

한국인 유방암 및 양성 유방질환의 telomerase 활성도

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실

박우찬 · 서영진 · 최승혜 · 유영경 · 조원일 · 김정수 · 오세정 · 정상설 · 김인철

= Abstract =

Telomerase Activity in Breast Cancer and Benign Breast Disease of Korea

Woo Chan Park, M.D., Young Jin Seo, M.D., Seung Hye Choi, M.D.,
Young Kyoung You, M.D., Won Il Cho, M.D., Chung Soo Kim, M.D.,
Se Chung Oh, M.D., Sang Seol Jung, M.D. and In Chul Kim, M.D.

Department of Surgery, Catholic University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Telomerase is an RNA-dependent DNA polymerase that compensates for the telomere shortening that occurs in its absence. Reactivation of telomerase is thought to be an important step in cellular immortalization, and recent studies have indicated that telomerase activity is often detected in primary human malignancies. The purpose of this study is to identify telomerase activity in breast cancer. **Materials & Methods:** Telomerase activities were analyzed in the samples of 12 breast cancer tissues and 11 benign breast disease tissues by TRAPeze ELISA detection kit (Oncor, Gaithersburg, USA). All samples were obtained from the excised mass at the time of specimen removal in the operating room and stored in liquid-nitrogen tank. **Results:** Telomerase activity was detected in 10 of 12 (83.3%) breast cancer samples and 4 of 11 (36.4%) benign breast disease samples. The detection of telomerase activity in diagnosis of breast cancer has validity: 83.3% sensitivity rate, 63.6% specificity rate, 71.4% (+) predictability rate, 77.8% (-) predictability rate. The telomerase activity correlates with the estrogen receptor status ($p=0.009$). **Conclusion:** The telomerase activity can be detected in breast cancer sensitively. Further study with sufficient samples is needed to establish detection of telomerase activity as diagnostic tool in breast cancer. (Korean J of Breast Cancer 1999; 2: 51~56)

Key Words: Breast cancer, Telomerase activity

서 론

유핵세포의 염색체 양단부에 존재하는 telomere는 그 구조와 기능이 알려지면서 염색체의 안정성 및 유전정보의 유지에 중요한 역할을 하는 것

으로 인정되고 있다. 이와 함께 최근에 발견되어 활발한 연구가 진행되고 있는 telomerase는 RNA 의존성 DNA 중합효소로서 telomere의 길이를 유지하는 역할을 하며, 그 활성도가 주로 생식세포나 암세포 등의 불멸세포에서 확인되고 있다. 이에 telomerase와 암과의 관계를 밝히려는 많은 연

구가 이루어지고 있으며, Telomerase 활성도 측정에는 PCR을 이용한 측정법(telomeric repeat amplification protocol: TRAP)이 개발되면서 비교적 쉽게 telomerase 활성도 측정이 가능하게 되었고, 이를 이용하여 여러 암조직에서 활성도 측정이 가능하게 되었다. 저자는 유방암 조직과 양성 유방질환 조직에서 telomerase 활성도를 측정하여 비교하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1997년 1월부터 1998년 3월까지 가톨릭대학교 강남성모병원 외과에서 유방암과 양성 유방질환으로 유방절제수술을 시행받았던 환자들의 냉동보관 중인 조직 가운데 유방암 조직 15예와 양성 유방질환 조직 12예를 대상으로 하여 본 실험을 시행하였다.

2. 방법

1) 조직액 추출 및 단백질 정량

냉동 보관된 조직을 녹이면서 파쇄(homogenization)시키고, 여기에 CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate) lysis buffer를 넣어 처리한 후 4℃에서 12000 rpm으로 20분간 원심분리하여 추출액인 상층액을 얻어 이를 -75℃에 보관한다. 얻은 추출액에서 단백질 농도를 Bladford법으로 측정하고 각 검체에서 일정량의 단백질을 사용하여 실험을 시행하였다.

2) TRAP 반응 및 ELISA법에 의한 telomerase 활성도 판정

TRAP 반응 및 그 결과 판정은 ELISA법을 응용한 TRAPeze ELISA Telomerase Detection Kit (Oncor, Gaithersburg, USA)를 사용하여 확인하였다. TRAP 반응은 추출액과 kit에서 제공되는 반응 혼합물(tirs buffer, primers: biotinylated TS and RP primers, dNTPs: dGTP, dATP, dTTP, DNP-dCTP, oligomer mix for amplification of 36bp

internal control band)을 섞고 30℃에서 30분간 telomerase 반응을 일으키고 그 산물을 PCR 반응으로 증폭시킨다. PCR 산물은 streptavidin으로 표면처리한 microtiter plate에서 biotin-streptavidin 반응을 일으키고, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 항 DNP항체를 이용하여 반응시킨 후에 발색제인 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)로 처리하여 발색시키고 이를 ELISA 판독기로 판독한다. 실험에서 양성 대조군으로는 kit에서 제공되는 telomerase 양성 세포를 이용하며, 음성 대조군으로는 각 검체별로 추출액을 85℃에서 10분간 열처리한 것으로 하였고, PCR 및 ELISA 반응에 대한 양성 대조군으로 kit에서 제공되는 합성 oligonucleotide을 사용하며, primer-dimer PCR 오염에 대한 대조군으로는 추출액 대신 CHAPS lysis buffer를 이용하였다. 결과의 판독은 primer-dimer PCR 오염 대조군에서 측정값이 0.200 미만이고, PCR 및 ELISA 반응 양성 대조군에서 측정값이 0.800를 초과하고, 각 검체의 음성 대조군의 측정값이 0.250 미만인 결과를 분석 가능한 결과로 볼 수 있으며 각 검체에서 측정값이 음성 대조군에서의 측정값과의 차이가 0.150을 초과하는 경우를 telomerase 양성으로 최종 판정하였다.

3) 결과의 분석

유방암 조직과 양성 유방조직에서 얻은 telomerase 활성도의 측정 결과에 대해 t-검정으로 결과의 차이를 비교하였고, 암조직에서 telomerase 활성도 측정의 정확도를 민감도, 특이도 및 예측도를 통하여 확인하였고, 나이, 유방암의 병기(stage), 호르몬 수용체 상태 등과 telomerase 활성도와 상관관계를 Pearson 법에 의해서 분석하였다. SPSSWIN(Ver 7.5) 프로그램을 사용하여 통계적 분석을 시행하였다.

결 과

1. Telomerase 활성도

유방암 환자 조직 15예와 양성 유방질환 조직

12예에서 telomerase 활성도를 측정한 결과 결과 분석에 적합한 예는 유방암 조직 12예, 양성 유방질환 조직 11예였다. 이들의 병리조직학적 소견과 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 상태, 호르몬 수용체 상태와 telomerase 활성도 결과는 Table 1에 서와 같다. 양성 유방질환에서 telomerase 활성도는 11예 중에서 4예(36.4%)에서 양성 소견을 보였다. 유방암에서의 telomerase 활성도는 12예 중에서 10예(83.3%)에서 양성 소견을 보여 양성 유방

질환 조직보다 높은 양성률을 보였다($p=0.005$)

2. 유방암 진단에서 telomerase 활성도의 정확도

양성 유방질환 조직과 유방암 조직에서 telomerase 활성도 비교를 통하여 유방암 진단에서 telomerase 활성도 측정의 정확도를 민감도, 특이도, 예측도를 구하여 알아본 결과 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 민감도는 83.3%, 특이도는 63.6%,

Table 1. Telomerase activity in tissues from 12 breast cancers & 11 benign breast diseases

pathology	age	TN	stage	ER	PR	telomerase activity
malignant(n=12)						
IDC	53	T2N0	IIA	(-)	(-)	(+)
IDC	45	T2N0	IIA	(-)	(+)	(-)
IDC	61	T2N1	IIB	(-)	(-)	(+)
IDC	46	T2N1	IIB	(+)	(-)	(+)
IDC	51	T1N1	IIA	(-)	(-)	(-)
IDC	38	T4N1	IIIB	(-)	(-)	(+)
IDC	52	T2N0	IIA	(+)	(+)	(+)
IDC	34	T2N0	IIA	(-)	(-)	(+)
IDC	37	T1N0	I	(+)	(+)	(+)
IDC	40	T2N1	IIB	(+)	(+)	(+)
IDC	70	T1N0	I	(-)	(-)	(+)
IDC	45	T4N1	IIIB	(+)	(-)	(+)
benign(n=11)						
fibroadenoma	37					(-)
fibroadenoma	32					(+)
fibroadenoma	47					(-)
FCD	40					(-)
FCD	22					(-)
fibroadenoma	38					(-)
FCD	45					(-)
FCD	46					(+)
FCD	35					(-)
FCD	25					(+)
FCD	37					(+)
Phyllodes tumor						

IDC: invasive ductal ca.; FCD: fibrocystic disease; ER: estrogen receptor; PR: progesteron receptor

Table 2. Tissue pathology & telomerase activity

tissue pathology		telomerase activity
benign (n=11)		
fibroadenoma	3	1 (33.3%)
fibrocystic disease	7	2 (28.6%)
phyllodes tumor	1	1 (100.0%)
Total	11	4 (36.4%)
malignant (n=12)		
stage I	1	1 (100.0%)
stage IIA	5	3 (60.0%)
stage IIB	4	4 (100.0%)
stage IIIA	-	
stage IIIB	2	2 (100.0%)
Total	12	10 (83.3%)

Table 3. Validity of telomerase activity in breast cancer; sensitivity, specificity, and predictability

telomerase	malignant*	benign*	total
(+)	10	4	14
(-)	2	7	9
Total	12	11	23

sensitivity=10/(10+2)=0.833

specificity=7/(4+7)=0.636

positive predictability=10/(10+4)=0.714

negative predictability=7/(2+7)=0.778

*significant in t-test; p=0.05

양성 예측도는 71.4%, 음성 예측도는 77.8%였다.

3. 유방암에서 telomerase 활성도와 다른 변수 사이의 상관관계

유방암 환자 조직 12예에 대한 나이, 병리조직학적 특성(종양의 크기, 림프절 전이 여부), 호르몬 수용체 상태(ER, PR) 등에 따른 결과와 telomerase

활성도 간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 4와 같다. 분석 결과 에스트로젠 수용체의 발현과 telomerase 활성도 사이에 통계적으로 유의한 상관관계를 보였고, 종양의 크기(T)와 telomerase 활성도 간의 상관관계에서 통계적으로 유의하지는 않았지만 상당한 관련성을 보이는 결과를 보였다(p=0.073).

고 안

주로 생식세포나 암세포와 같은 불멸세포에서 주로 존재하는 것으로 알려진 telomerase는 1985년 Gleider와 Blackburn¹⁾이 처음으로 발견하였고, 그 구조는 RNA와 단백질로 구성되며, RNA에 의존하는 DNA 중합효소로서 일종의 역전사효소(reverse transcriptase)로 밝혀졌다²⁾. Telomer 가설³⁾에 의하면 telomerase는 암세포의 불멸화 단계에서 필수적인 효소로 발암단계에서 이 효소의 활성이 없으면 암의 특징인 불멸화(immortalization)를 갖추지 못하게 되며, 자연소멸되는 암으로 잘 알려진 신경아세포종 병기 IV-S의 예에서와 같은 임상양상을 보일 것이라는 주장⁴⁾도 있다.

Table 4. Correlation of telomerase activity with age, stage, and hormonal receptor status in breast cancers

		telomerase activity		p value
		(+)	(-)	
age	31-40	4	-	p=0.920
	41-50	2	1	
	51-60	2	1	
	61-70	2	-	
tumor	T1	2	1	p=0.073
	T2	6	1	
	T3	-	-	
	T4	2	-	
node	N0	5	1	p=0.539
	N1	5	1	
stage	I	2	-	p=0.664
	IIA	3	2	
	IIB	3	-	
	IIIA	-	-	
ER	(+)	4	-	p=0.009*
	(-)	6	2	
PR	(+)	3	1	p=0.252
	(-)	7	1	

*significant in Pearson correlation

인체에서의 효소 활성도는 매우 미약하여 측정이 어려웠으나 Kim 등⁵⁾은 telomerase 효소반응 산물을 PCR 처리하여 결과를 확인하는 방법(telomeric repeat amplification protocol: TRAP)을 개발하여 이 방법으로 정상세포와 조직, 암세포와 조직에서 각각 활성도를 측정하여 보고하였다. 이후에 telomerase 활성도에 대한 측정이 인체조직에서 많이 시행되고, 특히 암조직에서 중점적으로 이루어졌다. 이러한 측정 결과 telomerase 활성도는 주로 생식세포와 암세포 및 그 조직에서 확인

되었고, 정상체세포에서는 활성도가 거의 없다고 보고되고 있다. 다른 추가 연구⁶⁾에서도 유사한 결과를 보여 이를 종합하면, 암조직의 80% 이상에서 활성도를 보인다고 알려지고 있다.

유방암의 telomerase 활성도에 대하여 Hiyama 등⁷⁾의 보고에 의하면 140예의 유방암 조직 가운데 130예(93%)에서 telomerase 활성도를 보였고, 이는 병기, 림프절 전이, 종양의 크기와 상관관계를 보이며, 다변량 분석에서도 병기가 진행됨에 따라서 활성도가 높게 나타난다고 보고하였고, 양성 유방질환에서는 섬유선종에서 45%, 엽상종양에서 50%에서 활성도를 보인다고 하였다. Kim 등⁵⁾의 보고에서는 정상유방조직에서는 효소의 활성도가 전혀 없었고, 암주위 조직에서는 활성도의 양성률이 10% 정도였고, 암조직에서는 79%의 양성률을 보였다고 한다. Bednarek 등⁸⁾의 의하면 유방암 조직의 95.2%에서 효소의 양성 활성도를 보였고, 양성 종양에서는 20%에서 활성도를 보였다고 하며, 병기나 호르몬 수용체 등의 어떠한 요소와도 상관관계를 보이지 않았으며, 다만 제4 병기의 진행성 유방암에서 높은 효소 활성도를 보이는 경향이 있었다고 보고하고 있다. Clark 등⁹⁾의 예비 연구에서도 20예의 유방암에서 16예(80%)에서 양성 활성도를 보였고, 본 연구에서는 이러한 활성도가 환자의 불량한 예후와 관계가 있다고 하였다.

본 연구에서는 실험 검체가 많지 않아 단정적인 결론을 내리기에 무리가 있겠으나 다른 보고에서와 유사한 telomerase 활성도 양성률을 보였고, 특히 유방암에서 진단적 의미를 진단의 정확도에 두고 볼 때, 민감도, 특이도 및 예측도 등에서 유방암 진단의 한 방법으로 인정할 만한 결과를 보인 것으로 사료된다. Telomerase 활성도의 상관관계에서 에스트로젠 수용체 발현이 통계적으로 유의한 결과를 보였는데 이에 대한 보다 명확한 결론은 더 많은 검체에서 효소의 활성도와 에스트로젠 수용체 발현을 확인하고 검증해야 할 것으로 사료된다. 더 많은 유방암 조직 검체의 측정과 더불어 세포검사 검체에서 측정이 가능하면 유방암의 조기진단 및 선별검사로써 telome-

rase 활성도의 측정이 충분한 의의가 있으리라 사료된다¹⁰⁾. 이번 연구는 비록 검체 수가 많지 않았지만 이러한 맥락에서 이루어진 예비 연구로서 충분한 의의가 있으리라 사료되며, 추가로 유방암 조직에서의 활성도 측정뿐만 아니라 세포검체에서 활성도를 측정하여 그 결과를 확인하는 본격적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

유방암 조직 12예와 양성 유방질환 조직 11예에서 telomerase 활성도를 TRAP을 이용한 ELISA 법으로 측정한 결과 유방암 조직에서 83.3%의 활성도 양성률을 보였고, 양성 유방질환 조직에서는 36.4%의 활성도 양성률을 보였다. 유방암 진단에서 telomerase 활성도 측정법의 민감도는 83.3%, 특이도는 63.6%, 양성 예측도는 71.4%, 음성 예측도는 77.8%였다. 또한 에스트로젠 수용체의 발현과 telomerase 활성도 사이에 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다. 이상의 결과에서 검체의 수가 충분하지 못하여 단정적인 결론을 내리기에 무리가 있지만, 유방암에서 telomerase는 활성화되어 있었다.

참 고 문 헌

- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomeric terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cells* 1985; 43: 405-413
- Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cells* 1987; 51: 887-898
- Olovnikov AM. A theory of marginotomy. *J Theoret Biol* 1973; 41: 181 - 190
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med* 1995; 1: 249-255
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015
- Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-894
- Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Katsumasa K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-122
- Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnson DA, Aldaz CM. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-16
- Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1874-1881
- Breslow RA, Shay JW, Srivastava S. Telomerase and early detection of cancer: a national cancer institute workshop. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 618-623