



Establishment of Leukemia Mouse Model Using Mouse-Derived A20 Leukemic Cells, and Detection of Tumor Cells in Bone Marrow

Lan Ying Wen, Su-Mi Bae and Woong Shick Ahn*

Cancer Research Institute, Catholic Research Institute of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Objectives of this study were to establish a leukemia mouse model in the Balb/c mouse based upon the A20 cell line (murine B-lymphoma/leukemia cell line, H-2^d). Here we demonstrate for the first time that A20 cells were infiltrated into tissue and bone marrow, thereby evaluate the feasibility of using A20 leukemic cells as a leukemia model. In the study, changes of behavior, survival rate and histological changes of major organs after intravenous injection of A20 cells (1×10^5 , 1×10^6 or 1×10^7) into Balb/c mice were observed. After inoculation of 1×10^6 cells, animals survived up to 38.3 days, although there were no significant correlation between the number of injected cells and life-span. At 21 and 28 days post-injection, both hematoxylin-eosin and CD45R immunohistochemical stains showed diffuse large B-cell lymphoma in the liver. FACS analysis was performed after injection of fluorescent nanomaterial (MNPs@SiO₂ RITC)-labeled A20 cells. The labeled A20 cells were detected in bone marrow from 6 hours post-inoculation, indicative of the cellular infiltration. This is the first study that demonstrated the invasion of A20 cells into the bone marrow of Balb/c model using A20 cells. With the occurrence of systemic lesions following metastasis of the cells into lymph nodes and neighboring tissues via bone marrow infiltration, it is suggested that the A20 cell-inoculated Balb/c mouse could be an animal model of acute lymphocytic leukemia.

Key words: Balb/c mouse, A20 cells, infiltration, expansion, leukemia mouse model

Received 25 November 2010; Revised version received 8 December 2010; Accepted 11 December 2010

인체 암 발생과 유사한 환경을 제공할 수 있는 동물 모델의 개발은 암 발생과정을 밝히고, 새로운 치료법개발에 있어서 필수적이다. 그러나 종양의 형성 및 전이에는 많은 인자들이 관여하므로 인체와 유사한 최적의 동물 모델개발에 관한 다양한 연구가 진행중이다. 암 동물모델 형성은 인체의 종양조직을 이식하는 방법과 화학적 암 유발 인자를 이용해서 암을 유도하는 방법이 있다(Hawkins *et al.*, 1994). 암 유발 인자를 이용한 동물모델은 발암과정의 연구나 유전자치료요법에 적합한 모델이며, 새로운 치료 방법 개발이나 새로운 항암제의 선택에 관한 연구에는 인체의 종양조직을 숙주에 이식하는 동물 모델이 유용하게 사용되고 있다(Giovanella and Stehlin, 1973; Giovanella *et al.*, 1974).

종양 이식 동물모델은 인간 암세포를 종양의 기원이 동일한 조직에 이식하는 동소위 모델(orthotopic model)과

피하 등 다른 조직에 이식하는 이소위 모델(atopic model)로 나눌 수 있다. 대부분의 연구결과에 의하면 동소위 모델은 종양 발생율이 높고, 주위조직으로의 자발적 전이와 침윤양상이 쉽게 관찰되는 등 임상적으로 유사한 상황을 재현한다는 점에서 새로운 항암제나 치료법의 분자 생물학적 기전을 연구하는데 많이 이용되고 있다(Fu *et al.*, 1991; Killion *et al.*, 1998; Umeda *et al.*, 2002). 이소위 동물 모델은 이식방법이 간단하고, 종양성장을 확인하기 쉽고, 장기간의 관찰이 가능하다는 장점이 있으며 항암제 효능 연구에 많이 이용되고 있다(Huang and Harari, 2000; Huang *et al.*, 2002; Scheper *et al.*, 2007)

한국에서 백혈병, 악성림프종, 골수이형증 등 혈액암의 발생 빈도는 폐암, 위암, 간암 등의 고형암에 비하여 낮지만, 발생초기부터 전신확산의 특징이 있으므로 전신적인 치료가 요구된다(Gahrton, 1983; Drexler *et al.*, 2000; Pieters and Carroll, 2010). 혈액암은 항암화학요법에 비교적 잘 반응하며, 많은 새로운 화학요법이 개발되고 있다. 그러나 혈액암의 재발방지와 완치를 위하여는 유지요법, 공고요법, 강화요법 등 관해 후 2차 치료를 필요로 하며 화학요법에 따르는 부작용도 많이 보고되고 있

*Corresponding author: Woong Shick Ahn, Catholic Research Institute of Medical Science, The Catholic University of Korea, 505 Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel: +82-2-2258-7488
Fax: +82-2-599-4120
E-mail: ahnlab1@catholic.ac.kr

다(Gahrton, 1983; Goldman, 1987; Marie, 2001). 혈액암의 새로운 치료법의 개발을 위해서 새로운 백혈병-림프종 연구(leukemia-lymphoma research)를 위한 세포주와 동물 모델의 개발이 끊임없이 진행되어 왔으며, 1963년 림프종에서 유래한 세포주가 처음으로 개발된 이래 현재까지 1,000여종의 세포가 보고되고 있다(Hans et al., 2000). 백혈병 동물모델로는 HL-60, K562 등 인간 골수성 백혈병 세포주를 면역 부전 마우스에 정맥 이식하거나 마우스 유래의 B림프구인 A20 세포주를 동일계통 마우스 (syngenic mouse)에 정맥 이식방법이 많이 사용되고 있으며, 이들은 간단한 동소위 중앙이식이란 점에서 혈액암 동물모델로서의 가치가 높다(Ratajczak et al., 1992; Benjamin et al., 2007). 백혈병 동물모델 형성을 위하여 HL-60, K562, KG-1, MO7E, TF-1 등 인간 백혈병 세포주(human leukemia cell line)를 누드 마우스에 투여하여 급성골수성백혈병(acute myelogenous leukemia; AML) 동물모델이 완성되었다(Nara and Miyamoto, 1982; Machado et al., 1984; Janssen et al., 1987; Krishnaraju et al., 1998; Kiser et al., 2001). 그러나 강한 방사선조사, 면역 억제제, 항생제, 심지어 비장절제술 등 다양한 면역억제 방법이 동반되어야 하며, 이로 인하여 누드마우스를 이용한 연구 결과는 연구자에 따라 다른 결과를 나타내기도 한다(Watanabe et al., 1980; Nara and Miyamoto, 1982; Fingert et al., 1987; Caretto et al., 1989). 그 후 SCID 마우스에 HL-60 세포주를 복강투여 혹은 정맥투여하여 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia; AML) 모델로 사용하고, Molt-4, CCRF-CEM과 같은 세포주를 투여하여 급성림프구성백혈병(acute lymphocytic leukemia; ALL) 모델로 사용한 경우에는 보다 좋은 결과가 보고되고 있다(Uciun et al., 1996; Perentesis et al., 1997; Tomkinson et al., 2003). 이외에도 NOD/SCID 마우스를 사용할 경우 다른 면역부전마우스에 비하여 중앙이 쉽게 형성된다는 장점이 있으나(Lumkul et al., 2002), 인간 사이토카인이나(Rombouts et al., 2000), 성장인자를 과발현하는 세포주 혹은 보조세포의 보충이 필요하고(Bonnet et al., 1999), NK 세포가 활성화 되는 등의 문제가 보고되고 있다(Shultz et al., 1995).

최근 많은 연구자들이 마우스 유래의 세포주를 이용한 백혈병모델의 개발에 관심을 갖게 되었다. Wasserman 등은 Balb/c 유래의 Eu-Ret fusion protein (RFP+) 형질전환 마우스로부터 83, 289, t309, 420.2 마우스백혈병 세포를 분리 배양하였으며(Wasserman et al., 1998; Zeng et al., 1998), 이들 중 289 세포를 다시 동계마우스에 이식하여 백혈병 동물 모델을 형성한 후 항암제 효능테스트 및 치료과정 중 단백질 발현 변화와 나아가서 T 세포가 매개하는 백혈병에 대한 면역반응까지 보고하였다(Seif et

al., 2009). 이외에 WEHI-3 (myelomonocytic), PU5-1R (myeloid) 등의 마우스 유래의 세포들을 이식하여 백혈병 모델로서 활용하였으며 특히 Balb/c (H-2^d) 유래의 A20 세포주를 동일계통마우스에 이식한 동물모델은 이식편대 백혈병(graft-versus-leukemia; GVL) 연구와 항백혈병 면역반응연구에 많이 이용되고 있다(Glass et al., 1996; Zeis et al., 2001). A20 세포주는 이식 후 3-4주 후에 간 조직에서 diffuse Large B-cell lymphoma가 형성되고 간조직 외에도 근육 등 연조직, 복강, 비장 및 척추를 따라 산재성 림프종이 형성된 것이 보고되고 있다(Passineau et al., 2005). 그러나 A20 세포주는 마우스 유래의 세포주로서 CD45R 등의 B cell marker를 이용하여 말초혈액과 골수내에서의 중앙세포 확장을 정확하게 판단할 수 없었다. 따라서 A20 세포주를 이용한 동물모델은 명확한 구분이 없이 연구자에 따라 백혈병과 림프종 모델로 모두 사용되어 왔으며 림프종 모델로서 사용한 사례가 더 많이 보고되고 있다(Glass et al., 1996; Zeis et al., 2001; Xu et al., 1995; Passineau et al., 2005; Liu et al., 2007). 따라서 본 연구에서는 경제적이며 정상적인 면역력을 갖고 있고, 모델 형성이 용이한 Balb/c 마우스에 heplotype이 같은 A20 세포주를 정맥투여하여 중앙의 형성과정을 관찰하고 혈액 내 A20세포의 체류, 골수 내로의 침투 과정을 연구 하여 백혈병 동물 모델로서의 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에서는 Balb/c 마우스에서 유래된 세망세포육종(reticulum cell sarcoma)으로서 세포타입이 B림프구인 A20 (murine B-lymphoma/leukemia cell line, Balb/c origin, H-2^d) 세포주를 사용하였다. A20 세포주는 75T 세포배양 플라스크(culture 75T flask; SPL, Pochoen-city, Korea)에서 RPMI (Hyclone, Logan, USA) 배양액에 fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, USA)을 10%, Penicillin-streptomycin solution (Hyclone, Logan, USA)를 1% 첨가하여 사용하였고 37°C, 5% CO₂ 배양기(Thermo Electron, Waltham, Massachusetts, USA)에서 배양하였다.

실험동물 및 사육조건

암컷 Balb/c (6주령)은 오리엔트바이오(Seongnam-city, Korea)에서 구입하였으며, 가톨릭대학교 특정병원균 부재(specific pathogen-free; SPF) 동물실에서 항온(23~24°C), 항습(40~60%) 상태에서 멸균수와 사료(Purina Korea, Seongnam-city, Korea)로 사육하였다. 본 연구는 동물 보호법(Animal welfare act)을 준수하였고, 가톨릭대학교 동물실험윤리위원회(IACUC (Institutional Animal Care and

Use Committee) in school of medicine, The Catholic University of Korea]의 심의를 거쳐 허가를 받은 후 진행되었다.

세포주의 동종이식

1×10^5 , 1×10^6 및 1×10^7 cells/100 μ L로 준비된 A20 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)에 부유시켜 26½ gauge 주사기로 Balb/cAnN의 미정맥으로 100 μ L씩 주입하였다. A20 세포주를 이식하기 각각 4일전, 2일전에 체중 1 kg당 150 mg의 cyclophosphamide (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)를 복강에 주사하였다. 세포주 투여 후 상태 관찰, 체중 측정, 생존그래프 기록, 사망한 실험 동물의 간, 비장 등의 장기 무게를 측정하였다.

Wright 염색

A20 세포를 배양액과 같이 모아 900 g로 3분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 세포 덩어리에 PBS를 첨가하여 Pasteur pipette로 희석시킨 후, micropipette을 사용하여 A20 세포 부유액을 각각 20 μ L씩 취하여 slide glass 위에 떨어뜨려 micropipette tip을 사용하여 도말한 후, 자연건조시켰다. 이와 같이 준비한 표본에 Wright 염색용액(영동제약, Yongin-city, Korea)을 도말표본이 충분히 덮이도록 500 μ L/slide씩 첨가한 후 5분간 염색하고, Wright 염색액이 있는 상태에서 동량의 완충액(Na_2HPO_4 , 4.53 mg/mL, KH_2PO_4 , 5.94 mg/mL)을 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 물로 2-3회 세척하여 여분의 염색액을 완전히 제거한 후, 수용성 polyvinyl pyrrolidone (PVP)로 마운팅한 후 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

조직병리 및 면역조직화학염색

이식 후 21일과 28일에 골수, 비장, 간 등의 장기를 적출하여 조직검사를 시행하였다. 모든 조직은 4% formalin으로 고정하여 파라핀 포매한 후 hematoxylin-eosin (H&E, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)와 B세포 면역조직화학염색을 함께 시행한 후 현미경으로 조직을 관찰하여 A20 세포의 침윤을 확인하였다. 파라핀으로 포매된 조직을 4 μ m 두께로 절편하여 silane coating slide (Muto Pure Chemicals, Ltd., Tokyo, Japan)에 부착하여 실험에 이용하였다. 조직절편을 Xylene 용액에 3분간씩 2회 담가서 파라핀을 제거한 후 무수알콜에서 조직을 완전히 탈수시켰다. Rat anti-mouse CD45R/B220 단일클론 항체(BD Pharmingen™, Sparks, Maryland, USA)를 4°C에서 8시간 반응시키고 PBS완충액으로 3회 세척한 후 Vectorstain ABC kit (VECTASTAIN®, Burlingame, California, USA)으로 반응시킨 후 세척하였다. 면역반응결과를 확인하기 위하여 streptavidin conjugated phosphatase (Abcam®,

Cambridge, England)로 상온에서 15분간 biotin과 결합하게 한 후 HRP chromogen-DAB liquid kit (Abcam®, Cambridge, England)으로 발색하게 한 후 hematoxylin (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)으로 대조염색을 실시하였다.

말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)의 분리

마우스는 소동물흡입마취기(Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA)를 이용하여 가볍게 마취시킨 후 안와정맥을 통해 채혈하였으며 약 500~700 μ L의 전혈을 EDTA가 들어있는 microtube 에 모았다. RBC lysis buffer (150 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0.1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$)를 넣고 실온에서 2분간 가볍게 흔들어주면서 반응시킨 후 PBS를 충분히 첨가한 후 원심분리(900 g, 5분)하여 상층액을 제거하였다.

골수세포의 분리

무균 조건에서 마우스의 양측 대퇴골을 채취하여 골단부를 자르고 주사기에 26½ gauge의 바늘을 장착한 후 골단부의 한 쪽으로부터 10% FBS가 첨가된 RPMI 배지 10 μ L로 골수강이 붉은 색에서 흰색으로 변할 때까지 완전히 세척하였다. 세척액 중 뼈조각 및 기타 불순물을 제거 한 후, 900 g에서 3분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 채취한 세포들을 배양접시에 넣어 배양기에서 2 시간 배양한 후, 부착되지 않은 세포만 따로 모아 골수 세포로 사용하였다.

비장세포의 분리

마우스의 비장을 적출하고 PBS로 2회 세척한 후 해부용 수술칼로 잘라서 일부는 4% 포르말린 용액에 고정시키고 나머지는 면역표지자 검색을 하기 위하여 비장세포를 분리하는데 사용하였다. 비장세포를 분리하기 위하여 10% FBS가 들어있는 RPMI 1 μ L를 세포배양접시에 넣은 후, 비장조직을 주사기 피스톤 부분으로 으깨어 Cell strainer (BD Falcon, Bedford, Massachusetts, USA)에 통과시켜 불순물을 제거하였다. 4°C에서 900 g로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 비장세포를 PBS로 두번 세척하였다. 비장세포중의 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer를 첨가 한 후 실온에서 2분간 반응시키고 PBS를 충분히 첨가하여 원심분리를 한 후 상층액을 제거하였다.

나노형광물질을 이용한 A20 세포주의 표기

A20 세포주는 실리카나노 분자(MNPs@SiO₂)로서 RITC 형광을 띠는 CELL-STALKER™II-CSR (Biterials, Seoul, Korea)를 사용하여 표지하였다(Kim, 2006a, 2006b; Park, 2010). 실리카나노 분자를 사용하기 전 bath sonicator

(Daihan scientific, Seoul, Korea)를 이용하여 40 kHz-300 W 이상으로 초음파 분쇄한 후 최종농도가 0.2 mg/mL이 되도록 배지에 섞어 A20 세포와 함께 24시간동안 배양하였다. 배양 후 PBS로 3번 씻어준 후, $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ 의 농도가 되게 완충액에 부유시켜 실험동물에 정맥투여하였다. 형광 표지여부는 형광현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 FACS Caliber (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA)로 확인하였다.

유세포분석기를 이용한 A20 세포의 확인

형광나노물질로 표지한 A20 세포주를 주사 후 1분, 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 1일, 2일, 3일 및 7일에 말초혈액, 골수 및 비장 세포를 각각 분리하였다. 분리된 단핵 세포를 FACS 완충액으로 2회 씻어준 후, FACS Caliber로 분석하였다.

통계처리

ANOVA와 Student *t*-test를 실시하였다. 통계학적 유의수준은 각각 $P < 0.05$ 과 $P < 0.01$ 로 하였다.

결 과

A20 세포의 특성

A20 세포는 림프구성 백혈병(lymphoblastic leukemia)에

서 기원한 암세포주로서 림프모세포의 형태로 자랐다. A20 세포는 크기가 비교적 일정하고, 모양은 둥글고 표면이 부드러우며 중심부는 검고 가장자리는 선명하게 보이는 halo 현상이 관찰되었다(Figure 1A). A20 세포의 doubling time은 18시간이었으며, 배양시간이 지속됨에 따라 여러 개의 세포들이 덩어리를 형성하였다(Figure 1B). 또한 Wright 염색 후, 핵 내의 염색질이 보라색으로 염색되었으며, 세포의 대부분을 차지하는 세포질은 옅은 푸른색으로 나타났으며, 핵과 세포질이 겹쳐져 뚜렷하게 구별되지 않는 림프구의 특성을 나타내었다(Figure 1C). 또한 B-cell lymphoblast 특이 표면 항체인 CD45R이 높게 발현하고 있음을 확인하였다(Figure 1D).

A20 세포를 이용한 동물모델

1×10^7 개의 A20 세포주를 투여한 군에서 주사 후 29일에 처음으로 실험동물의 사망이 관찰되었으며 평균 생존율은 36.3 ± 5.3 일이었다. 1×10^5 및 1×10^6 개의 세포를 주입한 군에서 평균 생존율은 각각 42.5 ± 6.2 일과 38.3 ± 5.4 일이었다. 주입한 세포수의 증가에 따라 마우스의 생존기간이 짧아짐을 확인할 수 있었으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다(Figure 2). 또한 주입한 세포수에 따른 체중 및 간장과 비장의 크기변화를 관찰한 결과 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았으나, 1×10^6 과 1×10^7 개의 세포를 주입한 그룹에서 4주째 간장의 무게가 뚜렷

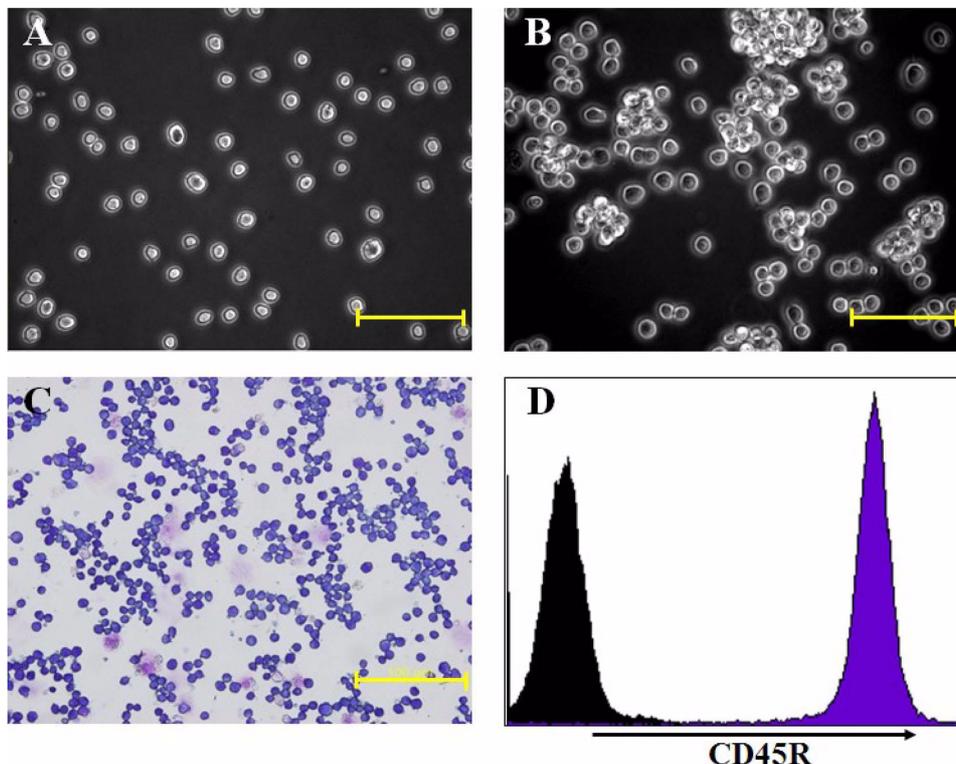


Figure 1. Morphology and CD45R expression of A20 cell line, showing features immediately (A) and 48 hours after seeding (B) (scale bar: 50 μm), Wright's staining (C) (scale bar: 100 μm), and CD45R expression on the cell surface (D).

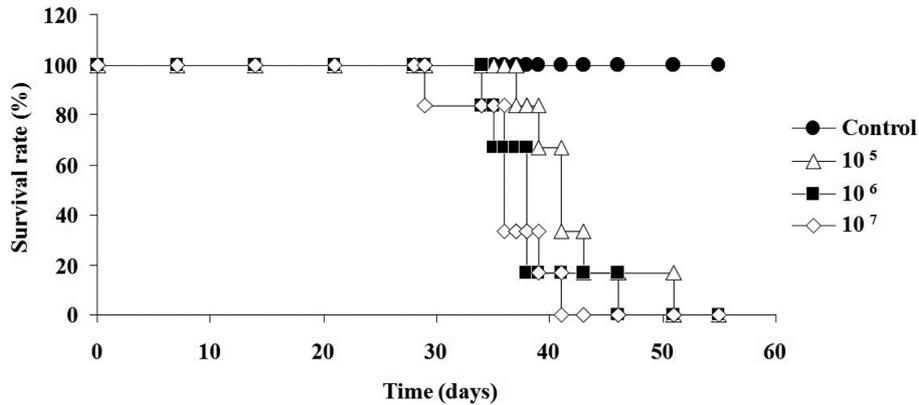


Figure 2. Survival rate of A20 cell-transplanted Balb/c mice. Three different numbers (1×10^5 , 1×10^6 or 1×10^7 cells) of A20 leukemia cells were intravenously injected into Balb/c mice. Each group consisted of 6-13 mice.

Table 1. Body and tissue weights of A20 cell-transplanted Balb/c mice

Treatment (cells)	Survival (days)	Body weight (g)			Liver weight (g)	Spleen weight (g)
		0 week	3 week	4 week	4 week	4 week
PBS	∞	100.0 \pm 4.5	108.5 \pm 7.1	111.0 \pm 5.4	1.351 \pm 0.051	0.074 \pm 0.006
1×10^5	42.5 \pm 6.2	100.0 \pm 5.4	107.5 \pm 6.3	110.9 \pm 7.6	1.374 \pm 0.021	0.078 \pm 0.005
1×10^6	38.3 \pm 5.4	100.0 \pm 3.7	104.1 \pm 6.4	110.1 \pm 4.1	1.590 \pm 0.082*	0.087 \pm 0.010
1×10^7	36.3 \pm 5.3	100.0 \pm 1.6	107.6 \pm 3.1	103.4 \pm 4.7	1.985 \pm 0.167*	0.134 \pm 0.121*

* $P < 0.01$.

하게 증가하였으며 1×10^7 개의 세포를 주입한 그룹에서 4주째 비장의 무게도 현저히 증가하였다(Table 1, $P < 0.01$). A20 세포주를 이용한 동물모델은 사망하기 48시간 전부터 털이 거칠어지고, 움직임이 적었으며, 안구주위가 끼지는 등의 현상이 나타났고, 83.3%의 개체에서 하반신 마비증세가 나타났다.

A20 동물모델에서 조직의 변화

A20 세포 주사 후 4주째에 간장 조직절편을 제작하여 H&E 염색을 실시한 결과 핵이 크고 세포질이 적으며 hematoxylin에 의해 짙게 염색된 세포들을 쉽게 관찰할 수 있었고(Figures 3B-D), 또한 면역조직화학염색을 통해 A20 세포로부터 전환된 diffuse Large B-cell lymphoma로 판단되는 CD45R/B220 양성 세포들이 산재성 또는 결절성으로 간장조직에서 성장하고, 대량으로 분포하고 있음을 확인할 수 있었다(Figures 3F-H). 이러한 병변은 간장 조직에만 국한되어 있는 것이 아니라, 골반강, 복강 등에 산재성으로 분포되어 있었으며 특히 척수를 따라 경추주위, 요추주위에 크고 작은 고형의 종양덩어리를 형성하고 있음이 확인되었다.

골수에서 A20 세포의 검출

형광물질로 A20 세포를 표지한 후 형광현미경과 유세포분석기기를 이용하여 확인한 결과 형광물질 표지율이 89.84%로 나타났다(Figures 4A & 4B). 형광 표지된 A20

세포를 정맥으로 주사한 후 1분, 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간, 72시간에 혈액에서 표지된 A20 세포의 검출율은 각각 40.16, 36.49, 27.95, 20.98, 17.51, 10.99, 4.27, 4.83, 2.84%였고, 골수에서 표지된 A20 세포의 검출율은 1.23, 1.07, 1.16, 1.20, 1.64, 3.28, 9.64, 5.61, 3.36%로 나타났다(Figures 4C & 4D).

고 찰

성공적인 암 치료를 위해서는 현재 주요하게 수술요법, 방사선요법, 화학요법, 그리고 면역요법이 사용되고 있다. 또한 새로운 치료방법과 효능이 좋은 항암제개발이 지속적으로 이루어지고 있으며 이런 연구를 위해서는 적당한 생체 종양 모델의 개발이 필요하다. 그 중에서도 마우스를 이용한 동물 모델은 암 연구에서 대체하기 어려운 만큼 광범위하게 사용되고 있다.

백혈병 동물모델은 크게 바이럴 모델(viral models), 이식 모델(transplantable models), 이종이식 모델(xenograft models), 형질전환 모델(genetically engineered models)이 있다(McCormack, 2005). 이 중 백혈병세포를 투여하는 이종이식 모델이 많이 연구되고 있으나 연구자에 따라 마우스 생존율에 차이를 보이기도 한다. Balb/c 마우스에 A20 세포주를 정맥으로 투여하여 형성한 모델은 현재 이식편대 백혈병(graft-versus-leukemia; GVL)연구와 항백혈병 면역반응 연구에 많이 사용되고 있으며(Glass, 1996; Zeis,

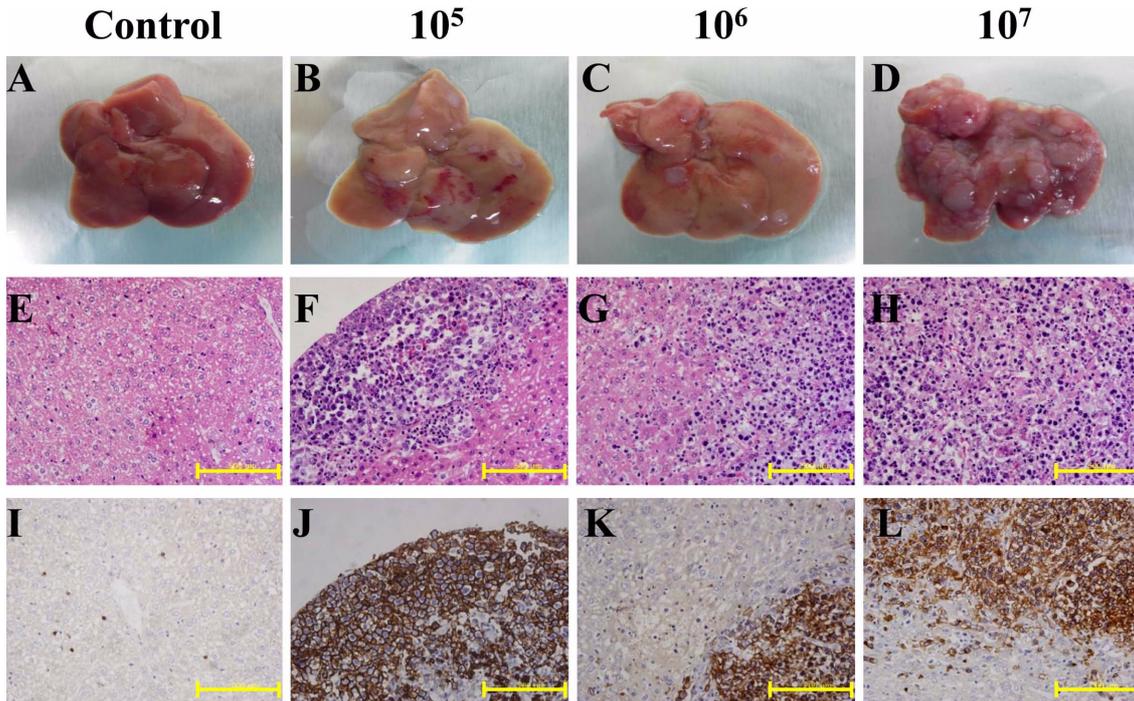


Figure 3. Comparison of the livers of control and A20 cell-inoculated mice. Livers were removed at 28 days post-injection. The surface of control liver is smooth and soft, while distinct nodules are visible on the A20 cell-transplanted mice (A-D). Histological examination showed diffuse or nodular infiltration of lymphoma cells in the liver parenchyma of A20 cell-transplanted mice. The infiltrated A20 cells were confirmed by H&E (E-G) and immunohistochemical staining on CD45R (H-K). Scale bar: 500 μ m.

2001), 또한 이는 조직학적, 세포형태학적으로 선천성 B 세포림프종과 아주 비슷했으므로 림프종 동물모델로 많은 연구가 진행되고 있다(Xu, 1995; Passineau *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). 특히 최근에는 비교적 짧은 시간에 연조직, 복부의 림프절, 위, 비장 등 조직기관에 널리 퍼지는 특징으로 인하여 전신적인 질환연구 및 화학, 면역, 유전요법의 효과를 검증하는 실험에 아주 좋은 모델로 사용되고 있다(Xu, 1995; Passineau *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). 이 동물모델은 가격이 비싸고 쉽게 기타 병원체에 감염되어 사망할 확률이 높은 면역억제 마우스를 사용하지 않아도 적은 수(1×10^5)의 세포주로 종양 형성이 되며 HL60 세포주를 면역억제 마우스에 50배 (5×10^6) 정도 투여했을 때보다도 종양모델이 쉽게 형성되어 생존기간이 10여일 정도 단축시킬 수 있다는 점에서 장점을 가지고 있다(Glass, 1996; Zeis, 1997; Benjamin, 2007; Liu, *et al.*, 2007).

본 연구에서는 Balb/c 마우스에서 자연 발생된 세망세포육종(reticulum cell sarcoma), 세포타입이 B 림프구인 A20 (murine B-lymphoma/leukemia cell line, Balb/c origin, H-2^d)세포주를 Balb/c 마우스의 꼬리정맥으로 종양 세포를 주입하여 백혈병 동물 모델을 제작하였다. 종양세포 투여 후 3주째부터 일부 개체들에서 복수 형성, 하지 마비 등의 현상이 관찰 되었으며, 종양세포 투여 후 4주

에 관찰한 결과, 모든 개체들에서 경추, 요추를 따라 형성된 척추인접(paravertebral)조직에서 종양의 침투를 육안으로 확인할 수 있었다. 하지 마비가 일어난 마우스는 약 83.3%에 달했으며, 관찰 결과 요추주위의 종양덩어리를 확인할 수 있었다. 가장 뚜렷한 변화는 간조직에서 나타났다. 종양세포이식 3주째부터 산재성 또는 군집성의 흰색 종양덩어리가 형성되는 것을 육안으로 관찰 할 수 있었다(Figures 3B-D). 종양세포 투여 후 4주째 실험동물의 간 조직에서 세포핵이 크고 세포질이 희소하여 hematoxin으로 질게 염색이 되는 종양세포를 관찰할 수 있었고 조직학적으로는 전이된 diffuse Large B-cell lymphoma로 확인되었다(Figures 3F-H). 이는 A20 세포주를 주입한 동물모델에서 세포주입 후 5일 만에 간장의 연조직에서 림프계 세포로 의심되는 세포들의 침윤을 발견하였으며, 세포의 침윤이 점점 가중화되어 10일째부터는 전형적인 B세포림프종임이 H&E 조직염색을 통해 광학현미경으로 관찰 되었으며 30일째 에는 육안으로도 분별될 수 있는 큰 nodule을 형성하거나 산재성(spread)으로 침습하는 것을 관찰 할 수 있었다고 보고한 Passineau의 연구와 일치하는 것이다(Passineau *et al.*, 2005). 이들 연구에 따르면 종양세포를 정맥투여한지 30 일째에 H&E 염색을 통하여 척수에 백혈병세포가 대량으로 침투되었을 뿐 만 아니라 골조직을 침범하는 등 현상이 보고되었다.

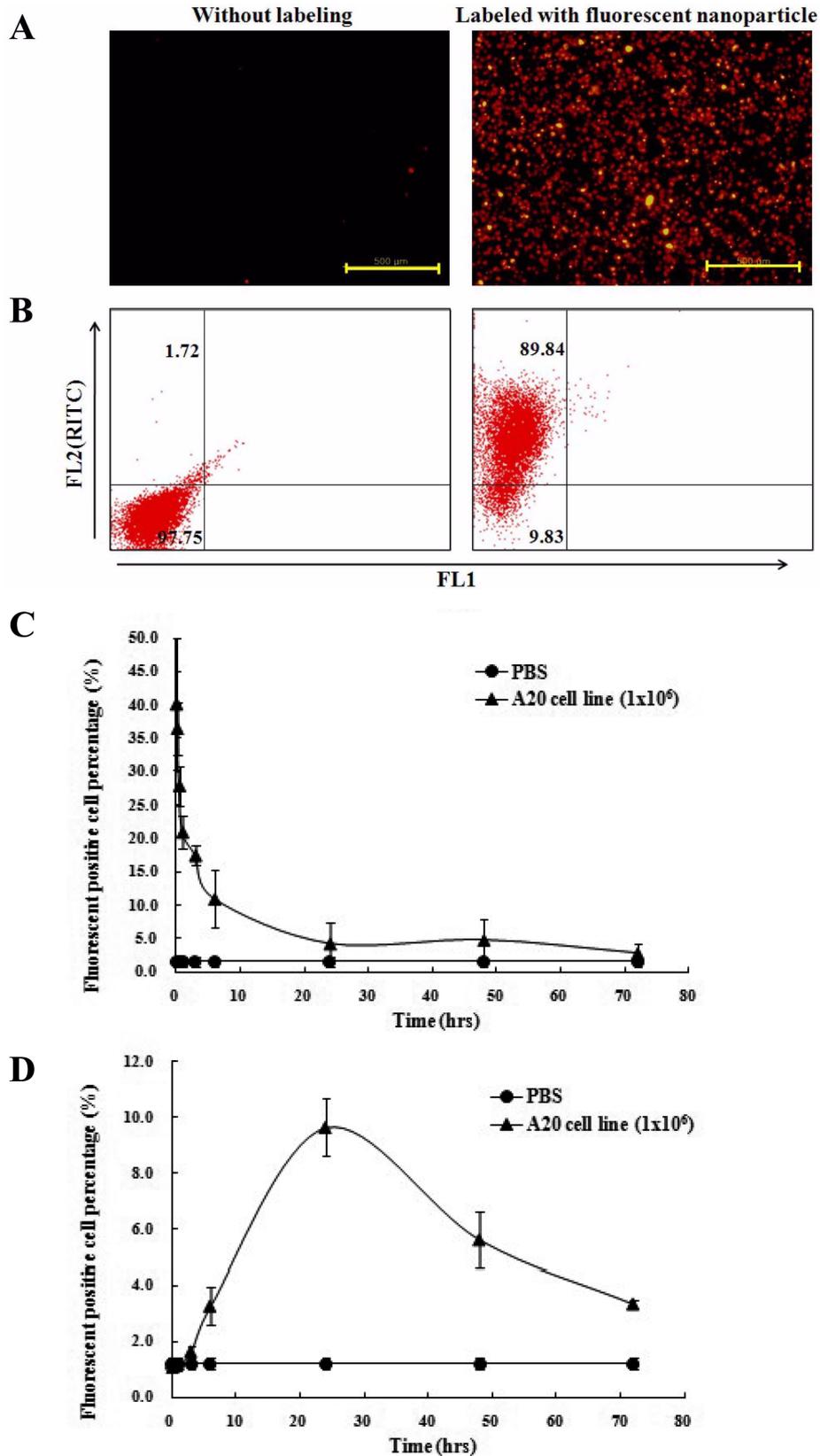


Figure 4. Detection of fluorescent nanoparticle (MNPs@SiO₂ RITC)-labeled A20 cells *in vitro* and *in vivo*. RITC signals in the labeled cells were detected by fluorescence microscopy (A) and FACS (B). *In vivo*, the infiltrations of A20 cells in PBMC (C) and bone marrow (D) were analysis by FACS. Data at every time point in each group consisted of 3 mice.

특히 본 연구에서 주목할 만한 점은 A20 세포주를 정맥 투여 후 6시간 내에 골수에서 투여한 A20 세포의 침투를 검출할 수 있었다는 점이다(Figure 4D). A20 세포는 Balb/cAnN 마우스와 같은 heplotype의 세포주이고, 특별한 중앙표지단백질이 없기 때문에 혈액이나 골수내에서 A20 세포를 검출할 수가 없었다. 본 연구에서는 A20 세포의 정맥투여 후 생체내에서 A20 세포의 골수내 침투를 확인하기 위하여 RITC 형광을 띠는 CELL-STALKER™II-CSR 실리카나노분자로 A20 세포주를 표지하였다. 형광표지자는 세포성장 속도에 영향을 미치지 않았으며(data not shown), 형광 물질의 세포 표지율은 전체 세포의 약 89.84%였으며(Figure 4B), 이는 기존에 보고된 결과의 동일한 효율이다(Park, 2010). 형광 물질로 표지된 중앙세포를 실험동물에 주사한 후 1분, 10분, 30분, 60분, 3시간, 6시간, 24시간, 48시간에 각각 3수씩 희생하여 혈액과 골수에서 FACS 분석을 실시하였다. 주사 1분 후에 혈액내에서 RITC 양성세포가 40.2%로 검출되었으나, 시간이 지남에 따라 점점 검출율이 줄어드는 것을 확인하였다. 골수의 경우 주사 후 3시간까지도 대조군과 차이가 없었으나, 6시간째부터는 골수내에서 유의성 있게 형광 표지된 세포들이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4D). 혈액내에서 형광 표지 중앙세포의 검출율이 점점 줄어드는 것은 중앙세포들이 각 기관과 장기에 확산, 침투되고, 일부는 탐식세포(macrophage) 등에 의해 대식작용(phagocytosis)이 일어나거나 체외로 배출된 것으로 분석할 수 있다. 정맥투여로 주입된 백혈병세포는 골수내에 빠른 시간에 침투되어 정착하는 것으로 나타났으나, 표지된 중앙 세포의 양은 골수내에서 24시간째에 10% 정도의 검출율을 나타냈으며, 점점 검출율이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 세포 성장에 따른 형광 표지 정도를 확인하기 위해 *in vitro*에서 A20 세포를 형광 표지한 후 1일, 3일, 7일째에 수거하여 FACS analysis를 실시하였다. 형광 표지 후 1일째와 3일째의 형광표지된 세포의 검출율은 각각 89.84%, 46.0%였으나, 7일째는 검출율이 1% 미만이었다. 이러한 결과는 A20 세포의 성장으로 인하여 형광 표지 세포 수의 감소에 의한 결과로 사료된다(Park, 2010). 따라서 골수내의 형광 표지 세포의 감소는 골수내 A20 세포의 분열에 의한 것으로 추측된다.

A20 세포주와 정상적인 면역력을 갖고 있는 Balb/c 마우스를 이용한 백혈병 동물모델은 주사 후 6시간 내에 골수 침투, 척추 주변조직으로의 신속한 침윤, 신경압박, 1×10^6 세포주를 주사하였을 때 평균생존기간 약 38.3일로써 매우 공격적인 동물모델이다. 또한 간, 척수, 기타 연조직에 전이성 중앙조직을 형성하는 동물모델이다. 특히 주사 후 6시간 내에 골수 침투는 본 연구에 의해서 처음 증명 되었으며, 또한 A20 세포의 골수 침투를 통한 간조직 등 다른 조직으로의 전이를 증명하였다. 따라서

Balb/c 마우스에 A20 세포주를 정맥으로 투여하는 방법은 림프종 동물모델로서뿐만 아니라 경제성, 실험의 용이성, 모델의 공격성 등을 고려할 때 여러 가지 백혈병 연구 생체모델로서의 우수한 가치를 가지는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Benjamin, R., Khwaja, A., Singh, N., McIntosh, J., Meager, A., Wadhwa, M., Streck, C., Ng, C., Davidoff, A.M. and Nathwani, A.C. (2007) Continuous delivery of human type I interferons (alpha/beta) has significant activity against acute myeloid leukemia cells in vitro and in a xenograft model. *Blood* 109(3), 1244-1247.
- Bonnet, D., Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U. and Dick, J.E. (1999) Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant.* 23(3), 203-209.
- Caretto, P., Forni, M., d'Orazi, G., Scarpa, S., Feraioni, P., Jemna, C., Modesti, A., Ferrarini, M., Roncella, S. and Foà, R. (1989) Xenotransplantation in immunosuppressed nude mice of human solid tumors and acute leukemias directly from patients or in vitro cell lines. *Ric. Clin. Lab.* 19(3), 231-243.
- Drexler, H.G., Matsuo, A.Y. and MacLeod, R.A. (2000) Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk. Res.* 24(11), 881-911.
- Fingert, H.J., Chen, Z., Mizrahi, N., Gajewski, W.H., Bamberg, M.P. and Kradin, R.L. (1987) Rapid growth of human cancer cells in a mouse model with fibrin clot subrenal capsule assay. *Cancer Res.* 47(14), 3824-3829.
- Fu, X.Y., Theodorescu, D., Kerbel, R.S. and Hoffman, R.M. (1991) Extensive multi-organ metastasis following orthotopic onplantation of histologically-intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. *Int. J. Cancer* 49(6), 938-939.
- Gahrton G. (1983) Treatment of acute leukemia--advances in chemotherapy, immunotherapy, and bone marrow transplantation. *Adv. Cancer Res.* 40, 255-329.
- Giovanella, B.C. and Stehlin, J.S. (1973) Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. I. Breeding and maintenance of "nude" mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 51(2), 615-619.
- Giovanella, B.C., Stehlin, J.S. and Williams, L.J. Jr. (1974) Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 52(3), 921-930.
- Glass, B., Uharek, L., Zeis, M., Loeffler, H., Mueller-Ruchholtz, W. and Gassmann, W. (1996) Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 93(2), 412-420.
- Goldman, J.M. (1987) Prospects for cure in leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 40(9), 985-994.
- Hawkins, B.L., Heniford, B.W., Ackermann, D.M., Leonberger, M., Martinez, S.A. and Hender, F.J. (1994) 4NQO carcinogenesis: A mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 16(5), 424-432.
- Huang, S.M. and Harari, P.M. (2000) Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 6(6), 2166-2174.
- Huang, S.M., Li, J., Armstrong, E.A. and Harari, P.M. (2002) Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Res.* 62(15), 4300-4306.

- Janssen, J.W., Steenvoorden, A.C., Losekoot, M. and Bartram, C.R. (1987) Novel transforming sequences in human acute myelocytic leukemia cell lines. *Oncogene* 1(2), 175-179.
- Killion, J.J., Radinsky, R. and Fidler, I.J. (1998) Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer metastasis Rev.* 17(3), 279-284.
- Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Kim, B.G., Park, S.J., Kim, H.W., Lee, K.H., Park, S.B., Lee, J.K. and Cho, M.H. (2006) Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.* 89(1), 338-347.
- Kim, J.S., Yoon, T.J., Yu, K.N., Noh, M.S., Woo, M., Kim, B.G., Lee, K.H., Sohn, B.H., Park, S.B., Lee, J.K. and Cho, M.H. (2006) Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *J.Vet. Sci.* 7(4), 321-326.
- Kiser, M., McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Ramage, J., Alexander, R.L., Kucera, G.L., Pettenati, M., Willingham, M.C., Miller, M.S. and Frankel, A.E. (2001) Oncogene-dependent engraftment of human myeloid leukemia cells in immunosuppressed mice. *Leukemia* 15(5), 814-818.
- Krishnaraju, K., Hoffman, B. and Liebermann, D.A. (1998) The zinc finger transcription factor Egr-1 activates macrophage differentiation in M1 myeloblastic leukemia cells. *Blood* 92(6), 1957-1966.
- Liu, J., Li, Y., Tang, L.J., Zhang, G.P. and Hu, W.X. (2007) Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. *Biomed. Pharmacother.* 61(4), 229-234.
- Lumkul, R., Gorin, N.C., Malehorn, M.T., Hoehn, G.T., Zheng, R., Baldwin, B., Small, D., Gore, S., Smith, D., Meltzer, P.S. and Civin, C.I. (2002) Human AML cells in NOD/SCID mice: engraftment potential and gene expression. *Leukemia* 16(9), 1818-1826.
- Machado, E.A., Gerard, D.A., Lozzio, C.B., Lozzio, B.B., Mitchell, J.R. and Golde, D.W. (1984) Proliferation and differentiation of human myeloid leukemic cells in immunodeficient mice: electron microscopy and cytochemistry. *Blood* 63(5), 1015-1022.
- Marie, J.P. (2001) Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr. Opin. Oncol.* 13(6), 463-469.
- McCormack, E., Bruserud, O. and Gjertsen, B.T. (2005) Animal models of acute myelogenous leukaemia—development, application and future Perspectives. *Leukemia* 19(5), 687-706.
- Nara, N. and Miyamoto, T. (1982) Direct and serial transplantation of human acute myeloid leukaemia into nude mice. *Br. J. Cancer* 45(5), 778-782.
- Park, K.S., Tae, J., Choi, B., Kim, Y.S., Moon, C., Kim, S.H., Lee, H.S., Kim, J., Kim, J., Park, J., Lee, J.H., Lee, J.E., Joh, J.W. and Kim, S. (2010) Characterization, *in vitro* cytotoxicity assessment, and *in vivo* visualization of multimodal, RITC-labeled, silica-coated magnetic nanoparticles for labeling human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine* 6(2), 263-276.
- Passineau, M.J., Siegal, G.P., Everts, M., Pereboev, A., Jhala, D., Wang, M., Zhu, Z.B., Park, S.K., Curiel, D.T. and Nelson, G.M. (2005) The natural history of a novel, systemic, disseminated model of syngeneic mouse B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 46(11), 1627-1638.
- Perentesis, J.P., Gunther, R., Waurzyniak, B., Yanishevski, Y., Myers, D.E., Ek, O., Messinger, Y., Shao, Y., Chelstrom, L.M., Schneider, E., Evans, W.E. and Uckun, F.M. (1997) *In vivo* biotherapy of HL-60 myeloid leukaemia with a genetically engineered recombinant fusion toxin directed against the human granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor. *Clin. Cancer Res.* 3, 2217-2227.
- Pieters, R. and Carroll, W.L. (2010) Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 24(1), 1-18.
- Ratajczak, M.Z., Kant, J.A., Luger, S.M., Hijiya, N., Zhang, J., Zon, G. and Gewirtz, A.M. (1992) *In vivo* treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(24), 11823-11827.
- Rombouts, W.J., Martens, A.C. and Ploemacher, R.E. (2000) Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model. *Leukemia* 14(5), 889-897.
- Scheper, M.A., Nikitakis, N.G., Chaisuparat, R., Montaner, S. and Sauk, J.J. (2007) Sulindac induces apoptosis and inhibits tumor growth *in vivo* in head and neck Squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 9(3), 192-199.
- Seif, A.E., Barrett, D.M., Milone, M., Brown, V.I., Grupp, S.A. and Reid, G.S. (2009) Long-term protection from syngeneic acute lymphoblastic leukemia by CpG ODN-mediated stimulation of innate and adaptive immune responses. *Blood* 114(12), 2459-2466.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L. and Leite, E.H. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154(1), 180-191.
- Tomkinson, B., Bendele, R., Giles, F.J., Brown, E., Gray, A., Hart, K., LeRay, J.D., Meyer, D., Pelanne, M. and Emerson, D.L. (2003) OSI-211, a novel liposomal topoisomerase I inhibitor, is active in SCID mouse models of human AML and ALL. *Leuk. Res.* 27(11), 1039-1050.
- Umeda, M., Komatsubara, H., Nishimatsu, N., Oku, N., Shibuya, Y., Yokoo, S. and Komori, T. (2002) Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma line of the salivary gland which is serially transplantable and spontaneously metastasizes to the lung in nude mice. *Oral Oncol.* 38(1), 30-34.
- Wasserman, R., Zeng, X.X. and Hardy, R.R. (1998) The evolution of B precursor leukemia in the E-mu-ret mouse. *Blood* 92(1), 273-282.
- Watanabe, S., Shimosato, Y., Kuroki, M., Sato, Y. and Nakajima, T. (1980) Transplantability of human lymphoid cell line, lymphoma, and leukemia in splenectomized and/or irradiated nude mice. *Cancer Res.* 40(7), 2588-2595.
- Xu, Y. and Scheinberg, D.A. (1995) Elimination of human leukemia by monoclonal antibodies in an athymic nude mouse leukemia model. *Clin. Cancer Res.* 1(10), 1179-1187.
- Zeis, M., Uharek, L., Hartung, G., Glass, B., Steinmann, J. and Schmitz, N. (2001) Graft-vs-leukemia activity and graft-vs-host disease induced by allogeneic Th1- and Th2-type CD4+ T cells in mice. *Hematol. J.* 2(2), 136-144.
- Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Steinmann, J., Dreger, P., Gassmann, W. and Schmitz, N. (1997) Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br. J. Haematol.* 96(4), 757-761.
- Zeng, X.X., Zhang, H., Hardy, R.R. and Wasserman, R. (1998) The fetal origin of B-precursor leukemia in the E-mu-ret mouse. *Blood* 92(10), 3529-3536.