

방광이행세포암에서 PCNA 및 AgNORs 발현양상

동아대학교 의과대학 병리학교실

박병곤 · 이상용 · 노미숙 · 나서희 · 홍숙희

PCNA Labelling index and AgNORs of Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder

Byung Gon Park, M.D., Sang Yong Lee, M.D., Mee Sook Roh, M.D.,
Seo Hee Rha, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.

Department of Pathology, Dong-A University School of Medicine

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA, PC10), an auxillary protein of DNA polymerase, plays a main role in the early stage of DNA synthesis and is synthesized from G1 phase to S phase of the cell cycle.

Nucleolar Organizer regions (NORs) are DNA loops encoding ribosomal RNA proteins (AgNORs).

To evaluate correlation with PCNA labelling index (LI) and AgNORs according to histological grades and clinical stages of transitional cell carcinoma of the urinary bladder, the authors analysed 54 transitional cell carcinoma using immunohistochemical stain for PCNA and silver stain for AgNORs in paraffin sections.

The comparison of PCNA (PC10) LI and clinical stage showed a significant correlation ($p < 0.05$), where as PCNA (PC10) LI according to histologic grade showed no significant correlation. High grade tumors showed increase PCNA LI.

Superficial tumors (Ta-T1) showed significantly lower PCNA LI than muscle invasive tumors (T₂-T₃) ($p < 0.05$).

There was no significant correlation between AgNORs and clinical stage, bur higher stage and higher grade tumors showed increased noubers of AgNORs.

These results suggest that PCNA LI has a significant correlation with clinical stages of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. (**Korean J Pathol 1994; 28: 469~477**)

Key Words: PCNA, Transitional cell carcinoma, AgNORs

서 론

사람의 방광에 발생하는 이행세포암은 대부분이 악성종양으로서 그 예후는 주로 조직학적 분화도와 처음 진단시의 병기에 따라 결정되며 또한 분화도와 병기 사이에는 밀접한 상관관계가 있다^{1,2)}.

악성종양에서 세포증식능은 중요한 예후인자로 알려져 있으며¹⁻³⁾ 세포증식능에 대한 측정방법 중 최근 유세포측정기에 의한 합성기 세포 분획, 면역조직화학적 염색, 그리고 은염색에 의한 Nucleolar Organizer Regions(NORs) 수 등이 많이 이용되고 있으며, 이들간의 상관관계를 규명하려는 연구들이 행해지고 있다⁸⁻¹²⁾.

이중 유세포측정기에서 얻어진 DNA 배수체는 세포증식능과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다^{2,13-24)}. 면역조직화학적 방법에 의한 세포 증식능의 검사는 최근 세포분열시 나타나는 표지자 중 prolife-

접 수: 1994년 1월 14일, 게재승인: 1994년 4월 6일
주 소: 부산시 서구 동대신동 3가 1, 우편번호 602-103
동아대학교 의과대학 병리학교실, 박병곤

rating cell nuclear antigen(PCNA)과 Ki-67 등에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 염색방법이 많이 이용되고 있으며, 이 방법은 종양조직의 구조가 유지되며 개개의 증식 세포를 볼 수 있고, 직접 그 정도를 헤아릴 수 있어 유세포측정기에 의한 합성기 세포 분획 측정법보다 유리하다^{1,2)}.

PCNA는 전신성 홍반성 낭창 환자의 혈청에서 발견되는 자가항체로서²⁵⁾ 36 KDa의 분자량을 가진 nuclear polypeptide인 DNA polymerase delta에 대한 보조 단백질로서²⁶⁾ DNA 합성초기에 중요한 역할을 하며, 세포주기중 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐서 합성된다²⁵⁻²⁷⁾. PCNA를 이용한 면역조직화학적 염색 방법은 세포증식에 따른 핵의 증식으로 생기는 핵 항원을 단클론 항체를 이용하여 검출하는 것으로 파라핀 포매조직에서 검출할 수 있다는 장점이 있어 많이 활용되고 있다.

NORs는 ribosomal RNA gene을 가진 DNA 고리에 해당되며, AgNORs 수는 구성하는 단백질의 은호기성 때문에 은 염색후 검은 점으로 나타나므로 용이하게 관찰할 수 있는데^{28,29)}, 종양세포에서 세포증식도와 비례한다하며 최근 연구에 의하면 PCNA와 AgNORs 수 사이에는 상관관계가 있다는 보고들이 있다^{11,12,30,31)}.

저자들은 방광이행세포암에서 종양세포의 증식 정도를 관찰하기 위해 PCNA 표지수와 AgNORs 수를 측정하고 현재 방광암의 예후인자로 알려진 조직학적 분화도 및 병기와 이들의 상관관계를 알아보고 또 이들이 방광이행세포암의 예후인자 지표로 이용할 수 있는지를 알아보고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재료

연구재료로는 1990년 3월부터 1993년 3월까지 3년간 동아대학교 부속병원에서 방광이행세포암으로 진단된 조직표본중에서 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토한 후 전체병변을 대표할 수 있고 파라핀과의 보관상태가 양호한 54예를 대상으로 하였다. 54예 중 전적출된 방광이 15예, 부분적출된 방광조직이 2예, 및 경요도 절제된 방광조직 37예를 대상으로 임상기록을 재검토하였으며, 병리학적 검색은 종양의 병기 및 조직학적 분화도를 관찰하였다.

2. 염색방법

1) **면역조직화학적 염색:** 파라핀 포매괴를 3 μ m 두께로 잘라 크실렌에서 탈파라핀 한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 순서대로 1 분씩 합수시키고 증류수에 수세한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하였다. 1:50으로 희석한 PCNA 단

클론 항체(PCI10, Dako, Denmark)를 도포하여 실온에서 2시간 동안 방치시킨 후 PBS로 세척하고 조직 주위의 과다한 완충액은 닦아 내었다. Anti-mouse biotinylated IgG 2차 항체를 도포하여 30분간 방치하고 PBS로 세척한 후 avidin-biotin-peroxidase를 도포하여 실온에서 30분간 방치시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 발색제 aminoethylcarbazole(AEC)를 도포하였다. Mayer hematoxylin에 3분간 대조 염색 후 crystal mount로 봉입하여 현미경으로 검정하였다.

2) **도은 염색:** 파라핀 포매괴를 2~3 μ m 두께로 조직절편을 만들어 크실렌에 탈파라핀한 후 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 순서대로 1분씩 방치하여 합수시키고 증류수로 수세하였다. 50% silver nitrate와 2% gelatin 용액을 2:1로 섞어 만든 은용액에 실온에서 45분간 반응시킨 다음 증류수에 세척한 후 95%, 95%, 100% 에탄올에 탈수하여 크실렌에 2단계로 청명한 다음 봉입제로 봉입하여 현미경으로 검정하였다.

3. 병리학적 검색

1) **면역조직화학적 검색:** 결과의 판정은 염색된 각 종양조직을 광학 현미경의 400배 시야로 관찰하여 핵에 적갈색의 과립이 있을 때 PCNA 발현 세포로 판독하였으며, 반응의 강도가 가장 낮은 부위에서부터 가장 높은 부위까지 4장의 사진을 찍어 각부위에서 종양세포수를 250개씩 헤아리고 이중에 반응의 강도에 관계없이 양성으로 나타난 종양세포수를 헤아려 이들을 합산하여 총 1000개의 종양세포 중 PCNA 양성 세포수를 구하여 다음과 같이 PCNA 표지수(%)를 구하였다.

$$\text{PCNA 표지수(}\%) = \frac{\text{양성으로 나타난 종양세포 수}}{\text{헤아린 전체 종양세포 수}} \times 100$$

2) **도은 염색의 검색:** 판정은 각 종양조직에서 광학 현미경하에서 대표할 만한 시야를 골라 1000배 시야에서 100개의 종양세포를 골라 개개 세포의 핵내에서 검은색으로 염색되는 식별가능한 모든 AgNORs 수를 세어 합한 수를 100으로 나누어 평균 AgNORs 수를 구하였다.

4. 통계 처리

조직학적 분화도는 WHO 분류법³²⁾을 이용하였고 병기의 결정은 American Joint Commtee on Cancer(AJCC) 분류인 TNM 체계³³⁾를 따라 병리 및 임상소견을 참조하여 분류하였다.

조직학적 분화도 및 병기에 따른 각각의 PCNA 표지수와 AgNORs 수를 구한 뒤 상관관계를 알아보

기 위해 IBM-PC의 SPSS PC+program을 이용하여 비교분석하여 P value가 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 연령과 성별에 따른 환자의 분포

연구대상이 된 방광암환자의 연령분포는 27세부터 81세였으며, 이중 남자가 42명(77.8%)이었고 여자는 12명(22.2%)이었다. 남,여 모두 60대에서 가장 높은 빈도를 나타내었다(Table 1).

2. PCNA 및 AgNORs 염색소견

PCNA(PC 10)의 양성반응은 핵에 국한되어 확산상 내지 과립상으로 나타났으며 염색의 강도는 세포의 비정형성이 증가될수록 강하게 염색되는 경향을 보였으나 전체적으로 다양한 강도를 나타내었다. 유사분열을 보이는 세포에서는 확산상의 염색을 보이나 일부에서는 염색이 되지 않는 것을 볼 수 있었다. 반면에 종양주위의 정상상피에서의 PCNA 염색은 대부분이 음성반응을 나타내었다.

AgNORs 염색에서 세포의 증식성 및 비정형성이 증가될수록 AgNORs 수 뿐 아니라 그 모양이나 크기에 변화가 있어 정상상피에서는 비교적 작은 점 모양으로 일정한 모습이었으나 종양에서는 크기가 더 커지며 모양은 불규칙하고 응집된 것도 볼 수 있었다.

3. 병기와 조직학적 분화도에서의 환자 분포 및 상관관계

방광암 54예중 조직학적 분화도가 1등급이 17예(32%), 2등급이 23예(43%), 3등급이 14예(26%)였고, 병기는 Ta가 22예(41%), T1이 10예(19%), T2가 9예(17%), T3가 4예(7%), T4가 9예(17%)였으며, 분화도가 나날수록 PCNA 표지지수가 증가하였는데,

병기에 따른 PCNA 표지지수의 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보였다($P < 0.05$)(Table 2).

4. 병기에 따른 PCNA 표지지수 및 AgNORs 수

병기에 따른 PCNA 표지지수는 Ta에서 18.8 ± 11.8 , T1에서 19.0 ± 3.7 , T2에서 23.6 ± 1.3 , T3에서 27.9 ± 1.3 , T4에서 30.8 ± 6.8 로, 병기가 높을수록 PCNA 표지지수가 증가하였는데, 병기에 따른 PCNA 표지지수의 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있음을 보였다($P < 0.05$)(Table 3).

병기에 따른 AgNORs 수는 Ta가 2.69 ± 0.78 , T1이 2.65 ± 0.66 , T2가 2.83 ± 0.64 , T3가 3.53 ± 0.51 , 그리고 T4가 3.05 ± 1.16 으로, Ta를 제외하고는 병기가 높을수록 AgNORs수의 평균치가 증가하는 경향을 보

Table 2. Distribution of patients according to clinical stages and histological grades of Transitional cell carcinoma of the urinary bladder

Histological grade	Clinical stage				
	Ta	T1	T2	T3	T4
I	13	1	1	-	2
II	9	6	5	-	3
III	-	3	3	4	4
Total	22	10	9	4	9

($\chi^2 = 32.67, p < 0.05$)

Table 3. Mean PCNA labelling Index and AgNORs according to the Clinical Stages of Transitional Cell Carcinomas of the Urinary Bladder

Clinical stage	No. of patients	Mean value(%)	
		PCNA Labelling Index	Mean AgNORs
Ta	22	18.8 ± 11.8	2.69 ± 0.78
T1	10	19.0 ± 3.7	2.65 ± 0.66
T2	9	23.6 ± 1.3	2.83 ± 0.64
T3	4	27.9 ± 1.3	3.53 ± 0.51
T4	9	30.8 ± 6.8	3.05 ± 1.16
Total	54	24.0 ± 7.0	2.95 ± 0.75

The Mean PCNA labelling index and clinical stages shows a significant correlation ($p < 0.05$), but there is no correlation between the Mean AgNORs and clinical stages.

Table 1. Age and sex distribution of transitional cell carcinoma of the urinary bladder

Age group (years)	Male	Female
20~29	1 (1.9%)	
30~39	1 (1.9%)	
40~49	8 (14.8%)	
50~59	5 (9.3%)	2 (3.7%)
60~69	20 (37.0%)	5 (9.3%)
70~79	6 (11.1%)	4 (7.4%)
80~89	1 (1.9%)	1 (1.9%)
Total	42 (77.8%)	12 (22.2%)

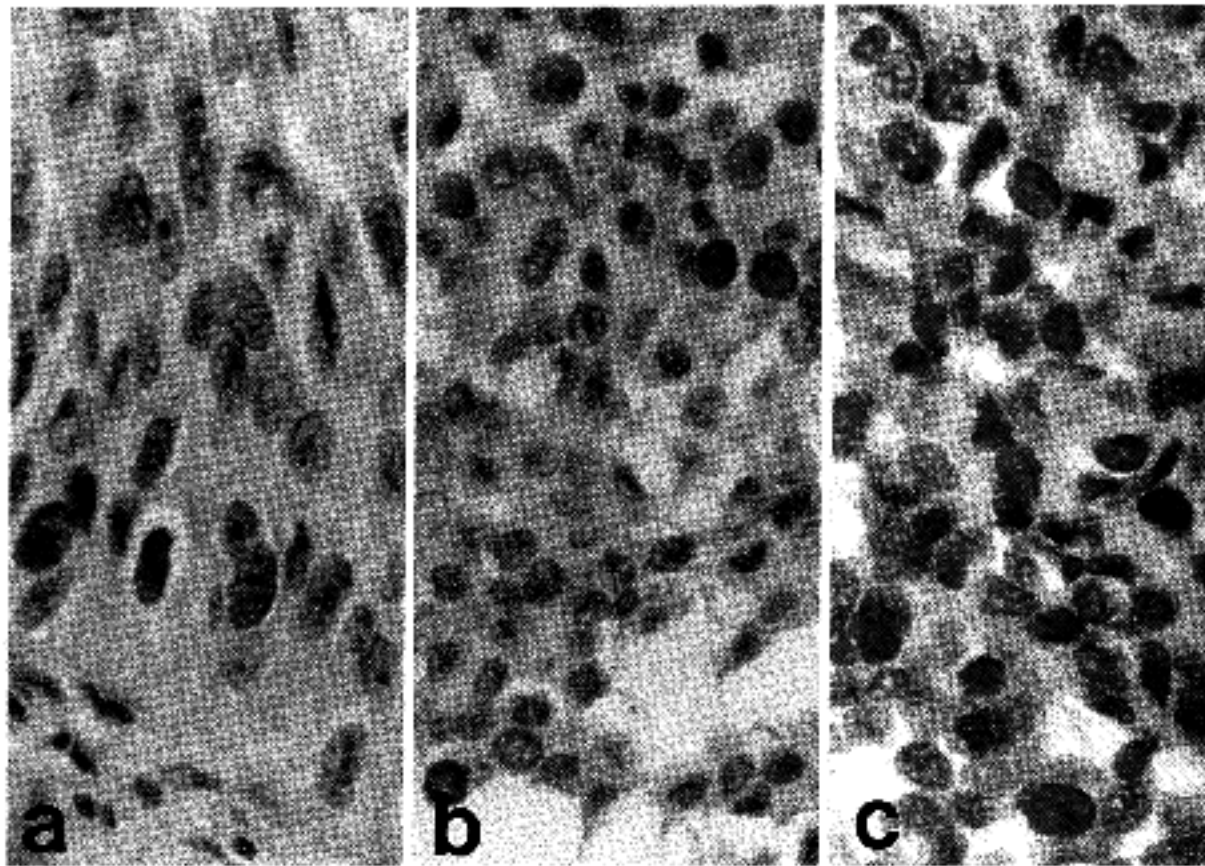


Fig. 1. Immunohistochemical stain for PCNA by using PC10 antibody (a) WHO grade I transitional cell carcinoma shows only occasional nuclei positive for PCNA. (b) WHO grade II transitional cell carcinoma exhibits many nuclei positive for PCNA. (c) WHO grade III transitional cell carcinoma in which nearly all of the nuclei are positive for PCNA.

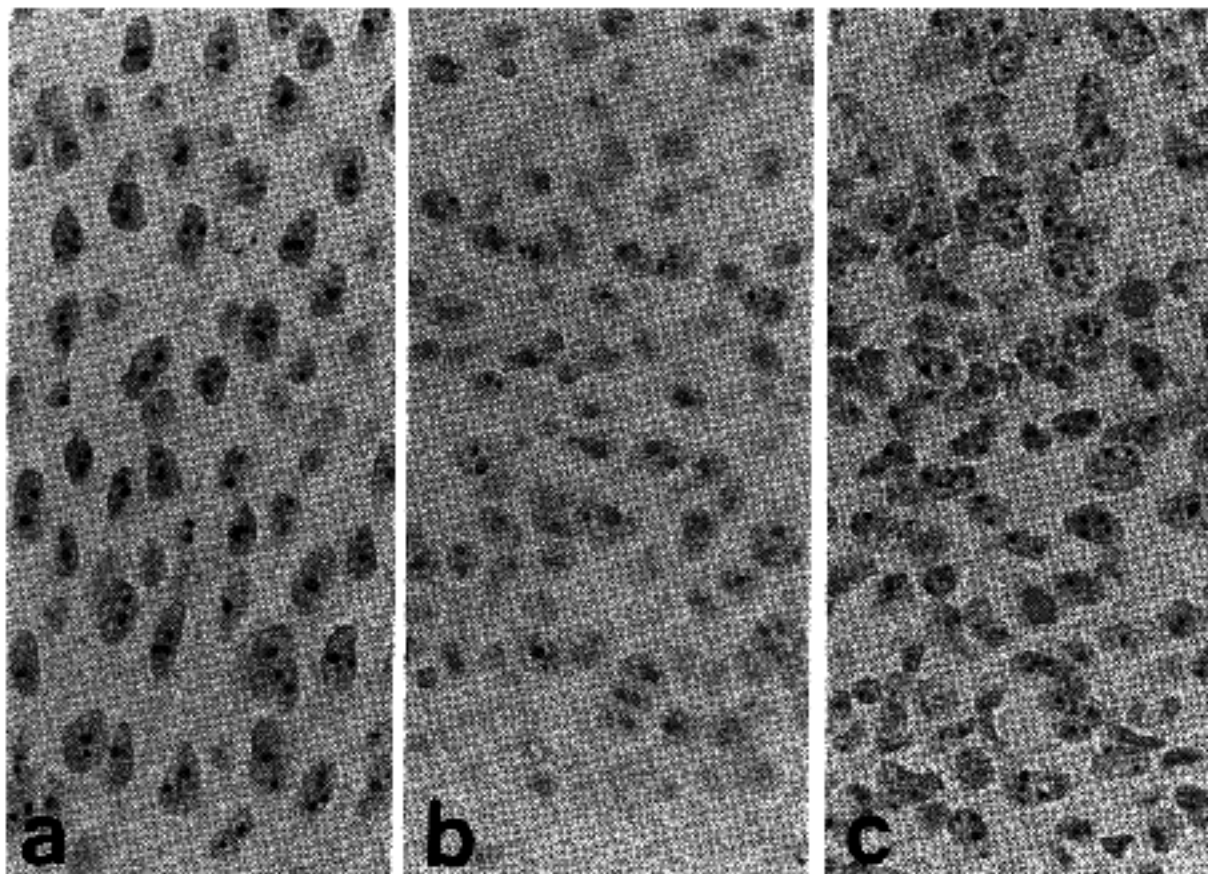


Fig. 2. Staining pattern of AgNORs according to histologic grade of transitional cell carcinoma (a) WHO grade I transitional cell carcinoma shows small number of relatively uniform AgNORs. (b) WHO grade II transitional cell carcinoma exhibits more increased number of AgNORs than grade I. (c) WHO grade III transitional cell carcinoma shows numerous dispersed AgNORs and clusters of AgNORs.

Table 4. Mean PCNA Labelling Index and AgNORs according to the Histological Grades of Transitional Cell Carcinomas of the Urinary Bladder

Histological grade	No. of Patients	Mean value(%)	
		PCNA Labelling Index	Mean AgNORs
I	17	17.9±10.4	2.75±0.77
II	23	24.1±10.1	2.77±0.64
III	14	25.1±9.2	3.01±1.10
Total	54	22.4±9.9	2.84±0.84

There is no correlation between the histological grades and either the Mean PCNA labelling index or AgNORs.

Table 5. Mean PCNA Labelling Index and AgNORs between superficial and infiltrating Transitional Cell Carcinomas of the Urinary Bladder

Group	No. of patients	PCNA Labelling Index(%) (mean±S.D.)	AgNORs (mean±S.D.)
Superficial (Ta+T1)	32	19.0±9.9	2.68±0.73
Infiltrating (T2+T3+T4)	22	27.4±8.8	3.05±0.88
Total	54	24.0±7.0	2.95±0.75

(t=3.24, p<0.05)

였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 3).

5. 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지 지수 및 AgNORs 수

조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지 지수는 1등급이 17.9±10.4, 2등급이 24.1±10.1, 3등급이 25.1±9.2로서, 등급이 높을수록 PCNA 표지 지수가 증가하였으나 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지 지수의 차이는 통계적으로 유의성이 없었다(Table 4)(Fig. 1).

조직학적 분화도에 따른 AgNORs 수는 1등급이 2.75±0.77, 2등급이 2.77±0.64, 3등급이 3.01±1.10으로 등급이 높을수록 AgNORs 수의 평균치가 증가하는 경향을 보였으나 이 역시 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 4)(Fig. 2).

6. 표재성과 침윤성 암종간의 PCNA 표지 지수 및 AgNORs

병기중 Ta와 T1을 표재성 암종으로 T2에서 T4를 침윤성 암종으로 나누어 두 군사이의 PCNA 및 AgNORs 수를 비교하여보면, PCNA 표지 지수는 표재성인 경우 19.0±9.9, 침윤성인 경우 27.4±8.8로서 침윤성암종이 표재성암종에 비해 높았는데 이 두군 사이의 PCNA 표지 지수는 유의한 차이가 있음이 통계적으로 인정되었다(P<0.05)(Table 5).

AgNORs 수의 평균치는 표재성암종이 2.68±0.73, 침윤성암종이 3.05±0.88로서 침윤성인 경우 표재성에 비해 AgNORs 수가 증가하였으나 이 두 군사이의 차이는 통계적으로 유의성이 없었다(Table 5).

고 찰

방광이행세포암은 방광암의 95%를 차지하고 이 종양은 환자의 치료방향을 정하는데 임상적으로 예후를 판정하는 것이 매우 중요하다. 현재 알려진 바에 의하면 이 종양의 예후는 조직학적 분화도와 처음 진단시의 병기에 따라 결정되며 이들 사이에는 상관관계가 있다고 알려져 있다^{1,2)}.

그러나 방광암의 조직학적 분화도는 구조나 침입성보다도 세포학적 형태에 의존하므로 유사한 조직학적 분화도를 보이는 종양에서는 종종 예후를 예측하지 못하는 경우가 있기 때문에 새롭고 믿음직한 예후인자를 찾기 위해 유세포 측정, 면역학적, 미세구조적 표지자에 대한 연구가 진행되고 있다^{1,2,7,9,34)}.

종양세포의 역동학적 자료는 많은 암종의 치료와 재발에 중요한 자료가 될 수 있을 것이다. 이러한 측면에서 세포주기와 연관된 항원에 대한 단클론 항체를 조직절편에 면역화학적 염색을 시행함으로써 항원을 손쉽게 빠르게 측정할 수 있으며, 최근 세포주기와 연관해서 많이 사용되고 있는 대표적인 단클론 항체로는 PCNA와 Ki-67이 있다^{13,35)}.

PCNA는 전신성 흥반성 낭창 환자의 혈청에서 보이는 자가항체로서 Miyachi등²⁵⁾에 의해서 발견되었으며, 36 KDa의 분자량을 가진 핵내 peptide인 DNA polymerase delta에 대한 보조 단백질로서 합성 초기에 중요한 역할을 하며 세포주기 중 G1 후기부터 S기 전반에 걸쳐서 합성되는데, G1 전기에서는 합성이 약한 경향이 있으나 S기 동안에 최고에 달한다^{13,26,27)}. Bruno등³⁶⁾은 PCNA는 S기 전반에 걸쳐 꾸준히 합성되는데 반해 Ki-67 항체는 S기 후반기에 합성된다고 보고하였다. PCNA를 이용한 면역조직화학적 염색방법은 세포증식 때 핵의 증식으로 생기는 핵항원을 단클론 항체를 이용하여 검출하는 것으로서 인체에서 발생하는 모든 종양에서의 성장율을 측정할 수 있어 방광암^{1,2)}, 자궁암^{3,4)}, 백혈병¹⁴⁾, 중추신경계 종

양¹⁶⁾, 유방암²¹⁾, 폐암²³⁾, 대장암³⁷⁾, 악성임파종^{38,39)}, 부신피질암⁴⁰⁾, 상부소화기계암⁴¹⁾, 그리고 신 세포암⁴²⁾ 등에서 PCNA 종양세포의 증식능을 연구한 보고가 있다. 이 방법은 파라핀 포매조직에서도 사용할 수 있다는 장점이 있어 많이 활용되고 있다.

PCNA를 인식하는 항체로서는 19A2와 PC10이라는 두가지 단클론 항체가 발견되었는데 포르말린으로 고정시킨 파라핀 포매조직에서는 PC10이 세포증식 활성도에 대해서 더욱 믿음직한 표식자가 되며⁴⁾, Garcia등³⁵⁾은 알콜에 고정한 조직에서는 19A2를 추천하고 있다.

본 실험에서 PCNA(PC10)의 염색상이 병기나 조직의 분화도에 관계없이 핵에 국한되어 확산상 내지는 과립상으로 나타났으며 유사분열을 보이는 세포에서는 확산상의 염색을 보였으나 일부 세포는 염색이 되지 않는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 핵 분열 과정동안 핵막이 소실되는 것으로 생각되며 이와같은 염색상은 Hall등⁴³⁾의 염색 결과와 일치한다.

각종 종양에서 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지 지수는 분화도의 등급이 높을수록 유의성있게 증가한다는 보고들이 있는데^{11,16,39,44)} Lipponen등^{1,2)}은 방광이행세포암에서 조직학적 분화도의 등급이 낮은 종양에서는 PCNA 양성으로 염색되는 핵이 수개정도이고 주로 상피의 기저세포층에 존재하며, 반면에 분화도의 등급이 높은 종양에서는 대부분이 PCNA 양성으로 염색되고 주로 상피의 표피층에 존재하며, 비유두성 종양이 유두성 종양보다 PCNA 양성율이 높게 나타나는 것을 관찰하였다. 그 외에도 Miyazaki등³⁰⁾ 및 Colterera등⁴¹⁾은 상부 소화기계, Penney등³¹⁾은 피부의 표피층, Mittal등³²⁾은 자궁의 경부 상피등에서 유사한 결과를 보고하고 있다. 방광이행세포암을 대상으로 한 본 연구에서도 이와 유사하게 분화도가 높을수록 PCNA 표지 지수가 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

방광암에서 병기에 따른 PCNA 표지 지수는 병기가 높을수록 증가한다는 연구결과^{1,2)}들이 있는데, 본 연구에서도 방광이행세포암의 병기가 높을수록 PCNA 표지 지수가 통계적으로 유의한 증가를 보여 이들과 유사한 결과가 관찰되었다. 또한 표재성 암종보다 침윤성 암종에서 PCNA 표지 지수가 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있다.

한편 어떤 연구에 의하면 PCNA 양성율이 조직학적 분화도 및 병기와의 상관관계가 명확하지 못하며 또한 임상적으로 예후인자로서 활용하는데는 많은 문제점이 따른다는 보고들^{20-22,37)}도 있다. Suzuki등⁴⁰⁾은 특히 부신피질종양에서는 암종과 선종사이에서의 PCNA 표지 지수는 통계학적으로 전혀 유의한 차이가 없음을 보고하면서 PCNA가 악성종양을 확인하는데는 별 도움을 주지 못한다는 결론을 내렸다. Robbins 등⁴²⁾은 모든 인체 내의 고형암종은 비슷한 수치의

PCNA 양성율을 보이는데, 유방암이나 대장암에서는 분화도가 나쁠수록 그리고 유사분열의 활동성이 높을수록 PCNA 양성율이 증가하였으나, 전체적으로는 고형암종에서의 PCNA 양성율과 종양의 등급사이의 상관관계는 불명확하다고 하였으며, 조직배양세포나 조혈 기관의 종양보다 고형암에서 PCNA 양성율이 많이 떨어지는데 이는 고형암의 세포증식율 즉 G1후기나 S기 핵의 비율이 낮거나 포르말린 고정후 파라핀 포매로 인해 항원성의 부분적 소실이 그 원인이 될 수 있다고 보고하였다.

또한 DNA ploidy 및 S기 분획과 PCNA 양성율 사이에는 깊은 관계가 있는 것으로 알려졌는데 이는 PCNA가 세포주기와 관계가 있는 단백질이므로 쉽게 추정할 수 있는데, 즉 높은 S기 분획을 가진 aneuploid성 종양은 높은 PCNA 양성율을 보이며 이는 인체내 종양에서 일치된 결과를 보인다^{1,2,13,15,23)}. 일반적으로 PCNA 표지 지수가 유세포측 정기에 의한 S기 분획과 상관관계가 있지만 어떤 경우에는 불일치할 수도 있는데, 이는 종양의 이질성, 표본 추출의 다양성, 간질 세포의 증식 및 괴사, 그리고 골수의 조혈 등의 형태학적 변화 때문이라고 주장하는 학자들도 있다^{20-22,37)}.

세포 증식율이 방광 이행세포암을 포함하는 사람의 모든 종양에 있어 예후에 대한 유의한 정보를 제공하고 있는 것으로 밝혀졌으며, PCNA 양성율에 대한 분석결과의 다양성은 detection system의 감수성 및 scoring 과정에서의 변수 때문이라 사료된다. 하지만 숙주의 방어 기전 및 metastatic potential에 관여하는 인자들도 중요하기 때문에 세포의 증식능 단독으로는 예후를 결정할 수 없으며 결국 여러가지 임상적 분화도 및 임상적 병기가 중요한 예후인자가 되므로 결국 조직학적 구조에 대해서 정확한 인식이 필요하다. 하지만 본 실험의 결과에서 관찰되었듯이 PCNA 표지 지수는 적절한 검체의 추출 및 객관성있는 지수산출 방법 등의 형태 제측학적 객관성만 유지된다면 세포의 증식능을 평가하는데 있어서 아주 좋은 표식자가 되리라 생각된다.

NORs는 ribosomal RNA gene을 가지는 DNA 고리로 인체 내에서는 5쌍의 선단부 염색체(13, 14, 15, 21, 22)의 단원에 위치하며 세포분열 간기에 핵소체 부위에서 나타난다²⁸⁾. NORs를 구성하는 단백질은 RNA polymerase I, C23(nucleolin), B23등으로서 이들이 은 호기성을 가지고 있다는 것이 알려져²⁹⁾ 결국 AgNORs수는 세포나 핵의 활동성을 반영한다고 볼 수 있으며 은염색으로 볼 수 있는 호은성 구조는 NOR-associated nonhistone nucleopeptide이나, 예외적으로 갑상선암, Ewing씨 육종 및 부신피질 암종 등은 내분비 세포가 자극을 받는다면지 과도하게 기능을 해서 rRNA 수가 증가하면서 결국 NORs수가 증가하게 된다³⁰⁾.

AgNORs 수의 측정은 일반적인 조직병리에서 세포 증식능을 평가할 수 있는 비용이 싸고도 손쉬우며 광학 현미경 시야에서 특별한 부착장치 없이 측정할 수 있는 장점이 있다.

Crocker 등⁴⁵⁾은 AgNORs 수를 보다 정확하게 평가하기 위해서는 도은 염색의 방법이 중요하다고 말하고 있는데 특히 반응시간, 고정방법 및 조직절편의 두께 등이 AgNORs 수를 좌우한다. 따라서 정확한 형태 계측학적인 방법을 사용하지 않으면 AgNORs 수로서 종양의 생물학적 반응을 평가하기에는 무리가 따를 것으로 생각되나, 최근에는 AgNORs 단백질을 자동 영상 분석기로서 정확히 측정하므로써 조직학적 측면에서 종양조직의 증식율을 객관성있게 평가하는데 많은 도움을 주고 있다.

조직학적 분화도와 AgNORs 수 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고된 논문들^{7,9,11)}도 있으나, 반면에 어떠한 상관관계도 보이지 않는다는 연구결과⁸⁾도 있는데, 이것은 AgNORs 수가 PCNA 발현율에 비해 종양내 부위에 따라 변화가 다양하며 또한 조직학적 분화도의 주관적인 결정에 있는 것이 아닌가 생각된다.

Takeuchi⁷⁾는 방광에서의 정상상피, 증식성 방광염, 이행성종 및 이행세포암의 AgNORs 수가 세포의 증식성 및 비정형성이 높을수록 의미있게 증가하였음을 관찰하였으며, Yu 등¹¹⁾은 위장관 간질 종양에서 PCNA 표지자수, AgNORs 수, 그리고 조직학적 분화도와 비교에서 유사분열 수, PCNA 지수, 및 AgNORs 수 간에는 서로 상관관계가 없었으며, 암종의 형태에 따라서 AgNORs 수가 일관성있는 양상을 보이지 않는다고 보고하였다. 본 연구 결과에서도 방광이행세포암의 병기와 조직학적 분화도가 높을수록 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 상관관계는 보이지 않았으며, 표재성 암종보다 침윤성 암종에서 AgNORs 수가 증가하였으나 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다. 결국 AgNORs 수가 세포 증식 활동성과는 관계가 있으나, 세포 증식능은 종양의 침범성을 결정하는데 주요한 인자는 아니며, 오히려 효소의 분비, 면역 방어기전 및 세포의 활동성등이 더 중요한 인자가 될 수 있으므로 다른 여러가지의 현미경적 소견을 함께 고려한다면 더욱 객관성 있는 결과를 기대할 수 있으리라고 생각된다.

결 론

1990년 3월부터 1993년 3월까지 3년간 동아대학교 부속병원에서 방광이행세포암으로 진단된 54예를 대상으로 조직학적 분화도와 병기에 따른 PCNA 단백질 항체를 이용한 면역조직화학적 방법 및 도은염색에 의한 AgNORs 수와 조직학적 분화도와 병기사이의 상관관계를 살펴본 결과는 다음과 같다.

1) 병기에 따른 PCNA 표지자수는 병기가 높을수록 증가하였고 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$). 조직학적 분화도에 따른 PCNA 표지자수는 등급이 높을수록 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다.

2) AgNORs 수는 병기와 조직학적 분화도가 높을수록 그 수가 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

3) 병기 중 T₁과 T₂를 표재성 암종으로 T₃에서 T₄를 침윤성 암종으로 나누어 비교하여 보면 PCNA 표지자수에서 침윤성인 경우 표재성에 비해 지수가 증가하며 통계적으로도 유의하였으나($p < 0.05$), AgNORs 수에서 역시 침윤성인 경우가 표재성에 비해 증가하였으나 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 토대로 방광암에서의 PCNA 표지자수는 병기에 따라 유의한 차이를 보이므로 형태학적 소견과 임상적 고찰을 함께 고려해 본다면 방광암에 있어서 예후를 평가할 수 있는 하나의 인자로서 활용할 가치가 있다고 사료된다. 방광암의 조직학적 분화도와 병기에 따른 AgNORs 수는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않으므로 예후인자로서의 AgNORs의 활용가치를 기대하려면 형태 계측학적인 표준화와 더불어 좀 더 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Lipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional cell bladder cancer determined by PCNA/Cyclin immunostaining. A histopathological description. *Anticancer Res* 1992; 12: 577-84.
- 2) Lipponen PK, Eskelinen MJ. Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/Cyclin immunostaining and prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 171-6.
- 3) Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Proliferating cell nuclear antigen (Cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelium. *Am J Pathol* 1993; 17: 117-22.
- 4) Oka T, Hoshi T, Arai T. Prognostic significance of the PC10 index as prospective assay for cervical cancer therapy with radiation therapy alone. *Cancer* 1992; 70: 1545-50.
- 5) Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990; 160: 93-102.
- 6) Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Waseem NH, Lane DP, Levison DA. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade,

- S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991; 19: 21-7.
- 7) Takeuchi T. Study of nucleolar organizer regions in bladder neoplasm. *Nippon-Hinoyokika-Gakkai-Zasshi* 1990; 81: 1711-9.
- 8) Mansour P, Crocker J, Newman J. Lack of prognostic value of nucleolar organizer region enumeration on transitional cell carcinoma of the bladder. *Arch Pathol* 1989; 158: 185-8.
- 9) Lipponen PK, Eskelinen MT, Nordling S. Nucleolar organizer regions (AgNORs) as predictors in transitional cell bladder cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 1139-44.
- 10) Hall PA, Levison DA. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
- 11) Yu KCCW, Fletcher CDM, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNORs) staining and histological grading in gastrointestinal stromal tumors. *J Pathol* 1992; 166: 147-52.
- 12) Pich A, Chiusa L, Pisani P, Krenkli M, Pia F, Navone R. Argyrophilic nucleolar organizer region counts and proliferating cell nuclear antigen scores are two reliable indicators of survival in pharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 119: 106-10.
- 13) Van Dierendock JH, Wijsman JH, Keizer R, Von de Valde CJH, Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-72.
- 14) Ito M, Tsurusawa M, Zha Z, Kawai S, Takasaki Y, Fujimoto T. Cell proliferation in childhood acute leukemia. Comparison of Ki-67 and proliferating nuclear antigen. *Immunocytochemical and DNA flow cytometric analysis. Cancer* 1992; 69: 2176-82.
- 15) Landberg G, Roos G. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol* 1991; 30: 917-21.
- 16) Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, Veronese S, Mauri FA, Gambacorta M, Pollo B, Dalla Palma P, Barbareschi M. Proliferating nuclear antigen in central nervous system. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1991; 419: 417-23.
- 17) Giordano M, Danova M, Pellicciari C, Wilson GD, Mazzini G, Conti AM, Riccardi A, Franchini G, Romanini MG. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin expression during the cell cycle in normal and leukemic cells. *Leuk Res* 1991; 24: 469-79.
- 19) Krauss JS, Pantazis CG, Chandler FW. The proliferative fraction in lymph nodes: comparison of proliferating cell nuclear antigen morphometry to flow cytometry. *Ann Clin Lab Sci* 1992; 22: 189-96.
- 20) Benjamin DR. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and pediatric tumors: assessment of proliferative activity. *Pediatr Pathol* 1991; 11: 507-19.
- 21) Visscher DW, Wykes S, Kubus J, Crissman JD. Comparison of PCNA/cyclin immunohistochemistry with flow cytometric S-phase fraction in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22: 111-8.
- 22) Del Giglio A, O'Brien S, Ford R, Saya H, Manning J, Eating M, Johnston D, Khetan R, El-Naggar A, Deisseroth A. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in chronic lymphoid leukemia. *Blood* 1992; 79: 2717-20.
- 23) Fontanini G, Macchiarini P, Pepe S, Ruggiero A, Hardin M, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angelletti CA. The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer* 1992; 70: 1520-7.
- 24) Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J. Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p-53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 883-7.
- 25) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-34.
- 26) Bravo R, Frank R, Blindell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326: 515-20.
- 27) Celis JE, Celis A. Cell cycle dependent variation in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-6.
- 28) Annon. NORs-a new method for the pathologist. *Lancet* 1987; 1: 1413-4.
- 29) Crocker J. Nucleolar organizer regions. In Underwood JCE, ed. *Current topics in pathology: Pathology of the Nucleus. Berlin Heidelberg; Springer-Verlag* 1990; 91-105.
- 30) Miyazaki S, Sasano H, Suzuki T, Sawai T, Nishihira T, Mori S. Nucleolar organizer regions in human esophageal disorders: Comparison with proliferating cell nuclear antigen by immunostaining. *Mod Pathol* 1992; 5: 396-401.
- 31) Penneys NS, Bogaert M, Serfling U, Sisto M. PCNA expression in cutaneous keratinous neoplasms and verruca vulgaris. *Am J Pathol* 1992; 141: 139-42.

- 32) Mostofi FK, Sobin HL, Torlini H. *Histopathological typing of urinary bladder tumors. WHO International Histological Classification of Tumors. Geneva, WHO 1973.*
- 33) American Joint Committee on Cancer. *Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott Co., 1992; 195-200.*
- 34) Cairns P, Suarez V, Newman J, Crocker J. *Nucleolar organizer regions in transitional cell tumors of the bladder. Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 1250-2.*
- 35) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. *Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol 1989; 134: 733-9.*
- 36) Bruno S, Crissman HA, Bauer KD, Darzynkiewicz Z. *Changes in cell nuclei during S phase: Proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, PCNA, p105 and p34. Exp Cell Res 1991; 196: 99-106.*
- 37) Yamada K, Yoshitake K, Sato M, Ahren DJ. *Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, preneoplastic and neoplastic colonic epithelium of the rat. Gastroenterology 1992; 103: 160-7.*
- 38) Benjamin DR, Gown AM. *Aberrant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. Am J Pathol 1991; 15: 764-8.*
- 39) Kamel OW, LeBrun DP, Davis RE, Berry GJ, Warnke RA. *Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/Cyclin 19A2. Correlation with Ki-67 labeling. Am J Pathol 1991; 138: 1471-7.*
- 40) Suzuki T, asano H, Nisikawa T, Rhame J, Wilkinson DS, Nagura H. *Discerning malignancy in human adrenocortical neoplasms: Utility of DNA flow cytometry and immunohistochemistry. Mod Pathol 1992; 5: 224-31.*
- 41) Coltrera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, Gown AM. *Markers for dysplasia of the upper aerodigestive tract. Suprabasal expression of PCNA, p53 and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissues. Am J Pathol 1992; 141: 817-25.*
- 42) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. Arch Pathol Lab Med 1987; 111: 841-5.*
- 43) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 1990; 162: 285-94.*
- 44) Carey FA, Fabbioni G, Lamb D. *Expression of proliferation with DNA ploidy. Histopathology 1992; 20: 499-503.*
- 45) Crocker J, Blody DAR, Egan MJ. *How should we count AgNORs? proposals for a standardized approach. J Pathol 1989; 158: 185-8.*
- 46) Mourad WA, Erkman-Balis B, Livinston S, Shoujri M, Cox CE, Nicosia SV, Rowlands DT. *Agyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Cancer 1992; 69: 1739-44.*