

샘종암종연쇄를 동반한 대장암에서 *Vimentin* 유전자의 프로모터 메틸화에 관한 연구

조미희 · 이유미 · 김진숙 · 김현수
이경화 · 정상우 · 이재혁

전남대학교 의과대학 병리학교실 및
'내과학교실 소화기분과

접 수 : 2009년 2월 18일
게재승인 : 2010년 1월 5일

책임저자 : 이 재 혁
우 519-809 전남 화순군 화순읍 일심리
160 화순전남대학교병원 병리과
전화: 061-379-7073
Fax: 061-379-7099
E-mail: jhlee@chonnam.ac.kr

*본 연구는 보건복지부 암정복추진연구개발사업(0720570) 및 대학교 의생명인력사업단의 지원으로 이루어진 것임.

Aberrant Promoter Methylation of the *Vimentin* Gene in Colorectal Cancer Associated with the Adenoma-Carcinoma Sequence

Mi Hee Cho · Yu Mi Lee · Jin Sook Kim · Hyun Soo Kim¹ · Kyung Hwa Lee
Sang Woo Juhng · Jae Hyuk Lee

Department of Pathology and ¹Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Background : DNA hypermethylation is a common epigenetic finding in human cancers and is closely associated with transcriptional silencing. In the present study, we investigated the proportion of colorectal neoplasms that showed the adenoma-carcinoma progression and *vimentin* gene methylation. **Methods :** Methylation status of the *vimentin* gene was examined in nontumoral mucosa, adenomas, and adenocarcinomas from 45 colorectal cancer patients who had adenoma and adenocarcinoma together. Methylation status was determined by bisulfite modification and the methylation-specific polymerase chain reaction. The expression of the *vimentin* gene product was also examined by immunohistochemistry. **Results :** Promoter methylation of *vimentin* was detected in 80% (36 out of 45 cases) of adenocarcinomas, 82.2% (37 of 45) of adenomas, and 28.9% (13 of 45) of normal epithelia, and the difference between neoplastic and normal specimens was statistically significant ($p < 0.001$). However, no significant correlations were observed between methylation frequency and clinicopathologic variables. Immunohistochemically, vimentin expression was not observed in either normal epithelial cells or tumor cells. Protein expression and *vimentin* promoter methylation were not associated. **Conclusions :** The frequency of aberrant methylation of the *vimentin* gene was high in colonic adenomas and adenocarcinomas. This result suggests that the methylation status of *vimentin* may be clinically beneficial in screening for colorectal cancer patients and may be helpful in clarifying colorectal cancer biology.

Key Words : Methylation; Polymerase chain reaction; Colorectal neoplasms; *Vimentin*

우리나라 성인에게 발생하는 악성종양 중 높은 빈도를 차지하고 있는 대장암은 최근에 단백질과 유류 섭취가 증가되면서 발생률이 점차 증가하고 있다. 대장암은 정상 점막에서 일련의 유전적 또는 외 유전적 변화 과정들이 단계적으로 복합 축적되어 발생하는데, 이러한 사실은 처음 제시된 이후 많은 연구자들에 의해 수정 보완되어 왔다.^{1,2} 이들에 따르면 암종의 형성 과정에서 adenomatous polyposis coli (APC), K-ras, deleted in colorectal cancer (DCC), p53 등의 돌연변이나 대립 유전자의 소실이 전암 병변부터 여러 단계를 거쳐 대장암의 발생을 유도한다는 것이다.³ CpG 밀집 부위가 많은 유전자 프로모터(promoter)

에서 관찰되는 비정상적 메틸화(aberrant methylation)는 DNA 복제 오류 복구유전자, 종양억제 유전자, 종양의 침윤과 전이를 억제하는 유전자, 호르몬 수용체 관련 유전자, 신생혈관 형성을 억제하는 유전자들의 기능 소실과 관련이 있어서 대장암을 포함한 많은 종류의 암 발생에 관여한다고 알려져 있다.⁴⁻⁶

Vimentin은 중간 엽세포의 세포질 내에 존재하는 중간 세섬유(intermediate filament)로서⁷ 세포 발달 과정 중 조절될 뿐 아니라, 배아 기원과는 무관하게 배양 세포에서도 발현되는 것으로 알려져 세포의 종류에 따라 그 조절 기전이 다양하다고 보

고되어 있다.⁸ 또한 vimentin은 정상 점막 상피세포에서는 발현되지 않기 때문에 메틸화를 보일 경우 발암 과정과 관련되어 나타날 가능성이 높을 것으로 생각되는데 몇몇 기존의 연구 결과에서도 정상 점막과 샘암종에서의 발현율에 현격한 차이를 보이는 것으로 알려져 있다.⁹

최근 대장암에서 vimentin의 메틸화 연구는 주로 종양 조직과 대변 내에 포함된 종양성 DNA에서 이루어지고 있으며, 정상 점막, 샘종 및 샘암종 등의 다단계 변화 과정에 대한 연구는 드문 형편이다. 따라서 본 연구는 샘종에서 발생한 대장암 환자들을 대상으로 정상 점막, 샘종, 샘암종 각각의 조직에서 vimentin 유전자의 프로모터 부위의 메틸화 빈도를 조사하고, 전암성 병변과의 진행 관련성 등 생물학적 특성과 진단 표지자로서의 가능성을 탐색해 보고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료

2004년 4월부터 2005년 9월 사이에 대장암으로 수술적 적출술이나 내시경적 절제술을 시행 받은 환자 중 샘종과 동반된 샘암종 45예를 대상으로 하였다. 수술 조직은 대표적 암 조직과 정상 조직들로 10% 포르말린 용액에서 고정시킨 후, 포매괴 파라핀 블록으로 만들었다. 이때 선천성 비용종 대장암 환자는 대상에서 제외되었으며, 샘종에서 발생한 암종의 예만을 연구 대상에 포함하였다. 또한 대상자들의 대장암 발생 부위와 크기, 분화도, 침윤 깊이(T 병기) 및 임파절 전이와 같은 병리학적 정보도 수집하였으며, 조직 분화도에 따른 샘암종의 분류는 통계상의 편의를 위하여 고분화암과 중등도 분화암을 저등급 암종으로, 저분화암을 고등급 암종으로 나누었다.

연구방법

DNA의 추출 및 정량

대상 대장암의 파라핀 포매괴를 10 μ m 두께로 박절하여 탈파라핀 과정을 거치고, 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)에 염색한 후, 저배율의 광학현미경 하에서 정상 조직, 샘종, 샘암종을 각각 선택하였다.¹⁰ 그리고 선택된 조직 부위를 각각 27

게이지 세침을 사용하여 다른 조직으로부터의 오염에 주의하면서 추출하였다. 그런 후 절단한 조직을 적당량의 TK 완충액(0.5% Tween 20 [Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany], 20 μ g proteinase K [Boehringer Mannheim], 50 mmol/L Tris-buffer [pH 8.9] 및 2 mmol/L ethylene diaminetetraacetic acid) 50 μ L에 넣어 14-16시간 동안 56°C의 수조에서 방치하였으며, 완충액 중의 proteinase K는 100°C에서 10분간 반응시켜 그 작용을 불활성화하였다. 그리고 추출된 DNA의 농도를 측정하기 위해 적당량의 증류수를 혼합한 후, 260 nm에서 흡광도를 계산하여 각각의 증류당 DNA 농도를 기록하였다.

Vimentin 유전자의 CpG 섬에 메틸화 유무 검색

분리한 DNA 2 μ L (최고 2 μ g까지)를 아황산수소나트륨 처리 방법에 따라 50 μ L 증류수에 희석한 다음 2 M NaOH 5.5 μ L를 첨가하여 잘 혼합한 후, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 또한 매 실험마다 바로 제작한 10 mM 히드로퀴논(hydroquinone, Sigma, St. Louis, MO, USA) 30 μ L와 3 M 아황산수소나트륨(Sigma, pH 5.0) 520 μ L를 첨가한 후 DNA와 잘 혼합하여 이 혼합물에 무기질 오일(mineral oil)을 떨어뜨린 뒤 50°C의 중탕 냄비에서 16시간 동안 반응시켰다. 이때 17시간 이상 시간을 두면 메틸화된 시토신이 타이민(thymine)으로 바뀔 수 있으므로 비특이적 변화가 없도록 반응 시간에 주의하였다. 이튿날 무기질 오일을 제거한 다음 DNA 정화 장치 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 염기 제거 및 정제 과정을 거친 후 증류수 20 μ L를 첨가하여 잘 녹인 뒤 중합 효소 반응 시행 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

메틸화 특이성 중합효소연쇄반응법은 GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였고, 각각의 중합효소반응 시발체들은 아황산수소나트륨 전처리 후 메틸화 DNA와 메틸화되지 않은 DNA에 선택적으로 결합할 수 있도록 제작하였다(Table 1). 또 각 반응 혼합물에는 1배 H-Taq 완충액, 10 mM의 dNTP, 10 pmole의 메틸화(M)나 비메틸(U) 시발체, 1 U H-Taq polymerase (SolGent, Deajeon, Korea), 2 μ L의 modification 이 끝난 DNA가 포함되었고 총 반응량이 12.5 μ L가 되도록 증류수로 채웠다. 그리고 95°C에서 15분간 초기 변성을 유도하고, 95°C에서 30초, 54°C에서 40초, 72°C에서 1분간 반응하는 과정

Table 1. MS-PCR primer sequences used in this study

Genes	Type of primer	Primer sequence	Size (bp)
Vimentin-M	Sense	TGGTTTCGTGGTTTTCGCGTTAGAGAC	216
	Antisense	CGACTAAACTCGACCGACTCGCGA	
Vimentin-U	Sense	TTGGTGGATTTTTGTGGTTGATG	188
	Antisense	CACAACCTACCTAACCCCTAAACTACTCA	

MS-PCR, methylation specific PCR; M, methylated; U, unmethylated.

을 35회 반복하였으며, 72°C에서 7분간 둔 다음 4°C에서 반응을 종결시키고 전기영동 전까지 4°C에 보관하였다. 이때 육안 및 사진에서 메틸화 시발체를 이용한 반응에서는 216 염기쌍(base pair)의 중합효소연쇄반응 산물이, 비메틸화 시발체 반응에서는 188 염기쌍의 중합효소연쇄반응 산물이 확인되면 양성으로 간주하였다. 총 반응 산물의 10 μ L는 ethidium bromide가 염색된 2% 아가로스겔(agarose gel)에서 전기영동하여 메틸화 유무를 확인하였다. 그리고 정상 혈액에서 추출한 DNA에 CpG methyltransferase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 처리하여 얻어진 것을 양성 대조군으로 삼고, 메틸화 시발체에 반응하여 밴드가 형성된 대상을 메틸화되었다고 해석하였다.

*Vimentin*에 대한 면역조직화학염색

대상 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 포매괴로부터 3 μ m 두께의 절편을 만들고, 이를 탈파라핀과 합수 과정을 거친 후 *vimentin* (mouse monoclonal antibodies, Dako, Carpinteria, CA, USA) 항체를 이용하여 염색하였다. 이때 내재성 과산화효소(peroxidase)를 억제하기 위해 3% 과산화수소(hydrogen peroxidase)에 10분간 반응시키고 항체를 1:100으로 희석한 다음 실온에서 40분간 작용시킨 후 완충액으로 세척하였다. 또 반응 산물의 검출을 위해 비오틴(biotin)이 부착된 항마우스 IgG와 streptavidin-horseradish peroxidase를 각각 10분간 작용시킨 후, diaminobenzidine (DAB, Sigma)을 이용하여 발색 반응시키고 헤마톡실린으로 대조 염색하였다.

음성 대조군은 일차 항체 대신 항마우스 IgG 희석액을 반응시킨 슬라이드를 동일한 과정을 거쳐 실험에 이용하였고, 절편 내에 위치한 말초신경 부위를 양성 대조를 위하여 참조하였다. 판독은 전혀 염색이 되지 않은 경우를 0, 염색은 되지만 강도가 매우 약한 경우를 1, 비교적 뚜렷하게 염색이 되는 경우를 2, 매

우 강한 염색을 보이는 경우를 3 등으로 등급을 매기고, 이중 0과 1을 비정상적인 발현 감소(-, suppressed expression), 2와 3을 발현 유지(+, sustained expression)로 평가하였다. 또한 판독에는 두 명의 병리전문의가 독립적으로 판독한 후 결과를 비교하였으며, 판독의 불일치 예는 공동 판독으로 결론을 도출하였다.

통계학적 분석

대상 예에서 *vimentin*의 메틸화와 병리학적 또는 임상적 변수와의 관련성을 분석하기 위해 Fisher's exact test를 그리고 정상 점막과 샘종, 샘암종 간의 메틸화 정도의 차이를 평가하기 위해 Wilcoxon signal rank test를 실시하였고, 샘종과 샘암종 사이의 일치성 조사를 위해 카파값(kappa value)을 계산하였다. 또한 *vimentin*의 메틸화와 면역조직화학염색 결과를 비교하기 위해 Fisher's exact test를 사용하였다.

결 과

임상 정보의 분석

대상 환자는 남자 33명과 여자 12명이었으며, 평균 나이는 61.1 \pm 9.9세였다. 대상 대장암의 평균 크기는 3.0 \pm 1.6 cm였는데, 좌측 대장에서 발생한 증례가 40예 그리고 우측 대장에서 발생한 증례가 5예였으며, 림프절 전이를 보인 경우는 4예였다. 또한 저등급 암종이 43예, 고등급 암종이 2예였으며, 침윤 깊이에 따른 중앙 병기(tumor stage)별로는 T1이 31예, T2가 8예, T3가 5예 그리고 T4가 1예였다(Table 2).

샘종-샘암종 진행에 따른 메틸화 빈도

대상 조직의 샘암종 45예 중 36예(80%)에서 메틸화를 보였고, 샘종 45예 중에서는 37예(82.2%)가 메틸화를 보였다. 반면, 정상 점막의 메틸화 빈도는 45예 중 13예(28.9%)로 나타났으며, 정상 점막 대 샘종 혹은 정상 점막 대 샘암종의 메틸화 빈도를 비교하였을 때는 두 경우 모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.001$) (Table 3, Fig. 1). 한편 *vimentin* 메틸화에

Table 2. Correlation between *vimentin* gene promoter methylation and clinicopathological parameters of colorectal cancer

Variables		Total No.	<i>Vimentin</i> methylation		
			U (n = 9)	M (n = 36)	p-value
Sex	Male	33	5	28	0.219
	Female	12	4	8	
Age (yr)	≤ 60	21	7	14	0.061
	> 60	24	2	22	
Tumor location	Left	40	8	32	1
	Right	5	1	4	
Differentiation	Low grade	43	8	35	0.364
	High grade	2	1	1	
Tumor stage	T1 or T2	39	7	32	0.583
	T3 or T4	6	2	4	
LN metastasis	Present	4	1	3	1
	Absent	41	8	33	

U, unmethylated; M, methylated; LN, lymph node.

Table 3. Comparison of methylation frequencies between sample groups

	Methylation (%)	Unmethylation (%)	p-value
Normal	13/45 (28.9)	32/45 (71.1)	
Adenoma	37/45 (82.2)	8/45 (17.8)	$< 0.001^a$
Carcinoma	36/45 (80.0)	9/45 (20.0)	$< 0.001^a$

^avs normal.

Case No.	Age	Sex	Location	Differentiation	MSP status		
					N	A	C
1	63	M	Left	LG			
2	67	M	Left	LG			
3	66	M	Right	LG			
4	76	M	Left	LG			
5	68	M	Left	LG			
6	69	M	Left	LG			
7	57	M	Left	LG			
8	71	M	Left	LG			
9	69	F	Left	LG			
10	61	M	Left	LG			
11	33	M	Left	HG			
12	59	M	Left	LG			
13	70	M	Left	LG			
14	52	M	Left	LG			
15	47	F	Left	LG			
16	72	F	Left	LG			
17	55	M	Left	LG			
18	75	F	Left	LG			
19	62	M	Left	LG			
20	53	M	Left	LG			
21	60	F	Left	LG			
22	51	M	Left	LG			
23	45	F	Right	LG			
24	58	M	Left	LG			
25	56	M	Left	LG			
26	60	M	Left	HG			
27	63	M	Left	LG			
28	49	M	Right	LG			
29	54	M	Left	LG			
30	49	F	Left	LG			
31	62	F	Left	LG			
32	69	M	Left	LG			
33	63	M	Left	LG			
34	68	M	Right	LG			
35	57	F	Left	LG			
36	71	M	Left	LG			
37	78	F	Left	LG			
38	56	M	Left	LG			
39	81	M	Left	LG			
40	42	M	Right	LG			
41	60	M	Left	LG			
42	63	M	Left	LG			
43	64	F	Left	LG			
44	72	M	Left	LG			
45	54	F	Left	LG			

□ Unmethylated ■ Methylated

Fig. 1. Summary of clinicopathologic data and methylation status of the *vimentin* gene. Information on age, sex, tumor location, and degree of tumor differentiation of each patient along with methylation status is shown.

MSP, methylation specific PCR; N, normal mucosa; A, adenoma; C, adenocarcinoma; M, male; F, female; LG, low grade; HG, high grade.

따른 전기영동 분석 결과, 비메틸화 밴드는 각 예마다 비교적 고른 강도를 보인 반면, 메틸화 밴드는 증례에 따라 밴드의 강도 차이를 보였는데, 정상 점막이나 샘종의 메틸화 밴드보다 샘암종의 메틸화 밴드가 더 강하게 나타나는 경향을 보였다(Fig. 2).

임상 변수 및 병리학적 변수와 메틸화의 연관 관계를 보기 위하여, 성별, 연령, 대장암의 발생 위치 그리고 조직 분화도에 따른 메틸화군과 비메틸화군 간의 빈도 차이를 비교하였으나 어느 변수에서도 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 2).

또한 *vimentin* 유전자의 메틸화가 샘종과 대장암 조직에서 비슷한 비율로 나타남에 따라 메틸화를 보이는 샘종 증례들과 샘암종 증례 간의 일치도를 보기 위해서 카파값(kappa value)을 구해본 결과 -0.087로 유의한 수준은 아니었다($p=0.559$) (Table 4).

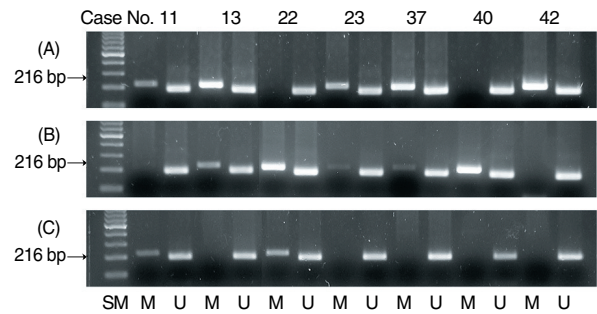


Fig. 2. Methylation specific PCR (MS-PCR) results of the *vimentin* gene in seven representative cases. Unmethylated bands are uniformly strong, whereas the intensities of methylated bands vary among cases. Overall, the methylated bands of colon adenocarcinomas are stronger than those of colon adenomas or normal colonic mucosa (A, colon adenocarcinoma; B, colon adenoma; C, normal colon mucosa; SM, molecular size marker; M, methylated; U, unmethylated).

Table 4. Agreement of methylation status between adenoma and carcinoma

		Methylation in adenoma		Kappa value	p-value
		U (n = 8)	M (n = 37)		
Carcinoma	U (n = 9)	1	8	-0.087	0.559
	M (n = 36)	7	29		

U, unmethylated; M, methylated.

Table 5. Comparison of *vimentin* promoter methylation and its immunohistochemical expression

Immunohistochemistry		Methylation		Total	p-value
		M	U		
Normal	(-)	13	27	40	0.30
	(+)	0	5	5	
Adenoma	(-)	22	6	28	0.69
	(+)	15	2	17	
Carcinoma	(-)	21	8	29	0.12
	(+)	15	1	16	

U, unmethylated; M, methylated.

Vimentin에 대한 면역조직화염색 발현 분석

Vimentin 단백질은 정상 점막, 샘종, 샘암종의 상피세포에서는 발현되지 않았고 기질에서만 발현되었다. 또 면역조직화염색 방법으로 vimentin 단백질의 발현을 methylation specific PCR 결과와 비교하였을 때 일부 메틸화를 보인 예의 샘종이나 샘암종의 기질 부분에서 vimentin의 발현이 감소하였고, 비메틸화 예에서의 기질 부분에서는 발현이 유지되는 경향이 있었으나 (Fig. 3), 유의한 연관성을 보이지는 않았다(Table 5). 또한 정상 점막 내 기질(11.1%, 5/45)보다 샘종(37.8%, 17/45) 및 샘암종의 기질(35.6%, 16/45)에서 vimentin 양성 발현의 비율이

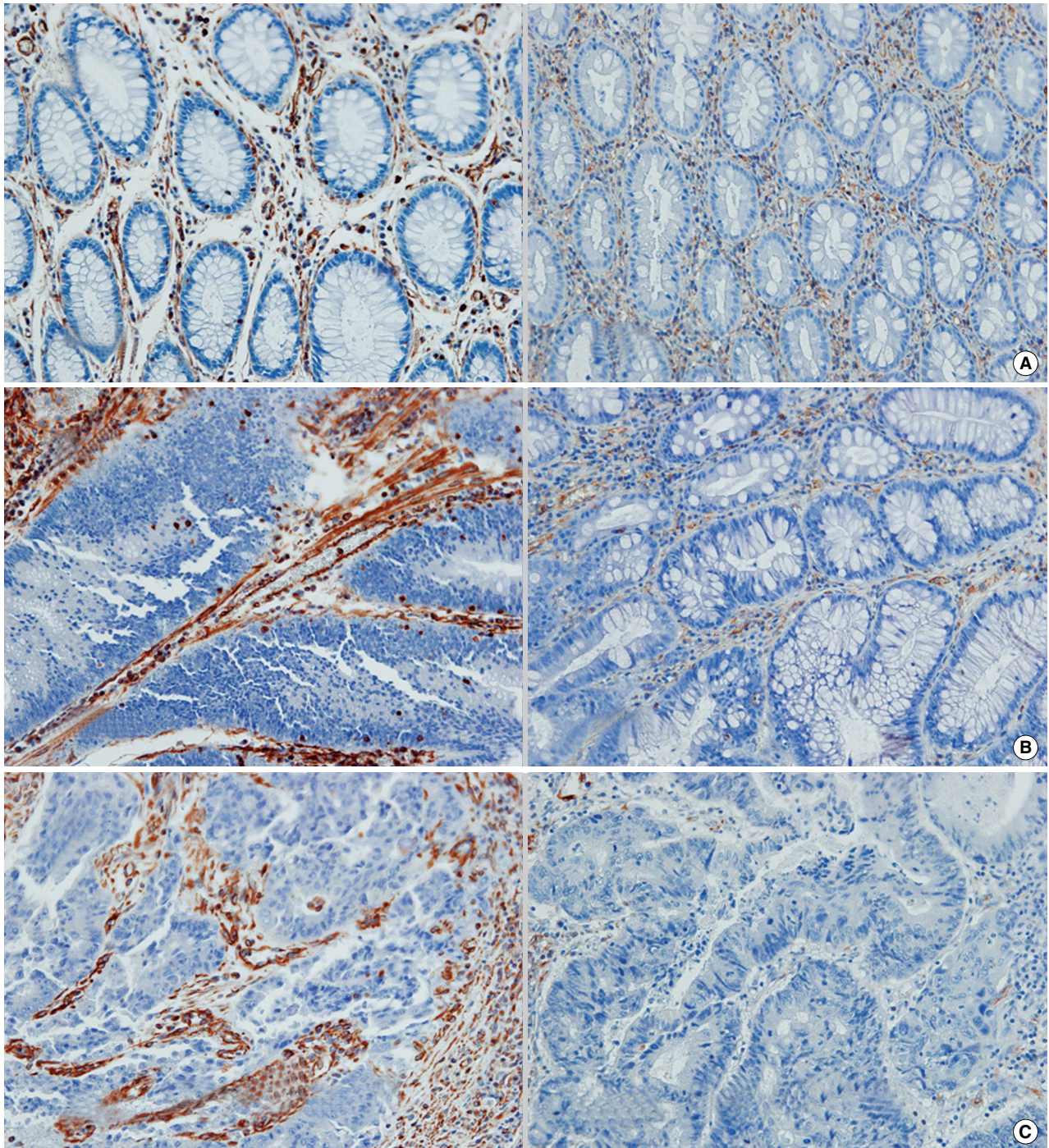


Fig. 3. Vimentin expression by immunohistochemistry. Its expression is not observed in epithelial components of normal mucosa (A), adenoma (B) and adenocarcinoma (C). Strong immunoreactivity in non-tumoral stromal components of case No. 24 contrast with weak immunopositivity in those of case No. 31.

더 높았다($p=0.01$).

고 찰

대장암의 발생 빈도는 서양에 비해 우리나라가 현저히 낮았으

나, 최근 식생활 등 서구화된 환경 요인에 따라 발병이 점차 증가하여 2003년부터 2005년까지 전체 암 발생의 12.0%로 증가되었으며, 장기별 암 발생률 3위, 5년 동안 상대 생존율 64.8%로 5위를 차지하고 있다.¹¹ 현재 진단과 치료를 개선시키려는 다양한 노력에도 불구하고 50% 정도가 다른 장기로의 전이에 의하

여 사망하고 있으므로 궁극적인 치료와 예방 그리고 조기 발견이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다.¹²

대장암은 인체에 발생한 다른 암종에 비해 여러 가지 면에서 생물학적으로 중요한 점들이 많은데, 그것은 대장암 중 일부의 원인 유전자가 밝혀져 있다는 점과, 인체의 종양 중 가장 많은 분자유전학적인 연구 결과가 밝혀져 있으며 이의 응용이 시도되고 있다는 점 그리고 대장암 발생에서 전이에 이르기까지 비교적 일관된 경과를 보이기 때문에 암 예후와 관련된 생물학적 표지자 판정에 좋은 모델이라는 점 등이다.¹³ 현재까지 밝혀진 대장암에 관한 유전자 변화 유형은 크게 세가지로 나뉘볼 수 있다. 첫째는 APC 유전자, β -catenin 유전자, K-ras 등의 돌연변이나 결손에 의한 염색체 불안정형(chromosomal instability, CIN)이고, 두 번째는 hMLH1, hMSH2, PMS1, PMS2 등의 DNA 복제 오류 복구유전자의 변이에 의한 현미 부수체 불안정형(high microsatellite instability, MSI-H)이다. 그리고 세 번째는 대장암에서 비교적 최근에 알려진 CpG 섬 메틸화 유형(CpG island methylation phenotype, CIMP)이다.¹⁴

DNA 메틸화는 DNA 염기서열 중 시토신 다음에 구아닌(guanine)이 위치할 때 시토신 5번째 탄소에 메틸그룹(-CH₃)이 첨가되는 반응이다.¹⁵ 이는 DNA 염기서열의 변화 없이 유전자의 발현을 조절하는 외 유전적 기전으로서, 유전자 본래의 상태를 유지하는 데 있어 매우 중요한 기능을 한다. 많은 종양억제 유전자에서 5'-CpG 섬의 과메틸화는 이미 널리 알려져 있는 유전자의 결손(deletion)이나 점 돌연변이(point mutation) 등에 의한 구조적 변화로 발생하는 염기서열의 변화 없이도 유전자의 전사 기능을 억제함으로써 종양 억제 능력을 감소시키게 된다.¹⁶

Rb 유전자는 이런 종양억제유전자 중 처음으로 과메틸화가 밝혀진 유전자이며,¹⁷ 그 외 von Hippel-Lindau (VHL) 유전자, E-cadherin 유전자, hMLH1 유전자 그리고 estrogen receptor (ER) 유전자 등이 CpG섬의 과메틸화에 의한 유전자의 불활성화가 증명된 유전자들이다. 최근 들어 더 다양한 유전자의 메틸화 연구가 진행되고 있으며, vimentin 유전자도 그 중 하나이다.¹⁸⁻²¹

DNA 메틸화는 작은 크기의 샘종에서만 아니라 샘암종이 발생한 환자의 정상 대장 점막에서도 발견되는 변화이기 때문에 현재까지 밝혀진 대장암 발생 과정의 분자유전학적 변화 중 가장 초기의 변화로 여겨지고 있다.¹³ 따라서 대장암의 표지자로 유용하게 이용하기 위해서 정상 점막 조직에서는 발현되지 않고 암 발생과 관련이 있는 CpG가 많은 부분을 목표로 하는 메틸 특이 유전자를 발굴하는 데 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

한편 최근 들어 대장암에서 vimentin 유전자의 과메틸화에 대한 연구가 활발한데, 2005년에 발표된 Brenner와 Rennert²²의 연구 결과에서는 대장암에서의 vimentin 메틸화가 53%에서 83%까지 나타난다고 했고, 같은 해 발표된 Chen 등²³의 연구에서는 92%에서까지 관찰된다고 발표했다. 그 후 2007년 Zou 등²⁴

은 샘암종 72%, 샘종 84% 그리고 정상 상피조직의 11%에서 메틸화가 관찰된다고 발표했다. 본 연구에서도 샘종에서 발생한 대장암 환자들의 수술 조직을 대상으로 살펴 본 결과, 정상 점막, 샘종, 샘암종 각각에서 vimentin 유전자 시발자 부위의 메틸화 빈도가 28.9%, 82.2% 및 80.0%로 나타나 이전의 보고들과 비슷하였다.

그러나 유전자 단계가 아닌 단백 발현 단계에 대한 기존의 연구 결과는 상이한 결과를 보여왔다. 즉 면역조직화학염색을 통하여 대장암에서 vimentin 발현을 연구한 Ngan 등²⁵에 따르면 대장암 조직의 상피 성분은 vimentin 발현을 보이지 않았지만, 예후가 좋지 않은 환자 그룹에서 기질 부분의 vimentin 발현이 증가한다고 하였다. 대장 조직 이외에도 Singh 등²⁶은 침습성이 강한 전립선암 세포주에서 그렇지 않은 세포주보다 vimentin 발현이 증가한다고 발표한 바 있다. 또 Alfonso 등²⁷은 프로테오믹스법을 통하여 정상 대장 점막에 비해 대장암 부위에서 vimentin 단백질의 발현이 유의하게 높아진다고 보고하였다. 위의 연구자들이 선택했던 실험 재료를 좀 더 세분하여 보면, Ngan 등²⁵은 면역조직화학염색상 vimentin 발현이 없었던 상피 부분과는 별도로 기질 성분만을 분석의 대상으로 삼았고, Singh 등²⁶은 기질 성분이 포함되지 않은 세포주를 재료로 선택하였으며, Alfonso 등²⁷은 프로테오믹스의 재료로 주로 상피 성분을 채취하였지만, 일부 기질 성분을 포함시켰다. 이는 전립선암 등 일부 종양세포 자체에서의 vimentin 발현의 증가는 상피-간엽 전환(epithelial-mesenchymal transition)과 관련하여 종양의 침습성이 증가하는 성향을 나타내는 것이라 볼 수 있다. 또한 vimentin의 발현이 없었던 상피 종양에서는 섬유모세포를 포함한 기질성분의 vimentin 발현의 증가가 좀 더 공격적인 종양의 특성과 관련되어 있다. 본 연구에서도 이와 유사하게 정상 점막에 비해 샘종, 샘암종 기질 조직에서 유의하게 vimentin 발현이 증가하였다. 프로모터 메틸화의 비율 역시 샘종, 샘암종에서 유의하게 증가해 있었다. 따라서 일반적으로 유전자 프로모터 메틸화가 단백 발현 억제와 관련되어 있지만, vimentin 유전자 프로모터의 메틸화는 상피세포 내의 단백 발현 조절과는 관련 없이 발암 과정에서 암 전구 병변의 진행과 관련하여 발생하였음을 유추해 볼 수 있고, 메틸화를 통한 후생학적 기전이 아닌 다른 조절 기전에 의하여 발현이 조절되는 것으로 추정할 수 있다. 특히 최근에는 상피-간엽 전환에서 vimentin 발현 조절에 대한 연구가 중점적으로 이루어지고 있어, 전사(transcription) 단계의 조절 인자인 Smad interacting protein-1 (SIP1; ZEB2)이나 val¹² ras 등이 유전자 발현 조절에 관여할 것으로 추측하고 있다.^{28,29}

지금까지의 연구 결과를 종합해 보면 vimentin 유전자의 메틸화가 대장암에서 53-93%까지 다양하게 진행되었고, 샘종에서는 84%, 정상 점막에서는 11%로 보고되었다. 본 연구의 결과에서도 이와 비슷하게 대장암 환자의 정상 점막보다(28.9%) 샘종과 샘암종 조직에서 vimentin 유전자의 메틸화 빈도가 높

았다(82.2%, 80%). 이러한 결과로 볼 때 대장의 샘종-샘암종의 유전적 진행에 관여하는 CpG섬 메틸화 유형(CIMP)의 새로운 구성원으로서 *vimentin* 유전자를 고려할 수 있는데, 이 *vimentin* 유전자의 메틸화는 비교적 발암 과정의 초기에 관여한다는 사실을 알 수 있다. 또한 이는 대변 내 DNA 검사 등의 비교적 간편한 방법으로 초기 대장암 환자의 선별 검사에 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 그러나 샘종에서 메틸화를 보이는 증례와 샘암종에서 메틸화를 보이는 증례들 간의 일치도가 높지 않았던 점에 대한 추가적인 연구는 더 많은 증례를 통한 후속 연구에서 보완되어야 할 것이다. 또한 *vimentin* 유전자의 메틸화 유무와 병기를 포함한 대장암의 여러 임상 양상과의 관계에 대해서도 앞으로 더 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 보인다.

참고문헌

- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-32.
- Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, *et al.* Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996; 13: 343-6.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-16.
- Esteller M, Risques RA, Toyota M, *et al.* Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4689-92.
- Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6163-7.
- Kim HC, Roh SA, Ga IH, Kim JS, Yu CS, Kim JC. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1920-6.
- Bloemendal H, Pieper FR. Intermediate filaments: known structure, unknown function. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1007: 245-53.
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Mastudaira P, Darnell J. *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995.
- Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 593-625.
- Moskaluk CA, Kern SE. Microdissection and polymerase chain reaction amplification of genomic DNA from histological tissue sections. *Am J Pathol* 1997; 150: 1547-52.
- Ministry for Health, Welfare, and Family Affairs. Statistical yearbook of Ministry for Health, Welfare, and Family Affairs: cancer incidence and major cancer five-year relative survival. Seoul: Ministry for Health, Welfare, and Family Affairs, 2008.
- Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G7-17.
- Kim H. Clinical and pathological significance of the genetic analysis in colorectal carcinomas. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 275-82.
- Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 854-65.
- Bestor TH, Ingram VM. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 5559-63.
- Huang TH, Perry MR, Laux DE. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 459-70.
- Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet* 1994; 94: 491-6.
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, *et al.* E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5195-9.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, *et al.* Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9700-4.
- 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.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-11.
- Brenner DE, Rennert G. Fecal DNA biomarkers for the detection of colorectal neoplasia: attractive, but is it feasible? *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1107-9.
- Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, *et al.* Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1124-32.
- Zou H, Harrington JJ, Shire AM, *et al.* Highly methylated genes in colorectal neoplasia: implications for screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2686-96.
- Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, *et al.* Quantitative evaluation of

- vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 986-92.
26. Singh S, Sadacharan S, Su S, Beldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2306-11.
27. Alfonso P, Núñez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sánchez L, Casal JL. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; 5: 2602-11.
28. Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, *et al.* Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006; 25: 4975-85.
29. Yates B, Zetterberg C, Rajeev V, Reiss M, Rittling SR. Promoter-independent regulation of vimentin expression in mammary epithelial cells by val(12)ras and TGFbeta. *Exp Cell Res* 2007; 313: 3718-28.