

사람의 Natural Killer Cell Assay의 標的細胞로 利用되는 K₅₆₂細胞의 染色體에 관한 研究

高神大學 醫學部 解剖學教室

金 岡 鍊

A Study on Chromosome of K₅₆₂ Cells for the Use of Target Cells in Human Natural Killer Cell Assay

Kang Ryune Kim

Department of Anatomy, Kosin Medical College, Pusan, Korea

= Abstract =

The metaphase chromosomes of the K₅₆₂ cell lines stained with trypsin-giemsa method were observed and the results obtained are summarized as following;

- 1) The chromosome types were classified according to the position of centromere.
- 2) The K₅₆₂ cells were aneuploid with a prominent, pseudotriploid mode.
- 3) Chromosome numbers were varied from 43 to 75
- 4) The most frequent chromosomal number was 60(27.0%)
- 5) Single chromatid break were observed in the long arms of chromosome No.6 and No.11
- 6) In the karyotypic analysis it was appeared that all the cells contained at least four markers.

I. 緒 論

最初로 Flemming이 染色體를 觀察한 이후, Winniwarter(1929)와 Painter(1923) 등에 의해 染色體가 繼受되어오다⁸⁾ Tjio와 Leven(1956)¹⁹⁾에 의해 人類의 染色體 數가 確定되었다. Rowley¹⁵⁾은 人間의 染色體

를 規則적으로 配列하여 核型分析을 할 수 있음을 發表하였고 그후 遺傳物質을 지니고 있는 染色體는 많은 學者들의 關心의 對象이 되어 人類 및 動物에서 그 形態와 數에 대하여 많은 것이 알려져있고 昨今에는 G와Q, R과C 그리고 T banding Pattern을 觀察하여 보다 精密하게 研究되고 있다. K₅₆₂ 細胞에 관한 研究로는 Take-gawa¹⁸⁾와 Ravazzolo¹⁴⁾ 등이

核型을 分析한 것이 있지만 本實驗에 使用한 K₅₆₂ 細胞와는 전혀 다른 양상으로 觀察되기에 이에 著者는 Natural Killer Cell Assay의 標的細胞로서 또한 骨髓性 白血病의 細胞遺傳學的⁶⁾ 및 化學的 研究⁹⁾을 위한 in vitro model로서 많은 研究者들에 의해 使用되고 있는 K₅₆₂ 細胞에 對하여 Moorhead⁷⁾ 등과 HSU 및 Kellogg⁴⁾ 등의 進歩된 組織培養法과 Rothfels 및 Siminovitch¹⁶⁾ 등의 空氣乾燥法과 Sehnright¹⁷⁾, Drets²⁾ 등, Dutrillaux³⁾ 등, Patil¹³⁾ 등의 染色體 區別, 染色體의 變法을 利用하여 染色體 Banding Pattern으로 核型을 分析하여 보았다.

II. 實驗材料 및 方法

實驗材料로 使用한 K₅₆₂ 細胞는 blast crisis에 있는 慢性骨髓性 白血病 患者의 胸膜滲出液에서 얻어진 細胞로부터 培養된 細胞株로서, 高神大學 醫學部 微生物學教室의 細胞株 保存研究室에서 保存되어 있는 것을 使用하였다. 實驗方法은 生體 外 培養된 K₅₆₂ 細胞를 계대 배양시 교환되는 培養液을 25ml의 배양플라스크에 담고 RPMI 1640, 15% 牛胎兒血清 및 항생-항진균제(Penicillin, Streptomycin, Fungizone)가 섞인 배양액을 첨가하여 전체가 10ml가 되도록 하여 37℃인 5% CO₂ 배양기에서 72時間 배양

後, 細胞는 固定 前 1~2時間 사이에 Colchicine(Difco 10⁻⁵gr/ml), 0.4cc을 培養液에 첨가하여 細胞分裂을 억제시켰고 2時間 後, 培養液을 10ml 플라스틱 원심분리管으로 옮긴 다음 1000rpm에서 8分間 遠沈시킨 후 그 침전물을 低張液으로 處理하고 다시 1000rpm에서 8分間 遠沈시켜 上澄液을 버리고 4℃로 冷却시킨 固定液(methanol: acetic acid=3:1)을 넣어 30分間 處理한 다음, 새로운 固定液으로 1回 정도 바꾼 후 여기 섞인 細胞는 Rothfels and Siminovitch 및 Tjio and Puck²⁰⁾의 空氣乾燥法에 따라 染色體 標本을 作成하였다. 이상과 같은 方法으로 얻은 Slide를 Sehnright의 方法의 變法으로 PBS(Phosphate Buffer Saline)에 trypsin 0.2% 溶液을 만들어 10秒~1分間 Trypsin Solution으로 處理 後, 2回 PBS로 씻어낸 다음 Giemsa 溶液으로 5~10分間 染色한 後에 分裂像이 좋은 Slide를 20枚씩 선택하여 分裂中期에 있는 染色體를 實驗한 別로 各各 100個의 細胞를 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

K₅₆₂細胞의 中期分裂像에서 觀察된 染色體數 및 그 數的 變異는 Table 1과 같다.

Table 1. Numbers of Chromosomes in Cells of K562

No. chromosome per cell	No. Cells		Percentage No. Cells (combined results)
	Expt 1	Expt 2	
45	10	2	6.0
48	6	0	3.0
51	6	1	3.5
54	20	16	18.0
57	12	19	15.5
60	26	28	27.0
63	12	22	17.0
66	2	3	2.5
69	2	1	1.5
72	2	3	2.5
75	2	5	3.5

Table 2. Chromosome distribution in K562

Reference	Chromosomal group	A	B	C + X	D	E	F	G	Markers	Chromosomal count
Takegawa et al		9	6	23	7	9	5	6	5	70
Ravazzolo et al		8	6	20	8	10	5	4	5	66
		7	5	18	7	9	6	6	4	60
Present study		(M-1)		(M-1)	(M-1)		(M-1)	(M-1) (=ph ¹ -ch.)	(A. C. D. F)	

染色體數는 count 하는데 오차를 피하기 위하여 染色體數를 3個씩 한 群으로 만들었다. 즉 60개 染色體群은 58, 59, 60씩 3個의 數를 내포하고 있으며 모든 染色體群은 같은 方法을 취했다. 染色體數는 43個부터 75個까지의 상당히 넓은 범위에 걸쳐 分布되어 있어 低二倍體부터 거의 多倍體의 양상을 보였다. K₅₆₂ 細胞株의 染色體數가 60個로서 27.0%의 비율로 나타나므로 최빈수로 볼 수 있고 二倍體가 안되는 것은 6.0%였으며 四倍體가 넘는 것은 觀察하지 못하였다. K₅₆₂ 細胞株의 中期分裂像에서 觀察된 60個의 染色體에 대한 形態學的 類型區分은 Trypsin-Giemsa Method로 腕內의 差異를 容易하게 區別할 수 있어서 各 染色體의 크기와 Centromere의 位置에 따라 分類하여 染色體雙과 그 順位를 定하였다. 本 實驗에서 觀察된 染色體數는 60個인 假三倍體로 나타났으며 Takegawa 등과 Ravazzolo 등이 觀察한 染色體數는 各各 triploid mode(66~72個)인 aneuploid와 triploid에 가까운 66個였으므로 많은 數의 差異를 나타내었다. 本 實驗에 使用한 K₅₆₂와 Takegawa 등과 Ravazzolo 등이 觀察한 各 染色體群을 비교하여 보면 Table 2와 같다.

本 實驗에 使用한 K₅₆₂細胞의 染色體와 Takegawa 등이 觀察한 染色體에서는 Ph¹-Chromosome이 觀察되었지만 Ravazzolo 등이 觀察한 染色體에선 觀察되지 않았으며 第1 染色體의 短腕이 缺損된 것은 모두 같이 觀察되었다. 그러나 本 實驗에서는 染色體 第6番과 第11番에서 短染色體分體가 切斷되었으며 4個의 markers도 染色體 A, B, D, F群에서 觀察되었다. 이와 같은 染色體의 數의 差異와 變異는 實驗方

法에서나 細胞株가 繼續으로 進化하여가는 過程에서 부주의로 야기되지 않았나 생각되며 G群 染色體의 長腕이 缺損¹⁰⁾¹¹⁾된 것은 K₅₆₂細胞는 慢性骨髓性白血病(CML) 患者에서 얻은 細胞이기 때문에 標識되는 것이라 본다. Nowell¹²⁾ 등에 의하면 이러한 증상을 Philadelphia 染色體(Ph¹-Chromosome)라고 하는데 Ph¹-Chromosome은 CML에 비교적 特異한 所見이기 때문에 診斷, 豫後 및 臨床所見이 不明確한 非典型的인 경우 CML의 診斷을 내리는데 必要¹⁾하다 생각합니다.

IV. 結 論

著者は Natural Killer Cell Assay의 標的細胞로 利用되는 K₅₆₂細胞의 染色體 形態를 알아보기 위하여 核型分析을 하여 다음과 같은 結果를 얻었다. 1) 染色體의 形態學的 類型區分은 染色體의 크기와 Centromere의 位置에 따라 分類하여 染色體雙과 그 順位를 定하였다. 2) K₅₆₂細胞들은 거의 Pseudotriploid mode인 Aneuploid이다. 3) 가장 빈번하게 나타나는 染色體數는 60個로서 27%가 되었다. 4) 染色體 第6番과 第11番의 長腕에서 短染色體分體가 切斷된 것을 觀察하였다. 5) 核型分析 結果 모든 細胞에서 4個의 markers들도 觀察되었다.

감사의 글

본 논문의 작성을 위하여 도와주신 고신대학 의학부 미생물학교실 장명웅교수님과 김광혁교수님께 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Bowen P, Lee CSN : Ph¹-chromosome in the diagnosis of chronic myeloid leukemia Report of a case with features simulating myelofibrosis, Bull. Hopkins Hosp 113 : 1, 1963
2. Drets ME, Shaw MW : Specific banding patterns of human chromosomes. Proc Natl Acad Sci(wash) 68 : 2073~2077, 1971
3. Dutrillaux B, Lejeune J : Cytogenetique humaine en evidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique(Pronase en particulier). C R Acad Sci Paris 273 : 587~588, 1971
4. HSU TC, Kellogg DS : Primary cultivation and continuous propagation of cells in vitro from cell biopsy specimens. J Natl Cancer Inst 25 : 211~235, 1960
5. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliak A, Vanky F : Properties of the K₅₆₂ cell line, Derived from a patient with chronic myeloid leukemia, Int. J Cancer 18 : 421, 1976
6. Luzzio CB, Luzzio BB : Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive philadelphia chromosome. Blood 45 : 321, 1975
7. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Bittips DM, Hungerford DA : Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp Cell Res 20 : 613~616, 1960
8. Moore LK : The developing human-clinically oriented embryology, 2nd ed. USA, W.B Saunders, 1977, p. 9
9. Neumann H, Klein E, Hauck-Granoth R, Yachnin S, Ben-Bassat H : Comparative study of alkaline phosphatase activity in lymphocytes, Mitogen-Induced blast, lymphoblastoid cell line, Acute myeloid leukemia and chronic lymphatic leukemia cells. Proc Nat Acad Sci 73 : 1432, 1976
10. Nowell PC, Hungerford DA : A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132 : 1497, 1960
11. Nowell PC, Hungerford DA : Chromosome studies on normal and leukemia human leukocytes J Nat Cancer Inst 25 : 85, 1960
12. Nowell PC, Hungerford DA : Chromosome studies in human leukemia II. Chronic granulocytic leukemia J Nat Cancer Inst 27 : 1013, 1961
13. Patil SR, Luhs HA : Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain. Science 173 : 821~822, 1971
14. Roberto Ravazzolo, Mario Sessarego et al. : Demonstration of phosphoglucosylase 1 in a subclone of the K₅₆₂ cell line. Cancer Res 45 : 1296~1299, 1985
15. Rowley JD : Cytogenetics in clinical medicine. J Am Med ASS 207 : 914, 1969
16. Rothfels KH, Siminovitch L : An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro Stain Tec 33(2) : 73~77, 1958
17. Sebright M : A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet II : 971, 1971
18. S Takegawa, T Shinahara, S Miwa : Hemine-Induced conversion of pyruvate kinase isozymes in K₅₆₂ cells. Blood 64(3) : 754~757, 1984
19. Tjio JH, Levan A : The chromosome number of man. Hereditas 42 : 1, 1956
20. Tjio JH, Puck TT : Somatic chromosomes of man Proc Natl Acad Sci 44 : 1229, 1968

Explanation of Figures

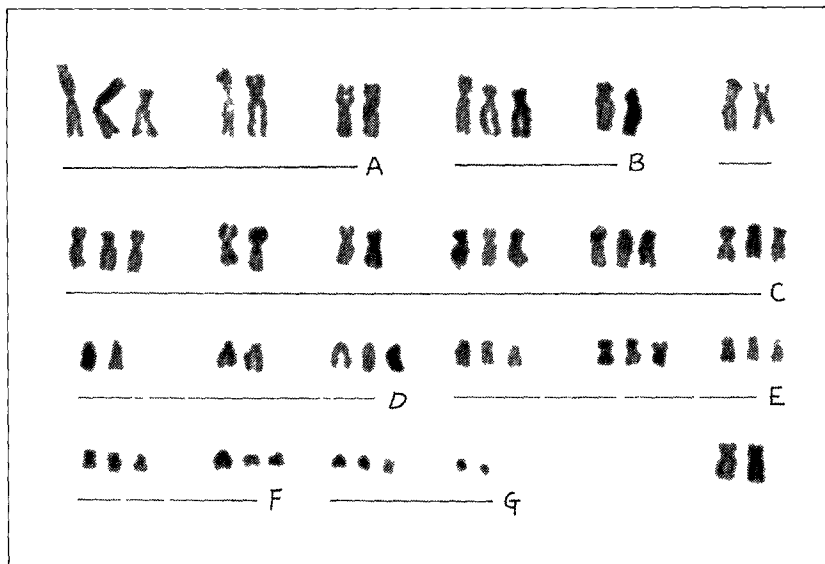


Fig. 1. The Karyotype of K₅₆₂

1

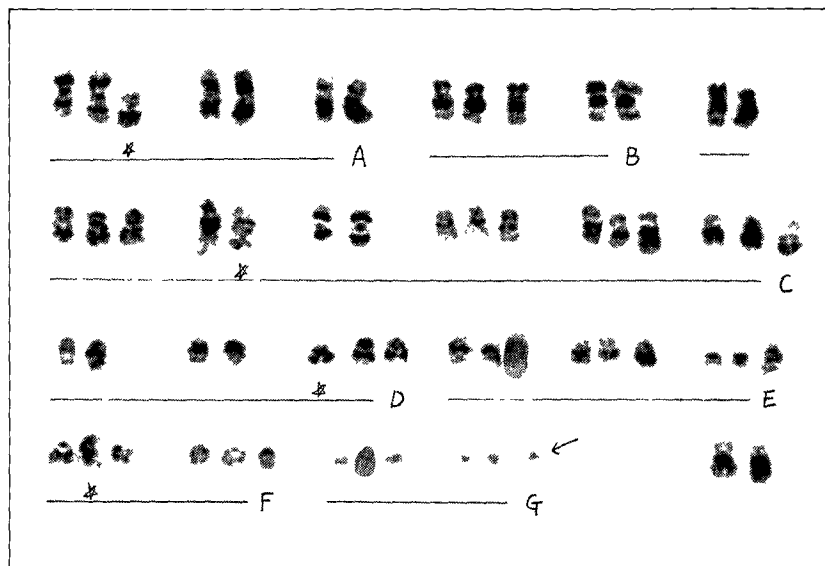


Fig. 2. The karyotype of G-band pattern of K₅₆₂

2

*Karyotype of a pseudotriploid cell with 46 chromosome stained with the giemsa banding technique

The philadelphia chromosome(Ph¹) is identified by the arrow.

★. abnormal chromosomes : M 1~4 markers