

## 만성 궤양성 대장염과 급성 자기제어성 대장염 사이의 세포증식능 비교

원광대학교 의과대학 병리학교실, <sup>1</sup>내과학교실

윤기중 · 유형륜 · 최석채<sup>1</sup> · 나용호<sup>1</sup>

= Abstract =

### Comparison of Cell Proliferation between Chronic Ulcerative Colitis and Acute Self-limited Colitis

Ki Jung Yun, M.D., Hyung Ryun Yoo, M.D., Suck Chei Choi, M.D.<sup>1</sup>  
and Yong Ho Nah, M.D.<sup>1</sup>

*Department of Pathology and <sup>1</sup>Internal Medicine, Wonkwang University  
School of Medicine, Iksan, Korea*

**Purpose:** The ulcerative colitis is a major chronic intestinal disease of unknown etiology affecting principally the rectum and left colon, and its incidence is markedly increasing in Korea. The main differential diagnosis of ulcerative colitis is an acute self-limited colitis. This study was performed to evaluate difference of cell kinetics between chronic ulcerative colitis and acute self-limited colitis. **Methods:** The normal colon (n=25), acute self-limited colitis (n=25) and chronic ulcerative colitis (n=25) were investigated by using Ki-67 immunohistochemical staining for proliferation and TUNEL method for apoptosis. The Ki-67 labeling indices and TUNEL labeling indices were determined. **Results:** The means of Ki-67 labeling indices in normal colon, acute self-limited colitis and chronic ulcerative colitis were  $5.14 \pm 5.25\%$ ,  $6.81 \pm 5.73\%$ ,  $13.10 \pm 10.15\%$ , respectively. And the means of TUNEL labeling indices in normal colon, acute self-limited colitis and chronic ulcerative colitis were  $1.59 \pm 0.10\%$ ,  $2.54 \pm 1.60\%$ ,  $2.51 \pm 1.40\%$ , respectively. **Conclusions:** The apoptosis is one of method of cell loss in both acute self-limited colitis and chronic ulcerative colitis. High proliferative activity of chronic ulcerative colitis may predispose to mutational events in colonic mucosa, therefore may be one of the increased cancer risk factors in chronic ulcerative colitis.

**Key Words:** Ulcerative colitis, Acute self-limited colitis

책임저자 : 윤기중, 전북 익산시 신용동, 원광의대병원 해부병리과(우편번호: 570-711)  
(Tel: 0653-850-1559, Fax: 0653-852-2110)

본 논문은 1999년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구되었음.

## 서 론

만성 궤양성 대장염(chronic ulcerative colitis)은 재발과 관해가 흔하게 반복되는 원인불명의 만성적인 염증성 장질환의 하나로 임상 증상이 다양하여 정확한 진단이 어렵다. 또한 진단 후 지속적인 치료 및 추적관찰이 필요하다.<sup>1</sup> 그리고 만성 궤양성 대장염은 대장을 침범하는 다른 질환과 중복되는 소견이 많으므로 임상 증상, 내시경 소견, 방사선 소견 및 병리적 소견을 종합하여 진단하게 된다. 감별해야 하는 질환들로는 급성 자기제어성 대장염(acute self-limited colitis), 허혈성 대장염, 그리고 크론씨병 등이다. 이 중에서 특히 급성 자기제어성 대장염은 *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* 등의 세균감염에 의한 것으로 암종으로 이환이 없고 보통 수주안에 치유되는 질환이다. 임상적으로 급성 자기제어성 대장염은 출혈성 설사와 함께 대장내시경상 특발성 염증성 장질환과 유사하게 보이기도 한다.<sup>2,3</sup> 그리고 급성 자기제어성 대장염을 만성 궤양성 대장염으로 오진하여 스테로이드 등으로 치료를 하면 전격성 대장염이나 폐혈증을 유발할 수 있으므로 정확한 감별이 요구된다.<sup>2,3</sup> 따라서 만성 궤양성 대장염과 급성 자기제어성 대장염의 병인에 대한 연구의 일환으로 세포의 죽음의 한 형태인 apoptosis와 세포의 생성을 반영하는 Ki-67 면역염색을 통한 세포동력학적 측면에서 두 질환을 비교하여 궤양 형성 과정과 암종으로 이환되는 차이를 설명해 보고자 하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1) 연구재료

연구재료는 원광대학교 의과대학병원에서 내시경을 통해서 얻은 이형성이 없는 만성 궤양성 대장염 25예, 급성 자기제어성 대장염 25예, 정상 대장 25예의 파라핀 포매조직으로 하였다.

### 2) Apoptosis 염색

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) 방법인 ApopTag apoptosis *in situ* detection kit (Oncor, USA)를 사용하였다. Apoptosis되는 세포를 염색하기 위해서 파라핀 포매조직을 박절하였다. 그리고 xylene으로 탈파라핀시킨 후 흡수시켰다. 그리고 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 처리하고 proteinase K (20 µg/ml, Boehringer Mannheim, Germany)를 실온에서 15분간 반응시키고 증류수로 수세하였다. Equilibration buffer로 처리하고, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 효소 및 reaction buffer 용액을 희석하여 54 µl를 처리한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고, 37°C stop/wash 완충액에 담구어 10분간 반응시키고, phosphate-buffered saline로 수세하고 anti-digoxigenin-peroxidase를 가한 후 30분간 반응시켰다. Diaminobenzidine으로 발색시키고, methyl green으로 대조 염색한 후 봉입하였다. 대조 염색은 구개편도를 사용하였다.

### 3) Ki-67 염색

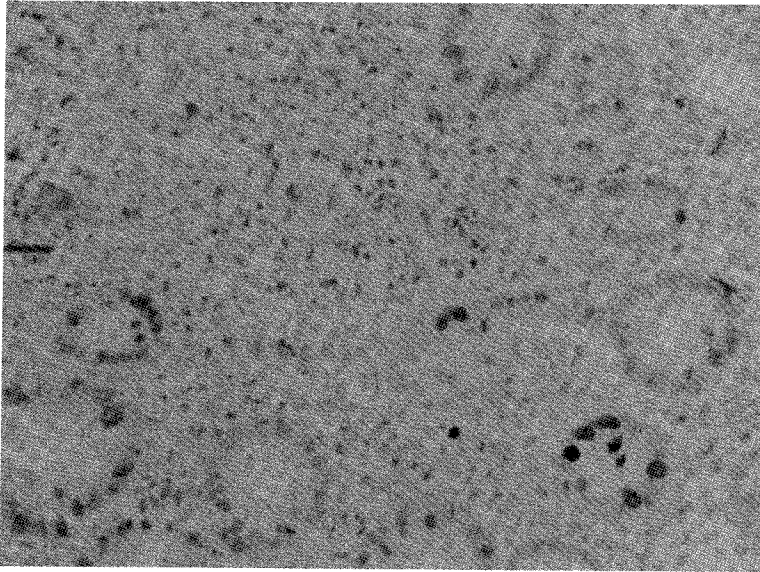
Ki-67 (ZYMED, USA)의 일차 항체 농도는 1 : 50이었으며, 염색방법은 4 µm 두께로 박절한 조직편을 ProbeOn Plus Microscope Slide (Fisher Scientific, USA)에 부착하여 탈파라핀 및 흡수를 시켰다. 그리고 0.01 M citrate buffer (pH: 6.0)을 가하고, DNA buffer (Research Genetics, USA), protein blocker (Research Genetics, USA)를 처리하고, 일차 항체를 45°C에서 25분간 반응시켰다. 이차항체는 LSAB plus kit (DAKO, USA)를 이용하였으며, 최종 발색제는 stable fast red와 stable naphthol phosphate (Research Genetics, USA)였고, Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다.

### 4) 판독

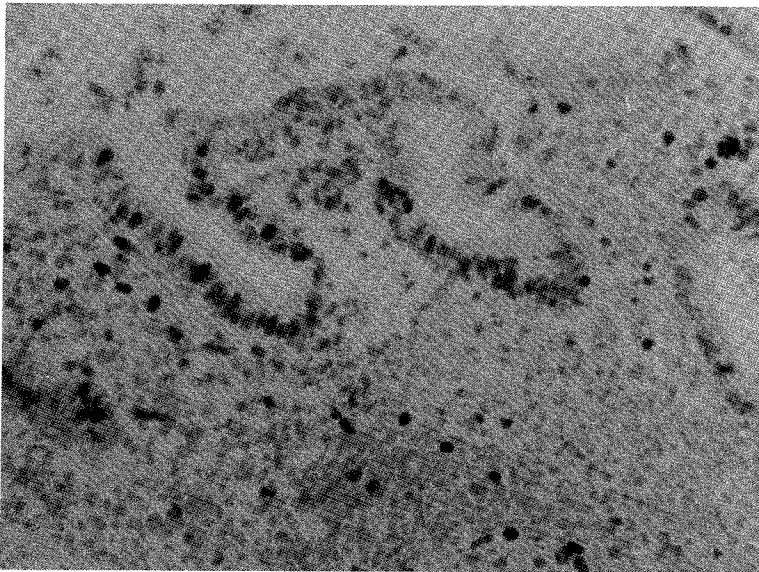
현미경(Olympus, BH-2) 400배 한 시야에서 보이는 상피세포를 전부를 센 후 TUNEL 양성세포 및 Ki-67 양성세포를 백분율로 하여 각각의 표지

수를 구했다. Apoptosis 세포는 TUNEL 염색에 의해서 진한 갈색으로 염색된 경우를, Ki-67 양성세포는 면역조직화학적 염색에서 진한 붉은색으로

염색된 경우를 각각을 양성으로 하였다. 또한 판독시 점막근육판이 있거나 핵이 미성숙하여 점막하부로 인정된 곳에서는 판독을 하지 않았다.



**Fig. 1.** Immunohistochemical staining for Ki-67 in acute self-limited colitis. A few Ki-67 positive cells are noted ( $\times 200$ ).



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining for Ki-67 in chronic ulcerative colitis. Numerous Ki-67 positive cells are noted ( $\times 200$ ).

### 5) 통계

만성 궤양성 대장염, 급성 자기제어성 대장염, 정상 대장 사이의 apoptosis 및 Ki-67 표지자수를 비교하기 위해서 Student's *t*-test를 하였으며 유의 수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

### 결 과

#### 1) Ki-67

정상 대장, 급성 자기제어성 대장염(Fig. 1), 그리고 만성 궤양성 대장염(Fig. 2)에서 표지자수를

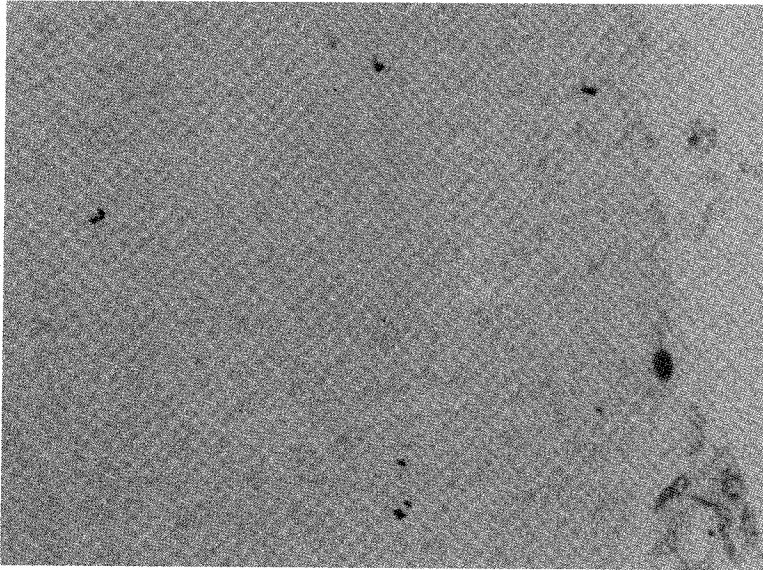


Fig. 3. TUNEL method for apoptosis in acute self-limited colitis. TUNEL positive cells are noted ( $\times 200$ ).

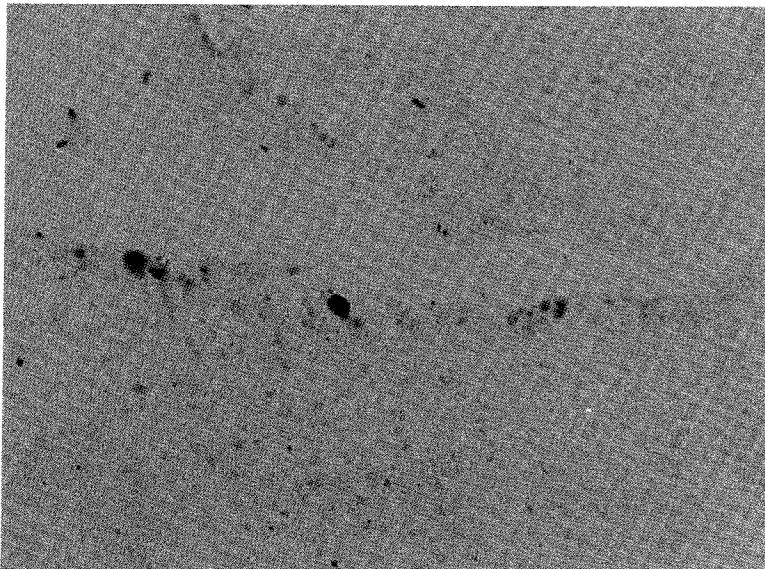


Fig. 4. TUNEL method for apoptosis in chronic ulcerative colitis. TUNEL positive cells are noted ( $\times 200$ ).

구하기 위해 쉰 총 상피세포 수는 각각 평균 2267, 1285, 720개이었고 각각의 표지지수는  $5.14 \pm 5.25\%$ ,  $6.81 \pm 5.73\%$ ,  $13.10 \pm 10.15\%$ 이었다. 만성 궤양성 대장염의 표지지수가 급성 자기제어성 대장염 및 정상 대장보다 통계학적으로 유의있게 높았으나 급성 자기제어성 대장염과 정상 대장 사이에는 유의있는 통계학적 차이가 없었다.

## 2) Apoptosis

정상 대장, 급성 자기제어성 대장염(Fig. 3), 그리고 만성 궤양성 대장염(Fig. 4)에서 표지지수를 구하기 위해서 쉰 총 상피세포 수는 각각 평균 1370, 1217, 409개이었고 각각의 표지지수는  $1.59 \pm 0.10\%$ ,  $2.54 \pm 1.60\%$ ,  $2.51 \pm 1.40\%$ 이었다. 만성 궤양성 대장염 및 급성 자기제어성 대장염의 표지지수가 정상 대장보다 통계학적으로 유의있게 높았으나, 만성 궤양성 대장염과 급성 자기제어성 대장염 사이에는 유의있는 통계학적 차이가 없었다.

## 고 찰

만성 궤양성 대장염의 진단은 절대적인 병리적 소견이 없기 때문에 감염성 질환이나 허혈성 대장 질환 등을 배제하고 임상 증상, 내시경 소견, 방사선 소견 그리고 병리적 소견들을 종합하여 이루어지는 것이 보통이다. 허혈성 대장 질환은 주로 고령층에서 호발하고 병리적으로는 점막의 고유층에 출혈이나 유리질화(hyalinization), 가막형성, 선화(crypt)의 허혈성 변화, 전층괴사(full thickness necrosis) 등의 소견을 기초로 하여 진단하게 된다.<sup>4,6</sup> 그리고 *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* 등과 같은 박테리아에 의하여 야기되는 급성 자기제어성 대장염은 출혈성 설사와 함께 대장 내시경상 특발성 염증성 질환 형태와 유사하게 보이면서 보통 2주 이내에 치유되는 것으로 특이적인 진단명이라기보다는 서술적인 진단명이다.<sup>3</sup> 병리적으로는 점막 고유층에 부종, 출혈 및 호중구 침윤이 특징적이고 만성 궤양성 대장염에서 보이는 선화의 구조적 변화, 점막 기저

부의 형질세포증, Paneth 세포화생 등이 없는 점으로 감별된다.<sup>13</sup> 특히 급성 자기제어성 대장염을 만성 궤양성 대장염으로 오인하여 스테로이드 등으로 치료하면 전격성 대장염이나 폐혈증이 초래될 수 있어 특히 감별해야 한다. 임상적으로 만성 궤양성 대장염으로 의심하여 대장 내시경으로 생검 했던 61예 중 29예인 47.5%에서 부적절한 생검을 포함하여 임상진단과 병리소견이 불일치하였으며, 이중 5예인 8.2%에서 급성 자기제어성 대장염으로 진단되었다.<sup>7</sup> 이처럼 만성 궤양성 대장염은 유사한 다른 질환과 감별해야 할 중요한 질환이다. 그리고 약 2% 정도에서는 이형성을 거쳐 암종으로 이환될 수 있는 질환이므로 이에 대한 이해가 함께 요구된다.<sup>8</sup> 만성 궤양성 대장염에서 암종이 유발될 때는 p53 유전자 변이, DNA의 비배수성 등이 나타난다. 그리고 Ki-67과 같은 증식능을 알아보는 면역조직화학적 염색에서는 정상 점막, 이형성이 없는 궤양성 대장염, 이형성 및 암종을 동반한 궤양성 대장염으로 진행할수록 증식능이 높으며, 이런 높은 증식능이 점막 세포의 돌연변이를 증가시켜 암종을 일으킬 수 있는 소인이 될 수 있다는 보고가 있다.<sup>9,10</sup> 이와함께 대장의 암종 형성 과정에서 이런 증식세포와 apoptosis가 발암과정에 중요한 역할을 한다는 보고도 있다.<sup>11</sup>

본 연구에서 시행한 Ki-67은 세포주기의 G<sub>0</sub> 시기를 제외하고 모든 세포주기에 나타나는 핵단백으로 G<sub>2</sub> 및 M 시기에 최대로 나타난다.<sup>12,13</sup> 연구 결과 표지지수는 정상 대장, 급성 자기제어성 대장염, 만성 궤양성 대장염에서 각각  $5.14 \pm 5.25\%$ ,  $6.81 \pm 5.73\%$ ,  $13.10 \pm 10.15\%$ 로 만성 궤양성 대장염이 정상 대장 및 급성 자기제어성 대장염보다 증식능이 유의있게 높았다. 이는 만성 궤양성 대장염이 재발과 관해를 반복하면서 증식능이 높다는 것을 의미하는데, 이로 인해서 세포가 불안정해지고, DNA 등이 손상될 가능성이 높을 것으로 생각되었고, 또한 만성 궤양성 대장염이 암종으로 이환될 수 있는 질환임을 시사하는 소견으로 생각되었다. 그리고 본 연구에서 관찰되는 Ki-67 표

지지수는 Franklin등<sup>13</sup>이 정상 점막에서  $23 \pm 1.6\%$ , 비활동성 궤양성 대장염  $35 \pm 7.5\%$ , 활동성 궤양성 대장염  $58 \pm 4.9\%$ 의 Ki-67 표지지수를 각각 보인 것과 비교할 때 전반적으로 표지지수가 낮게 나왔다. 이러한 차이는 Franklin등<sup>13</sup>의 결과는 주로 대장에서 증식대가 있는 점막 하부에서 측정된 것이어서 전반적으로 높게 나온 것으로 생각되며, 실제로 Franklin등<sup>13</sup>의 연구에서도 활동성 궤양성 대장염의 점막 상부는 평균 12% 정도의 표지지수를 보이고 있었다. 또한 Kikuchi등<sup>14</sup>의 연구에서도 정상 대장의 표지지수는 점막 상, 하부에 따라 큰 차이를 보였는데, 하부는  $27.7 \pm 11.1\%$ , 상부는  $0.1 \pm 0.1\%$ 의 표지지수를 보였다. 이는 대장의 점막에서 Ki-67 등의 증식능에 대한 표지지수를 측정하고자 할 때는 점막의 위치에 따라 표지지수가 크게 다르므로 이점이 고려되어야 함을 시사하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 이점을 고려하여 판독시 점막근육판이 있거나 핵이 미성숙하여 점막 하부로 인지된 곳에서는 판독을 피하여 표지지수를 구하였다. 그러나 일부 조직은 상, 하부를 판단하기 힘든 경우도 있어서 점막의 위치가 정확히 구분되는 예를 대상으로 더욱 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각되었다. Apoptosis는 세포의 죽음의 한 형태로 허혈 등의 병리적 상황에서 발생하는 피사와 달리 생리적 또는 병리적 상황에서 나타나는 것으로 생리적 상황에서는 세포의 수적인 평형을 유지하는데 중요한 역할을 한다.<sup>15,16</sup> 연구결과 apoptosis 표지지수는 정상 대장, 급성 자기제어성 대장염, 만성 궤양성 대장염에서 각각  $1.59 \pm 0.10\%$ ,  $2.54 \pm 1.60\%$ ,  $2.51 \pm 1.40\%$ 로 만성 궤양성 대장염 및 급성 자기제어성 대장염에서 정상 대장 보다 높게 나왔는데, 이는 만성 궤양성 대장염 및 급성 자기제어성 대장염에서 세포 소실의 한 형태가 apoptosis임을 시사하는 것으로 생각되었다. 그리고 Iwamoto등<sup>15</sup>이 정상 대장, 궤양성 대장염에서 각각  $1.1 \pm 0.2\%$ ,  $9.0 \pm 0.9\%$ 의 apoptosis 표지지수를 보여 궤양성 대장염에서 정상 대장보다 표지지수가 의의있게 높았는데 이는 본 연구결과와 일치하는 소견이었다. 그러나 궤양성

대장염에서 apoptosis 표지지수의 수치가 본 연구 결과와는 차이를 보였다. 이는 TUNEL 방법에 의한 염색 결과를 판독하는 기준의 차이 그리고 조직의 고정 시간, 절편의 두께, proteinase K의 농도, TdT 효소 농도 등이 TUNEL 방법에 다양하게 영향을 미치므로 이점 때문일 것으로 생각되었다.<sup>16</sup> 또한 본 연구에서 Ki-67 표지지수를 조사하기 위해서 쉐 상피세포수가 정상 대장, 급성 자기제어성 대장염, 만성 궤양성 대장염에서 각각 2267, 1285, 720개, apoptosis 표지지수에서는 각각 1370, 1217, 409개로 질환에 따라 많은 차이를 보였다. 이는 400배 현미경시야에서 각 질환에 따라서 나타나는 상피세포의 수가 차이가 있음을 시사하는 것으로 급성 자기제어성 대장염에서는 점막 고유층의 부종 및 호중구 침윤으로 선와의 간격이 넓어졌기 때문이며, 만성 궤양성 대장염에서는 림프구 및 형질세포 침윤과 함께 선와의 구조적인 변화로 인해서 상피세포가 현미경시야에서 적게 출현했기 때문으로 생각된다. 또한 같은 질환이더라도 Ki-67 및 apoptosis 표지지수를 구하기 위해서 쉐 상피세포수가 차이가 있는데 이는 Ki-67 발현과 apoptosis가 나타나는 부위가 서로 다르기 때문인 것으로 생각되었다. 그러므로 점막의 부위에 따른 표지지수의 변화 등에 대해서도 계속 연구되어야 할 것으로 생각되었다.

## 결 론

정상 대장, 급성 자기제어성 대장염 그리고 만성 궤양성 대장염에서 세포의 Ki-67 발현과 apoptosis를 중심으로 세포동력학적 측면에서 비교하기 위해서 시행했던 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 만성 궤양성 대장염 및 급성 자기제어성 대장염에서 궤양 형성시 apoptosis가 세포소실을 일으키는 방법들 중의 하나이다.

2) 만성 궤양성 대장염이 급성 자기제어성 대장염 및 정상 대장보다 Ki-67 발현이 높았다.

이상의 연구결과로 만성 궤양성 대장염의 궤양

형성과정에 apoptosis가 부분적으로 관여하는 것으로 생각되며, 만성 궤양성 대장염에서는 세포의 증식능이 높아 세포가 불안정해져 돌연변이 등의 DNA 손상에 노출될 가능성이 급성 자기제어성 대장염 및 정상 대장보다 높고 암종발생 가능성이 증가될 것으로 생각되었다.

## REFERENCES

1. Juan R. Ackerman's surgical pathology. 8th ed. St. Louis: Mosby; 1996. p. 735-44.
2. Kumar NB, Nostrant TT, Appleman HD. The histopathologic spectrum of acute self-limited colitis (acute infectious type colitis). *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 523-9.
3. Ming SC, Goldman H. Pathology of the gastrointestinal tract. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 658-9.
4. Brandt L, Boley S, Goldberg L, Mitsudo S, Berman A. Colitis in elderly. *Am J Gastroenterol* 1981; 76: 239-45.
5. Digman CR, Greenson JK. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 706-10.
6. Bharucha AE, Tremaine WJ, Johnson CD, Batts KP. Ischemic proctosigmoiditis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2305-9.
7. 배종엽, 김호근. 내시경적 생검으로 진단한 만성궤양성 대장염의 임상적, 병리적 특성. *대한병리학회지* 1996; 30: 1091-8.
8. Morison BC. Precancer and cancer in inflammatory bowel disease. *Pathology* 1985; 17: 173-80.
9. Noffsinger AE, Miller MA, Cusi MV, Fenoglio-Preiser CM. The pattern of cell proliferation in neoplastic and nonneoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer* 1996; 78: 2307-12.
10. Holzmann K, Klump B, Borchard F, Hsieh CJ, Kuhn A, Gaco V, et al. Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutation in colectomy specimens with long standing ulcerative colitis. *Int J Cancer* 1998; 76: 1-6.
11. Koike M. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J Surg Oncol* 1996; 628: 92-108.
12. Pelosi G, Bresaola E, Manfrin E, Rodella S, Schiavon I, Iannucci A. Immunohistochemical detection of cell proliferation-related antigens in cytologic smears of human malignant neoplasm using PC10, reactive with proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 510-6.
13. Franklin WA, McDonald GB, Stein HO, Gatter KC, Jewell D, Clarke LC, et al. Immunohistochemical demonstration of abnormal colonic crypt cell kinetics in ulcerative colitis. *Hum Pathol* 1985; 16: 1129-32.
14. Kikuchi Y, Dinjens WNM, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 1997; 431: 111-7.
15. Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-9.
16. Moss SF, Attia L, Scholes JV, Walter JRF. Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut* 1996; 39: 811-7.