

미만성 대세포림프종의 Retinoblastoma Gene 2/p130분석†

연세원주의대 병리학교실, 아주대학교 의과학연구소*

박광화 · 정순희 · 이광길 · 강엽*

Analysis of Retinoblastoma Gene 2/p130 in Diffuse Large Cell Lymphomas

Kwang Hwa Park, M.D., Soon Hee Jung, M.D., Kwang Gil Le, M.D., Yup Kang, M.D.*

*Department of Pathology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju,
and Ajou University Research Institute for Medical Science*, Suwon, Korea*

Abstract : A Retinoblastoma-related gene 2/p130 (*pRb2/p130*), which belongs to Rb family, was recently discovered. There were no studies about *pRb2/p130* and mutation of tumor in contrast to this fact that *pRb/p105* was related to various kinds of other cancer. There are many well known cancer genes, which are related to the diffuse large cell lymphoma (DLCL), but no researches have so far been made at the study of the mutation of *pRb2/p130*. Therefore, we have been made this study to show the features of mutation of *pRb2/p130* in DLCL. For the research materials, we used the 10 frozen tissues, which were diagnosed as DLCL. Eight out of them were diffuse large B cell lymphoma (DLBL), and two were Burkitt's lymphoma (BL). After we extracted the DNA from the frozen tissues, then we did PCR about the *pRB/p130* exon 19, 20, 21, 22, after that, we directly analyzed the sequence of an amplified DNA. However, there were no mutation of *pRb2/p130* in both DLBL 8 and BL 2. In this research, we can infer that there is no relationship between the cancer development of this tumor and the mutation of *pRb2/p130* because there was no sign of mutation in the DLBL and sporadic BL and the exon 19, 20, 21, 22 of *pRb2/p130*. When we compare this with the results of a former research, which had suggested the existence of lots of mutations of *pRb2/p130* in endemic (Burkitt's lymphoma), we can find that the non-existence of mutation of *pRb2/p130* at DLBL indicates that DLBL is different from the endemic and it is one of the characteristics which are different from the carcinogenesis and in the light of classification based on molecular biology.

† 이 논문은 연세 학술 연구비 지원으로 이루어짐.

Key words : Burkitt's lymphoma, Diffuse large B cell lymphoma, Direct sequencing, Mutation, Retinoblastoma-related gene/p130.

서 론

Retinoblastoma-related gene 2/p130 (*pRb2/p130*)은 최근에 클론된 유전자로 *pRb/p105*나 *Rb/p107* 같이 retinoblastoma계의 유전자이다[1]. 이 단백질들은 서로 비슷한 염기서열을 가지고 있고 동시에 E2F와 결합하거나 transcriptional activity에 있어서도 같은 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [2]. 하지만 *pRb/p105*가 휴지기 및 증식세포 모두에서 발현되는 반면에 *pRb2/p130*와 *pRb/p107*은 모두 세포주기에 있는 세포에서만 나타난다[3]. *pRb2/p130*이 E2F에 결합하는 것은 주로 G0기에서 발견되나 *pRb/p107*은 G1과 S기에서 나타난다[4]. *pRb/p105*가 종양억제 유전자로 여러 종양에서 종양 발생에 있어 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으나, 이에 비해 그 아형인 *pRb2/p130*와 사람 암에 대한 관련성은 알려진 바가 별로 없다. 최근에 AIDS와 관련된 산발성 Burkitt림프종(BL)에서 wild type *pRb2/p130*을 보이는 반면에, 대부분의 풍토성 Burkitt림프종에서는 돌연변이를 보이는 특징이 발견되어 Burkitt림프종의 아형들이 서로 다른 발생기전을 가지는 것으로 생각되고 있다[5].

미만성 대세포림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBL)은 하나의 질병으로 생각되기보다는 여러 림프종들이 공통적인 병리학적, 임상적 특징을 보이는 질병 군으로 여겨진다[6]. 또한 일부의 DLBL은 BL과 병리학적으로 매우 유사한 형태적, 면역학적 소견을 보여 두 종양의 구별이 어려운 경우도 있다. 따라서 DLBL과 BL에서 *pRb2/p130*이 서로 다른 변이양상을 보인다면 이들 종양의 진단에 있어서 그리고 종양의 발생기전과 분류에 있어서 중요한 근거를 제공해 주리라 생각된다. 저자들은 이 연구에서는 DLCL

의 *pRb2/p130*을 직접 염기서열을 분석하는 방법으로 조사하여 DLCL의 *pRb2/p130* 변이양상을 조사하였다.

재료 및 방법

원주기독병원에서 생검하여 조직학적 소견과 면역조직화학염색에 의해 진단된 10례를 대상으로 하였다. DLBL과 BL은 각각 조직학적인 소견과 CD20, CD3, CD5, CD30, Ki-67, bcl-2, 및 *c-myc* 등에 대한 면역조직화학 염색을 통해 WHO 분류법에 따라 분류하였다[6]. DNA의 추출은 생검한 후에 -70°C 동결보관된 조직에서 종양의 괴사가 없고 방사선요법이나 화학요법을 받기 전의 조직을 선정하여 시행하였다. 연구 대상의 임상 소견과 병리 진단은 Table 1과 같다.

동결 조직에서 DNA isolation kit (Boehringer Mannheim사, 미국)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 400 mg의 조직에 10 mL의 cellular lysis buffer를 넣고 조직이 미세한 현탁액으로 되기까지 파쇄하였다. Proteinase K 용액 6.1 μ L를 넣고 진탕한 다음, 65°C에서 1시간동안 두었다. RNAase 용액 400 μ L를 넣고 2-3초 동안 진탕한 후에 37°C에 15분간 두었다. Protein precipitation solution 4.2 mL를 넣고 5-10초간 진탕한 후에 얼음에 5분간 두었다. 상온에서 15,000 rpm으로 원심분리한 다음 침전물이 섞이지 않게 상층액을 얻었다. 상층액의 0.7배 정도의 isopropanol을 추가하여 위 아래로 부드럽게 섞어 준 후에 2,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 10 mL의 4°C 에탄올을 넣었다. 2,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 에탄올이 보이지 않기가 완전히 말린 다음 TE buffer(pH 8.0) 1 mL

Table 1. Clinical characteristics of cases studied

Case No.	Age	Sex	Location	Diagnosis
1	49	M	Lymph node	DLBL
2	60	M	Soft tissue and lymph node	DLBL
3	61	M	Lymph node	DLBL
4	70	M	Lymph node	DLBL
5	68	F	Stomach and lymph node	DLBL
6	84	M	Lymph node	DLBL
7	43	F	Breast	DLBL
8	38	M	Colon	DLBL
9	7	F	Colon and ovary	BL
10	6	M	Tonsil	BL

DLBL: diffuse large B cell lymphoma; BL: Burkitt's lymphoma .

를 넣고 4°C에서 하룻밤을 두었다.

*pRb2/p130*의 B 도메인과 C 말단부의 19, 20, 21, 22 엑손을 PCR과 직접 염기서열분석을 통해 분석하였다. PCR 반응량은 50 μ L로 제논 DNA가 최종농도 4 ng/L, 4가지 deoxynucleotide triphosphates가 각각 0.2 mmol/L, taq polymerase(Takara사, 일본)가 2 U, 시발체(Table 2)가 각각의 최종농도 0.4 mol/L가 되게 하였다. Thermal cycler(Hybaid사, 영국)를 사용하여 변성(95°C, 1분), 단련(55°C, 1분), 연장(72°C, 1분)을 한 주기로 하여 35회 반응한 다음 72°C에서 7분간 두었다.

PCR 산물은 ethidium bromide염색된 1.5% agarose gel에서 확인하였다. 각각의 밴드는 오염이 되지 않게 주의하며 일회용 깨끗한 칼로 잘랐다. DNA는 Qiaex II gel extraction kit(Qiagen사, 독일)를 이용하여 DNA를 추출하여 ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits(Applied Biosystems사, Cleveland, Ohio, 미국)를 이용하여 자동화된 DNA 염기서열분석기를 사용하여 분석하였다.

성 적

10례 모두에서 *pRb2/p130*의 19, 20, 21, 22 엑손 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 직접 염기서열분석에서 얻은 염기서열을 NCBI gene bank BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 이용하여 비교하였을 때(accession: XM_007895) 서로 완전히 일치하는 염기서열을 보였다. 결과적으로 8례의 DLBL과 2례의 산발성 BL 조직의 *pRb2/p130* 엑손 19, 20, 21, 22에서 돌연변이가 없었다.

고 찰

사람의 림프종 조직과 폐암 세포주에서 *pRb/p105*와 함께 *pRb2/p130*의 변이 역시 종양의 발생에 관여함이 알려져 있다[5]. *pRb2/p130*의 변이양상은 풍토성과 산발성 BL 아형 간에 서로 차이가 있어 이들 두 아형의 발생기전이 서로 다른 것으로 추정된다[7]. 새로운 림프종의 분류법[6]에 따라 각기 서로 다른 림프종의 유형에서 *pRb2/p130*의 변이양상에 대해서는 아직까지 알

Table 2. Sequences of primers for *pRb2* PCR

Primer	Sequences (5' to 3')
Exon 19	AGGTCCTATCACCAAGGGTGT
Exon 19R	GCTTAGTTACTTCTTCAAGGC
Exon 20	GAGAAAGTTAATATCCTAGCTG
Exon 20R	GTGAATGGTCCATATATAAATCA
Exon 21	TGGTTTAGCACACCTCTTCAC
Exon 21R	GCTTAGCACAAACCCTGTTTC
Exon 22	CTGAGCTATGTGCATTGCA
Exon 22R	AAGGCTGCTGCTAAACAGAT

려진 것이 없는 실정이다. DLBL은 BL과 같이 하나의 질병이라기보다는 다양한 원인에 의해 발생되어 공통적인 병리학적 특징을 보이는 종양으로 생각되고, 그 조직학적인 양상이 BL과 비슷하여 때로는 감별하기 어려울 때가 있다. DLBL에서 *pRb2/p130* 유전자 변이를 염기서열분석으로 증명한 연구는 아직 없었다. 이 연구에서는 한국인 DLBL과 산발성 BL 환자에서 *pRb2/p130* 유전자 19,20,21,22 엑손의 변이양상을 PCR과 직접 염기서열분석을 통해 조사하였다.

Retinoblastoma 유전자는 매우 커서 현실적으로 모든 엑손의 변이를 조사하기는 어렵다. 따라서 이 연구에서는 풍토성 BL에서 잦은 돌연변이를 보인 엑손 19, 20, 21, 22를 대상으로 조사하였다. 이 연구의 결과에서 DLBL과 산발성 BL에서 *pRb2/p130*의 변이가 없었던 점으로 보아, DLBL은 *pRb2/p130*의 잦은 돌연변이를 보이지 않는 것으로 추정되고 산발성 BL도 풍토성 BL의 경우와는 달리 *pRb2/p130*의 잦은 돌연변이를 보이지 않을 것으로 생각된다[7]. 비호지킨림프종에서 Retinoblastoma(*RB-1*) 유전자의 돌연변이는 흔하지 않고[8], 다발성 골수종에서도 *RB-1*의 변이가 드문 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 본 연구의 결과와 비교해 볼 때 *pRb2/p130* 역시 *RB-1* 과 같이 DLBL과 산발성 BL에서 변이가 드문 것으로 추정된다. 악성

림프종에서 증식능력이 왕성한 표지자인 세포분열 지수와 Ki-67 지수가 높은 종양에서 *Rb/p107*의 발현이 높았으나, *pRb2/p130*의 발현이 적었던 증례들은 치료에 보다 잘 반응하는 경향을 보였다[10]. 이 연구에서는 *pRb2/p130*의 발현을 조사하지는 못했으나, 증식능력이 왕성한 것으로 알려져 있는 DLBL과 산발성 BL에서 *pRb2/p130*의 변이가 없었던 것은 *pRb2/p130*의 발현의 감소가 돌연변이와 관련이 없을 것으로 생각된다.

풍토성 BL에서 *pRb2/p130*의 잦은 변이를 보였던 이전의 연구[7]와 비교해 볼 때 DLBL과 산발성 BL에서 *pRb2/p130*의 변이가 없었던 점은 풍토성 BL과는 구별되는 DLBL의 하나의 특징적인 분자생물학적 소견일 것으로 생각된다. DLBL과 산발성 BL에서 *pRb2/p130* 변이가 보이지 않는 것은 DLBL과 산발성 BL은 *pRb2/p130*의 변이가 종양의 생성에 작용하지 않을 가능성이 있다. 또한 종양의 진단 및 분류에서 *pRb2/p130*의 변이양상에 대한 조사가 종양의 진단 및 분류에서 유용한 분자생물학적 소견으로 사용할 수도 있으리라 생각된다. 하지만, 본 연구에서는 retinoblastoma 유전자 전체를 조사한 것이 아니고 조사한 엑손이 제한적이므로 *pRb*의 변이가 완전히 없는지는 더 많은 엑손의 분석 및 단백질 변이양상 조사 등으로 더 많은 증례를 대상으

로 한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다. 또한 DLBL과 BL의 구별을 명확히 하기 위해서 다른 암유전자의 변이에 관한 추가적인 조사가 필요한 것으로 생각된다.

요 약

8례의 diffuse large B cell lymphoma(DLBL), 2례의 Burkitt 림프종(BL)으로 진단된 동결조직에서 DNA를 추출한 다음 *pRb/p130* exon 19, 20, 21, 22에 대한 PCR을 시행하여 증폭된 DNA를 이용하여 염기서열을 직접 분석한 결과 DLBL 8례와 BL 2례 모두에서 *pRb2/p130* 유전자의 변이가 없었다.

이러한 결과로 DLBL의 암 발생에서 *pRb2/p130*의 변이와는 관련이 없을 것으로 추정된다. 풍토성 BL에서는 *pRb2/p130*의 많은 변이가 있었다는 사전 연구결과와 비교해 볼 때 DLBL 림프종이 분자생물학적으로 풍토성 BL과는 다른 특징적인 소견으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Mayol X, Grana X, Baldi A, Sang N, Hu Q, Giordano A. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (*pRb2*) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 1993;**8**(9):2561-6.
2. Claudio PP, Howard CM, Baldi A, De Luca A, Fu Y, Condorelli G, *et al.* *p130/pRb2* has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res* 1994;**54**(21): 5556-60.
3. Smith EJ, Leone G, DeGregori J, Jakoi L, Nevins JR. The accumulation of an *E2F-p130* transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol* 1996;**16**(12):6965-76.
4. Corbeil HB, Branton PE. Characterization of an *E2F-p130* complex formed during growth arrest. *Oncogene* 1997;**15**(6):657-68.
5. Cinti C, Claudio PP, Howard CM, Neri LM, Fu Y, Leoncini L, *et al.* Genetic alterations disrupting the nuclear localization of the retinoblastoma-related gene *RB2/p130* in human tumor cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 2000;**60**(2):383-9.
6. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, *et al.* The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999;**10**(12):1419-32.
7. Cinti C, Leoncini L, Nyongo A, Ferrari F, Lazzi S, Bellan C, *et al.* Genetic alterations of the retinoblastoma-related gene *RB2/p130* identify different pathogenetic mechanisms in and among Burkitt's lymphoma subtypes. *Am J Pathol* 2000;**156**(3):751-60.
8. Grierson AJ, Hodgkins MA, Hancock BW, Goepel JR, Royds J, Goyns MH. Investigation of the RB-1 tumour suppressor gene in a United Kingdom series of non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1996;**23**(3-4):353-63.
9. Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Vanrumbeke M, Vachee A, Quesnel B, *et al.* The retinoblastoma gene (RB-1) status in multiple myeloma: a report on 35 cases. *Leuk Lymphoma* 1995;**18**(5-6):497-503.
10. Leoncini L, Bellan C, Cossu A, *et al.* Retinoblastoma-related p107 and pRb2/p130 proteins in malignant lymphomas: distinct mechanisms of cell growth control. *Clin Cancer Res* 1999;**5**:4065-72.