

## DNA Ploidy 측정방법에 있어서의 유세포분석과 화상분석법의 비교 고찰

— 인간과 실험동물의 간세포암종에서의 실제 분석에 따른 연구 —

이화여자대학교 의과대학 병리학교실  
김성숙 · 구혜수 · 한운섭 · 김옥경

= Abstract =

### Comparative Study of Flow Cytometry and Image Cytometry of Hepatocellular Carcinomas in Human and Experimental Animal Tissue

Sung Sook Kim · Hea Soo Koo · Woon Shub Han · Ok Kyung Kim

*Department of Pathology, Medical College, Ewha Womans University*

The rapidly expanding field of flow cytometry consists of the simultaneous measurement of several parameters while a suspension of cells flows through a beam of light past stationary detectors.

Flow cytometric DNA analysis can even be performed on nuclear suspensions recovered from thick sections of routine formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks with results remarkably similar to those obtained using fresh tissues.

Because the main limitation of flow cytometry is that cells need to be in a single-cell suspension in order to be analysed, image cytometric device was recently developed.

At present study, we did comparison between flow cytometric and image cytometric methods in measurement of DNA ploidy pattern of same specimen from human and experimental animal tissue and obtained a good correlation between 2 methods.

It is concluded that DNA image cytometry appears to be supplementary to FCM for the study of DNA ploidy abnormalities and that the combined results of these methods have a major influence on the clinical outcome.

## 서 론

세포 분석(cytometry)은 세포들의 물리적 또는 화학적 특성은 계측하는 것으로 그중 유세포 분석기(flow cytometry)이 이와 같은 측정은 상태의 세포를 이용하여 하는 기법이다. 지난 십 수년간 레이저, 컴퓨터학, 단일세포군 항체 생산 및 형광 색소 화

학의 발달로 임상적으로 새로운 분야로서의 유세포 분석법의 장을 열게 되었다<sup>1)</sup>.

현재 종양성 질환에 대한 이해는 상당히 기술적이고 주관적이어서 무엇이 종양형성을 유도하는지, 종양의 진전 또는 치료반응을 조절하는 인자가 무엇인지 확실히 알려져 있지 않다. 이에 이런 세포 분석을 이용한 세포집단의 객관적이고도 정량적인

분석은 생물학적으로 종양 세포에 대한 형태위주의 맹점을 보완할 수 있다는 장점이 있다<sup>2)</sup>.

병리학 분야에서 종양 세포내 DNA 양이나 형태를 측정하는 일은 비교적 최근에 시작되었지만 종양세포내 DNA양 또는 형태가 종양의 예후와 밀접한 관계가 있다는 것이 밝혀지고 또한 종양의 병리기전이나 생물학적 특성의 연구에 중요한 지표를 제공하므로 현재 활발히 행하여지고 있다<sup>3-7)</sup>.

특히 1983년 Hedley등에 의해 파라핀에 포매된 조직의 DNA양을 측정할 수 있는 방법이 고안되어 실제 많은 종양의 DNA양과 예후를 비롯한 여러 임상적 인자들과의 관계가 밝혀지게 되었다<sup>8)9)</sup>.

이와 같이 종양병리 분야에서 점차 중요한 위치를 차지하는 DNA형태의 검색법에는 크게 2가지가 사용되고 있다. 즉, 종양 조직을 단일 세포핵 부유액(single cell suspension)으로 만든 다음 propidium iodide로 염색한 후 유세포 분석기(flow cytometry, 이후 FCM으로 표기)를 이용하여 자동으로 측정하는 방법과 세포를 슬라이드에 고정된 후 핵을 Feulgen 염색하여 현미경으로 직접 보면서 컴퓨터를 이용하여 DNA양을 측정하는 화상분석법이 있다<sup>10-12)</sup>.

따라서 같은 검체를 두가지 방법으로 시행하여 두 방법간의 일치율 및 장단점을 비교하고 실제 적용하는데 있어 문제점들을 검토하여 보고자 한다. 또한 외과 병리 분야 외에도 실험동물에서도 응용하여 보아 실험병리분야에서도 가치있는 자료가 됨을 확인 하여 보았다.

## 연구재료와 방법

### 1. 연구재료

두 종류의 재료를 사용하였는데 우선 실험동물 재료로는 사람의 alpha-1 antitrypsin gene을 이용하여 만든 transgenic mice의 간에서 얻은 조직을 사용하였다. H & E 염색상 간이형성증 및 간암발생을 보였다(Fig. 1). 또한 사람의 조직에서도 비교검색을 하기위해 간세포암종으로 진단받고 간절제술을 시행한 50세의 간세포암종 조직도 같이 실험하였다. 이들은 분화가 좋은 소주성 형태부터 분화가 나쁜 형태까지 다양하였다(Fig. 2).

### 2. 연구방법

각 장기 검체는 10% 중성포르말린에 고정된 후

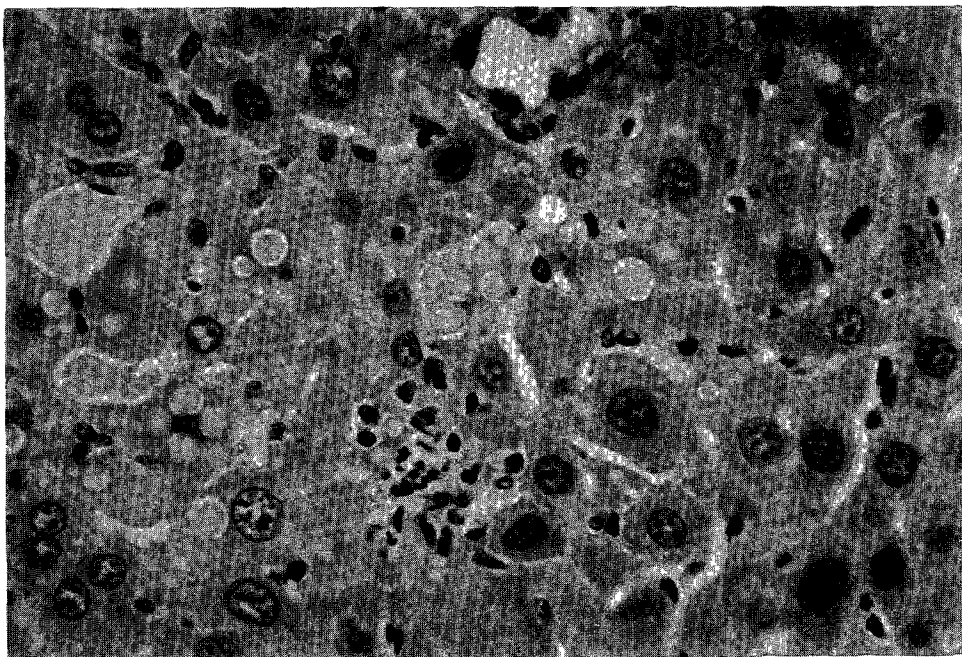
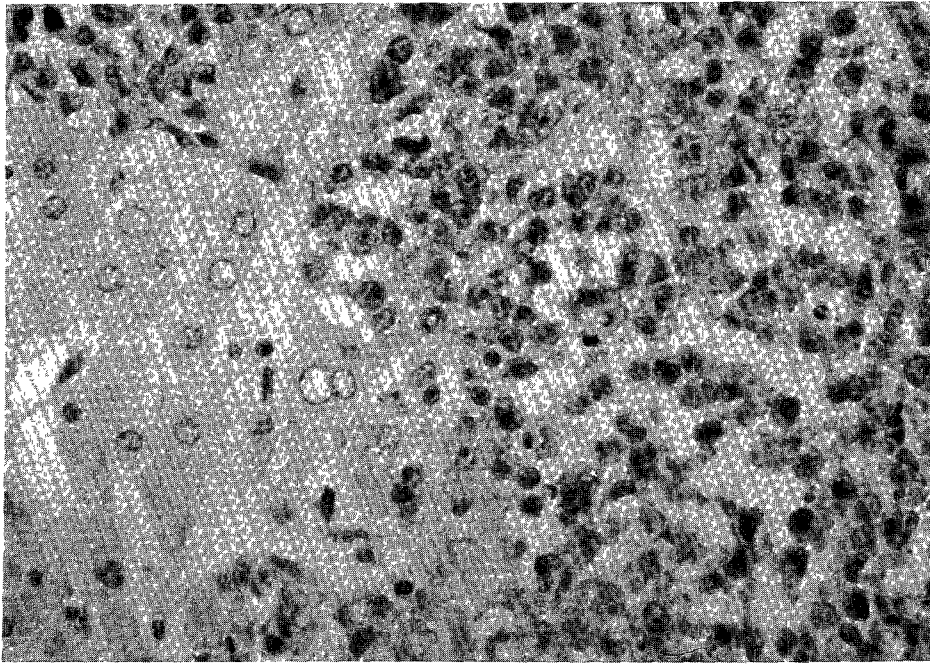


Fig. 1. Microscopic view of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficient liver disease in a transgenic mouse ; Note many  $\alpha_1$ -antitrypsin globules and a few dysplastic nuclei of hepatocytes(H & E stain,  $\times 450$ ).



**Fig. 2.** Microscopic view of human hepatocellular carcinoma ; Relatively poorly differentiated pleomorphic cells are observed compared to adjacent non-tumorous hepatocytes(H & E stain,  $\times 200$ ).

파라핀에 포매되었다. 파라핀 포매된 조직으로부터 4 $\mu$ m과 50 $\mu$ m의 두가지 절편으로 자른후 4 $\mu$ m 절편은 H & E 염색을 하여 조직 병리학적 검사를 하였고 또 좋은 부분을 얻기위해 시행하는 미세 절제(microdissection)를 위해 사용하였다. 되도록 주위 정상부분이 포함된 절편을 사용하였으며 50  $\mu$ m 절편은 H & E 염색과 비교하여 출혈이나 괴사조직을 제거한 후 정상부분과 중앙부분으로 나누었다. 한편 조직 절편에서의 화학 분석을 하기 위하여 4 $\mu$ m과 7 $\mu$ m의 두가지 절편을 더 만들었다.

### 3. 유세포 분석

유세포 분석을 하기위해서는 파라핀 포매 조직으로 부터 세포를 추출하는 Hedley와 Vindelov에 의한 방법으로 시행하였다<sup>13)</sup>. 절편기로 얻은 50 $\mu$ m 절편을 유리 slide에 놓고 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 말린후 실온에서 수세 하였다. 그후 xylene에 2번 10분간 담그고 그뒤 100%, 90%, 70%, 50% 에탄올에 차례로 10분간씩 담그고 증류수에 10분간 2번을 수세 하였다<sup>14)</sup>. 그후 H & E 염색상을 보고 필요한 곳만 미세 절제하여 조심스럽게 슬라이드에서 떼내어 5 ml의 트립신 buffer에 옮겨 담았다. 이 조직을 진

탕기로 섞은후 16~20 시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubate 하였다. 그후 이 조직을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.6)로 2번 수세한후 남은 PBS를 따라 버리고 세포 pellet을 10ml의 PBS에 다시 담근 후 불순물을 제거하기 위해 210 $\mu$ m 나일론 그물을 사용하여 거르고 그후 53 $\mu$ m과 37 $\mu$ m로 다시 여과 하였다. 원심 분리한후 부유물을 버리고 세포 pellet을 PBS로 다시 세척한 후 2ml의 PBS에 담갔다. 그후 세포는 측정(hemocytometer)으로 세고 modified krishan staining buffer에 담가 세포를 녹이고 핵을 염색하였다<sup>14)</sup>. 마지막 세포농도는 염색 Buffer 1ml당 10<sup>6</sup>개가 되도록 조정하였다. 표준을 정하기 위해 닭의 적혈구(CRBCs)를 사용하였다. CRBCs는 PBS에 3번 수세후 ml당 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cell이 되도록 염색하였다. 각 시험관은 4 $^{\circ}$ C에서 30~60분간 항온 수조하였고 빛으로부터 격리하였다. 유세포 측정하기 전에 다시 진탕 하고 37 $\mu$ -nylon mesh로 여과하여 큰 조직을 제거하였다. 각 핵을 Coulter Epics C 또는 Profile을 사용하여 조사하였다. CRBCs로 표준으로 사용하였고 이 photomultiplier tube를 channel 20에 맞추었다. 이 CRBCs는 동일성을 유지하기 위해 매 검체마다 시행하였다. 각 검체는

10,000개의 세포를 분당 80~100 세포의 속도로 측정하였고 C.V., peak position을 Epics C program을 사용하여 얻었다.

DNA aneuploidy는 검체내에 2개나 그 이상의 G0/G1 분포가 있는 경우에 설정하였고 DNA aneuploidy의 정도는 aneuploidy peak의 mean channel을 diploidy peak의 mean channel로 나눔으로서 DI (DNA Index)를 구하였다. G0/G1 peak의 위치가 각 예마다 다른 것은 검체마다 파라핀 정도와 염색 정도의 차이때문으로 생각하였다.

#### 4. 화상분석법

화상분석법을 시행하기 위해서는 CAS Model 200 Image Analysis System(Beckton Dickinson, USA)을 사용하였고 그 standard DNA ploidy analysis software module을 이용하였다. 그 각각의 표준 슬라이드가 포함되어 각 슬라이드의 표준화를 위한 대조세포가 묻혀져 있었다. 이 구조는 Reichert Diastar 현미경과 향상된 IBM-AT 콤퓨터, 2개의 색체 모니터로 구성되어 있고 화상 감지는 CCD 카메라로 구성되어 있다.

##### 1) 종래의 cytospin을 이용한 화상분석법

Cytospin 슬라이드를 먼저 시술한 Hedley 방법에 의해 만들어진 단일핵 부유핵으로 만들고 30분간 10% 포르말린에 고정하였다. 그후 5분간 증류수로 세척한후 실내에서 완전히 말린 후 이 검체는 CAS 200의 염색 단위를 사용하여 염색하였다. 즉 실온에서 60분간 5N 염산에 녹인후 CAS의 Feulgen 염색액과 세척액을 사용하여 Feulgen 염색을 시행하였다.

##### 2) 조직 절편을 이용한 화상분석법

4 $\mu$ m과 7 $\mu$ m 조직 절편을 통상 조직에 사용되는 Feulgen 염색을 하였다. 즉, 절편을 수세후 약산에서 처리한 후 purine 염기와 pyrimidine 염기를 분리시킨 후 aldehyde group을 유리시킨다. 그 후 Schiff 시약으로 1시간 정도 처리후 다시 sulfurous rinse 액으로 헹구고 증류수에 수세한다. Light green solution 액으로 대조염색후 말려서 mount 한다.

##### 3) CAS에 의한 DNA측정

각 슬라이드는 표준 DNA ploidy software module에 의해 분석이 시행되었다. 이 구조는 각각

마다 알려진 DNA 양을 포함한 대조세포를 이용하여 표준화하였다. 이 DNA 양을 7.18pg으로 입력하였고 이 값을 기준으로 하였다<sup>5)</sup>. 그러나 본 연구에서는 오랜 기간동안 파라핀에 포매된 조직이었으므로 정상 G0/G1이 7.18pg보다 적은 값이었고 각 예마다 차이를 많이 보였다. 그러므로 각 슬라이드에 존재하는 임파구를 20개에서 30개 이상 세어 이것을 표준으로 사용하였다<sup>16)</sup>. 가능한한 150개 이상의 종양세포를 세었으나 경우에 따라서는 그보다 적은 수를 세기도 하였으나 최소한 50개 이상의 세포를 대상으로 하였다.

각 결과는 정상 세포의 DI를 1로 하여 정의에 따라 G0/G1 분포의 DNA index를 나타내었다. Diploidy(정상 DNA 유형)를 제외한 모든 경우는 nondiploidy(ND : 비정상 DNA 유형)라 표현 하였으며 그중 A는 aneuploid(이배수체성), A(T)는 Tetraploidy(사배수체성)를 말한다.

## 결 과

### 1. 일치율

처음 시행한 사람의 간세포암종에서 보면 두방법에 따른 결과는 Table 1과 같고 95%의 일치율을

Table 1. Results of DNA ploidy

	Diploidy		Nondiploidy		Not acceptable	Total
	An	Tet	An	Tet		
FCM	11	19	12	8	8	50
ICM	12	28	10	0	0	50

HCC : Hepatocellular carcinoma

FCM : Flow cytometry

ICM : Image cytometry

Table 2. Comparison of results by methods in TG mice

	Section		Cytospine		Flowcytometry		Total
	D	ND	D	ND	D	ND	
Control	2	0	2	0	2	0	2
M#1	2	0	2	0	2	0	2
M#2	1	0	1	0	1	0	1
Z#1	1	1	2	0	2	0	2
Z#2	3	24(7)	4	23(16)	4	23(14)	27
Total	9	25	11	23	11	23	34

D : Diploidy ND : Nondiploidy

TG : Transgenic

보였다(Table 1).

2번째 행한 실험동물에서는 ICM의 경우 cytospin 법과 절편(section)법 두가지를 시행하여 각각 FCM과 비교하여 보았는데 Table 2와 같다. 일치율은 ICM의 cytospin과 section법간에 94%, ICM의 cytospin과 FCM간에 97%, ICM의 section과 FCM간에 91%을 보였다(Table 2).

## 2. DNA index 비교

비교적 상관관계가 있는 graph를 보였다. 2가지 연구에서의 DI는 Fig. 3과 Fig. 4와 같다.

## 3. C.V. 비교

기관에 따라 받아들여 지는 C.V.가 다르지만 보통 FCM에서는 4%이하, ICM에서는 12%이하를 acceptable 하다고 할 수 있다. 그러나 검체가 오래된 경우 C.V.치가 커지고 심지어는 FCM에서 판독이 불가능한 경우가 있었다. 두 방법간에 C.V. 비교를 하여보았을 때 FCM에서보다 ICM에서 좀더 낮은 C.V.를 관찰할 수 있었다(Fig. 5 & 6).

## 4. Histogram 비교

각 방법간에 Histogram을 비교하여 보았을 때

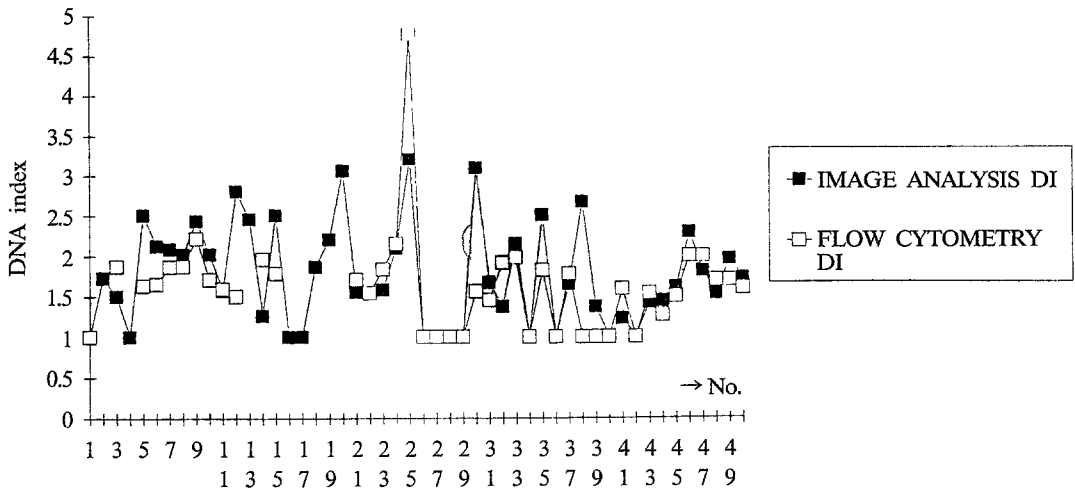


Fig. 3. Comparison of DNA index by 2 methods in human HCC.

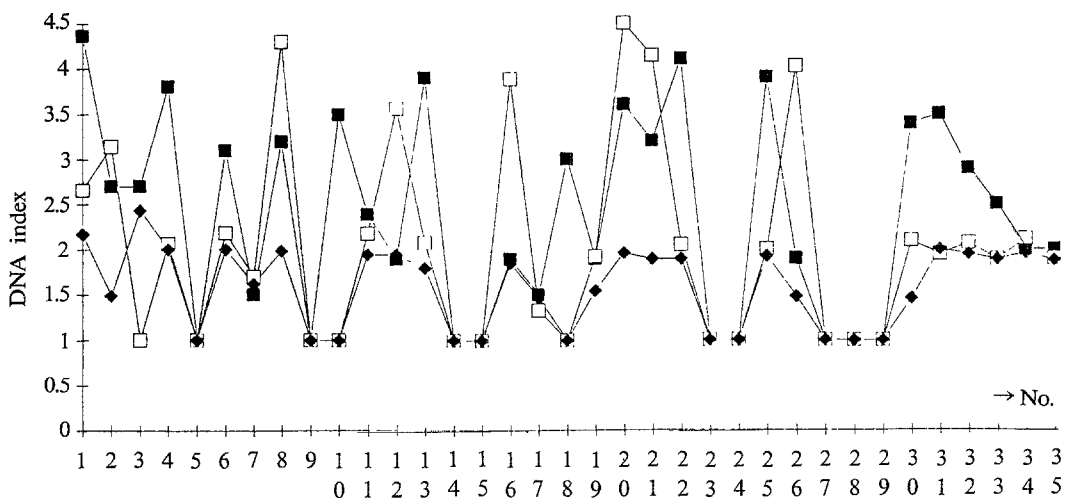


Fig. 4. Comparison of DNA index by 3 different methods in (■ : image cytometry cytospin, ◆ : image cytometry section, □ : flow cytometry)  $\alpha_1$ -antitrypsin deficient liver disease in TG mice.

비교적 유사한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 7 & 8).

## 고 안

유세포 분석기를 통한 여러 종류의 암에서의 DNA 형태의 분석은 암의 생물학적 특성과 예후를 판정하는 객관적 자료로서 활발히 행하여지고 있다. 이런 분석의 이용은 진단적 그리고 치료 및 예후 판정에 효과적으로 사용되고 있으며 계속 연구 중에 있다. 한편 최근에는 컴퓨터의 놀라운 발전으로 화상 분석법이 개발되면서 이에 의한 DNA 연구가

이루어져 직접 암세포를 관찰하면서 DNA 분석을 가능하게 함으로써 더욱 정확하고 믿을만한 결과를 얻을 수 있게 되었다. 이런 방법들은 이제 종양의 생물학적 특성을 연구하는데 그리고 암을 가지고 있는 환자의 처치에 중요한 지표로서 가치있는 정보를 제공하고 있다<sup>8-7)</sup>.

한편 병리조직학적 진단 분야에서 형태계측학이 관심을 끄는 이유는 형태계측상 얻어진 결과가 객관성, 재현성이 있고 또한 확률론적 해석이 가능하기 때문이다. 형태 계측학은 형태학적 변화에 따른 기능적 변화에 대한 연구, 진단적 오류를 피

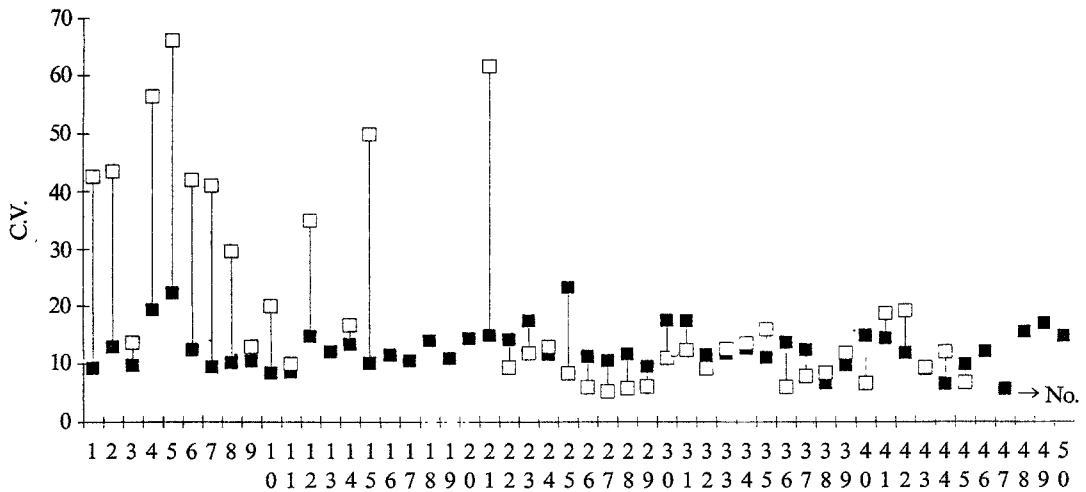


Fig. 5. Comparison of 'C.V. by 2 methods ; Note the too wide C.V. by flow cytometry in old samples.

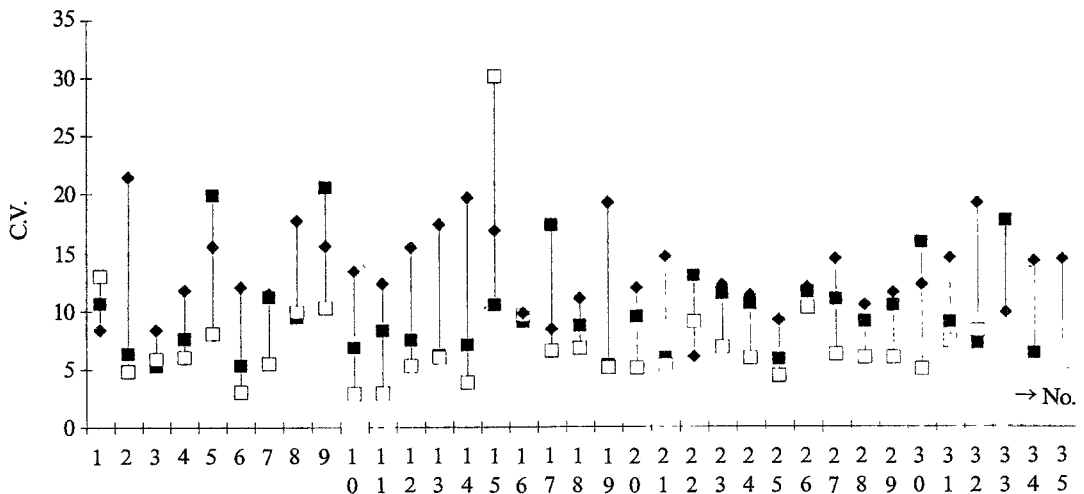
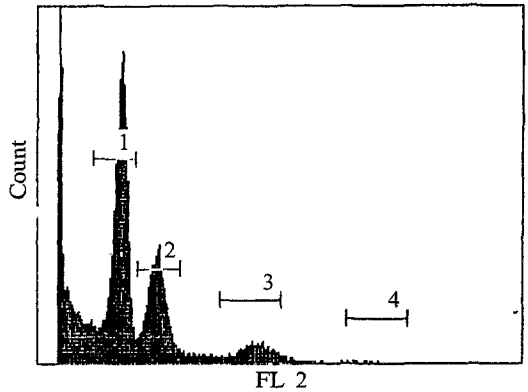
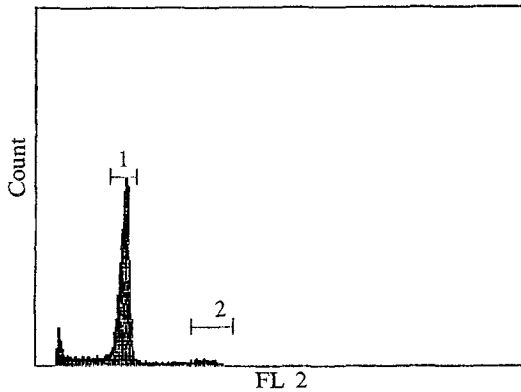
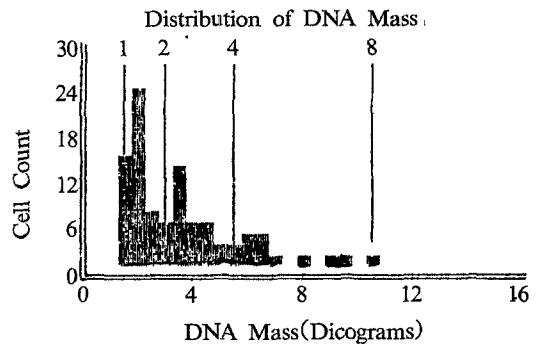
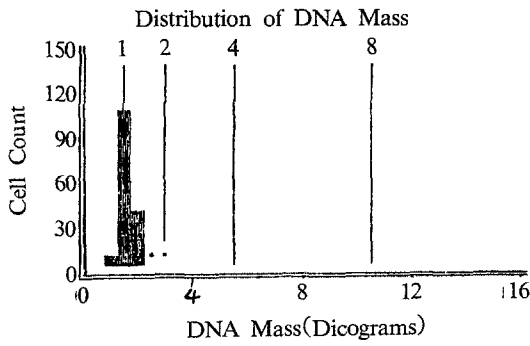


Fig. 6. Comparison of C.V. by 3 methods in animal model.



	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	HPCV
1	39	53	23796	68.2	45.7	2.7	5.32
2	82	104	1801	5.2	89.7	5.0	8.14

	MIN	MAX	COUNT	PERCENT	MEAN	SD	HPCV
1	29	52	16876	41.2	42.2	4.6	8.06
2	53	76	8118	19.8	62.9	5.1	7.26
3	97	129	2625	6.4	114.3	8.1	8.19
4	163	195	277	0.7	175.7	8.1	0.69

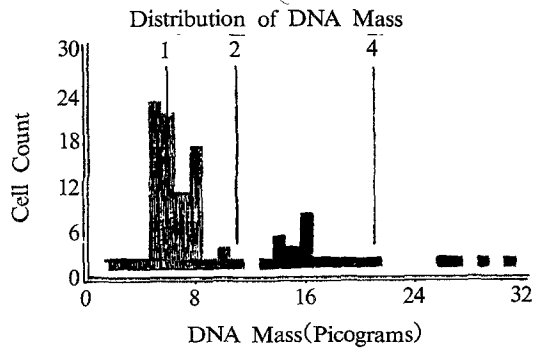
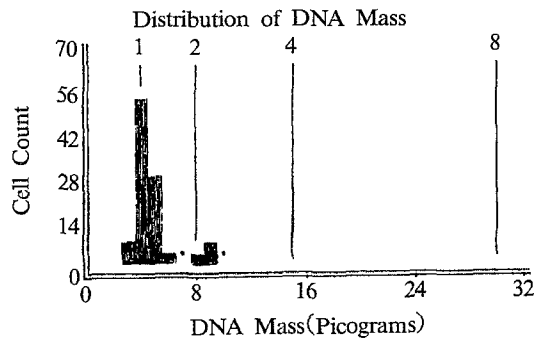


Fig. 7. 7a(section ICM), 7b(FCM) and 7c(cytospine ICM) show diploidy, representative histograms showing similar pattern of 3 methods.

Fig. 8. a8(section ICM), 8b(FCM) and 8c(cytospine ICM) reveal aneuploidy, representative histograms showing similar pattern by 3 different methods.

하기 위한 객관적인 판단, 정량분석을 통한 정도 관리를 가능하게 해준다<sup>9-11)</sup>.

형태학에 있어서의 변화량은 다른 물리량처럼 연속적이다. 이와 같은 연속적 변화량을 정밀도가 높은 측정방법을 이용하여 수치적으로 표현함으로써 객관성과 재현성을 부여할 수 있고 확률론적

해석이 가능하도록 한 것이 화상분석이다. 따라서 형태계측학은 Virchow 이래로 많은 형태학자의 관심대상이었으나 정밀도가 높은 측정방법이 없어 특정분야 이외에는 발달되지 못하였다.

금세기 후반에 들어와서 일고 있는 컴퓨터 혁명의 결과 많은 의료기기가 microprocessor의 도움으로 수치자료를 출력시키고 있다. 이 기술의 발달은 형태학 분야에도 예외가 아니어서 이미 백혈구의 자동 감별계산 염색체 분석 및 방사선 화상의 판독 등에 화상분석 방법이 이용되고 있으며 현재는 microcomputer에서도 형태 인식 및 분석이 가능하게 되었다. 즉 형태계측학에 컴퓨터가 도입됨으로서 진정한 의미의 형태계측학이 발달되고 있는 것이다.

유세포분석이나 종래의 화상분석을 이용하여 DNA 형태 분석을 하기 위해서는 단핵부유물(single cell suspension)을 만들어야하고 특히 파라핀에 포매된 조직을 위해서는 탈파라핀 과정을 거치는 등의 복잡한 과정이 있어야 한다. 또 그를 위해서는 적어도 50 $\mu$ m의 절편이 필요하여 작은 생검등의 조직에서는 불가능한 경우도 많았다<sup>13-14)</sup>.

화상 분석법의 구조를 설명하면 우선 표본을 관찰할 수 있는 현미경과 이의 화상 감지를 컴퓨터에 전달 해주는 CCD 카메라, 컴퓨터, 그리고 화상을 볼 수 있는 모니터와 컴퓨터에 의해 만들어지는 histogram을 볼 수 있는 모니터로 구성되어 있다. 한편 Becton Dickinson사의 CAS Model 200 Image Analysis System에는 여러가지 software가 있는데 DNA 측정을 위해서는 standard DNA ploidy analysis software module을 사용하였다. 그 밖에 필요한 것으로는 각 슬라이드의 표준화를 위한 대조 세포(control cell)이 묻혀져 있는 표준 슬라이드(calibration slide)가 있다. 염색은 전술한 바와 같이 Feulgen 염색을 하는데 BD사의 Kit를 이용할 수도 있고 통상의 과병리 분야에서 시행하는 Feulgen염색법도 가능하다<sup>12)17)</sup>.

한편 검체의 표본을 만드는 방법은 여러가지가 가능한데 가장 많이 사용되며 좋은 방법은 신선한 종양의 Touch Imprint이고 단일 세포 부유액을 cytopsin에 의해 슬라이드에 고정하는 방법도 있다<sup>18)</sup>. 또한 body fluid나 흡인 천자에 의한 검체일 경우 역시 도말하거나 cytopsin에 의해 표본을 만들 수 있다. 만약 검체가 파라핀에 포매되어 있다 하더라도 FCM때와 마찬가지로 가능한데 Hedley 방법에 의한 단일 세포 부유액을 만들거나 간세포와 같이 세포 경계가 비교적 명확한 경우는 절편을 이용할

수도 있다. 즉, cell debris가 가장 적으면서 가능한 접치는 것을 피할 수 있는 7나지 10 $\mu$ m의 절편을 만들어 이를 탈파라핀, 수분을 가한 후 Feulgen 염색하여 검색하는 것이다.

FCM에서는 자동적으로 검색이 되므로 빠른 시간에 10,000개의 핵을 분석하는데 ICM에서는 일일이 현미경으로 관찰하면서 원하는 세포의 핵을 분석하기 때문에 150개의 정도의 핵이면 분석이 가능하고 경우에 따라서 검체가 소량인 경우는 최소한 50개정도면 가능하다. ICM에서는 calibration외에 직접 현미경으로 관찰하면서 임프구나 비종양세포로서 internal standard를 정할 수 있다. 각 종류의 세포를 N, 1, 2, 3, 4 등으로 구분하면서 측정하면 이들의 전체 histogram과 각각의 histogram을 컴퓨터가 그려줌으로써 여러 세포의 DNA 형태를 비교할 수 있다.

한편 본 연구에서 FCM과 ICM사이에 95% 이상의 일치율을 보이므로 대부분의 경우 어떤 방법이던지 대체로 믿을 만 하다고 할 수 있지만 결과에서도 볼 수 있는 것같이 직접 세포를 관찰하면서 측정할 수 있는 ICM이 비정상 DNA 형태를 찾을 가능성이 높다.

두 방법간에 장단점을 비교하면서 우선 FCM이 빠르고 자동으로 측정이 되므로 손쉬운 장점이 있다<sup>19)</sup>. 또한 reproducibility가 높고 10,000개의 세포를 측정하므로 객관적인 점이 장점이다. 그리고 immunophenotyping을 할 수 있어 임상병리분야나 실험병리분야에서 널리 사용된다<sup>20)</sup>. 그러나 전술한 바와 같이 비정상 DNA 형태를 발견하지 못할 수가 있고 특히 검체가 소량인 경우 측정이 불가능하다는 점이 단점이다. 본 연구에서 본 바와 같이 오래동안 파라핀에 포매되어 있던 경우 C.V.치가 너무 높았고 8예에서는 측정이 불가능 한 경우도 있었다.

반면에 ICM은 직접 현미경으로 세포를 관찰하면서 측정할 수 있기 때문에 원하는 세포의 정확한 DNA 형태를 알 수 있고 소량의 검체도 가능한 장점이 있다. 일치율에서 보는 것같이 50개의 세포만으로도 10,000개의 세포와 거의 비슷한 histogram을 얻을 수 있다는 점이 놀랍다. ICM의 실제적인 또하나의 장점은 시간은 많이 소비되지만 즐겁고 흥미롭다는 점이다. 직접 관찰하는 세포의 DNA 형태를 앞으로써 형태와 DNA 형태간에 비



교가 가능하기 때문이다<sup>21)22)</sup>. 또한 DNA 외에도 image analysis에 응용할 수 있다는 장점이 있다.

특히 절편에서의 측정은 세포의 손실없이 DNA 형태를 알 수 이는 점과 cytospin 법에서는 세포학적 관찰만이 가능한데 비교 조직병리학적 관찰이 가능하므로 장점이 된다. 또한 cytospin 법의 단점인 노력 손실과 시간 손실의 단점도 어느정도 단축시킨다. 따라서 cell debris나 세포가 겹치는 경우만 기술적으로 해결한다면 구태여 단일 세포 부유액을 만들고 다시 cytospin으로 슬라이드에 고정시키는 불필요한 노력을 해결할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 아직까지 이런 점들이 해결이 안되어 비교적 세포 경계가 분명한 간 조직에서는 그런대로 가능하는데 심장, 혈관 등에서는 시도해 보았지만 판독이 불가능하였다.

## 결 론

DNA 분석에 있어 유세포분석법과 화학분석법의 비교 연구를 위해 인간의 간세포암종 50예와 alpha-1-antitrypsin 결핍 간질환을 갖는 transgenic mice 34예를 대상으로 하여 DNA 분석을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 인간의 간세포암종에서는 DNA 형태 분석에서 두방법간에 95%, 실험동물에서는 97%의 일치율을 보였다.

2) DNA index는 2 방법간에 유사한 상관관계를 보였다.

3) C.V.는 화학분석법에서 비교적 낮았고 유세포분석법으로는 불가능한 경우가 8에 있었다.

4) FCM보다 ICM이 노력이 많이 들지만 좀 더 믿을만한 결과를 얻을 수 있었다.

결론적으로 정리하여보면 두 방법간에 좋은 일치율을 보이고 각 방법이 각각 장단점이 있어 어떤 방법이 더 좋다고 말할 수 없고 각 경우에 따라 적용이 되는 방법이 다르고 가장 좋은 것은 두가지 방법을 병행하는 것이 객관적이면서도 정확한 DNA 측정을 할 수 있다고 하겠다.

## References

- 1) Rocis J : *Ackerman's surgical pathology*. 3rd ed., New York, The C.V. Mosby Company, 1989 : 32-33
- 2) Dressler LG, Bartow SA : *Flow cytometry in solid tumors : Practical aspects and clinical applications. Seminars in Diagnostic Pathology* 1989 : 6 : 55-82
- 3) Frankfurt OS, Arbutk SG, Chin JL, Greco WR, Pavelic ZP, Slocum HK, Mittelman A, Piver SM, Pontes EJ, Rustum YM : *Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors. Ann NY Acad Sci* 1986 : 468 : 276-290
- 4) Atkin NB, Nay R : *Prognostic significance of model DNA value and other factor in malignant tumors, based on 1465 cases. Br J Cancer* 1979 : 40 : 210-221
- 5) Kuo SH, Sheu JC, Chen DS, Sung JL, Lin CC, Hsu HC : *Cytophotometric measurements of nuclear DNA content in hepatocellular carcinomas. Hepatology* 1987 : 7 : 330-332
- 6) Fujimoto J, Okamoto E, Yamanaka N, Fujiwara S, Kato T, Mitsunobu M, Toyosala A : *Nuclear DNA analysis of hepatocellular carcinoma. Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1989 : 90 : 1568-1570
- 7) Takahiro E, Takashi K, Takesh O, Takesh S, Keizo S : *DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinoco pathologic implications. Cancer* 1988 : 61 : 106-109
- 8) Hedley DW, Fruendlander MS, Taylor IW, Rurr CA, Musgrove EA : *Methods for analysis of cellular DNA content from paraffin-embedded archival material using flow cytometry. J Histochem Cytochem* 1983 : 31 : 1333-1335
- 9) Hedley DW : *Flow cytometry using paraffin-embedded tissue : Five years on. Cytometry* 1989 : 10 : 229-234
- 10) 김성숙 · 박석건 · 한동선 · 허만하 : 간세포암종의 DNA 분석 - 유세포 분석법과 화학 분석법의 비교 고찰 - 대한병리학회지 1992 : 26 : 1-9
- 11) Mayall BH : *Current capabilities and clinical applications of image cytometry. Cytometry Supp* 1988 : 3 : 78-83
- 12) Oud PS, Hanseaar AG, Pahlplatz MMM, Vooijs GP : *Image DNA index(ploidy) analysis in cancer diagnosis. Applied Optics* 1987 : 26 : 3349-3355
- 13) Hedley DW, Frienlander ML, Taylor IW : *Application of DNA flow cytometry to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. Cytometry* 1987 : 6 : 237-334
- 14) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI : *Deter-*

- gent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 1983 : 3 : 323-327*
- 15) Bose KK, Curley S, Smith WJ, Allison DC : *Differences in the flow and absorption cytometric DNA distributions of mouse hepatocytes and tumor cells. Cytometry 1989 : 10 : 328-387*
  - 16) Van Driel-Kulker AMJ : *Preparation of monolayer smears from paraffin embedded tissue for image cytometry. Histochemistry 1986 : 84 : 549-555*
  - 17) Rodenburg CJ : *Use of DNA Image Cytometry in addition to flow cytometry for the study of patients with advanced ovarian. Cancer Research 1987 : 47 : 3938-3941*
  - 18) Cornelisse CJ, Van Der Velde CJH, Caspers RJC, Moolenaar AJ, Hermans J : *DNA image cytometry in machine-selected breast cancer cells and a comparison between flow cytometry and scanning cytophotometry. Cytometry 1985 : 6 : 471-477*
  - 19) Friedlander ML, Hedley DW and Taylor IW : *Clinical use and biological significance of aneuploidy in human tumors. J Clin Pathol 1984 : 37 : 961-974*
  - 20) Ploem JS, Van Driel-Kulker AMJ, Goyarts-Veldstra L, Ploem-Zaaijer JJ, Verwoerd NP and Van Der Zwan M : *Image analysis combined with quantitative cytochemistry. Histochemistry 1986 : 84 : 549-555*
  - 21) Van Driel-Kulker AMJ and Ploem JS : *The use of leytas in analytical and quantitative cytology. IEEE Trans Biomed Eng 1982 : 289 : 92-100*