

□ 원      저 □

## 편평세포폐암에서 Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions(AgNORs)의 임상적의의

계명대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실,\* 의과학연구소

한 승 범 · 전 영 준 · 이 상 숙\*

= Abstract =

### Clinical Significance of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions(AgNORs) in Squamous Cell Carcinoma of the Lung

Seung Beom Han, M.D., Young June Jeon, M.D. and Sang Sook Lee, M.D.\*

Departments of Internal Medicine, and Pathology,\* and Institute of Medical Science, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

**Background:** Nucleolar organizer regions(NORs) are chromosomal segments encoding for ribosomal RNA and associated with argyrophilic nonhistone protein. Ribosomal RNA genes ultimately direct ribosome and protein synthesis, and it has been suggested the numbers of NORs detected in the cell may reflect nuclear and cellular activity. This study was performed to evaluate the applicability of AgNORs to the diagnosis of squamous cell carcinoma of the lung.

**Method:** The one step silver methods(AgNORs) was used to stain NORs in the routinely processed, formalin fixed, paraffin embedded sections of 36 cases of squamous cell carcinoma of the lung obtained by surgical resection of primary tumor. In each specimen, 100 tumor cells and 100 normal cells adjacent to the tumor chosen at random were examined under an oil immersion lens at a magnification of  $\times 1000$ . The mean number of AgNORs per nucleus was calculated for each specimen.

**Results:** The mean number of AgNORs per nucleus(mAgNORs) of normal bronchial epithelium and squamous cell carcinoma of the lung was  $1.74 \pm 0.25$  and  $4.05 \pm 0.80$ , respectively. The difference of mAgNOR between normal and tumor tissue was statistically significant( $p < 0.001$ ). There was no statistical difference among tumors of different stages. The difference of mAgNOR between normal and tumor tissue was statistically significant in each TNM stage( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Mean AgNOR count may be used as a useful marker for the differential diagnosis of benignancy and malignancy, and proliferative activity of the cell in squamous cell carcinoma of the lung. But there was no statistical difference in mean AgNOR count among tumors of different

본 논문의 요지는 1993년도 대한내과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

surgical stages. Further studies for the application of mAgNORs to the diagnosis of other histologic types and cytologic specimens of the lung cancer are needed.

**Key Words:** Nucleolar organizer region, Squamous cell lung cancer, Proliferative activity

## 서 론

광학현미경하에서 관찰하는 전통적인 병리학적 진단 방법으로는 정확하게 종양을 진단하기에 불충분한 경우가 흔히 있고 예후에 관한 정보도 얻지 못하는 수가 많다. 따라서 정상상태, 종양이양단계, 종양에서의 핵, 핵산, 세포역동학의 역할에 대해서 유체세포계산법(flow cytometry)<sup>1)</sup>, 핵산, 리보핵산(RNA) in situ hybridization<sup>2)</sup>, Ki-67 항체 이용법<sup>3)</sup>, bromodeoxyuridine법<sup>4)</sup> 등의 많은 새로운 연구가 행하여지고 있으나, 이러한 방법은 많은 비용과 복잡한 과정이 필요하다는 단점이 있다.

종양세포에서 관찰되는 핵소체이상은 오래전부터 알려져 있었으나<sup>5)</sup> 핵소체 형태의 변화를 평가하는 객관적인 기준이 없었기 때문에 진단에 이용할 수는 없었다. 최근 전자현미경을 이용한 연구에서 리보솜 유전자를 가지는 원섬유성분 분포에 의하여 핵소체 모양이 결정된다는 것이 밝혀지고<sup>6)</sup>, 이원섬유성분은 휴지기의 중기염색체 nucleolar organizer regions(NORs)에 해당되는 것으로서 리보솜 유전자와 연관된 산성단백질을 간편한 은염색으로 검출함으로써 휴지기의 NORs를 발현시킬 수 있게 되었다<sup>6)</sup>.

광학현미경에서 작은 갈색점으로 관찰되는 은염색된 NORs를 AgNORs라 하고 논란은 있으나 실제로 은염색된 단백질은 NORs와 연관된 은기호성의 비 histone 단백질 즉 RNA 중합효소 1<sup>8)</sup>, C23 단백질(nuoleolin)<sup>9)</sup> 등으로 추정된다. NORs는 RNA 중합효소 1등에 의하여 r-RNA를 전사하여 리보솜 전구체 및 리보솜 구성 단백질을 만든다고 알려져 있으므로 AgNORs는 핵소체의 활동 즉 세포의 증식 능력을 반영한다고 생각되고 있다<sup>8)</sup>.

AgNORs이 림프종<sup>10,11)</sup>, 흑색종<sup>12)</sup>, 유방암<sup>13~15)</sup>, 악성

중피종<sup>16)</sup> 등에서 정상조직과 종양조직의 비교 감별진단에 유용하다는 여러 보고가 있었고, 최근에는 소세포폐암<sup>17)</sup>, 비소세포폐암<sup>18-20)</sup>에서의 AgNORs의 진단적 의의와 종양 증식능력과 연관성에 관한 연구도 행하여지고 있으나 국내에서는 이에 대한 연구가 드문 실정이다.

저자들은 편평세포폐암환자의 정상조직과 종양조직에서 은염색을 시행하여 핵당 평균 AgNORs수를 비교하고 TNM 분류에 따른 병기별 핵당 평균 AgNORs수를 비교함으로써 AgNORs수가 편평세포폐암의 증식능력 판단과 정상조직과 종양조직의 비교감별에 유용한 지를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1988년부터 1992년까지 계명대학교 동산의료원에서 수술로써 절제된 편평세포폐암 조직 36예를 대상으로 하였다. 수술 환자중 남자는 32명 여자는 4명 이었고 연령은 43세에서 75세사이로 평균연령은  $59.2 \pm 8.4$ 세였으며 TNM분류에 따른 병기는 1기가 11예, 2기 4예, 3A기 16예, 3B기 5예 였다.

동일 슬라이드내에서 종양조직의 인접 정상부위를 선정하여 정상조직으로 사용하였다.

### 2. 방 법

은염색은 Mourad 등<sup>14)</sup>의 방법을 사용하였다.

포르말린으로 고정시켜 파라핀으로 포매된 폐 조직 블록을 4 $\mu$ m 두께로 잘라서 유리 슬라이드에 부착시킨 후 xylene과 100%에탄올로 각각 5분간 처리하여 탈파라핀과 탈수를 하였다.

에탄올과 초산을 3:1로 섞은 용액으로 5분간 고정후 증류수에서 수세하였다. 조직 슬라이드를 은고질 용액

에 담구어 빛이 차단된 상태에서 45분간 반응시킨 후 증류수로 은교질 용액을 철저히 세척하였다. 5% sodium thiosulfate 용액으로 5분간 반응시킨후 증류수로 다시 세척하고 이어서 70%, 95%, 100% 에탄올로 탈수한 후 봉입하였다. 은교질 용액은 1% formic acid 용액에 gelatin을 2%가 되도록 용해시킨 용액과 50% silver nitrate 용액의 비가 1:2가 되도록 혼합하여 사용하였다.

### 3. 판 정

광학현미경으로 1,000배 배율하에서 2명의 관찰자가 독립적으로 각 조직 슬라이드의 종양조직부위와 인접 정상조직부위에서 임의로 각각 100개씩의 세포를 선정한 후 각 세포핵에서 진한 갈색으로 염색된 AgNORs의 수를 세어서 해당 평균 AgNOR의 수(mAgNORs)를 구하였고 student t-test로 통계처리하여 TNM분류에 의한 병기별 차이와 정상조직과 종양조직간의 차이를 비교하였다.

## 결 과

AgNORs는 정상폐조직에서는 경계가 분명한 1개 혹은 2개의 갈색점으로 나타났고 드물게는 3개 이상 또는 여러개의 작은 갈색점으로 보였으나 종양조직에서는 2~8개의 많은 수가 관찰되었을 뿐 아니라 간혹 갈색점들이 모여서 송이모양을 만들거나 불규칙적인 큰 덩어리를 형성하여 AgNORs면적이 현저히 증가한 경우가 있었다(Fig. 1).

해당 평균 AgNORs수의 TNM 분류에 따른 병기별 차이의 유의성은 없었으나(Fig. 2, 3), 정상조직과 종양조직을 서로 비교하였을때는 정상조직에서는  $1.74 \pm 0.25$ , 종양조직에서는  $4.05 \pm 0.80$ 으로서 종양조직의 해당 평균 AgNORs수가 정상조직에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.001$ , Fig. 4).

TNM분류에 따른 각 병기별 종양조직과 인접정상조직의 해당 평균 AgNORs수를 비교하여도 각 병기에서 종양조직의 평균 AgNORs수가 정상조직에 비하여 유

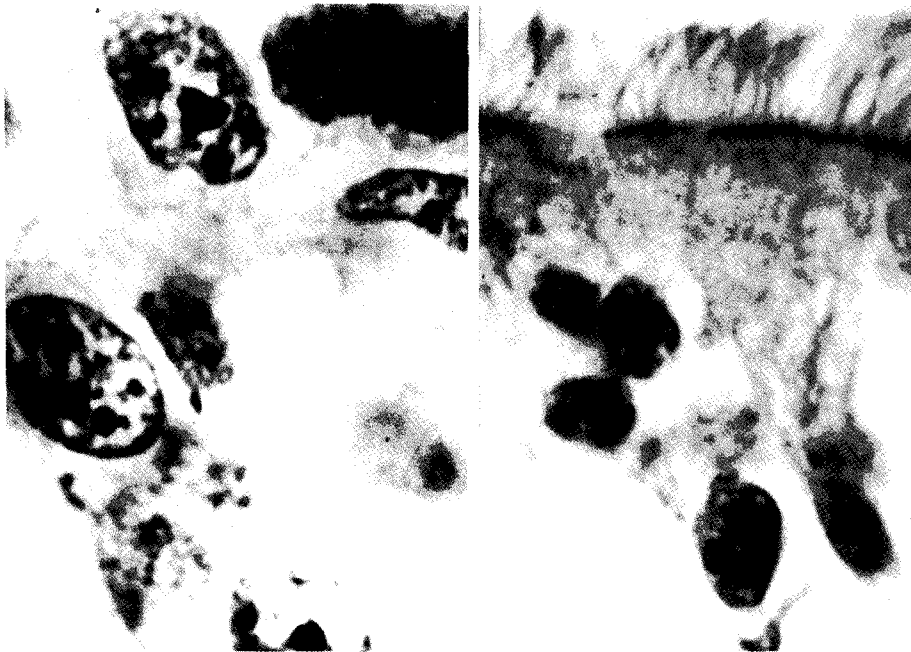


Fig. 1. Normal ciliated bronchial epithelium showing 1 or 2 AgNOR dots per nucleus, right(silver stain,  $\times 1,000$ ). Squamous cell carcinoma of the lung showing multiple AgNOR dots per nucleus and large pleomorphic polyhedral cells, left(silver stain,  $\times 1,000$ ).

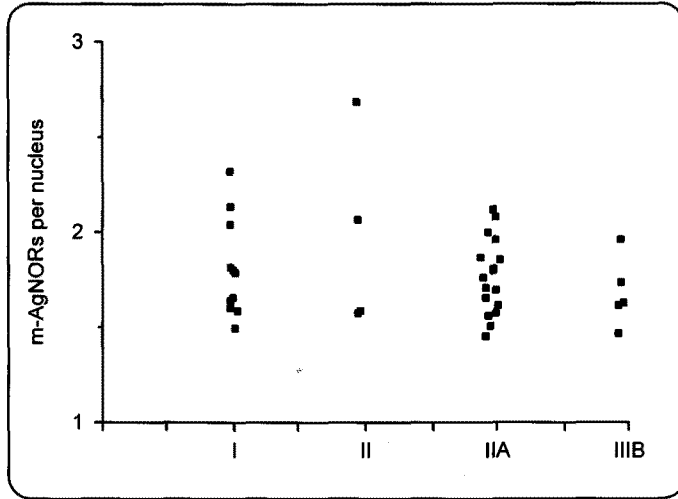


Fig. 2. Distribution of mean AgNORs per nucleus in normal bronchial epithelium of different TNM stages.

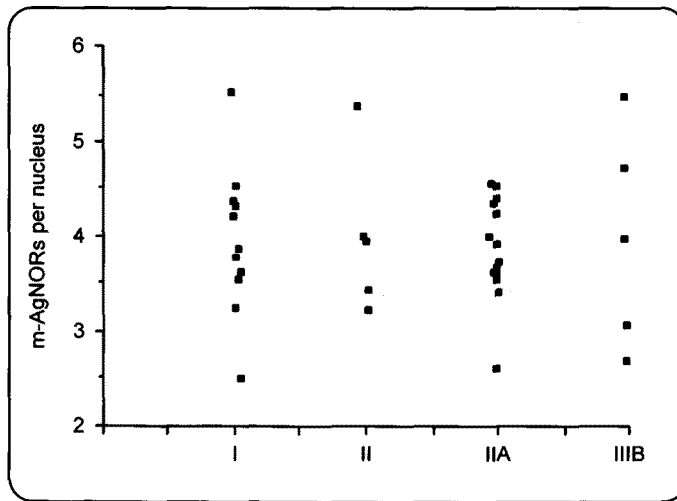


Fig. 3. Distribution of mean AgNORs per nucleus in squamous carcinoma of the lung of different TNM stages.

의하게 높았다( $p < 0.05$ )(Table 1).

## 고 찰

종양세포의 증식능력 평가는 종양의 진단 뿐만 아니라 예후 판단에도 중요한 것<sup>22)</sup>으로 알려져 있다. 증식능력의 평가를 위하여 유체세포계산법<sup>1)</sup>, 핵산과 리보핵산 in situ hybridization<sup>2)</sup>, proliferating cell nuclear

antigen(PCNA)측정<sup>23)</sup>, bromodeoxyuridine<sup>4)</sup> 이나 Ki-67 항체<sup>3)</sup> 등이 이용되나 많은 비용과 복잡한 과정이 필요하다는 단점외에도 유체세포계산법은 검체물이 보관조직인 경우 신뢰도가 떨어지고<sup>14)</sup> 종양조직의 일부를 생검법으로 획득하여 단일절편을 검사하면 종양 핵산 이수배수체가 실제보다 낮게 평가되는 문제점이 있다<sup>18)</sup>. 또한 Ki-67항체는 동결조직이 아닌 파라핀 포매 조직절편에서는 적용될 수 없기 때문에<sup>3)</sup> 양자 모두 실

제 임상에 적용하는데 한계가 있다. 종양세포의 핵소체 이상에 대하여서는 오래 전부터 알려져 왔지만<sup>5)</sup> 전자 현미경이 개발된 후에야 조직병리학자들이 핵소체 구조의 진단적 가치에 관하여 관심을 가지게 되었고 최근에는 핵소체가 filamentous nucleolonema, pars amorphous, fibrillar center로 구성되어 있다는 것이 알려졌다.<sup>6)</sup> 휴지기에는 fibrillar center가 NORs에 해당되고 NORs의 핵산은 종국에는 r-RNA를 전사하여 단백질 합성에 관여하므로 NORs의 수와 크기는 세포의 활성도와 증식능을 반영하고 따라서 은교질용액으로 NORs와 연관된 단백질에 특이적으로 염색되는 AgNORs 평가가 세포의 증식능력을 평가할 수 있는 가장 간편한 방법의 하나로 알려져 있다<sup>7)</sup>. 핵내 NORs 수와 분포는 cell cycle 과 밀접한 연관이 있으며 증기에는 선단부 부착염색체(13, 14, 15, 21, 22 번) 단완에 존재하고 은

염색하에서 흑색점으로 나타난다<sup>22)</sup>. 휴지기 핵내 염색체 배열에 대해서는 자세히 알려져 있지 않지만 NORs를 가진 염색체 수와 fibrillar center의 수사이에는 서로 상관성이 없는 것으로 보고 되고 있다<sup>24)</sup>.

NORs와 관련되는 단백질의 정확한 생화학적 성상에 대하여 아직도 논란이 있지만 RNA polymerase 1, C<sub>23</sub> 단백질, B<sub>23</sub> 단백질, 29, 100 KD 단백질 등으로 구성된다고 추정되고<sup>8,9)</sup>, 이들에 포함된 carboxyl, sulphidyl 성분의 은기호성을 이용하여 상기 단백질들을 염색할 수 있으며 rDNA 전사의 조절역할을 한다고 생각된다<sup>22)</sup>.

AgNOR 발현은 동결절편과 파라핀포매절편 사이에는 차이가 없으나<sup>22)</sup> 고정 방법에 따라서 차이가 있는데 10% formol saline 사용시 가장 좋고 picric산이나 수은이 함유된 고정액은 나쁜것<sup>25)</sup>으로 알려져 있다. 1975년 Howell 등<sup>26)</sup> 및 Goodpasture 등<sup>27)</sup>에 의해서 은염색으로 염색체에서 NORs의 존재가 확인 된후 다시 Howell 등<sup>28)</sup>에 의해 간단하고 신속한 일단계 은염색 방법이 소개되었고 Ploton 등<sup>7)</sup>이 염색온도를 20℃로 낮추어서 주위 배경 염색을 감소시킴으로써 AgNORs 발현양상을 더욱 개선시켰다. Cromie 등<sup>29)</sup>은 염색시간을 2분으로 단축하여 더욱 신속하게 검사를 시행할 수 있게 하였지만 대부분의 경우 은교질용액과의 반응시간을 30분 내외로 할 경우 만족한 결과를 얻을 수 있어서<sup>30)</sup>, 이 방법이 가장 널리 이용되고 있다. 저자들은 Mourad 등<sup>14)</sup>의 방법으로 은염색을 시행하였다. AgNORs 염색판정은 경계가 분명한 갈색점수를 세어서 세포핵당 평균 AgNORs 수를 구하였고 부분적으로 분리되어 경계가 불명확한 융합된 염색구조로 관찰된 경우에는 각각 구별하여 계산하였다. 하지만 핵의 직경은 7μm 정도이고 조직절편 두께는 3~4μm이기 때문에

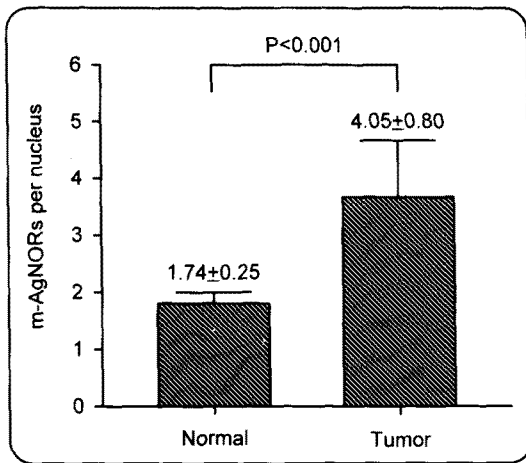


Fig. 4. Mean AgNORs per nucleus in normal bronchial epithelium and squamous carcinoma of the lung.

Table 1. Numbers of Mean AgNOR ± SD per Nucleus and its Relationship between Normal Bronchial Epithelium & Squamous Carcinoma of the Lung of Different TNM Stages

Stage(no.)	I (11)	II (4)	III (16)	III B (5)	Total (36)
Normal	1.81 ± 0.29	1.98 ± 0.50	1.77 ± 0.20	1.69 ± 0.18	1.74 ± 0.25
Tumor	4.06 ± 0.82*	3.73 ± 0.40 <sup>+</sup>	4.03 ± 0.53*	4.16 ± 1.28 <sup>++</sup>	4.05 ± 0.80*

\*p < 0.001, <sup>+</sup>p < 0.01, <sup>++</sup>p < 0.05

이러한 계산법도 NORs의 정확한 절대수를 나타내지는 못한다고 알려져 있다<sup>22)</sup>. AgNORs수를 평가하는 방법으로 평균 AgNORs수 외에도 핵당 AgNORs수가 5개 이상인 세포의 백분율을 의미하는 pAgNORs로도 표현할 수 있고 Mourad 등<sup>4)</sup>은 pAgNORs이 8% 이상이면 이수성을 시사하며 이는 종양의 등급(grade)과 통계학적으로 연관성이 있다고 주장하였지만 본 연구에서는 핵당 AgNORs 수가 5개 이상인 세포는 드물어서 이 방법을 적용할 수 없었다.

휴지기 세포에서 AgNORs수가 증가하는 이유에 관하여 확립된 설은 없지만, ① 염색체수 자체의 증가 및 ② 유사분열 전이나 후에 식별할 수 있는 AgNORs수의 증가, ③ 세포의 분화도 및 ④ 전사능력에 따라 AgNORs수가 변하거나, ⑤ 핵소체의 기질화능력의 결합 등<sup>8)</sup>의 가설이 있으나 더 많은 추가연구가 필요하리라 생각된다.

세포의 증식능을 나타내는 다른 지표들과 AgNORs수의 연관성은 비호즈킨씨 림프종의 경우 Ki-67 항체 발현 및 S-phase 세포 백분율과 AgNORs수 사이에는 높은 상관관계를 보여서 AgNORs수는 세포증식능을 일부 반영하거나 직접 관련이 있음<sup>11)</sup>을 알 수 있다.

생검조직의 조직학적 소견만으로는 양악성감별이 어려운 경우 경계부위(borderline)와 전암성(premalignant)병변 및 종양병변 사이에 AgNORs수의 차이가 있다면 더 세심한 관찰이나 추가조사를 함으로써 위험군을 찾는데 유용할 것이고 간경변과 간암의 구별<sup>31)</sup>, melanocytic dysplasia와 악성흑색종의 감별<sup>12)</sup>, 자궁경부의 전암성 병변<sup>32)</sup>, 경계군 난소 점액암<sup>33)</sup>을 감별하는데 AgNORs이 유용하다는 보고가 있다.

유방질환에서는 양성 관증식(benign ductal proliferation)과 관내암종(intraductal carcinomas)을 감별하는데 유용하다는 보고와 유용하지 않다는 서로 상반된 보고가 있고<sup>13~15)</sup> 전립선암, 갑상선암<sup>34)</sup>, 대장점막병변<sup>35)</sup>, 위상피세포병변<sup>36)</sup>을 평가하는데는 일반적으로 도움이 되지 않는 것으로 알려져 있다. 신경모세포종의 경우 AgNORs 수와 예후는 역상관관계를 보이고<sup>37)</sup> 유방암에서는 염색체수나 핵산 성분과는 별개의 독립적인 예후 인자로 알려져 있다<sup>13~15)</sup>.

흉곽질환에서는 반응성 중피증식(reactive mesothe-

lial proliferation)과 선암, 악성 중피종의 감별<sup>16)</sup> 및 양성과 악성 늑막액 감별<sup>38)</sup>에 AgNORs이 유용하다는 보고가 있다. 폐암의 경우는 편평세포폐암, 선암의 조직학적 분화단계와 병기에 따른 AgNORs 수는 유의한 차이가 없는 것으로 알려져 있으며<sup>18,19)</sup> 저자들도 병기에 따른 AgNORs의 차이를 발견하지 못하였다.

또한 편평세포폐암, 선암에서 종양의 배가시간과 AgNORs수는 역상관관계가 있다고 알려져 있고<sup>19,21)</sup> 따라서 폐암조직에서 AgNORs는 세포증식능의 지표로 이용될 수 있음을 시사한다. 편평세포폐암의 예후와 AgNORs수 사이에는 유의한 상관관계가 없는 것으로 보고 되어 있다<sup>18)</sup>. Abe 등<sup>20)</sup>은 상피내암종(carcinoma in situ)이 이형편평상피화생(atypical squamous metaplasia) 보다 AgNORs수가 유의하게 많아서 통상적인 조직학적 방법으로는 구별하기 어려운 전암성 병변과 암병변을 감별하는데 유용하다고 보고 하였다. 객담이나 기관지경하 및 흡인세포진 검체에서도 전암성 병변과 암병변 사이에 유의한 AgNORs수의 차이가 있다면 폐암의 조기발견 내지 폐암발생의 위험군을 파악하는 선별 검사로서 유용한 방법이라고 생각되며 추후에는 편평세포폐암을 포함한 다른 조직형의 폐암에서도 AgNORs의 진단적 적용에 대하여 추가연구가 필요하리라 생각된다.

## 요 약

**연구배경:** 세포의 증식능력을 반영한다고 알려진 NORs를 간편한 은염색으로 발현시켜서 AgNORs 수가 정상조직과 종양조직의 비교감별과 종양의 증식능력판단에 유용한지를 알기위하여 파라핀 포매된 편평세포폐암 조직을 이용하여 본 연구를 시행하였다.

**방법:** 수술로써 절제된 파라핀 포매된 편평세포폐암 조직 36예를 Mourad 등<sup>4)</sup>의 방법으로 은염색하였다. 1,000 배 배율하에서 종양조직과 정상조직에서 임의로 100 개씩 세포를 선정해서 핵당 평균 AgNORs수를 구하였다.

**결과:** 종양조직에서 TNM병기에 따른 핵당 평균 AgNORs수는 유의한 차이가 없었으나 정상조직과 종양조직을 비교하여 정상조직에서는  $1.74 \pm 0.25$ , 종양조직에서는  $4.05 \pm 0.80$ 으로 종양조직의 핵당 평균

AgNORs수가 정상조직에 비해서 유의하게 높았다( $p < 0.001$ ).

**결론:** TNM분류에 따른 각 병기별 종양조직과 인접 정상조직의 핵당 평균 AgNORs수를 비교하여도 각 병기에서 종양조직의 평균 AgNORs수가 정상조직에 비하여 유의하게 높았다( $p < 0.005$ ).

## 결 론

편평세포폐암에서 평균 AgNORs수는 정상조직과 종양조직을 감별하는데 유용한 지표로 생각되나 TNM 병기에 따른 AgNORs수의 유의한 차이는 없었다. 편평세포폐암을 포함한 다른 조직형의 폐암과 세포학적 검체물에서 AgNORs의 진단적 적용에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Barlogie B, Raber MN, Schuman J: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* **43**:3982, 1983
- 2) Van Dekken H, Pizzlo JG, Kelsen DP, Melamed MR: Targeted cytogenetic analysis of gastric tumor by in situ hybridization with a set of chromosome specific DNA probes. *Cancer* **66**:491, 1990
- 3) Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke RA: Proliferative rates of non-Hodgkin's lymphoma as assessed by Ki-67 antibody. *Hum Pathol* **18**:1155, 1987
- 4) Sugihara H, Hattori T, Fukuda M: Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin fixed tissues. *Histochemistry* **85**:193, 1986
- 5) Koller PC: The nucleus of cancer cell - a historical review. *Exp cell Res* **9(s)**:3, 1963
- 6) Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novello F: Structural organisation of chromatin in nucleolar organiser regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J Ultrastruct Res* **84**:161, 1983
- 7) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Hember G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* **18**:5, 1986
- 8) Williams MA, Kleinschmidt JA, Krohne G, Franker WW: Argyrophilic nuclear and nucleolar protein of xenopus laevis oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp Cell Res* **137**:341, 1982
- 9) Ochs RL, Busch H: Further evidence that phosphoprotein C<sub>23</sub> (110KD/PI 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp Cell Res* **152**:260, 1984
- 10) Crocker J, Nar P: Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* **151**:111, 1987
- 11) Crocker J, Macartney JC, Smith PJ: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* **154**:151, 1986
- 12) Leong ASY, Peter Giehom HT: Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum Pathol* **20**:257, 1989
- 13) Smith R, Crocker J: Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in breast malignancy. *Histopathology* **12**:113, 1988
- 14) Mourad WA, Balis BE, Livingston S, Shoukri MS, Cox CE, Nicosia SV, Rowlands DT: Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. *Cancer* **69**:1740, 1992
- 15) Raymond WA, Leong ASY: Nucleolar organizer regions related to growth fraction in human breast carcinoma. *Hum Pathol* **20**:741, 1989
- 16) Ayres J, Crocker J, Skilbeck N: Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organiser region associated protein. *Thorax* **41**:366, 1989

- 17) Crocker J, Ayres J, McGovern J: Nucleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. *Thorax* **42**:972, 1987
- 18) Boldy DAR, Ayres JG, Crocker J, Waterhouse JAH, Gilthorpe: Interphase nucleolar organizer regions and survival in squamous cell carcinoma of the bronchus: A 10 year follow up study of 138 cases. *Thorax* **46**:871, 1991
- 19) Ogura S, Abe S, Sukoh N, Kunikane H, Nakajima I, Noue K, Kawakami Y: Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. *Cancer* **70**:63, 1992
- 20) Abe S, Ogura S, Kunikane H, Suko N, Watanabe N, Nakajima I, Kawakami Y, Inoue K: Nucleolar organizer regions in precancerous and cancerous lesions of the bronchus. *Cancer* **67**:472, 1991
- 21) Abe S, Sukoh N, Ogura S, Kunikane H, Watanabe N, Nakajima I, Takekawa H, Kawakami Y: Nucleolar organizer regions as a marker of growth rate in squamous cell carcinoma of the lung. *Thorax* **47**:778, 1992
- 22) Egan MJ, Crocker J: Evaluation of nucleolar organizer regions in pulmonary pathology. *Thorax* **45**:225, 1990
- 23) Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM: Immunohistochemical detection of proliferation cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* **111**:841, 1987
- 24) Mirre C, Knibiehler B: Reevaluation of the relationships between the fibrillar centres and the nucleolus organizing regions in reticulated nucleoli: Ultrastructural organization, number and distribution of fibrillar centres in the nucleolus of the mouse Sertoli cell. *J Cell Sci* **55**:267, 1982
- 25) Smith P, Skilbeck N, A Harrison A, Crocker J: Effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J Pathol* **155**:109, 1988
- 26) Howell WM, Denton TE, Diamond JR: Differential staining of the satellite regions of acrocentric chromosomes. *Experimentia* **31**:260, 1975
- 27) Goodpasture C, Bloom SE: Visualisation of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**:37, 1975
- 28) Howell WM, Black DA: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer a one-step method. *Experimentia* **36**:1014, 1980
- 29) Cromie CJ, Benbow EW, Stoddart RW, McMahon RFT: Preincubation with a glycine solution aids the demonstration of nucleolar organizer region associated protein. *Histochem J* **20**:722, 1988
- 30) Crocker J, Boldy D, Egan M: How should we count AgNORs proposals for a standardised approach. *J Pathol* **158**:185, 1989
- 31) Crocker J, McGovern J: Nucleolar organizer region in normal, cirrhotic and carcinomatous liver. *J Clin Pathol* **41**:1044, 1988
- 32) Rowlands DC: Nucleolar Organizing regions in cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* **41**:1200, 1988
- 33) Kinsey N, Randall B, Brown JR: AgNOR counts in mucinous tumors(Abstract). *J Pathol* **155**:3457, 1988
- 34) Raim EP, Crocker J, McGovern J: Limited value of AgNOR enumeration in the assessment of thyroid neoplasms. *J Clin Pathol* **41**:1136, 1988
- 35) Arends JW, Kate J: AgNORs in colonic mucosal lesions. *Histopathology* **13**:707, 1988
- 36) Suarez V, Newman J, Hiley C, Crocker J, Collins M: The value of NOR numbers in neoplastic and non neoplastic epithelium of the stomach. *Histopathology* **14**:61, 1989
- 37) Derenzini M, Pession A, Farabegoli F, Trere D, Baldiali M, Dehan P: Relationship between inter-



phasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am J Pathol* **134**:925, 1989

38) Huang MS, Tsai MS, Hwang FF, Wang TH:

Comparison of nucleolar organizer regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusion. *Thorax* **49**:1152, 1994