

만성 골수성 백혈병에서 Two Color Fluorescence In Situ Hybridization(FISH)을 이용한 적모구, 림프구의 bcr/abl유전자 융합확인

가톨릭대학교 의과대학 임상병리학교실 및 ¹소아과학교실

강창석 · 이은정 · 이원배¹ · 김용구 · 한경자 · 이경수¹ · 심상인

Normoblasts and Lymphocytes Carry the Fused Bcr-Abl Gene in Chronic Myelogenous Leukemia: Two Color Fluorescence in Situ Hybridization(FISH) Analysis on the Blood Smears

Chang Suk Kang, Eun Jung Lee, Wonbae Lee¹, Yonggoo Kim, Kyungja Han, Kyung Soo Lee¹, and Sang In Shim

Departments of Clinical Pathology & ¹Pediatrics, Catholic University Medical College, Seoul 150-173, Korea

We performed dual color fluorescence in situ hybridization (FISH) for the bcr/abl fusion in CML using the peripheral blood smears without destruction of cell morphology to determine the bcr/abl fusion. Two patients of CML, one patient in accelerated phase and one patient in chronic phase, were selected. The blood smears were fixed in absolute methanol. FISH was performed with the Mber/abl translocation DNA probe mixture and the slides were stained with Wright's stain after FISH. The blood smears of both cases revealed distinct signals without destruction of cellular morphology. The normoblasts and lymphocytes revealed beautiful fused bcr/abl signals as well as granulocytes in both cases. The results provide a novel finding that the normoblasts and lymphocytes in CML are also neoplastic clonal cells which has not been demonstrated with a single-cell approach before. (Korean J Pathol 1998; 32: 58~62)

Key Words: bcr/abl fusion, CML, Normoblasts, Lymphocytes, FISH

서 론

만성 골수성 백혈병 (CML)은 다능 간세포의 클론성 증식성 질환이다.¹ CML환자의 90% 이상에서 필라델피아 염색체 (ph¹)라 불리는 특징적인 염색체 이상이 관찰되는데 이는 9번과 22번 염색체 사이의 전위로서 그 결과 bcr 및 abl 유전자의 융합이 일어나는 것으로 알려져있다.^{2,3} CML의 탐식세포, 과립구,

거핵구 및 호산구가 glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme연구로 악성 클론임이 보고되어 왔다.⁴ 그러나 림프구가 CML의 백혈병 클론에 포함되는지 여부는 아직 보고마다 다른 실정이며,^{5,6} 다른 세포 계열에서도 아직 개개 세포에서 직접 확인 된바 없다. 또한 CML을 다단계 질환이라는 가설로 보면,⁷ 9번과 22번염색체 사이의 전위가 백혈병으로 전환되는 초기 현상이 아니라 이차적으로 발생하므로 적어도 일부의 CML 증례들에서는 클론성 변화가 있으나 아직 ph¹ 염색체는 음성일 수 있다고 한다.⁸ 이에 저자들은 핵형 검사와 bcr/abl 융합 유전자 mRNA에 대한 PCR검사로 ph¹ 양성 CML로 진단 받고, 말초 혈액에서 적모구가 관찰된 전형적인 CML 환자의 말초혈액 도말 표본을 이용하여 적모구와 림프구에서 bcr/abl

접 수: 1997년 9월 22일, 게재승인: 1997년 11월 11일

주 소: 서울시 영등포구 여의도동 62, 우편번호 150-173

성모병원 임상병리과, 강창석

*본 논문은 가톨릭 중앙의료원 학술연구 조성비로 이루어졌음.

ISSN : 0379-1149

융합 유전자의 융합 유무를 직접 dual color FISH로 증명하여 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

2예의 CML 환자 말초혈액 검체를 이용하였다. 한 예는 28세 남자 환자로서 백혈구 $33.0 \times 10^9/l$, 감별계수상 골수모세포 3%, 전골수구 2%, 골수구 6%, 후골수구 4%, band 호중구 6%, 호중구 32%, 호산구 28%, 호염구 9%, 단구 4%, 림프구 6%였으며, 100개의 백혈구당 9개의 유핵 적혈구가 관찰되었다. 골수소견은 백백한 양상을 보이고, 심한 과립구와 거핵구의 증식을 나타냈으며, 골수모세포와 전골수구의 합은 전 유핵세포의 17%였다. 이상의 소견으로 가속기의 CML로 진단 받았다. 염색체 검사상 25개의 중기 세포중 24개에서 46XY,t (9; 22) (q34; q11)가 관찰되었고 나머지 한 개의 중기 세포는 46XY 였다. bcr/abl mRNA 의 PCR 검사는 보고된 방법에 따라⁹ 시행하였는데 cDNA는 reverse transcriptase (AMV type, Boehringer- Mannheim Co., 독일)를 이용하여 합성하였고, antisense oligonucleotide는 5'-TCCAGCGAG-AAGGTTTT CCTTG-3'(primer B)를 사용하였다. 역전사가 끝나면 다른 oligonucleotide (primer A, 5'-CCTGATCTCCTCTGACTATGAG- 3')와 primer B를 첨가하여 PCR 증폭을 시행하였다. Nested PCR을 위해 두가지의 oligonucleotide (primer A'; 5'-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3', primer B'; 5'-TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC-3')를 첨가하여, 다시 한번 더 증폭하였다. Beta 2-microglobulin 유전자를 PCR control로 사용하였다. PCR 산물은 전기영동상 125bp의 band를 나타내어 bcr/abl 융합이 있는 것으로 판정받았다.

다른 1예는 30세 남자 환자로서 백혈구 $52.0 \times 10^9/l$, 감별계수상 골수모세포 5%, 전골수구 2%, 골수구 6%, 후골수구 4%, band 호중구 6%, 호중구 40%, 호산구 2%, 호염구 18%, 단구 3%, 림프구 8%였으며, 100개의 백혈구당 2개의 유핵 적혈구가 관찰되었다. 골수소견은 백백한 양상을 보이고, 심한 과립구와 거핵구의 증식을 나타냈으며, 골수모세포와 전골수구의 합은 전 유핵세포의 11%였다. 이상의 소견으로 만성기의 CML로 진단 받았다. 염색체 검사상 관찰한 22개의 중기 세포 모두에서 46XY,t (9; 22) (q34; q11)가 관찰되었으며 전에에서 시행하였던 방법과 같은 방법으로 시행한 bcr/abl mRNA PCR 에서는 125bp의 band를 나타내어 bcr/abl 융합이 있는 것으로 판정받았다.

2. 방 법

1) bcr/abl유전자의 double color FISH: 말초 혈액 도말표본을 제작하여 사용하였다. 슬라이드를 공기중 건조시킨다음 무수 메탄올에 3분간 고정하였다. 슬라이드 위의 DNA를 70% formamide in 2xSSC 용액에서 3분간 식히고 $-20^{\circ}C$ 에서 graded ethanol로 탈수하여 공기중 건조시킨다. Mbc/abl 전위 DNA probe (Oncor, 미국)를 $37^{\circ}C$ 로 미리 가온한 다음 10ul를 취하여 슬라이드에 도포하고 coverslip을 덮는다. 하룻밤 방치후 2xSSC 로 $72^{\circ}C$ 에서 5분간 세척하고 digoxigenin-rhodamine 및 biotin-FITC detection kit (Oncor, 미국)로 제작사 지시대로 신호를 검출하였다. FISH결과는 경험있는 2인이 관찰하였고 triple band pass를 장착한 형광현미경으로 1,000배 시야에서 사진을 촬영하였다. 신호 색깔은 bcr유전자 부위는 빨강, abl 유전자 부위는 녹색으로 관찰되었고 융합된 bcr/abl유전자는 황색 또는 매우 근접한 두 색의 신호로 나타났다. 두 신호 간격이 한 신호 지름보다 작을 때는 융합유전자로 판정하였다.⁵ 사진촬영후 슬라이드를 10분간 Wright염색하여 촬영 부위와 같은 부위를 찾아 사진촬영하였다.

결 과

두예 모두에서 확실한 신호가 관찰되었으며 세포 형태도 그대로 유지되어 있었다. 과립구들에서는 빨간색의 bcr유전자 신호와 녹색의 abl신호가 한 개씩 관찰되고 밝은 연한 황색의 bcr/abl 융합 신호가 관찰되어 모두 3개의 신호가 관찰되었다 (Fig. 1). 적모구 즉 유핵 적혈구에서도 bcr/abl융합 신호가 관찰되었으며 (Fig. 2A) Wright 염색으로 동일 세포를 적모구로 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 림프구는 가장 신호 크기도 작고 신호가 검출되지 않은 세포들도 많아서 전체 림프구에서의 bcr/abl융합 분포는 판단할 수 없었으나 적어도 일부의 림프구에서는 bcr/abl융합이 있음을 FISH와 Wright 염색으로 확인할 수 있었다 (Fig. 3A, B). 우연하게 관찰된 내피 세포에서는 bcr/abl 융합이 관찰되지 않고 각각 2개의 bcr유전자 신호와 2개의 abl유전자 신호가 관찰되었다 (Fig. 4).

고 찰

CML 환자의 말초혈액 도말표본을 이용하여 세포의 형태를 유지 한체로 bcr/abl융합 유전자 검출을 시도하였다. FISH에 의한 bcr/abl융합 유전자 검출은 고식적인 염색체 검사보다 더 예민한 방법으로 알려져 왔다.¹⁰⁻¹⁵ 이들 연구들은 Carnoy 고정액에 부유되어 있는 염색체 검사용 간기세포들을 분석하였으므로 세포 형태는 유지시킬 수 없었다. Bentz등이 혈액 도

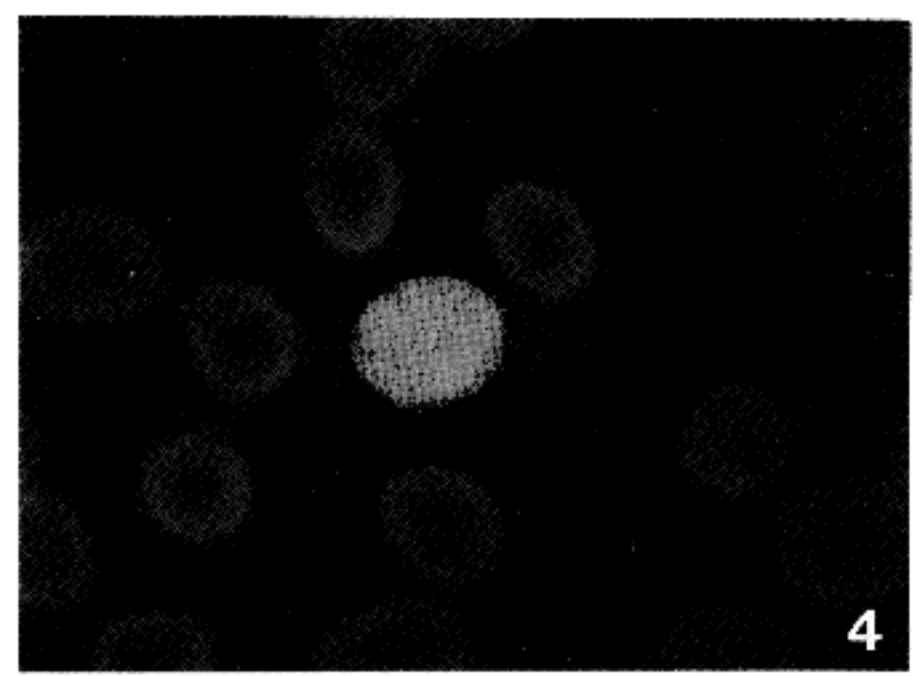
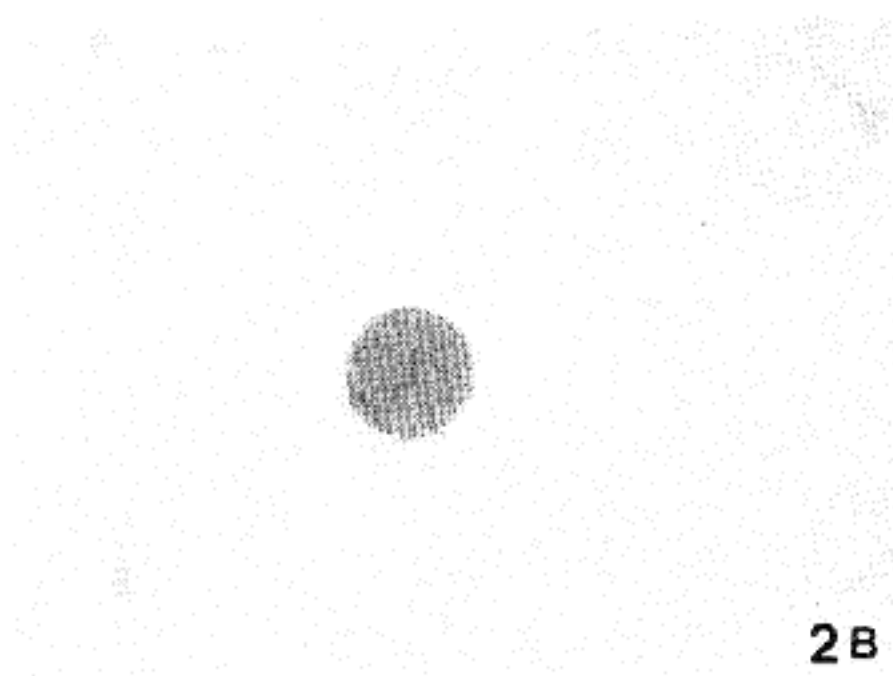
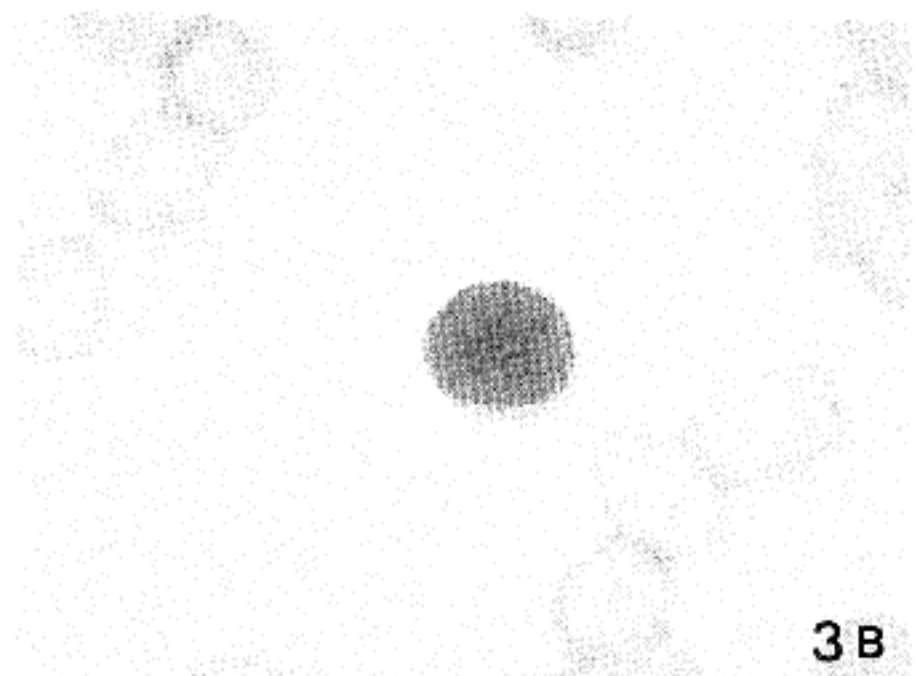
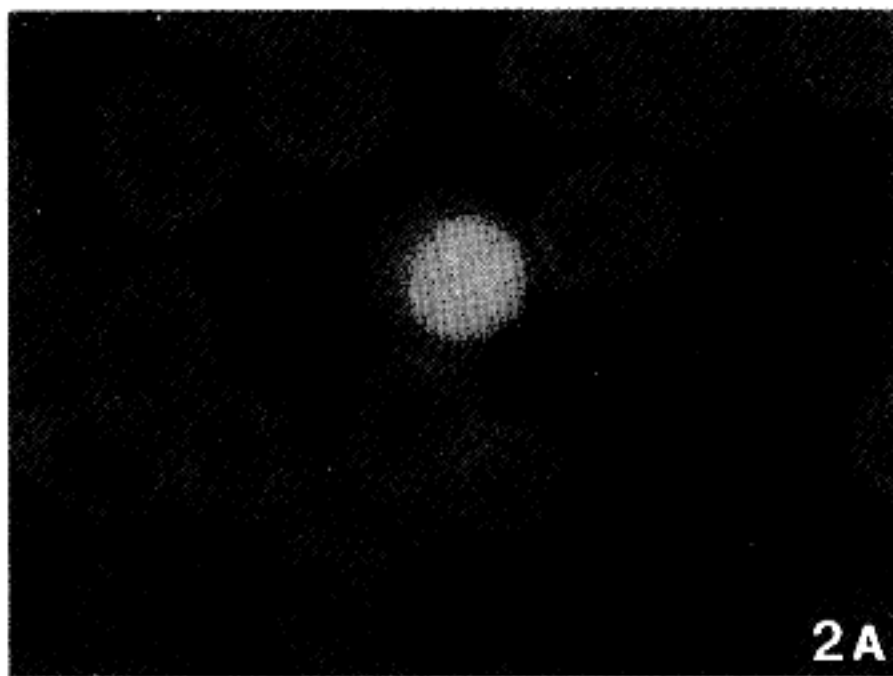
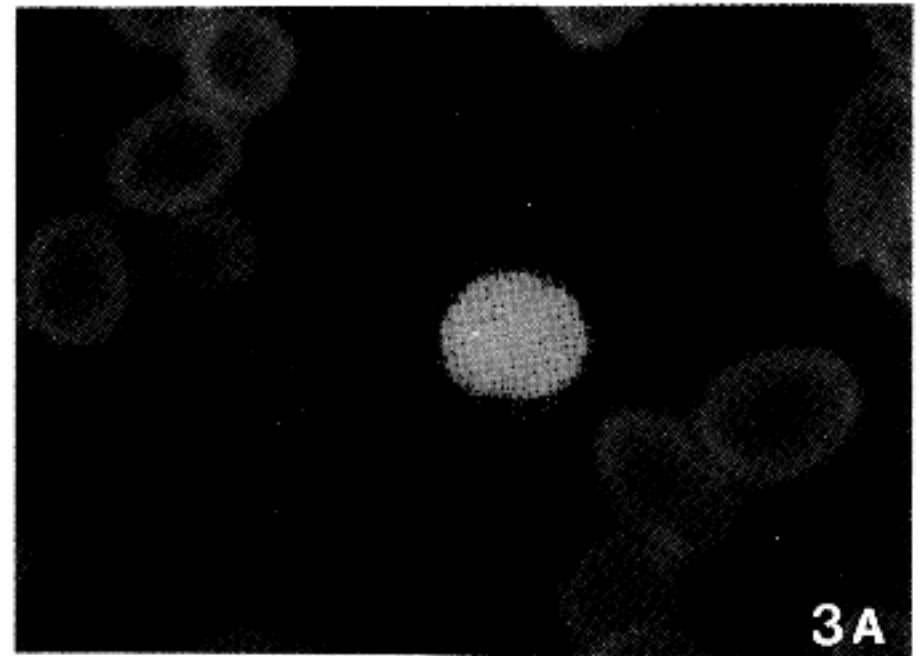
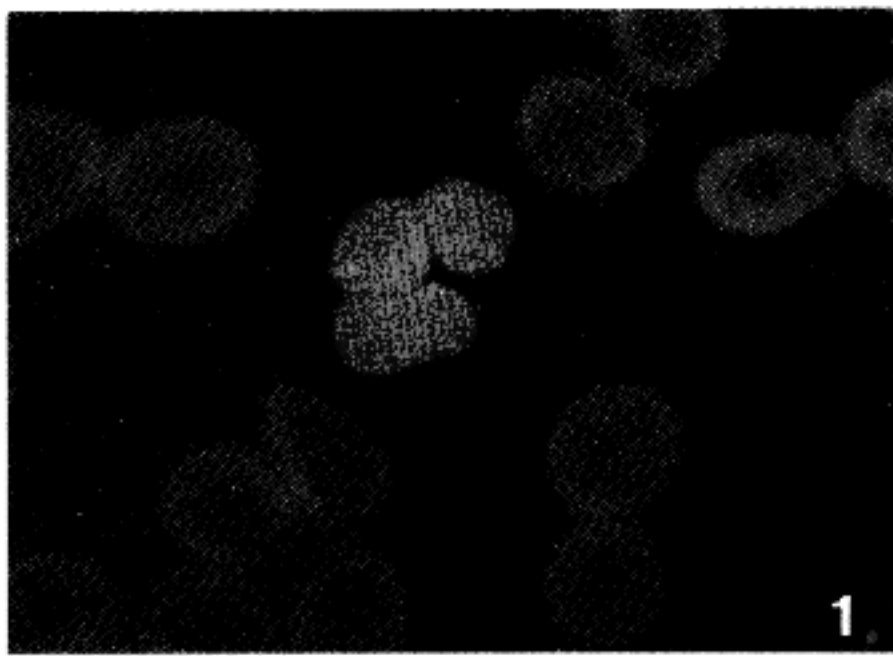


Fig. 1. FISH of the peripheral blood smear of case 1 with Mbcr/abl translocation probe demonstrates adjacent red/green bcr/abl fusion signal on a neutrophil with separate red (bcr) and green (abl) signals.

Fig. 2. FISH of the nucleated erythrocyte of case 1 with Mbcr/abl translocation probe demonstrates bright yellow bcr/abl fusion signal with separate red (bcr) and green (abl) signals (2A). The Wright stain of the same nucleated erythrocyte shows typical morphology of an orthochromatophilic normoblast (2B).

Fig. 3. FISH of the lymphocyte of case 2 with Mbcr/abl translocation probe demonstrates bright yellow bcr/abl fusion signal with separate red (bcr) and green (abl) signals (3A). The Wright stain of the same lymphocyte shows intact morphology of a small lymphocyte (3B).

Fig. 4. FISH of the endothelial cell with Mbcr/abl probe reveals 2 red (bcr) signals and 2 green (abl) signals.

말 표본에 FISH를 시도할 수 있는 방법을 기술하였으나¹⁶ 이들 역시 세포 형태 유지에는 실패하였다. 이런 난관들 때문에 지금까지는 세포 계열 확인을 위해서 세포 표면 항원을 면역화학염색으로 확인하고 동시에 FISH를 시행하는 ImmunoFISH법이나^{17,18} 유세포 분석기를 이용하여 세포를 분리한 후 고식적인 방법으로 핵형검사를 할 수 있는 방법들이 보고되었으나¹⁹ 아직 CML에서 만족할 만한 결과가 없고 직접법이 아니기 때문에 한계가 있었다. 본 연구에서는 세포의 형태를 그대로 유지시킴으로서 직접 세포를 감별하여 동시에 FISH에 의한 bcr/abl 융합 신호를 관찰함으로써 직접적인 근거를 확보할 수 있었으며 ImmunoFISH나 세포 분리 등의 번거로움이 없었다. 또한 FISH 후 Wright 염색으로 FISH로 관찰했던 세포들을 확인할 수 있는 장점도 있었다.

CML에서 적혈구 계열 세포들이 악성 클론에 포함되어 있을 것이라는 것은 알려져 있었으나 직접 적모구에서 bcr/abl 융합을 확인한 예는 없었다. Nolte 등^{17,20}은 골수 생검조직에 FISH를 시행하여 거핵구와 과립구에서 bcr/abl 융합을 발견하였다. 그러나 이들도 적혈구 계열에 대한 언급이 없었으며 림프구들에서는 bcr/abl 융합을 발견하지 못하였다 하였다. 더구나 생검 절편은 핵이 잘려서 신호의 수가 불충분하게 검출되거나 겹치는 경우가 있어 FISH 검체로는 단점이 있다. 본 연구에서는 말초 혈액 도말 표본으로 FISH를 시행하여 적모구의 핵에 bcr/abl 융합이 있는 것을 확인할 수 있었으며 림프구의 적어도 일부에서도 이들 유전자의 융합이 관찰되었다. CML에서 림프구의 악성 클론 여부는 많은 논란이 있어 왔으며,^{5,6} 악성 클론에 포함되는 것으로 보고되고 있는 B 세포에서도 직접 bcr/abl 융합을 확인한 보고는 아직 없다. 본 연구에서 림프구들은 가장 신호의 질이 좋지 못하여 교잡이 가장 어려웠던 세포들이었으며 그 수가 적어서 관찰에 어려움이 있었다. 그러나 세포 형태 유지를 위해서는 proteinase K와 같은 분해 효소를 쓸 수 없었다. 그래도 일부 림프구에서는 뚜렷한 신호를 관찰할 수 있었는데 모두 bcr/abl 융합을 나타내었다. 이런 융합이 관찰되었던 림프구가 모두 B 세포인지는 알 수 없으나 적어도 일부 내지는 그 이상의 림프구들이 CML에서 악성 클론임은 물론 bcr/abl 이 융합되어 있음을 증명할 수 있었다. 이와 같이 세포 형태를 유지하며 신호를 검출할 수 있었던 가장 중요한 단계는 무수메탄올에 3분간 고정 후에 들어갔던 것과 신호 질을 높이기 위해 보통 처리하는 proteinase K 처리를 하지 않았던 데에 있었던 것으로 사료된다. 이상의 방법을 응용하면 차후 각종 암종에서 세포의 형태를 유지한 채로 여러 가지 암유전자 변이를 연구할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

핵형 검사와 bcr/abl 융합 유전자 mRNA 에 대한 PCR검사로 ph¹ 양성 CML로 진단 받고, 말초 혈액에서 적모구가 관찰된 전형적인 CML 환자의 말초 혈액 도말 표본을 이용하여 적모구와 림프구에서 bcr/abl 융합 유전자의 융합 유무를 밝히고자 직접 dual color FISH를 시행하였다. 그 결과 두 예 모두에서 확실한 신호가 관찰되었으며 세포 형태도 그대로 유지되어 있었다. 과립구들에서는 빨간색의 bcr 유전자 신호와 녹색의 abl 신호가 한 개씩 관찰되고 밝은 연한 황색의 bcr/abl 융합 신호가 관찰되어 모두 3개의 신호가 관찰되었다. 적모구에서도 bcr/abl 융합 신호가 관찰되었으며 Wright 염색으로 동일 세포를 적모구로 확인할 수 있었다. 일부의 림프구에서는 bcr/abl 융합이 있음을 FISH와 Wright 염색으로 확인할 수 있었다. 이상으로 CML에서 적모구와 적어도 일부의 림프구가 악성 클론임은 물론 bcr/abl 융합 유전자를 갖고 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977; 63: 125-30.
2. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-3.
3. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 1985; 315: 550-4.
4. Koefler HP, Levine AM, Sparkes M, Sparkes RS. Chronic myelocytic leukemia: eosinophils involved in the malignant clone. *Blood* 1980; 55: 1063-5.
5. Garicochea B, Chase A, Lazaridou A, Goldman JM. T lymphocytes in chronic myelogenous leukaemia(CML): no evidence of the BCR/ABL fusion gene detected by fluorescence in situ hybridization in 14 patients. *Leukemia* 1994; 8: 1197-201.
6. Schuh AC, Sutherland DR, Horsfall W, et al. Chronic myeloid leukemia arising in a progenitor common to T cells and myeloid cells. *Leukemia* 1990; 4: 631-6.
7. Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ, Hansen JA. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1981; 58: 158-63.
8. Raskind WH, Ferraris AM, Najfeld V, Jacobson RJ, Moehr JW, Fialkow PJ. Further evidence for the existence of a clonal Ph-negative stage in some cases of Ph-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia* 1993; 7:

- 1163-7.
9. Lee M, Khouri I, Champlin R, et al. Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction of bcr/abl transcripts in chronic myelogenous leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1992; 82: 708-14.
 10. Lion T. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia: methodological approaches and clinical aspects. *Leukemia* 1996; 10: 896-906.
 11. Nolte M, Werner M, Ewig M, et al. Fluorescence in situ hybridization(FISH) is a reliable diagnostic tool for detection of the 9;22 translocation. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 287-94.
 12. Garcia-Isidoro M, Tabernero MD, Garcia JL, et al. Detection of the Mbcrl/abl translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization: Comparison with conventional cytogenetics and implications for minimal residual disease detection. *Hum Pathol* 1997; 28: 154-9.
 13. Amiel A, Yarkoni S, Slavin S, et al. Detection of minimal residual disease state in chronic myelogenous leukemia patients using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 76: 59-64.
 14. Froncillo MC, Maffei L, Cantonetti M, et al. FISH analysis for CML monitoring? *Ann Hematol* 1996; 73: 113-9.
 15. Tanaka K, Arif M, Eguchi M, et al. Application of fluorescence in situ hybridization to detect residual leukemic cells with 9;22 and 15;17 translocations. *Leukemia* 1997; 11: 436-40.
 16. Bentz M, Cabot G, Moos M, et al. Detection of chimeric bcr/abl genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood* 1994; 83: 1922-8.
 17. Nolte M, Werner M, Ewig M, von Wasielewski R, Wilkens L, Georgii A. Demonstration of the Philadelphia translocation by fluorescence in situ hybridization(FISH) in paraffin sections and identification of aberrant cells by a combined FISH/immunophenotyping approach. *Histopathology* 1995; 26: 433-7.
 18. Knuutila S, Larramendy M, Ruutu T, Paetau A, Heinonen K, Mahlamaki E. Analysis of phenotype and genotype of individual cells in neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 68: 104-13.
 19. Knuutila S, Nylund SJ, Wessman M, Larramendy ML. Analysis of genotype and phenotype on the same interphase or mitotic cell. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 72: 1-15.
 20. Nolte M, Werner M, Ewig M, et al. Megakaryocytes carry the fused bcr-abl gene in chronic myeloid leukaemia: a fluorescence in situ hybridization analysis from bone marrow biopsies. *Virchows Arch* 1996; 427: 561-5.
-