

간세포암종과 주변간조직에서 HBcAg, p53 단백질의 발현과 세포증식능의 관계

연세대학교 의과대학 병리학교실

백 소 야 · 김 호 근 · 박 찬 일

Relationship between Proliferative Activity and Expression of HBcAg and p53 Protein in Hepatocellular Carcinoma and Surrounding Nontumorous Liver

Soya Paik, M.D., Hogueun Kim, M.D. and Chanil Park, M.D.

Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine

In an attempt to discover the factors contributing to the increased proliferative activity in hepatocytes and subsequent development of HCC, the proliferative activity of hepatocytes was compared with the size of regenerative nodules and HBcAg expression status in the surrounding nontumorous liver of 45 surgically resected hepatocellular carcinomas, including 34 HBV related ones. In the tumor, the difference in proliferative activity and the histological grade was analyzed in terms of p53 gene alteration. The proliferative activity was assessed by immunohistochemical methods using Ki-67 monoclonal antibody. HBcAg expression in the surrounding nontumorous liver correlated with both the inflammatory and proliferative activity of hepatocytes ($p < 0.05$). p53 overexpression was associated with high proliferative activity and aggressive phenotype of tumor. No correlation was observed between the proliferative activity of hepatocytes and the size of regenerative nodules in cirrhosis ($p > 0.05$). p53 overexpression was not evident in surrounding nontumorous liver including cirrhosis. In conclusion, the above results are in line with the view that hepatic carcinogenesis is a multistep, progressive process. In the initial stage, chronic cellular injury incurred by immunologic reaction against HBcAg seems to play a pivotal role in increased cellular regeneration. However, once transformation of hepatocytes occur the major contributor to tumor growth seems to be alteration in p53 tumor suppressor gene. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 773~781)

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Hepatitis B virus, p53, Proliferative activity, Regenerative nodule

접 수: 1996년 6월 5일, 게재승인: 1997년 6월 23일

주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-140

연세대학교 의과대학 병리학교실, 백소야

*본 연구는 1995년도 및 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.

서 론

B형 간염시 초래되는 간세포 손상은 HBV에 대한 세포성 면역반응에 의해서 발생하며 이러한 HBV에 대한 면역반응은 HBcAg에 대한 것으로 생각되고 있다¹. 특히 HBcAg의 발현은 핵, 세포질 또는 핵과 세포질 모두에 발현되나 세포질에 발현되는 HBcAg이 T세포에 의한 세포 용해의 일차적 표적으로서 HBcAg이 간소엽의 괴사-염증과 밀접한 연관이 있어 담관염증, 분엽 활성화도, 간 활성화 등의 조직학적 소견과 관련이 있다고 보고되어 있으며^{2,3} 이의 임상적 중요성 및 분자생물학적 기전에 대한 관심이 높아지고 있다⁴. HBV에 의해 유발되는 간세포손상에 따른 증식능의 증가가 HCC의 발병인자로 작용한다는 보고가 있으나⁵ 조직내 HBcAg 발현 여부에 따른 세포증식능에 대한 연구는 많지 않다⁶.

HBV는 간세포 손상과 재생에 관여할 뿐 아니라 바이러스 DNA가 간세포 핵내 DNA에 삽입될 수 있기 때문에 간세포내 종양억제유전자 주위에 삽입될 수도 있을 것이며⁷ 이러한 경우의 유전적 변화는 종양억제유전자의 비활성화를 일으켜 세포 분화와 증식을 유발할 수 있다. 현재 HCC에서 문제가 되는 종양억제유전자 중 가장 흔하고 중요한 것은 p53 유전자이다⁷⁻⁹. p53 유전자는 17번 염색체에 위치하고 53kD의 핵단백을 형성하여 세포의 증식을 조절한다고 알려져 있고¹⁰ 많은 종양에서 가장 빈번한 이상을 보이는 유전자로 보고되어 있다. p53 유전자 변이에 의해 형성된 돌연변이 단백질은 정상 p53 단백질에 비해 반감기가 5~100배 길어져 종양세포내에 축적됨으로써 면역조직화학적염색으로 검사가 가능하며 다양한 종양, 즉 흑색종, 대장암종, 그리고 난소, 폐, 유방등의 암종에서 그 과발현이 면역조직화학적 방법에 의해 보고된 바 있다¹¹. 또한 HBV와 p53 유전자와의 관련성에 관한 연구들을 보면 HBV와 관련된 HCC에서 p53 유전자변이율이 높다고 보고되고 있으나^{7,12} HBV 관련여부와 무관하다는 국내의 보고^{13,14}도 있어서 아직 더 많은 연구가 필요하다.

간경변증과 HCC와의 연관성에 대해서는 오래전부터 주목되어 왔으며 간경변증이 어떤 원인에 의해서 초래되었건 간경변증 그 자체가 HCC 발생의 위험을 안고 있으며^{15,16} 특히 HBV에 의한 간경변증의 경우 발암 가능성이 더 높다는 사실은 잘 알려져 있다. 또한 간경변증이 대결절형인 경우 소결절형에 비해 조직 재생능력이 높고¹⁷ HCC의 발생률도

높은 것으로 알려져 있지만¹⁸ 결절의 크기를 측정하여 이를 입증한 연구는 거의 없다.

간세포의 재생과 연관된 세포의 증식능을 알아볼 수 있는 방법으로 유세포 분석법이 이용되어 왔으나 최근에는 증식세포에만 발현되는 단백질에 대한 면역조직화학적염색의 발달로 인해 형태학적 구조와 함께 세포의 증식상태를 관찰할 수 있게 되었다. 특히 Ki-67은 세포의 증식 주기중 G1, G2, S, M기에 모두 나타나는 유용한 표지자로 소개되어 있으며¹⁹ 간세포 증식성 병변에서도 이를 이용한 연구들이 있다²⁰. Grigioni등²¹은 간종양의 증식능에 관한 연구에서 악성인 경우에 양성병변이나 정상조직에 비해서 증식능이 월등히 높음을 확인한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 HCC를 포함하는 간조직을 대상으로 p53 유전자 단백질의 과발현을 검색하고 그 과발현 여부에 따른 암세포 증식능 및 암종의 조직학적 등급을 비교하는 한편 종괴 주변 간조직에서 간경변증의 재생결절 크기와 HBcAg 표현 여부에 따른 간세포 재생능을 조사하여 HCC의 발생과정의 단계별 변화를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

연세대학교 의과대학 병리학교실에서 1988년부터 1995년 6월까지 진단된 HCC 중 항암화학요법, lipiodol 주입법 등의 비외과적 전처치 없이 외과적 절제를 시행한 총 45예를 대상으로 하였다. 이중 HBV와 연관된 것은 34예이다.

2. 연구방법

1) **임상기록 검토:** 임상기록을 검토하여 진단 당시 환자들의 연령 및 성별, 혈청 HBsAg 및 Anti-HCV에 관한 검사 결과를 조사하였다.

2) **병리조직학적 검색:** 병리조직학적 검색은 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 고정후 일련의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 보관된 조직을 이용하였다. 각 예당 HCC 종괴와 주변 간조직이 충분히 포함된 파라핀 블록 1개를 선택하여 5 μ m 두께로 2장씩의 연속절편을 만들었다. 그 중 1장은 hematoxylin-eosin염색을 시행하였고, 다른 1장은 Victoria-Blue 염색을 시행하였다. Hematoxylin-eosin 염색 표본은 HCC의 조직학적 등급 결정²²과 종괴 주변 간조직의 조직학적 활성화도 검색에 사용하였다. 조직학적 활성화도는 문맥 주변부의 염증세포 침윤, 섬유화

및 조각괴사를 토대로 평가하였다. Victoria-Blue 염색 표본은 HBsAg을 함유한 간세포의 유무를 검색하는데 이용하였다.

3) 간경변증 결절의 크기 계속: 간경변증이 있는 경우 HCC가 포함되지 않은 파라핀 블록 한개씩을 선택하여 한장씩의 5 μ m 절편을 만든 다음 Masson's

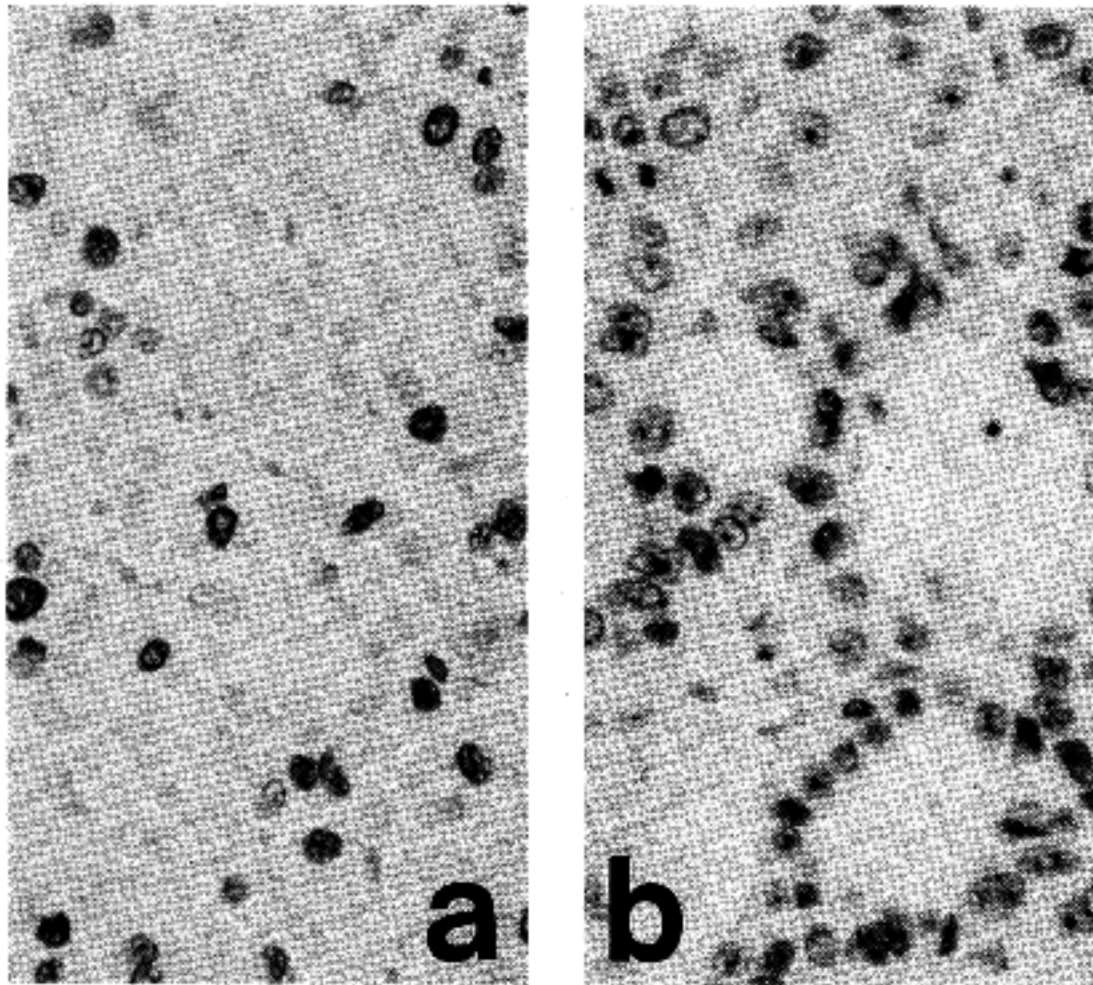


Fig. 1. Immunohistochemical stains for Ki-67(a) and p53(b) showing strong nuclear staining in neoplastic tissue.

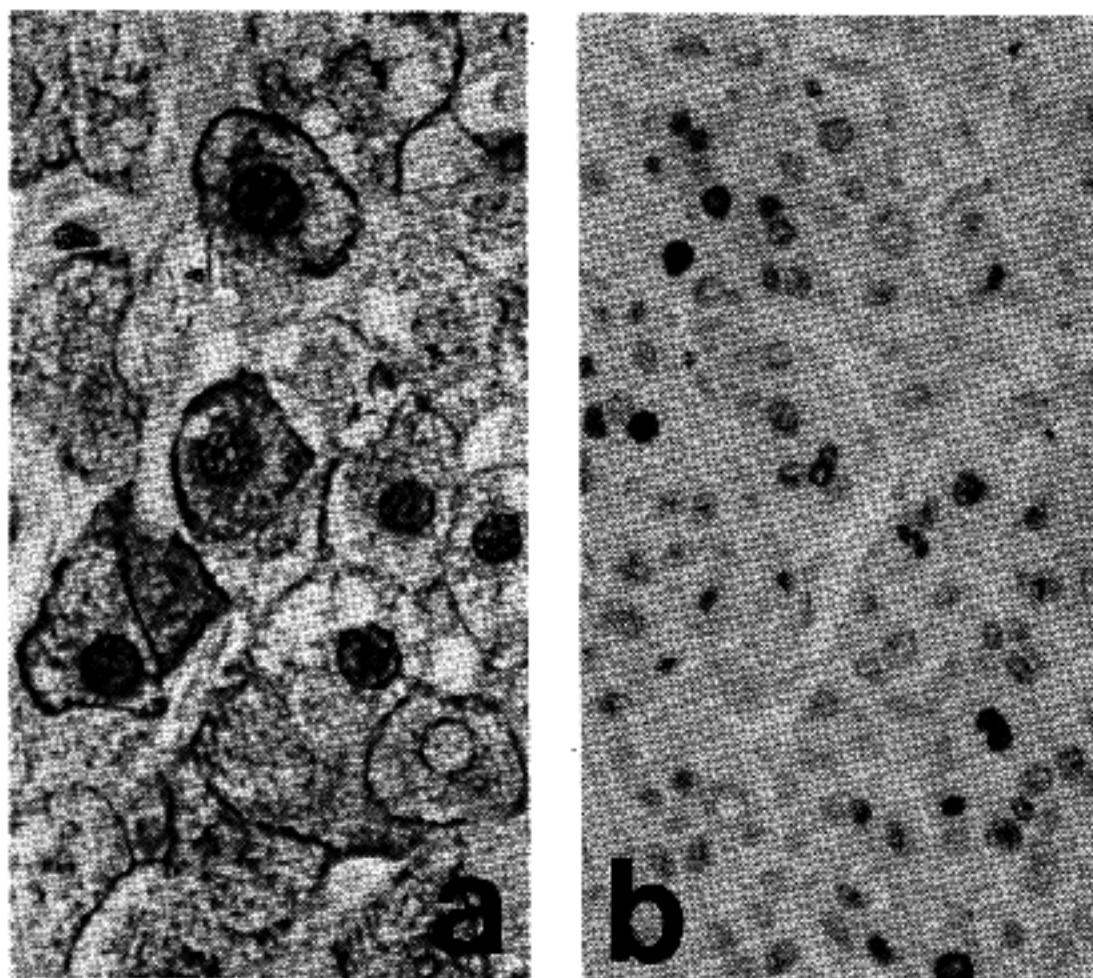


Fig. 2. Immunohistochemical stain for HBcAg showing simultaneous cytoplasmic and nuclear staining in non-neoplastic tissue(a), and only nuclear staining in neoplastic tissue(b).

trichrome 염색을 시행하였다. 이 유리 슬라이드를 Optomax V Semi-automatic Image Analyser에 연결된 광학현미경(Olympus Vanox-T(AHBT-513)에 올려 놓고 video camera를 통해 영상을 입력시킨 다음 image monitor에 나타난 영상을 보면서 간경변증의 재생결절 개개의 단면적을 측정하였다. 대부분의 재생결절이 타원형이라는 점을 감안하여 장경 3 mm, 단경 2 mm인 타원형의 단면적을 기준으로 하였다. 즉, 4.8 mm² 이상인 것을 대결절, 4.8 mm² 이하인 것을 소결절로 구분하였다²³.

4) 면역조직화학적 염색: 병리조직학적 검색에 사용한 것과 동일한 파라핀 블록으로부터 5 μm 두께의 연속절편 3장씩을 취하여 xylene으로 파라핀을 제거하고 에틸알콜에서 단계적으로 합수한 후 labelled streptavidin-biotin 방법을 이용한 LSAB kit (DAKO, Capenteria, CA, USA)를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 일차항체로는 항HBcAg (DAKO, Capenteria, CA, USA), 항p53 Ag(Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) 및 항Ki-67 Ag(Immunotech, Westbrook, ME, USA)을 사용하였으며, 3-aminoethyl carbazole로 발색한 후 Meyer's hematoxylin 으로 대조염색하였다. Ki-67 과 p53 단백질에 대한 염색에서는 핵에 진한 갈색으로 염색한 경우를 양성으로 판정하였으며(Fig. 1a, Fig. 1b), Ki-67 지수는 고배율시야(×400)에서 간세포(또는 암세포) 1000개를 세어 그 중 Ki-67 염색에 양성 반응을 보이는 세포의 수로 정의하였다. HBcAg은 핵이나 세포질 중 어느 부위에 발현하던지 모두 양성으로 간주하였다(Fig. 2).

3. 통계학적 검색

모든 자료의 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System) 프로그램을 이용하여 Wilcoxon rank sums test를 적용하였다.

결 과

1. HCC에 있어서 환자의 혈청 HBsAg 상태에 따른 차이

HCC 총 45예중 혈청 HBsAg이 양성인 것이 34예였고, 혈청 HBsAg이 음성인 것이 11예이었다. 혈청 HBsAg 양성 여부에 따른 발생연령 및 남녀 비율의 차이는 없었다. 혈청 HBsAg이 양성인 경우에는 간경변증을 동반한 것이 21예(61.8%)로써 HBsAg 음성인 경우에 비하여 많았으며($p < 0.05$), 또한 HBsAg 양성인 간경변증들에서는 재생결절의 단면적이 평

균 7.2 mm²으로서 음성인 경우(4.5 mm²)에 비하여 넓은 경향을 보였다. HCC 종괴 내외의 Ki-67 지수와 종괴내의 p53 과발현은 혈청 HBsAg 양성여부에 따른 차이를 보이지 않았다(Table 1).

2. B형 간염과 관련된 HCC에서 종괴 내외의 HBcAg 및 p53 발현과 Ki-67 지수

혈청 HBsAg이 양성인 34예 중 종괴내에서 HBcAg이 발현된 것은 7예(20.6%)였으며, 주변 조직에서 HBcAg이 발현된 것은 20예(58.5%)였다. 종양조직의 평균 Ki-67 지수는 184.7±95.4로서 주변 조직의 6.7±14.0보다 약 26배 높았다. p53 유전자 단백질은 17예(50%)에서 과발현하였는데 발현부위는 모두 종양 조직이었으며, 선종성 증식 2예를 포함한 21예의 간경변증 및 다른 주변 조직에서는 전혀 발현되지 않았다(Table 2).

Table 1. Clinicopathologic characteristics of patients according to serum HBsAg status(n=45)

Clinicopathologic feature	HBsAg	
	Serum Positive(n=34)	Negative(n=11)
Age(year)±SD	50.7±8.4	55.8±8.4
Sex(M : F)	26 : 8	8 : 3
Cirrhosis*	21(61.8%)	3(27.3%)
Nodule size(mm ²)±SD	7.2±4.1	4.5±1.2
Ki67 score ¹⁾ ±SD		
HCC	184.7±85.4	199.8±171.9
Nontumorous liver	8.7±14.0	11.7±17.1
p53 overexpression	17(50%)	5(45.4%)

¹⁾ No. of positive cells/1000 cells

*P<0.05

Table 2. Tissue HBcAg, p53 expression and Ki-67 score of HBV related HCC(n=34)

Immunohistologic feature	HCC	Nontumorous liver
Tissue HBcAg expression	7(20.6%)	20(58.8%)
p53 overexpression	17(50%)	0(0%)
Ki67score ¹⁾ ±SD	184.7±95.4	6.7±14.0

¹⁾ No. of positive cells/1000 cells

3. p53 유전자 단백 과발현 여부에 따른 HCC의 특성

p53 유전자 단백 과발현은 종양의 크기 및 암종내 HBcAg 발현 여부와는 상관관계가 없었다. 조직학적 분화도가 낮은 경우(Edmondson-Steiner 등급 3 및 4)에는 과발현을 보이는 예가 61.5%인 반면 조직학적 분화도가 높은 경우(Edmondson-Steiner 등급 1 및 2)에는 과발현을 보이는 예가 43.9%로서 악성도가 높을 수록 p53 유전자 과발현율이 다소 높은 경향을 보였다($p > 0.05$). p53 유전자 단백 과발현을 보이는 경우 평균 Ki-67 지수는 214.6 ± 77.9 로서 과발현을 보이지 않는 경우의 154.8 ± 104.0 보다 높았지만 통계학적인 의의는 없었다(Table 3).

4. HCC의 특성에 따른 Ki-67 지수

HCC에서 종괴의 크기 및 종양내 HBcAg 발현 여부에 따른 Ki-67 지수의 차이는 없었으나 조직학적 분화도가 높은 경우에는 151.7 ± 88.7 , 낮은 경우에는 238.0 ± 83.3 로서 악성도와 Ki-67 지수는 비례하는 경향을 보였다(Table 4).

5. 종괴주변 간조직의 조직병리학적 특성에 따른 Ki-67 지수

주변 간조직에서 HBcAg 발현 양성군과 음성군의 평균 Ki-67 지수는 각각 10.0 ± 17.3 및 1.9 ± 3.9 로서

Table 3. Histopathologic features of HCC according to p53 overexpression(n=34)

Histopathologic feature	p53 overexpression	
	Positive	Negative
Tumor size \pm SD	5.1 ± 3.0	5.0 ± 3.7
Tumor grade ¹⁾		
Low(n=21)	9(43.9%)	12(56.1%)
High(n=13)	8(61.5%)	5(38.5%)
Tissue HBcAg expression		
positive(n=7)	4(55.6%)	3(44.4%)
negative(n=27)	13(51.8%)	14(48.2%)
Ki67 score ²⁾ \pm SD(n=34)	214.6 ± 77.9	154.8 ± 104.0

¹⁾ Tumor grade was divided into low grade(Edmondson and Steiner grade 1 and 2) and high grade(Edmondson and Steiner grade 3 and 4)

²⁾ No. of positive cells/1000 cells

HBcAg 발현을 보이는 경우 Ki-67 지수가 의미있게 높았다($p < 0.05$). 간경변증이 있는 경우 절절내 평균 Ki-67 지수는 9.9 ± 17.0 인 반면 간경변증이 없는 경우 간세포들의 Ki-67 지수는 1.4 ± 1.9 에 불과하였다. 또한 간경변증의 유무와 관계 없이 종괴주변 간조직이 조직학적 활성을 나타내는 경우에는 Ki-67 지수가 평균 14.7 ± 19.0 으로서 비활성인 경우의 $3.9 \pm$

Table 4. Ki-67 score of HCC according to histopathologic features in HBV related HCC(n=34)

Histopathologic feature	Category	No. of cases	score ¹⁾ Ki-67
Tumor size	>3 cm	20	185.7 ± 82.7
	<3 cm	14	181.4 ± 96.2
Tumor grade ²⁾	low	21	151.7 ± 88.7
	high	3	238.0 ± 83.3
Tissue HBcAg expression	positive	7	182.4 ± 121.2
	negative	27	190.4 ± 89.4
p53 overexpression	positive	17	214.6 ± 77.9
	negative	17	154.8 ± 104.0

¹⁾ No. of positive cells/1000 cells, mean \pm standard deviation

²⁾ Tumor grade was divided into low grade(Edmondson and Steiner grade 1 and 2) and high grade(Edmondson and Steiner grade 3 and 4)

Table 5. Ki-67 score of nontumorous liver according to histopathologic features in HBV positive HCC (n=34)

Histopathologic feature	Category	No. of cases	score ¹⁾ Ki-67
Tissue HBcAg expression*	positive	20(58.9)	10.0 ± 17.3
	negative	14(41.1)	1.9 ± 3.9
Cirrhosis*	presence	21(61.8)	9.9 ± 17.0
	absence	13(38.2)	1.4 ± 1.9
Tissue activity*	active	9(26.5)	14.7 ± 19.0
	inactive	24(73.5)	3.9 ± 10.9
Nodule area	>4.8 mm	13(61.9)	9.4 ± 19.1
	<4.8 mm	8(38.1)	10.9 ± 14.2

¹⁾ No. of positive cells/1000 cells, mean \pm standard deviation

* $p < 0.05$

Table 6. Pathologic features of HBV related HCC and nontumorous liver according to tissue HBcAg expression(n=34)

Histopathologic features	Category	Nontumorous liver		HCC	
		HBc(+)	HBc(-)	HBc(+)	HBc(-)
Cirrhosis	presence	15(71.4)	6(28.6)	5(23.8)	16(76.2)
	absence	5(38.5)	8(61.5)	2(15.4)	11(84.6)
Nodule size	>4.8 mm ²	10(76.9)	3(23.1)	3(23.1)	10(76.9)
	<4.8 mm ²	5(62.5)	3(37.5)	2(25.0)	6(75.0)
Ki-67 score ¹⁾ ± SD		10.0 ± 17.3*	1.9 ± 3.9*	162 ± 121.2	190.4 ± 89.5
Tissue activity	Active	9(100.0)*	0(0.0)*	5(55.6)	4(44.4)
	Inactive	11(44.0)	14(56.0)	2(8.0)	23(92.0)
p53 overexpression	positive	9(52.9)	8(47.1)	4(23.5)	13(76.5)
	negative	11(64.7)	6(35.3)	3(17.6)	14(82.4)

¹⁾ No. of positive cells/1000 cells Numbers in parenthesis are percent

*p<0.05

10.9보다 유의있게 높았다(p<0.05). 결절 단면적의 크기에 따른 Ki-67 지수의 차이는 없었다(Table 5).

6. 종양 및 주변 조직내 HBcAg 발현 여부에 따른 병리학적 특성

종괴 주변 간조직에 간경변증이 있는 경우에 HBcAg이 71.4%에서 발현한 반면 간경변증이 없는 경우에는 38.5%에 불과하였으며, 간경변증의 결절 크기에 따른 HBcAg 발현율에는 차이가 없었다. 주변 조직이 조직학적으로 활성인 9에서는 모두 HBcAg이 양성이었으며, 종괴내에서 염증 반응이 현저한 경우에는 HBcAg 발현률이 55.6%인 반면 염증이 없는 경우에는 8%에서만 HBcAg이 발현되었다. p53 유전자 단백질의 과발현과 HBcAg 발현 여부는 상관관계가 없었다(Table 6).

고 찰

HBV가 간세포암종의 원인 인자라는 사실에는 이견이 없는 반면 그 발생 기전은 아직 분명하지 않다. 동물 실험을 통해서 HBV에 의한 HCC의 발생 기전은 현재 크게 두가지 학설로 정리된다²⁴. 첫째 HBV에 의해 만성 간손상이 초래되면 간세포들이 재생하는 과정에서 무작위 유전자 변이가 일어날 가능성이 있고 이러한 유전자변이가 반복되는 중 악성 클론이 나타난다는 것이다. 둘째는 HBV DNA가 간세포 핵에 삽입되어 세포분화와 증식에 관여하는 원발암유전자를 활성화시키거나 종양억제유전

자를 불활성화하는 변이를 일으켜 간세포의 암성전환이 초래된다는 것이다.

숙주유전자내 바이러스 DNA의 삽입이 일어난 경우에는 HBcAg이 생성되지 않는다는 사실이 알려져 있어^{5,26} 간접적으로 조직내 HBcAg 발현 여부가 HBV DNA 삽입 여부를 반영하는 것으로 가정할 수 있다. 즉, HBcAg 발현이 음성일 때 간세포의 변형이 일어났다고 추측할 수 있으며 이에 따른 세포증식의 현저한 증가를 기대할 수 있고 이러한 사실에 근거하여 HBcAg은 암종의 발생과정중에 일어나는 중요한 단계별 변화의 지표로 생각할 수 있다. 최근에 시험관내 microcytotoxicity assay등을 통해서 HBcAg이 세포성 매개 면역 반응의 표적 항원이라는 사실이 밝혀졌다¹. 또한 HBcAg은 핵내, 세포질 또는 모두에 발현되나 세포질에 발현되는 경우 간의 염증반응과 관련이 있다고 보고되었다^{2,3}. HCC에서는 HBV의 모든 DNA가 삽입되어 HBcAg이 더 이상 형성되지 않으므로 HBcAg이 발현되지 않는다고 여겨져 왔으나 최근의 연구들은 대부분의 암조직내에서도 HBcAg이 발현된다고 보고하고 있다. Hsu등²⁷은 종양 세포내 HBcAg 발현율이 15% 까지 된다고 보고하였으며 이러한 종양세포내 HBcAg 발현은 종양내 림프구성 세포 침윤과 밀접한 관련이 있다고 하였다. 즉 HBcAg은 비종양성 조직뿐 아니라 종양내에서도 면역 반응을 일으키는 것으로 생각된다. Hsu는 B형 간염 바이러스 유전자의 산물인 HBcAg과 HBsAg은 크기가 작은 간세포암종에서 더 높은 빈도로 발현되며 이는 종양 성장의 단계와 연관되어 나타나는

현상으로 간세포암종 발생의 초기 단계와 관계가 있는 것으로 주장하였다. 또한 HBV와 연관된 HCC에서 국소적인 면역 반응의 증거인 림프구의 침윤이 자주 관찰된다는 점을 들어 종양의 성장과 다양화(diversification)중에 HBV의 항원을 함유한 종양 세포들이 선택적으로 제거됨으로써 삽입된 유전자 배열(integrated sequence)을 함유한 세포들만이 증식되는 것으로 추측하였다. 본 연구에서 HBcAg은 간세포암종의 20.6퍼센트, 주변 조직의 58.8퍼센트에서 발현되어 이전의 보고²⁷와 유사하였다. 또한 주변 조직에서의 HBcAg의 발현은 이전의 보고들^{2,28} 동일하게 조직학적 활성도 및 간세포 재생과 연관이 있었으나 종양내 HBcAg 발현여부와 암 세포 증식정도와는 연관성을 찾을 수 없었다. 본 연구에서 종양내 HBcAg은 세포 증식과 관련이 없는 점으로 보아 HBV는 HCC의 발생과정중 초기에만 관여하는 것으로 생각하였다. 악성 종양세포에서도 HBV의 증식은 가능하고, 종양세포내에서 바이러스 유전자의 산물이 표현되는 것은 변형된 간세포에 바이러스 DNA의 삽입을 의미하는 것이 아니라 바이러스의 증식을 의미한다는 주장²⁷과 일치하는 소견으로 생각하였다. HBV는 간세포 손상과 재생에 관여할 뿐 아니라 바이러스 DNA가 간세포내 종양 억제 유전자 주위에 삽입되어 변이를 통한 비활성화를 일으켜 세포 분화와 증식을 유발할 수 있는데 이중 p53이 가장 중요한 유전자로 알려져 있다.

HBV와 P53 유전자와의 관련성에 관한 연구들을 보면 HBV와 관련된 HCC에서 p53 유전자변이율이 높다고 보고되고 있으나^{7,12} HBV 관련여부와 무관하다는 국내의 보고^{13,14}도 있어서 아직 더 많은 연구가 필요하다. 본 연구에서는 p53 단백질의 과발현은 간경변증 및 선종성 증식에서 관찰되지 않았으며 간세포암종에서만 50퍼센트의 발현율을 보였다. 또한 p53 단백질의 과발현은 악성 분화도 및 세포 증식능과의 연관성을 보여 p53 유전자의 변형을 거치는 HCC는 생물학적으로 매우 불량한 예후를 보이는 경향임을 알 수 있었으며 이는 이전의 보고들^{29,30}과 일치하였다. 종양내 HBcAg 발현 여부와 세포 증식능과는 관련이 없었던 반면 p53 단백질의 과발현을 보이는 간세포암종이 훨씬 높은 세포 증식능을 보이는 사실에 근거하여 간세포암종의 생물학적 특성은 p53 유전자의 상태가 중요한 변수임을 알 수 있었다.

간경변증과 HCC와의 연관성에 대해서는 오래전부터 주목되어 왔고, 지역에 따라서 다르지만 HCC

의 60~90%에서 간경변증을 동반하고 간경변증 환자에서 HCC이 병발하게 되는 빈도가 5~40% 정도로 보고되어 있다¹⁵ 간경변증이 어떤 원인에 의해서 초래되었건 간경변증 그 자체가 HCC 발생의 위험을 안고 있으며^{15,16} 특히 HBV에 의한 간경변증의 경우 발암 가능성이 더 높다는 것도 잘 알려져 있다. 또한 간경변증이 대결절형인 경우 소결절형에 비해 조직 재생능력이 높고¹⁷ 암종의 발생률도 높은 것¹⁸으로 알려져 있다. 그리고 최근의 연구에서는 HBsAg양성인 간경변증의 재생결절이 음성인 재생결절에 비해 그 크기가 크며 소결절에서 대결절로의 변화는 결절내의 간세포 재생 능력을 의미하는 것이고 간세포암종에 동반된 간경변증의 주된 형태가 대결절형이라는 점 또한 활발한 재생 과정이 암 발생과 관련이 있음을 시사한다고 하였다. 본 연구에서도 HBsAg 양성인 예들의 간경변증 결절의 평균 단면적은 7.2 mm²으로 음성인 예들의 4.5 mm²에 비해 더 큰 것으로 나타나 B형 간염에 의한 간경변증의 대부분이 대결절형이라는 이전의 보고와 일치하나, B형 간염과 관련된 간세포암종에 동반된 간경변증 20예에서 Ki-67에 대한 면역조직화학염색을 통해 세포 증식능을 측정해 보았을 때 재생결절의 단면적에 따른 세포 증식능의 차이가 없는 점으로 미루어 간경변증의 재생결절이 크다는 사실이 반드시 높은 재생 능력을 의미하는 것이 아님을 알 수 있었다. 이러한 결과는 대결절형 간경변증은 소결절형보다 간경변증 형성 과정에서 발생하는 섬유화가 넓은 구역을 경계로 만난다는 특성이 있을 것이라는 점을 시사한다. 간경변증에서 발생한 결절에 대한 세포증식능을 측정한 이전의 연구는 없지만 간암의 전암 병변이라고 강력히 의심되는 선종성 증식, 즉 직경이 0.8 mm² 또는 1 cm² 이상의 큰결절에서 세포증식능을 측정한 초기의 연구결과가 있는데 이들의 결과를 보면 선종성 증식에서 Ki-67에 대한 면역조직화학염색을 시행한 결과 Ki-67 표식 지수가 주변 간조직과 차이가 없으며 악성과 양성이 모호한 예에서만 그 지수가 높았다고 하였으며²¹ 간암 발생과정에서는 암발생 후기에서만 정상과 크게 차이가 나는 세포증식능이 초래된다고 해석된다. PCNA를 이용한 다른 보고에서도 선종성 증식의 PCNA지수는 재생결절의 경우와 차이가 없으며 비정형 선종성 증식에서만 높은 결과를 보였다³³. 이러한 보고들은 본 연구에서 결절의 크기와 세포증식능이 반드시 비례하지 않은 점을 뒷받침해주는 근거라고 생각할 수 있겠다.

결 론

외과적으로 절제된 HBV와 연관된 HCC 34예를 대상으로 조직내 HBcAg 표현 여부와 p53 유전자 산물의 과표현 여부에 따른 세포 분열능의 변화를 조사하고 주변 간조직에서 간경변증의 결절 크기와 조직학적 활성도에 따른 세포분열능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 중앙 주변조직에서의 간세포내의 HBcAg 발현, 염증 반응, 간경변증 빈도 및 간세포 재생 사이에는 밀접한 상관 관계가 있었다. 간세포암종에서 p53 유전자 변형이 있을 때에는 암세포의 증식능이 의의있게 높고, 조직학적 분화도도 낮은 경향을 보였다. 그러나 간경변증에서 결절의 크기와 간세포 재생능은 비례하지 않았다. 중앙 주변 간조직에서는 p53 유전자 산물이 발현되지 않았다. 이상의 결과로 보아 B형 간염 바이러스에 의한 간세포암종의 발생은 여러 단계를 거쳐서 일어나며, 초기에는 증식된 바이러스에 대한 세포 독성 반응으로 유발된 간세포의 손상과 이에 따른 재생 과정에 의한 간세포의 증식이 중요한 역할을 하는 것으로 생각하였다.

참 고 문 헌

1. Mondelli M, Vergani GM, Alberti A, et al. Specificity of T lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection: evidence that T cells are directed against HBV core antigen expressed on hepatocytes. *J Immunol* 1982; 129: 2773-8.
2. Chu CM, Liaw YF. Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigens in chronic hepatitis B virus infection: hepatocyte with cytoplasmic/ membranous hepatitis B core antigen as a possible target for immune hepatocytolysis. *Gastroenterology* 1987; 92: 225-9.
3. Wu PC, Lau JY, Lau TK, Lau SK, Lai CL. Relationship between intrahepatic expression of hepatitis B viral antigens and histology in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 648-53.
4. Wen YM. Hepatitis B virus precore and core gene mutations in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma patients. *J Intern Med* 1993; 234: 441-5.
5. Chisari FV, Klopman K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dusford 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.
6. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle of regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 6459-63.
7. Hsia CC, Kleiner DE, Aviotos CA et al. Mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma: roles of hepatitis B virus and aflatoxin contamination in the diet. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1638-41.
8. Goldblum JR, Barbs RE, Carr KA, Frank TS. Hepatitis B and alterations of the p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1244-51.
9. Volkman M, Hofmann WJ, Muller M, Rath U, Otto G, Zentgraf H, Galle PR. p53 overexpression is frequent in European hepatocellular carcinoma and largely independent of the codon 249 hot spot mutation. *Oncogene* 1994; 9(1): 195-204.
10. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
11. Strehl JR, Gatter KC, Ralfkiaer E, Lane DP, Harris AL. Expression of mutant p53 in melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5976-9.
12. Laurent-Puig P, Flejou J, Fabre M, et al. Overexpression of p53: a rare event in a large series of white patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 16: 1171-5.
13. 맹영희, 이선, 박재훈, 이주희, 양문호: 간세포암종에서 B형 간염과 p53 종양억제 유전자간의 관계에 관한 연구(초록). *대한병리학회지* 1994; 28(부록): 65.
14. 장우영, 김동석, 김기권, 김창운, 김홍진, 이태숙: 간세포암에서 p53 단백질 발현. *대한병리학회지* 1995; 29: 607-14.
15. Kew MC, Popper H: Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1984; 4: 136-46.
16. Macsween RN, Anthony PP, Scheuer PJ. Pathology of the liver, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1987; 598-600.
17. Nakamura T, Hayama M, Sakai T, Hotchi M, Tanaka E. Proliferative activity of hepatocytes in chronic viral hepatitis as revealed by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. *Hum Pathol* 1993; 24: 750-53.
18. Omata M, Ashcavai M, Liew CT, Peters RL. Hepatocellular carcinoma in the USA: Etiologic consideration. *Gastroenterology* 1979; 76: 276-87.
19. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production

- of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
20. Mancini R, Marucci L, Benedetti A, Jezequel AM, Orlandi F. Immunohistochemical analysis of S-phase cells in normal human and rat liver by PC10 monoclonal antibody. *Liver* 1994; 14: 57-64.
 21. Grigioni WF, D'Errico A, Bacci F, et al. Primary liver neoplasms. evaluation of proliferative index using MoAb Ki67. *J Pathol* 1989; 158: 23-9.
 22. Edmondson HU, Steiner PE: Primary carcinoma of the liver. A study of 100 caes among 48,900 necropsies. *Cancer* 1983; 52: 462-503.
 23. 강경훈, 김용일: 간세포암종을 동반한 간경변증에 대한 형태 계측학적 연구. *대한병리학회지* 1991; 25: 338-45.
 24. Tennant BC, Gerin JL: Woodchuck model of Hepatitis B virus infection. In: Arias IM, Boyer J, Fausto N, eds. *The Liver: Biology and pathobiology*. New York: Raven Press, 1994; 1455-63.
 25. 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; 35: 298-302.
 26. 한지영, 정우희, 전재윤, 박찬일: 간세포암종에서 종괴와 종괴주변 간조직의 HBsAg 및 HBcAg 발현. *대한병리학회지* 1993; 27: 371-78.
 27. Hsu HC, Wu TT, Sheu JC, et al. Biologic significance of the detection of HBsAg and HBcAg in liver and tumor from 204 HBsAg positive patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989; 9: 747-50.
 28. 진윤미, 박찬일: 간경변증의 조직학적 활성도에 따른 간세포내 HBsAg 및 HBcAg의 발현율 및 발현 양상. *대한병리학회지* 1995; 29: 669-77.
 29. Murakami Y, Hayashi S, Sekiya T: Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 5520-5.
 30. Irene OL, Srivastava G, Chuang LP, Tsang SWY, Matthew MT: Overexpression and point mutations of p53 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinomas in Hong Kong Chinese people. *Cancer* 1994; 74: 30-7.
 31. Terada T, Nakanuma Y: Cell proliferation activity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1992; 70: 591-98.
-