

장액성 난소암 세포주의 확립 및
특성 분석

연세대학교 대학원
의 학 과
채 두 병

장액성 난소암 세포주의 확립 및 특성 분석

지도교수 김 재 훈

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과

채 두 병

채두병의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2008 년 6 월

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어서 많은 조언과 지도를 해주신 김재훈 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 김동욱 교수님과 백용한 교수님의 지도와 자문에 깊은 감사를 드립니다. 아울러 본인이 산부인과 전문의의 길을 갈 수 있도록 어려운 일이 있을 때마다 격려와 가르침을 주신 연세의대 산부인과학 교실 교수님들께 또한 감사의 말씀을 올립니다. 마지막으로 지금까지 의사로 성장할 수 있도록 키워주신 부모님과 사랑하는 아내 신연정과 아들 채희건에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 환자 병력	5
2. 세포주의 확립 및 배양 조건	6
3. 형태학적 관찰	6
4. 세포주의 Mycoplasma 감염 측정	7
5. 성장 속도 측정	7
6. 종양 표지자 분비능 검사	8
7. 인간 백혈구 항원(HLA) 분석	8
8. 종양 억제 유전자의 변이 분석	9
9. 항암 화학약물 감수성 검사	10
10. 종양 형성 능력 측정	10
11. cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 연구	11
12. 2-DE 및 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 발현 연구	12
III. 결과	14
IV. 고찰	26
V. 결론	32
참고문헌	32
영문요약	37

그림 차례

Figure 1. Phase-contrast microscopy of YDOV-139 cell line	15
Figure 2. Transmission electron microscopy of YDOV-139 cell line	15
Figure 3. The growth curve of YDOV-139 cell line	16
Figure 4. Chemosensitivity test of YDOV-139 cell line	19
Figure 5. Xenograft of YDOV-139 cells to nude mice	20
Figure 6. Hierarchical clustering of YDOV-139 cell line gene expression	21
Figure 7. Proteomic comparison between YDOV-139 cell line and HOSE using 2-DE.....	25

표 차례

Table 1. BRCA2 mutation	18
Table 2. Selected groups of upregulated genes expressed at least 10 folds higher in YDOV-139 compared with HOSE	22
Table 3. Selected groups of downregulated genes expressed at least 10 folds higher in HOSE compared with YDOV-139	23
Table 4. Identification of proteins that were differentially expressed in YDOV-139 and HOSE using 2-DE and MALDI-TOF MS	25

<국문요약>

장액성 난소암 세포주의 확립 및 특성 분석

목적: 암 세포주는 생체외(in vitro)실험 및 생체내(in vivo)실험을 가능하게 하는 중요한 암 연구 수단이다. 특히 불균질성과 복잡성을 특징으로 하는 난소암을 연구하기 위해서는 다양한 난소암 세포주의 확보가 중요하다. 최근 YDOV-139로 명명된 세포주를 확립하고 특성을 분석하였다.

연구방법: 67세 장액성 난소암 환자의 복수에서 세포를 분리하여 DMEM 배양액으로 세포주(YDOV-139)를 확립하였으며 현재 지속적 계대 배양 중이다. 위상차 현미경 및 전자 현미경에 의한 세포주의 형태학적 관찰, 성장 속도 측정, 종양 표지자 분비능 검사, 인간 백혈구 항원 분석, p53과 BRCA1,2들의 유전자 변이 분석, 이종이식을 통한 종양 형성 능력 관찰, 항암제 감수성 검사, 유전자 및 단백질 발현 연구 등을 시행하였다.

결과: 세포들은 세포간의 접촉에 의한 억제현상 없이 부착성 단층으로 성장하였으며 위상차 현미경 소견상 세포들은 방추형, 타원형 혹은 다각형의 형태를 보였다. 세포주의 배가시간은 120시간이었다. 난소암 종양 표지자 분비능

검사에서 CA 125, CA 19-9는 정상 범위 보다 증가하였고 CEA, CA 15-3 는 증가하지 않았거나 큰 차이를 보이지 않았다. 유전자 변이 분석에서 BRCA1의 변이는 없었으나 BRCA2는 다양한 polymorphism 과 missense mutation 이 발견 되었고, p53 유전자의 변이는 발견되지 않았다. 또한 이종이식에 의한 종양 형성이 관찰 되었고, 항암제 감수성 검사상 gemcitabine이 가장 높은 chemosensitivity index를 보였다. cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 연구에 의하면 정상 난소 상피세포에 비해 2520개의 유전자가 통계학적으로 유의한 발현 차이를 보였으며, 이차원 젤 전기영동을 이용한 단백질 발현 연구에서도 정상 난소 상피세포와 비교하여 발현차이를 보인 23개의 단백질을 확인하였다.

결론: 본 연구는 성공적으로 확립된 장액성 난소암 세포주를 소개하고 그 분자생물학적 특성을 분석하였다. 확립된 세포주의 특성은 난소암의 병리기전 연구, 세포 기능 연구, 항암제 감수성 연구 그리고 암에 대한 새로운 치료 모델 개발에 유용한 가치를 제공할 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : 난소암, 세포주 특성화, 유전자 발현, 단백질학

장액성 난소암 세포주의 확립 및 특성 분석

<지도교수 김재훈>

연세대학교 대학원 의학과

채 두 병

I. 서론

근래의 우리나라 여성암 발병 빈도의 변화는 유방암과 난소암의 증가로 요약할 수 있다. 서구형 암으로 알려진 난소암의 증가는 주요 부인암이 자궁 경부암에서 난소암으로 자리 이동함을 뜻한다.¹

난소암은 부인암 중 사망률이 가장 높은 치명적인 암이다. 질병 초기에 특징적인 증상이 없고 효과적인 집단 검진법(screening)이 없어 조기진단이 쉽지 않기 때문이다. 따라서 대부분의 환자들은 III기 이상의 진행된 상태에서 발견된다. 광범위한 수술과 새로운 약물 치료로 완치된 환자가 늘어날 것으로 기대했지만 수십 년 동안의 통계는 난소암의 생존률 변화가 거의 없음을 보고하고 있다.²

2007년도 미국 통계청(American Cancer Society; www.cancer.org)

자료에 의하면 난소암은 미국 여성암(female cancer) 중 발생률 8위이고 사망률 4위이다. 매년 2만3천 여명의 신환과 1만6천 여명의 사망 환자가 발생하고 있다. 우리나라의 경우 2005년도 한국 중앙암 등록 본부 자료에 의하면 여성암중 발생률 9위로 연평균 1,300 여명이 새롭게 진단 받고 있고 사망률 9위이며 매년 800 여명이 사망 하고 있다.³

난소암 연구가 쉽지 않은 이유는 난소암 특유의 불균질성(heterogeneity)과 복잡성(complexity) 때문이다. 같은 아형의 난소암 환자에서도 개체마다 다른 유전적 변이와 암 관련 단백질의 다양한 발현이 관찰된다. 이러한 이유로 난소암을 대표하는 고유의 질환 모델을 만들기는 매우 어렵다. 따라서 다양한 특징을 지닌 난소암 세포주를 많이 확보하여야만 난소암의 다양성과 복잡성을 극복하여 효과적인 연구를 진행할 수 있을 것이다.

세포주는 생체 외(in vitro) 실험 및 동물을 이용한 생체 내(in vivo) 실험을 가능하게 하여, 질병 발현에 영향을 주는 생물학 및 유전학적 요소를 이해하고 질병의 합리적인 연구계획을 개발하는 근거로써 유용하다. 종양학 분야에서는 암 발생 기전에 대한 연구뿐만 아니라 암의 진단과 감시에 사용하는 단세포군 항체의 생산 및 항암제 감수성 검사에 이용하여 왔으며, 최근에는 암 관련 유전자 윤곽연구(profiling study) 및 암 표지자 선별연구에 주로 사용하고 있다.⁴⁷

이에 최근 재발을 반복하지만 항암화학요법에 민감하게 반응하는

67세 장액성 난소암 환자의 복수에서 세포주(YDOV-139)를 확립하고 세포주의 특성을 연구하기 위해 위상차 현미경 및 전자현미경에 의한 형태학적 관찰, 성장 속도 측정, 종양 표지자 분비능 검사, 인간 백혈구 항원(HLA) 분석, p53과 BRCA1,2들의 유전자 변이 분석, 종양 형성 능력 관찰, 항암제 감수성 검사, 유전자 및 단백질 발현 연구를 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 환자 병력

세포주는 2005년 5월 재발성 난소암으로 진단 받은 67세 여자 환자의 복수에서 유래되었다. 환자는 2006년 4월 난소암 의심하에 병기결정 개복술로 양측 난소난관절제술, 대망절제술 및 다중골반내 생검을 시행하였으며 조직검사상 난소의 장액성 난소암으로 진단 받았고 FIGO 병기상 IIIc였다. 수술 후 paclitaxel과 carboplatin으로 총 6차례 보조 항암 화학요법 시행 받으며 2005년 5월 재발성 난소암 진단하에 belotecan에 의한 총 9회 항암 화학요법, 2006년 1월부터 paclitaxel과 cisplatin에 의한 6회 항암화학요법, 2006년 10월부터는 docetaxel과 cisplatin에 의한 6회 항암화학요법 2007년 9월부터 gemcitabine과 cisplatin에 의한 6회 항암화학요법을 시행 받았으며 관해 후 현재까지 외래 추적 관찰 중이다.

2. 세포주의 확립 및 배양 조건

채취한 복수(Ascites)를 ficoll(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 18°C에서 1500 rpm, 35분 원심분리한 후 암세포를 분리하였으며, Phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후 다시 원심분리하였다. 10% Fetal bovine serum(FBS), antimyotics가 함유된 DMEM 배양액(Gibco, Grand island, NY, USA)에 세포를 부유시킨 후, 조직 배양 접시에 옮겨 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포들이 배양접시 바닥에 75% 정도 덮었을 때 PBS로 2회 세척을 한 뒤, 1 mM EDTA가 함유된 0.25% trypsin으로 처리하여 계대 배양하였으며 현재까지 80회 이상 진행 중이다.

3. 형태학적 관찰

배양된 세포를 PBS로 세척한 후 위상차 현미경(Olympus, Toko, Japan)으로 40배, 100배에서 관찰하였다. 또한 전자현미경을 이용한 미세 구조 관찰을 위해 배양된 세포를 0.1 M PBS(pH7.4)로 완충된 2% glutaraldehyde 와 paraformaldehyde로 전고정(prefix) 및 phosphate buffered 1.33% osmium tetroxide(OsO₄)로 후고정(postfix)한 후 alcohol로 탈수과정을 거쳐 propylene oxide로 치환하였다. Epon 혼합액(EPON812, MNA, DDSA, DMP30)에 포매(embedding)한 후 초박절편을 만들어 Uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 Philips CM 10 transmission electron microscopy (TEM; Philips Scientifics,

Eindhoven, The Netherlands)을 이용하여 미세 구조를 관찰하였다.

4. 세포주의 Mycoplasma 감염 측정

계대 배양한 세포주의 Mycoplasma 감염 여부를 측정하기 위해 Mycoplasma detection kit(e-MycTM mycoplasma PCR detection kit; iNtRON Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 이용하였다. 약 100개의 세포로부터 얻은 DNA templet과 2.5 U i-Taq DNA polymerase, 250 mM dNTPs, 10 mM Tris-Hcl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 pmol primers, loading buffer, chemical stabilizer I를 포함하는 e-MycTM PCR 통합 용액을 혼합하여 20 μ l로 맞춘 후 가열 방법으로 templet을 추출하였으며 initial denaturation을 위해 94°C에서 1분, cycle denaturation을 위해 94°C에서 30초, cycle annealing을 위해 60°C에서 20초, cycle extension을 위해 72°C에서 1분 그리고 final extension을 위해 72°C에서 5분 간의 조건으로 35 주기의 증합효소 연쇄 반응(PCR)을 실시하였다. 1.2% agarose gel에서 30분간 전기영동한 후 ethinum bromide로 염색하여 Mycoplasma DNA의 증폭여부를 확인하여 감염 여부를 검사하였고 3회 이상 반복 검사하였다.

5. 성장 속도 측정

50회 계대 배양 후 Cell Titer 96[®] Aqueous one Solution cell proliferation Assay kit(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 성장

속도 및 성장 곡선을 측정하였다. 96 well plate에 3×10^3 의 세포를 100 μ l의 배지에 잘 섞어서 분주한 후 첫 4일간은 매일, 그 후 10일까지 이틀 간격으로 측정하였다. 측정 시 20 μ l의 MTS solution을 96 well plate 의 각 well 에 넣고, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 490 nm에서 ELISA reader(EL311, Bio-tek Instruments, NY, USA)기를 이용하여 OD값을 측정하였다. 이후 성장곡선으로부터 배가시간(doubling time)을 구하였으며 모든 검사는 3회 반복 측정하였다.

6. 종양 표지자 분비능 검사

종양 세포 1.5×10^6 개를 4일간 배양시킨 후 불순물을 제거한 배양 상청액에서 난소 종양 표지자인 CA 125, CA 19-9, CA 15-3 그리고 CEA의 분비 여부를 면역효소 분석법으로 Architect system (Abbott Diagnostics, Abbott park, IL, USA)에서 측정하였다. 정상 대조군은 세포가 없는 배양 상청액을 이용하였으며 모든 검사를 2회 반복 시행하였다.

7. 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA) 분석

HLA Class I ABC 는 PCR 후 sequencing 반응에 의해 염기서열을 분석하는 allele specific PCR-SBT(sequencing based typing) 방법으로 검사하였으며, Class II DR은 PCR 후 sequence specific oligonucleotide probe를 이용한 southern blot하는 allele specific PCR-SSOP(sequence

specific oligonucleotide probe) (INNO-Lipa HLA DRB1 plus, Innogenetics, Belgium) 방법을 사용하였다.

8. 종양 억제 유전자의 변이 분석

배양 세포주에서 종양 억제 유전자인 BRCA1, BRCA2 그리고 p53의 exon 4의 변이 여부를 검사하였다. BRCA1, BRCA2는 PCR-DHPLC(PCR based denaturing high performance liquid chromatography) 방법으로 분석하였으며 이는 세포주에서 QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 DNA를 적출 후 2 μ l DNA template (약 50.100 ng/l), 10 pmol 의 각 primer, 200 μ M dNTPs, 표준 PCR 용액 (1.5 mM MgCl₂), 그리고 5U Taq DNA polymerase의 혼합액 25 μ l로 81개의 primer pair에 대한 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 실시하였다(Takara Bio Inc., Kyoto, Japan). Thermal cycling은 GeneAmp 2700 thermocycler(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하였고, WAVE Maker System (Transgenomic Inc., San Jose, CA, USA)을 이용하여 DHPLC 분석 을 시행하였다.

중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 BRCA1, BRCA2의 증폭체 (amplicons)의 적출 및 쌍방향 sequencing은 BigDyeDeoxy terminator cycle sequencing kit(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)을 이용 하고, Sequencing 반응을 ABI 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)으로 분석하였다.

p53 exon4 변이는 DNA 추출물의 PCR-RFPL(Restriction Fragment

Length Polymorphism)을 확인하는 방법으로 조사하였다.

9. 항암 화학약물 감수성 검사

세포주를 96 well plate에 3일간 배양한 후 예비실험을 통해 각 항암제 별로 실험군과 대조군에서 세포의 성장 속도 차이가 명확한 농도를 PPC(Peak Plasma Concentration)로 결정하였다. 실험에는 상용 항암 화학약물인 bleomycin, carboplatin, cisplatin, docetaxel, doxorubicin, etoposide, 5-FU(fluorouracil), gemcitabine, irinotecan, oxaliplatin, paclitaxel, topotecan의 12종을 사용하였으며, 예비실험을 통해 얻은 PPC를 기본으로 0.2 x, 1 x, 5 x에서 항암 화학약물 감수성 검사를 시행하였고 대조군과 비교한 실험군의 ATP(adenosine triphosphate)양을 측정하여 세포의 사멸 정도를 측정하였다. Chemosensitivity Index(CI)는 $300 - \text{SUM} (\% \text{ cell suppression } 0.2 \text{ x} - 5 \text{ x})$ 로 계산하였다.

10. 종양 형성 능력 측정

3마리의 BALB/c nu/nu 누드 마우스(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea)의 왼쪽 등에 5×10^6 개의 종양 세포를 함유한 PBS 200 μl 를 피하 접종한 후 종양 형성 능력 및 성장을 관찰하였다.

11. cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 연구

유전자 발현은 cDNA microarray 기술을 이용하여 관찰하였다. Trizol Reagent(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였고 Illumina Amplification Kit(Ambion, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 Biotynylated cRNA를 만든 후 RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용해 정제한 cRNA를 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, DE, USA)로 정량화하였다. 750 ng의 cRNA 표본을 Sentrix Human Ref-6-V2 Expression Bead Chips(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)에 hybridization 시킨 후 배열 신호(array signal)를 Amersham fluorolink streptavidin-Cy3(GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK)로 감지하였다. Illumina BeadArray Reader를 이용하여 스캔한 후 Illumina BeadStudio 프로그램으로 분석하였다.

26827개의 probes가 분석되었으며 선별된 probes에 대해 실험에서 발생하는 시스템적 변동(systematic variation)을 줄이기 위해 Quantile Normalization 방법으로 보정했다. 두 그룹 즉 HOSE(human ovarian surface epithelial cell)와 YDOV-139간의 발현차이를 살펴보기 위해 one-way analysis of variance(ANOVA) 및 LPE-test를 이용하여 분석하였다. 또한 다수의 유전자들을 한꺼번에 검정하면서 생길 수 있는 multiple test을 피하기 위해 Benjamini-Hochberg FDR(False Discovery Rate)으로 p-value값을 보정했다.

본 연구에서는 ANOVA p-value < 0.05 이며, |Fold (YDOV-139/HOSE)| > 2 값을 만족하는 2520개의 probes를 Hierarchical cluster(Euclidean method, complete linkage)를 통해 관찰 하였으며 모든 통계적 분석은 Avadis Prophetic version.3.3(Strand Genomics, Bangalore, India)으로 하였다.

12. 2-DE 및 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 발현 연구

단백질 발현 및 동정은 2-DE(2-Dimensional gel electrophoresis)과 MALDI-TOF(Matrix assisted laser desorption ionization – Time of flight) MS (Mass spectrometry)을 이용하였다. 배양된 세포에서 단백질을 추출 하여 2D Quant Kit(Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 정량화하였으며 20℃에 24시간 동안 IPG gel strips (Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 재수화하고, 13 cm immobilized nonlinear pH 3-10 NL strip에 단백질 100 μ g을 Isoelectric focusing(IEF)하였다. IEF는 Ettan IPGphor II(Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 20℃ 에서 50 V, 500 V, 1000 V 그리고 8000 V에 총 60 kVhrs로 시행되었다. IEF 후 각 strip들은 6 M Urea, 75 mM Tris-HCl, 29.3% Glycerol, 2% SDS이 함유된 완충액 및 1% DTT에 15분간, 그 후 15분간은 2.5% iodoacetamide를 넣어 평형화시켰다. 10% SDS gel에 평형화된 IPG gel strip을 넣고 0.5% agarose 용매로 덮은 후 전기영동 한 후 silver staining하였으며, ImageScanner, ImageMaster™ 4.01 software(Amersham Biosciences Co.,

Piscataway, NJ, USA)로 스캔 및 분석하였다. 정상 대조군으로 HOSE를 사용하였다.

질량분석을 위해 단백질들은 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하였다. 젤 조각으로부터 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50% acetonitrile로 세척한 후, trypsin(8-10 ng/ μ l)으로 reswelling하고 8-10시간 동안 37°C에서 incubation하였으며 단백질 분해반응은 5 μ l 0.5% trifluoroacetic acid의 첨가에 의해 종결되었다. Trypsin에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18ZipTips(Millipore)을 이용하여 1-5 μ l 부피로 탈염 및 농축되었으며, 동량의 50% aqueous acetonitrile에 포화된 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합되어, 질량 분석을 위하여 target plate 위에 적하되었다.

단백질 동정(MALDI-TOF analysis and database search)은 질량분석기 Ettan MALDI-TOF(Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ, USA)를 사용하였다. Target plate 상에 적하되어 있는 단백질 단편들은 337 nm의 N₂ laser 조사에 의해 기화된 다음, 20 Kv injection pulse에 의해 가속되었고 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 ion peak m/z(842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였으며 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)

을 이용하였다.

III. 결과

1. 세포주의 확립

세포 배양 5일 후부터 세포 성장이 관찰되었으며, $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 농도에서는 세포간의 접촉에 의한 억제현상 없이 세포간에 쌓이는 부착성 단층으로 성장하는 모습을 관찰할 수 있었다. 세포 파종 2주 후 첫 계대가 이루어 졌으며, 이후 계대 부터는 1주에 1회로 세포 성장이 빨라지고 연속적 계대가 유지되었다. 확립된 세포주를 YDOV-139로 지정하였으며, 현재 80회 이상 계대 배양 중이다.

2. 형태학적 특성

위상차 현미경 소견상 세포들은 비교적 크고 둥근 핵을 가진 방추형, 타원형 혹은 다각형의 형태를 보였다. 또한 핵(nucleus)안에 작은 인(nucleolus)이 다수 관찰되었다(Fig. 1).

전자 현미경 소견상 장액성 난소암의 특징인 세포질에 비해 큰 핵, 세포질 내 풍부한 당원, 미토콘드리아 및 secretory vesicles, 그리고 세포 표면의 풍부한 미세융모가 관찰 되었다. 15000 배율에서는 세포질 내에서 풍부한 당원 및 미토콘드리아와 함께 desmosomal-tonofilament 복합체도 관찰되었다(Fig. 2).

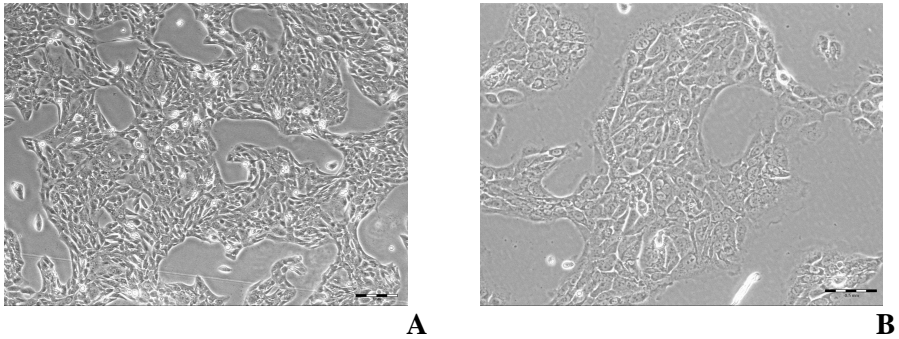


Figure 1. Phase-contrast microscopy of YDOV-139 cell line

(A, x 40; B, x 100) Polygonal appearance with large and round nucleus.

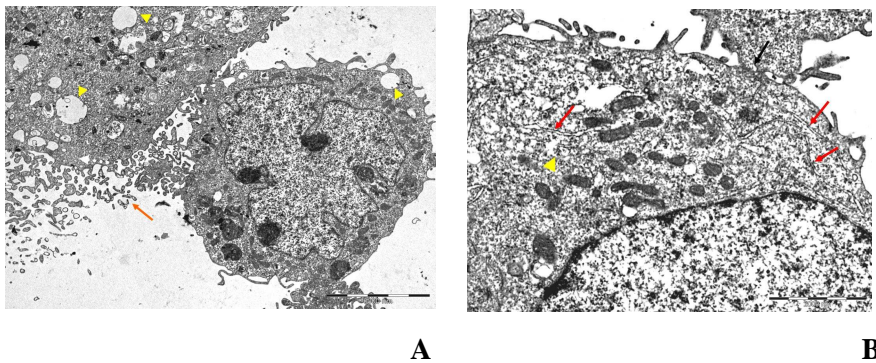


Figure 2. Transmission electron microscopy of YDOV-139 cell line.

A : Magnification x 6,000

The tumor cell reveal high N/C ratio. The tumor cell shows abundant, short and blunt microvilli in the cell surface (red arrow) and abundant mitochondria, glycogen and amorphous annulated lamellae, possible secretory vesicles (yellow arrowhead) in the cytoplasm.

B : Magnification x 15,000

Higher magnification shows desmosomal-tonofilament complexes (red arrow), abundant mitochondria and glycogen (yellow arrowhead).

3. 세포주의 Mycoplasma 감염 측정

배양 중 Mycoplasma 감염은 발견되지 않았다.

4. 성장속도

세포주의 성장은 10% 우태아 혈청(FBS)에서 지수성장곡선을 보였고, 세포 증식의 평균 배가 시간은 120시간이었으며 95% 이상의 생존력을 보였다 (Fig. 3).

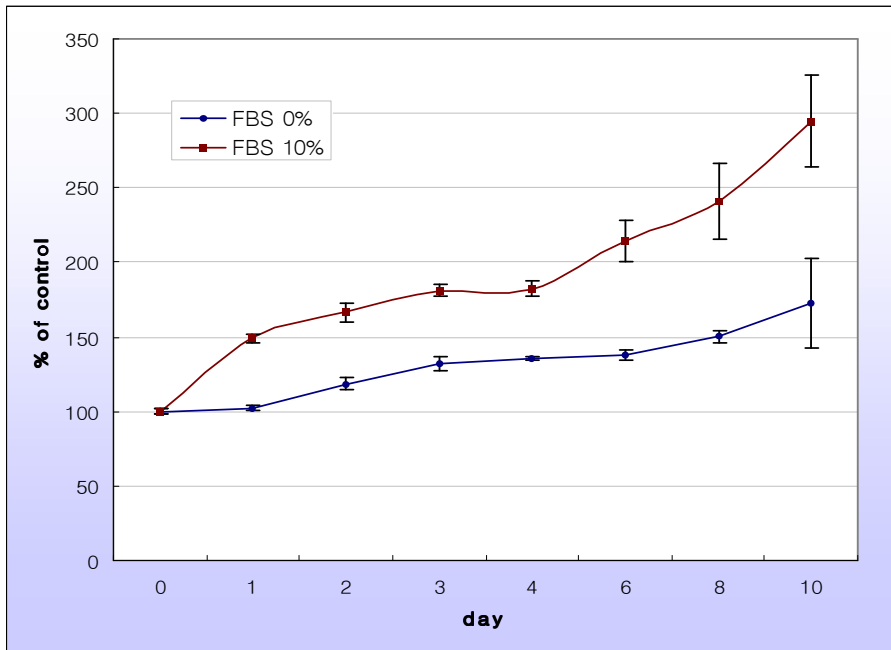


Figure 3. The growth curve of YDOV-139 cell line.

Cells were cultured under the conditions of 5% CO₂ incubator at 37°C.

5. 종양 표지자 분비능 검사

세포주의 배양 상청액에서 난소암 종양 표지자를 측정된 결과 CA 125와 CA 19-9은 각각 2487.8 U/ml, 2476.6 U/ml으로 정상보다 높았으며 CA 15-3은 13.1 U/ml, CEA는 5.3 ng/ml로 측정되었다. 표지자들의 혈중 농도 기준치 CA 125: 35 U/ml, CA 19-9: 31.3 U/ml, CA 15-5: 36 U/ml 그리고 CEA: 5.0 ng/ml 이상과 비교하였을 때 CA 125, CA 19-9의 분비는 증가하였으며 CA 15-3, CEA는 증가하지 않았거나 큰 차이를 보이지 않았다.

6. 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA) 분석

Allele specific PCR-SSOP와 allele specific PCR-SBT 방법으로 HLA Class I과 II를 검사하였으며 HLA Class I의 유전형(ABC allele1/allele2)은 A*24/A*31 B*07/B*35 Cw03*(09)/w*07 이었고 HLA Class II의 유전형은 allele1에서 DRB1*01, allele2에서 DRB1*15로 나타났다.

7. 종양 억제 유전자의 변이 분석

p53 유전자 exon 4는 wild type을 보였다. BRCA1 에서는 유전자 변이가 발견되지 않았으나 BRCA2 에서는 다양한 polymorphism 과 missense mutation 이 발견되었다(Tab. 1).

Table 1. BRCA2 mutation

Mutation: location change (amino acid change)	Mutation type	Mutation effect
Exon 10: 1093 A>C (N289H)	Missense Mutation	Polymorphism
Exon 10: 1342 C>A (H372N)	Missense Mutation	Polymorphism
Exon 10: 1593 A>G (S455S)	Polymorphism	Polymorphism
Exon 11: 2457 T>C (H743H)	Polymorphism	Polymorphism
Exon 11: 3199 A>G (N991D)	Missense Mutation	Unclassified variant
Exon 14 (int14): 7663+53 C>T	Polymorphism	Polymorphism
Exon 17 (int16): 8034-14 T>C	Polymorphism	Polymorphism
Exon 22 (int21): 8983-66 T>C	Polymorphism	Polymorphism

A: adenine T: thymine G: guanine C: cytosine

N: Asparagine H: Histidine S: Serine D: Aspartic acid

8. 항암 화학약물 감수성 검사

PPC에 의한 12종의 상용 항암제의 억제율(inhibition rate)은 gemcitabine(49.1%), doxorubicin(42.4%), irinotecan(37.9%), 5-FU(30.0%), topotecan(26.1%), etoposide(25.5%), bleomycin(21.3%), oxaliplatin(19.4%), docetaxel(18.7%), cisplatin(17.1%), paclitaxel(9.0%), carboplatin(6.9%) 순이었다. 약물 농도에 대하여 약물 감수성을 나타내는 CI값은 gemcitabine(CI=157.3), irinotecan(CI=161.1), doxorubicin(CI=184.4), 5-FU (CI=201.9), oxaliplatin(CI=210.4), etoposide(CI=221.2), topotecan(CI=221.7), docetaxel(CI=226.7), cisplatin(CI=228.1), bleomycin(CI=238.1), carboplatin (CI=248.8) 그리고 paclitaxel (CI=282.6) 순으로 나타났다 (Fig. 4).

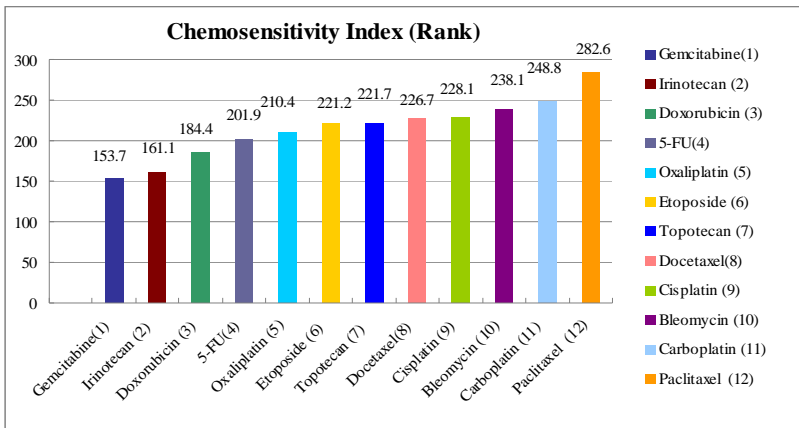
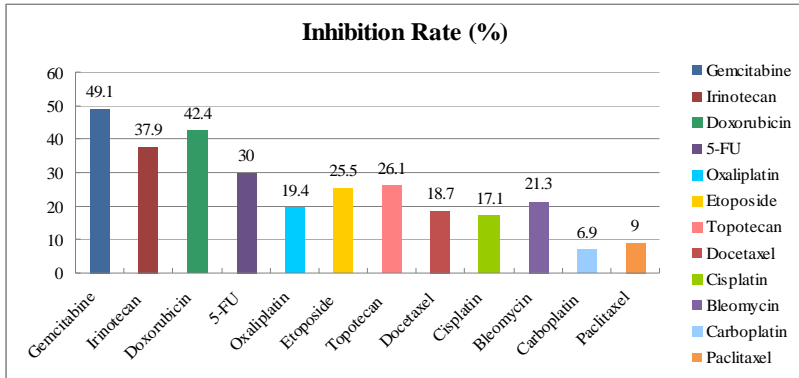


Figure 4. Chemosensitivity test of YDOV-139 cell line.

Inhibition rate(%) and chemosensitivity index(rank) were analyzed

9. 종양 형성 능력

누드 마우스에 YDOV-139를 접종한 7일 후 접종 부위에서 피하 종양이 형성되었으며 7주 동안 종양의 크기는 서서히 증가하였다. 접종 후 8주에 최대 직경은 6 mm였고, 3마리의 누드 마우스 모두에서 형성되었다(Fig. 5).

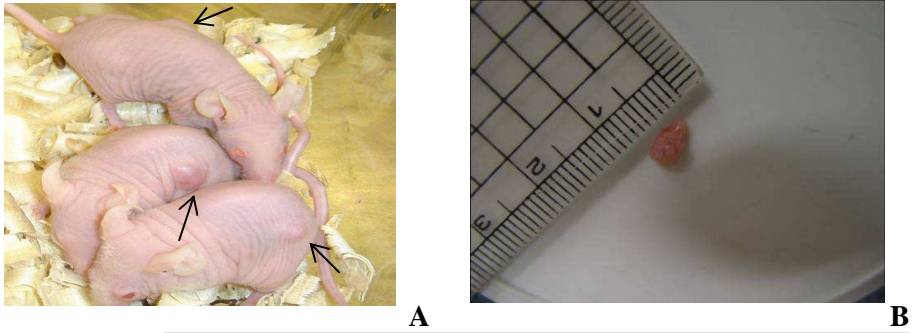


Figure 5. Xenograft of YDOV-139 cells to nude mice.

Formation of tumor mass was noted in 8 weeks (A) with the largest diameter of 6mm (B).

10. cDNA microarray을 이용한 유전자 발현 연구

cDNA microarray을 이용하여 YDOV-139 와 HOSE의 유전자 발현 차이를 비교 분석하였다. Hierarchical clustering(계층학적 묶음) 분석에서 약 2520개의 유전자가 통계적으로 유의한 발현 차이를 보였다(> 2-fold, $P < 0.05$). 이들 유전자 중 1108개는 발현 증가(up regulation)되었으며, 1412개는 발현 감소(down regulation) 되었다(Fig. 6).

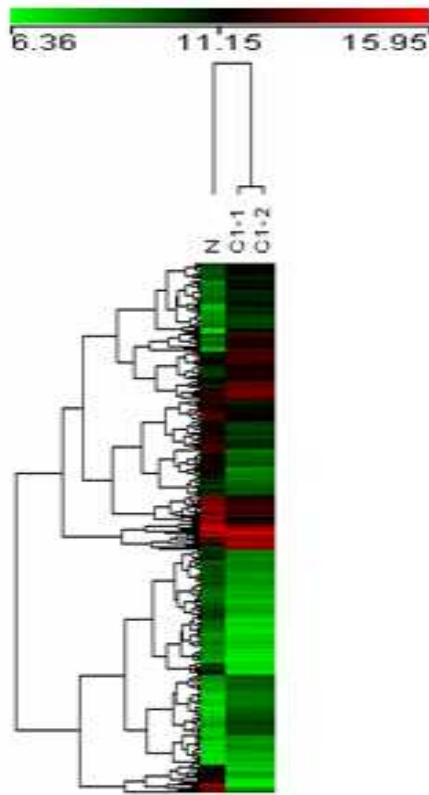


Figure 6. Hierarchical clustering of YDOV-139 cell line gene expression. N: HOSE C1: YDOV-139

Upregulated signals are expressed in red while downregulated signals are expressed in green.

또한 이들 유전자와 난소 암의 기능적 경로의 연관성을 보고자 10배 이상 통계적으로 의미 있게 증가 및 감소를 보인 유전자들을 기능학적으로 분류하였다(Tab.2 & Tab.3).

Table 2.**Selected groups of upregulated genes expressed at least 10 folds higher in YDOV-139 compared with HOSE**

TargetID	Definition	Symbol	Fold*	Accession
Cell adhesion				
ILMN_23335	epithelial V-like antigen 1	EVA1	49.33	NM_005797.2
Cell cycle control				
ILMN_24793	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	15.50	NM_001786.2
Mitosis				
ILMN_15944	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	SMC4L1	17.22	NM_001002799.1
Cell proliferation & differentiation				
ILMN_38732	PREDICTED: paternally expressed 10	PEG10	13.14	XM_499343.2
ILMN_4070	tumor-associated calcium signal transducer 1	TACSTD1	102.39	NM_002354.1
ILMN_3786	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MDK	43.95	NM_001012334.1
Cell structure				
ILMN_7397	spodin 1, extracellular matrix protein	SPON1	12.25	NM_006108.1
ILMN_13755	claudin 7	CLDN7	67.35	NM_001307.3
T-cell mediated immunity				
ILMN_29440	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	VTCN1	42.62	NM_024626.1
Nucleotide and nucleic acid metabolism				
ILMN_5449	centromere protein A, 17kDa	CENPA	13.37	NM_001809.2
ILMN_30154	Thymidine kinase 1, soluble	TK1	32.13	NM_003258.1
Oncogenesis				
ILMN_16236	runt-related transcription factor 3, transcript variant 2	RUNX3	32.26	NM_004350.1
ILMN_20794	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	LCN2	111.19	NM_005564.2
Protein biosynthesis and modification				
ILMN_26083	chromosome 12 open reading frame 46	C12orf46	34.62	NM_152321.1
ILMN_1007	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	PPP2R2B	42.00	NM_181676.1
Proteolysis				
ILMN_30268	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1	SERPINA1	10.67	NM_001002236.1
ILMN_14210	protease, serine, 8 (prostasin)	PRSS8	55.04	NM_002773.2
ILMN_11560	kallikrein 6 (neurosin, zyme)	KLK6	58.23	NM_002774.3

Signal transduction

ILMN_2234	gap junction protein, beta 3, 31kDa (connexin 31)	GJB3	10.93	NM_001005752.1
ILMN_3066	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	27.97	NM_000599.2
ILMN_17250	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	SLC1A3	32.87	NM_004172.3

Ion transport

ILMN_14229	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	SLCO2A1	12.19	NM_005630.1
------------	---	---------	-------	-------------

* YDOV-139 / HOSE

Table 3.	Selected groups of downregulated genes expressed at least 10 folds higher in HOSE compared with YDOV-139
-----------------	---

TargetID	Definition	Symbol	Fold*	Accession
Amino acid biosynthesis				
ILMN_5150	chromosome 10 open reading frame 65	C10orf65	-13.15	NM_138413.2
Apoptosis				
ILMN_28684	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	TNFRSF19	-13.84	NM_148957.2
Carbohydrate metabolism				
ILMN_15812	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	-63.30	NM_006931.1
ILMN_9544	aconitase 1, soluble	ACO1	-11.62	NM_002197.1
Cell proliferation and differentiation				
ILMN_3875	vascular cell adhesion molecule 1	VCAM1	-25.88	NM_001078.2
ILMN_25295	junctional adhesion molecule 3	JAM3	-29.95	NM_032801.3
Cell structure				
ILMN_676	vimentin	VIM	-111.60	NM_003380.2
ILMN_1052	tropomodulin 1	TMOD1	-22.59	NM_003275.1
ILMN_17132	talín 2	TLN2	-10.30	NM_015059.1
ILMN_4516	Fibronectin 1	FN1	-23.01	NM_054034.2
ILMN_1137	collagen, type IV, alpha 6	COL4A6	-15.62	NM_001847.1
ILMN_137533	collagen, type V, alpha 2	COL5A2	-51.67	NM_000393.2
ILMN_17073	claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	CLDN11	-10.04	NM_005602.4
Homeostasis				
ILMN_24349	aquaporin 1 (Colton blood group)	AQP1	-34.12	NM_198098.1
Immunity and defense				
ILMN_16098	Thrombospondin 2	THBS2	-104.73	NM_003247.2
ILMN_12111	complement factor H	CFH	-14.79	NM_001014975.1
ILMN_14902	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	C1QTNF1	-11.03	NM_030968.2

Nucleotide and nucleic acid metabolism

ILMN_6405	REC8-like 1 (yeast)	REC8L1	-39.25	NM_005132.1
Tumor suppressor				
ILMN_1781	Wilms tumor 1	WT1	-13.94	NM_024425.2
Protein biosynthesis and modification				
ILMN_28424	galactose-3-O-sulfotransferase 1	GAL3ST1	-11.40	NM_004861.1
ILMN_5690	myosin, light polypeptide kinase	MYLK	-12.60	NM_005965.3
ILMN_29283	eEF1A2 binding protein	DKFZp434B1231	-24.70	NM_178275.3
ILMN_6510	glutaminy-peptide cyclotransferase (glutaminy cyclase)	QPCT	-27.34	NM_012413.3
Proteolysis				
ILMN_3680	kallikrein 11	KLK11	-51.34	NM_006853.2
ILMN_28025	macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)	MST1	-18.39	NM_020998.2
Signal transduction				
ILMN_4516	Fibronectin 1	FN1	-23.01	NM_054034.2
ILMN_15406	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	PIK3CD	-17.29	NM_005026.2
ILMN_18672	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	DAB2	-22.09	NM_001343.1
ILMN_27192	doublecortin domain containing 2	RAB7L1	-10.14	NM_003929.1
ILMN_139202		DCDC2	-20.77	NM_016356.1
Transport				
ILMN_7795	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	SEC24D	-11.24	NM_014822.1
ILMN_9543	hemoglobin, delta	HBD	-145.18	NM_000519.3
ILMN_2381	folate receptor 3 (gamma)	FOLR3	-49.94	NM_000804.2

* YDOV-139 / HOSE

11. 2-DE 및 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 발현 연구

2-D electrophoresis로 YDOV-139 와 HOSE의 단백질 발현 연구에서 여러 단백질이 출현 및 발현증가 또는 발현감소 및 소실되는 발현 차이를 보였다(Fig. 7). 이 중 발현 증가된 17개 또한 발현 감소된 6개 총 23개의 단백질을 MALDI-TOF MS를 이용하여 확인 하였다(Tab. 4).

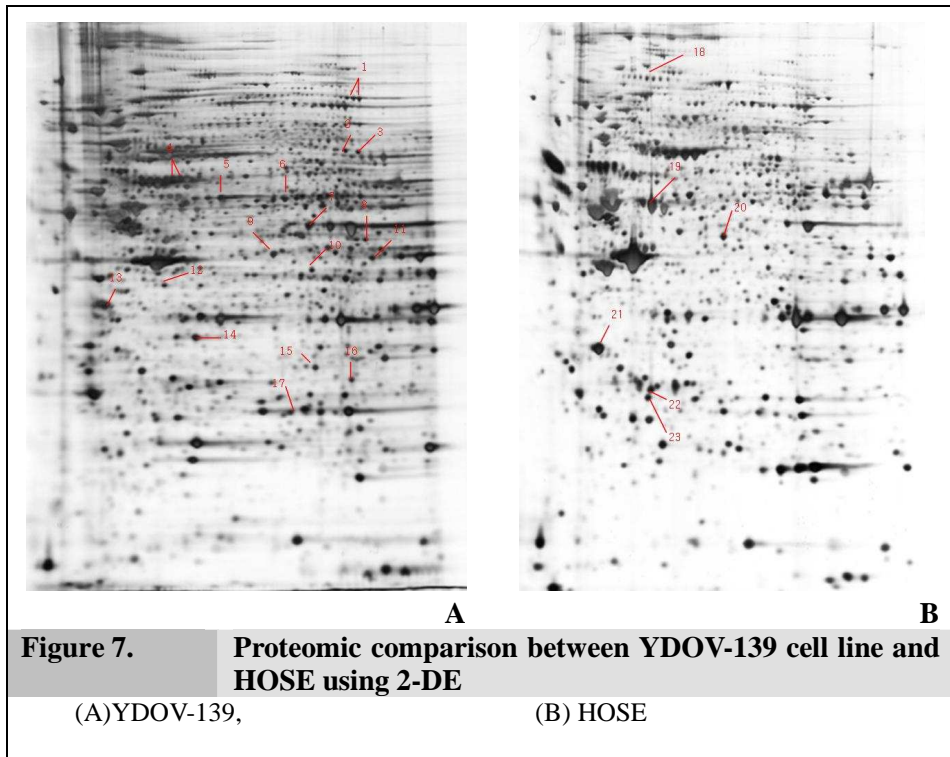


Table 4. Identification of proteins that were differentially expressed in YDOV-139 and HOSE using 2-DE and MALDI-TOF MS

Spot No.	Identification	% Coverage	<i>pI</i>	Mw (kDa)
<Up-regulated proteins in YDOV-139>				
1	FUBP1 (Far upstream element binding protein1)	20	6.9	68.81
2	Far upstream element binding protein	27	7.2	67.71
3	Far upstream element binding protein	14	7.2	67.71
4	Chaperonin	49	5.7	61.21
5	ER-60 protein (ethylene responsive catalase)	41	5.9	57.1
6	Chaperonin containing T-complex protein 1, subunit 2	34	6.0	57.81
7	ENO1 protein (enolase 1)	46	5.9	29.19
8	Fumarate hydratase precursor	25	9.0	54.79
9	S-adenosylhomocysteine hydrolase	27	6.0	48.27
10	Actin related protein2 isoform b	20	6.3	45.03
11	Albumin-like protein	19	5.7	53.43
12	Thioredoxin-like protein	22	5.2	37.76
13	B23 nucleophosmin (280 AA)	28	4.7	31.09
14	Pyrophosphatase 1	31	5.5	33.10
15	NP (nucleoside phosphorylase)	31	6.5	32.33
16	5'-methylthioadenosine phosphorylase	32	6.8	31.73

17	Albumin-like protein	16	5.7	53.43
<Down-regulated proteins in YDOV-139>				
18	VLA-3 alpha subunit	8	6.1	114.5
19	Keratin 7	39	5.4	51.46
20	VAT (Vesicle amine transport) protein 1	28	6.2	4167
21	Annexin 5 chain A	64	4.9	35.84
22	Chloride intracellular channel 4	60	5.5	28.9
23	Nicotinamide N-methyltransferase	23	5.6	30.1

pI: isoelectric point

IV. 고찰

난소암을 임상적으로 진단하고 치료하기 위해 난소암의 분자학적, 세포학적 경로를 특징화하고 규명하는 많은 새로운 연구 및 기술의 발전들이 요구되며 다양한 세포주의 확립은 매우 유용하다.^{8,9}

또한 최근에는 배양기술의 발전에 힘입어 조직으로부터 확립된 세포주 이외에 환자의 체액에서도 세포주들이 확립되고 있다.¹⁰ 본 연구에서도 환자의 복수에서 장액성 난소암 세포주를 확립하고 그 분자 생물학적 특성을 규명하였다.

난소암 세포주 확립과정은 검체의 종류, 검체의 처리과정, 비종양세포의 오염비율, 성장인자 의존도 그리고 배양액 함유성분 등 여러 가지 요건에 영향을 받으며, 장기간 배양시 과도한 subcloning때문에 확립된 많은 세포주에서 표현형적 불안정을 보이고 점차적으로 기원한 세포의 특징이 소실되기도 한다.^{11,12} 본 연구에서 확립된 세포주는 성장 인자의 추가 없이 표준 media에서 잘 배양되었으며 확립된 세포주는 형태학적으로 장액성 상피성 난소암의 소견을 보였고 또한 이종이식에서 종양형성 능력을 확인할 수 있듯이 기원세포의 특징을 유지하고 있었다.

본 연구의 예측 배가시간은 120시간으로 기존 보고된 다른 여러 난소암 세포주의 18-66시간과 차이가 있었다. ^{13,14} 보고된 여러 난소암 세포주는 난소 조직에서 대부분 확립 되었으며, 일부는 항암제 치료 후 진행된 환자에서 확립된 세포주도 있었으나 배가시간이 차이가 나는 조건은 설명 할 수 없었다.

난소암은 진단 당시에 이미 상당히 진행된 경우가 대부분이며 조기 진단을 위한 선별 검사의 중요성이 특히 강조되는 질환이다. CA125는 난소암 세포주를 쥐에 주입하여 형성된 단세포군 항체(OC125)에 의하여 발견된 종양 표지자로 상피성 난소암의 약 80%에서 증가되어 있으며 초기 난소암(I기 또는 II기)인 경우는 약 60%에서 진행성 난소암(III기 또는 IV기)인 경우는 90% 이상에서 증가되어 되어있다. Coelomic epithelium에서 기원된 조직에서 발견되므로 암 이외에 임신초기 그리고 내막증, 골반염증을 포함한 복막이 자극되는 양성질환에서도 증가한다. CEA는 진행된 상피성 암의 경우 30-65%, CA 19-9는 17-25%까지 증가가 보고 되었다. 이러한 종양 표지자 단독의 특이성 저하와 높은 위양성 때문에 암 조기 진단을 위하여 CA125와 함께 CA19-9, CA15-5, CEA등 같은 다른 종양 표지자들을 병합 검사한다.¹⁵⁻¹⁷ 본 세포주에서 상기 표지자중 CA 125 및 CA 19-9 가 증가되었으며 이는 상기 두가지 표지자 가장 빈번히 증가하는 진행된 장액성 상피세포 난소암의 임상학적 특징에 부합된다.

HLA는 인간의 조직적합항원을 반영하며 유전자는 6번 염색체의

단완에 위치한다. 약 3500 Kb로 이루어져 있고 Class II(DR) – Class III – Class I(B,C,A)의 순서로 배열되어 있다. HLA 유전자는 광대한 다형현상(polymorphism)이 존재하여 각 locus에 대하여 각기 다른 HLA-allele를 특징 지우며 또한 특정 HLA 분자에 결합하는 peptide들을 결정하고 각 개인들은 Haplotype이라 일컫는 특정 HLA allele들의 조합이 유전된다. HLA class I 분자는 종양특이 세포독성 T 세포의 항원제 표시자로 암세포에 대한 면역 감시에 대한 중요한 역할을 하는데 암의 경우 면역체계서 암세포를 비자가(non-self)로 인식하여 면역 반응을 유발하며 조직적합항원의 변형은 면역체계서 암세포에 대한 인지를 변화시켜 면역감시를 피하고 암 발생을 진행하게 한다. HLA-A2 frequency 와 Haplotype A33-B14-DR1처럼 일부 HLA class I, II haplotype들은 난소암 발생 위험성과 연관된다는 보고가 있다.¹⁸⁻²⁰ 본 세포주의 HLA 유전적 표현형은 현재까지 보고된 이러한 haplotype과 무관하였으나 추후 더 많은 세포주를 대상으로 연관성에 대한 연구가 필요하다.

같은 종류의 암이라도 발암 유전자(HER-2/nu, K-ras, c-myc), 종양 억제유전자(p53, BRCA1, BRCA2) 또는 부조화 교정 유전자 (mismatch repair gene- hMLH1, hMLH2, hPMS1, hPMS2)등의 변이 정도가 다르며 이로 인해 생물학적 특성이 달라지고 암화과정에서 또한 발암 유전자 및 종양 억제유전자 등에 의하여 성장인자의 분비 및 수용체 증가 발현(overexpression)등 다양한 세포주기 조절의 변화가 일어난다. 이러한 변화는 임상학적으로 진단 및 치료 전략을

세우는데 있어서 중요한 표적이 될 수 있어 종양 유전자와 종양 억제 유전자가 난소암 발생에 미치는 영향에 관해서 많은 연구들이 있어왔다.²¹⁻²³

17q21 염색체에 존재하는 BRCA1와 13q12-q13 염색체에 존재하는 BRCA2는 Rad51 등과 함께 핵산의 이중구조 파손을 교정 및 유전자 안정을 유지하는 역할을 하며 유전성 유방암/난소암과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. BRCA1과 BRCA2의 유전적 이상은 난소암의 10% 정도 에서 발견되며, BRCA1 및 BRCA2 이상이 있는 여성에서 70세까지 20-40%와 10-20%에서 난소암이 발생하는 것으로 보고되고 있다.^{24, 25} 본 세포주에서 BRCA1의 유전적 이상은 관찰되지 않았으며, BRCA 2의 경우 exon10, 11, 14, 17, 22 에서 polymorphism이 나타났으며, exon10(1093번째, 1342번째 염기서열) exon11(3199번째 염기서열) 에서 missense mutation을 보였다.

종양 억제 유전자인 p53 유전자는 염색체 17p13.3에 위치하며 11개의 exon으로 이루어져 있으며 세포성장 억제하고 DNA 손상 복구 및 apoptosis등에 관여하며 난소암에 있어서 가장 흔한 유전적 이상으로 알려져 있다. 진행된 난소암의 경우 약 50~80%까지 보고되는 반면 조기 난소암의 경우엔 약 10~20% 정도만 보고되고 있다. P53 변이가 발견 된 cell line은 wild type의 p53 cell line보다 더 종양 형성능력이 높다고 보고되었으며, 상피성 난소암에서 p53은 생존에 대한 독립적 예측인자로서 유용하다는 보고도 있듯이 p53 안정화에 대한 노력은 난소암 치료에 도움이 될 것이다.^{26, 27} 본

세포주에서 p53은 wild type을 보였다.

진행된 난소암에 있어서 항암제 치료에 대하여 많은 난항이 존재한다. 현재 표준치료로 진행된 III기 또는 IV기 난소암에서 수술 후 paclitaxel과 백금제(platinum based) 항암제가 적용되며, 반응률은 70-80%로써 20-30%의 환자에서는 암이 계속 진행되거나, 치료 6개월 이내에 재발하는 저항성이 나타난다. 또한 진행된 난소암의 5년 생존률은 30-40%로 보고되고 있다. 이러한 항암제 저항성 및 5년 생존률에 대하여 난소암의 임상적 병태생리학적 분류 및 치료 이외에 분자유전학적 분류 및 치료의 필요성이 제기되고 있으며, 이를 근거로 한 맞춤형 치료에 대한 논의가 있다.^{28, 29} 본 연구에서 세포주의 항암제 검사상 수술 후 표준치료 항암제인 paclitaxel과 백금제(platinum based) 항암제가 gemcitabine, irinotecan, doxorubicin, 5-FU와 같은 항암제보다 낮은 억제율 (inhibition rate) 및 CI값을 보였으며 이는 Chemosensitive 하지만 재발을 반복하는 환자의 임상 양상과 연관성이 제기될 수도 있으며 앞서 논한 맞춤형 치료 모델이 유용할 수도 있다.

분자생물학적 발현연구는 암 진단 및 치료에 있어서 잠재력이 높은 강력한 연구방법이다. 현재까지의 여러 연구에서 난소암의 복잡성 때문에 전통적인 조직학적 방법으로는 명확하게 구별이 안되었던 부분을 분자적 표현형으로 구별 확인할 수 있으며, 또한 새로운 분자 표지 및 치료제 표적의 확인을 가능하게 해 줄 것으로 기대된다.^{30, 31}

현재 임상학적으로 난소암에서 유전자 발현 연구는 정상 난소 조직과 난소암 조직을 구별하게 하는 유전자 집합을 밝히는데 유용하며 환자의 임상학적 예후에 대한 연관성이 밝혀지지 않았으나 항암제 감수성과 관련하여 유용하였으며 78-86%의 예측 성적을 보였다는 보고가 있다.^{32, 33} 그러나 유전자 수준의 발현 분석이 세포의 실질적 단백질 수준 발현을 대표하지는 못하고 있으며 유전자 발현 분석과 단백질 발현 분석을 함께한 보완적 복합 분석이 난소암의 생물학적 연구에 필요로 한다.³⁴

본 연구에서는 cDNA microarray을 이용하여 세포주 특유의 유전자 발현을 확인할 수 있었으며, 또한 2-DE 및 MALDI-TOF MS를 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. Hierarchical clustering(계층학적 묶음) 분석에서 약 2520개의 유전자가 다른 발현을 나타냈으며 YDOV-139에서 유전자 발현은 HOSE와 현저히 구별 되었다. 또한 단백질 발현 연구에서도 YDOV-139와 HOSE사이에 발현 차이를 보이는 26개의 단백질을 확인하였다. 이런 연구들이 모여 정상 세포와 여러 많은 난소암세포 표본에서 단백질 발현을 관찰하는 것이 기능적 역할을 확인해주고 난소암 진단 및 치료에 있어서 암 표지자 및 치료 표적자로 이용될 수 있는 방법을 제시해 줄 것으로 기대 된다. 추후 과정에서 본 연구의 분자 생물학적으로 발현된 양상이 추가적인 연구를 통하여 선택과정 또 여러 많은 난소암 표본을 통한 유용성 확인(validation) 과정을 필요로 할 것이다.

V. 결론

본 연구에서 성공적으로 장액성 난소암 세포주(YDOV-139)를 확립하고 특성을 분석하였다. 확립된 세포주의 특성은 난소암의 병리기전 연구, 세포 기능 연구, 항암제 감수성 연구 그리고 현재 치료가 어려운 암에 대한 새로운 치료 모델 개발에 유용한 가치를 제공할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 이효표, 송용상, 김재욱, 남궁성은, 목정은, 문형 등. 한국 부인암 등록 사업 조사 보고서(2003. 1. 1- 2003.12.31) 대한산부회지, 2006; 49(4): 762-812.
2. Reynolds EA, Moller KA. A review and an update on the screening of epithelial ovarian cancer. *Curr Probl Cancer*. 2006 Sep-Oct;30(5):203-32.
3. Central Cancer Registry Center in Korea. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea (2005.1-2005.12). Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea. 2007.
4. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004;164(5): 1511-8.
5. Garson K, Shaw TJ, Clark KV, Yao DS, Vanderhyden BC. Models of ovarian cancer--are we there yet? *Mol Cell Endocrinol* 2005;239: 15-26.
6. Biade S, Marinucci M, Schick J, Roberts D, Workman G, Sage EH, *et*

- al.* Gene expression profiling of human ovarian tumours. *Br J Cancer*. 2006 Oct 23;95(8):1092-100.
7. Van der Merwe DE, Oikonomopoulou K, Marshall J, Diamandis EP. Mass spectrometry: uncovering the cancer proteome for diagnostics. *Adv Cancer Res*. 2007;96:23-50.
8. Yuan Y, Kim WH, Han HS, Lee JH, Park HS, Chung JK, *et al.* Establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic oncology* 1997;66: 378-87.
9. Indraccolo S, Tisato V, Agata S, Moserle L, Ferrari S, Callegaro M, *et al.* Establishment and characterization of xenografts and cancer cell cultures derived from BRCA1 -/- epithelial ovarian cancers. *Eur J Cancer*. 2006 Jul;42(10):1475-83.
10. Alama A, Barbieri F, Favre A, Cagnoli M, Noviello E, Pedulla F, *et al.* Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 1996;62: 82-8.
11. Schlade-Bartusiak K, Sasiadek MM, Bar JK, Urbschat S, Blin N, Montenarh M, *et al.* A. Cytogenetic and molecular cytogenetic characterization of the stable ovarian carcinoma cell line (OvBH-1). *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Jan 1;164(1):10-5.
12. Fernando A, Glaysher S, Conroy M, Pekalski M, Smith J, Knight LA, *et al.* Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 2006 Sep;17(8):913-9.
13. Scoles DR, Pavelka J, Cass I, Tran H, Baldwin RL, Armstrong K, *et al.* Characterization of CSOC 882, a novel immortalized ovarian cancer cell line expressing EGFR, HER2, and activated AKT. *Gynecol Oncol*. 2007

Jan;104(1):120-8.

14. Langdon SP, Lawrie SS, Hay FG, Hawkes MH, McDonald A, Hayward IP, *et al.* Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1988;48: 6166-72.

15. Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF 3rd, Liotta LA. .Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer*. 2004 Nov;40(17):2604-12.

16. Luborsky JL, Barua A, Shatavi SV, Kebede T, Abramowicz J, Rotmensch J. Anti-tumor antibodies in ovarian cancer. *Am J Reprod Immunol*. 2005 Aug;54(2):55-62.

17. Draghici S, Chatterjee M, Tainsky MA. Epitomics: serum screening for the early detection of cancer on microarrays using complex panels of tumor antigens. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2005;5(5): 735- 43.

18. Gamzatova Z, Villabona L, van der Zanden H, Haasnoot GW, Andersson E, Kiessling R, *et al.* Analysis of HLA class I-II haplotype frequency and segregation in a cohort of patients with advanced stage ovarian cancer. *Tissue Antigens*. 2007 Sep;70(3): 205-13.

19. Gamzatova Z, Villabona L, Dahlgren L, Dalianis T, Nillson B, Bergfeldt K., *et al.* Human leucocyte antigen (HLA) A2 as a negative clinical prognostic factor in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Oct;103(1): 145-50.

20. Kübler K, Arndt PF, Wardelmann E, Krebs D, Kuhn W, van der Ven K. HLA-class II haplotype associations with ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12): 2980-5.

21. Legge F, Ferrandina G, Salutati V, Scambia G. Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol*. 2005

May; 16 Suppl 4:iv95-101.

22. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Aug;5(4):388-93.

23. Rosen EM, Fan S, Ma Y. BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett.* 2006 May 18;236(2):175-85.

24. Press JZ, De Luca A, Boyd N, Young S, Troussard A, Ridge Y, *et al.* Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer.* 2008 Jan 22;8:17.

25. Turner N, Tutt A, Ashworth A.. Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Aug;5(4):388-93.

26. Palmer JE, Sant Cassia LJ, Irwin CJ, Morris AG, Rollason TP. P53 and bcl-2 assessment in serous ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2008 Mar-Apr;18(2):241-8.

27. Wang Y, Zhang Z, Lu Y, Yao R, Jia D, Wen W, *et al.* Enhanced susceptibility to chemical induction of ovarian tumors in mice with a germ line p53 mutation. *Mol Cancer Res.* 2008 Jan;6(1):99-109.

28. Crijns AP, Duiker EW, de Jong S, Willemse PH, van der Zee AG, de Vries EG. Molecular prognostic markers in ovarian cancer: toward patient-tailored therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16 Suppl 1:152-65.

29. Agarwal R, Kaye SB. Expression profiling and individualisation of treatment for ovarian cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Aug;6(4):345-9.

30. Mok SC, Elias KM, Wong KK, Ho K, Bonome T, Birrer MJ. Biomarker discovery in epithelial ovarian cancer by genomic approaches. *Adv Cancer Res.* 2007;96:1-22.

31. Dressman HK, Berchuck A, Chan G, Zhai J, Bild A, Sayer R, *et al.* An

- integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Feb 10;25(5):517-25.
32. Olivier RI, van Beurden M, van' t Veer LJ. The role of gene expression profiling in the clinical management of ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(17):2930-8.
33. Lancaster JM, Dressman HK, Clarke JP, Sayer RA, Martino MA, Cragun JM, *et al*. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Sep-Oct;16(5):1733-45.
34. Bloom GC, Eschrich S, Zhou JX, Coppola D, Yeatman TJ. Elucidation of a protein signature discriminating six common types of adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2007 Feb 15;120(4):769-75.

Abstract

Establishment and characterization of a serous ovarian cancer cell line

Doo Byung Chay

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jae Hoon Kim)

Objective: Cancer cell line is a valuable tool in cancer studies because it can substitute an in vitro experiment for a human body. As for ovarian cancer because of the extreme heterogeneity and complexity, many cell lines with their own biologic properties are needed. A new cell line, designated YDOV-139, was established and the characteristics were determined.

Methods: The tumor cells were obtained from ascites of a 67-year-old Korean woman with recurrent ovarian cancer. Primary cell cultures were performed with DMEM media and the cells are maintained by serial passages. Cell line characterization was performed by cell line morphologies, growth kinetics, tumor marker secretion, HLA typing, mutational analysis of BRCA1, BRCA2 and p53 genes. Tumorigenicity and chemosensitivity test of the cultured cells were also performed. Gene expression profile and proteomics were studied using cDNA

microarray and 2D electrophoresis.

Results: The cells showed a polygonal appearance with large, round nucleus by phase-contrast microscopy. The average population doubling times were 120 hours and the tumor marker secretion assay revealed highly elevated CA125 and CA19-9. P53 gene was wild type and while no mutations were detected with BRCA1, polymorphism and missense mutation were detected with BRCA2. When transplanted into nude mice, cell successfully induced tumor and gemcitabine had the highest chemosensitivity index. Compared to HOSE(Human Ovarian Surface Epithelial cell), 2520 differentially expressed genes were noted by gene expression profile using cDNA microarray and 23 proteins were identified by 2D electrophoresis.

Conclusions: Biological characteristics of this cell line may be an important research resource for studying ovarian cancer pathophysiology, cell biology and chemosensitivity as well as for developing a new strategy model against ovarian cancer treatment.

Key Words: Ovarian cancer, Cell line characterization, Gene expression, Proteomics.