대한병리학회지 1992;26:1~9

간세포암종의 DNA 분석

— 유세포 분석법과 화상 분석법의 비교 고찰 —

동국대학교 의과대학 병리학교실 및 내과학교실

김 성 숙·박 석 건·한 동 선

고신대학교 의과대학 병리학교실

허 만 하

Analysis of DNA Ploidy Pattern of Hepatocellular Carcinoma with Comparison between Flow Cytometric and Image Cytometric Study

Sung Sook Kim, M.D., **Seok Gun Park** M.D., **Dong Sun Han** M.D. and **Man Ha Huh**, M.D.**

Department of Pathology and Internal Medicine Dong Kuk University Hospital, Kyong Ju, Korea*
*Department of Pathology, Kosin Medical College**, Pusan, Korea*

Fifty cases of hepatocellularcarcinoma were studied using retrospective flow cytometric (FCM) and image cytometric(ICM) DNA analysis to determine the prevalence of aneuploid cell population and whether they were associated with any particular clinico-pathologic findings. At the same time, we compared the difference between FCM and ICM.

The materials were prepared from 50 μm cut of paraffin embedded blocks. The DNA modal values, which could be defined in 42 cases by FCM with 74% aneuploidy and in 50 cases by ICM with 76% aneuploidy . So 95% of the cases had concordant DNA ploidy results by both techniques of FCM and ICM.

Abnormal DNA pattern was correlated with age(<50), presence of cirrhosis, pathologic grade and some pathologic types($p<0.05$), but was not correlated with presence of HBsAg, sex, alphafeto protein, and alcohol history($p>0.05$).

Also we found that ICM technique was easier to perform and interprete. **(Korean J Pathol 1992;25:1~9)**

Key Words: Hepatocellular carcinoma, DNA anaysis, Flow cytometry, Image cytometry

서 론

간세포암종은 한국인에 있어 가장 흔한 암종중의 하나이며 전체 암종중에 두번째를 차지하고 있다[1]. 특히 B형 간염이 흔히 발생하는 일부 아시아 국가에서 간세포암종의 증가는 더욱 중요하게 인식되고 있다. 극히 드문 몇 예를 제외하고 간세포 암종을 가지고 있는 환자의 대부분은 좋지않은 예후와 아주 짧은 생존율을 보이고 있다. 그러나 fibrolamellar carcinoma를 비롯하여 몇 예에서는 비교적 오래사는 경우도 보고되고 있다[2].

최근 유세포 분석기를 통한 여러 종류의 암에서의

접 수:1990년 12월 15일, 게재승인:1991년 10월 16일
주 소:경북 포항시 죽도 2동 646-1번지, 우편번호 790-052
동국대학교 의과대학 해부병리과, 김 성 숙

DNA 양의 분석은 암의 생물학적 특성과 예후를 판정하는 객관적 자료로서 활발히 행하여지고 있다[3,9]. 이런 분석의 이용은 진단적 그리고 치료 및 예후 판정에 효과적으로 사용되고 있으며 계속 연구중에 있다. 한편 최근에는 화상분석법에 의한 DNA연구가 암연구에 있어 중요한 방법으로 대두되어 그 이용이 활발하며 종양의 생물학적 특성을 이해하는데 그리고 암을 가지고 있는 환자의 처치에 중요한 지표로서 가치있는 정보를 제공하고 있다[10].

예후뿐 아니라 다른 여러 데이타에 대해서도 다양한 분석 결과가 나와있어 좀 더 많은 분석이 행하여져서 믿을만한 결론이 이루어져야 할 것으로 사료되어 이 연구를 하게 되었다.

수술 조직뿐 아니라 최근에 시행되는 흡인 세포 천자법이나 생검등에 의한 작은 양으로도 DNA 분석을 하기 위해서는 화상 분석법이 필수적으로 필요하므로 종래의 유세포법과 화상 분석법을 동시에 시행하여 두 방법간의 장단점을 비교 검토하여 보았다.

연구재료와 연구방법

1. 연구재료

1974년 부터 1988년까지의 15년간 고신의과대학부속복음병원의 일반외과에서 간 세포암종으로 진단받고 절제술을 시행하여 얻은 50예를 대상으로 하였고 임상적인 항목은 병력지를 사용하여 참고로 하였다. 전체 50예중 남자가 35례 여자가 15예였고 연령은 17개월에서 65세까지였다.

2. 방 법

각 장기 검체는 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매되었다. 파라핀 포매된 조직으로 부터 4 μm과 50 μm의 두가지 절편으로 자른후 4 μm 절편은 H & E 염색을 하여 조직 병리학적 검색을 하였고 또 좋은 부분을 얻기위해 시행하는 미세 절제(microdissection)를 위해 사용하였다. 되도록 주위 정상부분이 포함된 절편을 사용하였으며 50 μm 절편은 H & E 염색과 비교하여 출혈이나 괴사조직을 제거한 후 정상부분과 종양부분으로 나누었다.

1) 유세포 분석: 유세포 분석을 하기 위해서는 파라핀 포매 조직으로 부터 세포를 추출하는 Hedley와 Vindelov에 의한 방법으로 시행하였다[14]. 절편기로 얻은 50 μm 절편을 유리 Slide에 놓고 50 °C에서 30분간 말린 후 실온에서 수세하였다. 그후 xylene에 2번 10분간 담그고 그뒤 100%, 90%, 70%, 50% 에탄올에 차례로 10분간 담그고 증류수에 10분간 2번을 수세하였다[15]. 그후 헤마톡실린-에오신(H & E) 염색상을 보고 필요한 곳만 미세 절제하여 조심스럽게 슬라이드에서 떼내어 5 ml의 트립신 완충액에 옮겨 담았다. 이 조직을 진탕기로 섞은후 16~20시간 동안 37 °C에서 항온수조하였다. 그후 이 조직을 phosphate-buffered saline(PBS, PH7.6)로 2번 수세한 후 남은 PBS를 따라 버리고 세포 pellet을 10 ml의 PBS에 다시 담근 후 불순물을 제거하기 위해 210 μ 나일론 그물을 사용하여 거르고 그후 53 μ과 37 μ로 다시 여과하였다. 원심 분리한 후 부유물을 다시 버리고 세포 pellet을 PBS로 다시 수세한 후 2 ml의 PBS에 담갔다. 그후 세포는 세포 측정기로 세고 modified Krishan staining buffer에 담가 세포를 녹이고 핵을 염색하였다[16]. 마지막 농도는 염색 Buffer 1 ml당 10^6개의 세포가 되도록 조정하였다[17]. 표준을 정하기 위해 닭의 적혈구(CRBs)를 사용하였다. CRBCs는 PBS에 3번 수세후 ml당 $\times 10^5$ cell이 되도록 염색하였다. 각 시험관은 4°C에서 30~60분간 항온수조 하였고 빛으로부터 격리하였다. 유세포 측정하기 전에 다시 진탕하고 37 μ 나일론 그물로 여과하여 큰 조직을 제거하였다. 각 핵을 Coulter Epics C, Profile을 사용하여 조사하였다. CRBCs로 표준으로 사용하였고 이 photomultiplier tube를 channel 20에 맞추었다. 이 CRBCs는 동일성을 유지하기 위해 매 검체마다 시행하였다. 각 검체는 10,000개의 세포를 분당 80-100세포의 속도로 측정하였고 C.V., peak position을 Epic C program을 사용하여 얻었다[18].

DNA aneuploidy는 검체내에 2개나 그 이상의 G0/G1분포가 있는 경우에 설정하였고 DNA aneuploidy의 정도는 aneuploidy peak의 mean channel을 diploidy peak의 mean channel로 나눔으로서 DI(DNA Index)를 구하였다. G0/G1 peak의 위치가 각 예마다 다른 것은 검체마다 파라핀 정도와 염색도의 차이 때문으로 생각하였다[19].

2) 화상 분석법: 화상 분석법을 시행하기 위해서는

CAS Model 200 Image Analysis System을 사용하였고 그 standard DNA ploidy analysis software module을 이용하였다. 그 각각의 표준 슬라이드가 포함되어 각 슬라이등의 표준화를 위한 대조세포가 묻혀져 있었다. 이 구조는 Reichert Diaster 현미경과 향상된 IBM-AT콤퓨터, 2개의 색채모니터로 구성되어 있고 화상 감지는 CCD카메라로 구성되어 있다[20].

Cytospin슬라이드를 먼저 기술한 Hedley방법에 의해 만들어진 단일핵 부유액으로 만들고 30분간 10% 포르말린에 고정하였다. 그후 5분간 증류수로 세수한후 실내에서 완전히 말린 후 이 검체는 CAS200의 염색 단위를 사용하여 염색하였다. 즉 실온에서 60분간 5N염산에 녹인후 CAS의 Feulgen염색액과 세척액을 사용하여 Feulgen 염색을 시행하였다. 각 슬라이드는 표준 DNA ploidy software module에 의해 분석이 시행되었다. 이 구조는 각각마다 알려진 DNA양을 포함한 대조세포를 이용하여 표준화하였다. 이 DNA양을 7.18 pg으로 입력하였고 이 값에 의해 실험되는 세포의 양을 값을 구하였다[21]. 그러나 본 연구에서는 이 값을 이용하지 못했는데 오랜 기간동안 파라핀에 포매된 조직이었으므로 정상 G0/G1이 7.18 pg보다 적은 값이었고 각 예마다 차이를 보였기 때문이다. 그러므로 체내세포의 표준으로 각 슬라이드에 존재하는 임파구를 20개에서 30개 이상 세어 이것을 표준으로 사용하였다[22]. 가능한한 150개 이상의 종양세포를 세었고 경우에 따라서는 그보다 적은 수를 세기도 하였으나 최소한 50개 이상의 세포를 대상으로 하였다.

각 결과는 정상 세포의 DI를 1로 하여 정의에 따라 G0/G1분포의 DNA index를 나타내었다 Diploidy (정상 DNA유형)를 제외한 모든 경우는 nondiploidy(ND: 비정상 DNA유형)라 표현하였으며 그중 A는 aneuploidy(이배수체성), A(T)는 tetraploidy (사배수체성)를 말한다.

3) 통계학적 분석: 각 그룹간에 비교를 위해서는 chi square test를 사용하여 통계학적으로 처리하였으며 $p<0.05$를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 하였다.

병력지에 의해 알콜 병력을 조사하여 맥주 2병 또는 소주 반병 이상을 거의 매일 음복하여 5년이상의 병력이 있는 경우를 알콜 병력 양성으로 하였다. B형 항원검사와 alpha feto protein은 효소면역법과 동위원소법을 사용하여 측정하였으며 그외의 임상적 병력은 환자의 병록지를 참고로 분석하였으며 생존율의 경우 추적검사가 불가능한 경우가 많았다.

결 과

50예 중 정상DNA 유형은 화상 분석법으로 12예에서(24%) 관찰되었고 이배수체성, 사배수체성을 포함한 비정상 DNA유형(ND)은 38예(76%)에서 관찰되었다. 그중 이배수체성은 56%, 사배수체성은 20%였다. 유세포 방법으로 8예는 C.V.가 너무 커 받아들일 수 없는 결과를 얻었으며 나머지 측정이 가능했던 42예중 11예가 정배수체성, 31예가 ND, 그중 19예가 이배수체성, 12예가 사배수체성을 보였다(Table 1). 두 방법의 측정이 가능했던 42예중 40예에서 동일한 결과를 보여 95%의 일치율을 보였다. 한편 주위 정상조직의 분석에서는 15예(10예의 간 경변포함) 모두 정상 DNA유형을 관찰할 수 있었다.

Table 1. HCC DNA ploidy by flow cytometry and image analysis in HCC

	Diploidy	Non-diploidy		Questionable	Total
		An	Tet		
Flow Cytometry	11	19	12	8	50
Image analysis	12	28	10	0	50

* HCC: Hepatocellular carinoma
An: Aneuploidy
Tet: Tetraploidy

Table 2. IA DNA ploidy pattern by sex distribution

Ploidy/Sex	Diploidy	Nondiploidt		Total
		An	Tet	
Male	8	21	6	35
Female	4	7	4	15
Total	12	28	10	50

*IA: Image Analysis

Table 3. IA DNA ploidy pattern by age distribution

Age/ploidy	Diploidy	Nondiploidy		Total
		An	Tet	
0~10	0	0	1	1
11~20	0	1	0	1
21~30	0	0	0	0
31~40	1	3	0	4
41~50	3	10	4	17
51~60	6	11	3	20
61~70	2	3	2	7

Table 4. Clinical factors related to ploidy pattern

Clinical factor	Over all incidence	Diploid	Non-diploid(aneuploid/tetraploid)	Pvalue
HBsAg positivity	62%	3/ 7(43%)	13(9~4)/19(68%)	NS(p>0.05)
Alcohol history	59%	3/ 6(50%)	10(8~2)/16(63%)	NS(p>0.05)
AFP>600	56%	2/ 6(29%)	16(11~5)/38(68%)	NS(p>0.05)
Presence of cirrhosis	56%	3/12(25%)	25(18~7)/38(68%)	S(p>0.05)
Alive	16%	1/ 1(100%)	6/7 (86%)	
Metastasis present at the time of surgery	18%	3/ 9(33%)	6/9 (67%)	

*HBsag: Hepatitis B surface antigen
AFP: alpha-feto-protein
NS: not significant
S: significant

1. DNA 유형과 임상적 고찰과의 관계

연령, 성별, B형 간염 항원 표지, alpha feto protein, 알콜병력, 간경변의 존재등과 DNA유형과의 비교 결과는 다음과 같다(Table 2~4).

이중 연령이 50세 이상인 그룹에서 정상 DNA 유형을 많이 보였고 이는 통계학적으로 의의가 있었으며 ($p<0.05$) alpha feto protein이 증가된 환자에서 비정상적 DNA(ND) 유형을 보였으나 통계학적 의의는 없었다. 성별, B형 간염 항원, 알콜 병력등과 DNA유형과는 상관 관계가 없었다. 간경변은 28예의 종양주위에 존재했고 주위에 간 경변이 없는 환자에서 정상 DNA유형을, 간경변이 있는 경우는 비정상 DNA유형을 더 많이 관찰되었으며 이는 통계학적으로 의의가 있었다($p<0.05$).

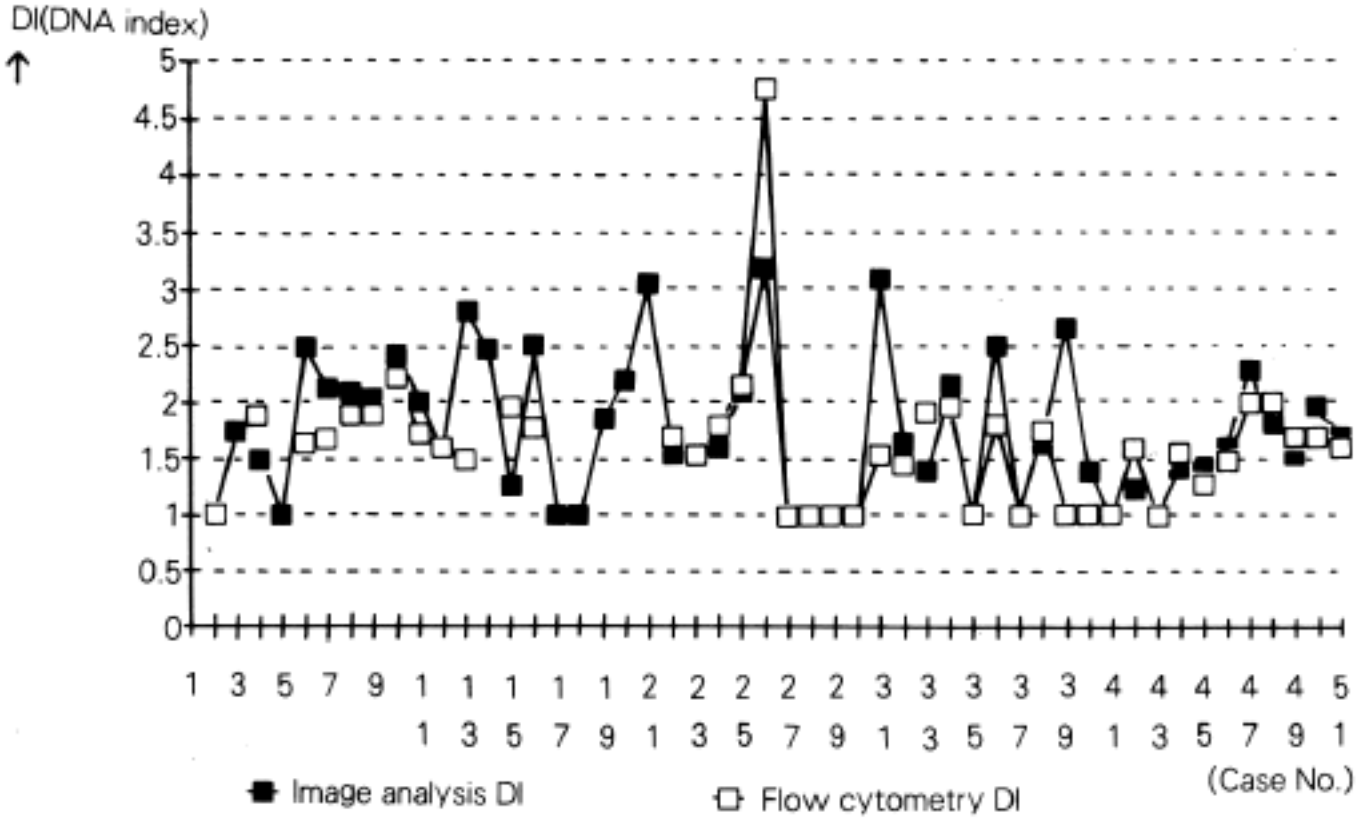
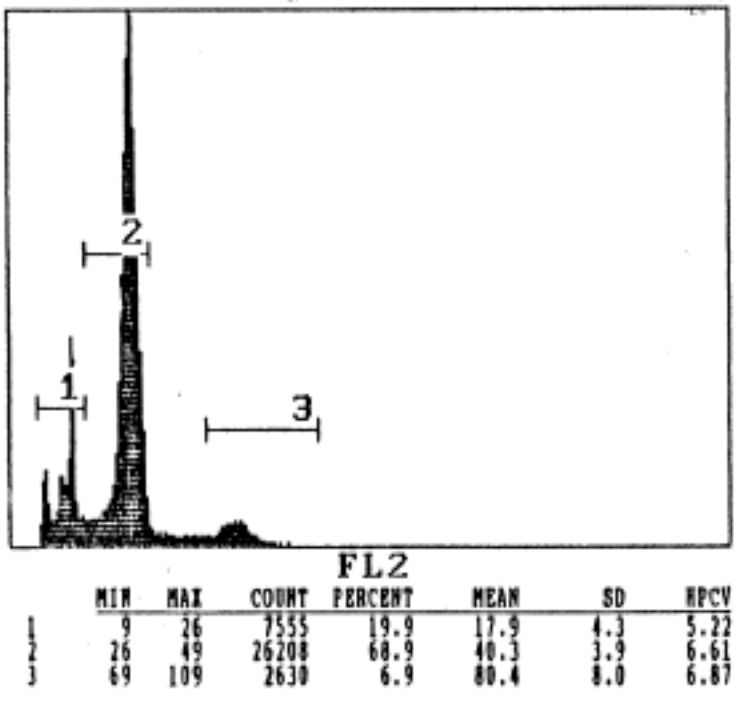


Fig. 1. Relatvely well correlated DNA indices obtained by FCM & ICM.



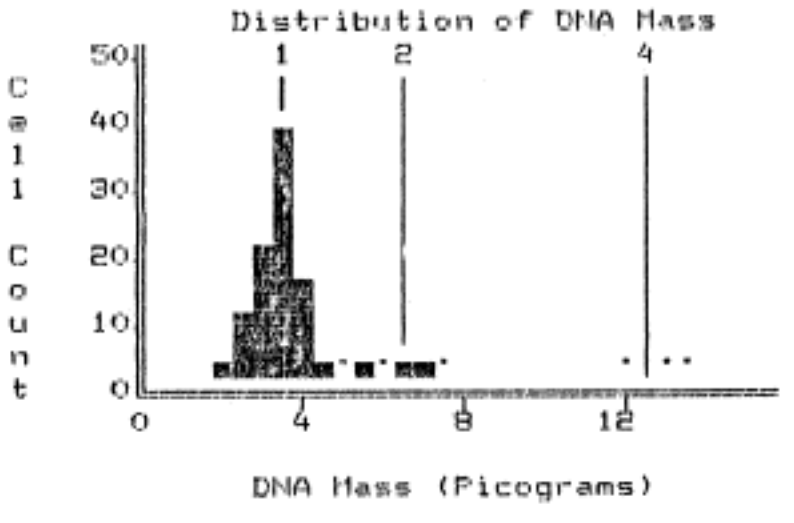


Fig. 2. Diploid pattern of case #40(FCM & ICM).

2) DNA 유형과 병리학적 소견과의 관계

간세포 암종의 병리학적 유형과 DNA유형과의 관계를 볼때 비교적 분화가 좋은 소주형태의 경우 정상 DNA 유형이 4예, 비정상 DNA 유형이 16예였고, 분화가 좋지않은 밀집 형태에서는 13예 모두 비정상 DNA 유형을 관찰할 수 있었다. 투명세포 형태는 모두 정상 DNA 유형을 보여 흥미로왔다. 병리조직학적 분화 정도에 따라 나누었을 때 분화가 나쁠수록 비정상적 DNA 유형을 보였고 이는 통계학적으로 의의가 있었다($p<0.05$).

3. DNA 유형과 예후와의 관계

임상 기록(Chart)에 환자의 생존율 이 표시되어 있

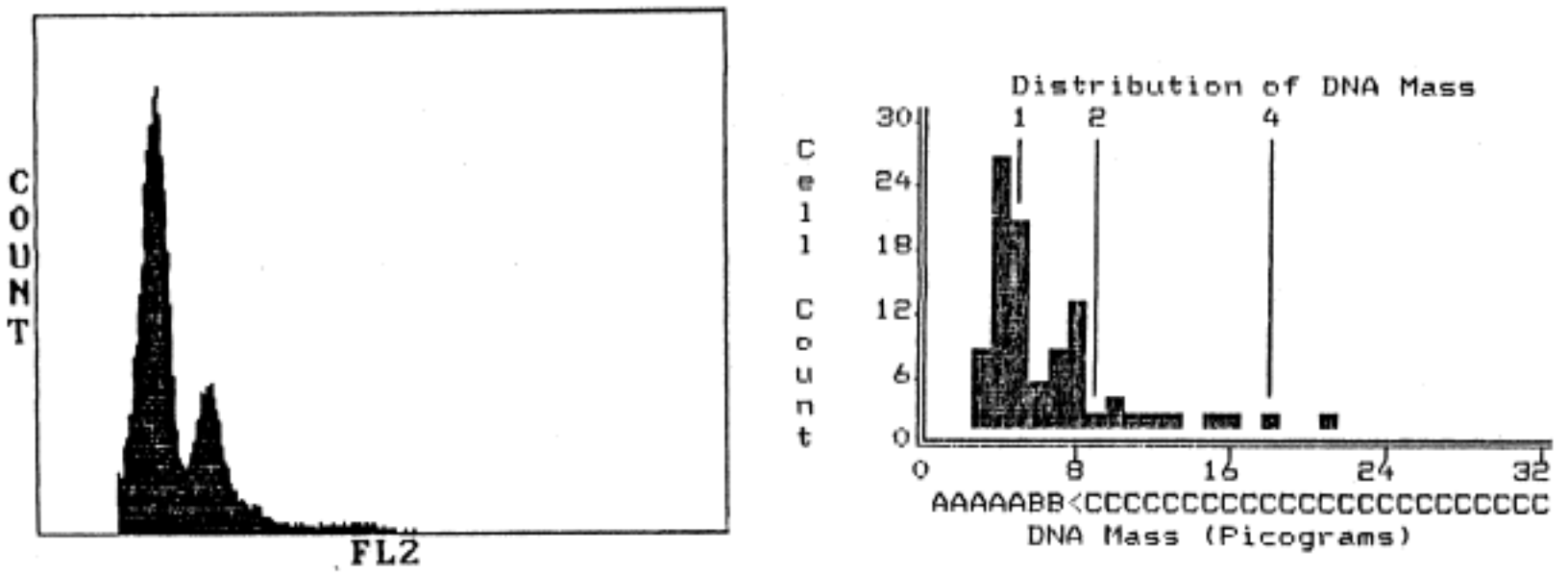


Fig. 3. Basically Same histograms of case #31 by FCM and ICM: aneuploid pattern.

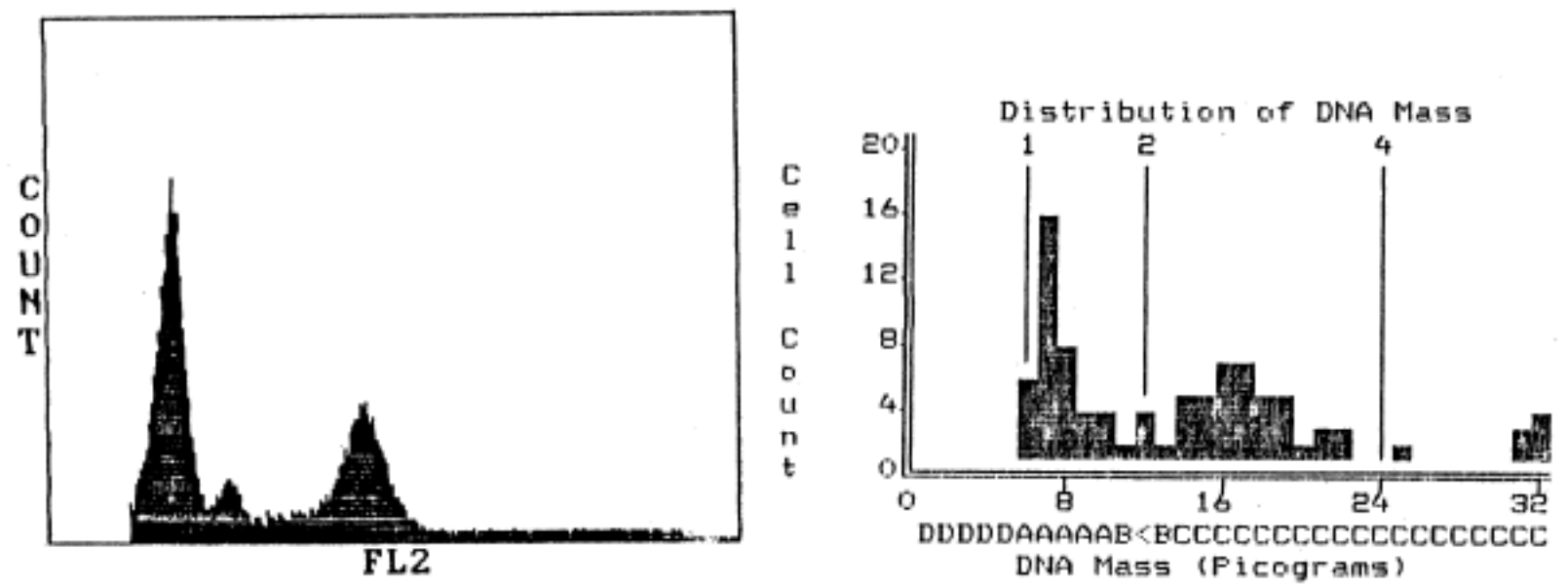


Fig. 4. FCM and ICM show very similar histograms in Case #30: aneuploid & tetraploid pattern.

는 것이 7예에 불과했고 그 결과는 다음과 같이 요약될 수 있었으나 통계학적으로 분석하기에는 불가능하였다. 생존이 확인된 7예중 2예는 수술후 퇴원하기 전에 사망하였는데 2예 모두 비정상 DNA 유형을 보였고 수술 후 3, 5, 6개월에 사망하였던 환자는 모두 비정상 DNA 유형을 보였으며 3년이상 생존한 2예중 1예에서 정상 DNA 유형을 보였다.

수술당시 9예에서 이미 다른 곳으로 전이를 한 것이 관찰되었는데 그중 3예가 정상 DNA 유형(diploid pattern), 6예가 비정상 DNA 유형을(nondiploid pattern)을 보였다.

4. 화상분석법과 유세포 분석법의 비교

전술한 바와 같이 유세포 분석법으로 측정이 불가능했던 8예를 제외하고는 42예중 40예에서 일치를 보였다. 그리고 DI의 평균치가 화상 분석법으로는 1.75유세포 분석법으로는 1.62를 보여 유사한 결과를 얻었고 각각의 DI는 상당히 비슷한 치를 보여 주었다(Fig. 1). 한편 일치를 보이는 예중 정배수체성, 이배수체성, 사배수체성을 보이는 경우 이 히스토그램이 상당히 비슷한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2~4).

한편 불일치를 보이는 2예는 모두 화상분석법으로는 비정상 DNA 유형, 유세포 분석은 정상 DNA 유형을 보였다.

고 안

종양세포의 DNA 유형(ploidy)은 유세포 분석법이

Table 5. Previous studies on the DNA contents of HCC

Author	Method	ND(%)	Factors correlated	Ref.(인용문헌)
Kou SH(Taiwan)	Cytophotometer	92.6	α FP	(Hepatology, 87)[12]
Takahiro E(Japan)	microspectrometer	62	age, size	(Cancer, 88)[11]
Fujimoto J(Japan)	flow cytometry	50	size, survival, α FP	(NGGZ, 89)[13]
Present study	FCM & ICM	76	age, cirrhosis, grade	1990

*ND: Non Diploidy
HCC: Hepatocellular carcinoma
FCM: flow cytometry
ICM: image cytometry

나 화상 분석법에 의해 쉽게 측정될 수가 있다[24]. 최근 종양세포의 DNA 유형이 종양의 진단이나 치료 예후 판정에 중요한 지표가 되고 있어 활발히 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 파라핀에 포매된 간 세포암의 조직의 DNA양을 유세포 분석법과 화상 분석법에 의해 측정하였고 그 결과를 여러 임상 또는 조직병리학적 소견과 비교하였고 두 측정 방법간의 비교를 검토하여 장단점을 관찰하였다.

전술한 바와 같이 간세포암종의 생존율과 DNA분석간의 관계를 규명하고자 하는 논문이 여러편 있었으나 결과가 모두 상이했고 예후외에도 여러 임상 병리학적 인자에 대한 결과가 차이가 많이 있었다. 영어로 쓰여진 6개의 논문과 1편의 일본어 논문을 찾아 볼 수 있었는데 그중 2편은 정상 간세포, 양성종양, 간세포암에 대해 그리고 2편은 전암 단계인 간세포 이형성증과 과형성 부위에 대해 연구되었고 나머지 3편은 간세포암의 DNA 유형과 임상 병리학적 소견과의 관계였다. 각 논문의 중요한 점과 본 연구의 비교는 다음과 정리될 수 있었다(Table 5). 간 세포암종에서의 DNA 유형은 다른 종양과는 달리 tetraploidy를 비롯한 비정상 DNA 유형이 단연 많았으며 비정상 DNA유형은 연령에 따라 그리고 간경변 존재에 따라 통계학적으로 의의가 있게 나타나 50세 이상에서 발생한 예가 그전에 발생한 경우보다 정상 DNA 유형을 많이 보였으며 간경변이 없는 경우가 있는 경우보다 정상 DNA 유형을 많이 보였다. 한편 표준을 삼기 위해 주위조직의 DNA 양상을 조사한 경우 15예중 10예가 간경변 조직이었는데 이들은 모두 정상 DNA 유형을 보였다. 이의 결과는 다른 논문과는 다른 결과였다. Kuo등[12]에 의하면 DNA유형이 alpha fetoprotein양성 여부에 따라 차이를 보였은 바 본 연구에서는 차이는 있게 나타났으나 통계학적으로 의의는 없었다. 성별, B형 간염 항원, 알콜병력과는 관계가 없었다.

DNA분석과 병리학적 관계에서는 한 논문에서는 상관관계가 없고 또 다른 논문에서는 있었다고 기술되어 있으나 본 연구에서는 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 더욱 재미있는 것은 투명세포 형태에서는 모두 정상을 보인 점이었다. 또한 scirrhous type에서 분화 정도가 나쁜 편이었으나 2예 모두 정상 DNA 유형을 보인점이 흥미로왔다.

DNA분석과 예후와의 관계는 추적조사가 7예에서만 이루어져 통계학적 분석이 불가능했으나 4년 이상 산 경우 정상 DNA 유형을 보였고 6개월이전에 사망한 4예는 모두 비정상 DNA 유형이었다. 전이가 발견된 경우도 기술이 9예에서만 되어있어 통 계학적 분석이 불가능했으나 이중 3예가 정상 DNA 유형, 6예가 비정상 유형이었다. 그리고 예후는 간경변의 존재라든지 수술의 기술등의 문제에 보다 많은 영향을 받는 것으로 사료되므로 진정한 의미의 생존율을 비교하기 위해서는 흡입천자나 생검술이 외과적 절제술의 검체보다 적절할 것으로 생각된다. 이런 의미에서 많은 세포가 필요한 유세포 측정보다 소량의 세포로도 가능하고 거의 유사한 결과를 얻을 수 있고 직접 종양세포를 관찰하면서 측정할수 있는 화상 분석법이 더욱 활발하게 이용될 것으로 전망된다.

유세포 측정법과 화상 분석법과의 비교에서는 유세포 측정법으로 측정이 불가능했던 8예를 제외하고 42예중 40예에서 일치율을 보였고 이배수체성의 존재뿐 아니라 DI도 잘 일치하고 있음을 알 수 있었다. Fig.

2, 3, 4,에서도 보이는 바와 같이 50개의 세포에서 얻어진 히스토그램과 10,000개의 세포로 얻어진 히스토그램이 거의 같은 모습을 보이는 것을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 화상분석법으로는 오래된 조직에서도 거의 비슷한 C.V.로 측정이 가능했던 것과는 반대로 유세포 분석법에서는 오래된 조직에서는 C.V.가 너무 높고 8예에서는 peak를 분별할 수 없을 정도로 높은 C.V.를 보이고 있었다. 이는 자가용해나 고정액 등의 차이로 설명될 수 있으나 확실한 이유는 알 수 없었다[25,26]. 또 화상분석법에서는 30개 정도의 적은수의 세포로도 히스토그램을 얻을 수 있으므로 흡입 천자 세포술이나 생검등의 검체에 활용할 수 있을 것으로 기대된다[27]. 화상분석법은 종양세포의 변형된 G0/G1세포를 많이 증가한 상태를 관찰할 수 있어 정상세포와의 감별이 가능하다. 이것은 종양세포를 직접 보면서 측정하기 때문이다. 또한 화상분석법은 DI가 2.0보다 큰 ploidy의 소수의 세포도 측정이 가능하여 다 DNA 유형(multiploidy)의 진단을 가능케하는 장점이 있다. 전체적으로 화상분석법에서의 C.V.가 유세포 분석보다 안정되었고 특히 오래된 검체에서도 측정이 가능하였으며 해석하기가 훨씬 용이하였다.

결 론

1974년부터 1988년까지 외과적으로 절제된 50예의 간세포암종을 유세포 분석법과 화상 분석법을 이용하여 비정상 DNA유형의 존재 여부를 분석하고 이들과 임상적 인자 그리고 조직 병리학적 형태와의 상관관계를 연구하였다. 또한 DNA분석을 할 수 있는 유세포 측정법과 화상 분석법을 동시에 시행하여 두 방법간의 장단점 및 결과를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 유세포 측정법으로는 50예중 42예가 측정이 가능하였고 화상 분석법으로는 50예 전부 만족할만한 결과를 얻었다.

2) 50예중 38예(76%)가 비정상 DNA유형(non-diploidy)을 보였으며 이들의 대부분은 이배수체성과 유사 사배수체성이었다.

3) 비정상 DNA 유형은 연령(50세 이상), 간경변증의 존재, 병리학적 분화정도와 상관관계가 있어 연령이 낮을수록, 간경변증이 있을 경우, 분화정도가 나쁠수록 비정상 DNA 유형을 더 많이 관찰할 수 있었다.

4) 비정상 DNA 유형은 성별, B형 간염 항원, 병리 조직학적 유형, alpha feto protein정도와 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

5) 화상분석법과 유세포분석, 두 방법에 따른 DNA 유형분석에서는 95%의 일치율을 보였으며 DI도 유사한 수치를 얻을 수 있었다.

6) 화상 분석법에서 더 좋은 C.V.를 얻을 수 있었으며 측정하기가 수월했으며 좀더 확실한 결과를 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1) Sang Kook Lee, Je G Chi, Sang In Kim, et al. *malignant Iumors Among Koreans. KJP 1979; 13: 3-20.*

2) Juan Rosai. *Ackerman's Surgical Pathology, The C. V. Mosby Company,(7th ed), 1989, p 706-14.*

3) Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A. *Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. Cancer Res 1984; 44: 394-96.*

4) Banner BF, Tomas-De-La vega JE, Roseman DL, Coon JS. *Should flow cytometric DNA analysis precede definitive surgery for colon carcinomas. ANN Surg 1985; 202: 740-44.*

5) Franffurt OS, Arbuck SG, Chin, JL, Greco WR, Pavelic ZP, Slocum HK, Mittelman A, Piver SM, Pontes EJ, Rustum YM. *Prognostic applications of DNA flow cytonetry for human solid tumors. Ann NY Acad Sci 1986; 468: 276-290.*

6) Ftiendlan ML, Hedley DW, Taylor IW, Russel P, Coates AS, Tattersall MHN. *Influence of cellular DNA content on survival in davanced ovarian cancer. Cancer Res 1984; 44: 397-400.*

7) Crrnellisse CJ, Van der Velde CJH, Caspers RJC, Moolenaar AJ, Hermans J. *DNA ploidy and survival in breast cancer. Cytometry 1987; 8: 225-234.*

8) Endin STO, Stenling R, Roos G. *Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma Cancer 1987; 60: 1282-87.*

9) Atkin NB, Kay R. *Prognostic significance of model DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1465 cases. Br J Cancer 1979; 40: 210-21.*

10) Mayall BH. *Current capabilities and clinical applications of image cytometry. Cytometry Supp 1988;*

3:78-83.

11) Takahiro E, Takashi K, Takesh O, Takash S, Keizo S. *DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinico pathologic implications. Cancer 1988; 61: 106-9.*

12) Kuo SH, Sheu JC, Chen DS, Sung JL, Lin CC, Hsu HC. *Cytophotometirc measurements of nuclear DNA contentin hepatpcelluar carcinomas, Hepatology 1987; 7: 330-32.*

13) Fujimoto J, Okamoto E, Yamanaka N, Fujiwara s, Kato T, Mitsunobu M, Toyosaka A. *Nuclear DNA analysis of hepatocellular carcinoma Nippon Geka Gakkai Zasshi 1989; 90: 1569-70.*

14) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor JW, Rugg CA, Musgrove EA. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material folw cytometry J Histochem Cytochem 1983; 31: 1333-35.*

15) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. *Detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometirc DNA analusis Cytometry 1983; 3: 323-27.*

16) Krishan A. *Rapid flow cytofuorometirc analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J Cell Biol 1975; 66: 188-93.*

17) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. *Standardization of high resolution folow cytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken trout red blood cells internal reference standards Cytometry 1983; 3: 328-31,*

Givan AL, Shenton BK, Carr IW. *Acorrection required for calculation of DNA ratios in flow cytometirc analysis of ploidy. Cytometry 1988; 9: 271-74.*

19) Kallioniemi OP. *Comparison of fresh paraffin embedded tissue as starting material for flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. Cytometry 1988; 9: 164-69.*

20) Oud PS, Hanseaar AGJM, Pahlplatz MMM, JWR, Vooijs Gp. *Image DNA index(ploidy) analysis in cancer diagnosis. Applied Optics 1987; 26: 3349-55.*

21) Bose KK, Curley S, Smith WJ, Allison DC. *Differences in the flow and absorption cytometric DNA distributions of mouse hepatocytes and toumor cells. Cytometry 1989; 10: 388-83.*

22) Taylor SR, Ernstoff LT, Stitely S S. *Central values and variation on measured nuclear DNA content in imprints of normal tissues determined by image analysis. Cytometry 1989; 10: 328-87.*

23) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. *Application of DNA flow cytomerty to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry 1987; 6: 327.*

24) Dressler LG, Bartow SA. *DNA folw cytometrt in solid tumors; Practical aspects and clinical applications. Seminars in Diagnostic Pathology 1989; 6: 55-82.*

25) Alanen KA, Joensuu H, Klemi PJ. *Autolysis is apotential source of false aneuploidy peaks in flow cytometric DNA histograms. Cytometry 1989; 10: 417-25.*

26) Egerter DA, Said JW, Epling S, Lee S. *DNA content of T cell lymphomas A flow cytometric analysis. Am J Path 1988; 130: 326-34.*

27) Greenebaum E, Koss LG, Sherman AB, Elequin F. *Comparison of needle aspiration and solid biopsy of DNA distributions of surgically resected tumors. AJCP 1984; 82: 559-64.*