

성장호르몬과 프로락틴분비 뇌하수체선종의 In Situ Hybridization에 의한 분석

연세대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실*, 신경외과학교실**

이은직 · 김경래 · 이현철 · 남문석 · 조재화 · 임승길 · 정현주*
김태승* · 김선호** · 최종언** · 정상섭** · 이규창** · 허갑범

In Situ Hybridization Analysis of Human Growth Hormone and Prolactin Secreting Pituitary Adenomas

Eun Jig Lee, M.D., Kyung Rae Kim, M.D., Hyun Chul Lee, M.D., Moon Seok Nam, M.D.

Jae Wha Jo, M.D., Sung Kil Lim, M.D., Hyun Joo Jung, M.D.*, Tae Sung Kim, M.D.*

Sun Ho Kim, M.D.** , Joong Uhn Choi, M.D.** , Sang Sup Chung, M.D.**

Kyu Chang Lee, M.D.** and Kap Bum Huh, M.D.

Department of Internal Medicine, Pathology, Neurosurgery**, Yonsei University,
College of Medicine, Seoul, Korea*

ABSTRACT

A non-isotopic in situ hybridization method with biotin-labelled oligonucleotide probes was used to examine growth hormone (GH) and prolactin (PRL) gene expression in 32 patients with pituitary adenomas; 13 were prolactinomas, 8 GH secreting adenomas, and 11 mixed GH and PRL secreting adenomas.

Positive immunostaining for GH was found in all patients with GH secreting adenomas, and mixed GH and PRL secreting adenomas. Positive immunostaining for PRL was found in all patients with prolactinomas and 9 (81.8%) of 11 mixed GH and PRL secreting adenomas, 5 (62.5%) of 8 GH secreting adenomas. Immunohistochemistry revealed that 13 were lactotrope adenomas, 5 somatotrope adenoma, and 14 GH and PRL cell adenomas.

In situ hybridization revealed that GH mRNA expression was found in all the patients with somatotrope adenoma and GH and PRL cell adenomas, and 6 (46.1%) of 13 lactotrope adenomas. PRL mRNA expression was 100% in lactotrope and GH and PRL cell adenomas, and 4 (80.0%) of 5 somatotrope adenomas.

The patients with a clinical diagnosis of acromegaly had detectable PRL mRNA in their neoplasm and it is suggested that the PRL cells in the adenomas did not result from dedifferentiation, but from the neoplastic stimulus for some mixed tumors probably occurred in cells previously committed to produce PRL and GH. In lactotrope adenomas, the PRL cells of the patients without expression of GH mRNA may be arised from cells programmed to secrete PRL or precursor PRL cells rather than from mixed GH-PRL cells. The finding that some patients produced mRNA detectable by in situ

본 논문은 1993년도 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의하여 연구된 것임.

hybridization, but no hormone detectable by immunohistochemistry within tumor was suggested of a silent adenoma.

These observations indicated that in situ hybridization studies may improve the classification of pituitary adenomas and may provide a precise knowledge of the biology of these neoplasms. (J Kor Soc Endocrinol 9:82~92, 1994)

Key Words: Growth hormone secreting pituitary adenoma, Prolactin secreting pituitary adenoma, In situ hybridization, GHmRNA, PRLmRNA

서 론

일반적으로 정상 뇌하수체에서 개개의 세포는 한가지 호르몬을 분비한다고 알려져 왔으나 최근의 연구에 의하면 어떤 세포는 한가지 이상의 호르몬을 분비하며, 예를 들면 호산성세포는 성장호르몬(growth hormone, GH)과 프로락틴(prolactin, PRL)을 분비하며, 또한 어떤 뇌하수체선종은 2가지 이상의 호르몬을 분비하는 경우도 있다[1, 2]. 뇌하수체선종환자의 혈청 검사시 2가지 이상의 호르몬이 증가되는 경우는 말단비대증에서 가장 많은 빈도로 관찰된다. 즉 말단비대증에는 30~50%에서 고프로락틴혈증이 동반되는 데 이들의 원인은 선종세포에서 2종류의 호르몬을 분비하는 경우와 뇌하수체종양이 뇌하수체경(pituitary stalk)을 압박하여서, 프로락틴분비를 억제하는 시상하부의 도파민을 차단하여 일어나는 고프로락틴혈증의 경우이다[3, 4]. 수술후 얻은 조직에서 성장호르몬과 프로락틴의 면역조직화학염색을 하면 이들을 감별할 수 있는데, 혈청 프로락틴치가 증가하여도 프로락틴 면역조직화학염색이 음성으로 나올 수 있고, 또 혈청 프로락틴치가 증가하지 않아도 면역조직화학염색이 양성으로 나올 수 있다. 또한 한종류의 세포에서 성장호르몬과 프로락틴이 동시에 염색되거나 서로 다른 세포에서 염색될 수 있는 등 매우 다양한 결과가 나온다[5].

최근 태어나 성인의 뇌하수체세포를 면역염색 및 reverse hemolytic plaque assay를 통하여 성장호르몬과 프로락틴을 같은 세포내에 저장하고 분비하는 정상 뇌하수체세포를 확인한 바 있다[1, 2]. 따라서 이 세포에서 유래되는 뇌하수체선종은 성장호르몬과 프로락틴을 동시에 분비할 수 있겠다. 이와 같이 선종세포에서 합성되어서 분비되는 호르몬은 유전자에서

mRNA로 전사(transcription)되고 또 번역(translation)되어 단백질합성과정을 밟는데 선종세포의 분화 정도와 그 과정에 따라 매우 다양한 결과가 예상된다.

한편 최근에 도입된 in situ hybridization (ISH)분석법은 특이한 유전자의 전사활성도(transcriptional activation)에 대한 정보를 밝힐 수 있는 방법으로 소식자(probe)를 이용하여 염색체나 세포 그리고 조직에서 소식자와 상보적인 유전자 배열을 검출하는 방법으로서 장점은 세포나 조직 그리고 염색체 등의 형태적인 구조가 유지된 상태에서 양성 신호(positive signal)를 관찰할 수 있어서 높은 특이성을 갖는다[6, 7].

ISH를 이용한 mRNA의 검출은 여러 연구 분야에 이용되고 있는데 내분비학의 영역에서는 각종 호르몬이나 호르몬 수용체 및 내분비 종양의 표지자 등에 대하여 연구가 활발히 진행되고 있으며 내분비세포의 유전자발현에 있어서 핵산을 추출하는 단계가 필요하지 않기 때문에 비교적 유용하게 실험에 이용되고 있다. 또한 내분비세포의 대사과정이 매우 불안정할 경우 유전자에서 아무리 전사된다 하더라도 단백질로 번역되지 않기 때문에 면역조직화학염색방법으로는 확인되지 않지만 ISH로는 mRNA의 검출이 용이하며 아울러 이질성을 갖는 내분비세포에서 유전자 산물을 분비하는 세포와 그렇지 않은 세포를 구분할 수 있고, 뇌하수체 전엽호르몬을 분비하는 세포의 유형을 동정하고, 비기능성 뇌하수체선종에서도 호르몬에 관련된 mRNA를 검출할 수 있다[8~13]. 내분비종양에서도 분비가 왕성하고 세포내에 저장이 어려운 종양세포의 검색에 있어서 ISH를 통한 mRNA를 검출하는 방법은 매우 유익한 검사로서, Lloyd 등[14]은 말단비대증이 있는 뇌하수체선종환자에서 성장호르몬을 대량으로 분비하고 세포내에 저장되지 않으므로 면역조직화학적으로로는 검출되지 않지만 ISH로 성장호르몬 mRNA가

검출된 경우를 보고한 바 있다. 이와 같이 말단비대증과 고프로락틴혈증이 있는 뇌하수체선종환자에서 면역조직화학염색으로 불충분한 정보를 ISH를 시행하여서 성장호르몬과 프로락틴의 mRNA를 검출하면 선종세포의 유전자에서 발현되는 정보를 직접적으로 얻을 수 있겠다.

따라서 본 연구에서는 성장호르몬과 프로락틴분비선종 환자에서 임상증상 및 혈청 호르몬검사를 시행하여 내분비학적 특징을 파악하고 수술을 하여 얻은 조직에서 면역조직화학염색을 하여 선종세포내 함유하고 있는 성장호르몬과 프로락틴을 확인하고 또한 ISH를 병용하여 성장호르몬 mRNA 및 프로락틴 mRNA를 검출하여 서로 비교하여 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

성장호르몬 및 프로락틴 분비 뇌하수체선종으로 진단받고 중앙절제술을 받은 32예를 대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 내분비학적 검사

환자들에서 혈청 성장호르몬과 프로락틴치를 방사면역측정법으로 측정하였고, 성장호르몬분비선종(growth hormone secreting adenoma)은 말단비대증의 임상증상과 혈청 성장호르몬치가 5 ng/ml 이상일 경우로 하였고, 프로락틴분비선종(prolactin secreting adenoma)은 2회 이상 측정된 혈청 프로락틴치가 50 ng/ml 이상으로 하였으며, 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종은 위의 양쪽을 모두 충족시킬 때로 하였다.

2) 조직학적 검사

(1) 조직

파라핀에 포매된 조직을 4~5 um 두께로 잘라서 3-aminopropylomethoxysilane (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)을 피막한 슬라이드(slide)에 부착시킨다. 조직을 절편할 때는 비닐장갑을 착용하고 RNase를 제거하는 diethylpyrocarbonate (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, DEPC)로 처리 후 가압멸균한 탈이온화된 증류수(deionized distilled water)를 사용한다.

(2) 면역세포화학염색

성장호르몬과 프로락틴에 대한 토끼의 항체를 이용하여 avidin-biotin peroxidase complex 방법을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 이때 사용한 항체는 1 : 500으로 희석된 성장호르몬항체 및 1 : 300으로 희석된 프로락틴항체를 사용하였으며 DAKO (Kyoto, Japan) 제품을 사용하였다.

면역조직화학염색과정은 먼저 조직절편을 인큐베이터(incubator)에 56~58°C의 온도로 50분간 가온시킨 후 크실렌(xylene)에 20분 침수하여 파라핀을 제거하고 면역글로불린의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 95% 메틸알콜에서 5분간, 3% 과산화수소수에서 약 10분간 처리하고, 그 후 실온에서 차단항체(blocking antibody)에 20분간 반응시킨다. 이런 처리를 한 조직절편을 일차항체(primary antibody)에 약 40분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 10분간 수세하고 연결항체(link antibody)에 20분간 반응시키고, Tris 완충액에 다시 10분간 수세한 후 alkaline phosphatase labelled streptavidin에 20분간 반응시켰다. 동일한 수세과정을 거친후 diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)으로 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

각각의 호르몬에 대한 중앙세포의 양성율을 정함에 있어서 비교적 많은 다섯 영역을 선택하여 400배의 고배율 시야에서 전체세포중 양성인 세포수를 세어 이들의 평균값을 구하고 다음과 같이 분류하였다.

- : 음성, (+) : 1~10% 양성, + : 11~30% 양성, ++ : 31~60% 양성, +++ : 61% 이상 양성

면역세포화학염색시 각호르몬에 염색되는 세포수가 10% 이상인 경우를 양성으로 판정하여 성장호르몬에 양성인 성장호르몬분비세포선종(somatotrope adenoma), 프로락틴에 양성인 프로락틴분비세포선종(lactotrope adenoma) 및 성장호르몬과 프로락틴이 동시에 양성인 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종(growth hormone and prolactin cell adenoma)으로 분류하였다.

(3) In Situ Hybridization

① 소식자 및 표지(probe and labeling)

성장호르몬과 프로락틴 mRNA를 검출하기 위한 소식자는 oligonucleotide를 사용하며 그 염기순서는 아래와 같으며 성장호르몬소식자는 인형 성장호르몬 유

전자의 아미노산 11-17을 부호화하는 mRNA 부위와, 프로락틴소식자는 인형 프로락틴유전자의 아미노산 66-72을 부호화하는 mRNA 부위에 각각 상보적인 염기 배열을 하고 있는 21개의 염기로 구성된 oligonucleotide이며, 이는 British Bio-technology Products (Oxon, United Kindom)사에 의뢰하여 합성 및 5' 말단에 biotin을 표지시키고 HPLC로 정제시켰다.

성장호르몬 소식자 : 5'[GGC GCG GAG CAT AGC GTT GTC]3'

프로락틴 소식자 : 5'[GGC TTG CTC CTT GTC TTC GGG]3'

양성 대조소식자는 biotin을 표지시킨 polydT를 사용하였고 음성대조는 소식자를 첨가하지 않거나 RNase를 처리한 뇌하수체선종과 영세포선종 및 간조직을 이용하여 실험하였다(Fig. 1).

② In situ hybridization

조직절편 37°C에서 밤새 말린 후 크실렌에 10분간 처리하여 파라핀을 제거하고, 99% 및 95% 알콜에 탈수 및 가수화(rehydration)시키고, DEPC로 처리된 증류수에 5분간 수세한 뒤, 미리 가온한 60°C 2×SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M trisodium citrate) 용액에 10분

간 처리 후 DEPC로 처리된 증류수에 수세한다. 실온 상태의 50 mM Tris (pH 7.6) 용액에 5분간 처리후 가속된 hybridization 상자에 넣고, 조직위에 proteinase K (5 ug/ml)를 300 ul씩 떨어뜨리고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 뒤에 1×PBS에 1분간 수세 후 4°C의 0.4% paraformaldehyde에 10분간 postfix시킨 뒤 DEPC로 처리된 증류수에 수세하고 다시 hybridization 상자에 넣는다. 조직절편위에 prehybridization 용액(30%(v/v) formamide, 0.6 M salts, 150 ug/ml sonicated salmon sperm DNA)을 300 ul씩 떨어뜨리고 1시간(37°C)동안 prehybridization시킨 뒤, 조직절편위의 용액을 흘려버리고 소식자가 포함된 hybridization용액(소식자 농도 200 ng/ml)을 100 ul씩 떨어뜨리고 덮개유리(cover glass)를 덮고 37°C에서 18시간 hybridization시킨다.

Hybridization이 끝난 후 biotin 검출은 다음과 같다. 조직절편은 미리 37°C로 가온한 4×SSC/30% formamide에 5분간 2회, 2×SSC/30% formamide에 5분간 2회 및 0.2×SSC/30% formamide에 5분간 2회 수세후 실온의 1×modified TBS/trition (50 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1%

Fig. 1. The result of in situ hybridization. A. Negative control, B. Positive control (×400).

bovine serum albumin, 0.1% triton)에 15분간 처리한다.

조직절편위에 1:1000으로 희석한 avidin-alkaline phosphatase conjugate를 300 ul 떨어뜨려 실온에서 30분간 반응시키고, 1×modified TBS에 5분간 2회 처리후 증류수로 수세후 발색소가 포함된 완충액(0.125 M Tris pH 9.5, 1 M NaCl, 0.5 M MgCl₂, NBT, BCIP, levamisole)을 300 ul씩 떨어뜨리고 암실에서 밤새도록 반응시키고, 꺼내어 증류수에 수세후 0.1% malachite green에 2분간 대조염색후 현미경으로 관찰한다.

양성판정기준은 면역조직화학염색후 판정하는 기준을 같이 적용하였다.

결 과

1. 임상 및 내분비학적 특징

대상 32예중 남자 10예(31.2%), 여자 22예(68.8%)이었고, 연령분포는 20세부터 60세까지로 평균연령은 35.6세이었고, 임상 및 내분비학적으로 분류한

Table 1. Clinical and Endocrinological Classification of Pituitary Adenomas

Adenoma	M	F	Total(%)
PRL	3	10	13(40.6)
GH	5	7	12(37.5)
Mixed GH and PRL	2	5	7(21.9)
Total (%)	10(31.2)	22(68.8)	32(100.0)

Table 2. Classification by Computed Tomogram of Pituitary adenoma

Adenoma	Grade*			
	I	II	III	IV
PRL	3	1	3	6
GH	0	3	7	2
Mixed GH and PRL	1	1	4	1
Total (%)	4(12.5)	5(15.6)	14(43.7)	9(28.1)

*: Hardy Classification (I: microadenoma, II: intrasellar localization, III: extrasellar extension, IV: invasive adenoma)

Fig. 2. The result of immunohistochemistry and in situ hybridization of somatotrope adenoma. A. Immunopositivity for growth hormone. B. In situ hybridization gives a positive signal for growth hormone mRNA. (×400)

Fig. 3. The result of immunohistochemistry and in situ hybridization of lactotrope adenoma.

A. Immunopositivity for prolactin.

B. In situ hybridization gives a positive signal for prolactin mRNA. (×400).

결과 프로락틴분비선종이 13예(40.6%), 성장호르몬 분비선종 8예(25.0%) 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종이 11예(34.4%)가 있었다(Table 1).

전산화단층촬영 소견상 종양의 크기가 1 cm보다 작은 미세선종이 4예(프로락틴분비선종 3예, 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종 1예) 있었고 나머지 28예는 모두 거대선종이었으며 이들 중 침윤성선종이 9예(프로락틴분비선종 6예, 성장호르몬분비선종 2예, 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종 1예)가 있었다(Table 2).

2. 면역조직화학염색 소견

성장호르몬과 프로락틴의 면역조직화학염색의 양성 소견은 Fig. 2, 3과 같다.

면역조직화학염색결과 선종세포중 10% 이상의 세포가 성장호르몬에 염색이 되는 경우는 전예(100.0%)의 성장호르몬분비선종 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종에서 관찰되었고, 프로락틴 면역조직화학염색 양성은 전(100.0%)예의 프로락틴분비선종과 5예(62.5%)의 성장호르몬분비선종 및 9예(81.8%)의 성

Table 3. Classification by the Results of Immunohistochemistry

Adenoma	Male	Female	Total(%)
Lactotrope	3	10	13(40.6)
Somatotrope	2	3	5(18.7)
GH and PRL cell	5	9	14(43.7)

장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종에서 관찰되었다.

면역조직화학염색결과에 의해 선종을 분류한 결과 프로락틴분비세포선종이 13예(40.6%) 있었고, 성장호르몬분비세포선종이 5예(15.6%) 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종이 14예(43.8%)가 있었다(Table 3).

3. In Situ Hybridization 결과

성장호르몬과 프로락틴의 ISH검색결과 검출된 프로락틴mRNA와 성장호르몬mRNA는 Fig. 2, 3과 같다.

프로락틴분비세포선종 13예중 성장호르몬mRNA는 6예(46.1%)에서 프로락틴mRNA는 전예(100.0%)에서 검출되었다(Table 4, 7). 성장호르몬분비세포선종

Table 4. Clinical Features, Immunohistochemical and In Situ Hybridization Results in Patients with Lactotrope Adenoma

Sex	Age	CT*	GH		PRL		IH*		ISH**	
			(ng/ml)		GH	PRL	GH	PRL	GH	PRL
F	29	I	0.3	230.0	-	+++	++	++		
F	40	I	0.3	236.6	-	++	-	++		
F	20	I	1.3	109.5	-	++	-	++		
F	28	II	0.3	>1000.0	-	+++	-	+++		
F	29	IIIa	0.3	2269.2	-	++	-	++		
F	29	IIIa	0.9	691.4	-	++	-	+		
F	29	IIIa	4.4	503.0	-	++	-	++		
M	39	IVb	2.4	543.5	-	++	-	++		
M	31	IVb	0.3	339.5	-	++	+++	+++		
M	34	IVb	1.4	5615.0	-	+++	+++	++		
F	30	IVc	1.3	2000.0	-	+++	+	+++		
F	53	IVc	2.4	>1000.0	-	+	-	+		
F	32	IVc	0.3	>1000.0	-	++	+	++		

*IH: immunohistochemistry

**ISH: in situ hybridization

*CT: Hardy classification (I: microadenoma, II: intrasellar) localization, III: extrasellar extension, IV: invasive adenoma, suprasellar extension a: mild, b: moderate, c: severe)

Table 5. Clinical Features, Immunohistochemical and In Situ Hybridization Results in Patients with Somatotrope Adenoma

Sex	Age	CT*	GH		PRL		IH*		ISH**	
			(ng/ml)		GH	PRL	GH	PRL	GH	PRL
F	37	II	>30.0	79.2	++	(+)	++	+		
F	37	III	>30.0	80.0	++	(+)	++	++		
F	55	IIIa	16.9	12.1	+++	(+)	++	++		
M	40	IIIb	>30.0	26.9	+++	-	+++	++		
M	48	IV	>30.0	2.5	+++	-	+++	-		

*IH: immunohistochemistry

**ISH: in situ hybridization

*CT: Hardy classification (I: microadenoma, II: intrasellar localization, III: extrasellar extension, IV: invasive adenoma, suprasellar extension a: mild, b: moderate, c: severe)

5예중 성장호르몬mRNA는 전예(100.0%)에서 프로락틴mRNA는 4예(80.0%)에서 검출되었다(Table 5, 7), 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종에서는 성장호르몬mRNA와 프로락틴mRNA가 전예(100.0%)에서 검출되었다(Table 6, 7).

고 안

과거에 호산성으로 염색되는 뇌하수체선종은 대개

성장호르몬과 프로락틴을 분비한다고 알려져 왔으나, 최근에 도입된 면역조직화학염색은 세포질내 호르몬을 검출하게 해주므로 분비세포중심으로 선종의 분류를 다시 하게 되었고, 혈액소성선종도 성장호르몬과 프로락틴을 분비하는 경우도 발견되었다[4]. 또한 혈청 호르몬치가 상승되지 않기 때문에 호르몬상승에 의한 증상이 없는 무중상선종을 진단하게 되었고, 2가지 이상의 호르몬을 함유하고 분비하는 선종도 밝혀지게 되었

Table 6. Clinical Features, Immunohistochemical and In Situ Hybridization Results in Patients with GH and PRL Cell Adenoma

Sex	Age	CT*	GH		PRL		IH*		ISH**	
			(ng/ml)		GH	PRL	GH	PRL	GH	PRL
M	29	I	16.4	50.8	++	++	++	++	++	++
F	60	II	28.1	18.8	++	++	++	++	++	+
M	33	II	>30.0	32.4	++	++	++	++	+++	+++
F	42	IIb	57.2	65.9	+++	++	++	+	+	+
M	32	III	56.2	1.1	++	++	++	++	++	+
F	40	IIIa	>30.0	50.3	++	++	++	++	+++	++
M	31	IIIa	15.7	54.2	++	++	++	++	++	++
M	29	IIIb	49.4	386.8	+++	++	++	++	++	+
M	27	IIIb	25.4	57.1	+++	+++	++	++	++	++
F	43	IIIb	>30.0	65.2	+++	+	++	++	+++	++
M	28	IIIc	55.6	65.0	+++	++	++	+	+	++
M	32	IIIc	41.8	40.0	+++	++	++	++	+++	+++
F	38	IVb	64.9	47.7	+++	++	++	++	+++	+++
F	36	IVc	359.6	172.2	+++	+	++	++	++	++

*IH: immunohistochemistry

**ISH: in situ hybridization

*CT: Hardy classification (I: microadenoma, II: intrasellar localization, III: extrasellar extension, IV: invasive adenoma, suprasellar extension a: mild, b: moderate, c: severe)

Table 7. Positivity of Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in Patients with Pituitary Adenoma Classified Immunocytochemistry

	IH*		ISH**	
	GH	PRL	GH	PRL
Lactotrope	0/13(0.0%)	13/13(100.0%)	6/13(46.1%)	13/13(100.0%)
Somatotrope	5/ 5(100.0%)	3/ 5(60.0%)	5/ 5(100.0%)	4/ 5(80.0%)
GH and PRL cell	14/14(100.0%)	14/14(100.0%)	14/14(100.0%)	14/14(100.0%)

*IH: immunohistochemistry

**ISH: in situ hybridization

다. 뇌하수체선종 중에서 2가지 이상의 호르몬이 증가되는 경우는 말단비대증에서 가장 흔하게 관찰되는데, 말단비대증의 약 30~50%의 빈도로 혈청 프로락틴의 상승이 관찰된다. 이들은 면역조직화학염색의 도움으로 3가지의 가능성으로 분류된다. 첫째 한 종류의 세포에서 성장호르몬과 프로락틴을 동시에 분비하는 단일형태성 이중호르몬분비선종(monomorphic bihormonal adenoma)인 호산성간세포선종(acidophil stem cell adenoma)나 맘모소마토프로선종(mam-

mosomatotrope adenoma)이 있고, 둘째 성장호르몬 분비선종과 프로락틴분비선종세포가 서로 모자이크(mosaic)형태로 혼합된 이중형태성 이중호르몬분비선종(bimorphous bihormonal adenoma, mixed somatotrope and lactotrope adenoma) 및 셋째 성장호르몬을 분비하는 거대선종이 뇌하수체경을 압박함으로써 프로락틴억제인자(prolactin inhibiting factor)가 차단하여 유발된 경우이다[15].

본 연구에서는 면역조직화학염색결과 말단비대증을 보인 19예중 선종세포중 10% 이상의 세포가 성장호르

본에 염색이 되는 경우는 전예에서 관찰되었고, 프로락틴은 14예(73.7%)에서 양성을 보였고, 프로락틴분비선종 13예중 전예에서 프로락틴면역염색상 양성이었으나 성장호르몬면역염색에 양성인 경우는 없었다. 이와 같은 결과는 다른 연구자들의 보고보다 말단비대증에서 프로락틴 양성율이 높았는데 이런 이유는 본 연구의 말단비대증환자군에서 고프로락틴혈증이 동반된 경우인 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종이 11예(57.9%)로 많기 때문으로 생각된다. 본 연구에서 이중면역세포화학염색(double immunohistochemical stain)은 하지 못했으나 면역조직화학염색을 통해 프로락틴분비세포선종, 성장호르몬분비세포선종 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종으로 분류할 수 있었다.

이와 같이 면역조직화학염색이 선종조직내에 호르몬의 저장을 확인해주지만 뇌하수체선종세포의 호르몬의 생합성능력을 파악하기에는 미흡하다. 일례로 Lloyd 등[14]은 말단비대증이 있는 뇌하수체선종환자에서 성장호르몬을 대량으로 분비하나 세포내에 저장되지 않으므로 면역조직화학적으로는 검출이 되지 않지만 ISH로 성장호르몬mRNA를 검출한 바 있는데, 즉 호르몬이 합성된 뒤 빠르게 분비되는 경우는 면역조직화학염색으로는 진단이 불충분한 경우가 있기 때문이다. 또한 ISH는 조직의 형태학적 구조를 유지하면서 특정 유전자에서 전사되는 호르몬의 mRNA를 검색할 수 있는 장점이 있다[6, 7].

보통 mRNA를 검출하기 위해 사용되는 소식자로는 nick-translated cDNA소식자와 20~30개의 염기로 구성된 oligonucleotide 및 RNA소식자 등이 있으며, 소식자의 생산방법이 간편하고 또한 염기의 길이가 짧은 oligonucleotide가 비교적 많이 이용된다[16]. ISH를 시행한 후에 상보적인 사슬과 결합된 소식자를 확인하기 위해서는 소식자에 방사선 동위원소나 비방사성 물질을 부착하여 실험에 이용하며, 비방사성물질로는 biotin, digoxigenin, alkaline phosphatase, fluorescein 등이 이용되며[17, 18], 본 실험에서는 21개의 염기로 구성된 oligonucleotide에 biotin을 표지시켜 사용하였다. 조직내의 mRNA의 보존 유무가 검출 유무를 결정하기도 하는데 신선한 조직이 좋으며 파라핀에 포매된 조직은 양성율이 감소한다고 하나 고정액을 paraformaldehyde를 사용하는 경우에 mRNA의

보존이 양호하며 formalin에 고정된 조직도 가능한 것으로 되어 있다[7, 8].

본 연구에서 ISH를 시행한 결과 성장호르몬분비세포선종 5예중 성장호르몬mRNA는 전예(100.0%)에서 프로락틴mRNA는 4예(80.0%)에서 검출되었다. 다른 연구자들의 보고에 따르면 성장호르몬분비세포선종에서 프로락틴mRNA의 검출율은 Levy 및 Lightman[19]에 의하면 52.5%, Lloyd 등[14]은 87.5%, Tallen 등[18]은 95.0%, Uhlig 등[20]의 80.0% 등과 비교하면 유사함을 알 수 있다. 이런 사실은 말단비대증을 보인 환자에서, 비록 면역조직화학염색상 일부에서 프로락틴이 검출되지 않았으나, ISH검색결과 대부분의 경우에 프로락틴mRNA가 검출된 것은 선종세포중 프로락틴에 양성인 세포는 종양발생과정에서 역분화(dedifferentiation)로 인한 것이 아니고, 이미 성장호르몬과 프로락틴을 분비하게 조정된 세포에서 발생한 선종임을 의미한다[14]. 최근의 연구의 결과에도 태아의 뇌하수체조직에서 성장호르몬과 프로락틴을 분비하는 전구세포인 양성능력을 갖는 세포(bipotential cell)를 확인하였고, 또 성인의 정상 뇌하수체에서 맘모소마토포프로세포(mammomatotropic cell)를 발견한 바 있다[1, 2]. 이것은 성장호르몬과 프로락틴 유전자는 공통된 조상유전자(ancestral gene)에서 유래되었고 진화과정 중에서 전환된 것으로 생각되므로 성장호르몬과 프로락틴을 같이 분비하는 뇌하수체세포가 있다는 것은 이들 세포의 공통적인 개체 및 계통발생학적 발생(ontogenetic, phylogenetic development)을 의미하는 것이다.

본 실험에서 면역조직화학염색상 성장호르몬과 프로락틴이 동시에 양성인 성장호르몬과 프로락틴혼합분비세포선종에서는 성장호르몬mRNA와 프로락틴mRNA가 전예(100.0%)에서 검출되었는데, 본 실험에서는 이중면역조직화학염색과 전자현미경검사를 시행하지 않았기 때문에 불확실하나, 이들은 앞서 말한 것처럼 성장호르몬분비세포와 프로락틴분비세포 혼합선종(mixed somatotrope and lactotrope adenoma), 호산성간세포선종 및 맘모소마토포프로선종에 속하겠다.

프로락틴분비세포선종에서 성장호르몬mRNA의 검출은 보고자에 따라 조금 차이가 있으나 0%~59.0%로 보고되었고[14, 18~20], 본 연구에서도 프로락틴분비세포선종 13예중 성장호르몬mRNA가 6예

(46.1%)에서 검출되었는데, 앞서의 성장호르몬분비세포선종에서 프로락틴mRNA의 양성율보다 낮았다. 이와 같은 결과는 다수의 프로락틴분비세포선종은 프로락틴을 분비하게 예정되었는 전구세포에서 기원된 종양으로 생각되며 소수의 경우에서 성장호르몬과 프로락틴을 동시에 분비하게 예정된 공통의 세포에서 기원된 것으로 추정되나 앞으로 더 연구가 필요하겠다.

면역조직화학염색상 호르몬이 검출이 되지 않지만 ISH검색상 호르몬mRNA가 검출된 경우는 다음과 같은 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 생성된 호르몬이 세포질내 저장되지 않고 빠르게 분비될 가능성이 있고, 이 때는 혈청 호르몬치는 상승되어 있겠다. 둘째, mRNA표현은 되어 있지만 소량만 번역되어 호르몬의 생합성이 적은 경우로써 일종의 무증상 선종임을 의미한다[21~23]. 본 연구에서는 프로락틴분비세포선종의 일부에서 호르몬분비증가나 면역조직화학염색으로는 검출되지 않았지만 ISH검색상 성장호르몬mRNA가 검출된 경우로 생각되며, 이와 같은 선종은 전자현미경검사를 시행하여 미세구조적 특징을 파악하거나, 조직배양을 하여 호르몬생산 및 분비를 검사하는 것이 확진을 위해 필요하다.

이상의 결과를 종합하면 면역조직화학염색에서 얻을 수 없는 세포질내 호르몬의 생합성에 관한 정보를 ISH검색을 통해 mRNA를 검출함으로써 선종세포의 기원과 분화정도를 파악할 수 있었고, 유전자표현위치에서 무증상선종의 발견도 가능하게 되었다. 따라서 뇌하수체선종을 분류하거나 그 생리를 이해함에 있어서 면역조직 화학염색뿐만 아니라 ISH검색이 필요하다고 생각된다.

결 론

성장호르몬과 프로락틴분비선종 환자에서 임상증상 및 혈청 호르몬 검사를 시행하여 내분비학적 특징을 파악하고 수술을 하여 얻은 조직에서 면역조직화학염색을 하여 선종세포내 함유하고 있는 성장호르몬과 프로락틴을 확인하고 또한 ISH를 병용하여 성장호르몬mRNA 및 프로락틴mRNA를 검출하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 대상 환자 32예를 임상 및 내분비학적으로 분류한 결과 프로락틴분비선종이 13예(40.6%), 성장호르몬

분비선종 8예(25.0%) 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종이 11예(34.4%) 있었다.

2) 면역조직화학염색결과 선종세포중 10% 이상의 세포가 성장호르몬에 염색이 되는 경우는 전예의 성장호르몬분비선종 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종에서 관찰되었고, 프로락틴 면역조직화학염색 양성은 전예의 프로락틴분비선종과 5예(62.5%)의 성장호르몬분비선종 및 9예(81.8%)의 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비선종에서 관찰되었다.

3) 면역조직화학염색에 의하여 분류한 결과 프로락틴분비세포선종이 13예(40.6%), 성장호르몬분비세포선종이 5예(15.6%) 및 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종이 14예(43.8%) 이었다.

4) In situ hybridization 결과 성장호르몬분비세포선종 5예중 성장호르몬mRNA는 전예(100.0%)에서 프로락틴mRNA는 4예(80.0%)에서 검출되었고 프로락틴분비세포선종 13예중 성장호르몬mRNA는 6예(46.1%)에서 프로락틴mRNA는 전예(100.0%)에서 검출되었으며, 성장호르몬과 프로락틴 혼합분비세포선종 14예에서는 성장호르몬mRNA와 프로락틴mRNA가 전예(100.0%)에서 검출되었다.

이상의 결과를 종합하면 대부분의 성장호르몬분비선종은 성장호르몬과 프로락틴을 동시에 분비할 수 있는 전구세포에서 발생한 선종임을 의미하고, 프로락틴분비세포선종의 대부분은 프로락틴을 분비하게 예정되었는 전구세포에서 기원된 종양으로 생각되며, 면역조직화학염색으로 검출되지 않지만 ISH검색으로는 호르몬mRNA가 검출되는 경우는 일종의 무증상선종임을 의미한다. 이와 같이 ISH검색은 선종세포의 기원과 분화정도를 파악하는데 도움을 주며, 따라서 뇌하수체선종을 분류하거나 그 생리를 이해함에 있어서 면역조직화학염색뿐만 아니라 ISH검색이 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

1. Frawley LS, Bookfor FR, Hoeffler JP: *Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. Endocrinology* 116:734-737, 1985
2. Mulchahey JJ, Jaffe RB: *Detection of a potential progenitor cell in the human fetal pituitary that*

- secretes both growth hormone and prolactin. J Clin Endocrinol Metab* 66:24-32, 1987
3. 이은직, 이현철, 이관우, 김미림, 임승길, 김경래, 양우익, 이광길, 박찬일, 최인준, 정상섭, 이규창, 이미경, 허갑범 : 면역세포화학염색법에 의한 뇌하수체 선종의 특징. 대한의학협회지 34:385-394, 1991
 4. 이은직, 이현철, 양우익, 김경래, 김현만, 안광진, 정운석, 임승길, 김태승, 박찬일, 최인준, 윤도홍, 박용구, 정상섭, 이규창, 허갑범 : 면역세포화학염색법과 전자현미경검사를 통한 뇌하수체 선종의 특징. 대한내과학회지 43:188-203, 1992
 5. 이은직, 이현철, 이관우, 김미림, 정춘희, 임승길, 김경래, 허갑범, 이미경, 양우익, 최인준 : Somatotroph와 lactotroph 혼합선종 3예. 대한내분비학회지 5:226-230, 1990
 6. 백상호 : 프락틴 유전의 *in situ hybridization*-프락틴 mRNA 발현에 미치는 에스트로겐의 영향을 중심으로-. 대한내분비학회지 4:111-116, 1989
 7. Asa SL: *Clinical significance of in situ hybridization. Exp. Clin. Endocrinol.* 101:46-52, 1993
 8. 박창수 : *In situ Hybridization*을 이용한 mRNA의 검출. 제 11 차 대한내분비학회 추계학술대회 초록집 1992, pp S23-S25
 9. Böz E, Saeger W, Uhlig H, Fehr S, Lüdecke DK: *HGH, PRL and β HCG/ β LH gene expression in clinically inactive pituitary adenomas detected by in situ hybridization. Virchows Archiv (A) Pathol Anat* 418: 405-410, 1991
 10. Jameson JL, Klibanski A, Black PM, Zervas NT, Lindell CM, Hsu DW, Ridgway EC, Habener JF: *Glycoprotein hormone genes are expressed in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. J Clin Invest* 80: 1472-1478, 1987
 11. Lloyd RV, Fields K, Jin L, Horvath E, Kovacs K: *Analysis of endocrine active and clinically silent corticotropic adenomas by in situ hybridization. Am J Pathol* 137:479-488, 1990
 12. Lloyd RV, Jin L, Fields K, Chandler WF, Horvath E, Stefanescu L, Kovacs K: *Analysis of pituitary hormones and chromogranin A mRNAs in null cell adenomas, oncocytomas, and gonadotroph adenomas by in situ hybridization. Am J Pathol* 139:553-564, 1991
 13. Sakurai T, Seo H, Yamamoto N, Nagaya T, Nakane T, Kuwayama A, Kageyama N, Matsu N: *Detection of mRNA of prolactin and ACTH in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. J Neurosurg* 69:653-659, 1988
 14. Lloyd RV, Cano M, Chandler WF, Barkan AL, Horvath E, Kovacs K: *Human growth hormone and prolactin secreting pituitary adenomas analysed by in situ hybridization. Am J Pathol* 134:605-613, 1989
 15. Kovacs K, Horvath E, Ezrin C: *Anatomy and histology of the normal and abnormal pituitary gland. In DeGroot LJ, eds. Endocrinology: 2nd ed, Philadelphia WB Saunders, 1989, pp 264-283*
 16. Farquharson M, Harvie R, McNicol AM: *Detection of messenger RNA using a digoxigenin end labelled oligonucleotide probe. J Clin Pathol* 43:424-428, 1990
 17. Arnold N, Seibl R, Kessler C, Wienberg J: *Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin labelled DNA probes. Biotechnic Histochemistry* 67:59-67, 1992
 18. Tallen G, Fehr S, Saeger W, Uhlig H, Lüdecke DK: *Detection of growth hormone, prolactin and human β -chorionic gonadotropin mRNA in growth hormone-secreting pituitary adenomas and in prolactin-secreting pituitary adenomas by in situ hybridization using a non-isotopic detection method. Acta Endocrinologica* 128:411-17, 1993
 19. Levy A, Lightman SL: *Quantitative in-situ hybridization histochemistry of anterior pituitary hormone mRNA species in human pituitary adenomas. Acta Endocrinologica* 119:397-404, 1988
 20. Uhlig H, Saeger W, Fehr S, Lüdecke DK: *Detection of growth hormone, prolactin and human β -chorionic gonadotropin messenger RNA in growth-hormone-secreting pituitary adenomas by in situ hybridization. Virchows Archiv (A) Pathol Anat* 418:539-546, 1991
 21. McNicol AM, Walker E, Farquharson MA, Teasdale GM: *Pituitary macroadenomas associated with hyperprolactinaemia: immunocytochemical and in-situ hybridization studies. Clinical Endocrinology* 35:239-244, 1991
 22. Pagesy P, Li JY, Delrue FR, Delalande O, Bouc YL, Kujas M, Joubert D, Martial J, Peillon F: *Growth hormone and somatostatin gene expression in pituitary adenomas with active acromegaly and minimal plasma growth hormone elevation. Acta Endocrinologica* 122: 745-752, 1990
 23. Trouillas J, Sassolas G, Loras B, Velkeniers B, Raccurt M, Chotard L, Berthezene F, Tourniaire J, Girod C: *Somatotropic Adenomas without Acromegaly. Path Res Pract* 187:943-949, 1991