

## 직·결장의 악성종양에서 DNA Ploidy와 술전 CEA가 5년 생존율에 미치는 영향

인하대학교 의과대학 외과학교실

강규철 · 정성택 · 윤민영 · 최선근 · 허윤석 · 이건영 · 김세중 · 조영업 · 안승익 · 홍기천 · 신석환  
김경래 · 우제홍

### Influences of DNA Ploidy and Pre-operative CEA Level on the 5 Year Survival Rate in Colorectal Cancer

Kyu Chul Kang, M.D., Sung Teak Jung, M.D., Min Young Yoon, M.D., Sun Keun Choi, M.D., Yoon Seok Hur, M.D., Keon Young Lee, M.D., Sei Joong Kim, M.D., Young Up Cho, M.D., Seung Ik Ahn, M.D., Kee Chun Hong, M.D., Seok Hwan Shin, M.D., Kyoung Rae Kim, M.D., Ze Hong Woo, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

**Purpose:** The role of DNA ploidy in colon cancer as a prognostic factor and the correlation of DNA ploidy with the established prognostic factors have been studied for the past 20 years. The purpose of this study was to look into the correlation of DNA ploidy with the prognostic factors and to assess the influence of pre-operative CEA level and DNA ploidy on survival in colorectal cancer.

**Methods:** A total of 319 patients with colorectal cancer received radical operations, and DNA flow cytometric analyses of DNA ploidy patterns were performed at the Department of Surgery, Inha University Hospital, from June 1996 to July 2002. The patients were divided into 2 groups according to the DNA ploidy patterns.

**Results:** The DNA ploidy of the colorectal tumors were compared to various prognostic factors, the pre-operative CEA level and lymph-node metastasis. The latter two showed correlations to the DNA ploidy. The 5-year survival rate for patients with a normal pre-operative CEA level and DNA diploidy was 85.6% compared to 47.8% for patients with both high pre-operative CEA level and DNA aneuploidy, a statistically significant correlation ( $P=0.0003$ ).

**Conclusions:** This study suggests that DNA ploidy in patients with colon cancer has a significant correlation

with pre-operative CEA level and lymph-node metastasis. Especially, the pre-operative CEA level and DNA ploidy in patients with colorectal cancer may play a role as useful prognostic factors. *J Korean Soc Coloproctol* 2004;20: 157-162

**Key Words:** Colorectal neoplasms, Pre-operative care, Carcino-embryonic antigen, DNA ploidy, Survival rate  
결장·직장 종양, 수술전처치, 암태아성 항원, DNA 배수성, 생존율

### 서 론

대장의 악성종양은 발생률도 매우 높은 편이며, 전체 악성종양으로 인한 사망에 있어서 위, 간, 호흡기계 암 이후 4번째를 차지하는 종양이다. 그리고 광범위한 절제술을 받고난 뒤에도 5년 생존율은 약 60%에 머무르고 있다.<sup>1</sup> 기존의 연구에서 수술 후 예후를 예측할 수 있는 객관적인 지표로서는 원발종양의 침습정도, 림프절 전이 상태, 원격전이의 유·무, 원발종양의 크기 및 수술 전·후 CEA와 같은 종양 표식자 등의 다양한 인자들이 제시되어 왔다.<sup>2</sup> 대장의 악성종양에서 유세포 측정기 분석을 통한 DNA에 관한 연구는 1982년 Wolley 등<sup>3</sup>이 예후인자로서의 가치를 보고한 이래로 독립된 예후인자로서 또는 기존의 예후인자와의 상관성에 대한 연구로서 지난 이십여 년 간 활발히 진행되어 왔으며 국내외의 여러 보고를 통하여 그 타당성이 인정되고 있다.<sup>4</sup> 이에 저자들은 DNA 분석을 통하여 DNA ploidy에 대한 기존인자들과의 상관관계 및 5년 생존율에 대한 상관관계를 규명하고, 예후인자들 중 비교적 그 효용성을 인정받고 있는 술 전 CEA level에 따른 5년 생존율을 분석하여 DNA 분석결과와의 연관성을 규명함으로써 대장의 악성종양에서 DNA ploidy와 술 전 CEA level이 5년 생존율에 미치는 영향에 대해서 평가해 보고자 하였다.

책임저자: 우제홍, 인천시 중구 신흥동 3가 7-206  
인하대병원 외과(우편번호: 400-013)  
Tel: 032-890-3143, Fax: 032-890-3097  
E-mail: woopark@inha.ac.kr

2003년 아시아 대장항문학회에서 포스터 발표하였음.

방 법

1996년 6월부터 2002년 7월까지 외과에서 대장 악성종양으로 근치적 대장 절제술을 받은 환자로서 DNA 유세포 측정기분석을 시행한 390명의 환자 중 추적 손실된 45명과 Astler-Coller stage D인 환자 26명을 제외한 319명을 대상으로 하였다. 환자의 평균 나이는 59.3세였고, 연령범위는 23세부터 91세였다. 대상 환자의 남녀 구성은 남자가 185명(58%), 여자가 134명(42%)이었다. 각 환자의 병기는 Astler-Coller stage A가 10명(3.1%), B1이 33명(10.3%), B2가 119명(37.3%), C1이 14명(4.4%), C2가 143명(44.8%)이었다. 또한 평균 술 전 CEA는 14.8 ng/ml로 범위는 0.3에서 558이었으며, CEA가 6 ng/ml 이하로 정상인 환자는 214명(67.1%), 6 ng/ml 이상인 환자는 100명(31.3%)이었다(Table 1). 환자의 원발종양 발생장소는 상행 및 횡행 결장이 61명(19.1%), 하행결장이 10명(3.1%), 에스자 결장이 64명(20.1%), 직장이 179명(56.1%), 다발성이 5명(1.6%)이었다(Fig. 1).

각 환자로부터 술 후 암조직의 포맷된 파라핀 블록을 이용하여 검사를 시행하였다. 검체를 50 $\mu$ m의 두께로 박절하여 종양의 크기에 따라 3~5절편을 얻고 이를 각각 10 ml의 xylene으로 실온에서 30분, 10분, 10분씩 총 3회의 탈파라핀 과정을 거쳐 원심분리하였다. 다음으로 10 ml absolute alcohol에 10분 간 2회, 95%, 70%, 50% alcohol 10 ml에 각각 10분 간 1회씩 처리하고 10 ml의 증류수에 하루 동안 흡수시켰다. 증류수를 제거한 후 0.5%, 2 ml의 pepsin solution에 넣어 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분간 배양하고 원침시킨 후 citrate buffer 50 $\mu$ m으로 재부유시킨 뒤 각

Table 1. The characteristics of patients

		Number of patient (%)
Age (mean)		59.3 $\pm$ 12.3
Sex	Male	185 (58.0)
	Female	134 (42.0)
CEA (mean)		14.8 $\pm$ 50.0
CEA	<6 ng/ml	214 (68.2)
	>6 ng/ml	100 (31.8)
Aster-Coller stage	A	10 (3.1)
	B1	33 (10.3)
	B2	119 (37.3)
	C1	14 (4.4)
	C2	143 (44.8)

각 Trypsin, RNase, Propidium iodide가 첨가된 stock solution을 가하고 실온에서 10분 간 방치하여 DNA를 염색하였다. 그 후 47 $\mu$ m pore 크기의 Nylon mesh로 여과하여 single cell suspension을 만들고 Coulter사의 EPICS flow cytometry의 multicycle system을 사용하여 DNA histogram을 얻었다. DNA histogram상 G0/G1에서 하나의 peak를 보이는 경우와 G0/G1의 DNA content 값의 2배에 부합하는 G2M peak를 가지는 경우를 diploid로 판정하였고 G0/G1 pattern을 보이는 경우를 aneuploidy로 판정하였다.

각기 환자를 DNA ploidy에 따라 diploidy군과 aneuploidy군으로 구별한 후 두 군에서의 나이, 성별, 병변의 위치, 원발 종양의 크기, 육안소견, 세포 분화도, 병기, 림프혈관침습 여부, 주위신경침습 여부, 술 전 CEA의 상관관계를 규명하고, 술 전 CEA와 DNA ploidy에 따른 5년 생존율의 상관관계를 분석하였다.

수술 후 환자는 통상적인 방법에 의거하여 외래를 통한 정기적인 추적조사가 이루어졌으며, 외래 추적이 없는 환자에게는 전화조사를 통해 생존 여부 및 생존기간을 확인하였고, 이를 후향적으로 연구하였다.

통계학적 분석은 SPSS 10.0 for Windows 프로그램을 이용하여 처리하였다. DNA ploidy와 기존의 예후인자와의 연관성은 Chi-square와 Student t-test로 분석하였으며, DNA ploidy 및 술전 CEA level에 따른 5년 생존율의 관계는 Kaplan-Meier 생존분석과 log rank test를 시행하여 차이를 검정하였다. 각각의 경우에 있어서 P-value 0.05 미만 시 통계학적 유의성을 인정하였다.

결 과

전체 환자 319명의 DNA ploidy는 aneuploidy가 132명(41.4%), diploidy가 187명(58.6%)이었다. DNA ploidy와 기존의 예후인자들과의 관계를 분석해본 결과 DNA di-

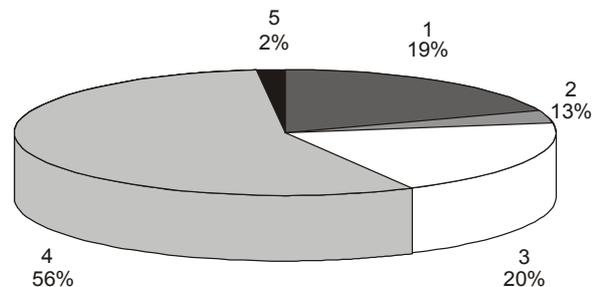


Fig. 1. The site of primary colo-rectal cancer. 1 = Ascending and transverse colon; 2 = descending colon; 3 = sigmoid colon; 4 = rectum; 5 = multiple.

ploidy인 환자의 평균 술 전 CEA level은 10.7 ng/ml인데 반해, DNA aneuploidy인 환자의 평균 술 전 CEA level은 17.7 ng/ml으로 높은 수치를 나타내었으며 이는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(P=0.001). 이와 더불어 DNA diploidy 환자의 림프절 전이율은 36.8%인데 비해, DNA aneuploidy 환자의 림프절 전이율은 46.2%로 높았고, 이 역시 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(P=0.040). 그 외에 다른 인자들인 나이, 성별, 원발병소의 위치, 크기, 육안 소견, 세포분화도, 종양 병기, 림프혈관성 침습, 주위신경침습, Astler-Coller 병기와 DNA ploidy와는 유의한 상관관계를 보이지 않았다(Table 2).

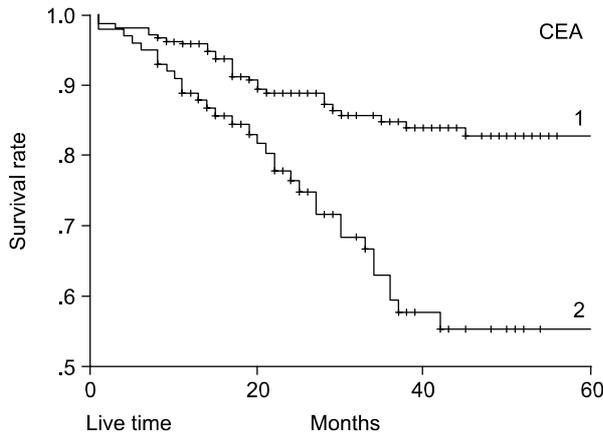
대상 환자 319예 중 추적 조사 기간 내(1996년 6월 ~ 2003년 3월) 사망한 예는 65예였다. 술 전 CEA치에 따른 5년 생존율은 술 전 CEA치가 6 ng/ml 이하로 정상인 경우에는 82%이고 술 전 CEA치가 6 ng/ml 이상일 경우에는 53%로서, 통계적으로 유의하게 술 전 CEA치가 높은 경우에 5년 생존율이 낮았다(P=0.0006)(Fig. 2).

DNA ploidy에 따른 5년 생존율은 diploidy와 aneuploidy에서 각각 76%, 65%로 이는 통계학적으로 유의한 수준은 아니었지만(P=0.102), DNA diploidy 환자군에서 5년 생존율이 높은 것으로 조사되었다(Fig. 3). 또한 DNA ploidy와 술 전 CEA를 동시에 고려하여 5년 생존율을 조사해본 결

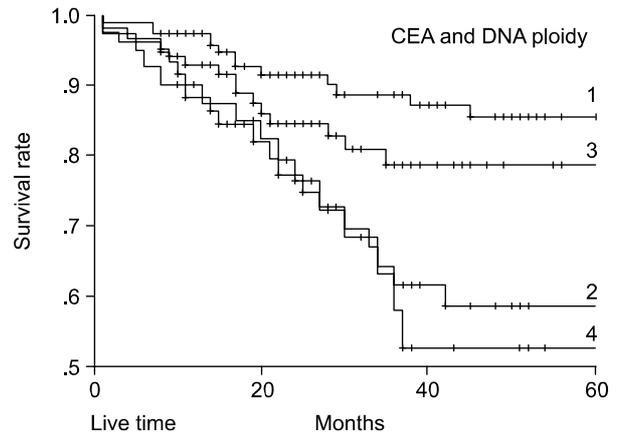
**Table 2.** The correlations between clinicopathologic factors and DNA ploidy

		DNA diploidy (%)	DNA aneuploidy (%)	P-value
Total		187 (58.6)	132 (41.4)	
Age (mean)		59.3±11.7	59.3±13.1	0.629
Sex	Male	111 (60.0)	74 (40.0)	0.557
	Female	76 (56.7)	58 (43.3)	
Site of primary tumor	Ascending colon	38 (62.3)	23 (37.7)	0.772
	Discending colon	7 (70.0)	3 (30.0)	
	Sigmoid colon	38 (59.9)	26 (40.1)	
	Rectum	102 (57.0)	77 (43.0)	
	Mutiple	2 (40.0)	3 (60.0)	
*CEA (mean)		10.7±32.4	17.7±59.1	0.001
Size (mean)		5.5±1.8	5.5±2.0	0.548
Gloss Finding	Ulcerofungating	102 (59.6)	69 (40.4)	0.738
	Ulceroinfiltrate	43 (54.4)	36 (45.6)	
	Fungating	1 (33.3)	2 (66.7)	
	Polypoid	18 (54.4)	11 (45.6)	
Differentiation	Well	51 (65.4)	27 (34.6)	0.250
	Moderate	113 (54.6)	94 (45.4)	
	Poor	7 (53.8)	6 (46.2)	
Tumor stage	T1	6 (60.0)	4 (40.0)	0.816
	T2	25 (54.3)	21 (45.7)	
	T3	156 (59.3)	107 (40.7)	
Lymphovascular invasion	Negative	77 (60.2)	51 (39.8)	0.376
	Positive	93 (55.0)	76 (45.0)	
Perineural invasion	Negative	102 (54.5)	85 (45.5)	0.683
	Positive	52 (57.1)	39 (42.9)	
*Lymph node metastasis	Negative	103 (63.2)	60 (36.8)	0.040
	Positive	84 (53.8)	72 (46.2)	
Astler-Coller stage	A	6 (60.0)	4 (40.0)	0.310
	B1	19 (57.6)	14 (42.4)	
	B2	78 (65.5)	41 (34.5)	
	C1	7 (50.0)	7 (50.0)	
	C2	77 (54.2)	65 (45.8)	

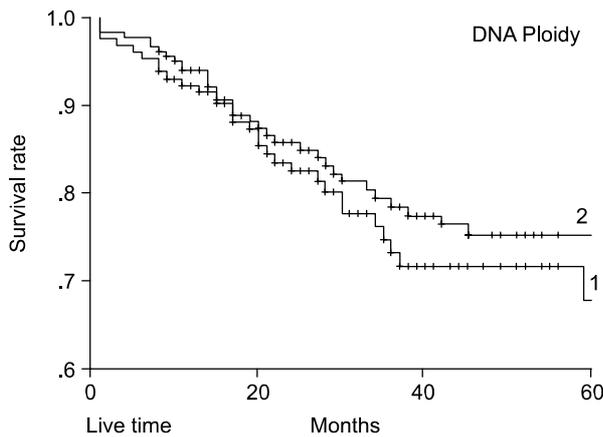
\*Statistically significance : P<0.05



**Fig. 2.** The survival curves according to the preoperative CEA level of patients. 1 = CEA < 6 ng/ml; 2 = CEA > 6 ng/ml (P=0.001).



**Fig. 4.** The survival curves according to the DNA ploidy and preoperative CEA level of patients. 1 = CEA < 6 ng/ml, DNA diploidy; 2 = CEA < 6 ng/ml, DNA aneuploidy; 3 = CEA > 6 ng/ml, DNA diploidy; 4 = CEA > 6 ng/ml, DNA aneuploidy (P=0.006).



**Fig. 3.** The survival curves according to the DNA ploidy of patients. 1 = DNA aneuploidy; 2 = DNA diploidy (P=0.102).

과, DNA diploidy 및 CEA level이 6 ng/ml 이하인 경우 5년 생존율은 86%, DNA aneuploidy 및 CEA level이 6 ng/ml 이하인 경우가 75%, DNA diploidy 및 CEA level이 6 ng/ml 이상인 경우가 59%, DNA aneuploidy 및 CEA치가 6 ng/ml 이상인 경우가 51%를 각각 나타내었으며, 이는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(P=0.006)(Fig. 4).

### 고 찰

대장의 악성종양에 있어서 전통적인 예후인자로서는 널리 알려진 바와 같이 원발종양의 침습 정도, 림프절 전이 상태, 원격전이의 유무, 수술 전후 CEA와 같은 종양 표식자 등의 다양한 인자들이 있다. 특히 원발종양의 침습 정도와 림프절 전이 상태는 Astler-Coller 병기를 결정하

는 주된 인자로 비교적 그 객관성을 인정받아 오고 있다. 그러나 최근 십여 년 사이에 종양의 증식과 유전자변이가 새로운 예후척도로 대두되고 있고, 이 중에서도 유세포 측정기를 이용한 DNA 분석이 고형 종양의 또 다른 예후인자로서 추천되고 있다.<sup>5</sup>

그러나 기존의 예후인자들과 DNA ploidy의 상관관계에 대한 연구는 아직도 보고자에 따라 차이가 있다. 이전의 문헌보고에서 DNA aneuploidy는 대장악성종양 전체의 51%에서 89% 정도를 차지하고 있다.<sup>6-8</sup> 이 중 몇몇 보고에서 우측 대장 종양보다는 좌측 대장 종양에서 DNA aneuploidy가 더 많이 관찰된다고 발표된 바 있고,<sup>6,9</sup> Silvestrini 등<sup>10</sup>과 Tomoda 등<sup>11</sup>은 원발 종양의 위치, 병기 및 조직학적 분화도와 DNA ploidy 간에는 유의한 차이가 없다고 보고하고 있다. 반면에 Halvorsen과 Johannesen<sup>12</sup>은 조직학적 분화도에서는 유의한 차이가 없었으나 병기 및 림프절 전이 등과는 차이가 있으며, 또한 Schwartz 등<sup>13</sup>도 병기 및 림프절 전이 상태가 DNA ploidy와 관계가 있다고 보고하고 있다. 이번 연구에서는 원발 종양의 위치, 병기, 나이, 성별, 원발 종양의 크기, 육안 소견, 세포분화도, 림프혈관성 침습, 주위 신경 침습 등의 예후인자와 DNA ploidy와는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 병기 결정에 중요한 위치를 담당하는 예후인자인 림프절 전이 유무와 DNA ploidy와는 유의한 차이를 보였으며(P=0.040), 대장의 악성종양에서의 생물학적 종양표지자로서 가장 널리 활용되는 술 전 CEA와도 유의한 차이를 보였다(P=0.001). 이는 아직까지도 대장의 악성종양에서 예후의 지표로 널리 활용되고 있는 림프절 전이 및 술 전 CEA와

DNA ploidy와의 상관관계를 강조한 것으로 간접적으로 DNA ploidy가 종양의 예후와 관련이 있음을 시사하는 것이라 하겠다.

대장의 악성종양에서 유세포 측정기를 이용한 DNA에 대한 연구는 1982년 Wolley 등<sup>3</sup>이 DNA diploidy 환자에서 5년 생존율이 높다고 최초로 보고한 이래, 그 자체로서의 독립적인 예후인자뿐만 아니라 기존의 예후인자와의 상관관계에 있어서 그 중요성이 강조되고 있다.<sup>14</sup> 아직까지 논란의 여지가 남아 있지만, 대부분의 연구에서 DNA diploidy인 종양이 예후가 좋다고 보고되고 있다.<sup>7,8,15,16</sup> 국내의 보고로는 임과 채<sup>17</sup>가 DNA diploidy에서 21개월 생존율이 85%, DNA aneuploidy의 경우 55.6%이었다고 하였고, 국외로는 Chapman 등<sup>15</sup>이 DNA diploidy와 aneuploidy의 5년 비재발 생존율이 각각 75% 및 54%로서 DNA ploidy가 예후인자로서 유용하다고 보고하고 있다. 본 연구의 경우에는 DNA diploidy와 aneuploidy에서의 5년 생존율이 각각 76% 및 65%로서 diploidy환자에서 생존율이 높았지만, 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $P=0.102$ ).

CEA는 결장, 직장의 악성종양에서 가장 널리 쓰이는 종양 표지자로서, 결장, 직장의 근치적 수술 후에 추적관찰에 있어, 그 유용성이 이미 여러 논문을 통해 입증되어 있다.<sup>18</sup> 그러나 최근의 논문에서 CEA는 CEA-specific producing gene therapy 등의 치료적인 의미뿐만 아니라,<sup>19</sup> 술전 CEA가 결장, 직장암에서 독립적인 예후인자로서의 의미를 가진다고 보고되고 있다.<sup>20</sup> 본 연구에서도 술전 CEA가 6 ng/ml 이하인 환자와 6 ng/ml 이상인 환자의 5년 생존율이 각각 82% 및 53%로 통계학적으로 유의한 차이가 있었다( $P=0.001$ ). 본 연구에서 DNA ploidy에 따른 기존의 예후인자와의 연구에서, 가장 연관성이 깊은 것으로 나타난 술전 CEA와 DNA ploidy를 동시에 고려하여 5년 생존율을 각각 비교하여 본 결과, 술전 CEA 6 ng/ml 이하이면서 DNA diploidy인 경우와 CEA 6 ng/ml 이상인 경우 DNA aneuploidy인 경우보다 생존율이 유의하게 높았다( $P=0.006$ ).

결론적으로 DNA ploidy는 기존의 예후인자로 알려진 여러 임상병리학적 특성 가운데, 술전 CEA, 림프절 전이와 유의한 상관관계가 있을 것으로 생각된다. 또한 술전 CEA는 그 자체가 5년 생존율에 영향을 미칠 수 있는 예후인자로서 의미를 가질 수 있었다. 따라서 술전 CEA와 DNA ploidy가 결장, 직장의 악성종양에서 생존율 및 재발유무의 예측에 있어서 예후인자로서의 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Bosman FT. Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1216-21.
2. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Doglietto GB, Crucitti CR. Prognostic factors in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:1033-49.
3. Wolley RC, Schreiber K, Koss LG, Karas M, Sherman A. DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship. *J Nat Cancer Inst* 1982;69:15-22.
4. 정기훈, 이은숙, 백정원, 서성목, 문홍명, 김세민. 결장 및 직장암의 예후인자로서 DNA 지수의 의의성. *대한외과학회지* 1996;50:838-45.
5. Zoras. OI, Curti G, Cooke TG, Vlachonikolis IG, Foster G, McArdle CS, et al. Prognostic value of ploidy of primary tumor and nodal secondaries in colorectal cancers. *Surg Oncol* 1994;3:345-9.
6. Changchien CR, Wang JY, Tang RT, Ho YS. Pathogenetic implications of DNA nondiploidy in colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 1997;40:1244-7.
7. Lanza G Jr, Maetri I, Ballotta MR, Dubini A, Cavazzini L. Relationship of nuclear DNA content to clinicopathologic features in colorectal cancer. *Mod Pathol* 1994;7:161-5.
8. Lanza G, Gafa R, Santini A, Maetri I, Dubini A, Gilli G, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma. *Cancer* 1998;82:49-59.
9. Costa A, Faranda A, Scalmati A, Quagliuolo V, Colella G, Ponz de Leon M, et al. Autoradiographic and flow-cytometric assesment of cell proliferation in primary colorectal cancer: relationship to DNA ploidy and clinico-pathologic features. *Int J Cancer* 1992;50:719-23.
10. Silvestrini R, D' Agnano I, Farandan A, Costa A, Zupi G, Cosimelli M, et al. Flow cytometric analysis of ploidy in colorectal cancer, A multicentric experience. *Br J Cancer* 1993;67:1042-6.
11. Tomoda H, Kakeji Y, Furusawa M. Prognostic significance of flow cytometric analysis of DNA contents in colorectal cancer: a prospective study. *J Surg Oncol* 1993;53:144-51.
12. Halvorsen TB, Johannesen E. DNA ploidy, tumor site and prognosis in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1990;25:141-8.
13. Schwartz D, Banner BF, Roseman DL, Coon JS. Origin of multiple 'primary' colon carcinomas. A retrospective flow cytometric study. *Cancer* 1986;58:2082-8.
14. Melamed MR, Enker WE, Banner P, Janov AJ, Kessler G, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry of colorectal cancer with three year follow up. *Dis Col Rectum* 1986;29:184-6.
15. Chapman MA, Hardcastle JD, Armitage NC. Five-year prospective study of DNA tumor ploidy and colorectal cancer

- survival. *Cancer* 1995;76:383-7.
16. Flyger HL, Larsen JK, Nielsen HJ, Christensen IJ. DNA ploidy in colorectal cancer, heterogeneity within and between tumors and relation to survival. *Cytometry* 1999;38:293-300.
  17. 임채용, 채권묵. 대장 및 직장암에서 DNA ploidy의 예후인자로서의 의의. *대한외과학회지* 1991;41:467-72.
  18. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Follow-up strategies after curative resection of colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003;30:349-60.
  19. Ueda K, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Matsuura I, Ojima T, et al. Improvement of carcinoembryonic antigen-specific producing gene therapy for experimental colon cancer. *Surgery* 2003;133:309-17.
  20. Young Tabusso F, Payet Meza E, Celis Zapata J, Ruiz Figueroa E, Berrospi Espinoza F. Value of the preoperative carcinoembryonic antigen as an independent prognostic factor in cancer of the colon and rectum. *Rev Gastroenterol Peru* 2002;22:213-20.
-