

신장의 이행세포암종에서 예후인자로서의 PCNA 표지지수 및 AgNORs 점수의 가치

한양대학교 의과대학 병리학교실, ¹국립보건원 종양연구과

김완섭¹ · 백승삼 · 김남훈 · 박문향 · 이종달

Prognostic Significance of PCNA Index and AgNORs Score in Transitional Cell Carcinoma of the Renal Pelvis

Wan Seop Kim¹, Seung Sam Paik, Nam Hoon Kim
Moon Hyang Park, and Jung Dal Lee

Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

¹Laboratory of Cancer Research, National Institute of Health, Korea

Proliferative activity of a malignant tumor is known to reflect its biological aggressiveness. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a marker of cellular proliferation, and silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) have been shown to correlate with ploidy and proliferative activity of cells. In transitional cell carcinoma of the renal pelvis, the prognostic value of these markers has not been well defined. We studied PCNA expression and the AgNORs count in 22 transitional cell carcinoma of the renal pelvis to assess their prognostic significance compared with their cumulative survival rate, the stage of disease and histopathologic features of the tumors. An immunohistochemical method and a standard colloidal silver staining were used. The mean percentage of PCNA positivity (PCNA index) and the mean number of AgNORs per nucleus (AgNORs score) were determined. In a multivariable analysis, PCNA indexes were significantly associated with tumor stage ($p=0.024$), whereas AgNORs scores were not significantly associated with the stage or histopathologic features of the tumors. Histologic grade was correlated to disease stage at a significant level ($p=0.000$). But there was a trend of low tumor PCNA-indices or AgNORs counts with survival advantage for patients, but this did not reach statistical significance. The results suggest that the fraction of PCNA positive nuclei would be useful for investigating the malignant potential of renal pelvic cancers, although their clinical use as markers of biologic behavior may be limited. (*Korean J Pathol* 1998; 32: 521 ~ 530)

Key Words: Kidney, Transitional cell carcinoma, PCNA, AgNORs, Survival

서 론

신우에 발생하는 이행세포암종은 전체 신종양의 5~10%를 차지하며^{1,2} 이 종양의 예후에 영향을 주는 인자로는 세포의 유형, 종양의 분화도, 종양의 병기, 침습형태, 치료 방법 등이 알려져 있으며 이 중 종양의 분화도

와 병기가 가장 민감한 예후 인자로 밝혀져 있다. 특히 이 두가지는 상호 밀접한 연관관계를 보여 병기가 높아질수록 분화도가 나빠지는 것으로 되어있다.³⁻⁶ 그러나 분화도의 판정은 종양세포의 세포학적 형태에 의존하는 것이기 때문에 관찰자간의 동일성 및 재현성에 문제가 있고 실제로 동일한 등급의 분화도를 보이는 종양들 사이에도 서로 다른 예후를 보이는 경우가 있다.^{7,8} 그래서 이러한 종양의 악성도를 객관적으로 평가하기 위하여 유세포 측정 또는 면역학적, 미세구조적 표지자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁹⁻¹³ 최근 종양 세포의 증식능이 환자의 임상소견 및 예후와 직접적으로 관

접 수: 1998년 4월 6일, 게재승인: 1998년 5월 30일

주 소: 서울 성동구 행당동 산 17, 우편번호 133-791

한양대학교 의과대학 병리학교실, 박문향

ISSN : 0379-1149

련된다는 것이 알려진 이후^{14,15} 세포분열의 S기 연관 항원으로 알려진 증식세포 핵 항원 (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 검사와^{9,10,16~18} r-RNA에 의한 전사 능력을 간접적으로 나타내는 AgNORs (Argentaffinic nuclear organizer regions) 검사가^{13,15,18,19} 각종 악성 종양을 대상으로 이루어지고 있다. 이 중 방광의 이행세포암종에 대하여 면역조직화학적 염색에 의한 PCNA 표지 지수와 은친화성 염색에 의한 AgNORs 점수를 이용하여 종양의 예후 판정에 도움이 되는지 알아보려는 많은 연구들이 있었으며 이들이 방광의 이행세포암종의 병기 및 분화도 등과 밀접한 연관성이 있음이 보고되고 있다.^{13,17,18} 그러나 신우에 일차적으로 발생한 이행세포암종의 예후적 인자와 PCNA 표지 지수 및 AgNORs 점수와 관련된 연구는 거의 찾아보기 힘들다. 그러므로 저자들은 신우의 이행세포암종에서 PCNA의 표지 지수와 은염색을 통한 AgNORs 점수를 이미 알려져 있는 신우 이행세포암종의 예후인자들과 추적조사를 통한 환자의 생존기간과 비교해 봄으로서 그 가치를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구는 1985년 1월부터 1991년 12월 까지 7년간 한양대학병원 조직병리과로 의뢰된 절제 신에서 이행세포암종으로 진단된 예 중 추적 조사가 잘 이루어지고 조직의 보관상태가 양호한 22예를 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 조직학적 검색: 절제된 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 후 통상적인 방법을 이용하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 시행하고, 2명의 병리 의사가 관찰하여 Ash가 고안한 조직학적 분화도와 세포의 유형, 침습의 형태, 유두상 모양의 형성, 림프관 색전, 혈관 침습의 유무를 재검토하였다.

2) 임상소견 및 병기의 결정: 임상기록을 재검토하여 성별, 연령, 증상, 증상 발현에서 내원시 까지의 기간, 좌우위치, 임상적 병기 및 다른 질환과의 연관성을 조사하였다. 병리학적 병기의 결정은 American Joint Committee on Cancer (AJCC)의 분류에 따라 판정하였고 임상소견을 참고하였다.

3) 수술 치료 및 추적조사: 임상기록 및 환자와의 전화응답을 통하여 수술 후 보조적 치료를 시행했는지의 유무와 그 방법 그리고 종양의 재발 및 종양으로 인한 사망 유무 등을 알아 보았다.

4) PCNA 염색 및 PCNA 표지 지수의 판정: 병변을 대표하는 소견을 보이고 보관상태가 양호한 파라핀 블록 1개를 선택하였다. Avidin biotin immunoperoxidase staining system을 사용하여 PCNA에 대한 면역 염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 잘라서 poly-L-lysine으로

피복된 유리 슬라이드 위에 부착시켜 60°C에 1시간 부란시킨 후 조직을 xylene과 알코올로 탈파라핀 및 탈수하였다. 0.1M PBS에 10분 수세후 구연산 완충액 (pH 6.0)에 담아서 전자오븐에 30초간 전처리하고 냉각시켰다. 3% 과산화수소 (H₂O₂)에 5분간 작용시켜 내인성 페록시다제의 작용을 차단시킨 후 증류수로 5분간 수세하였다. pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 2회 담구고 나서, 정상 염소혈청 (DAKO)으로 10분간 작용시켜 비특이적 단백 염색을 차단하였다. PCNA에 대한 항체 (PC 10, DAKO PATIS, A/S Denmark)는 1 : 100으로 희석하여 사용하였고 약 1시간 반응시켰다. 다시 pH 7.6 Tris 완충액에 약 5분간 2회 씻은 후 이차항체로 바이오틴이 부착된 rabbit anti-mouse IgG link antibody를 15분간 작용시키고 다시 Tris 완충액으로 2회 5분간 세척하였다. Streptavidin-biotin complex (DAKO, LSAB K681)에 약 15분간 작용시킨후 다시 Tris 완충액으로 2회, 5분간 세척하였다. DAB (diaminobenzidine)으로 5~10분간 발색시키고 수세한 후 Mayer's hematoxylin에 20초간 대조 염색하고 수세하여 crystal mount로 봉입하였다. PCNA 표지 지수의 판정은 200배 시야에서 사진을 촬영하여 종양세포의 핵에 갈색으로 분명하게 염색된 세포만을 양성으로 간주하고, 1,000개 이상의 종양세포를 세어 양성 세포의 수에 대한 백분율을 지수로 나타내었다.

5) 은염색 및 AgNORs 표지 지수의 판정: PCNA의 면역염색과 동일한 1개의 파라핀 블록으로 colloidal silver 염색을 시행하였다. 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 절편하여 xylene으로 탈파라핀 시킨 후 알코올과 증류수로 합수시켰다. 슬라이드에 은교질 용액을 도포한 후 뚜껑을 덮어 빛을 차단하고 45분간 반응시킨 후 증류수로 은교질 용액을 철저히 세척하였다. 5% sodium thiosulfate 용액으로 5분간 반응시킨 후 증류수로 다시 수세하고 이어서 계열 에탄올로 탈수한 후 봉입하였다. AgNORs 점수의 판정은 광학 현미경으로 대표적인 시야에서 임의로 세포 500개를 선택해서 400배 시야로 세포의 핵내에 검은색으로 염색된 AgNORs의 수를 세어 핵 1개에서의 AgNORs의 평균을 계산하였다.

6) 통계학적 분석: 통계학적 처리는 IBM PC의 SPSS PC+를 사용하여 연구결과 얻어진 각 변수들간의 상관관계를 조사하였다. PCNA 표지 지수와 AgNORs 표지 지수 및 조직학적 검색에서 얻어진 각각의 예후인자와 그 상관관계를 다변량 회귀 분석으로 검정하였다. 생존율은 Kaplan and Meier 방법으로 산출하였으며 통계학적 검정은 Mantel와 Cox의 generalized salvage 방법으로 분석하였다.

결 과

1. 임상적 소견

환자의 임상적 소견을 Table 1에 요약하였다. 이행세포암종 22예 중 남자가 19명 여자가 3명으로 남녀비는

Table 1. The clinical findings and follow-up data of the patients with renal pelvis tumor

Patient	Sex	Age	Symptom	Duration	Site	Post operation Tx	Follow up (months)	Survival
1	M	62	Hematuria, Flank pain	2 mo	Rt	None	121	Alive
2	M	48	Hematuria	4 mo	Lt	Radiation:3000rad	100	Alive (lung, bone meta)
3	M	34	Flank pain	3 mo	Rt	Chemo:adriamycin Radiation:6000rad	97	Alive
4	M	41	Hematuria	1 wk	Lt	None	72	Alive
5	M	58	Hematuria	1 mo	Lt	None	80	Alive
6	M	61	Hematuria, Urinary retention	15 mo	Rt	None	26	DOD ^k
7	M	56	Hematuria	2~3 yrs	Rt	None	60	Alive
8	M	65	Hematuria	14 mo	Rt	None	46	Alive
9	M	75	Hematuria	4 mo	Rt	None	13	DOD
10	M	68	Hematuria	1 mo	Rt	None	38	Alive
11	M	50	Hematuria	2 wks	Rt	None	37	Alive
12	M	48	Hematuria	18 mo	Lt	None	36	Alive
13	F	71	Abdominal pain	2 wks	Rt	None	34	Alive
14	M	72	Flank pain	Unknown	Rt	Unknown	Unknown	Unknown
15	M	71	Hematuria, Abdominal pain	1 yr	Lt	Chemo:adriamycin mitomycin	12	Alive (urethra meta)
16	M	58	Hematuria, Flank pain	5 mo	Lt	Chemo:MVAC	41	DOD
17	M	60	Flank pain, Hematuria	1 mo	Lt	Unknown	Unknown	Unknown
18	M	52	Hematuria	6 mo	Rt	Chemo:adriamycin	20	DOD
19	F	56	Hematuria	1 mo	Rt	None	63	Alive
20	F	57	Hematuria	2 mo	Lt	Radiation:5300rad	12	DOD
21	M	67	Flank pain	3 mo	Lt	None	12	DOD
22	M	71	Flank pain, Fever	5 mo	Rt	None	1	DOD

Tx: treatment, Chemo: chemotherapy, meta: metastasis, DOD: die of the disease, MVAC: methotrexate, vinblastine, doxorubicin, cisplatin

6.3 : 1 이었다. 환자의 연령은 평균 약 59세 (34~71세) 였다. 40대에서 70대 사이에 비교적 호발하는 경향이 있었고 50대가 7명 (31.8%)으로 가장 많았다. 수술 전 주증상은 혈뇨가 17예 (77.3%)로 가장 많았고 복부 통증은 9명의 환자가 호소하였다. 증상 발현에서 내원시 까지의 기간은 1주에서 3년으로 평균 4.2개월이었다. 종양은 좌우비가 9 : 13으로 우측에 다소 호발하였고 양측 성인 예는 없었다. 환자는 모두 이환신의 광범위 절제술 및 요관 절제술 그리고 방광의 부분절제술을 함께 시행 받았으며 이 중 7명의 환자는 주변 림프절의 박리가 이루어 졌다. 수술로 인한 환자의 사망은 없었다. 수술 후 6예에서 보조적 치료요법이 시행되었는데 3예는 화학요법만을, 다른 2예는 각각 3600과 5300 rad의 방사선 요법만을 시행받았고 나머지 1예는 화학요법과 방사선 치료를 함께 시행받았다. 22예 중 추적 조사가 이루어진 것은 20예이며 평균 추적조사 기간은 46개월이었

다. 추적조사 기간 중 7명의 환자가 사망하였는데 이 중 6예가 종양으로 인해 사망하였으며 1예는 수술 후 화학요법 시행 도중 패혈증으로 사망하였다. 사망한 환자의 평균 생존기간은 21개월이었으며 생존이 확인된 환자 중 2예에서 종양의 원격전이가 존재하였다.

2. 병리학적 소견

종양의 분화도 및 병기를 포함한 병리학적 소견을 Table 2에 요약하였다. 종양은 모든 예가 신장의 신우에서 발생하였는데 1예는 신우의 각기 다른 두 곳에서 별개의 종괴를 형성하였다. 종양의 크기는 1 cm에서 5 cm으로 평균 3.6 cm이었다. 종양의 절단면은 경계가 불분명한 연황색의 유두상 종괴로서 2예를 제외하고 대부분 괴사나 출혈은 현저하지 않았다. 조직학적으로 종양은 대부분 정도의 차이는 있으나 3예를 제외하고 중심부 섬유 혈관성 심지위에 종양세포들이 중첩되어 배열하

Table 2. Pathologic findings, and PCNA index and AgNORs count of the 22 cases of renal pelvis tumor

Patient	Stage	Grade	Cell Type	Growth Pattern	Papillary Growth	Lymph node Involvement	Angio-invasion	Arterio-sclerosis	PCNA Index(%)	AgNOR Count	Associated Lesions
1	1	1	TCC	expansile	+	-	-	mod	9	2.44	simple cyst, CIN
2	1	1	TCC	expansile	+	-	-	-	14	2.91	hydronephrosis, CPN
3	2	2	TCC	invasive	+	-	-	-	36	1.96	CIN
4	2	2	TCC	expansile	+	-	-	mild	9	2.46	CPN, focal
5	2	2	TCC	expansile	+	-	-	-	26	2.83	TCC:UB & ureter, CPN
6	2	2	TCC	expansile	+	-	+	mild	19	2.98	simple cyst
7	2	2	TCC	expansile	+	-	-	mild	11	2.88	-
8	2	2	TCC	expansile	+	-	-	mod	15	2.02	TCC:ureter, simple cyst
9	2	3	TCC \bar{c} squam	invasive	+	-	-	mod	22	3.10	simple cyst
10	2	2	TCC	expansile	+	-	-	mod	30	3.40	CIN
11	2	3	TCC	expansile	+	+	-	mod	81	3.25	CPN
12	2	1	TCC	expansile	+	-	-	mild	63	3.25	hydronephrosis, CPN
13	2	2	TCC	expansile	+	-	-	mod	46	3.00	TCC:ureter & UB, hydronephrosis, CPN
14	3	3	TCC	invasive	-	+	+	mod	50	1.99	Diabetic nephropathy, hydronephrosis, CPN
15	3	1	TCC	invasive	+	-	-	mod	48	2.73	TCC:ureter, hydronephrosis
16	3	3	TCC	invasive	+	-	+	mild	39	2.66	simple cyst, CIN
17	3	3	TCC \bar{c} adeno	invasive	-	-	+	mod	26	2.38	CIN
18	3	2	TCC	invasive	+	-	-	mod	32	2.99	nephrolithiasis
19	3	3	TCC \bar{c} squam	invasive	+	-	-	mod	34	2.55	simple cyst, double ureter
20	4	4	TCC	invasive	-	+	+	severe	21	3.79	CIN, focal
21	4	3	TCC \bar{c} squam	invasive	-	+	+	mod	82	3.90	CPN
22	4	4	Tcc \bar{c} squam	invasive	-	+	+	mod	28	1.84	-

TCC: transitional cell carcinoma, TCC \bar{c} squam: TCC with squamous cell carcinoma, TCC \bar{c} adeno: TCC with adenocarcinoma, CIN: chronic interstitial nephritis, CPN: chronic pyelonephritis, UB: urinary bladder

는 유두상 성장을 하고 있었다. 5예에서 부분적으로 편평세포암종 또는 선암종으로의 분화가 관찰되었으며 이러한 분화는 종양의 분화도가 나빠질수록 빈발하는 경향을 보였다. 종양 중 11예는 침습성 성장을 하고 있었으며 혈관 침습은 7예에서 림프절 전이는 5예에서 관찰되었다. Ash가 고안한 조직학적 등급에 따라 종양을

구분하면 grade I이 5예 (22.7%), grade II 8예 (36.4%), grade III 7예 (31.8%) 그리고 grade IV 2예 (9.1%)로 grade II 종양이 가장 많았다. 병리학적 병기는 제 1기 2예 (9.1%), 2기 11예 (50%), 3기 6예 (27.3%) 그리고 제 4기 3예 (13.6%)로 2기 종양이 가장 많았으며 분화도가 나빠질수록 병기가 높아지는 경향을 관찰할 수 있었다

($p < 0.05$). 다중 회귀분석으로 예후인자들간의 상관관계를 비교한 결과 신우 이행세포암종의 병기는 분화도 ($p = .00$), 세포의 유형 ($p = .045$), 침습형태 ($p = .00$), 림프관 침습 ($p = .002$), 혈관침습($p = .001$), 동맥경화 ($p = .012$), PCNA 발현지수 ($p = .024$) 등과 유의한 상관관계가 있었다. 3예를 제외한 19예의 환자에서 신장내 혈관에 동맥경화증이 관찰되었다. 신우의 종양 이외에도 요관에 이행세포암종이 동반된 예가 4예로 이 중 2예는 방광에도 이행세포암종이 관찰되었다. 그 밖에 종양을 제외한 주변 신실질과 신우에서 피질 낭종이 관찰된 예가 5예, 만성 간질성 신염 5예, 만성 신우신염 7예, 수신증 4예, 요결석 1예, 당뇨병성 신증 1예, 중복 요관 1예가 각각 관찰되었다.

3. PCNA 표지지수 및 AgNORs 점수

PCNA 표지지수는 최하 9에서 최고 82로 평균 31.6 ± 16.3 이었다. PCNA의 염색조건은 핵에 국한되어 과립상으로 나타났으며 염색성의 강도는 종양세포의 이형성이 심할수록 강하게 염색되는 경향을 보였다 (Fig. 1). 종양주위 신실질이나 신우의 정상 상피세포는 PCNA

염색에 대하여 거의 반응하지 않았다. AgNORs 점수는 최하 1.84에서 최고 3.90으로 평균 2.79 ± 0.559 이었다. AgNORs에 대한 은염색에서 종양세포의 핵내에 봉입체와 유사한 검은색의 소체들을 관찰할 수 있었으며 종양 주변의 정상 상피에서는 모양이나 크기가 작은 점모양으로 비교적 일정한 모습이었으나 종양세포에서는 크기가 더 커지고 불규칙해지며 응집되는 양상으로 종양세포의 이형성이 심해질수록 위와같은 불규칙성이 더욱 강해지는 양상을 보였다 (Fig. 2).

병기 및 분화도를 포함한 신우 이행세포암종의 각각의 예후인자들과 PCNA 표지지수 및 AgNORs 점수와의 상관관계를 Table 3에서 Table 5에 나타내었다. 신장 이행세포암종의 병기에 따른 PCNA 표지지수의 변화를 보면 1기 11.4 ± 3.5 , 2기 28.6 ± 1.59 , 3기 38.5 ± 1.91 , 4기 44.3 ± 32.7 로 병기가 높아질수록 PCNA 표지지수도 통계학적으로 유의하게 증가하였다 ($p = .024$). 또한 림프절 전이에 따른 PCNA 표지지수도 림프절 전이가 있는 경우 40.2 ± 23.9 , 없는 경우 27.1 ± 13.1 로 PCNA 표지지수가 증가할수록 림프절 전이가 많아지는 것을 알 수 있었다 ($p = .017$). 그 밖에 종양의 분화도, 조직학적 유형

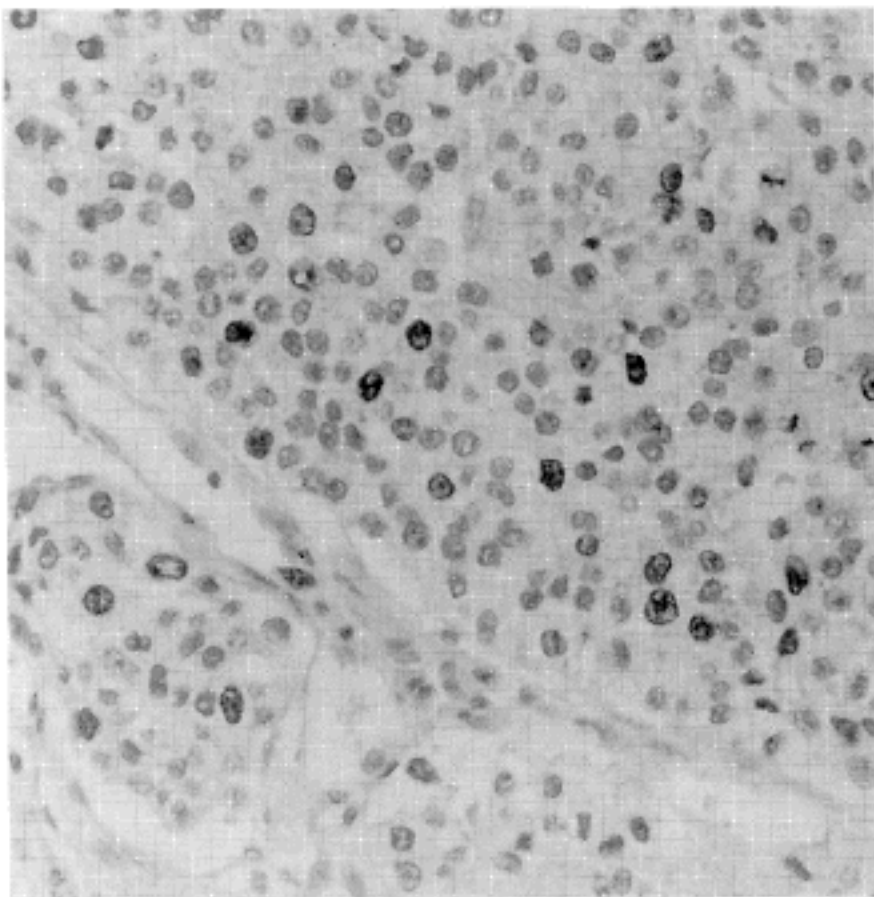


Fig. 1. PCNA immunostaining in transitional cell carcinoma of the renal pelvis.

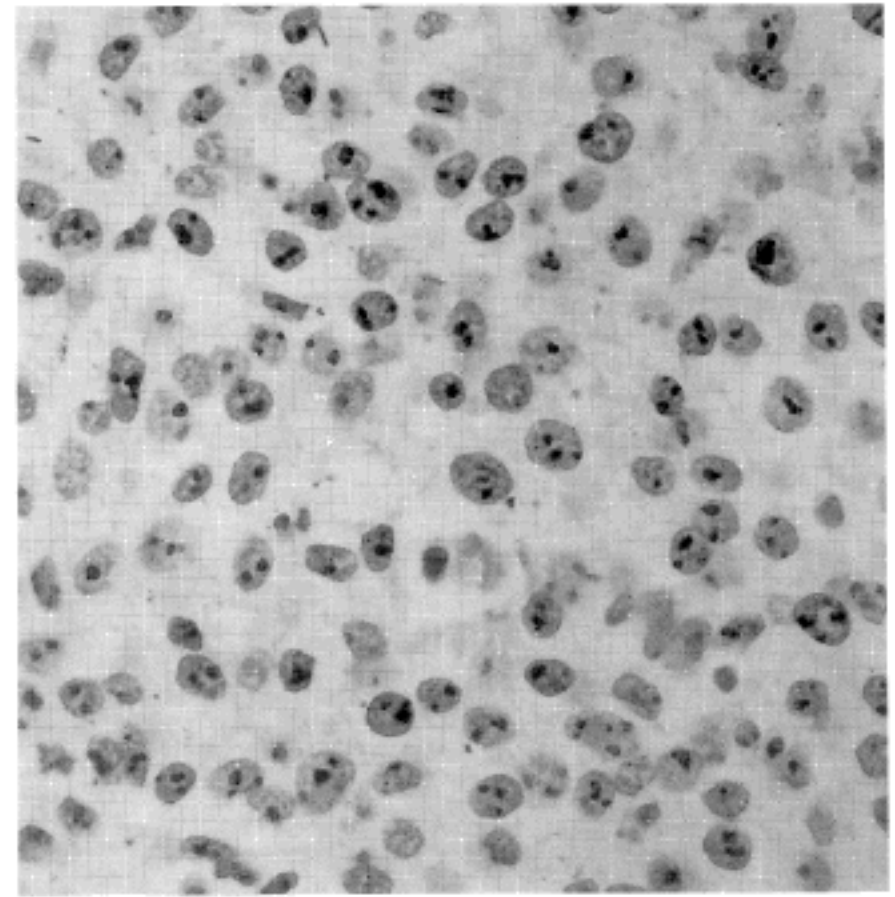


Fig. 2. AgNORs silver staining in transitional cell carcinoma of the renal pelvis.

Table 3. Mean PCNA index(%) and AgNORs count of TCC according to stage

Stage	I	II	III	IV	P value
PCNA	11.4 ± 3.5	28.6 ± 15.9	38.5 ± 19.1	44.3 ± 32.7	0.034
AgNORs	2.69 ± 0.33	2.83 ± 0.48	2.55 ± 0.34	3.17 ± 1.15	0.616
No. of cases	2	11	6	3	

Table 4. Mean PCNA index(%) and AgNORs count of TCC according to grade

Grade	I	II	III	IV	P value
PCNA	31.6 ± 19.2	22.7 ± 10.8	44.4 ± 20.8	25.5 ± 3.5	0.423
AgNORs	2.65 ± 0.48	2.82 ± 0.41	2.83 ± 0.63	2.81 ± 1.37	0.664
No. of cases	5	8	7	2	

Table 5. Mean PCNA index(%) and AgNORs count of TCC according to lymph node metastasis

Lymph node	Positive	Ngative	P value
PCNA	48.2 ± 23.9	27.1 ± 13.1	0.017
AgNORs	2.59 ± 0.98	2.73 ± 0.39	0.461
No. of cases	5	17	

Table 6. Correlation coefficient between survival state and studied prognostic factors

Prognostic factors	Correlation coefficient	p value
Angioinvasion	0.7868	0.00
Stage	0.6337	0.03
Grade	0.6330	0.03
Growth pattern	0.6005	0.005
Lymph node involvement	0.4193	0.066
Cell type	0.4193	0.066
Arteriosclerosis	0.3251	0.162
Papillary growth	0.3126	0.180
AgNORs count	0.2614	0.266
PCNA index	0.1634	0.491

(cell type), 성장유형, 유두상 성장의 유무, 혈관 침습 등과는 유의한 관계를 보이지 않았다. AgNORs 점수는 각각의 예후인자들과 비교하여 유의한 연관성을 보이지 않았다. 분화도 및 병기를 각각 저등급 (grade I, II), 고등급 (grade III, IV) 그리고 저병기 (stage 1, 2), 고병기 (stage 3, 4)의 두 군으로 나누어서 PCNA 표지자수와 AgNORs 점수에 대한 통계학적 검증을 해보았으나 병기만이 PCNA 표지자수와 유의한 상관관계를 보였고 (Fig. 3) AgNORs 점수는 상관관계를 보이지 않았다. PCNA 표지자수와 AgNORs 점수사이에도 유의한 상관관계는 관찰되지 않았다.

4. 생존율의 분석

PCNA 표지자수, AgNORs 점수 및 각각의 예후인자가 환자의 생존율에 미치는 영향을 다중회귀분석을 통

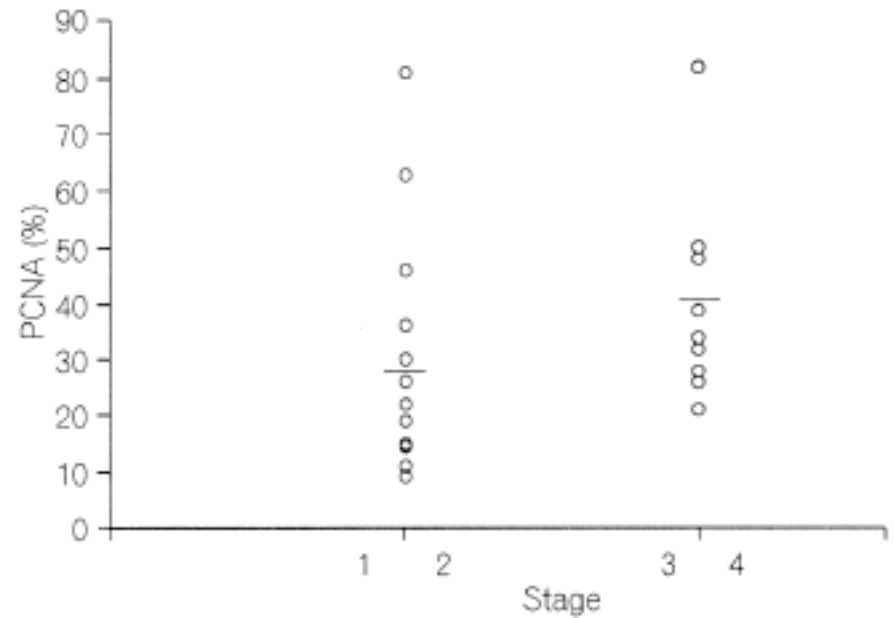


Fig. 3. PCNA indexes are significantly associated with low- and high stage of transitional cell carcinoma of the renal pelvis (p=.024).

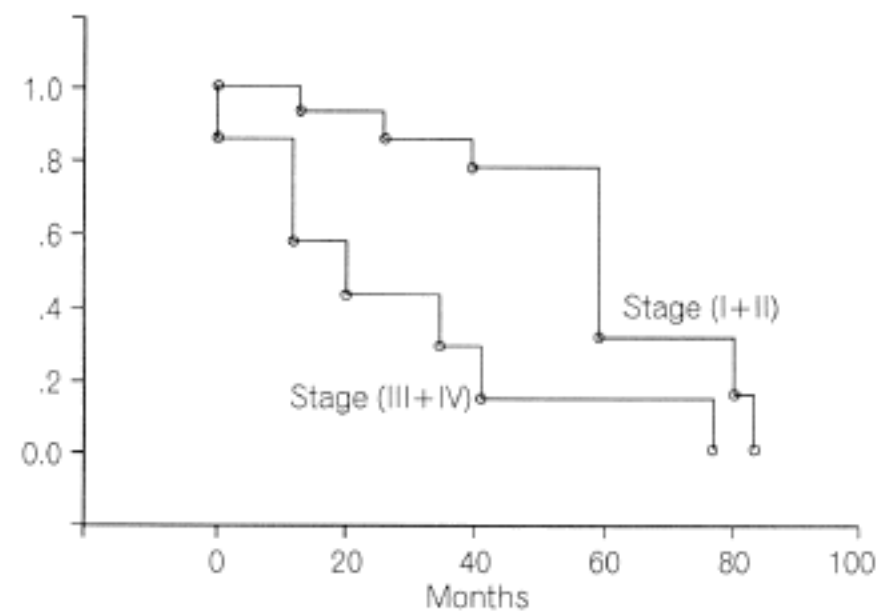


Fig. 4. Survival of 22 patients with transitional cell carcinoma of the renal pelvis according to tumor stage (p=.0042).

하여 분석하였다 (Table 6, Fig. 4). 혈관침습, 병기, 분화도, 성장유형 등이 환자의 생존율과 유의한 상관관계를 보였다. 그러나 림프절 전이가 있는 경우 환자의 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다. PCNA 표지자수, AgNORs 점수가 높아질수록 환자의 생존율이 감소하는 경향은 있었지만 유의한 관계는 보이지 않았다.

고 찰

악성 종양의 성장과 전이는 아직까지 모르는 점이 많고, 종양세포의 이질적인 성질 때문에 각각의 종양의 자연사를 예측하기는 매우 어려운 실정이다.¹² 이러한 악성 종양을 가진 환자의 예후를 판정하기 위하여 과거에는 각각의 종양의 특성에 기초한 임상적, 병리학적 예후인자들을 이용해 왔다. 그러나 이러한 병기나 분화도와 같은 보편적으로 사용되는 예후적 인자와 종양세포의 생물학적 행태가 일치하지 않는 경우가 흔히 발견되어 왔다.

신우의 이행세포암종은 전체 신 종양의 5~10%를 차지하며 이들 종양의 병기와 분화도는 환자의 임상성적과 밀접한 관련을 갖고 있다. 저등급의 분화를 보이는 종양은 통상 낮은 병기이면서 양호한 예후를 보이는 반면 고등급의 분화도를 보이는 분화가 나쁜 종양은 높은 병기이면서 임상적으로 불량한 경과를 보이게 된다.³⁻⁶ 본 연구에서도 병기와 분화도 사이에는 상관계수 0.73 ($p=0.000$)으로 매우 밀접한 관계를 볼 수 있었다. 그러나 조직학적 분화도만으로는 환자의 예후를 정확하게 예측하기가 힘든 경우가 많고 조직학적 분화도를 결정하는 것이 때로는 주관적일 수 있고 재현성이 낮다.^{7,8} 실제로 낮은 병기이면서 중등도의 분화도를 보이는 종양은 병리조직학적으로 비교적 균일한 양상을 보이지만 예후면에 있어서는 차이가 큰 경우가 많다. 이러한 경우 환자의 예후를 보다 적절히 반영하기 위하여 숙주의 반응 (host reponse), 유사분열, 병변의 다발성, 병변의 크기등과 같은 육안적, 조직학적 요소들을 검색해 보았으나 상기한 어느것도 분화도 또는 병기와는 독립적인 예후적 결정인자로 사용할 수 없었다.⁴⁻⁶ 유세포 측정에 의한 DNA 배수체가 환자의 생존율을 예측하는데 유용한 표지자로 여겨져 왔으나 이 또한 연구자들간에 상반되고 다양한 결과가 제시되어 결론을 내릴 수 없었다.^{6,11} 1996년 Lee등¹¹은 상부 요로 이행세포암종의 예후에 있어 병기 ($P=0.0037$)와 분화도 ($P=0.0001$)가 주로 밀접히 관련되어 있고 종양의 염색체 배수성은 통계적으로 환자 생존율과는 유의한 연관성이 없다고 보고하였다. 이와는 반대로 Blute등⁶은 낮은 병기, 중등도의 분화도를 갖는 종양 중, 이배수체 (aneuploidy)를 보이는 환자에서 예후가 불량함을 보고하였다. 최근 면역조직화학적 염색으로 신우 이행세포암종의 증식능을 알아보기 위한 여러개의 표지자가 도입되어 예후인자로서의 가치를 검증하고 있다. 일반적으로 종양 세포의 증식능은 그 종양의 예후 판정에 있어서 중요한 요소가 될 수 있으며 이를 측정하는 데에는 여러가지 방법이 있으나 PCNA와 AgNORs에 대한 면역조직화학적 염색이 비교적 간편한 방법이면서도 종양의 형태학적 소견과 연관하여 검색할 수 있는 장점 때문에 널리 이용되고 있다. 저자들은 PCNA에 대한 면역조직화학적 염색과 AgNORs에 대한 은염색을 시행하여 이미 알려진 신우 이행세포

암종의 병리적 예후인자들과 환자의 추적조사를 통한 임상성적을 비교해 봄으로서 예후인자로서의 가치를 평가하고자 하였다.

PCNA는 전신성 홍반성 루푸스 환자의 분열중인 세포의 핵에서 자가항원 중 하나로 발견된 29 KDa의 단백질이다. PCNA는 DNA 중합효소 8의 보조 단백질로서 DNA 복제와 합성기작에 있어 필수적인 구성성분이다. 또한 DNA 재조합과 수복에도 관여하고 세포 주기 조절에 관여하는 세포내 단백질과도 상호작용한다. PCNA의 발현은 세포주기상 G1기에서 증가하기 시작하여 S기에서 최대에 이른 후 M기에서 소실된다. 따라서 항 PCNA 항체는 DNA 복제 부위의 단백질과 결합하는 특이성이 높으며 항 PCNA 항체를 이용하여 증식하는 세포를 표지할 수 있다.^{20,21} 방광암,¹⁷ 성상세포종,²² 유방암³¹등에서의 조직학적 등급 또는 병기와 연관된 PCNA 표지지수에 관한 연구에서 모두 조직학적 등급이 높거나 병기가 높아질수록 PCNA 표지지수도 높아져 종양의 악성도를 잘 반영한다고 보고하였다.

Nucleolar organizer region (NOR)은 ribosomal RNA를 생산하는 DNA 고리로서 분열중기 (metaphase)의 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 단완과 세포분열간기 (interphase)의 핵소체 부위에서 나타난다.²⁴⁻²⁷ NOR의 구성은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만 RNA 중합효소 I, 110 KDa의 C₂₃ 단백질, 37 KDa의 B₂₃ 단백질, 36 KDa의 Ag-NORs 단백질 등으로 구성되어 있다고 알려져 있고²⁵⁻²⁷ 그 기능은 전사능 (transcriptional activity), ribosomal RNA 유전자 증폭, 핵의 해리 (nuclear dissociation) 등의 조절에 관여할 것으로 추측되고 있다.²⁶ NOR의 수는 증식성 혹은 종양성 병변에서와 같이 핵소체 활동이 많아질 때, 전사능이 증가할 때 그리고 배수성이 증가하여 염색체 수가 많아질 때 증가한다고 알려져 있다.¹⁹ 이러한 NOR에 대한 은염색은 종양의 증식능 및 악성도를 측정하는데 있어 광범위하게 쓰이고 있는 방법이다. AgNORs 염색은 Howell과 Black²⁸에 의해 빠르고 간편한 일단계 은염색이 개발되어 현재 사용되고 비교적 간편하고 비용이 저렴하여 쉽게 응용할 수 있다. 검색하는 방법은 핵내 AgNORs의 평균 면적을 구하거나 평균수를 구할 수도 있고, 핵의 면적에 대한 AgNORs의 면적비를 구하는 등 다양한 방법이 있으며 본 연구에서는 핵당 AgNORs의 평균 수를 구하였다.

AgNORs 점수와 PCNA 표지지수가 악성 림프종, 위암, 자궁경부암, 방광암 등 다수의 종양에서 종양세포의 증식력 및 환자의 예후와 연관이 있다는 보고가 많이 발표되었지만²⁹⁻³³ 이와 상반된 결과들도 있다.^{34,35} Pich등³⁶의 연구에서 AgNORs 점수는 방광의 이행세포암종과 다발성 골수종의 분화도 및 병기와는 유의한 관계를 보이지만 신세포암종 또는 인두암종의 병기나 분화도와는 관련성을 보이지 않는다고 하였다.

신우 이행세포암종을 대상으로 AgNORs 점수와 PCNA 표지지수의 역할에 관하여 연구된 문헌들은 매우 드물

었다. 1994년 Kamijo등¹⁰은 20예의 신우, 요관의 이행세포암종을 대상으로 PCNA 발현과 병리조직학적 소견을 비교하였다. 이들은 종양의 분화도, 침습깊이, 림프절 전이, 슬후 원격전이 등에 따라 PCNA의 발현율을 비교하였는데 각각의 경우 PCNA 발현이 유의하게 높은 비율로 나타나서 PCNA 발현정도가 이들 종양에 대한 예후적 인자로서 기여할 수 있다고 보고하였다. 이들과 상반된 연구결과도 있었는데 Cheville등⁹에 의하면 신우의 이행세포암종에 대하여 Ki-67 (MIB-1)과 PCNA 표지 지수를 종양의 분화도, 병기, 생존율과 비교해 보면 PCNA는 분화도 및 병기와는 통계적으로 유의있게 연관되지만 상이한 분화도 또는 병기 사이에 상당한 중첩이 존재하며 생존율과는 연관성을 보이지 않고 Ki-67의 경우 분화도와는 연관되지만 병기 및 생존율과는 통계적으로 유의한 연관성을 보이지 않아 PCNA 또는 Ki-67이 실제 임상에서 예후 표지자로 사용하는 데에는 제한적일 것으로 보고하고 있다. 또한 1996년 Shiina등¹³은 신우-요관 이행세포암종과 방광의 이행세포암종을 대상으로 화상분석기를 이용한 AgNORs의 은염색 양상을 비교하였는데 두 종양간에 있어 병기나 분화도에 따른 AgNORs의 염색성에는 차이가 없으며 신우-요관 이행세포암종이 방광의 이행세포암종보다 예후가 나쁜 것은 종양세포의 잠재적 악성도 이외의 다른 원인 즉 신우-요관 이행세포암종의 경우 조기 발견이 상대적으로 어렵고, 신우-요관 벽이 방광보다 얇고 그리고 림프관이 풍부한 해부학적 특성이 그 이유일 것으로 설명하였다. 이와 같이 같은 종류의 종양에서 그 결과에 차이가 나는 것은 우선 AgNORs 점수와 PCNA 표지 지수를 산정하는 방법에 있어서 각 연구자간의 주관적 요소와 관찰자 사이에 오차가 생길 수 있으며,³⁷ 동일한 종양에서도 부위에 따라 염색성의 차이가 날 수 있고,^{9,38} 조직의 고정, 반응 시간, 세는 방법 등에 따라 그 결과가 달라질 수 있기 때문에 저자들에 따라 다른 결과가 나올 수 있다.^{39,40} 특히 동일한 종양내에서 이질적으로 나타나는 염색성은 종양 세포의 구성이 이질적임을 의미하고 이들 중 염색성이 높게 나타나는 부분은 보다 악성도가 높은 종양세포들일 가능성이 있다. 이때문에 염색을 위한 파라핀 블록의 선정시 또는 수술전 진단을 위한 적은 양의 생검 조직을 대상으로 한 염색일 경우 오판될 위험성이 있는 것이다.¹² 저자들의 연구에서도 특히 PCNA의 면역조직화학적 염색에서 이질적인 염색성을 보이는 종양이 상당 수 관찰되었고 이런 경우 염색이 가장 강하게 된 것 만을 선정하여 표지 지수를 산정하였다.

본 연구에서 PCNA 표지 지수는 신우 이행세포암종의 병기 ($p=0.024$) 및 림프절 전이 ($p=0.017$)와 상관관계가 있을 뿐 기존에 알려진 다른 병리적 예후 인자들, 즉 분화도, 종양 세포의 유형, 성장 경향, 유두상 성장의 유무, 림프절 전이, 혈관 침습과는 상관관계가 없었고, AgNORs 점수는 전술한 여러 병리적 예후 인자들과 상관관계를 보이지 않았다. 또한 생존율과의 관계에 있어

서 비록 대상환자의 수가 제한적이긴 하지만 PCNA 표지 지수, AgNORs 점수 그 어느 것보다 상관관계를 보이지 않았다. 그러나 생존율과 여러 예후인자들을 비교하였을 때 혈관침습 ($p=0.00$), 병기($p=0.03$), 분화도 ($p=0.03$), 성장 유형 ($p=0.05$)은 생존율과 유의한 상관관계를 보여 기존의 예후인자들이 역시 중요함을 알 수 있었다. 그리고 본 연구에서 분화도 2, 병기 2인 종양이 7예로 가장 많은 부분을 차지하였으나 PCNA 표지 지수는 9%에서 46%로 AgNORs 수치는 1.96에서 3.40으로 매우 폭넓은 분포를 보였고, 병기가 높거나 낮은 종양 또는 분화도가 높거나 낮은 종양 사이에도 PCNA 표지 지수와 AgNORs 수치가 중첩되어 나타났다.

이와 같은 결과로 미루어 볼 때, 신우 이행세포암종의 예후를 예측함에 있어 이미 알고있는 다른 예후인자들과 함께 PCNA 표지 지수를 이용한다면 예후판정에 유용할 것으로 생각되나 AgNORs 점수는 신우의 이행세포암종의 예후판정에는 도움이 되지 않을 것으로 판단되었다. 앞으로 더 많은 증례를 모아서 연구하여야겠으며 세포 증식능을 평가하는데 PCNA 표지 지수 이외의 Ki-67 등의 다른 방법들과의 비교가 필요하리라 생각된다.

결 론

저자들은 신우의 이행세포암종에서 PCNA에 대한 면역조직 화학적 염색으로 얻은 PCNA 표지 지수와 은염색을 통한 AgNORs 점수를 신우 이행세포암종의 여러 예후인자들과 비교하고 추적조사를 통한 환자의 생존기간과 비교하여 다음과 같은 연구 결과를 얻었다.

- 1) 연구대상 22예에서 추적조사된 20예중 7예 (31.8%)가 사망하였으며 평균 생존기간은 21개월 (1~40)이었다.
- 2) 사망과 관련된 예후인자중 유의하였던 것은 병기 ($p=.03$), 분화도 ($p=.03$), 침습형태 ($p=.005$), 혈관 침습 ($p=.00$) 등이었다.
- 3) PCNA 표지 지수와 평균 AgNORs 점수는 그 수가 증가될수록 생존율이 낮아졌으나 통계학적 유의성은 없었다 ($p=.491$, $p=.266$).
- 4) PCNA 표지 지수는 병기와 림프관 침습과 유의한 상관관계가 있었다.
- 5) AgNORs 점수는 비교된 여러 예후인자들과 통계학적으로 유의한 상관관계를 보이지 않았다.
- 6) 다중 회귀분석으로 예후인자들간의 상관관계를 비교한 결과 신우 이행세포암종의 병기는 분화도 ($p=.00$), 세포의 유형 ($p=.045$), 침습형태 ($p=.00$), 림프관 침습 ($p=.002$), 혈관침습 ($p=.001$), 동맥경화 ($p=.012$), PCNA 발현지수 ($p=.024$) 등과 의미있는 관계가 있었다.

결론적으로, 신우 이행세포암종에서 PCNA 표지 지수는 다른 예후인자들과 함께 이용한다면 비교적 유용한 예후예측인자로 생각되고, AgNORs 점수는 별다른 의미가 없을 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Chasco SB, Gray GF, McCarron JP, Jr. Urothelial neoplasia of the upper urinary tract. *Pathol Annu* 1981; 16: 127-53.
2. Strobel SL, Jasper WS, Gogate SA, Sharma HM. Primary carcinoma of the renal pelvis and ureter. Evaluation of clinical and pathologic features. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108: 697-700.
3. Huben RP, Mounzer AM, Murphy GP. Tumor grade and stage as prognostic variables in upper tract urothelial tumors. *Cancer* 1988; 62: 2016-20.
4. Davis BW, Hough AJ, Gardner WA. Renal pelvic carcinoma: morphologic correlates of metastatic behaviour. *J Urol* 1987; 137: 857-61.
5. Badalament RA, O'Toole RV, Kenworthy P, et al. Prognostic factors in patients with primary transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 1990; 144: 859-63.
6. Blute ML, Tsushima K, Farrow GM, Therneau TM, Lieber MM. Transitional cell carcinoma of the renal pelvis: nuclear deoxyribonucleic acid ploidy studied by flow cytometry. *J Urol* 1988; 140: 944-9.
7. Ooms ECM, Anderson WAD, Alons CL, Boon ME, Veldhuizen RW. Analysis of the performance of pathologists in the grading of bladder tumors. *Hum Pathol* 1983; 14: 140-3.
8. Ooms ECM, Kurver PHJ, Veldhuizen RW, Alons CL, Boon ME. Morphometric grading of bladder tumors in comparison with histologic grading by pathologists. *Hum Pathol* 1983; 14: 144-50.
9. Checille JC, Terrel RB, Cohen MB. Use of proliferative markers Ki-67 (MIB-1) and proliferating cell nuclear antigen (PC 10) in transitional cell carcinoma of the renal pelvis. *Mod Pathol* 1994; 7: 794-800.
10. Kamijo T, Sato T, Yanagizawa R, Kishi H. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in renal pelvic and ureteral cancers and its prognostic value. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1994; 85: 938-44.
11. Lee SH, Lin JS, Tzai TS, et al. Prognostic factors of primary transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Eur Urol* 1996; 29: 266-70.
12. Chowdhury GM, Kojima K, Kanayama H, Tsuji M, Kurokawa Y, Kagawa S. The proliferation index of MIB-1 as a prognostic factor for patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Cancer* 1996; 78: 827-33.
13. Shiina H, Igawa M, Urakami S, Shirakawa H, Ishibe T. Comparison of uretero pelvic transitional cell carcinoma with bladder transitional cell carcinoma using an image analyzer. *Urol Int* 1996; 58: 163-8.
14. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 199-206.
15. Hall PA, Woods AL. Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 505-22.
16. Hall PA, Levison DA. Review; Assessment of cell proliferation in histologic material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
17. 이상엽, 박영년, 박찬일. 방광 이행세포암종 예후인자로서의 PCNA 표지지수의 가치. *대한병리학회지* 1994; 28: 282-7.
18. Kruger R, Muller H. Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* 1995; 75: 480-4.
19. Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 1739-44.
20. Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA/cyclin. *Science* 1988; 240: 1544-6.
21. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997; 14: 629-40.
22. 조미연, 정순희, 김태승, 한용표. 정상교세포종의 조직학적 등급과 Ag-NOR수, PCNA 발현 및 유세포 측정기를 이용한 DNA 분석의 비교. *대한병리학회지* 1994; 28: 49-55.
23. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma. Correlation with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992; 45: 416-9.
24. Morris GF, Mathews MB. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Cell Biol* 1989; 264: 13856-64.
25. Derenzini M, Thiry M, Goessens G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1237-56.
26. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988; 155: 95-6.
27. Lischwe MA, Snetana K, Olson MOH, Busch H. Protein C₂₃ and B₂₃ are the major silver staining proteins. *Life Sci* 1979; 25: 701-8.
28. 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.
29. Crocker J, Macartney JC, Smith PJ. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region

- data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1988; 154: 151-6.
30. Roas J, Mehta A, Fillipe MI. Nucleolar organizer regions, proliferative activity and DNA index in gastric carcinoma. *Histopathology* 1990; 16: 614-6.
31. Jain S, Fillipe MI, Hall PA, Waseem N, Lane DP. Nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1991; 44: 655-9.
32. Skopelitou A, Korkolopoulou PM, Papanicolaou A, Christodoulou PM, Thomas E, Pavlakis K. Comparative assesment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur Urol* 1992; 22: 235-40.
33. Allen JP, Gallimore AP. Nucleolar organizer regions in benign and malignant glandular lesions of the cervix. *J Pathol* 1992; 166: 153-6.
34. Smith FG, Murray PG, Crocker J. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J Clin Pathol* 1993; 46: 28-31.
35. Visakorpi T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 1992; 168: 7-13.
36. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophylic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect Prev* 1995; 19: 282-91.
37. Falck VG, Novelli MR, Wright NA, Alexander N. Gastric dysplasia: Inter-observer variation, sulphomucin staining and nucleolar organizer region counting. *Histopathology* 1990; 16: 141-9.
38. Siitonen SM, Isola JJ, Rantala IS, Helin HJ. Intratumor variation in cell proliferation in berast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 226-31.
39. Start RD, Cross SS, Clelland C, Silcocks PB, Rogers K, Smith JHF. Delay in fixation does not affect the immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J Pathol* 1992; 168: 197-9.
40. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ, How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-8.
-