대한세포병리학회지 제8권, 제1호
Korean J. Cytopathol. pp 20~26
Vol. 8, No. 1, June, 1997

체강삼출액의 진단에 있어서 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정의 유용성

국군중앙의무시험소 병리과 및 전남의대 병리학교실*

이 지 신 · 정 상 우*

= **Abstract** =

Diagnostic Value of Flow Cytometric DNA Analysis in the Evaluation of Effusions

Ji Shin Lee, M.D., and Sang Woo Juhng, M.D.*

Departments of Pathology, Military General Laboratory and
Chonnam University Medical School*

The specificity of cytologic examination in effusions is high but the sensitivity is low. Therefore, various ancillary methods for the detection of malignant cells in effusions have been proposed. The presence of an aneuploid cell population is generally considered diagnostic of malignancy.

The purpose of this study is to determine whether the routine use of flow cytometry adds to standard cytologic evaluation in effusions.

We did flow cytometric DNA analysis in 76 effusions(28 malignant and 48 benign fluids). All the 48 benign effusions were diploid. There were 12(42.9%) aneuploid and 16(67.1%) diploid malignant effusions. Based on these results flow cytometric DNA analysis had a sensitivity of 42.9% and a specificity of 100%.

These results suggest that flow cytometric DNA analysis may be a useful adjunct to conventional cytology, but its principal limitation is its relatively low sensitivity.

Key words: Flow cytometry, DNA, Effusion cytology

서 론

체강삼출액내의 악성세포 유무는 환자의 치료방침 결정과 예후판정에 중요한 역할을 한다[1-3]. 삼출액에 대한 세포학적 진단은 특이성은 높으나 민감성이 낮아 악성세포를 찾을 수 있는 부수적인 방법들이 개발되고 있다[4-6].

인체종양 대부분에서 보고되고 있는 염색체 이상은 비정상적인 DNA 함량을 의미하는데 이러한 비정상적인 DNA 함량은 악성의 증거로 사용되고 있다[7-9]. DNA 함량은 다수의 세포를 신속히 처리하며 DNA 함량 이외에도 핵의 크기 또는 세포의 다른 phenotype을 동시에 측정할 수 있는 유세포분석이 보편화되어 있다[10,11].

최근 체강삼출액의 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 악성을 확진할 수 있는 유용한 방법으로 대두되고 있으나[12-19] 국내의 연구는 드물다.

이에 저자들은 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 체강삼출액의 악성세포 진단에 도움이 되는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

전남대학교병원 해부병리과에 의뢰된 체강내 삼출액 중 세포학적 검사와 삼출액의 세포블록을 이용한 cytokeratin(CK), carcinoembryonic antigen(CEA), epithelial membrane antigen(EMA), fibronectin에 대한 면역조직화학적 검사를 병행하여 최종 진단된 76예를 연구대상으로 하였다.

2. 유세포분석에 의한 DNA 함량의 측정

세포학적 검사와 세포블록을 만들기 위해 사용하고 남은 체강삼출액 약 50ml를 25ml씩 2개의 원심분리관에 분주하여 1500rpm으로 20분간 원심분리하여 상청액은 버리고 침전물을 citrate 완충액으로 부유액을 만든 후 최종세포농도가 106/ml가 되게 하였다. 여기에 150×10^4/ml chicken RBC 50~100μl를 첨가한 후 trypsin으로 10분간 실온에서 부치시켰고, trypsin inhibitor와 RNAse로 10분간 실온에서 부치시킨 후, 0.416% propidium iodide와 spermine tetrahydrochloride로 20분간, 4℃ 암실에서 부치시켜서 Vindel φv 염색을 시행하였다[20].

염색된 표본을 15mW argon-ion laser가 부착된 FACScan(Becton Dickinson) 유세포분석기를 이용하여 DNA 함량을 측정한 후 DNA ploidy 유형을 분석 하였다. 측정시의 excitation wave length는 488nm이고 emission wave length는 585 nm이었다. 각 증례마다 20,000개 이상의 세포를 측정하였고 내부기준은 chicken RBC를 이용하였다. 24시간내에 측정을 원칙으로 하였고 즉시 측정이 어려울 때는 냉장보관을 하였다.

3. DNA histogram 분석

G0/G1 피크, S phase fraction 그리고 G2/M 피크로 구성된 single cell cycle의 소견을 보인 경우를 DNA diploidy라 하였고(Fig. 1), DNA aneuploidy는 비정상적인 "stem cell line"이 존재함으로써 적어도 두가지 이상의 분리된 G_0/G_1 피크가 나타나는 경우로 하였다(Fig. 2). 평균변이계수(coefficient of variation)는 표준편차를 평균치로 나눈값으로 산정하였다.

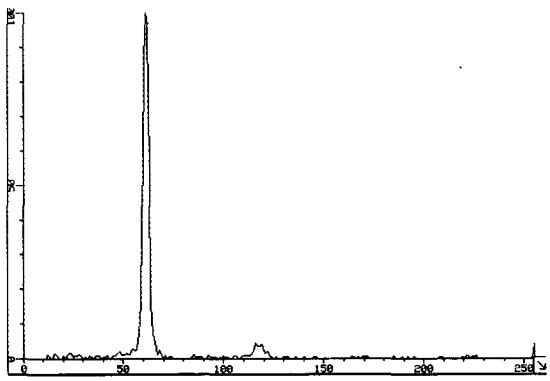

Fig. 1. DNA diploid histogram

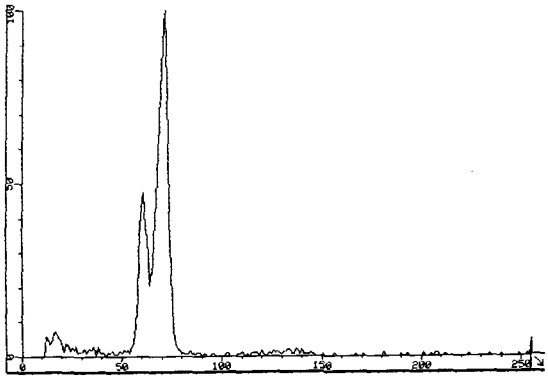

Fig. 2. DNA aneuploid histogram

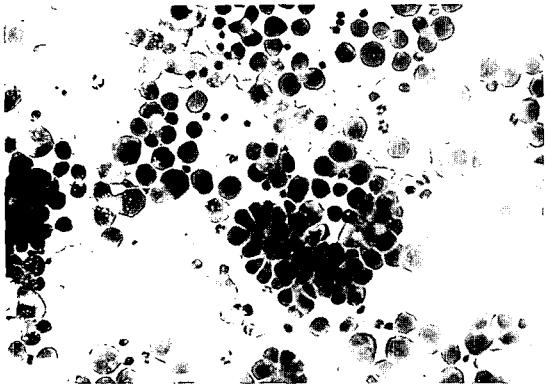

Fig. 3. Malignant pleural effusion from a pulmonary adenocarcinoma(Papanicolaou, ×400).

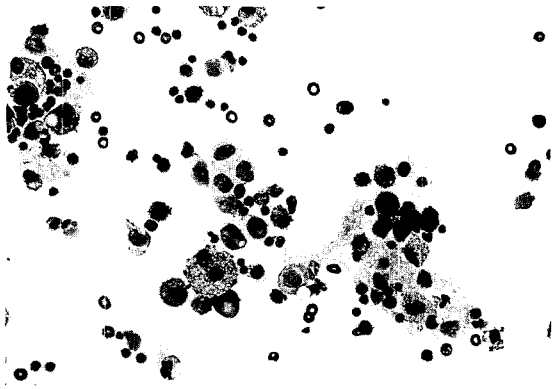

Fig. 4. Peritoneal effusion in cirrhosis. Many reactive mesothelial cells and inflammatory cells are noted (Papanicolaou, ×400).

상에서 양성이면서 동시에 fibronectin에 음성인 경우를 최종적으로 "악성"으로 진단하였으며, 세포학적으로 비전형적인 세포가 없고(Fig. 4) 세포블록의 면역조직화학적 염색상 CEA, EMA 음성이면서 fibronectin에 양성인 세포만이 관찰된 경우를 최종적으로 "양성"으로 진단하였다 21). 76예의 최종적인 진단은 28예가 "악성" 이었고 48예는 "양성"이었다. 최종적으로 "악성"으로 진단된 28예의 원발부위는 폐가 가장 많았다(Table 1).

결 과

1. 체강삼출액의 진단

검색대상 76예 중 흉강삼출액은 45예, 복강삼출액은 31예였다. 76예 중 환자의 병력상 조직학적으로 진단된 암종이 있는 경우는 50예이었고 악성기왕력이 없는 경우는 26예 이었다.

세포학적으로 악성세포의 형태학적 소견을 보이면서(Fig. 3) 이들 세포가 세포블록의 면역조직화학적 염색상 CK, CEA, EMA중 2개 이

Table 1. Origin of malignant effusions and results of flow cytometry

Origin	No. of cases	No. of cases of DNA aneuploidy(%)
Lung	12	5(41.7)
Gall bladder	1	0(0)
Stomach	10	5(50)
Rectum	2	1(50)
Ovary	3	1(33.3)
Total	28	12(42.9)

No: number

Table 2. Final diagnosis and results of flow cytometry

Final diagnosis	Flow cytometry	
	Aneuploidy(positive)	Diploidy(negative)
Malignant	12	16
Benign	0	48

2. 유세포분석 검사

검색대상 76예에서 모두 만족할 만한 DNA histogram을 얻었으며 평균 변이계수는 4.51±1.24이었다.

DNA histogram을 Jones 등[16]의 기준과 같이 aneuploidy인 경우는 양성(positive)으로, diploidy인 경우는 음성(negative)으로 정의하였다. 최종적으로 "악성"으로 진단된 28예 중 12예(42.9%)에서 aneuploidy가 관찰되어 양성으로 구분되었으며 의음성율은 57.1%이었다. 원발병소에 따른 양성 빈도는 원발병소가 위와 결장인 경우가 50%로 가장 높았다(Table 1).

최종적으로 "양성"으로 진단된 48예는 모두 DNA diploidy이어 모두 음성으로 구분되었고 의양성율은 0%이었다.

유세포분석에 의한 DNA 함량 측정은 체강내 삼출액의 악성세포를 진단함에 있어서 민감성은 42.9%, 특이성은 100%이었다(Table 2).

고 찰

체강내 삼출액의 세포학적 검사는 악성을 진단하는 유용한 방법이나 아직까지 높은 빈도의 의음성율을 보고하고 있다[15,18]. 이러한 이유는 첫째, 형태학적 소견만으로 악성과 양성세포를 구분하는 것이 힘들며 형태학적 소견의 해석이 세포병리의사의 경험과 지식에 의존하는 경향이 높기 때문이다. 둘째, 악성세포의 수가 적은 경우 정상세포 즉 염증세포나 반응성 중피세포 등에 의해 감춰질 수 있기 때문이다. 셋째, 세포상호간의 관계가 액체배양액(fluid medium)에서 대부분 상실되기 때문이다. 따라서 체강삼출액의 악성세포를 진단함에 있어 보다 객관적이며 민감성이 높은 방법이 요구된다[4-6].

최근 비정상적인 DNA 함량이 악성의 증거로 이용되고 있는데[7-9] 세포의 DNA 함량은 전통적으로 현미분광측정(microspectrophotometry)에 의해 측정되어 왔으나[22], 근래에는 유세포분석과 화상분석에 의한 측정이 보편화 되어있다[10,11].

유세포분석에 의한 DNA 함량 측정과 세포학적 검사 결과를 비교분석한 보고에 따르면 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 삼출액의 많은 부분에서 악성세포를 재현성있게 그리고 객관적으로 검출하는 능력이 있다고 한다[12-19].

그러나 대부분의 보고에서 의음성인 예가 관찰되었는데 그 비율은 0~79%까지 다양하였다[12-19,23]. 본 연구에서는 의음성율이 57.1%로 기존의 보고에 비해 비교적 높게 관찰되었다. 이러한 이유는 첫째, DNA histogram을 해석하는 기준이 보고자에 따라 다르기 때문이다. 본 연구에서와 같이 두가지 이상의 분리된 G0/G1 피크 만을 양성으로 판정한 경우에서는[16] 79%의 의음성율을 보고하였고 G2M phase 분획이 2.5% 이상이거나 diploid G0/G1 피크의 폭이 넓어진 경우 등을 양성의 기준에 포함시킨 보고에서는 본 연구보다 낮은 의음성율을 보고하였다[12]. 그러나 임의의 G2M phase 분획으로 악성과 양성을 구분하는 것은 주관적이기 때문에 보다 정확한 양성 판정기준이 확립되어야 한다고 생각된다. 둘째, 악성세포가 적은 경우 염증 혹은 다른 비종양성 세포에 의해 희석되어 유세포분석에서 diploidy 형태로 나타

날 수 있다는 점이다. 실제로 유세포분석에서 diploidy 형태가 세포를 직접보면서 종양세포만을 선택적으로 측정하는 화상분석상 aneuploidy 형태로 관찰된 예의 보고가 있다[13,15]. 셋째, 유세포분석에서 악성종양의 일부분은 diploidy인 점인데 고형성 종양을 대상으로 한 보고에서 일정비율의 diploidy를 관찰할 수 있었다[9,24]. 이러한 세가지 이유로 체강삼출액의 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정상 diploidy인 예가 출현할 수 있으므로 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 악성을 확진하는 절대적인 수단은 될 수 없다고 생각된다. 최근 선택적으로 종양세포만을 구분하여 DNA 함량 측정시 DNA aneuploiudy 빈도가 증가하였다는 보고가 있었는데[25] 이와같이 의음성율을 줄일 수 있는 방법의 개발이 추가로 필요하다고 생각된다.

한편 본 연구에서 유세포분석에 의한 DNA 함량 검사가 위양성인 예가 없어 100%의 특이성을 지니고 있었는데 이는 기존의 보고에 부합되는 소견이다[3,18,23,26]. 그러나 35% 정도의 높은 의양성율을 보고한 논문도 있다[19].

이상의 성적으로 체강삼출액의 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 악성세포를 인지함에 있어 도움은 되나 민감성이 낮아 진단에 단독 사용하기에는 제한이 있음을 알았다.

본 연구는 세포학적 검사와 세포블록에 대한 면역조직화학적 검사로 최종적으로 "악성"과 "양성"으로 진단된 예에서 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정의 유용성을 살펴보았다. 그러나 세포학적 검사소견만으로 진단된 예와 비교한 논문의[14,19,27] 경우 세포학적 검사상 음성, 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정상 양성으로 관찰된 예가 있었는데 이들 예의 대부분이 병력조사와 조직검사로 악성으로 확진되었다고 하였다. 따라서 세포학적 검사 단독인 경우보다 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정을 병행시 악성세포 인지율이 상승하였다고 보고하였다. 또한 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정은 임상분야에 중요한 정보를 제공할 수 있는데 난소암종이 있는 환자들의 복강내 삼출액을 대상으로 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정을 실시한 Rotmensch 등은[17] diploidy인 예가 aneuploidy인 경우보다 예후가 좋았다고 하였다. 따라서 체강내 삼출액의 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정은 낮은 민감성 때문에 진단에 단독 사용하기는 곤란하나 세포학적 검사와 병행시 보다 많은 정보를 얻을 수 있으므로 체강삼출액의 진단에 추천할 만한 검사라고 생각된다.

결 론

유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 체강삼출액의 악성세포 진단에 도움이 되는지를 알아보고자 하였다.

전남대학교 병원 해부병리과에 의뢰된 체강내 삼출액 중 세포학적 검사와 삼출액의 세포블록을 이용한 CK, CEA, EMA, fibronectin에 대한 면역조직화학적 검사로 최종 진단된 76예를 연구대상으로 하였다. 세포학적 소견과 면역조직화학적 소견을 종합하여 최종적으로 "악성"으로 진단된 경우는 28예, "양성"으로 진단된 경우는 48예 이었다.

최종적으로 "악성"으로 진단된 28예 중 12예(42.9%)에서 aneuploidy가 관찰되어 의음성율이 57.1%이었다. 최종적으로 "양성"으로 진단된 48예 모두에서 diploidy가 관찰되어 의양성율은 0%이었다. 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정은 체강내 삼출액의 악성세포를 진단함에 있어서 민감성은 42.9%, 특이성은 100%이었다.

이상의 성적으로 체강삼출액의 유세포분석에 의한 DNA 함량 측정이 악성세포를 인지함에 있어 도움은 되나 낮은 민감성 때문에 단독사용 사용하기에는 제한이 있음을 알았다.

참 고 문 헌

1. Creasman W, Rutledge F: The prognostic value of peritoneal cytology in gynecologic malignant disease. *Am J Obstet Gynecol* 110:773-781, 1971
2. Keettel W, Pixley E, Buchsbaum H: Experience with peritoneal cytology in the management of gynecologic malignancies. *Am J Obstet Gynecol* 120:174-182, 1974
3. Morrow CP, Bundy B, Kurman R, et al: Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 40:55-65, 1991
4. Dewald G, Dines DE, Weiland LH, Gordon H: Usefulness of chromosome analysis in the diagnosis of malignant pleural effusions. *N Engl J Med* 295:1494-1500, 1976
5. Singh G, Dekker A, Ladoulis CT: Tissue culture of cells in serous effusions: Evaluation as an adjunct to cytology. *Acta Cytol* 22:487-489, 1978
6. Whiteside TL, Dekker A: Diagnostic significance of carcinoembryonic antigen levels in serous effusions: Correlation with cytology. *Acta Cytol* 23:443-448, 1979
7. Barlogie B: Abnormal cellular DNA content as a marker of neoplasia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20:1123-1125, 1984
8. Barlogie N, Drewinko D, Schumann J, et al: Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 69:195-203, 1980
9. Frankfurt OS, Slocum HK, Rustum YM, et al: Flow cytometric analysis of DNA aneuploidy in primary and metastatic human solid tumors. *Cytometry* 5:71-80, 1984
10. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS: Biology of disease: Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 57:453-479, 1987
11. 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* 20:528-548, 1989
12. Stonesifer KJ, Xiang J, Wilkinson E, Benson NA, Braylan RC: Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids. *Acta Cytol* 31: 125-130, 1987
13. Schneller J, Eppich E, Greenebaum E, et al: Flow cytometry and Feulgen cytophotometry in evaulation of effusions. *Cancer* 59:1307-1313, 1987
14. Sinton EB, Carver RK, Morgan DL, et al: Prospective study of concurrent ploidy analysis and routine cytopathology in body cavity fluids. *Arch Pathol Lab Med* 114:188-194, 1990
15. Rijken A, Dekker A, Taylor S, Hoffman P, Blank M, Krause JR: Diagnostic value of DNA analysis in effusions by flow cytometry and image analysis: A prospective study on 102 patients as compared with cytologic examination. *Am J Clin Pathol* 95:6-12, 1991
16. Jones MA, Hitchcox S, D'Ascanio P, Papillo J, Tarraza HM: Flow cytometric DNA analysis versus cytology in the evaluation of peritoneal fluids. *Gynecol Oncol* 43:226-232, 1991
17. Rotmensch J, Atcher BW, Schwartz JL, Grdina DJ: Analysis of ascites from patients with ovarian carcinoma by cell flow cytometry. *Gynecol Oncol* 44:10-12, 1992
18. Huang MS, Tsai MS, Hwang JJ, Wang TH: Comparison of nucleolar organizer regions and DNA flow cytometry in the evaluation of pleural effusion. *Thorax* 49:1152-1156, 1994
19. Kehoe S, Ward K, Luesley D, Chan KK: The application of flow cytometric DNA analysis in detecting the presence of malignant cells in ovarian carcinoma peritoneal fluids. *Br J Obstet Gynecol* 102:656-659, 1995
20. Vindelφv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 3:323-327, 1983
21. Lee JS, Nam JH, Lee MC, Park CS, Juhng SW: Immunohistochemical panel for distinction carcinoma cells and reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 40:631-636, 1996
22. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MHN: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 44:397-400, 1984
23. Evans D, Thornthwaite J, Ng ABP, Surgarbaker E: DNA flow cytometry of pleural effusions: Comparison with pathology for the diagnosis of malignancy. *Analy Quant Cytol* 5:19-27, 1982
24. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al: Flow

cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43:3982-3997, 1983

25. Wright GL, Alexander JP, Konchuba AM, Schellhammer PF, Schlossberg SM: Flow cytometric DNA analysis after immunoselection of bladder tumor cells with monoclonal antibody DU 83.21. *Cancer* 66:1242-1252, 1990
26. Weissman GS, KcKinley MJ, Budman DR, et al: Flow cytometry: A new technique in diagnosis of malignant ascites. *J Clin Gastroenterol* 9:599-602, 1987
27. Zarbo R: Flow cytometric DNA analysis of effusions: A new test seeking validation. *Am J Clin Pathol* 95:2-4, 1991