

골 Ewing 육종에 대한 식물성 렉틴의 결합능 관찰

서울대학교 의과대학 병리학교실

김 철 우 · 김 호 민 · 함 의 근

서 론

골에 발생하는 Ewing 육종은 원발성 골 육종중 4 번째로 호발하는 종양으로 특히 소아기(5~13세)에 흔히 발생하는 악성종양이다¹⁾. 이 종양은 임상적 중요성에 비추어 아직까지 발생기원세포에 대한 정설이 확립되지 않았으며 소아시기의 골에 생길 수 있는 다른 육종들, 특히 악성림프종과 전이성 신경아세포종등과의 감별진단이 매우 힘들어 병리학적으로 꾸준한 연구가 필요한 질환이다. 현재까지 밝혀진 본 종양세포의 가장 중요한 병리조직학적 특징은 종양세포에 diastase에 소화되는 PAS 양성물질을 포함하고 있는 소견으로 이는 전자현미경상 glycogen이 함유됨이 증명되는 점이다²⁻³⁾. 따라서 저자들은 식물성 렉틴들이 각각 다른 glycogen 가지와 특징적 결합능을 지닌 것에 착안하여 렉틴을 Ewing 육종에 적용하여 봄으로 다른 육종과의 감별진단 내지는 종양기원세포를 추적하는데 도움이 되리라는 가정 하에서 본 연구를 시행하였다.

관찰재료 및 방법

서울대학교병원 병리과와 서울의대 병리학교실에서 1980년부터 1986년까지 검색된 골 Ewing 육종 6예를 대상으로 하였다. 이들 6예의 기존 보관된 파라핀 블록들 중 적절한 것을 선택하여 평균 5 μ m의 두께로 박절하여 hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff 및 diastase 처리 periodic acid Schiff 등의 염색을 시행하였고 biotinylated-Lectin Kit(Vector, Calif.)를 사용하여

* 본 논문의 요지는 1987년 춘계학술대회에서 포스터 전 시로 발표하였음.

* 본 연구는 1986년도 서울대학교병원 임상연구비 및 서울의대 병리학교실 연구비의 보조로 이루어졌음.

avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)⁴⁾ 법에 의해 6가지의 식물성 렉틴에 대한 면역조직화학적염색을 시도 하였다(Table 1).

본 연구에서 ABC 법에 의한 렉틴 염색과정을 간단히 기술하면 다음과 같다. 박절된 slide를 건조시키고, 탈 paraffin 과정을 거친 후, 3% hydrogen peroxide 용액을 표본 위에 점적하여 10분간 처치(incubation)하였다. 다음 biotinylated 렉틴들을 Tris 완충 용액 (pH 7.6)에 희석(100 μ g/mL) 하여 40분간 처치하였고 마지막으로 avidin-biotin-peroxidase 복합용액을 다시 40분간 처치하였다. 기질(substrate)은 H₂O₂-aminoethyl carbazole을 사용하여 20분간 처치하였다. 각 단계 사이에 Tris 완충 용액 (pH 7.6)에 5분간씩 담그어 비 특이성 결합을 억제하였다. 대조염색은 Meyer hematoxylin으로 시행하였고 glycerol gelatin으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

관찰 결과

1. 광학현미경소견

6예중 4예(종례 1,2,5와 6)는 비교적 전형적인 Ewing

Table 1. Lectins used in this study and their sugar specificities

Lectins	Simple sugar specificity
Ricinus communis I (RCA I)	Gal
Concavalin A (Con-A)	a-Man
Wheat germ (WGA)	GlcNAc
Ulex europeus I (UEA I)	L-Fuc
Peanut (PNA)	Gal
Soybean (SBA)	GalNAc

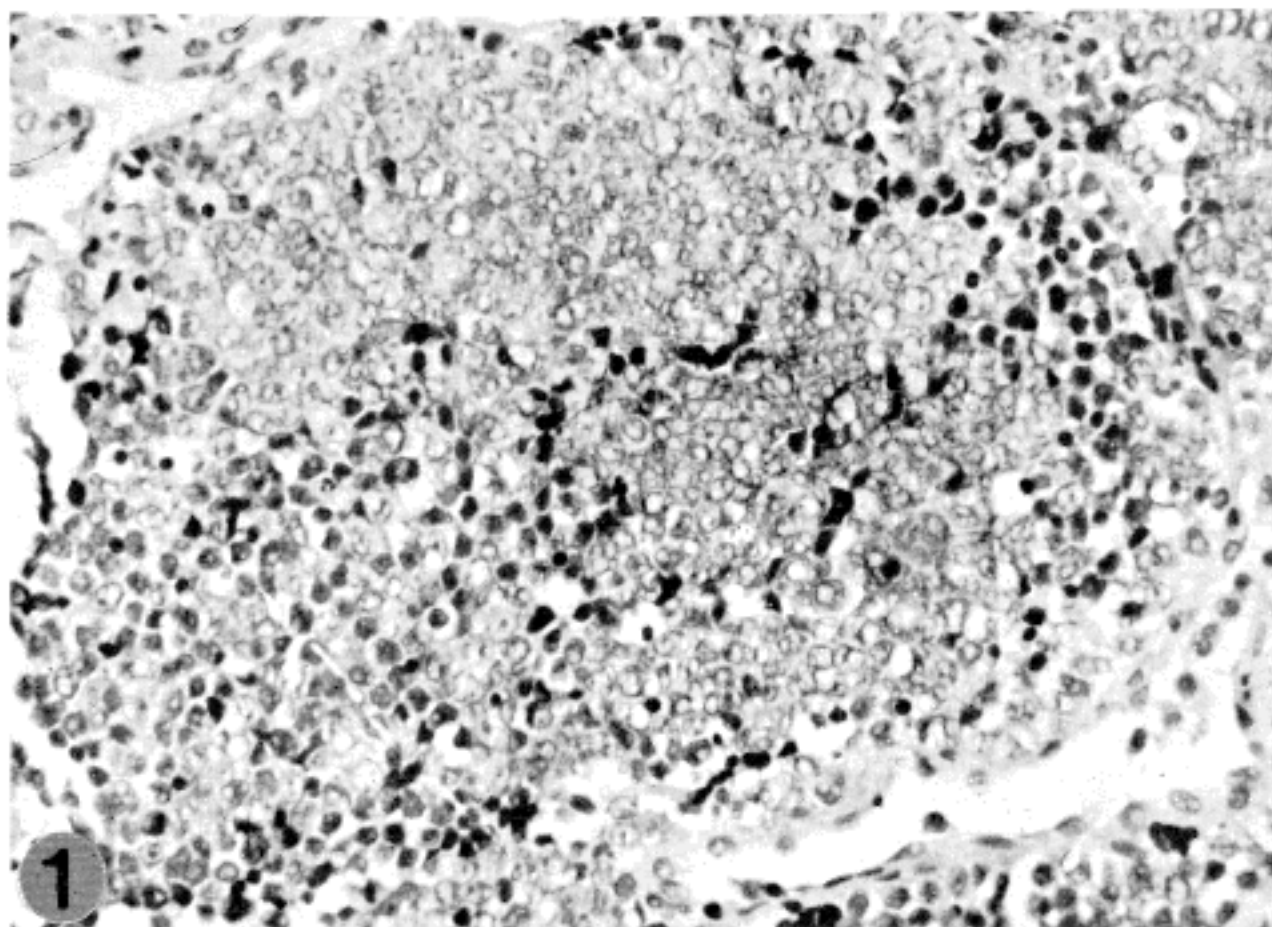


Fig. 1. Neoplastic small round cell proliferation, separated by thin fibro-collagenous bands. (H-E x40).

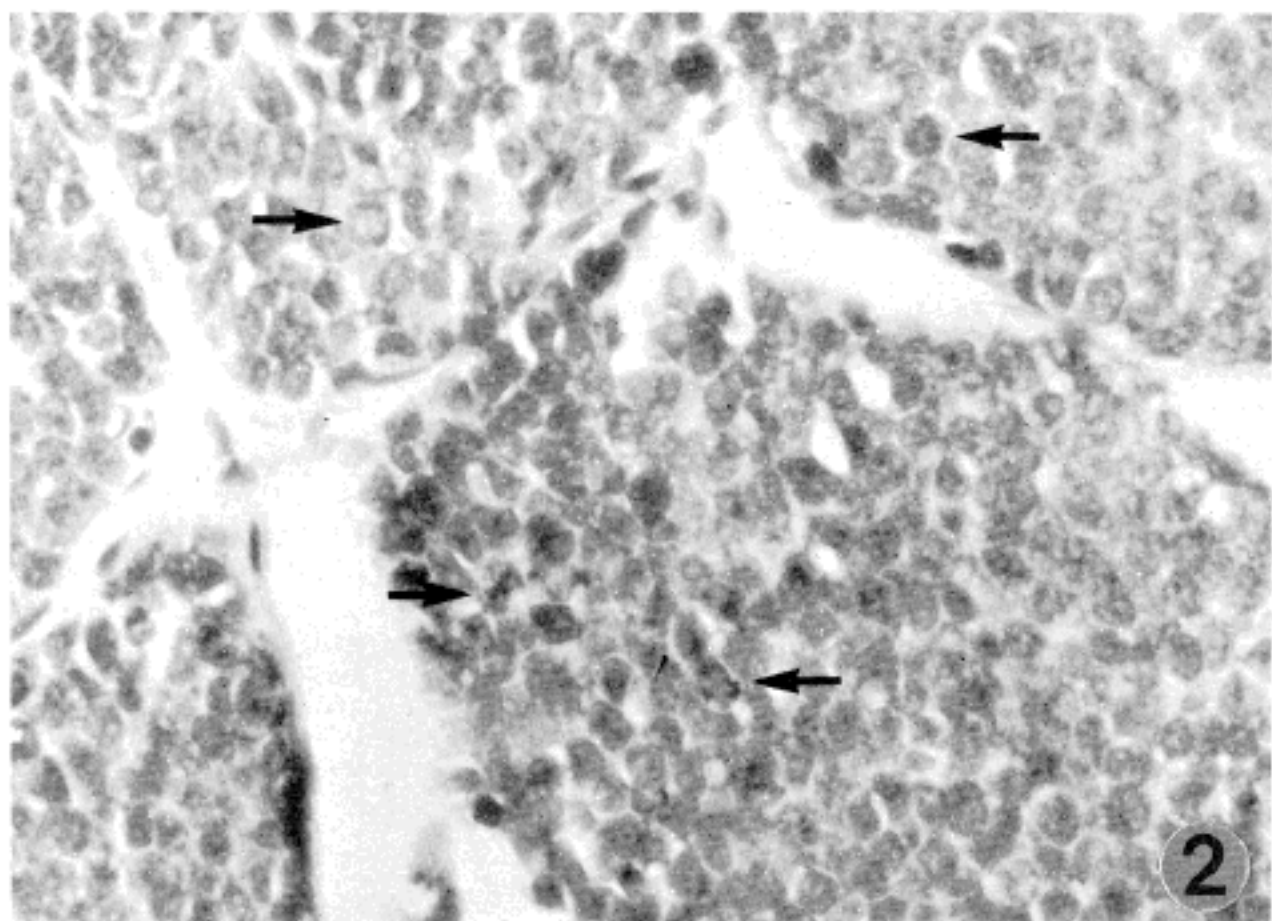


Fig. 2. Focally noted positive reaction in the cytoplasm of tumor cells in PAS stain (arrow) (PAS, x200)

육종으로 관찰된 바, 개개 종양세포는 원형으로 크기가 일정하며 염색질의 배열은 균질하였다. 크고 작은 세포 군을 형성하고 이들 사이를 섬유결체조직이 구획짓고 있음이 특징적이었다(Fig. 1). 부위에 따라 종양세포군의 괴사를 볼 수 있었고 간혹 염색질이 보다 농염되고 세포

질이 거의 관찰되지 않은 "secondary cell"들이 소수 모여 있는 소견도 눈에 띄었다. 나머지 2예(증례 3과 4)는 비전형적 유형으로 볼 수 있었다. 이들 예의 종양세포는 크기가 서로 상이하며 원형 혹은 다각형의 핵에 핵소체가 뚜렷한 세포들이 자주 관찰되었다.

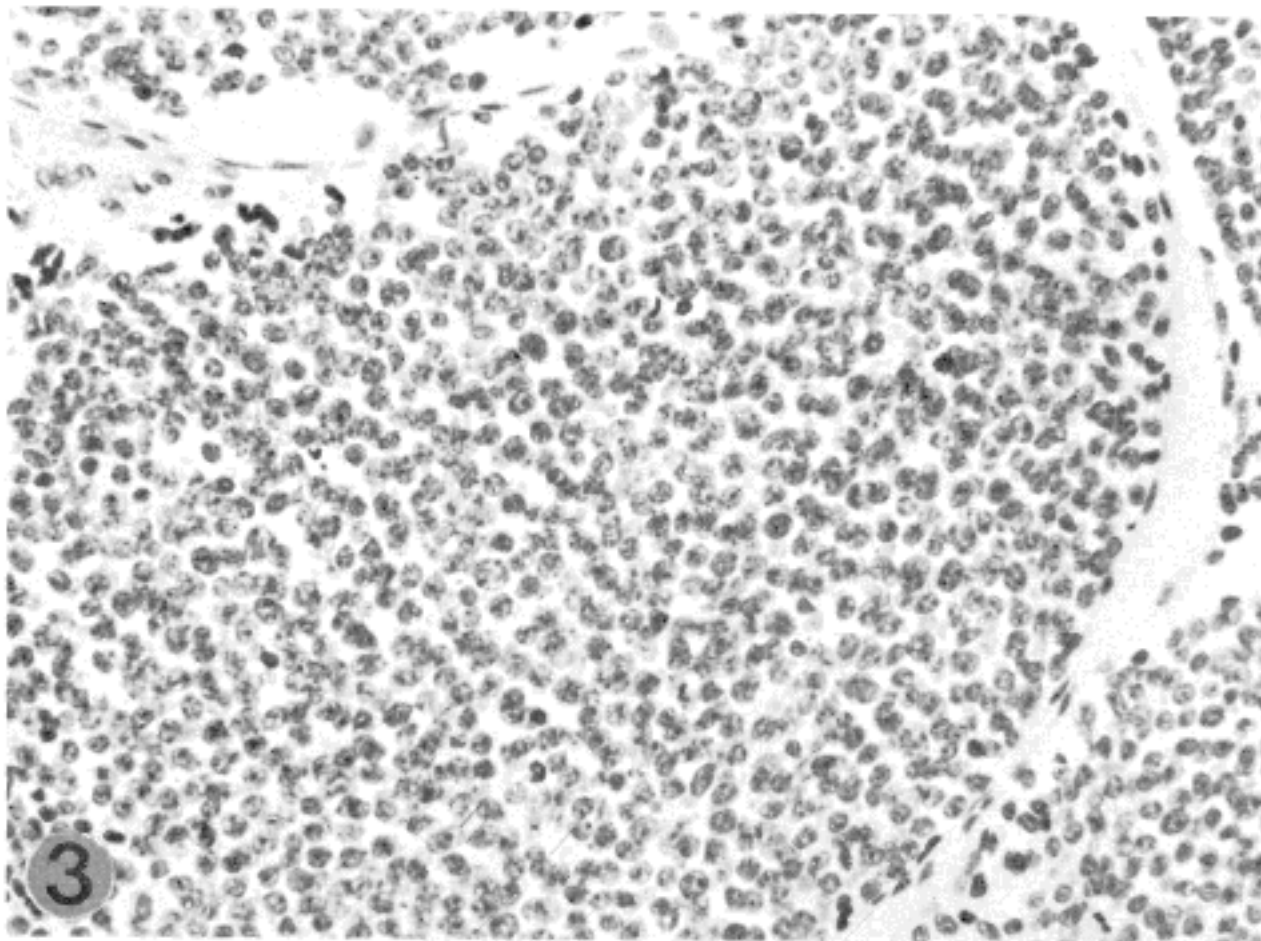


Fig. 3. Conversion to negative reaction in diastase treated PAS stain. (D-PAS, x40)

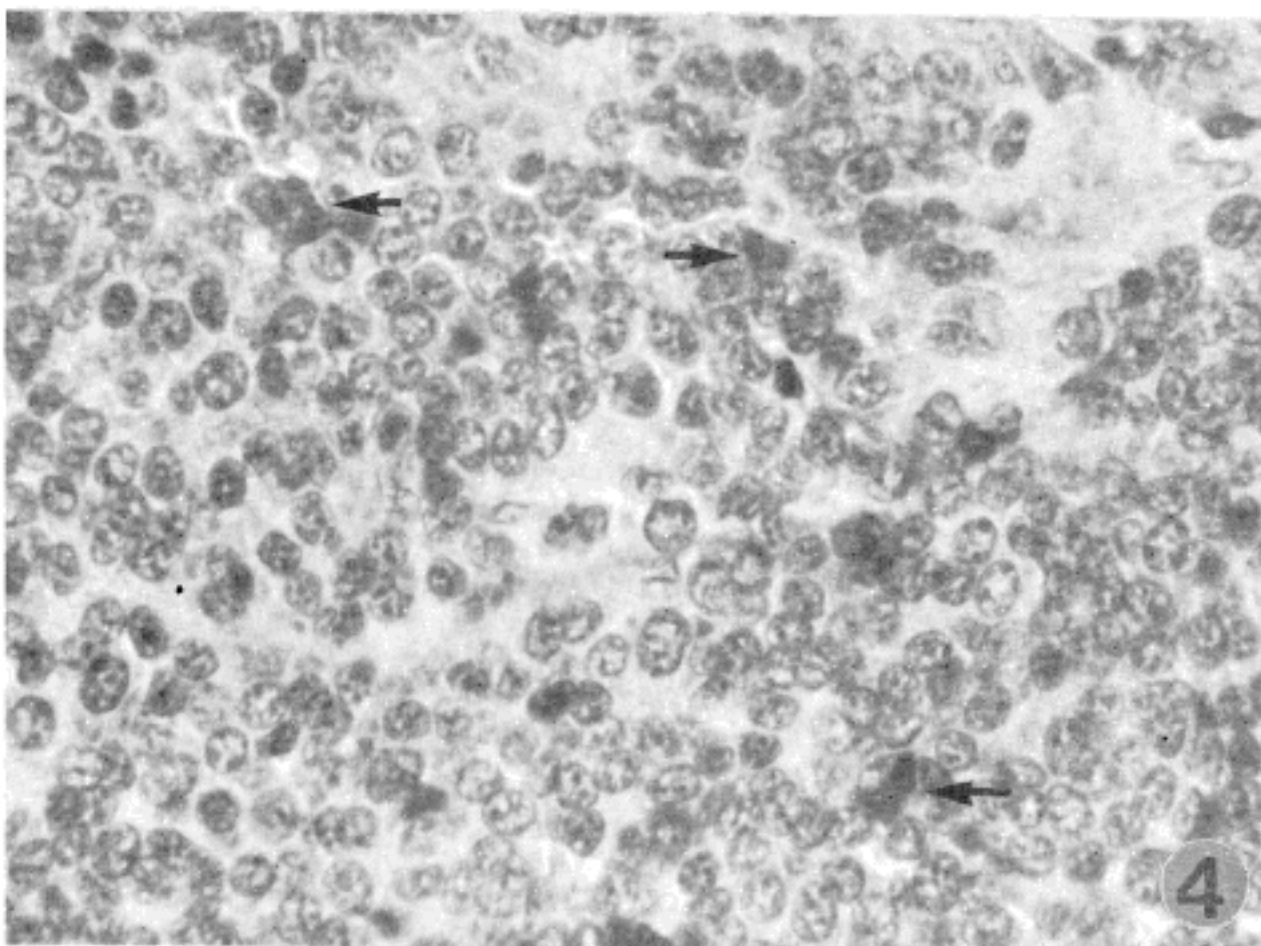


Fig. 4. Scattered positive binding cells (arrow) in RCA I. (Immunoperoxidase, x200)

종양세포에서 PAS 양성 (Fig. 2)이고 D-PAS에 음성 (Fig. 3) 소견을 보인 예는 4예이고 나머지 2예에서는 PAS에 음성이었다. 한편 종양세포가 PAS에 미완성으로 양성을 보인 예는 중례 2, 3과 5의 3예 이었다 (Table 2).

2. 렉틴에 대한 면역조직화학적 염색소견

RCA I 렉틴염색에, 6예 중 5예에서, 종양 세포군을 둘러싸는 간질조직에서 H-E 표본상 조직구로 인지되는 세포들과 그 주변의 비교적 새로이 형성되는 모세혈관의 내

Table 2. Results for special stains and lectin binding activities in the Ewing's sarcoma

Cases	Age	Sex	Site	PAS	D-PAS	RCA I	Con-A	WGA	UEA I	PNA	SBA
1	16	M	Femur	-	-	+	-	-	-	-	-
2	17	M	Skull	+	-	++	+	-	-	-	-
3	23	M	Femur	+	-	++	+	-	-	-	-
4	12	M	Scapula	+	-	++	+	-	-	-	-
5	19	M	Scapula	+	-	++	+	-	-	-	-
6	23	M	Clavicle	-	-	-	-	-	-	-	-

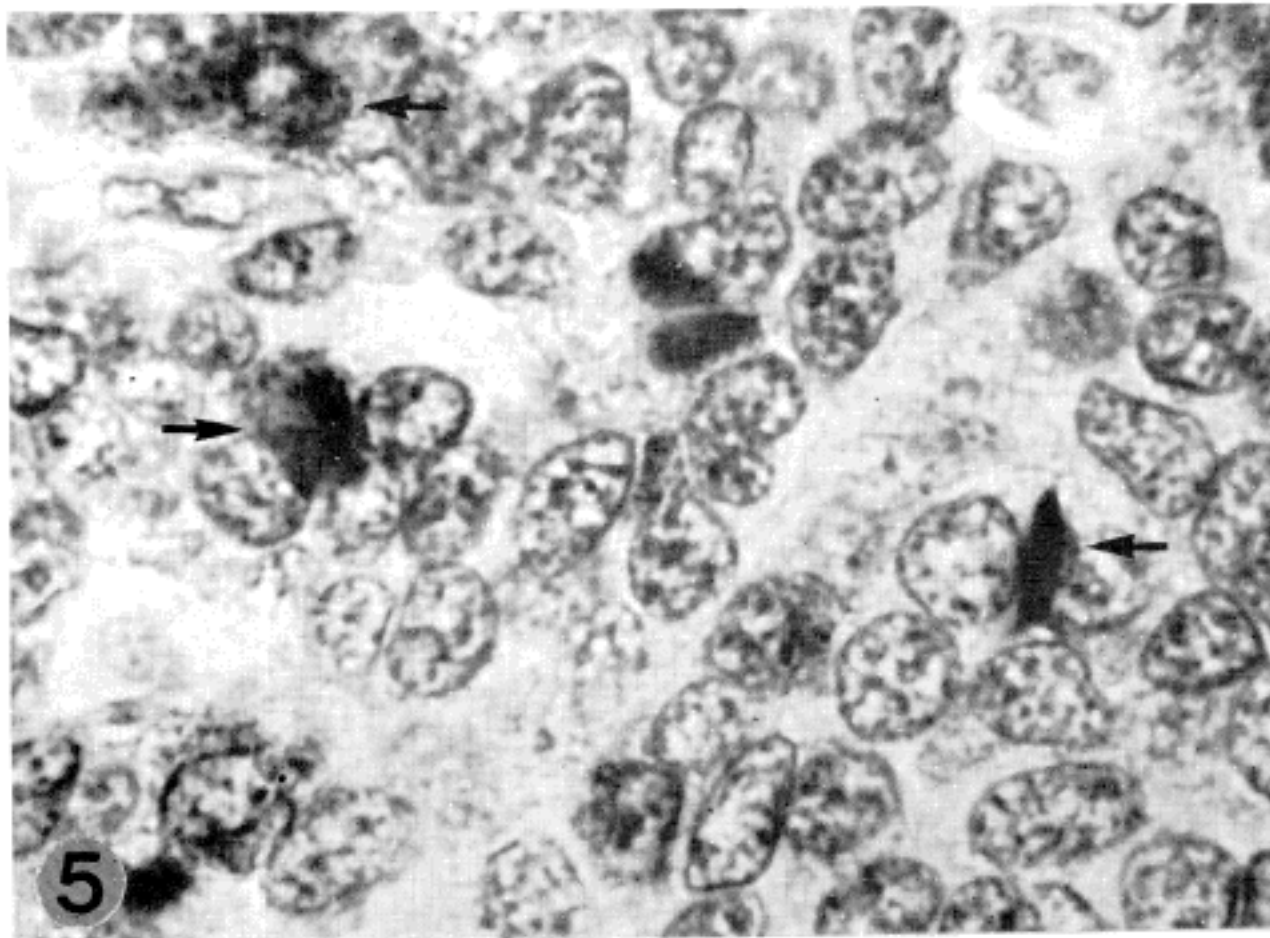


Fig. 5. Positive dark granules in the cytoplasm of tumor cells (arrow) in RCA I. (Immunoperoxidase, x1000)

피세포들의 세포질에 양성이었으며 종양세포군 내에서는 20~30세포 중 하나정도씩 비교적 규칙적으로 양성세포가 출현됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 종양세포군 내에서 양성염색을 보인 세포들은 세포질에 균등히 갈색과립들의 염색상을 보였고 일부 세포들은 세포질 주변으로 가는 가지들을 내는 듯한 양성염색 소견을 보였다(Fig. 5). Con-A는 6예 중 4예의 종양세포군 내에서 RCA I 염색에 비해 소수의 양성세포를 관찰할 수 있었는데 대부분은 RCA I에서도 양성이었던 세포로 인지되었다(Fig. 6). 광학현미경 소견의 전형적인 예와 비전형적 예들에서 RCA I 및 Con-A에 양성인 세포들의 염색상에 두드러진 차이는 없었고 전반적으로 비전형적 예에서 양성세포의 수가 약간 많음을 알 수 있었다. PNA는 종양

세포군 주변의 간질내 조직구에 양성소견을 UEA I은 성숙된 혈관들의 내피세포에 양성소견을 보였다. 종양세포에서는 PNA, UEA I, SBA 및 WGA 등이 모두 음성반응을 보였다.

고 찰

식물성 렉틴은 glycoprotein 또는 protein으로 구성되어 있으며 이들이 특히 당당류가지와 선택적으로 결합하는 특성을 지니고 있어 형태학분야에서는 주로 세포분류와 세포특성을 파악하는데 이용되고 있다⁵⁾. 또한 이들 렉틴의 특성상 종양세포와 결합하는 항종양 항체들과는 다르기 때문에 인체 각 장기의 정상세포 및 종양세포와

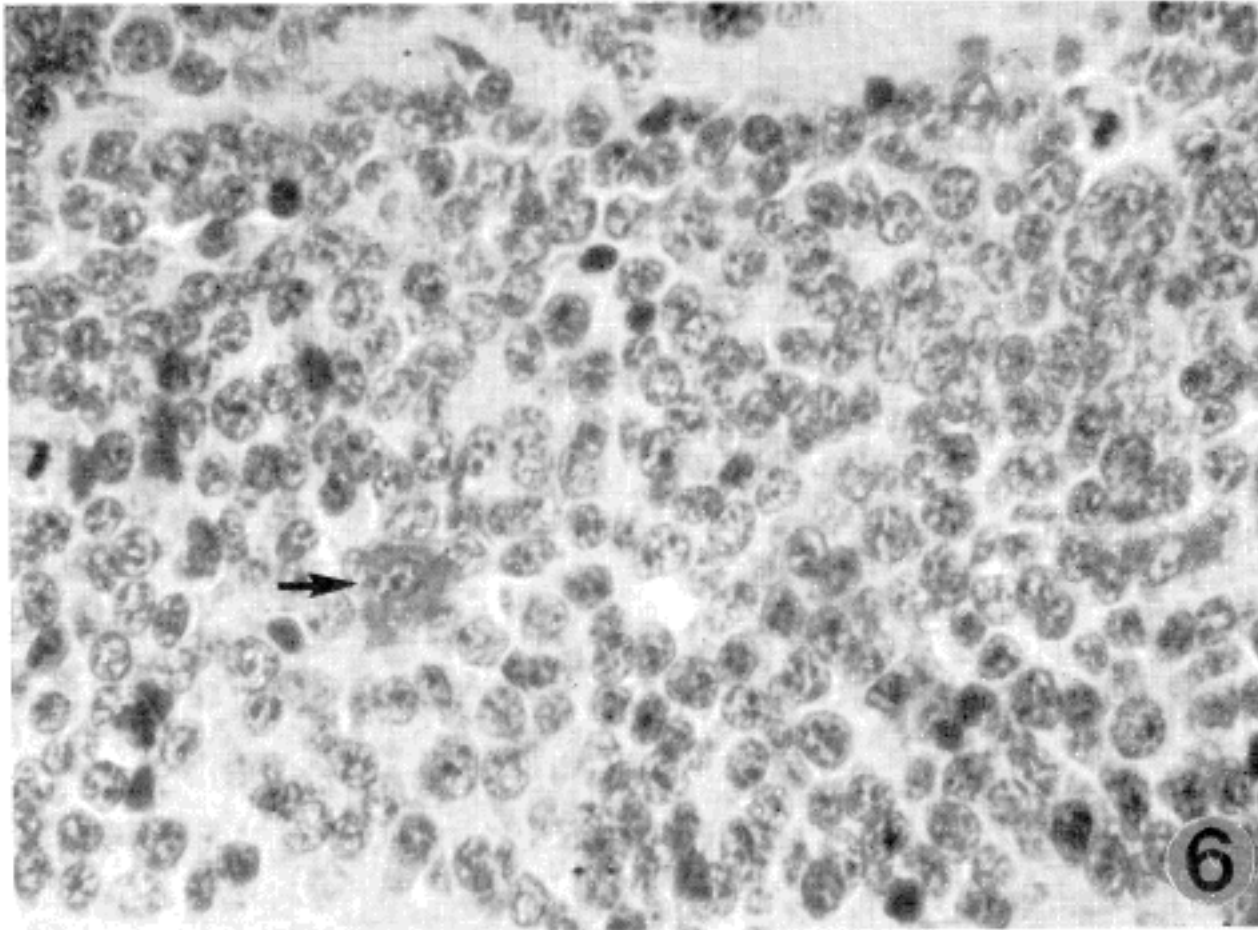


Fig. 6. A few positive binding cells (arrow) in Con-A. (Immunoperoxidase x200)

의 결합능에 대해서는 그 시도가 아직까지 한정되어 있고 차츰 밝혀져가는 시점에 있다.

본 연구에서 임상소견 및 광학현미경 표본에 대한 재검색 소견은 모두 Ewing 육종에 합당하였으나 이들 종양세포에 특이하게 결합하는 렉틴을 찾을 수는 없었다. 단지 6예 중 5예 및 4예에서 각각 관찰되는 의미있는 소견은 종양세포군 사이에 존재하는 RCA I 양성세포와 Con-A 양성세포의 출현이었다.

특이 종양에 대한 RCA I 렉틴 결합능을 관찰한 연구는 극히 드문데 단핵 탐식구 계열 세포중 양성세포 (benign)에서는 RCA I 양성 반응이, 악성세포 (malignant)에서는 음성반응이 보고 된 바 있어 악성 조직구를 감별하는 표지 (marker)로 이용할 수 있음이 알려져 있다⁶⁾. 또한 림프종의 large cell type 중 일부에서 소수의 종양세포가 RCA I에 양성임이 보고되기도 하였다⁷⁾. 한편, Con-A는 여포성 림프종 (follicular lymphoma)의 종양세포군 내에 산재해 있는 비종양성 조직구들과 특이 결합을 함이 보고되었다⁸⁾.

이러한 보고들을 토대로 본 연구의 결과를 분석하여 보면 RCA I 및 Con-A에 동시에 염색되는 종양군 내의 일부 세포는 비종양성 조직구로 인지되고 RCA I에만 양성인 세포는 20~30여개의 종양세포에 하나 정도씩 비교적 규칙적으로 출현하고 있어 단순한 간질 조직구

(stromal histocyte)보다는 종양세포와 상당히 밀접한 연관성을 가진 지지세포 (supporting cell)이거나 혹은 종양세포와 동일 기원의 세포이면서 악성세포로 분화되는 과정 중의 세포일 가능성등을 추정할 수 있겠다. 지금 이 시점에서는 광학현미경 소견상 RCA I 양성세포와 RCA I 음성인 종양세포 간의 형태학적 특징이 매우 흡사하여 둘 사이에 명확한 감별이 되지 않는다. 하지만 RCA I 렉틴에 일부세포에서만 양성 반응이 관찰되는 한계점 때문에 Ewing 육종 종양세포에 대한 RCA I의 결합능의 특이성은 추후에 보완적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 본다.

현재까지 Ewing 육종의 종양세포에 대한 기원에 대하여는 혈관내피세포⁹⁾, 혈액 골수성 세포¹⁰⁻¹¹⁾, 림프 망상계 세포 및 미분화성 간엽 세포¹²⁾ 등의 가능성들이 보고되고 있다. 앞서 거론된 세포들에 대한 렉틴의 결합능에 대한 충분한 연구 보고등이 미흡한 실정이고 본 연구에서도 종양세포에 미만성으로 일정하게 결합하는 렉틴은 없어 Ewing 육종 세포에 대한 기원을 유추한다는 것은 무리일 것으로 사료된다. 다만 RCA I가 주로 조직구 계열의 세포들에 결합능을 보이고 본 연구의 소견 중 종양 주변의 새로 형성된 모세혈관의 내피세포에도 양성소견이 관찰된 점으로 미루어 종양실질내의 일부세포에 RCA I가 양성인 점은 Ewing 육종 세포가 미분화성 간엽 세

포르부터 망상내피계 (reticuloendotelial system) 세포로 분화되는 과정 중이거나 그와 밀접한 상관관계가 있음을 시사한다고 생각된다.

본 연구에서 과거의 paraffin block을 이용하였기 때문에 포르말린 및 탈회를 위한 질산은 용액 등에 의해 세포질 내의 항원성 유지가 적정치 못하였다는 것이 제약점으로 지적될 수 있다.

따라서 향후 후향성 연구로써 종양 표본의 고정이 고농도 알콜이 함유된 고정액으로 시행되고 전자현미경을 통한 관찰등이 함께 이루어지면 RCA I 결합능과 Ewing 육종 종양세포 및 지지 세포들간의 연관성이 보다 명료해질 수 있으리라 기대한다.

결 론

6예의 골 Ewing 육종에 대하여 6가지 식물성 렉틴 (RCA I, Con-A, WGA, UEA I, PNA 및 SBA)을 ABC법에 의한 면역조직화학적 염색을 시도하여 결합능을 관찰한 바,

1) 6예중 5예에서 종양실질 내에 RCA I에 양성 소견을 보인 세포가 소수 관찰되었는데 이들은 종양세포들 사이에서 비교적 규칙적인 간격으로 분포되었다.

2) 4예에서는 Con-A에 양성반응을 보인 세포가 드물게 관찰되었다.

3) WGA, UEA I, PNA 및 SBA는 6예 모두에서 종양세포에 음성이었다.

이상 소견으로 Con-A의 양성세포와 RCA I에 양성인 세포 중 일부는 종양세포 군에 섞여있는 조직구로 인지되었으나 RCA I에 양성인 세포 중 일부는 종양세포이거나 종양세포와 밀접한 연관성을 지닌 지지세포일 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 1) Dahlin DC, Unni KK: *Bone tumors. 14th ed., Charles C Thomas Publisher, pp. 332-336, 1986*
- 2) Schajowicz F: *Ewing's sarcoma and reticulum cell sarcoma of bone. J Bone Joint Surg 41-A:349-356, 1959*
- 3) Llombart-Bosch A, Blanche R, Peydro-Olaya: *Ultrastructural study of 23 cases of Ewing's sarcoma; Typical and atypical forms. Cancer 41:1362*

-1373, 1978

- 4) Hsu SM, Raine L, Fanger H: *The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique; A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. J Histochem Cytochem 29:577-580, 1981*
- 5) Sharon N: *Lectins. Sci Am 236:108-119, 1977*
- 6) Ree HJ, Kadin ME: *Lectin distinction of benign from malignant histiocytes. Cancer 56:2046-2050, 1985*
- 7) Ree HJ, Raine L, Crowley JP: *Lectin binding patterns in diffuse large cell lymphoma. Cancer 52:2089-2099, 1983*
- 8) Ree HJ: *Lectin histochemistry of malignant tumors; II. Concanavalin A: A new histochemical marker for macrophage-histiocytes in follicular lymphoma. Cancer 51:1639-1646, 1983*
- 9) Ewing J: *Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc, 21:17-24, 1921*
- 10) Kadin ME, Bensch KG: *On the origin of Ewing's tumor. Cancer 27:257-273, 1971*
- 11) Dickman PS, Liotta LA, Triche TJ: *Ewing's sarcoma; Characterization in established cultures and evidence of its histogenesis. Lab Invest 47:375-382, 1982*
- 12) Miettinen M, Lehto V-P, Virtanen I: *Histogenesis of Ewing's sarcoma; An evaluation of intermediate filaments and endothelial cell markers. Virchow Arch (Cell Pathol) 42:277-284, 1982*

- Abstract -

Lectin Binding Activities in Ewing's Sarcoma of the Bone

Chul Woo Kim, M.D., Hyo Min Kim, M.D.
and Eui Keun Ham, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine,
Seoul National University

The binding activities of 6 plant lectins were studied in a total of 6 cases of Ewing's sarcoma of the bone, using the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method on paraffin embedded material. The lectins used in this study were Ricinus communis agglutinin I (RCA I), Concanavalin A (Con-A), Peanut agglutinin (PNA), Wheat germ agglutinin (WGA), Ulex europeus I (UEA I), and Soybean agglutinin (SBA).

However, no specific lectin, which showed consistent binding activity in the majority of Ewing's sarcoma cells was identified, in 5 of 6 cases, intracytoplasmic RCA I binding cells were occasionally observed, at somewhat regular intervals, among the neoplastic cell nests. Con-A stains were also positive in 4 cases, but the numbers of Con-A binding cell were fewer than that of positive cell with RCA I. With PNA, WGA, UEA I, and SBA virtually no tumor cells were stained.

These findings suggest that all Con-A positive cells and a part of RCA I binding cells are probably stromal macrophage-histiocytes, which are incorporated in neoplastic cells. And remaining RCA I positive cells seem to be either a kind of differentiating neoplastic cells or supporting cells having close correlation with the neoplastic cells.

Key Words: Lectin, Ewing's sarcoma, Bone tumor