

유사분열 수와 PCNA를 이용한 갑상선 병변의 세포 증식능 측정

충북대학교 의과대학 병리학교실

정화숙 · 이건국 · 송형근 · 성노현

Proliferative Activity of Thyroid Lesions Evaluated by Mitotic Count and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

**Hwa Sook Jeong, M.D., Geon Kook Lee, M.D., Hyung Geun Song, M.D.
and Rohyun Sung, M.D.**

Department of Pathology, College of Medicine, Chungbuk National University, Chungju, Korea

To evaluate the clinical and histopathological significance of the proliferative activity in neoplastic and non-neoplastic thyroid lesions, we analyzed the mitotic count and the proliferating cell nuclear antigen labeling index (PCNA-LI) by immunohistochemistry as the proliferation-related markers. In this study included were surgically removed normal thyroid tissue (27 cases), adenomatous goiter (15 cases), Hashimoto's thyroiditis (5 cases), follicular adenoma (13 cases), follicular carcinoma (7 cases), papillary carcinoma (44 cases), poorly differentiated carcinoma (2 cases) and undifferentiated carcinoma (3 cases). The median PCNA-LI was 0 in normal thyroid tissue, 0.5 in adenomatous goiter, 6.2 in Hashimoto's thyroiditis, 1.2 in follicular adenoma, 4.8 in follicular carcinoma, 8.5 in papillary carcinoma, 60.8 in poorly differentiated carcinoma, and 55.2 in undifferentiated carcinoma ($p=0.0001$). Although PCNA-LI was exceptionally high in Hashimoto's thyroiditis, it was suggested that PCNA-LI could be used as a marker differentiating benign lesions from malignant neoplasm. Also, it could differentiate follicular adenoma from follicular carcinoma. Except clinical stage ($p=0.0397$), PCNA-LI was not related with sex, size, histologic subtype, and lymph node metastasis in papillary carcinoma. The presence of mitosis differentiated the neoplastic thyroid lesions from the non-neoplastic lesions ($p<0.05$), however, it could not divide benign and malignant neoplasm. These results suggest that an evaluation of the proliferative activity can help to differentiate the thyroid lesions. In addition, there was no significant correlation between the value of PCNA-LI and the presence of mitosis. It can be recommended to evaluate both the mitotic count and the PCNA-LI for determining the proliferative activity of the thyroid lesions. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 1297 ~ 1307)

Key Words: Thyroid, Mitotic count, PCNA labeling index, Papillary carcinoma

접 수: 1997년 6월 12일, 게재승인: 1997년 9월 11일

주 소: 충북 청주시 개신동 산 48, 우편번호 360-240

충북대학교 의과대학 병리학교실, 성노현

ISSN : 0379-1149

본 연구는 1996년 충북대학교 병원 지정진료 연구비의 보조로 이루어졌음.

서 론

세포 증식능을 객관적으로 평가하는 방법으로 과거에는 광학현미경하에서 유사분열 수를 세거나 종양 세포를 배양하여 살아 있는 세포를 위상차현미경으로 관찰하는 고식적 방법을 사용하였다. 근래에 thymidine labeling index 혹은 bromodeoxyuridine (BrdU) 표식법 및 유세포 측정기를 이용한 DNA ploidy를 보는 방법들이 이용되고 있으나¹ 이는 과정이 복잡하고 많은 비용 및 시간을 요함으로 사용빈도가 떨어지고 있는 추세이다. 최근에는 핵소체 조성부에 관련된 단백질의 은호기성 (AgNORs)을 이용하여 실시하는 은염색법^{2,3}과 Ki-67 항체⁴ 및 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)⁵⁻⁷에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색법이 선호되고 있다.

갑상선암은 인체의 내분비 기관에 생기는 암 중 가장 흔하며, 최근에 그 빈도가 증가하는 추세이다. 갑상선암의 예후에 미치는 인자를 찾기 위하여 많은 임상·병리적 연구가 이루어졌으며 지금까지 밝혀진 예후 인자로 나이, 성별, 종괴의 크기, 조직학적 형태, 혈관 혹은 피막내 침윤, 주위 조직 내로의 침습 정도, 림프절 전이 유무, 임상 병기, 수술 범위와 수술 후 보조적 치료 유무 등이 거론되고 있다⁸⁻¹⁰. 여러 장기의 종양에서 세포의 증식능이 그 종양의 생물학적 특성, 진단, 악성도 추정, 치료 및 예후 판정에 관여된다고 알려져 있으나, 종양 세포의 증식능이 갑상선암에 미치는 효과에 대한 연구는 매우 적어 갑상선암에 어떤 역할을 하는지에 대하여는 아직 확실히 밝혀져 있지 않다.¹⁻¹⁶

형태학적인 광학현미경상의 관찰만으로 갑상선 병변을 진단하는 데는 한계가 있으며, 진단에 따른 각각의 예후를 따지기에 앞서 정확한 진단을 하는 것이 무엇보다도 우선되어야 할 것은 주지의 사실이다. 특히 갑상선암은 다른 장기의 암종과 달리 조직 반응이나 세포의 이형성이 매우 적고, 성장 속도 또한 매우 느리므로 진단에 주의를 요한다. 림프절 전이를 관찰하는 것도 중요하지만, 이것은 림프절 전이가 흔한 유두상 암종의 경우에만 가능하며 또한 수술로 림프절 절제가 적절히 시행되어야 가능하다. 따라서 갑상선 질환의 진단에 다른 보조적인 수단이 필요하며, 다른 많은 장기에서 악성도 평가나 예후 및 치료 지표로까지 연구되고 있는 세포 증식능을 갑상선 질환에서도 면밀히 관찰하여 각각의 갑상선 질환의 세포 역동적 정보를 파악하고 이

결과를 토대로 임상·병리적 지표로서 사용 가능한지 조사하여 보는 것이 필요하다고 생각된다.

이에 본 논문에서는, 세포 증식능 측정 방법으로 광학현미경하에서 유사분열 수를 세는 고식적 방법과 PCNA를 이용한 면역조직화학 염색을 동시에 실시하여, 다양한 갑상선의 질환에서 세포 증식능의 정도를 평가하고, 이를 토대로 각 질환과 세포 증식능의 상관관계를 통계학적으로 분석하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1992년 1월부터 1995년 12월까지 4년간 충북대학교 병원에서 외과적으로 절제된 후 해부병리과에서 진단된 갑상선 질환 중 15예의 선종성 종괴, 5예의 하시모토 갑상선염, 13예의 여포상 선종, 7예의 여포상 암종, 44예의 유두상 암종, 2예의 저분화성 암종과 3예의 미분화성 암종을 대상으로 하였다. 대조군으로는 여포상 선종 주위나, 유두상 암종에서 떨어져 있는 정상 갑상선 조직 및 후두암으로 인한 근치적 광범위 절제 검체에 포함된 갑상선 조직에서 여포 구조가 잘 유지된 부위를 선택하여 총 27예를 선정하였다. 이들은 통상적인 방법인 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하여 헤마톡실린과 에오신 염색을 실시하여 진단 후 보관되었던 유리 슬라이드 표본과 파라핀 블록이다.

2. 연구 방법

1) **임상 기록 재검토:** 연구 대상 환자들의 임상 기록과 병리 진단지를 재검토하여 성별과 연령을 조사하였고, 유두상 암종 44예에서는 종괴의 크기, 림프절 전이 여부, 임상적 병기 및 수술 후 병의 진행 과정 등을 추가로 조사하였다.

2) **병리조직학적 검색:** 육안 검색은 갑상선 피막의 보존 여부를 관찰하였으며, 절단면에서 종괴의 크기를 측정하고 절제된 갑상선 주위 지방 조직에서 림프절을 찾았으며, 10% 포르말린에 고정과 파라핀 포매하여, 4 μ m 두께로 박절 후 통상적인 방법으로 헤마톡실린과 에오신 염색을 하여 조직학적인 진단을 하였고, 전이된 림프절 수를 세었다.

3) **유사분열수 측정:** 광학현미경상 200배에서 50개 시야를 검색하여 유사분열 수를 세었으며 400배 시야로 확인하였다. 농축된 핵이나 핵질이 선명하지 않은 핵은 제외하였으며 분명한 유사분열상으로 생각되는 유사분열 세포만을 세었다.

4) PCNA의 면역조직화학 염색 및 판독:

(1) PCNA의 면역조직화학 염색; 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절 후 60°C의 항온기에서 30분간 가온 후 실온에서 xylene으로 탈파라핀 시킨 다음 알코올과 증류수를 거쳐 함수 시켰다. 내인성 과산화효소의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수를 사용하여 10분간 처리 후, Tris 완충용액 (Tris 0.05M, pH 7.6)에 씻고 일차 및 이차항체의 비특이적 결합을 막기 위하여 정상 염소 혈청을 가한 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 일차항체는 PCNA를 생쥐에 면역시켜 얻은 mouse monoclonal antibody인 anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA, Novocastra Lab, UK, 1:100)을 가하여 냉장고에서 16시간 동안 반응시킨 후에 다시 Tris 완충용액으로 씻고, 이차항체인 biotinylated anti-mouse rabbit IgG를 10분간 반응시킨 후, peroxidase reagent를 가하고 Tris 완충용액으로 씻고, AEC (3-amino-9-ethyl-carbazole)를 가하여 발색 반응을 확인한 후에 흐르는 물에 씻은 다음, glycerol mounting medium으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. PCNA 염색시 발색 반응은 핵에서 일어나는데 대조 핵 염색에 사용되는 Mayer hematoxylin으로 염색하는 경우, PCNA의 염색상을 흐리게 하여 양성 결과 수치를 떨어뜨리는 경향이 있어 대조 핵 염색은 시행하지 않았다.

(2) PCNA의 염색 결과 판정: PCNA에 대한 면역조직화학 염색 후 광학현미경하에서 200배 시야 중 염색율이 높은 부위를 선정하고, 10개의 400배 시야에서 관찰하여 핵에 붉게 염색된 경우를 양성으로

판정하였다. 염색 강도를 흐릴 때는 1점, 약간 진할 때는 2점, 진할 때는 3점으로 표시하였고, PCNA 표지수는 헤마톡실린과 에오신으로 염색한 동일 표본에서 400배 시야의 평균 세포 수를 세어 백분율로 산정하였다. "양성 PCNA군"은 염색 강도가 2점 이상이고, PCNA 표지수가 1점 이상인 경우로 정의하였다.

5) 통계학적 분석: 각 지수는 양성 검체수 및 분율, 평균±표준편차와 중간값 등으로 표기하였고, 통계학적인 처리는 Kruskal-Wallis 및 Fisher's exact 검정법과 비모수 다중비교 검정법을 실시하여 p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 임상 소견 및 병리학적 소견

연령 분포는 선종성 종대가 13~54세(평균 37세), 하시모토 갑상선염이 29~76세(평균 49세), 여포상 선종이 14~61세(평균 36세), 여포상 암종이 17~57세(평균 32세), 유두상 암종이 16~66세(평균 41세), 저분화성 암종이 59~66세(평균 63세) 및 미분화성 암종이 60~66세(평균 62세)이며, 대조군인 정상 조직은 17~61세(평균 42세)로 저분화성 암종과 미분화성 암종이 고 연령층에서 주로 발생하였고, 암종 중 여포상 암종의 연령층이 낮은 경향이였다. 선종성 종대는 93.3%, 여포상 선종은 84.6%, 유두상 암종은 63%가 여성에서 발생하였으며, 하시모토 갑상

Table 1. PCNA labeling index of the thyroid lesions

Diagnosis	Cases	Mean Age(yr)	Sex F : M	Median	Range
Normal	27	42	22 : 5	0	0 - 38.4
Adenomatous goiter	15	37	14 : 1	0.5	0 - 37.7
Hashimoto's thyroiditis	5	49	5 : 0	6.2	2.8 - 38.4
Follicular adenoma	13	36	11 : 2	1.2	0 - 45.5
Follicular carcinoma	7	32	7 : 0	4.8	0.7 - 43.8
Papillary carcinoma	44	41	34 : 10	8.5	0 - 89.4
PD carcinoma	2	63	2 : 0	60.8	50 - 71.6
Undifferentiated carcinoma	3	62	0 : 3	55.2	48.5 - 88.3

Statistics: Kruskal-Wallis test, p=0.0001

Statistics: nonparametric multiple comparison test, p<0.05

PD carcinoma: poorly differentiated carcinoma

선염과, 여포상 암종과, 저분화성 암종은 모두 여자에서, 반면에 미분화성 암종은 모두 남자에서 발생하였다(Table 1). 유두상 암종 44예 중 79.6%가 여성이며 1~4 cm 크기가 대부분을 차지하였다. 조직학적 형태는 분화가 잘된 경우가 30예, 여포상 변형이 10예, 주상 구조를 이루는 경우가 4예이며, 림프절 전이는 약 반수에서 관찰되었고, 임상적 병기는 대부분이 등급 II와 III에 속하였다(Table 2).

2. 유사분열 측정 결과

유사분열이 관찰된 경우는 정상 갑상선 조직에서 3.7%, 여포상 선종에서 46.2%, 여포상 암종에서 71.4%, 유두상 암종에서 25%, 그리고 저분화성 암종과 미분화성 암종은 모두에서 유사분열이 관찰되었으며, 평균 유사분열 수는 각각 1개, 2.8개, 7.2개, 2.3개, 23개 및 69.3개였다. 선종성 종대와 하시모토 갑상선염에서는 유사분열 세포가 관찰되지 않았다(Fig. 1). 종양성 병변의 39.1%에서 유사분열이 존재하였고, 비종양성 병변에서는 거의 유사분열이 관찰되지 않았으며(대조군 정상 조직은 제외), 악성 종양의 38%에서 유사분열이 존재하였고, 양성 종양의 46.2%에서 유사분열이 관찰되었다. 따라서 유사분열의 존재를 관찰하는 것이 종양성·비종양성 병변의 구분에 도움을 줄 수 있다고 생각되었지만(p<0.05), 양성인지 악성인지 여부를 가리는 데에는 도움이 되지 않는다고 생각되었다. 그러나 3가지 악성 종양에서 평균 유사분열 수가 상당히 높은 것을 관찰할 수 있었으며, 저분화나 미분화 암종은 모든 예에서 유사분열을 관찰할 수 있었다(Table 3).

Table 2. PCNA-LI and clinicopathologic features of 44 papillary carcinomas

Clinicopathologic factor	Cases(No)	Median	p value
Histologic type			0.1018
WD	30	17.7	
FV	10	0.4	
Trabecular	4	25.2	
Sex			0.7259
Female	35	13.8	
Male	9	3.9	
Size			0.5259
< 1 cm	6	0.8	
≥ 1- < 4 cm	31	9.9	
≥ 4 cm	7	30.9	
LN metastasis			0.6539
positive	21	32.2	
negative	23	3.7	
Stage			0.0397
I	3	1.1	
II	17	3.7	
III	18	4.9	
IV	6	48.7	

WD: well differentiated, FV: follicular variant
 Statistics: Kruskal-Wallis test and nonparametric multiple comparison test

Table 3. Mitosis- and PCNA-positive cases in the thyroid lesions

Diagnosis	Cases	Mitosis case(%)		PCNA(+) case(%)		Concordance case(%)	
		A	B	A	B	A→B	B→A
Normal	27	1(3.7)	1(3.7)	0	0	0	0
Adenomatous goiter	15	0(0)	2(13.3)	·	0	·	0
Hashimoto's thyroiditis	5	0(0)	5(100)	·	0	·	0
Follicular adenoma	13	6(46.2)	3(23.1)	2/6	3/3	2/6	3/3
Follicular carcinoma	7	5(71.4)	4(57.1)	3/5	3/4	3/5	3/4
Papillary carcinoma	44	11(25.0)	25(56.8)	6/11	7/25	6/11	7/25
PD carcinoma	2	2(100)	2(100)	2/2	2/2	2/2	2/2
Undifferentiated carcinoma	3	3(100)	3(100)	3/3	3/3	3/3	3/3

PCNA-positive cases: All except cases with weak stain and PCNA LI<1

PD carcinoma: Poorly differentiated carcinoma

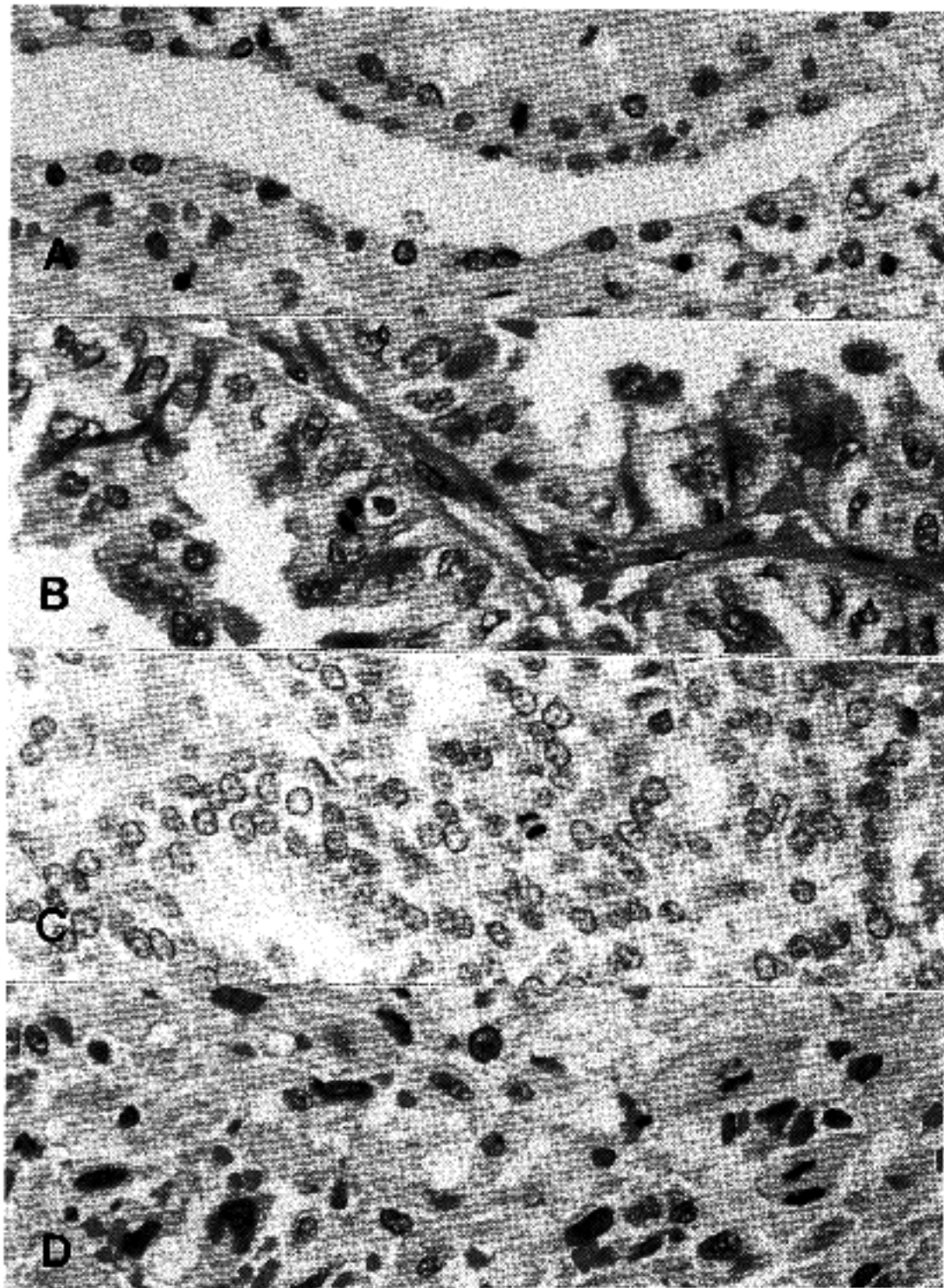


Fig. 1. A. Only one case among 27 normal thyroid tissue showed one mitotic figure per 50 medium power fields.
 B. Histology of follicular carcinoma showing mitosis.
 C. Histology of papillary carcinoma showing a few mitoses.
 D. Anaplastic carcinoma showing numerous mitoses.

유두상 암종에서는 통계학적으로 유의한 상관성은 없었지만, 남자, 나이가 많을수록, 종괴의 크기가 클수록, 조직학적으로 주상 구조, 림프관 전이가 존재할수록 유사분열이 관찰되는 빈도가 높은 경향이였다(Table 4).

3. PCNA 단백질발현

PCNA에 양성인 세포는 대조 핵 염색을 하지 않아 발색 반응이 선명하여 쉽게 확인할 수 있었으며,

콘덴스로 적당히 빛 조절을 함으로써 갑상선 상피 세포를 기타 결합 세포나 염종 세포 및 내피 세포로부터 간별할 수 있었다. 저분화성 및 미분화성 암종에서는 유두상 암종에 비해 대부분의 암세포들이 미만성으로 염색되었으나 비종양성 병변에서는 양성세포의 출현이 극소적으로 관찰되었다(Fig. 2).

PCNA 표지지수의 중간값은 각각 정상 조직이 0, 선종성 종대가 0.5, 하시모토 갑상선염이 6.2, 여포상 선종이 1.2, 여포상 암종이 4.8, 유두상 암종이

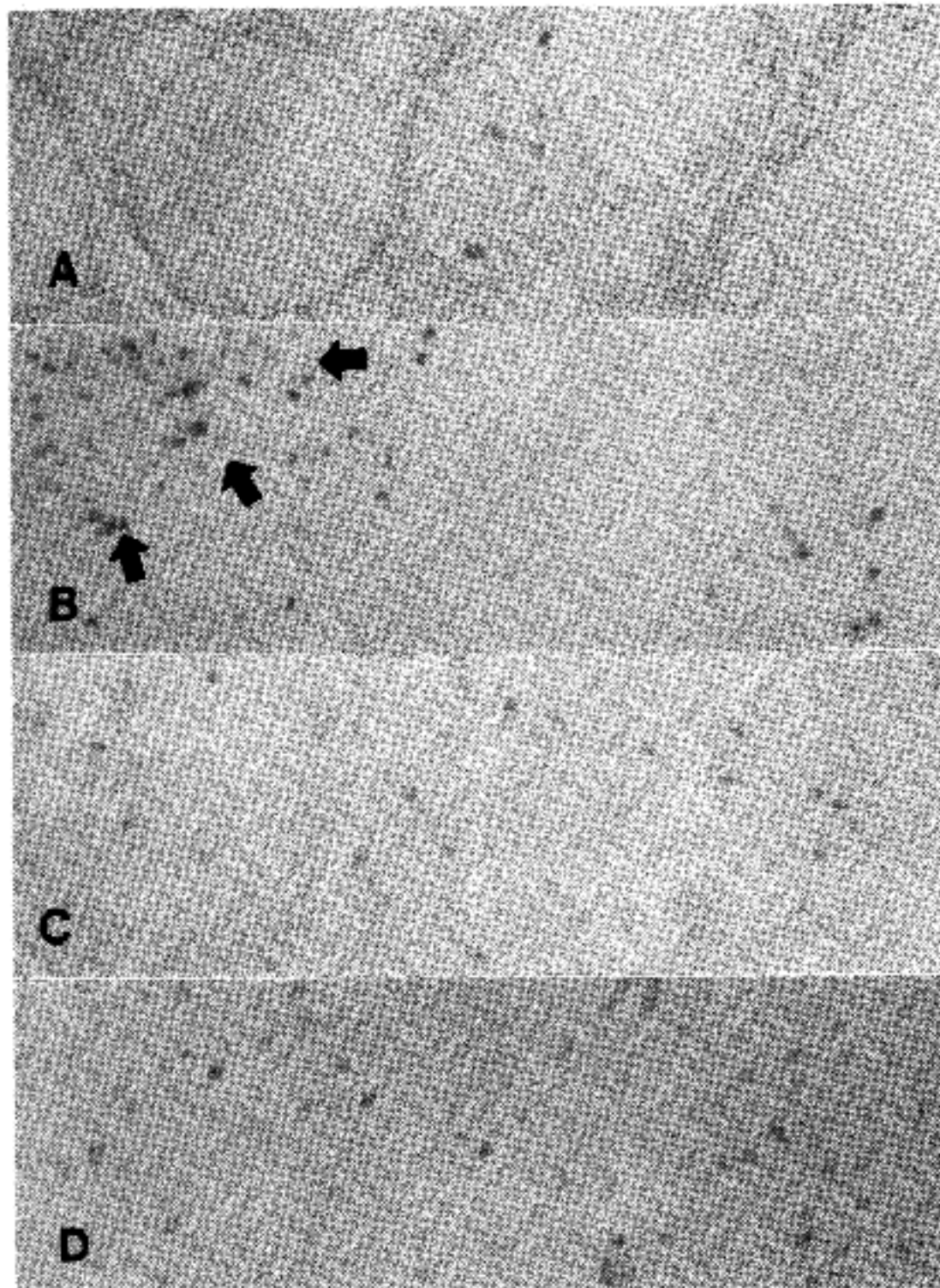


Fig. 2. A. Adenomatous goiter. A few nuclei of the only two cases of adenomatous goiter stained positively for PCNA.
 B. Hashimoto's thyroiditis. Several nuclei of follicular cells showed weak or strong PCNA positivity. Left upper portion is a lymphoid follicle.
 C. Papillary carcinoma showing frequent PCNA-positive nuclei.
 D. Diffuse PCNA strong positive nuclei in undifferentiated carcinoma.

8.5, 저분화성 암종이 60.8이며, 미분화성 암종은 55.2였다. 이들 각각의 PCNA 표지지수가 통계적 유의하게 각 질환간에 차이를 보였다($p=0.0001$)(Table 1). 정상 조직 및 양성 갑상선 종대와 여포상 선종의 PCNA 표지지수가 낮아 악성 종양과의 구별이 가능하였다. 하지만 하시모토 갑상선염의 PCNA 표지지수가 상당히 높아져 하시모토 갑상선염을 양성 군에 포함시켰을때 악성 종양, 특히 여포상 암종과

의 감별에는 도움을 얻기는 곤란하였다. 그러나 하시모토 갑상선염의 조직학적 소견이 특징적이어서 종양성 병변과 혼동 되지 않음을 감안하여 하시모토 갑상선염을 제외한 경우, 양성과 악성 질환의 감별에 PCNA 표지지수가 도움이 됨을 알 수 있었다. 또한 여포상 선종과 여포상 암종을 구분하는 것이 가능하였다(Table 1, 2). PCNA 표지지수가 1 이상이고 염색 강도가 2점 이상인 경우를 "양성 PCNA군"

Table 4. Comparison between clinicopathologic factors and the mitosis- and PCNA-positivity in 44 papillary carcinomas

Clinicopathologic factor	Cases	Mitosis	PCNA(+)
		case(%) A	case(%) B
Histologic type			
well differentiated	30	6(20.0)	20(66.7)*
Follicular variant	10	2(20.0)	2(20.0)*
Trabecular	4	3(75)	3(75.0)
Sex			
Female	35	6(17.1)	19(54.3)
Male	9	5(55.6)	6(66.7)
Size			
< 1 cm	6	1(16.7)	1(16.7)
≥ 1 ~ < 4 cm	31	7(22.6)	20(65.0)
≥ 4 cm	7	3(42.9)	3(43.0)
LN metastasis			
Positive	21	8(38.1)	13(61.9)
Negative	23	3(13.0)	12(52.2)
Stage			
I	3	0	1(33.3)
II	17	2(11.8)	9(52.9)
III	18	7(38.9)	10(55.6)
IV	6	2(33.3)	5(83.3)

Statistics: Kruskal-Wallis test or T-test, *:p<0.05

으로 정의하고, 그 빈도를 관찰한 결과 대조군으로 사용한 27예의 정상 갑상선 조직에서는 3.7%, 선종성 종대는 13.3%, 여포상 선종은 23.1%, 여포상 암종은 57.1%, 유두상 암종은 56.8%이고 하시모토 갑상선염, 저분화성과 미분화성 암종은 모든 예가 양성 PCNA군에 속하였다.

유두상 암종에서 PCNA 표지指수가 임상·병리적 지표와 연관이 있는지를 분석한 결과, 임상적 병기만이 통계적으로 유의하게 관련이 있는 것을 알 수 있었다(p<0.0397)(Table 2). 양성 PCNA군의 빈도는 조직학적으로 분화가 좋은 경우와 여포상 변형인 경우에 통계학적인 차이가 나는 것을 관찰하였다(p<0.05). 또한 통계학적인 차이는 없지만 남자, 종괴의 크기가 1~4 cm, 조직학적 형태가 주상 구조일 때, 림프절에 전이했을 때와 임상적 병기가 높을수록 양성 PCNA군에 속하는 경우가 많음을 알 수 있

Table 5. Correlations among mitosis, PCNA and lymph node metastasis in 44 papillary carcinomas

	LN metastasis(+)	LN metastasis(-)
	Mitosis(+)	8
Mitosis(-)	13	20
<hr/>		
	LN metastasis(+)	LN metastasis(-)
	PCNA(+)	13
PCNA(-)	9	10
<hr/>		
	PCNA(+)	PCNA(-)
	Mitosis(+)	6
Mitosis(-)	19	14

Statistics: Fisher's exact probability test, All p>0.05

었다(Table 4).

4. 유사분열과 PCNA 단백질발현간의 비교

유사분열의 존재 여부와 PCNA 단백질 발현 정도간의 상관성을 검색하고자 유사분열이 관찰되면서 양성 PCNA군에 속하는 경우를 조사한 결과 저·미분화성 암종은 모두에서 일치도를 보였지만 여포상 선종, 여포상 암종 및 유두상 암종에서는 50% 내외의 증례에서만 일치도를 보였다. 따라서 양성 병변 및 고분화를 보이는 암종에서는 유사분열 유무와 PCNA 표지指수간에 상관성이 떨어짐을 알 수 있었다. 두 가지 모두 증식능의 지표로 이용될 수는 있으나 특정 병변의 증식능을 관찰하기 위해서는 양자를 병용하는 것이 바람직할 것으로 생각되었다.

유두상 암종에서는 각각의 임상·병리적 지표에 따라 유사분열이 관찰되면서 양성 PCNA군에 동시에 속하는 경우가 전체적으로 1/3에서 반수 정도만을 차지하여 유사분열과 PCNA 단백질발현과는 상관관계가 없는 것으로 확인되었다. 또한 유사분열 및 양성 PCNA군 각각을 림프절 전이 유무와 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 상관관계를 찾아볼 수 없었다(p>0.05)(Table 5).

고 찰

갑상선은 인체에서 가장 큰 내분비선이고, 또한 내분비선 중 가장 많은 병변이 발생하는 장소이다. 갑상선 종대는 갑상선 호르몬 부족에 대한 대상성

비후로 생기는 갑상선 비대인데 대부분에서 갑상선 기능 상태는 정상이며 갑상선에서 발생하는 질환 중 가장 흔한 형태이다.¹⁷ 갑상선염 중 자가면역 질환인 하시모토 갑상선염은 억제 T세포 기능의 선천적 결핍이라고 생각되고 있다. 그 결과 세포 파괴성 T세포에 의해 여포 세포가 공격받는 것이 제어되지 않게 되고 동시에 B세포에 의한 항체 생산에 T보조 세포의 참여가 억제되지 않는다.¹⁸ 양성 종양으로 여포상 선종은 대부분 단독 결절로 나타나는데 이것은 여포상 암종과의 감별이 어려운 점이 이 종양의 정확한 분류에 있어서의 문제점이다. 또한 조직학적으로 다결절성 갑상선 종대와 구별하기 어려운 경우도 드물지 않다. 갑상선의 악성 종양은 인체에 발생하는 암의 1% 미만을 차지할 만큼 많지 않으나 내분비선암 중 가장 흔하다.^{17,18}

갑상선의 상피에서 기원하는 주요 암종에는 여포상 암종, 유두상 암종, 저분화 암종 및 미분화 암종 등이 있다. 이들 암종 중 미분화 암종을 제외하고는 종양의 성장 속도가 매우 낮아 예후가 좋은 암으로 알려져 있으며, 생존율이 비교적 높고 재발율이 낮아 다른 장기의 암종에 비하여 연구 자료가 빈약하다. 그러나 실제로 주위로 침윤하거나 전이 및 재발하여 사망하는 경우도 상당히 보고되고 있다. 지금까지 갑상선 암종의 여러 예후 인자가 언급되어 있지만, 성장의 속도가 낮은 갑상선 종양의 특징으로 인하여 세포 증식능에 대한 연구는 거의 되어있지 않다.¹¹⁻¹⁷

많은 장기의 종양에서 세포의 증식능은 그 종양의 생물학적 특성, 진단, 악성도 추정, 치료 및 예후 판정에 관여된다고 알려져 있다.^{1-7,20-23,27-32} 본 연구에서는 여러 장기의 암종에서 고식적으로 사용하였던 세포분열 측정법과, 다른 방법에 비하여 많은 장점을 가져 각광을 받는 PCNA를 이용한 면역학적 측정법을 이용하여 세포 증식능을 측정·평가하였다.

세포분열 측정법은 오래 전부터 암종의 악성도를 평가하는 가장 기본적인 방법으로 성장 속도를 가장 쉽게 예측할 수 있다.²⁰ 특히 세포분열 수의 측정은 자궁과 위장관계의 평활근의 종양에서 악성으로 진단하는데 가장 중요한 진단 기준으로 이용되고 있으며, 유방, 뇌, 방광 및 난소암을 포함한 다른 많은 악성 종양의 예후를 예측하는 지표로 사용되어 왔다. 그럼에도 불구하고 유사분열 수를 측정하는데에는 재현성이 떨어지는 것이 중요한 문제가 되며, 이를 보완하기 위하여 검체를 즉시 고정하는 것이 필요하고, 잘 보존된 시야에서 세고, 세포 밀도가

높은 부위에서 세며, 농축된 핵은 빼고 세어야 하는 주의 사항이 언급되어 있다.^{21,22} 그러나 대부분의 갑상선 암종은 특히 성장 속도가 낮고 농축된 핵과 분열하는 세포를 구별하기 어려워 세포분열 중에 있는 세포를 찾기가 매우 어렵다. Lee등¹⁴은 127예의 갑상선 암종에서 유사분열 수를 연구하였는데 유사분열 수를 100개의 고배율 시야에서 0개에서 316까지 관찰하였으며 미분화 암종에서 가장 높고, 다음에는 여포상 암종, 수질암종, 유두상 암종 순으로 나타났다. 이들 4군 간에는 유사분열 수에 따라 통계학적으로 유의하게 구분할 수 있는 것으로 나타났다. LiVolsi등¹⁵은 갑상선 유두상 암종에서 유사분열이 매우 드문 것을 관찰하였고, 따라서 이러한 결과는 종양의 "생물학적 불활성"을 시사한다고 하였다. 또한 Mizukami등¹¹은 50예의 유두상 암종에서 유사분열 수가 10개의 400배 시야에서 1개 내지 3개 만이 관찰되었으며 총 12예에서 유사분열 세포가 존재하였다고 보고하였다. 유사분열이 관찰된 예의 임상·병리적 분포를 보면 남자 환자의 50%, 나이가 50세 이상인 환자의 30%, 종괴의 크기가 4 cm 이상인 경우의 50%, 주상 구조의 37%를 차지하여 다소 높은 경향이 있지만 유사분열 유무와 임상·병리적 지표와는 통계학적인 유의성이 없다고 보고하였다.

본 연구에서는 유사분열의 존재 여부가 종양성·비종양성 병변을 구분하는 데에 도움이 된다는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 하지만 양성인지 악성인지 여부를 구분하는 것은 불가능하였다. 그러나 여포상 암종, 저분화 암종 및 미분화 암종에서의 평균 유사분열 수는 상당히 높은 것을 관찰할 수 있었으며, 저분화나 미분화 암종은 모든 예에서 유사분열을 관찰할 수 있었다. 또한 44예의 유두상 암종에서는 통계학적으로 유의한 상관성은 없지만, 조직학적으로 남자, 나이가 많을수록, 종괴의 크기가 클수록, 주상 구조, 림프절 전이가 존재할수록 유사분열이 관찰되는 빈도가 높았는데 이 중 일부는 Mizukami등¹¹의 결과와 일치하는 소견이다. 그러나 유사분열 수의 많고 적고가 항상 양성과 악성 임상 경과와 관련된 것은 아니며 때로 유사분열 수의 측정 결과가 잘못 해석되기도 하였다. 예를 들면, 유사분열 수는 정상피종의 악성도에 확증을 주지 못하며, 기관 암종과 악성 수막종의 확실한 예후 인자도 아니며, 부갑상선 선종과 과증식에서도 병변의 생물학적 진행을 예측하지 못한다.¹⁶ 본 연구의 결과는 종양성 병변의 진단에 있어 유사분열의 관찰과 그 수

의 측정이 측정이 진단에 어느 정도 도움이 될 수 있음을 시사하였다.

PCNA를 항원에 대한 항체를 이용한 면역조직화학 염색은 포르말린 고정 파라핀 조직에도 사용 가능하며 시간과 비용이 적게 소요됨으로 세포 증식능 연구에 많은 도움이 되고 있다. PCNA는 DNA 중합효소 δ 의 보조 단백질로 분자량이 36 kd이며, 1978년 전신성 홍반성 낭창 환자의 혈청에서 처음 발견되었다.²³ 이것은 정상적으로도 소량 존재하지만 암 세포 내에서는 다량 검출되는데 그 이유는 PCNA가 핵내 DNA 합성에 보조인자로서의 정상적인 기능 외에 계획하지 않았던 DNA 합성에도 관여하기 때문이다.²⁴ PCNA는 세포 주기와 밀접한 관계가 있는데 G1말기에서 증가하기 시작하여 S기에서 최대가 되고 G2와 M기에 다시 감소하는 것이 실험적으로 관찰되었고, 따라서 PCNA가 세포 주기의 G1말기와 S기에 대한 표지자임이 밝혀졌다.^{25,26} PCNA 항체를 이용한 세포 증식능 측정은 백혈병, 악성 림프종, 전립선암, 방광암, 유방암, 폐암, 신 세포 암종, 뼈의 연골형성 종양, 두경부의 편평상피암종 및 다른 여러 종양들에서 많은 연구가 이루어졌는데 대부분의 연구에서 악성 종양인 경우에 PCNA 양성률이 정상 조직이나 양성 병변에 비하여 유의하게 증가하여 악성도를 잘 반영한다고 보고하였다.^{5-7,27-32}

Mizukami등¹¹은 50예의 유두상 암종에서 남자이거나, 종괴의 크기가 클 때에 고 PCNA군에 속하는 경향이 있지만 PCNA 양성률과 임상·병리적 지표는 서로 관련이 없다고 보고하였다. Shimizu등¹³은 정상 갑상선 조직에서 0.6, 선종성 종대에서 1.9, 여포상 선종에서 2.0, 여포상 암종에서 3.6, 유두상 암종에서 4.9, 저분화성 암종에서 4.6과 미분화성 암종에서는 50 등으로 각각의 PCNA 표지지수를 산정하였다. 이 결과로 선종성 종대와 여포상 선종을 정상 갑상선 조직과 분리할 수 있으며, 유두상 암종, 여포상 암종 및 저분화 암종을 정상 조직, 선종성 종대, 여포상 선종 등 양성 병변과 구분할 수 있다고 하였다. 또한 이 보고에서 미분화성 암종은 나머지 모든 종양에 비하여 상당히 높은 PCNA 수치를 보였는데 이것은 실험에 사용한 증례 수가 단지 2에 뿐이라 통계학적인 처리를 할 수 없지만, 미분화성 암종의 다른 암종과는 달리 단 기간에 빨리 자라는 급성 과정을 거치는 종양임을 시사하였다. Tateyama등¹²은 PCNA 표지지수가 여포상 선종에서 2.5~8.6, 미세한 침윤이 있는 여포상 암종에서 11.8~39.1, 광범위하게 침윤이 있는 여포상 암종에서 18.6~20 등인 점

을 관찰하고, 양성과 악성 기준을 PCNA 표지지수 10으로 하여 여포상 종양의 양성과 악성을 구분하는데 도움을 얻을 수 있다고 주장하였다. 최근에 Czyz등¹⁶도 PCNA 표지지수 및 염색 강도를 통하여 갑상선의 여포상 선종과 여포상 암종을 감별 진단할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서 PCNA 표지 지수의 중간값은 각각 정상 조직이 0, 선종성 종대가 0.5, 하시모토 갑상선염이 6.2, 여포상 선종이 1.2, 여포상 암종이 4.8, 유두상 암종이 8.5, 저분화성 암종이 60.8이며, 미분화성 암종은 55.2였다. 이들 각각의 PCNA 표지지수가 통계적 유의하게 다르므로 서로를 구분하는 것이 가능하였다. 이 결과는 Shimizu등¹³의 결과와 일치하지만, PCNA 표지지수가 Shimizu등¹³의 결과에 비해 다소 높은 경향이 있는데, 이것은 본 연구의 면역염색 방법에서 헤마톡실린으로 대조 핵 염색을 하지 않아서 다소 높게 나온 것으로 생각된다. 양성 질환인 선종성 종대나, 여포상 선종의 PCNA 표지지수가 낮아, PCNA 표지지수가 상당히 높지만 다른 질환과 쉽게 구분되는 조직학적 특징을 가진 하시모토 갑상선염을 양성군에서 제외하면 악성 종양과의 구별에 PCNA 표지지수가 매우 좋은 지표로 이용될 수 있음을 시사하였다. 또한 여포상 선종과 암종과의 구분이 가능한 것은 Tateyama등¹² 및 Czyz등¹⁶의 결과와 일치하는 소견이다.

유사분열이 관찰되면서 양성 PCNA군에 속하는 경우를 조사한 결과 여포상 선종, 여포상 암종과 유두상 암종은 50% 내외에서 일치도를 보였고, 저·미분화성 암종은 100%의 일치도를 보였다. 유두상 암종에서는 각각의 임상·병리적 지표에 따라 유사분열이 관찰되면서 양성 PCNA군에 동시에 속하는 경우가 전체적으로 1/3에서 반수 정도만을 차지하여 유사분열과 PCNA 단백질 발현 간에는 상관관계가 없음을 확인하였다. 또한 유사분열 및 고 PCNA군 각각을 림프절 전이 유무와 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 상관관계를 찾아볼 수 없었다. 따라서 유사분열 측정법이나 PCNA 표지지수 측정법은 다른 임상·병리적 지표와 상관없이 단독적으로 임상·병리적으로 의미가 있는 세포 증식능 측정법이라 생각되며, 특정 병변의 세포 증식능 측정을 위해서는 두 가지 방법을 모두 시행하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

결 론

갑상선 질환에서 세포 증식능을 연구하기 위하여 유사분열 측정법과 PCNA에 대한 면역화학 염색법을 사용한 결과는 다음과 같다.

1) PCNA 표지指수가 각 질환에 따라 통계적 유의하게 다르므로 서로를 감별하는 것이 가능하였다 (p=0.0001). 양성 질환인 갑상선 종대나, 여포상 선종의 PCNA 표지指수가 낮으나 하시모토 갑상선염의 PCNA 표지指수가 상당히 높으므로 하시모토 갑상선염을 양성군에 포함시켰을 때 악성 종양과의 감별이 어려운 것을 볼 수 있었다. 그러나 하시모토 갑상선염을 제외한 경우 양성과 악성 질환의 감별이 가능하였다. 또한 여포상 선종과 여포상 암종을 구분하는 것이 가능하였다. 유두상 암종에서 PCNA 표지指수가 임상·병리적 지표와 연관이 있는지 조사하였을때, 임상적 병기만이 통계적으로 유의하게 관련이 있는 것을 알 수 있었다 (p<0.0397).

2) 유사분열의 존재 여부에 따라 종양성·비종양성의 구분은 가능하지만 (p<0.05), 양성인지 악성인지 여부를 가리는데에는 불가능하였다. 유두상 암종에서는 통계학적으로 유의한 상관성은 없지만, 남자이거나, 나이가 많을수록, 종괴의 크기가 클수록, 조직학적으로 주상 구조, 림프절 전이가 존재할수록 유사분열이 관찰되는 빈도가 높았다.

3) 유사분열의 존재와 PCNA 단백발현과는 통계학적으로 상관관계가 없었다.

4) 유사분열 측정법이나 PCNA 표지指수 측정법은 다른 임상·병리적 지표와 상관없이 단독적으로 임상·병리적으로 의미가 있는 세포 증식능 측정법이라 생각되며, 특정 병변의 세포 증식능 측정을 위해서는 두 가지 방법을 모두 시행하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ljunberg B, Stenling R, Roos G. DNA content and prognosis in renal cell carcinoma. A comparison between primary tumors and metastases. *Cancer* 1986; 57: 2346-50.
2. Rosa J, Mehta A, Filipe MI. Nucleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology* 1990; 16: 265-9.
3. 윤철희, 이상숙, 장은숙. 간세포암종의 진단에 argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs)의 적

용. *대한병리학회지* 1993; 27: 553-60.

4. Gerdes K, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab J, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1983; 133: 1710-5.
5. Robbins BA, Vaga 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.
6. Keim D, Hailat N, Hodge D, Hanash SM. Proliferation cell nuclear antigen expression in childhood acute leukemia. *Blood* 1990; 76: 985-90.
7. Coltrera MD, Gown AM. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 23-30.
8. Ito J, Noguchi S, Murakami N, Noguchi A. Factors affecting the prognosis of patients with carcinoma of the thyroid. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 150: 539-44.
9. Young RL, Mazzaferri EL, Rahe AJ, Dorfman SG. Pure follicular carcinoma: impact of therapy in 214 patients. *J Nucl Med* 1980; 21: 733-7.
10. Donohue JH, Goldfien SD, Miller TR, Abele JS, Clark OH. Do the prognoses of papillary and follicular thyroid carcinomas differ? *Am J Surg* 1984; 148: 168-73.
11. Mizukami Y, Nonomura A, Michigishi T, et al. Tumor proliferation-related markers in papillary thyroid carcinomas: correlation with histologic subtypes. *Anti-cancer Res* 1993; 13: 267-71.
12. Tateyama H, Yang YP, Eimoto T, et al. Proliferative cell nuclear expression in follicular tumours of the thyroid with special reference to oxyphilic cell lesions. *Virchows Arch* 1994; 424: 533-7.
13. Shimizu T, Usuda N, Yamanda T, Sugeno A, Iida F. Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer* 1993; 71: 2807-12.
14. Lee TK, Myers RT, Marshall RB, Bond G, Kardon B. The significance of mitotic rate: A retrospective study of 127 thyroid carcinoma. *Hum Pathol* 1985; 16: 1042-6.
15. LiVolsi VA. Papillary lesions of the thyroid. In: *Surgical pathology of the thyroid*. Philadelphia: WB Saunders, 1990: 136-72.
16. Czyz W, Joensuu H, Pylkkanen L, Klemi P. p53 protein, PCNA staining, and DNA content in follicular

- neoplasms of the thyroid gland. *J Pathol* 1994; 174: 267-74.
17. Rosai J. *Ackerman's surgical Pathology*, 8th ed. Mosby, 1996: 493-567.
 18. Cotran RC, Kumar V, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. WB Saunders, 1994: 1113- 71.
 19. Aichinger G, Fill H, Wick G. In situ immune complexes, lymphocyte subpopulations, and HLA-DR-positive epithelial cells in Hashimoto thyroiditis. *Lab Invest* 1985; 52: 132-40.
 20. Hilsenbeck SG, Allred DC. Improved methods of estimating mitotic activity in solid tumors. *Hum Pathol* 1992; 23: 601-2.
 21. O'leary TJ, Steffes MW. Can you count on the mitotic index? *Hum Pathol* 1996; 27: 147-51.
 22. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 1990; 21: 683-5.
 23. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Antibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-34.
 24. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1623-8.
 25. Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA): Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96: 121-9.
 26. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985; 4: 655-61.
 27. Smetana K, Gyorkey F, Chan PK, Tan EM, Busch H. Proliferating cell nuclear antigens (PCNA) and human tumor nucleolar antigens (HMTNA) in nucleoli human hematological malignancies. *Blut* 1983; 46: 133-41.
 28. Harper ME, Glynn-Jones E, Goddard L, et al. Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters. *Prostate* 1992; 20: 243-53.
 29. 이상엽, 박영년, 박찬일. 방광 이행상피암종 예후인자로서의 PCNA 표지수치의 가치. *대한병리학회지* 1994; 28: 282-7.
 30. Theunissen PH, Leers MP, Bollen EC. Proliferating-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1992; 20: 251-5.
 31. Hasegawa T, Seki K, Yang P, et al. Differentiation and proliferative activity in benign and malignant cartilage tumors of bone. *Hum Pathol* 1995; 26: 838-45.
 32. Nylander K, Stenling R, Gustafsson H, Zackrisson B, Ross G. p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 1995; 75: 87-93.
-