

9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene으로 유도된 햄스터 협낭 발암과정 중 AgNORs과 증식성 핵항원(PCNA)의 악성도 측정 표지자로서의 유의성 평가

서울대학교 치과대학 구강병리학교실 및 서울대학교 치학연구소 구강악안면암 연구부

홍삼표 · 송명순 · 홍성두 · 이재일 · 임창윤

Evaluation of Prognostic Significance of AgNORs and PCNA during 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis

Sam-Pyo Hong, Myong-Soon Song, Seong-Doo Hong, Jae-Il Lee, and Chang-Yun Lim

Department of Oral Pathology, College of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-744, Korea

The purpose of this study is to evaluate the prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by using DMBA hamster buccal pouch carcinogenesis which provides a good experimental model in reproducing steps from precancerous lesions to invasive squamous cell carcinomas. The buccal pouches of 50 Syrian hamsters were applied with 0.5% DMBA in mineral oil three times a week to reproduce various lesions from precancerous ones such as hyperkeratosis or epithelial dysplasia to invasive squamous cell carcinomas. Their sections were stained with H & E, and silver colloid, and processed immunohistochemically by being applied with monoclonal antibody to PCNA. The histopathologic examinations were done and the counts of AgNORs were evaluated. The PCNA labelling indices on each lesions were evaluated. The correlation between histopathological grades and counts of AgNORs or PCNA labelling indices were evaluated. The number of AgNORs was 2.22 ± 0.22 in control group, 3.46 ± 0.72 in carcinoma in situ (CIS), 3.78 ± 0.63 in squamous cell carcinoma (SCC), respectively. AgNORs significantly increased in severe epithelial dysplasia, CIS, and SCC compared with normal tissue ($P < 0.05$). The PCNA Labeling Index (LI) was $39.47 \pm 6.68\%$ in control group, $79.61 \pm 4.14\%$ in CIS, and $85.43 \pm 6.25\%$ in SCC, respectively. PCNA LI also significantly increased in epithelial dysplasia, CIS, and SCC compared with normal tissue ($P < 0.05$). The number of AgNORs, AgNOR area, and PCNA LI slightly increased in the advancing front than in the center of SCC, but, it was not statistically significant. It appeared that there were a good correlation between the number of AgNORs and PCNA LI (Pearson correlation coefficient : 0.649, $P < 0.001$). These results suggested that the number of AgNORs and the PCNA LI could be useful markers for evaluating the risk of malignant transformation and prognosis of SCC. It was thought that the clinical usefulness of these markers should be verified by using human tissue specimens. (**Korean J Pathol 1998; 32: 337~345**)

Key Words: AgNORs, PCNA, DMBA, Carcinogenesis, Prognostic significance

접 수: 1998년 1월 23일, 게재승인: 1998년 3월 23일

주 소: 서울시 종로구 연건동 28, 우편번호 110-744, 서울치대 구강병리학교실, 홍삼표

ISSN : 0379-1149

*본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비 (961-1000-001-2)의 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

서 론

대부분의 구강 편평세포암종은 구강 점막의 전암 병소가 장기간 존재하다가 악성전환되면서 발생한다.¹⁻³ 구강 전암병소를 적절하게 치료하고 예후를 정확하게 예측하기 위해서는 구강 전암병소에서의 악성전환 위험성을 정확하게 측정할 필요가 있다. 현재까지는 전암병소와 암종의 악성도를 평가하기 위하여 일반적으로 조직 표본에서 H & E 염색법에 의한 판독에 널리 의존하여 왔으나, 이 방법은 객관성이 결여되어 있으며 악성전환 위험성을 정확하게 예측하는 데에 한계가 있다.⁴ 따라서, 전암병소에서의 악성전환 위험성을 보다 객관적으로 정확하게 평가할 수 있는 표지자를 개발할 필요가 있다. 이러한 악성전환 위험성 예측 표지자들의 성공적 조건으로는 일관성, 재현성, 객관성, 간편성, 경제성, 생검물의 이용 등을 들 수 있다.

생검물을 이용하여 전암병소에서의 악성전환 위험성이나 편평세포암종에서의 예후를 측정하는 방법으로는 광학현미경에 의한 유사분열지수 측정,⁵ ³H-thymidine을 이용한 자가방사법,⁶ bromodeoxyuridine (BrdU) 흡수정도 측정,⁷ 유세포 분석기 (flow cytometry)를 이용한 방법,⁸ 그리고, Ki-67,⁹ proliferating cell nuclear antigen (PCNA),¹⁰ Topoisomerase II¹¹ 등의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색방법, argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) 방법 등이 이용되고 있다. 유사분열지수 측정에서 셀 수 있는 유사분열기는 단지 세포의 분열과정 중 일부에 해당할 뿐이며 조직을 즉시 고정하지 않으면 분열이 진행되어 휴지기에 도달하기 때문에 실제의 증식성을 나타내기에 부정확하다는 보고가 있다.⁵ 또, BrdU와 Ki-67은 주로 동결 절편에서 이용하며,^{7,9} 유세포 분석기에 의한 방법은 온침된 조직 표본이 요구되는 한계성이 있다.⁸

AgNORs는 세포 증식과 단백질 합성을 조절하는 ribosomal RNA를 encode하는 DNA 고리로써 사람에서 5개의 선두 부착 염색체 (acrocentric chromosomes - 13, 14, 15, 21, 22)의 단완에 위치한다.¹² AgNORs는 은호기성을 보이고 Howell과 Black등¹³이 개발한 은염색법으로 비교적 간편하게 발현시킬 수 있으며, AgNORs 수와 세포활성 사이에 상관관계가 있음이 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁷ AgNORs 수는 염색체 구성 중 NORs를 가지고 있는 염색체 수를 표현하는 것이고, RNA 전사능력과 세포주기의 단계에 따라 변화된다.¹²

PCNA는 36KD의 핵단백질로 1978년 Miyachi등¹⁸에 의해 홍반성 낭창 (lupus erythematosus) 환자에서 처음 발견되었으며, G₁후기에서 S기의 DNA 합성세포에서 풍부하게 발현되며 세포 증식과 관계되고 세포 주기를 조절하는 것으로 알려져 있다. 항PCNA 항체를 이용하여 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한

조직에서 비교적 간편한 면역조직화학적 염색법으로 발현시킬 수 있다.^{10,18-25}

9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) 유도 햄스터 협낭 발암과정은 실험적 발암과정을 단계별로 관찰할 수 있는 모델로서 높은 재현성을 보여 객관적 평가를 위해 적절하다.²²⁻²⁵

AgNOR법과 PCNA 염색법 등 다수의 접근 방법을 사용하여, 이 모델의 발암과정 단계별 분석을 통한 임상적으로 이용가능한 표지자를 판별하는 것이 중요하다. 이에 저자는 DMBA 유도 햄스터 협낭 발암과정을 이용하여 AgNORs와 PCNA가 악성전환 위험성 예측, 악성도, 침습성과 관련된 표지자로서의 유의성을 검증하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

실험동물은 체중 100 gm 이상 200 gm 이내의 생후 4주에서 6주 사이의 50마리의 웅성 golden Syrian 햄스터를 사용하였고, 이를 다시 10개의 군으로 나누었으며 각 군은 다시 실험군 4마리와 대조군 1마리로 구분하였다.

발암물질은 DMBA (Sigma사, 미국)를 0.5% 농도로 mineral oil (U.S.P.)에 용해시켜 사용하였다.

Gelatin을 1% formic acid 용액에 2%가 되도록 녹인 용액과 50% 질산은 (silver nitrate) 용액을 1:2 비율로 혼합한 silver colloid 용액을 사용하였다.

PCNA에 대한 항체 (monoclonal mouse anti-human PCNA antibody, PC10; Zymed사)는 1% bovine serum albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS, 0.85% NaCl in 0.1M phosphate buffer, pH 7.2)으로 1:100의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 연구 방법

대조군에는 mineral oil만을, 실험군에는 DMBA를 협낭에 주3회 면봉으로 도포하였고, 2주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주, 14주, 16주, 18주, 20주 후에 각각 희생시켰다. 협낭을 적출하여 포르말린에 고정한 후 동법에 의해 파라핀에 포매하고 4~5 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 Hematoxylin-Eosin (H & E) 염색, AgNORs 염색, PCNA 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 연구 결과의 통계학적 분석을 위해 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 ANOVA법-multiple range test를 시행하였다.

1) AgNORs 염색법: 파라핀 절편을 각각 탈파라핀 및 함수시키고 증류수로 세척한 후, silver colloid 용액을 도포하여 암실에서 실온에 45분 동안 반응시켰다. 이 후 증류수로 세척, alcohol과 xylene으로 탈수 처리하고 Permount로 봉입하였다.

광학현미경으로 유침하에 1,000배로 사진촬영하고

Table 1. Summary of histopathologic findings during hamster buccal pouch carcinogenesis

HPF	WEEKS											
	Cont.	2w	4w	6w	8w	10w	12w	14w	16w	18w	20w	
Hyperkeratosis	+/-	+/-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BCH	-	-	+/-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acanthosis	-	-	+/-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mitotic figures	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Nuclear Pleomorphism	-	-	-	+/-	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Histopathologic Diagnosis	N	N	HK	BCH	MED	MED	SED	SED/ CIS	CIS/ SCC	SCC	SCC	SCC

*Cont: Control, HPF: Histopathologic Findings, N: Normal, HK: Hyperkeratosis, BCH: Basal Cell Hyperplasia, MED: Mild Epithelial Dysplasia, SED: Severe Epithelial Dysplasia, CIS: Carcinoma In Situ, SCC: Squamous Cell Carcinoma
*+; mild, ++; moderate, +++; severe, -; no change

100개 이상의 세포를 관찰하여 염색된 총 AgNORs 수를 측정하고 이를 세포당 수로 계산하였다. 또, 1 mm×1 mm grid를 이용하여 AgNOR 점 (dot)의 면적을 측정하였다. 편평세포암종에서는, 암종 중심부와 진행 전단부로 나누어서 측정하였는데, 암종 중심부는 종괴 중앙의 종양도 (tumor island)에서, 진행 전단부는 하부 간질과 인접하고있는 종양도에서 구하였다.

2) PCNA 면역조직화학적 염색법: 파라핀 절편을 탈파라핀과 합수시킨 후 증류수와 PBS로 각각 3회씩 세척하였고, 내인성 peroxidase의 활성을 억제시키기 위하여 3% 과산화수소수 용액으로 5분간 처리한 후 증류수와 PBS로 세척하였다. Labeled Streptavidin Biotin kit (Dako사)의 blocking serum으로 30분간 부란시켜 비특이적 IgG 결합을 방지하였다. 그리고, 상온에서 일차 항체 (PC10)로 60분이상 부란한 뒤 PBS로 3회 세척하였고, biotin이 표지된 이차 항체로 30분간 부란한 후 PBS로 3회 세척한 후, peroxidase가 표지된 Strept-avidin으로 30분간 부란시키고 PBS로 충분히 세척하였다. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 3~5분간 발색시킨 후 증류수로 충분히 세척하였다. Meyer's hematoxylin으로 대조염색한 후 Permount로 봉입하였다.

3군데 이상의 대표 부위를 광학현미경으로 400배 사진촬영하고 1000개 이상의 세포를 관찰하여 PCNA 표지지수 (PCNA LI)를 계산하였다. PCNA에 양성인 세포들은 염색의 강도에 관계없이 양성세포로 간주하여 계산하였다.

$$PCNA LI = (\text{양성반응을 보인 세포수} / \text{총세포수}) \times 100\%$$

연구 결과

1. 조직병리학적 소견 (Table 1 참조)

1) 대조군: 20주까지의 대조군의 소견은 정상적인 협낭의 소견으로 망상용선의 발달이 빈약하고 몇 개의 세포층을 가지는 균일한 두께의 상피를 보였으며, 개체별에 따라서는 매우 미약한 염증세포의 침윤을 보이기도 하였으나 특기할 만한 소견은 없었다.

2) 실험군

2주군 - 미약한 염증세포의 침윤을 보였으나 전체적으로 정상 범주에 드는 양상이었다.

4주군 - 과각화 현상을 볼 수 있었으며 부분적으로 기저세포층이 두꺼워지고 극세포증식층을 보이기도 하였다.

6주군 - 각화층이 더욱 두꺼워지고 전반적인 기저세포층 증식과 극세포증식층을 보였다.

8주군 - 과각화증과 기저세포층의 증식이 현저해지고 미약한 상태의 이형성 변화가 관찰되었으며 망상용선의 발달이 보이기 시작하였다.

10주군 - 8주군과 유사한 소견으로 상피비대와 기저세포층의 과색소증, 망상용선의 발달이 보였고 세포증식, 극세포증식층, 과각화증 등의 이형성 양상을 보였다.

12주군 - 대체로 이형성의 양상이 심해졌으며 그 정도는 부위에 따라 심한 차이를 보였다.

14주군 - 상피내암의 소견이 보이기 시작하여 거핵세포, 다핵세포, 비정상 세포 분열의 양상을 보였으며 기저막은 명료하였고 이형성 세포의 결합조직으로의 침투는 없었다.

16주군 - 개체에 따라 상피내암종과 편평세포암종의 소견을 보였다 (Fig. 1).

18주군 - 전형적인 편평세포암종의 양상을 보였으

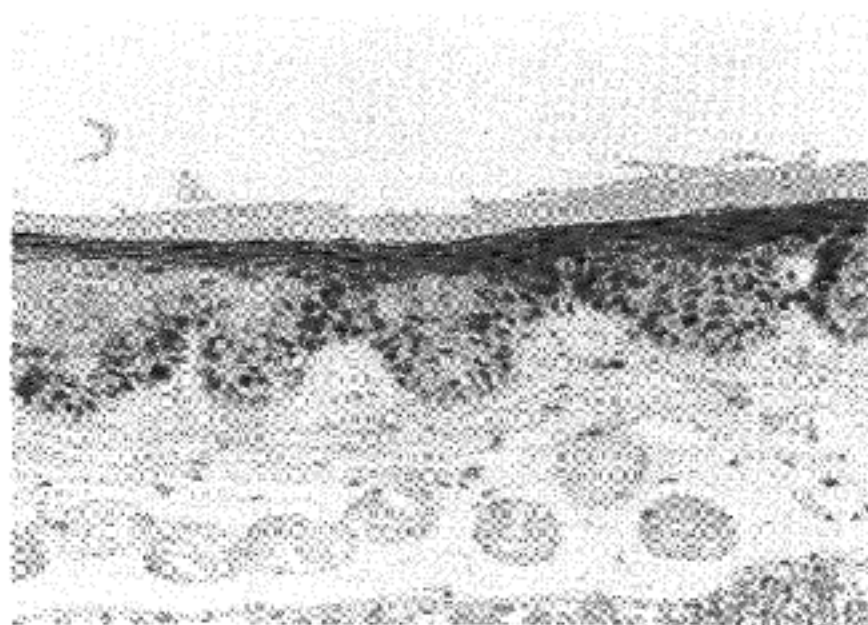


Fig. 1. Carcinoma in situ at 16 weeks of DMBA treatment.

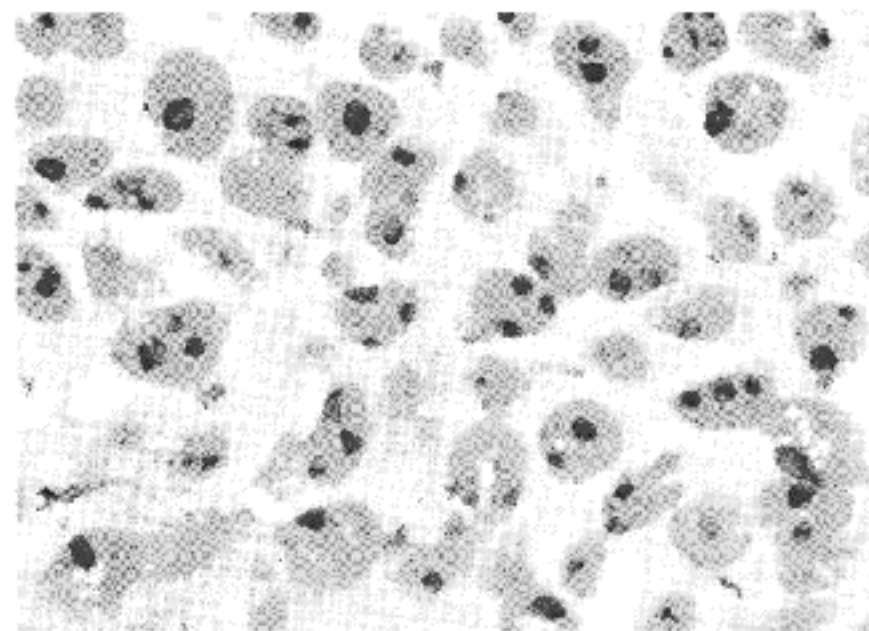


Fig. 4. Increased expression of AgNORs in squamous cell carcinoma at 20 weeks of DMBA treatment (AgNORs).



Fig. 2. Squamous cell carcinoma at 20 weeks of DMBA treatment.

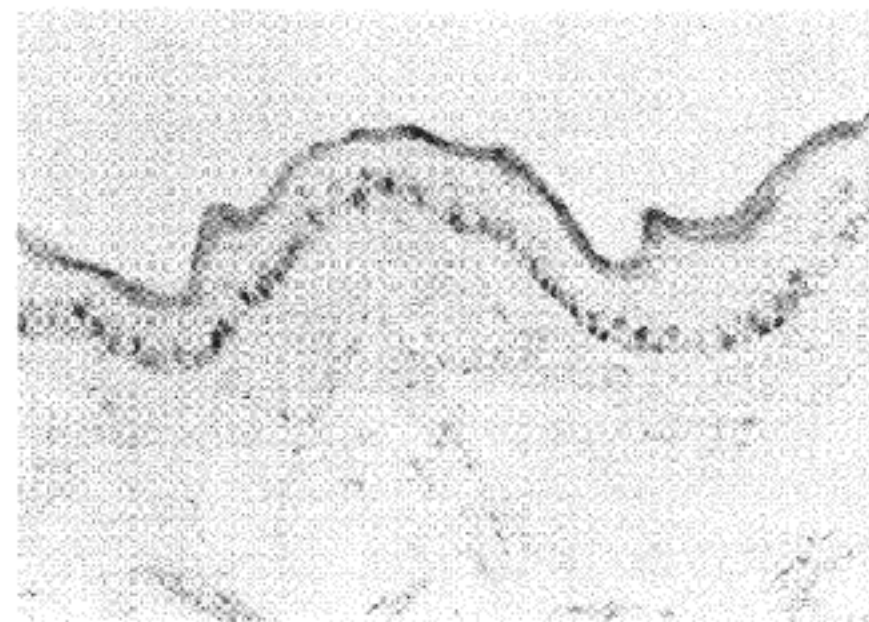


Fig. 5. At 2 weeks of DMBA treatment (PCNA).

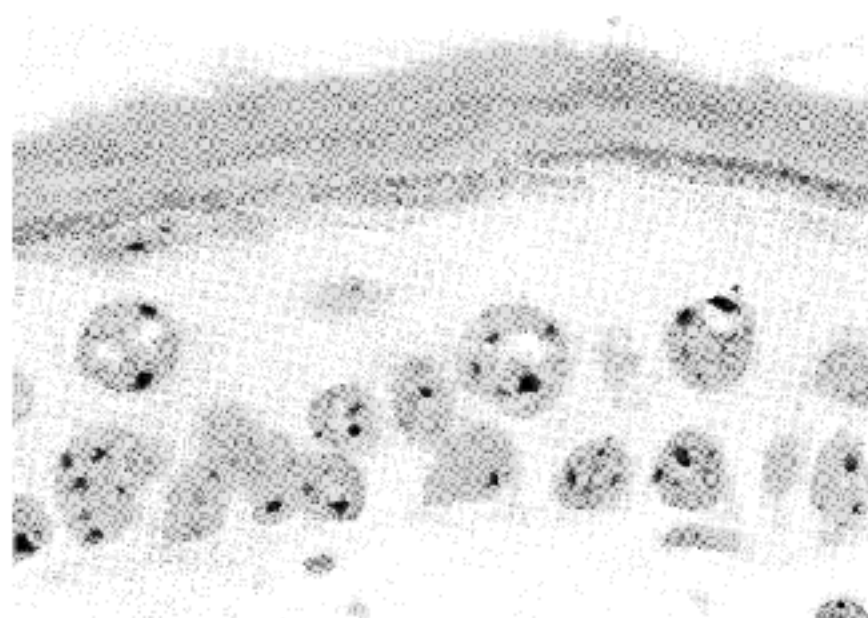


Fig. 3. At 2 weeks of DMBA treatment (AgNORs).

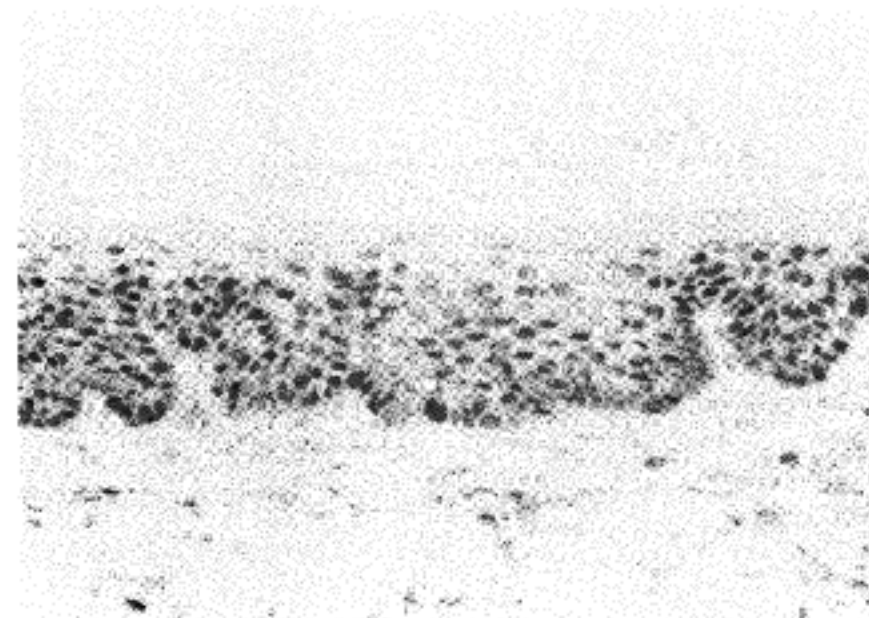


Fig. 6. Carcinoma in situ at 16 weeks of DMBA treatment (PCNA).

Table 2. Comparison of AgNORs during hamster buccal pouch carcinogenesis

Histopathologic Diagnosis	Range	Mean No. ± SD	Range	Mean area ± SD
Normal tissue	1.9~3.0	2.48 ± 0.34	1.3~2.9	2.08 ± 0.53
Hyperkeratosis	2.1~3.1	2.63 ± 0.55	1.4~2.9	2.13 ± 0.69
BCH	2.3~3.3	2.73 ± 0.38	2.0~4.5	3.32 ± 1.02
MED	2.5~3.9	3.10 ± 0.44	1.9~3.5	2.89 ± 0.48
SED	3.1~3.8	3.44 ± 0.26	1.6~2.4	2.01 ± 0.35
CIS	2.5~4.3	3.46 ± 0.72	2.2~3.1	2.79 ± 0.38
SCC	2.9~5.1	3.78 ± 0.63	1.8~5.0	3.21 ± 1.06
center	2.9~4.2	3.74 ± 0.71	2.2~5.0	3.17 ± 0.89
advancing front	3.3~5.1	3.87 ± 0.52	1.8~4.2	3.23 ± 0.95

*BCH: Basal Cell Hyperplasia, MED: Mild Epithelial Dysplasia, SED: Severe Epithelial Dysplasia, CIS: Carcinoma In Situ, SCC: Squamous Cell Carcinoma

며, 결체조직내로의 침습 양상과 부분적으로는 암도를 형성한 곳도 볼 수 있었다. 20주군-18주와 거의 유사한 소견으로 분화가 잘 된 편평세포암종의 양상을 보였으며, 결체조직과 근육조직내로 침윤하고 있는 종양세포들을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

2. AgNORs 염색 소견 (Table 2 참조, Fig. 3~4 참조)

AgNORs은 세포핵내에서 뚜렷한 검은 점 형태와 점들이 뭉쳐진 듯한 형태로 보였다. 결합조직내의 림프구를 표본내 대조세포로써 사용하였는데, 대부분의 이들 세포핵에서는 한 개 내지 두 개의 작은 점상의 AgNORs이 관찰되었다. H & E 염색으로 판정한 조직병리학적 소견에 따라 평균 AgNORs 수와 평균 AgNOR 면적을 비교하였다.

1) AgNORs 수: 정상 조직에서는 2.48개이었으며, 과각화증에서는 2.63개, 기저세포증식증에서는 2.73개로 미약하게 증가되었다. 경미한 상피이형성에서는 3.10개로 증가 양상이 뚜렷하였고, 심한 상피이형성에서는 3.44개, 상피내암에서는 3.46개, 편평세포암종에서는 3.78개로 계속적으로 증가되는 소견을 보였다. 대조군에 비해 심한 상피 이형성, 상피내암, 편평세포암종에서의 증가가 통계학적으로 유의성이 있었다 (P<0.05).

암종의 중심부에서는 3.74개이었고, 진행 전단부에서는 3.87개로 증가되는 양상을 보였으나, 통계적 유의성은 없었다.

2) AgNOR 면적: 정상 조직에서는 2.08이었고, 과각화증에서는 2.13, 기저세포 증식증에서는 3.32로 증가 양상이 뚜렷하였다. 그러나, 경미한 상피이형성에서는 2.89로 감소되었고, 심한 상피이형성에서도 2.01로 더욱 감소되었다. 상피내암에서는 2.79로 다시 증가되었으며, 편평세포암종에서는 3.21로 분명하

Table 3. Comparison of PCNA LI during hamster buccal pouch carcinogenesis

Histopathologic Diagnosis	Range (%)	PCNA LI (%) & SD
Normal tissue	28.9~53.9	44.24 ± 7.62
Hyperkeratosis	42.1~58.5	51.82 ± 6.80
BCH	42.7~62.9	53.42 ± 7.71
MED	46.9~67.2	56.83 ± 7.37
SED	57.5~75.0	66.22 ± 8.03
CIS	73.2~83.0	79.61 ± 4.14
SCC	71.6~96.0	85.43 ± 6.25
center	71.6~92.8	84.67 ± 5.38
advancing front	80.9~96.0	89.01 ± 7.36

*LI: Labeling Index, BCH: Basal Cell Hyperplasia, MED: Mild Epithelial Dysplasia, SED: Severe, Epithelial Dysplasia, CIS: Carcinoma In Situ, SCC: Squamous Cell Carcinoma

게 증가하였다. 대조군에 비해 기저세포 증식증, 편평세포암종에서 통계학적으로 유의성 있는 증가를 보였다 (P<0.05).

암종의 중심부에서는 3.17이었고, 진행 전단부에서는 3.23으로 증가되었으나, 통계학적 유의성은 없었다.

3. PCNA 면역조직화학적 염색 소견 (Table 3 참조, Fig. 5~6 참조)

정상 조직에서는 기저세포층에서만 양성세포들을 관찰할 수 있었으며 평균 PCNA 표지수는 44.24%이었다. 과각화증에서는 51.82%이었고, 기저세포 증식증에서는 53.42%로 양성반응이 증가하였다. 경미한 상피이형성에서는 56.83%, 심한 상피이형성에서는 66.22%로 강한 양성반응을 보였으며 상피내암에

서는 79.61%, 편평세포암종에서는 85.43%로 더욱 강한 양성반응을 보였다.

암종의 중심부에서의 평균 PCNA 표지지수는 84.67% 이었고, 암종의 진행 전단부에서는 89.01%로 강한 양성반응을 보였다.

4. AgNORs과 PCNA 표지지수의 상관관계

평균 AgNORs 수와 평균 PCNA 표지지수 사이에는 양호한 상관관계가 있었으나 (Pearson 상관계수: 0.649, $P < 0.001$), 평균 AgNORs 면적과 평균 PCNA 표지지수사이에는 유의성 있는 관계가 없었다.

총괄 및 고찰

Kramer⁴⁴는 구강 상피내암종을 전암병소로 분류하면서 자궁경부의 상피내암종과는 달리 침습성 암병소로 진행되는 경향이 크다고 보고하였고, Shafer¹와 Ackerman⁴⁵은 발생속도는 다양하지만 많은 구강암이 상피내암에서 발생된다고 보고하였으며, Shedd⁴⁶은 상피내암을 구강암 발생의 한 단계로서 보고하였다. Gupta²은 구강전암병소에서 구강암으로의 악성전환 위험성 대한 추적 연구를 하였는데 대부분의 구강암은 전암병소로부터 발생되며, 상피이형성 병소는 이형성을 보이지 않는 병소보다 15배나 높은 암병소로의 유병률을 보였다고 보고하였다.

전암병소에서 임상적으로 유용하게 적용할 수 있는 진단과 예후 측정을 위한 많은 방법들이 연구중에 있는데, 가장 만족스러운 결과를 얻기 위해서는 사람에서 발암과정의 진행과 병행하는 연속적인 연구를 할 수 있어야 한다. 그러나, 윤리성 등의 문제로 실제로는 불가능하므로 적절한 동물모델을 이용하여 발암과정의 단계에 따라 연구한 후 이를 사람에서 검증하는 과정을 거쳐 임상적으로 활용하게 된다. DMBA 유도 햄스터 협낭암 발생 실험 모델은 1954년 Salley⁴⁷가 처음 보고한 것으로, Boyd²⁶과 Steidler²과 Odukoya²⁸이 기시와 증강의 기전으로 발생된다고 보고하였다. 그 후 실험의 효율과 신뢰도를 높이기 위해 Morris²⁹에 의해 동물의 연령, 발암물질의 농도, 도포 빈도 등에 대한 조정이 이루어졌으며, 본 연구에서도 이를 따라 생후 4~6주 사이의 햄스터를 이용하여 0.5% 농도의 DMBA를 주 3회 협낭에 도포하였다. 이에 따라 DMBA 도포 후 12주에 심한 상피이형성의 소견을 보였으며, 16주에 유두상의 증식과 케양을 보이는 편평세포암종의 소견을 보였다.

NORs은 세포 증식과 단백질 합성을 조절하는 ribosomal RNA를 코딩화하는 DNA 고리로써 사람에서 5개의 선두 부착 염색체 (acrocentric chromosomes -13, 14, 15, 21, 22)의 단완에 위치하고 있으며,¹² 구성이 정확히 밝혀져 있지는 않지만 RNA polymerase I의 subunit이거나 C₂₃ 단백질로 구성되어 있을 것이

라는 보고가 있고,^{30,31} ribosomal RNA gene을 가지고 있어 RNA polymerase I에 의해 전사되며, 궁극적으로 단백질 합성이라는 핵심적 의미를 갖는다고 보고되었다.¹⁵

NORs 수가 세포의 증식과 관련이 있고, 사람의 다양한 악성 질환과 은염색된 AgNORs 수 사이에 상관관계가 있음이 보고되었다.^{12,14-17} 악성 종양세포에서 NORs 수가 증가되어 나타나는 이유는 핵세포체내에 흩어져 있는 NORs이 서로 응집되어 은염색에 의해 가시화됨으로써 광학현미경상에서 관찰할 수 있는 AgNORs의 수가 증가된다는 보고가 있었다.^{32,33} 또, 간기에서의 NORs의 분포가 종양세포와 비종양세포를 구별한다는 보고가 있는데, 종양세포에서 NORs의 양이 증가하고 분포의 불규칙성이 증가하며 좀더 다양한 크기로 나타난다.³⁴

또, Deleener⁴⁸이 NORs을 모양에 따라 집적형(낮은 활성, 높은 활성), 산만형으로 분류하였고, Yoshimi³⁷은 DMBA 유도 햄스터 협낭 실험에서 악성도가 높아질수록 높은 활성의 집적형 NORs이 증가하여 악성 종양에서 최고치를 보였으며 산만형 NORs은 전암병소와 기저세포 증식증에서 증가되어 나타났다고 보고하였다.

Warnakulasuriya¹²은 AgNORs법이 구강전암병소를 단계별로 구별하기에 부족한 점이 있다고 보고하였는데, 첫째 조직 고정에 민감하여 포르말린 고정에 의해 작은 입자들이 뭉쳐져 silver colloid 용액에 염색될 수 있다고 하였고,¹⁶ 둘째 이형성이 여러 가지 형태로 나타나고 캔디다 감염등으로 인해 부적절한 부위가 선택될 수 있으며, 셋째 상피세포가 아닌 간질세포가 포함되어져 결과가 작아질 수 있으며, 넷째로 조사자간 측정의 차이가 있다고 언급하였다. 최근에는 NORs의 발현양태를 좀 더 객관적으로 평가하기 위하여 자동 영상 분석기 (automatic image analyzer)를 사용하기도 하는데 표준 누적 평균 기법 (standard cumulative means technique)으로 갯수 측정과 나아가 양적인 측정도 좀 더 정확하게 할 수 있으며 재현성이 좋고, 관찰자간의 또, 동일한 관찰자의 관찰간의 높은 일치성이 보고되었다.³⁵

본 연구에서는 각 슬라이드의 대표 부위를 1,000배 사진촬영하고 100개 이상의 세포를 관찰하여 해당 평균 AgNORs 수를 계산하였는데, 발암과정의 진행에 따라 악성도가 심해질 수록 평균 AgNORs 수가 정상조직에서 2.48개, 심한 상피이형성에서 3.44개, 편평세포암종에서 3.78개로 증가하였고, 정상조직에 비해 심한 상피이형성의 단계부터 통계적으로 유의성 있는 증가를 보여 전암병소의 악성전환 위험성에측 표지자로 이용할 수 있으리라고 생각되며 악성도와 유의성있는 관련이 있다고 사료된다. 암종의 중심부와 진행 전단부에서의 평균 AgNORs 수를 비교해 보면, 각각 3.74개, 3.87개로 암종의 진행 전단부

에서 증가된 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 따라서, 평균 AgNORs 수는 암종의 침습성에 대한 표지자로는 유효하지 않다고 생각된다.

평균 AgNOR 면적은 정상조직에서 2.08이었고 이와 통계적 유의성을 보인 기저세포 증식증과 편평세포암종에서 각각 3.32, 3.21이었고, 암종의 중심부에서 3.17, 진행 전단부에서 3.23으로 약간의 증가가 있었으나 통계적 유의성은 없었다. 따라서, 평균 AgNOR 면적은 악성 전환 위험성, 악성도, 침습성의 표지자로 이용하기 어렵다고 생각된다. 그러나, 본 연구에서 평균 AgNOR 점상의 면적을 측정하기 위해 사용한 1 mm×1 mm grid 방법은 그 객관성과 정확성이 부족하여 결과를 신뢰하기가 곤란하므로 표준화를 위해 위에서 언급한 바 있는 자동 영상 분석기(automatic image analyzer)의 이용이 요구된다.

PCNA는 1978년 Miyachi등¹⁸에 의해 홍반성 낭창 환자에서 발견된 항체와 반응하므로써 그 존재가 밝혀졌는데 이 항체는 종양세포를 포함한 증식세포에서 양성반응을 보이거나 정상조직의 휴식세포에서는 탐지할 수 없을 정도로 미약한 반응을 보임을 보고하였고, 어린 햄스터 신장세포에서도 핵의 염색상이 관찰되었다고 보고하였다. PCNA는 36KD 핵단백질로 DNA polymerase δ 의 보조단백으로 DNA 합성세포에서 풍부하며 DNA 합성을 조절하고 세포주기를 완성하는 역할을 한다고 알려져 있다. G₁ 후기와 S기에서 가장 증가하므로 이 시기에 있는 세포의 특징적인 표식자가 될 수 있다고도 보고되었다.^{21,22,24} 또, Celis등²⁰과 Bravo²¹는 PCNA가 S기 초기에는 심한 과립성 분포를 보이고 핵인에는 존재하지 않으나 S기 후기에는 핵인에 뚜렷한 염색상을 보이기 때문에 S기에서 더욱 특이적이라고 보고하였고, Louis등⁹은 S기의 중간에서 단백질이 핵 내로 재분산되는데 이때 PCNA는 핵 과립으로 응집되므로 Ki-67보다는 S기 특이성이 높다고 보고하였다.

Ogata등²³은 순수한 rabbit PCNA로 정상 생쥐를 능동 면역시켜 생성한 PCNA에 대한 단일항체를 처음으로 생산하였고, 이 monoclonal antibody의 이용이 단백질 분리와 구조와 기능을 특성화할 수 있는 원천을 제공해 줄 수 있다고 보고하였다. Waseems등⁴⁹은 11가지의 PCNA 항체중 본 연구에서 사용된 PC10이 가장 높은 친화성을 보인다고 보고하였으며 파라핀 조직절편에서 사용할 수 있게 됨에 따라 Ki-67등이 동결절편에서 주로 이용하는 점을 극복하였고 특별한 고정기 필요하지 않고 그 방법도 비교적 간단하다.

Robbins등²⁵은 유방암, 폐암, 구강편평세포암종 등에서 PCNA에 관한 연구를 시행하여 유방암 76%, 대장암 55%, 신장암 75% 정도의 PCNA 표지자수를 가지며 증가된 PCNA 표지자수는 G₁기에서 S기에 있는 세포가 많이 존재하고 단백질 합성이 이루어지고 있

음을 의미하는 바 종양의 전이, 악성도와 상관을 관계를 가진다고 하였다. Hall등⁵⁰은 종양주변의 정상상피에서도 PCNA 양성세포가 현저히 증가된다고 하였으며, 이는 종양세포가 성장인자를 분비하여 주변세포의 PCNA 발현을 증가시키기 때문이라고 보고하였다.

Woods등⁸은 위장관 림프종에서 면역조직화학적 염색을 시행하여 PCNA 지수를 구하였고 유세포 측정기를 이용한 S+G₂+M 분율과 상관관계를 가지는 것을 보고하였으며,⁴ Theate등⁴²은 생쥐의 폐암조직의 PCNA 표지자수가 자가방사선학적 연구, 유세포 측정기의 분율과 상관관계를 가짐을 보고하였다. 또, Skopelitou등⁴³은 방광의 이행세포암종에서 PCNA와 AgNORs 수 사이에 아주 양호한 상관관계가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 한 슬라이드에서 대표 부위 3곳 이상을 400배로 사진촬영하고 PCNA의 다양한 염색도와 관계없이 양성세포를 세어 평균 PCNA 표지자수를 구하였는데, 정상 조직에서는 44.24%, 경미한 상피이형성에서는 56.83%, 심한 상피이형성에서는 66.22%로 현저하게 증가하였으며 편평세포암종에서는 85.43%로 더욱 증가되었다. 정상조직에 대해 상피이형성의 단계에서부터 통계적으로 유의한 증가를 보여 악성전환 위험성 예측 표지자, 악성도에 대한 표지자로 PCNA 표지자수가 유의하다고 생각된다. 암종의 중심부와 진행 전단부에서의 PCNA 표지자수는 각각 84.67%, 89.01%로 약간의 증가를 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. 따라서, 암종의 침습성에 대해 PCNA 표지자수는 유의성이 없다고 생각된다.

또한, AgNORs 수와 PCNA 표지자수 사이의 상관계수가 0.649 (P<0.001)로 양호한 양성 상관관계라고 생각된다.

그러나, 이러한 결과는 사람이 아닌 DMBA를 이용하여 화학적으로 유도시킨 햄스터 협낭에서의 발암과정에서의 결과이므로 이를 근거로 하여 사람의 전암병소 및 편평세포암종 조직에서의 추가적인 검증이 필요하다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 구강암 발생과정에서 악성전환 위험성 예측, 악성도, 침습성과 관련된 표지자로서의 AgNORs과 PCNA의 유의성을 검증하고자 DMBA 유도 햄스터 협낭 발암과정을 이용하였고 AgNORs과 PCNA의 발현양태를 조사하기 위하여 각각 silver colloid 용액과 항PCNA 항체를 이용한 면역조직화학적 염색법을 시행한 후 각 단계별 조직병리학적 발암과정과 이들의 발현 양상을 비교 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 대조군에서 평균 AgNORs 수는 2.22±0.22개이었으며, 상피내암에서는 3.46±0.72개이었고, 편평세

포암종에서는 3.78 ± 0.63 개를 보였다. 대조군에 비해 심한 상피 이형성, 상피내암종, 편평세포암종에서 유의성 있는 증가를 보였다 ($P < 0.05$).

2) 대조군에서 PCNA 표지지수는 $39.47 \pm 6.68\%$ 이었고, 상피내암종에서는 $79.61 \pm 4.14\%$ 이었으며, 편평세포암종에서는 $85.43 \pm 6.25\%$ 이었다. 대조군에 비해 상피이형성, 상피내암종, 편평세포암종에서 유의성 있는 증가를 보였다 ($P < 0.05$).

3) 편평세포암종에서 종양 중심부보다 진행 전단부에서 AgNORs 수와 면적, PCNA 표지지수가 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다.

4) 평균 AgNORs 수와 PCNA 표지지수 사이에는 양호한 양성 상관관계를 보였다 (Pierson 상관계수 : 0.649, $P < 0.001$)

5) 이상의 결과로 AgNORs 수와 PCNA 표지지수 모두 유효한 악성전환 위험성 예측 표지자로 이용될 수 있는 가능성을 보였으며, 악성도 측정에 있어서는 PCNA 표지지수가 더 유효하였으나, 사람의 전암병소 및 편평세포암종 조직에서 추가의 검증이 필요할 것으로 생각하였다.

참 고 문 헌

1. Shafer WG. Oral carcinoma in situ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975; 39: 227-38.
2. Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980; 8: 287-333.
3. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 285-98.
4. Boyd NM, Reade PC. Differences between preneoplastic cells, neoplastic cells and their normal counterparts. *J Oral Pathol* 1988; 17: 257-65.
5. Graem N, Helweg-Larsen K. Mitotic activity and delay in fixation of tumor tissue. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1979; 87: 275.
6. Heenen M. Autoradiographic analysis of cell kinetics in human normal epidermis and basal cell carcinoma. *Cancer Res* 1973; 33: 123-7.
7. Gatzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: 474-5.
8. Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology* 1991; 19: 21-7.
9. Louis DN, Edgerton S, Thor AD, Hedley-Whyte ET. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. *Acta Neuropathol* 1991; 81: 675-9.
10. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21: 591-4.
11. Yabuki N, Sasano H, Kato K, et al. Immunohistochemical study of DNA topoisomerase II in human gastric disorders. *Am J Pathol* 1996; 149: 997-1007.
12. Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW. Nucleolar organizer region(NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 77-81.
13. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 1980; 36: 1014-5.
14. Sano K, Takahashi H, Fujita S, et al. Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 53-6.
15. Crocker J, Paramjit NAR. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987; 151: 111-8.
16. Griffiths AP, Butler CW, Roberts P, Dixon MF, Quirke P. Silver-stained structures(AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol* 1989; 19: 121-7.
17. Landini G. Nucleolar organizing regions(NORs) in pleomorphic adenomas of salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 257-60.
18. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121: 2228-34.
19. Mathews MB, Bernstein RM, Robert Franza Jr B, Garrels JJ. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-6.
20. Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells : Subdivision of S phase. *Cell Biol* 1985; 82: 3262-6.
21. Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin(PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986; 163: 287-93.
22. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986; 166: 209-19.
23. Ogata K, Kurki P, Celis JE, Nakamura RM, Tan EM. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/Cyclin) associated with DNA replication. *Exp Cell Res* 1987; 168: 475-86.
24. Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989;

- 264: 13856-64.
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. Boyd NM, Reade PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol* 1988; 17: 193-201.
 27. Steidler NE, Reade PC. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. *J Oral Pathol* 1986; 15: 43-7.
 28. Odukoya O, Shklar G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. *Oral Surg* 1984; 58: 315-20.
 29. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 1961; 40: 3-15.
 30. Williams MA, Kleinschmidt JA, Krohne G, Franker WW. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 1982; 137: 341.
 31. Ochs RL, Busch H. Further evidence that phosphoprotein C₂₃(110KD/pH 5.1) is in nucleolar silver staining protein. *Exp Cell Res* 1984; 152: 260-5.
 32. Egan MJ, Raafat F, Crocker J, Williams D. Prognostic importance of nucleolar organizer regions in embryonal rhabdomyosarcoma. *J Pathol* 1988; 154: 477.
 33. Egan MJ, Raafat F, Crocker J, Williams D. Comparative study of the degree of differentiation of neuroblastoma and mean numbers of nucleolar organizer regions. *J Clin Pathol* 1988; 41: 527.
 34. Derenzini M, Nardi F, Farabegoli F, Ottinetti A, Roncaroli F, Bussolati G. Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. *Acta Cytol* 1989; 33: 491-8.
 35. Ruschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions(NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J Pathol* 1990; 161: 113-8.
 36. Schwint AE, Folco A, Morales A, Cabrini RL, Itoiz ME. AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 20-4.
 37. Yoshimi N, Gimenez-Conti IB, Slaga TJ. Morphological changes of the nucleolar organizer regions induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in the hamster cheek pouch. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 97-100.
 38. Tsuji T, Sasaki K, Kimura Y, Yamada K, Mori M, Shinozaki F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and its clinical application in oral cancers. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1992; 21: 369-372.
 39. Tsai ST, Jin YT. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 313-5.
 40. Benjamin dr, Gown AM. Aberrant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 764-8.
 41. Shin DM, Voravud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential increase in proliferating cell nuclear antigen in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 971-8.
 42. Theate LG, Ahnen DJ, Malkinson AM. Proliferating cell nuclear antigen immunocytochemistry as an index of cell proliferation in normal and regenerating mouse lung epithelium. *Fed Proc* 1987; 46: 997.
 43. Skopelitou A, Korkolopoulou P, Papanicolaou A, Christodoulou P, Thomas TE, Pavlakis K. Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Correlation with other conventional prognostic pathologic parameters. *Eur Urol* 1992; 22: 235-40.
 44. Kramer IRH, Carcinoma-in-situ of the oral mucosa. *Int Dent* 1973; 23: 94-9.
 45. Ackerman LV, McGavran MH. Proliferating benign and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Surg* 1958; 16: 400-13.
 46. Shedd DP, Hukill PB, Kligerman MM, Gowen GF. A clinicopathologic study of oral carcinoma-in-situ. *Am J Surg* 1963; 106: 791-6.
 47. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 1954; 33: 253.
 48. Deleener A, DeGerlache S, Lans M, Kirsch-Volders M. Nucleolar changes during the first steps of experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17: 151-7.
 49. Wascems NH, Nane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA); Structural conservation and the detection of a nuclear form. *J Cell Science* 1990; 96: 121-9.
 50. Hall PA, Levison DA. PCNA immunolocalization in-paraffin sections; An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-94.