

자궁경부암환자의 임파구에 있어 자매염색분체 교환*

계명대학교 의과대학 해부학교실

최인장 · 이인환 · 장성익

경북대학교 의과대학 해부학교실

주 강

==Abstract==

Sister Chromatid Exchange in Lymphocyte from Patients with Cervical Cancer

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

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

Joo Kang, MD

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

Sister chromatid exchange (SCE), that is, the reciprocal interchange of DNA between chromatids, is easily visualised in metaphase chromosome, and so frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) was investigated in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated lymphocytes of 28 women with cervical cancer after culture for 72h in 5-bromodeoxyuridine (BrdU) containing medium according to Speit method.

The results were as follows:

1. Mean of SCEs in 28 women with cervical cancer is 6.87 ± 1.76
2. SCEs did not localized on a specific chromosome.
3. Age of the patient with cervical cancer was moderate correlation with frequency of SCEs
4. There was insignificant correlation between progress of cervical cancer and frequency of SCEs

서 론

염색체의 DNA 손상과 회복과정을 알기 위한 방법의 일환으로 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange; 이하 SCE)법이 많이 이용되고 있다. 1957년 Taylor 등¹⁾에 의해 식물세포에 자기방사능

법으로 염색체에서 DNA 복제가 다르게 나타남을 보고한 이래 1974년 Latt²⁾에 의해 DNA 염기 中 thymidine 대신 BudR 로 치환하여 형광염색시키는 방법을 개발하여 염색체에서 SCE 가 일어남을 처음 발표하였다. Perry 와 Wolff³⁾에 의해 형광성 염색 시약인 Hoechst 33258과 Giemsa 염색방법을 동시에 사용하는 기술이 개발되면서 SCE의 연구에 획

* 본 논문은 1985년도 한국과학기술비로 이루어졌음.

기적인 계기를 다룬하였다. 최근에 환경성 돌연변이 물질이나 발암물질의 검출방법으로⁴⁾ SCE의 빈도가 이용되고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않고 단지 유사분열 교차에 의해 일어난다는 replication bypass model⁸⁾이 있을 따름이다. 그러나 SCE 빈도가 유방암환자에서는 유의성있게 높다는^{9,10)} 보고가 있으며 이들 연구자들 중 Skholink 등⁹⁾은 유방암의 조기진단을 위한 preclinical marker로서 SCE 유발빈도 調査가 선행되어야 한다고 주장하였다. 그러나 자궁경부암환자에서는 SCE 빈도가 증가한다^{11,12)}는 보고들과 이와 상반되게 정상인과 같은 빈도를 나타낸다는 보고¹³⁾가 있다. 이런 SCE 빈도는 세포를 배양하는 배양액, 세포분열을 촉진하는 mitogenic agents의 종류등에 영향을 받으며 특히 SCE를 관찰하기 위해 배양액에 첨가시키는 BudR의 농도에 영향을 받게되며 이런 BudR은 세포독성물질로 작용하게 되므로 Miller¹⁴⁾는 말초 혈액 내의 T 임파구들과 B 임파구들에 있어 sister chromatid differentiation을 유도하는데 T 임파구들에서는 0.07 μ M의 농도가, B 임파구들에서는 10 μ M 농도가 최저의 농도로 요구된다고 보고하였다.

Riedel과 Obe¹⁵⁾는 초기 증식세포에서는 SCE 빈도가 높으나 후기 증식세포에서는 낮다고 하였으나 Snopce와 Rary¹⁶⁾는 PHA로, Miller¹⁷⁾는 pokeweed mitogen으로 세포분열을 자극시킨 배양세포에서는 반대의 효과가 있다고 주장하였고, Beek와 Obe¹⁸⁾ 그리고 Giulotto 등¹⁹⁾은 아무런 차이가 없었다고 보고하였다.

저자들은 먼저 자궁경부암환자들의 말초혈액 임파구들을 PHA로 자극시키고 BudR의 양은 Speit가 주장한 바와 같이 $\times 10^6$ 세포에 3 μ M을 넣어 얻었던 표본에서 자궁경부암환자들에서 SCE 빈도의 평균치와 특이한 염색체에서 SCE 빈도가 다발적으로 일어나는가를 관찰하며, 나이와 SCE 빈도와의 상관관계, 자궁경부암의 진행도와 SCE 빈도의 변화관계를 연구하고자 이 실험을 실시하였다.

실험재료 및 방법

실험재료: 자궁경부암 중 편평상피암환자 28명의 말초혈액

실험방법: 말초혈액 1ml를 채취하여 세포수를 계산하고 RPMI 1640 8ml, PHA 5 μ g과 fetal calf serum 2ml의 배양액에 BudR은 3 μ M/ 10^6 cells에 비례되게 첨가하여 37°C 인 CO₂ 배양기에 70시간 배

양하고 colcemid 0.1ml를 넣어 2시간 후에 배양된 임파구들을 800rpm으로 8분간 원심분리하여 세포들을 모았다. 저장액인 0.075M KCl 용액 6ml를 2ml씩 세 번 나누어 천천히 첨가하여 8분간 세포들을 팽창시켜 다시 800rpm으로 8분간 원심분리하고 4°C의 고정액(acetic acid: metanol=1:3) 6ml로 1시간씩 세 번 고정시킨 후 같은 방법으로 원심분리하여 임파구들을 모았다. 무수 alcohol에 담겨두었던 slide에 모은 임파구들을 2~3방울 떨어뜨리고 alcohol lamp에 화염시켜 1주일간 건조시켜 Hoechst 33258 50 μ g을 3차 증류수 1ml에 녹인 용액에 slide를 30분간 담겨 후 slide를 흐르는 물에 씻고 실온에서 말렸다. 잘 말린 slide 표면에 McIlvaine 완충액(pH 8.0)을 3방울 떨어뜨리고 건조를 막기 위해 cover glass를 덮고 가장자리를 잘 봉합하여 70°C 가열판에 slide를 놓고 15w U·V燈에서 40cm 떨어지게하여 4시간동안 照射하고 cover glass를 제거한 후 흐르는 물에 씻어 공기 건조시켰다. 5% Giemsa 용액에 8분간 염색하여 검경하고 사람당 6~8개의 metaphase를 선별하여 사진 촬영한 후에

Table 1. Frequency of SCE in women with cervical cancer

Group	No. of metaphases / subjects (year)	Age range (year)	SCE per metaphase	
			Mean \pm SD	Range
Cancer of cervix	190/28	28-62 (43.6)	6.87 \pm 1.76	2-15

Figure in parenthesis indicate average age



Plate 1. One sample of cultured lymphocyte from patient with cervical cancer. Indicators represente sister chromatid exchanges.



Plate 2. Another sample of cultured lymphocyte from patient with cervical cancer. Indicators represente sister chromatid exchanges.

SCE 빈도를 관찰하였다.

SCE 빈도수의 계산은 하나의 염색체에서 single exchange와 twin exchange의 구별없이 모두 하나로 간주하였으며 중심체에서의 교차는 명확한 것만 빈도수에 포함시켰다.

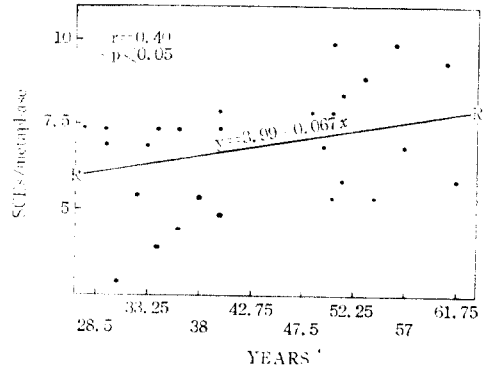


Fig. 1. Relationship between age and SCEs per metaphase in lymphocytes of 28 women with cervical cancer.

실험성적

SCE 빈도는 SCE 분석 자료들에서 환자 개인에 따라 범위가 많았으며 같은 사람에서도 세포에 따라 SCE 분현이 많이 상이하였는데 표 1에서 저된 빈도 범위가 한 염색체 사진에서(2n=46) 2개에서 부터 15개까지 나타났으며(plate 1, 2) 28명의 자궁경부암 환자들에서는 6.87±1.76였다. 자궁경부암은 주로

Table 2. Intra-chromosomal distribution of SCE in women with cervical cancer

Group	No. of metaphases/subjects	SCE distribution in chromosomal number and groups										Total no. of SCEs
		No.1	No.2	No.3	B	No.6	C	D	E	F	G	
Cancer of cervix	190/28	104	122	104	215	106	397	131	79	15	14	1287
		(8.1)	(9.5)	(8.1)	(16.7)	(8.2)	(30.9)	(10.2)	(6.1)	(1.1)	(1.1)	(100)

Figures in parenthesis indicate percentage frequency

Table 3. Frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of 26 women with cervical cancer

Grade of Cancer	No. of metaphases /subjects	Age range (years)	SCE per metaphase	
			Mean ± SD	Range
I b	74/11	28-51 (36.7)	6.57±2.02	2-14
II a	65/10	32-62 (45.5)	6.67±1.46	2-15
II b	34/5	48-56 (51.4)	7.20±1.90	2-15

Figures in parenthesis indicate average age

herpes virus 감염에 의한 것으로 추정되기 때문에 이런 virus가 특이적으로 SCE 유발에 관련할까를 調査하기 위하여 특정한 염색체에 관심을 두어 관찰하였으나 표 2에서 보는 것과 같이 특이할만한 사실을 관찰하지 못했으며 자연발생적인 SCE 빈도와 유사한 형태였고 다만 숫자상의 차이 뿐이었다. SCE 빈도와 나이간에는 Fig. 1에서처럼 상관관계수가 0.40으로 중등도의 상관관계를 나타내고 있었다. 자궁경부암환자에서 암의 진행정도에 따른 등급분류에서 調査된 환자에서 11명에서는 I b, 10명에서는 II a, 5명의 경우에서는 II b, 그 외 두명은 I a와 III b의 등급에 해당되었기 때문에 두명을 제외한 26명에서 비교해 본 결과 표 3에서 나타난 것 같이 빈도의 평균값은 다소 증가하지만 일원분산분석을 실시해 본 결과 등급의 심도와 SCE 빈도간에는 상관관계가 전혀 없었다.

고 찰

자매염색분체 교환(SCE)은 쉽게 증기세포에서 관찰할 수 있으며 염색체 구조연구나 염색체 손상과 염색체의 불안전성 및 DNA 복제 결손연구에 많이 이용되고 있는데 예로서 Bloom's syndrome과 같은 질환에서는 염색체 이상과 자매염색분체 교환간에는 높은 상관관계가 있어 SCE 빈도가 높다²¹⁾고 보고하고 있으며 환경성 변이 誘發原인 mutagen들을 사용하여 배양세포들의 연구에서도 같은 결과를 얻었다고⁹⁾보고하고 있다. 그러나 ataxia telangiectasia²²⁾와 Fanconi's anemia²³⁾에서는 SCE가 낮은 빈도를 나타내고 있다고 각각 보고하였다. 현재 SCE 발생에 대한 정확한 기전이 밝혀져있지 않기 때문에 명확한 이유는 알 수 없다. 그러나 유방암에 있어서는 SCE 빈도가 상당히 높아 유방암의 조기 진단을 위해 SCE 검사가 필요하다⁹⁾고 주장하고 있으나 자궁경부암의 조기진단으로 SCE 검사가 가능하다고 주장하는 학자들^{11,12)} 있지만 이에 반대하는 보고¹³⁾도 있다. 정상사람에 있어 100명을 대상으로 관찰한 결과에서 SCE의 평균값이 5.1에서 24.9에 이르는 정도의 변이가 높다고 Hedner 등²⁴⁾은 발표하였는데 이런 결과는 자연발생적인 요인에 여러가지 요소들이 관계되기 때문에 우선 저자들은 우리 실험실에서 정확한 염색시약 및 염색 시간 특히 배양액에 첨가되는 BudR 양을 최대로 줄인 상태로 Speit²⁰⁾가 주장한 바대로 실시하여 BudR 자체의 영향을 극소화시켜 실험을 실시한 결과 자궁

경부암환자 中 편평상피암에 있어 SCE 빈도의 평균치는 6.87 ± 1.76 이었는데 Mitra 등¹¹⁾과 Murty 등¹²⁾의 자궁경부암환자에 대한 SCE 빈도의 관찰결과와 비교해 보면 정상치에 유사한 값이었다. 이런 이유는 BudR의 농도차 및 배양액에 첨가하는 시간도 상이하였고 배양액의 종류에 차이가 있었던 것으로 추정된다.

SCE 빈도와 나이간의 관계에 대해서는 상관관계가 전혀 없었다는 보고들^{22,24~27)}과 나이가 많은 사람에게 SCE 빈도가 높다는 보고들^{28~30)}이 있었지만 Schenider 등²⁷⁾은 나이가 임파구에 있어 SCE 빈도를 높이는 약제에 대해 별 효과가 없었다고 주장하였다. 그렇지만 Murty 등¹²⁾은 정상인과 자궁경부異形成症에 있어서는 나이와 SCE 빈도와는 상관관계가 없었으나 자궁경부암 환자에서는 상관관계수가 0.4154로서 중등도로 상관관계가 나타났다고 보고하면서 그 이유로서 흡연습관이나 피임약 복용등에 의한 것으로 추정된다고 하였다. 이번 연구에서의 결과는 상관관계수가 0.40으로 중등도의 상관관계를 나타내었으며 이 원인에 대해서는 확실하게 규정지을 수 없으나 같은 원인이 아닐까 생각한다.

자궁경부암에 대한 연구로 사람의 염색체 中 1번 염색체와 관련이 있을 것으로 생각한 연구³²⁾가 있지만 Mitra 등¹¹⁾은 SCE 연구로서는 1번 염색체와 무관하게 생각하며 그의 염색체와도 관계가 없다고 주장하면서 이는 Kato 등³³⁾의 연구보고에서 염색체 이상의 발생과 SCE를 조절하는 분자과정과는 별개라는 결론에 부합된다고 하였다. 본 연구자들은 6번 염색체의 장완에 myb oncogen 부위가 존재하기 때문에 6번 염색체 SCE 빈도를 정확하게 調査하였지만 역시 SCE가 6번 염색체에 특이할 정도로 나타나지는 않았다.

암의 진행정도에 따라 SCE 빈도에 대한 연구는 없었지만 Murty 등¹²⁾은 암이 되기前的 자궁경부異形成症환자들에 있어 그 정도를 輕症, 中等症, 重症의 3단계에서 SCE 빈도와 질환의 등급간의 상관관계를 調査하였으나 아무런 상관관계가 없었다고 보고하였다. 본 연구에서는 암의 진행정도에 따른 I b, II a, II b의 환자들간의 상관관계를 파악한 결과 SCE 평균치의 증가는 진행정도가 심해질수록 나타나 일원분산분석을 해본 결과 상관관계는 없었다. 그러므로 자궁경부암의 SCE로서의 연구방법은 앞으로 더 새로운 방법을 개발하지 않는 한 효과적인 방법이라고 생각하기엔 문제점이 있는 것으로 사료된다.

요 약

자궁경부암환자 28명에 대해 말초혈액을 PHA 로 자극시키고 Speit 방법에 의해 $\times 10^6$ 세포당 배양액 1ml에 0.3 μ M의 BudR 을 첨가하여 얻은 표본에서 개체당 6~8개의 metaphase 에서 SCE 를 관찰하였던바 28명의 자궁경부암환자에서 SCE 의 평균 값과 표준편차는 6.87 \pm 1.76이였으며, SCE 가 특정한 염색체에 국재되어 나타나지 않았다.

28명의 자궁경부암환자에서 SCE 빈도와 나이간에는 중등도의 상관관계($r=0.40$)가 있었으나 26명의 자궁경부암환자에서 SCE 빈도와 암의 진행 정도에 따른 등급간에는 아무런 상관관계가 없었다.

참 고 문 헌

1. Taylor JH, Woods PS, Hughs WL: The organization and duplication of chromosome as revealed by autoradiographic studies using tritium labelled thymidine. *Proc Natl Acad Sci* 1957 ; 43 : 122-138.
2. Latt SA: Localization of sister chromatid exchanges in human chromosome. *Science* 1974 ; 135 : 74-76.
3. Perry P, Wolff S: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974 ; 251 : 156-158.
4. Kato H: Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp Cell Res* 1973 ; 82 : 382-390
5. Perry P, Evans HJ: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975 ; 258 : 121-124.
6. Stetka DG, Wolff S: Sister chromatid exchanges as an assay for genetic damage induced by mutagens and carcinogens. II. In vitro test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat Res* 1976 ; 41 : 343-350.
7. Raposa T: Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro

- and in lymphocytes of leukemic patients under cytostatic therapy. *Mutat Res* 1978 ; 57 : 241-251.
8. Stetka DG: Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange. *Hum Genet* 1979 ; 49 : 63-69.
9. Skolnik M, Livingston GK, Fineman RM, Hohnson P, King MC, McLellan T, Bishop DT: Genetics of breast cancer genealogical clusters major genes. Linkage and sister chromatid exchange as a preclinical marker. *Am J Hum Genet* 1980 ; 32 : 151A.
10. Livingston GK, Cannon LA, Bishop DT, Hohnson P, Fineman RM: Sister chromatid exchange: Variation by age, sex, smoking and breast cancer status. *Cancer Genet Cytogenet* 1983 ; 9 : 289-299.
11. Mitra AB, Murty VVVS, Luthra UK: Sister chromatid exchanges in leukocytes of patients with cancer of cervix uteri. *Hum Genet* 1982 ; 60 : 214-215.
12. Mutry VVVS, Mitra AB, Luthra UK, Singh IP: Sister chromatid exchanges in patients with precancerous and cancerous lesions of cervix uteri. *Hum Genet* 1983 ; 72 : 37-42.
13. Adhvaryu SG, Vyas RS, Dave BJ, Trivedi AH, Parikh BN: Spontaneous and induced sister chromatid exchange frequencies and cell cycle progression in lymphocytes of patients with carcinoma of uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 1984 ; 13 : 170-174.
14. Miller K: Sister chromatid exchange in highly purified human B and T lymphocytes. *Hum Genet* 1983 ; 72 : 160-163.
15. Riedel L, Obe G: Trenimon-induced SCEs and structural chromosomal aberrations in early-and late-dividing lymphocytes. *Mutat Res* 1979 ; 73 : 125-131.
16. Snope AT, Rary JM: Cell-cycle duration and sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1979 ; 63 : 345-349.
17. Miller K: The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immun-*

- obiology* 1983 ; 165 : 132—146.
18. Beek B, Obe G: Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: Spontaneous and induced frequencies in early and late-proliferating cells in vitro. *Hum Genet* 1979 ; 49 : 51—61.
 19. Giullotto E, Mottura A, Giorgi R, De Carli L, Nuzzo F: Frequencies of sister chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte culture. *Mutat Res* 1980 ; 10 : 343—350.
 20. Speit G: "Unusual SCD" explained by differences in BudR incorporation during subsequent cell cycles. *Cancer Genet Cytogenet* 1985 ; 15 : 85—88.
 21. Changanti RSK, Schonberg S, German J: A many fold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 4508—4512.
 22. Galloway SM, Evans HJ: Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. *Cytogenet Cell Genet* 1975 ; 15 : 17—29.
 23. Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Buchanan GR, Gerald PS: The induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 ; 72 : 4066—4070.
 24. Hedner K, Hogstedt B, Kolning AM, Mark-Vendel E, Strombeck B, Mitelman F: Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Hum Genet* 1982 ; 62 : 305—309.
 25. Morgan WF, Crossen DF: The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1977 ; 42 : 305—312.
 26. Hollander DH, Tockman MS, Liang YM, Borgaoka DS, Frost JK: Sister chromatid exchanges in peripheral blood of cigarette smokers and in lung cancer patients and effect of chemotherapy. *Hum Genet* 1978 ; 44 : 165—171.
 27. Schneider EL, Kram D, Kakanishi Y, Monticone RE, Tice RR, Gilman BA, Nieder ML: The effect of aging on sister chromatid exchange. *Mech Ageing Dev* 1979 ; 9 : 303—301.
 28. De Arce MA: The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes growing in vitro. *Hum Genet* 1981 ; 57 : 83—85
 29. Goh K: Sister chromatid exchange in the ageing population. *J Med* 1981 ; 12 : 195—198.
 30. Funes-Cravioto F, Zapata-Gayon C, Lolmodin Hedman B, Lambert B, Lindsten J, Norberg E, Nordenskjold M, Olin R, Swensson A: Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers. *Lancet* 1977 ; 2 : 322—325.
 31. Ardito G, Lambertil L, Ansaldi E, Ponzetto P: Sister chromatid exchange in cigarette smoking human females and their newborns. *Mutat Res* 1980 ; 78 : 209—212.
 32. Atkin NB, Baker MC: Chromosome 1 in cervical carcinoma. *Lancet* 1977a ; 2 : 984.
 33. Kato H, Sandberg AA: Effects of Herpes simplex virus on sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in human diploid fibroblast. *Exp Cell Res* 1979 ; 109 : 423—427.