

癌細胞 染色體 研究에 있어서 새로운 方法*

—細胞分離와 培養方法—

啓明大學校 醫科大學 解剖學教室

張性翼 · 崔寅章 · 李仁煥

=Abstract=

Advanced technique on chromosome study of tumour cells

—Cell segregation and culture technique—

Sung Ik Chang, MD; In Jang Choi; Ihn Hwan Lee, MD

*Department of Anatomy, Keimyung University
School of Medicine, Taegu, Korea*

Three combined mechanical and enzymatic disaggregation techniques and a simple mechanical disaggregation procedure were compared. The combined procedures involved a mechanical comminution the tumour tissue followed by incubation in trypsin. In one method, the tissue was subjected to long-term trypsinization at 4°C, and in the other procedure, repeated short-term trypsinization at 37°C, and in the third method, trypsinization at 4°C and collagenase procedure was applied. The results were compared in terms of the yield of viable cells. The combined techniques provided reproducible cell yields of $2.8-5.8 \times 10^7$ viable cells g^{-1} of tissue, whereas only a small number of tumour cells was produced by the mechanical method. Especially, after trypsinization at 4°C and collagenase procedure, we gained high cell yield of $5.4-5.8 \times 10^7$ viable cells g^{-1} of tissue.

We introduce this advanced technique on tumour cell to detect the prognosis of patients suffered from neoplasm clinically.

序 論

1962年 Nowell¹⁾에 의해서 만성 골수성 白血病 (CML) 患者에서 소위 Ph¹(Philadelphia chromosome)이란 染色體 異狀을 발견하여 癌과 染色體間의 어떤 관계가 있을 것으로 보고된 후 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근에 Yunis²⁾에 의하여 白血病 중 CML의 경우 98%가 染色體 異常으로 판명된다는 보고가 있다. 白血病이나 淋巴瘤 같은 것은 骨髓細胞나 淋巴瘤球를 培養해서 검사할 수 있기

때문에 培養이 비교적 용이하다. 그러나 固形質 腫瘍(solid tumor)의 경우 우선 組織 培養에 어려움이 있다. 癌細胞는 正常細胞와 달라서 분화 과정이나 分裂方法 등이 매우 상이하다. 그러므로 固形質 腫瘍 細胞의 染色體를 연구하기 위해서는 무엇보다도 細胞培養 기술이 전제되어야 하고 특히 癌 조직에서 癌細胞 자체와 여기에 기생, 또는 보조하는 잡다한 細胞를 분리해야만 하는 문제점이 있다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 70년대까지는 주로 물리적인 方法으로 조직을 칼 등으로 썰어서 培養液에 심고 장기일 培養後 培地에 살아 남은 細胞를

* 본 논문은 1984년도 계명대학교 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어졌음.

다시 再培養하였다. 이는 번거로운 뿐만 아니라 곰팡이나 bacteria의 汚染으로 인해 細胞가 죽는 경우가 많으며 살아남은 細胞일지라도 숫적으로 적으며 癌細胞 자체는 극히 적은 경우가 허다하다. 이런 결점을 해결하기 위하여 Hamburger와 Salmon⁹⁾은 酵素인 trypsin을 使用하여 細胞를 分離하는데 성공하였으며 Rasey와 Nelson¹⁰⁾은 trypsin을 온도에 따라 長時間 혹은 短時間의 培養으로 分離細胞를 量的으로 비교 분석한 바 있다. 著者들은 최근에 많이 사용되고 있는 collagenase를 trypsin과 並行해서 낮은 온도(4°C)에서 培養하여 固形質 癌조직의 분리세포를 얻어 물리적인 方法 및 trypsin 단독 사용 方法으로 얻은 분리세포를 양적으로 비교하여 좋은 結果를 얻었기에 보고드리는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

병리 조직학적으로 확인된 子宮頸部癌, 喉頭癌 膀胱癌 組織.

2. 細胞 分離 方法

a. 酵素 처리한 方法

1) 長時間 trypsin 처리

각각의 癌 조직을 PBS(-)로 잘 씻은 다음 laminar flow hood 내에서 먼도날로 잘게 썰고(1mm³ 이하) 0.1% trypsin(pH 7.5)을 35mm Petri dish에 癌 組織 200mg 당 50ml를 부어 4°C 下에서 24시간 培養하였다. 培養後 交返하여 浮遊液을 두 겹의 거즈에 통과시켜 Eagle's MEM 培地(30% FBS 포함)에 등으로써 trypsin의 작용이 중지케 하고 다시 MEM 배지(20% FBS 포함)로 두 번 水洗하였다.

2) 短時間 trypsin 처리

上記와 같이 잘게 썬 各各의 조직 200mg을 0.1% trypsin 50ml에 넣어 37°C 下에서 30-60分間 培養하였다. 培養後 交返하여 두 겹의 거즈에 통과시키고 上記와 같은 과정을 거쳐 MEM 培地에 두

었다.

3) 複合 酵素처리(trypsin과 collagenase)

上記와 같이 처리한 各各의 조직들을 0.1% trypsin으로 4°C 下에서 overnight 둔 뒤 MEM 培地로 두 번 水洗하고 이를 다시 0.1% Collagenase 10ml에 細胞 浮遊액 40ml씩을 처리하여 진탕 恆溫器(shaking incubator)에서 4°C로 하여 10分間 培養後 두 겹의 거즈에 통과시켰다. 이를 다섯번 반복하여 MEM 培地에 두었다.

b. 物理的인 方法

上記와 같이 PBS(-)로 수세하고 잘게 썬 조직들을 125mesh 금속채로 여과하고 다시 두 겹의 거즈에 통과시켜 MEM(20% FBS 포함) 培地에 두었다.

3. 細胞 生存力 檢査 및 分離細胞 總計

각기 과정을 거친 細胞 浮遊物 0.1ml에 trypan blue 혹은 nigrosine을 섞은 후 1-2分 經過後 적어도 200個 이상의 細胞를 hemocytometer로 셀하여 生存力 있는 細胞의 百分率을 결정하고 위 배가지 方法으로 얻어진 分離細胞들을 hemocytometer로 총 수를 구하여 各各의 癌 조직 1gm 당 細胞수에 生存力 있는 細胞의 百分率을 곱하여 세가지 癌 조직에 따른, 서로 다른 方法으로 얻어진 生存力 있는 細胞數(cell yield)를 구하였다.

實驗 成績

위에서 기술한 4가지 細胞 分離方法을 3가지 암 조직에 各各 시행한 結果를 요약하면 Table 1과 같다.

이 표에서 物理的인 方法으로 細胞 分離한 경우 0.08~0.4×10⁷ 個로 3方法 中 가장 낮은 細胞數를 얻었으며 그 중에서도 후두암 조직에서 가장 낮았다.

trypsin과 collagenase를 複合的으로 使用한 경우 5.4~5.8×10⁷ 個의 세포를 세 가지 암 조직에서 공히 가장 많은 分離腫瘍細胞를 얻을 수 있었으며

Table 1. Cell yield disaggregated by four different methods.

tumours	long term trypsinization cell yield×10 ⁷	short term trypsinization cell yield×10 ⁷	trypsin plus collaganase cell yield×10 ⁷	mechanical disaggregation cell yield×10 ⁷
cervical Ca:	5.5	4.7	5.8	0.4
laryngeal Ca:	4.6	3.0	5.4	0.08
bladder Ca:	5.2	2.8	5.6	0.1

癌 조직에 따른 차이는 별로 발견할 수 없었다. trypsin 처리와 物理的 方法을 並行할 경우, trypsin 을 낮은 온도(4°C)에서 長時間 처리하는 것이 높은 온도(37°C)에서 短時間 처리보다 효과가 있는 것으로 나타났으며 특히 그 차이는 방광암 조직에서 더욱 현저하여 短時間 고온 trypsin 처리 후 2.8×10^7 個에 대해 長時間 저온 trypsin 처리 후는 5.2×10^7 개였다. 각 분리 方法에서 암 조직별로 비교해 본 결과 후두암과 방광암에서 보다 자궁 경부암에서 더 많은 分離 細胞를 얻을 수 있었으며 物理的 方法과 나머지 세 가지 方法과의 결과 차이는 아주 현저하였다($p < 0.01$).

考 察

癌조직 細胞의 生物學的 研究에 있어서 癌 細胞의 分離는 기본적인 必要불가결한 것이다. 특히나 固形質 종양에 있어서 X-線 照射, 化學療法 등을 가한 후 癌細胞의 生存如否, 상태 등을 研究함에 있어서 細胞分離 方法이 多角的으로 研究되어 왔다³⁻⁶⁾. Pretlow, Russel, Hemstreet, Eremin⁷⁻¹⁰⁾ 등은 物理的 方法과 효소(trypsin) 처리를 並行하여 분리한 固形質 종양 細胞를 nude mouse에 接種했던 바 더 많은 종양 형성을 관찰할 수 있었다. Grabstein 등¹¹⁾은 trypsin 이 시험관 내에서 細胞에 長時間 노출될 경우 細胞 毒性을 가진다고 하였다. 그러나 Hodges 등¹²⁾은 이를 낮은 溫度(4°C)에 長時間 노출할 경우 효소(trypsin)의 活性이 온도에 의존하는 고로 세포막을 투과하지 못하여 細胞內 毒性을 나타내지 못하고 細胞 表面에서만 일부 활성을 유지한다고 하였다. 이로써 37°C에서 短時間 배양한 경우보다 4°C에서 長時間 배양한 경우에서 더 많은 分離된 癌細胞를 얻을 수 있음이 推定된다.

한편으로는 효소 처리를 함으로써 生物學的 變化를 초래하여 膜에 싸인 免疫 globulin(membrane bound immunoglobulin)을 파괴시킴이 보고된 바도 있다⁸⁾. 그러나 효소 처리가 核이나 核內의 染色體 또는 DNA에 영향을 주는지는 아직 그 근거를 찾아낼 수가 없다. 그러므로 染色體 또는 DNA 研究에 있어서 효소 처리는 본래 상태에 영향을 주지 못할 것으로 사료된다. 이로써 固形質 종양과 染色體의 상관관계 研究에서 효소 처리에 의한 細胞 分離法은 方法론에서 큰 진전이라 하겠다.

Slocum 등¹³⁾은 종양 조직에 따라 다소 차이는

있으나 固形質 종양일 경우 종양 조직 1gm 당 $5 \times 10^8 - 10^9$ 個의 細胞를 생할 수 있었다. 이에 비해 두 가지 효소(trypsin 과 collagenase)를 동시에 使用하였을 경우 $5.4 \sim 5.8 \times 10^7$ 個의 종양 分離 細胞를 얻을 수 있었음을 전 細胞數의 10%에 가까운 숫자로서 종양 조직 細胞 研究에 만족할 만한 細胞 分離法이라 할 수 있겠다.

37°C에서 trypsin 처리에서의 결과는 짧은 시간 培養이지만 효소의 적정온도로 인한 細胞 毒性으로 인해 낮은 성적을 보인 것으로 사료되며 특히나 후두암 조직과 방광암 조직에서 효소의 細胞 毒性에 영향을 더욱 많이 받는 것으로 사료된다.

효소 처리에 있어서 細胞 자체에 毒性을 거의 주지 않고 細胞 分離할 수 있는 적정 온도, pH, 항온기 등의 研究가 계속되어야겠다.

要 約

固形質 종양 조직의 細胞 分離에 있어서 物理的인 方法과 物理的인 方法에 효소 처리를 추가한 세 가지 方法으로 細胞 分離를 한 결과 요약하면 다음과 같다.

1. 복합 효소 처리에서 가장 높은 生存力 있는 分離 細胞群(cell yield)을 얻었으며 $5.4 \sim 5.8 \times 10^7$, 物理的인 方法에서 가장 낮은 分離 細胞群($0.08 \sim 0.4 \times 10^7$)을 얻었다.

2. 세 가지 癌 조직에 대한 네 가지 方法으로 細胞를 分離해 본 결과 각기 方法마다 자궁 경부암에서 가장 높은 分離 細胞群을 얻을 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Nowell PC: The minute chromosome(Ph¹) in chronic granulocyte leukemia. *Blut* 1962; 8: 65.
2. Yunis JJ, Sawyer JR, Ball DW: Characterization of banding patterns of metaphase-prophase G-banded chromosomes and their use in gene mapping. *International Conference on Gene Mapping*. Winnipeg, 1977: *Cytogenet Cell Genet* 1978; 22: 679.
3. Hamburger QW, Salnon, SE: Primary bioassay of human tumour stem cells. *Science* 1977; 197: 461.

4. Rasey JS, Nelson NJ: Response of an in vivo-in vitro tumour to X-rays and cytotoxic drugs: effect of tumour disaggregation methods on cell survival. *Br J Cancer* 1980; 41(Suppl.): 217.
5. Courtenay VD, Selby PJ, Smith JE, Mills J, Peckham MJ: Growth of human tumour cell colonies from biopsies using two soft agar techniques. *Br J Cancer* 1978; 38: 77.
6. Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen BS, et al: Quantitation of differential sensitivity of human-tumour stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* 1978; 298: 1321.
7. Pretlow TP, Glover GI, Pretlow TG: Separation of lymphocytes and mast cells from the further transplantable mast cell tumor in an isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium. *Cancer Res* 1977; 37: 578.
8. Russell SW, Doe WF, Hoskins RG, Cochrane CG: Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I. Tumor disaggregation and identification of constituent inflammatory cells. *Int J Cancer* 1976; 18: 322.
9. Hemstreet GP, Enoch PG, Pretlow TG: Tissue disaggregation of human renal cell carcinoma with further isopyknic and isokinetic gradient purification. *Cancer Res* 1980; 40: 1043.
10. Eremin O, Coombs RA, Prospero TD, Plumb D: T-lymphocyte and B-lymphocyte subpopulations infiltrating human mammary carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 1982; 69: 1.
11. Grabstein G, Cohen J: Collagenase: Effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro. *Science* 1965; 150: 626.
12. Hodges GM, Livingston DC, Franks, LM: The localization of trypsin in cultured mammalian cells. *J Cell Sci*, 1973; 12: 887.
13. Slocum HK, Pavelic ZP, Rustum YM: An enzymatic method for disaggregation of human solid tumors for studies of clonogenicity and biochemical determinants of drug action. In *Cloning of Human Tumor Stem Cells*, 1980, p339(Ed. Salmon). Allan R. Liss: New York.