

9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA)으로 유발한 흰쥐의 악성 섬유성 조직구종의 세포주기에 관한 검색

박명선, 정해진*, 허방

고신대학교 의학부 병리학 교실, 언양 보람병원 해부병리과*

Cell Cycle Analysis of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) Induced MFH Cell Strain of Wistar Rat

Myeng Sun Park, Hae Jin Jeong, Bang Hur

Department of Pathology, Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea

Abstract

Background/Objective Although a malignant fibrous histiocytoma (MFH) is the most common malignant soft tissue tumor in adults, its biologic property is not fully understood. The aim of the study is to present the basic data for cell cycle of MFH which is essential to elucidate the biologic property of component cells in experimentally-induced MFH. **Method** Experimental MFH was induced by repeated intra-articular injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) in Wistar rats. Using the produced MFH, cell culture and cloning were performed, followed by establishment of a cell strain, in which radiolabelled thymidine was incorporated into DNA of proliferating cells by single exposure of tritiated thymidine. **Results** Average labelling index of DMBA-induced MFH cells was 26.6% and mitotic index was 4.3%. Labelled mitosis index (LMI) showed a maximum level (90.9%) at 4 hours incorporation. After decrease of LMI at 14 hours (7.8%), it's level again increased at 24 hours (56.8%). Each phase of cell cycle time was determined in the curve using Quastler and Sherman method. **Conclusion** A total generation time(TG) of DMBA induced MFH cell strain was about 24.1 hours, and the duration of S, G₂, M, and G₁ phase was 6.4, 2.0, 1.6, and 14.1 hours, respectively.

Key Words: Malignant fibrous histiocytoma, Cell strain, ³H-thymidine, Autoradiography, Cell cycle time

서론

악성 섬유성 조직구종 (malignant fibrous histiocytoma, MFH)은 성인의 연부조직에서 발생하는 악성 종양 중 가장 흔한 형태으로써 그 구성세포의 종류가 다양하여 조직학적으로 광범위한 특징을 가지고 있다. 더구나 발생 기원등 아직 밝혀지지 않은 부분이 많으므로, 이 종양의 생물학적 성상을 살펴보기 위해서는 종양세포의 정확한 특성들을 구명하는

것이 무엇보다 중요하다.¹⁻³⁾ 종양 세포의 특성 중에서 세포의 증식능을 측정하는 것은 종양의 악성도와 밀접한 연관이 있기 때문에 특히 중요하다. 병리학적으로 세포의 증식능을 평가하는 데에는 증식 상태 (state of proliferation)를 평가하는 방법과, 증식 속도 (rate of proliferation)를 구하는 방법이 있다.⁴⁻⁶⁾ 유사분열 세포의 계수 (mitotic index), 유세포 측정법 (flow cytometry), 면역조직화학적 염색법 등의 방법은 일정 주어진 시점에서 세포주기내에 있는 세포의 비율을 나타내는 증식 상태를 평가하는 방법이고, 세포들이 얼마동안 세포주기중에 있는가를 측정하는 방법인 metaphase arrest나 thymidine labelling method, double labelling method 등은 세포의 증식 속

교신저자 : 박명선
TEL: 051-240-6477 · FAX: 051-241-7420
E-mail: upmspark.netian.com

도를 측정하는 방법들이다.

이에 본 연구에서는 실험적으로 발생시킨 MFH에서 하나의 세포주를 수립하고 이들 세포의 증식속도를 측정하여, 아직도 분명하게 규명되지 못한 MFH 구성세포의 생물학적 성상을 밝히기 위한 기초 자료를 제공하고자 한다. 세포주기의 각 시기의 기간을 결정하기 위한 방법들로는 여러 가지가 있으나, 본 연구에서는 다소 복잡한 계산을 필요로 하지만 정확한 것으로 알려져 있는 ^3H -thymidine의 단회 노출후 세대시간을 결정하는 Quastler와 Sherman의 방법을 이용하였다.^{7,8)}

재료 및 방법

1. 재료 및 실험모델

생후 6주된 Wistar 흰쥐 (체중 200g 가량)의 슬관절에 파라핀에 녹인 2% DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene, Sigma, USA) 0.1 ml를 4주 간격으로 3회 반복 주사한 후 4~8개월에 걸쳐 촉진 및 방사선 촬영으로 종양 형성과 발육상태를 추적 관찰하였다. 종양이 약 4 cm에 이를 때 실험동물을 희생시켰다.

2. 실험 방법

1) 육안적 및 조직학적 검색

생성된 종양조직을 적출하여 육안적 형태를 관찰하고 절제한 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 통상적인 방법에 의하여 hematoxylin-eosin (H-E) 염색표본을 만들었고, 이를 광학현미경으로 검색하였다.

2) MFH 종양세포의 분리 및 배양

형성된 종양 조직 중 피사부위를 피하여 무균적으로 일부를 채취하고, 박절한 후 0.5% trypsin-EDTA로 약 20분간 처리하여 세포를 분리시켰다. 분리된 세포를 항생제와 10% 우태아 혈청이 보충된 RPMI-1640 배양액에 부유시켜 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 세포성장이 융합성을 보일 때 계대 배양을 시행하였다.

3) 단일세포 클로닝

배양하던 세포중 일부를 0.5% trypsin-EDTA를 이용하여 분리한 후 0.22% Noble agar (Difco, Detroit,

Michigan)를 함유한 RPMI-1640 배지에서 세포수 1×10^3 cell/ml로 부유시켜 부유액 3 ml씩을 6-well plate에 분주한 후, 0.5% agar RPMI-1640 배지 4 ml씩을 첨가하여 반경화 (semisolidification)시켜 배양하였다. 반경화된 배양액 내에서 세포들의 집락이 형성된 2주 후에 각 집락을 새로운 배양병에 이식하고 다시 배양시켜 0.5% trypsin-EDTA로 세포를 낱알이 분리시켜 한 차례 더 세포를 반경화 배지에 배양하여 다시 형성된 세포 집락을 수확하는 방법으로 단일세포 클로닝하여 하나의 세포주를 획득하였다. 이들 세포를 15개의 배양병에서 배양하였다.

4) 세포주기의 확인

(1) 방사능 표지 (Radioisotope labeling)

얻어진 MFH 세포주에 DNA를 표지하기 위하여 RPMI-1640 배양액에 10 $\mu\text{Ci/ml}$ 의 농도로 희석하여 4°C에 보관 준비된 ^3H -thymidine (specific activity 25 Ci/m mol, Amersham)을 각 15개의 배양병에 첨가하여 30분간 배양 (37°C, 5% CO₂)하여 방사능 표식을 하였다. cold thymidine 0.2%를 RPMI-1640 배양액에 희석하여 4°C에 보관 준비된 배지에서 계속 배양하여 ^3H (tritium)에는 배양세포가 30분간만 노출되게 하였다. ^3H -thymidine처리 1시간 후, 그리고 2시간부터는 2시간 간격으로 처리 28시간까지 15개의 배양병을 하나씩을 꺼내어 0.5% trypsin-EDTA를 처리하여 배양세포를 분리하였다. 각 시간대 별로 분리된 세포를 cytospin을 이용하여 5개의 슬라이드에 부착시키고, 각 슬라이드를 메탄올과 아세톤을 1:1로 혼합한 용액으로 10분간 고정하였다. 빙냉 10% 과염소산 (HClO₄)으로 10분간 처리하여 DNA에 부착되지 않은 ^3H -thymidine과 같은 산 가용성 전구 물질을 제거하고 증류수로 수세를 충분히 한 후 100% 메탄올로 건조시켰다.

(2) 자기 방사능법 (autoradiography)

각 슬라이드는 안전등이 설치된 암실에서 감광유제인 NTB2 (Kodak)와 40°C로 가온된 증류수를 1:1의 비율로 혼합한 용액에 2~3회 서서히 흔들어 담근 후 약 30분간 공기 중에서 자연 건조시켰다. 건조된 각 슬라이드를 light-tight microscope 슬라이드 박스에 건조제와 함께 넣어 완전 밀봉하고, 4°C의 암실 냉장고에서 4주간 노출시켰다. 슬라이드의 현상, 고정 등은 암실에서 Langman의 방법에 따라 시행한 후 대조염색으로 H-E 염색을 하였다.⁹⁾ 각 시간대별의 5개씩의 슬라이

드에서 전체 세포수, ^3H -thymidine 표지 세포수, 비표지 분열 세포수 및 표지 분열 세포수를 400배 현미경 하에서 세어서 세포주기 측정에 필요한 각 지수 백분율들을 구하였다. 한 개의 핵에 ^3H -thymidine과 결합된 핵 내 반응 과립 (grain)이 10개 이상 관찰 될 때 이를 표지 된 핵으로 간주하였다 (Figure 1, 2).¹⁰⁾



Fig. 1. An autoradiograph obtained after a short period of incubation of MFH cell strain in culture with ^3H -thymidine (H-E, x1000) Prophase of mitosis is represented by unlabeled MFH cell strain.



Fig. 2. Metaphase of mitosis in labeled MFH cell strain (H-E, x1000). The presence of exposed silver grains over nucleus in MFH cell strain indicates that the cell incorporated radioactive thymidine into its DNA.

(3) 분석 방법

i) 표지계수 (Thymidine labeling index, TLI)

총 세포수 중에서 ^3H -thymidine에 의해 표지된 세포의 비의 백분율 (표지세포/총 세포수 x100)을 표지계수로

하였고, 이 값을 각 시간대별로 그래프에 표시하였다.

ii) 세포 분열상 표지율 (Labeled mitosis index, LMI)

전체 세포 분열상을 보이는 세포 중 표지된 세포 분열상 세포의 비율로써 그 백분율 (표지 분열세포/총 분열세포)을 그래프에 표시 연결하였다. 일반적으로 세포들은 LMI는 0%에서 100%까지 증가하였다가 안정기를 지낸 후 급격히 하강하고, 다시 상승과 하강을 하는 파형을 그리게 되는데, 이 파형을 이용하여 총 세대 시간 (Total generation time, TG), S기, G2기, M기, G1기를 결정한다.

G2 + 1/2M기는 LMI가 50%에 이르기까지의 시간, S기는 상승 50%에서 하강 50% 지점까지의 시간, G2 + M기는 상승 50% 점에서 접선을 그어 100%점의 눈금과 만나는 점까지의 시간, G1기는 총 세대시간에서 (S + G2 + M)값을 뺀 시간으로서 이론적으로 총 세대시간은 첫 곡선의 정점과 둘째 곡선의 정점 사이의 시간이지만 세포 손실이나 첨가와 같은 여러 요인들 때문에 실제로 사용하지 못하고 $TG=S/LI$ (Labeling Index)라는 수식에 의해 구해질 수 있다.⁷⁾

결과

실험 동물 슬관절에 DMBA를 주사한 지 4~8개월 경에 대퇴부 연부 조직에 종괴가 발생하였고, 이 종괴는 육안적으로 다분엽형의 회백색을 띤 육질성 종괴였다. 조직학적으로는 사람의 악성 섬유성 조직구종 (Malignant fibrous histiocytoma, MFH)의 가장 흔한 유형인 storiform-pleomorphic type이었다. 단일 세포 클로닝으로 수립된 세포주는 MFH 종괴의 조직학적 양상과 유사한 storiform을 나타내어 종양세포와 세포주의 성장양상이 유사함을 알 수 있었다.

단일세포 클로닝으로 수립된 세포주에서 ^3H -thymidine 단회 노출 방법으로 구해진 각 시간대별 표지 계수의 변화는 다음과 같다. 노출 6시간대까지는 ^3H -thymidine 표지율 (TLI) 11%~13%를 유지하다가 8시간에 81.3%였으며 점차 감소하는 추세를 보였고, 28시간까지의 평균 표지율은 26.6%였다 (Table 1, Figure 3). 또한 세포 분열상 표지율은 노출 4시간에 급격히 증가되어 90.9%로 최고가 되었다가 점차 감소하여 14시간대에는 7.9%로 감소되었다. 24시간대에 56.3%로 다시 증가되었으나 28시간대에 이르러 또다시 감소하였다 (Figure 4). 이러한 파형곡선으로 얻은 표지율 변화에

Table 1. ^3H -thymidine labeling index (TLI) and labeled mitosis index (LMI) of rat MFH cell strain

Time interval (hr)	TLI(%) (Mean $\pm$ SD)	LMI(%) (Mean $\pm$ SD)
1	12.2 $\pm$ 2.1	14.9 $\pm$ 8.1
2	15.4 $\pm$ 1.7	29.2 $\pm$ 3.8
4	11.5 $\pm$ 5.2	90.6 $\pm$ 1.6
6	13.2 $\pm$ 2.9	85.7 $\pm$ 2.1
8	81.3 $\pm$ 5.7	72.7 $\pm$ 3.8
10	45.7 $\pm$ 0.9	33.3 $\pm$ 1.4
12	48.3 $\pm$ 5.5	31.2 $\pm$ 2.4
14	16.5 $\pm$ 1.1	7.8 $\pm$ 0.8
16	18.3 $\pm$ 0.7	8.1 $\pm$ 0.5
18	23.7 $\pm$ 16.6	9.9 $\pm$ 5.6
20	22.9 $\pm$ 4.0	46.5 $\pm$ 0.9
24	30.9 $\pm$ 7.1	56.7 $\pm$ 2.8
26	24.0 $\pm$ 5.2	13.3 $\pm$ 7.6
28	16.2 $\pm$ 1.6	5.3 $\pm$ 2.3

* Mean Labeling Index is 26.6% and Total Mitotic Index is 4.3%

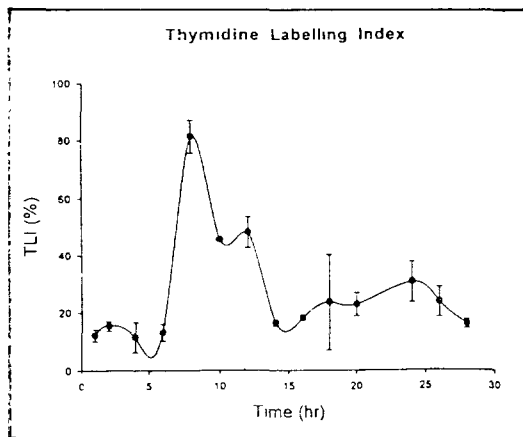


Fig. 3. Curve of labelling indices in MFH cell strain.

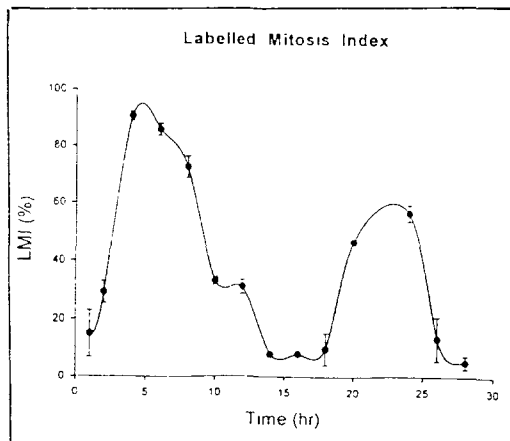


Fig. 4. Curve of labeled mitosis indices in MFH cell strain.

의한 세포주기별, 각 기간별 시간은 총 세대시간 (TG) 24.1시간 중 G1 기가 14.1시간, S 6.4시간 G2 2.0시간 M 1.6시간이었으며, 분열계수는 4.3% (분열 세포수 3,835/총 세포수 89,614)였다 (Table 2).

Table 2. Cell cycle analysis of MFH cel strain

cell cycle	hours (%)
G1	14.1 (58.5)
S	6.4 (26.6)
G2	2.0 (8.3)
M	1.6 (6.6)
TG	24.1 (100)

cf) HeLa cell: TG (20 h), G1 (7.7 h)

고찰

악성 섬유성 조직구종은 성인 연부 조직 악성 종양 중 가장 흔한 종양으로, 형태학적으로 다양한 모양을 나타내어 storiform-pleomorphic type을 비롯한 여러 유형들로 분류되고 있다.¹¹⁻¹²⁾ 그 구성세포의 종류 또한 다양하여 섬유아세포, 근섬유아세포, 조직구 등이 주로 관계하는 것으로 알려져 있다. 연구자에 따라 종양 세포의 구성 세포 이외에 다른 세포도 관여하는 것으로 주장되고 있으나, Kauffman¹³⁾과 Tsuchiya등²⁾은 하나의 세포에서 기원한 종양으로 단순한 형태학적 변형에 의해 구성세포의 다양성을 보인다고 주장한 반면, Mirra¹⁴⁾는 MFH는 단순한 섬유육종의 한 변형이라는 주장을 하고있어, 여전히 구성세포의 발생기원이나, 다양한 세포의 침윤에 대한 기전 등 밝혀지지 않은 부분이 많다.

종양 세포의 특성 중 세포의 증식 능력을 측정하는 것은 그 종양의 생물학적 동태를 알 수 있는 중요한 지표가 된다.¹⁵⁾ 1950년 Howard와 Pelc^{16,17)}가 ^{32}P incorporation과 autoradiography를 이용하여 세포주기를 측정하고, 세포주기가 단계별로 이루어져 있다는 개념이 소개된 이래 세포의 증식 능력을 측정하는 연구가 활발히 이루어져왔다. 유사분열 세포를 계수하는 것과 유사 세포 측정법 (flow cytometry), 면역조직화학적 염색법 등의 증식상태를 평가하는 방법들은 각각 그 이용이 편리하다는 점, 객관적 지표가 될 수 있도록 많은 세포를 측정에 이용한다는 점 등의 장점이 있지만, 세포의 증식속도를 알 수는 없다는 단점이 있다. 그래서 본 실

험에서는 세포의 증식속도를 측정하는 방법중의 하나인 thymidine labeling method를 이용하였다. Thymidine labeling method는 1950년대에 고해상 autoradiography의 발전과 ^3H -thymidine의 소개로 cell kinetics연구의 기본 방법으로 상용되게 되었다. ^3H -thymidine은 DNA를 합성하고 있는 세포에만 흡수되어 핵 내 DNA의 일부가 됨으로써 세포주기를 비교적 쉽고 정확하게 측정할 수 있다. 특히 유방암이나 임파암의 예후와 임상경과의 추정인자로서 좋은 정보를 제공한다.¹⁸⁻²⁶⁾ 그러나 thymidine labeling method의 단점으로는 radiolabeled thymidine을 생체에 투여해야 하므로 임상적으로 실용성이 적고, 생검이나 다른 가검물을 고정 전에 일정시간 ^3H -thymidine에 incubation시켜야 하는 단점이 있다.

분열하는 세포의 세포주기는 유전기구를 복제하기 시작할 때까지의 세포로 구성되어 있는 G1기, genome을 복제하기 위해 DNA의 합성이 일어나는 S기, 분열기 직전까지 4배체의 염색체를 가진 성숙 세포들로 되는 G2기, 그리고 염색체가 분명하게 보이는 M기의 4단계를 거쳐서 한 세대를 이루고, 다시 새로운 세대로 넘어가는 과정들을 거친다.

일반적으로 37°C에서 배양된 포유류의 세포들은 핵산 합성기 (S): 6-9시간, 세포 분열전기 (G2): 2-5시간, 세포 분열기 (M): 1-2시간 정도로 대개 일정한 반면, 세포 분열 후기 (G1)기가 세포 종류에 따라 다양하게 나타나는 것으로 되어있다.²⁷⁾ 설치류의 경우도 S기가 6-10시간이고, G2 기나 M 기도 포유류에서와 마찬가지로 일정한 값을 가지지만 G1 기가 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 그러나 설치류를 이용한 Goldfeder²⁹⁾의 연구에서는 같은 쥐에게 상피성 종양과 방추 세포 종양을 동시에 이식시켜 두 종양 각각의 세포주기 및 각 기별 시간을 측정하였는데, 총 세대시간은 16시간으로 동일하였으나, 핵산 합성기 (S)는 상피성 종양이 6시간, 방추 세포 종양이 12시간으로 약 두배의 차이를 보였고, 세포분열전기 (G2)는 상피성 종양이 2.5시간, 방추 세포 종양이 1시간으로 상피성 종양이 빠른 것으로 나타났고, 세포분열후기 (G1)는 각각 7.5시간 그리고 3시간으로 나타났으나 세포 분열기 (M)는 시간 측정이 되지 않을 정도로 짧다고 보고하여 세포분열후기 (G1)를 제외한 나머지 기들은 일정하다는 앞의 주장과는 상충되는 결과를 발표하기도 하였다. 본 연구에서는 S기 6.4시간, G2기 2시간, M기 1.6시간으로 S, G2, M기가 일정하다는 의견과 유사한 시

간 값을 보였다.

암세포들의 세포 주기 시간은 정상세포에 비하여 빠르리라는 것은 쉽게 짐작이 가능 하지만 각각의 암 종류와, 그 세포 종류에 따라 각각 다양하게 나타날 것으로 생각된다. 1970년 Volpe 등³⁰⁾은 HeLa 세포를 배양하여 배양액 내에서 DNA 합성 과정을 관찰하여 세대 시간을 산출하였는데 S기 6시간, G2기 4.5시간, M기 1.8시간, 그리고 G1기가 7.7시간이었고, Steel³¹⁾도 실험적으로 동물에 암을 유발하여 암 세포의 표지 계수와 세대기간을 밝히려 한 바 있다. 본 연구에서는 방향성 탄수화물의 일종인 DMBA를 이용하여 실험적으로 유발된 MFH 종양에서 하나의 세포주를 확립하여, ^3H -thymidine을 이용한 세포증식능의 측정하였는데, S기가 6.5시간으로 총 세대기간 24.1시간의 26.6%에 해당되어 HeLa 세포와 비슷하였으며, S기가 총세대 시간의 30-40%정도를 차지한다는 일반적인 세포에서의 보고에 비해 다소 짧고 G2기도 2시간으로 비교적 짧은 편이다. 그리고 총 세대시간이 24.1시간으로 CHO (Chinese Hamster Ovary)세포 12시간, 그리고 HeLa 세포 20시간에 비해 길지만, 인간의 섬유육종의 세포계 중의 하나인 HT-1080이 26시간인데 비하여 약간 짧게 나타났고 인간의 자궁에서 발생된 poorly differentiated sarcoma의 세포계인 MES-SA의 총 세대기간 22-24시간과 비슷하게 나타났다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 이용된 세포주가 그만큼 분화가 덜되었다는 해석이 가능하고, 인간의 섬유육종보다 더 악성도가 높다는 해석도 가능하다. 그러나 섬유육종 중 하나의 세포계와의 비교로 선부른 해석을 하기는 어렵다. 그러므로 증식 관련 항원들 중 각 기에 특이도가 높은, 즉 예를 들어 G2-M기에 특이도를 갖는 *Cdc2p34*나 MPP2, 또 G1-S기에 특이도를 갖는 *Cdk4*, *Cdk6*, PCNA 등의 면역조직화학적 염색을 동시에 시행함으로써 그 염색율, 염색 강도를 본 연구 결과와 비교하는 것도 의의가 있으리라 생각된다.

결론

악성 섬유성 조직구종 (Malignant Fibrous Histiocytoma, MFH)은 형태학적 다양성과, 구성세포의 다양성으로 인하여 그 생물학적 성상, 특히 그 발생기원에 대한 논란이 많은 종양이다. 때문에 종양의 주요 구성세

포의 세포학적 특징, 특히 증식능력을 정확히 계산해 내는 것은 MFH의 생물학적 성상을 밝히는데 있어 중요한 기초가 된다.

본 연구는 DMBA를 흰쥐의 슬관절에 주기적으로 주입하여 MFH를 유발하고, 이 종양의 주요세포를 배양하여 단세포 클로닝 방법으로 하나의 세포주를 확립, ³H-thymidine을 이용한 자기 방사능 법으로 세포주기를 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 본 실험에 이용된 MFH 세포주의 평균 표지계수는 26.6%였고, 평균 분열계수는 4.3%였다.
- 2) 표지 분열계수는 4시간에 90.6%로 급격히 상승하였다가, 14시간째에 7.8%로 하강한 후 24시간에 다시 56.7%로 다시 증가되는 파형곡선을 나타내었다.
- 3) 결과 2)를 근거로 Quastler와 Sherman의 방법으로 얻은 세포주기의 각 시간은 총 세대시간 (TG); 24.1시간, 핵산 합성기 (S); 6.4시간, 세포 분열전기 (G2); 2.0시간, 세포 분열기 (M); 1.6시간, 그리고 세포 분열후기 (G1); 14.1시간이었다.

이상의 결과는 본 실험에서 이용된 MFH의 세포주가 인간의 섬유육종 세포계 중 하나인 HT-1080에 비해 그 세대시간이 약 1.9시간 빨라 그만큼 분화도가 낮고, 악성도가 높다는 해석이 가능하다. 그러나, 더 진보된 면역 조직화학적 검색이나 분자 생물학적 검사 등으로 이러한 결과 해석의 뒷받침이 필요하리라 생각된다.

참고문헌

- 1 박명선, 정해진, 허만하. DMBA로 유발된 흰쥐 악성 섬유성 조직구종 (MFH)의 세포학적 기원: cell cloning에 의한 세포주에 대한 면역 조직화학적 및 전자현미경적 검색. 대한병리학회지 31:574-585, 1997
- 2 Tsuchiya T, Takahashi K, Takeya M, Hosokawa Y, Hattori T, Takagi K: Immunohistochemical, quantitative immunoelectron microscopic, and cytofluorometric characterization of chemically induced rat MFH. Am J Pathol. 143:431-445, 1993
- 3 Kato T, Takeya M, Takagi K, Takahashi K: Chemically induced transplantable malignant fibrous histiocytoma of the rat: Analysis with immunohistochemistry, immunoelectron microscopy and [³H] Thymidine Autoradiography. Lab Invest 62 635-645, 1990
- 4 Steel GG: Growth kinetics of tumours. Oxford, Clarendon Press, 1977
5. Wright NA, Alison M: The biology of epithelial cell populations. Oxford, Clarendon Press, 1984
6. Aherne WA, Dunnill MS: Morphometry, London; Edward Arnold, 1982
7. Zwaan J, Pearce TL: Cell population kinetics in the chicken lens primordium during and shortly after its contact with the optic cup. Dev Biol 25:96-118, 1971
- 8 Quastler H, Sherman FG: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp Cell Res. 17:420-438, 1958
9. Langman UJ: Preparation of coated radioautographs using liquid emulsion. printed matter for Dept Anat Sch Med Univ VA, Charlottesville VA USA, 1968
10. 이윤식, 김주영, 성언기, 이용창: 단기 배양한 심장 내피 세포의 세포주기. 대한해부학회지 25:204-212, 1992
11. Weiss SW, Enzinger FM: Malignant fibrous histiocytoma: an analysis of 200 cases. Cancer 41:2250-2266, 1978
12. Kearney MM, Soule EH, Ivins JC: Malignant fibrous histiocytoma; a retrospective study of 167 cases Cancer 45:167-178, 1980
13. Kauffman SL, Stout AP: Histiocytic tumors (fibrous xanthoma and histiocytoma) in children. Cancer 14:469-482, 1961
14. Mirra JM: Malignant fibrous histiocytoma-fact or fancy? J Jpn Orthop Assoc 68:S1010-1011, 1994
- 15 Hall PA, Levison DA: Review; Assessment of cell proliferation in histological material. J Clin Pathol 43:184-192, 1990
- 16 Howard A, Pelc SR: Nuclear incorporation of ³²P as demonstrated by autoradiographs. Exp Cell Res 2 178-187, 1951
17. Howard A, Pelc SR: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity Suppl 6:173-261, 1953
18. Meyer JS, Prey MU, Babcock DS, McDavitt RW: Breast carcinoma cell kinetics, morphology, stage and host characteristics A thymidine labeling study Lab Invest 54:41-51, 1986
19. Meyer JS, Friedman E, McCrate MM, Bauer WC: Prediction of early course in breast carcinoma by thymidine labeling. Cancer 51:1879-1886, 1983
- 20 Gentili C, Sanfilippo O, Silvestrini R: Cell proliferation and its relationship to clinical features and relapse in breast cancers. Cancer 48:974-979, 1981
- 21 Cooper EH, Peckham MJ, Millard RE, Hamlin IME, Gerard-Marchant R: Cell proliferation in human malignant lymphomas Analysis of labeling index and DNA content in cell populations obtained by biopsy Eur J Cancer 4:287-296, 1976
22. Peckham MJ, Cooper EH: Proliferation characteristics of the various classes of cells in Hodgkin's disease. Cancer 24:135-146, 1969

23. Peckham MJ, Cooper EH: The pattern of cell growth in reticulum cell sarcoma and lymphosarcoma. *Eur J Cancer* 6:453-463, 1970
24. Costa A, Bonadonna G, Villa E, Valagussa P, Silverstrini R: Labeling index as a prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. *JNCI* 66:1-5, 1981
25. Silverstrini R, Piazza R, Riccardi A, Rilke F: Correlation of kinetic findings with morphology of non-Hodgkin's lymphoma. *JNCI* 58:499-504, 1977
26. Brandt L, Olsson H, Monti M: Uptake of thymidine in lymphoma cells obtained through fine-needle aspiration biopsy. Relation to prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 17:1229-1233, 1981
27. Pott HM, Quastler H: Radiation effects on cell renewal and related systems. *Physiol. Rev* 43:357-396, 1963
28. Cameron IL: Is the duration of DNA synthesis in somatic cells of mammals and birds a constant? *J cell Biol.* 20:185-188, 1964
29. Goldfeder A: Biological properties and radiosensitivity of tumor : Determination of the cell-cycle and time of synthesis of deoxyribonucleic acid using tritiated thymidine and autoradiography. *Nature* 207:612-614, 1965
30. Volpe P, Eremenko-Volpe T: A method for measuring the length of each of the cell cycle in spinner's cultures. *Exp Cell Res* 60:456-460, 1970
31. Steel GG: Cell loss from experimental tumors. *Cell Tissue Kinet* 1:193-207, 1968.