인체 폐암에서의 Autoradiography 에 의한 ³H-Thymidine Labeling Index에 관한 연구*

한양대학교 의과대학 내과학교실

박성수 · 이성준 · 이동후 · 이정희

병리학교실

이 중 달

= Abstract =

Autoradiographic Labeling Index of Tritiated Thymidine in Human Lung Cancer

Sung Soo Park, M.D., Seong Jun Lee, M.D., Dong Hoo Lee, M.D. and Jung Hee Lee, M.D.

Departments of Internal Medicine, School of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

Jung Dal Lee, M.D.

Department of Pathology

For the assessment of tumor cell proliferation, in vitro thymidine labeling indices of human lung cancers and squamous metaplasia were measured employing autoradiography of paraffin-embedded tissue sections.

The tissues for culture were obtained with fiberoptic bronchosceopic biopsy from the 19 patients. The biopsy specimens consisted of eight squamous cell carcinomas, five small cell carcinomas, and six squamous metaplasias. The biopsy specimens were incubated with Eagle's MEM culture media containing tritiated thymidine (specific activity, 20 Ci/mmol) for 30 minutes.

The mean value with standard deviation of thymidine labeling indices was $20.54 \pm 5.57\%$ for squamous cell carcinomas, $19.20 \pm 5.19\%$ for small cell carcinomas and $7.94 \pm 2.29\%$ for squamous metaplasias, respectively. A wide range of individual labeling indices was noticed in the lung cancers.

In conclusion, tritiated thymidine labeling indices of human lung cancers were significantly higher than those of squamous metaplasia that may probably be an preneoplastic lesion.

서 론

기관지등의 정상적인 상피조직에서 일어나는 세포증식은 세포의 소멸에 대한 균형을 반영하는 것으로 본다¹⁻³⁾. 다시 말해서 정상적인 호흡기 상피세포는 기도내로 소실되는 세포들 만큼 세포분열 능력을 가진다고 볼

수 있다. 이와같은 정상적인 세포증식과는 달리 세포성장 조절기능을 벗어난 비정상적인 세포가 자율적인 불멸의 증식능력을 가진 것이 바로 암세포집단이다.

폐암을 비롯한 고형암종의 성장에 관한 최근의 병리학적 분석과 분자생물학적 연구들은 궁극적으로 복잡한 다단계 발암기전에 관한 이해와 더불어 발암 요인에 대한 예방 대책과 효율적인 암치료 방법을 모색하는데 목표를 두고 있다. 다단계 발암과정에서의 성장 진행 속도를 평가하기 위해 최근 암병소의 여러 단면상을 입체적으로

*본 연구는 1988년도 대한결핵학회 학술연구비 보조로 이루어 졌음.

재구성, 전산화 처리에 의한 용적을 정량적으로 계측하려는 시도들이 있으나 아직까지도 동물실험 단계에 있다⁴⁻⁸⁾. 그 밖에도 중앙 항원의 정량 또는 정성분석이나 각종 생화학적 물질들의 정성 분석이나 정량 분석 방법들이 개발되어 있으나 암 성장속도를 효과적으로 평가하기에는 미흡한 실정이다⁹⁻¹⁴⁾.

한편 세포 집단의 성장 속도는 적절한 평가가 모호한 세포분열 지표(mitotic indices)로 반영되기도 하나 세포의 합성지표(synthetic indices)가 보다 더 예민한 척도로 표현된다. 까닭은 세포주기 가운데 DNA 합성에 소요되는 S기가 실제 세포분열 시간보다 상당히 길기 때문이다^{9,15,16)}. 그러므로 세포핵 내의 DNA 구성물질 가운데 하나인 thymidine으로 DNA의 합성이 일어나는 세포핵 즉 세포증식의 위치를 정확히 알아낼 수가 있어 암종괴와 같은 특정 세포집단의 증식 정도를 가장 잘 파악할 수 있다.

인체 폐암에서의 thymidine 표지 지표에 관한 연구는 구미에서 근간에 활발하게 검토되어 오고 있으나^{17,18)}, 한국인 폐암에 관해서는 전혀 알려지지 않은 바가 없다. 이에 저자는 폐암의 증식 정도와 폐암의 발암 전구병변으로서의 잠재력을 갖고 있다고 추정되는 기관지상피화생에서의 증식 정도를 비교 관찰하고자 본 연구를 시도하였다. 즉, 한국인 폐암 및 만성 폐질환환자들의 기관지 내시경 적시하 생검 조직을 이용 in vitro에서 thymidine 표지 실험을 하여 autoradiography에 의한 폐암세포의 증식 지표 등을 추구하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

폐암 및 기타 기관지 질환의 확진을 위해 기관지내시경(Fujinon-YL 1061090) 적시하 생검을 실시한 19예의 환자들로부터 채취된 조직을 연구 대상으로 삼았다. 각 예마다 생검조직은 직경 1mm 이하의 크기로 최소한 3개씩이 채취되었다. 이들의 조직병리학적 진단은 편평세포암종이 8예, 소세포암종이 5예, 그리고 편평상피화생이 6예였다.

2. Thymidine 표지를 위한 조직배양

기관지내시경 적시하에서 얻은 생검조직은 즉시 Eagle's minimum essential medium (MEM) (Sigma

Chemical Co. St. Louis, MO.)에 옮겨졌다. MEM은 gentamycin sulphate 80 mg/L와 sodium penicilline 5,000,000 units/L을 함유하고 10% fetal bovine serum과 7.5% (w/v) 멸균 중탄산염을 첨가시킨 pH 7.4의 배양액이다. 이 용액 8 ml를 담은 10 ml 용기에 각각 생검 조직편을 담근 다음 37°C 수조(water bath)에서 가벼운 진탕을 가하면서 30분 내지 60분 동안 배양하였다.

그후 상기한 바와 동일하게 새롭게 제조된 배양액에 특이 활성도가 20 Ci/mmol 인 ³H-thymidine (TdR) (New Engl Nuclear, Rochester, NY)을 첨가한 배양 용기에 조직을 옮겨 담은 후 37°C 수조에서 30분간 가벼운 진탕을 가하면서 다시 배양한 다음 ³H-TdR이 함유되지 않은 MEM 배양액으로 5분간씩 세척하였다. 그 후 배양조직은 10% 완충 포르말린 액에 고정한 다음 파라핀에 포매하였다.

3. Autoradiography

파라핀에 포매된 조직을 5 μm의 두께로 박절하여 슬라이드에 첩포한뒤 파라핀을 제거하였다. 조직 슬라이드들은 liquid emulsion 용액인 Ilford K-5를 멸균 증류수와 1:1로 희석시킨 용액에 담근 후 밀봉, 4°C에서 3주간 노출시켰다. 그후 조직 슬라이드들을 Kodak D-19 현상액에 담겼다가 증류수로 세척후 Kodak fixer에 담근 다음 깨끗한 물로 세척하고 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다.

4. Thymidins 표지지표의 산정

조직표본 슬라이드에서 임의의 시야를 선택하여 400배율로 검경하였다. 주어진 시야의 전 세포수를 본모로 하고, ³H-TdR 입자가 5개 이상으로 표지된 핵을 가진 세포수를 분자로 삼아 백분율을 구하였다. 한 환자의 표본으로부터 임의의 시야 3곳을 택하여 산정된 ³H-TdR 표지 백분율의 평균치를 얻어 그 환자의 ³H-TdR 표지 지표로 삼았다.

통계학적 검사는 t-test로 이루어졌다.

결 과

각 환자들의 연령, 진단명 및 ³H-TdR 표지지표는 Table 1에 나타난 바와 같다. 편평세포암종 8예에서 ³H-TdR 표지지표의 범위는 27.47%와 11.92%였고, 소

세포암종 5예에서는 26.17%에서 12.64%사이, 편평상피화생 6예에서는 11.36%에서 4.73%사이를 보여주었다. 각 환자별 ^3H -TdR 표지 지표는 Table 1과 Fig. 1에 나타나 있듯이 개체별 차이가 있었다.

한편, Table 2 및 Fig. 2에 나타난 바 처럼 편평세포암종 8예의 ^3H -TdR 표지 지표 평균치와 표준편차는 $20.54 \pm 5.57\%$ 였고, 소세포암종의 그것은 $19.20 \pm 5.19\%$ 로 폐암종의 병리조직학적 차이에도 불구하고 매우 근사치를 보였으며 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 이와는 대조적으로 편평상피화생에서의 ^3H -TdR 지표 평균치와 표준편차는 $7.94 \pm 2.29\%$ 로서 폐암종의 지표보다 현저히 낮았으며 그 차이는 통계학적으로도 매우 유의하였다 ($p < 0.01$). 편평상피화생과 편평

세포암종에서의 ^3H -TdR 표지 지표는 Fig. 3~6에서의 autoradiography를 통해서도 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다.

고 찰

Autoradiography는 조직표본의 세포내에 분포하고 있는 특정 물질의 원자비적상(原子飛跡像)을 나타내기 때문에 방사성 동위원소로 표지시킨 nucleotide의 DNA 합성 참여를 분석하는데 일찍부터 널리 이용되어 왔을 뿐만 아니라, 최근에는 분자생물학적 연구가 활발해짐에 따라 더욱 광범위하게 활용되고 있다^{1~3,15,16,19,20}.

폐암을 비롯한 고형 암의 ^3H -TdR 표지 지표는 주로

Table 1. Indices of ^3H -thymidine Labeled in Vitro in Individual Lung Cancers and Squamous Metaplasias

Patine	Sex	Age	Pathological diagnosis	^3H -TdR labeling index
1	M	70	squamous cell carcinoma	19.84%
2	M	49	squamous cell carcinoma	15.29%
3	M	58	squamous cell carcinoma	22.03%
4	M	64	squamous cell carcinoma	27.47%
5	M	75	squamous cell carcinoma	26.58%
6	M	53	squamous cell carcinoma	11.92%
7	M	65	squamous cell carcinoma	24.32%
8	M	75	squamous cell carcinoma	16.84%
9	M	64	small cell carcinoma	21.72%
10	M	49	small cell carcinoma	16.07%
11	F	62	small cell carcinoma	26.17%
12	M	59	small cell carcinoma	12.64%
13	M	75	small cell carcinoma	19.39%
14	F	53	squamous metaplasia	11.36%
15	M	70	squamous metaplasia	4.73%
15	M	56	squamous metaplasia	7.28%
16	M	56	squamous metaplasia	9.14%
18	F	20	squamous metaplasia	6.57%
19	F	56	squamous metaplasia	8.43%

Table 2. Tritiated Thymidine Labeling Indices of Human Lung Cancers and Squamous Metaplasias

Pathological Diagnosis (N)	Age (Mean $\pm$ SD)	^3H -TdR labeling index (Mean $\pm$ SD)
squamous cell carcinoma (8)	63.6 $\pm$ 9.7 yr	20.54 $\pm$ 5.57%
small cell carcinoma (5)	61.8 $\pm$ 9.4 yr	19.20 $\pm$ 5.19%
squamous metaplasia (6)	51.8 $\pm$ 16.7 yr	7.94 $\pm$ 2.29%

Fig. 1. Labeling index (LI) represents the incorporation of tritiated thymidine by cancer and metaplastic cells from 19 patients. Variation of labeling indices among same group is remarkable.

Fig. 2. Mean value and standard deviation of labeling indices of tritiated thymidine in 8 squamous cell carcinomas, 5 small cell carcinomas, and 6 squamous metaplasias.

Fig. 3. Autoradiograph of a squamous metaplasia of the bronchial epithelium labeled in vitro for 30 minutes with tritiated thymidine (20 Ci/mmol). (200X, H&E).

동물 실험을 통해 in vivo 및 in vitro에서 다양하게 검토되어 왔으나, 인체에서의 연구는 방사선 노출의 위험 때문에 in vivo 검토가 어려워 in vitro 검색에 의한 경우가 대부분이다. 인체 편평세포암종에서 in vitro ^3H -TdR 표지지표는 in vivo에서의 지표와 비교해 볼 때, 2/3의 예에서는 거의 비슷하나 나머지 1/3의 예에서는

매우 낮았다는 보고가 있다²¹⁾. 또한 in vivo와 in vitro 실험에서 암종괴의 변연부는 ^3H -TdR 표지지표가 양자간의 별다른차이가 없으나 암종괴의 깊숙한 중앙부에는 in vivo가 in vitro보다 두배 가까이 높은 수치를 보였거나, 암 변연부위의 표지지표가 암 중앙부위의 그것보다 훨씬 높았다는 보고들도 있다^{18,22)}. 암종괴의 비균질성과

Fig. 4. Clumps of the fine grains indicate nuclei labeled with tritiated thymidine in a case of squamous metaplasia. (400X, H&E).

Fig. 5. Autoradiograph of a squamous cell carcinoma of bronchogenic origin. Tritiated thymidine labeled cells are readily identified. (400X, H&E).

암종과 심부의 산소결핍은 생체내 실험 수치와 생체의 실험 수치간의 불일치성을 설명할 수 있는 요인들로 지적된다^{21~23)}. 따라서 *in vitro* 실험에서 조직내 산소분압을 높여주려는 노력의 일환으로 고압산소를 ^3H -TdR 표지를 위한 조직배양에 이용할 것을 권장하고 있으나^{18,22~26)} 이러한 노력에도 불구하고 300내지 500 μm 이상의 깊이에서는 ^3H -TdR로 표지된 암세포핵을 거의 찾아보기가 어렵다고 한다^{18,26)}. 본 연구에서는 기관지내시경 직시하 생검 조직표본이 모두 기관지내로 돌출된

병변 부위에서 채취되었으므로 연구 대상 조직들은 대부분 암종과의 변연부에 해당된다는 점과 아울러 생검 조직표본이 대부분 직경 1mm 이하의 것들이라는 점에서, ^3H -TdR 표지를 위한 조직 배양시 고압산소는 적용하지 않았었다.

한편, ^3H -TdR 표지를 위한 조직 배양시간은, 8분 이상 70분 이내에서 거의 비슷한 수치의 지표를 보였다는 보고와²⁷⁾ DNA 합성에 참여하는 것은 ^3H -TdR 투여후 처음 10분에서 15분 사이에 대부분 일어난다는 사실

Fig. 6. Autoradiograph of the other squamous cell carcinoma of lung. (400x, H&E).

에²⁸⁾ 입각, 본 실험에서는 30분간으로 하였었다.

본 연구에 있어, 편평세포암종 8예에서의 ^3H -TdR 표지표 평균치 20.54%와 소세포암종 5예에서의 19.20%는 Wolberg등³¹⁾이 2예의 폐암에서 보고한 30%보다는 낮았다. Kerr등¹⁸⁾의 보고에서는 미분화 대세포암종 (undifferentiated large cell carcinoma) 10예가 30.4%로 가장 높은 지표를 보였으며, 일반적으로 침습도가 매우 강한 것으로 알려져 있는 소세포암종 3예에선 16.9%로 오히려 낮은 지표를 보였다고 했다. 이들은 또 편평세포암종 26예를 중등도 및 불량한 분화를 나타내는 경우들과 (moderately well differentiated and poorly differentiated category) 분화도가 양호한 경우 (well differentiated category)로 구분, 전자가 각각 14.5%와 13.0%의 ^3H -TdR 표지지표를 보인 반면 후자에서는 5.9%로 가장 낮은 지표를 보였다고 했다. 이와같은 폐암세포의 분화도와 ^3H -TdR 표지지표간의 역 상관관계를 이들은 분화도가 양호한 암종과가 아마도 각질화 (keratinization)를 야기, 세포분열능력이 낮아짐에 기인하는 것으로 설명하고 있다. Hainau등¹⁷⁾과 Straus 등³²⁾의 보고에서도 편평세포폐암은 각각 7.5%와 8.4%의 매우 낮은 ^3H -TdR 표지지표를 보였다. 저자의 소세포폐암 5예의 ^3H -TdR 표지지표 평균치 $19.20 \pm 5.19\%$ 는 Kerr등¹⁸⁾의 3예 분석에서의 16.9%와 근사하였으나 Hainau등의 11%보다는 높았다.

저자의 연구에서 편평세포암종과 소세포암종은 ^3H

-TdR 표지지표 평균치가 유의차를 보이지 않았으나, Kerr등¹⁸⁾과 Muggia³³⁾, Livingston등³⁴⁾은 모두 소세포암종이 편평세포암종보다 높은 지표를 보인다고 했다. 한편 Hainau등¹⁷⁾은 소세포암종에서 1.9%로부터 28.0% 사이의 다양한 ^3H -TdR 표지지표를 제시하면서 병리 세포학적으로 서로 다른 종류의 폐암과의 통계학적 유의차는 없었다고 했다. 그리고 대부분의 보고들은 저자의 경우에서와 마찬가지로 폐암세포의 종류에 관계없이 개체간의 다양한 수치 차이와 조직표본별의 차이 및 관찰 시야별 차이를 지적하고 있다. 이와같은 사실은 폐암세포의 비균질성이 폐암의 성장 속도에도 매우 다양한 양상을 나타내게 하는 것으로 해석된다.

한편 편평상피화생은 각종 만성 호흡기질환에서 일어날 수 있는 현상이기는하나 다단계 암생성과정에서의 발암 전구병변으로도 주목되고 있다. 특히 저자의 성적에 있어 기관지상피화생조직은 평균 $7.94 \pm 2.29\%$ 의 표지지표를 보여 일부 연구자들의¹⁸⁾ 편평세포폐암에서의 ^3H -TdR 표지지표보다도 높았던 점은 편평상피화생이 폐암으로의 이행 가능성을 암시하고 있는 것으로 보인다. 다시 말해서, 편평상피화생은 폐암보다는 비록 낮은 세포증식 능력을 가지고 있으나, 결코 낮다고만 볼 수 없는 세포증식 능력은 기관지상피에서의 거듭 반복되는 세포주기과정에서 돌연변이등이 일어날 가능성이 매우 높아 폐암으로까지 진전될 잠재성을 내포하고 있다고 풀이된다.

Wolberg와 Brown³¹⁾에 의하면 항암화학요법의 효과가 없는 환자들에서는 약제사용전의 표본들이 uridine 과 thymidine 표지지표가 아예 낮은 수치를 보일 뿐만 아니라 약제에 의한 uridine 표지 억제가 미약함에도 불구하고 thymidine 지표는 약제사용으로 오히려 상승 자극을 보였다고 한다. 항암화학요법이 효과적인환자들은 약제사용전의 uridine 및 thymidine 표지지표가 높았던 것이 약제에 의해 uridine 표지지표가 현저히 낮아지고 thymidine 표지의 상승자극은 없었다고 했다. 따라서 세포주기의 S기에 특이한 작용을 보이는 항암화학요법의 효과판정에 이와같은 nucleoside의 표지지표를 autoradiography로 검색함은 매우 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

인체 폐암의 성장 속도에 관한 지표를 파악하기 위하여 기관지내시경 직시하에서 채취한 생검조직으로 in vitro에서 ³H-TdR 표지를 구하여 보았다. 생검조직을 단 시간 배양한 다음 ³H-TdR 표지를 위한 배양을 30분 간 실시 후, 완충 포르말린 용액에 고정, 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 박절한 조직슬라이드들을 이용 autoradiography를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

연구대상 19예의 병리조직학적 진단은 편평세포암종이 8예, 소세포암종이 5예, 그리고 편평상피화생이 6예였다. 편평세포암종 8예에서 ³H-TdR 표지지표의 평균치와 표준편차는 $20.54 \pm 5.57\%$ 였으며 소세포암종 5예에서는 $19.20 \pm 5.19\%$ 로 이들 두 폐암 상호간에는 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 이와는 대조적으로 기관지의 편평상피화생에서는 ³H-TdR 표지지표 평균치와 표준편차가 $7.94 \pm 2.29\%$ 로서 폐암에서의 지표 평균에 비하여 현저히 낮았고 그 차이는 통계학적으로 매우 유의하였다($p < 0.01$). 그러나 ³H-TdR 표지지표는 동일 암종에서도 기체별 차이를 보였다.

이와같은 사실로 미루어 보아 인체 폐암의 성장 속도는 암세포집단의 비균질성과 개체별 차이에 의해 비록 다양성이 있으나 각종 만성 호흡기질환에서 나타날 수 있는 비암성의 편평상피화생의 세포증식 속도보다는 월등히 빠름을 알 수 있다.

REFERENCES

- 1) Leblond CP, Walker BE: Renewal of cell population. *Physiol Rev* 36:255, 1956
- 2) Leblond CP, Messier B, Kopriwa B: Thymidine-H³ as a tool for the investigation of the renewal of cell populations. *Lab Invest* 8:296, 1959
- 3) Edwards JL, Klein RE: Cell renewal in adult mouse tissues. *Am J Pathol* 38:437, 1961
- 4) Campbell HA, Pitot HC, Potter VR, Laishes BA: Application of quantitative stereology to the evaluation of enzyme-altered foci in rat liver. *Cancer Res* 42:465, 1982
- 5) Moor MP, Drinkwater NR, Miller EC, Miller JA, Pitot HC: Quantitative analysis of the time dependent development of glucose-6-phosphatase-deficient foci in the liver of mice treated neonatally with diethylnitrosamine. *Cancer Res* 41:1585, 1981
- 6) Scherer E, Hoffmann M, Emmelot P, Friedrich-Frekas M: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. *J Natl Cancer Inst* 49:93, 1972
- 7) Pugh TD, King JH, Koen H, Nychka D, Chover J, Wahba G, He HY, Goldfarb S: Reliable stereological method for estimating the number of microscopic hepatocellular foci from their transections. *Cancer Res* 43:1261, 1983
- 8) Koen H, Pugh TD, Goldfarb S: Hepatocarcinogenesis in the mouse; combined morphologic-stereologic studies. *Am J Pathol* 112:89, 1983
- 9) Steel GG: Growth kinetics of tumours: cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Clarendon Press, Oxford, 1977, p 1
- 10) Gropp C, Lehmann FG, Havemann K: Carcinoembryonic antigen in bronchial carcinoma; Staging and monitoring of radio and chemotherapy. Ed. Lehmann FG, Carcino-embryonic proteins; chemistry, biology, clinical application. Vol I, Elsevier, North-Holland, 1979, p 75
- 11) Reddy MN, Rochman H, Hunter RL, Fang VS, De Meester T: Carcinoembryonic antigen, k-casein and beta-human chorionic gonadotropin in the staging of lung cancer. Ed. Lehmann FG, Carcino-embryonic proteins; chemistry, biology, clinical application. Vol II, Elsevier, North Holland, 1979, p

- 12) Potter VR: Biochemical perspectives in cancer research. *Cancer Res* **24**:1085, 1964
- 13) Weinstein IB: Protein kinase, phospholipid and control of growth. *Nature* **302**:750, 1983
- 14) Weber G: Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy. *Cancer Res* **43**:3466, 1983
- 15) Lajtha LG: Detection of adenine carbon-14 in deoxyribonucleic acid by autoradiography. (Letter to the editor). *Nature* **173**:587, 1954
- 16) Stumpf WE: Autoradiography; advances in methods and application. *J Histochem Cytochem* **29**:107, 1981
- 17) Hainau B, Dombrowsky P, Hansen HH, Borgeskov S: Cell proliferation and histologic classification of bronchogenic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **59**:1113, 1977
- 18) Kerr KM, Robertson AMG, Lamb D: In vitro thymidine labelling of human pulmonary neoplasms. *Brit J Cancer* **47**:245, 1983
- 19) Raza A, Spiridonidis C, Ucar K, Mayer G, Bankert R, Preisler HD: Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer Res* **45**:2283, 1985
- 20) Haase AT, Walker K, Störwing L, Ventura P, Galle A, Blum H, Brachic M, Goldberg R, O'Brien K: Detection of two viral genomes in single cells by double-label hybridization in situ and color microautoradiography. *Science* **227**:189, 1985
- 21) Chavaudra N, Richard JM, Malaise EP: Labelling index of human squamous cell carcinomas, comparison of in vivo and in vitro labelling methods. *Cell Tissue Kinet* **12**:145, 1979
- 22) Meyer JS, Conner RE: In vitro labelling of solid tissues with tritiated thymidine for autoradiographic detection of S-phase nuclei. *Stain Technol* **52**:185, 1977
- 23) Steel GG, Bensted JPM: In vitro studies of cell proliferation in tumours-I. Critical appraisal of methods and theoretical considerations. *Europ J Cancer* **1**:275, 1965
- 24) Meyer JS, Bauer WC: In vitro determination of tritiated thymidine labeling index (LI); evaluation of a method utilizing hyperbaric oxygen and observations on the LI of human mammary carcinoma. *Cancer* **36**:1374, 1975
- 25) Denecamp J, Kallman RF: In vitro and in vivo labelling of animal tumours with tritiated thymidine. *Cell Tissue Kinet* **6**:217, 1973
- 26) Fabridant JI, Wissemann CL, Vitak MJ: The kinetics of cellular proliferation in normal and malignant tissues, II. An in vitro method for incorporation of tritiated thymidine in human tissues. *Radiology* **92**:1309, 1969
- 27) Nordenskjöld B, Zetterberg A, Lpwwjagem T: Measurement of DNA-synthesis ^3H -thymidine incorporation into needle aspirates from human tumors. *Acta Cytol* **18**:215, 1974
- 28) Rubini JR, Cronkites EP, Bond VPP, Flidner TM: The metabolism and fate of tritiated thymidine in man, *J Clin Invest* **39**:909, 1960
- 29) Walker DG, Lyons MM, Wright JC: Observations on primary short-term cultures of human tumors; A second 5-year study. *Europ J Cancer* **1**:265, 1965
- 30) Titus JL, Shorter RG: Labeling of human tumors with tritiated thymidine. *Arch Pathol* **79**:324, 1965
- 31) Wolberg WH, Brown RR: Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. *Cancer Res* **22**:113, 1962
- 32) Straus MJ, Moran RE: Cell cycle parameters in human solid tumors. *Cancer* **40**:1453, 1977
- 33) Muggia F: Correlation of histologic types with cell kinetic studies in lung cancer. *Cancer Chemother Rep* **4**:69, 1973
- 34) Livingston RB, Ambus U, George SL, Freireich EJ, Hart JS: In vitro determination of thymidine- ^3H labeling index in solid tumors. *Cancer Res* **34**:1976, 1974