

상피성 난소암에서 핵 DNA 정량검사와 Cyclin A의 예후적 의의

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, *병리학교실
이종승 · 조남훈* · 김영태 · 김성훈 · 노종환 · 김재욱

=ABSTRACT=

Prognostic Value of Nuclear DNA Quantification and Cyclin A in Epithelial Ovarian Cancer

Chong Seung Lee, M.D., Nam Hoon Cho, M.D.*, Young Tae Kim, M.D.,
Sung Hoon Kim, M.D., Jong Hwan Roh, M.D., Jae Wook Kim, M.D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, *Department of Pathology,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective : This study was carried out to investigate the relationship between DNA ploidy, S-phase fraction (SPF), expression of cyclin A and clinical prognostic factors including stage, grade, CA-125 and residual tumor size in epithelial ovarian cancer, and to evaluate the association between DNA ploidy, SPF, expression of cyclin A and 3-year survival.

Methods : Study group consisted of 31 cases of epithelial ovarian cancer, 10 of borderline ovarian tumor and 5 of benign ovarian tumor diagnosed at the department of Obstet. & Gynecol. in Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea from Feb. 2000 to Jan. 2003. All patients underwent staging-laparotomy and postoperative chemotherapy. The level of CA-125 was assessed after 6th postoperative chemotherapy with cut-off value of 35 U/mL. DNA ploidy and SPF were evaluated by flow-cytometry of fresh ovarian tissue obtained at the operative field. The expression of cyclin A was evaluated by immuno-histochemical stain. Expression of 5% was considered as positive. Statistical analysis was done by two-sample t-test, chi-square test, and Kaplan-Meier survival curve using SPSS ver 11.0 software.

Results : In 46 ovarian tumors aneuploidy, SPF and expression of cyclin A were significantly higher in epithelial ovarian cancer as compared with benign and borderline tumors ($p=0.004, 0.001, 0.001$, respectively). Number of aneuploidy, SPF and expression of cyclin A were significantly higher in patients with higher grade, more advanced stage, higher level of CA-125 (more than 35 U/mL) and more than 2 cm of residual tumor size ($p=0.004, 0.009, 0.05, 0.002$ in aneuploidy; $p=0.06, 0.01, 0.04, 0.007$ in SPF; $p=0.03, 0.004, 0.06, 0.02$ in cyclin A). Aneuploidy and expressions of more than 10% of SPF and cyclin A were also associated with poorer overall survival ($p=0.02, 0.02, <0.0001$, respectively). Significantly positive correlations were observed among these factors.

Conclusion : Number of aneuploidy, percentage of SPF and expression of cyclin A were higher in more advanced stage, higher grade, higher CA-125 and more than 2 cm of residual tumor size and associated with poorer overall survival. Thus DNA flow-cytometry and estimation of expression of cyclin A may provide major information about prognosis of disease in epithelial ovarian cancer patients.

Key Words : Flow-cytometry, DNA ploidy, S-phase fraction, Cyclin A

난소암은 부인암에 있어서 중요한 사망원인의 하나이다. 외과적 수술과 보조항암화학요법 등의 여러 치료법

들을 시행해 보나 여전히 완치가 힘든 상태여서 진행성 난소암 환자의 대부분은 불량한 예후를 나타내고 있다.

현재까지 난소암의 예후인자로 알려진 것들은 여러 가지가 있지만 이들 중 중요시되는 것들이 병기 (stage), 조직학적 분화도 (histologic grade), 혈청내 CA-125 수치, 잔류암의 크기 (residual tumor size) 등이 있다.¹ 현재까지 난소암 영역에서 중요한 예후인자로 가장 많은 연구가 이루어진 지표는 CA-125이다.² Rustin 등은 CA-125는 난소암의 진행정도, 치료에 대한 반응 그리고 재발에 대한 유용한 지표라고 보고한 바 있다.³

그러나 이와 다른 측면에서 여러 연구자들은 예후인자로서 종양세포 자체를 분석하기 시작하였다. 그래서 '종양세포는 증식능이 크다'라는 전제하에 종양세포의 증식능을 측정하기 위해 정량검사를 시행하였다.^{4,5} Garcia 등은 종양세포의 증식세포 정량검사를 통해 종양세포의 악성능을 측정한 바 있다.⁶ 이런 방법들로는 [³H]-thymidine 자가방사기록법, Halo-pyrimidine bromodeoxyuridine (BrdU)을 투여하여 측정하는 법, Ag-NOR수를 측정하는 법, Ki-67 항체 또는 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)을 이용한 면역조직화학염색법, 유세포분석법 (flow cytometry) 등이 있으며 이런 여러 방법들을 통해 종양세포의 증식능에 대한 정량화가 시도되었다.⁷⁻¹⁰

최근에 이 중에서 유세포분석법을 통한 DNA 정량검사에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Volm 등은 37명의 난소암 환자의 생검조직을 이용해 유세포분석법을 통한 DNA 정량검사를 시행하여 이배수성 (diploidy) 종양에 비해 비배수성 (aneuploidy) 종양에서 5년 생존율이 불량함을 밝혀내고, 유세포분석법을 통한 DNA 정량검사가 난소암의 중요한 예후인자라고 발표한 바 있다.¹¹ Friedlander 등은 비배수성 종양이 이배수성 종양에 비해 예후가 불량하다고 보고한 바 있다.¹² 그러나 이에 반해 DNA 배수성과 예후가 무관하다고 발표된 연구도 있었다.¹³ Meyer 등은 유세포분석법을 통해 얻어진 세포주기 중 합성기의 한 분획인 합성기 분율 (S-phase fraction, SPF)을 측정하는 것이 세포의 증식능을 규명하는데 가장 자세한 방법이라고 보고하였다.¹⁴

세포주기는 G1, S, G2, M기로 구성되며 이런 세포주기 조절에 cyclin protein의 합성과 소멸이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Cyclin은 세포분열의 각 주기에서 그 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 CDK (cyclin dependant kinase)들과 결합하여 작용을 나타낸다. 이런 cyclin으로는 A형, B형, G1 cyclins (C, D1, D2, D3, E) 등이 알려져 있다.¹⁵ 이 중에서 cyclin A는 세포주기 중에서 특이적으로 G1후기와 S기에 CDK2와 결합하여 작용하는 것으로 밝혀져 있다.¹⁶ Barboule 등은 간, 대장, 난소 또는 식도암에서 cyclin A가 과발현된다고 보고한 바 있고,¹⁷ Chao 등은 cyclin A의 과발현은 불량한 예후와 조기재발에 관여한다고 밝힌 바 있다.¹⁸ 이런 점에서

불 때 cyclin A의 과발현이 암화 (tumorigenic process)에 관여한다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 먼저 상피성 난소암으로 진단받은 환자에 있어서 DNA 배수성, 합성기 분율 및 cyclin A와 임상적 예후인자들인 병기, 분화도, CA-125 및 잔류암의 크기와와 관계를 조사하고, DNA 배수성, 합성기 분율 및 cyclin A의 발현에 따른 3년 생존율을 평가하며 이 세 가지 인자들의 상호연관성을 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 환자군

연세대학교 의과대학 산부인과학교실에서 2000년 2월부터 2003년 1월까지 난소종양으로 진단받은 46예를 대상으로 전향적인 연구를 시행하였다. 이 중 양성 난소종양이 5예, 경계성 난소암이 10예이었고 악성 난소암이 31예였다. 양성 종양과 경계성 난소암의 경우 일차적으로 개복술을 시행하여 병변을 제거하였고, 난소암으로 진단된 모든 환자에서는 병기결정을 위한 개복술을 시행하였으며 수술 후 보조항암화학요법 (Taxol 135 mg/m² plus carboplatin AUC 4-5)을 6회에 걸쳐 시행하였다.

Table 1. Patient characteristics in 31 malignant ovarian tumors

	No.	%
Age (years)		
≤50	17	54.8
>50	14	45.2
Histopathology		
Serous	12	38.7
Mucinous	7	22.6
Endometrioid	7	22.6
Clear cell	1	3.2
Undifferentiated	4	12.9
Grade		
1	8	25.8
2	7	22.6
3	16	51.6
Stage		
Early (I+II)	14	45.2
Advanced (III+IV)	17	54.8
Residual tumor		
<2 cm	21	67.7
≥2 cm	10	32.3

31예의 악성 난소암 환자들의 연령은 50세 이상이 45.2%였다. 조직병리상 장액성 (serous type)이 38.7%로 제일 많았고, 분화도에서는 grade 3이 51.6%였으며, 병기에서는 각각 I기와 II기를 합쳐 초기 병기 (early stage), III기와 IV기를 합쳐 진행된 병기 (advanced stage)로 분류

하였을 때, 진행된 병기가 54.8%에 해당하였다. 잔류암의 크기는 2 cm를 기준으로 구분하였고 2 cm 이상인 경우가 32.3%에 해당하였다 (Table 1).

2. 병리조직검사

세포형태, 조직학적 분화도와 병기는 WHO criteria와 FIGO 병기에 따라 분류하였다. 조직학적 분화도는 grade 1이 고형성 부분이 5% 미만인 경우, grade 2는 고형성 부분이 5% 이상 50% 미만인 경우, grade 3는 고형성 부분이 50% 이상인 경우로 하였다.¹⁹

3. 면역조직화학염색법

개복술을 통해 얻은 신선조직 (fresh tissue)을 10% 중성완충 포르말린에 고정한 다음 4 μ m 두께로 절편을 만든 후 poly-L-lysine을 입힌 slide에 얹은 후 탈과라핀화, 재수화 과정을 시행하고 10 mM citrate 완충액 용액에 담가 autoclave에서 15분 동안 처리하였다. 조직내 내인성과산화 효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 용액에서 10분간 처리후 배경의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 normal goat serum으로 30분간 전처리하였다. 1:100으로 희석된 일차항체용액 (mouse monoclonal Ab, DAKO)에 4 $^{\circ}$ C로 하룻밤 동안 배양하였다. 추가적으로 실온에서 30분간 배양한 후 30분 동안 biotinylated goat antimouse Ab와 peroxidase가 부착된 streptavidin을 결합시킨 후 AEC (aminoethylcarbazole)로 발색시켜 hematoxylin으로 대조 염색하였다. 핵내에 갈색으로 염색되는 세포를 양성으로 간주하였으며 총 1000개의 세포를 세어 양성세포수가 5% 이상일 때를 (+)군으로, 5% 미만일 때를 (-)군으로 정의하였다 (Fig. 1).

4. DNA 정량검사

일차 개복술을 통해 얻은 신선조직 (fresh tissue)으로 유세포분석법을 이용하여 DNA 정량검사를 하였다. 0.2 g의 신선조직을 phosphate buffered saline (PBS)에 넣은 후 100 μ m nylon mesh로 여과하여 얻어진 세포부유액에 다시 PBS를 넣고 원심분리해서 얻은 세포침전물을 다시 PBS로 세척한 후에 혈구계 (hemocytometer)로 세포수를 계산하였다. Vindelov 시약으로 세포 1×10^4 개/mL를 염색하여 FACScanner (FACS, Becton Dickinson USA)로 유세포분석을 시행하였다.²⁰ DNA 배수성 및 합성기 비율은 Phenix flow system을 통해 DNA histogram으로 그렸다. DNA histogram 상에서 서로 다른 G0/G1 peak가 2개 이상 나타나며 peak를 구성하는 세포의 최소 10%가 aneuploid cells일 때를 비배수성으로 정의하였다. 변이계수 (coefficient of variation)는 5% 이내인 histogram을 적합한 것으로 판정하였다. DNA index (DI) 값은 정상조직의 DNA 함량에 대한 검체조직의 DNA 함량의 비로 0.96-1.04일 때를 이배수성으로 정의하였고 이 기준에서 제외되는 검체는 비배수성으로 정의하였다 (Fig. 2).

5. CA-125

혈청 CA-125 값은 방사면역측정법을 이용하여 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정하였다. 정상범위는 35 U/mL 이하로 하였다. 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 값은 35 U/mL를 기준으로 CA-125 값이 35 U/mL 이상인 군과 이하인 군으로 두 군으로 분류하였다.

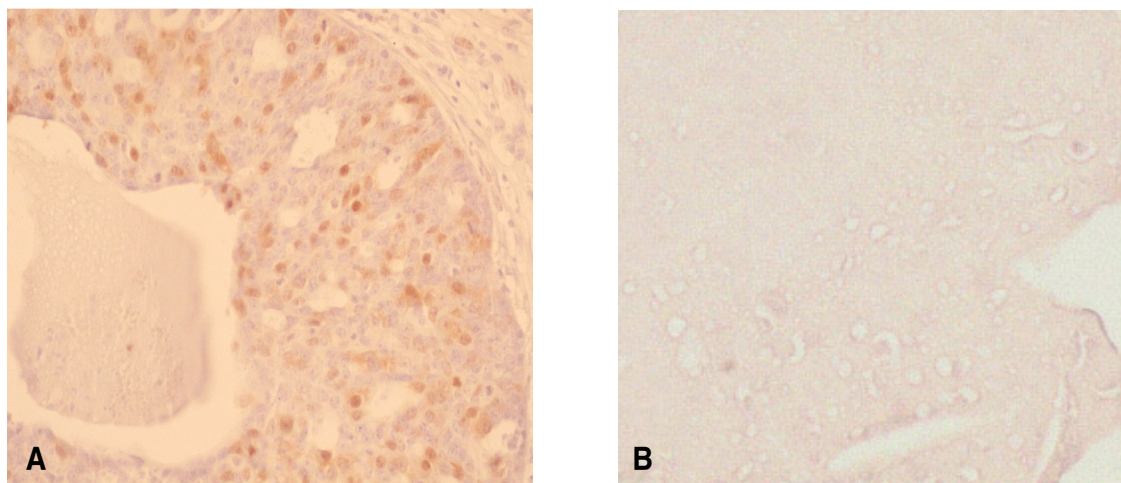


Fig. 1. Expression of cyclin A. A) Cyclin A (+); cyclin A expression \geq 5%, B) Cyclin A (-); cyclin A expression <5%.

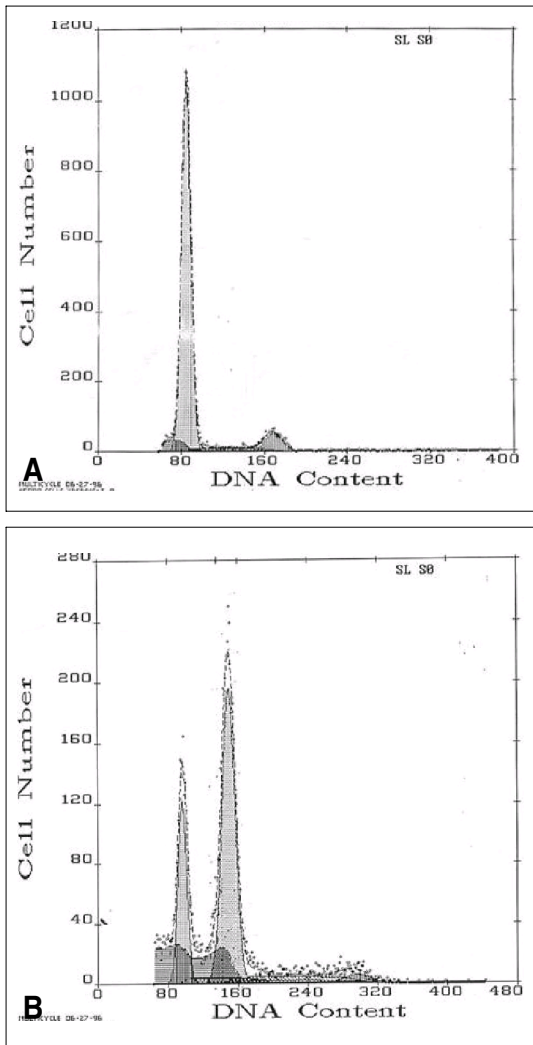


Fig. 2. DNA histograms analysed by flow-cytometry.
 A: Diploidy, DI=0.96-1.04.
 B: Aneuploidy, DI<0.96, >1.04.

6. 자료 분석

자료분석은 two sample t-test, chi-square test와 ANOVA (analysis of variance) test를 이용해 통계처리하였고, 통계 분석은 SPSS (version 11.0)을 이용하였다. 생존곡선은 Kaplan-Meier method로 구하였다. p value<0.05인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

46예의 난소종양 환자들의 DNA 배수성, 합성기 분율, cyclin A 발현율을 비교하였을 때 양성 난소종양과 경계성 난소암 환자에 비해 악성 난소암 환자에서 비배수성 종양이 많았고 (p=0.004), 합성기 분율이 높았으며 (p=0.001), cyclin A의 발현율이 높았다 (p=0.001, Table 2).

임상적 예후인자들과 DNA 배수성, 합성기 분율, cyclin A 발현율간의 상관관계를 살펴보았다. DNA 배수성과의 상관관계에서는 분화도가 증가할수록, 진행된 병기에서, 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125값이 35 U/mL 보다 큰 군에서 그리고 잔류암이 2 cm 보다 큰 군에서 비배수성 종양이 많았다 (p=0.004, 0.009, 0.05, 0.002). 합성기 분율과의 상관관계에서는 분화도가 증가할수록, 진행된 병기에서, 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125값이 35 U/mL 보다 큰 군에서 그리고 잔류암이 2 cm 보다 큰 군에서 합성기 분율이 유의하게 높았다 (p=0.06, 0.01, 0.04, 0.007). Cyclin A의 발현율과의 상관관계에서는 cyclin A (+) 군에서 cyclin A (-) 군에 비해 분화도가 높았고, 진행된 병기가 많았으며, 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 값이 35 U/mL 보다 큰 경우가 많았다. 또한 잔류암이 2 cm 보다 큰 경우가 많았다 (p=0.03, 0.004, 0.06, 0.02) (Table 3).

Table 2. DNA ploidy, S-phase fraction (SPF) and cyclin A expression in 46 benign, borderline and malignant ovarian tumors

	Aneuploidy			SPF (%)		Cyclin A (+)			Total No.
	N	%	p	(Mean±SE)	p	N	%	p	
Benign	0	0	0.004	2.3±0.3	0.001	0	0	0.001	5
Borderline	1	10		5.7±3.3		0	0		10
Malignant	13	42		8.2±4.7		13	42		31

Table 3. Correlation between clinical prognostic factors and DNA ploidy, S-phase fraction (SPF) and cyclin A expression

	Diploidy		Aneuploidy		p	SPF (%)		Cyclin A expression					
	N	%	N	%		(Mean ± SE)	p	(+)		(-)		p	
								N	%	N	%		
Stage													
Early (I+II)	12	85.7	2	14.3	0.009	5.8 ± 3.6	0.001	2	14.3	12	85.7	0.004	
Advanced (III+IV)	6	35.3	11	64.7		10.2 ± 4.0		11	64.7	6	35.3		
Grade													
1	8	100	0	0	0.004	4.9 ± 2.7	0.06	1	12.5	7	87.5	0.03	
2	4	57.1	3	42.9		10.2 ± 4.5		4	66.7	2	33.3		
3	6	37.5	10	62.5		9.1 ± 5.0		8	47.1	9	52.9		
Residual tumor													
<2 cm	17	80.9	4	19.1	0.002	5.0 ± 2.2	0.007	10	37.1	17	62.9	0.02	
≥2 cm	1	10.0	9	90.0		13.8 ± 4.5		3	75.0	1	25.0		
CA-125 (U/mL)													
≤35	17	65.4	9	34.6	0.05	7.4 ± 4.4	0.04	10	38.5	16	61.5	0.06	
>35	1	20.0	4	80.0		12.3 ± 5.1		3	60.0	2	40.0		

생존율에 있어서 DNA 배수성에 대한 3년 생존율 곡선에서는 이배수성 종양에 비해 비배수성 종양에서 생존율이 불량함을 보였고 (p=0.02), 합성기 분율에 대한 3년 생존율 곡선에서는 합기 분율을 10%를 기준으로 두 군으로 분류하였을 때 합성기 분율이 10%보다 큰 군에서 불량한 생존율을 보였다 (p=0.02). Cyclin A의 발현율에 대한 3년 생존율 곡선에서는 cyclin A의 발현율을 10%를 기준으로 두 군으로 분류하였을 때 발현율이 10%보다 큰 군에서 생존율이 불량함을 보였다 (p<0.0001) (Fig. 3).

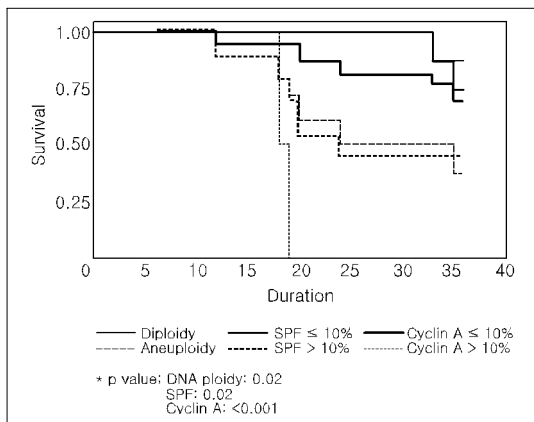


Fig. 3. Kaplan-Meier survival curve according to DNA ploidy, S-phase fraction (SPF) and cyclin A expression.

DNA 배수성, 합성기 분율 및 cyclin A 발현율간의 상관관계에서 볼 때, 비배수성 종양에서 합성기 분율이 크

고 (p=0.0005), cyclin A의 발현율이 유의하게 높았으며 (p=0.001), cyclin A(+) 군에서 합성기 분율이 유의하게 높게 나타났다 (p=0.0003) (Table 4, 5).

Table 4. S-phase fraction (SPF), cyclin A expression according to DNA ploidy

	SPF (%)		Cyclin A expression		
	(Mean ± SE)	p	(+)	(-)	p
			%	%	
Diploidy	5.9 ± 3.3	0.005	16.7	83.3	0.001
Aneuploidy	11.5 ± 4.6		76.9	23.1	

Table 5. S-phase fraction (SPF) according to cyclin A expression

Cyclin A expression	SPF (%)	
	(Mean ± SE)	p
(+)	11.7 ± 4.1	0.0003
(-)	5.8 ± 3.6	

고 찰

난소암은 보건복지부에서 시행한 한국중양 암 등록 사업 연례보고서에 의하면, 2001년 여성 10대 암 중에 하나이며,²¹ 현재까지 부인암에 있어서는 중요한 사망 원인의 하나이다. 난소암 환자의 대부분은 증상이 없어

진단 당시 이미 진행된 소견을 보이는 예가 많다. 표준적 치료방법으로 일차적으로 병기결정 및 종양감축술 (debulking surgery)의 의미로 수술을 시행하며, 수술 후 보조항암화학요법을 시행하고 있으나 여전히 치료가 힘들고 재발이 잘 되는 질환으로 알려져 있다.

난소암의 예후 예측은 치료방침을 결정하는데 중요한 역할을 하는데, 이런 예후인자로 알려진 것들로는 병기, 조직학적 분화도, 혈청내 CA-125 수치, 잔류암의 크기 등이 있다.²²⁻²⁴ 이러한 인자들과 더불어 예후에 대한 객관적 예측의 필요성이 대두하게 되었는데 종양세포의 증식능이 종양의 악성능을 예측할 수 있는 객관적인 척도라는 연구가 보고되었다.⁶ 이런 이유로 종양세포의 증식능을 정량화하려는 다양한 연구가 시도되었는데 특히 유세포 분석을 통한 DNA 정량검사가 많이 보고되고 있다.

유세포분석은 면역조직학적 방법들과는 달리 단시간에 많은 수의 세포정보를 처리할 수 있고 정량적인 분석이 가능하며 생검조직이나 파라핀 고정조직을 이용하여 세포주기에 따른 DNA 정량분석과 배수성을 빠르고 정확하게 분석할 수 있는 장점이 있다.²⁵ 그리고 그 동안의 연구들에 의하면 비배수성 종양이 이배수성 종양에 비해 분화도와 병기가 더 높고 좀 더 불량한 임상결과를 보이는 것으로 보고되고 있다.^{26,27} 본 연구에서도 양성 난소종양은 5예 모두 이배수성 종양이었으며 경계성 난소암은 10예 중 1예만 비배수성 종양이었으나, 악성 난소암은 31예 중에서 13예가 비배수성 종양으로 무려 42%에 해당하였으며 보고된 결과들과 큰 차이를 보이지 않았다 ($p=0.004$) (Table 2). 또한 악성 난소암 중에서도 이배수성 종양에 비해 비배수성 종양에서 분화도와 병기가 진행된 것으로 나타났고 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 수치가 35 U/mL 이상인 경우가 많았으며 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 경우가 많았고 3년 생존율 또한 불량했다 (Table 3, Fig. 3).

유세포분석법을 통한 합성기 분율 측정은 증식하는 세포의 부분을 인지하는 좀 더 정밀한 방법으로, 일반적으로 종양에서 합성기 분율이 높으면 종양의 공격능 (aggressiveness)이 증가한다고 보고하고 있다.²⁸ Friedlander 등은 난소암에서 이배수성 종양에 비해 비배수성 종양에서 높은 합성기 분율을 보인다고 하였고,²⁶ 합성기 분율은 난소암뿐만 아니라 유방암, 대장암, 폐암 등의 많은 고형암에서도 유용한 예후인자로 알려져 있다.^{29,30} 본 연구 결과에서 분화도가 높을수록 ($p=0.06$), 진행된 병기에서 ($p=0.001$), 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 수치가 35 U/mL 이상인 군에서 ($p=0.04$) 그리고 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 군에서 ($p=0.007$) 합성기 분율이 크게 나타났고, 합성기 분율이 10%보다 큰 군에서 3년 생존율 또한 불량하였다 ($p=0.02$) (Table 3, Fig. 3).

Cyclin과 CDK는 세포주기 조절인자로서 cyclin은 세포주기의 각 단계에서 발현이 특이적으로 증가했다가 감소하며 CDK들과 결합하여 세포주기 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는데, cyclin A는 세포주기 중에서 DNA 합성 시작직전부터 출현하여 전기 (prophase)까지 증가하다가 중기 (metaphase)에 소멸되며 CDK2와 결합하여 작용한다.³¹ 현재 많은 암유전자들이 성장인자 (growth factor)와 세포주기를 연결하여 세포분열기전을 자극하는 신호전달계의 구성원으로 밝혀졌으며, 항암유전자들은 세포주기 조절기전을 통하여 세포분열을 억제함으로써 발암을 억제한다고 알려져 있다.³² 특히 몇 종류의 암에서는 cyclin 유전자의 구조적 변화나 과발현이 암화와 관련이 있는 것으로 밝혀져 현재 cyclin을 암유전자로 보는 견해도 있다. 본 연구 결과에서 양성 난소종양과 경계성 난소암에 비해 악성 난소암에서 cyclin A 발현율이 5% 이상인 (+) 군이 많게 나타나 보고된 견해들과 일치하는 결과를 보였다 (Table 2). 또한 cyclin A (+) 군에서 분화도가 높고, 진행된 병기가 많았으며 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 수치가 35 U/mL 이상인 경우가 많았고 또한 잔류암이 크기가 2 cm 이상인 경우가 많았다. 그리고 cyclin A 발현율이 10%보다 큰 군에서 3년 생존율 또한 불량했다 (Table 3, Fig. 3).

이런 결과에서 볼 때, 분화도와 병기가 높을수록 그리고 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정된 CA-125 수치가 35 U/mL 이상인 경우 또한 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 경우에 예후가 불량하므로, 비배수성 종양이거나 합성기 분율이 높을수록 또는 cyclin A 발현율이 높을수록 예후가 불량할 것을 예측할 수 있다.

현재까지 난소암에서 유세포분석법을 이용한 DNA 배수성과 임상적 예후인자들간의 관계를 보고한 많은 연구들이 있었으나 이들은 대부분이 과거의 파라핀 포매조직 (paraffin-embedded tissue)을 이용한 연구였다. Hedley 등은 파라핀 고정조직을 이용한 유세포분석법을 보고하였고,³³ Schutte 등은 파라핀 포매조직과 신선조직에서의 유세포분석 결과가 동일하다고 발표한 바 있다.³⁴ 그 후 파라핀 포매 조직을 이용한 연구가 활발히 진행되었다. 그러나 Stephenson 등은 파라핀 포매조직으로 얻은 DNA histogram의 질 (quality)은 신선조직의 그것보다 못한 것으로 보고한 바 있고,³⁵ Jacobsen 등과 Deitch 등은 파라핀 포매조직을 이용한 경우 diploid peak의 변이계수가 높게 나타나게 되고, aneuploid peak에서는 나머지 절편들에 의해 작고 불분명하게 나타나며 따라서 정확도가 신선조직에 비해 떨어지게 된다고 보고하였다.^{36,37} Volm 등은 37예의 난소암 환자의 신선조직을 이용해 유세포분석법을 통한 DNA 정량검사를 시행한 바 있고,¹⁷ Nyvang 등은 41예의 난소암 환자의 신선조직을 가지고 CA-125, 조직학적 분화도 및 DNA index의 상관관계를

조사한 바 있다.³⁸ 이렇듯 소수의 연구자들을 제외하고는 신선조직을 이용한 예는 거의 보고된 바가 없다. 그러나 본 연구에서는 다른 대다수의 연구들과 달리 46예 모두에서 신선조직을 사용하였다. 본 연구에서, 생존율에 대한 추적관찰 기간이 3년으로 비교적 짧았는데, 이는 신선조직을 갖고 한 최근의 연구였다는데 그 이유가 있다. 결론적으로 위의 결과들을 종합할 때 난소암 환자에서 유세포분석법을 통한 DNA 정량검사를 시행해서 DNA 배수성 여부와 합성기 분율을 측정하거나 면역조직화학 염색을 시행하여 cyclin A의 발현율을 측정하는 것은 예후를 예측하는데 있어 중요한 임상정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

- 참고문헌 -

1. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(1): 3-10.
2. Lavin PT, Knapp RC, Malkasian G, Whitney CW, Berek JC, Bast RC Jr. CA-125 for the monitoring of ovarian carcinoma during primary therapy. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 223-7.
3. Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, Lambert HE. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA-125: a North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol* 1996; 7(4): 361-4.
4. Barlogie B, Drewinko B, Schumann J. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980; 69: 195-203.
5. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1690-703.
6. Garcia RL, Gown AM. Analysis of proliferative grade using anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies in formalin fixed, paraffin embedded tissues, comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 1989; 134: 733-9.
7. Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, Velde CJH, Cornlisse CJ. Cell cycle related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1991; 138: 1165-72.
8. Dervan PA, Magee HM, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissues correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 21-8.
9. Huettner PC, Weinberg DS, Lage JM. Assessment of proliferative activity in ovarian neoplasms by flow and static cytometry. *Am J Pathol* 1992; 141: 699-706.
10. Yu CCW, Woods AL, Levison DA. The assessment of cellular proliferation by immunocytochemistry; a review of currently available methods and their applications. *Histochemical J* 1992; 24: 121-31.
11. Volm M, Kleine W, Pfeleiderer A. Flow-cytometric prognostic factors for the survival of patients with ovarian carcinoma: a 5-year follow-up study. *Gynecol Oncol* 1989; 35: 84-9.
12. Friedlander ML, Hedley DW, Swanson C. Prediction of long-term survivals by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1988; 6: 282-90.
13. Rice LW, Mark SD, Berkowitz RS, Goff BA, Lage JM. Clinicopathologic variables, operative characteristics, and DNA ploidy in predicting outcome in ovarian epithelial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86: 379-85.
14. Meyer JS, Gorsell DJ, Yim S. Cell proliferation in ovarian carcinoma: superior accuracy of S-phase fraction(SPF) by DNA labeling index versus flow cytometric SPF, lack of independent prognostic power for SPF and DNA ploidy, and limited effect of SPF on tumor growth rate. *Gynecol*

- Oncol* 2001; 81: 466-76.
15. Lock LF, Wickramasinghe D. Cycling with CDKs. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 404-5.
16. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992; 11: 961-71.
17. Barboule N, Baldin V, Jozan S, Vidal S, Valette A. Increased level of p21 in human ovarian tumors is associated with increased expression of cdk2, cyclin A and PCNA. *Int J cancer* 1998; 76: 891-6.
18. Chao Y, Shih YL, Chiu JH, Chau GY, Lui WY, Yang WK, et al. Overexpression of cyclin A but not Skp2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 985-90.
19. Serov F, Scully RE, Solbin LE. Histologic typing of ovarian tumors. In: *International classification of tumors*. Geneva: World Health Organization, 1973.
20. Rose NR, Marcario ECD, Fahey JL, Frenzman H, Penn GM. *Manual of clinical laboratory immunology*, 5th ed, ASM 1997; 255-61.
21. 보건복지부 한국중앙 암등록본부. 한국중앙 암등록사업 연례보고서. 2003.
22. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; 9(7): 1138-50.
23. Baak JP, Chan KK, Stolk JG, Kenemans P. Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. *Pathol Res Pract* 1987; 182(6): 755-74.
24. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61: 334-9.
25. Barlogie B, Raber MN, Schumann J. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; 43: 3982-9.
26. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Coates AS, Tattersall MHN. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 1984; 44: 397-400.
27. Rutgers DH, Wils IS, Schaap AHP, van Lindert ACM. DNA flow cytometry, histological grade, stage, and age as prognostic factors in human epithelial ovarian carcinomas. *Path Res Pract* 1987; 182: 207-13.
28. Hansson J, Tribukalt B, Lewensohn R, Ringborg U. Flow cytometric analyses of metastases of human malignant melanomas. *Anal Quant Cytol* 1982; 4: 99-104.
29. Meyer JS, Coplin MD. Thymidine labeling index, flow cytometric S-phase measurement, and DNA index in human tumors: comparisons and correlations. *Am J Clin Pathol* 1988; 89(5): 586-95.
30. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis: DNA flow cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990; 65: 1194-205.
31. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. *Cell* 1991; 66(6): 1071-4.
32. Marx J. How cells cycle toward cancer. *Science* 1994; 263(5145): 319-21.
33. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content to paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-6.
34. Schutte B, Reyners MM, Bosman FT. Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin embedded tissue. *Cytometry* 1985; 6: 26-30.
35. Stephenson RA, Gay H, Fair WR, Melamed MR. Effect of section thickness on quality of flow cytometric DNA content determinations in paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1986; 7: 41-4.
36. Jacobsen AB, Fossa SD, Thorud E. DNA flow cytometric values in bladder carcinoma biopsies obtained from fresh and paraffin-embedded material. *APMIS* 1988; 96: 25-9.
37. Deitch AD, White RDV, Madewell BR. False DNA aneuploidy in canine and human neoplasms. *Anticancer Res* 1993; 13: 2117-8.
38. Nyvang GB, Mogensen O, Bichel P, Jakobsen A. Combined prognostic importance of CA-125, histopathologic grade and DNA index in advanced ovarian cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 2000; 21(6): 569-72.

=국문초록=

목적 : 본 연구는 상피성 난소암으로 진단받은 환자에 있어서 DNA 배수성 (ploidy), 합성기 분율 (S-phase fraction) 및 cyclin A의 발현율과 임상적 예후인자들 중 병기 (stage), 분화도 (grade), CA-125 및 잔류암의 크기와 의 관계를 조사하고, DNA 배수성, 합성기 분율 및 cyclin A의 3년 생존율을 평가하며, 동시에 세 인자들 각각의 상관성을 분석하고자 하였다.

연구 방법 : 2000년 2월부터 2003년 1월까지 연세대학교 의과대학 산부인과학교실에서 진단받은 상피성 난소암 31예, 경계성 난소암 10예, 양성 종양 5예를 대상으로 하였다. 난소암으로 진단받은 모든 예에서 병기결정을 위한 시험적 개복술 및 보조항암화학요법을 시행받았으며, CA-125는 수술 후 6회의 보조항암화학요법 시행 후 측정하였으며, 35 U/mL를 기준으로 초과와 이하인 두 군으로 나누었다. DNA 배수성은 이배수성 (diploidy) 종양과 비배수성 (aneuploidy) 종양으로 구분하였고, DNA 배수성 및 합성기 분율 값은 병기결정을 위한 시험적 개복술시 생검을 통해 얻은 신선조직 (fresh tissue)을 유세포분석법 (flow cytometry)을 이용해 분석하였다. Cyclin A는 면역조직화학염색법을 시행하여 발현율을 측정하였고, 발현율이 5% 이상인 군을 (+), 5% 미만인 군을 (-)로 분류하였다. 통계처리는 SPSS ver.11.0을 이용하여, two sample t-test, chi-square test, Kaplan-Meier survival curve로 분석하였다.

결과 : 46예의 난소종양 환자들의 DNA 배수성, 합성기 분율, cyclin A 발현율을 비교하였을 때 양성 난소종양과 경계성 난소암 환자에 비해 악성 난소암 환자에서 비배수성 종양이 많았고, 합성기 분율이 높았으며, cyclin A의 발현율이 높았다. 이는 모두 통계적으로 유의하였다 ($p=0.004, 0.001, 0.001$). DNA 배수성과 임상적 예후인자들간의 관계에서는 분화도가 높을수록, 진행된 병기일수록, CA-125가 35 U/mL 보다 큰 군에서 그리고 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 군에서 비배수성 종양이 유의하게 많았고 ($p=0.004, 0.009, 0.05, 0.002$), 합성기 분율과의 관계에서도 분화도가 높을수록, 진행된 병기일수록, CA-125가 35 U/mL 보다 큰 군에서 그리고 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 군에서 합성기 분율이 높았다 ($p=0.06, 0.01, 0.04, 0.007$). 그리고 cyclin A의 발현율과의 관계에 있어서도 분화도가 높을수록, 진행된 병기일수록, CA-125가 35 U/mL 보다 큰 군과 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 군에서 cyclin A의 발현율이 높았다 ($p=0.03, 0.004, 0.06, 0.02$). 3년 생존율에 있어서는 비배수성 종양에서, 합성기 분율이 10%보다 큰 군에서 그리고 cyclin A의 발현율이 10%보다 큰 군에서 생존율이 불량하게 나타났다 ($p=0.02, 0.02, <0.0001$). DNA 배수성, 합성기 분율 및 cyclin A의 발현율간의 상관관계에서도 서로 유의한 상관관계를 보였다.

결론 : 분화도가 높을수록, 진행된 병기일수록, CA-125가 35 U/mL 보다 큰 군에서 그리고 잔류암의 크기가 2 cm 이상인 군에서 비배수성 종양이 많았고, 합성기 분율이 높았으며, cyclin A의 발현율이 높았다. 비배수성 종양이거나 합성기 분율이 높은 경우, 또는 cyclin A의 발현율이 높을 때 생존율이 불량했음을 알 수 있었다. 그러므로, 상피성 난소암 환자에 있어 DNA 정량검사를 시행하거나 cyclin A 발현율을 조사하는 것은 환자의 예후를 예측하는 데 있어 중요한 임상정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

중심단어 : 유세포분석법, DNA 배수성, 합성기 분율, Cyclin A