

유방암에서 유세포분석의 의의

연세대학교 의과대학 ¹외과학교실, ²병리학교실

구 자 윤¹ · 이 회 대¹ · 정 우 희²

The Significance of DNA Flow-cytometry in Breast Cancer

Ja Yun Koo, M.D.¹, Hy-De Lee, M.D.¹ and Woo Hee Jung, M.D.²

Department of ¹Surgery and ²Pathology, Yonsei University College of Medicine

Purpose: To evaluate the relationship between nuclear DNA contents and prognostic factors and survival in breast cancer patients.

Materials and Methods: We determined nuclear DNA content from 91 paraffin-embedded malignant breast tumors and evaluated relationship between DNA nuclear content and well-known prognostic indicators of breast cancer and the survival of the patients by statistical analyses.

Results: Twenty nine(34.5%) of the 91 tumors examined were diploid, and the remainder(65.5%) contained one or more aneuploid clones. S-phase fraction(SPF) ranged from 1.4 to 68.3%(median 11.2%) and it was higher in aneuploidy tumors than in diploid tumors($p < 0.05$). Positive axillary lymph nodes were found in 72.7% of the patients who had a tumor with a high SPF (above the median 11.2%) and in 27.3% of those with tumor with low SPF (below median)($p < 0.05$). The overall survival rate was 96.1% in DNA diploid and 87.6% in DNA aneuploid tumors, showing that DNA ploidy had no prognostic significance in breast cancers. The actuarial survival rates were 96.4% and 86.3% for low and high SPF, respectively($p = 0.28$). The patients with high SPF showed high disease free survival rate compared to the patients with low SPF but the difference had no statistical significance.

Conclusion: Our results indicate DNA aneuploid tumors were more prevalent in breast cancer patients with high SPF or lymph node metastasis and larger patient accumulation with longer follow-up period will be helpful to identify the relationship between flow-cytometrical analysis and prognosis.

Key Words: DNA flow-cytometry, S-phase fraction, DNA index, Breast cancer

서 론

유방암의 빈도는 동서양을 막론하고 점차 증가하는 추세에 있다. 유방암의 발생 증가에 대한 이유는 한마디로 설명할 수는 없지만 고지방식이, 비만, 암유전인자, 여성 호르몬 제재의 과다복용 및 생활패턴의 변화 등 여러 원인이 복합적으로 작용하는 것으로 판단된다. 우리 나라도 급속한 경제발전을 통해 전반적인 서구화 경향을 보이는 것과 더불어 질병의 양상도 변화를 보이고 있다. 보건 복지부의 통계에 의하면 1990년 이전에는 여성암 중 유방암의 비율이 9%로 5위였으나 1990년 이후에는 10%이상으로 증가하여 위암, 자궁암에 이어서 제 3위의 여성암으로 건강을 위협하고 있어 큰 사회적 문제가 되는 질병으로 많은 연구가 이루어져 있으나 한국을 비롯한 동남아시아의 유방암 발생에 관한 연구는 아직 초보적인 단계라 할 수 있다. 종양의 크기와 액와림프절 전이여부가 생존율에 중요한 인자로 알려져 있으며 액와림프절 전이가 없는 경우는 10년 생존율이 80%를 상회하므로 조기 발견이 중요한 요소라 할 수 있다. 그러나 조기암일지라도 전이나 재발로 10년내 사망하는 경우도 있어(1) 고위험군 감별에 필요한 예후인자의 개발이 임상적 예후판정 및 치료방침의 결정에 중요한 의미를 가지게 되었다. 유방암 발생 및 예후에 기여하는 것으로 알려진 유전인자들이 계속 연구되는 가운데 DNA flow-cytometry를 이용한 DNA ploidy가 예후 추정인자로 이용되기 시작한 후 DNA index 및 S-phase fraction은 유방암 환자의 종양의 크기와 액와림프절 전이와 연관된 예후인자로 중요한 연구의 대상으로 되어 있다. 본 연구는 파라핀 포매 조직에서 DNA flow-cytometry를 통해 nuclear DNA content를 유방암의 병기별로 분석함으로써 Tumor progression 혹은 Tumor metastasis의 관련 여부를 규명하고자 하였으며 또한 S-phase fraction과 DNA ploidy를 측정하여 Tumor cell의 growth activity와의 연관성을 밝히고자 하였다.

연구재료 및 방법

1) 재 료

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원에서 1991년부터 1995년까지 유방암으로 유방절제술을 시행한 환자 중 DNA flowcytometry의 면역조직화학 염색에 필요한 파라핀 블록 보존이 양호하고 조직의 양이 충분한 경우에 stage 0, I, IIa, IIb, III별로 각각 20명씩을 대상으로 하였다. 수술 전 항암요법이나 방사선치료환자는 없었으며 수술 후 림프절전이 있거나 고위험재발군인 43예에서는 수술 후 항암요법을 시행하였으며 수술 후 호르몬치료는 28예에서 시행하였다.

2) 방 법

(1) **임상기록검토:** 환자들의 진단시 연령, 수술 방법, 에스트로겐과 프로게스테론 수용체의 발현 등을 조사하였다.

(2) **병리조직학적 검색:** 10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin염색을 시행한 후 조직학적 분류는 변형된 세계보건기구(World health organization)분류에 따르고 핵등급 및 조직학적등급은 Bloom and Richardson numerical scoring system에 따랐다(2). slide 상 H & E 염색에서 15% 이하의 tumor cell이 있으면 제외하였다.

(3) **유세포 측정기를 이용한 DNA 분석:** 병리전문의를 의하여 유방암환자의 파라핀포매조직에서 정상조직과 암조직의 부위를 정한 후 50 micrometer 정도의 조직 2개씩을 확보하였는데 이때 종양의 부위가 15% 이상의 종양세포를 함유하는 경우를 대상으로 하였다. 조직절편에 xylene 10ml 가하여 paraffin을 제거하였고 xylene을 모두 따라낸 후 순차적 에탄올(95%, 70%, 50%) 첨가한 뒤 남은 알콜을 모두 제거하고 증류수를 가하여 잘 섞은후 parafilm으로 sealing하여 실온에서 밤새 방치하였다. 그후 증류수를 모두 따라내고 0.5% pepsin 용액을 2 ml 가하고 sealing하여 37°C

water bath에서 30분동안 incubation 하는데 이때 10분간격으로 적당세기로 vortexing 하였다. 그후 ice bath에 미리 넣어둔 cold PBS가 들어있는 원심관에다 incubation한 후 조직이 함유된 용액을 45 micrometer pore size의 nylon mesh에 여과한후 1500 RPM 에서 5분간 원심분리하였다. 이 침전물에 modified Krishan buffer방법에 의한 propidium iodide solution을 2 ml 가한 후 nylon mesh로 여과한 후 에픽스 유세포 측정기(Coulter Epic-XL, USA)를 이용하여 DNA 정량분석을 하였는데 Coulter electronics에서 제공된 Phoenix Flow system soft ware (Multicycle ver 2.53)를 이용하여 DNA함량 분석을 하였다. Ploidy와 cell kinetics는 정상 배수성을 가진 백혈구핵과 비배수성을 관찰할 수 있는 종양의 핵의 비교를 통해 측정하는데 DNA index는 aneuploid G0/G1 population 및 diploid G0/G1의 peak channel의 수에 대한 비율로 diploid의 경우는 DI 가 1.0에 가깝다. Coefficient of variation(CV)는 peak의 넓이를 의미하는데 G2와 mitotic cell은 정상적인 G1 DNA content의 2배이므로 이론적으로는 G1 peak의 중앙치에 2배인 Gaussian peak가 생겨야하지만 G1 cell 에 비해 G2 및 mitotic cells이 DNA protein(chromatin)에 고농도로 condensation 되어 있어 G2/G1 비율은 2.0 이하(1.96~1.98)이다. S-phase fraction의 제외 기준은 G0/G1 peak의 CV가 8% 이상인 경우, G0/G1 peak가 asymmetrical pattern이거나 excessive debris나 background가 G2/M의 오른쪽에 분포하고, 2개 이상의 aneuploid population이고 aneuploid cell이 near diploid tumor의 30% 이하인 경우로 하였다.

(4) Bcl-2의 면역조직학적 검색: primary mouse MAbs for Bcl-2(clone 124, DAKO) 를 이용하여 면역화학염색을 시행하였는데 10% 이상의 cytoplasmic staining을 보이는 경우를 양성으로 하였다.

(5) 통계처리: 수집된 자료는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 개인용 컴퓨터로 분석하였다. 여러 예후인자와의 연관성은 chi-square test를 이용하여 비교하였고 생존율분석은 Kaplan Meier method으로 분석하였고 Log rank test로 검증하였다.

결 과

환자의 나이는 28세에서 70세까지로 중앙치가 45세 이었고 이중 41세에서 50세 여성이 가장 많은 비중을 차지하였다. (84명중 40명) DNA ploidy status는 diploidy가 84명중 29 명으로 34.5%, non-diploidy가 84명중 55명으로 65.5%를 차지하였으며 나이에 따른 ploidy 분포의 차이는 없었다($p=0.9$). 종괴의 크기별 분포를 보면 aneuploidy의 분포가 종괴의 크기가 커질수록 증가하는 양상을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다($p=0.138$). 림프절 전이여부에 따른 ploidy의 양상은 림프절 전이가 있는 경우 aneuploidy의 비율이 76.7%, diploidy가 23.3%이었으며 림프절 전이가 없는 경우는 각각 53.7%, 46.3%으로서 림프절 전이가 있는 경우 aneuploidy의 비율이 높은 경향을 보였다($p=0.026$). 그러나 조직학등급, 핵등급, 호르몬수용체 양성여부 및 병기에 따른 ploidy의 양상은 통계적 유의성이 없었다. S-phase fraction은 1.4에서 68.3까지로 median 값은 11.2(SD 13.1) 이었으며 SPF가 증가할수록 DNA aneuploidy가 많은 분포를 보였다($p<0.01$). S-phase fraction은 종괴의 크기가 2cm 이하인 T1의 경우 SPF가 median 값인 11.2보다 높은 예가 52.6%, T3의 경우는 70.6%로 다소 증가하는 경향이 있으나 통계학적인 의의는 없었다($p>0.05$). Low SPF의 경우 high SPF의 경우에 비하여 estrogen receptor 양성률이 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다($p=0.11$). 유방암 세포의 조직학적등급이나 핵등급의 경우도 S-phase fraction과 연관성을 관찰할 수 없었으며 Bcl-2의 발현과 DNA ploidy 및 SPF의 연관성의 관찰에서도 유의한 결과는 나타나지 않았다(Table 1, 2).

중앙추적기간은 32.5개월이었는데 생존율의 경우 high SPF가 low SPF에 비하여 예후가 나쁜 것으로 나왔고 Aneuploidy의 경우 diploidy에 비하여 생존율이 수치상으로는 낮은 경향을 보였으나 통계학적인 유의성이 없었다($p=0.28$, $p=0.37$)(Fig. 1, 2, 3, 4). 또한 high SPF의 경우에도 DNA ploidy에

Table 1. Correlation of clinicopathological parameters with SPF and ploidy status(I)

	Diploidy	Aneuploidy	p-value	SPF > 11.2	SPF < 11.2	p-value
Age			0.9			0.93
40이하	7	15		13	8	
41-50	13	25		23	15	
51이상	9	15		15	9	
Size			0.138			0.54
T1	9	10		10	9	
T2	15	30		26	16	
T3	3	15		12	5	
Lymph node			0.026			0.034
positive	10	33		32	12	
negative	19	22		18	20	
Histologic grade			0.48			0.5
1	7	14		15	6	
2	12	18		16	13	
3	5	16		13	8	
Nuclear grade			0.5			0.7
1	2	9		3	8	
2	13	26		14	23	
3	9	15		10	14	
Bcl2			0.6			0.6
Positive	17	29		27	19	
Negative	12	26		23	13	

Table 2. Correlation of clinicopathological parameters with SPF and ploidy status(II)

	Diploidy	Aneuploidy	p-value	SPF > 11.2	SPF < 11.2	p-value
ER			0.9			0.115
positive	13	27		20	18	
negative	14	28		28	12	
PR			0.68			0.98
positive	11	25		21	14	
negative	16	30		27	16	
STAGE			0.46			0.144
0	6	8		7	6	
1	7	9		6	9	
2	12	23		24	11	
3	4	15		13	6	

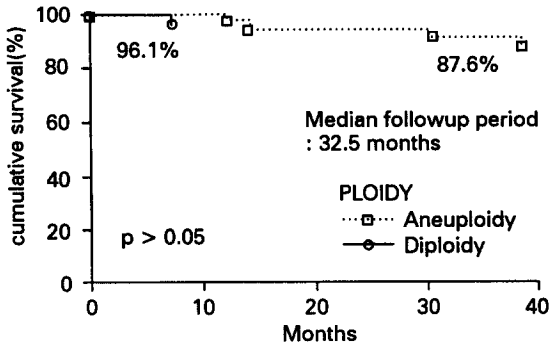


Fig. 1. Overall survival by ploidy status.

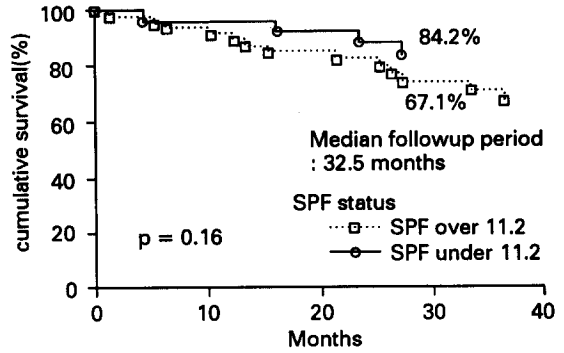


Fig. 4. Disease free survival by S-phase fraction status.

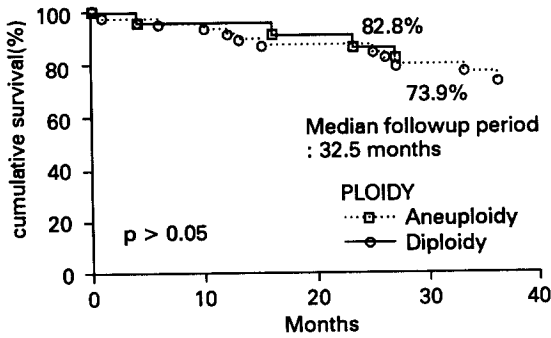


Fig. 2. Disease free survival by ploidy status.

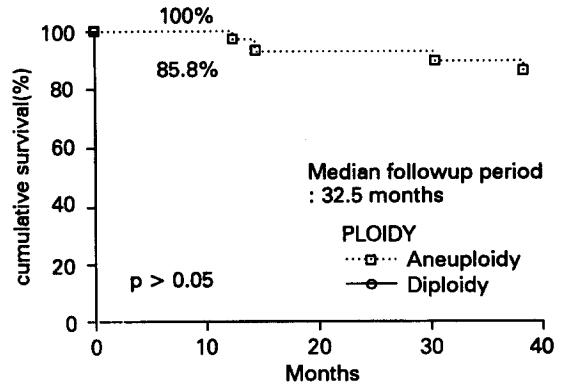


Fig. 5. Overall survival by ploidy status.

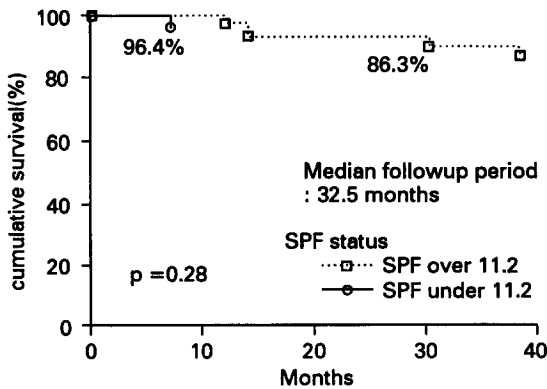


Fig. 3. Overall survival by S-phase fraction status.

Table 3. DNA ploidy distribution

DNA ploidy type (DNA index)	No of patients(%)
diploidy(1.00~1.049)	31 (34.8)
hyperdiploidy(1.05~1.75)	18 (20.2)
near tetraploidy(1.76~2.00)	29 (32.6)
hypertetraploidy(>2.00)	5 (5.6)
multiploidy	6 (6.7)
Total	89 (100.0)

따른 생존율 및 무병생존율의 비교에서도 통계적인 유의성이 없었다(Fig. 5).

고 찰

유방암 수술후 항암화학요법은 종양의 크기, 액와림프절 전이 여부 등의 해부학적 병기를 기준으로 시행하여 왔으나 이로 인한 부작용이 환자에게 고통을 더 할수 있다. 유방암의 진단 및 치료기술의 발달로 유방암의 조기진단과 생존율이 점차 향상하고 있으나 진단 당시는 림프절 전이가 없는 조기유방암의 경우에도 약 30%에서는 재발하므로 예후인자에 따른 추가적인 분류기준이 필요한 실정이다(3,4). 따라서 진단 당시는 병기가 초기이지만 향후 나쁜 예후를 보일 것으로 예상되는 환자를 조기에 찾아내기 위한 연구가 다각도로 이루어 지고 있다. 이를 위한 연구 결과로 현재 알려져 있는 oncogene 만도 150여가지에 달하는 실정이나 어느 하나 만족할만한 결과를 나타내지 못하고 있다. 이는 종양형성(oncogenesis)의 multistep tumorigenesis의 관점에서 볼 때 당연히 예측할 수 있는 점이며 어느 한가지로만 환자의 예후 및 치료방법의 지표로 삼을 것이 아니라 환자의 여러 가지 상태를 고려하여 algorithm에 따른 치료방법의 선택이 필요하다. 특히 최근에는 조기 진단 방법이 개발됨에 따라 종양의 크기가 T2 이하에 해당하고 액와림프절 침습이 없는 조기유방암 환자들이 많이 발견되어 수술후 전신적 보조요법의 시행여부가 논란이 되고 있는데 1 cm 이하 종양의 경우 재발률이 10~15%이고 3 cm 이상일 경우 50% 이상의 재발의 가능성이 있으므로 이에 대한 선별기준이 시급한 실정이다(5~8). 수술후 보조 항암요법이나 내분비 요법을 종양의 진행이 좀더 공격적일 것으로 예상되는 고위험군의 환자에게만 선별적으로 시행할 수 있다면 환자의 고통을 감소시키면서 치료성적을 향상시킬수 있을 것이다.

최근 광범위한 임상적 연구가 진행되고 있는 염색체 이상의 지표로서 DNA ploidy와 prolife-

rative capacity(S-phase fraction)이 있는데 이들은 flow-cytometry로 측정이 가능하여 매우 유용한 prognosis 예측인자로 알려지게 되었다. DNA flow-cytometry는 DNA specific fluorescent stains를 이용하여 G1과 G2 사이의 DNA content를 측정함으로써 S-phase cell을 측정하는 새로운 방법으로 비정상적인 DNA contents(aneuploid)를 가진 세포를 찾아낼 수 있다는 장점을 가지고 있다. DNA 함량의 변화는 고형종양에서 흔히 관찰되며 종양의 발육 및 진행에 중요한 역할을 하는 염색체 및 염색체 하부구조의 유전자적 변화이다. DNA flow-cytometry 는 임상적이거나 실험적인 종양에서 DNA 함량에 따른 생물학적 양상과의 연관성을 분석하는데 이용하여 tumor behavior의 임상적 생물학적인 인자들과 연관관계를 연구하는데 사용되고 있다. 유방암의 증식능(Proliferative activity)의 측정에는 다양한 방법이 이용되어왔다. Mitosis가 진행중인 종양세포의 비율은 growth fraction에 비례하는데 이는 growth rate이다. Growth fraction은 thymidine labeling index(TLI)나 flow-cytometry로 S-phase fraction(SPF, 이하 SPF로 통칭)의 추정을 통해 얻을 수 있다. 이중 mitotic figures(9), thymidine labelling index(10~13), flow cytometry 등의 방법이 예후 및 재발의 위험성에 측에 관한 보고가 있었다. Mitotic figures는 cell proliferation을 가장 직접적으로 측정할 수는 있지만 유방암에서는 이 수치가 매우 낮아서 측정이 어렵고 검사 기간이 너무 오래 걸린다는 단점이 있다. Thymidine labelling index는 mitotic figure 측정정보다는 시간이 덜 걸리지만 fresh tissue로 즉시 검사를 시행하여야 하고 시간이 많이 소요되어 널리 사용되지 않고 있다. 이렇듯 Mitotic index, thymidine labelling index 등의 proliferation의 직접적인 관찰이 있기는 하나 과정의 복잡성, 시간의 소요, 경비의 과다 및 fresh tissue을 통한 즉시 시행 등의 복잡한 문제로 초기의 기대감과는 달리 널리 시행되지 못하던 중 proliferation의 지표로서 이에 대등한 결과를 얻을 수 있으면서도 파라핀포매조직에서도 시행이 가능하며 훨씬 간편한

방법으로 결과를 얻을 수 있는 DNA flow-cytometry가 각광을 받기 시작하였다(14). 유방암의 증식능은 DNA thymidine labelling index와 estrogen progesterone receptor status를 결부시켜서 결정하는데 재발률 및 생존율의 위험도 예측에 매우 유용하다. Ploidy status가 예후에 미치는 영향은 논란이 많으나 aneuploidy의 경우 high SPF과도 연관성이 높으며(15) 본 연구에서도 유사한 결과가 나왔다. 또한 이러한 경우에는 예후가 좋지 않은 경향을 보이는데(16~19) 이의 보완을 위하여 SPF, G2M phase에 SPF를 더한 proliferation index를 이용한 연구, DNA index를 이용한 연구들이 발표되었다. DNA ploidy의 예후인자로서의 가치는 유방암환자에서의 다른 인자들과 연계된 연구가 미흡한 실정이다. 몇몇 논문에 의하면 DNA aneuploidy를 보이는 경우에는 DNA diploid cancer에 비교하였을 때 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다(14~16,18~25). DNA ploidy는 SPF와 연관성을 보이는데 종양의 크기가 작을수록 diploidy가 많으며 SPF가 낮다고 하였으며(26) 본연구에서는 종양의 크기가 클수록 diploidy 보다는 aneuploidy가 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 의의는 없었다($p=0.13$). 또한 SPF이 높을수록(median value of SPF=11.2이므로 cutoff value를 11.2로 정했음) aneuploidy가 diploidy에 비하여 현저히 많았다($p=0.00128$). DNA index는 종양생태가 더욱 공격적인 경우나 전이성인 경우 증가되어 있으며 SPF은 원발성 병소보다 전이성 병소의 세포에서 높게 나오는 경향이 있다는 보고도 있다(27). DNA index는 aneuploidy의 양적인 측정인데 편중된 G1:G0 peak를 정상 diploid peak의 channel number로 나눈값이다. DNA index가 1.0이라는 것은 정상염색체로 구성되어있다는 의미가 아니라 diploidy와 구분이 안된다는 의미이며 DNA index가 2.0이라는 것은 G2 cell, tetraploid cell이나 aneuploid cell로 되어 있을 가능성이 있어 tetraploid와 구분이 안된다는 의미이다(28). G2 + M peak는 G1:G0 peak의 channel number의 2배인데 이는 이 시기의 nucleus DNA가 2배이기 때문이

다. DNA index(DI), aneuploid stemline의 diploid cell과 비교한 상대적인 DNA 함량 및 SPF은 예후인자로서의 가치가 있는 것으로 알려져 있다(14, 15,19,24). 그러나 DNA ploidy는 유방암환자에서 multivariate analyses를 하였을 때 가장 중요한 예후인자로 나타나지는 않으며(20,23,25,29,30) DI와 SPF의 조합이 유방암의 중요한 예후인자로 알려진 논문도 있다(15). Cornelisse등은 diploid cancer에서의 survival advantage는 아주 적으며 aneuploid tumor이면서 $DI < 1.4$ 인 경우를 diploid tumor와 묶어서 보았을 때 예후가 좋다고 하였다(20). S-phase fraction은 mitosis의 과정중 G0/G1 phase에서 G2M phase의 전환기의 중간단계에 있는 세포의 수를 계산한 것으로 proliferation의 정도를 반영하는 것으로 볼 수 있는데 일반적으로 예후가 좋을 것으로 예측되는 estrogen receptor, progesterone receptor 양성의 경우 이 두 수용체 음성인 경우보다 SPF이 낮은 것은 이 수용체의 양성인 경우 호르몬 치료에 반응을 잘하는 점외에도 그 자체가 예후의 영향을 미치는 인자로 볼 수도 있으며 본 연구에서도 estrogen receptor 양성시 SPF가 낮은 경향을 보였다($p=0.115$). 또한 이에 대한 간접적인 추정으로서 SPF이 높은 호르몬 수용체 음성의 경우 proliferation rate가 빠른 세포가 chemotherapy에 반응이 좋을 것이라는 가설에 비추어 볼 때(31) 비록 조기이지만 다른 예후인자들과 연관을 지어 이러한 환자는 좀더 주의깊게 관찰하거나 조심스럽게 항암요법의 투여여부를 생각해 볼 수도 있다. 림프절 전이 여부는 현재까지 알려진 가장 강력한 예후인자의 하나로 되어있다. 림프절전이 없는 환자에서의 연구는 재발 위험군의 선별을 위한 연구가 활발한데 Clark등은 high SPF를 가지는 환자의 경우 low SPF에 비하여 무병생존율이 낮아지며 특히 diploid의 경우에 비하여 aneuploid의 경우는 통계학적 의의가 강하게 나타났으며(32) O'Reilly등은 림프절전이가 없더라도 종양의 크기가 1 cm 이하이면서 SPF가 10% 이상인 경우가 10% 이하인 경우에 비하여 재발률이 높으므로 추가치료의 기준이 될

수있다고 하였다(33). Kallioniemi등은 림프절전이 가 없는 경우 diploid의 경우가 aneuploid에 비하여 생존율이 좋다고 하였고(18) 많은 연구자들이 SPF가 높은 경우 무병생존율이 낮아진다고 하였다(16,34). 본 연구에서도 SPF이 높을수록 림프절 전이가 많았으며 이를 기초로 림프절전이가 현재는 없더라도 SPF이 높고 aneuploidy 이면 과연 앞으로 전이가 될 가능성이 많은점을 예고하는 지표가 되는지는 좀더 장기적인 추적결과를 기다려야 할것으로 보이며 만약 이것이 증명된다면 조기유방암이면서도 20%의 사망률을 보이는 추가적인 치료가 필요한 환자군을 선별하는데 도움이 되리라 예상된다. 그러나 성급한 약물의 투여는 불필요한 환자의 고통을 가중시킬 수 있으므로 이의 감별을 위한 검사방법의 개발 및 확립을 해야할 필요성이 있다.

저자들의 연구에서 differentiation의 단계와의 연관성에서 Bcl-2와 종양세포의 differentiation과는 연관성이 많은 것으로 나왔으나(35) 본연구에서는 SPF과 Bcl-2, SPF과 tumor differentiation과는 연관성이 없는 것으로 나왔다. 림프절전이가 없는 경우 Bcl-2가 p-53과 역상관관계를 보이며 예후와 밀접한 관련을 보이지만 림프절전이가 있는 경우는 Bcl-2와 p-53의 역상관관계가 상실되며 예후인자로서의 영향도 p-53에 의하여 없어지는 Bcl-2의 예에서도 알 수 있듯이 항상 동일한 결과만을 보이지는 않을 수도 있어 이의 응용에 더욱 신중을 기해야 할 것이다(36,37). Growth factor나 growth factor에 대한 receptor가 증가된 경우도 mitotic activity가 증가되어 있는데 이는 prognostic value가 있는 것으로 알려져 있어 Epidermal growth factor receptor (EGFR)가 많이 연구되었는데 초치료 후 재발되기까지의 기간이 짧고 estrogen receptor 양성이라도 호르몬치료에 반응률이 낮은 것으로 나와 이의 연관연구도 유용할 것으로 판단된다.

또한 DNA flow cytometry의 SPF의 산출에는 여러 가지 문제점이 있는데 paraffin 포매 조직에서의 SPF가 신선조직에서의 값과 유사하며(38)

DNA histogram에서 산출한 SPF 값이 thymidine labelling과 bromodeoxyuridine incorporation techniques과 연관성이 많다고는 하나(14,38) nuclear debris가 방해가 되어 S-phase의 관측이 용이하지 않은수가 있고 DNA stemline의 overlapping으로 방해받는 경우도 있다. S-phase가 부정확한 이유는 early S-phase가 G1에, late S-phase는 G2에 overlap되기 때문이다. Diploid histogram의 경우 stromal and inflammatory cell이 G0/G1 peak에 더해져서 diploid cancer cell의 실제 SPF 보다 작게 나올 수도 있다. 가장 큰 문제점은 각 기관별, 각 연구자별 관점의 차이로 인한 cutoff value의 상이성으로 이는 각연구기관마다 reproducible data의 완성을 위한 지침이 마련되어야 할 것이며 cell debris, background material 으로 인한 오차율을 줄이는데 노력해야 할 것으로 생각된다. 향후 더욱 많은 환자군과 장기간의 추적결과를 위한 다기관 공동연구가 바람직할 것으로 보인다.

결 론

유방암에서 DNA flowcytometry 분석상 diploidy (34.5%)보다는 aneuploidy(65.5%)가 많았으며 S-phase fraction의 중앙값은 11.2%이었고 aneuploidy의 경우 diploidy에 비하여 높은 SPF 수치를 보였다($p < 0.05$). 또한 림프절 전이가 있는 유방암의 경우 전이가 없는 경우에 비하여 높은 수치의 SPF 수치를 보여($p < 0.05$) DNA 함량의 변화가 기존의 예후인자들과 연관성을 가지면서 측정가능한 예후인자로서 가능성이 있음을 알 수 있었다. 예후적 가치를 위한 연구에서 DNA ploidy나 S-phase fraction에 따른 생존율 및 무병생존율은 aneuploidy이거나 high SPF의 경우가 diploidy나 low SPF에 비하여 통계적 유의성은 없었지만 높은 수치를 보여 좀더 장기간의 추적조사를 통하여 예후인자 및 예측인자로서의 역할을 알 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. *Cancer* 1978; 41: 1170-8.
2. Bloom HJG, Richardson WW. Historical grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 358-377.
3. Frierson HF. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flowcytometry of invasive adenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 358-67.
4. Page DL. Prognosis and breast cancer: recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 334-49.
5. Mansour EG, Gray R, Shatila AH, Osborne CK, Tormey DC, Gilchrist KW, Cooper MR, Falkson G. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high risk node negative breast cancers: an Intergroup Study. *N Engl J Med* 1989; 320: 485-90.
6. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 355-66.
7. Styblo TM, Wood WC. Adjuvant chemotherapy in the node-negative breast cancer patient. *Surg Clin North Am* 1996; 76: 327-41.
8. McGuire WL. Adjuvant therapy of node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989; 320: 525-7.
9. Russo J, Frederick J, Ownby HE, Fine G, Hussain M, Krickstein HI, Robbins TO, Rosenberg B. Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 123-31.
10. Lee HD, Soh EY, Chi HS, Kim BR, Lee KS, Song KS, Jung HJ. Thymidine labelling index in breast tumors. *Jpn J Surg* 1990; 20: 180-5.
11. Meyer JS, Friedman E, McCrate MM, Bauer WC. Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labelling. *Cancer* 1983; 51: 1879-86.
12. Silvestini R, Daidone MG, DiFronzo G, Morabito A, Valagussa P, Bonadonna G. Prognostic implication of labelling index versus estrogen receptors and tumor size in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1986; 7: 161.
13. Tubiana M, Pejovic MH, Chavaudra N, Contesso G, Malaise EP. The long term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *Int J Cancer* 1984; 33: 441-5.
14. Meyer JS, Coplin MD. Thymidine labelling index, flow cytometric S-phase measurement, and DNA index in human tumors. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 586-95.
15. Eskelinen MJ, Pajarinen P, Collan Y, Pesonen E, Alhava E, Kettunen K, Nordling S. Relationship between DNA ploidy and survival in patients with primary breast cancer. *Br J Surg* 1989; 76: 830-4.
16. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-33.
17. Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. DNA flowcytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988; 61: 420-7.
18. Kallioniemi O-P, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, Koivula T. Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 56: 637-42.
19. Stal O, Wingren S, Carstensen J, Rutqvist LE, Skoog L, Klintonberg C, Nordenskold B. Prognostic value of DNA ploidy and S-phase fraction in relation to estrogen receptor content and clinicopathological variables in primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25: 301-9.
20. Cornelisse CJ, Velde van de CJH, Caspers RJC, Moonlenaar AJ, Hermans J. DNA ploidy and survival in breast cancer patients. *Cytometry* 1987; 8: 225-34.
21. Coulson PB, Thornthwaite JT, Woodley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D. Prognostic indicators including DNA histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 1984; 44: 4187-96.
22. Ewers S-B, Langstrom E, Baldetop B, Killander D. Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinoma and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984; 5: 408-19.
23. Hedley DW, Rugg C, Ng ABP, Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44: 5395-8.
24. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4729-35.
25. Linden van der JC, Lindeman J, Baak JPA, Meijer CJLM, Herman CJ. The multivariate prognostic fac-

- tors in primary breast cancer patients. *Cytometry* 1989; 10: 56-61.
26. Silvestrini R, Costa A, Veneroni S, Del Bino G, Persici P. Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21: 123-31.
 27. Haghbin M, McCue PA, Mansfield CM, Komarnicky LT, Benammar A, Schwartz GF. Correlation of flow cytometry to clinical factors, hormone receptors, and histopathological grade in stage I and II invasive breast carcinoma. *Am J Clin Oncol(CTT)* 1996; 19: 54-8.
 28. Bauer KD. *Clinical flow cytometry: Principles and application*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1993, p 118.
 29. Dowle CS, Owainati A, Robins A, Burns K, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 74: 133-6.
 30. Muss HB, Kute TE, Case LD, Smith LR, Booher C, Long R, Kammire L, Gregory B, Brockschmidt JK. The relation of flow cytometry to clinical and biologic characteristics in women with node negative primary breast cancer. *Cancer* 1989; 64: 1894-900.
 31. Remvikos Y, Beuzeboc P, Zajdela N, Voillemot N, Magdelenat H, Pouillart P. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1383-7.
 32. Clark GM, Mathieu MC, Owens MA, Dressler LG, Eudey L, Tormey DC, Osborne CK, Gilchrist KW, Mansour EG, Abeloff MD. Prognostic significance of S-phase fraction in good risk, node negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1992; 10: 428-32.
 33. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Rubens RD, Richards MA. Node negative breast cancer: prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J Clin Oncol* 1990; 8: 2040-6.
 34. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Ferno M, Killander D, Olsson H. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1045-53.
 35. Lee HD, Koo JY, Jung WH. Correlation of Bcl-2 expression with clinicopathological features in breast cancer(abstract). *Breast Can Res Treatment* 1996; 41: 251.
 36. Silvestrini R, Benini E, Veronesi S, Daidone MG, Tomasic G, Squicciarini P, Salvadori B. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1604-10.
 37. Silvestrini R, Veroni S, Daidone MG, Benini E, Borscchi P. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 499-504.
 38. Alanen KA, Klemi PJ, Joensuu H, Kujari H, Pekkala E. Comparison of fresh, ethanol preserved, and paraffin embedded samples in DNA flow cytometry. *Cytometry* 1988; 10: 81-5.