

유방암종에서의 DNA 함량 분석

—신선조직과 파라핀 포매조직의 비교 연구—

인제대학교 의과대학 상계백병원 진단병리과

유진예 · 조혜제

Flow Cytometric DNA Content Analysis in Breast Cancer

—Comparison study of fresh and paraffin-embedded tissues—

Jin Ye Yoo and Hye Jae Cho

Department of Diagnostic Pathology, Sanggye Paik Hospital,
College of Medicine, Inje University, Seoul 139-707, Korea

DNA content of 25 cases of breast carcinoma was analyzed by flow cytometry in both fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Aneuploidy in fresh tissue and paraffin-embedded tissues was 72% and 32%, respectively. There was a 52% agreement in analysis of DNA ploidy between fresh and paraffin-embedded tissues. Most of the discrepancies resulted from loss of aneuploid peaks on the histograms of paraffin-embedded tissue. Mean S-phase fraction was slightly higher in a paraffin-embedded tissue than that in the fresh tissue; $19.2 \pm 9.1\%$ versus $16.1 \pm 8.8\%$ and there was no significant correlation between the S-phase fractions. In statistical analysis, the histologic and nuclear grades were not correlated with ploidy or mean S-phase fraction. Therefore it is strongly recommended to use the fresh tissue in flow cytometric DNA content analysis of breast cancer. (Korean J Pathol 1998; 32: 993~999)

Key Words: Flow cytometry, Ploidy, S-phase fraction, Breast carcinoma

서론

DNA 유세포 분석은 종양의 생물학적 활성도를 예측 가능하게 하였고 합성기 분석 및 DNA 배수성 등은 생존률과 연관성을 보임으로써 많은 종양에서 예후 및 치료방향의 결정을 위한 보조적 수단으로 시행되어 왔다. 분석 재료는 신선조직을 이용하여야 하며 임상적 결과를 결정할 수 있는 충분한 기간이 전향성 연구에 요구되어 졌으나 Hedley등¹에 의해 발표된 방법은 파라핀 포매조직을 이용하여 DNA 유세포 분석을 가능하게 하였고 그 이후 이미 임상적 결과가 알려진 환자에서 장

기간 보관되어 오던 파라핀 포매조직을 이용하여 후향성 연구가 이루어져 왔다. 그 중 파라핀 포매조직의 결과가 신선조직과 거의 일치한다는 보고도 있었으나²⁻⁴ 잘 맞지 않는 예도 발표되어 왔고⁵⁻⁷ Hedley도 파라핀 포매조직의 단점을 일부 지적한 바 있다.⁸ 이에 본원에서 경험한 유방의 침윤성 관암종에서 동일환자의 신선조직과 파라핀 포매조직에서 시행된 DNA 유세포 분석 결과를 비교하고 이들과 조직등급 및 핵등급과의 상관성을 비교하여 파라핀 포매조직의 분석결과에 대한 신뢰성을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1993년부터 1997년까지 인제대학교 의과대학 상계백병원에서 침윤성 관암종으로 진단받고 변형근치 절제

접 수: 1998년 6월 26일, 게재승인: 1998년 8월 27일
주 소: 서울특별시 노원구 상계동 761-1, 우편번호 139-707
인제대학교 부속 상계백병원 진단병리과, 유진예
ISSN : 0379-1149

술과 액와 림프절 절제술을 받은 환자 중 신선조직으로 DNA 유세포 분석이 시행되었던 25예의 유방암종을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 병리조직학적 검색: 외과적으로 절제된 유방조직을 수술 즉시 또는 4°C에서 15~20시간정도 냉장보관후 1~2 cm 간격으로 연속 절편을 만들고 종양 부위를 0.1 cm 두께와 0.5~1×0.5 cm 크기로 도려내어 신선조직으로 DNA유세포 분석을 시행하였고 나머지 조직은 10% 중성 포르말린 용액에 담구어 24시간동안 고정한 후 종양부위를 0.2~0.3 cm 두께와 2×1.5 cm 크기로 잘라 통상적인 조직표본 제작법에 따라 탈수, 투명, 침투의 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 4 μm 두께로 박절하여 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하였고 병리 의사 2명이 광학현미경으로 검경 후 종양 조직이 충분히 포함된 파라핀 블록을 각 예당 1개씩 선택하였다. 파라핀 블록의 보관기간은 약 1개월에서 4년 사이였고 보관상태는 비교적 양호하였다.

2) 조직등급 및 핵등급: 조직학적 등급은 Bloom과 Richardson⁹이 제창한 WHO 분류법을 따랐고 핵등급은 Black¹⁰의 등급법에 따라 분류하였다.

3) 유세포 분석

(1) 파라핀 포매조직의 전 처리: 선택된 파라핀 블록과 조직 슬라이드를 대조하여 종양이 주로 분포된 부위를 0.5×0.5×0.2 cm 크기로 도려낸 후 3 ml의 xylene에 넣고 60°C에서 30분간 탈파라핀 과정을 2회 거치고 인산 완충 용액이 담긴 페트리 접시에서 수술용 칼날로 잘게 분쇄한 후 100%, 90%, 80%, 70%, 50% 에탄올의 순서대로 60°C에서 10분씩 보온한 후 50% 에탄올에서 15시간정도 (하룻밤) 방치한 다음 증류수에 담귀 60°C에서 10분간 보온하는 함수 과정을 거친 다음 인산 완충 용액에 넣고 60°C에서 30분간 보온후 pH 1.5의 0.4% pepsin을 넣고 30°C의 수욕조 (water bath)에서 30분간 반응시킨 뒤 얼음 욕조 (ice bath)에 넣고 pepsin의 작용을 억제한 후 인산 완충 용액으로 씻어 내었다.

(2) 신선조직 및 전 처리 과정을 거친 파라핀 포매조직의 유세포 분석: 수술용 칼날로 잘게 분쇄한 신선조직 또는 전 처리 과정을 거친 파라핀 포매조직에 인산 완충 용액을 첨가한 후 50 μm 구멍 크기를 갖는 나일론 망을 이용하여 여과 후 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포부유액을 농축시키고 세포 수를 $2.5 \times 10^3/\mu\text{l}$ 정도로 맞춘 다음 세포부유액 50 μl를 Falcon 튜브에 옮기고 Becton Dickinson사의 트립신 완충 용액 (solution A) 900 μl를 가하여 10분간 실온에서 작용시킨 뒤 트립신 억제제와 ribonuclease A 혼합 용액 (solution B) 750 μl와 10분간 반응시킨 후 propidium iodide (solution C) 750 μl를 가하여 10분간 암소에서 반응시켜 DNA를 염색한 다음 15 mW, 흥분 파장 488 nm의 Argon-ion laser를 광원으로 하는 FACScan (Becton Dickinson) 유세포 분석기

로 DNA함량을 측정하였다. Doublet discrimination module (DDM)의 작동 및 분석기의 기능을 평가하고 표준화하기 위해 DNA QC Particles (Becton Dickinson, Cat. No. 95-0023)를 사용하였고 종양조직 안에 섞여 있는 정상 세포나 염증 세포를 내부 표준으로 정하고 CellFit 프로그램을 이용하여 각 검체당 약 10,000~20,000개의 세포에서 DNA 함량을 분석하였다.

(3) 히스토그램 분석: G0/G1 극과의 변이계수 (Coefficient of variance, CV)가 5.0 이상인 경우 sum of broad rectangular (SOBR) 방식을, CV가 5.0 미만인 경우 rectangular fit (R fit) 방식을 사용하였고 G0/G1 극과가 2개 이상인 경우 polynomial 방식을 이용하였으며 자동 분석이 용이하지 않은 경우에는 수동으로 재분석하였다. 단일 G0/G1 극과를 가지며 G2/M 극과와 G0/G1 극과의 채널 수의 비가 2.0 ± 0.15 의 범위 내에 있을 때 배수성으로 정의하였고, 배수성 G0/G1 극과와 분명하게 구분되는 또 다른 G0/G1 극과가 관찰되면서 해당 G2/M 극과를 동반할 때 비배수성으로 정의하였으며 CV가 10% 이하인 예만 본 연구 대상으로 선정하였다.

3) 통계학적 분석: 통계학적 검색은 SPSS통계 프로그램으로 χ^2 -test, Pearson correlation test, paired t-test 및 단순 분류의 분산 분석 (one-way ANOVA)을 시행하여 95%의 유의 수준으로 검정하였다.

결 과

1. 연령 분포 및 림프절 상태

환자의 연령 분포는 24세에서 69세 사이로 평균 연령은 49세였으며 15예 (60%)에서 액와 림프절 전이가 있었다.

2. 신선조직과 파라핀 포매조직의 DNA 배수성 비교 (Table 1)

신선조직은 18예 (72%)에서 비배수성이었고 동일 종양의 파라핀 포매조직은 17예 (68%)가 이배수성을 보여 신선조직과 파라핀 포매조직의 배수성 일치율은 52% (13예)로 낮았다. 신선조직에서 이배수성이었던 7예 중 6예는 파라핀 포매조직에서도 이배수성을 보였으나 나머지 1예 (증례 9)는 비배수성을 나타내었다. 신선조직에서 비배수성이었던 18예 중 11예는 파라핀 포매조직에서 비배수성 극과가 없어졌고 나머지 7예만이 비배수성 극과를 나타내었으며 이 중 5예는 이배수성 극과에 가까운 비배수성 G0/G1 극과 (DNA Index, DI ≤ 1.25)를 보였다.

3. 신선조직과 파라핀 포매조직의 합성기 분획 비교 (Table 1)

신선조직의 전체 평균 합성기 분획은 $16.1 \pm 8.8\%$ 이었고 파라핀 포매조직의 전체 평균 합성기 분획은 $19.2 \pm 9.1\%$ 였으며 Pearson correlation test상 두 군 간의 상호

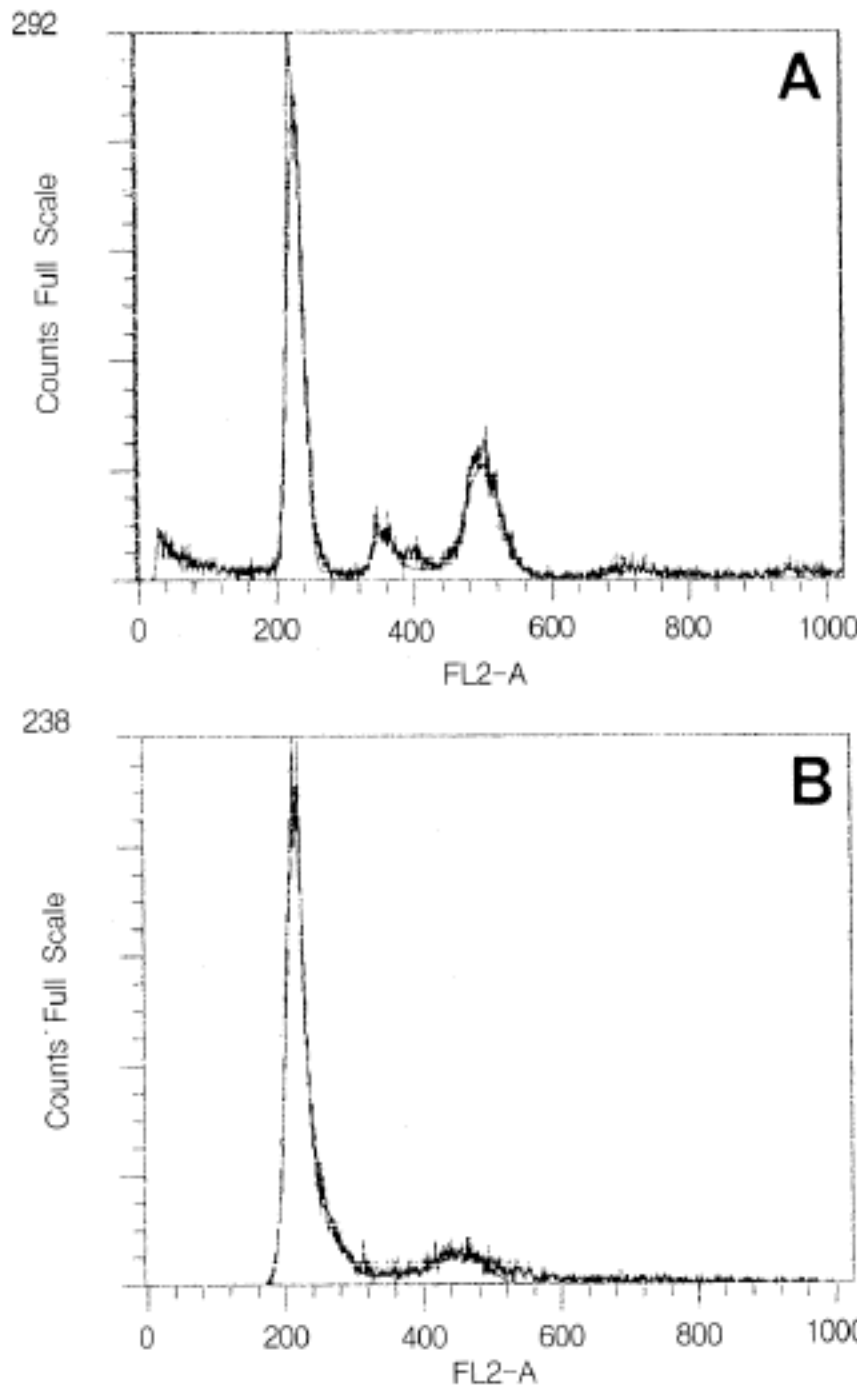


Fig. 1. DNA ploidy discordant case (Case 4). Multiple aneuploid peaks (DI=1.53, 1.74, 2.18) on the histogram of fresh tissue(A) disappeared on the histogram of paraffin-embedded tissue(B).

연관성은 뚜렷하지 않았다 ($p=0.371$). 배수성에 따라 나누어 비교해 보면 신선조직에서 이배수성군의 평균 합성기 분획은 12.0%였으며 파라핀 포매조직에서 이배수성군의 평균 합성기 분획은 20.7%로 더 높은 비율을 나타내었다. 신선조직에서 1예 (증례 4)는 다발성 G0/G1 극과 (DI=1.53, 1.74, 2.18)를 가져 신뢰할 만한 합성기 분획을 측정할 수 없었으며 같은 종양의 파라핀 포매조직에서는 G2/M극과의 분열이 약하게 나타나 비배수성이 의심스러우나 신선조직에서 분명하게 보였던 비배수성 극과들은 나타나지 않았다 (Fig. 1).

4. 신선조직과 파라핀 포매조직의 G0/G1극과의 변이계수 비교 (Table 1)

신선조직의 평균 CV는 4.3 ± 1.8 이었고 파라핀 포매조직의 평균 CV는 5.1 ± 1.6 으로 조금 더 높았으나 paired t-test상 두 군간 유의한 차이는 없었다 ($p=0.109$).

Table 1. Comparison of DNA content analysis between fresh and paraffin-embedded tissues

	Ploidy (F/P)	SPF% (F/P)	CV (F/P)	DI (F/P)
1.	A/A	22.4/15.3	5.8/3.5	1.74/1.17
2.	D/D	23.6/15.4	4.0/3.7	1/1
3.	A/A	13.6/22.0	4.1/4.9	1.76/1.25
4.	A/D	ND/30.0	3.6/6.1	1.53,1.74,2.18/1
5.	A/D	27.6/16.7	3.8/5.3	1.66/1
6.	A/D	22.6/20.0	6.9/4.5	2.47/1
7.	D/D	17.8/8.8	6.5/8.5	1/1
8.	A/A	17.4/25.5	3.3/6.1	1.9/1.23
9.	D/A	4.1/17.0	3.9/5.3	1/1.33
10.	A/D	11.7/23.5	2.5/4.1	1.73/1
11.	A/A	13.1/15.7	4.0/6.4	1.62/1.13
12.	A/D	15.2/20.6	3.6/5.0	0.82/1
13.	D/D	12.1/6.5	3.9/3.8	1/1
14.	A/D	24.0/15.0	9.5/4.3	1.53/1
15.	D/D	16.7/11.4	3.1/4.3	1/1
16.	D/D	6.2/44.9	6.9/4.4	1/1
17.	A/A	34.5/16.7	5.2/2.6	1.5/1.78
18.	A/D	7.9/20.9	5.8/6.0	1.69/1
19.	A/A	6.2/9.7	2.8/4.3	1.47/1.18
20.	A/A	13.6/7.0	2.2/6.8	1.69/1.82
21.	D/D	3.5/34.3	4.0/7.6	1/1
22.	A/D	6.3/13.1	3.9/3.5	1.83/1
23.	A/D	20.0/12.5	0.7/2.7	1.82/1
24.	A/D	34.4/26.1	3.1/4.5	2.07/1
25.	A/D	10.8/31.6	4.3/8.8	0.83/1

F: fresh tissue, P: paraffin-embedded tissue, SPF: S-phase fraction, DI: DNA index, CV: coefficient of variance, A: aneuploidy, D: diploidy

5. 조직등급 및 핵등급과 DNA 배수성 비교 (Table 2)

조직등급과 DNA 배수성은 신선조직 ($p=0.508$)과 파라핀 포매조직 ($p=0.145$) 모두에서 χ^2 -test상 상관관계를 찾을 수 없었으며, 핵등급과 DNA 배수성 간에도 신선조직 ($p=0.776$)과 파라핀 포매조직 ($p=0.315$) 모두에서 상관성을 얻지 못하였다.

6. 조직등급 및 핵등급과 합성기 분획 비교 (Table 3)

조직등급에 따른 신선조직의 합성기 분획을 비교해 보면 분화가 좋은 1등급에는 4예가 속했고 평균 합성기 분획은 $19.1 \pm 12.6\%$ 였으며 2등급에는 6예가 속했고 평균 합성기 분획은 $11.9 \pm 6.9\%$ 였다. 3등급에는 14예가 속했고 평균 합성기 분획은 $17.0 \pm 8.4\%$ 였다. 단순분류의 분산분석 검정에서 각 등급에 따른 신선조직의 평균 합성기 분획의 차이는 뚜렷하지 않았으며 ($p=0.387$) 파라핀 포매조직의 합성기 분획 역시 통계학적으로 유의

한 차이를 보이지 않았다 (p=0.177).

핵등급에 따라 신선조직의 합성기 분획을 비교해 보았을 때 분화가 나쁜 1등급에는 8예가 속했고 평균 합성기 분획은 16.9±10.3%로 가장 높았고 2등급에는 15예가 속했으며 평균 합성기 분획은 16.3±8.1%로 1등급의 분획치와 비슷하였으며 분화가 좋은 3등급에는 1예가 속했고 합성기 분획은 6.2%로 낮았다. 파라핀 포매조직에서는 핵등급 1등급의 평균 합성기 분획은 19.0±8.0%였고 2등급은 19.9±9.9%로 신선조직과 마찬가지로 1등급과 비슷한 분획치를 보였으며 분화가 좋은 3등급은 9.7%로 낮은 수치를 나타내었다. 신선조직과 파라핀 포매조직 모두에서 핵등급 1등급과 2등급은 비슷한 평균 합성기 분획치를 보였으며 분화가 좋은 3등급과 큰 차이가 있었으나 통계학적 유의성은 없었다.

고 찰

DNA 유세포 분석은 종양의 악성 경과에 대한 빠르고

Table 2. Relationship of histologic and nuclear grades with ploidy

	Diploidy (F/P) Case No.	Aneuploidy (F/P) Case No.	p-value (F/P)
Histologic grade			0.508/0.145
I Well	2/2	2/2	
II Moderate	1/6	5/0	
III Poor	4/9	11/6	
Nuclear grade			0.776/0.315
III Well	0/0	1/1	
II Moderate	5/11	11/5	
I Poor	2/6	6/2	

F: fresh tissue, P: paraffin-embedded tissue

객관적인 정보를 주며¹¹ 일부 상반된 보고도 있으나¹²⁻¹⁷ 합성기 분획 및 DNA 배수성은 임상적 병기, 림프절 전이, 종양의 크기 등과 유의한 상관성을 보일 뿐 아니라^{11,18-20} 생존율에 대한 독립적 예후 정보를 제공하는 가치 있는 예후 인자로서 인식되고 있다.²¹⁻²⁵ Hedley등¹이 전 처리법을 고안한 이후 신선조직만 가능했던 DNA 유세포 분석이 장기간 보관되었던 파라핀 포매조직에서도 후향성 연구가 가능하게 되었으나 신선조직에 비해 더 많은 시간이 소요되며 조직파편이 많아 CV치가 높고 포르말린 고정과정에서 발생하는 조직의 변성 및 불충분한 고정 그리고 파라핀 블록의 보관상태 등이 DNA 분석 결과에 큰 영향을 주게되는 문제점들이 제기되고 있다.⁸

본 연구에서 DNA 배수성은 신선조직에서는 비배수성 종양이 72%, 파라핀 포매조직에서는 32%로 큰 차이를 보였는데 다른 보고들에서 유방암의 신선조직을 대상으로한 연구의 비배수성의 비율은 48~70%범위였고,^{2,19,26,27} 파라핀 포매조직의 비배수성의 비율은 42~70%범위로^{11,12,14-16,18,21-23,28-31} 두 구간 비슷한 비율을 보여 주었으나 본 연구의 파라핀 포매조직에서 얻은 DNA 배수성은 훨씬 낮은 빈도의 비배수성을 보였다. 합성기 분획은 대부분의 연구에서^{11,16,17,19,24} 비교적 일치된 결과로 DNA 이배수성인 경우 낮은 합성기 분획을, 비배수성인 경우 높은 합성기 분획을 나타내었으며 본 연구에서도 신선조직으로 검색한 경우 이배수성군의 평균 합성기 분획은 12.0%로 비배수성군의 17.7% 보다 낮았으나 파라핀 포매조직에서는 오히려 이배수성군의 평균 합성기 분획이 20.7%로 비배수성군의 16.1% 보다 높아 이 역시 다른 연구와 상반되는 결과로 DNA 배수성 분석시 세심한 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다. 파라핀 조직에서 이와 같은 신뢰성이 낮은 결과를 얻게된 원인을 알아 보기 위해 우선 다른 연구자들의 전 처리 과정을 조사해 보았는데 대부분의 연구자들은 Hedley등¹의 전 처리법을 기초로한 약간의 변형법³¹⁻³⁴을 사용하고 있었고 본 연구에서 사용된 방법과 대부분

Table 3. Relationship of histologic and nuclear grades with mean SPF

	Case No.	Mean SPF±SD% (F/P)	p-value (F/P)
Histologic grade			0.387/0.177
I Well	4	19.1±12.6 / 12.1±4.8	
II Moderate	6	11.9±6.9 / 23.0±11.4	
III Poor	14	17.0±8.4 / 19.6±8.4	
Nuclear grade			0.532/0.573
III Well	1	6.2 / 9.7	
II Moderate	15	16.3±8.1 / 19.9±9.9	
I Poor	8	16.9±10.3 / 19.0±8.0	

F: fresh tissue, P: paraffin-embedded tissue, SPF: S-phase fraction, SD: standard deviation, ANOVA: analysis of variance

일치하였으나 탈 파라핀 및 합수과정을 실온에서 시행한 다른 연구와 달리 본 연구에서는 60°C에서 시행하였고, 효소 처리과정인 기존의 pepsin 처리 후 trypsin 처리를 본 연구에서 추가하였다는 점이 달랐다.

전 처리 중 온도의 차이가 어떤 영향을 미칠 수 있는가를 알아보기 위해 저자들은 25예의 검체 중 파라핀 포매조직에서 신선조직과 동일하게 비배수성을 보인 1예와 동일하게 이배수성을 보인 2예 그리고 신선조직에서 비배수성이었으나 파라핀 포매조직에서 이배수성을 나타낸 2예의 파라핀 블록을 선택하여 각각 60°C에서와 실온에서 탈파라핀 및 합수과정을 거쳐 DNA 함량을 비교분석해 보았는데 양 군의 DNA 배수성은 모두 일치하였고 히스토그램의 모양도 거의 일치하는 형태를 보여 온도 차이에 의한 효과는 뚜렷하게 증명할 수 없었다.

효소 처리과정은 세포덩어리를 분리하며 포르말린 고정으로 형성된 DNA와 histone간의 공유결합을 깨뜨림으로써 DNA의 염색 강도를 높여 주는 것으로 생각하고 있으나 pepsin은 30분 이상 처리하면 조직파편을 증가시킬 수 있으며 trypsin은 pepsin과 동일한 효과를 가지고 propidium iodide의 염색 강도를 높여 주면서 pepsin 보다 조직파편의 생성은 적은 것으로 알려져 있으며 pronase는 CV를 낮추어 주며 세포 미세구조를 더 잘 보존함으로 image cytometry에 적용하기에 합당하다.⁸ 본 연구에서 pepsin과 trypsin을 함께 사용함으로써 DNA 함량 분석에 좋지 않은 영향력을 줄 수 있는지는 연구된 바가 없으나 Schultz등³¹에 의한 유방암과 대장암에서 신선조직과 파라핀 포매조직의 8가지 전 처리법의 비교연구에 따르면 각기 다른 활성을 갖는 pepsin의 사용과 pepsin 처리과정을 두 번 반복한 방법들 중 배수성에 같은 영향을 미치는 전 처리법은 없었다.

히스토그램의 해석은 크게 주관적인 요소를 가지며 분석기의 기종과 방법의 차이, 비정상에 대한 기준의 차이가 있다. 미국 국립암연구소³²의 주도로 5개 연구소에서 이형세포암 5예의 파라핀 블록을 이용하여 유세포 분석을 행하여 비교한 결과 각 연구소에서 사용한 기술에 상당한 차이가 있었지만 히스토그램의 해석에서 놀라운 일치를 보여주어 파라핀 포매조직을 이용한 연구소간 표준화 시스템의 형성 및 정도관리의 가능성과 필요성을 부각시켜 주었다.

Chen등²은 유방암종 35예에서 신선조직과 파라핀 포매조직의 DNA 함량을 비교 연구한 보고에서 두 조직간 배수성의 일치율은 89%였고 불일치한 4예 중 3예는 신선조직에서 보였던 비배수성 극과가 파라핀 포매조직에서 소실되어 이배수성을 나타내었으며 1예는 반대의 결과를 보였다. 본 연구에서 신선조직과 파라핀 포매조직의 배수성 일치율은 32%로 현저히 낮았고 그 주된 원인은 Chen등²의 보고에서와 같이 파라핀 포매조직의 유세포 분석시 비배수성 극과의 소실이었다. 이러한 비배수성 세포집단의 소실은 포르말린 고정하기 전 또

는 그 도중에 발생하는 핵의 변성 및 pepsin 효소처리 중의 핵의 변성, 파라핀 블록의 잘못된 보관상태 등이 중요한 원인으로 제시되고 있다.³³ 본 연구의 1예에서 경험하였던 신선조직에서 보이지 않던 비배수성 극과가 파라핀 포매조직의 분석에서 나타나는 기전 역시 포르말린 고정 전 또는 중간의 염색질의 변성으로 인한 propidium iodide와의 비정상적인 결합력 증가로 해석되고 DNA 변성의 빈도 차이는 연구소, 고정시약, 고정하는 조직의 크기 및 조직의 종류에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다.³⁴ 본 연구의 대상인 유방 조직은 모두 변형근치절제술로 적출된 큰 조직이었고 약 2 cm 두께로 자른 후 포르말린에 고정시켰으나 쉽게 고정되지 않는 지방 조직으로 종양이 둘러 싸여 있어 내부까지 충분히 고정되는데 더 긴 시간이 요구되고 따라서 고정 전이나 그 중간에 조직의 변성 가능성이 높아질 것으로 사료된다.

또한 한 종양 내에 이배수성과 비배수성 세포집단이 모두 있을 가능성, 즉 종양조직 자체의 이질성도 신선조직과 파라핀 포매조직간의 DNA 함량 차이를 설명할 수 있는 기전으로 제시되고 있으며 본 연구에서는 이에 대한 검증은 하지 않았으나 유방암의 10%에서 이질성에 의한 배수성이 관찰되었다는 보고⁸는 염두에 두어야 하겠다.

조직등급과 핵등급의 DNA 함량 및 예후와의 연관성은 여러 연구자들에 의해 보고되어 왔으나^{11,16,19,20,25,35} 분류기준으로 사용되는 핵의 크기나 모양, 염색질 양상 등은 다분히 주관적 요소를 배제할 수 없으며 관찰자간의 재현성이 낮아 그 신뢰성이 떨어진다는 주장도 제기되고 있다.^{24,36} 본 연구에서도 조직등급 및 핵등급은 신선조직과 파라핀 포매조직 모두에서 뚜렷한 DNA 함량과의 연관성 및 차이점을 구분할 수 없었으나 증례의 수가 적은 점을 고려하여 더 많은 증례에 대한 분석이 필요하고 객관성 있는 판독을 위해서는 여러 연구기관이 함께 정기적인 교류와 공동 연구를 통하여 해결해 나가야 할 것으로 생각한다.

결 론

파라핀 포매조직을 이용한 DNA 함량 분석의 신뢰성을 알아보고자 유방의 침윤성 관암종 25예를 대상으로 동일 환자의 신선조직과 파라핀 포매조직에서 시행된 DNA 유세포 분석 결과를 비교하고 이들과 조직등급 및 핵등급과의 상관성을 비교해 보았을 때 다음의 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, DNA 비배수성은 신선조직에서 72%였으나 파라핀 포매조직은 32%로 현저하게 낮았고, 두 조직간 배수성 일치율은 52%였다. 낮은 배수성 일치율의 주 원인은 파라핀 포매조직에서 비배수성 G0/G1 극과의 소실 때문이었다. 평균 합성기 분획은 신선조직에서 $16.1 \pm 8.8\%$ 였고 파라핀 포매조직에서 $19.2 \pm 9.1\%$ 로 더 높은

수치를 보였으며 두 조직간 상호 연관성을 찾을 수 없었다 ($p=0.371$). 평균 CV는 신선조직에서 4.3 ± 1.8 였고 파라핀 포매조직에서 5.1 ± 1.6 이었으며 두 구간 유의한 차이는 없었다 ($p=0.109$). 둘째, 조직등급과 핵등급은 신선조직과 파라핀 포매조직 모두에서 DNA 배수성 및 평균 합성기 분획과 유의한 상관성을 발견할 수 없었다. 파라핀 포매조직에서 DNA 함량 분석은 포르말린 고정 전이나 그 중간에 핵의 변성으로 인하여 비배수성 세포의 소실을 초래할 수 있으므로 정확한 결과를 얻기 위해서는 신선조직에서 시행하는 것이 바람직 하고 포르말린 고정조직을 사용할 때에는 결과 판독에 세심한 주의를 하여야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 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.
- Chen TL, Luo I, Mikhail N, Raskova J, Raska K Jr. Comparison of flow and image cytometry for DNA content analysis of fresh and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in breast carcinoma. *Cytometry* 1995; 22: 181-9.
- Frierson HF. Flow cytometric analysis of ploidy in solid neoplasms: comparison of fresh tissues with formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Hum Pathol* 1988; 19: 290-4.
- Camplejohn RS, Macartney JC. Comparison of DNA flow cytometry from fresh and paraffin embedded samples of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 1985; 38: 1096-9.
- Garcia R, Bueno A, Feijoo E. DNA content in non-Hodgkin's lymphoma; comparison between flow cytometry and cytogenetics in fresh and paraffin-embedded tissue. *Acta Oncologica* 1994; 33: 621-5.
- Frei JV, Martinez VJ. DNA flow cytometry of fresh and paraffin-embedded tissue using cytokeratin staining. *Mod Pathol* 1993; 6: 599-605.
- Danque POV, Chen HB, Patil J, Jagirdar J, Orsatti G, Paronetto F. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. *Mod Pathol* 1993; 6: 270-5.
- Hedley DW. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 1989; 10: 229-41.
- Bloom HJG, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.
- Black MM, Opler SR, Speer FD. Survival in breast cancer cases in relation to the structure of the primary tumor and regional lymph nodes. *Surg Gynecol Obstet* 1955; 100: 543-51.
- 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.
- Harris RS, Hedley DW, Taylor IW, Levene AL, Smith IE. Tumor ploidy, response and survival in patients receiving endocrine therapy for advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1985; 51: 573-6.
- Wingren S, Stal O, Carstensen J, Sun X, Nordenskjold B. S-phase determination of immunoselected cytokeratin-containing breast cancer cells improves the prediction of recurrence. *Br Cancer Res Treat* 1993; 29: 179-87.
- Hedley DW, Rugg CA, Taylor IW. Influence of cellular DNA content on disease-free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44: 5395-8.
- Masters JRW, Camplejohn RS, Millis RR, Rubens RD. Histological grade, elastosis, DNA ploidy and the response to chemotherapy of breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 55: 455-7.
- Kallioniemi OP, Hietanen T, Mattila J, Lehtinen M, Lauslahti K, Koivula T. Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumor cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 23: 277-82.
- Stanton PD, Cooke TG, Oakes SJ, et al. Lack of prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in breast cancer. *Br J Cancer* 1992; 66: 925-9.
- Noguchi M, Taniya T, Ohta N, Koyasaki N, Miyazaki I, Mizukami Y. Lymph node metastases versus DNA ploidy as prognostic factors for invasive ductal carcinoma of the breast. *Br Cancer Res Tr* 1991; 19: 23-31.
- Visscher DW, Zarbo R, Jacobsen G, et al. Multiparametric deoxyribonucleic acid and cell cycle analysis of breast carcinomas by flow cytometry; clinicopathologic correlations. *Lab Invest* 1990; 62: 370-8.
- Dowle CS, Owainati A, Robins A, et al. Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br J Surg* 1987; 74: 133-6.
- Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, et al. Tumor DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 56: 637-42.
- Camplejohn RS, Ash CM, Gillett CE, et al. The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: result from 881 patients treated in a single centre. *Br J Cancer* 1995; 71: 140-5.
- Kallioniemi O, Blanco G, Alavikko M, et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction: a proposed classification of DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 1998; 62: 2183-90.
- McGuire WL, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992; 326: 1756-61.
- O'Reilly SM, Richards MA. Is DNA flow cytometry a useful investigation in breast cancer? *Eur J Cancer* 1992; 28: 504-7.

26. 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.
 27. 김애리, 김인선, 이갑노. 유방암에서 화상분석기를 이용한 DNA 배수성, 에스트로젠과 프로제스테론 수용체 및 Her-2/neu 종양단백의 표현에 관한 연구. *대한병리학회지* 1994; 28: 246-59.
 28. 조성진, 김애리, 원남희. 인체 전이성 유방암에서 p53 유전자 돌연변이와 DNA Ploidy의 분석. *대한병리학회지* 1997; 31: 135-44.
 29. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, et al. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990; 61: 671-4.
 30. Baidam AD, Zaloudik J, Howell A, et al. DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1987; 55: 553-9.
 31. Kallioniemi OP, Visakorpi T, Holli K, Heikkinen A, Isola J, Koivula T. Improved prognostic impact of S-phase values from paraffin-embedded breast and prostate carcinomas after correcting for nuclear slicing. *Cytometry* 1991; 12: 413-21.
 32. Coon JS, Deitch AD, White RW, et al. Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. *Cancer* 1988; 61: 126-30.
 33. Schultz DS, Zarbo RJ. Comparison of eight modifications of Hedley's method for flow cytometric DNA ploidy analysis of paraffin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 291-5.
 34. Joensuu H, Alanen KA, Klemi PJ, Aine R. Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1990; 11: 431-7.
 35. Fallenius AG, Franzen SA, Auer GU. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphologic factors: a retrospective study of 227 consecutive cases. *Cancer* 1988; 62: 521-30.
 36. Stenkvist B, Bengtsson E, Eriksson O, Jarkrans T, Nordis B, Westman-Naser S. Histopathological systems of breast cancer classification: reproducibility and clinical significance. *J Clin Pathol* 1983; 36: 392-8.
-