

구강암 세포 주를 이중 이식한
설암의 누드마우스 모델

연세대학교 대학원

치 의 학 과

정 재 승

구강암 세포 주를 이중 이식한
설암의 누드마우스 모델

지도교수 차 인 호

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

정 재 승

정재승의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008년 6월 일

감사의 글

연세대학교 치과대학을 졸업한지 13년이 되었습니다. 참된 치과 의사의 길을 가기 위해 현실과 이상과의 사이에서 수없이 많은 고민과 노력을 해왔습니다. 대학원에 진학하여 학문에 대한 열정을 키웠고 이 논문에 그 동안의 고민과 정성을 담아 보았습니다. 먼저 대학원에 진학할 수 있도록 용기와 힘을 불어넣어 주신 차인호 지도 교수님께 깊은 감사를 올립니다. 또한 동물실험기간동안 열정적인 모습으로 실험을 도와주신 남 옹 교수님께도 많은 감사를 드립니다. 석사과정동안의 전반적인 조언을 아끼지 않았던 오랜 친구이자 교수인 정영수 교수님께 감사의 말을 드리고 싶습니다.

공개 발표때 아낌없는 조언으로 한층 더 학문의 기쁨을 맛보게 도와주셨던 이충국 교수님, 박형식 교수님 그리고 김형준 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 논문심사과정에서 바쁜 시간을 쪼개어 논문의 방향과 틀을 잡아주신 황영선 박사님, 김현실 교수님께도 감사를 드립니다. 또한 바쁜 수련의 생활에도 불구하고 도움을 주었던 구강악안면외과 의국원 여러분께도 감사를 드립니다. 학위논문을 준비하는 동안 학문적 발전을 포함한 제 자신의 발전을 위해 많은 노력을 했고 힘들 때 마다 때로는 따뜻하게 때로는 호된 질책으로 저를 바로 잡아 주셨던 차인호 지도교수님의 깊은 뜻을 조금이나마 느낄 수 있는 시간들이었습니다. 앞으로 환자를 진료하는 의사로서 학문에 대한 발전을 게을리 하지 않는 진정한 의료인이 되도록 노력하겠습니다. 마지막으로 저를 낳아주시고 길러주신 아버님, 어머님, 그리고 멀리서 늘 격려해주시는 장인, 장모님, 그리고 늘 마음속으로 저를 믿고 평생을 함께하는 사랑하는 아내 김예정 과 사랑하는 딸 정지안 에게 깊은 감사를 전합니다.

2008년 6월 정 재 승

차 례

그림 및 표 차례.....	ii
국문요약.....	iii
I. 서론.....	1
II. 연구재료 및 방법.....	4
1. 연구재료 및 방법.....	4
가. 세포주 확립과 배양.....	4
나. Transwell® invasion assay.....	4
다. Zymography.....	5
라. 실험동물.....	5
마. 실험동물군 설정.....	6
바. 실험동물 희생.....	6
사. 조직학적 관찰.....	6
III. 연구 결과.....	7
1. YD-10B mod 세포주제작.....	7
가. Transwell® invasion assay.....	7
나. Zymography.....	8
2. 종양형성.....	9
3. 조직학적 검사.....	10
가. 대조군.....	10
나. YD-10B mod 실험군에서의 종양형성.....	11
IV. 고찰.....	15
V. 결론.....	19
참고문헌.....	20
Abstract.....	25

그림 차례

Fig. 1 Transwell [®] invasion assay 결과	7
Fig. 2 crystal violet으로 염색한 세포주 비교	7
Fig. 3 MMP-9의 gelatinase 활성도 비교 결과	8
Fig. 4 tumor formation on lateral border of tongue	9
Fig. 5 대조군 (3주)의 조직병리학적 소견.....	10
Fig. 6 YD-10B mod 세포주 (5×10^4 , 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	11
Fig. 7 YD-10B mod 세포주 (5×10^5 , 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	12
Fig. 8 YD-10B mod 세포주 (5×10^6 , 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	13
Fig. 9 YD-10B mod 세포주 (5×10^6 , 2주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견	14

표 차례

Table 1. 세포수 및 관찰 시간별 종양형성 정도.....	14
------------------------------------	----

국문 요약

구강암 세포주를 이종이식한 설암의 누드마우스 모델

일반적으로 구강암의 80-90%는 편평세포암종 (squamous cell carcinoma)으로 좋지 못한 예후를 보인다. 혀에 암종이 발생하면 임파절 전이가 양측성으로 이루어 질 수 있고, 혈관분포가 풍부한 근육조직으로 이루어져 있기 때문에 암세포의 침투 및 성장 속도가 빠르며 경부 임파절 전이가 잘 된다. 따라서 동물실험 모델을 개발하기도 어렵지만, 개발하여도 종양 유발 후에 식이 섭취의 어려움을 초래하여 실험 동물들이 빨리 사망하기 때문에 적절한 후속의 연구를 진행하는데 많은 어려움이 있다.

이에 저자는 YD-10B_{mod} 세포주를 세포수 별로 누드마우스의 혀에 이종이식 하여 구강설암의 발생 정도를 관찰하여 구강설암 연구에 적절한 동물 실험 모델을 개발하고자 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 누드마우스의 혀에 YD-10B_{mod} 세포주를 5×10^4 cells/mouse로 이종이식한 실험군에서는 종양 중심부 괴사를 동반한 침윤성 종양성장이 실험 5주차에서 부터 관찰되었다.

2. 누드마우스의 혀에 YD-10B_{mod} 세포주를 5×10^5 cells/mouse로 이종이식한 실험군에서는 실험 4주차부터 종양 중심부 괴사를 동반한 침윤성 종양 성장이 관찰되었다.

3. 누드마우스의 허에 YD-10B_{mod} 세포주를 5×10^6 cells/mouse로 이종이식한 실험군 에서는 실험 3주차부터 종양세포의 급격한 증식을 보였고, 5주차에서는 종양의 크기가 급속히 성장하여 실험동물이 사망 하였다.

이상의 결과로 YD-10B_{mod} 세포주를 누드마우스의 허에 이종이식하여 형성된 종양은 인체의 허에서 발생된 설암과 유사하게 주위조직으로의 침윤과 종양중심부 괴사의 소견을 보였다. 그리고 이종이식한 세포 수에 따라 종양의 크기나 종양중심부 괴사가 되는 시기가 다른 것으로 보아, 향후 이종이식하는 YD-10B_{mod} 세포주의 세포수를 5×10^4 cells/mouse 이하로 더 적게 이종이식 하면 누드마우스의 생존기간을 더 연장할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 효과적인 항암제의 개발을 위한 연구모델로도 유용하게 이용할 수 있을 수 있으며, 설암의 경부 임파절전이 양상까지도 관찰이 가능한 실험동물 모델을 확립할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 설암, 편평세포암, 동위성 종양모델, 세포주

구강암 세포주를 이종이식한 설암의 누드마우스 모델

(지도 차인호 교수)

연세대학교 대학원 치의학과

정재승

I. 서론

구강암의 대부분을 차지하는 편평세포 암은 후천적이고 환경의 영향을 받는 질환이다. 주로 담배와 술에 장기간 노출된 경우에 잘 발생하는 것으로 여겨지고 있다. 특히 구강은 해부학적으로 화학적 발암물질이나 바이러스 등 외부의 발암인자에 쉽게 노출되는 상태로 존재하며, 구강상피는 세포의 전환(turnover)이 비교적 빠르다는 특징을 가지고 있어 상피성 신생물이 발생할 가능성이 높은 부위이다(김명진 등, 2002).

일반적으로 구강암의 80-90%는 편평세포 암종 (squamous cell carcinoma) 으로 좋지 못한 예후를 보이며, 구강 내에서 혀에 암종이 발생하면 임파절 전이가 양측성 으로 이루어 질 수 있고, 원발부위 자체가 순수한 근육조직으로 이루어져 종양세포가 인접조직으로 침윤되기가 용이하기 때문에 그 예후가 좋지 않은 것으로 보고되고 있다(Zelefsky MJ et al 1990).

이처럼 치료가 어렵고 좋지 않은 예후를 보이는 구강암의 연구를 위해 오래전부터 구강암에 대한 동물실험 모델의 개발이 있어왔다.

1954년 Salley에 의해 처음 개발되고(Salley,J,J 1954) Morris에 의해 보편화된(Morris, A, L 1961) DMBA solution 도포를 이용한 햄스터의 협낭(buccal pouch)에서의 종양 발현 모델을 필두로 현재는 세포주(cell line)를 이용한 종양 발현 모델에 이르게 되었다. 이런 동물실험 모델의 개발은 구강암의 발암과정, 침윤 방법, 전이 경로 등의 이해와 각종 치료방법 연구에 많은 기여를 하게 되었다.

구강암 세포주로는 HN22, UM-SCC, KB-cell등 수많은 세포주 들이 개발 되어 구강암 동물실험 모델 개발을 위해 많이 이용되고 있다. 그러나 구강암 연구를 위한 많은 동물실험 모델 개발에도 불구하고 구강에 암을 유발하였을 경우에 동물의 식이섭취에 문제가 발생하여 연구자들이 원하는 만큼의 동물 생존에 많은 문제가 있어, 최적의 동위성(同位性, orthotopic) 종양모델은 별로 없는 실정이다.

인체종양을 누드마우스에 이종 이식하는 방법은 종양조직을 직접 이식하는 방법과 배양된 종양 세포주를 이식하는 방법이 있는데 직접 이식하는 방법은 종양의 미세 환경 요소들을 같이 이식 해 준다는 장점이 있지만 기술적으로 매우 어렵기 때문에 피하 종양모델은 확립할 수 있더라도 동위종양 모델(orthotopic model)은 확립하기 어렵다는 단점이 있다(박영옥, 2007). 반면에 배양된 인체 종양의 세포 주를 누드마우스에 이종 이식하여 유도된 종양은 세포의 형태, 세포내 미세구조 및 조직소견 등이 다르지 않은 것으로 알려져 있고(Hendrickson EA 1993) 이식 성공률도 높은 것으로 보고되었다.(Kubota T 1994)

누드마우스의 피하조직에 이종 이식된 대부분의 인체 종양 세포는 기관 전이가 잘 일어나지 않는 반면에 성공적으로 확립된 많은 동위종양 모델에서는 인간 암의 임상적 침습과 전이 양상이 모사되는 것으로 보고되었다(Killion JJ, et al 1999, Kim S. et al 2005). 그러나 설암의 경우 혈관분포

가 풍부하여 암 세포의 침윤 및 경부 임파절 전이가 다른 부위에 비해 빠르고 종양의 성장속도가 빠르기 때문에 식이 섭취의 어려움을 초래하여 실험동물 들이 암이 유발된 후 조기에 사망하기 때문에 적절한 후속의 연구를 진행하는데 많은 어려움이 있다.

본 연구의 목적은 사람의 혀에 발생한 편평세포 암에서 확립된 YD-10B 세포주로부터 보다 침윤성이 높은 세포를 선택하여, 누드마우스의 혀에 이종이식하고 세포수별 구강설암의 발생 양상을 관찰하여 구강설암 연구에 적절한 동물실험 모델을 개발하고자 하였다. 이를 통해 향후 실험동물을 보다 실제 인간 설암과 유사하게 유발되는 세포수를 밝히고, 오래 생존하게 하여 설암의 인접 조직의 침윤 경로 및 경부 임파절 전이 경로를 연구하고 적절한 치료 방법을 모색할 수 있는 기반을 마련하고자 한다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료 및 방법

가. 세포주 확립과 배양

동물실험을 위해 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 확립한 Human tongue origin의 oral squamous cell carcinoma, YD-10B 세포주(Lee EJ. et al, 2005)를 Transwell invasion apparatus의 Matrigel (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)로 재구성 시킨 기저막을 투과시켜 침습정도가 높은 세포를 선택하였다. 이 세포들을 pEGFP [Clontech, encoding enhanced green fluorescence protein (EGFP) with C-terminal His6 tag, Palo Alto, CA] 로 Lipofectamine-mediated transfection 하여 안정화된 세포주를 확립할 수 있었다. 안정화된 세포주는 flow cytometer로 분석, 40 mm mesh를 거쳐 FACS vantage SE (Becton-Dickinson) 하에서 강한 형광을 발하는 세포들 (< 1%)을 골라 변형시킨 YD-10B_{mod} 세포주를 제작하였다. 이후 Trypsin-EDTA로 분리, serum-containing medium으로 세척 후 누드마우스에 접종하기 전까지 배양하였다

나. Transwell[®] invasion assay

세포의 침윤 정도는 Matrigel[®] (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)로 insert chamber를 코팅시킨 Transwell[®] chamber plates (Costar, Corning, NY)를 이용하여 측정하였다. Matrigel[®]을 일정 시간 녹이고 30 µg/ml를

insert chamber에 가하여 코팅하였다. [³H] thymidine으로 표지한 세포를 well당 50,000개씩 넣고 48시간 동안 배양한 후, Matrigel[®]을 통과하여 lower chamber로 이동한 세포의 총 cpm(cycles per minute)을 Scintillation counter로 측정하였다. 세포의 침윤 정도는 처음 넣어준 세포의 총 cpm에 대한 백분율로 표시하였다. 또한 Matrigel[®]을 통과하여 lower chamber로 이동한 세포를 paraformaldehyde로 고정 후 crystal violet으로 염색하여 현미경 하에서 관찰하였다.

다. Zymography

세포 (1×10^5 cells/ml)를 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 원심분리 하였다. 20 μ g의 단백질을 포함하는 상등액을 0.1% (w/v) gelatin이 함유된 10% polyacrylamide 겔에서 전기 영동하였다. 겔을 2.5% Triton X-100이 함유된 Tris-HCl 완충용액에 2시간 동안 방치하였다가 37°C, 10 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl이 함유된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액에서 16시간 동안 반응시켰다. 겔을 0.25% Coomassie brilliant blue로 염색하여 MMP-9에 의해 기질이 분해된 부분을 확인하였다.

라. 실험동물

20마리의 생후 4주된 자성의 athymic BALB/c nude (nu/nu) mice를 이용하였다. Clean bench에서 일주일 동안 적응 시켰고, 그 후 임의로 각 군을 나누어 실험에 이용하였다.

마. 실험 동물군 설정

상기한 방법으로 확립한 구강 편평 세포 암종 세포주인 YD-10B_{mod} 세포주를 대조군과 실험군으로 나눈 누드마우스의 혀 부위에 실험군은 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 cell/mouse로 각각 점막 하층(submucosa)에 0.1 ml씩 마취 후 주입하였고, 대조군은 media로 사용하는 DMSO를 누드마우스의 혀 부위에 주입하였다. 모든 동물들은 NIH guideline에 따라 사육되었다.

바. 실험 동물 희생

YD-10B_{mod} 실험군의 경우 접종 후 2주후부터 매주 희생하고 종양을 포함한 주위 조직을 절제하여 포르말린으로 고정하였다.

사. 조직학적 관찰

채취한 조직 및 장기는 10% 중성 formalin에 24시간 이상 고정한 후 파라핀에 포매하여 4 μ m 두께의 조직 표본을 만들어 통상적인 방법으로 H-E 염색한 후 암종의 조직학적 소견을 관찰하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. YD-10B_{mod} 세포주 제작

가. Transwell[®] invasion assay

YD-10B를 Matrigel를 깬 transwell chamber를 이용해 4 번 연속 highly invasive한 세포만을 선택하여 green fluorescence protein을 transfection하여 구축된 YD-10B_{mod} 세포는 YD-10B와 비교하여 Transwell[®] invasion assay 상에서 2.3-3.2배 높은 invasion 활성을 나타내었고 (fig. 1), crystal violet으로 세포를 직접 염색하여 확인한 결과에서도 비슷한 정도의 차이가 확인되었다 (fig. 2).

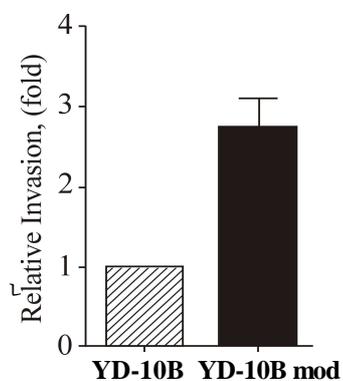


Fig 1.

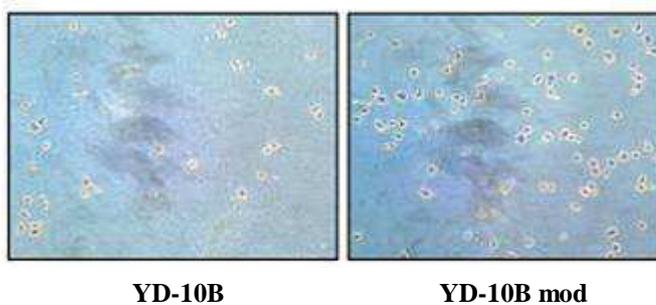


Fig 2.

Fig 1. Transwell[®] invasion assay 결과

Fig 2. crystal violet으로 염색한 세포주 비교

나. Zymography

Gelatin이 함유된 zymography를 이용하여 암세포 침윤에 주된 역할을 하는 단백질 분해 효소인 MMP-9 (matrix metalloproteinase 9)의 활성을 확인하였다.

Secretion 된 MMP-9의 gelatinase 활성은 YD-10B_{mod}가 YD-10B보다 약 2배 정도 높았으며(fig 3), 이는 단백질의 발현 양에 따른 차이임을 western blot으로 확인하였다

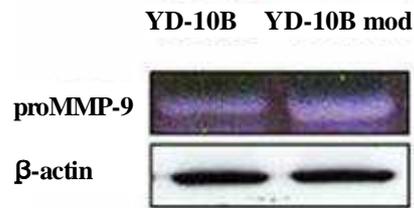


Fig 3. MMP-9의 gelatinase 활성도 비교 결과

2. 종양 형성

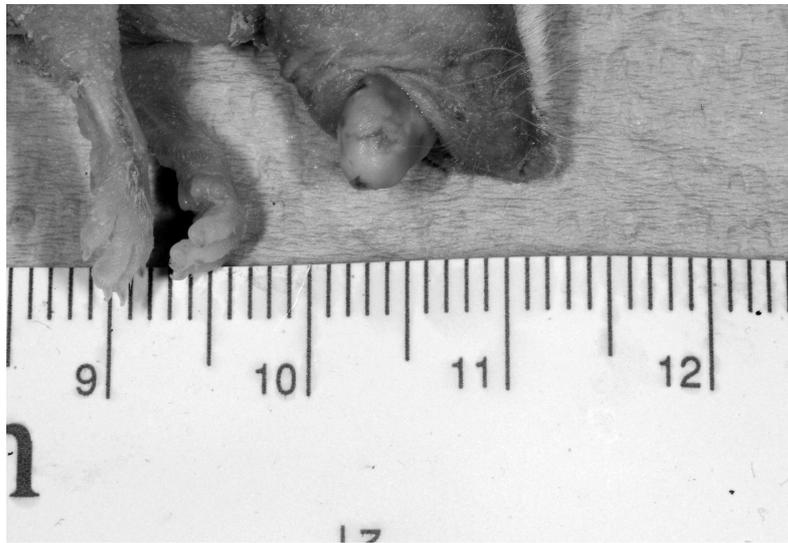


Fig 4. tumor formation on lateral border of tongue

3. 조직학적 검사

가. 대조군

피하 조직 내에서 종양이 관찰되지 않았으며, 약간의 염증 세포가 관찰되었다.

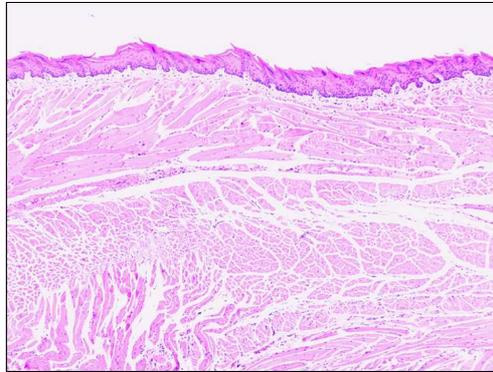


Fig 5. 대조군 (3주)의 조직병리학적 소견. 누드마우스의 혀에 media만 주입한 대조군은 종양이 관찰되지 않았다 (H-E 염색, $\times 40$).

나. YD-10B_{mod} 실험군 에서의 종양 형성

1) 5×10^4 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^4 cells/mouse로 누드마우스의 허에 0.1ml 주입한 후, 3주, 4주, 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 피하 조직에 종양 세포가 종물을 형성하고 있었고, 근육 조직으로 침윤성 성장을 하고 있었다. 종양 세포는 대체로 분화가 좋은 편평 세포 암종 이었다(fig 6). 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 주변 근육 조직으로의 광범위한 침윤과 함께, 종양 중앙 부위에 괴사 소견을 보였다

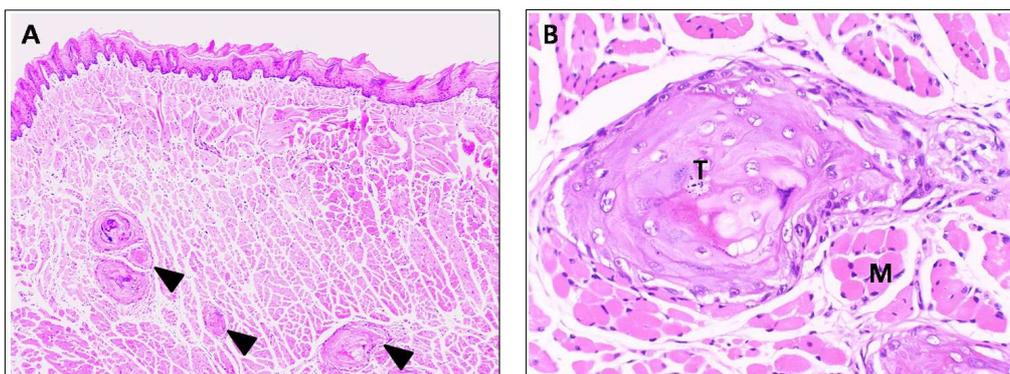


Fig 6. YD-10B_{mod} 세포(5×10^4 cells/mouse, 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. A. 3주 후 관찰하였을 때, 근육 조직 내에 산재되어 있는 종양 (arrowhead)이 관찰되었다. B. 종양 (T)은 주변 근육 조직 (M)으로 침윤성 성장 양상을 보이고 있었다 (H-E 염색, A: $\times 40$, B: $\times 200$).

2) 5×10^5 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^5 cells/mouse로 누드마우스의 허에 0.1ml 주입한 후, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 후에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 편평 세포 암종이 관찰되었다. 종양 세포는 대체로 침윤성 성장 양상을 보였다 (fig 7). 4주, 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 주변 근육 조직으로의 광범위한 침윤과 함께, 종양의 중앙부위에 각화 및 괴사 소견을 보였다.

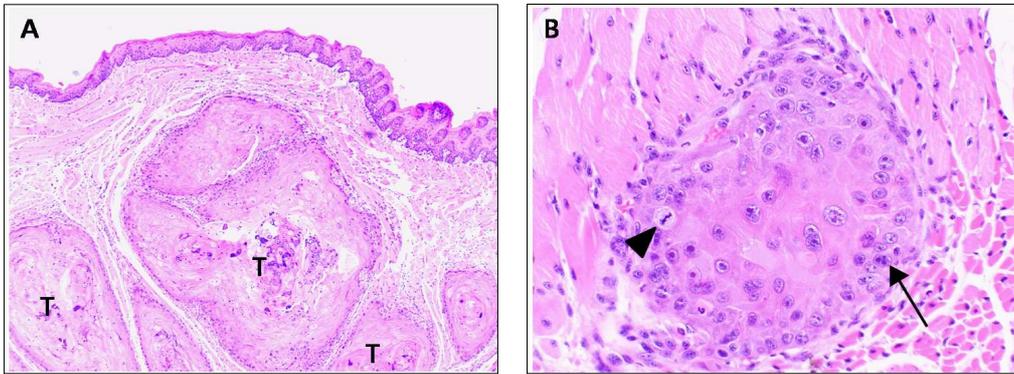


Fig 7. YD-10B_{mod} 세포(5×10^5 cells/mouse, 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. A. YD-10B_{mod} 세포를 5×10^5 cells/mouse로 누드마우스의 허에 0.1ml 주입하고 3주 후 관찰하였을 때, 피하에 침윤성 성장을 하고 있는 종양 (T)의 형성이 관찰되었다. B. 종양 세포는 이형성 소견을 보이고 있었으며, 유사분열 (arrowhead)이 자주 관찰되고 비정상적 유사분열 (arrow) 소견도 보이고 있었다 (H-E 염색, A: $\times 40$, B: $\times 200$).

3) 5×10^6 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^6 cells/mouse의 농도로 누드마우스의 허에 0.1ml 주입한 후, 2주, 3주, 4주 후에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 침윤성 편평 세포 암종이 관찰되었다(fig 8). 일부 종양에서는 신경 외막을 침윤한 소견도 같이 관찰되었다(fig 9). 부검된 조직에서도 편평 세포 암이 주변 근육 조직으로의 광범위한 침윤 소견이 관찰되었다.

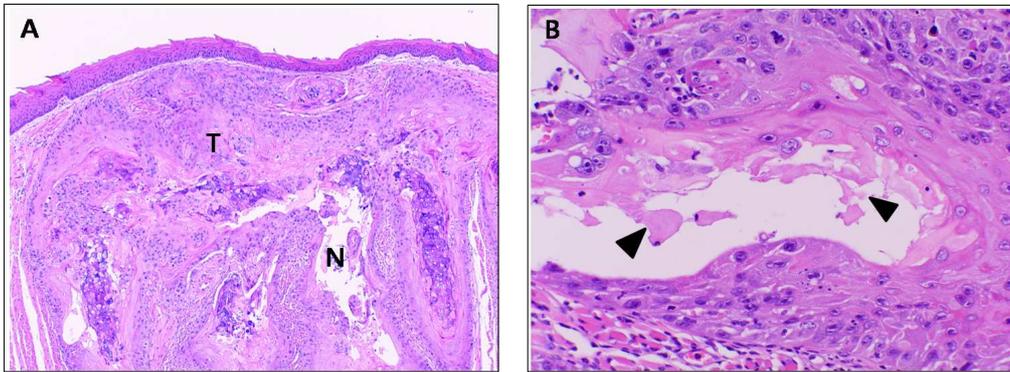


Fig 8. YD-10B_{mod} 세포 (5×10^6 cells/mouse, 3주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. A. YD-10B_{mod} 세포를 5×10^6 cells/mouse의 농도로 누드마우스의 허에 0.1ml 주입하고 3주 후 관찰하였을 때, 피하 조직 내에 침윤성 편평 상피 암종 (T)이 관찰되었다. B. 종양의 중심부에서는 괴사 소견 (arrowhead)이 관찰되었다 (H-E 염색, A: $\times 40$, B: $\times 200$).

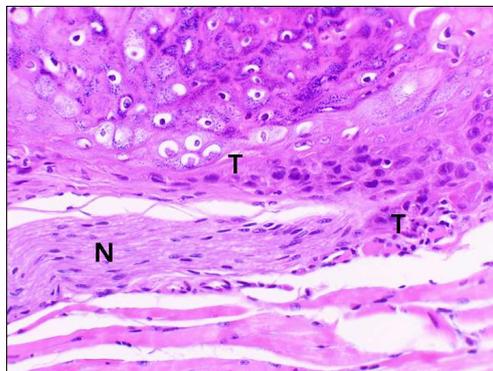


Fig 9. YD-10B_{mod} 세포(5×10^6 cells/mouse, 2주)에 의한 종양의 조직병리학적 소견. 종양 (T)이 신경 (N)의 외막을 침윤한 소견이 관찰되었다 (H-E 염색, $\times 200$).

Table 1. 세포수 및 관찰 시간별 종양형성 정도

세포수 (cells/mouse)		2주	3주	4주	5주	6주
대조군		-	-	-	-	-
실험군	5×10^4	T	T	T	T,N	T,N
	5×10^5	T	T	T,N	T,N	T,N
	5×10^6	T,N	T,N	T,N	die	die

T : Tumor cell, N : Necrosis

IV. 고 찰

편평세포암(squamous cell carcinoma)은 인간의 암 중에서 가장 일반적이고 높은 발생 빈도를 차지하고 있다. 그중에서도 구강 편평세포암(oral squamous cell carcinoma)의 경우는 발생 후 5년 생존율이 50%정도에 그치고 있다 (Johnson, 2003). 구강을 포함한 두경부 영역에서 편평세포암의 생존율이 낮은 이유는 경부 임파절 전이나 타 장기로의 원격전이가 잘 일어날 수 있고 경부 임파절 전이는 예후에 큰 영향을 주기 때문이다(Carew 등 2003).

본 연구는 이러한 구강암의 취약점을 해결하기 위해서는 전이의 기전과 과정을 이해하기 위한 기초적인 연구를 위해서 적절한 동물 실험 모델을 확립하는데 그 의미를 두었으며, 누드마우스의 혀에 구강설암 세포 주를 이종 이식하여 각각의 이식한 세포 수에 따른 종양세포의 침윤 및 성장 정도를 분석하였다.

누드마우스는 상염색체 열성유전으로 생긴 것으로 흉선이 없으며 천천히 자라고 생식능이 약하며 바이러스, 박테리아 그리고 기생충 등에 쉽게 감염되어 생존기간이 짧은 것이 특징이다. 흉선이 없기 때문에 활성화된 T-lymphocyte는 없고 정상적이지는 않지만 B-lymphocyte는 존재하여 면역학적 불완전결손을 보인다. 따라서 인위적으로 흉선을 절제하여 면역능이 떨어진 다른 동물실험 모델에 비해 누드마우스의 면역학적 반응이 낮은 것을 관찰할 수 있고, 이런 드문 가치로 인해 면역학과 종양연구의 적용이 용이하다.(육의곤,박재갑 2000)

누드마우스에 종양 세포 주를 이종 이식하여 종양을 유도한 동물실험 모델은 많이 보고되어져 왔다. HN-22 세포주를 누드마우스에 엉덩이에 이종

이식하거나, UM-SCC 세포주를 구강저부에 이종이식하거나, KB 세포주를 등(flank)에 이종 이식하여 확립한 동물실험 모델 등이 있다(B. Henson 등 2007, 장면진 등 2003, 박형국 등 1997).

그러나 혀는 풍부한 혈관과 임파관의 분포 때문에 암세포의 침투 및 전이 능력이 높고 혀에 종양이 유발되면 실험동물들이 식이 섭취가 곤란해져 조기 사망하기 때문에, 설암의 동소위(orthotopic) 동물실험 모델을 만들기 어려웠다(Cunping Qiu 등 2003).

본 실험에서 YD-10B 세포 주에서 Matrigel을 깬 transwell chamber를 이용하여 highly invasive cell 만을 채택하여 만든 YD-10B_{mod} 세포주 이용하였는데, 이 세포주의 경우 모세포주인 YD-10B와 비교해서 transwell invasion assay상에서 2-3배 정도 높은 세포 활성도를 보였다. 이것은 전이(metastasis)가 더 잘되는 모델을 개발하려 한다면 도움이 될 수도 있을 것을 사료된다.

본 실험의 조직학적 소견에서도 종양세포의 침윤성 성장도가 매우 높은 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 이 세포 주를 이용하면 누드마우스의 혀에 인체에서와 비슷한 설암을 빠른 시간에 유도할 수 있는 가능성을 보여 주는 것이라고 사료된다.

누드마우스 동물실험 모델에 이종 이식한 세포 주는 연세대학교 치과대학 구강병리학 교실에서 확립한 YD-10B cell line을 모태로 재확립한 YD-10B_{mod} cell을 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 cells/mouse의 세 종류의 세포수로 누드마우스의 혀 점막 하에 주입을 하였다. 동물을 희생 시킨 후 제작한 시편의 조직학적 소견에서, 5×10^4 cells/mouse의 경우는 중심부 괴사를 동반한 침윤성 종양성장은 실험 5주차에서부터 관찰되었고, 5×10^5 cells/mouse 경우는 4주차부터, 5×10^6 cells/mouse 경우는 실험 3주차부터 종양의 급속한 침윤성 성장을 보였고, 실험 5주차에는 tumor size의 성장까지 동반되

어 실험 동물 들이 사망하였다.

여기서 이종 이식한 세포수의 차이에 따른 조직학적 실험 결과를 주목할 필요가 있다(표 1). 각각의 세포 수 별로 종양의 형성시기, 종양 중심부 괴사시기, 사망시기의 차이를 보인다. 이것은 구강 설암 동물실험 모델 확립 시 각각의 목적에 맞게 세포수를 선택하여 이종 이식하는 것이 필요하다는 것을 시사하고 있다. Lou(2003) 등의 보고에 의하면 누드마우스의 구강과 등(flank)에 마우스 구강암 세포주 AT-84를 동종 이식하여 종양을 유발시켰을 때 구강이 등에서 보다 훨씬 더 빨리 성장하는 것을 관찰 하였고, 다른 장기로의 전이도 일부 관찰되었다. 그러나 등에 종양이 유도된 누드마우스는 모두 잘 생존한 반면에 구강에 종양이 유도된 누드마우스는 약 4 주 후에 모두 사망하였다(Lou, RM. et al, 2003)

본 실험에서도 누드마우스의 허에 YD-10B_{mod} 세포를 5×10^6 cells/mouse 로 이종 이식한 경우에는 실험 5주차에 종양이 너무 커져서 식이섭취 곤란으로 모두 사망하였으나, 5×10^4 cells/mouse 및 5×10^5 cells/mouse로 이종이식한 군에서는 실험 종료 시한인 6주차 까지 비교적 건강하게 생존하였다. 이런 결과는 YD-10B cell line에서 침윤 활성도가 높은 세포들을 선택하여 확립한 YD-10B_{mod} 세포주로 인체와 유사한 종양을 유도하면서 이종 이식하는 세포수를 조절하면 실험동물의 생존기간을 연장할 수 있는 가능성을 제시하는 것이라고 사료된다.

과거에 구강암 발암에 관한 동물실험 모델은 주로 햄스터의 헤팅에 DMBA나 4-NQO를 도포하여 발암과정을 연구하는 모델이었던 반면에 (Shkar G. 1984), 이런 발암과정을 이해한 후 부터는 구강암 세포 주를 이종 이식하여 종양을 유도한 후 종양의 침윤, 전이 과정 등을 이해하고 적절한 항암 치료제를 개발하기 위한 동물 실험 모델을 개발하기 위한 연구가 주로 이루어져 왔다(Zelefsky MJ등 1990). 본 연구에서는 이런 연구를

하기 위한 구강암 세포 주를 확립하고 실험동물의 생명을 연장할 수 있는 적절한 종양 세포수를 확립한데 의미가 있는 결과를 얻었다고 사료된다.

V. 결 론

사람 혀의 편평세포 암 중에서 확립한 YD-10B 세포 주에서 보다 침윤성이 높은 세포 들을 가지고 YD-10B_{mod} 세포주를 확립하였고, 이 세포들을 이용하여 누드마우스의 혀에 이종 이식시켜 형성된 종양은 인체의 혀에서 발생된 설암과 유사하게 주위조직으로의 침윤과 중심부 괴사의 소견을 보였다.

그리고 이종 이식한 세포 수에 따라 종양의 크기나 중심부괴사가 되는 시기가 달라지는 것으로 보아, 향후 이종 이식하는 세포수를 더 줄이면 누드마우스의 생존기간을 더 연장할 수 있어 효과적인 항암제의 개발을 위한 연구모델로도 유용하게 이용할 수 있을 수 있으며 설암의 전이양상까지도 관찰이 가능한 실험동물 모델을 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

김명진: 구강암. 5-95쪽, 지성출판사.서울. 2002

김문기: 누드마우스에서 snail 발현을 이용한 이종이식 종양의 침윤성 성장 유도. 박사학위 논문, 연세대학교 대학원, 2005

박형국,김용각: 구강암 연구를 위한 동물실험모델의 개발(I). 대한악안면성형재건외과학회지 19(3): 300-310쪽, 1997

육의곤,박재갑: 인체종양의 누드마우스 이식.서울의대 암 연구소 94-122 쪽.2000

박영욱, 정성훈: 마우스에서 타액선 동위종양 모델 제작을 위한 실험적 연구. 대한구강악안면외과학회지 33(2): 81-93쪽, 2007

장명진, 이재훈: 누드마우스에 이종이식된 구강편평상피세포암종에 대한 “ABNOVAviscum”의 치료효과에 관한 실험적 연구. 대한악안면성형재건외과학회지 25(5):383-397쪽, 2003

B. Henson, F. Li, D. D. Coatney, T. E. Carey, R. S. Mitra, K. L. Kirkwool.: An orthotopic floor-of-mouth model for locoregional growth and spread of human squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 36:363-70, 2007

Carew JF ,Singh B, Shah JP.: Factors affecting choice of treatment. In Oral Cancer. Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG(eds)., pp203-213, Martin Dunitz, London. 2003

Cunping Qiu, Hong Wu, Huajun He, Weiliu Qiu.: A Cervical Lymph Node Metastatic Model of Human Tongue Carcinoma: Serial and Orthotopic Transplantation of Histologically Intact Patient Specimens in Nude Mice. J Oral Maxillofac Surg. 61: 696-700, 2003

Eun Ju Lee, Jin Kim, Seoung Ae Lee, Eun-Jung Kim, Yong-Chan Chun , Mi Heon Ryu and Jong-In Yook.: Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. Exp Mol Med. 37(5):379-390, 2005

E Lou, RM Kellman, R Hutchison, EJ Shillitoe.: Clinical and pathological features of the murine AT-84 orthotopic model of oral cancer. Oral Disease 9:305-312, 2003

Furukawa T, Fu X, Kubota T.: Nude mice metastatic Models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histological intact tissue. Cancer Res. 53: 1024-8 ,1993

Shklar G.: Oral Cancer, the diagnosis, therapy, management and rehabilitation the oral cancer patient. pp41-54, W.B.Saunders, Philadelphia. 1984

Hendrickson EA.: The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. Am J Pathol, 143:1511-22 , 1993

Johnson NW.: Global epidemiology in Oral cancer. Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG(eds), pp10-20, Martin Dunitz, London. 2003

Irish JC, Bernstein A.: Oncogenes in Head and Neck Cancer. Laryngoscope 103:42-52 , 1993

Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ.: Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. Cancer Metastasis Rev. 17(3):279-84 , 1999

Kim S, Park YW, Schiff BA, Doan DD, Yazici Y, Jasser SA.: An Orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma. Clin Cancer Res. 11:1713-1721, 2005

Kubota T.: Metastatic models of human cancer xenografted in mice: the importance of orthotopic transplantation. J. Cell Biochem. 56(1): 4-8 , 1994

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB.:
Recurrence at the primary site in head and neck cancer and significance
of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73(1):
187-90 , 1994

Meyers EN.: *Cancer of the Head and Neck*. 2nd ed., New York,
Churchill Livingstone. 1989

Morris AL.: Factors influencing experimental carcinogenesis in the
hamster cheek pouch. *J. Dent. Res.* 40:3-15 ,1961

Salley J.: Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian
hamster. *J. Dent. Res.* 33(2): 253-62 ,1954

Woolgar JA, Scott J.: Prediction of cervical lymph node metastasis in
squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck.*
17(6): 463-72 , 1995

Todd R, Donoff RB, Wong DT.: The molecular biology of oral
carcinogenesis:
toward a tumor progression model. *J. Oral Maxillofac Surg.* 55:613-23,
1997

Holmes JD, Dierks EJ, Homer LD, Potter BE.: Is detection of oral and oropharyngeal squamous cancer by a dental health care provider associated with a lower stage at diagnosis? J. Oral Maxillofac Surg. 61: 285 - 91, 2003

Zelevsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong J, Spiro RH, Shah JP.:Postoperative radiotherapy for oral cavity cancers: Impact of anatomic subsite on treatment outcome. Head Neck, 12(6),470-475. 1999.

ABSTRACT

An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma

JAE-SEUNG CHUNG

*Department of Dental Science, Graduate School, Yonsei University
(Directed by Prof. In-ho Cha, D.D.S., Ph.D.)*

Squamous cell carcinoma, which is 80-90% of oral cancers, generally shows poor prognosis. Development of carcinoma on oral tongue may cause bilateral cervical lymph node metastasis, rapid invasion and growth of the cancer cells due to rich blood supply in muscle tissues. It is not only difficult to develop an animal experimental model, but also to proceed follow-up research after the development of such model as the induction of cancer lead to difficulty in taking nutrition for the experimental animals that often causes early death.

In this study, author have transplanted YD-10B_{mod} cells into nude mouse oral tongues with different cells number and observed the development aspect of oral tongue cancers. The results are as follows.

1. In group where 5×10^4 cells/mouse of the YD-10B_{mod} cells had been transplanted into each nude mouse oral tongue, invasive cancer growth with central necrosis was observed from the 5th week of the

experiment.

2. In group where 5×10^5 cells/mouse of the YD-10B_{mod} cells had been transplanted into each nude mouse oral tongue, invasive cancer growth with central necrosis was observed from the 4th week of the experiment.

3. In group where 5×10^6 cells/mouse of the YD-10B_{mod} cells had been transplanted into each nude mouse oral tongue, cancer presented sudden proliferation from the 3rd week of the experiment, and rapid growth of the tumor mass lead to death of the nude mouse on the 5th week of the experiment.

The cancer developed from orthotopic transplantation of YD-10B_{mod} cells into nude mouse oral tongue show invasiveness and central necrosis of the tumor, similar to the cancers developed human oral tongue cancer. The difference in tumor size and the time of central necrosis development depending on the number of transplanted tumor cells shows the feasibility of extending the survival period of the nude mouse by limiting the transplanted tumor cells to 5×10^4 cells/mouse or under per nude mouse. Therefore, this nude mouse model could be used effectively in developing effective chemotherapy agent and establishing an animal experimental model that can be used to study the mechanism of cervical lymph node metastasis of the oral tongue cancer.

key words: oral tongue, squamous cell carcinoma, orthotopic model, cell line.