

림프구성 기질의 위암에서 Epstein-Barr Virus (EBV), 세포자멸사와 림프구 침윤 정도와의 상관성

김태현 · 조미연 · 이상엽¹ · 정우희²
박광화

연세대학교 원주의과대학 병리학교실
¹관동대학교 의과대학 병리학교실
²연세대학교 의과대학 병리학교실

접 수 : 2001년 4월 9일
게재승인 : 2001년 8월 3일

책임저자 : 박 광 화
우 220-701 강원도 원주시 일산동 162
연세대학교 원주의과대학 병리학교실
전화: 033-741-1552
Fax: 033-731-6590
E-mail: pathology@wonju.yonsei.ac.kr

Relationship between Epstein-Barr Virus (EBV), Apoptosis and Lymphocytic Infiltration in Gastric Carcinoma with Lymphoid Rich Stroma

Tae Heon Kim, Mee Yon Cho, Sang Yeop Yi¹, Woo Hee Jung² and Kwang Hwa Park

Department of Pathology, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju; ¹Department of Pathology, College of Medicine, Kwandong University, Gangneung; ²Department of Pathology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Background : Gastric carcinoma with lymphoid rich stroma (GCLRS) is an undifferentiated gastric carcinoma with heavy lymphocytic infiltrate. In order to clarify the relationship between lymphocytic infiltration and apoptosis in gastric carcinoma, we investigated the association of apoptosis with apoptotic proteins and Epstein-Barr Virus (EBV) expression in GCLRS. **Methods :** We performed immunohistochemical stains for bcl-2, bax and *in situ hybridization* for EBER (Epstein-Barr virus encoded RNA)-1 and the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling (TUNEL) technique using 47 out of 1635 gastric carcinoma cases. **Results :** The prevalence of GCLRS was 1.47% (24/1635). The prevalence of EBV involvement in GCLRS (79%, 19/24) was significantly higher than that of gastric carcinoma with lymphoid poor stroma (GCLPS) (8.7%, 2/23). The immunohistochemical stain for bcl-2 revealed negative expressions in all cases, but that of bax was positive for in all cases. bax was significantly correlated with the apoptotic index ($p < 0.05$). There was no statistical significance between lymphocytic infiltration and apoptosis. The lymphocytic infiltration significantly correlated with the expression of EBV ($p < 0.05$) but not with survival rate and apoptosis. However, most of the GCLRS displayed low clinical stages (stage IA, B), and we suggest that was a proper reason for a good prognosis. **Conclusions :** These results support that EBV is associated with GCLRS, and there is no relationship between apoptosis and bcl-2, bax and prognosis. They also suggest that EBV infection play an important role in the gastric carcinogenesis.

Key Words : Carcinoma, Stomach, Herpesvirus 4, Human, Apoptosis

위암종으로 인한 사망률은 한국에서 10만명당 29.8명으로, 암으로 인한 사망 중 가장 중요한 원인이다.¹ 위암종의 대부분은 선암종이나 1-4%의 빈도로 드물게 림프성 기질을 가진 위암종을 볼 수 있다.² 이 암종은 종양 세포 주위 기질에 뚜렷한 림프구 침윤을 동반하는 것으로 다른 위암종과 조직학적으로 구분되며, 흔히 관찰되는 선암종에 비해 예후가 좋은 것으로 알려져 있다.² 이 암종은 조직학적으로 비인두에 호발하는 림프상피종과 유사하여 EBV가 이 종양 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.³ EBV는 Epstein 등⁴에 의해 Burkitt 림프종에서 배양한 림프모세포주에 증명된 herpesvirus군에 속하는 DNA 바이러스로, 타액선의 상피세포 및 B 림프구의 CD21과 결합하

여 침윤한 뒤 대부분은 잠복감염 상태로 있다. 또한 비인두암종, 호지킨병, 말초 T 세포 림프종 등 여러 림프증식성 질환뿐만 아니라, 상피성 종양의 원인 인자로 작용하거나 연관되어 있다.⁵ 위암종에서의 EBV 발현은 Shibata 등⁶의 경우 16%, Tokunaga 등⁷의 경우 6.9% 등 다양한 빈도로 보고하고 있으며, 한국에서는 13.5%로 보고되었다.⁸ Nakamura 등⁹에 의하면 림프성 기질을 가진 위암종의 80% 이상에서 EBV가 검출되어 다른 유형의 위암종에 비해 EBV가 높은 빈도로 발현되는 것으로 보고하였다. 림프성 기질의 위암종은 EBV가 발암과정에 밀접하게 관여하고 있는 것으로 일반적인 위암종과 구별되는 특징적인 유형으로 사료된다.^{10,11}

최근 연구들은 자궁경부암,¹² 식도암,¹³ 결장암¹⁴ 등 악성 종양이 발생하고 발달하는 단계에서 세포자멸사의 역할에 대해 언급하였다. 세포의 증식과 사망간에 수적인 평형이 유지되고 있으나 어떤 원인에 의해 세포 증식력이 증가하거나 세포의 사망이 감소하면, 세포의 수가 증가하여 종양을 형성하게 된다. 이러한 발암과정에는 세포의 비정상적인 증식뿐만 아니라 세포자멸사가 관여하게 된다.¹⁵ 세포자멸사는 괴사와는 다르게 능동적이며 계획된 세포사의 한 형태로서 지금까지 많이 연구되어 왔으며, 특히 종양유전자나 종양억제유전자 중에도 세포자멸사의 유도에 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있는 유전자들이 있는데, 이들 중 세포자멸사 길항제인 *bcl-2*와 세포자멸사 촉진제인 *bax* 등이 있다.¹⁶

*Bcl-2*는 18번 염색체에 위치하는 26 kD의 사립체 내막과 핵막, 소포체 등에 존재하는 단백질로 정상적인 세포소멸을 억제하는 종양유전자이다. *Bcl-2*는 t(14:18) 염색체 전위나 EBV 잠복성 유전자 산물인 latent membrane protein (LMP)-1에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있으며, 여포성 림프종과 미만성 B 세포 림프종 발생과 연관이 있다.¹⁷ 최근에는 태생기 상피세포에 발현되어 형태발생 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁸ *bax*는 *bcl-2* 유전자와 구조적으로 매우 비슷하며, 생체내에서 *bcl-2* 유전자와 상호 경쟁적으로 작용하여 동종결합체나 이종결합체를 형성하고, *Bcl-2* 유전자가 세포자멸사를 억제하는 기능에 대하여 반대작용을 함으로써 세포자멸사를 촉진하는 것으로 보고되고 있다.¹⁹

Saegusa 등²⁰은 위암중에서 세포자멸사와 종양의 침윤 정도 및 조직학적 분화도가 밀접한 연관성이 있음을 보고했지만 예후와의 관계는 결정하지 못했고, Koshida 등²¹은 위암중에서 세포자멸사가 예후 인자로서의 생물학적 중요성은 없다고 보고했다. 특히 위선암중에서 세포자멸사 조절단백질(*bcl-1*, *bax*, *bcl-X*, *Mcl-1*)에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 연구에서 면역 양성률 및 반응 강도와 임상 병기가 상호 연관성이 없음을 보고된 바 있다.²² 또한 Kume 등²³은 EBV 양성인 위선암중이 *bcl-2*는 발현되고 세포자멸사는 낮음을 보고하여 EBV와 세포자멸사의 관련성을 시사하였다.

이에 저자들은 외과적으로 절제된 위암중을 검색하여 림프성 기질을 가진 위암중의 빈도와 임상 병리학적 특징을 조사해 보고 일반 위암중과 비교하여 EBV와의 관련성, 세포자멸사와 그 관련 단백질의 발현을 조사하여 예후와 관련성을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

연구대상

1982년부터 1999년까지 연세대학교 원주의과대학 원주기독병

원 및 1996년부터 1999년까지 연세대학교 의과대학 부속 영동 세브란스 병원에서 위암중으로 진단 받고 외과적으로 위절제술을 시행 받은 총 1,635예의 조직 슬라이드를 재검토하여, 조직학적으로 풍부한 림프성 기질을 가진 위암중의 빈도를 알아보고 림프성 기질이 없는 위암중을 무작위 선택하였다.

임상정보

환자의 병리 진단지와 임상 기록지를 검토하여 환자의 연령, 성별, 종양 위치를 조사하고 American Joint Committee on Cancer (AJCC) 기준²⁴에 따라 임상 병기를 정하였다.

병리조직학적 검색

파라핀 포매 조직을 5 μm 두께로 박절하여 H&E 염색을 시행한 슬라이드를 모두 광학현미경으로 검색하여 종양의 조직학적 유형 및 림프구 침윤 정도를 확인하였다. 종양 세포 주위에 침윤하는 림프구 침윤 정도에 따라 거의 없거나 종양의 면적에 비해 30% 미만인 경우를 'gastric carcinoma with lymphoid poor stroma (GCLPS)'로 정의하였고, 종양 간질에 전반적으로 침윤해 있고 결체조직 증식이 없으며 림프구의 침윤이 종양 면적의 30% 이상되는 경우를 'gastric carcinoma with lymphoid rich stroma (GCLRS)'로 정의하였다(Fig. 1). 총 1,635예의 위암중을 검색하여 GCLRS는 24예를 찾았고, GCLPS는 24예를 제외한 나머지 1,611예 중에서 무작위 표본 추출한 23예를 대조군으로 하였다.

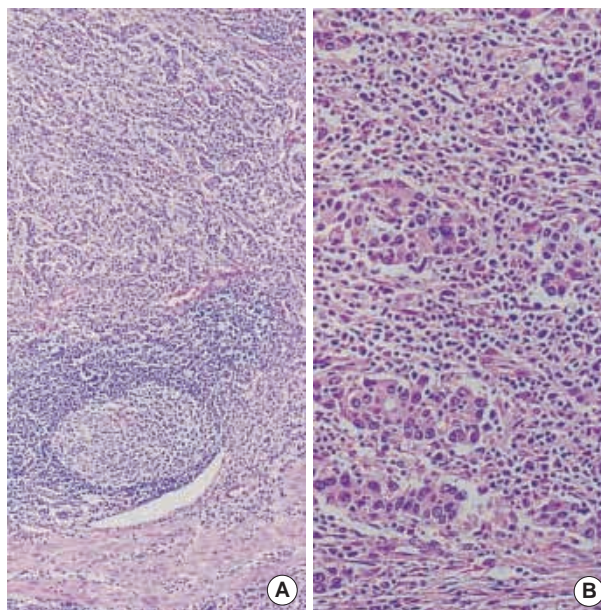


Fig. 1. Histologic finding of gastric carcinoma with lymphoid rich stroma shows dense lymphocytic infiltration between poorly differentiated tumor cells with lymphoid follicle formation.

면역조직화학 염색

면역조직화학 염색의 일차 항체는 bcl-2 (DAKO, Denmark)와 bax (Carpinteria, CA, U.S.A.)를 각각 1:50, 1:100으로 희석하여 사용하였다. Bcl-2에 대한 면역조직화학 염색은 선택한 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 poly-L-lysine-coated slide 위에 부착시키고 50°C에서 2시간 건조시켰다. 탈파라핀과 재수화를 시키고 수세한 후 microwave (750 W)에 5분간 3회 가열하고 20분간 pressure cooker 안에 유지시켰다. 3% hydrogen peroxide/methanol에 10분 동안 처리하여 내인성 과산화효소를 억제하였다. 증류수에 세척하고 Tris buffer에 10분간 수세하였다. 일차 항체를 각각 실온에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 Tris buffer에 10분간 수세하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole에 6분간 발색한 후 흐르는 물에 세척하고 hematoxylin으로 대조 염색한 다음 다시 흐르는 물에 세척하고 글리세롤로 봉합하였다. Bax는 bcl-2와 마찬가지로 시행하되 microwave 대신 CSA (Catalysed Signal Amplification) kit (DAKO, CA, U.S.A.)를 이용하여 amplication reagent를 약 15분간 유지시킨 뒤 streptavidin-peroxidase를 15분간 처리한 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 광학현미경상 중앙 조직에서 중앙 세포의 핵 혹은 세포질에 강한 갈색으로 염색된 경우가 중앙 조직의 10% 이상일 때 양성으로 판정하였다. 그리고 중앙 조직에서 양성 발현 면적을 전체 중앙의 10% 이하, 10-30%, 30% 이상으로 분류하고 각각 0, 1+, 2+로 나누었다.

Terminal deoxynucleotidyl-mediated dUTP-nick end labelling (TUNEL) 방법을 이용한 세포자멸사 염색

세포자멸사를 보기 위해 ApopTag in situ apoptosis detection kit (Intergen, NY, U.S.A.)를 이용하여 다음과 같이 염색하였다. 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 실온에서 건조시킨 후 탈파라핀 과정과 합수를 거친 다음 실온에서 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K로 25분간 처리한다. 내인성 과산화효소의 차단을 위해 phosphate buffered saline (PBS)에서 3% 과산화수소수 용액으로 처리한다. Terminal deoxynucleotidyl transferase 효소를 이용하여 digoxigenin-labeled nucleotide의 부가물을 fragmented DNA의 3'OH end로 만든 후 antidigoxigenin-peroxidase 용액을 슬라이드 위에 떨어뜨린다. 발색 반응을 위해 diaminobenzidine hydrogen peroxidase를 사용한 후 0.5% methyl green으로 약하게 대조 염색을 하였다.

세포자멸사는 핵 염색이 뚜렷하게 된 세포들의 조직학적 위치를 관찰하고 저배율 시야에서 괴사된 부위나 변연부를 피하여 염색이 잘 된 부위를 택하였다. 그리고 중앙 조직에서 양성 발현 면적을 전체 중앙의 10% 이하, 10-30%, 30% 이상으로 분류하고 각각 0, 1+, 2+로 나누었다. 그리고 광학 현미경 400배 시야에서 1,000개의 중앙 세포를 골라 그 중 양성 세포의 수를

세어 백분율을 구하였으며, 이를 세포자멸사지수로 하였다.

Epstein-Barr virus encoded RNA (EBERs)에 대한 *in situ* hybridization

파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 50°C에서 건조시킨 후 탈파라핀 과정과 합수를 거치고 실온에서 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteinase K로 20-30분간 반응시킨 다음 증류수로 세척하였다. 95%와 99% 에탄올에 순차적으로 탈수 과정을 거친 다음 공기 중에 말렸다. EBERs에 대한 oligonucleotide probe (Novocasttra, Newcastle, U.K.) 1-2방울을 떨어뜨린 후 커버 슬립을 덮고 37°C 항온 수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% Triton X-100을 함유한 Tris 완충액으로 세척하였다. 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 0.05 M Tris 완충액으로 100배 희석한 anti-FITC/alkaline phosphatase 시약을 실온에서 30분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척한 후 발색제가 조직에 잘 침투해서 반응하도록 하는 alkaline substrate 완충액에서 5분간 반응시켰다. 발색제로 사용한 nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)과 내재성 alkaline substrate를 억제하기 위하여 추가한 levamisole (1 μL)의 혼합 용액을 alkaline substrate 완충액으로 50배 희석하여 만든 용액에 1시간 정도 반응시킨 후 Tris 완충액으로 세척하였다. Hematoxylin으로 대조 염색을 하였다. 광학현미경상 중앙 조직에서 중앙 세포의 핵에 강한 갈색으로 염색된 경우가 중앙 조직의 10% 이상일 때 양성으로 판정하였다.

통계학적 분석

림프구 침윤 정도와 중앙의 위치, bcl-2와 bax에 대한 면역조직화학 염색 결과, EBV 검출 결과 및 임상 병기와 관계는 SPSS 9.0[®] (Systat, U.S.A.)를 이용하여 χ^2 검정으로 조사하였다. 그리고 세포자멸사 지수와 위 변수들과의 관계는 student's t-test를 이용하여 통계학적 유의성을 알아보았다. 또한 추적 관찰이 가능한 예의 생존율과 림프구 침윤 정도, 중앙 위치 및 EBV 발현 간의 연관성을 Kaplan-Meier 분석으로 조사하여, p값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

GCLRS의 임상 및 병리학적 특징 (Table 1)

총 1,635예의 위암중 중에서 GCLRS는 24예로 빈도가 1.47%였다. 남녀 성비는 GCLRS와 GCLPS 각각 2:1과 2.4:1로 거의 비슷했고, 평균 연령도 각각 55세와 56세로 차이가 거

Table 1. The clinical characteristics between GCLRS and GCLPS

		GCLRS	GCLPS
Sex	M:F	2:1	2.4:1
Age (yr)	Median age	55	56
Site (%)	Antrum	54	62
	Body & cardia	46	38
Stage (%)	IA	16.7	22.2
	IB	33.3	10.9
	II	4.2	19.7
	IIIA	25.0	21.9
	IIIB	20.8	16.1
	VI	0.0	9.2

GCLRS: gastric carcinoma with lymphoid rich stroma, GCLPS: gastric carcinoma with lymphoid poor stroma, M: male, F: female.

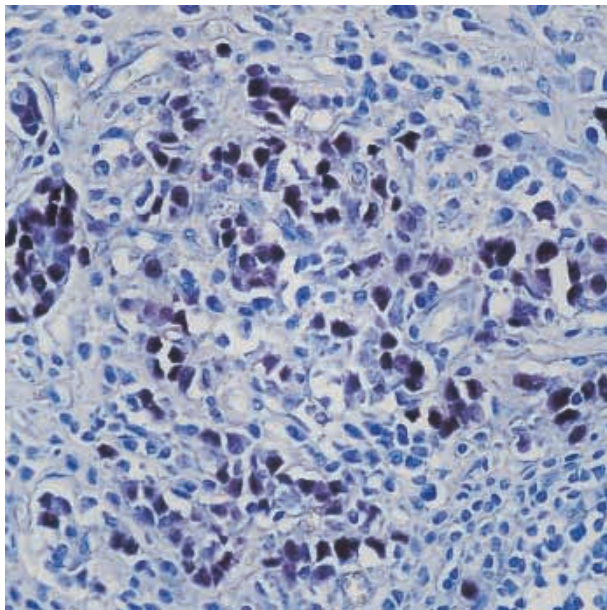


Fig. 2. *In situ hybridization* for Epstein-Barr virus encoded RNA-1 shows strong positivity in nuclei of the tumor cells.

의 없었다. 병변 위치는 GCLRS와 GCLPS 모두에서 체부 및 분문부보다 전정부에서 발생 빈도가 높았으나 GCLRS가 체부 및 분문부에 약간 호발하였다. 임상 병기는 GCLRS는 stage IA, IB가 50%를 차지하고 있는 반면 GCLPS는 stage IIIA, IIIB가 48%를 차지하였다.

EBV에 대한 *in situ hybridization* (Table 2)

EBER-1은 GCLRS 24예 중 19예에서 검출되었고, GCLPS 23예 중 2예에서 검출되어 GCLRS와 GCLPS의 EBV 발현 빈도는 각각 79%와 8.7%로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$) (Fig. 2).

Table 2. Relationship between lymphocytic infiltration, bax, apoptosis, and EBV expression

		GCLRS (n=24)	GCLPS (n=23)	No. of cases	p value
Bax	1+	7	7	14	NS
	2+	17	16	33	
Apoptosis	1+	11	14	25	NS
	2+	13	9	22	
EBV	Negative	19	2	21	<0.001
	Positive	5	21	26	

GCLRS: gastric carcinoma with lymphoid rich stroma, GCLPS: gastric carcinoma with lymphoid poor stroma, M: male, F: female.

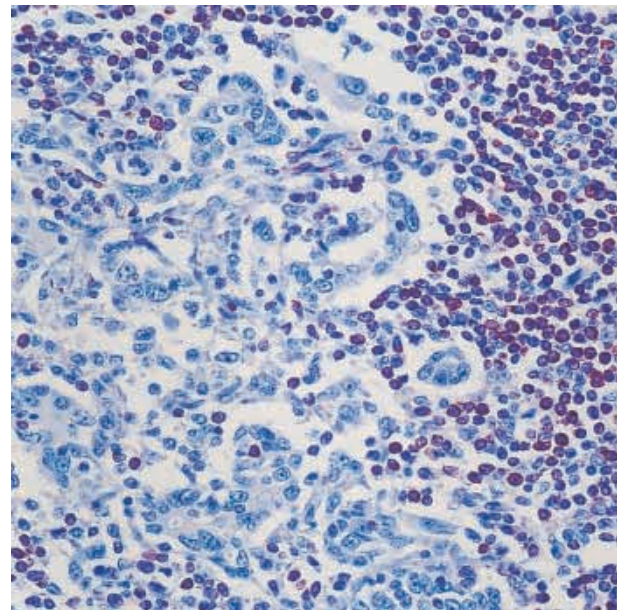


Fig. 3. Immunohistochemical staining for bcl-2. The tumor cells demonstrate negative immunoreactivity but infiltrating lymphocytes show positive immunoreactivity.

Bcl-2와 bax에 대한 면역조직화학 염색

Bcl-2 단백질은 림프구의 세포질에서 균질한 염색상을 보여 좋은 내부 대조 염색이 되었지만, GCLRS 24예 모두에서 중양 세포는 음성이었고 대조군 GCLPS 23예에서도 모두 음성이어서 림프구 침윤 정도에 따른 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

Bax 단백질은 중양 세포의 세포질과 정상 림프구의 세포질에서 진한 갈색의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). GCLRS 24예와 대조군으로 사용한 23예의 GCLPS 모두에서 양성 반응을 보였고, GCLRS는 7예(29.2%)는 1+, 17예(70.8%)는 2+였고, GCLPS는 7예(30.4%)가 1+, 16예(69.6%)가 2+였다.

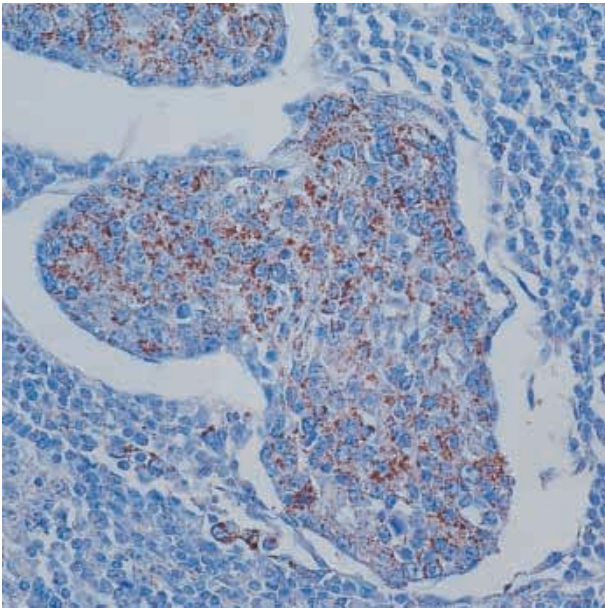


Fig. 4. Immunohistochemical staining for bax. The cytoplasm of the tumor cells shows brown granular positivity.

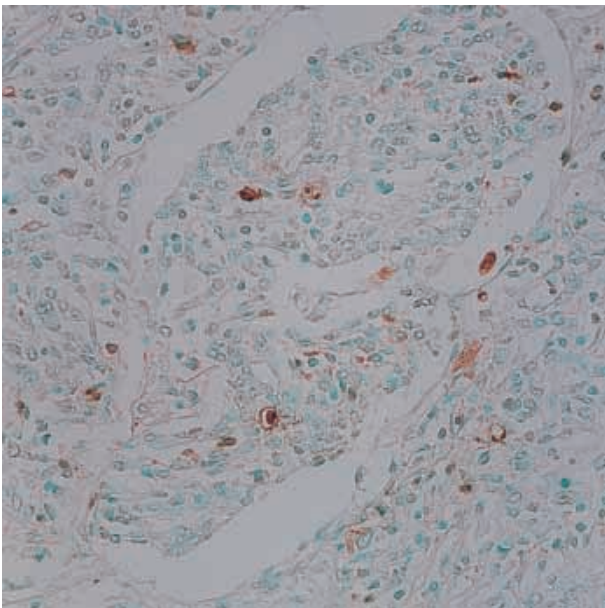


Fig. 5. Terminal deoxynucleotidyl-mediated dUTP-nick end labelling for apoptosis. In the tumor cells, occasional nuclear staining is noted.

TUNEL 방법을 이용한 세포자멸사 염색 (Table 2)

세포자멸사는 GCLRS 24예와 대조군으로 사용한 23예의 GCLPS 모두에서 관찰되었다. GCLRS에서는 1+가 11예 (45.8%), 2+가 13예(54.2%)였고, GCLPS는 1+가 14예 (60.9%), 2+는 9예(39.1%)로 통계학적으로 유의한 차이는 없

Table 3. Relationship between lymphocytic infiltration, EBV, bax, apoptosis, and apoptotic index in stage III

	GCLRS (n=11)	GCLPS (n=17)	No. of cases	p value
EBV				
Negative	1	17	18	<0.001
Positive	10	0	10	
bax				
1+	4	5	9	NS
2+	7	12	19	
Apoptosis				
1+	6	11	17	NS
2+	5	6	11	
Apoptotic index (mean ± SD)	3.00 ± 1.47	2.52 ± 1.47		NS

GCLRS: gastric carcinoma with lymphoid rich stroma, GCLPS: gastric carcinoma with lymphoid poor stroma, M: male, F: female.

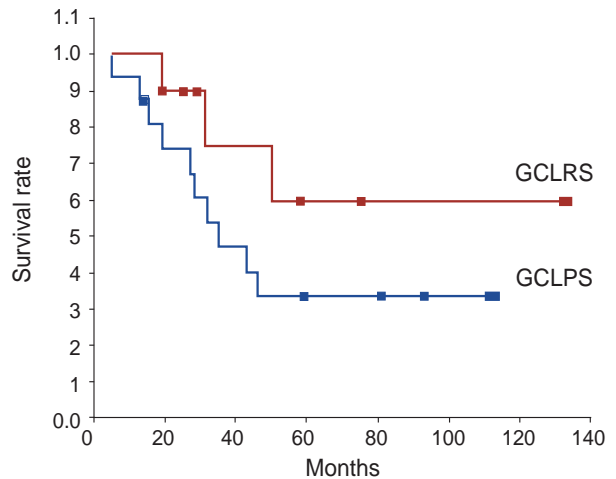


Fig. 6. Relationship between survival rate and lymphocytic infiltration in the stage III. GCLRS: Gastric carcinoma with lymphoid rich stroma, GCLPS: Gastric carcinoma with lymphoid poor stroma.

었다(Fig. 5).

세포자멸사지수와 림프구 침윤 정도, bax, EBV와의 관련성

세포자멸사지수와 bax는 통계학적으로 유의한 상관성이 있으나(p<0.05), 세포자멸사 지수와 림프구 침윤 정도, EBV와는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

Stage III에서 생존율과 림프구 침윤 정도, bax, 세포자멸사, EBV 발현의 비교 (Table 3)

추적 관찰이 가능했던 예는 GCLRS 22예, GCLPS 21예로 총 43명이었고 평균 생존율은 각각 107개월, 61개월로 뚜렷한

차이가 있었다($p < 0.05$). 그러나 GCLRS의 경우 50%가 stage I에 해당되며 환자의 대부분이 생존하였기 때문에, 대조군과의 비교를 위하여 stage III에 해당되는 예만을 대상으로 하여 두 군간의 생존율, EBV 발현, bax의 발현 및 세포자멸사 지수 차이를 비교 분석하였다. Stage III의 GCLRS는 11예였고, GCLPS는 17예였으며 평균 생존율은 각각 89개월, 56개월이었다. Kaplan-Meier 생존곡선에서 두 군의 생존율에 통계학적으로 유의한 차이는 없었지만($p = 0.16$), 추적기간이 길어질수록 GCLRS가 좋은 예후를 보이는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 두 군간에 EBV 발현, bax 발현, 세포자멸사지수는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 3).

고찰

위암종의 종양내 림프구의 침윤이 동반된 경우에 예후가 좋다는 보고가 MacCarty 등²⁵에 의해 발표된 이후, Watanabe 등²이 결체조직의 증식이 없이 풍부한 림프구 침윤이 있는 기질을 특징으로 하는 위암종을 통상의 위암종과 구별하여 기술하였다. 그 발생 빈도는 1-4%로 매우 낮으나 특징적인 조직학적 소견과 함께 예후가 좋은 점에서 구별해야 할 필요성이 강조되었다. 본 연구에서는 간질에 결체조직이 없이 림프구 침윤이 종양의 전반에 걸쳐 있고 종양의 30% 이상인 예를 GCLRS로 정의하였다. 총 1,635예의 위암종을 검색하여 24예를 찾음으로써 그 발생 빈도는 1.47%였다. 이는 Watanabe 등²이 1-4%, Matsunou 등¹⁰이 3.7%, Chang 등¹¹이 4.6%를 보고한 것에 비해 비교적 낮은 결과이다. 이는 본 연구에서 선택한 GCLRS가 다른 논문에서보다 림프구 침윤이 뚜렷한 예만을 엄선했기 때문이라고 생각되며, 추후에 용어에 대한 정확한 정의가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

EBV 감염은 림프구증식질환과 비인두암종의 발생에 관여할 뿐 아니라 다른 여러 장기에 림프상피종과 유사한 병변의 발생에도 연관이 있는 것으로 보고되었다.⁹ 특히 림프구 침윤이 동반된 위암종에서의 EBV 발현에 대한 연구가 활발하며 82-90%의 양성율이 보고되었다.^{7,9} 이는 본 연구 결과에서 79%를 보인 것과 비교적 일치하였고 최근 국내의 보고¹¹인 67%보다는 높은 빈도를 보였다. 본 연구의 결과에서도 확인된 바와 같이 GCLRS에서의 EBV 발현 빈도는 대조군인 GCLPS에 비해 통계학적으로 유의하게 높았다. 본 연구에서는 EBER-1에 대한 *in situ hybridization*을 이용하여 EBV 발현을 관찰하였는데, 특징적으로 종양 세포에서만 양성이었다고 주위의 림프구에서는 발현되지 않았다. 이러한 결과는 Shibata 등⁶과 Pittaluga 등²⁶의 보고와 일치하였다. Harm 등²⁷에 의하면 EBV에 감염된 위암종의 종양 세포들이 모두 단클론성의 EBV DNA를 나타냄으로써 상피세포가 악성으로 변형되기 이전에 바이러스 감염이 일어났다고 보고하였다. Shin 등¹⁰은 EBER이 위암종 세포의 핵

전체에 고루 분포되어 있고, 종양의 원발 부위와 함께 전이 부위에도 발현된다는 점과 조기위암에서도 발현된다는 점 등을 들어 EBV 감염이 암발생 초기 단계에 관여하여 EBV를 함유하는 종양 세포의 단클론성 성장이 이루어진다고 주장했다. 그러나 GCLRS에서 EBV의 역할은 아직 정확히 알려지지 않았으며 림프구 침윤의 기전도 명백히 밝혀지지 않은 상태이다. EBV 발현이 관찰되는 위암종에서 침윤된 림프구는 UCHL-1 양성인 T 세포와 L-26 양성인 B 세포가 함께 섞여 있다는 보고¹⁰와, 대부분 CD8+ T 림프구이며 EBV와 종양 항원에 대한 직접적인 반응 때문이라는 보고⁷가 있으며, 광범위한 T 림프구 침윤이 예후에 영향을 주는 것으로 생각된다. 따라서 조직학적으로 림프구 침윤이 풍부한 종양은 EBV 발현이 있을 가능성이 크다고 생각된다.

Kume 등²³은 EBV 양성인 위선암종에서 bcl-2가 발현되고 세포자멸사가 낮다고 보고하였고, EBV 양성인 림프성 기질의 위암종이 낮은 세포자멸사지수를 보이며 정확한 기전은 알 수 없으나 좋은 예후와 연관성이 있다고 기술한 바 있다. 위암종에서 bcl-2 발현에 대한 기술은 보고에 따라 매우 다양하여 Krajewska 등²²은 위암종의 54%에서 bcl-2가 발현된다고 하였고, Lauwers 등²⁸은 위선암종 중 장형에서 대부분 bcl-2가 발현되며 미만형에서는 거의 발현되지 않는다고 기술한 반면, Lee 등²⁹은 오히려 미만성의 위암종에서 bcl-2가 강하게 발현된다고 보고하였다. 또한 Koshida 등³⁰은 위암종에서 bcl-2 양성인 경우 세포자멸사지수가 낮은 반면 bax에 양성인 경우에는 세포자멸사지수가 높다고 보고했지만, bcl-2 발현 유무가 세포자멸사지수와 상관이 없다는 보고도 있다.²⁶ 본 연구에서는 TUNEL 방법을 이용하여 세포자멸사의 빈도를 조사하였고, 세포자멸사 관련 단백질 중 파라핀 포매 조직으로 검색이 가능한 bcl-2와 bax에 대하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. Bcl-2가 주변 림프구 침윤에 좋은 대조 염색을 보였지만 모든 예의 종양 세포에서는 음성이어서 림프구 침윤 정도에 따른 bcl-2 발현의 차이를 관찰할 수 없었다. 본 연구에서 종양 세포에서 bcl-2의 발현이 없었던 점은 Lauwers 등²⁸의 결과와 일치하였다. 그러나 위암종에서 bcl-2 발현에 관한 결과는 보고자에 따라 매우 다양하므로 더 많은 예를 대상으로 한 연구가 필요하다고 생각한다. bax는 세포자멸사를 촉진하는 역할을 하는 단백질로서 위암종의 92%에서 발현된다고 보고되었고²², 본 연구에서도 거의 모든 예에서 양성 반응을 보였으며 단지 염색 강도의 차이만 있었다. bax의 염색 강도와 세포자멸사 지수는 통계학적으로 유의한 상관관계를 보여($p < 0.05$) bax가 세포자멸사를 촉진한다고 추측할 수 있었다. 그러나 GCLRS군과 GCLPS군 간에 bax와 세포자멸사의 유의한 차이는 없었고 EBV 발현과도 연관성이 없었다.

림프구 침윤이 동반된 위암종의 예후는 여러 연구에서 일반 위암종에 비하여 좋은 것으로 보고하고 있다.¹¹ Matsunou 등¹⁰은 GCLRS가 종양 기질내 결체조직이 거의 없기 때문에 종양 세포내로 항암제의 침투를 용이하게 하여 민감한 치료 반응을

보인다고 설명했고, 이러한 이유가 좋은 예후와 연관이 있다고 설명하였다. 본 연구에서는 GCLRS의 50%가 stage IA, B, 4.2%는 stage II, 45.8%는 stage IIIA, B인 반면, GCPLS는 33.1%가 stage IA, B, 19.7%가 stage II, 38%가 stage IIIA, B로 GCLRS의 많은 수가 낮은 병기를 보여서 두 군의 생존율에 유의한 차이를 보였다. 동일한 임상 병기(stage III)에서의 림프구 침윤 정도에 따른 생존율을 고려하였을 때 통계학적으로 유의한 차이는 관찰할 수 없었지만, 두 군간에 평균 생존기간이 GCLRS는 89개월, GCPLS는 56개월로 차이를 보이며 생존율 곡선도 분리되는 경향이 있으므로(Fig. 6) 추적 기간이 더 길어지고 GCLRS의 예가 추가된다면 유의한 차이를 기대할 수 있다고 생각한다.

이상의 결과를 종합하면 림프성 기질을 갖는 위암종은 다른 위암종과는 구별되는 특징적인 유형으로서 EBV 감염과 밀접한 관련이 있고 예후가 좋다는 것을 알 수 있었다. 세포자멸사와 bcl-2, bax의 발현은 GCLRS와 GCPLS간에 서로 차이가 없으며, 본 증양의 예후와도 관련이 없는 것으로 생각된다. 향후 림프성 기질을 갖는 위암종의 발생 단계에서 EBV의 역할과 림프구 침윤의 기전에 대한 연구가 계속 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Kim JP. Diagnosis, treatment and survival rate of 5 major cancers in Korea. *J Korean Med Assoc* 1995; 38: 157-164.
- Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* 1976; 38: 232-43.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999; 764.
- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-5.
- Rowe M, Gregory C. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. Klein G ed. *Advances in viral oncology*. vol 8. New York: Raven Press, 1989; 237-58.
- Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
- Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-4.
- Shin WS, Kang MW, Kang JH, *et al*. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinomas among Koreans. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 174-81.
- Nakamura S, Ueki T, Yao T, Ueyama T, Tsuneyoshi M. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* 1994; 73: 2239-49.
- Matsunou H, Konishi F, Hori H, *et al*. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* 1996; 77: 1988-2004.
- Chang MS, Kim WH, Kim CW, Kim YI. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas with lymphoid stroma. *Histopathology* 2000; 37: 309-15.
- Shoji Y, Saegusa M, Takano N, Okayasu I. Correlation of apoptosis with tumour cell differentiation, progression and HPV infection in cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1996; 49: 134-8.
- Ohbu M, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis and cellular proliferation in oesophageal squamous cell carcinomas: differences between keratinizing and nonkeratinizing types. *Virchows Arch* 1995; 427: 271-6.
- Ikenaga M, Takano Y, Saegusa M, Ohtani Y, Hiki Y, Okayasu I. Apoptosis of colon cancers assessed by in situ DNA nick-end labelling method. *Pathol Int* 1996; 46: 33-7.
- Guido M, Isabelle J. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- John FR, Clay MW, Brian VH. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
- Bakhshi A, Jesen JP, Goldman P. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14; 18) human lymphomas. *Cell* 1985; 41: 889-906.
- LeBurn GY, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993; 142: 743-53.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* 1994; 369: 321-3.
- Saegusa M, Takano Y, Wakabayashi T, Okayashi I. Apoptosis in gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 743-8.
- Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of bcl-2 and bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 1997; 75: 367-73.
- Krajewska MR, Fenoglio CM, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol* 1996; 149: 1449-57.
- Kume T, Oshima K, Shinohara T, *et al*. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Histopathology* 1999; 34: 502-9.
- Irvin DF, Jay SG, Donald EH, *et al*. *Manual for Staging of Cancer*. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1997; 71-6.
- MacCarty WC, Mahle AE. Relation of differentiation and lymphocytic infiltration to postoperative longevity in gastric carcinoma. *J Lab Clin Med* 1922; 6: 321-30.

26. Pittaluga S, Loke SL, So KC, Cheung KN, Ma L. Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: Demonstration of viral genome by in situ hybridization and southern blot analysis. *Mod Pathol* 1992; 5: 661-4.
27. Harn HJ, Chang JY, Wang MW. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum Pathol* 1995; 26: 267-71.
28. Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1995; 75: 2209-13.
29. Lee SS, Cho KJ, Hong SI, Myoung NK, Jang JJ. Nuclear overexpression of bcl-2 oncoprotein during the progression of human stomach cancer. *J Korean Med Sci* 1998; 13: 153-8.
30. Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of bcl-2 and bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study 1997; 75: 367-73.