

암성흉수의 진단에 있어서 Flow cytometry를 이용한 DNA Ploidy 측정의 역할

울산대학교 의과대학 내과, 임상병리과*

최정은, 고윤석, 임채만, 이상도, 김우성, 김동순, 지현숙*, 김원동

=Abstract=

The Role of DNA Analysis using Flow Cytometry in the Diagnosis of Malignant Pleural Effusion

Jeong Eun Choi, M.D., Younsuck Koh, M.D., Chae Man Lim, M.D.
Sang Do Lee, M.D., Woo Sung Kim, M.D., Dong Soon Kim, M.D.
Hyun Sook Chi*, M.D., Won Dong Kim, M.D.

*Departments of Internal Medicine, Clinical Pathology**
Asan Medical Center, College of Medicine, University of Ulsan

Background There are some difficulties in the differential diagnosis of lymphocyte-dominant exudative pleural effusion because of nonspecific chemical findings and poor positive yield of cytopathologic findings. It has been known that most malignant tumor cells possess an abnormal number of chromosome and consequently an abnormal DNA content. Flow cytometry allows rapid and accurate analysis of DNA contents. Therefore the detection of aneuploidy in pleural fluid using flow cytometry could be used for the differential diagnosis between malignant and benign effusion.

Methods Flow cytometric DNA analysis were performed in 14 tuberculous pleural effusions and 21 malignant effusions, which were confirmed by cytopathological method. Samples were fixed in absolute ethanol and stained with propidium iodide, a DNA intercalating fluorescent stain.

Results All of the 14 tuberculous effusions shows diploidy. Among the 21 malignant effusions, 10 samples had aneuploidy. The comparison of S-phase fraction, the indicator of cellular proliferative activity, showed no significant difference between tuberculous and malignant effusions. Flow cytometric analysis, compared to cytopathology, yields 46.7% sensitivity, 100% specificity.

Conclusion The finding of aneuploidy in pleural fluid highly suggest malignancy in etiology. Therefore if flow cytometric DNA analysis show aneuploidy, further diagnostic work up would be required.

Key Words : pleural fluid, aneuploidy

서 론

암성 흉수는 한국에서 흔한 결핵성 흉수에서와 마찬가지로 흉수내에 림프구를 주로 보이나, 일반 생화학 검사만으로는 두 질환의 감별진단이 어려우며, 흉수 세포 진단법이나 흉막 조직 검사를 시행하여도 특이적 소견을 얻지 못하는 경우가 흔하여 임상적으로 감별 진단에 어려움이 있다. 따라서 암성 흉막염의 진단에 있어서 객관적인 결과를 얻을 수 있는 보조적 검사 방법이 요구되고 있다. 최근 진단에 많이 이용되고 있는 Flow cytometry (유량 세포 분석기)는 액체속에 부유하여 흐르는 여러 세포 각각의 물리적, 그리고 생화학적 특성 측정이 가능한 자동 세포 분석기로 DNA에 특이적으로 결합하는 fluorochrome을 사용하여 세포들의 주기 분석 및 DNA양의 분석이 가능하며 조작이 간편하면서 신속히 수행할 수 있는 객관적인 검사방법으로 인정되고 있다.¹⁾ 한편 DNA 양적 이상은 염색체 이상과 관련되며 암세포의 존재를 시사한다고 알려진 바 있다.^{2,3)} 이에 저자들은 흉수에서 Flow cytometry를 이용한 DNA 양적 이상의 측정이 림프구를 주로 보이는 흉수의 감별 진단에 도움을 줄 수 있는지 여부를 알아보기 위하여 다음과 같은 연구를 시행하였다.

대상환자 및 방법

1. 환자군

1992년 5월부터 8월까지 흉부 X-선 촬영상 흉수의 소견을 보여 흉수 분석을 시행한 환자중 대조군으로서 흉막 조직 검사상 결핵성 흉막염이 확진된 14명과 대상군으로서 세포 진단 및 조직 검사상 암성 흉막염이 확진된 환자 21명을 연구대상으로 하였다. 결핵성 흉막염군의 평균 연령은 42.5 ± 16.5 세, 남녀비는 13:1이었으며 암성 흉막염군의 평균 연령은 57.3 ± 16.5 세, 남녀비는 1.1:1이었다.

2. Flow cytometry 분석

1) 방법

각 환자의 흉수를 EDTA 항 응고제가 포함된 시험관에 채취하여 세포수를 2×10^5 /ml로 맞추어 99% 에탄올로 고정시킨후 propidium iodide로 DNA를 염

색하여 flow cytometer(FACScan, Beckton Dickinson, USA)를 이용하여 세포분석을 시행하였다. 기계 조작을 위한 내표준 물질(internal standard)로 닭 적혈구를 이용하였고 정상 G_0/G_1 의 두배수체 정점(diploidy peak)을 얻기 위한 외표준 물질(external standard)로서 정상인의 말초 혈액 림프구를 이용하였다. Flow cytometer는 휴지기와 전합성기(G_0/G_1), 합성기(S), 전분열기와 분열기(G_2+M)의 세 가지 세포 분열 단계를 보여 주며 본 연구에서 33건의 정상인의 림프구를 분석한 결과 G_0/G_1 기의 세포는 $93.64 \pm 19.8\%$, S기의 세포는 $0.46 \pm 0.28\%$, G_2M 기의 세포는 $0.82 \pm 0.70\%$ 이었고 변이계수는 2.45 ± 0.64 이었다. 변이계수는 G_0/G_1 정점의 중심위치와 정점 주변에 존재 하는 통로(channel)들의 표준편차로써 계산하였으며 정점길이의 61% 위치에서의 정점의 폭을 정점의 통로수로 나눈뒤 2를 곱하여 얻은 수치이다.^{4,5)} 환자 검체 분석시 변이계수 5% 미만이면 판독이 가능하나 본 연구에서는 3% 이상의 변이계수를 나타내면 기계조작을 다시 하였다. 정상세포를 분석한 DNA 히스토그램(histogram)은 그림 1과 같다.

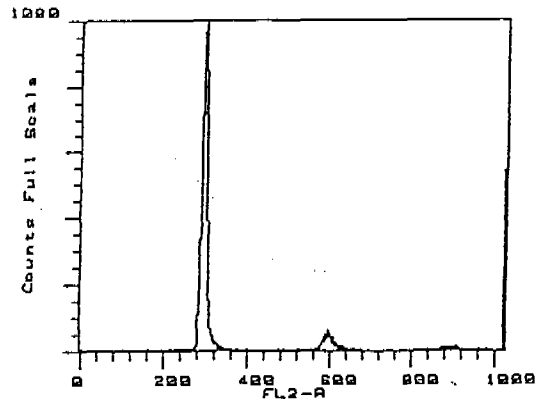


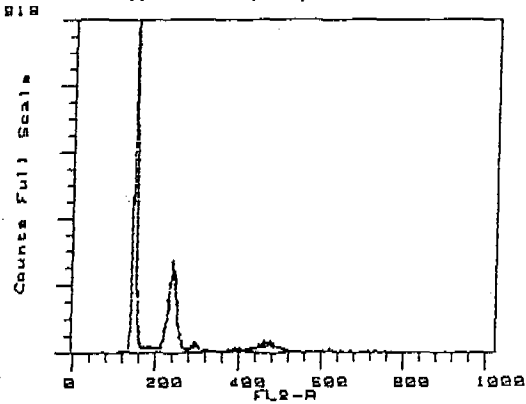
Figure 1. The Example of Normal DNA Histogram

2) 정의

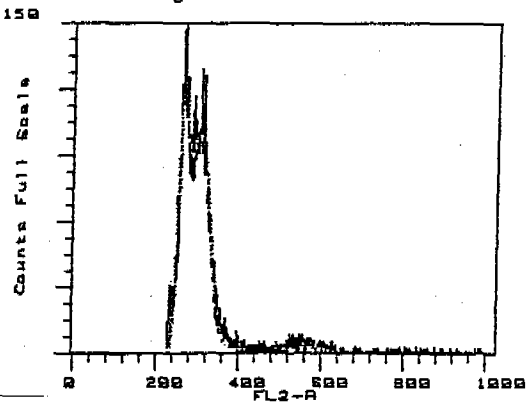
두배수체(diploidy)는 검체의 G_0/G_1 정점이 정상 G_0/G_1 정점과 일치 하는 경우로 정의 하였고 이수배수체(aneuploidy)는 DNA양에 이상을 보이는 경우로서 Stonesifer 등이 제시한 기준⁶⁾을 따랐다.

- 즉, (1) 정상 세포군을 제외한 또 다른 G_0/G_1 기의 정점을 보여 주는 경우,
- (2) 검체의 G_0/G_1 정점이 대조 세포의 G_0/G_1 의

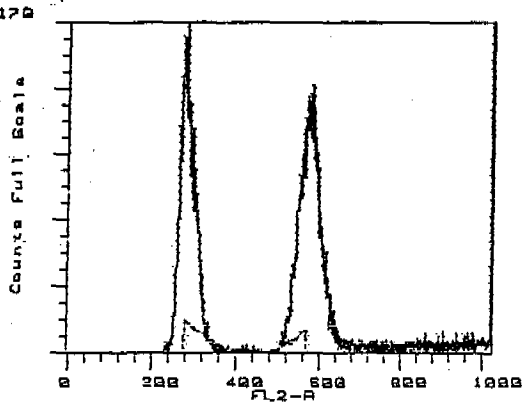
Figure 2. The Example of DNA Histogram of Typical Aneuploidy



2-1. The tallest peak corresponds to diploid cells. The presence of discrete cell population containing an abnormal amount of DNA forms distinct extra peaks in the DNA histogram



2-2. A distinct asymmetry and shoulder of G_1 peak is noted.



2-3. The G_2M peak contains an abnormal large number of cells

평균보다 2 표준편차 범위를 벗어난 경우,
 (3) 검체의 G_0/G_1 정점이 정상 G_0/G_1 의 정점과 겹쳐 비대칭적 G_0/G_1 정점이 보이는 경우,
 (4) G_2M 기 세포군의 분포가 2.5% 이상일 경우로 정의 하였다.
 전형적인 이수배수체의 히스토그램은 그림 2와 같다.

3) 통계적 처리

각 군간의 이수배수체 분포는 t-test를 이용하였고 합성기 분포의 비교는 Mann-Whitney U test를 이용하였다.

결 과

결핵성 흉막염군의 흉수 분석 결과 14예에서 모두 두배수체를 보였다. 암성 흉막염군의 경우 총 21예 중 10예에서 이수배수체를 보였고 11예에서는 두배수체를 보였다(표 1). 이수배수체를 보인 10예의 원

Table 1. The Results of DNA Analysis using Flow Cytometry

| FCM* | Tb** | effusion | Malignant effusion |
|------------|------|----------|--------------------|
| Aneuploidy | 0 | 10 | |
| Diploidy | 14 | 11 | |
| Total | 14 | 21 | |

* FCM : Flow cytometry Tb** : Tuberculosis

Sensitivity=47.6%
 Specificity=100%

Table 2. The Pathology of Malignant Pleuritis in the Patients with DNA Aneuploidy

| Pt | Age/Sex | Histopathology | Primary site |
|----|---------|---------------------------|--------------|
| 1 | 66/f | adenocarcinoma | lung |
| 2 | 72/m | adenocarcinoma | lung |
| 3 | 45/m | squamous cell ca | lung |
| 4 | 47/f | adenocarcinoma | lung |
| 5 | 57/m | poorly differentiated ca. | lung |
| 6 | 81/f | adenocarcinoma | lung |
| 7 | 59/m | small cell ca. | lung |
| 8 | 69/f | adenocarcinoma | lung |
| 9 | 70/m | adenocarcinoma | stomach |
| 10 | 31/m | non Hodgkin's lymphoma | |

Pt : patient

발병소 및 병리 소견을 보면 폐암이 8예로 이중 선암이 6예이었고 소세포암과 상피세포암이 각각 1예였다. 그 밖에 위암과 임파선암에서 전이된 예가 각각 1예였다(표 2). 이 결과로 DNA 이수배수체에 의한 암성 흉수 진단의 민감도는 47.6%(10/21), 특이도는 100%(10/10)이었다.

또한 세포의 증식 능력을 알려주는 지표로서 합성기(S기)의 분포를 비교한 결과 결핵성 흉막염균의 평균 합성기 분포는 $3.72 \pm 1.06\%$, 암성 흉막염균의 평균 합성기 분포는 $6.69 \pm 1.79\%$ 로 두군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p=0.1152$)(표 3).

Table 3. The S-Phase Fraction in Tuberculous Effusion and Malignant Effusion

| FCM | Tb. Effusion | Malignant effusion | p value |
|---------|-------------------|--------------------|---------|
| SPF (%) | $3.72 \pm 1.06^*$ | 6.69 ± 1.7 | 0.115** |

FCM : Flow cytometry Tb : Tuberculosis

SPF : S-Phase Fraction

* mean \pm S.E.

** Mann-Whitney U test

고 찰

림프구를 주로 보이는 삼출성 흉수의 정확한 원인 규명은 환자의 예후와 치료 방향을 결정하는데 있어 매우 중요하다. 특히 결핵의 유병율이 많은 우리나라에서는 결핵성 흉수와 암성 흉수의 감별은 임상적으로 그 중요성이 크며, 또한 폐암을 비롯한 악성 신생물의 흉막 전이의 유무는 병기 결정에 중요 요소이므로 정확한 진단이 반드시 필요하다고 하겠다. 세포 분석 및 조직 생검등의 형태학적인 진단 방법은 암세포의 발견에 가장 확실한 방법으로 인정되고 있으나 암성 흉수의 초기단계에서는 흉수내 암세포의 수가 적어서 분석시 위 음성을 나타낼 수 있으며⁷⁾, 또한 암 세포의 종류 및 분석자의 경험에 따라 서로 차이를 보일 수 있다.⁸⁾ 따라서 최근 염색체 분석, 그리고 조직 배양등의 진단방법이 소개 되었으나 시간이 오래 걸리며 기술상의 어려움이 있고⁹⁾ 흉수내 CEA(Carcinoembryonic antigen)나 Cyfra 21-1등의 암세포 표지자 이용시에도 암세포의 종류에 의해

영향을 받으며 측정방법에 따라 오차가 있다는 문제가 있다. 또한 흉수의 화학적 성상을 이용한 분석도 시도되었으나 의미있는 차이를 보이지 않아 감별진단에 이용 하기에는 적절하지 않다.¹⁰⁾

Flow cytometry를 이용하여 세포분석을 시행할 경우, 한 검체당 수만개의 세포를 분석할 수 있으며 염색체 분석시와는 달리 분열기 이외의 세포주기에 있는 세포군도 분석가능한 장점이 있고¹¹⁾ 기술상으로도 간단하여 쉽게 이용할 수 있다. DNA 염색 방법인 Feulgen방법이 사용된 이후 DNA양과 염색체 이상과의 관련성이 확립되기 시작하였으며 정상 두배체보다 적거나 많은 이수배수체를 보이는 경우 악성 종양이 의심된다는 보고가 있다.^{2,12)} 그러나 모든 악성 종양이 이수배수체를 보이는 것은 아니며 양성 종양이나 심한 염증 상태의 경우에서도 때때로 이수배수체를 가지는 세포군이 존재할 수 있다는 보고도 있다.^{13,14)} 따라서 본 연구에서는 조직 검사나 세포검사로 확진된 암성 흉막염균과 결핵성 흉막염균의 흉수내 세포를 Flow cytometry를 이용, DNA 분석을 시행하여 DNA 이상이 두군간의 감별진단에 유용한지의 여부를 검사 하였다. 본 연구에서 모든 결핵성 흉수세포는 정상 두배체를 보인 반면 암성 흉수의 경우 47.6%(10예)에서 이수배수체를 보였으며 모두 DNA 양이 정상 보다 증가된 과두배수체(hyperdiploidy)이었다. 이수배수체를 보인 10예의 원발 병소 및 병리 소견을 보면 폐암이 8예로 이중 선암이 6예이었고 소세포암과 상피세포암이 각각 1예였다. 그 밖에 위암과 임파선암에서 전이된 예가 각각 1예였다. 본 연구의 결과에서는 폐 선암에서 전이된 악성 흉수에서 이수배수체를 가장 많이 보였으나 현재까지의 보고에 의하면 이수배수체의 질환별 및 조직학적인 종류에 따르는 특이성은 없는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾

이수배수체의 진단 유용성에 대한 민감도와 특이도 외에 양성 예상률과 음성 예상률을 측정하지 않은 것은 대상군을 암성 흉막염균과 결핵성 흉막염균으로 제한하여 연구 하였으므로 림프구를 주로 보이는 삼출성 흉수 환자가 모두 대상이 된것은 아니기 때문이었다. 본 연구결과에서 민감도가 47.6%로 비교적 낮게 측정되었는데 이는 흉수내 악성 세포의 수가 정상 세포에 비하여 상대적으로 적은 경우, 혹은

전이된 악성 세포자체가 두배수체를 가지는 경우 등에 기인한 것으로 사료된다. 반면 특이도는 100%로 감별진단에 보조적인 유용성을 고려할 때 높은 민감도 보다는 높은 특이도를 보이는 진단 방법이 더 가치가 있으므로 림프구를 주로 보이는 삼출성 홍수에서 결핵성 홍수와 악성 홍수의 감별진단에 있어서 홍수내 DNA ploidy의 측정이 보조적으로 이용될 수 있을것으로 사료된다.

본 연구에서 세포의 증식 능력을 알려주는 합성기의 분포도를 비교한 결과 암성 홍막염군과 결핵성 홍막염간에 유의할 만한 차이는 보이지 않아 합성기 분포도의 측정은 암성 홍수의 감별 진단에 큰 도움을 주지는 못할 것으로 보인다.

이상의 결과로서 삼출액이면서 림프구를 주로 보이는 홍수 환자에서 flow cytometry를 이용한 DNA 분석상 이수배수체를 보일때 암성 홍수의 가능성이 높으므로 세포 진단법이나 홍막 생검상 비특이적 소견을 보이더라도 확진을 위한 적극적인 노력이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 : 암성 홍수는 한국에서 흔한 결핵성 홍수와 마찬가지로 홍수내에 림프구를 주로 보이나, 일반 생화학 검사나 홍수 세포 진단법 및 홍막 조직 검사상에도 특이적 소견이 나타나지 않는 경우가 흔하여 감별 진단에 어려움이 있다. 최근 악성 종양에서 염색체이상에 따르는 DNA 양적이상이 보고되었으며 Flow cytometry는 세포들의 주기 분석 및 DNA양의 분석이 가능하며 조작이 간편하고 신속히 수행할 수 있는 객관적인 검사방법으로 인정되고 있다. 이에 저자들은 림프구를 주로 보이는 홍수에서 Flow cytometry를 이용한 DNA 양적 이상의 측정이 암성 홍수의 감별 진단에 도움을 줄 수 있는지 여부를 조사하기 위하여 다음과 같은 연구를 시행하였다.

방법 : 홍수 세포 진단법 및 홍막 조직 검사상 확진된 결핵성 홍막염 환자 14명과 암성 홍막염환자 21명의 홍수를 99% 에탄올로 고정시키고 popidium iodide로 DNA를 염색한후 flow cytometry를 이용하여 이수배수체의 여부와 합성기의 세포 분포율을 조

사하였다.

결과 : 결핵성 홍막염군의 홍수 분석 결과 14예 모두 두배수체를 보였다. 암성 홍막염군의 경우 총 21예중 10예에서 이수배수체를 보였고 11예는 두배수체를 보였다. 합성기(S기)의 분포를 비교한 결과 결핵성 홍막염군의 평균 합성기 분포는 3.72 ± 1.06 %, 암성 홍막염군의 평균 합성기 분포는 6.69 ± 1.79 %로 두군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p = 0.1152$). DNA 이수배수체에 의한 암성 홍수 진단의 민감도는 47.6%, 특이도는 100% 이었다.

결론 : 삼출액이면서 림프구를 주로 보이는 홍수 환자에서 flow cytometry를 이용한 DNA 분석상 이수배수체를 보일때 암성 홍수의 가능성이 높으므로 세포 진단법이나 홍막 생검상 비특이적 소견을 보이더라도 확진을 위한 적극적인 노력이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Melamed MR, Mullaney PF, Mendelsohn ML. Flow cytometry and Sorting. New York, John Wiley & Sons Inc, 1979.
- Barlogie B, Gohde W, Johnston DA, Schmann J. Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumor by pulse cytophotometry. *Cancer Res* 1978;38:3333-3339.
- Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, Gohde W, Dosi KG, Latreille J, Johnston DA, Freireich EJ. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med* 1980;69:195-203.
- Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurement of DNA and other cell component in human tumor. *Hum Pathol* 1989;20:528-548.
- Dressler LG, Barton SA. DNA flow cytometry in solid tumor, practical aspect and clinical application. *Seminar in Diag Patho* 1989;6:55-82.
- Stonesifer KJ, Xiang J, Wilkinson EW, Benson

- NA, Braylan RC. Flow cytometric analysis and cytopathology of body cavity fluids. *Acta Cytologica* 1987;31:125-30.
7. Croon Am, Valk P, Herman CJ, Lindeman J. Cytology, immunopathology and flow cytometry in the diagnosis of pleural and peritoneal effusion. *Lab Invest* 1988;6:725-32.
8. Ungar KM, Raber M, Bedroisian CWM, Stein DA, Barlogie B. Analysis of pleural effusions using Automated flow cytometry. *Cancer* 1983; 52:873-7.
9. Hansson A, Korsgaard R. Cytogenetics diagnosis of malignant pleural effusion. *Scand J Respir Dis* 1974;55:301-308.
10. 최윤미, 지현숙. Flow Cytometry를 이용한 체강액의 DNA 분석. *대한임상병리학회지* 1992;12: 185-93.
11. Barlogie B, Hittelman W, Spitzer G, Trujillo JM, Hart JS, Smallwood L, Drewinko B. Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 1977;37: 4400-4407.
12. Nowell PC. Chromosomal changes and the Clonal Evolution of cancer. *Int. German J(ed). Chromosome and Cancer*. 1974;267-285.
13. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Biology of disease. *Advances in flow cytometry for diagnostic pathology*. *Lab Invest* 1987;57:453-479.
14. Watts KC, Boyo-Ekwume H, To A, Posansky M, Coleman DV. Chromosome studies on cell cultured from serous effusions. *Use in Routine cytologic practice*. *Acta Cytol(Baltimore)* 1983;27:38-44.