

포상기태에서 암유전자 C-MYC, C-RAS, C-ERB B-2 및 P53 유전자 발현에 대한 연구

전남대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*
최호선 · 김석모 · 박창수*

Expression of C-MYC, C-RAS, C-ERB B-2 Oncogenes and P53 Gene in Hydatidiform Mole

Ho Sun Choi, M.D., Seok Mo Kim, M.D., Chang Soo Park, M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, Pathology*, Chonnam National University Medical School,
Gwangju, Korea

Objective : To date early predictors for the development of persistent gestational trophoblastic disease (PGTD) after evacuation of a complete hydatidiform mole were not known. The purpose of this study was to investigate whether there is a correlation between oncogene expression and PGTD after evacuation of molar pregnancy.

Methods : The expression of c-myc, c-ras, c-erb B-2 oncogene and p53 gene product in paraffin-embedded trophoblastic tissues using immunohistochemical staining were investigated retrospectively. We compared 20 cases of PGTD group with 20 cases of spontaneous regression group after molar evacuation.

Results : Expression of p53 gene was in 25% of regression group while it was detected in 15% of PGTD group. The c-myc, c-ras, c-erb B-2 oncogene product was detected in 80%, 20%, 40% of regression group while it was detected in 75%, 15%, 65% of PGTD group respectively.

Conclusion : This result showed that correlation between c-myc, c-ras, c-erb B-2 and p53 gene product expression and PGTD is not significant.

Key Words : c-myc, c-ras, c-erb B-2, p53, Hydatidiform mole

서 론

최근의 연구로 포상기태를 제거 후에 지속성 용모성 질환으로 발생할 가능성이 많은 임상 및 병리학적인 위험 인자들이 발견되고 있으나 현재까지 나중에 지속성 용모성 질환으로 발전될 환자들을 미리 예측할 수 있는 어떤 인자도 아직 보고되지 않고 있다. 이들 인자들은 임상 상태와 조직학적 면역학적 특성 및 세포유전학적인 특성들이 관여하리라고 생각되고 있다. 포상기태 환자에서 지속성 용모성 질환의 발생을 조기에 예측할 수 있다면 이 환자들에게 항암화학 요법이나 다른 유용한 치료들을 조기에 시행할 수 있게

되어 도움을 줄 수 있을 것이다.

포상기태를 제거한 후에 80%는 자연 관해가 이루어지나 20%는 지속성 용모성 질환으로 발전하게 된다.^{1,2} 현재 지속성 용모성 질환을 조기에 진단하려면 β -hCG치를 지속적으로 측정하는 것이 가장 정확한 방법으로 알려져 왔다. 포상기태를 제거 후에 계속적인 용모성선 자극호르몬을 측정하더라도 포상기태가 자연 소실되어 β -hCG가 정상으로 돌아오는 데는 약 4-12주가 소요된다.^{3,4} 그러므로 포상기태를 제거 후에 연속적인 β -hCG 측정으로 지속성 용모성 질환을 진단하려면 적어도 1-2개월이 소요되어 이들을 미리 정확하게 진단할 다른 방법들이 필요하게 되었다.

최근에는 종양의 발생에 관여하는 인자들로 여러 유전자들과의 연관성이 대두되었다. 여러 가지 종양 유전자들은 정상 세포들의 성장과 분화에 관여하며 이들이 점돌연변이, 전위, 소실 등이 발생하면 세포의 성장과 분화의 조절에서 종양 발생으로 변화된다고 한다.^{5,6} 그래서 포상기태를 제거 후 지속성 용모성질환으로 발생하는데 종양 유전자들과의 상호 연관을 알아보고자 이 연구를 시도하였다.

연구 대상 및 방법

1994년부터 2000년까지 전남대학교병원 산부인과에서 포상기태로 흡인 소파한 후 β -hCG치를 연속 측정하여 자연 소실된 20예와 β -hCG치가 상승하거나 전이가 발견되어 항암화학요법을 시행한 20예를 대상으로 하였으며 모두 흡인 소파술로 제거된 포상기태의 파라핀 포매괴를 이용하여 면역조직화학 염색하여 암유전자 c-myc, c-ras, c-erb B-2와 종양 억제 유전자 p53의 발현을 조사하였다.

임상경과를 알 수 없도록 무작위로 선택된 포상기태 환자들의 조직번호만을 병리의사에게 주어 면역조직화학 염색하게 하였고 한 명의 병리 의사가 그 발현 정도를 판정하였다.

면역조직화학적 염색법은 10% 중성 완충 포르말린에 고정된 후 제작한 파라핀 포매괴를 3 μ m 두께로 박절하여 Probe-On Plus 슬라이드에 부착시켜 건조시킨 다음 검색에 사용하였고 염색의 전과정은 Probe-On Plus 슬라이드를 맞대어 생기는 capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 Microprobe System (Fisher)을 이용하였다. 파라핀 절편이 부착된 슬라이드는 탈 파라핀과 함수과정을 거친 후 내재성 과산화효소를 억제 할 목적으로 Autoblocker (Research Genetics)에 3분간 부치시켰다. p53 단백질의 면역조직화학적 염색은 다른 조직항원과 다르게 항원 검색방식(antigen retrieval system)을 이용하였다. 항원 검색방식은 조직 절편을 0.01 M citrate 완충액에 담귀서 전자렌지(삼성 630W)에서 5분씩 3번 가온시켰다. 일차항체는 p53 (DO-1, Santa Cruz), c-erb B2 (Zymed), c-myc (Novocastea), c-ras (Oncogene Scinece)를 이용하였고, 40℃에서 15분간 부치시켰다.

일차 항체의 부치가 끝난 후 0.01 M Tris 완충액으로 세척하고 anti-mouse IgG (Sigma)에 8분간 부치하였다. 이차 항체의 부치가 끝난 후 완충액으로 세척

하고 검출기에 10분간 작용시킨 다음 10분간 작용시킨 다음 10분간 발색시켰다. 검출제는 streptavidin-horseradish peroxidase로 하였고 발색제는 적갈색의 색조를 나타내는 3-aminoethyl carbazole을 이용하였다. 대조염색은 헤마톡실린을 이용하였고 Universal mount (Research Genetics)로 봉입한 후 양성 반응을 광학현미경으로 검색하였다. 염색의 전 과정에 있어서 부치 온도는 40℃로 하였으며 음성대조군은 일차 항체 대신 항체 희석액을 부치시켜 실험에 이용하였다.

c-myc, c-ras, c-erb B-2에 대한 양성반응은 염색의 강도에 따라 약한 양성 반응(1+), 중등도의 양성 반응(2+), 강한 양성 반응(3+)으로 구분하였으며 p53은 염색된 핵의 세포 수가 25% 미만(1+), 25-50%(2+), 50% 이상(3+)으로 표시하였다.

결 과

p53 항체는 핵에서 적색으로 발현되었는데 염색된 핵의 세포 수가 50% 이상이 발현된 것은 나중에 지속성 용모성 질환으로 된 포상기태에서 15%, 자연 관해된 포상기태군에서는 25%가 발현되었다(Table 1, Fig. 1). c-myc 항체는 세포질에서 관찰되었는데 후에

Table 1. Evidence of p53 antibody staining in patients subgroups

p53 immunostaining	PGTD (%)	Spontaneous Resolution (%)
1+	7 (35)	8 (40)
2+	10 (50)	7 (35)
3+	3 (15)	5 (25)
Total	20	20

*PGTD: Persistent Gestational Trophoblastic Disease.

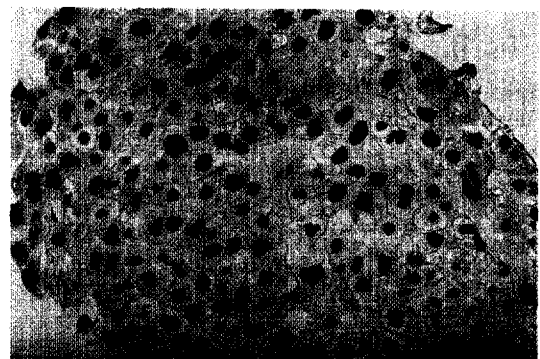


Fig. 1. Photomicrograph showing positive nucleus staining for p53 gene in Hydatidiform mole.

지속성 용모성 질환으로 된 포상기태에서 강양성으로 염색된 것은 75%, 자연 관해된 포상기태 조직에서는 80%가 발현되었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Evidence of c-myc antibody staining in patients subgroups

c-myc immunostaining	PGTD (%)	Spontaneous Resolution (%)
1+	2 (10)	1 (5)
2+	3 (15)	3 (15)
3+	15 (75)	16 (80)
Total	20	20



Fig. 2. Photomicrograph showing positive cytoplasm staining for c-myc oncogene in Hydatidiform mole.

c-ras항체도 역시 세포질에서 발현되었는데 지속성 용모성질환으로 된 포상기태에서는 강양성으로 염색된 것은 15%였고 자연관해된 포상기태 조직에서는 20%가 발현되었다(Table 3, Fig. 3). c-erb B-2 항체는 세포질막에서 발현되었는데 나중에 지속성 용모성질환으로 된 군에서는 강양성으로 65%가 발현된 반면 자연관해된 포상기태에서는 40%가 발현되었다(Table 4, Fig. 3).

Table 3. Evidence of c-ras antibody staining in patients subgroups

c-ras immunostaining	PGTD (%)	Spontaneous Resolution (%)
1+	11 (55)	6 (30)
2+	6 (30)	10 (50)
3+	3 (15)	4 (20)
Total	20	20

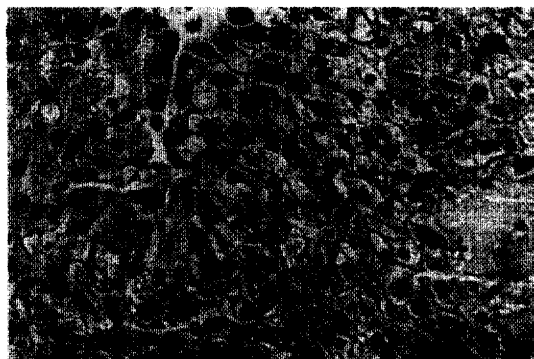


Fig. 3. Photomicrograph showing positive cytoplasm staining for c-ras oncogene in Hydatidiform mole.

Table 4. Evidence of c-erb B-2 antibody staining in patients subgroups

c-erb B-2 immunostaining	PGTD (%)	Spontaneous Resolution (%)
1+	1 (5)	4 (20)
2+	6 (30)	8 (40)
3+	13 (65)	8 (40)
Total	20	20



Fig. 4. Photomicrograph showing positive membrane staining for c-erb B-2 oncogene in Hydatidiform mole.

고 찰

포상기태를 소파한 후 대부분은 자연적으로 관해되나 약 10-20%에서 지속성 용모성 질환으로 발전하게 된다. 지속성 용모성 질환으로 발생할 가능성이 높은 위험인자들은 환자의 연령이 40세 이상, 커다란 난소 과립막 종양, 자궁 용적의 크기 증가, 분만 횟수, 포상

기태의 기왕력, 높은 융모성선 자극 호르몬치 등이라고 알려졌다.²

Parazzini 등⁷은 지속성 융모성 질환을 예측할 인자들에 대한 다변량 분석을 시행하여 어떠한 위험인자들이 있다하더라도 정확하게 이들을 예측할 수 있는 것은 단지 69%라고 하였다. 이 한계 때문에 이들의 예후 인자들을 이용하여 예방적인 항암화학요법을 시행하기 어렵고 이들 인자들에 대한 임상적인 이용을 할 수 없게 된다.

포상기태를 제거한 후에 지속성 융모성 질환을 진단하는데는 융모성선 자극 호르몬을 연속적으로 측정하여 하강하지 않거나 상승하는 것을 발견하여 진단하므로 포상기태를 제거 후에 2개월까지 진단 및 치료가 지연되게 된다. 그러나 현재까지 지속성 융모성 질환을 조기에 진단할 유용한 어떤 임상적, 조직학적, 세포발생학적, 면역조직학적 인자들도 없었다.

Yohkaichiya 등⁸은 전향적인 연구로 포상기태 환자의 혈청에서 inhibin 농도를 측정하여 이들이 지속성 융모성 질환의 조기 진단에 유용할 수 있을 것이라고 추측하였으나 이들의 혈청 표지물에 대해서는 앞으로 임상적인 유용성이 검토되어야 할 것이다.

유식세포기를 이용한 연구에서 Hemming 등⁹은 DNA 양이 포상기태를 진단하는데는 유용하였으나 지속성 융모성질환을 예측하는데는 사용할 수 없었다.^{10,11}

hybridization in situ 기법을 사용하여 Sarkar 등¹²은 포상기태 및 융모암, 조기 정상임신 융모에서 c-myc, c-ras 종양 유전자들이 강양성으로 발현되나 만기의 태반에서는 발현되지 않음을 보고하였다. 이 연구에서는 c-myc 종양 유전자는 후에 지속성 융모성 질환으로 될 포상기태나 자연 관해된 포상기태 양 군에서 모두 75-80%가 강양성으로 발현되었으나 c-ras 종양 유전자는 강양성으로 발현된 것이 15-20%로 적어서 이들의 보고와는 상이하였다. Maruo와 Mochizuki¹³는 인간 태반에서 c-myc과 표피성장인자 항체를 면역조직화학적으로 조사한 바 거의 대부분이 syncytiotrophoblast에 위치하여 이들이 융모의 분화에 관여하리라고 추정하였다.

c-erb B-2 단백질은 막 수용체로 알려졌으며 그 기능에 대해서는 아직 불명이나 표피성장인자와 구조가 비슷하므로 이것도 세포의 종양화 또는 성장의 조절에 관여하는 것 같다고 하였다.¹³ 포상기태에서 c-erb B-2의 발현에 대해 Cameron 등¹⁴은 나중에 지속성 융모성질

환으로 발전된 20예 중 단지 1예에서 발현을 보고하였으나 이 연구에서는 20예 중 13예(65%)가 강양성으로 발현되었고 포상기태를 흡인 소파 후 자연 관해된 군에서는 40%가 강양성으로 발현되어 상이한 결과를 나타내어 민족적인 차이가 아닌가 사료되었다.

p53 단백질은 wild형과 돌연변이형으로 구분되며 wild형의 p53 단백질은 정상세포에서도 출현되나 반감기가 매우 짧아 면역조직화학 염색법으로는 거의 발현되지 않으며¹⁵ 면역조직화학염색법에 의해 염색되는 p53 단백질은 반감기가 긴 돌연변이형이 대부분을 점한다고 하였다.¹⁶

Chen 등¹⁷은 24예의 포상기태에서 SSCP법으로 p53 유전자의 돌연변이를 조사한바 단지 1예에서만 점돌연변이를 발견하여 p53 유전자는 융모성질환의 발생 원인과 관련이 적을 것이라고 했으며 Cheung 등¹⁸은 p53 유전자와 포상기태 제거 후 지속성 융모성 질환으로 된 예들을 비교한 바 관련성이 없었다고 하였고 이 연구에서도 나중에 지속성 융모성 질환으로 된 포상기태 중 3예(15%), 자연 관해된 포상기태 중 4예(25%)에서 p53 단백질이 강양성으로 발현되어 p53 유전자의 발현이 지속성 융모성 질환을 예측하는데 관계가 없었다.

최근에 Chiu 등¹⁹은 자연고사하는 빈도가 나중에 항암화학요법을 필요로 하는 군 보다 자연관해되는 군에서 유의있게 높았다고 보고하고 있으나 지속성 융모성 질환으로 발전할 포상기태를 미리 예측하여 임상에 사용하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각되었다.

이상의 연구 결과로 포상기태에서 종양 유전자 c-myc, c-erb B-2의 발현은 강양성의 발현율이 많았으나 c-ras 종양 유전자는 이들 보다 강양성의 발현율이 적었고 종양 억제 유전자인 p53 유전자의 강양성의 발현율도 비교적 적었고 후에 지속성 융모성 질환으로 진행될 포상기태와 자연 관해된 포상기태를 구분하여 조사한 바 이들의 발현율이 서로 비슷하여 c-myc, c-erb B-2, c-ras 종양 유전자 및 p53 종양 억제 유전자의 발현으로는 지속성 융모성 질환의 발생을 예측할 수 없으리라고 사료되었다.

참고문헌

1. Schlaerth JB, Morrow CP, Kletzky OA, Nalick RH, d'Ablaing GA. Prognostic characteristics of serum

- human chorionic gonadotropin titer regression following molar pregnancy. *Obstet Gynecol* 1981; 58: 478-82.
2. Lurain JR, Brewer JI, Torok EE, Halpern B. Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 591-5.
 3. Morrow CP, Kletzky OA, DiSaia PJ, Townsend DE, Mishell DR, Nakamura RM. Clinical and laboratory correlates of molar pregnancy and trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 128: 424-30.
 4. Hatch KD, Shingleton HM, Austin JM Jr, Boots LR, Younger JB, Soong SJ. Southern Regional Trophoblastic Disease Center. *South Med J* 1978; 71: 1334-6.
 5. Seemayer T. Molecular mechanisms of oncogenesis. *J Lab Invest* 1989; 60: 585-97.
 6. Muschel R. Oncogenes, tumor formation, and tumor progression. *Adv Oncol* 1990; 6: 2-5.
 7. Parazzini F, Mangili G, Belloni C, LaVecchia C, Liati P, Marabini R. The problem of identification of prognostic factors for persistent trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1988; 30: 57-62.
 8. Yohkaichiya T, Fukaya T, Hoshiai H, Yajima A, Krester D. Inhibin: a new circulating marker of hydatidiform mole? *BMJ* 1989; 298: 1684-6.
 9. Hemming J, Quirke P, Womack C, Wells C, Elston M, Pennington GW. Diagnosis of molar pregnancy and persistent trophoblastic disease by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1987; 40: 615-20.
 10. Hemming J, Quirke P, Womack C, Wells C, Elston M, Pennington GW. Flow cytometry in persistent trophoblastic disease. *Placenta* 1988; 9: 615-21.
 11. Lage J, Driscoll S, Yavner D, Olivier A, Mark AP, Weinberg SD. Hydatidiform moles: application of flow cytometry in diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 586-600.
 12. Sarkar S, Kacinski B, Kohorn E, Merino M. Demonstration of myc and ras oncogene expression by hybridization in situ in hydatidiform mole and in the BeWo choriocarcinoma cell line. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 390-3.
 13. Maruo T, Mochizuki M. Immunocytochemical localization of epidermal growth factor receptor and myc oncogene product in human placenta: implication for trophoblast proliferation and differentiation. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 727.
 14. Cameron B, Gown AM, Tamimi HK. Expression of c-erb B-2 oncogene product in persistent gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1616-22.
 15. Iggo R, Gatter K, Bartek I. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-9.
 16. Ogden GR, Kiddie RA, Lunney DP. Assessment of p53 protein expression in normal benign and malignant oral mucosa. *J Pathol* 1992; 166: 389-94.
 17. Chen CA, Chen YH, Chen TM, Ko TM, Wu CC, Lee CN, Hsieh CY. Infrequent mutation in tumor suppressor gene p53 in gestational trophoblastic neoplasia. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2221-3.
 18. Cheung AN, Shen DH, Khoo US, Chiu MP, Tin VP, Chung LP, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumor suppressor gene in gestational trophoblastic disease: correlation with mdmz, proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9: 123-30.
 19. Chiu PM, Ngan YS, Khoo US, Cheung AN. Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* 2001; 38: 243-9.

국문초록

목적 : 현재까지 포상기태를 흡인소파 후에 지속성 용모성 질환으로 진행될 것을 예측하는 방법은 알려져 있지 않다. 이 연구는 포상기태에서 암유전자들과 p53 유전자가 지속성 용모성 질환을 예측하는데 관계가 있는지를 알아보고자 하였다.

연구 방법 : 포상기태를 소파 후 지속성 용모성 질환으로 진행된 군과 자연 관해된 군을 각각 20명을 후향적으로 선정하여 그들의 파라핀 포매 조직에서 면역조직화학법으로 암유전자 c-myc, c-ras, c-erb B-2 및 p53 유전자들의 발현율을 검사하여 이를 비교하였다.

결과 : p53, c-myc, c-ras, c-erb B-2 항체가 강양성 반응은 각각 차례대로 지속성 용모성 질환에서는 15%, 75%, 15%, 65%였으며 자연관해군에서는 25%, 80%, 20%, 40%가 발현되었다.

결론 : 포상기태 치료 후 지속성 용모성 질환으로 진행될 군과 자연 관해될 군에서 암유전자 c-myc, c-ras, c-erb B-2 및 p53 유전자들의 발현율이 비슷하여 이것으로는 지속성 용모성 질환의 발생을 예측할 수 없었다.

중심단어 : 포상기태, c-myc, c-ras, c-erb B-2, p53