

# p16과 RARB2 유전자의 비정상적인 메틸화 검사를 이용한 악성 흉수의 진단

동아대학교 의과대학 <sup>1</sup>호흡기내과, <sup>2</sup>해부병리과, <sup>3</sup>영상의학과, <sup>4</sup>흉부외과

나서희<sup>2</sup>, 이수미<sup>1</sup>, 구태형<sup>1</sup>, 신봉철<sup>1</sup>, 허정훈<sup>1</sup>, 염수정<sup>1</sup>, 양두경<sup>1</sup>, 이수결<sup>1</sup>, 손춘희<sup>1</sup>, 노미숙<sup>2</sup>, 배호정<sup>2</sup>, 김기남<sup>3</sup>, 이기남<sup>3</sup>, 최필조<sup>4</sup>

## Diagnosis of Malignant Pleural Effusion by using Aberrant Methylation of p16 and RARB2

Seo Hee Rha, M.D.<sup>2</sup>, Su Mi Lee, M.D.<sup>1</sup>, Tae Hyoung Koo, M.D.<sup>1</sup>, Bong Chul Shin, M.D.<sup>1</sup>, Jung Hun Huh, M.D.<sup>1</sup>, Soo Jung Um, M.D.<sup>1</sup>, Doo Kyung Yang, M.D.<sup>1</sup>, Soo-Keol Lee, M.D.<sup>1</sup>, Choonhee Son, M.D.<sup>1</sup>, Mee Sook Roh, M.D.<sup>2</sup>, Ho-Jeong Bae<sup>2</sup>, Ki Nam Kim, M.D.<sup>3</sup>, Ki Nam Lee, M.D.<sup>3</sup>, Pil Jo Choi, M.D.<sup>4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Pathology, <sup>3</sup>Radiology and <sup>4</sup>Thoracic and Cardiovascular Surgery, Dong-A University College of Medicine, Busan, Korea

**Background:** A diagnosis of malignant pleural effusion is clinically important, as the prognosis of lung cancer patients with malignant pleural effusion is poor. The diagnosis will be difficult if a cytological test is negative. This study was performed to investigate whether the detection of hypermethylation of the p16 (CDKN2A) and retinoic acid receptor b2 (RARB2) genes in pleural fluid is useful for a diagnosis of malignant pleural effusion.

**Methods:** Pleural effusion was collected from 43 patients and was investigated for the aberrant promoter methylation of the RARB2 and CDKN2A genes by use of methylation-specific PCR. Results were compared with findings from a pleural biopsy and from pleural fluid cytology.

**Results:** Of 43 cases, 17 cases of pleural effusion were due to benign diseases, and 26 cases were from lung cancer patients with malignant pleural effusion. Hypermethylation of the RARB2 and CDKN2A genes was not detected in the case of benign diseases, independent of whether or not the patients had ever smoked. In 26 cases of malignant pleural effusion, hypermethylation of RARB2, CDKN2A or either of these genes was detected in 14, 5 and 15 cases, respectively. The sensitivities of a pleural biopsy, pleural fluid cytology, hypermethylation of RARB2, hypermethylation of CDKN2A, or hypermethylation of either of the genes were 73.1%, 53.8%, 53.8%, 19.2%, and 57.7%, respectively; negative predictive values were 70.8%, 58.6%, 58.6%, 44.7%, and 60.7%, respectively. If both genes are considered together, the sensitivity and negative predictive value was lower than that for a pleural biopsy, but higher than that for pleural fluid cytology. The sensitivity of hypermethylation of the RARB2 gene for malignant pleural effusion was lower in small cell lung cancers than in non-small cell lung cancers.

**Conclusion:** These results demonstrate that detection of hypermethylation of the RARB2 and CDKN2A genes showed a high specificity, and sensitivity was higher than for pleural fluid cytology. With a better understanding of the pathogenesis of lung cancer according to histological types at the molecular level, and if appropriate genes are selected for hypermethylation testing, more precise results may be obtained. (*Tuberc Respir Dis* 2008;64:285-292)

**Key Words:** Pleural effusion, Malignancy, Hypermethylation

## 서론

이 논문은 2007학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제)에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence: Choonhee Son, M.D.

Department of Internal Medicine, Dong-A University College of Medicine, 1, Dongdaesin-dong, Seo-gu, Busan 602-714, Korea

Phone: 82-51-240-2874, Fax: 82-51-242-5852

E-mail: son30243@hanmail.net

Received: Feb. 14, 2008

Accepted: Mar. 28, 2008

폐암은 전 세계적으로 암으로 인한 사망 원인 중 수위(首位)를 차지하며, 수 년 전부터 우리나라에서도 암으로 인한 사망 원인 중 1위를 차지하게 되었다<sup>1</sup>. 그리고 우리나라 성인 남성 흡연율은 1980년 79.3%에서 2006년 44.1%로 급격한 감소를 보였지만 여전히 높고, 폐암 발병률이 줄어드는 것은 흡연 인구 감소 20~30년 후라는 점을 고려하면 폐암은 앞으로도 수 십 년 간 중요한 보건학

적 문제로 남게 될 것이다.

흉수는 폐 뿐 아니라 순환기, 신장 등 여러 장기의 다양한 질환들에 의해서 생긴다. 하지만 이런 여러 질환을 규명하는 진단법에 대한 표준화된 지침은 아직 합의된 바가 없다. 대부분의 환자들에게서 흉부 방사선과 흉수 분석 검사를 실시하고, 진단이 되지 않는 경우 흉막 생검을 실시한다. 그런 검사를 다 하여도 20%의 환자들은 진단이 되지 않고<sup>2</sup>, 22%의 악성 흉수는 시간이 경과되어서 진단된다<sup>3</sup>. 따라서 비침습적으로 흉수의 원인을 규명할 수 있는 새로운 방법이 필요할 것으로 생각되며, 최근에 발전된 분자 생물학적 진단 기법이 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

암의 발병 과정은 다양한 유전적 변이에 의해서 여러 단계를 거쳐 생긴다. 이런 유전적 변이는 DNA 염기 서열의 변화(genetic change)를 동반하기도 하지만 염기 서열의 변화는 동반하지 않고 유전자의 발현을 억제하는 epigenetic 변화도 중요하다는 것이 알려졌다, 암의 발병 과정에서 여러 종양 억제 유전자의 발현 장애가 관여하는 것에 주목하게 되었다.

많은 종류의 암에서 DNA 과메틸화가 여러 체액에서 발견되는데 폐암에서도 객담, 기관지 세척액, 말초 혈액에서 이런 변화가 관찰되고 종양과 혈중 DNA 메틸화 사이에서 연관성이 관찰된다는 보고도 있었다<sup>4</sup>. 따라서 체액에서 DNA 메틸화의 발견은 악성 종양 진단에 도움이 될 수 있을 것으로 생각이 된다. 하지만 아직 국내에서 흉수 내 DNA 메틸화의 유용성에 관한 연구는 없어서 이의 유용성에 관한 검증이 필요할 것으로 생각된다.

p16과 retinoic acid receptor-beta 2 (RARB2)의 DNA 과메틸화에 의한 발현 억제가 비소세포 폐암의 발병과 연관되어 있을 것으로 알려져 있지만<sup>5,6</sup>, 흉수 내에서 이들 유전자의 과메틸화가 진단에 도움이 될 것인지는 명확하지 않다. 이에 저자들은 흉수 내에서 p16과 RARB2의 DNA 과메틸화 발현 확인이 악성 흉수의 감별 진단에 도움이 될 것인지를 검증하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상 환자군 및 흉수의 채취

2005년 5월 1일부터 2005년 12월 31일까지 동아대학교 병원 호흡기내과로 흉수 때문에 내원한 환자군에서 흉수를 50 ml 채취하여 30분 이내에  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고로 옮겨서 보관했다. 모든 대상 환자군은 흉부 CT를 촬영하고 흉수

내 총 세포 수 및 백혈구 분획 계량 검사, LDH, 총단백, 당, adenosin deaminase (ADA), carcinoembryonic antigen (CEA), 세포진 검사, 결핵균 PCR 검사와 초음파 유도하 생검을 이용하여 원인 질환을 규명하였다.

### 2. 악성 및 양성 흉수의 진단

1) 생검 혹은 세포진 검사에서 악성 종양 세포가 발견될 경우: 폐암이 다른 부위의 생검에서 확진되고, 흉수 내 CEA가 증가( $>10\text{ ng/ml}$ )되면서 발열, 흉수 내 중성구의 증가, ADA의 증가( $>45\text{ IU/L}$ ) 등과 같은 감염성 흉수의 소견이 없을 경우 악성 흉수로 진단했다.

2) 흉수 내 중성 백혈구가 증가되어 있고, 흉부 방사선 및 CT에서 폐렴에 합당한 폐 경결이 있으며, 발열, CBC 상 백혈구 증다증이 있을 경우 폐렴에 의한 부폐렴 흉수로 진단했다.

3) 흉수 내 결핵균 PCR 양성: 임파구 증가와 ADA 치상승( $>45\text{ IU/L}$ ); 생검에서 만성 육아종성 염증 소견을 보일 경우 결핵성 흉수로 진단했다.

4) 흉막 생검에서 충분한 검체가 나오지 않거나, 비특이 염증 소견만 보이면서 ADA 치가  $45\text{ IU/L}$  이하, CEA 치가  $10\text{ ng/ml}$  이하, 폐렴의 임상 증거가 없을 경우 확진이 되지 않은 흉수로 분류했다.

5) 부폐렴 흉수와 결핵성 흉수는 양성 흉수로 분류하고, 확진이 되지 않은 경우는 조사 대상에서 제외했다.

### 3. DNA 추출

흉수는 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포 덩이만 이용하여 DNA를 추출하였는데, QIAamp Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용 제조사 추천 방식으로 시행하였다.

### 4. 중아황산염(bisulfite) 처리 및 DNA 정제

정제된 DNA는 spectrophotometer 기기(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Germany)를 이용하여 DNA의 농도를 측정한 후 CpGenome universal DNA Modification Kit (Cat. S7820 Chemicon, Germany)를 사용했다.

DNA  $1\text{ }\mu\text{g}$ 을 증류수로 희석하여 총 용량이  $100\text{ }\mu\text{l}$ 이 되게 만든 후  $3\text{ M NaOH } 7\text{ }\mu\text{l}$ 를 가하여  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 변성시켰다. 그리고 DNA 수정 시약 I (DNA modification reagent I)  $550\text{ }\mu\text{l}$ 를 첨가한 후, DNA와 잘 혼합한 뒤  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 16 시간동안 반응시켰다.  $5\text{ }\mu\text{l}$ 의 DNA 수정 시

약 Ⅲ을 첨가 후 750  $\mu$ l의 DNA 수정 시약 Ⅱ를 첨가했다. 용액과 DNA가 서로 섞이게 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 후 70% 에탄올로 세척했다. 20 mM NaOH/90% 에탄올을 50  $\mu$ l 첨가하여 DNA와 잘 섞어준 후 실온에서 5분간 반응시키고 원심분리로 DNA를 회수한 후에 90% 에탄올로 침전시켜서 증류수에 다시 부유시켜서 즉시 사용하거나  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 냉동 보관했다.

## 5. 메틸화 특이 PCR (methylation specific PCR, MSP)

Primer는 이전의 실험 결과<sup>7,8</sup>들을 참고하였고, 염기 서열과 온도는 Table 1과 같았다. PCR 반응 조성액은 1 X 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 0.2 mM dNTP 혼합액, 0.2  $\mu$ M primer, 중이황산염 처리 DNA 2  $\mu$ l, Platinum<sup>®</sup> Taq polymerase 1.25 unit, 증류수로 최종 용량 20  $\mu$ l가 되게 하였다. PCR 조건은  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 35 주기를 반복하고 1분간 냉각,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 최종 염기 연장  $72^{\circ}\text{C}$  5분간 하였다. 냉각 온도는 메틸화 RARB2 유전자는  $58.4^{\circ}\text{C}$ , 비메틸화 RARB2 유전자는  $52^{\circ}\text{C}$ , 메틸화 p16 유전자는  $67^{\circ}\text{C}$ , 비메틸화 p16

유전자는  $58^{\circ}\text{C}$ 였다. 양성 대조로 광범위 메틸화 DNA (universal methylated DNA, Cat. S7821, Chemicon, Germany)를, 음성 대조로 생리 식염수를 사용하였다. PCR 산물은 브롬화 에티디움(ethidium bromide)로 염색한 비변성 10% 폴리아크릴아미드 겔(nondenaturing 10% polyacrylamide gels)에서 자외선 조명 하에 관찰하였다.

## 결 과

총 43명의 환자군에서 흉수를 채취하여 검사를 실시하였다. 이 중 15명이 결핵으로, 2명이 부폐렴 흉수로 진단되었고, 26명의 환자가 악성 흉수로 확인되었다(Table 2). 악성 흉수의 경우 23명에서 흉막 생검 혹은 흉수 세포진 검사에서 확진되었지만, 편평상피세포암에서 1명, 소세포암에서 2명이 생검 및 세포진 검사에서 음성이었다. 이들은 모두 기관지경 생검에서 폐암으로 확진되었고, 발열 등의 감염 소견이 없으면서 흉수 내 CEA가 상승되어 임상 진단을 내릴 수 있었다(흉수 내 CEA가 30번, 39번, 40번에서 각각 501 ng/ml, 418 ng/ml,  $>600$  ng/ml).

RARB2와 p16 유전자의 MSP 결과는 Figure 1과 Table 2와 같았다.

양성 흉수 환자군에서 8명이 흡연자였지만, 이들의 흉수에서도 RARB2, p16 유전자의 과메틸화는 관찰되지 않아, 특이도 및 양성 예측도는 모두 100%였다. 악성 흉수 26명에서 흉막 생검, 흉수 세포진 검사, RARB2 단독, p16 단독, 그리고 RARB2와 p16 두 유전자 공동의 과메틸화 분석에서 양성을 보인 환자 수를 보면 각각 19명, 14명, 14명, 5명, 15명이었다. 이를 민감도로 비교하면 각각 73.1%, 53.8%, 53.8%, 19.2%, 57.7%로서 두 유전자 중 한 가지에서라도 과메틸화가 있는 경우에는 흉막 생검보다는 민감도가 낮았지만, 흉수 천자보다는 높은 결과를 보였다. 또, 음성 예측도 역시 각각 70.8%, 58.6%, 58.6%, 44.7%, 60.7%로서 민감도와 같은 결과임을 알 수 있었다(Table 3). 특이도 및 양성 예측도는 흉막 생검과 세포진 검사는 정의상, 유전자 과메틸화는 앞서 기술한대로 양성 흉수에서 위음성이 나오지 않아 모두 100%이었다( $p > 0.05$ ).

각 유전자와 조직 유형별 양성률을 보면, RARB2 유전자에서는 선암과 편평상피세포암의 경우 비교적 높은 민감도(각각 75.0% 및 66.7%)를 보였지만 소세포암에서는 낮았고(14.3%), p16 유전자에서는 이들 모두에서 낮은 민감도를 보였다(각각 33.4%, 0.0%, 14.3%). 형태학적 분류

Table 1. Primers used in methylation specific PCR

Primer	PS*	AT <sup>†</sup>	Sequence
RARB2 <sup>‡</sup>			
methylated			
forward	146 bp	$58.4^{\circ}\text{C}$	TCG AGA ACG CGA GCG ATT CG
reverse			GAC CAA TCC AAC CGA AAC GA
unmethylated			
forward	146 bp	$52.0^{\circ}\text{C}$	TTG AGA ATG TGA GTG ATT TGA
reverse			AAC CAA TCC AAC CAA AAC AA
p16			
methylated			
forward	150 bp	$67.0^{\circ}\text{C}$	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC
reverse			GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA
unmethylated			
forward	151 bp	$58.0^{\circ}\text{C}$	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT
reverse			CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A

\*product size, <sup>†</sup>annealing temperature, <sup>‡</sup>retinoic acid receptor beta 2.

Table 2. The results of the aberrant methylation and the characteristics of the patients

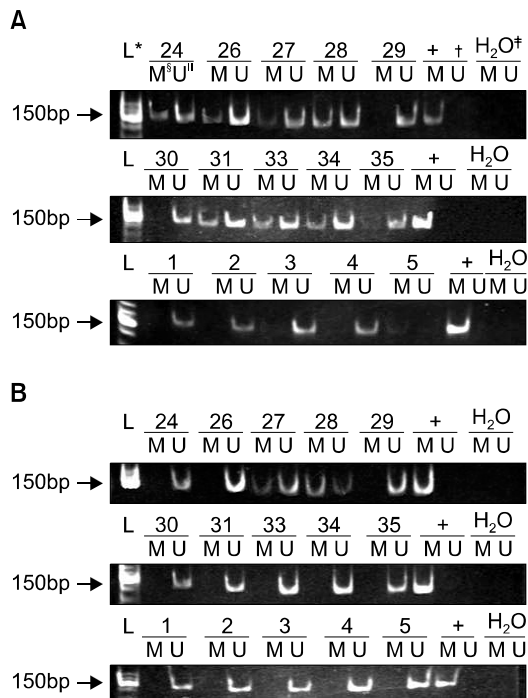
No	Sex	Age	Diagnosis	Smoking	RARB2 <sup>¶</sup>	p16	histology	cytology
1	F*	40	tuberculosis	no	— <sup>§</sup>	—	—**	—**
2	M <sup>†</sup>	71	tuberculosis	yes	—	—	—	—
3	M	56	tuberculosis	yes	—	—	—	—
4	F	28	tuberculosis	no	—	—	—	—
5	F	65	tuberculosis	no	—	—	—	—
6	M	16	tuberculosis	no	—	—	—	—
7	F	78	tuberculosis	yes	—	—	—	—
8	F	38	tuberculosis	no	—	—	—	—
9	F	47	tuberculosis	yes	—	—	—	—
10	F	22	tuberculosis	no	—	—	—	—
11	M	40	tuberculosis	yes	—	—	—	—
12	F	23	tuberculosis	no	—	—	—	—
13	F	65	tuberculosis	no	—	—	—	—
14	M	19	tuberculosis	no	—	—	—	—
15	M	88	tuberculosis	yes	—	—	—	—
16	M	79	pneumonia	yes	—	—	—	—
17	M	68	pneumonia	yes	—	—	—	—
18	M	67	adenocarcinoma	yes	—	—	+ <sup>++</sup>	+ <sup>++</sup>
19	F	39	adenocarcinoma	no	—	—	+	—
20	M	54	adenocarcinoma	yes	+ <sup>  </sup>	—	—	+
21	M	75	adenocarcinoma	yes	+	—	+	—
22	M	84	adenocarcinoma	yes	+	+	+	+
23	M	46	adenocarcinoma	no	+	—	+	+
24	M	70	adenocarcinoma	yes	+	—	—	+
25	F	65	adenocarcinoma	no	+	—	+	+
26	M	70	adenocarcinoma	yes	+	+	—	+
27	M	77	adenocarcinoma	yes	+	+	+	+
28	F	74	adenocarcinoma	no	+	+	+	+
29	M	70	adenocarcinoma	yes	—	—	+	+
30	M	63	squamous cell	yes	—	—	—	—
31	M	65	squamous cell	yes	+	—	+	—
32	M	66	squamous cell	yes	+	—	+	—
33	M	70	squamous cell	yes	+	—	+	+
34	M	68	squamous cell	yes	+	—	+	—
35	M	74	squamous cell	yes	—	—	+	—
36	F	50	NSCLC <sup>‡</sup>	no	—	—	—	+
37	F	71	small cell	yes	+	—	+	—
38	F	50	small cell	yes	—	—	+	+
39	M	54	small cell	yes	—	—	—	—
40	M	47	small cell	yes	—	—	—	—
41	M	71	small cell	yes	—	—	+	+
42	F	68	small cell	yes	—	+	+	—
43	M	69	small cell	yes	—	—	+	—

\*female, <sup>†</sup>male, <sup>‡</sup>non-small cell lung cancer, <sup>§</sup>negative for aberrant methylation, <sup>||</sup>positive for aberrant methylation, <sup>¶</sup>retinoic acid receptor beta 2, \*\*negative for malignancy in histology or cytology, <sup>++</sup>positive for malignancy in histology or cytology.

가 어려웠던 비소세포암은 그 중례 수가 적어 판단하기 어려웠다(Table 3).

폐암 환자군 중에서 흡연자와 비흡연자의 유전자 변이

정도를 비교하였을 때 과메틸화 출현 빈도는 유의한 차이가 없어 보이지만 그 중례 수가 적어서 결과에 대해 단언하기는 어려웠다(Table 4).



**Figure 1.** The results of methylation specific PCR of retinoic acid receptor beta (A) and p16 (B) in cells collected from the pleural effusion of lung cancer patients (24~35) and control (1~5). Both unmethylated (U) and methylated (M) PCR products are shown for each sample. \*patient number DNA ladder, †positive control, ‡normal saline for negative control, §methylated, ‖unmethylated.

## 고 찰

폐암의 75%가 III, IV 병기로 진행된 상태에서 발견된다<sup>9</sup>. 또, 흉강 내 전이가 확인될 경우 환자의 기대 생존 기간은 8개월에 불과하고 완치가 불가능하여 현재의 병기 분류법에 의한 T4를 M1a로 올려서 IV 병기로 분류할 것을 제안하고 있다<sup>10</sup>. 따라서 악성 흉수의 확인은 질환의 진단 뿐 아니라, 예후 판정에도 중요하다. 본 연구에서 저자들은 폐암에 의한 악성 흉수의 진단법으로 흉수 내 RARB2와 p16의 과메틸화를 MSP 법으로 확인하여 흉수 내 세포진 검사 및 흉막 생검법과 비교하였다. 두 유전자의 과메틸화로 악성 흉수를 진단할 경우 민감도와 음성 예측도는 흉막 생검보다는 낮았지만 흉수 내 세포진 검사보다는 높아 이런 분자 생물학적 진단 방법의 임상 응용 가능성을 시사해주는 소견이었다.

계놈의 반복되는 영역에서의 저메틸화 때문에 계놈이

**Table 3.** The sensitivity and negative predictive values for the detection of malignant pleural effusion according to the detecting methods

	Histology	Cytology	RARB2*	p16	p16+RARB2
Sensitivity (%)	73.1	53.8	53.8	19.2	57.7
AD <sup>†</sup>	56.3	62.5	75.0	33.4	75.0
SQ <sup>‡</sup>	83.3	16.7	66.7	0.0	66.7
SCLC <sup>§</sup>	71.4	28.6	14.3	14.3	28.6
NSCLC <sup>‖</sup>	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
NPV <sup>¶</sup> (%)	70.8	58.6	58.6	44.7	60.7

\*retinoic acid receptor beta 2, †adenocarcinoma, ‡squamous cell carcinoma, §small cell carcinoma, ‖unclassifiable non-small cell lung cancer, ¶negative predictive value.

**Table 4.** The sensitivity for the detection of malignant pleural effusion by aberrant methylation according to the smoking status

	RARB2*	p16	p16+RARB2
Smokers (n=21)	52.4%	19.0%	12.0%
Never smokers (n=5)	60.0%	20.0%	60.0%

\*retinoic acid receptor beta 2.

불안정해져서도 암이 발생하게 된다. 하지만, 종양 억제 유전자나 성장 억제 유전자의 촉진자 과메틸화가 이들 유전자의 불활성화를 일으키므로, 계놈 촉진자 부위에서 정상적으로는 메틸화가 이루어지지 않는 CpG 섬의 과메틸화가 더 중요한 epigenetic 변화로 생각된다. 폐암과 유전자 DNA 과메틸화에 대해 많은 보고가 있는데, 이런 유전자의 epigenetic 변화를 진단에 이용하려는 연구들이 있었다. 여러 연구자들이 객담<sup>11</sup>, 기관지 폐포 세척액<sup>12</sup>, 혈액<sup>4</sup> 등에서 종양 억제 유전자의 과메틸화가 진단에 도움이 되는지 확인하였지만, 흉수를 이용한 연구는 많지 않았다. 하지만 난소암의 복강 내 전이에 의한 복수를 진단하는데 복수 내 BRCA1, RASSF1A의 과메틸화가 유용하게 이용되는 것으로 보아, 흉수 내 종양 억제 유전자의 과메틸화 역시 악성 흉수의 감별 진단에 도움이 될 것으로 생각된다<sup>13</sup>.

p16 종양 억제 유전자에 의해 생산되는 단백질은 CDK4와 CDK6 단백질과 결합하여 G<sub>1</sub>에서 S 단계로의 세포 증식

주기의 진행을 조절함으로써 Rb 단백질의 비인산화 상태를 유지하는데 중요한 역할을 하고, 세포 증식 주기의 진행을 억제한다. 이런 p16 유전자의 메틸화는 폐암 환자의 객담, 기관지 세척액 내에서 증명되었다<sup>12</sup>. RARB 유전자 역시 종양 억제 유전자로 작용하며, 대장암<sup>6</sup>, 유방암<sup>14</sup>, 비소세포 폐암<sup>15</sup>에서 메틸화 되어 있다고 보고되었다.

본 연구에서 저자들은 흉수 내에서 RARB2와 p16 유전자의 과메틸화를 확인하였으며, 각각 53.5%와 19.2%의 민감도, 양 유전자 모두에서 100%의 특이도를 관찰하였다. Katayama 등<sup>16</sup>도 흉수를 이용하여 저자들과 같은 목적의 연구를 하였는데 이들의 결과에서는 p16과 RARB의 민감도가 각각 17.0%, 40.4%이었고, 특이도는 각각 100%, 82.4%로서 본 연구의 결과와 상이한 결과를 보였다. 민감도의 차이는 primer나 실험 방법, 흉강 내 악성 종양의 침범 정도, 종양의 조직 유형 등에 따라 나타날 수 있을 것으로 생각되지만 그들의 연구에서는 primer나 종양의 조직 유형에 관한 언급은 없어 확인할 수 없었다. 또, 흉강 내 종양의 침범 정도 역시 표준화된 기준이 없어서 비교할 수 없었다. 이들의 연구에서는 본 연구에서 이용한 두 유전자 외에 O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene (MGMT), death-associated protein kinase (DAPK), Ras associated domain family 1 (RASSF1A) 등 5개의 유전자를 이용하였는데 양성 흉수에서도 과메틸화 발현이 보여 본 연구와 차이가 있었다. 하지만 다른 연구에서 난소암 환자의 악성 복수 진단시 100%의 특이도를 보였던 것으로 보아 민감도와 관련하여 생각할 수 있는 여러 변수를 확인하여야만 해석 가능할 것으로 생각된다<sup>13</sup>.

p16 유전자는 비소세포 폐암의 모든 조직형으로부터 얻어진 세포주에서 불활성화되는데<sup>17</sup>, 이 중 DNA 메틸화에 의한 발현 억제는 비소세포 폐암의 초기 단계에 작용한다고 알려져 있다<sup>5</sup>. Fraipont 등<sup>12</sup>의 연구에 의하면 폐암이 없는 대조군에서도 흡연력이 있을 때 기관지 폐포 세척액 중에서 p16, DAPK, MGMT, fragile histidine triad (FHIT), adenomatous polyposis coli (APC) 유전자 과메틸화가 관찰되었다. 하지만 본 연구에서는 흡연력 유무와 상관없이 양성 흉수에서 유전자의 과메틸화는 없었다. 이 차이를 명확히 설명할 수는 없다. 하지만 흡연에 의한 유전자의 과메틸화 같은 초기 변화들은 폐포 및 기관지 상피 내에서 시작될 것이고, 흉강 내에서 발견되는 유전자 과메틸화는 흉막 상피의 직접적인 변화보다 종양의 침범과 파종에 의한 것일 가능성이 높기 때문으로 추정된다. 본 연구에서 숫자는 작았지만 폐암 환자를 흡연 여부에 따라 구분하여

과메틸화 발현 빈도를 비교할 때 유의한 차이는 없었다.

소세포 폐암에 의한 악성 흉수가 있었던 환자군에서 비소세포암에 비하여 RARB2 유전자의 과메틸화 발현율이 낮았지만 p16 유전자의 경우는 차이가 없었다(Table 3). Otterson 등<sup>17</sup>의 폐암 세포주에 의한 연구를 보면 소세포암 세포주에서는 11%에서만 p16 단백질 발현이 없었지만, 비소세포암 세포주에서는 70%에서 p16 단백질 발현이 관찰되지 않았다고 한다. 본 연구 결과는 선암이 비소세포암에 비해 과메틸화 발현율이 높았지만, 편평상피세포암은 낮아서 Otterson 등의 연구와 정확히 일치되지는 않는 것으로 보였다. 또, 다른 선행 연구<sup>18,19</sup>에서 RARB2 유전자 과메틸화가 소세포암과 비소세포암이 차이가 나지는 않는다는 점도 본 연구 결과와 차이가 있었지만 증례 수가 적다는 한계점 때문에 앞으로 추가 확인이 필요할 것으로 생각된다. 따라서, 앞으로 이와 유사한 연구를 하게 될 때 보다 많은 증례를 가지고, 상이한 다른 조직 유형에 따른 다양한 분자 생물학적 기전을 고려하여 표적 유전자를 선정하여야 될 것이라고 생각된다.

본 연구에서 저자들은 흉수 내 추출 세포에서, 폐암 발생과 연관이 있다고 알려진 두 유전자인 RARB2와 p16의 과메틸화 발현을 검사하여 악성 흉수를 진단할 수 있을지를 조사하였다. 양성 흉수에서는 이들 종양 억제 유전자의 발현 억제를 시사하는 과메틸화가 발견되지 않아 높은 특이도를 보였지만, 민감도는 만족할만한 수준에는 이르지 못하였다. 하지만 두 가지 유전자의 과메틸화 발현을 동시에 측정하였을 때, 흉수 내 세포진 검사보다 높은 민감도를 보였고, 조직 유형에 따른 차이가 관찰되었다. 이는 각 조직형에 따라 관여하는 특이 종양 억제 유전자에 대한 연구가 진행되어서, RNA microarray와 같은 방법으로 동시에 다수 유전자 변화를 확인할 수 있게 되면 임상적으로 유용한 비관혈적 진단법이 될 수도 있으며, 본 연구가 그런 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 악성 흉수가 있는 환자는 예후가 좋지 않아 이를 감별하는 것은 임상적으로 중요한 일이다. 하지만 흉수 내 세포진 검사가 음성일 경우 진단이 쉽지 않다. 따라서 본 연구는 흉수 탈락 세포에서 추출한 DNA에서 종양억제 유전자로 알려진 retinoic acid receptor b2 (RARB2)와 p16 유전자의 과메틸화 측정이 악성 흉수 진단에 도움이 될 수 있을지를 확인하기 위하여 실시하였다.

**방 법:** 43명의 환자에서 흉수를 천자하여 흉수 내 탈락 세포에서 메틸화 특이 PCR 방법으로 RARB2와 p16 유전자의 과메틸화를 측정하고, 이를 흉막 생검 및 흉수 세포진 검사법과 비교하였다.

**결 과:** 43명의 환자 중 17명은 폐렴, 결핵에 의한 양성 흉수 환자였고, 26명은 흉막 침범 폐암 환자였다. 17명의 양성 흉수에서는 흡연 유무와 상관없이 RARB2와 p16 유전자의 과메틸화가 관찰되지 않았다. 26명의 악성 흉수에서 과메틸화는 각각 14명, 5명에서 관찰되었으며, 두 유전자 중 어느 한 쪽이라도 과메틸화가 생긴 경우는 15명이었다. 흉막 생검, 흉수 내 세포진 검사, RARB2 단독, p16 단독, 두 유전자 동시 측정 과메틸화 검사의 민감도는 각각 73.1%, 53.8%, 53.8%, 19.2%, 57.7%이었고, 음성 예측도는 각각 70.8%, 58.6%, 58.6%, 44.7%, 60.7%로서 두 유전자를 동시에 검사할 때의 민감도와 음성 예측도는 흉막 생검보다는 낮았지만, 흉수 내 세포진 검사보다는 높았다. 또, 소세포암에서 p16를 이용한 민감도가 14.3%로 떨어져서 조직 유형에 따른 차이를 보였다.

**결 론:** 본 연구 결과에서 p16과 RARB2 유전자의 과메틸화의 발견은 악성 흉수를 양성과 감별하는데 높은 특이도를 보였고, 민감도 역시 흉수 내 세포진 검사보다 높은 방법이었다. 폐암의 세포 유형에 따른 분자 생물학적 병리를 이해하고 적절한 유전자를 선정한다면 이런 결과는 더욱 향상될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Korea National Statistical Office. Annual report on the cause of death statistics, 2005. Daejeon, Korea: Korea National Statistical Office; 2005. available from: [http://www.cancer.go.kr/nciapps/user/basicinfo/gcancer\\_main.jsp](http://www.cancer.go.kr/nciapps/user/basicinfo/gcancer_main.jsp).
2. Light RW. Clinical practice. Pleural effusion. *N Engl J Med* 2002;346:1971-7.
3. Poe RH, Israel RH, Utell MJ, Hall WJ, Greenblatt DW, Kallay MC. Sensitivity, specificity, and predictive values of closed pleural biopsy. *Arch Intern Med* 1984;144:325-8.
4. Digel W, Lubbert M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;55:1-11.
5. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of P16<sup>INK4a</sup> is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11891-6.
6. Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WE. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:985-9.
7. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
8. Schmiemann V, Böcking A, Kazimirek M, Onofre AS, Gabbert HE, Kappes R, et al. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin Cancer Res* 2005;11:7728-34.
9. Kim YC, Kwon YS, Oh IJ, Kim KS, Kim SY, Ryu JS, et al. National survey of lung cancer in Korea, 2005. *J Lung Cancer* 2007;6:67-73.
10. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Patz EF Jr, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007;2:686-93.
11. Gilliland FD, Harms HJ, Crowell RE, Li Y-F, Willink R, Belinsky SA. Glutathione s-transferase P1 and NADPH quinone oxidoreductase polymorphisms are associated with aberrant promoter methylation of P16<sup>INK4a</sup> and O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in sputum. *Cancer Res* 2002;62:2248-52.
12. Fraipont F, Moro-Sibilot D, Michelland S, Brambilla E, Brambilla C, Favrot MC. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2005;50:199-209.
13. Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, Herman JG, Dulaimi E, Edelson MI, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res* 2004;64:6476-81.
14. Liu Y, Lee MO, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, et al. Retinoic acid receptor beta mediates the growth inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:1138-49.
15. Cote S, Sinnott D, Momparler RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998;9:743-50.

16. Katayama H, Hiraki A, Aoe K, Fujiwara K, Matsuo K, Maeda T, et al. Aberrant promoter methylation in pleural fluid DNA for diagnosis of malignant pleural effusion. *Int J Cancer* 2007;120:2191-5.
  17. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16<sup>INK4</sup> protein is restricted to the subset of lung cancer cell lines that retains wildtype RB. *Oncogene* 1994;9:3375-8.
  18. Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, et al. DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 2001;1:61-7.
  19. Grote HJ, Schmiemann V, Geddert H, Rohr UP, Kappes R, Gabbert HE, et al. Aberrant promoter methylation of p16<sup>INK4a</sup>, RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int J Cancer* 2005;116:720-5.
-