

악성 연골종세포의 기본배양법에 관한 연구

서울대학교 의과대학 정형외과학교실

성상철 · 석세일 · 최인호 · 이지호 · 노상권

=Abstract=

Study on Basic Culture Method of Tumor Chondrocytes

Sang Cheol Seong, M.D., Se Il Suk, M.D., In Ho Choi, M.D., Ji Ho Lee, M.D.
and Sang Gweon Roe, M.D.

*Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, Seoul National University,
Seoul, Korea*

In vivo and in vitro culture of rat tumor chondrocytes is a good culture model for physiologic, pathologic and biochemical studies of tumor chondrocytes. Human tumor chondrocyte culture is another method, but it is difficult to maintain a cell line and in vivo culture. So called, Swarm Rat Chondrosarcoma, which was developed spontaneously in a Sprague-Dawley rat and maintained by Dr. R. Swarm, can be cultured in vivo and in vitro at the same time.

It is easy to maintain Swarm Rat Chondrosarcoma and is said that there are nearly no notable changes in cellular characteristics during consecutive cultures.

In this study, in order to establish the basic culture method of rat tumor chondrocytes, the inoculated tumor mass were studied with swarm rat chondrosarcoma cell line which had been preserved at Orthopedic Research Laboratory of the Massachusetts General Hospital.

In vivo culture, injection of digested 1×10^6 cells, 1×10^7 cells and direct inoculation of tumor of mass were done at each 10 Sprague-Dawley rats group and examination was done at postinoculation 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 weeks.

In vitro culture, 1×10^6 /ml, 2×10^6 /ml and 4×10^6 /ml concentration cell suspensions were plated at 96-well-plate and observed at 2, 3, 4 and 5 days with inverted microscope.

The results of this study are as follows.

1. In vivo culture, the best result was observed at direct inoculation of tumor fragments among 1×10^6 cells, 1×10^7 cells and direct tumor fragments inoculation.
2. The ideal time of obtaining tumor mass growing in rats is between 4 to 6 weeks after inoculation.
3. In vitro culture, the proper cell density in 96-well-plate was 1×10^6 /ml among 1×10^6 /ml, 2×10^6 /ml and 4×10^6 /ml.

Key Words : Swarm rat chondrosarcoma, In vivo culture, In vitro culture.

서론

악성 연골종 세포의 생체내(in vivo) 또는 시험관내(in vitro) 배양은 악성 연골종 세포의 생리학적, 병리학적 및 생화학적 연구 수행의 좋은 모델이 되고 있다^{1,6,8)}.

Sprague-Dawley종 쥐에서 자연 발생하여 Swarm에 의해 발견된 후, 계대배양되어 온 소위 Swarm Rat Chondrosarcoma²⁾는 생체내³⁾ 및 시험관내 배양⁷⁾이 동시에 가능하며, 계대배양이 용이하고, 계대배양에 따른 세포의 변화가 거의 없는 것으로 알려져서 악성 연골종 세포의 배양을 토대로 한 많은 연구에 이용되고 있다⁵⁾.

Swarm Rat Chondrosarcoma의 배양에 이용되는 세포주(cell line)는 대체로 Swarm 자신이 계대배양중인 종양의 일부를 기증받아서 배양하거나, 또는 그 종양을 계속 쥐에서 생체배양해 나가면서 사용하는 두가지 방법이 있다.

저자들은 미국 보스턴 소재 Massachusetts General Hospital의 정형외과 연구실에서 영하 70°C로 냉동 보관중이던 Swarm Rat Chondrosarcoma cell line을 분양받아, 1987년 1월부터 Sprague-Dawley종 쥐에 생체내 배양하고 96-well-plate에 시험관내 배양하여, 생체 및 plate에 주입한 종양세포 수에 따른 종양세포 성장 상태를 관찰하여 생체내 및 시험관내 배양시 적당한 주입 종양세포수 및 생체내 배양후 종양 채취시기를 알 수 있었다. 이에 악성 연골종 세포 연구의 기본이 되는 배양법의 경험을 소개하고자 한다.

연구 목적

본 연구의 목적은 Swarm Rat Chondrosarcoma세포주를 이용한 악성 연골종 세포의 배양에 있어 생체내 배양의 이상적인 주입조건, 생체내 배양후 종양 채취 시기 및 시험관내 배양에 적합한 plating cell number를 알아 악성 연골종 세포 연구의 기본이 되는 배양법을 정립함에 있다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

상기한 Swarm Rat Chondrosarcoma를 서울

대학교 실험동물 사육장에서 들어온 Sprague-Dawley종 쥐에 생체 배양하였으며, 시험관내 배양에 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 미국 New York소재 Gibco사)이며 이외의 재료로 96-well-plate(덴마크 Nunc사), PBS(Phosphate Buffered Saline, 저자 제조), FCS(Fetal Calf Serum, Gibco사), Collagenase(미국 Sigma사) 및 Haemacytometer(독일 Superior사)등이 사용되었다.

2. 실험방법

(1) 생체내 배양을 위한 비교실험

가장 바람직한 생체내 배양법을 결정하고자 다음과 같은 세가지 방법을 사용하여 비교하였다.

1) 세포수 1×10^6 부유액의 주입

연골육종을 10% Betadine용액에 담갔다가 꺼낸 후 소독된 PBS(Phosphate Buffered Saline) 용액으로 두번 세척한 후 섬유성 조직을 가능한 한 깨끗이 제거하고 $3 \sim 5 \text{mm}^3$ 의 크기로 잘게 썬다. 이때 5% Fetal Calf Serum을 함유한 DMEM 속에서 dice하여 종양이 건조하게 되거나 세포가 죽지 않도록 유의한다. 얇고 작은 조각이 된 종양을 0.09% Collagenase와 5% Fetal Calf Serum을 함유한 DMEM에 넣어 CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air, 37°C)⁹⁾내에서 약 2시간 동안 digest하여 연골세포를 분리해 낸다. 세포 부유액을 125 μ 크기의 여과기를 거치게한 뒤 750~800 rpm으로 약 5분간 원심분리시켜서 Collagenase를 포함한 상층액을 흡인해내고 10% Fetal Calf Serum을 함유한 DMEM으로 다시 세포 부유액을 만들어 세포수를 1cc에 4×10^6 이 되게 한다. 이때 세포의 농도는 Haemacytometer에 의해 측정했으며, 세포 부유액을 만드는 과정에서 세포의 생존율이 85~90%가 되도록 하였고 이를 확인하기 위하여 0.4% trypan blue를 이용한 색소배제법(dye exclusion method)을 사용하였다. 이 세포부유액 0.25cc(세포수 1×10^6)를 1cc 용량 tuberculin syringe를 이용하여 실험대상 쥐 10마리의 양쪽 flank에 피하 주사한다.

2) 세포수 1×10^7 부유액의 주입

1)과 같은 방법으로 세포수만 4×10^7 이 되게 하여 0.25cc(세포수 1×10^7)를 10마리 쥐의 양쪽 flank에 피하주사 한다.

3) 연골육종을 직접주입

연골육종을 잘게 썰어 주사바늘을 제거한 tuberculin syringe로 연골육종 조각을 직접 흡인

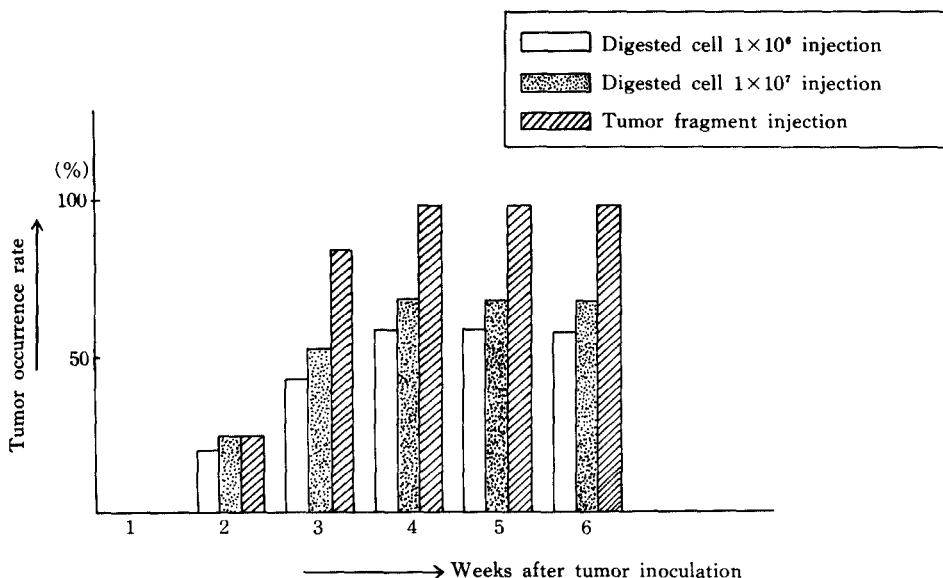


Fig. 1. Occurrence rate of chondrosarcoma after subcutaneous inoculation.

하여 약 0.2cc가 되게 한 후 15gauge 또는 17 gauge 바늘을 연결하여 10마리 쥐의 양쪽 flank에 피하 주사한다.

생체내 배양법의 결과 피하 주사후 2주째 부터 주사부위의 종양 발생유무를 촉지 관찰하였으며 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 및 8주째의 종양 발현빈도를 조사하였다.

*생체내 배양 후 시험관내 배양을 위한 종양 채취시기의 선택을 위한 실험

연골육종 세포를 10마리의 쥐에서 양쪽 flank에 피하 주사하여 종양을 발현시켰으며, 4주째 부터 이들 간격으로 종양을 촉지하여 종양내 실질의 연화(softening), 출혈 또는 피부의 괴사를 종양괴사의 징후로 판단하여 4주, 5주, 6주, 7주 및 8주에서의 종양 괴사율을 조사하였으며 종양을 적출하여 절단해 가면서 종양실질의 연화, 출혈유무를 확인하였다.

2. 시험관내 배양시 적정 세포수 결정을 위한 실험

본 실험에서 사용된 96-well-plate에 심을 적정 세포수를 결정하기 위하여 ml당 세포수 1×10^6 , 2×10^6 및 4×10^6 의 세 종류를 비교하였으며 배양시 well당 용적은 200ul로 하였다.

1) 제 1일 : 적절한 크기의 종양을 보이는 쥐를 ether로 마취하여 희생시킨 후 무균조작하에

Fig. 2. Tumor growth(➡) at the 4th weeks after inoculation.

Fig. 3. Skin necrosis(➡) over tumor over-growth is a predilection site for secondary infection.

Table 1. Percentage of gross tumor necrosis

Weeks after tumor inoculation	Necrosis rate (%)
5	2/46 (4.3)
6	9/46 (19.6)
7	24/46 (52.2)
8	36/42*(85.7)

*Two rats with four tumor growths were dead during experiment.

서 종양을 적출한 뒤, 적출된 연골육종을 생체 내 배양시와 같은 방법을 사용하여 $1 \times 10^6/\text{ml}$, $2 \times 10^6/\text{ml}$ 및 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 세 농도의 세포 부유액으로 만들어, 96-well-plate에 각기 종류대로 48well에 200ul씩 심는다. 세포가 배양 plate의 벽에 부착되도록 18~20시간 동안 건드리지 말

Fig. 4. Clean monolayer cell attachment at the second day at the plated cell concentration of $1 \times 10^6/\text{ml}(\times 100)$.

고 CO_2 incubator내에 보관한다.

2) 제 2일 : 소독된 DMEM으로 두번 세척하고 penicillin 100u/ml와 streptomycin 100ug/ml를 함유한 DMEM을 200ul 넣는다 그리고 연골세포의 부착정도를 도립현미경(inverted microscope)으로 관찰 비교한다.

3) 제 3일, 제 4일 및 제 5일 : 24시간 마다 DMEM을 갈아주면서 단층세포배양(monolayer cell culture)의 형태, 세포 괴사 및 부유세포의 유무를 관찰하여 48well씩 심은 세가지 세포 농도의 plate에서 배양세포를 상호 비교 관찰한다.

* 통계학적 방법

통계학적 방법으로는 생체내 배양시 주입농도 및 방법에 따른 종양 발현율의 비교를 위해 X^2 -test와 Fisher의 exact method를 종양 괴사율에 따른 주입 종양의 적정 채취 시기 결정시에는 McNemar test와 Fisher의 exact method를 사용하였다.

결 과

1. 생체내 배양을 위한 비교실험

1) 주입후 2주

1×10^6 세포수의 주입군에서 20주입장소 중 4장소에서 작은 종양이 촉진되었으며, 1×10^7 주입군에서는 20장소 중 5장소에서, 종양 직접 주입군에서는 20장소 중 5장소에서 종양이 촉진되었다.

2) 주입후 3주

1×10^6 세포수의 주입군에서 20주입장소 중 9

Fig. 5. Well maintained chondrocyte culture on 4th day (A) and 5th day (B) after beginning of in vitro culture by cell concentration of $1 \times 10^6/\text{ml}(\times 100)$.

Fig. 6. Multiple layers of chondrocytes are shown on the second day of the plated cell concentration of $2 \times 10^6/\text{ml} (\times 100)$.

Fig. 8. Cell boundaries of chondrocytes are indistinguishable on the second day at the plated cell concentration of $4 \times 10^6/\text{ml} (\times 100)$.

Fig. 7. Dead chondrocytes are floating on the 5th day at the plated cell concentration of $2 \times 10^6/\text{ml} (\times 100)$.

Fig. 9. Only few chondrocytes are visible on the 5th day at the plated cell concentration of $4 \times 10^6/\text{ml} (\times 100)$.

장소에서, 1×10^7 주입군에서는 20장소 중 11장소에서, 종양 직접 주입군에서 20장소 중 17장소에서 종양이 축지되었다(Fig. 1).

3) 주입후 4주

1×10^6 주입군에서 20장소 중 12장소에서, 1×10^7 주입군에서는 20장소 중 14장소에서, 종양 직접 주입군에서는 20장소 전체에서 종양이 축지되었다(Fig. 2).

4) 주입후 5주

4주째와 같은 결과를 보였으나 각기 종양의 크기는 상당히 증가되었다. 2례에서는 종양의 육안적 괴사소견이 관찰되었다.

5) 주입후 6주

종양은 직경 3~6cm 크기로 자랐으며, 종양이 발생한 46장소를 관찰할 결과 9장소에서(19.6%) 종양의 육안적 괴사소견이 관찰되었다(Fig. 3).

6) 주입후 7주

종양의 육안적 괴사 발생율은 52.2%(26/46)로 증가되었으며 실험대상 쥐들의 운동성이 현저히 저하되어 있었다.

7) 주입후 8주

발현된 종양의 85.7%(36/42, 4장소를 가진 2마리는 실험도중 죽음)에서 육안적 괴사가 관찰되었다(Table 1).

2. 시험관내 배양시 적정 세포수 결정을 위한 실험

96-well-plate에 심은 연골세포를 제 2, 3, 4 및 5일에 도립현미경을 이용하여 관찰한 결과는 다음과 같다.

1) 배양 세포수 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 군

제 2일에 깨끗한 단층 세포부착(monolayer

cell attachment)을 나타내었으며(Fig. 4), 이러한 소견은 제 3, 4 및 5일까지도 계속되었다. (Fig. 5-A, B). 그러나 제 3일째에는 연골세포 사이사이로 섬유아세포의 출현이 관찰되었으며 점차 그 숫자가 조금씩 증가되는 추세를 보였다.

2) 배양 세포수 2×10^6 군

제 2일째에 부분적으로 세포가 배양기의 벽에 부착되었으나 세포가 과밀집되어 있는 소견을 보였다(Fig. 6).

제 3일째에 상당부분의 세포가 부유하고 있었으며 여전히 세포의 과밀집을 보여 세포 하나하나의 구분이 뚜렷하지 않았고, 제 5일째에는 많은 세포들이 부유하고 있어 세포의 괴사소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

3) 배양 세포수 4×10^6 군

제 2일째에 세포의 과밀집 소견을 보였으며 세포 하나하나의 범위를 전혀 구분할 수 없었다(Fig. 8). 제 4일째에는 거의 대부분의 세포가 부유, 괴사에 빠졌으며 건강한 연골세포로 판단되는 세포를 찾기가 어려웠다(Fig. 9).

고 찰

Swarm Rat Chondrosarcoma의 시험관내 배양은 생체내 배양으로부터 출발되며, 생체내 배양에서 양질의 연골육종을 얻는 것이 필수적인 선행조건이다.

종양의 채취시기는 보고에 따라 다소 차이가 있지만 대체로 종양 주입 후 5~7주로 잡고 있다^{7,9)}. 저자들은 종양 주입 후 6주에 이미 육안적 괴사소견이 20%에 달해 종양괴사율의 의미 있는 증가를 보여 6주부터는 종양 채취시기로 적당치 않을 것으로 보여 채취시기를 4~6주로 하는 편이 좋을 것으로 판단하였다($p < 0.05$).

생체내 주입방법도 문헌에 자세히 보고되어 있지는 않으나 Collagenase 또는 trypsin으로 세포를 분리한 후 일정 수의 세포부유액을 만들어 주입하는 방법이 종양조직을 잘게 썰어 직접 주입하는 것보다 성공율이 낮아 후자의 방법을 택하는 것이 좋을 것으로 생각되었다($p < 0.05$).

Swarm 자신은 15gauge trocar를 이용하여 작은 종양 절편을 피하에 주입한다고 하였는데 이는 저자들이 사용한 tuberculin 주사기에 15gauge 바늘을 연결해서 주입하는 것과 유사한 방법이라 하겠다¹⁰⁾.

악성 연골종 세포의 시험관내 배양은 쉬운 조

작만은 아니어서 우선 0.4% Trypan blue를 이용한 색소배제법에 의해 세포 생존율을 90%선으로 끌어 올리는 것이 가장 선행되어야 할 문제이다⁷⁾. 또한 세포배양 도중의 오염(contamination)을 방지하기 위하여 항상 조심해야 하며 배양 시작 후 제 5~6일까지 건강한 연골세포를 유지하는 것이 배양을 토대로 하는 모든 실험조작의 필수 요건이다. 아주 짧은 기간동안 연골세포 배양을 유지하는 경우에는 꼭 필요하지 않겠으나, 통상적으로 penicillin(100u/ml)과 Streptomycin(100ug/ml)등의 항생제를 혼합하는 것이 좋다¹⁴⁾.

본 실험에서 언급되지 않았으나 연골세포의 배양을 위한 배지는 DMEM을 비롯하여 MCDB-100series(HAM), Nutrient Mixture F-12등이 상품화되어 있어 모두 사용 가능할 것으로 생각된다. DMEM에 Bes, Tes, Hepes등의 buffer를 넣어 pH를 7.2로 만들어 사용하였다⁹⁾.

시험관내 배양을 위하여 연골육종을 적출하여 섬유성 조직을 제거하고 잘게썰는 과정에서 너무 오랜 시간을 소모하는 것은 세포 생존을 위하여 바람직하지 않으며 세포 부유액을 만들 때나 희석할 때에도 가급적 충격을 덜 주는 것이 유리하다. 본 실험에서도 같은 조작을 수 없이 되풀이하여 가장 이상적인 조건을 얻고나서 실험에 임하였다. 단층세포배양을 위하여 세포를 배양기에 심을 때의 적정 세포수는 사실 plate의 크기에 관계되는 것이어서 본 실험을 모든 경우에 적용할 수는 없다. 예를들어 48-well-plate와 35mm크기의 plate는 그 용량부터가 달라 상황에 따라 세포수를 달리해야 될 것이다.

저자들의 경우 96-well-plate를 위한 적정 세포농도를 실험에 의해 1×10^6 /ml로 결정하였으며 24-well-plate라면 표준 용량에 맞추어 산출 가능할 것으로 생각된다.

한가지 해결되어야 할 문제는 배양도중에 섬유아세포들이 출현하는 것이며 그 비율이 비록 높지 않았다고는 하나 연골세포의 병리학적 및 생화학적 성상에 인자로 작용될 것으로 추정된다. 이 문제는 계속적인 배양에 따른 변화 또는 배양 초기에 존재한 섬유아세포의 증식으로 설명이 될 지도 모르는 일이나 아직은 숙제로 남아 있는 현상이라 하겠다.

악성 연골종 세포 배양법의 확립은 정상 연골 세포 배양을 위한 전단계일 수 있으며 각종 연골세포의 생리학적 연구를 위한 좋은 모델이 될

수 있다. 이런 점에서 Swarm Rat Chondrosarcoma는 동물실험을 통한 정형외과 영역의 중앙 연구에 있어 이상적인 연구재료가 될 것이며 다른 육종세포의 배양법과 아울러 연구가치가 충분한 분야가 될 것으로 믿는 바이다.

결 론

Sprague-Dawley종 쥐를 이용한 Swarm Rat Chondrosarcoma 연골세포의 기본 배양법에 대한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 생체내 배양을 위하여 연골세포를 주입할 때, 1×10^6 , 1×10^7 세포 및 종양 직접 주입군 중 잘게 썰은 종양조직을 직접 피하에 주입하는 군이 가장 좋은 결과를 나타내었다($p < 0.05$).
2. 생체에서 발현된 종양조직의 채취시기는 주입 후 4~6주 사이가 가장 이상적이며($p < 0.05$), 6주부터는 종양의 육안적 괴사 빈도가 높아진 것으로 관찰되었다.
3. 시험관내 배양시 96-well-plate를 사용하는 경우 $1 \times 10^6/\text{ml}$, $2 \times 10^6/\text{ml}$ 및 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 중 적정 세포농도는 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 이었다.

REFERENCES

- 1) Bembenek, M.E. and Liberti, J.P.: *The Anabolic effects of insulin on Type II collagen Synthesis of Swarm Rat Chondrosarcoma Chondrocytes. Arct of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 233, No. 1: 203-211, 1984.
- 2) Choi, H.U., Meyer, K. and Swarm, R.: *Mucopolysaccharide and Protein-Polysaccharide of a Transplantable Rat Chondrosarcoma. Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 68: 877-879, 1971.
- 3) Faltz, L.L., Reddi, A.H., Hascall, G.K., Martin, D., Pita, J.C. and Hascall, V.C.: *Characteristics of Proteoglycans extracted from the Swarm Rat Chondrosarcoma with Associative Solvents. J. Biol. Chem.* Vol. 254, No. 4: 1375-1380, 1979.
- 4) Handley, C.J., Bateman, J.F., Oakes, B.W. and Lowther, D.A.: *Acta. Biochem. Biophys.* Vol. 386: 444-450, 1975.
- 5) Hascall, G.K. and Kimura, J.H.: *The Ultrastructure of Cultures from the Swarm Rat Chondrosarcoma. The Anatomical Record*, Vol. 200: 287-292, 1981.
- 6) Kimura, J.H., Hardingham, T.E. and Hascall, V.C.: *Assembly of Newly Synthesized proteoglycan and Link Protein into Aggregates in Cultures of Chondrosarcoma Chondrocytes. J. of Biological Chemistry*, Vol. 255, No. 15: 7134-7143, 1980.
- 7) Kimura, J.H., Hardingham, T.E., Hascall, V.C. and Solursh, M.: *Biosynthesis of Proteoglycans and Their Assembly into Aggregates in Culture of Chondrocytes from Swarm Rat Chondrosarcoma. J. of Biological Chemistry*. Vol. 254, No. 8: 2600-2609, 1979.
- 8) Stevens, R.L., Hasumura, S., Parsons, W. G. and Cheng, S.Y.: *The Identification of a Plasma Membrane 3, 3', 5-Triiodo-L-Thyronine Binding Protein on the Cultured Swarm Rat Chondrosarcoma Chondrocytes and Lack of its Up-Regulation by Insulin in Vitro. Endocrinology*, Vol. 118, No. 2: 673-582, 1986.
- 9) Stevens, R.L., Nissley, S.P., Kimura, J.H., Rechler, M.M., Caplan, A.I. and Hascall, V.C.: *Effects of Insulin and Multiplication-Stimulating Activity on Proteoglycan Biosynthesis in Chondrocytes from the Swarm Rat Chondrosarcoma. J. Biological Chemistry*, Vol. 256, No. 4: 2045-2052, 1981.
- 10) Swarm, R.: *Personal Communications*. 1986.