

## 대장 및 직장암 환자에서 DNA Ploidy 및 증식능과 기존의 예후인자와의 상관관계 분석

원주의과대학 외과학교실

김상철 · 김대성 · 노병선 · 윤광수

= Abstract =

### Analysis of Correlation between DNA Ploidy and Proliferative Activity with Previous Prognostic Parameter of Colorectal Carcinoma

Sang-Chol Kim, M.D., Dae-Sung Kim, M.D., Byung-Sun Rho, M.D. and Kwang-Soo Yoon, M.D.

Department of Surgery, Wounju-College of Medicine

This study was designed to determine the reliability of DNA analysis in predicting outcome of patients with colorectal carcinoma and evaluated for the correlation of clinicopathologic parameters with DNA analysis as a prognostic factor of colorectal carcinoma.

Eighty-five patients who underwent curative resection for colorectal carcinoma were examined for DNA ploidy, S-phase fraction and proliferative index by flow cytometry.

20 cases(23.6%) were DNA diploid, 65 cases(76.4%) were DNA aneuploid. The frequency of DNA aneuploid was noted higher as the poorer histologic grade, positive lymph node involvement and grossly ulceroinfiltrative pattern of tumor( $p < 0.05$ ). The frequency of high S-phase fraction (S.P.F > 20%), high proliferative index(P.I > 30%) was noted higher as the poorer histologic grade, increased Duke's stage and positive lymph node involvement( $p < 0.05$ ).

In patients with aneuploid with high S-phase fraction(S.P.F > 20%) group, ratio of death, recurrence were significantly poor than those with aneuploid alone and diploid group(28.2% Vs 15.1% Vs 15%,  $p < 0.05$ ).

As the result of this study, we conclude that flow cytometric analysis of DNA content, histologic grade, Duke's stage, lymph node involvement and gross pattern of tumor were significance prognostic factors in patients with colorectal carcinoma and provide more accurate assessment of outcome.

**Key Words:** Colorectal carcinoma, Flow cytometry, Prognostic factor

### 서 론

대장, 직장암은 타장기에 비하여 진단이 용이하고 조기 진단 및 근치적 절제술과 보조요법으로 좋은 예후를 기대할 수 있는데 현재 대장, 직장암 환자에서

예후를 예측하고 보조요법의 선택에 도움이 되기 위한 여러 임상 및 병리학적 예후인자가 이용되고 있다. 그러나 대부분의 예후인자들은 임상 및 병리학적 분류에 의한 주관적인 것으로 종양세포의 생물학적 특성을 객관적으로 반영하는 것은 아니다.

유세포 측정법에 의해 얻어진 종양세포의 배수성과

증식능은 이전의 많은 보고를 통해 방광암<sup>3)</sup>, 유방암<sup>10)</sup>, 난소암<sup>11)</sup>, 대장, 직장암<sup>1,4,13,18)</sup> 환자에 있어서 객관적인 예후인자라고 알려지고 있다. 즉 이배수체(aneuploid) 이면서 S.P.F(S-phase fraction), P.I(Proliferative index)등이 높을 경우 나쁜 예후를 보인다<sup>1,4,13,18)</sup>. 그러나 병기가 높고 기존의 나쁜 예후인자를 가진 환자에 있어서도 종양세포의 배수성과 증식능이 반드시 비정상적으로 나타나는 것만은 아니기 때문에 저자들은 현재 국내에서도 보편화 되고 있는 유세포 측정법에 의한 종양세포의 배수성과 증식능이 대장, 직장암 환자에 있어서 객관적인 예후인자로 타당성이 있는지를 기존의 예후인자들과의 상관관계분석 및 사망, 재발한 예에 있어서의 분포를 통해 알아보고 또한 이에 따라 객관적으로 이용할 수 있는 기존의 예후인자를 분석해 보았다.

## 연구 대상 및 방법

### 1) 연구 대상

1992년 1월부터 1994년 12월까지 원주의과대학 외과 교실에서 대장, 직장암으로 수술을 시행받은 121명의 환자중 유세포 측정법을 시행한 85예를 대상으로 하였다. 여기에는 타부위에 악성종양이 동반된 환자, 근치적 절제술을 시행치 못했거나 전이성 암인 경우, 조직생검만을 시행하였거나, 선암이 아닌 경우는 제외되었다.

### 2) 유세포 측정 및 연구방법

유세포 측정을 위해 paraffin 포매조직을 50  $\mu$ m 두께로 잘라 이를 시험관에 넣고 5 ml xylene (Histo-clear, National Diagnostics, Sonerville, NJ, USA)을 넣어 30분간 paraffin 제거를 2회에 걸쳐 시행후, 상온에서 100%, 95%, 70%, 50% ethanol에 각각 10분씩 처리후, DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)에 10분간 2회 처리시켜 재수화(rehydration)시켰다. 다음 2.5 ml의 0.5% pepsin(pH 1.5)으로 37°C에서 30분간 처리시켜 세포질과 결합조직을 파괴시켜 핵산을 추출한후 41  $\mu$ m nylon mesh로 여과시킨후 pepsin activity를 없애기 위해 1 ml 0.025% pepstatin을 첨가후 10분간 반응시킨 다음 염색액이 RNA와 결합하는 것을 방지

하기 위해 6 drops RNase를 첨가후 37°C에서 30분간 처리시킨 다음 nylon mesh로 여과하여 propidium iodide형광염색약을 가한후 분석때까지 4°C에서 빛을 차단한 상태로 보관하였다. 준비된 sample은 FACScan(Becton & Kickinsion Immunocytometry systems. san joe, CA, USA)를 이용하여 cellFit cell-cycle analysis. version 2.2로 분석하였다.

분석상에서 나타난 DNA histogram상 배수체 결정은 cell cycle상의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> peak가 단일하게 나타날

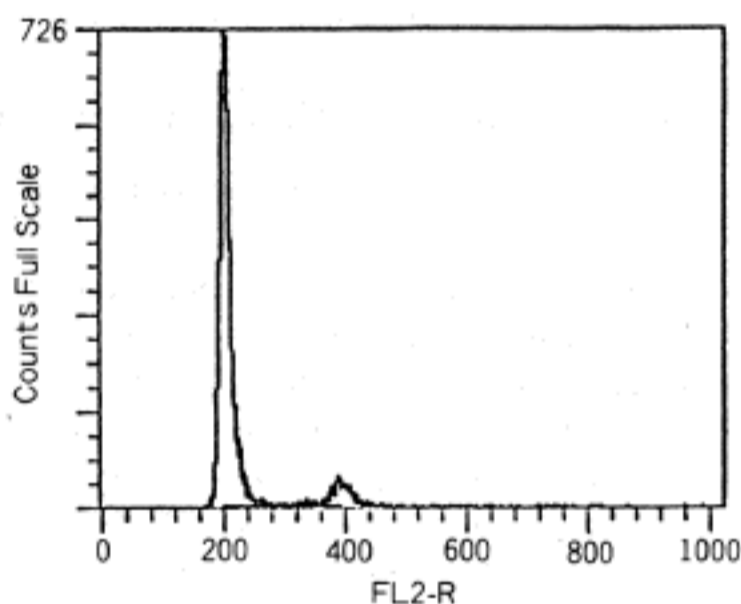


Fig. 1. Diploid DNA histogram.  
X axis: DNA content  
Y axis: Cell event

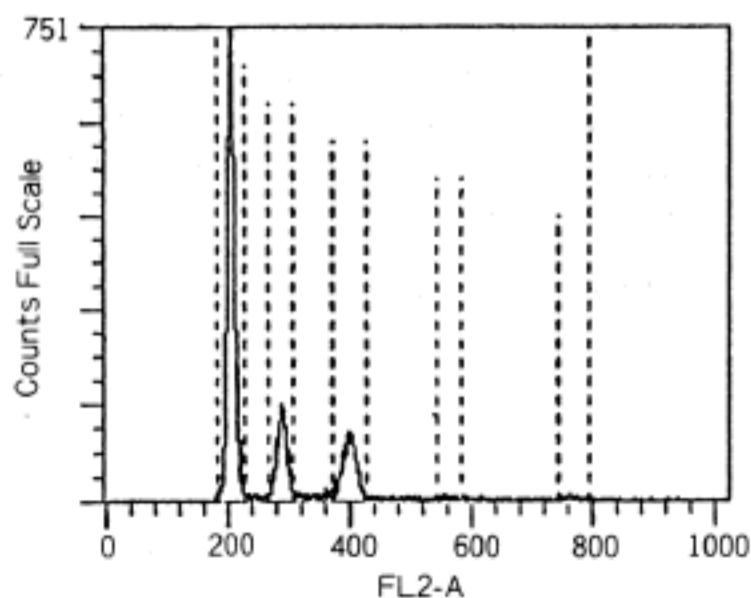


Fig. 2. Aneuploid DNA histogram.  
X axis: DNA content  
Y axis: Cell event

때 diploid로 분류하였고, 두개 이상의  $G_0/G_1$  peak가 관찰되며 그에 해당하는  $G_2/M$  peak가 증명되고 비정상적인  $G_0/G_1$  peak의 비율이 전체 세포수의 10% 이상인 경우를 이배수체(aneuploid)로 정의하였다 (Fig. 1, 2).

DNA index가 1 이하인 경우, 즉  $G_0/G_1$  peak가 diploid의  $G_0/G_1$  peak보다 좌측에 위치할 경우 hypoploid,  $G_0/G_1$  peak가 우측에 위치할 경우 DNA index에 따라 hyperdiploid( $1.1 \leq D.I < 1.9$ ), tetraploid( $1.9 \leq D.I < 2.2$ ), hypertetraploid( $D.I \geq 2.2$ )로 정의하였고 이들은 모두 이배수체(aneuploid)의 범주에 포함시켰다.

S.P.F(S-phase fraction)은 세포주기중  $S/G_0G_1 + S + G_2M \times 100(\%)$ , 즉 종양세포의 합성능력을 백분율로 나타낸 수치로 단독으로도 종양세포의 증식지수로서 의의가 있고 proliferative index(P.I)는 세포주기에서  $S = G_2M/G_0G_1 + S + G_2M \times 100(\%)$ , 즉 S-phase와  $G_2/M$  phase를 합한 백분율로 계산되는데 이는 DNA histogram 변이계수(coefficients of variation, C.V)가 sample간에 서로 상이할때 이들을 합한 값이 세포 분포를 예측하는데 보다 정확하기 때문이다. C.V값은 각 분석마다 6~8% 이하인 경우 분석을 채택하여 받아 들였다. Aneuploid에 있어서 S.P.F 및 P.I 평균값을 기준으로 S.P.F. > 20%, P.I > 30%으로 각각 나누어 DNA ploidy와 함께 기존의 예후인자들과의 상관관계를 분석하였다.

추적조사에 의해 사망, 재발한 예를 aneuploid + S.P.F > 20%, aneuploid, diploid 각각의 군에 있어 분포를 조사하였고 유의성을 검증하였으며 이를 통해 기존의 예후인자중에서 객관성을 파악하였다.

### 3) 통계

통계학적 분석은 SPSS/PC<sup>+</sup>를 이용하였으며 95%에서 유의수준에서 통계학적 검증을 시행하였다. DNA ploidy S.P.F > 20% 그리고 P.I > 30%에 따른 예후인자들과의 상관관계를 chi-square test를 통해 분석하였고, 통계학적 유의성을 검증하였다. 각 aneuploid + S.P.F > 20%, aneuploid, diploid군에 있어 outcome분석은 chi-square test를 시행하였다.

## 결 과

### 1) Patients profiles

환자의 연령분포는 36세에서 83세로 다양하였으며 평균연령은 58.2세였고 남자가 46예 그리고 여자가 39예이었다. 수술전 암성태아성 항원(CEA)수치는 5 ng/ml 이하가 55예(64.7%), 5~20 ng/ml 이하가 18예(21.2%), 20 ng/ml 이상이 12예(14.1%)였고 수술후 암성태아성 항원(CEA) 수치는 5 ng/ml 이하가 65예(76.5%), 5~20 ng/ml가 17예(20.0%), 20 ng/ml 이상이 3예(3.5%)의 분포를 보였다.

종양의 해부학적 발생부위는 간만곡부를 포함한 우측대장이 16예(18.8%), 비장만곡부를 포함한 횡행대장이 11예(12.9%), 좌측대장이 5예(5.9%), S자 결장이 13예(15.3%), 직장이 40예(45.9%)였다. 종양의 크기는 2 cm 이하가 3예(3.5%), 2~6 cm이 37예(43.5%), 7 cm 이상이 45예(52.9%)였다.

종양의 분화도는 고분화가 14예(16.5%), 중등도가 59예(69.4%), 미분화가 12예(14.1%) 분포를 보였고, Duke's 병기에 따른 병기 분류는 병기 A가 2예(2.4%), B1이 4예(4.7%), B2가 32예(37.6%), C1이 4예(4.7%), C2가 40예(47%)이고 원격전이가 관찰된 병기 D가 3예(3.5%)였다.

임과절전이는 45예(53%)에서 양성하였고 40예(47%)에서 음성이었으며 종양의 육안적 소견상 용기형이 4예(4.7%), 케양성 돌출형이 35예(41.2%), 케양성 침윤형이 46예(54.2%), 미만성이 1예(1.2%)였다(Table 1).

### 2) 기존의 예후인자와 비교분석 결과

(1) 전체환자에서 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: 전체 85예중 aneuploid가 65예(76.4%), diploid가 20예(23.6%)로 aneuploid가 많은 분포를 보였고, aneuploid일 경우 증식능이 (S.P.F & P.I) diploid보다 평균 10% 정도 높게 나타나 통계학적으로 의의가 있었다(Table 2).

(2) 나이에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: 배수체의 분포는 40세 이하에서 7예중 6예(86%), 40~50세에서 14예중 13예(93%), 50~60세에서 31예중 19예(61.3%), 60~70세에서 19예중 15예(78.9

Table 1. Patients profile

Parameter	No.(%)
Age	
~40 yr	7(8.3)
41~50 yr	14(16.5)
51~60 yr	31(36.5)
61~70 yr	19(22.3)
71~	14(16.6)
Pre-Op CEA	
under 5ng/ml	55(64.7)
5~20 ng/ml	18(21.2)
above 20 ng/ml	12(14.1)
Site	
ascending	16(18.8)
transverse	11(12.9)
descending	5(5.9)
sigmoid	13(15.3)
rectum	40(45.9)
Size	
<2 cm	3(3.5)
2~6 cm	37(43.5)
7 cm <	45(52.9)
Histologic grade	
well	14(16.5)
moderate	59(69.4)
poor	12(14.1)
Duke's stage	
A	2(2.4)
B1	4(4.7)
B2	32(37.6)
C1	4(4.7)
C2	40(47)
D	3(3.6)
L.N involve	
positive	45(52.9)
negative	40(47.1)
Gross pattern	
polypoid	4(4.7)
ulcerofungating	35(41.2)
ulceroinfiltrative	45(52.9)
diffuse	1(1.2)

%), 70세 이상에서 14예중 12예(85.7%)로 각 연령군에 있어서 aneuploid의 분포에 통계학적 차이는 없었고, 높은 증식능을 보이는 S.P.F.>20% 및 P.I>

Table 2. DNA analysis by flow cytometry

DNA ploidy	No(%)	S.P.F(mean)*	P.I(mean)**
Diploid	20(23.6)	10.55±7.26%	18.07±11.12%
Aneuploid	65(76.4)	20.59±12.50%	26.54±14.16%

\*=0.0062

\*\*=0.0067

‡significance: p<0.05

30%의 빈도도 각 연령간에 분포의 차이는 없어 나이와 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계는 없었다(Table 3).

(3) 수술전 암성태아성 항원 수치에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: 배수체는 수술전 암성태아성 항원 수치가 5 ng/ml 이하인 55예중 42예(76.4%), 5~20 ng/ml인 18예중 13예(72.2%), 20 ng/ml 이상에서 12예중 10예(83.3%)에서 aneuploid의 분포를 보여 각 군이 있어 배수체 분포에는 차이가 없었고, S.P.F>20% 및 P.I>30%인 경우도 차이를 보이지 않아 수술전 암성태아성항원과 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계는 없었다(Table 4).

(4) 종양의 부위에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: 해부학적인 부위에 따른 aneuploid 및 S.P.F>20%, P.I>30%의 빈도는 각 부위에 따라 비슷한 분포를 보였다. aneuploid가 descending colon, rectum에서 각각 5예중 5예(100%), 40예중 33예(82.5%)로 비교적 높은 빈도를 보였으나 통계학적 의미는 없어 종양의 해부학적 부위도 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계는 없었다(Table 5).

(5) 종양의 크기에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: 종양의 크기를 2 cm 이하, 2~6 cm, 7 cm 이상으로 나누어 분석한 결과 2 cm 이하인 경우 3예에서 모두 aneuploid를 나타냈으나 통계학적 의미는 없었고, 2~6 cm 및 7 cm 이상의 경우 aneuploid의 분포에 차이가 없었고, S.P.F. 20% 및 P.I>30%의 빈도도 각군간에 비슷한 분포를 보여 종양의 크기에 따라 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계는 없었다(Table 6).

(6) 조직학적 분화도에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: aneuploid는 중등도 및 미분화에서

**Table 3. Correlation of DNA analysis with age**

Age	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
~40 yr	7(100)	1(14)	6(86)	4(57)	4(57)
41~50 yr	14(100)	1(7)	13(93)	5(35.7)	6(42.9)
51~60 yr	31(100)	12(38.8)	19(61.3)	7(22.6)	7(22.6)
61~70 yr	19(100)	4(21.1)	15(78.9)	9(47.4)	8(42.1)
71~	14(100)	2(14.3)	12(85.7)	7(50)	6(42.9)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.1296	0.1844	0.2324

<sup>f</sup> significance: p<0.05

**Table 4. Correlation of DNA analysis with pre-Op CEA**

CEA	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
< 5	55(100)	13(23.6)	42(76.4)	17(30.9)	16(29.1)
5~20	18(100)	5(27.8)	13(72.2)	8(44.4)	9(50)
20<	12(100)	2(16.7)	10(83.7)	7(58.3)	6(50)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.7908	0.1978	0.2785

<sup>f</sup> significance: p<0.05

**Table 5. Correlation of DNA analysis with site**

Site	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
Ascending	16(100)	5(31.3)	11(68.7)	4(25)	5(31.3)
Transverse	11(100)	4(36.4)	7(63.6)	5(45.5)	5(45.5)
Descending	5(100)	0	5(100)	1(20)	1(20)
Sigmoid	13(100)	4(30.8)	9(69.2)	7(53.8)	6(46.2)
Rectum	40(100)	7(17.5)	33(82.5)	15(37.5)	13(35)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.4884	0.3823	0.7275

<sup>f</sup> significance: p<0.05

각각 59예중 49예(83.1%), 12예중 9예(75%)로 고분화에서보다 높게 나타나 aneuploid일수록 종양의 분화도가 나쁘게 나타나고, S.P.F>20% 및 P.I>30%의 빈도도 미분화에서 모두 12예중 8예(66.7%)의 빈도를 보여 증식능이 높을수록 종양의 분화도가 나쁘게

나타나 종양의 조직학적 분화도에 따라 배수체 분포 및 증식능은 통계학적으로 유의하게 상관관계를 보였다(Table 7).

(7) 종양의 병기에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: aneuploid는 각 병기에 다른 빈도가 50~

**Table 6. Correlation of DNA analysis in size**

Size	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
< 2 cm	3(100)	0	3(100)	1(33.3)	1(33.3)
2~6 cm	37(100)	7(18.9)	30(81.1)	14(37.8)	11(29.7)
7 cm <	45(100)	13(28.9)	32(71.1)	17(37.8)	19(42.2)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.3573	0.7944	0.7414

\* significance:  $p < 0.05$

**Table 7. Correlation of DNA analysis with histologic grade**

Differentiation	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
Well	14(100)	7(50)	7(50)	3(21.4)	3(21.4)
Moderate	59(100)	10(16.9)	49(83.1)	21(35.6)	20(33.9)
Poor	12(100)	3(25)	9(75)	8(66.7)	8(66.7)
Total	85	20	65	41	32
p-value			0.0319*	0.0492*	0.0455*

\* significance:  $p < 0.05$

**Table 8. Correlation of DNA analysis with stage(Duke's stage)**

Stage	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
A	2(100)	1(50)	1(50)	0	0
B1	4(100)	0	4(100)	1(25)	0
B2	32(100)	12(37.5)	20(62.5)	7(21.9)	7(21.9)
C1	4(100)	1(25)	3(75)	1(25)	0
C2	40(100)	6(15)	34(85)	20(50)	21(52.5)
D	3(100)	0	3(100)	3(100)	3(100)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.0940	0.0467*	0.0104*

\* significance:  $p < 0.05$

100%로 유사하게 나타나 병기에 따른 분포의 차이를 보이지 않아 병기가 진행될수록 aneuploid가 많이 나타나는 상관관계를 보이지 않았고, S.P.F>20% 및 P.I>30%의 경우 병기 C, D에서 50~100%로 병기 A, B의 20~25%보다 높게 나타나 병기가 높을수록 증식능이 높게 나타나는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 즉 종양의 병기는 증식능과 통계학적으로 유

의한 상관관계를 보였다(Table 8).

(8) 임파선 전이에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: aneuploid의 빈도는 임파선 전이가 양성인 경우 45예중 39예(86.7%)로 임파선 전이가 음성인 40예중 26예(65%)보다 의미있게 많이 나타났고, 임파선 전이가 양성인 경우에 음성인 경우보다 높은 증식능(S.P.F>20%, P.I>30%)을 보였다. 즉 임파선 전

**Table 9. Correlation of DNA analysis with L.N involve**

L.N involve	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
Positive	45(100)	6(13.3)	39(86.7)	23(51.1)	23(51.1)
Negative	40(100)	14(35)	26(65)	9(22.5)	8(20)
Total	85	20	65	32	31
p-value			0.0186*	0.0028*	0.0114*

\*significance: p<0.05

**Table 10. Correlation of DNA analysis with gross pattern**

Gross pattern	No.(%)	Diploid(%)	Aneuploid(%)	S.P.F>20%(%)	P.I>30%(%)
Polypoid	4(100)	3(75)	1(25)	0	0
Ulcerofungating	35(100)	7(20)	28(80)	13(37.1)	10(28.6)
Ulceroinfiltrative	45(100)	10(22.2)	36(80)	18(39.1)	20(43.5)
Diffuse	1(100)	1(100)	0	1(100)	1(100)
Total	85(100)	20(23.6)	65(76.4)	32(100)	31(100)
p-value			0.0447*	0.2777	0.0869

\*significance: p<0.05

이가 양성인 경우 aneuploid의 빈도가 많고, 높은 증식능을 보여 임파선 전이여부는 배수체 분포 및 증식능과 유의한 상관관계를 보였다(Table 9).

(9) 종양의 육안적 형태에 따른 배수체 분포 및 증식능과의 상관관계: aneuploid는 궤양성 돌출형에서 35예중 28예(80%), 궤양성 침윤형에서 45예중 36예(78.2%)로 단순용기형보다 높은 빈도를 보여 유의한 차이를 보였고, 증식능은 각군에 있어 비슷한 분포를 보여 상관관계를 찾을 수 없었다. 즉 종양의 육안적 형태는 배수체의 분포와 유의한 상관관계를 보였다(Table 10)

### 3) Follow up

85예중 80예에서 추적조사가 가능하였으나 기간이 충분치 않고 증예수가 만족스럽지 않아 생존율을 구하는데는 무리가 있어 추적조사중 사망, 재발한 환자에 있어서 DNA ploidy 및 S.P.F%, P.I%값의 분포를 분석하였다. 평균 추적기간은 17개월이었으며 63예에 있어 생존이 확인되었고, 7예에서 재발되었고 사망한

**Table 11. Follow up**

mean follow up time: 17 months

Outcome	No.(%)
Survival	63 pt(74.2)
Recurrence	7 pt(8.1)
Dead*	10 pt(11.8)
Lost to follow up	5 pt(5.9)
total	85 pt(100)

\* dead에서 recurrence가 5예 존재

경우는 10예였다(Table 11).

DNA aneuploid+S.P.F>20%인 군에서 추적가능했던 29예중 9예(28.2%)가 사망 재발하여 나쁜예후를 나타냈고, aneuploid군에서는 추적가능한 31예중 사망, 재발이 5예(15.1%)있었다. Diploid군에서는 추적가능한 20예중 사망, 재발한 경우가 3예(15%)로 다른 군에 비해 좋은 예후를 나타내어 유의한 차이를 보

**Table 12. Patient outcome with DNA analysis**

Outcome	Aneuploid + S.P.F > 20% (%) (n = 32)	Aneuploid (%) (n = 33)	Diploid (%) (n = 20)
Alive	20(62.5)	26(78.8)	18(85)
Recur & dead	9(28.2)	5(15.1)	3(15)
recur	3	3	1
dead	6	2	2
Lost	3(9.4)	2(6.1)	0

\*p=0.0271

**Table 13. 10 death related to the DNA analysis**

Stage	No.	Diploid	Aneuploid	S.P.F > 20%	P.I > 30%
B2	4	1	3	2	1
C1	1	1	0	0	0
C2	3	0	3	2	2
D	2	0	2	2	2
Total	10	2	8	6	5

**Table 14. Significance of clinicopathological parameter by DNA analysis**

Clinicopathologic factor	DNA ploidy	S.P.F	P.I
Age	No	No	No
Pre-Op CEA	No	No	No
Site	No	No	No
Size	No	No	No
Histologic grade	Yes	Yes	Yes
Stage(Duke's)	No	Yes	Yes
L.N involve	Yes	yes	Yes
Gross pattern	Yes	No	No

였다(Table 12).

사망한 10예의 경우 평균생존기간은 21개월이었고 aneuploid가 8예, S.P.F > 20%가 6예, P.I > 30%는 5예의 분포를 보였다(Table 13).

이상의 결과로 유세포 측정법에 의한 DNA ploidy 및 S.P.F%, P.I는 대장, 직장암 환자의 예후를 예측하는 객관적인 예후인자로 생각할 수 있고, 예후인자와의 상관관계 분석을 통해 기존의 예후인자중 종양의

분화도, 병기, 임파선 전이 여부, 종양의 육안적 형태는 DNA analysis 결과와 더불어 비교적 객관적인 예후인자라고 할 수 있다(Table 14).

## 고 찰

1982년 Wolley등<sup>28)</sup>이 유세포 측정법을 이용, DNA ploidy에 따른 5년 생존율이 DNA diploid에서 65%인데 반해 aneuploid에서는 7.5%에 불과하다고 처음보고한 이래 많은 연구들이<sup>1,4,12,18)</sup> 대장, 직장암의 예후인자로서의 DNA ploidy 및 증식능에 대한 결과를 보고하고 있다. Philip등은 aneuploid에서 5년생존율이 35%이고 diploid에서 57%이며, P.I (proliferative index)값이 25% >에서 5년 생존율이 70%, 25% <에서 40%라고 보고하였고<sup>18)</sup> Barbara등은 Duke's 병기 A, B 환자에서 P.I값이 20 ≤에서 나쁜예후를 보이고 20 >인 경우에 비교적 좋은 예후를 보인다고 보고 하였다<sup>4)</sup>. 이렇게 현재까지의 대부분의 보고들은 유세포 측정법에 의한 DNA 분석의 결과들이 대장, 직장암 환자에서 중요한 예후인자라는 Wolley등의 보고를 뒷받침 해주고 있다.



본 연구에서 85예중 diploid와 aneuploid는 각각 20예(23.5%), 65예(76.5%)로 나타났다. Stefan등<sup>20)</sup>은 그들의 연구에서 diploid는 38%, aneuploid는 62%라고 보고 하였는데 다른 연구자들<sup>8,19,30)</sup>에 의하면 aneuploid는 55~67%로 나타난다고 하였고 Barbara등<sup>4)</sup>은 저자들의 연구와 비슷하게 diploid 25% aneuploid 75%의 분포를 보고 하였다.

나이는 대장, 직장암의 한 예후인자로 여겨지고 있는데 Jones<sup>8)</sup>, Kenneth<sup>13)</sup>등은 70세 이하에서 diploid가 16예, aneuploid가 51예로 나이가 많을수록 aneuploid의 빈도가 높게 나타난다고 보고하였고 Harry<sup>12)</sup>, Scott<sup>17)</sup>등은 나이는 DNA ploidy여부와 관련이 없다고 보고하였다. 저자들의 결과에서도 나이에 따른 DNA ploidy분포를 분석한 결과 각 연령군에 있어 aneuploid의 빈도에 차이성은 없었다.

암성태아성 항원은 수술전에 예후 판정이나 근치적 절제술을 시행한 환자에서 재발을 조기에 찾아냄으로써 적절한 치료를 결정짓는데 임상적 의의가 있다고 알려져 있는데 Scott등<sup>17)</sup>은 암성태아성 항원수치가  $2.5 \text{ ng/ml} >$ ,  $2.5 \sim 10 \text{ ng/ml} <$ 인 군에서 각각 diploid는 52%, 40%, 54% 이고 aneuploid는 48%, 60%, 46%로 DNA ploidy분포에 차이는 없었다고 보고 하였다. 그러나 Rognum등<sup>25)</sup>은 암성태아성 항원 수치가 높을수록 aneuploid가 많다고 보고 하였고, Cooper등<sup>6)</sup>은 수술전 및 수술후의 암성태아성 항원 수치가 각각  $20 \text{ ng/ml}$  이상인 경우에 예후가 나쁘다고 보고 하였는데 저자들이 암성태아성 항원수치들  $< 5 \text{ ng/ml}$ ,  $5 \sim 20 \text{ ng/ml}$ ,  $> 20 \text{ ng/ml}$ 의 군으로 나누어 DNA ploidy 분포를 알아본 결과 각 군에 있어 aneuploid의 빈도는 유의한 분포의 차이를 보이지 않았다.

Jones등<sup>8)</sup>은 대장 및 직장암 환자에서 종양의 위치에 따른 DNA ploidy분포를 분석한 결과 종양의 위치가 우측, 좌측에 상관없이 aneuploid의 빈도는 차이가 없다고 하였는데 Heimann<sup>24)</sup>, Kokal<sup>27)</sup>등도 대장 및 직장의 각각의 부위에 따른 DNA ploidy분포에는 연관이 없다고 보고하였다. 그러나 Scott<sup>17)</sup>, Rognum<sup>25)</sup>등은 ascending colon 보다는 Lt colon 및 rectum에 aneuploid 빈도가 더 많다고 보고하고 있다. 저자들의 결과에서도 종양의 부위에 따른 DNA ploidy에는 유의한 차이가 없었다.

종양의 크기는 일반적으로 병기 분류 및 예후판정의 한 중요한 요소로 알려져 있는데 Kokal등은 종양의 크기와 DNA ploidy분포와는 관계가 없다고 보고하였는데<sup>27)</sup> 저자들의 결과도 종양의 크기에 따른 DNA ploidy 분포에는 차이를 보이지 않았다.

종양의 조직학적 분화도는 중요한 예후인자의 하나로서 Barlogie등<sup>2)</sup>은 미분화형에서 aneuploid의 빈도가 많았다고 보고하고 있다. 일부연구에서 DNA ploidy와 조직학적 분화도에 연관관계는 없다는 보고도 있으나<sup>4,20)</sup> 저자들의 결과에서는 분화도가 중등도, 미분화형에서 aneuploid가 많아 유의한 차이를 보였다.

종양의 병기는 대장, 직장암에 있어서 가장 중요한 예후인자로 알려져 있는데<sup>7)</sup> 병기 구분을 위해 Duke's 병기 분류법에 따른 병기중 A, B에서는 diploid가 많고, C, D에서는 aneuploid가 많은 것으로 보고되고 Banner<sup>4)</sup>, Seckinger<sup>7)</sup>, Jones<sup>8)</sup>등도 병기가 진행될수록 aneuploid의 빈도가 높다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 DNA ploidy와 병기와의 상관관계에서 병기가 C, D일수록 aneuploid가 많은 빈도를 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다.

환자분포 및 사망환자에서 병기 B2와 C2의 분포가 비슷하여 다시 DNA ploidy에 따른 임파절 전이 여부를 관찰한 결과 aneuploid일수록 임파절 전이가 음성보다 양성인 경우가 유의하게 많이 나타났는데 이에 반해 Banner등<sup>4)</sup>은 임파절 전이와 DNA ploidy와는 관련이 없다고 보고하기도 했다.

Ngoi<sup>19)</sup>, Sugarbaker<sup>22)</sup>, 홍<sup>29)</sup>등의 보고에 의하면 종양의 육안적 형태에 따른 3년 생존율은 종괴형이 75%, 침윤형이 57.9%로 이 역시 예후인자의 하나로 보고하고 있다. 본 연구에서 DNA ploidy와의 관계를 관찰한 결과 aneuploid일수록 폐양성 형태가 많이 나타났다.

유세포 측정법에 의해 측정되는 세포 증식 능력의 척도로는 S.P.F(S-phase Fraction), G<sub>2</sub>M fraction 그리고 P.I(proliferative index)가 있다. 그러나 최등<sup>30)</sup>은 G<sub>2</sub>M의 경우 diploid와 aneuploid 사이에 차이가 없다고 보고하였고 P.I값 자체가 S.P.F와 G<sub>2</sub>M을 합한 비율로 산출되므로 저자들은 본연구에서 S.P.F와 P.I 값을 산출하여 예후 인자로 보고 분석을 시행하였다. Ngoi등<sup>19)</sup>의 보고에 의하면 S.P.F는 dip-

loid에서  $15.1 \pm 0.8\%$ , aneuploid에서  $21.1 \pm 2.0\%$ 로 보고하였는데 저자들의 연구에서도 비슷한 결과를 보여주고 있다. 이에 반해 최등<sup>30)</sup>은 그들의 연구에서 S.P.F값이 평균  $40.3 \pm 17.7\%$ 라고 비교적 높은 결과를 보고하고 있다.

P.I값은 대략 13~26으로 보고되고 있으나<sup>18,21,23)</sup> 최등<sup>30)</sup>은 그들의 연구에서 P.I 값은 평균  $45.3 \pm 18.2$ 로 높게 보고하고 있다.

이러한 각 연구들 사이의 S.P.F% 및 P.I% 결과의 차이는 선택된 sample의 차이, sample의 처리과정의 차이, 검사자의 주관적 요소, 연구증례수의 차이들에 의한 것으로 생각할 수 있는데 특히 Bauer<sup>14)</sup>에 의하면 연구증례의 수가 충분해야 한다고 주장하고 있는데 그들은 이의 극복을 위해서는 충분한 연구증례를 가지고 내적 질 관리(internal quality control)을 시행하는 것이 중요하다고 한다. 저자들은 본연구에서 S.P.F 및 P.I 값을 aneuploid의 평균값을 기준으로 S.P.F는 20%를 P.I는 30%를 기준으로 높은 군과 낮은 군으로 각각 나누어 분석하였다. 이 결과 나이, 암 성태아성 항원수치, 종양의 부위, 크기, 종양의 육안적 형태와는 S.P.F 및 P.I의 수치에 유의한 차이가 없었고 종양의 분화도, 병기, 임파선 전이에 따라 S.P.F, P.I 수치가 높게 나타나 유의한 상관관계를 보였다. 즉 S.P.F > 20%, P.I > 30%인 경우에 미분화형이 많고, 병기가 높으며, 임파선 전이는 양성이 많은 것으로 나타나고 있다.

유세포 측정의 결과는 분석유형에 따라 상이하게 나타날 수 있는데 대부분 변이계수(C.V: Coefficient of variants) 수치를 기준으로 분석의 적정성을 평가하여 결과를 받아들여지게 된다. 변이계수의 값은 클수록 histogram상의 peak 넓어지며  $G_0G_1$ 에 가깝게 위치하는 비정상 세포집단을 찾아내지 못할 위험이 크며, 또는 2개의 비정상적인 세포 집단이 넓은 peak 하나에 숨겨질 위험이 있다. 일반적으로 변이계수 값이 6%를 기준으로 6%이하인 경우 의의를 두고 이보다 큰 경우에는 분석이 적절하지 않다고 한다<sup>28)</sup>. 본 연구에서는 변이계수를 6~8%이내의 것에 적정성을 두어 결과를 받아들였다.

Kouri등은 종양의 병기가 가장 중요한 예후인자로서 S.P.F는 예후와 무관하다고 보고하였으나<sup>10)</sup> Heimann등<sup>24)</sup>이 S.P.F는 매우 유용한 예후인자로서

S.P.F 수치를 20%를 기준으로 연구한 결과 생존율의 차이가 있다고 보고하였고 Venkatesh등<sup>16)</sup>은 그들의 연구에서 aneuploid+S.P.F > 20%, aneuploid, diploid의 3군으로 나누어 예후를 분석한 결과 aneuploid+S.P.F > 20%의 군에서 재발율, 사망률이 높아 이는 중요한 예후인자라고 보고하였다. 저자들의 연구에서 추적조사가 가능했던 29예의 aneuploid+S.P.F > 20%인 군에서 사망 6예, 재발 3예가 있었고, diploid군에서 20예중 사망 2예, 재발 1예가 있었는데 aneuploid+S.P.F > 20%인 군에서 통계적으로 유의하게 aneuploid, diploid군보다 사망, 재발한 예가 많은 것으로 나타났다. 즉 DNA 분석결과상 aneuploid 및 S.P.F > 20%인 경우에 나쁜예후를 가짐을 알 수 있다.

이상의 결과를 토대로 DNA분석에서 aneuploid 및 S.P.F > 20%, P.I > 30%는 객관적인 예후인자로 고려할 때 상관관계분석에서 나타난 종양의 분화도, 병기, 임파선 전이 유무, 육안적 형태들도 비교적 객관적인 예후인자라고 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 충분한 증례수가 안되고 기간이 짧은 관계로 저자들의 연구결과가 만족할 만한 객관성 및 타당성을 가지는 데는 무리가 있겠지만 앞으로의 계속된 유세포 측정 및 추적조사를 통해 충분한 증례를 가지고 생존율을 분석할 수 있을때 보다 만족스럽고 객관적인 결과를 얻으리라 생각한다.

저자들의 분석대로 DNA ploidy, S.P.F 그리고 P.I는 대장, 직장암 환자에서 객관적인 예후인자로 의의가 있다면 수술전 조직생검 또는 수술후에 이들 예후인자들의 평가를 통하여 종양의 생물학적 특성을 파악함으로써 치료에 도움이 될 것이다. 특히나 유세포 측정의 결과에만 의존하기 보다는 객관적인 기존의 예후인자를 같이 고려 할때 보다 합리적이고 적극적인 치료 및 예후의 평가가 이루어 질것이다. 이를 통해 유세포 측정에 의한 종양세포의 특성과악의 보완 및 합리적인 대장, 직장암 치료가 기대된다.

## 결 론

저자들은 1992년 1월부터 1994년 12월까지 연세대학교 원주의과대학 일반외과학 교실에서 대장, 직장암으로 수술을 시행한 121명의 환자중 유세포 측정법을

시행한 85예를 대상으로 DNA ploidy와 증식능이 객관적인 예후인자로 타당성이 있는가를 알아보았고, 이를 기존의 예후인자와의 상관관계분석을 통해 객관적으로 이용할 수 있는 기존의 예후인자를 알아보았다.

DNA ploidy 및 S.P.F, P.I는 기존의 예후인자중 종양의 분화도, 종양의 병기, 임파선 전이 여부, 종양의 육안적 형태와 유의한 상관관계를 보였고, 환자의 outcome 분석에서 aneuploid+S.P.F>20%의 군에서 사망, 재발한 예가 많아 DNA ploidy 및 증식능은 객관적인 예후인자로 타당성이 있었고, 이를 통해 기존의 예후인자중 종양의 분화도, 병기, 임파선전이 여부, 육안적형태 역시 비교적 객관적인 예후인자라고 할 수 있겠다.

본 연구를 통해 수술전 조직생검 또는 수술후에 이들 예후인자들의 적절한 평가를 통하여 종양의 생물학적 특성을 파악함으로써 치료에 도움이 될 것이라 여기며, 특히나 유세포 측정의 결과에만 의존하기보다는 기존의 예후인자를 같이고려함으로써 보다 합리적이고 적극적인 치료 및 예후의 평가가 이루어질 것이다. 이를 통해 유세포 측정에 의한 종양세포의 특성파악의 보완 및 합리적인 대장, 직장암의 치료가 기대된다.

## REFERENCES

- 1) Ando Y: Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in colorectal cancer(Japanese). *Journal of Japan Society* 91(11): 1700, 1990
- 2) Brthel Barlogie Martin N, Raber, Johannes Schumann, et al: Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43: 3982, 1983
- 3) Blomjous CEM, Schipper NW, Baak JPA, et al: Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol* 41: 21, 1988
- 4) Barbara F, Banner, JE tomas-De La Vega devid L Roseman, et al: Should folw cytometric DNA analysis procede defintive surgery for colon carcinoma? *Ann Surg* 202(6): 740, 1985
- 5) Bauer KD, Lincoln ST, Vera-Roman JM, et al: Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colorectal adenocarcinoma. *Lab Invest* 57: 329, 1987
- 6) Cooper EH, Neville AM: *Logic & cogistics of large bowel cancer, gastrointestinal tract cancer.* Lipkin M & Good RA. New York, plenum press 442, 1978
- 7) Daniel Seckingerm, Everett Sagarbaker, Oskar Franksurt: DNA content in hyman cancer. *Arch Pathol Lab Med* 57(3): 329, 1987
- 8) DJ Jones, M Moore, PF Schofield: Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *Br J Surg* 75: 26, 1988
- 9) Dukes CE, Bussey HJR: The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer* 12: 309, 1958
- 10) Erba E, Ubezio P, Pepe S, et al: Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancer. *Br J Cancer* 60: 45, 1989
- 11) Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM: Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62: 331, 1988
- 12) Harry F, Van den longh, Gerrit Groffioen, Cornelis J, Cornelisse: Flow cytometric detection of aneuploid in colorectal adenomas. *Cancer Res* 45: 3392, 1985
- 13) Kenneth D, Bauer, Sarah T, Lincoln, Jose M, Vera-Roman, et al: Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinoma. *Lab Invest* 57(3): 329, 1987
- 14) Kenneth D, Bauer, C Bruce Bagwell, Walter Giaretti, et al: Consensus review of the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 14: 486, 1993
- 15) Kouri M, Pyrhomen S, Mechklin JP, et al: The prognostic value of DNA ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 62(6): 976, 1990
- 16) KS Venkatesh, David J, Weingart, PJ Ramanujam: Comparison of double and single parameters in DNA analysis for staging and as a prognostic indicator in patients with colon and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 37(11): 1142, 1994
- 17) Nigel A, Scott, Harry S, Wieand, Charles G, Moertel, et al: Colorectal cancer. *Arch Surg* 122: 1375, 1987
- 18) Philip Quirke, Michael F, Dixon, Andrew D Clayden, et al: Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 151: 285, 1987

- 19) Sing Shang Ngoi, Lisa Staiano-Coico, Thomas A Godwin, et al: *Abnormal DNA ploidy and proliferative pattern in superficial colonic epithelium adjacent to colorectal cancer. Cancer* 66: 953, 1990
- 20) Stefan O, Emdin, Roger Stenling, Goran Roos: *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. Cancer* 15: 1282, 1987
- 21) Streffer C, van Beuningen D, Gross E, et al: *Predictive assays for the therapy of rectal carcinoma. Radiother Oncol* 5: 303, 1986
- 22) Sugarbaker PH, Gunderson LL, Wittes RE: *Colorectal cancer. Cancer, principles and practical oncology. 2nd ed, Lippincott, Philadelphia, 795, 1992*
- 23) Tribukait B, Hanmarberg C, Rubio C: *Ploidy and proliferation patterns in colorectal adenocarcinomas related to Duke's classification and to histopathological differentiation a flow cytometric DNA study. Acta Pathol Microbiol Scand(A)* 91: 89, 1983
- 24) Tomas M, Heimann, Giorgio Martinelli, Arnold Szporn, et al: *Prognostic significance of DNA content abnormalities in young patients with colorectal cancer. Accepted for Publication* 210(6): 792, 1989
- 25) TO Rognum, E Thorud, K Ellgio, et al: *Large bowel carcinomas with different ploidy, related to secretory component, IgA, and CEA in epithelium and plasma. Br J Cancer* 45: 921, 1982
- 26) TO Rognum, E Thorud, E Lund: *Survival of large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy. Br J Cancer* 56: 633, 1987
- 27) William Kokal, Kharil Sheibani, Jose Terz, et al: *Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA* 255(22): 3123, 1986
- 28) Wolley RC, Schreiher K, Koss LG, Larns M, Shurman A: *DNA distributio in human carcinomas and its relationship to clinical behavior. J Natl Cancer Inst* 69: 15, 1982
- 29) 홍성국, 전호경, 이갑국: 대장 및 직장암에 대한 임상적 고찰. 대한대장항문병학회지 4: 251, 1988
- 30) 최홍조, 이상형, 김영훈등: 결직장암 환자에서 DNA ploidy와 증식능이 예후에 미치는 영향. 대한대장항문병학회지 11: 55, 1994