

림프종에서 BCL-2 암단백 및 Epstein-Barr 바이러스의 표현에 대한 연구

-면역화학염색 및 정상소재 교배법에 의한 66예 분석-

인제대학교 의과대학 상계 및 부산*백병원, 해부병리과

조혜제 · 김연미 · 유현주 · 주종은*

The Studies of bcl-2 Oncoprotein and Epstein-Barr Virus Expression in Malignant Lymphomas

- Immunohistochemical and *in situ* hybridization analysis on 66 cases -

Hye Jae Cho, M.D., Yeon Mee Kim, M.D., Hyun Ju Yoo, M.D. and Jong Eun Joo, M.D.*

Department of Pathology, Sanggye and Pusan* Paik Hospital, Inje University

Bcl-2 oncoprotein is being localized to mitochondria and interfering with programmed cell death (apoptosis) independent of promoting cell division in the lymphoid and nonlymphoid cells. The bcl-2 oncoprotein expression has been reported in follicular lymphomas as well as in diffuse non-Hodgkin's lymphoma, leukemia and a variable proportion of Hodgkin's lymphoma cases. Recent evidence suggests that some lymphomas protected from apoptosis is conferred through expression of Epstein-Barr virus(EBV) latent membrane protein which turn to cause upregulation of bcl-2.

To define the role of the bcl-2 oncoprotein and EBV in lymphoid malignancy, we tried immunohistochemical studies with anti-bcl-2 antibody and *In situ* hybridization (ISH) with EBV-encoded small nuclear RNAs(EBER) in the paraffin embedded sections of 46 non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cases and 20 Hodgkin's lymphoma (HL) cases. Bcl-2 oncoprotein expression was found in 37 of 46 cases (80%) of NHL with relatively strong cytoplasmic staining, and in 14 of 20 cases (70%) of HL with weak cytoplasmic staining in limited small numbers of RS, Hodgkin and lacunar cells.

The widespread presence of bcl-2 oncogene in many different types of both NHL and HL supports that the extended cell survival through overexpression of bcl-2 gene protein may be a growth advantage of neoplastic lymphoid cells.

In the ISH analysis for EBV, the presence of EBV was detected in 17 of 20 cases (85%) of HL, compared to 6 of 44 cases(13.6%) of NHL. It appears to be no direct correlation between

접 수 : 1995년 3월 25일, 게재승인 : 1995년 12월 1일

주 소 : 서울시 노원구 상계 7동 761-1, 우편번호 139-207

인제의대 상계백병원 해부병리과, 조혜제

**이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

overexpression of bcl-2 oncoprotein by neoplastic lymphoid cells and the presence of EBV in NHL but it seems to be a definite association between EBV and HL. (Korean J Pathol 1996; 30: 121~131)

Key Words: Bcl-2 oncoprotein, Epstein-Barr virus, non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma

서 론

암유전자에 대한 연구가 활발해지면서 종양발생의 이해에 혁신을 일으키고 이의 응용은 강력한 진단적 의미를 제공하게 되었다. 최근 암유전자에 대한 세가지 형태가 알려졌는데 그 첫째가 myc, ras, abl 같은 암유전자로서 세포의 성장과 증식을 조절하는 유전자 역할을 하며, 둘째로는 Rb 와 p53 로서 세포의 성장과 증식을 억제하는 유전자이고 셋째가 Bcl-2 등으로서 주로 계획되어진 세포사멸(apoptosis)의 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다¹.

Bcl-2 암유전자는 계획되어진 세포의 사멸을 방지함으로써 수명을 연장시키므로 생존기간 중 다양한 자극을 받게되고 이로써 림프계 및 비림프계 세포의 성장조절에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다. 그 세포사멸을 방해하는 분자학적인 기전은 널리 알려져 있지 않으나 bcl-2 유전자 생산물이 mRNA를 조절하고 암단백표현을 조절하는 기전은 정상 및 종양세포에서 각기 다르게 규명되고 있다¹⁻⁴. 세포 유전적인 분석에서 t(14:18)의 발견은 면역글로블린의 중쇄(heavy chain) 유전자에 바로 인접해 있는 18q 21위치로의 bcl-2 유전자 재배열이 일어나는 것으로^{5,6} 그 자체가 종양발생을 일으키는 것으로 보지는 않으나 Epstein-Barr 바이러스(EBV) 감염된 림프아세포 혹은 유전자를 전해받은 쥐(transgenic mice)에서 클론형성을 항진시키는 것으로 생각되고 있다¹. 또한 bcl-2표현을 과조절할 뿐 아니라 그 기능이 알려져 있지 않은 EBV latent protein을 부호결정(coding)하여 항bcl-2 항체와 교차반응을 일으키기도 한다⁷.

본 연구의 목적은 림프절에서 발생한 호즈킨 림프종과 비호즈킨 림프종에서 첫째 bcl-2 암단백 표현 양상을 면역화학 염색을 통하여 각 아형에 따라 비교 관찰하고, 둘째 EBV-encoded small nuclear RNAs에 대한 ISH를 시행하여 EBV의 존재유무 및 분포를 확인하여, 비호즈킨 림프종과 호즈킨 림프종간의 차이를 비교하고자 한다.

재료 및 방법

림프절의 미만형 비호즈킨 림프종 46예와 호즈킨 림프종 20예를 그 대상으로 하였다. 비호즈킨 림프종은 대부분이 미만형이었기 때문에 이를 중심으로 인제의대 상계 백병원에서 15예(1990~1994년)와 부산백병원에서 31예(1988~1993년)를, 호즈킨 림프종은 인제의대 상계 백병원에서 12예(1990~1994년), 서울대학병원 5예 및 계명대학병원의 3예를 중심으로 하였다.

모든 예의 파라핀 블록을 4~5 μ m의 두께로 박절하여 poly-L-lysine을 입힌 슬라이드에 재절편하였다. 림프구 면역아형을 위한 염색으로는 단일항체와 다크론성 항체를 이용한 Avidin Biotin Complex(ABC) 방법으로 L26, UCHL1 및 Lysozyme 염색과 Bcl-2 (Dako Bcl-2 124) 면역화학염색을 LSAB Kit(Dako Co.)을 이용하여 시행하였고, EBV 검출을 위하여는 EBV-encoded small nuclear RNAs(EBER Dako Co.)을 이용하여 정상소재 교배법(*In situ hybridization*)을 시행하였다.

1. 림프구 아형을 위한 면역화학 염색

호즈킨 림프종과 비호즈킨 림프종의 모든 예에서 단일항체인 L26, UCHL1과 다크론성 항체인 Lysozyme을 이용한 면역화학염색을 LSAB Kit를 사용하여 Avidin-Biotin Complex 방법으로 시행되었다. 비호즈킨 림프종에서는 각 종양세포의 International Working Formulation(IWF)에 따른 분류에 대한 면역아형을, 호즈킨 림프종에서는 주위 배경의 정상 림프구의 면역 아형 분포 양상을 관찰하였다.

2. Bcl-2 암단백 표현을 위한 면역화학염색

Bcl-2 항인체 단일항체(Dako Bcl-2 124)을 이용하여 자동멸균기에서 121°C 15분간 전처리한 후 LSAB Kit를 사용하여 Avidin Biotin Complex 방법으로 염색을 시행하였다.

비호즈킨 림프종은 IWF에 따른 분류를 한 후 각

아형에서 종양세포의 양성비율에 따라 등급(Grade)을 나누어 음성반응일때 0점, 1~25% 양성을 보일때 1점, 26~50% 양성일때 2점, 51~75% 양성일때 3점, 76~100% 양성일때 4점으로 구분하였고, 또한 종양세포에서 양성을 보이는 세포질 염색의 강도(Intensity)에 따라 음성시 0점, 미양성 1점, 약양성 2점, 중등도 양성 3점, 강양성 4점으로 매긴 후 각 아형에 따라 염색의 빈도등급과 강도의 총점을 구하였다.

호즈킨 림프종에서는 Reed-Sternberg(RS)세포, 호즈킨 세포와 열공(lacuna) 세포에서 세포질 염색이 되었을 때를 양성으로 간주하였고 양성세포의 비율에 따른 등급(Grade)은 이들 세포에서 음성일때 0점, 1~25% 양성일때 1점, 26~50% 양성일때 2점, 51~100% 양성일때 3점으로 구분하였다. 또한 양성세포의 염색강도(Intensity)는 주변 정상림프구 반응을 4점으로 기준하여 종양세포에서 음성일때 0점, 약양성 1점, 중등도 양성 2점, 강양성 3점으로 매긴 후 각 아형에 따라 염색의 빈도등급과 강도의 총점을 구하였다.

3. EBV 검출을 위한 정상소재 교배법

비호즈킨 및 호즈킨 림프종의 모든 예에서 poly-L-lysine을 입힌 슬라이드에 재절편된 조직을 Fluorescein-Conjugated EBV(EBER) oligonucleotides (Dako Co.) probe를 이용하여 42°C에서 20~22시간 침복반응 시킨 후 ISH Detection Kit(Dako Co. KO607)

을 이용하여 항 FITC 항체에서 30분간 신은 방지하고 BCIP/NBT 기질액에서 45분 반응시킨 후 Nuclear Fast Red로 대조 염색하여 관찰하였다. 전반적인 음성을 보일때 0점, 산발적으로 소수의 종양세포(10% 미만)에서 양성반응을 보일때 1점, 10~25% 종양세포에서 양성시 2점, 26~50% 양성시 3점, 51~75% 양성시 4점, 76% 이상에서 양성시 5점으로 하였다.

결 과

1. 미만형 비호즈킨 림프종

총 46예의 남녀비는 1.1:1로 큰 차이가 없었고 연령분포는 6~90세로 평균연령은 47세이었다. 병발 부위로는 경부림프선이 38예(82.6%)로 제일 호발부위이었다. 그 아형의 분포는 대림프구형 19예(43%), 혼합림프구형 11예(22%), 소림프구형 5예(11%), 면역아세포형 4예(9%), 림프아세포형 5예(11%), 함몰소림프구형 1예(2%), Sezary 증후군형 1예(2%)이었고, 면역아형은 B 림프구 림프종 29예(63%), T 림프구 림프종 12예(26%), B 와 T 림프구 및 조적구 면역표현형에 모두 음성인 림프종 5예(11%)이었다 (Table 1).

(1) Bcl-2 암단백의 표현양상: 염색의 빈도등급과 강도의 총점은 대부분을 차지하는 대림프구형과 혼합림프구형에서 0점에서 7점까지 다양한 양상의 염색 분포를 보여 주었고 나머지 아형군에서는 그 예들의 수가 적어 유의성 있는 염색 정도를 관상하기

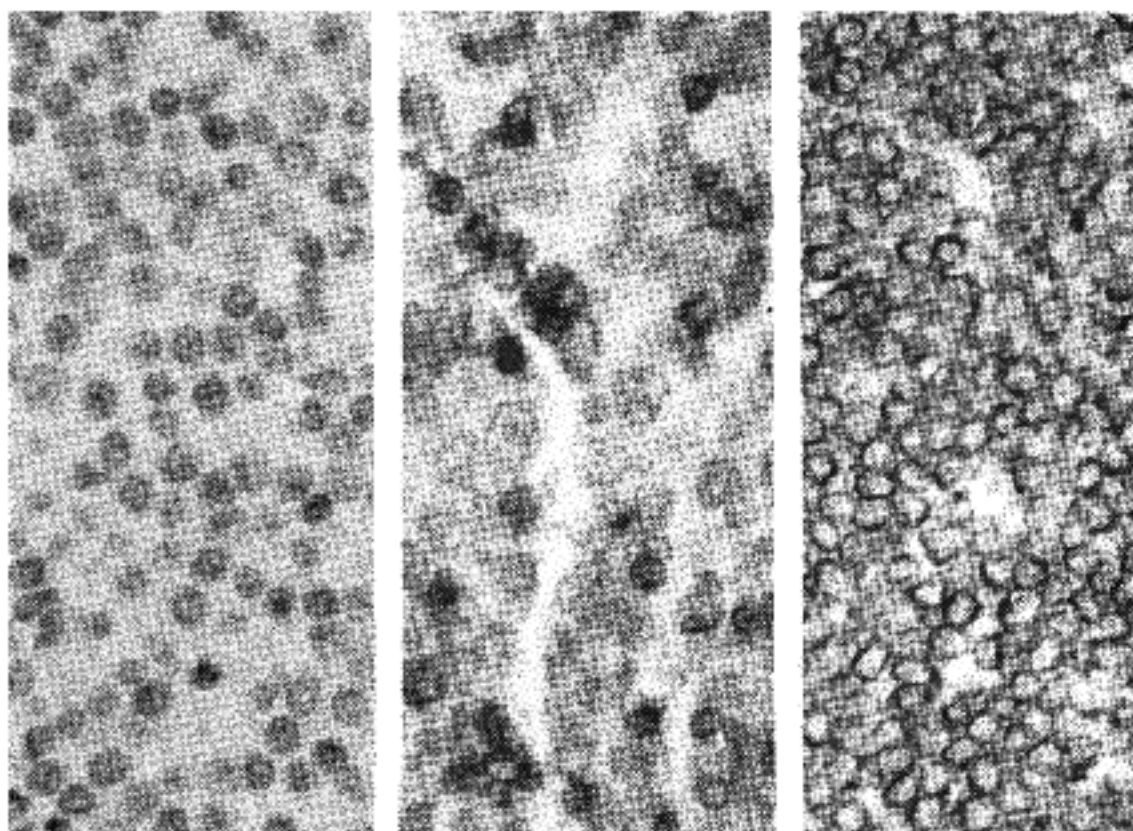


Fig. 1. Bcl-2 intensity degree II(left), III(middle), IV(right) in non-Hodgkin's lymphoma cases.

Table 1. BCL-2 oncoprotein & Epstein-Barr virus expression in 46 non-Hodgkin's lymphoma cases

Case	Sex	Age	Site	Type	BCL-2/G	BCL-2/I	BCL-2/T	EBV
1	F	51	Cervical	DL, B	2	2	4	0
2	F	73	Cervical	DL, B	3	3	6	0
3	F	36	Cervical	DL, B	0	0	0	1
4	M	73	Cervical	DL, B	0	0	0	0
5	M	65	Cervical	DL, B	2	2	4	0
6	M	40	Cervical	DL, B	0	0	0	0
7	F	59	Axilla	DL, B	3	3	6	0
8	F	80	Cervical	DL, B	1	2	3	0
9	M	51	Cervical	DL, B	2	2	4	0
10	F	19	Axilla	DL, B	0	1	1	0
11	M	37	Cervical	DL, B	3	2	5	0
12	F	73	Cervical	DL, B	4	3	7	0
13	F	52	Cervical	DL, B	4	3	7	0
14	M	50	Cervical	DL, N	3	4	7	0
15	F	37	Cervical	DL, N	2	3	5	0
16	M	30	Cervical	DL, N	3	3	6	0
17	M	90	Cervical	DL, T	2	3	5	1
18	M	16	Cervical	DL, T	0	0	0	1
19	F	25	Cervical	DL, T	0	0	0	2
20	F	72	Cervical	DM, B	3	4	7	0
21	M	33	Cervical	DM, B	0	2	2	4
22	F	49	Inguinal	DM, B	3	3	6	0
23	F	43	Cervical	DM, B	0	0	0	0
24	F	65	Cervical	DM, B	2	2	4	0
25	M	37	Cervical	DM, B	3	3	6	0
26	M	37	Cervical	DM, N	1	2	3	0
27	F	53	Cervical	DM, N	1	2	3	0
28	M	30	Cervical	DM, T	0	0	0	0
29	M	46	Cervical	DM, T	1	1	2	0
30	M	64	Cervical	DM, T	0	1	1	1
31	M	6	Cervical	LB, T	4	3	7	ND
32	F	5	Inguinal	LB, T	2	2	4	0
33	F	32	Cervical	LB, T	3	3	6	0
34	M	34	Inguinal	LB, T	2	2	4	0
35	M	9	Cervical	LB, T	3	2	5	0
36	F	57	Cervical	SL, B	4	3	7	0
37	M	39	Axilla	SL, B	4	3	7	0
38	F	64	Cervical	SL, B	4	3	7	0
39	F	45	Cervical	SL, B	4	4	8	0
40	F	55	Cervical	SL, B	4	4	8	0
41	M	69	Inguinal	IB, B	0	0	0	0
42	M	45	Cervical	IB, B	3	4	7	0
43	M	47	Cervical	IB, B	4	3	7	0
44	M	53	Cervical	IB, B	3	3	6	0
45	F	54	Cervical	SC, B	4	4	8	0
46	M	40	Cervical	SZ, T	0	0	0	ND

DL: Diffuse Large Cell, DM: Diffuse Mixed Cell, LB: Lymphoblastic Cell, SL: Small Lymphocytic Cell, IB: Immunoblastic Cell, SC: Small Cleaved Cell, SZ: Sezari syndrome, BCL-2/G: Percentile grade scores of BCL-2 positive cells, BCL-2/I: Intensity scores of BCL-2 staining, BCL-2/T: Total scores of percentile grade & intensity, T: T Cell, B: B Cell, N: Null cell, ND: Not Done.

곤란하였다(Table 1). 림프종 아형에 따른 bcl-2 암단백 표현의 양성빈도는 대림프구형 19예 중 14예(74%), 혼합림프구형 11예 중 9예(82%), 소림프구형 5예 중 5예(100%), 면역아세포형 4예 중 3예(75%), 림프아세포형 5예 중 5예(100%), 함몰 소림프구형 1예 중 1예(100%), Sezary 증후군형 1예 중 0예(0%)로 bcl-2 암단백표현을 보이는 예는 총 37예(80%)이었고 나머지 9예(20%)는 음성으로 나타났으며 bcl-2 염색에 양성을 보인 37예 중 60%(37예 중 22예)에서 염색 빈도등급과 강도(Fig. 1)의 분포는 모두 3점 이상을 나타내었다(Table 2).

림프종의 면역표현형에 따라서는 B 림프구 림프종이 29예(63%), T 림프구 림프종 12예(26%) 이었고 Null 세포 림프종이 5예(11%) 이었다. Bcl-2 암단백

표현은 B 림프구 림프종 29예 중 24예(83%), T 림프구 림프종 12예 중 8예(67%), Null세포 림프종 5예 중 5예(100%) 모두에서 관찰되었다(Table 4).

(2) EBV 존재 및 분포양상: 총 46예의 미만형 비호즈킨 림프종에서 조직이 부적절하여 정상소재 교배법의 시행이 곤란한 2예를 제외한 나머지 44예 중 6예(13.6%)에서 EBER 염색을 통한 EBV 존재가 확인되었다(Table 3). 그 6예 중 4예는 대림프구형이었고 2예는 혼합 림프구형이었으며, 4예는 B 림프구 표현형을, 2예는 T 림프구 표현형을 보여 주었다. 그 정도는 1~4 등급으로 6예 중 4예(66.7%)에서 10% 미만의 소수 종양세포내 EBV의 존재가 확인되었고(Fig. 3.left), 2예(33.3%) 에서는 각각 30%, 70% 정도의 종양세포내 EBV가 검출되었다(Table 1).

Table 2. Distribution of BCL-2 expression scores in 46 non-Hodgkin's lymphoma cases

G+I Type	Sum of grade scores and intensity scores(G+I)										No. of cases(%)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8		
DL	5	1	0	1	3	3	3	3	3	0	19(41)
DM	2	1	2	2	1	0	2	1	0	0	11(24)
SL	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	5(11)
IB	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	4(9)
LB	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	5(11)
SC	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1(2)
SZ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(2)
Total(%)	9(20)	2(4)	2(4)	3(7)	6(13)	4(9)	7(15)	10(21)	3(7)		

DL: Diffuse Large Cell, DM: Diffuse Mixed Cell, SL: Small Lymphocytic Cell, IB: Immunoblastic Cell, LB: Lymphoblastic Cell, SC: Small Cleaved Cell, SZ: Sezari syndrome.

Table 3. The result of BCL-2 oncoprotein & EBV expression in 46 non-Hodgkin's lymphoma cases

Type	BCL2+(%)	BCL2-(%)	Total(%)	EBV+(%)	EBV-(%)	Total (%)
DL	14(74)	5(26)	19	4(21.1)	15(78.9)	19
DM	9(82)	2(18)	11	2(18.2)	9(81.8)	11
SL	5(100)	0(0)	5	0(0)	5(100.0)	5
IB	3(75)	1(15)	4	0(0)	4(100.0)	4
LB	5(100)	0(0)	5	0(0)	4(100.0)	4(1ND)
SC	1(100)	0(0)	1	0(0)	1(100.0)	1
SZ	0(0)	1(100)	1	-	-	(1ND)
Total	37(80)	9(20)	46(100)	6(13.6)	38(86.4)	44(100)

DL: Diffuse Large Cell, DM: Diffuse Mixed Cell, SL: Small Lymphocytic Cell, IB: Immunoblastic Cell, LB: Lymphoblastic Cell, SC: Small Cleaved Cell, SZ: Sezari syndrome, ND : not done, EBV: Epstein Barr Virus.

Table 4. The relationship between BCL-2 oncoprotein expression & immunophenotyping of 46 non-Hodgkin's lymphoma cases

BCL-2 \ IPT	B(%)	T(%)	N(%)	Total
Positive	24(83)	8(67)	5(100)	37
Negative	5(17)	4(33)	0(0)	9
Total	29(63)	12(26)	5(11)	46

B: B lymphocyte, T: T lymphocyte, N: Null cell
IPT: Immunophenotype

2. 호즈킨 림프종

총 20예의 남녀비는 3.2:1로 남자에서 호발하였고 연령분포는 11~65세 나이로 평균 연령은 39세이었다. 아형은 혼합세포형이 14예(70%), 결절성 경화형이 5예(25%), 이었고, 림프구 감소형 1예(5%) 이었고, 림프구 우세형은 없었다(Table 5,6). 수위배경 림프구 세포의 면역형은 T 세포가 우세한 군이 18예(90%)로 B 세포가 우세한 군이 2예(10%)보다 단연 많았다(Table 5).

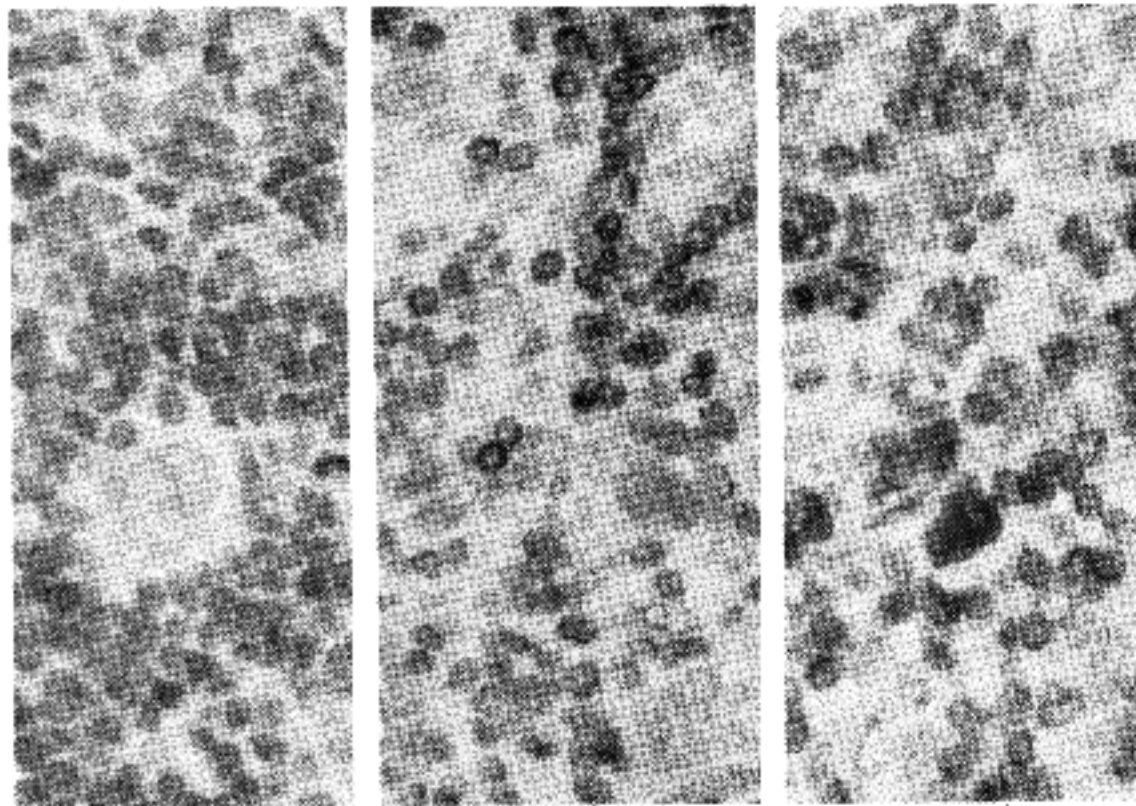


Fig. 2. Bcl-2 intensity degree I (left), II(middle), III(right) in Hodgkin's lymphoma cases.

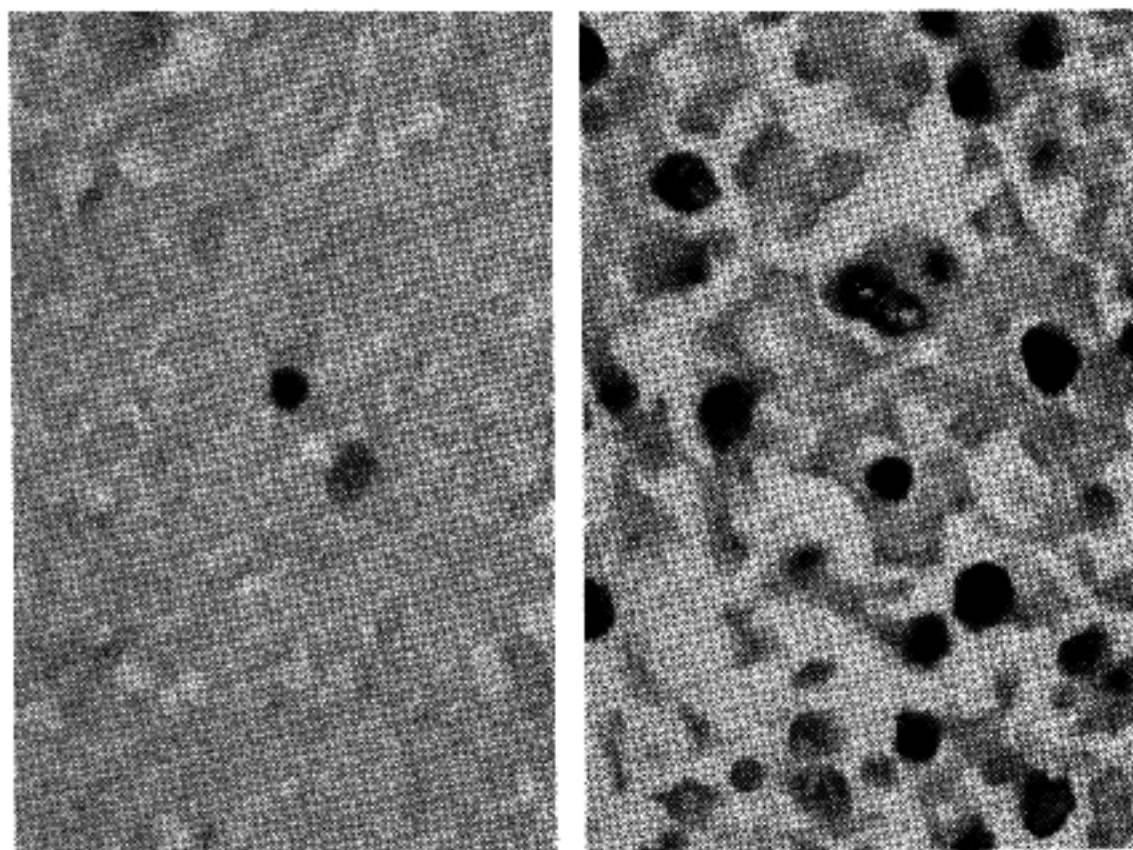


Fig. 3. EBER positive reaction in the non-Hodgkin's lymphoma(left) and Hodgkin's lymphoma(right).

Table 5. Bcl-2 oncoprotein & Epstein barr virus expression in 20 Hodgkin's lymphoma cases

Case	Sex	Age	Site	Type	BCL-2/G	BCL-2/I	BCL-2/T	EBV	Background
1	M	48	Cervical	MC	0	0	0	2	T
2	M	18	Cervical	MC	1	1	2	1	T
3	M	58	Cervical	MC	3	3	6	4	T
4	M	65	Cervical	MC	2	1	3	2	T
5	M	63	Axilla	MC	2	2	4	2	B
6	M	20	Inguinal	MC	1	1	2	3	T
7	M	27	Cervical	MC	1	2	3	0	T
8	F	49	Cervical	MC	1	3	4	5	T
9	M	34	Cervical	MC	1	2	3	3	B
10	M	51	Cervical	MC	1	1	2	2	T
11	F	32	Axilla	MC	1	1	2	2	T
12	M	60	Axilla	MC	1	1	2	4	T
13	M	34	Cervical	MC	0	0	0	4	T
14	M	32	Axilla	MC	0	0	0	1	T
15	F	25	Cervical	NS	3	3	6	1	T
16	M	41	Cervical	NS	2	1	3	0	T
17	F	30	Cervical	NS	0	0	0	0	T
18	M	62	Mesentery	NS	0	0	0	3	T
19	F	26	Cervical	NS	0	0	0	2	T
20	M	11	Cervical	LD	1	1	2	3	T

MC: Mixed Cellularity, NS: Nodular Sclerosis, EBV: Epstein Barr Virus, LD: Lymphocyte Depletion, BCL-2/G: Percentile grade scores of BCL-2 positive cells, BCL-2/I: Intensity scores of BCL-2 staining, BCL-2/T: Total scores of percentile grade & intensity, T: T Cell, B: B Cell.

Table 6. The result of BCL-2 oncoprotein & EBV expression in 20 Hodgkin's lymphoma cases

Type	BCL2+(%)	BCL2-(%)	Total(%)	EBV+(%)	EBV-(%)	Total (%)
MC	11(78.6)	3(21.4)	14	13(92.9)	1(7.1)	14
NS	2(40.0)	3(60.0)	5	3(60.0)	2(40.0)	5
LD	1(100.0)	0(0.0)	1	1(100.0)	0(0.0)	1
LP	0(0.0)	0(0.0)	0	0(0.0)	0(0.0)	0
Total	14(70.0)	6(30.0)	20(100)	17(85.0)	3(15.0)	20(100)

MC: Mixed Cellularity, NS: Nodular Sclerosis, LP: Lymphocyte Predominance, LD: Lymphocyte Depletion, EBV: Epstein-Barr Virus.

(1) Bcl-2 암단백 표현양상: 총 20예 중 14예(70%)에서 종양세포인 RS세포, 호즈킨 세포 및 열공 세포에서 양성을 보여 주었고, 6예(30%)에서 음성을 보였다(Table 6). 아형에 따른 Bcl-2 암단백의 양성 표현은 혼합세포형에서 14예 중 11예(78.6%), 결절성 경화형에서는 5예 중 2예(40%), 림프구 감소형 1예

중 1예(100%)에서 양성반응을 보였다(Table 6). Bcl-2 염색에 양성을 보인 14예의 염색 빈도등급과 강도의 분포는 빈도등급 1점이 9예(64.3%), 2점이 3예(21.4%), 3점이 2예(14.3%)로 대부분 1~25%의 종양세포에서 반응을 보였고, 양성세포의 종양세포질의 염색강도(Fig. 2)도 1점이 8예(57.1%), 2점이 3예

Table 7. Distribution of BCL-2 expression scores in 20 Hodgkin's lymphoma cases

G+I Type	Sum of grade scores and intensity scores(G+I)							No. of cases(%)
	0	1	2	3	4	5	6	
MC	3	0	5	3	2	0	1	14
NS	3	0	0	1	0	0	1	5
LD	0	0	1	0	0	0	0	1
LP	0	0	0	0	0	0	0	0
Total cases(%)	6(30)	0(0)	6(30)	4(20)	2(10)	0	2(10)	20(100)

MC: Mixed cellularity, NS: Nodular Sclerosis, LP: Lymphocyte Predominance, LD: Lymphocyte Depletion.

Table 8. Comparison of non-hodgkin's & Hodgkin's lymphomas

	NHL (46 cases)	HL (20 cases)
Age	6~ 90세(47세)	11~ 65세(39세)
M : F	1.1 : 1	3 : 1
BCL-2(+)	80.4% (≥4:65%)	75.0% (≥4:15%)
EBV(+)	13.6%	85.0%

NHL: nonHodgkin's lymphoma, HL: Hodgkin's lymphoma, EBV: Epstein Barr Virus

(21.4%), 3점이 3예(21.4%)로 대개 미약한 양성반응을 보였다(Table 5).

(2) EBV 존재 및 분포양상: 총 20예 중 17예(85%)에서 EBV 존재가 확인되었고(Fig. 3. right), 그 아형에 따라서는 14예의 혼합세포형 중 13예(92.9%), 결절성 경화형 5예 중 3예(60%), 림프구 감소형 1예 중 1예(100%)로 대체적으로 모든 아형에서 높은 비율로 표현되었고, 그 정도도 대상 예들의 수가 많은 혼합형과 결절성 경화형에서 1~5점까지 다양하나 각 아형 등급의 최다빈치가 2점으로 10~25%의 적은 수의 종양세포에서 EBV 존재가 확인되었다(Table 5, 6). 림프구 감소형에서는 1예에서 정도가 3점으로 30%의 종양세포에서 EBV가 검출되었다.

고 찰

최근에 이르러 암유전자와 암 억제유전자가 종양 발생기전의 분자학적 근간을 이해하는데 있어서 중심적인 역할을 담당하고 있고 특히 세포증식을 조절하는 유전자가 암조직의 생존에 중요변이인자로 대두되고 있다. 이 중에서 특히 bcl-2 유전자는 14번

과 18번 염색체의 전위에 의해 단백질은 과잉 발현하게 된다¹⁻³. Bcl-2 암단백은 세포질내 미토콘드리아 단백질로 이의 과잉표현(overexpression)은 계획되어진 세포의 사멸을 방해하는 것으로 알려져 있다⁸. 이러한 bcl-2단백은 장시간 생존한 원조세포(long-lived progenitor cell)에 국한되어 있으며 림프절에서는 림프여포의 외투층(mantle zone)에 위치한 정상 memory B 세포와 수질 흥선세포에서 관찰되지만 비교적 빈번하게 세포사멸을 초래하는 피질 흥선세포와 림프절의 반응성 종자중심(reactive germinal center)에서는 표현되지 않는다⁸. Bcl-2 단백질의 과잉표현은 t(14;18) 염색체 전좌 뿐 아니라 Epstein-Barr nuclear antigen-2와 latent membrane protein을 매개로 한 EBV에 의해서도 유도되어지고 일부 림프증식성 질환에서도 표현되어 bcl-2 종양단백의 표현 자체가 t(14;18) 전좌를 의미하는 것은 아니다^{9,10}.

처음에는 이러한 bcl-2 단백질이 여포성 림프종에서 그 진단적 의의를 가지는 것으로 알려졌으나 최근에는 여포성 림프종 외에 미만성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병등과 호즈킨 림프종에서도 bcl-2 암단백의 과잉표현이 보고되고 있다^{12,9}. Said등⁹은 1993년 bcl-2에 대한 단일항체를 이용한 면역화학염색으로 bcl-2 단백질이 63예의 B 세포 림프종 중 79%, 29예의 T 세포 림프종에서는 48%의 양성반응을 보고하였고 김등¹¹은 각 림프종에서 42%, 19%의 다소 낮은 양성율을 보이면서 모든 아형에서 bcl-2 암단백 표현이 관찰된다고 하였다. 또한 Villuendas등¹²은 결절성 B 세포 림프종(39/48)과 MALT B세포 림프종(1/15)에서 bcl-2 암단백에 대한 양성반응에 큰 차이가 있음을 보고하였고 이는 결절성 림프종이 Maltoma 보다 좀 더 나쁜 임상적 양상을 가지는 것과 연관이 있는 것으로 생각하였다. 본 연구에서는 B 세포형 림프종에서 83%, T 세포형 림프종에서 67%로 비호즈킨 림프종의 모든

아형에서 비교적 높은 비율을 보였는데 이처럼 동일한 회사의 동일 제품으로 김등¹¹이나 Said등⁹의 결과보다 높은 양성율을 보인 것은 염색 전처리 과정으로 자동 멸균기를 사용한 것이 bcl-2 암단백 표현을 항진시키는데 일부 기여한 것으로 생각된다.

호즈킨 림프종에서는 최근까지 Polymerase Chain Reaction(PCR)등의 방법으로 bcl-2 암유전자 재배율을 확인하였고 그 비율은 6%에서 40%까지 다양하였다¹³⁻¹⁶. 또한 RS세포의 bcl-2 단백질표현에서도 다양한 비율 즉 0%~83%로 보고되고 있다¹⁷⁻¹⁹. Said등⁹은 53예의 호즈킨 림프종에서 전체적으로 26%의 양성율을 보고하였으며 조직학적 아형에 따른 분포는 결절성 경화형에서 35%, 혼합세포형에서 22%, 림프구 우세형에서는 15%의 양성비율을 보고하였다. 본 연구에서는 호즈킨 림프종에서 70%의 높은 양성율을 보여 대조적이었는데 이는 종양세포에서 미약한 양성반응을 보인 경우와 소수의 세포에서 양성을 보인 경우 모두를 포함시켰기 때문인 것으로 사료된다. 일부 학자에 의하면 호즈킨 림프종에서 이처럼 다양한 bcl-2 양성반응을 보이는 이유로 불균일한 발병기전(heterogeneous pathogenesis), 종양세포 즉 RS세포와 그 아형세포의 수가 다양한 점 등으로 생각하고 있으나¹² 최근에는 호즈킨 림프종에서의 bcl-2 단백질표현은 t(14;18) 염색체 전좌 자체보다는 다른 경로 즉 EBV를 매개로 한 경로가 많이 관여하기 때문이라고 생각하고 있다.

본 연구에서의 bcl-2 암단백 표현결과는 첫째, 미만형 비호즈킨 림프종에서는 총 46예 중 37예(80%)에서 양성반응을 보였으며 그 아형에 따른 bcl-2 암단백 양성빈도는 대림프구형 74%, 혼합림프구형 82%, 소림프구형 100%, 면역아세포형 75%, 림프아세포형 100%, 함몰 소림프구형 100%, Sezary증후군 0%를 보여 이들 각 아형간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 이들 bcl-2 염색에 양성을 보인 37예의 양성 빈도등급과 강도의 총점은 비교적 다양한 분포를 보여 주었으나 59%(37예 중 22예)에서 빈도등급과 강도의 분포 모두 3점 이상을 나타내어 전체적으로 80% 이상의 양성빈도와 중등도 이상의 염색강도를 나타내었다. 또한 림프종의 면역표현형에 따라서는 B 림프구 림프종이 83%, T 림프구 림프종이 67%이었고 Null 세포 림프종이 100%(5예)로 조직학적 각 아형간의 차이 뿐 아니라 면역표현형에 따른 차이도 근소함을 알 수 있었다.

둘째, 호즈킨 림프종의 bcl-2 암단백 표현양상은 총 20예 중 14예(70%)에서 양성반응을 보였으며 그 조직학적 아형에 따른 표현양상은 그 수가 가장 많

았던 혼합세포형에서 78.6%, 결절성 경화형에서 40%, 림프구 감소형에서 100%(1예) 양성 반응을 보였다. 하지만 호즈킨 림프종에서는 비호즈킨 림프종과는 달리 빈도등급 1점이 64.3%로 가장 많았고 염색강도도 1점이 57.1%로 가장 많아 전체적으로 종양세포 10~25%의 양성빈도와 미약한 양성반응을 보였다.

결과적으로 미만성 비호즈킨 림프종과 호즈킨 림프종에서 이러한 bcl-2 암단백이 이처럼 많은 빈도에서 표현되는 것은 bcl-2 종양단백의 과잉표현으로 인하여 연장된 세포의 생존이 종양성 림프양 세포의 성장에 기여했기 때문이라 생각된다.

EBV는 human herpes virus로서 세계인구 90% 이상에서 순환하는 B 림프구 군에 무증상의 지속적인 감염을 일으키며 주된 감염은 일반적으로 초기 유아기에 구강을 통하여 일어나고 이 바이러스는 T 세포와 무관한 방식으로 B 세포를 다클론성 활성화 시켜 분화와 면역글로블린의 생성을 초래시킨다²⁰. 그러나 유전적으로 혹은 이차적인 면역 결핍상태인 사람에서는 EBV 감염된 B세포의 증식이 조절되지 못하므로 인하여 다클론성의 림프종식질환이나 B 세포 림프종을 발병하게 된다²¹. EBV감염 세포는 EBV latent protein을 통하여 B 림프구의 계획되어진 세포의 사멸을 방해하여 B세포의 생존을 증가시키는 것으로 알려져 있고 또한 bcl-2 단백질의 과잉표현은 t(14; 18) 염색체 전좌 뿐 아니라 EBV latent membrane protein을 매개로 한 EBV에 의해서도 유도되어지고 일부 EBV는 항 bcl-2항체와 교차반응을 일으키기도 한다⁷. Libetta등²²은 Southern blot hybridization을 이용한 연구에서 총 34예의 호즈킨 림프종 중 15예 (44%)에서 양성반응을 보고하여 EBV와 호즈킨 림프종 간에 깊은 연관이 있음을 시사하였다.

저자들은 이러한 비호즈킨 림프종과 호즈킨 림프종에서의 EBV 분포와 그 연관성을 찾고 또한 bcl-2 암단백 표현과 EBV 존재와의 관련성 여부를 알기 위하여 정상소재 교배법을 이용하였다. 그 결과 실험가능한 총 44예의 미만성 비호즈킨 림프종 중 6예(13.6%)에서 EBV 존재가 확인되었고 그 중 4예는 대림프구형이었으며 2예는 혼합림프구형이었다. 하지만 이들 양성 비율은 전체적으로 10% 미만의 소수 종양세포에서만 표현되었다. 반면 총 20예의 호즈킨 림프종에서는 17예(85%)에서 EBV 존재가 확인되었고 그 아형별로는 혼합세포형이 92.9%로 가장 높았으며 결절성 경화형이 60%를 보여 모든 아형에서 높은 비율을 보였으나 그 양성 세포비율은

대체적으로 10~25%로서 적은 수의 종양세포에서 양성반응을 보였다. 그리고 비호즈킨 림프종 중 EBV양성인 6예의 3예(50%)와 EBV에 음성인 38예 중 3예(7.8%)에서 bcl-2에 양성반응을 보였다. 호즈킨 림프종에서는 EBV 양성인 17예 중 12예(70.0%)에서 bcl-2 양성반응을 보였고 EBV에 음성인 3예 중 2예(66.7%)에서 bcl-2에 양성반응을 보였다. 이러한 결과는 bcl-2 암단백과 EBV염색과의 직접적 연관성은 찾기 힘들으나 비호즈킨 림프종보다는 호즈킨 림프종에서 EBV를 매개로 한 bcl-2 암단백 표현이 더 강한 것으로 사료된다.

결 론

1988년부터 1994년까지 인제의대 상계백병원, 부산백병원, 서울대학병원과 계명대학병원에서 진단된 46예의 비호즈킨 림프종과 20예의 호즈킨 림프종을 대상으로 종양세포에서의 면역화학염색을 통한 bcl-2 암단백 표현과 정상소재 교배법을 이용한 EBV 존재 여부를 관찰하였다.

Bcl-2 암단백은 전체 46예의 비호즈킨 림프종 중 37예(80%)에서 양성반응을 보였고, 이중 22예(59%)에서 염색 빈도등급과 강도의 분포 모두 3점 이상을 나타내었다. 20예의 호즈킨 림프종에서는 14예(78%)에서 양성 반응을 보였으나 대부분 적은 수의 종양세포에서 미약한 양성반응을 보였다. 비호즈킨 림프종과 호즈킨 림프종 모두 조직학적 아형 간에는 큰 차이가 없었다.

EBV 존재 및 분포양상은 46예의 비호즈킨 림프종 중 6예(13.6%)에서 양성이었으며 그 중 4예는 대림프구형이고 2예는 혼합림프구형이었다. 20예의 호즈킨 림프종 중에서는 17예(85%)에서 양성반응을 보여 유의적인 빈도차이를 나타내었다.

또한 비호즈킨 림프종 중 EBV 양성인 6예 중 3예(50%)와 EBV에 음성인 38예 중 3예(7.8%)에서 bcl-2에 양성반응을 보였다. 호즈킨 림프종에서는 EBV 양성인 17예 중 12예(70%)와 EBV에 음성인 3예 중 2예(66.7%)에서 bcl-2에 양성반응을 보였다.

이상의 결과로 bcl-2 암단백은 호즈킨 림프종보다는 비호즈킨 림프종에서 더 강하게 표현되었으며 이처럼 악성 림프종에서 bcl-2 암단백이 빈도 높게 표현되는 것은 bcl-2 암단백의 표현으로 인하여 연장된 세포의 생존이 종양성 림프구 성장에 기여하기 때문이라 생각된다. 그러나 bcl-2 암단백과 EBV와의 직접적 연관성은 찾기 힘들었다.

감사의 글

본 연구를 위하여 좋은 증례를 검토하도록 도와 주신 서울대학병원 김철우 교수님, 계명대 이상숙 교수님과 권건영 교수님께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Inghirami G, Frizzera G. Role of the BCL-2 oncogene in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 681-3.
2. Cobally N, Grogan L, Keane M, Devaney DM, Dervan PA, Carney DN. Bcl-2 rearrangement in Hodgkin's disease and reactive lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 756-60.
3. Ratech H. The uses of molecular biology in Hematopathology. Oncogenes as diagnostic markers in non-Hodgkin's malignant lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 381-4.
4. Limpens J, Jong Dd, Krieken JHJM et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissue with follicular hyperplasia. *Oncog* 1991; 6: 2271-6.
5. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. 4th. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 270.
6. Clear ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14; 18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 7439-43.
7. Gregory CD, Dire C, Henderson S et al. Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* 1991; 349: 612-4.
8. Hockenberry D, Zutter M, Hickey W, et al. BCL-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-5.
9. Said JW, Pinkus GS, Lones MA, Preston M, Shintaku IP. Expression of bcl-2 oncogene protein in malignant lymphomas, including Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype. *Appl Immunohistochem* 1993; 1(2): 108-14.
10. Pezella F, Tse A, Cordell J et al. Expression of the BCL-2 oncogene protein is not specific for the 14; 18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137: 225-32.

11. Kim IS, Lee YS, Kim HK, et al. Bcl-2 oncogene in non-Hodgkin's lymphomas-Expression of Oncoprotein and t(14: 18) translocation. Proceedings of the third Korean-Japanese lymphoreticular workshop 1994; 150-60.
 12. Villuendas R, Piris MA, Orradre JL et al. Different bcl-2 protein expression in high-grade B-cell lymphomas derived from lymph node or mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1991; 139: 989-93.
 13. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, et al. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 1987; 316: 79-84.
 14. Reid AH, Cunningham RE, Frizzera G, O'Leary TJ. Bcl-2 rearrangement in Hodgkin's disease. Results of polymerase chain reaction, flow cytometry, and sequencing on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Am J Pathol* 1993; 142: 395-402.
 15. Lorenzen J, Hansmann M-L, Pezzella F. et al. Expression of the bcl-2 oncogene product and chromosomal translocation t(14; 18) in Hodgkin's disease. *Hum Pathol*. 1992; 23: 1205-9.
 16. Poppema S, Kaleta J, Hepperle B. Chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin's disease: Evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent bcl-2 gene rearrangement in Reed-Sternberg cells. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1789-93.
 17. Mrozek K, Bloomfield C. Cytogenetics of indolent lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20: 47-57.
 18. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991; 78: 1062-8.
 19. Louie DC, Kant JA, Brooks JJ, Reed JC. Absence of t(14: 18) major and minor breakpoints and of bcl-2 protein overproduction in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1991; 139: 1231-7.
 20. Ring CJA. The B cell-immortalizing functions of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1-13.
 21. Gratama JW, Zutter MM, Minarovits J, et al. Expression of Epstein-Barr virus encoded growth-transformation associated proteins in lymphoproliferations of bone marrow transplant recipients. *Intern J Cancer* 1991; 47: 1882-92.
 22. Libetta CM, Pringle JH, Angel CA, Craft AW, Malcolm AJ, Lauder I. Demonstration of Epstein-Barr Viral DNA in formalin-fixed paraffin-embedded samples of Hodgkin's disease. *J Pathol* 1990; 161: 255-60.
-