

## 자궁경부 상피내 종양에서 Bcl-2 종양 단백질 및 PCNA 발현양상

동아대학교 의과대학 병리학교실

노미숙·허기영·홍숙희

### Expression Patterns of Bcl-2 and PCNA in Cervical Intraepithelial Neoplasia

Mee Sook Roh, M.D., Gi Yeung Huh, M.D. and Sook Hee Hong, M.D.

Department of Pathology, Dong-A University College of Medicine

Immunohistochemical stains for bcl-2 oncoprotein and PCNA and examination of the mitosis level were performed in 76 cases of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). We studied the expression pattern of bcl-2 protein according to histologic grades and the function of bcl-2 oncogene associated with cellular proliferation by comparing with PCNA expression and the mitosis level.

The results were as follows:

- 1) Of 76 cervical intraepithelial neoplasias, 23 (30.3%) were CIN I, 23 (30.3%) were CIN II, and 30 (39.4%) were CIN III.
- 2) Of 23 CIN I cases, grade 0 and 1 mitosis level were seen in 20 (87.0%), PCNA in 16 (69.6%), and bcl-2 in 19 (82.6%) cases, respectively, which indicates that CIN I lesions have a low cellular proliferative activity.
- 3) Of 30 CIN III cases, grade 2 and 3 mitosis level were noted in 28 (93.3%), PCNA in 25 (83.3%) and bcl-2 in 19 (63.3%) cases, respectively, which indicates that CIN III lesions have a high cellular proliferative activity.

The results suggest that progressive increase of dysfunctional proliferative activity and abnormal decrease of cell death result in increased number of neoplastic cells according to CIN grade. Also the expression rate of bcl-2, PCNA and mitosis level were significantly different between CIN I and III, which suggest that they might be good parameters for classifying CIN into low and high grade and for prediction of the biologic behavior of the CIN lesion. (**Korean J Pathol 1995; 29: 703~713**)

**Key Words:** Bcl-2 oncoprotein, Proliferating cell nuclear antigen, Cervical intraepithelial neoplasia, Immunohistochemistry, Mitosis

## 서 론

인체에서 발생하는 종양 중 자궁경부암은 전암성 병변인 자궁경부 상피내 종양(Cervical intraepithelial neoplasia, CIN)의 등급별 세포의 형태 변화에 대한 관찰을 통해 단계적 발암현상에 대한 형태학적 연구가 잘 이루어져 있는 종양 중의 하나이지만, 자궁경부암의 실제 발암현상에 대한 단계적 기전이나 종양유전자의 역할 그리고 병변의 경과를 예측할 수 있는 지표들은 아직도 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

종양 발생에 관여하고 있는 많은 종류의 유전자 중 B 림프구 기원의 여포형 림프종에서 흔히 과발현되는 bcl-2 종양유전자는 14번과 18번 염색체의 상호전좌로 인하여 재배열된 bcl-2-IGH 융합유전자로 이 유전자로부터 과다하게 만들어진 bcl-2 단백질은<sup>1-3</sup> B 림프구로 하여금 apoptosis 또는 프로그램된 세포사에 저항력을 갖게 하여 세포수명을 연장시켜 종양을 발생시키는 것으로 알려져 있다<sup>4</sup>. Hockenbery 등<sup>5</sup>은 bcl-2 단백질은 림프계 세포 뿐만 아니라 피부, 장관 등 몇몇 상피세포에서도 발현되고, 표층의 분화된 세포층 보다는 기저세포에서 bcl-2 단백질이 발현되는 것을 관찰하였고 이러한 발현 양상은 상피의 표층의 분화된 세포가 수명연장에 의해 과다 축적되는 것이 방지되는 반면 심부의 간세포는 긴 수명을 갖고 분화를 계속해 나간다는 사실을 뒷받침 해준다고 설명하였다. 만약 bcl-2 단백질이 발현되지 않아야 할 상피세포에서 bcl-2 단백질이 계속 나타나게 되면 그러한 세포들은 죽지 않고 수명이 연장되므로 비정상적인 세포의 축적이 일어나게 될 것이다. 이러한 현상은 bcl-2가 세포의 종양성 증식을 일으키는 기전이라고 추측할 수 있으나 각종 암종에 있어서 bcl-2 발현에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이어서 좀 더 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

저자는 우리나라 여성에서 가장 흔한 악성종양인 자궁경부암에서 종양 조직의 증식이나 성장과 연관이 있는 종양유전자의 역할에 대한 연구 중에서 최근에 그 기능에 있어서 기존의 종양유전자와는 다른 기능을 가진 bcl-2 단백질의 발현 양상이 자궁경부암의 전구병소인 상피내 종양에서 병변의 등급에 따라 어떠한 변화를 보이고 있는지를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다. 또한 세포분열 동안 DNA 합성에 필수적인 물질로서 세포증식의 표지자로 알려져 있는 증식세포 핵항원(Proliferating Cell Nuc-

lear Antigen, PCNA)<sup>6</sup>의 발현 양상과 유사분열 세포의 위치를 bcl-2 단백질의 발현과 비교하여 자궁경부암 전구병소의 각 등급에서 bcl-2 종양유전자의 발현과 세포증식능 사이에 어떤 상관관계가 있는지를 알아보려고 본 연구를 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구 대상

1990년 3월부터 1994년 8월까지 동아대학교병원 해부병리과에서 편치 생검, 원추 생검 또는 자궁 전적출술로 얻어진 자궁경부 조직에서 자궁경부 상피내 종양으로 진단된 예 중에서 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토한 후 전체 병변을 대표할 수 있고 파라핀 포매조직의 상태가 양호한 76예를 대상으로 하였다. 이들 76예 중 편치 생검한 조직은 19예, 원추 생검한 조직은 36예, 자궁 전적출술로 절제한 조직은 21예였다.

### 2. 병리조직학적 검색

1) 병리조직학적 등급: 통상적인 방법으로 제작된 hematoxylin-eosin(H&E) 염색표본을 재검토하여 각 층마다 조직학적 진단을 기록하였다. 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급은 상피세포 성숙도의 점차적인 결여와 기저세포양 또는 미분화세포가 상피를 차지하는 비율 등에 기초를 둔 전통적인 방법에 따라 I, II, III 세 등급으로 나누었다.

2) 유사분열 등급: 자궁경부 점막 상피를 세 구역, 즉 방기저층(하층 1/3), 중간층(중간층 1/3), 표재층(상층 1/3)으로 나누어 유사분열이 나타나는 가장 높은 위치에 따라 유사분열이 없거나 기저층에 국한된 경우에는 등급을 0으로 하고, 표재층까지 이른 경우에는 등급 3, 방기저층과 중간층인 경우 각각 등급 1과 등급 2로 표시하였다.

### 3. 면역조직화학적 검색

1) PCNA의 염색 방법과 등급 기준: 종양세포의 증식에 대한 PCNA의 검출은 면역조직화학적 방법으로 염색을 시행하여 관찰하였는데, PCNA에 대한 단클론 항체인 PC10(Dako, USA)을 1:80으로 희석하여 1차 항체로 사용하여 통상적인 avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) 법으로 염색하였다.

PCNA에 대한 면역조직화학적 검색에서 자궁경부 상피내 종양의 점막 병소에 있는 상피세포의 핵에 반응을 보이는 것은 그 강도에 상관없이 모두 양성으로 간주하였다. 염색 등급은 유사분열 등급과 마

찬가지로 나누어, 양성 반응이 없거나 양성 핵이 기저층에 국한되면 등급 0으로 하고, 방기저층, 중간층 또는 표재층에 나타나면 각각 등급 1, 2, 3으로 나누었다.

2) Bcl-2 단백질의 염색 방법과 등급 기준: Bcl-2 단백질 염색도 PCNA와 같은 방법인 ABC 방법으로 시행하였는데, 조직표본을 부착시킨 슬라이드를 구연산 완충액에서 700W 마이크로파로 5분간 2회 전처리 하였고<sup>7</sup>, bcl-2 1차 항체(Oncogene Science, USA)는 1:20으로 희석하여 사용하였다. B 세포 표현형의 여포형 림프종과 반응성 증식을 보이는 편도조직을 양성 대조군으로 사용하였다.

Bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학적 검색에서 자궁경부 상피내 종양의 점막 병소에 있는 상피세포의 핵이나 세포질에 염색되는 것은 그 강도에 상관 없이 모두 양성으로 간주하였다.

4. 통계 처리

조직학적 등급, 유사분열, PCNA 그리고 bcl-2 등급을 각각 구한 뒤 IBM-PC의 SAS system을 이용하여 비모수적 Spearman 순위상관계수 검정으로 상관관계를 알아보고 chi-square 검정을 통해 빈도분석하여 p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

자궁경부 상피내 종양의 병리조직학적 등급에 따른 유사분열 등급 및 PCNA와 bcl-2 단백질에 대한 면역조직화학적 염색 결과는 다음과 같다.

1. 병리조직학적 등급

연구 대상이 된 76예 중 조직학적으로 자궁경부 상피내 종양 등급 I은 23예(30.3%), 등급 II는 23예(30.3%) 그리고 등급 III은 30예(39.4%)였다.

2. 유사분열 등급과 병리조직학적 등급의 비교

(Table 1, Fig. 1~4)

76예의 자궁경부 상피내 종양의 점막 병소에서 11예(14.5%)가 유사분열을 보이지 않거나 기저층에 국한된 등급 0이었으며, 등급 1이 21예(27.6%), 등급 2가 28예(36.8%), 그리고 등급 3이 16예(21.1%)이었다. 등급 3의 유사분열은 모두 자궁경부 상피내 종양 등급 II와 III에서 나타났다.

조직학적 진단에 따른 자궁경부 상피내 종양 등급과 유사분열 등급을 비교한 결과 조직학적 등급

Table 1. Comparison of mitosis grades and histologic grades in 76 cervical intraepithelial neoplasia

CIN grade	No. of case	Mitosis grade			
		0	1	2	3
I	23(30.3%)	8	12	3	0
II	23(30.3%)	3	7	8	5
III	30(39.4%)	0	2	17	11
Total	76(100%)	11(14.5%)	21(27.6%)	28(36.8%)	16(21.1%)

Table 2. Comparison of PCNA grades and histologic grades

CIN grade	No. of case	PCNA grade			
		0	1	2	3
I	23	9	7	7	0
II	23	2	5	11	5
III	30	2	3	9	16
Total	76(100%)	13(17.1%)	15(19.8%)	27(35.5%)	21(27.6%)

이 높을수록 유사분열 등급도 증가되어 Spearman 상관계수  $r_s=0.652(P<0.001)$ 로 통계학적으로 의미있는 상관관계를 나타내었다.

3. PCNA 등급과 병리조직학적 등급의 비교

(Table 2, Fig. 1~4)

PCNA에 대한 면역조직화학적 반응성은 적갈색의 미만성 또는 과립성의 핵 염색으로 나타났다. 염색성은 핵에만 국한되어 나타났으나 유사분열 세포에서는 세포 전체에 걸쳐 미만성으로 염색성이 나타났다. 대부분의 예에서 100배 시야에서 쉽게 관찰될 수 있는 염색 강도를 나타내었다. 일부 자궁경부 상피내 종양 병변 주위의 정상상피에서도 PCNA에 대한 양성 반응이 나타났는데 이는 모두 기저층에 국한되어 나타났으며, 또 7예(11.0%)에서는 방기저층에도 양성 반응이 나타나 등급 1 정도의 염색성을 나타내었다. 정상상피에서부터 상피내 종양으로 이행되는 경계부위에서는 PCNA 양성 정도가 갑자기 증가하는 양상이 관찰되었다.

PCNA 등급은 자궁경부 상피내 종양의 점막 병소에서 PCNA 양성 세포가 나타나는 가장 높은 층에



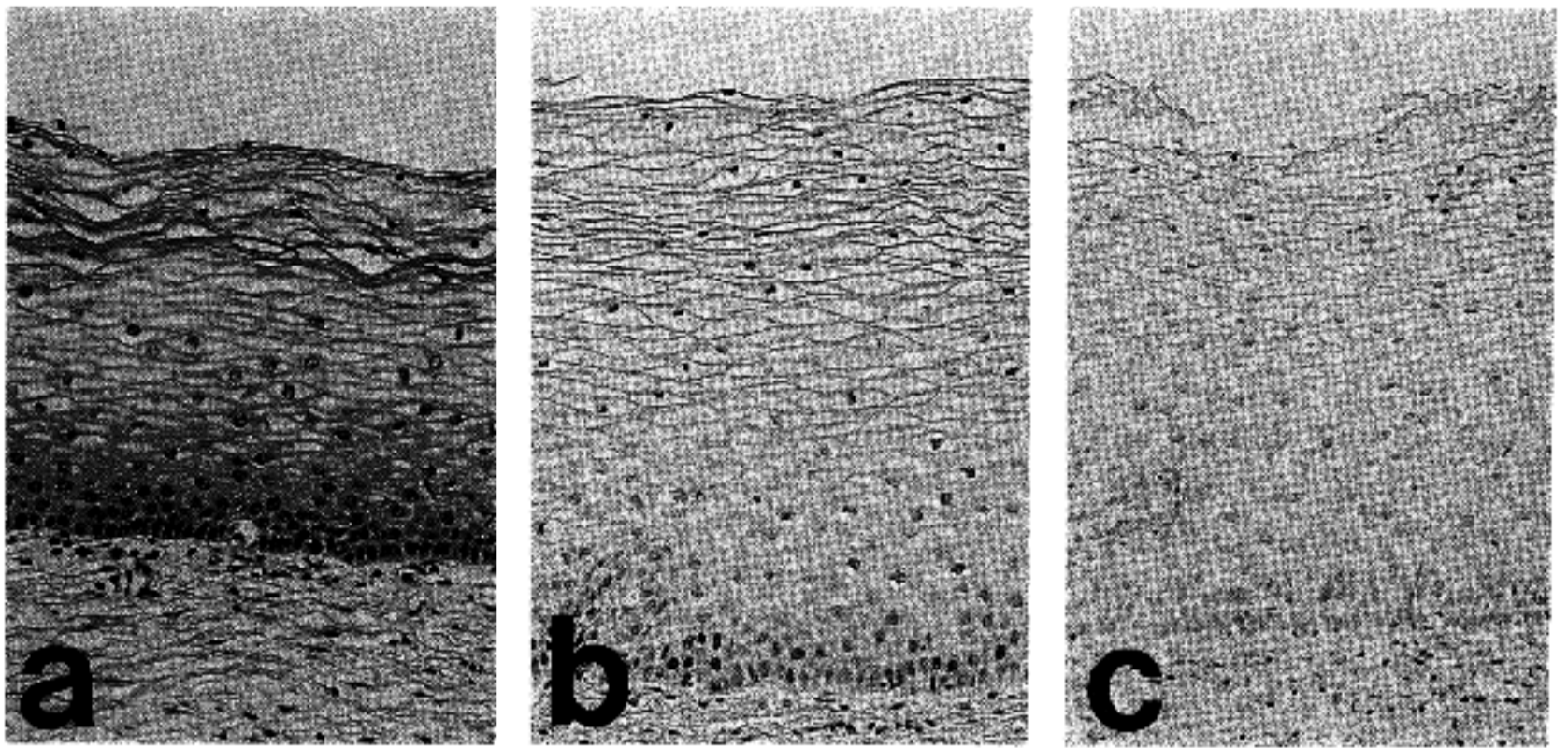


Fig. 1. Normal squamous epithelium adjacent to the CIN lesion

- a) Normal squamous epithelium without mitotic figure; Mitosis grade 0
- b) PCNA-positive nuclei confined to the basal layer; PCNA grade 0(Immunohistochemical stain for PCNA)
- c) Bcl-2-positive cells confined to the basal layer; Bcl-2 grade 0(Immunohistochemical stain for bcl-2 protein)

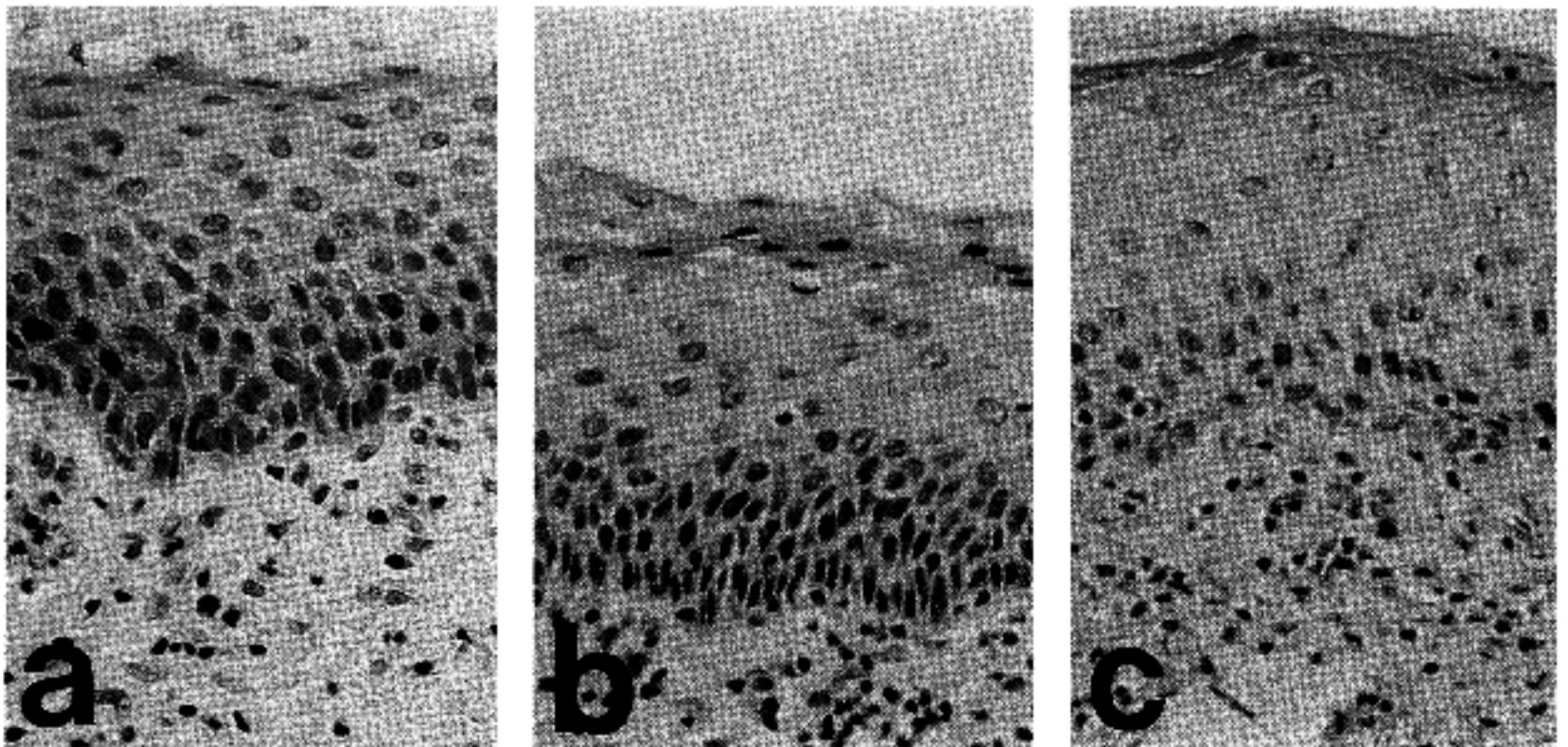


Fig. 2. Cervical intraepithelial neoplasia, grade 1

- a) Mitotic figures extending into the parabasal layer; Mitosis grade 1
- b) PCNA-positive nuclei extending into the parabasal layer; PCNA grade 1(Immunohistochemical stain for PCNA)
- c) Bcl-2-positive cells extending into the parabasal layer; Bcl-2 grade 1(Immunohistochemical stain for bcl-2 protein)

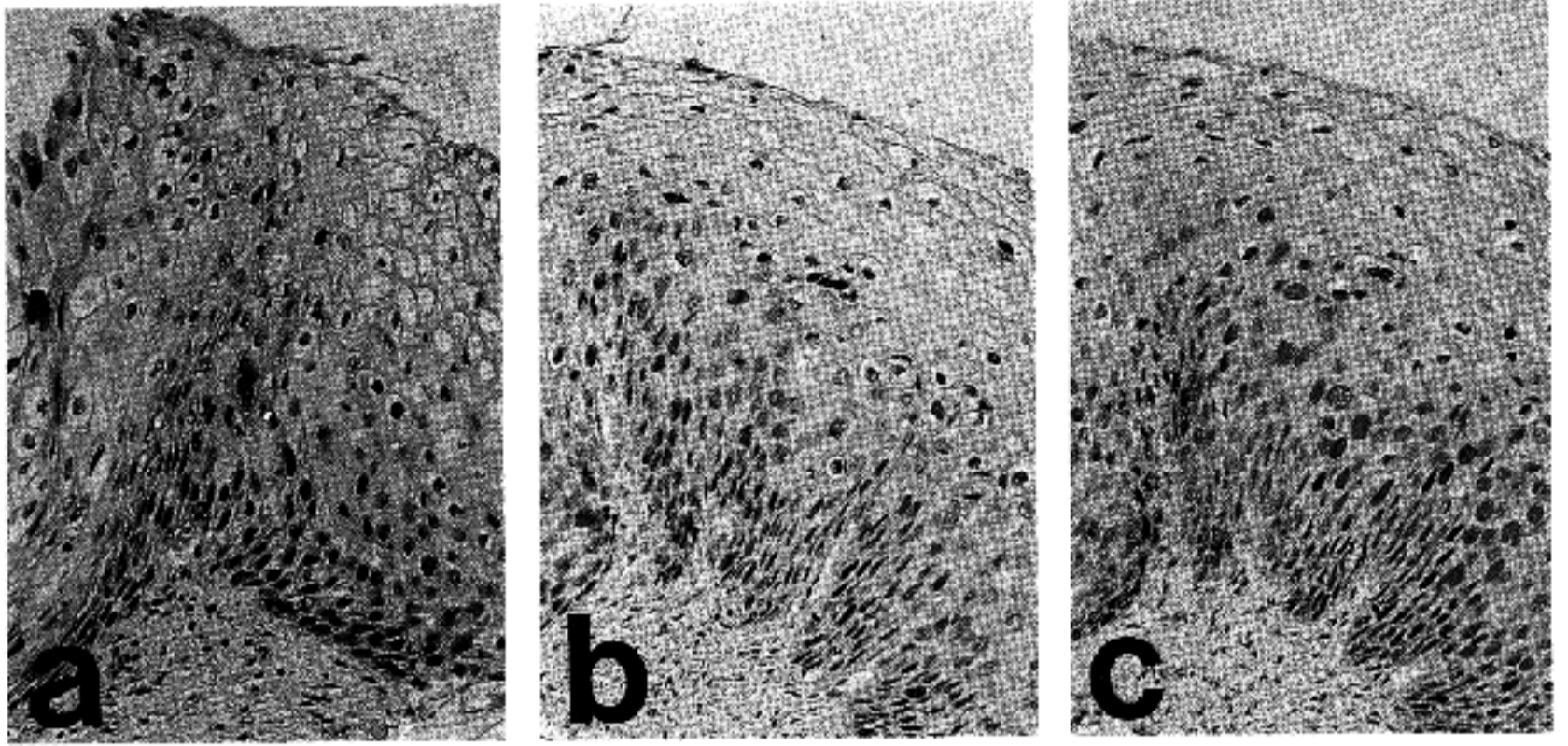


Fig. 3. Cervical intraepithelial neoplasia, grade II

a) Mitotic figures extending into the middle layer; Mitosis grade 2

b) PCNA-positive nuclei extending into the middle layer; PCNA grade 2(Immunohistochemical stain for PCNA)

c) Bcl-2-positive cells extending into the middle layer; Bcl-2 grade 2(Immunohistochemical stain for bel-2 portein)

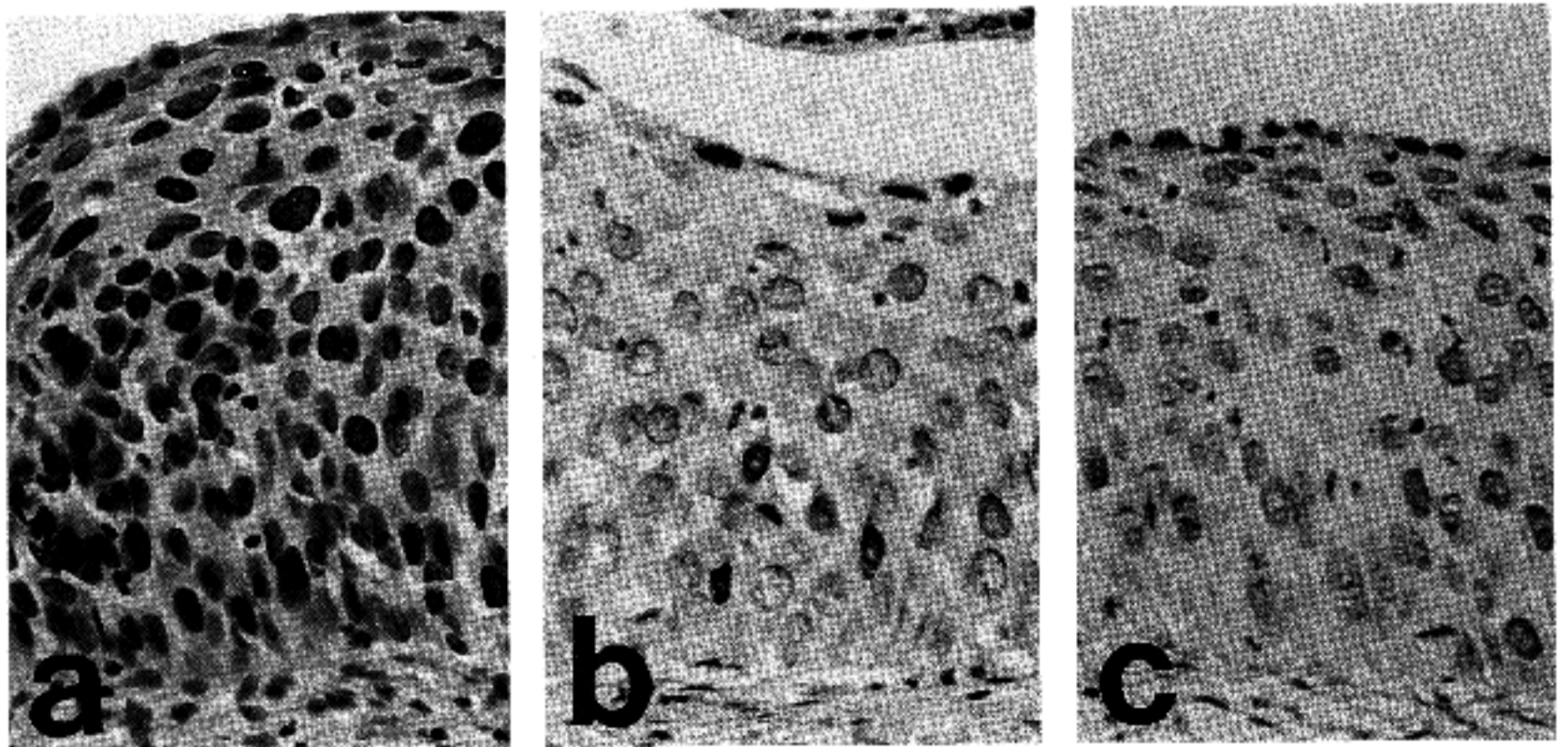


Fig. 4. Cervical intraepithelial neoplasia, grade III

a) Mitotic figures extending into the superficial layer; Mitosis grade 3

b) PCNA-positive nuclei extending into the superficial layer; PCNA grade 3(Immunohistochemical stain for PCNA)

c) Bcl-2 positive cells extending into the superficial layer; Bcl-2 grade 3(Immunohistochemical stain for bel-2 protein)



Table 3. Comparison of bcl-2 grades and histologic grades

CIN grade	No. of case	Bcl-2 grade			
		0	1	2	3
I	23	11	8	4	0
II	23	3	9	8	3
III	30	5	6	11	8
Total	76(100%)	19(25.0%)	23(30.3%)	23(30.3%)	11(14.4%)

따라 나누었던 바, 76에 중 13예(17.1%)는 전혀 양성 세포가 나타나지 않았거나 기저층에 국한되어 등급 0이었으며, 방기저층에 양성 세포가 보이는 등급 1은 15예(19.8%), 중간층까지 나타나는 등급 2는 27예(35.5%), 그리고 표재층까지 나타나는 등급 3은 21예(27.6%)이었다. 등급 3의 PCNA는 모두 자궁경부 상피내 종양 등급 II와 III에서 나타났다.

조직학적 등급과 PCNA 등급을 비교하여 보면 조직학적 등급이 높을수록 PCNA 등급도 증가되는 것을 알 수 있는데 이 두가지 등급 사이에는 Spearman 상관계수  $r_s=0.552(P<0.001)$ 로 통계학적으로 의미있는 상관관계를 나타내었다.

#### 4. Bcl-2 등급과 병리조직학적 등급의 비교

(Table 3, Fig. 1~4)

면역조직화학적 염색에서 bcl-2 단백질은 적색의 과립성 또는 미만성으로 핵, 세포질, 또는 양자 동시에 나타났고 일부는 핵막을 따라 염색되는 경우도 있었다. PCNA 염색성과 마찬가지로 대부분 예에서 100배 시야에서 쉽게 관찰될 수 있는 염색 강도를 나타내었지만, 몇몇 예에서 강도에 심한 차이가 있었는데 이들이 조직학적 등급과 특별히 연관된 상관성을 보이지는 않았다. 일부 상피내 종양 병변의 주위 정상상피의 기저층에서도 양성 반응을 보였고, 2예(2.6%)에서는 방기저층에도 나타나 등급 1 정도의 염색성을 나타내었다.

점막 병소에서 bcl-2 단백질 발현은 76예 중 19예(25.0%)에서 양성 세포가 전혀 나타나지 않거나 기저층에 국한되어 등급 0이었으며, 방기저층에 양성 세포가 나타나는 등급 1은 23예(30.3%), 중간층까지 양성 세포가 나타나는 등급 2는 23예(30.3%), 그리고 표재층까지 양성 세포가 나타나는 등급 3은 11예(14.4%)이었다. 등급 3의 bcl-2 단백질 발현은 자궁경부 상피내 종양 등급 II와 III에서 나타났다.

Table 4. Comparison of bcl-2 grades and mitosis grades

Mitosis grade	Bcl-2 grade	0	1	2	3	Total
		0	6*	3**	2**	
1	9***	9*	3**	0**	21	
2	2***	9***	10*	7**	28	
3	2***	2***	8***	4*	16	
Total		19	23	23	11	76

\*Concordance of bcl-2 and mitosis grade: 29 cases (38.2%)

\*\*Overexpression of bcl-2 than mitosis grade: 15 cases (19.7%)

\*\*\*Underexpression of bcl-2 than mitosis grade: 32 cases (42.1%)

Table 5. Comparison of bcl-2 grades and PCNA grades

PCNA grade	Bcl-2 grade	0	1	2	3	Total
		0	10*	2**	1**	
1	3***	9*	3**	0**	15	
2	4***	8***	11*	4**	27	
3	2***	4***	8***	7*	21	
Total		19	23	23	11	76

\*Concordance of bcl-2 and PCNA grade: 37 cases (48.6%)

\*\*Overexpression of bcl-2 than PCNA grade: 10 cases (13.2%)

\*\*\*Underexpression of bcl-2 than PCNA grade: 29 cases (38.2%)

조직학적 등급과 bcl-2 등급을 비교하였을 때 Spearman 상관계수  $r_s=0.411(P<0.05)$ 로 통계학적으로 의미있는 상관관계를 나타내어 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급이 높을수록 bcl-2 등급도 증가됨을 알 수 있었다.

#### 5. Bcl-2 등급과 유사분열 등급의 비교(Table 4)

Bcl-2 등급과 유사분열 등급 사이에는 Spearman 상관계수  $r_s=0.516(P<0.05)$ 로 유의한 상관관계를 보여 유사분열의 등급이 높을수록 bcl-2 등급도 증가됨을 알 수 있었다.

두 등급이 일치된 경우는 29예(38.2%), bcl-2 등급이 더 높게 나타난 경우는 15예(19.7%), 더 낮게 나

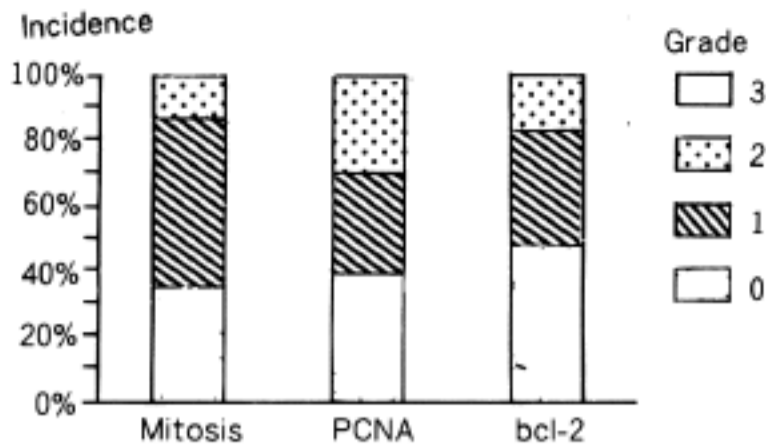


Fig. 5. Incidence of mitosis, PCNA and bcl-2 grades in 23 cases of cervical intraepithelial neoplasia, grade I.

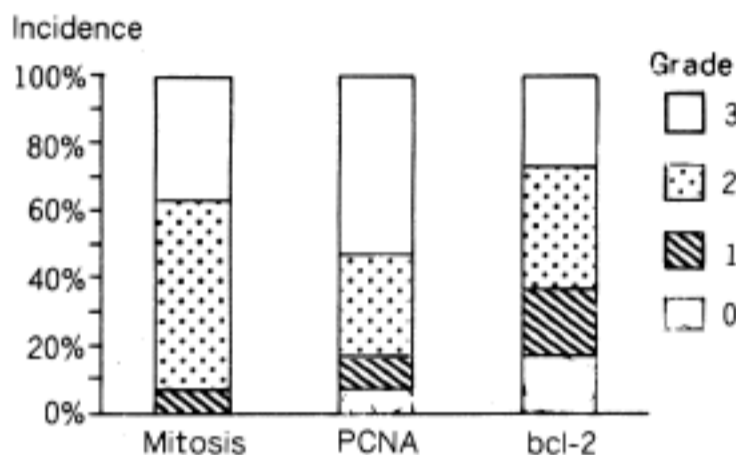


Fig. 6. Incidence of mitosis, PCNA and bcl-2 grades in 30 cases of cervical intraepithelial neoplasia, grade III.

타난 경우는 32예(42.1%)였다.

6. Bcl-2 등급과 PCNA 등급의 비교(Table 5)

Bcl-2 등급과 PCNA 등급 사이에는 Spearman 상관계수  $r_s=0.549(P<0.001)$ 로 유의한 상관관계를 보였으며 PCNA 등급이 높을수록 bcl-2 등급도 증가됨을 알 수 있었다.

두 등급이 일치된 경우는 37예(48.6%), bcl-2 등급이 더 높게 나타난 경우는 10예(13.2%), 더 낮게 나타난 경우는 29예(38.2%)였다.

7. 유사분열, PCNA, bcl-2 세 지표의 병리조직학적 등급에 따른 비교

자궁경부 상피내 종양 등급 I인 23예 중 많은 예는 세포 증식 정도가 낮음을 보여 주었는데, 유사분열은 20예(87.0%), PCNA는 16예(69.6%), bcl-2는 19예(82.6%)에서 0과 1등급의 낮은 등급을 보였다(Fig. 5).

반면 자궁경부 상피내 종양 등급 III인 30예 중 유사분열은 28예(93.3%), PCNA는 25예(83.3%), bcl-2

는 19예(63.3%)에서 2와 3등급의 높은 등급을 보여 세포 증식능의 증가와 세포사의 감소로 세포 수의 증가가 일어나고 있음을 보여 주었다(Fig. 6).

고찰

자궁경부암은 대부분이 암전구 병소에서 발생하는 것으로 알려져 있으며 따라서 초기의 경미한 이형성증 병변이 점차 진행하여 일련의 비정형성 변화의 마지막 단계인 침윤성 자궁경부암종에 이르고 할 수 있다.

질현미경 검사와 글루코스-6-인산 탈수소 효소 X-염색체 표지자 실험에 의하면 종양발생은 처음에 한 세포 또는 소수의 세포들로 구성된 작은 부분에서 시작하고 이 클론이 팽창하면서 병변은 커지고 또한 다양한 정도의 세포성숙도, 증식능을 보이는 세포들의 불균질한 집단으로 구성되게 된다. 따라서 세포증식능은 상피내 종양 병소의 매우 중요한 특징이며, 상피내 종양의 등급이 증가함에 따라 점진적으로 세포증식능 조절의 장애가 심해지고 증식하는 세포들이 상피의 기저층 뿐 아니라 표재층에까지 나타나게 된다. 이러한 세포증식능은 유사분열 지수나 자가방사기록법 등으로 측정할 수 있다. Rubio등<sup>8</sup>은 자궁경부 상피내 종양의 등급이 증가함에 따라 생체에서 <sup>3</sup>H-thymidine 표지 지수가 증가함을 보고하면서 유사분열 분포에 따라 상피내 종양 병소는 증식 부분과 비증식 부분이 공존하고 있다고 보고하였다.

자궁경부암종의 발생이 인유두종 바이러스(Human Papillomavirus, HPV)와 연관이 있고 HPV 아형은 자궁경부암 발생과의 관련성 정도에 따라 고위험군과 저위험군으로 나누어진다. 자궁경부 상피내 종양 조직에서 감염된 HPV 아형을 알게 되면 이 병변의 경과를 예측하는데 도움이 될 수 있다<sup>9</sup>. 또한 HPV 외에 부가적인 발암물질이나 유전적 변화가 또한 중요한 요소로 작용할 것으로 생각된다. 인체의 많은 장기에서 발생하는 종양에서 최근에 종양유전자의 역할과 발현 양상에 관한 많은 연구가 진행되어 왔고, 특히 대장암에서는 병변의 진행과정에 따라 염색체 이상 및 유전자 이상이 단계별로 나타나는 것이 증명되어 종양발생의 다단계 과정의 개념을 확립시켰다<sup>10</sup>. 따라서 대장암이나 자궁경부암을 포함한 여러 종양은 여러 단계를 거치는 분자생물학적 이상에 의해 발생하는 것으로 생각되며<sup>11</sup> 지난 수년 동안은 세포의 성장 및 증식과 연관된 종양유전자와 종양억제유전자에 대한 연구가 종양형성에 관한

분자생물학적 연구의 핵심을 이루어 왔다. 그러나 종양형성에는 세포가 비정상적으로 증식하는 것 뿐 아니라 생리학적인 세포사가 감소함으로써 세포수가 증가하게 되는 또 하나의 기전이 크게 관여하는 것이 알려지게 되었다<sup>12</sup>. 그리하여 최근 Korsmeyer<sup>12</sup>는 종양유전자를 세포의 성장과 증식을 촉진시키는 작용을 하는 myc, ras, abl과 같은 제 1군의 종양유전자, p53과 Rb 단백질 처럼 정상적인 세포증식과 성장을 조절하는 제 2군의 종양억제 유전자와 함께 프로그램된 세포사 또는 apoptosis를 억제하는 역할을 하는 bcl-2 유전자를 제 3군으로 분류하기를 제안하였다.

Bcl-2 유전자의 발현은 처음에 B-세포 림프종에서 t(14;18) (q32;q21)의 염색체 전좌에만 국한되어 나타난다고 기술되었지만<sup>13</sup> 계속적인 연구에 의해 bcl-2 단백질은 염색체 이상이 없는 림프세포증식성 질환에서 발현될 뿐 아니라<sup>14</sup> 더욱이 최근에는 다양한 상피 기원의 정상세포에서도 발현이 보고되었다<sup>5</sup>. 정상적으로 bcl-2 단백질의 발현은 호르몬이나 성장인자에 의해 과형성이나 퇴축이 일어나는 유방과 같은 선세포, 피부나 소화관의 긴 수명을 가지면서 복잡하게 분화된 상피의 간세포, 그리고 신경원처럼 완전 분화된 오랜 수명을 가진 비주기성 세포에서 발현된다<sup>15</sup>. 또 계속적으로 재생되는 기관, 즉 소화관, 피부, 유방 등의 상피에서는 세포사망에 앞서서 bcl-2 단백질의 발현이 소실된다<sup>15</sup>.

세포는 정상적으로 계획된 세포사의 과정을 거치게 되어있는데 Kerr<sup>16</sup>은 이 때 관찰되는 형태학적 특징을 apoptosis라 명명하였고 이는 새로운 RNA와 단백질 합성을 필요로 하는 세포사의 능동적 형태라고 기술하였다. Bcl-2가 apoptosis를 막는 정확한 생화학적 기전은 아직 정립되어 있지 않다. 일반적으로 bcl-2 단백질은 세포질에만 존재한다고 생각하던 바와는 달리 최근 연구에서는<sup>17,18</sup> 핵내에도 위치할 수 있다는 보고를 하였는데, 본 연구에서 bcl-2 염색성이 세포질 뿐만 아니라 핵에 미만성으로 또는 핵막을 따라 나타났다. Krajewski<sup>17</sup>은 면역-전자현미경 자료를 이용하여 bcl-2 단백질은 세포내에서 사립체 내막 뿐 아니라 사립체 외막, 핵막, 소포체 등에 일정하지 않게 위치하고 있음을 관찰하였고, Willingham<sup>18</sup>은 단클론 항체와 형광 면역화학적 방법으로 bcl-2 단백질이 세포주기에 따라 세포내에서의 위치가 변화하는 것을 관찰하고 bcl-2가 apoptosis에 의한 세포사를 막는 기전을 다음과 같이 설명하였다. 즉, apoptosis의 주요 특징은 internucleosomal site에서 endonuclease에 의한 세포 DNA가 분절되는 것

으로, 유사분열이 시작되는 시기에 bcl-2 단백질이 발현되어 핵막이라는 장벽이 다시 나타났을 때 internucleosomal site에서 endonuclease의 작용을 받아 DNA의 분절이 일어나서 apoptosis가 시작되는 것을 염색체에 부착되어 있던 bcl-2 단백질이 막는 역할을 함으로써 세포사가 일어나지 않게 하는 것이라 하였다.

정상상피에서 bcl-2 단백질은 기저세포에서 발현이 된다. Bcl-2 단백질 발현의 이러한 양상은 표재층의 분화된 세포의 과다 축적을 방지하는 반면 기저층의 간세포는 긴 수명을 갖고 있어야 한다는 사실을 뒷받침 해주고 있다. 만약 bcl-2 단백질이 발현되지 않아야 하는 층의 세포에서 계속 발현된다면 그러한 세포들은 죽지 않고 수명이 연장되므로 비정상적인 세포 축적을 일으키게 될 것이다. 이러한 사실로 bcl-2 단백질이 세포의 종양성 증식이 일어나도록 하는데 어떤 역할을 할 것이라는 추측을 할 수 있지만 상피 기원의 암종에 있어서 bcl-2 단백질의 발현에 대한 연구는 지금까지는 유방암<sup>19</sup>, 폐암<sup>20</sup>, 위암<sup>21</sup>, 전립선암<sup>22</sup> 등 몇 가지 암종 외에는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

따라서 암전구 병소인 상피내 종양 병소는 아직 간질로의 침윤이 일어나지 않은 상피내에 국한된 병변으로서 상피라는 한정된 공간 내에서 그 병변의 진행 정도에 따라 세포성숙도, 증식능, 세포밀집도가 다를 것이고 이러한 암전구 병소에서 세포수명을 연장시켜 세포 수를 증가시키는 역할을 하는 bcl-2의 발현 정도와 상피내 종양 병소 등급과의 연관성을 분석해본다는 것은 의의 있는 연구로 사료되어 저자는 자궁경부 상피내 종양에서 면역조직화학적 방법으로 bcl-2 단백질의 발현 양상을 연구하였다.

본 연구에서는 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급과 bcl-2 등급 간에 유의한 상관관계를 나타내어 조직학적 등급이 높아질수록 표재층까지 비정상적으로 수명이 연장된 세포들이 나타나고 이로 인해 세포의 과다 축적으로 세포밀집도를 증가시킬 뿐 아니라 세포수명의 연장으로 인하여 이차적으로 유전적 결손이나 발암성 영향을 더 많이 받을 기회를 가지게 될 것으로 추측된다. 고형성 암종에서 bcl-2에 관한 연구는 아직 미흡한 상태이나 Leek<sup>19</sup>에 의한 유방암 조직에서와 Pezzella<sup>20</sup>의 비소세포성 폐암종에서 연구에 의하면 bcl-2 단백질의 과발현을 보이는 종양은 세포 수명의 연장으로 인해 이차적으로 유전자 결손을 취득할 수 있는 위험도가 높으나 유사분열 속도가 느려 종양 진행과정을 느



리게 하여 임상 경과가 좋고, 비교적 종양의 후반기에 이르러 bcl-2가 소실되면 예후가 좋지 않은 종양으로 된다고 하였다. 마찬가지로 자궁경부에서도 암종의 전구병변으로서의 상피내 종양같은 조기 병변에서는 등급에 따른 bcl-2 단백질의 발현의 증가로 세포의 축적을 가져오다 어느 시점이 넘어서서 많이 진행된 침윤성 암종에서는 오히려 그 발현이 소실되어 질병의 경과가 급속히 진행될 것으로 추측을 해 볼 수 있지만 아직 발표된 연구 자료가 없으며 본 연구에서도 이러한 연구는 시행되지 않았다.

또한 bcl-2 단백질은 세포의 생존을 연장시키나 세포증식에 관여하는 세포주기 조절단백질은 아닌 것으로 알려져 있는데<sup>23</sup> 자궁경부 상피내 종양 병소에서 세포증식능의 증가는 병변이 진행됨에 따라 나타나는 아주 중요한 특징으로 알려져 있다. 현재 세포의 증식능을 측정하는 방법으로 증식세포 핵항원(PCNA) 표지지수를 많이 사용하고 있다. 각종 종양에서 조직학적 분화도에 따라 PCNA 표지지수는 분화도 등급이 높아질수록 유의성있게 증가한다는 보고들이 있고<sup>24,25</sup> 몇 가지 종양에서는 PCNA 표지지수가 병기가 높을수록 증가한다는 연구결과도 있다<sup>24,26</sup>. 이미 다른 몇몇 연구에서는 자궁경부 상피내 종양의 등급에 비례해 세포증식능이 함께 증가한다는 보고도 있어<sup>27,28,29</sup> 본 연구에서 자궁경부 상피내 종양의 등급에 따라 PCNA의 발현 양상을 관찰하고 bcl-2 단백질의 발현 양상과 비교한 바 조직학적 등급에 비례하여 PCNA 등급이 함께 증가하였고 더불어 bcl-2 등급과도 비례적인 상관관계를 나타내었는데, 세포주기 조절과 무관한 작용을 하는 bcl-2와 세포주기를 조절하는 세포증식능의 표지자인 PCNA가 조직학적 등급이 높아짐에 따라 비례적인 관계를 나타냈다는 것은 매우 흥미로운 결과였다.

자궁경부의 정상상피에서 유사분열은 드물게 나타나고 주로 기저층에만 국한되며 자궁경부 상피내 종양에서는 기저층보다 상층에 유사분열이 흔히 나타나며 유사분열 모양 또한 비정상적인 경우가 많다<sup>30</sup>. 이러한 비정상적인 위치와 모양을 보이는 유사분열의 존재 유무가 미성숙 편평상피 화생과 자궁경부 상피내 종양 등급 III을 감별하는데 도움이 되는 것으로 알려져 있고<sup>31</sup> 일부 병리학자들은 자궁경부 상피에서 유사분열이 나타나는 가장 높은 위치가 자궁경부 상피내 종양의 등급을 결정하는데 도움을 준다고 하였다. 본 연구에서도 유사분열 등급이 조직학적 진단에 따른 등급과 유의한 상관관계를 나타내어 등급 결정에 있어서 중요한 인자로 사료된다. Bcl-2 등급과 유사분열 등급을 비교하였던

바 비례적인 상관관계를 나타내어 이 사실도 또한 흥미로웠다.

본 연구를 통하여 세포의 증식에는 무관하며 세포분열시 발현되는 시기가 M기의 전기에서부터 M기 끝까지로 생각되는 bcl-2 단백질, 세포주기의 S기 동안 주로 나타나는 PCNA, 그리고 M기를 대표하는 유사분열 등 이 세가지의 지표가 그 발현되는 시기에 있어 서로 양립되는 모순을 보임에도 불구하고 이들의 발현 양상이 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급과 비례하여 유의한 상관관계가 있음을 알 수 있었다. 아마도 이는 이들 병변 내 각각 세포들의 G2기의 길이가 다르며, 병변이 다양한 속도의 세포주기를 갖는 세포로 구성되어 있고, 또 세포증식과는 밀접한 관계가 있으면서 PCNA나 bcl-2 단백질과는 또 다른 독립적인 어떤 인자가 자궁경부의 종양성 병변에 관여하고 있기 때문일 것으로 생각된다.

이상으로 본 연구에서 PCNA와 유사분열 등급이 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급과 비례적인 상관관계를 보여 조직학적 등급이 증가함에 따라 세포증식능이 비정상적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 bcl-2 단백질도 자궁경부 상피내 종양에서 비정상적으로 과발현될 뿐 아니라 조직학적 등급이 증가함에 따라 bcl-2 단백질 발현 등급이 증가함을 보여 bcl-2 단백질의 발현이 자궁경부암의 발생 초기 단계인 전암성 병변에서 어떠한 역할을 하고 있을 것으로 추측된다. 그러나 자궁경부 상피내 종양에서 bcl-2가 세포유전학적 결함이나 다른 종양유발 인자와 어떤 연관관계가 있으며, 병변이 진행되도록 하는데 어떤 생물학적 역할을 하는지에 대해서는 알 수 없으나 이에 대한 연구가 앞으로 체계적으로 이루어진다면 종양 발생에 있어서 이들 세 지표간의 생물학적 상호관계를 밝힐 수 있을 것으로 생각되며, 또 이 지표들이 자궁경부 상피내 종양의 등급을 나누는 기준이나 병변의 진행과정을 예측할 수 있는 인자로서의 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

1990년 3월부터 1994년 8월까지 동아대학교 병원에서 편치 생검, 원추 생검 또는 자궁 전적출술로 자궁경부 상피내 종양으로 진단된 76예를 대상으로 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급간에 bcl-2 종양유전자의 발현 양상의 변화를 관찰하기 위하여 bcl-2 종양 단백질에 대한 단클론 항체를 이용한 면

역조직화학적 염색을 시행하고, 이를 유사분열 정도와 증식세포 핵항원(PCNA)의 발현 양상과 비교한 결과 다음과 같은 소견이 관찰되었다.

1) 76예의 자궁경부 상피내 종양은 등급 I이 23예(30.3%), 등급 II가 23예(30.3%), 등급 III이 30예(39.4%)이었다.

2) 23예의 자궁경부 상피내 종양 등급 I 중 각각 20예(87.0%), 16예(69.6%) 및 19예(82.6%)에서 0과 1 등급의 낮은 등급의 유사분열, PCNA 및 bcl-2 발현을 보여 세포증식과 축적의 정도가 낮음을 보여 주었다.

3) 30예의 자궁경부 상피내 종양 등급 III 중 각각 28예(93.3%), 25예(83.3%) 및 19예(63.3%)에서 2와 3 등급의 높은 등급의 유사분열, PCNA 및 bcl-2 발현을 보여 세포증식능의 증가와 세포사의 감소로 활발한 세포 수의 증가가 일어나고 있음을 보여 주었다.

이상의 결과로 유사분열, PCNA 그리고 bcl-2 단백질 발현의 등급이 자궁경부 상피내 종양의 조직학적 등급과 비례하여 의의있게 증가하였고, 조직학적 등급이 증가함에 따라 세포증식능력이 비정상적으로 증가하고 또한 bcl-2 종양단백질의 발현의 증가로 세포사가 감소해 세포 수의 증가가 활발함을 보여주었다. 또한 종양 발생에 있어서 이들 세 지표간의 정확한 생물학적 상호관계를 밝힐 수는 없었으나 이 세 지표의 등급이 조직학적 등급 I과 III간에 현저한 차이가 있음을 보여 이 지표들은 자궁경부 상피내 종양의 등급을 나누는 기준에 도움이 되는 인자로 이용될 수 있고, 또한 자궁경부 상피내 종양의 진행 과정이나 예후 등의 생물학적 양상을 추정할 수 있는 지표로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 299: 1390-3.
2. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas; clustering around J<sub>H</sub> on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
3. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47: 19-28.
4. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
5. Hockenbery D, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-5.
6. Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Beserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA/cyclin. *Science* 1988; 240: 1544-6.
7. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-8.
8. Rubio GA, Langerlof B. Proliferating and non-proliferating compartments in cervical dysplasia and carcinoma in situ. *Acta Path Microbiol Scand Sect(A)* 1975; 83: 189-91.
9. zur Hausen H, Schneider A. The role of human papilloma viruses in human urogenital cancer. In: Salzman N, Howley P, eds. *The papovaviridae*. New York: Plenum Press 1987: 245-63.
10. Fearon ER. Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surv* 1992; 12: 119-36.
11. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602.
12. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
13. Nagan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *New Engl J Med* 1988; 318: 1638-44.
14. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-32.
15. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKran JP, Korsmeyer SJ. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144: 3602-10.

16. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
17. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fento W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer research* 1993; 53: 4701-14.
18. Willingham MC, Bhalla K. Transient mitotic phase localization of bcl-2 oncoprotein in human carcinoma cells and its possible role in prevention of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 441-50.
19. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumors and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-9.
20. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, et al. Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *New Engl J Med* 1993; 329: 690-4.
21. Tahara E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 265-72.
22. Segal NH, Cohen RJ, Haffejee Z, Savage N. Bcl-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 616-8.
23. Reed JC, Tanaka S, Cuddy M. Cell cycle analysis of p26-bcl-2 protein levels in proliferating lymphoma and leukemia cell lines. *Cancer Res* 1992; 52: 2802-5.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Shurbaji MS, Brooks SK, Thurmond TS. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and benign cervical epithelium. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 22-6.
28. Mittal KR, Demopoulos RI, Groszami S. Proliferating cell nuclear antigen(cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 117-22.
29. Kobayashi I, Matsuo K, Ishibashi Y, Kanda S, Sakai H. The proliferative activity in dysplasia and carcinoma in situ of the uterine cervix analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and silver-binding argyrophilic nuclear organizer region staining. *Hum Pathol* 1994; 25: 198-202.
30. Fu YS, Regan JW. Pathology of the uterine cervix, vagina, and vulva. Philadelphia: WB Saunders 1989; 225-335.
31. Hendrickson MR, Kempson RL. Uterus and fallopian tubes. In: Sternberg SS, ed. *Histology for pathologists*. New York: Raven Press 1992; 797-834.
32. Fu YS, Reagan JW, Richart RM. *Cancer campaign*, vol 8. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1985; 67-74.