DMBA 도포로 유발된 Hamster 협낭의 구강암조직에서 in Situ Reverse Transcriptase(RT) PCR 기법에 의한 EGFR mRNA의 발현*

경북대학교 의과대학 이비인후과학교실, 대구파티마병원 이비인후과,**
계명대학교 의과대학 병리학교실***
박준식 · 손수준** · 이상숙***

= Abstract =

Detection of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA Using in Situ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction in DMBA-induced Squamous Cell Carcinoma of the Hamster Buccal Pouch

June-Sik Park, M.D., Soo-Jun Sohn, M.D., Sang-Sook Lee, M.D.*****
Department of Otolaryngology, Kyungpook National University School of Medicine, Seoul, Korea
*Department of Otolaryngology, Fatima Hospital, Taegu, Korea***
*Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea****

Epidermal growth factor receptor(EGFR) mRNA was assessed in 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene(DMBA)-induced squamous cell carcinomas(SCC) in the hamster buccal pouch model to elucidate the role and timing of histologic changes and differentiation during carcinogenesis. In situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction was used to identify the EGFR. DMBA(0.5%) in heavy mineral oil was applied to the right buccal pouch 3 times per week for up to 16 weeks. Hyperplasia was detected by histologic analysis at 4 weeks, dysplasia with or without papillomatous changes at 8 weeks, and SCC at 16 weeks. Paraffin embedded sections of the tumors were used for EGFR mRNA and immunohistochemical determinations. EGFR cDNA was synthesized in situ by reverse transcription using an EGFR-specific oligonucleotide primer. In situ PCR amplification in the presence of digoxigenin-11-dUTP and subsequent binding with an antidigoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase allowed direct visualization. EGFR mRNA was localized in the nuclei of the basal cell layer of normal squamous epithelium but is expanded to the superficial squamous cell layer as well as the basal cell layer in hyperplasia and dysplasia and is diffusely expressed in squamous cell carcinoma. EGFR protein, detected by immunostaining using a monoclonal antibody, was expressed mainly in the cytoplasm of superficial squamous cell layers(not

*이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.
논문접수일 : 1996년 8월 21일
심사통과일 : 1996년 12월 13일

in the basal cell layer) in normal squamous epithelium. It increased gradually in level and amount through the stages of hyperplasia and dysplasia to invasive squamous cell carcinoma.

These results suggest that the biological markers EGFR mRNA and EGFR protein may be used for assessing intermediate end points in tests of various chemopreventive agents on oral carcinogenesis in the hamster buccal pouch model as well as in human clinical trials. **(Korean J Otolaryngol 40 : 2, 1997)**

KEY WORDS : EGFR · In situ RT PCR · Hamster buccal pouch carcinogenesis.

서 론

두경부에 생기는 암중 가장 흔한 편평상피암은 최근 그 발생빈도가 점차 증가하고 있다. 아직도 치료발전이 생존률 증가에 크게 기여하지는 못하고 있는 실정이다. 두경부의 편평상피암을 예방하고 조기 발견을 위해서는 이 종양의 병인을 깊이 이해하고 종양 발생의 위험성을 인지하기 위한 생화학적 또는 유전학적 표지자의 개발이 시급한 실정이다[1)9)].

두경부암과 관련된다고 알려진 대표적 oncogene으로 상피성장인자수용체(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)가 있다. 상피성장인자(EGF : Epidermal Growth Factor)는 정상세포의 증식과 분화에 관여하는 일종의 폴리펩타이드로[3)] 세포표면에 있는 수용체인 EGFR과 결합함으로서 비로서 핵분열에 관여하게 된다. 두경부의 편평상피암 환자의 조직에서 EGFR의 과발현이 관찰되고 또한 EGFR 발현이 높은 환자에서 예후가 불량함이 보고되어 종양의 악성도 및 예후인자로써 그 가능성이 제시되었다[8)].

EGFR mRNA의 발현을 검사하는 방법으로 in situ hybridization(ISH)는 종양조직에 포함된 mRNA 양이 정상조직에 비해 매우 많을 때 사용되어 왔다. 그러나 DNA의 copy 수가 적거나 발현된 mRNA 양이 세포당 10 20copy보다 작을때 ISH으로서는 검색하기가 어렵다[11)]. 이런 경우 PCR은 한개의 세포내에서 한 copy의 DNA도 찾아 낼 수 있기 때문에 PCR을 이용한 조직내 EGFR mRNA를 알아내는 방법이 고안, 개발되었다[11)]. PCR은 조직 표본이나 세포에서 얻은 DNA나 cDNA를 주로 이용하고 있어 특정한 핵산 배열을 합성하는 세포나 세포들의 부위를 알 수 없는 단점이 있다.

최근에 세포내에서 바이러스 DNA를 찾아내는데 PCR로 증폭시킨후 ISH를 하는 방법이 개발 되었다[10)]. 이 PCR-ISH은 단 한개의 DNA copy도 찾아 낼 수 있을 정도로 ISH의 감도를 향상시켰다. 또한 Spann등[19)]은 PCR로 합성된 DNA의 분절속으로 표식자를 직접 병합시킴으로서 숙주의 세포들중에서 특정 바이러스 DNA를 검색할 수 있는 in situ PCR 방법을 개발하였다.

이에 저자들은 구강암의 대표적인 다단계 발암과정 모델로 사용되고 있는 DMBA(7, 12-dimethylbenzanthracene)로 유도된 햄스터 협낭암에서의 세포학적, 분자생물학적 변화를 암발생시기별로 이해하기 위해서 편평상피암의 대표적인 암유발인자인 EGFR mRNA 발현 양상의 변화를 보고자 EGFR primers를 이용한 in situ RT(reverse transcriptase) PCR방법으로 발현정도를 보고 향후 구강암의 조기발견이나 중간예후 지표로서의 유용성여부를 검토하고자 본 연구를 시행하게 되었다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험동물은 생후 4 6주 된 체중 100gm 내외의 96마리의 Golden Syrian Hamster를 암수 구별없이 사용하였다. Hamster를 일정한 실내온도와 습도를 유지하는 사육 케비냇 내에서 고형사료와 야채 및 물로 사육하였다.

실험군에 사용된 발암물질은 DMBA(Sigma, D3254, USA)를 heavy mineral oil(Sigma, USA)에 0.5%의 농도가 되게 희석하여 주당 3번씩 우측 협낭에 붓으

로 도포하였다. 좌측 협낭은 아무 처치없이 두어 우측편과 비교하였다.

96마리의 Hamster를 정상군 8마리, 대조군 8마리와 실험군 80마리로 나누었다. 정상군은 정상발육 과정에 따른 변화를 관찰하기 위하여 일반사육하여 4주, 8주, 12주, 16주에 각각 두마리씩 희생하였다. 대조군은 heavy mineral oil을 협낭점막에 도포하고 4, 8, 12, 16주에 두마리씩 희생하였다. 실험군은 주당 3회씩 DMBA를 협낭점막에 도포하고 4, 8, 12, 16주에 각각 20마리씩 희생하였다.

실험동물은 ether로 전신마취후 협낭점막을 감자(forcep)로 집고 외부로 노출시켜 육안적으로 확인하고 적출한후 즉시 조직의 일부는 formalin에 고정하고 나머지 부위는 액화질소에 급속 냉동시킨후 섭씨 -70℃의 냉동기에 보관하였다. 포르말린에 고정한 조직은 통상적인 방법에 따라 파라핀에 포매한 후 hematoxylin eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 위에 기술한 저자들의 사전 연구[1]에 의해 만들어 둔 정상 햄스터 협낭과 0.5% DMBA(Sigma, USA)의 도포로 유도된 햄스터 우측 협낭의 병변 즉 과형성(4주), 이형성(8주)와 편평세포암(16주)의 파라핀 블록을 실험에 제공하였다.

2. EGFR mRNA의 조직내 검색을 위한 방법 (in situ RT PCR)[7)15)]

1) Oligonucleotide primers

인간 EGFR cDNA의 염기 4056에서 시작하는 EGFR mRNA에 상보하는 염기배열이 5' AATATTCTTGCTGGATGCGTTTCTGTA3 '인 27염기(antisense primer)와 염기 3855에서 시작하는 mRNA에 있는 염기배열이 5' TTTCGATACCCAGGACCAAGCCACAGCAGG3 ' 인 30염기(sense primer)의 oligonucleotide[21]를 역전사효소(reverse transcriptase)와 PCR에 사용하였다. 이들 primer는 인간과 생쥐에서 EGFR cDNA 배열에서 양측이 동일하여 매우 높게 보존된 부분이므로 선택되었다[21]. 이 primer들로 PCR 증폭할때 EGFR cDNA의 202bp 분절이 증폭되고 EGFR의 coding 부위가 된다.

2) 조직표본의 전처치

파라핀에 포매된 조직편을 5μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 37℃ 항온기에 하루밤 방치한 후, 10분간 3번 xylene 용액에 담구어 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 70% 알콜과 증류수에 단계적으로 함수하였다. 조직 절편을 0.01 N HCl 내 2mg/ml trysinogen(Sigma, St Louis MO)으로 25℃에서 15분동안 침투 시킨후 0.1M Tris HCl(pH 7.5), 0.1M NaCl로 중화시켰다[11]. 40mM Tris HCl(pH 7.9), 10mM NaCl, 6mM $MgCl_2$, 0.1M $CaCl_2$ 내에서 RQI RNase-free DNase(8U/100μl)(Promega, Madison WI)를 37℃에서 10분동안 반응시켜 DNA를 분해했다. DNase는 75℃에서 10분동안 가열함으로 반응을 중지시켰다.

3) Reverse transcription

Reverse transcriptase 반응에는 Oligo d(T)(Boringer Mannheim, Indianapolis IN)나 EGFR oligonucleotide primer를 사용했다. 역전사에 사용하는 반응 혼합물(reaction mixture)에 대한 최종 농도는 다음과 같다. 10mM Tris HCl, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 25μM deoxynucleotides[dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia, Piscataway NJ)], 1.2μM oligo $d(T)_{15}$ 혹은 EGFR primer와 100μl내 10mM DTT중에서 100nM 반응 혼합액에 75U RNase(Promega)와 400 U M-MLV Reverse Transcriptase(GIBCO BRL, Gaithersberg MD)를 첨가하였다. 조직 절편을 위의 반응 혼합액에 oligo $d(T)_{15}$와 EGFR primers를 혼합하고 50℃에서 한시간동안 반응시켰다. 용액을 흡인 제거하고 슬라이드를 sodium citrate buffer[3M NaCl, 0.3M Na_3Citrate, pH 7.0(2XSSC)], 1X SSC, 0.5 XSSC에 각각 5번 씻어내고 다시 ddH 2O로 두번 수세하였다.

4) Polymerase chain reaction

PCR 증폭은 각각의 nucleotides dATP, dCTP, dGTP(Pharmacia), 23.75μM dTTT(Pharmacia), 1.25 μM digoxigenin-11-dUTP(dig-11-dUTP, Boeringer Mannheim), 10mM Tris HCl, 50mM

KCl, 1.5mM MgCl 2, 5U/100 μl Tag DNA polymerase(Boeringer Mannheim)과 각각의 sense와 antisense primer로 하였다. PCR을 시작하기 전에 nucleotides가 들지 않은 반응 혼합액의 모든 것이 포함된 90 μl를 조직표본에 넣고 위에는 mineral oil을 첨가했다. 그 슬라이드를 PCR 기계(Bio Oven III, Enprotech, USA)에 넣고 95℃에서 5분간 가열하였다. 온도를 85℃로 낮춘 후 5 10분간 반응시킨후 nucleotide가 든 10 μl 용액을 각 슬라이드에 첨가 했다. PCR 증폭은 94℃에서 1.5분간 denaturing, 60℃에서 1분간 annealing 그리고 72℃에서 primer extension하는데 마지막 extension에는 12분간 실시하였다. 조직 절편 슬라이드를 2XSSC, 1XSSC와 0.5 XSSC 용액의 500 μl로 25℃에서 5번 씻어내었다.

5) PCR 산물의 면역학적 검색

슬라이드를 maleate buffer(100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5)에서 5분간 중화시킨 후 maleic buffer 내 2% normal sheep serum(Sigma)과 0.3% Triton-X 100(Sigma)에 반응시키고 maleate/sheep serum/Triton-X 100 buffer에서 1 : 500으로 희석시킨 alkaline phosphatase(Boeringer Mannheim)가 붙어있는 anti-digoxigenin[Fab'] antibody을 24℃에서 최저 3시간동안 반응시켰다. 그 조직절편은 maleate/sheep serum/Triton-X 100 buffer로 10분간 두시간 씻고 다음 magnesium buffer (100 mM Tris HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl 2, pH 9.5)로 10분간 수세하였다. 500 μl의 chromogen [niroblue tetrazolium salt(NBT) 용액 45 μl와 magnesium buffer내에 ml당 0.24mg levamisol(Sigma)이 포함된 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(X-phosphate, Boeringer Mannheim)를 각 튜브에 첨가시켰다. 그 슬라이드는 빛이 없는 장소에서 in situ RT PCR assay에 10분이하로 반응시켰다. 색반응은 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)에서 두번 씻어냄으로 정지시켰다. 조직절편은 methyl green으로 약하게 대조 염색을 한후 광학 현미경하에서 관찰하였다.

양성대조군은 EGFR을 갖고 있음이 알려진 햄스터의 설조직을 내부대조군으로 사용하였고 또한 역전사 과정에서 oligo d(T) 15를 사용하거나 DNase 처리를 실시하지 않았다. 음성대조군으로는 역전사과정을 빼고 전 과정을 실시하였다. 각 실험마다 양성과 음성대조 실험을 병행하여 양성대조군이 조직의 80% 이상의 거의 모든 세포에서 양성으로 염색되고 음성대조군이 염색이 안 되었을 때 전 과정이 제대로 되었다고 판정하여 그 결과를 분석하였다.

3. EGFR 단백 검색을 위한 면역조직화학적 방법

면역조직화학적 검색을 위해 파라핀에 포매된 조직편을 5 μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 37℃ 항온기에 하루밤 방치한 후, 10분간 3번 xylene 용액에 담구어 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 70% 알콜과 증류수에 단계적으로 함수하였다. 조직내 존재하는 내인성 peroxidase를 차단하기 위해 메탄올과 30% 과산화수소가 9 : 1의 비율로 섞인 용액에서 15분간 처리하고 0.01 M PBS(phosphate buffer solution) 완충액으로 수세하였다. 그후 포르말린 고정으로 인해 조직내 감추어진 항원을 노출시키기 위해 0.01M citrate buffer 용액에 담구어 microwave oven을 이용하여 10분간 가열하였다. 실온에서 20분가량 식힌 후 30분간 정상 horse serum(Vectastain Elite kit, USA)을 가해 비특이반응을 차단시켰다. 일차항체로 EGFR clone 29.1과 F4 단클론 항체(Sigma, U.S.A.)를 1 : 500 1 : 1000 비율로 희석하여 37℃에서 1 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 수세후 이차항체로는 biotinylated anti-mouse IgG(Vectastain Elite kit, U.S.A.)를 가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후 avidin-biotin peroxidase complex(Vectastain Elite kit, U.S.A.)를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 DAB(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, U.S.A.)로 10 20분간 실온에서 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

양성 대조군으로서는 사전 연구에서 각 항체에 대해 양성으로 알려진 폐의 편평상피암 조직절편을 사용하고 음성 대조군으로서는 일차항체 대신에 PBS를

사용하여 동일한 방법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 염색결과의 판독은 EGFR 항체의 경우 세포질이나 세포막에 갈색으로 염색되면 양성으로 간주하였다.

성 적

EGFR mRNA는 정상 햄스터의 점막(대조군)의 기저층의 핵에 위치하였다(Fig. 1). 그러나 DMBA 도포군(실험군)에서 과형성과 이형성 시기에서 기저층 뿐만 아니라 표면의 편평상피세포층까지 분포가 확장되었으며 편평상피암에서는 암세포에 미만성으로 발현되었다(Fig. 2 - 4). 양성대조군은 역전사 과정에서 EGFR primer대신 oligo d(T) 15를 사용하여 햄스터의 협낭점막의 거의 모든 세포가 염색되었다(Fig. 5). 그리고 역전사 과정을 거치지 않아 cDNA가 형성되지 않아 전혀 EGFR mRNA의 발현이 되지 않은 경우를 음성대조군으로 정하였다(Fig. 6).

EGFR 단백은 단클론 항체를 이용한 면역염색을 실시하여 관찰하였다. 정상 협낭 점막의 표면의 편평상피세포층의 세포질에 주로 발현되었다. 그러나 기저층에는 단백이 발견되지 않았다. EGFR 단백은 과형성, 이형성과 침윤성 편평상피암으로 발전할수록 점차 그 양 및 분포가 점막의 하부 층으로 확대되었다.

고 찰

두경부암의 발암기전은 암의 발생기전과 치료법연구의 주요한 과제로서 다각적인 측면에서 활발히 연구되고 있으나, 아직도 암의 본질규명에는 해결되어야 할 문제가 많다. 발암과정은 반복되는 발암물질의 노출로 인해 영역 전체가 종양화 되는 영역종양화(field cancerization)라는 가설아래, 종양화 과정은 전암병소로부터 암으로 발전되는 다단계 발암과정(multistep process)이 알려지게 되었다[18)20)]. 두경부의 한 병소에 다발성의 독립된 원발암이 생기거나 원발암의 치료후 수년이 경과된 후에 제2의 원발암이 발생하는 것으로 보아 영역 종양화의 존재를 알수 있고[18)20)], 발암물질에 노출된 영역에 전암병소가 존재함은 종양이 다단계 발암과정으로 생김을 시사하고 있다[4)].

구강의 실험종양은 1954년 Salley[16)]가 최초로 DMBA를 도포하여 햄스터협낭점막에 편평상피암을 실험적으로 발생시켰고, 1961년 Morris[12)]에 의해 이 시술이 확립, 표준화되었다. 실험동물로서의 햄스터 협낭점막은 사람과 유사한 단층편평상피로 되어 있으며 면역학적 특성에 의해 쉽게 편평상피암이 유도되고 관찰이 용이한 관계로 구강암 유발실험에 널리 이용되고 있다.

저자들의 사전 실험에서는 0.5% DMBA를 주 3회, 16주간 도포한 결과 협낭점막에서 4주째에 과형성, 8주째에 이형성증 및 유두종양, 16주째에는 전형적인 침윤성 편평상피암등 다단계 발암과정을 관찰할 수 있었다[1)].

현재 구강암의 악성도 평가 및 예후측정의 지표로서 주로 병리조직학적 소견을 이용하고 있으나 암의 조기발견과 예후판단을 하기 위해 새로운 방법이 요구되고 있다. 최근 분자생물학의 발달로 정상세포에 존재하는 암유전자가 화학발암물질, 방사선이나 자외선의 과다한 노출, 종양바이러스감염등에 의해 암유전자의 과도한 발현이나 종양억제인자의 결손과 같은 세포내 유전자 및 표현형의 변이 또는 성장인자와 그들 수용체의 이상발현을 포함하는 분자생물학적 현상들이 상기도의 암세포에서 확인되었다[23)].

한편 Cohen[3)]이 1962년 신경성장인자를 연구하는 과정에서 생쥐의 악하선에서 처음으로 분리하여 보고한 EGF은 정상세포의 증식과 분화에 관여하는 분자량 6,045 dalton(D)인 일종의 폴리펩타이드단백으로 세포막위에 있는 특별한 수용체인 EGFR과 결합함으로써 그 신호를 세포내로 전달하여 세포의 이온교환과 함께 형태학적 변화를 일으킨다. EGFR은 분자량 170kD의 인당단백으로 세포막내외에 걸쳐 있다. 세포막외 영역은 EGF가 결합하는 부위이고 세포막내 영역은 고유의 tyrosine kinase 능력을 갖는 부위로 EGF가 EGFR과 결합하면 자극을 받아 EGFR의 자가인산화가 일어나고 여러 표적 단백질들의 인산화로

이어진다[22].

EGFR 단백의 상승은 두경부의 편평상피암환자의 세포주와 조직에서 증명되었으며[17] 최근에는 편평암세포에서도 발견되고 그 양적증가가 증명됨에 따라 종양 표식자로서의 가능성이 높아지고 있다[21]. EGFR의 과발현을 보인 암환자는세포증식능의 증가와 관련되어 예후가 더 불량하다고 알려져 있다[8]. 한편 EGFR mRNA의 발현증가가 두경부 종양에서 정상세포의 암화과정에 깊이 관여한다고 생각되고 있다[5].

본 연구에서 DMBA 도포로 유도된 햄스터 협낭암 모델을 이용하여 암발생과정동안 조직학적 변화에 따른 EGFR mRNA와 EGFR 단백의 역할을 알아 보고자 in situ RT PCR과 면역조직화학 기법을 사용하여 검색한 결과를 보면 EGFR mRNA는 정상 햄스터의 점막(대조군)의 기저층의 핵에 위치하였다. 이런 소견은 EGFR mRNA는 정상 편평상피세포의 분열이 일어나고 있는 기저층에서 일정하게 더 높게 발현되고 분화된 부위에서는 발현이 매우 낮다는 기존의 연구결과와 일치된다[6]. 반면 DMBA 도포군(실험군)에서 과형성(4주)시기에는 기저층 뿐만 아니라 기처층 상부 일부 세포에도 EGFR mRNA이 발현되어 이런 기저층 상부의 발현이 암발생전기의 첫 단계로서 중요한 소견이라고 생각된다. 그후 이형성 시기(8주)나 유두종 또는 상피내암으로 병소가 진행할수록 EGFR mRNA는 기저층 뿐만 아니라 표면의 편평상피세포층까지 분포가 확장되었으며 동시에 양적 증가도 관찰되었다. 편평상피암(16주)조직에서는 암세포에 미만성으로 강하게 발현되었다. 이는 EGFR 유전자가 암이 발생되기 전 과형성 시기 부터 관여함을 추측할 수 있다. 이는 Heinford등[7]에 의한 in situ RT PCR 방법에 의해 인간과 생쥐의 정상조직과 종양에서 EGFR mRNA 발현에 관한 연구에서 특히 사람과 생쥐의 편평 상피암에서 높은 mRNA 발현된다는보고와 일치되는 소견이다.

본 연구는 포르말린으로 고정되고 파라핀으로 포매된 조직절편에서 in situ RT PCR 방법에 의해 EGFR mRNA를 찾아 낼 수 있다는 것을 보여준다. 지금까지의 연구를 보면 인간의 여러 조직으로부터 in situ RT PCR을 사용하여 찾아낸 EGFR mRNA는 세포표면에 있는 EGFR을 찾아내는 EGFR 항체 분석으로 측정된 조직내 분포와 동일하지는 않지만 비슷하게 세포간의 차이를 보이고 있음을 보고하고 있다[7].

EGFR mRNA이 세포질보다는 핵에서 주로 나타나는 것은 다른 연구에서와 같은 소견으로[7][15] 생물학적 상태를 보여주는 것으로 추측된다. 즉 정상 세포에서 세포질 mRNA 반감기가 매우 짧기 때문일 것이다. 또한 이러한 차이는 핵 mRNA는 역전사(reverse transcriptase) 반응동안 oligonucleotide primer가 더 쉽게 도달 할 수 있는 것인지 혹은 세포질 mRNA가 조직표본의 조작중 더 쉽게 떨어져 나가서 생기는 것인지는 몰라도 이와 같은 artifact일 수도 있다[7].

in situ PCR은 손상이 없는 조직내에서 표적이 되는 DNA나 mRNA를 찾아 내거나 증폭된 분절을 합성하는 세포를 찾아 낼 수 있다[2][14]. 이 반응은 반응동안 적당한 조건과 primers가 있다면 증폭되어지는 cDNA나 DNA의 분절에 대하여 특수하다.

In situ RT PCR은 dig-11-dUTP로 표식을 한 cDNA를 사용한 것으로 비교를 하면 ISH보다 더 특이성과 예민성이 높다. ISH로서 신호를 찾아내는 탐식자(probe)의 특이적 활동성은 in situ RT PCR로 합성된 것이 증폭되어 나오는 것 보다는 5배나 크고 chromogen에 노출 된 것보다는 60배나 길다. PCR in situ를 연구하는 학자들은 증폭된 DNA를 찾아 내는데 ISH를 이용해 왔다[2][13][14]. in situ PCR은 매우 강력해서 dig-11-dUTP가 cDNA probes를 합성하는데 드는 량의 약 1/20로 줄일 수 있고 음성인 세포로부터 양성인 것을 구별하기 위해서는 chromogen에 노출을 10분 이하로 줄일 수 있다. Nuovo등은 PCR한후 ISH를 하면 HVP를 찾아내는데 20배 높게 나타낸다고 했다[13]. dig-11-dUTP를 직접 결합 시키면 ISH보다 더 예민성이 높고 최저 ISH-PCR 만큼 예민하게 나타난다.

본 연구에서 EGFR 단백은 단클론 항체를 이용한 면역염색을 실시하여 관찰하였다. 정상 협낭 점막의 표면의 편평상피세포층의 세포질에 주로 발현되었다. 그러나 기저층에는 단백이 발견되지 않았다. EGFR

단백은 과형성, 이형성과 침윤성 편평상피암으로 발전할수록 점차 그 양 및 분포가 점막의 하부 층으로 확대되었다. 이런 소견은 EGFR 단백이 두경부암 조직내 분포와 양을 관찰함으로서 한 가능성있는 종양 표식자로서의 역할이 기대된다.

이런 소견으로 미루어 보면 두경부 편평상피암의 발암위험이 있는 환자의 정상점막에서 EGFR 조절이상이 생길 수 있음을 알 수 있다. 따라서 EGFR mRNA와 EGFR 단백을 햄스터 협낭암 모델에서와 함께 사람의 두경부 편평상피암의 분자생물학적 표식자로 사용할 수 있음과 동시에 임상 시험에서도 구강암 발생에 따른 다양한 예방적 차원의 화학요법 사용의 중간 시점을 결정하는chemomodulation나 암의 재발이나 제2원발암의 표식자로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

7, 12 - dimethylbenz(a)anthracene(DMBA)로 유도된 햄스터 협낭암 모델을 이용하여 암발생과정동안 조직학적 변화와 분화정도에 따른 EGFR mRNA와 EGFR 단백의 역할을 규명하기 의해 in situ RT PCR과 면역조직화학 기법을 사용하여 검색하였다. 햄스터의 우측 협낭에 1주에 3회씩 DMBA(0.5%)를 heavy mineral oil에 희석하여 16주동안 도포하였다. DMBA 현미경 소견상 DMBA 도포후 4주째 점막상피의 과형성(hyperplasia), 8주째 이형성(dysplasia)과 함께 유두상 돌기가 관찰되었고 16주에 이르면 편평상피암이 발생하였다. 각 시기별로 점막의 병변을 절제하여 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 조직을 연구대상으로 하였다. EGFR cDNA는 EGFR - specific oligonucleotide primer를 사용하여 reverse transcription에 의해 자체내에서(in situ) 합성되었다. Digoxigenin - 11 - dUTP를 첨가하여 PCR로 증폭을 시킨 후 alkaline phosphatase로 결합된 antidigoxigenin antibody를 결합시키고 발색하여 현미경하에서 분포와 양을 직접 관찰할 수 있었다. EGFR mRNA는 정상 햄스터의 점막(대조군)의 기저층의 핵에 위치하였다. 그러나 DMBA 도포군(실험군)에서 EGFR mRNA는 과형성과 이형성 시기에서 기저층 뿐만 아니라 표면의 편평상피세포층까지 분포가 확장되었으며 편평상피암에서는 암세포에 미만성으로 과발현되었다.

EGFR 단백은 단클론 항체를 이용한 면역염색을 실시하여 관찰하였다. 정상 협낭 점막의 표면의 편평상피세포층의 세포질에 주로 발현되었다. 그러나 기저층에는 단백이 발견되지 않았다. EGFR 단백은 과형성, 이형성과 침윤성 편평상피암으로 발전할수록 점차 그 양 및 분포가 점막의 하부층으로 확대되었다.

이러한 결과를 종합하면 EGFR mRNA와 EGFR 단백의 조직내 분포와 양이 두경부암으로 진행하는 전구과정의 단계를 알 수 있는 한 생물학적 표지자로 사용할 수 있으리라 생각된다. 또한 햄스터 협낭암 모델에서와 함께 사람의 구강암 발생에 따른 임상 시험에서도 다양한 예방적 차원의 화학요법 사용의 중간 시점을 결정하는데 적용할 수 있으리라 기대된다.

References

1) 박준식 · 이상숙 · 사민강 : *7, 12-Dimethylben-zanthrancene*로 유도된 햄스터의 협낭암모델에서 *p53* 변이 단백의 발현과 *proliferating Cell Nuclear Antigen*에 의한 세포증식능의 변화. 대한이비인후과학회지 *38 : 1380-1391, 1995*
2) Chen RH, Fuggle SV : *In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. Am J Pathol 143 : 1527-1534, 1993*
3) Cohen S : *The epidermal growth factor (EGF). Cancer 51 : 1787-1791, 1983*
4) Farber E : *The multistep nature of cancer development. Cancer Res 44 : 4217-4223, 1984*
5) Grandis JR, Tweardy DJ : *Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res 53 : 3579-3584, 1993*
6) Grooves RW, Allen MH, MacDonald DM : *Abnormal expression of epidermal growth factor receptor in cutaneous epithelial tumors. J Cutan Pathol 19 : 66-72, 1992*
7) Heniford BW, Shum-Siu A, Leonberger M, Hendler FJ : *Variation in cellular EGF receptor mRNA expression demonstrated by in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction. Nucleic Acid*

Res 21 : 3159-3166, 1993

8) Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, et al : *Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinoma of the head and neck. Br J Cancer 59 : 559-562, 1989*
9) Jones PA, Buckley JD, Henderson BE, et al : *From gene to carcinogen : A rapidly evolving field in molecular epidemiology. Cancer Res 51 : 3617-3620, 1991*
10) Komminoth P, Long AA, Ray R, Wolfe HJ : *In situ polymerase chain reaction of viral DNA, singlecopy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytospins. Dign Mol Pathol 1 : 85-97, 1992*
11) Komminoth P, Long AA : *In-situ polymerase chain reaction. Virchows Archic B Cell Pathol 64 : 67-73, 1993*
12) Morris AL : *Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. J Dent Res 40 : 3-15, 1961*
13) Nuovo GJ, Gallery F, MacConnell P, Becker J, Bloch W : *An improved technique for the in situ detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. Am J Pathol 139 : 1239-1244, 1991*
14) Nuovo GJ, Margiotta M, MacConnell P, Becker J : *Rapid in situ detection of PCR-amplified HIV-1 DNA. Diag Mol Pathol 1 : 98-102, 1992*
15) Patel VG, Shum-Siu AS, Heniford BW, Wieman TJ, Hendler FJ : *Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in tissue sections from biosy specimens using in situ polymerase chain reaction. Am J Pathol 144 : 7-14, 1994*
16) Salley JJ : *Experimental carcinogenesis in cheek pouch of the Syrian hamster. J Dent Res 33 : 253-262, 1954*
17) Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, et al : *Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. Virchows Arch Pathol Anat 418 : 349-353, 1991*
18) Slaughter DL, Southwick HW, Smejkal W : *"Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium : Clinical implications of multicentric origin. Cancer 6 : 963-968, 1953*
19) Spann W, Pachmann K, Zabnienska H, Pielmeier A, Emmerich B : *In situ amplification of single copy gene segments in individual cells by the polymerase chain reaction. Infection 19 : 242-244, 1991*
20) Strong MS, Inceze J, Vaughan CW : *Field cancerization in the aerodigestive tract-its etiology, manifestation, and significance. J Otolaryngol 13 : 131-136, 1984*
21) Ullrich A, Coussens JS, Hayflick JS, et al : *Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expressiion of amplified gene in A431 epidermal carcinoma cells. Nature 309 : 418-425, 1984*
22) Ushiro M, Cohen S : *Identificatiion of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A431 cell membranes. J Biol Chem 255 : 8363-8365, 1980*
23) Weinberg R : *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multi-step carcinogenesis. Cancer Res 49 : 3713-3721, 1989*

□ Legends for Figures □

Fig. 1. EGFR mRNA is confined to the nuclei of the basal cell layer of normal squamous epithelium of the buccal mucosa in untreated control hamsters(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×200).

Fig. 2. EGFR mRNA is expanded to the suprabasal cell layer as well as the basal cell layer in hyperplasia of 4 weeks DMBA-treated hamster(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×100).

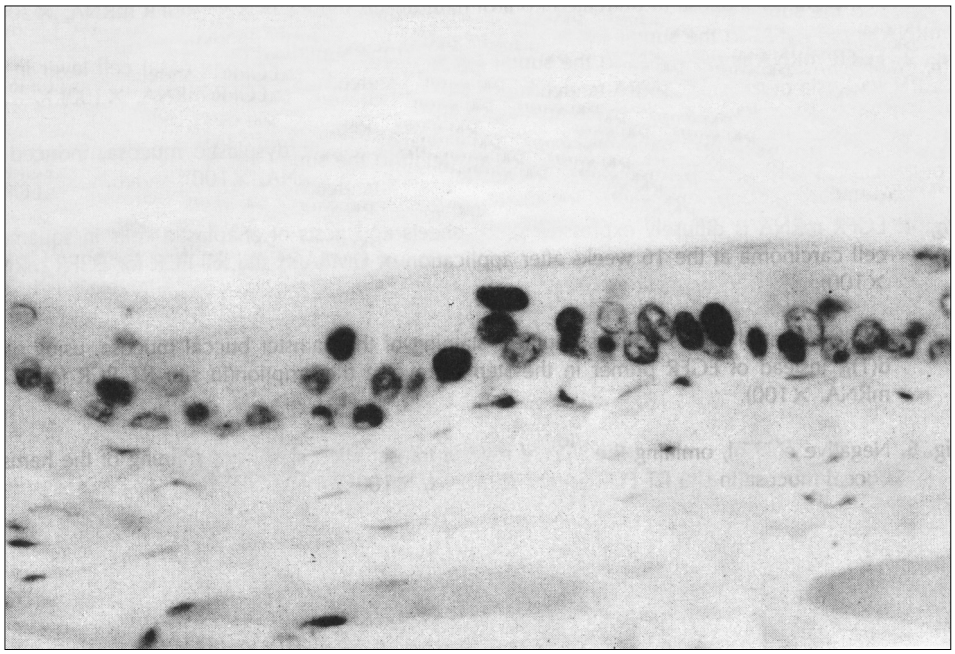
Fig. 3. EGFR mRNA is expanded to the whole thickness of the dysplastic mucosa, induced by DMBA application for 8 weeks(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×100).

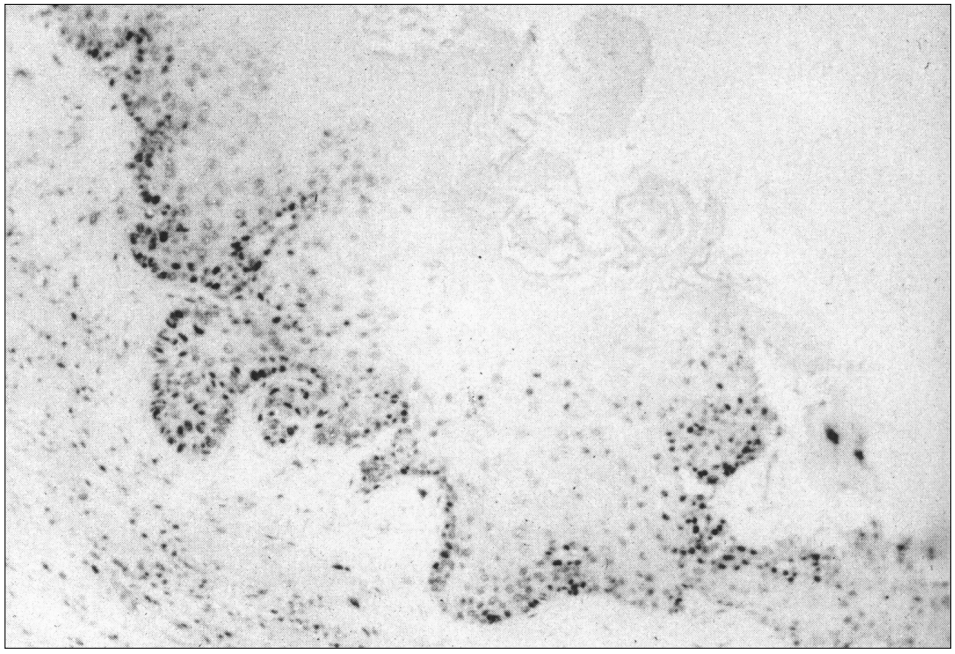
Fig. 4. EGFR mRNA is diffusely expressed in the sheets and nests of anaplastic cells in squamous cell carcinoma at the 16 weeks after application of DMBA(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×100).

Fig. 5. Positive control shows a diffuse nuclear staining of the hamster buccal mucosa, using oligo d(T) 15 instead of EGFR primer in the step of reverse transcription(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×100).

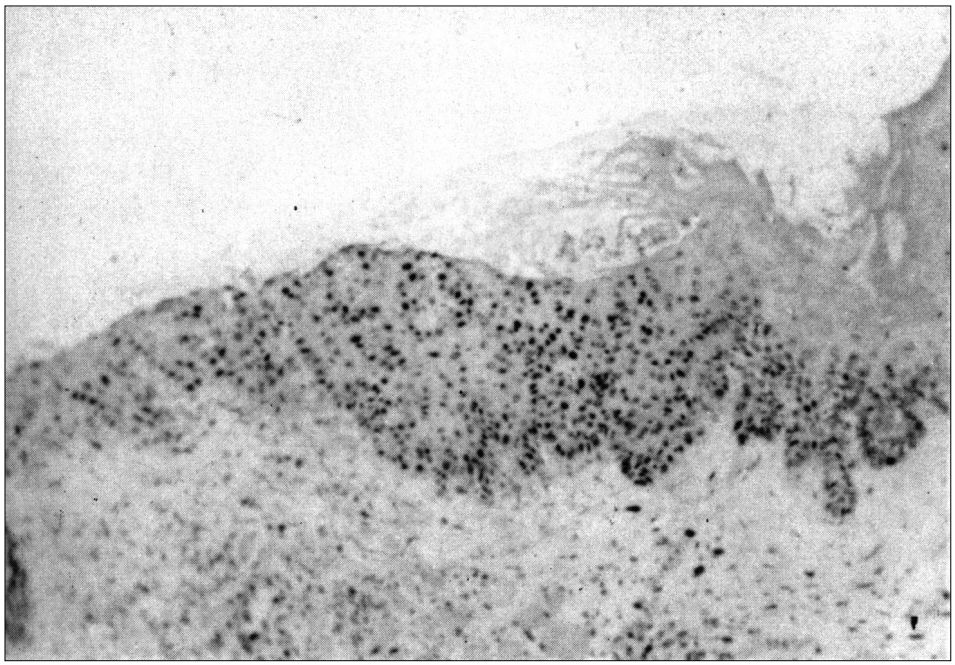
Fig. 6. Negative control, omitting the step of reverse transcription shows no staining of the hamster buccal mucosa(In situ RT PCR for EGFR mRNA, ×100).

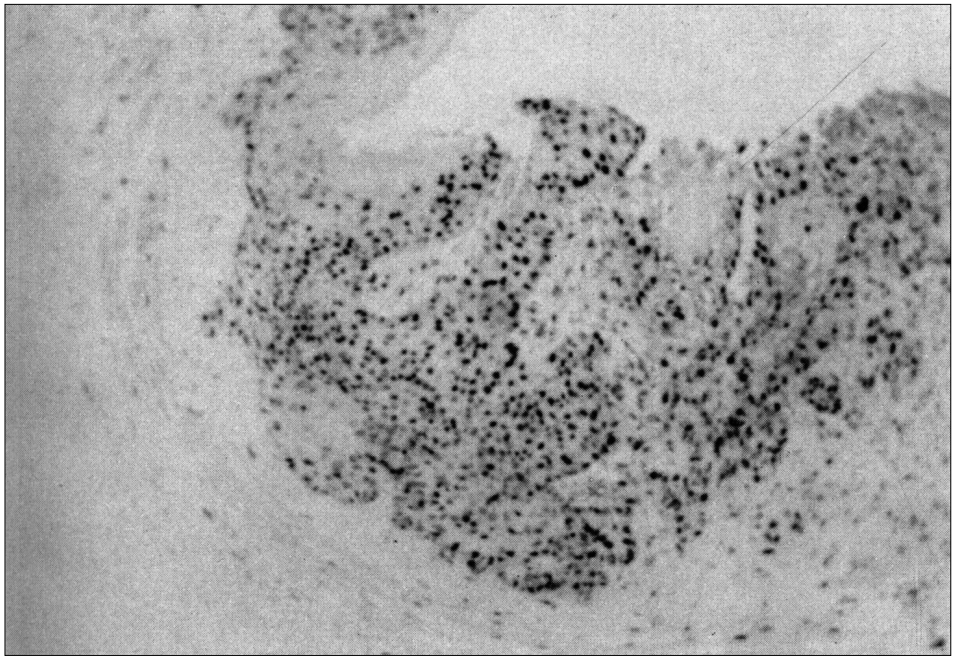
□박 준 식 외 사 진 부 도 I □





□박 준 식 외 사 진 부 도 Ⅱ □





□박 준 식 외 사 진 부 도 Ⅲ□