

# Nucleolar Organizer Regions와 유세포 분석기를 이용한 핵의 배수성 검사를 통한 유방암종의 비교연구

원광대학교 의과대학 병리학교실

윤기중 · 한원철 · 최 찬 · 문형배

## Comparative Study of the Breast Carcinoma by the Measurement of Nucleolar Organizer Regions and the Flow Cytometric DNA Analysis

Ki Jung Yun, M.D., Weon Cheol Han, M.D., Chan Choi, M.D. and Hyung Bae Moon, M.D.

It is important to predict the prognosis of patient with cancer. Well known parameters predicting the prognosis are stage and degree of differentiation. Recently, the prognostic and diagnostic significance of silver-stained nucleolar organizer regions(Ag-NORs) and flow cytometric DNA analysis are introduced.

This study aims to detect the diagnostic significance of Ag-NORs in breast lesions, and to correlate the number of Ag-NORs and cellular ploidies in breast carcinoma. In addition, the existence of heterogeneity according to the sample in the same patient is studied.

Sixty six paraffin blocks(two primary lesions and the two metastatic lymph nodes in 13 patients, and one primary lesion and one metastatic lymph node in 10 patients) of breast carcinoma, 30 paraffin blocks of fibroadenoma and 23 paraffin blocks of normal breast are studied. The number of Ag-NORs increased from normal breast(mean 1.45) through fibroadenoma (mean 1.60) to carcinoma(mean 2.43). It was significantly different between each lesions( $P < 0.0005$ ). The number of Ag-NORs increased in the aneuploidy carcinoma than that in the euploidy one( $P < 0.05$ ). But, there was difference between the number of Ag-NORs and DNA index according to the sample area in the same patient with carcinoma.

In conclusion, the number of Ag-NORs is diagnostically significant in breast lesions and is correlated with cellular ploidies in breast carcinoma. In addition, Ag-NORs and cellular ploidies are heterogenous in the same patient. (Korean J Pathol 1992; 26: 117-124)

**Key Words:** Ag-NORs, Cellular ploidies, Breast carcinoma, Heterogeneity

### 서 론

악성 종양은 현대인의 난치병중 대표적인 것으로,

이에 대한 발생기전, 진단, 치료방법 등에 관한 수 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 또한 암환자를 관리, 치료하는데 있어서, 예후를 예측하는 것이 매우 중요한 일로서 과거부터 많이 이용되어 왔던 분화도, 병기외에 최근에는 유세포 분석기를 이용한 핵의 배수성 측정과<sup>1~3)</sup>, 은 염색을 이용한 Ag-NORs 수가 예후의 한 인자로, 진단의 한 방법으로 점차 폭넓게 이용되어 가고 있다<sup>4~6)</sup>. 그러나 대부분 종양은 한 세포

접 수: 1991년 7월 8일, 게재승인: 1991년 11월 5일  
주 소: 전북 이리시 신용동 344-2번지, 우편번호 570-749  
원광대학교 의과대학 해부병리과, 윤 기 중

에서 기원했다고 하는 단클론 설이 받아들여지고 있음에도 불구하고, 종양 세포는 증식하면서 유전학적으로 불안정하기 때문에, 증식성, 면역학적 특성, 핵형, 색소형성, 세포 표면의 수용체, 약물 반응 등에서 다양한 이질성을 보여주고 있다<sup>7-9</sup>. 이런 이질성은 동일인의 한 종양 안에서 뿐만 아니라, 원발 부위와 전이된 부위 사이에서도 나타나고 있다<sup>10,11</sup>. 그러므로 한 병소만을 관찰하여 그 사람의 예후를 판정하거나, 진단하는데에는 많은 문제점이 있다고 생각된다.

그리하여 본 연구는 유방에서 은 염색을 이용한 Ag-NORs과 유세포 분석기를 이용한 핵의 배수성 검사를 통해서, 유방의 각 병변에서 Ag-NORs 수의 진단적 의의 및 암종에서 Ag-NORs 수와 핵의 배수성 사이의 연관성을 알아보고, 또한 암종의 이질성이 원발 부위와 전이된 부위에서 각각 어떻게 나타나는가를 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

Ag-NORs 수 측정에서 유방의 침윤성 선암종의 연구재료는 1985년 1월부터 1990년 6월까지 원광대학교 부속병원에서 외과적으로 절제된 파라핀 포매 조직 중 핵와 림프절에 전이한 23명의 여자 환자를 대상으

로 하였다. 그 중 10명의 환자에서는 원발 부위 및 전이된 부위에서 각각 2개의 표본을 채취했고, 나머지 13명의 환자에서는 원발 부위와 전이된 부위에서 각각 1개의 표본을 채취하여 총 66예를 검색하였다. 섬유선종과 정상 유방조직은 1987년 1월부터 1989년 12월 까지 내원했던 여자환자들 각각 30명, 23명의 파라핀 포매조직을 1개씩 이용하였다. 유세포 분석기를 이용한 핵의 배수성 검사는 Ag-NORs 수를 측정했던 침윤성 선암종의 같은 파라핀 포매 조직 66예를 대상으로 하였다.

#### 2. 분화도 측정

유방 암종의 분화도는 핵 등급(nuclear grade), 세포 분열수, 구조의 비정형성(structural atypism)에 따라 각각 3점씩, 총 9점을 기준으로 하여 3~5점은 분화암종, 6~7점은 중등도 분화암종, 8~9점은 미분화암종으로 구분하였다.

#### 3. Ag-NORs 수 측정

- 1) 10% 포르말린 고정과 파라핀으로 포매되었던 조직을 3~4  $\mu$ m 두께의 절편으로 만들었다.
- 2) Xylene으로 탈 파라핀 시킨후 알콜과 증류수로 함수시켰다.
- 3) 슬라이드에 silver colloid 용액을 도포한 후 빛

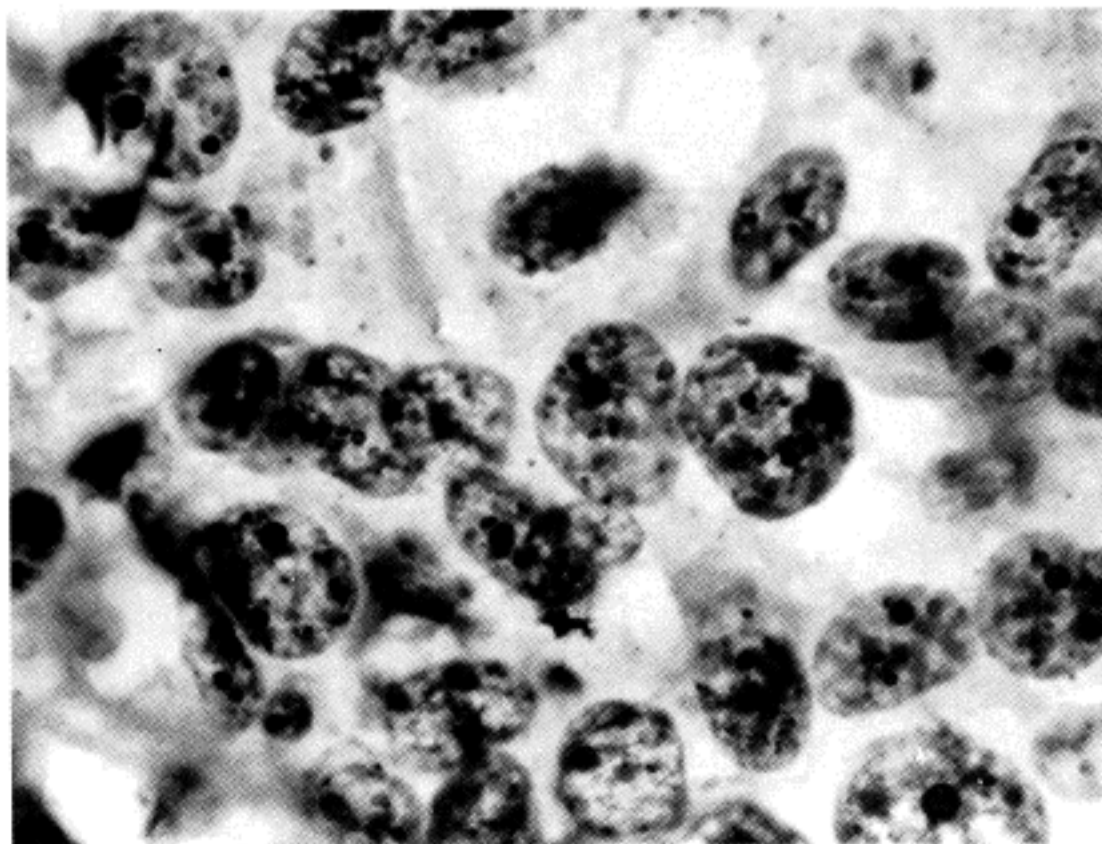


Fig. 1. Large or small Ag-NORs of breast carcinoma.

을 차단하고 두껍을 덜어 실온으로 40분동안 반응시킨 다음 증류수로 수세하고 탈수한 후, glycerin jelly로 봉입하였다.

4) 유침하에 광학 현미경으로 관찰하여, 임의로 한 조직 슬라이드 당 평균 4장의 사진을 찍었다.

5) 평균 100개의 선상피를 기준으로 하여 세사람이 Ag-NORs 수를 측정 후 평균하여 한 세포당 Ag-NORs 수로 표시하였다. 측정 기준은 핵내에서 분명하고 진한 갈색 반점으로 염색된 경우에만 측정하였고, 크기가 매우 작고 불분명한 갈색반점은 제외시켰다(Fig. 1).

#### 4. 유세포 분석에 의한 핵산 지수(DNA index) 측정

1) Ag-NORs 수를 측정했던 침윤성 선암종의 파라핀 포매조직을 광학현미경으로 hematoxylin-eosin 염색 조직과 비교하여 암종이 아닌 부위를 제거한 후 50  $\mu\text{m}$  두께로 박절하였다.

2) Xylene으로 파라핀을 제거한 후 알콜을 거쳐 증류수로 함수시켰다.

3) 조직을 37°C에서 0.5% pepsin에 1시간 동안 처리시킨 다음 23게이지 주사기로 잘 섞어 주었다.

4) 냉장고 안에서 세포들을 0.01% ribonuclease와 0.0005% propidium iodide의 혼합용액에 2시간 동안 반응시킨다음, 30  $\mu\text{m}$ (pore size)의 나일론 필터로 여과시켜 부유세포를 얻었다.

5) Ribonuclease와 propidium iodide 혼합용액으로 반응시킨 세포는 flow cytometer(Facstar, Beckton Dickson제)를 이용하여 488 nm의 아르곤 레이저(Argon laser)로 여기시켰다. 초당 100~500개의 세포가 측정되도록 유속을 조정하여 최소 10,000개의 세포를 측정하였다.

6) 변이계수(Coefficient of variation)는 DNA diploid peak에서 구하였다. 변이계수가 6이상인 경우는 다시 검색하였다. 핵산지수는 diploidy가 아닌 G1 peak의 DNA 양의 중앙값을 diploid G1 peak의 DNA 양의 중앙값으로 나눈 값으로 하였다. 핵산지수가 0.95~1.05 사이이거나 불분명한 euploidy 근처의 G1 peak가 있을때는 핵산지수 1로 하였다.

#### 5. 통계처리

정상, 섬유선종, 암종사이의 Ag-NORs 수, 그리고 유세포 분석기에 의한 핵산 지수 등의 비교를 위해서 Student t-test를 하였다.

### 결 과

#### 1. Ag-NORs 수 측정

Ag-NORs 수는 정상 선세포에서  $1.45 \pm 0.07$ (평균  $\pm$ 표준편차), 섬유선종은  $1.60 \pm 0.12$ , 유방의 침윤성 선암종은  $2.43 \pm 0.42$ , 액와 림프절의 전이성 암종은  $2.43 \pm 0.35$ 로 측정되었다. 정상 선세포, 섬유선종, 침윤성 선암종 순으로 통계학적으로 유의있는 수의 증가를 보였으나( $p < 0.0005$ ), 원발 부위와 전이된 부위사이 Ag-NORs 수 평균값의 차이는 없었다(Fig. 2). 그러나, 동일한 환자에서 침윤성 선암종의 원발 부위와 전이된 부위사이의 Ag-NORs 수는 23명 모두에서 서로 다르게 측정되었고, 이들의 상관관계는 없었다(Fig. 3). 또한 원발 부위 및 전이된 부위에서 각각 2개의 표본을 채취했던 10명의 환자에서도 표본에 따라 모두 다르게 측정되었다. 선암종의 분화도에 따른 Ag-NORs 수는 원발 부위에서는 분화암종  $2.39 \pm 0.53$ , 중등도 분화암종  $2.41 \pm 0.39$ , 미분화암종  $2.49 \pm 0.49$  순으로 평균은 증가했으나 통계학적 의미는 없었다(Table 1). 전이된 부위에서는 분화도에 따른 Ag-NORs 수의 증가는 없었다.

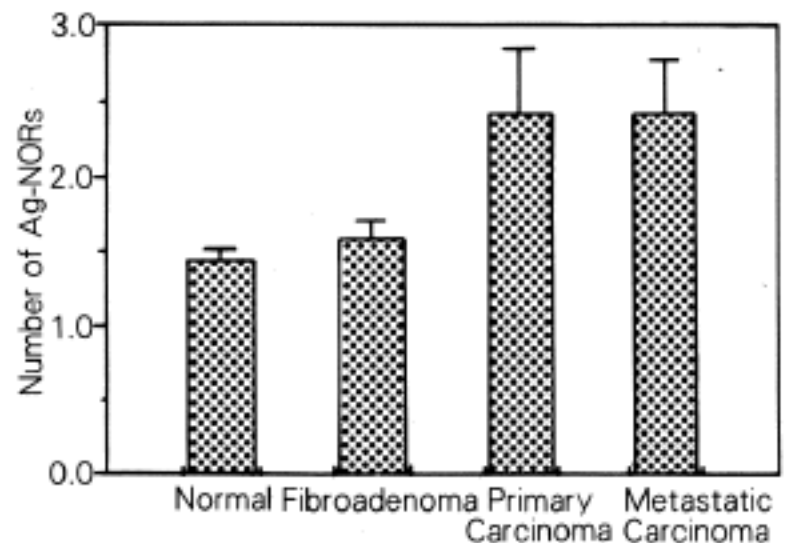


Fig. 2. Numbers of Ag-NORs in primary and metastatic lesion.

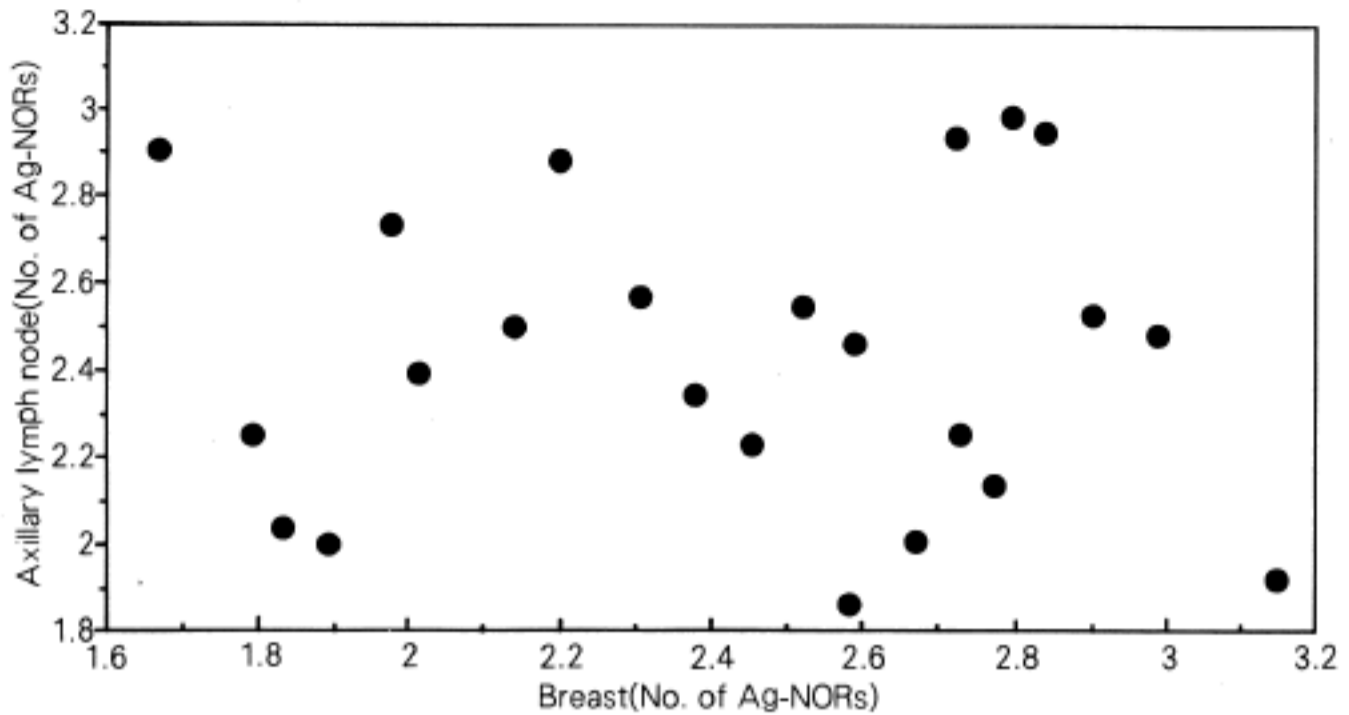


Fig. 3. Numbers of Ag-NORs in primary and metastatic ductal carcinoma of breast.

Table 1. Numbers of Ag-NORs according to histologic differentiation of breast carcinoma (mean  $\pm$  SD).

Region	Differentiation	Ag-NORs
Breast	Well(5)	2.39 $\pm$ 0.53
	Moderate(11)	2.41 $\pm$ 0.39
	Poor(7)	2.49 $\pm$ 0.49
Axillary lymph node	Well(2)	2.39 $\pm$ 0.74
	Moderate(16)	2.46 $\pm$ 0.32
	Poor(5)	2.35 $\pm$ 0.36

Table 2. DNA indices in patients who have aneuploid stem line in the breast or axillary lymph node

Patient No.	Primary lesion	Metastatic lesion
1	1.2	1.0
2	1.3	1.0
3	1.0	1.3
4	1.7	1.7
5	1.0, 1.0	1.1, 1.0
6	1.4, 1.4	1.0, 1.0
7	1.0, 1.2	1.0, 1.0
8	1.1, 1.0	1.0, 1.0

## 2. 유세포 분석에 의한 핵산 지수(DNA index) 측정

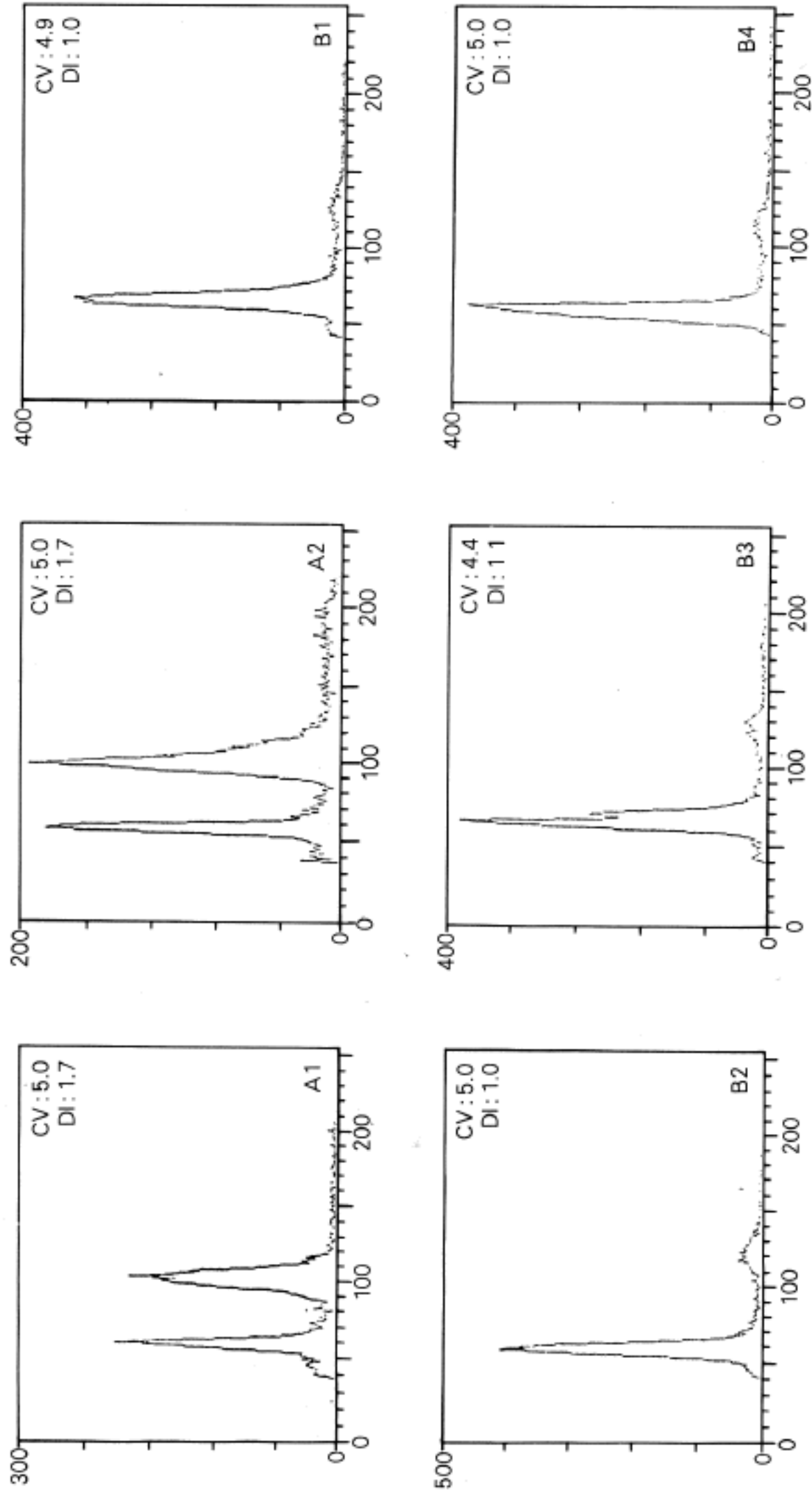
유세포 분석기를 이용하여 핵산 지수를 측정하여 abnormal DNA stemline은 23명중 8명(35%), 66예중 10예(15%)에서 나왔다(Table 2). Abnormal DNA stemline을 보인 경우에, 동일인에서 원발 부위와 전이된 부위의 핵산지수는 채취된 표본에 따라서 다르게 측정되었고(Table 2), 47세 환자(patient A)는 원발 부위 및 전이된 부위 모두에서 abnormal DNA stemline이 보였으나, 43세 다른 환자(patient B)에서는 전이된 부위에서만 abnormal DNA stemline이 보였다(Fig. 4).

Abnormal DNA stemline을 보인 8명중 5명은

원발 부위에서만, 2명은 전이된 부위에서만, 1명은 원발 부위와 전이된 부위 모두에서 abnormal DNA stemline 이 측정되었다(Table 2). 또한 원발 부위와 전이된 부위에서 각각 1개씩 표본을 취한 13명중 4명(31%), 2개씩 표본을 취한 10명중 4명(40%)에서 abnormal DNA stemline이 나와 2개의 표본을 채취한 경우에서 abnormal DNA stemline 빈도가 9% 증가했다.

## 3. Ag-NORs와 핵산지수의 관계

원발 부위와 전이된 부위의 euploidy 암종과 aneuploidy 암종사이의 평균 Ag-NORs 수는 각각 2.38



**Fig. 4.** DNA histograms of the primary and metastatic lesions of breast carcinoma.  
A1: Primary Lesion (Patient A) A2: Metastatic Lesion (Patient A)  
B1: Primary Lesion (Patient B) B2: Another Primary Lesion (Patient B)  
B3: Metastatic Lesion (Patient B) B4: Another Metastatic Lesion (Patient B)

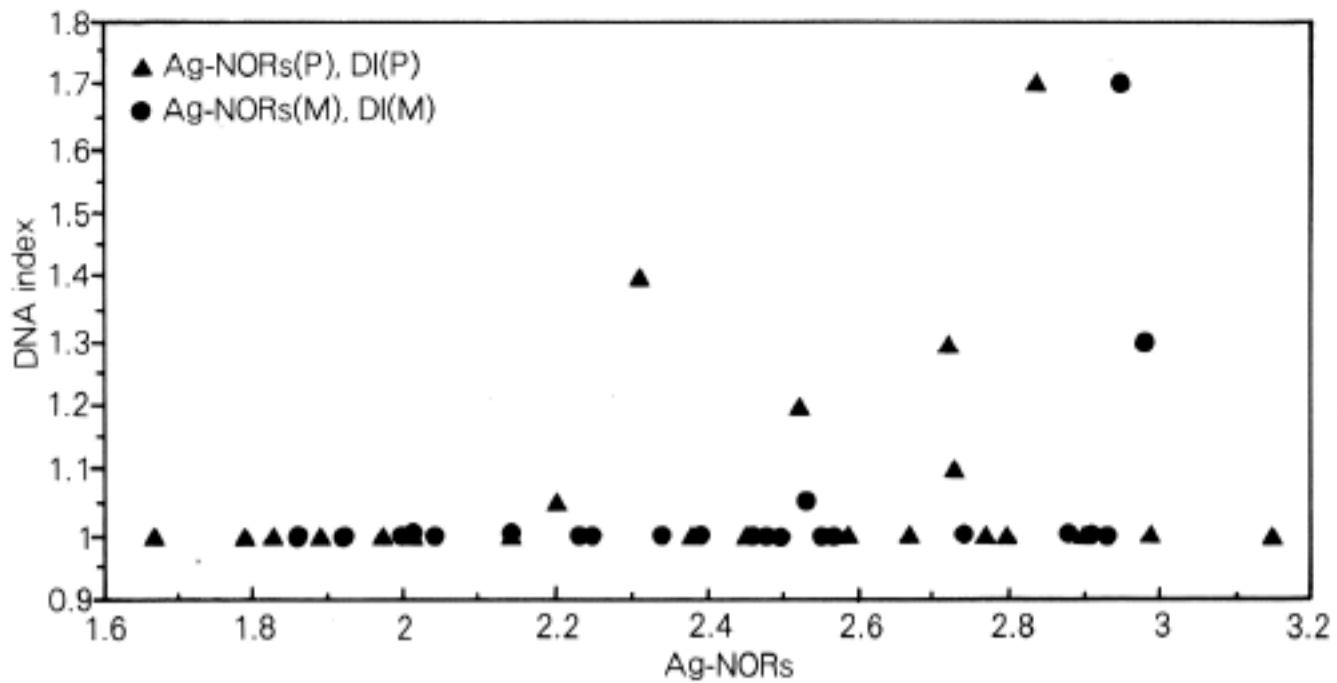


Fig. 5. Correlations between numbers of Ag-NORs and DNA indices in primary(P) and metastatic lesion(M).

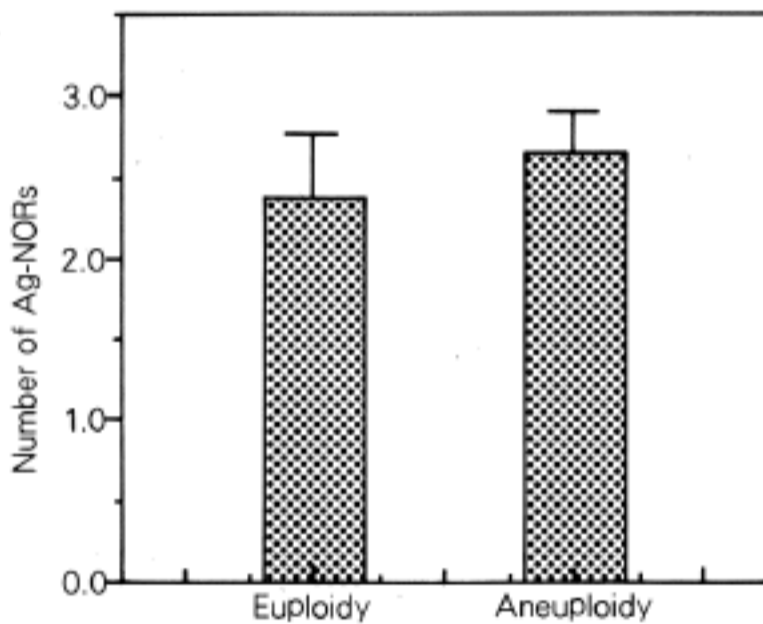


Fig. 6. Numbers of Ag-NORs in the two different DNA stem lines of breast carcinoma.

± 0.39과 2.69 ± 0.27로(Fig. 5, 6), 통계학적으로 aneuploidy 암종에서 유의있게 Ag-NORs 수가 증가되었다(p < 0.05).

### 고 찰

Nucleolar organizer region(NOR)은 ribosomal RNA를 생산하는 DNA 고리로서 분열중기(metaphase)에 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 short arm에서 세포분열 간기(interphase)에 핵소체 부위

에서 나타난다고 알려져 있다<sup>4,12,13</sup>. NOR의 구성은 정확히 밝혀져 있지는 않았지만 RNA polymerase I, 110KD의 C23 단백질, 37 KD의 B23 단백질, 36 KD인 Ag-NORs 단백질 등으로 구성되어 있다고 보고되어 있다<sup>4,12</sup>. NOR은 증식성 또는 종양성 병변에서 핵소체의 활동성이 증가할때, 전사능이 증가할때, 그리고 배수성이 증가하여 염색체 수가 증가될때 등에서 수의 증가가 있다고 알려져 있다<sup>4,12</sup>. 또한 최근에는 Ag-NORs 수가 종양의 예후와 관련이 있을 수도 있다고 알려져 있다<sup>4-6,14</sup>.

본 연구에서 평균 Ag-NORs 수는 정상 선암종 1.45, 섬유선종 1.60, 침윤성 선암종 2.43 순으로 Ag-NORs 수의 유의있는 증가를 보였다. 그러나 Ag-NORs 수에 있어서 Giri등<sup>5</sup>은 침윤성 암종에서 4.22, 김등<sup>16</sup>은 정상 1.38, 섬유선종 1.79, 침윤성 선암종 2.46-6.60등으로 보고하여 본 연구 결과와 상이하였다. 이런 차이는 Ag-NORs 수가 종양의 이질성, 염색정도, 절편두께, 고정액 종류 및 검색자에 따라 달라질 수 있기 때문이라고 생각된다<sup>4</sup>. 암종의 핵내에서 크기가 작은 갈색 반점이 많이 나타나는데, 본 연구에서는, 검색자 사이에 오차가 많아서 크기가 작은 갈색 반점중에서 매우 불분명한 반점은 제외 시킨점이 또한 암종에서 Ag-NORs 수가 다른 연구자들 보다 낮게 측정된 요인으로 생각된다. 또한 본 연구의 유방에서처럼 정상, 섬유선종, 암종순으로 병변에 따른 Ag-

NORs수의 증가는, Rowlands<sup>13)</sup>가 자궁경부에서 3도 이형성이 1, 2도 이형성 보다 의미있는 증가가 있음을 보고하였고, Rosa등<sup>17)</sup>은 위에서 정상, 장형화생, 암종 순으로 점진적인 증가가 있음을 보고한 것과 상응하였다. 또한 Giri등<sup>15)</sup>이 유방에서 섬유선종 보다 암종에서 Ag-NORs 수의 증가가 있음을 보고하고 있는 것과 일치하여, Ag-NORs 수가 증식성 병변 및 종양성 병변일수록 증가함을 알 수 있었다.

유방암종에서, abnormal DNA stemline(aneuploidy)이 나타나는 빈도는 Olszewski등<sup>2)</sup> 92%, Christov등<sup>18)</sup> 65%, Dawson등<sup>19)</sup> 46%, Kute등<sup>1)</sup> 44% 등에 비해서 본 연구에서는 23명중 8명(35%), 총 66예중 10예(15%)로 낮게 나왔다. 이러한 차이는 실험방법, 표본 채취, 기계적 문제, 변이계수 등의 차이 때문이라고 생각된다<sup>1)</sup>.

본 연구에서, Ag-NORs 수가 aneuploidy 암종에서 euploidy 암종보다 의미있게 증가하였는데, 이는 Giri등<sup>15)</sup>이 유방에서 Ag-NORs 수가 aneuploidy를 보인 암종에서 더욱더 증가했던 것과 일치하는 결과였다. 이처럼, aneuploidy때 Ag-NORs 수가 증가하는 것은 NOR을 포함하는 염색체 수의 증가 등 때문에 생긴다고 알려져 있다<sup>12)</sup>.

또한 전이된 부위에서 원발 부위의 Ag-NORs 수 및 핵산 지수와 차이를 보이는 것은 암종이 부위에 따라 이질성을 보이며, 이는 또한 전이를 하는 원발 부위 암종의 클론의 특성에 따라 차이가 있기 때문인 것으로 생각된다<sup>7-11)</sup>.

본 연구에서 동일한 환자내에서 부위에 따라 Ag-NORs 수, 핵산 지수 등에 차이가 있고, 원발 부위와 전이된 부위에서 각각 1개의 표본을 채취한 것 보다는 2개의 표본을 채취한 환자에서 aneuploidy 빈도가 31%에서 40%로 증가하는 것 등은 암종이 이질성을 보이고 있는 한 예라고 생각되며, 종양의 Ag-NORs 수 측정, 핵의 배수성 검사 등에 있어서 원발 부위 및 전이된 부위에서 많은 표본 채취와 함께, 종양의 이질성에 대한 더욱 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

### 결 론

유방조직에서 은 염색을 이용한 Ag-NORs 수의 의미, 유세포 분석기를 이용한 핵의 배수성과의 상호연

관성, 그리고 암종에서 부위에 따르는 각각의 이질성을 알아보고자, 원광대학교 의과대학 부속병원에서 외과적으로 절제된 유방 및 액와 림프절 선암종의 파라핀 포매조직 66예, 섬유 선종의 파라핀 포매조직 33예, 정상의 파라핀 포매조직 23예를 대상으로 한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Ag-NORs 수는 euploidy인 암종(2.38)보다 aneuploidy를 보인 암종(2.69)에서 의미있게 증가하였고( $p < 0.05$ ), 정상 1.45 섬유선종 1.60, 선암종 2.43 순으로 의미있게 증가하였다( $p < 0.0005$ ).

2) 원발 부위와 전이된 부위의 선암종 사이의 23명 환자에서의 평균 Ag-NORs 수에는 차이가 없었으나, 동일한 환자내에서는 부위에 따라 Ag-NORs 수, 핵산 지수에 차이가 있었다.

결론적으로 유방에서 Ag-NORs 수는 각 병변에 따라 차이를 보였으며, euploidy 암종보다 aneuploidy 암종에서 Ag-NORs 수가 증가되었다. 그러나, 한 환자내에서 부위에 따른 이질성이 나타날 수도 있으므로 진단이나 예후예측을 위하여 이러한 검사들 할 때에는, 여러군데에서 표본을 채취해야 할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Kute TE, Muss Hb, Anderson D, Crumb K, Miller B, Burns D, et al. Relationship of steroid receptor, cell kinetics, and clinical status in patients with breast cancer. *Cancer Res* 1981; 41: 3524-29.
- 2) Olszewski W, Darzynkiewicz Z, Rosen PP, Schwartz MK, Melamed MR. Flow cytometry of breast cancer: 1. Relation of DNA ploidy level to histology and estrogen receptor. *Cancer* 1981; 48: 980-84.
- 3) Owainati AAR, Robins RA, Hinton C, Ellis IO, Dowle CS, Ferry B, et al. Tumor aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 55: 449-54.
- 4) Walker RA. The histopathological evaluation of nucleolar organizer proteins. *Histopathology* 1988; 12: 221-23.
- 5) Egan MJ, Raafat F, Crocker J, Williams D. Comparative study of the degree of differentiation of neuroblastoma and mean number of nucleolar organizer regions. *J Clin Pathol* 1988; 41: 527-31.
- 6) Rüschoff J, Bittinger A, Neumann K, Schmitz-Moormann P. Prognostic significance of nucleolar

- organizing regions(NORs) in carcinoma of the sigmoid colon and rectum. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 85-91.
- 7) Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
- 8) Hart IR, Fidler IJ. The implications of tumor heterogeneity for studies on the biology and therapy of cancer metastasis. *Biochemica et Biophysica Acta* 1981; 651: 37-50.
- 9) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease. 4th edition. Philadelphia, WB Saunders Co, 1989; 250-3.*
- 10) Ljungberg B, Stenling R, Roos G. DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer* 1985; 56: 503-8.
- 11) Hiddemann W, Dirk B, Bassewitz B, Kleinemeier HJ, Brochterbeck ES, Hauss J, et al. DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 258-63.
- 12) Underwood JCE, Giri DD: Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988; 155: 95-6.
- 13) Rowlands DC: Nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1200-02.
- 14) Rüschoff J, Plate K, Contractor H, Thomas C. Silver-stained structures(AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol* 1990; 161: 89-90.
- 15) Giri DD, Nottingham JR, Lawry J, Dundas SAC, Underwood JCE. Silver-binding nucleolar organizer regions(AgNORs) in benign to malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase DNA flow cytometry. *J Pathol* 1989; 157: 307-13.
- 16) 김준미, 김인선, 백승룡. 정상조직과 증식성 및 종양성 병변에서의 nucleolar organizer regions. *대한병리학회지* 1989; 23: 208-22.
- 17) Rosa J, Mehta A, Filipe M. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* 1990; 16: 265-69.
- 18) Christov K, Milev A, Todorov V. DNA aneuploidy and cell proliferation in breast tumors. *Cancer* 1989; 64: 673-79.
- 19) Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast cancer by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.