

간세포암종의 DNA Ploidy 유형

서울대학교 의과대학 병리학교실

오영륜·김용일

Flow Cytometric DNA Analysis of Hepatocellular Carcinoma

Young Lyun Oh, M.D. and Yong Il Kim, M.D.

Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul

A flow cytometric analysis of the nuclear DNA content of solid tumors using paraffin-embedded tissues has become available since 1983, and its ploidy pattern has been designated as an important prognostic parameter in many human tumors. Hepatocellular carcinoma(HCC) is one of the most common malignant tumors among Koreans, but little information is consolidated about the significance of ploidy pattern.

We measured the nuclear DNA content of 62 surgically resected HCCs and 45 non-neoplastic tissues from the surrounding parenchyma by flow cytometry. Aneuploid was detected in 18 cases(29.0%) in HCCs and 2 cases(4.4%) in nonneoplastic hepatic parenchyma($p < 0.005$).

Correlations between the DNA ploidy pattern and various clinicopathologic findings of HCCs were analyzed. The mean tumor size was significantly different($p < 0.05$) between the aneuploid group(8.8 cm) and the diploid group(6.1 cm). Mean age of the aneuploid group was younger(47 year) than the diploid group(51 years), but the difference was not statistically significant($p = 0.052$). The DNA pattern did not show any meaningful correlation with the gross and microscopic features of HCC except for the presence of capsule. These results suggest that DNA ploidy correlates with growth rate of the tumor and it may be a possibly useful prognostic factor in HCCs. (Korean J Pathol 1993; 27: 581~589)

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Flow cytometry, Aneuploid, Ploidy

서론

종양성 질환에 대한 유세포측정의 적용 범위는 매우 광범위하지만, 주된 사용 목적은 아래와 같이 크게 두 가지로 압축된다. 즉 세포내의 DNA 함량을 측정하여 전암성 및 암성 병변을 조기에 진단하는 경우와, 염색체 배수성의 유형과 %SG2M 치를 구하여 악성종양의 예후나 임상치료방침 결정 및 치료효과 판정에 이용하

는 경우이다. 이 분야 연구는 1983년 Hedley등¹⁾의 연구 방법 개발에 힘입었던 바, 그동안 세포내 DNA 함량 측정을 위한 연구 재료가 신선 조직에만 국한되어 사용되던 것이 파라핀 포매된 조직을 이용할 수 있게 됨으로써 그 사용 범위가 확대되었다. 최근 10년간 유세포측정에 의한 연구는 주로 유방^{2~4)}, 결장⁵⁾, 대장⁶⁾, 자궁경부⁷⁾, 방광⁸⁾, 폐⁹⁾, 위^{10~12)}, 난소^{13,14)}, 전립선¹⁵⁾의 암종 및 신경아세포종¹⁶⁾ 등의 진단 및 예후 결정에 집중되어 왔고 예후측정인자로서 많은 정보를 제공하여 왔다. 그러나 아시아와 아프리카 지역에서 가장 흔하고 치명적 종양종의 하나로 알려진 간세포암종에 대한 연구와 그 예후와의 관계에 대한 결과는 아직까지 미흡하다. 일부 간세포암종에서 밝혀진 이수배수체 빈도는 50%에서 78%로 그 범위가 연구자마다 다양하게 나타나고 있을뿐 아니라 결과 해석에 있어서도

접 수: 1993년 3월 27일, 게재승인: 1993년 7월 5일
주 소: 서울시 종로구 연건동 28번지, 우편번호 110-244
서울대학교 의과대학 병리학교실, 오영륜·김용일
*본 연구에서 소요된 경비의 일부는 1993년도 서울대학교병원 임상연구비에서 지급되었다.

적지 않은 어려움이 따르고 있으며¹⁷⁻²⁰⁾, 특히 한국인의 간세포암종을 대상으로 한 연구는 거의 참조할 수 없어 본 연구의 필요성을 요하게 되었다. 본 연구의 목적은 첫째, 유세포측정을 이용하여 간세포암종과 간세포암종의 간조직의 이수배수체 빈도와 세포 분열 주기를 관찰하며 비교 분석하고, 둘째, 간세포암종군의 이수배수체 양상과 성별, 연령, 혈청 B형 간염표면항원(hepatitis B virus surface antigen; HBsAg), alpha-fetoprotein(AFP) 등 임상요인과의 연관성을 알아보고, 셋째, 간세포암종군의 이수배수체 양상과 종양의 크기, 육안유형, 종양 세포의 등급, 모양, 조직학적 성장 유형 및 종양의 혈관 침범 등 병리학적 소견과의 연관성을 알고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1989년 1월부터 1991년 12월까지 만 3년 동안 외과적으로 절제된 간세포암종 72예중 경동맥화학전색(transarterial chemoembolization)에 의하여 조직 괴사가 심한 예를 제외한 간세포암종 62예와 정상 및 종양 주변의 조직 45예를 대상으로 하였다. 종양 주변 조직은 정상간 10예, 만성 지속성 간염 6예, 만성 활동성 간염 8예, 불완전 중격 섬유화증 1예 및 간경변증 20예였다.

2. 연구 방법

1) 임상 기록 검토: 연구 대상 환자들의 성별, 연령, HBsAg, AFP 등에 대해서는 의무기록지를 참조하였다.

2) 병리조직학적 검색: 외과적으로 절제된 간조직을 수술 즉시 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정된 후 대략 0.5 cm내의 연속 절편을 내어, 단면의 특성을 기본으로 일본 간암 연구회(Japanese Liver Cancer Study Group)가 제정한 분류법²¹⁾에 따라 육안적 유형을 분류하였고, 가장 대표적인 한 개의 절단면을 복사한 후 조직구축학적 방법에 따라 절취하고 통상의 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거친 후, 파라핀에 포매하고 4~5 μm의 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin염색을 시행하였고, 광학현미경 하에서 경검하였다.

(1) 간세포암종의 크기 분류: 간세포암종의 크기에 의한 구분은 일본 간암 연구회에서 채택하고 있는 종양 최장 직경 3 cm를 기준으로 소-간세포암종과 대-간세포암종으로 구분하였다²²⁾.

(2) 간세포암종의 육안적 분류: 육안소견에 따른 유형분류는 Eggel의 분류를 토대로 한 일본 간암 연구회의 분류²³⁾에 따라 결절형(nodular type), 괴사형(massive type), 미만형(diffuse type)으로 나누었고, 결절형은 다시 단결절형(single nodular type),

단결절-주위 파급형(single nodular type with perinodular extension), 다결절 분산형(multinodular, discrete type), 다결절 융합형(multinodular, confluent type)으로 세분하였다. 괴사형은 비교적 두꺼운 섬유성 조직에 의해 종양 전부가 둘러 싸이고 종괴의 단면이 솟아오르는 경우로 한정하였다.

(3) 간세포암종의 조직학적 분류: 간세포암종의 조직학적 성장 유형은 세계보건기구가 제안한 분류법²⁴⁾을 기본으로 하고 Peters²⁵⁾ 및 Craig등²⁶⁾에 의해 보완된 분류를 적용하였다. 즉 주형(trabecular type), 선방/위선형(acinar/pseudoglandular type), 충실/고형형(compact/solid type), 경결형(scirrhous type), 특수형-혈관확장형(pelioid type), 유두형(papillary type), 층판섬유형(fibrolamellar type)으로 나누었다. 또한 종양세포의 모양에 따라 전형 세포군(classical cell group), 거대세포/부정세포군(giant/pleomorphic cell group), 투명세포군(clear cell group) 및 방추세포군(spindle cell group)으로 나누었다.

연구재료로 선택된 블럭의 세포 분화도는 Edmondson과 Steiner의 기준²⁷⁾을 기본으로 하였다. 즉 정상 간세포를 닮은 정도에 따라 I, II, III, IV등급으로 나누었고 혼합형인 경우에는 고분화(I, I+II), 중분화(II+III) 및 저분화(III, III+IV, IV)로 재조정하였다.

3) 유세포측정: Hedley²⁸⁾의 개량법에 의해 파라핀 포매된 조직을 단일세포부유액으로 만들었다. 먼저 광학현미경으로 괴사가 적고 종양을 대변할 수 있는 가장 대표적인 부분과 비종양성 부분의 블럭을 각각 선택하였다. 선택된 파라핀 블럭은 50 μm의 두께로 박절하고 xylene에서 탈-파라핀 과정을 거친 다음 100%, 95%, 80%, 70%, 50% 에탄올의 순서대로 10분씩 방치하여 흡수시키고 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)에 10~15분간 2회 담가 두었다. 흡수후 조직을 15 ml 시험관에 옮기고 pH 1.5의 0.5% pepsin(Sigma)을 1~2 ml 넣어 37°C 항온조에서 5분 간격으로 흔들며 30분간 처리하였다.

DPBS를 5~10 ml 첨가한 후 1200 rpm에서 5분간 원심 분리 시켰다. 상층액을 버리고 nylon mesh (Medilab, 41 μm)로 거른 후 다시 PBS를 5 ml 넣고 1500 rpm에서 5분간 원심 분리 시켰다. 다시 상층액을 버리고 0.01% RNase(Sigma) 1 ml를 첨가하여 5분 간격으로 흔들며 30분간 37°C 항온조에서 방치하였다. PBS를 5~10 ml 넣고 1500 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 버리고 nylon mesh에 걸렸다. PBS를 3 ml 넣고 1500 rpm에서 원심 분리한 후 상층액을 버리고 부유액 1 ml당 0.025% propidium iodide 50 μl를 넣어 DNA를 염색하였다. 염색된 단일 세포 부유액을 15 milliwatt Argon-ion laser가

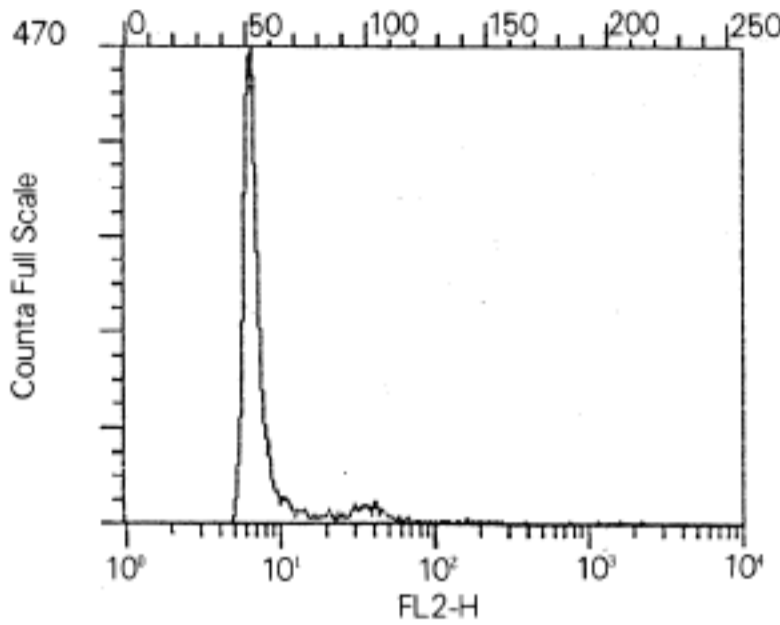


Fig. 1. Histogram of the DNA distribution pattern, Diploid.

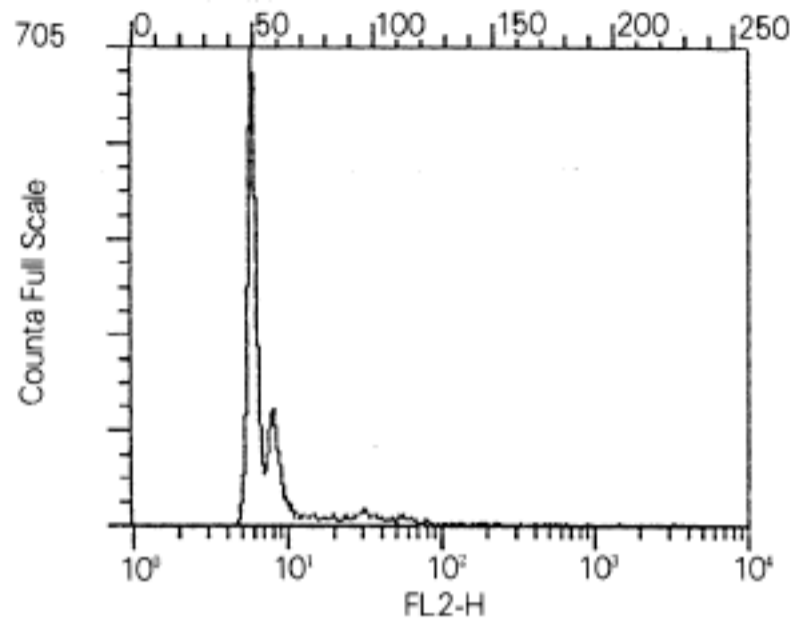


Fig. 3. Histogram of the DNA distribution pattern, Aneuploid.

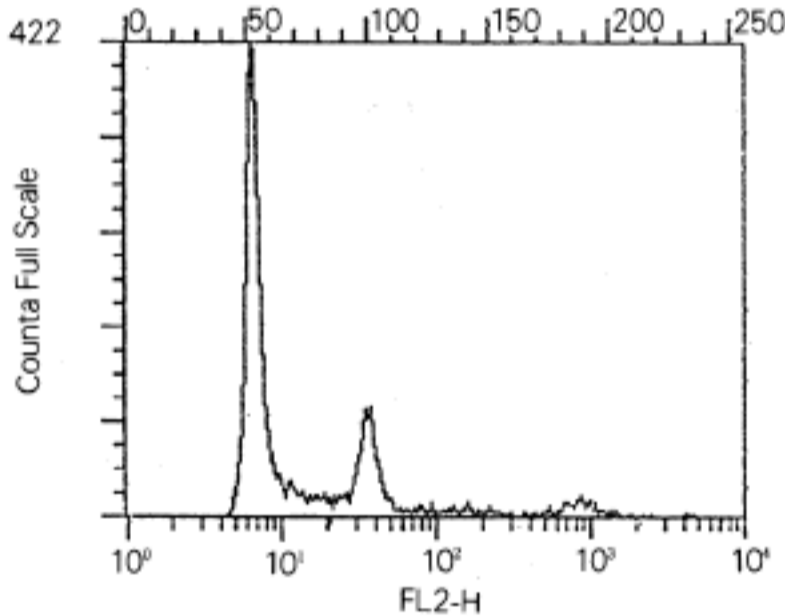


Fig. 2. Histogram of the DNA distribution pattern, Polyploid.

부착된 FACScan(Becton Dickinson)으로 excitation wave length 488 nm에서 처리 분석하였다. 각 예마다 10,000개의 세포를 측정하였고 정배수체 G₀/G₁ peak의 기준치는 중앙 포매 블럭에 포함된 내부의 양성세포로 하였다^{28,29}). DNA histogram의 판독은 대다수의 세포가 내부 기준의 G₀/G₁ peak에 있고 peak가 하나인 경우를 정배수체(Fig. 1), 20% 이상 세포가 정배수체 G₂M에 있는 경우를 다배수체(Fig. 2), 10% 이상의 세포가 정배수체의 G₂M 이외의 위치에 있어 2개 이상의 G₀/G₁ peak가 나타나며 각각에 해당하는 G₂M peak가 있는 경우를 이수배수체(Fig. 3)로 하였다. DNA 지수(DI)는 이수배수체와 정배수체의 G₀/G₁ peak의 channel비로 계산하였

Table 1. DNA ploidy pattern in hepatocellular carcinoma and nonneoplastic tissue

Ploidy	Aneuploid	Diploid	Total
HCC	18	44	62
%	29.0	71.0	100
Nonneoplastic	2	43	45
%	4.4	95.6	100

HCC: hepatocellular carcinoma, $p < 0.005$

다. 모든 G₀/G₁ peak의 변이 계수(half peak coefficient of variation, CV)는 10이하가 되는 경우만 연구 대상에 포함시켰다.

4) 통계 처리: 통계 처리는 SPSS/PC를 사용하여 chi-square test와 student's t-test로 처리하였다. 유의수준은 p-value 0.05이하로 하였다.

결 과

연구 대상이 되었던 62예의 간세포암종군과 45예의 간세포암종의 간조직군에서의 DNA 염색체 배수성 양상을 비교하였다. 62예의 간세포암종군에서는 18예(29.0%)가 이수배수체로 판독되었고, 45예의 간세포암종의 간조직군에서는 2예(4.4%)만이 이수배수체 양상을 보여 간세포암종군에서 이수배수체가 통계적으로 유의하게 많이 나타났다($p < 0.005$)(Table 1). 이수배수체를 보인 18예의 간세포암종군중 2예가 다배수체 양상을 보였고 이들은 통계적 분류시 이수배수체군에 포함시켜 분석하였다. 유세포측정을 시행한 107예의 CV 평균치는 5.8이었고 총 20예의 이수배수체군의

Table 2. Correlation between DNA ploidy and clinical variables

Variable	Total No. of cases	DNA ploidy		p-value
		Aneuploid(%)	Diploid(%)	
Sex				
Male	52	15(28%)	37(72%)	NS
Female	10	3(30%)	7(70%)	
Age(year)				
≤45	19	9(47%)	10(53%)	<0.05
>45	43	9(21%)	34(79%)	
HBsAg				
Negative	14	5(36%)	9(64%)	NS
Positive	39	11(28%)	28(72%)	
AFP(ng/ml)				
≤20	17	6(35%)	11(65%)	NS
20~500	11	2(18%)	9(82%)	
>500	29	8(27%)	21(73%)	

AFP: alpha-fetoprotein, NS: not significant

Table 3. Correlation between DNA ploidy and pathologic variables

Variable	Total No. of cases	DNA ploidy		p-value
		Aneuploid(%)	Diploid(%)	
Tumor size(cm)				
≤3	13	1 (8%)	12 (92%)	NS
>3	49	17(35%)	32 (65%)	
Capsule formation				
present	30	5(14%)	25 (86%)	Significant
absent	32	13(48%)	19 (52%)	
Angioinvasion				
present	10	3(30%)	7 (70%)	NS
absent	52	15(29%)	37 (71%)	
Associated lesion				
Normal	23	5(22%)	18 (78%)	NS
CPH	10	4(40%)	6 (60%)	
CAH	6	3(50%)	3 (50%)	
ISF	2	0	2(100%)	
Cirrhosis	27	4(15%)	23 (85%)	
Unknown	4	2(50%)	2 (50%)	

CPH: chronic persistent hepatitis, CAH: chronic active hepatitis, ISF: incomplete septal fibrosis, NS: not significant

DNA 지수의 평균치는 1.53(1.10~2.38)이었다.

간세포암종군에서 이수배수체를 보인 군의 평균연령은 47.1세인 반면 정배수체군의 평균연령은 53.1세로서 두 군간의 평균 연령은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(t-test, p=0.052), 다시 45세를 기준으로 분류하여 비교하였을 때 45세 이하 군에서는 이

상인 군에 비하여 이수배수체의 빈도가 높았다(p<0.05)(Table 2). 남자 52예, 여자 10예의 간세포암종군중 이수배수체는 각각 15예(28.8%), 3예(30%)로 남녀간의 유의한 차이는 없었다(Table 2). 연구 대상 중 혈청 HBsAg 결과를 알 수 있었던 예는 53예이었다. 이 중 이수배수체는 HBsAg이 양성인 39예중 11

예(28.2%)였고 음성인 14예중 5예(35.7%)였으며 두 군간의 유의한 차이는 없었다(Table 2). AFP의 혈청 농도에 따른 염색체 배수성의 양상에도 유의한 차이가 없었다(Table 2).

이수배수체 양상을 보인 간세포암종의 평균 크기는 8.8 cm이고 정배수체인 간세포암종에서는 6.1 cm으로 두 군간의 평균 크기에는 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 그러나 암종 크기를 3 cm로 기준하였을 때, 즉 소-간세포암종군과 대-간세포암종군의 이수배수체의 빈도는 유의한 차이가 없었으나 p 값이 유의 수준에 근접하여 있었다($p = 0.056$)(Table 3). 섬유성 피막 형성이 불충분한 간세포암종 28예중 13예(48%)가 이수배수체인 반면 피막 형성이 잘 된 간세포암종군에서는 35예 중 5예(14%)만이 이수배수체를 보여 피막 형성이 되지않은 간세포암종군에서 이수배수체가 의미

Table 4. Correlation between DNA ploidy and gross feature

Variable	Total No. of cases	DNA ploidy		p-value
		Aneuploid (%)	Diploid (%)	
Nodular				
SN	21	7 (33%)	14(67%)	
SN c PE	22	6 (27%)	16(73%)	
MND	6	1 (17%)	5(83%)	NS
MNC	4	1 (25%)	3(75%)	0.44
Massive	8	2 (25%)	6(75%)	
Diffuse	1	1(100%)	0	

SN: single nodular, PE: perinodular extension, MND: multinodular discrete, MNC: multinodular confluent, NS: not significant

있게 많았다(Table 3). 육안적 유형과 조직학적 성장 양식, 종양세포의 모양과는 연관성이 없었다(Table 4 ~6). 이수배수체는 고분화도군에서는 출현하지 않는 반면 중등도 및 저분화도군의 간세포암종에서만 나타

Table 5. Correlation between DNA ploidy and histologic type

Variable	Total No. of cases	DNA ploidy		p-value
		Aneuploid (%)	Diploid (%)	
Trabecular	44	13(30%)	29 (70%)	
Acinar	1	0	1(100%)	NS
Compact	5	1(20%)	4 (80%)	0.87
Scirrhou	0	0	0	
Mixed	12	4(33%)	8 (67%)	

NS: not significant

Table 6. Correlation between DNA ploidy and cytologic group

Variable	Total No. of cases	DNA ploidy		p-value
		Aneuploid (%)	Diploid (%)	
Classic	45	11 (24%)	34 (76%)	
Clear	2	2(100%)	0	
Pleomorphic	2	1 (50%)	1 (50%)	NS
Spindle	1	0	1(100%)	0.12
Mixed	12	4 (33%)	8 (67%)	

NS: not significant

Table 7. Correlation between DNA ploidy, S phase, DNA index and cytologic grade

Variable	Total No. of cases	Degree of differentiation			p-value
		Well	Moderate	Poor	
DNA ploidy					
Aneuploid	18	0	13	5	NS
Diploid	44	5	21	18	0.13
S phase					
≤10%	14	1	6	7	NS
>10%	30	4	12	14	0.83
DI					
≤1.5	9	0	7	2	NS
>1.5	9	0	6	3	0.50

Well I, I+II; Moderate II, II+III; Poor III, III+IV, IV; NS: not significant

났으나 유의한 차이는 없었다(Table 7). 종양 주변 간 조직의 병변과 염색체 배수성 양상에는 연관성이 없었다(Table 3). 종양의 혈관침범이 있었던 10예중 이수배수체가 3예, 정배수체가 7예로 유의한 차이는 없었다(Table 3). 간세포암종의 S-phase 분석시에는 부정확할 가능성이 있는 이수배수체군을 제외시켰다. 즉 정배수체군의 S-phase를 10%를 기준으로 나누어 종양세포의 분화도와 비교하였으나 유의한 차이가 없었다(Table 7). 이수배수체군의 DI를 1.5를 기준으로 나누어 역시 종양세포의 분화도와 비교하였으나 유의한 차이가 없었다(Table 7). 이수배수체를 보인 간세포암종의 간조직은 2예 모두 만성 활동성 간염으로서 염증이 심했고 지방침윤을 동반하고 있었다.

고 찰

유세포측정을 이용한 종양 세포의 DNA량 분석은 1983년 Hedley등¹¹⁾의 보고 이후 파라핀 포매 조직을 이용하여 여러 종양¹²⁻¹⁶⁾에서 예후인자로 활용되고 있지만 간세포암종에 대한 연구는 드물다. 1988년 Ezaki등¹⁷⁾에 의하여 간세포암종의 DNA 분석과 그 임상적, 병리학적 소견과의 연관성이 처음 검토된 바 있으며, 종괴의 크기가 5cm 이상일 때와 환자 나이가 55세 이하일 때 이수배수체가 자주 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서는 이수배수체와 정배수체군의 종양 크기간에는 통계학적으로 유의한 차이를 보였고, 3cm를 기준으로 나눈 소-간세포암종군과 대-간세포암종군의 이수배수체 빈도 차이는 통계적 유의수준이 0.056으로 그 의미가 상당히 의심되었다.

또한 피막이 형성되지 않은 간세포암종군에서는 피막이 잘 형성된 간세포암종군에 비하여 이수배수체 빈도가 높았다. 종양에서의 피막 형성 기전은 확실히 알려진 바는 없으나 저자들의 경험에 의하면 종양의 성장에 따른 주위조직의 압박과 간질의 섬유화에 의한 것으로 생각되며 비교적 천천히 자라는 간세포암종의 특징적인 육안소견이기도 하다. 종양의 크기가 클수록 이수배수체 빈도가 높다는 사실은 다음 두가지 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째는 이수배수체를 보이는 종양일수록 빨리 자라 초기 진단이 어려워 크기가 어느 정도 커진 후에도 진단 될 수 있다. 둘째는 종양이 성장함에 따라 DNA 염색체 배수성이 변화된다는 가설이다. 두번째 가설에 대해서는 DNA 염색체 배수성 양상이 종양의 진행과는 관계없이 일정하다는 여러 보고^{30,31)}와 재발된 종양의 DNA 지수가 동일하다는 보고가 있다³²⁻³⁴⁾. 이를 종합해보면 종양의 악성도는 초기에 결정된다는 의견이 타당하며 이수배수체를 보이는 간세포암종일수록 빨리 자라고 발견시 종양의 크기가 비교적 클 것이라고 예상할 수 있으며 이는 피막 형성이 안된 간세포암종에서 이수배수체가 많은 점으로 추정할 수 있다. 간세포암종에서의 피막 형성은 생존율

에 영향을 미치는 중요한 인자로 알려져 있으며³⁵⁾ 본 연구에서 DNA 염색체 배수성 양상이 피막 형성 여부 및 종양의 크기에 따라 차이를 보인 점은 DNA 염색체 배수성 양상이 간세포암종의 좋은 예후인자로서의 가능성을 시사해주고 있다. 이수배수체 빈도가 45세 이하에서 45세 이상보다 높았던 것으로 미루어 보아 낮은 연령층에 생긴 간세포암종의 성장이 빠를 것으로 생각된다.

간세포암종의 DNA 염색체 배수성 양상과 그 예후에 대해 현재까지는 체계적으로 검토한 연구는 극히 제한되어 있다. 고식적 절제술을 받은 환자까지 연구 대상에 포함시켰던 Ezaki등¹⁷⁾의 보고에서는 DNA 염색체 배수성 양상과 환자의 생존율간에는 유의한 차이가 없었다. 그 후 치료적 절제를 받은 예만을 연구 대상에 포함시킨 Ishizu¹⁸⁾와 Fujimoto등²⁰⁾의 보고에서는 이수배수체인 경우 예후가 나쁜 것으로 판명되었고 Chen등¹⁹⁾의 보고에서는 연관성이 없는 것으로 나타났다.

만일 종양의 DNA 염색체 배수성이 초기에 결정되고 일정하다고 하면 향후 치료 계획을 수립할 때 중요한 요인으로 관여할 수 있으리라 예상되고 간세포암종 진단과 아울러 유세포측정에 의한 DNA 염색체 배수성 분석이 필수적이어야 하며 특히 젊은 연령층에 생긴 간세포암종에서 강조되어야 하리라 생각된다.

그러나 유세포측정을 이용하여 간세포암종의 DNA 염색체 배수성 양상을 조사함으로써 환자의 생존율을 예측하는 데에는 몇가지 어려움이 있다. 첫째, 이수배수체의 기준이 문헌에 정확히 기술되어 있지 않아 연구자마다 그 기준이 다르다. 이수배수체를 판단하는데 가장 흔히 사용되는 세가지 기준으로 ① 다수의 G0/G1 peak가 존재할 때, ② 증가된 CV 값을 갖는 하나의 G0/G1이 정상 peak channel에 위치할 때, ③ 정상 CV 값을 갖는 하나의 G0/G1이 정상 peak channel 외에 위치할 때를 들 수 있다³⁰⁾. 그러나 마지막 두가지 기준은 비교적 CV 값이 높은 파라핀 포매 조직에서는 적용하기 곤란하며 첫번째 기준 역시 분석하는 사람마다 해석이 다를 소지가 있다. 따라서 간세포암종의 이수배수체 빈도가 다양하게 나타날 수 있으며 서로 다른 해석을 유도할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구에서는 정배수체 peak와 뚜렷이 구분되며 전체 세포 수의 10%가 G0/G1 peak를 이루고 이에 대응되는 G2M peak를 갖는 경우만을 이수배수체로 해석하였기 때문에⁵⁾ 이수배수체 빈도가 다른 보고들보다 낮게 나타났다고 생각된다.

둘째, 한 종양내에서의 DI의 이형성을 들 수 있다. 충실성 종양에서 DNA 지수의 이형성은 여러 연구자들에 의해 확인된 바 있으며, 이는 종양의 고유한 생물학적 특성-악성도, 성장 속도 및 화학 요법에 대한 반응을 갖는 서로 다른 아-클론(subclone)들이 존재함을 시사해 주고 있다. Ishizu¹⁸⁾는 동일 간세포암종

의 여러곳에서 조직을 채취하여 DI를 구하고 서로 비교한 결과 16예중 1예에서는 조직학적으로 전혀 다른 점이 없음에도 불구하고 DI의 차이가 있음을 발견했다. 이와 유사한 종양내 이행성 소견은 신종양³⁶⁾과 결장직장암종³⁷⁾에서도 관찰할 수 있다. 또한 김등³⁸⁾은 1 cm 전후의 미소 간세포암종에서도 격벽을 형성하고 있음을 관찰하고 종양 초기부터 서로 다른 아-클론들이 존재하고 있음을 시사하였다. 한 종양내에서의 DI의 이형성을 극복하기 위해서는 종양의 대표적인 곳에서 다수의 표본 채취가 요구되며 특히 적절한 치료방법의 선택에 필수적이라고 생각된다.

셋째, Joensuu 등³⁹⁾이 주장한 바와 같이 의양성으로 나타날 수 있는 이수배수체 경우이다. 이들은 병변이 없는 정상조직 198예중 14예(7.3%)에서 이수배수체를 관찰했다. 이수배수체는 대부분 CV가 클 뿐 아니라 peak가 둥글고 넓어서 구분이 가능하였으나 가끔 CV와 DI가 작으면서 정배수체의 G1 peak에 겹쳐 있는 양상을 보였다. 이들은 의양성 이수배수체가 포프탈린 용액 고정 전후에 생길 수 있는 핵분해에 의해 생길 가능성이 많으며 이는 소화 효소를 가지고 있는 췌장처럼 자가 분해가 있는 경우에는 특히 의심하여야 한다고 하였다. 이러한 의양성 이수배수체를 최소화하기 위해서는 조직의 충분한 고정이 필수적이며 파라핀블럭 선정시 괴사, 출혈 및 염증이 심한 곳을 제외하여야 함을 뜻한다.

본 연구에서는 연구재료의 채취년도 때문에 염색체 배수성 양상과 환자의 생존율간의 직접적인 연관성을 조사하지 못했다. 그러나 간세포암종을 포함한 여러 악성종양에서 이수배수체가 나쁜 예후 인자로 추정된 점으로 미루어 보아 간세포암종 진단시 유세포측정에 의한 DNA 염색체 배수성 분석은 필수적이어야 하며 향후 치료 계획에 중요한 요인이 될 수 있으리라 생각된다. 또한 이수배수체가 45세 이전에서 많이 관찰되는 점으로 보아 젊은 연령층의 간세포암종에서 특히 강조되어야 하리라고 생각된다.

결 론

저자들은 외과적으로 절제된 72명의 간세포암종중 63예와 종양 주변의 조직 45예를 대상으로 유세포측정을 사용하여 DNA 염색체 배수성을 측정하였다. 이수배수체는 간세포암종에서 18예(29.0%), 간세포암종의 간조직에서 2예(4.4%)로서 간세포암종에서 상대적으로 많았다.

간세포암종에서의 염색체 배수성 양상과 임상적 및 병리학적 특성과 비교분석하였다. 이수배수체인 간세포암종의 평균 크기는 8.8 cm인데 반하여 정배수체인 간세포암종의 평균 크기는 6.1 cm로서 두 군간에 유의한 차이가 있었으며, 피막 형성이 안된 간세포암종에서 이수배수체의 빈도가 높았다($p < 0.05$). 이수배수

체군의 평균연령(47.1세)은 정배수체군(53.1세)보다 낮았고 45세 이전군에서 이수배수체가 통계적으로 유의하게 많았다($p < 0.05$). 환자의 성별, 혈청 B형 간염 바이러스항원, AFP등과의 연관성은 없었으며, 종양의 육안 유형, 종양 세포의 등급, 모양, 조직학적 성장 유형 및 종양의 혈관 침범과의 연관성도 없었다. 피막이 형성되지 않은 간세포암종에서 이수배수체의 빈도가 더 높고 이수배수체인 간세포암종의 평균 크기가 정배수체의 평균크기보다 큰 점으로 미루어 이수배수체가 비교적 빨리 성장하는 간세포암종의 표지가 될 수 있으리라 생각된다. 그러므로 간세포암종에 대한 조직학적 진단과 더불어 유세포측정에 의한 DNA 염색체 배수성 분석이 필수적이며 향후 치료 계획에 중요한 요인이 될 수 있으리라 생각된다.

<감사: 본 논문의 실험 및 결과 해석에 있어서 서울대학교 의과대학 병리학교실의 김철우 교수의 도움을 받았음을 밝혀 둔다.>

참 고 문 헌

- 1) 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.
- 2) Dowle CS, Owainati A, Robins A, Burns K, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br J Surg* 1987; 74: 133-6.
- 3) Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4729-35.
- 4) Kallioniemi O-P, Hietonen T, Mattila J, Lehtinen M, Lauslahti K, Koivula T. Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23: 277-82.
- 5) Chang K-J, Enker WE, Melamed M. Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. *Am J Surg* 1987; 153: 184-8.
- 6) Finan PJ, Quirke P, Dixon MR, Dyson JED, Giles GP, Bird CC. Is DNA aneuploidy a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 1986; 54: 327-30.
- 7) Hendy-Ibbs P, Cox H, Evan GI, Watson JV. Flow cytometric quantitation of DNA and c-myc oncogene in archival biopsies of uterine cervix neoplasia. *Br J Cancer* 1987; 55: 275-82.
- 8) Coon JS, Schwartz D, Summers JL, Miller AW,

- Weinstein RS. *Flow cytometric analysis of deparaffinised nuclei in urinary bladder carcinoma. Comparison with cytogenetic analysis. Cancer 1986; 57: 1594-601.*
- 9) Zimmerman PV, Hawson GAT, Bint MH, Parsons PG. *Ploidy as a prognostic determinant in surgically treated lung cancer. Lancet 1987; 2: 530-3.*
 - 10) Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. *Proliferative activity and malignancy in human gastric cancers. Cancer 1992; 69: 314-21.*
 - 11) Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T, Aretxabala X, Kamata T, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. *Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. Cancer 1988; 62: 1497-502.*
 - 12) Yonemura Y, Ooyama S, Sugiyama K, Kamata T, Aretxabala X, Kimura H, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. *Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. Cancer Res 1991; 50: 509-14.*
 - 13) Kallioniemi O-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.*
 - 14) Lage JM, Weinberg DS, Huettner PC, Mark SD. *Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in ovarian tumors. Cancer 1992; 69: 2668-75.*
 - 15) Lundberg S, Carstensen J, Rundquist I. *DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study. Cancer Res 1987; 47: 1973-7.*
 - 16) Schmidt D, Wiedemann B, Keil W, Sprenger E, Harms D. *Flow cytometric analysis of nephroblastomas and related neoplasms. Cancer 1986; 58: 2494-500.*
 - 17) Ezaki T, Kanematsu T, Okamura T, Sonoda T, Sugimachi K. *DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. Cancer 1988; 61: 106-9.*
 - 18) Ishizu H. *Flow cytometric analysis of the nuclear DNA content of hepatocellular carcinoma. Jpn J Surg 1989; 662-73.*
 - 19) Chen MF, Hwang TL, Tsao KC, Sun CF, Chen TJ. *Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. Surgery 1991; 109: 455-8.*
 - 20) Fujimoto J, Okamoto E, Yamanaka N, Toyosaka A, Mitsunobu M. *Flow cytometric DNA analysis of hepatocellular carcinoma. Cancer 1991; 67: 939-44.*
 - 21) Hata Y, Ishizu H, Ohmori K, Hamada H, Sasaki F, Uchino J, Inoue K, Naitoh H, Fujita M, Kobayashi T, Yokoyama S. *Flow cytometric analysis of the nuclear DNA content of hepatoblastoma. Cancer 1991; 68: 2566-70.*
 - 22) Kanai T, Hirohashi S, Upton MP, Noguchi M, Kishi K, Makuuchi M, Yamasaki S, Hasegawa H, Takayasu K, Moriyama N, Shimosato Y. *Pathology of small hepatocellular carcinoma. Cancer 1987; 60: 810-9.*
 - 23) Okuda K, Peters RL, Simson IW. *Gross anatomic features of hepatocellular carcinoma from three disparate geographic areas. Cancer 1984; 54: 2165-73.*
 - 24) Gibson JB, Sobin LH. *Histological typing of tumours of the liver, biliary tract and pancreas. In: International histological classification of tumours. Geneva: World Health Organization, 1978: 13-30.*
 - 25) Peters RL. *Pathology of hepatocellular carcinoma. New York: John Wiley and Sons, 1976: 107-68.*
 - 26) Craig JR, Peters RL, Edmondson HA. *Tumors of the liver and intrahepatic bile ducts. In: Atlas of tumor pathology, second series fascicle 26: 1988: 123-222.*
 - 27) Edmondson HA, Steiner PE. *Primary carcinoma of the liver: A study of 100 cases among 48,900 necropsies. Cancer 1954; 7: 462-503.*
 - 28) Hedley DW. *Flow cytometry using paraffin-embedded tissue. Cytometry 1989; 10: 229-41.*
 - 29) Arber DA, Cook PD, Moser LK, Speights VO. *Variation in reference cells for DNA analysis of paraffin-embedded tissue. Am J Clin Pathol 1992; 97: 387-92.*
 - 30) Molenaar WM, Oosterhuis JW, Meiring A, Sleyfer DT, Koops HS, Cornelisse CJ. *Histology and DNA contents of a secondary malignancy arising in a mature residual lesion six years after chemotherapy for a disseminated nonseminomatous testicular tumor. Cancer 1986; 58: 264-68.*
 - 31) Auer GU, Fallenius AG, Erhardt KY, Sundelin BSB. *Progression of mammary adenocarcinomas as reflected by nuclear DNA content. Cytometry 1984; 5: 420-5.*
 - 32) Frankfurt OS, Slocum HK, Rustum YM, Arbuck SG, Pavelic ZP, Petrelli N, Huben RP, Pontes EJ, Greco WR. *Flow cytometric analysis of DNA aneuploidy in primary and metastatic human solid tumors. Cytometry 1984; 5: 71-80.*
 - 33) Kokal WA, Duda RB, Azumi N, Sheibani K, Kemeny MM, Terz JJ, Harada JR. *Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg 1986; 121: 1434-9.*
 - 34) Taylor SR, Roederer M, Murphy RF. *Flow cytometric DNA analysis of adrenocortical tumors in children. Cancer 1987; 59: 2059-63.*
 - 35) 김수태, 노동영, 이홍주, 이상진. 원발성 간세포암 환자의 수술 후 생존에 영향을 미치는 예후 인자들. 대

한소화기병학회지 1990; 22: 876-82.

- 36) Ljungberg B, Stenling R, Roos G. *DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. Cancer* 1985; 56: 503-8.
- 37) Hiddemann W, Bassewitz DB, Kleinemeier H-J, Schulte-Brochterbeck E, Hauss J, Lingemann B, Buchner T, Grundmann E. *DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. Cancer* 1986; 58:

258-63.

- 38) 김용일, 이진국, 송상용. 소형 간세포암종 39예에 대한 병리학적 분석과 대형 간세포암종과의 비교. 대한병리학회지 1992; 26: 103-16.
- 39) Joensuu H, Alanen KA, Klemi PJ, Aine R. *Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. Cytometry* 1990; 11: 431-37.