

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)에 의해 유발된 랫드의 유선종양에서 DNA 배수성 양상

식품의약품안전청 국립독성연구소 병리부, ¹제주대학교 수의과대학
²서울대학교 수의과대학

강진석 · 안병우 · 김대중 · 김기석 · 남기택
한범석 · 배종희¹ · 박응복² · 장동덕

DNA Ploidy Patterns in Mammary Gland Tumors Induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in Rats

Jin Seok Kang, Byeongwoo Ahn, Dae Joong Kim, Ki Sok Kim
Ki Taek Nam, Beom Seok Han, Jong Hee Bae¹
Ung Bok Bak², and Dong Deuk Jang

*Department of Pathology, National Institute of Toxicology Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea*

¹*College of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea*

²*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*

DNA cytometry has frequently been used to characterize DNA ploidy pattern in relation to clinical and histopathological findings. Aneuploidy of tumor cells has been considered to be related with poor prognosis of patients. This study was carried out to examine the relationship between DNA ploidy patterns obtained by flow cytometry (FCM) & static cytometry (SCM) and histopathological observations of mammary gland tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rats. Eighteen from the total of 40 SD rats treated with DMBA (10 mg/kg) developed 39 tumor masses. Tumor incidence was 45.0% and tumor multiplicity was 0.97. Adenocarcinoma was most predominant subtype among DMBA-induced tumors. In 35 cases of malignant tumors, the incidence of aneuploid tumor was slightly higher in SCM than in FCM. In comparison of histopathological findings with DNA ploidy patterns aneuploidy was correlated with the grade of mitotic rate in malignant tumors ($P < 0.05$). Morphological parameters such as nuclear areas and perimeter of nuclei were increased tendency with aneuploidy. Our results suggest that increased tendency of malignancy might be correlated with the degree of aneuploidy in mammary gland tumors of rats.

Key Words: Rat, DMBA, Mammary tumor, Histopathological observation, DNA ploidy

서 론

암환자의 예후에 관한 정보를 알기 위한 방법의 하나로 종양세포의 DNA 함량을 측정하는데, 이 DNA 함량은 악성도를 진단하거나 예후를 판정할 수 있다고 알려져 있다.^{1,2)} 종양세포의 DNA 함량이 정상분포를 벗어나면 예후가 좋지 않으며, 세포의 증식성이 높아 악성의 지표가 될 수 있는 것으로 알려져 있다.³⁾ DNA 함량의 해석은 euploid와 aneuploid로 나누며, euploid라 함은 세포주기 G₀G₁에 해당하는 DNA 2배수 함량(2n)과 G₂M에 해당하는 DNA 4배수 함량(4n)과 이에 대한 배수성을 나타내는 정상적인 세포분화과정을 나타내는 것을 말하며, aneuploid라 함은 이런 정상적인 배수성을 벗어나 있는 상태를 일컫는다. Aneuploid peak를 기술하기 위해 보통 DNA index (DI)를 사용하는데 이는 DNA의 2배수에 해당하는 위치를 1로 정하여 비정상적인 배수성을 나타내는 위치의 상대적인 값을 표시하는 것이다. Diploid는 DI 1.0 ~ 1.1로 정의하고 aneuploid는 0.9 이하, 또는 1.2와 1.9 사이, 또는 2.2 이상에 위치하고 전체세포의 분포 중 10% 이상이 피크를 형성하는 것을 말한다.

DNA 배수성은 flow cytometer 혹은 영상분석기를 통해 측정할 수 있는데, DNA 배수성의 유형과 병리학적 진단을 병행하여 유방, 방광, 결장, 자궁경부, 난소 종양 등을 가진 환자의 예후 판정 등에 유용하게 사용될 수 있다고 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ Flow cytometry (FCM)는 다수의 세포를 신속하게 처리할 수 있고 세포내 DNA 함량의 측정과 함께 세포 표면 항원의 표현형 (cell surface antigen phenotype) 등을 검사할 수 있다는 장점도 있으나,⁷⁾ 모든 세포가 동시에 측정되고 near diploid population을 놓칠 수 있는 가능성이 있고, 종양세포와 비종양세포의 비율에 따라 DNA 배수성 양상이 달라질 수 있을 뿐만 아니라 경우에 따라서는 작은 DNA 배수성 피크가 감춰질 수 있으며 종양세포만의 형태학적 특성의 관찰이 불가능하다는 단점도 갖는다. 하지만, 영상분석기를 이용한 static cytometry (SCM)는 측정자의 의지에 따라 종양세포만을 선택적으로 구분하여 종양세포만의 배수성 판정을 할 수 있고 종양세포들에 대한 면적, 주위길이, 장경, 단경 등의 형태학적 변수를 비교할 수 있다. DNA 배수성이 정상을 벗어난 aneuploidy는 조직학적으로 미분화

도가 높을수록,^{8,9)} 종양의 크기가 클수록 또는 종양 stage가 진행될수록 빈번하게 나타난다.¹⁰⁾ 유선암에서는 DNA 함량을 해석하여 악성정도를 진단하는 보조 수단으로 사용하거나 환자의 예후를 판정하는데 이용하기도 하는데,¹¹⁾ aneuploid를 보이는 종양이 diploid를 보이는 것보다 종양의 재발생률이 높고 환자의 생존율이 떨어진다고 보고되어 있다.¹²⁾

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)로 유발된 랫드의 유선암은 사람의 유방암과 조직학적으로 유사하며,¹³⁾ DMBA 1회 경구투여에 의해 80 ~ 100%의 종양 발생률을 보이고 병리조직학적으로 선종 (adenoma), 섬유선종 (fibroadenoma), 선암종 (adenocarcinoma)의 형태를 나타낸다.¹⁴⁾

본 연구는 DMBA에 의해 유발된 랫드의 유선종양에 대하여 FCM과 SCM 기법으로 DNA 배수성 유형을 조사 비교하고, 이 DNA 배수성과 종양세포의 형태학적 특성과의 연관성 및 DNA 배수성과 영상분석기를 통해 산출된 세포의 계량형태학적 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 7주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen free) 암컷 Sprague-Dawley계 랫드 40마리를 본 실험에 사용하였으며, 온도와 상대습도가 각각 23±1°C, 55±5%로 유지되는 방에서 랫드용 케이지에 사육하였고, 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등)하에 음수와 사료는 자유로이 섭취하도록 하였다.

2) 시험물질 투여

화학 발암물질인 DMBA (Aldrich Chemical Co., USA)는 sesame oil (Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 랫드 체중 kg당 10 mg을 1회 경구 투여하였다.

3) 병리조직학적 검사

DMBA 투여 6개월 후에 모든 동물을 에테르 마취하에 부검을 실시하여 유선종양조직과 정상유선을 분리하였다. 분리한 조직은 병리조직학적 검사를 위해 10% 중성포르말린으로 24시간 고정 후 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하고 조직절편을 H&E 염색하였다. 조직학적 검사를 실시함에 있어서 종양의 형태학

적 특성을 소관형성(tubule formation), 핵다형성(nuclear pleomorphism), 유사분열률(mitotic rate)의 3가지로 조직학적 등급 판정의 기준을 삼았다. 소관형성의 경우 분명한 소관의 형성과 관강이 보이면 grade I, 뚜렷한 소관의 형성이 있으나 충실성 종양성장이 있으면 grade II, 소관의 형성이 거의 없으면 grade III로 분류하였다. 핵다형성은 핵의 크기와 모양에 따라 분류하여 핵의 크기와 모양이 일정하면 grade I, 핵의 크기와 모양의 극도의 변화는 없으나 약간의 변화가 인지되면 grade II, 뚜렷한 핵의 크기와 모양의 변화와 함께 크고 기이한 핵이 존재하면 grade III로 분류하였다. 유사분열률은 현미경 400배 시야에서 10개의 필드를 검사하여 총 핵분열상이 10개 미만이면 grade I, 10개에서 20개 미만이면 grade II, 20개 이상이면 grade III로 분리하였다.

4) DNA 배수성 검사

(1) 세포 부유액의 제조: Hedley등이 사용한 방법을 이용하여 파라핀에 봉입된 조직괴로부터 세포부유액을 만들었다.¹⁵⁾ 먼저 파라핀에 포매된 조직을 조직박절기(Reichert-Jung Co., Austria)로 50 μm 두께로 절편하고 xylene으로 파라핀을 제거하여 알콜로 함수과정을 거친 후 40 mM citrate buffer (pH 7.6)에 10분간 부유시켰다. 이어서 0.25% trypsin이 함유된 citrate buffer를 처치한 후 37°C에서 하루밤 방치하여 세포를 분리하였다. 세포분리를 용이하게 하기 위하여 가위로 잘게 잘라 주었다. 분리된 세포를 45 μm 구경의 nylon mesh로 여과하여 5% dimethylsulfoxide (DMSO)가 첨가된 citrate buffer (pH 7.6)에 부유시켜 세척 과정을 3회 이상 반복하여 세포 부유액을 얻은 후 이를 2개의 시험관에 분주시킨 후 하나는 flow cytometry 분석에 사용하였고 다른 하나는 static cytometry 분석에 사용하였다.

(2) Flow cytometry: 각 시험관 내의 세포수를 1×10^6 /ml개가 되도록 조정하여 최종 부유액 0.4 ml을 0.25% trypsin이 함유된 용액 1.8 ml에 10분간 처리하고 이어서 0.05% trypsin inhibitor와 0.01% RNase가 함유된 액 1.5 ml에 10분간 처리한 후 0.04% propidium iodide 1.5 ml에 20분간 처치하여 핵을 염색하였다. 유세포분석기(EPICS C/CS, Coulter Co., USA)를 사용하여 argon laser 하에서 5,000개 이상의 세포에서 propidium iodide의 형광발현을 측정하여 종

양의 DNA의 배수성을 검사하였다. 검사시 chicken RBC를 외부기준으로 사용하여 G₀G₁ 피크를 구하고 이 피크의 배수성 수치에 $\pm 25\%$ 에 해당하는 위치를 2C로 하고 이것의 두 배에 해당하는 위치를 4C로 정의하여 정상배수성에 해당하는 채널에 피크가 형성되는 것을 diploid peak로 정의하였다. Aneuploid는 적어도 전체 세포수의 10% 이상이 정상배수성을 벗어나는 위치에 피크가 형성되는 경우로 설정하였다.

(3) Static cytometry: 각 시험관내의 세포수를 2×10^4 /ml개가 되도록 조정하여 최종 부유액 2 ml를 cytospin (Shandon Co., GB)을 이용하여 poly-L-lysine 코팅된 슬라이드 위에 부착시킨 후 Feulgen 염색을 실시하였다. Feulgen 염색강도를 현미경 400배 배율에서 영상분석장치(Carl Zeiss Co., Germany)로 측정하였다. 염색표본을 영상분석기를 통해 핵의 영상을 분리하고 핵의 면적, 둘레 및 장경과 단경을 산출하고, 각 핵의 평균휘도(grey level of nuclei)와 세포가 없는 부분의 배경휘도(background grey level)를 구하여 아래와 같은 식에 따라 핵의 DNA 함량을 산출하였다.

$$DNA = \left(- \log \frac{\text{grey level of nuclei}}{\text{background grey level}} \right) \times \frac{\text{nuclear area}}{\text{area}}$$

정상 이배수성을 갖는 DNA 함량값을 구하기 위하여 각 슬라이드에서 30개 이상의 정상 림프구 또는 정상 간질조직세포를 측정하여 정상 DNA value의 평균을 구하였다. 이 값으로 G₀G₁ 피크를 구하고 이 수치의 $\pm 25\%$ 에 해당하는 위치를 2C로 하고 이것의 두 배에 해당하는 위치를 4C로 정의하여 정상배수성에 해당하는 채널에 피크가 형성되는 것을 diploid로 정의하였다. 종양시료에서는 종양세포를 200개 이상을 무작위로 선택하여 DNA 함량을 측정하였다. 여기서 정상적인 배수성을 나타내는 것을 diploid 종양으로 하였고, 적어도 전체 세포수의 10% 이상이 정상배수성을 벗어나는 위치에 피크가 형성되는 경우는 aneuploid 종양으로 분류하였다. 또, 영상분석기를 통하여 종양세포의 핵의 크기(nuclear area), 주위길이(perimeter), 장경(maximal diameter)과 단경(minimal diameter)을 측정하였다.

4) 자료의 분석



Fig. 1. The mammary gland tumor of the rat induced by DMBA shows adenocarcinoma lesions, composed of acini with irregular size and shape. H&E stain, $\times 100$.

FCM과 SCM 분석방법에서 진단에 따른 유의성 검정은 continuity adjust χ^2 test를 이용하였고 조직학적 등급에 따른 종양의 병리조직학적 양상은 Mantel-Haenszel χ^2 test를 이용하였다. DNA 배수성 양상과 핵의 형태학적 변량과의 유의성을 검정하기 위해 각 군간의 측정치에 대한 분석은 ANOVA test를 이용하였고 여기에서 유의성이 인정된 경우에는 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 각각의 검정에서 유의수준은 0.05를 채택하였다.

결 과

1) 종양발생 및 병리조직학적 검사

DMBA 투여군 40마리 중 종양이 발생한 랫드는 18마리이며 종양 수는 39개였다. 종양의 발생률은 45%이며 종양의 multiplicity는 0.97이었다. 종양이 발생한 18마리에 대한 종양갯수는 39개로 마리당 평균 2.16개의 종양을 갖고 있었다. 종양은 경부, 견갑부, 흉부, 복부 피하직에 분포하였다. 발생한 종양은 대부분 유허색조의 경도가 다양한 원형 또는 타원형이었으며, 크기는 직경이 0.8 cm에서 5 cm에 달하였다. DMBA 투여에 의해 발생한 종양 39예의 종양조직의 조직학적 검사 결과 선암종이 29예, 섬유선종이 4예, 편평세포암종이 3예, 유두암종이 3예로 선암종이 가장 많은 빈

도를 나타내었다. 선암종은 대부분의 경우에서 다양한 크기와 모양을 갖는 소관의 형성과 입방 혹은 원주상 피세포의 증식이 있었고 핵분열상도 다수 나타났다. 섬유선종은 증식된 상피세포들이 주위에 있는 섬유조직에 의해 잘 구획되어 있었다. 유두암종의 경우는 상피세포의 유두상 증식이 전반부에 걸쳐 나타났다. 편평세포암종의 경우는 상피세포가 중층편평상피의 분화양상을 나타내었고 각질진주의 형성이 관찰되었다. 관찰된 유선암종 가장 많이 나타난 선암종의 한 예를 Fig. 1에 나타내었다. 종양의 조직학적 등급판정을 소관형성, 핵다형성, 유사분열률의 3가지로 구분하여 실시한 결과 선암종의 경우 각 grade II에서 가장 높은 빈도를 나타내었다. 이에 대한 결과를 Table 1에 요약하였다.

2) DNA 배수성

발생한 종양 39예에 대하여 DNA 배수성 분석을 실시하였다. FCM과 SCM의 기법에 의해 얻은 DNA 배수성 양상은 Table 2에 나타나 있다. 양성종양 4예의 경우는 FCM, SCM 검사에서 모두 diploid를 나타내었다. 양성종양 35예 중 FCM에서는 28예에서 분석이 가능하였는데 diploid가 16예(57.3%), aneuploid가 12예(42.7%)로 분석되었다. 분석 불가능한 것이 7예가 있었는데 3예는 뚜렷한 G_0G_1 peak를 형성하지 않았으며

Table 1. Incidence of malignant mammary tumors of rat induced by DMBA by histologic grade

| Histologic classification | Number of tumor cases | Grade of tubule formation ^a | | | Grade of nuclear pelomorphism ^b | | | Grade of mitotic rate ^c | | |
|---------------------------|-----------------------|--|----|-----|--|----|-----|------------------------------------|----|-----|
| | | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| Adenocarcinoma | 29 | 3 | 25 | 1 | 5 | 17 | 7 | 10 | 12 | 7 |
| Papillary carcinoma | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Squamous cell carcinoma | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| Total number | 35 | 3 | 28 | 4 | 5 | 23 | 7 | 13 | 15 | 7 |

a: Grade of tubule formation is classified into three categories: grade I (tubules with clearly visible lumens are formed), grade II (definite tubule formation is seen in moderate amount but there are also areas of solid tumor growth) and grade III (little or no tubule formation). b: Grade of nuclear pleomorphism represent variability of both size and shape of the tumor nuclei, classified into three: grade I (nuclei show regular and little variation in size and shape), grade II (moderate variation in size and shape of nuclei) and grade III (marked variation, particular when very large and bizzare nuclei are present). c: Grade of mitotic rate represents total number of mitotic figure, sum in ten fields under the magnification of ×400 (I: <10, II: 10–19, III: >20).

Table 2. Ploidy patterns of flow cytometry (FCM) and static cytometry (SCM) in DMBA-induced mammary tumors in rats

| | | No. of samples | No. of ploidy examination | No. of diploid tumor | No. of aneuploid tumor |
|-----|-----------|----------------|---------------------------|----------------------|------------------------|
| FCM | Benign | 4 | 4 | 4 (100%) | 0 (0%) |
| | Malignant | 35 | 28 | 16 (57.3%) | 12 (42.7%) |
| SCM | Benign | 4 | 4 | 4 (100%) | 0 (0%) |
| | Malignant | 35 | 32 | 16 (50.0%) | 16 (50.0%) |

나머지 4예에서는 CV 값이 높아 분석에서 제외하였다. SCM의 경우 검사된 악성종양 35예 중 32예에서 분석이 가능하였는데 diploid가 16예로 50%, aneuploid는 16예로 50%를 나타냈으며 분석이 불가능한 3예에서는 뚜렷한 세포주기를 나타내는 피크를 형성하지 않았다. 이 분석에서 SCM의 경우 FCM보다 aneuploid의 비율이 조금 높게 나타났다. 두가지 분석방법에서 진단에 따른 유의성을 검정하기 위하여 Continuity Adjust χ^2 test를 실시한 결과 유의성이 관찰되지 않아서 두가지 방법은 서로 유사한 시험결과를 도출하였음을 확인하였다.

DNA ploidy histogram은 x축에 DNA 함량을 임의단위(arbitrary unit)로 표시하고 y축에 세포의 수를 표시하여 각 DNA 함량에 대한 세포의 분포를 나타내는 것인데, FCM의 경우에는 닭적혈구에 의해 정상 DNA 이

배수에 해당되는 위치를 선정한 후 시료를 flow cytometer로 측정하여 이배수체에 해당하는 위치를 G₀G₁ peak로 잡고 이 위치를 2C로 명명하며 이에 2배에 해당하는 위치를 G₂M peak로 정의하고 이 위치를 4C로 명명하였다. DNA histogram중 G₀G₁ peak와 G₂M peak 사이에 비정상적인 위치에 피크가 형성되어 이를 aneuploid 종양으로 분류하고 이의 한 예를 Fig. 2에 나타내었다. SCM의 경우에는 시료내의 정상임파구 및 간질세포를 사용하여 영상분석기로 측정하여 정상 DNA 2배수에 해당하는 위치를 2C로 하고 이에 두배에 해당하는 채널을 4C로 정의하여 이를 각각 2배체 DNA 함량을 갖는 G₀G₁ peak, 4배체 DNA 함량을 갖는 G₂M peak로 구분하고 이 사이에 위치하는 것을 S phase로 구분하였다. G₀G₁ peak와 G₂M peak 사이에 비정상적인 위치에 피크가 형성되어 이를

Table 3. Ploidy patterns by histological grade in DMBA-induced mammary tumors in rats

| Histologic findings of tumors | Grade of tumor | No. of diploid tumor | No. of aneuploid tumor | Significance |
|-------------------------------|----------------|----------------------|------------------------|--------------|
| Tubule formation | I | 1 | 1 | NS |
| | II | 12 | 14 | |
| | III | 3 | 1 | |
| Nuclear pleomorphism | I | 0 | 0 | NS |
| | II | 4 | 6 | |
| | III | 12 | 10 | |
| Mitotic rate* | I | 9 | 3 | P<0.05 |
| | II | 5 | 8 | |
| | III | 2 | 5 | |

*: Significantly different in ploidy pattern at P<0.05 (Mantel-Haenszel χ^2 test)

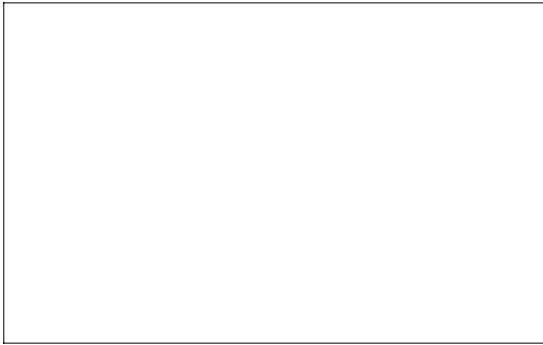


Fig. 2. Abnormal DNA stemline is found at the site of DNA index 1.57 in DNA histogram obtained by the method of FCM in one case of adenocarcinoma.

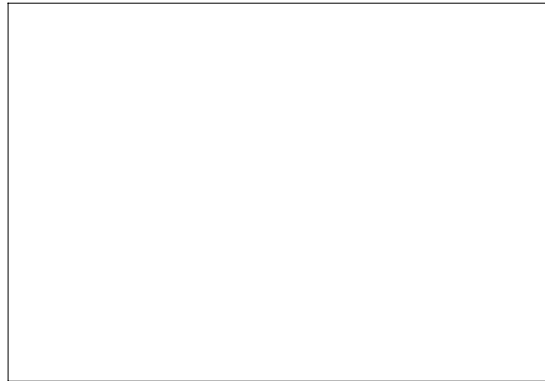


Fig. 3. Aneuploid peak located at the site of DNA index 1.52 indicates abnormal DNA stemline in DNA histogram obtained by the method of SCM in one case of adenocarcinoma.

aneuploid 종양으로 분류하고 이 중의 한 예를 Fig. 3에 나타내었다.

FCM과 SCM에 의해 얻어진 DNA 배수성 양상과 조직학적 소견과의 관계를 살펴보면 병리조직학적으로 양성인 경우에는 diploid 양상을 보이며 aneuploid 형태는 관찰되지 않았다. 또, 소관형성과 핵다형성에서 DNA 배수성 양상은 diploid 종양과 aneuploid 종양 사이에 유의성이 나타나지 않았다. 조직등급에 따른 유사분열률은 diploid 종양과 aneuploid 종양 사이에 유의한 차이를 보여서(Mantel-Haenszel χ^2 test, P<0.05), 유사분열률의 등급이 증가할수록 diploid 종양에 비해 aneuploid 종양의 빈도가 증가하는 경향을 나타내었으며 이 결과를 Table 3에 나타내었다.

영상분석기를 통해 얻어진 형태학적 변량과 DNA 배수성 양상을 비교하여 보면 핵크기, 핵주위둘레, 단경의 변량값에서 양성종양보다 악성종양의 경우 평균이 높게 나타났다. 또, aneuploid 종양의 경우는 diploid 종양에 비해 핵크기, 핵주위길이, 핵장경, 핵단경의 변량값의 평균이 모두 크게 나타났으나 각 변량값에 대한 두 군간에 유의성은 없었다. 이 결과를 Table 4에 나타내었다.

고 찰

DNA 배수성에 관한 초기 연구는 주로 분광측광현미경법(microspectrophotometry)을 이용하여 이루어져 왔

Table 4. Morphological parameters of rat mammary tumor cells by DNA ploidy patterns

| Morphological parameter | Ploidy pattern | | |
|--------------------------------|----------------|-------------|-------------|
| | Benign | Malignant | |
| | Diploid | Diploid | Aneuploid |
| Nuclear area (AU) ^a | 33.60±9.22 | 38.77±14.64 | 43.01±15.40 |
| Perimeter (AU) | 32.78±5.65 | 33.20±9.13 | 35.78±8.32 |
| Maxiaml diameter (AU) | 8.53±1.38 | 8.23±1.82 | 8.87±1.65 |
| Minimal diameter (AU) | 6.04±0.93 | 6.07±1.34 | 6.58±1.16 |

a: AU represents arbitrary unit.

다.⁴⁾ 이어서 flow cytometer와 영상분석기를 사용하여 종양조직의 DNA 함량, DNA 배수성 양상과 S phase 분획을 구하는 것이 시도되어 왔다.^{9,16)}

FCM 방법은 핵을 propidium iodide로 염색하여 레이저에 의해 산란된 빛을 분석하여 DNA histogram을 나타낸 것이다. 본 연구에서 FCM 분석시 이배수 DNA 함량을 구하기 위해 외부기준으로 Vindeløv 등의 방법¹⁷⁾에 따라 닭적혈구를 사용하였다. 여기서 파라핀 포매 조직에서 다른 재료를 처리할 경우 내부기준은 다른 염색정도를 보이며 일정한 G₀G₁ peak를 보이지 않는다는 Hedley 등의 연구¹⁵⁾에 기준하여 내부기준은 사용하지 않았다. SCM의 경우에는 종양내부의 있는 정상 임파구 또는 정상간질세포를 측정하여 이를 내부기준으로 사용하였다.

FCM을 검사법을 이용하면 세포표면 또는 세포내 항원 등을 조사하여 종양세포의 유용한 정보를 알아낼 수가 있다. SCM 방법은 핵의 크기, 형태, 염색질 형태, 핵소체 크기, 핵세포질비율을 연구하여 악성도 평가에 사용할 수 있다.¹⁸⁾ 이런 monoparameter 외에 면역조직화학반응에 대한 적절한 발색제를 선정하고 적절한 필터를 사용하면 특별한 세포의 항원 또는 종양 유전자를 정량분석할 수 있으며 이것을 DNA 함량과 비교하여 상관관계를 추정할 수 있다. 여기서 SCM법은 세포시료를 슬라이드 위에 단층을 형성시켜 현미경을 통해 영상을 포착하여 세포를 측정자가 임의로 선택하여 종양세포와 비종양세포의 DNA 배수성을 구분하여 측정할 수 있고 세포를 형태학적 특성에 따라 구분하여 각 세포에 따른 히스토그램을 작성할 수 있으며 각각 세포의 형태계측학적 변량을 동시에 측정하여 형태학적 변량에 대한 객관성 있는 기술을 부분적으로

가능하다는 장점을 갖는다.

Bacus 등은 유선종양조직을 동결절편하여 HER-2/neu protein을 면역염색하고 Feulgen 염색을 실시하여 이에 대한 영상 분석을 실시하여 두 번량에 대한 상관관계를 추정하였다.¹⁹⁾ 또한 특정 DNA 배수성 피크를 이루는 종양세포의 형태학적 특성을 규명할 수 있다.²⁰⁾ 최근에 사람의 유선암종에서 배수성과 cyclin D1의 발현을 검사하였는데 aneuploidy 종양중 70%가 cyclin D1의 강한 발현을 나타내어 cyclin D1의 과발현이 aneuploidy에 기여한다고 보고하였다.²¹⁾ 본 연구에서 SCM 분석에 의해 산출된 핵면적, 주위둘레, 장경, 단경의 평균이 diploid 종양보다 aneuploid 종양에서 증가하는 경향을 나타내었으나 군간의 유의성은 없었다. 종양세포의 크기와 모양이 다양하여 본 분석에 사용한 형태학적 인자와 DNA 배수성 양상과 관계는 규명하기가 어려웠다. 앞으로는 분자생물학적 기법을 사용하여 세포표면에 발현된 표지물질을 검출하여 이를 형태학적 인자와 동시에 분석하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

몇몇 시료의 경우에서 CV의 값이 높게 나타나 이를 분석에서 제외하였다. CV에 영향을 미치는 주요 요인으로는 Hedley 등이 지적한 조직의 고정제에 대한 문제가 있다.⁵⁾ 고정제로서는 중성포르말린 또는 formalin/acetic acid/acetone이 낮은 CV를 보이는 것으로 보인다. 또, CV 값에 영향을 미치는 요인으로 파라핀 절편의 두께의 문제를 들 수 있다. Kallioniemi는 파라핀 절편의 두께에 따른 영향에서 얇은 절편일수록 조직파편이 많이 생성되어 높은 S phase 분획을 보인다고 보고하였다.²²⁾ 높은 S phase 분획의 증가는 역시 비정상적 DNA 분포와 종양의 미분화와 연관되는 것으로 알려져

있다.¹⁶⁾ Hedley등의 연구에서 S phase 분획의 백분율이 종양의 grade와 환자의 생존율과 연관되는 것으로 나타났다.⁹⁾ 본 연구에서는 aneuploid 종양의 경우 FCM 기법을 사용하였을 때 S phase 분획이 정확하게 산출되지 못했는데, 이는 정상적 세포분획의 S phase 분획과 비정상적 세포분획의 S phase 분획이 겹쳐서 나타나기 때문이다. 또 본 연구에서는 산출된 S phase 값이 큰 차이를 나타냈다(data not shown). 이는 S phase 분획의 형태가 다양하여 기존의 계산방법으로는 상당한 오류가 발생하기 때문이다. Baisch등은 FCM 히스토그램의 분석방법에서 대부분이 G₀G₁ peak의 분획을 과대평가하고 S phase 분획을 과소평가한다고 하였으며,²³⁾ McGuire등은 FCM 히스토그램으로부터 S phase를 계산하는 프로그램의 오류를 지적하였다.¹⁶⁾ 정확하게 S phase 분획을 구하기 위해서는 DNA 히스토그램 상에서 산출하는 것 보다는 세포주기 표지인자를 사용한 biparameter analysis를 이용하는 것이 더욱 효과적일 것으로 생각된다. 세포주기 markers로는 ploidy, Brdu, ³H-thymidine, Ki-67, PCNA, cyclin 등이 있는데 Brdu, ³H-thymidine 방법은 S phase 만을 검출할 수 있다는 장점이 있으며, Ki-67, PCNA, cyclin은 증식성 인자에 대한 연구를 할 수 있는 장점이 있다.²⁴⁾ 앞으로는 DNA ploidy와 여러 세포주기 표지인자가 어떤 상관성이 있는지에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다. 또, SCM에서는 대다수의 예에서 DNA 히스토그램에서 뚜렷한 세포주기가 나타나지 않아 S phase 분획을 구하기 어려웠으며 여기서도 S phase 분획을 정확히 구하기 위해서는 S phase에 해당하는 세포만을 특수하게 염색하는 방법을 사용하여 이에 대한 영상을 정량분석하는 것이 효과적일 것으로 생각된다.

결 론

DMBA에 의해 유발된 랫드의 유선종양은 선암종이 가장 많았으며, DNA 배수성 검사 결과 양성 종양은 모두 diploid 종양을 나타내었고, 악성종양에서는 aneuploid 종양의 빈도는 FCM 결과 42.7%, SCM 결과 50%를 나타내어 FCM 기법을 사용하여 얻은 것 보다 SCM을 사용하여 얻은 것이 조금 높았다. 조직학적 검사와 배수성 양상을 비교해 본 결과 유사분열률의 등급이 높아질수록 aneuploid 종양이 더욱 빈발하는 것

으로 나타났다(P<0.05). DNA 배수성과 세포형태학적 특징은 핵면적과 핵주위 길이가 증가하는 경향을 나타내었다.

참고 문헌

- 1) Ewers S-B, Langström E, Baldetorp B, Killander D. Flow-cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. *Cytometry* 1984; 5: 408-419.
- 2) Bacus S. An optical microscope image analysis system with clinical applications. *Am Clin Products Rev* 1988; February: 26-31.
- 3) Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 1988; 62: 331-341.
- 4) Fossa SD, Thorud E, Vaage S, Shoaib MC. DNA cytometry of primary breast cancer. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A* 1983; 91: 235-243.
- 5) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6: 327-333.
- 6) Thorud E, Fossa SD, Vaage S, Kaalhus O, Knudsen OS, Börner O, Shoaib MC. Primary breast cancer: Flow cytometric DNA pattern in relation to clinical and histopathologic characteristics. *Cancer* 1986; 57: 808-811.
- 7) Lindahl B, Alm P, Killander D, Langström E, Trope C. Flow cytometric DNA analysis of normal and cancerous human endometrium and cytological-histopathological correlations. *Anticancer Res* 1987; 7: 781-790.
- 8) Mikel UV. Absolute DNA values from Feulgen microspectrophotometric measurements and quantitative electron microscopy. *Anal Quant Cytol Histol* 1987; 9: 13-16.
- 9) 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: 4729-4735.
- 10) Kallioniemi O-P, 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* 1987; 23: 277-282.
- 11) Erhardt K, Auer G, Fallenius A, Folin A, Forslund G, Silfverswärd C, Zetterberg A. Prognostic significance of nuclear DNA analysis in histological sections in mammary carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1986;

- 9: 117-125.
- 12) Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, Willig AJ, Los J, Peterse JL, Ruitenbergh HM, Schapers RF, Somsen JG, van Beek MW, Bellot SM, Fijnheer J, van Gorp LH. Prognostic value of DNA ploidy using flow cytometry in 1301 breast cancer patients: results of the prospective multicenter morphometric mammary carcinoma project. *Mod Pathol* 1997; 10: 762-768.
 - 13) Russo J, Russo IH. Development pattern of human breast and susceptibility to carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 1993; 3(Suppl.): 85-100.
 - 14) Steel VE, Monn RC, Lubet RA, Grubbs CJ, Reddy BS, Wargovich M, McCormick DL, Pereira MA, Crowell JA, Bagheri D, Sigman CC, Boone CW, Kelloff GJ. Preclinical efficacy evaluation of potential chemopreventive agents in animal carcinogenesis models: methods and results from the NIC chemoprevention drug development program. *J Cellular Biochemistry* 1994; 20(Suppl.): 32-54.
 - 15) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological materials using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.
 - 16) McGuire WL, Meyer JS, Barlogie B, Kute TE. Impact of flow cytometry on predicting recurrence and survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1985; 5: 117-128.
 - 17) Vindeløv LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for the flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323-327.
 - 18) Marchevsky AM, Gil J, Jeanty H. Computerized interactive morphometry in pathology: Current instrumentation and methods. *Hum Pathol* 1987; 18: 320-331.
 - 19) Bacus SS, Bacus JW, Slamon DJ, Press MF. HER-2/neu oncogene expression and DNA ploidy analysis in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 164-169.
 - 20) 김수성, 이재혁, 정상우, 유주용. 기관지암 세포의 DNA 배수성에 관한 화상분석학적 연구. *대한병리학회지* 1991; 25(3): 238-244.
 - 21) Collecchi P, Passoni A, Rocchetta M, Gnesi E, Baldini E, Bevilacqua G. Cyclin-D1 expression in node-positive (N+) and node-negative (N-) infiltrating human mammary carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 84(2): 139-144.
 - 22) Kallioniemi O-P. Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry* 1988; 9: 164-169.
 - 23) Baisch H, Beck HP, Christensen IJ, Hartmann NR, Fried J, Dean PN, Gray JW, Jett JH, Johnston DA, White RA, Nicolini C, Zeitz S, Watson JV. A comparison of mathematical method for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 1982; 15: 235-249.
 - 24) Schafer KA. The cell cycle: A review. *Vet Pathol* 1998; 35: 461-478.