

전립선비대증 환자에서 5알파환원효소 억제제 투여가 Survivin과 Bcl-2의 발현에 미치는 영향

Expression of Survivin and Bcl-2 in Benign Prostatic Hyperplasia Treated with a 5-alpha-reductase Inhibitor

Woo Heon Cha, Tae Jung Jang¹, Kyung Seop Lee

From the Departments of Urology and ¹Pathology, College of Medicine, Dongguk University, Gyeongju, Korea

Purpose: A 5-alpha-reductase inhibitor (5 α RI) can induce apoptosis and decrease the prostatic volume in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). In this study we assessed the expression of survivin and bcl-2 in the epithelium of BPH patients treated with finasteride.

Materials and Methods: Group 1 consisted of 39 patients who underwent transurethral resection of the prostate (TURP) without medication and Group 2 consisted of 31 patients who underwent TURP and were treated with finasteride for more than three months. The mean age of both groups of patients was 73.03 \pm 7.02 years and 74.71 \pm 5.99 years, respectively. Immunohistochemical staining for survivin, bcl-2 and ki-67 was performed in prostatic tissues. The percentage of cells that expressed survivin and bcl-2 were classified into four categories based on the staining intensity. The expression of ki-67 in nuclei using 10 random cells per specimen was obtained. The relationship between 5 α RI and the expression of survivin, bcl-2 and ki-67 was analyzed.

Results: The total mean prostate volume of group 1 patients and group 2 patients was 45.51ml and 37.23ml, respectively ($p < 0.001$) and the mean serum total prostate-specific antigen (PSA) level of group 1 patients and group 2 patients was 5.09ng/ml and 3.75ng/ml, respectively ($p = 0.105$). Decreased expression of survivin and bcl-2 in specimens from group 2 patients was observed as compared to the level of expression in group 1 patients ($p < 0.001$, $p = 0.001$). Expression of ki-67 determined in samples from both groups was not significantly different ($p = 0.345$).

Conclusions: We suggest that finasteride may induce apoptosis of prostatic epithelial cells in BPH patients by reducing the expression of survivin and bcl-2. These findings may indicate a reduction of prostatic volume. (Korean J Urol 2008;49:242-247)

Key Words: Prostatic hyperplasia, Apoptosis, Survivin, Bcl-2

대한비뇨기과학회지
제 49 권 제 3 호 2008

동국대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹병리학교실

차우현 · 장태정¹ · 이경섭

접수일자 : 2007년 5월 3일
채택일자 : 2008년 1월 21일

교신저자: 이경섭
동국대학교 의과대학
경주병원 비뇨기과
경북 경주시 석장동 1090-1번지
☎ 780-350
TEL: 054-770-8265
FAX: 054-771-0769
E-mail: ksleemd@dongguk.ac.kr

서 론

전립선비대증은 노인 인구의 증가로 인해 급격히 증가하고 있는 추세이다. 전립선비대증의 발생 원인은 노화와 디하이드로테스토스테론과 관련이 있으며¹ 여러 종류의 성장인자 및 남성호르몬의 불균형, 세포고사 억제 등이 전립선비대증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 최근

에는 세포고사를 통해 전립선 크기를 줄여서 증상을 호전시키는 약물치료에 대한 관심이 증가하였다.²

전립선비대증의 대표적 약물치료제 중 하나인 5알파환원효소 억제제는 테스토스테론이 전립선 조직 내에서 디하이드로테스토스테론으로 변환되는 것을 억제하여 전립선 크기를 20-30% 감소시키는 것으로 알려져 있다.³ 최근의 보고에 의하면 전립선비대증 환자에서 5알파환원효소 억제제를 투여할 경우 호르몬의 영향으로 전립선의 크기를 줄

일 뿐 만 아니라 전립선조직 내에서 세포고사를 통해서도 전립선의 크기를 감소시킨다.⁴

세포고사 억제유전자인 survivin은 태아기관에서 많이 발현되고 정상적으로 분화된 조직에서는 억제되어 발현되지 않으나, 직장암, 유방암, 림프종 및 폐암에서 발현된다.⁵ 전립선조직에서는 전립선암과 전립선비대증에서 survivin의 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있다.⁶

널리 알려진 세포고사 억제 단백질인 bcl-2는 비호즈킨 여포성 림프종에서 처음 발견되었으며,⁷ 폐의 비소세포암과 유방암에서 bcl-2의 발현이 증가할수록 높은 생존율을 보이고 진행된 갑상선 암에서도 bcl-2의 발현이 증가된다.^{8,9} 또한 bcl-2는 호르몬의존성 전립선암에서 호르몬 비의존성 암으로 변이에 영향을 주고, 전립선비대증의 상피세포에서 증식이 있을 때 발현이 된다고 알려져 있다.^{10,11}

저자들은 세포고사 억제유전자가 전립선비대증에 발현된다는 여러 보고를 바탕으로 5알파환원효소 억제제를 투여한 전립선비대증 환자에서 survivin과 bcl-2의 발현을 조사하여 5알파환원효소 억제제가 전립선 상피세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2004년 1월부터 2006년 8월까지 본원에서 전립선비대증으로 진단된 50세 이상의 환자 중 어떤 약제도 복용하지 않고 경요도전립선절제술을 시행한 군(대조군) 39례와 5알파환원효소 억제제인 finasteride를 3개월 이상 복용 후 경요도전립선절제술을 시행한 군(실험군) 31례를 대상으로 하였다. 전체 대상 환자의 평균 연령은 73.8세(52-86)로 대조군은 73.03±7.02세, 실험군은 74.71±5.99세였다. 전립선특이항원이 4ng/ml 이상이었던 9례는 경직장유도하 전립선 생검을 통해 전립선암이 없음을 확인한 후 각 군에 포함시켰다.

2. 방법

경요도전립선절제술을 통해 얻은 전립선 조직을 10% 중성 완충 포르말린에 고정한 후 제작한 파라핀 포매괴를 4mm의 두께로 잘라서 연속 절편을 만든 후 Poly-L-lysine (Sigma Chemical Co, ST Louis, USA)이 입혀진 슬라이드에 부착시킨 후 충분히 건조시켰다. 탈파라핀화 함수과정을 거친 파라핀 절편은 10mM citrate 완충액 (pH 6.0)에 담근 후 autoclave에서 15분간 처리되었다. 조직 내 내인성 과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂에서 15분간 처리하고 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 차단혈청으로 15분 동안 전 처치를 하였다. 파라핀에 포매된 조직

절편에 DAKO-LSAB^R+kit (Dako, Santa Babara, USA)를 이용하여 염색하였다. 일차항체로 survivin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), bcl-2 (Dako, Santa Babara, USA)와 ki-67 (Dako, Santa Babara, USA)을 사용하였다. 모든 면역조직화학 염색은 동일한 환경에서 이루어졌고 병리과 의사가 survivin, bcl-2와 ki-67의 발현 정도를 평가하였다. 전립선 상피세포에서 survivin과 bcl-2의 면역염색 판정은 면역반응성의 정도를 4등급으로 하였다. 400배 시야에서 염색된 전립선 상피세포가 관찰되지 않을 때를 발현 없음을 0, 25% 이하의 염색된 세포가 관찰될 때를 1(경도), 26-50% 사이에서 염색된 세포가 관찰될 때를 2(중등도), 염색된 세포가 50%를 초과할 때 3(중증도)으로 판정하였다. Ki-67의 면역염색 판정은 400배 시야에서 10군데 영역을 관찰하여 염색되는 상피세포 핵의 평균 개수로 판정하였다. 두 군에서 survivin, bcl-2와 ki-67의 발현정도를 비교분석하였다.

3. 통계적 분석

각 군 간의 비교는 SPSS 13.0을 이용하였다. 연속 변수의 비교는 모수 검정에 사용하는 Student's t-test와 one-way ANOVA 방법을 사용하였고 비연속 변수는 chi-square test의 linear by linear association방법을 사용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다 (SPSS, Chicago, USA).

결 과

전립선의 크기는 대조군은 45.51±8.78ml, 실험군은 37.23±3.36ml였다 (p<0.001). 대조군과 실험군의 평균 전립선특이항원은 각각 5.09±4.37ng/ml와 3.75±2.25ng/ml였다 (p=0.105) (Table 1).

Survivin은 전립선세포의 세포질에서 과립상으로 염색되었고 bcl-2는 상피세포 중 기저세포의 핵주위에서 주로 염색되었으며 ki-67은 상피세포의 핵에서 염색되었다. Survivin과 bcl-2의 발현은 실험군보다 대조군에서 잘 관찰되었으나 ki-67의 발현은 두 군에서 비슷하게 관찰되었다 (Fig. 1).

Table 1. Baseline patients characteristics

	Group 1 (n=39)	Group 2 (n=31)	p-value*
Age (years)	73.03±7.02	74.71±5.99	0.283
Total prostate vol (ml)	45.51±8.78	37.23±3.36	<0.001
Serum total PSA (ng/ml)	5.09±4.37	3.75±2.25	0.105

PSA: prostate-specific antigen. *: Statistical significance was done by Student's t-test.

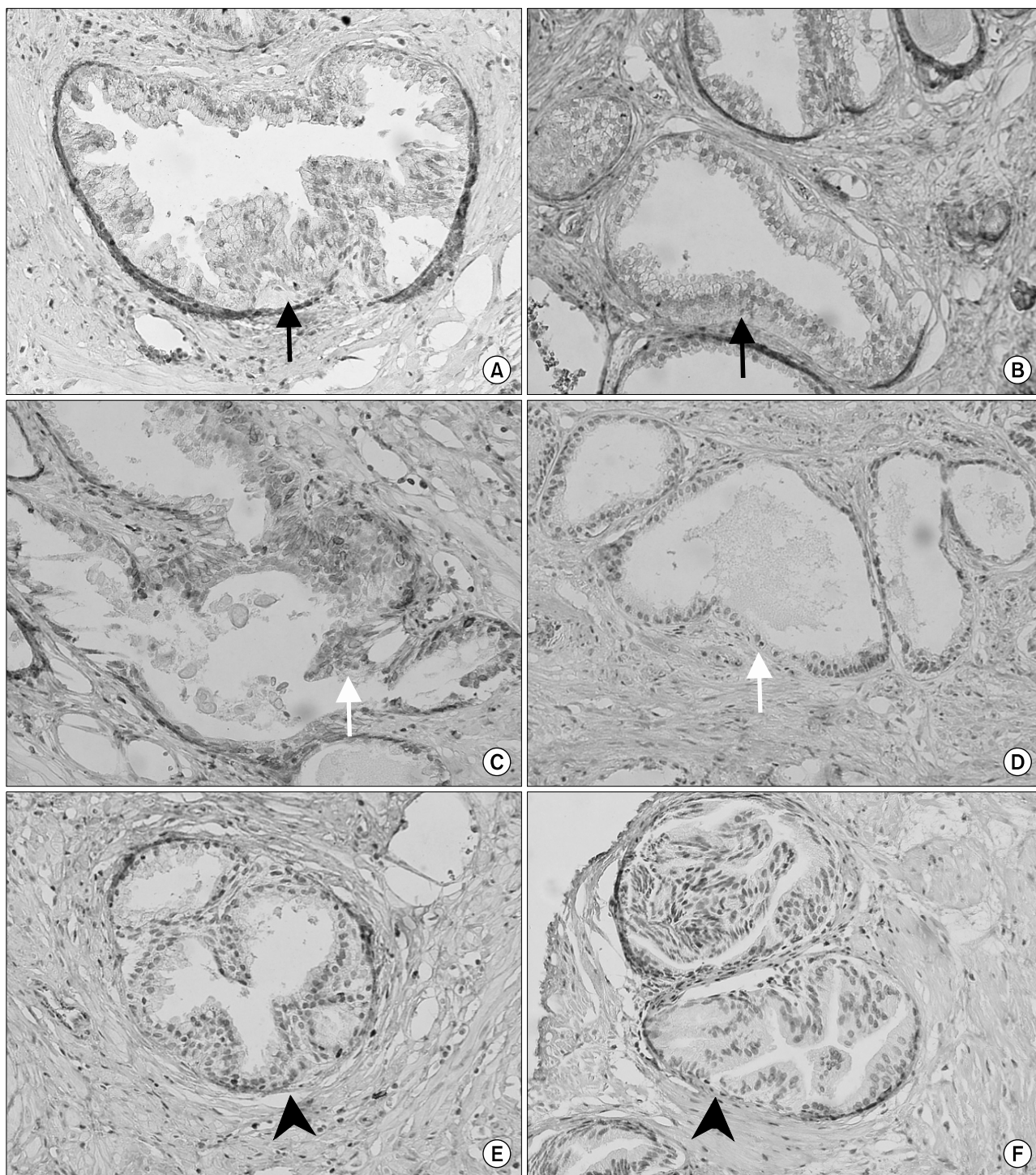


Fig. 1. Immunohistochemical staining for survivin (A, B), bcl-2 (C, D) and ki-67 (E, F) in benign prostatic hyperplasia (BPH) patients given finasteride treatment (B, D, F) and for non-treated patients (A, C, E). In these tissues, survivin expression was distributed predominantly in the cytoplasm of epithelial cells (black arrow) and bcl-2 was expressed predominantly in the basal epithelium (white arrow). Comparing both groups, the immunoreactivities of survivin and bcl-2 in the group treated with finasteride (B, D) were decreased more than the immunoreactivities of the other group (A, C). The number of ki-67 labelled epithelial cells (black arrowhead) was similar between samples from the two groups (E, F) (x400).

Table 2. Expressions of survivin, bcl-2 and ki-67 in specimen from both groups

	Group 1 (n=39)	Group 2 (n=31)	p-value
Survivin expression			<0.001*
0 (%)	0 (0)	3 (9.7)	
1 (%)	8 (20.6)	19 (61.3)	
23(%)	21 (53.8)	9 (29.0)	
3 (%)	10 (25.6)	0 (0)	
Bcl-2 expression			0.001*
0 (%)	3 (7.7)	11 (35.4)	
1 (%)	13 (33.3)	10 (32.3)	
2 (%)	17 (43.6)	10 (32.3)	
3 (%)	6 (15.4)	0 (0)	
Ki-67	27.99±21.85	18.14±16.32	0.345 [†]

*: Statistical significance was done by chi-square test, [†]: Statistical significance was done by Student's t-test.

Survivin의 발현은 대조군에서 0, 1, 2, 3이 각각 0%, 20.6%, 53.8%, 25.6%에서 관찰되었고 실험군에서 각각 9.7%, 61.3%, 29.0%, 0%가 관찰되었다 ($p<0.001$). 중등도 이상의 survivin의 발현은 대조군에서 79.4%, 실험군에서 29.0%였다. Bcl-2의 발현은 대조군에서 0, 1, 2, 3이 각각 7.7%, 33.3%, 43.6%, 15.4%가 관찰되었고 실험군에서 각각 35.4%, 32.3%, 32.3%, 0%가 관찰되었다 ($p=0.001$). 중등도 이상의 bcl-2 발현은 대조군과 실험군 각각에서 59.0%와 32.3%였다. Ki-67의 발현은 대조군과 실험군에서 각각 27.99 ± 21.85 와 18.14 ± 16.32 였다 ($p=0.345$) (Table 2).

고 찰

전립선비대증의 발생 원인은 명확하지 않으나 나이의 증가, 호르몬의 변화, 여러 종류의 성장인자의 불균형과 세포고사 억제를 통한 전립선세포의 증식이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{1,12}

Kyprianou 등¹³은 전립선비대증 치료의 대표적인 약제 중 하나인 doxazosin과 같은 알파차단제가 전립선비대증 조직의 간질에서 평활근 세포의 세포고사를 유도하여 하부요로 증상들을 호전시킨다고 하였다. Lee 등¹⁴은 doxazosin과 terazosin을 투여한 전립선비대증 환자의 전립선 조직에서 세포고사가 유의하게 증가되었으나, 선택적 알파차단제인 tamsulosin을 투여한 환자에서는 세포고사가 증가되지 않음을 보고하여 일부 알파차단제가 세포고사를 유도한다고 보고 하였다.

Gormley 등¹⁵은 전립선비대증 환자에서 5알파환원효소 억제제를 투여한 결과 전립선 상피세포에서 증식이 억제되

고 세포고사를 유도하여 전립선 크기를 감소시킨다고 하였다. Lowe 등¹⁶도 전립선비대증 환자에서 5알파환원효소 억제제를 투여하였을 때 대부분 상피세포에서 세포고사가 발생하고 이로 인해 전립선 크기를 20-30% 감소시켰다고 보고하였다. 이런 결과는 5알파환원효소 억제제 투여가 호르몬에 영향을 미쳐 전립선의 크기를 감소시킬 뿐만 아니라 세포고사를 통해서도 전립선의 크기를 감소시킬 수 있다.

세포고사 억제유전자 중 하나인 survivin은 142개의 아미노산으로 구성되어 있고 16.5kDa의 분자량을 가지며 17번 염색체의 말단부위에 위치해 있고 세포고사 억제능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다.¹⁷ Survivin은 세포분화 시 G2/M기에 발현되고 미세소관을 조절하여 세포고사를 억제한다. Survivin은 많은 암 세포에서 발현되지만 정상 조직에서는 발현이 되지 않으며 전립선 조직에서 survivin의 발현에 대하여서는 주장이 엇갈리고 있다. Jeon 등¹⁸은 survivin이 전립선암 조직에서 70% 발현되었으나 전립선비대증 조직에서는 발현되지 않는다고 하였다. Kim 등¹⁹은 토끼를 이용한 실험을 통해 전립선의 양성 신경내분비세포에서 survivin이 발현된다고 하였다. Shariat 등²⁰은 전립선비대증 조직에서 세포증식에 따라 survivin의 발현이 증가되는 것을 밝혀냈고 survivin의 발현과 전립선증상점수, 잔뇨량, 최대 요속 및 TGF-beta와 관련이 있음을 보고하였다. 저자들도 전립선비대증 조직의 79.4%에서 중등도 이상의 survivin이 발현되어 전립선비대증 조직에서도 survivin이 발현됨을 알 수 있었다. Rittmaster 등²¹은 finasteride의 투여가 전립선의 크기를 줄이는 기전을 연구한 결과, finasteride는 전립선 조직의 DNA를 파괴시키고 세포고사 유전자인 transglutaminase (tTG)의 발현을 증가시키는 것으로 미루어 전립선 상피세포의 위축과 세포고사를 일으킨다고 하였다. 저자들의 경우에도 5알파환원효소 억제제를 투여 받지 않은 군에 비해 3개월 이상 투여 받은 군에서 survivin의 발현이 감소되는 것을 알 수 있었으며 ($p<0.001$) 이는 finasteride의 투여가 전립선 상피세포를 고사시켜서 전립선의 크기를 감소시킨다고 생각된다.

다른 세포고사 억제 유전자 중 하나인 bcl-2는 세포분열에 영향을 미치지 않고 세포고사를 막아 세포의 생존을 촉진시킨다. 사람의 18번 염색체 장완 21좌와 14번 염색체 장완 32좌가 전위되고 면역글로블린 조절 부위의 변화에 의해 영향을 받는다.²² Bcl-2와 상동인 BH-1, BH-2는 proapoptotic 단백질인 bax 이형이량체의 형성으로 세포고사를 억제하고 세포내막의 국소화나 황산화작용을 통해 세포고사 과정에 도달하지 못한다.^{23,24} Bcl-2의 과발현은 폐암, 유방암, 갑상선암 등에서 관찰되고 특히 전립선암에서도 과발

현되는 것으로 알려져 있지만 전립선비대증에서 발현되는 지에 대해서는 이견이 있다. Colombel 등²⁵은 정상 전립선조직, 전립선비대증 및 전립선암 조직에서 bcl-2의 발현을 비교분석한 결과 전립선암 조직에서만 bcl-2가 강하게 발현된다고 보고하였다. 그러나 Cardillo 등²⁶은 전립선비대증 조직에서 정상 전립선조직보다 bcl-2가 높게 발현된다고 하였으며 저자들의 경우에서도 전립선비대증 조직의 59%에서 중등도 이상의 bcl-2가 발현되어 전립선비대증에서도 bcl-2가 발현됨을 알 수 있었다. 또한 finasteride를 투여 받았던 군보다 투여 받지 않았던 군에서 bcl-2가 강하게 발현이 되어 finasteride가 전립선비대증 조직의 세포고사를 일으켜 전립선의 크기를 줄이는 것으로 생각한다.

Ki-67은 핵단백질로서 세포 주기 G0기를 제외한 모든 활성기(G1, S, G2, metaphase) 동안 나타나는 항원이며 세포고사 억제와 세포의 증식능력을 평가하는 데 유용하게 쓰인다.²⁷ Mazerolles 등²⁸은 ki-67의 발현이 전립선비대증 조직의 기질과 상피세포에서 증가되지만 정상 전립선 조직에서는 뚜렷한 발현을 나타내지 않는다고 하였다. 저자들의 경우 ki-67의 발현은 5알파환원효소 억제제를 투여한 군과 투여하지 않은 군 모두에서 발현이 증가되어 있음을 확인하였다.

본 실험에서는 5알파환원효소 억제제를 투여한 전립선에서 세포고사를 억제하는 survivin과 bcl-2의 발현이 감소된 것으로 조사되어 5알파환원효소 억제제 투여 시 세포고사가 전립선 조직의 크기를 감소시키는 데 중요한 역할을 하는 것으로 생각한다.

결 론

전립선비대증 환자에서 finasteride의 투여는 세포고사억제 유전자인 survivin과 bcl-2의 발현을 감소시켰다. 이는 finasteride 투여가 호르몬의 영향뿐만 아니라 전립선 상피세포의 고사를 통해 전립선의 크기를 감소시키는 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Colombel M, Vacherot F, Diez SG, Fontaine E, Buttyan R, Chopin D. Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 1998;82:380-5
- Claus S, Berges R, Senge T, Schulze H. Cell kinetic in epithelium and stroma of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1997;158:217-21
- Steers WD. 5alpha-reductase activity in the prostate. *Urology* 2001;58(6 Suppl 1):17-24
- Glassman DT, Chon JK, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N. Combined effect of terazosin and finasteride on apoptosis, cell proliferation, and transforming growth factor-beta expression in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2001;46:45-51
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-9
- Shariat SF, Ashfaq R, Roehrborn CG, Slawin KM, Lotan Y. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2005;174:2046-50
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690-4
- Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000;20:4221-5
- Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F. bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1996;73:139-43
- McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:6940-4
- Cardillo M, Berchem G, Tarkington MA, Krajewski S, Krajewski M, Reed JC, et al. Resistance to apoptosis and up regulation of bcl-2 in benign prostatic hyperplasia after androgen deprivation. *J Urol* 1997;158:212-6
- Roehrborn CG, McConnell JD. Benign prostatic hyperplasia: etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Patrin AQ, Peters CA, editors. *Campbell's urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007;2727-8
- Kyprianou N, Litvak JP, Borkowski A, Alexander R, Jacobs SC. Induction of prostate apoptosis by doxazosin in benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1998;159:1810-5
- Lee HI, Kim KK, Lee KS. Induction of apoptosis by α 1-adrenoceptor antagonists in benign prostatic hyperplasia. *Korean J Urol* 2003;44:643-8
- Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, et al. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 1992;327:1185-915
- Lowe FC, McConnell JD, Hudson PB, Romas NA, Boake R, Lieber M, et al. Long-term 6-year experience with finasteride in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2003; 61:791-6
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-59

18. Jeon HG, Jeong H, Kwak C, Lee SE. Expression of survivin correlated with antiapoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Korean J Urol* 2004;45:224-8
19. Kim JM, Lee KW, Kim YH, Go ES, Kim ME, Lee MK. Expression pattern of neuroendocrine cells and survivin in the prostate of rabbits. *Korean J Urol* 2006;47:201-5
20. Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, Saeedi O, Sagalowsky AI, Lotan Y. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 2007;109:1106-13
21. Rittmaster RS, Norman RW, Thomas LN, Rowden G. Evidence for atrophy and apoptosis in the prostates of men given finasteride. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:814-9
22. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993;81:3091-6
23. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51
24. 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
25. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993;143:390-400
26. Cardillo M, Berchem G, Tarkington MA, Krajewski S, Krajewski M, Reed JC, et al. Resistance to apoptosis and up regulation of Bcl-2 in benign prostatic hyperplasia after androgen deprivation. *J Urol* 1997;158:212-6
27. Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC, Casella R, Grunder B, Moch H, et al. Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol* 1998;29:949-54
28. Mazerolles C, Rishmann P, Chopin D, Popov Z, Malavaud B, Selves J, et al. Usefulness of MIB1 monoclonal antibody in assessing the proliferative index in human bladder carcinoma: comparison with ki-67 antibody. *Histopathology* 1994;25:563-8