

Immunohistochemical Assessment of Peripheral Squamous Lung Cancer: Comparison to Central Squamous Cell Carcinoma and Peripheral Adenocarcinoma

Purpose: Incidence of peripheral squamous cell carcinoma (pSCCs) of the lung has increased over recent years, but the immunohistochemical factors involved in pSCCs have not been well established. The aim of this study was to analyze the immunohistochemical differences between pSCCs and central-type SCCs (cSCCs), and similarities between pSCCs and peripheral adenocarcinomas (pADCs). **Materials and Methods:** In this retrospective study, we investigated the expression of three potential prognostic factors (p53, Ki-67, t-CEA), and two potential therapeutic targets (epidermal growth factor receptor [EGFR], and c-erbB-2) in 263 surgically resected cases of primary SCC and pADCs of the lung from January 2001 to July 2008. We divided the SCCs between peripheral and central types, and compared the expression rates of markers between pSCCs and cSCCs, and between pSCCs and pADCs. **Results:** In this study, there were 149 pADC cases, and among the 114 SCC cases, there were 41 pSCCs (36.0%). There were significantly higher expression rates of Ki-67 and EGFR in pSCCs than in cSCCs or pADCs ($p=0.003$, $p=0.039$, respectively). **Conclusion:** We found immunohistochemical differences in pSCCs from cSCCs and pADCs. (J Lung Cancer 2009;8(2):99-102)

Key Words: Lung neoplasms, Immunohistochemical study, Malignant diseases

Jae Jun Kim, M.D.
Jae Kil Park, M.D. and
Young Pil Wang, M.D.

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Received: October 8, 2009
Revised: November 6, 2009
Accepted: November 13, 2009

Address for correspondence

Jae Kil Park, M.D.
Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel: 82-2-2258-6133
Fax: 82-2-594-8644
E-mail: jaekpark@catholic.ac.kr

서 론

전체 폐암 발생의 약 30%를 차지하고 있는 편평상피세포 폐암은 주로 폐문부의 깊은 기관지에서 발생하는 대표적인 중심형 폐암의 하나이다. 그러나 일부에서는 폐의 말초부에서 발생되기도 하는데, 아구역기관지(subsegmental bronchus) 이하 부위에서 발생하는 말초형 편평상피세포 폐암의 발생빈도는 15~30%라고 보고되어 있고, 최근 그 발생빈도가 증가되는 추세를 보인다고 하였다(1,2).

최근의 연구에 의하여 말초형 편평상피암은 조직학적으로 중심형과는 다른 독특한 형태를 보이는데, 부분적으로는 말초형 선암과의 유사성이 보고되고 있다(3-5). 또한 화학적으로도 말초형 선암과의 유사성이 관찰되고 있는데, 단층촬영에서 종괴 내에 반흔을 형성하기도 하며, 그러한

경우 흉막함몰이 동반되고 spicular가 관찰되는 등 선암과의 감별이 곤란한 증례도 보고되고 있다(6,7).

이에 저자들은 말초형 편평상피암과 중심형 편평상피암, 그리고 말초형 편평상피암과 말초형 선암 사이에 면역조직화학적 유사성 혹은 상이점이 있는지를 관찰하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

2001년 1월부터 2008년 7월까지 단일 병원에서 완전 절제된 편평상피세포암 114예와 폐 말초 발생 선암 149예를 대상으로 하여, 말초형 편평상피암과 중심형 편평상피암 그리고 말초형 선세포암으로 구분하였으며, 각각의 증례에서 면역조직화학적 검사로서 여러 종양지표들의 발현도를 측정하였다. 즉, 종양 조직에 대하여 예후와 유력한 상관관

계가 있는 p53, Ki-67, 그리고 t-CEA의 3가지 종양지표와 표적치료의 주요 대상이 되고 있는 EGFR, c-erbB-2의 2가지 지표를 검색하여, 각각의 발현도를 비교하였다.

1) 면역조직화학염색 방법

동정된 조직 표본에서 5 μ m 두께의 절편을 얻어 유리 슬라이드에 부착시킨 후 histoclear (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)와 xylene의 3 : 1 혼합액에서 5분씩 4회 반복 접촉하여 파라핀을 제거하였다. 항원성을 높이기 위하여 10 mmol/L citrate buffer solution으로 121°C에서 가압멸균하고 실온에서 식힌 후, Dulbecco's phosphate buffered saline으로 세척하였다. 이후 내인성 peroxidase를 차단하기 위하여 3% H₂O₂로 처리하고, 비특이 반응을 억제하기 위하여 blocking solution (histostain sp for AEC; Zymed Co., San Francisco, CA, USA)으로 2분 처리한 후, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 75로 각각 희석한 1차 항체를 40°C에서 20분간 결합시켰다. 아비딘-바이오틴-퍼옥시데이즈(avidin biotin peroxidase)에 15분간 반응시킨 후, AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)로 발색시키고 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

p53단백질의 면역염색은 monoclonal mouse anti-human p53protein (DO-7, DAKO)을 1차 항체로 사용하였다. 그 후 PBS로 실온에서 30분간 세척하고 1 : 250으로 희석한 2차 항체(Universal kit; Vector Labs, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰으며, Ki-67은 단클론항체 Ki-67 (1 : 100; Dako, Copenhagen, Denmark)을 1차 항체로 사용하였고, t-CEA는 monoclonal mouse anti-human CEA (II-7; DAKO)을 1차 항체로 사용하였다. EGFR은 1 : 10으로 희석한 1차 항체인 단클론성 항EGFR 항체(clone E30; Biogenex, San Ramon, CA, USA)를 도포하여 4°C에서 24시간 반응시켰다. 여기에 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse Immunoglobulin G (Research Genetics, Huntsville, AL, USA)를 도포한 후 상온에서 30분간 반응시켰다. c-erbB-2는 1 : 50으로 희석한 1차 항체

(Novocastra, Newcastle, UK)로 90분 동안 반응시킨 후 완충액으로 3회 세척하고, LSAB kit (DAKO)를 이용하여 2차 항체를 15분간 반응시킨 후 완충액으로 3회 세척하였다.

2) 결과판독 기준

p53, t-CEA, c-erbB-2 그리고 EGFR의 양성 정도는 백분율(0~100%)로 표기하였는데, 시야 내 세포의 1% 이상(scale 1)이 염색된 경우를 양성이라고 하였으며, Ki-67은 시야 내 세포의 10% 이상이 염색되었을 때를 양성이라고 하였다.

3) 통계학적 처리

각 종양지표들에서 양 군 간 빈도의 비교는 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 변수를 가중시킨 후, Pearson Chi-square값을 각각 구하여 평가하였다. 모든 검정은 $p < 0.05$ 를 유의 한계로 하였다.

결 과

편평상피세포암 114예 중 말초형(pSCCs)은 41예(36.0%)였고 중심형(cSCCs)은 73예(64.0%)로서, 말초형과 중심형의 비율은 1 : 1.78이었으며, 말초형 선세포암(pADCs) 증례는 149예였다(Table 1).

pSCCs, cSCCs 그리고 pADCs에서의 p53 양성률은 각각 63%, 54% 그리고 41%로서, pSCCs에서 가장 높았으나 유의한 차이는 없었다(Table 2). Ki-67의 발현율은 각각 93%,

Table 1. Materials

Group	Cytology	n (%)
I	Squamous cell carcinoma	114
	pSCCs	41 (36%)
II	cSCC	73 (64%)
	Adenocarcinoma	149
III	pADCs	149 (100%)
Total		263

pSCCs: peripheral squamous cell carcinomas, cSCCs: central squamous cell carcinomas, pADCs: peripheral adenocarcinomas

Table 2. Positive Rates of Various Tumor Markers and Statistical Differences among the Groups

Tumor markers	Cytology	Positive rate (%)	
p53	pSCCs	63	p=0.301
	cSCCs	54	
	pADCs	41	
Ki-67	pSCCs	93	p=0.077
	cSCCs	75	
	pADCs	55	
t-CEA	pSCCs	70	p=0.500
	cSCCs	70	
	pADCs	81	
EGFR	pSCCs	100	p=0.039
	cSCCs	71	
	pADCs	80	
c-erbB-2	pSCCs	31	p=0.137
	cSCCs	50	
	pADCs	45	

EGFR: epidermal growth factor receptor

75% 그리고 55%로 대체적으로 높았으며, pSCCs에서 가장 높았고 pADCs과는 발현도의 유의한 차이가 있었다($p=0.003$). t-CEA는 각각 70%, 70% 그리고 81%의 발현도를 보였으나, 통계적 유의성은 없었다. EGFR은 각각 100%, 71% 그리고 80%로 대체적으로 높은 발현도를 보였는데, pSCCs에서 가장 높았고, cSCCs와는 유의한 차이를 보였다($p=0.039$). c-erbB-2는 각각 31%, 50% 그리고 45%로서 대체적으로 낮은 발현도를 보였으며, 각 군 간에 유의한 차이는 없었다.

고안 및 결론

말초형 편평상피암의 화상적 소견에서 종괴 내에 반흔이 형성된 형태도 간혹 보고되고 있는데, 그러한 경우에는 경계가 명료하고 홍맥함몰이 동반되며 단층촬영에서는 spicular가 관찰되는 등 선암과의 감별이 곤란하다고 하였는데(6-8), 다만 전자에서는 병소 내에 괴사가 잘 동반되고 또한 세기관지나 폐동정맥의 보존 현상이 관찰되지 않는 점이 다르다고 하였다.

말초형 편평상피암에 대한 조직학적인 연구에서 기본적인 발육형식은 폐포 구조를 보존해 가며, 종양세포가 폐포 내강을 채워나가는 이른바 ‘폐포강 내 충만형’이며, 종양의 기본적인 발육 장소는 폐포 기저막과 폐포 상피의 사이라고 하였다. 그리고 종양의 증식형태와 elastic framework의 형태에 따라 비교적 뚜렷하게 3가지 유형으로 구분된다고 하였다(4,7). 즉, 폐포강 충만형(alveolar space-filling type)과 확산형(expanding type), 그리고 혼합형(mixed type)으로 구분할 수 있는데, 폐포강 충만형은 약 5%로 드물게 관찰되며, 이 형태에서는 림프관이나 림프절로의 전이가 없어 예후가 매우 양호하였다고 하였다. 그 중에는 종양세포가 폐포벽을 따라 설상으로 증식되어 고분화형 선암과 유사한 모습을 보이는 경우도 있다고 하였는데, 다만 종양세포가 중층으로 증식하며, 폐포상피가 종양을 피복하고 있다는 점이 상이하다고 하였다(9).

동 기간 중에 말초형 선편평상피암은 5예 치험하였으나, 본 연구에서는 제외하였다.

말초형의 편평상피암은 중심형에 비하여 절제하기 용이하여 외과적 치료의 효과도 양호할 것이라고 생각되는데, 양자 간의 예후의 차이에 대해서는 아직 이론이 있으나, 해부학적인 위치 관계로 인하여 중심형에 비하여 폐문부나 종격동 림프절로의 전이가 비교적 서서히 진행되므로 상대적으로 예후가 양호하다고 하였는데(2-4,10), 특히 Asamura 등(2)은 림프절 전이가 없는 직경 2 cm 이하의 작은 말초형

편평상피암은 폐 부분절제만으로도 대부분에서 근치효과가 있었다고 하였다.

p53은 암억제 유전자로서 p53의 불활성화는 폐암에서 가장 흔히 관찰되는 유전자 변이 소견으로, 비소세포암에서는 50%, 그리고 소세포폐암에서는 약 70~80%의 발현도를 보이는 것으로 알려져 있다(11,12). p53 변이와 면역조직화학적 연구에서 폐암 전체에서는 유의차가 없었으나, 선세포 폐암에서는 예후불량의 인자로 확인되었다고 하였다(13).

Ki-67은 p53, K-ras, Bcl2, 그리고 HER2 등과 함께 비소세포암 환자의 예후와 관련이 있다고 알려져 있는 종양 지표로서, 종양의 증식 정도를 나타내며 발현도가 클수록 예후가 불량하다고 알려져 있다(14).

CEA는 정상 상태에서는 발현되지 않는 종양관련 항원으로서, 혈청에서 CEA (s-CEA)가 고 수치로 발현되면 예후가 불량하다고 알려져 있는데(15) 반해, 암조직 내(t-CEA)에서 CEA가 고 수치로 발현되는 경우에는 특히 편평상피암에서 예후가 양호하였다고 하였는데(16), 저자들의 연구에서는 편평상피암의 말초형과 중심형 사이에 차이가 없었고 선세포암에 비하여 모두 발현도가 낮았다.

EGFR은 암세포의 유동성(cell motility)과 접착능(adhesion), 침습(invasion), 그리고 혈관신생(angiogenesis)에 두루 관여하여 폐암의 진행과 밀접한 관계가 있고 표적 치료의 대상이 되고 있으며, c-erbB-2도 EGF 관련 tyrosine kinase로서, 비소세포폐암 중 주로 선세포암에서 약 25%의 발현도를 보이는데, 발현 예에서는 예후가 불량하며 항암제에 대한 저항성도 나타내고 있어, 항체를 이용한 표적치료가 유효하다고 보고되어 있다(17).

세포형태와 편평상피암의 발생 부위에 따른 상이성 혹은 유사성을 규명하기 위한 저자들의 면역조직화학적 연구 결과 Ki-67은 중심형 편평상피암에 비하여 말초형 편평상피암에서 발현도가 의미 있게 높았으며, EGFR은 말초형 선암에 비하여 말초형 편평상피암에서 발현도가 의미 있게 높았는데, 이러한 차이의 의미를 명확히 하기 위해서는 향후 보다 많은 증례에서 다양한 종양지표들에 의한 다각적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

REFERENCES

1. Hammar SP, Brambilla E, Pugatch B, et al. Squamous cell carcinoma. In: Travis WD, Brambilla E, Muller-hermelink HK, Harris CC, editors. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus, and heart. Lyon: IARC Press; 2004. p.26-30.
2. Asamura H, Nakayama H, Kondo H, Tsuchiya R, Shimosato

- Y, Naruke T. Lymph node involvement, recurrence, and prognosis in resected small, peripheral, non-small-cell lung carcinomas: are these carcinomas candidates for video-assisted lobectomy? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:1125-1134.
3. Tomasshefski JF Jr, Connors AF Jr, Rosenthal ES, Hsiue IL. Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology, and survival. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:468-474.
4. Funai K, Yokose T, Ishii G, et al. Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 2003;27:978-984.
5. Kushihashi T, Munechika H. Histologic classification and radiologic manifestation of lung cancer. *Jpn J Diagn Imaging* 1994;16:379-390.
6. Takahasi T. Squamous cell carcinomas in the periphery of the lung: cell types and roentgenological findings. *Jpn J Lung Cancer* 1984;24:183-194.
7. Zwirerwich CV, Vedal S, Miller RR, Müller NL. Solitary pulmonary nodule: high-resolution CT and radiologic-pathologic correlation. *Radiology* 1991;179:469-476.
8. el-Torkey M, Giltman LI, Dabbous M. Collagens in scar in carcinoma of the lung. *Am J Pathol* 1985;121:322-326.
9. Tokuda H. Morphological features of peripherally originating squamous cell carcinoma of the lung. *Jpn J Lung Cancer* 1990;30:963-973.
10. Sakurai H, Asamura H, Watanabe S, Suzuki K, Tsuchiya R. Clinicopathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* 2004;78:222-227.
11. Demoly P, Pujol JL, Godard P, Michel FB. Oncogenes and anti-oncogenes in lung cancer. *Presse Med* 1994;23:291-297.
12. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1207-1217.
13. Osada H, Takahashi T. Pathophysiology of lung cancer. *Saishin Igaku* 1997;52:12-18.
14. Harpole DH Jr, Richards WG, Herndon JE 2nd, Sugarbaker DJ. Angiogenesis and molecular biologic substaging in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1470-1476.
15. Sadoff L. The usefulness of carcinoembryonic antigen testing in the overall management of patients with non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 1998;21:284-286.
16. Veronesi G, Pelosi G, Sonzogni A, et al. Tumour CEA as predictor of better outcome in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2005;48:233-240.
17. Kern JA, Filderman AE. Oncogenes and growth factors in human lung cancer. *Clin Chest Med* 1993;14:31-41.