

## 대장선암에서 유세포 측정과 은기호성 염색법을 이용한 비교 연구

서울적십자병원 일반외과 및 고려대학교 의과대학 일반외과학교실\*

김 재 만 · 김 한 선 · 김 세 민\*

= Abstract =

### A Comparative Study of DNA Ploidy Pattern by Flow Cytometry and AG-NORs in Colon Adenocarcinoma

Jae Man Kim, M.D., Han Sun Kim, M.D. and Sae Min Kim, M.D.\*

*Department of General Surgery, Seoul Red Cross Hospital*

*\*Department of General Surgery, Korea University College of Medicine*

In colon adenocarcinoma, it has been well known that the prognosis of the disease depends on the Duke classification, histologic grade and serum CEA level.

To evaluate the relationship between conventional method (cellular differentiation by histologic grade), argyrophilic method (Ag-NORs) and attractive method (flow cytometry), we studied 30 cases of colon carcinoma who were operated at Department of Surgery, Korea University Hospital, from Mar. 1987 to Feb. 1992.

The results were as follows;

1) Of the 30 cases of adenocarcinoma, 21 cases (40%) were DNA aneuploid type.

Diploid type was 83.3% in well differentiate type, 57.2% in moderate differentiate type and 33.3% in poorly differentiate type. There was a positive correlation between type of ploidy and cellular differentiations of colon adenocarcinoma ( $r=0.28$ ).

2) The cytometric S-phase had a significant difference with cellular differentiations of colon adenocarcinoma ( $P=0.05$ ) and cytometric G0/G1 phase and proliferation index had a correlation with cellular differentiations of colon adenocarcinoma ( $r=-0.33$ ,  $r=0.34$ ).

3) In Ag-NORs study, the mean number of Ag-NORs was  $5.68 \pm 3.77$  in aneuploid type and  $3.52 \pm 1.75$  in diploid type. The mean number of Ag-NORs had a significant difference between diploid types and aneuploid types ( $P=0.05$ ).

4) There was a weak correlation between mean number of Ag-NORs and cytometric G0/G1 phase, S-phase and proliferation index ( $r=-0.28$ ,  $r=0.26$ ,  $r=0.28$ ).

5) The cytometric S-phase was  $8.5 \pm 9.0\%$  in diploid type and  $19.9 \pm 11.7\%$  in aneuploid type, G1/G1 phase was  $86.7 \pm 9.8\%$  in diploid type and  $75.6 \pm 11.5\%$  in aneuploid type, proliferation index was  $13.3 \pm 9.8\%$  in diploid type and  $24.4 \pm 11.5\%$  in aneuploid type. The cytometric S phase, G0/G1 phase and proliferation index had a significant difference with ploidy pattern ( $P=0.006$ ,  $0.006$ ,  $0.007$ ).

**Key Words:** Colon adenocarcinoma, Flow cytometry, Ag-NORs

## 서 론

유세포측정법(Flow cytometry)을 이용한 세포측정법은 1930년대에 Moldavan이 처음 시도한 이래 발전해 왔으며 은형광색소를 이용하여 세포측정속도를 가속화하였다<sup>1)</sup>. 유세포측정법은 동종의 세포를 세포 성분에 의한 빛의 굴절, 반사와 회절 및 빛의 소실을 동시에 측정함으로써 세포의 역동학적 분석이 가능하다. 이 방법을 이용하여 세포의 DNA양을 측정하여서 각 세포주기에 있는 세포의 분포를 알 수 있을 뿐 아니라 ploidy의 양상도 같이 알 수 있다고 한다<sup>2-3)</sup>. 한편 핵의 은기호성을 이용한 Ag-NORs 방법은 세포의 핵에 존재하는 염색체 중 nucleolar organizer regions을 colloidal silver nitrate를 이용하여 염색하는 방법으로 세포 분열 능력을 알 수 있다 하였고, 특히 S-phase에 있는 세포들과 밀접한 관계를 갖고 있어 종양 예후 판정에 도움을 준다고 한다<sup>4-6)</sup>.

이와같이 Flow cytometry와 Ag-NORs방법이 종양의 세포증식능력을 표현하지만 양자의 상관 관계에 대한 연구는 드문 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 대장선암의 조직학적 분화도와 Flow cytometry 및 Ag-NORs방법을 시행하여 대장선암의 증식능력을 비교 검토하여 향후 대장선암의 치료지침으로 이용해 보고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 재 료

연구재료는 1987년 3월부터 1992년 2월까지 5년간 고려대학교 의과대학 부속병원 외과에 입원하여 수술 받았던 대장선암 환자 중 30예를 선별하여 연구하였다.

### 2) 비교관찰 방법

대장선암의 조직학적 세포분화도를 고분화선암, 중등도분화선암, 저분화선암으로 나누고 각 군에 따른 Flow cytometry 결과와 Ag-NORs 방법으로 측정된 평균 NORs수를 student t-test(SPSS program, P value), Mann-Whitney test(SPSS program, p value), Pearson 상관계수(Statview 11

program, r value)로서 통계처리하여 유의성을 검증하였다.

### 3) 실험 방법

(1) 조직학적 분화도 검사: 10% Phosphate 완충 포르말린으로 고정되어 파라핀 포매된 조직을 5 $\mu$ m의 두께로 절편을 만들어 Hematoxylin-eosin 염색을 하여 고분화선암, 중등도분화선암, 저분화선암으로 나누어 검토하였다.

(2) DNA 유세포 측정: 환자들의 파라핀 포매된 조직 절편을 5 $\mu$ m 두께로 잘라 염색하여 현미경으로 종양조직이 충분히 포함된 조직임을 우선 확인 한 다음 DNA 분석을 위하여 선택된 파라핀 포매 조직을 50 $\mu$ m 두께로 잘라 13 $\times$ 100 mm 시험관에 넣고 3~4 ml의 HistoClear(National diagnostics, Somerville, NJ)를 넣은후 10분간 방치한다. 이후 53 $\mu$ m Nylon mesh를 통하여 HistoClear를 따라내고 걸른 조직을 다시 시험관에 넣고 100% Ethanol 3~4 ml를 넣고 흔든후 10분간 방치한 다음 이 과정을 다시 한번 되풀이 한다. 95%, 70% Ethanol과 증류수로 동일한 방법을 2회 반복한다. 여기에 0.5% Pepsin 3~4 ml를 넣고 흔든후 37 $^{\circ}$ C에서 30~50분간 부란한다. 부란 후 35 $\mu$ m Nylon mesh를 이용하여 걸러낸 후 1200 rpm으로 10분간 원심 침전후 부유액을 버린다. 여기에 1.0 ml RNase와 Propidium iodide 용액을 넣고 빛과 차단한다. 10분 후 Flow cytometry (FACS Beckton-Dickinson R, USA)로 S-Phase, G0/G1 Phase, G2+M Phase, Proliferation index는 백분율로, G2+M/G1은 비율로 산출하였고 또한 ploidy를 관찰하였다.

### (3) 은기호성 방법:

① 염색방법: 통상적인 포르말린 고정과 파라핀 포매를 거친 조직을 5~6 $\mu$ m의 두께로 절편을 만들어 슬라이드에 부착시킨 다음 Xylene으로 탈파라핀화하고 100%, 95%, 70% 알콜에서 함수시킨다. 증류수에서 함수시킨 슬라이드 전체에 Silver colloid 용액을 고루 덮은 다음 빛을 차단하도록 뚜껑을 덮어 실온에서 40분간 반응시킨 후 증류수로 깨끗이 세척하고 탈수시켜 Glycerine jelly로 봉입한다. Silver colloid 용액은 1% formic acid 용액에 Gelatin을 2%가 되도록 녹인 용액과 50% Silver nitrate 용액의

비율이 1:2가 되도록 섞어 만든다.

② **판정 방법:** 은교질용액으로 염색한 각각의 조직 슬라이드를 광학현미경하에서 1000배율로 관찰하여 세포내에서 진한 갈색으로 염색된 Ag-NORs의 수를 세어 세포당 평균 NORs 숫자로 표시하였다.

## 결 과

### 1) 대장선암의 조직학적인 분화도

30예중 고분화선암 6예(20%), 중등도분화선암 21

**Table 1.** Cell statistics, proliferation index, ploidy patterns and Ag-NORs in colon adenocarcinoma

Case No.	Pp	G0/G1 (%)	S (%)	G2+M (%)	G2+M /G1	PI (%)	DIF	Ag-NORs		
								C' #	N' #	Score
1	D	85.5	4.9	9.5	1.86	14.4	WD	220	1283	5.83
2	D	77.9	16.1	6.0	1.87	22.1	WD	231	394	1.70
3	D	96.6	1.1	2.3	1.91	3.4	WD	238	467	1.96
4	D	79.5	10.1	0.4	1.89	20.5	WD	208	505	2.42
5	D	93.4	1.6	5.0	1.85	6.6	WD	210	629	2.99
6	A	81.0	15.8	3.2	1.88	19.0	WD	207	558	2.69
7	D	94.0	4.3	1.7	1.92	6.0	MD	227	451	1.98
8	D	99.1	0.3	0.6	1.87	0.9	MD	206	256	1.24
9	D	87.2	7.9	4.9	1.88	12.8	MD	217	1489	6.86
10	D	88.7	6.8	4.5	1.87	11.3	MD	207	408	1.97
11	D	92.1	4.3	3.7	1.85	8.0	MD	204	808	3.96
12	D	96.7	2.0	1.3	1.86	3.3	MD	200	672	3.36
13	D	91.4	6.2	2.5	1.92	8.7	MD	228	656	2.87
14	D	70.9	19.5	9.7	1.85	29.2	MD	151	751	4.97
15	D	88.4	2.3	9.3	1.85	11.6	MD	224	615	2.74
16	D	74.9	16.7	8.4	1.91	25.1	MD	210	1310	6.23
17	D	62.8	37.0	0.3	3.17	37.2	MD	204	1044	5.11
18	D	91.5	3.7	4.7	1.77	8.5	MD	209	1088	5.20
19	A	84.8	14.1	1.1	1.88	15.2	MD	210	404	1.92
20	A	61.2	36.0	2.8	1.93	38.8	MD	216	300	1.38
21	A	81.7	16.0	2.4	1.84	18.4	MD	210	2520	12.00
22	A	82.1	11.2	6.6	1.86	17.8	MD	216	137	5.26
23	A	77.2	17.1	5.7	1.88	22.8	MD	215	1616	7.51
24	A	81.4	14.0	4.6	2.02	18.6	MD	212	1844	8.69
25	A	83.5	6.5	9.9	1.83	16.5	MD	211	1542	7.30
26	A	90.8	4.8	4.4	1.81	9.2	MD	213	273	1.28
27	A	69.7	30.1	0.2	2.00	30.3	MD	212	2272	10.71
28	D	89.4	8.4	2.2	1.92	10.6	PD	214	425	1.98
29	A	56.1	37.8	6.0	1.90	43.8	PD	203	446	2.19
30	A	58.1	35.3	6.6	1.87	41.9	PD	210	1521	7.24

Pp: Ploidy pattern, A: Aneuploidy pattern, D: Diploidy pattern, S: DNA synthesis phase,  
 PI: Proliferation index, M: Mitosis phase, DIF: Diagnosis with differentiation, WD: Well  
 differentiated, MD: Moderately differentiated, PD: Poorly differentiated, C' #: cell numbers  
 counted for Ag-NORs, N' #: Ag-NORs numbers of cell counted,

Score:  $\frac{\text{Ag-NOR numbers}}{\text{Cell numbers}}$

예(70%), 저분화선암 3예(10%)였다(Table 1, 2).

2) 조직학적 분화도에 따른 유세포측정

고분화선암은 총 6예중 5예(83.3%)가 Diploidy를 보였으며 이 종양의 S-phase의 범위는 1.1~16.1%로 다양하였고, 평균은  $8.3 \pm 6.8\%$ 이었다. G0/G1 Phase의 범위는 77.9~96.6%였고 평균은  $85.7 \pm 7.7\%$ 였다. G2+M Phase의 범위는 0.4~9.5%이었고 평균은  $4.4 \pm 3.2\%$ 이었다. G2+M/G1과 PI의 평균치는 각각  $1.88 \pm 0.02$ ,  $14.3 \pm 7.7\%$ 이었다.

중등도분화선암은 총 21예중 12예(57.2%)가 Diploidy를 보였으며 이 종양의 S-Phase의 범위는 0.3~37.0%로 다양하였고, 평균은  $12.2 \pm 10.8\%$ 이었다. G0/G1 Phase의 범위는 61.2~99.1%였고 평균은  $83.3 \pm 10.6\%$ 였다. G2+M Phase의 범위는 0.2~9.9%이었고 평균은  $4.3 \pm 3.1\%$ 이었다. G2+M/G1과 PI의 평균치는 각각  $1.94 \pm 0.29$ ,  $16.7 \pm 10.6\%$ 이었다.

저분화선암은 3예중 1예(33.3%)가 Diploidy를 보였으며 이 종양의 S-Phase의 범위는 8.4~37.8%로 다양하였고, 평균은  $27.2 \pm 16.3\%$ 이었다. G0/G1 Phase의 범위는 56.1~89.4%였고 평균은  $67.9 \pm 18.8\%$ 였다. G2+M Phase의 범위는 2.2~6.6%이었고 평균은  $4.9 \pm 2.4\%$ 이었다. G2+M/G1과 PI의 평균치는 각각  $1.90 \pm 0.03$ ,  $32.1 \pm 18.6\%$ 이었다.

Table 2. Cellular differentiation in colon adenocarcinoma (N=30)

Differentiation	No. (%)
Well Differentiated	6(20)
Moderately differentiated	21(70)
Poorly differentiated	3(10)
Total	30(100)

Table 4. Cellular differentiation and mean value of DNA flow cytometry in colon adenocarcinoma

Differentiation	G0+G1(%)	S(%)	G2+M(%)	G2+M/G1	PI(%)
Well differentiated	$85.7 \pm 7.7$	$8.3 \pm 6.8$	$4.4 \pm 3.2$	$1.88 \pm 0.02$	$14.3 \pm 7.7$
Moderately differentiated	$83.3 \pm 10.6$	$12.2 \pm 10.8$	$4.3 \pm 3.1$	$1.94 \pm 0.29$	$16.7 \pm 10.6$
Poorly differentiated	$67.9 \pm 18.8$	$27.2 \pm 16.3$	$4.9 \pm 2.4$	$1.90 \pm 0.03$	$32.1 \pm 18.6$

즉 조직학적 분화도에 따라서 분화가 나뉠수록 G0+G1값은 낮았으며( $r = -0.33$ ,  $P = 0.29$ ), S Phase값은 증가하였고( $r = 0.39$ ,  $P = 0.05$ ) 또한 PI값도 증가하였다( $r = 0.34$ ,  $P = 0.29$ ). 그러나 G2+M과 G2+M/G1은 조직학적 분화도와는 r값이 0.03 및 0.05로, P값이 0.8 및 0.7로 관계가 없었다(Table 1, 3, 4 and Fig. 1).

3) 조직학적 형태에 따른 은기호성 염색 결과

NOR은 핵내에서 진한 갈색으로 염색되면서 경계가 불분명한 은기호성 점으로 나타났는데 이는 거의 모든 핵에서 관찰되었으며 경우에 따라서는 점이 모여 송이 모양을 만들거나 점보다 크기가 작은 미세분말 형태로 관찰되기도 하였다. 핵은 연한 갈색으로 염색되었고 세포질은 노란색으로 염색되었다.

고분화선암은 Ag-NORs 수의 범위가 1.70~5.83까지였으며 평균은  $2.93 \pm 1.50$ 이었고 중등도분화선암은 Ag-NORs 수의 범위가 1.24~12.0까지였으며 평균은  $4.88 \pm 3.11$ 이었고 저분화선암은 Ag-NORs 수의 범위가 1.98~7.24까지였으며 평균은  $3.80 \pm 2.98$ 이었다. Ag-NORs 수는 고분화선암보다는 중등도와 저분화암에서 더 많았으나 통계학적인 의의는 없었고( $r =$

Table 3. Ploidy pattern according to the cellular differentiations in colon adenocarcinoma (N=30)

Differentiation	Ploidy pattern	
	Aneuploidy(%)	Diploidy(%)
Well Differentiated	1(16.7)	5(83.3)
Moderately differentiated	9(42.8)	12(57.2)
Poorly differentiated	2(66.7)	1(33.3)
Total	12(40.0)	18(60.0)

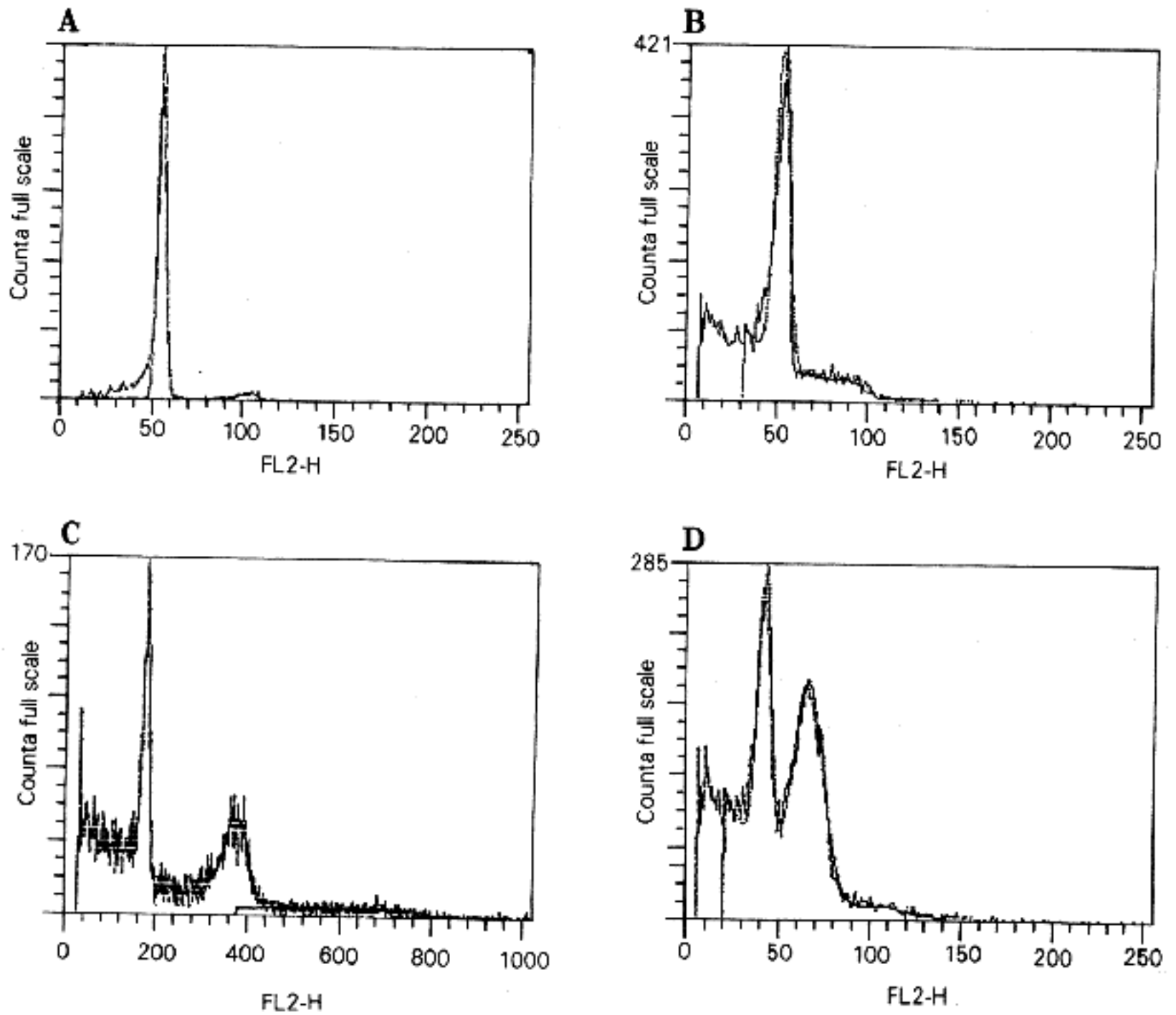


Fig. 1. Ploid patterns of colon adenocarcinoma.

A, B: Diploid pattern  
C, D: Aneuploid pattern

0.28,  $P=0.45$ ), Ag-NORs이 보이는 세포수(C' #)나 총 Ag-NORs 숫자(N' #)는 상관계수 0.23과 0.22로서 상관관계는 미약했다(Table 1, 5).

#### 4) 각종 대장선암에서의 유세포측정과 은기호성 염색에 의한 결과의 비교

Ag-NORs 수와 DNA 유세포 측정중 각 Phase에 속하는 세포백분율과의 관계는 G0/G1 Phase와는  $r=-0.28$ , S-Phase와는  $r=0.26$ , PI값은  $r=-0.28$ 로서 비교적 상관관계가 있었으나 G2+M Phase와는  $r=0.17$ , G2+M/G1과는  $r=0.07$ 로서 상관관계가 없었

Table 5. Cellular differentiations and average scores of Ag-NORs in colon adenocarcinomas

Differentiation	Average score
Well differentiated	$2.93 \pm 1.50$
Moderately differentiated	$4.88 \pm 3.11$
Poorly differentiated	$3.80 \pm 2.98$

다.

Ploidy에 따른 Ag-NORs score의 평균수를 보면 Aneuploidy는  $5.68 \pm 3.77$ , Diploidy는  $3.52 \pm 1.75$



를 보여 Aneuploidy에서 통계학적으로 유의있게 평균수가 더 높았다( $r=0.40, P=0.05$ ).

대장암을 조직학적인 형태, Ploidy에 따라 구분하면 6개의 군으로 대별할 수 있었다. 즉 ① 고분화암이면서 Diploidy 군, ② 고분화암이면서 Aneuploidy 군, ③ 중등도분화암이면서 Diploidy 군, ④ 중등도분화암이면서 Aneuploidy 군, ⑤ 저분화암이면서 Diploidy 군, ⑥ 저분화암이면서 Aneuploidy 군으로 나눌 수 있었다. 각 군에서 G0+G1 Phase, S Phase, Proliferation index는 조직학적인 분화도보다는 Ploidy에 따라서 세포백분율이 차이가 나는 경향을 보였다. 즉 G0+G1 Phase는 Diploidy에서는 고분화선암  $86.6 \pm 8.3\%$ , 중등도분화선암  $86.5 \pm 11.1\%$ , 미분화선암  $89.4\%$ 였으나( $P=0.97$ ) Aneuploidy에서는  $81.0\%$ ,  $79.2 \pm 8.8\%$ ,  $57.1 \pm 1.4\%$ 로서 Aneuploidy에서 감소하였다( $P=0.09$ ), S-Phase는 Diploidy에서는 고분화선암  $6.8 \pm 6.3\%$  중등도분화선암  $9.3 \pm 10.5\%$ , 미분화선암  $8.4\%$ 였으나( $P=0.75$ ) Aneuploidy에서는  $15.8\%$ ,  $16.6 \pm 10.3\%$ ,  $36.6 \pm 1.8\%$ 로서 Aneuploidy에서 증가하였다( $P=0.15$ ). Proliferation index는 Diploidy에서는 고분화선암  $13.4 \pm 8.3\%$ , 중등도분화선암  $13.6 \pm 11.1\%$ , 미분화선암  $10.6\%$

였으나( $P=0.97$ ) Aneuploidy에서는  $19.0\%$ ,  $20.8 \pm 8.8\%$ ,  $42.9 \pm 1.3\%$ 로서 Aneuploidy에서 증가하였다( $P=0.09$ ). 그러나 G2+M Phase, G2+M/G1은 Ploidy에 따라서 차이가 없었다.

Ploidy에 따른 세포백분율의 평균치는 G0/G1은 Diploidy에서  $86.7 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy에서  $75.6 \pm 11.5\%$ 로 Aneuploidy에서 유의있게 감소하였고( $r=-0.49, P=0.006$ ), S-Phase는 Diploidy에서  $8.5 \pm 9.0\%$ , Aneuploidy에서  $19.9 \pm 11.7\%$ 로 Aneuploidy에서 유의있게 증가하였고( $r=0.49, P=0.006$ ), Proliferation index는 Diploidy에서  $13.3 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy에서  $24.4 \pm 11.5\%$ 로 Aneuploidy에서 유의있게 증가하였다( $r=0.42, P=0.007$ )(Table 6~8, Fig. 2, 3).

**Table 6.** Average scores of Ag-NORs according to ploidy pattern in colon adenocarcinoma

No. of Cases	Ploidy pattern	Average numbers of Ag-NORs score
12	Aneuploidy	$5.68 \pm 3.77$
18	Diploidy	$3.52 \pm 1.75$

**Table 7.** Mean values of Flow Cytometry in groups of colon adenocarcinoma according to cellular differentiation and ploidy pattern

Group	G0+G1(%)	S(%)	G2+M(%)	G2+M/G1	PI
W.D, D	$86.6 \pm 8.3$	$6.8 \pm 6.3$	$4.6 \pm 3.5$	$1.88 \pm 0.02$	$13.4 \pm 8.3$
M.D, D	$86.5 \pm 11.1$	$9.3 \pm 10.5$	$4.3 \pm 3.3$	$1.90 \pm 0.38$	$13.6 \pm 11.1$
P. D, D	89.4	8.4	2.2	1.92	10.6
W.D, A	81.0	15.8	3.2	1.88	19.0
M.D, A	$79.2 \pm 8.8$	$16.6 \pm 10.3$	$4.2 \pm 3.0$	$1.90 \pm 0.07$	$20.8 \pm 8.8$
P. D, A	$57.1 \pm 1.4$	$36.6 \pm 1.8$	$6.3 \pm 0.4$	$1.89 \pm 0.02$	$42.9 \pm 1.3$

W.D: Well differentiated adenoca, M.D: Moderately differentiated adenoca  
P.D: Poorly differentiated adenoca, D: Diploidy, A: Aneuploidy

**Table 8.** Mean value of DNA flow cytometry according to ploidy pattern

Ploidy pattern	G0/G1(%)	S(%)	G2+M(%)	G2+M/G1	PI
Diploid	$86.7 \pm 9.8$	$8.5 \pm 9.0$	$4.3 \pm 3.2$	$1.94 \pm 0.31$	$13.3 \pm 9.8$
Aneuploid	$75.6 \pm 11.5$	$19.9 \pm 11.7$	$4.7 \pm 2.7$	$1.89 \pm 0.06$	$24.4 \pm 11.5$

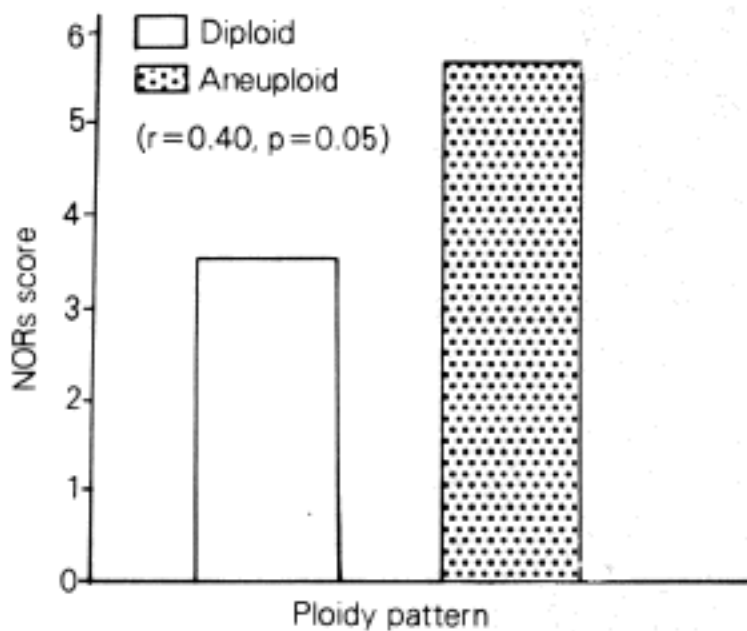
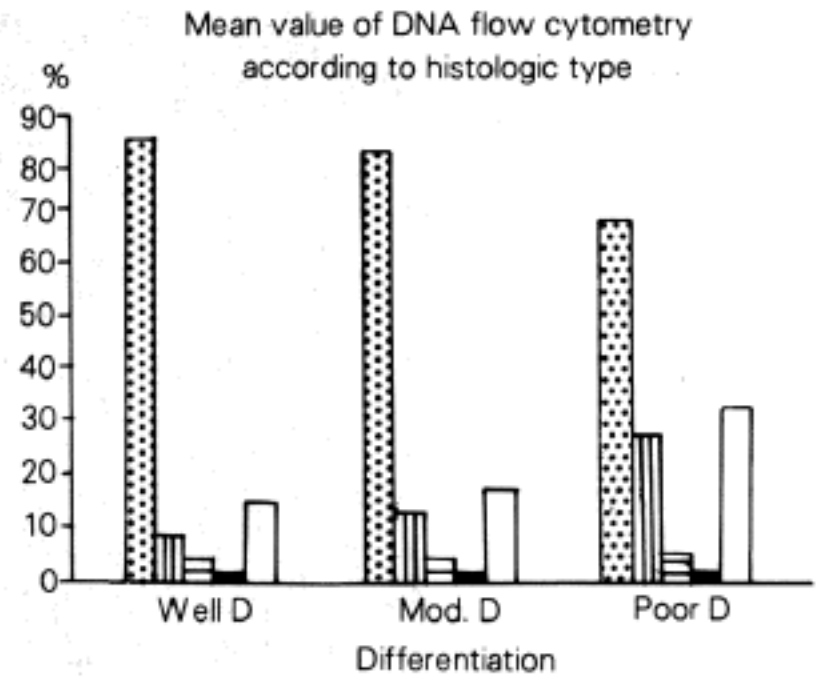


Fig. 2. Mean scores of Ag-NORs according to ploidy pattern.

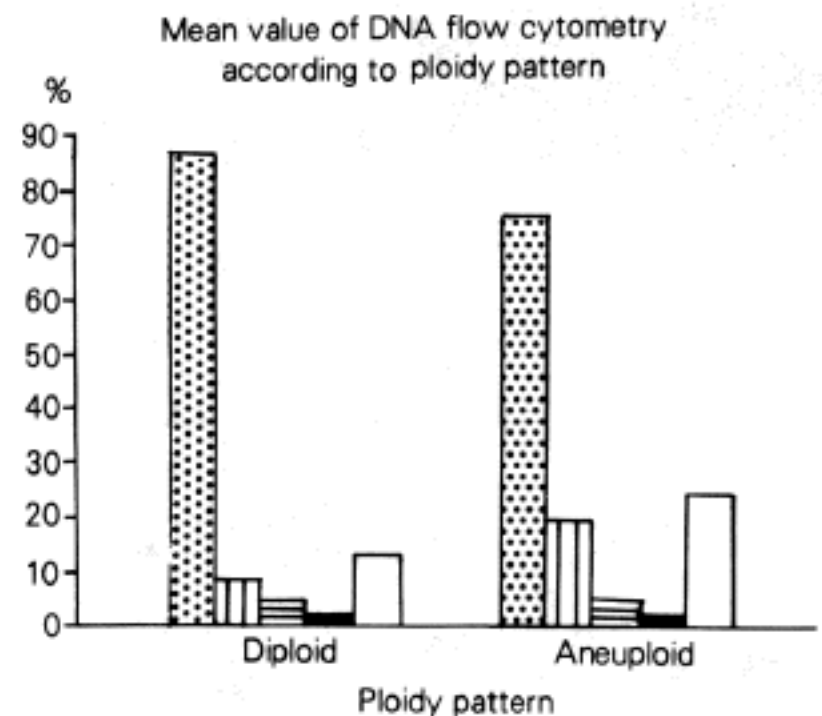
### 고 안

대장암은 미국에서는 폐암에 이어 두번째로 빈발하는 종양이며<sup>7)</sup>, 한국에서의 대장암의 발생 빈도는 남녀 공히 4위를 차지하고 있고 그 발생 빈도도 증가 추세에 있으며<sup>8)</sup> 사망의 중요한 원인중 하나이다. 일반적으로 모든 악성 종양의 예후는 환자의 연령, 성별, 인종 및 치료 방법 즉 수술, 방사선 치료, 항암화학요법등에 의하여 영향을 받겠지만, 보다 객관적인 인자는 종양의 Stage 및 조직분화도이다<sup>9,10)</sup>.

종양세포의 증식정도는 종양의 악성도와 밀접한 관계가 있기때문에 세포의 증식정도를 측정하는 것은 종양의 진단, 치료 및 예후 판정에 필수적인 요건이 된다<sup>11)</sup>. 대장암의 경우 환자의 예후 판정을 위하여 일반적으로 종양의 Duke Stage, 혈중의 CEA Level, 조직분화도를 이용하고 있다<sup>12)</sup>. 그러나 이것도 시술자에 따라 다소의 차이가 있어 정확한 예후 판정이 어려워 최근에는 세포증식능력에 대한 연구가 활발히 이루어지게 되었다. 즉 세포 분열수 측정<sup>11-15)</sup>, Autoradiography<sup>16)</sup>, Flow cytometry(유세포 측정법, 이하 FCM으로 약함)<sup>10,16-18)</sup>, Bromodeoxyuridyl의 흡수정도의 측정<sup>19)</sup>, Ki-67 항체를 이용한 면역 효소 방법<sup>20)</sup>, 은기호성 염색법을 이용한 Nucleolar organizer region(이하 An-NORs로 약함)<sup>10,16-18)</sup>, Bro-



Mean value of DNA flow cytometry according to histologic type



Mean value of DNA flow cytometry according to ploidy pattern

Fig. 3. Mean value of DNA flow cytometry according to histologic type and ploidy pattern.

mdoeoxyuridyl의 흡수정도의 측정<sup>19)</sup>, Ki-67 항체를 이용한 면역 효소 방법<sup>20)</sup>, 은기호성 염색법을 이용한 Nucleolar organizer region(이하 Ag-NORs로 약함)<sup>4,5,21)</sup>에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

외국에서는 각종 종양에서 DNA Ploidy에 대한 연구가 비교적 활발하게 진행되고 있고 또한 Ag-

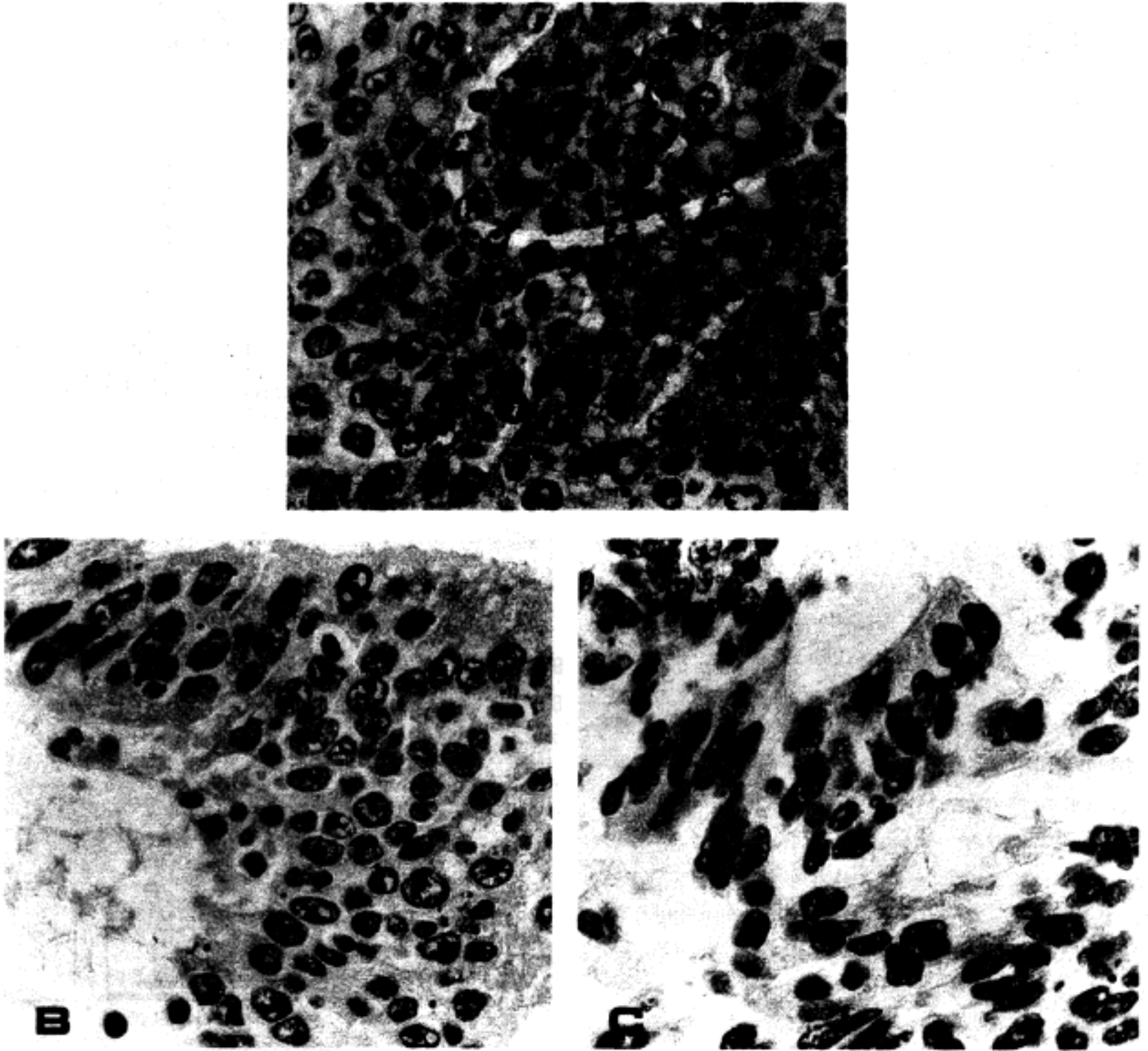


Fig. 4. A: Most of cells have 1~2 Ag-NOR in the nucleus  
B: Most of cells have 3~4 Ag-NOR in the nucleus  
C: Most of cells have numerous Ag-NOR in the nucleus

NORs에 대한 연구가 진행중이나 이들을 동시에 시행하여 비교 검토한 논문은 드물고, 국내에서도 최근에 DNA Ploidy연구와 Ag-NORs에 대한 보고가 부분적으로 발표되고 있을뿐이다.

FCM을 이용한 세포측정법은 1930년대에 Moldavan이 현미경하에서 모세관을 통하여 개개의 세포를 측정할 이래 발전해왔으며, Van Dilla등은 형광색소를 이용하여 세포측정속도를 가속화하였다<sup>1)</sup>. 이후

많은 논문에서 FCM을 이용한 연구 결과를 발표하였다<sup>10, 17, 18, 22~29)</sup>.

전형적인 유세포 측정기는<sup>2)</sup> 4가지 구성 체계로 되어 있는데 ① 레이저 광원, ② 표본실과 광학 기기, ③ 광충격과를 디지털 신호로 변환하는 전자기기, 그리고 ④ 기계의 작동, 자료의 수집과 분석을 종합하고 관리하는 컴퓨터 부품으로 되어 있다. 즉 세포를 광학적 및 전기적 방법으로 종합하여 측정하는 것으로 동



되어지고 이는 단백질의 최종합성에 대단히 중요하며<sup>21,42)</sup>, 세포내 Ag-NORs의 수는 세포의 활동성 세포증식정도 및 분화정도를 반영한다고 한다<sup>4)</sup>.

따라서 NORs의 숫자와 모양이 세포의 활동력을 반영한다고 믿어지고 있다. 이 NORs를 유사분열 중기에 염색체 확산시 argyrophil 염색방법(Ag-NORs)을 적용하여 나타나게 만드는 것이다. 이것이 종양세포의 악성도를 알아내는 보조적인 방법으로 유용하리라는 가정 아래 국외 및 국내에서 연구가 이루어졌다.

1987년 Crocker와 Nar<sup>4)</sup>는 non-Hodgkin's lymphoma에서 Ag-NORs염색을 시행하여 악성도가 낮은 임파종에서 세포당 1~1.5개의 Ag-NORs숫자를 보인 반면 악성도가 높은 임파종에서는 4.4~6.8개를 보여 악성도에 따른 숫자의 차이에 통계학적 의의가 있다고 보고하였고, 1989년 Marbaix<sup>42)</sup>는 자궁경부의 정상세포와 암종상피세포를 비교하여 자궁암종인 경우가 정상상피세포보다 Ag-NORs수가 의미있게 높았다고 하였으나 예후와는 관계가 없다고 하였으며, Smith등<sup>6)</sup>은 유방에 생기는 악성종양은 양성질환에 비해 Ag-NORs 숫자가 증가되었다고 하였으며 Egan등<sup>44)</sup>은 아동기 신경아세포종, Ewing씨 육종, 평활근 육종등에서 질환을 감별하는데 도움을 줄뿐 아니라 신경아세포종의 경우 Ag-NORs의 숫자가 감소할수록 분화가 좋고 생존율이 증가하는 추세를 보였다고 하였다. 또한 Crocker와 Skibeck<sup>5)</sup>는 모반세포성 모반과 악성흑색종간에서 두 질환을 감별하는데 도움이 된다고 하였다.

1989년 허등<sup>46)</sup>이 자궁경부, 자궁내막 및 난소병변에서 전암병변과 편평상피내암 및 침윤성상피암의 감별에 유용하다고 하였고, 1991년 신등<sup>47)</sup>이 비호지킨씨 림프종에서 세포분열수와 Ag-NORs의 평균치는 통계학적으로 유의있게 등급이 높을수록 증가한다고 하였다.

본 연구에서 조직학적 분화도에 따른 Ag-NORs 염색결과를 보면 고분화선암은 평균 Ag-NORs수가  $2.93 \pm 1.50$ 이었고, 중등도분화선암은  $4.88 \pm 3.11$ , 저분화선암은  $3.80 \pm 2.98$ 로서 고분화선암보다는 중등도와 저분화암에서 평균 Ag-NORs 수가 더 많았다. 이 결과는 Crocker<sup>4)</sup>, Marbaix<sup>42)</sup>, Wilkinson<sup>43)</sup>, Wiley<sup>45)</sup>, 허<sup>46)</sup>, 신<sup>47)</sup>, 김등<sup>48)</sup>의 연구 결과와 비슷하였다.

유세포측정과 Ag-NORs 염색에 의한 결과를 비교해보면 Ag-NORs수와 DNA 유세포측정의 G0/G1 phase, S-Phase, Proliferation index와의 상관관계수는 각각 -0.28, 0.26, 0.28로서 경미한 상관관계를 보였는데 신등<sup>47)</sup>은 림프종에서 DNA 유세포측정의 각 세포주기에 속하는 세포들의 백분율과 Ag-NORs 수와 상관관계가 없었다고 하였다.

Ploidy에 따른 Ag-NORs수를 보면 본 연구에서는 Aneuploidy가  $5.68 \pm 3.77$ , Diploidy가  $3.52 \pm 1.75$ 를 보여 Aneuploidy가 Diploidy보다 평균 Ag-NORs수가 통계학적으로 유의있게 높았는데 이는 한등<sup>49)</sup>의 수막종에서 Diploidy와 Aneuploidy를 비교하여 Aneuploidy에서 Ag-NORs수가 높다는 결과와 일치하였다.

Ploidy에 따른 유세포측정결과를 보면 G0/G1 phase는 Diploidy는  $86.7 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy는  $75.6 \pm 11.5\%$ 로서 Diploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였고( $P = 0.006$ ), S-phase는 Diploidy는  $8.5 \pm 9.0\%$ , Aneuploidy는  $19.9 \pm 11.7\%$ 로서 Aneuploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였고( $P = 0.006$ ), Proliferation index는 Diploidy는  $13.3 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy는  $24.4 \pm 11.5\%$ 로서 Aneuploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였다( $P = 0.007$ ). Emdin<sup>39)</sup>의 보고에서는 S-phase가 Diploidy는  $7.7 \pm 4.2\%$ , Aneuploidy는  $13.5 \pm 6.6\%$ 로서 본 연구 결과와 비슷하였다.

향후 유세포측정법을 이용하여 S-phase, PI, G0/G1값을 측정하고 Ploidy를 관찰하고 은기호성염색을 통한 Ag-NORs 숫자를 측정하여 대장선암의 조직학적 유형과 더불어 종양의 병기를 예측하고 또한 치료 방법을 결정하고 나아가 환자의 예후를 예측할 수 있는 예측인자로 사용할 수 있으리라고 사료된다.

## 결 론

대장선암에서 조직학적인 양상과 세포증식능력과 상관관계를 규명하기 위하여 30예의 대장선암을 대상으로 H-E 염색된 표본을 이용한 조직학적인 진단, 은염색을 이용한 Ag-NORs수, 그리고 유세포 측정법을 이용한 DNA 량 및 세포주기 분석등을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

종의 세포를 세포성분을 의한 빛의 굴절, 반사와 회절 및 빛의 소실을 동시에 측정함으로써 세포의 역동학적 분석이 가능하다.

적절히 염색된 검체는 표본실에 흡인되어 일정한 압력이 작용하는 nozzel등을 지나면서 이상적으로 단일 세포 흐름의 액체상태로 나온다. 유세포 측정을 이용한 세포의 DNA 분석의 원리는 세포 분열시 각각의 주기에 있는 세포는 상이한 DNA의 양을 가진다는 점이다<sup>27</sup>. 즉 DNA에 결합하는 fluorochrome을 이용하여 반응시키면 각 세포주기에 속하는 세포들의 백분율을 계산해 낼 수 있다는 점에 근거를 두고 있다.

즉 휴지기(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>)의 세포는 2n 염색체의 DNA량을 가지며 합성기(S)에 들어가면 DNA의 양이 증가하고 합성후기(G<sub>2</sub>)나 유사분열기(M)에는 4n 염색체의 DNA량을 가지게 된다. Aneuploidy를 결정하는 가장 확실한 기준은 임상표본에서 정상적으로 위치된 G<sub>1</sub> peak에 비해서 하나 혹은 그 이상의 분명히 비정상적으로 위치된 G<sub>1</sub> peak의 존재다<sup>29,30</sup>. 이러한 유세포 측정법을 이용하여 각종 고형종양에 대한 연구를 진행하고 있으며, FCM 분석 결과 DNA aneuploidy가 Diploidy보다 예후가 나쁘다는 여러 보고가 있다<sup>3,11,18</sup>.

최근에는 고형종양의 평가뿐만 아니라 Body cavity fluid 즉 복수 및 늑막액에서 세포병리 검사와 더불어 FCM을 실시하여 암의 진단 및 평가에 도움을 얻을 수 있다고 한다<sup>11,31,32</sup>.

본 연구에서 대장선암의 조직학적인 분화도는 저자의 경우 고분화선암 20%, 중등도분화선암 70%, 저분화선암 10%로서 Blenkinsopp<sup>12</sup>)은 26%, 58%, 16%, Kokal<sup>33</sup>)은 29%, 61%, 20%, Rognam<sup>34</sup>)은 고분화선암 66%, 중등도분화선암 13%, 저분화선암 21%로서 고분화선암이 많다고 하였다.

조직학적인 형태에 따른 유세포 측정 결과는 Kokal 등<sup>30</sup>)은 고분화선암중 61.5%가 Diploidy이었으며, 중등도분화선암중 37.2%가 Diploidy이었고, 저분화선암은 28.6%가 Diploidy를 보였다고 하였다. Rognum<sup>34</sup>)은 45.5%, 39.1%, 20.0%였고, 저자의 경우에는 83.3%, 57.2%, 33.3%를 보여 Diploidy의 빈도가 약간 높았으나 분화도가 저분화일수록 Diploidy가 감소하는 것은 일치하였다.

대장선암에서의 Ploid형을 보면 많은 논문<sup>28,33,34,36-40</sup>)

에서 대장선암의 50~75%가 Aneuploidy라고 하였는데 본 연구에서는 30예중 12예(40%)에서 Aneuploidy로 나타나서 상이하였으나 Wooley<sup>41</sup>)는 39%만이 Aneuploidy라고 보고하여 본 연구와 비슷하였다.

유세포 측정정상 세포주기를 보면 S-phase는 고분화선암에서는 8.3±6.8%, 중등도분화선암에서는 12.2±10.8%, 저분화선암에서는 27.2±16.3%로 증가하는 경향을 보였고 Proliferation index는 고분화선암에서 14.3±7.7%, 중등도분화선암에서 16.7±10.6%, 저분화선암에서 32.1±18.6%으로 증가하였다. 그러나 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase는 고분화선암에서 85.7±7.7%, 중등도분화선암에서 83.3±10.6%, 저분화선암에서는 67.9±18.8%로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Kokal 등<sup>33</sup>)의 대장암에서의 연구결과와 비슷하였으나 임<sup>35</sup>), Banner<sup>37</sup>), Emdin 등<sup>39</sup>)의 유세포 측정법을 이용하여 대장암의 분화도를 예측할 수 없다는 결과와는 상이하였다.

한편 다른 고형종양의 연구로는 Srigley<sup>3</sup>), Andreeff<sup>17</sup>), Shackney 등<sup>29</sup>)의 림프종 연구에서, 가장 Aneuploidy 했던 경우에 높은 S-Phase를 가지며 저분화 림프종의 조직학적 양상을 보인다고 하였고 Meyer 등<sup>11</sup>)은 유방암에서 Aneuploidy가 Diploidy보다 높은 S-Phase를 가지며, S-Phase 수치가 환자의 Survival을 예측할 수 있다고 주장하여 본 연구와 비슷하였다. 또한 Bäckdahl 등<sup>24</sup>)은 갑상선암에서 저분화암과 고분화암을 구별하는데 도움이 된다고 보고하여 본 연구와 비슷하였다.

이상의 결과로 볼때 유세포 측정법을 이용하여 대장암의 조직학적 분화도를 예측할 수 있겠으며 또한 Aneuploidy에서 환자의 예후가 나쁘리라는 것을 예측할 수 있겠다.

한편 핵의 은기호성을 이용한 Ag-NORs 방법은 세포의 핵내에 존재하는 염색체 Nucleolar Organizer Regions(이하 NORs)을 질산은으로 염색, 관찰하여 세포의 증식 능력을 간접적으로 측정하는 방법이다. NORs은 45-s ribosomal RNA(rRNA) 전구물질에 대한 duplicated gene coding에 상응하는 DNA 고리로서<sup>42</sup>) 5개의 선단부 부착 염색체 즉 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 short arm에 부착하는데 이 rRNA genes은 RNA polymerase 1에 의해 전사

1) DNA 유세포측정을 시행했던 30예중 12예(40%)가 DNA Aneuploidy이었으며 조직학적인 형태에 따른 유세포측정 결과는 Diploidy가 고분화선암에서는 83.3%, 중등도분화선암에서는 57.2%, 미분화선암에서는 33.3%를 보여 고분화선암에서 Diploidy가 더 많았다( $r=0.28$ ).

2) 유세포측정상의 세포주기를 보면 미분화암에서 S-Phase값은 증가하였고( $P=0.05$ ), Proliferation index도 증가하여 상관관계를 보였으며( $r=0.34$ ), G0+G1값은 감소하여 역상관관계를 보였다( $r=-0.33$ ).

3) Ploidy에 따른 Ag-NORs수는 Aneuploidy는  $5.68 \pm 3.77$ , Diploidy는  $3.52 \pm 1.75$ 로서 Aneuploidy가 Diploidy보다 평균 Ag-NORs수가 통계학적으로 유의있게 높았다( $P=0.05$ ).

4) Ag-NORs수와 DNA 유세포측정에 의한 각 세포주기에 속하는 세포들의 백분율은 G0/G1 phase, S-Phase 및 PI 값은 약한 상관관계를 보였다( $r=-0.28, 0.26, 0.28$ ).

5) Ploidy에 따른 유세포측정결과는 G0/G1 phase는 Diploidy가  $86.7 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy는  $75.6 \pm 11.5\%$ 로서 Diploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였고( $P=0.006$ ), S-phase는 Diploidy가  $8.5 \pm 9.0\%$ , Aneuploidy가  $19.9 \pm 11.7\%$ 로서 Aneuploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였고( $P=0.006$ ), Proliferation index는 Diploidy는  $13.3 \pm 9.8\%$ , Aneuploidy는  $24.4 \pm 11.5\%$ 로서 Aneuploidy에서 통계학적으로 유의있게 증가하였다( $P=0.007$ ).

이상의 결과로 볼때 조직학적인 분화도가 나쁠수록 Aneuploidy가 더 많고, Aneuploidy가 Diploidy보다 평균 Ag-NORs수가 통계적 유의있게 높았고, Ploidy에 따른 유세포 측정은 G0/G1 phase, S-phase, PI가 통계적 의의가 있다는 결과는 대장선암 환자의 예후를 결정하는데 도움을 줄 수 있다고 사료되나, 향후 지속적인 임상적 연구가 필요할것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) Steinkamp JA: *Flow cytometry. Rev Sci Instrum* 55: 1375, 1984
- 2) Lovett EJ, Schnitzer B, Keren DF, Flint A, Hudson JL, McClatchey KD: *Application of flow cytometry to diagnostic pathology. Labor Invest* 50: 115, 1984
- 3) Srigley J, Barlogie H, Butler JJ, Osborne B, Blick H, Johnston D, Kantarjian H, Reuben J, Batsaskis J, Freireich EJ: *Heterogeneity of non-Hodgkin's lymphoma probed by nucleic acid cytometry. Blood* 65: 1090, 1985
- 4) Crocker J, Nar P: *Nuclear organizer regions in lymphomas. J Pathol* 151: 111, 1987
- 5) Crocker J, Skilbeck N: *Nuclear organizer regions in melanotic lesions of the skin. A quantitative study. J Clin Pathol* 40: 885, 1987
- 6) Smith R, Crocker J: *Evaluation of nuclear organizer region associated proteins in breast malignancy. Histopathology* 12: 113, 1988
- 7) Sabiston DC: *Textbook of Surgery, Cancer of the colon and rectum, 13th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 1986*
- 8) 보건연감: 성별, 부위별 암종 발생 상황: 157. 보건신문사, 1987
- 9) Poleski MH, Gordon PH: *Screening for carcinoma of the colon. PGS* 4: 1, 1987
- 10) Seckinger D, Sugarbaker E, Frankfurt O: *DNA content in human cancer. Arch Pathol Lab Med* 113: 619, 1989
- 11) Meyer JS, Coplin MD: *Thymine labelling index, Flow cytometric S-phase measurement, and DNA index in human tumors. AJCP*, 89: 586, 1988
- 12) Blenkinsopp WK, Stewar-Brown S, Blesovsky L: *Histopathology reporting in large bowel cancer. J Clin Pathol* 34: 509, 1981
- 13) Akerman M, Brandt L, Johnson A, Olsson H: *Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to the prognosis. Br J Cancer* 55: 219, 1987
- 14) Grem N, Helweg-Larsen: *Mitotic activity and delay in fixation of tumor tissue. Acta Pathol Microbiol Scand* 87: 375, 1979
- 15) The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: *National cancer institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphoma. Summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer* 449: 2112, 1982
- 16) Kvaloy S, Marton PF, Kaalhus O, Hoie J, Foss-Abrahamsen A, Godal T: *[3H]-Thymine uptake in B cell lymphomas-relationship to treatment response and survival. Scand J Haematol* 34: 429,



1985

- 17) Andreef, et al: *DNA-RNA flow cytometry*. *Ann N Y Acad Sci* 468: 369, 1986
- 18) Diamond LW, Nathwani BN, Rappaport H: *Flow cytometry in the diagnosis and classification of malignant lymphoma and leukemia*. *Cancer* 50: 1122, 1982
- 19) Nagashina T, DeArmond DJ, Murovic J, Hoshino T: *Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tissues*. *Acta Neuropathol* 67: 155, 1985
- 20) Drach J, Gattriger C, Glassl H, Schwarting R, Stein H, Huber H: *Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma*. *Cytology* 10: 743, 1989
- 21) NORs-A new method for the pathologist. *Lancet* 1: 1413, 1987
- 22) Armitage NC, Robins RA, Evans DF, Turner DR, Baldwin RW, Hardcastle JD: *The influence of Tumor cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer*. *Br J Surg* 72: 828-830, 1985
- 23) Babers FB, JE Tomas-de LV, et al: *Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma?* *Ann Surg* 202(No 6): 740, 1985
- 24) Bäckdahl M, Wallin G, Löwhagen T, Auer G, Granberg P-O: *Fine-needle biopsy cytology and DNA analysis*. *Surg Clin N Am* 67: 197, 1987
- 25) Czerniak J, Papenhouse PR, Herz F, Koss LG: *Flow cytometric identification of cancer cells in effusions with Cal monoclonal antibody*. *Cancer* 15: 2783-2788, 1985
- 26) Daniel S, Barbara F: *Flow cytometric DNA ploidy in colorectal adenoma and family history of colorectal cancer*. *Cancer* 58: 2082, 1986
- 27) Jones DJ, Moore and Schofield PF: *Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer; a prospective flow cytometric study*. *Br J Surg* 75: 28, 1988
- 28) King JC, Warren EE: *Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer*. *Am J Surg* 153: 184, 1987
- 29) Shackney SE: *The use of flow cytometry in the diagnosis and biological characterization of the non-Hodgkin's lymphoma*. *Ann NY Acad Sci* 468: 160, 1986
- 30) Kokal W, Gardine RL, Sheibani K, Morris PL, Prager E, Zak IW, Terz JJ: *Tumor DNA content in resectable, primary colorectal carcinoma*. *Ann Surg* 209: 188, 1989
- 31) Schneller J, Eppich E, Greenebaum E, Elequin F, Sherman A, Wersto R, Koss LG: *Flow cytometry and feulgen cytophotometry in evaluation of effusion*. *Cancer* 1: 1307, 1987
- 32) Stonesifer KJ, Xiang J, Wilkinson EJ, Benson NA, Braylan RC: *Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids*. *Acta Cytologica* 31: 125-130, 1987
- 33) Kokal WA, Sheibani K, Terz JJ, Harada JR: *Tumour DNA content in the prognosis of colorectal adenocarcinoma*. *JAMA* 255: 3123-3127, 1986
- 34) Rognum T, Thorud E, Lund E: *Survival of large bowel carcinoma patient with different DNA ploidy*. *Br J Cancer* 56: 633, 1987
- 35) 임재용, 채권목: 대장 및 직장암에서 DNA ploidy와 예후인자로서의 의의. *대한외과학회지* 41: 467, 1991
- 36) Quirke P, Dixon MF: *Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinoma*. *J Pathol* 151: 285, 1987
- 37) Banner BF, Tomas-de la Vega JE, Roseman DL, Coon JS: *Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinoma?* *Ann Surg* 202: 740-744, 1985
- 38) Scott NA, Rainwater LW, Wieland HS, et al: *The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma*. *Br J Surg* 72: 828-830, 1985
- 39) Emdin SO, Stenling R, Ross G: *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma*. *Cancer* 60: 1282, 1987
- 40) 김진천, 김석구, 박건춘, 민병철, 이인철, 유은실, 배한익, 김명환, 민영일: 소화기 암종의 핵 DNA 함량 분석에 관한 초기 결과 및 해석. *대한외과학회지* 40: 565, 1991
- 41) Wooley RC, Schreiber K, Koss LG, Karas M, Sherman A: *DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behaviour*. *J Natl Cancer Inst* 69: 15-22, 1982
- 42) Marbaix E, Dewandeleer S, Habba Cl, Liegeois Ph, Willem T, Rahier J, Donner J: *Nuclear organizer regions in the normal and carcinomatous epithelium of the uterine cervix*. *In J Gynecol Pathol* 8: 237, 1989

- 43) Wilkinson N, Buckley CH, Chawner L, Fox H: *Nuclear organizer regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometria. Int J Gynecol Pathol* 9: 55, 1990
- 44) Egan MJ, Raafat F, Crocker J, Smith K: *Nuclear organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. J Clin Pathol* 41: 31, 1988
- 45) Wiley J, Sons L: *Nuclear organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol* 155: 95, 1988
- 46) 허준용, 김인선, 홍성봉: 자궁 경부, 자궁 내막 및 난소 병변에서 *nuclear organizer regions(NORs)*에 관한 연구. 고대의대논문집 26: 235, 1989
- 47) 신미경, 채양석, 김인선, 백승룡: 비호지킨씨 림프종에서 세포분열수, Ag-NORs 및 유세포 측정법을 이용한 세포증식능 평가에 관한 연구. 고대의대논문집 28: 421, 1991
- 48) 김준미, 김인선, 백승룡: 정상 조직과 증식성 및 종양성 병변에서의 *nuclear organizer regions(NORs)*. 대한병리학회지 23: 208, 1989
- 49) 한동석, 채양석, 김인선, 백승룡: 수막종의 *flow cytometry* 및 *nuclear organizer regions(NORs)*에 관한 비교연구. 고대의대논문집 26: 235, 1989
-