

폐암 조직에서의 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 발현에 관한 연구

충남대학교 의과대학 내과학교실

김선영 · 이경주 · 홍석철 · 한표성
이종진 · 조해정 · 김주옥

= Abstract =

Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Lung Cancer

Sun Young Kim, M.D., Kyung Joo Lee, M.D., Suk Chul Hong, M.D., Pyo Sung Han, M.D.

Jong Jin Lee, M.D., Hae Jung Cho, M.D. and Ju Ock Kim, M.D.

Department of Internal Medicine, Chungnam National University, School of Medicine, Daejeon, Korea

Background: Since an important component of carcinogenesis is unregulated growth, many investigators have reported the methods to detect cell proliferation in tissues including PCNA. PCNA is a 36 Kd intranuclear polypeptide and plays a critical role in cell proliferation. Thus progressive dysregulation of proliferation during carcinogenesis can be directly visualized in the paraffin embedded tissue using immunohistochemistry for PCNA which has an advantage of simplicity and maintenance of tissue architecture. The heterogeneity of PCNA expression is known to be related with proliferating fraction, histologic grade, DNA ploidy, and susceptibility of anticancer drugs, etc. We analyzed the biologic significance of the expression of PCNA in lung cancer tissues.

Method: 43 lung cancer tissues, which were resected by surgery and were embedded in paraffin, were stained immunohistochemically by one hour MicroProbe System and the results were correlated with cell type, stage, site and survival.

Result:

- 1) Suamous cell type showed high positivity (89%) than in adenocarcinoma (54%).
- 2) No significant difference related to tumor stage was noticed.
- 3) No significant difference between primary site and metastatic site was noticed.
- 4) No significant difference in 12-month survival between positive group and negative group was noticed.

Conclusion: From this study, we concluded that immunohistochemistry for PCNA expression of routinely processed tissue is a simple technique for the assessment of proliferation in non-small cell lung cancer. Whether the labelling index has an independent prognostic value and deserves special attention in pathobiological evaluation in lung cancer remains to be investigated from large series with longer follow-up and to be correlated with multiple biological markers.

Key Words: Lung cancer, Proliferating cell nuclear antigen, Biologic marker

*본 논문은 1992년도 충남대학교병원 임상 연구비의 보조로 이루어 졌음.

서 론

세포 동태에 관한 제정보는 암세포의 조직학적 분류에 도움을 주고 암세포의 생물학적 성상을 이해하는데 기여하며 특히 암의 재발이나 예후에 관한 위험인자를 판별하는데 중요한 예견인자로서의 의미가 있다^{1,2)}. 이를 알아보기 위한 몇가지 방법 중에서 면역조직화학적 염색법이 최근에 각광 받고 있는데, 이는 flow cytometry 등과는 달리 세포 또는 조직 형태를 그대로 유지한 채로 시행할 수 있으며 그 방법 또한 간편하기 때문이다^{3,4)}. PCNA는 36 KD의 산성 핵단백질로서^{5,6)} 후기 G1 또는 S기에 생성이 증가한다고 알려져 있어 세포 증식성과 비례하게 되는데⁷⁻⁹⁾ 단클론성 항체를 이용하여 보편적 조직 보관법인, 파라핀에 포매된 조직에서 사용할 수 있는 장점이 있고 이에 의한 결과 또한 다른 방법에 의해 얻어진 것과 크게 다를 바 없다고 알려진 바 권장할 만한 방법이라 하겠다^{10,11)}. 이에 저자들은 이 방법을 이용하여 폐암 조직에서의 발현 양태를 조사하여 암의 세포형, 암의 병기 정도, 림프절전이 병소에서의 발현 여부 등과 비교 분석하여 폐암의 병태 생물학적 성상을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

폐암으로 진단받고 폐절제술로 적출되어 파라핀에 포매된 상태의 43예의 폐암 조직 절편을 사용하였다. 세포 유형별로는 편평상피암이 28예, 5예의 세기관지 폐포암을 포함한 선암이 14예, 대세포암이 1예이었으며, 병기별로는 1기가 18예, 2기가 15예, 3기가 10예이었다.

2. 방 법

면역조직화학 염색은 MicroProbe System (Biomed, Foster city, CA)을 이용한 1시간 염색법을 사용하였는데 요약하면 다음과 같다. 조직을 4 um의 두께로 슬라이드에 부치한 후 파라핀을 녹이기 위하여 Xylene과 HistoClear가 1 : 3으로 혼합된 용액에 60°C, 1분간 3번 씻은 후 실온에서 1분간 씻은 다음 순수 에탄올로 실온에서 4번 씻는다. 내재성 peroxidase를 억제하기 위하여 40°C에서 2분간 endo/bloker에 담근 다음 automation buffer로 씻고 1차 항체(PCNA, Dako, Carpenteria, CA)를 부치시켜 40°C에서 9분간 데운 후 buffer로 실온에서 2번 씻고 2차 항체(Biomed, Foster city, CA)를 부착시켜서 40°C에서 4분간 데운다. 그 다음 실온에서 buffer로 2번 씻고 avidin이 부착된 peroxidase reagent (Biomed, Foster city, CA)를 40°C에서 4분간 부치시킨 후 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)로 발색시키기 위한 chromogen kit (Biomed, Foster city, CA)로 40°C에서 10분씩 2번 데운 다음 증류수로 실온에서 씻는다. 조직의 세포핵은 hematoxyline 으로 대비염색한다.

3. 양성을 판정

매슬라이드를 광학 현미경으로 검색하여 5% 미만의 핵이 염색되었을 경우를 음성 반응으로, 25%까지는 1+, 50%까지는 2+, 75%까지는 3+, 75% 이상은 4+로 판별하였다.

결 과

1. 세포형에 따른 구분

총 43예의 조직 절편 중 편평상피암은 28예 중 25예

Table 1. PCNA Expression of Lung Cancer by Cell Type

PCNA positivity cell type	0	1	2	3	4	Total
Squamous	3	5	9	4	7	28
Adenoca.	7	2		1		14
Large cell		1				1

0 < 5%, 1 : 5-25%, 2 : 25-50%, 3 : 50-75%, 4 > 75%.

(89%), 선암은 17예 중 7예(54%)에서 양성 반응을 나타내었고, 대세포암은 1예로서 역시 양성이었다. 편평

상피암의 높은 양성율은 다른 세포형에 비해 통계학적으로 의미가 있으며($p < 0.05$), 같은 양성이라도 그 정도에 있어서도 50%이상의 핵이 염색되는 3+과 4+는 더욱 그렇다(Table 1). 대세포암 1예가 양성이나 1+로 약한 양성이며, 선암 중 세기관지폐포암의 경우 5예 중 2예가 양성이나 역시 1+의 약한 양성이었다(Fig. 1).

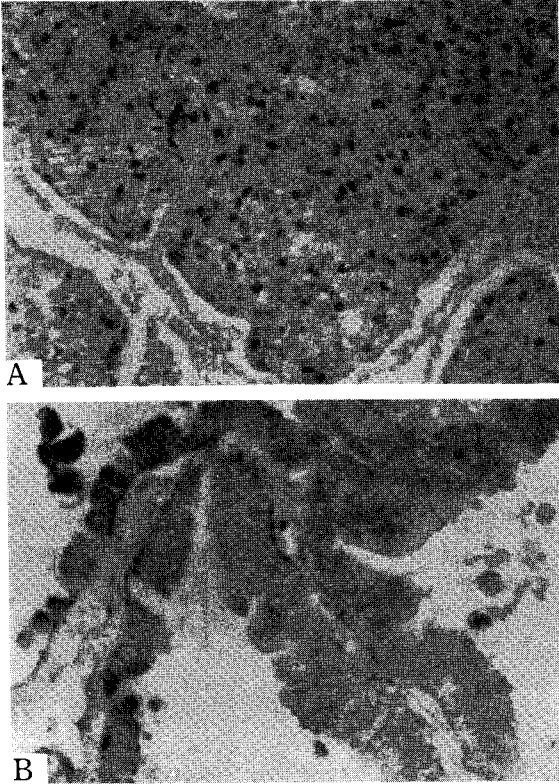


Fig. 1. Expression of monoclonal PCNA antibody applied to a paraffin section. (A) Squamous cell carcinoma, (B) Adenocarcinoma

2. 병기에 따른 구분

Table 2에서 보는 바와 같이 1기보다 2기, 3기에서 양성율은 높으나 통계적 의미는 없었다.

3. 병소에 따른 구분

전체 43예에서 원발암 부위의 양성율은 33예(77%)이었고, 림프절 전이 병소에서의 양성율은 13예 중 8예(62%)로서 큰차이는 없으나, 전이 병소를 가진 13예에서 원발 부위와 전이병소를 비교하면 각각 12예(92%)와 8예(62%)로 원발 부위에서 양성율이 높으며, 전이 병소를 가진 원발 부위와 전이 병소를 가지지 않은 원발 부위의 양성율은 각각 92%와 70%로서 전이 병소를 가진 원발 부위에서 높은 양성율을 보였다. 또한 전이 림프절 중 N1과 N2의 양성율은 각각 50%와 67%로서 큰 차이는 없으나 N2 병소에서 보다 강한 양성을 띠는 경향이 있다(Table 3).

4. 생존기간에 따른 구분

진단 후 관찰 기간이 짧아 모든 환자에서의 생존 기간

Table 2. PCNA Expression of Lung Cancer by Stage

stage	PCNA positivity	0	1	2	3	4	Total
I		7	3	5	1	2	18
II		1	5	4	1	4	15
III		2	2	2	2	2	10

Table 3. PCNA Expression of Lung Cancer by Site

site	PCNA positivity	0	1	2	3	4	Total
Primary		10	10	11	4	8	43
Metastatic		1	5	4	1	4	13
	N1	4	3	1			8
	N2	2	1	1	1	1	6

분석은 아직 이르나 우선 12개월 생존율로 비교할 때 편평상피암과 선암 모두에서 발현 양태에 따른 생존율의 차이는 없었다.

고 안

폐암을 분류할 때 광학 현미경을 사용하여 세포형 및 분화정도를 판정하는데 이것만으로는 다양한 암세포의 생물학적 성상을 잘 이해할 수 없으며 임상적 연관성을 찾는 데도 제한점이 많으므로¹²⁾ 요즘은 각종 생물학적 지표를 이용하여 암의 병태생리학적 변화를 이해하고 예후인자로서의 가능성을 제시하고자 하는 시도들이 이루어지고 있다. 이들중에서 세포동태(cell kinetics)에 대한 연구 특히 세포 주기 및 세포 증식에 관한 방법들 중 flow cytometry를 이용한 DNA의 배수성 및 증식세포 비율의 검증이 예후인자로서 의미 있다고 보고되어지고 있으며^{1,2,13-15)}, 또한 면역화학염색법을 사용한 Ki67 이나 PCNA의 검색도 같은 의미가 있다고 보고되는데 Ki67은 염색 조건상 동결 절편에만 가능하나 PCNA는 통상적 조직보관법인 파라핀 포매 절편에서 가능하기 때문에 비교적 간단하고 신속한 방법이며, 세포와 조직형태를 그대로 유지한다는 점에서 Flow Cytometry 와는 또다른 장점이 된다¹⁶⁾.

PCNA는 Miyachi등⁵⁾에 의해서 전신성 낭창성 흉반 환자의 혈장에서 발견되는 자가항체로서 핵단백질을 발견하는데 사용되었으며, 그후 Bravo와 Celis에 의해서 36 KD의 단백질로 밝혀 졌고¹⁷⁾ DNA polymerase delta의 보조적 단백질로서 DNA 합성과 수선에 관계하여 세포증식에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다^{18-20,21)}. Bravo 등의 연구 결과에 의하면 PCNA는 2 가지 종류가 있는데 하나는 복제가 일어나는 곳에 존재하여 S기에 특이한 것과 다른 하나는 핵질 전체에 퍼져 있어 S기에 특이하지 않은 것으로서 염색상으로는 결정성과 미만성으로 나타나는데 본 연구에서도 그 경향은 관찰되었으나 명확치는 않았다^{8,22)}.

일반적으로 PCNA의 발현은 세포주기에 따라 다른데 G1 기에는 미량이 존재하나 서서히 증가하여 S기에 최고치에 달하고 G2기에 서서히 감소하는 것으로 알려져 있으며^{8,9)} 또한 유사분열 정도 및 종양의 분화 정도와 관계 있다고 보고되었다^{10,23)}. DNA의 배수성이 각종 암의 예후인자로서 고려되고 있고 특히 폐암에선 편평상피암

의 경우 이수배수성이 생존율과 역상관계가 있다고 알려져 있다¹⁴⁾. Carey 등은 PCNA의 발현을 검사하여 flow cytometry를 이용한 DNA 배수성과의 상관 관계를 비교한 결과 PCNA를 이용한 것이 더욱 자세한 정보를 제공한다고 보고하였고²⁴⁾, Theuissen 등은 PCNA 발현율과 세포분열 지수와는 비슷한 양상을 나타내므로 PCNA를 이용하여 증식성 세포의 검색이 가능하다고 보고하여 PCNA 발현율을 사용한 예후인자로서의 가능성을 제시하였고 세포형별로는 편평상피암에서 선암보다 발현율이 높다고 보고하였다¹⁶⁾. 또 Lee 등은 PCNA가 증식세포의 지표로서 매우 유용하며 폐암에서의 조직의 암화 진행 정도와 PCNA 양성세포 비율은 역상관 관계가 있음을 보고하여 예후인자로서의 의미뿐 아니라 암화 과정상의 중간 종말지표로 사용 가능함을 제시하였다²⁵⁾. 또 Vilor 등은 PCNA의 강양성은 soft tissue sarcoma 에서 전이가 잘되는 것과 관계된다고 보고 하였으며²⁶⁾, Thomas 등은 난소암에서 borderline 기나 1기가 진행기에 비해서 양성율이 월등히 낮다고 보고하였다²⁷⁾. Giglio 등은 AML 환자에서 PCNA의 강양성은 화학요법의 내성과 관계된다는 견해를 나타내었고²⁸⁾ Parman 등은 대, 직장암에서 PCNA와 p53 양성율은 높은 상관관계를 나타낸다고 보고하였다²⁹⁾. 그러므로 PCNA를 검색하는 것은 각종암의 생물학적 성상을 보다 잘 이해하여 치료 및 예후 판정에 자료로 삼으며 이미 알려진 각종 지표와의 상관관계를 연구할 필요성을 제공한다 하겠다.

본 연구에서도 편평상피암에서 선암에서보다 월등히 높은 양성율 및 양성정도를 나타내었는데 이런 차이는 전자의 doubling time이 87일 정도이고 후자는 134일 정도인 것에서 증식성 세포의 비율이 차이가 나타나게 되는 점에 기인한다고 생각된다¹⁶⁾. 예후 인자로서의 가능성을 알아보기 위하여 각 병기에서의 양성율을 비교한 바 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으나 강양성을 나타내는 경우에는 병기가 진행할수록 양성율이 높은 경향을 보였다. 또한 실질적인 예후인자로서의 가능성으로서 본 연구에서는 12개월 생존율로 볼 때 의미없는 것으로 나타났으나 추후 더 오랜 관찰기간을 거쳐 생존기간 등과 비교 검토되어야 할 것으로 사료되며 또한 수술한 환자뿐 아니라 다른 치료를 받은 환자에서의 검색도 시행하여 재검토되어야 하리라 생각된다. 동일한 환자에서의 원발병소와 전이병소에서의 양성율은 원발병소

가 높으나 통계적 의미는 없었고 전이병소라도 N1과 N2의 비교는 큰 차이가 없었으나 강양성은 N2에서만 나타났고, 동일한 환자에서도 원발병소와 N1, N2 임파절에서의 PCNA 성상이 다 다르게 나타나는바 향후 다른 제 지표들과 비교 검토하여 그 의의를 규명할 필요가 있을 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경 : 암화 과정상의 한 중요한 요소는 조절되지 않는 세포의 증식인바 그 증식성을 알아볼 수 있는 많은 방법들이 소개되었는데 그중 한 방법이 소위 증식표지인 PCNA를 검색해 보는 것이다. PCNA는 36 KD의 핵단백질로서 세포의 증식과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 암세포에선 그 발현성이 잘 조절되지 않으므로 이를 이용하여 암세포의 생물학적 성상을 보다 잘 이해하려는 연구들이 시도되었다. 지금까지 알려진 바로는 암세포에서의 PCNA 발현율은 암세포중 증식세포 비율뿐 아니라 암세포의 분화정도, DNA의 배수성, 항암제에 대한 감수성 등과 관련된다고 보고되었다. 또한 그 방법의 단순성 및 신속성과 아울러 통상적 조직 보관법인 파라핀 포매 절편을 이용하므로써 조직형태를 그대로 유지한다는 장점이 있다. 이에 저자들은 폐암조직에서 PCNA 발현양상을 조사 분석하여 그 병태 생물학적 의의를 알아보고자 하였다.

방법 : 연구 대상은 폐암으로 진단받고 폐절제술로 적출되어 파라핀에 포매된 43예의 폐암조직을 사용하여, 면역조직화학 염색법으로 PCNA 발현을 조사하여 암세포형, 병기, 병소 종류, 생존율 등과 어떤 관계가 있는지 분석하였다.

결과 :

- 1) 세포형에 따른 구분 : 편평상피암은 89%, 선암은 54%의 양성율을 나타내어 세포형에 따른 차이를 보였고 대세포암은 1예인데 양성이었다.
- 2) 병기에 따른 구분 : 병기가 진행할수록 즉 1기에서 보다 2, 3기에서 양성율은 높은 경향을 보이나 통계적 의미는 없었다.
- 3) 병소에 따른 구분 : 원발암 부위와 전이 임파절 부위에서의 양성율은 각각 77%와 62%로서 큰 차이가 없었고, 전이 병소를 가진 13예에서 두 부위간의 양성율은 92%와 62%로서 원발 부위에서 높으며, 전이 병소를 가

진 원발 부위에서의 양성율이(92%) 전이 병소가 없는 원발 부위의 양성율보다(70%) 높았다.

4) 생존 기간에 따른 구분 : 12개월 생존율을 비교할 때 양성율에 따른 차이는 없었다.

결론 : 본 연구 결과 폐암조직에서의 PCNA의 발현은 편평상피암에서 보다 높으며, 전이 병소를 가진 원발 부위에서 높게 나타났으나, 병기 및 생존율 등에서는 차이가 나지 않았으므로 향후 더 많은 예수에 대한 검증, 여러 다른 치료를 받은 경우에서의 검증, 더 오랜 기간의 생존율 관찰 및 다른 생물학적 지표와의 비교 검토가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Hiroshi I, Hiroshi M, Toru S, Hitoshi H, Masato H, Kazuaki I, Shigetaka M, Yoshikazu K: Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in non-small cell lung cancer. *Cancer* **66**:733, 1990
- 2) Andrew EF, Gerad AS, Constantine G, Daniel JL, Julie H, Stuart DF: Prognostic significance of tumor proliferative fraction and DNA content in stage I non-small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* **146**:707, 1992
- 3) Lippman SM, Lee JS, Peters E, Ro JY, Wargovich M, Morice R, Hittelman WN, Hong W: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) correlates with histologic stage of bronchial carcinogenesis. *Proc Am Assoc Cancer Res* **31**:168, 1990
- 4) Lee JS, Ro JY, Sahin A, Hong WK, Hittelman WN: Quantitation of proliferating cell fraction (PCF) in non-small cell lung cancer using immunostaining for PCNA. *Proc Am Assoc Cancer Res* **31**:22, 1990
- 5) Miyachi K, Frizler MJ, Tan EM: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* **121**:2228, 1978
- 6) Bravo R, Frank R, Brundell PA, Bravo HM: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature (Lond.)* **326**:515, 1987
- 7) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/Cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. *Am J Pathol* **134**:733, 1989
- 8) 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3262, 1985
- 9) 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* **166**:209, 1986
 - 10) Robbins BA, dela Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM: Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* **111**:841, 1987
 - 11) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnese DM, Gillette CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression on some neoplasms. *J Pathol* **162**:285, 1990
 - 12) Greenberg SD, Fraire AE, Kiner BM, Johnson EH: Tumor cell types versus staging in the prognosis of carcinoma of the lung. *Pathol Annu* **22**:387, 1987
 - 13) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA: Methods for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* **31**:1333, 1983
 - 14) Sahin A, Ro JY, Adel Ke, Lee JS, Alberto GA, Kim BS, Hong WK: Flow cytometric analysis of DNA content of the non-small cell lung cancer. *Cancer* **65**: 1391, 1990
 - 15) Camille H, Raid A, Edward B, Francois P, Joseph A: DNA alterations at protooncogene loci and their clinical significance in operable non-small cell lung cancer. *Cancer* **66**:733, 1990
 - 16) Theunissen PHMH, Leers MGG, Bollen ECM: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* **20**:251, 1992
 - 17) Bravo R, Celis JE: A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* **84**:795, 1980
 - 18) Prelich G, Tan C-K, Kostura M, Mathew MB, So AG, Downey KM, Stillman B: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* **326**:517, 1987
 - 19) So AG, Downey KM: Mammalian DNA polymerase alpha and delta: Current status in DNA replication. *Biochemistry* **27**:4591, 1988
 - 20) Nishida C, Reinhard P, Linn S: DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase delta. *J Biol Chem* **263**:501, 1988
 - 21) Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R: Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science (Washington DC)* **240**:1544, 1988
 - 22) Bravo R, Macdonald-Bravo H: Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: Association with DNA replication sites. *J Cell Biol* **105**:1549, 1987
 - 23) Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijer R, Velde CJH, Corneliss CJ: Cell cycle-related staining pattern of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am J Pathol* **138**:1165, 1991
 - 24) Carey FA, Fabbroni GF, Lamb D: Expression of proliferating cell nuclear antigen in lung cancer: A systematic study and correlation with DNA ploidy. *Histopathology* **20**:499, 1992
 - 25) Lee JS, Lippman SM, Hong WK, Ro JY, Kim SY, Lotan R, Hittelman WN: Determination of biomarkers for intermediate end points in chemoprevention trials. *Cancer Res (Suppl)* **52**:2707s, 1992
 - 26) Vilor M, Khalek Y, Sorrentino J, Brown M, Herrera L: Uptake of proliferating cell nuclear antigen as a prognostic factor in soft tissue sarcomas. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**:202, 1992
 - 27) Thomas H, Nasim MM, Sarraf CE, Alison MR, Lambert HE, Price PM: Quantitation of proliferation in ovarian cancer by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**:259, 1992
 - 28) Del Giglio A, Khetan R, Saya H, Johnston D, Hester J, El-Nagger A, Deisseroth A: High level of PCNA in adult acute myelogenous leukemia (AML) are associated to increased resistance to chemotherapy and not to cell proliferation. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**:265, 1992
 - 29) Darmon E, Wargovich MJ: Immunohistochemical detection of p 53 and PCNA overexpression in colorectal tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* **33**: 287, 1992