

사구체신염에서 MIB-1을 이용한 Ki-67 항원의 발현

인제대학교 의과대학 부산백병원 소아과학교실, 병리학교실*

정 우영 · 송 민섭 · 김 영주*

< 한 글 요 약 >

목 적 : 증식성 핵 항원인 Ki-67의 발현은 조직 표본에서 세포증식의 활성도를 나타내어 주는 매우 유용한 표지자로 이용되고 있다. MIB-1은 포르말린에 고정되고 파라핀 포매된 조직에서 Ki-67항원을 인식해 낼 수 있는데, 단클론성 항체 MIB-1을 이용하여 각종 사구체신염에서 사구체 및 신세뇨관의 MIB-1 발현 정도를 알아보고, 특히 메산지움의 증식을 가지는 사구체신염의 진단에 도움이 될 수 있는지를 조사하기 위하여 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법 : 1994년 1월부터 1996년 12월 사이에 인제대 부산백병원 소아과에 입원하여 신질환이 의심되어 신생검을 시행한 환자 중 사구체신염으로 진단된 15세 이하의 환자 41례를 대상으로 하였다. 면역조직화학적 염색은 Ki-67에 대한 MIB-1(Immunotech, 505) 항체를 이용하였으며, 판정은 모든 사구체의 세포수에 대해서 세포의 핵에 적갈색의 과립이 보이는 세포수를 백분율로 구하여 MIB-1 표지자수로 나타내었다.

결 과 :

1. 미세변화 신염과 막성 신염에서는 전례에서 사구체 및 신 세뇨관에서 MIB-1의 발현은 관찰되지 않았다.
2. IgA 신증의 경우에는 18례에서 단지 2례 (11.1%)에서만 사구체의 메산지움 세포와 신 세뇨관 세포에서 MIB-1이 발현되었으며, 7례에서는 신 세뇨관 세포에서만 MIB-1이 발현되었다.
3. 막증식성 사구체신염에서는 4례중 2례에서 사구체내에 MIB-1이 발현되었다.
4. 연쇄상 구균 감염 후 사구체신염의 경우에는 5례중 4례에서 사구체 와 신 세뇨관 세포에서 MIB-1항원이 발현되었다.

결 론 : 각종 신질환에서 사구체내 MIB-1의 발현은 사구체 및 신 세뇨관 세포의 증식상태를 어느 정도 반영한다고 생각된다. 그러나 IgA 신증의 경우에서 나타난 바와 같이 메산지움 세포에서의 발현율은 낮아서, 메산지움의 증식을 보이는 사구체신염의 진단에 도움을 줄 수 있는 지표로서의 의미는 제한적인 것으로 사료된다.

서 론

증식성 핵 항원인 Ki-67은 세포주기중 G₀기의 세포를 제외한 모든 세포의 핵에 존재하며^{1,2)} 세포증식능과 증양의 악성도와 상관이 있는 것으로 알려져 있다. 이 항원은 Mr 345 와 395 kDa의 성질을 가지며 10번 염색체에 유전자가 encode되어 있는데, 단클론 항체를 이용하여 이 항원을 인식해 낼 수 있으며, 항원의 발현유무는 세포주기와 밀접하게 연관되어 있다³⁾. 또한 일부 종양 세포에서는 성장 분획을 알아낼 수도 있으며⁴⁾, 증양의 예후를 판단하는 데에도 중요한 지식을 제공해 주기도 한다^{5,6)}. 특히 주목할만한 점은 항원의 발현이

G₁에서 시작되어 세포주기 동안에 증가하다가 유사분열 후에 급격히 감소된다는 사실이다⁷⁾. 일반적으로 세포증식에 대한 표지자는 AgNORs(aryrophilic nuclear organizer regions), PCNA(proliferating cell nuclear antigen)와 Ki-67이 사용되고 있다. AgNORs는 은을 이용하기 때문에 염색이 까다로우며 핵내 염색된 AgNORs 수를 세어야하기 때문에 판독하기 힘들고 PCNA는 가장 흔히 사용되는 세포증식 표지자이나 G₁/S 기에 발현이 증가되며 정상에서도 발현되는데 비해 Ki-67은 감수성 및 특이성이 높은 것으로 알려져 있어서 Ki-67항원의 발현은 조직표본에서 세포의 증식여부를 나타내어 주는 매우 유용한 표지자로

이용되고 있다⁸⁹⁾. 그러나 Ki-67에 대한 항체는 단지 동결절편에서만 사용할 수 있으므로 실제 조직검사에 광범위하게 사용하는 데에는 제한이 있다. 최근 Ki-67 유전자의 절편이 함유되어 있는 cloned Ki-67 cDNA를 이용하여 pAX vector내로 subclone하여 E. coli에 발현시킬 수 있게 되었다⁹⁰⁾. 이렇게 얻어진 합성 단백질은 Ki-67항원에 대한 단클론성 항체를 생산하는데 이용되었다. 이중 MIB-1은 포르말린에 고정되고 파라핀 포매된 조직에서 Ki-67항원을 인식해 낼 수 있다⁹¹⁾.

저자들은 단클론성 항체 MIB-1을 이용하여 각종 사구체신염에서 사구체 및 신 세뇨관에서 MIB-1의 발현 정도를 알아보고, 특히 메산지음의 증식을 가지는 사구체신염의 진단에 도움이 될 수 있는지를 조사하기 위하여 본 연구를 계획하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1994년 1월부터 1996년 12월 사이에 인제의대 부산백병원 소아과에 입원하여 신질환이 의심되어 신생검을 시행한 환자 중 사구체신염으로 진단된 15세 이하의 환자 41례를 대상으로 하였다.

2. 방 법

대상 환아들에 대해서는 병력청취, 이학적 검사를 시행하였으며, 일반 혈액 검사, 요검사, 신기능 검사 및 간기능 검사, 24시간 소변에서 크레아티닌 청소율과 총단백량을 측정하였다. 그리고 B형 간염 바이러스 표면항원과 항체, 항핵항체, rheumatoid factor, CRP, ASO, C3, C4를 측정하였다. 일부 환아에서는 ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibody) 검사를 추가로 시행하였다.

신생검은 초음파 유도하에 Tru-cut needle을 이용하여 경피적 신생검을 실시하였다. 신생검을 시행전 출혈성 경향 여부를 검사하고 저녁 10시경부터 금식시켰다. 대부분의 경우에는 Lidocaine으로 국소 마취를 실시하였으며, 나이가 너무 어리거나 비협조적인 환아에게는 ketamine 1 mg/kg를 정맥주사하여 전신 마취를 시행하였다.

환자를 복외위 자세로 눕게하여 상복부에 베개를 받쳐서 신장의 움직임을 최소화하였다. 우선 신장의 longitudinal scan을 시행한 후 하극부의 transverse

scan을 다시 실시하여 생검할 부위를 결정하였으며, 초음파 유도하에 생검 침을 신장의 피질 부근에 도달시킨 다음 호흡을 잠시 중지시킨 후 신조직을 채취하였다. 이렇게 채취한 신조직은 광학현미경검색용, 면역형광검색용과 전자현미경검색용으로 배분하였다.

1) 광학현미경적 관찰

Dubosque Brazil 용액에 2-4시간 고정하고 탈수한 후 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 3-4 μ m 두께로 4장을 박절하여 각각 hematoxylin-eosin염색, PAS(Periodic acid-Schiff)염색, Masson's trichrome염색, Methanamin silver염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 면역형광현미경적 관찰

면역형광조직 검사를 위하여 신장조직을 즉시 동결하여 3 μ m 두께로 7장을 동결절편하여 저온에서 1시간 건조시킨 후 acetone에 5분간 고정하고 PBS(phosphate buffer solution)에 2회 세척하여 습윤 chamber에서 IgG, IgA, IgM, C4, C3, C1q, fibrinogen에 대한 fluorescein isothiocyanate(FITC)부착 항면역글로블린을 사용한 직접면역형광법으로 1시간 반응시키고 PBS로 2회 세척한 후 수용성 봉입체로 봉입하고 냉암소에 보관하여 면역형광현미경으로 관찰하였다.

3) 투과전자현미경적 관찰

1mm³로 세절된 신장조직을 2.5% Glutaraldehyde 고정액에 넣어 4°C에서 2-4시간 1차 고정하고 0.1M phosphate buffer(pH 7.2-7.4)로 세척하고 다시 1% osmium tetroxide에 4°C에서 2시간 2차 고정하고 0.1M phosphate buffer(pH 7.2-7.4)로 세척한 후 계열 ethyl alcohol로 각각 10-20분간 탈수하였다. Propylene oxide로 30분간 2회 치환하고 propylene oxide와 Epon 혼합물로 1-3시간 침투시킨 후 Epon 혼합물로 포매한 후 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 0.5-1 μ m 두께로 박절하여 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 결정한 다음 60-90nm로 초박절하여 200 mesh copper grid에 절편을 부착하여 uranyl acetate & lead citrate로 이중염색하여 JEOL 1200EX-II로 관찰하였다.

4) 면역조직화학적 관찰

각 환자의 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 박절하여 유리 슬라이드에 부착 시키고 60°C에서 4시간 동안

방치한 후 100% xylene으로 파라핀을 제거한 후 100%, 90% 및 75% 알콜로 처리하고 증류수로 함수시켰다. 파라핀 고정으로 조직내 감추어진 항원을 노출시키기 위해 citric acid 용액에 담구어 극초단파를 이용하여 10분간 처리한 후 30분간 실온에 두었다. 3% 과산화수소수로 15분간 처리하여 내인성 과산화효소를 억제시킨 후 증류수로 수세하였다. 이후의 과정은 LASB (Labeled streptavidine biotin) kit (DAKO)를 이용하여 시행하였다. 15분간 정상 산양 혈장을 처리한 후 Ki-67에 대한 MIB-1(Immunotech, 505) 항체를 1:100으로 희석하여 실온에서 60분간 반응시켰고, TBS(Tris-buffered saline, DAKO)로 수세하였다. 이차항체인 biotinylated anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat immunoglobulins을 처리하여 실온에서 10분간 둔 후 TBS로 수세하고 peroxidase-conjugated streptavidine (DAKO)을 실온에서 10분간 반응시킨 후 TBS로 수세하고 DAB(3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)로 10~20분간 실온에서 발색시켰다. Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하고 봉입하였다. 판정은 모든 사구체의 세포수에 대해서 세포의 핵에 적갈색의 과립이 보이는 세포수를 백분율로 구하여 MIB-1 표지지수로 나타내었다 (Fig. 1).

결 과

각종 사구체신염 조직에서 Ki-67 항원에 대한 MIB-1의 발현 빈도는 표 1과 같다. 표에서 보는 바와 같이 미세변화 신염과 막성 신염에서는 사구체내에서는 MIB-1의 발현은 관찰되지 않았다. IgA 신증의 경우에는 18례 중에서 단지 2례(11.1%)에서만 사구체내에서 MIB-1이 발현되었는데, 이들은 모두 메산지움세포에서 관찰되었고 발현의 정도는 평균 4.2%였으며 신세뇨관 세포에서도 MIB-1의 발현이 동반되었다.

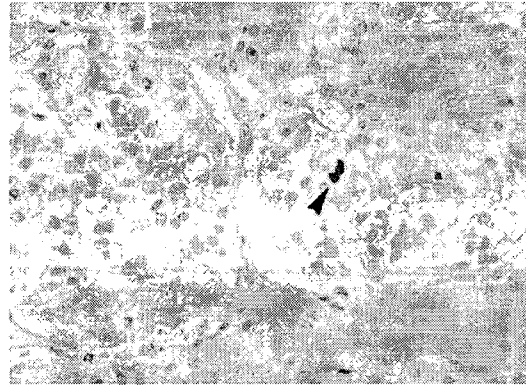


Fig. 1. Focal nuclear immunoreactivity for MIB-1 is observed in glomerular tuft of IgA nephropathy (X 400).

7례에서는 신세뇨관 세포에서만 MIB-1이 발현되었다. 막증식성 사구체신염에서는 4례중에서 2례에서 사구체내에 MIB-1이 발현되었는데 1례에서는 보우만씨 상피세포와 반월체의 세포에서, 다른 1례에서는 메산지움세포와 보우만씨 상피세포 모두에서 발현이 나타났으며, 발현의 정도는 5.3% 였다. 신세뇨관 세포에서도 MIB-1의 발현이 동시에 관찰되었다. 연쇄상 구균 감염 후 사구체신염의 경우에는 5례중 4례에서 사구체내에서 MIB-1이 높은 빈도로 발현되었는데, 평균 3.8%의 표지지수를 보였다. 2례에서는 상피세포에서, 1례에서는 메산지움세포, 혈관내피세포 그리고 보우만씨 상피세포 모두에서, 나머지 1례는 메산지움세포에서 발현이 나타났다. 신세뇨관 세포에서도 MIB-1의 발현이 4례 모두에서 동반되었다. (Table. 1).

Table 1. Clinicopathological Diagnosis and Expression of Glomerular and Tubular MIB-1 Staining in 41 Renal Biopsies

Diagnosis	No. of cases	No. of MIB-1 positive cases	
		Glomerulus	Tubules
Minimal change lesion	10	0	0
Membranous GN	4	0	0
IgA Nephropathy	18	2	9
Membranoproliferative GN	4	2	2
Poststreptococcal GN	5	4	4

GN: glomerulonephritis

고 찰

Ki-67항원의 발현을 보기 위하여 MIB-1을 이용한 본 조사에서는 메산지움의 증식이 현저한 조직학적 특징을 가지는 IgA 신증 18례의 조직에서 단지 2례에서만 메산지움 세포에 MIB-1의 발현이 나타나서 11.1%의 양성 반응을 보였다. 발현의 정도도 평균 4.2%로 미약하게 관찰되었다. Yokoyama 등¹²⁾은 IgA 신증 환자 49명을 대상으로 하여 Ki-67항원의 발현을 조사하였을 때 약 38%에서 양성 반응을 보였다고 하였다. 이들은 Ki-67항원의 발현이 HLA-DQ 양성군에서는 63%로 관찰되어, HLA-DQ 음성군의 11%에 비해 유의하게 높은 빈도를 나타내었다고 보고하면서, HLA-DQ 양성군에서는 조직학적으로 삼출성 혈관 내피증식이 68%에서 관찰된 반면 HLA-DQ 음성군에서는 이러한 조직학적인 변화를 관찰할 수 없었다고 하였다. 또한 HLA-DQ 양성군에서 증상의 급성 악화가 32%였으나 HLA-DQ 음성군에서는 10%였다고 하였다. 이는 IgA 신증에서 Ki-67항원의 발현이 단순한 메산지움 부위의 증식 상태에 기인하는 것이 아니라, 급성 증상을 일으킬 때 일어나는 조직학적인 혈관 내피세포의 증식상태에 의한 것이라고 주장하였다. Hall 등¹³⁾도 반월형 사구체신염에서는 비교적 높은 MIB-1의 발현율을 보였지만, 메산지움 세포의 증식을 보이는 소수의 경우를 제외하고는 사구체내의 MIB-1의 발현은 거의 관찰할 수 없었다고 하였다.

메산지움의 증식을 특징으로 하는 IgA신증에서의 이러한 결과는 임상적으로 IgA 신증의 증상을 야기시키는 데에 관여하는 메산지움 세포의 증식이 소수의 세포에 국한해서 야기되는 것이 아닌가 하는 추측을 상정해 볼 수 있다. 또 전체 18례중 9례에서 사구체의 변화와는 달리 신 세뇨관의 세포에서는 비교적 활발한 MIB-1의 발현을 관찰할 수 있었다. 이는 IgA 신증 환자에서 관찰되는 여러 가지 신 기능의 변화가 사구체의 병변에 국한되는 것이 아니라, 신 세뇨관의 병변과도 밀접하게 관련되어 있을 가능성을 암시해 준다고 생각된다.

본 조사에서는 막증식성 사구체신염 4례중 2례에서 사구체내에 MIB-1의 발현이 관찰되었다. MIB-1 발현을 보인 2례 중 1례에서는 사구체내의 메산지움 세포, 보우만씨 상피세포 그리고 신 세뇨관 조직 모두에서 MIB-1이 발현되었는데, 이 2례는 신생검이 이루어지기 4개월 전에 급성 신부전증과 심한 단백뇨의 증상이 있었으나, 조직검사 당시에는 신부전증의 증상은 회복

된 상태였으며 경미한 단백뇨는 지속되는 중이었다. 나머지 1례는 보우만씨 상피세포와 반월체의 세포와 신 세뇨관에서 MIB-1이 발현되었는데 만성신부전의 증상이 나타나는 도중에 조직검사가 실시되었고 결국 2개월 후에 복막투석이 실시되었다. 나머지 MIB-1의 발현이 관찰되지 않은 2명의 환자는 심한 단백뇨를 보였으며 이중 한명은 신증후군의 임상양상을 가졌으나, 신기능 검사는 정상 소견을 보였다.

연쇄상 구균 감염 후 사구체 신염에서는 5례중 4례에서 사구체내 MIB-1의 발현이 관찰되어 높은 빈도를 보였는데, 이 중 1례에서는 사구체의 메산지움 세포와 혈관내피세포, 보우만씨 상피세포 그리고 신 세뇨관 세포 모두에서 MIB-1의 발현이 나타났고, 1례에서는 사구체의 메산지움 세포와 신 세뇨관에서, 다른 2례에서는 사구체의 상피세포와 신 세뇨관에서 MIB-1의 발현이 나타났다.

그러나 미세변화 신염과 막성 신염의 경우에는 전례에서 사구체에서 MIB-1의 발현이 관찰되지 않았다.

이러한 연구결과를 살펴볼 때 각종 신질환에서 사구체내 MIB-1의 발현은 사구체 및 신 세뇨관 세포의 증식상태를 어느 정도 반영한다고 생각된다. 그러나 IgA 신증의 경우에서 나타난 바와 같이 메산지움 세포에서의 발현율은 낮아서, 메산지움의 증식을 가지는 사구체신염의 진단에 도움을 줄 수 있는 지표로서의 의미는 제한적인 것으로 사료된다. 막증식성 사구체신염이나 연쇄상 구균 감염후 사구체신염의 경우에는 비교적 높은 MIB-1 발현율을 보였는데, 이들 신질환에서 MIB-1의 발현이 사구체신염의 급성기를 알려주는 표식자로서의 역할을 담당할 수 있는지를 알아보기 위해 많은 증례를 모아서 병기에 따른 MIB-1의 발현 양상의 연구가 필요 하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Stein H, Uchanska-Ziegler B, Gerdes J, Ziegler A, Wernet P: Hodgkin and Sternberg-Reed cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. *Int J Cancer* 29:283-90, 1982
2. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5, 1984
3. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human

- nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20, 1983
4. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, Van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA: A comparison of immunohistochemical makers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 165:173-8, 1991
 5. Hall Pa, Gregory W, Richards MA, D'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG: The prognostic significance of Ki 67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 154:223-5, 1988
 6. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K: Ki-67 immunostaining in breast primary breast cancer: pathological and clinical association. *Br. J Cancer* 59:943-56, 1990
 7. Bruno S, Darzynkiewicz Z: Cell cycle dependent expression and atability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60m cells. *Cell Prolif* 25:31-40, 1992
 8. Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17:489-503, 1990
 9. Hall PA, Woods A: Immunohistochemical markers of cell proliferation. Achievements, problems and prospects. *Cell Tissue Kinetics* 23:531-549, 1990
 10. Cattoretti G, Becker MHG, Key G: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-64, 1992
 11. McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA: Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB 1. *Histopathology* 22:355-60, 1993
 12. Yokoyama H, Takaeda M, Wada T, Ogi M, Tomosugi N, Takabatake T, Abe T, Yoshimura M, Kida H, Kobayashi K: Intraglomerular expression of MHC classII and Ki-67 antigens and serum γ -interferon levels in IgA nephropathy. *Nephron* 62:169-75, 1992
 13. Hall PA, Greenwood RA, D'Ardenne AJ, Levison DA: In situ demonstration of renal tubular regeneration using the monoclonal antibody Ki-67. *Nephron* 49:122-5, 1988

= Abstract =

Expression of the Ki-67 antigen Using Monoclonal Antibody MIB-1 in Children with Glomerulonephritis

Woo Yeong Chung, Min Seop Song, Young Ju Kim.*

Department of Pediatrics, Department of Pathology, Pusan Paik Hospital, Inje University,
College of Medicine, Pusan, Korea*

Purpose : The proliferative nuclear antigen Ki-67, present in all cell cycle phases except G₀, is a useful marker for the detection of proliferative cells in vivo. MIB I has been found to recognize an antigen in formalin-fixed and wax-embedded material. The aim of this study was to assess the efficacy of MIB-1 expression as a marker of representing the status of mesangial cell proliferation in renal tissues.

Methods : Immunohistochemical staining for Ki-67 Ag using monoclonal antibody MIB-1 (Immunotech, 505) were performed in 41 renal tissues which were obtained by percutaneous renal biopsy done between January 1994 and December 1996.

Results : In both glomeruli and renal tubules, MIB-1 expression was observed only in 2 of 18 (11.1%) cases of IgA nephropathy, in 2 of the 4 (50%) cases of membranoproliferative glomerulonephritis, in 4 of the 5 (80%) cases of poststreptococcal glomerulonephritis. But MIB-1 expression was not detected in all cases of minimal lesion and membranous nephropathy. Renal tubules in another 7 cases of IgA nephropathy were MIB-1 positive.

Conclusion : MIB-1 expression in renal tissues may relate to the cell proliferation in glomeruli and renal tubules. But the efficacy of MIB-1 expression as a marker of mesangial cell proliferation may reveal a limited value because of it's lower positive rate in IgA nephropathy.

Key Words : Ki-67 Antigen, MIB-1, IgA Nephropathy