

실험적으로 유발한 악성 섬유성 조직구종에서의 DNA ploidy와 세포증식능에 관한 연구

전남대학교 의과대학 병리학교실 · 치과대학 구강병리학교실*

이지신 · 박종태 · 정상우 · 최홍란* · 조규혁

DNA ploidy and Cellular Proliferation Activity in Experimentally Induced Malignant Fibrous Histiocytoma

Ji Shin Lee, M.D., Jong Tae Park, M.D., Sang Woo Juhng, M.D.
Hong Ran Choi*, D.D.S. and Kyu Hyuk Cho, M.D.

Department of Pathology, Chonnam University Medical School

*Department of Oral Pathology, Chonnam University Dental School

To find out the changes of DNA ploidy and cellular proliferation activity during carcinogenesis and evaluate correlation between flow cytometrically determined S-phase fraction and proportion of proliferating cell nuclear antigen(PCNA, PC10) immunoreactive cells, the authors studied on malignant fibrous histiocytoma induced by intra-articular injection of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(DMBA) in the rats. Forty Wistar rats were used.

The results obtained were as follows.

1) Firstly, tumors were palpated 5 weeks after the last injection of DMBA and formed in 27 rats at sacrificed. Histologically, these lesions showed storiform, indicative of malignant fibrous histiocytoma.

2) Three cases of DNA aneuploidy were observed at 4 and 5 months after the last injection of DMBA and one of them, which was DNA diploidy at main mass, was found at daughter mass.

3) Flow cytometrically determined S-phase fraction and proportion of PCNA(PC10) immunoreactive cells in malignant fibrous histiocytoma induced by DMBA were much higher than in control groups and slightly increased according to sequential changes after formation of mass. The comparison of flow cytometrically determined S-phase fraction and proportion of PCNA(PC10) immunoreactive cells showed significant correlation($r=0.6092, p<0.001$).

Above results strongly suggest that ploidy pattern may evolve into aneuploid type during the development of tumor and proliferation activity increases during the carcinogenesis. (**Korean J Pathol 1993; 27: 205~216**)

Key Words: DMBA, Malignant fibrous histiocytoma, DNA, Flow cytometry, PCNA

서 론

·화학적 발암 물질에 의한 암유발은 시간의 경과에

따른 동적인 변화로 불연속적인 개시, 촉진 및 진행의 과정을 거친다^{1,2)}.

발암과정에서 세포증식이 중요한 역할을 담당하며 이에대한 연구³⁻⁵⁾는 많으나 종양의 진행과정에 따른 연구는 드물다. 다양한 세포증식능에 대한 연구방법 중⁶⁾ 최근 유식세포측정기에 의한 합성기세포분획과 면역조직화학적방법 양자간의 상관관계를 구명하려는 노력들이 행하여지고 있다. 또한 유식세포측정기에서 얻

접 수: 1992년 11월 14일, 게재승인: 1993년 1월 30일
주 소: 광주직할시 동구 학동 5번지, 우편번호 501-190
전남대학교 의과대학 병리학교실, 이지신

어떤 DNA ploidy는 환자의 예후 추정에 중요한 인자로⁷⁻¹⁴⁾ 일반적으로 DNA aneuploidy가 diploidy에 비해 예후가 불량하며 세포증식능과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져있다. 그러나 이러한 DNA aneuploidy가 종양의 발생당시부터 출현하는 것인지 혹은 종양의 발육진전과 함께 DNA ploidy도 변하는지에 대한 구체적인 보고는 없다.

악성 섬유성 조직구종은 성인에서 발생하는 육종중 가장 높은 빈도로 관찰되며 양성과 악성, 그리고 그 중간단계의 악성도를 갖는 저급성 악성으로 구분될 수 있다^{15,16)}. 따라서 악성 섬유성 조직구종을 실험적으로 유발할 수 있다면 종양의 진행에 따른 DNA ploidy와 세포증식능의 변화를 관찰할 수 있을 것이다. 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(DMBA)은 방향성 탄수화물의 일종으로 강력한 발암 작용을 가지는 물질로 알려져 있다. 즉 Hamster계 백서의 피부도포로서 피부흑색종이 유발되고¹⁷⁾, 혀에 도포시 편평상피암이¹⁸⁾, 백서에 경구 투여시 유방암이 발생되며¹⁹⁾, 정맥내에 투여시 백혈병이 유발된다고 한다²⁰⁾. 최근에는 DMBA를 쥐나 토끼의 슬관절강내에 주입하면 악성 섬유성 조직구종의 특징을 갖는 육종이 발생된다는 보고가 있다^{21,22)}.

이에 저자들은 DMBA를 백서의 슬관절강내에 주입하여 유발된 악성 섬유성 조직구종에서 종양의 진행과정에 따른 DNA ploidy의 변화를 관찰하고, 세포증식능의 변화를 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획과 proliferating cell nuclear antigen(PCNA) (PC10)를 이용한 면역조직화학적방법으로 비교관찰하여 이들 양자간의 상관관계를 구명하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물과 종양유발

체중 150 g 정도의 Wistar계 흰쥐를 암수 구별없이 실험군 40마리와 대조군 8마리로 구분하였다. 실험군은 우측 슬관절강내에 파라핀에 녹인 2% 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(DMBA) 0.1 ml를 4주 간격으로 3회 주입하였으며 대조군은 DMBA용매인 파라핀만을 주입하였다. 실험군 동물은 DMBA 최종(3차) 주입직전, 최종 주입후 20일, 40일, 2, 3, 4, 5, 6개월후에 오후 2시부터 4시 사이에²³⁾ 5마리씩 도살하여 검색하였으며 해당되는 기간에 대조군은 1마리씩 도살하였다. 도살시 우측슬관절과 종괴의 직경을 측정하였다. 실험기간중 실험군과 대조군 동물은 먹이(제일사료)와 물을 자유롭게 먹을 수 있게 사육하였다.

2. 방사선과적 검색

종괴가 형성된 모든 백서는 도살시 방사선과적 검사

를 시행하였다. 방사선 촬영기는 Intraoral X-ray (U.S.A)를 사용하였으며 tube로부터 40 cm거리에서 40 Kv, 15 mA로 0.15 sec동안 노출시켰다.

3. 조직학적 검색

절제한 조직을 10% 완충 중성 포르말린에 고정된 후 통상적인 방법에 의하여 hematoxylin-eosin 염색표본을 만들었고 광학현미경으로 검색하였다.

4. DNA ploidy검색

통상적인 파라핀 블록을 만든 부위의 인접한 조직에서 단일세포 부유액 제작을 위한 절편을 채취하였다. 실험조직은 4°C citrate 완충용액(pH 7.6)이 담긴 petri dish에서 가위를 이용하여 잘게 절단후 0.5% collagenase(Sigma)를 가한 후 37°C에서 1시간씩 2회 부치시킨 후, 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 5% fetal calf serum을 함유한 RPMI 1640에 부유시킨 후 직경 60 μm의 nylon mesh를 통해 여과시켰고 여과액내에 단일세포수가 2 × 10⁵/ml되도록 조정하여 최종 단일세포 부유액을 만들었다.

단일세포 부유액을 실온에서 0.416% propidium iodide(Aldrich)에 15분간 부치시켜 반응시킨 후 5 milliwatt argon-ion laser가 부착된 FACScan (Becton Dickinson) 유식세포측정기를 이용 각 증례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였다. 내부기준은 닭적혈구(chicken red blood cells)를 이용하였다. G₀/G₁ 피크, S phase fraction 그리고 G₂/M 피크로 구성된 single cell cycle의 소견을 보인 경우를 DNA diploidy라 하였고 DNA aneuploidy는 비정상적인 "stem cell line"이 존재함으로써 적어도 2개 이상의 분리된 G₀/G₁ 피크가 나타나는 경우로 하였다.

5. 세포증식능 검색

1) 합성기 세포분획: 유식세포측정기에 의해 얻어진 DNA histogram을 Multicycle program(Multiple option cell cycle analysis)으로 분석하여 S-phase fraction(합성기 세포분획)을 구하였다. 측정분해능은 G₀/G₁ 피크의 변이계수(C.V.: Coefficient of Variation)로 정의하였다.

2) 면역조직화학적 검색: 세포증식능에 대한 면역조직화학적 검색은 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)을 사용하였다. 검색은 biotin과 avidin 사이의 강한 결합력을 이용한 Ultraprobe detection system을 사용하여 단클론성의 PCNA(PC10)를 항체로 사용하였다. 각 파라핀 포매괴에서 4 μm 두께의 조직절편을 만들어 xylene과 alcohol을 거쳐 증류수로 함수시켜 1X automation buffer로 세척하였다.

1:50으로 희석한 1차 암체를 도포한 후 37°C oven에서 60분 동안 부치시킨 후 1X automation buffer로 세척하고 조직 주위의 과다 buffer는 닦아내었다. 2차항체를 30분간 부치시킨 후 buffer로 세척하고 avidine-alkaline phosphatase를 도포하여 37°C oven에서 30분간 부치시켰다. 다시 buffer로 세척한 후 Fast Red Chromogene를 도포하였다. Hematoxylin으로 대조 염색후 crystal mount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 결과의 판정은 두명의 병리의사가 광학현미경으로 관찰하여 일의로 1,000개의 종양세포중 반응의 강도에 관계없이 암색인 세포수를

산정 백분율로 환산하였다. 종괴가 형성된 군에서 조직학적 유형별로 PCNA(PC10) 양성률을 구하였는데 시간의 경과에 관계없이 광학현미경상 나타나는 유형별로 정리하였고 각유형사이의 이행부위는 제외하였다.

6. 통계학적 유의성 검정

모든 양군 사이의 차이는 PC용 MSTAT를 이용 Student's *t* test로 검정하였으며 PCNA(PC10) 양성률과 암색기 세포분획과의 상관관계는 regression analysis로 검정하였다.

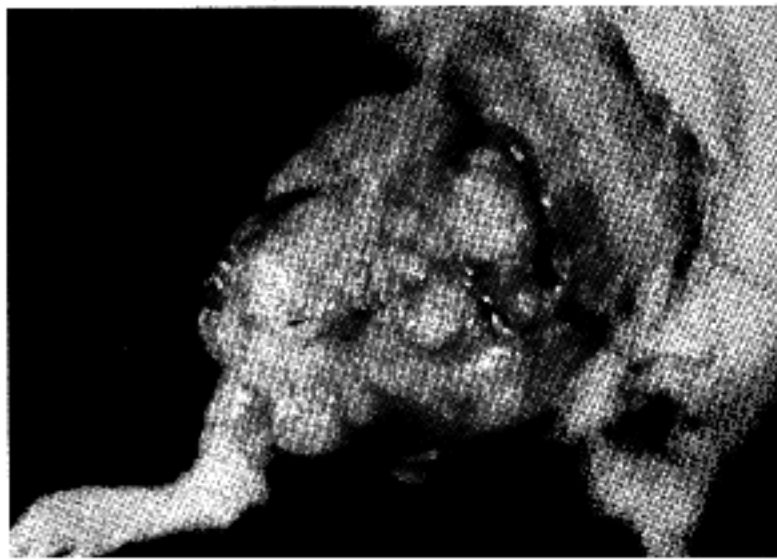


Fig. 1. An ovoid tumor, measuring 4×3.5×3 cm in dimension, is formed near the right knee joint, 5 months later the last injection of DMBA.

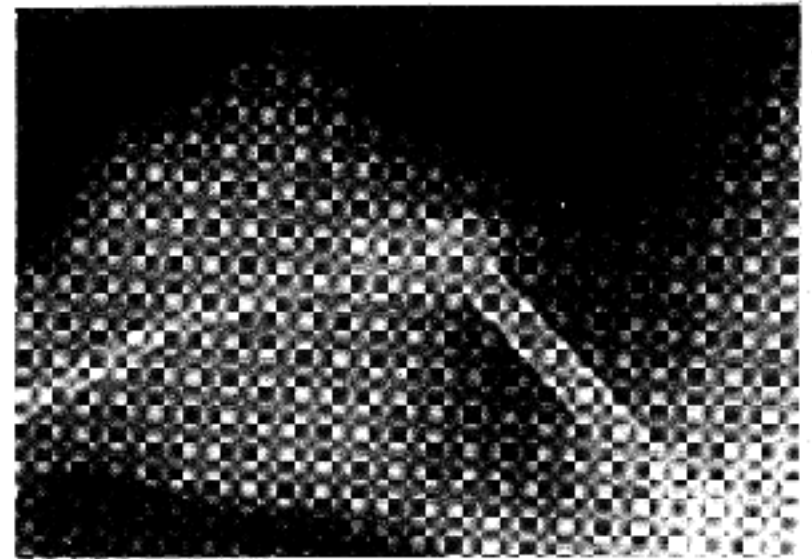


Fig. 2. A radiogram of a tumor produced by the injection of DMBA. Mild cortical bony destruction is observed in the proximal end of the tibia and fibula.

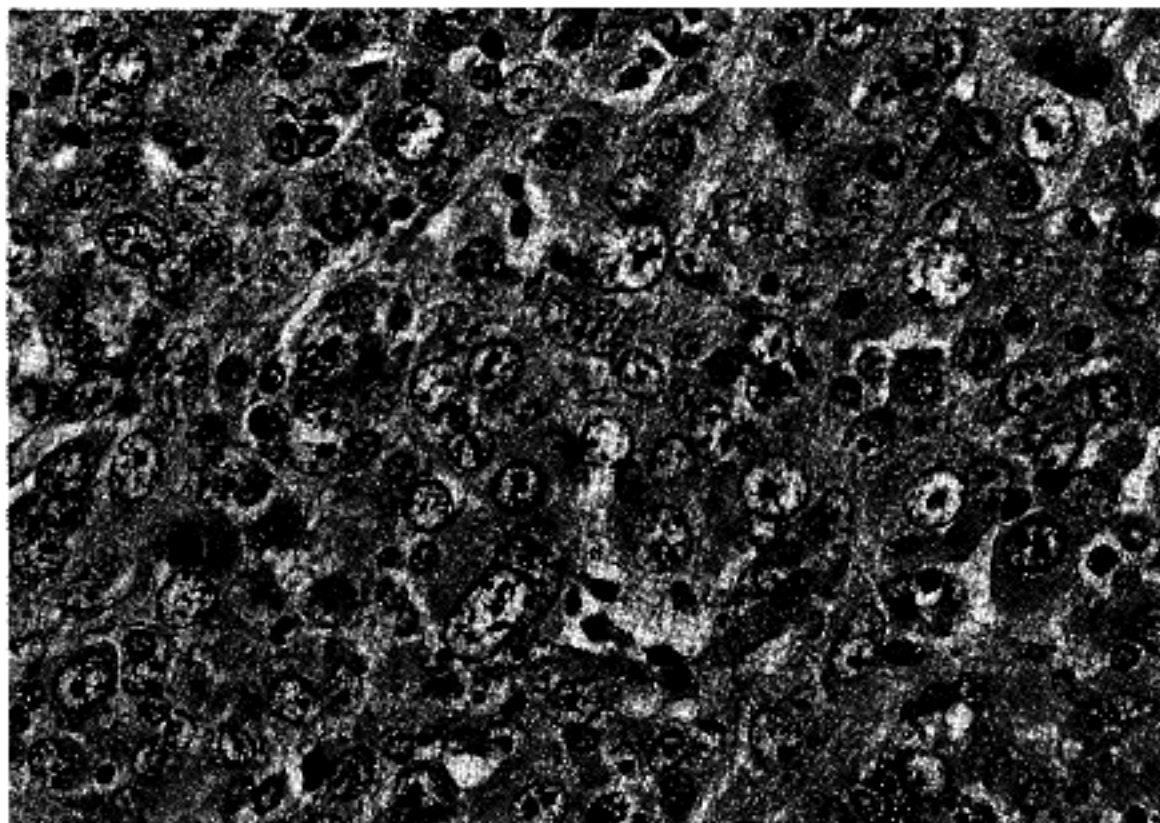


Fig. 3. The tumor cells are mostly round and show high nuclear/cytoplasmic ratio with prominent nucleoli.

성 적

1. 육안적 소견

DMBA 최종 주입지전군 및 최종 주입후 20일군 모두와 40일군 3마리, 모두 13마리에서 도살시 종괴가 형성되지 않았으며 우측 슬관절의 직경은 평균 10.87 mm로 대조군의 7.13 mm에 비해 컸다. 5주부터 육안적으로 인정되는 원형의 종괴를 확인할 수 있었고(Fig. 1) 도살시 종괴가 형성되었던 실험군은 27

마리이었다. 시일이 경과할수록 종괴의 크기는 증가되는 경향이 있었으나 개체차가 커서 종괴의 크기와 경과시간이 비례적이라고 볼 수는 없었으며 도살시 종괴의 직경은 2~5 cm이었다. 4개월군과 5개월군 각각 1마리에서 크기가 큰 주종괴외에도 직경 약 1 cm 크기의 2차 종괴가 인접하여 출현하였으며 5개월군 1마리에서 복강내에 전이된 종괴를 관찰할 수 있었다.

형성된 종괴는 슬관절강 주위의 피하조직과 근육조직내에서 형성되었으며 종괴와 슬관절강과의 직접적인 연결은 볼 수 없었다. 종괴는 혈면상 일반적으로 황적

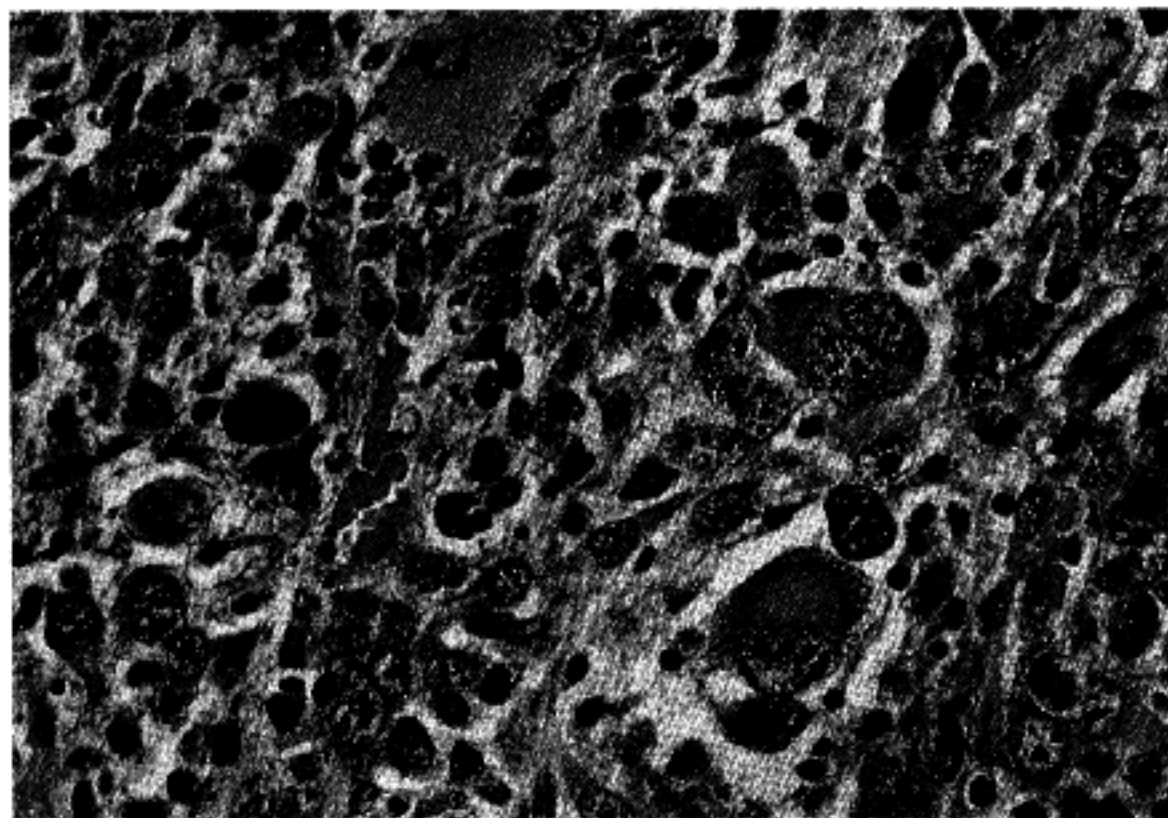


Fig. 4. Pleomorphic type of tumor consists of bizarre looking cells, which have abundant and eosinophilic cytoplasm. Binucleated cell is noted at the center.

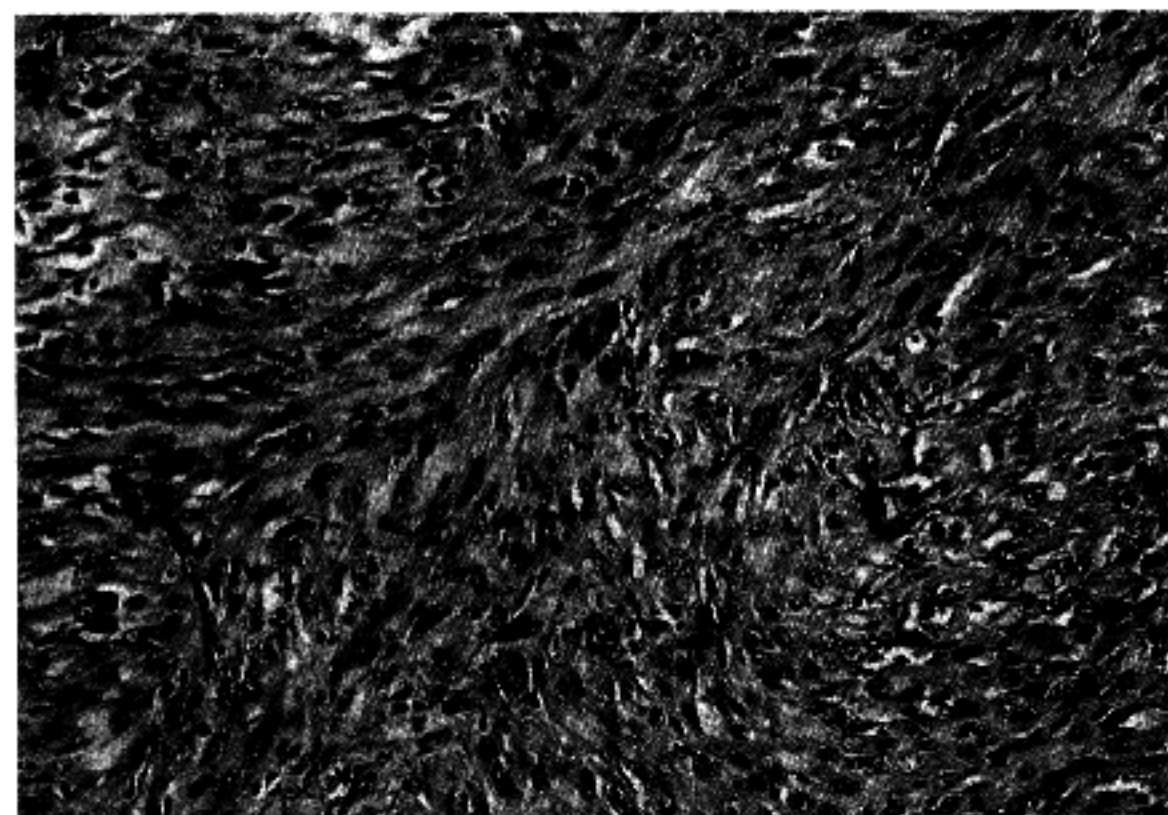


Fig. 5. The tumor cells are rather spindle-shaped and arranged in a fascicular pattern.

색이었으나 부분적으로 황색, 갈색, 점액상등 다양하였다. 피막은 거의 형성되지 않았으며 일부에서는 표면에 케양이 형성되었고 괴사는 모든 종괴에서 관찰되었으나 종괴의 크기가 클수록 현저해지는 경향이였다.

2. 방사선과적 소견

종괴가 형성된 대부분의 경우 직경 2~5 cm 크기의 연부조직 종괴가 관찰되었으며 인접한 골 피질부 파괴와 경화소견이 관찰되었다(Fig. 2).

3. 조직학적 소견

1) **종괴형성전**: 대부분의 경우에서 섬유모세포의 증식과 주위 활막세포군의 국소적인 증식소견을 나타냈으며 주로 림프구로 구성된 염증세포의 침윤과 파라핀 공포도 일부 관찰되었다.

2) **종괴 형성후**: HE 염색표본의 광학현미경적 소견은 하나의 종괴내에서도 다양하게 관찰되었으나 기본적으로는 5가지 유형으로 구분할 수 있었다. 첫째

Table 1. Sequential proportions of the histological types in DMBA induced MFH

Duration	Histological type	Round	Pleomorphic	Storiform	Myoxid	Angiomatoid
40 Ds		+++	-	(+)	-	-
2 Ms		+++	(+)	+	(+)	-
3 Ms		+++	+	+	(+)	-
4 Ms		++	+	+	++	(+)
5 Ms		+	++	++	(+)	+
6 Ms		++	++	++	+	-

-: not present

(+): present but as minor component

+: occupies about one fourth of the sections

++: occupies about one third of the sections

+++ : occupies more than one half of the sections

Ds: Days after the last injection of DMBA

Ms: Months after the last injection of DMBA

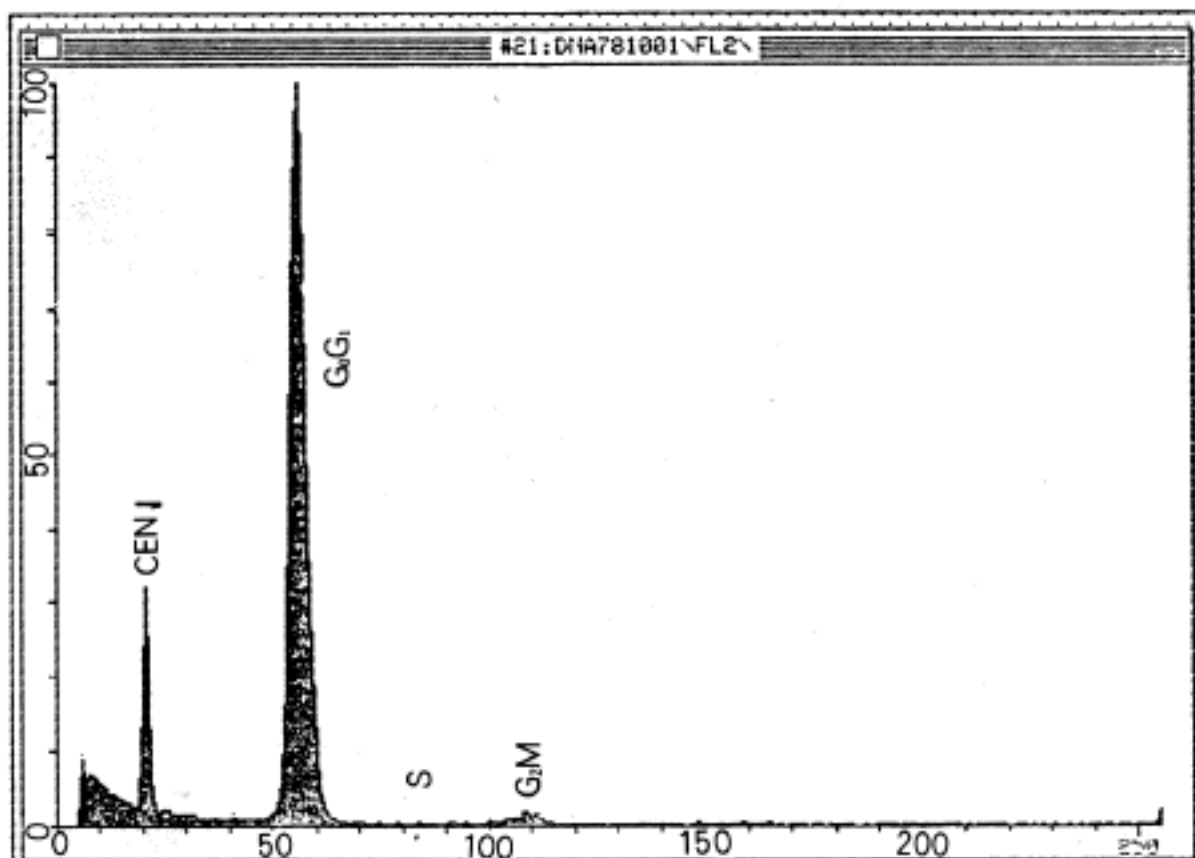


Fig. 6. DNA histogram showing a diploid G_0/G_1 and G_2/M peak.

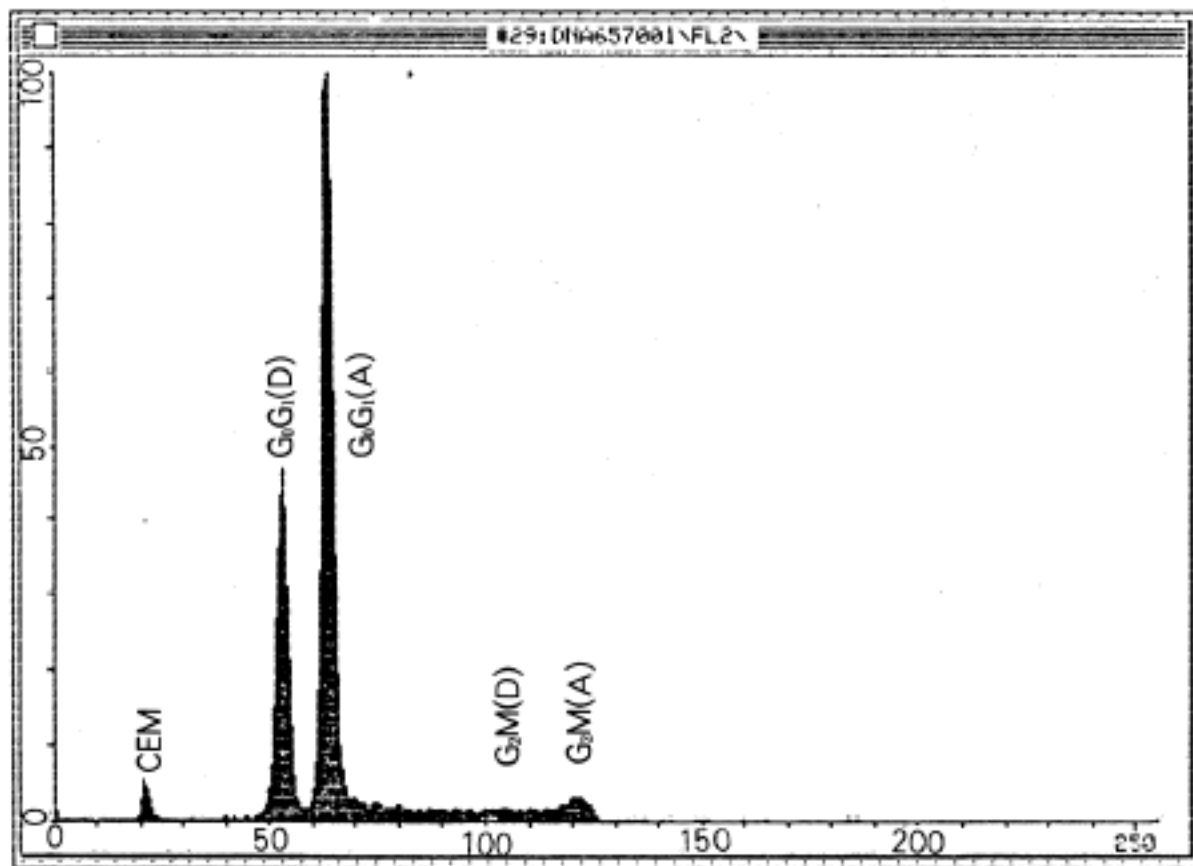


Fig. 7. The DNA histogram shows two cell lines, one of diploid clone and the other of aneuploid clone.

유형은 원형의 세포가 밀집되어 출현하는 부위로서 종양세포는 비교적 균일한 모양이며 핵과 세포질의 비가 컸고, 핵소체가 뚜렷하였다(round cell type)(Fig. 3). 둘째 유형은 종양세포의 크기가 크고 다양하며 풍부한 호산성의 세포질을 가지며 전형적인 혹은 비전형적인 유사분열과 함께 때로는 다핵성 거대세포가 출현하는 부위이었다(pleomorphic type)(Fig. 4). 셋째 유형은 종양세포가 방추상이며 종양세포 사이에 교원섬유가 출현하고 storiform의 배열이 관찰되는 부위로서(storiform type) 섬유성 조직구종과 부합되는 소견이었다(Fig. 5). 넷째 유형은 종양세포가 방추형 또는 방사형으로 출현하며 간질이 점액성 변화를 일으킨 부위이었다(myxoid type). 다섯째 유형은 불규칙적인 출혈성의 낭성공간과 그 주위를 여러층의 종양세포가 싸고 있는 부위이었다(angiomatoid type). 이와같은 5가지 유형외에도 흔히 유형 사이의 이행형이라고 볼 수 있는 부위가 출현하였으며 염증성 림프구가 출현하는 부위가 출현하였다. 조직학적 유형에 따라 정도의 차이는 있었으나 전체적으로 세포밀도가 높았고 한국성 괴사가 다양하게 출현함을 볼 수 있었다. 종양의 조직소견은 동일한 종괴, 그리고 동일 절편 조직에서도 조직학적 유형이 다양한 비율로 섞여서 출현하였으나 관찰시기별로 절편조직에서 차지하는 비율을 보면 시간이 경과할수록 원형세포가 감소하고 방추상과 다형성 세포가 증가하는 경향이었다(Table 1).

3) 대조군: 전예에서 파라핀주입에 의한 육아종 및

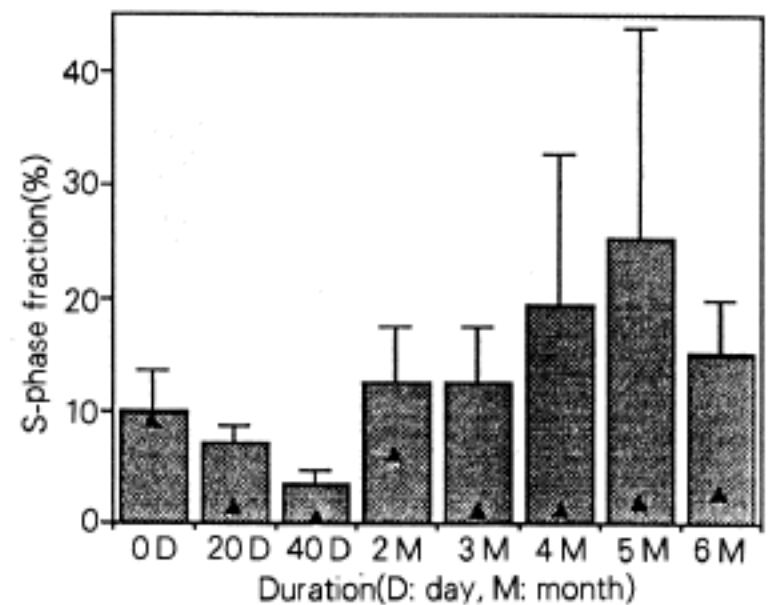


Fig. 8. Flow cytometrically determined S-phase fraction according to sequential change in MFH induced by DMBA(▲; control).

염증세포의 침윤외에 특기할 만한 조직학적 소견은 볼 수 없었다.

4. DNA ploidy

변이계수의 평균값은 4.74이었다. 실험군 40마리중 38마리에서 DNA diploidy(Fig. 6)였으며 4개월군과 5개월군 각 1마리의 주종괴와 4개월군 1마리의 2차

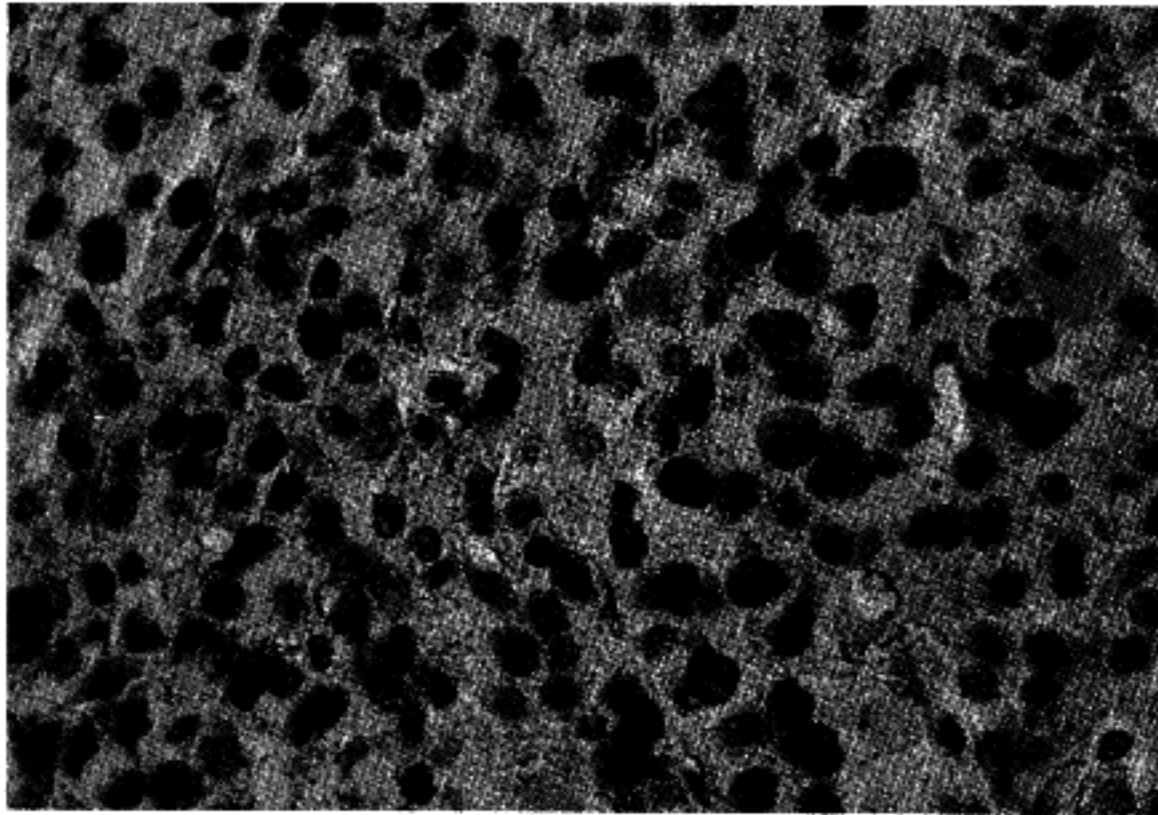


Fig. 9. PCNA(PC10) immunostaining is almost entirely confined to the nucleus and shows diffuse or granular pattern in round cell type. Mitotic cell shows diffuse staining throughout the cell(arrow head). PCNA(PC10)

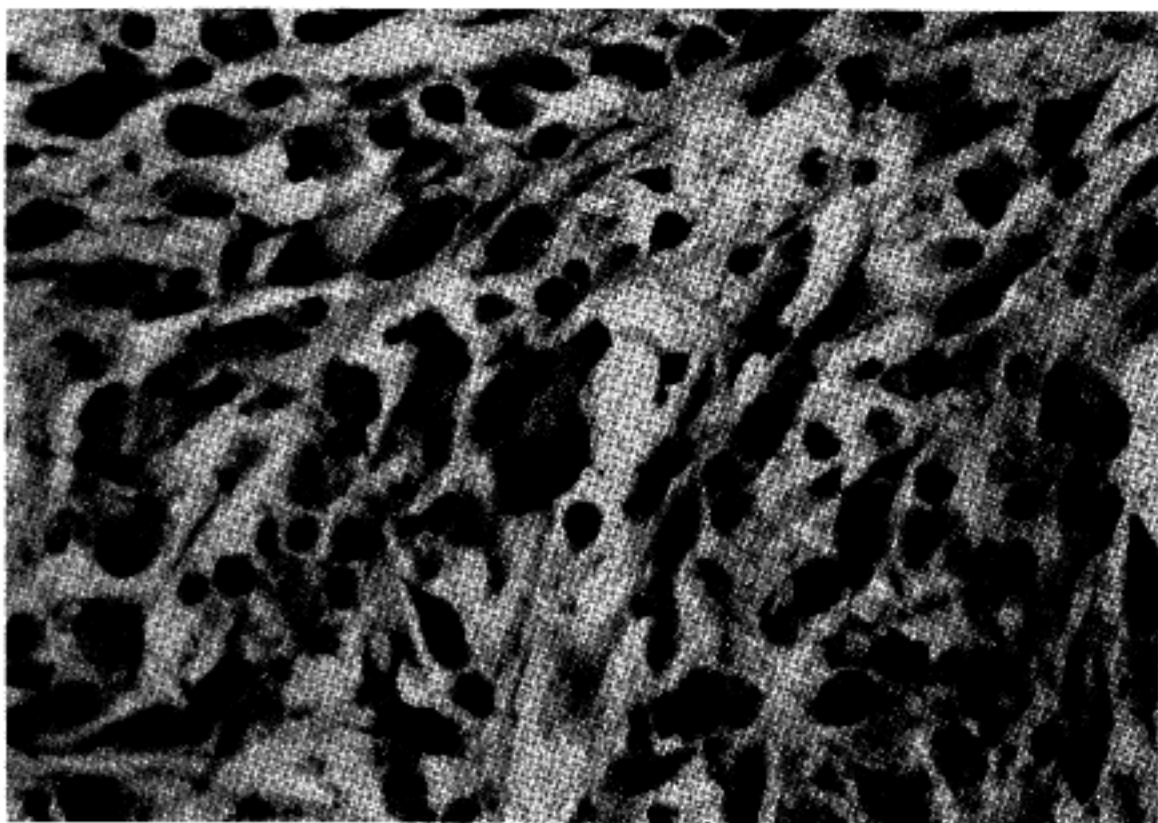


Fig. 10. PCNA(PC10) immunostaining in pleomorphic type. PCNA(PC10)

종과중, 모두 3예에서 DNA aneuploidy가 관찰되었다(Fig. 7).

5. 세포 증식능 분석

1) 합성기 세포분획(%): 유식세포증정기에서 얻어진 DNA histogram을 Multicycle program을 이용하여 분석한 결과 최종 주입전에 $9.90 \pm 3.76\%$, 최종 주입후 20일에 $7.24 \pm 1.44\%$, 40일에 $3.46 \pm 1.26\%$, 2개월에 $12.50 \pm 5.16\%$, 3개월에 $12.50 \pm 5.09\%$,

4개월에 $19.51 \pm 13.42\%$, 5개월에 $25.51 \pm 18.47\%$, 6개월에 $15.13 \pm 4.78\%$ 로 내조군의 9.40%, 3.76%, 0.00%, 7.70%, 2.00%, 2.40%, 3.00%, 4.50%에 비해 높게 나타났으며 종괴 형성이후에는 증가하다 감소하는 경향이였다(Fig. 8).

2) PCNA(PC10)염색소견 및 양성률(%): PCNA(PC10)의 양성반응은 핵에 국한되어 있었고 염색상은 조직학적 형태에 관계없이 확산 또는 과립상으로 나타났으며(Fig. 9, 10, 11) 극히 일부에서는 염색점에

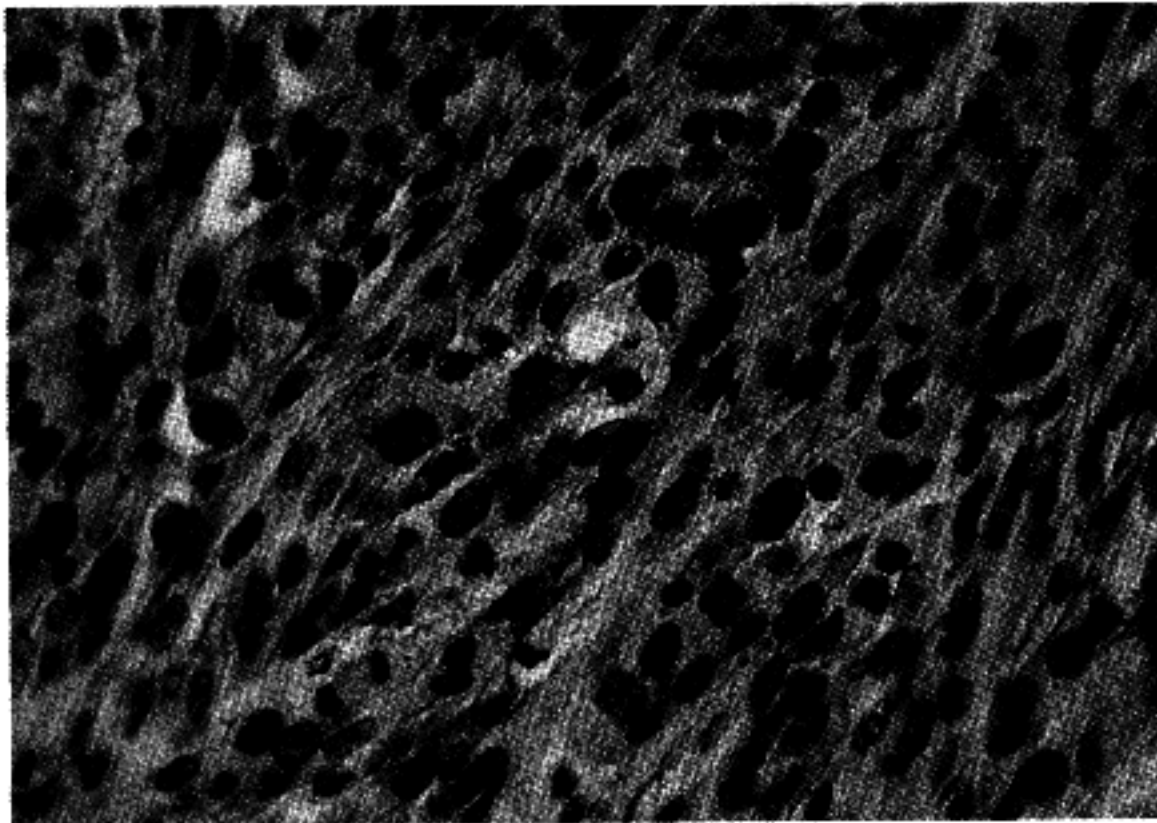


Fig. 11. PCNA(PCI0) immunostaining in storiform type. PCNA(PCI0)

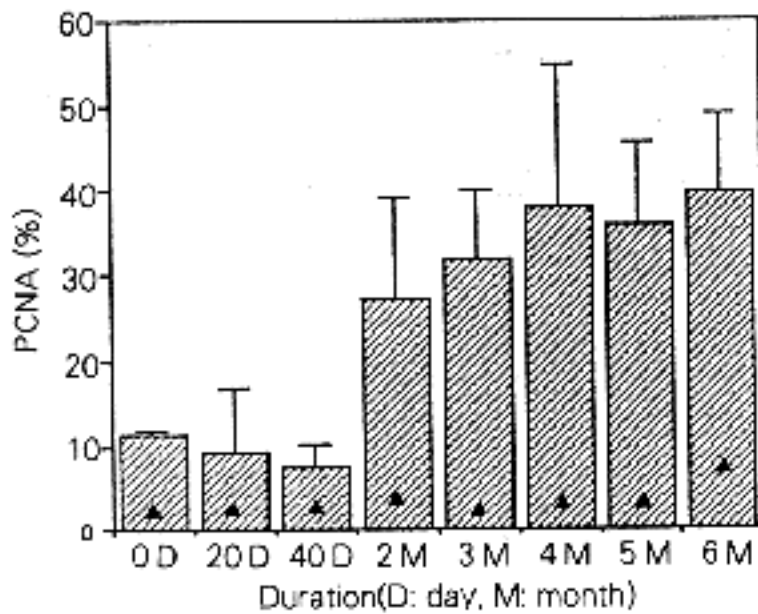


Fig. 12. Proportion of PCNA(PCI0) immunoreactive cells according to sequential change in MFH induced by DMBA(▲; control).

인식되었다. 유사분열세포의 경우 세포전체에 걸쳐 확산적으로 염색되었다. PCNA양성률은 최종 주입전에 11.29±0.66%, 최종 주입후 20일에 9.33±7.52%, 40일에 7.64±2.59%, 2개월에 27.15±11.93%, 3개월에 31.46±8.14%, 4개월에 38.01±16.86%, 5개월에 35.92±9.50%, 6개월에 39.84±9.05%로 대조군의 2.41%, 2.57%, 2.80%, 4.45%, 2.28%, 4.34%, 4.38%, 4.22%에 비해 높게 나타났으며 종괴형성이후에는 증가하는 경향이였다(Fig. 12). 각 유형에 따른 PCNA 양성률은 round cell type이 45.77±11.50

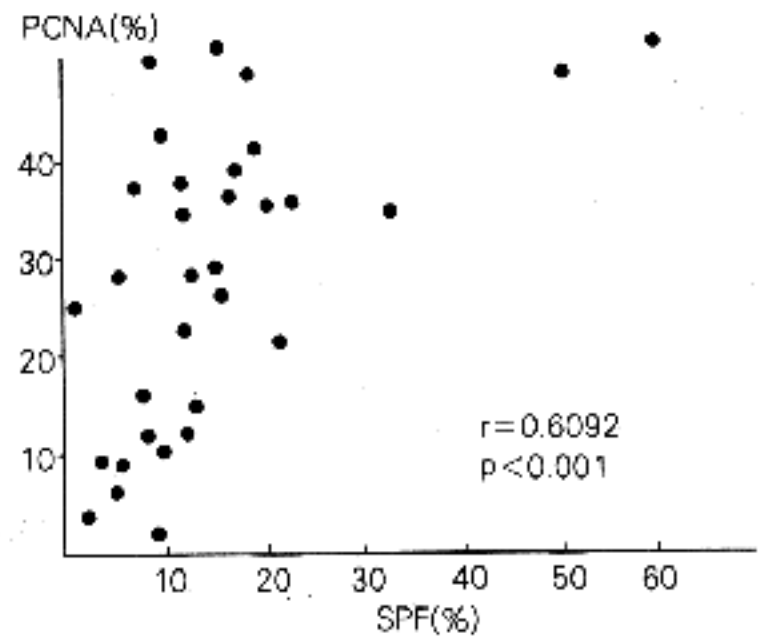


Fig. 13. Correlation between proportion of PCNA (PCI0) immunoreactive cells and flow cytometrically determined S phase fraction (SPF).

%, storiform type이 28.27±8.82%, myxoid type이 16.70±12.70%, pleomorphic type이 38.51±15.50%, angiomatoid type이 34.20±9.87%로 나타났으며 round cell type은 storiform과 myxoid type에 비해 유의있게 높았다($p<0.01$, $p<0.05$).

3) PCNA양성률과 합성기 세포 분석의 비교: PCNA 양성률과 무식세포측정기에 의한 합성기 세포 분석은 모두 종괴형성후 증가하는 추세를 보였고 각 개체에서는 대부분 PCNA 양성률이 높게 나타났다. 또한 PCNA(PCI0) 양성률과 합성기 세포분석은 유의

한 상관성을 보였다($r=0.6092, p<0.001$)(Fig. 13).

고 찰

9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA)은 방향성 탄수화물의 일종으로 강력한 발암작용을 가지는 물질로 알려져 있다. 최근에 Homma등²¹⁾과 Sakamoto등²²⁾에 따르면 DMBA를 백서의 슬관절강내에 주입하면 악성 섬유성 조직구종의 특징을 갖는 육종이 발생된다고 보고 하였다. 본실험에서 백서의 슬관절강 내에 DMBA를 주입하여 유발시킨 종양은 hematoxylin eosin 염색 표본상 다양한 소견을 가졌다. 그러나 모든 종괴에서 정도의 차이는 있었으나, 방추형의 종양세포가 출현하고 방추형 종양세포는 교원 섬유를 형성하며 storiform형태로 배열되는 것으로 보아 종괴는 섬유성 조직구종이라고 진단할 수 있었고 세포밀도가 크고 핵 세포질 비율이 높으며, 정상 또는 비정상 핵분열상과 괴사가 관찰되며 주위 근육으로의 침윤성 성장을 하고 DMBA 주입후 4개월군과 5개월군의 각각 1마리에서 2차 종괴가 형성되었고 5개월군 1마리에서 복강내로 전이된 종괴를 관찰할 수 있었고 또한 DNA ploidy상 aneuploidy가 관찰된 점으로 미루어 본 실험에서 유발한 종괴 역시 악성 섬유성 조직구종으로 인정되었다.

세포핵의 DNA 함량 측정은 세포분광측정법(cytophotometry)에 의해 측정되어 왔으나²⁴⁾ 레이저, 컴퓨터학, 단일세포군 항체 생산 및 형광색소 화학의 발달로 유식세포측정법(flow cytometry)의 장이 열리게 되었다^{25,26)}. 유식세포측정기에 의한 종양세포의 ploidy측정은 이미 유방²⁷⁾, 방광²⁸⁾, 결장²⁹⁾, 자궁경부¹⁰⁾, 폐¹¹⁾, 난소¹²⁾, 전립선¹³⁾ 암종, 신경아 세포종¹⁴⁾의 진단 및 예후 결정에 중요한 인자로 알려져 있는데 신경아 세포종²⁷⁾, 수아세포종²⁸⁾, 소아 악성림프구성 백혈병²⁹⁾을 제외하고 종양의 DNA aneuploidy는 diploidy에 비해 예후가 불량하다고 한다.

섬유성 조직구종에 연계된 종양에 있어서 피부섬유종(dermatofibroma)과 융기성 피부섬유육종(dermatofibrosarcoma protuberans)에서 DNA aneuploidy인 경우는 드물나 악성 섬유성 조직구종에서 DNA aneuploidy빈도는 높으며 DNA aneuploidy인 경우는 재발과 사망률이 높은 것으로 알려져 있다^{30,31)}. 본 실험에서 관찰된 3예의 DNA aneuploidy는 악성 섬유성 조직구종에서 보고된 빈도에 비해 낮으나 도살시기가 임의적인 시간의 경과에 따라 행하여졌고 DMBA 최종 주입후 4개월과 5개월에 관찰되어진 점은 경시적인 관찰의 시기를 늘릴 경우 DNA aneuploidy의 빈도가 늘어날 것으로 추정할 수 있었다. 한예에서 주종괴가 DNA diploidy를 보인 반면 2차 종괴에서 DNA aneuploidy로 관찰된 점은 원발소에서 보다 전이소에서 DNA aneuploidy가 더 흔

히 관찰된다는 보고³²⁾와 일치하는 것으로 DNA aneuploidy의 stem line이 보다 더 활발한 전이성을 갖으며 이때문에 DNA aneuploidy인 경우 재발 빈도가 높은 것으로 추정해 볼 수 있었다.

DNA aneuploidy가 종양의 발생단계에서 부터 출현하는 것인지 또는 종양의 발달과 함께 DNA ploidy도 변하는 것인지는 불분명하다. 자궁경부암에서 상피내암종이 미소침윤성 암종을 거쳐 침윤성 암종으로 발달하는 것으로 알려져 있는데^{33,34)} 이들 종양이 진행하면서 핵형도 변화한다는 사실³⁵⁾로 미루어 종양의 발달에 따라 DNA ploidy도 변한다는 해설이 가능한데 본 실험에서 종양의 초기단계보다는 후기에서 DNA aneuploidy가 출현하는 사실은 이에 부합되고 따라서 DNA ploidy 변화도 종양의 생물학적 현상중의 하나라고 볼 수 있었다.

유식세포측정기에 의해 측정되어진 G_0/G_1 피크의 변이계수는 표준편차를 평균치로 나눈값으로 수치가 낮을수록 resolving power가 좋으며 일반적으로 변이계수가 5보다 작을 경우 바람직한 결과로 여겨지는데 본 실험의 평균 변이계수 4.74로 이에 합당하였다. 유식세포기에 의해 측정되어진 각 세포주기의 분획값은 정확한 수치가 아니고³¹⁾ aneuploidy인 경우 분석이 어렵기 때문에 정상세포의 cell line 뿐만아니라 aneuploid cell line의 세포주기 분획의 측정이 가능한 Multicycle program을 통해 DNA histogram을 분석하여 보다 정확한 합성기 세포분획을 구하였다. 유식세포측정기에 의해 측정되어진 합성기 세포분획도 예후인자로서 간주되는데 일반적으로 합성기 세포분획이 높을수록 예후가 불량한 것으로 되어 있다³⁶⁻³⁹⁾. 본 실험에서 합성기 세포분획이 종괴 형성후에 경시적으로 증가하는 경향을 보였는데 이는 합성기 세포분획이 양성에서 악성으로 변화시 증가한다는 보고^{40,41)}와 부합되며 발암물질에 의해 DNA에 변이를 가져와 개시된 조직이 증식되는 과정을 거쳐 종양으로 되어간다고 볼 수 있었다. 그러나 합성기 세포분획이 선형비례를 하지않고 증가하다 감소되는 경향을 보이는 것은 성장하는 종괴에서 낭세포(daughter cell)가 정상세포보다 집착능이 낮으므로 이탈하여 사망하거나 분활하지 않는 휴지기(G_0 phase)로 들어감으로서 복제장으로 부터 떨어져 나가므로 합성기 세포분획이 계속적인 증가를 보이지 않는다고 생각해 볼 수 있었다.

면역조직화학적 방법에 의한 합성기 세포분획의 측정은 세포와 조직구조가 유지되며 간단하고 빠른 결과를 얻을 수 있고 방사능에 노출될 위험이 없으므로⁶⁾ 최근 각광받고 있다. 초기에는 주로 Ki-67이 많이 이용되었는데 유방암^{42,43)}, 폐암⁴⁴⁾, 악성림프종⁴⁵⁾, 뇌종양⁴⁶⁾에서 Ki-67 index가 높을수록 예후가 불량한 것으로 알려져 있다. 그러나 G_0 기 이외의 모든 세포주기에서 검출되고 또한 신선조직이 이용되므로 사용범위에 제한이 있다⁴⁷⁾. 최근에 개발된 proliferating cell nu-

결 론

clear antigen(PCNA)은 36 KD의 핵단백으로 말기의 G₁/S기에서 최고 농도로 존재하며⁴⁸⁾ 파라핀 조직에서도 사용이 가능한데 그중 하나는 PC10이다⁴⁹⁾.

본 실험에서 PCNA(PC10)의 염색상이 조직학적 유형에 관계없이 핵에 국한되어 확산 또는 과립상으로 나타났는데 이는 PCNA(PC10)가 핵단백이기 때문이며 유사분열 세포에서는 세포전체에 걸쳐 확산상으로 염색되었는데 이는 분열과정 동안 핵막이 파괴되기 때문이라고 사료되었다. PCNA(PC10)양성물과 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획이 경시적인 변화에서 종괴 형성후 증가 추세를 보였고 서로 유의한 상관관계($r=0.6092, p<0.001$)를 나타냈는데 이는 Ki-67 및 PCNA(PC10)에 대한 양성물과 유식세포기에 의한 합성기 세포분획 사이에는 상관관계가 있다는 보고^{50,51)}와 일치한다. PCNA(PC10) 양성물이 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획에 비해 높게 관찰되어 졌는데 이는 첫째, 유식세포기에 의해 측정되어진 합성기세포분획에는 종양세포뿐만 아니라 대부분의 증식하지 않는 간질세포와 염증세포가 동시에 측정되어지고 둘째, PCNA(PC10)가 non S phase(비합성기)의 분할하고 있는 세포에서도 나타날 수 있기 때문이라고 사료되었다.

단일세포 부유액을 만들기 때문에 조직이 파괴되는 유식세포측정기에 비하여 면역조직화학적 방법에 의한 세포증식능의 검색시 조직구조가 유지되므로 다양한 정보를 얻을 수 있다. 조직학적 유형에 따른 PCNA(PC10) 양성물 산정시 다른 유형에 비해 round cell type에서 높았는데 이는 round cell type에서의 세포증식이 다른 type보다 더 활발하다는 것을 시사해 준다고 해석되었다. Storiform type은 악성 섬유성 조직구종의 특징적인 소견이며 pleomorphic type, myxoid type 및 angiomatoid type도 악성 섬유성 조직구종의 형태로 볼 수 있다¹⁵⁾. 따라서 round cell type에서의 세포증식능은 형태학적으로 악성 섬유성 조직구종의 소견을 보이는 부위보다 더 활발할 것으로 해석되었다. 또한 조직학적으로 시간이 경과함에 따라 종양조직을 구성하는 조직학적 형태는 round cell type이 감소하고 pleomorphic과 storiform type이 증가하는 경향이 있었는데 이는 본 연구에서 유발한 종양이 초기에는 round cell을 중심으로 활발한 증식을 하면서 점차 악성 섬유성 조직구종으로 분화함을 시사하였다.

또한 본 실험에서 PCNA(PC10) 양성물과 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획사이에 높은 상관관계를 보였는데 차후에 PCNA(PC10)의 결과를 영상 분석기를 통하여 정량화하면 보다 객관적인 독립된 예후추정인자로 사용될 수 있을 것이다.

DMBA를 배서의 슬관절강내에 주입하여 유발된 악성 섬유성 조직구종에서 종양의 진행과정에 따른 DNA ploidy의 변화를 관찰하고, 세포증식능의 변화를 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획과 PCNA(PC10)을 이용한 면역조직화학적방법으로 비교관찰하여 이들 양자간의 상관관계를 구명하고자 본 연구를 시행하였다.

DMBA를 40마리의 Wistar계 백서 우측 슬관절강내에 4주간격으로 3회 주입하여 종양을 유발시켰으며 그 진행과정(최종주입전, 최종주입후 20일, 40일, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월)에 따라 DNA ploidy와 세포증식능의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) DMBA 최종 주입후 5주 부터 원형의 종괴가 형성되었으며 실험기간 동안 DMBA 처치군 40마리 중 25마리에서 종괴의 형성을 확인 할 수 있었고 4개월, 5개월군 각 1마리에서 원종괴에 인접한 부위에 2차종괴와, 5개월군 1마리에서 복강내에 전이된 종괴가 각각 관찰되었다. 광학현미경상 종양세포는 부분적으로 storiform형태의 조직구축을 보이는 악성 섬유성 조직구종의 소견을 보였다.

2) DNA ploidy상 3예의 DNA aneuploidy가 관찰되었는데 이는 4개월, 5개월군 각 1마리의 원종괴와 4개월군 1마리의 2차종괴에서였다.

3) 유식세포측정기에 의한 합성기 세포분획과 PCNA(PC10) 양성물은 paraffin만을 주입한 대조군에 비해 높게 나타났으며 종괴가 형성된 이후에는 시간의 경과에 따라 다소 증가하는 경향을 보였다. 또한 합성기 세포분획과 PCNA(PC10)양성물은 유의한 상관성을 보였다($r=0.6092, p<0.001$).

이상의 결과로 DNA aneuploidy는 종양의 발달과 함께 출현하며 세포증식능은 종양의 발생과정에서 증가함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Faber E. Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals; C.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res* 1986; 44: 5463-74.
- 2) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 4th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1989; 268-9.
- 3) Enomoto K, Farber E. Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res* 1982; 42: 2330-5.
- 4) Rabes HM, Scholze P, Jantsch B. Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient

- 'preneoplastic' liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1972; 32: 2577-86.
- 5) Bleiberg H, Buyse M, Galand P. Cell kinetic indicators of premalignant stages of colorectal cancer. *Cancer* 1985; 56: 124-9.
 - 6) Hall PA, Levison DA. Review; Assessment of cell proliferation in histologic material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-92.
 - 7) Kallioniemi OP, Blanco G, Alavikko M, Hietanen T, Mattila J, Lauslahti K, Koivula T. Tumor DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 56: 637-42.
 - 8) Blomjous C, Schipper NW, Baak J, Galen EV, Voogt H, Meyer CM. Retrospective study of prognostic importance of DNA flow cytometry of urinary bladder carcinoma. *J Clin Pathol* 1988; 41: 21-5.
 - 9) Quirke P, Dixon MF, Clayden AD, Durdey P, Dyson JE, Williams NS, Bird CC. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 285-91.
 - 10) Rutgers DH, van der Linden PM, van Deperzeel HA. DNA flow cytometry of squamous cell carcinomas from the human uterine cervix; The identification of prognostically different subgroups. *Radiother Oncol* 1986; 7: 249-58.
 - 11) Volm M, Hahn EW, Mattern J, Müller T, Vogt-Moykopf I, Weber E. Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1988; 48: 2923-8.
 - 12) Kallioniemi P, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer* 1988; 61: 334-9.
 - 13) McIntire TL, Murphy WM, Coon JS, Chandler RW, Schwartz D, Conway S, Weinstein RS. The prognostic value of DNA ploidy combined with histologic substaging for incidental carcinoma of the prostate gland. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 370-3.
 - 14) Gansler T, Chatten J, Varella M, Bunin GR, Atkinson B. Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma, correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* 1986; 58: 2453-8.
 - 15) Weiss SW, Enzinger FM. Malignant fibrous histiocytoma; An analysis of 200 cases. *Cancer* 1978; 41: 2250-66.
 - 16) Kearney MM, Soule EH, Ivins JC. Malignant fibrous histiocytoma; a retrospective study of 167 cases. *Cancer* 1980; 45: 167-78.
 - 17) Shubik P, Pietra G, Porta GD. Studies of skin carcinogenesis in the syrian gold hamster. *Cancer Res* 1960; 20: 100-5.
 - 18) Maeda H, Kameyama Y. Effect of excisional wounding of DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. *J Oral Pathol* 1986; 15: 21-7.
 - 19) Huggins CB, Grand LC, Billantes FP. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature* 1961; 189: 204-7.
 - 20) Huggins CB, Sugiyama T. Induction of leukemia in rat by pulse doses of 7, 12-dimethyl benzantracene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 55: 74-81.
 - 21) Homma W, Wunsch PH. Experimental-induced sarcoma after intra-articular injection of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *Arch Orthop Trauma Surg* 1983; 102: 111-3.
 - 22) Sakamoto K. Malignant fibrous histiocytoma induced by intra-articular injection of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene in the rat; Pathologic and enzyme histochemical studies. *Cancer* 1986; 57: 2313-22.
 - 23) Erb CPW, Maurer W. Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature* 1963; 199: 863.
 - 24) Böhm N, Sandritter W. DNA in human tumors: A cytophotometric study. *Current Topics in Pathology* 1975; 60: 152-219.
 - 25) Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; 57: 453-79.
 - 26) Kute TE, Muss M. Flow cytometry in solid-tumor prognosis. *Laboratory Management*, July, 1987; 21-32.
 - 27) Taylor SR, Blatt J, Costantino JP, Roederer M, Murphy RF. Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma and ganglioneuroma. *Cancer* 1988; 62: 748-54.
 - 28) Tomita T, Yasue M, Engelhard HH, Mclone DG, Gonzalez-Crussi F, Bauer KD. Flow cytometric DNA analysis of medulloblastoma; Prognostic implication of aneuploidy. *Cancer* 1988; 61: 744-9.
 - 29) Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM. Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1982; 60: 864-71.
 - 30) Radio SJ, Wooldridge TN, Linder J. Flow cytometric DNA analysis of malignant fibrous histiocytoma and related fibrohistiocytic tumors. *Hum Pathol* 1988; 19: 74-7.
 - 31) Kreicbergs A, Tribukait B, Willems J, Bauer HCF. DNA flow analysis of soft tissue tumors. *Cancer* 1987; 59: 128-33.
 - 32) Molenaar WM, Dam-Heiring A, Kamps WA,

- Cornelisse CJ. *DNA-aneuploidy in rhabdomyosarcomas as compared with other sarcomas of childhood and adolescence. Hum Pathol* 1988; 19: 573-9.
- 33) Kolstad P, Klein V. *Long-term follow-up of 1121 cases of carcinoma in situ. Obstet Gynecol* 1976; 48: 125-9.
- 34) Murphy WM, Coleman SA. *The long-term course of carcinoma in situ of the uterine cervix. Cancer* 1976; 38: 957-63.
- 35) Nowell PC. *The clonal evaluation of tumor cell populations. Science* 1976; 194: 23-8.
- 36) Dressler LG, Seamer L, Owens MA. *Evaluation of a modeling system for S-phase estimation in breast cancer by flow cytometry. Cancer Res* 1987; 47: 5294-302.
- 37) Joensuu H, Klemi PJ, Korheila E. *Prognostic value of DNA ploidy and proliferative activity in Hodgkin's disease. Am J Clin Pathol* 1988; 90: 670-3.
- 38) Quirke P, Dixon MF, Clayden AD. *Prognostic significance of DNA aneuploidy and fraction of cell proliferation in rectal adenocarcinomas. J Pathol* 1987; 151: 285-91.
- 39) Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. *Prognostic value of S-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine on human gastric cancers. Cancer* 1990; 65: 116-21.
- 40) Ngoi SS, Coico LS, Goldwin TA, Wong RJ, Pe-Cosse JJ. *Abnormal DNA ploidy and proliferative patterns in superficial colonic epithelium adjacent to colorectal cancer. Cancer* 1990; 66: 953-9.
- 41) Bleiberg H, Buyse M, Galand P. *Cell kinetic indicator of premalignant stages of colorectal cancer. Cancer* 1985; 56: 124-9.
- 42) Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H. *Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. J Clin Pathol* 1987; 39: 977-80.
- 43) Barnard NJ, Hacll PA, Lemoine NR, Kadar N. *Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. J Pathol* 1987; 152: 287-95.
- 44) Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY. *New approach to assessing lung tumors in man. J Clin Pathol* 1986; 39: 590-3.
- 45) Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. *The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J Pathol* 1988; 154: 223-35.
- 46) Burger PC, Shibata T, Kleihues P. *The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells; Application to surgical neuropathology. Am J Surg Pathol* 1986; 10: 611-7.
- 47) Gerdes J, Lemke M, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
- 48) Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. *A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation; Its distribution in synchronized cells. J Exp Med* 1981; 154: 1899-909.
- 49) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE. *Rapid communication; Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections; An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol* 1990; 162: 285-94.
- 50) Garcia RL, Coltrera MD, Gown AM. *Rapid communication; Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. Am J Pathol* 1989; 134: 733-9.
- 51) Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. *Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.