영남의대학술지 제8권 제2호
The Yeungnam Univ. Med. J.
Vol. 8, No. 2. December 1991

신경교종에서 핵소체 조성부의 의의

영남대학교 의과대학 병리학교실

남혜주 · 김동석 · 최원희 · 이태숙

서 론

종양의 성장양상을 아는것은 종양의 생태(biology)를 이해하고 효과적인 치료를 위해서 중요하다. 1972년 이래 뇌종양에서 세포의 증식능을 측정하기 위해 여러가지 방법의 세포역학연구가 이루어져 왔다. 즉 tritiated thymidine의 labeling index 측정[1], anti-bromodeoxyuridine antibody를 사용한 S phase fraction의 측정[2,3], Ki-67 monoclonal antibody[4], 그리고 DNA의 flow cytometric analysis등[5]이 있다. 그러나 tritiated thymidine을 이용하는 방법은 수술전 환자에게 이 물질을 투여하기 때문에 방사능 위험이 있다. 생체내 연구로 bromodeoxyuridine과 anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody를 사용하는 경우 bromodeoxyuridine을 수술전 환자에게 투여해야 되는데 이는 발암물질의 가능성이 있어서 문제가 되고 생체외 연구인 경우 환자에게 부담은 없으나 신선조직, 특수한 단클론성 항체가 있어야 된다. Ki-67 monoclonal antibody를 이용하는 방법과 flow cytometric analysis는 환자에게 부담없이 세포증식에 대해 유용한 정보를 제공해 주지만 이를 시행하기 위해서는 역시 특수한 단클론성항체, 신선동결절편, 특수한 기자재 등의 까다로운 조건들이 필요함으로 모든 환자에게 쉽게 적용하기는 어렵다. 이에 비해 핵소체 조성부(nucleolar organizer region, NOR)를 이용하는 방법은 인체에 전혀 부담이 없고 은염색법으로 관찰하는 간단한 방법인데 이는 신선동결절편 뿐 아니라 포르말린이나 알코올에 고정된 파라핀포매조직에서도 사용할 수 있는 장점이 있다. 이 핵소체 조성부는 처음에 세포유전학자들이 염색체이상을 연구하는 한 방법으로 이용하여 왔었는데[6] 이것이 정상, 반응성, 혹은 양성종양세포에 비해 악성종양세포에 더 많은 수가 발견된다는 설이 나오게 됨에 따라 비교적 최근에 많은 관심을 끌게 되었다[7,8].

본 연구에서 저자들은 신경교종에서 핵소체 조성부를 측정하고 조직학적 악성도와의 관계를 비교하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

연구재료로는 영남대학교 의료원에서 수술하여 신경교종으로 진단된 예 중 세포의 형태가 잘 유지된 18예(성상세포종, 악성 성상세포종, 다형성 신경교아종 각각 6예)를 대상으로 하였다. 포르말린에 고정시켜 일반공정으로 처리된 파라핀 포매 블록으로 3μm두께의 절편을 만들어 xylene으로 탈파라핀화시키고 100%와 95% ethanol를 거쳐 증류수로 수세하였다. 은교질용액을 만들기 위해 1% formic acid에 gelatin을 녹여 2% gelatin 용액을 만든 다음 이것과 50% silver nitrate용액을 1 : 2의 비율로 혼합하여

최종 염색액을 만들었다. 조직절편을 이 용액으로 20℃ 암실에서 30분간 염색하고 대조염색은 하지 않았다. 관찰은 oil immersion objective lens를 사용하여 1000배율에서 하였으며 모든 예에서 200개 이상의 세포를 대상으로 핵소체 조성부의 수를 헤아려서 한세포당 핵소체 조성부의 평균치를 측정하였다. 또 동정맥 기형으로 수술하면서 채취된 3명의 정상 뇌조직을 대상으로 성상세포의 핵소체 조성부를 같은 방법으로 측정하였다.

결 과

검사한 모든 조직의 핵에서 핵소체 조성부는 여러가지 크기의 갈색 내지 흑색의 점으로 나타났다. 그 모양은 대부분 둥근 점으로 염색되었으나 세포의 역분화가 심할수록 핵소체 조성부의 다형태성도 심해지는 경향이 있어서 다형성 신경교아종에서는 다형태성 핵소체 조성부가 흔히 관찰되었다(Fig. 1).

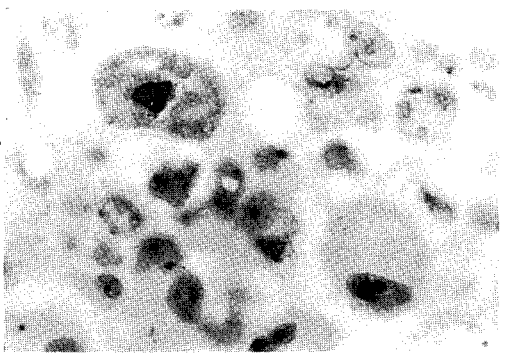

Fig. 1. Glioblastoma multiforme. Large irregular Ag-NOR in tumor cell. (silver stain, x100)

세포 한개당 핵소체 조성부의 평균수는 정상뇌의 경우는 1.17±0.07(Fig. 2), 성상세포종은 1.53±0.25(Fig. 3), 악성 성상세포종은 2.37±0.71(Fig. 4), 다형성 신경교아종은 2.88±0.41(Fig. 5)로 조직학적 등급에 따라 유의한 차이가 있었다($P<0.05$). 각 군을 따로 비교하였을 때 성상세포의 핵소체 조성부의 수는 정상뇌에 비해 유의하게 높았고($P<0.05$), 악성 성상세포종도 성상세포종에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 그러나 다형성 신경교아종과 악성 성상세포종의 경우 평균치가 다형성 신경교아종에서 높았지만 통계학적인 유의성은 없었다.

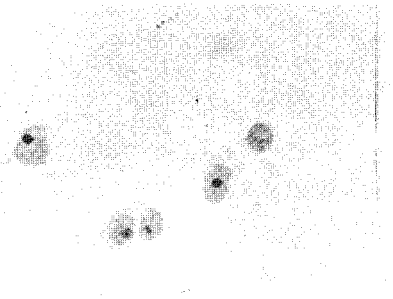

Fig. 2. Normal brain. The astrocytes have one (average 1.17) Ag-NORs(silver stain, x 1000)

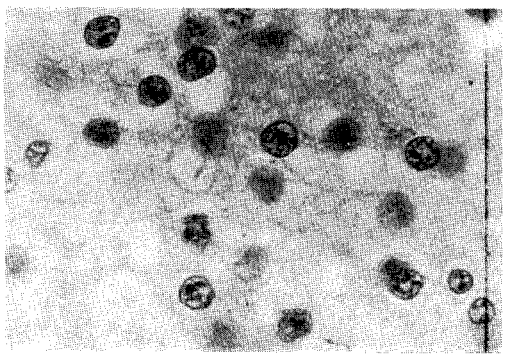

Fig. 3. Astrocytoma. The neoplastic cells have one to two(average 1.53) Ag-NORs. (silver stain, x1000)

Table 1. Mean number of Ag-NOR in histopathological type of glioma

Case NO.	mean No. of Ag-NOR
normal brain	
1	1.22
2	1.09
3	1.20
mean±SD	1.17±0.07#
astrocytoma	
1	1.40
2	1.37
3	2.00
4	1.32
5	1.57
6	1.52
mean±SD	1.53±0.25*#
malignant astrocytoma	
1	2.62
2	3.56
3	2.30
4	1.89
5	2.35
6	1.49
mean±SD	2.37±0.71**#
glioblastoma multiforme	
1	2.48
2	2.92
3	2.95
4	2.34
5	3.41
6	3.21
mean±SD	2.88±0.41#

* $p<0.05$ compared with normal brain by Mann-Whitney U test

** $p<0.05$ compared with astrocytoma by Mann-Whitney U test

# $p<0.05$ compared between each group by Kruskal-Wallis test

Fig. 4. Malignant astrocytoma, The neoplastic cells have two or three(average 2.37) Ag-NORs(silver stain, x1000)

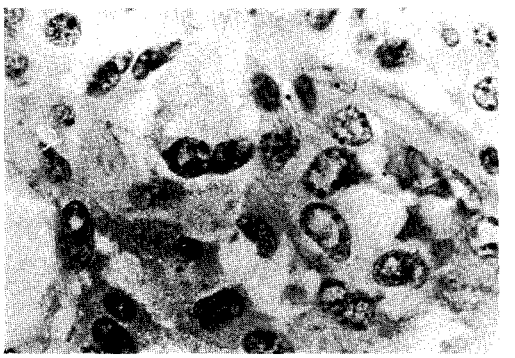

Fig. 5. Glioblastoma multiforme. The neoplastic cells have multiple (anerage 2.88) Ag-NORs. (silver stain, x100)

고 찰

핵소체 조성부는 핵소체에 있는 ribosomal DNA(rDNA) loop로서 ribosomal RNA(rRNA) gene을 가진다. 이 rRNA gene은 RNA polymerase I에 의해 전사되며 ribosome과 최종 단백생성에 관여하기 때문에 핵소체 조성부의 양상은 핵의 전사능력과 세포의 활성도를 반영한다[8,9]. 최근에 이 핵소체 조성부의 위치가 은교질

염색법에 의해 관찰되었다[10]. 은염색법은 rRNA나 rDNA를 증명하는 것이 아니고 핵소체 조성부와 관련된 단백(Ag-NOR)을 증명하는 것으로 핵소체 조성부에 있는 rDNA와 연관된 nucleolar argyrophilic nonhistone protein이 염색되는데 이 단백의 정확한 속성은 아직 불확실하나 RNA polymerase I 의 미세단위거나 C_{23}단백으로 생각되고 있으며[11-13]그 본체가 무엇이건간에 rRNA전사를 조절하거나[14] rDNA를 확장형으로 유지하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각되므로[15] 핵소체 조성부와 관련된 단백도 핵소체 조성부와 마찬가지로 세포와 핵의 활성도를 조사하는데 유용한 방법이 된다. Ploton D 등이[10] 광학 수준에서 핵소체 조성부 관련단백을 관찰하는 더 좋은 방법을 고안하면서 악성 전립선 조직에서의 핵소체 조성부의 수가 양성 과형성 변화에서의 수와 정상 임파구에서수보다 더 많다고 했고, Croker J와 Nar P는[9]는 저악성 임파종과 고악성 임파종 사이에 핵소체 조성부의 수가 차이가 있음을 보고했다. 그 외 여러 종양에서 핵소체 조성부의 수와 종양의 생물학적 침습성과의 관계를 조사한 보고들이 많다[7,9,13].

성상세포 계통의 종양은 인체 뇌종양중 가장 많은 비율을 차지하고 신경교세포 계통의 종양 중 가장 많으며 조직학적 분화도는 환자의 예후와 밀접한 관계가 있다. 또 종양의 분화도 외에 종양의 증식능을 아는것은 환자의 예후를 예측하고 치료계획을 수립하는데 있어 중요하다. 그러나 이는 이질적인 종양집단으로 육안, 현미경적 양상뿐 아니라 생물학적 행동에 있어 심한 차이를 보이는 종양이어서 병리조직학적으로 등급을 나누는 것이 때로 애매하고, 특히 조직의 양이 적거나 손상이 있을때는 주관적인 견해 차이가 있어서 객관적인 기준이 필요하다. 그래서 본 연구에서 신경교종에 핵소체 조성부 관련단백을 관찰하는 은염색법을 적용하여 악성도를 판정하는데 도움이 되고자 조직학적 등급과 핵소체 조성부의 관계를 조사하였는데 전체적으로 신경교종의 조직학적 등급에 따라 핵소체 조성부의 평균수의 의의 있는 차이를 보여주었다. 성상세포종의 핵소체 조성부수는 정상뇌에 비해 더 높게 나왔고 악성 성상세포종과 다형성 신경교아종은 성상세포종에 비해 더 높았다. 이로 미루어 보아 조직학적으로 악성 신경교종의 경우 정상뇌와 세포학적으로 양성인 성상세포종에 비해 핵소체 조성부가 유의하게 높다는 것을 알 수 있으며 이는 다른 보고들과도 일치한다. 또 신경교종의 등급이 높아질수록 핵소체 조성부의 모양이 더 불규칙해지고 크기가 커지는 경향이 있었다. 그러나 악성 성상세포종 1예에서 그 수치가 양성의 평균수치보다 적게 나왔다. Hara A등[16]의 연구에 의하면 신경교종에서 핵소체 조성부가 2이상이면 악성이라고 하였으며, Kajiwara K등[13]은 1.8이상인 경우 임상적으로 악성이며 1.8이하는 임상적으로 양성이라고 보고했으며 본 실험의 결과도 그와 유사한 수치를 보였다. 그 외 여러가지 뇌종양에서 핵소체 조성부에 대해 보고한 바가 많다[17-19].

Ki-67 labeling index, bromodeoxyuridine labeling index 혹은 S-phase fraction등은 신경교종에서 조직학적으로 등급을 판정하는 것보다 더 정확하게 증식능을 반영한다고 하며[20] 핵소체 조성부는 Ki-67 labeling index나 S-phase fraction과 직선관계가 있다고 한다[13,16]. 이로 미루어보아 핵소체 조성부의 평균수는 종양세포역학을 간접적으로 반영한다는것을 시사하며 이는 환자에게 부담을 주지 않는 비교적 빠르고 간단한 방법으로 신경교종의 악성도를 평가하는데 도움이 되는 방법으로 생각된다. 특히 뇌종양 환자에게서 진단을 위해 시행하는 입체 뇌외과 수술(stereotaxic surgery)에 의해 채취한 조직은 조직의 양이 적고 손상이 있어서 판단이 어려운 경우가 많은데 이 경우 핵소체 조성부를 측정

하면 도움이 될 것으로 생각된다. 그러나 본 결과에서 보는 바와같이 조직학적으로 양성종양과 악성종양간에 중복되는 경향을 완전히 배제할 수는 없기 때문에 핵소체 조성부의 측정만으로 종양의 생물학적 침습성을 판단하기는 어려울 것으로 생각된다.

요 약

신경교종에서 핵소체 조성부를 측정하기 위해 18예의 인체 신경교종을 대상으로 은교질염색을 시행하였다. 그 결과 정상뇌의 성상세포는 1.17±0.07의 핵소체 조성부수를 보였고 성상세포종의 핵소체 조성부수는 1.53±0.25, 악성 성상세포종은 2.37±0.71, 다형성 신경교아종은 2.88±0.41이었으며 각 군들간에 유의한 차이를 보였다. 그래서 은교질 염색법에 의한 핵소체 조성부의 측정은 환자에게 부담을 주지 않는 비교적 간단하고 빠른 방법으로 신경교종의 증식능을 판정하는데 어느정도 도움이 될 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Hoshino T, Wilson CB : Cell Kinetic analysis of human malignatnt brain tumors(Gliomas), Cancer 44 : 956-962, 1979.
2. Hoshino T, Nagashima T, Murovic JA, Wilson CB, Edwards MSB, Gutin PH, Davis RL, Dearmond SJ : In situ cell kinetics studies on human neuroectodermal tumors with bromodeoxyuridine labeling. J Neurosurg 64 : 453-459, 1986.
3. Nashizaki T, Orita T, Saiki M, Furutani Y, Aoki H : Cell kinetics studies of human brain tumors by in vitro labeling using anti-BUdR monoclonal antibpdy. J Neurosurg 69 : 371-374, 1988.
4. Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Takahashi M : Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. Cancer 62 : 989-993, 1988.
5. Nishizaki T, Orita T, Furutani Y : Flow-cytometric DNA analysis and immunohistochemical measurement of Ki-67 and BUdR labeling indices in human brtain tumors. J Neurosurg 70 : 379-384, 1989.
6. Markovic VD, Worton RG, Berg JM : Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions. Hum Genet 41 : 181-187, 1978.
7. Crocker J, Ayres J, McGovern J : Nucleolar organizer regions in small cell carcinomas of the bronchus. Thorax 42 : 972-975, 1987.
8. Underwood JCE, Giri DD : Nucleolar organizer regions as diganostic discriminants for malignancy. J Pathol 155 : 95-96, 1988.
9. Crocker J, Nar P : Nucleolar organizer regions in lymphoma. J Pathol 151 : 111-118, 1987.
10. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ : Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochem J 18 : 5-14, 1986.
11. Lischwe MA, Richards RL, Busch RK, Busch H : Localization of phosphoprotein C_{23} to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. Exp Cell Res 136 : 101-109, 1981.

12. Ochs RL, Busch H : Further evidence that phosphoprotein C_{23}(110kD/pI 5.1) is nucleolar silver staining protein. Exp Cell Res 152 : 260—265, 1984.
13. Kajwara K, Nishizaki T, Orita T, Nakayama H, Aoki H, Ito H : Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. J Neurosurg 73 : 113—117, 1990.
14. Olson MOJ, Thompson BA : Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli. Biochemistry 22 : 3187—3193, 1983.
15. Iverson OH : Kinetics of cellular proliferation and cell loss in human carcinomas. Eur J Cancer 3 : 389—394, 1967.
16. Hara A. Hirayama H, Sakai N, Yamada H, Tanaka T, Mori H : Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. Surg Neurol 33 : 320—324, 1990.
17. Shiraishi T, Tabuchi K, Mineta T, Momozaki N, Takagi M : Nucleolar organizer regions in various human brain tumors. J Neurosurg 74 : 979—984, 1991.
18. Plate KH, Ruschoff J, Behnke J, Mennel HD : Proliferative potential of human brain tumors as assessed by nucleolar organizer regions(AgNORs) and Ki67-immunoreactivity. Acta Neurochir 104 : 103—109, 1990.
19. Maier H, Morimura T, Ofner D, Hallbrucker C, Kitz K, Budka H : Argyrophilic nucleolar organizer region proteins(Ag-NORs) in human brain tumors, Acta Neuropathol 80 : 156—162, 1990.
20. Hoshino T, Prados M, Wilson CB, Cho KG, Lee KS, Davis RL : Prognostic implications of bromodeoxyuridine labeling index of human gliomas. J Neurosurg 71 : 335—341, 1989.

-Abstract-

Nucleolar Organizer Regions in Glioma

Hae Joo Nam, Dong Suk Kim, Won Hee Choi, Tae Sook Lee

Department of Pathology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea

Nucleolar organizer regions (NOR) are loops of ribosomal DNA(rDNA) which are transcribed by RNA polymerase I. They produce ultimately ribosome and protein. Thus they are believed to reflect nuclear activity. We applied silver colloid staining technique to human glioma to examine relationship between the mean number of Ag-NOR and histopathological grading. The mean number of Ag-NOR(± S.E of the mean)were 1.17± 0.07 in normal brain, 1.53± 0.25 in astrocytoma, 2.37± 0.71 in malignant astrocytoma. and 2.88± 0.41 in glioblastoma multiforme. And there was a statistically significant difference among these. The results show that Ag-NOR technique is a rather simple and rapid method and will become a helpful tool for estimation of the proliferative potential of glioma

Key words : Glioma, Nucleolar organizer regions