

## 자궁경부암의 예후인자로서 DNA Ploidy와 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)에 대한 연구

순천향대학교 의과대학 산부인과학교실, 해부병리학교실\*  
심일구 · 남계현 · 이해혁 · 진소영\* · 이권해

= Abstract =

### The Study of DNA Ploidy and Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) as a Prognostic Factor in Uterine Cervical Cancer

Ill Goo Shim, M. D., Kae Hyun Nam, M. D., Hae Hyeog Lee, M. D.,  
So Yung Jin, M. D.,\* Kwon Hae Lee, M. D.

*Department of Obstetrics and Gynecology, anatomical pathology\**  
*College of Medicine, Soonchunhyang University*

**OBJECTIVE** : The objective of this study were to clarify the significance of PCNA and DNA ploidy as a possible parameter of the prognosis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix.

**STUDY DESIGN** : Women with the diagnosis of cervical cancer operated between January 1987, and July 1991, composed the study group(n=35) in this case-control group. Among these 35 patients. In these patients we chose the patients with complete follow up treatment. Also we employed 7 control paraffin-embedded cervical specimens without any specific pathologic lesions for the comparison. Immunohistochemical staining to identify PCNA was applied to case of paraffin section and PCNA indices was obtained. DNA analysis was done by using flow cytometry and S-phase fraction and DNA ploidy were obtained.

**RESULT** : The results were summarized as follows.

1. S-phase fraction were  $20 \pm 7\%$  in cervical cancer and  $16 \pm 11\%$  in control group. There were no statistical difference. Aneuploid ratio were 26%(9/35) in cervical cancer and

---

Key words : DNA ploidy, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Cervical cancer

0%(0/7) in control group. There were statistical difference. PCNA indices were  $45 \pm 6\%$  in cervical cancer and  $5 \pm 4\%$  in control group. There were statistical difference.

2. There were no statistical difference in PCNA indices between large cell keratinizing type, and large cell nonkeratinizing type of cervical cancer.

3. According to lymph node metastasis, there were no statistical difference in PCNA indices between positive group and negative group.

4. According to various pathologic parameters, recurrence rate was higher in cases of parametrial involvement.

5. The correlation of coefficient was 0.747 between PCNA indices and S-phase fraction. that is a significant relationship.

6. According to recurrence, there were no statistical difference in S-phase fraction, aneuploidy and PCNA indices between group of recurrence and no recurrence.

7. There were no statistical difference between  $<20\%$ , group and  $>20\%$ , group of S-phase, aneuploid and  $<60\%$ , group and  $>60\%$ , group of PCNA index in view of recurrence rate.

**CONCLUSION** : That is a significant relationship between S-phase fraction and PCNA indices. But, there are no statistical significance of PCNA indices, DNA ploid and a prognostic factor. So, that is a limitation in PCNA index DNA ploid when it was used as a prognostic parameter of uterine cervical cancer.

## I. 서론

자궁경부암의 예후인자는 임상적 병기가 가장 중요하며 같은 임상적 병기에서는 조직의 분화도, 조직형, 임파절의 전이유무 등이 중요하다. 현재까지 자궁경부암의 치료방침 및 예후측정에는 일반적으로 FIGO의 임상적 병기를 이용하고 있으나 최초의 보고들에 의하면 수술적 치료가 가능한 I기와 II기에 있어서는 이들의 예후가 다양하며 보편적으로 방사선치료에 대한 반응도가 다르다. 그러므로 자궁경부암의 치료적 예후에 영향을 미치는 여러 요소들에 대한 연구와 아직 발견되지 않은 예후인자 중 예측할 수 있는 인자를 찾고자 하는 노력이 많이 이루어지고 있다.

그 노력들로 최근에는 유식 세포 분석기(Flow cytometry)를 이용한 세포내 DNA의 양상과 FIGO 분류(1970년)의 자궁경부암 병기와 상관관계를 알아보아 그 예후와 치료에 DNA의 분석 결과가 어떤 이유를 갖는지 그 연관성을 알아보기 위한 연구가 진행되고 있고 조직의 증식 정도를 이용하여

예후를 예측하고자 하는 노력이 이루어지고 있다.

세포의 증식성을 보는 방법의 하나로서 proliferating cell nuclear antigen(이하 PCNA 라고 함)은 증식성 세포에서 표현되는 핵단백질 중의 하나로 1978년 Myachi 등<sup>1)</sup>에 의해 최초로 기술되었고 1987년 Prelich<sup>2)</sup>는 PCNA가 DNA 증식에 중요한 역할을 한다고 발표하였다.

PCNA는 분자량 36KD의 nuclear polypeptide로서 DNA polymerase- $\delta$ 에 대한 accessory molecule이며 반감기는 20시간 가량<sup>3)</sup>되는 핵단백으로 세포 분열시 세포 주기중 후기 G1-phase에 나타나기 시작하여 S-phase 때 최고에 도달하였다가 G2 및 M-phase에서 다시 감소하므로 세포의 증식능을 알 수 있는 지수로서 이용된다.<sup>4)</sup>

Robbins 등<sup>5)</sup>은 PCNA의 표현 정도가 조직형, 분화도, mitotic index 등과 밀접한 관계가 있고 PCNA의 염색 결과가 유세포분석 결과와 일치된다는 사실을 보고<sup>6)</sup>한 바가 있다. 이에 본 연구자는 자궁경부암에서 유식세포 분석기를 이용하여 암세포의 DNA를 분석하고 세포 증식 정도를 나타내는

PCNA 지수를 구하여 임상 병기, 연령, 암세포의 조직학적 특성들과의 상관관계를 비교하여 자궁경부암의 예후인자로서 임상적 유효성이 있는지를 알아보고자 본 연구를 시행하게 되었다.

## II. 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

1987년 1월부터 1991년 7월까지 서울 순천향대학교 부속병원 산부인과에서 자궁경부암으로 수술한 환자 중 추적 관찰이 잘 이루어진 35예를 대상으로 하였고 이 중에 20예는 수술 전 유도 항암화학요법을 받았다. 대조군으로는 양성 자궁경부조직 7예를 포함하였으며 적출된 조직의 포르마린 고정 파라핀 포매조직을 이용하여 후향적 연구를 시행하였다.

자궁경부암 환자의 평균연령은 45세(26-66세)였으며 FIGO 분류에 의한 병기별 분포는 Ib가 24예, IIa가 3예, IIb가 8예였고, 수술 후 추적 관찰한 중위 기간은 40개월이며 범위는 28개월에서 68개월이었다(Table 1, 2).

Table 1. Treatment modalities of the patients

	No. of patients
Operation*	20
Induction chemotherapy & operation**	15
Postoperative adjuvant radiation	24

\* Operation : Radical hysterectomy & lymphadenectomy

\*\* Induction chemotherapy : VBP regimen

Table 2. Characteristics of the patients

	No. of patients	Age		Stage			follow-up (months)	
		mean	range	Ia	Ia	Ib	mean	range
Invasive cervical cancer.	35	45	26-66	24	3	8	40	28-68
Control	7	40	34-46					

### 2. 연구방법

통상적인 방법으로 처리되어 보관된 파라핀 조직

표본은 재검색하여 종양을 확인 후, PCNA 항원 검색을 위해서는 5-6 $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 면역조직화학적 염색을 실시하였고 유식세포분석기에 의한 DNA 분석을 위해서는 종양세포를 구분하여 가능한 한 주변의 파라핀 조직이 첨가되지 않도록 선별하여 조직을 채취하였다. 대조군으로는 자궁경부 병변이 없었던 환자의 자궁경부 파라핀 고정조직을 대조군으로 이용하였다.

PCNA 항원에 대한 면역조직화학적 염색방법은 절편을 58 $^{\circ}$ C slide warmer에서 48시간 처리하여 탈파라핀하고, 100% 알콜부터 70% 알콜까지 다단계로 거쳐 합수시킨 다음 메탄올을 20분간 처리하여 내인성과산화 효소의 작용을 억제시켰다.

PCNA에 대한 단클론성 항체(Daco PC10)를 1:20으로 희석한 다음 실온에서 1시간 작용시키고 biotinylated rabbit anti-mouse 이차항체(1:400)를 30분간 반응 시킨 후 avidin peroxidase complex를 만들어 절편한 조직에 30분간 반응시켰다. 발색은 Amino Ethyl Carbazine(A.E.C) Chromogen을 사용하여 발색하였고, hematoxylin으로 15초간 대조 염색 후 탈수시킨 다음 봉입하였다.

PCNA 지수 산정에서 결과 분석은 1,000배 광학현미경하에서 핵내 진한 암갈색으로 분명히 염색된 것을 양성 반응으로 취급하였고, 5개 시야하에서 관찰되는 총 세포중 양성 반응을 보인 핵을 가진 세포들의 수를 세어 백분율을 계산하여 PCNA 지수로 하였다(Fig. 1, 2)

유식세포 분석기에 의한 DNA 분석을 위한 파라핀 고정 조직의 처리는 1983년 Hedley 등이 고안하여 일반적으로 널리 이용되는 방법을 약간 변형하여 사용하였으며 그 방법은 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 40 $\mu$ m thin slice section by microtome
2. Deparaffinization and Dehydration
3. 0.5% Pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 40 min
4. Phosphate buffer solution
5. 37 $\mu$ m Nylon mesh
6. 0.1% RNase+Propidium iodide, 21 hrs
7. 37 $\mu$ m Nylon mesh
8. Flow cytometric analysis

각 DNA 양은 5-W argon laser가 장착된 Coulter $\text{\textcircled{C}}$ , Epics $\text{\textcircled{C}}$ -C flow cytometry를 이용하여 측정

Fig. 1. The finding of routine H-E staining(left) and immunoreactivity for PCNA(right, ABC method, dark nuclear taining) in the uterine cervical cancer(100×)

Fig. 2. Immunoreactivity for PCNA in a few nuclei(left) and many nuclei(right) in the the uterine cervical cancer(1,000×)

하였으며 각 조직당  $14,300 \pm 3,200$ 개의 세포가 분석되었으며 변이계수(coefficient of variation)는  $4.9 \pm 0.9$ 이었다.

분석결과는 컴퓨터에 입력된 Software program을 통해 DNA histogram으로 그려지며 DNA 양은 상대 DNA 지수로 표시하였는데 정상 2 배체성 휴지기(diploid ho/G1)세포의 상대 DNA 지수를 1.0으로 하여 이곳에 DNA 정점을 보이는 종양을 2 배체성 종양(diploid tumor)이라고 하였고 그 외에 다른 DNA 정점을 가지는 종양을 비배체성 종양(aneuploid tumor)으로 판정하였다(Fig. 3).

여기에서 또한 DNA index, 각 세포 주기간의 비율(%G0-G1, %S, %G2+M) 등이 자동으로 계산되어 나타나며, 지표의 통계처리는 백분율 비율검정을 하였고 합성기 비율과 PCNA 지수와와의 관계는 회귀분석을 하였으며 재발에 대한 검정은 Kaplan & Meier에 의해 생존 곡선을 구한 후 log-rank test에 의해 비교하였다.

### III. 결 과

#### 1. 자궁경부암 환자와 대조군에서의 합성기와 비배수체의 빈도와 PCNA 지수 비교

자궁경부암과 대조군간 간에 합성기는 각각  $20 \pm 7\%$ 와  $16 \pm 11\%$  였고 비배수체는  $26\%(9/35)$ 와  $0\%(0/7)$ , PCNA 지수는  $45 \pm 16\%$ 와  $5 \pm 4\%$ 로 합성기는 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 비배수체와 PCNA 지수는 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Table 3).

#### 2. 암종의 자궁경부 침윤 정도에 따른 PCNA 지수의 비교

암종이 자궁경부의 벽을 절반 이하 침윤시와 절반 이상을 침윤하였을시 PCNA 지수는 각각  $44 \pm 18\%$ ,  $47 \pm 13\%$ 로 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 4).

#### Diploidy

% G0 - G1 = 78.37  
% S = 78.37  
% G2 + M = 78.37  
% CV = 78.37

#### Aneuploidy

% G0 - G1 = 84.88      72.11  
% S = 14.33      27.19  
% G2 + M = 0.77      0.69  
% CV = 5.58      5.23  
Peak = 96.80      225.5  
DNA index = 2.3

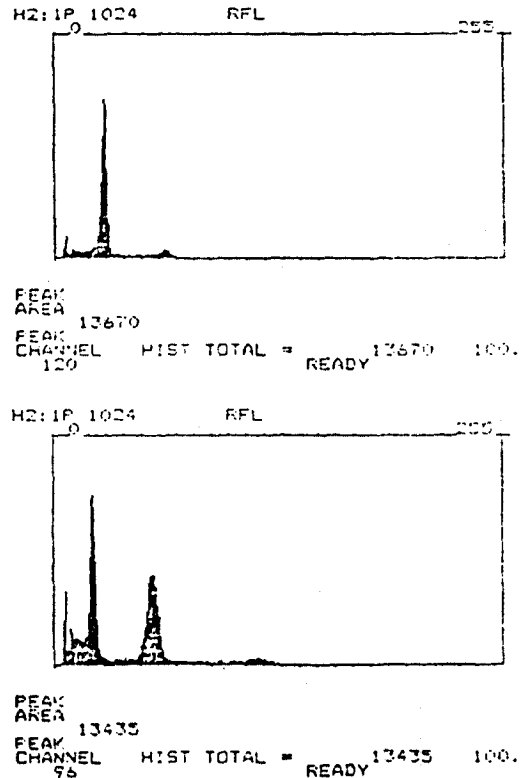


Fig. 3. Examples of flow cytometric analysis in uterine cervical cancer

Table 3. Incidences of S-phase, Aneuploidy and PCNA indices between cervical cancer and control group

	Cervical cancer(%)	Control (%)	P-value
S-phase	20±7*	16±11*	0.20
Aneuploidy	26(9/35)	0(0/7)	0.05
PCNA index(%)	45±16*	5±4*	0.01

\* Mean±1SD

Table 4. PCNA indices according to the depth of invasion

	the depth of invasion		P-value
	<1/2	>1/2	
PCNA index(%)	47±13*	43±20*	0.53

\* Mean±1SD

### 3. 임파절 전이유무에 따른 PCNA 지수의 비교

임파절 전이가 없었던 예와 있었던 예에서 PCNA 지수는 각각 47±13%, 43±20%로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 5).

Table 5. PCNA indices according to status of lymph node metastasis

	negative	positive	P-value
PCNA index(%)	47±13*	43±20*	0.53

\* Mean±1SD

### 4. 병리학적 인자(pathologic factors)에 따른 재발률 비교

이들 조직소견에 따른 재발률을 종합하여 비교하여 보면 임파절 전이시, 조직형 중 비각화 대세포형, 중앙침윤이 절반 이상시, 임파혈관계 침윤시 재발이 많은 양상이나 통계적으로 재발률에 차이를 보이는 것은 자궁방결합 조직 침윤유무였다(Table 6).

### 5. 자궁경부암 환자에서 합성기와 PCNA 지수와 의 상관관계

합성기와 PCNA 지수와 의 상관관계를 회귀분석을 통하여 구해본 결과 Correlation of coefficient(R)

Table 6. Recurrent rate according to pathologic parameters.

Pathologic parameters	No. of Pts.	Recurrent rate(%)	P-value
Lymph node invasion			0.12
Absent	21	14	
Present	14	36	
Cell type			0.17
Large, nonkeratinizing	22	27	
Large, keratinizing	13	8	
Parametrial involvement			0.03
Absent	30	17	
Present	5	60	
Depth of cervical involvement			0.32
<1/2	9	11	
>1/2	26	27	
Lymphatic & Vascular invasion			0.19
Absent	24	17	
Present	11	36	

은 0.747(P<0.05)으로 상관관계가 있었고 PCNA 지수를 독립변수(X)로, 합성기를 종속변수(Y)로 하여 구한 식은  $Y=0.28X+8$ 으로 양의 상관관계가 있었다(Fig. 4).

### 6. 재발하지 않은 군과 재발한 군에서의 PCNA 지수와 합성기 및 비배수체 유무의 비교

재발하지 않은 군과 재발한 군에서 합성기 비율은 22±4% 및 15±10% 비배수체의 빈도는 26% 및 25% PCNA 지수는 각각 45±17%와 41±10%로 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table. 7).

### 7. 합성기 비율 및 PCNA 지수를 이용한 예후 비교

합성기 비율을 20% 이상군과 이하군으로 나누어 재발유무를 비교하여 보았으나 통계적인 차이는 없었고 비배수체 유무에 따른 재발률 비교에도 통계적인 차이가 없었으며 PCNA 지수를 60% 이상군과 이하군으로 나누어 재발유무를 비교하여 보아도 통계적인 유의한 차이가 없었다(Fig. 5-7).

## IV. 고 찰

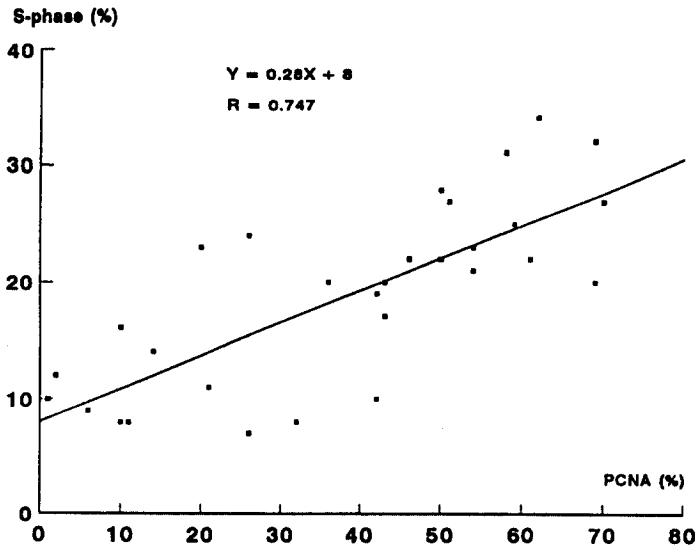


Fig. 4. Correlation between PCNA staining and S-phase fraction

Table 7. Incidences of S-phase, Aneuploid and PCNA indices according to recurrence

	no recurrence(%)	recurrence(%)	P-value
S-phase	22±4*	15±10*	0.53
Aneuploidy	26(7/27)	25(2/8)	0.74
PCNA index(%)	45±17*	41±10*	0.62

\* Mean±1SD

자궁경부암은 한국의 여성에서 발생하는 악성 종양 중 발생빈도가 가장 높은 질환으로 최근에는 자궁경부암 조기진단에 대한 인식 확대로 비침윤성 부위의 조기 발견율이 높으며 이에 따른 적절한 치료로 침윤암으로의 진행을 방지할 수 있어 그 발생빈도는 점차 감소되었으나 아직까지도 여성 악성 종양 중 최고의 비율을 차지하고 있다.

자궁경부암의 악성 변화의 진행과정을 살펴보면 그 첫 단계가 자궁경부 상피세포에 현미경학적 전암 변화가 일어나 이것이 완만한 진행을 하여 상피내암으로 되고 다시 침윤성 암으로 진행되어 간다.

현재까지 자궁경부암의 치료 방침 및 예후측정에는 일반적으로 FIGO의 임상적 병기를 이용하고 있으나 최근의 보고들에 의하면 수술적 치료가 가능한 I기와 II기 초기에 있어서도 이들의 예후가 다양하며 보편적으로 방사선치료가 시행되고 있는 III기

말기 이상의 환자에서도 방사선치료에 대한 반응도가 다르다. 자궁경부암의 치료적 예후에 영향을 미치는 여러 요소들에 대한 연구와 아직 발견되지 않은 예후인자 중 예측할 수 있는 인자가 있는가에 대한 연구가 진행되고 있다.

자궁경부암에서의 예후인자(prognostic factors)로는 병리조직적(histopathological type) 소견, 병변의 크기(tumor size), 임파절 침범유무(lymph node involvement), 임파-혈관계 침범(lymphatic vascular permeation), 자궁방 결합조직의 침윤(parametrial involvement) 등을 들 수 있으며 병기(stage)가 가장 중요한 인자로 인식되고 있다.

저자들도 이런 사항에 중점을 두어 DNA ploidy와 합성기에 있어서의 PCNA 지수를 구해 자궁경부암의 예후인자로서 어떠한 의의가 있는지 그 중요성과 임상적 의의를 알아보려는 시도를 하였다.

Friedel 등<sup>7)</sup>은 자궁경부암에 있어서 초기에 암세포의 혈관내 침입여부와 임파선 전이유무가 예후에 영향을 미쳐 초기에 암세포가 혈관 내에 침입하는 경우와 임파선 전이시 비록 같은 병기라도 예후가 나쁘다고 하였고, Reagen 등<sup>8)</sup>은 조직병리학적으로 세포의 분화도의 정도와 기질의 암침윤 깊이 및 임파선 전이유무에 따라 예후가 달라진다고 하였다. Stanhop 등<sup>9)</sup>은 환자의 연령이 아주 낮거나 증가할수록 자궁경부암의 예후가 나쁘다고 하였으며 최근

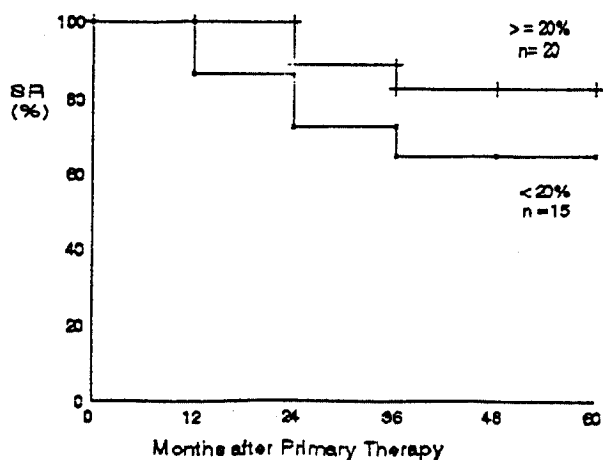


Fig. 5. Absolute recurrence free survival rate according to the S-phase fraction

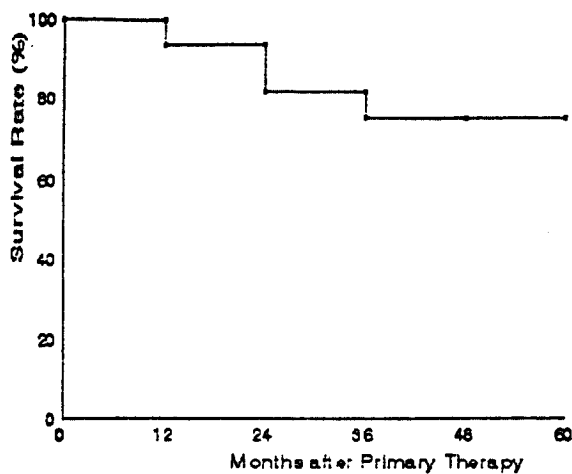


Fig. 6. Absolute recurrence free survival rate according to the presence of Aneuploidy

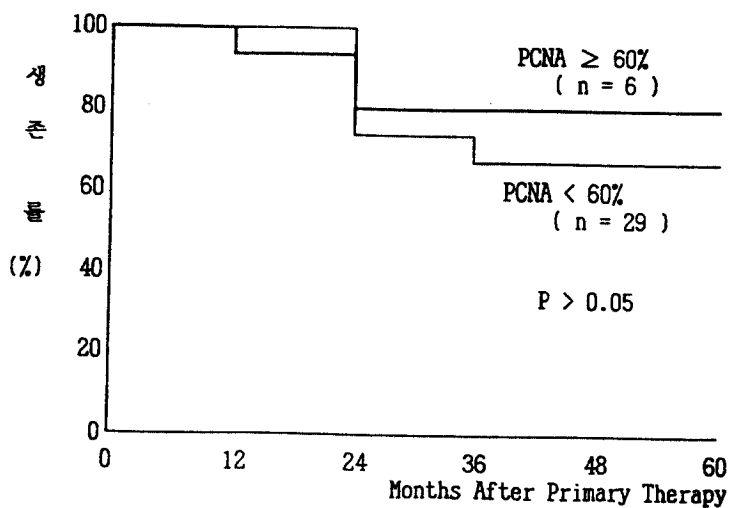


Fig. 7. Absolute recurrence free survival rate stratified by PCNA index [ $<60\%$  (n=6) vs  $>60\%$  (n=29)]



Stendahl 등<sup>10)</sup>은 세포의 조직학적 형태, 세포핵의 다형성, 세포의 분열정도, 침윤의 형태 및 정도, 세포의 반응도 등을 도입한 점수제를 이용하여 이들의 예후를 보다 더 정확하게 알아내려고 노력하였다.

또 한편으로는 악성 종양의 활성에 따라 증가하는 다양한 종양표지물질들을 자궁경부암의 진단과 예후 판정에 이용하려는 연구가 진행되어 Barrelet 등<sup>11)</sup>은 CEA를, Donaldson 등<sup>12)</sup>은 CEA,  $\beta$ -hCG, AFP 등의 종양표지물질이 자궁경부암의 병기와 예후에 상관관계가 있음을 보고하였다. 그럼에도 불구하고 이러한 요소들은 병리조직학적 판정 및 점수제들이 각 연구기관마다 그 기준이 상이하고 특히 점수제에서 중등도의 변화를 보이는 경우에 이것이 암의 생물학적인 특성을 대변할 수 있느냐 하는 문제점이 대두되고 종양물질의 경우에도 이것이 자궁경부암에 대한 특이성 및 정상 상환값의 정도에 따른 위양성의 폭이 문제로 제기되고 있다.

PCNA 염색은 다른 세포증식능 검사에 비해 세포 및 조직의 유지가 좋고, 간편하며, 방사선 피해의 위험이 없는 장점이 있으나 PCNA 판독시에는 주의할 점이 있다. Autoradiography와 비교시 성장비율이 높게 평가된다고 알려져 있으며,<sup>13)</sup> PCNA 양성반응을 보인 세포에서 3H-thymidine 검사시 음성으로 나타나는 일이 있다고 보고하고 있다.<sup>14)</sup> 또한 절단부위에 따라 양성도에도 차이가 날 수 있고, 이러한 이유는 PCNA 단백질의 반감기가 20시간이므로 최근에 분열이 끝난 세포에서도 반응이 일어난다고 알려져 있으며, 비정상적인 성장인자의 발현에 기인할 수 있다고도 알려져 있다.<sup>15)</sup> 휴식기의 세포는 분열세포에 비해 PCNA의 농도가 10% 정도 이어서 보통의 경우에는 반응이 일어나지 않으나 반응 시간을 길게하면 나타나는 것을 보고하기도 하였다.<sup>3)</sup> 또한 분열하고 있는 세포의 주위 정상 세포에서도 PCNA의 과발현이 보고되는 것은 이것은 autocrine 또는 paracrine 작용이 있는 것이 아닌가 추측하였다.<sup>16)</sup>

세포증식능의 평가 방법 종류로서 유식세포분석기를 이용한 분석결과와 PCNA 분석 및 thymidine labelling, Ki-67 면역화학염색 등 서로 밀접한 상관이 있는 것으로 알려져 있으나, 종양에 따라서 서로 상이한 결과를 보고하기도 한다.<sup>17-19)</sup> 강 등<sup>20)</sup>의 결과에서는 정상자궁조직 및 자궁경부암에서 PCNA

지수가 각각 28%, 71%로서 본 연구의 PCNA 지수보다 높은 수치를 보여주었다. 본 연구에서도 자궁경부암 환자와 대조군 간의 PCNA 지수는 평균 45%와 5%로 자궁경부암에서 현저히 증가되었고 통계적인 유의성이 있었으므로 다른 보고와 일치한 소견을 보여주어서 양성과 악성간에 PCNA 지수가 유의하게 차이를 보여줌으로 PCNA 지수는 양성과 악성의 감별에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료되며 저자에 따라 PCNA 지수가 차이가 있는 것은 염색시의 조건에 따라서 변할 수 있는 것에 기인하는 것으로 생각된다.

자궁경부암에서는 보고가 없으나, 자궁내막암에서는 PCNA 지수가 높을 경우 재발이 높은 것으로 보고하였으나,<sup>21)</sup> 본 연구에서는 재발군과 비재발군에서 PCNA 지수를 비교시 통계적인 차이를 보이지 않았으며, PCNA 지수를 기준으로 60% 이상 군과 이하 군으로 재발률을 비교시 재발률의 차이를 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 자궁경부암에서 병기가 올라갈수록 PCNA 지수의 변화가 없다는 보고와 일치하고 있다.<sup>20)</sup>

또한 최근에는 의용전자공학의 발달에 의해 유식 분석기에 의한 세포내 DNA의 양상을 임상에서 손쉽게 알 수 있게 되어 이를 이용한 자궁경부암 환자들의 병기에 따른 DNA 양상과 이들과 자궁경부암 예후와의 연관성, 다른 요소들과의 상관관계들이 부분적으로 알려지고 있다.

정상인체의 체세포는 46개의 염색체를 가지며 이 염색체의 수가 46보다 작거나 많은 경우 비배수체라고 한다. 그런데, 흥미로운 것은 인체 여러 기관의 암에서, 특정 염색체의 이상과 비배수체가 다양한 빈도로 발견된다. 그러나 고형암에서부터 적절한 염색체의 배열을 얻기는 쉽지 않으며 단지 10-20%의 경우에서 해석할 수 있을 정도의 염색체 배열을 얻을 수 있을 뿐이다. 그러므로 단지 중기세포에서만 염색체 분석이 가능한 기종의 배양에 의한 세포 유전학적인 분석은 자궁경부암을 비롯한 인체의 다양한 고형암에 일괄 적용하기에는 어려운 점이 있다. 이에 최근 개발된 유식세포분석기의 도입으로 신선한 조직(fresh tissue)이나 파라핀 고정조직(paraffin-embedded tissue) 등 어느 표본에서나 종양의 증식력에 관계없이 일정한 세포집단에서의 DNA 양을 정량분석 할 수 있게 되었으며 이를 통해 비

배수체(aneploid)의 유무와 그 정도를 빠르고 정확하게 판정할 수 있게 되었다.

또한 여기에서 컴퓨터를 이용하여 종양세포의 각 세포주기, 휴지기(Go/G1 phase), 합성기(S-phase), 및 분열기(G2/M phase) 등 각 주기에 해당하는 세포 집단의 수를 산출함으로써 결과를 쉽게 얻을 수 있게 되었다. 이러한 유식 분석기는 단일세포의 현탁액을 만든 후 1초에 약 1,000개의 세포가 감지부위를 통과하게 하여 이때 분산되는 빛이나 형광물질을 흡수하여 DNA를 측정<sup>22)</sup>하게 되며 이러한 세포들은 분석 전에 결과를 DNA histogram으로 볼 수 있다.

유식세포분석기의 S-phase 비율을 이용한 세포 증식능 검사시 조직형에 따라 PCNA 지수의 변화를 보고하고 있고 본 연구에서도 S-phase 비율과 PCNA 지수는 양의 상관관계를 나타내었고, 조직의 분화가 나뉠수록 PCNA 지수가 높아진다고 보고하였으나<sup>6)</sup> 본 연구에서는 조직형이나 임파절의 전이에 따른 PCNA 지수에는 통계적 차이가 없었다.

유식세포분석기를 이용한 분석과 조직병리학적 소견 사이에 있어 비배체성 종양의 발생빈도는 세포분화 정도와는 차이가 없는 것으로 나타나 Strang,<sup>23)</sup> 나 등<sup>24)</sup>의 연구와 같은 결과를 나타내었다.

Hanselaar 등,<sup>23,25-28)</sup> 많은 연구가들이 유식세포분석기를 이용하여 침윤성 자궁경부암의 33-80%에서 Aneuploid의 존재를 보여주었지만 DNA ploidy를 하나의 독립된 예후인자로 보기에는 부정적이었고 비록 일부 연구<sup>29,30)</sup>에서 Aneuploid와 임파절 침범 등, 나쁜 예후를 나타내는 인자들과 관계가 있음을 보여주었으나, 유식세포분석기를 이용하여 임상적으로 DNA ploidy의 의미를 증명해 보이지 못했다. Ivan 등<sup>31)</sup>은 유식세포분석기를 이용하여 구한 DNA ploidy와 합성기 비율이 자궁경부암의 예후인자로서의 효용성이 없다고 하였고 이것은 본 논문의 결과와도 일치하였다.

DNA 각 세포주기 중 세포의 증식능력을 가장 잘 반영하는 S-phase의 비율이 20% 이상군과 이하군으로 나누어 조사시 재발률에 차이를 보여주지 못하여서, 다른 저자와 일치하지 않은 결과를 보여주었다. Barlogie 등<sup>32)</sup>은 종양에서 비배수체가 있을 때 재발률이 높다고 하였으나 본 조사에서는 통계적으로 재발률의 차이를 보여주지 못하였다. Fu 등<sup>33)</sup>은

비배수체율이 자궁경부암의 병기와 상관관계를 보이지 않았으며 본 연구에서도 자궁경부암의 여러 예후인자와 상관관계를 보이지 않아 같은 결과를 나타내었다.

Jakobson은 상피내암의 분석에서 중등도의 이형성이나 0기암에서는 대부분 비배수체를 보인 반면 경등도의 이형성에서는 대부분 배수체를 보임을 보고함으로써 종양의 세포 병리학적인 분석에 유식세포 분석기가 보조적으로 유용한 방법이 될 수 있다고 주장하였다.<sup>34)</sup> 즉, 비배수체의 존재는 침윤성 암으로의 이행 가능성이 높은 것을 의미하며 따라서 비배수체 형태를 보이는 병변은 침윤성 암의 전구 단계로 간주되어야 할 것이라고 제안하였다. 본 연구에서는 제외되었으나 앞으로 신중히 연구하여 추적, 검토할 필요가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 자궁경부암 근치 수술 후 알 수 있는 조직학적 예후인자에 비교하여 유식세포 분석에 의한 세포 증식능과 PCNA 지수의 예후인자로서의 가치는 제한적인 것으로 사료되며, 앞으로 Ki-67, oncogene 등의 연구와 병행하여 검사시 유용성이 증가될 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 자궁경부암 환자에서 유식세포 분석기에 의한 DNA 분석결과 및 암조직에 PCNA 염색을 시행하여 얻은 PCNA 지수를 산출하여 여러 임상적 예후와의 관계를 알아보기 위하여 1987년 1월부터 1991년 7월까지 순천향대학교 부속병원 부인과에서 자궁경부암으로 입원하여 자궁경부암 근치수술 후 추적관리가 이루어진 35명의 자궁경부암 환자와 병변이 자궁경부에 없었던 대조군 7명을 대상으로 하여 연구를 시행, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 자궁경부암 환자와 대조군에서 합성기의 발생빈도는 양군에서 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며 비배수체는 자궁경부암에서만 26%에서 발견되어 통계학적인 차이를 보여 주었고 PCNA 지수는  $45 \pm 16\%$ ,  $5 \pm 4\%$ 로 통계학적으로 유의한 차이를 보여 자궁경부암 환자의 조직세포에서 세포증식이 높은 것으로 나타났다.

2. 자궁경부 침윤 정도에 따른 PCNA 지수는 자

궁경부를 반이상을 침윤하였을 때와 반 이하로 침윤하였을 때를 비교하여 보았을 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

3. 임파절 전이유무에 따른 PCNA 지수는 임파절 전이가 있었던 환자에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

4. 몇 개의 병리학적 인자에 따른 재발률을 비교해 본 결과 자궁방 결합조직의 침윤이 있었던 경우의 재발률이 통계적으로 유의하게 높았다.

5. 자궁경부암 환자에서 PCNA 지수와 합성기비율과의 관계는 통계학적으로 유의있는 양의 상관관계가 있었다.

6. 재발한 군과 재발하지 않은 군에서의 합성기 비율이나 비배수체의 빈도, PCNA 지수는 통계적인 유의성이 없었다.

7. 합성기 비율 20% 이상군과 이하군으로 나누어 재발률을 비교하여 보았으나 차이가 없었고 비배수체의 유무에 따른 재발률 비교시도 차이를 발견할 수 없었으며 PCNA 지수를 60%를 기준으로 하여 재발률을 비교하여 보았으나 통계적인 차이를 발견할 수 없었다.

본 연구의 결과로 볼 때 유식세포 분석기에 의한 DNA 양상의 분석 및 PCNA 지수를 이용, 자궁경부세포 증식성을 파악하여, 질환의 예후를 예측하고자 시도하였으나 임상적 예후인자로서는 제한적인 것으로 사료되었다.

## - References -

1. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM : Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121:2228-2234.
2. Plerich G, Kostura M, Marshak DR : The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* 1987;326:471.
3. Bravo R, MacDonald-Bravo H : Existence of two populations cyclin/PCNA during the cell cycle ; association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987;105:1549-1554.
4. Celis JE, Celis A : Cell cycle dependent variation in the distribution of the nuclear protein cyclin proli-

ferating cell nuclear antigen in culured cell : Subdivision of S-phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3262.

5. Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM : Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol lab Med III* : 1987;841.
6. Yu CCW, Christopher DM, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA : A comparison of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining, nuclear organizer region(AgNor) staining, and histological grading in gastrointestinal stomal tumors. *J. of Pathol* 1992;166:147-152.
7. Friedel GH, Steiner G & Kistner RW : Prognostic value of blood vessel invasion in cervica cancer. *Obstet Gynecol* 1967;29:855-857.
8. Reagen JW & Wentz WB : Genesis of carcinoma of the uterine cervix. *Clin Obstet Gynecol* 1976;10: 883-885.
9. Stanhop CR, Smith JP, Taylor IW, Rutledge FN, Fletcher GH, Gallager HS : Carcinoma of the cervix. The effect of age on survival. *Gynecol Oncol* 1980;19:188-189.
10. Stendahl U, Eklund G & Willen R : Prognosis of invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. A comparative study of the predictive value of clinical stage Ib-III and a histopathologic malignancy grading system. *Int J Gynecol Path* 1983;2: 42-44.
11. Barrelet V & Mach JP : Variations of the varvino-embryonic antigen levels in the olasma of patients with gynecologic cancers during therapy *Am J Obstet Gynecol* 1975;121:164-168.
12. Donaldson ES, Van Nageil JR, Kashmiri R & Voorde J : Multiple biochemical markers in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 1980;45:948-953.
13. Scott RJ, Hall PA, Haldane LS, et al. : A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991;165:173-178.
14. Francis SE, Holt CM, Violaris Ag, Celand C, Angelini GD : Neointimal proliferation in an organ culture of human coronary artery. *Eur Heart(suppl)* 1991;12:10.
15. Battersby S, Anderson TJ : Correlation of proliferative activity in Breast tissue using PCNA/

- cyclin. Human Pathol 1990;21:781.
16. Hall PA, Levison DA, Woods AL et al. : Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections : an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J of Pathology 1990;162:285-294.
17. Roos G, Dige U, Lenner P et al. : Prognostic significance of DNA analysis by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma. Haematol Oncol 1985;3:233-242.
18. Kvayloy S, Morton PF, Kaahum O, et al. : Spontaneous [3H]-thymidine uptake in B cell lymphomas. Relationship to treatment response and survival. Scan J Haematol 1985;34:429-435.
19. Hall PA, Richards MA, Gregory WM, et al. : The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. J Pathol 1988;154:223-235.
20. 강재성, 김인선 : 자궁경부 편평상피암에서 Proliferating cell nuclear antigen 양성도에 관한 연구. 대한암학회지 1991;23:755-768.
21. Hareyama H, Ohkohchi T, Takeda N, Nishiya M, Tsumura N, Ohkubo H, Sakuragi N : Proliferative activity of endometrial cells and endometrial cancer cells using the monoclonal antibody PCNA. ACTA OBST GYNEC JPN 1992;4:609-610.
22. Taylor IW : A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorimetry. J of Histochem Cytochem 1990;28:1021-1024.
23. Strang P, Stendahl U, Frankendal B, et al. : Flow cytometric DNA patterns in cervical carcinoma. Acta Radiol Oncol 1986;25:249-254.
24. 나덕진, 김수평 : 유식 세포분석에 의한 자궁경부암 세포의 DNA 양상 : 임상적 예후 및 생화학적 특징과의 관계 대부종콜포회지 1990;1:80-89.
25. Hanselaar AG, Vooijs GP, Oud PS, et al. : DNA ploidy patterns in cervical intraepithelial neoplasia grade III, with and without synchronous invasive squamous cell carcinoma : Measurements in nucleic isolated from paraffin-embedded tissue. Cancer 1988;62:2537-2545.
26. Jacobson A : Ploidy level and short time prognosis of early cervix cancer. Radiother Oncol 1983;1:271-275.
27. Kenter GG, Cornelisse CJ, Aartsen EJ, et al. : DNA ploidy level as a prognostic factor in low stage carcinoma of the uterine cervix Gynecol Oncol 1990;39:181-185.
28. Zanetta G, Katzmman JA, Keeney GL, et al. : Flow cytometric DNA analysis of stage Ib and IIa cervical carcinomas. Gynecol Oncol 1992;46:13-19.
29. Dyson JED, Joslin CAF, Rothwell RI, et al. : Flow cytofluorometric evidence for the differential radio-responsiveness of aneuploidy and diploid cervix tumors. Radiother Oncol 1987;8:263-272.
30. Jarrell MA, Heintz N, Howard P, et al. : Squamous cell carcinoma of the cervix : HPV 16 and DNA ploidy as predictors of survival. Gynecol Oncol 1992;46:361-366.
31. Ivan J, Philip TV, Linda G, Gary MC : DNA ploidy and S-phase fraction are not significant prognostic factors for patients with cervical cancer. Am J Obstet Gynecol 1994;171:1511-1518.
32. Barlogie B, Hittman W, Spitzer G, Trujulib JM, Hart JS, Smallwood L : Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma. Cancer Res 1977;37:4400-4406.
33. Fu YS, Reagan JW, Fu AS, Janiga KE : Adenocarcinoma and mixed carcinoma of the uterine cervix II. Prognostic value of DNA analysis. Cancer 1983;49:2571-2577.
34. Jakobson A, Kristensen PB, Poulsen HK : Flow cytometric classification of biopsy specimens from CIN. Cytometry 1983;4:166-170.