

유방암에서 HMGI(Y) 유전자 발현 및 병리 조직학적 관계에 대한 연구

단국대학교 의과대학 외과학교실

류진우

The Expression of High Mobility Group I (Y) Proteins in Human Breast Cancer

Jin-Woo Ryu, M.D.

Purpose: The precise mechanisms of tumorigenesis of breast cancer remains unknown in spite of major efforts. Recent studies have shown that High Mobility Group I (Y) Proteins [HMGI(Y)] have an important role in the regulation of chromatin structure and function, and that HMGI(Y) protein expression is generally correlated with a malignant phenotype. This study was undertaken to define the relationship of the HMGI(Y) protein expression between malignant breast tissue and non-malignant breast tissue in human, and clinicopathologic findings were reviewed for this purpose.

Methods: Using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for HMGI(Y) with β -actin, this study demonstrated the expression of HMGI(Y). The p53, ER, and PR. were defined by immunohistochemical staining.

Results: The HMGI(Y) expression was increased in the malignant tissue (90%), than in benign (76.9%) or normal (65%) tissue ($p=0.031$). As for the invasive ductal cancers, there was no difference between the HMGI(Y) expression and histopathologic parameters.

Conclusion: These results suggest that the HMGI(Y) expression may be of little pathogenetic prognostic importance in human breast cancer. (J Korean Surg Soc 2001;60:136-140)

Key Words: HMGI(Y), Breast cancer

중심 단어: HMGI(Y), 유방암

Department of Surgery, College of Medicine, Dankook University, Chongnam, Korea

책임저자 : 류진우, 충남 천안시 안서동 산 29

☎ 330-714, 단국대학교 의과대학 일반외과

Tel: 041-550-3933

E-mail: gsryu@anseo.dankook.ac.kr

접수일 : 2000년 12월 15일, 게재승인일 : 2001년 1월 8일

이 연구는 2000학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

서론

유방암은 전 세계적으로 매년 약 100만명의 새로운 환자가 발생한다.(1) 미국 등 서구 사회에서는 여성암중에서 가장 많은 경우이며, 현재 우리 나라에서도 매년 새로운 환자가 급격히 증가하는 추세로 최근의 보고에 의하면 여성암 중에서 위암에 이어 두 번째로 많은 빈도를 차지하고 있다.(2)

유방암에 대한 치료는 최근 방사선 치료방법의 발전과 병행하여 수술 방법의 변화가 이루어졌으며, 새로운 항암제의 개발 등으로 생존율의 증가에 많은 발전이 있었다. 그러나 모든 유방암의 가장 중요한 치료방법은 유방암을 조기에 발견하여 치료하는 것이다. 이런 이유로 유방암의 발병 및 종양 발생에 대한 생물학적 변화에 대한 이해와, 이에 대한 연구가 최근에 급격히 이루어졌으며, 많은 지식들이 축적되었다. 그러나 유전자 수준에서의 분자생물학적 연구를 통한 지식으로도 종양발생의 기전은 명확히 밝혀지지 않은 가운데, 세포의 악성 종양으로의 변화에 대한 연구의 하나인 핵 내 단백질 High Mobility Group I (HMGI) 단백질에 대한 연구가 많은 관심을 끌고 있다.(3)

HMGI 단백질은 저분자량을 갖는 비히스톤계의 핵 내 단백질로서 Adenine/Thymine (A/T)이 풍부한 DNA의 소구(minor groove)에 강한 친화력을 가지고 있으며, 이 부위에 특이적으로 결합하여 염색체 구조와 기능의 조절에 관여한다.(4,5) HMGI계 단백질은 HMGI, HMGY와 HMGI-C의 세 종류의 단백질로 구성되어 있으나, HMG단백의 I와 Y는 염색체 6p21에 위치하는 HMGI(Y)로 알려진 유전자의 교대접합으로 인한(alternative splicing) 이종 단백질이며,(6) 유전자 상에서 기능적으로 여러 종류의 전사인자(Transcriptional factors)들과 결합하여 전사항진 복합체를(enhanceosomes) 이루어, 전사복합체를 총괄하는 중심적인 역할을 하여, 대부분의 경우 유전자들의 전사를 유도한다고 알려져 있다.(7) HMGI(Y) 단백질은 동물실험, 세포주, 몇몇 인체 조직을 이용한 실험에서 정상 세포 및 조직에서는 발현이 되지 않거나 아주 미약한 발현을 보인 반면, 급속히 분열하는 악성종양 또는 미분화 세포에서는 강한 발현을 보이는 것으로 현재까지 보고되고 있다.(8-10) 본 연구는 HMGI(Y) 단백질 발현을 연구하여, 유방암의 발생에

어떠한 연관이 있는지 알아보려 하였으며, 유방암에서는 여러 임상적, 병리학적 결과들과 비교 분석하여 암의 진행도와 어떠한 관련이 있으며, 유방암의 예후인자로서 임상적 의의가 있는지를 연구하려 하였다.

방 법

1) 실험 재료

유방 조직 재료는 수술 받은 환자에서 절제된 유방 조직을 절제 즉시 종괴의 크기를 재고, 종괴의 가장 충실한 부분 조직을 채취하며, 종괴에서 가장 먼 곳에서 정상 유방 조직을 채취하여 동결절편을 만들어 염색하여 확인하였다. 남은 조직은 액체 질소에 급속 동결하여 -80°C 의 냉동고에 넣어 보관하였으며 실험에 사용하였다. 나머지 검체는 포르말린으로 고정 후 파라핀 절편을 만들어 확인하였다. 양성 대조 군으로 사용된 유방암 세포주는 MDA-MB-231, MCF-7과 HS 578T (한국 세포주 은행)를 사용하였다. 연구에 사용된 조직은 77명의 환자로부터 진행성 유방암 조직 60예, 양성 유방 종양 13예, 정상 유방 조직 20예, 관내 상피내암 4예를 사용하였다.

연구 대상 환자의 임상기록과 병리 보고지들은 재검토 되었으며, 연령, 병기, 조직학적 등급 등이 조사되었다.

2) 실험 방법

(1) RNA 분리과정: ULTRASPEC™ RNA Isolation System (Biotecx Lab, Inc. USA)을 사용하여 Total RNA를 얻었다. -80°C 에서 보관중인 조직에서 약 50 mg을 잘게 갈아 Homogenate 1 ml (Ultraspec™ RNA 1 ml per 10~100 mg tissue) 첨가 후 0.2 ml chloroform 첨가 후 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 약 80% 정도 취한 후 동량의 isopropanol을 가하였다. 잘 섞은 용액은 4°C 에서 약 10분 정도 세워두며 이때 RNA 침전을 볼 수 있었다. 원심 분리 후 상층액을 버리고 RNA 침전물을 75% ethanol 1 ml 넣어 세척하였다. 잘 말린 후 DEPC 처리된 3차 증류수에 녹여 사용하였다.

(2) RT-PCR (Reverse transcription and polymerase chain reaction): HMG-I(Y) 단백질의 RT-PCR에 사용된 oligo-primer의 염기서열은 exon 7의 sense; 5'-CAAAACAA-GGGTGCCAAGACC-3', exon 8의 antisense; 5'-AGCCTG-TCCAGGAGGGCATG-3'이었으며 β -actin의 sense; 5'-CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT-3' antisense; 5'-TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG-3'였다. RT-PCR의 최종용적을 $30\mu\text{l}$ 로 하였으며 $10\times$ buffer $3\mu\text{l}$, 2 mM/ μl dNTPs $1.5\mu\text{l}$, 100 mM DTT $1.0\mu\text{l}$, 40 units RNase inhibitor $0.3\mu\text{l}$, 10 units AMV $0.3\mu\text{l}$, 5 units/ μl Taq polymerase $0.15\mu\text{l}$, Total RNA $3.0\mu\text{l}$, 10 pmol/ μl sense primer $1.5\mu\text{l}$, 10 pmol/ μl antisense primer $1.5\mu\text{l}$, DEPC 처리된 증류수 $17.75\mu\text{l}$ 를 혼

합하였다. 이 혼합물은 PCR 증폭기(Perkin Elmer 9600, USA)를 이용하여 HMG-I(Y) 단백질의 경우 42°C 에서 60분간 reverse transcription시킨 후 95°C 3분간 1 cycle 시행 후 94°C 1분(denaturation 단계), 56°C 1.5분(annealing 단계), 72°C 2분간(extension 단계) 33 cycle 반응시킨 후 72°C 5분간 1 cycle 반응시켰다. 증폭된 산물은 2% agarose gel에서 100 Volts로 전기 영동 후 ethidium bromide로 염색 후 자외선 투조하에서 사진을 찍었다.

(3) 면역조직화학적 검사: 포르말린에 고정하고 파라핀 포매한 조직을 이용하여 면역화학조직 검사를 일반적인 Streptavidine-Biotin 검색법으로 시행하였다. 일차 항체는 p53 (BP53.12, monoclonal antibody, Zymed, San Francisco, USA), Estrogen receptor (ER, 1 : 50, monoclonal antibody, Immunotech, Marseille Cedex, France), Progesterone receptor (PR, 1 : 50, polyclonal antibody, Dakopatts)를 사용하였다. 음성 대조 군으로는 일차 항체대신 생리식염수를 이용하여 관찰하고, p53, ER, PR 염색의 판정은 종양 세포 핵 내에 명확한 갈색 과립이 보이면서, 종양 세포의 10% 이상에서 관찰될 때를 양성으로 판정하였다.

(4) 통계분석: 통계분석은 SAS 통계 프로그램을 이용한 Chi-square와 Fisher's exact 검정으로 하였다.

결 과

1) RT-PCR을 이용한 HMG(I)Y 발현

HMG-I(Y) 단백질에 대한 양성 대조군으로 유방암 세포주에 대한 RT-PCR 결과 414 bp의 증폭된 분절을 얻었으며, 실험에 사용한 유방암 세포주 MDA-MB-231, MCF-7, HS 578T 모두에서 현저한 발현을 보였으며(Fig. 1), HMG(I)Y에 대한 발현을 DNA 자동염기서열분석기를 이용하여 확인하였다(data not shown). 생리 식염수를 이용한 음성 대조군 및 정상 조직, 양성 종양, 유방암 조직에 대한 414 bp의 발현을 보았다(Fig. 2)

2) 병리 조직학적 결과와 HMG(I)Y 단백질 발현과의 관계

HMG(I)Y 단백질의 발현은 RT-PCR을 이용하여 유전자의 발현을 보았으며, 진행성 유방암 60예 중 54예(90%), 양성 유방 종양 13예 중 10예(76.9%), 그리고 정상 유방 조직 20예 중 13예(65%)에서 발현이 되었으며 정상 조직에 비하여 유방암에서 발현율이 증가함을 볼 수 있었다(Table 1, $p=0.031$), 진행성 유방암에서(50예) 조직학적 분화도는 발현율이 증가와 관계가 없었다. 관상피내암중 4예의 경우 3예에서(75%) HMG(I)Y 유전자의 발현이 관찰되었다.

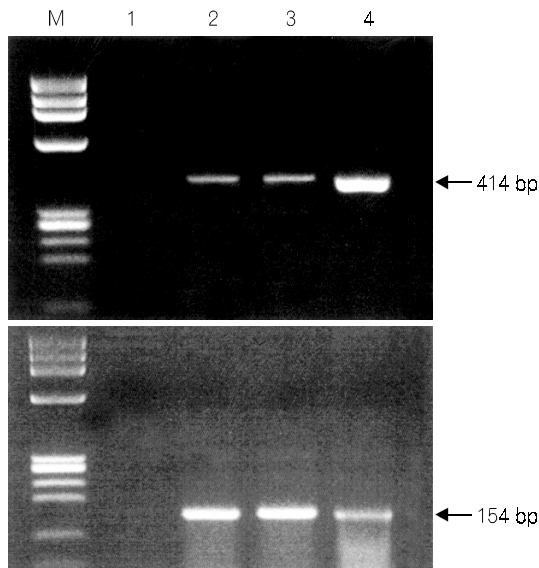


Fig. 1. HMGI(Y) expression in breast cancer cell lines. Negative control (without cDNA, lane 1), MCF-7 (lane 2), MDA-MB-231 (lane 3), HS 578T (lane 4). Actin was used as an internal control for RNA extraction in the sample (bottom).

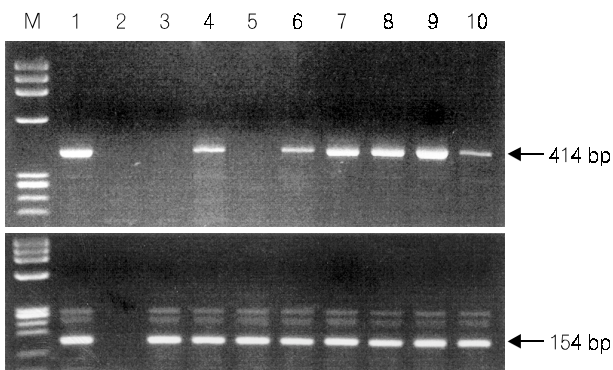


Fig. 2. HMGI(Y) expression in human breast tissues. Positive control, MCF-7 (lane 1), negative control (lane 2), normal tissue (lane 3 and 4), benign tumor (lane 5, 6), ductal carcinoma in situ (lane 7), and invasive cancer tissues (lane 8, 9 and 10). Actin expression for internal control (bottom).

3) 진행성 유방암의 임상적, 병리학적 예후인자들과 HMGI(Y) 발현

진행성 유방암 60예의 평균 종양의 크기는 2.78 ± 1.67 cm이었으며, 33예(55%)가 2 cm 이상이였다. 병기는 2기 유방암이 가장 많았으며(33예, 55%), 4기 환자는 없었다. 진행성 유방암 환자에서 p53, ER, PR의 양성률은 각각 46.7%, 60%, 56.7%이었으며, HMGI(Y) 유전자 발현과의 관련성은 없었다. 임상적, 병리학적 예후인자들인 종양의

Table 1. The HMGI(Y) expression and histopathologic type of breast tissues

	No. of negative specimen	No. of positive specimen	Statistical significance
Histologic type			
Normal	7	13	p=0.031
Benign lesion	3	10	
Invasive ductal cancer	5	45	
- Grade 1	0	5	NS
- Grade 2	4	25	
- Grade 3	1	15	
Invasive lobular cancer	0	2	NS
Medullary cancer	1	2	
Mucinous cancer	2	2	
Metaplastic cancer	0	1	
DCIS	1	3	

DCIS = ductal carcinoma in situ; NS = no signification; No = number.

Table 2. The HMGI(Y) expression and clinicopathologic prognostic parameters in invasive breast cancer (n=60)

	No. of positive specimen	No. of negative specimen	Statistical significance
Tumor size			
≤ 2 cm	3	24	NS
> 2 cm	3	30	
LN metastasis			
Negative	3	31	NS
Positive	3	23	
Stage			
I	0	14	NS
II	5	28	
III	1	12	
Mitosis/10 HPF			
≤ 10	3	32	NS
10~20	1	16	
> 20	2	6	
ER			
Negative	4	20	NS
Positive	2	34	
PR			
Negative	4	22	NS
Positive	2	32	
p53			
Negative	3	29	NS
Positive	3	25	

LN = axillary lymph node; HPF = high power field; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor; No = number; NS = no signification.

크기, 액와부 림프절 전이 유무, 종양의 병기, 그리고 종양의 조직학적 분화도 및 유사분열 수, 등과 HMGI(Y) 유전자의 발현은 연관성이 없었다(Table 2).

고 찰

유방암은 세계적으로 연간 100만 명의 새로운 환자가 발생하며, 한국 여성에서도 최근에 급격히 증가하여 여성 암중 2위를 차지하는 암이다. 유방암의 치료방법에는 전통적인 수술방법외에 최근에는 방사선 치료요법의 발달과 병행하여 수술의 범위를 점차적으로 최소화하며, 전신 질환으로서 항암 화학요법이 중요한 치료방법이 되어가고 있으며, 그 외 항암 호르몬요법 및 면역요법 등이 현재까지 시도되고 있다.

새로운 유방암에 대한 치료 시도로는 현재 많이 연구되는 유전자 치료요법 및 동위원소를 이용한 치료가능성(11) 등에 대한 연구들이 발표되고 있다. 이러한 다양한 치료방법에 대한 연구 및 시도들은, 유방암에 대한 어떤 특정한 치료방법이 아직까지도 만족할 만한 성과를 얻지 못하였다는 사실을 반증하는 것이며, 현재까지도 초기 유방암인 1기 유방암에서 환자의 30%까지 10년 내 원격전이를 일으킨다. 유방암의 효과적인 치료에 대한 연구로, 유방암의 암 발생기전에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으나, 아직까지 명확한 기전이 설명되지 않았으며, 최근에 종양 발생에 있어 유전자의 전사를 조절하는 High Mobility Group (HMG) 단백질에 대한 연구가 새롭게 주목받고 있다. HMG 단백질은 핵 내 저 분자량의 비히스톤계의 단백질로 알려진 지는 약 25년 이상 되었지만,(12) 최근에 와서 기능 및 역할에 대한 연구가 이루어지고 있다. 일반적인 기능으로는 DNA의 A/T가 풍부한 소구에 결합하여 구조적인 변형을 만들며, 전사 전달 물질과(Transcription factors) DNA 사이의 상호작용을 조절하여, 전사(Transcription)의 기초적 기전으로 작용한다고 알려져 있으며, 이런 이유로 구조적 전사 요소(Architectural Transcription Factor)로 대변되고 있다.(13) HMG 단백질의 아과(Subfamily)로 HMGI, HMGY 그리고 HMGI-C의 세종류의 단백질이 있으며, 사실상 HMGI(Y)는 유전자의 A/T가 풍부한 염기서열부위에 결합하여 유전자 전사를 활성화시키며 TNF- β , β -interferon 등등의 여러 유전체 촉진자(promotor region)와 연관하여 작용한다. HMGI(Y)는 정상 조직에서는 발현이 없거나 낮은 수준의 발현을 보이며, HMGI(Y)의 증가 및 발현이 사람에서는 전립선암,(14) 갑상선 종양,(15,16) 대장암(17) 등 여러 다양한 종양에서 악성화와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. HMGI(Y) 유전자는 상피 종양의 발생에 주로 기인하고 HMGI계의 다른 아과(Subfamily)인 HMGI-C 유전자가 간엽성 종양 발생에 주 역할을 하는 것으로 알려졌으나 Tallini등은 HMGI(Y)와 HMGI-

C의 인체에서 여러 가지(지방종, 폐의 연골과오종, 자궁근종, 자궁 내막폴립) 양성 간엽성 종양 발생에 대한 역할 기전을 설명하였다.(9) 그러나 Rogalla등은 염색체 12q14-15 부위의 재배열로 인한 HMGI-C 유전자의 이상이 상피 세포암인 유방암에서 임상적, 병리학적 예후인자로서 의미가 있음을 보고하였다.(18) 본 연구에서는 HMGI(Y) 유전자 발현이 정상 유방조직에서도 65%의(20예 중 13예) 발현이 있었으나, 진행성 유방암 90% 및 유방 양성 종양 76.9%의 발현율을 보여 악성 종양에서 발현율이 증가함을 볼 수 있었다($p=0.031$). 그러나 정상 조직에서도 높은 발현율(65%)을 보여 암에서 특이적으로 발현하여 암의 발생 기전에 특이적 영향을 주는 단백질로서의 의의를 찾기 어려웠다, 또한 유방암의 임상적, 병리학적 예후인자들과의 비교 관찰에서는 HMGI(Y) 단백질의 발현과 비교 인자들과의 연관성이 없음을 보여주어, HMGI(Y) 발현이 유방암에서는 진단적 가치나 역할이 크지 않음을 시사하였다. 그러나 여러 가지 인체 암 세포주(갑상선암, 대장암, 폐암, 유방암) 이용한 유전자 치료로써, HMGI(Y) 단백질 생성을 아데노 바이러스 벡터를 이용하여 성공적으로 억제함으로써, 인체의 여러 암 세포주의 성장을 억제할 수 있다는 최근의 보고도 있어,(19) 향후 HMGI계 단백질의 다른 한 계통인 HMGI-C의 발현에 대한 연구 및 HMGI(Y)에 대한 연구가 좀더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) World Health Organization. The world health report 1998. Geneva, World Health Organization, 1998.
- 2) Suh CI, Suh KA, Park SH, Chang HJ, Ko JW, Ahn DH. Annual report of the central cancer registry in Korea-1998 (based on registered data from 124 hospitals). J Korean Cancer Assoc 2000;32:827-34.
- 3) Tallini G, Dal Cin P. HMGI(Y) and HMGI-C Dysregulation: A common occurrence in human tumors. Adv Anat Pathol 1999;6:237-46.
- 4) Stauss F, Varshavsky A. A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. Cell 1984;37: 889-901.
- 5) Reeves R, Nissen MS. The A/T-DNA-binding domain of mammalian High Mobility Group I chromosomal proteins: a novel peptide motif for recognizing DNA structure. J Biol Chem 1990;265:8573-82.
- 6) Friedman M, Holth LT, Zoghbi HY, Reeves R. Organization inducible expression and chromosome localization of the human HMGI(Y) non-histone protein gene. Nucleic Acids Res 1993;21:4259-67.
- 7) Thanos D, Maniatis T. Virus induction of human INF- β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. Cell

- 1995;83:1091-100.
- 8) Giaccotti V, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Fusco A, Vecchio G, Crane-Robinson C. Changes in nuclear proteins following transformation of rat thyroid epithelial cells by a murine sarcoma retrovirus. *Cancer Res* 1985;45:6051-7.
 - 9) Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, et al. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 2000;80:359-69.
 - 10) Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, et al. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of High Mobility Group I (Y) proteins. *Cancer Res* 2000;60:317-22.
 - 11) Tazwabay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan, Zuckier LS, Zhao QH, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 2000;6:871-8.
 - 12) Goodwin GH, Johns EW. Isolation and characterisation of two calf thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973;3:215-9.
 - 13) Bustin M. High mobility group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1996;54:35-100.
 - 14) Tamimi Y, Van Her Poel HG, Dinyan MM, Umbas R, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, et al. Increased expression of high mobility group protein I (Y) in high grade prostatic cancer determined by in situ hybridization. *Cancer Res* 1993;53:5512-6.
 - 15) Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, Visconti R, Manfioletti G, Battistat S, et al. The expression of the high mobility group HMGI(Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias. *Oncogene* 1995;10:1307-14.
 - 16) Ryu JW, Kim SJ. The elevated expression of the high mobility Group-I (Y) proteins in thyroid cancer using semi-quantitation RT-PCR. *J Korean Surg Soc* 1998;54:23-7.
 - 17) Kim DH, Park YS, Park CJ, Son KC, Nam ES, Shin HS, et al. Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;84:376-80.
 - 18) Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancer: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 1997;19:153-6.
 - 19) Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A. Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4256-61.
-