

## 후두편평세포암종에서 Proliferating Cell Nuclear Antigen의 발현양상

중앙대학교의과대학 이비인후과학교실  
황찬승 · 양훈식 · 김춘길

광명성애병원  
이건수

= Abstract =

### Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas

Chan Seung Hwang, M.D., Hoon Sik Yang, M.D., Chun Gil Kim, M.D., Gun Soo Lee, M.D.\*  
Department of Otolaryngology, College of Medicine, Chung-Ang University, Kwangmyung Sung-Ae Hospital\*,  
Seoul, Korea

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) indicates the cellular kinetic activity during the late G1 and S phase. Among the various approaches for evaluating the proliferative activity, PCNA has been recently introduced as an antigenic marker of cellular proliferation.

The purpose of this study was to analyze the relationship between PCNA expression and clinicopathological findings in laryngeal squamous cell carcinomas. Forty-one cases of laryngeal squamous cell carcinomas were analyzed for the detection of PCNA by immunohistochemical technique. The PCNA expression rates were  $34.34 \pm 18.02\%$ ,  $55.23 \pm 12.97\%$ , and  $78.53 \pm 5.74\%$  in well differentiated, moderately differentiated and poor differentiated squamous cell carcinomas of larynx respectively with statistical significance( $p < 0.05$ ). There was no correlation between PCNA expression and clinical findings.

In conclusion the PCNA index was related to cellular differentiation regardless of T stage, nodal involvement, recurrence and treatment results.

KEY WORDS : PCNA · Laryngeal carcinoma

## 서론

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)은 DNA polymerase-delta의 보조단백으로 DNA 합성과 세포증식에 밀접한 연관성이 있어 종양세포의

증식능을 나타내는 지표로 알려져 있다<sup>1,2)</sup>. 종양세포 증식능의 측정은 종양의 임상적 경과 및 예후에 대하여 간접적인 지표로 삼을 수 있다고 하나, 두경부 영역의 여러 종양에서 PCNA 발현양상이 예후인자로서의 역할에 대하여는 논란의 여지가 많다<sup>3,4)</sup>.

따라서 저자들은 후두평평세포암종에서 종양의 T병기, 림프절 전이여부, 세포분화도, 재발여부, 치료결과 등과 PCNA 발현율을 검토하여 PCNA의 예후인자로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1984년 2월부터 1996년 12월까지 중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실에서 조직검사로 진단된 후두평평세포암종 41례(성문상부암종 23례, 성문암종 18례)를 대상으로 하였다. 대상례의 연령분포는 47세-78세로 평균연령은 60.2세 이었고, 성별분포는 남자 39례, 여자 2례로 남녀비는 19.5 : 1 이었다. 대상례 모두 수술적 치료를 받았으며 9례를 제외한 32례에서 술후 방사선 치료를 받았고, 재발 및 유병생존 유무는 연구 시작 일을 기준으로 하였으며 평균 추적기간은 43.5개월이었다. 대상례의 조직표본 재료는 적출된 조직의 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 종양이 많이 포함되고 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다.

### 2. 방법

#### 1) PCNA의 검출

##### (1) 전처치

조직이 부착된 슬라이드를 60℃ 오븐에서 1시간 처리하고, xylene으로 탈파라핀 후 에탄올로 함수시켰다. 내재성 과산화수소를 제거하기 위하여 2.5% hydrogen peroxide에 30분간 처리하고 10 mM citric acid에 담궈서 microwave oven으로 5분간 가열하고 실온에서 30분간 식힌 후, 다시 microwave oven으로 5분간 가열한 후 0.05 M Tris buffered saline(pH 7.6)으로 10분간 2회 세척하였다. 비특이적 항원-항체반응을 억제하기 위하여 정상 염소혈청으로 1시간 반응시켰다.

##### (2) LSAB법

일차항체는 단클론성 항체 PC 10(DAKO사)을 1 : 60으로 희석하여 실온에서 하룻밤 반응시켰다. Tris buffer로 3회 세척한 다음 biotin과 결합된 이

차항체를 15분간 반응시킨 후 streptavidin-horseradish peroxidase를 15분간 반응시켰다. AEC chromogen 용액으로 발색시켜 Meyer's hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 양성반응의 양상은 종양세포의 핵에 국한되어 담갈색으로 염색된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2, 3).



Fig. 1. Immunohistochemical staining for PCNA in well differentiated laryngeal squamous cell carcinoma. Positive reaction of dark-brown color is identified in the nuclei of cancer cells(LSAB method, X200). The mean PCNA index in this case was  $35.25 \pm 10.05$ .

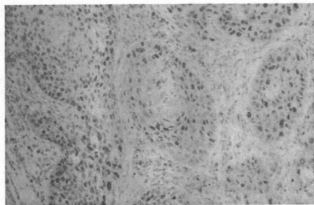


Fig. 2. Immunohistochemical staining for PCNA in moderately differentiated laryngeal squamous cell carcinoma(LSAB method, X200). The mean PCNA index in this case was  $56.23 \pm 12.97$ .

##### (3) 판독

염색된 모든 조직표본은 저배율(100배 시야)로 판

찰하면서 염색이 잘 된 부분을 선택하여 고배율(400 배 시야)에서 관찰하여, 총 종양세포의 합계에서 양성으로 염색된 세포의 갯수를 백분율로 나타내었다<sup>9)</sup>. 이때 각 슬라이드 표본당 10개의 고배율 시야에서 구한 값의 평균값으로 PCNA index를 산출하였다.

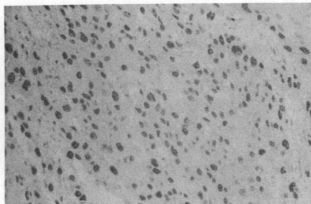


Fig. 3. Immunohistochemical staining for PCNA in poorly differentiated laryngeal squamous cell carcinoma (LSAB method, X200). The mean PCNA index in this case was  $79.54 \pm 5.75$ .

## 결 과

### 1. T병기와 PCNA 발현

면역조직화학염색법을 이용한 PCNA 발현율은 11.26-84.76%로 평균  $48.39 \pm 21.06\%$ 이었으며, T 병기에 따른 PCNA 발현율은 제1기는  $23.10 \pm 0.21\%$ , 2기는  $47.41 \pm 23.69\%$ , 3기는  $53.48 \pm 22.2\%$ , 4기는  $44.45 \pm 15.8\%$ 로 병기의 증가와 PCNA 발현율은 연관성이 없었다(Table 1).

Table 1. Positive rates of PCNA according to T stage in laryngeal squamous cell carcinomas

	T1(n=2)	T2(n=8)	T3(n=20)	T4(n=11)
PCNA indices	$23.01 \pm 0.21$	$47.41 \pm 23.69$	$53.48 \pm 22.2$	$44.45 \pm 15.8$
(Mean $\pm$ SD%)				

### 2. 림프절 전이여부와 PCNA 발현

PCNA 발현율은 림프절 전이가 없었던 경우  $44.02 \pm 21.96\%$ , 림프절 전이가 있었던 경우는  $50.91 \pm 20.54\%$ 로 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

Table 2. Positive rates of PCNA according to nodal involvement in laryngeal squamous cell carcinomas

Nodal status	No. of cases (n=41)	PCNA indices (Mean $\pm$ SD%)
N0	26	$44.02 \pm 21.96$
N1-3	15	$50.91 \pm 20.54$

(Tested by t-test,  $p > 0.05$ )

### 3. 세포분화도와 PCNA 발현

PCNA 발현율은 세포분화도가 좋은 경우  $34.34 \pm 18.02\%$ , 중등도 분화도의 경우  $55.23 \pm 12.97\%$ , 분화도가 나쁜 경우는  $78.53 \pm 5.74\%$ 로 PCNA 발현율은 세포분화도가 나쁠수록 높았으며 통계학적으로 유의한 차이가 있었다(Table 3).

Table 3. Positive rates of PCNA according to cellular differentiation in laryngeal squamous cell carcinomas

Cell differentiation	No. of cases (n=41)	PCNA indices (Mean $\pm$ SD%)
Well	19	$34.34 \pm 18.02$ *
Moderate	17	$55.23 \pm 12.97$ *
Poor	5	$78.53 \pm 5.74$ *

Tested by ANOVA

\* Tested by multiple comparison,  $p < 0.001$

† Tested by multiple comparison,  $p < 0.05$

### 4. 재발여부와 PCNA 발현

41례중 국소재발 8례, 원격전이 5례로 나머지 28례에서는 재발이 없었다. PCNA 발현율은 재발이 없었던 경우  $54.2 \pm 19.39\%$ , 국소재발한 경우  $45.9 \pm 25.53\%$ , 원격전이된 경우  $45.8 \pm 3.84\%$ 로 재발여부와 PCNA 발현율은 연관성이 없었다(Table 4).

**Table 4.** Positive rates of PCNA according to recurrence in laryngeal squamous cell carcinomas

	No. of cases (n=41)	PCNA indices (Mean $\pm$ SD%)
No	28	54.2 $\pm$ 19.39
Locoregional	8	45.9 $\pm$ 25.53
Distant metastasis	5	45.8 $\pm$ 3.84

#### 5. 치료결과와 PCNA 발현

41례중 무병생존 26례, 유병사망 10례, 유병생존 3례와 다른 원인에 의한 사망이 2례이었다. 무병생존인 경우 PCNA 발현율은 55.97 $\pm$ 18.84%, 유병사망인 경우 48.88 $\pm$ 20.79%, 유병생존인 경우 45.84 $\pm$ 13%으로 PCNA 발현율과 치료결과는 연관성이 없었다(Table 5).

**Table 5.** Positive rates of PCNA in treatment results

	No. of cases (N=39)	PCNA indices (Mean $\pm$ SD%)
NED*	26	55.97 $\pm$ 18.84
DWD†	10	48.88 $\pm$ 20.79
AWD‡	3	45.84 $\pm$ 13

\* : No evidence of disease

† : Dead with disease

‡ : Alive with disease

## 고 찰

세포의 증식능력을 잘 표현하는 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)는 분자량 36 KD의 non-histone 핵 단백질이며, DNA polymerase-delta의 보조단백으로 DNA 합성과 세포증식에 밀접한 연관성이 있다<sup>13)</sup>. G1 후기부터 핵 내에 나타나기 시작하여 S기에 최고에 도달했다가 G2기 및 M기에 감소하는 것으로, 세포의 증식을 야기시키는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6,7)</sup>.

종양세포의 증식능력을 평가하는 방법으로는 1) 3H thymidine를 이용한 autoradiography, 2)

Bromodeoxyuridine(Brd-U), 3) Ki-67, DNA polymerase  $\alpha$  등의 증식세포 관련항원에 대한 면역조직화학염색법, 4) Ag-NORs법, 5) flow cytometry에 의한 S기 세포의 분석법 등이 있다. 그러나 1)과2)의 방법은 신선한 조직세포가 필요하고<sup>3)</sup>, 3)의 방법은 신선동결조직이 필요하며<sup>8)</sup>, 4)의 방법은 핵내의 염색 NORs의 계측의 어려움이 있고<sup>9)</sup>, 5)의 방법은 조직을 분쇄하여 사용하므로 과사가 있는 조직을 잘못 분석하거나 조직학적 관찰이 불가능하다는<sup>8)</sup> 단점이 있다. 최근 Murashima와 Takasaki는<sup>7)</sup> 파라핀 포매조직으로 PCNA를 검출할 수 있는 단클론항체를 개발함으로써 임상에 널리 이용되고 있으며, 후기 G1기와 S기를 잘 표현하는 PCNA는 피부와 점막의 기저세포 및 비장, 흉선, 고환 등의 분열증식성이 있는 세포에서 관찰되며 정상 조직이 암세포로 이행되는 정도, 즉 증식정도에 따라 PCNA의 표현율이 높아진다고 보고되고 있다<sup>10,11)</sup>.

종양의 증식능과 악성도가 관련이 있다면 PCNA에 의한 증식능의 정량적 평가는 종양의 악성도와 예후를 추측하는 유용한 인자로 생각된다. 조절계의 악성 질환은 암세포의 증식성이 악성도 및 예후와 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있으며<sup>3,12)</sup>, 상피세포에서는 유래된 악성 종양의 증식성이 악성도를 반영할 수 있지만 그 예후와의 관련성에 대하여는 논란의 여지가 많다<sup>4)</sup>.

Shin 등은<sup>13)</sup> 후두암을 포함한 두경부평평세포암종 및 인접해 있는 전구암소에서 PCNA 발현을 관찰하였는데 정상 상피에서 과형성, 이형성 및 상피암으로 진행할수록 PCNA 발현이 통계학적으로 유의하게 높게 발현되어 다단계 발암현상에 대한 생물학적 표지자로서의 유용성을 제시하였다. PCNA 발현율은 조직의 고정액이나 고정시간의 차이, 사용한 PCNA 항체의 차이, 다양한 염색상으로 인한 계측상의 차이로 인하여 보고자에 따라 다양하게 보고되고 있다. 박 등은<sup>14)</sup> 후두평평세포암종 26례에서 평균 37.67%의 발현율을 보고하였으며, 림프절 전이가 있었던 예에서 PCNA 발현율이 높았으나 통계학적 유의성은 없었고, 세포분화도가 나쁠수록 PCNA 발현율은 유의하게 높았다고 보고하였고, 안 등도<sup>15)</sup> PCNA 발현율과 세포분화도는 밀접한 연관성이 있다고 보고하였

다. 저자들의 연구에서도 후두평평세포암종 41례중 PCNA 발현율은 평균 48.39%로 다른 보고자와 비슷한 결과를 얻었으며, 림프절 전이가 있었던 예에서 PCNA 발현율이 높았으나 유의한 차이는 없었고 세포분화도가 나쁠수록 유의하게 PCNA 발현율은 높았다.

PCNA 발현율과 재발이나 치료결과와의 관계를 검토하여 보면 안 등은<sup>15)</sup> 3년간 무병생존한 예에서는 PCNA 발현율이 48%였고 재발 또는 사망한 예에서는 50.7%로 PCNA 발현율이 높으면 예후가 나쁘다고 하였으며, 박 등도<sup>16)</sup> 3년 무병생존의 예는 PCNA 발현율이 35.24%였고 유병생존의 경우 42.18%로서 유병생존의 예에서 PCNA 발현율이 높았으나 통계학적인 유의성은 없었다고 보고하였다. 저자들의 연구에서는 재발이 없었던 예와 무병생존한 예에서 PCNA 발현율이 더 높았는데, 다른 연구자의 결과와의 차이는 조직 고정액의 차이와 계측상의 차이로 인한 것으로 생각되며 PCNA 발현율은 재발 및 치료결과와는 연관성이 없는 것으로 생각된다.

## 결론

결과적으로 후두평평세포암종에서 PCNA 발현만으로 예후인자로서의 역할을 기대하기는 힘들 것으로 생각되나 악성도를 반영할 수 있는 생물학적 표지자로서의 가능성은 있을 것으로 생각된다.

## References

- 1) Cellis JE, Bravo R, Larsent PM : Review cyclin : A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leuk Res.* 1994 ; 8(2) : 143-157
- 2) Takasaki Y, Deug JS, Tan EM : A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. *J Exp Med.* 1981 ; 308 : 1261-1264
- 3) Nagashima T, De Armond JJ, Murovic J et al : Immunohistochemical demonstration of S phase cells by antibromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol(Berl).* 1985 ; 67 : 155
- 4) Zoller M, Goodman ML, Cummings CW : Guidelines for prognosis in head and neck cancer with nodal metastasis. *Laryngoscope.* 1978 ; 88 : 135-141
- 5) Woods AL, Hall PA, Shepherd NA : The assessment of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction(flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathology.* 1991 ; 19 : 21-27
- 6) Bravo R, Frank R, Blundell PA et al : Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase. *Nature.* 1987 ; 326 : 515-517
- 7) Takasaki T, Deng JS, Jan EM : A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation : Its distribution on synchronized cells. *J Exp Med.* 1989 ; 154 : 1899
- 8) Barlogie B, Raber MN, Schumann J et al : Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.* 1983 ; 43 : 3982
- 9) Croker J, Nar P : Nuclear organizer regions in lymphoma. *J Pathol.* 1987 ; 151 : 111
- 10) Mathews MB, Bernstein RM, Frenza BR : Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature.* 1984 ; 309 : 374
- 11) Murashima A, Takasaki Y : Immunohistochemical localization of PCNA in squamous cell carcinoma from paraffin embeded tissue. *J Clin Immunol.* 1989 ; 1 : 1
- 12) Kamel OW, Lebrun DP, Eric Davis et al : Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using Anti-PCNA/cyclin 19A2. *Am J Pathol.* 1981 ; 138 : 1471-1477
- 13) Shin DM, Voravud N, Ro JY : Sequential increase in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis. A potential

- biomarker. J Natl Cancer inst. 1993 ; 85 : 971-978
- 14) Park HO, Do NY, Kim YG : The study of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression in human laryngeal carcinomas. Korean J Otolaryngol. 1995 ; 38(1) : 89-95
- 15) Ahn MS, Choi JO, You HK, et al : The clinical and prognostic significance of PCNA in the head and neck. J Kor Univ. 1992 ; 29 : 339-347