

인체편평상피세포암의 세포유전학적 분석*

계명대학교의과대학 정형외과학교실

권 진 우·편 영 식

=Abstract=

Cytogenetic Analysis on Primary Squamous Cell Carcinoma in Human

Jin Woo Kwon, MD; Young Sik Pyun, MD

Department of Orthopedic Surgery, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea

Cytogenetic analysis was performed in human squamous cell carcinoma untreated with drugs or radiation. Tumor was disaggregated with mechanical and enzymatic methods.

Long-term trypsinization(4°C, 24 hours) reproduced more cell yields than short-term trypsinization(37°C, 30-60 minutes) however, the frequency of metaphases was no significance.

Disaggregated cells were treated with colcemid(5ug/ml) for 3 hours.

Recognizable metaphase chromosomes could be obtained from conventional preparation of chromosomes. The results were summarized as follows:

Chromosomal range was 42 to 50, but one cell line showed near-tetraploid.

There were no findings of specific chromosomal abnormalities such as structural rearrangement or marker chromosome.

Nonrandom chromosomal losses were found at chromosome #10, #12, #15, #17, #22.

However, these chromosomal losses are of no significance since these cells will die soon.

Specific findings in this study were trisomy #1, #7.

It is known that ras oncogenes is located in the chromosome #1 and raf-2 oncogene in the chromosome #7.

Further study is in need to clarify the relation between these oncogenes and trisomy in squamous cell carcinoma.

서 론

장완 일부가 소실된 Philadelphia 염색체가 발견되면서부터 암과 그 암의 독특한 염색체 이상의 상관관계를 연구하기 시작하였다.

암과 염색체의 관계는 Nowell과 Hungerford(1960)에 의하여 만성 백혈병 환자에게 제22번 염색체의

Cassperson등(1970)에 의하여 염색체 band법이 개발되고 난후 Rowley(1973)는 만성 백혈병 환자에

* A thesis submitted to the committee of the Graduate School of Keimyung University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Medicine Science, October 1988.

서 보였던 Philadelphia 염색체에서 탈락되었다고 생각된 22번 장관이 9번 장관으로의 전좌 된 것을 증명하고 부터 많은 학자들에 의해서 혈액세포에 발생하는 암에 대한 세포 유전학적 보고가 있었다. Yunis(1980)에 의하여 high-resolution band법의 기술이 개발되고 나서 소아 종양인 Wilm씨 종양, 신경아세포종(neuroblastoma), 망막아세포종(retinoblastoma)에서는 염색체에서 일정한 부위에 특이한 이상소견이 나타남으로써 현재는 이를 종양에 대해서는 염색체적 진단이 가능하게 되었다(Yunis, 1983, 1984, Ramsey, 1978).

그러나 고형암의 경우는 암의 종류와 연구자에 따라 그 소견이 각각 다르게 나타나서 아직 고형암과 염색체의 관계가 정확하게 정립된 것은 없으며 단지 여성의 유방암과 자궁 경부암이 제1번 염색체와 관계가 있을 것으로 추측하고 있을 정도이다(Grouchy, Vallée, et al, 1963).

이는 일차적으로 암세포를 분리 배양시키는 기술에 어려움이 있고 이차적으로는 암세포 염색체는 정상 세포의 염색체보다 모양이 상당히 불규칙 할 뿐 아니라 염색사의 농축이 매우 다양하며 정확한 염색체 진단이 어렵고 band가 잘 나타나지 않는 데 기인한다고 여겨지며 삼차적으로는 암세포의 대상이 이미 진행된 암세포이므로 불규칙한 세포 분열로 인한 염색체의 다형현상이 나타나기 때문에 해석이 불가능할 경우가 많다.

그러므로 고형암의 경우 염색체 조작기술을 개발하여 이런 난점을 극복하고 고형암의 염색체이상을 찾음으로서 암의 암화과정을 추적할 수 있는 발판을 이루어야 할 필요성이 있다.

연구자는 하지에 발생한 원발성 편평상피세포암을 대상으로 염색체 검사를 하여 분석함으로서 어떤 암유전자가 관련될 것인지를 간접적으로 추적해 보고자 본 실험을 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

병리조직학적으로 확진된 원발성 편평상피세포암 조직

실험 방법

1. 세포분리 방법

1) 물리적 방법

암조직을 무균실에서 잘게 썰어서 배양액에 둠으로서 암세포가 petri dish에 부착하여 분열하게 하여 Colcemid ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 후 3시간 동안 배양하였다.

2) 효소처리한 방법

가) 단시간 trypsin처리에 의한 방법

생검한 암조직을 해부현미경하에서 괴사한 조직과 혈괴를 잘라내고 PBS(-)로 수세한 다음 무균실에서 젤편이 1mm^3 이하로 잘게 썰어서 35mm petri dish에 암조직을 200mg 당 0.1% trypsin(PH 7.5) 50ml를 첨가하여 37°C 교반배양기(shaking incubator)에서 30~60분간 배양하였다. 교반후 부유액을 금속채(120 mesh)로 여과 시킨후 원심분리(800rpm, 8분)하여 trypsin을 제거하고 RPMI 1640배지에 colcemid($5\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 3시간 배양하였다.

나) 장시간 trypsin처리에 의한 방법

암조직을 상기와 같이 전처리하고 0.1% trypsin 50ml에 조직 200mg 을 넣어 4°C 하에서 24시간 배양하였다.

배양후 trypsin을 제거하고 RPMI 배지에 colcemid($5\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하여 역시 3시간 배양하였다.

2. 염색체 조작 방법

위와 같은 방법으로 colcemid 처리된 배양액에 0.1% sodium citrate 10ml를 첨가한 후 37°C 에서 20~30분간 두었으며 원심분리(800rpm, 5분)시킨다음 acetic acid와 methanol을 1:3의 비율로 만든 고정액을 0°C 에서 30분 내지 1시간 동안 고정 시킨후 flame하여 10% Giemsa에 염색하였다.

환자의 암에 대한 risk factor를 알기위하여 최등(1986)의 방법에 의하여 자매염색분체(sister chromatid exchange)를 아울러 시행하였다.

성적

환자의 혈액 임파구에서 염색체는 모두 46, X X였으며 자매염색 분체도 모두 정상 범위였다(6.5 ± 2.0).

암세포수는 장시간 배양한 것에서 더 많이 얻을 수 있었으나 염색체가 나타나는 빈도는 비슷하였다 (Table 1).

암세포의 염색체는 구조적 변화나 표지 염색체등은 발견할 수 없었고 염색체 수는 42~50개가 대부분이었지만 한개의 세포에서 tetraploid근처로서 4개의

Table 1. Comparison of the frequency of metaphases suitable for chromosome obtained with long and short term enzymatic disaggregation procedures

long term trypsinization		short term trypsinization	
cell yield X 10 ⁶	frequency(%) of metaphase	cell yield X 10 ⁶	frequency(%) of metaphase
2.1	0.8	1.2	1.2

표지 염색체를 나타냈다(Fig 1).

염색체 소실은 무작위로 나타나서 제1번, 12번, 15번, 17번, 22번 등에서 관찰되었으나 염색체 소실이 있는 세포는 곧 사망할 것으로 추측되므로 별 의미를 부여할 수 없다.

특이한 소견으로는 제1번과 제7번 염색체에서 trisomy가 있었다(Fig 2,3).

제1번 염색체에는 ras암유전자가 있고 제7번 염색체에는 raf-2 암유전자가 있다. 이들 암유전자가 평상피 세포암의 암화과정을 유발하는지는 앞으로 northern blot 기술로 확인할 필요가 있다.

고 칠

인체의 암은 정상 세포에서 핵산을 이루고 있는

염기의 국소변이 (point mutation)에 의한 유전자 변이로 발생한다(Nowell, 1976).

변이된 유전자는 증폭(amplification)하여 전형(transformation)되며 이 과정이 되풀이 되면서 염색체의 이상을 초래한다. 그러므로 대부분의 암세포에서는 여러 형태의 염색체의 숫적 변화와 구조적 이상을 나타낸다. 변이를 일으키는 원인 인자로는 바이러스, 화학물질, 방사선 그리고 환경인자등이 관여할 것으로 믿고 있다.

암의 발생과 염색체의 관계는 Nowell과 Hungerford(1960)가 philadelphia 염색체를 발견하면서부터 암과 그 암의 독특한 염색체 변이의 상관관계를 연구하기 시작하였다. 고형암의 경우 Wilm씨 종양은 제11번 염색체 단위(short arm)에 변이(del(11)) (p¹³) (Yunis, 1983, 망막아세포종(retinoblastoma)에

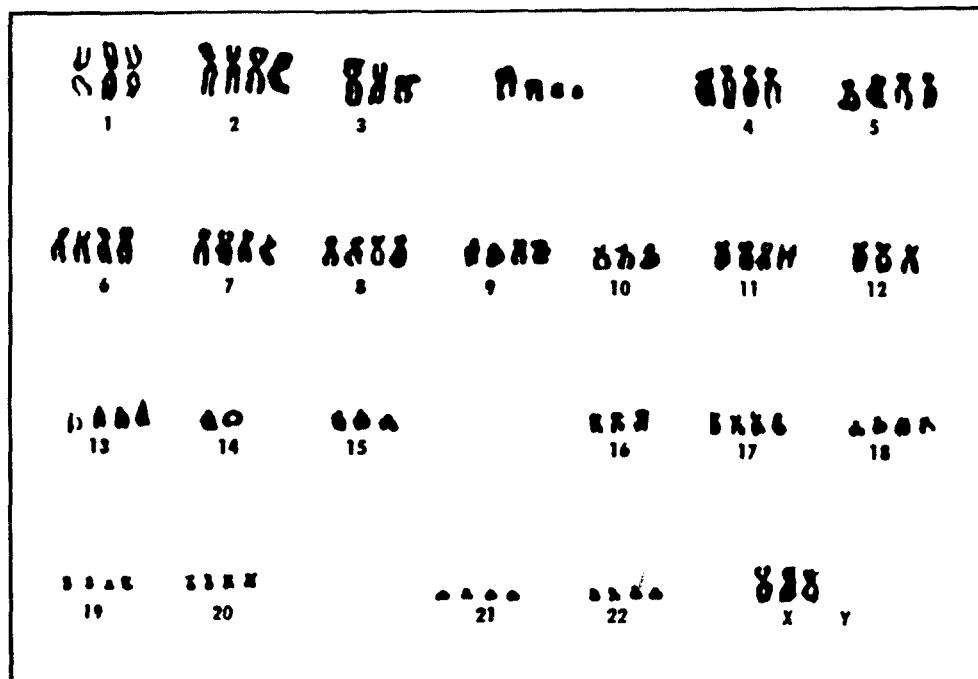


Fig 1. Tetraploid chromosome with four marker chromosome from patient with squamous cell carcinoma.

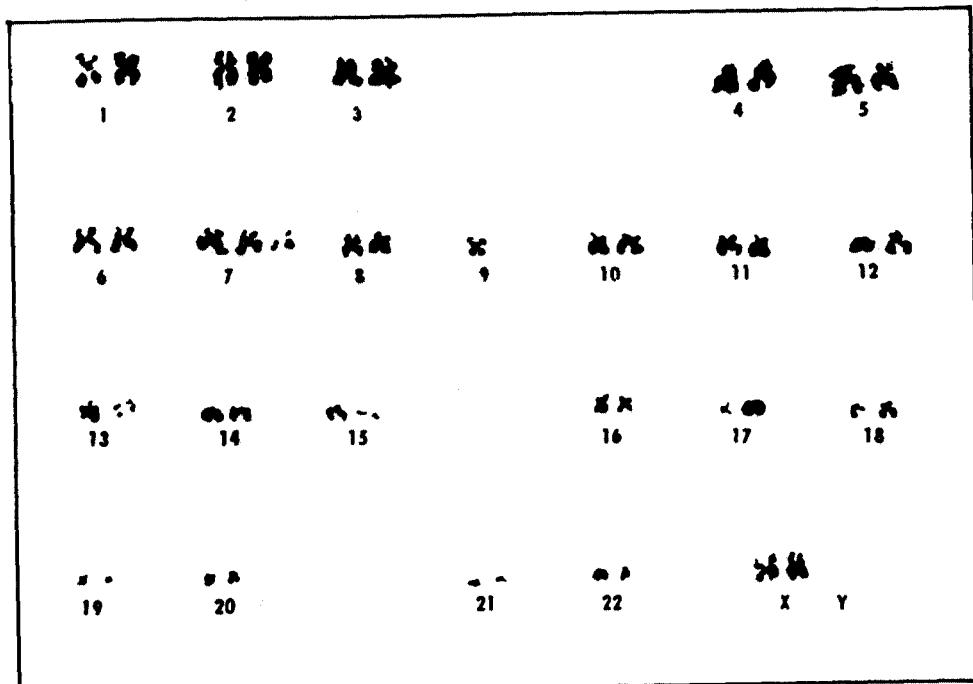


Fig 2. Trisomy 7 from patient with squamous cell carcinoma.

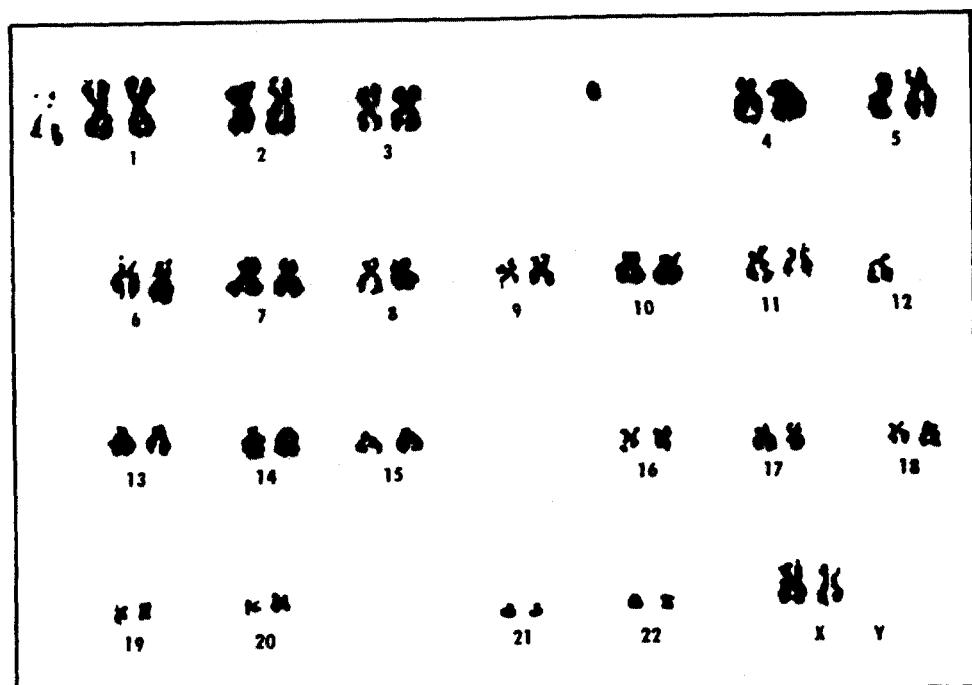


Fig 3. Trisomy 1 with one marker chromosome.

서는 제13번 염색체의 장완(long arm)에 변이(del 13) (q¹⁴), (Yunis, Ramsay, 1978), 신경아세포종(neuroblastoma)에서는 제1번 염색체 단완에 변이(del 1) (p³² p³⁶) (Yunis, 1984) 등과 같이 종양 세포계(cell line)가 비교적 안정되어 암에 따른 특이한 염색체변화 소견을 보이는 것이 있는 반면 방광암, 직장암, 자궁경부암에서처럼 염색체가 불안정하여 어떤 변이가 일차적 염색체 변화소견인지 규명되지 않는 것도 있다.

Sandberg 등(1987)은 암의 초기 단계에서는 일차적 염색체 변이만을 나타내나 암이 진행되면서 다른 염색체에서 이차적 염색체 변이를 동반한다고 보고하면서 백혈병에서는 하나의 염색체 변이만을 나타내는 경우가 많은데 비해서 고형암에서는 여러개의 염색체 변이가 동반되어 나타나기 때문에 일차적 염색체 변이가 어느 것인가를 구분하기 어려울 뿐만 아니라 여러 암유전자가 관여하기 때문에 어떤 암유전자가 암을 유발시켰는가를 확인하기 어렵다.

일차적 변이이외의 이차적 염색체의 변이는 암의 전이, 침투, 재발, 치료에 대한 반응을 반영해주기 때문에 매우 중요하다고 하였다.

이런 염색체 변이를 초래하는 기시부는 암유전자에서 기인한다고 알려져 있으며 philadelphia 염색체에서 암유전자 c-abl이 22번 염색체 장완에 위치하여 9번 염색체로 전좌(translocation)에 관여함이 보고된 후 Varmus(1984)는 c-myc 암유전자가 전골수성 백혈병(promyelocytic leukemia), 악성 Burkitt 임파종, 소세포성 폐암(small cell lung cancer)과 관계가 있고 N-myc 암유전자가 원발성 신경아세포종(primary neuroblastoma), 망막아세포종(retinoblastoma)과 관계가 있고 c-myb 암유전자는 급성 골수성 백혈병, N-ras는 유방암, c-erb는 상피양암과 관계있다고 보고했다.

Sandberg 등(1987)은 c-myc 유전자나 c-abl 유전자같이 직접적으로 염색체 변이를 일으키는 것도 있으나 염색체 band와 암유전자가 무관한 경우도 있어서 반드시 암유전자 단독으로 염색체 변이를 일으키지 않느라고 했다.

염색체 단절(breakage)로 일어나는 여러 변화외에 HSR(homogenous staining region)이나 DM(double minute) 염색체의 출현에 대해서 Alitalo 등(1983)은 c-myc 암유전자의 증폭을 반영한 것이고 이것은 암세포 핵형변화의 말기 상태이며 암세포가 항암제 대처 내성을 지닌 것을 반영한 것이라 하였다.

대장 선종(colon adenoma), 뇌막종(meningioma), 혼합 타액 선종(pleomorphic adenoma), 지방종(lipoma)과 같은 양성 종양에서 일정한 염색체 변이를 나타내므로 이러한 염색체 변이가 반드시 암을 의미하거나 악성화 전단계로만 보아서는 안된다는 보고도 있다.(Sandberg, 1987).

편평상피 세포암의 염색체 변이에 관해서는 Atkin과 Baker(1978)는 자궁경부의 편평상피 세포암 26례의 염색체 변이를 보고하였다. 그들에 의하든 모든 증례에서 제1번 염색체의 변이가 있었는데 7례에서 단완 소실(ip⁻)이 있었고 6례에서 장완 isochromosome(i(lq))이 있었고 11례에서 다른 염색체에서 1번 염색체의 단완 혹은 장완에 전좌(translocation)되어 있었으며 1례에서 단완 isochromosome(i(lp))이 있었다. 이들이 조사한 염색체 수는 40개에서 107개 사이였으며 대부분이 diploid보다 수가 많았다. 염색체의 수가 diploid에 가까울수록 제1번 염색체의 변이가 많았으며 1번 염색체 변이는 악성화의 후기 중후로 추정된다고 하였으며 양성에서 1번 염색체 변이가 발견되면 예후가 나쁜것으로 추정된다고 하였다.

P Villar, R Weichselbaum 등(1987)이 8례의 두경부 편평상피 세포암환자의 염색체 변이를 G, Q band법으로 분석하여 보고하였는데 대부분이 hyperdiploid (56-64)였으며 제7번 염색체에서 가장 많은 변이가 있었고 그외에도 제1번, 3번, 8번, 11번, 13번 염색체에서 변이를 보였다.

제7번 염색체의 변이는 주로 단완(7p¹¹⁻²²)에서 일어났는데 이는 epidermal growth factor receptor (EGFR, c-erb-B) 암유전자가 여기에 있는데 이와 7번 염색체 단완의 변이와의 관계를 연구중이다.

Fred Gilbert(1983)는 염색체 변이를 세가지로 분류했다. 첫째, 임파종(lymphoma)이나 백혈병에서 볼 수 있는 상호 전좌(reciprocal translocation)이고 둘째, 망막아세포종(retinoblastoma), Wilm 씨 종양, 신경아세포종(neuroblastoma)에서 소실(deletion)되는 것이고, 세째, 만성 백혈병 말기 등에서 볼 수 있는 duplication으로 trisomy도 여기에 속하는데 이는 특정한 암에서 생기기 보다는 암이 진행되면서 보이는 변화로 생각되며 이러한 변이가 보이면 예후가 매우 나쁘다고 보고했다.

부분의 암에서 hyperdiploid를 나타내며 난소암, 유방암, 후두암, 전이된 악성 흑색종(malignation melanoma) 등에서는 hypodiploid를 나타낸다(Atkin,

1974).

Tonamura(1959), Sasaki(1961)에 의하면 위암세포에서 암이 진행될수록 hyperdiploid의 세포수는 감소하여 항암제를 사용하였을 경우 염색체의 단절(breakage)이 일어나는 빈도가 감소된다고 하였다.

편평상피 세포암외에 제1번 염색체 변이를 나타내는 암은 유방암, 난소암, 방광암, 악성흑색종등이 보고되어 있다.

저자가 시행한 실험에서의 특이한 소견은 제1번, 7번 염색체에서 trisomy가 나타났는데 이들이 ras암 유전자와 raf-2 암유전자와의 상관관계는 앞으로 DNA와 m-RNA level에서 더 연구되어야 할 문제이다.

요 약

치료받지 않은 원발성 편평상피세포암환자의 암 조직을 물리적 방법과 효소처리 방법으로 세포분리하였다.

암세포수는 장시간 배양한 것에서 더 많이 얻을 수 있었으나 염색체가 나타나는 빈도는 비슷하였다.

분리된 암세포들은 colemid로 3시간 처리한 후 의례적인 염색체 조작방법으로 충분한 중기 염색체를 얻을 수 있었다.

환자의 혈액 임파구에서 염색체는 모두 46, X X였으며 자매염색분체도 모두 정상 범위였다.

암세포의 염색체는 구조적 변화나 표지염색체등은 발견할 수 없었고 염색체 수는 42~50개가 대부분이었지만 한개의 세포에서 tetraploid근처로서 4개의 표지염색체를 나타냈다.

염색체소실은 무작위로 나타나서 제10번, 12번, 15번, 17번, 22번등에서 관찰되었으나 염색체소실이 있는 세포는 곧 사망할 것으로 추측되므로 별 의미를 부여할 수 없다.

특이한 소견으로는 제1번과 제7번 염색체에서 trisomy가 있었다.

제1번 염색체에는 ras암유전자가 있고 제7번 염색체에는 raf-2암유전자가 있다. 이들 암유전자가 편평상피세포암의 암화과정을 유발하는지는 앞으로 northerm blot기술로 확인할 필요가 있다.

참 고 문 헌

Alitalo K, Schwab M, Lin CC, et al: Homogenously staining chromosomal regions contain amplified

copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1707-1711.

Casspersson T, Zech L, Johansson C: Quinacrine mustard fluorescence of human chromosome. *Exp Cell Res* 1979; 61: 474-475.

Craig R, Sager R: Suppression of tumorigenicity in hybrids of normal and oncogene transformed CHEF cells. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 2062-2066.

Dallapiccola B, Tataranni G: Modello di evoluzione ionale del cariotipo in versamento pleurico neoplastico. *Arch Ita Pathol Clin Tumori* 1969; 12:3-21.

Doll R: Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 1977; 265: 598-596.

Ferti-Passantonopoulou AD, Panani AD, Viachos JD, Raptis SA: Common cytogenetic findings in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 63-73.

Fred Gilbert: Chromosome, genes, and cancer; A classification of chromosome abnormalities in cancer. *JNCI* 1983; 71(No. 6)(December).

Fialkow PJ: The origin and development of human tumors studies with cell markers. *N Engl J Med* 1974; 291: 26-35.

Gloria B Balaban, Meenhard Herlyn, Wallace H Clark, Jr, Peter C Nowell: Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 19: 113-122.

John Cairns: The origin of human cancers. *Nature* 1981; 289: 29.

Klein G, Klein EL: Evolution of tumors and the input of molecular oncology. *Nature* 1985; 315: 190-195.

Linda Workman, et al: Biologic characteristics of four Ewing's sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15: 215-225.

Linzer HID, Nathans D: Growth related changes in specific mRNAs of cultured mouse cells. *Proc Nat Acad Sci* 1983; 80: 4271-4275.

Makino S, Ishihara T, Tanomura A: Cytologic studies of tumors, XXVII. The chromosomes of thirty human tumors. *Z Krebsforsch* 1959; 63: 164-208.

Niels B Aticin, MD, FIAC, abd Marion C Baker, B Sc: Chromosome 1 in 26 carcinoma of the cervix uteri. *Cancer* 1979; 44: 604-613.

Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosomal in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-1451.

Rowley JD: A new consistent chromosomal abnorma-

- lity in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-293.
- Sandberg AA, Bross IDJ, Takagi N, Schmidt ML: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. IV Vectorial analysis. *Cancer* 1981; 21: 77-82.
- Sasaki NS: Cytological effect of chemicals on tumors. XII. A Chromosome study in a human gastric tumor following radioactive colloid gold (198 Au) treatment. *J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool* 1961; 14: 566-575.
- Sandra R. Wolman, MD: Cytogenetics and cancer.
- Arch Pathol Lab Med* 1984; 108.
- Suresh H Moolgavkar, Alfred G Knudson, Jr: Mutation and cancer; A model for human carcinogenesis. *JNCI* 1981; 66(No. 6).
- Tonomura A: Cytologic studies of tumors. Chromosome analyses in stomach and uterine carcinomas. *J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool* 1959; 14: 149-156.
- Yunis JJ: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 221: 227-236.
- Varmus HE: Amplification of cellular oncogenes in human tumors. *Ann Rev Genet* 1984; 18: 553-612.