

한국의 간세포암과 Aflatoxin 관련 p53 codon249 점돌연변이와의 관계

¹아주대학교 의과대학 외과학교실, ²서울의과학연구소
왕희정¹, 홍성우¹, 박영석², 김욱환¹, 김명욱¹

Abstract

Aflatoxin Related p53 Codon 249 Point Mutation in Korean Hepatocellular Carcinoma

Hee Jung Wang, M.D.¹ Seong Woo Hong, M.D.¹ Young Seok Park,²
Wook Hwan Kim, M.D.¹ and Myung Wook Kim, M.D.¹

¹Department of surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, and

²Seoul Medical Science Institute, Seoul, Korea

(Purpose): P53 point mutation, especially G to T transversion at codon 249, has been found in many cases of the aflatoxin-related hepatocellular carcinoma(HCC). This study was aimed to exam the mutations of the third base at codon 249 of the p53 gene in Korean HCC. (Materials and Methods): Forty two patients with resectable HCC were enrolled. Genomic DNA was prepared by proteinase K digestion and phenol/chloroform extractions. A part of DNA including axon 7 of p53 was amplified by PCR. Restriction fragment polymorphism (RFLP) was analyzed after treatment of Hae III restriction enzyme. And the point mutation were confirmed using the direct sequencing method. (Results): P53 point mutation, G to T transversion at codon 249 was observed in only one tissue specimen(2.4%) (Conclusion): P53 point mutation at codon 249 does not correlate with HCC in Korea.

Key Words: Hepatocellular carcinoma, p53, codon 249, Aflatoxin,

서론

한국에서의 간암의 발생은 남녀 각각 2위와 4위로 높은 발생율을 보이고 있다. 그 위험 요소로는 B형, C형 만성간염, aflatoxin, 알코올 또는 genetic hemochromatosis 로 인한 간경화 등이 주요한 인자로 보이며, 그외에도 경구 피임약, 흡연, 남성용 스테로이드 등도 간세포암 발생에 작지만 관여한다¹. 우리나라의 주요 위험인자로는 만성 B형 간염을

꼽을 수 있으며, 간암 환자의 70-80%에서 B형 간염 항원 양성임을 보이고 있다. 한편 aflatoxin에 오염된 음식을 지속적으로 섭취하는 중국 광둥지방과 남아프리카지방에서 높은 간암 발생율을 보이며 이것은 또한 만성 B형 간염과 동반되었을 경우 상승 효과를 보이는데² 이러한 aflatoxin 관련 간세포암에서는 p53 codon 249의 세 번째 염기가 G에서 T로의 점 돌연변이를 보이는 것이 특징적인 것으로 알려져 있다³. 한국의 메주, 된장, 간장들은 콩을 원료 한다는 점과 그 보관 방법상 곰팡이에 오염될

가능성이 많아 전부터 aflatoxin 함유여부에 대한 조사가 행해졌다. Rapp 등은 43종의 메주검체에서 6종에서 양성으로 나왔으나 그양은 1ppb 이하로 미미하다고 하였고⁴, 김 등은 메주에서 7.4%, 된장에서 8.8% (최고 66ppb) 검출되었다는 보고를 한 바 있다⁵. 또, 이들은 116명의 입원환자의 urine에서 aflatoxin을 측정하여 4명에서 양성으로 검출되었다고 보고하였다⁶. 이에 저자들은 aflatoxin의 섭취가 한국의 높은 간암유병율에 어떤 역할을 하는지 여부를 확인 하고자 aflatoxin 유발 간세포암에서 특징적으로 나타나는 것으로 알려진 p53 유전자의 codon 249의 세 번째 염기의 돌연변이 여부를 간암환자를 대상으로 조사하였다.

대상 및 방법

1) 대상환자

1995년 8월부터 1997년 1월까지 본원에서 간절제술을 시행받은 후 간세포암으로 최종진단받은 42명의 환자를 대상으로 하였다.

2) 방법

p53의 codon 249의 검출을 위한 primer는 sense ACTTTCAACTCTGTCTCCTTCC 와 antisense GACCCTGTCGTCTCTCCAGC(5'→3')를 사용하였다. DNA의 추출은 술후 절제된 간조직을 영하 70℃에 보관하였다가 proteinase K digestion 과 phenol/chloroform 추출 방법을 이용하였다. PCR 최종양은 20ul가 되게하였고 그안에 1×PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH9.0], 0.1%

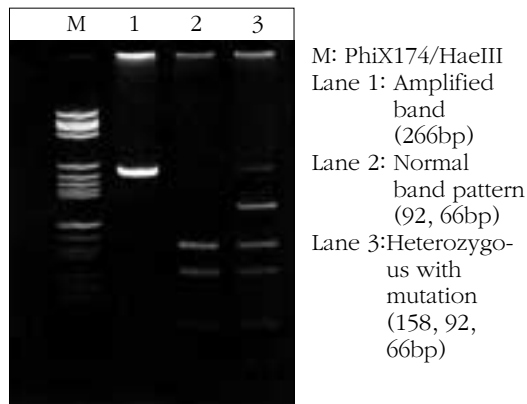


Fig 1. RFLP patterns of the mutational hotspot at codon 249 of p53. After amplification of p53 exon 7 by PCR, the amplified products were completely digested by HaeIII and analyzed on the 12% polyacrylamide gels.

Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM의 각 dNTPs, 0.5 U의 Taq DNA polymerase (Advanced Biotechnologies Co., Leatherland, KT, U.K.), primers 10 pmoles, DNA 0.2 ug를 포함하게 했다. 먼저 95℃에서 5분간 가열하여 DNA를 denature 시키고, PCR 과정은 95℃ 1분 (denature), 62℃ 1분 (annealing), 72℃ 1분(extension)으로 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA)을 이용하여 수행하였고, 마지막 extension을 72℃에서 5분간 하여 종료하였다. PCR 결과물은 2% agarose gel에 전기영동한 후에 ethidium bromide로 염색하여 보았다. 그리고, DNA restriction analysis는 7ul의 PCR product를 10 unit HaeIII restriction enzyme (New

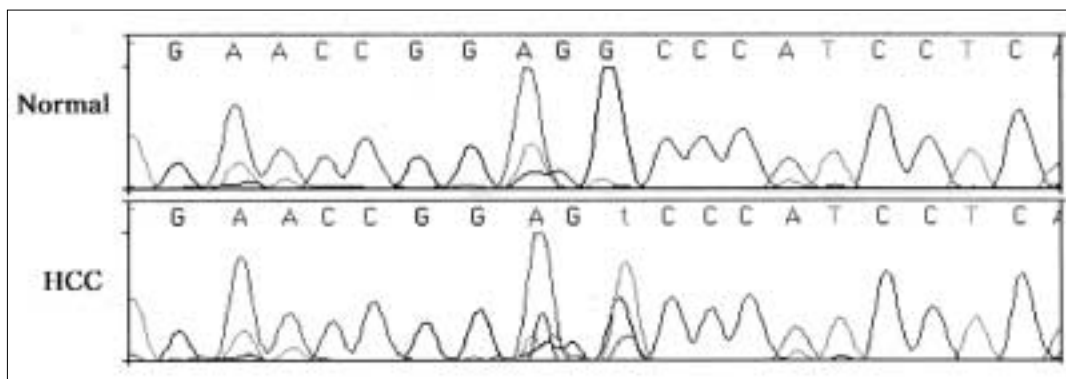


Fig 2. Direct sequencing analysis of p53 exon 7 using ABI 310 genetic analyzer. AGG(Arg) to AGT(Ser): p53 codon 249

England Biolab. Co., Beverly, MA, USA)과 4시간 동안 반응시킨 후 12% polyacrylamide gel에 100 V로 3시간동안 전기영동하였다. 역시 ethidium bromide로 염색하여 다형성 여부를 관찰하였다. DNA 염기서열은 DNA purification system(Wizard PCR preps, Promega, USA)으로 정제후 ABI 310 genetic analyzer(PE Applied Biosystems., Norwalk, CT, USA)로 확인하였다.

결과

42명 환자의 검체의 DNA PCR 결과물을 HaeIII restriction enzyme으로 처리한 결과 1예에서만 정상에서 볼 수 있는 92, 66bp 크기의 두 band와 codon 249의 세번째 염기의 점돌연변이시 볼 수 있는 156bp 크기의 band를 동시에 보여 정상과 돌연변이 대립유전자를 함께 가지고 있는 heterozygous임을 알 수 있었다(Fig 1). 이 환자의 p53 exon 7의 direct sequencing 결과 codon 249의 염기서열이 AGG(Arg)에서 AGT(Ser)로 점돌연변이를 일으켰음을 알 수 있었다(Fig 2).

고찰

1960년초 영국에서 사육하던 수많은 칠면조가 *Aspergillus flavus* 곰팡이의 대사물질에 오염된 종류의 사료에 의해 급성 출혈성 간조직괴사(turkey X disease)를 일으켜 폐죽음한 이래 이 aflatoxin - A. *flavus* toxin의 약자임- 간독성과 간암유발에 대한 연구가 활발히 행해져왔다. Aflatoxin은 여러종류의 유사체가 있으나 이중 Aflatoxin B1이 음식물의 오염에 가장 흔하게 발견되며 여러 aflatoxin중에서 가장 강력한 간독성, 간암 유발성 물질이다. 이 aflatoxin은 신장을 비롯하여 여러 장기에 암을 발생시킬 수 있지만 간장이 가장 흔하게 영향받는 장기이며, 또 간세포암이 가장 흔하게 발생하는 암이다⁷. aflatoxin은 간의 cytochrome P450 monooxygenase에 의해 aflatoxin-8, 9-epoxide로 활성화하여 DNA안의 guanine의 N7 위치에 결합하여 작용하며, 간의 glutathione S-transferase는 glutathione을 aflatoxin-8, 9-epoxide에 결합시켜 이러한 작용

의 해독역할을 하는 것으로 알려져있다⁸. 그리고, 동물실험과 역학적 조사에 의하여 aflatoxin의 섭취량과 간세포암 발병률이 밀접한 관계를 갖고 있음을 알게 되었다^{9,10}. 한편, 이와같이 aflatoxin 섭취율이 높은 지역-Mozambique, Quidong in China-에서 발생하는 간세포암에서 p53의 codon 249의 세번째염기가 G에서 T로 transversion되는 점돌연변이의 발현율이 50%에 달하며, 이러한 점돌연변이는 지역적 차이가 심한양상으로 발현되어지는데^{3,11}, 이것은 각지역의 aflatoxin 섭취율과 밀접한 관계를 가진다. 또한, HepG2 cell-line을 이용한 in-vitro 실험에서 aflatoxin에 의한 p53 codon 249의 점돌연변이가 유도되어¹² aflatoxin과 p53 codon 249 점돌연변이의 직접적 관련은 거의 확실시 되는 것 같다. 그리고, B형 또는 C형 간염과 p53 codon 249의 점돌연변이와의 관련성도 여러 연구자에 의해 조사되었지만 뚜렷한 상관관계는 없는 것으로 생각된다^{13,14}. 한국에서도 메주 등과 같은 콩류의 음식을 상식한다는 사실과 높은 간세포암 발병율로 인해 일찍부터 음식에서의 aflatoxin의 함량을 조사하는 연구가 진행되어^{4,5} 적지않은 양이 검출되었고, 소변에서 aflatoxin을 측정 116예중 4예에서 양성반응을 보인 연구도 있었다⁶. 따라서, 한국의 높은 간암 발생율에 aflatoxin이 어느정도 영향을 미치지 않을까 하는 의문을 가질 수 있다. 하지만, 이미 행해진 연구에서 김 등¹⁵은 13예의 간암조직을 대상으로 조사한 결과 codon 249는 한예도 없었고 codon 244에서 GCC가 GAC로 돌연변이된 한예를 보고하였고, 조 등¹⁶은 22예의 간암조직을 대상으로 codon 249의 돌연변이는 한예도 없었다고 보고하였다. 저자들의 경우도 42예의 간암조직중에서 단지 1예에서 codon 249 돌연변이가 발견되어지는 점으로 보아 한국의 간세포암의 발생에 aflatoxin의 섭취는 큰 역할을 하지는 않는 것으로 생각되어진다. 이것은 외국의 경우 aflatoxin의 섭취량이 많을수록 간세포암의 발생율이 증가하는 사실¹⁰을 볼 때 한국인이 섭취하는 aflatoxin의 양이 간세포암의 발생을 증가시킬정도는 아니라고 생각된다. 일본의 경우도 우리와 비슷하여 codon249의 돌연변이는 거의 발견

되지않고있고, 주로 B형과 C형 간염으로 인한 간경화가 여전히 간세포암발생의 주원인으로 꼽히고 있으며¹⁷, 이것은 한국에서도 마찬가지인 것으로 사료된다.

결론

aflatoxin 관련 간세포암에서 흔히 발견되는 p53 codon 249 의 세 번째염기의 G→T 돌연변이는 42 예의 간암조직중 1예에서만 발견되어 aflatoxin의 섭취는 한국의 높은 간세포암 발생에 중요한 원인이라고는 보기 힘들다고 생각된다.

참고문헌

1. Kew MC. Tumors of liver. In: Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology : A textbook of liver disease. Vol 2. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1996; 1513-1548
2. Ross, RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Handers BE. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet 1992; 339: 943
3. Ozturk M, and Collaborators. p53 mutation in heparocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet 1991; 338: 1356-1359
4. Rapp NS, Chung Y, Shin SH, Hong IS, Jang JY, Seel DJ. Muatagenic and anti-mutagenic of meju and other Korean food products from fermented soybeans. Yonsei Medical Journal 1988; 29: 117-123
5. 김용화, 황보정숙, 이서래. 몇가지 한국식품중 aflatoxin의 검출. 한국식품과학회지 1977; 9: 73-80
6. 이영준, 하우송. 한국인의 노중 아플라톡신 B1 측정. 외과학회지 1992; 42:376-389
7. Giltlin N. Cincial aspects of liver disease caused by industrial and environmental toxins. In: Zakim D, Boyer TD, eds. Hepatology: A textbook of liver disease. Vol 2. 3rd ed. Pholadelphia : Saunders, 1996: 1018-1050
8. Montesano R, Kirby GM. Chemical carcinogens in human liver cancer. In:Brecht C, ed. Primary liver cancer: Etiological and progression factors. Bodca Raton, CRC, 1994: 57-77
9. Wogan GN, Newberne PM. Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. Cancer Res 1967; 27:2370
10. Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, Van Der Watt JJ, Vincent TJ, Purchase IF. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br. J. Cancer 1985; 51: 713-726
11. Scorsone KA, Zhou YZ, Butel JS, Slagle BL. p53 mutations clusters at codon 249 in hepatitis B virus-positive hepatocellular carcinomas from China. Cancer Res 1992; 52: 1635-1638
12. Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P. Afltoxin B1 induces the transversion of G→T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 8586-8590
13. Goldblum JR, Bartos RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. Am J Surg Pathol 1993; 17:1244-1251
14. Shien YSC, Nguyen C, Vocal MV, Chu HW. Tumor-suppressor p53 gene in hepatitis C and B virus-associated human hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer 1993; 54: 558-562
15. 김주향, 박주배, Mitsudomi T, 최정주, 유내춘, 최진혁, 임호영, 노재경, 이경식, 김병수. 한국 인의 간암조직 및 간암세포주에서 p53 유전자의 이상에 관한 연구. 대한암학회지 1993; 25: 359-367

16. Cho YH, Lee KC, Kim BY, Paik YK, Kim CJ, Kim YI, Kim JW. A study on the p53 mutation in Korean hepatocellular carcinomas and cervical cancer cell lines. *J. Hanyang Med. Coll.* 1993; 13: 739-745
17. Hayashi H, Sugio K, Matsumata T, Adachi E, Urata K, Tanaka S. The mutation of codon 249 in the p53 gene is not specific in Japanese hepatocellular carcinoma. *Liver* 1993; 13: 279-281