

# CGH 방법에 의한 자궁경부암의 암유전자 변이 검색

울산의대 서울중앙병원 산부인과학교실

김영탁 · 이상범 · 지관자 · 김종혁 · 김용만 · 목정은 · 남주현

=Abstract=

## The Identification of Genetic Alteration in Cervical Cancer by Comparative Genomic Hybridization(CGH)

Young-Tak Kim, Sang-Beom Lee, Kowan-Ja Jee, Jong-Hyeok Kim,

Yong-Man Kim, Jung-Eun Mok, Joo-Hyun Nam

*Department of Obstetrics & Gynecology, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Medical Center,  
Seoul, Korea*

Until recently, cytogenetic studies failed to identify any landmark chromosomal aberrations associated with cervical carcinomas. Recent comparative genome hybridization(CGH) studies have, however, demonstrated that one of the most consistent chromosomal abnormality that marks the transition of carcinoma in situ (CIS) of the cervix to invasive carcinoma is the gain of specific chromosome 3q sequences. Although HPV infection has been demonstrated to be a most important initiating event in the development of most cervical cancers, other additional genetic events are also required for eventual development or progression of invasive cancer.

The genetic alterations in cervical cancer were investigated by CGH method using fresh frozen specimens. CGH is based on two-color in situ hybridization where genomic tumor DNA is labeled with fluorochrome (FITC) and a normal reference genome is labeled with fluorochrome (Rhodamine) by nick translation. Following co-hybridization of the differentially labeled genomes to normal reference metaphase chromosomes, Computer Assisted Image Analyzer interprets multicolor fluorescence. The volumetric change in the dual color is typically detected as gain or loss of the DNA sequences in specific region of chromosome.

In this study, the pattern of chromosomal aberrations in cervical cancer was not similar to that reported previously by other authors. Overall chromosomal aberration was observed in 46.2%(12/26 cases). The gain of chromosome 5, 11q, 15q, and 17q was most frequent. In deletion, 1q loss was most frequent. There was some cell to cell variability of CGH results in a same tumor sample. The results await careful interpretation and there are several possible reasons of such difference. First reason is a possibility of racial difference in the pattern of chromosomal alteration necessary for cervical carcinogenesis and second one is a possibility of faulty analysis by either improper standardization of computer software or heterogeneity of specimen due to normal cell contamination. However, from the finding that there was no chromosomal aberration in all myometria used for normal control, threshold of normal fluorescence profile in our CGH seems to be reliable.

The genetic studies on cervical cancer by this CGH technique should provide new insights into the molecular pathogenesis of lower genital tract cancer and allow for more logical and targeted approach to the cervical cancer management.

**Key Words:** 내용

## I. 서 론

보건복지부 한국인 암등록 조사자료에 의하면 자궁경부암은 전체 여성 암의 23%를 차지하여 아직도 우리 나라 여성에서 발생하는 암 중 가장 높은 발생률을 보이고 있다.<sup>1)</sup> 일반적으로 암화(carcinogenesis)는 다수의 유전자 변이의 축적에 의한 것으로 인식되고 있으며, 종양의 진행 과정에 따른 조직형태학적 변화와 이와 연관된 유전자의 DNA 염기 서열의 변화는 대장암에서 구체적으로 규명되어 있다.<sup>2)</sup> 자궁경부암에서는 발생 초기의 인유두종 바이러스(human papilloma virus :이하 HPV로 줄임) 감염이 가장 중요한 요인으로 밝혀져 있지만 그 밖의 염색체 이상이나 유전자 변이에 대해서는 아직 일정하게 연구된 것이 없는 실정이다. HPV의 감염은 자궁경부 상피세포의 변형에 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었으며 침윤암의 90% 이상에서 감염이 확인되어 발암 과정에서 중요한 초기 인자로 인식되고 있다.<sup>3,4)</sup> 그러나 HPV에 감염되었다 할지라도 대부분의 경우에서는 암으로 진행하지 않으며 암 발생 시에도 처음 감염 시점과 침윤암이 확인되는 시점 사이에는 상당히 긴 잠복 기간이 있다는 역학적 현상들에서 HPV 감염만이 자궁경부암 발생에 있어 필요는 하지만 충분한 조건은 되지 못한다는 사실을 알 수 있다. 즉, 대장암에서와 같이 자궁경부암의 경우에도 어떤 다른 유전자적 변화가 필히 동반되어야 함을 추정할 수 있다. 이와 더불어 최근까지의 암화의 개념은 세포의 불안정한 유전자 상태에 의해 일련의 유전자 변이가 초래되며, 이 유전자 변이가 정상적인 세포의 조절, 억제 기능을 방해하여 발생한다는 것이다.

자궁경부암과 관련된 중요 염색체 이상은 이미 20여년 전부터 알려졌음에도 불구하고 특정 DNA 염기서열의 변화 또는 암의 진행 상태에 따른 염색

체의 이상 등은 명확히 규명되지 않고 있다. 이는 일반적으로 고형암에서 종양 세포의 배양이 어렵고 염색체의 이상이 매우 복잡하여 그 분석이 어려우며 미세한 크기의 염색체 변화를 찾아내기 어려운 점 등이 그 가장 큰 요인이라고 볼 수 있다.

염색체의 일정한 부위의 증폭이나 손실을 검색하기 위한 세포유전학적 연구 방법 중 G-banding 방법은 염색체 이상을 모두 해석하기에는 낮은 민감도 및 특이도의 문제점이 있다.

최근 분자유전학적 방법의 발달에도 불구하고 혈액 종양을 제외한 고형성 종양에서의 세포유전학적 이상에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.<sup>5,6)</sup> 종양 세포의 세포유전학적 검사에서 염색체의 증가(gain)된 부위가 발견되면 그 위치에 종양유전자가 존재할 가능성이 크며,<sup>7)</sup> 소실(loss)된 부위가 발견되면 종양 억제 유전자가 존재할 가능성이 있음을 추정할 수 있다.<sup>8)</sup>

Kallioniemi 등에 의해 1992년 처음 소개된 comparative genomic hybridization(CGH) 기법은 정상 조직에 대한 상대적인 DNA copy-number 변화를 식별함으로써 전체 게놈(genome)을 분석할 수 있는 아주 유용한 분자세포유전학적 도구이며<sup>9)</sup> 현재 게놈 분석 기법들 중에서 가장 인기있는 방법으로 쓰여지고 있다. CGH 기법의 가장 큰 장점은 기존의 세포유전학 분석 방법에서 필수적인 복잡한 세포배양이 필요치 않으며 파라핀 포매 조직을 포함한 어떠한 검체에서도 분석이 가능하고 검색 방법이 빠르고 단순한 데 있다. CGH 기법을 통한 종양의 염색체 이상의 분석은 주로 혈액종양과 일부의 고형암에서 시도되어 왔으나 연구 결과가 아직 미약하고 국내에서 특히 부인암 영역에서는 아직 시도된 바 없는 새로운 분야이다. 따라서 본 연구는 부인과적 고형종양에 있어서의 CGH 기법의 적용 가능성을 확인하고, 이 기법을 통하여 침윤성 자궁경부암과 연관된 염색체의 이상을 조사하고자 시행되었다.

## II. 연구 대상 및 방법

### 1. 조직의 선택

1997년 1월부터 1998년 7월 사이에 울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과를 내원하여 자궁 경부암 병기 Ib-IIa 진단 하에 근치적 자궁절제술 및 골반임파절 절제술을 시행받은 환자 26명을 대상으로 하였다. 검체 조직은 적출된 자궁 경부에서 피사 부위나 염증 반응이 심한 부위를 제외하고 암세포가 잘 분포된 곳에서 채취하였으며 채취된 조직은 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관 하였다. 이와 함께 암조직 실험의 정상 대조군으로서 각예에서 정상 자궁 근 조직을 채취하여 동일한 방법으로 냉동 보관하였다.

### 2. DNA 추출

종양 조직과 정상 조직에서 각각 genomic DNA를 분리하는 과정으로써 종양 조직은 피사나 염증이 가장 적고 H & E 염색상 종양 세포가 최소한 80% 이상을 차지하는 부위를 선택하였다. 정상 DNA는 염색체 이상이 없는 건강한 남성의 말초혈액 임파구에서 채취하였다. DNA 추출은 DNA isolation kit (Becton Dickinson, USA)를 이용, phenol-chloroform 침전법으로 추출하고 추출된 DNA는 10% agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

### 3. 정상 중기(metaphase) 슬라이드 준비

교잡반응(hybridization)을 위한 target으로 정상적인 중기 상태의 세포를 도말한 슬라이드를 준비하는 과정이다. 정상 중기상태 target 슬라이드는 표준적인 세포유전학 슬라이드 준비 과정으로 만들어져 사용된다. 이때에는 phytohemagglutinin(PHA)으로 자극된 임파구를 48~72시간 동안 배양하고 여기에 thymidine을 첨가하여 세포를 synchronize 시켜 사용한다. 염색체의 길이는 400~500 band 정도로 하고 임파구는 정상의 남성 공여자(male donor)로 부터 채취된 것으로 한다. 중기 상태의 도말 세포 슬라이드 준비 과정은 다음과 같았다.

a. 정상 남성 공여자의 말초 혈액 2-3ml를 heparin 처리하여 채취한 후 통상의 염색체 배양 법으로 배양한다. Heparin 처리된 말초 혈액을 멸균 시험관에

옮기고, 실온에서 약 1~2시간 방치 후, buffy coat 부분 1ml를 미리 준비한 배양액(5% FBS 첨가 RPMI-1640) 5ml에서 부유시켜 PHA 0.1ml를 첨가하고,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 72시간 배양한다.

b. 72시간 동안  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양한 후 colcemid(Gibco) 처리하여 harvest한다. 배양 용기를 꺼내어, 800~1000rpm에서 5분간 원심 분리 후 상층액을 제거한다. 상기 침사에 0.075 M KCl을 4ml 첨가한 후, 침사가 균일하게 되도록 capillary에서 교반하고,  $37^{\circ}\text{C}$  항온조에서 20~25분간 저장 처리를 한다.

c. Hypotonic solution(0.075M KCl)으로 1시간 처리후 원심 분리하여 cell pellet을 모은 후 Carnoy's solution(acetic acid: methanol=1:3)으로 3회 반복 고정하여 냉동 보관한다.

d. 특수 처리된 슬라이드 위에 세포를 잘 펴서 분산시키고 실온에서 공기건조 시킨다.

e. 만들어진 슬라이드는  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 필요시 실온화시켜 사용한다.

### 4. DNA nick translation

Nick translation kits (Becton Dickinson, USA), FITC-14-dUTP (tumor DNA), Rhodamin-11-dUTP (normal DNA)를 이용하여 genomic DNA를 labeling시키는 과정이다. Eppendorf tube 내에 적당량의 DNA sample을 넣고 0.1mM dTTP, 0.1mM dNTP mixture, 10X nick translation buffer와 nick enzyme을 넣은 후 5% dextrose water로 총 volume이  $50\mu\text{l}$ 되게 tumor DNA와 control DNA를 각각 labeling한다. 충분히 nick시키고 labeling 되게 하기 위하여  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 적어도 3시간 이상 방치하며 이어서  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 옮김으로써 labeling을 정지시킨다.

### 5. 교잡반응 및 측정

대조군 : 양성 및 음성 대조군들은 CGH data의 해석과 교잡 반응 양상을 비교하기 위하여 제공된다. 음성 대조군으로는 test DNA와 reference DNA 모두를 정상 DNA로 사용하였고 이 실험에서 CGH intensity profile은 image analysis 했을 때 모두 threshold 내의 범위에 들어있었다. 양성 대조군으로는 CGH 분석에 의해 쉽게 분석되는 염색체 이상을 가진 cell line으로부터 분리된 DNA를 test DNA로

사용하였다.

Probe mixture의 준비 : Nick translation에 의해 green과 red로 labeling된 DNA의 signal intensity의 equivalent를 교잡하는 과정으로 다음과 같다. 1.5ml microtube 2개에 10  $\mu$ l (200ng)의 nick translated labeled test DNA(spectrum green), 1  $\mu$ l (100ng)의 total genomic reference DNA(spectrum red)를 각각 넣는다. 각각의 tube에 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g)의 human cot-1 DNA을 넣고 3M sodium acetate 2.1  $\mu$ l (0.1 volume)와 100% ethanol 52.5  $\mu$ l (2.5 volume)를 첨가하여 DNA를 침전시킨 후 간단히 vortex하고 15분간 dry ice에 방치한다. 이 후 12,000rpm 으로 30분간 4℃에서 원심분리하여 DNA를 침전 시키고 상층액을 제거한 뒤 vacuum으로 10~15분 pellet을 건조시킨다. 3  $\mu$ l의 purified H<sub>2</sub>O를 pellet에 resuspend시키고 7  $\mu$ l의 CGH hybridization buffer를 가한 후 heating(73℃, 5분, waterbath)으로 probe를 denature시킨다.

Probe mixture와 target 슬라이드와의 교잡 : Probe mixture를 만드는 동안 target 슬라이드도 함께 denature 시켜야 한다. Diamond pencil로 슬라이드 위에 교잡 반응 위치를 표시한 후 formamide가 첨가된 denature solution을 73±1℃로 정확히 맞추고 만들어진 슬라이드를 5분간 방치한다. 70%, 80%, 100% ethanol을 1분씩 거치면서 슬라이드를 탈수시킨다. Paper towel로 슬라이드의 뒷부분을 닦고 바닥 끝으로부터 blotting함으로써 touching에 의해 슬라이드를 건조시킨다. 45~50℃ 슬라이드 warmer에 슬라이드를 올려놓고 남아있는 ethanol을 완전히 없앤다. 10  $\mu$ l의 혼합된 denature probe를 슬라이드에 올려놓고 즉시 cover slip을 덮고 rubber cement로 봉한다. 봉하여진 슬라이드를 humidify box에 넣어 37℃ incubator에서 48~72시간 동안 교잡 반응시킨다.

슬라이드 세척 : 0.4 X SSC / 0.3% NP - 40과 2 X SSC / 0.1% NP - 40을 wash tank에 준비하여 적어도 30분간 74±1℃에 둔다. 슬라이드로 부터 cover slip을 제거하는 즉시 1번 세척 tank에 넣어 1~3초 흔든다. 한 번 더 1~3초간 흔든 후 2분간 세워둔다. 2번 세척 tank로 옮기고 1~3초 흔든 후 1분 정도 슬라이드를 세워둔 다음 어두운 곳에서 공기 건조한다. Anti-fade가 포함된 4',6'-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 분별 염색한 후 coverglass를 덮고 형광현미경하에서 관찰한다.

## 6. 형광 현미경 관찰 및 CGH 영상의 양적 분석

DAPI 염색 상에서 각 염색체를 확인하는데 적어도 하나의 슬라이드당 12~15개의 중기 상태의 염색체가 분석되었다. DAPI, FITC, rhodamin을 판정하는 blue, green, red color 각각의 filter가 동시에 부착되어 있는 epifluorescence가 갖추어진 CCD 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하고 영상을 포착하였다.

형광 분석을 위하여 Multicolor Fluorescence Computer Assisted Image Analyser (PSI, England)가 사용되었으며 2가지 서로 다른 형광 색(red/green)의 ratio가 computer software를 이용, 양적으로 분석되었다.

분석은 12~15개의 각 염색체의 평균 profile ratio를 기준으로 하였으며 염색체의 증가나 소실은 평균 red/green ratio 0.80~1.20 사이를 정상 역치(normal threshold)로 설정하여 0.80 이하이면 소실로 1.20 이상이면 증가로 해석하였다.(Fig. 1)(Fig. 2)

## III. 결과

### 1. 환자들의 임상적 특성

연구 대상 26예 중 2예는 조직학적으로 선암이었으며, 24예는 편평상피세포암이었다. 이들의 연령 범위는 29~67세까지였고(평균 연령; 49.6세) 평균 출산력은 3.1이었다. FIGO 병기는 Ib가 16예, IIa가 10예이었으며, 26예 모두는 Rutledge Type III의 근치적 자궁절제술 및 골반 임파절 절제술, 부대동맥 임파절 생검을 시행 받았으며 위험인자에 따라 수술 후 보조 치료가 시행되었다.(Table 1)

### 2. CGH 결과

정상 자궁 근 조직에서는 DNA copy number의 이상이 전혀 발견되지 않았다. 이와 대조적으로 본 연구에 포함된 총 26예의 암조직 표본 중 12예에서 염색체 상에서의 DNA copy number의 증가 혹은 소실이 확인되었다(Table 1, Table 2, Fig. 2). FIGO 병기에 따른 염색체 이상의 발현은 IB기의 경우에 총 16예 중 8예(50.0%)에서 나타났으며 IIa기의 경우에는 총 10예 중 4예(40.0%)에서 나타났다(Table 2). 염색체 변이의 양상은 5번(2예), 11q(2예), 15q(2예) 및

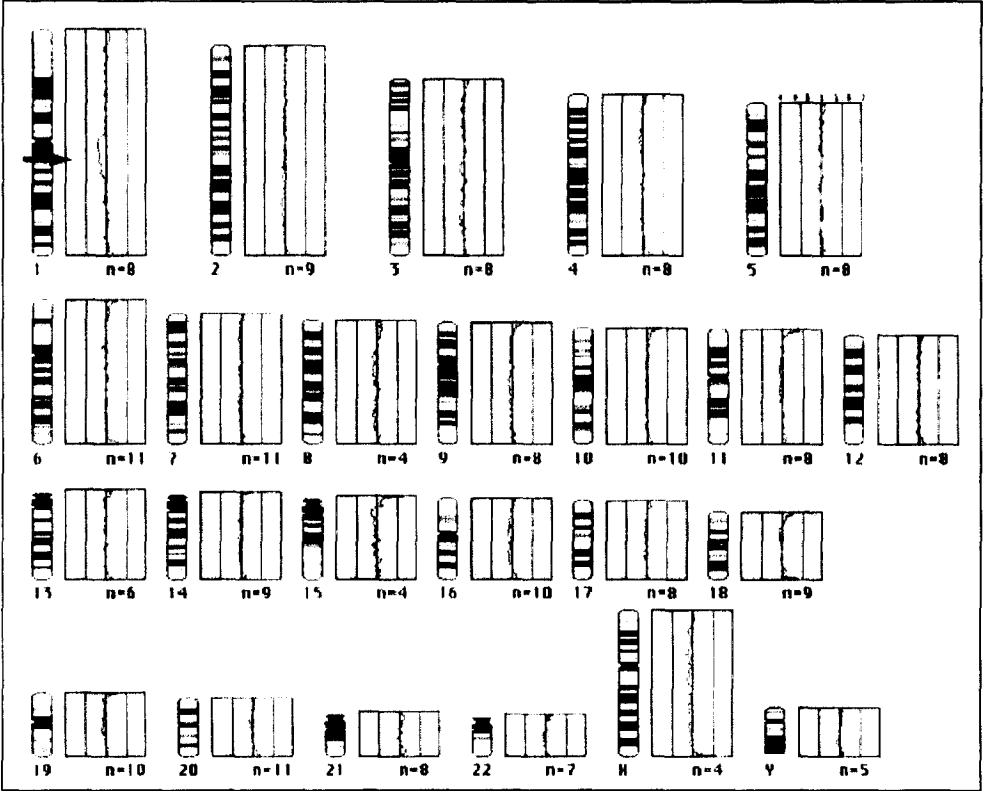


Fig 1. An example of an average FITC / Rhodamine ratio profile. The vertical lines on the right side of idiograms reflect different values of the fluorescence ratio between the tumor and normal DNA. The arrow indicates loss of subregion on chromosome 1q

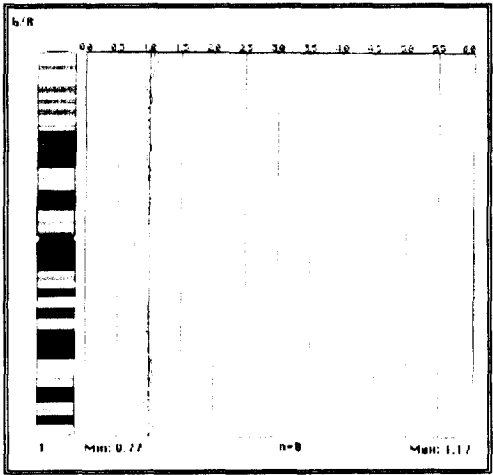


Fig 2. Fluorescence intensity ratio profile of chromosome 1 (tumor DNA : normal DNA). The shift of the mean ratio of 1q region to left represents loss of subregion of 1q in tumor

17q(2예)에서 DNA copy number의 증가가 확인되었으며 DNA copy number의 소실이 확인된 부위는 1q(2예), 8q(1예), 9q(1예), 16q(1예), 17q(1예), 19이었다.(Table 3)

#### IV. 고찰

악성 종양에서는 염색체의 이상이 흔히 관찰되는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들을 인지하기 위하여 이용되는 기존의 세포유전학적 검사에서는 살아 있는 종양 세포를 이용하여야 하고 시간이 많이 소요되며 많은 수의 세포를 한번에 검사하기 어려운 점 등이 단점으로 지적되어 왔다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위한 노력의 일환으로 FISH를 포함한 in situ hybridization 방법이 개발되었다. In

Table 1. Patients characteristics and CGH results

Case	Age	Stage	Cell type	CGH
1	42	Ib	squamous cell carcinoma	17q-
2	59	Ib	squamous cell carcinoma	normal
3	42	Ib	squamous cell carcinoma	normal
4	53	Ila	squamous cell carcinoma	normal
5	46	Ib	squamous cell carcinoma	1q-
6	65	Ib	squamous cell carcinoma	normal
7	67	Ila	squamous cell carcinoma	normal
8	42	Ib	squamous cell carcinoma	15q+
9	55	Ib	squamous cell carcinoma	normal
10	30	Ila	squamous cell carcinoma	normal
11	37	Ib	adenocarcinoma	normal
12	48	Ib	adenocarcinoma	normal
13	50	Ila	squamous cell carcinoma	normal
14	52	Ib	squamous cell carcinoma	-19
15	67	Ila	squamous cell carcinoma	16q-
16	29	Ib	squamous cell carcinoma	8q-
17	40	Ib	squamous cell carcinoma	normal
18	50	Ila	squamous cell carcinoma	normal
19	54	Ila	squamous cell carcinoma	normal
20	56	Ib	squamous cell carcinoma	normal
21	49	Ila	squamous cell carcinoma	+5, 11q+
22	66	Ib	squamous cell carcinoma	+5, 17q+
23	58	Ila	squamous cell carcinoma	17q+, 11q+
24	45	Ila	squamous cell carcinoma	9q-
25	46	Ib	squamous cell carcinoma	1q-
26	42	Ib	squamous cell carcinoma	15q+

Table 2. Number of cases with chromosomal alteration according to FIGO stage

FIGO stage	No. of Cases	No. of chromosomal alteration(%)	
		cancer	normal tissue
IB	16	8(50.0)	0(0.0)
IIA	10	4(40.0)	0(0.0)

situ hybridization은 viral DNA 염기 서열의 조직 내 위치, mRNA의 발현 측정 및 gene mapping에도 사용되고 있으며 최근 그 활용 영역이 점차 확대되고 있다.<sup>10-12)</sup>

염색체 이상의 발견을 위한 in situ hybridization 기법은 세포 내의 특정 염색체의 DNA 순서의 발견, 지정 및 정량화 하는 방법을 가능하게 하였다. 이전에는 목표된 특정 염기의 순서를 인지하는데 있어 방사성 표식자 및 자기방사기록법(autoradiography)

Table 3. Number of cases with gain or loss of DNA copy number

	Chromosomal aberration	No. of cases
Gain	5	2
	11q	2
	15q	2
	17q	2
Loss	1q	2
	8q	1
	9q	1
	16q	1
	17q	1
	19	1

의 사용이 필수적이었으나 최근에는 각종 비방사성 표식자를 이용한 방법이 개발되었으며 이를 통하여 세포 분열 중기 시 수 천개 정도만의 염기 결손도

인지가 가능하게 되었다.<sup>14-18)</sup> 즉, 형광 물질에 의한 교잡 신호(hybrid signal)를 이용하면 microautoradiography보다 더 정밀한 해상도를 얻을 수 있으며<sup>19,20)</sup> 형광 물질을 이용한 in situ hybridization 방법과 정량적인 영상 분석을 통하여 DNA 염기 서열의 위치 결정, 공간 구획배치 및 정량화를 더욱 빠르게 시행할 수 있다.

CGH 기법은 “intensity double-labeling”의 개념<sup>20)</sup>에 근거하여 1992년 Kallioniemi 등에 의해 처음 개발되었고,<sup>9)</sup> genome 전체를 분석하는데 사용된 최초의 분자세포유전학적 도구로써 현재 genome scanning technique들 중에서 가장 인기 있는 방법으로 인식되고 있다. 이는 in situ hybridization 기법에 기초한 것으로 차별적으로 label된 test DNA(green)와 reference DNA(red)를 정상 of 증기 염색체에 co-hybridization시킨 후 green과 red 형광 물질 광원의 강도 차이로 test와 reference genome 간의 copy-number 차이를 컴퓨터의 분석으로 식별하는 방법이다. DNA의 증폭은 형광 비율의 증가로, 손실은 감소로 발현되게 된다.<sup>9,21)</sup> 본 연구에서는 두 가지 색깔의 형광 물질을 사용하였으나 최근에는 probe를 서로 다른 여러 가지 fluorochrome을 이용하여 서로 다른 색을 띠게 한 후 각각에 맞는 filter를 사용하여 영상을 분석하는 방식으로까지 확대되고 있어 보다 복잡한 유전자의 증폭 과정을 확인할 수 있게 되었다.<sup>22)</sup> 사용되는 형광 물질로는 FITC(green), TR(red), rhodamine(red), AMAC(blue), spectrum orange, Cy3(red), Cy5(infrared), Cy7(infrared) 등이 있으며 이들을 조합하면 20여가지 이상의 서로 다른 probe를 만들 수 있다. 따라서 이러한 방법을 통하여 인간의 염색체 모도를 서로 다른 색으로 확인할 수 있게 하여 세포 유전학의 자동화에 응용하려는 시도가 있다.<sup>23)</sup> 궁극적으로 CGH는 DNA 염기의 copy number의 변이를 단 한번의 실험으로 확인할 수 있는 분자 세포학적 기법이라고 할 수 있다. 그러나 실제적으로 CGH는 매우 예민한 실험 과정이 얹혀있는 관계로 아직 많은 실험실에서 시작 단계에 불과하고 국내에서는 거의 이루어지지 않고 있다. 최근 몇몇 연구자들은 여러 시약의 상업적인 이용으로 교잡 과정의 효율성을 최대한 높이고, 보다 정밀한 영상 분석 시스템의 도입으로 CGH 기법을 좀 더 쉽고 신뢰할 수 있는 실험으로 정착시키고자 노력하고 있다.

CGH는 불균형적인 염색체 재배열을 진단하고 extrachromosomal material의 기원을 밝히는데 유용하여 발암 과정을 밝히는데 무엇보다 중요한 DNA copy-number 변화를 인지해내는 데 있어 그 적용이 확대되고 있다. 특히 종양 유전자와 약제 내성에 관련된 유전자는 DNA의 특정 염기 서열의 증폭에 의해서 조절된다고 알려져 있어 종양학 부문에서의 CGH 기법 응용은 중요한 요소를 차지할 것으로 기대된다. 이러한 염색체 상의 특정 부위 이상의 확인을 위해 기존의 PCR-based loss of heterozygosity (LOH) 검색은 유전자의 증폭과 소실이 신뢰성을 가지고 구분되지 않고 interstitial 또는 작은 결손은 marker가 결손된 부위에 위치하지 않아 놓치게 되는 단점이 있다. 한편 CGH의 단점은 결손 부위가 10Mb 이하인 경우나, 유사분열 시 재조합 (mitotic recombination)에 의하여 발생한 대립유전자의 소실 (allelic loss)이나 한 쪽 대립유전자는 소실되고 남은 대립유전자가 복제된 경우에 있어서 관련 부위의 소실이 발견되지 않는다는 데 있다. 즉, CGH image 분석에 있어서 10~20배 이상의 DNA copy number의 변화는 인지가 되지만 그보다 작은 결손이나 미세한 증가의 변화는 관찰되지 않는다.

지금까지의 CGH 연구는 주로 혈액종양 분야에 활발히 이루어져 왔으나 혈액 악성종양에서의 유전적 변화는 CGH에 의해 발견되지 않는 염색체 융합을 일으키는 balanced translocation의 경우가 많다. 반대로 unbalanced genomic rearrangement는 고형암에서 우세한데 이러한 사실에서 특별히 고형종양이 CGH 적용에 이상적인 대상이 될 수 있다. CGH로 고형 종양을 분석하는 것이 관심을 끄는 또 다른 이유는 다른 고식적인 방법에 의한 염색체 이상의 검색이 의외로 어렵다는 사실이다. 이는 종양 세포의 배양이 어렵고 증기 세포를 얻기 어려운 경우가 많으며 유전자의 불안정성과 clonal heterogeneity가 분석을 어렵게 하기 때문이다. 따라서 CGH는 세포의 배양 없이 정상적인 분열 증기 상태의 염색체 위에서 관찰할 수 있으므로 이런 점을 극복할 수 있다. 따라서 CGH는 유방암, 전립선암, 부신피질종양, 그리고 폐암 등 여러 종류의 고형 종양에서 유전적 변이를 발견할 수 있는 강력한 수단이며,<sup>24-28)</sup> 이들에서 CGH 방법을 사용하여 발견한 유전자 서열의 소실은 LOH 검색의 연구 결과와 일치

한다. 특히 유방암에서는 30개가 넘는 염색체 부위에서 특정 유전자의 증폭이나 소실이 보고 되었으며 이는 기존의 연구에서 밝혀진 종양 유전자들의 숫자보다 더 많다. 같은 조직학적 형태의 종양을 분석한 연구에서 얻은 몇몇의 CGH 결과를 종합하여 보면 일정한 유전적 이상이 일관되게 나타나고 있음을 발견할 수 있다. 예를 들어 유방암, 난소암, 전립선암, 신장암 및 방광암 등에서 1q, 3q, 8q의 염색체 부위가 증폭되고 8p, 13q, 16q, 17p 등의 부위가 소실되는 것이 흔하게 관찰되었다.<sup>24,25,29,30)</sup> 또한 드물지만 고환암에서의 12p, Xp의 증폭, 방광암에서 13q 증폭, 9q 소실, 신장암에서 14q 소실 및 난소암에서의 Xp 소실 등이 보고 되고 있다.<sup>29,30)</sup>

자궁경부암은 그 발생 초기에 HPV 감염이 가장 중요한 인자로 밝혀져 있기는 하나 그 밖의 염색체 이상이나 유전자 변이에 대해서는 아직 일정하게 연구된 것이 없는 실정이다. 이는 고형 종양에 있어서 기존의 분자유전학적 분석 방법이 갖는 한계에서 일부 기인한다고 볼 수도 있다. 따라서 자궁경부암의 연구에의 CGH의 적용은 폭넓은 분자생물학적 정보를 제공할 수 있을 것이다. 최근 Heselmeyer 등 (1996)이 상피내암(CIS)과 침윤성 자궁경부암을 대상으로 CGH를 적용한 연구를 시행하여 관심을 끌고 있다.<sup>31,32)</sup> 이들은 상피내암에서는 3q 염색체의 증가가 7.7%인데 비해 침윤성 자궁경부암에서는 90%에서 보여 3q 염색체의 특정한 부위의 증가가 침윤성 자궁암으로의 진행에 밀접한 관련을 가질 것으로 추정하였다. 또한 침윤성 자궁경부암에서 염색체 혹은 염색체의 일부분의 소실은 X, 3p, 4q, 6, 11, 13q 순으로 많이 발생한다고 하였다.

본 연구에서는 전체 침윤성 자궁경부암 26예 중 12예에서 CGH상 염색체의 증가와 소실이 확인되었다. 즉, 염색체 5번(2예), 11q(2예), 15q(2예) 및 17q(2예)에서 DNA copy number의 증가가 확인되었으며 염색체 1q(2예), 8q(1예), 9q(1예), 16q(1예), 17q(1예) 및 19번에서 소실이 확인되었다. 이상과 같이 본 연구의 CGH 결과는 이전의 보고되지 않은 유전적 변화가 산발적으로 발생함을 보여주고 있으며 다른 장기의 종양에서 흔히 관찰되는 염색체 변이인 13q와 17p의 이상은 발견되지 않았다. 13q에는 암억제 유전자인 retinoblastoma gene이 위치하고, 17p에는 역시 암억제 유전자인 p53이 위치한다. 따라서 본

연구에서 이러한 유전자의 이상이 CGH에서 거의 관찰되지 않은 것은 자궁경부암의 암화 과정은 HPV와 보다 밀접한 관련성이 있어 이러한 유전자 변이가 거의 발생하지 않았을 가능성이 있다. 그러나 현재까지 알려진 종양 유전자 및 종양 억제 유전자들 중 본 연구의 결과와 관련성이 있다고 추정할 수 있는 것으로는 Her-2/neu, fms, BRCA 1 및 NF-1 등이 라고 볼 수 있다. Her-2/neu는 17q에 위치하는 종양 유전자로 잘 알려져 있으며 본 연구에서는 17q에서의 DNA copy number의 증가가 총 2예에서 나타났다. fms 역시 종양 유전자로서 5q, 13q, 8p 등에 위치하는 것으로 잘 알려져 있으나 본 연구에서는 2예에서 5번 염색체에서의 DNA copy number의 증가가 관찰되었다. BRCA 1 혹은 NF-1은 종양 억제 유전자로서 그 위치가 17q이며 본 연구에서는 1예에서 17q에서의 DNA copy number의 소실이 확인되었다. 그러나 이러한 변화 양상이 서로 어떠한 연관성이 있는지를 밝혀내는 것은 앞으로의 과제라고 생각된다.

더불어 기존의 연구와 본 연구의 결과의 차이는 다음과 같은 몇 가지 측면에서 비롯될 수 있다고 추정할 수 있다. 그 첫째는 자궁경부암의 암화 과정에 관련된 염색체의 변이 양상이 인종에 따라 차이를 보일 수 있다는 가능성이며, 둘째는 정상 fluorescence profile의 threshold를 설정하고 분석하는데 있어서 아직 체계적으로 표준화된 computer software가 적용되지 못하고 있는 점이며, 셋째는 검체에 정상 세포가 과다하게 포함되어 분석상의 오류를 초래했을 가능성이 있다.

따라서 이러한 문제점들이 보완된 향후 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다. 특히 인종적 차이에 따라 암화 과정에 차이가 있을 수 있다는 가능성을 규명하기 위해서는 유전적인 양상 뿐 아니라 역학적 측면도 고려되어야 할 것이다. 그러나 본 연구에서 자궁경부암의 정상 대조군으로 사용된 정상 자궁 근 조직에서는 모두 정상 결과물을 나타내었으므로 설정한 역치(normal threshold)와 이의 분석은 적절하였다고 볼 수 있다. 본 연구에서 사용된 검체에 정상세포가 포함될 수 있는 문제점들을 해결하기 위해서는 미세 절제술(microdissection)에 의하여 보다 순수한 암세포를 얻어야 할 것이며 DOP(degenerate oligonucleotide primer)-PCR 기법 등을 이용



한 미세한 양의 세포에서 효과적으로 DNA를 분석할 수 있는 방법이 병용되어야 할 것으로 사료된다.

앞으로 보다 많은 예에서 연구가 지속된다면 자궁경부암에서 CGH 분석은 분자생물학적 암화 과정에 대한 이해를 깊게 하고 이를 토대로 임상적 응용에 있어서도 활용될 수 있는 가능성을 제시할 것으로 기대된다.

## V. 결론

1997년 1월부터 1998년 7월 사이에 침윤성 자궁경부암 병기 Ib, IIa 진단 하에 근치적 자궁절제술 시행 후 채취한 신선 자궁경부암 조직을 대상으로 염색체 변이를 확인하고자 CGH 연구를 시행하였다. 전체 검체에서 CGH 분석이 가능하였으며 검색 결과 전체 침윤성 자궁경부암 26예 중 12예(46.2%)에서 염색체의 증가와 소실이 확인되었다. 즉, 염색체 5번(2예), 11q(2예), 15q(2예) 및 17q(2예)에서 DNA copy number의 증가가 확인되었으며 염색체 1q(2예), 8q(1예), 9q(1예), 16q(1예), 17q(1예) 및 19번에서 소실이 확인되었다. 본 연구의 CGH 결과는 이전의 보고되지 않은 유전적 변화가 산발적으로 발생함을 보여주고 있으며 다른 장기의 종양에서 흔히 관찰되는 염색체 변이인 13q와 17p의 이상은 발견되지 않았다. 즉, 본 연구의 결과와 관련성이 있다고 추정할 수 있는 종양 유전자 및 종양 억제 유전자들로는 Her-2/neu, fms, BRCA 1 및 NF-1 등이 라고 볼 수 있으며 이들과 자궁경부암과의 보다 정확한 연관성은 앞으로 풀어나가야 할 과제일 것이다. 또한 염색체 변이의 발현 빈도에서도 일관된 특징을 보이지 않아 자궁경부암 발생에 연관된 유전자 이상은 인종간에 차이를 보일 수 있거나 기존의 몇몇 보고들과 달리 복잡한 양상을 갖을 가능성을 제시하였다. 그러나 동일한 검체에서 각 세포마다 염색체 변이가 서로 일치하지 않고 CGH 영상을 분석하는데 형광 강도의 ratio profile의 정상 기준치의 설정에 따라 다양한 결과를 보여 CGH 결과를 해석하는 신뢰성있는 computer software의 개발과 표준화가 추후 필요할 것으로 사료된다.

## - 참고문헌 -

1. 대한산부인과학회. 한국여성의 부인암등록사업조사 보고서 (1994.1.1-1994.12.31). 대한산부회지 1996;39:1215
2. Vogelstein B, Fearon FR, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244(4901):207-421.
3. Lorincz A, Reid R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr Opin Onol* 1989;1:123-9.
4. Lorincz A, Temple G, Kurman R. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1987;79:671-80.
5. Bruderlein S, van der bosch K, Schlae P, Schwah M. Cytogenetics and DNA implication in colorectal cancer. *Genes Chrom Cancer* 1990;2:63-70.
6. Saint-Ruf C, Gerbault Seureau M, Viegas-Pequignut F, Zaftant B, Cassingena R, Dutrillaux B. Proto-oncogene amplification and homogeneously staining regions in human breast carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 1990;2:18-26.
7. Kallioniemi O-P, Kallioiemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic Hybridization: A rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 1993;4:41-6.
8. Devilee P, van Vliet M, Van Sloun P, Kurpers-Dijkshoorn N, Her mans J, Pearwn pl, Cornelisse. Allelotype of human breast carcinoma : A second major site for loss of heterozygosity is on chromosome. *Oncogene*. 1991;6:1705-11.
9. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Cray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-921.
10. Coghlan JP, Aldred P, Haralmbidis J, et al. Hybridization histochemistry. *Analyt Biochem* 1985;149:1-28.
11. Hoefler H. In situ hybridization. A review. *Pathol Res Pract* 1987;182:421-30.
12. Matthews JA, Kricka LA. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Analyt Biochem* 1988;169:1-25.
13. Mitelman F. Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer. New York:Qiley-Liss. Inc. Pinkel D, Sandegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lueas J, Gray JW. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome. *Proc. Natl Acad Sei CSA*. 1988;85:9138-42.
14. Bhatt B, Burns J, Falnery D, et al. Direct visualization

- of single copy genes on banded chromosomes by non-isotopic in situ hybridization. *Nucleic Acids Res* 1998;16:3951-61.
15. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to a high specific activity. *Anal Biochem* 1984;137:266-7.
16. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2934-8.
17. Vernole P. Digoxigenin-labeled probes can detect single copy genes on human metaphase chromosomes. *Biotechniques* 1990;9:200-4.
18. Callan DE, Karim A, Zheng G, et al. Quantitation and mapping of integrated human papillomavirus on human metaphase chromosome using a fluorescence microscope imaging system. *Cytometry* 1992;13:453-61.
19. Litcher P, Tang CJC, Call K, et al. High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 1990;247:64-9.
20. Lawrence JB, Singer RH, McNeil JA. Interphase and metaphase resolution of different distances within the human dystrophic gene. *Science* 1990;249:928-32.
21. Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock R., Popps S, Dohner H, Kuvacek Ci., Robbett-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet.* 1993;90:590-610.
22. Cherif D, Julier C, Delattre O, et al. Simultaneous localization of cosmid and chromosome R-banding by fluorescence microscopy: Application to regional mapping of human chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6639-43.
23. Godsen J, Hanaratty D, Starling J, et al. Oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis(PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. *Cytogen Cell Genet* 1991;57: 100-4.
24. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Piper J, et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1994;91:2156-60.
25. Visakorpi T, Kallioniemi A, Syvanen A, et al. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995;55:342-347.
26. Levin N, Brzoska P, Gupta N, et al. Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:5086-91.
27. Ried T, Just K, Holtgreve-Grez H, et al. Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1995;55:5415-23.
28. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Research* 1996;56:4219-23.
29. Sakamoto M, Sakunaza H, Yang-Feng T, Si T, Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Pinkel D, Gray JW. Analysis of genetic aberrations in ovarian cancer using comparative genomic hybridization. *Pro AACR.* 1993;34:210.
30. Speicher MR, Schoell B, Du Manoir, et al. Specific loss of chromosome 1,2,6, 10, 13, 17, 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1994;145:356-64.
31. Heselmeyer K, Schrock E, Manoir S, et al. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:479-84.
32. Heselmeyer K, Macville M, Schrock E et al. Advanced cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. *Genes, Chromosomes & Cancer.* 1997;19:233-40.