

상피 및 비상피세포들의 Intermediate Filament에 대한 면역조직화학적 및 전자현미경적 연구

김 일 · 김 효 성 · 노 영 복*

Immunohistochemical and Electron Microscopic Studies on Intermediate Filament of Epithelial Cell and Non-Epithelial Cells

Kim, Il, Hyo Sung Kim and Young Bok Rho*

(Received March 20, 1991)

Abstract

The intermediate filament is one of the most important constituents of the intracytoplasmic cytoskeleton microtubule, actin, myosin and intermediate filament. It is composed of keratin, desmin, vimentin, neurofilament and glial filament, and has important role as a cellular marker, epithelial or mesenchymal origin. So it will be important to differentiated from some poorly or undifferentiated neoplasm to provide adequate therapeutic modalities.

This study was performed by using immunohistochemical staining and electron microscopic observation to find out intermediate filaments of epithelial and non-epithelial tumor cells evaluate the degree of differentiation in tumors and therefore to provide some diagnostic and therapeutic modalities.

The materials consisted of 83 epithelial and non-epithelial elements bearing 23 normal control, 28 epithelial tumors, and 32 non-epithelial tumors, that are resected for definite treatment at Chosun University Hospital from June, 1988 to June, 1990. Immunohistochemical stain for keratin, desmin and vimentin, and electron microscopic study were performed in all cases.

The results obtained were as follows.

1. Immunohistochemical stain for intermediate filament were very useful diagnostic aid for differentiated epithelial tumor to non-epithelial tumor in diagnostic

조선대학교 대학원 생물학과 *조선대학교 자연과학대학 생물학과

The Graduate school of Chosun University *Department. of Biology, Natural Science college, Chosun University

neoplasia.

2. In the electron microscopic finding, the size of intermediate filaments were possible differentiated to cell components of epithelial tumor and non-epithelial tumors.

서론

전자현미경 관찰을 통하여 고등 진핵세포들의 원형질에는 세포형태와 운동성을 유지하고 세포막 단백질의 이동을 조절하며 세포의 유전에 관계하는 염색체, 그리고 세포의 증식을 조절하는데 관여하는 사상체로 된 단백질이 존재하는 것이 알려져 있으며(Schlegel *et al.*, 1980), 이러한 사상체는 세포의 형태를 유지하는 세포골격으로 작용한다(McBeath and Fujiwra, 1989 ; Schurch *et al.*, 1990).

세포골격에는 미세관(microtubule), myosin, actin 및 중간형 사상체(intermediate filament)가 있다(Giulo *et al.*, 1981 ; Altmannsberger *et al.*, 1981 ; Ramaekers *et al.*, 1983). 이중 중간형 사상체는 초기에 다른 세포골격의 분리산물로 간주되어 별다른 관심을 나타내지 않았으나 최근에 새로운 생화학적, 면역형광법(Osborn *et al.*, 1977 ; Hynes and Destree, 1978), 그리고 전자현미경적 기법을 이용하여 이들이 이성질적인 아단위로 구성된 섬유성 계라 하는 것이 확립되었다(Elias, 1980). 중간형 사상체는 생화학적이나 면역학적으로 서로 다른 성질을 갖는 5가지의 아형이 있는데 keratin, desmin, vimentin, neurofilament 및 glial filament로 구분한다. Keratin(Franke *et al.*, 1978a, b ; Franke *et al.*, 1979a, b ; Sun and Green, 1978 ; Sun *et al.*, 1979 ; Viac *et al.*, 1980)은 주로 상피 세포에서 발견되며 상피성 유래의 조직이나 기관에서 관찰된다. Desmin(Lazarides and Hubbard, 1976)은 평활근, 골격근, 심근 등 주로 근육세포에서 발견되며 vimentin(Bennet *et al.*, 1978 ;

Franke *et al.*, 1978a, b ; Franke *et al.*, 1979a, b)은 비상피성의 간질세포들에서 관찰되는데 이는 간질에서 유래한 것으로 생각된다. 또한 neurofilament(Liem *et al.*, 1978 ; Schlaepfer and Freeman, 1978)는 신경조직의 뉴uron(neruron)에서 관찰되며 glial filament(Schachner *et al.*, 1978 ; Rueger *et al.*, 1979 ; Yen and Fields, 1981)는 모든 형태의 신경교세포에서 발견된다. 이러한 점으로 보아 이들 중간형 사상체는 다양한 형태의 원형질적 또는 유기체의 기계적 완성에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다. 인체내 세포에서는 이들 중간형 사상체가 모두 관찰된다. 이러한 점을 유의하여 최근 종양의 진단에 이 중간형 사상체를 이용하고 있다(Mary and Klaus, 1983 ; Walts *et al.*, 1983). 정상세포가 종양으로 전환시에도 일반적으로 중간형 사상체는 세포 고유의 면역학적 또는 생화학적인 특징을 나타내고 있다(Ramaekers *et al.*, 1983). 즉 정상조직이 종양으로 변화할 때 중간형 사상체의 합성은 양적인 차이는 있을 지라도 일어나게 될 것이다. 이러한 점을 이용하여 중간형 사상체를 이루는 단백질을 생화학적 방법 또는 면역학적 방법으로 검증을 함으로써 종양의 세포기원(Sun *et al.*, 1979 ; Schlegel *et al.*, 1980a, b) 즉 상피성인가 비상피성인가를 구별할 수 있다. 특히 분화가 좋지 않은 종양에서의 감별에 도움이 될 것이다(Schlegel *et al.*, 1980a, b). 중요한 점은 상피성 또는 비상피성의 종양을 구별함으로써 환자의 치료방향이 결정되므로 더욱 의미가 있다 하겠다(Giulio *et al.*, 1981).

이에 저자는 각종 인간의 종양에 있어서

세포질내 중간형 사상체들을 전자현미경으로 관찰하여 그 양상 및 크기들을 측정하고 면역조직화학적 염색을 통하여 각종 종양의 진단적 가능성을 제기하고자 본 연구를 시행하여 다소의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 재료는 1988년 6월부터 1990년 6월까지 조선대학교 부속병원에서 진단 및 치료 목적으로 수술적으로 절제된 조직중 비교적 보관 상태가 양호하고 전자현미경적 검토가 가능했던 83가지를 대상으로 정상 상피세포, 실질세포, 양성 종양의 상피세포종양, 실질세포종양, 악성 종양의 상피세포종양, 실질세포종양으로 분류하여 관찰하였다.

정상상피세포로는 자궁경부와 피부의 편평상피세포(squamous epithelium) 각각 3가지, 위의 선상피(glandular epithelium) 3가지, 갑상선 선상피 2가지, 정상의 실질세포로는 자궁근층, 신경, 대퇴골, 대퇴부 횡문근 각각 3가지를 대상으로 하였다. 양성 종양종 상피세포 종양으로 타액선의 다형성 선종(pleomorphic adenoma) 3가지, 피부의 유두종(squamous papilloma) 2가지, 수막종(meningioma) 2가지, 뇌하수체 선종(pituitary adenoma) 2가지, 간의 담관선종(biliary cystadenoma) 1가지, 뇌의 맥락총 유두종(choroid plexus papilloma) 1가지, Brenner씨 종양(Brenner tumor) 1가지, 실질세포종양으로 신경종(neuroma) 3가지, 신경절종(ganglion cell tumor) 2가지, 난소의 섬유종(fibroma) 2가지, 자궁과 위의 평활근종(leiomyoma) 각각 3가지, 신경섬유종(neurofibroma) 3가지를 대상으로 하였다. 악성 종양은 악성상피종양으로 위의 선암종(adenocarcinoma) 3가지, 직장의 선암종 3

가지, 난소에 전이한 선암종(metastatic adenocarcinoma) 2가지, 자궁의 편평상피암종(squamous cell carcinoma) 3가지, 식도의 편평상피암종 3가지, 방광의 이행상피암종(transitional cell carcinoma) 3가지, 자궁의 신경내분비세포종(neuroendocrine carcinoma or tumor) 1가지, 간의 간세포종(hepatocellular carcinoma) 2가지, 악성중피종(malignant mesothelioma) 1가지, 타액선의 악성 혼합종(malignant mixed tumor) 1가지를 악성 실질세포 종양으로 후막강의 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma) 3가지, 종격동의 악성신경초종(malignant schwannoma) 2가지, 자궁의 평활 근육종(leiomyosarcoma) 2가지, 대퇴부의 횡문근육종(rhabdomyosarcoma) 1가지, 경골의 골육종(osteosarcoma) 1가지, 활막육종(synovialsarcoma) 1가지를 대상으로 하였다 (Table 1).

면역조직화학적 염색에 사용된 일차항체인 cytokeratin, desmin, vimentin, 2차 항체인 rabbit immunoglobulin은 DAKO사 제품을, 발색시약 3,3'-diaminobenzidine(DAB)는 sigma 제품을 사용하였다(Table 2).

Table 1. Materials used in this study

	Epithelial cell	Non-epithelial cell	Total
Normal control	11	12	23
Benign tumor	12	16	28
Malignant tumor	22	10	32
Total	45	38	83

Table 2. Primary antibodies and enzyme employed in this study

Antigen	Antibody	Dilution	Source
Cytokeratin	Rabbit antihuman cytokeratin	1 : 300	DAKO
Vimentin	Rabbit antihuman vimentin	1 : 20	DAKO
Desmin	Rabbit antihuman desmin	1 : 250	DAKO

2. 조직학적 검사

가. 면역조직화학적 방법

1) Paraffin 포매과정을 거친 조직을 4 μ m의 연속절편을 만들어 slide glass에 부착시킨 후 58°C oven에서 약 40분간 가온하였다.

2) 탈Paraffin 및 함수과정을 다음과 같이 시행하였다.

- i) Xylene에서 10분씩 3번 처리.
- ii) Acetone에 1분 처리
- iii) 100% ethyl alcohol에 3분 처리.
- iv) 95% ethyl alcohol에 3분 처리.
- v) 70% ethyl alcohol에 3분 처리.
- vi) 증류수로 세척.

3) 3% H₂O₂-methanol 용액에서 10분간 처리하여 조직내에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제시킨 후 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4) 용액으로 5분씩 2회 세척하였다.

4) 단백질과의 비특이성 결합을 억제시키기 위해 slide glass를 습윤상자에 넣고 정상 염소 혈청을 가하여 37°C incubator에서 20분간 반응시켰다.

5) 습윤상자에서 정상혈청을 가볍게 흔들어 제거한 후 일차항체로 30분동안 반응시켰다.

6) PBS용액으로 5분씩 2회 세척하였다.

7) 습윤상자에서 과산화효소와 결합된 토끼에서 생성된 이차항체를 40분동안 반응시켰다.

8) PBS용액으로 5분씩 2회 세척하였다.

9) Avidin-Biotin complex로 40분동안 반응시켰다.

10) PBS용액으로 5분씩 2회 세척하였다.

11) 3,3'-diaminobenzidine(DAB) 20mg을 40ml의 PBS용액에 녹인 후 30% 과산화수소를 20 μ l 가했다.

12) 현미경 검색하에서 원하는 붉은 갈색이 나올때까지 발색시켰다.

13) 흐르는 물에 세척하였다.

14) Hematoxyline으로 2분간 대조 염색하였다.

15) 흐르는 물에 세척한 후 탈수과정을 거쳐 봉입하였다.

나. 전자현미경적 관찰

1) 적출된 조직을 신속히 1mm³크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1M cacodylate buffer, 온도 4°C)에서 2시간 전고정하였다.

2) 동일한 buffer를 사용하여 15분씩 3회 세척하였다.

3) 1% osmium tetroxide(O₈O₄) 용액 (pH 7.4, 0.1M cacodylate buffer, 온도 4°C)에서 2시간 후고정하였다.

4) 동일한 buffer를 사용하여 15분씩 3회 세척하였다.

5) 저농도의 ethanol(50%)로 부터 고농도 ethanol 계열하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다.

6) Epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, Epon mixture 원액에서 overnight 후 포매하였다.

7) 35°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 24시간 열증합하였다.

8) Epon block을 1 μ m로 박질하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 ultramicrotome(LKB-V형)으로 60nm의 초박절편을 만들어 Reynold법(1963)에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 전자현미경(JEM 100CX II형, TEM)으로 가속전압 80kV하에서 관찰하였다.

다. 중간형 사상체 직경측정

중간형 사상체의 크기 측정은 반자동측정기구인 videoplan(IBAS 2000 FRG형)을 이용하여 전자현미경을 통하여 얻어진 각 종양의 세포사진을 digitizing table위에 올려 중간형 사상체들의 윤곽을 전자펜으로 추적

하여 40개 이상의 직경을 계측하였다.

결 과

1. 면역조직화학적 관찰

광학현미경으로 관찰하여 세포막과 세포질이 뚜렷한 과립상의 갈색으로 나타나는 세포를 양성, 발색되지 않은 세포를 음성, 약한 갈색이나 적색으로 염색된 경우를 약양성으로 판정하였다.

1) 정상대조군

우선 keratin은 자궁경부의 상피세포 전층에서 강하게 양성반응을 보였으며(Fig. 1), 그의 자궁경부 상피에서는 편평화생이 흔한데 이는 기저에 위치한 keratin양성인 상피의 국소적인 증식과 관련되어 있다. 따

라서 편평화생이 일어난 부위는 강하게 염색되었다. 피부에서 표피의 전층, 즉 기저층에서 부터 각질층에 이르기까지 양성으로 나타났다. 그리고 위장관부의 상피세포에서도 양성으로 나타났다.

특이한 것으로 중배엽 기원이라고 생각되는 중피세포에서 강한 염색성이 관찰되었다. Desmin은 평활근(Fig. 2), 골격근에서 양성으로 나타났으며 진피교원섬유에서는 약양성을, 그 외의 세포에서는 염색이 되지 않았다.

Vimentin은 평활근(Fig. 3), 골격근에서는 desmin과 같은 양성을 나타내었다. 진피교원섬유에서는 양성반응을 나타냈으며, 실질세포의 신경에서 약양성으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Keratin, desmin and vimentin reactivity in normal tissue

Site	Keratin	Desmin	Vimentin
Cervix Exocervix			
Squamous epithelium	+	-	-
Endocervix			
Columnar epithelium	+	-	-
Basal cell			
Metaplastic epithelium	+	-	-
Reserve cell hyperplasia	+	-	-
Skin Epidermis	+	-	-
Hair follicle	+	-	-
Sebaceous gland	+	-	-
sebaceous cell	+	-	-
basal cell	+	-	-
Sweat gland			
ductal cell	+	-	-
myoepithelial cell	+	-	-
Dermal collagen	-	±	+
Stomach surface epithelium	+	-	-
Mocous gland	+	-	-
Thyroid follicular epithelium	±	-	-
Mesenchymal tissue			
nerve	-	-	±
muscle			
smooth	-	+	+
skeletal	-	+	+

Abbreviations : +, Positive ; -, Negative ; ±, Weak positive

2) 종양조직군

Keratin 단백질은 여러 종류의 상피성 종양에서 관찰할 수 있는데 장기에 관계없이 편평상피 종양에서 가장 많은 양을 함유하고 있었다. 따라서 편평상피로 구성된 유두종이나 뇌하수체 선종, 맥락막층에 발생하는 유두종(Fig. 4), 간에 비교적 드물게 발생하는 담관선종의 선상피세포에서 강양성으로 나타났으며, 중증도의 악성도를 나타내는 종양인 난소의 Brenner씨 종양의 이행 상피암 상피세포 성분에서도 강한 양성반응을 나타냈다. 염색되는 강도는 종양세포의 분

화 정도와 관련이 되지만, 편평상피세포종양의 경우는 분화가 나쁜 종양도 keratin 항체와 반응하였다.

Keratin에 대한 뚜렷한 염색성이 자궁의 편평상피 세포암, 요로상피 종양에서 발견되었는데, 방광요로 상피에서 기원한 이행 세포암의 경우, 부분적으로 편평세포로 분화한 부분은 세포의 염색성이 증가되는 특징을 보였다. 선암종은 매우 다른 염색 형태를 가지고 있었는데, 위의 선암인 경우 keratin에 대한 항체에 강양성이거나, 약하게 염색되는 등 반응이 다양하였다. 중피에

Table 4. Keratin, Desmin and Vimentin reactivity in tumor

Tumor	Keratin	Desmin	Vimentin
Benign epithelial			
pleomorphic adenoma	+	-	-
squamous papilloma	+	-	-
pituitary adenoma	+	-	-
choroid plexus papilloma	+	-	-
biliary cystadenoma	+	-	-
Brenner tumor	+	-	-
meningioma	-	-	±
non-epithelial			
neuroma	-	±	±
ganglion cell tumor	-	±	±
fibroma	-	+	+
leiomyoma	-	+	+
neurofibroma	-	+	+
Malignant epithelial			
adenocarcinoma	+	-	-
metastatic adenocarcinoma	+	-	-
squamous cell carcinoma	+	-	-
transitional cell carcinoma	+	-	±
neuroendocrine tumor	±	-	±
hepatocellular carcinoma	+	-	±
malignant mesothelioma	±	-	-
malignant mixed tumor	+	±	±
non-epithelial			
malignant fibrous histiocytoma	-	-	+
malignant schwannoma	-	±	±
rhabdomyosarcoma	-	+	+
osteosarcoma	-	-	±
synovial sarcoma	-	±	+

Abbreviations : +, Positive ; -, Negative ; ±, Weak positive

서 기원한 종양으로 알려진 악성종피종에서도 양성반응을 보였다. 그리고 혼합종으로 알려진 타액선의 다형성 선종에서는 종양성분 중 상피세포 성분만이 양성을 보인 반면, 실질세포종양에서는 염색이 되지 않았다. 이러한 결과는 악성화된 혼합종에서도 동일하게 나타났다. 그러나 신경 내분비 세포종, 악성 종피종에서는 약양성으로 나타났으며, 여성생식계종 난소의 생식세포 종양과 간질세포 기원의 종양은 모두 음성이었고, 자궁 내막과, 자궁경부에서 생긴 선암의 경우는 약한 정도의 염색성을 나타내었다.

Desmin은 양성종양 중 난소의 섬유종 이외에도 자궁의 평활근종, 신경종 섬유종, 타액선의 다형성 선종의 간질세포성분이 양성으로 나타났으며, 악성종양 중에서는 대퇴부의 횡문 근육종에서 강양성을 나타냈으며 (Fig. 5), 그외에도 위의 평활근육종과 활막육종에서도 양성으로 나타났다. 그러나 피부의 유도종, 간의 담관선종, 뇌하수체 선종, Brenner씨 종양 등 상피세포성 종양에서는 염색이 되지 않았다. 실질세포의 신경종, 신경절종, 타액선의 악성 혼합종의 간질성분, 종격동의 악성신경초종에서는 약양성을 나타냈다. Vimentin은 양성 실질세포종양인 난소의 섬유종이나 자궁의 평활근종, 신경 섬유종 등에서 양성으로 나타났으며, 악성 실질세포종양 즉 대퇴부의 횡문근육종이나 활막에 발생한 활막육종 (Fig. 6)에서 강양성으로 나타났으며, 후복막강에 발생했던 악성섬유성 조직구종에서는 거대 세포부위에서 양성으로 나타났다. 그러나 타액선의 다형성 선종의 상피세포성분, 피부의 유도종, 뇌하수체 선종, 뇌의 맥락종, 유도종, 간의 담관선종, Brenner씨 종양, 위의 선암종, 난소에 전이한 선암종, 자궁의 편평상피암종, 악성종피종에서는 염색이 되지 않았다 (Table 4).

2. 전자현미경적 관찰

초미세형태학적으로 양성 상피성 종양인 Brenner씨 종양은 세포주위에 많은 교원질 섬유로 둘러싸여 있으며, 개개의 세포에서 핵은 비교적 둥글고 핵질도 초질성으로 구성되어 있다. 세포질내에서 확장된 형질내세망과 사립체부종이 관찰되었으며, 사상체는 핵과 평행성으로 균질하게 퍼져 있었다 (Fig. 7). 또한 세포와 세포 사이에서는 잘 발달된 desmosome이 관찰되었다. 양성신경 섬유종에서는 산재된 기저막과 약간의 세포 흡수성 소포 그리고 중등도로 발달되며, 확장된 조면형질내세망이 있었으며, 느슨한 간격사이에 산재된 교원질 기질이 관찰되었다. 핵은 방추형으로 핵의 끝은 둔하게 되어 있었으며, 핵질은 균질성이었다. 잘 발달된 세포질 돌기내에서는 많은 양의 사상체들이 균일하게 서로 엉켜 존재하였다 (Fig. 8). 신경절 세포종양에서는 비교적 풍부한 세포질내에 다량의 사상체가 다발속 양상으로 뭉쳐져 있으며, 확장되어 파괴되는 형질내세망이 관찰되었다 (Fig. 9).

악성 상피성 종양 중 선암종은 세포막에 많은 미세돌기들이 세포막과 수직으로 돌출되어 있으며, 세포와 세포사이에서는 많은 desmosome이 관찰되고 하나의 내강을 이루면서 존재하였다. 세포와 핵은 비교적 불규칙적이며, 핵질은 세포막을 응집되어 있고 과립성이 없다. 세포질내에는 많은 양이 확장되며 파괴된 사립체와 형질내세망 그리고 세포내 소강이 관찰되며, 곳곳에서 진하게 응집되어 있는 tonofilament들이 관찰되었다 (Fig. 10).

악성 골수종에서는 비교적 풍부한 세포질내에 다량의 확장된 형질내세망과 ribosome들이 관찰되며, 많은 양의 사상체들이 산재되어 있으며 이들 사상체는 핵막과 평행으로 존재하였다 (Fig. 11). 악성 신경초종에서는 개개의 종양세포가 풍부한 세포간질사이에서 많은 교원질로 둘러싸여져 있으며, 핵

질은 주로 핵에 대체적으로 방추형이었으며, 끝이 둔하게 되어 여농연 양상으로 관찰되었다. 세포질은 많은 돌기를 내고 있으며, 이웃 세포와 심한 교대감입 효과를 보이며, 지속적으로 이어지는 한층의 외막에 의해 둘러싸여 있었다. 또한 사립체와 조면형질내세망은 중등도로 관찰되었으며, 소량의 사상체가 세포질돌기내에서 나타났다 (Fig. 12).

3. 중간형 사상체의 직경 측정

1) 정상대조군

자궁의 경부의 편평상피세포의 선상피

자궁근층, 신경, 횡문근 골격근에 대한 전자현미경 사진을 통하여 세포형태 계측기를 이용하여 사상체의 직경을 측정한 결과 계측성 방법에 다소의 차이는 있겠지만 자궁경부의 편평상피세포에서는 중간형 사상체의 직경이 작게는 90Å부터 크게 161Å까지 분포되어 있으며 위의 선상피에서는 95Å부터 121Å까지, 자궁근층에서는 92Å부터 128Å까지 신경에서는 87Å부터 143Å까지 횡문근에서는 89Å부터 158Å까지, 그리고 골격근에서는 98Å부터 176Å까지의 다양한 크기의 분포를 나타냈다(Table 5).

Table 5. Size of intermediate filaments in normal control

Source	Range(Å)	MEAN(Å)	SD(Å)	Mean±SD(Å)
Exocervix squamous epithelium	90-161	118	11	118±11
Glandular epithelium	95-121	114	6	114± 6
Myometrium	92-128	118	9	118± 9
Nerve	87-143	121	11	121±11
Smooth muscle	89-158	131	24	131±24
Skeletal muscle	98-176	135	18	135±18

2) 종양군

종양군에서는 Brenner씨 종양, 신경섬유종, 신경절종, 위와 직장의 선암종, 경골의 골육종, 종격동의 악성 신경초종에 대한 전자현미경 사진을 통하여 세포형태 계측기를 이용하여 사상체의 직경을 측정한 결과 계측상 방법에 다소의 차이는 있겠지만 Brenner씨 종양에서 중간형 사상체의 직경이 작

게는 85Å부터 크게는 111Å까지 분포되어 있으며, 신경섬유종에 있어서는 81Å부터 130Å까지 분포를 신경절종에서는 93Å부터 176Å까지 분포를, 경골의 골육종에 있어서는 85Å부터 168Å까지 분포를, 그리고 종격동의 악성 신경초종에서는 67Å부터 112Å까지의 다양한 크기의 분포를 나타냈다(Table 6).

Table 6. Size of intermediate filaments in tumor

Source	Range(Å)	MEAN(Å)	SD(Å)	Mean±SD(Å)
Brenner tumor	85-111	95	8	95± 8
Neurofibroma	81-130	106	12	106±12
Ganglion cell tumor	93-176	130	23	130±23
Adenocarcinoma	112-170	141	7	141± 7
Osteogenic sarcoma	85-168	138	25	138±25
Malignant schwannoma	67-112	91	11	91±11

고 찰

포유동물의 세포질에는 세포형태와 운동성의 유지, 세포막 단백질의 이동조절, 염색체와 세포돌기의 운동, 세포질 분열, 세포증식에 관여하는 단백질로 구성된 사상체가 존재하는 것으로 알려져 있는데(Schlegel *et al.*, 1980a, b), 이들은 그 크기에 따라 microtubule(200-250 Å), thin actin filament(60-80 Å), thick myosin filament(150 Å), 그리고 다양한 중간형 사상체(100 Å)로 구분되며 세포종류에 따라 중간형 사상체는 다시 상피세포에서 발견되며 상피성 유래의 세포인 keratin(tono) filament, 평활근, 골격근, 심근 세포에서 주로 발견되는 desmin filament, 간질세포에서 발견되며 간질유래의 세포인 vimentin filament, 뉴론(neurons)에서 발견되는 neuro filament, 그리고 모든 형태의 신경교(glial) 세포에서 발견되는 glial filament로 분류된다.

Keratin filament(Franke *et al.*, 1978a, b ; Franke *et al.*, 1979a, b ; Sun and Green, 1978 ; Sun *et al.*, 1979 ; Elias, 1980 ; Viac *et al.*, 1980 ; Copper *et al.*, 1985)는 대략 직경 80 Å의 사선형태(filamentous)와 관련되어 있는 세포질내의 α-fibrous 단백질 group이다. 그들은 포유동물 표피의 살아있는 세포층 즉 내부에서 활발히 합성되어 지는데, 주요한 생성물 판별을 설명해 준다. Keratin은 표면세포의 주요한 판별이 있는 것 외에도 편평상피세포에 어떤 다른 층을 이루어 나타난다. 그러나 그들은 실질세포 근원 세포로부터는 보이지 않는다. Keratin은 MW 47,000에서 58,000으로 현재까지 19종의 polypeptide가 증명되어있는데, polypeptide중 분자량이 가장 작은 45kd와 52kd keratin은 간세포나 소장, 대장등의 단순 상피에만 존재하므로 단순상피의 표지자로 이용되고, keratin 50kd와 58kd는 자궁 경부,

식도, 표피등 모든 중층 상피의 표지자로 이용될 수 있다. Keratin 51kd와 59kd는 식도, 자궁 경부, 혀등 일부의 중층 상피에서 발견되고 keratin 55kd와 64kd는 각막에 존재하는 것으로 알려져 있다. 가장 분자량이 큰 56.5kd와 65에서 67kd의 keratin은 각화가 일어난 표피세포에서만 증명되기 때문에 각화의 표지로 사용된다.

Desmin filament(Lazarides and Hubbard, 1976 ; Elias, 1980)는 α-actin과 actin이외에 세번째 protein으로 Z line에서 국한되어 있으며(Granger and Lazarides, 1979), 크기는 대략 100 Å정도이다. 무게는 50,000-55,000 MW protein으로 구성되어 있다. 근육세포 속에는 cytoskeleton(세포골격)이 있는데 그것은 구성요소인 myofibril을 적소에 유지시켜 주고 있다고 여겨져 왔다. Muscle fiber's 장축을 횡단하는 구조적인 요소들이 모습은 Z disk, M lines의 영향에 따라 그리고 fibre를 가로질러 myofibril을 이웃하고 있는 sarcomeric unit에 의해서 암시되어진다. 초기에 근육에 대한 광학 현미경과 전자현미경에 의한 관찰이 있는 이후에 fibrous element는 성분은 그들의 Z, N, 그리고 M line에 myofibril를 측면으로 연결하기 위해 그리고 전체 fibre의 surface membrane에 그들을 연결하기 위해 관찰되어졌으나, 최근에는 그들이 단지 중간형 사상체로만 특징지어지게 되었다. 사상체는 골격근, 심근 그리고 횡문근 세포에 특징적으로 나타난다. 사상체가 어린세포와 모든 세가지 근육형태에서 나타나는 동안에 그들은 adult smooth muscle에 풍부하다.

Vimentin(Bennett *et al.*, 1978 ; Franke *et al.*, 1978a, b ; Franke *et al.*, 1979a, b)은 실질세포 또는 비실질의 다양한 세포에서 나타나며, 세포질내에서 매우 불용성인 구조적인 기능을 가지고 있다. Vimentin은 중간형 사상체의 또다른 계층들의 몇몇 주요한

subunit와 함께 공존하며, 평균 직경은 100 Å이고, 무게는 52,000MW로 병아리 배아의 fibroblast에서 중간형 사상체의 주요한 subunit로써 최초로 특징지워졌으며, 간질세포에서 발견되며 간질유래의 세포이다.

따라서 본 연구결과 정상대조군은 정상상피세포의 경우 전자현미경 검색을 통하여 얻어진 크기는 자궁경부와 피부편평상피의 경우 $118 \pm 11 \text{ Å}$ 이었고, 선상피의 경우는 $114 \pm 6 \text{ Å}$ 이었다. 이들은 면역조직화학적 검색에서는 자궁경부와 위장관부의 상피세포 전층에서 또 피부의 기저층에서 각질층에 이르는 표피의 전층에 keratin 양성 반응을 나타냈다. 실질세포의 경우 중간형 사상체 크기는 자궁근층 $118 \pm 9 \text{ Å}$, 신경 $121 \pm 11 \text{ Å}$, 대퇴부 횡문근 $131 \pm 24 \text{ Å}$ 이었으며, 면역조직화학적 검색에서 평활근, 골격근, desmin, vimentin 모두 양성 반응이 나타났으며, keratin은 음성이었다. 실질세포의 신경에서 keratin, desmin은 음성이었고, vimentin은 약양성으로 나타났다.

종양조직군에서 실질세포 종양인 신경절종의 중간형 사상체의 크기는 $130 \pm 23 \text{ Å}$ 이었으며, keratin은 음성이었고, desmin, vimentin에 약양성 소견을 나타냈다. 악성상피 종양인 위의 선암종의 경우 중간형 사상체의 크기는 $141 \pm 7 \text{ Å}$ 이었으며, 면역조직화학적 검색에서 keratin 양성반응이 나타났고, desmin, vimentin 둘 다 음성으로 나타났다.

실질세포 양성종양인 신경섬유종의 경우 중간형 사상체의 크기는 $106 \pm 12 \text{ Å}$ 이었고, 면역조직화학적 검색에서 keratin에 음성, desmin, vimentin에 양성으로 나타났다. 상피세포 양성종양중 Brenner씨 종양의 경우 중간형 사상체의 크기는 $95 \pm 8 \text{ Å}$ 이었고, 면역조직화학적 검색에서 keratin 양성반응이 나타났고, desmin, vimentin 모두 음성으로 나타났다.

악성 실질세포종양중 경골의 골육종의 중간형 사상체의 크기는 $138 \pm 25 \text{ Å}$ 이었고, 면역조직화학적 검색에서 keratin, desmin 둘 다 음성으로 나타났으며, vimentin의 경우 약양성으로 나타났다. 또 종격동의 악성신경초종의 중간형 사상체의 크기는 $91 \pm 11 \text{ Å}$ 이었고, 면역조직화학적 검색에서 keratin 음성으로 나타났으며, desmin, vimentin 둘 다 약양성으로 나타났다. 본 연구에서 측정된 keratin, desmin, vimentin의 크기는 모두 $118 \pm 9 \text{ Å}$ 부터 $135 \pm 18 \text{ Å}$ 까지로 측정되어 지금까지 알려져 있는 중간형 사상체들의 평균치보다 크게 나타났다.

따라서 분화가 불량한 종양의 경우 그 종양의 기원을 밝히기가 어려운 경우를 흔히 접하게 되는데, 본 연구결과 그 세포 고유의 중간형 사상체는 종양으로 전환할지라도 그 양에 있어서 다소의 변이를 보이기는 하나, 고유하게 발현하는 특징이 있음이 밝혀졌으므로, 미분화 종양의 기원을 동정하는데 큰 도움을 줄 것으로 사료되며, 중간형 사상체의 양에 대한 연구결과 그 분화도에 비례하며, 중간형 사상체가 발현되는 점으로 보아, 중간형 사상체에 대한 면역조직화학적 염색을 통해 그 분화정도를 간접적으로 측정할 수 있으리라 생각된다.

결 론

중간형 사상체는 세포골격을 이루는 세포성분의 하나로써 세포의 형태와 운동성의 유지, 세포막 이동조절, 염색체와 세포돌기 운동, 세포질 분열, 세포증식에 관여하는 아주 중요한 역할을 담당하고 있으며, 종류에는 keratin, desmin, vimentin, neurofilament, glial filament의 다섯가지 유형이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 세포의 고유성질에 따라 그 종류에 차이가 있다. 이러한 중간형 사상체는 세포가 종양으로 전환시에도 세포질내에서 형성되고 있으므로 이

들을 세포내에서 증명함으로써 종양의 진단 시에 큰 도움이 될 것이라 생각되며, 특히 분화가 좋지 않은 종양의 감별에서는 더욱 중요하다고 판단된다. 이에 저자는 1988년 6월부터 1990년 6월까지 조선대학교 부속 병원에서 진단 및 치료목적으로 절제된 상피성 및 비상피성 종양에서 면역화학적 검색과 전자현미경적 검색이 가능했던 83가지들을 대상으로 연구한 결과는 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 종양진단에 있어서 각각의 중간형 사상체를 면역조직화학적으로 증명함으로써 상피성 종양과 비상피성 종양을 감별할 수 있었다.

2. 전자현미경적으로는 이들 중간형 사상체의 크기나 모양이 종류에 따라 큰 차이는 없었으나, 다른 세포 성분과 비교함으로써 상피세포종양과 비상피세포종양의 감별이 가능하였다.

그러므로 면역조직화학적 검색과 전자현미경적 검색은 상피세포종양과 비상피세포종양의 감별에 아주 유용한 검사방법이며, 특히 분화가 좋지 않은 종양의 그 기원을 동정하는데, 매우 중요하다고 사료된다.

References

Altmanberger, M., M. Osborn, A. Schauer and K. Weber. 1981. Antibodies to different intermediate filament proteins. Lab. Invest. 45, 427-452.

Bennet, G. S., S. A. Fellini, J. M. Cropp, T. T. Otto, T. Bryan and H. Holtzer. 1978. Differences among 100 Å filament subunits from different cell types. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 4364-4425.

Cooper, D., A. Schermer and T. T. Sun. 1985. Biology of disease. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins : strate-

gies, applications, and limitations. Lab. Invest. 52, 243-305.

Elias, L. 1980. Intermediate filaments as mechanical integratous of cellular space. Nature 283, 249-314.

Franke, W. W., E. Schmid, M. Osborn and K. Weber. 1978a, Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5034-5080.

Franke, W. W., K. Weber, M. Osborn, E. Schmid and C. Freudenstein. 1978b. Antibody to prekeratin : Decoration of tonofilament-like arrays in various cells of epithelial character. Exp. Cell Res. 116, 429-439.

Franke, W. W., E. Schnid, K. Weber and M. Osborn. 1979a. Hela cells contain intermediate-sized filaments of prekeratin type. Exp. Cell Res. 118, 95-120.

Franke, W. W., E. Schnid, S. Winter, M. Osborn and K. Weber. 1979b. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. Exp. Cell Res. 123, 25-37.

Giulio, G., K. Yusuf, G. Philippe and W. F. Werner. 1981. Immunochemical identification of intermediate-sized filaments human neoplastic cells. Am. J. Pathol. 104, 206-219.

Granger, B. L. and E. Lazarides. 1979. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibrol Z disk. Cell 18, 1053-1077.

Hynes, R. O. and A. I. Destree. 1978. 100nm filaments in normal and transformed cells. Cell 13, 151-182.

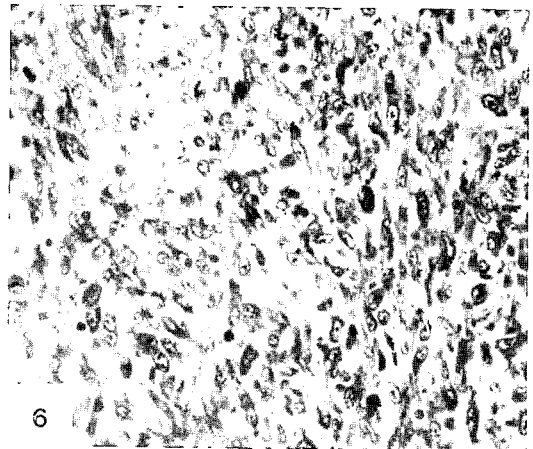
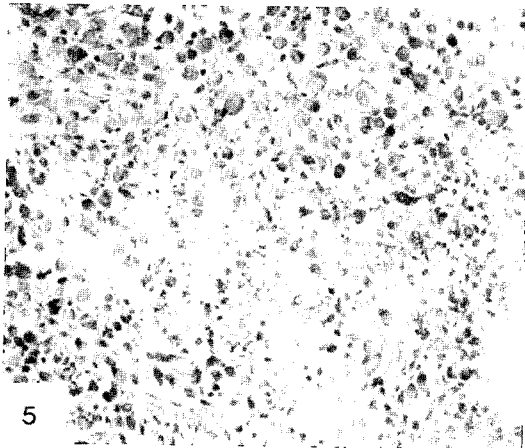
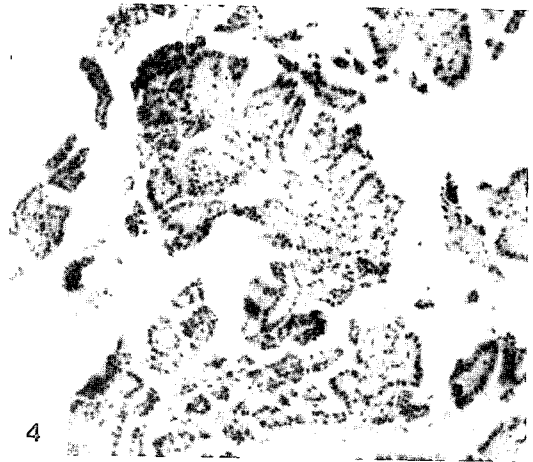
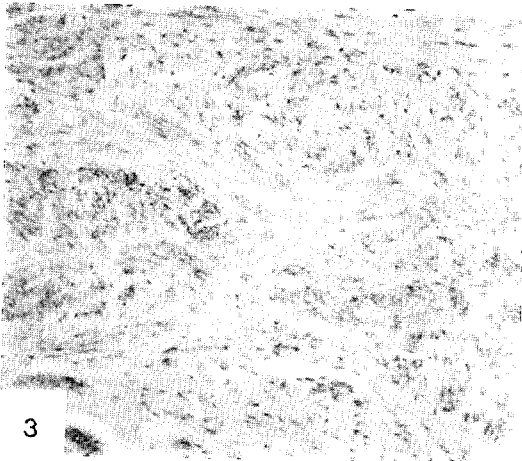
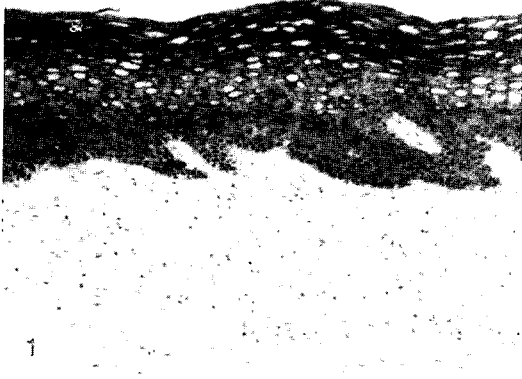
Lazarides, E. and B. D. Hubbard. 1976.

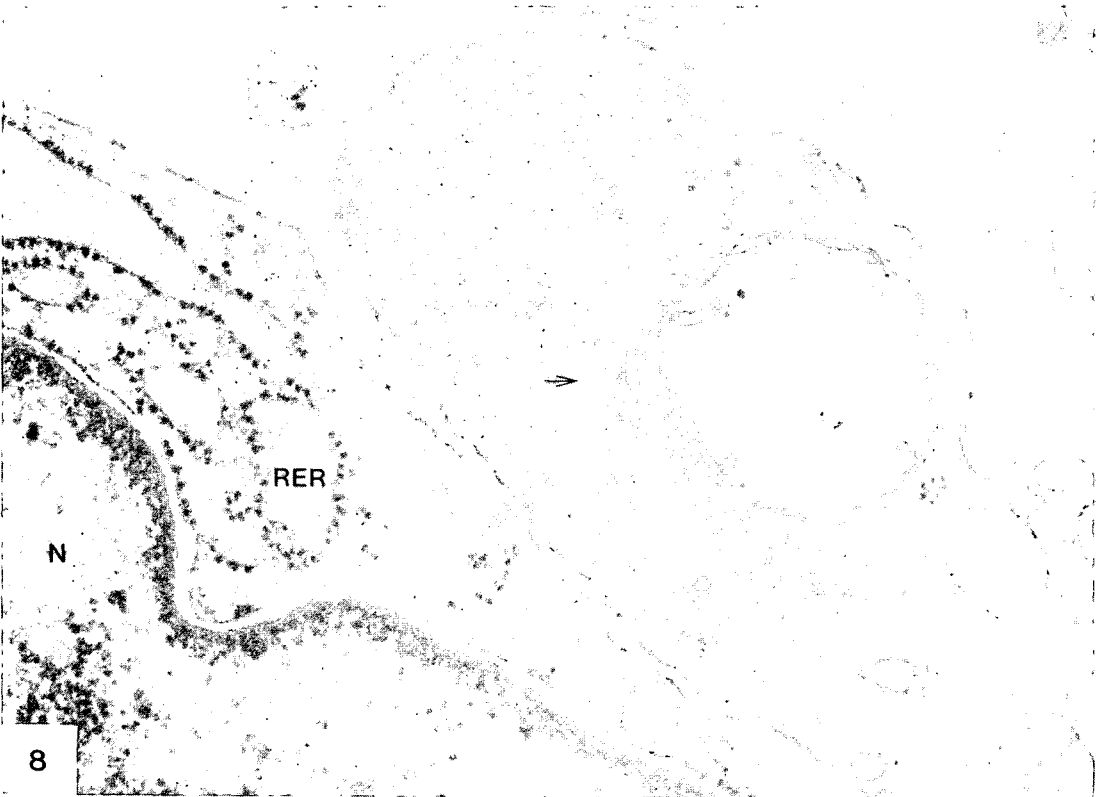
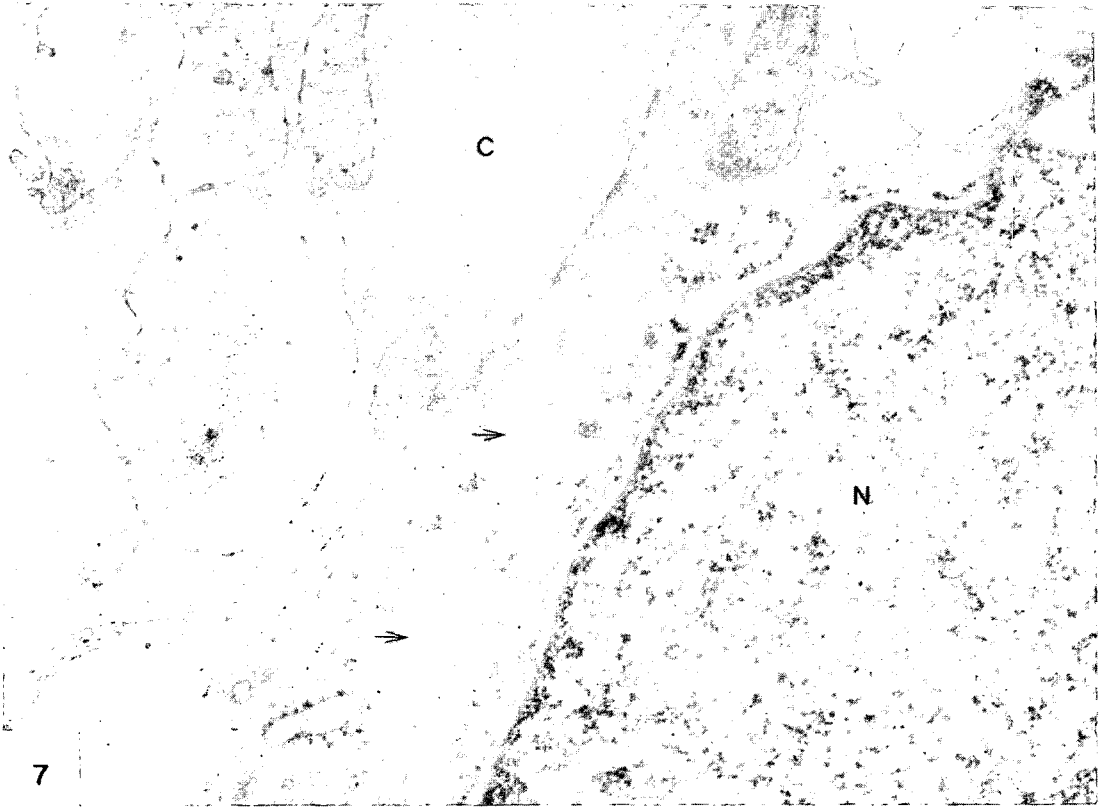
- Immunological characterization of the subunit of 100 Å filaments from muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 4344-4380.
- Liem, R. K. H., S. H. Yen, G. D. Salomon and M. L. Shelanski. 1978. Intermediate filament in nervous tissues. *J. Cell Biol.* 79, 637-652.
- Mary, O. and W. Klaus. 1983. Biology of disease, tumor diagnosis by intermediate filament typing. *Lab. Invest.* 48, 372-400.
- McBeath, E. and K. Fujiwara. 1989. Coalignment of microtubules, cytokeratin intermediate filaments, and collagen fibrils in a collagen-secreting cell system. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 510-521.
- Osborn, M., W. W. Franke and K. Weber. 1977. The visualization of a system of 7-10nm thick filaments in cultured cells of an epitheloid line (PtK₂) by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 2490-2503.
- Ramaekers, F., J. Puts, O. Moesker, A. Kant, P. Jap and P. Vooijs. 1983. Demonstration of keratin in human adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 111, 213-223.
- Reynold, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208-229.
- Rueger, D. C., J. S. Huston, D. Dahl and A. Bignami. 1979. Formation of the 100 Å filaments from purified glial fibrillary acidic proteins in vitro. *J. Mol. Biol.* 135, 53-72.
- Schachner, M., C. Smith and G. Schoemaker. 1978. Immunological distinction between neurofilament and glial fibrillary acidic proteins by mouse antisera and their immunohistological characterization. *Dev. Neurosci.* 11, 1-19.
- Schlaepfer, W. W. and L. A. Freeman. 1978. Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord. *J. Cell Biol.* 78, 653-664.
- Schlegel, R., S. B. Schlegel and G. S. Pinkus. 1980a. Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab. Invest.* 42, 91-103.
- Schlegel, R., S. B. Schlegel, J. A. McLeod and G. S. Pinkus. 1980b. Immuno peroxidase localization of keratin in human neoplasms. *Am. J. Pathol.* 101, 41-72.
- Schurch, W., O. Skalli, R. Lagace, T. A. Seemayer and G. Gabbiani. 1990. Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft-tissue tumor differentiation and origin. III. Hemangiopericytomas and glomus tumors. *Am. J. Pathol.* 136, 771-779.
- Sun, T. T., C. Shin and H. Green. 1979. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 2813-2832.
- Sun, T. T. and H. Green. 1978. Immuno fluorescence staining keratin fibers in cultured cells. *Cell* 14, 469-493.
- Viac, J., M. J. Staquet, J. Thivolet and C. Goujon. 1980. Experimental production of antibodies against stratum corneum keratin polypeptides. *Arch. Dermatol. Res.* 267, 179-202.
- Walts, A. E., J. W. Said and S. B. Schlegel. 1983. Keratin and carcinoembryonic antigen in exfoliated mesothelial and malignant cells: An immunoperoxidase study. *Am. J. Clin. Pathol.* 80, 671-693.
- Yen, S. H. and K. L. Fields. 1981. Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of nervous

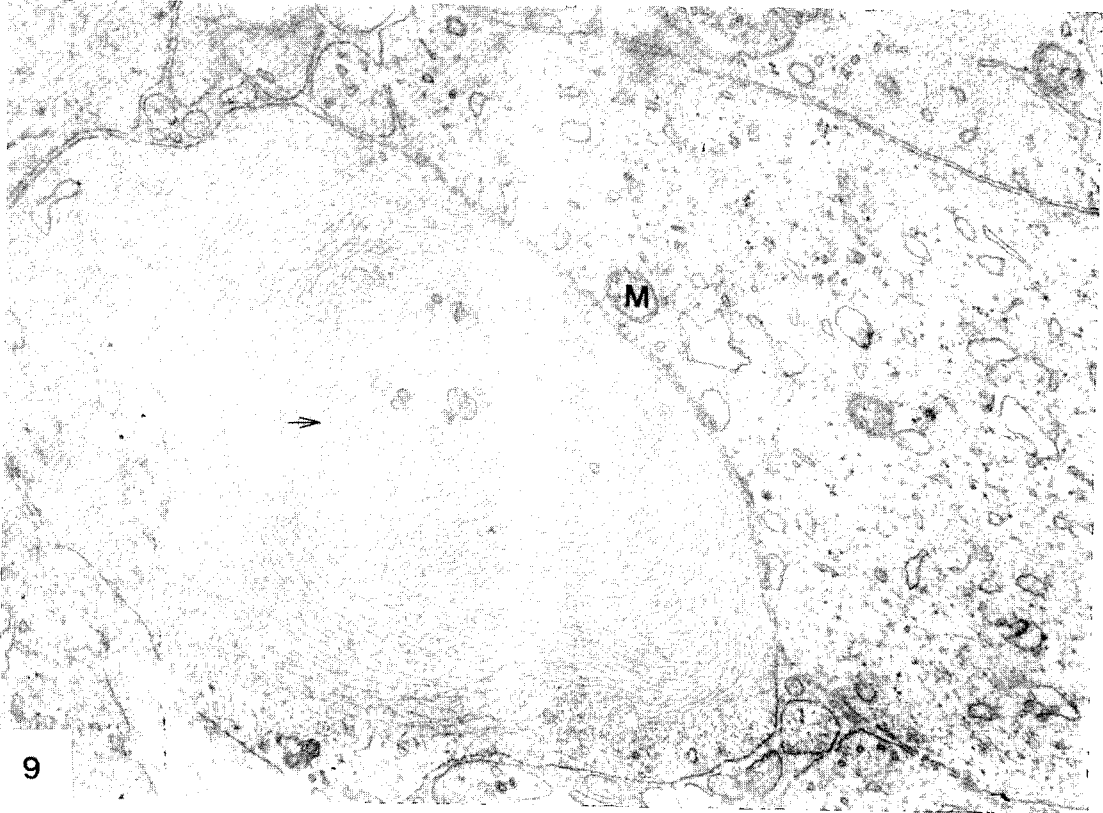
system. *J. Cell Biol.* 88, 115-132.

Figure Legends

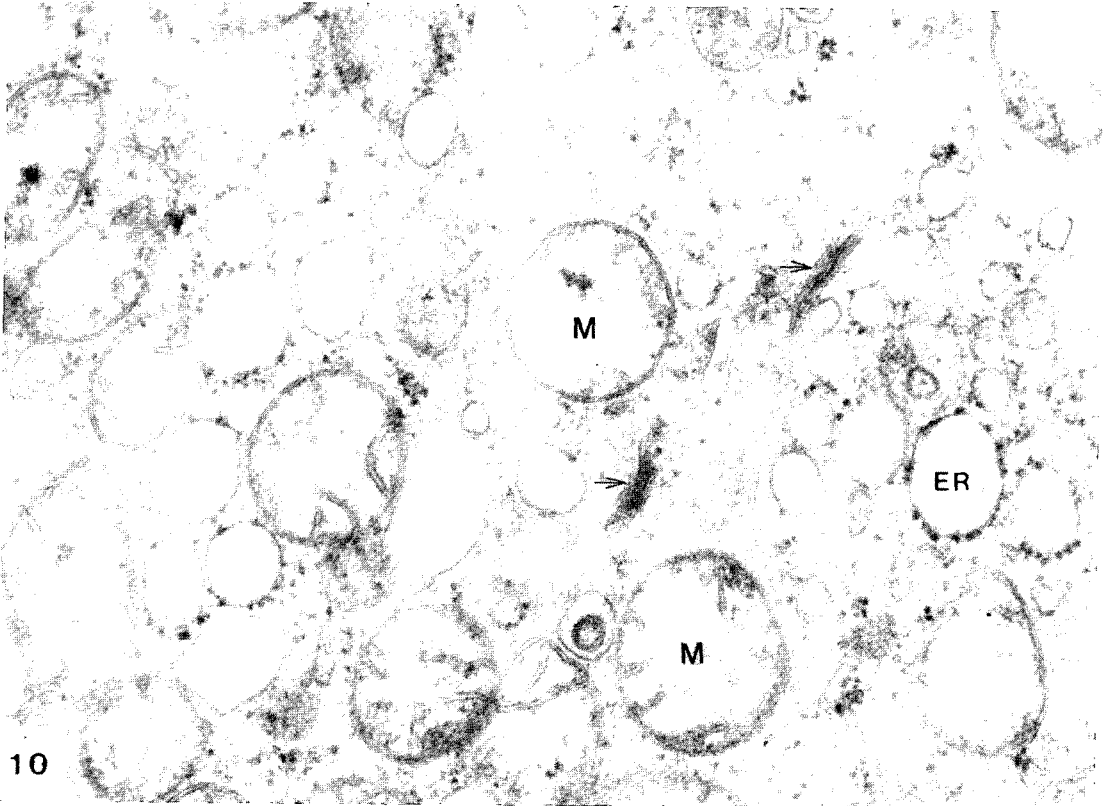
- Fig. 1.** Positive staining for cytokeratin in uterine cervix(ABC method, $\times 100$).
- Fig. 2.** Positive staining for desmin in smooth muscle(ABC method, $\times 100$).
- Fig. 3.** Positive staining for vimentin in uterine smooth muscle(ABC method, $\times 100$).
- Fig. 4.** Positive staining for cytokeratin in choroid plexus papilloma(ABC method, $\times 100$).
- Fig. 5.** Positive staining for desmin in rhabdomyosarcoma(ABC method, $\times 100$).
- Fig. 6.** Strong positive staining for vimentin in synovial sarcoma(ABC method, $\times 100$)
- Fig. 7.** Ultrastructural features of Brenner tumor of ovary. The tumor cells were enclosed with abundant collagen fibers(C) and had a round nucleus(N), dilated endoplasmic reticulum and abundant intermediate filaments.(Uranyl acetate and lead citrate, original magnification, $\times 16,000$).
- Fig. 8.** Ultrastructural features of neurofibroma. The tumor cells have a indented elongated nucleus(N), rough endoplasmic reticulum(RER), and aggregated intermediate filaments(arrow).(Uranyl acetate and lead citrate, original magnification, $\times 18,000$).
- Fig. 9.** Ultrastructural features of ganglion cell tumor. The tumor cells were abundant cytoplasm bearing with whorled intermediate filaments, dilated endoplasmic reticulum and few mitochondria(M). (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification, $\times 10,000$).
- Fig. 10.** Ultrastructural features of adenocarcinoma of stomach. The tumor cells showing numerous enlarged mitochondria(M), dilated endoplasmic reticulum(ER) and dense tonofilament(arrow). (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification $\times 16,000$)
- Fig. 11.** Ultrastructural features of osteosarcoma. The tumor cells showing dilated and coalescent endoplasmic reticulum(ER) and few tonofilaments. (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification, $\times 20,000$).
- Fig. 12.** Ultrastructural features of malignant schwannoma. Numerous cytoplasmic process bearing rough endoplasmic reticulum(RER), enlarged mitochondria(M), and intermediate filaments. (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification, $\times 16,000$).







9



10

