

# 항암제와 세포독성에 내성을 나타내는 생쥐 임파종 세포(NS-1)의 염색체 분포특성

연세대학교 이과대학 생물학과\* · 의과대학 미생물학교실

심우남\* · 김영민\* · 김주덕 · 이원영

= Abstract =

## Ploidy Characteristics of NS-1 Cells Resistant to BCNU or CCNU and Immune mediated Cytotoxicity *in vitro*

Woo Nam Shim\*, Young Min Kim,\* Joo Deuk Kim and Won Young Lee

\*Department of Biology, Yonsei University, Seoul, Korea

Department of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

In order to study the relationship between resistance of tumor cells to anticancer drugs and immunologic cytotoxicity and their chromosome number, a line of cancer cells (NS-1) was exposed to BCNU and CCNU *in vitro*. Characteristics of the distribution of chromosome number of the survived cells were then comparatively analyzed. Effect of immune mediated cytotoxicity, i.e. complement and cell-mediated cytotoxicity, on the ploidy characteristics was observed in the same way.

NS-1 cells were found to be a population of neoplastic cells of heterogeneity having 5 to 115 chromosomes per cell in metaphase. The majority of the cells were belong to the class of chromosome number 56 to 60 which were considered as the stem cell line.

Dramatic changes in the distribution of chromosome number following drug treatment were not observed. However the range of chromosome distribution was slightly changed. Characteristics of chromosomal distribution of drug treated cells were not significantly varied by different doses of drug treated. Changed chromosomal distribution patterns of drug treated cells were reversible, especially the cells having 56 to 60 chromosomes recovered rapidly. Cells having 41-60 and 61-80 chromosomes among cells treated with BCNU and cells with 41-60 chromosomes after CCNU treatment were the major population which regenerated continuously. Following BCNU treatment cells having 61-80 chromosomes were not varied much whereas CCNU treatment affects the population in the same class.

Chromosomal aberrations were significantly enhanced by BCNU and CCNU treatment. The frequency of chromosomal aberrations was greater in cells having more than 40 chromosomes compared with that in cells having less than 40 chromosomes.

Changes in ploidy characteristics of the cells following complement mediated and cell mediated cytotoxicity were not significant.

Therefore it was tentatively concluded that association of numerical distribution pattern of NS-1 cells with the response to the treatment used in this experiment was not recognized.

### 서론

종양은 악성세포의 집단으로서 그 구성은 동일한 성질을 가진 세포집단이 아니라 서로 다른 형질을 지닌 이질적인 세포의 소집단으로 이루어져 있

으며 이러한 이질성(heterogeneity)은 종양의 진행에 따른 숙주의 생리적 변화 등 기타 미세환경의 변화에 따라 계속적으로 변화한다는 사실이 보고되고 있다<sup>3, 28, 36, 57</sup>. 이러한 이질성은 동일개체에서 얻은 같은 종양이라 하더라도 이를 이루고 있는 각 개별세포의 형태가 서로 다르다고 하는 사실이 이들

의 병리조직학적 관찰에서 처음 알려졌으며, 그 후 종양을 이루고 있는 각 세포의 염색체수<sup>3, 12, 13, 24, 29, 39, 40, 45, 49, 52, 54, 60</sup>, 형태<sup>10, 78</sup>, 항원성<sup>51, 57</sup>, 종양성<sup>36</sup>, 전이능력<sup>19, 22, 23, 56, 71</sup>, 성장속도<sup>16, 26, 78</sup>, 그리고 항암제에 대한 감수성<sup>5, 7, 8, 21, 27, 30, 31, 32, 41, 48, 68, 76, 78</sup>, 등에서 보고가 되고 있다.

종양세포의 염색체수의 이질성은 종양이 숙주 체내에서 진행됨에 따라 계속 변화할 수 있는데 사람의 고형악성종양의 경우 진행초기부터 염색체의 양상은 정상과 크게 달라지며 그 후 임상적으로 진단될 만큼 진행되면 환자의 영양상태, 감염여부, 면역기능과의 반응, 치료 등의 환경요인이 기존 종양세포의 다양성의 정도를 더욱 증가시켜 이때의 염색체는 정상과 그것과는 거의 완전히 유형을 달리 하게 된다<sup>51, 53</sup>. 이와 같이 새로 형성된 종양세포 집단은 기타 미세환경의 변화에 따라 염색체의 구성은 물론 제반특성도 함께 지속적으로 달라지게 되는데, 이원영<sup>30</sup>은 흰쥐의 종양세포를 유리시험관과 플라스틱 용기에서 배양하면 그 배양용기에 따라 염색체의 구성과 종양성 그리고 virus에 대한 감수성이 크게 달라진다고 보고하였으며, Sanford et al.<sup>63</sup>과 Sanford<sup>62</sup>, 정해원 등<sup>3</sup>은 시험관 내에서 배양한 종양세포를 다시 생체내에 이식하면 종양성이 낮아진다고 보고하였다.

이와같은 종양은 우리나라 뿐만 아니라 전 인류를 위협하는 질병으로 등장하고 있으며 우리나라의 경우 10대 사인을 비교해 볼때 1953년 9위에 머물렀던 악성 신생물에 의한 사망이 1974년에는 순위로 부상하여 총사망진수의 6.4%를 차지하고 있다". 이와같이 암이 국민보건문제 중 중요시되는 이유는 암의 예방과 치료에 그만큼 어려움이 있기 때문이다. 김정순·이원영<sup>3</sup>은 암의 정복을 제1차 예방과 제2차 예방으로 나누어 고려하였는데 제1차 예방은 암의 유발요인을 규명하여 이들에 노출됨을 방지함으로써 암의 발생을 예방하는 것이나 그 유인의 정체를 확인하기 전에는 이용할 수가 없다. 따라서 개별환자의 조기진단과 조기치료를 근간으로 하는 제2차 예방 방법에만 의존하고 있는 것이 사실이다.

종양을 치료하는 방법에는 외과적으로 종양을 제거하는 방법과 화학요법, 방사선요법, 그리고 최근에 개발된 면역요법과 이들의 복합요법이 있다. 이 중 화학요법은 전신적 치료를 할 수 있는 아주 좋은 종양의 치료방법이나 정상세포에도 해를 줄 수 있으며 화학요법의 대부분이 숙주의 면역계를 저하시키는 작용 등 종양특이성이 없기 때문에 이를 해결해야 하는 단점이 지적되고 있다. 또한 항암제

에 대한 개별 종양세포의 감수성문제 역시 해결되어야 할 과제로 남아 있다. 즉 앞에서 언급한대로 종양세포집단이 서로 다른 특성을 지닌 이질적인 세포로 구성되어 있어 화학요법에 대한 감수성이 각 세포마다 다르기 때문에 일단 화학요법을 투여해도 그중에는 반드시 살아남는 세포가 있어 이들 내성세포의 종양성이 문제가 되고 있다.

한편 면역요법은 종양에 의해 저하된 숙주의 면역계를 강화시켜 숙주로 하여금 종양을 퇴치하게 하는 동시에 면역을 이용한 종양세포에의 직접독성을 이용하는 방법이다. 이 방법은 특이성이 있어 숙주에는 해가 없이 종양세포만을 죽일 수 있으나 아직은 임상에서 널리 이용될만큼 유효성이 높지 않아 임상적용은 거의 없는 실정이다. 현재까지 개발된 면역요법을 보면 BCG, *Corynebacterium parvum* 등의 세균과 이들의 biological products, interferon, 그리고 levamisole, tilorone, pyran copolymer 등의 화학 면역강화제 등이 있다<sup>9</sup>. 그러나 이러한 물질들에 의해 강화된 숙주의 면역계가 종양세포에 작용한다해도 종양세포집단의 이질성을 고려한다면 이 방법 역시 일부의 종양세포는 생존할 수 있을 것이며 이들 잔존세포의 종양성의 유무에 따라 그 치료 결과는 크게 달라질 것이다.

Richard and Atkin<sup>59</sup>은 자궁경부암 환자를 방사선 치료하면 살아남은 세포의 염색체 배수성이 변화되었으며 이들의 방사선 저항성이 증가되었음을 보고하고 있고, Fisher and Cifone<sup>24</sup>은 시험관내에서 배양된 생쥐의 섬유육종(fibrosarcoma)세포에 방사선을 조사한 후 생체내에 주입하면 전이능력과 종양성이 증가함을 보고하였다. 정해원 등<sup>3</sup>은 시험관 내에서 배양된 생쥐 종양세포 sarcoma-180 Y S 세포에 방사선을 조사하면 10배체 이상의 높은 배수성의 세포의 비율이 방사선 조사 총량에 따라 증가하며 방사선 양이 증가할수록 종양성은 감소한다고 보고하였다. 이러한 결과는 종양세포 집단은 근본적으로 이질적인 세포로 구성되어 있으므로 각 세포마다 방사선 감수성이 서로 다르기 때문이며, 또한 치료후 생존한 세포들도 원래 가지고 있던 방사선 저항 유전자형질외에 방사선에 의해 새로운 유형의 유전자발현에 의해 원래의 세포와는 크게 다른 형질을 나타낼 수 있는 가능성도 있다고 하였다.

또한 종양세포의 항암제에 대한 감수성이 서로 다르다고 보고되고 있는데 Mealey et al.<sup>68</sup>은 5종의 사람 신경교아세포종(glioblastoma)을 시험관 내 배양한 후 각 종양세포의 1, 3-bis(2-chloroethy) 1-nitrosourea(BCNU)에 대한 약제 감수성을 조사한

결과 세포독성은 4~85%로 크게 달랐음을 보고하였고 이들 세포의 약제 감수성은 방사선 감수성보다 훨씬 다양함을 보고하였다. Kornblith and Szypko<sup>32)</sup>도 24종의 사람 뇌종양세포를 시험관내 배양하여 BCNU에 대해 서로 다른 약제 감수성을 보임을 보고하였다. Heppner et al.<sup>30)</sup>은 하나의 생쥐 유암(mammary tumor)에서 유래된 3종의 서로 다른 소집단의 cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil에 대한 생체내 감수성이 현저히 다름을 보고하였고, 약제를 처리하면 primary tumor가 regression되거나 오히려 전이(metastasis)가 증가하는 등 다양한 반응을 나타낸다고 하였다. 또한 동일세포를 시험관내 배양하여 methotrexate와 5-fluorouracil에 대한 감수성을 조사해본 결과 이들 소집단간에 현저한 차이가 있음을 보고하였고 이때 시험관내 결과와 생체내의 감수성 사이에는 직접적인 연관성을 맺기 어렵다고 하였다. 어쨌든 동일종양내에 약제 감수성이 서로 다른 세포들이 혼재함은 사실이며, 어떤 약제에 대한 종양세포의 반응을 시험관내에서 미리 검사하여 효과적인 약제를 선택하는 방법의 개발이 중요하다고 하였다. 한편 Lotan and Nicolson<sup>41)</sup>은 B-16 melanoma parental cell line, 이들의 *in vitro* cloned cell line, *in vivo*에서 selection된 cell line, 그리고 시험관내에서 임파구 매개 세포독성에 내성인 cell line 등 모두 10종의 세포주를 이용하여 retinoic acid에 대한 감수성을 조사해 본 결과 그 억제되는 정도에는 각 세포주마다 현저한 차이가 있음을 보고하였고 더우기 primary cell과 이들의 전이된 세포 사이에도 약제 감수성이 서로 다르다고 하였다. Kornblith et al.<sup>31)</sup>은 58종의 사람 뇌종양세포의 BCNU에 대한 감수성을 조사해 본 결과 cytotoxic index가 0.25에서 0.76까지 심했으며 시험관내 약제 감수성 결과와 임상결과와는 밀접한 연관성이 있음을 보고하였다. 한편 Wilson and Neal<sup>6)</sup>은 시험관내에서 35종의 사람 난소종(ovarian tumor)세포를 배양하여 여러가지 화학요법제에 대한 감수성을 조사한바 그 차이가 매우 심하며, 시험관내 약제 감수성 결과와 임상결과와 밀접한 관련이 있음을 보고하였고, 일반적으로 약물치료를 받은 환자의 종양세포가 약물치료를 받지 않은 환자의 종양세포보다 훨씬 내성이 높음을 보고하였다. Tsuruo and Fidler<sup>68)</sup>은 생쥐와 사람 종양세포의 parental cell과 *in vitro* cloned cell, parental cell과 이들의 전이된 세포, 뿐만 아니라 여러 전이 종양세포 집단간에도 약제 감수성이 서로 다름을 보고하였다. Yung et al.<sup>76)</sup>은 사람의 악성 뇌종양에서 얻은 핵형이 서로 다른 12종의 세

포주에서 각 세포의 형태, 시험관내 성장속도, B CNU와 cis-diamminedichloroplatinum(11)에 대한 약제 감수성이 현저히 다름을 발견하였고, 염색체수와 형태, 성장속도 그리고 약제 감수성 사이에는 서로 연관성을 맺기 어렵다고 보고하였다. Ahmann et al.<sup>9)</sup>은 140종의 사람 종양세포의 4-(9-acridinyl-amino) methanesulfon-m-anisidide에 대한 감수성을 조사하여 이중 29예에서 감수성을 나타내었으며 이러한 시험관내 결과는 생체내 결과와 일치한다고 보고하였다.

이상과 같이 종양세포의 항암제에 대한 감수성의 차이를 보고한 예는 있으나 그 내성세포의 특성을 보고한 예는 거의 없다. 이에 저자는 종양세포 집단의 개별세포의 염색체수를 표지로 하여 그 종양집단의 특성을 파악한 후, 화학요법제로 BCNU와 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea(C CNU)를 선택하여 이들 약제에 감수성을 가진 세포들을 염색체수로 규정지을 수 있는지 또한 같은약리작용을 갖는 이들 약제에 내성세포들이 같은 성질을 갖는 세포들인지를 알아 보고, 그 외에 보체매개 세포독성과 임파구 매개 세포독성에 내성을 나타내는 세포들의 특성에도 염색체 분포도로 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 종양세포

BALB/c 마우스에서 유래되어 시험관내 배양된 임파종 세포 NS-1을 사용하였고 배양액은 주 2회 정기적으로 갈아주었다.

#### 2) 실험동물

체중  $18 \pm 2$  gm의 BALB/c마우스를 암수 구별없이 사용하였고, NS-1 세포에 대한 항혈청을 얻기 위한 실험동물로는 체중 2 kg 정도의 가토를 사용하였다.

#### 3) 세포배양액

배양액은 RPMI 1640(Flow Laboratories, USA) 배지에 10% 우태아혈청(fetal calf serum, GIBCO, USA)과 penicillin 100 I.U./ml, streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 사용하였다.

#### 4) 배양용기

NS-1 세포의 stock culture에서는 Falcon 플라스틱 용기를 사용하였고, 그외의 실험에서는 Pyrex 유리 용기를 사용하였다.

#### 5) 약 제

BCNU(Bristol Laboratories, USA)는 100 mg을

absolute ethanol 3ml에 녹인 후 멸균된 증류수 27 ml을 가하여 -20℃에 얼렸다가 쓰기 직전에 녹여 세포배양액으로 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. CCNU(Bristol Laboratories, USA)는 10mg을 absolute ethanol 3ml에 녹인 후 BCNU와 같은 방법으로 사용하였다. BCNU와 CCNU(Fig. 1)는 nitrosourea compound로써 임상에서 뇌종양, 다발성 골수종, 악성 임파육아종에 사용되고 있으며 그 약리작용은 주로 DNA나 RNA를 alkylation 시킴으로써 세포를 죽이며 cell cycle 중 S-phase에 있는 세포가 가장 민감하다고 알려져 있다.

## 6. Colcemid

냉동건조된 colcemid(GIBCO, USA)에 멸균된 증류수를 넣어 녹인 후 마지막 농도가 0.6 µg/ml이 되게 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 약제 감수성 검사

Mealey et al.<sup>44</sup>의 방법에 따라 NS-1 2×10<sup>6</sup> cell에 각 약제를 농도별로 넣고 24시간 처리한 후 약제가 없는 새로운 배지로 갈아 주고 다시 24시간 배양한 후 trypan blue를 사용하여 살아남은 세포의 수를 세어 약제 감수성 정도를 % growth inhibition으로 나타내고, 여기에 colcemid를 넣어 염색체 표본을 제작하였다. % growth inhibition은

$$\left(1 - \frac{\text{실험군의 평균세포수}}{\text{대조군의 평균세포수}}\right) \times 100 \text{으로 계산하였다.}$$

### 2) NS-1 세포에 대한 항혈청

Garvey et al.<sup>25</sup>의 방법에 따라 NS-1 3.5×10<sup>7</sup> cell을 생리식염수에 부유시켜 2주일 간격으로 3회 토끼의 이정맥내로 주사하였고 마지막 주사 1주일 후 채혈하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 -20℃에 얼렸다가 쓰기 직전에 녹여 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 실험에 사용하였다.

### 3) 보체 매개 세포독성

Garvey et al.<sup>25</sup>의 방법에 따라, NS-1에 대한 항혈청을 2단계 희석한 후 희석된 혈청 50µl와 NS-1 5×10<sup>4</sup> cell/100µl, guinea pig 혈청(1:5희석) 50µl를 넣고 37℃에서 1시간 배양한 후 새로운 배지로

갈아 넣고 다시 24시간 배양한 후 살아남은 세포수를 세어 % 세포독성을 계산하고, 여기에 colcemid를 넣어 염색체 표본을 제작하였다. % 세포독성은 Takasugi and Klein<sup>47</sup>, Garvey et al.<sup>25</sup>의 방법을 변형하여

$$\left( \frac{(\text{serum}+c) - (\text{SD}+C)}{\text{넣어준 세포수} - (\text{SD}+C)} - \frac{(\text{serum}-c) - (\text{SD}-C)}{\text{넣어준 세포수} - (\text{SD}-C)} \right) \times 100 \text{으로}$$

계산하였다.

serum+c; NS-1 항혈청과 보체를 함께 넣어 주었을 때 죽은 세포수

SD+C; NS-1 항혈청 없이 보체만 넣어 주었을 때 죽은 세포수

serum-c; 보체없이 NS-1 항혈청만 넣어 주었을 때 죽은 세포수

SD-C; NS-1 항혈청과 보체를 모두 넣지 않았을 때 죽은 세포수

### 4) 면역 비장세포

Garvey et al.<sup>25</sup>의 방법에 따라 BALB/c 마우스에 NS-1 4.6×10<sup>6</sup> cell을 생리식염수에 부유시켜 2주일 간격으로 2회 꼬리정맥내로 주사하였고, 2번째 주사 2주일 후에 비장을 적출하여 single-cell suspension을 만들었다. 그 후 0.14 M NH<sub>4</sub>Cl을 5분간 처리하여 적혈구를 깨뜨리고 Hanks balanced salt solution으로 2번 세척한 후 세포 배양액으로 원하는 농도로 희석하여 사용하였다.

### 5) 임파구 매개 세포독성

Vanky et al.<sup>60</sup>의 방법에 따라 NS-1 5×10<sup>6</sup> cell에 면역 비장세포를 effector cell: target cell ratio를 1:1, 3:1, 10:1, 33:1, 100:1의 비율로 넣고 37℃에서 24시간 배양한 후 trypan blue로 생존 세포수를 세어 % 세포독성을 계산한 후 여기에 colcemid를 넣어 염색체 표본을 제작하였다. % 세포독성은 Takasugi and Klein<sup>47</sup>의 방법을 이용하여,

$$\left( \frac{\text{실험군에서 죽은수} - \text{대조군에서 죽은수}}{\text{넣어준 세포수} - \text{대조군에서 죽은수}} \right) \times 100 \text{으로 계산하였다.}$$

### 6) 염색체 표본 제작

이원영<sup>36</sup>의 방법에 의하여 colcemid를 마지막 농도가 0.6 µg/ml되게 넣고 37℃에서 2시간 처리한 후 200g에서 원심분리한 후 미리 37℃로 가온한 0.075 M KCl 용액을 넣고 잘 섞은 후 다시 200g에서 10분간 원심분리하여 저장액을 제거한 다음 고정액(methanol 3:acetic acid 1)을 서서히 가한 후 4℃에 보유하고 있던 silde에 Rothfels and Siminovic<sup>61</sup>의 공기건조법에 따라 염색체 표본을 만들

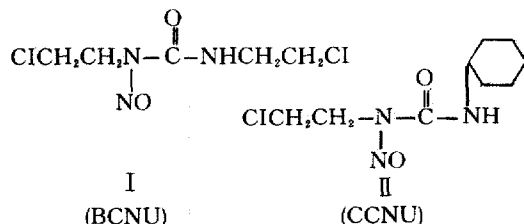


Fig. 1. Structures of BCNU and CCNU

마우스 정상세포는 telocentric한 40개의 염색체를 가지고 있으나 NS-1 세포는 Fig.2와 Table 1에서 보는 바와 같이 metacentric한 5~115개의 각

기 다른 염색체수를 갖는 이질적인 세포의 집단으로 50~60개의 염색체를 갖는 세포가 전체의 70%로 주종세포를 이루고 있었다.

**Table 2.** Effect of BCNU concentration on the distribution of survived NS-1 cells with regard to their chromosome number\*

No. of chromosomes	11 mcg/ml (EC <sub>40</sub> )		22 mcg/ml (EC <sub>50</sub> )		49 mcg/ml (EC <sub>75</sub> )	
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 5	0	0	0	0	0	0
6 - 10	4	4	0	0	1	1
11 - 15	2	2				
			6%			
16 - 20	0	0	0	0	4	4
					1	1
21 - 25	4	4	0	0	3	3
26 - 30	2	2	1	1	2	2
31 - 35	1	1	5	5	5	5
			15%		26%	
36 - 40	8	8	7	7	1	1
41 - 45	5	5	13	13	3	3
46 - 50	13	13	16	16	7	7
51 - 55	10	10	11	11	12	12
			61%		63%	
56 - 60	33	33	22	22	24	24
61 - 65	16	16	14	14	28	28
66 - 70	1	1	5	5	5	5
71 - 75	0	0	0	0	1	1
			17%		7%	
76 - 80	0	0	1	1	0	0
81 - 85	1	1	1	1	1	1
86 - 90			1	1	0	0
91 - 95			0	0	0	0
			1%		1%	
96 - 100			0	0	0	0
101 - 105			1	1	0	0
106 - 110			2	2	0	0
111 - 115					0	0
					3%	
116 - 120					0	0
121 - 125					2	2
126 - 130						
131 - 135						
						2%
136 - 140						
Total	100	100	100	100	100	100

\* Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with various doses of BCNU and then placed into the medium for additional 24 hours which does not contain the drug.

**Table 1.** Distribution of NS-1 cells with regard to their chromosome number.\*

No. of chromosomes	No. of cells	%	
1 - 5	1	1	
6 - 10	0	0	
11 - 15	3	3	6%
16 - 20	2	2	
21 - 25	2	2	
26 - 30	2	2	
31 - 35	3	3	7%
36 - 40	0	0	
41 - 45	6	6	
46 - 50	7	7	
51 - 55	9	9	69%
56 - 60	47	47	
61 - 65	15	15	
66 - 70	1	1	
71 - 75	0	0	16%
76 - 80	0	0	
81 - 85	1	1	
86 - 90	0	0	
91 - 95	0	0	1%
96 - 100	0	0	
101 - 105	0	0	
106 - 110	0	0	
111 - 115	1	1	1%
116 - 120	0	0	
Total	100	100	

\* Cells were cultured *in vitro* using RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 I.U./ml) and streptomycin (100 mcg/ml) as described in the methods.

었다. 그후 Giemsa 염색액으로 20분간 염색한 다음 영구표본을 제작한 후 oil immersion으로 100개의 중기(metaphase)세포를 세어 염색체 분포를 %로 나타내었다.

### 성 적

1. 시험관내에서 배양된 NS-1 세포의 염색체 분포 특성

**Fig. 2.** Metaphase chromosomes of NS-1 cells cultured *in vitro*.

- A. Metaphase chromosome of NS-1 cells which have 55 chromosomes
- B. "Endoreduplication". This is the result of a rare endomitotic mechanism preceding polyploidization.
- C. Metaphase chromosome of NS-1 cells after drug treatment which have 62 chromosomes with chromosome abnormalities including acentric fragments(short arrows).
- D. Metaphase chromosome of NS-1 cells after drug treatment which have 21 chromosomes with many gaps.

2. 시험관내에서 BCNU 처리후 생존 NS-1 세포의 억제용량에 따른 염색체 분포 양상 변화

NS-1 세포  $2 \times 10^6$ 을 각기 40%, 50%, 75%를 죽이는 BCNU의 용량을 선택하여 억제 처리 이틀후 생존세포의 염색체 분포를 보면(Table 2, Fig.3), 우선 용량에 관계없이 억제 처리후 염색체 분포가 변화하였고 또한 분포 범위가 넓어졌으며 용량에 따

라도 염색체 분포에 약간의 차이가 있으나 56~60개의 염색체를 갖는 세포는 계속 주종세포를 이루고 있었다. 또한 억제 처리후에 6배체 이상의 많은 염색체를 갖는 세포가 나타나는 것을 볼 수 있었다.

3. 시험관내에서 CCNU 처리후 생존 NS-1 세포의 억제용량에 따른 염색체 분포 양상 변화

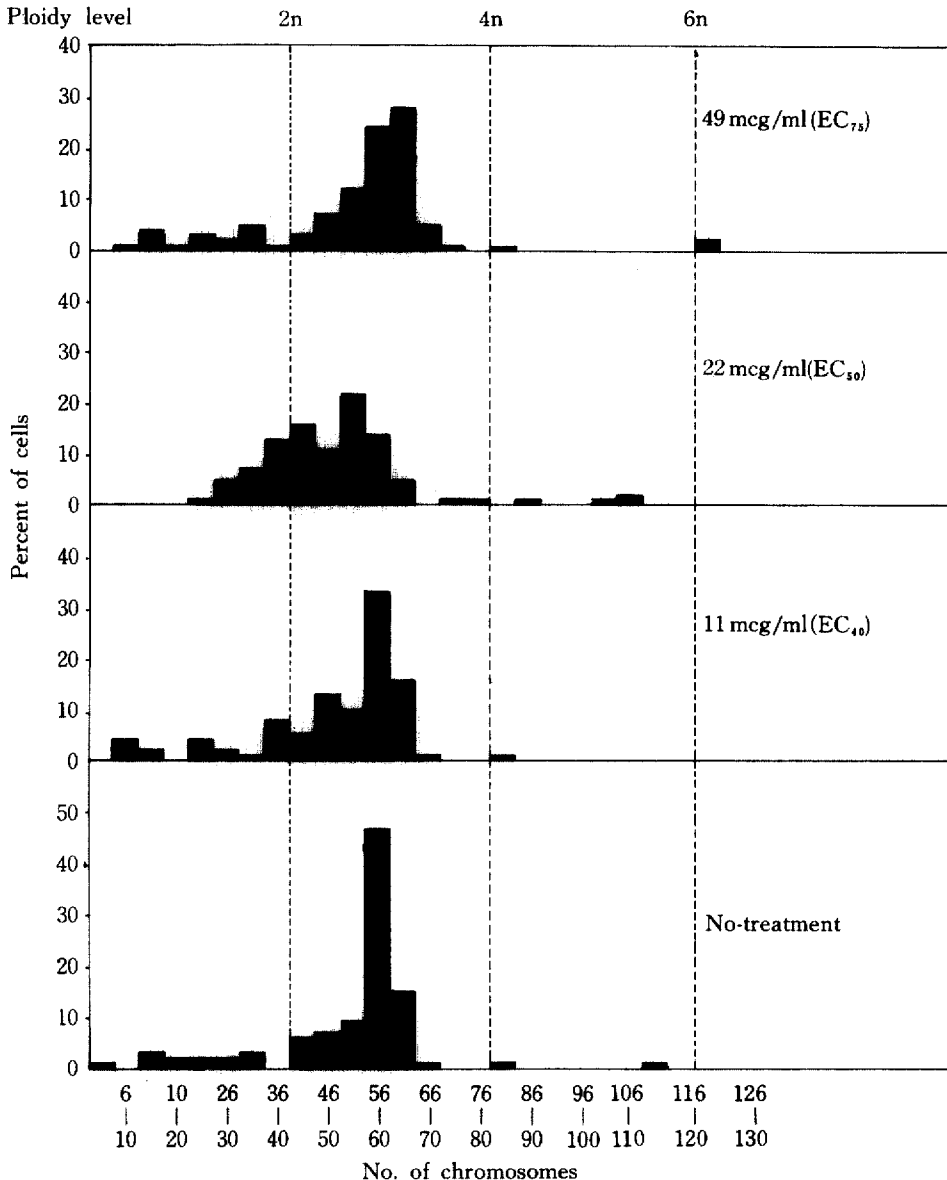


Fig. 3. Effect of BCNU concentration on the distribution of survived NS-1 cells with regard to their chromosome number.

Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with various doses of BCNU and then placed into the medium for additional 24 hours which dose not contain the drug.

**Table 3.** Effect of CCNU concentration on the distribution of survived NS-1 cells with regard to their chromosome number\*.

No. of chromosomes	6 mcg/ml (EC <sub>40</sub> )		14 mcg/ml (EC <sub>50</sub> )		35 mcg/ml (EC <sub>75</sub> )			
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%		
1 - 5	0	0	0	0	0	0		
6 - 10	0	0	0	0	3	3		
11 - 15	0	0						
		2%	1	1	4%	3	3	9%
16 - 20	2	2	3	3	3	3		
21 - 25	2	2	3	3	4	4		
26 - 30	3	3	3	3	2	2	10%	
31 - 35	5	5	5	5	2	2		
36 - 40	1	1	9	9	2	2		
41 - 45	6	6	3	3	7	7		
46 - 50	7	7	13	13	1	1	55%	
51 - 55	9	9	10	10	10	10		
56 - 60	26	26	31	31	37	37		
61 - 65	33	33	13	13	24	24		
66 - 70	2	2	3	3	0	0	24%	
71 - 75	0	0	0	0	0	0		
76 - 80	1	1	0	0	0	0		
81 - 85	0	0	0	0	0	0		
86 - 90	0	0	0	0	0	0		
91 - 95	0	0	0	0	0	0		
96 - 100	0	0	1	1	0	0		
101 - 105	1	1	0	0	1	1		
106 - 110	1	1	1	1	0	0	2%	
111 - 115	0	0	0	0	1	1		
116 - 120	0	0	0	0	1	1		
121 - 125	0	0	0	0				
126 - 130	0	0	0	0				
131 - 135	1	1	0	0				
136 - 140			0	0				
141 - 145			0	0				
146 - 150			1	1	1%			
Total	100	100	100	100	100	100		

\* Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with various doses of CCNU and then placed into the medium for additional 24 hours which does not contain the drug.



BCNU와 같은 방법으로 CCNU처리 이틀 후에 생존세포의 염색체 분포를 보면(Table 3, Fig. 4), BCNU의 경우와 거의 비슷한 것을 알 수 있었다. 이 두가지 경우 실제로는 약제 처리후 특정 염색체수를 갖는 세포집단이 없어졌으나 약제의 염색체 변형 유도 현상에 의해 다른 염색체수를 갖는 세포로

부터의 이동도 배제할 수는 없다. 아 물론 이 두경우에서 BCNU나 CCNU에 내성을 나타내는 세포를 염색체수의 특성만으로 규정지을 수는 없었다.

4. 시험관내에서 BCNU처리후 시간경과에 따라 회복되는 NS-1 세포의 염색체 분포 양상 변화

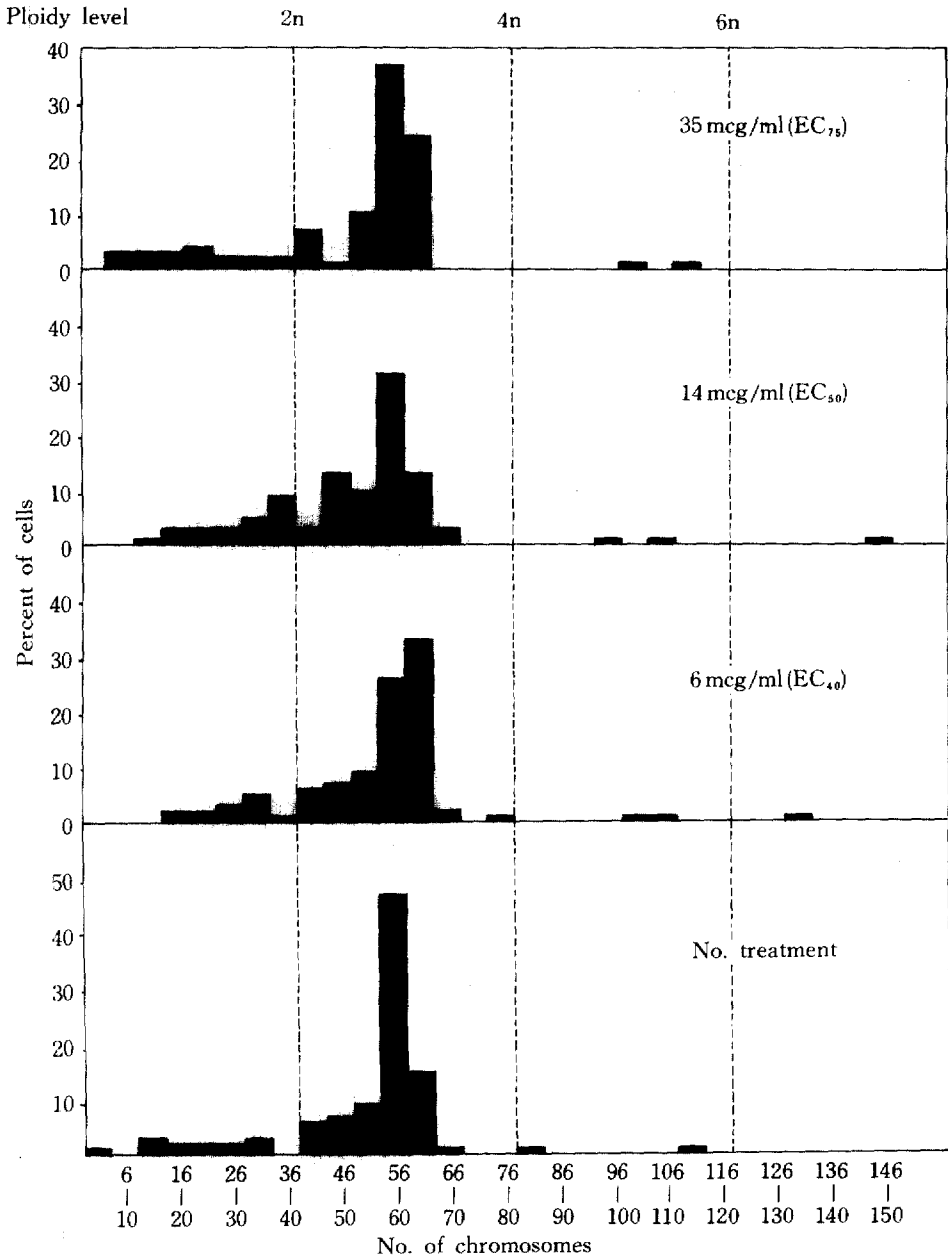


Fig. 4. Effect of CCNU concentration on the distribution of survived NS-1 cells with regard to their chromosome number.

Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with various doses of CCNU and then placed into the medium for additional 24 hours which dose not contain the drug.

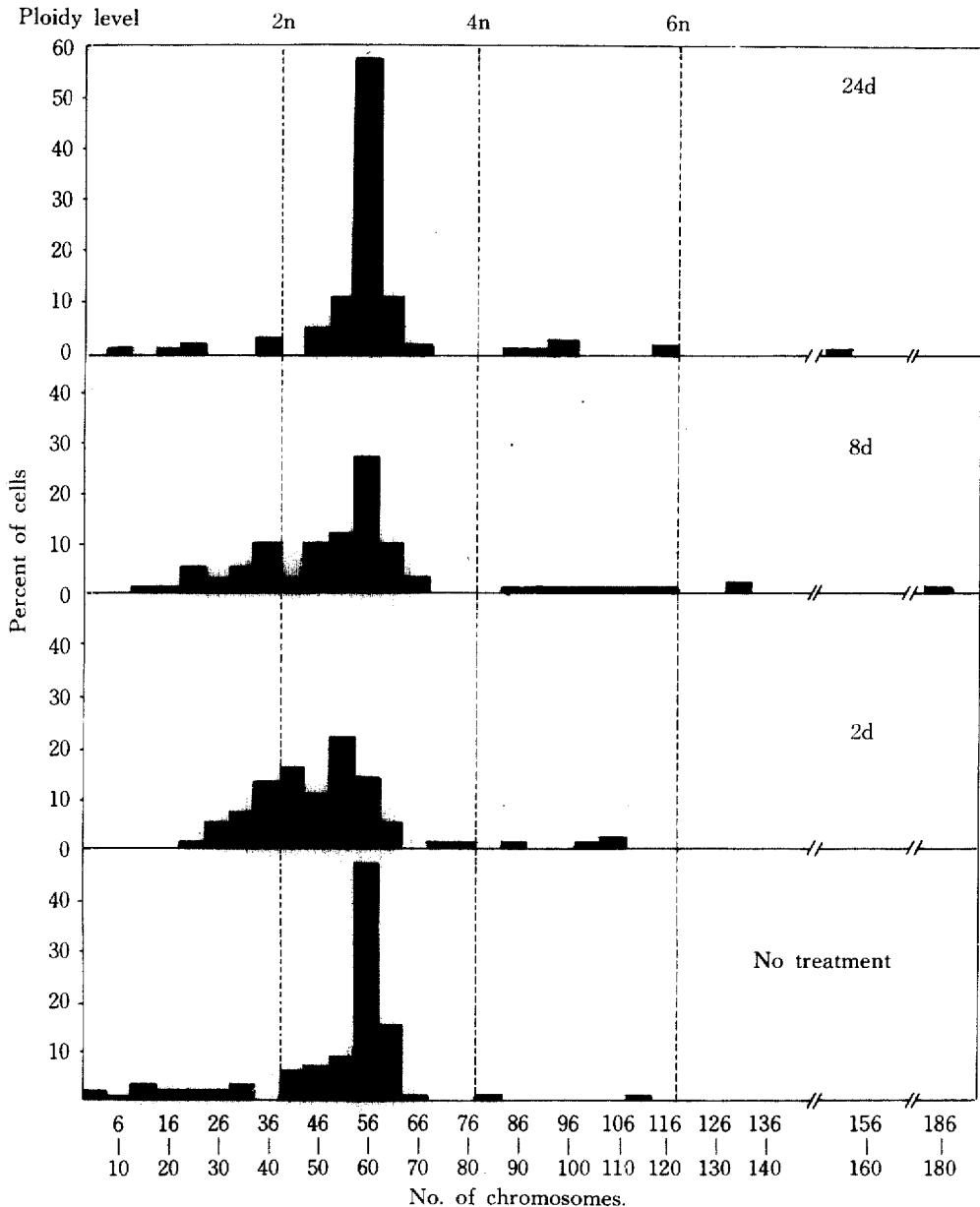
**Table 4.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after BCNU treatment\*.

No. of chromosomes	No treatment		After 2 days		After 8 days		After 24 days	
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 5	1	1	0	0	0	0	0	0
6 - 10	0	0	0	0	0	0	1	1
11 - 15	3	3	0	0	1	1	0	0
			6%				2%	2%
16 - 20	2	2	0	0	1	1	1	1
21 - 25	2	2	1	1	5	5	2	2
26 - 30	2	2	5	5	3	3	0	0
31 - 35	3	3	7	7	5	5	0	0
			7%	26%	23%			5%
36 - 40	0	0	13	13	10	10	3	3
41 - 45	6	6	16	16	3	3	0	0
46 - 50	7	7	11	11	10	10	5	5
51 - 55	9	9	22	22	12	12	11	11
			69%	63%	52%			74%
56 - 60	47	47	14	14	27	27	58	58
61 - 65	15	15	5	5	10	10	11	11
66 - 70	1	1	0	0	3	3	1	1
71 - 75	0	0	1	1	0	0	0	0
			16%	7%	13%			12%
76 - 80	0	0	1	1	0	0	0	0
81 - 85	1	1	0	0	0	0	0	0
86 - 90	0	0	1	1	1	1	1	1
91 - 95	0	0	0	0	1	1	1	1
			1%	1%	3%			4%
96 - 100	0	0	0	0	1	1	2	2
101 - 105	0	0	1	1	1	1	0	0
106 - 110	0	0	2	2	1	1	0	0
111 - 115	1	1			1	1	0	0
			1%	3%	4%			2%
116 - 120	0	0			1	1	2	2
121 - 125					0	0	0	0
126 - 130					0	0	0	0
131 - 135					2	2	0	0
							2%	
136 - 140					0	0	0	0
155 - 160					0	0	1	1
								1%
185 - 190					1	1		
								1%
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

\* Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with BCNU(22 mcg/ml) and then transferred to the medium which dose not contain the drug for additional 1, 7, or 23 days, respectively, of cultivation.

50%의 NS-1세포를 죽이는 BCNU의 용량을 선택하여 시험관내에서 처리한 후 시간 경과에 따라 회복되는 세포의 염색체 분포를 보면(Table 4, Fig 5), 24일까지 조사해 보았을 때 시간이 흐름에 따라 억제처리 이전의 상태로 돌아가는 것을 볼 수 있었고 특히 염색체수 56~60개를 갖는 주종세포의 비율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 6배체

이상의 많은 염색체를 갖는 세포가 24일후에도 계속 생존하는 것을 볼 수 있었다. 실제로 임상에서 BCNU를 재차 투여하는 기간은 6주 이상으로 되어 있으나 이미 억제 처리후 3주일이 되면 염색체 분포로 보았을 때 다시 억제 처리 이전의 상태로 돌아가는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 5.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after BCNU treatment.

Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with BCNU(22mcg/ml) and then transferred to the medium which does not contain the drug for additional 1, 7, or 23 days, respectively, of cultivation.

5. 시험관내에서 CCNU 처리된 세포는 8일 후에도 8배체 이상의 상태로 돌아가는 것 같  
 회복되는 NS-1 세포의 염색체 분포 양상 변화 이 보이나 이 경우에는 BCNU의 경우와는 달리  
 CCNU의 경우에도(Table 5, Fig. 6), 시간이 56~65개의 염색체를 갖는 세포들이 증가하였고 약  
 제처리 8일 후에도 8배체 이상의 많은 염색체를

**Table 5.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after CCNU treatment\*

No. of chro- mosomes	No treatment		After 2 days		After 8 days	
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 5	1	1	0	0	0	0
6 - 10	0	0	0	0	1	1
11 - 15	3	3	1	1	0	0
16 - 20	2	2	3	3	2	2
21 - 25	2	2	3	3	1	1
26 - 30	2	2	3	3	2	2
31 - 35	3	3	5	5	0	0
36 - 40	0	0	9	9	1	1
41 - 45	6	6	3	3	0	0
46 - 50	7	7	13	13	8	8
51 - 55	9	9	10	10	5	5
56 - 60	47	47	31	31	33	33
61 - 65	15	15	13	13	39	39
66 - 70	1	1	3	3	5	5
71 - 75	0	0	0	0	0	0
76 - 80	0	0	0	0	1	1
81 - 85	1	1	0	0	0	0
86 - 90	0	0	0	0	0	0
91 - 95	0	0	0	0	0	0
96 - 100	0	0	1	1	0	0
101 - 105	0	0	0	0	0	0
106 - 110	0	0	1	1	0	0
111 - 115	1	1	0	0	0	0
116 - 120	0	0	0	0	1	1
146 - 150			1	1	0	0
195 - 200					1	1
Total	100	100	100	100	100	100

\* Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with CCNU (14 mcg/ml) and then transferred to the medium which dose not contain the drug for addition 1 or 7 days, respectively, of cultivation.

갖는 세포가 생존하였다.

이와같이 약제처리후 시간경과에 따라 회복되는 세포들의 염색체수를 기준으로 집단을 나누어 각 개별집단의 분포 변화를 회복시간과 연관시켜 cumulative percent로 나타내보면 BCNU의 경우(Fig 7), 41~60개와 61~80개의 염색체를 갖는 세포들이 지속적으로 시간경과에 비례하여 회복되는 것을 볼 수 있었다. CCNU의 경우에도(Fig. 8) 41~60개의 염색체를 갖는 세포들이 가장 빨리 날짜와 비례하여 증가하였다.

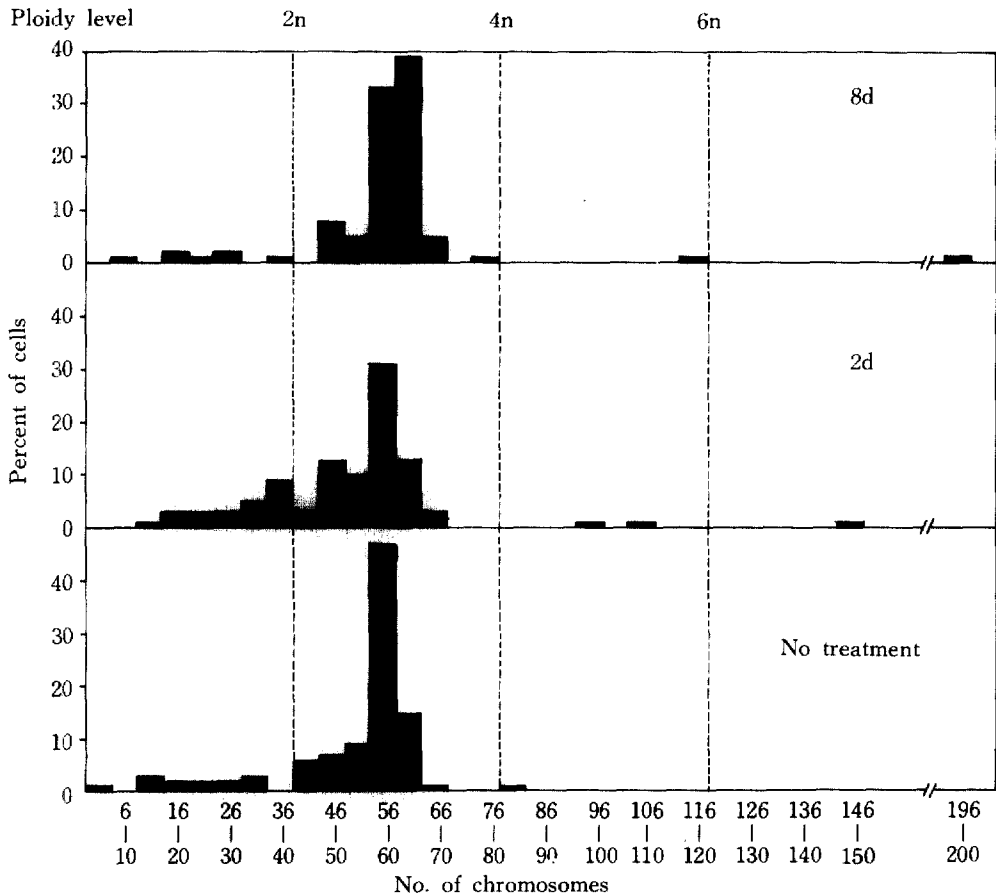
### 6. BCNU와 CCNU 처리후 회복되는 세포의 염색체 분포 양상 비교

BCNU와 CCNU 처리후에 염색체수를 기준으로 집단을 나누어 각 개별집단의 분포 변화를 회복시간과 연관시켜 보면(Fig. 9), BCNU의 경우 61~80개의 염색체를 갖는 세포들이 시간 경과에 따라 제

속 일정한 비율을 차지하고 있으나 CCNU의 경우에는 이들 집단이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이와같이 동일한 중앙세포를 같은 약리작용을 갖는 약제로 처리하였을때 서로 다른 염색체 분포를 갖는 세포들이 생존하였고 약제 처리후 회복되는 유형에도 두 약제 사이에 차이가 있었다.

### 7. 약제처리후 염색체 이상

또한 약제 처리후에 많은 세포에서 염색분체 절단(chromatid break), 염색체 절단(chromosome break), acentric fragment, minute, 이동원체염색체(dicentric chromosome), diversion 등의 많은 염색체 이상을 발견하였는데 그 결과를 종합해 보면 (Table 6), NS-1세포는 40개 이하의 염색체를 갖는 세포에서는 7.7%, 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 24.1%가 이러한 염색체 이상을 가지고 있었으나, BCNU처리 이틀후에는 40개 이하의 염색



**Fig. 6.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after CCNU treatment.

Cells were first treated *in vitro* for 24 hours with CCNU(14mcg/ml) and then transferred to the medium which does not contain the drug for additional 1 or 7 days, respectively, of cultivation.

체를 갖는 세포에서는 38.5%, 24일 후에는 14.3%가, 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 이틀후에는 44.6%, 24일후에는 61.3%에서 이러한 염색체 이상을 발견할 수 있었다. CCNU의 경우에는 약제 처리 이틀후에 40개 이하의 염색체를 갖는 세포에서는 83.3%, 8일 후에는 57.1%가, 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 이틀후에 46.1%에서 8일후에는 86.0%로 증가하였다. 즉 BCNU나 CCNU 모두 40개 이하의 염색체를 가진 세포에서는 시간이 흐름에 따라 염색체 이상을 가진 세포가 감소한 반면 41개 이상의 염색체를 가진 세포에서는 그 비율이 증가하였다.

총괄적으로 약제에 의한 염색체 이상이 시간 경과에 따라 회복되는 것이 아니라 오히려 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 염색체 분포 양상으로 보았을때 약제 처리후 일정시간이 지나면 다시 약제 처리 이전의 상태로 돌아가 두 집단이 서로 비슷한 염색체 분포를 가지나, 염색체 이상 정도로 보았을때 이 두 집단은 서로 다른 특성을 지닌 집단이라고 생각할 수 있었다.

#### 8. 시험관내에서 보체 매개 세포독성 실시후 생존 NS-1 세포의 염색체 분포 양상 변화

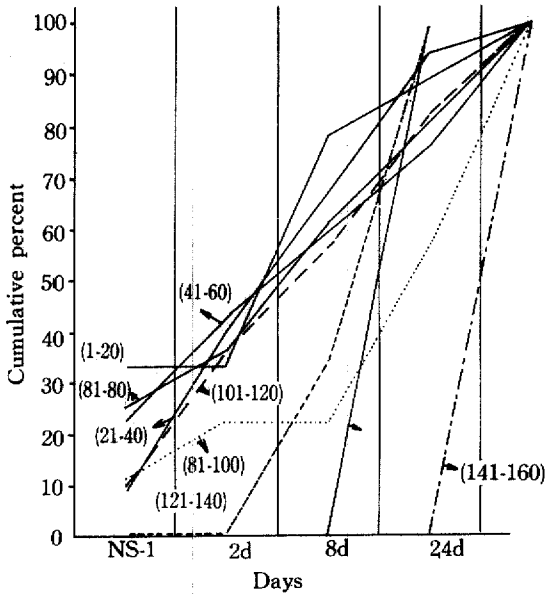


Fig. 7. Cumulative percent of recovered NS-1 cells after BCNU treatment with regard to their chromosome number.

Cells were initially treated *in vitro* for 24 hours with BCNU(22 mcg/ml) and then incubated for additional 1, 3, 7 or 23 days, respectively, in the medium without the drug.

방법 3에서와 같은 방법으로 시험관 내에서 보체 매개 세포독성을 실시한 후 50%의 NS-1 세포를 죽일 수 있는 NS-1 세포의 항혈청의 희석농도를 1:42로 결정할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 보체 매개 세포독성 실시후 1일후에 생존 NS-1세포의 염색체 분포를 보면(Table 7, Fig. 10), 처리이전과 큰 차이가 없으며 9일후에는 2배체 이하의 염색체를 갖는 세포들이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러므로 보체 매개 세포독성에 내성을 나타내는 세포들의 특성을 염색체수로 규정지을 수 없었다.

#### 9. 시험관내에서 임파구 매개 세포독성 실시 후 생존 NS-1 세포의 염색체 분포 양상 변화

방법 5에서와 같은 방법으로 시험관 내에서 임파구 매개 세포독성을 실시하여 50%의 NS-1 세포를 죽일 수 있는 작용세포(effector cell): 표적세포(target cell)의 비율 100:1로 결정할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 임파구 매개 세포독성을 실시한 후 1일후에 생존 NS-1 세포의 염색체 분포를 보면(Table 8, Fig. 11), 처리 이전의 상태와 큰 차이가 없으며 4배체 이상의 염색체를 갖는 세포는 없어지는 것을 알 수 있다.

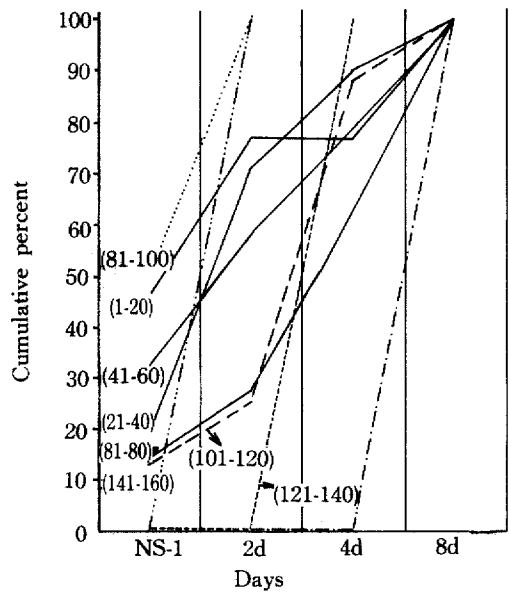
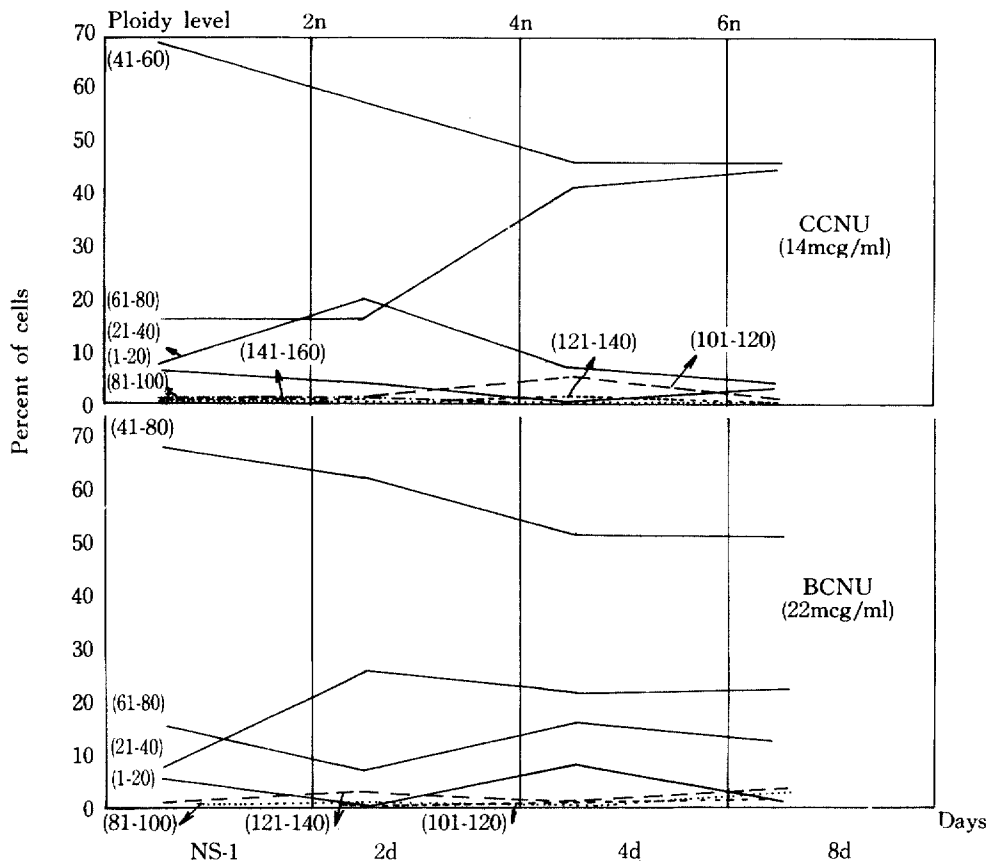


Fig. 8. Cumulative percent of recovered NS-1 cells after CCNU treatment with regard to their chromosome number.

Cells were initially treated *in vitro* for 24 hours with CCNU(14mcg/ml) and then incubated for additional 1, 3, or 7 days, respectively, in the medium without the drug.



**Fig. 9.** Changes in population size of drug treated NS-1 cells grouped by their chromosome number during recovery.

**Table 6.** Changes in the number of NS-1 cells with aberrated chromosomes after drug treatment<sup>a</sup>.

	Range of chromosome number	Total cells observed	Cells with aberrated chromosomes		
			Number	Relative % to the cells in each range	Relative % to the total cells observed
no treatment	1 - 40	13	1	7.7	1
	41 -	87	21	24.1	21
BCNU	1 - 40	26 <sup>b</sup> (77) <sup>d</sup>	10 <sup>b</sup> ( 1) <sup>d</sup>	38.5 <sup>b</sup> (14.3) <sup>d</sup>	10 <sup>b</sup> ( 1) <sup>d</sup>
	41 -	74 <sup>b</sup> (93) <sup>d</sup>	33 <sup>b</sup> (57) <sup>d</sup>	44.6 <sup>b</sup> (61.3) <sup>d</sup>	33 <sup>b</sup> (57) <sup>d</sup>
CCNU	1 - 40	24 <sup>b</sup> ( 7) <sup>e</sup>	20 <sup>b</sup> (4) <sup>e</sup>	83.3 <sup>b</sup> (57.1) <sup>e</sup>	20 <sup>b</sup> (4) <sup>e</sup>
	41 -	76 <sup>b</sup> (93) <sup>e</sup>	35 <sup>b</sup> (80) <sup>e</sup>	46.1 <sup>b</sup> (86.0) <sup>e</sup>	35 <sup>b</sup> (80) <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Cells were first treated *in vitro* for 24 hours BCNU (22mcg/ml) or CCNU (14 mcg/ml) and then cultured in the medium which does not contain the drug for additional period.

<sup>b</sup> additional incubation for 1 day

<sup>c</sup> additional incubation for 7 days

<sup>d</sup> additional incubation for 23 days

**Table 7.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after treatment with anti-NS-1 serum and complement\*.

No. of chromosomes	No treatment		After 1 days		After 9 days	
	No. of cells	%	No. of cells	%	No. of cells	%
1 - 5	1	1	0	0	0	0
6 - 10	0	0	2	2.3	2	2
11 - 15	3	3	2	2.3	5	5
		6%		5.8%		13%
16 - 20	2	2	1	1.2	6	6
21 - 25	2	2	2	2.3	2	2
26 - 30	2	2	1	1.2	2	2
31 - 35	3	3	2	2.3	8	8
36 - 40	0	0	4	4.6	3	3
		7%		10.4%		15%
41 - 45	6	6	4	4.6	5	5
46 - 50	7	7	7	8.0	2	2
51 - 55	9	9	11	12.6	6	6
56 - 60	47	47	36	41.4	46	46
		69%		66.6%		59%
61 - 65	15	15	14	16.1	11	11
66 - 70	1	1	0	0	1	1
71 - 75	0	0	0	0	0	0
76 - 80	0	0	0	0	0	0
		16%		16.1%		12%
81 - 85	1	1	0		0	0
86 - 90	0	0	0	0	1	1
91 - 95	0	0	0	0		
96 - 100	0	0	1	1.2		
		1%		1.2%		1%
101 - 105	0	0				
106 - 110	0	0				
111 - 115	1	1				
116 - 120	0	0				
		1%				
Total	100	100	87	100	100	100

\* Cells were first treated *in vitro* for a hour with anti-NS-1 serum (1:42 dilution) and complement (1:5 dilution) and then transferred to the medium which does not contain the antiserum and complement for additional 1 or 9 days, respectively, of cultivation.

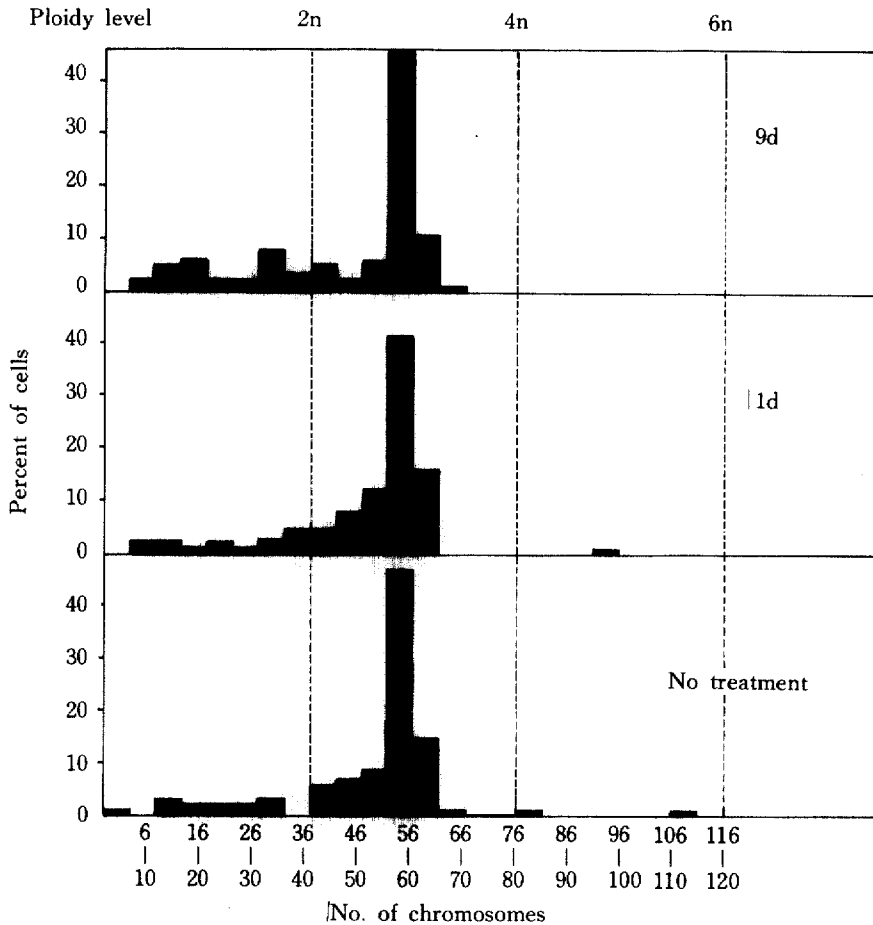
그러므로 임파구 매개 세포독성에 내성을 나타내는 세포들의 특성을 염색체수로 규정하지 수 없었다.

#### 고 찰

1. 시험관내 배양된 NS-1 세포의 염색체수의 다양성

Theodore Boveri는 1914년에 이미 체세포에서의 염색체의 돌연변이는 정상세포가 종양세포로 전환되는 것과 관계있다는 이론을 제시하였으며, 세포분열 장애(mitotic disturbance)가 이러한 염색체 돌연변이의 근본 기전이 된다고 주장하였다<sup>7)</sup>. 실제로 종양세포의 전형적인 특성인 주어진 환경에의 적응능력은 염색체 구성의 다양성에 기인하여 이 다양성은 비정상적인 세포분열로 더욱 심화되어 계





**Fig. 10.** Changes in the distribution of survived NS-1 cells with regard to third chromosome number after treatment with anti-NS-1 serum and complement.

Cells were first treated *in vitro* for an hour with anti-NS-1 serum (1:42 dilution) and complement (1 : 5 dilution) and then transferred to the medium which does not contain the antiserum and complement for additional 1 or 9 days, respectively, of cultivation.

속 유지될 수 있다<sup>53</sup>).

각종 종양과 그들의 염색체수에 관한 문헌은 수없이 많은데 모든 경우에서 염색체수의 다양성을 보고하고 있으며<sup>5, 12, 15, 28, 29, 38, 40, 45, 49, 52, 58, 60</sup>, 이 다양성은 세포주(cell line)로 형성되는데 필수적이며 또한 종양세포중 주종세포(stem line)의 염색체수는 정상세포와는 큰 차이가 있어서 보통 2배체 이상으로 나타난다고 하였다. 이러한 종양세포의 염색체수는 세포의 계대 환경조건에 따라 계속 변화하게 되어서 일반적으로 종양이 진행되면 염색체수가 증가하는 경향을 보이며, 대부분의 종양세포는 그 종양 특유의 전형적인 이수성(aneuploidy)을 나타내게 된다고 보고하였다<sup>53</sup>.

본 실험에서도 BALB/c 마우스에서 유래되어 시험관내 배양된 임파종 세포인 NS-1 세포는 이미 서

로 다른 염색체수를 지닌 이질적인 세포의 집단으로 2배체 이하의 세포는 13%에 지나지 않았으며 대부분이 2배 이상의 높은 배수성을 나타내고 있었고 그 중 56~60개의 염색체를 갖는 hyperdiploid의 세포가 전체의 47%로 주종세포를 이루고 있었다.

이러한 염색체수의 다양성은 세포융합(cell fusion), 내재복제(endoreduplication), 내분열(endomitosis), C-mitosis, restitution, 불분리현상(non-disjunction) 등에 의해서 나타나게 되는데 이러한 결과로 수개에서 수백개에 이르기까지의 단일세포내 염색체수를 나타낼 수 있다<sup>37, 38, 54</sup>.

내재복제 과정에는 중간의 유사분열(mitosis)이 없이 염색체복제(chromosome replication)가 적어도 두 번 이상 있게 되고 이러한 결과로 염색체의 배수성

**Table 8.** Changes in the distribution of recovered NS-1 cells with regard to their chromosome number after incubation with primed BALB/c lymphocytes\*

No. of chromosomes	No treatment		After 1 day		
	No. of cells	%	No. of cells	%	
1 - 5	1	1	0	0	
6 - 10	0	0	1	1	
11 - 15	3	3	2	2	6%
16 - 20	2	2	2	2	5%
21 - 25	2	2	1	1	
26 - 30	2	2	3	3	7%
31 - 35	3	3	4	4	18%
36 - 40	0	0	10	10	
41 - 45	6	6	9	9	
46 - 50	7	7	8	8	69%
51 - 55	9	9	19	19	68%
56 - 60	47	47	32	32	
61 - 65	15	15	9	9	
66 - 70	1	1	0	0	16%
71 - 75	0	0	0	0	9%
76 - 80	0	0	0	0	
81 - 85	1	1			
86 - 90	0	0			1%
91 - 95	0	0			
96 - 100	0	0			
101 - 105	0	0			
106 - 110	0	0			1%
111 - 115	1	1			
116 - 120	0	0			
Total	100	100	100	100	

\* Cells were incubated *in vitro* for 24 hours with primed BALB/c lymphocytes (E:T = 100:1).

(ploidy level)이 증가되며, 핵의 부피도 커지면서 이러한 과정이 계속되면 거대세포가 형성된다. 그러나 이러한 비정상적인 염색체복제 현상의 원인과 기전은 아직 확실히 알려지지 않고 있다<sup>33)</sup>.

내분열은 내배수체(endopolyploidy)로의 진행에 우선되는 과정으로써, 정상적인 염색체 복제를 거쳐 핵안에서 분열할때 방추사(spindle fiber)가 형성

되지 않고 핵만이 소실되지 않기 때문에 두 배수의 염색체를 가진 단일핵이 형성되는 과정이다.

C-mitosis는 내분열보다 정상에 가까운 현상으로 정상적인 간기(interphase)와 전기(prophase)후에 핵막이 소실되지만 방추사가 형성되지 않기 때문에 염색체는 세포질내로 흩어지게 되어 두 배수의 염색체를 갖는 단일핵이 만들어지거나 소수의 염색체로 구성된 micronuclei가 형성되게 된다.

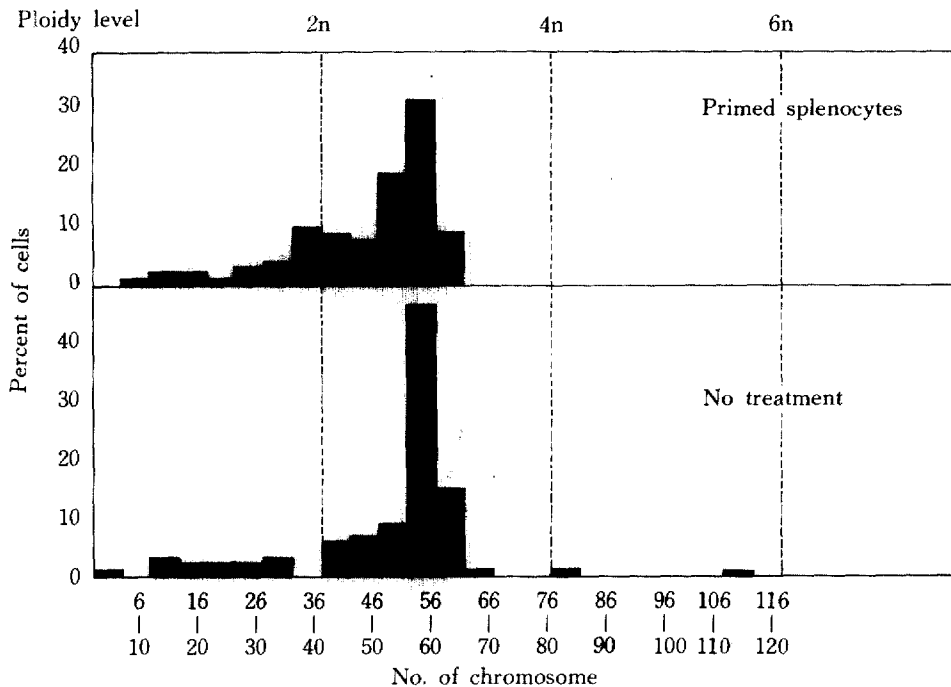
Restitution은 어느 시기까지는 정상적인 분열과정을 거치나 중기(metaphase)나 후기(anaphase)에 염색체가 분리되지 않고 두 배수의 염색체를 가진 핵을 형성하게 된다.

또한 2배체 이하의 염색체를 갖는 세포(hypodiploid)는 위의 C-mitosis, 불분리현상 또는 중심체가 3개 이상으로 분열하는 다극현상<sup>64)</sup>에 의해서 나타날 수 있다.

불분리현상은 후기(anaphase)에 중심체가 나누어지지 않은 상태로 남아 있기 때문에 한 염색체의 두개의 염색분체(chromatid)가 같은 쪽으로 이동하여 결과적으로 하나의 monosomic cell과 또 하나의 trisomic cell이 나타나게 된다. 이렇게 해서 1염색체성의 세포(monosomic cell)가 생성되면 그 세포 자체는 장기간 생존에는 불리하지만, 두번, 세번의 불분리현상에 의해 hyperdiploid로 변화할 수 있고, 또한 생성된 4배체의 세포는 계속적으로 2배체의 세포를 생성할 수 있다. 1염색체성의 세포는 위와 같은 이유로 흔하게 나타나지는 않고 많은 종양의 말기에는 hyperdiploid나 더 높은 배수성을 나타내게 된다고 보고하고 있다<sup>36, 46, 49, 53)</sup>. 또한 NS-1 세포의 염색체수의 분포가 다른 종양세포와 비교해 볼 때 그 범위가 좁은 것은 예를 들어, 시험관내 배양된 S-180 YS 세포는 60개에서 300개 이상까지의 telocentric한 염색체를 가지고 있으나<sup>3)</sup>, NS-1 세포는 5~115개의 metacentric한 염색체를 가지고 있었다. 이것은 NS-1세포의 두개의 telocentric한 염색체가 centric fusion에 의해 하나의 metacentric한 염색체를 형성하는 Robertsonian fusion에 의한 현상이라고 생각할 수 있다.

## 2. 시험관내에서 BCNU와 CCNU 처리후 생존 NS-1세포의 염색체 분포 양상 변화

BCNU와 CCNU는 alkylating agent로써 구조적인 단백질과 효소를 alkylation 시키기도 하나<sup>70, 72, 73)</sup> 주로 핵산을 alkylating 시킨다고 보고되어 있다<sup>6, 15, 34, 43, 70, 72, 73)</sup>. RNA와 DNA가 모두 target이 될 수 있으며 핵산의 인산 group을 alkylating 시켜 triester를 만든다. 이 ester가 가수분해되면 polynucle-



**Fig. 11.** Changes in the distribution of survived NS-1 cells with regard to their chromosome number after incubation with primed BALB/c lymphocytes. Cells were incubated *in vitro* for 24 hours with primed BALB/c lymphocytes (E : T = 100 : 1).

otide chain이 풀어지며, 또한 인산의 alkyl group이 purine이나 pyrimidine으로도 옮겨갈 수 있다고 하였다<sup>6,34</sup>). BCNU와 CCNU의 생물학적인 영향을 보면 초파리, 고등식물, 진균류, 세균, 바이러스와 포유류에 돌연변이를 일으킬 수 있고<sup>42</sup>), 여러가지 실험동물에 종양을 유발시킬 수 있으며<sup>14, 18, 35, 44, 66</sup>) 설치류와 사람에게 *teratogenic effect*를 줄 수 있고<sup>17</sup>), 또한 세포에도 독성을 주는 것으로 보고되어 있다<sup>34, 73</sup>).

약제에 대한 감수성이 각 세포가 가지고 있는 표현형의 일부라면 이러한 표현형은 그 세포의 유전형에 의해 결정되는 것이므로 약제에 대한 감수성과 유전형과의 관계를 그 세포가 가지고 있는 염색체수와의 관계로 알아보았다. 시험관내에서 NS-1 세포에 BCNU나 CCNU를 처리하면 염색체수의 분포 범위가 넓어졌으며, 많은 세포에서 염색체 이상(chromosomal abnormality)을 발견할 수 있었다. 또한 약제 처리후에 6배체 이상의 많은 염색체를 가진 세포가 나타났는데 이와같은 현상은 약제 처리에 의해 숫적 변화가 온것으로 그 기전은 약제에 의해 fragmentation이 된것으로 볼 수 있었다. 그러므로 여기에서 6배체라고 하는 것은 단순한 염색체수의 증가를 뜻하는 것이지 DNA 양의 증가를 뜻하는 것은 아니라고 할 수 있다.

또한 어느 특정한 염색체수를 가진 집단의 소실은 볼 수 없었으므로 약제의 선택적 독성, 즉 특정 염색체수를 갖는 소집단에 대한 약제의 특이성은 없다고 할 수도 있다. 한편으로는 약제 처리후에 염색체 분포에 큰 변화가 없다는 것은 각 소집단 구성세포의 염색체수의 변화는 없다하더라도 약제에 의한 염색체 변형 유도현상으로 인해 그 질을 달리하는 염색체를 갖고 있는 세포들로서 약제 처리 이전의 세포들과는 전혀 다른 세포집단일 수도 있다. 그러므로 약제에 대한 감수성이 각 세포의 유전적 형질에 의해 결정된 것이라면 이는 염색체 단위에서 구분할 수 있는 현상은 아니고 이를 규명하기 위해서는 분자 level로 내려가 좀 더 자세한 연구가 추구되어야 할 것으로 생각된다.

BCNU나 CCNU에 대한 감수성을 세포의 cell cycle과 연관시켜 본 결과를 보면 plateau phase나 confluent phase에 있는 세포가 exponentially growing cell에 비해 BCNU나 CCNU에 대한 감수성이 크며<sup>74, 75</sup>), 또한 골수이식한 후 이식된 조혈계세포(hematopoietic cell)는 lag phase에 BCNU에 대해 가장 높은 감수성을 나타내고<sup>65</sup>), 생체 내에서는 exponentially growing cell이나 plateau phase의 LSA 복수암 세포(ascites cell)가 모두 BCNU에 대해 감수성을 나타낸다고 보고한 사람도 있다<sup>47</sup>). 그

러나 이와같이 BCNU에 대해 분열하지 않는 세포의 감수성이 큰 것은 약제가 혈청내의 성분과 결합함으로써 올 수 있는 artifact이며, BCNU와 CCNU는 높은 농도에서 모든 세포분열 stage에 있는 세포를 죽일 수 있고 G<sub>1</sub>-S border 혹은 S-phase에 있는 세포가 가장 감수성이 높다고 하였다<sup>11)</sup> 이창혜등<sup>12)</sup>은 세포의 DNA 합성을 방해하는 adriamycin에 대한 S-180 YS 세포의 감수성은 염색체수보다는 세포의 cell cycle stage가 더 중요한 역할을 한다고 보고하고 있어 본 실험에서도 BCNU나 CCNU에 대한 감수성과 cell cycle stage와의 연관성을 고려할 수 있다. 본 실험에서 이를 증명할 수 있는 직접적인 결과는 없지만 약제 처리 전이나 후에 염색체 분포의 변화가 없다는 것은 약제에 의한 독성이 각 소집단에 균일하게 작용된 것이라고 볼 수 있다. 단 여기에는 염색체수에 관계없이 모든 세포가 일률적으로 cell cycle로 들어간다는 가정하에 위와 같은 설명이 가능할 수 있다.

### 3. 시험관내에서 BCNU와 CCNU처리후 회복되는 NS-1세포의 염색체 분포 양상 비교

약제 처리후 회복되는 세포의 염색체수를 기준으로 소집단을 나누어 각 개별집단의 분포 변화를 회복시간과 연관시켜 보면 BCNU의 경우에는 41~60개와 61~80개의 염색체를 갖는 세포가, CCNU의 경우에는 41~60개의 염색체를 갖는 세포가 시간 경과에 비례하여 지속적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그외의 다른 집단들은 불규칙적으로 증가하였는데 이것으로 약제 처리후 회복되는 정도도 각 세포마다 다르다는 것을 알 수 있었다.

또한 56-60개의 염색체를 갖는 세포들이 BCNU나 CCNU처리 후에 다른 염색체수를 갖는 세포들보다 많이 감소한 반면 약제 처리후에는 이들 집단이 가장 빨리 회복되어 오히려 약제 처리전보다 그 비율이 증가하였다. 그러므로 각 개별세포마다 회복되는 정도가 다르다는 사실은 원래 그 세포가 가지고 있던 성질이, 약제에 의해 변화되어 나타난 성질은 아니라고 할 수 있다. 이와같은 사실로써 cell cycle이 세포의 약제에 대한 감수성을 좌우할 수 있는 중요한 인자가 될 수 있다고 추정할 수 있다. 그러므로 본 실험에서 약제 처리후 생존한 세포는 유전적으로 내성인 세포이거나, 유전적으로는 감수성을 가진 세포이지만 cell cycle에서 볼 때 약제작용 동안 S-phase로 들어가지 않아 다행히 약제에 의한 독성을 피할 수 있었던 세포들로 생각할 수 있다.

또한 BCNU의 경우에는 41~60개의 염색체를

갖는 세포집단이 시간 경과에 따라 계속 일정한 비율을 차지하고 있으나 CCNU의 경우에는 이들 집단이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이와같이 동일한 종양세포를 같은 약리작용을 가지고 있으나 화학적 구조가 다른 두 약제로 처리하였을때 각기 염색체수의 분포가 다른 집단으로 변화했다는 사실은 종양세포의 치료나 진행과정에서 전혀 다른 종양세포로 변화할 수 있는 기회는 무수히 많다는 것을 암시하고 있다.

### 4. 염색체 이상

종양세포는 염색체수의 다양성과 함께 구조의 변화를 수반하는 경우가 대부분이며 본 실험의 경우에도 시험관내 배양된 NS-1세포는 40개 이하의 염색체를 갖는 세포에서는 7.7%, 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 24.1%가 minute, diversion, gap 등의 순서로 여러 형태의 염색체 이상을 가지고 있었다.

BCNU나 CCNU처리후에 염색체 이상의 빈도가 높아진다는 것은 널리 알려진 사실이며<sup>13)</sup> 염색체수가 많으면 약제처리후 염색체 이상이 올수 있는 확률이 크다는 가정하에 정상 diploid인 40개를 기준으로 40개 이하와 41개 이상의 두 group을 나누어 약제 처리 이틀후 각 group의 염색체 이상의 빈도를 비교해 보면 BCNU에서는 40개 이하의 염색체를 갖는 세포에서는 38.5%, 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 44.6%로, 염색체수가 많은 group에서 더 높은 염색체 이상 빈도를 발견할 수 있었다. 그러나 CCNU의 경우에는 오히려 반대현상이 나타나 염색체수와 염색체 이상이 올 수 있는 확률이 반드시 정비례 관계에 있다기 보다는 약제에 대한 특이한 target이 정해져 있다고 생각할 수도 있다.

또한 약제 처리후 일정시간이 지난 다음의 염색체 이상 빈도를 보면 BCNU나 CCNU 모두 40개 이하의 염색체를 갖는 세포에서는 염색체 이상 빈도가 감소하나 41개 이상의 염색체를 갖는 세포에서는 오히려 증가하였다. 이것은 40개 이하의 염색체를 갖는 전체 세포수는 감소하고 41개 이상의 염색체를 갖는 세포수는 증가하는 것으로 보아 40개 이하의 염색체를 갖는 세포중 염색체 이상을 가진 세포가 세포분열 이상이 함께 일어나 이들 세포가 죽어버리거나 아니면 41개 이상의 염색체를 갖는 세포로 될 수 있는 두가지 가능성을 생각할 수 있다. 실제로 본 실험에서 24일후에 내재복제를 하는 세포가 많이 나타나는 것으로 보아 두번째 가능성이 더 타당하다고 추정할 수 있었다. 이때의

염색체 이상은 minute, acentric fragment, gap, diversion, 이동원핵염색체(dicentric chromosome) 순으로 많았다.

또한 임상에서 BCNU나 CCNU를 재차 투여하는 기간은 6주 이상으로 되어 있으나 이미 약제 처리후 3주일이 되면 염색체 분포로 보았을때 다시 약제 처리 이전의 상태로 돌아가 두 집단이 서로 비슷한 성질을 가진 집단같이 보이나 염색체 이상 정도로 보았을 때 이 두 집단은 서로 다른 성질을 가진 집단이라고 생각할 수 있다. 그러므로 제2차 약제 투여시 새로운 약제 선정 시험의 중요성을 암시하고 있으며 이와같은 약제 선정 시험시 시험관내 항암제 감수성 검사의 가치는 이창혜등<sup>2)</sup>에 의해 보고된 바 있다.

#### 5. 시험관내에서 보체 매개 세포독성 실시후 생존 NS-1세포의 염색체 분포 양상 변화

NS-1에 대한 항혈청을 얻는 동물로서 syngeneic mouse를 사용하지 않고 heterogeneic한 토끼를 사용하였기 때문에 본 실험에서 사용한 NS-1에 대한 항혈청에는 hetero-antibody가 포함되어 있어, 물론 50%의 NS-1세포를 죽일 수 있는 혈청의 희석 농도를 결정하는 과정에서는 이를 고려하였으나, 실제 실험에서는 이를 제거하지 않았기 때문에 본 실험의 결과에 나타난 것은 NS-1에 대한 특이항체와 토끼 혈청내의 hetero-antibody에 의한 복합된 결과로 생각할 수 있다. 그러나 이 경우에 나타난 결과는 염색체 변형 유도 현상 없이 오로지 보체 매개 세포독성에 의한 선택(selection)의 결과로써 특정한 염색체수를 갖는 세포집단의 소실이 없는 것으로 보아 보체 매개 세포독성의 감수성 여부를 결정하는 것은 염색체수 이외의 다른 인자에 의한 것이라고 생각할 수 있다.

또한 보체 매개 세포독성 실시후 9일후의 염색체 분포를 본 것은 항체와 보체를 넣고 배양한후에 새로운 배지에 갈아 넣고 그후 9일후에 관찰한 것이므로 실제 생체내의 경우와는 약간 다른 점이 있으나 hypodiploid의 세포가 늘어나는 것같은 경향을 보였다.

#### 6. 시험관내에서 임파구 매개 세포독성 실시후 생존 NS-1세포의 염색체 분포 양상 변화

NS-1에 대한 면역 임파구를 얻는데 있어서 syngeneic mouse를 사용하였으므로 이 경우에는 특이적인 면역 임파구에 의한 세포독성의 결과를 기대할 수 있겠으나 이 경우 역시 임파구 매개 세포독성에 내성을 갖는 세포들의 특성을 염색체수로 구

정할 수 없었다. Lotan and Nicolson<sup>11)</sup>은 임파구 매개 세포독성에 내성세포를 시험관내에서 얻어 이들 세포는 parental cell에 비해 retinoic acid에 대한 감수성이 낮음을 보고하고 있고, Fidler et al.<sup>20)</sup>은 임파구 매개 세포독성에 내성세포와 parental cell을 생체내에 주입한 결과 피하로 주사했을 때에는 종양으로의 성장 유형이 두 세포간에 차이가 없었으나 정맥내로 주사한 경우에는 임파구 매개 세포독성에 내성세포가 parental cell에 비해 폐로의 전이(pulmonary metastasis)가 잘 안되며, 일단 폐에 전이된 세포가 그곳에 정착하여 생존하는 빈도도 parental cell에 비해 떨어진다고 보고하였다.

본 실험에서도 약제 내성세포와 보체 매개 세포독성 및 임파구 매개 세포독성에 내성을 나타내는 세포들의 종양성에 관한 연구가 더 추후되어야 할 것으로 생각된다.

### 결 론

종양세포 집단의 개별세포의 염색체수를 표지하여 그 종양집단의 특성을 파악한 후, 화학요법제인 BCNU와 CCNU를 처리하여 약리작용이 동일하다고 알려진 이들 두 약제에 대한 내성세포의 염색체 분포 특성을 관찰하였고, 그 외에 보체 매개 세포독성과 임파구 매개 세포독성에 내성을 나타내는 세포의 염색체 분포를 조사하여 약제에 의하여 고려될 수 있는 염색체이상 유인과 면역학적 방법에 의한 선택작용을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생쥐 임파종 세포인 NS-1세포는 염색체수의 분포로 보았을때 5~115개의 염색체를 갖는 이질적인 종양세포 집단이었고, 이미 알려진 다른 종양세포의 염색체수의 분포보다 그 범위가 좁았다.
2. BCNU나 CCNU처리후에 염색체수의 분포 양상이 크게 달라지지는 않으나 염색체이상이 많이 나타나는 것으로 보아 그 질을 달리하는 새로운 집단이 형성됨을 추정할 수 있었다.
3. BCNU나 CCNU에 내성을 나타내는 세포들은 염색체수의 분포 특성만으로 연관지을 수 없었다.
4. 동일한 종양세포를 같은 약리작용을 갖는 약제로 처리하였을때 서로 다른 염색체 분포를 갖는 세포들이 생존하였고, 약제 처리후 회복되는 유형에도 두 약제간의 차이에 있었다.
5. 약제 처리전과 처리후 일정시간이 지난 다음의 두 세포집단이 서로 비슷한 염색체수의 분포를 가지나 개별 염색체이상 정도로 보았을때 이 두집

단은 서로 다른 성질을 가졌을 것이라고 추정할 수 있었다.

6. 보체 매개 세포독성이나 임파구 매개 세포독성 실시후 염색체수의 분포 양상에는 거의 차이가 없었고, 약제 처리후에 볼 수 있는 개별 염색체 이상은 볼 수 없었으므로 이 경우에는 염색체 변형 유도현상보다는 선택(selection)작용에 의한 결과라고 추정할 수 있었다.

### 참 고 문 헌

- 1) 김정순, 이원영 : 우리나라 암의 발생현황과 연구과제. 대한보건협회지 **6**:45, 1980.
- 2) 이창혜, 이원영, 김주덕 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180 YS)의 Adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포 특성. 연세의대논문집 **16**: 180, 1983.
- 3) 정해원, 김정순, 이원영 : 생쥐종양세포의 염색체수의 이질성과 종양성과의 관계에 관한연구. 대한역학회지 **4**:158, 1982a.
- 4) 정해원, 김정순, 이원영 : 방사선조사에 의한 생쥐종양세포의 염색체수 및 종양성의 변화에 관한 연구. 대한역학회지 **4**:175, 1982b.
- 5) Ahmann FR, Meyskens FL Jr., Moon TE, Durie BGM, Salmon SE : *In vitro* chemosensitivities of human tumor stem cells to the phase 11 drug 4'-(9-Acridinylamino) methanesufon-m-ansidine and prospective *in vivo* correlations. *Cancer Res.* **42**:4495, 1982.
- 6) Alexander P : comparison of the mode of action by which some alkylating agents and ionizing radiations kill mammalian cells. *Ann. NY. Acad. Sci.* **163**:652, 1969.
- 7) Barranco SC, Drewinko B, Ho D, Humphrey RM, Romsdahl MM : Differential sensitivities of human melanoma cells grown *in vitro* to arabinosylcytosine. *Cancer Res.* **32**:2733, 1972.
- 8) Barranco SC, Drewinko B, Humphrey RM : Differential response by human melanoma cells to 1, 3-bis-2-(chloroethyl)-1-nitrosourea and bleomycin. *Mutat. Res.* **19**:277, 1973.
- 9) Bast RC Jr., Bast BS : Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with nonspecific immunostimulants. *Ann. NY. Acad. Sci.* **277**:60, 1976.
- 10) Becker FF, Klein KM, Wolmon SR, Asofsy R, Sell S : Characterization of primary hepatocellular carcinoma and initial transplant generations. *Cancer Res.* **33**:3330, 1973.
- 11) Bhuyan BK, Fraser TJ, Buskirk HH, Neil GL : Antileukemic activity of streptozotocin (NSC-85998) and its analogs. *Cancer Chemother. Rep.* **56**:709, 1972.
- 12) Bloomfield CD, Lindquist LL, Arther D, Mckenna RW, Lebien TW, Peterson BA, Nesbit ME : Chromosomal abnormalities in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* **41**:4838, 1981.
- 13) Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams DL, Tsiatis AA : Cytogenetic feature of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res.* **41**:4678, 1981.
- 14) Brookes P, Lawley PD : Alkylating agents. *Br. Med. Bull.* **20**:91, 1964.
- 15) Connors TA : Mechanism of action of 2-chloroethylamine derivatives, sulfur mustards, epoxides, and aziridines. In Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. 11 *Handb. Exp. Pharm.* **38**:18, 1975.
- 16) Danielson KG, Anderson LW, Rosick HL : Selection and characterization in culture of mammary tumor cells with distinctive growth properties *in vivo*. *Cancer Res.* **40**:1812, 1980.
- 17) Diapolo JA : Teratogenic agents:mammalian test systems and chemicals. *Ann. NY. Acad. Sci.* **163**:801, 1969.
- 18) Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S : N-Nitroso compounds in organotropic and transplacental carcinogenesis. *Ann. NY. Acad. Sci.* **163**:676, 1969.
- 19) Fidler IJ : Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* **38**:2651, 1978.
- 20) Fidler IJ, Gersten DM, Budmen MB : Characterization *in vivo* and *in vitro* of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* **36**:3160, 1976.
- 21) Fidler IJ, Gruys E, Cifone MA, Barnes Z, Bucana C : Demonstration of multiple phenotypic diversity in a murine melanoma of recent origin. *J. Natl. Cancer inst.* **67**:947, 1981.
- 22) Fidler IJ, Kripke ML : Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* **197**:893, 1977.
- 23) Fidler IJ, Poste G : The heterogeneity of metastatic

- properties in malignant tumor cells and regulation of the metastatic phenotype. In *Tumor Cell Heterogeneity*. A Owens Ed. Academic press, New York, 1982.
- 24) Fisher MS, Cifone MA : Enhanced metastatic potential of murine fibrosarcomas treated *in vitro* with ultraviolet radiation. *Cancer Res.* **41**:3018, 1981.
  - 25) Garvey JS, Cremer ME, Sussdorf DH : *Methods in immunology*. 3rd Ed. W.A. Benjamin Inc., 1977.
  - 26) Gray JM, Pierce GB : Relationship between growth rate and differentiation of melanoma *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* **32**:1201, 1964.
  - 27) Hakansson L, Trope C : On the presence within tumors of clones that differ in sensitivity to cyclostatic drugs. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **82**:35, 1974.
  - 28) Hauschka TS : The chromosome in ontogeny and oncogeny. *Cancer Res.* **21**:957, 1961.
  - 29) Hauschka TS, Levan A : Inverse relationship between chromosome ploidy and host specificity of sixteen transplantable tumor. *Exp. Cell Res.* **4**:457, 1953.
  - 30) Heppner GH, Dexter DL, DeNucci T, Miller FR, Calabresi P : Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res* **38**:3758, 1978.
  - 31) Kornblith PL, Smith BR, Leonard LA : Response of cultured human brain tumors to nitrosoureas: correlation with clinical data. *Cancer* **47**:255, 1981.
  - 32) Kornblith PL, Szytko PE : Variations in response of human brain tumors to BCNU *in vitro*. *J. Neurosurg.* **48**:580, 1978.
  - 33) Kusyk CJ, Hsu TC : Induction of high frequencies of endoreduplication in mammalian cell cultures with 33258 Hoechst and rubidazone. *Cytogenet. Cell Genet.* **23**:39, 1979.
  - 34) Lawley PD : Effects of some chemical mutagens and carcinogens on nucleic acids. *Prog. Nucl. Acid Res.* **5**:82, 1966.
  - 35) Lawley PD : Carcinogenesis by alkylating agents. In *Chemical Carcinogens*. Edited by C.E. Pearle. *Amer Chem. Soc. monograph* **173**:83, 1976.
  - 36) Lee WY : Chromosome of rat cell lines *in vitro* and *in plastico* in relation to tumorigenicity and response to RSV-SR. Sc. D. thesis of the school of Hygiene and Public Health of the Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, 1976.
  - 37) Levan A : The significance of polyploidy for the evolution of mouse tumors: strain of TA3 mammary adenocarcinoma with different ploidy. *Exp. Cell Res.* **11**:613, 1956.
  - 38) Levan A, Hauschka TS : Endomitotic replication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* **14**:1, 1953.
  - 39) Levan G, Levan A : Specific chromosome changes in malignancy: studies in rat sarcomas induced by two polycyclic hydrocarbons. *Hereditas* **19**:161, 1975.
  - 40) Levan G, Mandahl N, Bengtsson BO, Levan A : Experimental elimination and recovery of double minute chromosomes in malignant cell populations. *Hereditas* **86**:75, 1977.
  - 41) Lotan R, Nicolson GL : Heterogeneity in growth inhibition by B- trans-retinoic acid of metastatic B16 melanoma clones and *in vivo*-selected cell variant lines. *Cancer Res.* **39**:4767, 1979.
  - 42) Loveless A : Genetic and allied effects of alkylating agents. University Park, The Pennsylvania State University Press, 1966.
  - 43) Ludlum DB : Molecular biology of alkylation: An overview. In *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. **11**. *Handb. Exp. Pharm.* **38**:6, 1975.
  - 44) Mages PN : *In vivo* reactions of nitroso compounds. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **163** : 7 17, 1969.
  - 45) Mark J : Chromosomal analysis of ninety-one primary Rous sarcomas in the mouse. *Hereditas* **57**:23, 1967.
  - 46) Martin GM, Sprague CA : Paraxial cycle in cultivated human somatic cells. *Science* **166**:761, 1969.
  - 47) Maruyama Y : Effect of alkylating agents on LSA ascites lymphoma during growth. *Proc. Amer. Asso. Cancer Res.* **16**:179, 1975.
  - 48) Mealey J. Jr., Chen TT, Shupe R. : Response of cultured human glioblastomas to radiation and BCNU chemotherapy. *J. Neurosurg.* **41**:339, 1974.
  - 49) Mitelman F : The chromosomes of fifty primary Rous rat sarcomas. *Hereditas* **69**:155, 1971.
  - 50) Mitelman F, Mark J, Levan F, Levan A : Tumor etiology and chromosome patterns. *Science* **176**:1340, 1972.
  - 51) Nowell PC : The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**:23, 1976.
  - 52) Nowell PC, Morris HP, Potter VR : Chromosome of "minimal deviation" hepatomas and some other transplantable rat tumors. *Cancer Res.* **27**:1565, 1967.
  - 53) Ohno S : Genetic implication of karyological instability

- of malignant somatic cells. *Physiological Reviews* **51**:496, 1971.
- 54) Oksala T, therman E : Mitotic abnormalities and cancer. In *Chromosome and Cancer*, pp239, John Wiley & Sons, New York, 1974.
  - 55) Pimm MV, Baldwin RW : Antigenic differences between primary methylcholanthrene-induced rat sarcomas and post-surgical recurrences. *Intern. J. Cancer* **20**:37, 1977.
  - 56) Poste G, Fidler IJ : The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**:139, 1980.
  - 57) Prehn RT : Analysis of antigenic heterogeneity within individual 3-methylcholanthrene induced mouse sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**:1039, 1970.
  - 58) Puck TT : Quantitative studies on mammalian cells *in vitro*. *Modern Physics* **31**:433, 1959.
  - 59) Richard BM, Atkin NB : DNA content of human tumor:change in uterine tumors during radiotherapy and their response to treatment. *Br. J. Cancer* **13**:788, 1959.
  - 60) Rothfels KH, Parker RC : The karyotypes of cell lines recently established from normal mouse tissues. *J. Exp. Zool.* **142**:507, 1959.
  - 61) Rothfels KH, Siminovicth L : An air drying technique for flattening chromosome in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Technol.* **33**:73, 1962.
  - 62) Sanford KK : Clonal studies on normal cell and on their neoplastic transformation *in vitro*. *Cancer Res.* **18**:747, 1958.
  - 63) Sanford KK, Hobbs GL, Earle WR : The tumor producing capacity on strain L mouse cells after 10 years *in vitro*. *Cancer Res.* **16**:162, 1956.
  - 64) Schmid W : Multipolar spindles after endoreduplication. *Exp. Cell Res.* **42**:201, 1966.
  - 65) Sensenbrenner LL : Effect of 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea on the development of transplanted hematopoietic cells. *Proc. Amer. Asso. Cancer Res.* **13**:71, 1972.
  - 66) Shimkin MB, Weisburger JH, Weisburger EK, Gubareff N, Sontzeff V : Bioassay of 29 alkylating chemicals by the pulmonarytumor response in strain A mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **36**:915, 1966.
  - 67) Takasugi M, Klein E : A microassay for cell-mediated immunity. *Transplantation* **9**:219, 1970.
  - 68) Tsuruo T, Fidler IJ : Differences in drug sensitivity among tumor cells from parental tumors, selected variants, and spontaneous metastases. *Cancer Res.* **41**:3058, 1981.
  - 69) Vanky F, Gorsky T, Gorsky Y, Masucci MR, Klein E : Lysis of tumor biopsy cells by autologous T lymphocytes activated in mixed cultures and propagated with T cell growth factor. *J. Exp. Med.* **153**:83, 1982.
  - 70) Warwick GP : The mechanism of action of alkylating agents. *Cancer Res.* **23**:1315, 1963.
  - 71) Weiss L : Metastasis:differences between cancer cells in primary and secondary tumors. *Pathobiol Ann.* **10**:51, 1980,
  - 72) Wheeler GP : Some biochemical effects of alkylating agents. *Fed. Proc.* **26**:885, 1967.
  - 73) Wheeler GP : Pharmacological considerations of alkylating agents. In *Current Concepts in the Management of Lymphoma and Leukemia*. Edited by Ultmann JE, Griem ML, Kirsten, Wissler RW. *Recent Results in Cancer Res.* **36**:137, 1971.
  - 74) Wheeler GP : Mechanism of action of nitrosoureas. In *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. **11. Handb. Exp. Pharm.** **38**:65, 1975.
  - 75) Wheeler GP : A review of studies on the mechanism of action of nitrosoureas. In *Cancer Chemotherapy*, Edited by Sartorelli AC. *Amer Chem. Soc. Symposium Series* **30**:87, 1976.
  - 76) Wilson AP, Neal FE : *In vitro* sensitivity of human ovarian tumors to chemotherapeutic agents. *Br. J. Cancer* **44**:189, 1981.
  - 77) Wolf U : Theodore Boveri and his book "on the problem of the origin of malignant tumors". In *Chromosome and Cancer*. Edited by Garmen J, p3, John Wiley & Sons, New York, 1974.
  - 78) Yung WA, Shapiro JR, Shapiro WR : Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human blioma cells in culture. *Cancer Res.* **42**:992, 1982.