

간세포암종에서의 B형 간염 표면항원(HBs Ag), 형질 전환 성장인자-알파 (TGF- α) 및 증식세포핵 항원(PCNA)의 발현에 관한 면역조직화학적 검색

고신대학교 의과대학 병리학교실

허 방 · 허 만 하

Immunohistochemical Investigation on Expression of Hepatitis B Surface Antigen, Transforming Growth Factor- α , and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Hepatocellular Carcinoma

Bang Hur, M.D. and Man Ha Huh, M.D.

Department of Pathology, Kosin University Medical College

In an attempt to evaluate the expression of hepatitis B surface antigen(HBs Ag), transforming growth factor- α (TGF- α), and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in hepatocellular carcinoma(HCC), an immunohistochemical investigation(ABC method) was performed using 31 surgically resected HCCs. The authors examined the expression rate and patterns, histopathologic correlation, and inter-relationships among these expressions. The results were summarized as follows. 1) Among 25 seropositive HCCs, 15 cases showed tissue expression of HBs Ag(60.0%), being expressed as a predominantly cytoplasmic pattern. Its expression rate in low grade HCC was significantly high(76.9%), in contrast to a low rate in high grade HCC(41.7%)($P<0.05$). Adjacent nonneoplastic tissue showed a higher expression rate(82.6%). 2) TGF- α was expressed in 23 of 31 cases of HCC(74.3%). The intensity and extent of its expression did not correlate with histopathologic features. Bile duct epithelium, juxtaposed and/or entrapped liver cells, and cirrhotic nodules were variably expressed, of which intense peripheral reaction within the nodules was frequently noted. 3) PCNA was expressed throughout the neoplastic tissue of HCC. Its index was significantly high(34.4 ± 13.6), being compared to low index index(3.5 ± 2.1) in the non-neoplastic tissue($P<0.005$). High grade tumors revealed a higher index than the low grade tumors($P<0.05$). Conclusively, this data confirms that PCNA index offers useful information about cell proliferation associated with histologic degrees of malignancy of HCC, albeit TGF- α is also involved in cellular proliferation of both liver cell and bile duct epithelium. Changes in incidence and cellular localization of HBs Ag expression between the neoplastic and non-neoplastic tissues suggest that an integrated viral genome could be functionally altered during hepatocarcinogenesis. A significant inter-relationship among these expressions was not observed. (Korean J Pathol 1995; 29: 478~491)

Key Words: HBs Ag, TGF- α , PCNA, Immunohistochemistry, HCC

접 수:1994년 12월 12일, 게재승인:1995년 4월 1일

주 소:부산시 서구 암남동 34, 우편번호 602-702

고신대학교 의과대학 병리학교실, 허 방

서 론

B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)가 간세포암종의 발생에 가장 중요한 원인적 인자라는 점은 부인할 수 없는 사실이나, 이것의 종양관련성 항원으로서의 역할과 기전은 잘 알려져 있지 않다¹⁻⁴. 그러나 최근 간세포암종의 발생에 HBV 유전자 단백질의 하나인 HBx가 신호전달의 과정에 직접 관여한다는 Alexander 등의 주장에 의해 점차 그 기전이 구체화되고 있으며⁵, 간세포암종에서의 HBV 관련 항원의 일종인 B형 간염 표면항원(hepatitis B surface antigen, HBs Ag)의 표현을 간세포암종의 종양 및 주변조직의 병리조직학적 소견과 관련하여 조사하는 것은 이러한 관련성을 이해하는데 가장 기본적인 자료가 될 수 있다. 그러나, HBs Ag의 표현에 관련한 대부분의 국내자료는 비종양성질환에 치중되어 있으며⁶⁻⁹, 간세포암종을 대상으로한 연구는 제한되어 있는 실정이다^{7,10}.

세포의 증식과 분화는 여러 성장인자 및 그들의 수용체에 의해 조절될 수 있는데, 여기에는 여러 종양유전자의 활성화 및 성장인자의 부적절한 발현이 종양의 생물학적 또는 임상적 표현과 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹³. 형질 전환 성장인자-알파(transforming growth factor- α , TGF- α)는 상피 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)를 매개로하여 tyrosine kinase 활성도를 증가시켜 세포 증식에 관한 신호전달을 유발하는 성장인자이다^{14,15}. 정상 및 몇몇의 종양 조직에서 TGF- α 의 발현과 이에 따른 종양의 생물학적인 성장과의 상관성을 조사한 연구가 다수 보고되고 있으나¹⁶⁻¹⁹, 간세포암종에 대해서는 Chu등²⁰이 HBs Ag의 발현과 관련지어 처음으로 기술한 이래, Collier등²¹이 추가로 검색한 바 있으나, 간세포암종의 주변 및 종양의 병리조직학적 소견과 관련하여 TGF- α 의 발현을 조사한 자료는 태무한 편이다.

일반적으로 종양 증식능의 정도는 그 종양의 예후 판정에 있어서 중요한 요소가 될 수 있으며, 이를 측정하는 데에는 여러 가지 방법이 있으나 증식세포 핵 항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)에 대한 면역 조직화학적 검색이 비교적 간편한 방법이면서도 종양의 형태학적 소견과 연관하여 검색할 수 있다는 장점 때문에 비교적 널리 이용되고 있다^{22,23}. 간세포암종에 대한 연구는 Matsuno등²⁴과 Terada등²⁵이 선종성 증식과 소형 간세포암종에서 PCNA 표식 지수를 악성화에 관한 생물학적 유용한 지표로서 처

음 적용한 바 있으나, PCNA의 발현을 TGF- α 와 HBs Ag의 발현과 관련지어 검색한 문헌은 접할 수 없었다.

이에 저자들은 그 기전은 불명확하나 HBV에 의한 간세포 손상에 속발하여 간세포의 증식성 반응의 결과로서 간세포암종이 발생할 수 있다(Chisari등의 주장)는 점에 착안하여 HBs Ag 발현을 성장인자의 하나인 TGF- α , 및 증식성 핵단백의 일종인 PCNA의 발현과 관련지어 조사하고, 이들 발현 빈도 및 양상을 병리조직학적인 소견과 관련하여 검색하여 간세포암종의 발생과 진행에 관련된 병리학적 이해를 넓히고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구는 1990년부터 1993년 까지 3년동안 고신의료원에서 간염절제술 및 간구역절제술로 절제된 간의 외과적 가검물중 간세포암종으로 진단된 31예의 조직표본을 대상으로 하였다. 각 증예의 대표적인 파라핀 블록 1개를 취하여 연속 절편을 만들고 통상적인 헤마톡실린-에오진 염색을 실시하여 병리조직학적 소견을 검색하였다. 간세포암종의 조직학적 분류는 WHO 방법을 따랐으며, 종양세포의 악성도는 Edmondson과 Steiner의 기준에 의하였다²⁶. 남자가 22예, 여자가 9예였으며, 32세부터 73세(평균 58.9세)의 연령 분포를 보였다. 25명(80.6%)의 환자에서 혈중 B형 간염 표면항원에 양성 소견을 나타내었으며, 혈중 AFP이 조사된 20예중 10명이 200 ng/ml 이상이였다.

2. 면역조직화학적 반응

각 증례의 연속 절편에 대한 면역조직화학적 염색은 TGF- α 단클론 항체(Oncogene Science)를 이용한 통상적인 avidin-biotin conjugate 방법과, PCNA 단클론 항체(DAKO-PCNA, PC 10) 및 HBs Ag 다클론항체(DAKO)를 labelled streptavidin-biotin 방법으로 DAKO-LSAB kit를 이용하여 염색하였다.

HBs Ag에 대한 염색에서 구성세포의 세포질에 갈색의 과립성 반응을 보일때를 양성으로 판정하였으며, 이 항원의 세포내 발현은 Borchard 등의 기술²⁷에 따라 주변 조직에서의 반응형태를 기준하여 핵주변의 세포질에 과립상 반응을 보이는 것을 세포막형(cHBs Ag), 세포막을 따라 표현되는 것을 세포막형(mHBs Ag), 세포질의 일부에서 경계가 분명하고 다소 균질성 반응을 보이는 것을 봉입체형(iHBs Ag)으

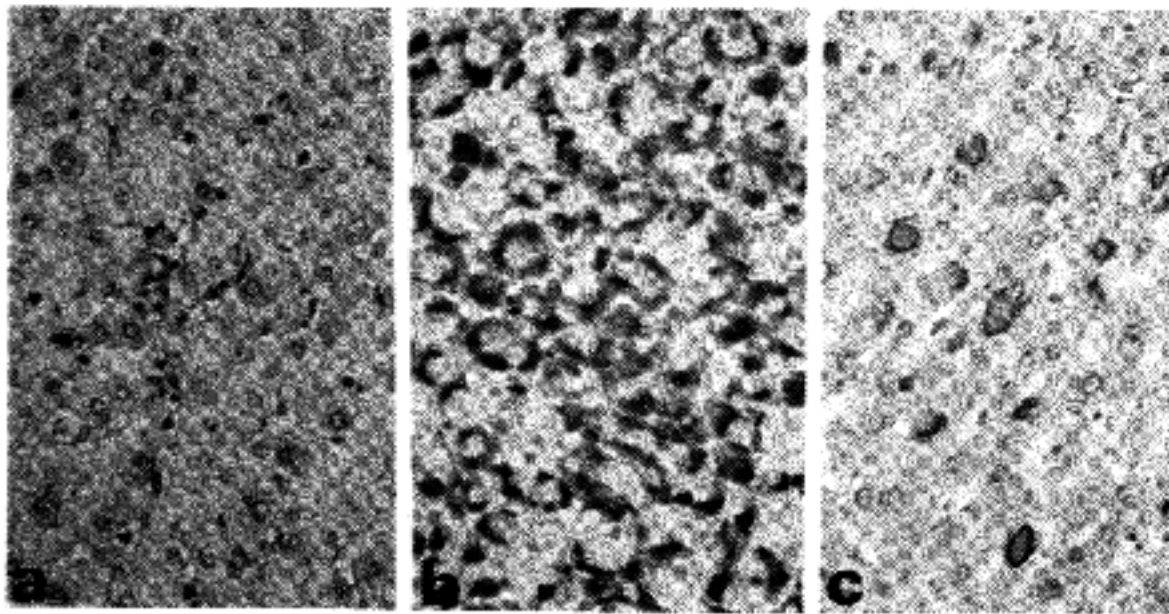


Fig 1. Expression patterns of HBs Ag are classified as cytoplasmic (a), membranous(b), and inclusion type(c) in the nonneoplastic tissue.

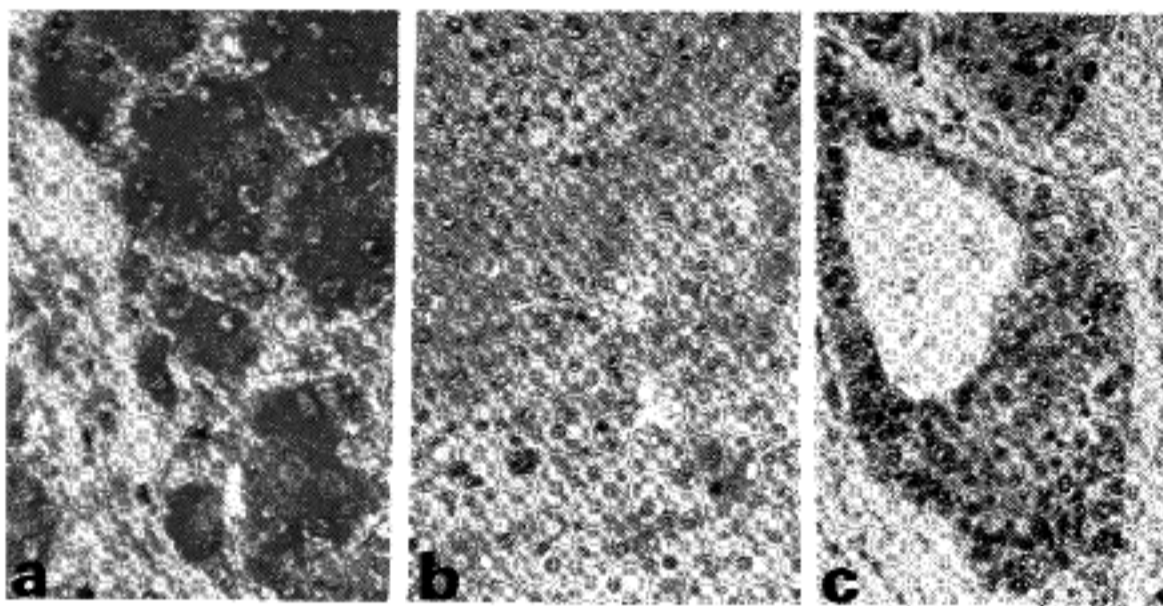


Fig 2. Intensity of TGF- α expression is scored on a scale of (+) to (-++); a(-+), b(+), c(++).

로 간주하였고, 종괴 및 주변조직에서의 이들 유형의 분포 양상을 조사하였다(Fig. 1). 또한 세포내 변형 유형에 관계없이 양성세포의 출현 빈위를 집단 및 산재형으로 나누어 관찰하였다.

TGF- α 에 대한 염색에서 구성세포의 세포질에 적색의 과립성 반응을 양성으로 판독하였으며, 염색상이 전혀 없거나 주변의 비특이적 반응과 차이가 나지 않으면 음성으로 판독하였다. 즉 주변의 비특이적 반응에 비해 미세한 과립성 염색상을 보이는 경우를 (+1), 분명한 굵은 과립성 염색상을 보이는 경우를 (+3), 그 중간을 (+2)으로 하였다(Fig. 2). 반응 범위에 따라 김경시아의 25% 이하의 세포에서 염색상을 보일 경우를 (+1), 25%에서 50% 양성 반응을 보일 경우 (+2), 50%에서 75% 양성 반응의 경우를 (+3), 75% 이상의 경우를 (+4)로 하여 TGF- α 에 대한 종양세포의 양성 반응을 준정량적으로 측정하였다(Table 1). 발현 강도와 범위의 각 수치를 곱하여 2점 이상을 low score, 3 점 이상을 high score로 하였

Table 1. Scoring system of TGF- α expression

TGF- α Expression	Degree	Score
Intensity	mild	(+1)
	moderate	(+2)
	marked	(+3)
Extent	<25%	(+1)
	25~50%	(+2)
	50~75%	(+3)
	>75%	(+4)

다.

PCNA에 대한 양성반응은 구성세포의 핵 염색질 위에 미세한 갈색 과립을 보이는 경우를 약양성, 염색실을 덮는 갈색의 굵은 과립 또는 균질성 반응을 보일때를 강양성으로 판독하였다(Fig. 3). 양성 반응 세포가 미만성으로 잘 분포하는 부위를 선정한다

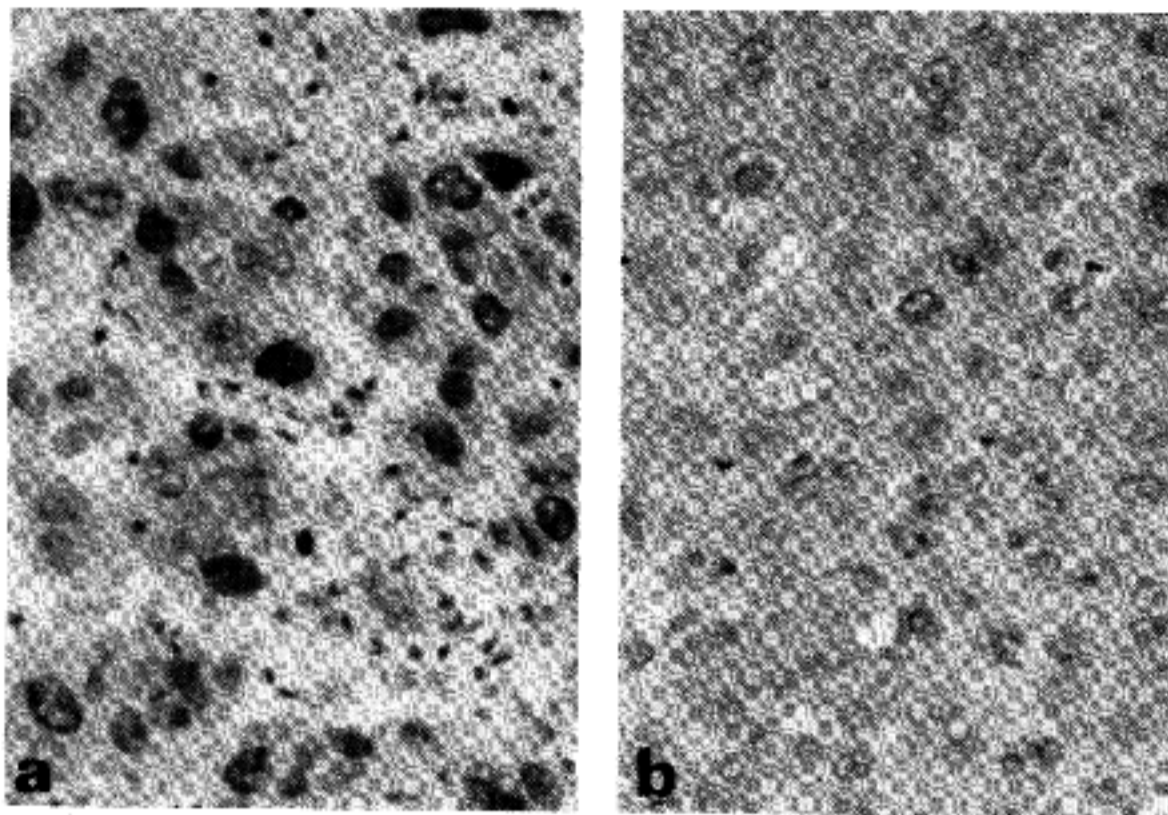


Fig 3. Homogeneous(a) and/or granular(b) nuclear staining for PCNA are interpreted as positive reaction.

음, 고배율 시야($\times 400$)에서 1000 개 정도의 중앙 세포를 기준하여 양성 세포 수를 헤아려 PCNA 표 식지수를 구하였다.

3. 통계학적 처리

검색된 성적은 Chi-square test로서 통계학적 검정 을 하였으며, P value가 0.05 이하일때 의미있는 것 으로 정하였다.

결 과

1. 간세포암종의 병리조직학적 소견

31예의 간세포암종의 조직학적인 유형별 분포는 31예중 23예(74.2%)가 색상형이었으며, 선방형 2예 (6.5%), 김화형 2예(6.5%), 충실형 1예(3.2%) 및 혼합 형이 3예(9.7%)였다. 간세포암의 분화도는 grade I과 II가 각각 4예와 14예로서 전체의 58.1%를, grade III 과 IV 가 각각 11예와 2예로서 41.9%를 차지하였다. 종괴의 크기는 최장경을 기준으로 하고 결절형의 종 괴일 경우에는 가상 큰 결절을 측정하였다. 조사된 26예에서 3 cm 이상인 경우가 18예(69.2%)였고, 8예 (30.8%)에서는 3 cm 이하의 크기였다(Table 2).

2. HBs Ag에 대한 면역조직화학적 검색

전체 31예에서 25예의 혈중 HBs Ag 양성예중 15 예(60.0%)의 간세포암종에서 HBs Ag이 발현되었으 며, 구성세포의 세포질에서 반응을 보였다. 주변조직

Table 2. Histopathologic features of HCC

	Cases	Incidence(%)
Type(n=31)		
Trabecular	23	74.2
Acinar	2	6.5
Sclerosing	2	6.5
Compact	1	3.2
Mixed	3	9.6
Grade(n=31)		
I	4	12.8
II	14	45.2
III	11	35.5
IV	2	6.5
Size(n=26)		
3 cm \uparrow	18	69.2
3 cm \downarrow	8	30.8
S. AFP(n=20)		
200 ng/ml \uparrow	10	50.0
200 ng/ml \downarrow	10	50.0
S. HBs Ag(n=31)		
Positive	25	80.6
Negative	6	19.4

의 검색이 가능했던 28예에서의 HBs Ag의 발현은 중앙조직내 발현을 보인 14예를 포함한 19예(82.6%)에서 양성 반응을 보였으며 전부 세포질 반응을 보

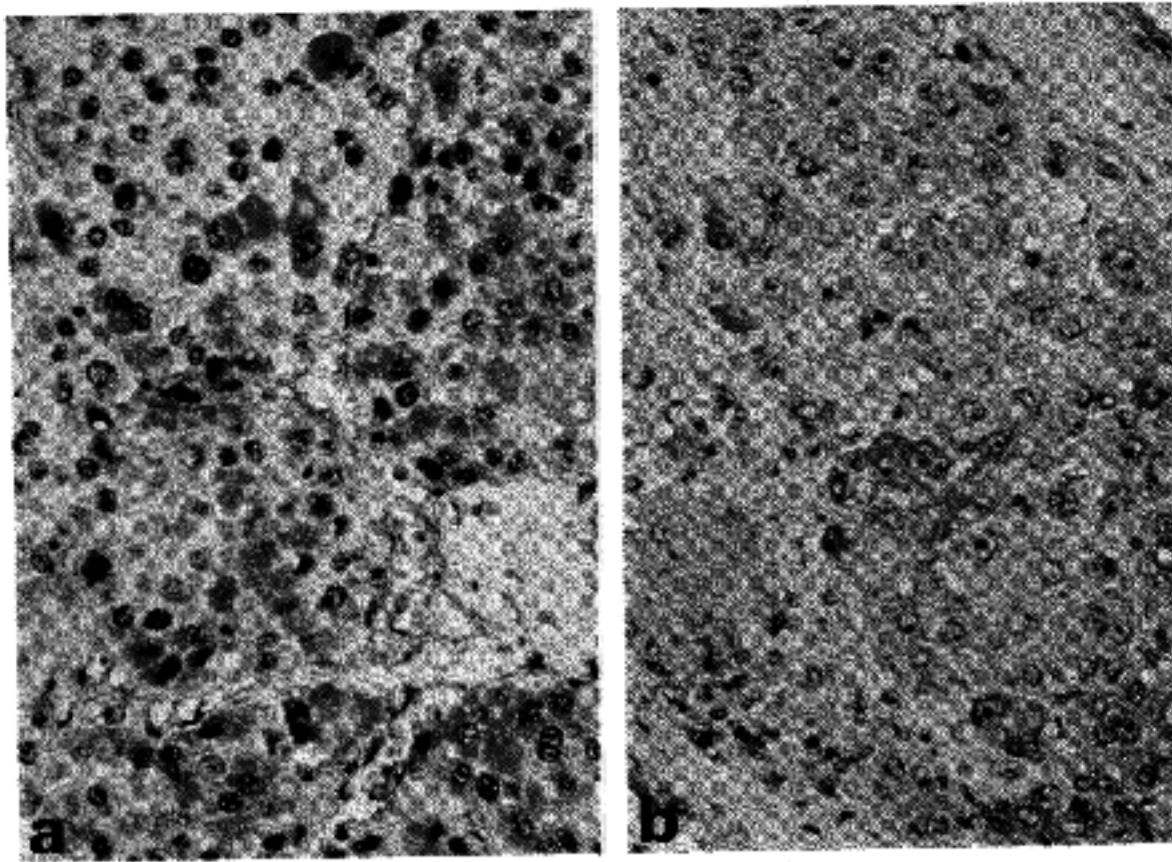


Fig 4. Distribution of HBs Ag reactive cells is small or extended groups(a) and/or isolated cells(b) in HCC.

Table 3. Expression pattern of HBs Ag in HCC and adjacent tissue

Pattern	Adjacent tissue(N=28)	HCC(N=31)
cHBs Ag	19(100%)	15(100%)
iHBs Ag	9(47.4%)	2(13.3%)
mHBs Ag	3(15.8%)	0(0.0%)
Total	19(67.9%)	15(48.4%)

cHBs Ag; Cytoplasmic pattern
iHBs Ag; Inclusion pattern
mHBs Ag; Membraneous pattern

였다. 아울러 혈중 HBs Ag 음성인 간세포암종(6예)에서는 종양 및 주변조직 모두에서 음성 반응을 보였다.

종양조직에서의 HBs Ag의 세포내 발현은 2예의 간세포암종의 일부에서 관찰된 봉입체형을 제외하고는 전부 세포질형(cHBs Ag)이었으며, 드물게 기계의 양성세포가 산재되기도 하나 대부분 소집단 또는 다소 확산된 집단의 형태로 표현되었다(Fig. 4). 이와는 달리 종괴주변조직에서는 모든예에서 세포질형(cHBs Ag)으로 관찰되나, 봉입체형(iHBs Ag)과 세포막형(mHBs Ag)이 각각 9예(47.4%), 3예(15.8%)로 혼재된 양상을 보였다(Table 3). 아울러 주변의 경변성 병변

Table 4. Expression of HBs Ag in HCC

	Incidence(%)
Grade(n=31)	
I(4)	3(75.0%) ^a
II(14)	7(50.0%)
III(11)	5(45.5%)
IV(2)	0(0%)
S. HBs Ag(n=31)	
Positive(25)	15(60.0%) ^b
Negative(6)	0(0%)
S. AFP(n=20)	
200 ng/ml ↑ (10)	2(20.0%)
200 ng/ml ↓ (10)	7(70.0%) ^a

^aP<0.05, ^bP<0.05, ^cP<0.005

은 결절에 따라 선택적으로 양성 반응을 보였으며, 양성 반응을 보이는 종양결절에 인접한 정상간세포 또는 종괴에 함유된 정상간세포에서 양성 반응을 보이기도 하였다(Fig. 5).

HBs Ag의 발현은 간세포암종의 조직학적 유형과는 관련이 없었으며, grade I 과 II의 HBs Ag 발현 빈도는 각각 75.0%(3/4), 50.0%(7/14)였다. 그러나 분화도가 낮은 grade III 및 IV의 경우에는 38.5%(5/13)

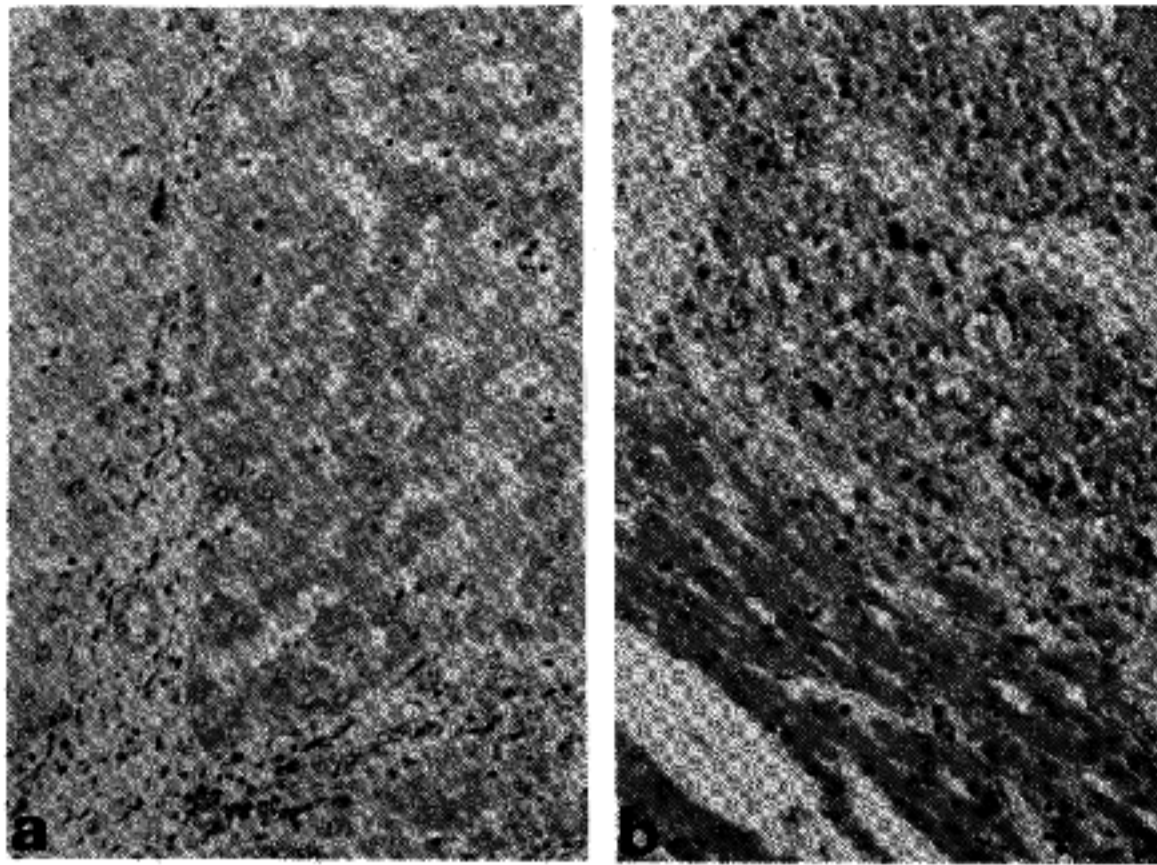


Fig 5. HBs Ag is selectively expressed as small groups in the regenerative nodules(a), and also expressed in the nonneoplastic hepatocytes adjacent to HCC(b).

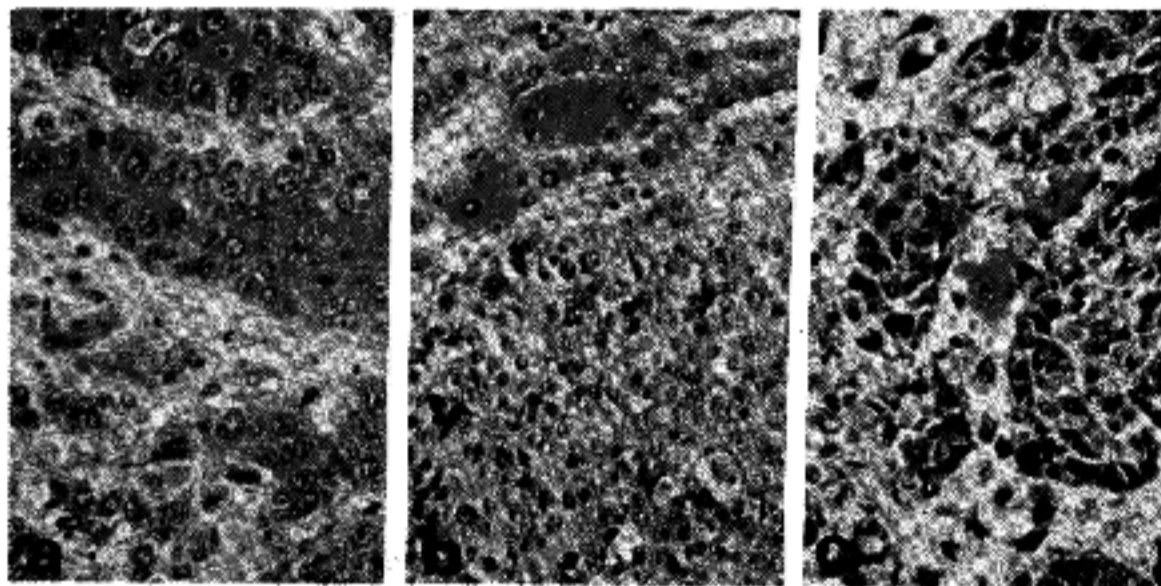


Fig 6. TGF- α expression is diffuse and poorly-delineated in distribution(a) in HCC. Also noted are well-defined, localized expression (b) and individually isolated expression(c) of neoplastic cells.

의 양성 반응을 보여, 저분화형에 비해 고분화형 간세포암에서 의미있게 높은 발현빈도를 보였다. 혈중 HBs Ag이 있는 25예중 15예(60%)의 간세포암종의 종양조직에서 양성 반응을 보였으나 혈중 표면항원이 없는 6예에서는 양성 반응을 보이는 예가 없었다. AFP의 혈중 농도가 200 ng/ml 이하에서 HBs Ag의 발현율이 의미있게 높았으며, 종괴의 크기와는 무관하였다(Table 4).

3. TGF- α 에 대한 면역조직화학적 검색

TGF- α 는 각 증예마다 발현의 강도와 범위의 차이는 있으나 23예(74.2%)에서 양성 반응을 보였다. 이 중 중등도 이상의 분명한 양성 반응을 보이는 예가

9예(39.1%)였으며, 약양성 반응을 보이는 예가 13예(65.2%)였다. 양성 반응을 보이는 종양 세포는 대부분 경계가 불분명한 미만성 분포를 보이고 있었으며, 경계가 분명한 군집상 분포로도 표현되었다. 또한 군집상 발현을 보일수록 보다 강한 발현을 나타내었다. 드물게는 개개의 세포에서 독립적으로 산발적인 양성 반응을 보이기도 하였다(Fig. 6). 양성 반응의 범위는 김성시야의 75%이상이거나, 또는 25%이하가 각각 9예로서 전체의 78.3%를 점하였다(Table 5). 전체 23예의 평균 TGF- α score는 3.1 ± 2.2 이었으며, 2점 이하의 low score는 19예(61.3%), 3점 이상의 high score는 12예(38.7%)였다.

종양 주변에서 증식성 반응을 보이는 일부의 담관

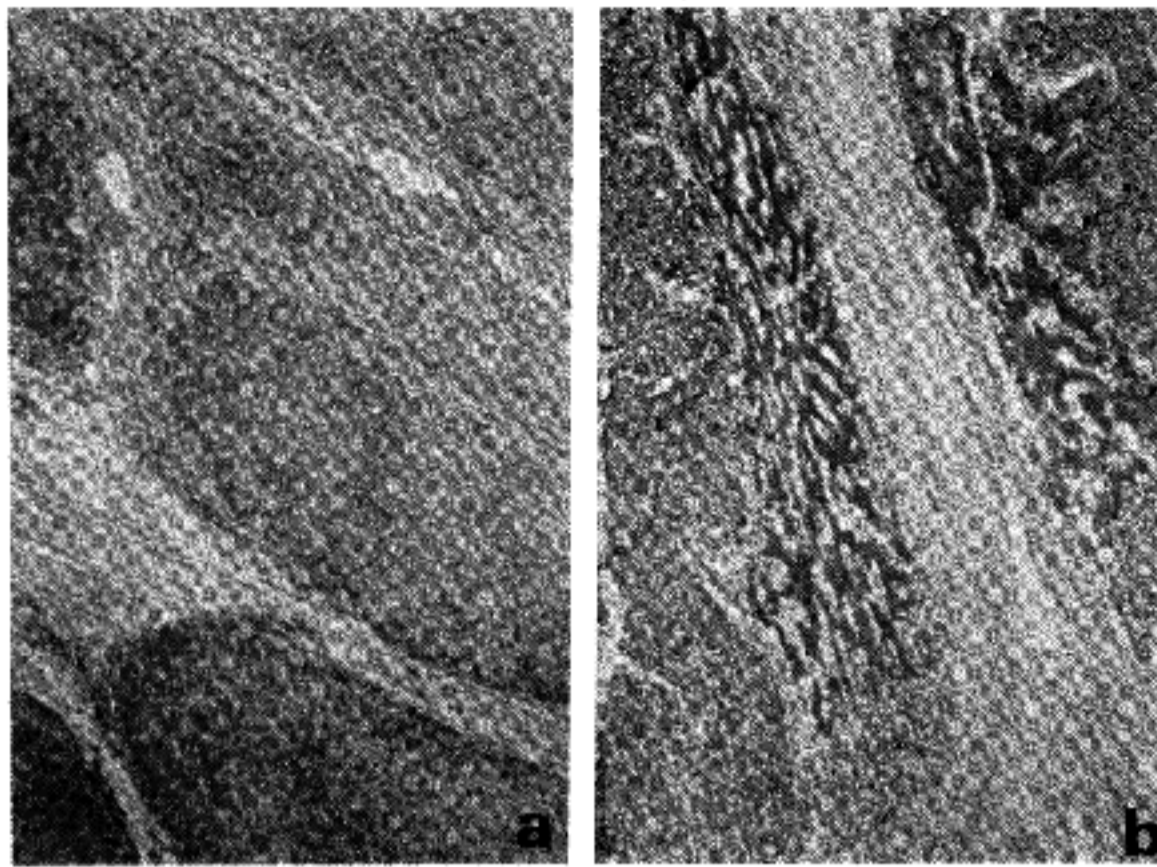


Fig 7. Regenerative nodules show TGF- α expression with intense peripheral staining(a). Juxtaposed nonneoplastic hepatocytes also reveal intense expression, in contrast to weak reaction in the neoplastic tissue(b).

Table 5. Incidence, intensity and extent of TGF- α expression in HCC

	Cases	Incidence(%)
Total No(n=31)		
Expressed	23	74.2
Unexpressed	8	25.8
Intensity(n=23)		
(+++)	4	17.4
(++)	5	21.7
(+)	15	65.2
Extent(%) (n=23)		
(++++)	9	39.1
(+++)	1	4.3
(++)	4	17.4
(+)	9	39.1

상피세포에서도 양성 반응을 보이며, 경변성 병변의 염증성 섬유성 각벽내의 섬유모세포등에서도 양성 반응을 보였다. 정상 간조직에서는 거의 발현되지 않으나 종양조직에 밀접히 접해 있거나 종양 조직에 함입된 일부의 간세포에서, 그리고 섬유 간질성 격벽에 의해 둘러싸인 간세포 군집에서 양성 반응을 보이는 경향이 있었다. 간경변증의 재생성 결절에서도 발현되며, 이 경우 결절의 변연부에서 보다 강하게

Table 6. Incidence & score of TGF- α expression related to histopathologic features of HCC

	Incidence(%)	Score*
Type(n=31)		
Trabecular(23)	18(78.3%)	2.8 \pm 2.7
Acinar(2)	1(50.0%)	0.0 \pm 0.0
Sclerosing(2)	2(100%)	5.0 \pm 5.0
Compact(1)	1(100%)	4.0 \pm 0.0
Mixed(3)	1(33.3%)	4.0 \pm 0.0
Grade(n=31)		
I(4)	3(75.0%)	2.8 \pm 0.9
II(14)	10(71.4%)	4.1 \pm 4.8
III(11)	9(81.8%)	2.6 \pm 2.8
IV(2)	1(50.0%)	2.5 \pm 1.5
Size(n=26)		
3 cm \downarrow (8)	6(75.0%)	4.3 \pm 5.1 [†]
3 cm \uparrow (18)	12(66.7%)	2.3 \pm 2.3
S. AFP(n=20)		
200 ng/ml \downarrow (10)	7(70.0%)	3.2 \pm 4.4 [‡]
200 ng/ml \uparrow (10)	7(70.0%)	1.4 \pm 1.3
S. HBs Ag(n=31)		
Positive(25)	19(76.0%)	3.0 \pm 3.4
Negative(6)	4(66.7%)	3.2 \pm 3.6

TGF- α score(Av); 3.1 \pm 2.2

*Mean \pm Standard deviation

[†]P<0.05, [‡]P<0.05

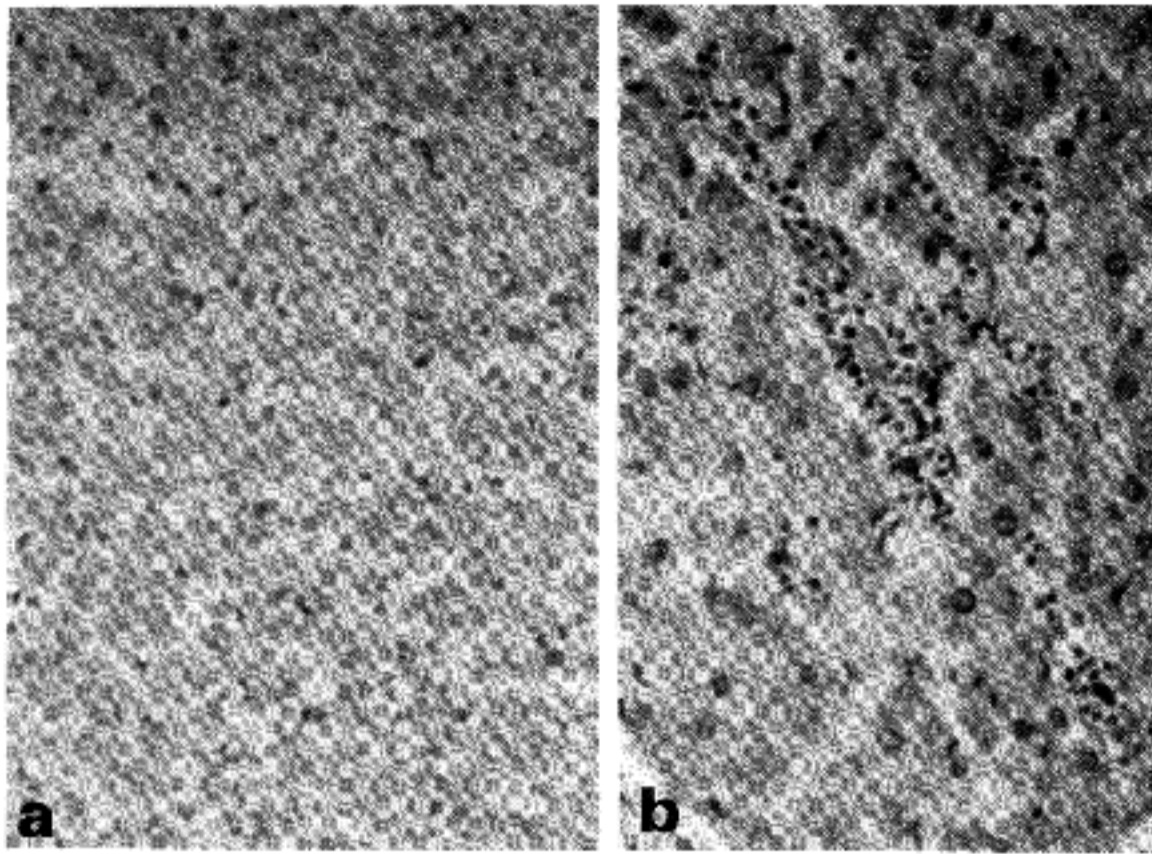


Fig 8. PCNA reactive cells are scattered(a) and/or clustered around the inflammatory foci in the nonneoplastic tissue(b).

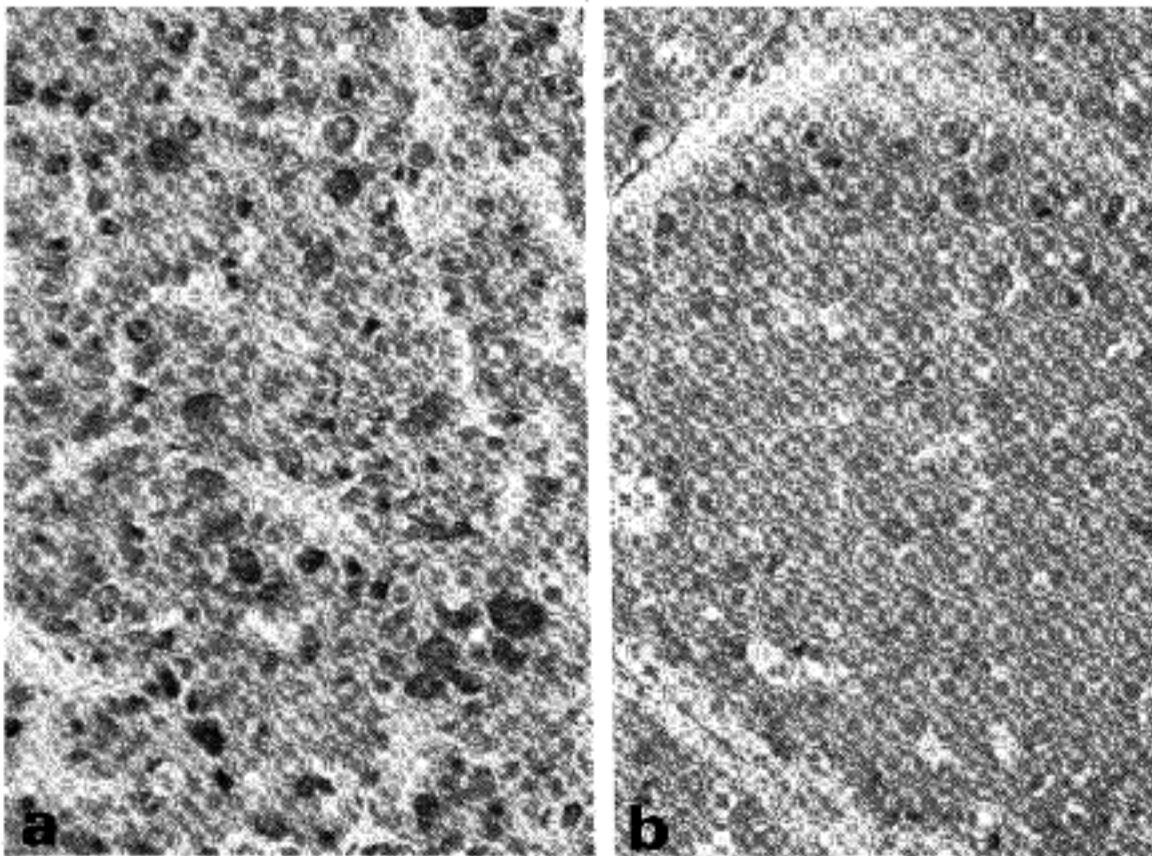


Fig 9. PCNA expression is intense and frequent in the high grade HCCs(a), while low grade HCCs show less frequent and marginal expression in the tumor nests(b).

표현되었다(Fig. 7).

색상형 간세포암종은 18예(78.3%)에서 양성 반응을 보였으며, 경화형 및 증식형은 전예 모두 전반적으로 중등도 이상의 양성 반응을 보였으나 선방형은 1예(50.0%)에서만 부분적으로 미약한 양성반응을 보였다. 또한 선방형과 색상형에 비해 경화형 및 증식형은 4 점 이상의 high score를 보였다. Grade I과 II의 간세포암종에서는 각각 3예(75.0%)와 10예(71.4%)에

서, Grade III과 IV에서는 각각 9예(81.8%)와 1예(50.0%)에서 발현되었으며, 고분화형(grade I, II)과 저분화형(grade III, IV)의 TGF- α score는 각각 3.4 ± 3.9 및 2.6 ± 2.5 로서 분화도에 따른 TGF- α 발현의 의미 있는 차이는 없었다.

TGF- α 의 발현은 혈중 HBs Ag과는 관련이 없으며, 종괴의 크기가 3 cm 이상인 경우에 비해 그 보다 작은 크기의 간세포암종에서 의미있게 높은 TGF- α

Table 7. PCNA labelling index related to histopathologic features of HCC

	PCNA LI [†]
Type(n=31)	
Trabecular(23)	34.3 ± 14.1
Acinar(2)	32.5 ± 16.5
Sclerosing(2)	22.0 ± 5.0
Compact(1)	30.3 ± 11.0
Mixed(3)	24.0 ± 15.7
Grade(n=31)	
I(4)	13.8 ± 7.5
II(14)	28.9 ± 11.0
III(11)	43.3 ± 8.5 [‡]
IV(2)	46.0 ± 26.0 [‡]
Size(n=26)	
3 cm ↓ (8)	31.4 ± 13.8
3 cm ↑ (18)	33.8 ± 14.6
S. AFP(n=20)	
200 ng/ml ↓ (10)	31.8 ± 15.8
200 ng/ml ↑ (10)	42.6 ± 6.6 [‡]
S. HBs Ag(n=31)	
Positive(25)	36.5 ± 12.8
Negative(6)	27.6 ± 11.5

PCNA LI(Av.); 34.4 ± 13.6

[†]Mean ± Standard deviation[‡]p<0.05, [§]p<0.05

score를 나타내었다. 또한 혈중 AFP 치가 200 ng/ml 이상인 경우에서 평균치 이하의 낮은 TGF- α score를 보였다(Table 6).

4. PCNA에 대한 면역조직화학적 검색

PCNA는 발현 강도의 차이는 있으나 간세포암종 전예에서 미만성으로 종양세포의 핵에서 양성 반응을 보였으며, 2예의 간세포암종에서 극히 일부의 종양세포의 세포질에서 핵과 함께 양성 반응을 보이기도 하였다. PCNA가 발현되는 종양세포의 분포는 대부분 미만형이며, 결절성 성장을 보이는 종양 결절의 변연부에서는 일부 국소형으로 표현되었다. 주변의 간경변증과 정상 간조직에서 PCNA 양성세포는 개별적으로 산발적인 분포를 보이며, 염증반응의 인접부위에서 국소적으로 발현되었다(Fig. 8). 발현의 강도는 약양성 발현을 주로하면서 강양성 발현을 보이는 세포가 혼재된 양상이며, 간세포암의 조직학적

Table 8. Relationship between TGF- α score, PCNA LI, and HBs Ag expression in HCC

		HBs Ag Expression	
		Positive	Negative
TGF- α score	PCNA LI	TGF- α score	PCNA LI
3.0 ± 3.4	32.9 ± 14.2	3.2 ± 3.6	33.3 ± 14.3

TGF- α expression			
Low score		High score	
HBs Ag(+)	PCNA LI	HBs Ag(+)	PCNA LI
42.1%	36.2 ± 13.9	58.3%	28.3 ± 12.4

TGF- α score(Av.); 3.1 ± 2.2, PCNA LI(Av.); 34.4 ± 13.6

유형과는 관련성은 없으나 종양세포의 이형성이 심한 저분화형일수록 강양성 반응과 함께 보다 흔히 관찰되었다(Fig. 9). 전체 31예의 평균 PCNA 표식지수는 34.4 ± 13.6 이었으며, 간경변증등의 종양조직에 인접한 간조직의 PCNA 평균 표식지수는 3.5 ± 2.1로 측정되었다.

조직학적 유형에 따른 PCNA 표식지수는 색상형이 34.3 ± 14.1, 선방형이 32.5 ± 16.5, 충실형이 30.3 ± 11.0인데 비해서 경화형은 22.0 ± 5.0로 상대적으로 낮은 표식지수를 보였다. 간세포암종의 grade에 따른 PCNA 표식지수는 grade I, II가 각각 13.8 ± 7.5, 28.9 ± 11.0로 평균치보다 낮고, grade III, IV가 각각 43.3 ± 8.5, 46.0 ± 26.0으로 높게 측정되어 악성도가 높을수록 PCNA 표식지수는 의미있게 증가하였다(p<0.05). 종괴의 크기에 따른 PCNA 표식지수의 의미있는 차이는 없으나, AFP 혈중 농도가 200 ng/ml 이하인 경우보다 그 이상인 환자에서 PCNA 표식지수의 의미있게 높았다(Table 7).

5. 각 항원의 관련성

종양조직에서의 HBs Ag 발현의 유무에 따른 PCNA 표식지수 및 TGF- α score의 의미있는 차이는 없으며, 또한 TGF- α score에 따른 HBs Ag의 발현 및 PCNA 표식지수의 의미 있는 차이도 관찰되지 않았다(Table 8).

고 찰

HBV가 간세포암종의 발생에 관련되어 있다고 여

겨지며, 이 관련성을 규명하기 위한 많은 연구가 면역조직화학적^{1-4,7,10,28} 및 분자생물학적^{5,11,29,30}인 측면에서 이루어지고 있다. 간세포암종의 종양 및 주변 조직에서의 HBs Ag의 발현 빈도는 보고자에 따라 큰 차이를 보이며, 여기에는 혈중 HBs Ag 양성을 동반된 간경변증의 유무 및 종류, 대상 가검물의 채취 방법 및 항원 발현의 방법 등에 따라 다른 것으로 알려져 있다^{2,9,31,32}. 한등의 보고에 의하면 한국인의 간세포암종의 종양 및 주변조직에서의 HBs Ag은 42.6%, 80.9%의 빈도로 발현되며¹⁰, 또한 김등도 이와 비슷한 결과를 보인다고 하였다⁷. 이들과 함께 본 검색에서의 결과, 즉 종양 및 주변조직에서의 48.4%와 67.9%는 구미인에서의 발현 빈도, 특히 종양조직에서의 발현 빈도에 비해 현저히 높으며, 이는 B형 간염의 높은 유병률과 관계가 깊은 것으로 생각된다.

Hsu등은 높은 소간세포암종이 종괴가 커짐에 따라 그 발현율이 낮아진다고 하였으며², 소형 및 대형 간세포암종을 비교분석한 김등에 의해서도 HBV는 다단계 과정의 간세포암종의 발생에서 초기에만 관여할 뿐 종양의 성장과 진행에는 무관한 것으로 추정되고 있다³³. 본 검색에서는 HBs Ag의 발현 빈도는 종괴의 크기와는 무관하였으며, 혈중 HBs Ag가 양성인 간세포암종에서 혈중 AFP의 농도가 높다는 점은 Vogel등³⁴과 Kashala등³⁵에 의해서 기술된 바 있다. 본 검색에서는 혈중 AFP의 농도가 200ng/ml 이상인 경우 보다 이하인 간세포암종에서 더 높은 HBs Ag 발현 빈도를 보였으며, 또한 종양의 분화도와 관련하여 저분화형보다 고분화형에서 더 잘 발현되었으나^{3,10,28,32}, Hsu등은 분화도와는 관련이 없다²고 하여 아직까지 이에 관한 명확한 결론은 없는 실정이다.

HBs Ag 양성 세포는 산발적, 군집, 또는 미만성으로 분포하며^{2,3,31}, 비경변성 주변 조직에서 군집형이 자주 관찰된다고 한다². 본 검색에서 경변성 병변에서는 결절에 따라 선택적으로 군집형 발현을 보이는 경향이 있었으며, 종양조직에서도 대부분 크기가 다양한 군집형으로 발현되었다. 이와 같이 결절의 선택적 발현과 군집형 발현 양상은 간세포의 증식 과정에 HBs Ag와 관련된 클론의 반복적 선택이 있었음을 시사하는 것으로 생각되었다.

HBs Ag의 세포내 발현 양상과 관련하여 그 유형을 세포질형, 봉입체형, 세포막형, 및 반점형^{2,27}, 또는 봉입형, 낭포관상형, 및 미만성 원섬유형등으로 분류하고 있으나³¹, 세포내 발현 유형의 병리학적 의의에 대하여는 구체적으로 알려진 바는 없다. 다만 Hsu등에 의하면 주변조직에서는 다양한 세포내 발현 양상

을 보이며, 경변성 결절내에는 동일한 유형으로 발현되는 반면에, grade I의 간세포암종을 제외하고 세포막형 및 봉입체형이 거의 관찰되지 않는다고 하였다². 본 연구에서도 주변 또는 종양조직에서는 주로 세포질형으로 표현되었으나, 봉입체형 및 세포막형은 주변 조직에서 각각 9예(47.4%), 3예(15.8%)에서 관찰되었고, 2예의 간세포암종의 극히 일부에서만 봉입체형이 관찰되었다. HBs Ag의 세포내 발현 유형의 차이는 HBV 감염에 의한 손상된 간세포의 단백질 분비 기능 이상뿐만 아니라 간세포에서 HBs Ag의 발현이 안될 정도의 심한 유전자 재조합과 관련지어 추정해 볼 수 있다^{36,37}.

TGF- α 의 과표현에 의한 EGFR의 자가분비형 자극은 암유전자의 과표현과 함께 종양증식의 진행에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있으며^{11-15,38}, 아울러 몇몇 인체 종양의 악성도의 지표로서 가치있는 것으로 보고되기도 하였다³⁹⁻⁴². 또한 TGF- α 는 실험적 간손상 또는 부분 간절제후의 간세포 재생에 기여하며⁴³, 아울러 인간 TGF- α 유전자를 주입한 동물 실험에서 간세포암종이 유발되고⁴⁴, 간세포암종 환자의 소변에서 TGF- α 의 농도가 증가한다는 점⁴⁰등으로 TGF- α 는 간세포암종의 병리발생학적인 측면에서 주목받고 있다.

간세포암종에서의 TGF- α 발현 빈도는 보고자에 따라 28%에서 82% 정도의 현격한 차이를 보이며, 또한 주변 조직에서의 빈도 역시 비슷한 차이를 보이고 있다^{20,21}. 본 연구에서는 74.2%(23/31예)의 빈도를 나타내 Chu등의 보고(82%)와 비슷하였다. Chu등에 의하면 종양 주변 조직에서의 HBV 항원 발현이 높을 경우에 TGF- α 의 발현 빈도가 높으며, 이 두가지가 동일한 세포에서 동시에 발현되는 경변성 결절을 관찰하고, 간세포암종의 발생에 이 두 항원성 단백질의 일련의 연속적인 관련성이 있을 것이라고 주장하고 있다. 그러나, 연속절편을 이용한 본 검색에서 두 항원성 단백질이 동일한 세포에서 발현되는 것은 관찰하지 못하였다. 아울러 Han과 Park등에 의해서도 TGF- α 는 HBs Ag의 발현과는 직접적인 관련성이 없는 것으로 이해되고 있으며⁴⁵, 이들은 insulin-like growth factor-II(IGF-II) 및 TGF- α 의 증식촉진 역할을 일련의 간세포 증식 병변을 대상으로 조사하고, TGF- α 는 간세포의 재생과정에, IGF-II는 종양성 전환에 더 깊이 간여한다고 주장한 바 있다. 본 검색에서는 IGF-II 발현을 조사하지 못했으나 종양뿐만 아니라 재생성 결절에서도 TGF- α 가 발현되는 점은 이들의 내용과 부분적으로 일치하고 있다.

Collier등²¹에 의하면 종양세포 및 담관 상피세포가

TGF- α 의 주된 생성원이며 그외 정상 및 재생성 간세포에서도 발현된다고 하였다. 본 검색에서도 종양 조직에 매우 근접해 있거나 합입된 정상 간세포와 경변성 결절의 염증성 섬유성 격벽내에 합입된 군집상의 정상 간세포와 주변의 증식한 담소관 상피세포에서 양성 반응을 보였으며, 그 발현 정도는 종양조직보다 더 현저하였다. 따라서 종양조직에서는 TGF- α 의 합성 능력을 초과하는 분비기능이 있거나, 종양 조직에서 분비된 TGF- α 가 주변 세포에 paracrine형 기전으로 합성을 자극할 가능성을 추정해 볼 수 있다. 특히 Bachem등은 간세포암종에서 풍부한 혈관의 형성은 부분적으로는 종양세포에서 분비되는 TGF- α 에 의한 주변 간질조직의 paracrine형 자극과 관련지어 설명하고 있다⁴⁶. 따라서 경화형 및 섬유증상형 간세포암종이 다른 유형의 간세포암종에 비해 TGF- α 의 발현이 다를 것으로 추정할 수 있으나, 본 연구에서 조직학적 유형에 따른 의미있는 차이를 보이지 않았다.

TGF- α 의 세포내 발현 양상은 대부분 세포질형이나 그외 세포막형, 핵주변형, 봉입체형, 및 혼합형등으로 표현되며^{20,21}, 이들 유형의 생물학적인 의의나 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 Teixido등에 의하면 세포막형은 TGF- α 전구체가 분비과정중 세포막에 남아있는 것이며, 또한 이는 EGFR과 결합하는 것이라고 하였다⁴⁷. 본 검색에서는 거의 모든 양성예가 세포질내 미만성 과립 형태로 표현되었다. Chu등에 의하면, TGF- α 의 발현은 종괴의 크기, 조직학적 유형 및 악성도등과는 무관한 것으로 보고하고 있으나, 본 검색에서도 TGF- α 발현의 강도 및 범위는 조직학적 유형 및 grade와는 무관하였으나 3 cm 이하의 소형 간세포암종 또는 혈중 AFP 농도가 200 ng/ml 이하의 경우에서 더 높은 TGF- α score 를 보인 점은 특기할만 하였다.

PCNA의 발현양상에 대하여 Bravo등은 면역형광항체 검사로 핵원형질형(nucleoplasmic PCNA)와 DNA 합성장소 관련형(DNA replication site associated PCNA)의 두가지의 유형으로 기술한 바 있으며, 유기용제로서 고정된 표본에서는 핵원형질형을 관찰할 수 없고 단지 DNA 합성장소 관련형만이 과립성으로 발현된다고 하였다⁴⁸. 그외 항원성 epitope의 차이 및 조직의 처치방법등도 PCNA의 발현에 영향을 주는 요소로 알려져 있다²³. 본 검색에서 핵염색질을 따라 미세한 과립성 반응을 보이는 것을 약양성, 굵은 과립 또는 균질성으로 염색되어 핵염색질을 알아볼 수 없는 것을 강양성으로 하였던 바, 대부분은 약양성의 반응을 보였으며, 핵의 이형성의 정도가

강한 세포에서 강양성 반응을 보이는 경향이 있어 이형성의 정도와 DNA 합성능력과 상관성이 암시되기도 하였다. PCNA의 발현정도는 종양의 종류에 따라 다르며⁴⁹, 이러한 차이는 종양 자체의 증식능력 뿐만 아니라 단클론 항체의 종류, 고정시간 및 포매 또는 수술전 약제등의 사용등 여러가지 요인이 관련된다고 한다^{23,50}. Matsuno 등⁴⁹이 결절내 결절의 소형간세포암을 대상으로 보고한 바에 따르면 PCNA양성 세포는 종양 전방에 걸쳐 분포하며 주변의 음성 반응 세포에 비해 작고, 주변의 간경변증보다 PCNA 양성세포의 수가 많다고 하였다²⁴. Terada 등은 선종성 증식등의 전암성 병변과 소형 간세포암종의 두병변 사이에는 PCNA 표식지수의 차이가 있으며, 또한 PCNA 표식지수는 간세포암종의 악성도와 상관성이 있는 것으로 보고한 바 있다²⁵. 본 검색에서 PCNA 표식지수는 34.4 ± 13.6 으로 측정되었으며, 이 결과는 Kawakita등이 보고한 55.6 ± 49.8 이나, 소형 간세포암종의 42.4 ± 17.7 에 비해 다소 낮은 수치를 보였다⁵¹. 아울러 본 검색에서 PCNA 표식지수는 조직학적 유형과 상관성을 보이지 않았으나, Terada등의 보고와 같이 세포학적 악성도에 비례하여 높게 나타났다.

PCNA 발현의 조절을 Hall등은 종양세포에서 분비되는 여러 성장인자의 자가(autocrine) 또는 방분비형(paracrine) 자극과 관련하여 설명하고 있다²³. 즉, PCNA 발현의 증가는 종양세포에서 분비되는 혈소판 유래 성장인자(Platelet-derived Growth Factor, PDGF)등과 같은 성장인자가 PCNA mRNA의 안정성을 증가시키고, 성장인자의 자가분비형 또는 방분비형 자극으로 종양세포에서 PCNA가 축적되며, 경우에 따라 이 기전이 탈조절되어 DNA 합성을 필요로 하지 않은 종양의 주변세포에서 PCNA가 발현된다고 하였다. 본 검색에서는 종괴에 인접한 정상세포에서 발현되는 탈조절 현상은 볼 수 없었으며, 재생성 결절이 일부 포함된 주변 간세포에서의 PCNA 표식지수가 3.5 ± 2.1 로서 간세포암종에 비해 현저히 낮으며, 이는 Terada등이 조사한 주변의 재생성 결절의 7.6 ± 5.8 과는 큰 차이가 없었다²⁵. 또한 본 검색에서 PCNA 표식지수와 TGF- α 발현 유무 또는 TGF- α score와는 상호 관련성은 없었다. 그러나, 혈중 AFP 농도가 200 ng/ml이상인 경우에 PCNA 표식지수가 높은 점은 매우 흥미있는 소견이기는 하나 추후 재검토되어야 할 부분이다. Tsuda등은 간세포암종의 발생과 진행을 HBV와 관련된 클론의 반복적인 선택과 이에 속발한 증식능이 높은 아클론의 증식으로 설명하고 있다⁵². 본 검색에서 각 항원성 단백질의 발현

에 상호 연관성은 없으나, 종괴 주변의 인접 정상조직에서도 TGF- α 가 강하게 발현되고, HBs Ag이 간경변증의 몇몇 선택된 결절에서 군집으로 또한, 저분화형보다 고분화형 간세포암종에서 보다 흔히 발현되며, 간세포암종에서의 악성도에 따라 PCNA 표식지수가 증가하는 점은 이들이 각기 독립적으로 작용하기는 하나 간세포암종의 발생과 진행에 기여하는 것으로 추정되었다.

결 론

외과적으로 절제한 31예의 간세포암종을 대상으로 HBs Ag, TGF- α , 및 PCNA의 발현 빈도 및 양상을 면역조직화학적 방법(ABC법)으로 조사하고, 아울러 간세포암종의 병리조직학적 소견과의 상호 관련성을 검색한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

첫째, HBs Ag은 혈중 HBs Ag이 음성인 경우에는 발현되지 않았으며, 31예중 15예(48.4%)에서 발현되었다. 대부분 세포질형(cHBs Ag)이었고 집단적인 분포를 나타내었다. HBs Ag의 발현은 간세포암종의 조직학적 유형과는 무관하였으나, 저분화형(38.5%)에 비해 고분화형 간세포암종(55.6%)에서 높은 빈도를 보였다. 주변 조직에서의 HBs Ag 발현 빈도는 67.9%이었으며, 재생성 결절에 따른 HBs Ag의 선택적 발현을 보였다.

둘째, TGF- α 는 23예(74.3%)의 간세포암종에서 구성세포의 세포질에서 양성 반응을 보였으며, 조직학적 유형 및 분화도와 TGF- α 발현 범위 및 강도와의 상호 관련성은 없었다. 주변 조직의 간세포 및 담관상피세포에서도 양성 반응을 보였으며, 주변 조직의 재생성 결절에서는 결절의 변연부에서 발현의 강도가 현저하였다.

셋째, PCNA는 종양세포의 핵에서 양성반응을 보이며, PCNA 양성세포는 종양 전반에 걸쳐 미만성으로 분포하였다. 주변조직에서의 PCNA 표식지수가 3.5 ± 2.1 로 낮은 반면에, 간세포암종의 PCNA 표식지수는 34.4 ± 13.6 로 현저히 높았으며($P < 0.005$), 분화도가 높은 경우(25.5 ± 12.7)에 비해 분화도가 낮은 간세포암종(43.7 ± 12.3)에서 의미있게 높은 표식지수를 보였다($P < 0.05$).

결론적으로, TGF- α 와 PCNA는 간세포의 재생 및 증식에 관련되어 있고, PCNA 표식지수는 간세포암종의 조직학적 악성도와 관련하여 종양세포 증식정도를 판정하는데 유용한 표식자임이 확인되었으나, HBs Ag, TGF- α , 및 PCNA의 발현에는 상호 관련성이 없는 것 같다.

참 고 문 헌

1. Hirohashi S, Shimosato Y, Ino Y, Kishi K. Distribution of hepatitis B surface and core antigens in human liver cell carcinoma and surrounding non-tumorous liver. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 565-8.
2. Hsu HC, Lin WSJ, Tsai MJ. Hepatitis-B surface antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Cancer* 1983; 52: 1825-32.
3. Suzuki K, Uchida T, Horiuchi R, Shikata T. Localization of hepatitis B surface and core antigens in human hepatocellular carcinoma by immunoperoxidase methods. *Cancer* 1985; 56: 321-7.
4. Okuda K, Nakashima T, Sakamoto K. Hepatocellular carcinoma arising in noncirrhotic and highly cirrhotic livers, A comparative study of histopathology and frequency of hepatitis B markers. *Cancer* 1982; 49: 450-455.
5. Alexander SK, Ulrich L, Ludwig W, Birgit L, Peter HH. Hepatitis B surface transactivator HBx uses a tumor promoter signalling pathway, *Nature* 361; 742-5.
6. 남정매, 문한규. 한국인 간염에 있어서 HBs Ag에 관한 병리조직학적 및 임상적 연구. *대한소화기병학회지* 1978; 10: 17-25.
7. 김경수, 고향미, 박창수, 정상우, 조규혁. 만성 간질환에서 B형 간염 바이러스의 발현 및 DNA 검출에 관한 연구. *대한병리학회지* 1993; 27: A51.
8. 진윤미, 박찬일. 간경변증 활성도에 따른 HBs Ag 및 HBc Ag의 발현 양상. *대한병리학회지* 1993; 27: A52.
9. 이해경, 이광민, 정동규, 이용용. 만성 B형 간염에서 간세포내 HBc Ag에 대한 연구 II. *대한병리학회지* 1992; 26: 355-9.
10. 한지영, 정우희, 전재윤, 박찬일. 간세포암종에서 종괴와 종괴주변 간조직의 HBs Ag 및 HBc Ag 발현. *대한병리학회지* 1993; 27: 371-78.
11. Varmus H. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev Genet* 1984; 18: 553-612.
12. Heldin CH, Westermark B. Growth factors: Mechanisms of action and relation to oncogenes. *Cell* 1984; 37: 9-20.
13. Goustin A, Leof E, Shipley G, Moses H. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 1986; 46: 1015-29.
14. Todaro GJ, Fryling C, DE Larco JE. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells; polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors, *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5258-62.

15. Derynck R. Transforming growth factor α . *Cell* 1988; 54: 593-5.
16. Kudlow JE, Koblin MS, Purchio AF, et al. Ovarian transforming growth factor α gene expression: Immunohistochemical localization to the theca-interstitial cells. *Endocrinology* 1987; 121: 1577-9.
17. Dudlow JE, Leung AWC, Koblin MS, et al; Transforming growth factor- α in the mammalian brain. Immunohistochemical detection in neurons and characterization of its mRNA. *J Biol Chem* 1987; 264: 3880-3.
18. Samuels V, Barrett JM, Bockman S, Pantazis CG, Aen JR MB. Immunohistochemical study of transforming growth factor- α expression in benign and malignant gliomas. *Am J Pathol* 1989; 134: 895-902.
19. Tateichi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Immunohistochemical evidence of autocrine growth factor in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res* 1990; 50: 7077-80.
20. Chu CH, Constantine AA, Adrian MDB Edward T. Transforming growth factor- α in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* 1992; 70: 1049-56.
21. Collier JD, Guo K, Gullick WJ, Bassendine MF, Burt AD. Expression of transforming growth factor- α in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1993; 13: 151-5.
22. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. 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.
23. Hall PA, Levison DA. Review; Assessment of cell proliferation in histologic material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
24. Matsuno Y, Hirohashi S, Furuya S, Sakamoto M, Mukai K, Shimasato Y. Heterogeneity of proliferative activity in nodule-in-nodule lesions of small hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 1137-40.
25. Terada T, Nakanuma Y. Cell proliferative activity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 591-98.
26. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver. *Cancer* 1954; 7: 462-503).
27. Borchard F, Gussmann V. Detection of HBs Ag-containing cells in liver biopsies by different stain and classification of positivity reacting ground-glass hepatocytes. *Virchows Arch[Path Anat]* 1979; 384: 245-61.
28. Ilradi CF, Ying YY, Ackerman LV, Elias YM. Hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma in the People's Republic of China. *Cancer* 1980; 46: 1612-6.
29. Paterlini P, Gerken E, Nakajima S, et al. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancer from patients negative for hepatitis surface antigen. *N Engl J Med* 1990; 323: 80-5.
30. Lai MY, Chen PJ, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS. Identification and characterization of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HBs Ag seronegative patient with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatology* 1990; 12: 575-81.
31. Nayak NC, Rajeev S. Localization of hepatitis B surface antigen in conventional paraffin sections of the liver. *Am J Pathol* 1975; 81: 478-92.
32. Nazarewicz T, Krawczynski K, Slusarczyk J, Nowoslawski A. Cellular localization of hepatitis B virus antigens in patients with hepatocellular carcinoma coexisting with liver cirrhosis. *J Infect Dis* 1977; 135: 298-302.
33. 김용일, 이건국, 송상용. 소형간세포암종; 39에에 대한 병리학적 분석과 대형 간세포암종 과의 비교. *대한병리학회지* 1992; 26: 103-16.
34. Vogel CL, Primack A, McIntire KR, Carbone PP, Anthony PP. Serum alpha-fetoprotein in 184 Ugandan patients with hepatocellular carcinoma. Clinical, laboratory and histopathologic correlation. *Cancer* 1974; 33: 959-65.
35. Kashala LO, Kalengayi MMR, Essex M. Alpha-fetoprotein synthesis in human hepatocellular carcinoma: correlation with hepatitis B surface antigen expression. *Cancer Invest* 1992; 10: 513-22.
36. Lai MY, Chen PJ, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS. Identification and characterization of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HBsAg-seronegative patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatology* 1990; 12; 575-81.
37. Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinell C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 1989; 59; 1145-56.
38. Sporn MB, Todaro GJ. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 1980; 303: 878-80.
39. 이경신, 김병현, 천봉권, 허만하. 신경교종에서의 형질 전환 성장인자- α 와 증식세포핵 항 원의 발

- 현. 대한병리학회지 1994; 28: 149-53.
40. Yeh YC, Tsai JF, Chuang LY, et al. Elevation of transforming growth factor- α and its relationship to the epidermal growth factor and α -fetoprotein levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1987; 47: 896-901.
 41. Yamamoto T, Hattori T. Interaction between transforming growth factor- α and C-Ha-ras p21 in progression of human gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* 1988; 183: 663-9.
 42. Arteaga CL, Hanauske AR, Clark GM, Osborne CK, Hazarika P, Pardue RL. Immunoreactive alpha transforming growth factor activity in effusions from cancer patients as a marker of tumor burden and patient prognosis. *Cancer Res* 1988; 48: 5023-8.
 43. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor- α may be a physiologic regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1558-62.
 44. Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. TGF- α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990; 61: 1137-46.
 45. Han BH, Lee SU, Ahn SY, Hur MH, Seo JH, and Park BC. Differential expression of transforming growth factor- α and insulin-like growth factor II in chronic hepatitis B, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Kor J Gastroenterol* 1994; 26: 127-42.
 46. Bachem MG, Riess U, Gressner AM. Liver fat storing cell proliferation is stimulated by epidermal growth factor/transforming growth factor- α and inhibited by transforming growth factor- β . *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162: 708-14.
 47. Teixido J, Gilmore R, Lee DC, Massague J. Integral membrane glycoprotein properties of the prohormone pro-transforming growth factor- α . *Nature* 1987; 326: 883-5.
 48. Bravo R, MacDonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO* 1985; 4: 655-61.
 49. Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.
 50. Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Path Lab Med* 1987; 111: 841-5.
 51. Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissue from various liver disease fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 1992; 140: 513-20.
 52. Tsuda H, Hirohashi S, Shimasato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 1988; 95: 1664-6.
-