TNM stage	
I	37 cases
II	33
III	13
Smoking	
Smoker	56 cases
Non-smoker	27

담근 다음 PBS(phosphate buffer saline)으로 세척한 후, 비특이적 항체 결합을 막기 위해 non-immune goat serum(5%, pH 7.6)으로 20분간 처리한 후, FHIT 일차 항체(IGL, Gunma, Japan)를 40℃에서 반응시켰다. 이후의 반응은 면역화학 염색법의 공통적인 것으로서, biotin이 결합된 2차 항체를 작용시키고, avidin이 결합된 peroxidase reagent를 반응시키면 biotin과 avidin이 결합되어 FHIT에 peroxidase가 부착된다. 여기에 3-amino-9-ethyl-carbazole과 반응하여 갈색반응을 일으키게 한 후 Hematoxylin-Eosin 염색으로 대조 염색시킨 후 FHIT의 발현을 확인하였다. FHIT는 암세포 외에도 정상 기관지 상피세포, 기관지 점액선 등에서도 발현되므로, FHIT 발현의 감소를 정상화하기는 매우 곤란하므로, FHIT 소실의 여부에 따른 임상적 차이를 확인하기 위하여 FHIT 발현 및 소실군으로 분류하였다(Fig. 2,3,4).

해당 병리조직의 세포 분열주기와 세포고사의 측정을 위한 실험 방법은 다음과 같다. paraffin 보관 조직을 절편하여 paraffin 제거와 재수화시킨 후 0.5% pepsin 용액에 처리하여 단일세포 부유액을 만든다. 채취된 단일세포 부유액은 PBS(pH 7.2)로 세척한 후 세포수가 10⁶/ml 정도로 되게 조

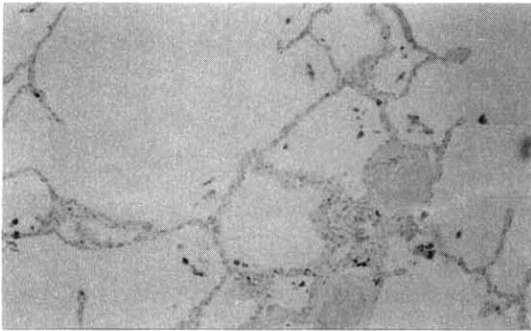


Fig. 2. FHIT(+) in normal lung tissue(HE counter stain, 400×).

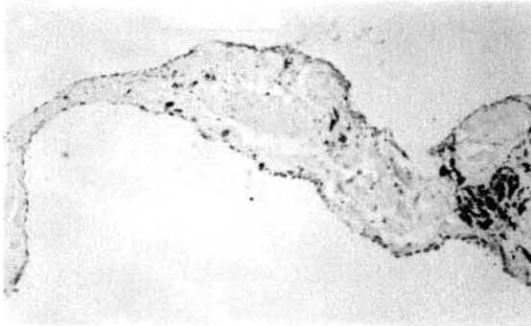


Fig. 3. FHIT(+) in lung cancer tissue(HE counter stain, 400×).

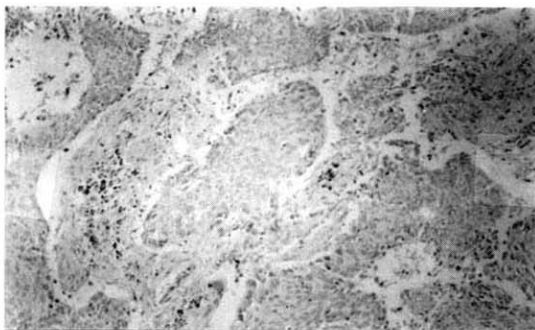


Fig. 4. FHIT(-) in lung cancer tissue(HE counter stain, 400×).

정한 후 propidium iodide 용액으로 DNA를 염색한 후 RNAse를 이용하여 RNA를 제거하였다. Propidium iodide 용액에 의한 염색이 끝난 후 단일세

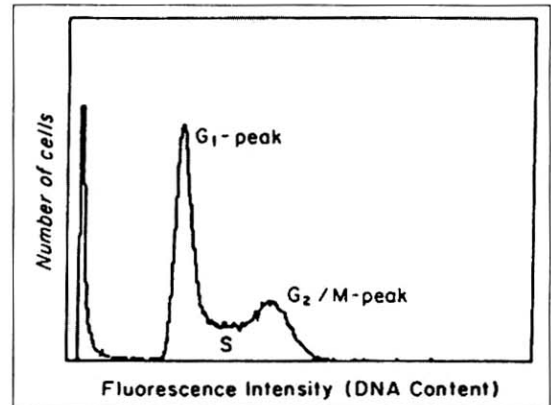


Fig. 5. Flow cytometric DNA histogram shows sub-G₁, S, G₁ phase fraction.

포 부유액은 40 μ m의 nylon망으로 거른 후 전체 세포수가 10^5 /ml 정도이면 시료로서 분석이 가능하였다. 사용된 유식 세포 분석기는 FACStar(Fluorescent Activated Cell Sorter, Becton Dickinson Immunocytometry System, USA)로서 488nm의 파장을 발산하는 Argon LASER를 갖추고 있다. DNA양을 측정하기 위해 사용되는 DNA 염색물질인 propidium iodide는 488nm의 파장에서 610nm의 파장으로 작동되는 형광물질로서, 형광의 발하는 강도에 따라 DNA양을 측정할 수 있다. 시료의 신뢰도를 위해서 CV(Coefficient of Variation)가 8 이하인 경우만을 채택하였으며, FACStar에 내장되어진 Becton Dickinson Immunocytometry System에 의한 DNA histogram을 얻은 후, 세포분열의 정도를 반영하는 SPF를 DNA histogram 상 G₁ peak와 G₂/M peak 사이의 양으로 측정하였고, 세포 정체의 정도는 같은 방법으로 G₁ phase fraction(이하 G1PF)으로 측정하였다. 세포고사의 정도는 역시 같은 DNA histogram 상 sub-G₁ peak 부위에서 염색되는 파편화된 핵의 DNA 양으로 측정하였다(Fig. 5).

폐암의 병리조직형, TNM 병기, 흡연여부에 따른 FHIT 발현 여부의 비교는 Chi-square로 검정

Table 2. Survival of patient

	Median survival	2-year survival
Histopathology*		
Squamous Carcinoma	26 months	53 %
Adenocarcinoma	19	37
Large cell Carcinoma	18	40
TNM stage**		
I	37 months	62 %
II	24	47
III	12	10

*p=0.04 between squamous & adenocarcinoma.

**p=0.0054 between stage I, II & III.

Kaplan-Meier curve

하였으며, FHIT 발현 여부에 따른 SPF, G1PF, 세포괴사의 비교는 Student's t test로 하였으며, FHIT 발현 여부에 따른 생존율과 중간 생존기간은 Kaplan-Meier curve로 구하였으며, 양군간의 비교는 generalized-Wilcox로 비교검정하였으며, 전 검정에서 p값이 0.05 이하이면 통계학적으로 유의성을 부여하였다.

결 과

1. 전 대상군의 생존율 및 중간 생존기간

전 대상군 83례에서의 중간 생존기간 및 2년 생존율은 TNM I 병기(37례)가 37개월 62%, II 병기(33례)가 24개월 47%, III 병기(13례)가 12개월 10%로서 통계학적으로 유의하게(p=0.0054) TNM 병기가 진행될수록 예후는 불량하였다. 병리조직학적 분류에 의한 중간 생존기간 및 2년 생존율은 편평상피암(54례)이 26개월 53%, 선암(23례)이 19개월 37%, 대세포암(6례)이 18개월 40%로서 전 군별로는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, 편평상피암군과 선암군만을 서로 비교하면 통계학적으로 유의하게 편평상피암군보다 선암군의 예후가 불량하였다(p=0.04) (Kaplan-Meier curve, generalized-Wilcox test) (Table 2).

2. FHIT 발현소실의 임상적 의의

전 83례 중 36례(43%)에서 FHIT 소실이 확인되었다. 병리조직학적 분류별로는 편평상피암 54례 중 28례(52%), 선암 23례 중 5례(22%), 대세포암 6례 중 3례(50%)에서 FHIT의 소실이 있었으며, 통계학적으로 유의하게 편평상피암군이 선암군보다 FHIT 소실이 높았다(p=0.048). TNM 병기별로는 I 병기가 37례 중 11례(30%), II 병기가 33례 중 16례(48%), III 병기가 13례 중 9례(69%)로서, TNM 병기가 진행될수록 FHIT 소실이 증가하였다(p=0.035) (Table 3).

3. 흡연여부에 따른 FHIT의 발현여부

흡연 경험군(금연자 포함)은 56례 중 30례(54%), 비흡연군 27례 중 6례(22%)가 FHIT 소실이 있었으며, 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(p=0.007) (Table 3).

4. FHIT 발현여부에 따른 생존율의 비교

FHIT 소실군(43%)과 발현군(57%)의 중간 생존기간은 24개월, 25개월이었고, 2년 생존율은 44%,

Table 3. FHIT expression

	FHIT (-)	FHIT (+)
Total	36 cases (43%)	47 cases (57%)
Histopathology*		
Squamous Carcinoma	28 cases (52%)	26 cases (48%)
Adenocarcinoma	5 (22%)	18 (78%)
Large cell Carcinoma	3 (50%)	3 (50%)
TNM stage**		
I	11 cases (30%)	28 cases (70%)
II	16 (48%)	17 (52%)
III	9 (69%)	4 (31%)
Smoking***		
Smoker	30 cases (54%)	26 cases (46%)
Nonsmoker	6 (22%)	21 (78%)

* p=0.048 between squamous & adenocarcinoma.

** p=0.035 between stage I, II & III.

*** p=0.007. Chi-square

Table 4. Survival according to FHIT expression

	FHIT (-)	FHIT (+)
Median survival	24 months	25 months
2-year survival	44 %	51 %

p=0.84. Kaplan-Meier curve

Table 5. Apoptosis and cell cycle rates according to FHIT expression

	FHIT (-)	FHIT (+)
Apoptosis (%)*	50.72 (\pm 13.93)	59.38 (\pm 14.33)
S-phase fraction (%)	13.93 (\pm 7.35)	15.65 (\pm 6.59)
G ₁ -phase fraction (%)	51.50 (\pm 23.15)	54.16 (\pm 20.25)

*p=0.01, mean(\pm S.D.)

51%로서 유의한 생존율의 차이를 발견할 수 없었다(p>0.05, Kaplan-Meier curve, generalized-Wilcoxon test) (Table 4).

5. FHIT 발현 여부에 따른 세포고사 및 SPF, G1PF의 비교

암세포의 세포고사를 반영하는 sub-G₁ fraction이 FHIT 소실군이 50.72(\pm 13.93)%이고, FHIT 발현

군은 59.38(\pm 14.33)%로서 통계학적으로 유의하게 FHIT 소실군의 세포고사 비율이 낮았다(p=0.01).

암세포의 세포분열능을 반영하는 SPF는 FHIT 소실군이 13.93(\pm 7.35)%이고 FHIT 발현군이 15.65(\pm 6.59)%로서 양군간의 유의한 차이는 없었다. 암세포의 증식 정제능을 반영하는 G1PF는 FHIT 소실군이 51.50(\pm 23.15)%이고, FHIT 발현군이 54.16(\pm 20.25)%로서, 양군간의 유의한 차이는 없었다 (Table 5).

고 찰

인체의 3번 염색체의 단완(3p)의 이형체 소실(loss of heterozygosity 이하 LOH)은 두경부, 신장, 위, 유방, 자궁경부, 난소의 암 외에 폐암에서도 흔히 발견된다^{6,7}. 이런 장기의 상피성 종양의 발암과정에 관여하는 종양억제 유전자의 위치가 LOH 연구에 의해서 3p에서는 3p12, 3p14, 3p21, 3p24-25의 네 부위가 주로 규명되었다⁸. 폐암에서는 3p 중에서 3p14.2가 주로 결손 되는 부위로서, 이 부위는 가족성 투명세포 신세포암의 발생에 관여하는 염색체 전위 t(3;8)(p14.2;q24.1)의 부위이며³, 인체 염색체 중 가장 취약한 부분을 나타내는 FRA3B의 위치이기도 하다⁴. FHIT 유전자는 3p14.2에서 t(3;8)과 FRA3B를 포함하는 1 megabase의 DNA로서 10개의 exon을 가지고 있으나, coding exon은 5부터 9까지의 5개로서, 1.1 kilobase의 mRNA가 표현되며, 이에 의한 16.8 kD의 단백질은 *Schizosaccharomyces pombe*가 생산하는, diadenosine tetraphosphate(Ap₄A)를 ATP와 AMP로 분해하는 효소인 비대칭적 Ap₄A 가수분해효소와 59%의 동질성을 보이는 것으로 밝혀졌다⁹(Fig. 1). 즉, diadenosine triphosphate hydrolase activity를 가지고 있으며, histidine triad(HIT) gene family에 속하기 때문에 Fragile histidine triad의 약자로 FHIT라 명명되었다. FHIT 유전자가 실제로 세포 내에서 어떠한 기능을 하는지에 대해서는 현재 연구 중에 있다. 다만, diadenosine 대사에 관여할 것이라는 추측을 할 수 있는 정도이다. 이러한 dinucleotide oligophosphate대사와 발암과정간의 관련성은 암억제 유전자 중에서도 FHIT 유전자에서 처음으로 제시된 것이라 할 수 있어 더욱 주목을 받고 있다. 이러한 암억제 기능을 가졌을 것으로 판단되는 FHIT 유전자는 폐암의 조직에서 면역조직화학염색법에 의해 소실이 확인되었으며, 정상 조직에서는 정상 상피에서 비교적 발현이 되었

고¹⁰, Nude mouse의 실험에서 FHIT 유전자를 주입한 종양세포는 유의하게 종양의 성장이 억제됨을 확인하였다¹¹.

흡연은 폐암의 발생과 매우 밀접한 관계가 있다. 흡연에 의해서 DNA 손상이 일어나거나, 발암 유전자가 자극되기도 하며, 또는 암억제 유전자가 억제 당하기도 한다. Sozzi 등¹²에 의하면 폐암 환자 91명 중 흡연자 51명중 41명(82%)에서 FHIT 소실이 나타났으며, 비흡연자 40명중에는 불과 7명(22%)만이 FHIT 소실이 확인되었다(p=0.0001). Mao 등¹³은 최근 흡연자군과 금연자군에서의 FHIT 소실율을 비교하였는데, 통계학적 유의성에 이르지 못하였으나, 각각 82%, 62%로서 최근 흡연자군의 FHIT 소실율이 높았다고 보고하였다. 그리고 Wistuba 등¹⁴은 폐암이 없는 흡연경험자와 비흡연자의 기관지 생검 조직에서 3p의 LOH를 검색한 결과, 흡연 경험자의 86%에서 LOH가 발견되었으나, 비흡연자에서는 LOH가 전혀 발견되지 않았다고 하였다. 그리고 Tseng 등¹⁵은 만성 흡연자의 기관지 생검 조직에서 화생(metaplasia)부위와 정상부위의 FHIT 소실율은 각각 47%와 20%로서 통계학적으로 유의하게 화생부위의 FHIT 소실의 비율이 높았다고 하였다. 이로서 폐암의 발암과정에 있어서 FHIT와 흡연은 매우 밀접한 관계라고 할 수 있겠다. 본 연구에서도 전체 83명중 36명(43%)이 FHIT 소실이 발견되었으며, 흡연자군은 56명중 30명(54%), 비흡연자군은 27명중 6명(22%)으로서 통계학적으로 유의하게, 흡연자군에서의 FHIT 소실의 비율이 높았다(p=0.007)(Table 3).

FHIT소실과 흡연은 매우 밀접한 관계가 있으므로, 원발성 폐암 중 흡연과 관계가 깊은 편평상피암과 소세포암이, 흡연과의 관계가 비교적 덜한 선암보다 FHIT 소실이 높을 것으로 유추가 가능하다. Tomizawa 등¹⁶은 TNM I 병기의 비소세포폐암 105명에서, 편평상피암은 28명중 24명(86%)이 FHIT 소실을 보였으나, 선암은 67명중 7명(10%)만의

FHIT 소실을 보고하였다($p=0.001$). Sozzi 등^{17,18}은 FHIT 소실비율이 편평상피암군 87%(202/233), 선암군 57%(112/196), 대세포암군 31%(14/45)로서 서로 유의하게 FHIT 소실율의 차이를 보여주었고, 소세포암군은 80%에서 FHIT 소실을 보고하였다. 본 연구에서도 FHIT 소실율이 편평상피암은 54명중 28명(52%)이고 선암은 23명중 5명(22%)으로서, 역시 통계학적으로 유의하게, 편평상피암군의 FHIT 소실율이 선암군보다 높았다($p=0.048$)(Table 3).

신세포암에 있어서, 낮은 악성도, 저병기에서는 FHIT가 발현되지 않았으며, 높은 악성도, 고병기에서는 FHIT가 단지 감소하기만 하였다¹⁹. 그리고 폐암의 전단계에서는 93%에서 FHIT 소실이 발견되었으나, 폐암의 단계에서는 75%에서 FHIT 소실이 발견되었다¹⁰. 즉 폐암의 진행과정 중 비교적 초기 발암 단계에서 FHIT 소실이 이루어진다고 추정하였다¹³. 그러나, 기관지 이형성(dysplasia)은 20례 중 17례(85%)에서 FHIT 소실이 있었으나, 오히려 상피내 암종(carcinoma in situ)에서는 25례 중 25례(100%)에서 FHIT 소실을 보고한 결과¹⁷도 있어, FHIT 소실이 폐암의 발암 초기 단계에만 관련한다고 보기는 어렵다. Pylkkanen 등²⁰은 TNM 병기가 진행될수록 유의하게 FHIT 소실이 있었다고 하였으나, Burke 등²¹은 FHIT 소실과 TNM 병기의 진행과는 유의한 관계가 없다 하였다. 본 연구에서는 FHIT 소실율이 TNM I 병기에서는 37명중 11명(30%), II 병기에서는 33명중 16명(48%), III 병기에서는 13명중 9명(69%)으로서, 통계학적으로 유의하게, TNM 병기가 진행할수록 FHIT 소실의 비율이 높았다($p=0.035$)(Table 3).

Tomizawa 등¹⁶은 TNM I 병기의 비소세포 폐암에서 FHIT 소실군이 발현군보다 유의하게 생존율이 불량하다고 하였으며, Burke 등²¹도 역시 FHIT 소실군의 예후불량의 유의함을 보고하였다. 그러나 Pavelic 등²²은 폐암 환자중 FHIT 소실군과 발현군의 중간 생존기간은 각각 22.46개월과

36.04개월이었으나 통계학적 유의성에 이르지지는 못하였다고 하였다. 그리고 Geradts 등²³은 FHIT 소실과 생존율과의 유의한 관계는 없었다고 하였으며, Tseng 등¹⁵도 TNM I 병기의 비소세포 폐암환자군에서 FHIT 소실과 생존율과는 유의한 관계가 없다고 하였다. 본 연구에서는, 중간 생존기간과 2년 생존율이 FHIT 소실군은 24개월, 44%였고, FHIT 발현군은 25개월, 51%로서 양군간의 유의한 차이는 없었다.

FHIT 유전자의 정확한 생물학적 기능에 대해서는 지금도 연구중이다. FHIT는 효모효소의 하나인 Ap4A 가수분해효소의 기능을 가지고 있으며, 이러한 diadenosine 대사와 관여하여 결과적으로 발암 과정을 억제하는 기능이 있으리라 추정되었다²⁴. FHIT가 없는 폐암 H460 세포주에 FHIT를 주입한 후 액체배지에서 배양한 결과 성장시간이 증가되었으며, 한천배지상에서도 집락형성이 감소하였으며, 체내 실험으로서는 nude mouse에 암세포주를 주입하면서, FHIT를 첨가한 경우에 대조군에 비하여 암의 형성이 억제되었다²⁴. 즉 FHIT가 dinucleotide polyphosphate와 결합하여 FHIT-Ap3A가 되어, 암 억제의 신호를 전달하는 것으로 규명되고 있다²⁵. 암의 형성과정에 중요한 요소는 세포고사에 의한 세포의 탈락감소와 세포분열에 의한 세포 신생간의 부조화이다. FHIT의 암 억제 작용이 이러한 세포고사와 세포분열에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. Sard 등⁵은 폐암 H460/FHIT(+) 세포주에서 TUNEL assay(TdT mediated dUTP Nick End Labelling)로서, 세포고사에 의한 DNA 파괴를 확인하였고, 이어서 H460/FHIT(+)와 H460/FHIT(-) 세포주에서 유식세포 분석법에 의해서 세포고사율(sub-G₁ peak)을 비교하였더니, H460/FHIT(+)가 44~47%, H460/FHIT(-)가 15%로서 FHIT가 암세포의 세포고사를 촉진시킨다고 하였으며, 여기에 p53, Bcl2, BclX, Bax 등은 관여하지 않으며, p21^{WAF}, Bak는

함께 증가하나 그 관계는 확실치 않다 하였고, 반면에 Roz 등²⁶은 caspase-8이 FHIT의 세포고사 촉진기능에 주 역할을 한다고 하였다. 그리고 발암능이 매우 높은 폐암 H1299 세포주에서도 FHIT 주입으로 세포고사가 증가되어서 발암능의 85~90% 정도가 소실되었음이 보고되었다¹¹. 본 연구에서도, 83명의 대상군에서, FHIT 소실군 36례와 FHIT 발현군 47례의 세포고사율은 각각 50.72(\pm 13.93)%, 59.38(\pm 14.33)%로서, 통계학적으로 유의하게 FHIT 발현군의 세포고사율이 높았다($p=0.01$).

FHIT의 생물학적 기능에 세포고사 촉진 외에, 세포분열 촉진 즉 세포분열주기 중 정체를 나타내는 G₁ 상태에서 분열기를 나타내는 S 상태로의 이행억제 기능 즉 G₁ arrest 기능이 있으며, 이런 과정이 G₁ arrest 기능의 주 요소인 p53과는 무관하다고 Sard 등⁵은 보고하였다. Ji 등¹¹도 FHIT를 adeno-virus를 매개로 하여 폐암 H1299 세포주에 주입한 후에 유식세포 분석법으로 분석한 결과, 세포분열 정체를 나타내는 G1PF가 FHIT 주입군과 대조군에서 각각 32%, 8%로서 유의하게 FHIT 주입군의 G₁ arrest 기능이 있음을 보고하였다. 반면에 Guo 등²⁷은 293 T 암세포주에 FHIT를 주입하여도 암세포의 성장은 억제되나, 세포분열 정체를 나타내는 G₁ arrest는 확인하지 못하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 G₁ arrest를 반영하는 G1PF가 FHIT 소실군과 발현군에서 각각 51.50(\pm 23.15)%, 54.16(\pm 20.25)%로서, 양군간의 유의한 차이는 없었으며, 세포분열능을 반영하는 SPF는 FHIT 소실군과 FHIT 발현군에서 각각 13.93(\pm 7.35)%, 15.65(\pm 6.59)%로서 역시 양군간의 유의한 차이는 없었다.

결론적으로 본 연구에 의하면, FHIT의 암억제 기능은 세포고사의 촉진에 의한다고 할 수 있겠다.

요 약

연구배경 :

폐암에서 가장 흔한 염색체 결손부위인 3p14.2 결

손에 따른 FHIT 자체 기능 즉 암억제 기능의 소실이 폐암의 형성과정에 중요한 기능이 있으리라 생각된다. 흡연 여부, 병리조직학적, TNM 병기 진행에 따른 FHIT 소실여부를 확인하고, 또 흡연및 생존률과의 관계, FHIT의 기능 특히 암 세포의 세포고사, 세포분열에 미치는 영향을 확인하였다.

방 법 :

원발성 비소세포 폐암으로 근치적 절제술을 시행 받은 83례의 paraffin 보관 병리 조직을 절편하여 면역조직화학염색법으로 FHIT의 소실 여부를 확인한 후, 여러 임상적 인자들과의 관계를 파악하고, 유식세포 분석법에 의해, sub-G₁ peak로서 세포고사의 정도를, S-phase fraction과 G₁-phase fraction으로서 세포분열주기에 미치는 영향을 확인하였다.

결 과 :

전체 83례 중 36례(43%)에서 FHIT가 소실되었고, FHIT 소실율이 편평상피암 52%, 선암 22%; TNM I 병기 30%, II 병기 48%, III 병기 69%; 흡연경험자 54%, 비흡연자 22%로서, 선암보다는 편평상피암에서, TNM 병기가 진행할수록, 흡연의 경험에 있을수록 FHIT 소실율이 높았다. FHIT 소실군과 발현군의 중간 생존기간은 24개월, 25개월, 2년 생존율은 44%, 51%로서 FHIT 소실여부에 따른 생존율의 차이는 없었다. 세포고사율은 FHIT 소실군과 발현군에서 각각 50.72(\pm 13.93)%, 59.38(\pm 14.33)%로서 유의한 차이가 있었으며, FHIT 소실군과 발현군에서의 S-phase fraction은 각각 13.93(\pm 7.35)%, 15.65(\pm 6.59)% G₁-phase fraction은 각각 51.50(\pm 23.15)%, 54.16(\pm 20.25)%로서 각 군간의 유의한 차이는 없었다.

결 론 :

FHIT는 인체의 비소세포 폐암의 43%에서 소실되었고, 흡연의 경험에 있을수록, 선암보다는 편평상피암일수록, TNM 병기가 진행할수록 유의하게 FHIT 소실이 높았고, FHIT 소실여부에 따른 생존율의 차이는 없었다. FHIT 소실군에서 발현군보다

세포고사율이 유의하게 낮았으며, S 및 G₁ phase fraction의 차이는 없었다.

참 고 문 헌

1. Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, et al. Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987;317:1109-13.
2. Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, et al. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA* 1995;273:1908.
3. Glover TW, Coyle-Morris JF, Li FP, Brown RS, Berger CS, Gemmill RM, et al. Translocation t(3;8)(p14.2;q24.1) in renal cell carcinoma affects expression of the common fragile site at 3p14(FRA3B) in lymphocytes. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;31:69-73.
4. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM. The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 1998;32:7-31.
5. Sard L, Accornero P, Tornelli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, et al. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8489-92.
6. Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 1992;7:445-9.
7. Yang-Feng TL, Han H, Chen KC, Li SB, Claus EB, Carcangiu ML, et al. Allelic loss in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1993;54:546-51.
8. Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 1993;260:1317-20.
9. Huang Y, Garrison PN, Barnes LD. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5'''-P₁P₄-tetraphosphate (Ap4A) asymmetrical hydrolase : sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem J* 1995;312:925-32.
10. Sozzi G, Tornelli S, Tagliabue E, Sard L, Pezzella F, Pastorino U, et al. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with Fhit gene abnormalities. *Cancer Res* 1997;57:5207-12.
11. Ji L, Fang B, Yen N, Fong K, Minna JD, Roth JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res* 1999;59:3333-9.
12. Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, et al. Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res* 1997;57:2121-3.
13. Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:857-62.
14. Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* 2001;28(2 Suppl 4):3-13.
15. Tseng JE, Kemp BL, Khuri FR, Kurie JM,

- Lee JS, Zhou X, et al. Loss of Fhit is frequent in stage I non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Res* 1999;59:4798-803.
16. Tomizawa Y, Nakajima T, Kohno T, Saito R, Yamaguchi N, Yokota J. Clinicopathological significance of Fhit protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:5478-83.
17. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res* 1998;58:5032-7.
18. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Coticelli MG, Inoue H, et al. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996;85:17-26.
19. Hadaczek P, Kovatich A, Gronwald J, Lubinski J, Huebner K, McCue PA. Loss or reduction of Fhit expression in renal neoplasias : correlation with histogenic class. *Hum Pathol* 1999;30:1276-83.
20. Pylkkanen L, Wolff H, Stjernvall T, Tuominen P, Sioris T, Karjalainen A, et al. Reduced Fhit protein expression and loss of heterozygosity at Fhit gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients. *Int J Oncol* 2002;20:285-90.
21. Burke L, Khan MA, Freedman AN, Gemma A, Rusin M, Guinee DG, et al. Allelic deletion analysis of the FHIT gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1998;58:2533-6.
22. Pavelic K, Krizanac S, Cacev T, Hadzija MP, Radosevic S, Crnic I, et al. Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis—clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 2001;7:442-53.
23. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Minna JD. Loss of Fhit expression in non-small-cell lung cancer : correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features. *Br J Cancer* 2000;82:1191-7.
24. Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, et al. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13771-6.
25. Huebner K, Sozzi G, Brenner C. FHIT loss in lung cancer:diagnostic and therapeutic implication. *Adv Oncology* 1999;15:3-10
26. Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3615-20.
27. Guo Z, Vishwanatha JK. Effect of regulated expression of the fragile histidine triad gene on cell cycle and proliferation. *Mol Cell Biochem* 2000;204:83-8.