

인간 뇌 신경교종에 있어서 c-myc 암유전자 발현의 *in situ hybridization* 검색*

계명대학교 의과대학 신경외과학교실, 미생물학교실¹, 병리학교실³,
울산대학교 의과대학 서울중앙병원 신경외과²

손은의 · 서민호¹ · 이정교² · 권건영³ · 김동원 · 임만민 · 김인홍

서 론

분자생물학적인 많은 연구방법들의 개발로 인해 과거에는 접근하기 매우 어려웠던 암화과정에 대한 연구가 깊이 있게 다루어지고 있다^{1~4)}. 세포의 분화 및 증식에 중요한 역할을 수행하는 암유전자의 특성이 규명되어감에 따라 특정한 암에는 특정한 암유전자들의 이상이 나타난다는 것이 발견되어 암의 분자생물학적 진단이라는 새로운 진단영역이 대두 되게 되었으며, 이들 유전자와 유전자산물은 암의 예후 혹은 암의 치료에 대한 반응도와 밀접한 관계가 있음이 알려져서 암의 분자생물학적인 예후추정 및 치료효과판정이 임상에 적용되기 시작했다^{5~10)}.

여러가지 암유전자 중에서 c-myc 암유전자는 avian myeloblastosis virus에서 처음 발견되었으며, 유방암, 자궁경부암, 소세포폐암, 대장암, 두경부종양 등에서 유전자의 증폭이나 과발현이 관찰되었고, 이와 유사한 n-myc암유전자의 발현은 인간 신경아세포종(neuroblastoma)의 stage 및 예후와 밀접한 관계가 있음이 보고되었다^{11~13)}.

저자들은 인간의 뇌 신경교종에 있어서 c-myc암유전자의 발현양상 및 암의 grade와 암유전자 발현도와의 관련성을 조직세포수준에서 직접 검사하고자, 비교적 간편하면서도 심도 깊은 결과를 얻을 수 있는 분자생물학적 기법인 *in situ hybridization*^{14~17)}을 이용하여 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

연구대상은 동산의료원 신경외과를 통하여 적출되고 병리조직학적으로 확진된 low grade glioma 2례와 high grade glioma 3례 및 정상뇌조직 1례의 병리조직표본을 대상으로 하였다. 병변부위에서 채취한 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매 시킨후 박절하여 H & E 염색 및 *in situ hybridization*을 시행하였다¹⁵⁾.

2. c-myc 암유전자 probe

human neuroendocrine tumor line인 COLO 320의 HSR(homogeneously staining region) 부위를 pUC18 plasmid vector에 cloning 한것을 제한효소 EcoRI과 Hind III로 자른 8.2Kb의 c-myc DNA를 Rigby등의 방법에 의해 biotin labelled-11-deoxy uridine triphosphate(dUTP)로 nick translation시킨 탐지자를 probe로 사용하였다^{16,17)}.

3. *in situ hybridization*

파라핀으로 포매된 조직을 6μm 두께로 박절한 후 3-amino propyltriethoxysilane으로 전처치한 특수 스테이드그라스 위에 부착시키고 60°C에서 1시간 부란하여 조직을 고정시켰다. 이것을 xylene과 ethanol을 사용하여 탈 파라핀과정을 거치고 proteinase K 용액을 접종하고 37°C에서 15분간 반응시켰다. 여기에 3% 과산화수소수를 가하여 조직내의 비특이적 peroxidase를 제거 시킨후 ethanol로 탈수과정을 시행하였다. 그후 biotin 표지된 c-myc probe액을 접종하고 커버그라스로 덮은후 92°C에서 10분간 처리하여 DNA를 denaturation 시킨후 37°C에서 30분간 부란하여 hybridization을 시켰다. 여기에 streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex를 접종하고 37°C에서 15분 부란시킨후 2% 3-amino-9-

* 이 논문은 1992년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

ethylcarbazole과 과산화 수소가 함유된 발색기질액을 접종하여 37°C에서 15분간 발색시켰다. 이것을 fast-green으로 대조염색한 뒤 광학현미경 200배로 검색하였다^{14,16,17)}.

4. c-myc 암유전자 발현의 판정

현미경 200배율로 암유전자의 시그날(dark-red color)을 확인하여 세포질마다 5~10개 정도의 grain들로 시그날이 발색되는 것이 전시야의 50% 미만일 경우를 경도(+)로, 세포질마다 10개이상의 시그날이 발현된 경우가 전시야의 50% 이상일때를 강도(++)로, 경도와 강도의 중간을 중등도(++)로, 경도 이하의 것을 (±)로 판정하였다^{16,17)}.

결 과

인간에 있어서 뇌 신경교종의 c-myc 암유전자에 대한 *in situ* hybridization 결과 c-myc probe와 세포질내의 c-myc RNA 사이의 hybridization 산물인 암적색의 grain들이 관찰되었는데 c-myc 암유전자 산물(c-myc RNA)들이 암세포의 세포질에 풍부하게 존재하였고 핵내의 c-myc DNA 자체의 증가는 관찰되지 않았다. low grade glioma의 경우 중등도(++)의 hybridization grain들이 관찰되어 c-myc 암유전자의 발현 증가를 보였다(Fig. 1. B). high grade glioma의 경우는 강도(++)의 hybridization grain들이 관찰되어 c-myc 암유전자 발현의 강한 증가를 보였다(Fig. 2. B). 그반면에 정상뇌조직에서는 hybridization

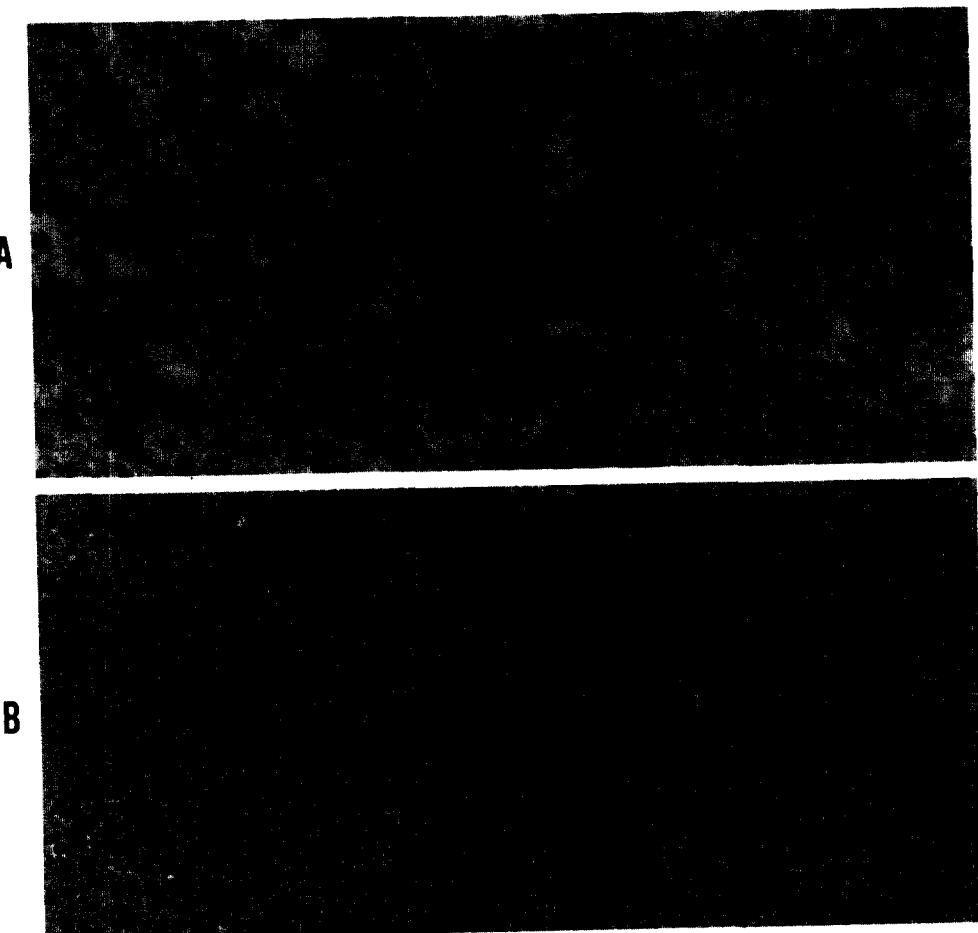


Fig. 1. *In situ* hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded low grade glioma of human brain section with biotin-labeled c-myc oncogene DNA probe. (A) Hematoxylin & eosin stained low grade glioma (x200). (B) Many cytoplasmic grains(dark red color) indicate increased expression of c-myc oncogene (counterstained with fast green, x200).

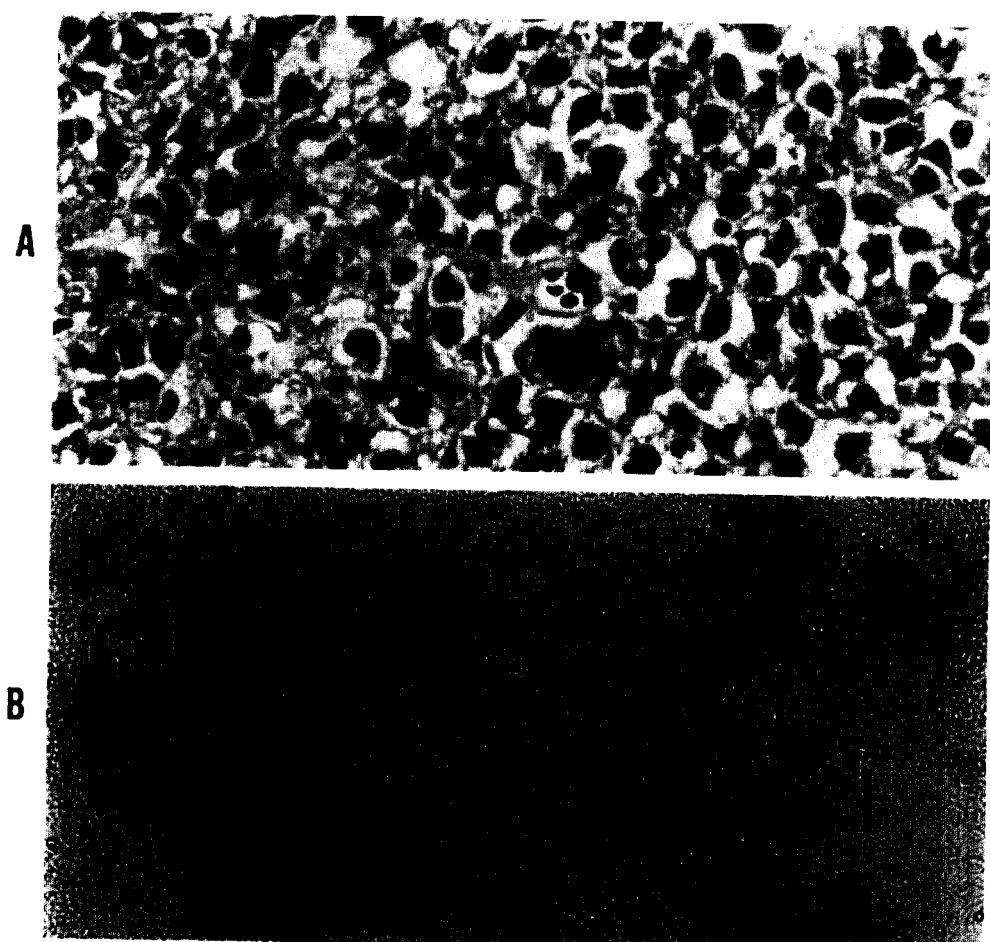


Fig. 2. In situ hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded high grade glioma of human brain section with biotin-labeled c-myc oncogene DNA probe. (A) Hematoxylin & eosin stained high grade glioma (x200). (B) Numerous cytoplasmic grains (dark red color) indicate very strong expression of c-myc oncogene (counterstained with fast green, x200).

grain들이 (\pm)로 아주 드물게 관찰되어 정상뇌조직에서는 약한 c-myc 유전자 발현만을 보였다(Table 1).

고 찰

암유전자는 1969년 미국 국립암연구소의 Huebner와 Todaro에 의해 처음 기술된 이후로 암화과정에 관여하는 많은 단백질의 규명과, 이를 지령하는 유전자의 규명 및 유전자 발현과정에 관여하는 인자들에 대한 많은 연구를 통해, 암유전자는 세포의 기본적인 활동, 즉 분화 및 증식에 중요한 역할을 하는 유전자임이 밝혀졌다^{11,18~24)}.

Table 1. c-myc oncogene expressions in low grade and high grade glioma of human brain detected by in situ hybridization

Case	Grade of glioma	c-myc expressions in microscopic field
1	Low	++
2	Low	++
3	High	+++
4	High	+++
5	High	+++
6	Normal	\pm

Remark: \pm very weak, ++ intermediate, +++ strong.

정상적인 세포성 암유전자가 활성화되는 기전으로는 암유전자 DNA 자체의 반복에 의한 증폭^{12,13,25-30)}, 암유전자 염기서열상의 점 돌연변이³¹⁻³³⁾, 염색체의 전위³⁴⁾ 또는 promoter의 변화로 인한 암유전자 RNA의 과발현⁵⁻¹⁰⁾, 또는 암단백질의 과발현^{35,36)} 등이 보고되어 있다.

소세포 폐암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 방광암 등에서 발현이상으로 보고되어 있는 c-myc암유전자는 DNA결합단백을 자령하여 세포의 핵내에서 활동하며, 유전자 발현을 조절하는 중요한 기능을 수행하는 것으로 생각되고 있으며, 주로 c-myc DNA 자체의 증폭이나, 전사증가로 인한 c-myc RNA의 과발현이 종양발생에 관계한다고 보고되어 있다¹¹⁻¹³⁾.

최근에 특정한 암유전자의 증폭이나 과발현이 특정한 암의 병기 분류(staging) 및 예후판정에 쓰일 수 있음이 보고되어 임상종양학 분야에 적용되기 시작했다⁵⁻¹⁰⁾. 그중에서도 인간 신경아 세포종의 stage와 N-myc암유전자 DNA증폭도와의 관계는 밀접한 관계가 있음이 밝혀졌고, DNA증폭도가 높을수록 예후가 나쁘다는 것이 규명되었다²⁵⁻²⁷⁾. 그러나 신경교종에 있어서의 암유전자에 대한 연구는 드물며 신경교종의 grade와 암유전자의 관련성에 대한 보고는 찾아 볼수가 없다. 이에 저자들은 조직절편상에서 직접 표적 유전자의 발현도를 조사하는 *in situ hybridization* 기법¹⁴⁻¹⁷⁾을 이용하여 신경교종의 grade별 c-myc암유전자의 발현도를 조사하였다. 그 결과 정상 뇌조직에서는 c-myc암유전자의 발현이 약하였으며, low grade glioma는 중등도의 c-myc암유전자의 발현을 보였고, high grade glioma는 c-myc암유전자의 강한 발현을 보였다. 이것은 c-myc암유전자의 발현도와 신경교종의 grade와 밀접한 관계가 있음을 시사하는 것이며, c-myc암유전자의 과발현이 신경교종의 병기 분류에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각되나, 현재로서는 증례가 적어서 통계학적인 의의를 부여하기 곤란하며, 향후 많은 증례에 있어서의 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 악

인간 뇌 신경교종에서의 c-myc 암유전자의 발현 양상 및 암의 grade와 암유전자 발현도와의 관련성을 조직세포수준에서 직접 검색하기 위하여, 파라핀포매된 low grade glioma 2례, high grade glioma 3례 및 정상뇌조직 1례에 대한 *in situ hybridization*을

실시하였다.

c-myc 암유전자의 발현은 정상뇌조직에서는 매우 낮았으며(\pm), low grade glioma에서는 중등도(++) 의 발현을, high grade glioma에서는 강도(+++)의 발현을 보였다. 이와같은 결과는 glioma의 암화과정과 c-myc암유전자발현 간에 밀접한 관계가 있음을 시사하며, c-myc 암유전자의 발현이 증가할수록 glioma의 grade(암세포의 악성도)가 더욱 증가한다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Bishop JM: The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-311.
2. Weinberg RA: The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 1985; 230: 770-776.
3. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983; 222: 771-778.
4. Ponten J: Oncogenes for the oncologist. *Acta Oncol* 1987; 1: 3-12.
5. de Jong D, Voetdijk BMH, Beverstock GC, et al: Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med* 1988; 318: 1373-1378.
6. Farwell J, Flannery JT: Cancer in relatives of children with central-nervous-system neoplasms. *N Engl J Med* 1984; 311: 749-753.
7. Henry JA, Nicholson S, Hennessy C, et al: Expression of the oestrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer: relation to oestrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy. *Br J Cancer* 1989; 61: 32-38.
8. Vijver MV, Peterse JL, Moor WJ, et al: Neu-protein overexpression in breast cancer. *N Engl J Med* 1988; 319: 1239-1245.
9. Forrester K, Almoguera C, Han K, et al: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298-303.
10. Saglio G, Camaschella C, Giai M, et al: Distribution of Ha-ras-1 proto-oncogene alleles in breast cancer patients and in a control population. *Breast Ca Res Treat* 1988; 11: 147-153.
11. Sheiness D, Bishop JM: DNA and RNA from uni-

- nfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 1979; 31: 514-521.
12. Saksela K, Bergh J, Lehto VP, et al: Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human small cell lung cancer. *Cancer Res* 1985; 45: 1823-1827.
 13. Alitalo K, Schwab M: Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 1986; 47: 235-281.
 14. Brahim M, Haase AT: Detection of viral sequences of low titeration frequency by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 6125-6129.
 15. Ostrow RS, Manias DA, Clark BA, et al: Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinoma of the cervix by in situ hybridization. *Cancer Res* 1987; 47: 649-653.
 16. 이동후, 이중달 : 간세포 암 조직표본내 유전자 재결합 반응기법에 의한 간염B형 바이러스 DNA 검색. 대한 소화기병학회잡지 1988; 20: 112-117.
 17. 정영락, 박성수, 이동후 외 : 편평세포성 폐암의 c-Ha-ras 암유전자 발현에 관한 in situ hybridization 검색. 대한의학회지 1990; 33: 160-166.
 18. Huebner RJ, Todaro GJ: Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64: 1087-1094.
 19. Cooper GM: Cellular transforming genes. *Science* 1982; 218: 801-806.
 20. Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA: Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med* 1988; 318: 618-622.
 21. Nowell PC: Molecular events in tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 575-577.
 22. Elvin P, Kerr IB, McArdle CS, et al: Isolation and preliminary characterisation of cDNA clones representing mRNAs associated with tumour progression and metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1988; 59: 36-42.
 23. Knudson AG Jr: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-1443.
 24. Bishop JM: Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 301-354.
 25. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313: 1111-1116.
 26. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-1124.
 27. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; 305: 245-248.
 28. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
 29. Parkes HC, Lillycrop K, Howell A, et al: c-erbB₂ mRNA expression in human breast tumours: Comparison with c-erb B₂ DNA. *Br J Cancer* 1990; 61: 39-45.
 30. 문한림, 한치화, 김훈교 외 : 두경부 편평상피암 조직에서 c-myc 종양 유전자의 증폭 대한암학회지 1990; 22: 32-36.
 31. Reddy EP, Reynolds PK, Santos E, et al: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982; 300: 149-152.
 32. Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, et al: Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982; 300: 762-765.
 33. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, et al: Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 1983; 302: 33-37.
 34. Cory S: Activation of cellular oncogenes in hematopoietic. *Adv Cancer Res* 1986; 47: 189-234.
 35. Klein EA, Fair WR, Chaganti RSK: Molecular and cytogenetic events in urologic tumors. *Semin Urol* 1988; 6: 2-21.
 36. Olumi AF, Skinner EC, Tsai YC, et al: Molecular analysis of human bladder cancer. *Semin Urol* 1990; 7: 270-277.

=Abstract=

Expression of c-myc Oncogene in Glioma of Human Brain by In Situ Hybridization

Eun Ik Son, MD; Min Ho Suh¹, MD; Jeong Kyo Lee², MD; Kun Young Kwon³, MD;
Dong Won Kim, MD; Man Bin Yim, MD; In Hong Kim, MD

*Department of Neurosurgery, Microbiology¹, and Pathology³
Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea
and Department of Neurosurgery², College of Medicine,
University of Ulsan, Seoul, Korea*

In order to elucidate the relationship between c-myc oncogene expression and tumor grade in human brain glioma, we studied two low grade gliomas, three high grade gliomas, and one normal brain tissue with in situ hybridization and biotin-labeled c-myc probe. All the specimens were formalin fixed and paraffin-embedded.

Many cytoplasmic c-myc RNA grains were observed in low grade glioma, and numerous cytoplasmic c-myc RNA grains were observed in high grade glioma, but only a few were seen in normal brain tissue.

In conclusion, these findings show that there is direct relationship between the degree of c-myc oncogene expression and grading of glioma.

Key Words: Brain tumor, c-myc, Glioma, In situ hybridization, Oncogene