

## 결장 및 직장암에서 c-myc, c-erb B<sub>2</sub> 및 c-Ha ras 암유전자의 발현

전남대학교 의과대학 외과학교실 및 병리학교실\*

김 영 진 · 박 창 수\*

= Abstract =

### Expression of Cellular Oncogenes in Colorectal Cancer

- c-cyc, c-erb B<sub>2</sub> and c-Ha ras -

Young Jin Kim, M.D. and Chang Soo Park, M.D.\*

*Department of Surgery and Pathology\*, Chonnam University Medical School*

Multiple heterogenous genes are correlated with carcinogenesis of colorectal cancer. However, the causative factors and molecular mechanisms of colorectal carcinogenesis have not been fully determined. Expression of oncogenes in colorectal cancer tissue was evaluated with immunohistochemical staining methods using monoclonal antibodies to products of the oncogenes. Rates of expression in colorectal cancer tissue were 26% for c-myc, 89% for c-erb B<sub>2</sub>, and 63% for c-Ha ras oncogenes. Expression of these oncogenes in colorectal cancer was not correlated with the histologic differentiation, the pathological stage, location of cancer and DNA ploid pattern. The rate of expression of c-myc and c-Ha ras oncogenes in colorectal cancer tissues was correlated with each other. Expression of c-myc, c-Ha-ras, and c-erb B<sub>2</sub> oncogenes did not correlete with other prognostic factor such as DNA ploidy pattern and pathological stage.

**Key Words:** Oncogenes, Colorectal cancer

### 서 론

암은 기본적으로 유전적 변이, 즉 우성 및 열성 돌연변이와 DNA의 재배열 등에 의한 세포 성장 특성의 변화이며 따라서 정상세포를 암변형시키는 유전적 변이에 관한 연구는 암 발생의 기전을 연구하는데 매우 중요하다. 유전자의 변이가 암 발생의 중요기전이라는 것은 암의 유전적 성향, 암세포의 염색체이상의 발견, 돌연변이의 발암성 등으로 시사되어 왔었으며 이제는 활성화 암유전자 및 암억제 유전자의 발견으로

확실한 사실로 되었다. 현재까지 약 60여종의 암유전자가 밝혀져 있고 이러한 암유전자들이 증폭, 전위, 돌연변이를 일으키거나 retrovirus의 감염에 의해서 활성화되어 암을 유발한다고 알려져 있다. 또한 암유전자들은 미분화 암세포에서 특이하게 발현되고 이러한 암유전자와 유전자산물은 종양표식자로 이용될 수 있다.

c-myc유전자는 8번 염색체의 q<sup>24</sup>에 위치하고 세포의 증식과 밀접한 관계가 있고, c-erb B<sub>2</sub>는 17번 염색체에 위치하며 epidermal growth factor receptor와 밀접하다. 또한 c-Ha-ras유전자는 codon 12

의 변이 암유전자이고 GTP와 결합하여 GTPase활성을 나타내는데 이 유전자의 변화는 상부 및 하부 위장관의 종양의 원인으로 생각되어진다.

이에 저자들은 결장 및 직장암에서 이들 암유전자의 발현 정도와 암의 악성도 및 진행 정도와의 관계를 규명하기 위하여 전남대학교 병원에서 수술을 받았던 38례의 결장 및 직장암환자의 조직표본에서 c-ras, c-myc 및 c-erb B<sub>2</sub> 암유전자 산물을 면역조직화학적으로 관찰하고 이를 핵산 배수성, 임상병기 및 조직학적인 분화도와와의 상관관계를 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 대 상

38예의 대장암 환자 중 남자가 25예 여자가 13예였고, 12예는 결장암이었고 26예는 직장암이었으며, DNA Ploidy 양상은 17예 45%에서는 Aneuploid였고 21예 55%는 diploid였다.

### 2) 조직 처치

4~5 μm의 두께로 파라핀조직을 잘라 증류수가 포함된 수조에 띄운 후 양전하를 띄는 슬라이드에 부착시킨다. 무수알코올에 1분간 두차례 넣어 파라핀을 없앤 후 acid-alcohol-iodine 용액 (95% ethanol, 8 mM iodine, 0.5% HCl, 0.05% Tween 20)에 30초간 두차례 둔 후, Tris-ethanol을 10초간 두차례 두어 가수한 후 섭씨 45도의 펩신용액에 8분둔 후 Tris-ethanol로 10초간 세척한다.

### 3) 면역세포화학적 조작

일차항체용액을 모세관에 채운 후 섭씨 45도에서 8분 배양 후 Tris-ethanol로 10초간 세척하고 0.6%의 hydrogen peroxide가 포함된 Tris-ethanol에 1분간두어 조직편내에 존재하는 peroxidase의 작용을 억제한다. 2차항체를 주고 섭씨 45도에서 3분간 배양 후 streptavidin-horseradish peroxidase를 주고 섭씨 45도에서 4분 배양한다. 그후 chromogen을 각 조직편에 화학적인 보조제와 번갈아 가며 적용시킨다<sup>11)</sup>. 단클론항체는 c-myc은 Cambridge Research Biochemicals Limited사의 CT14을 사용하였고, c-Ha-ras는 Oncogene Science사의 Ab-1을

사용하였으며, c-erb B<sub>2</sub>는 Triton Diagnostics사의 mAB 1을 사용하였다.

## 결 과

대장암조직에서 각 암유전자의 발현빈도는 c-myc은 38예 중 10예에서 발현 하였고(26%), c-erb B<sub>2</sub>는 34예에서 발현하여 89%에서 양성을 보였으며, c-Ha ras는 24예(63%)에서 양성소견을 보였다. 암유전자의 발현과 병리학적인 암병기와의 상관관계를 보면 대장벽에 국한된 Dukes A와 B환자와 림프절이나 혈행성 전이를 보이는 Dukes C와 D환자로 구분하여 본결과 각 암유전자의 발현과 암병기와의 관계는 통계학적으로 유의있는 차이는 발견할 수 없었다(Table 1). 암유전자의 발현과 대장암 조직의 DNA ploidy형과의 관계를 보면 각 암유전자의 발현여부와 Aneuploid나

Table 1. Relationship between expression of oncogenes and pathological stages\*

	Dukes' A & B	Dukes' C & D
c-myc (+)	4	6
c-myc (-)	8	20
c-erb B <sub>2</sub> (+)	12	22
c-erb B <sub>2</sub> (-)	0	4
c-Ha ras (+)	9	15
c-Ha ras (-)	3	11

\*p>0.05

Table 2. Relationship between expression of oncogenes and DNA ploidy patterns\*

	Aneuploid	Diploid
c-myc (+)	4	6
c-myc (-)	13	15
c-erb B <sub>2</sub> (+)	15	19
c-erb B <sub>2</sub> (-)	2	2
c-Ha ras (+)	10	14
c-Ha ras (-)	7	7

\*p>0.05

**Table 3.** Relationship between expression of oncogenes and location of cancers\*

	Colon	Rectum
c-myc (+)	5	5
c-myc (-)	7	21
c-erb B <sub>2</sub> (+)	11	23
c-erb B <sub>2</sub> (-)	1	3
c-Ha ras (+)	8	16
c-Ha ras (-)	4	10

\*p>0.05

**Table 4.** Relationship between expression of oncogenes and location of cancers\*

	Well & Moderate	Poor & Mucinous
c-myc (+)	9	1
c-myc (-)	25	3
c-erb B <sub>2</sub> (+)	32	2
c-erb B <sub>2</sub> (-)	2	2
c-Ha ras (+)	21	3
c-Ha ras (-)	13	1

\*p>0.05

Diploid여부와는 상호관계가 없었다(Table 2). 암유전자의 발현여부와 암의 위치 즉 결장암인가 혹은 직장암인가의 여부와는 상관관계가 없었다(Table 3).

조직의 분화도는 고분화암과 중분화암이 총 38예 중 34예 89%를 차지하여 대부분이 분화가 잘된 암이었는데 이와 저분화암 혹은 점액성암을 구분하여 본 결과 조직의 분화도와 암유전자의 발현과는 유의할만한 차이점을 발견할 수 없었다(Table 4). 암유전자 발현의 상호간의 관계를 살펴보면 c-myc과 c-erb B<sub>2</sub> 혹은 c-erb B<sub>2</sub>와 c-Ha-ras와는 상관관계가 없었으나 c-myc과 c-Ha-ras와는 서로 양성과 양성, 혹은 음성과 음성인 경우가 통계학적으로 유의있게 차이가 없었다(Table 5).

## 고 안

인간의 암종에는 30가지 이상의 암유전자가 발현되

**Table 5.** Relationship between c-Ha-ras and c-myc in the colorectal cancer\*

c-Ha-ras \ c-myc	Positive	Negative	Total
Positive	9	1	10
Negative	15	13	28
Total	24	14	38

\*P=0.04 by Fisher

고 있는데 이러한 암유전자들은 정상세포에서 악성종양의 발생에도 관여하고 또한 생물학적으로 악성도가 적은 암에서 악성도가 심한 암으로 진행할 때 관여한다고 알려져 있다. 이러한 암유전자들은 기능적으로나 세포내의 위치가 서로 다르다. 암이 이형질성을 갖는 것은 암의 특징중의 하나인데 원발성암, 전이성암과 항암제에 대한 내성을 갖게 되기까지 암의 DNA가 다양하고 생물학적인 특성이 다르다. 암이 진행하면서 세포내에 특정한 암유전자가 발현이 특징적으로 나타날 수 있다. 여러가지 암유전자와 결장 및 직장암의 암의 분화정도나 조직학적인 경과의 관계는 완전히 규명되지 않았으며 저자의 경우에도 그러한 연관성을 발견할 수 없었다.

c-myc암유전자는 염색체 8번의 q<sup>24</sup>에 위치하는데, 세포의 성장, 분화 및 종양형질변화에 관여하고 c-myc암유전자는 대장암에서 양성에서 악성으로의 변화에 중요한 생물학적인 표지자로 알려져 있으며 대장용종의 암발생의 가능성을 아는데 유용한 표지자이다<sup>1)</sup>. c-myc암유전자는 예후를 결정하고 치료의 방법을 결정하는데 유용하다<sup>13)</sup>. c-myc암유전자는 정상 및 변환된 세포의 증식에 관여하고<sup>11)</sup> 소화관의 암 및 정상 점막에서 5-bromo-2-deoxyuridine의 표지 지표와 비례한다고 알려져 있다<sup>12)</sup>. 또한 대장암의 암성변화 중 c-myc 암유전자가 증가하여 암의 발생에도 관여함이 보고되고 있다<sup>3)</sup>. c-erb B<sub>2</sub>암유전자는 17염색체에 위치하고 EGFR(epidermal growth factor receptor)와 구조적으로 밀접한 관계를 갖고 있고, 선암에서 많이 발견되며 c-erb B<sub>2</sub>암유전자의 과도한 발현은 위암에서 예후가 불량한 것으로 알려져 있다<sup>15)</sup>. 또한 대장암에서도 예후인자로서의 가능성이 있고<sup>9)</sup>, c-erb B<sub>2</sub> 암유전자가 발현시 5 FU에 대한 내성을 갖는

다고 보고하고 있다. 하지만 저자의 경우에는 c-erb B<sub>2</sub> 암유전자와 다른 예후인자와의 상호관계는 인정할 수 없었다.

c-Ha ras 암유전자는 codon 12의 변형유전자로서 이 유전자의 산물인 p<sup>21</sup>단백은 GTPase의 기능을 갖고 있다. c-erb B<sub>2</sub> 암유전자는 상부 및 하부 위장관 종양의 분자생물학적인 단계에서의 원인인자로 알려져 있다. c-erb B<sub>2</sub>이 대장의 용종에서 발견을 보고하고 있고<sup>16)</sup>, 이러한 용종의 암발생의 가능성과 밀접한 관계가 있다고 한다<sup>7)</sup>. 대장암의 발생에 밀접하며<sup>2,5)</sup>, 종양의 진행에 관여하고<sup>8,14)</sup>, 유사분열과 관계가 깊다는 보고도 있으며, 암의 전이에 관여하는 암유전자로 알려져 있다<sup>10)</sup>.

저자의 경우 대장암에서 c-Ha ras암유전자의 발현율은 63%를 보였으나 다른 예후인자 즉 암병기, 조직학적인 분화도, DNA ploidy양상 등과는 상관관계가 없었다. 위암에서는 c-myc과 c-Ha-ras암유전자와 전이여부 등의 예후인자와 상호관계가 있다<sup>6)</sup>. 그러나 c-myc과 c-Ha ras 암유전자와는 상호간에 유의한 상관관계를 보여주고 있어서 앞으로 지속적인 연구를 필요로 한다고 하겠다.

### 결 론

저자들은 38예의 결장 및 직장암환자의 조직표본에서 c-ras, c-myc 및 c-erb B<sub>2</sub> 암유전자 산물을 면역조직화학적으로 관찰하고 이를 핵산 배수성, 임상병기 및 조직학적인 분화도와 상관관계를 분석한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1) 대장암 조직에서 c-myc, c-erb B<sub>2</sub> 및 c-Ha-ras 암유전자의 발현율은 각각 26%, 89%와 63%였다.

2) c-myc, c-erb B<sub>2</sub> 및 c-Ha-ras 암유전자의 발현과 종양의 위치, DNA ploidy형태, 암병기 및 조직학적인 분화도와는 관계가 없었다.

3) c-myc와 c-Ha-ras암유전자 상호간에는 유의한 상관관계가 있었다.

4) 위암이나 다른 종양에서와 달리 이러한 암유전자들을 예후인자로 사용할 수는 없으리라 여겨진다.

### REFERENCES

- 1) Calabretta BC, Kacmarek L, Ming PML, Au F, Ming SC: *Expression of c-myc and other cell cycle-dependent gene in human colon neoplasia. Cancer Res* 45: 6000-6004, 1985
- 2) Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR: *Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. Nature* 297: 479-483, 1982
- 3) Guillem JG, Hsieh LL, O'Toole KM, et al: *Changes in expression of oncogenes and endogenous retroviral-like sequences during colon carcinogenesis. Cancer Res* 48: 3964-3971, 1988
- 4) Imaseki H, Hayashi H, Taira M, et al: *Expression of c-myc oncogene in colorectal polyps as a biological marker for monitoring malignant potential. Cancer* 64: 704-709, 1989
- 5) Kim YG, Park SM, Chang SK, Joo SY: *Point mutation of c-K-ras oncogene and p21 protein expression of v-K-ras & v-H-ras of dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. J Korean Cancer Assoc* 24: 619, 1992
- 6) Kim YJ, Ghu HD, Kim DY, Kim HJ, Kim SK, Park CS: *Expression of cellular oncogenes in human gastric carcinoma: c-myc, c-erb B<sub>2</sub>, and c-Ha-ras. J Surg Oncol* 54: 167-170, 1993
- 7) Michelassi R, Leuthner S, Lubinski M, Bostwick D, Rodgers J, et al: *Ras oncogene p21 levels parallel malignant potential of different human colonic benign conditions. Arch Surg* 122: 1414-1416, 1987
- 8) Ohuchi N, Hand PH, Merlo G, et al: *Enhanced expression of c-Ha-ras p<sup>21</sup> in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. Cancer Res* 47: 1413-1420, 1987
- 9) Pavelic ZP, Pavelic L, Lower EE, Gapany M, Gapany S, Barker EA, Preisler HD: *c-myc, c-erb B-2, and Ki-67 expression in normal breast tissue and in invasive and noninvasive breast carcinoma. Cancer Res* 52: 2597-2602, 1992
- 10) Price JE, Aukerman SL, Ananthaswamy HN, McIntyre BW, Schackert G, Schackert HK, Fidler IJ: *Metastatic potential of cloned murine*

- melanoma cells transfected with activated c-Ha-ras. Cancer Res 49: 4274-4281, 1989*
- 11) Reed JA, Manahan LJ, Park CS, Brigati DJ: *Complete one-hour immunocytochemistry based on capillary action. BioTechniques 13: 434, 1992*
- 12) Rew DA, Taylor I, Cox H, et al: *c-myc protein product is a marker of DNA synthesis but not of malignancy in human gastrointestinal tissues and tuours. Br J Surg 78: 1080-1083, 1991*
- 13) Sikora K, Chan S, Evan G, et al: *c-myc oncogene expression in colorectal cancer. Cancer 59: 1289-1294, 1987*
- 14) Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T: *ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. Cancer Res 52: 2903-2906, 1992*
- 15) Victor T, Du Toit R, Jordaan AM, et al: *No evidence for point mutations in codeon 12, 13 and 61 of the ras gene in a high incidence area for esophageal and gastric cancers. Cancer Res 50: 4911-4914, 1990*
- 16) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, Smitts AM, Bos JI: *Genetic alterations during colorectal tumor development. N Engl J Med 319: 525, 1988*
-