

구강암 세포주를 이종이식한 설암의 동소위 누드마우스 모델

정재승¹ · 김소미¹ · 황영선² · 장향란² · 차인호^{1,2}

연세대학교 치과대학 ¹구강악안면외과학교실, ²구강종양연구소

Abstract (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011;37:490-5)

An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma

Jae-Seung Chung¹, Somi Kim¹, Young-Sun Hwang², Xianlan Zhang², In-Ho Cha^{1,2}

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ²Oral Cancer Research Institute, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

Introduction: 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.

Materials and Methods: In this study, author have transplanted YD-10B_{mod} cells into nude mouse oral tongues with different cells number (5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 cells/mouse) and observed the development aspect of oral tongue cancers.

Results: The cancer developed from orthotopic transplantation of YD-10B_{mod} cells into nude mouse oral tongue show invasion 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 $< 5 \times 10^4$ cells/mouse or under per nude mouse.

Conclusion: 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: Tongue, Squamous cell carcinoma, Cell line

[paper submitted 2011. 9. 26 / revised 2011. 11. 1 / accepted 2011. 11. 1]

I. 서 론

구강암의 대부분을 차지하는 편평세포암(squamous cell carcinoma)은 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 부위이다¹. 일반적으로 구강암의 80-90%는 편평세포 암종(squamous cell carcinoma)으로 좋지 못한 예후를 보이며, 구강 내에서 혀에 암종이 발생하면 임파절 전이가 양측성으로 이루어질 수 있고, 원발부위 자체가 순수

한 근육조직으로 이루어져 종양세포가 인접조직으로 침윤되기가 용이하기 때문에 그 예후가 좋지 않은 것으로 보고되고 있다². 이처럼 치료가 어렵고 좋지 않은 예후를 보이는 구강암의 연구를 위해 오래 전부터 구강암에 대한 동물 실험 모델의 개발이 있어 왔다. 1954년 Salley³에 의해 처음 개발되고 Morris⁴에 의해 보편화된 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) solution 도포를 이용한 햄스터의 혀낭(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 HN-22, UM-SCC, KB-cell 등 수많은 세포주들이 개발되어 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 만큼 동물이 생존하기에 많은 문제가 있어, 최적의 동위성(orthotopic) 종양모델은 별로 없는 실정이다.

인체종양을 누드마우스에 이종 이식하는 방법은 종양조직을 직접 이식하는 방법과 배양된 종양 세포주를 이식하

차 인 호

120-752 서울시 서대문구 연세로 50

연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

In-Ho Cha

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

College of Dentistry, Yonsei University

50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

TEL: +82-2-2228-8750 FAX: +82-2-2227-8022

E-mail: cha8764@yuhs.ac

*이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(2010-0029704).

는 방법이 있는데 직접 이식하는 방법은 종양의 미세 환경 요소들을 같이 이식해 준다는 장점이 있지만 기술적으로 매우 어렵기 때문에 피하 종양모델은 확립할 수 있더라도 동위종양 모델은 확립하기 어렵다는 단점이 있다. 반면에 배양된 인체 종양의 세포주를 누드마우스에 이종이식하여 유도된 종양은 세포의 형태, 세포 내 미세구조 및 조직소견 등이 다르지 않은 것으로 알려져 있고⁵ 이식 성공률도 높은 것으로 보고되었다⁶. 누드마우스의 피하조직에 이종이식된 대부분의 인체 종양세포는 기관전이 가 잘 일어나지 않는 반면에 성공적으로 확립된 많은 동위종양 모델에서는 인간 암의 임상적 침습과 전이 양상이 모사되는 것으로 보고되었다⁷. 그러나 설암의 경우 혈관분포가 풍부하여 암 세포의 침윤 및 경부 임파절 전이가 다른 부위에 비해 빠르고 종양의 성장속도가 빠르기 때문에 식이 섭취의 어려움을 초래하여, 실험동물들이 암이 유발된 후 조기에 사망하므로 적절한 후속 연구를 진행하는데 많은 어려움이 있다.

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

II. 연구 대상 및 방법

1. 세포주 확립과 배양

동물실험을 위해 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 확립한 human tongue origin의 oral squamous cell carcinoma, YD-10B 세포주⁸를 이용하여 2009년 Kim 등⁹의 연구와 동일한 방법으로 Transwell[®] invasion assay (Costar, Corning, NY, USA)와 Zymography를 시행하여 제작된 YD-10B_{mod} 세포주를 제작하고 배양하였다.

2. 실험동물

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

3. 실험 동물군 설정

상기한 방법으로 확립한 구강 편평세포 암종 세포주인 YD-10B_{mod} 세포주를 대조군과 실험군으로 나눈 누드마우스

의 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 dimethyl sulfoxide를 누드마우스의 혀 부위에 주입하였다. 모든 동물들은 National Insurance Health guideline에 따라 사육되었다.

4. 실험 동물 희생

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

5. 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. 결 과

1. 종양 형성

누드마우스의 혀에 발생한 종양이 육안으로 관찰되었다.(Fig. 1)

2. 조직학적 검사

1) 대조군

피하 조직 내에서 종양이 관찰되지 않았으며, 약간의 염증세포가 관찰되었다.(Fig. 2)

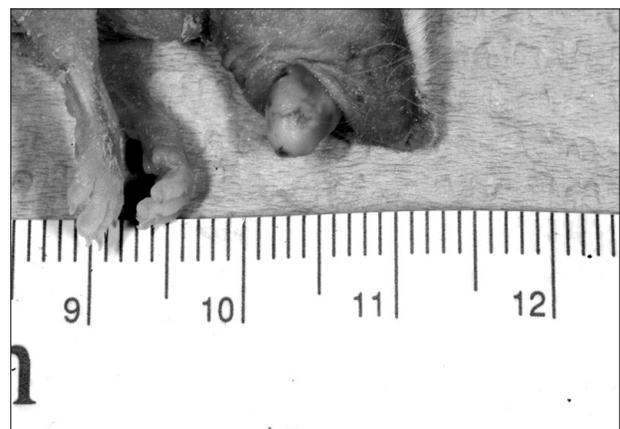


Fig. 1. Tumor formation on lateral border of tongue.
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

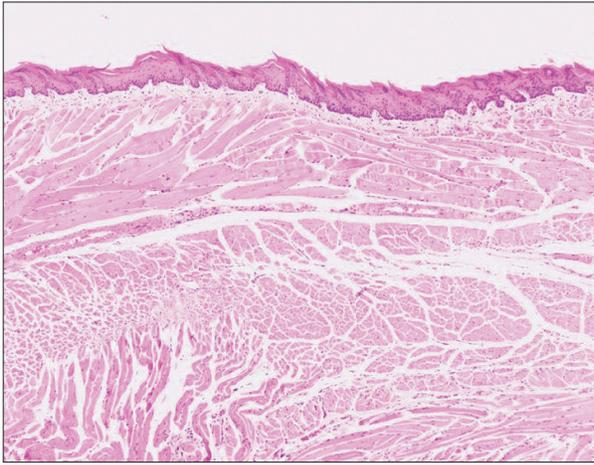


Fig. 2. There is no tumor formation by subcutaneous inoculation of media only in control group (3 weeks, H&E staining, $\times 40$).
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

2) YD-10B_{mod} 실험군에서의 종양 형성

(1) 5×10^4 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^4 cells/mouse로 누드마우스의 허에 0.1 mL 주입한 후, 3주, 4주, 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 피하조직에 종양세포가 종물을 형성하고 있었고, 근육 조직으로 침윤성 성장을 하고 있었다. 종양세포는 대체로 분화가 좋은 편평세포 암종이었다.(Fig. 3) 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 주변 근육 조직으로의 광범위한 침윤과 함께, 종양 중앙 부위에 괴사 소견을 보였다.

(2) 5×10^5 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^5 cells/mouse로 누드마우스의 허에 0.1 mL 주입한 후, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 후에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 편평세포 암종이 관찰되었다. 종양세포는 대체로 침윤성 성장 양상을 보였다.(Fig. 4) 4

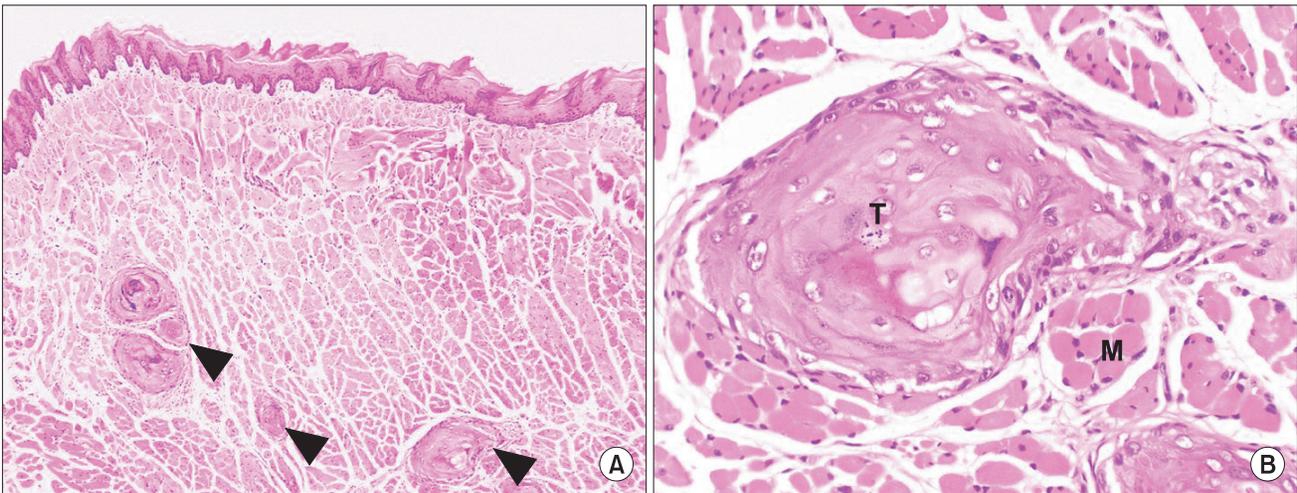


Fig. 3. The histopathologic findings of tumor (arrowheads) of YD-10B_{mod} cells (5×10^4 cells/mouse, 3 weeks). The tumor (T) showed invasive growth into surrounding muscle tissue (M) (H&E staining, A: $\times 40$, B: $\times 200$).
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

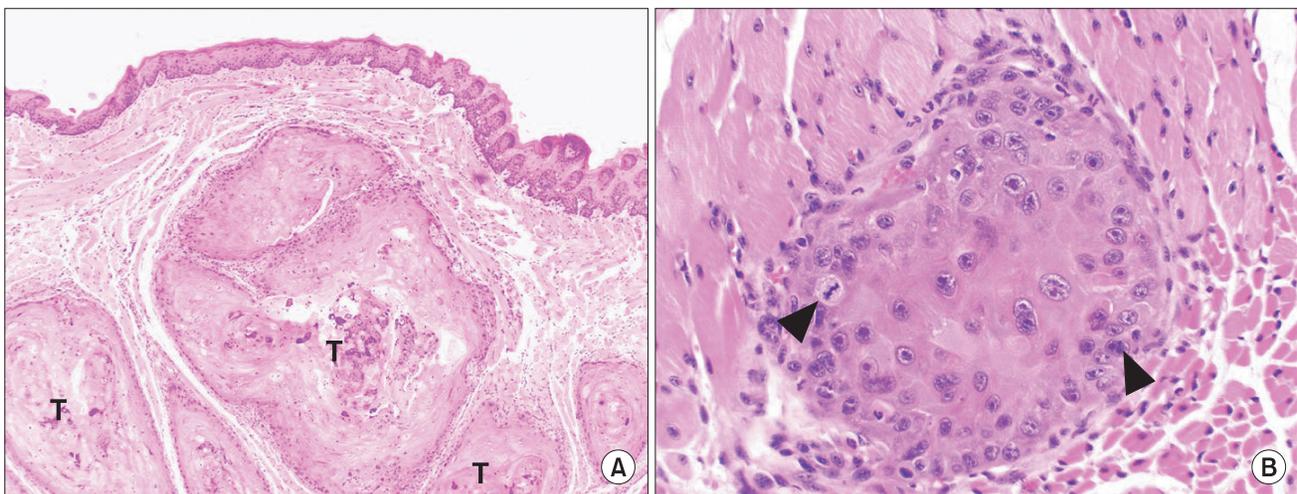


Fig. 4. The histopathologic findings of tumor of YD-10B_{mod} cells (5×10^5 cells/mouse, 3 weeks). The tumor (T) showed invasive growth into surrounding tissue. The tumor cells showed cellular dysplasia and abnormal mitosis (arrowheads) (H&E staining, A: $\times 40$, B: $\times 200$).
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

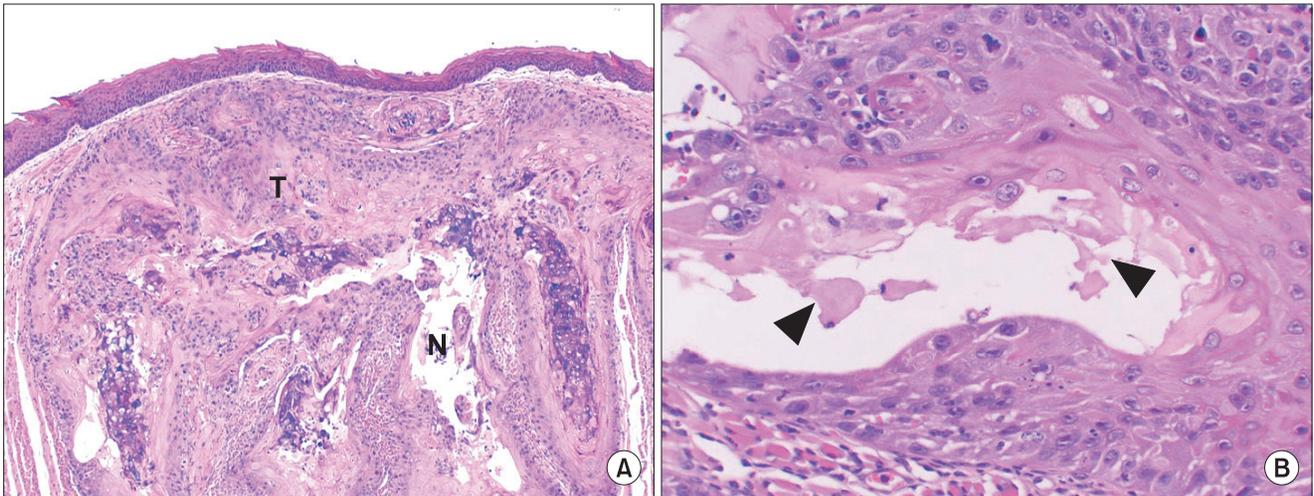


Fig. 5. The histopathologic findings of tumor of YD-10B_{mod} cells (5×10^6 cells/mouse, 3 weeks). The tumor (T) showed invasive growth into surrounding tissue. The tumor showed cellular pleomorphism and central necrosis (N, arrowheads) (H&E staining, A: $\times 40$, B: $\times 200$).
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

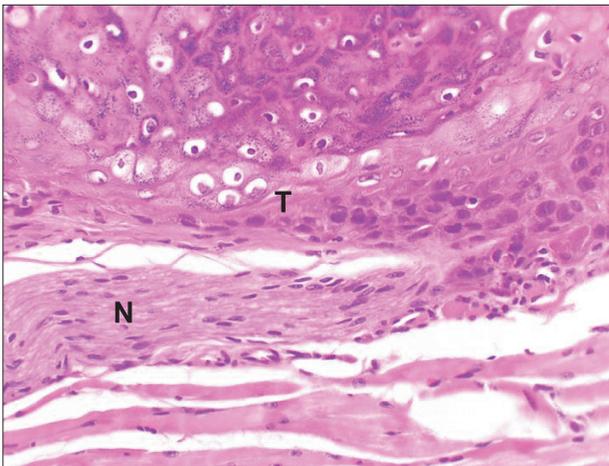


Fig. 6. The histopathologic findings of tumor of YD-10B_{mod} cells (5×10^6 cells/mouse, 2 weeks). The tumor (T) showed invasive growth into peripheral nerve sheath (N) (H&E staining, $\times 200$).
Jae-Seung Chung et al: An orthotopic nude mouse model of tongue carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011

주, 5주, 6주 후에 생검한 조직에서는 주변 근육 조직으로의 광범위한 침윤과 함께, 종양의 중앙 부위에 각화 및 괴사 소견을 보였다.

(3) 5×10^6 cells/mouse 처리군

YD-10B_{mod} 세포를 5×10^6 cells/mouse의 농도로 누드마우스의 혀에 0.1 mL 주입한 후, 2주, 3주, 4주 후에 생검한 조직 모두에서 피하 조직에 침윤성 편평세포 암종이 관찰되었다.(Fig. 5) 일부 종양에서는 신경 외막을 침윤한 소견도 같이 관찰되었다.(Fig. 6) 실험 4주 이후 사망한 2마리의 부검된 조직에서도 편평세포암이 주변 근육조직으로 광범위하게 침윤한 소견이 관찰되었다.

IV. 고 찰

편평세포암은 인간의 암 중에서 가장 일반적이고 높은 발생 빈도를 차지하고 있다. 그 중에서도 구강 편평세포암의 경우는 발생 후 5년 생존율이 50% 정도에 그치고 있다¹⁰. 구강을 포함한 두경부 영역에서 편평세포암의 생존율이 낮은 이유는 경부 임파절 전이나 타 장기로의 원격전이 가능성이 높을 수 있고 경부 임파절 전이는 예후에 큰 영향을 주기 때문이다. 이번 연구는 이러한 구강암의 취약점을 해결하고자 전이의 기전과 과정을 이해하기 위한 기초적인 연구를 할 수 있도록 적절한 동물실험 모델을 확립하는데 그 의미를 두었으며, 누드마우스의 혀에 구강설암 세포주를 이종 이식하여 각각의 이식한 세포수에 따른 종양세포의 침윤 및 성장정도를 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 불완전 결손을 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. 누드마우스에 종양 세포주를 이종이식하여 종양을 유도한 동물실험 모델은 많이 보고되어 왔다. HN-22 세포주를 누드마우스에 엉덩이에 이종이식하거나, UM-SCC 세포주를 구강저부에 이종이식하거나, KB 세포주를 등(flank)에 이종 이식하여 확립한 동물실험 모델 등이 있다¹¹⁻¹³. 그러나 혀는 풍부한 혈관과 임파관의 분포 때문에 암 세포의 침투 및 전이능력이 높고 혀에 종양이 유발되면

실험동물들이 식이 섭취가 곤란해져 조기 사망하기 때문에, 설암의 동소위 동물실험 모델을 만들기 어려웠다¹⁴. 2009년 Kim 등⁹의 연구에 따르면, YD-10B 세포 주에서 matrigel을 깬 transwell chamber를 이용하여 highly invasive cell만을 채택하여 만든 YD-10B_{mod} 세포주는 기존의 세포주에 비해 Transwell invasion assay 상에서 2.3-3.2배 높은 invasion 활성을 나타내었고, crystal violet으로 세포를 직접 염색하여 확인한 결과에서도 비슷한 정도의 차이가 확인되었다. 또한 암 세포 침윤에 주된 역할을 하는 단백질 분해 효소인 matrix metalloprotenase 9의 활성이 약 2배 정도 높은 것으로 확인이 되었다. 따라서 이번 연구에서도 YD-10B_{mod} 세포주를 동일한 방법으로 제작하여 이용하였으며 이번 실험의 조직학적 소견에서도 종양세포의 침윤성 성장도가 매우 높은 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 이 세포주를 이용하면 누드마우스의 혀에 인체에서와 비슷한 설암을 빠른 시간에 유도할 수 있는 가능성을 보여주는 것이라고 생각된다.

누드마우스 동물실험 모델에 이종이식한 세포주는 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 희생시킨 후 제작한 시편의 조직학적 소견에서, 5×10^4 cells/mouse의 경우는 중심부 괴사를 동반한 침윤성 종양 성장은 실험 5주차에서부터 관찰되었고, 5×10^5 cells/mouse의 경우는 4주차부터, 5×10^6 cells/mouse 경우는 실험 3주차부터 종양의 급속한 침윤성 성장을 보였고, 실험 5주차에는 tumor size의 성장까지 동반되어 실험 동물들이 사망하였다. 여기서 이종이식한 세포수의 차이에 따른 조직학적 실험 결과를 주목할 필요가 있다. 각각의 세포수 별로 종양의 형성시기, 종양 중심부 괴사시기, 사망시기의 차이를 보인다. 이것은 구강 설암 동물실험 모델 확립 시 각각의 목적에 맞게 세포수를 선택하여 이종이식하는 것이 필요하다는 것을 시사하고 있다. Lou 등¹⁵의 보고에 의하면 누드마우스의 구강과 등(flank)에 마우스 구강암 세포주 AT-84를 동종이식하여 종양을 유발시켰을 때 구강이 등에서보다 훨씬 더 빨리 성장하는 것을 관찰하였고, 다른 장기로의 전이도 일부 관찰되었다. 그러나 등에 종양이 유도된 누드마우스는 모두 잘 생존한 반면에 구강에 종양이 유도된 누드마우스는 약 4주 후에 모두 사망하였다. 본 실험에서도 누드마우스의 혀에 YD-10B_{mod} 세포를 5×10^6 cells/mouse로 이종이식한 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 6주차까지 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 있다는 가능성을 제시하는 것이라고 생각된다. 과거에 구강암 발암에 관한 동물실험 모델은 주로 햄스터

의 혀에 DMBA나 4-Nitroquinoline 1-oxide를 도포하여 발암과정을 연구하는 모델이었던 반면에¹⁶, 이런 발암과정을 이해한 후부터는 구강암 세포주를 이종이식하여 종양을 유도한 후 종양의 침윤, 전이 과정 등을 이해하고 적절한 항암 치료제를 개발할 수 있는 동물실험 모델을 만들려는 연구가 주로 이루어져 왔다². 이번 연구에서는 이런 연구를 하기 위한 구강암 세포주를 확립하고 실험동물의 생명을 연장할 수 있는 적절한 종양 세포수를 확립하여 의미가 있는 결과를 얻었다고 생각된다.

V. 결 론

사람 혀의 편평세포 암종에서 확립한 YD-10B 세포주에서 보다 침윤성이 높은 세포들을 가지고 YD-10B_{mod} 세포주를 확립하였고, 이 세포들을 이용하여 누드마우스의 혀에 이종이식시켜 형성된 종양은 인체의 혀에서 발생된 설암과 유사하게 주위조직으로의 침윤과 중심부 괴사의 소견을 보였다. 그리고 이종이식한 세포수에 따라 종양의 크기나 중심부 괴사가 되는 시기가 달라지는 것으로 보아, 향후 이종이식하는 세포수를 더 줄이면 누드마우스의 생존기간이 더 연장되어 효과적인 항암제의 개발을 위한 연구모델로도 유용하게 이용할 수 있으며 설암의 전이양상까지도 관찰이 가능한 실험동물 모델을 확립할 수 있을 것으로 생각된다.

References

1. MJ Kim. Oral Cancer. 1st ed. Seoul: Jisung Publishing; 2002.
2. Zelefsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong J, Spiro RH, Shah JP, et al. Postoperative radiotherapy for oral cavity cancers: impact of anatomic subsite on treatment outcome. *Head Neck* 1990;12:470-5.
3. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 1954;33:253-62.
4. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 1961;40:3-15.
5. Hendrickson EA. The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993;143:1511-22.
6. Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 1994;56:4-8.
7. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998-1999;17:279-84.
8. Lee EJ, Kim J, Lee SA, Kim EJ, Chun YC, Ryu MH, et al. Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *Exp Mol Med* 2005;37:379-90.
9. Kim JH, Hwang YS, Kim HS, Nam W, Cha IH. An atopic nude mouse model of oral cancer cell line. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2009;35:74-82.
10. Johnson N. Global Epidemiology. In: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG, eds. *Oral Cancer*. London: Martin Dunitz Publication; 2003:7-22.
11. Henson B, Li F, Coatney DD, Carey TE, Mitra RS, Kirkwood KL, et al. An orthotopic floor-of-mouth model for locoregional growth

- and spread of human squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36:363-70.
12. Jang MJ, Lee JH, Kim CH. An experimental study on the therapeutic effect of ABNOBAviscum. on oral squamous cell carcinoma xenografted in nude mice. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2003;25:383-97.
 13. Park HK, Kim YK. Making in vivo model to study about human oral cancer (I). *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 1997;19:300-10.
 14. Qiu C, Wu H, He H, Qiu W. 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* 2003;61:696-700.
 15. Lou E, Kellman RM, Hutchison R, Shillitoe EJ. Clinical and pathological features of the murine AT-84 orthotopic model of oral cancer. *Oral Dis* 2003;9:305-12.
 16. Shklar G. Oral cancer: the diagnosis, therapy, management, and rehabilitation of the oral cancer patient. Philadelphia: W.B. Saunders; 1984:138-43.