

# World Health Organization/International Society of Urological Pathology 등급체계에 따른 방광 요로상피암종의 증식표지자로서 Ki-67 발현 및 세포자멸사와 비교한 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 발현 양상

이태진 · 이동기 · 박언섭 · 유재형

중앙대학교 의과대학 병리학교실

## Expression of DNA Topoisomerase II- $\alpha$ as a Proliferating Marker in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder based on World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification: A Correlation with Expression of Ki-67 and Apoptosis

Tae Jin Lee, Dong Ki Lee, Eon Sub Park and Jae Hyung Yoo

Department of Pathology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

**Background** : DNA topoisomerase II- $\alpha$  is linked with active cell proliferation in mammalian cells. The aim of this study was to examine the relationship between the expression of DNA topoisomerase II- $\alpha$  as a proliferating marker, and the expression of Ki-67 and apoptosis in urothelial carcinoma of urinary bladder based on World Health Organization/International Society of Urological Pathology (WHO/ISUP) consensus classification. **Methods** : 73 urothelial carcinomas of the urinary bladder after transurethral resection and 25 carcinomas after radical cystectomy were investigated for histologic grading based on WHO and WHO/ISUP consensus classification. Formalin fixed, paraffin embedded tissue of 98 specimens from 73 patients were immunohistochemically stained for DNA topoisomerase II- $\alpha$  and Ki-67, and *in situ* TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method for evaluation of apoptotic cells was performed. For each case, a DNA topoisomerase II- $\alpha$ , Ki-67, and apoptotic indices were determined. **Results** : The histologic grades of 73 cases based on the WHO grading system were 21.9% (16 cases) in grade 1, 65.8% (48 cases) in grade 2, and 12.3% (9 cases). 5.5% (4 cases) of papillary neoplasm of low malignant potential, 47.9% (35 cases) of urothelial carcinoma of low grade, and 46.6% (34 cases) in urothelial carcinoma of high grade were reclassified using the WHO/ISUP consensus classification. Histologic grades based on two grading systems were correlated to invasion and stage ( $p < 0.05$ ). DNA topoisomerase II- $\alpha$ , Ki-67, and apoptotic indices were correlated to histologic grades based on two grading system and invasion. Also, the correlation of DNA topoisomerase II- $\alpha$  and Ki-67 indices, and DNA topoisomerase II- $\alpha$  and apoptotic indices were significant, respectively. **Conclusions** : DNA topoisomerase II- $\alpha$  appears to be an useful marker for assessing the proliferation potential of urothelial carcinoma of in the urinary bladder.

**Key Words** : Carcinoma, Transitional Cell-DNA Topoisomerase, Type II-Ki-67 Antigen-Apoptosis

접 수 : 2002년 7월 22일  
게재승인 : 2002년 10월 4일

책임저자 : 이 태 진  
우 100-272 서울시 중구 필동 2가 82-1  
중앙대학교부속 필동병원 해부병리과  
전화: 02-2260-2094  
Fax: 02-2260-2094  
E-mail: taejlee@chollian.net

\*본 연구는 중앙대학교 연구기자재구입지원 프로그램의 도움을 받아 수행한 결과임.

방광에서 발생하는 요로상피암종은 비뇨기계의 흔한 암종 중의 하나로, 재발이 흔하며 생물학적 활성을 예측하기 어려운 종양이다. 예후인자로 암종의 조직학적 등급, 병기와 함께 다양한 인자들이 알려져 있고 세포의 증식능 또한 중요한 예후인자로

인정받고 있다. 특히, 요로상피암종의 상당수가 비침윤성 암종이므로 조직학적인 등급과 세포의 증식능이 환자의 예후를 평가하는데 중요한 인자로 평가되고 있다.<sup>1</sup>

수년 전부터 세포주기와 관련된 핵항원의 검출이 면역조직화

학 염색에 의하여 세포 증식능을 측정하는데 사용되어 왔다. Ki-67은 세포주기의 모든 단계에서 발현되는 핵 항원이고, MIB-1은 Ki-67에 대한 단일 항체로 종양의 성장 분획을 측정하는데 이용되어 왔으며 G0기를 제외한 G1, S, G2기와 M기에서 모두 발현된다.<sup>2</sup> 또한 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)도 세포의 증식능과 핵산 합성능을 나타내는 표지자로 잘 알려져 있으며,<sup>2</sup> 최근에는 세포의 증식능을 측정하는 새로운 표지자로 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 가 알려지게 되었다.<sup>3</sup> DNA topoisomerase는 DNA 합성, 전사, 염색체 분리와 재결합과 같은 DNA 대사의 중요 단계에서 DNA 형태를 변화시키는 효소로 알려져 있으며, 여기에는 크게 DNA topoisomerase I과 II의 두 종류가 있다. 이들의 기능은 서로 다르다고 알려져 있으며, 최근에  $\alpha$ 와  $\beta$ 로 불리는 DNA topoisomerase II의 두 isoform이 포유동물 세포에서 발견되었다.<sup>4</sup> 이러한 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 를 이용한 세포 증식능 검출이 현재까지 소수의 이행상피암종과<sup>4</sup> 유방암,<sup>3</sup> 샘낭암종<sup>5</sup> 등에서 보고되었으며, 세포의 증식능으로 환자의 예후를 평가하는 데 있어서 Ki-67보다 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 가 더 의미가 있다는 연구 결과들이 알려져 있다.<sup>6,7</sup>

한편, 1922년 Broders<sup>8</sup>에 의하여 요로상피암종에 대한 등급체계가 처음 실시된 이후로 다양한 등급체계가 발표되고 적용되어 왔다.<sup>9-11</sup> 이 중 가장 널리 사용되었던 등급체계로는 1973년도에 발표된 World Health Organization (WHO) 등급체계이다.<sup>12</sup> WHO 등급체계는 요로상피에서 발생하는 종양을 유두종과 등급 1에서 3까지로 분류하고 있는데, 많은 수의 요로상피암종이 등급 2로 진단되고 있어서 정확한 예후인자로서의 역할이 미비하였다. 이에 1998년 12월에 International Society of Urologic Pathologists (ISUP)에서 Consensus Classification을 발표하여 WHO의 공인을 받게 되었고, WHO/ISUP Consensus Classification이라는 명칭으로 이 등급체계를 권장하고 있다.<sup>13</sup>

이에 본 연구에서는 방광의 요로상피암종을 요로상피암종의 새로운 등급체계인 WHO/ISUP consensus classification에 따라 재분류하고, 새로운 증식 표지자인 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 그에 따른 염색지수와 현재까지 세포 증식 표지자로 널리 이용되고 있는 Ki-67 염색지수 및 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 방법을 통한 세포자멸사와 비교하고, 조직학적 등급, 침윤성 여부, 병기와 비교 분석하여 예후와 관련된 증식 표지자로서의 가치를 알아보고자 한다.

## 재료와 방법

### 재료

1995년 1월부터 1999년 12월까지 조직학적으로 방광의 요로상피암종으로 진단받았던 73명의 환자, 98개의 검체를 대상으로

하였다. 73명 중 25명 환자는 근치적 방광절제술을 시행받았기 때문에 병기의 결정은 이들 환자의 검체를 대상으로 하였고, 조직학적이 등급과 침윤성 여부는 방광절제술을 시행받은 25명의 이전 검사인 73예의 경요도절제술로 얻어진 조직을 대상으로 하였다.

### 방법

#### 조직병리

경요도절제술로 얻은 조직의 HE 슬라이드를 재검색하여, WHO/ISUP 등급에 따라 암종의 등급을 재검색하였다. 악성 잠재력이 낮은 유두종양(papillary neoplasm of low malignant potential)은 세포층의 두께와 상관없이 약간의 구조적인 이상과 약간의 비전형성을 가진 세포들이 규칙적으로 배열된 병변으로 하였으며, 저등급의 요로상피암종은 전체적으로는 규칙적으로 배열되어 있지만 저배율 시야에서도 쉽게 인식할 수 있는 구조와 세포의 이상 소견을 가지는 병변으로 하였고, 고등급의 요로상피암종은 구조와 세포학적인 이상 소견 때문에 전체적으로 무질서한 배율을 저배율에서도 알아 볼 수 있고 세포학적으로 중등도에서부터 심한 정도의 다형성이 관찰되는 병변으로 하였다.<sup>13</sup> 침윤성 여부의 판정도 경요도절제술로 얻은 조직의 슬라이드를 통하여 검사를 하였고, 방광절제술로 얻어진 조직에 대해서는 AJCC (American Joint Committee on Cancer)에 의한 분류에 의거 T-병기를 정하였다.

#### 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직을 5  $\mu$ m 두께로 박절하여 통상의 탈파라핀 및 함수과정을 거친 뒤, 3% 과산화수소수로 5분간 처리하여 내인성 과산화효소의 작용을 차단하였다. 증류수와 Tris 완충액으로 수세한 후 일차항체인 DNA topoisomerase II- $\alpha$  (Zymed, South San Francisco, U.S.A.)와 Ki-67 (Zymed, South San Francisco, U.S.A.)을 모두 1:50으로 희석하여 표본에 가한 다음 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이차항체로 LSAB kit (Zymed, South San Francisco, U.S.A.)를 사용하고 diaminobenzidine으로 발색한 후 methyl green으로 대조염색하고 알코올 탈수과정을 거친 다음 Canada balsam으로 봉입하고 관찰하였다. 관찰 방법은 1,000개의 세포 중 핵에 진하게 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 판정하고 백분율로 표시하여 각각 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 와 Ki-67에 대한 염색지수로 삼았다.

#### TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)

파라핀에 포매된 조직을 5  $\mu$ m로 박절하여 poly-L-lysine으로 전 처리한 유리 슬라이드에 부착한 후 크실렌과 알코올을 과정을 거쳐 파라핀을 제거하고 알코올로 함수시켰다. *In situ* detection kit는 TACS™ 2TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detec-

tion Kit (Trevigen, Gaithersburg, U.S.A.)를 사용하여 유리 슬라이드를 증류수에 수세한 후 37°C 인산염완충액에 30분간 방치하였다. 인산염완충액을 제거한 후 20  $\mu$ L/mL의 proteinase K 용액을 가하고 37°C에서 30분간 작용시켰다. 증류수로 2분간 4회 수세하고 DNA nick end labelling 과정으로 50  $\mu$ L TdT buffer II를 가한 후 5-10분간 실온에서 방치하였다가 여분의 용액을 제거하고, 50  $\mu$ L의 TdT 용액을 가하고 37°C에서 60분간 작용시켰다. TB 완충액을 용기에 넣고 유리슬라이드를 실온에 15분간 둔 후 증류수로 수세하였다. 50  $\mu$ L의 차단 용액으로 10분간 실온에 방치한 후 인산염완충액으로 5분씩 3회 수세하고 과산화효소가 결합한 streptavidin에 20분간 방치하였다. 반응이 끝난 후 유리슬라이드 표본을 인산염완충액으로 세척하고 diaminobenzidine으로 1분 동안 발색하였다. 그 후 슬라이드를 증류수에 2분씩 3회 세척한 후 Mayer's hematoxyline으로 10분간 대조염색하고 흐르는 물에 수세하여 알코올 탈수과정을 거치고 Canada balsam으로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰방법은 1,000개의 세포 중 핵에 진하게 갈색으로 염색된

세포를 양성으로 판정하여 백분율로 표시하였다.

통계학적 분석

Window용 SPSS (version 8.0, Systat, Chicago, U.S.A.) 통계 프로그램을 이용하여 analysis of variance (ANOVA)와 Spearman의 상관관계를 분석하였으며, p값이 0.05 미만인 것을 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

임상 및 병리학적 소견과 WHO/ISUP 등급체계에 의한 재 분류

총 73예의 평균 나이는 62.3세이고, 30대가 4명(5.5%), 40대

Table 1. Histologic grade based on WHO and WHO/ISUP consensus classification of 73 urothelial carcinomas of urinary bladder

Grade	WHO (%)	Grade	WHO/ISUP (%)
1	16 (21.9)	PLMP	4 (5.5)
2	48 (65.8)	Low grade	35 (47.9)
3	9 (12.3)	High grade	34 (46.6)

PLMP: papillary neoplasm of low malignant potential, WHO: World Health Organization, ISUP: International Society of Urological Pathology.

Table 2. Correlation of invasion and histologic grade of 73 urothelial carcinomas of urinary bladder

Invasion	WHO Grade (%)			WHO/ISUP Grade (%)		
	1	2	3	PLMP	Low grade	High grade
Negative (n=46)	10 (21.7)	36 (78.3)	0 (0)	4 (8.7)	33 (71.8)	9 (19.5)
Positive (n=27)	6 (22.1)	12 (44.4)	9 (33.3)	0 (0)	2 (7.4)	25 (92.6)
p-value		0.0001			0.0001	

PLMP: papillary neoplasm of low malignant potential, WHO: World Health Organization, ISUP: International Society of Urological Pathology.

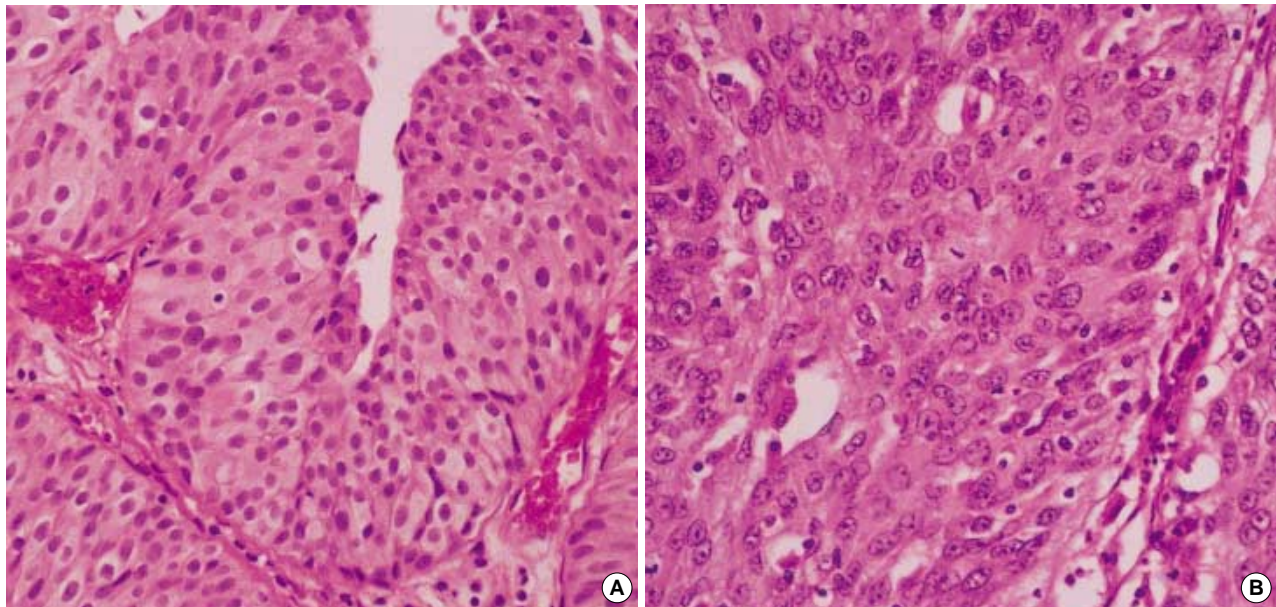


Fig. 1. (A) Urothelial carcinoma of low grade based on World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification. (B) Urothelial carcinoma of high grade based on World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification.

가 5명(6.8%), 50대가 20명(27.4%), 60대가 24명(32.9%), 70대가 17명(23.3%), 80대가 3명(4.1%)이었다. 이 중 남자가 70명으로 95.9%, 여자가 3명으로 4.1%였다. WHO 등급체계에 의한 조직학적인 등급은 등급 1이 16예(21.9%), 등급 2가 48예(65.8%), 등급 3이 9예(12.3%)였다. WHO/ISUP 등급체계에 의한 재분류에서는 악성 잠재력이 낮은 유두종양이 4예(5.5%), 저등급과 고등급의 암종이 각각 35예와 34예로 47.9%와 46.6%를 차지하였다(Table 1, Fig. 1).

총 73예 중 비침윤암종이 46예로 63.0%였으며 침윤암종이 27예로 37.0%였다. 조직학적 등급과 침윤성과의 관계에서 비침윤암종의 경우 WHO 등급 1-3은 각각 21.7% (10예), 78.3% (36예), 0%를 나타냈고, 침윤암종의 경우 WHO 등급 1-3은 각각 22.1% (6예), 44.4% (12예), 33.2% (9예)를 나타내어 WHO 등급과 침윤 여부는 통계학적인 유의성이 있었다( $p=0.0001$ ). WHO/ISUP 등급체계에 따라서도 비침윤암종의 경우 저등급과 고등급이 각각 71.8% (33예)와 19.1% (9예)였으며, 침윤암

**Table 3.** Correlation of stage and histologic grade of 25 cystectomy specimens of urinary bladder

Stage	No. of cases	WHO Grade (%)			WHO/ISUP Grade (%)	
		1	2	3	Low	High
Ta/T1	4	1 (25.0)	3 (75.0)	0 (0)	3 (75.0)	1 (25.0)
T2	10	1 (10.0)	7 (70.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	8 (80.0)
T3	8	2 (25.0)	3 (37.5)	3 (37.5)	1 (12.5)	7 (87.5)
T4	3	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	3 (100)
p-value		0.034			0.020	

WHO: World Health Organization, ISUP: International Society of Urological Pathology.

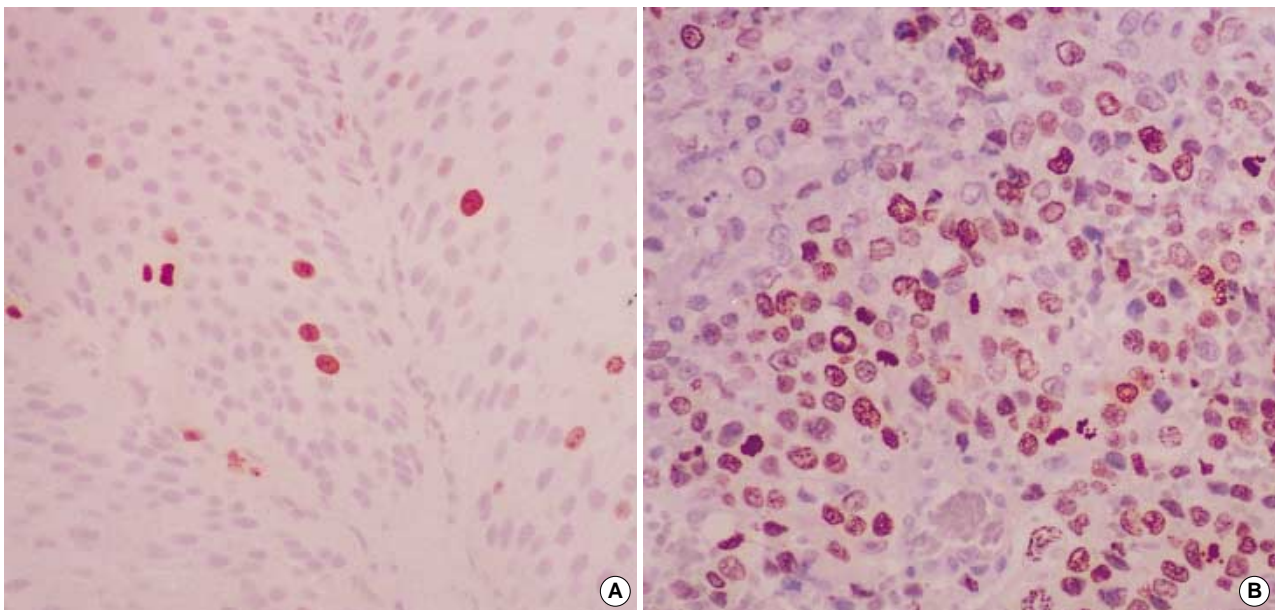
종의 경우는 저등급과 고등급이 각각 7.4% (2예)와 92.6% (25예)로 통계학적인 유의성이 있었다( $p=0.0001$ , Table 2).

방광절제술을 시행 받은 25예의 병기는 Ta/T1가 4예(16.0%), T2이 10예(40.0%), T3가 8예(32.0%), T4가 3예(12.0%)였다. 조직학적인 등급과 병기와의 관계에서 WHO 등급체계와 WHO/ISUP 등급체계와는 유의한 상관성이 있었다( $P<0.05$ , Table 3).

### DNA topoisomerase II- $\alpha$ 와 Ki-67의 염색지수 및 세포자멸사지수

#### 조직학적인 등급과 침윤과의 관계

총 73예에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 와 Ki-67의 염색지수 및 세포자멸사지수의 평균은 각각 10.99와 23.77 및 3.92였다. WHO/ISUP 등급체계에 의한 조직학적인 등급과 DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수의 관계를 보면 저등급에서는 염색지수가  $3.15 \pm 3.77$ 이었고, 고등급에서는  $9.87 \pm 6.99$ 로 통계학적인 유의성이 있었으며( $p=0.0001$ , Fig. 2), Ki-67 염색지수도 저등급과 고등급에서 각각  $14.66 \pm 9.74$ 와  $35.14 \pm 18.49$ 로 통계학적인 유의성이 있었고( $p=0.0001$ , Fig. 3), 세포자멸사지수도 저등급과 고등급에서 각각  $2.07 \pm 2.57$ 과  $6.43 \pm 2.37$ 로 통계학적인 유의성이 있었다( $p=0.0001$ , Fig. 4). WHO 등급체계에서 등급 1-3에서의 DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수는 각각  $5.18 \pm 4.94$ ,  $4.96 \pm 4.86$ ,  $14.38 \pm 10.12$ 였으며, Ki-67의 염색지수는 등급 1-3에서 각각  $18.29 \pm 16.55$ ,  $22.66 \pm 16.72$ ,  $40.42 \pm 18.20$ 이었고( $p=0.007$ ), 세포자멸사지수는 각각  $3.19 \pm 2.94$ ,  $3.52 \pm 3.03$ ,  $8.39 \pm 1.46$ 이었다( $p=0.0001$ ) (Table 4).



**Fig. 2.** (A) Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II- $\alpha$  in urothelial carcinoma of low grade. (B) Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II- $\alpha$  in urothelial carcinoma of high grade.

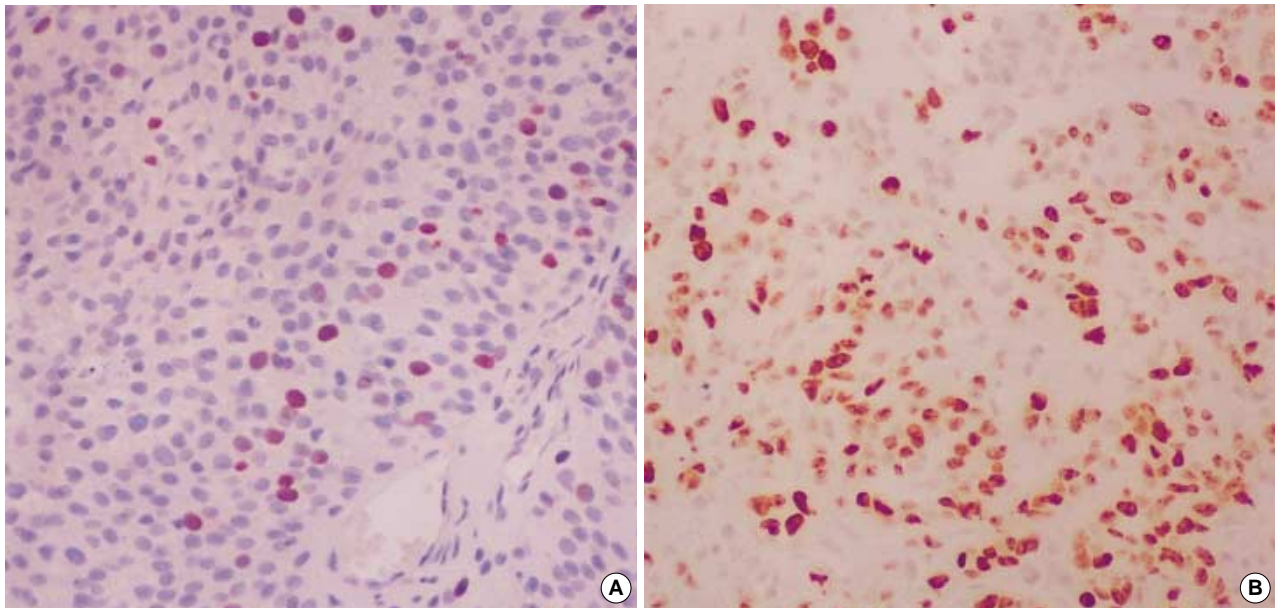


Fig. 3. (A) Immunohistochemical staining for Ki-67 in urothelial carcinoma of low grade. (B) Immunohistochemical staining for Ki-67 in urothelial carcinoma of high grade.

Table 4. DNA topoisomerase II- $\alpha$ , Ki-67, and apoptotic index in 73 urothelial carcinomas of urinary bladder

	No. of cases	Topo II- $\alpha$	Ki-67	Apoptotic Index
Histologic grade				
WHO/ISUP PLMP	4	1.20 $\pm$ 1.07	9.08 $\pm$ 9.25	1.15 $\pm$ 0.60
Low	35	3.15 $\pm$ 3.77	14.66 $\pm$ 9.74	2.07 $\pm$ 2.57
High	34	9.87 $\pm$ 6.99	35.14 $\pm$ 18.49	6.43 $\pm$ 2.37
p-value		0.0001	0.0001	0.0001
WHO 1	16	5.18 $\pm$ 4.94	18.29 $\pm$ 16.55	3.19 $\pm$ 2.94
2	48	4.96 $\pm$ 4.86	22.66 $\pm$ 16.72	3.52 $\pm$ 3.03
3	9	14.38 $\pm$ 10.12	40.42 $\pm$ 18.20	8.39 $\pm$ 1.46
p-value		NS	0.007	0.0001
Invasion				
negative	46	3.77 $\pm$ 4.66	17.61 $\pm$ 15.32	2.78 $\pm$ 3.07
positive	27	10.27 $\pm$ 7.05	34.60 $\pm$ 16.93	6.20 $\pm$ 2.41
p-value		0.0001	0.0001	0.0001

PLMP: papillary neoplasm of low malignant potential, Topo II- $\alpha$ : DNA topoisomerase II- $\alpha$ , WHO: World Health Organization, ISUP: International Society of Urological Pathology.

Table 5. Correlation of stage and DNA topoisomerase II- $\alpha$ , Ki-67, and apoptotic index in 25 cystectomy specimens of urinary bladder

	No. of cases	Topo II- $\alpha$	Ki-67	Apoptotic Index
Ta/T1	4	1.52 $\pm$ 1.18	12.95 $\pm$ 5.42	1.58 $\pm$ 1.14
T2	10	6.35 $\pm$ 8.57	17.54 $\pm$ 12.02	5.17 $\pm$ 3.01
T3	8	7.56 $\pm$ 8.21	21.26 $\pm$ 19.09	6.61 $\pm$ 3.62
T4	3	10.77 $\pm$ 7.45	25.70 $\pm$ 13.28	7.67 $\pm$ 0.58
p-value		NS	NS	0.037

Topo II- $\alpha$  : DNA topoisomerase II- $\alpha$ .

비침윤과 침윤암종의 비교에서도 DNA topoisomerase II- $\alpha$  와 Ki-67의 염색지수 및 세포자멸사지수 모두 통계학적인 유의

성이 있었다(p<0.05, Table 4).

병기와의 관계

방광절제술을 시행 받은 25예를 대상으로 한 병기와의 관계에서는 DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수는 병기 Ta/T1-T4에서 각각 1.52  $\pm$  1.18, 6.35  $\pm$  8.57, 7.56  $\pm$  8.21, 7.56  $\pm$  8.21, 10.77  $\pm$  7.45로 병기가 증가할수록 염색지수가 증가하는 경향을 보이지만 통계학적인 유의성은 없었고, Ki-67과도 역시 통계학적인 유의성은 없었다. 세포자멸사 지수는 Ta/T1-T4에서 각각 1.58  $\pm$  1.14, 5.17  $\pm$  3.01, 6.61  $\pm$  3.62, 7.67  $\pm$  0.58로 통계학적인 유의성이 있었다(p=0.037, Table 5).

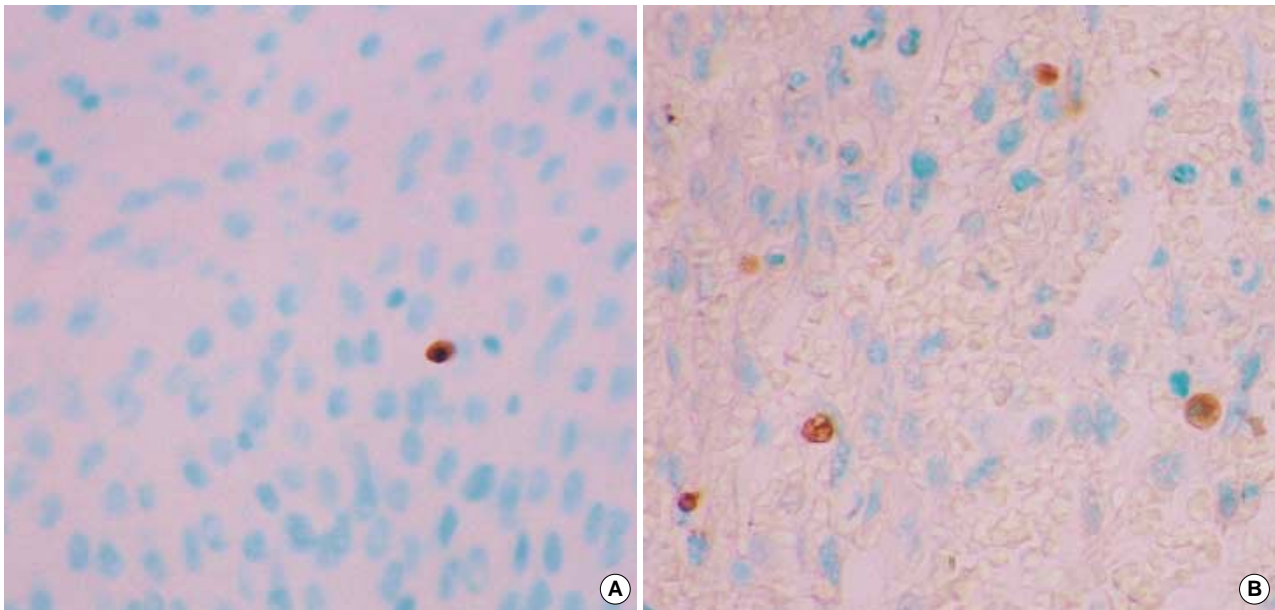


Fig. 4. (A) TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay for apoptosis in urothelial carcinoma of low grade. (B) TUNEL assay for apoptosis in urothelial carcinoma of high grade.

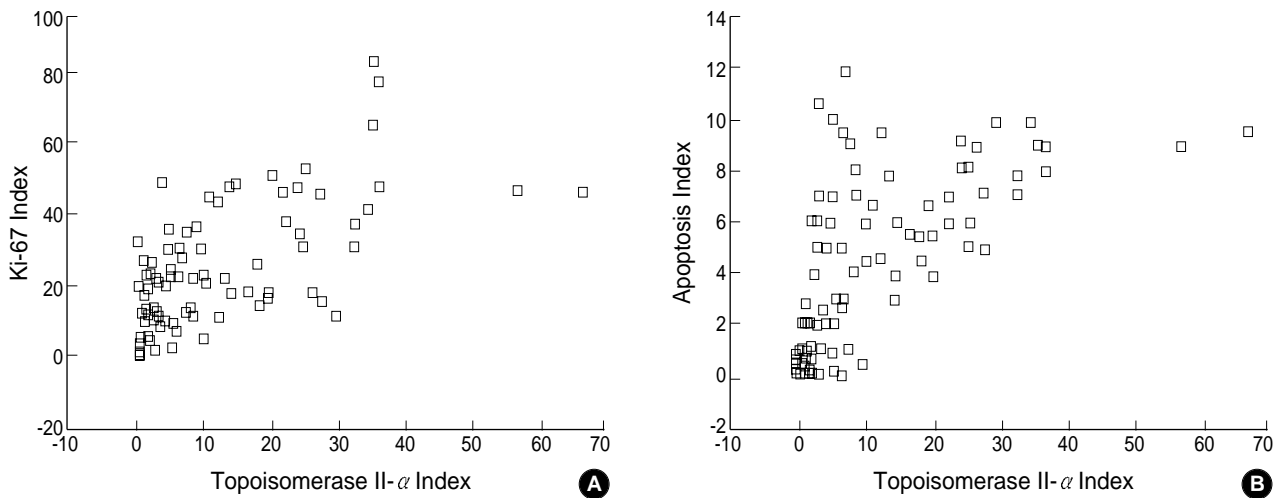


Fig. 5. (A) Correlation of DNA topoisomerase II- $\alpha$  and Ki-67 indices in urothelial carcinomas of urinary bladder ( $p=0.01$ ). (B) Correlation of DNA topoisomerase II- $\alpha$  and apoptotic indices in urothelial carcinomas of urinary bladder ( $p=0.01$ ).

#### DNA topoisomerase II- $\alpha$ 와 Ki-67 및 세포자멸사지수의 연관성

DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수와 Ki-67 염색지수의 correlation coefficient는 0.574였으며 topoDNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수의 상관계수는 0.654로 모두 통계학적인 유의성이 있었다( $p=0.001$ , Fig. 5).

#### 고찰

종양에서 세포의 증식능을 평가하는 여러 가지 방법 중에서

PCNA나 MIB-1에 대한 면역조직화학적 염색이 널리 이용되고 있다. MIB-1은 종양의 성장 분획을 측정하는데 이용되는 Ki-67의 단일클론 항체이며, 이 Ki-67은 395 kDa와 354 kDa의 분자량을 갖는 인간 핵의 비히스톤 단백질과 반응하고,<sup>14</sup> 세포주기의 G0기를 제외한 G1, S, G2와 M기에서 모두 발현된다.<sup>2</sup> Ki-67을 이용한 세포 증식능은 많은 종양을 통하여 진단과 예후인자로서의 가치가 있는 것으로 보고되어 있다. 한편 새로운 증식표지자로 연구되고 있는 DNA topoisomerase는 DNA의 합성, 전사, 염색체 분리와 재결합 등의 DNA 대사에 중요한 과정 동안 DNA의 구조 변화에 관여하는 효소이다.<sup>16</sup> 이 DNA topoisomerase는 기능적으로 서로 다른 I과 II의 두 가지 유형이었다.

DNA topoisomerase I은 DNA의 한 가닥을 자르는 역할을 하지만, DNA topoisomerase II는 동시에 두 가닥을 자르며 그 기능을 수행하기 위해 ATP를 필요로 한다고 알려져 있다. DNA topoisomerase II는 포유류에서 각각 170과 180 kDa를 가지는  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 isoform이 증명되었으며, 이들은 각각 염색체 17q21-22와 3q24에 위치한다.<sup>17</sup> 이들은 서로 높은 상동성을 가짐에도 불구하고 서로 독립적으로 조절되며 다른 성상과 기능을 가진다고 알려져 있다. DNA topoisomerase II- $\alpha$ 는 세포 증식에 민감하게 변화하여 급속한 증식기 동안에 높은 수준을 나타내며 세포가 성장을 멈추면 낮아지지만, DNA topoisomerase II- $\beta$ 의 발현은 세포 주기 동안 일정하게 유지된다고 하였다.<sup>17</sup> DNA topoisomerase II- $\alpha$ 는 정상 세포와 조직에서도 세포증식의 표지자로 알려져 있으며,<sup>18</sup> 각종 종양에서의 연구 결과가 학계에 보고되어 있다. Staley 등<sup>19</sup>은 대장암중에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 평균 염색지수는 63.6이라고 발표하였으며, 염색지수는 Dukes'stage A-C에서 각각 55.9, 63.8, 67.6로 병기에 따른 유의성은 없다고 하였다. 또 Willman과 Holden<sup>20</sup>은 전립샘의 양성 전암성 병터 및 악성 병터에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 에 대한 연구를 실시하여 고분화도 암중에서는 염색지수를  $1.5 \pm 0.9$ , 중등도 분화도에서는  $3.1 \pm 2.4$ , 저분화도 암중에서는  $6.7 \pm 5.5$ 로 발표하면서 침윤암중에서의 염색지수는 평균 4.0이라고 하였으며, 전암성 병터인 고등급의 전립샘상피내종양에서는 2.3, 양성 전립샘증식증에서는 0.54였다고 보고하였다. 또한, DNA topoisomerase II- $\alpha$ 와 MIB-1의 발현을 별아교세포종에서 비교한 연구에 의하면 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 염색지수는 환자의 2년 생존율과 연관성이 있었으나 MIB-1은 연관성이 없었다고 하였다.<sup>6</sup> 하지만 본 연구에서와 같이 방광 요로상피암중에서의 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 에 대한 연구는 드물다. Nakopoulou 등<sup>7</sup>은 방광의 요로상피암중에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 에 대한 면역조직화학 염색을 실시하여 DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수와 조직학적인 등급 및 고유근층으로의 침윤여부와의 연관성이 있으나, Ki-67과의 연관성은 없어서 세포증식에 있어서 서로 다른 경로와 기능을 가지는 인자라고 설명하고 있다. 또한 이와 관련하여 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 는 제한적인 환자 즉 표재성 암중에 있어서 치료의 방침을 결정하는 데 도움을 줄 수 있을 것이라고 하였다. Monnin 등<sup>4</sup>은 요로상피암중에서 1등급에서 4등급까지의 Ash 등급체계를 이용한 조직학적 등급과 DNA topoisomerase II- $\alpha$  염색지수를 발표하였다. 이 연구에 의하면 등급 1에서 topo II- $\alpha$  염색지수는  $7.5 \pm 3.8$ , 등급 2에서  $20.1 \pm 10.5$ , 등급 3에서  $40.3 \pm 8.2$ , 등급 4에서  $50.5 \pm 13.0$ 이었다.<sup>4</sup> 이들의 연구 결과는 본 연구 결과와 비교해 볼 때 상당히 높은 수치이다. 이는 이들의 연구대상 중 WHO 등급 1-3에 해당하는 것이 43으로 비교적 대상수가 적었던 영향도 있을 것이며 또한 면역조직화학 염색의 방법상의 문제와 검체 자체의 적합성 등도 영향이 있을 것이다. 본 연구에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 는 WHO/ISUP 등급체계에 의한 조직학적인 등급과 연관성이 있었으며 침윤과도 연관성이 있다. 그리고 병기가 높아질수록 증가하는 경향을 보여서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 는 세포의 증식성을 알아보는 데 있어서 Ki-67 만큼 유용한 우수한 표지자로서의 가능성이 있다고 생각된다.

세포자멸사란 “원치않는” 세포를 정확하게 조절하여 제거하도록 하는 계획적인 세포의 자연사멸을 말하고, 이는 괴사와 구별되는 세포사멸의 중요한 형태이다. 이 과정은 정상 장기의 발생과 분화, 세포 수의 조절, 세포분열 및 종양형성에 깊이 관여한다고 알려져 있다. 이러한 세포자멸사는 이를 촉진시키는 유전자와 억제시키는 유전자들, 특히 *p53*, *bcl-2*, *c-myc*, *Bax*, *fos*와 같은 몇몇 유전자가 정교하게 균형을 이루면서 일어나는데 이들의 균형이 깨지면 세포자멸사가 억제되고 종양이 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>21</sup> 세포자멸사가 억제되면 클론의 팽창과 2차적인 유전적 변화 및 악성 전환의 기회를 높임으로써 종양 발생이 일어난다. 암의 예후와 세포자멸사와의 관련성은 여러 종류의 암중에서 연구되어 왔으며 대부분의 연구에서 세포자멸사가 많은 경우 환자의 생존 기간이 짧고 종양이 이미 진행되어 있다고 보고하였다.<sup>22</sup> 하지만 방광암중을 대상으로 한 연구는 비교적 드물다. 정 등은 저등급의 요로상피암중에서는 세포자멸사 지수가  $1.15 \pm 0.69$ 였고 고등급에서는  $5.79 \pm 1.47$ 로 발표하였으며,<sup>23</sup> 이 결과는 본 연구의 저등급에서  $1.62 \pm 2.19$ 와 고등급에서  $6.21 \pm 2.48$ 와 유사한 결과이다. 또한 이들도 본 연구 결과와 같이 표재암중보다 침윤암중에서 높은 지수를 보였다. 이러한 결과는 인체의 다른 암에서 시행된 결과와 일치하였으며, 세포 증식능의 증가에 따라 과도하게 생성되었거나 유전적 손상을 가지고 있는 종양 세포들을 세포자멸사를 통하여 제거하는 빈도가 증가하기 때문이라고 해석되었다.

이러한 세포자멸사와 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 연관성에 대한 연구는 주로 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 억제제가 세포자멸사에 미치는 영향에 대한 방향으로 이루어졌다. Lansiaux 등<sup>24</sup>은 DNA topoisomerase II- $\alpha$  억제제인 peroxisomicine A(1) (T-514)이 독소에 노출된 백혈병 세포의 세포자멸사를 유도한다고 발표하였다. 또한 DNA topoisomerase II- $\alpha$  억제제인 dexrazoxane (ICRF-187)이 인체 백혈병 세포인 K562 세포의 분화와 세포자멸사를 유도한다는 보고도 있다.<sup>25</sup> 본 연구에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 염색 지수와 세포자멸사 지수에는 연관성이 있었다. 이는 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 발현이 세포자멸사를 유도했다기보다는 이 발현은 세포의 증식능을 표현하는 것이고 이러한 세포의 증식으로 인하여 다른 경로를 통하여 세포자멸사가 유도되었기 때문이라고 생각된다.

이러한 세포자멸사와 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 연관성에 대한 연구는 주로 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 억제제가 세포자멸사에 미치는 영향에 대한 방향으로 이루어졌다. Lansiaux 등<sup>24</sup>은 DNA topoisomerase II- $\alpha$  억제제인 peroxisomicine A(1) (T-514)이 독소에 노출된 백혈병 세포의 세포자멸사를 유도한다고 발표하였다. 또한 DNA topoisomerase II- $\alpha$  억제제인 dexrazoxane (ICRF-187)이 인체 백혈병 세포인 K562 세포의 분화와 세포자멸사를 유도한다는 보고도 있다.<sup>25</sup> 본 연구에서 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 염색 지수와 세포자멸사 지수에는 연관성이 있었다. 이는 DNA topoisomerase II- $\alpha$ 의 발현이 세포자멸사를 유도했다기보다는 이 발현은 세포의 증식능을 표현하는 것이고 이러한 세포의 증식으로 인하여 다른 경로를 통하여 세포자멸사가 유도되었기 때문이라고 생각된다.

한편 요로상피암종의 등급체계는 1922년 Broders<sup>8</sup>에 의하여 처음 시행되었는데, 이는 정상요로상피와 유사한 분화를 보이는 세포의 비율에 근거하여 이루어졌다. 그 이후 여러 가지의 등급체계가 발표되었는데,<sup>9-11</sup> 대부분이 유두모양 종양에 기초하여 유두종을 포함하는 4단계 혹은 5단계의 등급체계였다. 가장 널

리 사용되어 왔던 WHO 등급체계는 1973년도에 발표되었다.<sup>12</sup> 이 등급체계에서는 등급 1은 상피세포가 7층 이상으로 두꺼워진 경우로 정상적인 구조를 유지하면서 세포가 약간 커지고 유사분열이 없거나 드물게 관찰되는 경우로 규정하였으며, 등급 2는 좀 더 심한 세포의 다형성과 거친 염색질 그리고 약간의 구조적인 이상이 있는 경우로 세포층수는 증가하거나 감소할 수도 있다고 하였다. 등급 3은 심한 세포의 이형성, 정상 구조의 완전한 소실, 빈번한 유사분열이 관찰되는 경우로 규정하였다. 그러나 이 등급체계에서는 세밀한 조직학적 진단 기준이 다소 모호하여 최근 여러 연구자들에 의하여 이 등급체계를 수정 보완해 보려는 시도가 있었다.<sup>26,27</sup> WHO 등급체계에서는 등급 2에 대한 진단 기준이 광범위하여 많은 요로상피암종이 등급 2로 진단되는 문제점이 있었다. Pauwels 등<sup>26</sup>은 168예의 요로상피암종에 대한 WHO 등급을 분석한 결과 등급 1이 8%, 등급 2가 69%, 등급 3가 23%였다고 보고하였다. 또한 Lipponen 등<sup>27</sup>도 103예의 요로상피암종에 대한 분석에서 등급 1이 14%, 등급 2가 58%, 등급 3이 28%였다고 보고하였다. 이들의 결과는 본 연구의 등급 1이 21.9%, 등급 2가 65.8%, 등급 3이 12.3%인 것과 유사한 분포를 나타낸다. 또한 Pauwels 등은 침윤암종의 43.5%만이 등급 3이었다고 하면서 WHO 등급체계가 암종의 침윤성을 제대로 반영하지 못한다는 점을 지적하였다. 본 연구에서도 침윤암종의 33.3%만이 등급 3으로 판정되었었다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 만들어진 것이 WHO/ISUP Consensus Classification이며 이는 ISUP에서 제정되어 WHO의 공인을 받게 되었다.<sup>13</sup> 이 등급체계에서는 WHO 등급 1에 해당하는 종양에 대해서는 “악성 잠재력이 낮은 종양”이라는 용어를 사용하면서 더 이상 암종으로 분류하지 않았으며, 암종을 저등급과 고등급의 2단계로 분류하고 있다. 본 연구에서 이 새로운 등급체제로 재분류를 실시한 결과 76예 중 저등급과 고등급이 각각 35예 (47.9%)와 34예 (46.6%)를 차지하였고, 악성 잠재력이 낮은 종양은 4예인 5.5%를 차지하여 WHO 등급체계와는 상당히 다른 분포를 나타냈다. 27예의 침윤암종 중 25예인 92.6%가 고등급으로 분류되어 WHO 등급체계보다 침윤성을 반영하는 지표로 유용하였으며, 25예의 방광절제술을 통한 조직에서도 조직학적인 등급과 병기 사이에 유의한 상관관계가 있었다. 이러한 점으로 WHO/ISUP 등급체계에 대한 조직학적인 등급이 환자의 예후를 예측하는 데 좀 더 유용하다고 생각되며, 향후 각종 예후인자들을 연구할 때에 이 등급체계를 기본으로 하는 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

### 참고문헌

1. Kee KH, Oh YK. Expression of c-erbB-2, c-myc, c-fos, bcl-2, p53, PCNA, and TGF- $\alpha$  in transitional cell carcinoma. *Korean J Pathol* 2000; 34: 516-23.
2. Popov Z, Hoznek A, Colombel M, *et al.* The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; 80: 1472-81.
3. Lynch BJ, Guinee DG Jr, Holden JA. Human DNA topoisomerase II-alpha: a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 1997; 28: 1180-8.
4. Monnin KA, Bronstein IB, Gaffney DK, Holden JA. Elevation of DNA topoisomerase I in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: correlation with DNA topoisomerase II-alpha and p35 expression. *Hum Pathol* 1999; 30: 384-91.
5. Hirabayashi S. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase type II  $\alpha$  and Ki-67 in adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma of the salivary gland. *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 131-6.
6. Holden JA, Townsend JJ. DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in asrtocytic neoplasms of the central nerve system: correlation with MIB-1 expression and patient survival. *Mod Pathol* 1999; 12: 1094-100.
7. Nakopoulou L, Lazaris AC, Kavantzias N, *et al.* DNA topoisomerase II-alpha immunoreactivity as a marker of tumor aggressiveness invasive breast cancer. *Pathobiology* 2000; 68: 137-43.
8. Broders AC. Epithelium of the genito-urinary organ. *Ann Surg* 1922; 75: 574-604.
9. Ash JE. Epithelial tumors of the bladder. *J Urol* 1940; 44: 135-45.
10. Bergkvist A, Ljungqvist A, Moberger G. Classification of the bladder tumors based on the cellular pattern. *Acta Chir Scand* 1965; 130: 371-8.
11. Jordan AM, Weingarten BA, Murphy WM. Transitional cell neoplasms of the urinary bladder: can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* 1987; 60: 2766-74.
12. Mostofi FK, Sobin HL, Torlini H. Histologic typing of urinary bladder tumor, Geneva, World Health Organization 1973.
13. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The world health organization/international society of urological pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 1435-48.
14. Gerdes J, Li L, Schlueter C. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867-73.
15. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
16. Berger JM, Gamblin SJ, Harrinson SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 1996; 379: 225-32.
17. Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Croke ST, Mirabelli CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989; 28: 8154-60.

18. Heck MMS, Earnshaw WC. Topoisomerase II: a specific marker of cell proliferation. *J Cell Biol* 1986; 103: 2569-81.
19. Staley BE, Samowitz WS, Bronstein IB, Holden JA. Expression of DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II- $\alpha$  in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 1999; 12: 356-61.
20. Willman JH, Holden JA. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II- $\alpha$  in benign, premalignant, and malignant lesions of the prostate. *Prostate* 2000; 42: 280-6.
21. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities p53 and p21. *J Pathol* 1997; 183: 134-40.
22. Lipponen PK, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 2068-73.
23. Chung MJ, Kim SS, Choi HY. Expression of bcl-2 and p53 protein, and apoptosis in transitional cell carcinoma of the bladder. *Korean J Pathol* 2000; 34: 567-73.
24. Lansiaux A, Laine W, Baldeyrou B, Mahieu C, Wattez N, Vezin H. DNA topoisomerase II inhibition by peroxosomicine A (1) and its radical metabolite induced apoptotic cell death of HL-60 and HL-60/MX2 human leukemic cells. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 16-24.
25. Hasinoff BB, Abram ME, Barnabe N, Khelifa T, Allan WP, Yalowich JC. The catalytic DNA topoisomerase II inhibitor dexrazoxane (ICRF-187) induced differentiation and apoptosis in human leukemia K562 cells. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 454-61.
26. Pauwels RPE, Schapers RFM, Smeets AWGB. Grading in superficial bladder cancer: (1)morphologic criteria. *Br J Urol* 1988; 61: 129-34.
27. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K. Prognostic factors in WHO grade 2 transitional-cell cancers (TCC): a novel two-grade classification system for TCC based on mitotic index. *J Cancer Res Clin Oncol* 1992; 118: 615-20.