

원발성 및 재발성 대장암에서 세포 증식능의 평가
- Transforming growth factor- α 와 Proliferating cell nuclear antigen의
표현 양상과 DNA 유세포 분석 -

¹연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 병리학교실² 및 임상병리학교실³

성진실¹ · 성순희² · 이정운³
신현수¹ · 박찬일² · 권오현³

= Abstract =

Assessment of Cell Proliferation in Primary and Recurrent Colorectal Cancers
- Expression of Transforming Growth Factor- α and Proliferating Cell Nuclear
Antigen and Flow cytometric DNA Analysis -

Jinsil Seong, M.D.¹, Sun Hee Sung, M.D.², Jung Woon Lee, M.D.³,
Hyun Soo Shin, M.D.¹, Chan Il Park, M.D.² and Oh Hun Kwon, M.D.³

Departments of ¹Radiation Oncology, ²Pathology, ³Clinical Pathology
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Cell proliferation potential has been found to be a significant biological parameter correlated with the clinical outcome. This study was to investigate the cell proliferation potential in primary and recurrent colorectal tumor tissues.

Using paraffin-embedded tissues from the paired primary and recurrent tumors of 10 patients, a simple hematoxylin-eosin stain was done and immunohistochemical stains for transforming growth factor- α (TGF- α) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) were performed through a labeled streptavidine biotin method. DNA contents and S-phase fraction(SPF) of the cells were assessed by flowcytometric DNA analysis.

The degree of differentiation was poorer in the recurrent tumors than in primary tumors. In 4 primary tumors with mixed adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma, only the mucinous adenocarcinoma component was shown in the recurrent tumors. There was no difference in TGF- α expression between the primary and the recurrent tumors however, PCNA was overexpressed in the recurrent tumors comparing to the primary tumors. Flow cytometric DNA analysis was successful in 7 paired cases. There was change of the ploidy from the diploidy to the aneuploidy in 4 cases. SPF showed remarkable increase in the recurrent tumors comparing to the primary tumors.

These results show high proliferative potential of the recurrent colorectal tumors, which can be measured using PCNA expression and SPF as biomarkers. Based on the results of this study, an effort to establish more refined method to predict recurrence should be pursued.

Key Words: Proliferative potential, Colorectal cancer, TGF- α , PCNA, Flow cytometry

서 론

대장암에서 근치적인 외과적 절제가 시행되고 난 후에 국소 재발을 보이는 경우, 구제 치료가 적극적으로 시행된다고 하여도 진행 정도가 유사한 원발암에 비하여 치료율이 매우 저조하다¹⁾. 구제 치료가 효과적으로 시행되는 데 한계가 있는 것도 한 요인이겠으나, 재발암의 생물학적 특성과의 연관성을 생각해 볼 수 있다. 실제로 재발성 대장암에 대한 임상 연구 결과를 보면 원발 병소가 근치적으로 절제된 후에 재발한 암이 근치적으로 제거되지 않은 잔존암에서 재발된 경우보다 예후가 나쁘며^{2~6)} 이는 재발암의 생물학적 특성이 왕성함을 시사해 주고 있다.

세포의 증식능은 여러 생물학적 특성 중에서도 임상적 결과와 가장 관계가 깊은 지표로 알려져 있다⁷⁾. Transforming growth factor- α (TGF- α)는 종양에서 악성도의 진화 과정과 침습적 성장 과정에 중요한 성장 요인이며⁸⁾, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)은 세포의 DNA 합성에 필수적인 단백질로서^{9~12)} 두가지 다 세포의 증식에 깊이 관여한다. 또한 flow cytometer를 이용한 세포의 DNA 배수성(ploidy) 및 합성기 세포의 분할(S phase fraction)의 측정으로 세포 증식능을 직접적으로 평가할 수 있다¹³⁾.

본 연구는 대장암에서 동일 환자의 조직 표본을 이용하여 원발암과 재발암의 세포 증식능을 TGF- α 와 PCNA의 발현 양상 및 flow cytometer 분석을 통하여 구체적으로 평가하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1) 연구 대상 및 재료

원격 전이가 없이 원발 부위에 국한된 대장암으로서, 완치 목적의 근치적 절제술 후 추적 조사 기간중에 국소 재발이 조직학적으로 진단된 환자 10예를 대상으로 하였다. 대상 환자들의 원발암 및 재발암의 임상적 양상이 Table 1에 요약되어 있다. 원발암의 조직학적 유형은 6예에서 선암이었고 나머지 4예에서는 선암과 점액성 선암이 혼합된 양상을 보였다. 이들은 근치적 절제술을 시행한 후에 보조적인 항암 약물요법이나 방사선 치료는 받지 않았다. 국소 재발 시기는 8개월에서 60개월까지의 범위르 보이며 2예를 제외한 대부분에서 20개월 이내였다. 재발부위는 수술시 봉합 부위가 4예로 가장 많았고 대부분 골반강내에 국한되었으나 회음부 및 복벽의 수술흔에도 각각 1예씩 있었다. 이들의 원발 병소 및 재발 병소 조직 표본을 이용하여 TGF- α 와 PCNA에 대한 면역 조직 화학 염색을 각각 시행하였고 flow cytometry 분석을 시행하였다.

Table 1. Summary of the cases with primary and recurrent colorectal cancers

No. of cases	Age/Sex	Primary tumor*		Recurrent tumor		
		Site	Histologic type	Stage	Time(mo)	Site
1	29/F	Hepatic flexure	Adenoca	C3	17	Anastomosis
2	60/F	Sigmoid	Adenoca	C2	18	Pelvis
3	48/M	Transvers	Adenoca	B2	17	Anastomosis
4	49/F	Descending	Adenoca	B1	13	Anastomosis
5	54/F	Sigmoid	Adenoca	B2	20	Pelvis
6	62/F	Rectum	Adenoca	C2	16	Anastomosis
7	52/M	Sigmoid	Adenoca+mucinous	C2	44	Pelvis
8	38/F	Rectum	Adenoca+mucinous	C2	8	Rectovaginal septum
9	75/F	Rectum	Adenoca+mucinous	B2	8	Perineum
10	46/M	Ascending	Mucinous+adenoca	C2	60	Abdominal wall

* In all cases, curative resections were done for the primary tumors

2) 연구 방법

병리 조직학적 검색; hematoxylin-eosin 일반 염색을 하여 암종의 조직학적 유형, 분화의 정도 및 침윤의 정도를 조사하였다.

TGF- α 와 PCNA에 대한 면역 조직 화학 염색; Garcia 등¹⁴⁾의 방법을 따라서 시행하였다. 먼저 파라핀 포매 조직을 4 μ 두께로 연속 발절한 후 xylene으로 파라핀을 제거하였다. Peroxidase에 의한 불특정 조직 반응을 방지하기 위하여 methanol과 0.3% H₂O₂로 약 30분간 처리하고 연이어 2N 염산으로 30분간 처리하여 DNA 변성을 유도하였다. TGF- α 의 경우 정제된 anti-TGF- α 단클론 항체(Oncogene Sicence, Cambridge, MA)를 인산 완충액(1% 우혈청 알부민과 0.5% tween 20 함유)에 1:20으로 희석시켜서 이것으로 37°C에서 45분간 처리하였다. PCNA의 경우에는 역시 정제된 anti-PCNA 단클론 항체(DAKO, Santa Barbara, CA)를 인산 완충액에 1:100으로 희석시켜서 사용하였다. 표지된 streptavidine biotin kit(LSAB, DAKO, Santa Barbara, CA)으로 peroxidase 면역 염색을 하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다.

PCNA 면역 조직 화학 염색 후 결과의 판독은 현미경 400배 시야 10 부위를 관찰하여 전체 종양 세포수와 양성으로 염색되는 종양 세포수의 비를 구하였고 이때 정상 대조군은 종양 주변의 정상 점막 조직으로 하였다. TGF- α 는 양성으로 염색되는 정도를 -, +, ++, +++로 네등급으로 나누어 평가하였다.

Flow cytometry 분석; Flow cytometer를 이용한 DNA 분석은 Hedley 등²⁵⁾의 방법을 따라서 시행하였다. 파라핀 포매 조직을 50 μ 두께로 발절하여 Histo-Clear(National Diagnostics, Manville, NJ)로 파라핀을 제거한 후 알콜로 재수화시켰다. 여기에 0.5% 펩신으로 처리하고, 원심 분리한 후 RNase (2.50 mg/ml, Worthington Biochemical, Freehold, NJ)로 37°C에서 30분간 처리하였다. 이같은 과정을 통해 분리한 세포 핵들은 0.025% propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO)로 염색한 후 1~3 $\times 10^6$ /ml의 농도에서 Becton-Dickinson FAC Scan flow cytometer로 분석하였다.

결과의 판독은 DNA 히스토그램에서 첫번째 보이

는 G₀/G₁의 최고점을 이배수의 세포군으로 가정하여 이의 DNA index(점체의 DNA와 이배수의 대조군 세포의 DNA의 비율)를 1.0으로 하고, G₀/G₁ 최고점과 이후에 따르는 작은 G₂/M최고점 사이에 별도의 분명한 최고점이 보일때를 이수성(aneploidy)으로 간주하였다. 또한 전체 분석 대상 세포들에서 합성기에 있는 세포의 양을 합성기 세포의 분할(SPF)로 측정하였다.

결 과

조직학적 분화도를 보았을때 원발암과 재발암의 분화도와 유형에 있어서 차이가 나타났다. 즉 원발암의 분화도가 중등도였던 5예와 분화가 나빴던 1예는 재발암에서 분화도가 나쁘게 나타났다. 유형에 있어서도 선암 요소와 점액성 선암 요소가 혼합되어 있던 4예는 재발암에서 점액성 선암 요소만이 나타났다.

TGF- α 는 특별한 양식이 없이 주로 세포질에서 미만성으로 양상을 보이며, 전예에서 원발암과 재발암간에서 표현양식, 정도를 비교하였을때 큰 차이를 발견할 수 없었다(Table 2).

PCNA 표현 양상을 PCNA index로 나타내었을때 원발암과 재발암의 PCNA양성율은 각각 55 \pm 14, 71 \pm 18로서 재발암에서 PCNA index가 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1) 흥미로운 것은 재발암에서 종양 세포군이 주변 정상 조직으로 침습해 들어가는 경계 부위에 PCNA에 대한 강 양성이 보여서, 이러한 말단 침습 부위에 세포 증식이 활발하다는 것을 보여주

Table 2. Change in TGF- α expression in primary & recurrent colorectal cancers

No. of case	Primary tumor	Recurrent tumor
1	+	++
2	++	+
3	+++	+++
4	++	+
5	++	+
6	+	++
7	++	++
8	+	+
9	+	+
10	++	+

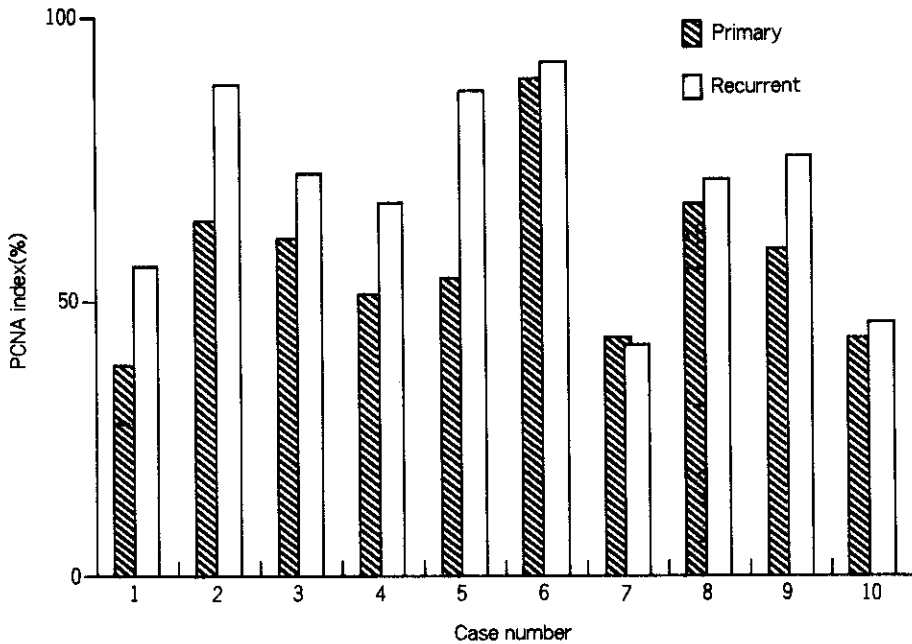


Fig. 1. Change in PCNA expression in primary and recurrent colorectal cancers. PCNA index(%) ratio of the number of PCNA positive tumor cells to the number of total cells.

Table 3. Change in DNA ploidy in primary & recurrent colorectal cancers

No. of cases	Primary tumor	Recurrent tumor
1	Diploid	Aneuploid(DI*=1.6)
2	Diploid	Diploid
3	Diploid	Diploid
4	Diploid	Aneuploid(DI=1.35)
5	Diploid	Diploid
7	Diploid	Aneuploid(DI=1.52)
8	Diploid	Aneuploid(DI=1.52)

*DNA index(%)ratio between the DNA content of tumor cells and that of normal diploid cells

** In case 6, 9, and 10, ploidy analysis was not possible due to high C.V.

였고 중앙 CV 값은 7.9%였다. 7예중 4예에서 배수성이 원발암의 이배성에서 재발암에서 이수성으로 변화하였다. 이수성을 보이는 재발암의 DNA index는 1.25에서 1.6까지의 분포를 보였다(Table 3).

역시 7예를 대상으로 SPF를 측정된 결과 원발암과 재발암이 각각 7.47 ± 5.23 , 17.69 ± 17.49 였으며 재발암에서 높은 SPF값을 보여 재발암의 세포 증식능이 원발암보다 높아짐을 보여주었다(Fig. 2).

원발암과 재발암간에 표현 정도의 차이를 보였던 PCNA와 SPF간에 어떠한 상관 관계가 있는지 보고자 하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 원발암이나 재발암에서 PCNA와 SPF의 상관 관계는 보이지 않았다.

고 찰

고 있었다.

DNA flow cytometry 분석은 10예중 3예에서 coefficient of variance(CV)가 13% 이상으로 나와 결과의 정확성을 기하기 위하여 분석에서 제외하였다. 나머지 7예의 CV는 5.2%에서 12.7%까지 분포하

악성 종양은 생물학적으로 다양한 성상의 세포군으로 구성되어 있다. 이같은 생물학적 이형성은 전이능이나 세포 독성 물질에 대한 감수성 등과 밀접한 관련이 있다는 것이 이미 밝혀진 바 있다¹⁶⁻¹⁸. 원발암을

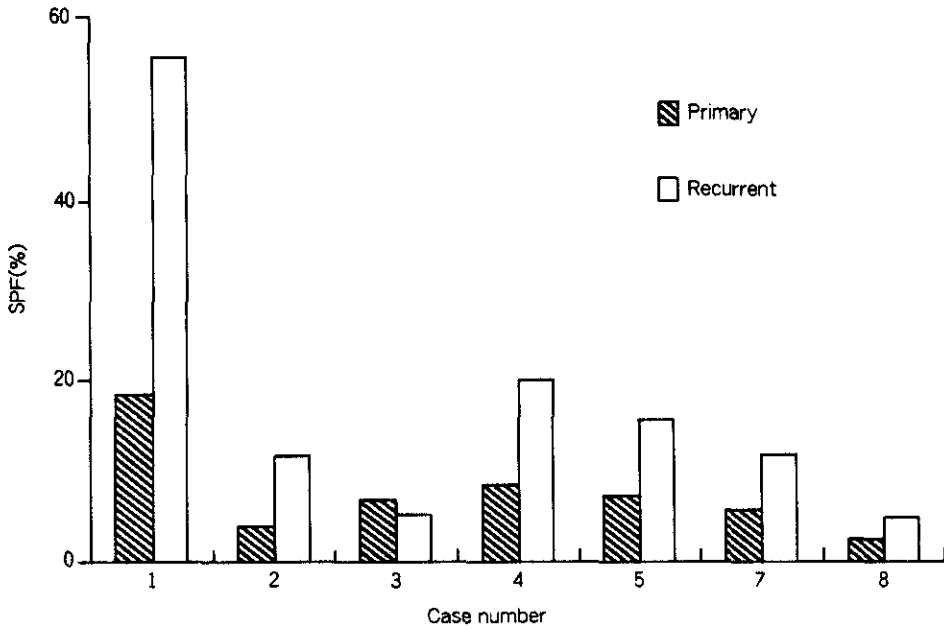


Fig. 2. Changes in S phase fraction (SPF) in primary and recurrent colorectal cancer. In case 6, 9, and 10, SPF analysis was not possible due to high C.V.

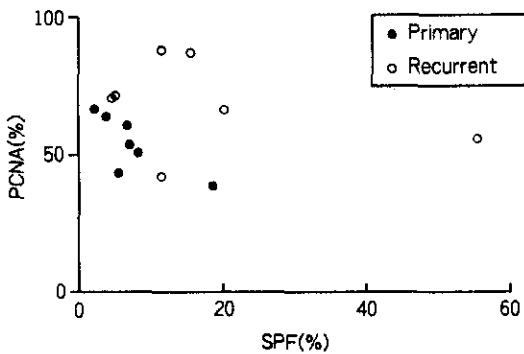


Fig. 3. Scattergram of SPF and PCNA index of primary and recurrent colorectal cancers.

근치적 방법으로 치료하게 되면 그 부위의 미세 환경은 세포의 성장에 불리한 여건이 된다. 여기에서 자란 재발암의 생물학적 성질은 원발암과는 다를 것으로 생각된다.

종양 세포의 증식능은 임상적 경과와 가장 연관성이 깊은 생물학적 지표로서 유방암을 비롯한 각종암에서 예후와의 상관 관계가 이미 보고된 바 있다.¹⁹⁻²⁰⁾ 증식

능을 평가하는 방법도 매우 다양하며, thymidine 표지법이나 bromodeoxyurine 표지 후 flow cytometry 분석을 통한 세포 주기의 역동학적 측정이 매우 중요한 방법으로 대두되었다³¹⁾. 그러나 기왕에 제작되어 있는 조직 표본을 이용한 후향적 연구일 경우는 세포 분열과 관련있는 항원을 면역 조직 화학염색으로 평가하는 방법과 flow cytometry로 세포의 DNA양 즉, 배수성과 합성기 세포 분할을 측정하는 방법으로 제한된다³¹⁾.

본 연구 결과 재발암의 조직 분화도가 원발암보다 나빠지는 경향을 보이고 선암과 점액성 선암의 혼합양상이 재발시 점액성 선암으로 진행된 것은 두가지 가능성을 시사하는 것으로 생각된다. 즉 원발암의 이행적 세포 집락 중에서 분화도가 나쁜 세포군들 또는 점액성 선암 세포군들이 이후 재발의 시초로 연계되었을 가능성과 또 한가지로는 열악한 미세 환경을 거치면서 암세포에서 악성도의 진화(evolution)가 일어났을 가능성이 있다. PCNA의 면역 조직 화학 염색에서 재발암의 PCNA index가 원발암보다 월등히 높은 것도 같은 의미로 받아들일 수 있을 것으로 생각된다.

반면 TGF- α 는 원발암과 재발암간에 표현 정도의 차이를 발견할 수 없었으며 이는 TGF- α 가 주로 종양 세포의 악성도의 진화 과정 및 침습적 성장 과정에 관여하지, 증식 자체에 직접적인 관여는 적기 때문일 것으로 생각된다.

Flow cytometry로 세포 DNA를 분석하는 것은 종양 세포들의 배수성을 판별할 뿐 만 아니라 세포 주기에서 DNA의 합성이 일어나고 있는 합성기 세포의 분할을 양적으로 측정할 수 있어서 매우 효용성이 높은 검사법이다¹³⁾. 본 연구 결과 4예에서 원발암의 이배성이 재발암에서 이수성으로 변화함을 보여주었다. 이는 종양세포의 악성도의 진화와 관련이 있음을 암시한다. SPF 역시 재발암에서 현저히 증가되는 양상을 보이고 있으며 이는 PCNA index의 증가와 같은 의미로 해석할 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 3에서 PCNA index와 SPF간에 상관 관계가 없는 것으로 나타난 것은, 본 연구가 이미 재발이 된 예만을 연구 대상으로 하였기 때문이 아닐까 한다. 5년 이상 무병 생존을 보이는 환자들의 원발암의 조직 표본을 재발이 나타난 예와 함께 연구해 본다면 좀 더 흥미로운 결과가 나올 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

대장암에서 원발암과 재발암간의 생물학적 특성의 차이를 세포 증식능으로 구체적으로 평가하였다. 본 연구 결과 재발암에서 세포의 분화도, 조직학적 유형 및 DNA 배수성이 이수성으로 변화하는 것이 관찰되어 재발암의 생물학적 특성이 악성도가 높은 쪽으로 변화하는 것으로 생각되었다. 또한 PCNA 표현 정도와 합성기 세포 분할이 재발암에서 현저히 증가되는 양상을 보여서 재발암에서 증식능이 활발하여짐을 알 수 있었다.

재발을 보이지 않은 장기 생존자의 조직 표본을 함께 연구한다면 좀 더 흥미로운 결과가 나올 것으로 기대하며 이같은 연구를 토대로 재발 가능성이 높은 예를 예측할 수 있는 보다 세련된 방법을 고안해 나가야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1) Hoffman JP, Riley L, Carp NZ, Litwin S: *Isolated*

locally recurrent rectal cancer: A review of incidence, presentation, and management. Sem Oncol 20: 506, 1993

- 2) Pemberton M: *Assessment and management of recurrences of carcinoma of the large intestine. Proc R Soc Med 65: 663, 1972*
- 3) Stearns MW: *Diagnosis and management of recurrent pelvic malignancy following combined abdominoperineal resection. Dis Colon Rectum 25: 359, 1980*
- 4) Pilipshen SJ, Heilweil M, Quan SHQ: *Patterns of pelvic recurrence following definitive resections of rectal cancer. Cancer 53: 135, 1984*
- 5) Wilking N, Herrera K, Petrelli NJ: *Pelvic and perineal recurrences after abdominoperineal resection for adenocarcinoma of the rectum. Am J Surg 150: 561, 1985*
- 6) Hohenberger P, Schiag P, Kretzschmar U: *Regional mesenteric recurrence of colorectal cancer after anterior resection or left hemicolectomy: Inadequate primary resection demonstrated by angiography of the remaining arterial supply. Int J Colorectal Dis 6: 17, 1991*
- 7) Tannock IF: *Cell proliferation. In: Tannock IF, Hill RP, eds. The basic science of oncology. 2nd edit, New York: McGraw-Hill, 154, 1992*
- 8) Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL: *Growth factors and cancer. Cancer Res 46: 1015, 1986*
- 9) Hall PA, Levison DA, Woods AL: *Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 162: 285, 1990*
- 10) Scott RJ, Hall PA, Haldane JS: *A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. J Pathol 165: 173, 1991*
- 11) Fontaini G, Pingitore R, Bigini D: *Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with Ki-67 labeling and DNA flow cytometry data. Am J Pathol 141: 1285, 1992*
- 12) Gelb AB, Kamel OW, LeBrun DP: *Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using two anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies. Am J Pathol 141: 1453, 1992*

- 13) Ormerod MG: *Flow cytometry: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1990
- 14) Garcia RL, Coltreara MD, Gown AM: *Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues*. *Am J Pathol* **134**: 733, 1989
- 15) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW: *Application of DNA flow cytometry to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance*. *Cytometry* **6**: 327, 1985
- 16) Fidler IJ, Kripke J: *Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor*. *Science* **197**: 893, 1977
- 17) Fidler IJ, Hart IR: *Biologic diversity in metastatic neoplasms-origins and implications*. *Science* **217**: 998, 1982
- 18) Kerbel RS: *Growth dominance of the metastatic cancer cell; Cellular and molecular aspects*. *Adv Cancer Res* **55**: 87, 1990
- 19) Armitage NC, Ballantyne KC, Evans DP: *The influence of tumor cell DNA content on survival in colorectal cancer: a detailed analysis*. *Br J Cancer* **62**: 852, 1990
- 20) Beerman H, Kluin PhM, Herman J: *Prognostic significance of DNA ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients*. *Int J Cancer* **45**: 34, 1990
- 21) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW: *Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors*. *J Clin Pathol* **37**: 961, 1984
- 22) Clark GM, Dressler LG, Owens MA: *Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry*. *N Engl J Med* **320**: 627, 1989
- 23) Hedley DW: *Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on*. *Cytometry* **10**: 229, 1989
- 24) Silvestrini R, Daidone MG, Cossta A: *Cell kinetics of solid tumors with time and its clinical implication*. *Tumori* **75**: 367, 1989
- 25) Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P: *Cell kinetics as a prognostic indicator in node-negative breast cancer*. *Eur J Cancer Clin Oncol* **25**: 1165, 1989
- 26) Silvestrini R, Giardini R: *Prognostic implications of cell kinetics, histopathology and pathologic stage in non-Hodgkin's lymphomas*. *Haematol Oncol* **7**: 411, 1989
- 27) Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P: *The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer-a study with long-term follow-up*. *Br J Cancer* **60**: 693, 1989
- 28) Costa A, Silvestrini R, Mezzanotte G: *Cell kinetics: an independent prognostic variable in stage II melanoma of the skin*. *Br J Cancer* **62**: 826, 1990
- 29) Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A: *Indicators of prognosis in node-negative breast cancer*. *N Engl J Med* **322**: 1045, 1990
- 30) Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K: *Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma*. *Cancer Res* **50**: 509, 1990
- 31) Hall PA, Levison DA: *Review: assessment of cell proliferation in histological material*. *J Clin Pathol* **43**: 184, 1990