



사람 난소암에 대한 암화과정의 기전과 암유전자의 활성화

Mechanism of oncogenesis and activation of oncogene in human ovarian carcinoma

저자
(Authors) 서영욱, 이태성, 장성익, 김대광, 김홍태
Suh Young Wook, Lee Tae Sung, Chang Sung Ik, Kim Dag Kwang, Kim Hong Tae

출처
(Source) [대한체질인류학회지 5\(2\)](#), 1992.12, 123-137 (15 pages)
[The Korean Journal of Physical Anthropology 5\(2\)](#), 1992.12, 123-137 (15 pages)

발행처
(Publisher) [대한체질인류학회](#)
Korean Association of Physical Anthropologists

URL <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE00556239>

APA Style 서영욱, 이태성, 장성익, 김대광, 김홍태 (1992). 사람 난소암에 대한 암화과정의 기전과 암유전자의 활성화. 대한체질인류학회지, 5(2), 123-137.

이용정보
(Accessed) 계명대학교
114.71.5.***
2016/09/22 14:54 (KST)

저작권 안내

DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.

이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information

The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.

You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

사람 난소암에 대한 암화과정의 기전과 암유전자의 활성화 (Mechanism of oncogenesis and activation of oncogene in human ovarian carcinoma)

서영욱, 이태성, 장성익¹, 김대광¹, 김홍태¹

계명대학교 의과대학 산부인과학교실

계명대학교 의과대학 해부학교실¹

간추림 : 일차성 난소암과 난소암세포주(HTB 161)를 대상으로 세포유전학적 분석과 암유전자(erb B2, N-ras 및 c-myc)의 활성화 유무를 알기위하여 암세포를 배양하여 G-band법으로 염색체를 분석하였고 DNA in situ hybridization과 Southern blot를 시행한 결과는 다음과 같다. Case 1에서는 모든 염색체가 46,XX, HSR 이었으며 erb B2가 염색체 제 17번 에서 9번 으로 전좌되어 증폭되어 있었으며 case 2에서는 t(1:7)(pter;q21) 과 N-ras가 증폭이 있었으며 case 3에서는 del(1)(p13,p22)가 주 염색체 이상이고 erb B2의 증폭이 있었다. 그러나 c-myc 은 모든 case에서 정상이었다. 세포주에서는 다양한 염색체 이상을 나타내었고 암유전자도 erb B2 와 N-ras 의 증폭 및 c-myc 의 재배열이 있었다. 이상을 종합해 볼때 난소암에서 암유전자 단독으로도 직접 암화시킬수 있고 염색체 이상과 관련된 암유전자의 활성화가 암화에 관계되기도 하며 염색체 결손 즉 항암유전자의 비활성화와 암유전자의 활성화가 암화과정에 관여 되기도 한다고 생각된다. 결국 난소암에 있어서는 개체마다 그 암화과정의 기전이 모두 다르다고 생각된다.

찾아보기 용어 : 난소암, 암유전자, 전좌, 결손, 증폭, 재배열

서 론

현재 암화과정에 있어서 가장 중요한 것은 유전 물질 즉 유전자의 변화(Bishop, 1985) 라는 것은 의심의 여지가 없다. 암에 관계되는 유전자는 첫째, 우성으로 작용하는 암유전자(oncogene)로서 동물실험에서 정상세포를 악성세포로 형질전환(transformation)시키는 유전자이고(Klein과 Klein, 1985) 둘째, 열성으로 작용하는 항암유전자(antioncogene)로서 이 유전자가 소실되거나 유전자의 변화가 있어 작용을 하지 못할때, 암이 유발되는 것이며(Knudson, 1983) 셋째, 조절유전자(modulating gene)로서 암세포와 숙주기관간의

상호작용에 간접적으로 영향을 주는 유전자로서 아직 밝혀져 있지는 않다. 암유전자설의 대표는 만성 골수성백혈병에서 제9번 염색체에 위치한 abl유전자가 제22번 염색체에 있는 bcr 유전자와 융합되어 새로운 단백질을 분비하므로써 암이 된다는 설이다(Berger 와 Bermheim, 1985). 또한 Burkitt lymphoma에서는 제8번에 위치한 myc 유전자가 제14번에 있는 면역글로빈 유전자 근처에 삽입되어 나타나는 것이 특징이다. 이들의 경우에는 예외 없이 모두 염색체의 전좌가 원인이 된다고 알려져 있다. 한편으로 소위 열성유전자로 알려져 있는 항암유전자의 개념(Knudson, 1985)이 도입된 후 망막아종양(retinoblastoma)에서 RB 유전자가 발현(Knudson, 1987) 되었으며 RB 유전자의 결손

"이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모 (지방대학육성) 과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음"

등으로 작용을 하지 못하면 망막아종으로 되며 이 유전자는 염색체 제13번 장완에 위치해 있고 망막아종세포의 염색체에서는 이 부위에 항상 결손이 특징적으로 나타난다. 현재 osteosarcoma에서도 RB유전자의 소실이 특징이라는 보고도 있다 (Godbout 등, 1983). 그렇기 때문에 암화과정의 설명에 있어서 암유전자 연구와 더불어 반드시 항암유전자 연구가 필요하며 이들 유전자 연구에 있어서 반드시 세포유전학적 접근이 필수적이다. 왜냐하면 실제로 50,000개가 넘는 기능유전자 가운데 어떤것이 항암유전자로 작용하는 것인지를 찾기란 거의 불가능하기 때문에 일차적으로 암염색체 분석을 통하여 특수절단 부위를 찾아야만 일반적으로 염색체의 구조적인 이상이 암세포에서는 매우 중요한 것으로서 전좌는 암유전자와, 결손은 항암유전자와 밀접한 관계가 있고 DMs 및 HSR 염색체는 2차적으로 나타나는 현상으로 파악하고 있다. 난소암에 대한 세포유전학적 분석은 제6번 염색체의 [del(6) (pter, q15-21)]와 같은 독특한 결손 (Trent 와 Salmon, 1981), 47,XX +3(Yang-Feng 등, 1988) 그리고 염색체의 여러곳에 나타나는 [del(3p, 6q, 8p and 10q)]와 같은 독특한 결손 (Tanaka 등, 1989) 등 보고가 있으나 보고자마다 그 결과가 모두 다르다. 난소암 이외에도 고형암에 대한 세포유전학적 연구가 많이 보고되어 있으나 아직 특정암에 대한 독특한 염색체이상에 대한 것은 보고된 것이 없다. 한편 난소암에 대한 암유전자 연구에 대한것은 K-ras 유전자와 활성화 (Fukumoto 등, 1989), K-ras 유전자의 증폭 (Filmus 와 Buick, 1985) 그리고 K-ras 유전자 증폭 DNA의 관련 (Fukumoto 등, 1989)이라는 보고가 있다. 이들의 보고는 K-ras 유전자에 대한 것 뿐이므로 다른 암유전자에 대한 연구가 필요하며 특히 염색체 이상과 암유전자 연구를 동시에 시행한 연구는 아직 없다. 본 연구의 목적은 첫째, 난소암에 대한 염색체 이상이 작위적이나, 무작위적이나? 둘째, 작위적이라면 어떤 염색체의 어느 부위에 어떤 형태의 이상이 있는가? 셋째, 어느 암유전자와 난소암에 활성화 되어 있는가? 넷째, 염색체이상과 암유전자의 활성화는 관계가 있는가? 다섯째, 환자마다 같은 결과인지 아니면 환자마다 다르게 나타

나는지?를 찾아서 난소암에 대한 암화과정을 규명하고 환자의 진단이나 예후판정에 도움을 얻고자 다음과 같은 실험을 통하여 흥미있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

A. 난소암 환자의 조직(3명)과 난소암 세포주 (HTB 161)

B. 암유전자 DNA probe(erb B2, N-ras 및 c-myc)

2. 실험방법

A. 염색체의 핵형분석

1. 배양 (culture)

난소암 세포의 배양은 수술실에서 가져온 암조직을 수술용 칼로서 아주 잘게 썰어 기계적인 분리방법 (mechanical disaggregation)을 이용하여 petridish에 붙인 다음 15%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, Gibco제)과 항생제 (streptomycin-penicillin: 1,000mcg/ml, 1,000iunits/ml)가 들어있는 F10 배양액을 37°C CO₂ 배양기에서 4-5개월간 배양하였다. 이때 배지는 3-4일마다 교환해 주었으며 세포가 과다하게 증식되었을 때는 분주(subculture)하여 다시 배양하였다. 난소암 세포주의 배양은 액화질소(liquid nitrogen)에 보관 되어 있던 세포를 dry ice를 이용하여 운반하여 37°C 수조에서 급속 용해하여 15% 우태아혈청과 항생제가 들어있는 F10배양액에서 4-5개월간 배양하였다. 이때 배지는 3-4일마다 교환해 주었으며 세포가 과다하게 증식되었을 때는 분주(subculture)하여 다시 배양하였다.

2. 세포수확 (harvest)

위와 같이 배양된 난소암세포와 난소암세포주에 colcemide(10mg/ml, Gibco제)를 ml당 8μl씩 첨가하여 90분간 배양하고 난 다음 0.5% trypsin과 5.3mM EDTA가 들어 있는 용액으로 1분간 처리하여 세포들을 flask의 표면으로 부터 분리하여

1500rpm으로 3분간 원심분리한 다음 부유액 (supernatant)을 제거하고 미리 37℃ 수조에 담구워 두었던 0.075M KCl 저장액(hypotonic solution) 5ml을 첨가하여 37℃수조에서 15분간 세포들을 팽창시켰다. 여기에 미리 준비하여 -20℃ 냉장고에 보관해둔 고정액(glacial acetic acid; methanol=1:3) 1ml를 첨가하여 pipette로 섞어준 후 1500rpm으로 3분간 원심분리하여 부유액을 버리고 세포의 덩어리가 회색될 때까지 고정단계를 3-4회 더 실시하였다. 이렇게하여 만들어진 세포 덩어리에 고정액을 약간량 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 각각의 세포를 완전히 분리시켰다. 다음에 70% 알콜에 담구어둔 젖은 slide를 휴지로 완전히 닦은 다음 두장의 젖은 거즈를 완전히 펴고 그위에 slide를 올려 놓고 세포들을 pasteur pipette로 2방울 떨어뜨렸다.

3. Giemsa band법

위와 같은 방법으로 만들어진 slide를 3-4일간 37℃ 배양기 혹은 실온에서 말린 다음 G-band를 실시하였다. 즉, slide를 60℃ 2XSSC용액에 50분간 담구어둔 다음 Sorensen씨 완충액으로 씻어주고 실온에서 건조시킨후 33ml의 Sorensen씨 완충액과 17ml의 과산화수소수가 들어 있는 용액에 5-7초간 둔 다음 즉시 50ml의 증류수에 0.03g trypsin(1:250, Gibco제)이 녹아 있는 용액에 1-3초간 둔 다음 흐르는 물에 씻어주고 4% Giemsa용액에 8분간 염색을 하였다.

B. Southern blotting

1. DNA 추출(Modified Blin method, 1989)

수술실에서 가져온 암조직과 태반 및 정상 난소암 조직은 -80℃ deep freezer에 보관해 두었다가 액체질소를 이용하여 급속냉동시킨후 막대사발과 봉을 이용해 잘게 부순다음 인 완충액(phosphate buffer solution)으로 세포들을 수세한 후 1.5ml Eppendorf tube에 모았다. 난소암 세포주는 flask에서 분리하여 역시 인 완충액을 이용하여 세포들을 수세한 후 1.5ml Eppendorf tube에 모았다. DNA를 추출하기 위하여 세포들의 pellet을 1ml SE buffer (sodium-EDTA;75mM NaCl,

25mM EDTA)로 수세한 후 원심분리하여 상층액을 버리고 여기에 다시 1% SDS(sodium dodecylsulfate)가 들어 있는 1ml SE buffer를 첨가하였다. Pellet-suspension을 조심스럽게 50ml centrifuge tube에 옮긴후 다시 5ml SE, 1% SDS, proteinase K(200ug/ml)를 첨가하였다. Sample이 완전히 녹을때 까지 65℃ 수조에서 방치한 후 여기에 6M NaCl을 첨가하여 1.5M NaCl로 조절하여 조심스럽게 12-15분 정도 흔들어준 후 3,000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 뽑아내어 1 volume의 isopropanol을 첨가하여 고분자량의 DNA가 가라앉을때 까지 조심스럽게 흔들어 주었다. DNA를 pasteur pipette로 뽑아낸 후 70% alcohol에 30분 동안 수세시켰다. 수세된 DNA를 뽑아내고 37℃ 배양기에서 완전히 건조시킨후 500μl의 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0))를 첨가하여 완전히 녹인후 DNA의 양과 순도를 검사하기 위하여 spectrophotometer에서 OD(optical density)값을 측정하였다.

2. 전기영동(electrophoresis)

암세포에서 뽑아낸 DNA를 BamHI 제한효소와 EcoRI, Hind III 제한효소를 이용하여 digestion 시킨후 0.8% agarose(No. A-6013 agarose, SIGMA)gel을 이용하여 전기영동하였다. 이때 buffer는 TAE(Tris-acetate EDTA)를 이용하였으며 전압은 1V/cm로 약 20시간 실시하였다. 전기영동이 끝난후 DNA의 분리를 확인하기 위하여 ml당 0.5ug의 etidium bromide용액에 염색하여 transilluminator위에서 확인하였다. 확인이 끝난 gel을 6차 증류수에서 다시 탈염색하여 Southern transfer를 위한 gel의 전처리 과정을 준비하였다.

3. DNA의 nitrocellulose membrane으로의 이동

Gel을 depurination하기 위해 0.25N HCl 용액에 15분간 전처리한 후 6차 증류수로 2번 세척한 다음 gel을 denature시키기 위하여 5N NaOH, 1.5M NaCl이 들어 있는 용액에서 1시간 처리한후 다시 중화시키기 위해 1M Tris HCl (pH8.0),

1.5M NaCl에서 30분간 2번 처리한 다음 gel을 20XSSC에 30분간 처리하였다. 이때 nitrocellulose membrane을 gel에 맞추어 적당히 자른 다음 6차 증류수에 부유시키고 다시 20XSSC에 부유시켰다. Southern transfer(=capillary transfer)를 위하여 20XSSC의 transfer buffer를 약 40시간 동안 transfer를 실시하였다. transfer가 완전히 끝난 다음 nitrocellulose membrane을 6XSSC로 씻어주고, 30분간 공기중에서 건조시킨 후 Whatman 3MM paper사이에 끼워 80℃에서 2시간 가량 baking 시켰다. 이때 gel을 etidium bromide용액에 염색하여 DNA의 transfer를 확인하였다.

4. Hybridization용 probe제작

1) Gene clean method

Supercoiled된 plasmid상태의 암유전자(K-ras, H-ras)를 PST I, BamHI 제한효소로 digestion 시킨후 0.8% agarose mini gel로 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난후 원하는 size의 band가 나타나 있는 agarose gel을 절단하여 NaI stock용액을 2.5-3 volume 첨가하였다. 45℃-55℃ 수조에서 5분간 방치하여 agarose gel을 완전히 녹인후 여기에 Glassmilk 5 μ l를 첨가하여 ice에서 5분간 보관시켰다. 10,000rpm에서 정확하게 5초간 원심분리하여 Glassmilk /DNA pellet를 침전시키고 상층액을 제거한 후 New wash 용액(New wash conc:water:100% ethanol =7:140:155)을 이용하여 3회 수세한 후 6차 증류수로 DNA를 elution하였다

2) Nick translation

Gene clean method를 통해 분리된 순수한 암유전자(K-ras, H-ras) 10 μ l (1 μ g)에 10% nick translation buffer 5 μ l, 0.1mM dNTP (-dCTP) 5 μ l, 3% β -mercaptoethanol 1ml, DNase I 1 μ l, DNA polymerase I 1 μ l, α^{32} P-dCTP 5 μ l (50uci)를 넣은 다음 6차증류수로 50 μ l 되게 하였다. 16℃ 수조에서 2시간 정도 방치한 후 nick translation stop buffer (25mM EDTA, 10mM Tris, HCl (pH 7.5) 0.5% SDS) 10 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰다.

3) Spun column chromatography

Incorporated dNTP와 oligomer를 제거하기 위하여 3XSSC로 포화된 sephadexG-50 column을 이용하였다. 1ml 주사기에 glass wool을 1mm 정도까지 꽉 채운 다음 sephadexG-50을 최종 volume이 0.9ml 되게 1,600g로 3-4분간 원심분리하여 다시 3XSSC로 1600g에서 3분간 원심분리하여 column을 균일화 시킨후 준비된 column에 sample을 100ul넣어 1600g에서 3분간 원심분리한 후 분리된 sample (probe)을 새로운 eppendorf tube에 옮겼다

5. Prehybridization과 hybridization

50% formamide, 5XSSC, 50mM sodium phosphate(pH6.8), 0.1% SDS 0.1mg/ml sonicated sperm DNA, 5XDenhardt's reagent(1% BSA, 1% Ficoll:type 400, 1% polyvinylpyrrolidone)가 들어 있는 용액을 filter cm²당 0.08ml 씩 nitrocellulose membrane이 들어 있는 vinyl bag에 첨가하여 42℃ 수조에서 16시간 가량 prehybridization을 실시하였으며 prehybridization용액을 vinyl bag으로 부터 제거한 후 다시 50% formamide, 5XSSC, 20mM sodium phosphate (pH6.8), 0.2% SDS, 0.1mg/ml sonicated sperm DNA, 1% Denhardt's reagent, 10% Dextran sulfate가 들어있는 hybridization용액으로 filter cm²당 0.05ml 씩 되게 vinyl bag에 첨가하여 42℃수조에서 24시간 hybridization을 실시하였다. hybridization용액을 조심스럽게 제거한 후 filter를 vinyl bag으로 부터 꺼집어 내어 3XSSC 용액에 옮겨 10분간씩 2회 수세하고 다시 1XSSC 용액에 옮겨 10분간 1회 수세한 후 42℃에서 1XSSC 용액으로 다시 10분간 수세하였다. hand held mininonitor(Geiger counter)로 membrane의 signal을 확인한 후 Whatman 3MM paper 위에서 10분간 air dry 시킨다.

6. Autoradiography

Membrane을 Whatman 3MM paper위에 놓고 polyethylene wrap으로 싸고난 후 X-ray film을 암실에서 원하는 크기로 절단한다. Membrane을 double intensifying screen이 들어있는 Cassette holder에 놓고 그 위에 X-ray film을

놓고 cassette holder의 뚜껑을 닫은 다음 -80℃ deep freezer에 넣고 autoradiography을 실시한다.

C. DNA in situ hybridization

1. Digoxigenin-11-dUTP를 이용한 암유전자의 labelling

1 μ g의 H-ras, K-ras 암유전자를 BamHI, Pst I 제한효소로 digestion 시킨후 3M sodium acetate(pH5.2)을 1/10 volume첨가하고 다시 100% alcohol 2.5 volume을 첨가하여 DNA를 침전 시킨후 -20℃ 냉동실에서 overnight하고 10,000rpm에 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 70% alcohol에서 수세하였다. 다시 위와 같이 원심분리하여 37℃ 배양기에서 완전히 건조시킨 후 TE buffer 10 μ l를 첨가하여 37℃ 배양기에서 완전히 용해시켰다. 이렇게하여 linearized purified된 DNA를 얻어낸 후 95℃ boiling water에서 10분간 denature 시킨후 ice에 보관하였다. 여기에 Baelinger Mannheim에서 만들어진 kit에 준비된 2 μ l hexanucleotide mixture, 2 μ l dNTP labelling mixture를 첨가한후 6차증류수를 첨가하여 19 μ l로 조절하고 여기에 DNA polymerase인 klenow enzyme 1 μ l를 첨가하였다. 빨리 원심분리하여 37℃ 수조에서 약 2시간 가량 중합반응시킨후 반응을 중지시키기 위해 0.2M EDTA 2 μ l를 첨가하고 DNA를 침전시키기 위해 4M LiCl 2.5 μ l, prechilled 100% ethanol 75 μ l를 첨가하였다. 잘 섞어준 후 tube를 -20℃에서 overnight 시키고 10,000rpm에서 15분간 원심분리하여 pellet을 얻은후 70% cold ethanol 40 μ l을 수세한 후 다시 위와 같이 원심분리하여 37℃ 배양기에서 완전히 건조 시킨후 50 μ l TE buffer에 녹였다.

2. Hybridization

앞에서 기술된 방법에 의해 만들어진 염색체 slide에 hybridization을 실시하였다. prehybridization은 실시하지 않았으며 probe의 비특이적인 결합을 방지하기 위해 slide에 DNase-free RNase(100 μ g/ml) 100ml를 얹은후 coverslip을

덮어 1시간 가량 37℃ 배양기에서 방치후 coverslip을 제거한 후 slide를 계속하여 증류수로 수세하고 alcohol을 이용하여 탈수한 다음 37℃ 배양기에서 완전히 건조시킨다. 50% formamide, 10% Dextran sulfate, 2XSSC, 0.5mg/ml sonicated herring sperm DNA와 1mg/ml의 digoxigenin labeled probe의 hybridization mixture를 slide위에 50 μ l 씩 얹은후 37℃ 배양기에서 14시간 가량 배양하였다. 이때 probe와 염색체는 72℃ dry oven에서 10분간 denature 시켰다. coverslip을 제거한 후 slide를 실온에서 5분간 3회 2XSSC 용액으로 철저히 수세한 후 인 완충액과 0.1% Triton X-100용액을 이용하여 실온에서 다시 3분간 수세한 후 인 완충액으로 3회 수세하였다.

3. Detection

Slide를 100mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl용액으로 수세한 후 100mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl용액에 antibody conjugate를 1:5,000(150mu/ml)으로 희석하여 용액 100 μ l를 slide 위에 얹은후 coverslip을 덮고 암실 실온에서 1시간 가량 방치시켰다. Coverslip을 제거하고 100mM Tris-HCl(pH9.5) 100mM NaCl, 50mM MgCl2 용액으로 equilibration시켰다. 다시 위의 용액에 10ml에 45 μ l의 NBT와 35 μ l의 X-phosphate를 첨가하여 신선한 color용액을 만든후 300 μ l을 각각의 slide위에 놓고 coverslip을 덮은후 실온에서 1시간 가량 방치시켰다. Coverslip을 제거한 후 slide를 10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM EDTA 용액으로 철저히 수세한 후 공기중에서 건조시킨 다음 4% Giemsa용액으로 2분간 counterstain을 실시하였다.

결 과

1. 세포유전학적 분석

일차성 난소암은 병리조직학적으로 모두 장액성 낭선악성종양(serous cystadenoma)으로서 상당히 진행된 암이었으며 약물치료를 전혀 받지 않았

었다(Table 1). 염색체이상의 특징은 상당히 진행된 암 임에도 불구하고 double minutes(DMs) 염색체가 전혀 나타나지 않았으며 case 1에서는 분석한 모든 염색체가 46,XX의 diploidy로서 단지 9q+ 의 구조적 이상만 나타내었다(Fig 1)(Table 3). Case 2에서의 특징은 aneuploidy로서 숫적이

상은 제12, 14 및 17번 염색체의 소실과 제3번 염색체의 3배수(trisomy)가 있었으며 구조적이상으로서는 제1번 과 3번 염색체의 결손과 전좌가 있었다(Fig 2). Case 3에서의 특징은 역시 aneuploidy로서 숫적이상은 제14번 염색체의 소실과 제4, 8, 13, 17 및 20번 염색체의 3배수가 있었으며 구조적이상

Table 1. Clinical Assessment of Three Patients and A cell line in Ovarian carcinoma

Case	Tissue source	Histology	Stage	Prior treatment
I (0619)	solid	serous cystadenocarcinoma	IV	none
II (0908)	solid	serous cystadenocarcinoma	IV	none
III (0920)	solid	serous cystadenocarcinoma	III-3	none
IV (HTB 161)	ATCC	adenocarcinoma		

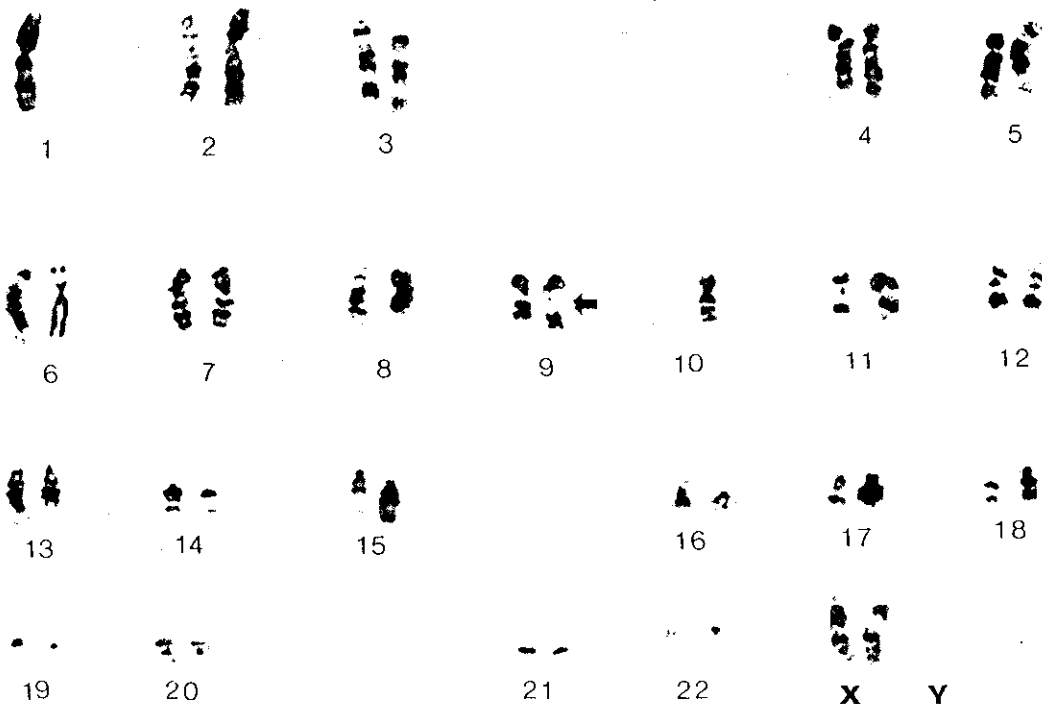


Fig. 1. G-banded karyotyped of ovarian cancer cell(Case I). All karyotypes show the same results. One of chromosome 9, as indicated by the arrow, looks like HSR without any abnormality

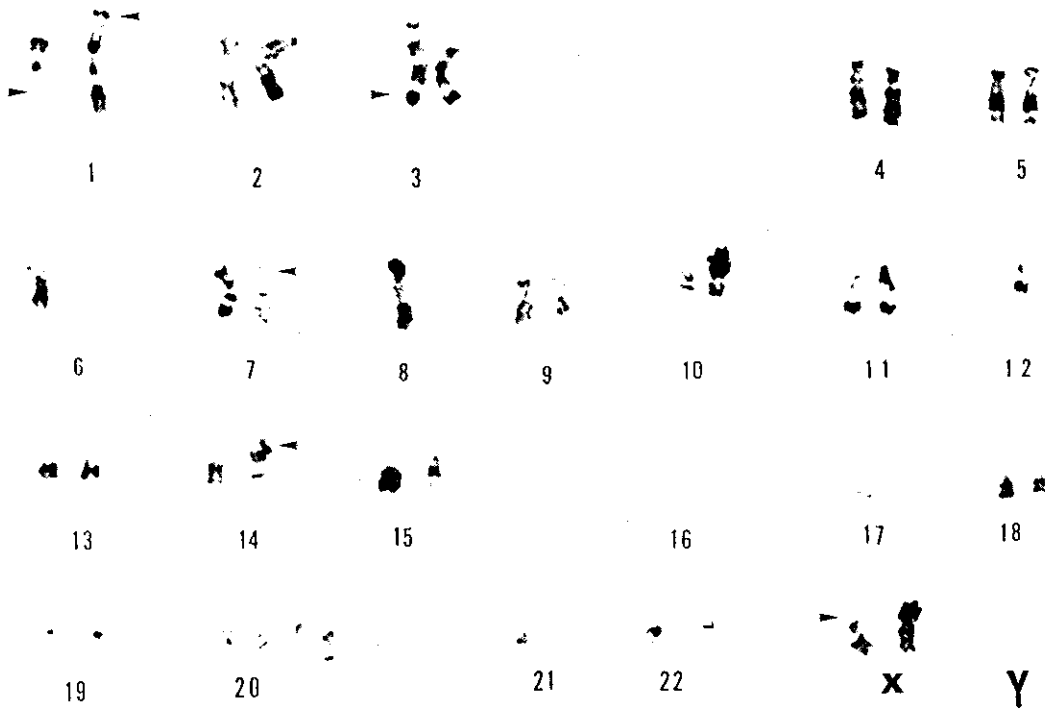


Fig. 2. G-banded metaphase from Case II. The abnormal chromosomes are indicated by arrows and listed like below : del(1)(q22), t(3;?)(q21:?), t(1;7)(pter:q21), t(14;?)(p11:?)

으로서는 제1번 과 3번 염색체의 결손이 대부분이었고 제 11번 염색체의 전좌와 20번의 동완 염색체가 소수세포에서 관찰되었다(Fig 3) (Table 2). 한편 세포주(HTB 161)에서는 많은 숫적이상이 있었으며 구조적 이상은 제 1, 3, 6번 염색체의 결손과 제10, 11번 및 14번 염색체의 결손, 13번 과 14번의 동완염색체 그리고 19번 염색체의 복제등 다양하게 나타났다. 전체적으로 공통된 소견은 드물었고 각 case마다 제각기 다른 이상을 나타낸 것이 특징이었다(Fig 4).

2. 분자유전학적 분석

Case 1에서는 DNA in situ hybridization 해 본 결과 erb B2 암유전자가 제17번 염색체에서 제9번 염색체로 전좌되어 증폭되어 있었으며(Fig 5) erb B2에 대한 Southern blot를 시행한 결과 3kb 에서 정상보다 증폭이 되어 있음을 알 수 있었다(Fig

6). Case 2 와 3 그리고 세포주에서는 erb B2를 EcoRI으로 소화시킨 후 Southern blot 한 결과 case 3과 세포주에서 3.2kb에서 정상보다 유전자가 증폭되어 있었으며 DNA의 재배열은 없었다(Fig 7). c-myc 암유전자를 Bam HI으로 소화시킨 후 Southern blot한 결과 case 2 와 case 3에서는 정상이었고 세포주에서만 5.7kb 에서 DNA 재배열이 있었다(Fig 8). N-ras 암유전자는 EcoRI으로 소화시킨 후 Southern blot한 결과 case 2에서 증폭이 있었으며 세포주에서는 유전자의 증폭과 3. 8kb에서 DNA 재배열이 있었다(Fig 9)(Table 4).

고 찰

난소암에 대한 세포유전학적 연구는 80% 에서

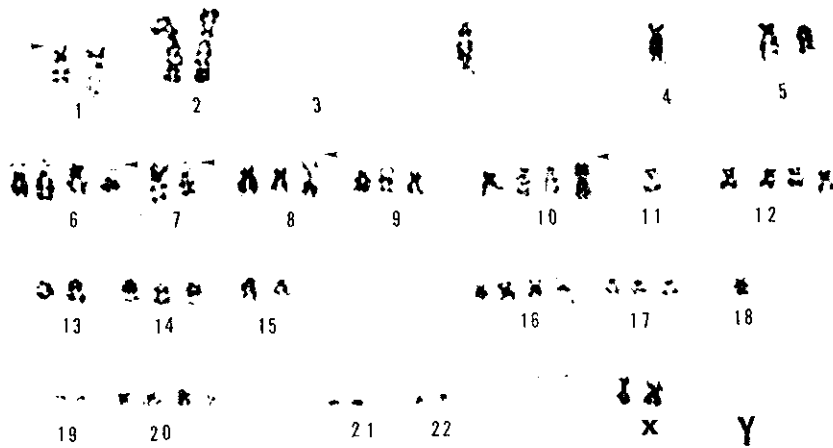


Fig. 3. G-banded metaphase from Case III. The abnormal chromosomes are indicated by arrows and listed like below: del(1)(p13), del(6)(q21), del(7)(p14), t(8:?) (p23:?), t(10:?) (p15:?)

Table 2. Cytogenetic Assessment of Three Patients and A cell Line in Ovarian Cancer

case	Number range	Type of banding	Total banded cell analyzed	Most common chromosome changes		
				numerical	structural	Double minute
I	46	G	20		9q+	none
II	40-47	G	10	-12, -14, -17, +3	del(1)(q22) del(3)(q11) t(1:7)(pter;q21) t(3:?) (q21:?)	none
III	44-83	G	15	-14, +4, +8, +13 +17, +20	del(1)(p13) del(1)(p22) del(3)(q21) t(11:?) (p15:?) iso(20q)	none
IV	47-86	G	17	-2, -6, -14, -17 -22, +5, +10, +11, +12	del(1)(p14) del(1)(q13) del(3)(q22) del(6)(q14) t(10:?) (p15:?) t(11:?) (p15:?) iso(13q) iso(14q) t(14:21)(q11;q11) dup(19)(q13)	none

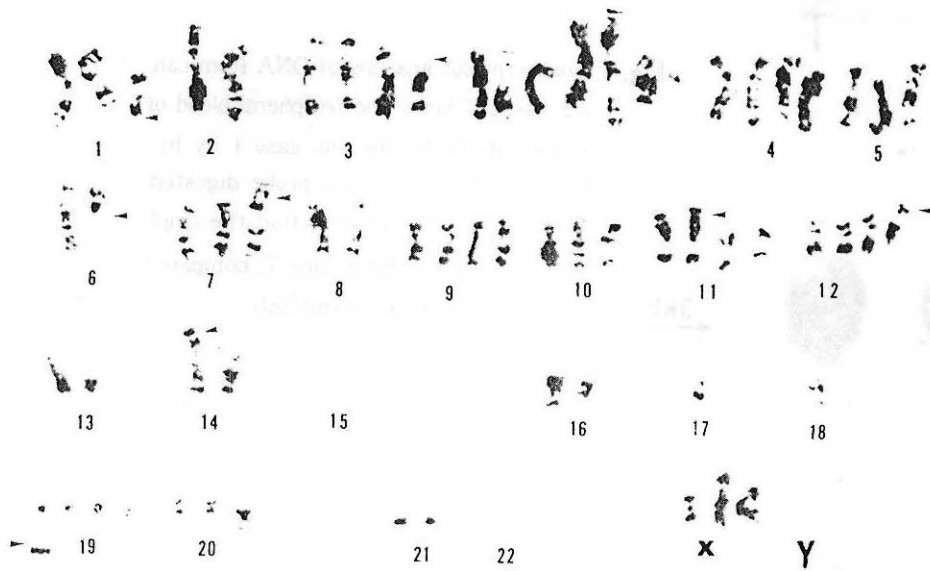


Fig. 4. G-banded metaphase from Case IV. The abnormal chromosomes are listed like below: del(1)(q22), del(3)(p22), del(6)(q14), t(7:?) (p22:?), t(11:?) (p15:?), t(12:?) (q23:?), iso(14q), dul(19)(13)

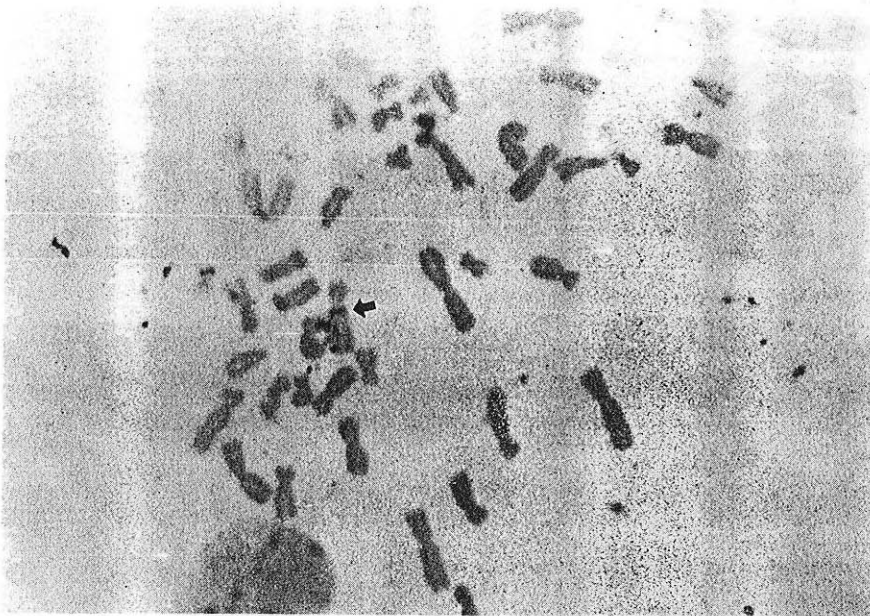


Fig. 5. In situ hybridization from cancer cell chromosome (case I). Arrow indicates chromosome 9 hybridized by c-erb B2 located near the centromere

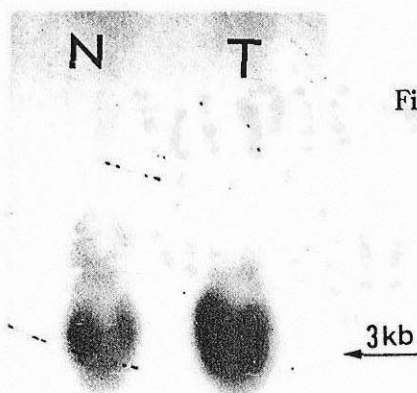


Fig. 6. Southern blot analysis of DNA from cancer tissue(T lane) and peripheral blood of same patient(N lane) on case I by hybridized with c-erb B2 probe digested with EcoRI. It is evident that the amplification of c-erb B2 in lane T, compared to lane N, appeared about 3kb



- I. placenta
- II. 0908
- III. 0920
- IV. empty
- V. HTB 161

3.2kb

N0.3(0920) & N0.5(HTB 161)
Amplification
EcoRI Digestion

Fig. 7. Southern blot analysis of DNA from ovarian cancers with erb B2

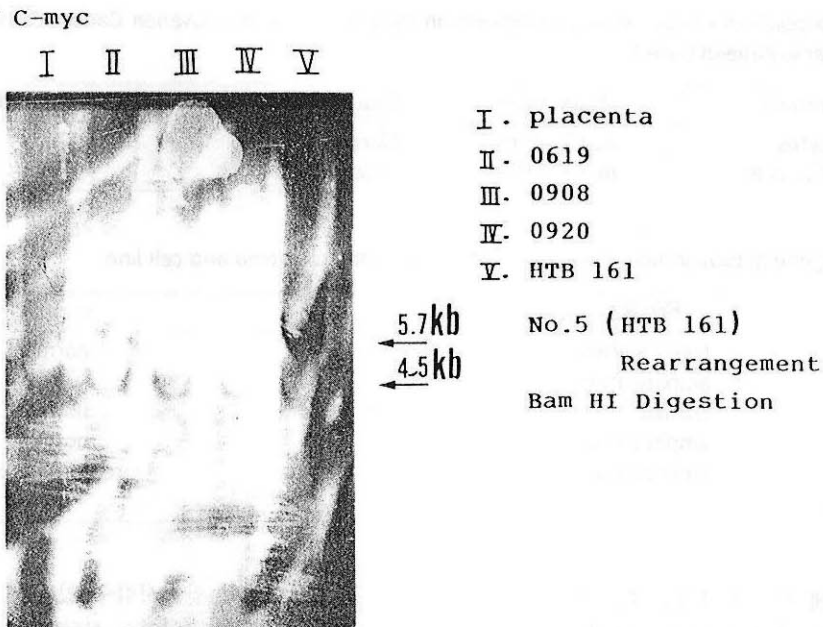


Fig. 8. Southern blot analysis of DNA from ovarian cancers with c-myc

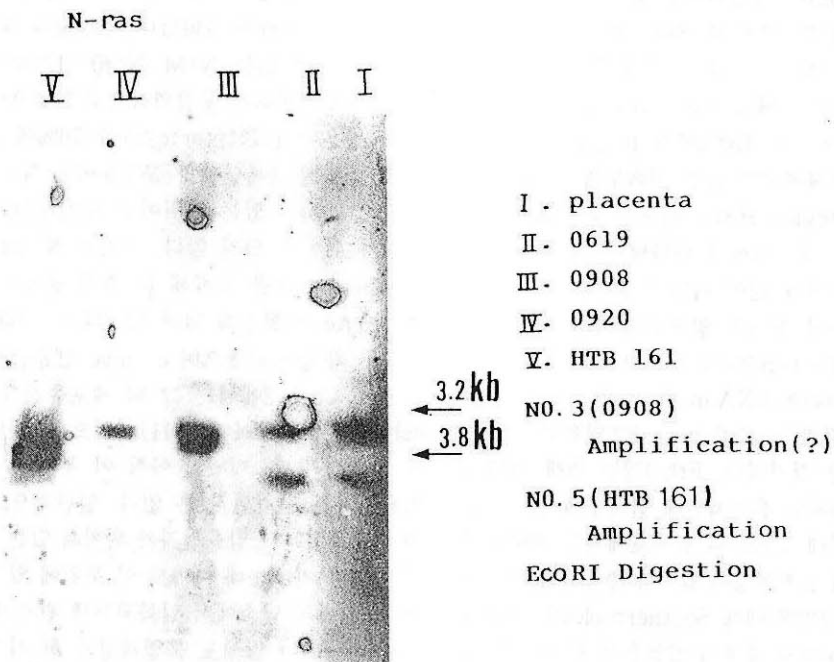


Fig. 9. Southern blot analysis of DNA from ovarian cancers with N-ras

Table 3. Comparison of erb B2 Oncogene between in Lymphocytes and in Ovarian Cancer Cells from the the Same patient(Case 1)

Materials	Karyotype	Southern blot	DNA in situ hybridization
Lymphocytes	46,XX,9q+	Normal	17q
Ovarian Ca. cell	46,XX, HSR	Amplification	9q+

Table 4. Oncogene activation from the cells of primary ovarian carcinoma and cell line

	Erb B2	N-ras	c-myc
I	translocation	normal	normal
II	amplification		
III	normal	amplification	normal
IV	amplification	normal	normal
(cell line)	amplification	amplification	rearrangement

염색체 제1번에 이상이 있었고 주로 복제, 전좌 및 역위가 대부분이었으며 이상 부위는 1q21 → 1q44 였다 (Whang-Peng 등, 1984)는 보고가 대표적이며 제6번 과 제14번 염색체의 전좌(Trent와 Salmon, 1981) 제6번 염색체 장완의 결손(Wake 등, 1982)이 특징이라고 보고 되어 있다¹⁵⁾. 이를 종합해 보면 제1번 과 제6번 염색체에서 이상이 나타난다고 할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 이들의 보고와는 전혀 일치하지 않고 있다. Case 1에서는 난소암세포의 100%에서 46,XX 였으며 단지 제9번 염색체에서만 동질 염색부위(homogenous staining region; HSR) 비슷한 것이 있었으며 예외없이 모든 염색체에서 나타났다. 혹시 선천적으로 이질염색사가 많이 나타난 결과가 아닌지를 규명하기 위하여 환자의 임파구에 대한 염색체를 분석한 결과 C-band에서 9q+가 나타났으며 이를 확인하기 위하여 DNA in situ hybridization 기술을 도입한 결과 HSR 은 erb-B2 암유전자가 증폭되어 나타난 결과였다. Erb B2는 원래 제17번 염색체에 존재하는 유전자인데 임파구에서는 모두 제자리에 위치해 있었으나 암세포에서는 제9번 염색체로 유전자 전좌현상이 일어나 증폭되었으며 암조직에서 erb B2에 대해 Southern blot을 시행해 본 결과 3.0kb 에서 증폭이 있었음을 확인할 수 있었다. 이런 결과로 미루어 보면 암유전자 1개가 단

독으로 활성화되어 암화시킬수 있다는 증거가 된다. 이 환자는 전이도 있었고 상당히 진행된 암임에도 불구하고 암염색체가 모두 46,XX였으며 단지 erb B2가 전좌되어 활성화가 일어나서 증폭된 결과 였고 아직 이런 종류의 보고는 다른 고형암에서도 없다. Case 2 와 3은 다른 고형암과 같이 염색체 이상이 다양하게 나타났다. Case2의 세포유전학적 특징은 aneuploidy(M. N;40-47)로서 염색체의 소실이나 획득은 무작위적으로 있었으며 구조적인 특징은 t(1;7)(pter;q21)이 70%에서 나타났다. 제1번 염색체단완의 끝부분에는 N-ras 암유전자가 위치해 있는 부위이고 7q21부위에는 암유전자가 위치해 있지 않다. 그래서 N-ras에 대해 Southern blot을 시행해 본 결과 증폭이 있었다. 즉 N-ras가 활성화 되어 있었다. 그러나 erb.B2는 정상과 동일하였으며 c-myc 암유전자도 정상이었다. Case 2에서는 그 외 세포유전학적 이상은 del(1)(q22)와 del(3)(q11)이었으나 그 빈도는 매우 낮았다(20% 미만). 아직 이 부위에 위치하는 암유전자가 발견된 것은 없다. 일반적으로 염색체의 결손부위는 항암유전자가 위치해 있는것과 밀접한 관계를 가지는데 아마도 이 부위에 있는 유전자가 이 환자의 난소에서 암화되는데 관계가 있지 않을까 추측되나 암세포 분열과정의 한 이상 형태로 나타난것인지도 모른다. 어쨌든 case 2는 전좌형의

이상 t(1:7)(pter:q21)과 더불어 N-ras가 깊이 관계된 것은 틀림이 없다. N-ras는 신경아세포종(neuroblastoma)에서 많이 활성화되는 암유전자로서 난소암에서 발견된 보고는 아직 없다. Case 3도 다양한 염색체 이상을 나타내었는데 그 특징은 숫적이상에 있어서 대체로 trisomy가 많으면서 무작위로 나타나는 것이었다. 이것은 암이 상당히 진행된 것을 의미하는데 실제로 임상적으로도 상당히 전이 등 진행된 경우였다. 구조적 이상의 특징은 제 1번 과 3번 염색체에서 독특하게 나타나는 결손이었는데 80%이상에서 특히 제1번 염색체의 단완에 결손이 나타났다. 이 부위에는 어떤 암유전자도 위치해 있지 않다. 따라서 암염색체에서 볼 수 있는 특수절단부위(specific fragile site)와 암유전자의 염색체 위치가 동일하다(Yunis, 1985)는 것은 잘못된 판단으로 생각된다. 아마도 1p13 혹은 1p22 부위에는 항암유전자가 존재할 것으로 추정되며 앞으로 더 연구가 필요한 것 같다. Case 3에서도 southern blot한 결과 erb B2의 증폭이 있었으며 N-ras 와 c-myc은 정상이었다. 그러나 erb B2의 염색체에서의 위치나 세포유전학적분석을 종합해 볼 때 이 환자에서는 erb B2가 일차적으로 작용했다기보다는 이차적으로 암화되는데 참여한 것으로 해석되어진다. 한편 일차성 난소암과 비교하기 위하여 세포주(HTB 161)에 대한 실험을 한 결과 일차성 난소암과는 전혀 다른 결과를 얻었다. 즉 염색체 이상은 분석을 할 수 없을 정도로 다양하였으며, 숫적이상뿐만 아니라 표지염색체를 포함한 많은 구조적 이상을 나타내었고 이상의 종류도 결손, 전좌 복제 및 동완염색체 등 여러가지 형태였으며 암이 상당히 진행 되었음을 시사해 주고 있었다. 실제로 암세포주를 만들려면 적어도 1년 이상 계속 배양이 필요함을 감안할 때 이런 형태의 이상은 생체에서는 도저히 발견될 수 없는 현상이다. 암유전자도 erb B2와 N-ras의 증폭이 있었을 뿐만 아니라 c-myc 재배열까지 나타났으며 아마도 다른 많은 암유전자도 활성화되어 있을 것이다. 이로 미루어 본다면 암은 진행될수록 암유전자의 활성화가 강화되며 활성화를 일으키는 것도 전좌나 재배열 및 점변이보다는 증폭이 많아진다는 사실을 알게 되었다. 그러므로 암화과정의

연구에 있어서 세포주는 첫째로 재료로서 부적합하다고 생각되며 여태까지의 많은 보고가 결과를 해석하는데 무리가 있었는 것 같다. 이상과 같이 일차성 난소암에서도 case마다 그 결과가 다르며 특히 세포주와는 전혀 다른 결과였다. 그러면 이들 결과를 어떻게 해석해야 할 것인가?. Case 1은 erb B2의 전좌와 증폭이 직접 원인으로 생각되며 case 2는 제1번 과 7번 염색체의 전좌와 N-ras의 증폭이 원인으로 생각되나 case 3은 일차적으로 아직 발견되지 않은 항암유전자가 작용을 못하여 암으로 형질전환되고 erb B2의 증폭으로 더 악성으로 진행되었지 않나 생각된다. 세포주에서는 많은 염색체의 구조적 및 숫적 이상과 더불어 암유전자가 활성화되어 있기 때문에 암화과정 연구에 있어서는 부적합한 것 같다. 이상의 설명을 요약하면 암은 개체마다 그 발생 기전이 다르며 특정암에 대한 특정염색체의 이상이나 특정암유전자 내지 항암유전자가 작용한다는 여태까지의 논리는 바뀌어야 하며 암은 결국 개체의 질병이라고 간주된다.

참 고 문 헌

- Berger R, Bernheim, A: Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukaemia: A review. In: Burkitt's lymphoma: A Human Cancer Model (Eds. Lenoir G, O'Connor G, Olwenym CLM) IARC (Sci. Publ. No. 60), Lyon : 65-80, 1985
- Bishop JM: Viral Oncogenes. Cell 42:23-38, 1985
- Feig LA, Bast RC, Knapp RC, Cooper GM: Somatic activation of ras^k gene in a human ovarian carcinoma. Science 223:698-701, 1984
- Filmus JE, Buick RN: Stability of c-K-ras amplification during progression in a patient with adenocarcinoma of the ovary. Cancer Res 45:4468-4472, 1985
- Fukumoto M, Estensen RD, Sha L, Oakley

- GJ, Twigg LB, Adcock LL, Carson LF, Roninson IB: Association of Ki-ras with amplified DNA sequences, detected in human ovarian carcinomas by a modified in gel renaturation assay. *Cancer Res* 49:1693-1697, 1989
- Godboat R, Dryja TP, Squire J, Gallie BL, Phillips RA: Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 304:451-453, 1983
- Klein G, Klein E: Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 315:190-195, 1985
- Knudson AG Jr: Hereditary cancers of man. *Cancer Invest.* 1:187-193, 1983
- Knudson AG Jr: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45:1437-1443, 1985
- Knudson AG Jr: A two-mutation model for human cancer in: *Advances in Viral Oncology*, Vol 7, (Ed, Klein G). Raven Press New York 1-17, 1987
- Tanaka K, Boice CR, Testa JR: Chromosome aberrations in nine patients with ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 43:1-14, 1989
- Trent JM, Salmon SE: Karyotypic analysis of human ovarian carcinoma cells cloned in short term agar culture. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 3:279-291, 1981
- Wake N, Hreshchyshyn MM, Piver SM, Matsui S, Sandberg AA: Specific cytogenetic changes in ovarian cancer involving chromosomes 6 and 14. *Cancer Res* 40:4512-4518, 1980
- Whang-Peng J, Knutsen T, Douglass EC, Chu E, Hogan WM, Young RC: Cytogenetic studies in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 11:91-106, 1984
- Yang-Feng TL, Katz SN, Cacangiu ML, Schwartz PE: Cytogenetic analysis of ependymoma and teratoma of the ovary. *Cancer Genet Cytogenet* 35(1):83-89, 1988
- Yunis JJ, Soreng AL: Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226:1199-1204, 1985

Abstract

**Mechanism of oncogenesis and activation
of oncogene in human ovarian carcinoma**

**Suh Young Wook, Lee Tae Sung, Chang Sung Ik¹,
Kim Dag Kwang¹, Kim Hong Tae¹**

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine Keimyung University
Department of Anatomy, School of Medicine Keimyung University¹

To investigate the specific chromosomal abnormalities and role of oncogene in human ovarian cancer, three cases of primary ovarian cancer tissues and cells line(HTB 161) were cultured and karyotyped after G-banding. DNA in situ hybridization and southern blot were also performed on the same materials for erb B2, N-ras and c-myc oncogenes. The case 1, had diploid 46 XX, showing HSR like regions in almost all cells. These HSR might have appeared due to amplification of erb-B2 oncogenes after translocation 17q21 to 9q12. In case 2 specific translocation t(1;7)(pter;q21) and amplification of N-ras were observed. However in case 3, the most common abnormality corresponded to del(1)(p13 or p22) with amplification of erb B2. In none of the cases the activation of c-myc was revealed in this study. This indicates that different karyotypic abnormalities may not interfere with activation of erb B2 or N-ras in cell lines. The paper also suggests that oncogenesis as a phenomenon might be progressed by the activation of an oncogene or may be combined with specific chromosomal translocation or even deletion (inactivation of antioncogene). Obviously, oncogenesis as a process may not be understood to adhere to fixed mechanisms but may show individual differences.