

생쥐 골육종의 폐전이후 세포핵 핵산량의 변화

광주 남광병원 정형외과

김 주 오

— Abstract —

Reversibility of DNA Ploidy Changes Observed in Pulmonary metastasis in the Murine Osteosarcoma after Orthotopic Implantation

Ju-O Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Namkwang Hospital, Kwangju City, Korea

The difference in DNA ploidy pattern between primary and metastatic tumor remains an interesting question.

We examined whether the observed change of tumor ploidy is permanent or whether it is reversible after reinoculation of the metastatic foci to an orthotopic site of another mouse.

We isolated 14 metastatic pulmonary nodules from 8 mice with MGH-OGS murine osteosarcoma of thigh, and inoculated these nodules into the thighs of twenty nine C3H/Sed mice.

In addition, we performed the cytoflowmetric examination of the primary tumor, the inoculated metastatic pulmonary nodules, and the regrown tumor after orthotopic inoculation.

In the primary thigh tumor of F8 MGH-OGS mice, the ploidy pattern was primarily aneuploid(Average values were % Diploid Cells : 23% and the mean DNA Index : 1.39). Examination of the pulmonary nodule revealed a significant increase in the diploid cell population(Mean : 54%) in 79% of nodules and a significant decrease in the mean DNA Index(Mean : 1.24) in 50% of the nodules. The tumors regrown after orthotopic implantation of metastatic pulmonary nodules however showed the same ploidy pattern and regrown parameters as was seen in the primary tumor, regardless of the ploidy pattern of the implanted metastatic nodules.

This data support the concept that the lesion that goes to the lung may have hyperpercentage of surviving diploid cells(rather than aneuploid), but once reimplanted into the "native " site became primarily aneuploid again.

※ 통신저자 : 김 주 오

광주직할시 광산구 마북동
남광병원 정형외과

※ 본 논문의 요지는 1993년 8월 28일 국제 정형외과 및 외상학회 기초학회(SIROT)에서 구연되었음

서 론

악성종양의 원발성병소와 전이병소 사이에 서로 다른 종양세포의 핵산형태를 보이는 경우가 사람 및 동물의 여러 악성종양에서 보고되었다^{5,6,7)}.

이와 같은 현상은 전이도중 원발성병소의 종양세포중 특정한 계열의 세포가 선택되어 증식하였다는 것을 의미하나, 이 현상과 예후와의 관계는 명확히 확립되어 있지는 않다. 다만 전이종양이 일반적으로 항암제에 내성을 보이는 현상과 관계가 있을 것으로 추측되고 있다.

MGH-OGS형의 생쥐 골육종에서도 전이과정중 종양세포의 핵산변화가 관찰되어 있는데, 저자는 변화된 전이 폐병소를 다른 쥐의 대퇴부(일반적인 원발부위)에 이식함으로써 전이과정중 나타난 핵산형태의 변화가 일시적인지, 또는 영구적인 것인지 알아내고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

생후 2-4주 평균 18g의 남성 C3H/Sed 생쥐를 이용하였다(Fig. 1-A). C3H/Sed는 Syngeneic mice로 쥐끼리는 개체 사이의 거부반응 없이 조직을 이식할 수 있다.

2. 종양

MGH-OGS는 C3H/Sed종 생쥐에 방사선 조사 후 발생한 골육종으로 동종간에는 이식이 가능하다(Fig. 2-A). 대퇴부에 이식하면 4주에 8mm의 크기로 성장하는데 이 시기에 다른 생쥐의 대퇴부에 이식하여 증식시켜 관리해 왔다. 7세대(F 7)부터 9세대(F 9)를 실험에 이용하였다.

3. 대퇴부 원발병소의 이식 및 폐전이의 발생

제 7세대 MGH-OGS 생쥐의 대퇴부 병소에서 무균조작으로 골육종을 채취하고 이조직을 1mm의 크기

로 자른 후 Nembutal로 마취한 10마리의 C3H/Sed생쥐(이하 F 8)의 대퇴부에 이식하였다. 2마리는 6주, 8마리는 10주 관찰 후 경추를 탈구시키는 방법으로 죽여서, 대퇴부 종양 및 폐전이 상태를 관찰하였다(Fig. 1-B, 2-B).

대퇴부 병소 및 폐전이병소를 채취하여 일부는 다른 생쥐에 이식하고 일부는 Cytoflowmeter를 이용하여 핵의 형태 및 핵산의 양을 분석하였다.

4. 폐전이 병소의 동소이식 및 관찰

10주에 희생시킨 8마리 C3H/Sed생쥐의 폐에서 14병소를 채취하고 이것의 일부를 Nembutal마취한 29마리의 생쥐(이하 F 9)의 대퇴부에 1mm씩 이식하여 성장상태를 관찰하였다. 3내지 5주 사이에 대퇴부에서 종양을 채취하여 cytoflowmeter를 이용한 핵산형태 검사를 시행하였다.

5. 종양세포핵의 DNA양 측정(Cytoflowmetry)

다른 생쥐에 이식하고 남은 종양조직을 잘게 자른 후 0.04% Collagenase(Worthington사) 및 DMEM(Sigma사) 혼합액에서 37°C, 2시간 교반하여 종양세포의 현탁액을 만들었다.

원심분리 및 여과를 시행하여 채취한 세포를 Cytospinning(1500RPM 10min) 방법으로 Slid에 부착시킨 후 ethanol탈수, 0.01% RNase처리, propidium iodide 염색 후 cyto-flowmeter(Nikon사, 개인조립)로 세포핵의 형광을 측정하여 핵의 DNA 양을 측정하였다.

측정된 세포들의 DNA 양은 dBase처리로 histogram을 작성하였다. 이때 사용한 두가지 중요한 분석지표의 하나는 % Diploid cell로 측정하였던 종양세포중 정상배수(diploid)세포의 비율을 말하며, 다른 하나는 Mean DNA Index로 전체 종양세포가 평균적으로 정상세포에 비하여 몇배의 DNA를 가지고 있는가를 의미한다(정상조직 1.0).

(Mean DNA I.=Mean DNA content of tumor cell/Mean DNA content of diploid tumor cell)

Fig. 1. C3H/Sed mouse and MGH-OGS murine osteosarcoma : Primary tumor(A) and the pulmonary metastasis(B)

결 과

1. 종양의 성장 및 전이

종양의 이식 후 F 8의 대퇴병소는 10례 모두 종양이 발생하여 이식 73일(평균)에 19.4mm(평균)의 크기로 성장하였다. 6주에 조기회생시킨 2마리 중 1마리, 10주 관찰한 8마리 모두에서 폐전이를 관찰할 수 있었는데, 10주의 경우 폐병소의 제일 큰 결절의

크기가 2.5mm이상이 되어서 이식 및 검사가 가능하였다.

폐병소에서 이식하였던 F 9의 대퇴병소는 29마리 중 24마리에서 종양이 발생하였는데, 27.5일에 8mm, 32일에 9.2mm의 크기로 성장하였다.

종양의 성장속도를 비교해 보면 대퇴부 종양의 경우 F 8에서는 주당 1.9mm, F 9(즉 F 8폐병소에서 이식한 경우)는 주당 2.0mm로 대퇴부의 종양을 이식한 경우이건, 폐병소를 이식한 경우이건 전과 비교

Fig. 2. Microscopic findings of MGH-OGS murine osteosarcoma in thigh(A ; 400x) and metastatic pulmonary nodules(B ; 40x). (H-E staining)

하여 차이가 없었다. 반면 폐병소의 경우는 달랐다. F 8의 폐전이이는 6주부터 관찰할 수 있었는데 10주에 관찰된 폐병소중 가장 큰 폐병소가 6주에 전이되어 성장했다 할 경우 주당 0.7mm씩 성장한 것이 되므로 대퇴부에 비해 현저히 느린 성장속도를 보였다.

2. Cytoflowmetry

F 8대퇴병소는 % Diploid cell : 23%(range

11-34%, SD 7.0%), Mean DNA Index : 1.39(range 1.34-1.43, SD 0.03)로 aneuploid형의 종양이었다.

F 8폐전이병소는 % Diploid cell : 47%(range 16-65%, SD 17%), Mean DNA Index : 1.33(range 1.20-1.47, SD 0.11)로 aneuploid종양이나 핵산지수상 정상배수에 접근하였다.

F 8전이병소를 이식하여 발생한 F 9 대퇴병소는 % Diploid cell : 24.2%, Mean DNA Index :

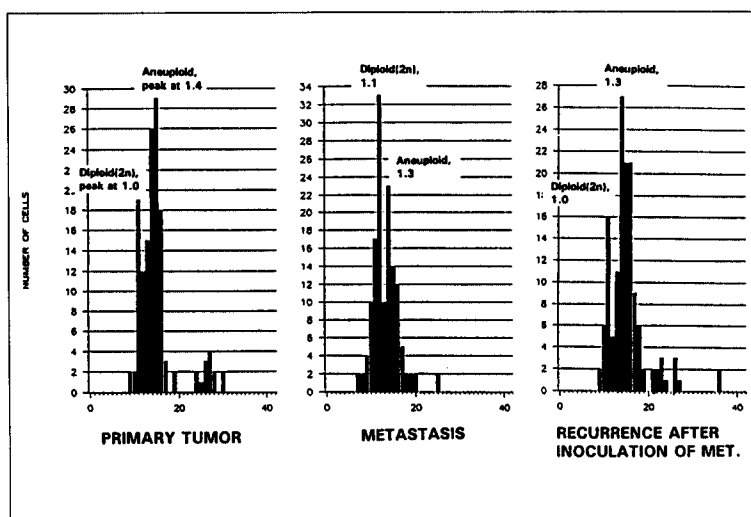


Fig. 3. DNA histograms of the primary(thigh) tumors, their pulmonary metastasis and the recurrent tumors from implanted metastatic foci. The diploid cells were increased and the aneuploid cells were decreased during metastasis, but which changes were reversed to original pattern after orthotopic implantation to another mice.

Table 1. Mean DNA Index and % of Diploid cells in the thigh and metastatic tumors. *

No.	F8 Thigh tumor (DNA Index & %Diploid)	F8 Metastasis (DNA Index & %Diploid)	Recurrence from Met. (DNA Index & %Diploid)
1	1.37(21%)	1.42(39%)	1.37(44%)
2	1.34(34%)	1.20(63%)	1.40(22%)
		1.47(16%)	1.36(18%)
3	1.37(20%)	1.22(63%)	1.45(15%)
4	1.41(19%)	1.39(49%)	1.38(21%)
		1.31(66%)	1.37(24%)
5	1.39(30%)	1.20(65%)	1.37(21%)
		1.50(20%)	1.43(24%)
6	1.40(24%)	1.28(43%)	1.34(30%)
		1.43(28%)	1.33(38%)
7	1.43(23%)	1.26(56%)	1.27(30%)
		1.22(65%)	1.32(10%)
8	1.42(11%)	1.42(47%)	1.38(24%)
		1.33(40%)	1.43(18%)
Average(S.D.)	1.39(0.03)	1.33(0.11)	1.37(0.10)

* Mean DNA Index and % of Diploid cells in the primary foci, their metastasis and the recurrent tumors from metastatic pulmonary nodules.

The DNA amount was reduced during metastasis in No. 2,3,5,6,7 mice, but which change reversed to usual aneuploid pattern after implantation to the thigh.

1.37로 다시 F 8대퇴병소의 핵산형태(Aneuploid)로 돌아왔다(Fig. 3).

폐전이 과정 중 원발종양에 비해 핵의 DNA양이나 정상배수세포의 비율이 현저히(모집단의 2 표준편차 이상) 증가하거나 감소한 경우가 있었는데, 이

경우 변화한 폐병소를 이식하여 발생한 대퇴병소의 핵산형태는 이전의 대퇴병소의 소견, 그리고 변화하지 않은 폐병소를 이식하여 발생한 대퇴병소의 핵산형태와 차이가 없었다. 즉, 검사한 14개의 폐병소중 2배수(Diploid) 세포의 비율은 11병소에서 증가하

고 DNA 양(Mean DNA Index)은 7병소에서 감소하여 전이과정중 핵산형태가 정상쪽으로 이동하는 경향을 보였으나 이 폐병소를 대퇴부에 이식한 경우 나타나는 종양은 이식한 종양의 핵산형태와는 관계 없이 모두 원래의 Aneuploid형의 종양이었다.

고 찰

Cytoflowmetry는 개개의 세포를 현미경으로 관찰하며 하나씩 분석할 수 있어 정상 세포와 암세포를 측정당시에 구별해 낼 수 있는 장점이 있다. 따라서 검사 시간이 많이 걸리는 단점이 있어 다량의 조직을 분석하기는 곤란하나 유식세포 분석법(flowcytometry)에 비해 더 정확한 검사이다. 종양세포의 DNA양을 측정하여 예후를 알아내고자 하는 시도는 많이 보고되어 있으며 이때 유식세포 분석법은 매우 유용한 검사법이다.

종양세포핵의 DNA양이 Aneuploid형인 경우 조직학상 고등급의 악성종양으로 분류되고 성장도 빠르고 예후도 대체로 불량하나, 종양의 종류에 따라서는 반드시 일치하지는 않는다^{1,9)}.

어떤 종양내에 여러가지 종양세포가 존재하는 것은 흔한 소견이며 특히 크기가 큰 악성종양에서는 Aneuploid와 Diploid종양세포가 혼합되어 나타날 수 있다. 원발성병소와 이의 전이병소 사이에 다른 핵산형태를 보이는 것은 여러 악성종양에서 보고되어 있으며 이경우 전이병소에는 핵산형태가 정상에 가까운 쪽으로 변화하는 경우가 많은데, 이 소견은 저자들의 관찰과 일치한다^{2,8)}. Burgio등과 Ensley등은 전이병소에서 Diploid세포의 증가가 전이병소의 항암제에의 저항성의 증가와 관계가 있다하였다^{3,4)}.

Aneuploid 종양세포가 항암제에 더 예민하다는 것으로 DNA ploidy와 예후가 일치하지 않는 이유의 하나를 설명할 수 있다. 즉 우리들이 악성종양환자에 수술을 시행할 경우 통상 부가적 치료를 시행하는데 조직학적으로 악성인 Aneuploid 세포가 항암제에 더 예민하게 반응하므로 항암제 투여시는 조직학적으로 더 고도의 종양이 오히려 더 좋은 예후를 보일 수 있다. 골육종도 조직학상 고도의 악성이나 항암제에 좋은 반응을 기대할 수 있다.

저자는 전이과정에 나타나는 핵산의 변화가 폐병소의 크기와 관계가 있는지를 알아보았으나 크기와

핵산형태와의 상관관계를 발견할 수 없었다. 폐결절의 크기 3mm를 기준으로 하여 3mm이상 7례와 미만 7례의 핵산형태를 비교했으나 다른 점이 없었다.

저자는 본 실험에서 폐병소의 크기가 작은 것은 폐병소의 성장속도가 느리기 때문으로 생각하며, 성장이 느린 이유의 하나는 Diploid세포의 비율이 높기 때문으로 생각한다.

저자는 MGH-OGS 골육종에 있는 Aneuploid 및 Diploid세포의 균형이 폐전이에 의해 변하므로 핵산의 형태가 다르게 나타난다 생각한다. 즉, 대퇴부에서는 Aneuploid 종양세포가 더 잘 성장하나, 전이후 폐에서는 정상세포에 가깝고 저항성이 강한 Diploid 종양세포가 우선적으로 성장하므로 핵산형태가 Diploid쪽으로 이동하며 성장속도도 느려진다. 따라서 폐병소를 대퇴부에 이식하면 다시 원래의 Aneuploid우선의 핵산 형태를 나타낸다.

결 론

원발성 종양과 이의 전이종양 사이에서 관찰되는 세포핵의 DNA양(ploidy)의 변화가 일시적인 것인가 또는 영구적인 것인가를 알기 위해, 10마리 C3H/Sed 생쥐의 대퇴부에 MGH-OGS 골육종을 이식하여 폐전이를 기다린 후 전이된 14폐병소를 다른 29마리 생쥐의 대퇴부에 이식하여 종양의 재발을 관찰하고 세포유식검사(Cytoflowmetry)를 통하여 종양세포의 DNA형태를 검사하였다.

제 8세대 MGH-OGS 골육종을 가진 생쥐의 대퇴병소는 비정상배수(Aneuploid)핵의 세포가 많고 핵산량이 많았으나(% Diploid cell : 23%, Mean DNA Index : 1.39), 폐전이후에는 정상배수(diploid)의 핵을 가진 세포의 수가 증가하고 핵의 DNA양이 감소하는 소견을 보였다.

그러나 전이병소를 다른 생쥐의 대퇴부에 이식시켜 재발시킨 경우는 이식한 종양의 핵산형태와는 관계없이 모두 원발성 종양과 같은 핵산형태를 보였다.

저자는 본 종양의 폐전이 과정에서 비정상배수 보다는 정상배수의 종양세포가 더 많이 생존하는 것으로 생각하며, 전이된 종양을 다시 대퇴부에 이식하면 원래대로 비정상배수의 종양세포 증식이 왕성히 이루어진다고 생각한다.

REFERENCES

- 1) **Bauer HCF, Kreicbergs A, Silfversward C** : Prognostication including DNA analysis in osteosarcoma. *Acta Orthop Scand*, 60(3) : 353-360, 1989.
- 2) **Beerman H, Bonsing BA, Vijver MJ, Hermans J, Kluin PM, Caspers RJ, Velde CJH, Cornelisse CJ** : DNA ploidy of primary breast cancer and local recurrence after breast-conserving therapy. *J Cancer*, 64 : 139-143, 1991.
- 3) **Burgio DL, Jacobs JR, Maciorowski Z, Alonso MDM, Pietraszkiewicz H, Ensley JF** : DNA ploidy of primary and metastatic squamous cell head and neck cancers. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 118 : 185-187, 1992.
- 4) **Ensley J, Maciorowski Z, Pietraszkiewicz H** : Prognostic impact of cellular DNA parameters in neoadjuvant and adjuvant trials of patients with head and neck cancer. In : *Salmon S Ed. Adjuvant therapy of cancer*. 6 : 101-108, New York, Grune & Straton, 1990.
- 5) **Rode J, Williams RA, Charlton IG, Dhillon AP, Moss E** : Nuclear DNA profiles in primary melanomas and their metastasis. *Cancer*, 67(9) : 2333-2336, 1991.
- 6) **Rutteman GR, Cornelisse CJ, Poortman J, Misdorp W** : Flowcytometric analysis of DNA ploidy in canine mammary tumors. *Cancer Research*, 48 : 3411-3417, 1988.
- 7) **Schleicher RL, Green AW, Beattie CW** : Growth and metastasis of hamster melanoma following transplantation into athymic mice. *Cancer Research*, 47 : 4465-4470, 1987.
- 8) **Umehara Y, Miyahara T, Yoshida M** : An analysis of the cellular DNA contents in lung-metastasized stomach cancers. *Gan-No-Rinsho*, 36 : 468-472, 1990.
- 9) **Yamaguchi A, Ishida T, Takegawa S, Nishimura G, Kanno M, Kosaka T, Yonemura Y, Izumi R, Miyazaki I** : Flowcytometric analysis of colorectal cancer with hepatic metastasis and its relationship to metastatic characteristics and prognosis. *Oncology*, 47 : 478-482, 1990.