

한국인 대장암 환자의 종양조직에서 APC 유전자변이

전남대학교 의과대학 외과학교실, ¹진단검사의학교실

조상혁 · 허정욱 · 김영진 · 신명근¹ · 김형록

APC Mutation Spectra in Sporadic Colon Cancer Tissue among Korean

Sang Hyuk Cho, M.D., Jung Wook Huh, M.D., Young Jin Kim, M.D.,
Myung Geun Shin, M.D.¹, Hyeong Rok Kim, M.D.

Departments of Surgery and ¹Laboratory Medicine, College of Medicine, Chonnam University, Hwasun, Korea

Purpose: APC (adenomatous polyposis coli) gene is one of the tumor-suppressor genes that acts in the early stages of cancer. Among general colon cancer patients, normal APC gene expression is deficient in 80%. It seems that APC is the most important gene in the development of colon cancer. This study was performed to analyze the mutation spectra of APC gene in sporadic colon cancer tissue from Korean patients with colon cancer.

Methods: A total of 38 patients with sporadic colon cancer were enrolled. Colon cancer tissues were analyzed for the determination of APC gene mutation spectra by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method using SALSA MLPA P403 APC kit (MRC-Holland, Amsterdam, NL).

Results: APC gene mutations showing deletion/duplication in one or more exons were detected in 23 (60.5%) patients. Duplication in 13 patients (56.5%), duplication and deletion in 7 patients (30.4%), and deletion in 3 patients (13.1%) was detected. The incidence of APC gene mutation found in this study was highest in exon 3. From this study, no significant differences were observed with respect to clinicopathologic findings and the presence or absence of APC mutations.

Conclusion: The frequency of APC gene mutation was about 61% in Korean patients with colon cancer, it showed concordance with the previous reports on the frequency of APC gene mutation from Caucasian patients with sporadic colon cancer. However, in contrast to these reports, the frequency of duplication disclosed much higher than those of western countries. (*J Korean Surg Soc* 2009;76:159-167)

Key Words: Colon cancer, APC gene, Mutation

중심 단어: 대장암, APC 유전자, 변이

서 론

대장암은 서구에서는 폐암에 이어 암 사망률 2위를 차지하는 흔한 질병이다. 우리나라에서 가장 흔한 암종은 위암

(20.3%), 폐암(12.9%), 간암(12.5%) 및 대장암(10.4%)의 순으로, 대장암은 남녀 모두에서 4번째로 흔한 암종이며, 암 사망률은 남녀에서 각각 4위(8%)와 3위(11.5%)를 차지하고 있다.(1,2) 하지만, 최근 식생활의 서구화 및 노령 인구의 증가 등에 따라 그 발생 빈도는 더욱 상승할 것으로 예상되고 있다.

대장암의 발생기전은 다양하지만 약 70% 정도에서 선종-암 발생기전(adenoma-cancer carcinogenesis)에 의하여 생기며, 다른 중요 기전으로 과소수정유전자(mismatch repair gene)의 기능 이상에 기인하는 것으로 알려져 있다.(3,4) 이

책임저자: 김형록, 전남 화순군 화순읍 일심리 160번지

☎ 519-809, 화순전남대학교병원 외과

Tel: 061-379-7646, Fax: 061-379-7661

E-mail: drkhr@jnu.ac.kr

접수일 : 2008년 10월 15일, 게재승인일 : 2008년 12월 17일

리한 대장암의 발생 과정에서 초기 단계에 관여하는 유전자 중의 하나로 *APC* (adenomatous polyposis coli) 유전자를 들 수 있는데, 이 유전자는 종양억제 유전자로서 가족성 선종성 용종증(familial adenomatous polyposis, FAP)이나 산발성 대장선종에서 대장암으로의 진행에 중요한 역할을 한다.(5,6) 이러한 *APC* 유전자의 변이는 가족성 선종성 용종증의 95% 이상에서, 그리고 대장선종 및 대장선암의 80% 이상에서 관찰된다.(3)

대장암종을 대상으로 한 최근까지의 연구에 따르면, 인종 및 지역에 따라 발생빈도 및 발생기전과 관련된 유전자 변이 빈도가 다를 수 있음이 알려져 있다.(7-11) 하지만, 아직까지 국내에서는 *APC* 유전자 변이와 관련된 연구들이 주로 가족성 선종성 용종증 또는 과오종 등에 국한되어 있어,(12,13) 산발성 대장암에서의 *APC* 유전자 변이 빈도에 대한 연구가 미비한 상태이다. 이에 본 연구에서는 한국인을 대상으로 산발성 대장암 환자군의 종양조직에서 multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 방법으로 *APC* 유전자 변이를 분석하여 그 변이 빈도 및 양상에 대해 조사하고, 그 결과를 임상상과 비교하였다.

방 법

1) 대상

화순전남대병원에서 2004년 10월부터 2005년 12월까지 대장암으로 진단받고 외과적 절제술을 시행 받은 환자 중 의무기록 조사가 가능하고, 종양조직이 보관되어 있던 38명을 대상으로 하였다. 대상군의 임상병리학적 특징(환자의 연령, 성별, 종양의 위치, 분화도, 병기 및 병리학적 소견)은 의무기록을 통해 후향적으로 조사하였다.

2) DNA 추출

대장암 환자의 조직을 잘게 잘라 tissue lysis buffer를 넣고 homogenizer로 완전 용해한 후 QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 TE buffer에 녹여 모든 시료의 농도를 50~500 ng/ μ l로 조정하였다.

3) MLPA를 이용한 *APC* 유전자변이 분석

APC 유전자변이 분석은 SALSA MLPA kit P403 *APC* (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands)를 이용하여 제조사에서 제시한 방법으로 시행하였다. MLPA 검사원리 및 방

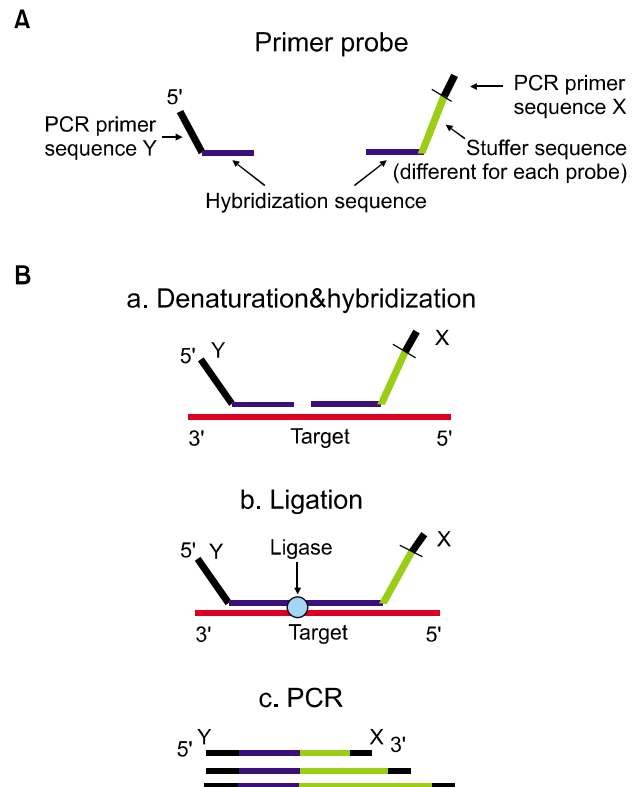


Fig. 1. Outline of the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) reaction. (A) The primer probes consist of two oligonucleotides, one with only primer and hybridization sequences, and the other with an extra stuffer sequence between the two sequences. (B-a) The two parts of each probe hybridize to adjacent target sequences. (B-b) Probes are ligated by a thermostable ligase. (B-c) A universal primer pair is used to amplify all ligated probes. The stuffer sequence is different for each probe and makes the amplification product separable by electrophoresis.

법에 대해서는 Fig. 1에 간단히 설명하였다. Kit 내의 *APC* probe mix에 포함된 소식자들은 Table 1과 같았다. MLPA 검사는 Takara PCR Thermal Cycler (Takara Bio Inc, Japan)를 이용하였다.

(1) DNA 변성(denaturation) 및 교잡(hybridization): 우선 TE buffer에 희석된 DNA 5 μ l를 튜브에 분주하여 98°C에서 5분간 두어 DNA를 변성시켰다. 그 다음 25°C로 냉각하여 probe mix 1.5 μ l와 buffer 1.5 μ l의 혼합액을 각 튜브에 분주하였다. 다시 95°C에서 1분간 항온 시킨 후 60°C에서 각 probe들이 target DNA와 교잡하도록 16시간 동안 반응시켰다.

(2) 결합(Ligation) 반응: *APC* gene에 특이적인 총 23개의 probe중에서 각 probe에 대해 2개의 oligonucleotide가 결합

Table 1. Probes used for APC-specific MLPA

Probe name*	Detection region	PCR length (nt)	Ligation site	Sequence
Synthetic probe	2q14			
0797-L0463	5q31			
1532-L0975	Promotor region 1	139	538-539	GGCATCTT-GTGCTAAT
2065-L1586	Promotor region 2	148	821-822	GCGCACGT-GACCGACA
1063-L0061	14q13			
1534-L0977	Promotor region 3	166	35-36	CTGCAGAT-GGCTGATG
1535-L0978	Exon 1	175	64-65	GCTTCATA-TGATCAGT
1217-L0694	4q34			
1536-L0979	Exon 2	193	240-241	CTATGGCT-TCTTCTGG
1537-L0980	Exon 3	202	363-364	AAGGATCT-GTATCAAG
1344-L0555	9q21			
1538-L0981	Exon 4	220	508-509	TGACAAAG-AAGAAAAG
1539-L1337	Exon 5	229	660-661	CGATGGAA-GAACAAC
0517-L0097	2q14.2			
1540-L0983	Exon 6	247	729-730	AGCAAATC-GAAAAGGA
1541-L0984	Exon 7	256	813-814	ATGAAACC-GGCTCACA
0960-L0547	2p12			
1542-L0985	Exon 8	274	921-922	ATGAAACA-GCCAGTGT
1773-L1339	Exon 9	283	1190-1191	AGTAAAGA-GGCTCGGG
0990-L0567	11p12			
1544-L0987	Exon 10	301	1418-1419	GTTCTAAT-GAAACTTT
1545-L1338	Exon 11	310	1492-1493	AGAATTAT-TGCAAGTG
1042-L0791	8q24			
1774-L1340	Exon 12	328	1652-1651 Rev	TTTtagTT-GGGCCACA
1700-L1341	Exon 13	337	1725-1726	GAGCAGAT-GTAAATAG
2182-L3127	6q26			
1548-L0991	Exon 14	355	1902-1903	TTGCATTT-TTGGTTGG
1549-L0992	Exon 15 start	364	2234-2235	GCAGCTTT-AAGGAATC
1085-L0653	14q32			
1550-L0993	Exon 15 middle	382	4896-4897	AGCTGCCT-GTGTACAA
1701-L1469	Exon 15 end	391	8409-8410	CTCCTTTT-AATTACAA
0977-L0564	15q31			
3323-L2526	Exon 10A (alternative)	409	215-216	GCATTTCA-TCACAGGA
3324-L2527	1061 mutation	418	3239-3240	GAAATAAAACAAAGTG
3325-L2528	309 mutation	427	3985-3984 Rev	CCAATCTT-TTCTTTTA
1843-L1408	16p13			
1440-L0909	2p16			

*Names of the probes included in the SALSA MLPA kit P403 APC (MRC-Holland).

되는 이 과정에서는 먼저 thermal cycler를 54°C로 냉각시켜 미리 얼음에서 녹여둔 Ligase-65 mix (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) 32 μ l를 각 튜브에 분주하였다. 그 다음 54°C에서 15분 동안 반응시킨 후 98°C에서 5분간 가온하였다.

(3) PCR 반응: 새 튜브에 PCR buffer 4 μ l와 3차 증류수 26 μ l의 혼합액과 상기의 반응 산물 10 μ l를 분주하였다. 60°C의 thermal cycler에서 10 μ l의 polymerase mix를 각각의 튜브에 분주한 후 PCR을 시작하였다. PCR 반응은 95°C에

서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분씩을 35회 증폭하고, 마지막에 72°C에서 20분간 항온시켰다. PCR 산물은 1.0 μ g/ml의 ethidium bromide를 함유한 1.8% agarose gel에서 100 V로 40분간 전기영동한 후 결과를 확인하였다.

(4) Genescan: PCR 산물 1 μ l에 ROX 0.3 μ l와 HiDi-Formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 9 μ l를 분주하고 각 튜브를 94°C에서 2분간 반응시킨 후 얼음에서 냉각시켰다. 그 다음 ABI PRISM 3130X Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 Genescan-ROX

500 sized standard (Applied Biosystems)를 이용하여 genescan을 시행하였다.

(5) 결과분석: APC 유전자 변이의 분석은 Softgenetics MLPA 프로그램(GeneMarker)을 이용하여, 각 DNA 샘플의 최대값(peak 값)과 크기를 엑셀파일로 옮긴 후 데이터를 분석하였다. 최대값이 낮거나 크기가 적은 비특이적으로 증폭된 산물, 시발체(primer) 이량체(dimer) 및 MLPA control mix로부터 얻어진 최대값은 삭제하고, MLPA 산물로 기대되는 최대값들만 남긴 상태에서 샘플의 모든 대조군 최대

값을 합한 값으로 각 최대값을 나누어 모든 최대값을 평균화시켰다. 그 다음, 본 실험에서 동시에 시행한 정상 대조군 반응과 비교하여 각 샘플의 상대적인 최대값(각 probe가 해당 exon의 target sequence와 결합하여 복제된 수)을 구하였다. 상대적인 최대값이 0.75 이하이면 결손, 1.3 이상이면 증복으로 보았다. 복제된 수의 변화를 보인 샘플은 최소 두 번 이상의 실험을 시행하여 매 실험에서의 대조군 반응과 비교하여 분석하였다.

Table 2. Clinicopathological characteristics of patients

Probe name*	Detection region	PCR length (nt)	Ligation site	Sequence
Synthetic probe	2q14			
0797-L0463	5q31			
1532-L0975	Promotor region 1	139	538-539	GGCATCTT-GTGCTAAT
2065-L1586	Promotor region 2	148	821-822	GCGCACGT-GACCGACA
1063-L0061	14q13			
1534-L0977	Promotor region 3	166	35-36	CTGCAGAT-GGCTGATG
1535-L0978	Exon 1	175	64-65	GCTTCATA-TGATCAGT
1217-L0694	4q34			
1536-L0979	Exon 2	193	240-241	CTATGGCT-TCTTCTGG
1537-L0980	Exon 3	202	363-364	AAGGATCT-GTATCAAG
1344-L0555	9q21			
1538-L0981	Exon 4	220	508-509	TGACAAAG-AAGAAAAG
1539-L1337	Exon 5	229	660-661	CGATGGAA-GAACAAC
0517-L0097	2q14.2			
1540-L0983	Exon 6	247	729-730	AGCAAATC-GAAAAGGA
1541-L0984	Exon 7	256	813-814	ATGAAACC-GGCTCACA
0960-L0547	2p12			
1542-L0985	Exon 8	274	921-922	ATGAAACA-GCCAGTGT
1773-L1339	Exon 9	283	1190-1191	AGTAAAGA-GGCTCGGG
0990-L0567	11p12			
1544-L0987	Exon 10	301	1418-1419	GTTCTAAT-GAAACTTT
1545-L1338	Exon 11	310	1492-1493	AGAATTAT-TGCAAGTG
1042-L0791	8q24			
1774-L1340	Exon 12	328	1652-1651 Rev	TTTtagTT-GGGCCACA
1700-L1341	Exon 13	337	1725-1726	GAGCAGAT-GTAAATAG
2182-L3127	6q26			
1548-L0991	Exon 14	355	1902-1903	TTGCATTT-TTGGTTGG
1549-L0992	Exon 15 start	364	2234-2235	GCAGCTTT-AAGGAATC
1085-L0653	14q32			
1550-L0993	Exon 15 middle	382	4896-4897	AGCTGCCT-GTGTACAA
1701-L1469	Exon 15 end	391	8409-8410	CTCCTTTT-AATTACAA
0977-L0564	15q31			
3323-L2526	Exon 10A (alternative)	409	215-216	GCATTTCA-TCACAGGA
3324-L2527	1061 mutation	418	3239-3240	GAAATAAAACAAAGTG
3325-L2528	309 mutation	427	3985-3984 Rev	CCAATCTT-TTCTTTTA
1843-L1408	16p13			
1440-L0909	2p16			

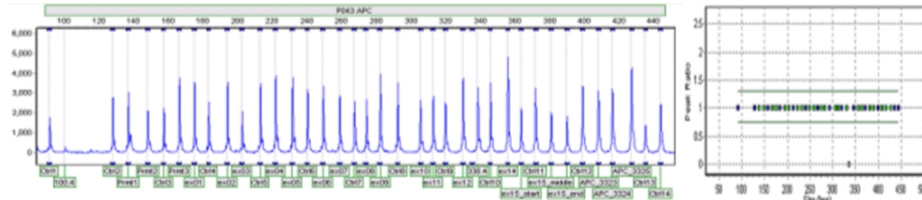
*Names of the probes included in the SALSA MLPA kit P403 APC (MRC-Holland).

4) 통계분석

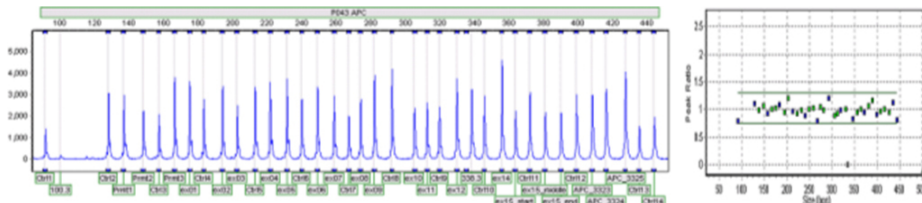
환자의 연령 및 성별, 종양의 위치, 분화도, 병기 및 병리

학적 소견에 따른 대장암 조직의 APC 유전자 변이 및 그 개수와의 상관관계를 SPSS 카이제곱검정(χ^2 test)을 이용하여 유의성을 검증하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유

A Control



B Patient without APC gene mutation



C Patient with APC gene mutation

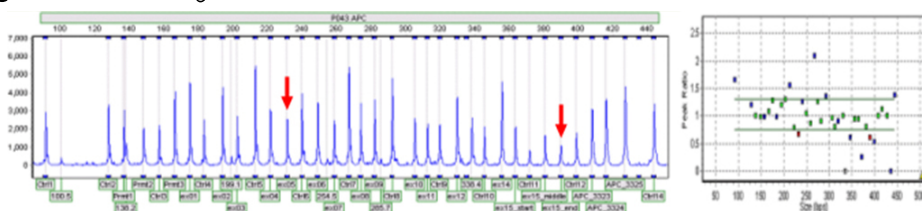
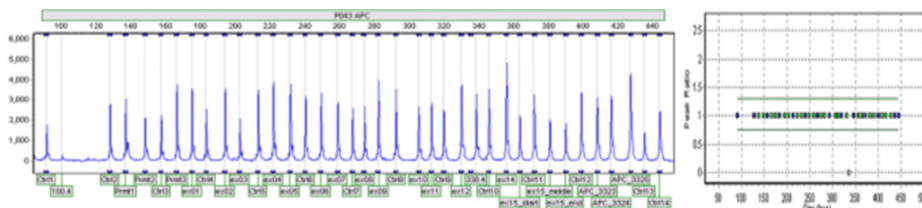
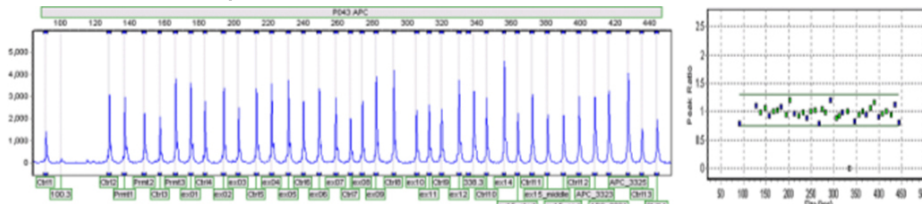


Fig. 2. Detection of deletions in the APC gene with MLPA. (A) Capillary electrophoresis (CE) pattern from a control sample containing normal APC gene. (B) CE pattern from patient 38 without any deletion or duplication in APC gene exon. (C) CE pattern from patient 10 with two deletions in exon 5 and exon 15 end of APC gene.

A Control



B Patient without APC gene mutation



C Patient with APC gene mutation

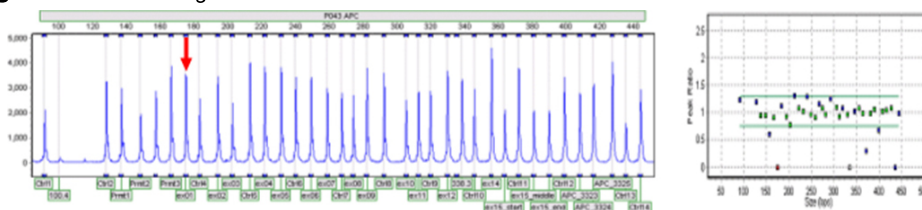


Fig. 3. Detection of deletions in the APC gene with MLPA. (A) Capillary electrophoresis (CE) pattern from a control sample containing normal APC gene. (B) CE pattern from patient 38 without any deletion or duplication in APC gene exon. (C) CE pattern from patient 14 with one duplication in exon 1 of APC gene.

의한 것으로 간주하였다.

결 과

1) 대상군의 임상병리적 특징

대상군은 각각 남자 23명(60.5%), 여자 15명(39.5%)이었고, 평균 나이는 61세(범위, 36~77세)였다. 종양의 위치는 원위부 24명(63.2%) 및 근위부 14명(36.8%)이었다. 종양의 병리학적 진단은 선암종 32명(84.2%), 점액성 선암종 5명(13.2%) 및 기타 1명(2.6%)이었다. 그리고, American Joint Committee on Cancer stage (AJCC)에 의해 분류한 대장암의 병기는 1기 3명(8.0%), 2기 14명(36.8%), 3기 20명(52.6%) 및 4기 1명(2.6%)이었다(Table 2).

2) MLPA 검사에 의한 APC 유전자 변이 양상

Fig. 2와 Fig. 3은 MLPA 검사로 관찰된 APC 유전자 각 exon의 결손(deletion) 및 중복(duplication)의 대표적인 예이다. 전체 38명 중 23명(60.5%)에서 하나 이상의 exon이 결손 또는 중복을 보이는 APC 유전자 변이가 관찰되었으며, 결손만 관찰된 경우는 3명(13.1%), 중복만 관찰된 경우는 13명(56.5%), 그리고 결손과 중복이 동시에 관찰된 경우는 7명(30.4%)이었다. 한편, promotor region, exon 및 frequent mutation region의 각 부분에서의 변이 양상은 Table 3과 같았다. 변이가 관찰된 부위는 exon 3이 15명으로 가장 많았고, exon 1에서 10명, exon 15에서 8명, exon 2 및 5에서 각 7명, exon 10에서 6명, exon 8에서 4명, promotor region 2, exon 4, 9 및 7에서 각 3명, promotor region 1 및 3에서 각

Table 3. MLPA analysis results from patients with deletions/duplications of one or more exons of the APC gene

Patient No.	Promotor region			Exon																Frequent mutation region			Deletion	Duplication
	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15, start	15, middle	15, end	10A	1061	1309	
1				dup	dup	dup																	0	3
2																				del			1	0
3				dup	dup	dup																	0	3
4						dup		del															1	1
6				dup																			0	1
10								del												del			2	0
12		dup	dup		dup	dup		del		dup	dup	dup	dup					del			dup		2	9
13				dup	dup	dup		del	del	del										del			4	3
14				dup																			0	1
15						dup																	0	1
16						dup				dup													0	2
17		del																					1	0
18				dup																			0	1
19			dup	dup	dup	dup	del	del		dup	dup	dup	dup	dup	dup			del			dup		3	11
20	dup						del	del											del				3	1
21				dup	dup	del	del			dup	dup	dup									dup		2	6
22						dup																	0	1
23						dup																	0	1
26	del	del		dup																dup			2	2
27						dup																	0	1
30						dup																	0	1
31				dup	dup	dup																	0	3
34				dup		dup														dup			0	3
Deletion	1	2	0	0	0	0	0	3	7	1	1	0	0	0	0	0	0	2	1	3	0	0	0	
Duplication	1	1	2	10	7	15	0	0	0	2	4	3	3	1	1	0	0	0	2	0	3	0	0	

Table 4. The association of APC gene mutation (one or more exon deletion/duplication) and clinical, histological and pathological parameters of patients

Parameter	No APC mutation, number (%)	APC mutation, number (%)				P-value*
		Deletion	Duplication	Both	Total	
Age						
< 60	4 (26.7)	2 (66.7)	6 (46.2)	2 (28.6)	10 (43.5)	0.167
60 ~ 70	9 (60)	0	3 (23.1)	5 (71.4)	8 (34.8)	
71 ~ 79	2 (13.3)	1 (33.3)	4 (30.7)	0	5 (21.7)	
Gender						
Male	10 (66.7)	2 (66.7)	7 (53.8)	4 (57.1)	13 (56.5)	0.905
Female	5 (33.3)	1 (33.3)	6 (46.2)	3 (42.9)	10 (43.5)	
Site						
Proximal	6 (40)	1 (33.3)	5 (38.5)	2 (28.6)	8 (34.8)	0.960
Distal	9 (60)	2 (66.7)	8 (61.5)	5 (71.4)	15 (65.2)	
Differentiation						
Well	9 (60)	1 (33.3)	8 (61.5)	3 (42.9)	12 (52.2)	0.902
Moderate	3 (20)	1 (33.3)	3 (23.1)	3 (42.9)	7 (30.4)	
Poor	3 (20)	1 (33.3)	2 (15.4)	1 (14.2)	4 (17.4)	
American joint committee on cancer stage						
I	1 (6.7)	0	1 (7.6)	1 (14.3)	2 (8.7)	0.812
II	6 (40)	0	6 (46.2)	2 (28.6)	8 (34.8)	
III	7 (46.6)	3 (100)	6 (46.2)	4 (57.1)	13 (56.5)	
IV	1 (6.7)	0	0	0	0	

* χ^2 (mutation versus no mutation).

2명, exon 6, 11 및 12에서 각 1명의 순이었다. 하지만, exon 13, 14, frequent mutation region 1061 및 1309에서는 변이가 관찰되지 않았다.

3) APC 유전자변이 빈도와 임상병리학적 소견의 연관성

환자의 연령, 성별, 종양의 위치, 분화도 및 병기에 따른 APC 유전자변이의 빈도는 Table 4와 같았다. APC 유전자변이는 60세 미만에서 43.5%로 60세 이상인 경우보다 많았고, 성별이 남자인 경우 56.5%로 여자의 43.5%에 비해 많았으나 통계적으로 유의하지는 않았다($P > 0.05$). 또한, 종양의 위치가 원위부인 경우 65.2%로 근위부 34.8%에 비해 변이가 더 많았으며, 분화도가 높은 경우 52.2%로 분화도가 낮은 경우보다 빈도가 높았고, 3기에서 56.5%로 다른 병기에 비해 변이 빈도가 높았으나, 이러한 소견들은 통계적으로 유의하지는 않았다($P > 0.05$). 병리학적 소견에 따라서는 각각 선암종 56.3% (18/32), 점액성 선암종 80% (4/5), 그리고 상피세포암종 100% (1/1)에서 APC 유전자 변이가 관찰되었는데, 병리학적 소견에 따른 APC 유전자변이 빈도 또한 유의한 상관관계가 없었다($P > 0.05$)(Table 5).

Table 5. APC gene mutations of respective carcinomas patients

	Total	APC mutation, number (%)	P-value*
Adenocarcinoma	32	18 (56.3)	0.429
Mucinous adenocarcinoma	5	4 (80)	
Squamous cell carcinoma	1	1 (100)	

* χ^2 (mutation versus no mutation).

고 찰

APC 유전자는 종양억제 유전자로서 5번 염색체의 q21 부위에 존재하며 15개의 exon으로 구성되어 있다.(14,15) 총 2,843개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 생성하는데, 이 단백질은 세포들 사이의 부착에 관여하는 단백질인 베타카테닌이라는 단백질과 결합하여 세포 사이의 신호전달에 관여함으로써 세포의 성장 조절에 영향을 준다.(14,15) 모든 대장암의 80% 이상에서 정상적인 APC 단백질이 발현되지 않으므로, APC 유전자는 대장암의 발생과 관련된 가장 중요한 유전자로 생각되고 있다. 한편, 다른 부위 암 발생과는

달리 대장암에만 특이하게 관여하는 APC 유전자의 변이는 암 발생의 초기에 관여한다. 이러한 APC 유전자 변이는 가족성 선종성 용종증의 일부가 암으로 진행되는 주원인으로, 유전성 암이 아닌 산발성 대장암의 발생과도 연관이 있다고 알려져 있다.(16-18)

본 연구에서는 APC 유전자 변이를 확인하기 위해 Schouten 등(19)이 고안한 MLPA 검사를 이용하였다. MLPA 검사는 target exon의 염기서열 복제 수를 측정하는 방법으로 다른 방법들에 비해 target region에 결합하는 한 쌍의 PCR primer만 사용하여 한 번의 반응으로 결과를 알 수 있다. 또한, 이전 검사들과 비교하여 한 번에 많은 검체를 처리할 수 있어 보다 간편하며, 각 exon의 복제 수를 알 수 있어 APC 유전자 변이 부위와 정도를 확인할 수 있다는 장점이 있다.(20) 이러한 이유로 이 검사법은 APC 외에도 *hMLH1*, *hMSH2*, *BRCA1* 및 *BRCA2* 등의 다양한 유전자 분석에 사용되고 있다.(21)

본 연구에서는 산발성 대장암 환자를 대상으로 APC 유전자 변이를 분석하였는데, 총 38명 중 23명(60.5%)에서 변이가 관찰되었다. 이는 서구인을 대상으로 한 기존 연구에서 보고된 APC 유전자변이의 빈도인 47~83%와 유사하였다.(6,16) 한편, 기존의 연구에 따르면 APC 유전자 변이가 있는 경우 exon의 결손이 대부분을 차지하였고,(10,21-23) 가족성 선종성 용종증으로 진단받은 한 가족에서 exon 4의 중복이 보고된 바 있다.(24) 하지만, 본 연구에서 관찰된 유전자 변이는 exon의 중복만 있었던 경우가 13명(56.5%)으로 가장 많았고, 결손과 중복이 동시에 관찰된 경우는 7명(30.4%), 그리고 결손만 관찰된 경우가 3명(13.1%) 순이었다. 이러한 차이가 인종 및 지역에 따른 차이인지를 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

한편, 본 연구에서 결손 또는 중복의 APC 유전자 변이를 보이는 부위는 exon 3이 15명으로 가장 많았으며, exon 1에서 10명, exon 15에서 8명, exon 2와 5에서 7명의 순이었다. 이는 Cao 등(10)이 가족성 선종성 용종증으로 진단받은 가족에서 조사한 APC 유전자 변이 부위 중 exon 15번이 가장 흔하였다는 보고와는 차이를 보이고 있었다. 이러한 차이는 본 연구의 대상군이 가족성 선종성 용종증이 아닌 산발성 대장암이었음에 기인하는 것으로 생각한다. 그리고, 본 연구에서는 APC 유전자변이가 없었던 경우가 15명(39.5%) 이었는데, 이는 대장암이 APC 유전자 이외에 다른 종양 유전자 혹은 종양 억제 유전자의 변이에 의해서도 발생할 수 있기 때문으로 생각한다.(25)

본 연구에서 APC 유전자변이의 빈도는 환자의 연령, 성별, 종양의 위치, 분화도, 병기 및 병리학적 소견과는 연관성이 없었다. MLPA 방법으로 산발성 대장암에 대한 APC 유전자 변이 양상과 임상병리학적 소견과의 연관성을 비교한 연구는 아직까지 접하기 어려운 실정이다. 따라서, 다른 검사 방법을 이용한 본 연구 결과에 대한 재확인 및 보다 많은 예의 산발성 대장암을 대상으로 APC 유전자의 대장암에서의 빈도양상과 APC 유전자 변이의 형태의 특성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론

한국인 산발성 대장암 환자에서 MLPA 방법을 이용하여 종양조직의 APC 유전자 변이를 분석한 결과, 총 38명 중 23명(60.5%)에서 하나 이상의 exon에서 결손 또는 중복을 보이는 APC 유전자 변이가 관찰되었으며, 변이 부위는 exon 3이 15명으로 가장 많았다. APC 유전자변이의 빈도는 환자의 연령, 성별, 종양의 위치, 분화도, 병기 및 병리학적 소견과는 연관성이 없었다. 한국인 대장암 환자에서의 전체적인 APC 유전자 변이 빈도는 서구의 경우와 유사하였으나, 아직까지 서구에서는 변이 양상이 exon의 결손이 대부분이었던 반면에 본 연구에서는 중복의 빈도가 보다 높아 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Ministry of Health and Welfare. 2001 Annual Report of the Korea Central Cancer Registry. 2002.
- 2) Korea National Statistical Office. 2005 Annual Report on the Cause of Death Statistics. 2006.
- 3) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 1988;319:525-32.
- 4) Vogelstein B, Kinzler KW. Colorectal tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The Genetic Basis of Human Cancer. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002. p.583-612.
- 5) Ichii S, Takeda S, Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Emi M, et al. Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). Oncogene 1993;8:2399-405.
- 6) Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. Hum Mol Genet 1992;1:229-33.
- 7) Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH. Sequence of molecular

- genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999;8(Suppl 1):S39-47.
- 8) Berney CR, Fisher RJ, Yang J, Russell PJ, Crowe PJ. Genomic alterations (LOH, MI) on chromosome 17q21-23 and prognosis of sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;89: 1-7.
 - 9) Massa MJ, Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, de Juan C, Caldes T, Sanchez-Pernaute A, et al. Differential prognosis of replication error phenotype and loss of heterozygosity in sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:1676-82.
 - 10) Cao X, Hong Y, Eu KW, Loi C, Cheah PY. Singapore familial adenomatous polyposis (FAP) patients with classical adenomatous polyposis but undetectable APC mutations have accelerated cancer progression. *Am J Gastroenterol* 2006;101: 2810-7.
 - 11) Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001;10:721-33.
 - 12) Lee SC, Han HJ, Kang MS, Choi KW, Park JG. Presymptomatic diagnosis of familial adenomatous polyposis by the use of closely-linked (to APC gene) DNA markers in Korean families. *Korean J Gastroenterol* 1995;27:189-98.
 - 13) Kim JC, Roh SA, Kim HC, Yu CS, Beck NE, Bodmer WF. Somatic mutations of APC presenting polymorphisms in the hamartomatous polyps of the colon. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:1288-96.
 - 14) Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 1998;8:573-81.
 - 15) Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, et al. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993;262:1731-4.
 - 16) Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-7.
 - 17) Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulos A, et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: a mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3352-7.
 - 18) Yang VW. APC as a checkpoint gene: the beginning or the end? *Gastroenterology* 2002;123:935-9.
 - 19) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwindenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
 - 20) Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 2003;22: 428-33.
 - 21) Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 2004;91:1155-9.
 - 22) Michils G, Tejpar S, Thoelen R, van Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns JP, et al. Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat* 2005;25:125-34.
 - 23) Meuller J, Kanter-Smoler G, Nygren AO, Errami A, Gronberg H, Holmberg E, et al. Identification of genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis by two independent quantitative techniques. *Genet Test* 2004;8:248-56.
 - 24) McCart A, Latchford A, Volikos E, Rowan A, Tomlinson I, Silver A. A novel exon duplication event leading to a truncating germ-line mutation of the APC gene in a familial adenomatous polyposis family. *Fam Cancer* 2006;5:205-8.
 - 25) Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res* 2007;5:165-70.