

체강 삼출액의 진단에 있어서 PLC- γ 1 면역 염색의 유용성

울산대학교 병원 진단 병리과

우 영 주 · 김 성 속

= Abstract =

PLC- γ 1 for Differentiating Adenocarcinoma from Reactive Mesothelial Cells in Effusions

Woo Yeong Ju, M.D. and Sung Sook Kim, M.D.

Department of Pathology, Ulsan University Hospital

Cytologic diagnosis of reactive or malignant effusion is sometimes difficult. Especially, differentiation of benign reactive mesothelial cells from malignant cells in body effusion is more difficult. Recently, immunohistochemistry has been used to diagnose difficult cases. Phospholipase C(PLC)- γ 1 is one of the isoenzyme of the PLC which plays central role in signal transduction involving cellular growth, differentiation and transformation by phosphorylating many protein component. Increased expression of PLC- γ 1 in human breast carcinoma, colorectal carcinoma and stomach cancers are reported. To evaluate the efficacy of positive PLC- γ 1 immunostaining in the diagnosis of malignancy in effusions, paraffin-embedded cell blocks of pleural fluid and ascites from 10 patients(5 metastatic adenocarcinomas, and 5 reactive mesothelial cells) were immunostained with a monoclonal antibody to PLC- γ 1. PLC- γ 1 immunostained all the adenocarcinomas in cell block(5/5) with intense membrane pattern, however, none of the reactive mesothelial proliferations stained with the diagnostic membrane pattern. Thus, our study strongly supports the conclusion that PLC- γ 1 immunopositivity is likely to become a useful adjunct for the diagnosis of malignancy in effusions.

Key words: PLC-1, immunohistochemical stain, body effusion

서 론

직장 내 삼출액의 세포학적 진단은 때때로 애매한 경우가 있으며 특히, 악성세포와 반응성 증괴세포는 세포학적 소견만으로는 감별이 용이하지 않은 경우가 많다. 최근 여러 가지 일차항체를 이용한 면역조직화학적 염색이 세포학적 진단의 정확성을 높이는 보조수단으로 사용되고 있으며 자주 쓰이는 일차 항체로서는 CEA, B72.3, P53 등이 있다. Phospholipase C(PLC)- γ 1은 PLC isoenzyme 중의 한가지로서 세포내 여러 가지 단백질의 인산화에 관여하여 세포의 성장, 분화, 증식 등에 관여하는 주요한 효소이다. 최근 인체의 중앙조직유 대상으로 PLC 활성도를 화학적 혹은 면역화학적으로 조사한 연구가 보고되고 있으며 특히, 인체의 유방암¹⁾, 대장암²⁾, 위암³⁾ 등 여러 악성 중앙에서 PLC- γ 1의 함량이 정상 조직보다 수배 높음이 보고되고 있다. 저자들은 직장 삼출액의 세포학적 진단에 있어서 PLC- γ 1의 면역 염색이 악성중앙세포와 양성 세포의 감별에 도움이 되는지 알아보고자 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

울산대학교병원 진단병리과에 의뢰된 직장 내 삼출액 중 조직 생검으로 확진되고 세포블록이 보존된 5예의 악성 삼출액과 5예의 양성 삼출액을 세포 블록을 이용하여 PLC- γ 1에 대한 면역 조직화학적 검사를 실시하여 대조 연구하였다. 악성 삼출액 5예 중 용강 삼출액은 4예, 복강 삼출액은 1예 이었으며 양성 삼출액 5예 중 용강 삼출액은 3예, 복강 삼출액은 2예 이었다.

PLC- γ 1에 대한 면역 조직화학적 염색은 세포 블록을 이용하여 통상 이용되는 avidin-biotin-

immunoperoxidase complex(ABC)법을 시행하였으며 PLC-1 일차 항체는 서 등⁴⁾의 방법에 따라 만들어지고 ELISA 법으로 검증된 PLC- γ 1의 단클론 항체(클론 F7-2, D7-3의 혼합, 1 g/ml)를 이용하였다.

결 과

PLC-1은 5예의 악성 삼출액 모두에서 악성 세포에 양성반응을 보였으며 그 발현양상은 대부분 세포막을 따라 강하게 염색되었으며 부분적으로 세포질 내에 염색되었다(Fig. 1 & 2). 악성 삼출액 중 4예의 용강 삼출액의 원발 부위는 위장 2예, 폐 2예 이었으며 1예는 복강 삼출액으로 그 원발부위는 직장이었다. 그리고 암종은 5예 모두 선 암종이었다(Table 1). 한편, 악성 세포와 함께 출현한 증괴세포 및 5예의 대조 염색한 양성 직장 삼출액의 반응성 증괴 세포에서는 모두 음성 혹은 극소적으로 세포질 내 10% 미만의 아주 약한 양성 반응을 보였고 진단적인 세포막을 따른 발현 양상은 보이지 않았다. 이런 10% 미만의 약한 양성반응은 음성으로 간주하였다.

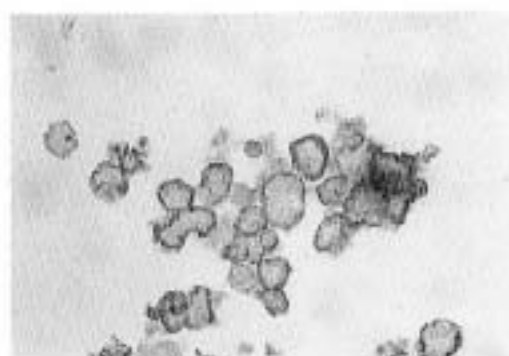


Fig. 1. Malignant cells immunostained with PLC- γ 1. Intense cell membrane staining is noted(Cell block, ABC method, \times 400).



Fig. 2. Papillary clusters of neoplastic cells positively immunostained with PLC- γ 1 (Cell block, ABC method, $\times 400$).

Table 1. Immunohistochemical staining of PLC- γ 1 in malignant effusion

Case	Type	Origin	Expression of PLC-1
1	pleural fluid	stomach	+
2	pleural fluid	lung	+
3	pleural fluid	stomach	+
4	pleural fluid	stomach	+
5	pleural fluid	lung	+

+: positive

고찰

체강 내 삼출액의 세포학적 진단에서 악성 세포와 반응성 중피세포는 세포학적 소견만으로는 감별이 용이하지 않은 경우가 많다. 즉, 반응성 중피 세포가 세포학적으로 비정형성을 보이거나 악성 세포가 중피세포 및 염증세포와 섞여있다거나, 악성 세포의 수가 적은 경우에는 더욱 그 감별이 힘들다. 또 특히 선암종의 경우 반응성 중피세포와 유사한 세포학적 특징을 보이는 경우도 있어 그 감별이 쉽지 않은 경우가 종종 있다. 이런 이유로 악성세포

와 반응성 중피세포의 감별을 위해 여러 가지 보조수단이 이용되어왔는데 과거에는 조직화학적 염색 및 전자현미경적 검사가 이용 되었으나 최근에는 여러 가지 일차항체를 이용한 면역조직화학적 검사가 자주 이용되고 있다. 면역조직화학적 검사에 이용되는 일차항체로는 CK, CEA, EMA, fibronectin 등의 panel이 악성 세포와 반응성 중피세포의 감별에 도움이 된다는 보고가 있으며⁷, 그 외 TAG-72 및 BW-495 등의 pancitibial 항원을 이용한 보고도⁸ 있으나 그 감별에 유일한 표지자는 없어서 여러 가지 일차항체의 panel을 이용하고 있는 형편이다. 가장 최근에는 Ber-EP4⁹나 P53¹⁰을 체강 삼출액의 면역조직화학적 검색에 이용한 연구도 보고되었다.

PLC에는 그 분자량이 따라 등위효소 β , γ , δ 가 있는데 이 등위효소 들은 각각 다른 수용체에 의해 활성화된다^{4,8,11}. 이중 PLC- γ 1은 세포의 유전자 발현, 성장, 분화, 증식에 관여하는 신호전달체계 중 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate(IP2)를 가수분해 하여 2차 신호전달분자인 inositol 1, 4, 5-trisphosphate(IP3)와 1, 2-diacylglycerol(DAG)을 생성하는 효소이다¹²⁻¹⁵. DAG는 세포형질 막에서 protein kinase C(PKC)를 활성화시키고, IP3는 세포 내 소기관으로부터 칼슘의 방출을 유도하는데 세포내 칼슘의 증가가 증양발생에 밀접히 관련되어 있다는 것은 이미 보고된 바 있다¹⁶⁻¹⁸. 또한 PLC- γ 1의 인산화에는 여러 가지 성장인자 등이 관여한다^{19,20}. 특히 PLC- γ 1의 인산화는 growth-factor stimulated inositol phospholipid 대사의 주요한 과정이며 이것은 세포증식에 관여하는 신호전달체계에 중요한 역할을 한다고 추정되고 있다^{22,18,19}. 이런 세포막에서의 PLC 신호전달체계는 정상 세포의 증식을 조절할 뿐만 아니라 또한 증양유전자의 과다발현 혹은 다른 기전으로 이 신호전달체계에 변형이 일어나면 계속적으로 세포 증식이 일어나 종양이 발현 될

수 있다고 생각되어지고 있다^{12,20}. 최근 인체의 중앙조직을 대상으로 PLC 등위효소의 활성도를 화학적 및 면역조직화학적으로 조사한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히, 인체의 유방암¹¹, 대장암², 위암²⁰ 등에서 PLC- γ 1의 활성도가 수배 높음이 보고된 바 있으며 가족성 선종성 폴립증같은 양성 과증식성 병변에서도 PLC의 과잉 발현이 보고된 바 있다²¹. 저자들은 최신 악성세포의 표지자로 보고되고 있는 PLC- γ 1을 악성 및 양성의 재장 삼출액에 면역조직화학적으로 염색 검색하여 PLC- γ 1이 재장 삼출액에서도 악성 및 양성 세포의 감별에 도움이 되는지 여부를 알고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서 PLC- γ 1은 악성 삼출액 5예 모두에서 "양성"반응을 보였으며 양성 삼출액의 췌장 세포에서는 모두 음성반응을 보이며 PLC- γ 1에 대한 면역조직화학적 염색이 재장내 삼출액의 또 다른 악성 표지자로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 앞으로 더 많은 수의 재장 삼출액을 이용하여 다른 일차암제와의 비교 연구 및 악성 췌장세포에 대한 비교 염색이 필요하다고 생각하였다.

결 론

PLC- γ 1에 대한 면역조직화학적 검색이 재장내 삼출액의 악성세포와 양성 세포의 감별에 도움이 되는지 알아보고자 조직 생검으로 확진된 5예의 선위종 및 5예의 양성 재장내 삼출액의 세포분류에 이용하여 면역조직화학적 검사를 시행하였다. 그 결과로 악성 5예 모두 PLC- γ 1에 양성반응을, 양성 5예 모두는 PLC- γ 1에 음성 반응을 보였다. 이상의 결과로 PLC- γ 1에 대한 면역조직화학적 검사는 재장내 삼출액의 악성 세포를 진단하는데 도움이 된다는 결론을 얻었다.

참 고 문 헌

1. Artega CL, Johnson MD, Toddman G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL: Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10435-10439, 1991.
2. Noh DY, Lee YH, Kim SS, et al: Elevated content of phospholipase C- γ 1 in colorectal cancer tissues. *Cancer* 73:36-41, 1994.
3. 김영옥, 조부연, 이승도, 김성숙, 서하경, 허만하: 위암조직에서 나타나는 Phospholipase C 활성도의 변화. *대한병리학회지* 30:210-217, 1996.
4. Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG: Monoclonal antibodies to three phospholipase C isoenzymes from bovine brain. *J Biol Chem* 263: 14497-14504, 1988
5. Lee JS, Nam JH, Lee MC, Park CS, Jung SW: Immunohistochemical panel for distinction of carcinoma cells and reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 40:631-636, 1996
6. Mezger J, Stitzler O, Schilli G, Bayer S, Wilmanns W: Identification of carcinoma cells in ascitic and pleural fluid. *Acta Cytol* 36:75-81, 1992.
7. Baily ME, Brown RW, Mody DR, Cagle P, Ramsey I: Ber-Ep4 for differentiating adenocarcinoma from reactive and neoplastic mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 40:1212-1216, 1996
8. 이지선, 박장수: 재장 삼출액의 진단에 있어서 p53단백의 유용성. *대한세포병리학회지* 7:138-143, 1995.
9. Mullick ss, Green LK, Rimzy I, et al: p53 gene product in pleural effusions. *Acta Cytol* 40:855-860, 1996.
10. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY: Studies of inositol phospholipid specific phospholipase C. *Science* 244:546-60, 1989
11. Rhee SG, Choi KD: Regulation of inositol phospholipid specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 267:12393-6, 1992
12. Rillema JA: Possible role of phospholipase C in the regulation of cell division in normal and neoplastic cells. *Med Hypotheses* 29:1-4, 1989.
13. Nishizuka Y: Studies and perspective of protein

- kinase c. *Science* 23:305-131, 1988.
14. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphate and cell signaling. *Nature* 341:197-205, 1989.
 15. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol Triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-21, 1984.
 16. Rasmussen B, Goodman BP: Relationship between calcium and cyclic nucleotide in cell activation. *Physiol Rev* 57:421-509, 1977.
 17. Veigl MI, Vamaman TC, Sedwich WD: Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochem Biophys Acta* 738:21-48, 1984.
 18. Witman M, Cantley L: Phosphoinositide metabolism and the control of cell proliferation. *Biochem Biophys Acta* 948:327-331, 1989.
 19. Smith MR, Ryu SH, PG, Kung HF: Transformation of quiescent NIH 3T θ cells by microinjection of phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:3659-3663, 1989.
 20. Rillema JA: Phospholipase C activity in normal rat mammary tissues and in DMBA-induced rat mammary tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 181: 450-453, 1986.
 21. Park JG, Lee YH, Kim SS, et al.: Overexpression of phospholipase C- γ 1 in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 15:2240-2244, 1994.