

이형성 위점막의 세포역학적 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실

남 종 희 · 조 규 혁

서 론

위의 전암성 병변은 만성 위축성 위염¹⁾, 장상피 화생²⁾, 만성 위궤양³⁾, 용종⁴⁾, 슬후 잔존위⁵⁾ 및 Menetrier 질환⁶⁾ 등으로 알려져 있다. 그러나, 이러한 병변들이 항상 암병변으로 진전하는 것은 아니며, 실제적인 면에서 암과 연관되는 병변으로는 이형성 위점막의 존재가 지적되고 있다^{7,8)}. 이러한 이형성 병변에 대한 세포역학적인 연구는 발암현상의 연구에 좋은 자료가 된다고 하여 그동안 ³H-thymidine을 사용한 자가방사기록법(autoradiography)이 주로 이용되어 왔다^{9,10)}. 그러나 ³H-thymidine 자가방사기록법은 생체에 직접 투여할 수 없고 결과를 판정하기까지 많은 시간이 소요되는 단점이 있어 최근에는 이와같은 단점을 보완해주면서 ³H-thymidine 자가방사기록법과 마찬가지로 DNA 합성세포핵에 표지되는 BrdUrd을 이용한 면역조직화학적 방법이 개발되어 세포역학적인 연구에 많은 진전을 보이고 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 그러나 BrdUrd을 이용한 세포역학적 연구는 주로 뇌종양의 증식능을 알아보는데 이용되고 있고^{15,16)} 위장관 질환에 대한 연구보고는 접하기 어려운 실정이다.

이에 저자는 이형성 위점막의 세포역학적 연구의 일환으로 위암으로 위절제술을 받은 환자의 절제위 조직을 이형성의 정도에 따라 International Study Group on Gastric Cancer (ISGGC)에서 제시한 기준대로 구분하고 BrdUrd을 이용한 면역조직화학적 검사를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

전남대학교 의과대학 부속병원에서 위암 진단아래 위절제술을 받게된 3례(Table-1)를 대상으로 절제된 위의 여러 곳에서 다수의 절편을 취하여 H&E 염색표본을 만들어 정상 위점막, 단순과형성 위점막, 비정형과형성 위점막 및 이형성 위점막을 구분(Table-2)하고 각각의 위점막에 대하여 BrdUrd 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 이 검사에서 장상피화생과 침윤성 암이 존재하는 위점막은 본 연구에 넣지 않았다.

2. 방 법

1) 면역조직화학적 검색 : 위 절제술을 시작하면서 체표면적 m²당 200 mg의 bromodeoxyuridine (BrdUrd)을 5%포도당용액 500 ml에 희석하여 1시간에 걸쳐 환자에게 정주하였다. 절제된 위는 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 24시간 이내에 수세하여 통상의 방법대로 파라핀 포매체를 만들었다. 포매된 조직을 2-3 μm 두께의 절편으로 만들어 60°C에서 하루저녁 보관한 후 xylene으로 탈파라핀시키고 phosphate-buffered saline (PBS)으로 수세하였다. 1N HCl로 37°C에서 20분간 가수분해 시키고 PBS로 잘 수세한 후 PBS에 0.05% Proteinase type VII (Sigma)을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 조직 절편을 PBS에 잘 수세한 후 1%

Table 1. Profile of patients

	Age	Sex	Diagnosis
case 1	46	male	Adenocarcinoma intestinal type
case 2	57	female	Adenocarcinoma intestinal type
case 3	41	male	Adenocarcinoma diffuse type

본 논문의 요지는 1988년 5월 20일 대한병리학회 제13차 춘계학술대회에서 발표되었음

Table 2. Histological features of simple hyperplasia (S.H.), atypical hyperplasia (A.H.) and dysplasia (D.)

	S.H.	A.H.	D.
Cellular abnormalities			
Pleomorphism	-	+	+,++
Loss of polarity	-	+	+,++
Pseudostratification	-	+	+ ~ +++
Anaplasia	-	-	+ ~ +++
Abnormal mitotic figures	-	-	+
Architectural derangements			
Elongation of glands	- ~ +++	- ~ ++	- ~ ++
Dilatation of glands	- ~ +++	- ~ ++	- ~ ++
Budding and branching of glands	- ~ +++	- ~ ++	- ~ +++
Intra-glandular folding	- ~ ++	- ~ +++	- ~ +++
Crowding of glands	-	- ~ +	- ~ ++
Back-to-back glands	-	-	- ~ ++

-, absent +, slight ++, moderate +++, severe

Periodic acid에 15분간 반응시키고 증류수에 담겼다
 PBS로 수세하여 정상 말혈청(normal horse serum)에
 30분간 부치하였다. 50배 희석된 항 BrdUrd항체에 실
 온에서 16시간 부치한 후 PBS로 수세하고 biotinylated
 antimouse IgG (horse)에 실온에서 1시간 동안 부치하
 였다. PBS로 수세시킨 후 avidin-biotin peroxidase
 complex (ABC)에 실온에서 2시간동안 부치하고 PBS
 로 수세한 후 0.05M Tris/HCl 완충액 (pH 7.0)에서 0.
 03% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)과 H₂O₂로 발색시
 킨 후 헤마톡실린으로 대조 염색하여 광학현미경하에 관
 찰하였다.

2) 표지 지수(labeling index)의 산정 : 면역조직화
 학적 방법에 의해 표지된 세포들이 나타나는 곳을 세포
 증식대로 생각하였으며 표지지수는 표지된 최상단 및 최
 하단 세포사이의 선상피 세포핵 수를 센 후 그 중에서 표
 지된 세포핵의 수를 백분율(%)로 표시하였다.

성 적

1. 면역조직화학적 소견

Bromodeoxyuridine (BrdUrd)이 표지된 세포는 면
 역조직화학적 염색상 핵에 갈색의 과립상을 보여주었
 다. 이 표지 세포들은 정상 위점막의 경우 위선의 경부
 에서만 출현하였고, 표층이나 심층부에서는 출현하지
 않았다(Fig. 1). 단순 과형성 병변에서 표지 세포들은

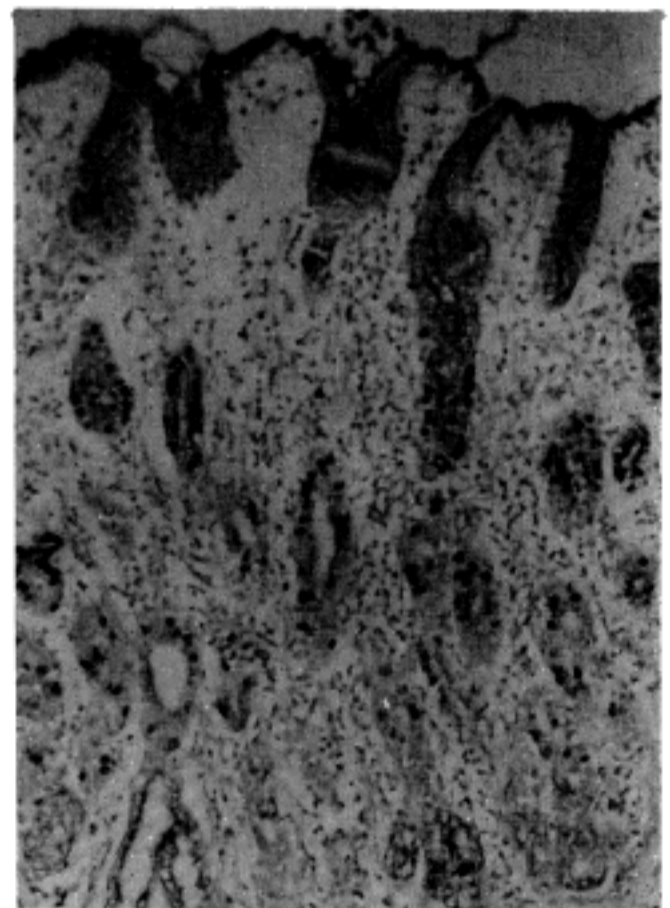


Fig. 1. In the norma gastric mucosa, labelled cells are confined to the middle level of the mucosa. Immunohistochemical stain for BrdUrd (x100).

경부의 위선 뿐만 아니라 상층부에서도 나타났으며(Fig. 2), 비정형 과형성 위점막에서는 단순 과형성 병변에 비해 상층의 표지 세포들이 증가되었고, 표층부에서도 부분적으로 관찰되었다(Fig. 3). 이형성 병변에서 과형성



Fig. 2. In the simple hyperplasia, labelled cells are shown at the more upper level of the mucosa than the normal. Immunohistochemical stain for BrdUrd (x200).

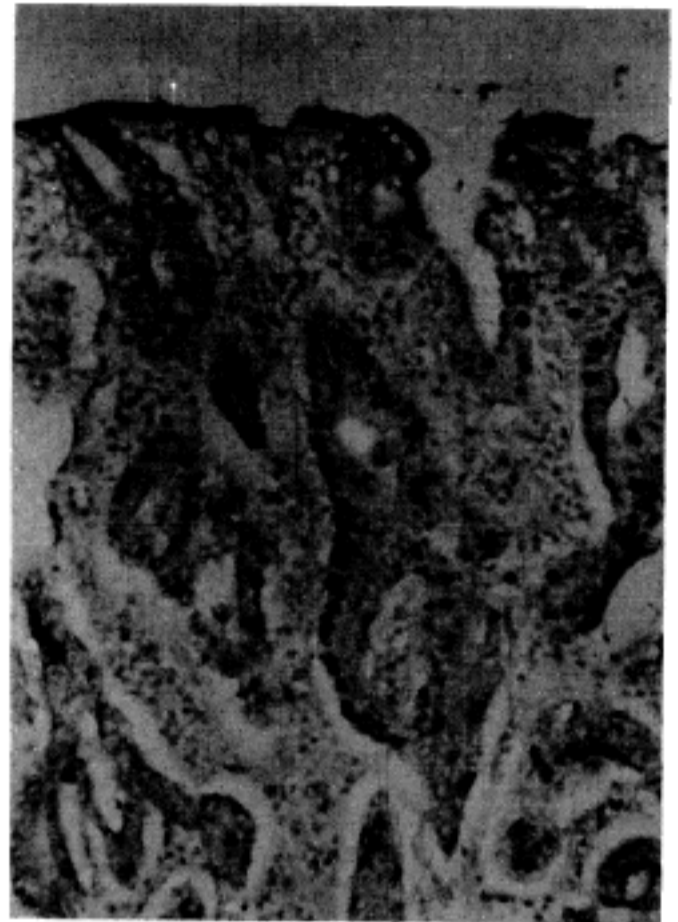


Fig. 4. In the dysplasia, labelled cells are increased in number, and are seen from the neck region to the surface, diffusely. Immunohistochemical stain for BrdUrd (x200).

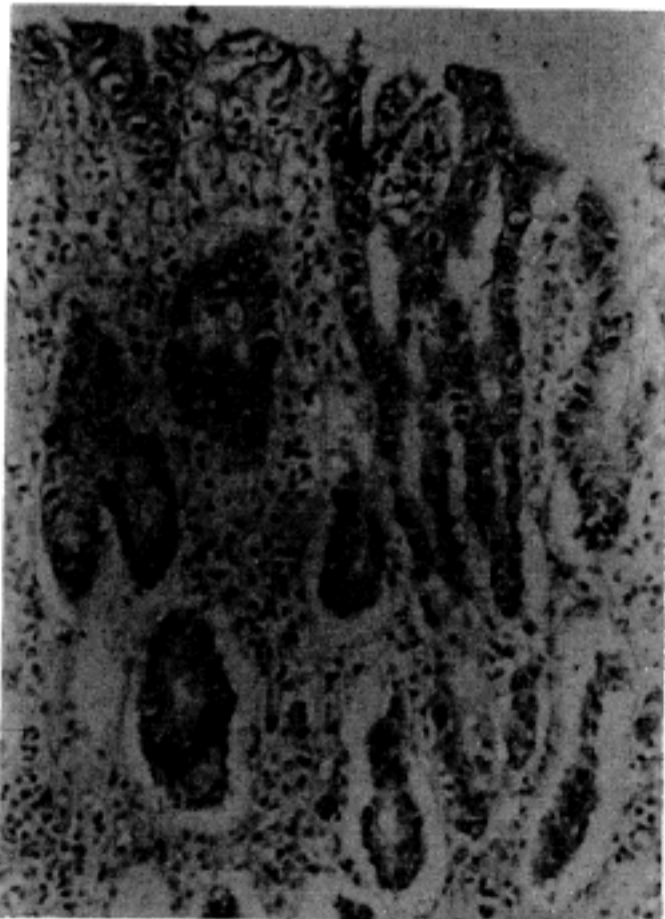


Fig. 3. In the atypical hyperplasia, and labelled cells are seen at the more superficial area than the normal and simple hyperplasia. Immunohistochemical stain for BrdUrd (x200).

에 비해 상층부의 표지 세포들이 더 증가됨을 보여주었다(Fig. 4).

2. 표지 지수(Labelling index;LI)

면역조직화학적 염색을 이용하여 산정한 표지 지수는 Table-3에서와 같다. 즉, 정상 위점막에서는 12.9%, 13.6%, 11.0%로 평균 12.8%를 나타내었다. 단순과형성 병변의 경우 15.8%, 14.3%, 17.9%로 평균 15.9%의 표지지수를 나타내어 정상 위점막에서보다 약간 증가되었다. 비정형 과형성 위점막에서는 16.4%, 16.7%, 19.2%로 평균 17.9%를 나타내어 정상 및 단순 과형성 병변에 비해 표지지수가 증가되었다. 이형성 병변에서는 20.0%, 17.4%, 20.7%로 평균 19.8%를 나타내어 정상 및 과형성 병변보다 표지지수가 더 높게 관찰되었다. 이상과 같이 표지지수는 정상, 단순 과형성, 비정형 과형성, 이형성 위점막의 순으로 증가되는 경향을 보였다(Fig. 5).

Table 3. Labelling index of bromodeoxyuridine-labelled cells

Case/Type	N	SH	AH	D
Case 1	461/3569 (12.9%)	694/4388 (15.8%)	280/1706 (16.4%)	807/4029 (20.0%)
Case 2	353/2591 (13.6%)	273/2046 (14.3%)	266/1577 (16.7%)	351/2013 (17.4%)
Case 3	171/1553 (11.0%)	469/2623 (17.9%)	606/3152 (19.2%)	986/4767 (20.7%)
Total	985/7713 (12.8%)	1436/9057 (15.9%)	1152/6435 (17.9%)	2144/10809 (19.8%)

N:Normal SH : Simple Hyperplasia AH : Atypical Hyperplasia D : Dysplasia

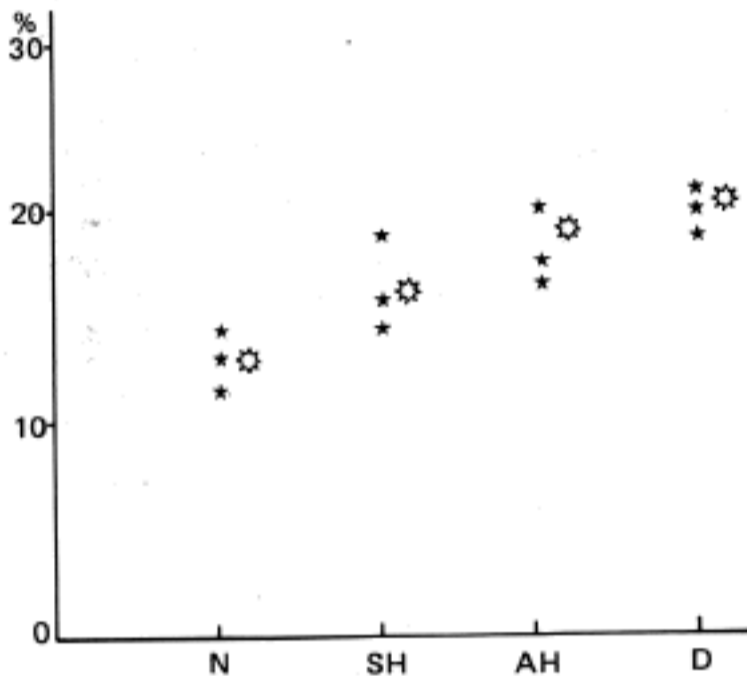


Fig. 5. Labelling index (%) of bromodeoxyuridine labelled cells in normal (N), simple hyperplastic (SH), atypical hyperplastic (AH), and dysplastic (D) epithelia of stomach.

고 찰

위의 전암성 병변으로는 만성 위축성 위염, 만성 게양, 선종 및 용종, 상상피 화생, 술후 잔존위 그리고 Menetrier 질환 등이 알려져 있는데 이와같은 병변이 악성질환을 일으키는 빈도에 대하여는 학자들에 따라 그 견해를 달리하고 있다¹⁻⁶⁾. 이러한 악성전환율의 상이성에 대하여 Grundmann등⁷⁾과 Morson등⁸⁾은 이형성의 출현 여부를 강조하고 있다.

세포의 크기나 모양 및 구조의 변화를 나타내는 이형성은 암소(cancer nest) 주위에서 흔히 관찰되기 때문에 일반적으로 암의 발현과정에서 관찰되는 주위 조직의 변화로 알려져 있고 Oehlert등¹⁷⁾과 Ming¹⁸⁾은 전암병변

이라고 주장하였다. Nagayo¹⁹⁾는 위선암의 경우 암의 병소와 이형성 병변은 관련성이 없이 독립적으로 발생할 수도 있다하여 이형성이 전암성 병변으로서의 가능성이 낮다 하였고, 일부 학자들은 이형성보다는 오히려 불완전 장상피화생이 위장관의 주된 전암성 병변이라고 하였다²⁰⁻²²⁾.

그러나 Oehlert등¹⁷⁾은 위점막의 이형성 병변을 경시적으로 생검하여 관찰한 결과 장기간 지속되는 병변은 암으로 전환된다 하였고 Ming¹⁸⁾은 장상피화생이 이형성의 변화를 거친 후 암으로 전환된다고 하여 이형성 병변이 실제적인 전암성 병변이라고 하였다.

또한 이형성 병변의 악성전환율은 이형성 병변의 정도에 따라 차이가 있다고 하여 많은 학자들이 이형성의 조직학적 등급을 구분하게 되었고 그들의 대부분은 심한 이형성의 경우만 암과의 연관성이 높다고 보고하였다^{7,8,17,23-25)}. 이형성 병변은 주위암소의 악성도나 지속기간 등에 따라 다양하므로 이의 조직학적 등급에 대한 분류기준도 학자에 따라 다양하여 본 실험에서는 최근에 비교적 많이 이용되고 있는 International Study Group on Gastric Cancer (ISGGC)의 분류에 양성 병변인 과형성(hyperplasia)과 전암병변인 이형성(dysplasia)등으로 구분하여 관찰하였다.

전암성 병변의 악성전환 및 발암현상을 규명하려는 노력이 여러가지 측면에서 이루어지고 있는데 세포의 증식능 및 증식 양상을 이해하는 데에는 주로 세포역학적인 연구방법이 적용되고 있다.

위장관 병변에 관한 세포역학적 연구는 지금까지 주로 ³H-thymidine을 이용한 자가방사기록법에 의존해 왔는데 암실내 작업으로써 숙련자가 있어야 되고, 약한 방사능 때문에 4주간 이상의 노출시간이 필요하며 생체내 주입시 조절기능장애등을 유발할 수 있으므로 인체에 직접 투여할 수 없는 단점이 있다. 최근에는 이러한 담

점이 보완된 BrdUrd을 이용한 면역조직학적 염색방법이 개발되어 세포역학적 연구에 많은 진전을 보였다^{13,15,26,27}.

BrdUrd는 항암제로서 생체내 투여가 가능하고 환자에 주입하면 핵의 DNA에 들어가므로 BrdUrd에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역조직학적으로 관찰이 가능하며^{15,28-30}, 아울러 파라핀 절편의 이용이 가능하기 때문에 암소 및 쥐의 병변 그리고 여러 종례들을 동일한 조건에서 검색할 수 있어서 전암 병변의 세포역학적 연구에는 적합한 실험 방법으로 생각되었다. 그동안 BrdUrd을 이용한 세포역학적 연구는 주로 뇌종양에 대한 것으로 이를 통한 예후판정의 지표로 설정하는데 널리 이용되어 오고 있으나^{16,30,31} 위장관이나 다른 장기에서의 연구보고는 매우 드물다. 본 연구에서는 위장관의 전암성 병변이라고 알려져 있는 이형성 병변에 대한 세포의 증식능 및 증식대를 이 BrdUrd 면역조직화학적 방법을 이용하여 관찰하여 보았다.

본 연구는 성적을 요약하면 대조군인 정상 위점막 세포에서는 BrdUrd 표지세포가 경부에 국한되어 관찰되었고, 단순 및 비정형 과형성 병변에서는 경부보다는 좀더 상부에서 표지세포들이 나타났으며 이형성 병변에서는 과형성 병변에서 보다 상부에서 출현하였다. 이러한 성적은 과형성 및 이형성 병변의 세포 증식대는 정상과는 달리 상부로 이동되어 있음을 나타내 주었으며 이형성의 정도에 따라 상부로의 이동이 더 심하여짐을 보여준 것이다. 또한 과형성 및 이형성 병변시 BrdUrd 표지세포들이 경부에서도 관찰되었던 것은 세포증식이 경부에서 뿐 아니라 상부에서도 일어나고 있음을 가르키고 있다.

Hattori¹⁰⁾는 ³H-thymidine 자가방사기록법에 의하여 위의 이형성 3급군을 관찰한 결과 세포 증식대는 위선의 상부 1/3층에 존재하였고 몇몇 표지 세포들이 중간 경부에서 관찰됨을 보고하여 이형성세포가 경부에서 기원한다고 한 점은 본 성적과 일치되었다.

세포증지능을 나타내는 표지지수 (labelling index)는 이형성 병변이 17.4%~20.7%로서 단순과형성 14.3%~17.9%, 비정형과형성의 16.4%~19.2%에 비하여 높게 관찰되어 Hattori¹⁰⁾가 보고한 이형성 병변 15~27%와 유사한 성적을 보였다. 본 실험에서 표지세포의 출현 부위 및 표지지수를 관찰한 결과 세포의 증식대가 병변에 따라 점차 상부로 이동되었던 점은 단순과형성 병변

이 비정형과형성을 거쳐 이형성 병변으로 진행되었을 가능성을 제시해 주는 것으로 Ming¹⁸⁾이 재생성 병변인 과형성과 장상피화생이 이형성 병변을 지나 암으로 전환될 것이라고 주장한 사실과 부합된다고 하겠다.

앞으로 암 병변 및 장상피화생성 병변을 이형성 병변과 함께 세포역학적인 측면에서 비교관찰하면 전암성 병변을 이해하는데 큰 도움이 되리라 생각한다.

결 론

전담대학교 의과대학 부속병원에서 위암 진단아래 위 절제술을 시행 받은 환자의 절제위 조직을 ISGGC의 분류에 따라 이형성을 구분한 후 BrdUrd을 이용한 면역조직화학적 검색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 면역조직화학적 방법으로 검색한 BrdUrd 표지세포들은 정상 위점막에서는 위선의 경부에 국한된 반면 과형성 및 이형성 위점막에서는 경부 뿐만 아니라 그 상층에서도 관찰되어 과형성 및 이형성 위점막의 세포증식대는 상층으로 이동됨을 알 수 있었다.

2) 면역조직화학적 염색을 이용하여 산정한 표지지수는 정상 위점막에서 11.0%~13.6%, 단순과형성 위점막에서 14.3%~17.9%, 비정형과형성 위점막에서 16.4%~19.2%, 그리고 이형성 위점막에서 17.4%~20.7%로 정상 위점막세포에 비해 과형성 및 이형성 위점막세포에서 더 높은 증식능을 보였고, 이형성의 정도가 심할수록 증식능이 더 높았다.

참 고 문 헌

- 1) Imai T, Kubo T, Watanabe H: Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 47:179, 1971
- 2) Morson BC: Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer* 9:377, 1955
- 3) Swynnerton BF, Tanner NC: Chronic gastric ulcer. A comparison between a gastroscopically controlled series treated medically and series treated by surgery. *Br Med J* 2:841, 1953
- 4) Ming SC, Goldmann H: Gastric polyps: a histogenetic classification and its relation to carcinoma. *Cancer* 18:721, 1965
- 5) Saegesser F, James D: Cancer of the gastric stump

- after partial gastrectomy (Billroth II principle) for ulcer. *Cancer* 29:1150, 1972
- 6) **Matzner MJ, Raab AP, Spear PW:** Benign giant gastric rugae complicated by submucosal gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 18:296, 1951
 - 7) **Herfarth C, Schlag P:** *Gastric Cancer*. first edition. Berlin, Springer-Verlag, 1979, p 72
 - 8) **Morson BC, Sobin LH, Grundmann E, Johnsen A, Nagayo T, Serck-Hanssen A:** Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol* 33:711, 1980
 - 9) **Bleiberg H, Galand P:** In vitro autoradiographic determination of cell kinetic parameters in adenocarcinomas and adjacent healthy mucosa of the human colon and rectum. *Cancer Res* 36:325, 1976
 - 10) **Hattori T:** Histological and autoradiographic study on development of group III lesion (dysplasia group III) in the stomach. *Path Res Pract* 180:36, 1985
 - 11) **Kriss JP, Revesz L:** The distribution and fate of bromodeoxyuridine in the mouse and rat. *Cancer Res* 22:254, 1962
 - 12) **Gratzner HG, Pollack A, Ingram DJ, Leif RC:** Deoxyribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunologic techniques. *J Histochem Cytochem*, 24:34, 1976
 - 13) **Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, Gratzner HG, Russo A, Mitchell JB:** Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 72:1844, 1983
 - 14) **Sugihara H, Hattori T, Fukuda M:** Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissues. *Histochemistry* 85:193, 1986
 - 15) **Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Levin EM, Levin VA, Rupp SM:** Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. *Cytometry* 6:627, 1985
 - 16) **Hoshino T, Nagashima T, Cho KG, Murovic JA, Hodee JE, Wilson CB, Edwards MSB, Pitts LH:** S-phase fraction of human brain tumors in situ measured by uptake of bromodeoxyuridine. *Int J Cancer* 38:396, 1986
 - 17) **Oehlert W, Keller P, Henke M, Strauch M:** Gastric mucosal dysplasia: what is its clinical significance? *Front Gastrointest Res*, 4:173, 1979
 - 18) **Ming SC:** *Precursors of gastric cancer*. First edition. New York, Praeger Publishers, 1984, p 9
 - 19) **Nagayo T:** Dysplasia of gastric mucosa and its relation to the precancerous state. *Gann* 72:813, 1981
 - 20) **Ming SC, Goldmann H, Frieman DG:** Intestinal metaplasia and histogenesis of carcinoma in human stomach. Light and electron microscopic study. *Cancer* 20:1418, 1967
 - 21) **Jass JR:** Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 33:801, 1980
 - 22) **Iida F, Kusama J:** Gastric carcinoma and intestinal metaplasia: significances of types of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. *Cancer* 50:2854, 1982
 - 23) **Nagayo T:** Histological diagnosis of biopsied gastric mucosae with special reference to that of borderline lesions. *Gann Monogr Cancer Res*, 11:245, 1971
 - 24) **Cuello C, Correa D, Zarama G, Lopez J, Murray J, Gordillo G:** Histopathology of gastric dysplasia. Correlations with gastric juice chemistry. *Am J Surg Pathol*, 3:491, 1979
 - 25) **Ming SC:** Dysplasia of gastric epithelium. *Front Gastrointest Res* 4:164, 1979
 - 26) **Gratzner HG:** Monoclonal antibody of 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218:474, 1982
 - 27) **Nagashima T, De Armond SJ, Murovic J, Hoshino T:** Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol* 67:155, 1985
 - 28) **Dolbeare R, Gratzner H, Dallavicini MG, Gray JW:** Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Nat Acad Sci* 80:5573, 1983
 - 29) **Nagashima T, Hoshino T:** Rapid detection of S-phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in 9L brain tumor cells in vitro and in situ. *Acta Neuropathol* 66:12, 1985
 - 30) **Nagashima T, Murovic JA, Hoshino T, Wilson CB, De Armond SJ:** The proliferative potential of human pituitary tumors in situ. *J Neurosurg* 64:588, 1986
 - 31) **Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB:** Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas: Cell kinetics studies with bromodeoxyuridine labelling. *J Neurosurg* 65:790, 1986

— Abstract —

**A Study on the Cell Kinetics
of the Dysplastic Epithelium
in the Stomach**

Jong-Hee Nahm, M.D. and Kyu-Hyuk Cho, M.D.

*Department of Pathology, Chonnam University Medical
School Kwangju, Korea*

This study was designed to evaluate the biological behavior of the dysplastic lesion of the stomach by applying immunohistochemical method for bromodeoxyuridine (BrdUrd).

The results obtained were as follows.

1) In most hyperplastic and dysplastic lesions, the

proliferative cell zones, loci of BrdUrd-labelled cells, were found in the upper layer of the mucosa, whereas they were confined to the neck zone in the normal gastric mucosa.

2) The labelling indices (LIs), percentages of BrdUrd-labelled cells, were 11.0% to 13.6% in the normal gastric mucosa, and were 14.3% to 17.9%, 16.4% to 19.2% and 17.4% to 20.7% in the simple hyperplasia, in the atypical hyperplasia and in the dysplasia, respectively. These findings suggested that proliferative potential in hyperplasia and dysplasia were greater than that in normal gastric mucosa, the higher the grade of dysplasia being, the greater the proliferative potentials.

Key Words: Gastric dysplasia, Cell kinetics, Bromodeoxyuridine, Immunohistochemistry, Monoclonal antibody