

위암의 DNA 배수성과 휴지기 세포 분획의 임상 및 병리적 연관성

연세대학교 의과대학 외과학교실, 임상병리학교실*

하현수 · 노성훈 · 이정운* · 민진식

= Abstract =

The Clinicopathological Correlations of DNA Ploidy and S-phase Fraction in Gastric Carcinoma

Hyun Su Hah, M.D., Sung Hun Noh, M.D., Jung Woon Lee, M.D.* and Jin Sik Min, M.D. F.A.C.S.

Department of Surgery and Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background/Aims: Previous studies have shown that clinicopathological findings are correlated with the DNA ploidy and S-phase fraction analyzed by flow cytometry in malignant tumors such as breast and colorectal cancer. We studied the clinicopathological correlations of DNA ploidy and S-phase fraction in gastric carcinoma. **Methods:** DNA flow cytometry was performed using fresh tissue in 188 patients who underwent gastrectomy from Aug. 1993 to Feb. 1995. The DNA ploidy and S-phase fraction were correlated with various clinicopathological findings in a retrospective manner. **Results:** The incidence of DNA aneuploid was 31.9%. DNA aneuploidy was more frequently associated with male patients and with antral location($p=0.001$ & $p=0.04$). Moderately differentiated adenocarcinoma had a significantly higher frequency of DNA aneuploid than the other histologic type($p=0.007$). The overall mean of S-phase fraction was 10.0%. The mean for diploid group was 6.3% and that for aneuploid group 17.6%. Higher S-phase fraction($\geq 11\%$) was associated with aneuploid, antral location, moderately differentiated adenocarcinoma, and the group with more than 4 metastatic lymph nodes. **Conclusions:** DNA aneuploidy and S-phase fraction of gastric carcinoma were significantly correlated with various clinicopathological findings. Further studies on correlations with long-term results such as recurrence and survival rate will be required to establish DNA aneuploidy and S-phase fraction as a significant biological marker in gastric carcinoma. (*Korean J Gastroenterol 1995;27: 536 - 545*)

Key Words: Gastric cancer, Flow cytometry, DNA ploidy, S-phase fraction

접수: 1995년 7월 22일, 승인: 1995년 10월 3일

연락처: 노성훈, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 외과

서 론

조직 세포의 DNA의 이수배수성(aneuploidy)은 유전성 질환이나 악성 종양에서 매우 가변적이고 비정상적인 DNA와 염색체 함량을 가진 상태를 가리킨다. 지난 20년간 단일 세포의 정성분석(qualitative analysis)이 가능한 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용해 종양조직 세포의 이수배수성에 관한 임상 및 조직 병리학적 측면의 연구가 광범위하게 진행되어 왔다. 종양조직 세포에서 DNA의 이수배수성은 그 빈도가 17%에서 많으면 100%까지 보고하기도 하나,¹ 생물학적인 과격성을 반영하는 임상적인 표식 인자로서는 아직 확립된 것이 없다.² 대장암³이나 유방암⁴ 및 방광암⁵ 등에서 종양세포의 DNA의 이수배수성과 DNA 합성이 일어나는 휴지기의 세포분획을 측정하는 DNA의 함량분석은 임상 및 병리학적 소견들과 수술 후 전이, 재발 등의 예후와 일정한 연관이 있는 것으로 보고 되었다. 위암의 경우 DNA의 이수배수성과 휴지기 세포분획이 위암 절제술후의 생존율과 관련 있고 이수배수체는 두배체(diploid)보다 장막 전이 및 간, 복막, 림프절 전이가 의미 있게 많은 것으로 보고했고,⁶ 병리학적 병기와 DNA의 이수배수성이 연관 있고 이수배수체가 두배체 보다 남자에게서 많고 위-식도 접합부 및 분문에서 발생한 위암에서 의미 있게 많은 것으로 발표하기도 했다.⁷ 또 다른 연구자들은 앞에서 보고한 것과는 다르게 DNA의 이수배수성과 임상 및 병리학적 결과들이 별로 관련 없는 것으로 보고하기도 했다.⁸ 이에 저자들은 위암 절제술을 받은 환자에서 위암 조직세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포 분획이 임상소견 및 병리학적 결과들과 어떤 연관성을 가지는지 조사하기로 했다.

대상 및 방법

1. 대 상

1993년 8월부터 1995년 2월까지 연세대학교 의과대학 신촌 세브란스병원 외과에서 위암 절제술을 받은 환자중 유세포 분석기로 DNA 함량 분석을 시행

한 188예를 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 검 체

환자의 검체는 위암 절제술을 시행한 즉시 종양의 변연부위를 채취하여 신선 조직을 기계적인 방법으로 단일 세포 부유액을 만들었다. 표준 참고물질로 사람의 말초 혈액내 단핵구의 DNA를 사용하기 위해 건강한 성인으로부터 400ml를 헌혈 받아 HISTOPAQUE-1077[®] (Sigma diagnostics, St. Louis, MO, U.S.A.)을 사용해서 분리하였다. 분리된 단핵구는 구연산 완충액에 2×10^{10} /ml로 세포수를 맞추어 분주하였다. 참고물질은 검사하기 전까지 영하 70℃에서 냉동 보관하였다.⁹

2) DNA 함량 분석

DNA 함량검사를 위한 유세포 분석기는 FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.)을 사용하였고 DNA 분석 프로그램은 CellFIT[™] (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.)를 사용하였다. 종양 조직은 절제후 바로 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, pH 7.6)가 담긴 petrit dish에서 칼로 조직을 얇게 썰어 세포를 분리하였고 검체를 바로 처리할 수 없을 때에는 RPMI 1640 medium(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.)에 넣어 냉장 보관하였다가 처리하였다. 처리된 조직 검체는 100 μ m nylon mesh(Spectrun, Houston, Texas, U.S.A.)로 여과하여 얻은 세포 부유액에 인산염 완충 식염수를 넣고 1,800 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 버린 후 세포 침전물을 다시 인산염 완충 식염수로 부유시켜 세척하였다. 이렇게 얻은 세포 침전물을 인산염 완충 식염수 1ml을 넣어 다시 부유시킨 후 혈구계(hemocytometry)를 이용하여 세포 수를 계산 하였다. DNA 염색방법은 Vindelov 등¹⁰이 고안한 염색 용액 A(stock sol. 100 ml, trypsin 3 mg-Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.), B (stock sol. 100 ml, trypsin inhibitor 50 mg, ribonuclease A 10 mg-Sigma Chemical Co, St Louis, MO, U.S.A.)와 C (stock sol. 100 ml, propidium iodide 41.6 mg, spermine tetrahydrochloride 116 mg-Sigma Chemical Co,

St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하였다. DNA 염색은 세포 수를 1×10^6 /ml로 맞춘 세포 부유액에 염색 용액 A 1.8 ml 을 첨가하여 섞고 실온에서 10분간 방치후, 용액 B 1.5 ml을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 10분간 반응시켰다. 다시 냉장 보관 된 용액 C 1.5 ml을 첨가하고 propidium iodide의 빛 차단을 위해 시험관을 알루미늄 호일로 감싸 분석하기 전까지 냉장 보관하였다가 사람 단핵구를 가지고 영점조절을 한후 유세포 분석기를 저유속도로 맞추고 세포수가 20,000개가 될 때까지 작동시켜 DNA 히스토그램을 얻었다.

3) DNA 지수, 휴지기 세포분획 및 임상소견 및 병리 결과와의 비교

DNA 히스토그램에서 종양 조직세포의 G0/G1 peak의 변이계수가 8이하인 것만 채택하였고 DNA 지수는 종양 조직 세포주기의 G0/G1 peak channel 수를 정상 조직세포의 G0/G1 peak channel 수로 나누어 구했고, DNA 지수가 0.96에서 1.04까지를 두배체로 간주하였고 나머지를 이수배수체로 간주하였다.¹¹ 휴지기 세포 분획은 분석된 종양 조직세포의 세포주기를 구해 전체 종양 세포에서 휴지기 종양세포가 차지하는 백분율을 구했다. 임상 소견으로 성별 및 나이를 구했고 조직 병리 소견으로 위암의 육안소견, 병소 위치, 병소 크기, Lauren과 Ming의 조직학적 분류, 세계보건기구의 조직학적 분류, 병소의 침윤도, 림프절 전이 양상, 원격전이 여부, 병기, 암의 정맥 및 림프관 침습 유무, 전이 된 림프절의 개수, 절제된 림프절 전체에서 전이 된 림프절이 차지하는 백분율 등을 구했다. 구해진 두배체 집단과 이수배수체 집단 및 휴지기 분획을 11.0%를 기준으로 하여 그 이상인 고분획 집단과 그 미만인 저분획 집단으로 나누어 각각 임상소견 및 조직병리 소견과의 상관관계를 보았다. 자료의 분석 처리는 SAS 프로그램을 이용하였다.

결 과

1) 연령 및 성별 분포

평균 연령은 55.4세 였고 남자가 125예, 여자가 63예 이었다.

2) DNA 히스토그램에서 위암세포의 G0/G1 Peak의 변이계수

총 검체의 변이계수는 평균이 3.8(범위 0.5~8.0)이었다.

3) 위암 세포의 DNA 배수성

총 188예의 환자 중 두배체는 128예(68.1%)이고 이수배수체는 60예(31.9%)이었다. 이수배수체 중에서 simple hyperdiploid($1.04 < DI \leq 1.9$)는 48예, near tetraploid($1.9 < DI \leq 2.1$)는 5예, hypertetraploid($DI > 2$)는 3예, multiploid(multimodal G0/G1 peak)는 4예이었다. DNA의 이수배수성은 나이가 60세 이상에서 많았으나 통계학적인 의의는 없었고 위암의 육안소견, 병소 크기, Lauren과 Ming의 조직학적 분류, 병소의 침윤도, 림프절 전이 양상, 원격전이 여부, 병기, 암의 정맥 및 림프관 침습 유무, 전이 된 림프절의 개수, 절제된 림프절 전체에서 전이 된 림프절이 차지하는 백분율등과는 별 상관성이 없었으나 남자에서 여자 보다 의미있게 이수배수체가 많았고, 병소의 위치에서 유문 및 전문에서 다른 부위 보다 의미 있게 이수배수체의 빈도가 많았고 세계보건기구의 조직학적 분류의 중분화 관상선암이 다른 형태의 암 보다 의미있게 이수배수체의 빈도가 많았다 (Table 1, 2).

4) 위암 세포의 휴지기 세포분획

총 188예의 환자의 휴지기 세포분획의 평균은 10.0 였고 DNA 함량이 두배체인 암환자 집단에서는 평균이 6.3% 였고 이수배수체 집단에서는 17.6% 였다. 휴지기 세포분획이 11.0% 미만인 저분획 집단은 122예(64.9%)이었고 11.0% 이상인 고분획 집단은 66예(33.1%) 이었다. 휴지기 세포분획 분획은 나이, 성별, 위암의 육안소견, 병소의 크기, Lauren과 Ming의 조직학적 분류, 병소의 침윤도, 림프절 전이 양상, 원격 전이 여부, 병기, 암의 정맥 및 림프관 침습 유무, 절제된 림프절 전체에서 전이된 림프절이 차지하는 백분율등과는 별 상관성이 없으나 휴지기 세포분획이 높은 집단에서 이수배수체가 의미 있게 많았고, 병소의 위치에서 유문 및 전문에서 발생한 암이 다른 부위 보다 의미 있게 휴지기 세포분획이 높았고, 세계보건 기구의 조직학적 분류의 중분화 관상선암에서 다른 형태의 암 보다 높았고 전이 된 림

Table 1. Clinicopathological Correlation of DNA Aneuploid in Gastric Carcinoma(I)

	Frequency of Aneuploid(%)	P-value
Age(yrs)		0.23
< 60	31/109(28.4)	
≥ 60	29/79 (36.7)	
Sex		0.001
Male	50/125(40.0)	
Female	10/63 (15.8)	
Gross findings		0.08
Borrmann I	3/9 (33.3)	
II	11/34 (32.4)	
III	32/95 (33.7)	
IV	3/27 (11.1)	
EGC	11/23 (47.8)*	
Tumor size(cm)		0.50
< 3	10/26 (38.5)	
3~6	27/79 (34.2)	
> 6	23/83 (27.7)	
Tumor location		0.04
EG junction & cardia	2/9 (22.2)	
Body	10/40 (25.0)	
Antrum & pylorus	37/87 (42.5)**	
Diffuse	11/52 (21.2)	
Lauren's classification		0.10
Diffuse	20/75 (26.6)	
Intestinal	17/43 (39.5)	
Mixed	9/17 (52.9)	
Ming's classification		0.60
Infiltrative	24/86 (27.9)	
Expanding	6/14 (42.9)	
Infiltrative & expanding	16/42 (38.1)	
WHO classification		0.007
Papillary	0/2 (0)	
Tubular		
Well differentiated	5/11 (45.5)	
Moderately differentiated	25/45 (55.5)***	
Poorly differentiated	22/89 (24.7)	
Mucinous	3/10 (30)	
Signet ring cell	4/26 (15.4)	
Others	1/5 (20)	

P-value obtained by comparing esterik-marked factor with the others in each item: *0.08, ** 0.004, *** <0.001

Table 2. Clinicopathological Correlation of DNA Aneuploid in Gastric carcinoma(II)

	Frequency of Aneuploid(%)	P-value
Depth of invasion		0.46
Serosa negative	21/59 (35.8)	
Serosa positive	39/129(30.2)	
Lymph node involvement		0.32
Negative	15/56 (26.8)	
Positive	45/132(34.1)	
Distant metastasis		0.69
Negative	58/183(31.7)	
Positive	2/5 (40)	
TNM stage		0.39
Ia+Ib+II	20/71 (28.2)	
IIIa+IIIb+IV	40/17 (34.2)	
Vein invasion		0.44
Positive	10/37 (27.0)	
Negative	38/112(33.9)	
Lymphatic invasion		0.23
Positive	26/70 (37.1)	
Negative	22/79 (27.9)	
Number of metastatic lymph nodes		0.61
0~3	26/89 (29.2)	
4~9	15/48 (31.3)	
≥10	19/51 (37.3)	
% of metastatic LNs/total resected LNs		0.84
0~20%	38/121(31.4)	
>20%	22/67 (32.8)	

프절의 개수가 많을 수록 의미 있게 휴지기 세포분획이 높았고, 특히 4개 이상일 때는 개수가 3개 이하의 집단에서 보다도 더욱 더 의미 있게 휴지기 세포분획이 높았다(Table 3, 4).

고찰

위암에서 절제술 후 생물학적인 과격성을 나타내는 임상 지표로 위암의 장막 침습, 림프절 전이, 복막 전이, 간전이, 원격 전이 등은 이미 확립되어 있다. 유세포 분석기로 얻어진 DNA 이수배수성과 휴

Table 3. Clinicopathological Correlation of S-phase Fraction in Gastric Carcinoma(I)

	Frequency of High phase fraction(%)	P-value
Age(yr)		0.48
< 60	36/109(33.0)	
≥ 60	30/79 (38.0)	
Sex		0.3
Male	47/125(37.6)	
Female	19/63 (30.2)	
Gross findings		0.88
Borrmann I	3/9 (33.3)	
II	14/34 (41.2)	
III	32/95 (33.7)	
IV	8/27 (29.6)	
EGC	9/23 (39.1)	
Tumor size(cm)		0.77
< 3	9/26 (34.6)	
3~6	30/79 (38.0)	
> 6	27/83 (32.5)	
Tumor location		0.01
EG junction & cardia	2/9 (22.2)	
Body	12/40 (30.0)	
Antrum & pylorus	41/87 (47.1)*	
Diffuse	11/52 (21.2)	
Lauren's classification		0.63
Diffuse	26/75 (34.7)	
Intestinal	16/43 (37.2)	
Mixed	8/17 (47.1)	
Ming's classification		0.15
Infiltrative	31/86 (36.0)	
Expanding	9/14 (64.3)	
Infiltrative & expanding	13/42 (31.0)	
WHO classification		0.14
Papillary	1/2 (50.0)	
Tubular		
Well differentiated	2/11 (16.2)	
Moderately differentiated	24/45 (53.3)**	
Poorly differentiated	29/89 (32.6)	
Mucinous	3/10 (30.0)	
Signet ring cell	6/20 (23.1)	
Others	1/4 (25.0)	

P-value obtained by comparing esterik-marked factor with the others in each item: *0.001, ** 0.0039

Table 4. Clinicopathological Correlation of S-Phase Fraction in Gastric Carcinoma(II)

	Frequency of High phase fraction(%)	P-value
Depth of invasion		0.37
Serosa negative	24/59 (40.7)	
Serosa positive	42/129(32.6)	
Lymph node involvement		0.27
Negative	17/56 (30.3)	
Positive	49/132(37.1)	
Distant metastasis		0.82
Negative	64/183(35.0)	
Positive	2/5 (40.0)	
TNM staaage		0.54
Ia+Ib+II	23/71 (32.4)	
IIIa+IIIb+IV	43/117(36.8)	
Vein invasion		0.39
Positive	11/37 (29.7)	
Negative	42/112(37.5)	
Lymphatic invasion		0.29
Positive	28/70 (40.0)	
Negative	25/79 (31.7)	
Number of metastatic lymph nodes		0.04
0~3	23/89 (25.8)*	
4~9	22/48 (45.8)	
> 10	21/51 (41.2)	
% of metastatic LNs/ total resected LNs		0.43
0~20%	25/79 (31.7)	
> 20%	41/109(38.8)	
Ploid		<0.001
Aneuploid	44/60 (73.3)	
Diploid	22/105(21.9)	

P-value obtained by comparing esterik-marked factor with the others in each item: *0.01

지기 세포 분획의 임상 지표와의 연관성은 현미경에 의존하는, 기존의 조직병리학 분야에서 보다 미시적인 접근방법으로 널리 받아 들여져 광범위하게 연구 되어 왔다. 하지만, DNA 이수배수성과 휴지기 세포 분획이 임상 및 병리학적인 결과들과의 연관성이 제기되었으나, 그 결과들의 불일치성으로 인해 아직

정설로 확립된 것은 없다.

본 연구에서 이수배수체가 나이가 60세 이상에서 빈도가 높았으나 통계학적인 의의가 없었으며, 남자에서 많고 유문에서 발생한 암에서 빈도가 높고 세계보건 기구의 조직학적 분류에서 중등도의 분화를 가지는 관상선암에서 많았다. 또 휴지기 세포 분획은 성별에는 관계가 없었으나, 이수배수체에서 높고 역시 유문에서 발생한 암에서 높고 중등도로 분화된 관상선암에서 분획이 높은 것으로 밝혀 졌다. 특이한 것은 전이된 림프절의 개수와 휴지기 세포 분획의 상관관계에서 0~3개, 4~9개, 10개 이상의 세 집단간에서 각각 휴지기 세포분획과 의미있는 상관 관계를 나타냈고 특히 4개 이상의 림프절 전이시 3개 이하의 집단 보다 높은 휴지기 세포분획을 보였다.

이 결과는 이수배수체와 휴지기 세포분획이 어느 정도 일정하게 세포의 분화도에 관계하고 종양의 위치에 따라서 영향을 받는 것을 말한다. 비록 휴지기 세포 분획이 국소 림프절 전이 여부와는 관계 없고, 림프절의 전이 개수에 따라 의미 있게 높은 것은 시사하는 바가 있다. 즉 한 종양의 증식 활동도를 반영하는 휴지기 세포분획의 증가는 진행된 악성 종양에서 림프절 전이가 어느 정도 이상 있게 되면 종양 세포의 DNA 자기복제가 활발하게 이루어져 생물학적으로 과격한 양상을 띠게 된 것을 반영한다고 하겠다.

이 등¹²은 위암 절제술을 받은 164예의 신선 검체에서 실시한 연구에서 이배수체가 79예(48%) 이었고 육개월 동안의 10% 이상의 체중 감소를 보인 집단에서 많고 중등도로 분화된 관상선암에서 빈도가 많은 것으로 보고했다. 휴지기 세포 분획은 심한 체중감소 및 전신 활동도가 나뉘었던 환자군에게서 높고 병리학적으로는 분화가 나쁜 관상선암에서 높은 것으로 보고했다. Baretton 등¹³은 125예의 위암 절제술을 받은 환자의 파라핀 포매 조직에서 시행한 DNA 배수성 분석에서 이수배수체가 전체적으로 34%이고 분문에서 발생한 암에서 많고 Lauren의 조직학적 분류가 장형과 혼합형에서 많고 국소 림프절 전이가 있는 집단에서 높은 것으로 보고했다.

Carini 등¹⁴은 59예의 위암 절제술을 받은 환자의 파라핀 포매 조직에서 시행한 DNA 배수성 분석에서 이수배수체가 44%이고 장막전이나 림프절 전이

가 있는 군과 진행성 위암(stage III-IV)에서 높은 것으로 나타났다. Shen 등¹⁵은 104예의 위암 절제술을 받은 환자의 파라핀 포매조직에서 원발 병소와 전이된 림프절에서 구한 이수배수체가 각각 36.5%와 31.0% 이고 원발 병소의 이수배수체는 60세 이상에서와 림프절 전이가 있는 군에서 많고 전이된 림프절의 이수배수체는 원발 병소의 장막전이가 있는 경우에 높은 것으로 보고했다. Rugae 등¹⁶은 위암 절제술을 받은 76예 환자의 파라핀 포매 조직에서 이수배수체가 54예(71%) 이고 Ming의 조직학적 분류에서 침습형과 확장형에서 림프절 전이가 있는 경우와 장막 전이가 있는 경우에 이수배수체가 많고 나이가 56세 이상에서 많은 것으로 보고했다.

위암세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포 분획의 임상 소견 및 조직 병리학적인 결과들과의 연관성에 관한 여러 연구들의 상이성은 큰 문제점으로 제기되어 왔다. 이렇게 연구결과가 다른 것에는 여러 가지 원인이 있을 수 있으나 위암 세포자체의 이질성이나 활동양식 차이 등과 같은 종양의 생물학적 요인이나 DNA 함량 분석의 기술적 요인이나 연구자들의 결과 해석 차이 등의 연구방법론의 문제로 대별할 수 있다. 실제로 DNA 함량 분석결과가 검사실간과 검사실내의 유의한 차이가 있음이 보고되었다.^{17,18,19,20} 이러한 결과 불일치의 많은 원인은 기술적 요인으로 분석전 변수와 유세포분석기의 성능이 관여될 수 있으며,²¹ 검사실내와 검사실간의 동일 조직에 대한 검사결과와 신뢰도와 재현성을 확보하기 위해 조직 검체의 전처리 과정과 결과 분석에 표준화 과정이 필요하다고 하겠다.²²

실제로 조직 검체의 전처리 과정에서 분석하고자 하는 조직세포를 산성 또는 고농도의 이온 용액으로 처리하느냐 아니면 단백 분해효소로 처리하느냐에 따라라도 분석 결과에 차이가 생길 수 있다.²³ 홍 등⁹은 DNA 함량 검사의 분석전 표준화로 영점 조정의 변화에 의한 영향을 배제하기 위해 외부 참고 물질 보다는 DNA 함량이 사람과 비슷한, 서로 다른 두 종류의 내부 참고 물질을 사용해야 하며 검체의 전처리 방법과 염색방법에 따른 결과 차이가 없어야 검사실간 또는 검사실내의 분석 결과에 차이가 없을 것으로 발표하였다. 아울러 염색 후 검사는 늦어도

24시간 이내에 시행해야 하고 결과 해석에 있어서도 조직검체에서 실제로 측정된 두배체 channel이 추정된 값과 차이가 있음을 고려해야 정확한 DNA 함량 분석 결과를 얻을 수 있을 것으로 제안하였다.

특히 휴지기 세포분획을 측정하는 데는 혼란이 생길 수 있는데, 그것은 DNA 히스토그램에서 휴지기 영역을 정의하는 문제 때문에 발생한다. 이 문제는 DNA 히스토그램에서 G0/G1, S 및 G2 등의 각 세포주기 집단이 서로 중복되는 가우스 분포를 하기 때문에 생긴다. 이 문제를 해결하기 위해 많은 수학적 모델이 개발되었으나 실제 영역과의 일치성이 보장되지 않고 여러 가지 다른 수학적 모델로 같은 종양을 분석하여 얻은 결과들의 상이성으로 인해 만약 한 종양이 휴지기 세포 분획이 10% 미만일 때는 분석 결과가 2~3%만 차이가 나도 결과는 크게 달라질 수도 있다. 마찬가지로 이수배수성 종양을 분석할 때도 혼란을 가져올 수 있는데, 그것은 큰 G0/G1 집단이 대개 두배체 휴지기 집단과 분포가 겹치는 것은 물론 두배체의 G2-phase 집단이 이수배수체의 휴지기 집단과 분포가 중복되기 때문이다.²

그 밖에 검체자체도 문제가 될 수 있는데 신선 검체를 사용하느냐 검체를 단일 세포부유액으로 만든 후 그대로 일정한 시간 동안 냉동보존 후 검사하느냐 아니면 메탄올, 에탄올 또는 포르말린 등의 고정제를 이용하여 보존한 후 검사하느냐 거기에도 파라핀 포매를 첨가하느냐 혹은 조직자체를 그대로 냉동보존할 지 등의 검체보존법이 DNA 함량 분석 결과에 영향을 미치는 것으로 보고되었다.^{24,25} 그 중에서 단일세포 부유액을 그대로 냉동보존하는 방법이 신선 검체를 가지고 검사한 결과와 차이가 없고 최소한 1년 이상 보관이 가능한 것으로 보고되었다.²⁶ 위암 조직세포의 성상(nature)과 활동 양식도 DNA 함량 분석 결과에 영향을 줄 수 있는데, 그 중에서도 먼저 종양 세포의 이질성²⁷을 들 수 있다.

Umehara 등²⁸은 12예의 조기 위암 환자와 26예의 진행성 위암환자에서 종양의 변연부에서 체계적으로 다발성 채취를 하였는데, 조기 위암은 표층(3 mm 깊이 이하)에서 네 곳 이상, 진행성 위암은 표층과 심층(5 mm 깊이 이상)에서 각각 네 곳 이상 실시하여 총 230개의 검체를 가지고 DNA 함량 분석을 하였

다. 그 결과 조기 위암은 58%에서 같은 종양조직이 모두 다 두배체였고 42%에서는 모두 다 이수배수체였다. 반면 진행성 위암에서는 표층에서는 종양 세포의 이질성이 없으나 심층에서는 50%가 이수배수체이고 42%가 두배체였지만 8%에서는 두배체와 이수배수체가 뒤섞인 이질적 배수성을 나타냈고 DNA 지수를 기준으로 둘 이상의 이수배수체를 보인 경우는 진행성 위암의 전층에서 46%와 표층에서 19%의 이질적 DNA 지수를 나타냈고, 심지어 조기 위암의 8%도 DNA 지수의 이질성을 보였다. 결론적으로 조기 위암에서의 DNA 배수성 검사는 신뢰할 수 있으나 진행성 위암에서의 DNA 배수성 결정에는 신중을 기해야 할 것을 제안하였다.

Sasaki 등²⁹은 15예의 위암 절제술을 받은 환자와 27예의 대장-직장암 절제술을 받은 환자의 종양조직에서 다발성 채취를 실시하여 같은 종양조직내에서 DNA 배수성의 차이를 위암에서는 40.0%, 대장-직장암에서는 7.4%로 보고하였다. DNA 배수성 검사가 정확하게 되려면 검체를 채취할 때 종양 조직의 여러 부위에서 다발성으로 채취해야 하며 이렇게 해야, 한 종양조직의 일정 부위에 국한된 이수배수체의 아군집을 채취하는 오류를 피할 수 있다고 하였다. 다른 연구자들도 위암에서 종양세포의 이질성을 보고하였고,³⁰ 뿐만 아니라 대장 및 직장암,³¹ 폐암,³² 그리고 유방암³³에서도 종양세포의 이질성으로 인한 DNA 배수성의 차이를 보고하였다. Sasaki 등²⁹은 위암과 대장-직장암에서 DNA 배수성의 상이성의 기전을 두 가지로 제안했는데 하나는 여러 가지의 종양세포가 거리상 가깝지만 서로 다른 접점에서 독립적으로 생겨 발생 과정에서 서로 충돌해 세포융합이 일어나 마치 하나의 세포에서 유래한 것과 같이 된다는 가설이고 또 하나는 첫 세대의 두배체 혹은 이수배수체 clone에서 병의 진행과정에서 종양세포의 불안정성으로 인해 두번째 세대의 clone이 생기고 이 새로운 clone이 하나의 세포계(cell line)를 이루어 마침내 그 종양에서 우위를 차지한다는 가설인데, 두 가설이 모두 가능하기는 하나 DNA 이수배수성의 정확한 기전은 아직 더 연구해야 할 과제로 남겨 두고 있다.

Rew²는 최근 20년간의 유세포 분석기를 이용한

DNA 함량 분석의 연구결과를 종합하면서 배수성은 염색체의 정확한 구조나 배열과는 관계 없고 DNA의 총 함량을 반영할 뿐이며 지금까지 DNA 지수가 최고 3.0인 것이 보고 되었으나, 최대한 얼마까지 가능한 지는 알려진 바가 없고 이수배수체가 생기는 기전으로는 첫째 조절유전자나 종양유전자의 점 돌연변이와 같은 genome의 원발적 이상, 둘째 불안정한 genome 내에서 일어날 수 있는 유전자 증폭이나 염색체 복사, 셋째 생존에 영향을 미치지 않는, 염색체가 불안정한 많은 종양 세포에서 보이는 일시적인 DNA 이상인 cytogenetic noise를 들 수 있다고 했다. 또한 두배체인 악성종양도 생물학적으로 과격한 양상을 띠는 것도 있고 모든 이수배수체 종양에서 두배체가 혼합되어 있기 때문에 이수배수체 자체로서 어떤 종양의 미래의 임상 양상을 예측하기에는 충분하지 않고 더우기 원발성 종양과 전이성 종양 사이의 DNA 배수성의 비교 연구가 부족한 현 시점에서는 이수배수성을 종양의 생물학적 과격성을 나타내는 임상적인 표지인자로 말하기에 아직 역부족이라 했다.

현재로서 DNA의 두배체와 이수배수체는 두 개가 별개의 존재로 인식되기 보다는 미세한 염기 배열의 차이로 나타나는 DNA 돌연변이에서 염색체 전체의 이상을 나타내는 것 사이의 일련의 연속적인 과정의 한 부분으로 인식 되어야 하겠다. 앞으로 DNA 이수배수성을 보다 잘 이해하기 위해서는 고속도 유세포 분석기와 같은 기계 자체의 진보나 polymerase chain reaction이나 *in situ* hybridization 등을 이용한 분자 생물학적인 연구와의 연계가 필요하다고 하겠다. 그 외 p53³⁴과 같은 종양 억제유전자나 c-erb B-2³⁵과 같은 종양 유전자 등도 DNA 이수배수성과 연관되어 있다고 주장하나 아직 정설로 받아 들이기에는 이르다.

결론적으로 말하면 위암 세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포 분획이 여러 가지 조직병리소견 및 임상소견과 연관성은 있으나 하나의 정설로 확립되기까지는 아직 DNA 함량분석 방법의 표준화, 원발암과 전이암과의 비교 연구, 재발, 예후 등의 장기적 임상 소견과의 연관성 및 다른 분자 생물학적 연구와의 연계 등 해결해야 할 과제가 많이 남아 있다고

하겠다

요 약

목적: 위암 세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포분획은 임상 및 병리 소견과 관련 있는 것으로 알려졌으나 아직 정설로 확립된 것은 없다. 저자 등은 위암 절제술을 시행한 환자에서 위암 세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포분획이 임상 및 병리 소견과 어떤 관련이 있는지 알아 보고자 하였다. **대상 및 방법:** 1993년 8월부터 1995년 2월까지 연세대학교 의과대학 신촌 세브란스병원 외과에서 위암 절제술 후 얻은 신선 검체를 유세포 분석기를 이용해 DNA 함량 검사를 한 188예를 대상으로 DNA 히스토그램 및 세포 주기를 구해서 DNA 지수를 기준으로 이수배수체군과 두배체군으로 나누고 휴지기 세포 분획을 기준으로 고분획군과 저분획군으로 양분해 각각 임상 및 병리소견과 비교해 그 연관성을 조사하였다. **결과:** 총 188예의 환자중 DNA 이수배수체는 60명(31.9%) 이었다. DNA 이수배수성은 나이, 위암의 육안 소견, 병소 크기, Lauren과 Ming의 조직학적 분류, 병소의 침윤도, 림프절 전이 양상, 원격 전이 여부, 병기, 암의 정맥 및 림프관 침습 유무, 전이 된 림프절의 개수, 절제된 전체 림프절 중 전이 된 림프절 수의 비율 등과는 통계학적 상관성은 없었으나 남자와 유문에서 발생한 암에서 이수배수체가 많았고 세계보건기구의 조직학적 분류의 중분화 관상선암이 다른 형태의 암 보다 의미있게 이수배수체의 빈도가 많았다. 위암의 휴지기 세포분획의 총 평균은 10.0% 였고, 두배체군의 평균은 6.3% 였고 이수배수체군의 평균은 17.6% 였다. 휴지기 세포분획이 11.0 미만인 저분획군은 122예(64.9%) 이고 11.0 이상인 고분획군은 66예(33.1%) 이었다. 휴지기 세포분획은 나이, 성별, 위암의 육안소견, 병소 크기, Lauren과 Ming의 조직학적 분류, 병소의 침윤도, 림프절 전이 양상, 원격 전이 여부, 병기, 암의 정맥 및 림프관 침습 유무, 전이 된 림프절의 비율 등과 별상관이 없으나 고분획군에서 이수배수체가 의미있게 많았고, 유문에서 발생한 암과, 세계보건 기구의 조직학적 분류의 중분화 관상선암에서 세포분획이

높았고 전이 된 림프절의 개수가 많을 수록 의미 있게 세포분획이 높았고 특히 개수가 4개 이상 일 때 더욱 의미 있게 높았다. 결론: DNA 이수배수체가 성별 및 종양의 위치와 종양 세포의 종류 및 분화도와 관련 있고, 휴지기 세포분획은 이수배수체 및 종양의 위치, 종양 세포의 종류 및 분화도와 전이된 림프절의 개수와 연관된 것으로 나타났다. 하지만 일반적으로 위암 세포의 DNA 이수배수성과 휴지기 세포분획이 임상 및 병리 소견과 관련 되어 하나의 정설로 확립되기까지는 아직 DNA 함량분석 방법의 표준화, 원발암과 전이암과의 비교 연구, 재발, 예후 등의 장기적 임상 소견과의 연관성 및 다른 분자생물학적 연구와의 연계 등 해결해야 할 문제가 많이 남아 있다고 하겠다.

색인단어: 위암, 유세포 분석, DNA 이수배수성, 휴지기 세포분획

참 고 문 헌

1. Sasaki K, Murakami T. Clinical application of flow cytometry for DNA analysis of solid tumors. *Acta Pathologica Japonica* 1992;42:1 - 14.
2. Rew DA. Significance of aneuploidy. *Br J Surg* 1994;81:1416 - 1422.
3. Bauer KD, Bagwell CB, Giaretti W, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1993;14:486 - 491.
4. Hedly DW, Clark GM, Cornillesse CJ, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of breast. *Cytometry* 1993;14:482 - 485.
5. Wheless LL, Badalament RA, de Vere White RW, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1993;14:478-481.
6. Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K, et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1990;50:509 - 514.
7. Nanus DM, Kelsen DP, Niedzwiecki D, et al. Flow cytometry as a predictive indicator in the patients with operable gastric cancer. *J Clin Oncol* 1989;7: 1105 - 1112.
8. Ballantyne KC, James PD, Robins RA, Baldwin RW, Hardcastle. Flow cytometric analysis of the DNA content of gastric cancer. *Br J Cancer* 1987; 56:52 - 59.
9. 홍성근, 조성란, 이정운, 권오현. 유세포분석기를 이용한 DNA 함량 검사에서 분석전 변수의 표준화. 대한 임상병리학회지 1994;14:488 - 499.
10. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3: 323-327.
11. Dressler LG, Bartow. DNA flow cytometry in solid tumors: Practical aspects and clinical applications. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1989;6:55 - 82.
12. Lee KH, Lee JS, Suh CW, et al. DNA flow cytometry of stomach cancer. *Cancer* 1993;72:1819 - 26.
13. Baretton G, Carstensen O, Schardey M, Lohrs U. DNA-ploidy and survival in gastric carcinomas: A flow-cytometric study. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991;418:301 - 309.
14. Carlini M, Garofalo A, Rinaldi G, et al. Gastric cancer cell DNA content correlates with early and late results after gastrectomy. *Int Surg* 1994;79:114 - 119.
15. Shen KL, Chu CH. DNA ploidy and biological aggressiveness of gastric adenocarcinoma in Chinese. *World J Surg* 1994;18:433 - 440.
16. Massimo R, Fulviva S, Marina P, et al. Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis. *Cancer* 1994;73:1127 - 1133.
17. Hitchcock CL. Variability in flow cytometric results using identical archival samples(Abstract). *Cytometry* 1991;5(suppl.):46.
18. Shankey TV, Badalament R, Benson M, et al. An interlaboratory assessment of the reproducibility of flow cytometric DNA content analysis of archival tumor samples(Abstract). *Cytometry* 1991;5(Suppl.): 56.
19. Wheless LL, Coon JS, Cox C, et al. Precision of

- DNA flow cytometry in inter-institutional analyses. *Cytometry* 1991;12:405 - 412.
20. Joensun H, Kallionieemi OP. Different opinions on classification of DNA histograms produced from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1989;10:711 - 717.
 21. Cusick EL, Milton JI, Ewen SWB. The resolution of aneuploid DNA stemlines by flow cytometry: limitations by the coefficient of variation and the percentage of aneuploid nuclei. *Anal Cell Path* 1990;2: 139 - 148.
 22. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472 - 477.
 23. Myc A, Traganos F, Lara J, Melamed MR, Drazynkiwicz Z. DNA stainability in aneuploid breast tumors: Comparison of four DNA fluorochromes differing in binding properties. *Cytometry* 1992;13: 389 - 394.
 24. Alanen KA, Klemi PJ, Joensuu H, Kujari H, Pekkala E. Comparison of fresh, ethanol preserved, and paraffin embedded samples in DNA flow cytometry. *Cytometry* 1989;10:81 - 85.
 25. Van Dam PA, Watson JV, Lowe DG, Chard T, Shepherd JH. Comparative evaluation of fresh, fixed, and cryopreserved solid tumor cells for reliable flow cytometry of DNA tumor associated antigen. *Cytometry* 1992;13:722 - 729.
 26. Vindelov LL, Christensen IJ, Kieding N, Spang-Thomsen M, Nissen NI. Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1982;3:317 - 322.
 27. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984;44:2259 - 2265.
 28. Umehara Y, Kimura T, Yoshida M, Oba N, Harada Y. Heterogeneity in early and advanced gastric carcinoma by flow cytometric DNA analysis. *J. Surg Oncol* 1993;52:97 - 100.
 29. Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino B, Takahashi M. Intratumoral regional differences in DNA ploidy in gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 1988;62:2569 - 2575.
 30. Aretxabata X, Yonemura Y, Sugiyama K, et al. Gastric cancer heterogeneity. *Cancer* 1989;63:791 - 798.
 31. Broterbeck E, von Bassewitz DB, Kleinemeier HJ, Schulte-Brochterbeck E, Hauss J, Lingemann B. DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 1986;58:258 - 263.
 32. Carley FA, Lamb D, Bird CC. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 1990;65:2266 - 2269.
 33. Fuhr JE, Frye A, Kattine AA, Meter SV. Flow cytometric determination of breast tumor heterogeneity. *Cancer* 1991;67:1401 - 1405.
 34. Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S. Detection of frequent p 53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation. *Cancer Res* 1991;51:3056 - 3058.
 35. Noguchi Y, Tsuburaya A, Makino T, et al. Predictive value of c-erb B-2 and DNA ploidy patterns in gastric carcinoma recurrence. *Int Surg* 1993;78:107 - 111.