

huPBMC-SCID Mouse에 이식된 MCF-7 유방암 세포의 성장과 전이

대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실 및 ¹경북대학교 의과대학 병리학교실

박성환 · 최동락 · 박기혁 · 주대현 · 이한일 · 유용운 · 박기호 · 서인수¹

Growth and Metastasis of MCF-7 Breast Cancer Cells Grafted to huPBMC-SCID Mouse

Sung Hwan Park, M.D., Dong Lak Choi, M.D., Ki Hyuk Park, M.D., Dae Hyun Joo, M.D., Han Il Lee, M.D., Yong Oon Yoo, M.D., Ki Ho Park, M.D. and In Soo Suh, M.D.¹

Department of Surgery, School of Medicine, Catholic University of Daegu, ¹Department of Pathology, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: The severe combined immunodeficient (SCID) mice which lack the functional T and B lymphocytes have been widely used for the research of various human diseases including AIDS, transplantation, autoimmune disease and cancer. The purpose of this study was to evaluate the huPBMC-SCID mouse as an animal model for human breast cancer research.

Methods: 5×10^7 human PBMC (peripheral blood mononuclear cell) were injected intraperitoneally in 18 SCID mice. After 24 hours, 2.5×10^6 , 5×10^6 and 10×10^6 MCF-7 human breast cancer cells were inoculated subcutaneously in the right flank of each of the 3 groups of 6 huPBMC-SCID mice.

Results: 4 subcutaneous ecchymosis (2 perioral area, 2 scalp), 1 splenomegaly and 1 hepatic embolism were found during the 20 weeks after the injections. The growth of tumor xenograft was identified in 14 of the total 18 huPBMC-SCID mice, and the growth rate of the tumor was proportional to the number of the inoculated cancer cells. Distant metastases were found in the retroperitoneum, kidney, pelvic cavity, omentum, perisplenic area and regional lymph node in 50 % of mice, but not in the lung and liver at 20 weeks.

Conclusion: In summary, the huPBMC-SCID mouse was expected to play an important roles as an animal model of

human cancers including breast cancer. (Journal of Korean Breast Cancer Society 2002;5:273-278)

Key Words: huPBMC-SCID mouse, MCF-7 breast cancer cell, Metastases, Growth

중심 단어: 면역결핍생쥐, 유방암, 전이, 성장

서 론

암 연구에서 인체 실험은 가장 이상적인 결과를 얻을 수 있는 수단이다. 그러나 인체 실험은 적지 않은 윤리적 및 기술적인 어려움으로 인하여 극히 제한적으로만 가능할 뿐이다. 따라서 인체 내의 여러가지 조건들과 유사한 환경을 제공할 수 있는 우수한 동물 모델의 개발은 인체 실험에서 나타날 수 있는 위험을 줄이고, 암 발생의 생물학적인 과정을 밝히며, 새로운 치료법의 개발에 따른 노력과 비용을 최소화시킬 수 있는 꼭 필요한 방법이다. 그 중에서도 쥐 모델은 암 연구에서 대체하기 어려울 만큼 광범위하게 사용되고 있다. 특히 1962년 흉선이 없는 nude mouse에서 활성화된 T-림프구의 결핍으로 인한 면역 거부 반응의 약화가 알려진 후, nude mouse에 인간의 암 세포나 조직을 이식한 암 연구가 활기를 띠게 되었다. 또한 최근 severe combined immunodeficient (SCID) mouse와 transgenic mouse가 실험에 사용되기 시작한 후에는 한층 더 인체에 가까운 조건에서 쥐 모델을 이용한 세밀하고 구체적인 암 연구가 가능해졌다. SCID mouse는 1983년 Bosma 등(1)이 처음 발견하여 보고하였는데, 이는 생쥐 16번 염색체의 SCID locus에 위치하는 두 대립유전자(allele)들이 유전자 돌연변이 때문에 비활성화되면서 해당 DNA 복구효소(repair enzyme)의 생성 결핍이 나타나고, 그로 인한 B 및 T 림프구 분화 과정의 V-D-J 유전자(gene)들의 재조합 장애 때문에 초래된 것이다.(2-4) 따라서 SCID mouse의 림프구들은 면역 활성이 없는 pro-B cell 및 미숙가슴샘세포(imature thymocyte) 상태로 남게 되며, 성숙한 B 및 T 림프구가 결핍된 SCID mouse는 동종은 물론 이종 조직 이식에도 비교적 약한 거부 반응을 나타내기 때문에 암을 비롯한 선천성 및 후천성 면역결핍증, 감염, 장기 이식 및

책임저자 : 박성환, 대구시 남구 대명동 3056-6
☎ 705-718, 대구가톨릭대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 053-650-4055, Fax: 053-624-7185
E-mail: shwpark@cuth.cataegu.ac.kr
접수일 : 2002년 11월 5일, 게재승인일 : 2002년 12월 20일
본 논문의 주요 내용은 2001년 6월 14일 제3회 Asian Breast Cancer Society Meeting에서 발표되었음.

자가면역질환 등의 연구에 동물모델로서 널리 이용되고 있다. 그러나 림프구를 제외한 골수세포계(myeloid), 적혈구계(erythroid), 항원제시세포(antigen-presenting cell, APC) 및 자연세포독성세포(natural killer, NK cell)에는 영향이 없는 것으로 알려져 있다.(1) athymic nude mouse를 이용한 유방암 연구에서 Taylor-Papadimitriou 등(5)은 estrogen 의존성 성장을 보이는 MCF-7 유방암 세포주의 경우, nude mouse에 이식한 후 hormone implant를 사용할 때에도 human tumor xenograft를 얻기가 어렵다고 하였고, Price와 Zhang 등(6)은 대부분의 인간 유방암 세포주(human breast cancer cell line)들은 nude mouse에서 mouse mammary fatpad를 제외한 다른 부위에서는 잘 자라지 않으며 MDA-MB-435 세포주를 제외한 다른 종류의 인간 유방암 세포주에서는 원격 전이가 매우 낮다고 보고하였다. 암 연구 모델로서 nude mouse의 이러한 특성들은 백혈병, 림프선암 및 골수암 등의 혈액암은 물론 흑색종, 난소암, 폐암, 대장암 및 유방암 등 많은 종류의 인간 암세포나 조직을 이식하였을 때 높은 종양 생착률 및 원격 전이를 나타낸다(7)고 알려진 SCID mouse와 비교하면 큰 결점으로 지적되고 있다.

1988년 Moiser 등(8)은 SCID mouse에 인간말초혈액단핵구(human peripheral blood mononuclear cell, huPBMC)를 복강 내로 투여한 후, mouse에 이식된 인간의 림프구가 수개월 동안 복강 및 말초 림프 조직에 존재함을 보고하였다. 또한 이러한 huPBMC-SCID mouse는 암 연구에서 인간 림프구의 면역 반응을 관찰하는데 nude mouse 등 이미 알려진 다른 모든 생쥐 모델보다 더욱 인체에 가까운 모델이 될 수 있다고 평가되고 있다.(9)

본 연구에서 저자들은 CB17 SCID mouse에 인간말초혈액단핵구(huPBMC)를 이종 이식하여 면역 반응 등의 변화를 관찰하고 또한 이미 다른 종류 인간 암의 동물모델로 사용되고 있는 huPBMC-SCID mouse의 피하에 MCF-7 cell을 이식하여 종양 형성과 성장 및 원격 전이를 조사하였다.

방 법

1) huPBMC 얻는 법

건강한 사람에서 얻은 leukopack 4 cc와 같은 양의 Hank's balanced salt solution (HBSS)을 잘 섞은 후, 50 cc centrifusion tube에 미리 준비해둔 Ficoll-Paque (Sigma, St. Louis, USA)액 12 cc 위에 천천히 올려놓았다. Centrifusion tube는 저속 원심분리기에 넣고 2,000 RPM에서 30분간 원심분리시켰다. 분리된 tube의 상층액을 버린 후 buffy coat layer를 pipet으로 천천히 빨아들여 모았다. 모아진 세포들을 HBSS액으로 2회 세척 후 분리시키고(1,000 RPM, 10분씩) 2 cc의 HBSS에 잘 섞은 후 50 ul을 1 cc Eppendorf tube에 따로 담고 같은 양의 trypan blue액과 섞어서 he-

mocytometer로 세포수와 viability를 확인하였다. 분리된 인간말초혈액단핵구(huPBMC)는 즉시 SCID mouse 한 마리당 5×10^7 cell씩 복강 안으로 주사하였다.

2) MCF-7 준비

유방암 세포주 MCF-7 (ATCC, Manassas, USA)은 fetal bovine serum 10% (Gibco, Rockville, USA), penicillin 및 streptomycin (Sigma, St. Louis, USA) 1%가 되도록 만든 RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA) 배양액이 들어있는 배양 용기에 끌고루 분산시킨 후 5% CO₂ 및 37°C 가슴배양기에서 증식시켰다. 배양 3일째에 MCF-7 cell들은 37°C 0.25% trypsin액으로 처리하고 HBSS액으로 2회 세척한 후 RPMI 1640 배양액에 모았다.

3) SCID mouse 관리

생후 6주 된(몸무게 20 g 정도) female CB17 SCID mouse (Charles River Laboratory, Wilmington, USA)는 외부와 차단된 specific pathogen free (SPF) room, autoclaved microfilter cage에서 키웠으며 autoclaved food pellet 및 ultraviolet irradiated water를 먹였다. 모든 시술은 hepa-filtered lamina flow hood에서 시행하였으며, 실험을 마친 SCID mouse는 methoxyflurane 흡입 마취 후 cervical dislocation을 시행, 조직 및 혈액 샘플을 얻었다.

4) Tumor growth kinetics study

Female CB17 SCID mouse 18마리에 개체당 5×10^7 huPBMC를 복강 내 주사했다. 24시간 지난 후 6마리씩 3군으로 나누고 tuberculin syringe를 사용하여 0.2 cc RPMI 1640 medium에 넣은 2.5×10^6 , 5×10^6 , 10×10^6 MCF-7 cell을 1, 2, 3군 각각의 SCID mouse 오른쪽 옆구리 피하조직에 주사하여 이식하였다. Vernier caliper로 매주 종양 크기를 측정하였으며, 실험 20주에 SCID mouse를 모두 희생시켜 조직 샘플을 얻고 종양 전이를 확인하였다. 종양용적(tumor volume) 계산은 $\text{넓이}^2 \times \text{길이} / 2$ (mm³)의 공식을 사용하였다.(11)

5) 통계 검정

통계 처리는 SPSS 9.0 version을 이용한 two-way ANOVA test를 실시하여 통계적 유의성을 검정하였다.

결 과

MCF-7 cell을 이식한 3개 군 각 6마리씩 huPBMC-SCID mice 중 1군(2.5×10^6 MCF-7 cell 이식)에서 5마리, 2군(5×10^6 MCF-7 cell 이식)에서 5마리, 3군(10×10^6 MCF-7 cell 이식)에서 4마리 등 전체 14마리(78%)에서 종양이 자랐다. 종양이 자란 14마리 중 제 7주에 1군에서 폐렴으로 1마리

가 죽고, 제 15주에 2군에서 원인미상으로 1마리가 죽어
서, 전체 18마리 중 종양성장이 확인되고 20주의 실험을
마친 것은 모두 12마리였다. 또한 전체 18마리 중 종양이
자라지 않은 4마리에서 제 14주에 2군 1마리가 hepatic
embolism with hepatomegaly로, 제 10주에 3군 1마리가 폐
렴으로 죽었다. 그 외 4마리(22%)에서 피하 반상출혈
(perioral ecchymosis 2, scalp ecchymosis 2)이 관찰되었고
또 다른 1마리에서 비장종대(splenomegaly)가 나타났다.

huPBMC-SCID mouse의 우측 옆구리 피하에 이식된
MCF-7 cell mass의 성장은 2 및 3군의 경우 이식 3주, 1군
의 경우 이식 5주 후부터 피하결절로 만져졌다. huPBMC-
SCID mouse 각 개체의 종양 성장속도는 다양하게 나타났
으며, 각 군 평균 종양부피의 증가는 이식된 MCF-7 cell

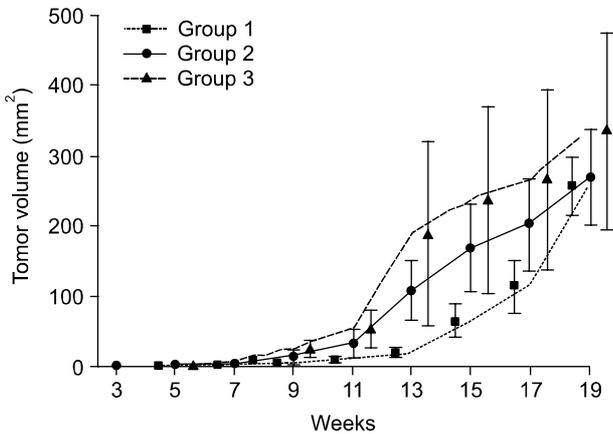


Fig. 1. The mean growth curves of MCF-7 cancer mass (mm³ in volume) in 3 huPBMC-SCID mice groups are shown. Group 1 = 2.5×10⁶ MCF-7 cells injected; Group 2 = 5×10⁶ MCF-7 cells injected; Group 3 = 10×10⁶ MCF-7 cells injected.

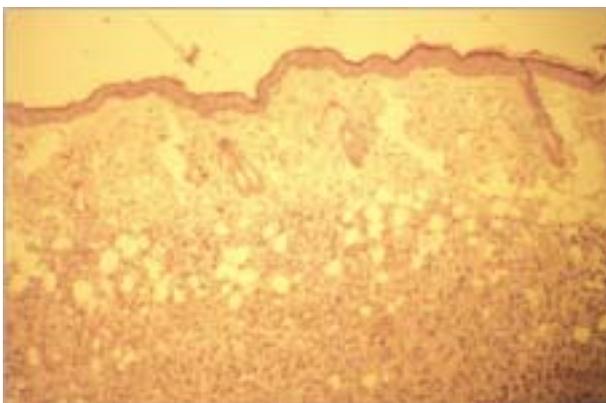


Fig. 2. The MCF-7 cancer cells grew in the right flank of huPBMC-SCID mouse (H & E staining, ×100).

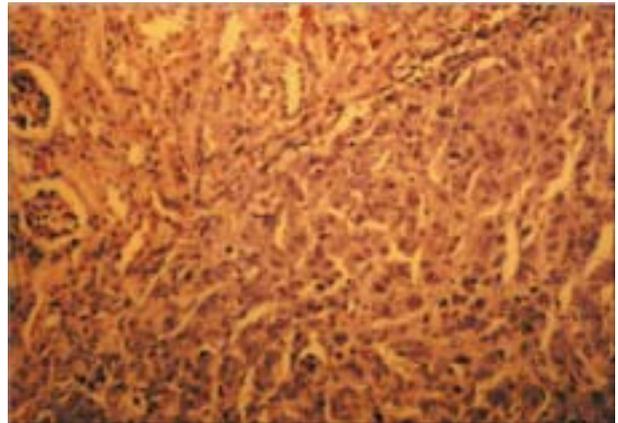


Fig. 3. The MCF-7 cancer cells metastasized to the kidney of huPBMC-SCID mouse(H & E staining, ×400).

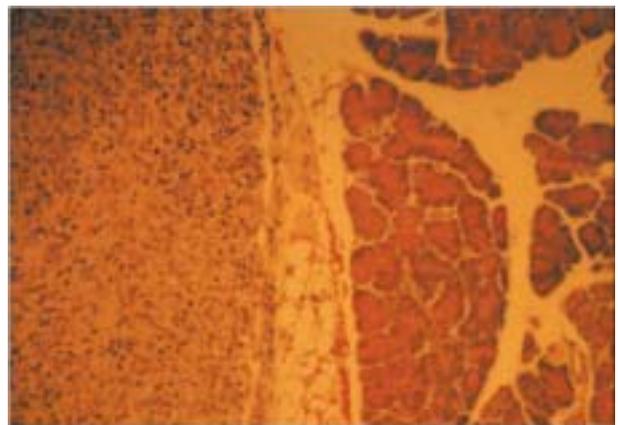


Fig. 4. The MCF-7 cancer cells metastasized to the tail of the pancreas of huPBMC-SCID mouse (H & E staining, ×200).

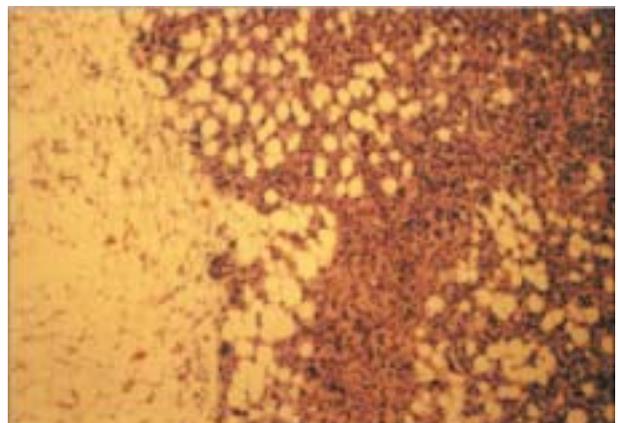


Fig. 5. The MCF-7 cancer cells metastasized to the omentum of huPBMC-SCID mouse (H & E staining, ×200).

Table 1. Location of distant metastasis.

Distant metastatic sites	No. of SCID mouse
Retroperitoneum	8
Kidney	2
Pelvic cavity	2
Perisplenic area	1
Peritoneum	1
Omentum	1
Regional lymph nodes	1

mass의 양에 따라 비례하는 성장속도를 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P > 0.01$)(Fig. 1).

종양이 자란 14마리 중 1군에서 2마리, 2군에서 3마리, 3군에서 2마리 등 전체 7마리(50%)에서 원격 전이가 확인되었다. 또한 피하 이식부위에 종양이 자라지 않은 1군 1마리에서 후복강 전이가 확인되었다. 원격 전이가 나타난 부위는 이식 부위에 종양이 자라면서 원격 전이가 확인된 7예와 피하 이식 부위의 종양이 확인되지 않은 1예를 합쳐 후복강이 8예로 가장 많았으며, 신장 2예, 골반강 2예 등의 순서였으나 간과 폐의 전이는 발견되지 않았다(Table 1, Fig. 2~5).

고 찰

SCID mouse에서는 DNA dependent protein kinase (P^{350}) catalytic subunit gene의 동형 접합성 돌연변이로 인하여 DNA double strand repair defect와 V-(D)-J gene recombination defect가 나타나고 혈중 P^{350} 농도도 감소된다.(2-4) 기능적으로는 이온화방사선(ionizing radiation)에 대한 과민성(hypersensitivity)이 관찰되고, T와 B 림프구의 면역활동 장애를 동반한다.(10) 이러한 특성으로 인해 SCID mouse는 동종은 물론 이종간 암세포 및 조직 이식에도 비교적 약한 거부 반응을 나타낸다. 인간의 T 및 B 림프구를 이식받은 huPBMC-SCID mouse는 면역용혈성빈혈(immune hemolytic anemia), 소화기계질환, 피부염, 비장비대, 간질환, graft versus host disease (GVHD), host versus graft disease (HVGD), EBV-induced B-cell lymphoma, 급사 등이 나타날 수 있다(9)고 알려져 있다. 또한 5% 이하의 SCID mouse에서는 생쥐림프구의 기능 회복이 나타날 수 있으며 (leaky SCID mouse), 이런 경우에는 huPBMC-SCID mouse에서 GVHD가 나타날 가능성이 높은 것으로 보고되었다.(11)

본 연구에서는 인간말초혈액단핵구(human PBMC) 5×10^7 cell씩을 복강 이식한 후 20주간 관찰한 18마리의 huPBMC-SCID mouse에서 피하 반상출혈 4예(22%, 입 주위 및 두피하 반상출혈 각 2예씩)가 확인되었으며 비장비

대 및 간색전증이 각 1예씩 등의 이식에 따른 면역 반응이 나타났다. 또한 전체 18마리 중 폐렴으로 인한 2예의 개체 손실이 발생하여 SCID mouse가 감염에는 매우 취약함이 확인되었다. 그러나 감염으로 인한 실험 개체의 손실과 huPBMC의 이식에 따른 면역 거부반응은 실험의 신뢰성을 크게 손상할 정도는 아니었다.

SCID mouse 복강으로 주입한 인간의 T 및 B 림프구는 복강 및 말초 림프조직에 수개월 이상 머무를 수 있으며, 복강 주입 2년 후에도 혈중 human immunoglobulin을 검출할 수 있다고 알려져 있다.(12) 복강으로 주입한 huPBMC의 생착 정도는 공여자, SCID mouse 자체의 면역활성 정도 및 실험자 등에 따라 상당한 차이를 나타내므로 서로 다른 실험자가 생착 정도를 비교하기 위한 표준화 등에는 많은 어려움이 있다고 보고되었다.(13) 본 연구에서는 SCID mouse 1마리에 5×10^7 huPBMC를 복강 내로 투여하였는데, William 등(9)은 성공적인 인간 림프구의 생착을 위해서는 SCID mouse 1마리에 최소 2×10^7 huPBMC를 복강으로 투여할 것을 제안하고 있다.

호르몬의존성 성장을 나타내는 MCF-7 세포주는 nude mouse에서 17-estradiol pellet을 피하 매식하여 투여하면 더 빨리 성장하는 것으로 알려져 있다.(14) 본 연구에서 SCID mouse의 우측 옆구리 피하에 이식한 MCF-7 cell은 호르몬 투여 없이도 78%의 높은 종양 생착률을 얻었다. 그러나 MCF-7 cell을 이식한 SCID mouse에서 estrogen을 투여하면 종양 성장 속도가 빨라져서 실험 소요기간을 줄일 수 있을 것으로 생각한다. 생착된 MCF-7 tumor xenograft는 이식된 종양 세포 수의 크기에 비례하는 평균 종양부피의 증가를 보였으나 통계적 유의성은 없었다($P > 0.01$).

난소암의 경우, Ward 등(15)은 nude mouse의 복강 내에 이식하였을 때 난소암의 원격 전이를 관찰할 수 없다고 하였으나, Yan 등(16)은 SCID mouse의 복강 내 이식 후 복벽, 대망, 횡경막 및 간 등에 광범위한 전이를 보고하였다. 또한 Xie 등(17)의 발표에 따르면 방광암, 대장암 및 흑색종을 이식한 경우 SCID mouse (96%)에서 nude mouse (27%)보다 높은 원격 전이율을 보였다. 이상의 보고에서 SCID mouse에서는 nude mouse 보다 더 심한 면역 결핍으로 인하여 더욱 활발하게 인간 암세포의 성장과 원격 전이가 일어나는 것으로 생각하였으며, 따라서 종양연구동물모델(human tumor animal model)로서 SCID mouse는 nude mouse 보다 종양세포 이식 실험에서 인체 반응에 더 가까운 조건들을 비교적 쉽게 제공할 수 있을 것으로 생각하였다. 본 연구에서는 이식 부위에 종양이 자란 14마리 중 7마리(50%)에서 후복강, 신장 및 골반강 등에 원격 전이가 나타났으며, 또한 이식 부위에 종양이 나타나지 않은 1예에서 후복강 미세 전이가 확인되었다. 그러나 이식된 MCF-7 종양 세포 수의 크기에 따른 각 군 사이의 원격 전이율의 차이는 확인할 수 없었다.

인간 암세포의 성장을 관찰하는 모델로서 huPBMC-SCID mouse의 가장 큰 문제점은 인간 림프구 생착의 정도, SCID mouse 각 개체의 인간 암세포에 대한 생쥐자연 세포독성세포(murine NK cell) 등의 면역 반응 정도, 전반적인 DNA repair pathway defect에 의한 SCID mouse 자체의 유전적 및 기능적 불안정성 등으로 인한 실험 결과의 심한 기복과 재현성 부족 등이 지적되고 있다.(9,18) 본 연구에서도 이식된 종양 세포 수의 크기와 관계없이 SCID mouse 개체에 이식된 각 MCF-7 xenograft의 성장 속도는 큰 편차를 보였다. 따라서 huPBMC-SCID mouse에서 특정 암세포의 성장 속도만을 비교하는 것은 실험에 참여하는 SCID mouse의 개체 수가 적을 경우, 잘못된 해석을 초래할 가능성이 있을 것으로 생각하였다. 또한 특정 항암 치료법의 효과 관점에서 가장 중요한 요소가 종양 성장 억제 정도임을 고려할 때, huPBMC-SCID mouse 실험에서 종양 성장 속도의 일관성 결여는 큰 단점으로 생각하였다. SCID mouse에서 비교적 정상적인 기능을 유지하고 있다고 알려져 있는 생쥐자연세포독성세포(murine NK cell)는 면역 감시는 물론 인간 림프구의 생착을 억제하며, 또한 이식된 인간 종양세포에 대해서도 증식 및 원격 전이를 억제하는 것으로 보고되었다.(19) 방사선 조사 또는 anti-asialo GM1 antibody (murine NK cell antibody) 투여 등으로 NK cell을 제거하면, 인간 림프구 생착이 증가하고 종양세포의 성장이 빨라지며, 종양 성장 속도 차이의 재현성 부족을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

결 론

건강한 사람의 PBMC 5×10^7 을 복강 투여한 female CB17 SCID mouse의 우측 옆구리 피하에 MCF-7 cell을 이식한 huPBMC-SCID mouse 18예의 면역반응 관찰에서 피하출혈 4예(22%), 비장종대 및 간색전증 각 1예가 확인되었다. 전체 18예 중 14예(78%)에서 종양의 성장을 확인할 수 있었으며, 9예에서 후복강, 신장, 골반강, 대망, 복막, 비장주위 및 국소 림프절로의 전이를 관찰하였다.

감사의 글

이 연구를 위해 도와주신 UCLA Breast Center의 Helena R. Chang 및 Jianbo He에게 감사드립니다.

REFERENCES

- 1) Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-30.
- 2) Schuler W, Weiler IJ, Schuler A, Phillips RA, Rosenberg N,

- Mak TW, et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immuno-deficiency. *Cell* 1986;46:963-9.
- 3) Malynn BA, Blackwell TK, Fulop GM, Rathburn GA, Furley AJ, Ferrier P, et al. The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. *Cell* 1988;54:453-7.
- 4) Fulop GM, Phillips RA. The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 1990;347:479-83.
- 5) Taylor-Papadimitriou J, Berdichevsky F, D'Souza B, Burchell J. Human models for breast cancer. *Cancer Surveys* 1993;16:59-62.
- 6) Price JE, Zhang RD. Studies of human breast cancer metastasis using nude mice. *Cancer Metastasis Rev* 1990;8(4):285-97.
- 7) Gillian DP, Charles WT, Rebecca AC, Marialouisa HA, Robert TD, Cynthia SJ, et al. Human tumor model in severe combined immune deficient (scid) mouse. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:209-14.
- 8) Moiser DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 1988;335:256-9.
- 9) William JM, Dennis DT, Dan LL. The huPBL-SCID mouse as a mean to examine human immune function in vivo. *Immunology* 1996;8:223-41.
- 10) Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID mouse defect. *Science* 1995;267(5201):1178-83.
- 11) John FR, Zhonghua L, Marnix DR, Anupam AD, Nancy LA. Scid mouse as a model for transplantation studies. *J Surg Research* 1996;65:34-41.
- 12) Duchosal MA, Eming SA, McConahey PJ, Dixon FJ. The hu-PBL-SCID mouse model; Long-term human serologic evolution associated with the xenogeneic transfer of human peripheral blood leukocytes into SCID mouse. *Cell Immunol* 1992;139(2):468-77.
- 13) Steinsvik TE, Gaarder PI, Aaberge IS, Lovik M. Engraftment and humoral immunity in SCID and RAG-2-deficient mice transplanted with human peripheral blood lymphocytes. *Scand J Immunol* 1995;42:607-16.
- 14) Clarke R, Brunner N, Katzenellenbogen BS, Thompson EW, Norman MJ, Koppi C, et al. Progression of human breast cancer cells from hormone-dependent to hormone-independent growth both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(10):3649-51.
- 15) Ward BG, Wallace K, Shepherd JH, Balkwill FR. Intra-peritoneal xenografts of human epithelial ovarian cancer in nude mouse. *Cancer Research* 1987;47:2662-5.
- 16) Yan X, David FS, Ning PY, Ezogelin O, Ronald EH, M Stein P, et al. Characterization of human ovarian carcinomas in a SCID mouse model. *Gyneco Oncol* 1999;72:161-70.
- 17) Xie X, Brunner N, Jensen G, Albrechtsen J, Gotthardsen B,

- Rygaard J. Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin Exp Metastasis* 1992;10:201-10.
- 18) Hendrickson EA. The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993; 143(6):1511-22.
- 19) Theresa LW, Ronald BH. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current Opinion of Immunology* 1995;7:704-10.
-