

신경교종에서의 형질 전환 성장인자- α (TGF- α)와 증식세포핵 항원(PCNA)의 발현

고신대학 의학부 병리학교실, 마산 고려병원* 및 메리놀병원* 해부병리과

이경신 · 김병현* · 천봉권[†] · 허만하

Expression of Transforming Growth Factor- α and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Human Gliomas

Gyeong Sin Lee, M.D., Byung Hyun Kim, M.D.*, Bong Kwon Chun, M.D.* and Man Ha Huh, M.D.

Department of Pathology, Kosin Medical College, Masan Koryo General Hospital* and Maryknoll Hospital[†]

To evaluate the expression of transforming growth factor- α (TGF- α) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and its relation to the differentiation of the tumors, immunohistochemical studies were performed in 49 human gliomas. Tumors were graded by a 3-grade-system; grade I=low grade glioma, grade II=anaplastic glioma, grade III=glioblastoma multiforme. TGF- α and PCNA were predominantly expressed in malignant gliomas compared with benign gliomas. Malignant gliomas revealed 87% TGF- α reactivity, while benign gliomas revealed 26% TGF- α reactivity. The proliferation index with PCNA was 26% \pm 27%(mean \pm standard deviation) in malignant gliomas and 5% \pm 9% in benign gliomas. A strong positive correlation between tumor grade and extent of TGF- α and PCNA expression was found(P<0.0001, Chi square and P<0.002, T-test). Synchronous expression of TGF- α and PCNA was observed in 16 cases(33%).

The results of this study support the suggestion that the expression of TGF- α might be a useful prognostic indicator in human gliomas. (Korean J Pathol 1994; 28: 149~153)

Key Words: TGF- α , PCNA, Gliomas, Immunohistochemistry

서 론

형질전환 성장인자- α (Transforming growth factor- α , TGF- α)는 배조직 및 몇몇 정상조직 그리고 다양한 종양에서 인지되어지는 것으로 알려져 있고, 아마도 세포의 종양성 전환 뿐만아니라 정상적인 생리학적 기능에도 관여하는 것으로 보고되고 있다^{1,2)}. 하지만, 주로 병리학적 관심의 대상이 되는 부분은 종양성 전환에 관여하는 TGF- α 의 역할이다. 악성 종양에서의 TGF- α 표현에 관한 연구는 간세포암³⁾을 포함하여 난소암⁴⁾, 폐선암⁵⁾, 위암⁶⁾, 갑상선암⁷⁾등에서 보고된 바

있으나 다른 악성종양에 관한 지견은 접하기 힘들다. 그러나, 최근 뇌의 신경교종을 대상으로 면역조직화학적 방법을 이용한 Samuel등(1989)⁸⁾ 및 Schlegel등(1990)⁹⁾의 보고가 있으며, 이 보고들은 TGF- α 가 정상 뇌조직보다는 종양조직에서, 양성보다는 악성종양에서 더 강한 양성반응을 보인다는 성적을 제시하고 있다^{2,9)}. 하지만 추가적인 검증이 아직 이루어져 있지 않고 있다.

이에 저자들은 신경교종의 분화도와 TGF- α 의 표현양상과의 관련성을 밝히는 일이 필요하다고 생각되어 본 연구를 시행하였다. 또한 증식세포 핵항원(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)은 증식세포 내에 존재하는 DNA polymerase의 보조 핵단백질로서 세포주기중 주로 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성된다⁹⁾. 따라서 악성 종양의 분화도와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되는 PCNA의 표현은 상대적으로 종양 악성도의 객관적인 지표가 될 가능성이 있을 것으로 사료되나, 신경 교종을 대상으로 TGF- α 와

접 수:1993년 7월 5일, 게재승인:1993년 9월 13일
주 소:부산시 서구 암남동 34번지, 우편번호 602-030
고신의료원 해부병리과, 이경신

*본 연구는 고신대학 의학부 기초의학 연구소의 연구비 일부를 지원 받았음.

PCNA의 발현을 함께 연구한 문헌은 아직 접할 수 없다. 이에 저자들은 세포증식의 지수로 사용되어 질 수 있는 PCNA에 대한 면역조직화학적 방법을 동일한 종양조직에 시행함으로써 종양의 잠재적인 증식능과 TGF- α 와의 관련을 비교검색하여 보았다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

1986년 1월부터 1993년 3월까지 고신 의료원, 마산 고려병원 및 메리놀 병원 해부병리과에서 신경교종으로 진단된 49예의 파라핀 포매조직을 연구재료로 하였다. 연구대상 49예중 남자 33명, 여자 16명으로 남녀비는 2:1이었다. 환자의 연령은 6세에서 72세까지 분포하였으며 평균연령은 37세이었다. 발생부위는 대뇌 36예, 소뇌 4예, 제 4 뇌실 5예, 외측 뇌실 1예, 소뇌교 1예였다.

2. 연구 방법

1) 병리조직학적 검색: 광학 현미경적 검색을 위하여는 10% 중성 완화 포르말린에 고정, 파라핀에 포매된 블록을 이용하였다. Hematoxylin-eosin 염색과 필요에 따라서는 GFAP 염색도 시행하여 검경하였다. 49예에 대한 광학 현미경적 재검색에서 세포 밀도, 종양세포핵의 이형성, 혈관신생, 괴사 및 유사분열의 수를 고려하면서 Burger의 등급단계¹⁰⁾에 따라서 grade I=분화형 신경교종(low grade glioma), grade II=역형성 신경교종(anaplastic glioma), grade III=다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme)으로 재분류하였다(이 및 허의 2인).

2) 면역조직화학적 염색: 조직 보존상태가 양호하면서도 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 파라핀 포매블록 하나를 선택하여, 단일 클론항체(TGF- α , Oncogen, PCNA, Dako)를 이용하여 avidin-biotin peroxidase complex(ABC)¹¹⁾법으로 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 이미 선택된 파라핀 포매 블록을 4~5 μ m의 두께로 박절하고, 60°C 이하의 온도에서 건조시킨 후 xylene에서 탈파라핀 과정을 거친 다음 100%, 90%, 80%, 70% 에탄올의 순서대로 1분씩 방치하여 합수시켰고, 흐르는 수돗물에 수세하였다. 이들을 메탄올-과산화수소용액(100% methanol 200 ml+30% H₂O₂ 5 ml)에 2분간 처치하여 세포내의 내인성 과산화효소의 활성화를 저지시킨 다음 인산완충용액(PBS)으로 3회 수세하였다. 비특이적인 배경염색을 방지하기 위하여 정상산양혈청을 가한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 일차항체를 도포하여 40분간 방치한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. 이차항체를 20분간 처치한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. Peroxidase labelled streptavidin을 20분간 도

포하여 표시한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. 기질인 H₂O₂-aminoethyl carbazole용액을 도포 후 20분동안 처치한 후 인산완충용액으로 3회 수세하였다. Mayer's hematoxylin으로 1분동안 처치하여 대조염색한 후 인산완충용액과 흐르는 수돗물로 수세하였다. Geltol 봉입제로 덮개유리를 유리 슬라이드에 부착시켰다. 음성 대조로는 정상 뇌조직을 사용하였다.

3) 면역조직화학적 염색의 결과판정: 저배율에서 염색양상이 국소적인지 미만성인지를 관찰하고, 고배율에서 각각의 표지자가 세포의 어느 부위에서 양성으로 나타나는지를 관찰하였다. TGF- α 에 대한 염색결과 판정은 염색상이 전혀없는 것을 음성(-), 다소 연한 갈색으로 관찰되는 것을 약양성(+), 진한 갈색으로 관찰되는 것을 강양성(++)으로 판정하였고, 이런 염색 정도와 염색된 종양세포의 비율을 종합하여 준정량적으로 파악하기 위하여 다음과 같은 점수제를 적용하였다. 0(-, 1% 이하의 양성세포율), 1(+, 1~70%의 양성세포율), 2(++ , 70%이상의 양성세포율)로 표시하였다. PCNA에 대한 염색결과는 각각의 종양 중 염색이 잘 된 부위에서 최소한 3군데의 현미경적 시야를 임의로 정하여 매 시야당 100개의 세포를 검색하여 표식지수를 이용하여 판정하였다. 표식지수(labeling index)는 전체 종양세포수에 대한 염색된 세포수를 퍼센트로 나타낸 것으로 정의하였다.

결 과

1. 병리조직학적 소견

기왕에 신경교종으로 진단되었던 49예의 재검색에서 grade I이 19예(분화형 성상교세포종 10, 혼합교종 3, 상의세포종 4, 피지교종 2), grade II가 16예(역형성 성상교세포종 15, 역형성 맥락막종 유두종 1), grade III가 14예(다형성 교모세포종 14)로 분류하였다.

2. 면역조직화학적 검색

1) TGF- α 의 발현양상: 일반적으로 종양세포의 세포질에서 양성반응을 보였으며(Fig. 1a, 1b), 음성대조로 사용한 정상 뇌조직에서는 반응을 보이지 않았다. 총 49예중 31예(63%)에서 양성반응을 나타내었으며, 양성 신경교종에서는 5예(26%), 악성 신경교종에서는 26예(87%) [역형성 신경교종; 14예(88%), 다형성 교모세포종; 12예(86%)]에서 양성반응을 보였다(Table 1). 이런 성적을 통계학적으로 검정한 결과, TGF- α 의 발현양상과 종양의 조직학적 분화도 사이의 연관성은 매우 유의한 것으로 판정되었다(P<0.0001, Chi square).

2) PCNA의 발현양상: 음성 대조로 사용한 정상 뇌조직은 염색되지 않았다. 거의 대부분이 세포핵에

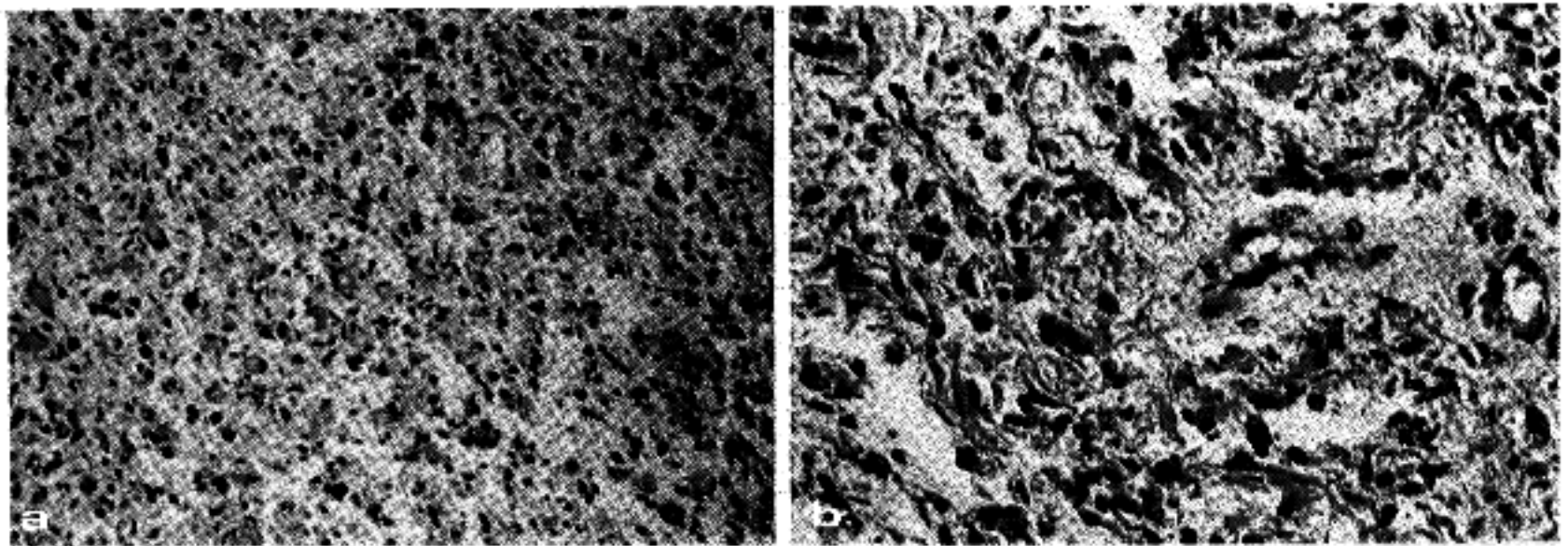


Fig. 1. Immunohistochemical stainings of human gliomas for transforming growth factor- α . a: Anaplastic astrocytoma, Intense cytoplasmic staining of the many tumor cells is seen. Cell nuclei are visualized by counterstaining with hematoxylin. b: Glioblastoma multiforme, Intense cytoplasmic staining of fibrillary astrocytic cells.

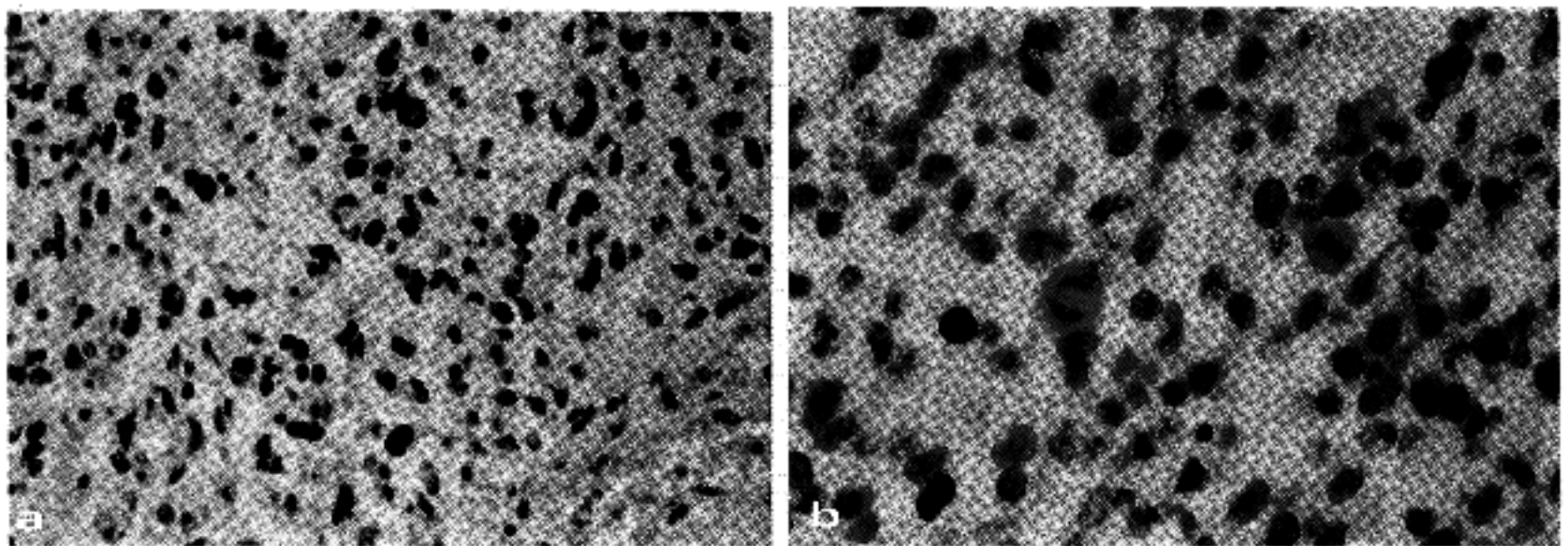


Fig. 2. Immunohistochemical stainings of human gliomas for proliferating cell nuclear antigen. a: Anaplastic astrocytoma, Positive reaction in the nuclei of tumor cells. b: Glioblastoma multiforme, Strong positive reaction in the nuclei of many tumor cells. Two mitotic cells show diffuse staining throughout the cells.

Table 1. The distribution of the TGF- α staining score in the three grades of gliomas

Staining score	Grade I	Grade II	Grade III	Total
0	14	2	2	18
1	3	6	6	15
2	2	8	6	16
Total	19	16	14	49

국한 되어 염색되었으며(Fig. 3a, 3b.), 유사분열 세포에서는 세포전체에 걸쳐 미강점으로 염색되었는데

(Fig. 3b.), 이는 유사분열중의 핵막 소실 때문으로 생각된다. 총 49예중, 양성 신경교종에서는 5%(0~50%), 양성 신경교종에서는 26%(0~97%)[역형성 신경교종; 11%(0~70%), 다형성 교모세포종; 43%(0~97%)]의 표식지수를 보였다. 양성에 대한 악성종양의 증식세포 핵항원 표식지수를 통계학적으로 점정한 결과 매우 유의한 것으로 판정되었다($P < 0.002$, T-test).

3) 한 종양에서 TGF- α 와 PCNA가 동시에 발현된 경우는 총 49예중 16예(33%)였으며, 동시에 발현되지 않은 경우는 12예(25%)였다. TGF- α 및 PCNA 발현양상 사이의 선형적인 연관성(linear association)은 유의하지 못한 것으로 판정되었다($P < 0.2$, Chi-square).

고 찰

TGF- α 는 50여개의 아미노산으로 구성되어 있는 저분자량의 폴리 펩티드(polypeptide)로서^{1,2,8,12)}, 육종 바이러스에 의하여 변형된 세포에서 처음으로 분리된 후¹²⁾, 그 생물학적 의의에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. TGF- α 는 비종양성 시상하부, 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선 및 부신등에서 생화학적으로 인정되며¹⁾, 이런 조직의 양성 및 악성종양 그리고 간, 난소, 폐 및 위의 악성 종양에서도 관찰되는 것으로 보고되었다^{1,3-6)}. 아마도 TGF- α 는 정상세포가 악성으로 전환될 때 분비되며, 종양세포에서도 생성, 분비되어 주위 정상세포의 종양성 전환에 영향을 미치고 주위 종양세포들에는 성장을 자극하는 효과가 있을 것으로 추측되고 있다^{2,8)}. 이러한 성장인자의 분비는 전환과정중의 세포변화에 의한 것이라기 보다는 발암 유전자 활성화의 결과로 생각되어지고 있고, 이러한 발암 유전자와 다른 폴리 펩티드 성장인자들과의 연관성은 이미 밝혀진 바 있다²⁾. 또 다른 연구자들의 배양된 종양세포주를 이용한 실험적인 연구결과, TGF- α 의 발현과 종양성 전환사이에 밀접한 연관성이 있다는 사실이 이미 보고되어 있다¹³⁻¹⁵⁾. Lieberman과 그 공동연구자들은 대부분의 악성 신경교종 세포주에서 4.6 Kb TGF- α mRNA가 표현된다고 밝히고 있으며, 이는 정상 뇌조직 또는 양성종양에서는 관찰되지 않는다고 하였다²⁾. 이런 연구 결과들은 TGF- α 와 세포의 종양성 전환사이에 명확한 연관성이 있다는 사실을 암시해 주고 있다. 하지만 어떤 연구자들에 의하면 TGF- α 는 다양한 정상세포계, 특히 상피세포와 표피 각화세포에서 생성되는 인자이고, 그래서 상피 성장인자 수용체와의 리간드(ligand)로 생각되어야 하며, 더이상 TGF- α 를 특이한 종양 성장인자로 생각해서는 안된다고 주장하고 있다¹⁵⁾. 또한 이 연구자들은 피부의 양성 증식 및 선택적인 악성종양에서 TGF- α 가 발현되는 이유는 protein kinase C 경로의 활성화에 의한 것이라고 설명하고 있다¹⁵⁾. 이와같이 최근 TGF- α 에 대한 많은 연구가 시행되고 있으며, 그 결과에 따르는 여러가지 주장과 가설이 발표되고 있다. 그러나, 최근 사람의 신경교종을 대상으로 TGF- α 에 대한 면역조직화학적 방법을 시행한 Samuel등(1989)²⁾ 및 Schlegel등(1990)⁸⁾의 보고가 있으며, 이 보고들은 종양의 분화도와 TGF- α 사이에 분명한 연관성이 있다는 견해를 제시하고 있다^{2,8)}.

이에 저자들은 이 분야에 관한 추가적인 검정이 필요하다고 사료되어 49예의 신경교종을 대상으로 TGF- α 에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 결과 양성 신경교종에서는 26%, 악성 신경교종에서는 87%(역형성 신경교종; 88%, 다형성 교모 세포종; 86%)의 발현빈도를 보였으며, 양성에 대한 악성 종양에

서의 발현빈도를 통계학적으로 검정한 결과 매우 유의한 것으로 판정되었다($P < 0.0001$, Chi-square). 아울러 Samuel등은 양성 신경교종 13%, 역형성 신경교종 85%, 다형성 교모세포종에서 76%의 발현빈도를, Schlegel등은 양성 신경교종 32%, 역형성 신경교종 79%, 다형성 교모세포종에서 92%의 발현빈도를 보고 하였으며^{2,8)}, 이런 결과들은 그 발현빈도 조사에 있어서 본 연구 결과와 거의 동일하였다. 그러나, 이들은 신경교종의 조직학적 분화도와 TGF- α 발현양상과의 관계를 조사하였을 뿐, 종양조직의 세포증식능과의 관련성에 관한 연구는 시행하지 않았다. 최근 암세포의 악성도 및 예후판정에 증식 관련항원이 이용되어 증식 동태의 검토가 이루어지고 있는 바, 그 가운데서도 PCNA는 DNA polymerase의 보조 핵단백질로서 세포주기중 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐 합성되며, DNA 합성에 중요한 역할을 하므로 많은 연구들이 이루어지고 있다^{9,16)}. 이와 함께 BrdU과 Ki67도 주목의 대상이 되고 있는 것으로 알려져 있다. 이번 연구에서는 신경교종에서의 PCNA 발현빈도 및 TGF- α 발현과의 관련성을 밝히기위해 49예의 동일한 종양조직에 대하여 PCNA의 발현상태를 면역조직화학적으로 검색하였다. 세포증식을 평가하기 위해 사용되는 면역조직화학적 방법은 다른 방법에 비하여 세포와 조직의 구조가 비교적 잘 유지되고, 방법이 간단하다는 장점을 가지고 있다⁹⁾는 사실이 본 연구에서도 활용된 셈이다. 본 연구의 PCNA 표식지수는 양성 신경교종에서는 5%(0~50%), 악성 신경교종에서는 26%(0~97%) [역형성 신경교종; 11%(0~70%) 다형성 교모세포종; 43%(0~97%)]로 나타났으며 양성에 대한 악성 종양의 표식지수를 통계적으로 검정한 결과 매우 유의한 것으로 판정되었다($P < 0.002$, T-test). 그렇지만, TGF- α 와 PCNA 사이에 선형적인 연관성(linear association)은 유의하지 않았다($P < 0.2$, Chi square).

하지만 Samuel등(1989)²⁾ 및 Schlegel등(1990)⁸⁾의 보고와 함께 저자들이 TGF- α 를 이용하여 시행한 연구결과 양성 신경교종보다는 악성에서 분명히 더 강한 염색반응을 보였고, 그래서 TGF- α 의 발현양상을 이용하여 양성 및 악성 신경교종을 분리하는 것이 가능하다는 견해가 타당성을 가지는 것으로 사료되며, 이러한 가능성은 최근 이들 폴리펩티드에 대하여 알려져 있는 생물학 및 생리학적 정보에 의하여 지지될 수 있다²⁾. 어떤 연구자들은 TGF- α 를 맥관형성 성장인자와 연관시키기도 하는데²⁾, 이런 혈관 내피세포의 증식은 악성 신경교종의 중요한 조직학적 특징중 하나이므로 종양의 조직학적 분화도와 관련성을 암시하는 소견이라 볼 수 있다. 통상 조직학적으로 양성 신경교종으로 진단된 환자는 악성 신경교종 환자보다 훨씬 더 좋은 예후를 가지는 것으로 알려져 있고 종양의 조직학적 분화도와 TGF- α 의 발현양상 사이에 분명한 연관성이 있는 것으로 미루어 신경교종에서 TGF- α 의

발현양상이 유용한 예후 측정인자가 될 수 있을 것으로 사료되며, 신경교종의 병리발생에도 시사하는 바가 있을 것으로 생각되나 앞으로 이 분야에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것 같다.

결 론

저자들은 TGF- α 의 발현양상과 종양의 조직학적 분화도 사이의 관련성을 밝히기 위하여 총 49예의 신경교종을 Burger의 등급단계¹⁰⁾에 따라 조직학적으로 분류하고, 통상적인 ABC방법에 의하여 TGF- α 와 PCNA에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. 그 결과 TGF- α 는 양성 신경교종에서는 26%의, 악성 신경교종에서는 87%의 발현빈도를 나타내었고, 이런 성적은 통계학적으로 매우 유의하다고 판정되었다. 또한 PCNA 표식지수는 양성 신경교종에서는 5%(0~50%), 악성 신경교종에서는 26%(0~97%)였고, 매우 유의한 성적으로 판정되었다. 이와 같이 종양의 조직학적 분화도와 TGF- α 및 PCNA의 발현빈도 사이에는 분명한 연관성이 있고, 이런 성적은 신경교종의 병리발생에도 시사하는 바가 있을 것으로 생각되고, 아울러 임상적으로도 TGF- α 의 발현양상이 신경교종에서의 예후 결정에 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Driman DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Asa SL. Transforming growth factor- α in normal and neoplastic human endocrine tissues. *Human Pathology* 1992; 23: 1360-5.
- 2) Samuels V, Barrett JM, Bockman S, Pantazis CG, Aen JR MB. Immunocytochemical study of transforming growth factor- α expression in benign and malignant gliomas. *Am J Pathol* 1989; 134: 895-902.
- 3) Hsia CC, Axiocitis CA, Di Bisceglie AM, Tabor E. Transforming growth factor- α in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* 1992; 70: 1049-56.
- 4) Bauknecht T. Clinical significance of oncogenes and growth factors in ovarian carcinoma. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1990; 37(6): 855-62.
- 5) Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Research* 1990; 50(21): 7077-80.
- 6) Yamamoto T, Hattori T, Tahara E. Interaction between transforming growth factor- α and c-Ha-ras p21 in progression of human gastric carcinoma. *Pathology, Research and practice* 1988; 183(6): 663-9.
- 7) Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, Spandidos DA. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in thyroid tumor. *In vivo* 1992; 6(3): 291-6.
- 8) Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, Furneaux HM. Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene* 1990; 5: 1839-42.
- 9) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Waseem NH, Sane DP. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immuno-localization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *Journal of Pathology* 1990; 162: 285-94.
- 10) Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FS. *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. New York, Churchill Livingstone 1991; 3rd ed: 196.
- 11) Hsu SM. The use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 553-60.
- 12) De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 75: 4001-5.
- 13) Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factor α and β and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Research* 1987; 47: 707-712.
- 14) Nister M, Libermann TA, Betsholtz C, Pettersson M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Schlessinger J, Westermark B. Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- α and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer Research* 1988; 48: 3910-8.
- 15) Derynck R, Lindquist PB, Bringman TS, Wilcox Jn, Elder JT, Fisher GL, Voorhees JJ, Moses HL, Pittelkow MR, Coffey RJ. Expression of the transforming growth factor- α gene in tumor cells and normal cells. *Cancer Cell 7/Molecular diagnostics of human cancer* 1989; 297-301.
- 16) Motohiko M, Kovach JS, Kelly PJ, Yanagihara T. Transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor, and proliferating potential in benign and malignant gliomas. *J Neurosurg* 1991; 75: 97-102.