

# 비소세포폐암과 염증성 폐질환에서 가래와 혈액 및 조직에서 $p16^{INK4a}$ Promoter 과메틸화

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실<sup>1</sup>

김정표, 김경미<sup>1</sup>, 권순석, 김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학, 안중현

## $p16^{INK4a}$ Promoter Hypermethylation in Sputum, Blood, and Tissue from Non-Small Cell Lung Cancer and Pulmonary Inflammation

Jeong Pyo Kim, M.D., Kyong Mee Kim, M.D.<sup>1</sup>, Soon Seog Kwon, M.D., Young Kyo Kim, M.D., Kwan Hyung Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D., and Joong Hyun Ahn, M.D.

Department of Internal Medicine, Department of Pathology<sup>1</sup>, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Background :** The aberrant promoter hypermethylation of  $p16^{INK4a}$ , as a tumor suppressor gene, is contributory factor to non-small cell lung cancer(NSCLC). However, its potential diagnostic impact of lung cancer is unclear. This study measured the level of  $p16^{INK4a}$  promoter hypermethylation in the sputum and blood, and compared this with the level measured in the tissue obtained from NSCLC and pulmonary inflammation.

**Methods :** Of the patients who visited the Our Lady of Mercy Hospital in Incheon, Korea for an evaluation of a lung mass and underwent blood, sputum, and tissue tests, 23patients (18 NSCLC, 5 pulmonary inflammation) were enrolled in this study. DNA was extracted from each sample and the level of  $p16^{INK4a}$  methylation was determined using methylation-specific polymerase chain reaction.

**Results :**  $p16^{INK4a}$  methylation of the blood was observed in 88.9% (16 of 18) and 20.0% (1 of 5) of NSCLC and from pulmonary inflammation samples, respectively ( $P=0.008$ ). Methylation of the sputum was observed in 83.3% (10 of 12) 80.0% (4 of 5) of NSCLC and pulmonary inflammation samples, respectively ( $P=1.00$ ). Among the 8 NSCLC tissue samples, methylation changes were detected in 75.0% of samples (6 cases). Four out of seven tissue samples (57.1%) showed concordance, being methylated in both the blood and sputum.

**Conclusions :** There was a higher level of  $p16^{INK4a}$  methylation of the blood from NSCLC patients than from pulmonary inflammation. The tissue showed a high concordance with the blood in the NSCLC samples. These findings suggest that  $p16^{INK4a}$  promoter hypermethylation of the blood can be used to discriminate between NSCLC and pulmonary inflammation. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 160-171)

**Key words :**  $p16^{INK4a}$  promoter hypermethylation, Non-small cell lung cancer, Pulmonary inflammation

## 서론

폐암은 미국에서 암 사망률 1위를 차지하고 있고<sup>1</sup> 국내에서도 2000년도부터 암 사망률 1위가 된 질환으로<sup>2</sup> 최근에 발생빈도가 급격히 증가하고 있다. 폐암은 이미 진행된 병기에서 진단되는 경우가 많고<sup>3</sup> 약 80%

를 차지하는 비소세포폐암인 경우에 I 병기에 발견하여 수술하면 70% 이상의 5년 생존율을 보이기 때문에<sup>4</sup> 폐암을 조기에 발견하려는 연구들이 있었다<sup>5-9</sup>. 하지만 흉부단순촬영과 가래 세포검사를 이용한 폐암 진단 방법으로는 사망률을 줄이지 못한다는 결론을 얻어<sup>10-13</sup> 폐암의 경우에는 선별검사(mass screening test)가 사망률의 감소에 효과가 없는 것으로 받아들여져 왔다.

폐암의 조기 진단에 가래 세포검사는 도움이 되지 못하지만 폐암에서 여러 종류의 유전자에 돌연변이나 promoter methylation이 유전자 발현을 억제하고 종양형성에 관여한다고 알려지면서<sup>14</sup> 조직을 비롯하여 가래나 혈청으로 분자생물학을 이용하여 폐암을 조기에 발견하려는 연구들이 진행 중에 있다. 특정 유전자의 DNA 순서에는 아무런 변화가 없으나 pro-

본 연구는 가톨릭대학교 암센터 연구비의 지원으로 이루어 졌음.

Address for correspondence : Joong Hyun Ahn, M.D.  
Department of Internal Medicine, Our Lady of Mercy Hospital, College of Medicine, the Catholic University of Korea, 665, Bupyong-dong, Bupyong-gu, Incheon, 403-720, Korea

Phone : 032-510-5500 Fax : 032-510-5683

E-mail : ajhcmcim@olmh.cuk.ac.kr

Received : Oct. 4, 2005

Accepted : Jan. 19, 2006

moter region에 있는 CpG islands의 메틸화에 의하여 전사과정이 일어나지 않는 epigenetic mechanism을 나타내는 유전자로는  $p16^{INK4a}$  종양억제유전자가 잘 알려져 있다<sup>15</sup>.  $p16^{INK4a}$ 는 9p21 염색체에 위치하며 promoter region에 비정상적인 메틸화가 발생하여 폐암을 비롯하여 식도암, 위암, 대장암, 췌장암, 방광암, 난소암 및 유방암 등을 유발하며<sup>16,17</sup> 비소세포폐암 세포주의 30~70% 이상에서 불활성화를 보인다<sup>14,18,19</sup>.  $p16^{INK4a}$ 는 정상적으로 활성화되면 세포 주기를 진행하지 못하게 하지만 기능이 소실되면 세포 증식과 종양발생을 초래하게 된다<sup>14</sup>. 이러한 기전을 기초로 하여 폐암을 조기에 진단하고자 폐암 환자의 조직, 가래, 기관지폐포세척액 및 혈청에서  $p16^{INK4a}$ 의 과메틸화를 규명하고자 하였으나 다양한 결과를 보이고 있어서<sup>20-27</sup> 아직까지 폐암 진단 방법으로서의 유용성에 대해서는 논란이 많은 실정이다.

이에 저자들은 폐종양이 의심되어 내원한 비소세포폐암과 염증성 폐질환 환자를 대상으로 가래와 혈액 및 조직에서  $p16^{INK4a}$  메틸화의 발현 정도와 발현 일치 정도를 알아보하고자 하였다.

## 방 법

### 1. 대상 환자

2004년 5월부터 2004년 12월까지 가톨릭대학교 성모자애병원에 폐종양을 주소로 내원한 환자를 등록하였고 조직학적으로 비소세포폐암과 염증성 폐질환으로 확진된 환자를 최종 분석하였다. 내원 전에 타장기의 암을 진단받은 경우나 항암요법 및 방사선요법을 시행 받은 환자는 제외시켰다. 모든 환자에게 기관지내시경을 설명한 후 동의서를 작성하도록 하고 시행 가능한 환자만을 포함시켰다. 흡연력은 내원 당시 문진을 기준으로 하였으며 흡연가 중에서 1년 이상 금연한 경우를 과거 흡연가(ex-smoker)로 분류하였고 여기에 해당되지 않는 경우는 현재 흡연가(current smoker)로 분류하였다. 폐암 환자의 조직학적 분류는 1999년에 개정된 세계보건기구(WHO) 분류에 따르고 병기는 1997년에 개정된 AJCC-UICC

(American Joint Committee on Cancer and Union Internationale Contre le Cancer)에 따라 분류하였다<sup>28</sup>.

### 2. 표본 채취 및 기관지내시경

각 환자에서 10 mL의 혈액을 정맥에서 채취하여 헤파린 150 U가 담긴 튜브에 5 mL씩 담아 잘 혼합하였다. 혼합된 5 mL를 다시 histopaque 5 mL가 담긴 튜브에 옮겨 담은 후 상온에서 15 분간 2200 rpm (IECCentra-8R, Thermo-Tec, USA)으로 원심분리를 하여 백혈구연층(buffy coat)만을 취하여 eppendorf tube에 담았다. PBS (phosphate buffered saline) 용액을 첨가하여 6 분간 7000 rpm (Centrifuge 5415C, Eppendorf, USA)으로 원심분리를 한 후 위층은 버리고 세포 침전물(pellet)만 취하였다.

가래는 3% 생리식염수를 이용한 분무기를 20분간 시행한 후 얻었다. 채취한 가래는 바로 70% 에탄올에 수집하여 포르말린을 사용한 후 파라핀 처리를 하고 10  $\mu$ m 두께로 절편한 후 H & E (hematoxylin & eosin) 염색을 시행한 후 세포검사를 통하여 비정형 세포와 악성세포를 확인하였다.

모든 환자를 대상으로 기관지내시경(Olympus Optical Co, Japan)을 시행하였고 확진 되지 않은 환자는 경피세침흡인생검술(percutaneous needle aspiration biopsy)이나 개흉 폐생검을 시행하였다. 검사에서 얻은 조직은 포르말린 용액에 넣은 후 파라핀 처리를 하고 10  $\mu$ m 두께로 절편한 후 H & E 염색을 시행하여 조직 분류를 하였다.

### 3. DNA 분리 및 정량

혈액으로부터 genomic DNA 분리는 Kunkel 등의 방식에 준하여 시행하였다<sup>29</sup>. 세포 침전물에 proteinase K를 첨가한 뒤 50°C에서 16시간 반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열 처리하여 proteinase K의 활성을 제거하고 750  $\mu$ l phenol/chloroform을 첨가하였다. 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 한 후 650  $\mu$ l를 취하여 650  $\mu$ l chloroform/isoamyl alcohol을 첨가하고 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 원

심분리를 마치고 500  $\mu$ l 를 취한 후 100% 에탄올 1 mL와 3M sodium acetate 100  $\mu$ l를 섞은 후 -70°C에서 30분간 보관하였다가 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 한 후 상층액을 버리고 DNA 침전물을 건조시킨 후 사용하였다.

파라핀 처리가 된 폐암조직과 가래는 10  $\mu$ m 두께로 절편하고 절편 3~5매에 1 mL의 xylene을 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 PBS로 세척하여 조직 침전물을 얻었다. 조직 침전물에 proteinase K를 첨가하는 과정부터는 혈액 DNA 분리 과정과 동일하게 시행한 후 ND-1000® spectrophotometer (NanoDrop, USA)로 DNA 농도를 측정하였다.

#### 4. Bisulfite Modification

추출한 DNA 2  $\mu$ g을 멸균 증류수 42  $\mu$ l와 3M NaOH 5  $\mu$ l를 혼합한 후 50°C에서 20 분간 반응시키고 10 mM hydroquinone (Sigma, USA) 30  $\mu$ l와 3M sodium bisulfite (Sigma, USA) 520  $\mu$ l를 첨가하여 50°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, USA)을 이용하여 DNA를 정제한 후 80% isopropanol 3 mL로 세척하였고 1분간 원심분리를 이용하여 isopropanol을 제거한 후 80°C 멸균 증류수 45  $\mu$ l를 첨가하여 1분간 원심분리를 하여 세척하였다. 3M NaOH 10  $\mu$ l를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시키고 7.5M ammonium acetate 100  $\mu$ l와 혼합하여 상온에서 5분간 반응시킨 후 100% 에탄올 500  $\mu$ l를 첨가하여 -70°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 4°C에서 13,000 rpm으로 30분간 원심분리를 시행한 후 상층액은 비우고 DNA 침전물을 얻었으며 멸균 증류수 20  $\mu$ l에 용해하여 중합효소연쇄반응을 위한 주형 DNA로 이용하였다.

#### 5. Methylation-specific polymerase chain reaction

Herman 등의 메틸화 특이성 중합효소연쇄반응법 (methylation-specific polymerase chain reaction)에 준하여 실시하였고 30 1단계와 2 단계로 나누어 시행

하였다. 1 단계 중합효소연쇄반응의 *p16<sup>INK4a</sup>* 메틸화 특이성 길잡이(primer)는 forward 5'-GAGGGGTT-GGTTGGTTATTAG-3', reverse 5'-AAACCCTC-TACCCACCTAAATC-3'을 사용하였고 용액의 조성은 총 10  $\mu$ l로서 10×PCR buffer 1  $\mu$ l, 0.05 mM dNTP (TaKaRa, Japan) 0.2  $\mu$ l, 0.4 pmol/ $\mu$ l forward primer (Bioneer, Korea) 0.2  $\mu$ l, 0.4 pmol/ $\mu$ l reverse primer 0.2  $\mu$ l, TaKaRa Ex TaqTM (TaKaRa, Japan) 0.15  $\mu$ l, 멸균 증류수 6.75  $\mu$ l, modified DNA 1.5  $\mu$ l를 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 95°C에서 5분간 반응시킨 후 변성 반응은 95°C에서 45초, 결합 반응은 58°C에서 45초, 연장 반응은 72°C에서 50초씩 반복적으로 35 회전을 시행한 후 72°C에서 10분간 더 반응시키고 4°C에서 종결하였다. 중합효소연쇄반응 산물은 다음 단계를 위한 주형 DNA로 이용하였다. 2 단계 중합효소연쇄반응의 길잡이는 비메틸화 반응의 경우 forward 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3', reverse 5'-C-AACCCCAAACCACAACCATAA-3'을 사용하였고, 메틸화의 경우 forward 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3', reverse 5'-GACCCCGAAC-CGCGACCGTAA-3'을 사용하였다. 용액의 조성은 멸균 증류수 7.25  $\mu$ l, 1 단계 중합효소연쇄반응 산물 1  $\mu$ l를 주형 DNA로 사용하고 나머지 조성은 1 단계와 같게 하여 총 10  $\mu$ l 로 하였다. 중합효소연쇄반응은 94°C에서 5분간 반응시킨 후 변성 반응은 94°C에서 45초, 결합 반응은 65°C에서 45초, 연장 반응은 72°C에서 50초씩 반복적으로 42 회전을 시행한 후 72°C에서 10분간 더 반응시키고 4°C에서 종결하였고 전기영동 전까지 -20°C에서 보관하였다.

이전의 폐암 조직에서 발굴되었던 DNA를 양성 대조군으로 사용하였고 음성 대조군으로는 멸균 증류수를 사용하였다. 중합효소연쇄반응의 최종 산물 10  $\mu$ l를 8% polyacrylamide gel (Sigma, USA)에 200 volt로 1시간 동안 전기영동을 하고 ethidium bromide로 염색을 한 후 151 염기 쌍의 비메틸화된 DNA분절과 150 염기 쌍의 메틸화된 DNA 분절을 자외선 조명기에서 확인하였다.

Table 1. Clinical characteristics of patients\*

| Characteristic         | NSCLC† | Pulmonary inflammation | P value |
|------------------------|--------|------------------------|---------|
| No. of cases           | 18     | 5                      |         |
| Age (yr)               | 68±8   | 65±10                  | 0.549   |
| Sex (no. of cases)     |        |                        |         |
| Male                   | 16     | 4                      | 0.539   |
| Female                 | 2      | 1                      |         |
| Smoking history        |        |                        |         |
| Pack-years             | 39±25  | 24±25                  | 0.329   |
| Current (no. of cases) | 12     | 1                      |         |
| Former                 | 4      | 2                      |         |
| Years since quitting   | 10±13  | 10±13                  |         |
| Never                  | 2      | 2                      | 4       |

\*Plus-minus values are mean±SD.

† NSCLC: non-small cell lung cancer

## 6. Carcinoembryonic antigen (CEA) 측정

혈청 CEA는 chemiluminescent immunoassay kits와 Immulite 2000 immunoassay system (DPC, U-SA)을 이용하여(정상 범위 ≤5 ng/mL) 내원시 측정하였고 수치는 ≤5 ng/mL, >5 ng/mL로 각각 구분하였다.

## 7. 통계 방법

통계적 분석은 SPSS 10.0 (SPSS Inc, USA)을 사용하였다. 폐암 그룹과 염증성 폐질환 그룹의 연령 및 흡연력 및 혈청 CEA의 차이는 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 두 그룹간의 성별, 가래 세포검사, 혈액 및 가래의 메틸화 특이성 중합효소연쇄반응의 차이와 혈청 CEA 구분에 따른 폐암과의 연관성을 알아보기 위하여 Fisher's exact test를 시행하였다. 폐암 그룹의 병기에 따른 상관관계는 Spearman's rho correlation analysis를 시행하였다. *P* 값이 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 특성

총 30명이 등록되었으나 2명은 소세포폐암이었고 3명은 검사 과정 중 이탈하였으며 2명은 가래와 혈액 채취에 실패하여 최종 23명을 분석하였다. 폐암 그룹과 염증성 폐질환 그룹간의 연령(*P*=0.549), 성비(*P*=0.539) 및 흡연력(*P*=0.329)의 차이는 없었다(Table 1). 폐암 그룹에서 조직학적으로 편평상피세포암(11명)이 가장 많았고 병기로는 IV 기(8명)가 가장 많았다. 염증성 폐질환은 폐렴이 3명이었고 결핵이 2명이었다.

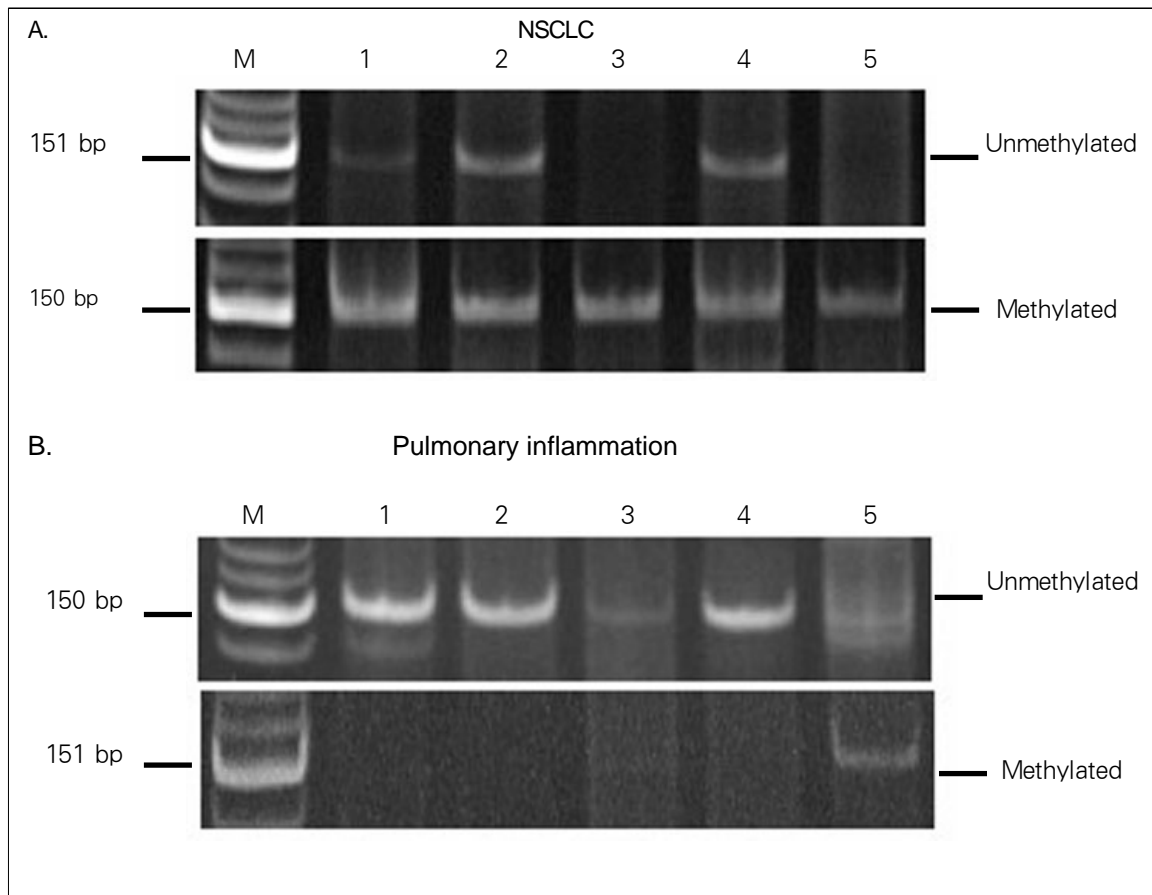
### 2. *p16*<sup>INK4a</sup> 메틸화의 발현 정도

비메틸화와 메틸화 DNA분절이 모두 나타나지 않은 표본은 분석 대상에서 제외하였는데 혈액은 23명 모두 분석하였고 가래는 폐암 그룹 중 6명이 제외되었다. 조직에서는 폐암 그룹 18명 중 10명이 부적합

Table 2. *p16*<sup>INK4a</sup> hypermethylation in NSCLC\* and pulmonary inflammation

| Sample (no. of cases) | NSCLC         | Pulmonary inflammation | P value |
|-----------------------|---------------|------------------------|---------|
| Blood                 | 16/18 (88.9%) | 1/5 (20.0%)            | 0.008   |
| Sputum                | 10/12 (83.3%) | 4/5 (80.0%)            | 1.00    |
| Tissue                | 6/8 (75.0%)   |                        |         |

\*NSCLC: non small cell lung cancer



**Figure 1.** Analysis of p16INK4a promoter hypermethylation in blood from NSCLC and pulmonary inflammation. Bisulfite modified DNA was amplified by primers specific to unmethylated or methylated alleles of p16INK4a. The presence of visible PCR product in each lanes marked unmethylated or methylated.

하였고 염증성 폐질환 그룹은 5명 모두 부적합하여 폐암 그룹 8명만 분석하였다(Table 2).

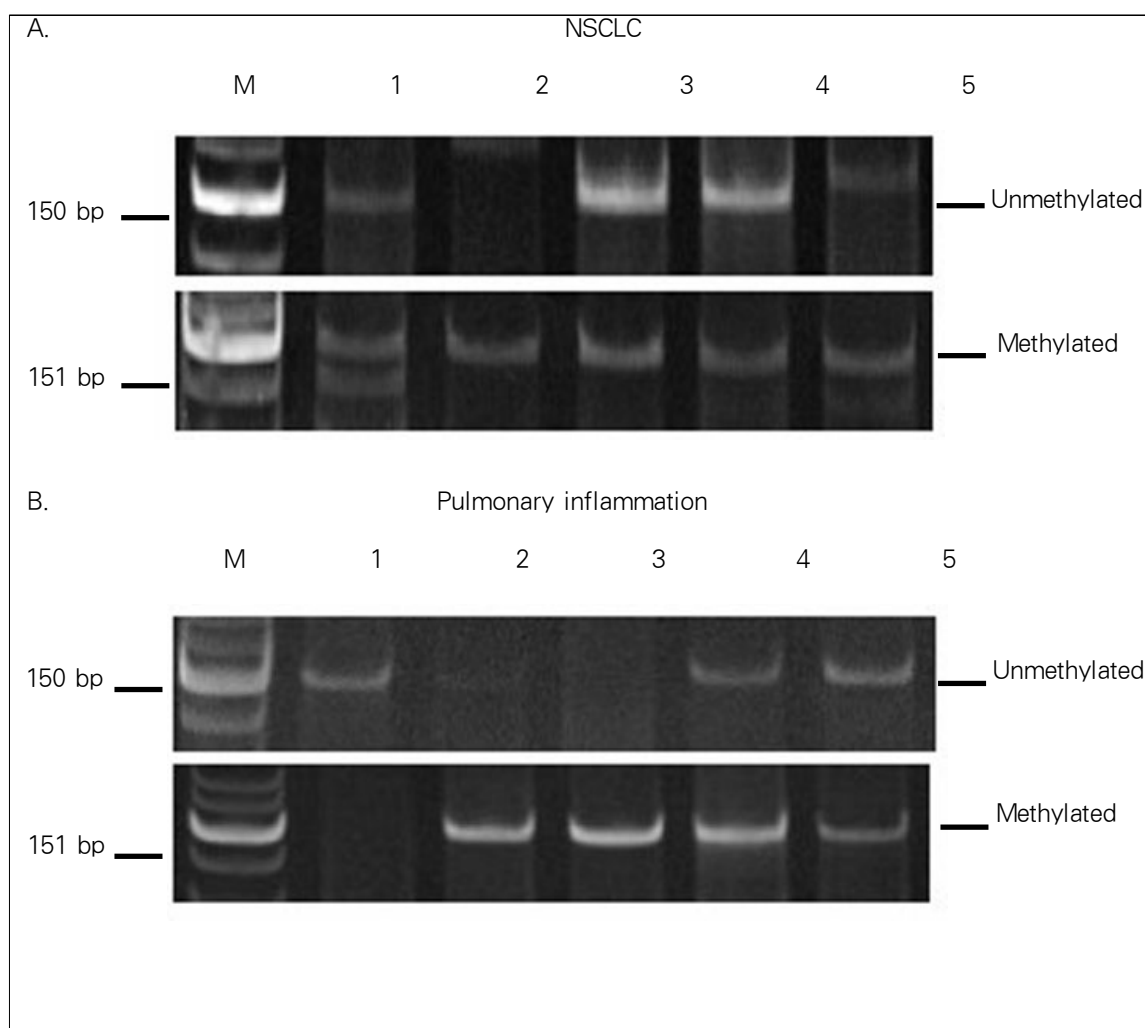
혈액에서는 폐암 그룹(88.9%)이 염증성 폐질환 그룹(20.0%)보다 발현이 증가하였으며(sensitivity 88.9%, specificity 80.0%,  $P=0.008$ )(Fig. 1) 가래에서는 폐암 그룹(83.3%)과 염증성 폐질환 그룹(80.0%)의 발현 차이는 없었다(sensitivity 83.3%, specificity 20.0%,  $P=1.00$ )(Fig. 2). 조직은 폐암 그룹만 분석하였는데 8명 중 6명(75.0%)이 메틸화가 나타났다(Fig. 3). 혈액, 가래 및 조직에서 p16INK4a 메틸화의 발현 일치율은 조직을 분석한 8명 중 가래 검사가 부적합한 1명을 제외한 7명 중 4명이 일치한 57.1%를 보였다(Table 3). 조직과 혈액은 8명 중 6명이 일치하였고(75.0%) 조직과 가래는 7명 중 5명이 일치하였다(71.4%).

### 3. 가래 세포검사

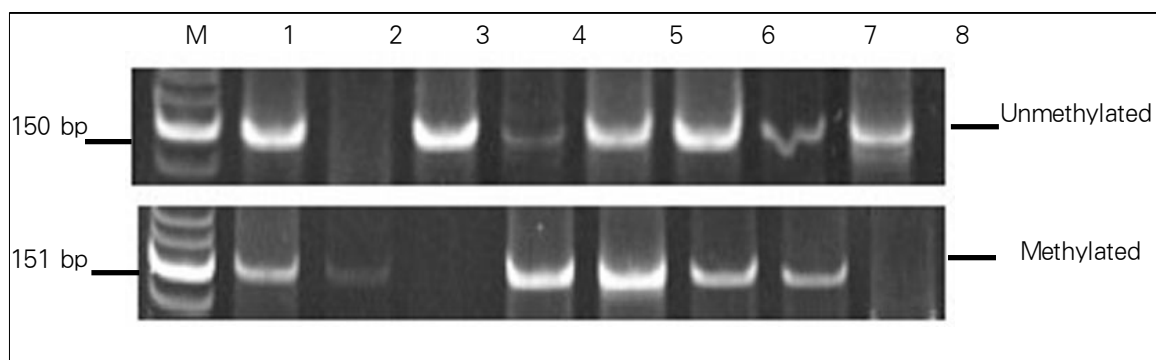
비정형세포와 악성세포를 포함하여 총 23명 중 폐암 그룹에서만 3명이 양성하였고(sensitivity 16.7%, specificity 100%) 폐암 그룹과 염증성 폐질환 그룹간의 통계적 차이는 없었다( $P=1.00$ ).

### 4. 비소세포폐암 병기에 따른 혈청 CEA 상승

혈청 CEA의 평균 수치는 비소세포폐암 그룹이 염증성 폐질환 그룹보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다( $P=0.101$ ). 비소세포폐암 그룹의 병기가 높을수록 혈청 CEA는 상승하였으나( $r=0.493$ ,  $P=0.037$ ), 혈청 CEA 구분에 따른 비소세포폐암 그룹과 염증성 폐



**Figure 2.** Analysis of p16INK4a promoter hypermethylation in sputum from NSCLC and pulmonary inflammation.



**Figure 3.** Analysis of p16INK4a promoter hypermethylation in tissue from NSCLC. Methylation was observed in six of eight cases.

Table 3. Combined  $p16^{\text{INK4a}}$  hypermethylation in blood, sputum, and tissue from NSCLC\*

| Methylation status† | No. of cases | %    |
|---------------------|--------------|------|
| T+                  |              |      |
| B+S+                | 4            | 57.1 |
| B+S                 | 1            | 14.3 |
| T                   |              |      |
| B+S+                | 1            | 14.3 |
| B+S                 | 1            | 14.3 |
| Total               | 7            | 100  |

\*NSCLC: non small cell lung cancer

† T: tissue, B: blood, S: sputum

‡ One case of total 8 tissue was excluded, since the one's sputum DNA could not be acquired.

질환 그룹의 차이는 없었다( $P=0.611$ )

## 고 찰

저자들은 본 연구에서 혈액에서  $p16^{\text{INK4a}}$  메틸화의 발현이 비소세포폐암 그룹에서 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었지만 가래에서는 염증성 폐질환 그룹과의 발현 차이를 발견할 수 없었다. 조직은 염증성 폐질환 그룹의 중합효소연쇄반응 산물을 얻지 못해서 비소세포폐암 그룹과 비교할 수 없었지만 비소세포폐암 환자의 조직에서  $p16^{\text{INK4a}}$  과메틸화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

폐암은 조직학적으로 정상 기관지 상피세포가 hyperplasia, metaplasia, dysplasia, carcinoma in situ의 변화를 거쳐서 암으로 발생하면서<sup>31</sup> 점진적으로 많은 대립유전자들의 소실이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다<sup>32</sup>. 9p21 염색체에 위치하는  $p16^{\text{INK4a}}$  종양억제유전자는 비소세포폐암에서 10~40%에서 결손이나 점 돌연변이가 발생하지만 10~40%에서 promoter region에 비정상적인 메틸화가 발생하여 폐암 초기에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>.  $p16^{\text{INK4a}}$  유전자 활성화는 CDK4를 억제하고 RB 유전자의 인산화를 막아서 세포주기를 G1기에서 S기로 진행하지 못하게 하는 역할을 한다. 하지만  $p16^{\text{INK4a}}$  유전자 기능 소실로 CDK4가 cyclin D1에 결합하게 하고 Rb 단백질을 RB 유전자를 인산화하여 전사 인자인 E2F를 증가시켜서 G1기에서 S기로의 세포증식을 초래하게 되며<sup>14</sup> 종양 발생이나 폐암의 임상 경과에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다<sup>33,34</sup>.

DNA 메틸화는 DNA methyltransferase에 의해

cytosine 고리의 5번째 탄소에 methyl기가 추가되어 유전자 발현을 억제하거나 thymine으로 변이가 일어날 수 있다<sup>35</sup>. 원핵생물에서는 유전자에 메틸화가 발생하지 않고 세균이나 하등 진핵세포생물은 adenine과 cytosine에서 메틸화가 발생한다<sup>36</sup>. 고등 진핵세포생물은 cytosine에서만 메틸화가 발생하는데 인간을 포함한 척추동물은 CpG dinucleotide 부위에서 70~80% 정도 cytosine에서 메틸화가 발생한다<sup>36,37</sup>. 종양억제유전자를 포함한 많은 유전자의 promoter 부위에 있는 수백에서 수천 염기 쌍이 반복되는 CpG를 CpG islands라고 하는데<sup>38</sup> 인간의 모든 유전자의 절반을 차지하며 정상적으로는 메틸화가 발생하지 않는다<sup>16</sup>.

정상적인 세포 기능으로서 DNA메틸화의 역할은 여성의 X 염색체 불활성화, 유전자 각인 등이 있으며<sup>39-41</sup> 척추동물에서는 전위유전단위(transposon)나 바이러스 유전체로 인해 손상받은 DNA에 메틸화가 일어나서 발현을 억제시키는 숙주 방어기전의 역할을 한다<sup>35,42</sup>. 마우스를 대상으로 한 실험에서 착상 전의 원시종자세포(primordial germ cell)와 주머니배(blastocyst)에서는 메틸화가 일어나지 않지만 착상 후에 분화가 시작된 배아나 줄기세포에서는 DNA메틸화가 전반적으로 발생하고 조직 특이성 유전자는 탈메틸화가 발생하였다<sup>43-45</sup>. 이러한 배아 시기에 자연적으로 발생하는 DNA 메틸화는 세포 발달과 생존에 필수적인 역할을 하며<sup>46</sup> 체세포 분화에 중요한 역할을 한다<sup>47</sup>.

현재까지 DNA 메틸화로 인한 암 발생 기전에는 cytosine이 thymine으로 점 돌연변이의 발생, 전반적인 탈메틸화로 인한 원발암유전자(proto-oncogene)의 활성화, 종양억제유전자의 메틸화로 인한 불활성

화, DNA 메틸화로 인한 염색체 불안정의 4 가지 가설이 있다<sup>35</sup>. 이 중에서 종양억제유전자의 불활성화의 기전으로 promoter의 비정상적인 메틸화에 의한 전사 억제를 중요하게 생각하는데 이러한 promoter의 비정상적인 메틸화를 유발시키는 인자는 흡연, 고령, 감염 등이 거론되고 있다.

담배에는 NNK(4-methylnitrosamoni-1-(3-pyridyl)-1-butanone), polyaromatic hydrocarbons, 크롬, 카드뮴 및 니켈 등의 발암 물질이 있는데 이러한 물질이 비소세포폐암 조직, 비소세포폐암 세포주 및 마우스의 비소세포폐암 조직에서  $p16^{INK4a}$  메틸화를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>21,48,49</sup>. NNK로 유발된 마우스의 폐암 모델에서는 사람의 폐암 발생과 유사한 경로를 거치는데  $p16^{INK4a}$  메틸화의 빈도는 basal cell hyperplasia (17%), squamous metaplasia (24%), carcinoma in situ (50%), adenocarcinoma (94%)로 진행 단계에 따라 상승하는 소견을 보여  $p16^{INK4a}$  메틸화는 비소세포폐암의 발생 초기부터 중요한 역할을 할 것으로 알려지고 있다<sup>21</sup>. 또한 흡연은 기관지 상피세포의  $p16^{INK4}$  promoter 메틸화를 유발하고 금연 후에도 메틸화는 지속되는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. 따라서 저자들의 연구에서 두 그룹 모두 심한 흡연가이었기 때문에 가래에서  $p16^{INK4}$  메틸화의 차이가 없었을 것으로 생각한다.

5-methylcytosine은 결핵균(*M. tuberculosis*)에서 가장 먼저 발견되었는데<sup>50,51</sup> guanine과 cytosine이 결핵균 DNA의 60~70%를 차지하며 독성을 나타내는 H37Rv 균주가 비병원성의 H37Ra 균주보다 6-methyladenine은 차이가 없지만 5-methylcytosine 비율이 높은 것으로 알려져 있다<sup>52,53</sup>. 저자들의 결핵 환자 2명의 가래에서 메틸화가 발생하였는데 1명은 30갑년의 흡연력의 영향으로 생각할 수 있으나 흡연력이 없는 1명은 메틸화가 발생하는 결핵균 DNA의 오염으로 인한 가능성을 생각할 수 있다.

흡연력이 없는 67세의 폐렴 환자 1명의 가래에서 메틸화가 발생하였는데 저자들의 대상처럼 60세 이상에서는 폐암을 비롯한 대부분의 장기에 암 발생이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있고<sup>54</sup> 연령이 증가할수록 정상조직 및 대장 세포의 promoter region에

메틸화가 증가하는 것으로 보아<sup>55,56</sup> 고령과  $p16^{INK4}$  promoter 메틸화의 관계를 생각할 수 있겠다.

저자들의 연구에서 두 그룹간의 혈액에서  $p16^{INK4}$  메틸화의 분명한 차이를 보이고 있고 비소세포폐암 그룹에서는 혈액과 조직의 높은 메틸화 발현의 일치를 보이고 있었는데 혈액에서 추출된 DNA가 폐암 조직에서 흘러 나온 DNA의 가능성은 떨어질 것으로 생각한다. 이러한 차이를 보이는 가능한 이유로는 흡연력의 차이가 없는 고 위험군에서 비소세포폐암이 발생한 그룹은 염증성 폐질환 그룹보다 메틸화를 유발시키는 인자에 대한 혈액내의 백혈구 세포의  $p16^{INK4}$  메틸화 발현에 대한 감수성의 차이를 생각해 볼 수 있겠다.

타 저자들은 메틸화 특이성 중합효소연쇄반응법에 1~2  $\mu$ g의 genomic DNA를 사용하였는데 저자들의 경우에는 가래와 조직의 DNA양은 평균 1.68  $\mu$ g과 1.61  $\mu$ g이었으나 1  $\mu$ g이 되지 않은 대상이 7명과 8명으로 부적합 대상이 많아 중합효소연쇄반응 산물을 얻지 못함으로써 분석에 제외된 대상이 많았다고 생각한다. 또한 폐암 조직의 경우에는 정상 세포의 혼합으로 인하여 상대적으로 암세포 DNA양이 적었을 가능성을 배제할 수 없겠다. 혈액의 경우에는 불충분한 sodium bisulfite 처리시 cytosine이 uracil로 바뀌지 않아서 위양성이 나올 수 있었음을 유의해야겠다<sup>30</sup>.

결과에서 언급하지 않았지만 등록에서 제외된 2명의 소세포폐암 환자는 가래와 혈액에서 모두  $p16^{INK4}$  메틸화를 보였고 조직에서는 1명에서 메틸화를 보였는데 소세포폐암에서는 RB 유전자는 90%가 변이를 나타내지만  $p16^{INK4}$ 는 메틸화가 잘 일어나지 않는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>. 저자들의 상반된 결과의 이유로 1명은 50갑년의 흡연력이 있고 1명은 78세의 고령의 위험 인자 때문이라고 생각한다.

저자들의 가래 세포검사는 폐암에 대한 낮은 민감도를 보여서 가래 세포검사는 폐암의 조기 발견에 도움이 되지 않는다는 이전의 결과와<sup>57,58</sup> 일치하는 소견을 보였다. 또한 혈청 CEA구분으로는 두 그룹의 차이를 보이지 않아 폐암과 염증성 폐질환과의 감별에는 도움이 되지 않으나 폐암 그룹에서는 병기의 진행에 따라 상승하는 소견을 보여 진행된 폐암의 진단



에는 도움을 줄 것으로 생각한다.

본 실험의 한계점으로는 대상자 수가 적어서 결과 분석에 편중된 영향을 미칠 수 있었기에 향후 대상자 수를 늘려서 분석하는 것이 필요하다고 생각한다.

결론적으로 비소세포폐암 그룹과 염증성 폐질환 그룹에서 가래, 혈액 및 조직에서  $p16^{INK4}$  메틸화의 발현 정도와 일치 정도를 알아보았는데 비소세포폐암 그룹의 혈액에서  $p16^{INK4}$  메틸화가 증가하였고 조직과의 일치율도 높았다. 따라서 폐암이 의심되는 고 위험 인자가 있는 환자에서 혈액의  $p16^{INK4}$  과메틸화는 비소세포폐암과 염증성 폐질환을 감별하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각하며 향후  $p16^{INK4}$  과메틸화와 비소세포폐암의 직접적인 관련 여부를 규명하는 것이 필요하다고 생각한다.

## 요 약

### 연구배경 :

종양억제유전자인  $p16^{INK4}$ 는 promoter region의 과 메틸화로 인해 비소세포폐암의 발생에 관여하는 것으로 잘 알려져 있지만 폐암의 진단 방법으로 사용할 수 있는지는 아직까지 명확하지 않다. 이에 저자들은 비소세포폐암과 염증성 폐질환 환자의 가래와 혈액 및 조직에서  $p16^{INK4}$  메틸화의 발현 정도와 발현 일치 정도를 알아보고자 하였다.

### 방 법 :

폐종양을 주소로 내원하여 혈액, 가래 및 조직 검사를 시행한 후 최종적으로 비소세포폐암(18명)과 염증성 폐질환(5명) 진단을 받은 23명을 대상으로 하였다. 각 표본에서 DNA를 추출한 후 메틸화 특이성 중합효소연쇄반응법을 이용하여  $p16^{INK4}$  promoter region의 메틸화 양상을 비교 분석하였다.

### 결 과 :

혈액에서는 비소세포폐암 그룹(88.9%, 18명중 16명)이 염증성 폐질환 그룹(20.0%, 5명중 1명)보다  $p16^{INK4}$  메틸화 발현이 증가하였으며( $P=0.008$ ), 가래에서는 비소세포폐암 그룹(12명중 10명)과 염증성 폐질환 그룹(5명중 4명)의 발현 차이는 없었다( $P=1.00$ ). 조직은 비소세포폐암 그룹에서 8명중 6명(75.0%)이

$p16^{INK4}$  메틸화가 나타났다. 혈액, 가래 및 조직에서  $p16^{INK4}$  메틸화의 발현 일치율은 7명 중 4명이 일치한 57.1%를 보였다.

### 결 론 :

비소세포폐암 그룹에서 염증성 폐질환 그룹보다 혈액의  $p16^{INK4}$  메틸화가 증가하였고 조직과의 일치율도 높았다. 따라서 폐암이 의심되는 고 위험 인자가 있는 환자에서 혈액의  $p16^{INK4}$  과메틸화는 비소세포폐암과 염증성 폐질환을 감별하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

## 감사의 글

바쁜 시간에도 실험에 많은 도움을 준 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 병리학 교실 이의진 연구원에게 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin. 2000;50:7-33.
2. 통계청. 2003년 사망원인통계결과(www.nso.go.kr). 2004.
3. Eddy DM. Screening for lung cancer. Ann Intern Med. 1989;111:232-7.
4. Martin J, Ginsberg RJ, Venkatraman ES, Bains MS, Downey RJ, Korst RJ, et al. Long-term results of combined modality therapy in resectable non-small cell lung cancer. J Clin Oncol. 2002;20:1989-95.
5. Weiss W, Boucot KR. The Philadelphia Pulmonary Neoplasm Research Project. Early roentgenographic appearance of bronchogenic carcinoma. Arch Intern Med. 1974;134:306-11.
6. An evaluation of radiologic and cytologic screening for the early detection of lung cancer: a cooperative pilot study of the American Cancer Society and the Veterans Administration. Cancer Res. 1966;26:2083-121.
7. Nash FA, Morgan JM, Tomkins JG. South London Lung Cancer Study. Br Med J. 1968;2:715-21.
8. Brett GZ. The value of lung cancer detection by six monthly chest radiographs. Thorax. 1968;23:414-20.
9. Wilde J. A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR. Eur Respir J. 1989;2:656-62.
10. Frost JK, Ball WC Jr, Levin ML, Tockman MS,

- Baker RR, Carter D, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Johns Hopkins study. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130:549-54.
11. Flehinger BJ, Melamed MR, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WB, Martini N. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Memorial Sloan-Kettering study. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130:555-60.
12. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF, Woolner LB, Miller WE, Muhm JR, et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130:561-5.
13. Kubik A, Polak J. Lung cancer detection. Results of a randomized prospective study in Czechoslovakia. *Cancer.* 1986;57:2427-37.
14. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118:1136-52.
15. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999;21:163-7.  
Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:359-67.
16. Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg.* 2001;234:10-20.
17. Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:359-67.
18. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994;264:436-40.
19. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ. Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene.* 1994;9:3375-8.
20. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res.* 1994;54:1634-7.
21. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) 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.
22. Esteller M, Sanchez-Céspedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 1999;59:67-70.
23. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, et al. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:332-9.
24. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000;60:5954-8.
25. Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol.* 2000;18:3221-9.
26. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res.* 2002;62:2370-7.
27. Destro A, Bianchi P, Allosio M, Laghi L, Di Gioia S, Malesci A, et al. K-ras and p16(INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer.* 2004;44:23-32.
28. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997;111:1710-7.
29. Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, et al. Analysis of human Y chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:1245-9.
30. 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.
31. Mulshine JL, Treston AM, Scott FM, Avis I, Boland C, Phelps R, et al. Lung cancer: rational strategies for early detection and intervention. *Oncology.* 1991;5:25-32.
32. Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene.* 1999;18:643-50.
33. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 1999 Apr;5(4):791-800.
34. Kratzke RA, Greatens TM, Rubins JB, Maddaus MA, Niewoehner DE, Niehans GA, et al. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung

- tumors. *Cancer Res.* 1996 Aug 1;56(15):3415-20.
35. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999;93:4059-70.
36. Szyf M The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther.* 1996;70:1-37.
37. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11995-9.
38. Bird AP. CpG rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986;321:209-13.
39. Baylin SB. Tying it all together: epigenetics, genetics, cell cycle, and cancer. *Science.* 1997;277:1948-9.
40. Grant SG, Chapman VM. Mechanisms of X chromosome regulation. *Annu Rev Genet.* 1988;22:199-233.
41. Lee JT, Jaenisch R. The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7:274-80.
42. McBurney MW. Gene silencing in the development of cancer. *Exp Cell Res.* 1999;248:25-9.
43. Razin A, Cedar H. DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev.* 1991;55:451-8.
44. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development.* 1987;99:371-82.
45. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development.* 1996;122:3195-205.
46. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 1992;69:915-26.
47. Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.* 1997;13:323-9.
48. Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K, et al. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol.* 1995;15:2547-57.
49. Swafford DS, Middleton SK, Palmisano WA, Nikula KJ, Tesfagzi J, Baylin SB, et al. Frequent aberrant methylation of p16INK4a in primary rat lung tumors. *Mol Cell Biol.* 1997;17:1366-74.
50. Johnson TB, Coghill RD. The discovery of 5 methyl cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. *J Am Chem Soc* 1925;47:2838-44.
51. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleotides by paper chromatography. *J Biol Chem* 1948;175:315-32.
52. Srivastava R, Gopinathan KP, Ramakrishnan T. Deoxyribonucleic acid methylation in mycobacteria. *J Bacteriol.* 1981;148:716-9.
53. Hemavathy KC, Nagaraja V. DNA methylation in mycobacteria: absence of methylation at GATC (Dam) and CCA/TGG (Dcm) sequences. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995;11:291-6.
54. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin.* 1998;48:6-29.
55. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.* 1998;58:5489-94.
56. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994;7:536-40.
57. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WA, Martini N. Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest.* 1984;86:44-53.
58. Screening (lung cancer). *Chest.* 1986;89:324S-326S.