

Cytogenetic Study in Suspicious Cases of Malignant Pleural Effusion

Seung-Bum Han, M.D.¹ and Dae-Kwang Kim, M.D.²

Departments of ¹Internal Medicine and ²Anatomy • Institute for Medical Genetics, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

Purpose: This study was performed to detect malignant cells in suspicious cases of malignant pleural effusion by cytogenetic analysis.

Materials and Methods: Eleven cases with pleural effusion were included in this study. Cells in pleural effusion were treated by direct, or short term, culture to prepare chromosomes. To analyze chromosomes, the G-banding method was used.

Results: Chromosome preparations succeeded in 10 cases. 5 cases had normal karyotypes, but in 2 of these cases malignant cells were detected on cytological examination. The other 5 cases had abnormal chromosomes, but on cytological examination showed normal cell appearances.

Conclusion: Cytogenetic analysis of pleural effusions is not used routinely, but is more sensitive than the cytological examination of malignant pleural effusions. So, chromosome analysis is a good diagnostic tool, when chromosomal abnormalities are detected in an effusion. If a combination of cytology and cytogenetic study are used, the chance of detecting malignant cells in pleural effusion will be higher, and then more invasive diagnostic procedures, such as thoracoscopy or thoracotomy, could be avoided. (Cancer Research and Treatment 2002;34:234-238)

Key Words: Malignant pleural effusion, Cytogenetic analysis

서 론

흉막강에는 흉막액이 정상적으로 소량 존재하지만 양성 및 악성 질환에 의하여 흉막표면의 투과성이 증가하여 흉막유출이 2~3리터로 증가할 수 있다. 흉막유출이 여출액인지 삼출액인지, 양성인지 악성인지, 그리고 악성인지 결핵성인지를 감별하기 위하여 여러 가지 실험적 방법이 이용된다. 그렇지만 흉막유출의 약 20% 정도는 정확한 감별 진단이 쉽지 않다(1). DeWald등(2)은 악성 흉막유출(malignant pleural effusion)의 진단에 세포학진단의 보조로 염색체 분석을 시도하였는데, 세포학진단과 염색체분석 단독의 진단 결과보다도 세포학진단과 염색체분석을 병용한 것이 더욱 더 정확한 진단 결과를 얻을 수 있었으며, 염색체분석을

이용한 세포유전학적 연구는 세포학진단보다 더 민감한 결과를 얻을 수 있다고 보고하였다. 악성 흉막유출에서 염색체의 이상을 보고한 경우가(3~5) 있으나 통상적으로 세포유전학적 연구는 흉막유출의 감별진단에는 현실적으로 이용하지 못하고 있다.

국내에서 악성 흉막유출에서 섬유소용해 물질을 조사하여 흉막유출의 악성유무를 조사해본 연구는 있으나(6), 악성 흉막유출에서 염색체에 대한 연구는 없다. 본 연구는 악성 흉막유출이 의심되는 환자의 흉막유출이 악성인지 양성인지를 감별진단하기 위하여 염색체 검사를 실시하였다.

대상 및 방법

계명대 동산의료원에 입원한 환자로서 흉막유출을 지닌 11명의 환자를 대상으로 하였다. 폐암환자가 8명, 자궁경부암 환자 1명, 그리고 진료가 중단되어 임상적인 정보가 없는 2명의 환자들의 흉막액을 실험체료로 사용하였다.

흉강천자로 얻은 흉막유출은 250 mL 배양용기에 담고 흉막유출의 응고를 방지하기 위하여 소량의 헤파린을 처리하였다. 염색체표본은 흉막유출 채취 즉시 실시하는 직접법과 직접법에서 염색체의 제작을 실패한 경우 흉막유출을

Correspondence: Dae-Kwang Kim, Department of Anatomy • Institute for Medical Genetics, Keimyung University School of Medicine, 194, Dongsan-dong, Jung-go, Daegu 700-712, Korea. (Tel) 82-53-250-7475, (Fax) 82-53-250-7471, (E-mail) dkkim@dsmc.or.kr

Received July 13, 2001, Accepted April 18, 2002
The present research has been conducted by the Bisa Research Grant of Keimyung University in 1997.

단기간 배양(7일 이내)하여 염색체를 제작하였다. 단기간 배양은 10% 소태아혈청(Gibco, Gaithersburg, MD)을 함유한 Ham's F12 배양액(Gibco)을 사용하였고 배양액은 배양 후 3일에 교환하고 세포수확 하루 전에 한 번 더 해 주었다. 세포수확은 colcemid (0.1 mg/mL, Gibco)로 2~3시간 처리한 후 1,200 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 세포를 수집하였다. 단기간 배양 시에는 0.25% 트립신을 사용하여 세포를 배양용기에서 탈락시킨 후 1,200 rpm으로 10분간 원심분리를 하고 상층액을 제거하여 세포를 수집하였다. 남은 세포는 0.075 M KCl 저장액으로 37°C 수조에서 20분간 방치하여 세포가 부종의 상태가 되도록 한 후, 1,200 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 부종상태의 세포를 모았다. 저장액으로 처리된 세포는 미리 -20°C에서 보관 중인 메탄올과 초산을 3 : 1로 배합한 고정용액으로 처리한 다음 1,200 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 고정된 세포를 모았다. 고정액으로 2~3회 위의 과정을 반복하였다. 염색체 표본제작은 슬라이드에 고정액 2~3 방울을 떨어뜨린 후 공기건조를 실시한 다음 슬라이드를 60°C에서 5시간 방치하여 숙성시켰다. 슬라이드를 0.25% 트립신으로 5~15초 동안 처리한 후 4% Giemsa (Fluka,

Buchs, Switzerland) 용액에 5분간 염색하여 G-banding을 실시하였다. 각 증례마다 20개의 중기세포의 염색체를 1,000배 배율로 사진 촬영을 하고 세포유전학 분석을 실시하였다. 염색체의 구조적 이상은 2개 이상의 세포에서 발견되는 경우에 클론성 구조적 이상으로 간주하였으며, 수적인 이상이 3개 이상의 세포에서 발견되는 경우에서 클론성 수적인 이상으로 간주하였다.

결 과

총 11예의 흉막유출의 염색체 검사 중 1예(증례 3)에서 실패하였고 나머지 10예에서는 성공하였다(90.9%)(Table 1). 이중 5예(증례 4, 5, 7, 8 및 9)에서는 염색체 핵형이 정상으로 나타났으며(50%), 나머지 5예(증례 1, 2, 6, 10 및 11)에서는 비정상적인 염색체 핵형을 나타냈다(50%)(Table 1, Fig. 1). 세포학진단에서는 종양세포가 양성으로 나타난 경우는 증례 7과 8 (Table 2)의 경우인데 이들의 염색체검사는 정상 핵형으로 나타났다(Table 1). 염색체 이상을 보인 5예의 경우에서 염색체 수적인 범위는 저이배체(hypodiploid)가 2예(증례 6과 11), 과이배체(hyperdiploid)가 1예(증례 1), 저

Table 1. Cytogenetic data

Patient	Range of chromosome no.	Clonal abnormalities	Nonclonal abnormalities
Case 1	Hyperdiploid		del(1)(q13), del(2)(p21), t(3;6)(q25;q27) i(13)(q10), dic(20;?)(qter;?) +1, +2, +6, +10, +22, -Y
Case 2	Hypotriploid	t(1;9)(q23;q34), i(1)(p10), del(5)(q13), i(5)(p10), i(6)(p10), der(9)t(9;?)(qter;?) i(11)(q10), i(14)(q10) +1, +14, +15, -Y, -9, -13, -17, -22	del(X)(q25), del(2)(p13), del(3)(p13), del(7)(q22), i(8)(q10)
Case 3	No mitosis		
Case 4	46,XX		
Case 5	46,XX		
Case 6	Hypodiploid	del(3)(q21)	+16, +20, +22, -Y, -10, -12, -13
Case 7	46,XY		
Case 8	46,XY		
Case 9	46,XY		
Case 10	Hypertriploid	t(1;9)(q25;p24), i(1)(p10), del(4)(q12), i(5)(p10), i(6)(p10), del(7)(q22), i(8)(q10), i(11)(q10), i(14)(q10) +1, +7, +9, +17, -4, -20	i(15)(q10), 20q+, +21, +8, -12, -13, -15, -18
Case 11	Hypodiploid	del(4)(q21) +21, +22, -Y, -1, -14	del(7)(q21) +13, +15, +17, -19

+: chromosome gain, -: chromosome loss

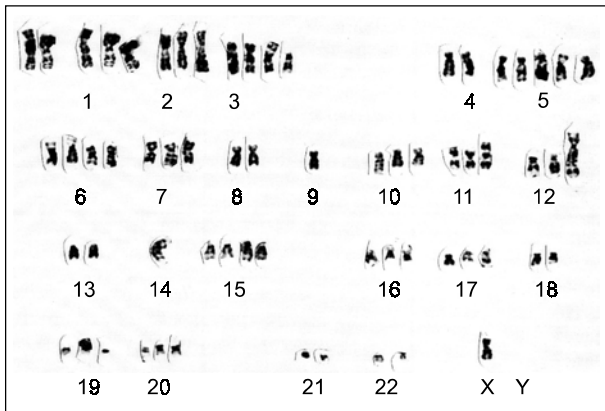


Fig. 1. An example of chromosome abnormalities in case 2.

삼배체(hypotriploid)은 1예(증례 2), 그리고 과삼배체(hypertriploid)가 1예(증례 10)가 있었다(Table 1). 특이적으로 나타나는 염색체 구조적 이상으로 염색체 전좌(translocation)로는 t(1;9)(q25;p24), t(1;9)(q23;q34), 그리고 der(9)t(9;?) (qter;?)가 나타났으며, 염색체 결손(deletion)으로 del(3)(q21), del(4)(q12), del(4)(q21), del(5)(q13), 그리고 del(7)(q22)이 나타났다. 그리고 1p, 5p, 6p, 8q, 11q, 그리고 14q의 등완염색체(isochromosome)가 보였다. 염색체 수적인 증가 경향은 1, 7, 9, 14, 15, 17, 21 및 22번 염색체에서, 그리고 감소 경향은 Y, 1, 9, 13, 14, 17 및 22번 염색체에서 나타났으며, 이외에도 비특이적인 염색체 이상과 수적인 이상을 보였다(Table 1).

고 찰

유전물질의 변화를 광학현미경으로 관찰할 수 있는 것이 염색체이다. 염색체를 이용한 세포유전학적 분석은 주로 출산 전에 산모에서 선천 기형을 진단하는데 사용되었는데, 만성골수백혈병에서 특이적으로 나타나는 Philadelphia 염색체는 염색체의 변화가 종양을 유발하는 직접적인 원인이 된다는 증거를 제시하여 암세포유전학의 새로운 이정표가 되었으며, 염색체 검사에서 염색체의 구조와 숫자의 이상을 보이는 것은 암세포의 존재를 의미한다고 할 수 있다(7). 암유전자, 종양억제유전자 그리고 세포의 노화와 apoptosis에 관련이 있는 유전자들은 염색체의 전좌(translocation), 역위(inversion), 결손(deletion), 또는 유전자가 증폭되는 부위를 지닌 염색체이상을 보일 수 있다. 유전자변이와 염색체 이상이 축적될수록 세포의 변형(transformation)이나 표현형(phenotype)의 변화가 일어나며, 특히 지속적인 특이한 염색체 변이를 확인하는 경우에는 질병의 진단과 예후에 적용할 수 있으며 잔류 질병의 잔존 여부를 확인하는

Table 2. Clinical data

Case	Age (yr) /sex	Diagnosis	Cytologic study of pleural effusion
1	60/M	Large cell carcinoma, lung	Negative*
2	49/M	Adenocarcinoma, lung	Negative
3	49/M	Adenocarcinoma, lung	Negative
4	62/F	Squamous cell carcinoma, cervix	Negative
5	61/F	Adenocarcinoma, lung	Negative
6	54/M	Small cell carcinoma, lung	Negative
7	59/M	Adenocarcinoma, lung	Positive [†]
8	73/M	Adenocarcinoma, lung	Positive
9	63/M	Adenocarcinoma, lung	Negative
10	60/F	No information	Negative
11	73/M	No information	Negative

*malignant cells are not detected, [†] malignant cells appear

표지로도 이용할 수 있다. 그러므로 염색체이상은 암세포의 존재를 나타내는 육안으로 확인할 수 있는 중요한 표지이다(8,9).

흉막유출의 진단은 여출액과 삼출액의 구별에서 시작되며, 대부분이 삼출액으로 그 원인으로 우리나라에서는 보고자마다 수치는 약간 다르나 순서상으로 결핵, 종양, 그리고 감염이 대부분 차지하고 있다(10,11). 최근 위생환경의 변화와 함께 결핵이환율의 감소, 평균 수명의 연장 및 진단 검사의 발달로 결핵이외의 다른 원인의 질환으로 인한 흉막유출의 발생빈도가 증가하고 있는데, 특히 폐암 및 다른 장기의 암의 발생 빈도가 증가하는 경향이므로 흉막유출의 정확한 감별 원인 규명이 중요하다. 흉막유출을 일으키는 악성 질환으로는 대표적으로 폐암, 유방암, 그리고 임파종이다(12). 악성 흉막유출로 진단을 내리기 위해서는 흉막액 또는 흉막에서 악성세포를 발견함으로써 가능하다. 통상적인 진단법으로 흉막액의 세포학진단, 흉막의 침생검 또는 흉강경검사가 행해진다. 외국의 경우 세포학진단에서 흉막유출로 악성을 진단할 수 있는 경우는 약 40~87%로 큰 변이를 보이고 있다(13,14). 최근 면역조직화학적방법을 이용하여 악성 흉막유출과 양성 흉막유출을 감별하려는 보고가 있으나, 이들 보고에서는 국내에서는 잘 유발되지 않는 중피종의 종양세포 또는 반응성 중피세포를 전이성 종양 세포와 감별 진단하려고 사용되었다(15~17). 클론성 세포유전학적 이상은 악성을 의미하는데, Granados등(18)은 10명의 중피종의 환자의 흉막유출에서 9명의 환자에서 염색체 이상을 발견하고 세포학진단으로 확진을 한 연구에서 염색체 검사법이 악성 중피종의 진단에 있어서 보조 수단으로

유용할 것으로 보고하였다. Tiainen등(19)은 악성 흉막 중피종에서 염색체분석을 통해 염색체수가 46개, 46개 이하, 46개 이상의 3군으로 나누어서 예후를 관찰하였는데 염색체수가 46개인 집단에서 가장 예후가 좋고 염색체가 46개 이상인 집단에서 가장 예후가 불량하게 나타나서 중피종에서는 염색체의 수가 예후와 상관 관계가 있음을 보고하였다. 그러나 흉막유출에서 염색체에 대한 연구는 중피종에 대해서 조금 되어 있을 뿐 기타 악성 및 양성 흉막유출을 일으키는 질환에 대해서는 국내외로 드문 상태이다. 그러므로 흉막유출의 경우에서 세포유전학적 연구는 기초적인 면에서도 의미가 있다고 사료된다.

본 연구의 증례 3의 경우에서는 염색체 제작에 실패하였는데 이는 세포분열을 하지 않거나 세포분열을 하더라도 그 수가 미미하여 중기세포를 검출 못했기 때문인 것으로 추정된다. 암조직에서 나타나는 정상 핵형을 보이는 세포의 기원은 악성 세포보다는 주로 종양세포의 주위 간질세포에서 기원한 것으로 설명할 수 있을 것이다(5).

증례 4, 5 그리고 9의 경우 세포학진단에서는 악성세포를 검출하지 못하였고 염색체분석에서도 정상 핵형이 나타났는데, 이들 정상 핵형을 지니는 세포의 기원은 염증 세포나 흉막의 중피세포로 추정되며 이들 경우의 흉막유출에서는 종양세포가 존재하지 않은 것으로 사료된다. 그러므로 악성 흉막유출이 의심되는 경우에서 염색체분석으로 악성 세포가 음성으로 나타나는 결과는 세포학진단에서 음성으로 나타난 결과를 지지하는 의미가 있을 것이다. 그렇지만 폐암세포의 경우 위낙 이질성을 보이므로 흉막유출의 세포학진단과 핵형 분석의 결과가 음성이라도 종양세포가 존재하지 않는다고는 할 수 없을 것이다.

증례 7과 8의 경우에서의 세포학진단은 종양세포 양성을 보였으나 염색체 분석은 정상으로 나타났다. 이는 아마도 염색체 표본 제작 당시 종양세포보다도 흉막액의 중피세포나 다른 정상세포들의 수가 급격히 증가하고 세포분열이 왕성하게 일어나서 악성 세포를 검출하지 못하여 나타나는 세포유전학 검사의 위음성의 결과로 추정된다. DeWald등(20)은 염색체를 직접적으로 제작하거나 단기간 또는 장기간 배양을 통한 염색체 검사를 동시에 실시하여 악성 흉막유출에서 암세포를 검출하는데 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 악성 흉막유출이 의심되는 경우에서 암세포가 소수로 존재하는 경우에는 암세포를 증식시킨 다음 염색체 분석을 할 필요성이 있겠다.

종양세포에서 염색체이상은 특이적으로 나타날 수 있지만, 세포분열이 적은 경우와 여러 기술적인 원인에 의해 비특이적인 염색체 이상이 나타날 수 있다(8). 증례 1, 2, 6, 10 그리고 11에서는 특이적인 염색체 이상과 비특이적인

염색체 이상이 나타났으나 세포학진단에서는 악성 세포가 검출되지 않아 염색체 분석이 세포학진단보다도 특이성이 높음을 시사하지만, 더 많은 대상에 대한 의미 있는 결과를 도출하기 위하여 추후 연구가 필요하겠다. 향후 악성 흉막유출이 의심되는 경우에서 세포유전학 검사를 실시하면 세포학진단보다도 높은 감수성을 보일 것으로 추정되며, 이는 통상적으로 사용되는 세포학진단 결과를 보충하는 역할을 할 것이다. 악성 흉막유출의 가능성이 매우 높지만 세포학진단과 세포유전학적 진단이 음성으로 나타나는 경우에는 흉막유출을 단기간 또는 장기간 배양을 하여 소수로 존재할 수 있는 암세포를 증식시켜서 세포학진단과 세포유전학적 검사를 실시하면 위음성의 결과는 더욱 더 감소할 것이다. 그러므로 악성 흉막유출을 진단하는데 염색체 검사가 앞으로 유용할 것으로 추정되며, 세포학진단과 세포유전학적 검사를 동시에 실시하면 악성 흉막유출에서 종양세포의 검출률을 높일 뿐만 아니라, 흉강경 검사와 흉막 침생검 같은 침습성 진단방법을 사용할 필요성이 줄어들 것이다.

결론

악성 흉막유출에서 세포유전학 검사는 세포학진단보다도 악성세포를 검출하는데 특이성이 높을 것으로 사료되며, 악성 흉막유출에서 종양세포를 검출할 경우에 세포학진단과 염색체 검사를 동시에 실시하면 종양세포의 검출률을 높일 뿐만 아니라 침습성 진단방법을 사용할 필요성이 줄어들 것이다.

REFERENCES

1. Valdes L, Pose A, Suarez J, Gonzales-Juanatey JR, Sarandeses A, San Jose E, Alvarez Dobana JM, Salgueiro M, Rodriguez Suarez JR. Cholesterol: A useful parameter for distinguishing between pleural exudates and transudates. *Chest* 1991;99:1097-1102.
2. DeWald G, Dines DE, Weiland LH, Gordon H. Usefulness of chromosome examination in the diagnosis of malignant pleural effusions. *N Engl J Med* 1976;295:1494-1500.
3. Falor WH, Ward RM, Brezler MR. Diagnosis of pleural effusions by chromosome analysis. *Chest* 1982;81:193-197.
4. Bousfield LR, Greenberg ML, Pacey F. Cytogenetic diagnosis of cancer from body fluids. *Acta Cytol* 1985;29:768-774.
5. Musilova J, Michalova K. Cytogenetic study of cancer cell in effusions. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;19:271-279.
6. Baick SH, Jeon JW, Won JH, Hong DS, Park HS. Fibrinolytic profiles in malignant pleural effusion. *J Korean Cancer Assoc*

- 1996;28:705-709.
 7. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
 8. Sandberg AA, Turc-Carel C, Gemmill RM. Chromosomes in solid tumors and beyond. *Cancer Res* 1988;48:1049-1059.
 9. Sheer D, Squire J. Clinical applications of genetic rearrangements in cancer. *Semin Cancer Biol* 1996;7:25-32.
 10. Kim YJ, Lee EK, Jung JW, Park JR, Suh CY. Clinical observation of exudative pleurisy and diagnostic significance in percutaneous needle biopsy of pleura. *Korean J Intern Med* 1982; 25:725-732.
 11. Kim CS, Ju KJ, Lee CH, Park SM, Shin YW, Song KY. Clinical observation of pleural effusion. *Tuberc Respir Dis* 1993;40: 584-594.
 12. Johnston WW. The malignant pleural effusion: A review of cytopathologic diagnosis of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer* 1985;56:905-909.
 13. Prakash UB, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo Clin Proc* 1985;60:158-164.
 14. Escudero Bueno C, Garcia Clemente M, Cuesta Castro B, Molinos Martin L, Rodriguez Ramos S, Gonzalez Panizo A, Martinez Glez-Rio J. Cytologic and bacteriologic analysis of fluid and pleural biopsy specimens with Cope's needle. Study of 414 patients. *Arch Intern Med* 1990;150:1190-1194.
 15. Wirth PR, Legier J, Wright GL Jr. Immunohistochemical evaluation of seven monoclonal antibodies for differentiation of pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 67:655-662.
 16. Frisman DM, McCarthy WF, Schleiff P, Buckner SB, Nocito JD Jr, O'Leary TJ. Immunohistochemistry in the differential diagnosis of effusions: use of logistic regression to select a panel of antibodies to distinguish adenocarcinomas from mesothelial proliferations. *Mod Pathol* 1993;6:179-184.
 17. Brown RW, Clark GM, Tandon AK, Allred DC. Multiple-marker immunohistochemical phenotypes distinguishing malignant pleural mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1993;24:347-354.
 18. Granados R, Cibas ES, Fletcher JA. Cytogenetic analysis of effusion from malignant mesothelioma. A diagnostic adjunct to cytology. *Acta Cytol* 1994;38:711-717.
 19. Tiainen M, Rautonen J, Pyrhonen S, Tammilehto L, Mattson K, Knuutila S. Chromosome number correlates with survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;62:21-24.
 20. Dewald GW, Hicks GA, Dines DE, Gordon H. Cytogenetic diagnosis of malignant pleural effusions: culture methods to supplement direct preparation in diagnosis. *Mayo Clin Proc* 1982;57:488-494.
-