

cDNA 유전자칩을 이용한 자궁내막양 자궁내막암의 종양조직과 자궁내막조직에서의 유전자 발현의 차이: a preliminary study

경북대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 면역학교실²

정민지¹ · 정은정² · 이택후¹ · 조영래¹ · 박일수¹ · 이윤순¹

목적 : 자궁내막암은 여성생식기 암 중 가장 흔한 암이지만 아직 발병기전의 분자생물학적인 기전은 밝혀져 있지 않다. 이에 저자들은 자궁내막암 환자의 암조직과 정상 자궁내막조직 간의 유전자 발현의 차이가 자궁내막암의 발병과 관련이 있을 것이라는 가정하에 cDNA microarray를 이용하여 연구를 시행하였다.

연구 방법 : 2003년 본원 산부인과에서 자궁내막암으로 수술을 시행한 3명의 환자를 대상으로 암조직과 정상자궁내막을 채취하여 KNH 4.8K cDNA chip을 이용하여 유전자 발현을 비교 연구하였다.

결과 : 자궁내막암 여성의 암조직에서 정상 자궁내막조직에 비하여 높게 발현되고 있는 유전자들은 interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), bifunctional apoptosis regulator (BFAR), paraneoplastic antigen MA2 (PNMA2), zinc finger protein 257 (ZNF257), ras homolog gene family, member F (in filopodia) (ARHF), cell division cycle 27 (CDC27) 등이 있었다. 한편, 암조직에서 정상 자궁내막조직에 비해 낮게 발현된 유전자들은 fibronectin 1 (FN1), meiotic checkpoint regulator (MCPR), transforming growth factor beta-stimulated protein TSC-22 (TSC22), programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4), transcript variant 2, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1) 등이 포함된다.

결론 : DNA microarray를 통해 얻어진 결과에서 자궁내막암 환자의 암조직과 정상 자궁내막조직에 비교하여 유전자 발현의 차이가 있음을 확인하였다. 그러나 RT-PCR법 등을 통한 유전자 발현의 검증 및 추후의 대규모 연구가 더 필요하리라 생각된다.

중심단어 : 자궁내막암, 유전자 발현, cDNA 유전자칩

서 론

자궁내막암은 미국의 경우 유방암, 폐암, 대장암에 이어 여성에게 발생하는 암 중에서 4번째로 흔하게 발생하는 암으로서 여성생식기에서 발생하는 가장 흔한 암이다. American cancer society의 보고에 따르면 미국에서는 2004년도에 40,100명의 새로운 자궁내막암 환자가 진단

이 되었으며, 6,800명의 환자가 상기간에 자궁내막암으로 사망하였다고 하였다.¹ 한국의 경우 1991년에 132명에서 2002년에는 825명의 자궁내막암 환자가 발생하였으며 미국의 경우와 비교해 보면 발생빈도는 낮지만, 생활환경이 서구화되어감에 따라 그 발생빈도가 급격히 증가하고 있다.²

지난 수십년 동안 자궁내막암의 예후에 영향을 미치는 조직병리학적 인자, 임상병리학적 인자들이 많이 규명되어지고 있으며, 분자유전학적인 방법을 통한 여러 연구들도 진행되고 있다. 자궁내막암의 경우에도 여러 단계의 종양유발유전자의 활성화와 종양억제 유전자의 불활성화 과정을 거치면서 암으로 진행되는 것으로 생각되며 PTEN, KRAS2, CTNNB1 등의 유전자 변이 및

논문접수일 : 2007년 6월 28일 채택일 : 2007년 7월 31일
교신저자 : 이윤순, 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50번지,
경북대학교병원 산부인과
전화 : 053) 420-5734 · 전송 : 053) 423-7905
E-mail : ysllee@knu.ac.kr

이 연구는 2002년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비 지원으로 이루어졌음.

P53, Her-2/neu 유전자의 변이가 자궁내막암의 발생과 관련된 것으로 주목받고 있다.³ 그러나 자궁내막암의 분자생물학적인 발병과정은 아직 완전하게 이해되지 못하고 있으며, 이에 따른 연구 또한 미흡한 실정이다.

본 연구는 자궁내막암 환자와 정상 대조군의 자궁내막조직의 유전자 발현을 비교하여 자궁내막암 환자에서는 자궁내막암의 발생을 조장하는 유전자가 발현되어 있을 것이라고 가정하고 DNA microarray 방법을 이용하여 실험을 시행하였다. 과거에 시행된 유전자발현에 관한 연구는 한번에 한 개의 유전자 이상의 연구는 불가능하여 연구에 많은 제약이 있었으나 DNA microarray 기술의 도입으로 한번에 수천 개의 유전자 발현을 조사할 수 있었다.

이에 저자들은 본원 산부인과에서 자궁내막암으로 수술을 시행한 3명의 환자를 대상으로 채취한 정상 자궁내막조직과 암조직으로 KNU 4.8K cDNA chip을 이용하여 유전자발현을 비교 연구하였다.

연구 대상 및 방법

1. 조직의 채취

2003년 본원에서 자궁내막암으로 진단된 3명의 환자에서 전자궁적출술을 시행하면서 정상 자궁내막조직 및 암조직을 채취하였다. 채취된 자궁내막암조직은 병리검사 결과 모두 자궁내막양 자궁내막암이었다.

2. RNA 추출 및 증폭

1) 미세조직으로부터 total RNA와 mRNA 추출

Trizol (Invitrogen, California)을 이용하여 각 조직에서 total RNA를 분리하였다. 조직을 액체질소로 얼려주면서 막자사발에서 미세하게 간 후 Trizol을 1-2 ml 넣어 조직을 녹여낸 후, 1/5 vol의 1-bromo 3-chloropropane을 첨가하고 잘 섞은 뒤 원심분리하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 넣어 total RNA를 침전시킨다. 침전된 RNA pellet을 RNase-free 증류수에 녹이고 정량한 후 agarose gel에서 전기영동 하였다. 이렇게 분리한 total RNA로부터 mRNA를 추출하기 위해 Dynabeads mRNA Purification kit (DynaL A.S)를 이용하였다. Oligo (dT)가 붙은 magnetic beads와 total RNA를 섞어 10분간 반응시켜 mRNA가 결합된 magnetic beads

만 분리한 후 11 μ l의 elution 용액을 넣고 65°C에서 2분간 방치하여 유리된 mRNA를 회수하였다.

2) Double stranded cDNA의 합성

Double stranded cDNA의 합성은 제조사의 방법에 따라 시행되었다. 간략히 기술하면 다음과 같다. mRNA 10 μ l에 oligo-dT/DpnII/T7 primer (5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGCGATC T21-3') 1 μ l, First strand buffer 4 μ l, DTT 2 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, Superscript II (GibcoBRL)를 1 μ l 첨가한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다. 위 반응액에 Second strand buffer (200 mM Tris pH6.9, 900 mM KCL, 46 mM MgCl₂, 1.5 mM inosineadenosine dinucleotide, 100 mM (NH₄)SO₄ 30 μ l, 10 mM dNTP 3 μ l, E.coli DNA ligase 1 μ l, E.coli DNA polymerase I 4 μ l, RNase H 1 μ l, DEPC treated water 91 μ l를 첨가하여 16°C에서 1시간 30분 처리한다. 합성된 double strand cDNA를 페놀추출한 후 7.5 M ammonium acetate와 에탄올(-20°C)을 첨가하여 precipitation시켰다. 침전물을 8 μ l의 DEPC water에 녹였다.

3) T7 RNA polymerase를 이용한 RNA 증폭

T7 RNA polymerase를 이용한 RNA 증폭을 간략히 기술하면 Ampliscribe T7 transcription kit (Epicentre Technologies)를 사용하여 RNA를 증폭하였다. 8 μ l의 double-stranded cDNA에 Ampliscribe T7 buffer 2 μ l, 100 mM의 ATP, UTP, GTP, CTP 각각 1.5 μ l씩, DTT 2 μ l, T7 RNA polymerase 2 μ l를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시켰다. 위 반응액을 다시 Trizol에 녹여 RNA만 분리해냈다. 증폭된 RNA를 Microcon-30에 통과시켜 정제하고 농축했다.

3. Microarray hybridization

본 실험에서는 경북대학교 기질세포 유전자은행에서 보유하고 있는 cDNA 중에 세포의 신호전달, 세포분열, 세포자멸사(apoptosis), 그리고 세포분화에 관여하는 유전자를 선별하여 제작한 유전자칩(cDNA microarray)을 이용하였다. 이 array에는 4,800여 종의 인간 유전자와 대조군(control) 유전자가 포함되어 있다. Housekeeping gene으로 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, alpha

tubulin, beta actin, 이렇게 3종류의 유전자가 각각 75개씩 spotting되어 있다. 정상 자궁내막조직의 mRNA에는 녹색 형광을 내는 Cy3-dUTP를 그리고 자궁내막암조직의 mRNA에는 적색형광을 내는 Cy5-dUTP를 각각 부착하여 cDNA probe를 제작하였다. 증폭된 RNA를 역전사(reverse transcription)하는 과정 중 각각 녹색과 적색형광 물질이 끼어들게 된다. Cy3와 Cy5 반응물을 섞은 후 20X SSC 3 μ l, 5% SDS 0.4 μ l, poly-dA 1.25 μ l, yeast tRNA 2.5 μ l를 첨가하고 99°C에서 5분 끓여 미리 제작된 array에 얹고 cover slide로 덮었다. Array를 hybridization cassette에 넣고 봉한 후 50°C에서 16-20시간 반응시켰다.

4. Confocal laser scanner를 이용한 형광의 측정과 데이터의 분석

Hybridization이 끝난 DNA chip 슬라이드를 Scanarray 4000 confocal laser scanner (GSI Lumonics)를 사용하여 Cy3와 Cy5가 내는 형광의 이미지를 스캔하여, Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 유전자의 상대적 발현을 Quantarray 이미지 분석 프로그램(Quantarray software, version 2.0.1, GSI Lumonics)을 이용하여 각 유전자의 형광이미지를 수치로 측정하였다.

각 유전자에 대하여 자궁내막암환자 암조직과 정상자궁내막에서의 형광의 세기를 비로 나타내고(각 유전자에 대한 Cy5/Cy3의 값), 일반적인 microarray 실험법과 같이 형광 강도의 값이 2배 이상 증가하거나 감소하는 유전자를 특이적으로 발현되는 유전자로 결정하였다. 즉, 자궁내막암에서 증가한 유전자의 선별은 형광강도의 차이가 2배 이상인 것으로 정하였으며 자궁내막암에서 발현이 감소한 유전자는 위와 같은 조건으로 감소한 유전자에 해당한다. 유전자가 포함되지 않은 점(spot)에서 발현되는 형광강도의 3배 값까지를 background 값으로 정하고 전체 4,800개 유전자 중 그 값 이하로 발현되는 유전자는 그 실험 조직에서 발현되지 않는 것으로 판정하여 분석에서 제외시켰다.

결 과

1. Microarray 데이터 분석

3명의 자궁내막암 환자의 자궁내막암 조직 내 유전자 발현을 정상 자궁내막조직과 비교하였다. 실험에 사용

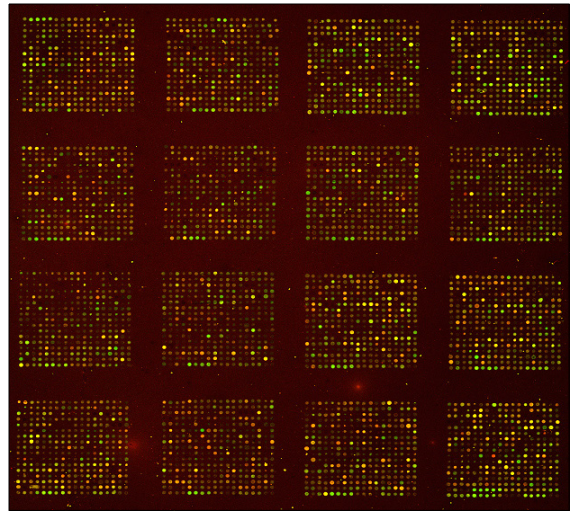


Fig. 1. A presentative result of microarray detection. Red and green spots show relative high expression in the tumor and in the normal, respectively.

된 자궁내막암조직은 병리조직검사상 모두 자궁내막양 자궁내막암이었다.

Fig. 1은 hybridization이 끝난 DNA chip 슬라이드를 Cy3와 Cy5가 내는 형광의 이미지를 스캔하여, Cy3와 Cy5의 경쟁적 결합에 의한 유전자의 상대적 발현을 관찰한 것으로 이 슬라이드에서 적색형광을 내는 점(spot)은 자궁내막암의 조직에서 발현이 증가되어 있는 유전자들이며, 녹색형광을 내는 점(spot)은 정상자궁내막조직에서 발현이 증가되어 있는 유전자들을 의미한다. 이러한 유전자의 상대적 발현을 Quantarray 이미지 분석 프로그램(Quantarray software, version 2.0.1, GSI Lumonics)을 이용하여 각 유전자의 형광이미지를 수치로 측정하였다. 본 실험에서는 2개의 유전자칩의 경우 신호강도가 낮게 관찰되어 나머지 한 개의 유전자칩에서 결과를 분석하였다.

2. 자궁내막암 조직에서 발현의 증감을 보이는 유전자
자궁내막암 조직과 정상자궁내막에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 자궁내막암 조직에서 증가한 유전자와 감소한 유전자로 나누어 표로 나타내었다(Table 1, 2).

자궁내막암 환자의 암조직에서 정상자궁내막에 비하여 높게 발현되고 있는 것으로 나타난 유전자들은 interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), bifunctional apoptosis regulator (BFAR), paraneoplastic antigen

Table 1. Up-regulated genes in endometrial cancer tissue compared to the normal endometrium

RefSeq / GenBank ID	Gene title	Ratio
Up-regulated gene		
	PAC clone J0659J06 from 7q33-q35	2.01
NM_001569.2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), mRNA	2.02
NM_016561.1	Bifunctional apoptosis regulator (BFAR), mRNA	2.04
	Paraneoplastic antigen MA2 (PNMA2), mRNA	2.07
NM_033468.1	Zinc finger protein 257 (ZNF257), mRNA	2.09
NM_019034.1	Ras homolog gene family, member F (in filopodia) (ARHF), mRNA	2.11
NM_001256.2	Cell division cycle 27 (CDC27), mRNA	2.12
	Keratin 5 (KRT5)	2.32
NM_003033.1	Sialyltransferase 4A (beta-galactosidase alpha-2,3-sialyltransferase) (SIAT4A), mRNA	2.34
NM_005516.2	Major histocompatibility complex, class I, E (HLA-E), mRNA	2.36
NM_016480.2	PABP-interacting protein 2 (PAIP2), mRNA	2.92

Table 2. Down-regulated genes in endometrial cancer tissue compared to the normal endometrium

RefSeq / GenBank ID	Gene title	Ratio
Down-regulated gene		
	Kluyveromyces lactis partial HEM13 gene	0.19
	Interleukin 11 receptor, alpha (IL11RA), mRNA	0.21
	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD2)	0.23
	Meiotic checkpoint regulator (MCPR), mRNA	0.27
	Fibronectin 1 (FN1), transcript variant 2, mRNA	0.28
	Haptoglobin-related protein	0.28
	Transforming growth factor beta-stimulated protein TSC-22 (TSC22), mRNA	0.31
	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) (MCL1), mRNA	0.32
	Calponin 1, basic, smooth muscle (CNN1), mRNA	0.34
	Selenium binding protein 1 (hSBP1)	0.36
	Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 5 (Igfbp5), mRNA	0.37
	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsilon, 47 kD) (EIF3S5), mRNA	0.37
	Programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4), transcript variant 2, mRNA	0.38
	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory) (TIMP3), mRNA	0.38
	Vinculin (VCL), transcript variant meta-VCL, mRNA	0.38
	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (EIF4G2), mRNA	0.39
	Heat shock 27 kD protein 1 (HSPB1), mRNA	0.40
	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25 kD) (CDC42), transcript variant 2, mRNA	0.40
	Zinc finger protein 265 (ZNF265), mRNA	0.43
	Matrix metalloproteinase 2 (MMP2), mRNA	0.43
	Insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), mRNA	0.43
	Downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1), mRNA	0.44
	Ras homolog gene family, member A (ARHA), mRNA	0.45
	Retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7), mRNA	0.45
	Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), mRNA	0.46

MA2 (PNMA2), zinc finger protein 257 (ZNF257), ras homolog gene family, member F (in filopodia) (ARHF), cell division cycle 27 (CDC27), PABP-interacting protein 2 (PAIP2) 등이다.

한편 자궁내막암 환자의 암조직에서 정상자궁내막에 비하여 fibronectin 1 (FN1), transcript variant 2, meiotic checkpoint regulator (MCPR), transforming growth factor beta-stimulated protein TSC-22 (TSC22), Ras-related GTP-binding protein (RAGA), eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsilon, 47 kD) (EIF3S5), programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4), transcript variant 2, matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72 kD gelatinase, 72 kD type IV collagenase) (MMP2), insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), fibronectin 1 (FN1), transcript variant 1, downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1) 등의 유전자가 낮게 발현되어 있었다.

고 찰

자궁내막암은 미국의 경우 여성에게서 발생하는 암 중에서 4번째로 흔하게 발생하는 암으로서 여성생식기에서 발생하는 가장 흔한 암이다. 한국의 경우에도 미국과 비교하여 발생빈도는 낮지만, 식습관이나 생활양식이 서구화되어감에 따라 그 발생빈도가 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 자궁내막암에 대한 이해와 진단 및 치료에 대한 관심은 더욱 높아지고 있다.

자궁내막암은 두 가지 종류의 병리유전학적인 형태를 보인다. 자궁내막양 자궁내막암(endometrioid carcinoma, Type 1)의 경우 전체의 75-85%를 차지하며 더 젊은 여성과 비길항(unopposed) 에스트로겐에 노출된 과거력이 있는 경우 호발한다. 이 종류의 자궁내막암은 자궁내막 증식증에서 시작되는 경우가 많으며 분화가 더 좋고, 예후 역시 더 양호하다. 비자궁내막양 자궁내막암(non-endometrioid carcinoma, Type 2)의 경우 자궁내막에 대한 에스트로겐의 자극이 없는 경우에서 관찰되는 형태로 위축성 자궁내막과 동반된 경우가 많고 나이가 많은 여성에서 호발한다. 이 종류의 자궁내막암은 분화가 좋지

못하며, 진단 당시 전이가 동반되는 경우가 많고, 예후 또한 불량하다.⁴

그러나 자궁내막암의 경우에도 여러 단계의 종양유발 유전자의 활성화와 종양억제 유전자의 불활성화 과정을 거치면서 암으로 진행되는 것으로 생각되어질 뿐, 정확한 자궁내막암의 분자유전학적인 발병과정은 아직 완전하게 이해되지 못하고 있다. 최근 분자생물학 연구방법의 발전에 힘입어, 자궁내막암의 발생에 관여하는 유전적 변이들에 관한 연구들이 시행되어 몇 가지 유전적 변이가 제시되고 있다.

Catusus 등은 mismatch repair deficiency, mutation, MLH1, MSH2, MSH6 mismatch repair gene의 hypermethylation과 빈번하게 연관되는 microsatellite instability (MSI)를 자궁내막양 자궁내막암에서 관찰되는 유전적 변화로 보고하였다.⁵ 이 외에도 국소 유착, 세포의 이동, 종양세포의 증식 등의 조절에 관여한다고 알려진 PTEN 종양억제유전자의 변이와 세포 증식에 관여하며 MSI와 hypermethylation과 연관된 종양 유발유전자인 k-RAS 유전자의 변이, 종양의 성장에 관여하는 b-catenin 유전자의 변이 등이 자궁내막양 자궁내막암에서 관찰되었다.⁶⁻¹⁵

반면에 비자궁내막양 자궁내막암의 발생에 있어서는 p53 유전자의 변이와 HER-2/neu amplification, 3p,10q, 17p,18p 등을 포함한 많은 수의 염색체에서 heterozygosity의 소실이 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁻²⁰

최근에는 cDNA microarray 방법을 이용하여 한번에 수천가지 유전자의 발현 양상을 비교하여 자궁내막암과 대조군의 자궁내막에서의 유전자 발현의 차이를 비교한 연구들도 소개되고 있다. 또한 자궁내막암의 조직학적 형태(type)에 따른 유전자 발현 양상의 차이를 비교함으로써 자궁내막암의 type에 따른 생물학적, 임상적 결과의 상이성을 가져오는 원인에 대한 이해를 높일 수 있으리라 생각된다.

Mutter 등은 cDNA microarray를 이용한 선구적 연구에서 자궁내막암 환자와 정상 대조군의 자궁내막에서의 유전자 발현 양상을 비교하였는데, 종양으로의 변환에는 정상 자궁내막에서 항상 발현되던 유전자들의 발현 소실과 특히 anti-tumorigenic progesterin response를 보이는 유전자의 발현 소실을 관찰하였다.²¹

Risinger 등은 자궁내막양과 비자궁내막양 자궁내막암

에서 다르게 발현되는 191개의 유전자를 cDNA microarray 방법을 이용하여 기술하였고, 그중에서 24개의 전사(transcripts)의 차이는 장액성과 자궁내막양암에서 구분되어 나타났다.²²

Cao 등은 자궁내막암의 발생에 관여하는 분자유전학적 사건을 규명하기 위한 연구를 시행하였으며, 자궁내막양암과 장액성암의 차이를 구별할 수 있었다. 두 군간에서 유의하게 다르게 발현된 315개의 유전자를 확인하였으며, 세포주기, 세포의 유착, 신호전달, 세포자멸사 및 종양의 진행에 관계있는 새로운 변이(novel alteration)에 대해 기술하였다.²³

Moreno 등은 자궁내막양 자궁내막암과 비자궁내막양 자궁내막암에서 발현에 2배 이상의 차이를 보인 66개의 유전자들 기술하였는데, 자궁내막양 자궁내막암에서 높게 발현된 31개의 유전자들은 월경주기동안에 호르몬에 의하여 조절되며 자궁내막의 항상성을 유지에 중요한 유전자들이었다. 한편, 비자궁내막양 자궁내막암에서 높게 발현된 35개의 유전자들 중에서 STK15, BUB1, CCNB2 유전자들은 mitotic spindle checkpoint의 조절에 관여하는 것으로서 특히 STK15의 경우 증폭(amplification), 과발현(over-expression) 시에 홀배수체(aneuploidy)와 침습적인 표현형(aggressive phenotype)과 관련되어 있다.²⁴

Planagumà 등은 자궁내막양 자궁내막암 환자의 자궁내막과 대조군의 자궁내막에서의 유전자발현양상을 cDNA microarray chip을 이용하여 비교하였고, 자궁내막암 환자의 자궁내막에서 발현에 변화가 있었던 53개의 유전자들 중에서 가장 높게 발현되어있던 acute myeloid leukemia proto-oncogene으로 알려진 RUNX1/AML1 유전자에 주목하였고, real time RT-PCR을 통해 유전자 수준의 발현을 정량하고, 조직의 면역조직화학검사(immunohistochemistry)를 통해 단백질 수준에서의 발현도 확인하였다. 이 연구에서 RUNX1/AML1 유전자는 자궁근층의 침입이 진행된 자궁내막암에서 더 강한 발현을 보였으며, 자궁내막암의 근층침입의 초기단계에서 종양발생(tumorigenesis)에 관여된다고 보고하였다.²⁵

이번 연구에서는 자궁내막암 환자와 정상대조군의 자궁내막에서 유전자 발현의 차이를 비교하였으며, 경북대학교 기질세포 유전자은행에서 보유하고 있는 cDNA 중에 세포의 신호전달, 세포분열, apoptosis, 그리고 세포

분화에 관여하는 유전자를 선별하여 제작한 cDNA array를 이용하였다. 이 array에는 4,800여종의 인간 유전자와 control 유전자가 포함되어 있다. 본 연구를 통해 자궁내막암의 자궁내막조직에서 대조군에 비해 유전자의 발현의 차이가 있음을 확인하였다. 유전자칩 실험에서 자궁내막암 환자의 암조직에서 정상자궁내막조직에 비하여 발현이 증가하거나 감소된 유전자들을 대상으로 하여 그 기능에 대한 문헌고찰을 시행하였다. 대부분의 유전자들은 자궁내막암의 발병기전에서의 역할이 정확하게 밝혀지지 않았으나, 몇몇 유전자들은 다른 고형암의 발생과 관련되어 연구들이 보고되고 있었다. 특히, fibronectin은 매우 강력한 유착물질(adhesion factor)로서 세포간의 유착을 강화하는 역할을 하며, fibronectin의 생성감소는 종양의 보다 공격적인 침입이나 전이와 연관된다고 알려져 있다.^{26,27} Vollmer 등은 자궁내막암세포 배양(RUCA-I)을 통해 자궁내막암세포에서 fibronectin의 mRNA 발현이 감소되어 있는 것을 RT-PCR법으로 확인한 바 있는데, 본 실험의 결과와도 일치한다.²⁸

한편, 본 실험의 결과를 토대로 하여 RT-PCR법 등을 통한 유전자 발현의 검증 및 추후의 대규모 연구가 더 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. Lancet 2005; 366: 491-505.
2. Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Annual report of Gynecologic cancer registry program in Korean for 2002 (Jan. 1, 2002- Dec.31, 2002) K J Obstet Gynecol 2004; 47: 1029-70.
3. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: From a phenotypical to a molecular based classification. Virchows Arch 2004; 444: 213-23.
4. Esteller M, Xercavins J, Reventos J. Advances in the molecular genetics of endometrial cancer: Review. Ver Dtsch Ges Pathol 1997; 81: 219-27.
5. Catusus L, Machin P, Matias-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinomas: Clinicopathologic correlations in a series of 42 cases. Hum Pathol 1998; 29: 1160-4.
6. Caduff RF, Svoboda-Neumann SM, Johnston CM, Bartos RE, Frank TS. Molecular analysis in endometrial cancer. Verh Dtsch Ges Pathol 1997; 81: 219-27.
7. Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: A review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. Adv Anat

- Pathol 2002; 9: 145-84.
8. Salvesen HB, Akslen LA. Molecular pathogenesis and prognostic factors in endometrial carcinoma. *APMIS* 2002; 110: 673-89.
9. Matias-Guiu X, Catus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 569-77.
10. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mourits MJ, Hollema H, Hofstra RM. Toward new strategies to select young endometrial cancer patients for mismatch repair gene mutation analysis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4364-70.
11. Kong D, Suzuki A, Zou TT, Sakurada A, Kemp LW, Wakatsuki S. PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* 1997; 17: 143-4.
12. Matsushima-Nishiu M, Unoki M, Ono K, Tsunoda T, Minaguchi T, Kuramoto H. Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous PTEN. *Cancer Res* 2001; 61: 3741-9.
13. Esteller M, Garcia A, Martinez-Palones JM, Xercavins J, Reventos J. The clinicopathological significance of K-RAS point mutation and gene amplification in endometrial cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1572-7.
14. Lagarda H, Catus L, Arguelles R, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001; 193: 193-9.
15. Schlosshauer PW, Pirog EC, Levine RL, Ellenson LH. Mutational analysis of the CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13: 1066-71.
16. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 177-85.
17. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: Evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer (Phila.)* 2000; 88: 814-24.
18. Oehler MK, Brand A, Wain GV. Molecular genetics and endometrial cancer. *J Br Menopause Soc* 2003; 9: 27-31.
19. Tritz D, Pieretti M, Turner S, Powell D. Loss of heterozygosity in usual and special variant carcinomas of the endometrium. *Hum Pathol* 1997; 28: 607-12.
20. Hedrick L. Endometrial cancer. New York: McGraw-Hill; 1998.p.621-9.
21. Mutter GL, Baak JP, Fitzgerald JT, Gray R, Neuberg D, Kust GA, et al. Global expression changes of constitutive and hormonally regulated genes during endometrial neoplastic transformation. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 177-85.
22. Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, et al. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 6-11.
23. Cao QJ, Belbin T, Socci N, Balan R, Prystowsky MB, Childs G, et al. Distinctive gene expression profiles by cDNA microarray in endometrioid and serous carcinomas of the endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 321-9.
24. Moreno-Bueno G, Sanchez-Estevéz C, Cassia R, Diaz-Uriarte R, Dominguez O, Hardisson D, et al. Differential gene expression profile in endometrioid and nonendometrioid endometrial carcinoma: STK15 is frequently overexpressed and amplified in nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003;63:5697-702.
25. Planagumà J, Díaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, Abal M, Monge M, García A, et al. Differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 2004; 15: 8846-53.
26. Varani J, Gibbs DF, Inman DR, Shah B, Fligel SE, Voorhees JJ. Inhibition of epithelial cell adhesion by retinoic acid. Relationship to reduced extracellular matrix production and alteration in Ca^{2+} levels. *Am J Pathol* 1991; 138: 887-95.
27. Humphries MJ, Obara M, Olden K, Yamada KM. Role of fibronectin in adhesion, migration, and metastasis. *Cancer Invest* 1989; 7: 373-93.
28. Vollmer G, Hopert AC, Ellerbrake N, Wünsche W, Knuppen R. Fibronectin is an estrogen-repressed protein in RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 54: 131-9.

A differential gene expression profiles by cDNA microarrays in endometrioid endometrial carcinoma: a preliminary study

Min Ji Chung¹, Eun Jung Chung², Taek Hoo Lee¹, Young Lae Cho¹, Il Soo Park¹, Yoon Soon Lee¹

Departments of Obstetrics and Gynecology¹ and Immunology², Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Objective : Endometrial carcinoma is the most common gynecological malignant disease in industrialized countries. However, the molecular bases for endometrial tumorigenesis are not clearly elucidated. Our hypothesis is that there may be some difference in gene expression patterns between normal endometrium and endometrial cancer lesion. In this study, we analyzed the difference of gene expression profile with cDNA microarray.

Methods : Normal endometrial tissues and cancer lesions were gathered from three patient with endometrioid endometrial cancer. cDNA microarray technique (KNU 4.8K chip) was applied to screen the different gene expression profiles.

Results : Many genes such as interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), bifunctional apoptosis regulator (BFAR), paraneoplastic antigen MA2 (PNMA2), zinc finger protein 257 (ZNF257), ras homolog gene family, member F (in filopodia) (ARHF), cell division cycle 27 (CDC27) were over-expressed in the endometrial cancer tissue. The genes were down-regulated in the endometrial cancer samples included fibronectin 1 (FN1), meiotic checkpoint regulator (MCPR), transforming growth factor beta-stimulated protein TSC-22 (TSC22), programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) (PDCD4), transcript variant 2, matrix metalloproteinase 2 (MMP2), insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), retinoblastoma binding protein 7 (RBBP7), insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), downregulated in ovarian cancer 1 (DOC1).

Conclusion : The result of this analysis supports the hypothesis that the endometrial cancer tissue has distinct gene expression profile from normal endometium. But, the validation of gene expression with RT-PCR and the further study are needed.

Key Words : Endometrial cancer, Gene expression, cDNA microarray
