
자궁목질 비른표본에서 비정형 편평세포의 p16에 대한 면역세포화학염색

경상대학교 의과대학 병리학교실

김 활 응 · 이 중 실 · 이 정 희 · 고 경 혁

= Abstract =

Immunocytochemical Staining for p16 of Atypical Squamous Cells in Cervicovaginal Smear

Hwal Woong Kim, M.D., Jong Sil Lee, M.D., Jeong Hee Lee, M.D., and Gyung Hyuck Ko, M.D.

Department of Pathology, Gyeongsang National University College of Medicine, Chinju, Korea

It was reported that the main cause of intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma of the uterine cervix is human papilloma virus infection, and that the expression of p16 is increased in cells infected by human papilloma virus. We performed an immunocytochemical staining for protein p16 in 17 cases of cervicovaginal smears initially diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance, to know whether the staining could help the differentiation of neoplastic cells from reactive atypical cells. Of 17 smears, 6 were diagnosed finally as high grade intraepithelial neoplasm or invasive squamous cell carcinoma by follow-up biopsy and smear, and 5 of the 6 were positive for p16. Three were diagnosed as koilocytosis, and one of them was weakly positive for p16. Eight were diagnosed as reactive atypical cells, and all of them were negative for p16. We thought that immunocytochemical staining of p16 in cervicovaginal smears could help the differentiation of neoplastic cells from reactive atypical cells.

Key words: Protein p16, Cervicovaginal smear, Immunocytochemistry

책임저자 : 고 경 혁

주 소 : (660-751) 경남 진주시 칠암동 92, 경상대학교 의과대학 병리학교실

전 화 : 055-751-8735

팩 스 : 055-759-7952

E-mail address : gyunghko@gshp.gsnu.ac.kr

서 론

자궁목질 (cervicovaginal) 세포표본에서 가장 문제가 되는 것은 비정형 정도가 약한 편평세포가 관찰되었을 때 이 세포가 염증에 의한 반응성 비정형 세포인지 종양 세포인지를 판단하는 일이다. 때때로 이것은 매우 어려우며 그럴 경우 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포 (atypical squamous cells of undetermined significance; ASC-US)로 진단하게 된다.

자궁목의 상피내종양 (CIN)이나 암종은 주로 사람 유두종바이러스 감염으로 일어난다.² 사람유두종바이러스에 감염되면 E7 단백질이 생산되고 E7은 pRB와 결합하여 pRB를 비활성화 시킨다.³ 원래 pRB는 cyclin-dependent kinase inhibitor 가운데 하나인 p16의 전사를 억제하므로, 사람유두종바이러스에 감염되면 결과적으로 p16의 발현이 증가한다.⁴ 최근에 여러 학자들이 자궁목 조직이나 세포 표본을 대상으로 p16에 대한 면역세포화학염색을 한 결과 상피내종양과 암종 세포에서 p16의 발현이 증가한다고 보고하였다.⁵⁻⁸ 그러나 비정형 정도가 약해서 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포로 진단할 수밖에 없는 예들에 대해 p16에 대한 염색을 함으로써 이러한 방법이 자궁목질 세포 표본의 진단에 실제적인 도움이 되는지를 연구한 보고는 거의 없다.

본 연구에서는 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포로 진단된 자궁목질 바른표본 (smear)을 대상으로 p16에 대한 면역세포화학염색을 함으로써 이러한 방법이 염증에 의한 반응성 비정형 세포와 종양 세포를 구별할 수 있는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

최근 3년 동안 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포로 진단된 예 가운데 추적 검사를 위해 적어도 한번 이상의 자궁목 바른표본 검사와 생검을 하여 최종 진단이 확정된 17 예를 선택하였다. 염증에 의한 반응성 비정형 세포로 확진된 예는 8 예이었고 원반세포증으로 밝혀진 예는 3 예이었고, 고등급 상피내종양이나 암종으로 확진된 예는 6 예이었다. 이들 바른표본 슬라이드를 다시 관찰하여 진단 시 표시한 비정형 세포를 사진 찍은 후, 크실렌에 담아 덮개를 떼어내고 알코올로 탈색한 후에 p16에 대한 면역세포화학 염색을 하였다. 일차 항체로는 1:25로 희석한 사람 p16에 대

한 생쥐 항체 (DakoCytomation, Denmark)를 사용하였고, 이차항체로는 홍당무과산화효소를 붙인 항생쥐 염소 면역글로블린을 사용하였으며, 색소원으로는 디아미노벤지딘 (3,3'-diaminobenzidine)을 사용하였다. 대조염색은 메이어 헤마톡실린으로 하였다. 염색 결과, 표시한 비정형 세포들 대부분에서 세포질 또는 세포 핵이 강하게 염색되었을 때를 양성으로 판단하였다.

결 과

염증에 의한 반응성 비정형 세포로 확진된 8 예는 모두 p16에 대해 음성이었고 (Fig. 1)(Table 1), 고등급 상피내종양이나 침습암종으로 확진된 6 예 가운데 5 예가 양성이었으며 (Fig. 2), 1 예는 음성이었다. 양성인 5 예 가운데 3 예는 세포질에 염색되었으며 2 예는 세포질과 핵에 모두 염색되었다. 음성인 1 예는 상피내암종으로 확진된 예로서, 조직에서는 p16에 대해 강한 양성이었다. 이 예에 대해 세포 표본을 다시 관찰한 결과 세포핵이 전체적으로 뿌옇게 보이고 핵 안 염색질 모양이 제대로 보이지 않아 표본 제작 과정 잘못으로 세포가 변성 된 것으로 생각되었다. 원반세포증 3 예 가운데 2 예는 음성이었으며, 1 예에서는 소수의 세포가 세포질에 약하게 염색되었다 (Fig. 3). 추적 검사와 p16 염색 결과를 참고로 하여 세포학적 소견을 재평가해 보니 상피내종양이나 침습암종 세포는 염증에 의한 반응성 비정형 세포에 비해 역시 핵/세포질 비율, 염색질 응괴 정도가 높고, 핵막이 더욱 불규칙하게 보였다.

고 찰

자궁목 생검 조직을 대상으로 p16에 대한 면역조직화학 염색을 한 몇몇 보고들에 따르면,⁵⁻⁸ 고등급 상피내종양의 거의 모든 예에서 종양세포의 핵과 세포질이 모두 광범위하고 강하게 염색되고, 저등급 상피내종양의 경우에는 고위험 사람유두종바이러스와 연관된 경우에만 강하게 염색된다고 한다. 저위험 사람유두종바이러스와 연관된 경우에는 국소적으로 약하게 염색된다고 한다. 따라서 이들에 따르면 자궁목 생검 조직을 대상으로 p16에 대한 면역조직화학 염색을 하는 것은 상피내종양의 진단과 등급 결정에 매우 도움이 된다고 한다. 이들 연구들 중 몇몇 연구에서는⁶⁻⁸

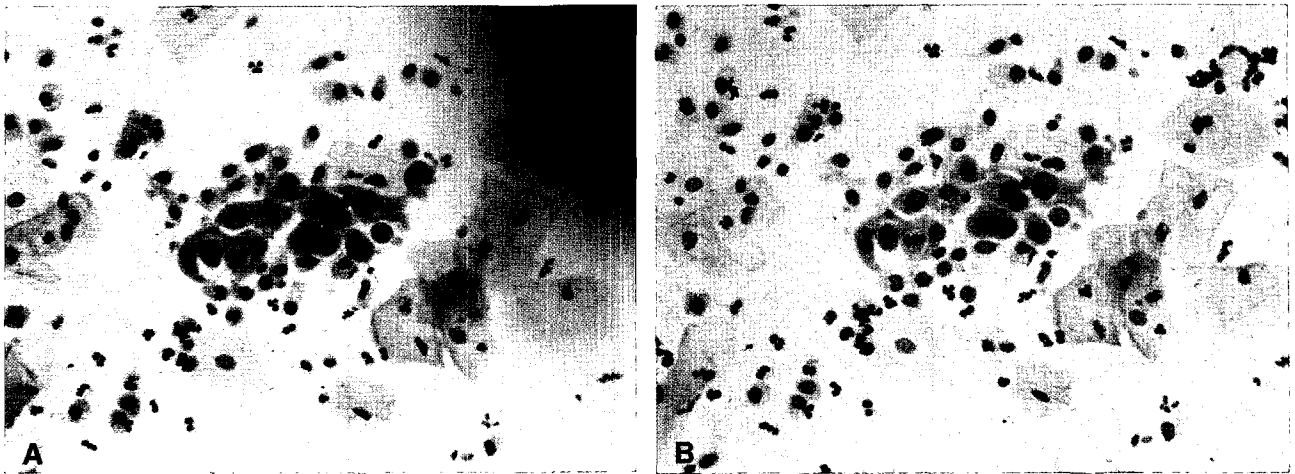


Fig. 1. Reactive atypical cells in a cervicovaginal smear. (A) The cells showing increased N/C ratio, slightly hyperchromatic nuclei, and a mitotic figure, were initially diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance, favor benign. The blue color at the right upper corner is an ink mark. (B) An immunocytochemical staining for protein p16 is negative.

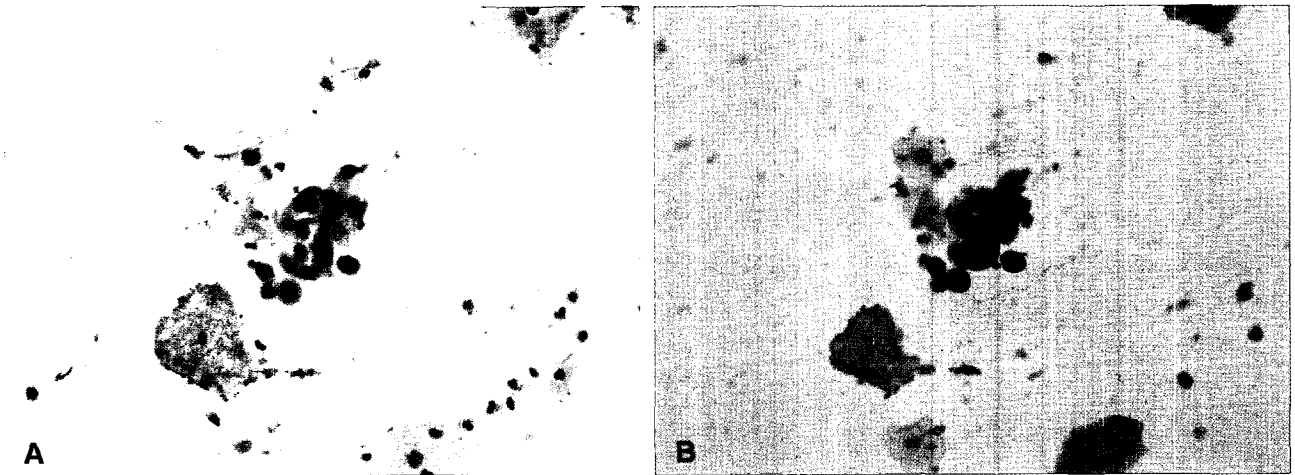


Fig. 2. Dysplastic cells in a cervicovaginal smear of high grade cervical intraepithelial neoplasm. (A) The cells showing increased N/C ratio, slightly hyperchromatic nuclei, and slightly irregular nuclear membranes, were initially diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance, favor benign. (B) Most of the cells are intensely stained immunocytochemically for protein p16, in the cytoplasm or in the cytoplasm and nucleus.

자궁목 세포 표본에 대해서도 p16에 대한 면역세포화학 염색을 하였으나, 한 연구⁸를 제외하고는 조직을 대상으로 한 연구의 보조적 수단에 불과하였다.

비교적 세포 표본에 대하여 자세히 한 연구⁸에 따르면 고등급 상피내 편평세포 병터 (HSIL) 26 예 가운데 25 예 (96%)가 양성이었다고, 저등급 상피내 편평세포 병터 (LSIL) 19 예 가운데 14 예 (74%)가 양성이었으며, 종양세포가 아닌 경우는 모두 음성이었다고 한다. 같은 저자들이 가장 최근에 본 연구와 비슷한 연구를 하였는데,⁹ 이에 따르면 생검에서 고등급 상피내

종양으로 진단된 18 예 가운데 17 예 (94%)가 세포 표본에서 양성이었다고 한다. 이 결과는 생검에서 고등급 상피내종양이나 침습암종으로 확진된 6 예 가운데 5 예가 세포 표본에서 p16 양성을 나타낸 본 연구의 결과와 비슷하다.

본 연구에서는 상피내암종 1 예가 세포 표본에서 p16에 대해 음성이었는데 이것은 표본제작 잘못으로 세포가 변성되었기 때문일 가능성이 있다고 생각된다. 그러나 다른 연구자들의 결과에서 보듯이 표본제작 잘못이 없다고 해도 고등급 상피내종양이나 침습

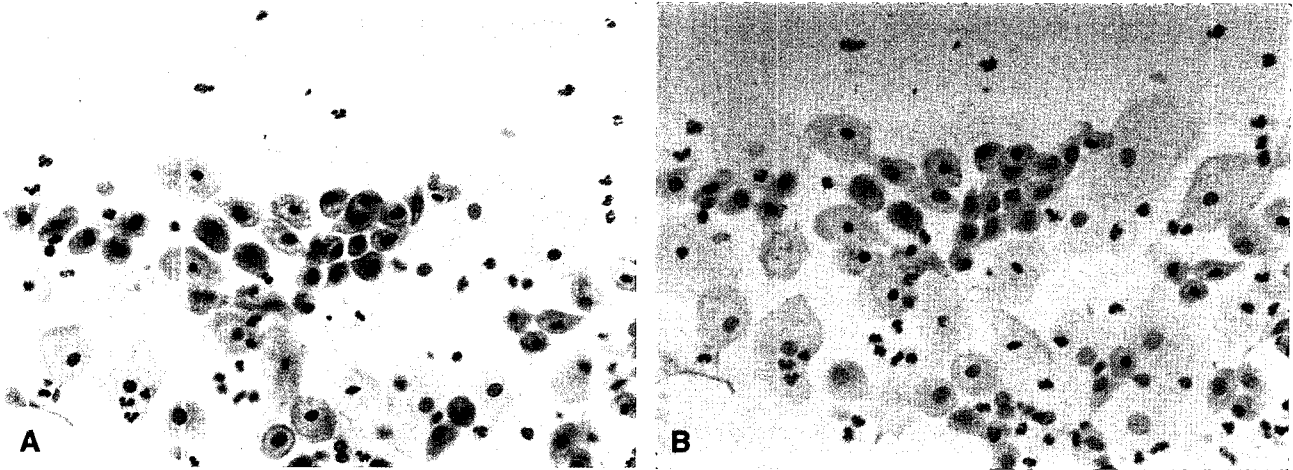


Fig. 3. Koilocytotic cells in a cervicovaginal smear. (A) The cells showing round configuration, increased N/C ratio, slightly hyperchromatic nuclei, and perinuclear haloes, were initially diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance, favor benign. (B) Cytoplasm of a few cells show weak immunoreactivity for protein p16.

Table 1. Results of immunocytochemical staining for p16 in cervicovaginal smears, initially diagnosed as atypical squamous cells of undetermined significance.

Initial diagnosis	Final diagnosis	Patient's age	Result
ASCUS favor SIL	Invasive SC	50	positive
ASCUS favor SIL	Invasive SC	77	positive
ASCUS favor SIL	SCIS	66	negative
ASCUS favor SIL	High grade CIN	44	positive
ASCUS favor SIL	High grade CIN	54	positive
ASCUS favor SIL	Koilocytosis	54	negative
ASCUS favor SIL	Chronic cervicitis	35	negative
ASCUS favor SIL	Chronic cervicitis	43	negative
ASCUS favor SIL	Chronic cervicitis	53	negative
ASCUS favor SIL	Chronic cervicitis	34	negative
ASCUS favor ben:gn	Severe dysplasia	42	positive
ASCUS favor ben:gn	Koilocytosis	28	negative
ASCUS favor ben:gn	Koilocytosis	58	focal positive
ASCUS favor ben:gn	Chronic cervicitis	54	negative
ASCUS favor ben:gn	Chronic cervicitis	31	negative
ASCUS favor ben:gn	Chronic cervicitis	45	negative
ASCUS favor ben:gn	Chronic cervicitis	71	negative

ASCUS: atypical squamous cells of undetermined significance
 SIL: squamous intraepithelial lesion
 Invasive SC: invasive squamous cell carcinoma
 SCIS: squamous cell carcinoma in situ
 CIN: cervical intraepithelial neoplasm

암종 환자 모두에게서 질 바른 표본에서 p16이 양성 이 아닌 까닭은 이러한 병터를 이루는 모든 세포가 p16을 발현하는 것이 아니기 때문일 것이다. 특히 세포 표본에서 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포로 진단할 수밖에 없는 경우에는 실제로 고등급 상피내종양이 있다고 해도 세포 수도 적고 비정형 정도도 약한 세포들만 보이는 경우이므로 처음부터 고등급 상피내 편평세포 병터로 진단된 세포 표본이나 고등급 상피내종양으로 진단된 조직 표본에서보다 p16이 음성일 가능성이 많을 것으로 예상된다. 그러나 본 연구에서나 다른 연구에서 이러한 차이가 뚜렷이 나타나지는 않고 있는데, 이것은 의의를 알 수 없는 비정형 편평세포로 진단된 증례 수가 적기 때문일 가능성이 있으므로 이에 대해 더 많은 증례를 토대로 한 연구가 필요할 것이다.

본 연구 결과 종양세포가 아닌 경우에는 모두 p16에 대해 음성이었으며 다만 원반세포증의 경우에서만 약한 양성을 보였는데 이 결과도 다른 연구자²의 결과와 같다. 이것은 원반세포증은 저위험 사람유두종바이러스 감염으로 생기며 고등급 상피내종양이나 암종은 고위험 사람유두종바이러스 감염으로 생기는데, 저위험 사람유두종바이러스 E7 단백질은 고위험 사람유두종바이러스 E7 단백질보다 pRb에 대한 결합력이 약하기 때문일 것으로 생각되고 있다.¹⁰

결 론

자궁목질 바른표본에서 비정형 정도가 약한 편평세포가 관찰되었을 때, 이 세포가 염증에 의한 반응성 비정형 세포인지 종양 세포인지를 판단하기 위해 p16에 대한 면역세포화학염색을 하는 것은 매우 도움이 된다고 생각된다. 즉 그러한 비정형 세포가 p16에 대하여 강하게 염색되었다면 거의 틀림없이 상피내종양이나 암종일 것이며, p16에 대해 염색이 되지 않았다면 반응성 비정형 세포일 가능성이 많을 것이다.

참 고 문 헌

1. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-9.
2. Zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Biochem Biophys Acta* 1996;1288:F55-78.
3. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243:934-7.
4. Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, et al. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. *Br J Cancer* 1997;75:1410-6.
5. Klaes R, Benner A, Friedrich T, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389-99.
6. Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003;56:56-63.
7. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.
8. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002;46:25-9.
9. Bibbo M, DeCecco J, Kovatich AJ. P16INK4A as an adjunct test in liquid-based cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 2003;25:8-11.
10. Gage JR, Meyers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b), and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 1990;64:723-30.