

## 염색체 과배수성이 대장암 세포의 생존능에 미치는 영향

박상언, 최은숙, 장연실, 홍승희<sup>1</sup>, 김인후<sup>1</sup>, 장동경

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소화기내과, 국립암센터 분자종양학연구과<sup>1</sup>

### Effects of Chromosomal Polyploidy on Survival of Colon Cancer Cells

Sang Un Park, Eun Sook Choi, Yeon Sil Jang, Seung-Hee Hong<sup>1</sup>, In-Hoo Kim<sup>1</sup> and Dong Kyung Chang

Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Research Institute, National Cancer Center<sup>1</sup>, Goyang, Korea

**Background/Aims:** Tetraploid cells are frequently observed in the inflamed mucosal epithelial cells of the patients with Barrett's esophagus or chronic ulcerative colitis. Polyploidy often occurs during cell fusion, abortive cell cycle, and endoreplication. Most tetraploid cells are engaged to apoptotic pathway, but some remaining stable tetraploid cells consequently cause aneuploidization and chromosomal instability. We investigated whether tetraploid cells could acquire survival advantage and hold a dominant position for natural selection.

**Methods:** We established tetraploid cell line (HCT116GH) from parental diploid colorectal cancer cell line (HCT116) via PEG-mediated cell fusion and compared its cell viability, cell cycle response and apoptotic fractions responded to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with diploid HCT116 and p53 suppressed HCT116/H6 cell lines.

**Results:** Using MTT assay, plating efficiency and clonogenicity, we evaluated the survival of each cell line. Tetraploid cell line HCT116GH demonstrated an 83 fold greater resistance to 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than the parental diploid HCT116, and 6 fold greater than even the p53 negative diploid HCT116/E6. Cellular sensitivity, G2/M arrests, and apoptotic proportion were observed less in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HCT116GH compared with HCT116 and HCT116/E6. HCT116GH expressed lower level of p53 and p21 than diploid HCT116.

**Conclusions:** Stable tetraploid cell lines showed enhanced viability in comparison to parental diploid cell lines. The enhanced viability observed in tetraploidization surpassed that from downregulation of p53. Frequent appearance of tetraploid cells in stressful condition can be caused by natural selection owing to their enhanced viability and may consequently contribute to cancer cell transformation. (Korean J Gastroenterol 2011;57:150-157)

**Key Words:** Tetraploidy; Chromosomal instability; Aneuploidy; Hydrogen peroxide

Received September 28, 2010. Revised December 24, 2010. Accepted December 24, 2010.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 장동경, 135-710, 서울시 강남구 일원본동 50번지, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소화기내과학교실

Correspondence to: Dong Kyung Chang, Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea. Tel: +82-2-3410-3409, Fax: +82-2-3410-3849, E-mail: dkchang@skku.edu

Financial support: This work was supported by Korea Research Foundation Grant funded by Korea Government(MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2005-003-E00087). Conflict of interest: None.

## 서 론

유전자 불안정성은 암 발생의 주요 동인으로 이해되고 있다.<sup>1,2</sup> 염색체 과배수화(chromosomal polyploidization)는 유전자 불안정성(genomic instability)을 유발하는 하나의 기전인데, 비대칭적 세포분열(asymmetric cell division)과 염색체 소실(chromosomal loss)로 유발되고, 그 결과 이수체 형성(aneuploidization) 및 염색체 불안정성(chromosomal instability)을 초래한다.

과배수체(polyploidy) 중 대부분은 사배체 상태인데 인체 내에는 다양한 상황에서 사배체 세포가 생성된다. 만성 염증성 스트레스가 지속되는 상태가 대표적으로, 바렛식도(Barrett's esophagus), 구강백반증(oral leukoplakia), 만성 궤양성 대장염(chronic ulcerative colitis) 등에서 사배체 세포들이 자주 발견된다.<sup>3-6</sup> 또한 종양 세포에서도 자주 발견되는데 췌장암에서 SV40 (simian virus 40)에 의한 세포 융합으로 세포 내 사배체가 축적되어 그 결과 이수체(aneuploid) 및 암세포가 발생하였으며 자궁 경부암 및 대장암에서도 이수체의 존재가 암 발생과 관련이 있다.<sup>7,9</sup> 그 외 재생과정의 인간 세포, 임신 시 자궁 평활근 세포, 갑상선 기능 항진증 상태의 갑상선 세포, 노화 과정의 정낭 세포, 고혈압 상태의 대동맥 평활근 세포 등에서 사배체의 존재가 보고되었다.<sup>10</sup>

저자들은 이 전의 연구에서 DNA index가 2로 사배체에 가깝다고 알려진 HEC1B, Caco2 세포가 활성 산소 스트레스에 가장 강한 생존능을 보이며, DNA index가 0.97로 과소배수성(hypoploidy)인 SW837이 가장 약한 생존능을 보이는 것과, HCT116에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 투여에 의해 사배체 세포의 분획이 증가하는 것을 확인한 바 있다.<sup>11</sup> 이번 연구에서는 polyethylene glycol (PEG) 융합법을 이용하여 사배체 세포인 HCT116GH를 제작하고 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 사배수성(tetraploidy)을 증명한 후, 염색체의 사배체 상태가 이배체에 비하여 생존율이 높은 지를 검증하고자 하였다. 열악한 환경에서 생존 능력이 우수하다는 것은 그만큼 암세포로 이행하기에 유리한 조건을 갖추고 있다는 말이 될 수 있기 때문이다. 이를 위하여 활성 산소(oxygen free radical) 투여 후, 사배체 세포(HCT116GH), 이배체 세포(HCT116) 및 p53 음성 이배체 세포(HCT116/E6)의 생존능을 비교해 보았다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 종류와 세포 배양

이번 연구에 사용된 대장암 세포주 HCT116와 여기서 파생된 세포주들은 10% fetal bovine serum (Life technologies

Inc., Grand Islandm, NY, USA)이 첨가된 Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Life technologies Inc., Grand Islandm, NY, USA)에서 37°C 습식 배양기(95% air - 5% CO<sub>2</sub>)를 이용하여 배양하였다.

### 2. 사배체 세포의 제작

PEG로 세포막을 녹여서 2개의 세포를 융합시키는 PEG 융합법을 통하여 HCT116 사배수성(tetraploidy) 세포를 제조하였다. G418 저항성 vector와 hygromycin 저항성 vector를 lipofectamine (Gibco BRL, Basel, Switzerland)을 사용하여 HCT116에 각각 형질감염(transfection) 시킨 후, 서로 다른 저항성유전자를 가진 두 세포를 PEG-1450과 혼합하여 37°C에 1분간 두었다. 배지를 세척한 후 3주 정도 배양기에 넣어 배양하는데 이 때, G418과 hygromycin으로 이중 선택하여 성공적으로 융합된 세포만을 골라내었다. 유세포 분석기를 이용하여 DNA 양을 측정함으로써 사배수성 세포가 만들어진 것을 최종적으로 확인하였다. 같은 방식으로 추후 실험에 사용할 p53의 기능을 불활성화시킨 HCT116/E6 세포도 제작하였다.

### 3. p53(-) 이배체 세포의 제작

HCT116를 포함한 많은 현미부수체 불안정성(Microsatellite instability) 종양들은 염색체 불안정성 종양들과는 달리 p53가 야생형(wild-type)인 경우가 많다.<sup>12</sup> 인간 유두종 바이러스(papillomavirus) type-16 E6 유전자를 세포에 형질감염(transfection)시켜 p53의 기능을 불활성화시킨 HCT116/E6 세포<sup>13</sup>는 Dr. Vogelstein으로부터 공급받았다.

### 4. 활성산소자극 후 세포생존능력 관찰

HCT116, HCT116/E6, HCT116GH 세포를 각각 96-well plate에 well 당  $1 \times 10^4$  cells (100  $\mu$ L)로 주입하여 14시간 동안 배양한 후, PBS로 세척하고, 100  $\mu$ M 과산화수소를 well 당 100  $\mu$ L씩 넣어 1시간동안 처리한 뒤 PBS로 1회 세척하고 IMDM, 10% FBS 배양액에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 추가로 배양하면서 3시간, 6시간, 24시간에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 사용하여 세포생존능력을 평가하였다.<sup>14</sup> 또한 로그상으로 성장하는 세포  $2 \times 10^6$ 개를 100 $\times$ 15 mm Falcon petri dish (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣어 24시간 배양 후 50, 75, 100 mM 농도의 과산화수소로 37°C에서 1시간동안 처리하고, PBS로 세척한 뒤 10% FBS를 함유한 IMDM 배양액에 재부유시키고 6-well plate에 well 당 500, 200, 100개의 농도로 주입하여 10일 간 배양 후, 형성된 세포의 집락 수를 세어 평판배양효율(plating effi-

ciency, colony forming ability)을 구하여 궁극적인 생존능을 평가하였다. 평판배양효율을 보면 초기 세포 고사 효과를 벗어난 후에도 생식치사(reproductive death)와 같은 현상에 의해 추후에 고사되는 세포 분획들을 생존능 평가에서 배제할 수 있다.<sup>15</sup>

## 5. 세포고사 정도의 비교

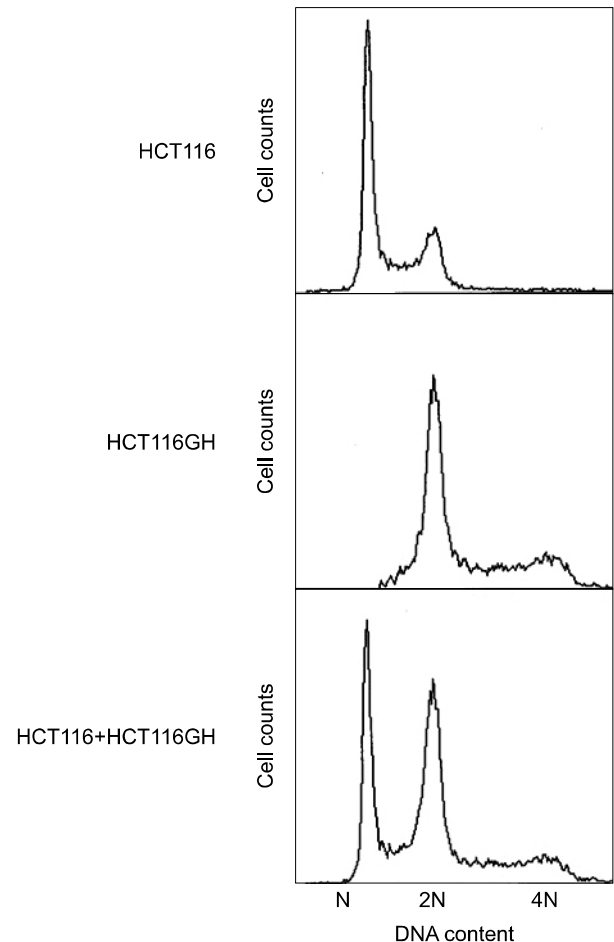
세포고사 정도를 확인하기 위해서는 apoptosis marker인 세포막의 phosphatidyl serine을 염색하는 원리를 이용한 annexin V-Cy5 apoptosis detection kit (PharMingen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 각 세포들을 과산화수소로 24시간 자극한 후 annexin V-Cy5 (1  $\mu$ M/mL)의 형광염색물질 5  $\mu$ L를 세포에 처리하여 15분 동안 상온에 방치한다. 다음, 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) (PharMingen, San Diego, CA)를 동일한 시간 동안 세포에 처리하고 1시간 이내에 형광현미경으로 관찰하면서 Immunocytochemistry 사진을 촬영하여 세포 고사 정도를 비교하였다.<sup>16,17</sup>

## 6. 세포 주기의 측정

로그상으로 성장하는 세 종류의 세포를 각각  $2 \times 10^6$ 개씩 100 $\times$ 15 mm Falcon petri dish (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣어 IMDM, 10% FBS 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양 후, 37°C PBS로 세척하고, Earle's MEM으로 희석한 100  $\mu$ M 과산화수소로 37°C에서 1시간 동안 처리한다. 이 들 세포를 PBS로 세척한 뒤 신선한 10% FBS를 함유한 IMDM 배양액을 넣어 다시 24시간 배양한 후 trypsin 처리로 세포를 수거하고, 4°C PBS로 2회 세척 후 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 재부유시켜서 50% ethanol로 -20°C에서 하루동안 고정시킨다. 고정된 세포들을 0.15% RNase A (boiled and renatured, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 37°C에서 15분 처리한 후 80  $\mu$ g/ml propidium iodide (Sigma Chemical Co.)에서 최소한 30분 이상 염색하여 Epics Elite flowcytometer (excitation at 488 nm, detection at 620 nm, Coulter Electronics, Hialeah, FL)로 DNA 함량을 측정하고, Multicycle Software Autofit Version 2.50 (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA)로 세포 주기를 분석한다.

## 7. Western Blot을 이용하여 p53와 p21 발현 측정

각 세포에서 활성산소 자극에 대한 p53 단백질의 활성 정도를 먼저 측정하고 그 다음 단계에 있는 p21이 p53-dependent 또는 p53-independent 방식으로 어느 정도 활성화되는지를 Western Blot으로 측정하였다.<sup>18</sup> 그리고 그 활성화 정도



**Fig. 1.** Establishment of the tetraploid cell line. Tetraploid cell line HCT116GH demonstrated 2N at G1 and 4N at G2 phase when the parental diploid cell line HCT116 demonstrated N at G1 and 2N at G2 phase.

를 각각의 세포들의 생존능과 비교하였다.

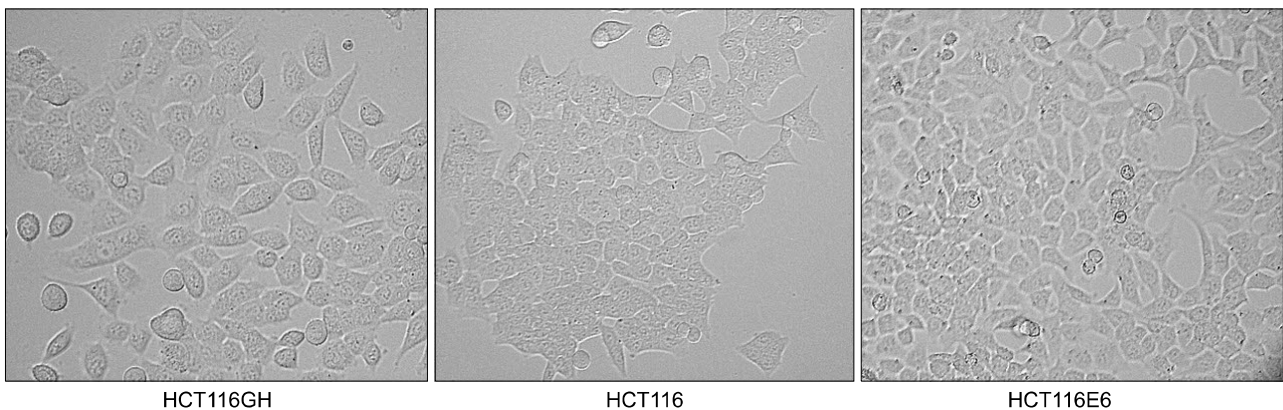
## 8. 통계 처리

활성 산소 자극 후 세포의 반응 평가는 최소한 3회 이상 반복 측정 후 분산분석법(analysis of variance, ANOVA)를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였으며 p-value 0.05 이하를 유의한 것으로 판단하였다.

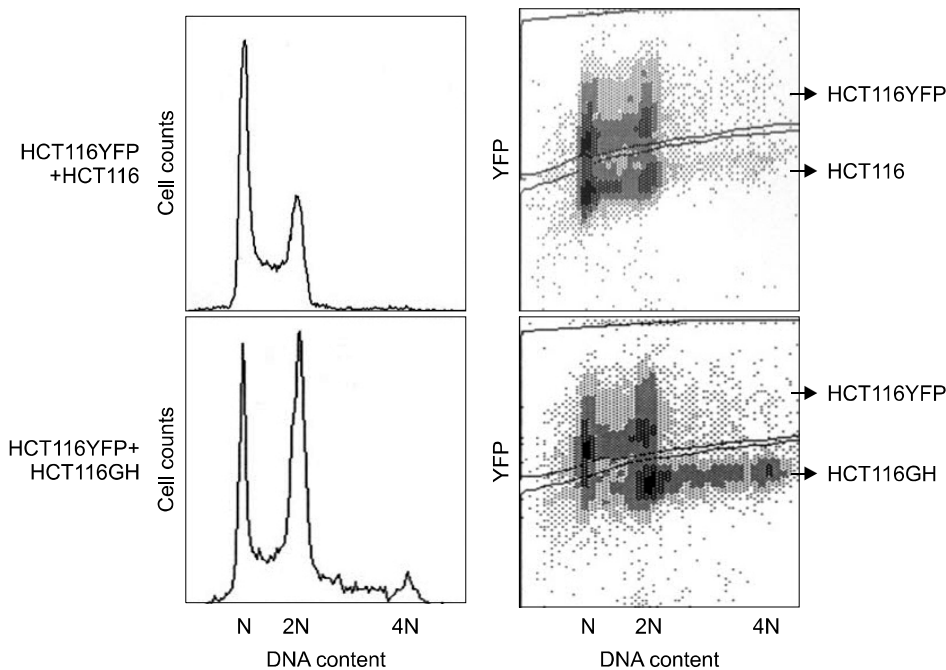
# 결 과

## 1. 사배체 세포 제조 여부의 확인

PEG 융합법을 통하여 HCT116의 사배체 세포가 제조되었음을 확인하였다. 유세포 분석기로 확인한 염색체 양(DNA content)이 이배체인 HCT116에 비해 사배체인 HCT116GH에서 2배로 늘어난 것을 확인할 수 있고 일부 4배로 늘어난 G2 phase에 있는 사배체 세포를 확인할 수 있었다(Fig. 1).



**Fig. 2.** Morphology of the tetraploid cells. Tetraploid cell line HCT116GH demonstrated that the size of cells was larger than that of parental diploid HCT116 cells.



**Fig. 3.** Confirmation of stable tetraploid cell line with the reference of the diploid HCT116YFP cell line. In the lower panel depicting the mixture of HCT116YFP and HCT116GH, 2N peak has increased and 4N peak newly appeared, which confirmed that HCT116GH was a stably established tetraploid cell line.

현미경으로 세포들을 확인하여 보았을 때도 HCT116GH에서 세포의 크기가 HCT116에 비해 증가한 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 2) 최종적으로 yellow fluorescent protein (YFP)을 발현하는 유전자가 이식된 이배체인 HCT116YFP와 혼합배양 후 유세포 분석기를 이용하여 염색체 양을 비교한 결과도 동일하게 나와 성공적으로 사배체 세포가 제조된 것을 확인하였다(Fig. 3).

## 2. 활성 산소 스트레스에 대한 각 세포군들의 반응

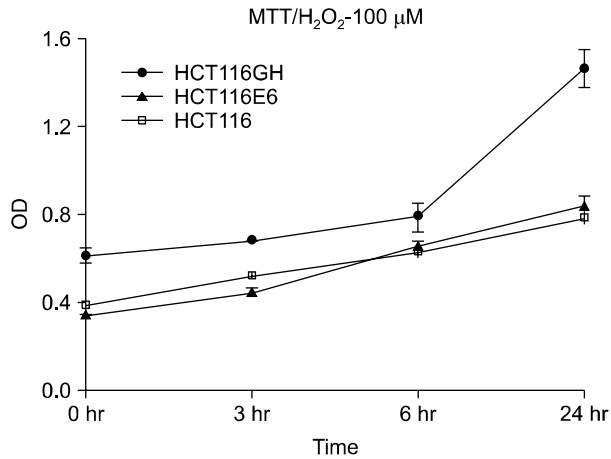
MTT assay를 이용하여 사배체 세포인 HCT116GH와 이배체 세포인 HCT116 그리고 HCT116세포에서 p53의 발현을 제거한 HCT116/E6의 생존능을 비교해 보았을 때 100  $\mu$ M 과산화수소 처리 후 24시간째의 OD 값은 HCT116가

$0.79 \pm 0.06$ , HCT116/E6가  $0.82 \pm 0.07$ 인데 비해 HCT116GH는  $1.48 \pm 0.17$ 로 유의하게 높은 생존율을 보였다( $p < 0.05$ , ANOVA, Fig. 4)

또한 평판배양효율 평가 방식으로 각 세포군의 세포생존능력을 측정해 보았을 때, 100  $\mu$ M 과산화수소 처리한 경우 HCT116GH 세포군이 HCT116에 비해서는 83배 HCT116/E6에 비해서는 6배 더 높은 생존율을 나타내었는데 흥미로운 것은 p53의 발현이 억제되어 정상적인 세포 고사 능력이 결핍된 이배체 세포인 HCT116/E6 세포군보다도 사배체 세포인 HCT116GH 세포군이 더 높은 농도의 과산화수소에서 생존율이 높은 것이 확인되었다( $p < 0.05$ , ANOVA, Fig. 5)

세포고사 정도를 비교하기 위해 과산화수소 500 mM에서 24시간 동안 방치한 후 Annexin V-Cy5 apoptosis de-

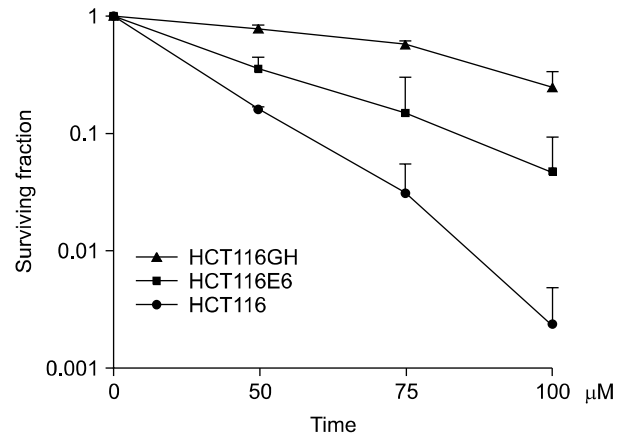
tection kit를 이용하여 세포막 외부로 phosphatidyl serin이 노출된 고사 세포들을 검출하여 형광현미경으로 촬영하였을 때 HCT116GH 세포군에서 가장 고사된 세포분획이 가장 적음을 확인할 수 있었다(Fig. 6).



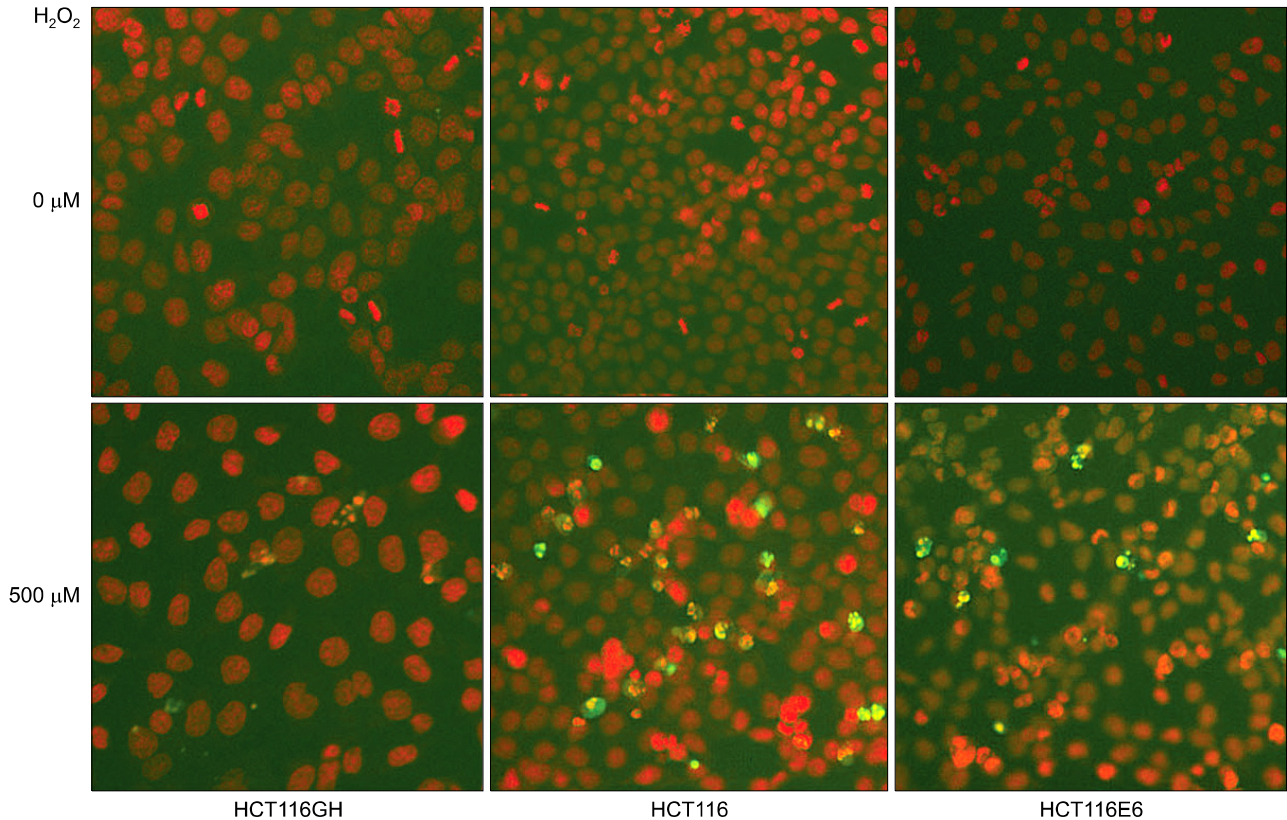
**Fig. 4.** Comparison of survival among tetraploid cell line, parental diploid cell line and p53(−) diploid cell line. MTT assay demonstrated that the tetraploid cell line HCT116GH showed higher survival at each time scale after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenging ( $p < 0.05$ , ANOVA).

### 3. 활성 산소 스트레스에 대한 각세포군에서의 세포주기 반응

세포들을 과산화수소 100 μM로 처리하고, 24시간 후 세포 주기를 측정하였다. 24시간 후에 HCT116 세포군과 HCT116/



**Fig. 5.** Comparison of the plating efficiency between tetraploid cell line, parental diploid cell line and p53(−) diploid cell line. Plating efficiency demonstrated that tetraploid cell line HCT116GH was resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in comparison to the parental diploid HCT116 and even p53 negative diploid cell line HCT116/E6 ( $p < 0.05$ , ANOVA).



**Fig. 6.** Comparison of the apoptosis to oxyradical stress among tetraploid cell line, parental diploid cell line and p53(−) diploid cell line. Apoptotic fraction assessed by annexin-V staining was lowest in the tetraploid cell line HCT116GH.

E6 세포군의 경우 DNA 양이 2배로 증가한 세포의 수가 급격히 증가하여 활성 산소 스트레스에 의해 G2/M arrest 상태가 된 세포의 분획이 각각  $79.5 \pm 6.2\%$ ,  $72.9 \pm 6.1\%$ 로 높게 측정된데 반하여, 사배체 세포인 HCT116GH 세포군은 같은 농도의  $H_2O_2$ 에 의해 G2/M arrest를 보인 분획이  $25.7 \pm 4.3\%$ 로 적어 정상 세포 주기로 빠르게 회복된다는 사실을 알 수 있었다( $p < 0.05$ , ANOVA, Fig. 7).

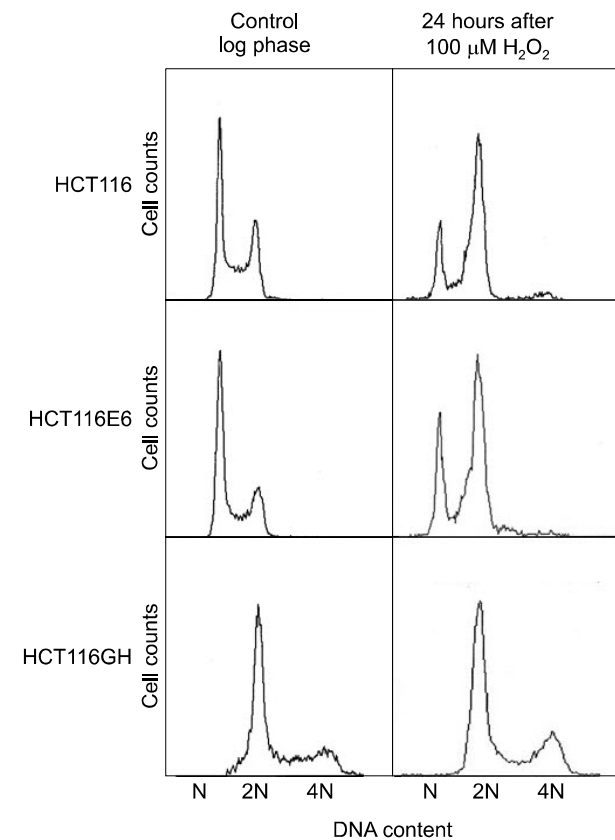
#### 4. 활성 산소 스트레스에 대한 p53 와 p21 단백질의 발현 정도

과산화수소 100  $\mu M$  농도에서 시간에 따른 p53과 p21 단백질의 발현 정도를 Western blot을 이용하여 측정해 보았을 때 사배체 세포인 HCT116GH 세포군에서 활성 산소 스트레스에 대한 p53와 p21 발현을 가장 적게 보였다(Fig. 8). p53 발현이 억제된 HCT116/E6의 경우 p53 의존성 발현 경로가 억제되어 있어 HCT116 세포군에 비해 p21 발현이 적음을 확인할 수 있었다.

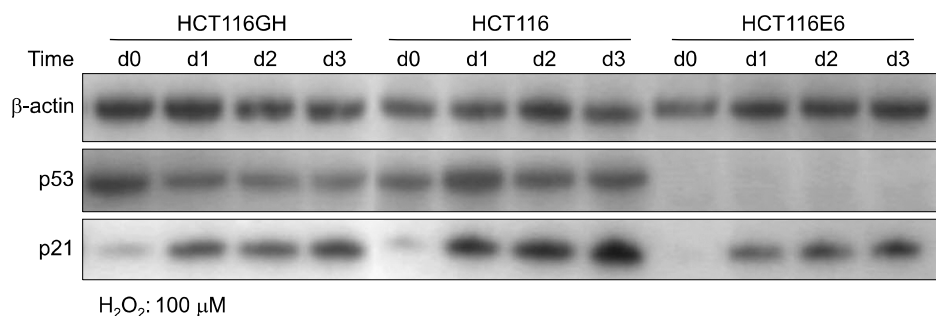
## 고 찰

사배체 세포는 다음 세 가지 경로로 생성된다. 첫째 근육 및 골세포의 정상 분화 과정이나 바이러스 감염 시에 볼 수 있는 세포의 융합(cell fusion)이고,<sup>19,20</sup> 둘째, 세포의 유사분열(mitosis)에서 결함이 발생했을 때 세포 핵과 세포질의 분화 없이 정상 염색체가 복제되어 염색체 수가 두 배로 늘어나는 경우이며<sup>21</sup> 셋째, 혈소판 생성에서 관찰되는 바 mitosis와 DNA 복제의 유기적 관계가 분리되어 mitosis 없이 연속적으로 DNA가 분열하는 내부복제(endoreplication) 기전이다.<sup>1</sup> DNA 복제에 문제가 생긴 경우 대부분 mitotic checkpoint에 의해 중기(metaphase)에서 분열을 멈추는데 그 문제가 해결되지 않으면 checkpoint adaptation 즉 mitotic slippage가 일어나게 되고 spindle checkpoint arrest에서 회복되면서 다시 G1 상태로 들어가 사배체 상태로 남게 된다.<sup>22,23</sup>

사배체 세포의 운명은 잘 밝혀져 있지 않으나 다음과 같은 가설들이 있다. 첫째 p53의 기능이 정상인 대부분의 사배체 세포는 tetraploidy checkpoint에 의해 G1 arrest가 발생하고 세포고사(apoptosis)로 귀결된다. 둘째 multipolar mitosis 과정에서 하나의 pole이 분리되면서 이배체로 회귀(reduction mitosis)될 수 있다. 셋째 여분의 중심체(centrosome)가 대칭으로 군집(clustering)을 이루어 안정된 이극성 분열(bipolar genome reductional division)을 하며 사배체를 유지하는 경우가 있다. 넷째 p53 결핍 시 tetraploidy checkpoint를 우회하고 극단적인 다극성 분열(catastrophic



**Fig. 7.** Comparison of the G2/M arrest status to oxyradical stress among tetraploid cell line, paternal diploid cell line and p53(−) diploid cell line. The fraction of cells in G2/M arrest was lowest in the tetraploid cell line HCT116GH.



**Fig. 8.** Expression of p53 and p21 to oxyradical stress in tetraploid cell line, paternal diploid cell line and p53(−) diploid cell line. Tetraploid cell line HCT116GH expressed lower level of p53 and p21 than diploid HCT116. p53 negative HCT116E6 expressed p21 less abundantly than HCT116, with p53 independent manner.

multipolar mitosis)을 거쳐 이수성(anueploidy) 세포로 이행하는 경우가 있다. 이 네번째 가설은 사배체 세포가 이수성을 가진 암세포로 이행하는 전구 세포일 수 있다는 점에서 발암 기전에 중요한 가설이다.<sup>2,10</sup>

일반적으로 이수성(anueploidy) 세포의 생성은 이배체 정상 세포가 DNA 손상의 발생 및 복구 과정 등을 통하여 염색체의 구조적 이상을 초래하거나 mitotic checkpoint의 결함으로 세포 분열 시 염색체의 균등분배가 일어나지 못하여 발생하는 것으로 추정되며,<sup>1</sup> 세포 노화에 따른 telomere의 단축도 이수성의 생성에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다.<sup>24</sup> 하지만 이배체에서 기원하는 이수성 외에도 스트레스, 노화, 바렛 식도, 궤양성 대장염 등 만성 염증 등에서 증가하는 다배수성 세포들이 사배체 세포를 중간 단계로 거쳐 checkpoint에 의해 걸리지 않고, catastrophic mitosis를 거치면 염색체의 무작위적 불균등 소실이 일어나면서 이수성 세포로 변할 수 있다는 가설이 있다.<sup>10</sup>

이번 연구에서는 만성 염증과 발암 기전에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 활성산소 스트레스 모델을 이용하여 활성 산소의 독성에 대해 다배체의 암세포가 높은 생존능을 갖고 있다는 사실을 증명하였다. 이는, 우선 활성산소 스트레스 상황에서 염색체가 증가하는 방향으로 세포가 선택되기 쉽다는 것을 의미하며, 실제 스트레스 상황에서 사배체 세포가 유도되거나 선택되는 현상을 설명하는 근거가 될 수 있을 것이다.

지금까지 직접적인 암관련 유전자의 변화 이외에 방관자(bystander)로 여겨지는 많은 유전자들의 염색체 수준에서의 동반 증가가 암성 형질에 어떤 영향을 미치는 지는 별 관심의 대상이 아니었다. 이번 실험에서는 세포의 생존능에 깊이 관여하는 p53의 단독 효과(p53 suppressed cell)와 전체 유전자 용량(genomic dosage)의 상승 효과(tetraploid cell)를 비교하여 생존능 증가라는 암성 형질이 소수의 암관련 유전자에만 전적으로 의존하는 것이 아니라 전반적인 유전자들의 용량 상승 효과에 의해서도 영향을 받는다는 사실을 보여준다. 즉 이번 연구 결과는 적어도 대사적 균형이 유지되는 상태에서의 전반적인 유전자 용량의 상승은 세포의 생존능을 강화하는 방식으로 작용한다는 것을 시사한다.

이번 연구 결과로 사배체 세포가 이수성 세포로 전환될 수 있는지를 증명할 수는 없으나 적어도 생존능의 향상이 이수성 세포 또는 암세포로의 전환에 유리한 형질이 될 것이라 추정할 수 있을 것이다.

과배수체의 융합세포는 염색체 상태가 불안정하여 계대 배양 과정 중에 획득하였던 염색체를 단계적으로 소실한다.<sup>1</sup> 염색체 불안정성 과배체 세포의 염색체 수가 어느 수준으로 수렴할 것인가를 알아 보는 것은 암세포 내 대사적 평형점을

찾는다는 관점에서 흥미로운 주제일 수 있다. 후속연구를 통하여 이배체에서의 염색체 증가 패턴과 사배체에서의 염색체 감소 패턴을 비교하여 염색체의 패턴 변화를 맵핑(mapping)해 나가면 이수체와 암성 형질을 획득해 나가는 과정에서 중요한 단서를 찾을 수도 있을 것이라 기대한다.

사배체 세포에 대한 이번 연구 결과를 간단히 요약하면 다음과 같다. 첫째, 사배체 융합 세포는 이배체 모체 세포보다 활성 산소 스트레스에 대해 생존능이 우월하다. 둘째, 사배체 세포의 생존능 증가는 p53 소실에 의한 효과를 능가한다. 셋째, 만성 염증이나 스트레스 상황에서 사배체가 증가하고, 이들의 생존능이 우월하다는 점은 사배체 세포가 암세포 형질을 획득하는데 유리한 방향으로 작용할 수 있음을 시사하는 것으로 추정된다.

## 요 약

**목적:** 바렛 상피나 만성궤양성대장염 환자의 대장 점막에서 사배체 세포가 증가한다. 과배수성은 세포의 융합, abortive cell cycle, 내부 복제 등의 기전으로 생성되며, 결국은 checkpoint에 걸려 고사하거나, 이배체로 회귀, 안정적 사배체 유지, 또는 이수성 세포로 전환되리라 추정된다. 과배수성 세포가 염색체 불안정성을 획득하여 암세포의 특징의 하나인 이수성 상태로 진행할 수 있는 지를 연구하는 1단계로, 여기서는 사배체 상태가 세포의 생존능을 강화시켜 선택상의 우위를 확보하는지를 검증하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 이배체의 대장암 세포주 HCT116를 PEG 융합술로 안정적인 사배체 HCT116GH로 만든 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 생존능, 세포 주기에 미치는 영향, 세포 고사 정도를 이배체의 HCT116, p53가 억제된 HCT116/E6와 비교하였다.

**결과:** MTT assay를 이용하여 평균배양효율과 클론원성으로 평가한 생존능에서 HCT116GH는 100  $\mu$ M의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대해 HCT116에 비해서는 83배, HCT116E6에 비해서는 6배의 생존능을 보였다. HCT116와 HCT116E6가 G2/M arrest를 보이는 농도에서 HCT116GH의 세포 주기는 유의하게 정지하지 않았으며 세포 고사율도 낮았다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 P53와 p21 발현은 HCT 116에서 가장 현저하였으며, p53가 건전한 HCT116GH와 p53가 억제된 HCT116E6에서 공히 p21이 유사한 수준으로 유도되었다.

**결론:** 안정적인 사배체 융합 세포는 2배체의 모체 세포보다 생존능이 우월하였다. 사배체에서 확보된 생존능의 증가는 p53 소실에 의한 효과를 능가하였다. 만성 염증이나 스트레스 상황에서 사배체가 증가하는 것은 생존능 상승에 의한 자연 선택될 가능성이 있으며, 이는 사배체의 운명이 무엇으로 귀결 되든지 간에 암세포 형질을 획득하는데 유리한 방향으로



작용할 수 있을 것이다.

색인단어: 사배체; 염색체 불안정성; 이수체; 과산화수소

## REFERENCES

1. Storchova Z, Pellman D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:45-54.
2. Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 2005;437:1043-1047.
3. Chaves P, Crespo M, Ribeiro C, et al. Chromosomal analysis of Barrett's cells: demonstration of instability and detection of the metaplastic lineage involved. *Mod Pathol* 2007;20:788-796.
4. Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, et al. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7081-7084.
5. Sudbø J, Lippman SM, Lee JJ, et al. The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med* 2004;350:1405-1413.
6. Levine DS, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Distribution of aneuploid cell populations in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* 1991;101:1198-1210.
7. Ornitz DM, Hammer RE, Messing A, Palmiter RD, Brinster RL. Pancreatic neoplasia induced by SV40 T-antigen expression in acinar cells of transgenic mice. *Science* 1987;238:188-193.
8. Olaharski AJ, Sotelo R, Solorza-Luna G, et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006;27:337-343.
9. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386:623-627.
10. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:157-162.
11. Chang DK, Goel A, Ricciardiello L, et al. Effect of H(2)O(2) on cell cycle and survival in DNA mismatch repair-deficient and -proficient cell lines. *Cancer Lett* 2003;195:243-251.
12. Honma M, Momose M, Tanabe H, et al. Requirement of wild-type p53 protein for maintenance of chromosomal integrity. *Mol Carcinog* 2000;28:203-214.
13. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 1994;68:4262-4273.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
15. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48:4827-4833.
16. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.
17. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
18. Parker SB, Eichele G, Zhang P, et al. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 1995;267:1024-1027.
19. Duelli D, Lazebnik Y. Cell fusion: a hidden enemy? *Cancer Cell* 2003;3:445-448.
20. Ogle BM, Cascalho M, Platt JL. Biological implications of cell fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:567-575.
21. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J* 2002;21:483-492.
22. Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* 2005;8:7-12.
23. Brito DA, Rieder CL. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol* 2006;16:1194-1200.
24. Cheung AL, Deng W. Telomere dysfunction, genome instability and cancer. *Front Biosci* 2008;13:2075-2090.