

다양한 종류의 암종조직에 있어서의 PLC- γ 1의 발현 비교*

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

김 성 숙

= Abstract =

Altered Expressions of PLC- γ 1 in Various Types of Human Cancer

Sung Sook Kim

*Department of Pathology and Division of Cell and Tissue Biology, Medical College
and Ewha Medical Research Center, Ewha Womans University*

Background : Phospholipase C isozymes(PLCs) play a central role in ligand-mediated signal transduction for cellular activity such as proliferation and differentiation. However, the biological significance of their molecules in carcinogenesis or tumor progression is not determined precisely yet.

Materials and Methods : Using PLC- γ 1 specific antibody, we have examined the relative contents of PLC- γ 1 in various types of human cancer tissue, by immunoblotting and immunohistochemistry techniques. Several oncogene studies and DNA ploidy study were performed additionally in some tumors.

Results : Most malignancy showed elevated contents of PLC- γ 1, especially in colorectal and breast cancer, whereas hepatocellular carcinoma revealed decreased expression of PLC- γ 1. onco-protein expression was correlated with PLC- γ 1 expression in some tumors. In hepatocellular carcinoma, DNA ploidy has an influence to PLC- γ 1 expression in most of the cases.

Conclusion : In conclusion, alteration or imbalance of the PLC- γ 1 mediated signal transduction may have a significant role in the development or progression of cancer. These findings not only have important implications for increasing our understanding of multistage carcinogenesis but they also have an impact on strategies for diagnosis and therapy of cancers.

KEY WORDS : Phospholipase C- γ 1 · Cancer · Signal transduction.

서 론

세포의 외부 신호들, 즉 호르몬, 성장 요소, 신경전달물

질 등은 자신의 특이 수용체와 결합하여 효과기(effector)인 adenylyl cyclase, guanylyl cyclase, phospholipase A2 및 phosphoinositide-specific phospholipase C(PI-PLC)를 활성화하여 이차 신호 전달 물질을 생성케하여 세포내 생리 활성을 일으킨다¹⁾²⁾. 이들

*This manuscript is partly supported by Ewha University Professor's Research fund 1994.

effector인 PLC는 세포막에 존재하는 PIP2를 가수분해하여 inositol trisphosphate(IP3)와 diacylglycerol (DG)의 두 가지 2차 전달 물질을 만든다. IP3는 세포내 Ca⁺⁺+ 저장 기관으로부터 Ca⁺⁺+을 세포질로 유리시키고 DG는 protein kinase C(PKC)를 활성화하여 세포의 분비, 대사, 수축, 신경 흥분, 분화 등의 생리적 현상을 조절한다³⁾.

PLC는 너를 비롯한 여러 동물 조직으로부터 여러 동위효소들이 분리 정제되어 그 특성이 밝혀졌으며 섬유아 세포로부터 cloning이 되었고 이들의 아미노산 서열을 기존의 동위효소와 비교한 결과 여러 종류의 subtype으로 분류할 수 있었다. 따라서 β_1 , β_2 , β_3 , β_4 , γ_1 , γ_2 , δ_1 , δ_2 , δ_3 등이 지금까지 보고되었다⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾.

이들중 PLC- γ 는 src 암유전자와 유사성이 있는 부분인 SH2와 SH3를 가지고 있어 이들의 활성이 세포의 성장에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 실제 PLC- γ 가 EGF, PDGF, NGF 및 FGF 등의 성장 인자의 수용체와 직접 결합함이 밝혀졌고⁸⁾⁹⁾ 이들 수용체의 tyrosine kinase활성에 의해 PLC- γ 의 tyrosine 잔기가 인산화되어 in vivo에서 PLC 활성이 증가함이 밝혀졌다¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾. 그리고 PLC- γ 의 microinjection에 의해 NIH 3T3 세포의 DNA 합성이 유도되었고 PLC- γ 의 항체를 microinjection할 경우에는 혈장과 ras에 의해 자극되었던 DNA합성이 차단되었다¹³⁾.

한편 사람의 유방암 조직과¹⁴⁾ 피부 질환인 psoriasis에서는 정상 조직에 비해 PLC- γ 1이 과다 발현되었고¹⁵⁾ 본 연구자들은 대장, 직장암, 위암, 자궁경부암에서 표현이 증가함을 관찰하였다¹⁶⁾¹⁷⁾. 이와 같이 여러 연구 결과에서 PLC- γ 1이 세포의 성장이나 암종전환에 중요한 요소임이 시사되고 있어 인간의 다양한 암종에서 이들의 표현을 주로 면역 조직 화학 염색을 이용하여 관찰하고 이들의 결과를 비교하고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 연구 재료

여러 인간의 다양한 암종 조직을 수술로 절제된 표본에서 얻어 그중 이환율이 높은 암종, 특히 우리나라 많은 암종을 대상으로 하였다. 수술로 절제된 조직중 대장, 직장암, 위암종은 -70℃에 얼려 둔 조직도 함께 이용할 수 있었고 그 밖의 조직은 이미 포르말린에 고정된

후 파라핀에 포매된 조직을 이용하였다. 모든 경우에 있어 주위 조직이 포함된 표본을 대상으로 하여 주위 조직을 대조로 사용할 수 있도록 하였다. 한편 표1에서 본 바와 같이 간암 중의 경우 실험적으로 백색에 발생시킨 종양도 대상으로 하였다. 그 종류와 건수는 다음 Table 1과 같다.

2. 연구 방법

1) 면역 조직 화학 염색

면역 조직 화학 염색 방법은 우선 파라핀에 포매된 조직으로부터 Poly-L-lysine으로 처리한 유리 슬라이드에 5 μ m절편을 만들어 60℃이하에서 말린 후 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀, hydration을 시킨 후 H₂O₂로 내부의 peroxidase를 blocking시킨다. 다음 PLC- γ 1의 항체를 2시간 실온에서 incubate하고 Dako사의 LSAB kit를 이용하여 avidin-biotin complex 방법으로 염색하였다¹⁸⁾. AEC로 발색하였고 hem-atoxylin으로 대조 염색하였다. Erb-B2와 ras oncoprotein도 같은 방법으로 염색하였다.

2) DNA Ploidy측정

간암종의 DNA Ploidy는 사람의 경우 flow cytometry와 image cytometry 두 방법으로 측정하였고 동물의 경우 절편에서 직접 image cytometry(CAS 200)으로 측정하였다¹⁹⁾²⁰⁾. 자세한 방법은 참고문헌에 기술되어 있다.

3) Phospholipase C- γ 1에 대한 항체 준비

서 등이 기술한 방법대로 소뇌에서 추출한 phospholipase C- γ 1 peptide로부터 생쥐에 면역시킨 후 생쥐 비장과 다발성 골수종 세포주와 hybridoma를 만들어 세포주의 supernatant를 사용하였다¹³⁾.

결 과

1. Phospholipase C- γ 1의 발현

대부분의 암종에서는 예상한 바와 같이 암종에서 정도

Table 1. Materials used in this study

종류(건수)	종류(건수)
Colo-rectal ca.(17)	Prostate ca.(15)
FAP(7)	Laryngeal ca.(13)
Breast ca.(80)	Lung ca.(10)
Stomach ca.(20)	Hepatocellular ca.(23)
Cervix ca.(20)	Experimental HCC(13)

의 차이는 있지만 주위 정상 조직에 비해 PLC- γ 1의 발현이 증가하였다(Fig 1). 그러나 일부의 간세포암종과 폐암종, 특히 편평상피암종에서는 표현의 차이가 없었고 대부분의 간세포암종에서는 놀랍게도 표현이 현저히 감소하거나 거의 표현이 관찰되지 않았다(Fig 2).

그 중에서도 Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 대장 및 직장암 중에서 표현이 가장 증가되어 관찰되었는데 저자들은 이미 그 사실을 보고한바 있고 그 후에도 시행한 검사에서 항상 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 이들의 발현 증가가 암종발생에 원인인지 또는 결과인지를 확인하기 위해 시행한 전암병변인 FAP에서도 시행하여 이들이 벌써 FAP에서 증가함을 관찰하고 이를 보고하였다. 우리 나라에서 1위를 차지하고 있는 위암종에서는 장암종만큼 증가가 뚜렷하지는 않지만 분화도에 따라 분화가 좋은 암종에서는 많이 표현이 증가함을 확인하여 논문을 제출해 놓고 있다²²⁾.

그리고 특이하게 자궁경부암에서 특히 침윤성 암병변에서 PLC- γ 1이 핵에 염색됨을 관찰할 수 있었다(Fig 3).

2. DNA ploidy와의 관계

한편 간세포암종에서 PLC- γ 1의 표현에 따라 두 군으로 나뉘었을 때 DNA Ploidy의 형태와 상관관계가 있게

나타났다. 즉 Diploidy와 tetraploidy에서는 표현이 감소하였고 aneuploidy에서는 표현의 차이가 관찰되지 않은 것이다(Fig 4). 그래서 동물에 발생시킨 간암종에서도 다시 실험을 하였는데 이때도 역시 주위 정상 간세포나 간경화조직에서보다 암종에서 현저히 표현이 감소하였다. 그러나 이들의 DNA Ploidy는 1예를 제외하고는 모두 aneuploidy를 보여 사람에서의 같은 통계학적인 의의는 찾을 수 없었다.

3. 다른 암유전자와의 관계

한편 실험적으로 만든 간세포암종에서는 여러 가지 암유전자단백들을 염색하여 발현을 비교하였는데 이들의 표현이 대체로 ras, erbB2, p53과 일치하여 관찰되었다. 즉 암종보다 주위 전암성 병변, 간경화증이나 hyperplasia에서 더 많이 표현이 된 것이다. 이들은 PCNA와는 반대의 염색상을 관찰 할 수 있었다. PCNA는 명확하게 암종 부분에서 염색이 강하게 나타났기 때문이다.

암유전자단백과 같이 시행하였던 경우 이들의 표현은 PLC- γ 1의 표현과 거의 일치하여 나타났다. 즉 두경부 종양에서 ras암유전자단백과 PLC- γ 1과의 표현이 비교적 일치한 것으로 밝혀졌고 유방암종에서 erbB2와 비슷한 분포를 보였다.

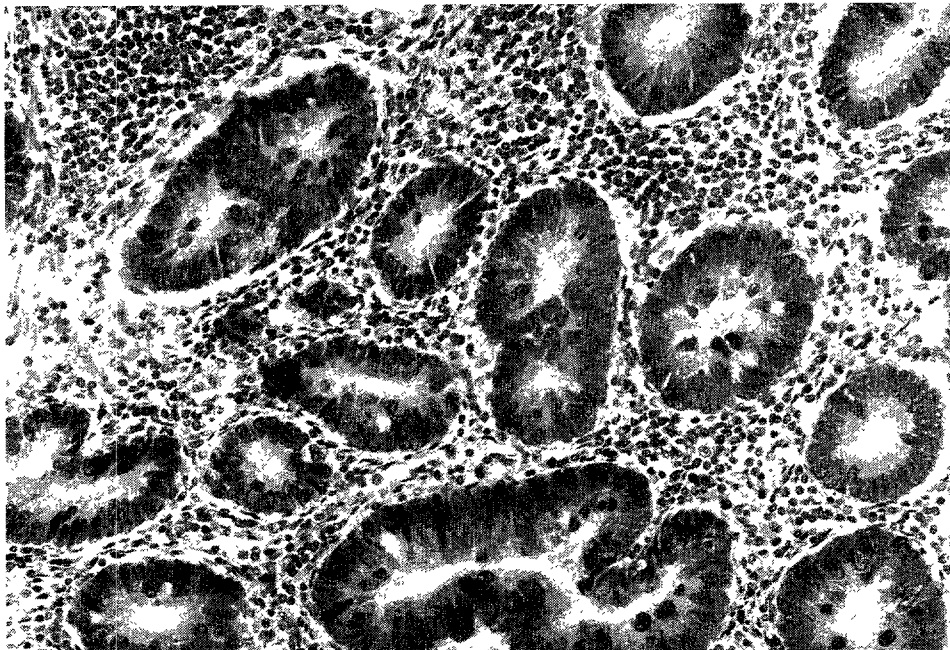


Fig. 1. Expression of PLC- γ 1 in stomach cancer tissue is increased(immunostain, $\times 100$).

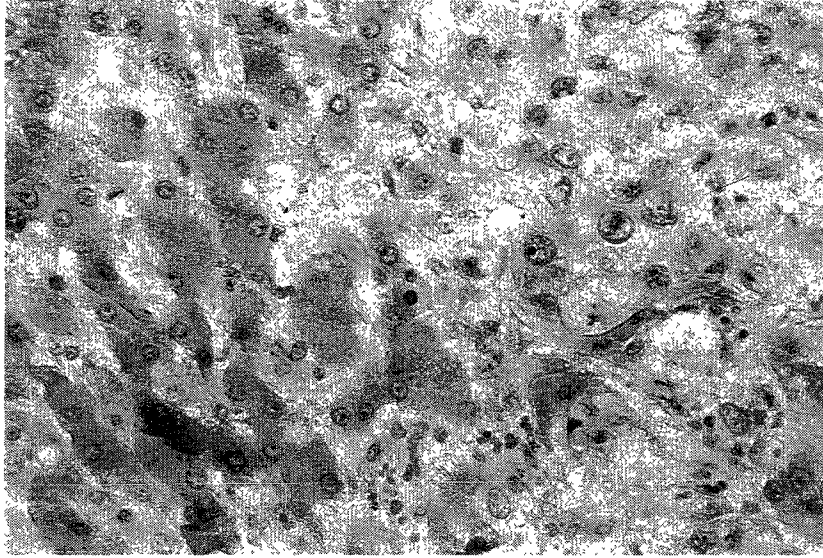


Fig. 2. Expression of PLC- γ 1 in hepatocellular carcinoma(HCC)is markedly decreased(immunostain, $\times 100$).

Table 2. PLC- γ 1 Contents in Cancer tissue

Expression of PLC- γ 1	Types of cancer
Markedly Elevated	1. Colorectal ca. 2. Breast ca.
Elevated	1. Stomach ca. 2. FAP 3. Laryngeal ca. 4. Cx ca. 5. Prostatic ca.
No Change	1. Lung ca 2. HCC(Aneuploidy)
Decreased	1. HCC (Diploidy & Tetraploidy)

고 안

본 연구에서 나타난 바와 같이 PLC- γ 1이 세포의 성장뿐 아니라 암종 전환(transformation)에도 관여할 것이라는 것은 확실한 것으로 밝혀졌다. 서론에서도 밝힌 바와 같이 이들의 여러 cell study에서 나타난 것과 같은 결과가 조직에서도 보이는 것이다⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾. 이들이 암발생에 관여하는 기전은 암유전자나 성장 인자들의 과다 발현이나 돌연변이로 인해 정상적인 신호 전달 체계의 이상이나 불균형을 통해 일어날 것으로 추측된다. 본 연구에서도 유방암이나 후두암종에서 암유전자 단백질의

발현을 같이 관찰하였는데 거의 일치하는 결과를 보인 것도 이를 뒷받침하는 것으로 사료된다. 그 중에서도 Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 대장 및 직장암종에서 표현이 가장 증가되어 관찰되었는데 저자들은 이미 그 사실을 보고한바 있고 그 후에도 시행한 검사에서 항상 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 이들의 발현 증가가 암종발생에 원인인지 또는 결과인지를 확인하기 위해 시행한 전암병변인 FAP에서도 시행하여 이들이 벌써 FAP에서 증가함을 관찰하고 이를 보고하였다¹⁷⁾.

세포의 성장인자와는 관련을 시켜 보지 못했는데 서론에서 밝힌 바와 같이 세포의 성장 인자가 세포막 관통 성장 인자 수용체에 결합하여 수용체 타이로신 인산화 효소를 활성화시켜 수용체 자가 인산화와 함께 SH-2 부위를 갖는 세포질 단백질 PLC- γ 1을 소집시키고 타이로신 인산화시킴으로써 PIP2를 가수분해시켜서 IP3와 DG의 두 이차 전령을 생산해 냄으로써 아직까지 밝혀지지 않은 세포 내의 연속적인 사건들이 일어나므로 핵내로의 신호를 전달하여 세포 주기를 진행시켜서 DNA합성과 세포 분열을 일어나게 함으로써 세포 증식을 하게 할 것이다¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾.

특히 간세포암종에서 다른 암종과 달리 PLC- γ 1의 표현이 현저히 감소함을 보이고 이들이 DNA 형태에 따라 다르게 발현함으로써 신호 전달 체계의 이상이 암종발생에 중요한 영향을 미치며 또 DNA 형태에 따라 아마도

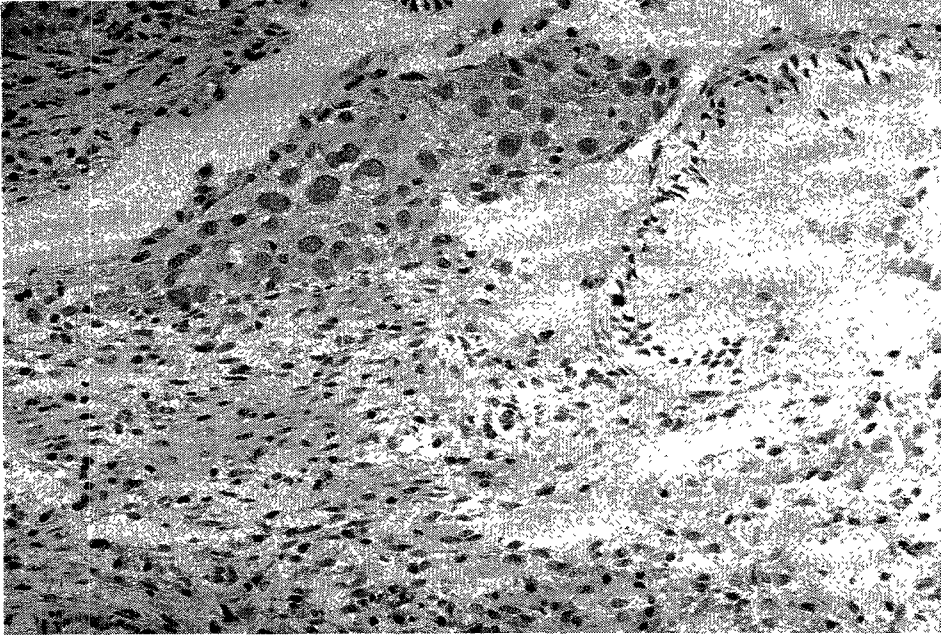


Fig. 3. Nuclear staining of PLC- γ 1 in uterine cervix cancer is observed(immunostain, $\times 100$).

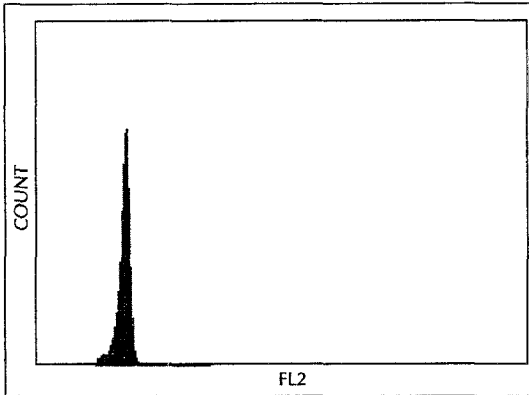


Fig. 4. Diploidy pattern of hepatocellular carcinoma showed decreased PLC- γ 1 expression.

서로 다른 암종 발생의 두 가지 기전이 있을 것으로 사료된다. 즉 DNA형태에 따라 간세포암종의 발생의 신호 전달 체계가 다를 것을 시사하고 있다. 그러나 Diploidy나 tetraploidy 즉 aneuploidy를 보이지 않는 암종에서는 적어도 정상적인 신호 전달 체계의 이상이 일어나고 이곳이 발암에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

또한 자궁경부암종에서 특히 침윤성 병변에서 핵에서 PLC- γ 1의 발현이 관찰된 것은 아마도 이것이 핵암유전자(Nuclear oncogene), 즉 c-fos나 c-myc, 등과 관계가 있을 것을 시사한다.

결론적으로 정리하여 보면 대부분의 암종에서 PLC- γ 1의 표현이 증가하고 간세포암종에서는 오히려 감소함이 관찰됨으로써 PLC- γ 1을 중심으로 하는 신호전달 체계의 이상이나 불균형의 초래가 암발생이나 전파에 관여할 것으로 추측한다.

요 약

본 실험의 결론은 다음과 같이 요약할 수 있다

1) 대부분의 암종조직에서 주위 정상 조직에 비해 PLC- γ 1의 표현이 증가되어 있고, 일부 종양에서는 발현상에 차이가 없었고 간세포암종, 특히 정상 배수체 또는 사배수체를 보이는 종양에서는 현저한 감소를 보였다.

2) 이들의 증가는 암유전자나 성장 인자들의 자극, 과발현 그리고 돌연변이로서 암발생을 시킬 때 PLC- γ 1을 통한 신호 전달 체계가 중요한 역할을 할 것임을 시사한다.

3) 뿐만 아니라 간세포암종에서 DNA 배수성에 따라 PLC- γ 1의 발현상에 차이를 보이는 것은 배수체에 따라 발암 기전이 다를 것을 암시하며 또한 이들 PLC- γ 1의 감소로서도, 즉 신호 전달 체계의 불균형이 발암 기전에 영향을 줄 것으로 사료된다.

따라서 앞으로는 여러 암유전자나 성장 인자와 연관시켜 실험을 해보아야 할 것이고 특히 자궁경부암에서 핵에서 발현이 되므로 nuclear oncogene과의 관계도 연구해야 할 것으로 사료된다. 특히 이들이 침윤성 병변에서 현저하므로 암의 발생뿐 아니라 progression에도 관여할 것으로 생각된다. 그리고 간세포암종의 발생에서 PLC- γ 1을 투여함으로써 diploidy나 tetraploidy를 보이는 종양의 발생을 줄이거나 예방할 수 있는지 좀 더 연구해야 할 것이다.

■ 감사의 글

본 연구를 수행함에 있어 참고문헌 정리 및 타이핑을 도와주신 병리학교실 조교인 박정미 선생과 이화여자대학교 의과대학 의학과 학생인 이혜정, 박현숙 학생께 감사드립니다.

References

- 1) 김우현 : 성장 인자 신호 전달 체계와 이노시톨 특이성 *Phospholipase C* CRC암 연구의 최신지견. 암 연구센터. 1993 : pp85-94
- 2) 서판길 : *Phospholipase C- γ 1* 유전자의 발현. CRC암 연구의 최신 지견. 암연구센터. 1993 : pp106-120
- 3) Berridge, MJ, Irvine, RF : *Inositol phosphate and cell signalling*. *Nature* 1984 : 312, 315
- 4) Rana RS, Hokin, LE : *Multiple forms of phospholipase C isoenzymes and their activation mechanisms*. *Physiol Rev* 1990 ; 70 : 115
- 5) Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY : *Studies of inositol phospholipid specific phospholipase C*. *Science* 1989 ; 244 : 546
- 6) Rhee SG, Choi KD : *Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isoenzymes*. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 12393
- 7) Nichzuka Y : *Studies and perspectives of protein kinase C*. *Science* 1986 ; 233 : 305
- 8) Wahl MI, Olashaw NE, Nishibe S, Rhee SG, Pledger WJ, Carpenter G : *Platelet growth factor induces rapid and sustained tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 in quiescent BALB/c 3T3 cells*. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 2934
- 9) Meisenheider J, Suh PG, Rhee SG, Hunter T : *Phospholipases C- γ 1 a substrate for the PDGF and EGF receptor protein tyrosine kinases in vivo and in vitro*. *Cell* 1989 ; 57 : 1109
- 10) Kim UH, Fink D, Kim HS, Park DJ, Contreras ML, Guroff G, Rhee SG : *Nerve growth factor stimulates phosphorylation of PLC- γ in PC 12 cells*. *J. Biol. Chem* 1991 ; 266 : 1359
- 11) Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitziki A, et al : *EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II : A potential mechanism for EGF-receptor signalling*. *Cell* 1989 ; 57 : 1101
- 12) Nanney LR, Stoscheck CM, King Lee, Underwood RA, Molbrook KA : *Immunolocalization of epidermal growth factor receptors in normal developing human skin*. *J Invest Dermatol* 1990 ; 94 : 742
- 13) Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG : *Monoclonal antibodies to three phospholipase C isoenzymes from bovine brain*. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 14497
- 14) Arteaga CL, Johnson MD, Toddererud G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL : *Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10435
- 15) Nanney LR, Gates RE, Toddererud G, King LE, Carpenter G : *Altered distribution of phospholipase C in hyperproliferative epidermal disease*. *Cell growth & Differentiation* 1992 ; 3 : 236
- 16) Noh DY, Kim YI, Kim SS, Lee YH, Ryu SH, Suh PG, et al : *Elevated content of PLC- γ 1 in colorectal cancer tissue* *Cancer* 1994 ; 73 : 36-41
- 17) Park JG, Lee YH, Kim SS, Park KJ, Noh DY, Ryu SH, et al : *Overexpression of Phospholipase C γ 1 in familial adenomatous polyposis*. *Cancer Research* 1994 ; 54 : 2240-2244
- 18) Rillema JA : *Possible role of phospholipase C in the regulation of cell division in normal and neoplastic cells*. *Med Hypo* 1989 ; 29 : 1
- 19) Hsu SM, Raine L, Fanger H : *Use of avidin-biotin peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures* *J Histochem cytochem* 1981 ; 29 : 577
- 20) Hedley DW, Frienlander ML, Taylor IW : *Application of DNA flow cytometry to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance*. *Cytometry* 1987 ; 6 : 327

- 21) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI : *Detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 1983 ; 3 : 323*
- 22) Kim SS, Noh DY, Park JG, Kim YI, Lee YH, Suh PG : *Immunolocalization of the Phospholipase C- γ 1 in Human Gastric Carcinomas(Submitted)*