

Urethane에 의한 생쥐의 폐암 발생 과정에서 Telomerase의 활성도

송지선 · 정순희¹ · 이상엽 · 오화은
조미연¹ · 박광화¹

관동대학교 의과대학 병리학교실; ¹연세대학교
원주 의과대학 병리학교실

Telomerase Activity in Urethane-Induced Mouse Lung Tumorigenesis

Ji-Sun Song · Soon-Hee Jung¹ · Sang Yeop Yi · Hwa Eun Oh · Mee Yon Cho¹
Kwang Hwa Park¹

Department of Pathology, Kwandong University College of Medicine, Goyang; ¹Department of Pathology, Yonsei
University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea

Background: Telomerase activity in precancerous conditions of lung adenocarcinomas has not been well studied. This study is designed to investigate the role of telomerase in premalignant lesions of urethane-induced mouse lung adenocarcinoma. **Methods:** We harvested A/J mouse lung tissues at 3, 6, 9, 12, 28, 41, and 48 weeks after intraperitoneal urethane treatment, and classified each lesion in terms of histologic findings. We examined telomerase activity using a modified version of the telomeric repeat amplification protocol assay using both gel-based and enzyme linked immunosorbent assay methods. An immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was performed. **Results:** In urethane-induced mouse lung tissues, it was sequentially developed from hyperplasia, adenoma, and eventually to adenocarcinoma. Telomerase activity began to show a positive level in tissues with no histologically visible nodule after urethane administration. It revealed a statistically significant increase in hyperplasia compared to the "control" lung tissue ($p < 0.05$), which was proportionally elevated relative to adenoma and adenocarcinoma. There was a direct correlation between telomerase activity and the PCNA labeling index ($p < 0.05$). **Conclusions:** The elevation of telomerase activity in normal-appearing lung lesions is thought to be a possible marker of early detection of pulmonary adenocarcinoma.

접 수: 2011년 2월 24일
게재승인: 2011년 5월 11일

책임저자: 정순희
우 220-701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주 의과대학 병리학교실
전화: +82-33-741-1551
Fax: +82-33-731-6590
E-mail: soonhee@yonsei.ac.kr

Key Words: Telomerase; Mice; Lung; Adenocarcinoma; Precancerous conditions

폐암은 전 세계적으로 암 사망의 주요 원인으로 알려져 있으며, 폐암의 원인 인자로 알려진 흡연의 증가와 더불어 점차 유병률도 증가하고 있다. 폐암은 조직학적 분류상 비소세포암종(non-small cell carcinoma)이 약 3/4를 차지하는데, 이 중 비흡연자에게도 발생하는 샘암종(adenocarcinoma)은 최근 흡연자와 비흡연자 모두에게서 발생률이 점차 증가하고 있다.

샘암종은 주로 폐의 실질에 위치하기 때문에 객담세포검사에 의한 조기 발견이 어렵고, 임상적인 증상도 늦게 나타나 병기가 매우 진행된 후에 진단되는 경우가 많다. 또한 이렇게 진행된 암종 검체로는 암 발생에 있어 초기 단계의 분자생물학적 변화를 연구하는 데도 어려움이 있다. 따라서 동물 실험 모델을 이용한 연구가 필요하게 되었는데, 사람의 폐샘암종의 연구에 이용할 수 있는 여러 동물 모델 중 생쥐에서 urethane으로 유도된 폐샘암종 발생 모델이 가장 유용한 방법으로 알려져 있다.

Urethane으로 유도된 폐샘암종 발생 모델은 재현성이 높고, 병변의 조직학적 소견이 인체의 것과 유사하며, 시간이 지남에 따라 단

계적으로 과형성(hyperplasia)과 샘종(adenoma)을 거쳐 샘암종을 발생시킨다.¹ 사람의 폐샘암종도 대장암에서의 샘종-샘암종 연쇄 과정과 비슷한 양상으로 발생되는 것으로 생각되고 있다. 따라서 생쥐의 암 발생 모델에서 단계적으로 발생하는 이러한 병변의 연구는 사람의 샘암종 발생 과정의 변화를 연구하는 데 중요한 자료가 될 것이다. 특히 암종의 발생 과정 중 나타나는 생쥐의 폐 상피세포는 종양발생유전자, 종양억제유전자 등 수많은 유전자 변화가 단계로 축적된다는 점에서 사람의 폐암종 발생 과정과 유사하다.²

척추동물의 telomere는 염색체의 양단에 위치해 있으며, 수많은 TTAGGG 염기서열이 일렬로 반복된 구조를 하고 있는데, 5'에서 3' 방향으로 DNA 복제 시 leading strand는 완전히 복제되지만, lagging strand는 template DNA의 3' 끝이 불완전 복제되어 결국 새로 합성된 DNA의 5' 부위에 틈이 생기게 된다. 따라서 체세포가 분열할 때마다 50-200 nucleotides가 상실되고 telomere의 길이는 짧아지게 된다. 이러한 단축은 세포분열 시에 유사분열의 시계(mitotic clock)로 작용하여 정상세포의 노화 신호로 apoptosis를 일으킨다

고 알려져 있다.^{3,5}

Telomerase는 RNA 의존 DNA 중합효소로서 염색체의 끝부분에 위치하며 세포가 분열할 때마다 길이가 짧아지는 telomere를 유지 시킨다. 따라서 telomerase는 정상적으로 세포분열이 지속적으로 일어나는 생식세포, 면역 및 조혈 간세포에서만 발현될 뿐 기타 분화된 체세포에서는 발현되지 않거나 매우 약한 활성만을 보인다.

그런데 이러한 telomerase가 이미 광범위한 인체의 여러 악성 종양에서 높은 활성도를 보인다는 보고들이 있었고, telomerase의 활성화가 세포의 불멸성 획득과 암 발생 과정에 중요한 역할을 할 것이라는 주장이 있어 왔다.⁶⁻⁹ 국내 연구에서도 대부분의 진행성 암 종에서 telomerase의 활성도 증가에 관한 연구가 활발하였으나, telomerase의 활성도와 폐암종과의 연관성에 대한 연구는 많지 않았고, 더욱이 폐암 발생 과정에서의 초기 증식성 병변에서부터 진행된 침습성 암종에 이르기까지 조직학적 단계별로 telomerase의 활성도를 측정한 연구는 드물었다. 그 중 Feng 등¹⁰은 사람의 종양 세포주에서 telomerase 억제에 의한 telomere의 단축과 세포사를 보고하였고, telomerase 억제제를 이용한 암 치료에 대한 임상적 응용 가능성도 제시하였다. 따라서 이러한 암 발생 과정의 단계별 telomerase 활성도에 대한 연구는 telomerase 억제를 이용한 적절한 치료 시기를 제시하는 데 도움을 줄 수 있고, 나아가 임상적 연구의 폭을 넓히는 데도 초석이 될 것으로 생각된다.

종양세포의 성장 속도를 나타내는 세포 증식능은 종양의 악성도 및 예후를 추정할 수 있는 중요한 지표로 알려져 있으며, 비종양성 병변의 범위를 이해하는 데에도 유용하다. 증식세포핵 항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 세포 증식 주기의 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성되고 핵 내에 축적되므로 면역조직화학염색 방법으로 확인한다면 종양과 전암 병변의 증식능의 차이를 조직학적 소견과 대응시켜 관찰할 수 있다.¹¹

본 연구는 생쥐에게 폐의 샘암종 발생을 유도하는 urethane을 투여한 후, 샘암종 발생 과정인 과형성, 샘종 그리고 샘암종 각 단계의 병변을 조직학적으로 확인하여 구분하고, telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay로 측정한 telomerase의 활성도를 각 단계별로 비교하며, PCNA 표지지수와도 비교하여 폐의 샘암종 발생 과정에서 telomerase의 활성도 변화를 살펴보고, 전암 병변을 포함한 폐샘암종 발생에서의 telomerase의 역할을 알아보기자 하였다.

재료 및 방법

생쥐의 폐샘암종 발생 유도

출생 후 6주 된 A/J 생쥐 46마리를 urethane 투여군 39마리와 투여하지 않은 대조군 7마리로 나누어 0.9% 식염수에 용해시킨 urethane을 체중 g 당 1 mg씩 복강 내 투여하고, 이후 3주, 6주, 9주, 12주, 28주, 41주, 48주에 각각 실험군 6마리(단 48주는 3마리)와 대조

군 1마리를 함께 부검하여 즉시 폐 조직을 채취하였다.

이때 생쥐의 폐 조직은 두 부분으로 나누어 오른쪽 폐는 telomerase 활성도 검색을 위해 신선조직으로 채취하여 넓은 면으로 이분한 후 동결절편검사로 병변 유무를 확인하고, 나머지 절반의 조직을 phosphate buffered saline으로 수세하여 -70°C 냉동고에 보관하였다. 왼쪽 폐는 조직학적 소견의 관찰과 면역조직화학염색을 위해 10% 중성 완충 포르말린을 주입한 후 고정하여 통상적인 방법에 따라 파라핀포매 블럭을 제작하고, hematoxylin & eosin 염색을 시행하여 왼쪽 폐의 가장 넓은 절단면 전체에서 조직학적 소견을 관찰하였다.

생쥐를 이용한 본 동물실험 연구는 관내 동물실험윤리위원회의 승인을 얻었다.

Urethane 투여 후 생쥐 폐 병변의 조직학적 분류

생쥐에게서 발생한 폐의 종양성 병변은 인체의 성장 양식과 동일하지 않으며, 통상적으로 과형성, 샘종, 샘암종으로 분류된다.¹² 과형성은 비정형성이 없이 원형 또는 타원형으로 비대된 상피세포가 폐포 구조를 유지하면서 폐포 벽을 피복한 병변으로 판별하고, 샘종은 비교적 균일하게 증식하는 상피세포가 연속된 세 개 이상의 폐포를 채우면서 고형성 또는 유두상 구조를 보이며 성장하는 경계가 좋은 결절성 병변으로 판별하였다. 그리고 샘암종은 정상 폐포 구조가 소실되고 밀집된 종양세포가 다형성을 보이며, 핵/세포질 비율이 증가되는 등 뚜렷한 세포학적 비정형성을 보이고, 유사분열이 자주 관찰되며, 다양한 성장 양식을 보이는 병변으로 판별하였으며 종양세포가 혈관, 흉막을 침범하거나 결절 주변의 폐포 강 또는 세기관지 내로 종양세포가 침윤하는 침습성 병변도 포함하였다.

Telomerase 활성도 측정(TRAP assay)

Telomerase 활성도는 냉동 보관한 조직으로 TRAP assay를 약간 변형시켜 이용하였으며,¹³ gel-based detection 방법으로 전기영동에 의해 가시화하고, 동시에 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 시행하여 반정량적으로 수치화함으로써 검사의 정확도를 높이고자 하였다.

냉동 조직을 100-200 units/mL의 RNase inhibitor를 포함하는 200 µL의 ice-cold 1× CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidine, 6 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol)에 넣고 homogenizer로 갈아준 다음 30분 동안 얼음 위에 보관한 후 4°C, 12,000 g에서 20분간 원침시켰다. 그리고 상층액만을 모아 단백 정량과 RNA 정성검사를 위해 일부만 남기고 나머지는 2-3개의 eppendorf tube에 나누어 담아 -70°C에 보관하였다. 이때 단백 정량은 Bradford법(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)으로 시행하였다.

Gel-based telomerase 측정을 위해 TRAPeze gel-based telomer-

ase detection kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA)를 이용하였는데, 이때 TRAP 반응혼합액은 10× TRAP reaction buffer (200 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 630 mM KCl, 0.5% Tween 20, 10 mM EGTA) 5 μL, 50× dNTPs (25 mM dATP, dITP, dGTP, dCTP) 1 μL, TS primer 1 μL, TRAP primer mix with RP primer, K1 primer 와 TSK1 template 1 μL, 그리고 2 units의 Taq DNA polymerase (Life Technologies, Gaithburg, MD, USA)를 함유하였으며, 중류수를 첨가하여 전체량이 24 μL가 되게 한 후 단백 추출물(10 ng/μL) 1 μL를 첨가하였다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 30°C에서 30분간 전처치한 다음 PCR inhibitor를 제거하고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초의 cycle을 30회 반복하였다. 또 각각의 PCR 산물을 2.5 μL씩의 loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylen cyanol, 50% glycerol, 50 mM EDTA)를 넣고 12.5% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 SYBR Green으로 염색하여 gel photography로 관찰하였다.

또 ELISA telomerase 측정을 위해 TRAPeze ELISA telomerase detection kit (Chemicon International)를 이용, 각 표본의 단백 추출물을 2번 중복 측정하고 각 표본을 85°C에서 열처리하여 음성대조로 사용하였다. 5× TRAP reaction mix (biotinylated TS primer, biotinylated RP primer, dATP, dCTP, dGTP, dITP, internal control primers, Tris buffer) 10 μL와 Taq polymerase 0.4 μL (2 units)를 혼합하고 중류수를 첨가하여 전체량이 49 μL가 되게 한 후 단백 추출물(50 ng/μL) 1 μL를 첨가하였다. PCR은 30°C에서 30분간 전처치한 다음 PCR inhibitor를 제거하고 94°C에서 30초, 55°C에서 30초의 cycle을 33회 반복하였다. 그리고 각각의 PCR 산물을 ELISA protocol에 따라 반응시켜 ELISA reader로 450 nm에서의 흡광도를 측정하고 690 nm의 흡광도를 참고치로 계산하였다. 최종적으로 각 sample의 흡광도에서 열처리한 sample의 흡광도를 뺀 값을 순수한 활성도 증가치로 표시하였고, 이 값이 0.15를 초과하였을 때 telomerase 활성도를 양성으로 평가하였다.

PCNA에 대한 면역조직화학염색

파라핀 블록을 4 μm 두께로 박절하여 poly-L-lysine-coated slides 위에 부착시키고, 60°C에서 2시간 건조시켰다. 그 다음 탈파라핀과 재수화를 시키고 수세한 후 pressure cooker를 이용하여 microwave (750 W)에서 5분간 3회 가열하고 20분간 pressure cooker 안에 유지시켰다. 그리고 3%의 hydrogen peroxide/methanol에 10분 동안 처리하여 내인성 peroxidase를 억제한 후 중류수에 세척하고 트리스 완충액에서 10분간 수세하였다. 이때 일차 항체 PCNA (1:50, Dako, Glostrup, Denmark)를 각각 실온에서 하루 밤 동안 반응시키고, 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 트리스 완충액에서 10분간 수세하였으며, 이차 항체에 30분간 반응시킨 후 트리스 완충액에서 10분간 수세하였다. 그리고 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)에서 6분간 발색한 후 흐르는 물에 세척하고 해마톡실린으

로 대조 염색하였다.

PCNA 표지지수는 핵에 강하게 염색된 경우만 양성으로 판독하였으며, 병변에서 양성 반응을 보이는 세포의 밀도가 높은 부분을 선별하여 고배율 시야에서 500개의 세포를 계수, 양성인 세포의 백분율을 계산하였다.

통계학적 분석

생쥐의 샘암종 발생 과정에서 나타나는 시기와 조직학적 분류에 따른 결절의 크기, telomerase 활성도, PCNA 표지지수의 차이를 분산 분석을 이용하여 Scheffe 검정법으로 분석하였다. 또한 telomerase 활성도와 PCNA 표지지수와의 상관 관계는 Pearson 상관 분석을 이용하였다.

결 과

Urethane으로 유도된 생쥐 폐의 육안 소견

Urethane 투여 후 제3주와 제6주까지는 육안적으로 아무 변화가 없었다. 그러나 제9주에는 육안으로 식별이 되는 몇 개의 좁쌀 같은 백색 결절이 폐 전반에 고르게 분포되었고(Fig. 1A), 제12주에는 비슷한 크기의 결절이 수적으로 약간 증가되었다. 그리고 시기가 경과할수록 좀 더 크기가 큰 결절이 많아지고 결절의 개수가 증가되었으며, 제41주와 제48주에는 흉막 밖으로 돌출된 종괴가 확연하게 많이 형성되었다(Fig. 1B). 제41주에는 2마리의 폐 실질에 경화 소견이 있어 폐렴이 동반된 것으로 생각되었다. 그러나 폐 이외의 다른 장기에 종양 전이의 소견이 관찰된 생쥐는 없었다. 대조군 생쥐는 제48주까지 이르는 동안 아무런 육안적 변화가 없었다.

Urethane 투여 후 시기에 따른 조직학적 소견

Urethane을 투여하지 않은 대조군 생쥐는 7마리 모두 조직학적으로도 폐포세포의 증식이 관찰되지 않았다. 실험군에서는 제3주에서 육안으로는 관찰되지 않았으나, 현미경적으로 한 개의 과형성 결절이 한 마리의 폐 실질에서 관찰되었다.

제6주에는 실험군 6마리 중 5마리에서 1개 또는 2개의 과형성 병변이 관찰되었는데, 증식한 폐포세포는 세포학적 비정형성이 없고 비교적 폐포 증격을 유지하고 있었다(Fig. 2A). 또 제9주부터 제48주까지는 모든 실험군 생쥐에게서 1개 이상의 결절이 관찰되었으며, 제9주에는 개체별로 1개에서 6개의 결절이 있었는데 이는 제6주 실험군보다 폐포 벽에 증식하는 상피세포 층이 두꺼워지면서 폐포 강을 채워 과형성 결절이 형성되는 샘종이 발생되는 시기로 생각되었다.

제12주 실험군은 6마리 모두 각각 2개에서 7개의 과형성이 발생하였는데, 이 중 3마리에서 결절 내에 세포학적 비정형성이 있는 샘

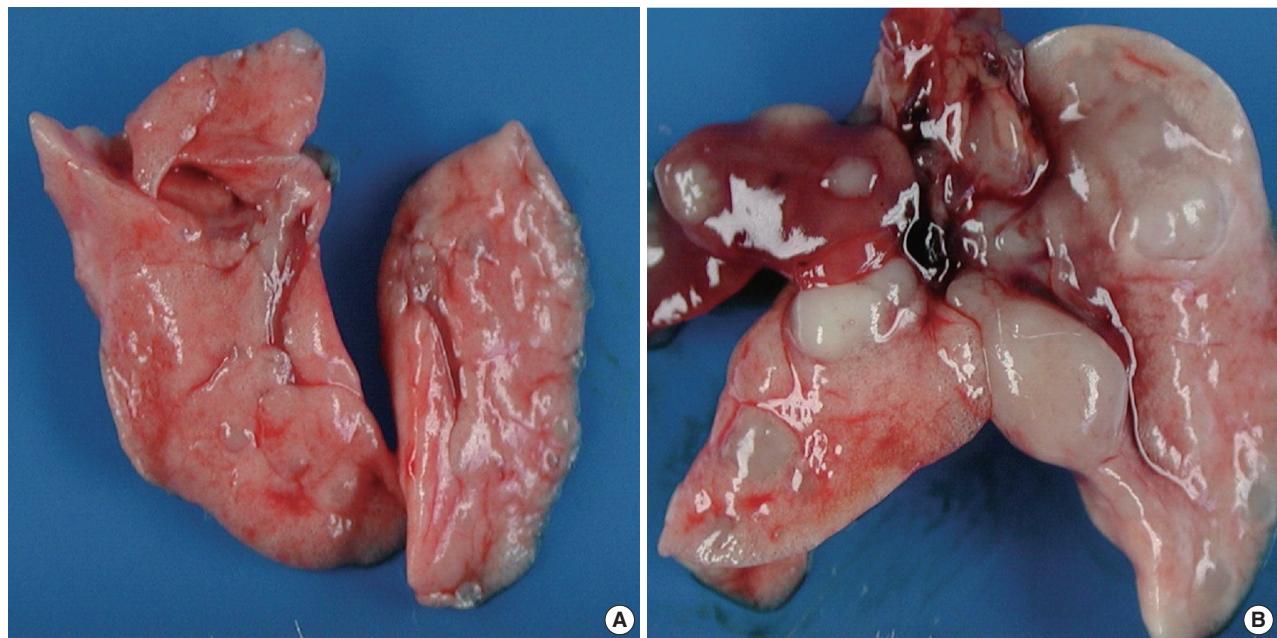


Fig. 1. Gross findings of the mouse lungs at 9 wk (A) and 41 wk (B) after urethane administration (1 mg/g i.p.). At 9 wk (A), several tiny white nodules are scattered through both lung fields. At 41 wk (B), many protruding masses of variable sizes are noted with focal pneumonic consolidation.

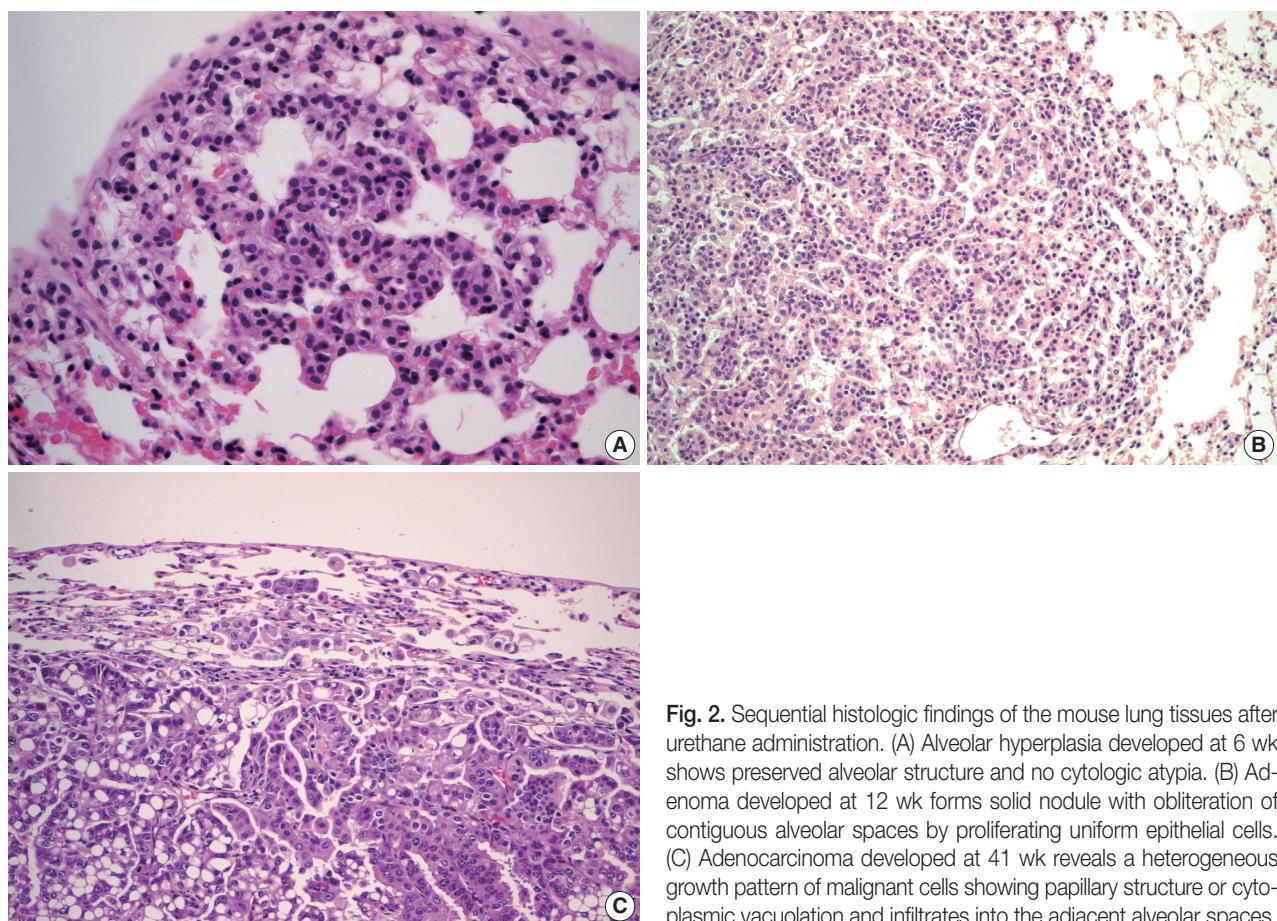


Fig. 2. Sequential histologic findings of the mouse lung tissues after urethane administration. (A) Alveolar hyperplasia developed at 6 wk shows preserved alveolar structure and no cytologic atypia. (B) Adenoma developed at 12 wk forms solid nodule with obliteration of contiguous alveolar spaces by proliferating uniform epithelial cells. (C) Adenocarcinoma developed at 41 wk reveals a heterogeneous growth pattern of malignant cells showing papillary structure or cytoplasmic vacuolation and infiltrates into the adjacent alveolar spaces.

종 결절이 포함되었고 이러한 병변에서는 유두상 구조가 형성되기도 하고, 간혹 유사분열도 관찰되었다(Fig. 2B).

제28주 실험군은 결절의 크기가 더 커져 주변의 혈관을 누르면서 성장하는 결절도 있었는데, 발생된 거의 모든 결절이 샘종의 소견을 보였다. 이러한 결절은 폐포 구조를 유지하면서 증식하는 병변과 연결되어 있어 과형성에서 샘종으로 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 한 개의 결절에서는 세포의 크기와 모양이 훨씬 다양하고 불규칙하며 핵의 과염색성이 증가하고 뚜렷한 핵소체를 갖는 등 암종에 해당하는 세포학적 비정형성이 관찰되어 샘암종에 해당하였다.

제41주 실험군은 작은 크기의 과형성에서부터 샘암종에 이르는 다양한 진행 양상을 보여 시간이 경과할수록 계속 새로운 증식성 병변이 발생하고 악성도가 진행되고 있는 것으로 생각되었다. 특히 제28주 실험군보다 발생된 결절의 수와 크기가 증가되었고, 세포학적 비정형성과 다형성이 더욱 심해지며 유사분열이 흔히 관찰되는 샘암종 병변을 6마리 모두가 포함하고 있었다. 한편 육안 소견상 폐 실질의 경화가 관찰되었던 2마리의 폐 조직에서는 조직학적으로도 주변 실질에 폐렴이 동반되어 있었고, 기관지와 세기관지의 내강을 채우는 결절이 2개 관찰되었다. 그리고 한 개 결절의 가장자리 일부 부위는 세기관지 상피세포와 연결되어 있었다.

제48주 실험군은 제41주와 비슷한 양상으로 과형성, 샘종, 샘암종의 병변이 모두 발생하였으며, 결절의 수는 제41주와 비슷하였으나 결절의 크기가 증가하였다. 특히 가장 크기가 큰 결절(6 mm)에서는 유두상 구조를 보이는 부분에서 세포 밀도가 증가되었으며, 충실성 성장 양상을 보이는 부분의 세포질 내에 공포가 형성되어 있는 부분도 있었고, 종괴의 가장자리로 갈수록 세포의 악성도가 심해지면서 종양세포가 낱개로 혹은 작은 집단을 형성하며 주변 폐 실질로 침윤하는 샘암종의 소견이 관찰되었다(Fig. 2C, Table 1).

Table 1. Histologic features of lung nodules at the different time point after urethane administration

Period (wk)	No. of mouse	Histologic findings	No. of nodule	Mean size of nodule at each period \pm SD (mm)
3	6	Hyperplasia	1	0.08 \pm 0.20
6	6	Hyperplasia	6	0.18 \pm 0.10
9	6	Hyperplasia Adenoma	17 2	0.27 \pm 0.11
12	6	Hyperplasia Adenoma	19 4	0.41 \pm 0.15
28	6	Hyperplasia Adenoma Adenocarcinoma	1 35 1	0.73 \pm 0.31
41	6	Hyperplasia Adenoma Adenocarcinoma	6 19 31	1.23 \pm 0.85
48	3	Hyperplasia Adenoma Adenocarcinoma	6 7 11	1.24 \pm 1.28

SD, standard deviation.

조직학적 진단에 따른 결절의 개수와 크기 변화

실험군 생쥐 39마리의 파라핀포매 폐 조직에서 관찰된 결절의 총 개수는 166개였는데, 이들을 조직학적 소견에 따라 분류해 보면, 과형성 56개, 샘종 67개, 샘암종 43개였다. 결절의 크기는 가장 작은 것이 0.1 mm의 과형성이었고, 가장 큰 것은 6 mm 크기의 샘암종이었다. 결절의 평균 크기는 병변의 악성도가 진행됨에 따라 점차 커지는 경향이 있었는데, 통계학적으로 샘종은 결절 형성이 없는 군과 과형성에서보다 유의하게 크기의 증가가 있었으며($p < 0.05$), 샘암종도 이전 단계의 병변보다 유의한 크기의 증가를 보였다($p < 0.05$) (Table 2).

한 개체의 생쥐에게서 가장 진행된 조직학적 소견을 보인 결절을 개체의 대표 진단으로 하고 조직학적 진단에 따라 생쥐를 개체별로 분류하여 보면, 병변이 발생하지 않은 생쥐는 6마리, 과형성을 형성한 생쥐는 13마리, 샘종을 보인 생쥐는 10마리, 그리고 샘암종을 형성한 생쥐는 10마리였다.

Telomerase 활성도

Gel based detection 방법으로 전기 영동하여 밴드를 관찰하였을 때 urethane을 투여하지 않은 대조군 생쥐에게서는 거의 활성도가 나타나지 않았고, urethane을 투여한 실험군은 제6주부터 약하게 활성도가 나타났으며, 시기가 지날수록 점차로 밴드의 염색 강도가 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

ELISA detection 방법으로 제3주, 제28주, 제41주, 제48주의 대조군 4마리와 실험군 34마리의 폐 조직에서 telomerase 활성도 측정이 가능하였다. 측정 결과 대조군은 telomerase 활성도를 보이지 않았으나, urethane 투여 후 제3주군부터는 약한 telomerase 활성도가 나타나기 시작하였고 제6주군까지의 활성도는 비슷하였으나 시기가 경과할수록 활성도가 점차로 증가하였다.

통계학적으로 대조군의 telomerase 활성도보다 유의한 차이를 보인 시기는 urethane을 투여한 후 제12주군부터였고, 제28주, 제41주, 제48주 실험군의 telomerase 활성도가 모두 urethane을 투여하

Table 2. Correlation with the histologic classification and size of each lung nodule

Histologic classification	No. of nodule	Size of nodule (mm)	
		Range	Mean \pm SD
Absence of lesion	0	0	0
Hyperplasia	56	0.10 - 0.95	0.34 \pm 0.20
Adenoma	67	0.30 - 1.50	0.74 \pm 0.31 ^a
Adenocarcinoma	43	0.50 - 6.00	1.69 \pm 1.12 ^b
Total No. of nodules	166		

Absence of lesion, a group of mice with no visible lesion grossly and histologically after urethane administration.

^a $p < 0.05$ vs absence of lesion and hyperplasia; ^b $p < 0.05$ vs absence of lesion, hyperplasia, and adenoma.

SD, standard deviation.

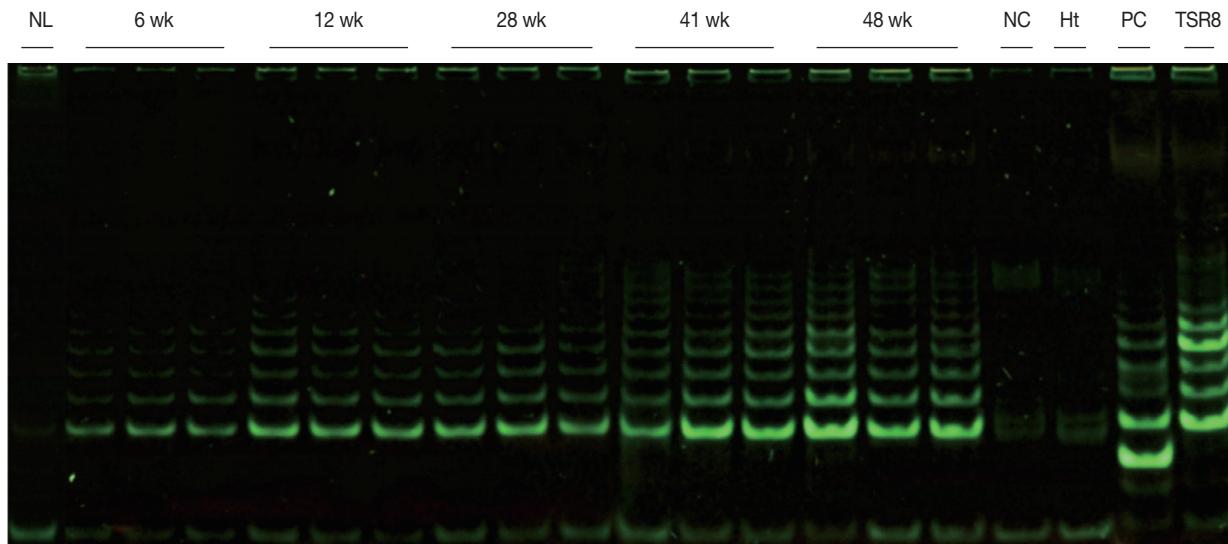


Fig. 3. Gel-based detection of telomerase activity in normal and urethane-induced mouse lung tissues. Telomerase activity is not detected in normal lung tissue (NL) of a control mouse that is not treated with urethane. The levels of telomerase activity are gradually increased according to the period after urethane administration labeled at the top of the lanes. CHAPS lysis buffer (NC) and heating (Ht) samples are used as negative controls. TSR8 and positive control cells (PC) supplied by the detection kit are used as positive controls.

지 않은 군에 비해 유의하게 높은 측정치를 보였다($p<0.05$). 실험군의 각 시기별 telomerase 활성도를 다중 비교해 보면 제41주군의 활성도가 제6주군에 비해, 제48주군의 활성도가 각각 제3주군과 제6주군의 활성도에 비해 유의하게 높은 수준을 나타내는 것을 알 수 있었다($p<0.05$).

실험군 생쥐를 각각 조직학적 진단별로 분류하였을 때, 대조군 생쥐에게서는 telomerase 활성도가 음성이었고, 실험군 중에서 조직학적으로 병변이 발생하지 않은 군에서도 telomerase 활성도가 양성을 나타내기 시작하여, 통계학적으로 대조군의 telomerase 활성도보다 유의한 차이를 보이기 시작했으며($p<0.05$), 결절의 악성도가 진행된 군일수록 telomerase 활성도는 악성도에 비례하여 증가하였다(Fig. 4). 또 실험군 내에서의 활성도를 비교 분석하였을 때, 통계학적으로 샘암종군의 telomerase 활성도는 각각 병변이 발생하지 않은 군, 과형성군, 샘종군에서보다 유의하게 높은 수준을 보였다($p<0.05$) (Table 3).

PCNA 표지지수

세포의 증식능을 나타내는 PCNA 표지지수는 대조군에 비해 실험군 제3주에서 약간 증가했으며, 제6주군은 제3주군보다 평균 표지지수가 약간 감소하기도 하였으나 의미있는 차이는 없었다. 반면 제9주부터 제12주, 제28주, 제41주, 제48주의 실험군 모두 대조군에 비해 유의하게 높은 세포 증식능을 나타냈는데($p<0.05$), urethane을 투여한 실험군 내에서 시기별로 PCNA 표지지수를 비교하였을 때, 제28주군은 제3주군, 제6주군의 표지지수에 비하여 유의하게 높은 값을 보였고, 제41주군은 제3주부터 제12주까지 실험군

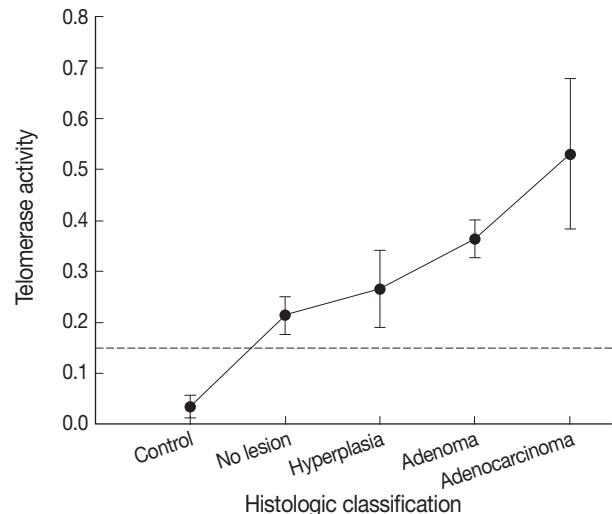


Fig. 4. Correlation with the histologic classification and telomerase activity. The levels of telomerase activity of each group are presented as the means (dots) \pm standard deviation (bars). A criterion of positive level is presented as a dash line. The lung tissues with no urethane administration (control) reveals negative levels of telomerase activity. The lung tissues with no histologically visible lesion after urethane administration (no lesion) show low positive levels of telomerase activity. As the histologic grades progress, the levels of telomerase activity are gradually increased.

의 표지지수보다 유의하게 높았으며, 제48주군은 제3주군부터 제28주까지 실험군의 표지지수보다 유의하게 높았다($p<0.05$).

또 실험군 생쥐를 각각 조직학적 진단별로 분류하였을 때, 결절

형성이 없는 군보다 결절의 악성도가 진행된 군일수록 PCNA 표지지수는 비례하여 증가하였다(Fig. 5). 실험군 내에서 각 집단간의 PCNA 표지지수 차이를 비교하였을 때, 샘종군이 이전 단계인 과형성군과 결절 형성이 없는 군의 표지지수보다 유의하게 높은 값을 나타내기 시작했고, 샘암종군도 결절 형성이 없는 군, 과형성군, 샘

Table 3. Correlation with the histologic classification and telomerase activity in urethane-induced mouse lung tissue

Histologic classification	No. of mouse with measurable data	Mean telomerase activity \pm SD	p-value
Control	4	0.04 \pm 0.02	<0.05 ^a
Absence of lesion	4	0.21 \pm 0.04	
Hyperplasia	11	0.27 \pm 0.08	
Adenoma	9	0.36 \pm 0.04	
Adenocarcinoma	10	0.53 \pm 0.15	<0.05 ^b
TSR8		1.23	
Total	38		

Control, a group of urethane not administrated mice at 3, 28, 41, and 48 wk; Absence of lesion, a group of mice with no visible lesion grossly and histologically after urethane administration; TSR8, positive control of telomerase activity.

^avs hyperplasia, adenoma, and adenocarcinoma; ^bvs absence of lesion, hyperplasia, and adenoma.

SD, standard deviation.

종군에서보다 유의하게 높은 표지지수를 보였다($p<0.05$) (Table 4).

Telomerase 활성도와 PCNA 표지지수의 상호 관계

실험군 생쥐의 조직학적 진단별 telomerase 활성도와 PCNA 표지지수의 상호 관계를 Pearson 상관 분석을 이용하여 분석하였다

Table 4. Correlation with the histologic classification and PCNA labeling index (LI) in urethane-induced mouse lung tissue

Histologic classification	No. of mouse	Mean PCNA LI \pm SD (%)	p-value
Control	7	6.86 \pm 3.40	<0.05 ^a
Absence of lesion	6	12.87 \pm 3.50	
Hyperplasia	13	16.83 \pm 9.54	
Adenoma	10	36.56 \pm 9.87	<0.05 ^b
Adenocarcinoma	10	60.07 \pm 15.64	<0.05 ^c
Total	46		

Control, a group of urethane not administrated mice at 3, 6, 9, 12, 28, 41, and 48 wk; Absence of lesion, a group of mice with no visible lesion grossly and histologically after urethane administration.

^avs adenoma and adenocarcinoma; ^bvs control, absence of lesion, and hyperplasia; ^cvs control, absence of lesion, hyperplasia, and adenoma.

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; SD, standard deviation.

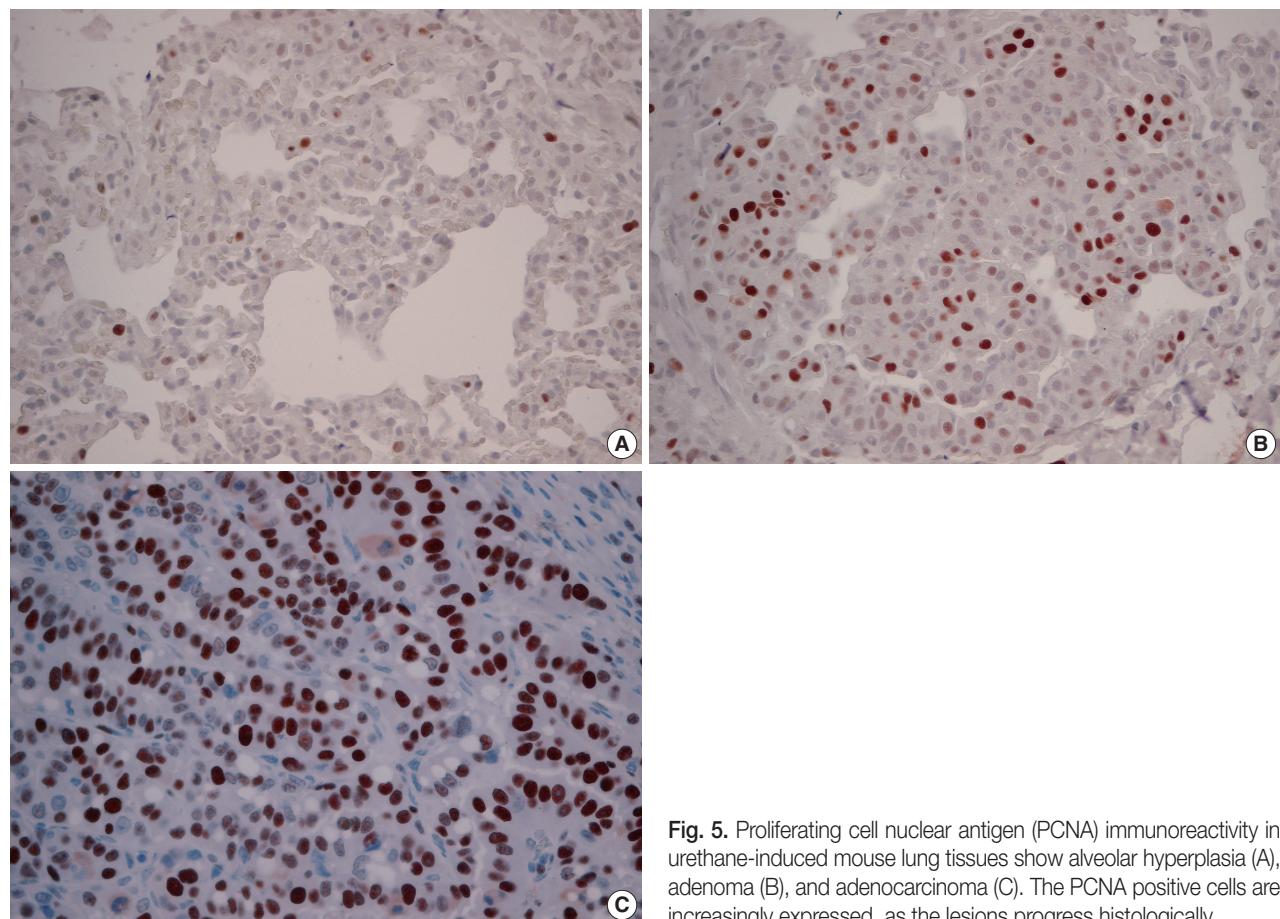


Fig. 5. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity in urethane-induced mouse lung tissues show alveolar hyperplasia (A), adenoma (B), and adenocarcinoma (C). The PCNA positive cells are increasingly expressed, as the lesions progress histologically.

Table 5. Correlation analysis between telomerase activity and PCNA labeling index (LI) in urethane-induced mouse lung tissue

	Telomerase activity	PCNA LI
Telomerase activity	r-value	1.000
PCNA LI	r-value	0.752 ^a

^ap<0.05.

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; r, correlation coefficient.

때 이들은 서로간에 비례 관계가 있었다($p<0.05$) (Table 5). 따라서 urethane으로 유도한 생쥐의 폐샘암종 발생 과정에서 telomerase는 조직학적으로 병변의 단계가 진행함에 따라 세포 증식능과 비례하여 활성도가 증가함을 알 수 있었다.

고 찰

폐샘암종의 발생 과정을 연구하기 위한 여러 가지 동물 모델 중 A/J 생쥐에게 urethane을 투여하여 유도한 폐샘암종 발생 모델은 가장 유용한 방법이라 할 수 있다. A/J 생쥐는 염색체 6번에 위치한 유전자 pulmonary adenoma susceptibility 1 (*Pas1*)으로 인해 폐 종양 발생에 더 민감한 종인 것으로 알려져 있다.¹⁴ 또 여러 동물 실험 모델의 발암 물질로 이용되는 urethane은 주로 폐에 종양을 일으키는데, 이 진행 과정에서 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinases의 변화가 관여됨이 보고된 바 있다.¹⁵

Urethane¹⁶ 폐암 발생에 영향을 주는 세포는 2형 폐포세포와 세기관지의 Clara 세포인데, 이들은 폐 실질에서부터 세포의 증식성 변화가 시작된다. 이전 연구들에서 생쥐에서 유발된 폐의 증식성 병변은 조직학적으로 과형성, 샘종, 샘암종으로 분류되어 왔다.¹²

한편 사람의 경우는 1999년에 개정된 World Health Organization (WHO) 분류에 따라서 폐의 샘종이란 용어 대신 비정형 샘종 양 과형성(atypical adenomatous hyperplasia, AAH)을 샘암종의 전 암 병변으로 정의하였다. AAH는 폐포 벽을 그대로 유지하면서 비정형 상피세포가 증식하는 작은 병변이다. AAH와 세포학적으로는 거의 동일한 형태를 보이지만, 크기가 5 mm 이상인 경우는 세기관지폐포암종(bronchioloalveolar carcinoma, BAC)이라 하는데, AAH 와 BAC는 샘암종 발생 과정에서 스펙트럼 상에 있는 병변들로 여겨진다. 그러나 Nikitin 등¹⁶은 사람과 생쥐 폐의 조직학적 분류는 서로 같지 않으며, 인체의 AAH와 BAC는 폐포 벽을 파괴하지 않으면서 종양세포가 확산되는 성장 양상을 보이지만, 생쥐 폐에서는 이러한 양상을 거의 보이지 않고, 세포학적 비정형성이 없는 세포가 증식하는 과정에서 고형성 결절을 먼저 형성하기 때문에 생쥐 폐에서 BAC라는 용어는 혼돈을 줄 수 있어 피하는 것이 좋다고 하였다.

또한 생쥐 폐에서는 샘종 내에서 발생한 샘암종을 관찰할 수 있어 이를 생쥐 폐 증식성 병변의 한 분류에 포함시키기도 하므로 샘

종은 생쥐 폐샘암종의 전암 병변으로 간주된다.¹² 따라서 본 연구에서는 urethane 투여 후 생쥐 폐에 발생한 병변을 통상적인 생쥐 폐에서의 조직학적 분류에 따라 과형성, 샘종, 샘암종으로 구분하였다.

본 연구에서는 urethane 투여 후 제3주군부터 혼미경으로 관찰 가능한 1개의 과형성 결절이 발생되기 시작하였고, 제9주군에서는 육안으로도 병변을 관찰할 수 있을 만큼 크기가 증가하였으며, 혼미경적으로 과형성에서 샘종으로 진행되는 부위가 관찰되었으므로 과형성은 샘종의 전구 병변인 것으로 생각된다. 또한 제28주에 발생한 결절은 대부분 샘종의 소견을 보였으나, 제41주에서는 샘종의 수는 감소한 대신 샘암종 결절이 증가하였는데 이 두 병변 역시 서로 진행되는 부위가 자주 관찰되었다.

제48주에서 발생한 가장 큰 결절에서는 주변 폐 실질로 일부 세포의 침윤이 있어 침윤성 샘암종이 발생되었는데, 이 시기의 생쥐는 한 개체 내에 과형성 병변부터 샘종과 샘암종에 이르는 병변이 모두 함께 존재하고 또 서로 진행 부위가 있으므로 생쥐 폐에서는 이러한 조직학적 단계를 거쳐서 폐샘암종으로 진행된다는 것을 확인하였다.

Telomerase는 정상 체세포의 노화 신호인 telomere의 단축을 보상하는 RNA 의존 DNA 중합효소로서 거의 모든 악성 종양에서 활성도가 증가되어 있음이 보고되어 종양세포의 불멸성 획득에 telomerase가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 그러나 telomerase가 악성 종양의 발생 과정 중 어느 단계에서 작용을 하는지에 대한 연구는 그리 많지 않다. 국내 연구 중 자궁경부암 환자에게서 telomerase의 활성도가 전암 병변인 이형성증과 상피내암종, 침습성 암종 모두에서 증가되었으며, 이형성증 주변의 만성 염증이나 편평화생 부위에서도 양성을 보였다는 보고가 있었고,¹⁷ 위샘암종 환자의 조직에서도 샘암종세포뿐만 아니라 이형성증의 세포, 정상 및 정상 증식성 상피세포에서 telomerase 양성 반응을 보였으며, 병변이 진행됨에 따라 활성도가 점차 증가한다고 보고하여 현재까지도 많은 연구에서 악성 종양세포에서 나타난다고 보고되어 왔던 telomerase 활성이 전암 병변이나 그 이전 단계에서도 발현될 수 있음을 시사하였다.¹⁸

폐암종에서의 높은 telomerase의 발현은 이전부터 보고되어 왔는데, Hiyama 등¹⁹은 폐의 소세포암종에서는 모두 높은 telomerase 활성도를 보였으나, 비소세포암종에서는 다양한 수준의 활성도를 보였고, 특히 전이된 암종에서와 샘암종에 동반된 흥수에서는 모두 높은 telomerase 활성도를 보여 telomerase 활성도의 정도가 폐암종 세포의 불멸성 정도를 나타낸다고 하였다.

또한 Lantuejoul 등²⁰은 폐암종의 조직학적 분류에 따라 telomerase 활성도를 비교하였는데, 샘암종이 편평세포암종, 기저양암종, 소세포암종보다 현저히 낮은 활성도를 보인다고 보고하여 비소세포암종 내에서도 조직학적 형태에 따라 다른 특성을 갖는다는 것을 시사하였다. 국내에서도 조기 비소세포암종에서 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)의 발현에 대한 연구가 있었는데, 연구 결과 편평세포암종에서 높은 발현을 보였고 이는 낮은 생존율과 관련이 있음을 보고하였다.²¹

또 비소세포암종 중에서는 편평상피암종이 국내에서 가장 발생 빈도가 높았는데, 이는 기관지 중심성 위치에 발생하여 연구 재료를 얻기가 용이하므로 주된 연구 대상이 되어 왔으나, 주로 폐 실질에서 기원하는 샘암종에 대한 연구는 그에 미치지 못하였고, 더욱 이 샘암종이 대부분 진행된 병기에서 발견되므로 전암 병변에 대한 연구는 매우 드물었다.

편평상피 병변에 대한 연구들 중에서 Miyazu 등²²은 기관지 중심성 초기 폐암 주변에 조직학적으로 정상이거나 이형성을 보이는 기관지 상피세포에서 hTERT에 대한 면역조직화학염색을 시행하고, 암종 치료 후 2년 이상 추적 관찰하였을 때, hTERT가 발현되었던 환자들은 모두 이차 암이 발생하였으며, hTERT 발현이 없었던 환자들은 완전 관해를 보였다고 하였다. 따라서 조직학적으로 비종양성 기관지 상피에서의 telomerase 발현은 추후 암 발생 가능성을 시사하므로 정상 상피를 보이는 환자를 대상으로 한 hTERT 측정은 폐암의 고위험군을 선별하는 데 유용할 것이라고 하였다.

폐샘암종 발생 기원 세포가 기관지 중심성 폐암의 것과 다르기는 하지만, 샘암종을 유도한 본 연구에서도 urethane을 투여한 후 육안으로나 조직학적으로 아직 아무런 병변의 발생이 없는 생쥐의 폐 조직에서 양성 기준치를 초과하는 telomerase의 활성도가 나타나기 시작하였다. 따라서 폐샘암종 발생 과정에 있어서도 telomerase는 형태학적인 증식성 변화가 나타나기 이전의 초기 단계부터 활성화되어 세포의 불멸성 획득을 유도하는 것으로 생각된다. 절제한 폐암 조직에서 채취한 전암성 기관지 상피의 병변을 조직학적 단계에 따라 분류하여 각 단계별로 hTERT의 면역조직화학적 발현과 telomere의 길이를 비교한 연구에서는 hTERT가 정상 혹은 과형성 상피의 기저층에 약하게 발현이 되기 시작하여 편평 화생, 이형성, 상피 내 편평상피암종에 이르기까지 점차적으로 발현 강도가 증가되었다. 또 telomere의 길이는 정상/과형성 상피의 기저세포에서보다 편평 화생에서 급격히 감소하여 최저치를 보이다가 이후로 고등급 이형성 단계까지 점차 증가하였다.²³ 이는 기관지암종 발생에 있어서 초기 이형성 단계의 비정상적인 telomere 길이 단축이 암 발생의 시발점이 되어 이차적인 telomerase의 재활성화를 유도함으로써 염색체의 불안정성을 회복시키고, 종양세포의 증식을 지속시키는 것이라 하였다. 이러한 가설을 바탕으로 최근 Lantuejoul 등²⁴은 기관지암종의 전암 병변과 함께 샘암종의 전암 병변에서 telomerase 길이에 대한 비교 연구를 진행하였는데, 기관지 상피세포에서는 편평 화생 단계에서 telomere의 길이가 짧아졌다가 이형성 단계부터 점차 길어져 침습성 편평상피암종에 이르러 정상 상피세포와 같은 수준에 도달하였고, 샘암종의 전암병변에서도 telomere 길이가 AAH와 침습 전 샘암종에서 점차 감소하다가 침습성 샘암종에서는 정상 폐포세포 및 기관지 상피세포와 같은 수준에 도달하였으며 이후 병기가 진행될수록 증가했다고 보고하면서 기관지암종과 세기관지폐포 기원의 샘암종이 비슷한 양상을 보인다고 하였다.

본 연구에서는 샘종 이전 단계인 과형성과 표면적으로 정상적인 조직에서부터 telomerase 활성도 증가를 알 수 있었다. 그러나 인체

의 폐 조직에서는 생쥐 모델에서만큼 초기 증식성 병변인 과형성을 잘 형성하지 않는다. 따라서 인체 폐 조직에서는 생쥐 모델을 이용한 본 연구와 같은 초기 증식성 병변의 변화를 구분하기가 어렵다고 생각된다. 이러한 관점에서 향후 인체 폐 조직보다 좀 더 초기 단계의 병변에 대한 연구가 용이한 생쥐 모델을 대상으로 telomere의 길이 변화에 대한 비교 연구가 진행된다면 발암 과정의 초기 단계에서 telomere 단축과 telomerase 활성화와의 연관 관계 그리고 샘암종 발생의 시발점으로서의 역할을 좀 더 명확하게 이해하는데 도움이 될 것이라 생각된다.

Telomerase 활성화에 의한 세포의 불멸성 획득은 종양이 증식하여 성장하는 데 매우 중요한 역할을 할 것이다. 이전의 연구들에서 높은 telomerase 활성도가 비소세포암의 세포 증식률 증가와 림프절 전이 등 병리학적 병기의 진행과 상관관계가 있음이 보고되었고,²⁵ 본 연구에서도 세포 증식능을 나타내는 PCNA 표지지수를 측정하였을 때 조직학적 단계가 높아질수록 점차 높은 증식능을 나타냈으며, telomerase 활성도와 비례하여 증가하는 상관관계를 보여 telomerase가 종양의 성장과 진행에 관여함을 확인하였다. 또한 실험군 내에서의 PCNA 표지지수 차이를 비교하였을 때, 과형성에서 전암 병변인 샘종으로의 진행 단계부터 유의한 세포 증식능의 차이를 보여 PCNA 표지지수는 샘암종의 조직학적인 전암 병변의 표지자로서도 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

이로써 생쥐의 샘암종 발생 과정에서 telomerase는 세포 증식이 일어나기 이전의 초기 단계에서 활성화되어 세포의 불멸성 획득을 유도하고, telomere를 유지시켜 지속적인 종양세포의 증식에 필요한 환경을 제공할 것이라고 생각된다. 따라서 육안 및 조직학적 변화가 없는 폐 조직에서 telomerase 활성도 측정은 조기 발견에 어려움이 있었던 폐샘암종의 발생 가능성을 예측할 수 있는 방법이 될 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res* 1992; 52(9 Suppl): 2670s-2676s.
2. Dragani TA, Manenti G, Pierotti MA. Genetics of murine lung tumors. *Adv Cancer Res* 1995; 67: 83-112.
3. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2882-5.
4. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.
5. Rhys MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 884-94.
6. Li ZH, Salovaara R, Aaltonen LA, Shibata D. Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1075-9.

7. Brien TP, Kallakury BV, Lowry CV, *et al*. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 2760-4.
8. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, *et al*. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-22.
9. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 1996; 56: 218-22.
10. Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al*. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-41.
11. Hall PA, Levison DA, Woods AL, *et al*. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-94.
12. Foley JF, Anderson MW, Stoner GD, Gaul BW, Hardisty JF, Maronpot RR. Proliferative lesions of the mouse lung: progression studies in strain A mice. *Exp Lung Res* 1991; 17: 157-68.
13. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
14. Malkinson AM, Nesbitt MN, Skamene E. Susceptibility to urethane-induced pulmonary adenomas between A/J and C57BL/6J mice: use of AXB and BXA recombinant inbred lines indicating a three-locus genetic model. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 971-4.
15. Butley MS, Stoner GD, Beer DG, Beer DS, Mason RJ, Malkinson AM. Changes in cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases during the progression of urethane-induced mouse lung tumors. *Cancer Res* 1985; 45: 3677-85.
16. Nikitin AY, Alcaraz A, Anver MR, *et al*. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium. *Cancer Res* 2004; 64: 2307-16.
17. Kim HS, Lee YJ, Kim MS, Ko HM, Juhng SW. Assay of proliferative activity, clonality and immortality of precancerous lesions of the uterine cervix. *Korean J Pathol* 1999; 33: 652-61.
18. Kim MS, Juhng SW. In situ detection of mRNA and RNA component of human telomerase in proliferative lesions of the stomach. *Korean J Pathol* 2001; 35: 299-305.
19. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, *et al*. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 895-902.
20. Lantuejoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, *et al*. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *Br J Cancer* 2004; 90: 1222-9.
21. Jung JH, Jung CK, Lee A, Park G, Yoo J, Lee KY. The expression of telomerase reverse transcriptase protein is an independent prognostic marker in early stage non-small cell lung carcinomas. *Korean J Pathol* 2007; 41: 95-102.
22. Miyazu YM, Miyazawa T, Hiyama K, *et al*. Telomerase expression in noncancerous bronchial epithelia is a possible marker of early development of lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 9623-7.
23. Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, *et al*. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2074-82.
24. Lantuejoul S, Raynaud C, Salameire D, *et al*. Telomere maintenance and DNA damage responses during lung carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2979-88.
25. Albanell J, Lonardo F, Rusch V, *et al*. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1609-15.