

## In Situ Hybridization을 이용한 원발성 폐암 조직의 간기핵에서 제 7 번 및 17 번 염색체의 수적 이상에 관한 연구

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 내과학교실\*

이 상 숙·한 승 범\*·박 승 국\*

### Detection of Numerical Chromosomal Aberration in Squamous Cell Carcinoma of the Lung by In Situ Hybridization Using #7 and #17 Centromeric Probes

Sang Sook Lee, M.D., Seong Beom Han, M.D.\* and Soong Kook Park, M.D.\*

*Department of Pathology and Internal Medicine\*, Keimyung University School of Medicine*

This study was carried out to understand the relationship between specific chromosome changes and their phenotypic consequences at the tissue level of human lung cancers. Ten paraffin-embedded human lung squamous cell carcinoma samples were investigated for the evidence of genetic alterations, using chromosome 7 and 17-specific repetitive  $\alpha$ -satellite DNA probes. In situ hybridization procedure with chromosome-specific DNA probes was optimized for use on formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections. The chromosome index ranged from 1.10 to 1.88 (median, 1.49) for chromosome 7 and 1.20 to 1.98 (median, 1.69) for chromosome 17. Normal lymphocytes and stromal cells showed one or two chromosome signals per cell in most cases. All tumors showed three or more chromosome signals per cell with range of 16.0% to 80.6% of cancer cells (median, 50.9%) for chromosome 7 and 32.7% to 84.7% (median, 69.9%) for chromosome 17. The chromosome index did not correlate with the DNA content in most cases. Chromosomes 7 and 17 were either overrepresented or underrepresented when they were compared with corresponding DNA index determined by FCM. An increase in copy number, particularly of chromosome 7 was associated with a less favorable phenotype, including high nuclear grade. In addition, chromosome alterations were differentially expressed in the different areas of the same tissue section, correlating with histologic heterogeneity.

These results suggest that chromosome polysomy can be reliably detected in tissue sections using in situ hybridization. There is a strong correlation between genotypic abnormalities and tumor phenotype in human lung cancer. This capability will prove to be an important tool for determining the underlying genetic basis for tumor development, tissue phenotype heterogeneity and progression by allowing genetic determination to be made on paraffin-embedded tissue sections where tumor histologic architecture is preserved. (**Korean J Pathol 193; 27: 443~458**)

**Key Words:** Chromosome, In situ hybridization, Lung, Squamous cell carcinoma, Polysomy, 7 and 17 centromeric probes

접 수: 1993년 6월 3일, 게재승인: 1993년 7월 19일  
주 소: 대구직할시 중구 동산동 194, 우편번호 700-310  
계명대학교 의과대학 병리학교실, 이상숙

서 론

사람의 종양은 다단계 과정을 통해 발생하므로 상당

히 이질적이다. 예를 들면 사람 폐종양의 90% 이상 이 DNA의 이질성을 보이는데<sup>1)</sup> flow cytometry (FCM)에 의해 저 2 배성(hypodiploid)에서 4 배성(tetraploid)에 이르는 넓은 폭의 이수성(aneuploidy) DNA 양을 가지며 다발성 간세포(stem cell)도 10~20%의 표본에서 관찰되었다<sup>2)</sup>. 또한 조직학적으로 분명히 다른 양상 즉, 선형성, 상피양, 미분화와 육종성 요소를 보이는 부위들로 구성되어 있다<sup>3)</sup>. 비소세포폐암(non-small cell lung carcinoma; NSCLC) 이 전 폐암의 75~80%를 차지함에도 불구하고 세포 유전학적 자료는 많지 않다. 원발성 NSCLC 표본은 흔히 유사분열 지수가 낮아 세포유전학적 분석에 필요한 중기 세포의 적당한 수를 얻기가 힘들다. 더우기 NSCLC의 핵형은 매우 복잡하여 일관성 있는 변화를 알아내기가 상당히 힘들다. 폐암 세포에서 점 돌연변이(point mutation), 염색체의 재배열과 소실, 유전자의 증폭과 유전자 발현의 변화등 일련의 유전자 변화를 발견하게 되었다<sup>4)</sup>. 최근에 원발성 NSCLC에서 자세한 핵형의 결과를 보고하였는데 다양한 염색체의 수적, 구조적 이상을 보였다<sup>5-8)</sup>. 이와 같은 사실로 보아 폐암은 유전자 질환 또는 변경된 유전자의 산물로 간주될 수 있다<sup>9)</sup>. 그러나 종양의 특수한 유전자 변화와 형태적 변화간의 관계는 다음 2가지 이유로 말하기 어렵다. 첫째, 염색체 분석이 성공적으로 이루어지더라도 같은 종양 조직에서도 다양한 핵형의 이상이 자주 발견된다<sup>10,11)</sup>. 이는 절제된 조직에 다발성 병소가 존재하거나 종양의 발생과 수반된 염색체의 무작위 변화 때문이다<sup>12-14)</sup>. 둘째, 전통적 세포유전학적 분석을 실시하기 위해 조직을 분쇄해야 하는데 이때 조직의 구조가 없어지게 된다. 그러므로 온전하게 보존된 조직 절편에서 특정 염색체의 변화를 탐지할 수 있는 방법이 필요하게 되었다. 이로써 사전에 핵형 검사로 알려진 특정 염색체의 변화와 형태적 변화를 1:1로 연관시킬 수 있게 되었다.

최근 염색체의 특이한 DNA probe를 이용한 in situ hybridization(ISH)기법이 이런 점에서 유용함이 알려 졌다<sup>15)</sup>. 이 방법은 특정 염색체에 특수한 표적이 되는 반복성 DNA 배열 순이나 전체 또는 일부 염색체 절편의 배열순을 인지하는 DNA probe를 사용하여 이들 probe와 보합하는 특정 염색체나 염색체의 특정 부위가 결합하여 핵에 영역을 형성하기 때문에 중기(metaphase)와 간기(interphase)세포들의 핵에서 염색체를 국한시키게 되었다<sup>16-18)</sup>.

특정 염색체의 수적 이상의 분석을 위해 단순한 satellite와  $\alpha$ -satellite(alphoid) DNA probe가 가장 큰 관심을 끌고 있다<sup>19-23)</sup>. 염색체에 높은 특이성을 갖는 이 probe는 표적이 되는 염색체의 중심질 주변 지역에 하이브리드 결합하여 중기와 간기세포에서 쉽게 검출된다.

더우기 각기 다른 염색체 DNA probe를 각각 다른

형광 또는 발색 계열로 결합시켜 사용하면 동일한 세포에서 다른 여러 개의 염색체나 염색체 부위를 동시에 나타낼 수 있다<sup>24)</sup>.

간기 세포 유전학(interphase cytogenetics)<sup>25-27)</sup>은 간기세포의 핵의 특정 염색체를 연구하는 새로운 방법으로 종래의 세포유전학적 분석에 필요 불가결한 유사분열 하는 세포들이 필요가 없게 되어 파라핀으로 포매된 조직 절편에 응용할 수 있다. 충실성 종양은 유사분열 지수가 낮아 중기 세포들을 얻기 어렵다<sup>10)</sup>. 간기 세포에 ISH를 실시하여 방광암<sup>26)</sup>, 신경계 종양 세포<sup>17,18)</sup>와 유방암<sup>20)</sup> 및 위장 종양<sup>15)</sup>등 충실성 종양의 신선한 적출물에서 염색체의 수적 이상을 발견하였다. 이와 같이 ISH이 간기나 중기 핵에서 염색체의 수적 이상을 검출하는 유용한 기법으로 급부상하게 되었다<sup>16,22,28,29)</sup>. 지금까지 몇몇 예에서 특정 염색체와 형태적 변화와의 상호관계가 세포 수준에서 규명되었을 뿐 대부분의 연구는 단일 세포 부유물에서 이루어져 염색체 변화와 조직병리학적 특징 또는 탐지된 클론 집단의 공간적 분포와의 관계를 알 수 없었다<sup>27,30-33)</sup>.

최근 ISH의 사용이 파라핀 절편에서 보고되어 졌다<sup>27,31,33)</sup>. 그러나 사전 연구에 의하면 파라핀 절편을 이용할 경우 검색 대상이 되는 각 조직에 대한 실험 조건을 미리 적정화시키는 것이 필요하다. 이 논문에서 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 폐암 조직 절편의 간기 세포유전학적 검색을 위해 ISH기법을 실시하는데 적절한 실험 조건 즉, 조직 절편의 슬라이드에 철저한 부착, 단백질해 정도, DNA 변성(denaturation), 하이브리드결합(hybridization)과 염색체 중심질의 biotinylated DNA probe와 보합하는 표적 DNA의 면역 화학적 발현에 대해서 기술하였다. 염색체 ISH 결과를 같은 조직 블록의 인접한 조직 절편을 따로 취해서 H & E(hematoxylin & eosin) 염색과 FCM으로 DNA 지수 및 S+G2M 분획 그리고 종양의 증식능을 알 수 있는 PCNA(proliferating cell nuclear antigen) 면역 염색을 실시하여 같이 비교하였다.

이 연구의 목적은 파라핀으로 포매된 사람의 폐암 조직에서 제 7 번 및 17 번 염색체의 중심질 probe를 사용하여 ISH 기법을 실시하여 폐암 조직 내의 염색체 변화와 형태적 변화를 서로 연관시켜 유전형과 표현형의 변화간의 상관관계의 일단을 정립하고자 하는데 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

10명의 폐의 원발성 편평상피암 환자의 수술 당시 절제된 암조직을 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 조직 블록을 대상으로 하였다.

임상: 환자의 평균 나이는 61.2세로 전 예가 다 남

**Table 1.** Demograph of 10 patients with squamous cell carcinoma of the lung

Case	Sex	Age	Staging	Treatment	Follow-up interval	Outcome
1.	M	58	T <sub>2</sub> No Mo	Op*	26 mos	Recurred(8 mos)
2.	M	66	T <sub>2</sub> No Mo	Op	12 mos	Recurrence(-)
3.	M	63	T <sub>2</sub> No Mo	Op	19 mos	Recurrence(-)
4.	M	64	T <sub>3</sub> No Mo	Op+XRT**	8 mos	Recurrence(-)
5.	M	67	T <sub>2</sub> No Mo	Op	5 mos	Recurred
6.	M	56	T <sub>4</sub> No Mo	Op	Lost	Unknown
7.	M	64	T <sub>2</sub> No Mo	Op	Lost	Unknown
8.	M	59	T <sub>2</sub> No Mo	Op	24 mos	Recurred in stump(7 mos) Recurred in contralateral lung(9 mos)
9.	M	56	T <sub>2</sub> No Mo	Op	1 mo	Recurrence(-)
10.	M	59	T <sub>2</sub> No Mo	Op	20 mos	Recurred in contralateral lung(15 mos)

Op\*: operation, XRT\*\*: radiotherapy

자였다. 전 예에서 조직은 수술 당시 채취되었는데 이 중 4명의 환자는 폐소엽절제를 나머지 환자들은 폐전절제술을 시행하였다. 환자의 특징은 Table 1에서와 같다.

## 2. 방 법

**1) ISH기법:** 유리 슬라이드를 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma, USA)용액에 2시간 담구어 흔들어 씻은 후 흐르는 물에 2시간 동안 두어 수세하였다. 그 후 95% 에탄올로 5분씩 두 번 세척하고 공기에 건조시켰다. 아세톤에 2%로 용해한 3-aminopropyltriethoxysilane(APES, Sigma, USA)으로 2분간 처리한 후 다시 증류수로 수세하여 공기에 건조시켰다. 60°C 오븐에 하룻밤 말린 후 상자에 담아 실온에서 보관하여 사용하였다.

전처리한 유리 슬라이드 위에 6 μm 두께의 조직 절편을 붙여 60°C 오븐에 하룻밤 두어 조직 절편을 슬라이드에 밀착시켰다.

다음날 조직 절편이 붙은 슬라이드를 xylene에 5분씩 두 번 담구어 파라핀을 제거한 후 100% 에탄올에 5분씩 두 번 담구어 탈수하고 슬라이드를 공기에 건조시켰다. 내인성 peroxidase 반응을 차단하기 위해 슬라이드를 메탄올에 1% 농도로 용해한 과산화수소 용액에 담구어 30분간 실온에 두었다. 1M sodium thiocyanate 용액(Sigma, USA)에 슬라이드를 담구어 37°C에서 5~15분가량 두어 세포질 단백질 및 핵의 일부 단백질을 제거하였다. 그 후 증류수로 씻어 반응을 중지시킨 후 일련의 에탄올과 아세톤으로 후고정하고 공기에 건조시켰다.

DNA probe(Oncor, USA)는 제 7번 또는 17번 염색체의 중심절부위(peri-centromeric region)의

DNA 배열순(sequences)를 인지하는 반복성 alpha-satellite DNA probe(p7tet1, biotinylated)을 사용하였다.

ISH 기법은 Kim등<sup>30)</sup>의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 중요 과정을 보면 RNase A(Sigma, USA), 1.0 mg/ml로 37°C에 한 시간 처리하여 조직 절편내의 RNA를 제거한 후 2×SSC(0.3M NaCl: 30 mM sodium citrate, pH 7.0)로 3분씩 3번 세척한 후 제열 에탄올로 다시 탈수하여 공기에 건조시켰다. 하이브리드결합 혼합물의 최종 농도는 60% formamide(Sigma, USA), 2×SSC, 5% dextran sulfate(Sigma, USA), 0.1 μg/μl salmon sperm DNA(Sigma, USA)와 1 ng/μl biotinylated DNA probe로 구성하였다. 조직 절편위에 각각 30 μl의 하이브리드결합 혼합물을 놓고 덮개 유리를 덮은 후 덮개 유리의 주변을 고무풀로 봉하였다. 슬라이드의 조직 절편내의 표적 DNA와 DNA probe를 동시에 열을 가하여 변성을 일으켰는데 94°C의 수조를 이용하여 4분 두었다. 슬라이드를 얼음 위에 5분간 두어 식힌 후 37°C 수조에서 하룻밤(16시간 가량) 두어 하이브리드결합을 행하였다. 다음날 결합되지 않은 DNA probe를 씻어 내기 위해 50% formamide: 1×SSC (pH 7.0)으로 실온에서 15분간씩 두 번, 0.1×SSC로 37°C에서 15분씩 두 번 더 흔들며 세척하였다.

Biotinylated DNA probe는 peroxidase반응에 의해 발색하였다. 처음 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)과 0.05% Tween 20를 함유한 phosphate-buffered saline(PBS)로 10분간 반응시켜 peroxidase의 비특이성 결합을 차단하였다. 그 후 rabbit anti-biotin, 1:100(Enzo, USA), biotinylated goat anti-rabbit IgG, 1:50(Vector, USA),

rabbit biotinylated anti-goat IgG, 1:100(Vector, USA), peroxidase-conjugated avidin, 1:80 (Dako, USA)로 차례대로 37°C에서 각각 30분간씩 결합시켰다. 각 반응의 중간에 PBS로 3번씩 세척하였다. 발색은 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 10~20분 두어 발색하고 희석한 Giemsa 용액으로 대조 염색하였다. 발색을 강하게 하기 위해 nickel chloride를 DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 첨가하였다.

ISH의 결과 80~90% 이상의 거의 모든 세포의 핵에서 신호가 고루 나타나야만 만족할 만하며 그렇지 못한 경우 다시 실시하였다. 전체적으로 200배의 현미경 시야에서 거의 모든 세포의 핵에서 반점이 보일 정도이면 신호의 강도가 적당하다고 생각하였다.

ISH 신호의 검색은 Hopman 등<sup>35)</sup>과 유사한 방법을 사용하였다. ISH의 신호의 검색은 종양 세포인 경우 슬라이드당 400개 이상의 핵을, 정상 세포인 경우 200개 이상을 세었다. 적절하게 수를 세는 요건은 다음과 같았다. ① 핵이 서로 중첩되지 않는 것, ② 신호의 강도가 같은 핵속에서 균일한 것, ③ 반점은 단지 신호들이 완전히 분리될 때만 인정하였고 쌍으로 존재하거나 갈라졌을 때는 하나로 세었다. ④ 미세한 결합 부위 같은 비특이적인 신호는 수에서 제외하였다.

이 연구에서 핵에 검출되는 ISH 신호수에 따라 0, 1, 2, 3 또는 그 이상의 핵으로 분류하였다. 핵 한 개당 신호의 개수에 따른 핵분율을 산출하고 핵 1개당 평균 신호수를 계산하였다. 때때로 probe의 조직 절편에의 침투 불량, 표적이 되는 DNA의 불완전한 변성, 또는 DNA 소실로 인하여 ISH 결과에 장애를 초래할 수 있다. 정상 조직에서 단지 신호를 한 개만 가진 핵이 흔히 10~20%에 이른다고 보고되어 있다<sup>29,34)</sup>. 이 연구에서 검출 방법의 신빙성을 평가하기 위해서 염색체 지수(chromosome index)를 산출하였다. 각 종양의 염색체 지수는 종양 세포의 핵에 발견되는 염색체 신호의 평균수를 산출하여 같은 조직 절편에 존재하는 정상 세포(림프구와 간질 세포)의 염색체의 신호의 평균수로 나누어 산출하였다<sup>36)</sup>.

**2) Flow Cytometry:** 파라핀으로 포매된 조직 절편을 Hedley 등<sup>35)</sup>에 의한 방법을 약간 수정하여 DNA 양을 측정하기 위해 핵부유액(nuclear suspension)을 준비하였다. 인접조직 절편을 조직학적으로 검색한 후 정상 조직과 피사 부위는 절제하여 종양세포가 있는 부위만을 선택하여 70 μm 절편을 1~2개 이용하였다. 선택한 조직 절편에서 파라핀을 제거한 후 일련의 에탄올과 증류수로 합수시켰다. 그 후 0.4% 펩신(Sigma, USA)로 37°C에서 30분간 둔 후 1분간 냉장 보관하여 효소 반응을 중단시켰다. FCM으로 분석하기 전에 조직을 3 ml 주사기와 17계지 주사 바늘에 통과시킨 후 구경 37 μm의 나일론 망으로 여과하

였다. RNase, 180 μg/ml(Sigma, USA)로 처리하고 그 후 propidium iodide, 50 μg/ml(Sigma, USA)로 염색하였다. 분석은 FAScan flow cytometer (Becton-Dickinson, USA)를 사용하였다. DNA 합성기(S phase) 분석은 RFIT model(CellFIT software, Cell-Cycle Analysis, Version 2.0, 2, Becton-Dickinson, USA)을 사용하여 산출하였다. DNA 지수(DNA index; DI)는 정상 2배성 대조군의 peak channel에 대한 검사용 채취물의 peak channel의 비로 정의하였다. 정의상 2배성 집단의 DI는 1.0이다. 한 개의 분명한 두 개이상의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>의 peak를 보이는 경우는 이배성(aneuploid)로 정의하였다. Cell cycle 중 S+G<sub>2</sub>+M기에 해당되는 세포들의 핵분율을 증식 분획(proliferation fraction)으로 정의하였다<sup>36)</sup>.

**3) 면역조직화학법(Immunohistochemistry):** PCNA 면역 염색을 위해 일차 항체로 PCNA(monoclonal antibody PC10, Novocastra Lab, USA)을 1:200으로 희석하여 사용하였다. 조직 절편을 탈파라핀과 탈수한 후 계열의 에탄올을 거쳐 합수하고 그 후 1% 정상 마혈청(normal horse serum, Vectastain kit, USA)으로 실온에서 20분간 둔 후 적당량의 일차 항체를 조직 절편위에 놓아 37°C에서 1시간 두었다. 세척 후 이차 항체(biotinylated anti-mouse immunoglobulin, Vectastain kit, USA)와 alkaline phosphatase-conjugated streptavidin, 1:200(Vector, USA)으로 조직절편위에 적당량 놓은 후 각각 37°C에서 30분간 두었다. 세척은 0.05M Tris buffered saline(TBS, pH 7.6)을 사용하였다. New fuchsin으로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 검색하여 1,000개의 종양 세포중 PCNA염색으로 양성인 종양 세포의 수의 핵분율을 계산하였다<sup>37,38)</sup>.

## 결 과

저자는 폐의 원발성 편평상피암 환자 10명을 대상으로 2개 또는 3개의 파라핀 블록을 선택하여 인접한 조직 절편들을 제 7번과 17번 염색체의 중심절의 DNA probe로 ISH하였다.

사람의 폐암에서 발견되는 특정 염색체의 수적 변화와 조직의 형태적 변화간의 관계를 더욱 잘 이해하고자 사람 폐암을 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 조직 절편을 사용하여 ISH를 적절하게 고안하여 사용하였다. 적절한 ISH의 조건을 만들기 위해 처리된 조직 절편의 가열과정, 펩신 농도와 처리 시간, 하이브리드결합 조건 및 하이브리드결합 후 세척 및 면역조직화학적 방법 등을 다양하게 변화시켰다. 이 연구에서 탈파라핀한 조직 절편에서 염색체 제 7번과 17번의 중심절 probe를 사용하여 ISH를 실시하여

하이브리드결합된 DNA probe는 간접 다단계 peroxidase 반응에 의해 폐암조직에서 고르게 발현되었다. Peroxidase가 증계한 일련의 반응에 의해 특정 염색체의 중심질의 DNA 배열 순서를 검색하기 위해 여러 단계의 avidin-biotin system을 이용하였는데 회수를 거듭할 수록 신호가 증폭되었다. 그림 1a와 1b에서와 같이 선택된 폐암조직에서 종양 핵에서 수많은 7번 염색체 중심질의 신호를 보여 이배성을 나타내었다. 한편 간질에 침윤하는 림프구는 1개 내지 2개의 분명한 신호를 나타내었다(Fig. 1c). 간질에 존재하는 작은 종양소도 종양세포의 핵에 분명하게 드러나는 여러 개의 염색체의 중심질의 신호에 의해 정상 세포와 쉽게 감별되었다(Fig. 2a, 2b).

정상 세포에서는 대부분의 경우 2개의 염색체 신호를 보였으나 3% 미만에서는 3개가 보였다. 대조적으로 암세포에서는 7번 염색체 중심질 probe를 사용한 경우 3개 이상의 염색체 신호가 평균 51.8%에서, 17번의 경우 66.8%에서 관찰되었다(Table 2, Fig. 3a,

3b).

제 7번 염색체 중심질 probe를 사용한 경우 염색체 지수는 1.11~1.98(median, 1.49)였고 17번의 경우 1.20~1.94(median, 1.65)였다. 암세포에서는 3개 이상의 염색체 신호가 7번 염색체 중심질 probe를 사용했을 때 16~80.6%(median, 59%)에서, 17번의 경우 32.7~84.7%(median, 61%)에서 보였다(Table 3).

정상 상피에서 악성 이행하는 부위의 상피(Fig. 4a, 4b, 4c, 4d)와 주변의 암조직(Fig. 5a, 5b, 5c)에서 염색체 신호의 분명한 증가를 볼 수 있었다. 각 종양을 조직학적 등급, 즉 분화도에 따라 ISH의 결과를 비교해 보면 분화가 좋은 종양, 즉 각화진주(keratin pearl)형성이 많은 종양 세포는 분화가 중정도이거나 나쁜 종양에 비하여 염색체 지수와 염색체의 신호수가 작았다.

H & E로 염색된 폐암 조직 절편을 보면 3예에서 분명한 형태적 이질성을 보였다. Fig. 6a와 6b에서와 같이 종양의 어떤 지역은 혼한 각화진주형성을 보이는

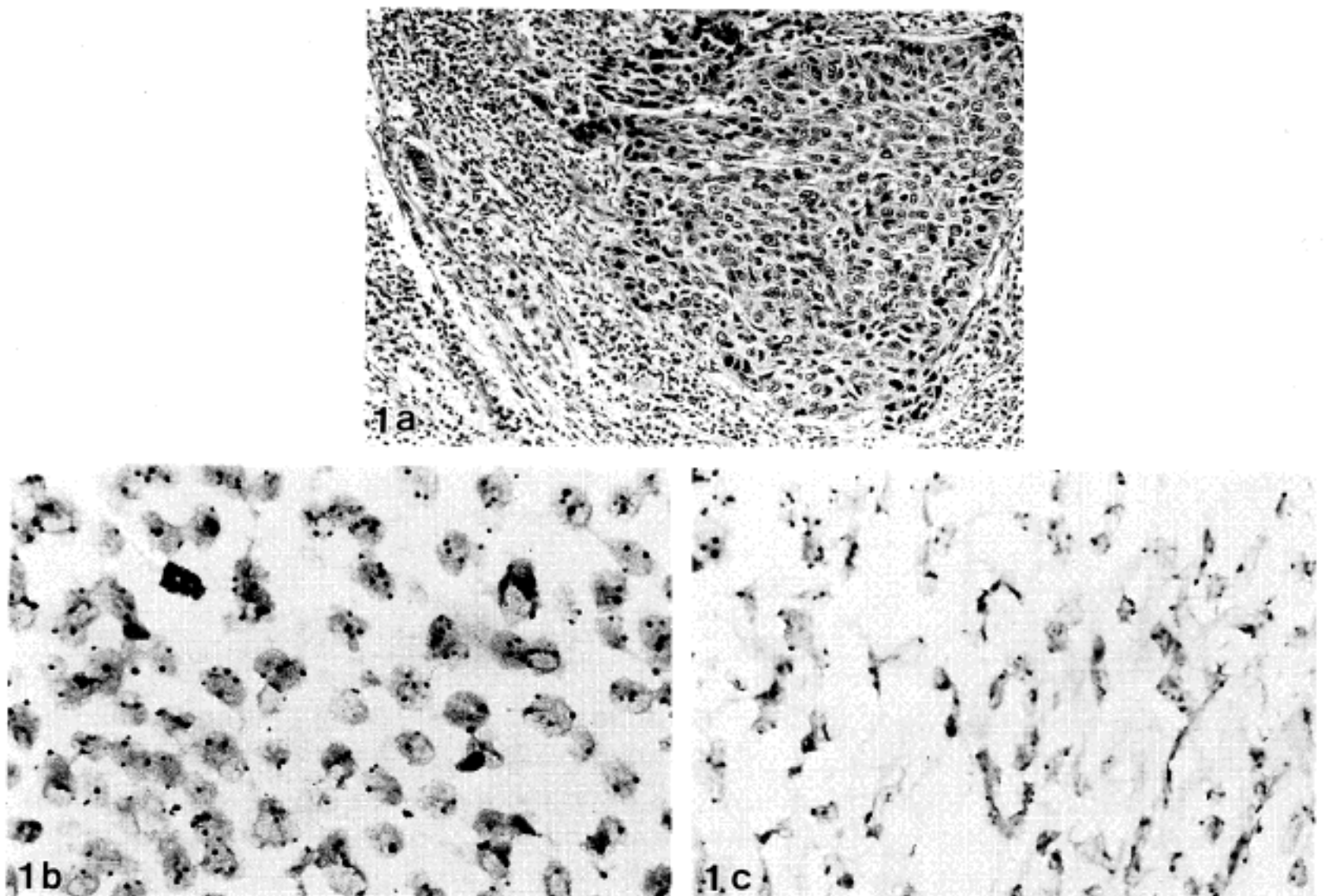
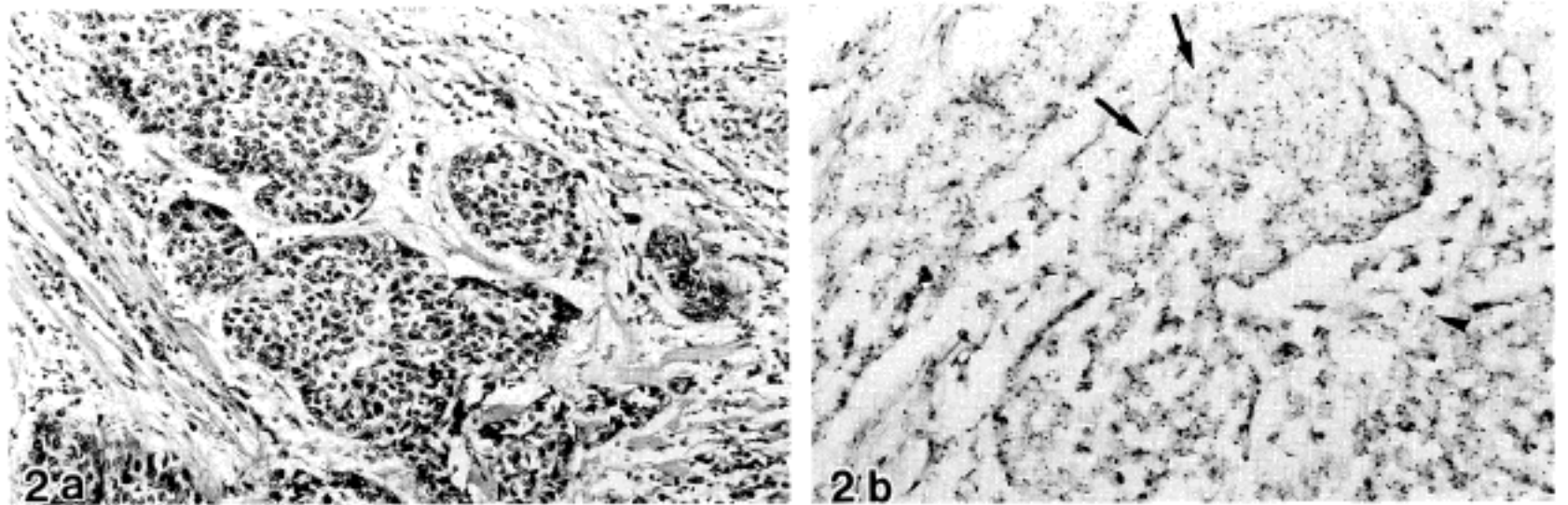


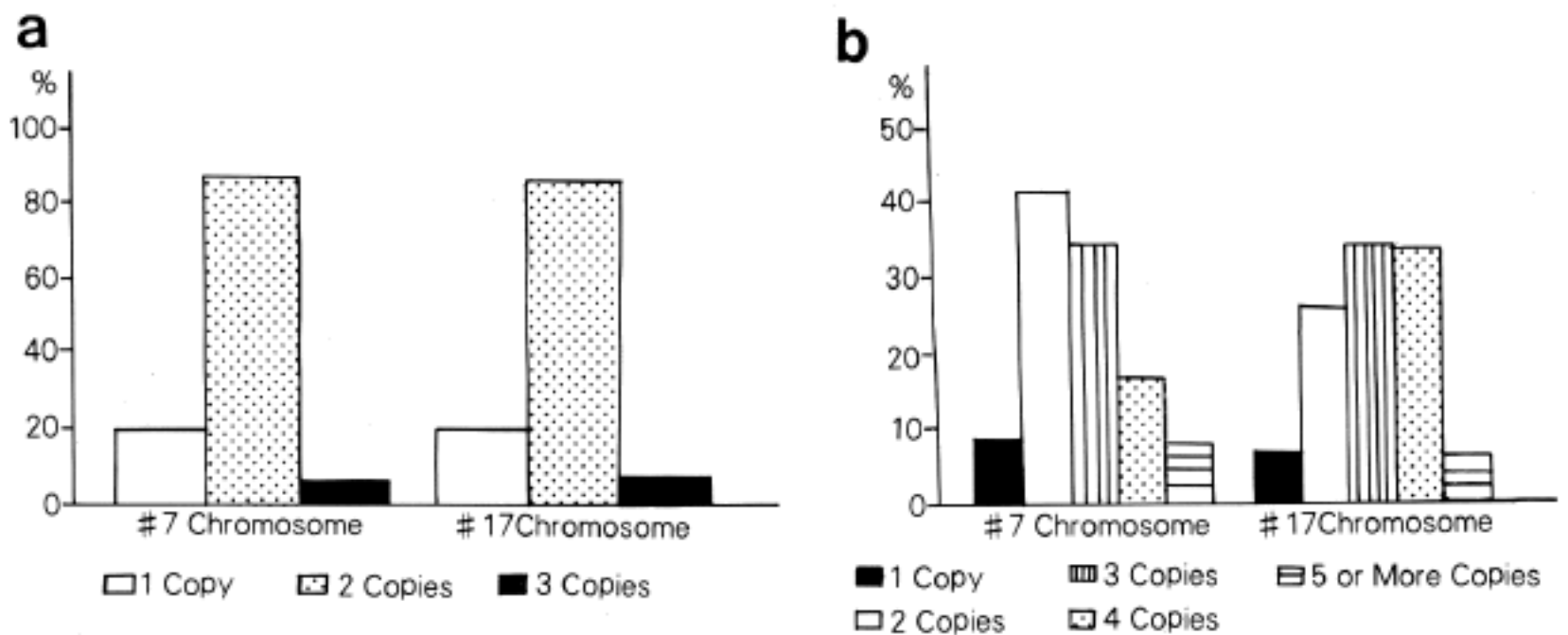
Fig. 1. (Case 10). ISH signals in proper conditions using chromosome 7 centromeric probe. Signal detection with indirect peroxidase/DAB staining and Giemsa counterstain. (a) Both tumor(left) and infiltrating lymphocytes(right) are well demonstrated by H & E stain. Original magnification  $\times 100$ . (b) Tumor nuclei showing multiple signals(2~5 spots). Peroxidase stain, original magnification  $\times 400$ . (c) Stromal cell nuclei showing one or two signals. Peroxidase stain, original magnification  $\times 400$ .

**Table 2.** Incidence(%) of centromeric copy number in 10 lung cancers

	Number of Centromeric Copies							
	Stromal cells/Lymphocytes			Cancer Cells				
	1	2	3	1	2	3	4	5 or more
Chromosome # 7	15.6	82.8	1.6	6.6	41.6	31.8	14.5	5.5
Chromosome #17	15.7	81.3	3.0	4.5	28.7	31.5	31.3	4.0



**Fig. 2.** (Case 4). (a & b) Small tumor islet(arrow) showing multiple signals compared to normal nuclei(arrow head). (a: H & E stain, original magnification  $\times 100$ , b: Peroxidase stain, original magnification  $\times 200$ ).



**Fig. 3.** (a) Centromeric copy numbers of control interphase lymphocytes and stromal cell nuclei for chromosomes 7 and 17. (b) Centromeric copy numbers of the interphase tumor nuclei of lung cancers for chromosomes 7 and 17.

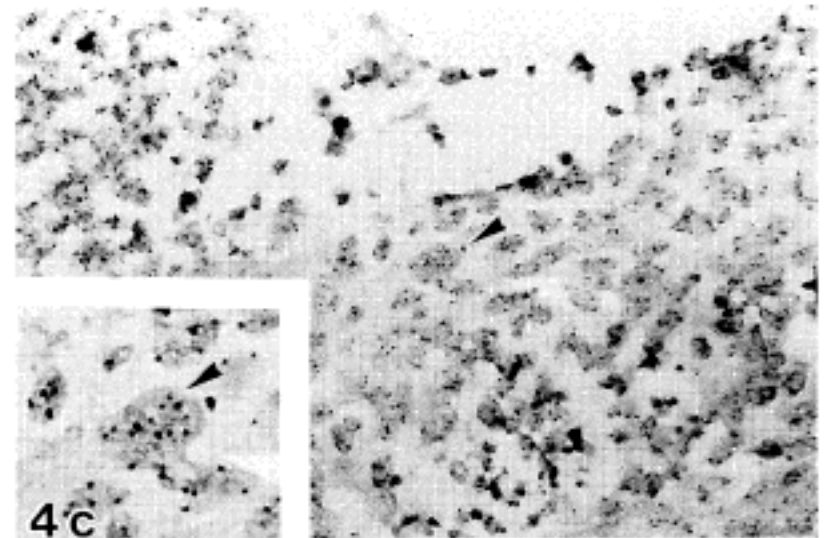
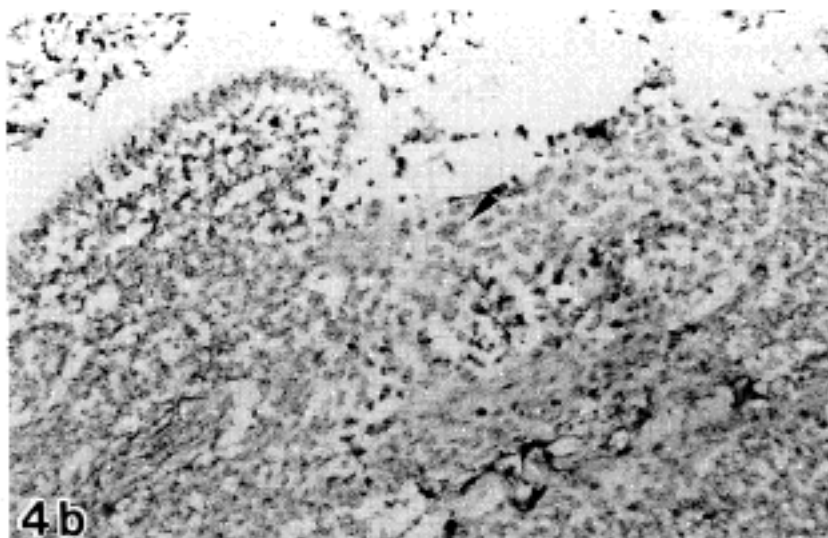
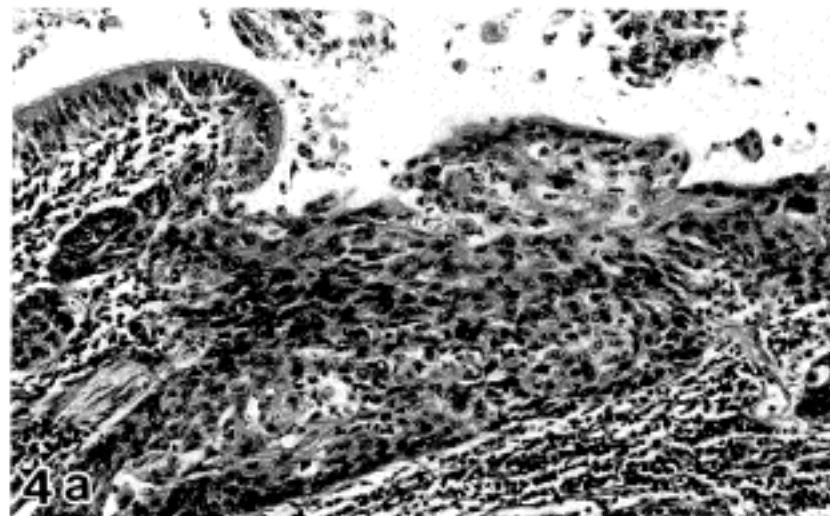
평형 세포로 분화를 보였으나(Fig. 6a) 다른 부위는 분화가 나뉘었다(Fig. 6c). 이 양지역의 인접한 조직 절편에서 ISH에 의해 7번 염색체 복제 수를 분석한 결

과 Fig. 6b와 6d에서 보는 바와 같이 잘 분화된 부위 보다 분화가 나쁜 지역에서 3개 또는 그 이상의 7번 염색체를 갖는 세포수가 전반적으로 증가되었다. 이와

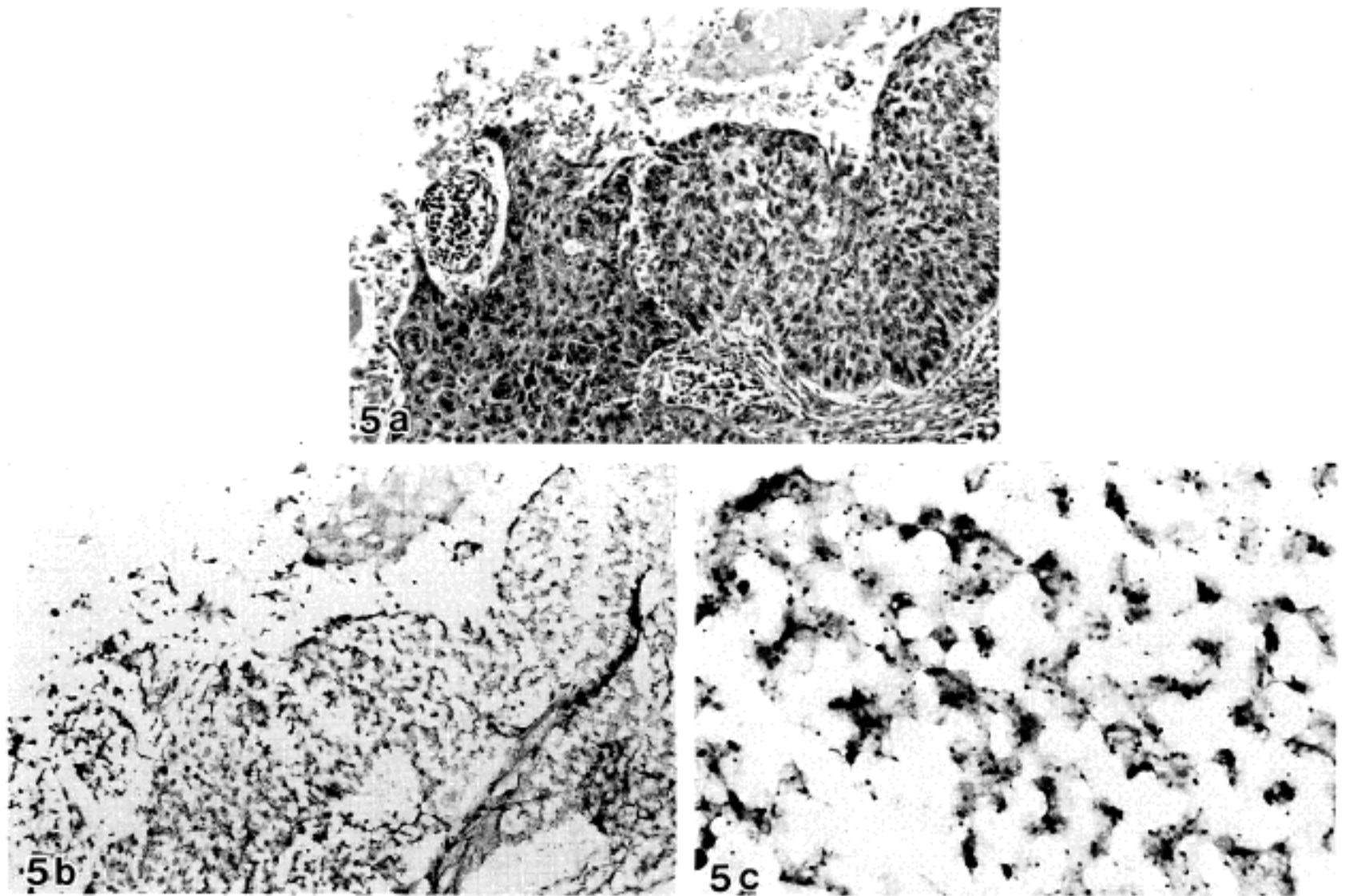
**Table 3.** Summary of interphase cytogenetics for 10 lung cancers

Case	#7 Chromosome			#17 Chromosome		
	Copy No.	≥3 spots(%)	CI*	Copy No.	≥3 spots(%)	CI*
1	2.10	16.0	1.11	2.20	32.7	1.20
2	3.00	64.0	1.56	2.70	51.9	1.47
3	3.40	72.6	1.70	3.40	72.6	1.98
4	2.50	47.7	1.33	3.70	82.9	1.95
5	2.64	54.1	1.49	3.30	77.9	1.77
6	2.14	17.1	1.22	2.90	67.1	1.40
7	2.36	41.1	1.30	3.20	74.5	1.77
8	3.27	80.6	1.69	2.86	62.9	1.56
9	3.44	78.1	1.88	2.92	60.3	1.60
10	2.59	46.9	1.48	2.58	84.7	1.90
Mean±SD	2.74±0.48	51.82±21.8	1.48±0.23	2.98±0.41	66.75±14.96	1.66±0.24
Median	2.62	50.9	1.49	2.91	69.9	1.69

CI\*: chromosome index



**Fig. 4.** (Case 2). (a) H & E showing area of malignant transformation of respiratory epithelium. (b, c) Peroxidase stain reveals increased numbers of signals of chromosome 7 in the nuclei in the transformed cell. The arrowheads show numerous signals in a big tumor nucleus, well demonstrated in the inset(a: H & E stain, original magnification×100, b, c: Peroxidase stain, original magnification×100, ×200).



**Fig. 5.** (Case 2). (a) H & E showing area of invasive squamous cell carcinoma portion, adjacent to Fig. 4. (b, c) Peroxidase stain reveals multiple signals of chromosome 7(3~5)(a: H & E stain, original magnification  $\times 200$ , b, c: Peroxidase stain, original magnification  $\times 200$ ,  $\times 400$ ).

같이 분화가 잘 된, 즉 각화진주형성이 많거나 세포질의 공동화를 많이 보이는 종양 세포는 분화가 나쁜 부위에 비해 염색체의 신호수가 적었다. 반면 종양세포 소내에서도 거대종양세포에서 분명히 신호의 수가 증가되었다(Fig. 7a, 7b).

10예의 폐에 생긴 원발성 편평상피암의 FCM에 의한 세포의 DNA양의 측정 결과는 Table 4와 같다. 10예중 3예가 이배성종양세포의 DNA양을 가졌다. 증례 2는 DAN 지수 1.52의 이배성을 보였다(Fig. 8). ISH결과 7번과 17번 염색체의 복제 수가 평균 3.0과 2.7로 고 2배성(hyperdiploid)였고 염색체 지수는 각각 1.56과 1.47로 DNA지수 1.5와 비슷하였다(Fig. 4a-d, Fig. 5a-c).

나머지 7예에서는 ISH에 의한 염색체 분석으로는 불명확한 7번과 17번 염색체의 고 2배성임을 나타내었으나 FCM에 의한 DAN지수는 모두 2배성 범위였다(Fig. 8).

PCNA 면역염색 결과 PCNA 항원은 거의 전적으로 핵에서 발현되었다. PCNA 표지 지수는 4.6%에서

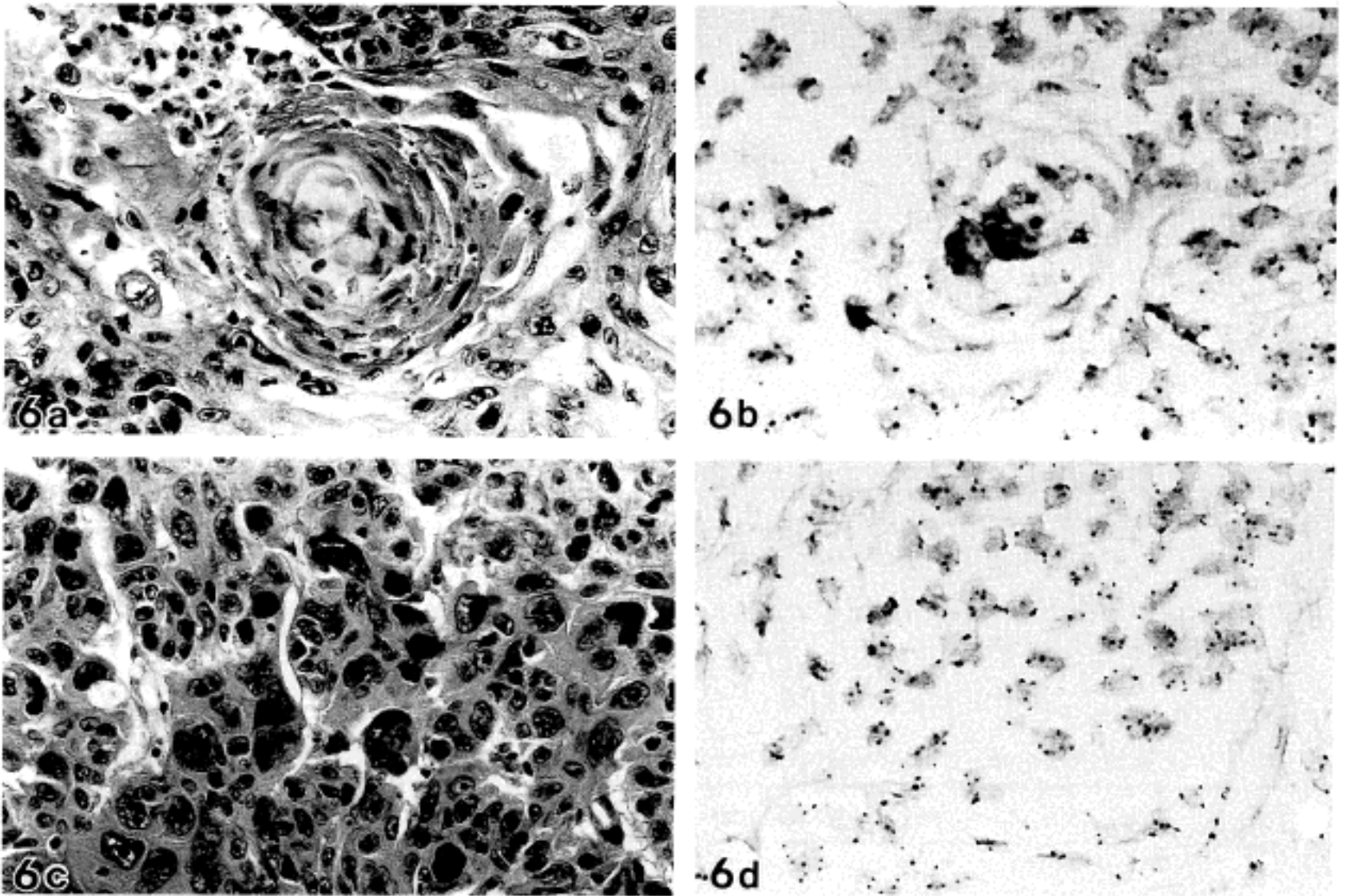
43.7%까지 다양하였다(Table 4). PCNA 표지 지수와 FCM에 의해 산출되는 증식능, 즉 S+G2M기의 분획사이에 어떤 상관관계를 발견할 수 없었다.

Table 4에서와 같이 일부 예에서 염색체 지수는 DNA 지수와 PCNA 양성 세포의 백분율과 상관성이 있었으나 대부분의 예에서 염색체 지수는 상응하는 DNA 지수와 PCNA염색 지수에 비해 과도하게 또는 더 적게 발현되었다. 그밖에 염색체의 신호수와 PCNA 염색이 같은 조직에서도 다르게 발현되었는데 이는 종양의 분화 정도의 변화와 일치하였다.

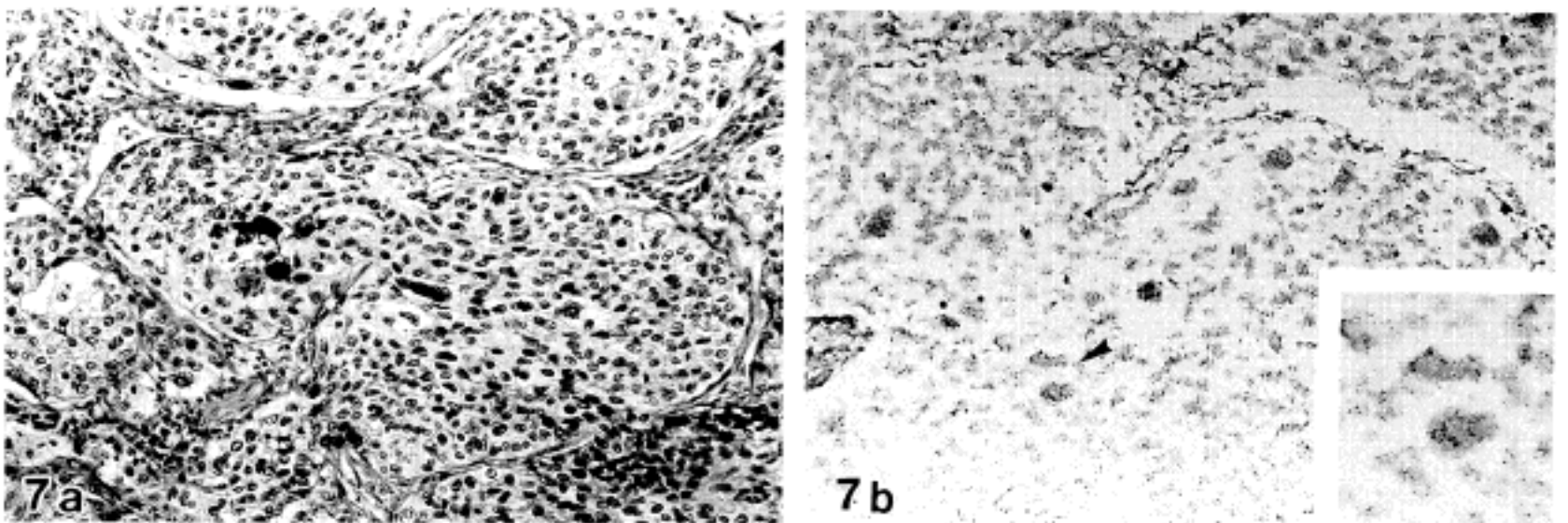
### 고 찰

사람의 충실성 종양은 생물학적 양상이나 병리조직학적으로 다양한데 이 종양의 유전적 기초(genetic basis)를 잘 이해하자면 신선한 종양 채취물에 발견되는 핵형의 변화가 직접 종양 세포의 특수한 생리적 변화와 연관되어야 한다. 사람의 몇몇 충실성 종양과 혈액 종양에서 특정 염색체의 이상이 발견되었고<sup>39)</sup> 사람





**Fig. 6.** (Case 4). Two separate regions of a squamous cell carcinoma of the lung in Case 4. (a) H & E showing a more differentiated region of tumor with frequent keratin pearls. (c) H & E showing less differentiated region of tumor. (b, d) Interphase tumor nuclei of the less differentiated region(d) showing increased numbers of signals(1~6) compared to the number of signals of well differentiated area(d)(a, b: H & E stain, original magnification  $\times 400$ , c, d: Peroxidase stain, original magnification  $\times 400$ ).



**Fig. 7.** (Case 8). (a) H & E showing several tumor giant cells in the moderately differentiated region of tumor. (b) Interphase tumor nuclei showing numerous signals(more than 10) in tumor giant cells compared to the numbers of signals of the background nuclei. Inset shows higher magnification of tumor giant cells, containing numerous signals( $\times 400$ )(a: H & E stain, original magnification  $\times 200$ , b: Peroxidase stain, original magnification  $\times 200$ ).

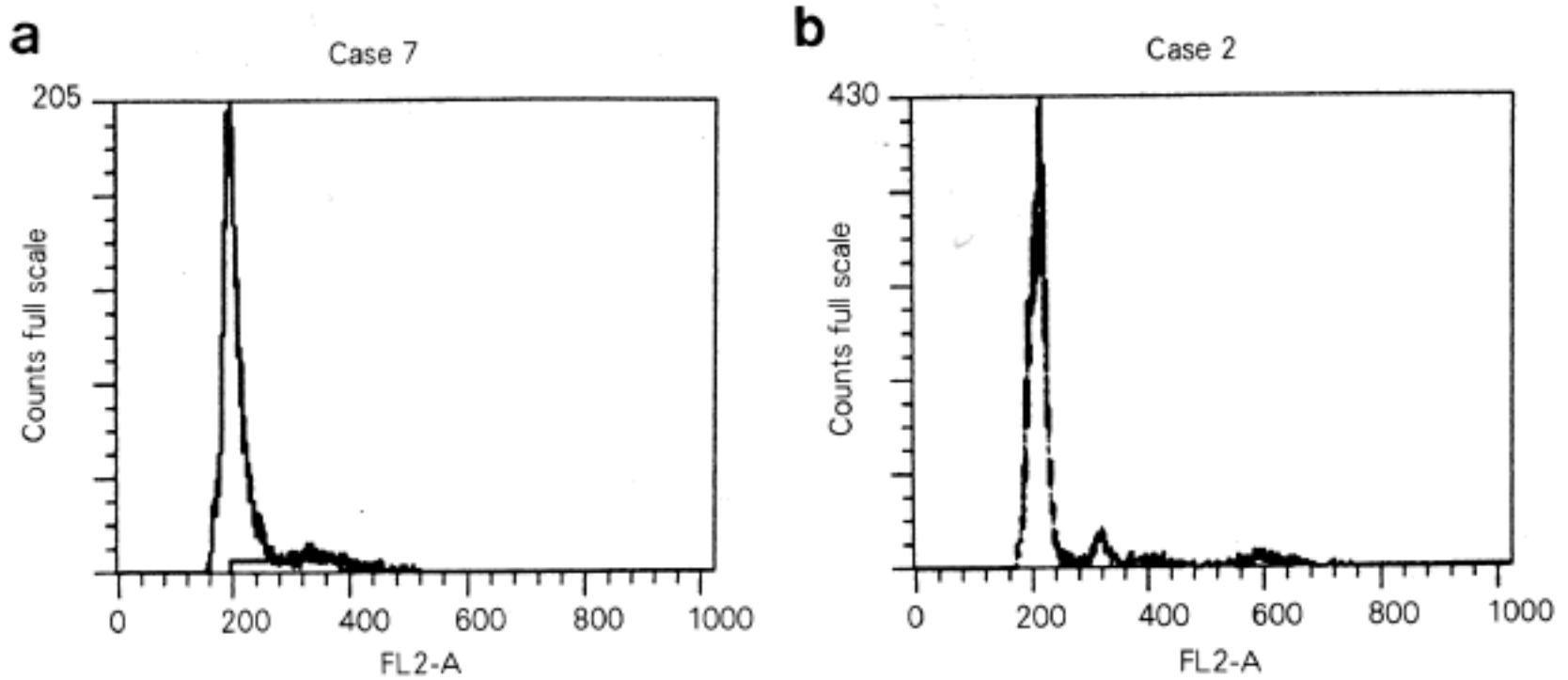


Fig. 8. (a) Diploid histogram(Case 7). (b) Aneuploid histogram(Case 2). In addition to the diploid peak, there is a large aneuploid peak.

Table 4. Correlation between flow cytometric analysis and the PCNA labeling index

Case	Flow Cytometric Analysis			PCNA
	Ploidy	DNA index	Proliferation fraction(%)	Labeling index(%)
1	Diploid	1.00	6.7	33.0
2	Aneuploid	1.52	6.4/51.8	18.8
3	Diploid	1.00	12.2	17.3
4	Aneuploid	1.72	31.9/53.8	19.4
5	Diploid	1.00	35.0	4.6
6	Diploid	1.00	5.8	30.2
7	Diploid	1.00	16.3	43.7
8	Diploid	1.00	10.4	11.5
9	Tetraploid	1.00	44.1	8.2
10	Diploid	1.00	10.2	13.6

의 대장암의 경우 특수한 DNA의 돌연변이(mutation)와 염색체 이상이 종양의 여러 단계의 발생 과정 중 각각 다른 시기에 관여함이 알려 졌다<sup>40)</sup>. 그러나 특정 유전자의 변화가 특정 조직의 증식, 분화, 세포 소실 및 침윤에 직접 어떤 영향을 미치는지 알 수 없다.

최근 세포 배양과 세포 유전학의 발전으로 NSCLC의 핵형 연구의 성공률이 개선되었다. 그러나 어떤 예에서는 종양 세포의 유사분열율이 매우 낮아 분석가능한 중기의 확산 배양을 얻기 힘들다<sup>41)</sup>. 현재는 비방사능의 DNA probe를 사용하는 ISH기법을 사용하여 신속하고 정확하게 중기 염색체와 간기 핵에의 특수표적을 나타내어 염색체 변화를 검색할 수 있다. 특정 염색체의 중심체에 대한 반복성  $\alpha$ -satellite DNA

probe로 ISH하면 간기 핵에 염색체의 수적 이상을 알기 위한 표적을 핵에 신호로 나타나게 된다<sup>42)</sup>. 신호의 수는 세포핵에 특정 염색체의 복제수를 나타낸다.

파라핀으로 포매된 조직 절편에서 ISH기법의 사용으로 같은 조직내에서 특정 염색체 변화와 형태적, 즉 표현형의 변화를 함께 알 수 있다<sup>27,30-32)</sup>. 그러나 ISH기법이 폐암의 파라핀 조직 절편에서 이루어진 예는 극히 드물어 최근 Kim등<sup>33)</sup>에 의해 비로소 실시되었다.

DNA probe가 하이브리드결합을 이루기 위해 세포 핵의 표적 DNA에 근접해야 한다. 이 연구를 하는데 가장 큰 첫째 어려움은 DNA probe가 핵과 염색체 주변의 단백질 때문에 표적 DNA에 근접하기 어렵다

는 점이다<sup>33)</sup>. 핵과 염색체 주변의 단백질을 제거하기 위해 염산과 펩신으로 단백 분해를 시도하였다. 염산은 염색질로부터 염기성을 제거하는데 효과적이고 DNA의 변성을 원활하게 할 수도 있기 때문이다. 둘째, 펩신은 산성 염색질 분획에 풍부한 트립토판(tryptophan)을 갖는 산성 단백을 분해할 수 있다. 이 펩신의 기능을 합하면 통상적으로 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 조직 절편에서 DNA를 노출하는데 상승 작용을 할 것이다. 그러나 실험결과에 의하면 각 조직 절편마다 단백질 분해의 정도가 다르기 때문에 일관성있는 결과를 얻기 어려웠다. 그래서 Hopman 등<sup>41)</sup>에 의해 추천된 1M sodium thiocyanate를 펩신 처리전에 미리 사용하여 훨씬 더 균일한 결과를 얻을 수 있었다.

이 연구의 또 다른 장애는 동일 조직에서도 조직의 각기 다른 부위가 각기 다른 속도가 단백 분해를 한다는 점이었다. 즉 펩신의 처리에도 종양 세포는 적당하게 하이브리드결합을 함에도 정상 부위는 그렇지 못하였다. 아마 정상세포의 어떤 물질이 효소의 확산을 제한하거나 정상 세포핵의 염색질의 구조가 더욱 조밀함에 기인하는 듯하였다. 이 문제는 Kim 등<sup>33)</sup>에 의해 제시된 바와 같이 펩신을 37°C에 반응시키기 전에 4°C 냉장고에 15분간 둬으로써 해결되었다.

ISH에 의한 특정 염색체의 수적 변화의 근거는 하이브리드결합의 효율에 달려 있다. 정상 2배성 세포인 경우 약 80%의 핵이 2개의 DNA probe와 관계된 하이브리드결합 신호를 보이거나 15%는 1개의 신호를 보인다고 보고되었다<sup>17, 18, 26, 29, 34)</sup>.

핵에서의 ISH에 의한 염색체 신호의 판정 및 분석을 위해 Hopman 등<sup>26, 32, 41, 42)</sup>의 기준을 다소 수정하여 이 연구에 적용하였다. 하이브리드결합에서 생길 수 있는 인공 산물들을 극소화하기 위해 stringency가 높은 실험 조건을 만들었음에도 불구하고 조직 절편에 내부 대조군의 필요성이 대두되었다. 이 연구에서 같은 조직 절편에 정상 림프구나 간질 세포를 종양 세포의 하이브리드결합 결과와 비교하기 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 대조군으로 정상세포를 사용한 사전 연구에서 저 2배성이 약 11%로 고 2배성의 1%보다 훨씬 더 많았다<sup>43)</sup>. 이 연구에서도 정상 림프구 및 간질 세포의 81~82%에서 2개의 신호를 보였으나 1개를 보인 경우는 16~18%였으며 3개를 보인 예는 3% 미만에 불과하였다. 이는 DNA probe의 침투가 불충분했거나 하이브리드결합 된 부위가 서로 중첩되었거나 시각적 융합(visual fusion)에 기인한다고 생각된다. 파라핀으로 포매된 조직 절편에서 이런 인공 산물은 더욱 증가하는데 이는 핵절편을 만들 때 정상 및 종양 조직에서 염색체의 중심절 부위가 물리적으로 소실되기 때문이다.

10예의 폐암의 염색체 수적 이상을 제 7번과 17번의 염색체의 중심절 부위에 특수한 probe를 하이브리

드결합하여 간기 세포에서 특징화하였다. 이 종양은 전 예에서 염색체의 이배체(aneusomy)를 보였다. 염색체의 중심절 부위에 특수한 probe를 하이브리드결합하여 나타나는 염색체의 복제수는 단지 그 염색체가 가지고 있는 배열순의 복제수의 측정에 불과하여 각 핵에 나타나는 신호는 하이브리드결합의 표적에 불과하다. 각 종양의 염색체 지수는 종양 세포의 핵에 발견되는 염색체 신호의 평균수를 같은 조직 절편에 존재하는 정상 세포(림프구와 간질 세포)의 염색체 신호의 평균수로 나누어 산출하였다.

이 연구에서 7번 염색체 중심절 probe를 사용한 경우 종양 세포의 염색체 지수는 1.11~1.98(median, 1.49%)였고 17번의 경우 1.20~1.94(median, 1.65%)였다. 정상 세포에서는 대부분의 경우 2개의 염색체 신호를 보였으나 3% 미만에서는 3개가 보였다. 대조적으로 종양 세포에서는 7번 염색체 중심절 probe를 사용한 경우 3개 이상의 염색체 신호가 16.0~80.6%(median, 50.9%)에서, 17번의 경우 32.7~84.7%(median, 69.9%)에서 관찰되었다. 이 결과는 Kim 등<sup>33)</sup>의 연구결과에서와 같이 폐의 편평상피암에서 7번과 17번의 다염색체가 있음이 분명히 밝혀졌다.

이 연구에서 ISH에 의해 얻어진 염색체 지수를 인접한 조직 절편을 사용하여 FCM으로 측정된 종양의 DNA 지수와 증식(S+G2+M) 분획 및 PCNA 면역염색을 통한 종양 세포의 증식능과 비교하였다. 염색체 지수는 DNA 지수와 PCNA염색 백분율과 소수 예에서 상관성이 있었으나 나머지 예에서 염색체 수가 상응하는 DNA 지수와 PCNA 염색 백분율에 비해 과도하게 또는 더 적게 발현되었다. 그밖에 염색체 지수와 PCNA염색 정도가 같은 조직에서도 부위에 따라 다양하였는데 이는 종양의 분화 정도의 변화와 일치하였다. 즉 암병소의 분화도가 낮을수록, 특히 거대 종양세포에서 염색체 신호수가 많아짐이 관찰되었다.

최근 FCM과 cytofluorometry를 이용한 핵의 DNA양을 측정하여 예후 측정에 도움을 얻고자 많은 시도가 이루어지고 있다<sup>44-46)</sup>. 비정상적인 핵의 DNA양(DNA 이배성)과 암환자의 나쁜 예후와 병의 빠른 진행 속도<sup>47, 48)</sup>, 종양의 크기<sup>50)</sup>와의 상관관계에 대해 많은 장기의 종양들에서 광범위하게 연구되어 왔다. 폐암에서 DNA 이배성의 빈도는 50~100%로 알려져 있다<sup>47-52)</sup>. 그러나 이 연구에서는 전 10예중 3예가 DNA 이배성을 보였다. DNA 이배성과 임상 병기, 조직분화 정도와 서로 상관성이 있고 한 유형의 폐암에서 핵의 이형성간의 관계를 보면 더욱 병이 진행되고 조직상이 덜 분화될수록 핵의 DNA양도 증가하고 더 많은 수의 이배성 세포들을 갖는다고 알려져 있다<sup>53)</sup>.

ISH과 FCM분석 사이에 강한 상관관계가 있음이 보고된 바 있으나<sup>15)</sup> FCM분석으로 염색체를 분간할 수 없음이 본 연구의 결과에 의해서도 판명되었다.

ISH기법에 의해 단지 한 개 또는 수소의 염색체에서 발견되는 이배성은 FCM에 의해 이배체의 DNA 지수를 갖는 종양에서 흔히 염색체의 수적 이상을 놓치게 된다. ISH 결과가 FCM에 의한 DNA의 분석보다 이질성을 가진 종양의 세포유전학적 특성을 더 잘 나타낸다고 알려져 있다<sup>54</sup>. 이 연구에서도 모든 예의 70%에서 FCM에 의해 이배체였으나 ISH기법으로는 제 7번과 17번 다염색체가 관찰되었다. 이는 이배체 종양에서도 핵형 구조의 이상이 있을 수 있음을 의미한다. 이와 같은 염색체의 ISH기법은 FCM에서 검색되지 못하는 특정 염색체의 이배성을 알 수 있다. 이런 현상은 Hopman 등<sup>55</sup>에 의해 최근에 지적된 바 있다.

PCNA는 증식하는 세포들의 G1 후기와 S기에 최고로 발현되는 핵단백으로 통상적으로 조작된 조직 절편에서 발현되는 장점이 있다. PCNA는 대개 활발하게 증식을 하고 있는 세포에서 나타나게 된다. PCNA는 여러 다양한 사람의 암종에서 발견된다<sup>37</sup>. PCNA 면역염색 정도는 종양 세포의 유사분열 능력(mitotic activity), 종양의 분화도와 FCM의 세포증식분획과도 상관이 있음이 보고되었다<sup>37-39</sup>. 이 연구에서 종양의 분화도와 PCNA 표지 지수사이에 강한 상관관계가 관찰되었다. 이는 종양의 분화도가 핵의 활동도를 나타내므로 PCNA 표지 지수와 분화도 사이의 상관관계는 일관성이 있다. 그러나 FCM에 의해 측정되는 증식(S+G2+M) 분획과는 상관성이 발견되지 않았다. 이 양방법에 의한 종양 세포의 증식능은 더 많은 예를 대상으로 비교 검토해 보아야 할 필요가 있다고 생각된다.

이배성은 혈액 질환을 포함한 수 많은 종양의 특징으로 급성 비림프구성 백혈병(acute non-lymphocytic leukemia; ANLL)과 이차성(secondary) 백혈병에서 7번 단염색체, myelodysplastic condition과 ANLL에서 8번 3염색체와 급성 림프구성 백혈병에서 21번 3염색체가 잘 알려져 있다<sup>55,56</sup>. 충실성 종양의 경우 대장의 선종에서 7번과 8번 3염색체, 신장의 방광암에서 7번 3염색체, 수막종(meningioma)에서 22번 염색체의 단배수체<sup>10</sup>와 대장<sup>57</sup>과 폐<sup>58</sup>의 경계형 종양에서 7번 3염색체가 알려져 있다. 이 단순한 염색체의 수적 이상을 보이는 대부분의 종양들은 양성 또는 경계(borderline) 증례이거나 조기암의 일차적 악성 변화와 수반되었다는 사실이 흥미롭다.

분자생물학적 측면에서 보면 7번 염색체는 여러 성장 요소 유전자와 세포표면 단백질에 대한 많은 유전자와 적어도 2개의 사람의 세포성 암유전자(erb B와 met)를 갖는다<sup>60</sup>. 만약 여분의 7번 염색체가 있으면 세포의 성장 요소의 분비가 증가되어 초기 단계의 악성 변화(malignant transformation)를 일으킬 수 있을 것이다. 여러 암에서 이배성이 존재하는 또 다른 설명으로 이런 변화가 악성으로 변하는 과정에 의해 장애를 받는 대사의 통로를 조정하는데 필요함이 제시

되고 있다<sup>61</sup>.

적어도 동물 모형에서 유전자 양의 변화(즉 3염색체 등에 의해 초래되는)가 악성 변형을 일으키거나 암을 일으키는 직접적 역할을 한다는 약간의 증거가 있다<sup>62</sup>. 예를 들면 Chinese hamster 세포의 시험관내 자연적 변형의 연구에서 악성 변형하기 전에 첫 현미경 변화가 5번 3염색체였다<sup>63</sup>. 그 후 다른 부가적 염색체 변화가 생긴 후 세포들이 점차 종양을 형성하였다.

Testa와 Siegfried<sup>64</sup>에 의하면 모든 NSCLC에서 여러 개의 염색체의 수적, 구조적 이상과 이배성이 관찰되었는데 60% 이상의 종양이 거의 3배성이나 4배성 범위의 핵형을 가져 특히 7번 다염색체가 가장 흔함을 보고하였다. 그밖에 7p의 부분적 상염색체 단독으로 또는 7번 다염색체와 함께 발견되었다. 특히 7번 염색체의 변화가 NSCLC에서 중요한, 그렇지만 아직은 확실하게 밝혀지지 않은 역할을 하는 듯 하다.

Jin 등<sup>51</sup>에 의하면 3예의 폐의 선암에서 7번 염색체 전체 또는 부분의 다염색체가 관찰되었으며 Fan과 Li<sup>65</sup>에 의해 폐의 선암세포종주에서도 역시 동일한 소견이 보고되었다. Lee 등<sup>66</sup>은 7번 3염색체는 NSCLC의 전기암 조직에 발견될 수 있는 매우 초기의 변화임을 제시하였다.

3p, 9p, 17p 염색체의 반복성 소실은 NSCLC에서 이 부위에 있는 종양 억제 유전자의 중대한 역할을 지지하는 부가적인 증거를 부여하여 NSCLC에서 발견되는 세포유전학적 변화가 많은 것은 수 많은 유전학적 사건들, 즉 여러 염색체의 이상이 축적되어 NSCLC가 형성됨을 시사한다<sup>67</sup>. 이 NSCLC 종양의 조기 발견과 조정을 위한 일차적 유전자의 변화를 알기 위해 기관지의 전기암(premalignant) 병변을 연구하는 것이 요구된다<sup>68</sup>.

이 연구에서 7번 염색체의 복제 수와 종양의 성상 사이의 직접적 연관성을 특정화시키기는 어려웠다. 7번 염색체에는 예를 들면 epidermal growth factor receptor(EGFR)같은 유전자가 있어 부가적인 복제수가 존재하면 종양의 증식을 증가시킨다고 볼 수도 있으나 한편 일반적 현상으로 유전적 불안정성과 함께 염색체의 이배성이 다른 염색체들에도 수 많은 특정 유전자의 변이 또는 소실을 가져와 종양의 증식을 유발시킬 수도 있다<sup>69</sup>.

Testa와 Siegfried<sup>64</sup>의 연구에서 40%의 폐암 환자에서 7p의 일부의 수적 증가를 보였는데 7p의 부분적 증가의 서로 겹치는 가장 짧은 부위가 7p11~p13에 있어 이 부위는 EGFR 유전자의 위치에 상응한다<sup>67</sup>. NSCLC에서 EGFR의 발현의 증가가 보고되었으나<sup>68,69</sup>, 현재 NSCLC에서 7번 염색체의 부가적인 복제와 증가된 EGFR양과의 관계는 아직 분명치 않다.

염색체 17p의 allele의 상실이 NSCLC에서 흔히 생긴다고 보고되어 졌다<sup>70</sup>. TP53 종양 억제 유전자는

염색체 띠(band) 17p13.1에 위치하고 폐암의 분자의 변화가 흔한 표적이 됨이 알려졌다<sup>71-73</sup>).

ISH결과와 DNA량 측정을 비교해 보면 여러 중요한 점이 부각된다. 첫째 대체적으로 종양에 염색체수의 이상은 DNA양의 변화와 연관 짓기가 어려웠다. 둘째 어떤 예에서는 염색체 지수가 DNA 지수와 차이가 났는데 이는 특정 염색체가 종양 세포의 지놈(genome)에서 덜 발현되거나 과도하게 발현함을 의미한다. 이 일련의 변화와 중요성은 그 후 그 종양의 표현형(phenotype)을 검사함으로써 비교될 수 있다.

이 연구를 요약하면 사람의 폐에 생긴 원발성 편평상피암에서 유전형 이상과 종양의 표현형간의 강한 상관관계가 있음이 밝혀 졌다. 염색체의 중심체의 복제수의 변화는 유전형의 변형을 반영한다. 특히 7번 염색체와 복제수의 증가는 더 나쁜 표현형 즉 높은 핵의 분화 등급, 높은 병리학적 병기와 높은 PCNA 표지 지수와 수반되었다. 반대로 7번 염색체가 이배체일 경우 더욱 양호한 표현형을 보였다. 기전은 불분명하나 아마 7번 염색체가 특정 유전자를 발현하거나 억제하는데 작용하는듯 하다. 이러한 환자들을 대상으로 전향적 연구를 실시하여 추적 관찰하면 유전형과 표현형 및 실제 임상 결과간의 관계를 확립할 수 있을 것이다. 이 연구에서와 같이 간기 세포유전학기법은 종양 조직의 전기암 병소에서 일차적 염색체 변화를 보이는 세포들을 찾는 데 유용한 방법이 될 것이라고 생각된다<sup>6)</sup>. 그러나 이 기법은 특정 종양에 특수 염색체나 DNA의 변화가 핵형 연구등에 의해 이미 알려진 경우에 적용될 수 있어 핵형과 DNA 분석을 대체하지는 못하지만 ISH기법은 형태적 구조의 파괴 없이 폐종양이 조직 절편을 유전적으로 지도화(mapping)하는데 상당히 중요한 가능성을 가진 방법으로 종양의 유전형/표현형(genotype/phenotype)간의 상관관계를 직접 검사할 수 있다. 세포유전학적 연구가 더 발전하고 특정 염색체 부위나 특정 DNA의 배열 순서를 가진 새로운 probe의 개발과 함께<sup>4)</sup> 더욱 예민한 발현방법이 개발되면<sup>75,76)</sup> ISH기법은 다단계 종양 형성 과정과 종양의 표현형의 이질성이 유래하는 유전적 근거를 더 잘 이해할 수 있는 강력한 분석 도구가 될 것이라고 생각된다.

## 결 론

사람 폐의 원발성 편평상피암에서 발견되는 특정 염색체의 수적 변화와 형태적 이질성간의 관계를 이해하고자 포르말린으로 고정하고 파라핀으로 포매한 폐암 조직 절편을 대상으로 제 7번과 17번의 염색체 중심체 probe를 사용한 ISH를 실시하였다. 각 종양의 염색체 지수는 종양 세포의 핵에 발견되는 염색체 신호의 평균수를 같은 조직 절편에 존재하는 정상 세포(림프구와 간질 세포)의 염색체 신호의 평균수로 나누어

계산하였다. 제 7번 염색체 중심체 probe를 사용한 경우 염색체 지수는 1.11~1.98(median, 1.49)였고 17번의 경우 1.2~1.94(median, 1.65)였다. 정상 세포에서는 대부분의 경우 2개의 염색체 신호를 보였으나 3% 미만에서는 3개가 보였다. 대조적으로 암세포에서는 7번 염색체 중심체 probe를 사용한 경우 3개 이상의 염색체 신호가 16.0~80.6%(median, 50.9%)에서, 17번의 경우 32.7~84.7%(median, 69.9%)에서 관찰되었다. 이 염색체 지수는 인접한 조직 절편에서 FCM에 의해 측정된 종양의 DNA 지수와 PCNA 면역 염색을 통한 종양 세포의 증식능과 비교하였다. 염색체 지수는 DNA 지수와 PCNA 양성율과 일부에서 상관성이 있었으나 대부분의 예에서 염색체 수가 상응하는 DNA 지수와 PCNA 양성율에 비해 과도하게 또는 더 적게 발현되었다. 그밖에 염색체 지수와 PCNA 양성율은 같은 조직에서도 부위에 따라 다양하였는데 이는 종양의 분화 정도의 변화와 일치하였다. 즉 암병소의 분화도가 낮을수록 염색체 신호수가 많아졌다. 이 연구에서 폐의 편평상피암에서 제 7번과 17번 염색체의 다배체가 있음이 밝혀 졌다. 또한 ISH를 이용하여 종양의 조직학적 구조가 보존되어 있는 폐의 편평상피암 조직 절편에서 제 7번과 17번 염색체의 중심체 probe를 이용하여 유전학적 검사를 함으로써 종양의 발생, 종양 형태의 이질성, 및 종양의 진행 등에 다른 형태적 변화와 염색체의 수적 변화를 서로 비교하였다. 이와 같이 파라핀 블록을 이용한 ISH 기법은 종양의 표현형과 유전형을 동시에 연구할 수 있는 유용한 방법이라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Carey FA, Lamb D, Bird CC. *Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. Cancer* 1990; 65: 2266-9.
- 2) Carney DN, De Leij L. *Lung cancer biology. Semin Oncol* 1988; 15: 199-214.
- 3) Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. *Lung cancer heterogeneity: A blinded and randomized study of 100 consecutive cases. Hum Pathol* 1985; 16: 569-79.
- 4) Bishop JM. *The molecular genetics of cancer. Science* 1986; 235: 305-11.
- 5) Jin Y, Mandahl N, Heim S, Schuller H, Mitelman F. *Isochromosomes i(8q) or i(9q) in three adenocarcinomas of the lung. Cancer Genet Cytogenet* 1988; 33: 11-7.
- 6) Lukeis R, Irving L, Garson M, Hasthorpe S. *Cytogenetics of non-small cell lung cancer: Analysis of consistent non-random abnormalities. Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2: 116-24.

- 7) Miura I, Siegfried JM, Resau J, Keller SM, Zhou JY, Esta JR. *Chromosome alterations in 21 non-small cell lung carcinomas. Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2: 328-38.
- 8) Testa JR, Siegfried JM. *Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer. Cancer Res (suppl)* 1992; 52: 2702s-6s.
- 9) Birrer MJ, Minna JD. *Molecular genetics of lung cancer. Semin Oncol* 1988; 15: 226-35.
- 10) Sandberg AA, Turc-Carel C, Gemmill RM. *Chromosomes in solid tumors and beyond. Cancer Res* 1988; 48: 1049-59.
- 11) Teyssier JR. *The chromosomal analysis of human solid tumors: a triple challenge. Cancer Genet Cytogenet* 1989; 37: 103-25.
- 12) Gluckman JL, Crissman JD, Donegan JO. *Multicentric squamous-cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Head Neck Surg* 1980; 3: 90-6.
- 13) Sozzi G, Miozzo M, Tagliawe E, Calderone C, Lombardi L, Pilotti S, Pastorino U, Pierotti A, Della Porta G. *Cytogenetic abnormalities and overexpression of receptors for growth factors in normal bronchial epithelium and tumor samples of lung cancer patients. Cancer Res* 1991; 51: 400-4.
- 14) Heim S, Mandahl N, Mitelman F. *Genetic convergence and divergence in tumor progression. Cancer Res* 1988; 48: 5911-6.
- 15) Van Dekken H, Pizzolo JG, Kelsen DP, Melamed MR. *Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. Cancer* 1990; 66: 491-7.
- 16) Pinkel D, Straume T, Gray JW. *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-8.
- 17) Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. *Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. Hum Genet* 1988; 80: 235-46.
- 18) Cremer T, Tesin D, Hopman AHN, Manuelidis L. *Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. Exp Cell Res* 1988; 176: 199-220.
- 19) Wayne JS, England SB, Willard HF. *Genomic organization of alpha satellite DNA on human chromosome 7: Evidence for two distinct alphoid domains on a single chromosome. Mol Cell Biol* 1987; 7: 349-56.
- 20) Devilee P, Cremer T, Slagboom P, Bakker E, Sholl HP, Hager HD, Stevenson AFG, Comelisse CJ, Pearson PL. *Two subsets of human alphoid repetitive DNA show distinct preferential localization in the pericentric regions of chromosomes 13, 18, and 21. Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 193-201.
- 21) Devilee P, Kievits T, Wayne JS, Pearson PL, Willard HF. *Chromosome-specific alpha satellite DNA: Isolation and mapping of a polymorphic alphoid repeat from human chromosome 10. Genomics* 1988; 3: 1-7.
- 22) Moyzis RK, Albright KL, Bartholdi MF, Cram LS, Deaven LL, Hildebrand CE, Joste NE, Longmire JL, Meyne J, Schwarzacher-Robinson T. *Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel markers for genetic analysis. Chromosoma* 1987; 95: 375-86.
- 23) Willard HF, Wayne JS. *Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. Trends Genet* 1987; 3: 192-8.
- 24) Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wesels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, van der Ploeg M, Raap AK. *Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. Cytogenet Cell Genet* 1990; 54: 108-11.
- 25) Cremer T, Landegent J, Brückner A, Scholl HP, Schardin M, Hager HD, Devilee P, Pearson P, van der Ploeg M. *Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. Hum Genet* 1986; 74: 346-52.
- 26) Hopman AHN, Ramaekers FCS, Raap AK, Beck JLM, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP. *In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. Histochem J* 1988; 89: 307-16.
- 27) Emmerich P, Jauch A, Hofmann MC, Cremer T, Walt H. *Interphase cytogenetics in paraffin embedded sections from human testicular germ cell tumor xenografts and in corresponding cultured cells. Lab Invest* 1989; 61: 235-42.
- 28) van Dekken H, Bauman JGJ. *A new application of in situ hybridization: Detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. Cytogenet Cell Genet* 1988; 48: 188-9.
- 29) Nederlof PM, van der Flier S, Raap AK, Tanke HJ, van der Ploeg M, Kornips F, Geraedts JPM. *Detection of chromosome aberrations in interphase tumor nuclei by non-radioactive in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet* 1989; 42: 87-98.
- 30) Walt H, Emmerich P, Cremer T, Hofmann M, Bannwart F. *Super-numerary chromosome 1 in in-*

- terphase nuclei of atypical germ cells in paraffin-embedded human seminiferous tubules. *Lab Invest* 1989; 61: 527-31.
- 31) Arnoldus EPJ, Dreef EJ, Noordermeer IA, Verheggen MM, Thierry RF, Peters ACB, Cornelisse CJ, van der Ploeg M, Raap AK. Feasibility of in situ hybridization with chromosome specific DNA probes on paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 1991; 44: 900-4.
- 32) Hopman AHN, Moesker O, Smeets AWGB, Pauwels PE, Vooijs GP, Ramaekers FCS. Numerical chromosome 1, 7, 9 and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res* 1991; 51: 644-51.
- 33) Kim SY, Lee JS, Ro JY, Gay ML, Hong WK, Hittelman WN. Interphase cytogenetics in paraffin sections of lung tumor by non-isotopic in situ hybridization: Mapping genotype/phenotype heterogeneity. *Am J Pathol* 1993; 142: 307-18.
- 34) Devilee P, Thierry RF, Kievit T, Kolluri R, Hopman AHN, Willard HF, Pearson PL, Cornelisse CJ. Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome-specific repetitive DNA probes. *Cancer Res* 1988; 48: 5825-30.
- 35) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-5.
- 36) Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurement of DNA and other cell components in human tumors: a critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 20: 528-48.
- 37) Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 841-5.
- 38) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. 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.
- 39) Rowley JD. Recurring chromosome abnormalities in leukemia and lymphoma. *Semin Hematol* 1990; 27: 122-36.
- 40) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
- 41) Hopman AHN, van Hooren E, van de Kaa CA, Vooijs PGP, Ramaekers FCS. Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 1991; 4: 503-13.
- 42) Hopman AHN, Poddighe PJ, Smeets AWGB, Moesker O, Beck JLM, Vooijs GP, Ramaekers FCS. Detection of numerical chromosome aberrations in bladder cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989; 135: 1105-17.
- 43) Eastmond DA, Pinkel D. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res* 1990; 234: 303-18.
- 44) Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, Göhde W, Dosik G, Latreille J, Johnston DA, Freireich EJ. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980; 69: 195-203.
- 45) Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Göhde W, Andreeff M, Freireich EJ. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983; 43: 3982-97.
- 46) Laerum OD, Farsund T. Clinical application of flow cytometry: A review. *Cytometry* 1981; 2: 1-13.
- 47) Tirindelli-Danesi D, Teodori L, Mauro F, Modini C, Botti C, Cicconetti F, Stipa S. Prognostic significance of flow cytometry in lung cancer: A 5-year study. *Cancer* 1987; 60: 844-51.
- 48) Teodori L, Tirindelli-Danesi D, Mauro F, Do Vita R, Uccelli R, Botti C, Modini C, Nervi C, Stipa S. Non-small cell carcinoma: Tumor characterization on the basis of flow cytometrically determined cellular heterogeneity. *Cytometry* 1983; 4: 174-83.
- 49) Bloendal T, Bengsson A. Nuclear DNA measurements in squamous cell carcinoma of the lung: A guide for prognostic evaluation. *Anticancer Res* 1981; 1: 79-86.
- 50) Bloendal T, Lindgren A. Fluorescence cytophotometric measurements of nuclear DNA in adenocarcinoma of the lung: Relation of proliferative activity and DNA ploidy to prognosis. *Anal Quant Cytol* 1982; 4: 225-32.
- 51) Volm M, Mattern J, Sonika J, Vogt-Schaden M, Wayss K. DNA distribution in non-small-cell lung carcinoma and its relationship to clinical behavior. *Cytometry* 1985; 6: 348-56.
- 52) Bunn PA, Carney DN, Gazdar AF, Whang-Peng J, Matthews MJ. Diagnostic and biological implications of flow cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res* 1983; 43: 5026-32.
- 53) Asamura H, Nakajima T, Mukai K, Noguchi M, Shimosato Y. DNA cytofluorometric and nuclear morphometric analyses of lung adenocarcinoma. *Cancer* 1989; 64: 1657-64.

- 54) Balazs M, Mayall BH, Waldman FM. *Interphase cytogenetics of a male breast cancer*. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 55: 243-7.
- 55) Chaganti RSK, German J. *Genetics in clinical oncology*. Oxford University Press Inc., New York, 1985.
- 56) Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. Alan R Liss Inc., New York, 1987.
- 57) Becher R, Gibas Z, Sandberg AA. *Involvement of chromosome 7 and 12 in large bowel cancer. Trisomy 7 and 12q-*. *Cancer Genet Cytogenet* 1983; 9: 329-32.
- 58) Tyssier JR, Sadrin R, Nou JM, Bureau G, Adnet JJ, Bajolle F, Pigeon F. *Trisomy 7 in lung carcinoid tumor: Precocious index of malignant transformation?* *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15: 277-88.
- 59) Tharapel SA, Qumsiyeh MB, Photopoulos G. *Numerical chromosome abnormalities associated with early clinical stages of gynecologic tumors*. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 55: 89-96.
- 60) Tsui LC, Farrall M, Donis-Keller H. *Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 7 and 8*. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 51: 166-201.
- 61) Dutrillaux B, Couturier J. *Chromosome imbalances in endometrial adenocarcinomas: A possible adaptation to abnormal metabolic pathways*. *Ann Genet* 1986; 29: 76-81.
- 62) Klein G. *The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis*. *Nature* 1981; 294: 313-8.
- 63) Cram LS, Bartholdi MF, Ray A, Travis GI, Kraemer PM. *Spontaneous neoplastic evolution of Chinese hamster cells in culture: multistep progression of karyotype*. *Cancer Res* 1983; 43: 4828-37.
- 64) Fan YS, Li P. *Cytogenetic studies of form human adenocarcinoma cell lines*. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 26: 317-25.
- 65) Lee JS, Pathak S, Hopwood V, Tomasovic B, Mullins TD, Baker FL, Spitzer G, Neidhart JA. *Involvement of chromosome 7 in primary lung tumor and nonmalignant normal lung tissue*. *Cancer Res* 1987; 47: 6349-52.
- 66) Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH. *Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer*. *Cancer Res* 1991; 51: 3807-13.
- 67) Spurr NK, Solomon E, Jansson M, Sheer D, Goodfellow PN, Bodmer WF, Vennstrom B. *Chromosome localization of the human homologues to the oncogenes erbA and B*. *EMBO J* 1984; 3: 159-63.
- 68) Hendler FJ, Ozanne BW. *Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors*. *J Clin Invest* 1984; 74: 647-51.
- 69) Haeder M, Rotsch M, Bepler G, Henning C, Havemann K, Heimann B, Moelling K. *Epidermal growth factor receptor expression in human lung cancer cell lines*. *Cancer Res* 1988; 48: 1132-6.
- 70) Weston A, Willey JC, Modali R, Sugimura H, McDowell EM, Resau J, Light B, Haugen A, Mann DL, Trump BF, Harris CC. *Differential DNA sequence deletions from chromosomes 3, 11, 13, and 17 in squamous-cell carcinoma, large-cell carcinoma, and adenocarcinoma of the human lung*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5099-103.
- 71) Iakahashi T, Nau MM, Chiba L, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD. *p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer*. *Science* 1989; 246: 491-4.
- 72) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. *Nature* 1989; 342: 705-8.
- 73) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. *Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer*. *Lancet* 1990; 335: 675-9.
- 74) Lichter P, Ledbetter SA, Ledbetter DH, Ward DC. *Fluorescence in situ hybridization with Alu and Ll polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6634-8.
- 75) Reid T, Baldini A, Rand TC, Ward DC. *Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinational fluorescence and digital imaging microscopy*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1388-92.
- 76) Cherif D, Bernard O, Berger R. *Detection of single-copy genes by nonisotopic in situ hybridization on human chromosomes*. *Hum Genet* 1989; 81: 358-62.