



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2010년 8월
박사학위논문

위샘암종의 발생 및 진행에서
cyclin-dependent kinase 8과
 β -catenin의 역할

조선대학교 대학원

의학과

김 문 영

위샘암종의 발생 및 진행에서
cyclin-dependent kinase 8과
 β -catenin의 역할

Roles of cyclin-dependent kinase 8 and β -catenin in
oncogenesis and progression of gastric
adenocarcinoma

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원
의학과
김 문 영

위샘암종의 발생 및 진행에서
cyclin-dependent kinase 8과
 β -catenin의 역할

지도교수 임 성 철

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2010년 4월 일

조선대학교 대학원

의학과

김 문 영

김문영의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 최 철 희 인

위 원 조선대학교 교수 변 주 남 인

위 원 조선대학교 교수 임 경 준 인

위 원 조선대학교 교수 신 성 희 인

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 인

2010년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차.....	i
도목차.....	ii
Abstract.....	1
서론.....	3
재료 및 방법.....	5
결과.....	11
고찰.....	22
결론.....	26
참고문헌.....	27

표목차

Table 1. Clinical, epidemiologic, and histopathologic characteristics of 60 patients with gastric neoplasm.....	30
Table 2. Immunoreactivity for CDK8 in gastric neoplasm and metastatic lymph node	31
Table 3. Immunoreactivity for β -catenin in gastric neoplasm and metastatic lymph node	32
Table 4. Interrelation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in early gastric carcinoma	33
Table 5. Interrelation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in advanced gastric carcinoma	34
Table 6. Interrelation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in metastatic lymph node	35

도목차

Figure 1. Immunohistochemical staining of gastric adenoma for CDK8.....	38
Figure 2. Immunohistochemical staining of early gastric adenocarcinoma for CDK8.....	38
Figure 3. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for CDK8.....	39
Figure 4. Immunohistochemical staining of gastric adenoma for β -catenin.....	39
Figure 5. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin.....	40
Figure 6. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin.....	40
Figure 7. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin.....	41
Figure 8. Western blot analysis of gastric cancer cell lines for CDK8 and β -catenin.....	41
Figure 9. Effect of CDK8 interference on β -catenin expression in gastric cancer cell lines.....	42

ABSTRACT

**Roles of cyclin-dependent kinase 8 and β -catenin
in oncogenesis and progression of gastric
adenocarcinoma**

Kim, Mun Young

Advisor: Prof. Lim, Sung-Chul, M.D., Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Gastric adenocarcinoma is the second most common cause of cancer-related death in the world. The Wnt/ β -catenin pathway plays an important role in various cancers. However, relatively little is known about the regulatory mechanism of β -catenin in stomach cancer.

To determine the patterns of cyclin-dependent kinase (CDK) 8 and β -catenin expression and the relationship between CDK8 and β -catenin, the author has conducted a study for immunohistochemical staining analysis of tumor tissues (12 adenomas, 24 early gastric carcinomas, 24 advanced gastric carcinomas, and 21 metastatic lymph nodes), and Western blot analysis and CDK8 interference studies of gastric cancer cell lines.

Gastric adenocarcinomas with CDK8 expression had distinct clinical, prognostic and molecular attributes. CDK8 stainability and delocalization of β -catenin expression showed a significant positive correlation with carcinogenesis and tumor progression, especially lymph node metastasis. Immunohistochemically, CDK8 expression in gastric adenocarcinoma was independently associated with β -catenin activation ($p < 0.05$). β -catenin expression was suppressed by CDK8 interference in gastric adenocarcinoma cell lines SNU-601 and SNU-638 cells.

These data support a potential link between CDK8 and β -catenin,

and suggest that CDK8 stainability and β -catenin delocalization may be related to a poor prognosis. Moreover, the interference of CDK8 could be a promising therapeutic modality of gastric adenocarcinoma.

Key Words: Stomach, Adenocarcinoma, CDK8, β -catenin, Immunohistochemistry, Western blot analysis, CDK8 interference

서론

위암은 전 세계적으로 두 번째로 흔한 암 관련 사망의 원인이며 (Hohenberger & Gretschel, 2003) 동아시아, 특히 한국에서 가장 흔한 암이다(Plummer *et al.*, 2004; Headquarters of Korea Central Cancer Registry, 2010). 많은 연구를 통하여 위암의 임상적, 병리학적 특성과 함께 위암의 위험인자에 대한 보고가 있어왔지만 이의 병인에 대해서 아직 완전하게 밝혀진 바는 없다. 최근에 분자병리학적 기술의 발전으로 위암발생에 중요하게 관여하는 분자기전 및 예후관련 인자들에 대한 보고가 있다(Becker *et al.*, 2000; Panani, 2008).

여러 종류의 암 발생 초기 과정에 관여한 Wnt/ β -catenin 경로가 대부분의 대장암(Walther *et al.*, 2009; Powell *et al.*, 1992)과 위암(Zhang & Xue, 2008; Kim *et al.*, 2010)의 발생에도 관여한다. β -catenin은 Wnt 신호전달계에 중추적인데 Wnt는 β -catenin의 안정화에 기여하며 일단 안정화되면 β -catenin이 축적되고 핵으로 이동한다. Wnt/ β -catenin 경로의 조절장애는 대장암의 시작에 중요한 역할을 담당한다(Firestein & Hahn, 2009).

Cyclin-dependent kinase (CDK) 8은 염색체 13 번에 위치하며 전사조절자(transcriptional regulators)와 짝을 이루어 대장암 형성과정에 관여하는 핵심적인 경로의 전사조절에 관여한다(Kim *et al.*, 2006). 또한 β -catenin 의존성 전사 및 종양형성(oncogenesis)은 CDK8의 kinase 활성이 필수적이다(Firestein *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008). 그러나 저자가 확인한 바에 의하면 위암에 관한 CDK8 연구는 아직 보고된 바가 없다. 그러므로 위암세포 및 조직에서 CDK8과 β -catenin의 상호 관련

성을 규명하는 것이 위암의 발생 및 진행에 관한 이해는 물론 위암의 효과적인 치료적 접근에 중요한 단서를 제공할 것으로 추정된다.

이에 저자는 위암 조직을 이용하여 여러 가지 임상병리학적 요소에 따른 CDK8과 β -catenin의 면역조직화학적 발현정도나 양상을 평가하고 CDK8과 β -catenin 상호간의 관련성을 분석하였다. 그리고 위암 조직을 이용한 면역조직화학적 연구결과의 타당성을 확인하기 위하여 위암 세포주를 이용한 분자병리학적 연구를 추가적으로 시행하였다.

재료 및 방법

1. 증례 선정 및 조직채취

2005년부터 2006년까지 약 2년 동안 조선대학교병원에서 조직검사로 확진된 위의 종양 60예를 대상으로 하였는데, 위샘암종 48예(진행성 위샘암종 24예; 조기 위샘암종 24예)와 샘종 12예이다. 진행성 위암의 경우 연령분포는 25-77세(평균 60세), 성비는 남녀 각각 19명과 5명이었다. 조기위암은 30-71세(평균 55세), 성비는 남녀 각각 15명과 9명이었다. 위샘종은 52-86세(평균 64세), 성비는 남녀 각각 11명과 1명이었고 대부분(92%) 관상형(tubular type)이었으며, 저등급 선종 7예, 고등급 선종 5예이었다(Table 1). 수술후 경과는 대상환자 모두 생존하였으며, 진행성 위샘암(림프절 전이 양성) 2예의 경우 국소재발이 있었다. 샘암종의 American Joint Committee on Cancer (AJCC) 조직학적 등급은 분화도에 따라 고분화(저등급, grade 1), 중등도분화(중등급, grade 2) 및 저분화(고등급, grade 3)로 등급화 하였다(Greene et al. 2002). 국소림프절 전이가 초래된 21예(진행성 위샘암종 18예; 조기 위샘암종 3예)는 원발병소인 위병변과 함께 전이가 초래된 림프절을 각각 연구대상에 포함하였다.

2. 조직병리학적 분석

가. 광학현미경적 검사

환자의 임상기록과 병리과 조직 슬라이드 파일을 후향적으로 분석하여

각 종양을 재검토하고 나이, 성별, 종양의 크기, 종양의 조직학적 형태 및 분화도, 종양 침습 깊이, 혈관침습여부, 림프절 또는 원격 전이 유무 등을 확인하였다. AJCC의 TNM staging system에 따라 병기를 정하였다(Greene *et al.* 2002).

관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매조직을 4-5 μm 두께로 박절하여 H&E 염색을 실시하였다. 광학 현미경으로 검경하여 연구목적에 부합되는 대표적인 부위를 선택하여 면역조직화학적 검사를 위한 슬라이드를 제작하였다.

나. 면역조직화학적 검사

파라핀 포매 조직을 4 μm 두께로 박절하고 X-traTM슬라이드 (Surgipath, Richmond, USA)에 부착하여 xylene에 탈 파라핀하였다. 이후 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 흡수시킨 후 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액(10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 압력밥솥(pressure cooker)에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액(TBS, pH 7.5)으로 수 세하였다. 조직절편내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 1차 항체인 mouse monoclonal β -catenin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)과 rabbit polyclonal CDK8 (Santa Cruz Biotechnology)을 1:200 으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 β -catenin은 Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system (Golden Bridge International, Inc., WA, USA)을, CDK8은 Polink-2

HRP plus rabbit DAB detection system (Golden Bridge International, Inc., WA, USA)을 이용하여 술식에 따라 염색을 시행하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Clearmount™ Mounting Solution (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA)으로 봉입하였다.

CDK8의 양성 대조군 다른 연구에서 CDK8 발현이 확인된 유방의 침윤성 관암종을 이용하였고, β -catenin의 양성 대조군은 종양주변의 정상 대장 점막의 발현을 기준으로 하였다. 그리고 음성 대조군으로는 1차 항체 대신 tris 완충액을 사용하였다.

다. 면역조직화학적 염색의 판정

염색의 결과 판정은 주관성을 배제하기 위하여 환자의 임상경과나 관련 검사결과를 알지 못하는 상태에서 시행되었다.

CDK8에 대한 염색은 종양세포의 핵염색을 대상으로 평가하였는데 핵염색이 없는 경우 음성으로 판정하고, 핵염색이 관찰되는 경우 염색강도를 기준으로 약한(weak) 염색, 중등도(moderate) 염색, 강한(strong) 염색으로 구분하였다(Firestein *et al.*, 2009).

β -catenin에 대한 염색은 핵, 세포질 및 세포막 염색을 각각 평가하였으며 이들 각각의 점수는 다음과 같다. 핵 염색점수(2+, positive expression; 1+, weak expression; 0, no expression), 세포질 염색점수(2+, positive expression; 1+, weak expression; 0, no expression), 세포막 염색점수(0, positive membrane expression; 1+, negative membrane expression). β -catenin 염색 결과는 핵, 세포질 및 세포막 염색 정도 평가점수의 합이 3-5에 해당되면 β -catenin이 활성화(active)된 것으로

평가하였고, 0-2에 해당되면 β -catenin이 불활성화(inactive) 된 것으로 평가하였다(Jass *et al.*, 1999).

3. CDK8과 β -catenin의 Western blot analysis

가. 세포배양

인체유래 위샘암종 세포주 SNU-1, SNU-601과 SNU-638을 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank) (Seoul, Korea)에서 구입하여 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL, NY, USA)과 1X antibiotic-antimycotic (GIBCO BRL)이 포함된 RPMI 1640에 배양하였다. 이들 세포주는 항암치료나 방사선 치료를 받은 적이 없는 위의 샘암종에서 수립되었다.

세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10 cm Petri dish에 1.5 x 10⁶ 개의 세포 밀도가 유지되게 분주한 후 하룻밤 배양을 하여 약물처리를 하였다.

나. 시약

Polyclonal rabbit anti-human CDK8 (H-139)와 monoclonal anti- β -catenin (E-5)은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, monoclonal mouse anti-actin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서, ECL system은 Santa Cruz Biotechnology에서 구매하였다. 그리고 기타 세포배양에 필요한 시약은 GIBCO BRL에서 구매하였다.

다. 단백질 분리정제

5 x 10⁵ 개 정도의 세포를 100Ø T/C dish에 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. Trypsin/EDTA로 처리하여 세포를 수확하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 세척한 후 1X CHAPS 용해완충액(10 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1 mM Benaxmidine, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 200 µl로 처리하고 얼음위에서 30 분간 방치한 후 12,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

라. Western blot analysis

배양된 세포를 PBS로 씻고, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 50 mM glycerophosphate, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin 및 10 µg/ml aprotinin으로 용해시켜 원심분리한 후 단백질 양을 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE (15%)를 통하여 분리한 후 nitrocellulose 막에 옮겨 해당 항체를 이용하여 immunoblot을 시행하였다. 반응신호는 ECL system을 이용하여 측정하였다.

4. RNA interference

CDK8 siRNA 5' -GUU UUU GCC GGU UGU CAA A(dTdT)-3' / (S) 5'-UUU GAC AAC CGG CAA AAA C(dTdT)-5' (AS) 와 scrambled RNA (Ctrl RNAi) sequence 5' -CCU ACG CCA CCA

AUU UCG U(dTdT)-3' (S)/ 5'-ACG AAA UUG GUG GCG UAG G(dTdT)-3' (AS)를 BIONEER (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 디자인하고 합성하였다. 위샘암세포주 SNU-1은 JET-PEI reagent (Polyplus-Transfection, France)를 이용하고, SNU-601과 SNU-638은 Amaxa transfection system(Lonza, Levallois-Perret, France)을 이용하여 생산자가 지시하는 술식에 따라 각 세포주당 암세포 10^6 개에 5 μ g siRNA를 transfection 시켰다. Transfection 된 세포들은 48 시간 배양하여 total protein extracts를 얻어 Western blot으로 분석하였다.

5. 통계학적 분석

위샘암종 및 샘종에서 CDK8 및 β -catenin 발현과 여러 임상병리학적 요소들에 관한 통계학적 분석은 χ^2 test, Fisher's exact test, ANOVA, logistic regression analysis를 이용하였으며, 통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 분석에 사용된 프로그램은 Stat View software package (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA)이다.

결 과

1. CDK8의 면역조직화학적 발현

1) 위샘종

12 예의 샘종 중 8 예(66.7%)에서 CDK8 양성을 보였는데(Fig. 1), 이는 통계학적으로 유의한 수준이었다($p < 0.01$). 이는 샘종발생에 CDK8이 관여한다고 할 수 있으며 일부 위샘암종의 경우 위샘종에서 진행됨을 감안하면 위샘암종의 발생 초기단계에 CDK8이 관여한다고 할 수 있다. 양성을 보인 증례를 구분하면 4 예는 약한 양성, 3 예는 중등도 양성, 1 예는 강한 양성을 보였다. 중등도 양성을 보이는 3 예는 모두 고등급 샘종 증례들이었고, 강한 양성을 보인 증례는 국소적으로 악성변화를 보이는 고등급 샘종 증례였다. 따라서 샘종이 고등급화되고 악성화될수록 CDK8의 발현이 증가함을 알 수 있었다(Table 2).

2) 조기 위샘암종

(1) 림프절 전이가 없는 군

1 예를 제외한 20 예(95.2%)에서 CDK8 양성을 보였다(Fig. 2). 양성을 보인 증례를 구분하면 7 예는 약한 양성, 9 예는 중등도 양성, 5 예는 강한 양성을 보였다(Table 2).

(2) 림프절 전이가 있는 군

3 예 모두(100%) CDK8 양성을 보였다. 양성을 보인 증례를 구분하면 1 예는 중등도 양성, 2 예는 강한 양성을 보였다. 조기 위샘암종군에서 림프절 전이 유무에 따른 CDK8의 발현변화는 림프절 전이군이

회소하여 비교평가가 적절하지 못하였으나, 림프절 전이가 있는 군에서 CDK8의 염색강도가 증가하는 경향을 보였다(Table 2).

3) 진행성 위샘암종

(1) 림프절 전이가 없는 군

6 예 모두(100%) CDK8 양성을 보였다. 양성을 보인 증례를 구분하면 2 예는 약한 양성, 1 예는 중등도 양성, 3 예는 강한 양성을 보였다(Table 2).

(2) 림프절 전이가 있는 군

18 예 모두(100%) CDK8 양성을 보였다(Fig. 3). 양성을 보인 증례를 구분하면 4 예는 약한 양성, 7 예는 중등도 양성, 7 예는 강한 양성을 보였다. 진행성 위샘암종군에서 림프절 전이 유무에 따른 CDK8의 발현변화는 림프절 전이가 있는 군에서 CDK8의 염색강도가 통계학적으로 유의하게 증가하는 경향을 보였다($p < 0.001$)(Table 2).

4) 전이성 림프절

(1) 조기 위샘암종 군

3 예 모두(100%) CDK8 양성을 보였는데 모두 강한 양성을 보였다.

(2) 진행성 위샘암종 군

18 예 모두(100%) CDK8 양성을 보였다. 양성을 보인 증례를 구

분하면 8 예는 중등도 양성, 10 예는 강한 양성을 보였다. 전이성 림프절에서 조기 위샘암종군과 진행성 위샘암종군간 CDK8의 발현변화는 조기 위샘암종군이 희소하여 비교평가가 적절하지 못하였으나, 조기 위샘암종이라도 CDK8이 강하게 발현되는 경우 림프절 전이가 용이할 것이라 판단된다(Table 2).

2. β -catenin의 면역조직화학적 발현

β -catenin은 정상적으로 세포막을 따라 염색이 되는데, 종양의 경우 세포막이 아닌 다른 부위에서 발현되는 탈국지화(delocalization)가 관찰된다. 이에 β -catenin의 핵내 발현, 세포질내 발현은 물론 세포막 발현의 변화를 중심으로 구분하여 관찰하였다.

1) 위샘종

(1) 핵내 발현

12 예 모두(100%) 핵내 발현이 없었다(Table 3).

(2) 세포질내 발현

12 예 모두(100%) 세포질내 발현이 없었다(Table 3).

(3) 세포막 발현

9 예(75%)는 세포막 발현이 유지되었으나 3 예(25%)는 세포막 발현이 감소하였다(Fig. 4). 세포막 발현이 감소된 3예는 국소적으로 악성 변화를 보이는 고등급 샘종을 포함하여 모두 고등급 샘종이었다(Table 3).

(4) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

12 예 모두(100%) β -catenin의 활성화가 초래되지 않았다(Table 3).

2) 조기 위샘암종

(1) 림프절 전이가 없는 군

i) 핵내 발현

1 예(5%)에서 핵내 염색이 관찰되었다(Table 3).

ii) 세포질내 발현

6 예(29%)에서 세포질내 염색이 관찰되었는데, 이들 중 4 예(19%)는 약한 발현을 보였고, 나머지 2 예(10%)는 중등도/강한 발현을 보였다(Table 3).

iii) 세포막 발현

10 예(48%)는 세포막 발현이 유지되었으나 11 예(52%)는 세포막 발현이 소실되었다(Table 3).

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

3 예(14%)에서 활성화가 초래되었다(Table 3).

(2) 림프절 전이가 있는 군

i) 핵내 발현

3 예 모두(100%) 핵내 발현이 관찰되지 않았다(Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 증례수의 제한과 모든 증례에서 음성을 보여 β -catenin의 핵내발현과 림프절 전이의 상관관계는 평가할 수 없었다.

ii) 세포질내 발현

1 예(33%)에서 약한 세포질내 발현이 관찰되었다(Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 β -catenin의 세포질내 발현과 림프절 전이는 유의한 상관관계가 없었다.

iii) 세포막 발현

1 예(33%)는 세포막 발현이 유지되었으나 2 예(67%)는 세포막 발현이 소실되었다(Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 β -catenin의 세포막 발현 소실과 림프절 전이는 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.01$). 즉, 조기 위암에서 림프절 전이는 β -catenin의 세포막 발현 소실과 양의 상관관계가 있었다.

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

3 예 모두(100%) 활성화가 초래되지 않았다(Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 증례수의 제한과 모든 증례에서 활성화가 초래되지 않아 β -catenin 발현 종합점수(활성화)와 림프절 전이의 상관관계는 평가할 수 없었다.

3) 진행성 위샘암종

(1) 림프절 전이가 없는 군

i) 핵내 발현

2 예(33%)에서 약한 핵내 염색이 관찰되었다(Fig. 5) (Table 3).

ii) 세포질내 발현

2 예(33%)에서 약한 세포질내 염색이 관찰되었다(Fig. 6) (Table 3).

iii) 세포막 발현

2 예(33%)는 세포막 발현이 유지되었으나 4예(67%)는 세포막 발현이 소실되었다(Table 3).

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

2 예(33%)에서 활성화가 초래되었다(Table 3).

(2) 림프절 전이가 있는 군

i) 핵내 발현

3 예(17%)에서 핵내 염색이 관찰되었는데, 2 예는 약한 발현, 1 예는 중등도/강한 발현을 보였다(Table 3).

ii) 세포질내 발현

9 예(50%)에서 세포질내 염색이 관찰되었는데, 이들 중 6 예(33%)는 약한 발현을 보였고, 나머지 3 예(17%)는 중등도/강한 발현을 보였다(Table 3).

림프절 전이가 없는 군과 비교시 β -catenin의 세포질내 발현과 림프절 전이는 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.05$). 즉, 진행성 위암에서 림프절 전이는 β -catenin의 세포질내 발현유무 및 발현 강도와 양의 상관관계가 있었다.

iii) 세포막 발현

5 예(28%)는 세포막 발현이 유지되었으나 13 예(72%)는 세포막 발현이 소실되었다(Fig. 7) (Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 β -catenin의 세포막 발현 소실과 림프절 전이는 유의한 상관관계가 없었다.

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

6 예(33%)에서 β -catenin의 활성화가 초래되었다(Table 3). 림프절 전이가 없는 군과 비교시 β -catenin의 발현 종합점수(활성화)와 림프절 전이는 유의한 상관관계가 없었다.

4) 전이성 림프절

(1) 조기 위암암종 군

i) 핵내 발현

1 예(33%)에서 약한 핵내 발현을 보였다(Table 3).

ii) 세포질내 발현

1 예(33%)에서 약한 세포질내 발현을 보였다(Table 3).

iii) 세포막 발현

1 예(33%)는 세포막 발현이 유지되었으나 2예(67%)는 세포막 발현이 소실되었다(Table 3).

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

1 예(33%)에서 β -catenin의 활성화가 초래되었다(Table 3).

(2) 진행성 위암암종 군

i) 핵내 발현

4 예(22%)에서 핵내 염색이 관찰되었는데, 3 예는 약한 발현, 1 예는 중등도/강한 발현을 보였다(Table 3).

ii) 세포질내 발현

10 예(55%)에서 세포질내 염색이 관찰되었는데, 이들 중 6 예(33%)는 약한 발현을 보였고, 나머지 4 예(22%)는 중등도/강한 발현을 보였다(Table 3). 조기 위암군과 비교시 진행성 위암군은 전이성 림프절내 β -catenin의 세포질내 발현과 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.05$). 즉, 진행성 위암군에서 β -catenin의 세포질내 발현이 강하게 관찰되는 경우 림프절 전이가 용이할 것이라는 예측이 가능할 것으로 판단된다.(Table 3).

iii) 세포막 발현

3 예(17%)는 세포막 발현이 유지되었으나 15 예(83%)는 세포막 발현이 소실되었다(Table 3). 조기 위암군과 비교시 진행성 위암군은 β -catenin의 세포막 발현 소실과 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.01$).

iv) β -catenin 발현 종합점수(활성화)

8 예(44%)에서 β -catenin의 활성화가 초래되었다. 조기 위암군과 비교시 진행성 위암군은 β -catenin의 발현 종합점수(활성화)와 유의한 상관관계가 있었다($p < 0.05$) (Table 3).

3. CDK8과 β -catenin의 면역조직화학적 반응 관계

1) 조기 위샘암종

CDK8 발현 강도에 따른 β -catenin의 발현양상을 관찰한 결과 β -catenin의 핵내 염색, 세포질내 염색은 통계적으로 유의한 상관관계가 없었으나, CDK8 발현 강도가 증가할수록 β -catenin의 탈국지화(핵내 염색, 세포질내 염색)가 초래되는 경향을 보였다. 한편, CDK8 발현 강도에 따른 β -catenin의 세포막 발현 소실은 통계적으로 유의하여 ($p < 0.001$), 조기 위샘암종 종양세포의 CDK8 발현강도가 증가할수록 β -catenin의 세포막 발현 소실이 나타났다(Table 4).

2) 진행성 위샘암종

CDK8 발현 강도에 따른 β -catenin의 발현양상을 관찰한 결과 β -catenin의 핵내 염색, 세포질내 염색은 물론 세포막 발현 소실은 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.005$, $p < 0.001$). 즉, CDK8 발현강도가 증가할수록 진행성 위샘암종 종양세포의 β -catenin 핵내 염색, 세포질내 염색은 물론 세포막 발현 소실이 나타났다(Table 5).

3) 전이성 림프절

CDK8 발현 강도에 따른 β -catenin의 발현양상을 관찰한 결과 β -catenin의 핵내 염색, 세포질내 염색은 물론 세포막 발현 소실은 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$). 즉, CDK8 발현강도가 증가할수록 전이성 림프절내 종양세포의 β -catenin 핵내 염색, 세포질내 염색은 물론 세포막 발현 소실이 나타났다(Table 6).

4. 위암 세포주 연구

1) Western blot analysis

(1) CDK8의 발현 양상

위암 세포주를 배양하여 CDK8을 측정된 결과 SNU-638 세포주에서 강하게 발현되었으나 SNU-1 및 SNU-601 세포주는 약하게 발현되었다(Fig. 8). 이는 면역조직화학적 염색의 결과에서 나타났듯이 위암에 CDK8 이 관여하고 있음을 시사한다.

(2) β -catenin 발현양상

위암 세포주를 배양하여 β -catenin을 측정된 결과 SNU-638 세포주에서 강하게 발현되었다. 그러나 SNU-1 및 SNU-601의 경우는 β -catenin의 발현이 SNU-638에 비하여 매우 약하게 발현되었다 (Fig. 8). 이는 면역조직화학적 염색의 결과에서 보인 바와 같이 위암에 CDK8과 관계하여 β -catenin이 발현될 수 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

(3) 혈청인자 배제 실험

CDK8과 β -catenin의 관계를 명확하게 하기 위하여 위암 세포주 배양액에서 10% FBS를 제외하고 24 시간 동안 배양하였다. CDK8은 SNU-1, SNU-601 및 SNU-638 세포주 모두에서 혈청인자가 배제된 상황에서 약간 감소하였다. 그러나 β -catenin은 혈청인자 존재 유무에 관계없이 약하게 발현되었다(Fig. 8).

2) CDK8 siRNA 처리에 따른 β -catenin 변화

CDK8 간섭을 일으켜 위암 세포주 SNU-1, SNU-601과 SNU-638의 β -catenin 발현을 측정된 결과 SNU-638과 SNU-601의 경우 β -catenin 발현이 감소하였는데 SNU-638에서 현저하였다. 그러나 이들의 경우 CDK8 간섭에 의하여 완전하게 억제하지는 못하였다. 또한 SNU-1의 경우는 β -catenin 발현이 대조군조차 매우 약하여 CDK8 간섭 효과를 적절하게 평가할 수가 없었다(Fig. 9).

고찰

종양은 Wnt 신호전달계 조절의 이상으로 초래되는데 β -catenin, APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β), axin이나 *Wnt* 유전자의 돌연변이 등에 의하여 발생된다. 이 중에서 다기능성(multifunctional) plasmosin의 일종인 β -catenin은 결정적 조절자(critical regulator)일 뿐만 아니라 cadherin 복합체의 주요성분이다 (Yonemura *et al.*, 2000; Flatmark *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2006). 정상세포에서 β -catenin은 E-cadherin에 결합하여 세포부착에 기여하지만(Takeichi, 1991; Ozawa *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 2000), Wnt 신호가 활성화되면 β -catenin의 인산화(phosphorylation)와 분해(degradation)가 억제되어 세포질에 축적된 β -catenin은 결국 핵으로 이동하여 전사인자(transcription factor)에 결합되어 세포증식에 기여한다 (Stein *et al.*, 2006).

CDK8의 활성화는 대장점막에서 샘암종이 발생하는 β -catenin 의존성 종양형성(oncogenesis)에 필수적이라는 보고(Firestein *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008)가 있지만 위(stomach)에 대한 연구는 저자가 아는 한 없다. 다만 전임상 시험(preclinical trials)을 통하여 CDK 억제제가 세포의 고사(apoptosis)를 유도하거나 세포의 분화를 촉진하고 혈관형성을 억제하며 전사(transcription)를 조절할 수 있다고 보고되었다 (Senderowicz & Sausville, 2000). 기존의 항암제와 병합요법(combination therapy)에 CDK 억제제가 긍정적인 효과를 보인다는 임상시험(clinical trials)이 보고된 바 있다(Arguello *et al.*, 1998; Zhai *et al.*, 2002; Senderowicz, 2003). 이를 토대로 인체 위암의 발생, 진행 및

전이에 CDK8 및 β -catenin이 어떤 역할을 하며 상호 어떤 관련성이 있는지를 파악하는 것은 위암의 병인에 대한 폭넓은 이해를 제공함은 물론 효과적인 예방 및 치료법을 제안할 수 있는 중요한 단서가 될 것이다.

본 연구결과에 의하면 CDK8은 위샘종에서 유의하게 발현되고 조기 위암을 포함한 위암군에서 유의하게 발현이 증가하여 위암발생의 초기 단계에 CDK8이 관여하고 있음을 짐작할 수 있었다. 또한 림프절 전이 유무에 따라 CDK8의 발현이 유의한 양의 상관관계를 보인 점은 위암의 진행 특히 전이에도 관여하고 있음을 나타낸다.

한편 β -catenin의 탈국지화는 위샘종과 샘암종간, 그리고 위샘종의 림프절 전이유무와 유의한 양의 상관관계가 있었고, 특히 세포질내 염색은 진행성 위샘암종의 림프절 전이가 있는 군과 진행성 위샘암종의 림프절 전이병변에서 유의한 상관관계가 있었다. 막염색의 소실은 조기 위암종의 림프절 전이가 있는 군과 진행성 위샘암종의 림프절 전이병변에서 유의한 상관관계가 있었다. 이로서 β -catenin의 탈국지화, 특히 세포질내 발현 및 막염색 소실은 위암발생의 초기단계부터 관여하며 위암의 진행 특히 전이에도 관여하고 있음을 나타낸다.

CDK8과 β -catenin 상호관계를 살펴보면 조기위암의 경우는 CDK8의 염색강도와 β -catenin의 막염색 소실정도가 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 보였고, 진행성 위암과 전이성 림프절의 경우는 CDK8의 염색강도와 β -catenin의 핵 또는 세포질내 발현은 물론 막염색 소실정도가 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 보였다. 이는 암의 진행 특히 전이에 CDK8 및 β -catenin이 깊이 관여하며, β -catenin의 탈국지화가 중요한 역할을 담당하고 있음을 나타낸다. 또한 CDK8의 발현이 증가함에 따라 β -catenin의 탈국지화가 초래될 수 있음도 나타낸다. 이와 같은

소견은 CDK8 module 구성요소인 MED12, MED13이 β -catenin 활성의 조절자로서 작용을 한다는 보고(Firestein & Hahn, 2009; Casamassimi & Napoli, 2007; Gold & Rice, 1998)와 CDK8이 β -catenin을 억제하는 E2F1을 억제하여 간접적으로 β -catenin을 증가시킬 수 있다는 보고 (Morris *et al.*, 2008)와 일치한다. 따라서 본 연구의 면역조직화학적 분석 결과를 바탕으로 위암에서 CDK8을 통한 WNT/ β -catenin 신호경로 조절이 가능한지에 대한 연구가 필요하다.

위암에서 CDK8과 β -catenin의 상관관계를 구체적으로 확인하기 위하여 실시한 위샘암 세포주를 이용한 실험에서 위암세포주는 모두 CDK8을 발현하였으며, β -catenin은 CDK8 의존성 발현을 보여 CDK8이 강하게 발현된 SNU-638에서 강하게 발현되었다. 혈청인자 배제후 시행된 Western blot 분석 결과에서 혈청인자 배제시 CDK8이 감소하게 되고 β -catenin도 동반하여 감소하는 현상은 CDK8에 의하여 β -catenin 발현이 주도적으로 영향을 받는다는 것을 나타낸다. 또한 위암세포주에 siRNA를 이용하여 CDK8 간섭을 초래한 후 β -catenin 발현변화를 분석한 결과 현저한 감소를 보였다. 이런 결과는 대장암에서 β -catenin의 translation 후 수정자 역할을 CDK8만이 유일하게 담당할 것이라는 Firestein 등(2008)의 주장을 뒷받침한다. Firestein 등(2008)의 주장에 근거하여 CDK8 조절을 통한 일반적인 대장암치료 가능성을 강력히 제시한 것을 일부 특정의 대장암에 국한된 이론으로 수정되어야 타당할 것이라는 연구보고(Seo *et al.*, 2010)가 있었다. 본 연구결과에 따르면 CDK8 조절을 통한 위샘암종 치료 가능성은 대장암과 마찬가지로 특정의 일부 위샘암종에 적용가능한 이론임을 알 수 있다.

본 연구를 통하여 위암의 발생, 진행 및 전이과정에 CDK8 및 β -catenin이 깊이 관여하고 있으며 CDK8과 β -catenin은 상호 밀접한

관련성을 지니고 발현되며 CDK8에 의하여 β -catenin 발현이 조절됨을 알 수 있었다. 이와 같은 연구결과는 위암의 발병인자로 CDK8 및 β -catenin을 고려하여야 하며, 이들을 예후 예측인자로 활용할 수 있을 뿐 아니라 CDK8을 통한 β -catenin 조절로 위샘암종의 치료적 접근이 가능할 수 있음을 나타낸다.

결 론

위샘암종은 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 한국에서 여전히 암사망을 일으키는 수위의 질환이다. 최근 Wnt/ β -catenin 경로에 대한 연구를 통하여 새로운 치료법 개발이 시도되고 있는데 CDK8과 β -catenin 간의 관계에 대한 연구가 그 중 하나이다.

저자는 위샘종 및 위샘암종 조직을 이용한 면역조직화학적 염색을 통하여 CDK8의 발현과 β -catenin의 탈국지화가 종양형성, 진행 및 전이와 유의한 관련성이 있으며 CDK8과 β -catenin의 면역조직화학적 발현 간 밀접한 상호관련성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 위샘암종 세포주(SNU-1, SNU-601 및 SNU-638)를 이용한 실험에서 CDK8과 β -catenin의 관련성을 확인하고, CDK8 간섭실험에서 CDK8 억제를 통한 효과적인 β -catenin 차단이 가능함을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면 CDK8 및 β -catenin 발현은 위샘암종의 발생, 진행 및 전이에 중요한 역할을 담당하고 있으며 이들 상호간 밀접한 연관이 있어 CDK8을 통한 β -catenin의 효과적인 차단이 위샘암종 치료에 적용될 수 있을 것으로 추정된다.

참고문헌

Arguello F, Alexander M, Sterry JA, Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF Jr, Koss W, Morgan CD, Stinson SF, Siford TJ, Alvord WG, Klabansky RL, Sausville EA. Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity In vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* 91:2482-90, 1998

Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 9: 5-11, 2000

Casamassimi A, Napoli C. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* 89: 1439 - 46, 2007

Firestein R, Bass AJ, Kim SY, Dunn IF, Silver SJ, Guney I, Freed E, Ligon AH, Vena N, Ogino S, Chheda MG, Tamayo P, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 455: 547-51, 2008

Firestein R, Hahn WC. Revving the Throttle on an oncogene: CDK8 takes the driver seat. *Cancer Res* 15;69: 7899-901, 2009

Flatmark K, Pedersen KB, Nesland JM, Rasmussen H, Aamodt G, Mikalsen SO, Bjørnland K, Fodstad Ø, Maelandsmo GM. Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer. *J Pathol* 200:589-95, 2003

Gold MO, Rice AP. Targeting of CDK8 to a promoterproximal RNA element demonstrates catalysis dependent activation of gene expression. *Nucleic Acids Res* 26: 3784 - 8, 1998

Greene FL, Page DL, Fleming ID. *AJCC cancer staging manual*, 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002

Headquarters of Korea Central Cancer Registry, Cancer Registry System in Korea. <http://ncc.re.kr/index.jsp>, accessed 5 January 2010

Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet* 26; 362: 305-15, 2003

Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, et al. Characterisation of a

subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 52: 455-60, 1999

Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R, Imai T, Wang C, Chen X, Konishi I. Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* 97:1061-9, 2006

Kim S, Xu X, Hecht A, Boyer TG. Mediator is a transducer of Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 281: 14066-75, 2006

Kim B, Byun SJ, Kim YA, Kim JE, Lee BL, Kim WH, Chang MS. Cell cycle regulators, APC/beta-catenin, NF-kappaB and Epstein-Barr virus in gastric carcinomas. *Pathology* 42: 58-65, 2010

Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, Sasaki T. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 16:1125-31, 2000

Morris EJ, Ji JY, Yang F, Di Stefano L, Herr A, Moon NS, Kwon EJ, Haigis KM, Naar AM, Dyson NJ. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature* 455: 552-6, 2008

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8:1711-7, 1989

Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett* 8; 266 :99-115, 2008

Plummer M, Franceschi S, Muñoz N. Epidemiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 157: 311-26, 2004

Senderowicz AM. Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene*. 22(42):6609-20, 2003

Senderowicz AM, Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst* 92:376-87,

2000

Seo JO, Han SI, Lim SC. Role of CDK8 and β -catenin in colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 24: 285-91, 2010

Stein U, Arlt F, Walther W, Smith J, Waldman T, Harris ED, Mertins SD, Heizmann CW, Allard D, Birchmeier W, Schlag PM, Shoemaker RH. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131: 1486-500, 2006

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 22;251:1451-5, 1991

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 489-99, 2009

Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 6: 4234-42, 2000

Zhai S, Senderowicz AM, Sausville EA, Figg WD. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. *Ann Pharmacother* 36:905-11, 2002

Zhang H, Xue Y. Wnt pathway is involved in advanced gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 55: 1126-30, 2008

Table 1. Clinical, epidemiologic, and histopathologic characteristics of 60 patients with gastric neoplasm

Characteristic	AGC(%)	EGC(%)	Adenoma(%)	Total
No. of patients	24(40)	24(40)	12(20)	60
Age(yrs.)				
Mean	60.1	54.7	64.2	
Range	25-77	30-71	52-86	
Gender				
Male	19(79)	15(63)	11(92)	45
Female	5(21)	9(37)	1(8)	15
Lymph node metastasis				
Yes	18(75)	3(13)		
No	6(25)	21(87)		
Histopathologic grade				
W/D	2(8)	6(25)	L/G 7(58.3)	
M/D	10(42)	6(25)	H/G 5(41.7)	
P/D	12(50)	12(50)		
Lauren's type				
Intestinal	13(54)	16(67)		
Diffuse	6(25)	6(25)		
Mixed	5(21)	2(8)		
Histologic type				
Tubular			11(92) *	
Villous			0	
Villotubular			1(8)	

AGC, advanced gastric carcinoma; EGC, early gastric carcinoma; W/D, well differentiated; M/D, moderately differentiated; P/D, poorly differentiated; L/G, low grade; H/G, high grade.

* A case of focal malignant transformation was included.

Table 2. Immunoreactivity for CDK8 in gastric neoplasm and metastatic lymph node

Immuno- reactivity	AGC(%)		EGC(%)		Adenoma [†] (%)	Meta-LN(%)	
	LN- / LN+	LN- / LN+	LN- / LN+	LN- / LN+		AGC	EGC
Negative	0	0	1(4.8)	0	4(33.3)	0	0
Positive [‡]	6(100)	18(100)	20(95.2)	3(100)	8(66.7)	18(100)	3(100)
Weak	2	4	7	0	4	0	0
Moderate	1	7	9	1	3	8	0
Strong	3	7	5	2	1*	10	3
<u>Total</u>	<u>6</u>	<u>18</u>	<u>21</u>	<u>3</u>	<u>12</u>	<u>18</u>	<u>3</u>

AGC, advanced gastric carcinoma; EGC, early gastric carcinoma; Meta-LN, metastatic lymph node; LN-, negative lymph node metastasis; LN+, positive lymph node metastasis

* A case of focal malignant transformation is included.

[†] Immunoreactivity is statistically significant in the adenoma group patients, $p < 0.01$

[‡] Immunoreactivity has a statistically significant positive correlation with lymph node metastasis in the AGC group, $p < 0.001$

Table 3. Immunoreactivity for β -catenin in gastric neoplasm and metastatic lymph node

Immuno-reactivity	AGC(%)		EGC(%)		Adenoma* (%)	Meta-LN(%)	
	LN- / LN+	LN- / LN+	LN- / LN+	LN- / LN+		AGC	EGC
Nucleus							
-	4(67)	15(83)	20(95)	3(100)	12(100)	14(78)	2(67)
1+	2(33)	2(11)	1(5)	0	0	3(17)	1(33)
2+	0	1(6)	0	0	0	1(5)	0
Cytoplasm [†]							
-	4(67)	9(50)	15(71)	2(67)	12(100)	8(44)	2(67)
1+	2(33)	6(33)	4(19)	1(33)	0	6(33)	1(33)
2+	0	3(17)	2(10)	0	0	4(22)	0
Membrane [‡]							
Expressed	2(33)	5(28)	10(48)	1(33)	9(75)	3(17)	1(33)
Lost(1+)	4(67)	13(72)	11(52)	2(67)	3(25) [*]	15(83)	2(67)
Overall score ^{§§}							
0-2(inactive)	4(67)	12(67)	18(86)	3(100)	12(100)	10(56)	2(67)
3-5(active)	2(33)	6(33)	3(14)	0	0	8(44)	1(33)
Total	6	18	21	3	12	18	3

AGC, advanced gastric carcinoma; EGC, early gastric carcinoma; Meta-LN, metastatic lymph node; LN-, negative lymph node metastasis; LN+, positive lymph node metastasis

* A case of focal malignant transformation is included.

[†] β -catenin score is calculated as the sum of nuclear (0-2), cytoplasmic (0-2) and membrane (0-1) scores as described in the materials and methods.

[†] Cytoplasmic immunoreactivity has a statistically significant positive correlation in the AGC LN+ group and AGC Meta-LN groups, $p < 0.05$

[‡] Loss of membranous immunoreactivity has a statistically significant positive correlation in the EGC LN+ group and AGC Meta-LN group, $p < 0.01$

[§] Overall score has a statistically significant positive correlation in the AGC Meta-LN group, $p < 0.05$

Table 4. Relation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in early gastric carcinoma (EGC)

β -catenin \ CDK8	weak(%) (n=7)	moderate(%) (n=10)	strong(%) (n=7)	p value
Nucleus				
- (n=23)	7(100)	10(100)	6(86)	
+ (n=1)	0	0	1(14)	
Cytoplasm				
- (n=17)	7(100)	6(60)	4(57)	
+ (n=7)	0	4(40)	3(43)	
Membrane				<0.001*
expressed (n=11)	6(86)	4(40)	1(14)	
lost (n=13)	1(14)	6(60)	6(86)	

*Loss of membranous staining of β -catenin and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in the EGC group, $p < 0.001$

Table 5. Relation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in advanced gastric carcinoma (AGC)

β -catenin \ CDK8	weak(%) (n=6)	moderate(%) (n=8)	strong(%) (n=10)	p value
Nucleus				<0.05*
- (n=19)	6(100)	6(75)	7(70)	
+ (n=5)	0	2(25)	3(30)	
Cytoplasm				<0.005 [†]
- (n=13)	5(83)	6(75)	2(20)	
+ (n=11)	1(17)	2(25)	8(80)	
Membrane				<0.001 [‡]
expressed (n=7)	6(100)	1(13)	0	
lost (n=17)	0	7(87)	10(100)	

* β -catenin delocalization in the nucleus and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in the AGC group, $p < 0.05$

[†] β -catenin delocalization in the cytoplasm and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in the AGC group, $p < 0.005$

[‡] Loss of membranous staining of β -catenin and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in the AGC group, $p < 0.001$

Table 6. Relation between the immunoreactivity of β -catenin and CDK8 in metastatic lymph node

β -catenin \ CDK8	weak(%) (n=0)	moderate(%) (n=8)	strong(%) (n=13)	p value
Nucleus				<0.05*
- (n=16)	0	7(88)	9(69)	
+ (n=5)	0	1(12)	4(31)	
Cytoplasm				<0.01 [†]
- (n=10)	0	8(100)	2(15)	
+ (n=11)	0	0	11(85)	
Membrane				<0.005 [‡]
expressed (n=4)	0	4(50)	0	
lost (n=17)	0	4(50)	13(100)	

* β -catenin delocalization in the nucleus and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in metastatic lymph node, $p < 0.05$

[†] β -catenin delocalization in the cytoplasm and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in metastatic lymph node, $p < 0.01$

[‡] Loss of membranous staining of β -catenin and CDK8 stainability has a statistically significant positive correlation in metastatic lymph node, $p < 0.005$

그림 설명

Figure 1. Immunohistochemical staining of gastric adenoma for CDK8. Diffuse nuclear staining was identified. Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 2. Immunohistochemical staining of early gastric adenocarcinoma for CDK8. Nuclear staining was identified weakly. Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 3. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for CDK8. Diffuse strong nuclear staining was identified. Polink-2 HRP plus rabbit DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 4. Immunohistochemical staining of gastric adenoma for β -catenin. a: Distinct membranous staining was demonstrated, b: Loss of membranous staining was identified. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 5. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin. Delocalization of β -catenin in the nucleus was noted. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 6. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin. Delocalization of β -catenin in the cytoplasm was noted. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 7. Immunohistochemical staining of advanced gastric adenocarcinoma for β -catenin. Loss of membranous β -catenin expression was identified. Polink-2 HRP plus mouse DAB detection system, counterstained by hematoxylin.

Figure 8. Western blot analysis of gastric cancer cell lines for CDK8 and β -catenin. Each cell line expressed CDK8 and β -catenin. After serum starvation for 24 h, CDK8 level was decreased in each cell line.

Figure 9. Effect of CDK8 interference on β -catenin expression in gastric cancer cell lines. Significant suppression of β -catenin was identified in each cell line.

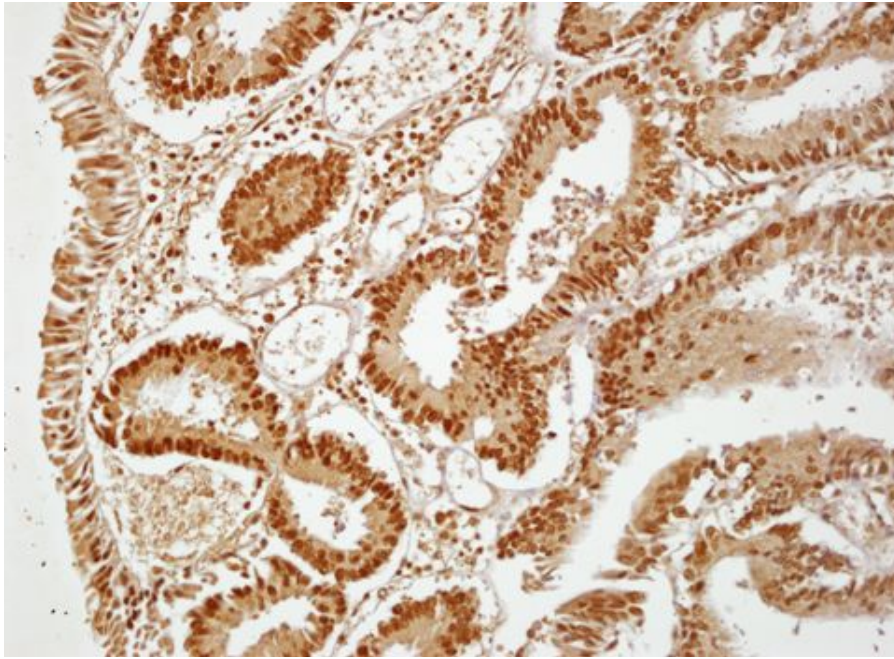


Figure 1

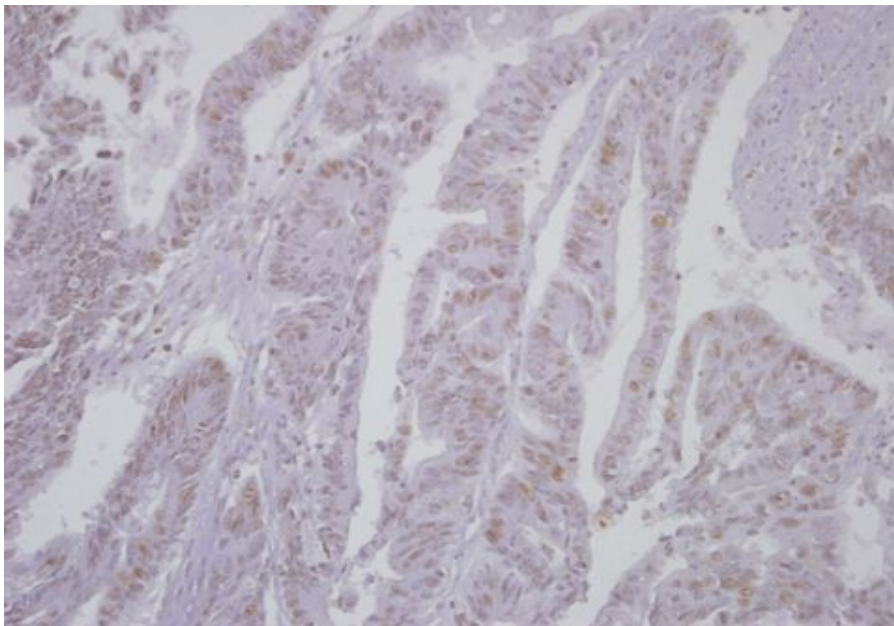


Figure 2

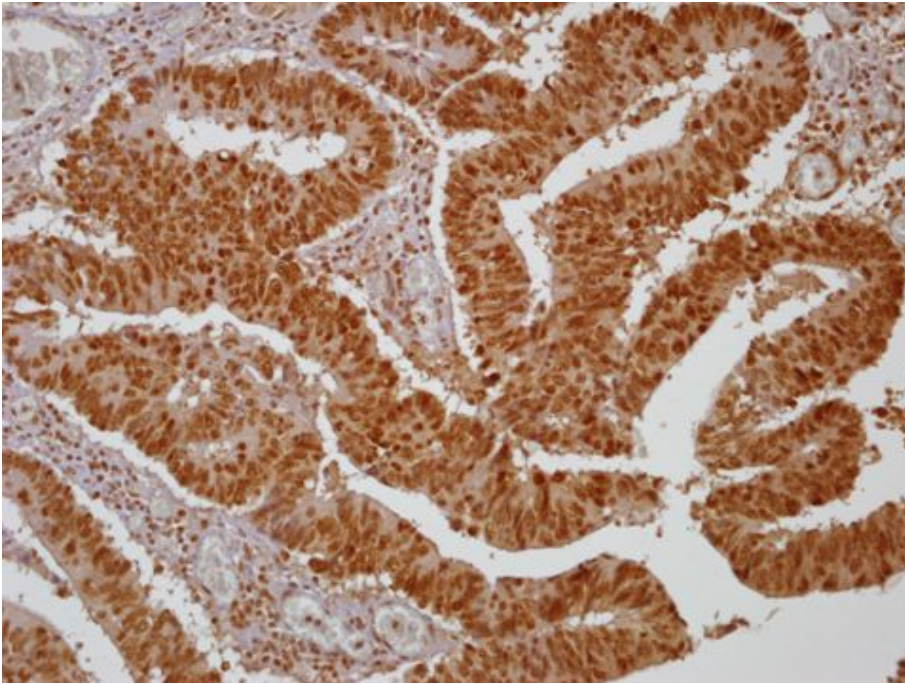


Figure 3

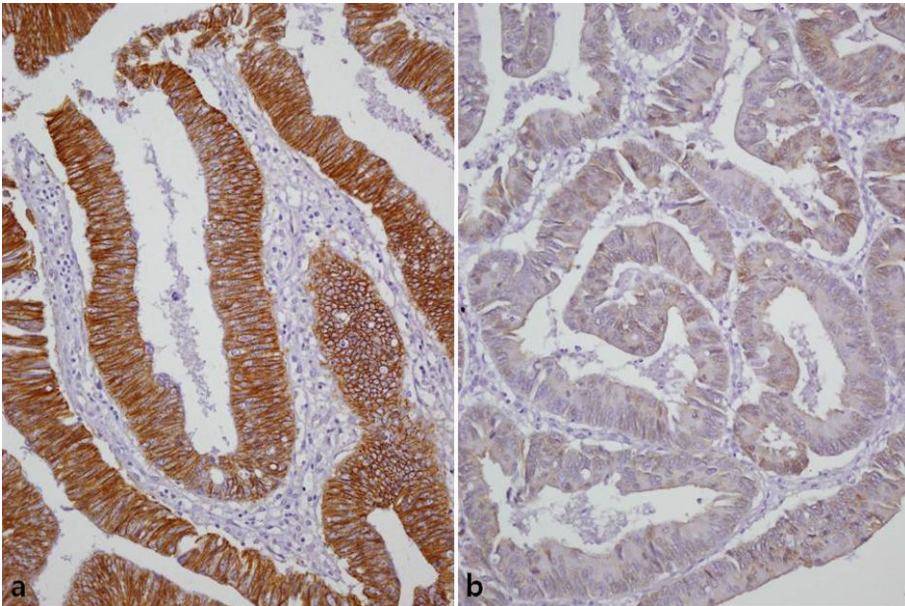


Figure 4

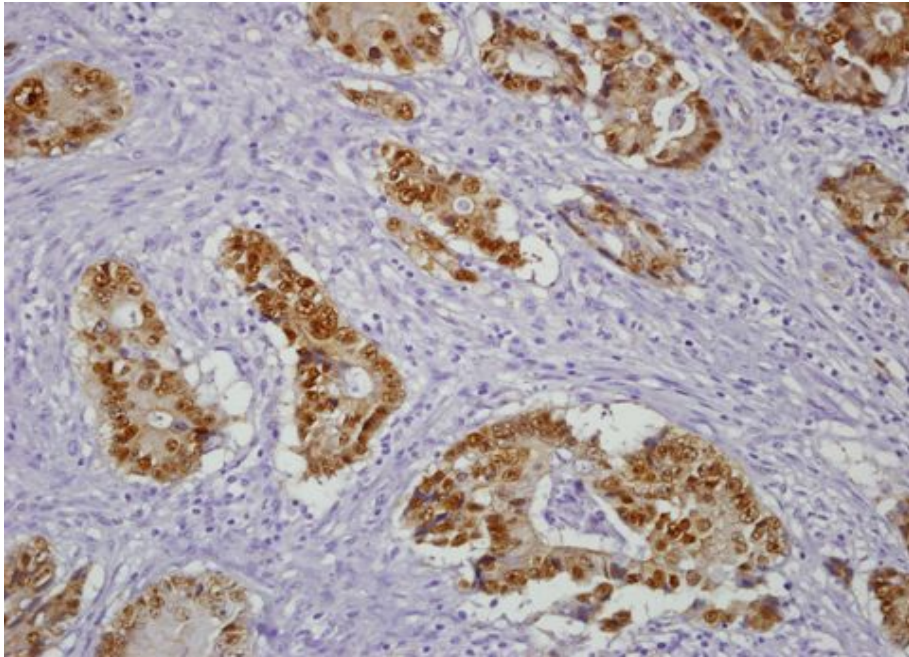


Figure 5

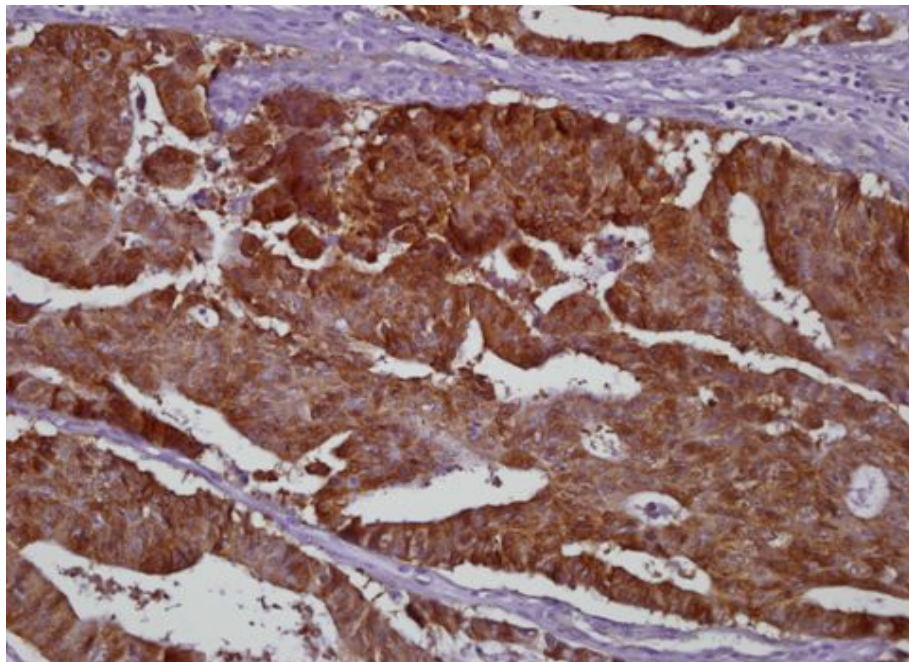


Figure 6

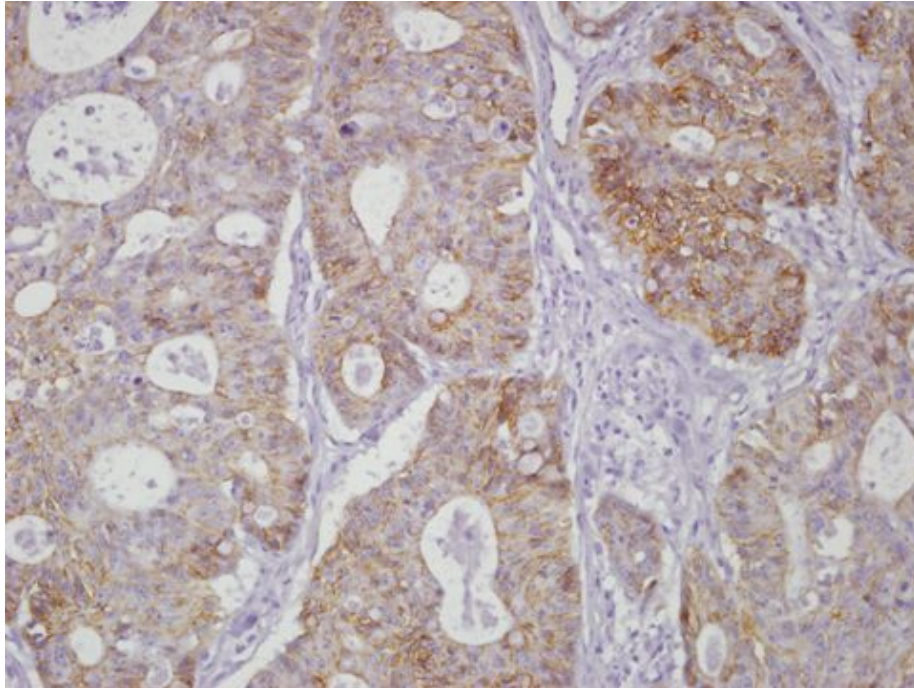


Figure 7

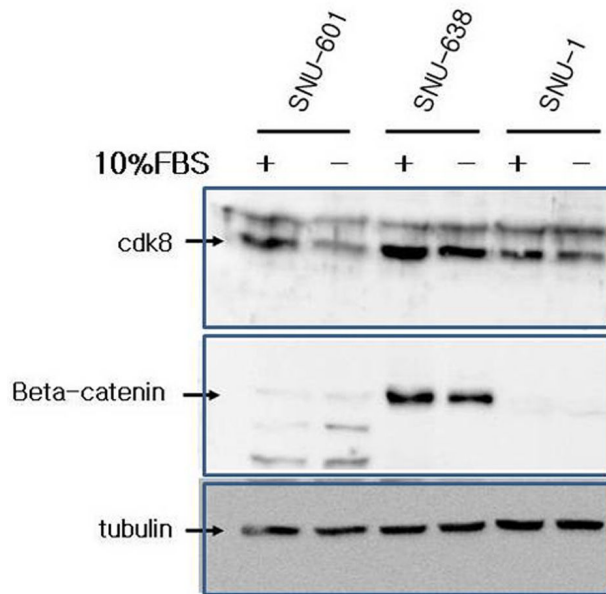


Figure 8

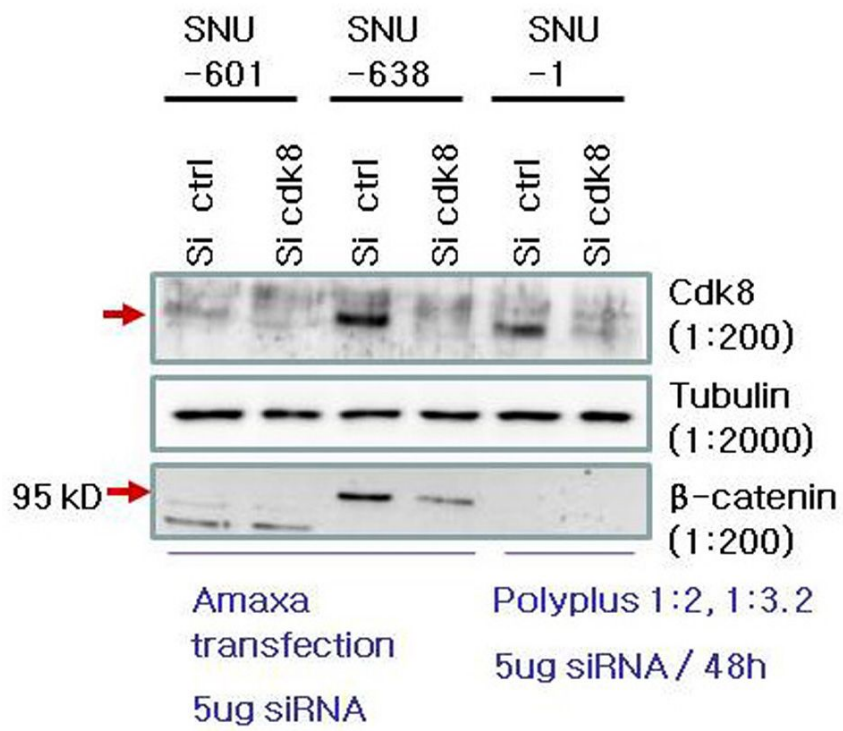


Figure 9

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20087546	과 정	박사학위과정
성 명	한글: 김 문 영 한문: 金 文 永 영문: Kim Mun Young				
주 소	광주시 서구 치평동 중흥아파트 101동 703호				
연락처	011-9440-2058				
논문제목	한글 : 위샘암종의 발생 및 진행에서 cyclin-dependent kinase 8과 β -catenin의 역할 영문 : Roles of cyclin-dependent kinase 8 and β -catenin in oncogenesis and progression of gastric adenocarcinoma				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2010년 6월 30일

저작자: 김 문 영 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하