

# 간세포암종의 진단에 Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions(AgNORs)의 적용

계명대학교 의과대학 병리학교실

윤 철 희 · 이 상 숙 · 장 은 숙

## Application of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions(AgNORs) in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma

Cheol Hee Yun, M.D., Sang Sook Lee, M.D. and Eun Sook Chang, M.D.

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine

Nucleolar organizer regions(NORs) are loops of DNA which transcribe to ribosomal RNA by RNA polymerase I. Since NOR-associated proteins are argyrophilic, silver staining method has been used for demonstration of AgNORs. The numbers and/or configurations of NORs may reflect the activities of cells in hyperplastic and neoplastic conditions.

To evaluate the applicability of AgNORs in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, the author had performed silver staining on the routinely processed, formalin-fixed, paraffin-embedded sections of 14 cases of normal liver(control), 23 cirrhotic liver, and 21 hepatocellular carcinoma.

The results are summarized as follows:

1) The mean number of AgNORs per nucleus(mAgNOR) of normal liver, cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma was  $1.45 \pm 0.07$ ,  $2.53 \pm 0.38$  and  $5.52 \pm 1.63$ , respectively. The difference of mAgNOR between normal and cirrhotic liver, and between cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma was statistically significant, respectively( $p < 0.01$ ).

2) The percentage of nuclei showing five or more AgNORs per nucleus(pAgNOR) was 0.07% in normal liver, 7.59% in cirrhotic liver, and 60.49% in hepatocellular carcinoma.

3) AgNORs in hepatocellular carcinoma were large, pleomorphic and irregularly clumped, in addition to increase of mAgNOR and high pAgNOR.

In conclusion, the increase of mAgNOR, high pAgNOR and large, irregular AgNORs are regarded as an additional helpful finding for the histopathological diagnosis of hepatocellular carcinoma. (Korean J Pathol 1993; 27: 553~560)

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma, mAgNOR, pAgNOR

### 서 론

종양의 증식력을 측정하는 것은 종양의 진단뿐만 아

접 수: 1993년 1월 30일, 게재승인: 1993년 8월 18일  
주 소: 대구시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-310  
계명대학교 의과대학 병리학교실, 윤철희

\*본 연구는 1993년도 계명대학교 울중연구비 및 동산의료원 조사연구비의 보조로 이루어짐.

니라 치료 및 예후 판정에 있어서 중요하다. 현재까지 여러 학자들에 의해 종양 세포의 증식 정도를 직접 또는 간접적으로 측정하는 방법이 연구되어 왔다. 즉 flow cytometry<sup>1)</sup>, autoradiograph<sup>2)</sup>, Ki-67 항체를 이용한 방법<sup>3)</sup> 및 bromodeoxyuridine을 사용한 방법<sup>4)</sup> 등이 있으나 여러 가지 기자재가 필요하고 높은 비용과 복잡한 과정이 수반된다는 단점이 있다. 최근에 nucleolar organizer regions(NORs)에 관련된 단백질의 은기호성(argyrophilia)을 이용하여 파라핀포매 조직 절편에 은염색을 실시함으로써 세포의 증식

능을 측정할 수 있다는 사실이 알려졌다<sup>3,6)</sup>.

NORs은 5개의 선단부 부착 염색체(acrocentric chromosome)의 단완에 존재하는 DNA 고리로서<sup>7)</sup>, 휴지기의 세포에서 핵소체에 존재하며 RNA polymerase I에 의해서 r-RNA를 전사(transcription)하여 핵소체에서 리보솜 구성 단백질 및 리보솜의 전구체를 생성한다. 은염색에 의해 핵에 나타나는 AgNORs(argyrophilic NORs)는 r-RNA에 의한 전사 능력을 간접적으로 나타내는 것이며, 악성종양에서 AgNORs의 모양이 불규칙해지고 면적이 증가한다는 사실이 보고되었다<sup>8)</sup>.

현재까지 여러 장기에 생긴 질환에서 AgNORs에 대한 연구가 이루어져 왔으나<sup>9~11)</sup>, 간 질환에 대한 AgNORs의 연구는 비교적 드물다<sup>12~14)</sup>. 특히 간경변증과 간세포암종을 병리학적으로 감별하기 어려운 경우 병리학적으로 이를 해결할 확실한 방법이 아직 정립되어 있지 않다. 이에 저자는 간질환에서 AgNORs의 수와 모양을 분석하여 간세포의 분열능을 간접적으로 측정함으로써 간경변증과 간세포암종의 진단에 있어 AgNORs의 응용 가치를 평가해 보고자 이 연구를 시행하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

1984년부터 1991년까지 계명대학교 동산의료원에서 절제되거나 생검 후 진단된 대조군(정상간) 14예, 간경변증 23예와 간세포암종 21예를 대상으로 하였다. 평균 연령은 대조군이 57.3세, 간경변증 44.2세, 간세포암종은 51.2세 였으며 남녀비는 대조군이 1.2:1, 간경변증이 1.9:1 그리고 간세포암종이 2.3:1로 남자가 많았다. 간세포암종 환자 21예중 4예에서 원격 전이가 생겼으며 5예에서  $\alpha$ -fetoprotein이 500 ng/ml 이상으로 증가되었다.

#### 2. 염색 방법

은염색은 Mourad등<sup>11)</sup>이 실시한 방법을 사용하였다. 포르말린에 고정시켜 통상적으로 처리되어 파라핀으로 포매된 간조직 블록을 4 $\mu$ m 두께로 잘라서 유리 슬라이드에 부착시킨 후 xylene과 100% 에탄올로 각각 5분간 처리하여 탈파라핀과 탈수를 하였다. 그후 에탄올과 초산을 3:1로 섞은 용액으로 5분간 후고정한 후 증류수에서 수세하였다. 조직 슬라이드를 은교질용액에 담구어 빛이 차단된 상태에서 45분간 반응시킨 후 증류수로 은교질용액을 철저히 세척하였다. 5% Sodium thiosulfate 용액으로 5분간 반응시킨 후 증류수로 다시 철저히 세척하였다. 이어서 70%, 95%, 100% 에탄올로 탈수한 후 봉입하였다. 은교질용액은 1% formic acid 용액에 gelatin을 2%가 되도록 용해시킨 용액과 50% silver nitrate 용액의 비율이 1:2

가 되도록 혼합하여 사용하였다.

### 3. 결과 판정

광학현미경으로 1000배 배율에서 관찰하였으며 조직 슬라이드에서 임의로 200개 이상의 세포를 선정하여 각 세포의 핵에 진한 갈색으로 염색된 AgNORs의 수를 세어 세포당 평균 AgNORs의 수(mAgNOR)로 표시하였고, Mourad등<sup>11)</sup>에 의해서 기술된 pAgNOR (AgNOR proliferative index), 즉 핵 1개당 AgNORs의 수가 5개 이상인 세포의 백분율을 구하였다. 그리고 각 간질환별로 AgNORs의 모양, 즉 크기 및 불규칙성을 비교하였다. 특히 간세포암종과 간경변증이 같은 조직절편내에 공존하는 경우에 각각의 병소 부위의 mAgNOR과 pAgNOR을 산출하고 또한 AgNORs의 모양과 크기를 비교 관찰하였다. 각 간질환의 mAgNOR을 통계학적으로 검정하기 위해서 student t-test를 시행하였다.

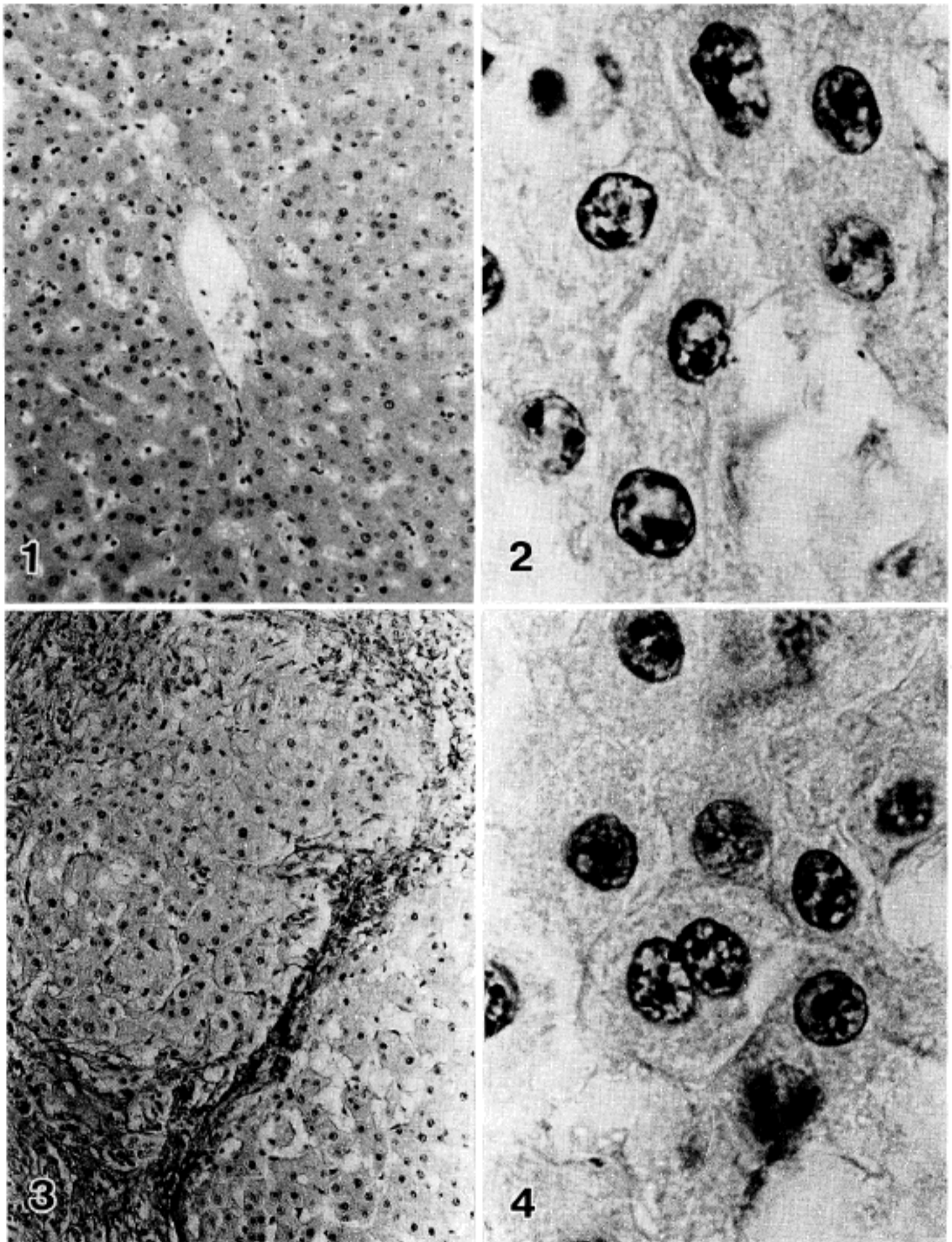
### 결 과

NORs은 은염색에 의해 정상 간세포의 핵에 경계가 뚜렷한 1개 또는 2개의 둥근 갈색 점으로 나타났으며 간혹 한 개의 핵소체 윤곽내에서 여러개의 작은 갈색 점이 관찰되었다(Fig. 1, 2). 간경변증 조직에서는 AgNORs의 수가 2~4개로 높았다(Fig. 3, 4). 간세포암종에서 은염색 결과 갈색 점이 4~7개로 많아 졌고, 이 갈색 점들이 모여 송이 모양을 만들거나 불규칙한 큰 덩어리를 형성하여 AgNORs의 면적의 현저한 증가를 알 수 있었다(Fig. 5~8). 간경변증과 간세포암종이 같은 조직절편내에 공존하는 예에서는 암세포의 핵에서 보이는 기괴하게 커진 AgNORs가 주변 간질 세포의 1~2개의 작고 둥근 AgNORs(Fig. 9, 10)나 간경변증조직의 간세포에서 보이는 2~4개의 둥근 AgNORs와 대조를 이루었다(Fig. 11, 12).

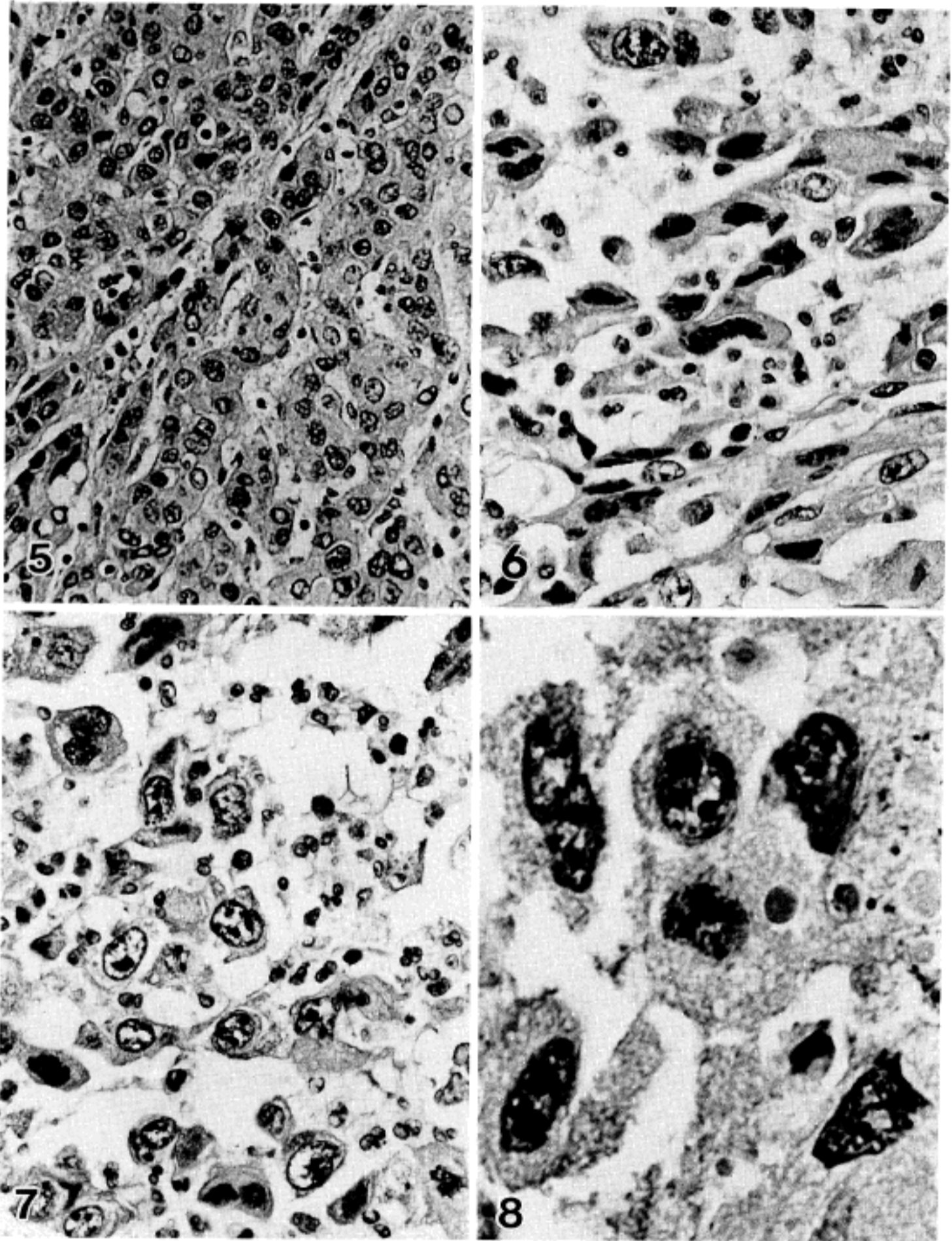
세포 한 개당 AgNORs의 평균수(mAgNOR)는 대조군에서는 1.45 $\pm$ 0.07, 간경변증에서는 2.53 $\pm$ 0.38인 반면, 간세포암종에서는 5.52 $\pm$ 1.63으로서 간경변증의 AgNORs의 수는 대조군에 비해 유의하게 높았고(p < 0.01), 간세포암종의 AgNORs는 간경변증에 비해 유의하게 높았다(p < 0.01). 또한 핵 1개당 AgNORs의 수가 5개 이상인 세포를 백분율로 나타내는 pAgNOR도 대조군에서는 0.07%, 간경변증에서는 7.59%인데 비해 간세포암종에서는 60.49%로 월등히 높았다(Table 1).

간경변증과 간세포암종이 같은 조직절편내에 공존하는 3예에서 mAgNOR이 각각 1.96과 5.10이었으며, pAgNOR은 3.7%와 58.4%으로 mAgNOR과 pAgNOR이 간경변증에서 보다 간세포암종에서 유의하게 높았다(Table 2).

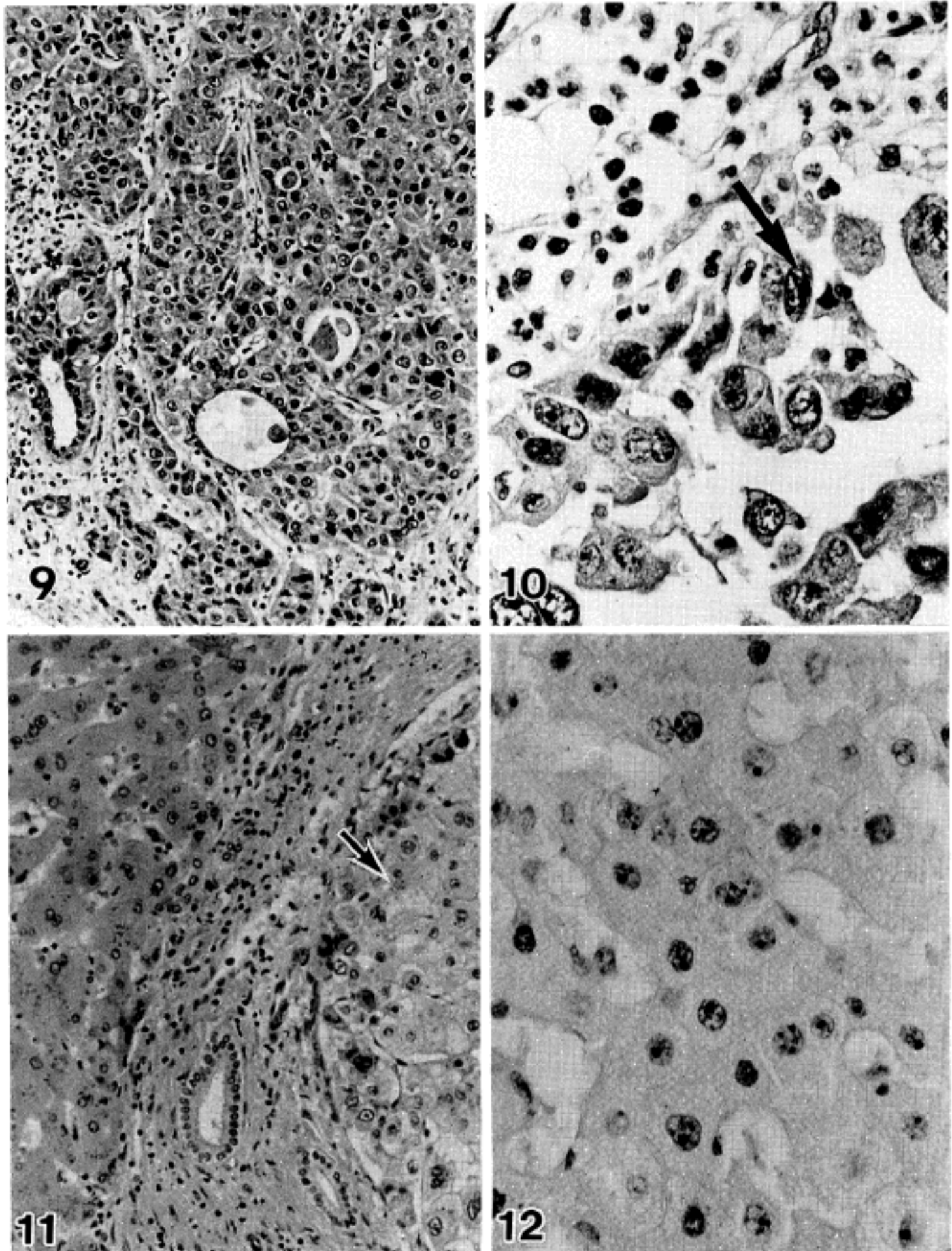
간세포암종중 원격 전이가 있었던 것은 모두 4예



**Fig. 1.** Normal liver showing plates of hepatic cells that radiate from the central vein toward the periphery.  
**Fig. 2.** Normal liver showing 1 or 2 AgNOR dots per nucleus of hepatocytes(Silver stain).  
**Fig. 3.** Cirrhotic liver showing two nodules enclosed within bands of mature fibrous tissue.  
**Fig. 4.** Cirrhotic liver showing 2~4 AgNOR dots per nucleus of hepatocytes(Silver stain).



**Fig. 5.** Hepatocellular carcinoma showing trabeculae of large, pleomorphic polyhedral tumor cells.  
**Fig. 6, 7 and 8.** Hepatocellular carcinoma showing multiple, irregular, AgNORs in the form of clusters of fine granules(Silver stain).



**Fig. 9.** Portion of hepatocellular carcinoma made up of trabeculae of well-differentiated hepatocytes with acinar formation.

**Fig. 10.** Tumor cells with large, irregular AgNORs(arrow), contrasted by small stromal cells in which one or two small, round AgNORs are found(Silver stain).

**Fig. 11.** Same case of Fig. 9, showing hepatocellular carcinoma(arrow), coexisting with cirrhotic liver.

**Fig. 12.** Portion of cirrhotic liver showing 2~4 AgNORs within one or each nucleus of hepatocytes. There is no AgNOR pleomorphism(Silver stain).

**Table 1.** AgNORs in normal, cirrhotic and carcinoma-tous livers

Cases(no)	mAgNOR(mean±SD)	pAgNOR(%)
Normal(14)	1.45±0.07	0.07
Cirrhosis(23)	2.53±0.38	7.59
Hepatocellular carcinoma(21)	5.52±1.63	60.49

(p-value <0.01)

**Table 2.** Comparison of mAgNOR and pAgNOR(%) in cases of hepatocellular carcinoma coexisting with liver cirrhosis

Case no.	mAgNOR(pAgNOR)	
	Cirrhosis	Hepatocellular carcinoma
1	1.82(1%)	6.17(85.5%)
2	2.17(6%)	5.57(67.8%)
3	1.90(4%)	3.55(22.0%)
Mean	1.96(3.7%)	5.10(58.4%)

(케 2예, 늑골 및 척추 각 1예)였으며, 원격 전이가 된 간세포암종의 mAgNOR은 5.73, pAgNOR은 73.9%였다. 또한 간세포암종중  $\alpha$ -fetoprotein이 500 ng/ml 이상으로 증가된 것은 5예였으며, 이들의 mAgNOR은 6.44, pAgNOR은 74.3%였다.

## 고 찰

NORs는 5개의 선단부 부착 염색체 즉 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 단완에 존재하는 DNA의 고리로서 r-RNA의 유전자를 갖는다. 이는 RNA polymerase I의 작용 하에 18s, 28s 및 5.8s의 r-RNA를 전사한다<sup>15,16</sup>. NORs에서 은교질용액으로 염색되는 부분은 은기호성의 NORs에 관련된 단백질로서 RNA polymerase I이거나 C<sub>23</sub> 단백질 또는 B<sub>23</sub> 단백질로 생각되며<sup>17</sup>, 이들의 기능은 r-RNA의 전사를 조절한다고 추측하고 있다. 이와같은 AgNORs의 특성을 이용해서 종양 세포의 증식능 및 악성도를 측정할 수 있다. 1987년 Crocker와 Skilbeck<sup>18</sup>의 악성 흑색종과 모반세포성 모반의 감별에 AgNORs를 이용하였으며, 그 외에도 여러 장기에서 생긴 양성과 악성종양의 감별에 AgNORs를 이용한 연구들이 보고되었다<sup>5-11</sup>.

1975년 Howell등<sup>19</sup> 및 Goodpasture와 Bloom<sup>20</sup>은 은염색으로 염색체에서 NORs의 존재를 확인하였다. 그후 세포 유전학자들 사이에서 이용되어 지다가

Howell과 Black<sup>21</sup>에 의해 빠르고 간편한 1단계 은염색이 개발되어 현재 사용되고 있다. AgNORs 염색은 비교적 간편하고 비용이 저렴하여 종양의 진단 및 예후 판정을 위한 임상적 응용이 가능하다.

간질환의 AgNORs에 관한 연구에서 정상 간조직과 간경변증 및 간세포암종 사이에서 AgNORs의 수치에 차이가 있음을 보고하였으며<sup>12</sup>, 이는 본 연구의 결과와 일치된다. 간경변증에서의 AgNORs의 수치의 증가는 재생 결절에서 생기는 세포 교체의 증가에 기인한다고 생각되며, Likovsky등<sup>13</sup>은 활동성 간경변증이 비활동성 간경변증에서 보다 AgNORs가 통계적으로 더 높은 수치임을 보고하였다. 간 이형성(dysplasia)<sup>12</sup>과 비정형선종성과형성(atypical adenomatous hyperplasia)<sup>14</sup>에서 AgNORs의 수치가 간경변증과 간세포암종의 중간으로 이들 병소가 간의 전암성 병변임을 제시하였다. AgNORs를 헤아리는 개인간의 오차는 1~5%라고 알려져 있으며<sup>5</sup>, 이러한 판독상의 문제점을 보완하고자 이 연구에서는 AgNORs의 수가 핵 한 개당 5개이상되는 핵분율(pAgNOR)을 구하여서 간세포암종에서 월등히 수치가 높음을 증명하였다. Mourad등<sup>11</sup>에 의하면 pAgNOR이 8%이상이면 이수성(aneuploidy)을 시사하고 이는 종양의 등급(grade)과 통계학적으로 상당한 관계가 있음을 입증하였다. 1989년 Sinn등<sup>22</sup>은 크고 기괴하게 생긴 AgNORs가 악성종양에서 많이 발견된다고 보고하였으며, Leek등<sup>23</sup>은 AgNORs의 수보다 오히려 AgNORs의 크기가 세포의 증식력과 지속적인 관계가 있음을 보고하였다. Giri등<sup>24</sup>에 의하면 휴지기나 비활동세포에서 AgNORs는 경계가 분명하고 핵의 중앙에 위치하지만, 악성종양세포에서는 핵소체의 윤곽이 불규칙해짐을 보고하였다. 이 연구에서 간세포암종의 AgNORs는 수가 많아질 뿐 아니라, 커지고 모양이 불규칙하고 다양해져 AgNORs의 면적의 증가를 알 수 있었다. 이런 AgNORs의 모양을 주변 정상세포와 간경변증에서 보이는 AgNORs와 비교해 볼때 더욱 분명한 대조를 이루었다. 일반적으로 암세포에서 핵이 커지고 핵의 모양이 불규칙적이고 다양해지듯이 핵소체도 역시 면적이 커질것으로 생각된다. 따라서 핵소체내의 AgNORs도 커지고 모양이 불규칙하고 다양해짐을 짐작할 수 있다. 그리고 간세포암종에서 혈청  $\alpha$ -fetoprotein이 500 ng/ml이상으로 증가된 5예와 원격 전이가 된 4예에서 AgNORs의 수치가 일반 간세포암종보다 더 높다는 사실은 간종양세포의 증식정도, 임상적 병기 및 악성도가 AgNORs의 수치와 밀접한 관계가 있다는 것을 강력하게 시사해 주고 있다. 임상적으로 간질환의 진단을 위해 세침, 생검이 많이 시행되므로 적은 양의 조직으로 간의 악성 질환을 진단할 때 AgNORs의 수, 크기 및 pAgNOR의 유용성이 높을 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과 간세포 핵의 mAgNOR과

pAgNOR의 수적 증가와 AgNORs의 불규칙적인 모양 및 커진 면적이 간세포암종을 진단하는데 유용한 보조 수단이 될 수 있을 것으로 생각되었다.

### 결 론

1984년부터 1991년까지 계명대학교 동산의료원에서 절제 또는 생검으로 이미 진단되어진 대조군(정상간) 14예, 간경변증 23예, 간세포암종 21예를 대상으로 AgNORs의 특성을 분석 비교하여 간세포암종을 진단할때 AgNORs의 응용 가치를 알고자 은염색을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 핵 한 개당 AgNORs의 평균수(mAgNOR)는 대조군에서  $1.45 \pm 0.07$ , 간경변증에서  $2.53 \pm 0.38$ , 간세포암종에서  $5.52 \pm 1.63$ 으로서 간세포암종에서 가장 많았으며 각 군간의 유의한 차이를 보였다( $p < 0.01$ ).

2) 핵 한 개당 AgNORs의 수가 5개 이상인 세포의 백분율로 나타내는 pAgNOR(AgNOR proliferative index)는 대조군에서 0.07%, 간경변증에서 7.59%, 간세포암종에서 60.49%로 간세포암종에서 가장 높았으며 각 군간의 유의한 차이를 보였다( $p < 0.01$ ).

3) 간세포암종에서 mAgNOR과 pAgNOR의 증가와 함께 AgNORs 모양이 매우 불규칙해지고 AgNORs의 크기가 커졌다. 원적 전이되었거나  $\alpha$ -fetoprotein이 500 ng/ml 이상인 간세포암종에서 mAgNOR과 pAgNOR이 더욱 증가되었다.

4) 간경변증과 간세포암종이 같은 조직 절편내에 공존하는 경우 간세포암종 부위가 간경변증 부위에서 보다 mAgNOR과 pAgNOR이 높았을 뿐만 아니라 AgNORs가 더 커지고 모양이 불규칙해졌다.

이상의 결과로 미루어 보아 간세포암종에서 은염색에 의한 mAgNOR과 pAgNOR의 증가 및 AgNORs의 불규칙적인 모양과 커진 면적이 병리조직학적으로 간세포암종을 진단하는데 유용한 보조 수단이 될 수 있다고 생각되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Barlogie B, Raber MN, Schumann J. *Flow cytometry in clinical cancer research. Cancer Res* 1983; 43: 3982-97.
- 2) George K, Harry WC. *Autoradiographic study of human nervous system tumors. Arch Pathol* 1965; 80: 38-42.
- 3) Hall PA, Crocker J, Watts A. *A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. Histopathology* 1988; 12: 373-81.
- 4) Lee SS, Lee TS, Park JS, Cho EK, Chung CH. *In vitro immunohistochemical localization of S-phase*

- cells by a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. J Kor Med Sci* 1989; 4: 193-202.
- 5) Smith R, Crocker J. *Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in breast malignancy. Histopathology* 1988; 12: 113-25.
- 6) Underwood JCE, Giri DD. *Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol* 1988; 155: 95-6.
- 7) Crocker J. *Nucleolar organizer regions, in Underwood JCE(ed), Current Topics in Pathology: Pathology of the Nucleus. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990; 91-150.*
- 8) 남혜주, 김동석, 최원희, 이태숙. 신경교종에서 핵소체 조성부의 의의. *영남의대 학술지* 1991; 8: 63-9.
- 9) Fallowfield ME, Dodson AR, Cook MG. *Nucleolar organizer regions in melanocytic dysplasia and melanoma. Histopathology* 1988; 13: 95-9.
- 10) Morgan DW, Crocker J, Watts A, Sheno PM. *Salivary gland tumours studied by means of the AgNOR technique. Histopathology* 1988; 13: 553-9.
- 11) Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, Shoukri M, Cox CE, Nicosia SV, Rowlands DT. *Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Cancer* 1992; 69: 1739-44.
- 12) Crocker J, McGovern J. *Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. J Clin Pathol* 1988; 41: 1044-48.
- 13) Likovsky Z, Fabian E, Smetana K. *Interphase nucleolus organizer regions visualized by silver reaction in human hepatocytes. Hepatogastroenterology* 1987; 34: 106-7.
- 14) Terasaki S, Terada T, Nakanuma Y, Nonomura A, Unoura M, Kobayashi K. *Argyrophilic nucleolar organizer regions and alpha-fetoprotein in adenomatous hyperplasia in human cirrhotic livers. Am J Clin Pathol* 1991; 95: 850-7.
- 15) Williams MA, Kleinschmidt JA, Krohne G, Franker WW. *Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of Xenopus laevis oocytes identified by gel electrophoresis. Exp Cell Res* 1982; 137: 341-51.
- 16) Derenzini M, Hernandez-Verden D, Pession A, Novello F. *Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. J Ultrastruct Res* 1983; 84: 161-72.
- 17) Lischwe MA, Snetana K, Olson MOH, Busch H. *Protein C<sub>23</sub> and B<sub>23</sub> are the major silver staining proteins. Life Sci* 1979; 25: 701-8.
- 18) Crocker J, Skilbeck N. *Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. J Clin Pathol* 1987; 40: 885-9.
- 19) Howell WM, Denton TE, Diamond JR. *Differential staining of the satellite regions of acrocentric chro-*

- mosomes. Experimentia* 1975; 31: 260-2.
- 20) Goodpasture C, Bloom SE. *Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma* 1975; 53: 37-50.
- 21) Howell WM, Black DA. *Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. Experimentia* 1980; 36: 1014-15.
- 22) Sinn HP, Lehnert TH, Kandetzki C, Waldherr R. *Nucleolar organizer regions in myogenic stromal tumors of the stomach. Virchows Arch [A]* 1989; 415: 317-21.
- 23) Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. *Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. J Pathol* 1991; 165: 43-51.
- 24) Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, Dundas SAC, Underwood JCE. *Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesion: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. J Pathol* 1989; 157: 307-13.
-