대부종콜포회지 제8권 제4호 1997
Vol. 8, No. 4, Dec., 1997

임신성 영양막세포 종양에서 p53 종양억제유전자의 돌연변이에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실, 생화학교실* 의과학 연구소 분자생물학부
김승철 · 문혜성 · 김형래*

=Abstract=

Mutation in p53 Tumor Suppressor Gene in Gestational Trophoblastic Neoplasia

Seung Cheol Kim, Hye Sung Moon, Hyung Rae Kim*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Biochemistry, College of Medicine, Molecular Section, Ewha Medical Research Center, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

This study attempted to determine the status of tumor suppressor gene p53 in gestational trophoblstic neoplasia. In this study, 19 cases of hydatidiform moles and two choriocarcinoma cell lines(JAR, JEG-3) were evaluated for the presence of alterations of p53 gene. The p53 mutations were evaluated by nonisotopic polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) and automatic sequencing of PCR products in exons 5, 6, 7, 8. But we could not find any mutations of the p53 gene. This results suggest that p53 mutation maybe rarely involved in the pathogenesis of gestational trophoblastic neoplasia. And nonisotopic SSCP analysis by ethidium bromide staining is considered as an useful method for detecting single base differences in PCR products.

Keywords: p53 gene, Gestational Trophoblastic Neoplasia

I. 서 론

인간의 종양을 대상으로 한 유전학적 연구에 의하면 여러 유전자의 결함(defect)이 발생하여 축적되고, 이러한 결함이 생긴 유전자들의 상호작용에 의하여 세포의 성장조절에 이상이 발생하며, 결과적으로 암으로 발전하는 것임을 알 수 있다.[1] 세포의 성장조절에 관여하는 종양억제유전자(tumor suppressor gene)는 정상적인 세포성장을 조절, 유지시켜주는 기능을 지니고 있으나, 유전자의 결함이 발생되면 그 기능이 상실되고 발암 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[2] 지금까지 알려진 종양억제유전자 중의 하나인 p53

* 이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의해 이루어진 것임.

유전자의 돌연변이는 이미 대장, 유방, 폐, 뇌 등과 같은 다양한 장기의 종양에서 발암 과정과 밀접한 관계가 있음이 발표된 바 있다.[3-9] 이러한 p53 유전자는 사람 염색체의 17번(17p13.1)에 위치하며 11개의 exon과 2개의 조절 유전자로 이루어져 있으며,[10,11] 정상(wild-type) p53 단백은 393개의 아미노산으로 구성된 핵내 인단백질(nuclear phosphoprotein)로 급속히 분해되어 미량이 존재하게 된다.[12] 정상 p53 유전자의 기능은 세포주기의 G1 phase에서 S phase로의 전이(transition)을 조절한다. 즉, DNA 손상시 DNA 복제의 G1 phase가 S phase로 전이하는 과정을 억제하므로 DNA 복제가 일시 정지되게 하며,[13-16] 손상된 DNA가 복구되지 못한 세포는 아파토시스(apoptosis) 과정을 거쳐 사망에 이르게 한다.[17] 또한 정상 p53 단백은 p53 responsive element로 불리우는 promotor 부위의 특이한 DNA sequence에 결합하여 유전자의 발현을 유도한다.[18] 이처럼 p53에 의하여 전사가 활성화되는 유전자 중에는 mdm2 유전자가 있으며, mdm2 단백은 feedback regulator로서 p53 유전자에 직접 작용하여 p53 유전자의 전사를 억제한다. 이러한 기능을 하는 p53 유전자에 손상이 발생하면 세포의 성장 및 분화 과정의 조절에 이상이 발생하여 종양 발생의 위험성이 높아지게 된다.[12]

p53 종양억제유전자의 불활성화(inactivation)는 대립인자(allele)에 변이를 미칠 수 있는 여러 기전에 의하여 유발될 수 있다. 즉, p53 종양억제유전자에서 두 개의 대립인자가 모두 변이가 생긴 경우에는 정상(wild-type) p53 단백을 생성할 수가 없게 되며,[7,19,20] 하나의 대립인자에 변이가 발생한 경우에도 정상(wild-type) 단백 사슬(chain)과 비정상(mutant-type) 단백 사슬이 동시에 생성되므로, 이들이 서로 결합하여 생성된 p53 단백은 결국 비정상기능을 지니게 된다.[21-23] p53 유전자의 변이율은 대부분의 종양에서 20－50% 정도로 보고되고 있는데, 구강점막 편평상피암은 81%, 소세포폐암은 70%, 미분화 갑상선암은 68%로 높게 보고되고 있으나, 자궁경부암에서는 5% 정도로 낮게 보고되고 있다.[24] 이러한 p53 종양억제유전자의 돌연변이는 여러 많은 인간의 종양에서 가장 흔히 발생하는 유전자 돌연변이 중의 하나로 알려져 있으며,[25] p53 유전자상의 변이는 대부분이 DNA 결합부위의 'Hot Spot'으로 불리는 특정 부위에 집중되어 나타나, exon 5－8(condons 126－306) 사이에서 95%가 발생하는 것으로 보고되고 있다.[26] 이러한 p53 유전자의 변이 형태도 암의 종류에 따라 달라 대장, 뇌, 림프계 종양에서는 G: C에서 A: T로의 전이(transition)가, 간의 종양에서는 G: C에서 T: A로의 변이(transversion)가, 기타 종양에서는 A: T 염기쌍 부분에 변이되는 경우가 많은 것으로 알려져 있다.[25]

임신성 영양막세포 종양은 영양막세포 질환(trophoblastic disease)으로, 양성종양인 포상기태, 그리고 악성종양인 침윤성 포상기태, 임신성 융모상피암, 태반 부착부 융모상피종 등 4가지가 이에 포함된다. 1976년 Vassilakos와 Kajii[27]가 조직학적으로 포상기태를 완전포상기태(complete mole)와 부분포상기태(partial mole)로 구분하였는데, 일반적으로 완전포상기태는 부분포상기태에 비하여 악성 임신성 영양막세포 종양으로 진행될 가능성이 높은 것으로 알려져 있으며, 포상기태의 약 3－7%는 융모상피암으로 진행되며, 임신성 융모상피암의 약 50%는 포상기태로부터 유래되는 것으로 생각되고 있다. 이러한 포상기태의 병인에 관한 세포유전학적 연구는 이미 잘 이루어져, 완전포상기태는 난자의 염색체는 소실되고 정자의 염색체에 의해서만 세포의 발달이 되는 androgenesis에 의하여 발생함이 밝혀졌다.[28] 그 후 완전포상기태에는 하나의 정자(monospermy)로부터 염색체를 받아 발생된 동형접합성(homozygous) 포상기태와 두 개의 정자(dispermy)로부터 받아 발생된 이형접합성(heterozygous) 포상기태가 존재함이 밝혀졌으며, 그 예후도 달라 이형접합성 포상기태가 동형접합성 포상기태보다 악성화할 위험성이 높은 것으로 알려져있다.[29] 한편 임신성 영양막세포 종양에서의 암유전자(oncogene) 발현에 관한 몇 개의 연구에 의하면 포상기태와 융모상피 세포암 세포주에서 *c-fms*가 과발현됨이 보고된 바 있다.[30-32]

그러나 저자가 아는 바로 임신성 영양막 세포 종양에서의 p53 유전자의 돌연변이에 관한 연구는 국내에서 없었으며, 국외에서도 소수의 연구가 보고되어 있을 뿐이다.[33-35] 이에 본 연구자는 동위원소를 이용하지 않고 ethidium bromide 염색법을 이용하는 중합효소 연쇄반응-단일쇄 형태변환 다

형성(nonisotopic Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism: PCR-SSCP) 분석[36,37] 및 자동 염기서열 결정법(automatic DNA sequencing)을 이용하여 한국인의 포상기태 및 융모상피암 세포주(JAR, JEG-3)에서의 p53 유전자 돌연변이의 양상을 파악하고, 부수적으로 ethidium bromide 염색법을 이용하는 단일쇄 형태변환 다형성(nonisotopic PCR-SSCP) 분석이 p53 유전자의 점상 돌연변이를 찾아내는 데 유용하게 사용될 수 있는지 알아보고자 하였다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 연구 재료

본 연구에서는 2 개의 융모상피암 세포주(JEG-3 및 JAR)와 조직학적으로 포상기태로 진단된 19예의 수태산물(conceptus)로부터 추출한 DNA를 대상으로 하였다. 수태산물의 조직 일부는 조직학적 검사를 위하여 포르말린에 고정시키고, 일부는 DNA 추출에 이용하였다. 19예의 포상기태 중 2예는 부분 포상기태이었으며, 나머지 17예는 완전 포상기태였다.

한편 p53 유전자의 점상 돌연변이(point mutation)가 밝혀져 있는 자궁경부암 세포주 HT-3에서 추출한 genomic DNA와 Human p53 Amplimer Panel(CLONTECH Laboratories, Inc., USA: Catalog #: 6398－1)에 제공되는 wild-type p53 genomic DNA를 가지고 대조실험을 하였다. 본 연구에 사용된 세포주는 모두 미국의 ATCC(American Tissue Culture Company)로부터 구입한 후 배양하여 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 포상기태 조직 및 세포주로부터의 DNA 추출

포상기태 조직 및 암 세포주로부터의 DNA의 추출은 QIAamp® Tissue Kit(QIAGEN Inc., USA & Canada)를 이용하여 QIAamp® Tissue Kit Handbook(QIAGEN, Dec 1996)의 Tissue Protocol에 따라 다음과 같이 시행하였다.

1) 포상기태 조직 약 25 mg을 가능한 잘게 조각으로 자른 후 1.5 ㎖ microfuge tube에 넣고 180 ㎕의 Buffer ATL(Kit에 제공됨)을 첨가한다(암세포주의 경우에는 조직 대신 배양된 세포 10^9개를 넣는다). 2) 20 ㎕의 Proteinase K를 첨가하고, vortexing하여 잘 섞은 후, 55℃에서 조직(세포)이 완전히 분해(lysis)될 때까지 incubation한다. 3) 200 ㎕의 Buffer AL(Kit에 제공됨)을 첨가한 후 vortexing하여 완전히 섞은 후 70℃에서 10분간 incubation 한다. 4) 210 ㎕의 ethanol(96－100%)을 샘플에 넣은 후, vortexing하여 완전히 섞는다. 5) QIAamp spin column(Kit에 제공됨)을 2 ㎖ collection tube(Kit에 제공됨)에 넣고 위에서 준비된 혼합물을 QIAamp spin column에 넣은 후, 8000 rpm에서 1 분간 원심분리한다. 6) 여과되어 나온 것은 버리고 새로운 2 ㎖ collection tube에 5번의 QIAamp spin column을 넣는다. 7) QIAamp spin column을 열고, 500 ㎕의 Buffer AW(Kit에 제공됨)를 넣은 다음 8000 rpm에서 1분간 원심분리 한다. 다시 여과되어 나온 것은 버리고 새로운 2 ㎖ collection tube에 6)의 QIAamp spin column을 넣는다. 8) QIAamp spin column을 열고 500 ㎕의 Buffer AW를 넣은 후 1,3000 rpm에서 3분간 원심분리를 한다. 9) 여과되어 나온 것은 버리고 새로운 2 ㎖ microfuge tube에 8)의 QIAamp spin column을 넣는다. 10) QIAamp spin column를 조심하여 열고 70℃로 미리 데워 놓은 증류수 200 ㎕를 넣은 후 1분간 실온에서 incubation 후 8000 rpm에서 원심분리하여 DNA를 elution해 낸다.

이와 같이 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 A_{260nm}/A_{280nm} ratio가 1.7－1.9인 것을 확인하여 DNA의 순도를 확인하고 농도를 결정하였다.

2) PCR-SSCP를 이용한 p53 유전자의 점변이(point mutation) 분석

(1) Oligonucletides(Primers)

중합효소 연쇄반응에 이용된 Primers는 20 base pair(BP) 전후의 크기로, 이들 primer에 의하여 증폭되는 염기서열의 길이는 대부분 200 bp 전후의 크기가 되며(Fig. 1), p53 exon 5－8에 대한 4 쌍으로 Clontech 사(Palo Alto, California, USA)로부터 구입한 Human p53 Amplimer Panel(CLONTECH Laboratories, Inc., USA: Catalog #: 6398－1)에 제

공되는 것을 이용하였다. 이 primer들의 염기서열과 genomic location은 Table 1과 같다.

Fig. 1. Electrophoresis of PCR products of exon 5—8 on 6% polyacrylamide gel.

(2) 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction: PCR)

중합효소 연쇄반응은 Table 2와 같이 혼합액(mixture)을 최종 volume 50 μℓ에 맞추어 PCR reaction tube에 준비한 후 GeneAmp PCR System 9600(PerkinElmer)을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응은 denaturation은 95℃에서 30초, annealing은 66℃에서 45초, extension은 72℃에서 90 초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반복 시행한 후, 마지막으로 72℃에서 7분간 반응시켰다.

DNA polymerase는 DynaZyme® (Finnzyme Oy, Finland)을 사용하였으며, 중합효소 연쇄반응의 양성대조 실험(positive control)과 음성 대조실험(negative control)을 같이 실행하였는데 양성대조 실험에는 template DNA로 Human p53 Amplimer Panel(CLONTECH Laboratories, Inc., USA: Catalog #: 6398—1)에 포함되어 있는 정상(wild-type) human genomic DNA를, 음성 대조실험에는 template DNA대신 H_2O를 넣어 시행하였다.

(3) 전기영동(Electrophoresis)

중합효소 연쇄반응으로 증폭된 산물(PCR product) 10 μℓ에 gel loading buffer 2 μℓ를 혼합하여 6% nondenaturing polyacrylamide gel에 loading한 후 150 volt에서 2시간 동안 전기영동한 후 0.5 μg/㎖ 농도의 ethidium bromide 용액으로 염색한 후, UV transilluminator로 증폭된 DNA band를 확인하여 중합효소 연쇄반응이 제대로 이루어 졌는지를 확인하였다.(Fig 1)

(4) 중합효소 연쇄반응 산물에서의 Ethiodium bromide 염색법을 이용한 비동위원소성 단일쇄 형태변환 다형성 검색(Nonisotopic SSCP detection in PCR products)

중합효소 연쇄반응 산물(PCR products) 5 μℓ와 10 μℓ Gel-loading buffer(98% deionized formamide, 10 mM NaOH, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xy-

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers for the p53 gene

Primer	Sequence(5'—3')	Genomic location
		911—930
PU5	TTCCTCTTCCTGCAFTACTC	INTRON 5 SEQ.
PD5	ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT	(26—46 3'TO I/E5 BOUNDARY)
		1249—1268
PU6	AGTTGCAAACCAGACCTCAG	INTRON 6 SEQ.
PD6	ACAGGGCTGGTTGCCCAGGGGT	(26—46 3'TO I/E5 BOUNDARY)
		1269—1288
PU7	GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC	INTRON 7 SEQ.
PD7	GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT	(46—65 3'TO I/E7 BOUNDARY)
		1411—1430
PU8	TATCCTGAGTAGTGGTAATC	INTRON 8 SEQ.
PD8	AAGTGAATCTGAGGCATAAC	(45—64 3'TO I/E7 BOUNDARY)

I/E: Intron/Exon; PU: upstream primer(5' primer); PD: downstream primer(3' primer)

Table 2. PCR reaction components

Reagents	Volume/reaction tube	Final concentration(amount)
10X PCR reaction buffer	5.0 μℓ	
Tris-HCl		10 mM
KCl		50 mM
MgCl2		1.5 mM
Gelatin		0.01%(w/v)
dNTP mix(10 mM each)	1.0 μℓ	
dATP		0.2 mM
dCTP		0.2 mM
dGTP		0.2 mM
dTTP		0.2 mM
DNA polymerase(2 units/μℓ)	1.0 μℓ	2.0 U
Sterile ddH2O	q.s.	
PU(5' primer)	1.0 μℓ	0.4 μM
PD(3' primer)	1.0 μℓ	0.4 μM
Template DNA(sample or control)	q.s.	4.0 ng/μℓ
PCR master mix	47.0 μℓ	
Total volume	50.0 μℓ	

lene cyanol FF)를 microtube에 넣어 혼합하여, 95℃에서 5분간 가열한 후, 곧바로 gel에 loading할 때까지 얼음 속에 꽂아둔다. 그리고 15% polyacrylamide gel(16 × 18 cm × 1 mm; 39: 1 acrylamide to bis-acrylamide cross-linking)을 준비하여 1xTBE buffer에 설치한 후, 미리 준비한 혼합액을 loading하고, 4℃, 50 volt(FB570 power supply, Fisher Biotech, Pittsburgh, PA)에서 bromophenol blue marker의 band가 gel의 거의 바닥에 도달할 때까지 전기영동을 시행한다. 전기영동이 끝난 후 gel을 ethidium bromide 용액(0.5 μg/㎖ 농도)에서 염색하고, 340 nm UV(ultraviolet) transilluminator로 DNA band의 위치를 확인, 폴라로이드 사진을 촬영하여, 단일쇄 형태변환 다형성(SSCP)의 유무를 검색하였다.

(5) 자동 염기서열 결정(automatic sequencing)

앞에서 준비된 중합효소 연쇄반응 산물의 정제(purification)는 WizardTM사의 PCR prep 정제 시스템(Promega, Medison, WI, USA)을 이용하였으며, DNA 농도는 OD260의 값을 이용하여 결정하였다. 중합효소 연쇄반응 염기서열 반응(PCR sequencing reaction)에는 0.0075－4.5 pmol의 정제된 DNA를 사용하였다. 반응 부피는 ABI protocol에 따라 20 μℓ로 반응시켰다(Applied Biosystems, Inc. 1993). 중합효소 연쇄반응 산물을 얻기 위해 사용한 primers와 동일한 primers를 염기서열 결정에 이용하였다. 여기에 사용한 다른 시약들은 Tag DyeDeoxyTM Termination Sequencing Kit(ABI)에 포함되어 있는 것을 사용하였다. Sequencing 반응은 PTC thermal cycler(M.J. Research, Water town, MA, USA)를 사용하였고, 미리 96℃로 예열시켰다가 10초간 온도를 유지한 다음, 98℃에서 30초, 50℃에서 15초, 그리고 60℃에서 4분을 한 cycle로 하여 총 25 cycle 반응시켰다. 반응되지 않은 nucleotide는 Centri-sep(Centri-Sep TM spin columns Princeton Separations, Adelphia, NJ. USA)을 사용하여 제거하며, Sequencing product는 Speed Vac에서 건조시킨 후(Savane Instruments, Farmingdate, NY, USA), 40 μℓ의 탈이온화된 formamide에 녹인다[50 mM EDTA, pH 8.0(5: 1)]. 6%의 변성(denaturing) polyacrylamide gel에 loading하기 전에, 검체는 90℃에서 2분간 처리하고 얼음에 담가둔다. 검체를

gel에 loading한 후, 30W에서 12시간 전기영동시킨 후 ABI 373A Sequence software version 1.2.1 (Applied Biosystems, Inc. 1993. Tag DyeDeoxy Terminator Cycle Kit Balletin #91047. Foster City, CA, USA)를 사용하여 결과를 분석하였다.

III. 연구 결과

1. 중합효소 연쇄반응-단일쇄 형태변환 다형성(PCR-SSCP) 분석을 이용한 p53 유전자 점변이(point mutation)의 검색(screening)

본 실험의 연구 대상인 포상기태 19예, 그리고 융모상피암 세포주인 JEG-3 및 JAR에서 추출한 DNA, 그리고 wild-type p53 human genomic DNA에서 nonisotopic PCR-SSCP 분석을 이용하여 exon 5, 6, 7, 8의 돌연변이를 검색(screening)한 결과, 이들 모두에서 전기영동상 비정상적으로 이동된 DNA band를 발견할 수 없었다. 즉, 단일쇄 형태변환 다형성이 나타나지 않음으로 모두 p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8에 점상 돌연변이가 없음을 추정할 수 있었다(Table 3). 그러나 p53 유전자의 점상 돌연변이가 있는 것으로 이미 알려져 있는 HT-3 자궁경부암 세포주에서 추출한 DNA에서 실시한 nonisotopic PCR-SSCP 분석 결과 Fig. 2에서 보이는 바와 같이 exon 7에서 전기영동상 비정상적으로 이동되는 DNA band를 확인할 수 있었다. 즉, 단일쇄 형태변환 다형성이 나타나므로 p53 유

Table 3. p53 mutation(ex0n 5—8) in 19 cases of hydatidiform moles and two choriocarcinoma cell lines

Patient	Histology	SSCP	p53 mutation	codon
1	PHM	no	no	
2	PHM	no	no	
3	CHM	no	no	
4	CHM	no	no	
5	CHM	no	no	
6	CHM	no	no	
7	CHM	no	no	
8	CHM	no	no	
9	CHM	no	no	
10	CHM	no	no	
11	CHM	no	no	
12	CHM	no	no	
13	CHM	no	no	
14	CHM	no	no	
15	CHM	no	no	
16	CHM	no	no	
17	CHM	no	no	
18	CHM	no	no	
19	CHM	no	no	
JEG-3	choriocarcinoma cell line	no	no	
JAR	choriocarcinoma cell line	no	no	
HT-3*	cervical cancer cell line	Yes(in exon 7)	GGC→GTC(Gly→Val)	245

CHM: complete hydatidiform mole; PHM: partial hydatidiform mole

* HT-3 cervical cancer cell line was analysed as a positive sample of p53 mutation.

전자의 exon 7에 점상 돌연변이가 있음을 추정할 수 있었다.(Fig. 2)

Fig. 2. Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining.

2. 자동 염기서열 결정법을 이용한 p53 유전자 변이의 분석, 확인

본 연구의 대상인 19예의 포상기태 및 융모상피암 세포주(JEG-3, JAR)들 모두에서 PCR-SSCP 분석상 p53 유전자의 exon 5, 6, 7, 8에서 모두 단일쇄 형태 변환 다형성(SSCP)이 나타나지 않았는데, 자동 염기서열 결정법으로 exon 5, 6, 7, 8의 염기서열을 분석, 확인한 바 모두 정상 염기서열로 돌연변이가 없음을 최종 확인할 수 있었다(Table 3). 그러나 PCR-SSCP 분석상 exon 7에서 돌연변이가 있는 것으로 나타난 HT-3 자궁경부암 세포주의 DNA의 PCR 산물을 이용하여 exon 7에 대한 자동 염기서열 결정법을 시행한 결과, codon 245에서 GGC가 GTC로 과오변이 되어 아미노산이 Gly이 Val로 변이되어 있는 점상돌연변이를 최종확인할 수 있었다(Fig. 3)(Table 3). 본 실험의 결과로 볼 때 nonisotopic PCR-SSCP는 p53 유전자의 점상 돌연변이를 검색하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 고 찰

p53 종양억제유전자의 돌연변이는 사람의 종양에서 가장 흔히 발견되는 유전적 변화 중의 하나로 알려져 있다.[25] 그러나 현재까지 저자가 아는 바로 임신성 영양막세포 종양에서의 p53 유전자의 돌연변이에 관한 연구는 국내에서 없었으며, 국외에서도 1994년 Chen 등[33]과 Cheung 등[35]이 발표한 연구를 처음으로 하여, 그 후 1996년 Shi 등

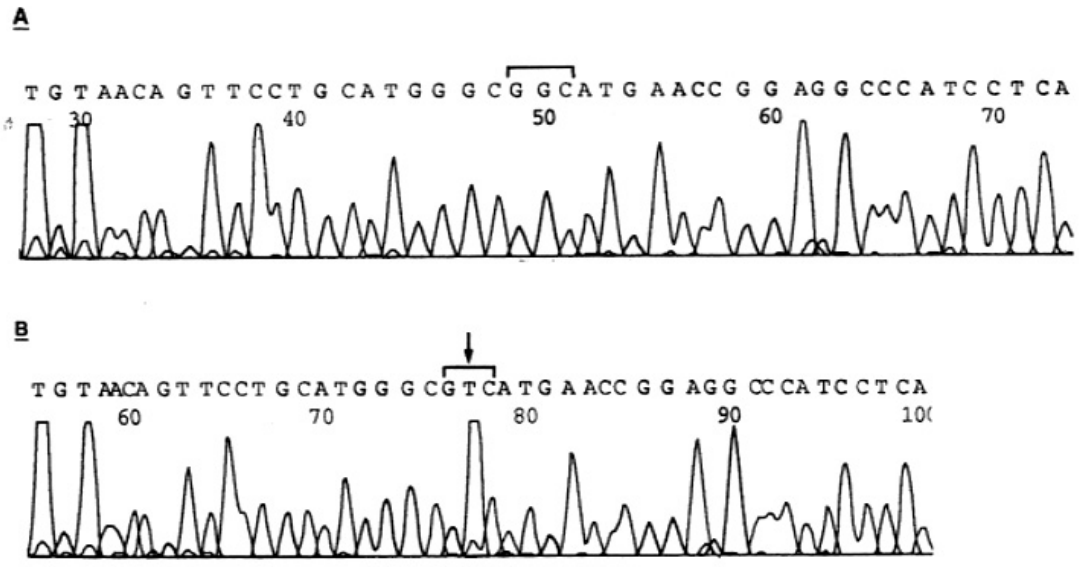

Fig. 3. Plot of a sequence of exon 7 of p53. The wild type human genomic DNA and DNA extracted from HT-3 cell line were subjected to PCR amplification. After recovery and DNA denaturation, the samole were sequenced. The arrow indicates the mutation found in the sequence.

A: wild type Human genomic DNA; B: DNA extracted from HT-3 cell line

34)이 발표한 연구가 있을 뿐이다. 이에 본 연구자는 동위원소를 이용 않고 ethidium bromide 염색법을 이용한 단일쇄 형태 변환 다형성 분석36,37) 및 자동 염기서열 결정법을 이용하여 한국인의 포상기태 및 융모상피암 세포주(JAR, JEG-3)에서의 p53 유전자 돌연변이를 연구하였다.

일반적으로 완전 포상기태는 모계(maternal) 유전물질이 소실되거나 비활성화된 난자에 정자가 수정되어 발생되는 것으로 알려져 있다.2,38-41) 즉, 23X 염색체를 지닌 하나의 정자가 유전물질이 소실되거나 비활성화된 난자에 수정된 후, 46XX로 중복(duplication)되는 것이다. 간혹 2개의 정자가 동시에 수정되어, XX 또는 XY의 패턴을 지니는 완전 포상기태가 발생하기도 한다. 따라서 만약 완전 포상기태에서 p53 유전자의 돌연변이가 있다면, 돌연변이 p53 유전자는 정자로부터 유래된 것이다. 반면, 부분 포상기태는 삼배체(triploid)로 모계 및 부계 유전물질을 모두 지니는데, 2 set의 부계(paternal) 염색체와 1 set의 모계 염색체를 지닌다. 본 연구에서는 19예의 포상기태 중, 17예는 완전 포상기태이었으며, 2예는 부분 포상기태였다.(Table 3)

p53 유전자의 점상 돌연변이는 100%는 아니지만 중합효소 연쇄반응-단일쇄 형태 변환 다형성(PCR-SSCP)에 의하여 대부분이 검출될 수 있다. 본 연구 결과에 비추어 볼 때 동위원소를 사용하지 않고 ethidium bromide 염색법을 이용하는 PCR-SSCP 분석법36,37)은 p53 유전자의 점상 돌연변이를 검색하는 데 유용한 방법으로 이용될 수 있다고 판단된다. 본 연구에서 임신성 영양막세포 종양은 다른 여러 가지 종양에서 p53 유전자의 돌연변이가 높은 빈도로 발견되는 것42)과는 달리 p53 유전자의 돌연변이는 발견할 수 없었다. 따라서 임신성 영양막세포 종양은 사람의 수아세포종(medulloblastoma),43) 전립선암,44) 자궁내막암,45) 악성흑색종(malignant meloma),46) 갑상선암,47) 자궁경부암48,49) 등과 같이 p53 유전자의 돌연변이가 드물게 발견되는 종양이거나, 돌연변이가 발견되지 않는 종양일 것으로 생각된다.

현재 p53 유전자의 돌연변이가 포상기태의 발생에 기여하는지 여부는 알려져 있지 않다. 대개 돌연변이 p53 유전자는 정상적인 그 기능의 상실 정도가 다양하여,50,51) 어떤 돌연변이는 더 심한 발암 기능을 지닐 수 있다.52) Chen 등33)의 연구에 의하면 24예의 포상기태에서 p53 유전자의 exon 2부터 11까지의 돌연변이를 연구한 바, 1예의 포상기태에서 돌연변이를 발견하였는데, codon 295에서 CCT → CTT(proline → leucine)로 missense mutation이 있었다고 한다. 한편, Cheung 등35)은 면역조직화학염색에서 p53 단백의 과발현을 보인 4예의 포상기태 환자에서 DNA 염기서열을 시행한바 모두 돌연변이가 없었다고 보고하고 있다. 또한 최근 Shi 등34)의 연구를 보면, 14예의 포상기태, 6예의 침윤성 기태, 8예의 융모상피암, 그리고 10예의 정상 조기임신 태반 등에서 p53 유전자의 exon 5－8의 DNA 염기분석을 실시한 바, 전혀 돌연변이를 발견할 수 없었다고 한다. 따라서 본 연구의 결과와 이들의 연구 결과로 비추어 볼 때, 임신성 영양막세포 종양의 발생에 p53 유전자의 돌연변이가 관계할 가능성은 희박하다고 생각되며, 임신성 영양막세포 종양의 발생에는 p53 유전자와는 다른 어떤 다른 종양억제유전자가 관여하거나, 아니면 전혀 다른 기전으로 종양이 발생될 것으로 생각된다.

결론적으로 p53 종양억제유전자의 돌연변이는 포상기태에서 전혀 없거나, 보기 드문 현상일 것으로 판단되며, p53 유전자의 돌연변이만으로 임신성 영양막세포 종양의 발생기전을 설명하기 어렵다고 생각한다. 그러나 본 연구에서 융모상피암 세포주는 2개(JAR, JEG-3)만을 대상으로 하였으며, Shi 등34)의 연구에서도 소수의 악성 영양막세포 종양을 대상으로 돌연변이를 연구하였기에, 이들에서 p53 유전자 돌연변이를 발견하지는 못하였더라도, 포상기태가 융모상피암으로 진행하는데 있어 p53 유전자의 돌연변이가 어떤 역할을 할 가능성은 완전히 배제할 수 없다고 생각된다. 따라서 앞으로 많은 예를 대상으로 한 연구가 더 실시되어야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구 결과, 19예의 포상기태 및 융모상피암 세포주(JEG-3, JAR) 모두에서 p53 유전자의 exon

5−8의 돌연변이는 발견되지 않았다. 따라서 임신성 영양막세포 종양에서의 p53 종양억제유전자의 돌연변이는 전혀 없거나, 매우 드문 현상일 것으로 생각되며, 따라서 p53 유전자의 돌연변이가 포상기태의 발생기전에 관여할 가능성은 매우 희박하다고 생각된다.

그러나 향후 더 많은 임신성 영양막세포 종양을 대상으로 한 연구가 수행되어야 할 필요성이 남아 있으며, 또한 본 연구에서 조사하지 못한 exon 5−8 이외의 exon으로 연구의 범위를 확대하여 p53 유전자의 돌연변이 양상을 더 확인하여야 할 것이다. 한편 앞으로 포상기태 환자에서 융모상피암으로 진행된 환자 예를 지속적으로 많이 수집하여, 융모상피암 조직에서의 p53 유전자 돌연변이를 연구하면, 포상기태가 융모상피암으로 진행하는 과정에 p53 유전자의 돌연변이가 어떤 역할을 하는지를 규명하는 데 도움이 될 것으로 생각한다. 한편 본 연구 결과에 비추어 볼 때 동위원소를 사용하지 않고 ethidium bromide 염색법을 이용하는 nonisotopic SSCP 분석법은 중합효소 연쇄반응 산물에서 p53 유전자의 점상 돌연변이를 검색하는 데 유용하게 이용될 수 있다고 판단된다.

감사의 글: 본 연구를 수행하는 데 많은 도움을 제공하여 준 SCL의 유전자 분석팀장 박 선생님에게 감사드립니다.

— References —

1. Ponder B: Gene losses in human tumors. Nature(Lond.) 1988; 335: 400.
2. Sager R: Tumor suppressor genes:the puzzle and the promise. Science 1991; 246: 1046.
3. Baker JS, Preisinger AC, Jessup JM et al.: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Research 1990; 50: 7717.
4. Rodriguez NR, Rowan A, Smith MEF et al.: p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 7555.
5. Prosser J, Thompson AM, Cranston G et al.: Evidence that p53 behaves as a tumor suppressor gene in sporadic breast tumors.
6. Bartek JIggo R, Gannon J, Lane DP: Genetic and immunohistochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. Oncogene 1990; 5: 1573.
7. Takahashi T, Nau MM, Chiba I et al.: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science(Washington DC), 1989; 246: 4912.
8. Chiba I, Takahashi T, Nau MM et al.: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Oncogene 1990; 5: 1603.
9. Nigro JM, Baker S, Preisinger C et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature(Lond.), 1989; 342: 705.
10. Miller C, Mohandas T, Wolf et al.: Human p53 localized to short arm of chromosome 17. Nature 1986; 319: 783.
11. McBride OW, Merry D, Givol D: The gene for human p53 cellular antigen is located on chromosome 17 short arm(17p13). Proc Natl Sci USA 1986; 83: 130.
12. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M et al.: Mutation in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 1994; 4: 42.
13. Diller L, Kassel J, Nelson CE et al.: p53 function as a cell cycle control protein in osteosarcoma. Mol Cell Biol 1990; 10: 5772.
14. Hartwell L: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. Cell 1992; 71: 543.
15. Livingstone LR, White A, Sprouse J: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild type p53. Cell 1992; 70: 923.
16. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ et al.: Wild type p53 restores cell cycle control inhibits gene amplification in cells with mutant p53 allele. Cell 1992; 70: 937.
17. Yonish-Roach E, Resmitzky P, Lotem J et al.: Wild type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. Nature 1991; 352: 345.
18. El Deiry WS, Harper JW, O'conner PM et al.:

WAF1/C1P1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Research 1994; 54: 1169.
19. Ahuja H, Bar-Elis M, Advain SH et al.: Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6783.
20. Bressac B, Galvin KM, Liang TJ et al.: Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1973.
21. Milner J, Medcalf EA: Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. Cell 1991; 65: 765.
22. Herskowitz I: Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. Nature 1987; 329: 219.
23. Milner J, Medcalf EA, Cook AC: The Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. Mol Cell Biol 1991; 11: 12.
24. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M et al.: Mutation in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etilogy and molecular pathogenesis. Cancer Research 1994; 54: 4815.
25. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B et al.: p53 mutation in human cancers. Science 1991; 253, 49.
26. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. Nature 1989; 342: 705.
27. Vassilakos P, Kajii T: Hydatidiform mole: two entities. Lancet 1976: 1: 259.
28. Kajii T, Ohama K: Androgenetic origin of hydatidiform mole. Nature 1977: 268: 633.
29. Jones WB. Gestational trophoblastic disease: what have we learned in past decade? Am J Obstet Gynecol 1990: 162: 1286.
30. Rettenmier CW, Sacca R, Furman WL et al.: Expression of the human c-fms proto-oncogene product (colony-stimulating factor-i receptor) on peripheral blood mononuclear cells and choriocarcinoma cell lines. J Clin Invest 1986; 77: 1740.
31. Cheung ANY, Srivastava G, Pittaluga S et al.: Expression of c-myc and c-fms oncogenes in trophoblastic cells in hydatidiform mole and normal human placenta. J Clin Pathol 1993; 46: 204.
32. Jokhi PP, Chumbley G, King A et al.: Expression of the colony stimulating factor-1 receptor(c-fms product) by cells at the human uteroplacental interface. Lab Invest 1993; 68: 308.
33. Chen CA, Chen YH, Chen TM et al.: Infrequent mutation in tumor suppressor gene p53 in gestational trophoblastic neoplasia. Carcinogenesis 1994; Oct: 2221.
34. Shi YF, Xie X, Zhao CL et al.: Lack of mutation in tumor suppressor gene p53 in gestational trophoblastic tumors. Br J Cancer 1996: 73: 1216.
35. Cheung AN, Srivastava G, Chung LP et al.: Expression of the p53 gene in trophoblastic cells in hydatidiform moles and normal human placentas. J Reprod Med 1994; 39: 223.
36. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ et al.: "Cold SSCP": A sample, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand confromation polymorphism analyses. Nuclec Acids Res 1993; 21(16): 3637.
37. Yap EP, McGee JO: Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. Trends Genet 1992; 8: 49.
38. Lawler SD, Pickthall VG, Fisher RA et al.: Genetic studies of complete and partial hydatidiform mole (Letter). Lancet 1979; ii: 580.
39. Pattillo RA, Sasaki S, Katayama KP et al.: Genesis of 46,Y hydatidiform mole. Am J Obstret Gynecol 1981; 141: 104.
40. Kajii T, Kurashige H, Ohama K et al.: XY and XX complete moles:clinical and morphologic correlations. Am J Obstet Gynecol 1984; 150: 57.
41. Ko TM, Hsieh CY, Ho HN et al.: Restriction fragment length polymorphism analysis to study the genetic drigin of complete hydatidiform mole. Am J Obstet Gynecol, 1991; 164: 901.
42. Caron de Fromentel C, Soussi T: p53 tumor-suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. Genes Chromosomes Cancer 1992; 4: 1.
43. Saylors RL, Sidransky D, Friedman HS et al.: Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas. Cancer Res 51 1991; 4721.
44. Uchida T, Wada C, Shitara T et al.: Infrequent involvement of p53 gene mutations in the tumo-

rigenesis of Japanese prostate cancer. Br J Cancer 1993; 68: 751.
45. Honda T, Kata H, Imamura T et al.: Involvement of p53 gene mutations in human endometrial carcinomas. Int J Cancer 1993; 53: 963.
46. Castresana JS, Rubio MP, Vazquez JJ et al.: Lack of allelic deletion and point mutation as mechanism of p53 activation in human malignant melanoma. Int J Cancer 1993; 55: 562.
47. Wright PA, Lemoine NR, Goretzki PE et al.: Mutation of the p53 gene in a differentiated human thyroid carcinoma cell line, but not in primary thyroid tumors. Oncogene 1991; 6: 1693.
48. Chen TM, Chen CA, Hsieh CY et al.: The state of p53 in primary human cervical carcinomas and its effects in human papillomavirus-immortalized human cervical cells. Oncogene 1993; 8: 1511.
49. Park DJ, Wilczynski SP, Paquette RL et al.: p53 mutations in HPV-negative cervical carcinoma. Oncogene 1994; 9: 205.
50. Raycroft L, Schnidt JR, Yoas K et al.: Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. Mol Cell Biol 1991; 11: 6067.
51. Frebourg T, Barbier N, Kassel J et al.: A functional screen for germ line p53 mutations based on transcriptional activation. Cancer Res 1992; 52: 6976.
52. Halevy O, Michalovitz D, Oren M: Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. Science 1990; 250: 113.