

소세포폐암 세포주(JePa-1)의 수립과 특성

조선대학교 의과대학 병리학교실 및 내과학교실*

이 미 자 · 전 호 종 · 정 종 훈*

Establishment and Characterization of a Small Cell Lung Cancer Cell Line(JePa-1)

Mi Ja Lee, M.D., Ho-Jong Jeon, M.D. and Jong Hoon Chung, M.D.*

Department of Pathology and Internal Medicine*, College of Medicine, Chosun University

Lung cancer is the most common malignant tumor worldwide and its incidence continues to rise each year. Recent development of molecular biologic method has led to advances in determining the etiologic factors of lung cancer and the establishment of cell lines has provided a lot of information on the through chemosensitivity, radiation biology studies, cytogenetics, and molecular biologic studies, which permits improved treatment for lung cancer. We established a small cell lung cancer cell line, designated JePa-1, obtained from malignant pericardial effusion of small cell lung cancer patient and characterized its morphologic and molecular biologic features. the JePa-1 cell line grew relatively slowly (doubling time 45hrs) as very loosely adherent floating aggregates growing in small clumps with distinct cell outlines and intertwined cords. Also JePa-1 cell line secreted antidiuretic hormones. Electronmicroscopic examination revealed that JePa-1 cell line and xenografts contained electron dense core granules, characteristic of being of neuroendocrine origin. To investigate the tumorigenic capacity, the JePa-1 cell line was injected into SCID and nude mice. Tumors taken from xenografts were observed in 3 out of 4 of the SCID mice and 2 out of 4 of the nude mice. The histologic characteristics of the xenografts were similar to those of the cell line and the original cytologic finding of the pericardial fluid, suggesting small cell carcinoma. The results of immunohistochemical markers showed reactivity for *Rb* protein, *c-myc*, TGF- α , TGF- β , EGFR, keratin, NSE, chromogranin, and EMA. The DNA ploidy and the index of the JePa-1 cells was tetraploid and 2.13, respectively. The positive rate for the *Rb*, *c-myc* and *K-ras* proteins of the JePa-1 cell line were 98.9%, 99.3%, and 99.7% respectively as determined by flow cytometry. Cytogenetic analysis using the G-banding technique showed 65 chromosomes with various numerical and structural abnormalities. On examination of the expression of TGF- α , TGF- β , and EGFR by PCR, only the EGFR was positive. Through the establishment of JePa-1 cell line, we report in this paper the characterization of a small cell lung cancer such as morphologic and immunocytochemical features, growth characteristics in culture, hormone production, expression of oncoprotein and several growth

접 수: 1997년 2월 11일, 게재승인: 1997년 4월 28일

주 소: 광주광역시 동구 서석동 375, 우편번호 501-140

조선대학교 의과대학 병리학교실, 전호종

이 논문은 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

factors, tumorigenicity, chromosomal abnormalities, and DNA ploidy and index. The JePa-1 cell line will be valuable in vitro studies for the etiology, treatment and the prognostic factors in small cell lung cancer. (Korean J Pathol 1997; 31: 695 ~ 710)

Key Words: Cell line establishment, Lung cancer cell line, Small cell, Immunohistochemistry, Oncoprotein

서 론

암사망의 주된 원인이 되고 있는 폐암은 조직학적 아형에 따라 병기와 예후에 차이는 있지만 전반적으로 폐암은 내원시 높은 병기를 가지고 있기 때문에 예후가 나쁘며 최근 통계에 따르면 5년 생존율이 5~10% 정도이다¹. 폐암의 분류는 현재 WHO 분류법²이 가장 널리 이용되고 있고, 크게 소세포암과 비소세포암(선암종, 편평세포암, 대세포암등)으로 나누는데 이는 소세포암이 비소세포암과 구별되는 많은 특징을 가지고 있기 때문이다. 소세포암은 치료를 하지 않는 경우 비소세포암에 비하여 생존율이 더 짧고 화학요법이나 방사선치료에 훨씬 더 반응적이며 독특한 조직학적 소견, 다양한 신경내분비표지자의 발현 및 특별부위의 염색체 결손등을 보인다²⁻⁴. 인체 폐암세포, 특히 소세포암과 비소세포암에 대한 배양 기술의 발달로 인해 폐암의 임상적, 생물학적 의의를 보다 쉽게 이해하게 되었으며 이들 형태학적 차이에 따른 종양 세포주의 특징이 비교연구되었다⁵⁻⁹. 수립된 세포주는 in vitro에서 화학요법의 반응성, 방사선 생물학, 세포유전학, 분자 생물학 연구등에 많은 정보를 제공함으로써 폐암의 치료에 도움을 주었다^{4,10}.

한국인에서 발생한 소세포폐암 세포주 수립에 대한 국내 문헌보고가 현재까지 없고 한국인에서 발생한 소세포폐암의 생물학적 특징을 잘 이해하기 위해서는 세포주의 수립이 필수적이다. 이에 저자는 64세 남자환자의 소세포폐암이 심낭으로 전이되어 생긴 심낭의 악성 삼출액을 채취하여 소세포폐암 세포주인 JePa-1세포주를 수립하였고, 수립된 세포주에 대한 특성: 1) JePa-1세포주와 이종이식의 병리조직학적 소견, 2) 전자현미경적 특징, 3) 면역표현형 검색(*Rb* 종양단백, *c-myc* 종양단백, *K-ras* 종양단백, TGF- α , TGF- β , EGFR, keratin, CEA, NSE, chromogranin, EMA), 4) 배양시의 성장특징 및 plating efficiency, 5) 세포주의 호르몬 분비여부, 6) 세포유전학

적 연구, 7) 유세포 분석기를 이용한 종양유전자 단백질(*Rb* 단백질, *c-myc* 단백질, *K-ras* 단백질) 발현여부, 8) DNA 배수성 및 지수, 9) SCID 마우스와 Nude 마우스에서의 종양형성 능력, 10) 중합효소연쇄반응을 통한 TGF- α , TGF- β , EGFR의 DNA검색에 관하여 연구하여 한국인에서 발생한 소세포 폐암에 관한 특성을 규명하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구검체 증례

환자는 1993년 4월 19일 내원 2달전부터 발생한 정도의 호흡곤란과 기침, 전신쇠약, 체중감소를 주소로 내원한 64세 남자로 이학적 소견상 안면은 창백하였으며 좌측 폐야에 호흡음이 감소되었고 국소적으로 천식음이 들렸다. 흉부 단순 및 컴퓨터 단층촬영상 좌폐 중앙 폐문주위에 종괴가 관찰되었으며 심장비대와 다량의 심낭액, 그리고 우측늑막액이 관찰되었다(Fig. 1). 심장의 심방세동때문에 기관지경하 조직검사는 시행하지 못하였고 심낭액에 대한 세포병리학적 검사상 종양세포들은 전이성 소세포암으로 진단되었다(Fig. 2). 환자는 종양 수반 증후

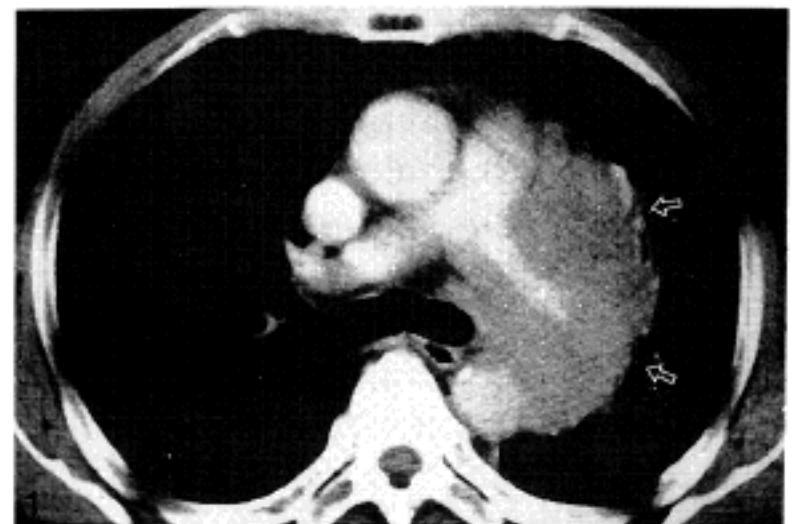


Fig. 1. A huge and lobulated low density tumor(arrow) is noted in hilar area of left lung.

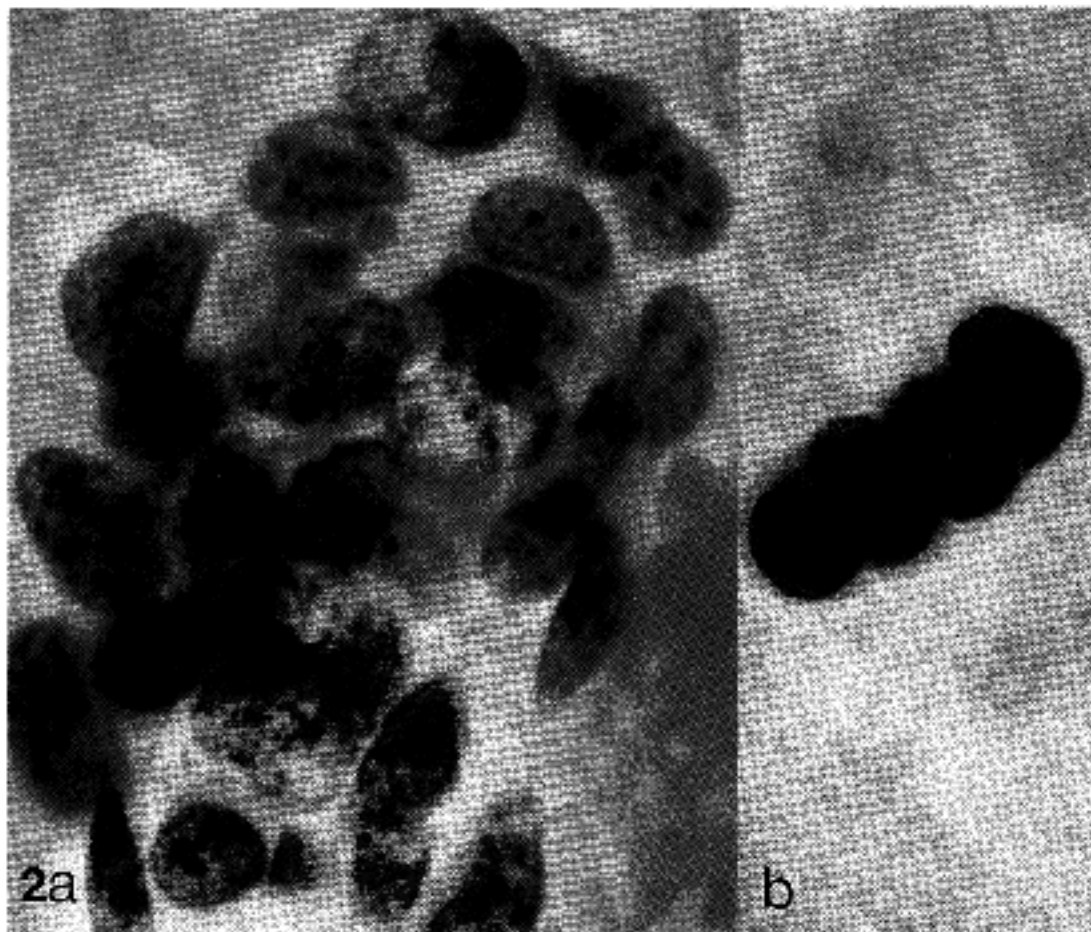


Fig. 2. Metastatic small cell carcinoma, pericardial fluid. The malignant cells show larger aggregates with relatively small size and small or absent nucleoli(a). Also formed characteristic short chain(h).(Pap)

군의 일종인 저나트륨혈증을 보여 조세포암의 ADH 분비를 임상적으로 시사하였다. 환자의 병기는 IIIB (T4N1M0)로 결심되어 그후 6차례에 걸쳐 화학요법을 시행하였으며 환자는 화학요법 실시 약 1년후인 1994년 4월 20일경 사망하였다. 부검은 시행지 못하였다.

2. 연구재료

화학요법으로 치료하기전에 환자의 심낭액을 부근 처리된 50 cc 주사기를 사용하여 10~20 cc정도 채취한 후 heparin으로 처리한 부근 시험관에 옮겨서 원심분리(1000 rpm, 5분)하여 침전물을 얻은 후 이 과성을 다시 2회 반복하였다. HBSS(Hanks balanced salt solution, Sigma)에서 3회 세척한 후 침전물에 RPMI 1640 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA), Ham's F-12(Sigma), HBSS를 2 : 1 : 1의 비율로 혼합한 후 56°C에서 30분간 열처리한 fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL)을 20%되게 배지에 첨가한 후 100 units/ml의 penicillin G, 100 µg/ml의 streptomycin 과 250 ng/ml의 amphotericin B를 혼합하여 25 cm²의 배양용기(Falcon, Becton-Dickinson, New Jersey, USA)에 배지 1ml당 5 × 10⁶개의 세포밀도로 주입한 후 36.5°C의 7.5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며 배양액은 양주원에 2회정도 교환하였다.

3. 연구방법

1) 세포주의 성장 특징: 세포주의 배가시간은 단 세포 부유액을 플라스크(25 cm²)에 주입한 다음 14일 동안 매 2~3일마다 세포수를 세었다. Plating efficiency는 0.3% 한천(Bio-Rad)에 20% FBS를 첨가하여 제작한 배지를 35 mm 페트리접시(Falcon, USA)에 분주한 다음 수립된 32번째 passage 세포를 페트리접시 면적(cm²)당 20개가 되게 분주하여 36.5°C의 7.5% CO₂배양기내 배양하였으며 형성된 세포의 집락은 14일 후에 세수하였다. 이를 10회 반복하였다. Plating efficiency는 수립된 세포주의 세포를 20% FBS가 포함된 한천 배지에 분주한 후 형성된 세포의 집락을 분주한 세포의 수로 나눈다음 100을 곱하여 계산하였다. 또한 도립위상차현미경을 이용하여 세포주의 성장 양상을 관찰하였다.

2) 형태학적 검색:

① 광학 현미경 관찰: 세포가 수립된 후 40번째와 50번째 passage 세포를 자동도발포분장기(Autosmear, Sakura, Tokyo, Japan)를 이용하여 유리슬라이드위에 도말한 다음 실온에서 30여분동안 건조시킨 후 아세톤에 10분간 고정하여 Wright염색하였으며 수립된 세포주를 각각 SCID 마우스와 Nude 마우스에 이종이식하여 형성된 종이에 대해서도 파라핀 블록을 만들어 hematoxylin-eosin염색하여 관찰하였다.

② 전자현미경적 관찰: 검색을 위하여 수립된 40 번째 passage 세포를 원심분리관을 이용하여 2500 rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 만든 후 4°C phosphate buffered saline(PBS)으로 제작한 3% glutaraldehyde에 24시간동안 1차 고정된 다음 4°C 1% osmium tetroxide(O₃O₄)에서 1시간동안 이차고정하였다. 고정이 끝난 조직은 계열별 알코올로 탈수후 epoxy resin에 포매하여 초미세박절편을 제작하고 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 JEM 100 CXII 를 이용하여 관찰하였다. 또한 이종이식으로 형성된 종괴에 대해서도 각각 같은 방법으로 관찰하였다.

3) 면역표현형(Immunophenotype) 검색: 수립된 세포주에 대한 면역표현형의 검색은 자동도말표본장치를 이용하여 제작한 도말표본으로 하였고 이종이

식하여 형성된 종괴에 대해서는 파라핀 절편을 이용하여 ABC법으로 면역세포화학적 및 면역조직화학적 검색을 실시하였다. 또한 대조군으로서 한국세포주은행에서 분양받은 5개의 세포주를 이용하였는데 이중 NCI-H522(KCLB 25810)와 NCI-H358(KCLB 25807)은 선암종이며 NCI-H128(KCLB 30120), NCI-H69(KCLB 30119)와 NCI-H146(KCLB 30173)은 소세포암이었다(Table 1). 이들 분양받은 세포주 또한 같은 방법으로 염색을 실시하였다. 본 검색에 사용된 일차항체는 *Rb* 단백질, *c-myc* 단백질, TGF- α , TGF- β , EGFR, keratin, CEA, NSE, chromogranin, EMA이었다(Table 2)

4) 유세포 분석기를 이용한 *Rb*, *c-myc* 및 *K-ras* 단백질검출: 수립된 47번째 passage 세포주에서 각각 10⁶개의 세포를 0.25% saponin(Sigma, USA)과 2% par-

Table 1. Lung cancer cell lines used in this study

Cell line	Source	Histology	Year established	Reference
JePa-1	Pericardial fluid	SC	1993 ~ 1996	present study
NCI-H522	Lung	AC	1977 ~ 1984	8
NCI-H358	Lung	AC	1981	14
NCI-H128	Pleural fluid	SC	1977 ~ 1984	8
NCI-H69	Pleural fluid	SC	1977 ~ 1984	8
NCI-H146	Pleural fluid	SC	1977 ~ 1984	8

SC: small cell carcinoma, AC: adenocarcinoma

Table 2. Primary antibodies used in this study

Primary Ab	Isotype/Clone	Dilution	Source
<i>Rb</i> protein	IgG ₁ /G3-245(mouse)	1 : 10	BioGenex
<i>c-myc</i>	IgG ₁ /9E10	1 : 100	Oncogene Science
<i>c-K-ras</i> (Ab-1)	MAb IgG2a/F234-4.2	1 : 100	Oncogene Science
TGF- α (Ab-2)	MAb IgG2a/213-4.4	1 : 17	Oncogene Science
TGF- β	rabbit IgG	1 : 50	R&D systems
EGFR(Ab-1)	MAb IgG2a/528	1 : 17	Oncogene Science
Keratin	IgG1, kappa/MNF116	1 : 50	DAKO
NSE	IgG1, kappa/BBS/NC/VI-H14	1 : 50	DAKO
Chromogranin A	IgG2b, kappa/DAK-A3	1 : 50	DAKO
CEA	IgG1, kappa/A5B7	1 : 100	DAKO
EMA	IgG2a, kappa/E29	1 : 50	DAKO

Ab: antibodies, *Rb*: Retinoblastoma, TGF: transforming growth factor
EGFR: epidermal growth factor receptor, NSE: neuron-specific enolase
CEA: carcinoembryonic antigen, EMA: epithelial membrane antigen

Table 3. Primer sequences for DNA amplification of the TGF- α , TGF- β , EGFR by PCR.

Primer	Sequence(5' to 3')	Genomic location	Length of amplified DNA(bp)	Tm(°C)
TGF- α	ATG GTC CCC TCG GCT GGA CA	35 ~ 54	182	66
	CTG CAG GTT CCA TGG AAG CA	216 ~ 197		64
TGF- β	GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T	1678 ~ 1699	161	68
	AGC CTC CAA ATG TAG GGG CAG G	1838 ~ 1817		70
EGFR	CGC TGC TGG CTG CGC TCT G	244 ~ 242	216	66
	CCT CCT GGA TGG TCT TTA T	439 ~ 421		56

TGF: transforming growth factor, EGFR : epidermal growth factor receptor

aformaldehyde가 함유된 4°C PBS에 5분간 고정시키고 원심분리(1000 rpm×5 min)한 다음 PBS로 2회 씻고 Rb 단백질, c-myc 단백질과 K-ras단백의 일차항체를 각각 4°C에서 30분간 부치시키고 냉동원심분리기에서 원심분리(1000 rpm×5 min)한 후 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG(BioSource, 1 : 25)를 4°C에서 30분간 부치시켜 FACScan (Becton-Dickinson, USA)에서 분석하였다. 음성대조군은 JePa-1세포주에 PBS만 부치시킨 경우와 FITC-conjugated IgG_{2a}를 사용한 경우로 각각 하였다.

5) DNA 배수성 및 지수: DNA 배수성 및 지수 검사를 위하여 수립된 60번째 passage 세포 2×10⁶개를 PBS에서 2회 씻은 후 trypsin buffer에 10분간, trypsin inhibitor와 혼합된 RNase에 10분간 실온에서 처리하고 propidium iodide로 10분간 4°C 암실에서 염색하여 FACSCalibur(Becton-Dickinson, USA)를 이용하여 검색하였으며 대조군으로서는 정상인의 말초 혈액 단백구를 사용하였다.

6) 중합효소연쇄반응을 이용한 TGF- α , β , EGFR의 검색: 중합효소연쇄반응에 의한 TGF- α , β , EGFR의 검색은 수립된 53번째 passage 세포주 및 한국세포주 은행에서 분양받은 세포주를 포함한 총 6개의 세포주에서 총 5회 반복 실시하였고 사용한 primer는 Maxim Biotech, Inc.(MBI, USA) 제품이였으며 oligonucleotide primer의 sequence는 Table 3에 표기하였다. PCR에 사용된 amplification 혼합액은 총 25 μ l이었으며 여기에 세포주에서 유출한 DNA 1 μ g, 50 pM의 oligonucleotide primer 1(0.5 μ l), primer 2(0.5 μ l), 20 μ M의 dNTP(Boehringer Mannheim, Germany) 5 μ l, 10X reaction buffer(USB, Amersham, USA) 2.5 μ l, 1.5 mM MgCl₂(USB, Amersham, USA) 1.5 μ l, 1.25 Unit Taq DNA polymerase(USB, Amersham, USA) 1.25 μ l를 포

Table 4. Temperature and time in each steps in specific primers

Step	Time	Temperature		
		TGF- α	TGF- β	EGFR
Predenaturation	120sec	95°C	95°C	95°C
Annealing	90sec	50°C	55°C	45°C (120sec)
Elongation	120sec	72°C	72°C	65°C
Denaturation	60sec	95°C	95°C	95°C
Post-elongation	420sec	72°C	72°C	65°C
Cycle No.		40 cycle		

TGF: transforming growth factor
EGFR: epidermal growth factor receptor.

합하였다. 이들 혼합액에 동량(25 μ l)의 mineral oil을 첨가하였으며 사용된 DNA 증폭기기는 tubing방식의 UNO Thermoblock(Biometra, Germany)을 이용하였다. PCR cycles은 TGF- α 의 경우 DNA의 predenaturation은 95°C에서 120초 1회, annealing은 50°C 90초에서부터 elongation 72°C에서 120초, denaturation 95°C에서 60초까지를 39회 반복한 후 elongation 72°C에서 120초, post- elongation 72°C에서 420초를 1회시행하여 총 40회를 반복하였다. TGF- β 의 경우 DNA의 predenaturation은 95°C에서 120초, annealing은 55°C에서 90초, elongation은 72°C에서 120초, denaturation은 95°C에서 60초, 그리고 post-elongation은 72°C에서 420초를 사용하였다. EGFR의 경우 annealing은 45°C에서 120초, elongation은 65°C에서 120초, post-elongation은 65°C에서 420초를 사용하였으며 그외 predenaturation과 de-

naturalization의 시간과 온도는 동일하였다(Table 4). PCR product의 10 µl를 2% agarose에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide(10 mg/ml)가 들어있는 염색통(30µl in D/W 300 ml)에 10분 염색한 후 자외선 등(UV/DNA photographic system SL III, Vilber Lourmat TFP-20M, France)에서 확인하였다. 분자 크기 표식자는 Hae III-digested φX174RF DNA fragment(Gibco, USA)를 이용하였다.

7) 염색체 검사: 수립된 45번째 passage 세포의 염색체 이상유무를 검사하기 위하여 배양중에 있는 세포에 colcemid 0.05 µg/ml를 1시간동안 가하여 배양한 후 0.075 mol/l potassium chloride를 가한 다음 메탄올과 빙초산을 3 : 1로 혼합하여 세포를 3회 고정하였다. 에탄올로 깨끗하게 처리한 유리슬라이드 위에 세포부유액을 떨어뜨린 후 건조시켜 Giemsa염색을 하여 광학현미경하에서 염색체수를 확인하고 핵형분석을 시행하였다.

8) 종양형성능력의 검색: 이들 수립된 43번째 passage 세포의 종양형성능력을 확인하기 위하여 수립된 세포주를 4마리의 4주령 숫컷 SCID 마우스(Fox Chase SCID™, C.B.-17/1cr Cr-SCID, Charles River, USA)와 Nude 마우스(SRF/VAF mouse, Cri: CD-1 (ICR)-nu/nu, SEKYO, Japan)의 복강내에 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free PBS에 희석한 5 × 10⁶/0.1 ml 세포를 이식한 후 pathogen free 환경에서 키우다가 이식 후 약 3개월째 도살하여 종양형성의 유무를 확인하였다. 형성된 종양세포는 일부는 동결조직으로 보관하였고, 일부는 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 절편을

이용하여 hematoxylin-eosin염색과 면역조직화학적 염색에 이용하였으며 또한 나비지는 전자현미경적 검색을 실시하였다.

9) 세포주의 호르몬 분비여부: 임상적으로 지나트 류혈중 소견을 보여 부적절한 ADH분비 증후군이 아닌가 의심되어 호르몬 분비여부를 알기위해 52번째 passage 세포주를 일본 SRL 검사센터에 의뢰하였다.

결 과

1. JePa-1세포주 수립

환자의 심낭액에서 종양세포를 분리하여 배양을 시작한 즉시(1993년 4월 19일) 종피세포의 증식이 관찰되었으며 종양세포의 증식은 현저하지 않았다. 종피세포는 매우 빠르게 증식하여 배양 7일째 종양 세포의 일부를 종피세포로부터 분리하여 새로운 배양용기에 옮겨 배양하였다. 이러한 조작은 종피세포의 오염이 없이질때까지 반복하였다. 배양 3개월 후 종양세포의 첫번째 계대배양을 하였다. 그 후 성장율이 향상되어 14번째 passage후부터는 배지내 20% FBS를 10%로 바꾸어 배양하였으며 현재까지 종양 세포는 60 passage를 거쳤고 세포의 배가시간은 45 시간으로 수립된 세포주는 JePa-1세포주라 명명하였다.

2. 조직학적 소견

1) 광학현미경 소견: 도말표본의 Wright염색결과 JePa-1세포의 핵은 비교적 작고 불규칙하였으며 미

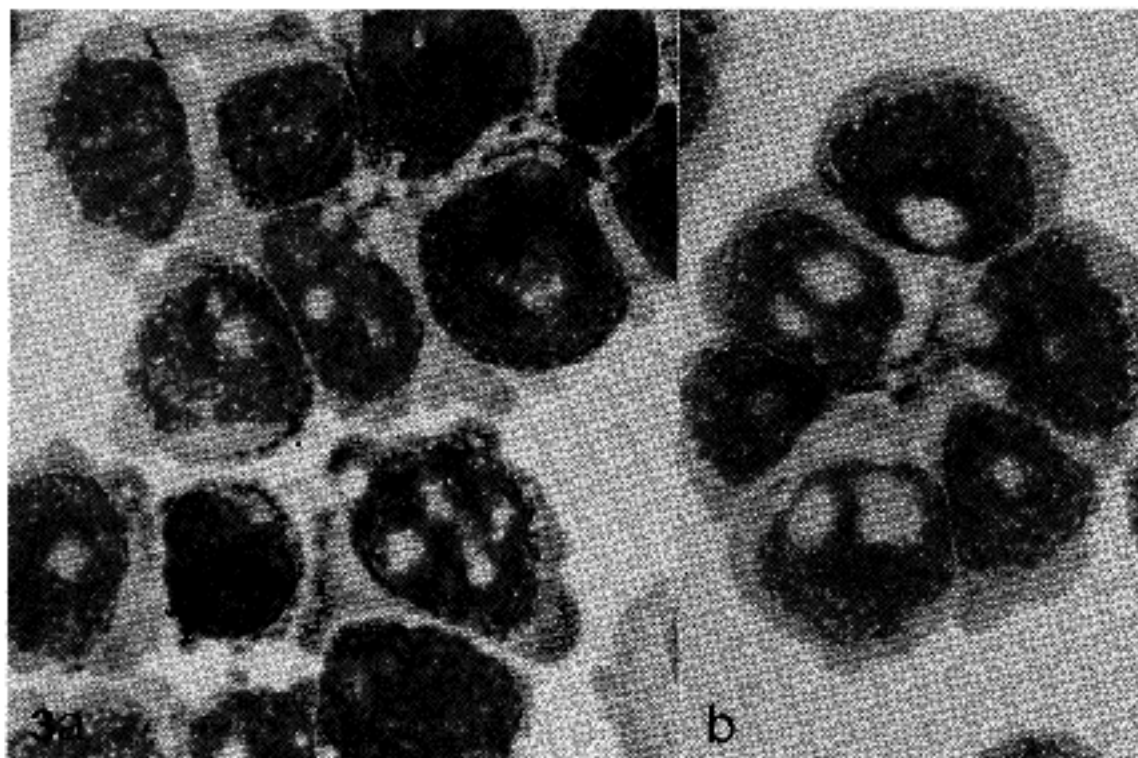


Fig. 3. Cytologic preparation of established JePa-1 cell line. Notice fine chromatin patterned nuclei with inconspicuous small nucleoli in cord(a) and papillary arrangement(b). (Wright)

세한 염색질로 구성되어 있었고 핵소체는 눈에 잘 띄지 않았다. 일부에서 코오도모양 내지는 유두상 배열도 관찰되었다(Fig. 3). SCID 마우스와 Nude 마우스에 JePa-1세포주를 이종이식한 후 생긴 종양의 광학현미경적 관찰 결과 종양은 작은 세포들로 밀집해 있으면서 중앙부에는 괴사가 동반되어 있고, 이들 종양세포들의 세포질은 거의 없으면서 핵은 미세한 염색질로 구성되어 있으며 핵소체는 잘 보이지 않는 소세포암종으로서 유사분열이 왕성하였다(Fig. 4). 이러한 소견은 황지의 심낭액에 대한 세포학적 검사상의 소견과 유사하였으며 소세포암종에 합당하였다.

2) 전자현미경 소견: 종양세포들은 비교적 남개로

별이져 있었으며 세포전내 탁에 한계된 농집을 갖는 내분비 과립이 관찰되었다(Fig. 5). 세포간의 결합소체는 비교적 발달이 미약하였으며 일부에서는 선구조의 분화를 보였다(Fig. 6). 이러한 소견은 JePa-1세포주나 이종이식에서 동일하였다.

3. 면역표현형 검색

JePa-1세포주에 대한 면역표현형의 결과는 Table 5와 같다. JePa-1세포주는 *Rb* 단백질과 *c-myc*에 1-, TGF- α 와 TGF- β 에 2+와 3+, keratin에 2+였고, EGFR, NSE, chromogranin, CEA, EMA에는 음성이었다. 이종이식후 생긴 종양은 *Rb* 단백질, *c-myc*, TGF- α , TGF- β , EGFR, keratin, NSE, chromogranin, EMA에

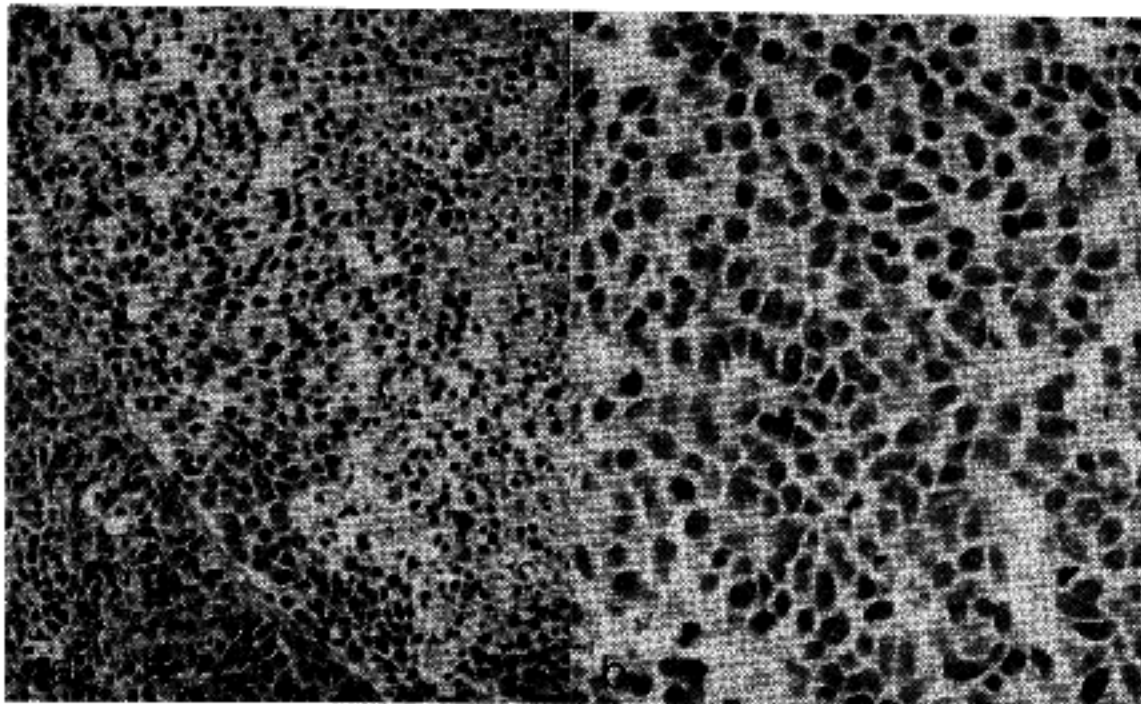


Fig. 4. Histopathologic features of the mouse xenograft tumor. The tumor is composed of relatively small cells with scanty cytoplasm, active mitoses and central necrosis(a) and fine chromatin nuclei with inconspicuous nucleoli(b).

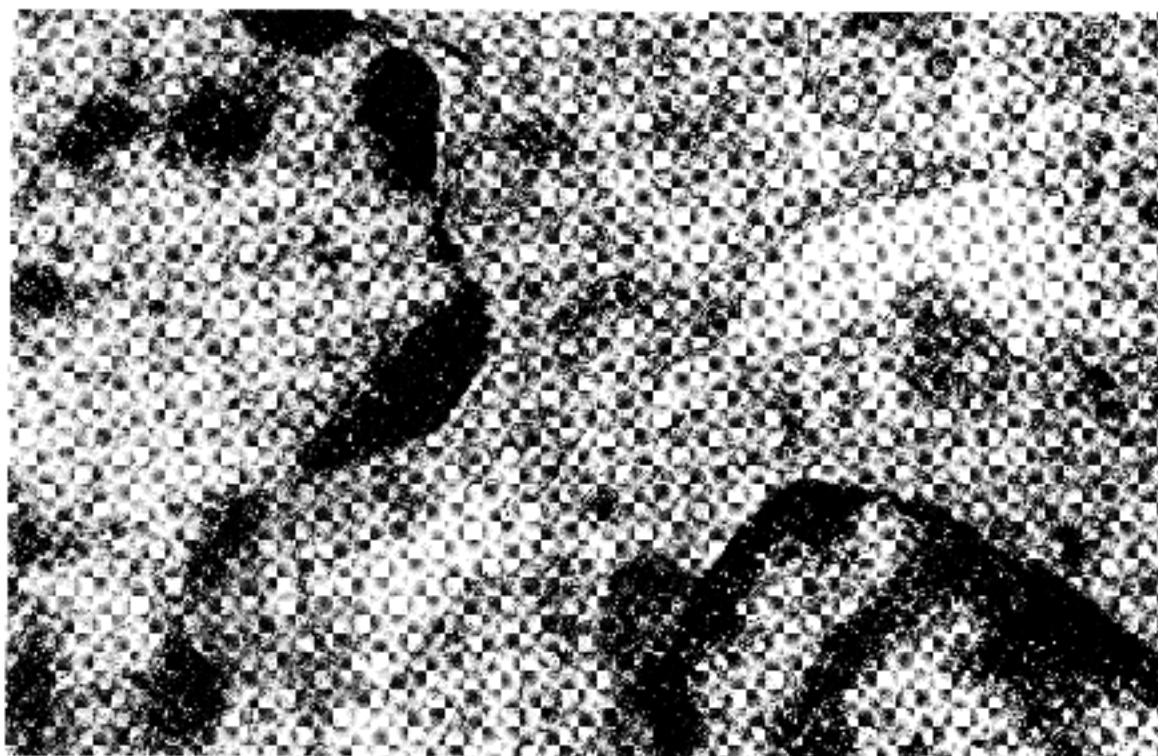


Fig. 5. Electron micrographs of JePa-1 cells. Cytoplasm contains scattered electron-dense, membrane-bound structures consistent with neurosecretory granules(x 16,000).

양성이었고 CEA에는 음성이었다(Fig. 7~13). 이종 이식후 생긴 종양이 JePa-1세포주에 비해 양성의 염색정도가 더 높고 JePa-1세포주에서는 음성인 EGFR, NSE, chromogranin, EMA에 양성을 보인다는 점이 차이가 있었다. 또한 한국세포주은행에서 분양받은

세포주는 소세포암 및 선암종 세포주 모두에서 *Rb* 단백, *c-myc*, TGF- α 와 TGF- β 에 양성이었고 EGFR에서는 선암종 세포주인 NCI-358를 제외하곤 모두 음성이었다.

Table 5. Immunohistochemical staining of lung cancer cell lines and tumors from xenografts

	<i>Rb</i> protein	<i>c-myc</i>	TGF- α	TGF- β	EGFR	Keratin	NSE	chromo- granin	CEA	EMA
Cell lines(Histology)										
JePa-1(SCC)	1+	1-	2+	3+	0	2+	0	0	0	0
NCI-H522(AC)	2+	1+	1+	2+	0	ND	ND	ND	ND	ND
NCI-H358(AC)	2+	2+	1+	3+	1+	ND	ND	ND	ND	ND
NCI-H128(SCC)	1+	1+	2+	3+	0	ND	ND	ND	ND	ND
NCI-H69(SCC)	3+	3+	3+	3+	0	ND	ND	ND	ND	ND
NCI-H146(SCC)	1+	2+	3+	3+	0	ND	ND	ND	ND	ND
Xenografts										
SM-1	1+	2+	3+	1+	0	ND	ND	ND	ND	ND
SM-2	1+	2+	3+	0	0	3+	3+	0	0	2+
SM-3	2+	3+	3+	2+	3+	2+	0	0	0	3+
NM-2	3+	3+	3+	2+	2+	3+	1+	1+	0	1+
NM-3	3+	1+	3+	1+	1+	2+	0	0	0	1+

SM: SCID mouse, NM: Nude mouse, SCC: small cell carcinoma, AC: adenocarcinoma, ND: Not done, *Rb*: Retinoblastoma, TGF: transforming growth factor, EGFR: epidermal growth factor receptor, NSE: neuron-specific enolase, CEA: carcinoembryonic antigen, EMA: epithelial membrane antigen.

Immunohistochemical staining graded as follows: 0=negative, 1+=<25% positive stained tumor cells, 2+=25~50%, 3+=>50%.

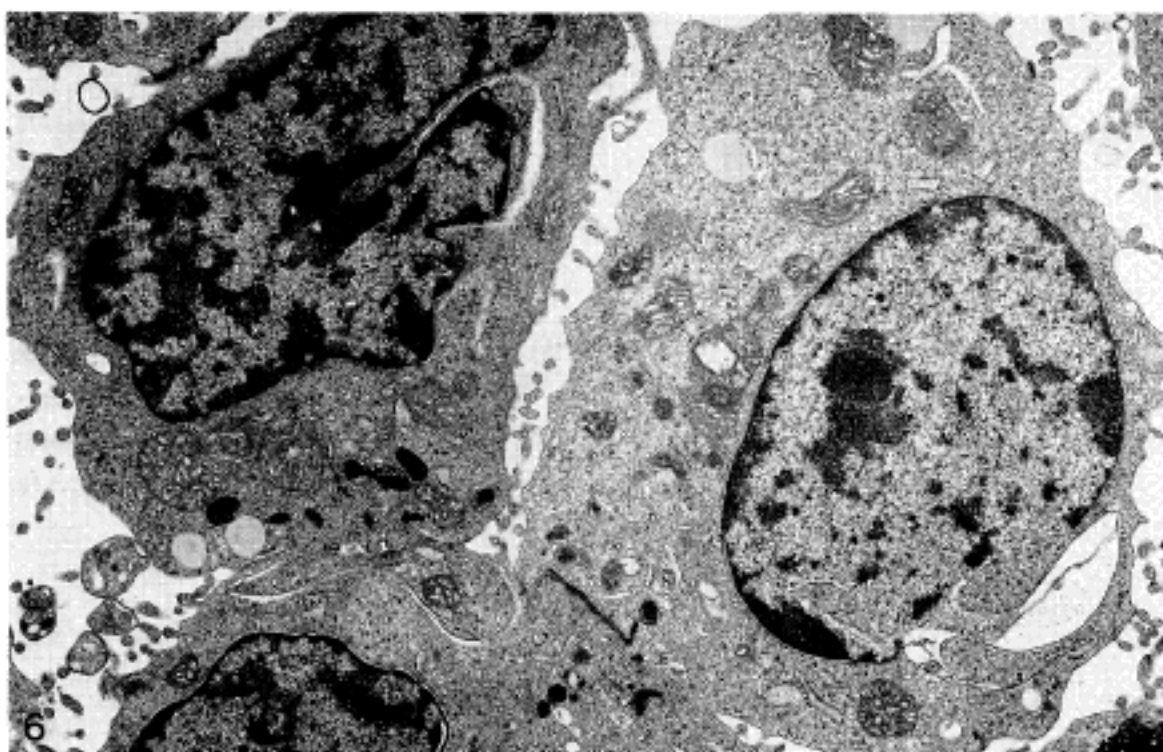


Fig. 6. Electron micrographs of JePa-1 cells. The microvillous formation suggests glandular differentiation. also Desmosome formations are noted.(x 4,000).

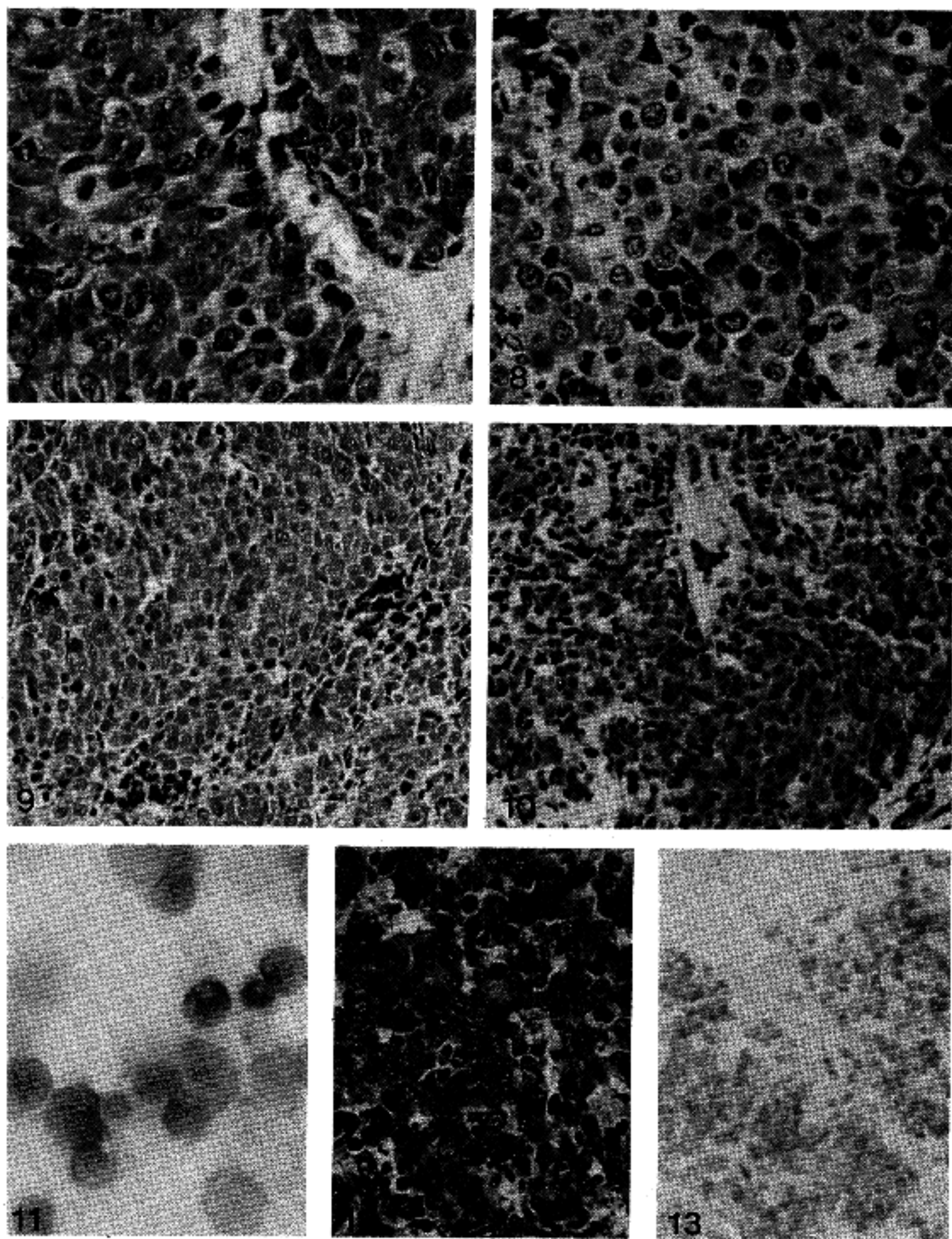


Fig. 7. Positive staining of *Rb* protein in xenografts.
Fig. 8. Positive staining of *c-myc* protein in xenografts.
Fig. 9. Positive staining of transforming growth factor- α in xenografts.
Fig. 10. Positive staining of epidermal growth factor receptor in xenografts.
Fig. 11. Positive staining of transforming growth factor- β in JePa-1 cell line.
Fig. 12. Positive staining of keratin in xenografts.
Fig. 13. Positive staining of chromogranin in xenografts.

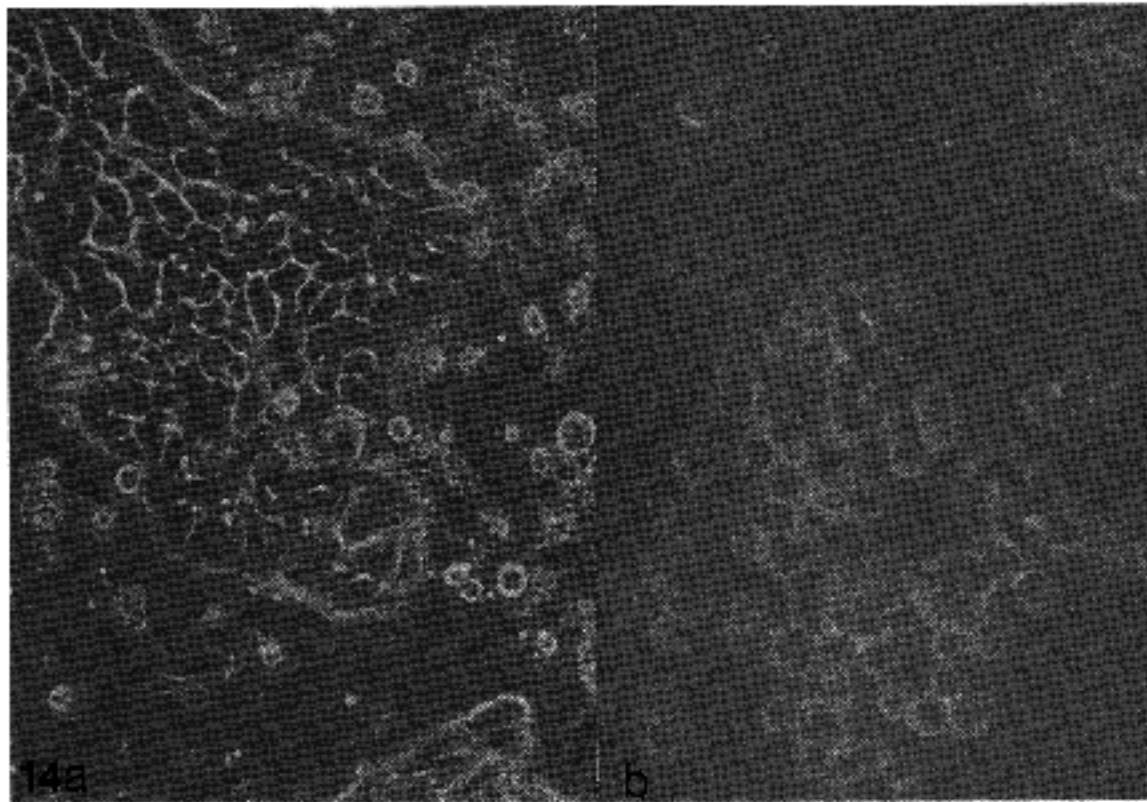


Fig. 14. JcPa-1 cell line grew in culture as packed aggregates in larger clumps with mixed adherent/floating cell line in early passage(a), and after passages very loosely floating aggregates growing in small clumps and intertwined cords(b).

Table 6. Growth characteristics and tumorigenicity of JcPa-1 cell lines

Appearance in tissue culture		Doublin Time(h)	'Plating efficiency	*Tumorigenicity in	
Primary culture	After passage			SCID mouse	Nude mouse
Relatively densely packed aggregates of cells in larger clumps.	Very loosely adherent floating aggregates growing in small clumps with distinct cell outlines and intertwined cords. Cental necrosis was absent.	45	0.35%	3/4	2/4

SCID: severe combined immunodeficiency

†: Number of clusters and colonies/number of cells plated × 100

*: Number of tumor takes/ number of mouse injected.

4. 성장특징과 Plating Efficiency

JePa-1세포주에 대한 배양시의 성장양상, 배가시간과 plating efficiency에 대한 검색 결과 JePa-1세포주의 배가시간은 45시간이며 plating efficiency는 0.35% 이었고 배양시 특징은 처음에는 비교적 밀집된 덩어리형태로 사라다가 점차 느긋해지면서 부유한 작은 덩어리 내지는 코오드 또는 유두상배열로 자랐다(Table 6, Fig. 14).

5. 세포분획

FACSCalibur를 이용한 JePa-1세포주의 DNA 배수성은 사배수성이었으며 DNA지수는 2.13이었고 세포분획은 G₀/G₁, S와 G₂/M에 대해 각각 72%, 23%, 5%였다.

6. 유세포분석기를 이용한 Rb, c-myc 및 K-ras 단백질 검색

JePa-1세포주에 대한 Rb, c-myc 및 K-ras 단백질 검

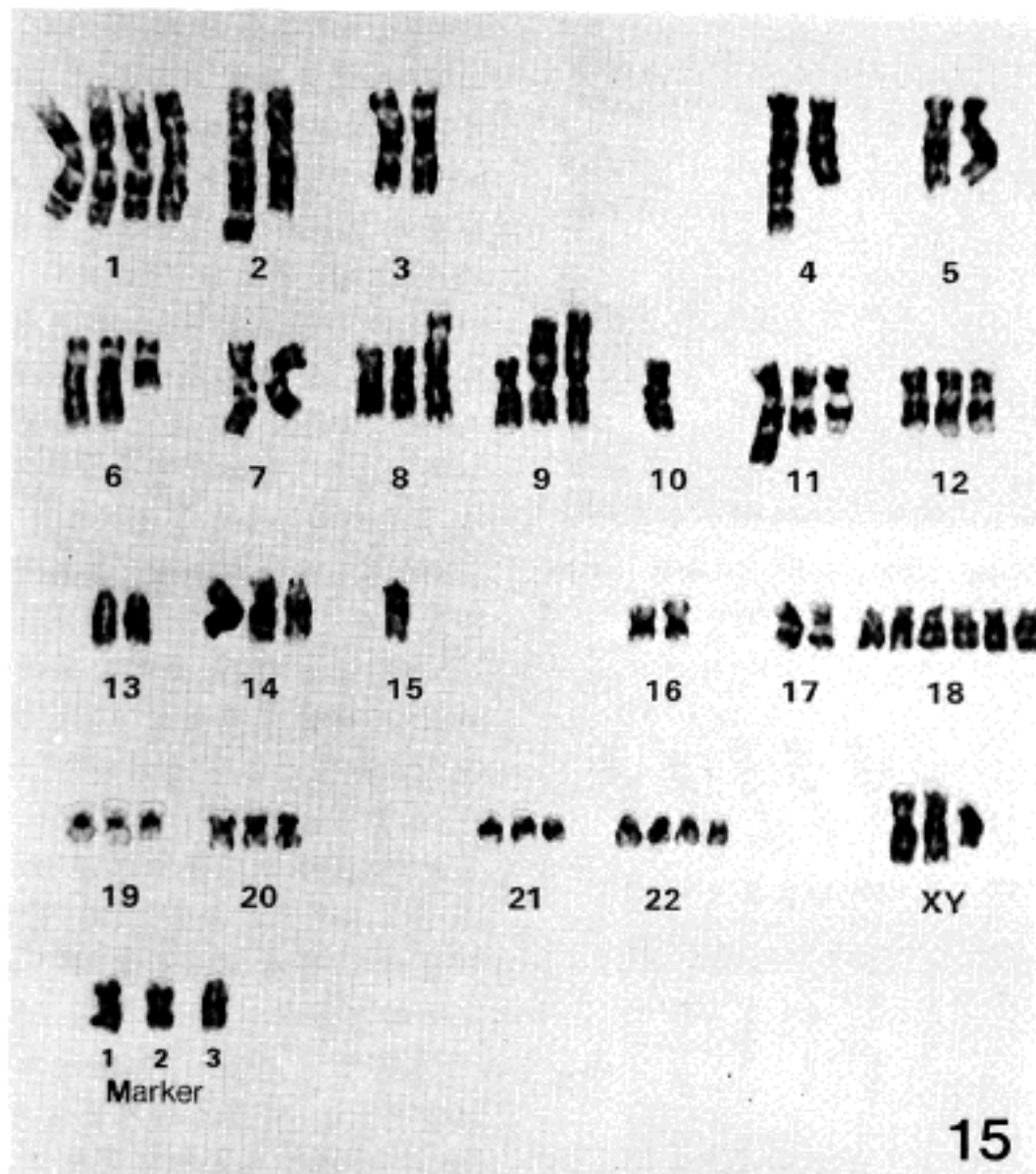


Fig. 15. G-banded karyotype from JePa-1 cell line.

색 결과 각각 98.9%, 99.3%, 99.7%에서 양성반응을 보였다.

7. 염색체 검사결과

염색체 분석상 JePa-1세포주는 65개의 염색체를 보였으며 핵형상 많은 수적, 구조적 이상을 보였다 (Fig. 15). 이를 살펴보면 65, XY, add(X)(p11), der(1)t(1; 10)(q10; q10), -2, add(2)(q37), -3, -4, add(4)(q35), -5, add(6)(q21), -7, add(7)(q36), add(8)(p23), add(9)(p24)x2, -10, -10, add(11)(q23), -13, add(14)(p11)x2, -15, -15, -16, del(16)(q13q24)x2, -17, +18, +18, +18, del(22)(q11), +mar1, +mar2, +mar3 이었다.

8. 종양형성능력

이종이식한 SCID 마우스 4마리와 Nude 마우스 4마리, 즉 총 8마리중에서 5마리(SCID 마우스 3마리와 Nude 마우스 2마리)에서 종양형성이 관찰되었으

며 주로 장간막에서 종양의 증식 및 종괴의 형성이 관찰되었다(Fig. 16).

9. 종합효소연쇄반응을 이용한 TGF- α , TGF- β , EGFR의 검색

JePa-1세포주에 대한 TGF- α , TGF- β , EGFR의 검색상 EGFR에서만 216bp에서 증폭된 DNA가 확인되었다. 또한 NCI-H522 세포주를 제외한 나머지 분양받은 4개의 세포주(NCI-H358, NCI-H128, NCI-H69, NCI-H146)에서도 EGFR에 양성이었다(Fig. 17).

10. 세포주 호르몬 분비여부

JePa-1세포주는 배양시 ADH를 0.9 pg/ml를 분비하였다.

고찰

폐암 세포주 수립의 첫 보고¹¹⁾ 이후 많은 세포주

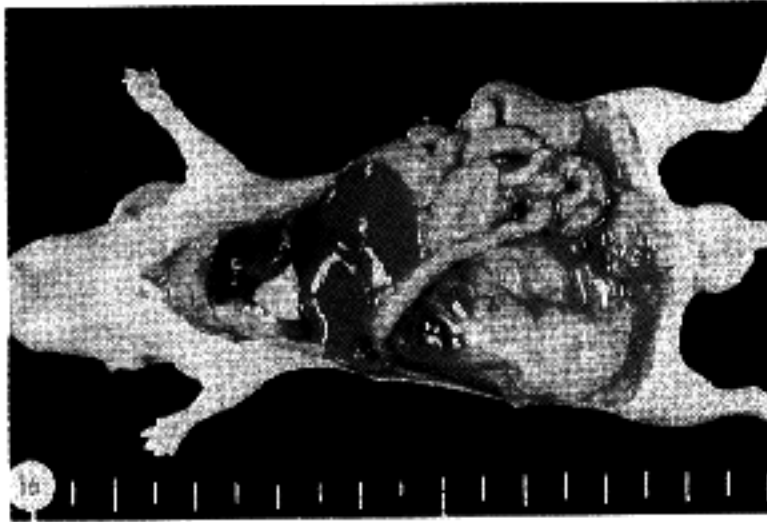


Fig. 16. Xenotransplanted JcPa-1 cells to nude mouse showed tumor formation(arrow) in abdomen.

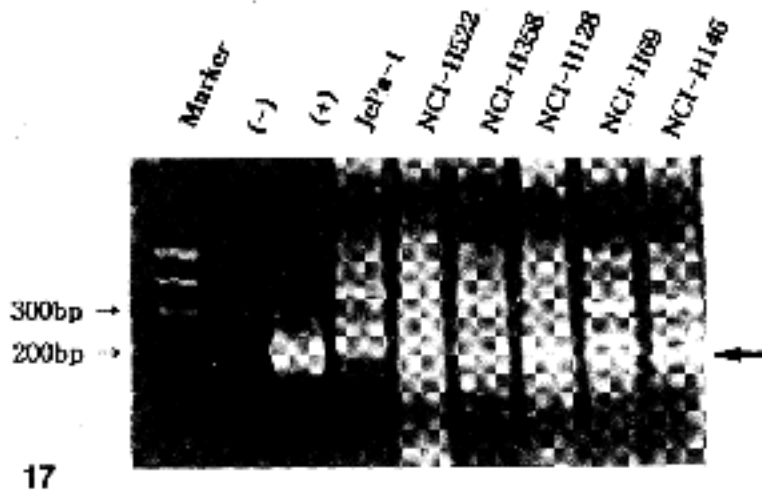


Fig. 17. PCR analysis of epidermal growth factor receptor expression in cell lines. The band is seen at 216bp(arrow) with EGFR in JcPa-1, NCI-H358, NCI-H128, NCI-H69, and NCI-H146 except for NCI-H522 cell line. Hae III-digested ϕ X174RF DNA was used as a size marker.

특히, 소세포암 세포주에 대한 수렴이 이루어졌고⁵⁻⁹ 이들 통해 폐암세포의 생물학적 특징들이 규명되었다. 소세포암 세포주 수렴의 성공률은 47% 정도이며¹² 신선한 조직으로부터 소세포암이나 비소세포암 세포주가 수렴되는 경우 더 예후가 나쁘다는 일부 주장¹³도 있지만 대부분은 소세포암 세포주 수렴과 치료에 대한 반응 혹은 예후와 관계가 없다는 보고이다^{12,14}. 소세포암 세포주들은 대부분이 밀집되거나 느슨한 집단형태로 부유하면서 성장하고⁶ 또는 배양 용기에 부착하면서 자라거나 양쪽 경향을 다 취하는 쪽으로 성장한다고 관찰하였다. 물론 이들 모든 세포에서는 신경내분비 과립이 전자현미경 검색상 관찰되었다. 그후 일부 소세포암 세포주에서 다소 "전형적"인 양상과는 다른 "변이형"이 소개되어⁷ 소

세포암 세포주를 크게 두가지 범주로 나눌수 있게 되었다. 전체 70% 정도를 차지하는 "전형적"인 세포주는 신경내분비 과립이나 ,dopa decarboxylase(DDC), bombesin, NSF, creatine kinase BB등을 포함한 신경내분비 표지자를 다양하게 표현하며 소세포암의 중간세포형을 취하는 형태학적 특징을 갖는 반면에 "변이형" 세포주는 다소 신경내분비 과립이나 DDC, bombesin같은 효소들이 결핍되는 생화학적 차이를 보이거나 오히려 더 높은 cloning efficiency나 더 빠른 배가시간을 가지며 방사선이나 항암요법에 저항성을 나타낸다. 따라서 소세포암 세포주가 "변이형"의 표현형을 보일 경우는 전형적인 소세포암 세포주 환자보다는 전체적으로 치료의 반응이 더 나빠 생존율이 보다 짧은 것으로 되어 있다¹⁵. 이와같이 소세포암 배양시 육안상 서로 다른 형태학적 모양으로 성장하는 점과 생화학적 효소같은 표지자의 유무가 중요한 생물학적 차이와 예후를 추정해 볼 수 있는 임상적 의미를 가지고 있기 때문에 수립된 세포주에 대한 in vitro에서의 실험 결과가 임상적으로 적용되기 전에 생물학적 특징에 대한 연구가 선행되어야 한다고 생각한다. 본 연구에서 수립된 JcPa-1 세포주 역시 성장시 "heterogeneity"를 보였다. 초기에 종양세포는 밀집된 엉겨붙는 덩어리 형태로 시험관에 부착하여 자라다가 점차 느슨해지면서 부유하는 작은 덩어리내지는 코오드모양으로 자랐다. 배가시간은 45시간, plating efficiency는 0.35%로 다른 소세포암 세포주의 결과와 비교해 볼때 평균치라 할 수 있다. JcPa-1 세포주는 신경내분비 과립을 가지고 있으면서 NSE와 chromogranin에 면역조직화학적 검사상 양성이며 ADH를 분비하는 집으로 비루어 전형적인 소세포암에 속한다고 생각할 수 있다. 앞서 기술한 JcPa-1세포주의 성장양상을 Carney등⁷에 의한 소세포암 세포주의 형태학적 분류에 따라 구분해보면 제 3형에 속한다. 수립된 폐암 세포주, 즉 크게 소세포암과 비소세포암(편평상피암, 대세포암 및 선암종) 세포주들의 특징을 조직학적 유형에 따라 비교하여 이들 상호관계를 규명한 연구⁸에서 보면 이들 세포주들은 서로 겹치는 생화학적 및 형태학적 특징을 보이고 한 세포형에서 다른 세포형으로 변화하는 경향을 보여 이들 폐암 세포주 모두 공통된 세포에서 기원한다는 개념을 뒷받침한다고 주장하였다. 이점은 또한 Carney등¹⁶이 숙주환경에 따른 종양세포 형태의 변화를 의미하거나 소수의 작은 다른 세포군이 처음부터 존재하고 있다가 성장시 원래의 주된 세포형

을 누르고 과다성장했음을 의미한다고 지적했다. 이러한 관찰은 임상과 연관시켜볼 때 소세포암 치료 후에 볼 수 있는 형태학적 변화와 유사하다고 생각한다. 본 연구에서도 살펴보면 JePa-1세포주는 형태학적 및 면역조직화학적 검색상 소세포암종임에도 전자현미경 검색에서 일부 선구조의 분화를 관찰할 수가 있었으며 이는 Duchesne등⁹이 주장한 공통된 세포기원을 의미하며 한 세포형에서 다른 세포형으로의 표현형이 변화한다고 생각한다.

원래의 조직소견과 수립된 세포주나 이종이식된 종양에서의 조직학적 특징들은 보고¹²된 대부분의 세포주에서처럼 JePa-1세포주에서도 동일하였다. 수립된 세포주의 종양형성능력을 살펴볼 때 Nude 마우스에서 전이능력을 갖는 비소세포암 세포주가 기술되었지만¹⁷ 소세포암 세포주에서 마우스에 이종이식된 종양이 접종부위의 다른 부위로의 전이는 드문 것으로 되어있다^{7,18,19}. JePa-1세포주는 총 8마리의 SCID및 Nude 마우스중 5마리에서 종양을 형성하였지만 접종된 복강내 장간막외의 다른 부위로의 전이는 관찰하지 못하였다.

폐암 세포주 수립으로 폐암세포에 대한 분자생물학적 특징에 대한 연구가 용이하여졌다. 염색체 3번 단완(3p)의 결손은 소세포암과 많은 비소세포암에서 흔히 관찰되는 변화중 하나이며 3p에 위치한 유전자가 폐암의 모든 세포형태의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각하였다^{4,20}. 실제적으로 거의 모든 예의 소세포암과 많은 비소세포암에서 염색체 3번 단완에 DNA서열에 대한 heterozygosity의 손실을 보여주었고 이러한 사실로 염색체의 결손이 종양억제 유전자에서 일어났다는 점과 세포유전학적으로는 정상인 염색체 3번에 열성 돌연변이가 있음을 발견하였다²¹⁻²⁴. 그러므로 이부위에서 결손된 정확한 종양 억제 유전자를 찾는 것이 중요하다고 생각되고 또한 폐암의 병인에 있어서 이 유전자의 역할을 규명하는 것이 폐암을 조기에 진단하고 치료하는데 도움을 제공할 것이라고 생각한다.

Rb 유전자는 13q14에 위치하며 초기 연구²⁵에서 이 유전자내 구조적 이상이 소세포암 세포주에서 약 18%정도 관찰되지만 비소세포암에서는 구조적 이상이 발견되지 않는 것으로 보고하였다. 더불어 소세포암 세포주에서는 RB1 mRNA가 60%정도에서 발현되지 않지만 비소세포암의 대부분에서는 RB1 mRNA발현에 이상이 없는 것으로 알려져 있어 일부 소세포암의 병인에 RB1 유전자가 중요한 역할을 할 것이라고 생각하였다²⁶. 그러나 소세포암에서 RB1

mRNA와 RB1 단백질의 결핍을 초래하는 Rb유전자의 불활성화가 흔하기는 하나 일치되거나 일반적인 소견은 아니다²⁵⁻²⁷. JePa-1세포주에서는 Rb단백의 발현이 관찰되었다.

myc 암유전자군인 c-myc, N-myc, L-myc등에 대한 소세포암 연구에서 보면 절제된 종양조직과 수립된 세포주에서 거의 동일율로 증폭되며²⁸ 이는 double minute chromosome, homogeneously staining region 또는 abnormally banding region등과 같은 유전자 증폭의 세포유전학적 증거와도 관련이 있다²⁹⁻³¹. c-myc 유전자는 8번 염색체 장완(8q24)에 위치한 반면 N-myc과 L-myc은 각기 2p23-24와 1p32에 위치한다. c-myc의 증폭은 "변이형"형에서 자주 동반되는 것으로 밝혀졌다²⁸. 또한 이러한 유전자 증폭은 미리 처치된 환자의 조직이나 세포주에서 자주 나타나는 것으로 제시되었고 게다가 c-myc유전자의 증폭을 보이는 환자가 보이지 않는 환자보다 더 생존율이 짧은 것으로 보고되어 있으며 폐암의 치료후 재발된 환자에서 c-myc 유전자가 주로 증폭되는 소견은 유전자 증폭이 소세포암 병인에서 비교적 늦게 발생하는 일일 것이라고 암시하였다³².

ras유전자는 세포막에 걸쳐 신호를 전달하는데 중요한 역할을 수행하여 세포의 증식을 조절한다. K-ras 유전자 활성화는 폐선암종에서 중요한 예후표지자임이 증명되었고³³ 이 유전자 활성화는 12, 13, 또는 61번째 아미노산의 점돌연변이로 유발되며 이중 codon 12에서의 돌연변이가 가장 흔한 것으로 되어 있다³⁴. 이러한 점돌연변이는 폐선암종에서 약 30% 정도 관찰되고 비소세포암의 다른 형에서는 4~10%로 드물게 관찰되나 소세포암 세포주에서는 동정되지 않은 것으로 보고되었다^{34,35}. JePa-1세포주는 유세포분석상 K-ras단백에 양성을 보여 일부에서 선구조의 분화를 보인것과 K-ras단백의 발현을 연관시켜 볼 수가 있겠다.

Mabry등³⁶과 Falco등³⁷은 유전적인 상호관계가 폐암의 병인과 생물학적 특성 및 변화에 중요한 역할을 할 것이라는 지적을 하였다. 특히 Mabry등³⁶은 종양 유전자들사이의 협력은 소세포암으로부터 비소세포암의 이행에 중요한 것이라 언급하였고, 소세포암 환자가 치료후 재발하였을 경우 일부 종양세포들이 보다 비소세포암을 암시하는 조직학적 표현을 보임으로서 소세포암에서 비소세포암으로의 이행이 일어날 수 있음을 제시하였다. 또한 소세포암 세포주에 변이된 여러 유전자들을 삽입시켜 보았을 때 myc 유전자군을 과발현하지 않는 전형적인 소세

포암 세포주에선 변이된 *ras* 유전자가 과발현되었지만 세포표현형의 변화를 관찰할 수 없었으나 *c-myc* 또는 *N-myc* 유전자의 과발현을 보이는 소세포암 세포주에 변이된 *ras* 유전자를 삽입했을 때에는 대세포 미분화암으로의 이행을 관찰할 수가 있었다고 보고하였다. 본 실험에서 수립한 JePa-1 세포주는 유세포 분석상 *c-myc* 단백질과 *K-ras* 단백을 발현하였으나 앞서 언급하였듯이 선구조의 분화를 보이기 때문에 Mabry 등³⁶의 실험 결과를 고려해볼 때 결국 소세포암 세포가 비소세포암의 표현형으로 이행할 수 있고 이러한 이행은 복합적인 종양유전자나 단백질물 사이의 상호관계에 의해 일어날 것이라고 추측할 수 있었다.

세포성장의 조절이 안되는 중요한 기전은 여러 성장인자들의 활동으로 인하며 이러한 성장인자와 수용체가 종양유전자로 전환되는 유전적 변화를 겪을 수 있다는 인지로 인하여 인체에서 발생한 암에서 이들의 역할을 규명하기 위한 연구가 고조되고 있다. 연구 대상중에 있는 인자들에는 EGF, TGF, IGF(insulin growth factor)-1 등³⁸이 있으며 이들은 세포증식을 자극하거나 억제할 수 있다. 소세포암의 연구에서 이러한 인자들의 기능이 제시되었는데³⁹⁻⁴⁰, EGF는 정상세포와 종양세포의 성장을 자극하는 polypeptide로서 이에 대한 수용체가 잘 규명되었고⁴¹ 폐암에서 EGFR의 발현을 첫 보고³⁹한 연구에서 보면 6종의 비소세포암 세포주중 5종에서 EGFR을 발현한 반면 11종의 소세포암 세포주에서는 하나도 발현되지 않았다고 하였다. 이러한 실험 결과는 다른 연구에서도 비슷하였다^{42,43}.

형질전환인자(TGF)는 크게 α 와 β 로 분류⁴³하며 TGF- α 는 배조직, 정상조직 그리고 다양한 종양조직에서 인지되는 것으로 알려져 있다^{45,46}. TGF- β 는 대부분 간엽조직세포의 증식과 많은 생리적 과정에 관여하는 peptide로 알려져 있으며 종양발생의 한 역할을 담당할 것으로 여겨지나⁴⁷ 이에 상반된 의견, 즉 골수구양세포나 림프구에 대해서는 성장억제 작용을 갖는 것으로 보고되었다⁴⁸. 이러한 성격의 TGF가 소세포암 세포주에서 대부분 발현되는 것으로 보고되어 있다^{49,50}.

이상에서 살펴본 바와같이 폐암은 조직학적 유형 및 종양 생물학에 있어 복잡한 종양이어서 종양의 치료는 생물학과 병인에 관계된 분자생물학적 기전을 잘 이해하는 것에 달려 있다고 보는 관점에서 볼 때 JePa-1 세포주의 수립과 특성에 대한 본 연구는 한국인 소세포암의 이러한 이해를 돕는데 이용될

것이라고 기대된다.

결 론

1993년 4월 19일부터 1996년 6월까지 64세 남자환자의 폐에서 발생한 소세포암이 심낭으로 전이되어 발생한 심낭의 악성 삼출액을 채취하여 소세포암 세포주를 수립하였고 이를 JePa-1 세포주라 명명하였다. JePa-1 세포주는 현재까지 60 passage에 달하며 배가시간은 45시간, plating efficiency는 0.35%이며 ADH 분비가 확인되었다. 종양형성능력은 4마리 SCID 마우스중 3마리와 4마리 Nude 마우스중 2마리에서 종양을 형성하였다. 염색체수는 65개이면서 핵형상 많은 수적, 구조적이상을 보였다. 형태학적 특징상 비교적 작은 세포이며 미세한 염색질의 핵과 잘 눈에 띄지 않는 핵소체, 세포질내 막에 한계된 농도를 갖는 내분비 과립등은 소세포암종에 합당하였고 일부에서는 선구조의 분화도 관찰되었다. *Rb* 종양 단백질, *c-myc* 종양 단백질, TGF- α , TGF- β , EGFR, keratin, NSE, chromogranin, EMA에 면역조직화학적 염색상 양성하였고 유세포 분석기를 이용한 *Rb*, *c-myc* 및 *K-ras* 단백질 발현 검색결과 각각 98.9%, 99.3%, 99.7%에서 양성반응을 보였다. 중합효소연쇄 반응을 이용한 TGF- α , β , EGFR의 검색상 EGFR에서 만 증폭된 DNA가 확인되었다. 또한 JePa-1 세포주는 사배수성이었으며 DNA지수는 2.13이었다.

본 연구를 통하여 한국인 소세포 폐암의 형태학적 및 면역조직학적 특징, 배양시의 성장특징 및 호르몬 분비여부, 종양유전자 단백질과 여러 성장인자와의 관계, 종양형성 능력여부 및 염색체 이상등을 관찰하였으며 이를 통하여 JePa-1 세포주가 한국인 소세포암의 원인, 치료 및 예후인자를 밝히는데 귀중한 세포주가 될 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics, 1992. CA Cancer J Clin 1992; 42: 19-38.
2. World Health Organization. The World Health Organization histological typing of lung tumors. 2nd ed. Am J Clin Pathol 1982; 77: 123-36.
3. Cohen MH, Matthews MJ. Small cell bronchogenic carcinoma: A distinct clinicopathologic entity. Semin Oncol 1978; 5: 234-43.
4. Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Lee EC, et al. Specific chromosome defect associated with human small cell

- lung cancer: Deletion 3p(14-23). *Science* 1982; 215: 181-2.
5. Pettengill OS, Sorenson GD, Wurster-Hill DH, et al. Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small cell carcinoma of the lung. *Cancer* 1980; 45: 906-18.
 6. Gazdar AF, Carney DN, Russel EK, et al. Establishment of continuous, clonable cultures of small cell carcinoma of the lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res* 1980; 40: 3502-7.
 7. Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, et al. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res* 1985; 45: 2913-23.
 8. Baillie-Johnson H, Twentyman PR, Fox NE, et al. Establishment and characterization of cell lines from patients with lung cancer(predominantly small cell carcinoma). *Br J Cancer* 1985; 52: 495-504.
 9. Duchesne GM, Eady JJ, Peacock JH, Pera MF. A panel of human lung carcinoma lines : Establishment, properties and common characteristics. *Br J Cancer* 1987; 56: 287-93.
 10. Carney DN, Mitchell JB, Kinsella TJ. In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res* 1983; 43: 2806-11.
 11. Oboshi S, Tsugawa S, Seido T, Shimosato Y, Koide T, Ishikawa S. A new floating cell line derived from human pulmonary carcinoma of oat cell type. *Gann* 1971; 62: 505-20.
 12. Campling BG, Haworth AC, Baker HM, et al. Establishment and characterization of a panel of human lung cancer cell lines. *Cancer* 1992; 69: 2064-74.
 13. Stevenson H, Gazdar AF, Phelps R, et al. Tumor cell lines established in vitro : An independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Ann Int Med* 1990; 113: 764-70.
 14. Stevenson HC, Gazdar AF, Linnoila RI, et al. Lack of relationship between in vitro tumor cell growth and prognosis in extensive-stage small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1989; 7: 923-31.
 15. Carney DN. Biology of small cell lung cancer. *Lancet* 1992; 339: 843-6.
 16. Carney DN, Broder L, Edelstein M, et al. Experimental studies of the biology of human small cell lung cancer. *Cancer Treat Res* 1983; 67: 27-35.
 17. Cole SPC, Campling BG, Dexter DF, Holden JJA, Roder JC. Establishment of a human large cell lung tumor line(QU-DB) with metastatic properties in athymic mice. *Cancer* 1986; 58: 917-23.
 18. Sharkey FE, Fogh J. Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int J Cancer* 1979; 24: 733-8.
 19. Kerbel RS, Man MS, Dexter D. A model of human cancer metastasis: Extensive spontaneous and artificial derived variant sublines in nude mice. *J Natl Cancer Invest* 1984; 62: 93-101.
 20. Falor WH, Ward-Skinner R, Weygryn S. A 3p deletion in small cell lung carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 16: 175-7.
 21. Brauch H, Johnson B, Hovis J, et al. Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small cell and non-small cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987; 317: 1109-13.
 22. Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small cell lung cancer. *Nature* 1987; 329: 451-4.
 23. Brauch H, Tory K, Kotler F, et al. Molecular mapping of deletion sites in the short arm of chromosome 3 in human lung cancer. *Genes Chrom Cancer* 1990; 1: 240-6.
 24. Rabbitts P, Bergh J, Douglas J, Collins F, Waters J. A submicroscopic homozygous deletion at the D3S3 locus in a cell line isolated from a small cell lung carcinom. *Genes Chrom Cancer* 1990; 2: 231-8.
 25. Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988; 241: 353-8.
 26. Rygaard K, Sorenson GD, Pettengill OS, Cate CC, Spang-Thomsen M. Abnormalities in structure and expression of the *Rb* gene in small cell lung cancer cell lines and xenografts in Nude mice. *Cancer Res* 1990; 50: 5312-7.
 27. Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, et al. Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 3067-72.
 28. Johnson BE, Brennan JF, Ihde DC, Gazdar AF. *Myc* family DNA amplification in tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 13: 39-43.
 29. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the *c-myc* oncogene in human lung cancer. *Nature* 1983; 306: 194-6.
 30. Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, et al. Human small cell lung cancers show amplification and expression of the *N-myc* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;

- 83: 1092-6.
31. Nau MM, Brooks BJ, Battey J, et al. *L-myc*, a new *myc*-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature(London)* 1985; 318: 69-73.
 32. Brennan J, O'Connor T, Makuch RW, et al. *Myc* family DNA amplification in 107 tumors and tumor cell lines from patients with small cell lung cancer treated with different combination chemotherapy regimens. *Cancer Res* 1991; 51: 1708-12.
 33. Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, et al. *ras* gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Res* 1991; 51: 4999-5002.
 34. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between *K-ras* oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1024-7.
 35. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, et al. *P53* mutations, *ras* mutations and *p53*-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51: 4090-6.
 36. Mabry M, Nelkin BD, Falco JP, Barr LF, Baylin SB. Transitions between lung cancer phenotypes : implications for tumor progression. *Cancer Cells* 1991; 3: 53-8.
 37. Falco JP, Baylin SB, Lupu R, et al. *V-ras_H* induces non-small cell phenotype, with associated growth factors and receptors; in a small lung cancer cell line. *J Clin Invest* 1990; 85: 1740-5.
 38. James R, Bradshaw RA. Polypeptide growth factors. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 259-92.
 39. Sherwin S, Minna JD, Gazdar AF, Todaro GJ. Expression of epidermal and nerve growth factor receptors and soft agar growth factor production by human cancer cells. *Cancer Res* 1981; 41: 3538-42.
 40. Moody TW, Russell E, O'Donohue T. Bombesin-like peptide in small cell lung cancer: Biochemical characterization and secreted from a cell line. *Life Science* 1981; 32: 487-91.
 41. Carpenter G, Zengdegui JG. Epidermal growth factor its receptor and related protein. *Exp Cell Res* 1986; 164: 10-4.
 42. Carney I, Barnes DM, Hasleton P, Healy W, Barber K, Gullick N. Expression of epidermal growth factor receptor in human lung tumors. *Br J Cancer* 1986; 54: 265-9.
 43. Gamou S. Molecular evidence for the lack for epidermal growth factor receptor gene expression in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1987; 47: 2668-73.
 44. Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, DeLarco JE. Sarcoma growth factor form conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type α and type β TGFs. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80: 6364-8.
 45. Driman DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Asa SL. TGF- α in normal and neoplastic human endocrine tissues. *Hum Pathol* 1992; 23: 1360-5.
 46. Pecur L, Kapitanovic S, Sonicki I, Pavelic IP, Spaventi S, Stambrook PJ. Prognostic significance of TGF- α in human lung cancer: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1994; 14: 2839-43.
 47. Moses HL, Branum EB, Proper JA, Robinson RA. TGF production by chemically transformed cells. *Cancer Res* 1981; 41: 2842-8.
 48. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation : New mechanistic insights. *Cell* 1990; 63: 245-7.
 49. Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Expression of TGF- β receptor and expression of TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 in human small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1993; 67: 1015-21.
 50. Norgaard P, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Expression and autoregulation of TGF- β receptor mRNA in small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1996; 73: 1037-43.
-