Journal of the Korean Chemical Society
2005, *Vol. 49, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

한국인 대장암 환자에서 Midkine 유전자의 단일 염기 다형성에 관한 연구

최재구† · 한상만 · 남윤형 · 박상범 · 장원철*
†동남보건대학 보건계열 환경생명과학과
단국대학교 첨단과학대학 화학과
(2005. 1. 17 접수)

Research for Single Nucleotide Polymorphism of Midkine Gene in Korean Colorectal Cancer Patients

Jae-Gu Choi†, Sang-Man Han, Youn-Hyoung Nam, Sang-Bum Park, and Won-Cheoul Jang*
†*Department of Environmental Science, Dongnam Health College, Korea*
Department of Chemistry, School of Advanced Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received January 17 2005)

요 약. MK(midkine) 유전자는 retinoic acid에 의해 활성을 나타내며 heparin과 결합하는 성장 인자이다. MK는 인간 염색체 11q11.2에 위치하고 있으며 인트론 3번 62번째 염기의 이형 접합성 G/T transversion이 대장암에서 발견되었다. 단국대학교 병원에서 대장암으로 진단 받고 수술한 환자의 조직 75개와 환자와 전혀 관련 없는 정상 조직 75개를 대상으로 DNA를 추출하고 PCR 법으로 증폭하여 RFLP한 후 겔 전기영동법과 DHPLC 법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. 그 결과 75개의 대장암 조직에서 21개(28%), 75개의 정상 조직에서 5개(6.7%)의 G/T genotype이 RFLP-겔 전기영동법과 RFLP-size based DHPLC법 모두에서 검출되었다. MK 유전자 62번째 염기의 G/T tranversion이 대장암에 영향을 미치는 인자임을 확인하였고 겔 전기영동법에 비해 DHPLC법으로 검출하는 방법이 정제 과정을 거치지 않고 자동화 되어 있어 더 효율적인 과정임을 확인하였다.

주제어: MK(midkine) 유전자, 대장암, RFLP-겔 전기영동법, DHPLC, 돌연변이

ABSTRACT. Midkine (MK) is a heparin-binding growth factor specified by retinoic acid responsive gene. It plays an important role in development and carcinogenesis. The MK gene is located on chromosome 11q11.2 in human. A heterozygous G to transversion at the 62nd base in intron 3 of this gene has been in sporadic colorectal cancer. To clarify whether this polymorphism is associated with a cancer risk, a case-control study was conducted. We examined 75 colorectal cancer tissue specimens and 75 unaffected control specimens. Using RFLP and DHPLC, we identified that the G to T transversion was detected 21 in 75 (28%) colorectal cancer samples and 5 in 75 (6.7%) normal sample. Therefore, this genotype could represent a risk for colorectal cancer in Korean. RFLP-DHPLC analysis is more efficient than RFLP-gel electrophoresis analysis, because DHPLC is not so time-consuming, technically easy, highly sensitive, and has the advantage of automation.

Keywords: MK(midkine) Gene, Colorectal Cancer, RFLP-Gel Electrophoresis, DHPLC, Mutation

서 론

악성 종양이 증식하기 위해서는 암 세포와 주위 정상 조직 사이에 매우 복잡하고도 정교한 전달 체계가 필요하다. 이 과정에는 암 세포로부터 생성 및 분비되는 폴리펩티드(polypeptide) 종양 성장 인자(growth factor)가 암세포와 정상 조직 사이 상호 반응의 매개체 역할을 함으로써 암의 성장과 전이를 촉진 시킨다.[1-5]

국소적으로 분비된 폴리펩티드 성장 인자의 중요한 역할 중의 하나가 상처 치유 혹은 종양 성장에 필수적인 신생 혈관 생성의 유도이다. 여러 연구 결과 고형 종양은 혈관의 공급을 받지 못하고는 수 mm 이상의 크기로 성장 할 수 없음이 밝혀졌으며, 이러한 혈관은 영양 공급의 역할 외에도 전이의 중요한 통로 역할을 하게 된다.[6-10]

현재까지 약 40여종의 성장 인자가 밝혀졌으며 이들은 각기 특정 암종에서 특정한 조절 기전에 의해 과발현되는 것으로 보고 되고 있다. 이들 종양 성장 인자 중 한 가지인 MK(midkine) 유전자는 최근 신장암, 대장암, 위암, 폐암, 유방암, 윌름씨(Wilm's) 종양 및 폐암에서 그 발현이 관찰되었다. MK 유전자는 retinoic acid에 반응하는 성장 및 분화 인자로서 분자량이 13 kDa인 단백질이고 5개의 엑손으로 구성되며 염색체 11q11.2에 위치한다.

대장암에서 MK 유전자의 돌연변이는 엑손 3번과 4번 사이에 위치한 인트론 3번의 62번째 염기가 G/T transversion이 일어난 것이 대다수인데 이러한 현상은 잘못된 RNA splicing을 일으켜 정상적인 아미노산 서열과는 다른 형태로 나타나는 것으로 보고 되어 있다.[11-14]

대장암에서 MK 유전자의 돌연변이를 검출하기 위해 PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)을 한 후 전기영동법을 이용한 분석 방법과 RFLP를 한 후 염기 서열의 크기에 기초한 DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 분석법을 이용했다.

PCR-RFLP는 특정 염기 서열만을 인식하여 절단하는 제한효소(restriction enzyme)를 PCR 증폭물에 첨가하여 반응시키면 절단 하고자 하는 염기 서열과 동일하면 절단되고 동일하지 않으면 절단되지 않기 때문에 발생하는 DNA 단편 크기의 차이를 분석하는 방법으로 RFLP 산물을 전기영동하여 분석한다. 또한 RFLP 산물을 DNA 단편 크기에 기초한 DHPLC법을 이용하면 DNA 단편이 클수록 컬럼 표면과의 상호작용이 강해져 소수성(hydrophobicity)이 커지기 때문에 극성 용매를 흘려주면 작은 단편이 먼저 분리되고 큰 단편은 나중에 분리되어 RFLP 산물을 쉽게 분리할 수 있다.[15-22]

본 연구에서는 대장암 환자 조직에서 PCR-RFLP한 후 전기영동법을 이용한 분리 방법과 DNA 단편 크기에 기초한 DHPLC 방법을 이용해 MK 유전자의 인트론 3번의 62번째 염기의 G/T transversion을 검출하여 돌연변이 검출법의 효율성을 평가하고자 한다. 또한 MK 유전자의 분자 생물학적 접근을 통해 질병 유전자 진단 및 치료에 관한 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 단국대학교 병원에서 대장암으로 진단 받고 수술 받은 환자의 조직 75개와 정상 조직 75개를 대상으로 하였다.

시약 및 기기

시약

혈액에서 genomic DNA 추출에는 AccuPrep™ Genomic DNA Extraction Kit, PCR산물 정제에는 AccuPrep™ PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)을 사용하였고, *Taq.* polymerase(GeNet Bio, Korea)을 사용하였다. 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™(Q-bio gene, USA)을 이용하였다. DHPLC의 이동상으로 triethylammonium acetate(TEAA)(Transgenomic, USA)와 acetonitrile(ACN) (Merck, USA)을 사용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 사용하였고, PCR 증폭물 확인은 Mupid-*a*(Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다. DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic, USA)를 사용해 돌연변이를 검출하였다.

실험 방법

대장암 환자와 정상인 조직에서 Genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 원하는 부위를 증폭하고 RFLP를 한 후 전기영동법과 크기에 기초한 DHPLC법에

의해 MK 유전자 인트론 3번의 62번째 염기에서 일어나는 G/T transversion을 검출하였다.

조직에서 genomic DNA의 추출

액체질소를 이용해 곱게 간 조직 25 mg을 1.5 mL 원심 분리 관에 proteinase K(20 mg/mL) 20 μL와 분해완충용액(lysis buffer)과 함께 넣고 56 ℃에서 1~3시간 반응시킨 후에 결합완충용액(binding buffer) 200 μL 넣고 72 ℃에서 10분간 반응시켰다.

2 mL 시험관에 수집 컬럼(collection column)을 넣고 컬럼에 반응한 결합 완충용액을 옮긴 후 8000 rpm에서 1 분 간 원심 분리하여 여과되어서 모아진 용액은 버리고 500 μL 세척완충용액(washing buffer)으로 세척하였다. 이것을 다시 8000 rpm에서 1분 간 원심 분리 후 여과되어서 모아진 용액을 버리는 작업을 두 번 하였다. 마지막으로 13,000 rpm에서 10 초 간 원심 분리하였다. 그리고 200 μL 용리완충용액(elution buffer)을 넣고 실온에서 1분 간 반응하고 8000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 모아진 용액을 1.5 mL 마이크로 시험관에 옮긴 후 UV 분광광도계를 이용해 DNA의 농도를 측정하고 4 ℃에 보관하거나, 장기간 보관하기 위해서는 –20 ℃에 저장하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)

PCR primer set(*Table* 1)을 이용하여 25 μL의 PCR 반응 용액(reaction solution)을 0.2 mL PCR 반응 시험관에 넣은 후, DNA thermal cycler(Bioneer, MyGene 32 thermal block, Korea)를 이용해서 우선 94 ℃에서 5분간 주형 DNA를 완전히 변성시킨 후(hot start) 다시 94 ℃에서 45초간 변성(denaturation), 57 ℃에서 45초간 결합(annealing), 72 ℃에서 50초간 신장(extension) 단계를 35회 반복한 후 마지막으로 72 ℃에서 5분간 신장(last extension)시켜 DNA를 증폭시켰다.

2 mL 마이크로 시험관에 결합 컬럼(binding column)을 장치한 후 PCR 산물과 PB(PCR buffer)을 1:5 비율로 섞어 결합 컬럼 시험관에 옮겨 1분간 원심 분리 한다. 결합 컬럼을 분리하여 새로운 2 mL 시험관에 결합하고 세척 완충용액을 750 μL를 넣고 원심 분리 한 후

Table 1. Primer sequence used to amplify the 62nd base in intron 3 of MK gene

Primer sequence	Size of fragment(bp)	Location
Forward: 5' gtcctgaactctgttcctcg 3' Reverse: 5' cacgcaccccagttctcaaa 3'	357	2834-3190

다시 결합 컬럼을 분리하여 1.5 mL 시험관에 장치하고 용리완충용액 30 μL를 결합 컬럼 시험관에 넣어 1분간 상온에 방치 후 1분간 원심 분리하여 DNA를 회수한다.

RFLP-겔 전기영동법에 의한 단일 염기 다형성 검출

RFLP 할 때 제한효소는 *Bme*18 I을 이용하였고 제한 부위는 5′ g^gacc 3′이며 반응은 MyGene 32 thermal block(Bioneer, Korea)에서 이루어졌다.

0.2 mL 반응 시험관에 RFLP 반응 용액 10 μL을 넣고 제한효소 반응 온도인 37 ℃에서 3시간, 제한효소가 비활성 되는 온도인 65 ℃에서 20분 동안 반응시켜 PCR 산물을 절단하였다.

2%(w/v) 아가로스 겔을 이용하여 전기영동장치로 RFLP 산물을 분석하였다.

RFLP 산물 10 μL와 6X BPB(bromophenol blue) 2 μL를 혼합하여 11 μL씩 주입한 후 100 V에서 25분 동안 전기영동하였다. 이 후 겔을 분리하여 EtBr(Ethidium Bromide)로 15분간 염색하는 stain 과정과 DNA와 결합하지 못한 EtBr을 증류수로 제거하는 destain 과정을 거쳐 UV transilluminator로 RFLP 여부를 확인하였다.

RFLP-size Based DHPLC 방법에 의한 단일 염기 다형성 검출

PCR 산물을 정제 과정을 거치지 않고 곧바로 RFLP 한 후 크기에 기초한 DHPLC 방법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. 컬럼의 재현성과 완충용액 이동상의 상태를 확인하기 위해 size standard(Trangenomic, USA)를 5 μL씩 3번 주입하여 분석하였다. 이 후 RFLP 산물을 컬럼 오븐 온도 50 ℃에서 이동상의 속도를 0.75 mL/min로 하여 5 μL 주입해 WAVEMAKERTM software(*Table* 2)에 의해 정해진 gradient 조건으로 분석하였고 UV 검출기로 260 nm에서 검출하였다.

Table 2. Gradient condition of mobile phase in WAVEMAKER™ program

Step	Time(min)	%A	%B
Loading	0.0	65	35
step1(3.6 min)	1.5	55	45
step2(3.6 min)	3.0	45	55
step3(3.6 min)	6.5	40	60
step4(3.6 min)	10.0	35	65
step5(3.6 min)	13.5	35	65
Start clean	15.0	0	100
Stop clean	16.5	0	100
Start equilibrate	17.5	65	35
Stop equilibrate	19.5	65	35

결과 및 고찰

RFLP겔 전기영동법에 의한 단일 염기 다형성 검출

RFLP 분석법은 현재 가장 많이 이용하고 있는 단일 염기 다형성 검출 방법 중 하나이다. 다형성을 찾고자하는 유전자를 PCR 방법으로 증폭한 후 PCR 산물을 염기 서열에서 한 부위만을 인식하는 제한효소를 이용하여 반응시키면 제한효소가 인식하는 부위일 경우는 절단될 것이고 그렇지 않으면 절단되지 않는다. 절단된 단편과 절단되지 않는 단편의 크기 차이를 이용하여 전기영동법으로 분석이 가능하다. 그러나 PCR 산물을 정제해야 하기 때문에 시간과 노동력이 많이 소모되며 실험자의 실험에 대한 숙련도에 따라서 검출률이 많이 달라질 수 있어 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

RFLP를 한 후 아가로스 겔 전기영동법으로 확인한 결과 75개의 대장암 조직 중 21개(28%)의 G/T transversion을 검출하였으며, 75개의 정상 조직 중 5개(6.7%)의 G/T transversion을 검출하였다(*Fig.* 1). *Fig.* 2에서 lane 1은 DNA molecular weight marker이고, lane 2는 제한효소 처리를 하지 않은 357bp PCR 산물이다. Lane 3는 한쪽 염색체에서 G/T transversion이 발생한 결과이며, lane 4는 양쪽 염색체 모두 G 만을 가지는 G/G genotype PCR 산물이다(*Table* 3).

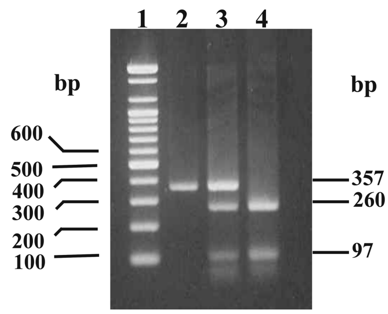

Fig. 1. PCR-based RFLP analysis of the G to T transversion located at the MK gene; Lane 1: DNA molecular weight standards; Lane 2: undigested 357 bp PCR product from G/T; Lane 3: the 357 bp PCR product from the G/T genotype was digested with *Bme*18 I; Lane 4: the 357 bp PCR product from the G/G genotype was digested with *Bme*18 I.

RFLP-size Based DHPLC 방법에 의한 단일 염기 다형성 검출

DHPLC 분석법은 DNA 돌연변이를 검출하거나 정제하는 새로운 방법으로 PCR 산물이나 RFLP 산물을 정제하지 않고 바로 분석할 수 있으며 시료 하나당 10~20분이면 분석이 가능하고 분석 과정을 실시간으로 확인할 수 있기 때문에 노동력과 시간을 절약할 수 있다. 또한 모든 실험 과정이 자동화되어 있어 분석 결과의 재현성이 뛰어나다.

정제 과정을 거치지 않은 RFLP 산물을 자동 시료

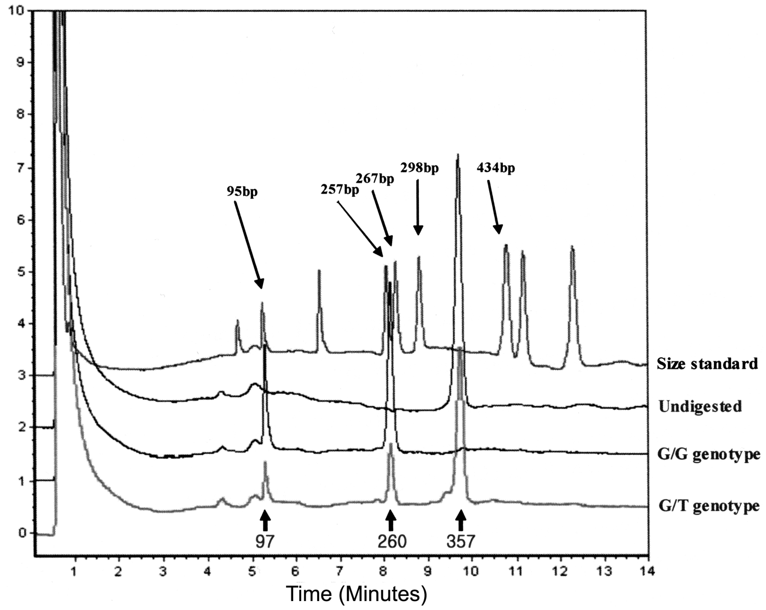

Fig. 2. Chromatogram of RFLP analysis of the G to T transversion located at the 62nd base of intron 3 in the MK gene.

Table 3. Distribution of the two genotypes (G/G and G/T) among healthy control and cancer patients T/T genotype was not detected in cancer or control samples

Samples	Genotypes (%)[a]	
	G/G	G/T
Healthy control		
75	70 (93.3)	5 (6.7)
Cancer		
75	54 (72)	21 (28)

주입기(auto sampler)에 장착하면 syringe에 의해 컬럼에 주입되어 적절한 이동상의 gradient로 분리하면 DNA 단편의 크기 차이에 의해 단일 염기 다형성을 검출할 수 있다.

우선 컬럼의 재현성과 이동상 완충용액의 상태를 확인하기 위해서 size standard를 5 μL씩 3번 주입하여 분석하였다. 그 후 제한효소로 처리하지 않은 357bp PCR 산물을 5 μL 주입하여 단일 피크로 나오는지 확인하고, 75개의 대장암 RFLP 산물을 5 μL씩 주입하여 분석한 결과 21개(28%)의 RFLP 산물에서 3개의 피크로 나타나는 G/T genotype과 54개(72%)의 RFLP 산물에서 2개의 피크로 나타나는 G/G genotype을 검출하였다. 또한 75개의 정상 RFLP 산물에서 5개(6.7%)의 G/T genotype과 70개(93.3%)의 G/G genotype을 검출하였다. 결과의 정확성을 판단하기 위해 size standard 피크와 RFLP 산물을 분석한 피크를 합쳐본 결과 RFLP 산물을 분석한 피크가 정확한 위치에서 나타남을 확인할 수 있었다(*Fig.* 2). 또한 이와 같은 결과는 RFLP-겔 전기영동법으로 분석한 결과와 동일함을 보였다.

결 론

75개의 대장암과 75개의 정상 조직을 대상으로 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 분석하고자 하는 부위의 DNA 단편을 증폭하고, PCR 산물을 일반적으로 행하는 RFLP를 한 후 겔 전기영동으로 확인하는 방법과 RFLP 후 염기 서열 크기에 기초한 DHPLC 방법으로 확인하는 새로운 방법으로 MK 성장 인자의 인트론 3번의 62번째 염기가 G에서 T로 치환되는 단일 염기 다형성을 검출하였다. 그 결과 RFLP 후 겔 전기영동법과 크기에 기초한 DHPLC로 검출한 방법 모두 75개의 대장암 조직에서 21개(28%), 75개의 정상 조직에서 5개(6.7%)의 단일 염기 다형성을 검출하였다.

본 연구를 통하여 RFLP 산물을 겔 전기영동법으로 확인하는 일반적인 방법보다 크기에 기초한 DHPLC 법으로 확인하는 새로운 방법이 정제 과정을 거치지 않으므로 시간과 노동력이 절약되며 전 분석 과정이 자동화되어 있기 때문에 실험자의 숙련도에 관계없이 결과의 재현성이 우수하다는 장점을 가지고 있다.

MK 성장 인자의 단일 염기 다형성은 대장암뿐만 아니라 여러 종류의 인체암에서 발생하기 때문에 환자의 예후 관찰에 있어서 보다 빠르고 정확한 단일 염기 다형성 검출 도구로 DHPLC 분석 방법이 상당히 유용할 것으로 생각되며 향후 primer extension과 같은 새로운 단일 염기 다형성 검출 방법에 DHPLC를 도입하여 겔 상에서 판단하기 힘든 하나의 염기 크기 차이도 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 방법을 모색해야 할 것이다.

본 연구는 2004년도 동남보건대학 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

인 용 문 헌

1. Aaronson, S. A. *Science* **1991**, *254*, 1146.
2. Aridome, K.; Tsutsui, J.; Takao, S.; Kadomatsu. K.; Ozawa, M.; Aikou, T.; Muramatsu, T. *Jpn. I. Cancer Res.* **1995**, *86*. 655.
3. Cross, M.; Dexter, T. M. *Cell* **1991**, *64*, 271.
4. Garver. Jr.; R. I.; Chan, C. S.; Mimer P. G. *Am, J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1993**, *9*, 463.
5. Garver, Jr.; R. J.; Radford, D. M.; Donis Keller, H.; Wick, M. R.; Milner, P. G. *Cancer* **1994**, *74*, 1584.
6. Heldin. C. H.; Westermark, B. *Eur. J. Biochem*. **1989**, *184*, 487.
7. Kadomatsu, K.; Tomomura, M.; Muramatsu, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *151*, 1312.
8. Kaname, T.; Kadomatsu, K.; Aridome, K.; Yamashita, S.; Sakamoto, K.; Ogawa, M.; Muramatsu, T.; Yamamura, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 256.
9. Kaname, T.; Kuwano, A.; Murano, I.; Uehara, K.; Muramatsu, T.; Kajii, T. *Genomics* **1993**, *17*, 514.
10. Matsubara, S.; Tomomura, M.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, T. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9441.
11. Michikawa, M.; Kikuchi, S.; Muramatsu, H.; Muramatsu, T.; Kim, S.U. *J. Neuro-sci. Res.* **1993**, *35*, 530.
12. Muramatsu, H.; Inui, T.; Kimura, T.; Sakakibara, S.; Song, X. J.; Manna. H. Muramatsu, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 1131.

13. Muramatsu, H.; Muramatsu, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177*, 652.
14. Muramatsu, H.; Shirahama, H.; Yonezawa. S.; Marina, H.; Muramatsu, T. *Dev. Biol.* **1993**, *159*, 392.
15. Nakagawara, A.; Milbrandt, J.; Muramatsu, T.; Deuel, T. F.; Zhao, H.; Cnaan, A.; Brodeur, G. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1792.
16. Nurcombe, V.; Fraser, N.; Herlaar, E.; Heath. J. K. *Development* **1992**, *116*, 1175.
17. Satoh, J.; Muramatsu, H.; Moretto, G.; Muramatsu. T.; Chang, H. J.; Kim, S. T.; Cho, J. M.; Kim, S. U. *Brain Res. Dev. Brain Rcs.* **1993**, *75*, 201.
18. Tsutsui, J.; Kadomatsu, K.; Matsubara, S.; Nakagawara, A.; Hamanoue, M.; Takao, S.; Shimazu, H.; Ohi, Y. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1281.
19. Tsutsui, J.; Uchara, K.; Kadomatsu, K.; Matsubara, S.; Muramatsu, T. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **1991**, *176*, 792.
20. Uehara, K.; Matsubara, S.; Kadomatsu, K.; Tsutsui, J.; Muramatsu, T. *J. Biochem* **1992**, *111*, 563.
21. Unoki, K.; Ohba, N.; Arimura, H..; Muramatsu, H.; Muramatsu, T. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,* **1994**, *35*. 4063.
22. Yoshida, Y.; Coto, M.; Tsutsui, J.; Ozawu, M.; Sam. E.; Osame. M.; Muramatsu, T. *Dev Brain Res.* **1995**, *85*. 25.