

갑상선 결절에서 PCNA 측정의 의의

전남대학교 의과대학 외과학교실
김정철 · 윤정한 · 제갈영종

= Abstract =

A Significance of Estimation of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Thyroid Nodule

Jung Chul Kim, M.D., Jung Han Yoon, M.D., Young Jong Jegal M.D.

Department of surgery, College of Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) plays an important role in DNA synthesis in nucleoli and is highly conserved non-histone nuclear protein composed of 261 amino acid. and is considered to correlated with the cells proliferative state, because it is synthesized particularly during the proliferative period of late G1 and S-phase.

Therefore, PCNA index meaningfully increases in the active or proliferative kinetic cells.

By the use of recently developed monoclonal antibodies against PCNA, the immunohistochemical staining methods can make possible. These staining methods are the useful and productive one for ascertaining the cell's proliferating ability. Moreover, immunohistochemical staining method with a antiPCNA antibody has particular advantages as follows. By means of these methods, we can stain the tissue that was already fixed in formalin or paraffin wax. We can see with naked eye that which cell is, where is differentiated through a microscope. Lastly, it maintains the whole tissue architecture and makes a search for the correlation.

As we have seen above, the immunohistochemical staining methods for PCNA have been studied as an important factor that can find the cell proliferative kinetics in malignancy and biologic behavior of tumors.

To investigate of the proliferative activity in thyroid nodule, Authors evaluated cell proliferative activity by immunostaining for PCNA in 45 pathologically confirmed solitary thyroid nodule.

The results were as follows.

1) The benign nodules were 25 cases(Adenomatous Goiter : 20 cases, Follicular adenoma : 5 cases) and malignant nodules were 20 cases(Papillary Ca : 14 cases, Follicular Ca : 4 cases, Anaplastic Ca : 2 cases).

2) The Most prevalent age groups were 4th decade(11 cases), and the next group was 5th decade.

3) The average PCNA labelling indices were as follows.

Adenomatous goiter(16.9%), Follicular adenoma(37.6%), papillary Ca(26.3%), Follicular

Ca(8.8%) and Anaplastic Ca(86.7%).

There were no significant differences in benign(20.4) and malignant nodules (28.8%) except anaplastic Ca(p=0.3226).

4) When the average tumor size 2cm in papillary Ca, the PCNA indices were 26.0% (below 2cm) : 26.6% (above 2cm)(p=0.9642). The PCNA incidies were 23.9% (with lymphatic spread) : 28.7% (without lymphatic spread)(p=0.7056).

There were no signifnificant differences in the above cases.

In conclusion, there were no significant differences in cell proliferative activity by staining for PCNA between benign and malignat nodules except anaplastic Ca.

KEY WORDS : PCNA · Thyroid nodule.

서 론

여러종의 악성종양에서 종양세포 증식능은 그 종양의 악성도 및 환자의 재발과 예후에 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

따라서, 종양세포의 증식능을 측정함으로써 종양의 조직학적 생물학적 특성 및 임상적 특성을 파악할 수 있다.

이러한 세포증식능을 측정하는 방법으로는 ³H-thymidin을 이용한 자가 방사선법(autoradiography)²²⁾, bromodeoxyuridine(BrdU)을 이용한 방법¹⁶⁾³⁴⁾, 세포분열수 측정, 유식세포 측정기(flow cytometry)를 이용한 합성기 세포분획측정⁷⁾³³⁾³⁶⁾ Ki-67⁹⁾¹⁵⁾⁵¹⁹⁾³²⁾, PCNA를 이용한 면역조직화학적방법 등이 있다.

이중 PCNA는 cyclin이라고도 불리며 주로 성숙핵에서 DNA 복제의 필수적인 요소로써 261개의 아미노산으로 구성된 분자량 36KD의 비히스톤계 단백질로써 주로 세포증식주기의 G1후기부터 S기에 걸쳐 세포핵내에 축적하여 DNA polymerase-delta의 보조인자로 작용하는 것으로 알려져 있다⁵⁾⁶⁾¹²⁾²⁸⁾.

PCNA 면역조직화학적염색법은 세포의 증식력을 측정할 수 있는 방법으로 세포 구조가 유지되면서 방법이 간편하고 빠른 결과를 얻을 수가 있으며 이미 파라핀에 고정되어 있는 조직으로도 염색이 가능하여 후향적 조사가 가능하다는 장점으로 이에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

이에 저자는 수술후 조직학적 진단이 확립된 45례의 단일성 갑상선 결절환자를 대상으로 갑상선

결절내 세포증식의 특성을 규명하기 위해 PCNA 표현능을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

1993년 10월부터 1994년 2월까지 전남대학교병원 외과학교실에서 수술후 조직학적 진단이 확립된 단일성 갑상선 결절환자 45례를 대상으로 하였으며 조직학적 소견으로는 양성결절환자는 25례(선양선종 20례, 여포성선종 5례) 악성 결절은 20례(유두상암 14례, 여포성선암 4례, 미분화암 2례)등이었다(Table 1). 성별로는 남자는 5례, 여자는 40례였다. 평균 나이는 42.5세였다.

2. 면역조직화학적 검색

면역조직화학적 검색은 10% 중성완충 포르말린에 고정된 후 제작한 포매괴를 3μm 두께로 박절하여 Probe-on Slide에 부착시켜 건조시킨 다음 검색에 사용하였고, 염색의 전과정은 capillary gap action의 원리를 응용하여 개발된 Micro Prove immuno/DNA stainer(Fisher Co.)을 이용하여 시행하였다.

Table 1. Materials examined

Thyroid nodule examined	No. of cases
Adenomatous goiter	20
Follicular adenoma	5
Papillary carcinoma	14
Follicular carcinoma	4
Anaplastic carcinoma	2

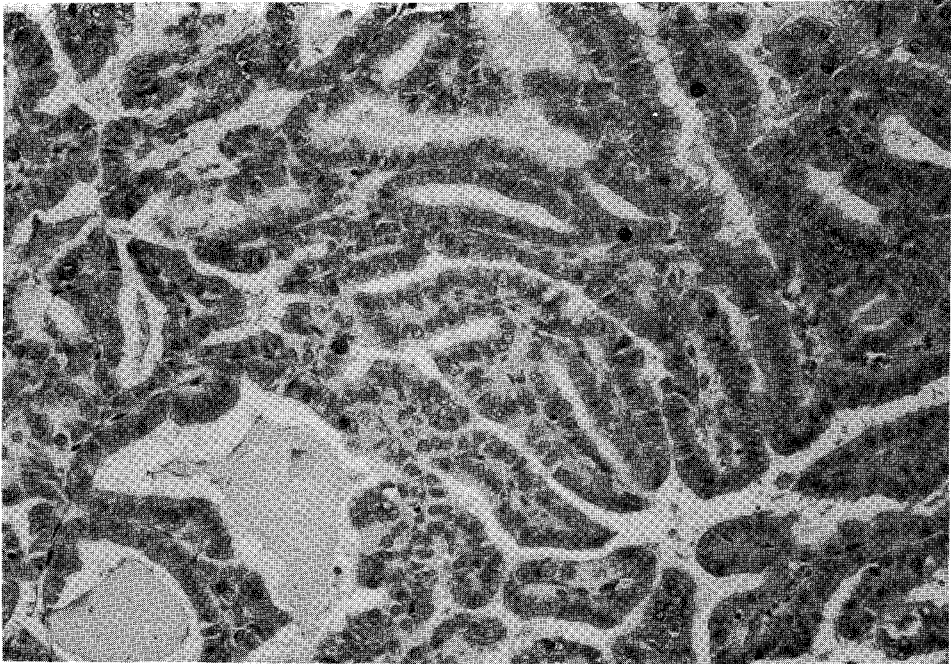


Fig. 1. PCNA expression in papillary carcinoma.

Slide holder에 파라핀절편이 부착된 20장의 슬라이드를 채운후 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 PCNA 항체(Dako)를 반응시켰다. 일차항체의 검출을 위한 이차항체는 biotin이 부착된 anti-mouse IgG(sigma)를 이용하여 30분간 부치시킨 후 완충액으로 씻어냈고 Avidine-alkaline phosphatase를 30분간 작용시켰다. 검출계의 부치가 끝난후 완충액으로 씻고 Fast red TR salt를 이용하여 발색시켜 양성 반응을 관찰하였다(Fig. 1).

염색 과정에서 부치온도는 십씨 40도로 하였다.

3. PCNA 반응도와 통계학적 유의성검정

종양세포 1000개당 양성세포수를 측정하여 PCNA반응도(Index)를 측정하였으며 student's t test를 사용하여 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

45례의 PCNA반응도 평균치는 24.5%였으며 선양선종: 16.9%, 여포성선종: 37.6%, 유두상암: 26.3%, 여포성선암: 8.8%, 미분화암: 86.7% 였으며, 양성결절 (25례): 20.4%, 악성결절 (20례): 28.8%로 나타났으며, 미분화암을 제외하고는 양성결

절과 악성결절 사이에 유의한 차이는 없었다($p=0.3226$)(Table 2).

14례의 유두상암에서 종양의 크기는 2cm를 기준으로할 때 PCNA반응도는 2cm이하: 26.0%, 2cm이상: 26.6% ($p=0.9643$)였고, 임파절 전이가

Table 2. Correlation between pathologic type and PCNA index

Pathologic type	PCNA index	
Adenomatous goiter	16.9%	
Follicular adenoma	37.6%	
Papillary carcinoma	26.3%	
Follicular carcinoma	8.8%	
Anaplastic carcinoma	86.7%	
Benign	20.4%	P value
		0.3226
Malignancy	28.8%	

Table 3. PCNA index related with size and lymph node invasion in papillary carcinoma

Variable	No of case	PCNA index	Pvalue
Size	2cm<	7	26.0%
	2cm>	7	26.6%
LN invasion	LN+	7	23.9%
	LN-		0.7056

없었던 경우 : 23.9%, 임파절 전이가 있었던 경우 : 28.7% ($p=0.7056$)로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

고 찰

갑상선의 결정성 병변은 WHO의 보고에 의하면 임상적으로는 전 인구의 약 7%에서 발생한다고 하며 부검시 확인되는 빈도가 50%에 이르는 극히 보편적인 질환이다. 이러한 갑상선결절성 병변에는 선종 및 선양선종 같은 양성결절과 유두상암, 여포성선암, 미분화암과 같은 악성종양이 있다.

일반적인 악성종양의 특징은 빠른 성장속도, 국소 침윤성 및 전이능력등이 있는데 이중 성장속도 즉, 세포증식능은 종양의 생물학적 악성도를 판정하는 독립적인 지표로서 이용되고 있다¹⁷⁾.

최근 고도로 활동력을 가지고 있거나 분화력이 강한 세포에서 출현하는 핵단백들이 알려져 있는데 이들은 K-67³⁾¹⁵⁾¹⁹⁾³²⁾, p53 transformation-related protein⁸⁾, myc-oncogene protein product²⁵⁾ 그리고 PCNA등이다.

Ki-67을 이용한 면역조직화학적 검색은 세포증식능을 측정하는 유용한 방법이지만, 이는 신선동결 조직만을 이용해야 하는 불편함이 있다.

그러나, Robbins등은²⁶⁾ PCNA가 파라핀 조직에서 면역조직학적 검색이 가능함을 제시하였다.

PCNA는 파라핀 절편에서 후향적 조사가 가능하고 현미경하에서 어떠한 세포가 어디에서 분화하고 있는지를 육안적으로 확인하여 종양부위에 따른 증식능의 차이를 측정할 수 있고¹⁹⁾, 조직의 전반적인 윤곽을 보존 하면서 조직구조의 변형없이 조직학적인 연관성을 가지는 검색이 가능하다는 장점을 가지고 있다.

위와같은 장점으로 인해 PCNA를 이용하여 세포증식능을 측정하여 조직학적, 생물학적특성을 파악하고 독립적인 예후인자로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서도 파라핀 조직에서 PCNA의 면역조직화학적 검색을 통해 세포 증식능을 측정함으로써 조직형태와 대응되는 세포증식능을 관찰할 수 있었고 종양의 생물학적 특성을 비교 검토할 수

있었다.

Tadahiro등은²⁷⁾ Papillary carcinoma(4.9%)와 follicular carcinoma (3.6%)의 PCNA index가 normal thyroid(0.6%), adenomatous goiter(1.9%), follicular adenoma(2.0%)에 비하여 유의하게 높음을 보고하였고, Mizukami등은³⁵⁾ papillary thyroid carcinoma의 Subtype과 종양크기에 따른 PCNA index의 차이가 없음을 보고하였다.

본 연구에서 PCNA수치는 선양선종; 16.9%, 여포선종; 37.6%, 유두상암; 26.3%, 여포성선암; 8.8%, 미분화암; 86.7%, 양성결절; 20.4%, 악성결절; 28.8%로 미분화암을 제외하고 양성질환과 악성질환 사이에 유의한 차이는 없었다($P=0.3226$).

그리고 유두상암에서 2cm이상; 26.0%, 2cm이하; 26.6% ($P=0.9643$)였고, 임파절전이가 없었던 경우; 23.9%, 임파절전이가 있었던 경우; 28.7% ($P=0.7056$)로 유의한 차이가 없었다.

갑상선암의 대부분을 차지하는 유두상암과 여포성선암과 같은 분화가 잘된 갑상선암의 경우 다른 조직의 암과 달리 병변이 서서히 진행되고, 재발 및 원격전이가 늦게 나타나는 특징을 가지고 있으며, 따라서 타장기의 양성종양에 비하여 예후가 좋은 것으로 알려져 있는데¹⁾²⁾⁴⁾⁹⁾¹¹⁾³¹⁾, 본 연구는 위와 같은 갑상선암의 임상적 특성과 연관이 있다고 할 수 있다.

미분화암 2례의 경우는 PCNA 표현능 (86.7%)이 다른 결절에 비하여 매우 높았는데, 이는 급속한 진행 경과를 갖는 미분화암의 임상적 특성과 연관이 있는 것으로 사료된다.

갑상선암 환자의 예후를 판정하는 예후인자로는 조직학적 유형, 종양의 크기, stage, 환자의 나이, 성별 등이 알려져 있는데²⁾⁴⁾¹¹⁾¹⁴⁾³¹⁾, PCNA에 대한 면역조직화학적 염색으로 측정된 세포증식능과 예후와의 관계는 불분명한 실정이다.

현재까지는 주로 백혈병 임파종 및 각종 소화기계 악성 종양에서 PCNA 표현능을 측정하여 그 종양의 치료후 예후 인자등으로 이용하려는 시도가 많이 이루어 지고 있으며¹⁰⁾¹³⁾²⁰⁾²¹⁾²³⁾²⁴⁾²⁹⁾³⁰⁾, 갑상선의 경우는 더욱 많은 증례와 다각적인 연구를 통하여 보다 유용한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

45례의 단일성 갑상선 결절환자를 대상으로 PCNA표현능을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) PCNA 수치는 선양선종 : 16.9%, 여포성선종 : 37.6%, 유두상암 : 26.3%, 여포성선암 : 8.8%, 미분화암 : 86.7%로 미분화암을 제외하고는 양성과 악성간의 PCNA수치는 유의 있는 차이를 보이지 않았다($p=0.3226$)

2) 유두상암에서 종양의 크기 2cm을 기준으로 할 때 PCNA 수치는 2cm이하와 2cm 이상에서 26.0% : 26.0% ($p=0.9643$)였고, 임파절전이 없었던 경우와 있었던 경우에도 23.9% : 28.7% ($p=0.7056$)로 차이를 보이지 않았다.

결론적으로 PCNA 측정에 의해 확인된 양성과 악성 갑상선 결절의 세포증식 상태는 미분화암을 제외하고는 의미있는 차이를 발견할 수 없었다.

Reference

- 1) 양유휘 · 김옥영 : 한국인의 갑상선 질환에 대한 임상 통계적 고찰. 대한외과학회지 46 6 : 781-794, 1994
- 2) 전기완 · 이승도 등 : 갑상선암의 임상 및 원경성적. 대한외과학회지 28 : 280, 1985
- 3) Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N : Proliferative index in breast carcinoma determined in situ Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. J pathol 152 : 289-295, 1987
- 4) Beierwalter WH, Nishiyama RH, Tompson NW : Survival time and 'cure' in papillary and follicular thyroid carcinoma with distant metastasis. J Nucl Med 23 : 561-8, 1982
- 5) Bravo R, Frank R, Brundell PA, McDonald-Bravo H : Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase. Nature 326 : 515-7, 1987
- 6) Burger PC, Shibata T, Kleihues P : The use of monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells : Application to surgicla neuropathology. Am J Pathol 10 : 611-7, 1986
- 7) Coltrera MD, Gown AM : PCNA/cyclin expression

- and Brdu uptake define different subpopulations in different cell lines. Histochem 39 : 23-30, 1991
- 8) Dippold WG, Gilbert J, et al : p53 transformation-related protein : detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. Proc natl acad sci USA 8 : 1695-9, 1981
 - 9) Donohue JH, Goldfien SD, Miller TR : Do the prognosis of the papillary and follicular thyroid carcinoma differ. Am J Surg 148 : 168-70, 1984
 - 10) Eisuke A, Hroschi H, et al : PCNA in hepatocellular carcinoma and small cell liver dysplasia. Cancer 72(10) : 2902-9, 1993
 - 11) Fauenhoffer CM, Patchefsky AS, Cobanoglu A : Thyroid carcinoma. Cancer 43 : 2414-2421, 1979
 - 12) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM : Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin in fixed, embedded tissues. Am j. Path 184 : 733-9, 1989
 - 13) Gearly WA, Cooper PH : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in common epidermal lesions. An immunohistochemical study of proliferating cell populations. J Cutan Pathol 19 : 458-468, 1992
 - 14) George S, Leight JR and Sabiston CD : Text book of surgery 14th ed p585
 - 15) Gerdes J, Schwabu, Lempke H, et al : Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen. associated with cell proliferation. Cancer 31 : 13-20, 1983
 - 16) Gratzener HG : Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iodo-deoxyuridine : A new reagent for detection of DNA replication. Science 218 : 474-5, 1982
 - 17) Hall PA, Levison DA : Review : Assessment of cell-proliferation in histological material. J clin Pathol 43 : 184-92, 1990
 - 18) Hall PA, Woods AL : Immunohistochemical markers of cell proliferation : Achievements, problems and prospects. Cell tiss kinet 23 : 505-522, 1990
 - 19) Hall PN, Richard MA, Gregory WM, Arclenne AJ, Lister TA, Stansfield AG : The prognostic value of ki-67 immunostaining in non-Hodgkins lymphoma. J Pathol 121 : 275-283, 1985
 - 20) Kiyoshi M, et al : PCNA labelling index of preoperative Bx specimen in gastric carcinoma with special reference to prognosis. Cancer 73(3) : 528-33, 1994
 - 21) Lamy F, Taton M, Dumont JE, Roger PP : Control of protein synthesis by thyrotropin and epidermal growth factor in human thyrocytes : Role of morpho-

- logical changes. *Mol cell Endocrinol* 73 : 195-209, 1990
- 22) Meyer JS, Friedman E, Mccrate MM, Bauer WC : *Prediction of early course in breast carcinoma by thymidine labelling.* *Cancer* 51 : 1866-79, 1983
 - 23) Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S : *Proliferating cell nuclear antigen(cyclin) expression in normal & abnormal cervical squamous epithelia.* *Am J Surg Pathol* 17 : 117-122, 1993
 - 24) Nemoto R, Kawamura H, et al : *Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in human prostate adenocarcinoma.* *J Urol* 149 : 165-169, 1993
 - 25) Persson H, Hennighausen L, Taub R, et al : *Antibodies to C-myc oncogene product : Evidence of an evolutionarily conserved protein induced during cell proliferation.* *Science* 225 : 687-94, 1984
 - 26) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM : *Immunohistochemical detection of PCNA in solid human malignancies.* *Arch Pathol Lab Med* 111 : 841-845, 1989
 - 27) Tadahiromizumi MD, et al : *Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies.* *Cancer* 71(9) : 2807-12, 1993
 - 28) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM : *A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation.* *J Esp Med* 154 : 899-906, 1981
 - 29) Taniai M, Tominatsu M : *Immunohistochemical detection of PCNA in hepatocellular carcinoma.* *J Gastroente Hepato* 8 : 420-5, 1993
 - 30) Terada T, Nakanuman Y : *Cell proliferativity in adenomatous hyperplasia of the liver and small hepatocellular carcinoma. An immunohistochemical study demonstrating proliferating cell nuclear antigen.* *Cancer* 70 : 195-209, 1990
 - 31) Tubiana, Schlumberger M, Rogor P, Laplanche A, Benhamon E, Gardet P, et al : *Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma.* *Cancer* 55 : 794-804, 1985
 - 32) Van Dierendonck JH, Keijzer R, Vande velde CJH, Cornelise CJ : *Nuclear distribution of ki-67 Antigen during cell cycle : Comparison with growth fraction in human breast cancer cells.* *Cancer Res* 42 : 2999-3006, 1989
 - 33) Volm M, Hahn EW, Weber et al : *Five year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non small cell lung carcinoma.* *Cancer Res* 48 : 2923-2928, 1988
 - 34) Wilson GD, McNally NJ, Dishes : *Mesurement of cell kinetics in human tumors in vivo using bromouridine incorporation and flow cytometry : Br J Cancer* 58y423-431, 1988
 - 35) Y, Mizukami, et al : *Tumor proliferation related markers in papillary thyroid carcinomas.* *Anti cancer research* 13 : 267-272, 1993
 - 36) Yonemura Y, Sugiyama K, Miyazami, Fumura T, Kamata T, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K : *Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer.* *Cancer* 62 : 1492-1502, 1988