

# 영양모세포군에서의 Cytokeratin의 면역조직화학적 검색

부산대학교 의과대학 병리학교실

강 정 희 · 서 강 석

## Immunohistochemical Study of Cytokeratin in Human Trophoblastic Tissue

Jeong Hee Kang, M.D. and Kang Suck Suh, M.D.

Department of Pathology, Pusan National University College of Medicine, Pusan, Korea

The use of human chorionic gonadotropin(hCG), human placental lactogen(hPL) as markers for trophoblastic tissue has been well documented in the literature. However, it is not widely recognized that cytokeratin is a very sensitive and reliable marker for various types of trophoblastic tissue. The authors have studied 15 cases of human placental tissue ranging in age from first to third trimesters. Unlike hCG and hPL, which stain only the syncytiotrophoblast and intermediate trophoblast, cytokeratin(low molecular weight) stains all three types of trophoblastic tissue. The staining of placental tissue for cytokeratin is marked and very consistent throughout pregnancy. Because of its high sensitivity and ability to stain cytotrophoblast, it is believed that it could be very useful in detecting trophoblasts of early pregnancy and in the study of the pathologic process of trophoblastic diseases. (Korean J Pathol 1992; 26: 459~465)

**Key Words:** Trophoblastic tissue, Immunohistochemical study, Cytokeratin

### 서 론

근래 면역조직화학적 방법이 개발되면서 여러가지 조직 또는 종양의 기원의 표지자가 알려지게 되었으며, 현재 human chorionic gonadotropin(hCG) 및 human placental lactogen(hPL)은 영양모세포군의 표지자로 알려져 있다<sup>1-7)</sup>.

Earl등<sup>8)</sup>과 Heyderman등<sup>9)</sup>들에 의하면, 이 표지자들은 융모막 융모조직중 합포체영양모세포군에서만 강한 양성 반응을 보이고, 세포영양모세포군에서는 음성이라고 보고하였다. 또한 Bulmer등<sup>10)</sup>과 그의 몇 연구자들<sup>9,10)</sup>도 영양모세포군에 특이성을 가진 NDOG<sub>1</sub> 등의 면역조직화학적 고찰에서도 상기와 유사한 결과를 보고하였다. 그러나 1991년 Daya 및 Sabet<sup>11)</sup>는 cytokeratin(AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub>)이 합포체영양모세포군은 물론 세포영양모세포군에 모두 강한 양성 반응을 나타낸

다고 보고하였다. hCG나 hPL에 대한 연구들은 많으나, 이들과 분자량이 낮은 cytokeratin에 대한 영양모세포군의 표지자로서의 비교 연구는 아직 드문 것 같다.

그러므로 저자들은 임신 초기, 중기 및 말기의 태반 조직 15예를 대상으로 hCG, hPL 및 cytokeratin에 대한 면역조직화학적 반응을 검색하였던 바, 약간의 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용한 재료는 소파술이나 질식 분만을 통해 얻어진 태반 조직들 중 연구하기가 적당하다고 인정된 15예를 대상으로 실시하였고, 각 증례들은 LMP를 기준으로 임신 초기, 중기 및 말기로 구분하였다. 관찰 대상이 된 조직들은 10% 중성 포르말린에 충분히 고정된 다음 파라핀 포매에 의해 5 $\mu$ m 두께로 연속 절편을 하여 제작하였다. 일반적인 조직학적 소견을 관찰하기 위하여 헤마톡실린-에오진 중염색을 실시하였고, 면역조직화학적 검색을 위하여 파라핀에 포매한 조직을 사용하여, rabbit monoclonal anti-

접 수: 1992년 4월 8일, 게재승인: 1992년 6월 17일  
주 소: 부산시 서구 아미동 1가 10번지, 우편번호 602-739  
부산대학교 병원 해부병리과, 강 정 희

hCG(DAKO), anti-hPL(DAKO) 및 swine monoclonal anti-cytokeratin(DAKO, MNF 116)에 대한 염색을 시행하였다.

면역조직화학적 염색 과정은 조직 절편들을 56~58°C에서 30분 정도 건조, 밀착시킨 후 xylene으로 탈파라핀시키고 알코올로 탈수시켰다. 다음 인산 완충액(phosphate buffer saline: PBS, pH 7.6±0.2)으로 수세한 후 조직내 적혈구에 존재하는 내재성 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소수로 실온에서 10분간 처리하였고, 탄백질과의 비특이성 결합을 막기 위하여 정상 혈청에 20분간 반응시켰다. 이렇게 처리한 조직에 일차항체( $\beta$ -hCG, hPL; prediluted, cytokeratin; 1:200)들을 실온에서 30분간 반응시킨 후 반응하지 않은 일차 항체를 PBS로 충분히 씻어낸 다음, 연체 항체( $\beta$ -hCG, hPL; swine anti-rabbit antisera, cytokeratin; rabbit anti-mouse antisera)를 실온에서 20분간 부착시킨 후 PBS로 수세하였다. 연체 항체의 유리부에 PAP complex를 실온에서 20분간 반응시켰으며, 결합되지 않은 PAP complex를 PBS로 씻어내었다. 3% 과산화수소수와, N,N-dimethyl formamide에 녹인 3-amino-9-ethyl carbazole, 그리고 0.1M acetate buffer(pH 7.6)를 잘 섞은 기질액을 실온에서 40분간 방치시킨 후 Mayer의 헤마톡실린으로 대조 염색을 한 후 glycerol gelatin으로 봉입하였다. 염색할 때는 언제나 융모막 조직 절편은 양성 대조군으로, 그리고 탈락막 세포 조직 절편은 음성 대조군으로 병행 염색하였다.

표본의 면역 반응 성적을 기호로 표시할 때, 반응이 인정되지 아니할 때는 -, 반응이 경도로 인정될 때는 +, 그리고 강한 반응일 때는 ++로 표기하였다.

## 결 과

### 1. 일반적인 조직학적 소견

15예 모두에서 융모막 융모를 관찰할 수 있었는데,

**Table 1.** Localization of hCG, hPL and cytokeratin for cytotrophoblast according to gestational age

Antibody	Gestational age(Trimester)		
	First	Second	Third
hCG	-	-	-
hPL	-	-	-
Cytokeratin	++	++	++

Note: hCG, human chorionic gonadotropin; hPL, human placental lactogen; -, negative; +, mild positive; and ++, marked positive.

대부분이 세포영양모세포각(shell)과 세포영양모세포주(column)의 조직 소견을 동반하고 있었다. 이러한 용모는 임신 주수가 커질수록 분지를 내어서 종말 가지는 아주 작아지고 수는 많아져 있었다. 융모 주변의 영양모세포군의 전체 양은 줄어들지 않지만 세포영양모세포군들은 시간이 지날수록 줄어들어 임신 말기에서는 광학 현미경의 저배율 소견에서는 거의 찾기가 힘들었다. 대부분의 예에서 간질, 혈관주변 및 혈관내에도 단핵성 영양모세포를 관찰할 수 있었고, 합포체 영양모세포군들의 집단도 융모주변이나 간질에서 관찰되었다. 중간 영양모세포들은 세포 영양모세포들 보다 크고 다각형 또는 진한 핵 그리고 풍부하고 연한 세포질을 가지지만 자궁근세포나 탈락막 세포와는 감별하기가 힘들었다.

### 2. 면역조직화학적 소견

면역조직화학적 표지자인 hCG, hPL 및 cytokeratin 등에 대한 염색 결과는 영양모세포군의 세포형과 임신 주수에 따라 차이가 있는데 이들에 관한 성적은 Table 1~3에서 보는 바와 같다.

세포영양모세포군의 성적은 Table 1에서 보는 바와 같이 임신 주수에 상관없이 cytokeratin에 대한 면역조직화학적 반응은 강한 양성 반응을 보였으나, hCG 및 hPL들은 음성이었다.

합포체영양모세포군의 성적은 Table 2에서 보는

**Table 2.** Localization of hCG, hPL and cytokeratin for syncytiotrophoblast according to gestational age

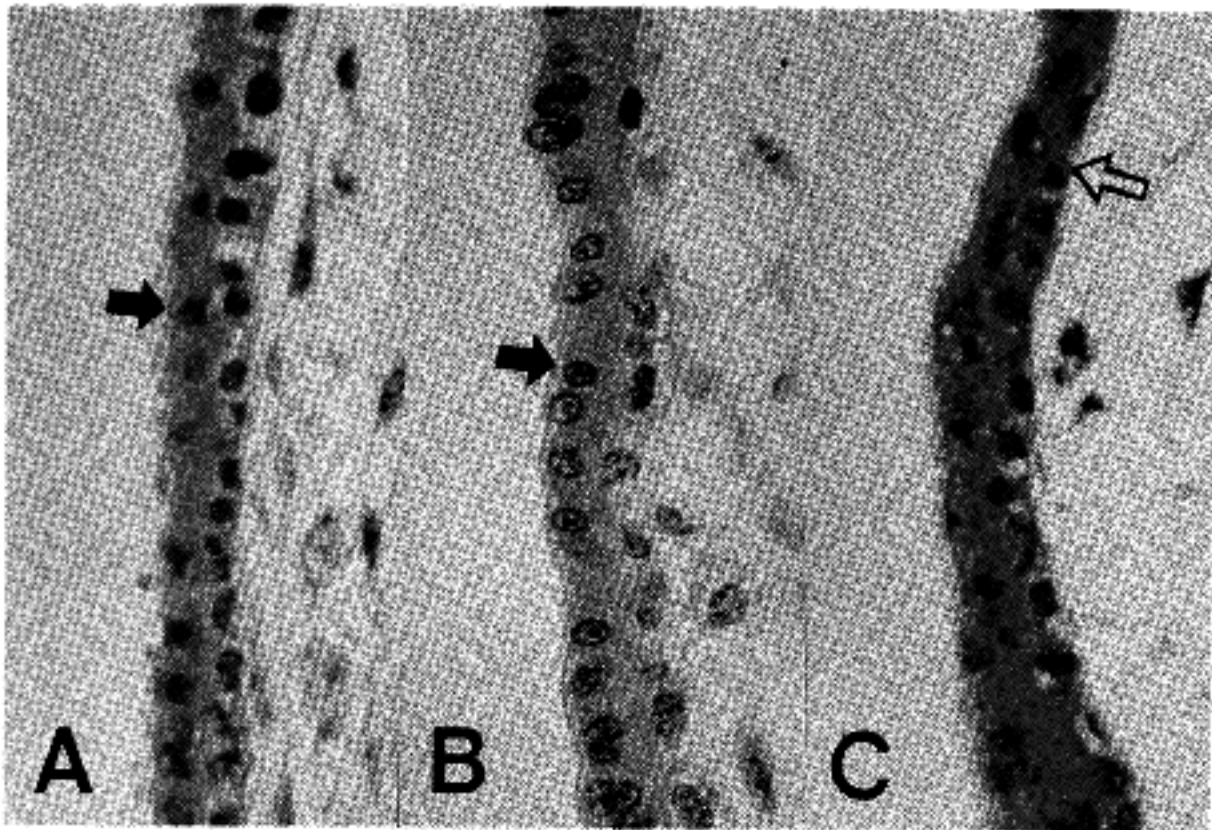
Antibody	Gestational age(Trimester)		
	First	Second	Third
hCG	++	-	-
hPL	++	+	+
Cytokeratin	++	++	++

Foot note: Refer to table 1.

**Table 3.** Localization of hCG, hPL and cytokeratin for intermediate trophoblast according to gestational age

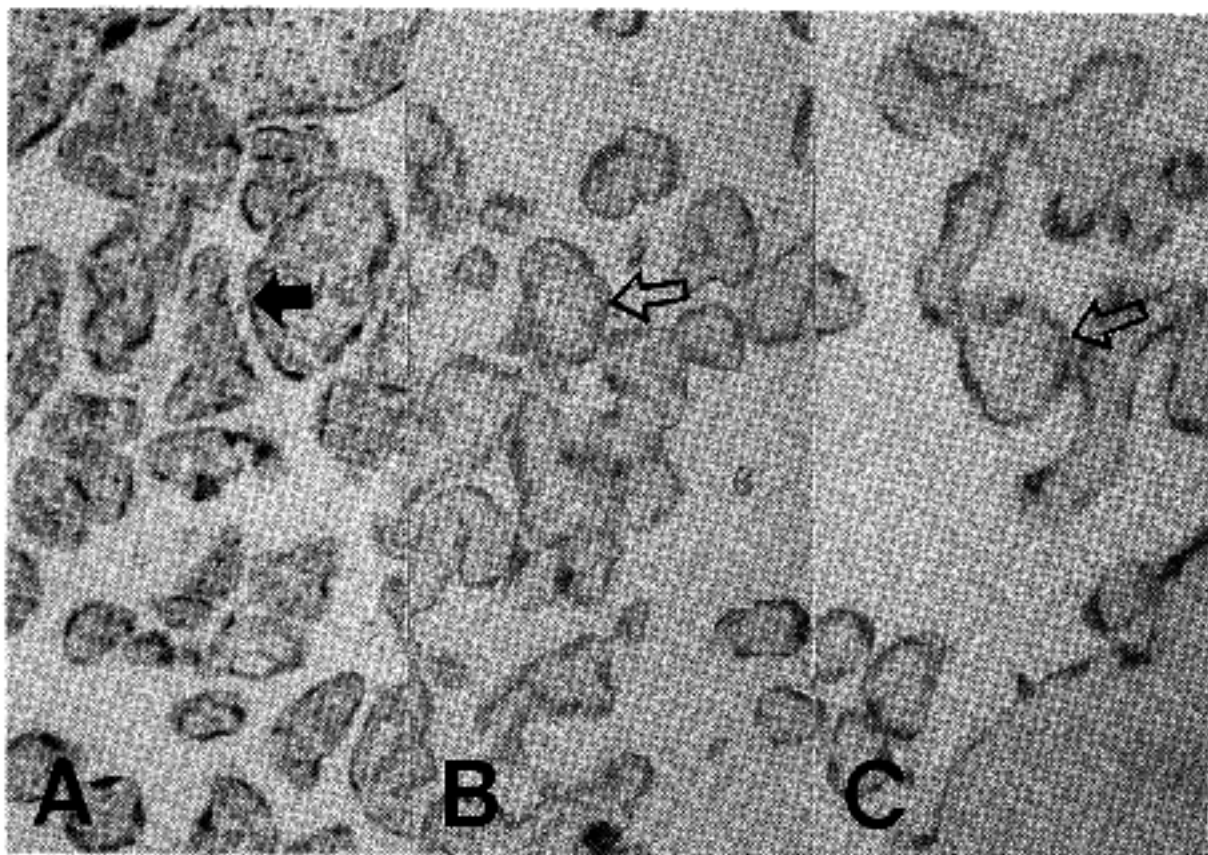
Antibody	Gestational age(Trimester)		
	First	Second	Third
hCG	-	-	-
hPL	+	+	+
Cytokeratin	++	++	++

Foot note: Refer to table 1.



**Fig. 1.** Immunohistochemical reaction for trophoblastic tissue of chorionic villus in first trimester. A.  $\beta$ -hCG, B. hPL, C. Cytokeratin.

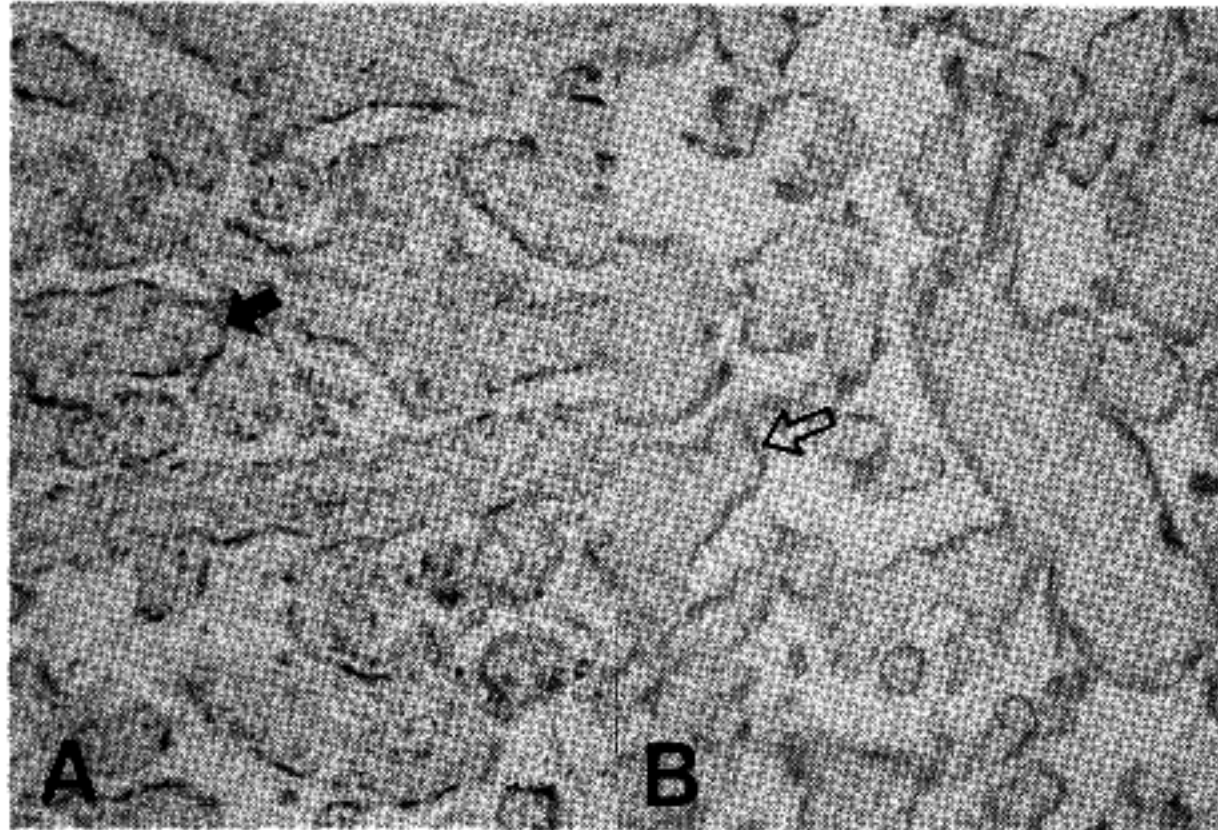
Note: Positive staining of the outer syncytiotrophoblastic layer with hCG and hPL (dark arrow). Negative staining of the inner cytotrophoblastic layer for  $\beta$ -hCG and hPL and strongly positive staining for cytokeratin (open arrow).



**Fig. 2.** Immunohistochemical reaction for trophoblastic tissue of chorionic villus in second trimester. A.  $\beta$ -hCG, B. hPL, C. Cytokeratin.

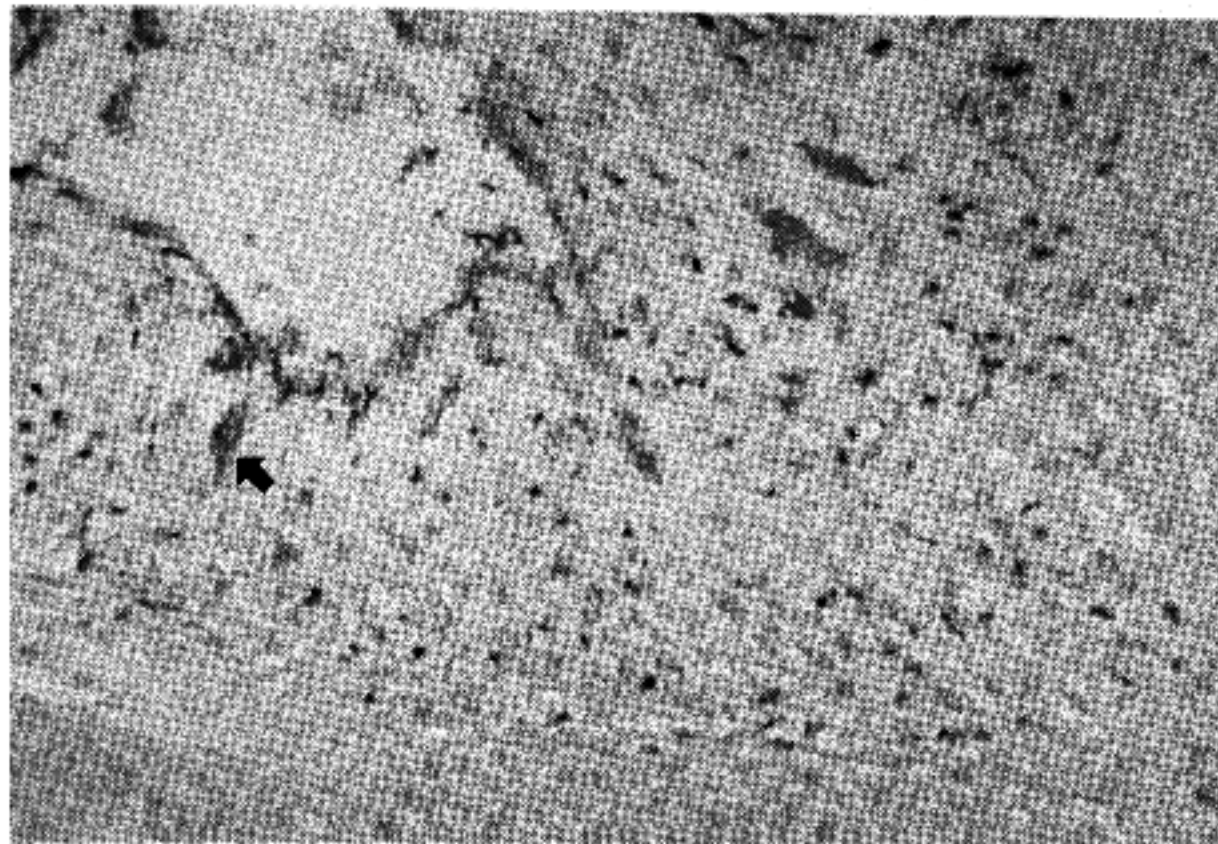
Note: Negative staining of the trophoblasts for  $\beta$ -hCG (dark arrow) and positive staining for hPL and cytokeratin (open arrow).





**Fig. 3.** Immunohistochemical reaction for trophoblastic tissue of chorionic villus in third trimester. A.  $\beta$ -hCG. B. hPL.

Note: Negative staining of the trophoblasts for  $\beta$ -hCG (dark arrow) and positive staining for hPL (open arrow).



**Fig. 4.** Localization of individually scattered trophoblasts around the small blood vessel, using hPL as the immunohistochemical marker in second trimester. Only occasional intermediate trophoblastic cells stain positively with weak reaction (dark arrow).

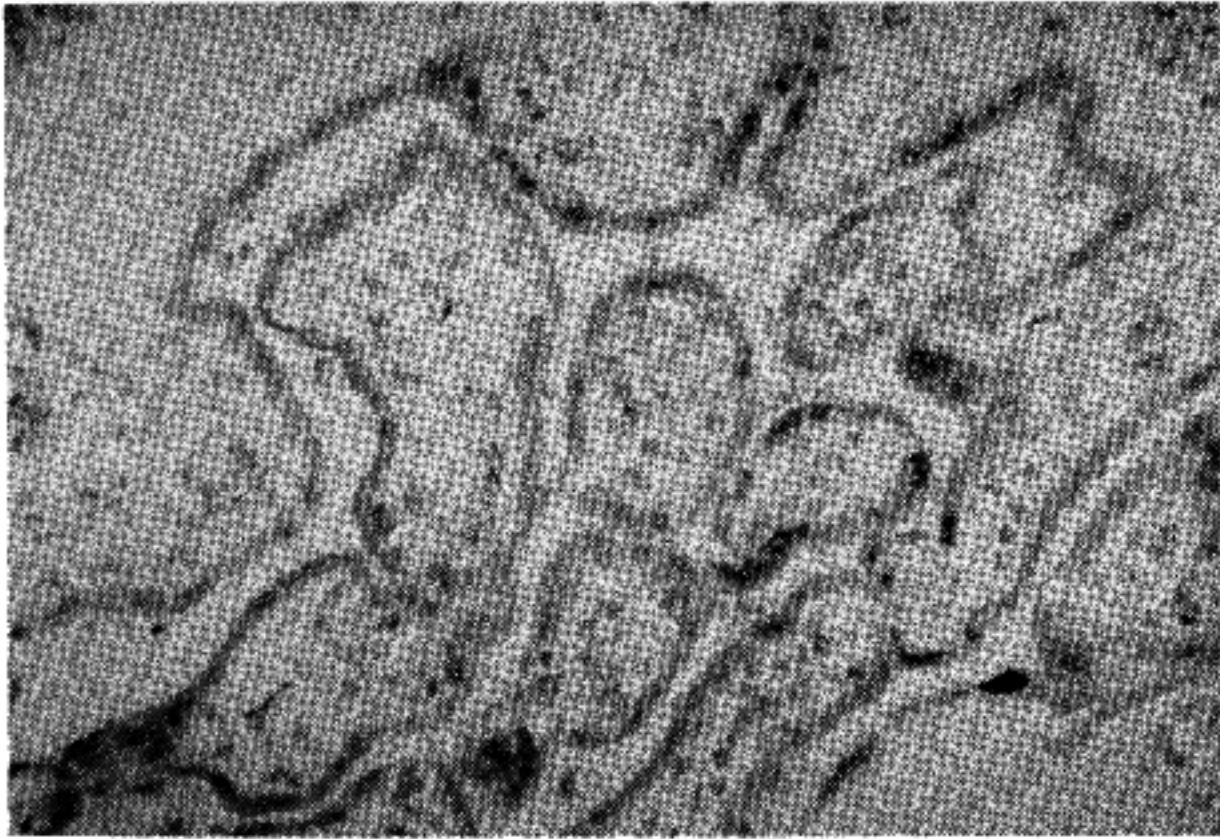


Fig. 5. Strongly positive staining of trophoblasts in chorionic villi in third trimester with cytokeratin.

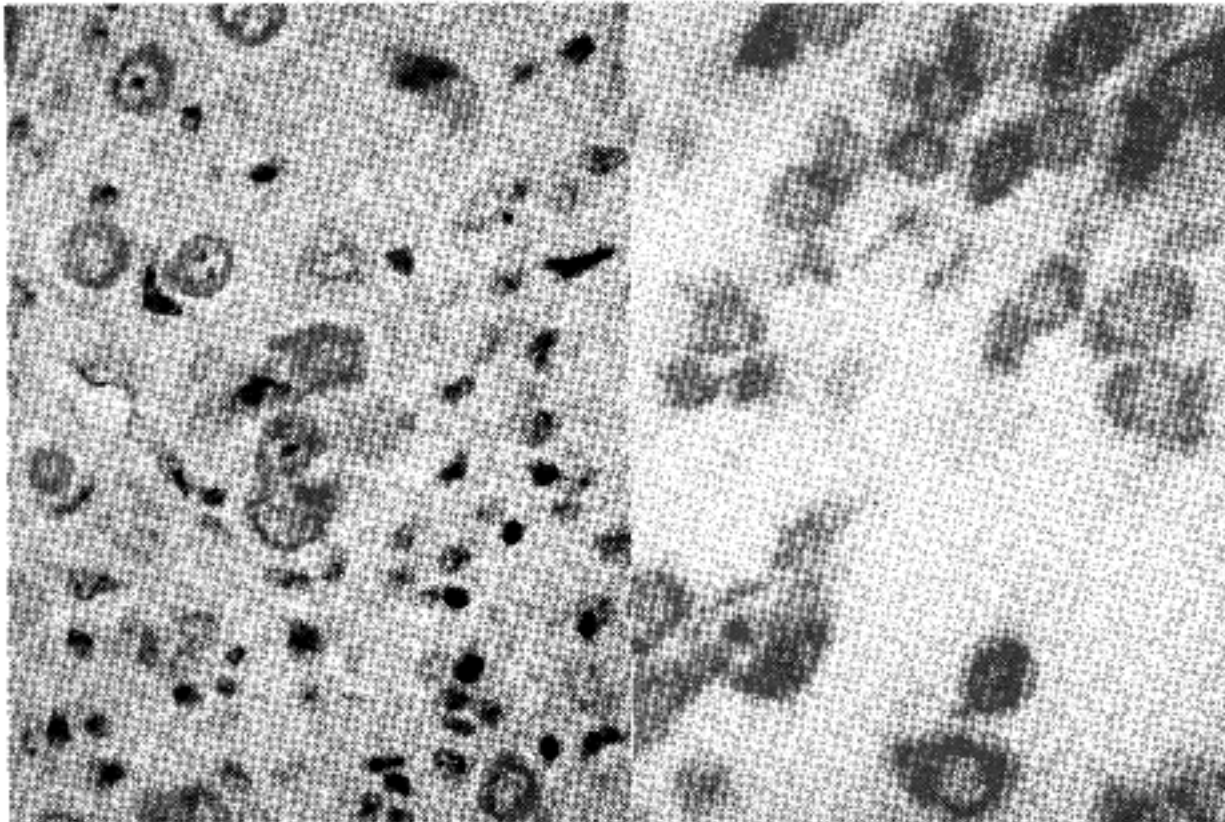


Fig. 6. The intermediate trophoblastic cells staining positively for cytokeratin are individually scattered within decidua.

바와 같이 hCG 및 hPL에 대한 면역조직화학적 반응은 임신 초기에서는 양자 공히 강한 양성반응을 보였으나, 중기와 말기에서는 hCG에서는 음성, hPL에서는 약 양성반응이었다. 그러나, cytokeratin에 대한

면역조직화학적 반응은 임신 기간중, 계속 강한 양성반응을 보였다.

중간 영양모세포군의 성숙은 Table 3에서 보는 바와 같이 임신 주수에 상관 없이 hCG에 대한 면역조



직화학적 반응은 모두 음성이었고, hPL에 대해서는 국소적이지만 경한 양성 반응을 보였으며, cytoke-  
ratin은 지속적인 강한 양성 반응을 보였다.

대조군으로는 영양모세포군이 침입하지 않은 탈락막 세포 조직절편들을 병행 염색을 한 cytokeratin에 관한 성적은 모두 음성이었다.

### 고 찰

현재 anti-hCG 및 hPL들은 어느 부위에서나 영양 모세포군의 믿을만한 표지자로 알려져 있고<sup>1-7)</sup>, 이에 대한 저자들의 연구 결과는 특히 Earl등<sup>6)</sup> 및 Heyderman등<sup>7)</sup>들의 성적과 매우 유사하였다. 그러나 hCG나 hPL들을 분자량이 낮은 cytokeratin의 영양모세포군에서의 비교 연구는 아직 드문 것 같다<sup>11-13)</sup>. 지금까지 영양모세포군에서의 표지자로 사용되어온 hCG 및 hPL들에 관한 저자들의 연구는 합포 영양모세포군에서는 임신 초기에 강한 양성 반응을 보이고, 세포영양모세포군에서는 음성인 반면, 분자량이 낮은 cytokeratin은 임신 주수에 상관없이 합포체 영양모세포군 및 세포영양모세포군에서도 강한 양성 반응을 보여 이전 몇 연구자들의 성적과 부합되었다<sup>11-13)</sup>.

영양모세포군의 분화과정은 임신 주수와 분포 장소에 따라 연관성이 있다<sup>14,15)</sup>. 융모가 생성되기 이전의 영양모세포군을 전 융모영양모세포군이라고 하며, 융모가 생성된 이후에는 융모막 융모를 둘러싸고 있는 영양모세포군을 융모영양모세포군, 그 이외의 장소의 영양모세포군을 융모의 영양모세포군이라고 한다. 착상 이후 즉시 세포영양모세포군에서 나온 중간 영양모세포군이 영양모세포주들 형성하면서 주변 자궁 내막으로 침범하게 된다. 그 이후 중간 영양모세포군은 수가 증가되고 합쳐져서 합포체영양모세포군이 된다. 이것은 전융모 영양모세포군의 분화 과정이다. 융모막 융모를 형성할 시기에는 융모막 융모 주위의 세포영양모세포군이 합쳐져서 합포체영양모세포군이 되어 융모 영양모세포군을 만든다. 고정된 융모의 한 부분에서는 세포영양모세포가 주를 형성하여 중간 영양모세포들이 탈락막이나 자궁근까지 침입하고 융모의 영양모세포군이 되기도 한다. 융모 표면에서의 세포영양모세포와 합포체영양모세포군의 돌연한 전환에 비해 주에서의 중간 영양모세포군을 통한 세포영양모세포와 합포체 영양모세포의 변이는 자연스럽다. 이러한 간질의 단핵성 또는 다핵성 영양모세포군들은 중간 영양모세포군으로 알려져 있기는 하나, 태반 조직에서도 다각형 또는 방추형을 가질 수 있으므로 광학현미경에서 모체의 탈락막 세포, 자궁근세포 또는 염증 세포와의 구별이 곤란할 때가 있다. Wynn<sup>16)</sup>은 전자현미경에서도 탈락막 세포와 태반 조직에서의 중간 영양모세포군과의 구별이 어렵기 때문에 면역조직화학적 표지자가 매우 유용할 것이라 하였다.

Hay<sup>17)</sup>에 의하면 정상적인 임신에서, 융모의 합포체 영양모세포군 중의 hCG는 임신 초기에는 현저하게 증가하나, 이 이후 계속 감소하여 임신 말기에는 거의 나타나지 않는다고 한다. 저자들의 연구에서도 융모의 합포체영양모세포군 중의 hCG는 임신 초기에는 현저하게 증가하나, 이 이후 모두 음성 반응을 보였다. 그리고 세포영양모세포군에서는 임신 주수에 상관없이 모두 음성 반응이었다. 융모의 합포체영양모세포군 중의 hPL은 임신시에 계속 증가한다. 그래서 Heyderman등<sup>7)</sup>과 Kurman<sup>18)</sup>들은 hPL이 영양모세포군의 표지자라고 하였지만, 저자들의 연구에서는 세포영양모세포군과 혈관 주위 및 중간 영양모세포군들에서 경한 양성 반응을 보여 모든 형의 영양모세포군에는 뚜렷한 표지자라고 할 수는 없었다. 최근에 Earl등<sup>6)</sup>은 융모의 영양모세포군에서 호르몬 분비를 측정하면서 특정 세포형에서 호르몬 분비를 증명할 수 있다고 하여 그 세포가 호르몬을 분비하는 부위는 아니라고 하였다. 따라서 혈관 주위 영양모세포군에서 hPL의 존재를 증명할 수 있다고 하여 혈관 주위 영양모세포군이 hPL을 생산하는 부위라는 것은 아니다. 영양모세포군이 모체 혈관에서 관찰될 수 있는 시기는 5~8주 정도이다. hPL은 간질 영양모세포에서 임신 초기 이후에 혈중에서 증가하기 시작하여 임신 34주가 되어 절정에 이르게 된다. 이러한 결과는 hPL이 혈관 침윤에 뚜렷한 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또 Riddick 및 Kusmik<sup>19)</sup>들도 탈락막에서 prolactin 또는 뇌하수체 lactogen이 합성된다 하더라도 hPL이 탈락막 또는 정상 모체 조직에서 합성되는 것은 아니라고 하였다. 괴사된 조직이나 염증이 있는 탈락막에서의 합포체영양모세포의 양성 반응은 아주 불량하였다. hPL의 활성은 hCG와는 달리 세포가 죽고나면 곧 없어지기 때문에 임신이 분명할때 낮은 hPL 혈청치를 나타내거나 태반 조직의 경한 양성 반응은 불량한 태반 기능을 나타낼 것이다.

분자량이 낮은 cytokeratin은 면역조직화학적 검색에서 영양모세포군의 모든 형, 특히 중간 영양모세포군에서도 강한 양성 반응을 보여 착상 부위에서의 탈락막세포와의 구별에 매우 좋은 표지자로 사용될 수 있을 것이다. 최근 Sasagawa등<sup>12)</sup>은 cytokeratin이 정상 영양모세포군과 영양모세포에서 발생한 종양군들에서 모두 강한 양성 반응을 보고하였고, Earl등<sup>6)</sup>도 자궁외 임신에서 영양모세포군에 관한 연구에서 비슷한 성적을 보고하였다. Clark 및 Damjanov<sup>19)</sup>는 cytokeratin이 영양모세포의 종양에서도 강한 양성 반응을 보인다고 보고하였다. 또한 Daya 및 Sabet<sup>11)</sup>도 cytokeratin이 영양모세포군의 모든 형태를 검색하는데 좋은 표지자로 보고하였으므로, hCG, hPL 등과 같은 다른 표지자가 국소적으로 양성 반응을 보일때 초기 임신 연구에 좋은 표지자로 사료되었다. 그리고 cytokeratin은 감수성이 높기 때문에 비정상적인 착

상의 병리학적 연구에도 매우 유용할 것으로 사료된다. 영양모세포군의 각 형의 특징은 처음 cytokeratin을 염색하여 영양모세포군을 확인하고, hCG 또는 hPL과 같은 특이성이 높은 표지자를 이용하여 결정할 수가 있다. 그러므로 병적 또는 정상 상태에서 음모막 용모가 관찰되지 않을 때 중간 영양모세포군에 대한 hPL 염색 반응이 음성이 될 때도 있기 때문에 감수성이 높은 cytokeratin이 매우 유용할 것으로 사료된다.

## 결 론

저자들은 임신 초기, 중기 및 말기의 인체 태반 조직 15예를 대상으로 hCG, hPL 및 cytokeratin에 대한 면역조직화학적 반응을 비교 검색하였던 바, hCG와 hPL들은 공히 합포체영양모세포군에서 임신 초기에는 강한 양성 반응을, 세포영양모세포군에서는 음성 반응을 나타내었으나, cytokeratin은 합포체는 물론, 중간 영양모세포군과 세포영양모세포군들에서도 공히 강한 양성 반응을 나타내었다. 따라서 cytokeratin은 영양모세포군의 여러가지 형태를 검색하는데 좋은 표지자이므로, hCG, hPL등과 같은 다른 표지자가 국소적으로 양성 반응을 나타낼때 초기 임신진단에 사용될 수 있고, 비정상적인 착상 및 영양모세포 종양에서의 병리학적 연구에도 매우 도움이 될 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kurman RJ, Main CS, Chen HC. *Intermediate trophoblast: a distinctive form of trophoblast with specific morphological, biological and functional features. Placenta* 1984; 5: 349-70.
- 2) Kurman RJ, Young RH, Norris HJ, Main CS, Laurence MD, Scully RE. *Immunocytochemical localization of placental lactogen and chorionic gonadotropin in the normal placenta and trophoblastic tumors with emphasis on intermediate trophoblast and placental site trophoblastic tumor. Int J Gynecol Pathol* 1984; 3: 101-2.
- 3) Gosseye S, Fox H. *An immunohistochemical comparison of the secretory capacity of villous and extravillous trophoblast in the human placenta. Placenta* 1984; 5: 329-48.
- 4) Gau G, Chard T. *Location of the protein hormones of the placenta by the immunoperoxidase technique. Br J Obst Gynecol* 1976; 83: 876-8.
- 5) Watkins WB. *Use of immunocytochemical techniques for the localization of human placental lactogen. J Histochem Cytochem* 1978; 26: 288-92.
- 6) Earl U, Wells M, Bulmer JN. *Immunohistochemical characterization of trophoblast antigens and secretory products in ectopic tubal pregnancy. Int J Gynecol Pathol* 1986; 5: 132-42.
- 7) Heyderman E, Gibbons AR, Rosen SW. *Immunoperoxidase localization of human placental lactogen: A marker for the placental origin of the giant cells in syncytial endometritis of pregnancy. J Clin Pathol* 1981; 34: 303-7.
- 8) Bulmer JN, Billington WD, Johnson PM. *Immunohistologic identification of trophoblast populations in early human pregnancy with the use of monoclonal antibodies. Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 19-26.
- 9) Sunderland CA, Redman CWG, Strirrat GM. *Monoclonal antibodies to human syncytiotrophoblast. Immunology* 1981; 43: 541-6.
- 10) Bulmer JN, Johnson PM. *Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunobiological relevance. Placenta* 1985; 6: 127-40.
- 11) Daya D, Sabet L. *The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. Am J Clin Pathol* 1991; 95: 137-41.
- 12) Sasagawa M, Watanabe S, Ohmomo Y, Honma S, Kanazawa K, Takeuchi S. *Reactivity of Two Monoclonal Antibodies(Troma 1 & CAM 5.2) on human tissue sections: Analysis of their usefulness as a histological trophoblast marker in normal pregnancy and trophoblastic disease. Int J Gynecol Pathol* 1986; 5: 345-56.
- 13) Kurman RJ. *The morphology, biopsy, and pathology of intermediate trophoblast: A look back to the present. Hum Pathol* 1991; 22: 847-55.
- 14) O'connor DM, Kurman RJ. *Intermediate trophoblast in uterine curettages in the diagnosis of ectopic pregnancy. Obstet Gynecol* 1988; 72: 665-70.
- 15) Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF. *Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. J Clin Pathol* 1984; 37: 975-83.
- 16) Wynn RM. *Cytotrophoblastic specializations. An ultrastructural study of the human placenta. Am J Obstet Gynecol* 1972; 114: 339-55.
- 17) Hay DL. *Discordant and variable production of human chorionic gonadotropin and its free  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits in early pregnancy. J Clin Endocrinol & Metabol* 1985; 61: 1195-200.
- 18) Riddick DH, Kusmik WF. *Decidua. A possible source of amniotic fluid prolactin. Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 187-90.
- 19) Clark RK, Damjanov I. *Intermediate filaments of human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. Virchows Arch(Pathol Anat)* 1985; 407: 203-8.