

유방도관암의 PCNA 발현*

계명대학교 의과대학 병리학교실

장은숙 · 김상표

서 론

종양의 증식율과 종양의 공격성과의 사이에 상관관계가 있을 것이라는 잠재성 가능성은 종양의 증식력을 조직병리학적으로 규명할 수 있게 되므로 매우 고무적이다¹⁾.

유방암의 생물학적 행동이 다양하고 그 임상경과도 상이하여 그 성장을 측정하면 예후추정에 기여할 것으로 생각되어 지금까지 여러 방법으로 시도되어 왔다^{2~11)}.

주기분획 검사로는 thymidine labeling index⁴⁾, 유세포 측정법⁵⁾, 영상 DNA 분석계^{6~9)} 등이 있고, 단클론 항원(monoclonal antigen)을 이용한 Ki67^{10,11)}과 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)¹²⁾이 있다.

PCNA는 증식과 관계있는 항원이며 세포주기 중 G₁ 후기, S, G₂, M리고 M기에 발현된다.

유방암 종양형 중에서 가장 흔한 도관암을 대상으로 PCNA의 발현을 이용하여 재발에 대해 평가하고 이의 이용도를 알아보고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1990년 12월부터 1991년 12월까지 13개월간 본원 병리과에서 검색된 외과적 절제된 유방의 원발성 침윤성 도관암 39례를 선택하여 대상으로 하였다.

2. 방법

(1) 임상기록 재검토

대상 환자들의 임상기록과 병리진단지 등을 재검토하여 성별, 연령, 임상적 병기 및 수술 후의 병의

진행경과(전이여부)와 수술외 치료를 추적조사 검토하였다.

(2) 통상 병리조직학적 검색

절제된 유방 검체를 통상 검색 방법으로 검사하고, 특히 종양의 크기, 전이된 액와 림프절의 유무 및 수에 유념하였고 이에 따라서 분류(Table 1) 하였다. 10% 포르말린에 고정 후 통상 H&E 염색하고, 한편 절제된 조직 중에서 암조직 일부는 즉시 -70°C에 급냉동 보관하여 1주 이내에 ER 및 PR 검색을 하였다. 전 예의 조직표본을 재검토하고 조직학적 등급(grade)은 Bloom과 Richardson¹³⁾ 기준에 준하여 하였다.

(1) 세관형성의 결여로 가늠하는 역분화(dedifferentiation)의 정도

(2) 핵의 크기, 모양 및 염색성의 변화

(3) 과염색성과 유사분열의 빈도를 경, 중, 강의 정도로 구분하여 총점수가 3에서 9까지 산출되도록 하고, 3, 4, 5는 1등급(저악성), 6, 7은 2등급(중간악성), 8, 9는 3등급(고악성)으로 구분하였다.

Table 1. Classification according to tumor size and lymph node status

Stage	Size	Node status	No (%)
I (-)	< 2 cm	negative	2 (5.12)
IIA (-)	2~5 cm	negative	13 (33.33)
IIA (+)	< 2 cm	positive	1 (2.56)
IIB (-)	> 5 cm	negative	3 (7.69)
IIB (+)	2~5 cm	positive	15 (38.46)
III (+)	> 5 cm	positive	5 (12.82)

(3) 면역세포화학적 검색(Immunocytochemical Assay, ICA)

· Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)
PCNA의 면역반응을 발현시키기 위하여 가장 적

* 이 논문은 1993년도 계명대학교 윤종연·구비 및 동산의료원 조사인 구비로 이루어졌다.

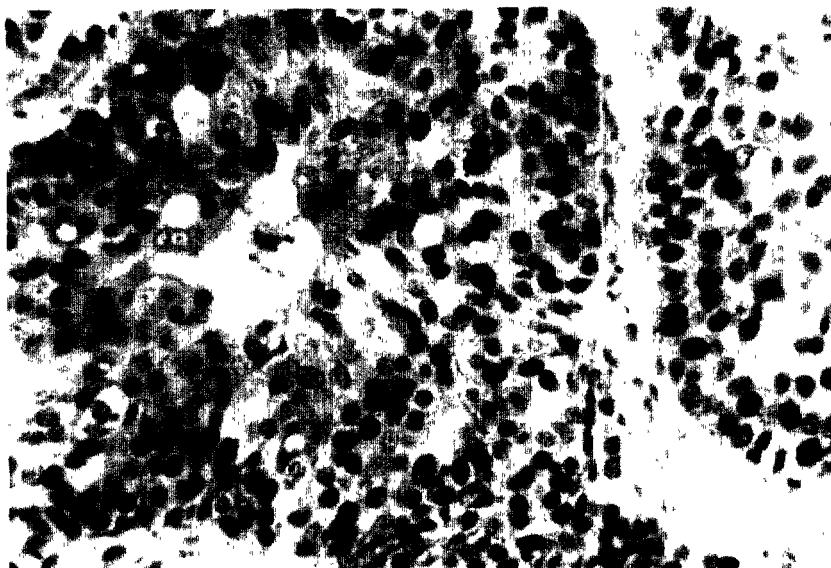


Fig. 1. PCNA immunoreactivity in infiltrating ductal carcinoma (PCNA score 55).

합한 파라핀 블록을 골라서 avidin/biotin immuno-peroxidase staining system을 사용하여 시행하였다. 유방암 조직 블록을 4 μ m 두께로 절편하여 슬라이드에 부착시켜 60°C에 1시간 incubation시킨 후 절편을 xylene과 알코올을 사용하여 탈파라핀 및 합수시키고 0.1M phosphate buffered saline(PBS)에 10분 둔 뒤에 3% H₂O₂를 가한 후 PBS에 씻고 protein blocking agent를 가한 후 primary antibody(PCNA; Dakopatts)를 가하여 1시간 incubation 시켰다. 계속하여 PBS로 씻은 뒤 secondary antibody를 가하고 다시 PBS로 씻고 peroxidase reagent를 가한 후 PBS로 씻고 chromogen solution(AEC)을 가하여 발색시킨 후 Mayer hematoxylin으로 대조염색을 하고 흐르는 물에 잘 씻은 후 봉입하였다.

판정 : 광학현미경 100배 배율로 이질성이 있는 경우를 감안하여 임의로 대표적인 8시야를 골라서 400배 배율로 100개이상 종양세포를 세어 그들의 핵이 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 간주하고 (Fig. 1) 이 세포들의 100분율을 계산해서 표시하였다. 종양세포가 25% 이거나 그 이상이 양성으로 염색되면 고 PCNA치(high PCNA score), 25% 이하이면 저 PCNA치(low PCNA score)로 분류하였다.

② Estrogen receptor (ER) 및 Progesterone receptor (PR)

급냉동시킨 유방암 조직을 4~6 μ m 두께로 동결절편하여 ER은 ER-ICA Kit(Abbott Laborato-

ries)를 사용하였고, PR은 anti-PR primary antibody(BioGenex Laboratories)와 ABC kit(Lipshaw)를 사용하여 시행하였다.

ER 측정은 동결절편을 즉시 10분동안 formaldehyde-phosphate buffered 식염수에 고정시킨 후 PBS에 철저히 씻은 후 kit blocking agent와 함께 15분 동안 moist chamber에 incubation 하였다. Primary antibody를 30분 동안 반응시키고 다시 secondary antibody로 30분 반응, incubation 시킨 후 PAP complex(peroxidase-antiperoxidase) 속에서 30분 incubation시켰다. 각각의 antibody에 반응시킨 후 PBS에 씻었다. 6분 동안 발색 시약인 chromogen substrate solution속에 절편을 incubation 함으로서 반응을 유발시킨 다음 중류수에 씻은 후 alum hematoxylin으로 간단히 대조염색한 후 탈수시키고 cover glass를 덮어 현미경으로 관찰하였다.

PR 측정은 고정액으로 10% neutral buffered formalin을 사용하였고, blocking reagent로 protein blocking agent를 사용하여 secondary antibody를 가한 후 peroxidase reagent를 가하고 chromogen substrate로 AEC를 사용하였다.

판정 : 광학현미경상으로 400배 배율에서 암세포핵이 갈색으로 염색되면 ER 및 PR 양성으로 판정하였고, 염색정도가 아주 약하면 -, 보통이면 1+, 강하면 2+로 표시하였고 임의로 대표적인 부위에서 선택하여 200개 세포를 세어서 양성세포의 백분율을

Table 2. Proliferating cell nuclear antigen scores and ER/PR by histologic grade

Histologic grade	Clinical stage	Case No	ER	PR	PCNA (%)
I	I (-)	22	+	+	+ (55)
		27	-	-	+ (10)
	IIA (-)	15	+	+	+ (30)
		41	+	+	-
		23	+	+	+ (20)
	IIB (+)	3	+	-	-
		5	-	-	-
		19	+	-	+ (15)
		29	+	+	-
		30	+	+	+ (30)
II	IIA (-)	7	+	-	+ (20)
		12	-	-	+ (40)
		18	+	-	-
		20	+	-	+ (30)
		39	+	+	+ (22)
		41	+	+	-
	IIA (+)	49	+	+	+ (45)
		14	+	+	+ (20)
	IIB (+)	25	+	-	+ (30)
		1	-	-	+ (50)
		2	-	-	+ (30)
		10	-	-	+ (15)
		36	-	-	+ (42)
		37	-	-	+ (4)
		42	+	+	-
III	III (+)	45	+	+	+ (8)
		26	-	-	+ (22)
		44	+	-	+ (12)
	III (-)	48	+	+	+ (5)
		8	-	-	-
III	IIA (-)	50	-	-	+ (85)
		38	-	-	+ (8)
		28	-	-	+ (30)
		24	-	-	+ (30)
	IIB (-)	34	-	-	+ (66)
		35	-	-	+ (25)
		46	-	-	+ (21)
	III (+)	31	-	-	+ (50)
		40	-	-	+ (41)

내어 표시하였고, 1⁺ 이상 강도로 염색된 세포가 20% 이상이면 양성으로 간주하였다.

(4) 통계학적 분석(Statistical analysis)

연구 결과 얻어진 성적을 Kruskal-Wallis 1-way ANOVA로 분석하였고 PCNA치와 ER, PR상태와의 관계 그리고 조직학적 등급 및 병기와의 관계 등을 분석하였다.

결 과

임상소견과 병리조직학적 검색

연령 분포는 28세에서 72세로서 중앙치는 51세였고 60대가 10명(25.64%)로 제일 많았고 40대와 50대는 각각 9명(23.07%)로서 40~60대가 71.78%로서 과반수를 차지하였다.

종양의 크기는 1.0cm에서 10.0cm까지 다양하였고 중앙치는 3.1cm였다. 액와림프절 전이는 39례 중 23례에서 생겼고 16례는 전이가 없었다. 종양의 크기와 액와림프절의 전이 유무를 기준으로 한 병기(stage)로 분류하였고(Table 1), 조직학적 등급에 의해 분류하니 1등급이 10, 2등급이 19, 3등급이 10례였다(Table 2).

검색된 39례 전부의 임상기록을 1993년 5월까지 재검사 추적하여 액와림프절, 원위 림프절 및 장기 전이와 사망 여부를 추적 조사하였는데, 동측 쇄골상 림프절에 전이가 산 경우가 2례, 간과 뼈와 뇌에 전이가 각각 1례, 그리고 폐에 전이가 각각 1례는 전이가 1~2년 사이에 발생하였고 특히 그 중 한 환자는 6개월내에 간과 뼈에, 그리고 뇌에 전이되는 급격한 경과로 진행하여 1년내에 사망하였다.

이상의 원위 전이 3례와 사망한 1례의 유방암은 모두 ER-/PR-이었고 PCNA치는 사망한 레가 41, 그리고 원위전이한 3례는 각각 8, 21, 22이었고 사망한 예만이 고 PCNA치를 보였다. 병기 I군에 속한 예에서는 재발이 없었다.

PCNA 면역검사

PCNA는 검색한 39례 중 8례가 음성, 31례가 양성이었고, 이들은 전형적인 핵이 갈색으로 염색되었다(Fig. 1). PCNA치는 각 등급별로 1등급이 평균 16.00, 2등급이 20.78, 3등급이 35.60으로서 총 평균 PCNA치는 23.35였다. 이 중 고 PCNA치는 17례이고 저 PCNA치는 22례였다. 조직학적 등급별과의 관계를 보면 고 PCNA치가 1등급에서는 3례(30%), 2등급에서는 7례(36.84%), 그리고 3등급에서는 7

례(70%)이었다.

ER과 PR의 발현

ER과 PR은 조직학적 3등급인 10례의 도관암 전부에서 유의하게 음성으로 나타났다(Table 2).

통계학적 분석(Statistical analysis)

PCNA는 ER/PR 상태와의 관계가 통계학적 유의성이 없었다($P=0.25$). 또 병기 및 조직학적 등급과의 관계도 통계학적 유의성이 없었다.

고 찰

PCNA는 핵에 DNA중합효소(polymerase δ)의 보조단백질로서 정상적으로도 소량 존재하는데^{13~15} 암세포 내에서도 다양 검출된다고 한다. 이는 PCNA가 핵내 DNA합성에 보조인자로서의 정상적 기능 외에 비계획성 DNA합성에도 역시 관여되기 때문이다^{17,18}.

세포 성장 주기 중에 총 PCNA치는 2~3배 정도의 작은 변동이 생기나 특별히 S기(DNA 합성기)에 복제터(replication site)들에 비례하여 극적인 변동이 생긴다고 한다¹⁹. 실제 DNA합성에 요구되는 양 보다 훨씬 더 많은 양의 PCNA가 주기세포의 핵에 나타난다. 성장인자들에 의해 PCNA가 유발될 수도 있는데 이는 성장인자가 PCNA mRNA 안정성의 증가를 유도하고 이어서 PCNA를 발현한다는 증거를 제시하였다^{20~22}. 따라서 이때 PCNA의 핵내 축적은 반드시 DNA 합성에 의존적인 것은 아니라고 한다^{23~25}. Hydroxyurea에 의해서 PCNA를 높은 치로 계속 생성하며 세포는 G₁/S기를 유지한다고 한다²⁶. 유사하게 aphidicolin에 의해서 DNA 합성의 억제는 PCNA의 합성을 저하시키지 않는다고 한다²⁵. 그래서 유방암에서 PCNA의 발현은 세포 주기 내의 변화와 무관할 수도 있다. Leonardi 등²⁶은 유방암에서 세포주기에 관련된 PCNA와 Ki67의 관계를 조사한 결과 PCNA는 Ki67과 다르며, PCNA는 Ki67의 대용으로 사용할 수 없다고 하였다. Tahan 등²⁷은 유방암의 인접 정상세포들은 평균 PCNA치(score)가 4.1인데 비해 유방암 조직은 22.5였다고 하였다($P=0.0001$). 본 연구에서 조직학적 등급에 따라 평균 PCNA치가 1등급군에서는 16.00, 2등급군에서는 20.78, 그리고 3등급군에서는 35.60이었다. 1등급에서 3례(30%), 2등급에서 7례(36.84%), 그리고 3등급에서 7례(70%)가 고 PCNA치를 나타냈다.

PCNA치가 종양크기, 액와림프절 전이유무, ER과 PR 반응상태와는 통계학적 상관관계가 없었다. 조직학적 등급이 높은 종양군이 높은 평균 PCNA치를 나타내었으나, 조직학적 등급 단독으로 PCNA 변이성과의 사이에 통계학적 유의성은 없었다.

PCNA는 유사핵분열이 많은 경우에 증가한다고 한다²⁷⁾. 본 연구에서도 PCNA치 85인 예에서 고배율시야(×400)당 4~8개의 높은율의 유사핵분열이 관찰되었다.

소수의 유방암에서 종양 인접 조직에서의 PCNA 발현이 증가하고 과발현 현상이 나타나는 수가 있는데 이는 autocrine 혹은 paracrine growth factor 영향으로 PCNA 유전자 발현으로 나타난다고 보고하였다. 장기간 정지기(G₀)의 세포들에서는 PCNA가 immunoblotting 방법으로 나타나지 않고, 분열(division) 할 수 있는 세포에서 주기세포의 10%에서 낮은치(low levels)로 존재한다고 한다²⁸⁾. 또 고정 시간에 민감하여 48시간 이상 길어지면 반응력이 급격히 감소한다. 72시간 후에는 실제 전부 폐지되기도 한다. PCNA단백의 반감기가 약 20시간 이어서 실제 세포주기를 갖 떠난 세포에서도 감지될 수 있다고 한다²⁹⁾. 이런 사실들을 감안할때 PCNA 음성 반응이나 동시에 시행한 AgNOR치와 비교해서 예상외로 낮거나, 간혹 높은 PCNA치가 나타날 때는 상기한 여건들의 작용이 있을 수 있다고 사료된다.

³H-thymidine labeling index나 유세포 측정법, 영상 DNA 분석계등 고가의 장비나 여건이 구비되지 않은 경우, 손쉽게 저렴한 가격으로 파라핀 불록에서 간편하게 할 수 있고, 후향성으로도 할 수 있어 PCNA검사는 유방암 예후 판정에 잠정적 사용 가치가 있다고 사료된다.

요 악

1990년부터 1991년까지 본원 병리과에서 검색된 원발성 도관암 39례를 대상으로 하여 임상경과의 추적조사, 육안적 소견, 현미경적 소견, ER과 PR의 유무 그리고 종양 증식력 측정을 위하여 PCNA의 면역반응을 보기위한 avidin/biotin immunoperoxidase 염색을 시행하였다. PCNA치는 유방의 침윤성 도관암에서 평균 23.35였고 (범위 0~85) 이는 조직학적 등급 및 병기 (종양의 크기, 림프절 전이유무)와 그리고 ER 및 PR 반응과 통계학적 유의성이 없었다. 평균 PCNA치는 조직학적 등급 1에서 16.00,

등급 2에서 20.78 그리고 등급 3에서 35.60이었다. 유사핵분열이 증가한 종양에서 PCNA치는 높았다. 수술후 1~2년 사이에 재발하거나 그로인해 사망한 4 환자에서 평균 PCNA치는 23.75(범위 8~41)였고 이들은 모두 조직학적 등급 3에 속했고 ER-/PR-였다.

이상의 결과로 유방암의 예후를 판정하는데 조직학적 등급, 병기 그리고 ER과 PR의 검사외에 종양의 증식력을 측정할 수 있는 PCNA검사도 동시에 시행하는 것이 예후를 판정하는데 보다 잠정적으로 유리하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Tubiana M, Courdi A: Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long term survival. *Radiother Oncol* 1989; 15: 1-18.
- Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, et al: Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991; 67: 421-428.
- McGurrin JF, Doria Jr MI, Dawson PJ, et al: Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of breast. *Cancer* 1987; 59: 1744-1750.
- Meyer JS, Province M: Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: Prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 12: 191-204.
- Clark GM, Wenger CR, Beardslee S, et al: How to integrate steroid hormone receptor, flow cytometric, and other prognostic information in regard to primary breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2157-2162.
- Meyer JS, Koehm SL, Hughes JM, et al: Bromodeoxyuridine labeling for S-phase measurement in breast carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 3531-3540.
- Clark GM, Dressler LG, Owens MA, et al: Prediction of relapse or survival in node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-633.
- Frierson HF Jr: Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991; 15(4): 358-367.

9. Batsakis JG, Sneige N, El-Naggar AK: Flow cytometric (DNA content and S-phase fraction) analysis of breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 2151-2153.
10. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, et al: Ki67 immunostaining in primary breast cancer: Pathological and clinical associations. *Br J Cancer* 1989; 59: 943-947.
11. Stauch G, Lelle RJ, Broermann L, et al: Comparison of prognostic factors in breast cancer: grading of malignancy according to Bloom and Richardson versus determination of Ki67 growth fraction. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1988; 72: 256-259.
12. Allegranza A, Girlando S, Arrigoni GL, et al: Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991; 419: 417-423.
13. Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
14. Tan CK, Castillo C, So AG, et al: An auxiliary protein for DNA polymerase-δ from foetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986; 261: 12310-12316.
15. Prelich G, Tan CK, Kostura M, et al: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase-δ auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517-520.
16. Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al: Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-δ. *Nature* 1987; 326: 515-517.
17. Celis J, Madson P: Increased nuclear cyclin PCNA antigen staining of non-S phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett* 1986; 209: 277-283.
18. Toschi L, Bravo R: Changes in cyclin PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107: 1623-1628.
19. Morris GF, Mathews MB: Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Cell Biol* 1989; 264: 13856-13864.
20. Jaskulski D, Gatti G, Travalli S, et al: Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988; 263: 10175-10179.
21. Bravo R, MacDonald-Bravo H: Induction of the nuclear protein cyclin in quiescent mouse 3T3 cells stimulated by serum and growth factors. Correlation with DNA synthesis. *EMBO J* 1984; 3: 3177-3181.
22. Bravo R, MacDonald-Bravo H: Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985; 4: 655-661.
23. Bravo R: Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986; 163: 287-293.
24. Celis JE, Celis A: Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin/proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3262-3266.
25. MacDonald-Bravo H, Barvo R: Induction of the nuclear protein cyclin in serum-stimulated quiescent 3T3 cells is independent of DNA synthesis. *Exp Cell Res* 1985; 156: 455.
26. Leonardi E, Girlando S, Serio G, et al: PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol* 1992; 45: 416-419.
27. Tahan SR, Neuberg DS, Dieffenbach A, et al: Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 1993; 71: 3552-3559.
28. Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immuno-localization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
29. Bravo R, MacDonald-Bravo H: Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987; 105: 1549-1554.

=Abstract=

Proliferating Cell Nuclear Antigen in Breast Ductal Carcinoma

Eun Sook Chang, MD; Sang Pyo Kim, MD

*Department of Pathology, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

39 cases of primary ductal carcinoma of breast surgically removed during the period 1990-1991 were investigated for the PCNA score, estrogen and progesterone receptors, histologic grade and clinical stage.

To determine the validity of these measurements, a variance analysis was done with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA. The results showed that PCNA has no statistical correlation with ER/PR status ($P=0.25$), clinical stage and histologic grade. PCNA score increased with the mitotic rate increase. PCNA score has potential value as a prognostic indicator in breast ductal carcinoma and offers advantages of relative simplicity of method and applicability to paraffin-embedded section of formalin-fixed tissue, and low cost.

Key Words: Ductal carcinoma, Histologic grade, PCNA