

# 신경모세포종에서 반정량적 중합효소연쇄반응을 이용한 N-myc 유전자 증폭의 검출 및 임상적 의의

원주의대 소아과학교실, <sup>1</sup>전국의대 임상병리학교실, <sup>2</sup>연세의대 소아과학교실,  
<sup>3</sup>아주의대 소아과학교실, <sup>4</sup>한림의대 소아과학교실, <sup>5</sup>고려의대 소아과학교실,  
<sup>6</sup>부산의대 소아과학교실, <sup>7</sup>계명의대 소아과학교실, <sup>8</sup>대구 파티마병원 소아과,  
<sup>9</sup>연세의대 외과학교실, <sup>10</sup>가톨릭의대 외과학교실, <sup>11</sup>연세의대 병리학교실

김황민 · 이창훈<sup>1</sup> · 유철주<sup>2</sup> · 박송희<sup>2</sup> · 김길영<sup>2</sup> · 김문규<sup>3</sup>  
조현상<sup>4</sup> · 이광철<sup>5</sup> · 임영탁<sup>6</sup> · 박석원 · 김홍식<sup>7</sup> · 강진무<sup>7</sup>  
강임주<sup>8</sup> · 최승훈<sup>9</sup> · 송영택<sup>10</sup> · 양우익<sup>11</sup>

## Detection of N-myc Amplification with Differential PCR in Neuroblastoma and It's Clinical Significance

Hwang Min Kim, M.D., Chang Hoon Lee, M.D.<sup>1</sup>, Chuhl Joo Lyu, M.D.<sup>2</sup>  
Song Hee Park, M.D.<sup>2</sup>, Kir-Young Kim, M.D.<sup>2</sup>, Moon Kyu Kim, M.D.<sup>3</sup>  
Hyun Sang Cho, M.D.<sup>4</sup>, Kwang Chul Lee, M.D.<sup>5</sup>, Young Tak Lim, M.D.<sup>6</sup>  
Seok Won Park, M.D., Heung Sik Kim, M.D.<sup>7</sup>, Chin Moo Kang, M.D.<sup>7</sup>  
Im Ju Kang, M.D.<sup>8</sup>, Seung Hoon Choi, M.D.<sup>9</sup>, Young Taek Song, M.D.<sup>10</sup>  
and Woo Ick Yang, M.D.<sup>11</sup>

Department of Pediatrics, Yonsei University Wonju College of Medicine,

<sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, Kon Kuk Medical School,

Departments of Pediatrics, <sup>2</sup>Yonsei University College of Medicine,

<sup>3</sup>Aju University College of Medicine, <sup>4</sup>Hallym University College of Medicine,

<sup>5</sup>Korea University College of Medicine, <sup>6</sup>Pusan National University College of Medicine,

<sup>7</sup>Keimyung University School of Medicine, <sup>8</sup>Fatima Hospital, <sup>9</sup>Department

of General Surgery, Yonsei University College of Medicine, <sup>10</sup>Catholic

University Medical College, <sup>11</sup>Department of Pathology, Yonsei University

College of Medicine

**Purpose:** The N-myc amplification is one of well known poor prognostic markers in neuroblastoma. Because the traditional detection method, Southern blot, is expensive, labor-intensive and time-consuming, the detection of N-myc amplification is not routinely performed in Korea. The purposes of this study are to develop polymerase chain reaction (PCR) for detecting N-myc amplification in neuroblastoma tumor tissue, and to elucidate the clinical significance of N-myc amplification. **Methods:** The clinical data and paraffin embedded tumor specimen of 54 neuroblastoma cases were collected from 10 medical

---

책임저자: 김황민, 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 소아과학교실, 220-701

Tel: 033-741-1284, Fax: 033-732-6229

본 연구는 1998년 연세대학교 학술 연구비 지원으로 이루어졌음.

centers in Korea. We have developed semiquantitative method of estimating gene copy number that uses differential PCR. N-myc gene primers (RC N-myc, N-myc 7-1) are amplified together with primers from a single-copy internal control gene (beta-globin). After ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis, the ratio of the two PCR products, which stands for N-myc amplification, is determined. Kaplan-Meier survival analysis was performed to evaluate the prognostic significance of N-myc amplification. **Results:** The differential PCR was very effective, less expensive, less labor-intensive, and simple detection method for N-myc amplification. The percentage of N-myc amplification was higher in the patients older than 1 year old (34.1%: 14/41), when they were compared to the patients younger than 1 year old (16.7%: 2/12). The percentage of N-myc amplification was higher in the patients who have primary tumor at adrenal gland (40.9%: 9/22) than who have primary tumor at retroperitoneum (17.6%: 3/17) or at mediastinum (16.7%: 2/12). In Stage I, II, and III patients, the mean survival time of N-myc amplified group was 18 months and that of N-myc unamplified group was 64 months (Log Rank 4.35,  $P=0.037$ ). **Conclusion:** The differential PCR was very effective, less expensive, less labor-intensive, and simple detection method for N-myc amplification. The N-myc amplification is one of poor prognostic indicators in Neuroblastoma. (Korean J Pediatr Hematol Oncol 2001; 8: 42~50)

**Key Words:** Neuroblastoma, N-myc amplification, Prognosis, PCR

## 서 론

소아의 5대 악성 종양 중의 하나인 신경모세포종은 치료에 대한 반응이 매우 다양하여 일부는 자연 소실되거나 치료에 매우 잘 반응하는 반면, 일부는 수술, 방사선 치료, 고용량 화학요법을 병용하여도 예후가 매우 불량하다. 이런 이유로 신경모세포종의 치료방침을 정하는데는 어려움이 많아, 예후를 예측하고자 하는 끊임없는 노력이 있었다.

1983년 Kohl 등은 신경모세포종 세포주의 일부에서 정상세포에 존재하는 c-myc 유전자와 유사성을 가지는 이제까지 알려져 있지 않던 암 유전자가 증폭되어 있다는 사실을 발견하고 N-myc으로 명명하였다<sup>1)</sup>. N-myc 유전자는 신경모세포종 환자에서 채취한 종양조직의 약 25%에서 증폭되어 있으며, 임상단계가 높은 환자에서 증폭의 빈도가 더 높다는 보고도 있고<sup>2,3)</sup>, 임상단계나 환자

의 나이와는 무관하게 종양의 빠른 진전이나 불량한 예후와 관계가 있다는 보고도 있다<sup>4~7)</sup>. 이렇게 신경모세포종에서 N-myc 유전자 증폭에 관한 연구가 외국에서는 활발하게 진행되고 있으나 국내에서는 아직 활발하지 않은 실정이다<sup>8)</sup>. 그 이유는 과거 N-myc 유전자 증폭을 검사하는 방법이 Southern blot이어서 많은 양의 조직이 필요하고, 시간이 오래 걸리며, 비용이 많이 들고, 결과의 판독이 객관적이지 않기 때문에 사료된다<sup>9)</sup>. 이런 단점을 보완하고자 1992년 Crabbe 등이 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 이용하여 적은 양의 조직으로, 짧은 시간에, 적은 비용으로 N-myc 유전자의 증폭을 검출할 수 있는 방법을 개발한 후<sup>10)</sup> 이에 대한 연구가 계속되고 있으며, 임상에도 이용되고 있다<sup>9,11)</sup>.

본 연구의 목적은 첫째, 중합효소연쇄반응을 이용하여 N-myc 유전자의 증폭을 검출하는 방법을 개발하고, 둘째, 이를 이용하여 신경모세포종에서

*N-myc* 유전자 증폭의 임상적 의의를 알아보기 위함이다.

## 대상 및 방법

### 1) 대상

*N-myc* 유전자가 1 copy인 음성 대조군으로는 정상인 말초혈액에서 추출한 DNA, 악성림프종 환자의 종양조직에서 추출한 DNA, LA-N-6 신경 모세포종 세포주에서 추출한 DNA를 사용하였으며, *N-myc* 유전자가 증폭된 양성 대조군으로는 *N-myc* 유전자 20 copy의 IMR 32 신경모세포종 세포주와 *N-myc* 유전자 40 copy의 KCNR 신경모세포종 세포주에서 추출한 DNA를 사용하였다.

실험군으로는 1984년부터 1999년까지 전국 10개 대학병원에서 경험하였던 54례의 신경모세포종 환자에서 적출한 신경모세포종 조직의 paraffin embedded 검체에서 추출한 DNA를 사용하였다.

전체 54명의 환자 중 남아는 29명이었고, 2세 이내가 24명이었다(Table 1). 원발 종양의 위치는 부신이 22례, 후복막강이 16례였으며(Table 2), 임상적 병기는 제 4 병기가 24례로 가장 많았다 (Table 3).

### 2) 방법

(1) 시발체(primer)의 제작: Biosearch 8750 DNA synthesizer를 이용하여 *N-myc* 유전자의 3번 exon의 428 bp 절편을 증폭시키는 RC *N-myc* (5'-TGG

TCC CTG AGC GTG AGA AA-3')과 *N-myc* 7-1 (5'-GAT GAA GAT GAA GAG GAA-3')을 제작하고, 1 copy internal standard 유전자로 사용할  $\beta$ -globin 유전자의 시발체는 269 bp 절편을 증폭시키는 GH20 (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3')과 PC04 (5'-TGG TCC CTG AGC GTG AGA AA-3')를 제작하여 reverse phase HPLC로 정제하였다.

(2) 중합효소연쇄반응을 이용한 *N-myc* 유전자 증폭의 측정: 정상인의 말초혈액, 신경모세포종

Table 1. Age Distribution of *N-myc* Unamplified and Amplified 54 Neuroblastoma Cases

Age (Year)	<i>N-myc</i> unamplified cases	<i>N-myc</i> amplified cases	Total
<1	10	2	12
1	8	4	12
2	1	3	4
3	4	1	5
4	4	1	5
5	2	1	3
6	2	2	4
8	2	1	3
9	2	0	2
12	1	0	1
14	1	0	1
17	0	1	1
Age unknown	1	0	1
Total	38	16	54

Table 2. Primary Sites of *N-myc* Unamplified and Amplified 54 Neuroblastoma Cases

Primary site	<i>N-myc</i> unamplified cases	<i>N-myc</i> amplified cases	Total
Adrenal gland	13	9	22
Retropertitoneum	14	3	17
Mediastinum	10	2	12
Head & neck	1	0	1
Paraspinal	0	1	1
Olfactory bulb	0	1	1
Total	38	16	54

**Table 3.** Clinical Stages of N-myc Unamplified and Amplified 54 Neuroblastoma Cases

Clinical stages	N-myc unamplified cases	N-myc amplified cases	Total
Stage I	3	1	4
Stage IIa	5	2	7
Stage IIb	2	1	3
Stage III	12	4	16
Stage IV	16	8	24
Total	38	16	54

세포주, 환자에게서 적출한 종양조직의 paraffin embedded 조직절편에서 Goelz 등<sup>[12]</sup>의 방법으로 xylene으로 paraffin을 제거한 후 phenol/chloroform법으로 DNA를 추출하였다.

검체 DNA 5 μl (200~400 ng), N-myc 유전자 시발체인 RC N-myc와 N-myc 7-1 각각 10 pM, β-globin 유전자의 시발체인 GH20과 PC04 각각 20 pM, dNTP 각각 0.25 mM, 10x buffer 5 μl, Taq polymerase 0.5 μl (2.5 U), D/W 적당량을 섞어 50 μl로 만들었다. 중합효소연쇄반응은 95°C에서 45초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1.5분을 1 cycle로 35 cycle을 실시하였다.

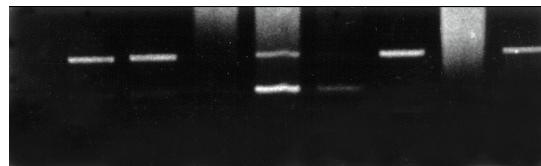
중합효소연쇄반응의 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 사진을 촬영하여 N-myc 유전자의 증폭정도를 측정하였다.

(3) N-myc 유전자 증폭의 임상적 의의: 각 환자의 검체와 함께 수집한 임상 정보들에 기초하여 N-myc 유전자 증폭의 임상적 의의를 SPSS-pc 통계 program을 사용하여 분석하였다.

## 결 과

### 1) 중합효소연쇄반응을 이용한 N-myc 유전자 증폭의 측정

중합효소연쇄반응으로 같은 세포내의 β-globin 을 internal standard로 하여 N-myc 유전자의 증폭 여부를 측정한 결과, N-myc 유전자의 증폭이 있었던 IMR32와 KCNR의 2가지 세포주에서 N-myc 유



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis result of differential PCR detection of N-myc amplification in neuroblastoma tissue.  
전자 증폭을 검출하였고, 일부 종양조직에서도 N-myc 유전자 증폭을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

### 2) N-myc 유전자 증폭의 임상적 의의

(1) N-myc 정상군과 N-myc 증폭군의 임상적 특성: 1세 이전의 환자 12명 중 2명(16.7%)에서 N-myc 유전자 증폭이 있었던 반면, 1세 이상의 환자 41명 중 14명(34.1%)에서 N-myc 유전자 증폭이 있어 1세 이상인 환자에서 N-myc 유전자가 증폭된 경우가 흔하였다( $P<0.05$ )(Table 1). 부신에서 원발하였던 22례 중 9례(40.9%)에서 N-myc 유전자 증폭이 있어, 17.6% (3/17)의 N-myc 유전자 증폭을 보였던 후복막강이나 16.7% (2/12)의 N-myc 유전자 증폭을 보였던 종격동에 비하여 높은 양성을 보였다( $P<0.05$ )(Table 2). 제 1, 2, 3 임상 병기에서 26.7% (8/30)에서 N-myc 유전자의 증폭이 있었던 반면 제 4 병기의 경우 33.3% (8/24)에서 N-myc 유전자의 증폭이 있었다(Table 3). 수술로 종양을 완전 절제하거나 거의 완전 절제가 가능하였던 경우는 N-myc 유전자 증폭이 없었던 경

**Table 4.** Clinical Characteristics of N-myc Unamplified and Amplified 54 Neuroblastoma Cases

Clinical characteristics	N-myc unamplified cases	N-myc amplified cases
Complete or near complete resection	26/38 (68.4%)	11/16 (68.8%)
Complete or partial response	27/36 (75%)	11/13 (84.6%)
Follow-up duration (Months, Mean $\pm$ SD)	26.97 $\pm$ 18.26*	12.38 $\pm$ 8.58*

\* $P<0.05$

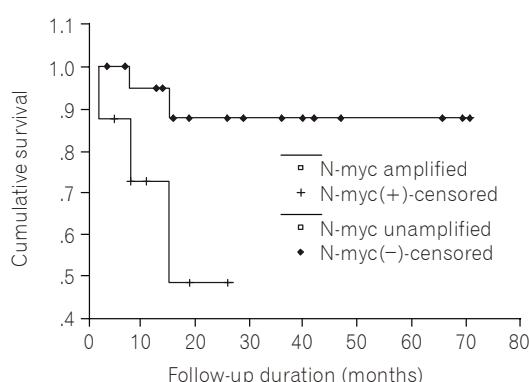
우 68.4% (26/38)였고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 경우 68.8% (11/16)에서 거의 비슷하였고, 치료에 완전반응 혹은 부분 반응하였던 경우도 N-myc 유전자 증폭이 없었던 경우 75% (27/36)였고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 경우 84.6% (11/13)에서 유의한 차이는 없었으나, 추적기간의 경우 N-myc 유전자 증폭이 없었던 경우 26.97 $\pm$ 18.26개월이었고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 경우 12.38 $\pm$ 8.58개월이어서 N-myc 유전자 증폭이 없었던 경우보다 오랫동안 추적이 가능하였다( $P<0.05$ )(Table 4).

(2) 예후인자로써의 N-myc 유전자 증폭: 임상적 병기의 영향을 제거하기 위하여 각 병기 별로 Kaplan-Meier 생존분석을 시행하고자 하였으나 각 병기별로 증례의 숫자가 충분치 않아, 제 1, 2, 3 병기와 제 4 병기로 나누어 Kaplan-Meier 생존분석을 시행하였다.

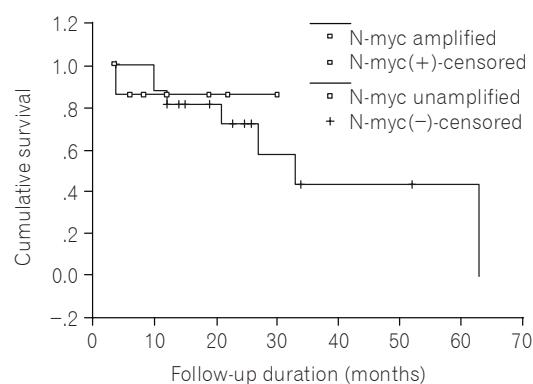
30례의 제 1, 2, 3 병기 환자 중 22례는 N-myc

유전자 증폭이 없었으며, 8례는 N-myc 유전자의 증폭이 있었는데, N-myc 유전자 증폭이 없었던 군의 평균 생존기간은 64개월이었고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 군의 평균 생존기간은 18개월이어서 Log Rank 4.35 ( $P=0.037$ )로 N-myc 유전자 증폭이 없었던 군의 예후가 매우 좋았다(Fig. 2). 24례의 제 4 병기 환자중 16례는 N-myc 유전자 증폭이 없었으며, 8례는 N-myc 유전자의 증폭이 있었는데, N-myc 유전자 증폭이 없었던 군의 평균 생존기간은 40개월이었고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 군의 평균 생존기간은 26개월이어서 Log Rank 0.08 ( $P=0.78$ )로 N-myc 유전자 증폭이 없었던 군과 있었던 군간에 유의한 예후의 차이는 없었다(Fig. 3).

## 고 찰



**Fig. 2.** Kaplan-Meier curve of N-myc unamplified and amplified stage 1, 2, 3 neuroblastoma cases (No. of cases=30)(Log rank=4.35,  $P=0.037$ ).



**Fig. 3.** Kaplan-Meier survival curve of N-myc unamplified and amplified stage 4 neuroblastoma cases (No. of cases=24)(Log rank=0.08,  $P=0.78$ ).

N-myc 유전자는 2p23-24에 존재하고, 3개의 exon으로 이루어져 있으며, 정상조직에서는 1 copy가 존재하지만, 신경모세포종을 비롯한 여러 가지 종양에서 여러 copy로 증폭될 수 있다<sup>13)</sup>. N-myc 유전자가 증폭된 경우에도 1 copy의 N-myc 이 2p23-24에 존재하는 것으로 볼 때 N-myc이 2p23-24에서 증폭된 후 떨어져 나와<sup>14)</sup>, double minutes (DMs)의 형태로 염색체외에 존재하거나, homogenous staining regions (HSRs)의 형태로 여러 염색체와 임의로 결합하여 존재한다<sup>15)</sup>.

N-myc 유전자에 의하여 합성되는 mycN 단백질은 수명이 짧고, 그 carboxy terminal에 nuclear localization signal (N)이 있어 핵 내에 존재하며<sup>16)</sup>, DNA에 결합하는 basic region (BR)을 가지고 있어 DNA와 결합할 수 있는 능력을 가진다<sup>17)</sup>. 또한 다른 단백질과 결합할 때 사용되는 helix-loop-helix (HLH)와 leucine zipper domain (Zip)<sup>18)</sup>을 가지며, N-terminal에는 전사를 활성화시킬 수 있는 기능을 가진 myc-box를 가진다<sup>19)</sup>.

세포가 여러 가지 성장인자의 자극을 받으면, mycN 단백질은 다른 BR-HLH-Zip 단백질인 max 와 HLH-Zip domain끼리 결합하여 heterodimer를 형성하고<sup>20)</sup>, 이 myc-max 이형 접합체는 DNA의 CACGTG의 염기서열에 결합하여<sup>21)</sup> 표적 유전자의 전사를 증가시킨다. 반면에 max/max homodimer는 전사를 억제시킨다<sup>22)</sup>. 신경모세포종에서 N-myc 유전자가 증폭되면 mycN의 양이 증가하여 mycN과 max간의 균형이 깨지고 mycN 단백질의 표적 유전자의 발현이 비정상적으로 증가하여 세포의 증식 및 분화과정을 변화시켜 신경모세포종의 발병에 관여한다. c-myc의 경우 ECA39, p53, ornithine decarboxylase (ODC),  $\alpha$ -prothymosin, Cdc25A 등 의 표적 유전자를 조절하고 있으나 신경모세포종에서 N-myc의 표적 유전자는 이것보다 훨씬 더 복잡하다고 한다<sup>23)</sup>. 최근 연구에 의하면 증폭된 N-myc 유전자가 모인 DMs나 HSRs에 MDM2 유전자<sup>14)</sup>나 DDX1 유전자<sup>24)</sup>가 함께 증폭되어 있어 이들도 예후에 영향을 미친다. 또한 N-myc 유전자의 증폭이 있는 신경모세포종 세포주에서 종양의 침

습 능력에 관여하는 membrane-bound type 1 matrix-degrading metalloproteinase 유전자를 활성화시키는 E1AF 전사인자는 증가하지만<sup>25)</sup> 세포간의 접착 능력에 관여하는  $\beta$ 1 integrin과 neural cell adhesion molecule (NCAM)의 발현이 감소하는 것<sup>26)</sup>으로 볼 때, N-myc 유전자가 증폭된 경우 신경모세포종의 침습 능력과 전이가 증가되어 종양이 더 악성화된다.

N-myc 유전자 증폭을 검출할 수 있는 방법에는 Southern blot, 중합효소연쇄반응, fluorescent in situ hybridization (FISH) 등 3가지가 있다. 본 연구에서 사용된 중합효소연쇄반응은 paraffin에 고정된 조직을 사용하므로 오래된 검체를 사용할 수 있고, 검체를 냉동 보관할 필요가 없다는 장점을 가지고 있을 뿐 아니라, FISH에 비하여 비용과 노력이 적게 든다. Southern blot은 수  $\mu$ g의 DNA가 필요하고, 비용이 많이 들고 1~2주의 시간이 소요되는 반면, 본 연구에서 사용한 중합효소연쇄반응은 수 ng의 DNA가 필요하고, 비용이 적게 들고 1~2 일의 시간이 소요되어, 검체를 아낄 수 있고, 비용 및 노력이 적게 들어 매우 편리한 방법으로 사용된다. 최근에는 N-myc 단백질에 대한 항체를 만들어 이를 이용하여 N-myc 단백질의 발현여부를 확인하고자 하는 시도도 있다<sup>27)</sup>.

N-myc 유전자는 임상단계가 높은 환자에서 증폭의 빈도가 더 높다는 보고가 있는데<sup>2,3)</sup>, 본 연구에서도 제 1, 2, 3 병기보다는 제 4 병기에 증폭되는 빈도가 높았으며, 예후가 좋은 것으로 알려진 1세 이전보다는 1세 이후에 더 증폭되는 빈도가 높았고, 예후가 좋은 종격동 원발 종양의 경우가 원발 종양이 부신에서 발생한 경우보다 N-myc 유전자증폭의 빈도가 낮았다.

제 1, 2, 3 병기의 Kaplan-Meier 생존분석 결과, N-myc 유전자 증폭이 있었던 군보다 N-myc 유전자 증폭이 없었던 군의 예후가 매우 좋았는데, 이는 제 1, 2, 3 병기의 신경모세포종 환자에게 현재 시행되고 있는 치료는 N-myc 유전자 증폭이 없는 군에만 유효한 것으로 사료되어, 향후 N-myc 유전자 증폭이 있는 군에 대한 새롭고 강력한 치료

의 개발이 요망된다.

제 4 병기의 Kaplan-Meier 생존분석 결과, N-myc 유전자 증폭이 없었던 군과 있었던 군간에 유의한 예후의 차이는 없었고, 두 군 모두에서 예후가 불량하였는데, 이는 N-myc 증폭군이 비증폭군에 비하여 예후가 나쁘다는 외국의 보고<sup>28)</sup>와 다른 결과를 보였다. 생각할 수 있는 이유로는 본 증례들이 본격적인 고용량 화학요법이 시작되기 전의 증례가 많았고, 최근 증례들은 추적기간이 짧았기 때문일 것으로 사료되며, 앞으로 제 4 병기의 신경모세포종에서 N-myc 증폭의 영향에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 과거의 연구와 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, N-myc 유전자의 증폭은 불량한 경과를 취하는 신경모세포종의 중요한 특징중에 하나이므로, 앞으로 진단 당시에 N-myc 유전자의 증폭여부를 확인하여 그 결과에 따라 다른 치료방침을 세우는 것이 필요할 것으로 사료된다.

현재까지 알려진 신경모세포종의 예후인자로는 연령, 임상적 병기, 소변내 VMA (vanillylmandelic acid)/HVA (homovanillic acid)의 비율, 혈중 ferritin 치, 혈중 LDH치, N-myc 유전자의 증폭, DNA의 배체성(ploidy), 1번 염색체 단완의 결실, TRK A 유전자의 발현 등이 있다. N-myc 유전자의 증폭이 있는 신경모세포종에서는 또 다른 불량 예후인자인 제 1 번 염색체의 단완의 결실도 나타나는 경우가 많다는 것은 이미 오래 전부터 알려져 왔다<sup>29,30)</sup>. 이를 두 가지의 유전학적 변화들 모두가 불량한 예후인자임에는 틀림없으나<sup>31~34)</sup>, 이들 두 가지 변화가 서로 연관되어 발생하는지, 서로 관계없이 일어나는 독립적인 불량 예후인자인지 는 아직 많은 논란이 있다. 또한 Bowman 등은 완전 절제가 불가능한 신경모세포종을 가진 영아에서 DNA 배체수, N-myc 증폭여부, 혈청 Lactate Dehydrogenase 농도로 예후를 예측할 수 있다고 하였고<sup>35)</sup>, Christiansen 등<sup>36)</sup>에 의하면 N-myc 유전자 증폭, DNA 배체수, 제 1 번 염색체 단완의 결실, CD44 발현의 예후인자로써의 의의를 분석해 본 결과 이들 모두가 예후인자로써 의의는 있으

나, 다변수 분석 결과 N-myc 유전자 증폭만이 유의하다고 보고하였다. 그 외의 유전자 이상으로는 제 2 번 염색체 장완, 제 9 번 염색체 단완, 제 11 번 염색체 장완, 제 14 번 염색체 장완, 제 14 번 염색체 장완의 결실이 있으며 이들중 제 9 번 염색체 장완의 결실만이 N-myc 유전자 증폭과 무관하게 불량한 예후인자로 작용한다<sup>37)</sup>. CD44가 양성인 경우 N-myc 증폭이 없고, 예후가 좋다는 연구도 있다<sup>38)</sup>. Brodeur 등<sup>39)</sup>은 DNA의 배체성, 제 1 번 염색체의 단완의 결실, N-myc 증폭, TRK A 유전자의 발현으로 신경모세포종을 분류하면, 3 배체성(triploid)이고 제 1 번 염색체의 단완의 결실과 N-myc 증폭이 없으며 TRK A 유전자가 많이 발현된 경우 임상병기가 낮고 예후가 좋아 90% 이상 치료 가능한 군이고, 근 2 배체성(near diploid) 혹은 4 배체성 (tetraploid)이고 N-myc 증폭이 없으며 제 1 번 염색체의 단완의 결실이나 14번 염색체 장완의 결실 등 이 동반되고, TRK A 유전자가 적게 발현된 경우 제 3, 4 병기의 나이가 많은 환자들로써 종양의 진행이 느리고 중간정도의 예후를 보여 25~50%의 완치율을 보이는 군이며, 세 번째 군은 N-myc 증폭이 있는 군으로 대부분 근 2배체성 혹은 4배체성이고 제 1 번 염색체의 단완의 결실이 있고, TRK A 유전자가 적게 발현되거나 발현되지 않고, 보통 1세에서 5세의 임상 병기가 높은 환자들로 구성된 완치율 5% 미만의 예후가 아주 나쁜 군이라고 보고하고 있다<sup>39)</sup>. 향후 국내에서도 이런 여러 가지의 분자생물학적 및 임상적 예후인자들을 이용한 예후 예측과 각 예후군에 알맞는 치료를 개발하고자하는 노력이 있어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목 적:** 본 연구의 목적은 첫째, 중합효소연쇄반응을 이용하여 N-myc 유전자의 증폭을 검출하는 방법을 개발하고, 둘째, 이를 이용하여 신경모세포종에서 N-myc 유전자 증폭의 임상적 의의를 알아보기 위함이다.

**방법:** 1984년부터 1999년까지 전국 10개 대학 병원에서 경험하였던 54례의 신경모세포종 환자에서 적출한 신경모세포종 조직의 paraffin embedded 검체에서 추출한 DNA를 사용하였다. N-myc 유전자는 RC N-myc와 N-myc 7-1 시발체를, internal standard인  $\beta$ -globin 유전자는 GH20과 PC04 시발체를 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하여, agarose gel에서 전기영동하여 N-myc 유전자의 증폭정도를 측정하여 그 임상적 의의를 분석하였다.

**결과:** 중합효소연쇄반응은 신경모세포종 조직에서 N-myc 유전자 증폭을 측정할 수 있는 매우 유용한 방법이었다. 1세 이전의 환자 12명 중 2명에서 N-myc 유전자 증폭이 있었던 반면(16.7%), 1세 이상의 환자 41명 중 14명에서 N-myc 유전자 증폭이 있어(34.1%) 1세 이상인 환자에서 N-myc 유전자가 증폭된 경우가 흔하였다( $P<0.05$ ). 부신에서 원발하였던 22례 중 9례에서 N-myc 유전자 증폭이 있어(40.9%), 17.6% (3/17)의 N-myc 유전자 증폭을 보였던 후복막강이나 16.7% (2/12)의 N-myc 유전자 증폭을 보였던 종격동에 비하여 높은 양 성률을 보였다( $P<0.05$ ). 제 1, 2, 3 임상병기에서 26.7% (8/30)에서 N-myc 유전자의 증폭이 있었던 반면 제 4 병기의 경우 33.3% (8/24)에서 N-myc 유전자의 증폭이 있었다. N-myc 유전자 증폭이 없었던 환자에서 26.97±18.26개월간 추적이 가능했고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 경우 12.38±8.58개월간 추적이 가능했다( $P<0.05$ ).

30례의 제 1, 2, 3 병기 환자 중 22례는 N-myc 유전자 증폭이 없었으며, 8례는 N-myc 유전자의 증폭이 있었는데, N-myc 유전자 증폭이 없었던 군의 평균 생존기간은 64개월이었고, N-myc 유전자 증폭이 있었던 군의 평균 생존기간은 18개월이었다(Log Rank 4.35,  $P=0.037$ ).

**결론:** 중합효소 연쇄반응은 신경모세포종에서 N-myc 유전자 증폭을 검출하는 매우 효과적인 방법이었으며, N-myc 유전자 증폭은 신경모세포종에서 불량한 예후인자임을 알 수 있었다.

#### 참 고 문 헌

- Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, et al. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastoma. *Cell* 1983;35:359-67
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in unrelated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985;313:1111-6
- Brodeur GM, Fong CT. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;41:153-74
- Brodeur GM, Azar C, Brother M. Neuroblastoma: effect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 1992;70:1685-94
- Seeger RC, Wada R, Brodeur GM. Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Progr Clin Biol Res* 1988;271:41-9
- Brodeur GM: Patterns and significance of genetic changes in neuroblastomas. In: Pretlow TP, Pretlow TG, eds. Biochemical and molecular aspects of selected tumors. Orlando. Academic Press, 1991;251-76
- 유철주, 김병수, 정우희. 신경아세포종에서 N-myc 유전자증폭에 관한 연구. 대한소아혈액종양학회지 1994;1: 227-32
- Boerner S, Squire J, Thorner P, McKenna G, Zielenska M. Assessment of MYCN amplification in neuroblastoma biopsies by differential polymerase chain reaction. *Pediatr Pathol* 1994;14:823-32
- Crabbe DCG, Peters J, Seeger RC. Rapid detection of MYCN amplification in neuroblastomas using the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1993;1: 229-34
- Gilbert J, Norris MD, Haber M, Kavallaris M, Marshall GM, Stewart BW. Determination of N-myc gene amplification in neuroblastoma by differential polymerase chain reaction. *Mol Cell Prog* 1993;7:227-34
- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130:118-26
- Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzschik KH, Nayler SL, Sakaguchi AT, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 1984;308:288-91
- Corvi R, Savelyeva L, Amler L, Handgretinger R,

- Schwab M. Cytogenetic evolution of MYCN and MDM2 amplification in the neuroblastoma LS tumour and its cell line. *Eur J Cancer* 1995;31A:520-3
15. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H. Clinical implication of oncogene activation in human neuroblastoma. *Cancer* 1986;58:541-5
  16. Dang CV, Lee WMF. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb, c-myc, N-myc, p53, HSP70 and HIV tat proteins. *J Biol Chem* 1989;30:1809-23
  17. Kouzarides T, Ziff E. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 1988;336:646-51
  18. Landschultz WH, Johnson PF, McKnight S. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988;240: 1759-64
  19. Schwab M, The myc-box oncogenes. In: Reddy EP, Skalka AM, Curran T, eds. *The oncogene handbook*. Amsterdam, Elsevier, 1988:44-59
  20. Kato GI, Lee WMF, Chen L. Max: functional domains and interaction with c-myc. *Gen Devel* 1992;6:71-80
  21. Ma A, Moroy T, Collum R. DNA binding by N- and L-myc proteins. *Oncogene* 1993;8:1093-8
  22. Wenzel A, Schwab M. The mycN/max protein complex in neuroblastoma. Short review. *Eur J Cancer* 1995;31A:516-9
  23. Ben-Yosef T, Yanuka O, Halle D, Benvenisty N. Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced tumors. *Oncogene* 1998;16:165-71
  24. Manhar CF, Salwen HR, Brodeur GM, Cohn SL. Co-amplification and concomitant high levels of expression of DEAD box gene with MYCN in human neuroblastoma. *Gene Chromo Cancer* 1995;14:196-203
  25. Taguchi K, Yoshida K, Sasaki F, Fujinaga K. Two transcriptional factors, E1AF and N-myc, correlate with the invasiveness of neuroblastoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:394-400
  26. Judeware R, Culp LA. Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of  $\beta 1$  integrin subunit. *Oncogene* 1995;11:2599-607
  27. Yang HW, Hemmi H, Ikeda H, Kato K, Tsuchida Y. A polyclonal antibody against synthetic peptide conserved in N-myc protein reacts with water-soluble recombinant N-MYC protein. *Oncol Rep* 1999;6:107-11
  28. Kaneko M, Nishihira H, Mugishima H, Ohnuma N, Nakada K, Kawa K, et al. Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. Study group of Japan for treatment of advanced neuroblastoma, Tokyo, Japan. *Med Pediatr Oncol* 1998;31:1-7
  29. Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, et al. Loss of heterozygosity for chromosome 1p in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3753-7
  30. Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, Cavenee WK, Kern SE, et al. Loss of heterozygosity for chromosome 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1992;52:1780-5
  31. Hayashi Y, Hanada R, Yamamoto K. Chromosome findings and prognosis in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;29:175-7
  32. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takeda T, et al. Different karyotypic patterns in early and advanced stage neuroblastomas. *Cancer Res* 1987;47:311-8
  33. Christiansen H, Lampert F. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* 1988;57:121-6
  34. Hayashi Y, Inabada T, Hanada R. Chromosome findings and prognosis in 15 patients with neuroblastoma found by VMA mass screening. *J Pediatr* 1988;112: 67-71
  35. Bowman LC, Castleberry RP, Cantor A, Joshi V, Cohn SL, Smith EI, et al. Genetic staging of unresectable or metastatic neuroblastoma in infants: a pediatric oncology group study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89: 373-80
  36. Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe H-J, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31a:541-4
  37. Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, et al. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 1995;11:1829-34
  38. Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz D, Perussiau G, Philip T, et al. Clinical relevance of CD44 cell-surface expression in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas. *J Clin Oncol* 1996;14:25-34
  39. Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1995;31A:505-10