

위암세포의 염색체 변화*

계명대학교 의과대학 해부학교실

이 인 환 · 장 성 익

동국대학교 의과대학 해부학교실

함 덕 상

= Abstract =

Cytogenetic Findings in Stomach Cancer

Inn Hwan Lee, MD; Sung Ik Chang, MD

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

Douk Sang Ham, MD

*Department of Anatomy, Dongkuk University
School of Medicine, Kyungju, Korea*

Cytogenetic analysis was performed in 16 patients of stomach cancer with no therapy. Recognizable metaphases could be obtained from six patients after conventional preparation of chromosomes. Long-term cultures for 24 hours at 4°C gave more cell yields and better results than short-term cultures for 30 minutes to one hour at 37°C. Among six cases of stomach cancer, four cases were adenocarcinomas and two cases were malignant gastric ulcers by histopathological finding. The frequency of metaphase was low and chromosomes appeared over condensation with irregular margin in general. One case in chromosomal number was diploid and the others were hyperdiploid (mn: 48, 49). Chromosomal gains in C-group were found in all cases and 19 trisomy occurred in four cases.

There were no findings of specific chromosomal abnormalities such as ring chromosome or marker chromosome. It is considered that the 19 trisomy is correlated with stomach cancer, however, it is needed to study the relation between chromosomal aberration and solid tumors.

서 론

인체의 암은 정상세포에서 핵산을 이루고 있는 염

기의 국소변이(point mutation)에 의한 유전자 변이로 발생한다. 변이된 '유전자는 증폭(amplification)하여 전형(transformation)되며 이 과정이 되풀이되면서 염색체의 이상을 초래한다. 그러므로 네

* 이 논문은 1987년도 계명대학교 유종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

부분의 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 1960년 Nowell과 Hungerford가 만성백혈병 환자에서 제22번 염색체의 장완(long arm)이 소실된 Ph¹ 염색체를 발견하면서부터 암과 그 암의 독특한 염색체 변이의 상관관계를 연구하기 시작하였다. Casspersson 등 (1970)에 의하여 염색체 band법이 개발된 후 1973년 Rowley는 만성 백혈병에서 Ph¹ 염색체는 소실된 것으로 일려진 22번 염색체의 장완이 9번 염색체의 장완 원위결(distal segment of long arm)에 전좌(translocation)되어 있음을 보고하였다. [t(9:22) (q34:q11)]. 고형암의 경우 Wilm씨 종양은 11번 염색체의 단완(short arm)에 변이 [del(11) (p13)], 망막아종(retinoblastoma)에서는 13번 염색체의 장완에 변이 [del(13) (q14)], 신경아세포종(neuroblastoma)에서는 1번 염색체의 단완에 변이 [del(1)(p32 p36)] 등과 같이 종양 세포계(cell line)가 비교적 안정되어 암에 따른 특이한 염색체 변화 소견을 보이는 것이 있는 반면 방광암, 직장암, 자궁경부암에서 처럼 염색체가 불안정하여 어떤 변이가 일차적 염색체 변화 소견인지 규명되지 않은 것도 있다(Yunis, 1983). 이런 염색체 변이를 초래하는 가시부는 암유전자(oncogene)에서 기인한다고 알려져 있으며 Sandberg 등 (1987)은 c-myc 유전자나 c-abl 유전자 같이 직접적으로 염색체 변이를 일으키는 것도 있으나 염색체 변이가 일어난 band와 암유전자는 무관한 경우도 있어서 반드시 암유전자 단독으로 염색체 변이를 일으키지 않는다고 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 유전자의 증폭을 반영하는 것이고 이것은 암세포 핵형 변화의 딸기 생태이며 암세포가 항암제에 대해 내성을 지닌것을 반영한 것이라 하였다. 위암세포의 염색체 이상에 관한 연구는 1959년 Makino에 의해 처음 시도되었으며 그는 복수에 전이된 위암세포에서 mn(modal number)이 hyperdiploid (2n±)와 near tetraploid(4n±)인 염색체 양상을 보고하였다. 또한 Ishihara (1959), Tonamura (1959), Sasaki (1961) 등의 보고를 종합하면 SL(stem line)이 42~120 사이로 핵형이 다양하며 암이 진행될수록 diploid의 세포수는 감소하며 항암제를 사용하였

을 경우 염색체의 단절이 일어나는 빈도가 감소된다고 하였다.

저자는 한국의 남성암증에서 발생빈도가 가장 많은 위암세포의 이상을 조사하여 특정한 염색체 이상 부위가 있는지를 알므로써 어떤 암 유전자가 위암에 관련되어 있으며 또한 예후와는 어떤 관계가 있는지를 알기 위하여 생검으로 위암 조직을 물리적 및 효소처리하여 세포를 분리한 후 염색체를 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험재료 : 위암으로 진단된 치료 받지 않은 환자 16명(남자 11명, 여자 5명)을 대상으로 위 내시경을 통한 위암 조직을 생검하여 사용하였으며 환자의 연령분포는 남녀공히 41~84세로 광범위하였다(Table 1).

실험 방법

1) 단시간 trypsin 처리에 의한 방법

생검한 암조직을 해부현미경하에서 과사한 조직과 혈괴를 잘라내고 PBS(-)로 수세한 다음 laminar hood 내에서 절편이 1mm³ 이하로 되게 잘게 썰었다. 다시 35mm petri dish에 암조직을 200mg 당 0.1% trypsin(pH 7.5) 50ml를 첨가하여 37°C 교반 배양기(shaking incubator)에서 30~60분간 배양하였다. 교반후 부유액을 금속채(120 mesh)로 여과시킨후 원심분리(800rpm, 8분)하여 trypsin을 제거하고 RPMI 1640배지에 colcemid (5μg/ml)를 첨가하여 3시간 배양후 저장액(hypotonic sol)과 고정과정을 거쳐 핵형을 분리하였다.

2) 장시간 trypsin 처리에 의한 방법

생검 조직을 상기와 같이 전처리하고 0.1% trypsin 50ml에 조직 200mg 넣어 4°C 하에서 24시간 배양하였다. 배양후 trypsin을 제거하고 RPMI 배지에 colcemid와 함께 3시간 배양하여 핵형을 분리하였다.

성적

위암으로 진단된 16명의 환자로부터 위암 조직을 생검으로 채취하여 암세포를 물리적 및 효소처리한 결과 6례(남자: 5, 여자: 1)에서 염색체 핵형을 분리할 수 있었다(Table 1). 염색체의 전체적 율박은 짙게 농축되어 있었으며 염색체 주위부가 불분명하였다(Fig 1).

효소 처리를 저온(4°C)에서 장시간(24시간) 고

온(37°C)에서 단시간(1시간)하는 두가지 방법을 병행한 결과 저온에서 장시간 처리하는 편이 더 많은 세포를 얻을수 있었으나(Table 2) 염색체 분리의 빈도는 차이가 없었다. 염색체의 구조적 변화 및 표지 염색체(marker chromosome)는 발견할 수 없었고 모두 숫적 변화를 초래하여 diploid 및 hyperdiploid(mn: 48, 49)였다. 모든 경우에서 C군

염색체의 수가 늘어났으며 그중 1례를 제외하고 모두 2개씩 증가 하였다(Table 3, 4).

또 4례에서 19번 염색체가 trisomy 였다. 염색체 소실의 정도는 다양하며 2번, D군 13번, 16번 염색체등에서 소실이 있었다. 그밖에, 성 염색체의 숫적 및 구조적 변화는 발견할 수 없었다.

고 찰

인체는 10¹³개의 세포로 구성되어 있으며 하루에도 수십억개의 세포들이 분열되어 대체되고 있다. 이들 세포중 extra doubling 이나 불충분한 분열이 일어나므로써 혼란을 초래하기도 한다. Klein 과 Klein (1985)은 이러한 혼란이 핵산의 변이(mutation) 때문에 일어나며 암이란 2개내지 7개의 유전

Table 1. Age distribution

	Male	Female	Total
41-50	1(1)	0	1(1)
51-60	5(2)	3(1)	8(3)
61-70	4(2)	1	5(2)
71-80	1	1	2

(): number of successful karyotyping.

Table 2. Comparison of the frequency of metaphases suitable for chromosome obtained with long and short term enzymatic disaggregation procedures.

case no.	long term trypsinization		short term trypsinization	
	cell yield X 10 ⁶	frequency(%) of metaphase	cell yield X 10 ⁶	frequency(%) of metaphase
1	5.5	3.4	4.7	3.2
2	4.6	2.1	3.0	2.0
3	5.2	3.0	2.8	2.8
4	4.2	1.8	4.0	0.9
5	2.1	0.8	1.2	1.2
6	1.8	1.2	1.3	1.3

Table 3. Cytogenetic results of 6 stomach ca. disaggregated by the enzymatic method:

case no.	no. of cell examined	chromosomal gain	chromosomal loss
1	32	C	2
2	33	2C, 19	D
3	25	2C, 19	13
4	27	2C, 19	-
5	21	13, 2C	-
6	10	3, 2C, 19	16

Table 4. Chromosomal abnormalities and pathologic findings from endoscopic biopsies of stomach.

case no.	karyotype	pathologic finding
1	46, XY, -2, +C	adenocarcinoma
2	48, XY, +2C, -D, +9	adenocarcinoma
3	48, XY, +2C, -13, +19	adenocarcinoma
4	49, XX, +2C, +19	adenocarcinoma
5	49, XY, +B, +2C	malignant gastric ulcer
6	49, XY, +3, +2C, -16, +19	malignant gastric ulcer

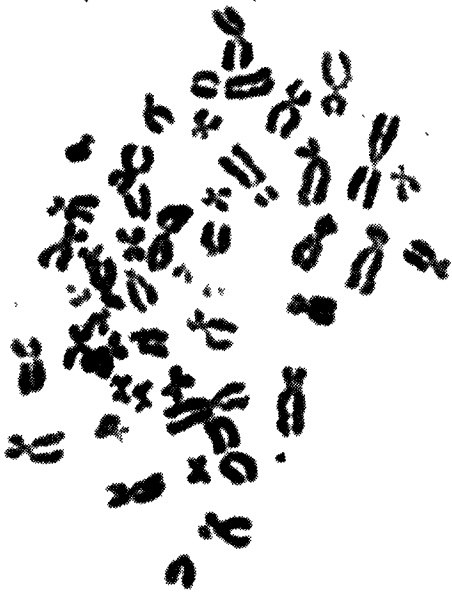


Fig.1. One example of overcontracted and indistinct outline chromosome in stomach cancer cell.

자의 변이로 초래된다고 보고하였다. 또한 Fialkow (1974)는 여자의 경우 활동성 X 염색체가 부계 혹은 모계로부터의 X 염색체가 섞여 있는 X mosaic 모델을 사용하여 암조직은 단일 세포에서 기원함을 증명하였다. 유전자의 변이는 증폭작용을 통하여 표현되며 염색체상에는 주로 전좌나 HSRs 혹은 DMs로 나타난다. 증폭된 유전자와 암과의 상관관계는 증폭된 c-myc 일 경우 전골수성 백혈병(promyelocytic leukemia) 혹은 소세포 폐암(small cell lung cancer)과 관계가 있고 N-myc 일 경우 원발성 신경아세포종(primary neuroblastoma) 혹은 망막아종(retinoblastoma), c-myc 일 경우 급성 골수성 백혈병, N-ras 일 경우 유방암, c-erb 일 경우 상피양 암등이 알려져 있다(Varmus, 1984). 이를 유발시키는 인자 검출은 20세기 초엽부터 시작되어 바이러스, 화학물질, 방사선, 그밖에 많은 환경 인자들이 보고되어 있다. 특히 바이러스는 유전자 변이외에도 바이러스 자체 유전자가 세포내에서 표현되어 암을 유발할 수 있다 하였고 이렇게 된 세포들은 유전자 증폭작용 외에 핵융합을 잘 일으켜 염색체 수의 많은 변화를 초래한다 하였다(Craig와 Sager, 1985). 뚜렷이 밝혀지지 않은 환경적 인자로는 지역에 따른 암의 발생빈도 차이로 설명하고

있다. 즉 폐암의 경우 영국에서 가장 빈도가 높고 나이지리아에서 가장 낮으며 위암은 일본에서 높고 우간다에서 낮으며 간암일 경우 모잠비크에서 높고 노르웨이에서 낮다는 등의 보고가 있다(Doll, 1977). 위암은 고행암으로서 분열지수가 낮아 염색체 분리 등이 어려우므로 연구 보고가 많이 없다. 위암 세포 염색체의 연구는 Makino (1959)가 복수에 전이된 암세포의 핵형을 분리한 것이 최초로 hyperdiploid ($2n \pm$) 및 near tetraploid ($4n \pm$)를 보고 하였고 그의 Ishihara (1959)는 암의 진행과 함께 연속적으로 세포를 검출한 결과 암의 진행함에 따라 극단적인 hyperdiploid가 감소됨을 발견하였고 Tonomura (1960)는 항암 화학 치료를 하였을 경우 이와 유사한 결과를 얻었다. 암의 말기로 갈수록 염색체가 diploid에 가까운 hyperdiploid로 이행되며 이 상태가 안정된 핵형이라 하였다.

C군 염색체 증가에 따른 전례로는 D군 및 G군 염색체의 중심체 융합이라 설명되고 있다(Sandberg, 1968). 그러나 전이된 복수일 경우 E군 염색체가 증가하며(Dalapiccca와 Tataranni, 1969), Granberg 등 (1973)은 3번, 7번, 8번 염색체의 trisomy와 $1q^-$, $4q^-$ 등을 보고하고 있다.

본 실험에서 C군의 염색체 증가는 그 기원을 추적하기 어려우나 D군 혹은 G군의 염색체의 중심체 융합이 아닌가 생각되나 앞으로 계속적인 연구가 필요할 것 같다. 특이한 소견은 19번 염색체의 trisomy가 나타났는데 아직까지 19번 염색체에서 암유전자가 발표된 것이 없기 때문에 위암과 암유전자와의 상관관계를 설명하기에는 아직 곤란하며 역시 앞으로 더 연구가 되어야 할 문제이다.

요 약

16명의 위암 환자로부터 암조직을 생검하여 물리적 및 효소처리한 후 암세포를 배양한 결과 핵형 분리에 성공한 6명에 대한 염색체 조사 결과를 요약하면 다음과 같다. 전체적으로 핵형출현율은 낮았으며 염색체는 많이 농축되어 있었으며 염색체 모양이 불분명하였다. 세포분리 과정에서 저온에서 장시간 trypsin을 처리한 군이 고온에서 단시간 처리한 군 보다 세포수를 더 많이 얻을수 있었다.

염색체이상의 소견으로서는 전체적으로 C군의 염색체에서 증가 되었으며 4명의 환자에서 19번 염색체에서 trisomy가 나타났다. 그 밖에 환 염색체(ring chromosome)나 표지 염색체(marker chro-

mosome)의 출현은 없었으며 성염색체에서도 아무런 변화가 없었다. 이상의 소견으로 미루어보아 제 19번 염색체와 위암과 어떤 상관관계가 있을 것으로 생각되나 앞으로 더 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Alitalo K, Schwab M, Lin CC, et al: Homogeneously 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 chromosomes. *Exp Cell Res* 1970 ; 61 : 474-475.
- Craig R, Sager R: Suppression oftumorigenicity in hybrids of normal and oncogene transformed CHEF cells. *Proc Natl Acad Sci* 1985 ; 82 : 2062-2066.
- Dallapiccola B, Tataranni G: modello di evoluzione lonale del cariotipo in versamento pleurico neoplastico. *Arch Ital Pathol Clin Tumori* 1969 ; 12 : 3-21.
- Doll R: Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 1977 ; 265 : 589-596.
- Ferti-Passantonopoulou AD, Panani AD, Viachos JD, Raptis SA: Common cytogenetic findings in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1987 ; 24 : 63-73.
- Fialkow PJ: The origin and development of human tumors studied with cell markers. *N Engl J Med* 1974 ; 291 : 26-35.
- Granberg I, Gupta S, Zech L: Chromosome analyses of a metastatic gastric carcinoma including quinacrine fluorescence. *Hereditas* 1973 ; 75 : 189-194.
- Ishihara T: Cytologic studies of tumors. XXXI. chromosome study in a human gastric carcinoma. *Gann* 1959 ; 50 : 403-408.
- Klein G, Klein E: Evolution of tumors and the input of molecular oncology. *Nature* 1985 ; 315 : 190-195.
- Linzer HID, Nathans D: Growth related changes in spcific mRNAs of cultured mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 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.
- Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosomal in human granulocytic leukemia. *Science* 1960 ; 132 : 1497-1451.
- Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality 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* 1968 ; 21 : 77-82.
- Sandberg AA, Turc-Carel C: The cytogenetics of solid tumors. Relation to diagnosis, classification and pathology. *Cancer* 1987 ; 59 : 387-395.
- 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.
- 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.