

위암의 세포유전학적 분석

계명대학교 의과대학 해부학교실

정용욱 · 장성익

서 론

암세포는 정상세포와 달리 염색체에 있어서 숫자·형태적 변화가 다양하게 나타나며 이러한 변화가 암세포의 발생과 진행에 관여할 것이라는 이론이 근래에 제기되기 시작하였다¹⁾. Nowell과 Hungerford²⁾에 의하여 만성골수성백혈병(CML) 환자의 임파구에서 22번 염색체의 결손(deletion)이 발견된 이후 염색체의 핵형분석(karyotyping)은 암세포 연구에 있어서 중요한 한 부분을 차지하게 되었으며 지금은 악성종양의 지속적인 염색체 변화가 종양의 발생과 진행에 관여하고 있음이 많은 실험을 통해서 입증되고 있다^{3~8)}. 악성종양은 DNA의 점돌연변이(point mutation)에 의해 염색체의 변화를 초래하거나 염색체에 영향을 주어 유전자의 변이를 가져 오므로서 발생될 수 있으며 이러한 변화는 단일세포에서 발생한다⁹⁾. 또한 암세포의 분열과정은 광범위한 이상을 보이는데 예를 들면 다중극(multiple poles), 또는 비정상적 중기(disorganized metaphases), 후기 지체(anaphases lagging), 염색분체교량(chromatid bridges), 내분열(endomitosis), 내제복제(endoreduplication) 등이다. 이러한 현상들은 암세포의 복제와 분리가 정상과 다르다는 것을 알려 주는 것이다. 암세포의 염색체변화는 즉 결실, 획득(gain), 전좌(translocation)가 있으며 암과 관련된 유전자에 영향을 미쳐 성상적인 세포를 암세포화 한다고 알려져 있다. 암세포의 염색체상의 변화는 암의 발생과 진행에 관련된 여러 종류의 유전자를 찾아내는데 중요한 도구가 되고 있으며 실제로 많은 혈액암¹⁰⁾과 소아종양 예를 들어 만성골수성백혈병, 신경아세포종¹¹⁾, 망막아세포종¹²⁾, Wilm씨 종양¹³⁾ 등에서는 이러한 염색체상의 변화를 임상적 진단과 예후판정에 유용하게 이용하고 있다. 고형암에 있어서 염색체조사의 어려움은 첫째, 원하는 암종의 조직을 쉽게 얻을 수 없으며, 둘째는 배양이 힘들며, 세째는 암세포의 염색체가 가지는 다양성, 특히 과농축(overcontraction)과 암의 진행에 따른 염색체 변화의 상이함 등으로 인해 해석이 어렵다는 것이다. 하지만 이러한 어려움에도 불구하고 고형암의 지속적인 염색체변화에 대해서는 많은 조사가 이루어져 왔으며 현재는 이러한 고형암에서의 염색체를 이용하여 진단을 예측하고 치료의 방향을 결정하며 예후를 결정하는 단계에까지 이르고 있다. 하지만 외국의 경우와는 달리 한국에서는 암세포의 염색체이상에 대한 조사는 미흡하며 특히 위암에 대한 외국의 보고는 소수에 불과하다. 최근의 연구는 인간의 염색체에 존재하는 세포성 암유전자(cellular oncogene)의 위치를 밝혀놓으면서^{14~16)} 여러가지 종양의 염색체상의 변화와 세포성 암유전자의 활성화를 연관지어 종양의 발생과 진행에 있어서 특이한 세포성 암유전자를 찾아내고 그 역할에 대해서 설명하려는 시도가 계속되고 있다. 저자는 한국인의 위암에 있어서 특이적인 염색체상의 변화를 알아내고 이러한 염색체상의 변화와 세포성 암유전자와의 관계를 밝혀내어 위암의 발생과 진행에 이들이 어떻게 관여하는지를 알고자 본 조사를 시행하였다.

재료 및 방법

재료

원발 위암세포(primary stomach cancer cell)는 39세 여자로서 병리학적 소견은 미分化된 위선암(poorly differentiated adenocarcinoma)이며 TNM 분류상 stage IV 환자의 조직에서 배양을 통해 얻어낸 세포로 하였고 위암세포주(stomach cancer cell lines)는 서울대학교 외과학교실에서 공여받아 조사하였다.

방법

1. 배양(culture)

원발성 위암세포의 배양은 수술실에서 가져온 암 조직을 수술용 칼을 이용하여 아주 잘게 기계적인 분리(mechanical disaggregation)를 실시하여 petridish에 붙인 다음 15%의 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco제)과 항생제(streptomycin-penicillin: 1000 mcg/ml, 1000 units/ml)가 들어 있는 F10 배양액을 이용하여 37 °C CO₂ 배양기에서 4~5개월간 배양하였다. 이때 배지는 3~4일 마다 교환해 주었으며 세포가 과다하게 증식되었을 때 분주(subculture)하여 다시 배양하였다. 위암세포주의 배양은 액화질소(liquid nitrogen)에 보관되어 있던 위암세포주를 dry ice를 이용하여 운반한 후 37 °C 수조에서 급속 용해하여 15% 우태아혈청과 항생제가 들어 있는 F10 배양액에서 4~5개월간 배양하였다.

2. 세포수확(harvest)

위와같이 배양된 원발성 위암세포와 위암세포주 I, III에 colcemid(10 mcg/ml, Gibco제)를 ml당 8 µl 첨가하여 90분간 배양하고 난 다음 0.5% trypsin과 5.3 mM EDTA가 들어 있는 용액으로 1분간 처리하여 세포들을 petridish의 표면으로부터 분리한 다음 1,500 rpm으로 3분간 원심분리한 다음 인 완충 용액 Phosphate buffered saline으로 2번 세척한 후에 다시 1,500 rpm으로 3분간 원심분리하여 부유액

을 버리고 세포의 덩어리를 회개될 때까지 고정단계를 3~4회 더 실시하였다. 이렇게 하여 만들어진 세포의 덩어리를 고정액을 약간량 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 각각의 세포를 완전히 분리 시켰다. 다음에 70% 알코올에 담구어둔 젖은 slide를 휴지를 이용하여 완전히 닦은 다음 두 장의 젖은 거즈를 완전히 펴고 그 위에 slide를 올려놓은 후 세포들을 pasteur pipette를 이용하여 2방울 떨어뜨렸다.

3. Giemsa-band법

위와 같은 방법으로 만들어진 slide를 3~4일간 37 °C 배양기 혹은 실온에서 말린 다음 G-band를 실시하였다. Slide를 60 °C 2XSSC 용액에 50분간 담구어 둔 다음 Sörensen씨 완충액으로 씻어주고 실온에서 건조시킨 후 33 ml Sörensen씨 완충액과 17 ml의 30% 과산화수소수가 들어 있는 용액에 5~7초간 둔 다음 즉시 0.03 g trypsin(1:250, GIBCO제) 수용액 용액에 1~3초간 둔 다음 흐르는 물에 씻어주고 4% Giemsa 용액으로 8분간 염색을 하였다.

성 적

원발성 위암세포에서는 17 metaphases, 위암세포

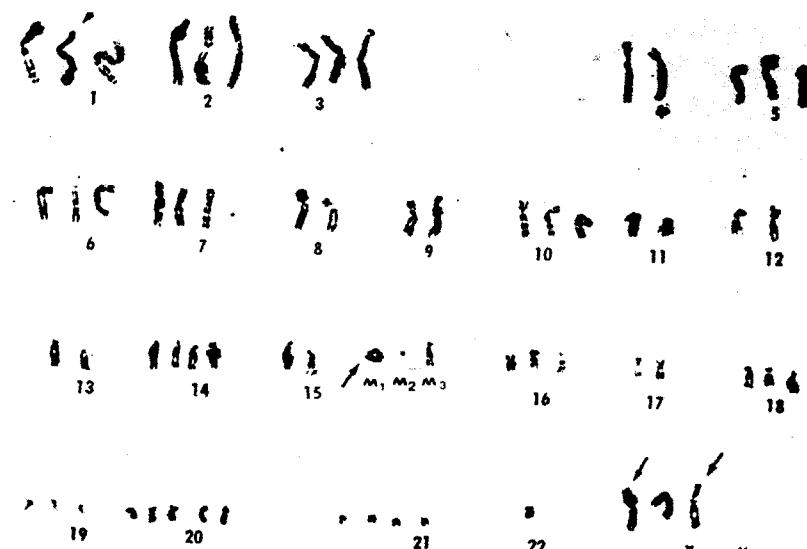


Fig. 1. Karyotype of primary stomach cancer cells

M: marker chromosome

Arrow(→) represent del(1)(p34)

ring chromosome

del(X)(p22)

Table 1. Distribution of chromosome number in gastric cancer cells

Case	Total number metaphase of	Chromosome(%)																										
		cells counted	43	45	47	48	61	62	63	64	65	66	67	69	74	78	80	81	82	83	85	87	88	90	91	92	94	95
primary	17	1					2	2	1	2	4	3	1	1													65/66	
stomach	(6)		(12)	(12)	(6)	(12)	(24)	(18)	(6)	(6)																		
cancer																												
stomach	24						1			1	1	1	1	2	2	1	1	3	1	2	2	2	3	80-89/				
cancer							(4)			(4)	(4)	(4)	(4)	(8)	(8)	(4)	(4)	(13)	(4)	(8)	(8)	(8)	(8)	(13)	90-95			
cell																												
line-I																												
stomach	13	3	5	1				1																				
cancer		(23)	(38)	(8)																								
cell																												
line-III																												
	set of	near diploid	near triploid																									
	chromosome	(2n±)	(3n±)																									

mn : model number

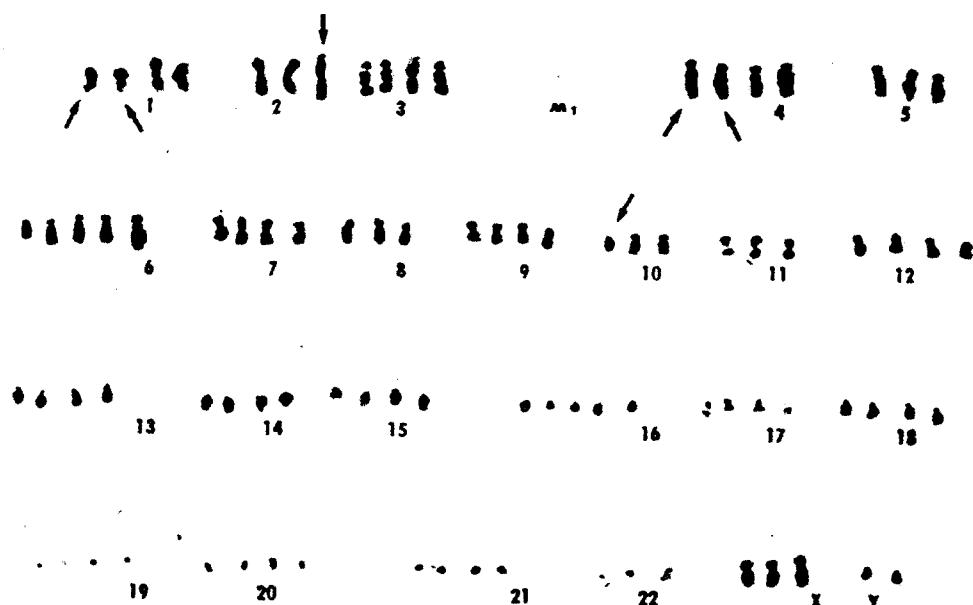


Fig. 2. Karyotype of stomach cancer cell line(SUN-1)

M: Marker chromosome

Arrow(→) represent del(4)t(4:1)(qter : q32→qter)

der(2)t(2:?) (p23 : ?)

del(10)(p13 : pter)

주 - I에 대해서는 23 metaphases, 위암세포주 - III에 대해서는 13 metaphases를 G-band를 실시하여 핵형분석을 시도하였다(표 1, 그림 1, 그림 2).

1. 수적인 이상(numerical abnormalities)

1) 원발성 위암세포

염색체 숫자상의 분포은 43개에서 69개까지 다양하게 나타났으며 42%의 세포들의 염색체 숫자가 65개, 66개에 모여있는 거의 삼배수성(triploid)의 양상을 띠고 있었으며 특히 1번, 3번, 5번, 7번, 11번, 14번, 16번의 삼체성(trisomy), 1번, 20번의 사체성(tetrasomy)이 비교적 높은 빈도로 나타났다.

2) 위암세포주 - I

염색체 숫자상의 분포는 66개에서 95개 이상까지 다양하게 분포하고 있었으며 88%의 숫자가 80개에서 95개까지의 사이에 모여 있는 거의 사배수성(near tetraploid)의 양상을 띠고 있었으며 특히 7번, X염색체의 삼체성(trisomy), 6번, 8번, 9번, 11번, 12번, 21번의 사체성(tetrasomy)이 비교적 높은 빈도로 나타났다.

3) 위암세포주 - III

염색체 숫자상의 분포는 43개에서 95개 이상까지

다양하게 분포하고 있었으며 69%의 숫자가 43개에서 48개에 모여 있는 거의 이배수성(diploid)의 양상을 띠고 있었으며 특이할 만하게 높은 빈도로 나타나는 숫자상의 변이는 나타나지 않았다(표 2).

이상과 같은 결과를 종합해 볼때 위암세포의 염색체 숫자상의 변이는 1번, 2번, 3번, 6번, 9번, 10번, 16번, X염색체의 삼체성과 1번, 7번, 9번, 18번, 20번, 21번 염색체의 사체성과 관련이 있었다(표 3).

2. 구조적인 이상(structural abnormalities)

1) 원발성 위암세포

del(1)(p34→pter), del(3)(p25→pter), del(X)(p22)가 높은 빈도로 나타났으며 모든 핵형에서 표지염색체(marker chromosome)가 나타났다.

2) 위암세포주 - I

del(1)(q32→qter), del(4)t(4:1)(qter : q32→qter)이 높은 빈도로 나타났으며 88%에서 표지염색체가 나타났다.

3) 위암세포주 - III

del(1)(q32→qter), del(4)t(4:1)(qter : q32→qter), del(X)(p22)가 높은 빈도로 나타났으며 38%에서 표지염색체가 나타났다(표 4).

Table 2. Numerical abnormalities in gastric cancer cells

Case	Number of cells karyotyped	Numerical abnormalities (% of each counted chromosome)
Primary stomach cancer	17	+1(59) +1+1(35) +2(65) +2+2(6) -2(12) +3(71) +3+3(6) +4(24) +4+4(12) +5(76) +6(100) +7(65) +7+7(18) +8(12) -8(29) +9(41) +9+9(6) -9-9(6) +10(35) -10(6) +11(59) +11+11(6) +12(35) -12(6) -12-12(6) +13(35) +14(35) +14+14(6) +15(6) +15+15(6) -15(18) -15-15(6) +16(59) -16(6) +17(12) -17(12) +18(47) +18+18(47) +19(35) +19+19(12) +19+19+19(6) -19(6) +20(12) +20+20(53) +20+20+20(18) -20(6) +21(4) +21+21(35) +22(18) -22(22)
Stomach cancer cell line - I	24	+1(46) +1+1(46) +1+1+1(8) +2(42) +2+2(46) +2+2+2(4) +2+2+2+2(4) +3(17) +3+3(38) +3+3+3(46) +4(21) +4+4(42) +4+4+4(21) -4(8) +5(25) +5+5(46) +5+5+5(21) +5+5+5+5(8) +6(21) +6+6(50) +6+6+6(17) +6+6+6+6(4) +7(50) +7+7(42) +8(33) +8+8(50) +8+8+8(13) +9(38) +9+9(54) +10(46) +10+10(29) +10+10+10(4) +11(21) +11+11(50) +11+11+11(21) +11+11+11+11(4) +12(25) +12+12(58) +12+12+12(4) -12(4) +13(21) +13+13(33) +13+13+13(25) +13+13+13+13(4) +14(17) +14+14(42) +14+14+14(8) -14(4)

		+15(46) +15+15(29) +15+15+15(13) +15+15+15+15(4) +16(21) +16+16(42) +16+16+16(21) +17(28) +17+17(29) +17+17+17(13) -17(4) +18(13) +18+18(34) +18+18+18(8) +18+18+18+18(8) -18(4) +19(25) +19+19(38) +19+19+19(13) +20(8) +20+20(38) +20+20+20(25) +20+20+20+20(29) +21(17) +21+21(42) +21+21+21(17) +21+21+21+21(4) +22(46) +22+22(42) +22+22+22+22(4) +X(67) +X+X(13) +Y(21) +Y+Y(8)
Stomach cancer cell line - III	13	+1(15) +1+1(15) -1-1(8) +2(15) +2+2(8) +2+2+2(8) +2+2+2+2(8) +3(15) +3+3(15) -3(8) +4(15) +4+4(15) +5+5(23) +5+5+5(8) -5(8) +6(23) +6+6(8) +7(31) +8(8) +8+8(15) +9(8) +9+9(23) -9(15) +10(8) +10+10(23) +11+11(15) +11+11+11(15) +12+12(23) +12+12+12(8) +13(8) +13+13(23) +14(15) +14+14(15) +15(8) +15+15(23) +16(8) +16+16(15) +16+16+16+16(8) +17(15) +17+17(8) -17(8) +18(8) +18+18(23) -18(8) +19+19(31) +20(23) +20+20(15) +20+20+20(15) +21(8) +21+21(23) +22(8) +22+22(15) +X(15) +X+X(8) +Y(8) +Y+Y(8)

Table 3. Numerical abnormalities of total counted chromosome in gastric cancer cell

Chromosome	Numerical abnormalities (case / % of total counted chromosome)
1	+1(3/43)* +1+1(3/35)* +1+1+1(1/4) -1-1(1/2)
2	+2(3/43)* +2+2(3/24) +2+2+2(2/4) +2+2+2+2(2/4) -2(1/4)
3	+3(3/33)* +3+3(3/22) +3+3+3(1/20) -3(1/2)
4	+4(3/20) +4+4(3/26) +4+4+4(1/9) +4+4+4+4(1/2) -4(1/4)
5	+5(2/35) +5+5(2/26) +5+5+5(1/9) +5+5+5+5(2/6) -5(1/2)
6	+6(3/46)* +6+5(2/24) +6+6+5(1/7) +6+6+6+6(1/2)
7	+7(2/43) +7+7(3/33)*
8	+8(3/20) +8+8(2/26) +8+8+8(1/6) -8(1/9)
9	+9(3/31)* +9+9(3/31)* -9(1/4) -9-9(1/2)
10	+10(3/33)* +10+10(2/19) +10+10+10(1/2) -10(1/2)
11	+11(2/28) +11+11(3/19) +11+11+11(2/13) +11+11+11+11(1/2)
12	+12(2/22) +12+12(2/31) +12+12+12(2/4) -12(2/4) -12-12(1/2)
13	+13(2/20) +13+13(2/20) +13+13+13(2/13) +13+13+13+13(1/2) -13(1/2)
14	+14(3/28) +14+14(3/24) +14+14+14(1/4) -14(1/2)
15	+15(3/24) +15+15(3/20) +15+15+15(1/6) +15+15+15+15(1/2) -15(1/6) -15-15(1/2)
16	+16(3/30)* +16+16(2/22) +16+16+16(1/9) +16+16+16+16(1/2) -16(1/2)
17	+17(3/24) +17+17(2/15) +17+17+17(1/6) -7(3/7)
18	+18(3/22) +18+18(3/44)* +18+18+18(1/4) +18+18+18+18(1/4) -18(2/4)
19	+19(2/22) +19+19(3/28) +19+19+19(2/7) -19(1/2)
20	+20(3/13) +20+20(3/37)* +20+20+20(3/20) +20+20+20+20(1/13) -20(1/2)
21	+21(3/22) +21+21(3/39)* +21+21+21(1/7) +21+21+21+21(1/2)
22	+22(3/28) +22+22(2/22) +22+22+22+22(1/2) -22(1/9)
X	+X(3/46)* +X+X(3/19)
Y	+Y(2/11) +Y+Y(1/2) -Y(1/4)

이상과 같은 결과를 종합해 볼 때 위암세포의 구조적인 이상은 del(1)(p34→pter), del(1)(q32→qter), del(3)(p25→pter), del(4)t(4:1) (qter:q

32→qter), del(10), del(X)(p22)와 관계가 있는 것으로 나타났다(표 5).

Table 4. Structural abnormalities in gastric cancer cell

Case	Number of cells karyotyped	Numerical abnormalities (% of each counted chromosome)
Primary stomach cancer	17	del(1)(p34→pter)(39) del(1)(q32→qter)(4) der(1)t(1:?)(qter:?)(2) del(2)(p24→pter)(2) del(3)(p25→pter)(26) der(3)t(3:?)(qter:?)(2) der(3)t(3:?)(cen:?)(2) del(4)(p14→pter)(5) der(4)t(4:?)(qter:?)(5) del(5)(p14→pter)(2) del(8)(q24)(3) der(8)t(8:?)(pter:?)(3) del(9)(p23→pter)(2) del(10)(p13→pter)(8) del(11)(p15)(2) del(X)(p22)(2) mar(100)
Stomach cancer cell line - I	24	del(1)(q32→qter)(55) del(1)(q34→pter)(3) der(2)t(2:?)(p23:?)(1) der(3)t(3:?)(cen:?)(1) der(4)t(4:1)(qter:q32→qter)(46) del(5)(q34→qter)(2) del(6)(p11→pter)(1) del(8)(p23)(2) del(10)(p13→pter)(16) del(11)(q23→qter)(1) del(X)(p22)(15) mar(88)
Stomach cancer cell line - III	13	del(1)(q32→qter)(42) del(1)(p34→pter)(6) del(2)(q37)(3) der(4)t(4:1)(qter:qa32→qter)(31) del(5)(q34→qter)(3) del(9)(q31→qter)(5) del(11)(p15)(3) del(19)(p13)(3) del(X)(p22)(18) mar(38)

Table 5. Chromosome rearrangement of chromosomes #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #1, #19 and X in one primary and two cell lines of gastric cancer

Chromosome	Case in appearance	Rearrangements(% of metaphases)
1	3	del(1)(p34→qter)(41)*
	3	del(1)(q32→qter)(65)*
	1	der(1)t(1:?)(qter:?)(2)
2	1	del(2)(p24→qter)(2)
	1	del(2)(q37)(2)
	1	der(2)t(2:?)(p23:?)(2)
3	1	del(3)(p25→qter)(11)*
	1	der(3)t(3:?)(cen:?)(2)
	2	der(3)t(3:?)(cen:?)(4)
4	1	der(4)(p14→pter)(4)
	1	der(4)t(4:?)(qter:?)(4)
	2	der(4)t(4:1)(qter:q32→qter)(52)*
5	1	del(5)(q14-?qter)(2)
	2	del(5)(q34→qter)(6)
6	1	del(6)(p11→qter)(2)
8	1	del(8)(q24)(2)
	2	del(8)(p23)(4)
	1	der(8)t(8:?)(pter:?)(2)
9	1	del(9)(p23→pter)(2)
	1	del(9)(q31→qter)(2)
10	2	del(10)(p13→qter)(22)*
11	2	del(11)(p15)(4)
	1	del(11)(q23→qter)(2)
19	1	del(19)(p13)(2)
X	3	del(X)(p22)(30)*

Table 6. Gastric cancer related oncogene

chromosome nuber	breakpoint	oncogene
1	1p34	fgr(Gardner-Rasheed feline sarcoma) src2(Rous chicken sarcoma)
2	2p24	N-myc(Human neuroblastoma)
3	3p25	raf1(3611 murine sarcoma)
4	4p14	raf2(3611 murine sarcoma)
5	5q34	fms(McDonough feline sarcoma)
6	6p11	K-ras1(Kirsten murine sarcoma)
8	8q24	myc(MC 29 avian myelocytomatosis)
9	9q31	abl(Abelson murine leukemia)
11	11p15	H-ras1(Harvey murine sarcoma)

3. 세포성 암유전자(cellular oncogene)와의 관련

위에서 얻은 염색체의 구조적 이상 가운데 파손위치 즉 break-points와 이미 알려진 세포성 암유전자와의 위치를 서로 비교해 보았다.

위의 결과를 종합하면 위암과 관계있는 세포성 암유전자는 표 6과 같이 fgr, src-2, N-myc, raf1, raf2, K-ras1, myc, abl, H-ras와 같은 암유전자와 관련이 있었다.

고 찰

Cassperson과 Johansson¹⁷⁾에 의해 중기염색체에 대한 band법이 도입되면서 여러가지 염색체 이상에 대한 연구가 본격적으로 이루어지게 되었다. 또한 최근에는 methotrexate를 이용한 세포환(cell cycle)의 동시성화(synchronization)와 세포의 colcemide에 대한 짧은 처리 방법들이 개발되면서 염색체의 band수가 250 내지 400band에서 800내지 1200band 까지 조작할 수 있는 단계까지 이르게 되었다¹⁸⁾. 이로인해 백혈병이나 임파종, 악성종양에 대한 연구가 본격적으로 이루어지게 되었으며 또한 과거에 불렀던 염색체상의 이상을 찾아내면서 발암과정에 중요한 역할을 담당하는 유전자가 위치한 염색체상의 위치들을 정확하게 알 수 있게 되었다. 암세포에서 일어나는 염색체변화를 크게 세가지로 분류해 보면, 첫째는 염색체물질의 유실(loss)이 일어나는 경우이다. 이러한 변화는 염색체상의 한 부분의 결손이나 혹은 전염색체의 유실(monosomy)로 인해 야기되며 이러한 변화는 결국 암억제유전자에 영향을 미쳐 암을 유발 시킬 수 있다. 또한 결실이 간질성(interstitial)이라면 재조합(recombination)은 break-point 지역에서의 유전자의 position effect를 통해 암을 유발 시킬 수도 있다. 둘째는 염색체물질의 획득이 일어나는 경우이다. 이상분리(malsegregation)는 삼배체(trisomy) 혹은 다배체(polysomy)를 일으킬 수 있으며 특정 염색체부위(region) 혹은 부분(segment)의 복제(duplication)는 비균형적인 유전자산물의 생성을 가져와 단순한 dose effect에 의해 암을 유발시킬 수 있으며 또한 암과 연관된 유전자의 증폭(amplification)이 암을 유발 시킬 수 있는 중요한 기전으로 작용하기도 한다¹⁹⁾.

세째는 유전자물질의 양에 변화없이 DNA의 배열에 변화가 생기는 경우이다. 이러한 변화는 염색체

간의 재배열(전좌와 삽입)과 염색체내의 재배열(역위와 삽입)로 나타나며 이러한 DNA 배열의 재조합으로 인해 이미 존재하던 유전자가 제기능을 상실하거나 새로운 합성유전자가 나타날 수도 있으며 유전자의 조절기능이 상실될 수도 있다. 이러한 position effect는 여러가지 인간의 종양에 있어 암유전자의 염색체적 활성화와 관계가 있다²⁰⁾. 암의 종류에 따른 암세포에서의 염색체 변화는 특이적이며 nonrandom하게 일어난다^{21~22)}. 예를들면 염색체 8, 9, 12, 21은 흔히 삼배체를 형성하며 반면에 7번, 22번, Y는 흔히 결실이 일어나는 것이다.

위에서 언급된 변화들 이외에도 많은 종류의 암종에서 double minutes와 homogenous staining region 등이 나타나는데 이것은 유전자의 증폭과 관계가 있는 것으로 보고되어 있다^{23~26)}. 악성암 세포에서의 break-points는 표준핵형 분석에서 볼 수 있는 band의 1/4에 국한되어 있으며 복잡한 염색체 변이를 가진 암세포의 96%는 이 부위에서 대부분의 파괴(breakage)가 일어나는 것을 알 수 있다²⁷⁾. 하지만 이러한 암세포 염색체의 nonrandomness에도 불구하고 암세포의 염색체 변화는 왜 그렇게 이질적인(heterogenous)것 인지를 알기 위해서 우리는 암세포에서 일어나는 염색체변화를 일차성변화(primary change)와 이차성변화(secondary change)로 나누어 볼 수가 있다. 일차성변화들은 암세포에 있어 단독적으로 나타나며 특이적인 종양의 형태와 직접적인 관계가 있는 것이다. 보통 이러한 변화들은 발암과정(carcinogenesis)의 초기단계(early stage)에 나타나는 것²⁸⁾으로 알려져 있다. 이에 반해 이차성변화들은 단독적으로 나타나는 변화들이 아니며 일차성변화에 수반되어 질병의 후기단계(later stage)에 많이 나타나는 것으로 알려져 있으며 암의 진행(progression)과 관계가 깊은 것으로 생각되고 있다²⁹⁾. Ochi 등³⁰⁾은 모두 5례의 위선암을 조사해 67가지의 숫자인 이상과 83가지의 구조적인 이상을 보고했다. 이 가운데 가장 흔한 숫자상의 변이는 3례에서 나타난 12번 염색체의 획득과 Y 염색체의 결실이다. 하지만 지속적인 구조적 이상은 발견하지 못하였으며 breakpoint는 1p22, 3p21, 19p13이 흔히 포함된다고 발표했다. 또한 Ferti-Passautoupolou와 Angeli³¹⁾는 역시 5례의 위선암을 조사해 3례의 이수성과 2례의 삼수성을 보고했으며 9번 염색체의 변화가 4례에서 i(9q)와 9p로 나타나며 8번 염색체의 삼배체 혹은 i(8q)가 3례에서 나타난다고 보고하였다. 또한

Ochi 등^[2]은 삼배체 X를 위암의 특이적인 일차성 변화라고 보고하기도 하였다. 본 실험에서는 3례의 위암세포에 있어서 모두 101가지의 숫자상의 변이와 25가지의 구조상의 변이를 초래했다. 이러한 매우 복잡한 핵형분석의 결과는 위암 뿐만 아니라 다른 모든 고형암의 일반적인 특징과 일치한다고 볼 수 있다. 또한 이러한 현상들은 위암의 발생과 관계가 있기보다는 악성종양으로서의 진행(progression) 과정의 결과로 나타난 것이라 생각할 수 있다. 숫자상의 변이에 있어 높은 빈도로 나타난 것은 1번, 2번, 3번, 6번, 9번, 10번, 16번 염색체와 성염색체 X의 삼배체, 1번, 7번, 9번, 18번, 20번, 21번 염색체의 사배체였으며 이 가운데 9번 염색체의 수적인 이상은 Ferti-Passautonopoulou가 보고한 것과 일치하는 점이 있으나 삼배체 X의 경우는 Ochi 등이 위암의 일차성변화의 하나라고 보고하고 있으나 본 실험에서는 위암세포주 2례에서 특정적으로 나타남으로서 일차성변화라기 보다는 위암의 진행과정 중에 나타나는 이차성 변화의 하나라고 생각된다. 염색체 구조상의 변화를 보인 것은 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번, 8번, 9번, 10번, 11번, 19번, X 염색체이며 이러한 변화의 대부분은 이미 알려진 암세포의 특이적인 break-points에서의 결실이었으며 이 가운데 1p34, 1q32, 3p25, 10p13, Xp22 위치에서의 결실은 높은 빈도로 나타남으로서 이 부분이 위암의 진행과 관련된 유전자의 위치와 관계가 있을 것으로 생각된다. 결실 이외에도 3번, 4번 염색체에서의 전좌가 일어났으며 특히 t(4:1)이 2례의 위암세포주에서 높은 빈도로 일어남으로서 이러한 변화가 위암의 진행과 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 3례 모두에서 표지염색체가 나타남으로서 이를 세포들이 아직도 불안정하며 계속해서 변화를 거치는 진행단계의 세포들이라는 규정을 지을 수 있다. 다음은 이러한 염색체상의 변이와 암과 연관성이 있는 유전자와의 관계에 대해서 알아보면 이러한 유전자들은 크게 세부류로 나누어 볼 수 있다^[3]. 첫째는 암유전자(oncogene)들이며 이것은 실험동물이나 혹은 배양세포에서 악성세포로의 전환(transformation)에 직접적으로 그리고 우성적(dominant)으로 작용하는 유전자집단이다. 둘째는 종양억제유전자(tumor suppressor gene 혹은 antioncogene)이다. 이것은 열성(recessive)으로 작용하며 양쪽 쌍동염색체 존재하는 이 유전자의 비활성화(inactivation)으로 인해 발암과정이 시작하며 결국은 암으로 발전이 된다는 것이다. 이것은

특히 선천성 소아종양에서 많은 연구가 이루어지고 있다. 세째는 조절유전자(modulatin gene)로서 암세포와 숙주개체 사이의 상호작용을 조절하는데 영향을 미치는 유전자이다. 이러한 유전자들은 간접적으로 작용이 되며 그 자체 유전자만으로는 정상세포를 암세포로 변형시킬수는 없다. 이 가운데 암의 형성에 직접적으로 우선적으로 작용하는 암유전자의 경우 이것은 크게 바이러스성 암유전자(v-onc)와 세포성 암유전자(c-onc)로 나누어 볼 수가 있으며 바이러스성 암유전자는 retrovirus와 같은 tumorigenic RNA virus에 의해서 운반되며 이것의 기원은 분명 세포성 암유전자가 바이러스의 유전자내로 복제되고 재조합(recombination)되어 결합(incorporation)된 것이라 볼 수 있다. 또한 세포성 암유전자는 진화의 과정중에 강하게 유지가 되는 것으로 보아 인간의 세포생리 즉 세포의 분화를 조절한다거나 이미 분화된 세포의 유지와 같은 생리적 현상에 매우 중요한 관계가 있는 것은 다음과 같은 몇가지 사실로서 입증이 될 수 있는데 그것은 첫째 인간의 암세포는 실험실에서 정상적인 세포를 변형시킬 수 있는 것으로 알려진 활성화된 암유전자(activated protooncogene 혹은 cellular oncogene)를 가지고 있으며 둘째는 어떤 세포성 암유전자는 바이러스가 그 유전자의 근처에 삽입되었을 때 활성화되며 세째는 어떤 세포성 암유전자는 인간의 암세포에서 증폭(amplification)되며 네째는 이러한 암유전자들이 종양에 있어 특이적인 염색체변이와 관계있는 break-points의 위치에 존재한다는 것이다. 현재까지 알려진 암유전자는 30여종에 달하며 이러한 세포성 암유전자의 분포는 종양의 일차성변화에 있어서 non-random하게 분포하는 83개의 break-points와 비교해 보았을 때 약 20여종의 세포성 암유전자의 위치가 종양의 일차성변화에서 나타나는 break-points와 일치한다는 것^[4]이 밝혀졌다. 이것은 분명 이러한 유전자들이 발암과정에 있어 중요한 역할을 하고 있다는 증거가 될 수 있다. 그렇다면 이러한 유전자들은 과연 어떠한 기전에 의해 활성화가 되어 발암과정에 관여하는 것일까? 그것은 다음과 같은 몇가지 기전에 의해 활성화 된다는 것이 밝혀져 있는데 첫째는 암유전자 자체의 점 돌연변이(point mutation)이며 둘째는 유전자의 증폭(geneamplification)이며 세째는 유전자의 전좌(translocation) 넷째는 이러한 암유전자에 promotor나 enhancer가 붙는 경우이다. 몇가지 예를들면 myc암유전자^[5~17]는 8q24에 위치해

있는데 이 부분은 Burkitt씨 임파종에 있어서 가장 흔한 break-point이며 이러한 임파종 중 어떤 것은 t(8:14) 때문에 myc 유전자가 14q32에 위치하게 되는데 이런 경우에는 myc유전자가 활성화되어 그 산물(products)의 양이 증가되거나 변형이 일어나 악성 임파종으로 발전하게 된다. 또한 abl 암유전자^{35~39)} 위치는 9q34인데 이것은 만성골수성백혈병에 있어서 가장 흔한 break-point이며 어떤 환자에 있어서는 t(9:22) 때문에 abl유전자가 22q11에 위치하게 됨으로서 이 유전자의 활성화를 가져오게 되어 암을 유발시킨다. 위암의 경우에는 염색체의 이상과 암유전자와의 관계를 연관시킨 보고들을 잘 찾아볼 수는 없으나 1p22에 위치해 있는 N-ras^{40~41)} 유전자의 증폭과 관계가 있다는 보고가 있다. 본 실험에 의하면 위암의 발생과 진행에 관여하는 특이적인 암유전자를 규정 지울수는 없었지만 여러가지 암유전자가 함께 관여함을 알 수 있었다. 원발성 위암에 있어서 높은 빈도로 나타난 1p34 위치에서의 결실은 세포성 암유전자 fgr, src-2의 결실을 가져올 수 있었으며 2p24는 N-myc, 3p25는 raf II, 8q24는 myc, 8p23은 mos, 11p15는 H-ras의 결실을 가져올 수 있었다. 위암세포주-Ⅰ에 있어서는 5q34는 fms 6p11은 pim, k-ras, 11q23은 est I의 결실을 가져올 수 있었으며 위암세포주-Ⅰ에 있어서는 5q34는 fms 6p11은 pim, k-ras, 11q23은 ets1의 결실을 가져올 수 있었으며 위암세포주-Ⅲ에 있어서는 1p34는 fgr, src2, 5q34는 fms, 9q34는 abl, 11p15는 N-ras의 결실을 가져올 수 있었다. 그러나 이러한 많은 암유전자가 위암의 발생에 관여한다고 보기是很 어렵으며 이것은 위암의 진행과정중에 수반되는 여러가지 염색체 이상에 수반되는 결과라고 보아야 할 것이다. 또한 이러한 결실된 암유전자가 어떠한 형태를 통해 활성화가 되는지도 염색체의 제작기술과 해석의 어려움으로 더 이상의 조사는 불가능하였다. 또한 요즘의 추세는 이러한 염색체의 결실된 부분이 암유전자와 관계가 있기보다는 종양억제유전자(antioncogene)와 더욱더 깊은 관계가 있는 것으로 보는 견해도 있다^{42~44)}. 이외에도 t(1:4)가 위암세포주 2례에서 높은 빈도로 나타난 것이 암유전자의 전좌를 통한 활성화와 관련이 있는지는 1번 염색체의 장완 말단부위에 존재하는 암유전자가 밝혀져야 하겠다.

요약

한국인에서 흔한 위선암에 관한 특이적인 염색체 변화를 알아보기 위해 1례의 원발성 위암과 2례의 위암세포주를 G-band법을 이용해 조사하였다. 3례에서 모두 101가지의 숫자인 이상과 25가지의 구조적인 이상이 발견되었다. 원발성 위암세포에서는 세포들이 삼배수성의 염색체 숫자를 가지고 있었으며 1번, 2번, 3번, 5번, 6번, 7번, 11번, 14번, 16번 염색체의 삼배체 1번, 20번 염색체의 사배체가 특징적이었으며 위암세포주-Ⅰ에 있어서는 사배수성의 염색체 숫자를 가지고 이었으며 7번, X염색체의 삼배체 6번, 8번, 9번, 11번, 12번, 21번 염색체의 사배체가 특징적이었다. 위암세포주-Ⅲ에 있어서는 이배수성의 염색체 숫자를 가지고 있었으며 특이할 만한 숫자인 이상은 나타나지 않았다. 따라서 본 실험의 위암세포 숫자상의 변이는 1번, 2번, 3번, 6번, 9번, 10번, 16번, X염색체의 삼체성과 1번, 7번, 9번, 18번, 20번, 21번 염색체의 사체성과 연관이 있었다. 구조적 이상 가운데는 원발성 위암세포에서는 del(1)(p34→pter), del(3)(p25→pter), del(x)(p22)가 특징적이었으며 위암세포주-Ⅰ에서는 del(1)(q32→qter), der(4)t(4:1) qter:q32→qter, del(10)(p15→pter)이 특징적 이었고 위암세포주-Ⅲ에서는 del(1)(q32→qter), der(4)t(4:1) (qter:q32→qter), del(X)(p22)이 특징적이었다. 또한 세례 모두에서 표지염색체가 나타났다. 이러한 염색체상의 다양한 변화는 이러한 것이 위암의 특이적인 일차성변화라기 보다는 종양의 진행과정에 나타나는 이차성변화의 하나라고 생각된다. 그러한 1p34, 2p24, 3p25, 4p14, 5q34, 6p11, 8q24, 11p15, 11q23 위치에서의 염색체 결실은 이미 알려진 암유전자 즉 fgr, src 2, N-myc, raf1, raf2, fms k-ras1, myc, abl, H-ras1의 염색체상의 위치와 일치함으로서 이를 암유전자들이 염색체의 구조적인 변이에 의해 활성화되어 위암의 진행과정에 관여하리라 생각된다.

참고문헌

- Wolff S, Boddyote J: The production of harlequin chromosomes by chemical and physical

- agents that disrupt protein structure. In R. S. Sparkes, D. E. Comings, C. F. Fox(eds.): Molecular Human Cytogenetics, New York : Academic Press 1977, pp. 335-340.
2. Nowell PC and Hungerford DA: A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497-1501.
 3. Louise CS: Genetic etiology of cancer. *Cancer* 1977; 40: 438-444.
 4. Avery AS and Irwind JB: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. *Cancer* 1967; 21: 77-82.
 5. Roland B: Overview. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 38: 147-152
 6. Jorge JY: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 226: 1199-1204.
 7. Niels BA: Solid tumor cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 40: 3-12.
 8. Albert de la chapelle: Conference overview. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 41: 211-214.
 9. Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
 10. Lawler SD: Significance of chromosome abnormalities in leukemia. *Hematology* 1981; 319: 257-272.
 11. Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, et al: Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 1981; 41: 4678-4686.
 12. Balaban G, Gilbert F, Nichols W, et al: Abnormalities of chromosome #13 in retinoblastomas from individuals with normal constitutional karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 2133-2136.
 13. Francke U, Holmes LR, Atkins L, et al: Aniridia-wilms tumor association: Evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet Cell Genet* 1979; 24: 185-192.
 14. Barbacid M: Oncogenes and human cancer: Cause or consequence?. *Carcinogenesis* 1986; 7: 1037-1042.
 15. Land H, Parada LF, Weinberg RA: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 1983; 222: 771-778.
 16. Willecke Km Schafer R: Human oncogenes. *Hum Genet* 1984; 66: 132-142.
 17. Caspersson TZ, Johansson C: Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 60: 315-319.
 18. Yunis JJ: High resolution of human chromosomes. *Science* 1976; 191: 1268-1270.
 19. Alitalo K, Schwab M: Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 1986; 47: 235-281.
 20. Duesberg PH: Activated protooncogenes: sufficient or necessary for cancer?. *Science* 1985; 228: 669-677.
 21. Rowley JD: Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 1984; 44: 3159-3168.
 22. Yunis JJ: The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983; 221: 227-236.
 23. Barker PE: Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 5: 81-94.
 24. Cowell JK: Double minutes and homogeneously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 1982; 16: 21-59.
 25. Schimke RT: Gene amplification in cultured animal cells. *Cell* 1984; 37: 705-713.
 26. Stark GR, Wahl GM: Gene amplification. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 447-491.
 27. Heim S, Mitelman F: Proliferation-specific and differentiation associated chromosomal breakpoints in human neoplasia. *Hereditas* 1986; 104: 307-312.
 28. Mitelman F: Tumor etiology and chromosome pattern-evidence from human and experimental neoplasia. *Genes Chromosomes and Neoplasia*. New York, Ravan Press, 1981, pp. 350.
 29. Hiem S, Mitelman F: Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. *Cancer Genet* 1986; 22: 331-338.
 30. Ochi H, Harold O, Douglass Jr, et al: Cytogenetic studies in primary gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22: 295-307.

31. Ferti-Passautonopoulou, Angeli D, : Common cytogenetic findings in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 24: 63-73.
32. Ochi H, Jin T, Harold O, et al: Trisomy X as a possible initial chromosome change in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 12: 57-61.
33. Klein G, Klein E: Evolution of tumors and impact of molecular oncology. *Nature* 1985; 315: 190-195.
34. Heim S, Mitelman F: Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genomic map to one of the 83 bands involved in primary cancer specific rearrangements. *Hum Genet* 1987; 75: 70-72.
35. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, et al: Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7824-7827.
36. Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RSK, et al: Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 7842-7846.
37. Rabbitts TH, Hamlyn PH, Baer R: Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 1983; 306: 760-765.
38. Deklein a, Van Kessel GA, Grosvelet G, et al: A cellular oncogene is translocated to the philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1982; 300: 765-767.
39. Heister KN, Stephenson JR, Groffen J, et al: Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1983; 306: 239-242.
40. De Martinville B, Cunningham JM, Murray MJ, et al: The N-ras oncogene assigned to chromosome 1(p31-cen) by somatic cell hybrid analysis. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 37: 531.
41. Davis M, Malcolm S, Hall A: The N-ras oncogene is located on the short arm of chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 1984; 37: 448-451.
42. Brodeur GM: The involvement of oncogenes and suppressor genes in human neoplasia. *Adv Pediatr* 1987; 34: 1-44.
43. Der CJ: Cellular oncogenes and human carcinogenesis. *Clin Chem* 1987; 33(5): 641-646.
44. Barrett JC, Oshimura M, Koi M: Role of oncogenes and tumor suppressor genes in a multistep model of carcinogenesis. *Symp Fundam Cancer(SFC)* 1986; 39: 45-56.

=Abstract=

Cytogenetic Analysis of Gastric Carcinoma

Yong Wook Jung, MD; Sung Ik Chang, MD

Department of Anatomy Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

In order to find out the specific chromosomal abnormalities of the gastric adenocarcinoma in Korea, author investigated one primary and two cell lines of gastric cancer with G-banding technique. All tumor cells had clonal chromosomal abnormalities : total 101 numerical and 25 structural karyotypic anomalies were identified. The most prominent and recurring numerical abnormalities were trisomy 1, 2, 3, 6, 9, 10, 16, X and tetrasomy 1, 7, 9, 18, 20, 21 and recurrent structural abnormalities were del(1) (q32→qter), del(1)(p34→qter), del(3)(p25→qter), der(4)(4:1)(q32:qter), del(10)(p13→pter), del(X)(p22).

The above results of wide variety of karyotyping in stomach cancer cells indicate that these are general due to secondary changes rather than primary changes specific to stomach cancer cells and also the break at bands 1p34, 2p24, 3p25, 4p14, 5q34, 6p11, 8q24, 11p15, 11q23 give rise to the deletion of cellular oncogenes fgr, src-2, N-myc, raf1, raf2, fms, K-ras1, myc, abl, H-ras1.

Key Words : Adenocarcinoma, Abnormalities, Oncogene, Cell line, Cancer cell.