

위암 환자의 식이와 위암조직의 *pS2* promoter 과메틸화 그리고 *p53*과 *Ki-ras* 유전자 돌연변이 사이의 상호 관련성

이정엽, 박주승, 윤효영, 현태선, 윤세진, 김용대, 강종원, 김 힌, 송영진

충북대학교 의과대학 외과학교실, 내과학교실, 예방의학교실, 을지대학교 의과대학 외과학교실, 충북대학교 생활과학대학 식품영양학과

Relationships between diet, hypermethylation of *pS2* and mutations of the *p53* and *Ki-ras* genes in gastric cancer patients

Jung-Yup Lee, Joo-Seung Park, Hyo-Yung Yun, Taisun Hyun, Sei Jin Youn,
Yong-Dae Kim, Jong-Won Kang, Heon Kim, Young-Jin Song

Departments of Surgery, Departments of Internal Medicine, and Departments of Preventive Medicine,
College of Medicine, Chungbuk National University; Department of Surgery, Eulji University, School of Medicine;
Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University



대한임상건강증진학회지 제5권 제1호 2005년 3월 별책
Korean Journal of Health Promotion and Disease Prevention Vol. 5, No. 1, Mar 2005

원저

위암 환자의 식이와 위암조직의 *pS2* promoter 과메틸화 그리고 *p53*과 *Ki-ras* 유전자 돌연변이 사이의 상호 관련성이정엽¹, 박주승², 윤효영¹, 현대선³, 윤세진⁴, 김용대⁵, 강종원⁵, 김 현⁵, 송영진¹충북대학교 의과대학 외과학교실¹, 내과학교실², 예방의학교실³, 을지대학교 의과대학 외과학교실⁴, 충북대학교 생활과학대학 식품영양학과⁵

요약

연구배경 본 연구의 목적은, 한국인에서 환경적 발암 요인이 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화에 미치는 영향을 파악하고, 나아가서 위암 발생과 위암 조직의 *p53*과 *Ki-ras* 유전자 돌연변이에 미치는 영향을 규명하는 것이다.

방법 병리조직학적으로 위암으로 진단 받은 환자 110명과 이들과 성과 연령을 짝지은 대조군 220명을 모집하고, 이들에 대하여 식이 습관과 음주, 그리고 흡연 등의 위암 위험요인 폭로에 대한 직접 면접조사를 실시하였다. 위암환자 조직에서 추출한 DNA를 이용하여 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화 여부를 확인하였고, RT-PCR로 *p53*과 *Ki-ras*의 염기서열을 분석하여 돌연변이를 검출하였다.

결과 흡연과 음주는 위암과 유의한 관련성을 보이지 않았다. 떡볶이와 돼지삼겹살, 그리고 아이스크림을 자주 먹는 경우 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화가 유의하게 적은 것으로 관찰된 반면 쌀밥과 닭도리탕·백숙·삼계탕을 많이 섭취할수록 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화가 유의하게 많은 것으로 나타났다. *pS2* 유전자 promoter 과메틸화와, 흡연과 음주 습관간에는 유의한 관련성이 관찰되지 않았다. 위암조직에서 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화와 *p53*과 *Ki-ras* 돌연변이 분포는 각각 40%, 28.2%, 4.9%가 관찰되었으며, *p53*과 *Ki-ras* 돌연변이 분포는 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화 여부에 따라 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

결론 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화는 위암 발생과는 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되지만, 이것의 과메틸화가 *p53*과 *Ki-ras*의 유전자 돌연변이를 유발하지는 않는 것으로 생각된다. 그러나, 각종 식이요인은 서로 다른 유전적 변화를 초래할 수 있을 것이며, 이는 위암에 있어서 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화와 *p53*과 *Ki-ras* 등 암 관련 유전자의 돌연변이가 암 발생을 유발하는 각기 서로 다른 기전임을 시사하는 것이다.

중심 단어 위암, 환경적 요인, 과메틸화, *pS2*, *p53*, *Ki-ras*

대한임상건강증진학회지 2005;1: 45~53

서론

위암은 우리나라에서 가장 많이 발생하는 암이며, 전체 남자 악성종양의 24.1%, 그리고 전체 여자 악성종양의 15.3%를 차지하고 있다.¹⁾ 우리나라의 연령조정 발생률은 다른 나라와 비교할 때 대단히 높은 수준이다.²⁾ 지금까지 위암의 원인으로는 식

이 습관을 포함한 환경적 인자 및 유전적 요인 등 다양한 요인이 관련되어 있는 것으로 알려져 있지만, 최근에는 유전자 promoter의 과메틸화가 각종 암발생의 전단계 과정으로 다양한 종류의 암 발생과 관련이 있다는 사실이 알려지면서 그것과 위암과의 관련성을 규명하려는 연구가 활발해지고 있다.^{3,4)}

DNA 메틸화는 근본적으로 염색질(chromatin)을 조절해주는 역할을 하며, DNA를 구획하는데 보조적인 기능을 가진다.⁵⁾ 인체 종양세포에서 관찰되는 유전자의 변화에는 돌연변이, 결손, 증폭(amplification), 과발현(overexpression) 및 비정상적인 메

·교신저자 : 송영진

·주 소 : 충북 청주시 흥덕구 개신동 충북대학교병원 외과

·전 화 : 043-269-6361 ·E-mail : yjsong@cbu.ac.kr

·접수일 : 2004년 12월 6일 ·채택일 : 2005년 3월 14일

틸화가 포함된다. 과메틸화에 의하여 5'-methylcytosine의 소실이 나타나며, 몇몇 암에서 저메틸화가 관찰되는 것에 반해, 과메틸화로 인한 변화는 각종 암 발생기전에 있어 더욱 중요한 것으로 인식되고 있다.⁶⁾ 종양억제 유전자의 promoter 부위에 과메틸화가 일어나면 그 유전자의 활성이 소실되어 종양이 발생할 수 있다. 실제로 망막모세포종(retinoblastoma)에서 Rb 유전자의 promoter의 과메틸화와 신세포암에서 VHL 유전자의 promoter 부위의 과메틸화 등, 다양한 종류의 과메틸화가 종양 세포에서 존재함이 확인된 바 있다.^{7,8)}

pS2는 암억제 유전자로서 단백질 분해효소의 억제인자(protease inhibitor)로서 역할을 하며 위점막의 정상적인 분화 및 위점막의 보호에 있어서 필수적인 증식인자(growth factor)이다.^{9,10)} pS2 유전자 promoter의 과메틸화는 pS2 유전자의 발현을 줄어뜨리게 하며 이로 인하여 위암 등의 발생율이 높아지는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 따라서 pS2 유전자 promoter의 과메틸화가 p53과 Ki-ras를 포함한 각종 유전자의 돌연변이를 유발할 가능성이 높다.

pS2 유전자 promoter의 과메틸화가 흔히 잘 나타나는 암종이 위암과 대장암 등의 소화기 암이므로, 이러한 과메틸화를 유발하는 요인으로 먼저 고려해야 할 것이 식이요인이다. 따라서, 각종 식이 요인 등의 환경적 발암 물질과 대사 효소 다형성 등의 숙주 요인이 상호 작용하여 위 조직의 pS2 유전자 promoter의 과메틸화를 초래하고, 이는 p53과 Ki-ras 등의 암 관련 유전자에 돌연변이를 유도함으로써 위암을 유발한다는 가설을 세울 수 있다.

본 연구의 목적은, 한국인에서 환경적 발암 요인이 pS2 유전자 promoter의 과메틸화에 미치는 영향을 파악하고, 나아가서 위암 발생과 위암 조직의 p53과 Ki-ras 유전자 돌연변이에 미치는 영향을 규명하는 것이다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1997년부터 2002년 사이에 충북대학교 병원과 을지병원에 병리조직학적으로 위암으로 진단 받아 수술 받은 환자 110명(남자 70명, 여자 40명)을 환자군으로 하였다. 대조군은 동일한 시기에 이들과 3세 이내에서 연령과 성을 짝지은 충

북대학교 병원의 정형외과에 골절 등 암이 아닌 다른 질환으로 입원한 환자와 건강검진 대상자 총 220명(남자 140명, 여자 80명)을 대상으로 하였다. 환자군의 평균(\pm 표준편차) 신장, 체중, 체질량지수(body mass index)는 각각 163.6 ± 8.3 , 59.8 ± 9.6 , 22.4 ± 2.8 이었으며, 대조군은 각각, 162.9 ± 8.0 , 66.1 ± 9.1 , 26.5 ± 4.3 로서 유의한 차이가 없었다.

2. 연구 방법

1) 설문조사

서울대학교 의과대학 예방의학교실에서 개발되고¹²⁾ 신뢰도와 타당도가 검증된¹³⁾ 구조화된 설문지를 이용하여 환자군과 대조군에 대하여 직접 면접조사를 실시하였다. 이 설문지는 89개 식이항목에 대한 섭취빈도와 1회 섭취시 섭취량, 설문지, 인적사항 및 인구학적 요인, 흡연력, 음주력, 기호품, 식이 습관, 질병 과거력 등이 포함되었다.

환자군에 대해서는 위암 조직을 적출하였다. 수술 중 적출된 조직은 조직의 손상을 최소화하기 위해서 즉시 액체 질소에 담갔다가, 영하 70도의 초저온 냉동고에 옮겨서 보관한 다음 실험에 이용하였다.

2) pS2 유전자 promoter의 과메틸화 여부 분석

위암 조직을 polytron homogenizer로 균질화하고, phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 이용하여 DNA를 추출하였다. 위암 조직 DNA를 대상으로 HpaII(New England Biolab, Beverly, USA)와 MspI(New England Biolab)에 대한 methylation specific digestion을 실시하였다. Genomic DNA 100 ng이 포함된 10X 완충액 20 μ l에 HpaII 75 units 혹은 MspI 150 unit를 넣은 다음 37°C에서 48 시간 반응시켜 완전히 소화시켰다. 제한효소로 처리한 DNA 10 ng를 주형으로 사용하여 10 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 4가지 dNTP 50 mM씩, Taq polymerase 0.75 unit 등을 넣어 반응액 25 μ l를 만든 후 PCR machine을 이용하여 유전자를 증폭하였다. 유전자 증폭의 온도조건은 95°C에서 9 분 가열 후, 94°C에서 2 분, 55°C에서 2 분, 72°C에서 3 분의 cycle을 33 회 반복한 다음, 72°C에서 10 분 반응시킨 후 반응을 종료시켰다. pS2 유전자의 promoter에 ccgg 염기서열이 세 곳(-395 ~ -392, -125 ~ -122, -61 ~ -58)에 존재하므로, 각각의 ccgg를 포함

하는 primer를 한 쌍씩 제작하여 PCR을 시행하였다. Primer pS2ccgg1과 pS2ccgg2는 -395 ~ -392의 ccgg를, primer pS2ccgg3와 pS2ccgg4는 -125 ~ -122의 ccgg를, 그리고 primer pS2ccgg5와 pS2ccgg6는 -61 ~ -58의 ccgg를 포함하여 증폭하도록 고안된 것으로, 이들의 PCR 산물의 크기는 각각 169 bp, 215 bp, 198 bp이다. 각 primer의 염기서열은 다음과 같다.

pS2ccgg1 5' - tgc aag gtc acg gtc gcc ac - 3'

pS2ccgg2 5' - tgg gag tct cct cca acc tg - 3'

pS2ccgg3 5' - ccc atg gga aag agg gac tt - 3'

pS2ccgg4 5' - ggg cag gct ctg ttt gct ta - 3'

pS2ccgg5 5' - ggg cct cct tag gca aat gt - 3'

pS2ccgg6 5' - acc agg acc agg gcg cag at - 3'

pS2 유전자의 promoter와 exon 1, 그리고 사용한 primer의 염기서열은 그림 1과 같다.

```

aagtgattctcctgacttaacctccagtagctaggattacaggacccgcaacctgctggctaattt
ttgtatttttttttttttagagacgggttttggcaggtgttgccaggctagtctcaactctgactt
taagtgatccgctctcttggtctccaaagtgttggattacagctgagccactgagccaggccctaca
tttcattattaaaccaattccactgttaaaagaatttagcttaggcttagagcgaatgggttcctgagct
ccttcccttccctcgcaggtcaggtggtccacccgctgagccactgttgcagggcaagcctttttcc
ggccactctcactatgataactctctgagtagagtagatttaccctggcgggagggcctctcagat
atgagtaggacctgagatgaaggtcaggttggagagactcccatgggaaagagggactttctgaatctca
gatccctcagcgaagtagcctcaccacatgtctctctgtctatcagcaaatccttccatgtagcttga
ccatgtctaggaacaccttgaataaatacagtgagattattgtctcagaggtacccgggctctctt
pS2ccgg1
pS2ccgg2
pS2ccgg3
pS2ccgg4
pS2ccgg5
pS2ccgg6
tgcctcctgctctggtgggcacagcagctctggcagctccgcaaggccactgtttacatacatat

```

Figure 1. Sequences of pS2 gene promoter region, a part of exon 1, and primers used for PCR amplifications

증폭된 유전자 산물을 2% agarose gel에서 120V로 1시간 정도 전개한 다음 ethidium bromide로 염색하여 자외선 아래에서 관찰함으로써 증폭 여부를 확인하였고, HpaII으로 처리한 genomic DNA에서 증폭된 band의 density가 MspI으로 처리한 genomic DNA에서 증폭된 band의 density 비해서 현저히 증가

된 경우에 한하여 해당 ccgg 부위의 메틸화를 인정하였다. 최종적으로, 세 부위의 ccgg 가운데 최소한 두 부위 이상에서 메틸화가 확인된 경우에 대하여 과메틸화로 판정하였다.

3) 위암 조직의 p53 및 Ki-ras 유전자 변이 양상 분석

수술시에 적출한 위암 조직은 즉시 액체 질소에 담가서 보관하였다. 이 조직을 polytron homogenizer로 균질화하고, TRIzol 용액(Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 역전사효소를 이용하여 p53과 Ki-ras cDNA를 만들고 이 cDNA를 주형으로 하고, 10X PCR buffer, 25mM MgCl₂, dNTP, primer, ExTaq(Promega, USA) 등을 섞은 후 95°C에서 30 초와 72°C에서 1 분의 주기를 40회 반복하는 PCR을 시행하였다. p53 cDNA의 +2부터 +810까지의 부분을 증폭하기 위해서, 5'-TCT AGA GCC ACC GTC CAG GGA G-3'과 5'-AAC CTC AGG CGG CTC ATA GGG CA-3'의 시발체를 사용하였으며, +443부터 +1317까지의 부분을 증폭하기 위해서는 5'-ACC AGG GCA GCT ACG GTT TCC GT-3'와 5'-TCA GTC TGA ATC AGG CCC TTC TGT-3'를 사용하였다. Ki-ras 유전자의 1 번과 2 번 exon을 동시에 증폭하기 위해서는 5'-GAC TGA ATA TAA ACG TGT GGT AG-3'와 5'-ACT GGT CCC TCA TTG CAC TG-3'의 시발체를 사용하였다. 증폭된 p53과 Ki-ras exon 부위를 PCR Purification Kits(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 이용하여 남아 있는 primer를 제거하고, 염기서열을 분석하여 돌연변이 여부를 확인하였다. p53은 모든 exon에 대하여 돌연변이 여부를 조사하였으며, Ki-ras는 codon 12, 61, 62에 대하여 중점적으로 조사하였다. 염기서열 분석에는 ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하였다.

4) 통계 분석

식이요인에서 식품군별 분석은 개별 식품항목의 섭취를 주당 섭취량으로 환산하여 각 식품군별로 합한 후에, 대조군에서 이 분포가 이분위되는 수준에 따라 2개군으로 범주화하였다. 식이 섭취량은 Willet 등¹⁴⁾의 방법으로 총 칼로리 섭취량으로 보정을 한 후 분석하였다. PC-SAS 패키지(6.12)를 이용하여 χ^2 또는 Fisher's exact test로 식이습관 등의 환경적 요인과 p53과 Ki-ras 유전자 돌연변이 등의 유전적요인, 그리고 위암발생과 위암조직의 pS2 promoter 과메틸화 여부와의 관련성을 검정하였다.

연구 결과

1. 흡연과 음주습관

흡연여부와 누적흡연량은 환자군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없었다. 음주여부와 주당 알코올 섭취량도 환자군과 대조군 사이에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다(표 1).

Table 1. Gastric cancer risk according to smoking and alcohol consumption

Variables	Number (%)		OR (95% CI)	P-value for χ^2
	Cases	Controls		
Smoking History				
Non-smoker	41 (37.3)	103 (46.8)	1.00	0.099
Smoker	69 (62.7)	117 (53.2)	1.48 (0.93-2.37)	
Cigarette Index*				
0	47 (42.7)	105 (47.7)	1.00	0.779 [‡]
1 - 15	13 (11.8)	23 (10.5)	1.26 (0.59-2.70)	
16 - 34	27 (24.5)	45 (20.5)	1.34 (0.74-2.42)	
35 -	23 (20.9)	47 (21.4)	1.09 (0.60-2.00)	
Alcohol Consumption				
Never	42 (38.2)	96 (43.6)	1.00	0.344
Ever	68 (61.8)	124 (56.4)	1.25 (0.79-2.00)	
Ethanol uptake per week (g/week) [†]				
0	58 (53.7)	115 (52.3)	1.00	0.366 [‡]
≤ 280	27 (25.0)	69 (31.4)	0.78 (0.45-1.34)	
280 <	23 (21.3)	36 (16.4)	1.27 (0.69-2.34)	

*Cigarette index means cigarette consumption in pack times duration of smoking in years.

[†] Ethanol uptake per week (g/week) means average ethanol uptake in gram times the average frequency of alcohol consumption per week during last 12 months.

[‡] P-value for χ^2 trend

2. 식이습관

환자군의 1일평균 총 칼로리 섭취량은 2053.3 ± 1235.7 Cal였 고 대조군은 1684.6 ± 1005.2 Cal였다. 여러 가지 식이습관 중에서 흰빵 · 식빵 · 토스트와 도넛츠 · 파배기, 그리고 피자 등의 밀가루류와 돼지삼겹살과 오리고기, 그리고 간, 쏜세지 등의 육류, 그리고 생선회 또는 흰살생선 구이, 그리고 참치통조림, 고등어통조림 · 꽂치 통조림 등의 어패류, 버터와 마아가린 등의 유지류, 생선초밥 · 김초밥, 튀긴감자 · 볶은감자, 양파, 야채주

스 · 녹즙, 녹두 빈대떡, 찹 · 꿀 · 시럽, 홍차 등을 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 반면에, 버섯류와 수박, 그리고 치즈, 녹차 · 썬차를 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 유의하게 높은 것으로 나타났다. 기타 식이군의 섭취량은 위암발생과 유의한 관련성이 없었다.

3. 위암 조직에서 pS2 유전자 promoter의 과메틸화 및 p53과 Ki-ras 유전자 돌연변이 양상

전체 위암 환자들의 위암 조직으로부터 과메틸화와 유전자 돌연변이를 조사한 결과, pS2 유전자 promoter의 과메틸화는 위암 조직의 40%에서 나타난 반면 p53과 Ki-ras 돌연변이는 각각 위암 조직의 28.2%와 4.9%에서만 관찰되었다(표 2).

Table 2. Frequency of pS2 promoter hypermethylation, p53 mutation and Ki-ras mutation in gastric cancer

Genetic or Epigenetic Change	Number of subjects (%)		
	Yes	No	Total
pS2 hypermethylation	44 (40.0)	66 (60.0)	110 (100)
p53 mutation	31 (28.2)	79 (71.8)	110 (100)
Ki-ras mutation	5 (4.9)	97 (95.1)	102 (100)

4. 흡연, 음주습관과 pS2 유전자 promoter의 과메틸화

pS2 유전자 promoter의 과메틸화와 흡연, 음주습관 사이의 관련성을 분석한 결과 이들 사이에는 유의한 관련성이 없는 것으로 나타났다(표 3).

Table 3. Distribution of pS2 promoter hypermethylation in cases according to smoking and drinking habits

Variables	pS2 hypermethylation (%)		OR (95% CI)	P-value
	Yes	No		
Smoking History				
Never	18 (40.9)	23 (34.8)	1.00	0.520
Ever	26 (59.1)	43 (65.2)	0.77 (0.35-1.70)	
Alcohol Consumption				
Never	18 (40.9)	24 (36.4)	1.00	0.631
Ever	26 (59.1)	42 (63.6)	0.83 (0.38-1.81)	

5. 식이습관에 따른 pS2 유전자 promoter 과메틸화

각종 식이습관에 따른 pS2 유전자 promoter 과메틸화 양상을 분석한 결과, 떡 · 떡볶이와 돼지삼겹살, 그리고 아이스크림을

자주 먹는 경우 pS2 유전자 promoter 의 과메틸화가 유의하게 적은 것으로 관찰되었다(표 5). 반면에, 쌀밥과 닭도리탕 · 백숙 · 삼계탕을 많이 섭취할수록 pS2 유전자 promoter의 과메틸화가 유의하게 많은 것으로 나타났다(표 4).

Table 4. Distribution of cases according to the dietary intake amounts of food items that were statistically associated with pS2 promoter hypermethylation

Variables	<i>p</i> S2 hypermethylation (%)		OR (95% CI)	P-value
	Yes	No		
Steamed rice				
Low	22 (50,0)	44 (68,8)	1,00	0,050
High	22 (50,0)	20 (31,3)	2,20 (0,99-4,86)	
Rice cake				
Low	33 (75,0)	32 (50,0)	1,00	0,009
High	11 (25,0)	32 (50,0)	0,33 (0,14-0,77)	
Lard				
Low	31 (70,5)	28 (43,8)	1,00	0,006
High	13 (29,5)	36 (56,3)	0,33 (0,14-0,74)	
Roast chicken, Boiled chicken, Chicken soup				
Low	13 (29,5)	31 (48,4)	1,00	0,050
High	31 (70,5)	33 (51,6)	2,24 (0,99-5,05)	
Ice cream				
Low	31 (70,5)	30 (49,6)	1,00	0,015
High	13 (29,5)	34 (53,1)	0,37 (0,16-0,83)	

6. pS2 유전자 promoter 과메틸화 여부에 따른 p53 및 Ki-ras 유전자 돌연변이 분포

pS2 유전자 promoter의 과메틸화가 위암관련 유전자의 돌연변이에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 과메틸화에 따른 유전자 돌연변이 정도를 비교하였다.

Table 5. Frequency of p53 and Ki-ras mutations according to pS2 promoter hypermethylation in gastric cancer cases

Variables	<i>p</i> S2 hypermethylation (%)		OR (95% CI)	P-value
	Yes	No		
<i>p53</i>				
No	33 (75.0)	46 (69.7)	1.00	0.545
Yes	11 (25.0)	20 (30.3)	0.77 (0.32-1.81)	
<i>Ki-ras</i>				
No	41 (97.6)	56 (93.3)	1.00	0.324
Yes	1 (2.4)	4 (6.7)	0.34 (0.04-3.17)	

분석결과, pS2 유전자 promoter의 과메틸화는 p53 및 Ki-ras 유전자 돌연변이 여부와 유의한 관련성이 없는 것으로 나타났다(표 5).

고찰

본 연구에서 흡연여부와 음주여부는, Lee 등¹⁵⁾이 한국인을 대상으로 시행한 연구결과와 동일하게, 위암발생 위험도에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 De Stefani 등¹⁶⁾이 남아메리카인을 대상으로 한 연구에서는 음주자가 비음주자에 비하여 위암발생 위험도가 2.4배 높다고 보고되었다. 알코올의 섭취에 의한 위암발생 위험도의 증가는 알코올 대사산물인 아세트알데히드(acetaldehyde)의 발암성 기전으로 설명할 수 있는데, Homann 등¹⁷⁾은 흰쥐를 대상으로 시행한 연구에서, 알코올에 의한 장내 미생물의 산화에 의하여 유발된 아세트알데히드는, 인체에 필수적인 아미노산중의 하나인 엽산의 파괴를 초래할 수 있으며 이로 인한 엽산결핍은 암 발생 위험도를 증가시킬 수 있다고 보고한 바 있다.

총 89가지 식품 중에서 밀가루류와 육류, 그리고 어패류, 유제품, 생선초밥 · 김초밥, 튀김감자 · 볶은감자, 양파, 야채주스 · 녹즙, 녹두 빈대떡, 찜 · 꿀 · 시럽, 홍차 등을 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 본 연구 결과에서 수박과 녹차의 섭취가 위암발생 위험을 유의하게 증가시킨 것으로 나타났다. 다른 과일에서는 유의한 관련성이 관찰되지 않고 수박에서만 이러한 결과가 관찰된 것은 우연에 의한 것일 가능성이 있다. 그 확률을 평가하기는 어렵지만 일부 연구에 의하면 암 환자들은 과일류가 암 발생에 보호효과가 있다는 정보^{18~21)}를 쉽게 접하기 때문에 다량 섭취하는 경향이 있고 이로 인해서 유병환자의 경우 조사 당시의 식이습관을 발병 이전의 식이습관과 혼동해서 과거의 식이습관에 비해 수박을 더 많이 먹는 것으로 잘못 조사되어 나타난 결과일 가능성도 있다. 일본인을 대상으로 한 연구²²⁾에서는 녹차 섭취와 위암발생 간에 관련성이 없는 것으로 나타나 일본인과 한국인에서 녹차가 위암에 미치는 영향이 서로 다르게 나타났다. 이는 인종적 차이, 환경적 요인의 차이에 의해 나타났을 가능성이 있고, 녹차도 최근 대중매체를 통해서 몸에 좋은 것으로 많이 알려지고 있어 수박과 같이 정보 비뚤림의 영향을 받았을 가능성도 있는 것으로 판단된다. 식이습관과 위암발생 사이의 관련성은 여러 인종을 대상으로 시행한 연구결과들마다 각기 서로 다른 양상

을 보여준다. Munoz 등²³⁾이 Venezuela인을 대상으로 시행한 연구에서는 곡물류와 유제품(dairy products)을 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 증가하는 반면에 육류와 생선, 그리고 신선한 야채 등을 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 감소한다고 보고하였다. 스페인²⁴⁾에서는 오래 보관된 생선이나 기름을 함유하고 있는 과일 등을 많이 섭취할수록 위암발생이 증가하는 것으로 나타났다. 중국인을 대상으로 시행한 연구²⁵⁾에서는 감자류나 발효시킨 간장을 많이 섭취할수록 위암발생 위험도가 유의하게 높았다. 이러한 차이는 아마도 민족별로 음식물 보관 법과 조리방법, 또는 식품에 함유된 소금함량에 차이가 있기 때문이거나 동일한 식이요인일지라도 서로 상이한 유전적 소견을 갖고 있는 인종에 미치는 영향이 다르기 때문일 것으로 생각된다.

Trefoil factor 1(TFF1)으로도 불리는 *pS2* 유전자는 에스트로젠(estrogen) 의존성 유방암 관련 유전자로 잘 알려져 있으며 그 발현 정도는 위암발생의 생물학적지표로 이용될 수 있다고 보고된 바 있다.^{26~28)} 본 연구 결과, *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화는 40%의 위암조직에서 관찰되어서 위암의 발생에서 매우 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각된다. Fujimoto 등¹¹⁾이 일본인 위암 환자를 대상으로 조사한 바에 의하면, *pS2* mRNA의 발현이 저하된 위암 환자의 38%에서 promoter의 과메틸화가 있는 것으로 나타났고, 조사된 30명의 위암환자 모두에서 *pS2*의 발현이 없었던 것으로 조사되었다. 이는 위암의 발생에서 *pS2*가 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사하는 것이다.

식이 요인 중 떡볶이와 돼지삼겹살, 그리고 아이스크림을 자주 먹는 경우 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화가 유의하게 적은 것으로 관찰된 반면, 쌀밥과 닭도리탕 · 백숙 · 삼계탕을 많이 섭취할수록 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화가 유의하게 많은 것으로 나타났다. 어미 쥐의 단백질 결핍이 갓 태어난 새끼 쥐 간의 DNA 과메틸화를 야기시킨다는 연구 결과²⁹⁾는 체내 단백질 수준이 과메틸화와 밀접한 관련이 있음을 시사하는 것으로, 본 연구에서도 돼지삼겹살 등의 섭취가 *pS2* 유전자 promoter 과메틸화에 보호효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구에서, 위암환자의 28.2%에서 *p53* 유전자 돌연변이가 관찰되었다. 이는 Hong 등³⁰⁾이 보고한 한국인의 변이율 36%와

는 비슷한 수준이나 이탈리아인이나 네델란드인³¹⁾에서의 65%와 91.2%에 비해서는 매우 낮은 것이다. *Ki-ras*는 4.9%의 변이 양성율을 보였는데 이는 일본인 위암환자에서의 돌연변이 수준 32.33%과는 비슷하지만 이탈리아인 위암환자의 연구결과^{34,35)}에 비하면 낮은 편이다. 이러한 결과들은 돌연변이율을 조사한 방법상의 차이에서 기인하였을 가능성이 있으며, 상술한 유전적 변화가 인종에 따라 차이가 있음을 시사하는 것이다. 또한, 식이요인과 대사효소 유전자 다형성, 그리고 상호작용이 이들 유전적 변화에 미치는 영향에 차이가 있기 때문일 가능성도 배제할 수 없다.

본 연구는 여러 식이항목 89가지를 분석에 포함하여 1종 오류가 발생할 가능성이 크다는 제약이 있으나, 식이항목에 대한 조사는 세분화하지 않으면 결과를 해석하기 어려워 식이역학 분야가 갖는 공통적인 제한점으로 판단된다. 이와 함께 본 연구의 대상자수가 상대적으로 적다는 점 때문에 본 연구결과를 해석함에 있어 주의가 필요할 것으로 판단된다. 이와 함께 본 연구는 설문조사과정에서 나타날 수 있는 비뚤림(bias)을 전부 제거하거나 보완하지 못했다는 점과 위암의 중요한 위험인자인 *H. pylori* 감염 여부와와의 관련성을 보지 못했다는 등의 제한점이 있다. 향후, 이러한 제한점들을 보완한 광범위한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각되며, 이는 다양한 위암 발생 기전을 이해하는데 매우 중요한 기초 자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 연구결과는, 식이습관이 위암의 위험요인으로 매우 중요함을 시사하는 것이다. 또한, *pS2* 유전자 promoter 과메틸화 유무에 따라 식이 요인이 차이를 보이므로, 이러한 식이 요인이 *pS2* 유전자 promoter 과메틸화 발생 가능성을 변화시킴으로써 위암 발병의 민감도에 영향을 미칠 수 있음을 시사하는 것이다. 그러나, 비록 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화는 위암 발생과 관련이 있을 것으로 생각되지만, 이것이 *p53*과 *Ki-ras*의 유전자 돌연변이를 유발하지는 않는 것으로 생각된다. 각종 식이요인은 서로 다른 유전적 변화를 초래할 수 있을 것이며, 이는 위암에 있어서 *pS2* 유전자 promoter의 과메틸화와 *p53*과 *Ki-ras* 등 암 관련 유전자의 돌연변이가 암 발생을 유발하는 각기 서로 다른 기전임을 시사하는 것이다. ㉔

참고문헌

1. 박재갑, 신혜림, 박영석, 배재순, 박병규, 노주원 등. 한국중앙 암등록 사업 연례 보고서. (2001.1 -2001.12) 보건복지부. 2003
2. 서울시 지역암등록 사업단. 서울시 지역암등록 통계. 1992-1995. 서울: 1998
3. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:1090-95.
4. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan ASY, Ho JCI. hMLH1 promoter methylation and Lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with High-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159-164.
5. Kang SH, Mione KC, Yang TP. Role of the promoter in maintaining transcriptionally active chromatin structure and DNA methylation patterns in vivo. *Mol Cell Biol* 2003;23:4150-61.
6. Richardson BC. Role of DNA methylation in the regulation of cell function: autoimmunity, aging and cancer. *J Nutr* 2002;132:2401-5.
7. Kuzmin I, Geil L, Ge H, Bengtsson U, Duh FM, Stanbridge EJ, Lerman MI. Analysis of aberrant methylation of the VHL gene by transgenes, monochromosom transfer, and cell fusion. *Oncogene* 1999;18:5672-9.
8. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001;81:77-82.
9. Rio MC, Chenard MP, Wolf C, Marcellin L, Tomasetto C, Lathe R, et al. Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterol* 1991;100:375-9.
10. Hoosein NM, Thim L, Jorgensen KH, Brattain MG. Growth stimulatory effect of pancreatic spasmolytic polypeptide on cultured colon and breast tumor cells. *FEBS Lett* 1989;247:303-6.
11. Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, et al. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Letters* 2000;149:125-34.
12. 김대성, 구혜원, 김동현, 배종면, 신명희, 이무송, 이충민, 안윤옥. 서울시 중년남성에서 육체적 활동량이 총 사망률에 미치는 영향에 관한 코호트 연구. *예방의학회지* 1998;31(4):608-615.
13. 김미경. 자기기록식 반정량식이섭취 빈도조사의 신뢰도 및 타당도 연구, 서울지역 중년남성을 대상으로. *한양대학교 박사학위논문*. 1995.
14. Willett W, Stampfer MJ. Total energy intake: Implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol* 1986;124:17-27.
15. Lee JK, Park BJ, Yoo KY, Ahn YO. Dietary factors and stomach cancer: a case-control study in Korea. *Int J Epidemiol* 1995;24:33-41.
16. De Stefani E, Boffetta P, Carzoglio J, Mendilaharsu S, Deneo-Pellegrini H. Tobacco smoking and alcohol drinking as risk factors for stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Causes Control* 1998;9:321-9.
17. Homann N, Tillonen J, Salaspuro M. Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency. *Int J Cancer* 2000;86:169-73.
18. Riboli E, Norat T. Cancer prevention and diet: opportunities in Europe. *Public Health Nutr* 2001;4:475-84.
19. Terry P, Lagergren J, Hansen H, Wolk A, Nyren O. Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur J Cancer Prev* 2001;10:365-9.
20. Kono S. Risk factors for stomach cancer. *Nippon Rinsho* 2001;4:13-23.
21. Wu AH, Yang D, Pike MC. A meta-analysis of soyfoods and risk of stomach cancer: the problem of potential confounders. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1051-8.
22. Tsubono Y, Nishino Y, Komatsu S, Hsieh CC, Kanemura S, Tsuji I, et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med* 2001;1:344(9):632-6.
23. Munoz N, Plummer M, Vivas J, Moreno V, De Sanjose S, Lopez G, et al. A case-control study of gastric cancer in Venezuela. *Int J Cancer* 2001;93:417-23.
24. Gonzalez CA, Sanz JM, Marcos G, Pita S, Brullet E, Saigi E, et al. Dietary factors and stomach cancer in Spain: a multi-centre case-control study. *Int J Cancer* 1991;49:513-9.
25. Hu JF, Zhang SF, Jia EM, Wang QQ, Liu SD, Liu YY, et al. Diet and cancer of the stomach: a case-control study in China. *Int J Cancer* 1988;41:331-5.
26. Elizabeth K, George H, Xu JF, Peter L. Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in breast, colon, and gastric tumor cells exposed to X-rays. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002;1:405-15.
27. Suarez C, Vizoso F, Rodriguez JC, Garcia I, Raigoso P, Allende MT, et al. Prognostic significance of cytosolic pS2 protein content in gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2001;16:37-44.

28. Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 1999;188:312-7.
29. Rees WD, Hay SM, Brown DS, Antipatis C, Palmer RM. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutri* 2000;130:1821-6.
30. Hong SI, Hong WS, Jang JJ, Lee DS, Cho NS, Jung ME, et al. Alterations of *p53* gene in primary gastric cancer tissues. *Anticancer Res* 1994;14(3B):1251-5.
31. Sinha R, Caporaso N. Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J Nutr* 1999;129:556S-559S.
32. Takeshima Y, Seyama T, Bennett WP, Akjyama M, Tokuoka S, Inai K, et al. *p53* mutatioes in lung cancers from non-smoking atomic-bomb survivors. *Lancet* 1993;342:1520-1.
33. Tsuchiya C, Ohshima S, Takahama M. Detection of c-Ki-ras oncogene mutation in gastric adenomas with formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy materials. *J Gastroenterol* 1997;32(1):28-33.
34. Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amorosi A, Galli M, et al. Mutations of the Ki-ras and *p53* genes in gastric adenocarcinomas from a High-incidence region around Florence, Italy. *Cancer Res* 1995;55(12):2665-72.
35. Scarpa A, Capelli P, Villaneuva A, Zamboni G, Lluís F, Accolla R, et al. Pancreatic cancer in Europe: Ki-ras gene mutation pattern shows geographical differences. *Int J Cancer* 1994;57:167-71.

[Abstract]

Relationships between diet, hypermethylation of pS2 and mutations of the p53 and Ki-ras genes in gastric cancer patients

Jung-Yup Lee¹, Joo-Seung Park², Hyo-Yung Yun, Taisun Hyun³, Sei Jin Youn⁴,
Yong-Dae Kim⁵, Jong-Won Kang⁵, Heon Kim⁵, Young-Jin Song¹

Departments of Surgery¹, Departments of Internal Medicine⁴, and Departments of Preventive Medicine⁵,
College of Medicine, Chungbuk National University; Department of Surgery, Eulji University, School of Medicine²,
Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University³

Backgrounds	The aim of this study was to investigate effects of dietary factors on hypermethylation in the promoter of <i>pS2</i> gene and on mutations in <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> genes in relationship with hypermethylation of the <i>pS2</i> gene promoter in gastric cancers.
Methods	One hundred and ten patients with stomach cancer and 220 age- and sex-matched controls were enrolled in this study. Information on the level of exposure to dietary factors was obtained by direct interview. The hypermethylation of the <i>pS2</i> gene promoter region and mutations in the <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> genes were investigated with DNA from gastric cancer tissue.
Results	In gastric cancer patients, diet high in steamed rice and chicken such as roast chicken, boiled chicken, chicken soup, and that low in rice cake, lard and ice cream also increased the frequency of hypermethylation of <i>pS2</i> gene promoter. However, hypermethylation of the <i>pS2</i> gene promoter did not influence on the mutations of <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> genes.
Conclusions	The hypermethylation of <i>pS2</i> promoter region would play an important role in the gastric carcinogenesis, but would not induce the genetic mutation of <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> gene in gastric cancer patients. None of the dietary factors was statistically associated with hypermethylation of <i>pS2</i> promoter region and genetic mutation of <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> genes at the same time. It is suggested that hypermethylation of <i>pS2</i> gene promoter, and genetic mutations of <i>p53</i> and <i>Ki-ras</i> genes do not share a common pathway in developing gastric cancer in Koreans.
Key words	Gastric cancer, Environmental carcinogens, Hypermethylation, <i>pS2</i> , <i>p53</i> , <i>Ki-ras</i>

[Korean J Health Promot Dis Prev 2005; 1: 45-53]

• Address for correspondence : Young-Jin Song
Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University
• Tel : +82-43-269-6361
• E-mail : yjsong@cbu.ac.kr