

신경교종에서 표피성장인자수용체의 발현도와 자기공명영상 소견의 상관관계

김 범 수¹, 신 경 섭¹

목 적 : 신경교종의 자기공명영상 소견과 표피성장인자수용체의 발현 사이의 상관관계를 알아보고자 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법 : 수술적 제거 혹은 생검으로 확진된 41예의 신경교종 (저등급 성상세포종 8예, 역형성 성상세포종 12예, 다형성 교아세포종 21예) 환자에서 시행한 자기공명영상을 종양의 경계, 괴사, 균질도, 출혈, 조영증강, 그리고 종괴주위의 부종에 대하여 분석하여 각 소견에 대한 등급값을 정하였다. 각 환자에서 얻어진 종양 조직을 면역조직화학법으로 표피성장인자수용체의 염색을 시행한 후 그 염색 분포 및 강도에 대해 등급값을 정했다. 각 자기공명소견과 표피성장인자수용체 발현의 상관관계를 통계적으로 알아보았다.

결 과 : 자기공명영상에서 종괴주위 부종만이 표피성장인자수용체의 염색 분포($r=0.71$, $p=0.00$) 및 염색 강도 ($r=0.69$, $p=0.00$)와 유의한 상관관계를 보이는 소견이었다. 나머지 소견은 표피성장인자수용체의 발현과 통계적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

결 론 : 자기공명영상은 신경교종의 진단에 있어 유용한 방법이며, 신경교종에서 종괴주위 부종은 그 조직병리학적 악성도의 예측 뿐만 아니라, 표피성장인자수용체의 발현을 예측하는 데에도 도움이 되는 소견이다.

서 론

근래에 p53 단백질, 표피성장인자수용체 (epidermal growth factor receptor, 이하 EGFR) 등 여러 인자들이 신경교종의 악성화 및 종양의 증식과 관련된 것으로 보고되었다 (1, 2). 그 중 EGFR은 모든 배엽에서 유래한 각종 조직에 정상적으로 분포하는데, 특히 표피, 유방, 위장관 및 비뇨기계 상피등의 증식이 활발한 세포에 주로 존재하고 있다 (3, 4). 한편, 두경부 평편상피암 및 유방암에서 EGFR이 발현된 경우에는 종양의 증식능이 높은 것으로 알려져 있으며 (5, 6), 악성 신경교종에서도 EGFR의 발현율이 높게 나타난다고 한다 (7). Reifenberger 들 (8) 은 EGFR의 발현율과 신경교종의 증식능에는 상관관계가 없다고 하였으나, 최근 EGFR의 발현율과 악성 신경교종에서의 세포증식능 및 예후 사이에 상관관계가 있다는 연구결과도 (2, 9) 보고된 바 있다. 이러한 EGFR의 발현을 확인함으로써 종양의 생물학적 예후의 예측 뿐 아니라, 수용체를

매개로 하는 치료등의 개발에도 도움이 될 수 있을 것이다.

신경교종의 MRI 소견중에서 병리조직학적 악성도 판단에 기준이 되는 소견을 정하고자하는 노력이 많은 연구를 통하여 계속되어 왔으며 (10), 연구에 따라 차이는 있으나 종괴주위의 부종, 종괴효과, 종괴내 괴사 혹은 낭종형성, 종양내 혈관에 의한 신호결손, 조영증강, 신호강도의 균질도 등이 신경종양에서 그 악성도를 시사하는 소견으로 보고되었다 (11, 12, 13). 이와 같이 신경교종의 MRI 소견과 그 조직학적 소견 및 악성도의 관계 등에 관하여 많은 연구가 이루어졌으나, 각 MRI 소견과 EGFR의 발현과의 관계에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 이에 저자들은 신경교종의 악성도 증가에 따른 EGFR 발현과 MRI 소견의 변화를 비교하여 MRI 소견과 EGFR 발현과의 상관관계를 알아보고자, 조직학적으로 확진된 신경교종의 수술 후 포매조직으로부터 면역조직화학염색방법에 의한 EGFR 발현의 염색분포 및 염색강도를 알아보고, 이들을 MRI 상 종양의 경계, 부종, 종괴효과, 신호강도의 균질도, 출혈, 괴사 및 낭종형성, 조영증강 범위 등 7 가지 항목의 소견과 비교 관찰하였다.

대한자기공명의과학회지 1:125-129(1997)

¹가톨릭대학교 의과대학 방사선과학교실

통신저자: 김범수 서울 서초구 반포동 505 가톨릭의대 강남성모병원 방사선과
Tel. 82-2-590-1576 Fax. 82-2-590-2718

대상 및 방법

1. 대상

개두술 후 병리조직학적으로 신경교종으로 진단된 환자 41예 (남자: 27명, 여자: 14명, 연령: 21세-67세, 중간값: 45세)의 병소로 부터 얻은 파라핀 포매조직과 그 수술전 검사로 시행한 MRI를 대상으로 하였다. 병리조직학적으로 신경교종 41예 중, 저등급 성상세포종이 8예, 역형성 성상세포종이 12예, 그리고 다형성교아세포종이 21예였다.

2. 방법

1) EGFR 염색 및 판정

실험대상의 파라핀포매조직을 4µm 두께로 연속절단하여 유 소처리된 슬라이드 (ProbeOn Plus microscopic slide, Fischer Scientific, Co., U.S.A)에 부착시켜 약 30분간 실온에서 건조시켰다.

슬라이드에 부착시킨 파라핀 포매조직절편으로부터 파라핀을 제거하기 위하여 1:2 비율의 실렌 (xylene)과 히스토클리어 (histoclear) 혼합액으로 60℃에서 1분간 4회 반복하여 파라핀을 제거한 후 실온에서 무수 에틸 알코올에 10초간씩 6회 처리하였다. 그 뒤 염색의 강도를 높이기 위하여 target unmasking fluid (SP-0025-FUF3, Kreotech Biotechnology B.V., Netherland)액에 90℃에서 10분간 처리하고, 1% immunoassay buffer (Tris buffer, pH 7.4, Biomeda Co., USA)에 3회 수세하였으며 3% 과산화수소수로 40℃에서 3분간 처리하여 조직내의 과산화효소를 억제시킨 후, normal bovine serum (DAKO Co., U.S.A.)으로 40℃에서 3분간 처리하여 일차 및 이차 항체의 비특이적 결합을 억제시켰다. antibody dilution buffer (DAKO Co., U.S.A.)를 이용하여 EGFR 단일클론항체 (clone: 31G7, IgG1, Triton diagnostics, USA)를 1:50으로 희석하여 40℃에서 15분간 배양시킨 후 1% immunoassay buffer로 4회 수세하였다. 일차항체와 결합하는 biotin이 부착된 항생쥐의 이차항체 (biotinylated goat anti-mouse IgG, DAKO Co., USA)를 40℃에서 5분간 배양시킨 후 1% immunoassay buffer에 4회 수세한 다음, 이차항체와 특이적 결합을

하는 streptavidin peroxidase conjugated reagent (DAKO Co., USA)를 실온에서 15분간 반응시킨 후 흐르는 물과 증류수로 다시 수세 후, 3-amino-9-ethylcarbazole(DAKO Co., USA)를 이용하여 40℃에서 10분간 반응시켜 발색시켰고, 대조 염색은 헤마톡실린으로 하였다.

광학 현미경상 ×400 배율에서 세포막 및 세포질에 염색된 경우를 양성으로 판정하였다. EGFR의 발현도 측정은 염색분포 및 염색강도에 따라 다음과 같이 각각 2가지 방법에 의해서 판정하였다. (1) 슬라이드에 부착된 종양조직에서 양성으로 염색되는 부위가 차지하는 비율에 따라 0%인 경우 0, 50%이하인 경우 1, 50%이상인 경우를 2로 각각 등급값 (graded score)을 주었고, (2) 면역반응이 일어난 종양세포들의 염색강도가 양성 대조조직의 염색강도와 비슷할 때 강양성으로 정해, 전반적인 염색정도에 따라 음성, 약양성, 강양성으로 나누어 0, 1, 2의 등급값을 주었다.

2) MRI의 획득 및 분석

(A) 영상의 획득

뇌에 대한 MRI는 1.5 tesla (Signa Advantage Version 4.8 : GE Medical Systems, Milwaukee, U.S.A.) 및 0.5 tesla (Gyrosan : Philips, Netherland) MRI 기기로 시행하였다. 스핀에코방식을 이용하여, 41명 모두 T1강조영상 (TR/TE : 500-600/20-30)은 횡단 및 시상영상을, T2강조영상 (TR/TE : 2000-2500/80-90)과 양자밀도 강조영상은 횡단영상을 얻었고 조영증강 T1강조영상은 40명에서 Gadolinium-DTPA (Magnevist, Schering AG, Germany) 0.1mmol/kg를 정맥 주사하여 얻었다. matrix 수는 128-256이었고 FOV는 21-31cm, 절편두께는 5-7mm, 평균화 횡수는 1-3회 였다.

(B) 영상의 판독 및 통계처리

진단방사선과 전문의 3명이 수술전 MRI를 각각 후향적으로 판독하였다. MRI상 종양주위의 부종, 종괴효과, 종양의 경계, 신호강도의 불균질도, 출혈, 괴사 및 낭종형성, 조영증강 범위 등 7가지 항목에 대하여 정도에 따라 0, 1, 2의 등급값을 주었다 (Table 1). 판독자들간의 소견이 일치하지 않은 경우에는 다수의 의견을 등급값으로 채택하였다.

Table 1. Grading of MRI Features in Glioma

MRI features of tumor	Grading		
	0	1	2
Margin	well defined	ill defined portion less than half	ill-defined portion more than half
Edema	mild(<2cm)	moderate(<half hemisphere)	severe(>half hemisphere)
Mass effect	no	mild	severe
Heterogeneity	homogeneous	mild	severe
Hemorrhage	no	less than half	more than half
Necrosis/cyst	no	less than half	more than half
Enhancement	no	less than half	more than half

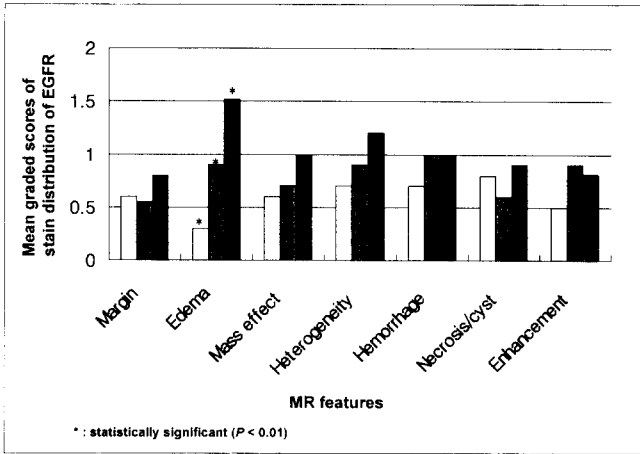


Fig. 1. Mean graded scores of MR features according to stain distribution of EGFR.

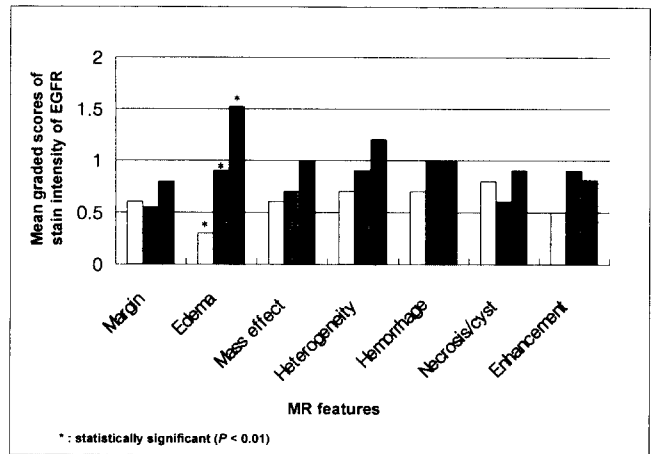


Fig. 2. Mean graded scores of MR features according to stain intensity of EGFR.

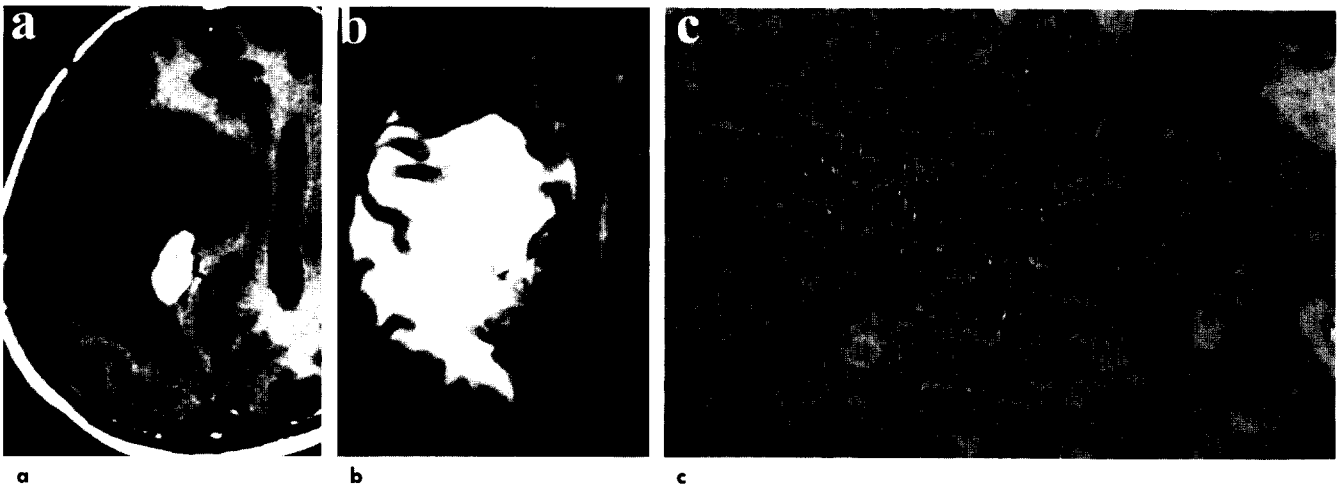


Fig. 3. Glioma involving the right parietal lobe. Gd-enhanced T1 weighted (a) & T2 weighted (b) images show marked peritumoral edema(grade 2). Photomicrograph (c) shows strong positive reaction (grade 2) of EGFR immunoreactivity (arrow) in both stain intensity and distribution along the cell membrane. $\times 400$.

신경교종에서 EGFR 발현도와 각 MRI 소견간의 상관관계에 대하여는 Kendall Tau b test로 검정하였고, 그 유의수준은 1% 이내로 하였다.

Table 2. MR Features Versus Histologic Grading & EGFR Expression in Glioma (correlation coefficients)

MR features of tumors	EGFR	
	Stain Distribution	Stain intensity
1. Margin	0.10	0.07
2. Edema	0.71*	0.69*
3. Mass effect	0.43	0.48
4. Heterogeneity	0.42	0.38
5. Hemorrhage	0.19	0.14
6. Necrosis/cyst	0.29	0.20
7. Enhancement	0.17	0.07

*: statistically significant (Kendall-Tau b test)

결 과

EGFR 발현분포의 등급과 통계적으로 유의한 상관관계를 보인 MRI 소견은 종양주위의 부종이었다 ($r=0.71, p=0.00$, Fig. 1, 3). 종양주위의 부종은 EGFR 발현강도의 등급과도 유의한 상관관계를 보였다 ($r=0.69, p=0.00$, Fig. 2, 3). 종괴효과 및 신호강도의 불균질도는 EGFR의 발현분포 및 강도의 증가에 따라 증가하는 추세를 보였으나 그 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 1, 2). 그의 종양의 경계, 괴사 및 낭종형성, 출혈, 조영증강 범위등과는 통계적인 관련성을 보이지 않았다(Table 2).

고 찰

뇌종양에 있어 종양주위의 부종은 대부분 혈관성 부종(vasogenic edema)으로 종양에 의한 유도되는 신생혈관 내막의 투

과성이 증가되고 종양주위 간질액내에 삼투압을 증가시키는 고분자 물질이 증가하여 생기는 것으로 알려져 있다 (14). 이는 EGFR이 활성화될 때 혈관내막성장인자 (vascular endothelial growth factor, 이하 VEGF)의 생성이 증가되고, 이에 따른 신생혈관의 증가 및 혈관 투과성 증가에 의해 부종이 형성됨을 기술한 Goldman등 (15) 및 Tsai등(16)의 연구 결과와 일치하며, 본 연구에서도 MRI상 종양주위 부종이 EGFR의 발현분포 및 발현강도와 통계적으로 유의한 상관관계를 보였다. 그러므로, 신경교종에서 MRI상 종양주위 부종이 심한 소견은, 그 조직학적 악성도의 예측 뿐 아니라 EGFR의 높은 발현을 예측하는데도 도움이 되는 소견이 될 것이다 (Fig. 3).

종양에 의한 종괴효과는 양성종양보다 급속히 자라는 높은 악성도의 종양에서 흔히 생길 수 있어 악성도나 증식속과의 연관이 기대되지만, 종괴주위의 부종 여부와 종괴의 위치에 영향을 받을 수 있다. 즉, 뇌실주위 혹은 중심부에 생긴 경우 낮은 악성도 및 부종 없이도 비교적 심한 종괴 효과를 보이는 경우가 있다. 저자들의 연구에서 MRI상 종괴효과는 EGFR의 발현의 증가에 따라 증가하는 경향을 보였지만 통계적인 연관성은 없었다.

신경교종에 있어 종괴 내의 조직 괴사는 대개 종괴내 간질액 압력의 증가에 의한 혈류감소 (14) 및 혈관내막 증식에 의한 혈관폐색에 의해 일어나는 응고성 괴사로 MRI상 신경교종의 악성도를 시사하는 중요한 소견이다(13). 또한 혈관 내막 증식에 VEGF가 관여하므로 그 활성화에 영향을 주는 EGFR과의 관계를 기대할 수 있다. 그러나, 본 연구에서 이들간의 상관관계를 발견할 수 없었는데, 그 원인으로 영상의 분석에서 낭종형성이 종괴내 괴사와 함께 분석된 점을 생각할 수 있다. 즉, 신경교종에서 종괴내 괴사는 일반적으로 악성도가 높은 교아세포종에 흔히 일어나는 소견이지만, 악성도가 낮은 저등급 성상세포종 특히 모양세포성 성상세포종 (pilocystic astrocytoma)에서도 흔히 있는 소견인 낭종형성이 영상분석 중 종괴내 괴사와 함께 분류되어 생긴 결과로 생각되며, 차후 낭종형성을 제외한 종괴내 괴사만의 MRI소견과 EGFR 및 VEGF의 coexpression을 확인하는 연구가 뒤따라야 할 것이다.

뇌종양의 조영증강 기전은 주입된 조영제가 뇌혈관장벽의 투과성 증가로 인해 혈관 외부의 간질액에 유출되어 그 주위에 상자성효과가 초래되는 것인데, 이는 뇌혈관장벽의 투과성이 증가된 악성 종양에서 잘 나타난다(14, 17). 한편 저자들의 연구에서 조영증강의 범위와 EGFR의 발현과는 통계적 연관을 보이지 않았다. 이는 저자들의 연구가 후향적 영상분석방법을 취했기 때문에 조영증강의 강도 및 시간에 따른 역동적 변화양상을 반영하기 어려웠고, 종괴내 괴사 및 낭종형성 부위에 의한 조영증강결손부가 조영증강되지 않는 고형종괴로 인지되었을 가능성이 있다. 그러므로, 조영증강에 대하여는 최근 시행되고 있는 관류영상 (perfusion image) 및 확산영상 (diffusion image) 등을 이용한 전향적 연구가 도움이 되리라 생각된다.

면역조직화학염색에 의한 EGFR의 발현도의 판정법은 (1) 그 유무에 따라 2개군으로 분류하는 방법과, (2) 양성으로 염색되는 부위가 차지하는 비율에 따라 분류하는 염색부위에 의한

등급, (3) 염색강도를 대조조직과 비교하여 분류하는 염색강도에 의한 등급, 그리고 (4) 염색부위에 의한 등급과 염색강도에 의한 등급을 곱한 EGFR 표현지수(EGFR labelling index)에 의해 분류하는 법등 네가지가 있다(2, 5, 18). 본 연구에서는 염색분포 및 염색강도 두가지 등급값에 대하여 각각 측정을 하였는데, 두가지 등급 모두가 MRI 소견상 종양주위의 부종과 상관관계를 보였고 그밖에 종양의 경계, 신호강도의 균질도, 출혈, 괴사 및 낭종형성, 조영증강 범위등은 염색분포 및 강도에 의한 등급들과 모두 무관하여, EGFR의 염색분포에 의한 발현등급과 염색강도에 의한 발현등급이 MRI 소견 중 같은 항목에 대하여 서로 유사한 상관관계를 가지고 있었다.

결론적으로, 신경교종에서 표피성장인자수용체의 발현은 MRI상 여러 악성도를 시사하는 소견 중 종양주변 부종의 정도가 면역조직화학염색에 의한 EGFR 발현의 범위 및 강도와 유의한 상관관계를 보였고, 통계적 유의성은 없었지만 종괴효과 및 비균질도 등이 EGFR의 발현도와 함께 증가하는 추세를 보여, MRI상 이러한 소견은 신경교종의 진단에서 그 조직학적 진단 및 그 악성도의 예측 뿐 아니라 EGFR의 높은 발현을 예상하는데도 유용할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 1984;44:753-760
2. Jaros E, Perry RH, Adams L, et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor and Ki-67 labelling in brain tumors. *Br J Cancer* 1992;66:373-385
3. Green MR, Basketter DA, Couchman JR, Rees DA. Distribution and number of EGF receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Devel Biol* 1983;100:506-512
4. Damjanov I, Mildner B, Knowles BB. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab Invest* 1986;55:588-592
5. Kearsley JH, Furlong LL, Cooke RA, Waters MJ. An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. *Br J cancer* 1990;61:820-827
6. Toi M, Wade T, Yamada H, Ohsaki A, Hattori T. Growth fractions of breast cancer in relation to epidermal growth factor receptor and estrogen receptor. *Jpn J Surg* 1990;20:327-330
7. Arita N, Hayakawa T, Izumoto S, et al. Epidermal growth factor receptor in human glioma. *J Neurosurg* 1989;70:916-919
8. Reifenberger G, Prior R, Deckert M, Wechsler W. Epidermal growth factor receptor expression and growth fraction in human tumors of the nervous system. *Virchows Archiv. A Pathol Anat* 1989;414:147-155
9. 지철, 최창락. 신경교종의 표피성장인자수용체 발현과 증식능. 가톨릭대학 의학부 논문집 1994;47:1639-1649
10. Brant-Zawadzki M, Badami JP, Mills CM, Norman D,

- Newton TH. Primary intracranial tumor imaging: a comparison of magnetic resonance and CT. *Radiology* 1984;150:435-440
11. Dean BL, Drayer BP, Bird CR, et al. Gliomas: classification with MR imaging. *Radiology* 1990;174:411-415
 12. Tervonen O, Frones G, Scheithauer BW, Dietz MJ. Diffuse fibrillary astrocytomas: correlation of MRI features with histopathologic parameters and tumor grade. *neuroradiology* 1992;34:173-178
 13. 장기현, 최충곤, 서정호 등 10인. 성인 성상세포교종의 자기공명영상에 의한 악성도 판정. *대한방사선학회지* 1994;31(3):377-384
 14. Steen RG. Edema and tumor perfusion: characterization by quantitative HMR imaging. *AJR* 1992;158:259-264
 15. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Molecular biology of the cell* 1993;4(1):121-133
 16. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82:864-873
 17. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma: pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 1985;56:1106-1111
 18. Mayer A, Takimoto M, Rritz E, Schellander G, Kofle, K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:2454-2460

J. Korean Soc. Magn. Reson. Med. 1:125-129(1997)

Correlation Between the Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and MR Features in Glioma

Bum-soo Kim, Kyung Sub Shinn

Department of Radiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea

Purpose: The aim of this study was to find correlation between the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and MR findings in the brain glioma.

Materials and Methods: MR features including edema, margin, necrosis, heterogeneity, hemorrhage and contrast enhancement were retrospectively analyzed with preoperative MR images in 41 patients with proven brain gliomas (8 low grade astrocytomas, 12 anaplastic astrocytomas, 21 glioblastoma multiformes). Immunohistochemical study of EGFR was done and their expressions were graded by both stained distribution and intensity. Correlation analysis between the MR features and EGFR expressions was done.

Results: Peritumoral edema was correlated with both distribution ($r=0.71$, $p=0.00$) and stain intensity ($r=0.69$, $p=0.00$) of EGFR expression. Other MR features showed no statistical correlation with EGFR expression.

Conclusion: MRI is useful in evaluation of brain glioma, and peritumoral edema is useful finding that suggests EGFR expression as well as malignant histopathologic grade of the tumor.

Index words: Brain tumor, glioma ;
Epidermal growth factor receptor (EGFR) ; MRI, brain tumor

Address reprint requests to : Bum-soo Kim, MD., Department of Radiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Kangnam St. Mary's Hospital, # 505 Banpo-Dong, Seocho-Gu, Seoul 137-040, Korea.
Tel. 82-2-590-1576 Fax. 82-2-590-2718