

## 방광암 세포의 *ras* 및 *myc* Oncogene 표현에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

박창수 · 정병동 · 정상우 · 조규혁

### 서 론

세포의 변형을 초래한다고 알려져 있는 암 유전자 (oncogene)는 크게 바이러스성(v-onc)과 세포성(c-onc)으로 구분되고 있으며 인체의 고형종(solid tumor) 암세포에서도 흔히 표현(expression)된다고 한다<sup>1,2)</sup>.

암유전자에 의한 세포의 변형은 체세포의 변이를 유발하여 형성된 유전자산물(gene product)이 세포의 변형을 초래한다고 하였고<sup>3-6)</sup>, Srivastava 등<sup>7)</sup>은 생체의 배양된 섬유아세포에 암유전자가 작용하여 세포가 변형됨을 보고하여 암유전자에 의한 세포의 변형을 확인하였다.

세포성 암유전자는 *ras*나 *myc* 그리고 *fos* 등 여러가지가 보고되고 있는데<sup>8)</sup> 고형종에서 제일 흔하게 표현되는 암 유전자는 *ras*라고 하였으며<sup>1)</sup> nucleotide나 DNA와 결합하는 것은 *ras*와 *myc* 산물이라고 하였다<sup>2)</sup>.

Chang 등<sup>9)</sup>은 이러한 암유전자가 세포의 변형을 초래한 사실이나 암세포 추출물에서 암 유전자에 특이적인 m-RNA의 양이 증가되었다는 사실등으로 미루어 암유전자 산물의 증가와 발암현상과는 밀접한 관련이 있을 것으로 추측하였다.

최근에 여러 연구자들은 각종 암세포 추출물에서 blot technique을 이용하여 암유전자 산물을 관찰한 결과 암유전자 산물은 일종의 암표지자라고 주장하였으며<sup>10,11)</sup> 암조직내의 암유전자 산물을 면역조직화학적으로 염색하여 암표지자로서의 가능성을 입증하였고 암세포내의 암유전자산물이 침윤성 암의 표지자일 가능성을 제시하였다<sup>12-15)</sup>. 그러나 아직까지 암세포내에 출현하는 암유전자산물과 악성전위와의 연관성은 확실하지 않다.

이에 저자는 암유전자 산물의 세포내 출현과 악성전위

와의 상관성을 규명할 목적으로 유두종 및 이행상피암의 종양세포를 대상으로 하여 세포성 암유전자 *ras* 및 *myc* 산물을 면역조직화학적으로 검색하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에 이용한 방광암종은 40예로서 유두종 10예, 1급, 2급 및 3급 이행상피암 각각 10예씩으로 하였다.

#### 1. 병리조직학적 분류

통상의 방법대로 제작된 H&E 염색표본을 이용하여 Murphy<sup>16)</sup>의 분류법에 따라 상피세포층의 분화 정도, 세포질의 투명도 및 다형성도 그리고 염색질 형태 및 세포분열수 등에 따라 유두종, 1급, 2급 및 3급 이행상피암으로 분류하였고 이의 Paraffin조직 절편을 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

#### 2. 면역조직화학적 염색

Biotin과 avidin 사이의 강한 결합력을 이용한 Biotin-avidin system(BAS)에 의한 immunoperoxidase 염색법으로 *ras* 및 *myc* 암유전자 산물을 염색하였다.

각 파라핀 포매괴에서 약 3  $\mu$ m 두께의 조직 절편을 만들어 xylene과 alcohol을 거쳐 증류수로 합수시켰고 1% periodic acid 수용액으로 15분간 처치하여 조직내의 내재성 peroxidase를 억제시켰으며 PBS(phosphate buffered saline, 10 mM, pH 7.6)로 세척하였다.

일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여 조직을 산양 혈청에 20분간 작용시킨 후 human Ha-*ras* 및 *myc* 합성 펩타이드에 대한 sheep anti-human *ras* IgG(oncor) 및 Sheep anti-human

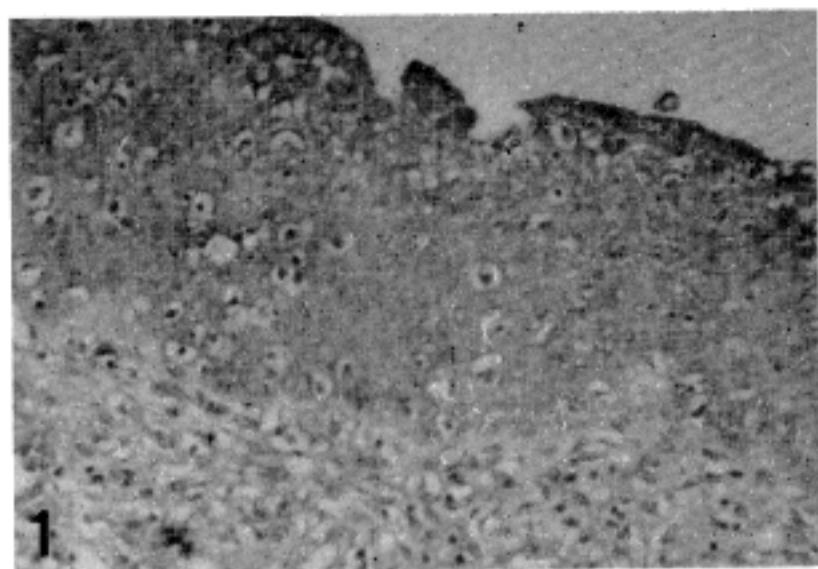


Fig. 1. In papilloma, the cells in upper three or four layers of urothelium are strongly positive, those in middle layer, relatively weak, and those in deep layer, negative. (*ras* Immunoperoxidase stain, x200)



Fig. 2. In grade I transitional cell carcinoma, positive cells are increased in number and positive reaction is distinct in the cytoplasm and along the cell membrane, though evenly and weakly stained. (*ras* Immunoperoxidase stain, x200)

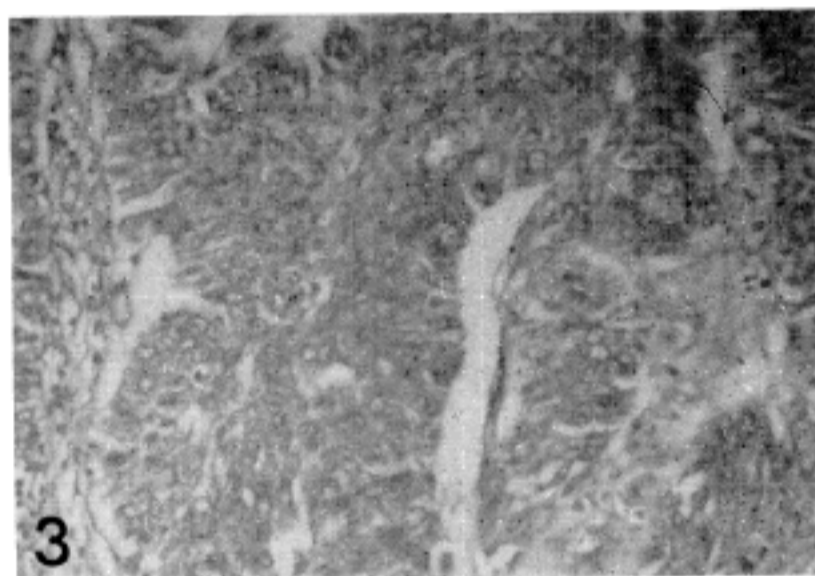


Fig. 3. In grade II, some cells show moderately strong reaction. (*ras* Immunoperoxidase stain, x200)

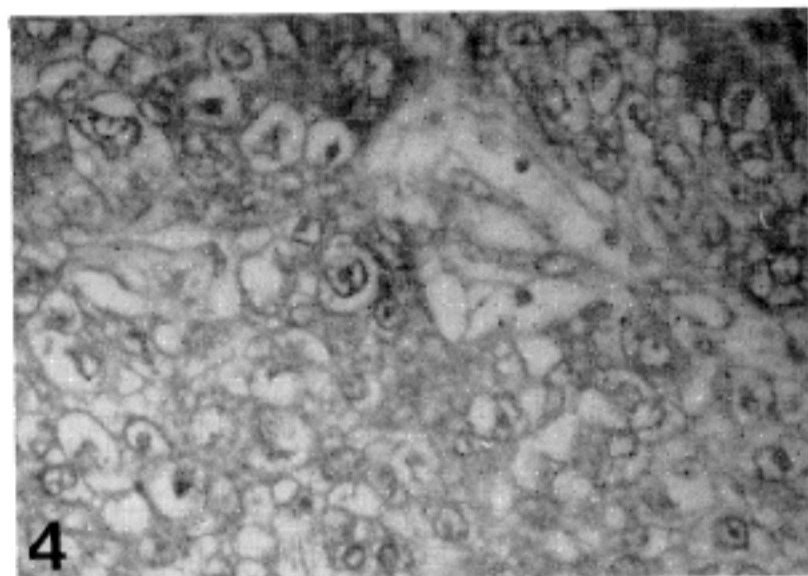


Fig. 4. In grade II, koilocytes reveal negative reaction in cytoplasm, but weakly positive reaction along the cell membrane. (*ras* Immunoperoxidase stain, x200)

*myc* IgG (oncor)를 16시간 도포하였고 PBS로 세척하였다. 산양의 biotinylated anti-sheep IgG (Vector)를 link antibody로 하여 avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H complex (ABC, Vector)를 작용시킨 후 peroxidase의 기질액인 hydrogen peroxide와 발색제인 DAB (diaminobenzidine 4HCl, Sigma)를 첨가하였다. Hematoxylin대조 염색 후 통상의 방법대로 탈수과정을 거쳐 Canada balsam으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 염색때 마다 일차항체 대신 PBS만을 도포시킨 표본을 음성 대조용으로, *ras* 및 *myc* 산물 양성 암세포가 확인된 방광암 조직표본을 양성 대조용으로 하였다.

### 3. 암 유전자산물에 대한 양성세포율의 산정

세포성 암유전자 산물에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 조직 표본을 400배의 배율로 관찰하여 10시야에서 출현하는 양성세포수의 비를 산출하여 이를 양성세포율 (%)로 하였다.

## 성 적

### 1. 면역조직화학적 염색 성적

a) 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성 반응 : 유두종 조직은 방광상피 표층부 4~5층 상피세포의 세포질 및

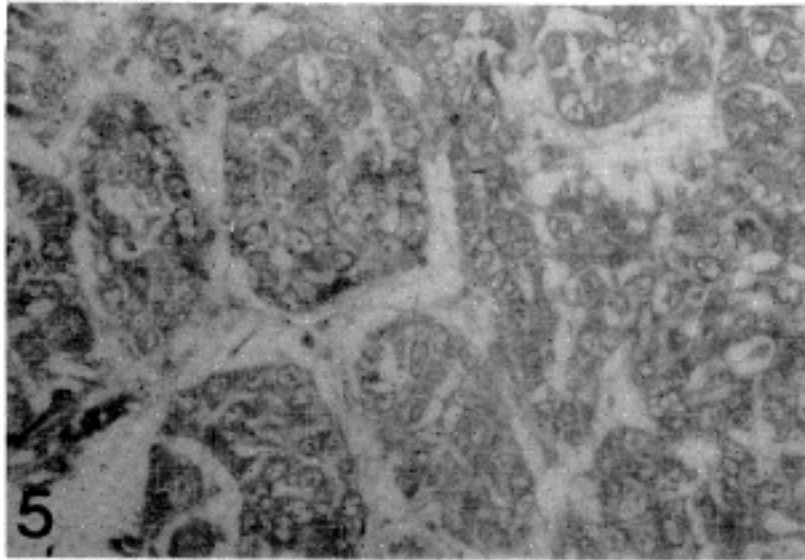


Fig. 5. In grade III, staining intensity is more pronounced than in grade I or II. (*ras* Immunoperoxidase stain, x400)

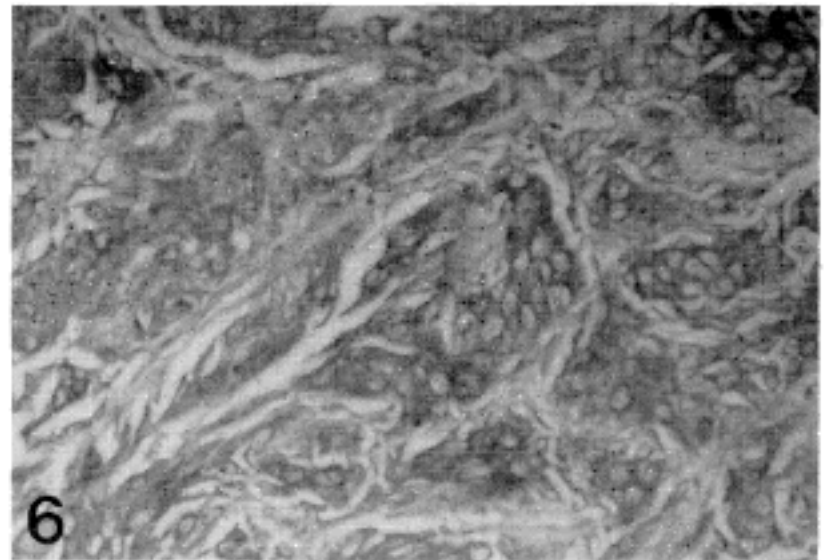


Fig. 6. Deeply infiltrated tumor cells have more strongly and homogeneously positive reaction than those of superficial area. (*ras* Immunoperoxidase stain, x200)

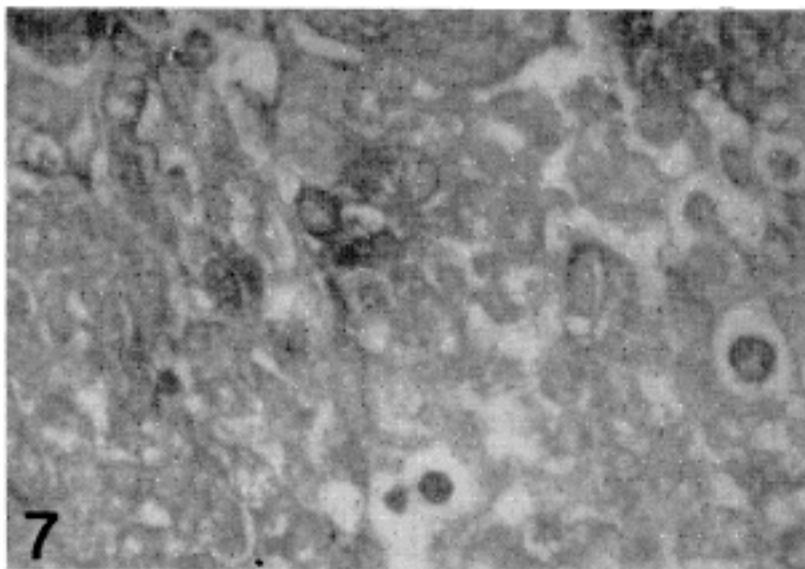


Fig. 7. In grade II, a few cells are positive and more strong in the nucleus. (*myc* Immunoperoxidase stain, x400)

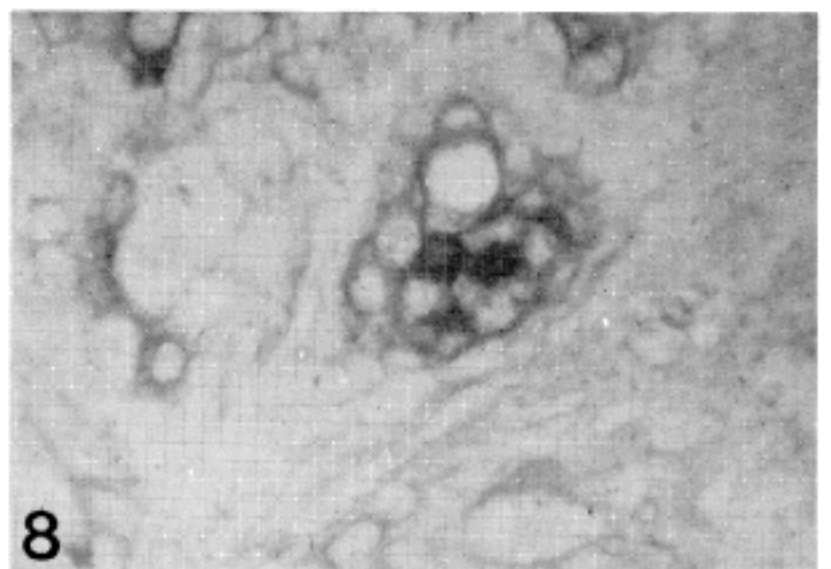


Fig. 8. In grade III, some cells are positive and mostly strong in the nucleus. (*myc* Immunoperoxidase stain, x1,000)

세포막에서 양성 반응을 보여 주었으며 근섬유나 신경섬유 및 혈관 내피세포 등은 음성반응을 나타냈다(Fig. 1).

유두종에 비하여 1급 이행상피암에서는 훨씬 많은 양성 세포를 관찰할 수 있었으며 심층부의 상피세포에서도 세포막의 양성 반응 및 세포질 내에 균일하고 약한 양성 반응을 나타냈다(Fig. 2).

2급 이행상피암의 경우 대부분의 암세포에서 양성반응이 나타났고 양성 반응의 양상은 1급 이행상피암과 유사하였으나 일부 암세포에서는 염색의 정도가 좀더 강하게 출현하였다(Fig. 3). 한편 투명한 세포질을 갖는 Koilocyte는 세포질에서는 음성 반응을 나타내었고 세포막에서만 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 4). 3급 이행상피암에서는 2급 암종에서와 같이 대부분의 암세포가 양

성 세포로 나타났으며 부분적으로 강한 양성 반응을 보이는 암소가 관찰되었다. 또한 분화가 안된 암세포들도 양성반응을 보여주었고(Fig. 5). 특히 심부에 침윤된 암소의 암세포에서는 세포질 내에 균일하고 강한 양성 반응이 나타났다(Fig. 6). 한편 유사 핵분열 과정의 세포 및 괴사된 병소는 음성 반응을 보여 주었으며 괴사된 병소 인접 부위의 암세포들에서는 양성반응을 관찰할 수 있었다.

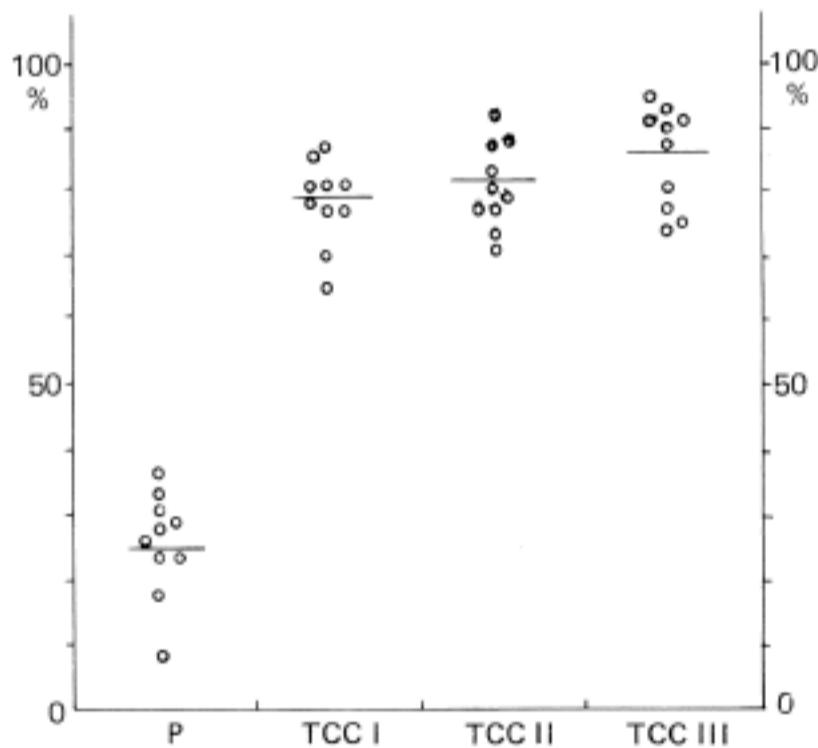
따라서 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 면역조직화학적 염색상 양성 반응은 세포막 뿐 아니라 세포질에서도 관찰되었으며 조직학적인 분화가 되지 않을수록 양성 반응은 증가됨을 보여주었다.

b) 세포성 암유전자 *myc* 산물에 대한 양성 반응 : 세

**Table 1.** Ratio of the cells positive with immunostaining for the ras oncogene product

No. of case	Papilloma	TCC-I	TCC-II	TCC-III
1	36	82	80	94
2	28	67	74	75
3	41	78	89	97
4	9	88	78	76
5	34	78	85	94
6	44	87	81	78
7	48	82	78	98
8	34	79	88	92
9	39	82	94	83
10	38	71	72	89
Mean ±SD	35.1 ±10.19	79.4 ± 6.17	81.9 ± 6.62	87.6 ± 8.40

TCC : Transitional cell carcinoma-grades I, II, and III



**Fig. A.** Ratio of the cells positive with immunostaining to the ras oncogene product in papilloma (P) and transitional cell carcinoma grade I (TCC I), II (TCC II) and III (TCC III).

포성 암유전자 *myc* 산물에 대한 양성 반응은 일반적으로 핵질과 핵 주변부 및 세포막에서 관찰되었다. 유두종에 비하여 1급 및 2급 이행상피암에서는 핵 주변부에서 주로 양성 반응을 보였고 핵질에서 양성 반응을 나타낸 세포가 소수 관찰되었던 반면(Fig. 7), 3급 이행상피암에서는 핵질에 양성 반응을 보인 세포를 상당수 관찰할

수 있었다(Fig. 8).

## 2. 양성세포 출현율

세포성 암 유전자 *ras* 산물에 대한 양성 세포 출현율의 평균치는 유두종이 35.1%, 1급 이행상피암이 79.4%, 2급 이행상피암이 81.9%였고 3급 이행상피암은 87.6%로서 양성 종양인 유두종에 비하여 이행상피암에서는 높은 양성 세포출현율을 보여 주었다(Table 1, Fig. A).

암 유전자 *myc* 산물에 대한 양성 반응은 핵질 및 핵막 주변부 그리고 세포막에 연하여 염색상이 출현하였으며 조직학적 등급에 따른 양성 세포 출현율은 이러한 염색상의 다양성 때문에 산정하지 않았다.

## 고 찰

세포성 암 유전자는 증식이 활발한 정상 세포에서도 표현된다고 하여 실험적으로 부분적 간절제술을 시행한 후의 간 세포나 영양아세포에서 암 유전자 산물이 증가된다고 알려져 있다<sup>17-20</sup>. 그러나 인체 종양 특히 고형종에서는 이러한 암 유전자 산물의 보다 높은 증가가 관찰됨으로서<sup>12</sup> 암유전자 산물이 암표지자로 알려지게 되었다. 각종 종양에 있어서 암 유전자 표현에 관한 연구는 그 관찰대상이 대장암, 방광암, 전립선암 및 유방암등으로서 대부분 고형종을 대상으로 하고 있으며<sup>12-15,21</sup>, 이들 종양에서의 암 유전자 표현 정도를 암종의 조직학적 등급에 따라 관찰함으로써 악성 전위와의 관련성을 규명하려 하고 있다.

본 연구에서는 암세포에서 흔히 출현하는 세포성 암유전자 *ras* 및 *myc* 산물을 방광암을 대상으로 하여 검색하였다.

세포성 암유전자 *ras* 산물은 세포내의 GTP(guanosine triphosphatate)와 결합하고 주로 원형질막에 존재하는 것으로 알려져 있으며<sup>22</sup>, Willingham 등<sup>22</sup>은 이를 전자현미경으로 확인하였다. 그러나 Viola 등<sup>14</sup>은 광학현미경적 소견상 양성 반응이 세포막 뿐 아니라 세포질 내에서도 관찰된다고 하였는데 본 연구에서 관찰된 세포질 및 세포막의 양성 반응은 Viola 등<sup>14</sup>의 성적에서와 같았다. 유두종의 양성 반응은 정상 방광 상피에 비하여 더

많은 세포층에서 양성 반응을 보였으며 양성 세포 출현율은  $35.1 \pm 10.29\%$ 로서 상당한 범위를 보였다. 유두종에서의 양성 세포 출현 정도가 환자의 예후에 어떠한 의미를 갖는지는 추시하여 볼 필요가 있다고 생각한다. 즉 방광 유두종 환자의 5년 생존율은  $90\%$ 로서 엄밀한 의미에서 유두종 양성 종양이 아닐 수도 있다고 하였는데<sup>23)</sup> 이러한 점을 고려하여 볼 때 유두종에 대한 암 유전자 산물의 면역조직화학적 염색 소견과 환자의 예후를 비교하여 관찰한다면 예후판정에 좋은 참고가 될 것으로 생각되었다. 1급의 이행상피암종에서 양성 세포는 유두종에 비하여 세포질 내에 균일한 양성 반응을 보여주었고 양성 세포 수 역시 유두종의  $35.1\%$ 에 비하여  $79.4\%$ 로 훨씬 높은 양성 세포 출현율을 보여 주었다. 2급과 3급의 이행상피암의 양성 반응은 1급 이행상피암에 비해 미만성으로 강한 염색상을 보여 주었고 양성 세포 출현율 역시  $81.9\%$ ,  $87.6\%$ 로서 대부분의 암세포에서 양성 반응을 보여 주었다. 3급 이행상피암의 암세포내 양성 반응은 2급 암종과 유사하였지만 국소적으로는 강한 염색상을 보여주는 암소가 관찰되었고 분화가 되지 않은 암세포에서는 양성 반응을 보여 주었다. 따라서 세포성 암 유전자 *ras* 산물에 대한 면역조직화학적 염색 소견은 양성 종양에서 보다는 악성 종양에서, 그리고 암세포의 분화 정도에 따라 염색상이 증가되었음을 알 수 있었는데, 양성 세포 출현율 역시  $79.4\%$ ,  $81.9\%$ ,  $87.6\%$ 로서 양성 반응의 염색상 소견을 뒷받침 해 주었다.

본 실험에서 분화가 되지 않은 암세포에서도 양성 반응을 보여 주었던 점은 Viola 등<sup>14)</sup>은 분화가 되지 않은 암소에서는 음성 세포들이 상당수 관찰되어 3급 암종에서의 양성 반응이 이종성을 보인다고 하였으며 이러한 소견은 괴사 인접 부위에서 관찰되므로 암세포의 생활력과 관련이 있을 것이라고 주장하였는데 본 연구에서는 괴사 병소 인접 부위의 암세포에서도 양성 반응을 보였다. 한편 방광벽의 심부에 침윤된 암소의 세포는 표층부에 존재하는 암소에 비하여 강한 양성 반응을 보여 주었는데 이러한 성적은 대장암 심부 조직암소에서 강한 양성 반응을 보였다는 Thor 등<sup>13)</sup>의 보고와 부합되었다. Calabretta 등<sup>24)</sup>은 암 유전자가 세포증식과 깊은 관계가 있음을 확인하여 세포의 증식이 활발한 세포에서 더 잘 표현된다고 하였는데 이러한 사실을 참조하여 볼 때 심부에 위치하는 암세포들이 더 활발한 증식을 할 것이라는 추측을 할 수도 있었다.

세포성 암 유전자 *myc* 산물은 DNA와 결합하고 주로 핵질에 위치하는 것으로 알려져 있으나<sup>25)</sup>, 본 성적에서는 핵질 뿐 아니라 핵 주변부 및 세포막에서도 관찰되어 다소 차이가 있었다. 이러한 차이점은 암 유전자 *myc*이 작용하여 형성된 유전자 산물이 세포질 내에서 형성되어 핵내의 핵산과 결합하기 때문에 일부는 핵 주변부에 위치하고 나머지는 세포막에 연하여 출현하였을 것으로 추측되었다. 또한 분화가 안된 암세포 조직일수록 핵질에 양성으로 염색되는 세포가 상당수 관찰되었는데 이러한 성적과 악성전위와 연관시켜 생각하기에는 본 실험 성적만으로는 미흡한 점이 있었다. 그러나 아직까지 세포성 암 유전자 *myc* 산물을 암조직편에서 면역조직화학적으로 관찰한 보고는 적하기 어려웠으며 앞으로 암 유전자 *myc*의 표준 cell line을 이용하여 면역세포화학적으로 관찰한다면 암 유전자 *myc* 산물의 위치를 좀 더 자세히 알 수 있으리라고 생각된다.

## 결 론

세포성 암 유전자 산물의 암세포내 양적 변화와 악성전위와의 상관성을 규명할 목적으로 방광암 조직을 이용하여 세포성 암 유전자 *ras* 및 *myc* 산물에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 일반적으로 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성 반응은 세포막 뿐만 아니라 세포질에서도 출현하였으며 *myc* 산물은 핵질 및 핵 주변부 그리고 세포막에 연하여 관찰되었다.

2) 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 반응은 방광의 유두종에 비하여 이행상피암에서 균일하고 강한 양성 반응을 보여 주었으며 침윤성 암소에서도 강한 양성 반응을 보여 주었다.

3) 세포성 암유전자 *ras* 산물에 대한 양성 세포 출현율은 유두종의  $35.1\%$ , 1급 이행상피암이  $79.4\%$ , 2급 및 3급 이행상피암이  $81.9\%$ ,  $87.6\%$ 로서 조직학적인 분화 정도에 따라 양성 세포 출현율은 증가되는 경향이 있었다.

4) 세포성 *myc* 산물에 대한 양성 세포의 출현율은 핵질에 양성으로 염색되는 세포가 조직학적인 등급에 따라 증가되었다.

참 고 문 헌

- 1) Land H, Paroda G, Weinberg R: *cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science (Wash DC) 222:771, 1983*
- 2) Pitot HC: *Oncogenes and human neoplasia. Clinics in Laboratory Medicine 6:167, 1986*
- 3) Der CJ, Cooper GM: *Altered gene products are associated with activation of cellular ras genes in human lung and colon carcinomas. Cell 32:201, 1983*
- 4) Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M: *A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature 300:149, 1982*
- 5) Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI: *Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300:143, 1982*
- 6) Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, goldfab M, Wigler M: *Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. Nature 300:762, 1982*
- 7) Srivastava A, Norris JS, Shmookler Reis RJ, Goldstein S: *c-Ha-ras-1 proto-oncogene amplification and over-expression during the limited replicative life span of normal human fibroblasts. J Biol Chem 260:6404, 1985*
- 8) Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM, Cline MJ: *Expression of cellular oncogenes in human malignancies. Science 224:256, 1984*
- 9) Chang E, Furth M, Scolnick E, Lowy D: *Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to Harvey murine sarcoma virus. Nature (Long) 297:479, 1984*
- 10) Glass II WF, Briggs RC, Hnilica LS: *Identification of tissue-specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose from polyacrylamide gels. Science 211:70, 1981*
- 11) Thomas PS: *hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci 77:5201, 1980*
- 12) Hand PH, thor A, Wunderlich D, Muraro R, Caruso A, Schlom J: *Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated ras gene expression in human mammary and colon carcinomas. proc Natl Acad Sci 81:5227, 1984*
- 13) thor A, hand PH, Wunderlich D, Caruso A, Muraro R, Schlom J: *Monoclonal antibodies define different ras gene expression in malignant and benign colonic disease. Nature 311:562, 1984*
- 14) Viola MV, Fromowitz F, Oravez S, Deb S, Schlom J: *Ras Oncogene p 21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. J Exp med 161:1213, 1985*
- 15) Viola MV, Fromowita F, oravez S, Finkel G, Lundy J, Hand P, Thor A, Schlom J: *Expression of ras oncogene p 21 in prostate cancer. NEJM 314:133, 1986*
- 16) Murphy WM: *Current topics in the pathology of bladder cancer. Pathol Annu 18:1, 1983*
- 17) Fausto N, Shank PR: *Oncogene expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. Hepatology 3:1016, 1983*
- 18) Makino R, Hayashi K, Sugimura T: *c-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximide treatment. Nature 310:697, 1984*
- 19) Goustin AS, Betsholtz C, Pfeifer-Ohlsson S: *Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. Cell 41:301, 1985*
- 20) Muller R, Tremblay MJ, Adamson ED, Verma IM: *Tissue and cell type-specific expression of two human onco genes. Nature 304:454, 1983*
- 21) Gallick G, Kurzrock R, Kloetzer W, Arlinghaus R, Gutterman J: *Expression of p 21 ras in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. proc Natl Acad Sci 82:1795, 1985*
- 22) Willingham M, Pastan I, Shih T, Scolnick F: *Localization of the src gene product of Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electronmicroscopic immunocytochemistry. Cell 19:1005, 1980*
- 23) Robbins SL, Cotran R, kumar V: *Pathologic basis of disease. 3rd edition. Philadelphia, WB Saunders, 1984, p 1076*
- 24) Calabretta BM, kaczmarek L, Ming P-M.L, Au F, Ming S-C: *Expression of c-myc and other cell cycle-dependent genes in human colon neoplasia. Cancer Res 45:6000, 1985*

= Abstract =

**The Expression of *ras* and *myc* Oncogene  
in Transitional Cell Carcinoma of  
the Urinary Bladder**

Chang-Soo Park, M.D., Byoung-Dong Juhng, M.D.  
Sang-Woo Juhng, M.D. and Kyu Hyuk Cho, M.D.

*Department of Pathology, College of Medicine  
Chonnam National University*

The oncogenes, which have been detected in various human solid tumors, transform culture cells, and the level of m-RNA specific for an oncogene increases in the cellular extract of the tumor cells. These findings suggested that oncogene expression was closely related with carcinogenesis.

Recently, oncogen products were considered as tumor markers, but it was not confirmed that the relationship between quantitative change of oncogene product and malignant potential of a neoplasm.

To evaluate the relationship between the quantitative change of oncogene product and malignant potential,

immunohistochemical staining for the *ras* and *myc* oncogene products was performed in the sections of papilloma and transitional cell carcinoma of urinary bladder.

1) Positive reaction of c-*ras* oncogene product was noted along the cell membrane and in the cytoplasm, and c-*myc* oncogene product in the nucleus, and along the nuclear membrane and cell membrane.

2) Tissue expression of c-*ras* oncogene was homogeneous and strong in the transitional cell carcinoma rather than in papilloma.

3) the ratio of the positive cells with c-*ras* oncogene product was 35.1% in the papilloma, 79.4% in the grade I, 81.9% in the grade II, 87.6%, in the grade III of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. There was a tendency for the ratio to increase with the degree of histological grading.

4) By the immunoperoxidase staining of c-*myc* oncogene product, the number of the cells showing positive nuclear staining increased with the tumor grading.

---

**Key Words:** *ras* and *myc* oncogene products, transitional cell carcinoma