

# 누드 마우스에서 초음파 유도하의 심장 내 유방암세포 주입을 통한 골전이암 모델 생성과 미세전산화단층촬영, 자기공명영상, 및 생물발광영상 분석<sup>1</sup>

박영진<sup>1, 2</sup> · 송은혜<sup>1, 3</sup> · 김설화<sup>1</sup> · 최상현<sup>4</sup> · 송호택<sup>1</sup> · 서진석<sup>1, 2, 3</sup>

**목적:** 누드 마우스에서 고해상도 초음파 유도 하에 암세포를 심장 내 주입하는 방법을 통한 유방암의 골전이 모델을 생성하고자 하였으며 생체 내에서의 골전이암의 발생과 분포 및 증식을 미세전산화단층촬영, 자기공명영상, 그리고 생물발광영상을 이용하여 평가하고자 하였다.

**대상과 방법:** 6주령된 누드 마우스를 호홉 마취한 후  $2 \times 10^5$ 개의 MDA-MB-231Bo-Luc 세포를 17MHz 고해상도 초음파 유도 하에 좌심실에 주입하였다. 주입 후 7주 동안 생물발광영상을 하였으며, 7주째에 미세전산화단층촬영과 자기공명영상으로 골용해 병변과 연부조직 전이암을 분석하였다. 영상에서 전이가 확인된 부위의 조직 슬라이드 절편을 얻고 헤마톡실린 에오신(hematoxylin-eosin) 염색과 cytokeratin 면역염색을 시행하여 현미경으로 관찰하였다.

**결과:** 전이암 생성율은 62.3%(5/8)이었다. 두부, 대퇴골부위와 척추에서 강한 생물발광 신호가 측정되었으며 2주부터 7주까지 세기가 증가하였다. 미세전산화단층촬영에서는 생물발광영상과 일치하는 두개골과 대퇴골 및 척추의 골용해 병변이 확인되었으며 자기공명영상과 조직 현미경 검사에서 대퇴골 주위로 자라난 종양과 소뇌에 발생한 전이암이 확인되었다.

**결론:** 초음파 유도하의 심장 내 종양세포 주입은 안전하고 높은 재현성으로 유방암의 골전이 모델을 형성할 방법으로서 이 동물 모델은 골전이암의 기전 연구와 치료제 평가에 유용하리라 생각한다.

골격계는 유방암 환자에서 가장 흔한 전이와 원위부 재발을 보이는 장기로서 진단 후 중간생존은 약 20개월 이상으로 골전이에 따르는 통증과 골절 및 고칼슘혈증 등은 고통스러운 병적 상태를 유발하여 삶의 질을 저하한다. 따라서 골전이암의 발생과정을 이해하고 이를 치료하기 위한 치료법 및 치료제 개발을 위해 생체 내에서의 진단 및 치료를 실험할 수 있는 전임상 동물모델에서의 연구가 매우 중요하다. 전이암의 이종이식편(xenograft) 동물모델은 암세포를 면역 결핍된 동물의 좌심실에 주입하여 얻을 수 있는데(1-3) MDA-MB-231 유방암 세포주는 골용해성 전이암 모델을 형성하는 것으로 보고되었다(2, 4). 그 외의 방법으로 Corey 등(5)은 누드 마우스의 경골에 전립선암세포를 직접 이식한 골경화성 전이암 모델을 보고하였고, Wang 등(6)은 누드마우스의 대퇴골에 MDA-MB-435 세포주를 주입하여 골용해성 및 골경화성 전이암을 보고

하였다. 누드랫을 이용한 연구로는 Kjonniksen 등(7)이 대퇴골에 골육종 세포주를 이식한 모델을 보고하였으며, Peterschmitt 등(8)은 대퇴동맥 내로 MDA-MB-231 세포주를 주입하여 대퇴골과 경골에 발생한 골용해성 병변을 보고하였다.

이들 동물모델에서 골전이암 형성의 평가는 주로 X-선 검사와 조직 현미경 검사로 이루어졌으며(2-5, 7, 8), 미세전산화단층촬영(micro-computed tomography)(9), <sup>99m</sup>Tc-MDP 스캐노그램(scintigram)(7), 양전자방출단층촬영(positron emission tomography, 이하 PET)(10), 그리고 생물발광영상(bioluminescence imaging)으로 전이암의 분포를 평가한 것(11-13) 등이 보고되었다. Song 등(14)은 생물발광영상에서 음성을 보인 정상면역 마우스에서 전이암을 평가하기 위하여 자기공명영상(magnetic resonance imaging, 이하 MRI)과 양전자방출단층촬영 영상을 사용하였으며, Mouchess 등(15)은 누드 마우스의 신경아세포종의 골전이 모델에서 X-선 영상, 미세전산화단층촬영, 7T 자기공명영상, 그리고 생물발광영상 등의 다면적 영상(multimodal imaging)을 시행하였다. 그러나 누드 마우스에서 유방암의 골전이암 동물 모델 생성을 위한 초음파 사용과 다면적 영상에 대한 연구는 보고된

<sup>1</sup>연세대학교 의과대학 영상의학교실 방사선의과학연구소

<sup>2</sup>연세대학교 국가핵심연구센터

<sup>3</sup>연세대학교 의과대학 두뇌한국 21

<sup>4</sup>민족사관고등학교

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-331-E00249).

이 논문은 2010년 7월 26일 접수하여 2010년 10월 14일에 채택되었음.

바 없다.

본 연구에서는 임상용 고해상도 초음파 유도 하에 루시페레이즈(luci-ferase)가 안정적으로 트랜스펙션된 MDA-MB-231 인간 유방암 세포주를 누드 마우스의 좌심실 내 주입하는 안전하고 재현성 높은 방법으로 골전이암 모델을 생성하고자 하였으며 전이암의 발생과 증식과정을 미세전산화단층촬영, 자기공명영상 및 생물발광영상으로 평가하고 조직학적 검사로 확인하고자 하였다.

## 대상과 방법

### 세포 준비

골 전이를 일으키는 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231Bo 세포(16)(미국 NIH National Cancer Center의 Steeg에게서 제공받음)에 luciferase plasmid인 pGL4.17(미국 NIH National Cancer Center의 Thorgeirsson에게서 제공받음)를 Lipofectamine plus reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 트랜스펙션(transfection)한 후 neomycin (800  $\mu$ g/ml; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 선별하여 안정적인 루시페레이즈 양성 세포주인 MDA-MB-231Bo-Luc(231Bo-luc)를 생성하였다. 생물발광의 측정은 enhanced luciferase kit (BD, BD moonlight™)를 사용하여 luminometer (Centro XS<sup>3</sup> LB960, Berthold, Germany)로 발광의 정도를 측정하여 가장 강한 발광을 나타내는 세포주를 선택하여 실험에 사용하였다. 세포배양은 DMEM (Gibco by Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지에 10% fetal bovine serum, 1% penicillin streptomycin, neomycin (200  $\mu$ g/mL)으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 배양기에서 배양하였다. 생물발광영상에서 Luciferase 유전자가 발현된 유방암 세포의 수에 따른 민감도를 알아보기 위하여 배양기(96 well plate: nunc, Denmark)에  $1 \times 10^5$  개의 세포 수로부터 1/2의 농도로 차례로 7번째까지 100  $\mu$ l의

배양액에 희석하여 782개의 세포까지 분주하였다. D-luciferin Potassium Salt (XR-1001, Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA)를 150  $\mu$ g/mL의 농도로 각 배양기에 첨가한 후 즉시 IVIS<sup>®</sup> Spectrum (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) 장비로 10초에서 1분간 영상을 얻었다.

### 전이 모델 생성

본 실험은 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. 6주령 된 암컷 BALB/c 누드 마우스 9마리가 실험에 사용되었다. 세포 이식 및 생체 영상 등 모든 동물실험 과정은 100% 산소 1 L/min에 isoflurane (Ilsung Pharmaceuticals Co., Ansan, Korea) 2~3%를 혼합한 흡입가스로 마취 유지한 상태에서 시행하였다. 마우스를 눕힌 상태에서 반창고로 양측 앞 발을 바닥에 고정한 후 알코올과 포비돈요오드액으로 마우스의 좌측 흉부를 소독하였다. 육안으로 흉부에서 심첨부의 박동을 확인한 후 그곳에서 고해상도 초음파 (iU22, Philips Medical Systems, Bothell, WA, USA)의 5~17 Mhz 선형 탐촉자로 좌심실의 단축상(short axis axial) 영상에서 주사 바늘(insulin syringe, 300  $\mu$ l, 29 G)을 유도하였다. 초음파 상에서 좌심실 내에 바늘의 끝이 위치함이 확인되면 주사기의 피스톤을 약간 뒤로 당겨 혈액이 주사기 내로 유입되는 것을 확인하였다. 그 후 100  $\mu$ l의 배양액에 분산시킨  $2 \times 10^5$  개의 231Bo-luc 세포를 천천히 주입하였다. 그림 1은 심장 내 종양 세포 주입의 초음파 영상으로서 좌심실 내에 바늘의 끝이 있는 것을 보여 주고 있다. 주입 후 마우스가 마취에서 깨어날 때까지 자세히 관찰하였다.

### 영상 획득 및 분석

전이 종양의 발생과 증식과정을 추적 관찰하기 위해서 231Bo-luc 세포를 심장 내 주입한 후 1일, 3일, 그리고 매주 최장 7주간 생물발광영상을 획득하였다. 증류수에 용해된

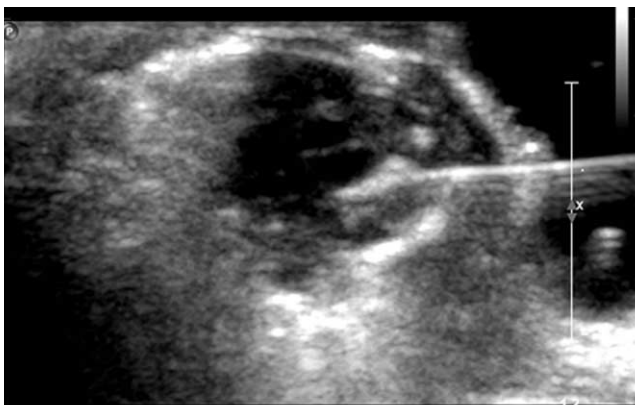


Fig. 1. Ultrasonogram of intracardiac injection to nude mouse. Ultrasound guided intracardiac injection to the left ventricle of nude mouse is shown. The needle tip is seen inside of the left ventricle.

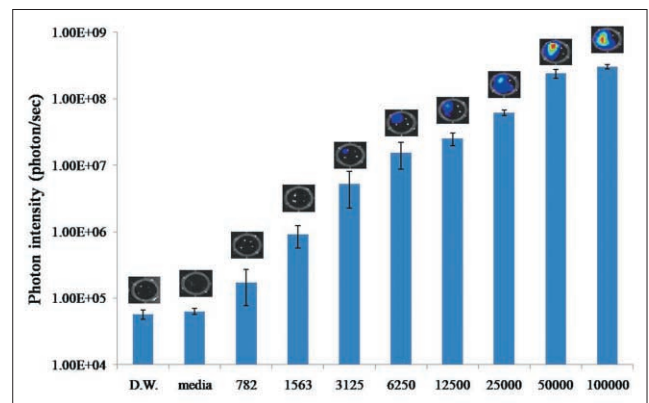


Fig. 2. Bioluminescence photon intensity of serially diluted MDA-MB-231Bo-Luc cell line in 96-well plate. Cells were serially diluted in from  $1 \times 10^5$  to  $7.8 \times 10^3$  cells/well. Wells with media (no cells) and distilled water (D.W.) were included as control.

luciferin 150 mg/kg를 복강 내에 주사 15분 후 IVIS® Spectrum으로 영상을 하였다. 영상 촬영 변수는 FOV: 20 cm, binning: medium, exposure time: 3분, f-Stop: 1을 사용하였다. 획득된 영상자료는 Mac Pro workstation (Apple computer, Cupertino, CA, USA)으로 전송한 후 Living Imaging Software version 3.1(Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA)을 사용하여 생체 내 전이 종양의 분포와 각 개체에서 발생하는 총 광자방출량을 측정하였다.

전이에 의한 골용해성 병변을 평가하기 위하여 7주째에 미세전산화단층촬영(NFR-Polaris G90MVC, Nano Focus Ray, 광주, 대한민국)을 시행하였다. 고해상도의 마우스 전신 영상을 얻기 위해 두부, 흉부, 복부의 세 부분으로 나누어 영상을 시행하였으며 흉부영상은 호흡과 심박동에 의한 인공물을 제거하기 위해 호흡 및 심박 동조를 시행하였다. 영상의 변수는 tube voltage 90 kV, 180 uA에서 스캔을 시행하였으며 재형성된 영상은 pixel size 35  $\mu$ m, slice thickness 69  $\mu$ m였다. 마우스 전신을 영상화하는데 총 30분이 소요되었다.

자기공명영상은 임상용 3.0 Tesla 자기공명영상장비 (Intera, Philips Medical System, Netherlands)와 내경 4 cm의 mouse coil을 사용하여 T2 강조영상을 종양세포 주입 후 7주째에 획득하였으며 영상획득 변수는 다음과 같다. FOV(mm) = 50; RFOV(%) = 70; Matrix scan = 224; reconstruction = 512; TR = 3,200 ms; TE = 60 ms; TSE factor 12; slice thickness 0.5 mm; slice number 14. 대퇴골 병변 부위에 대한 영상 획득 시간은 8분이 소요되었다.

### 조직검사

7주 영상 촬영 후 누드 마우스를 안락사시킨 뒤 개흉하여 좌

심실을 통해 4% paraformaldehyde로 관주하여 조직을 고정하고, 영상 검사 결과 골 전이가 확인된 장기 부위를 분리하여 표본을 얻었다. 파라핀으로 고정된 조직을 6  $\mu$ m 두께의 슬라이드 절편으로 얻고 hematoxylin-eosin 염색 및 면역염색을 시행하여 골 전이 여부를 현미경으로 관찰하였다. 면역염색은 cytokeratin 항체(DAKO, N1590)와 EnVision+System-HRP (K4006, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 실시하였고 hematoxylin QS (H-3404, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 대조 염색하여 Olympus BX40 현미경을 사용하여 40배 및 200배 배율에서 종양을 관찰하였다.

### 결 과

생물발광영상에서 231Bo-luc 세포의 광자방출 강도를 측정 한 결과  $1 \times 10^5$  개의 세포에서  $3 \times 10^8 \pm 2.3 \times 10^7$  photon/sec의 강도로 측정되었으며  $3 \times 10^3$  개의 세포숫자에서도  $10^6$  이상의 민감한 광자강도를 보였다(Fig. 2). 고해상도 초음파 유도하에 시행한 심장 내 세포주입에서 모든 개체에서 성공적인 주입이 되었으며 주입 후 마취회복도 정상적이었다.

누드 마우스에 231Bo-luc 유방암 세포를  $2 \times 10^5$  개를 심장 내에 주입한 후 1주~7주까지 생물발광 영상을 얻은 결과 주입 직후부터 1주까지는 머리, 척추, 사지에서 강한 발광이 관찰되었다가 점차 감소하여 발광 정도가 최소로 감소하여 평균  $9.3 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^5$  photon/sec의 신호강도를 보였다. 2주째부터 다시 발광 강도가 증가하여 시간이 지날수록 신호의 세기가 증가하여 7주째는 평균  $9.18 \times 10^9 \pm 5.0 \times 10^9$  photon/sec의 신호강도를 보였다(Fig. 3).

전체 9마리의 누드 마우스 중 1마리는 2주째에 사망하였는데 부검 상 특이소견은 없었다. 나머지 8마리 중 5마리에서 전

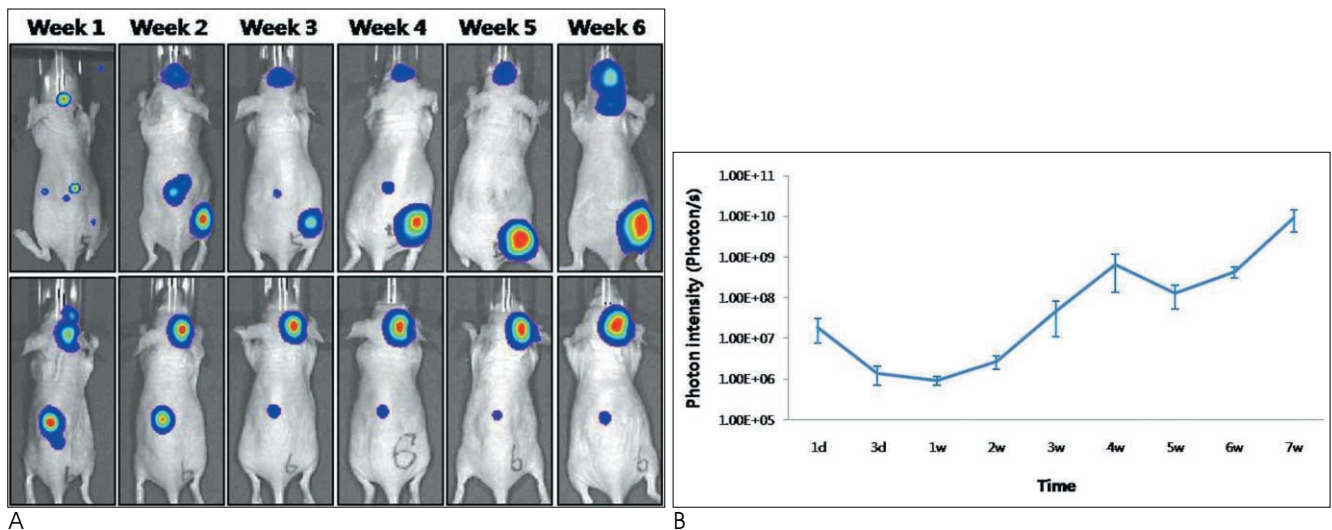


Fig. 3. Growth kinetics of MDA-MB-231Bo-luc cell line in individual mice.

A. Bioluminescence images from a representative mice, taken from the dorsal side, with every week intervals after injection of  $2 \times 10^5$  MDA-MB-231Bo-Luc cells. Brain, femur and spine metastasis was detected.

B. Serial average photon flux intensity from all animal.



이가 관찰되었는데(62.5%) 그 중 3마리에서는 뇌 전이가 동반하여 관찰되었다. 해부검사에서 내부 장기에서 전이된 종양은 발견되지 않았다. 개체 내에서 종양이 발생한 위치를 미세전산화단층촬영 및 자기공명영상과 연관 지어 알아보기 위해 7주째에 생물발광 영상을 얻을 때 마우스의 앞뒤 좌우 네 방향으로 2차원 영상을 얻었으며 또한 3차원 영상을 얻었다. 그림 4에서는 대표적인 동물의 네 방향 생물발광 2차원 영상과 3차원 영상 및 미세전산화단층촬영과 자기공명영상 영상을 보여주고 있다. 생물발광영상에서는 오른쪽 대퇴부와 좌측 두부에서 강한 신호가 나오는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4A). 대퇴골 부위의 미세전산화단층촬영 영상에서는 골용해 병변이 피질골을 파괴한 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 4B) 미세전산화단층촬영의 3차원 재조합 영상에서는 종양에 의한 골파괴 병변의 범위가 잘 관찰되었다(Fig. 4C). 대퇴골 부위의 자기공명 T2 강조영상에서는 대퇴골의 파괴와 대퇴골 피질을 뚫고 대퇴골 주변부로 둘러싸며 형성된 종양이 고신호 강도로 관찰되었다(Fig. 4D). 그림 5는 대표적인 다른 개체에서 발생한 전이암에 대한 3차원 생물발광영상, 미세전산화단층촬영, 및 자기공명영상 T2 강조영상을 보여주고 있는데 생물발광영상에서의 발광부위와 일치하는 두부 및 척추 부위에서 피질골의 파괴가 미세전산화단층촬영 상에서 관찰된다. 자기공명영상 T2 강조영상에서는 두개강 내 및 척추강 내에 형성된 전이종양이 고신호 강도로 관찰되었다(Fig. 5).

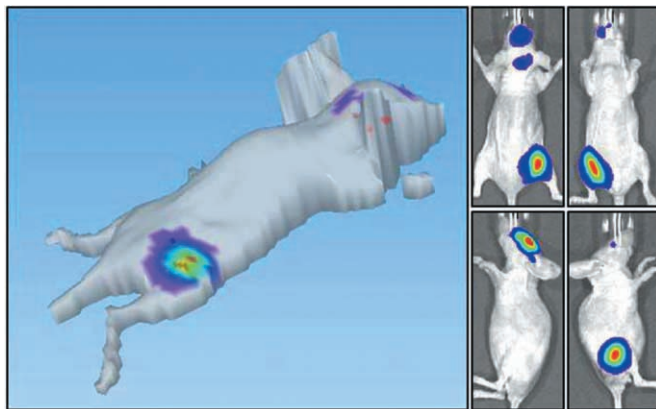
영상에서 확인된 종양 부위 조직의 현미경 소견상 소뇌, 대

퇴골 및 척추에서 형성된 유방암의 전이 종양이 hematoxylin-eosin 염색과 면역염색상에서 확인이 되었다(Fig. 6).

## 고 찰

전이암의 형성은 원발종양에서 종양세포가 혈관 또는 림프선으로 유출되어 혈액과 림프를 따라 순환하다가 원위부에서 혈관주위 조직으로 침투하고 신생혈관 의존적으로 군락을 형성하여 증식하면서 새롭게 암이 발생하는 과정에 의해 진행하게 된다(4, 17). 이렇게 발생한 전이암은 치료에 반응하지 않는 경우가 많으며 그 결과 높은 사망률을 보이게 된다(18). 종양의 발생과 전이과정은 종양-숙주 경계부위의 국소 환경 내에서의 조직 및 종양세포의 상호작용에 의존하는 것으로 알려져 있으며(19) 전임상 동물모델은 종양 발생의 병리적과정을 이해하고 치료를 위한 약물을 시험할 수 있어 매우 중요하다. 이를 위한 소동물 종양 모델은 정위적 이종이식편(orthotopic xenograft) 모델과 형질전환(transgenic) 모델로 분류할 수 있으며 형질전환 모델에서 골전이는 드물어서(14) 모델 생성이 비교적 쉬우며 빠른 시간 간에 종양을 생성할 수 있는 이종이식편 모델이 많이 사용되고 있고 이들은 인간의 각 장기에서 발생하는 종양을 모델로 하여 종양의 발생에 대한 연구와 이의 치료를 목적으로 연구되어 오고 있다.

이종이식편 종양 모델 중 흔히 사용되는 방법으로 종양 세포를 피하에 이식하는 것이 있는데 종양의 성장을 측정하기 쉽다



A

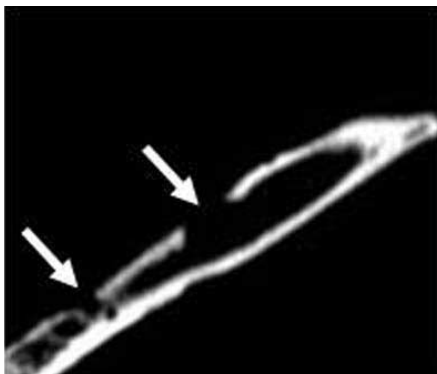
Fig. 4. Multimodal imaging showing femur metastasis.

A. 3D (left) and 2D (right small figures in prone, supine, right lateral, and left lateral positions) bioluminescence images, signal was shown on brain and right femur.

B. Micro-CT image shows cortical osteolysis of the right femur (arrows).

C. The 3D reconstructed image of micro-CT shows lesion extent of bone metastasis on the femur (arrows).

D. Axial T2 weighted MR image shows extraskeletal extension of the metastatic tumor (arrow).



B



C



D

는 장점을 갖고 있으나 국소환경을 반영하지 못하는 단점이 있다. 정위적 종양 모델은 국소적인 종양 숙주환경이 실제와 유사하여 종양의 성장과 전이에 관한 연구에 필수적이며 또한 장기별로 특화된 동물모델은 항암 효과를 갖는 약물의 효과를 평가하는데 매우 중요하다(20-22). 본 연구에서는 골전이암을 생성하기 위해 초음파 유도하에 종양세포를 실험동물의 심실 내에 주입하는 방법으로 안전하고 높은 비율로 재현성있게 골전이암의 생성을 확인할 수 있었다. 육안으로는 흉골로부터 좌측으로 약 3 mm, 두 번째 늑간에서 심장박동이 보이는 부위를 표적으로 주사바늘을 삽입하게 되는데 6주령 누드 마우스의 좌실실의 직경은 고에코도로 관찰되는 심장내피를 기준으로 약  $3 \pm 0.5$  mm로 매우 작아서 초음파 유도 없이 해부학적 표지만을 사용하는 방법으로는 실패율이 높다. 확실한 심장 내 주입을 위해 개흉을 한 후 주사하는 방법이 사용되기도 하였으나(3) 이는 매우 침습적인 방법이었다. 마우스의 심장을 영상화하는 데는 30-60 MHz의 초고해상도 초음파가 이용되지만 본 연구에서는 심장 내 세포주입을 유도하기 위하여 임상용 17 MHz 선형 초음파 탐촉자로 충분히 가능하였다. 심장 내 종양세포 주입 시에 초음파를 사용함으로써 얻는 이점은 실시간으로 주사바늘의 위치를 확인하여 주사바늘의 끝이 정확히 심실 내에 위치시키도록 한 후 세포가 주입되는 것을 영상으로 확인할 수 있어 종양세포의 손실이나 실험동물의 소실 없이 시술이 이루어질 수 있다는 점이다. 예비실험을 통해 파악된 심장을 통한 세포 주입 시 실패하는 요인으로는 심실내피막이 주사 바늘에 의해 천막 모양으로 들러 올려지고 주사 바늘의 끝

이 심실내피 하에 걸쳐 종양세포의 심실내피 하 주입이 이루어지면 혈류로 충분한 양의 세포주입이 이루어지지 않아 전이암 생성률이 낮아지게 되며, 잘못 표적하거나 심장벽의 손상으로 인해 심장압전이 발생하였을 때 또는 대동맥 근위부를 심실로 오인한 경우는 실험동물을 잃게 된다. 그러나 몇 번의 실습으로 빠른 숙달이 가능하며 부작용을 최소화할 수 있었다.

골전이암 동물 모델에서 종양의 확인과 평가는 주로 X-선 검사 또는 실험 동물의 안락사 후 해부 조직 검사를 통해서 이루어졌는데, X-선 영상으로의 평가는 골전이암이 상당히 진행된 후에야 진단할 수 있기 때문에 초기에 전이암의 발생을 평가하는 것 및 정확한 전이 종양의 위치와 숫자 등 생체 내에서의 분포를 확인하는 데에 한계점이 있다. 미세전산화단층촬영을 이용하면 작은 골전이 병변을 평가하는데 X-선 검사보다 좀 더 유리하지만, 조영제를 사용하지 않는 이상 연부조직과 장기로의 전이를 평가하는데 제약이 따른다. 자기공명영상은 골수와 골외부 연부조직의 전이를 평가하는데 용이한데(15, 23) 소동물에서 임상용 자기공명 영상장비를 이용하여 시행한 전이암 모델에 대한 연구는 Song 등(24)이 누드렛에서 초상자성 산화철로 표지된 MDA-MB-231 유방암 세포의 뇌전이를 3T 자기공명영상 및 생물발광영상으로 보고한 바 있으나, 마우스에서 골전이를 임상용 자기공명영상 장비로 연구한 것은 본 연구가 최초이다. 마우스 코일을 사용하여 200 um의 충분한 공간 해상도를 얻을 수 있어 척추와 대퇴골 그리고 뇌조직 및 골외의 연부조직 전이를 높은 대조도로 영상화할 수 있었다.

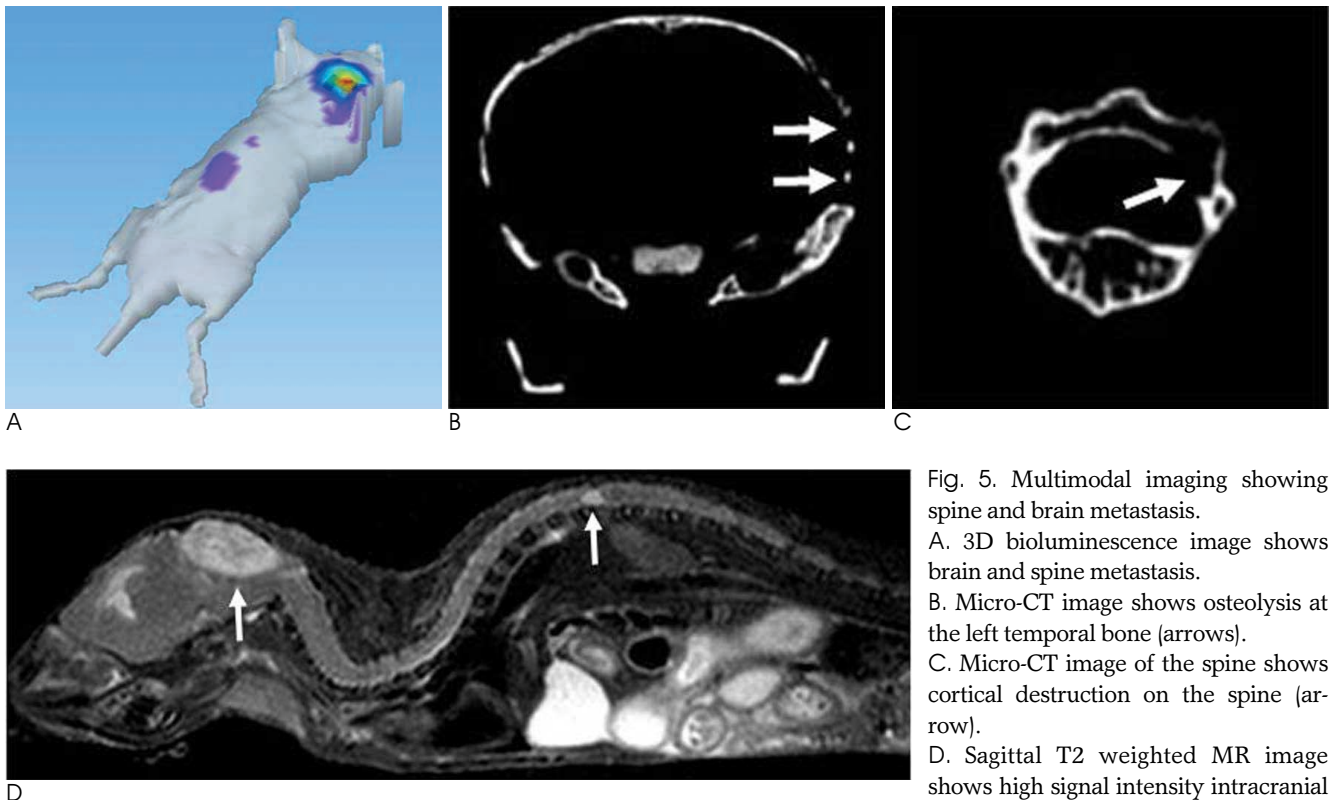
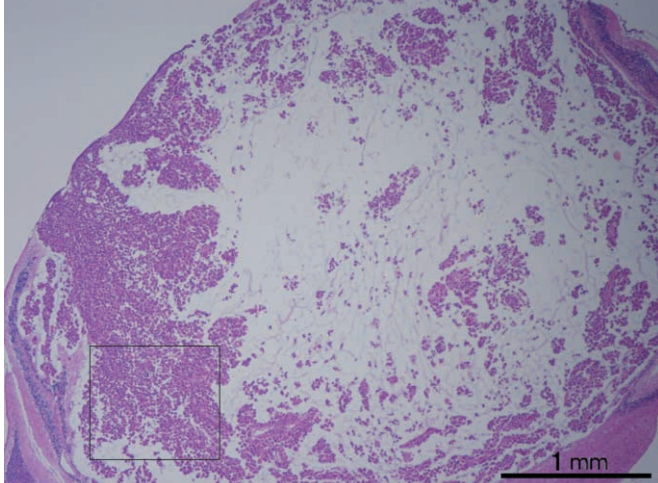


Fig. 5. Multimodal imaging showing spine and brain metastasis.  
A. 3D bioluminescence image shows brain and spine metastasis.  
B. Micro-CT image shows osteolysis at the left temporal bone (arrows).  
C. Micro-CT image of the spine shows cortical destruction on the spine (arrow).  
D. Sagittal T2 weighted MR image shows high signal intensity intracranial and spinal canal mass lesions (arrows).

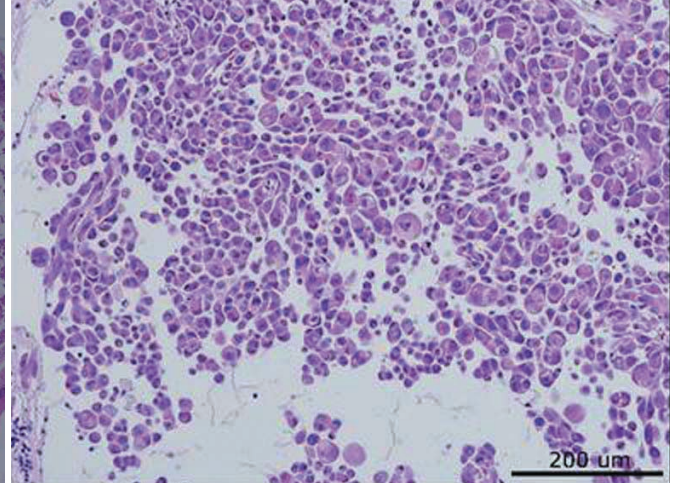


생체 내에서의 종양의 발생과정과 종양의 생존 및 증식 정도를 반영하는 대사상태에 대한 정보는 양전자방출단층촬영을 통하여 민감하게 또한 정량적으로 측정할 수 있는데(10, 14) 생물발광영상을 통하여도 종양의 증식 상태를 민감하게 정량적으로 측정할 수 있다(11-13, 24). 생물발광영상은 소동물에

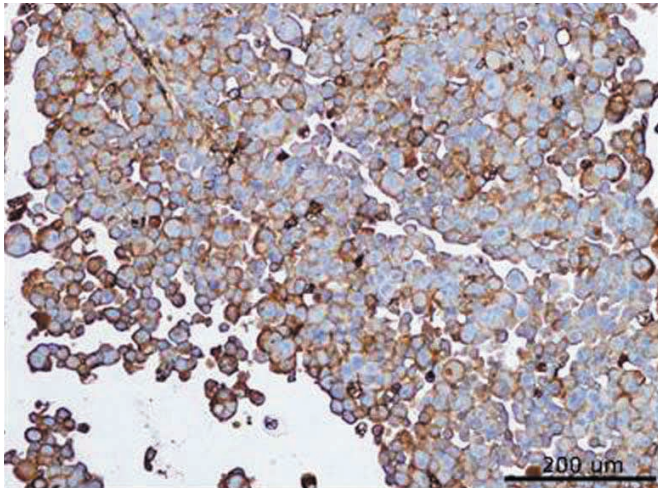
서 전신에 분포하는 전이 종양의 발생 위치 및 성장 정도를 정량적으로 파악하는데 매우 유리한 영상방법이다. 생체 내에서는 종양세포로부터 발생한 광자가 근육과 피부 등의 조직을 통과하면서 산란하여 소실되는 부분이 있기 때문에 정확한 정량에는 한계가 있으나 생체 외 실험을 통해 종양세포의 숫자와



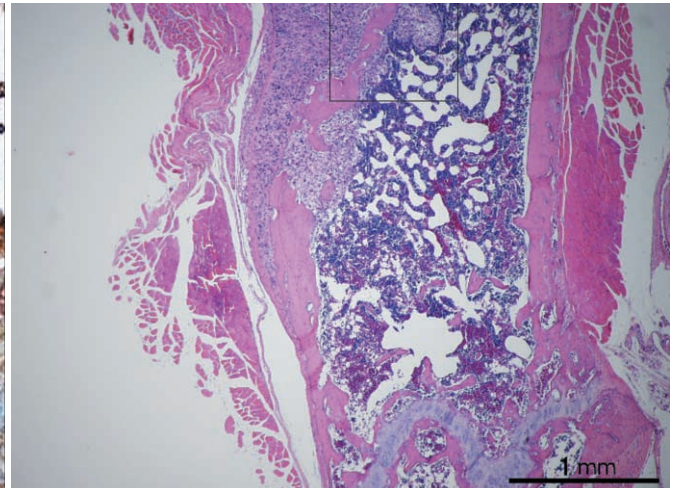
A



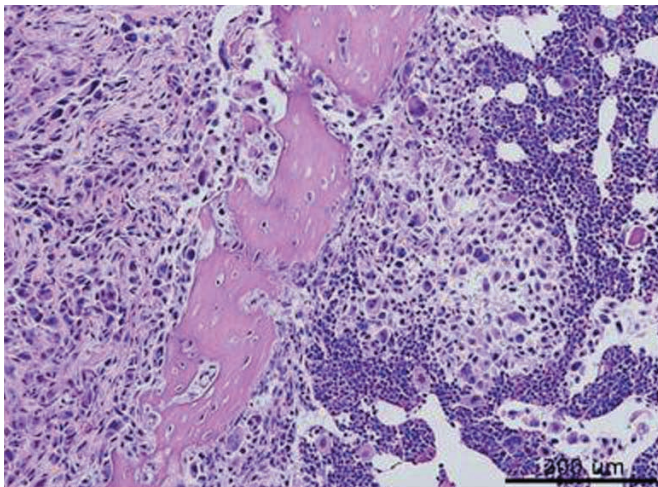
B



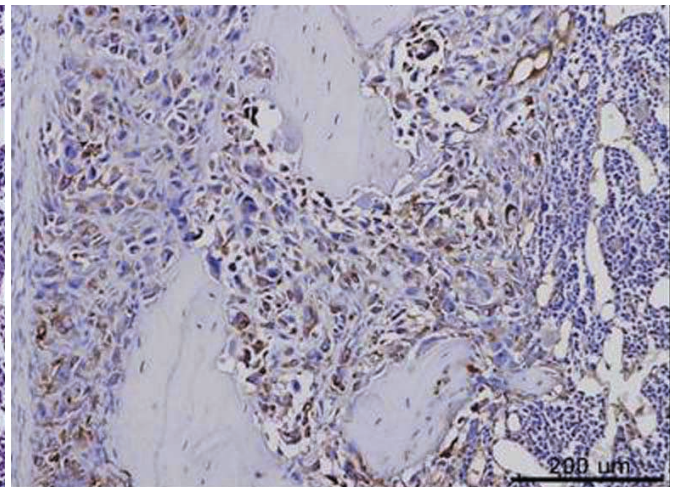
C



D



E



F



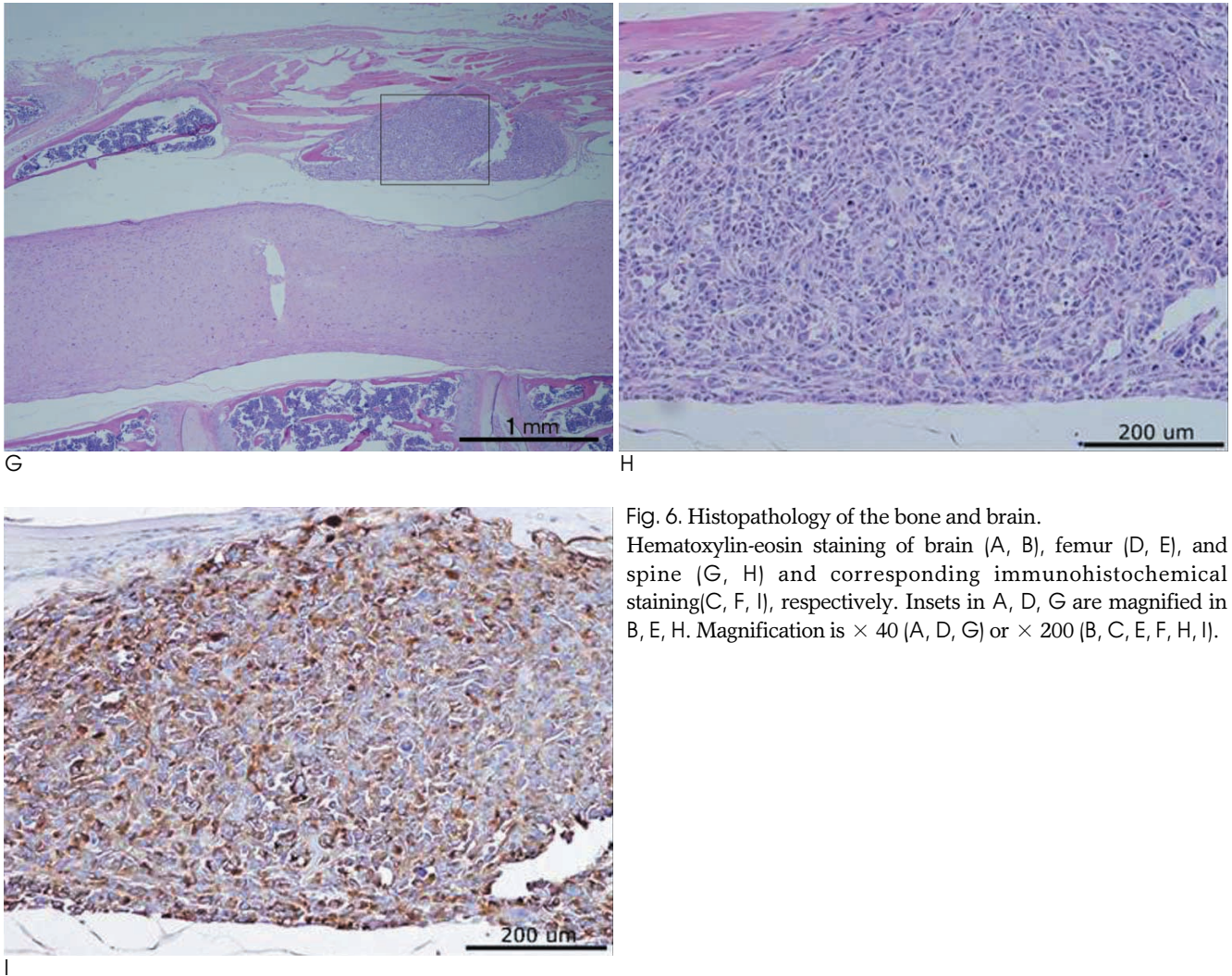


Fig. 6. Histopathology of the bone and brain. Hematoxylin-eosin staining of brain (A, B), femur (D, E), and spine (G, H) and corresponding immunohistochemical staining (C, F, I), respectively. Insets in A, D, G are magnified in B, E, H. Magnification is  $\times 40$  (A, D, G) or  $\times 200$  (B, C, E, F, H, I).

발생한 광자의 양이 비례함을 실험을 통하여 알 수 있었으며 비교적 민감하게 종양의 분포와 증식상태를 판단할 수 있게 하였다. 실험동물에서 생체 내에 주입된 종양세포는 대부분 소실되고 그 중 1% 내외의 종양세포만이 전이암 형성에 기여하는 것으로 알려져 있는데 Song 등(24)은 누드렛에서 뇌전이 유발암의 전이 시기에 따른 정량적 생물발광 영상 및 조직학적 검사로 표적장기인 뇌에서 종양세포 주입 후 1주째 전이된 종양 세포의 수가 가장 감소하며 또한 가장 낮은 생물발광 정도를 보이다가 종양 증식에 따라 생물발광이 다시 증가하는 것을 보고하였다. 본 연구에서 심장 내 주입 후 일주일째에 생물발광의 정도가 가장 낮은 수준으로 감소하였다가 다시 증가하는 양상은 주입된 종양세포 중 생존하는 세포의 수가 감소하였다가 생착에 성공한 생존한 종양세포가 증식하는 것을 반영하는 것으로서 이해할 수 있다. 생물발광 영상은 또한 한번에 다섯 마리의 마우스의 전신 영상을 얻을 수 있어 빠른 시간에 효과적으로 검사 및 평가가 이루어질 수 있는 장점이 있다.

미세전산화단층촬영 영상은 전이된 암에 의한 골용해성 병변을 고해상도로 명확히 보여주어 생물발광 광학영상에서 확인된 병변 부위와 일치함을 보여 주었다. 광학영상에서 뒷다리

와 두부에서 나오는 강한 생물발광 신호강도와 일치하는 미세전산화단층촬영 영상은 대퇴골의 중간부위와 두개골의 골융해 병변임을 확인할 수 있었는데 자기공명영상에서는 대퇴골의 피질골의 파괴부위를 넘어서 대퇴골을 둘러싼 큰 종양형성을 확인할 수 있었으며 두부에서는 소뇌부 전체를 침범하여 형성된 뇌전이 종양이 확인되었다. 전이암 동물모델을 생성하고 평가하는 데 있어서 생물발광영상은 누드 마우스 개체에서 전이암의 발생 분포와 종양 증식 정도를 정량적 방법으로 측정 가능하게 하며, 미세전산화단층촬영 영상은 피질골 파괴병변의 진단에 유리하며, 자기공명영상은 골격 외 종양 및 뇌전이 종양과 같은 연부조직 종양의 크기와 범위를 평가하는데 적절하여 각각 평가할 수 있는 내용이 달라서 상호 보완적인 영상을 같이 시행하는 것이 바람직하겠다.

결론적으로, 누드 마우스에서 유발암의 골전이 모델을 만들기 위한 초음파 유도하의 심장 내 암세포 주입 방법은 안전하며 전이 종양 형성의 높은 재현성을 가진 효과적인 방법이다. 또한, 생물발광영상, 미세전산화단층촬영, 자기공명영상의 복합적 활용은 골전이암을 진단하고 평가하는데 상호 보완적인 방법으로써 매우 유용한 진단 및 평가 방법이다. 끝으로 유발

암의 골전이 마우스 모델은 전이암 발생 연구와 새로운 치료제 시험을 위한 전임상 실험 재료로 매우 유용할 것으로 생각한다.

### Acknowledgement

This work was supported by the Korean Research foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2008-331-E00249)

### 참 고 문 헌

1. Yoneda T. Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone. *Histol Histopathol* 1997;12:1145-1149
2. Yoneda T, Sasaki A, Mundy GR. Osteolytic bone metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:73-84
3. Arguello F, Baggs RB, Frantz CN. A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. *Cancer Res* 1988;48:6876-6881
4. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF, et al. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 1996;98:1544-1549
5. Corey E, Quinn JE, Bladou F, Brown LG, Roudier MP, Brown JM, et al. Establishment and characterization of osseous prostate cancer models: intra-tibial injection of human prostate cancer cells. *Prostate* 2002;52:20-33
6. Wang CY, Chang YW. A model for osseous metastasis of human breast cancer established by intrafemur injection of the mda-mb-435 cells in nude mice. *Anticancer Res* 1997;17:2471-2474
7. Kjonniksen I, Winderen M, Bruland O, Fodstad O. Validity and usefulness of human tumor models established by intratibial cell inoculation in nude rats. *Cancer Res* 1994;54:1715-1719
8. Peterschmitt J, Bauerle T, Berger MR. Effect of zoledronic acid and an antibody against bone sialoprotein II on MDA-MB-231(GFP) breast cancer cells in vitro and on osteolytic lesions induced in vivo by this cell line in nude rats. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:449-459
9. Bauerle T, Adwan H, Kiessling F, Hilbig H, Armbruster FP, Berger MR. Characterization of a rat model with site-specific bone metastasis induced by MDA-MB-231 breast cancer cells and its application to the effects of an antibody against bone sialoprotein. *Int J Cancer* 2005;115:177-186
10. Hsu WK, Virk MS, Feeley BT, Stout DB, Chatzioannou AF, Lieberman JR. Characterization of osteolytic, osteoblastic, and mixed lesions in a prostate cancer mouse model using 18F-FDG and 18F-Fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 2008;49:414-421
11. Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J, Purchio T. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 2005;7: R444-R454
12. Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, et al. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 2005;115:44-55
13. Wetterwald A, van der Pluijm G, Que I, Sijmons B, Buijs J, Karperien M, et al. Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol* 2002;160:1143-1153
14. Song H, Shahverdi K, Huso DL, Wang Y, Fox JJ, Hobbs RF, et al. An immunotolerant HER-2/neu transgenic mouse model of metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6116-6124
15. Mouchess ML, Sohara Y, Nelson MD Jr, DeClerck YA, Moats RA. Multimodal imaging analysis of tumor progression and bone resorption in a murine cancer model. *J Comput Assist Tomogr* 2006;30:525-534
16. Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 2001;16:1486-1495
17. Jonkers J, Derksen PW. Modeling metastatic breast cancer in mice. *J Mammary Gland Biol* 2007;12:191-203
18. Hortobagyi GN. Developments in chemotherapy of breast cancer. *Cancer* 2000;88(12 Suppl):3073-3079
19. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411:375-379
20. Kim S. Animal models of cancer in the head and neck region. *Clin Exp Otorhinolar* 2009;2:55-60
21. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, Corn S, Schneider A, McCauley LK. Animal models of bone metastasis. *Cancer Treat Res* 2004;118:47-81
22. Sano D, Myers JN. Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncol* 2009;1:32
23. Rozel S, Galban CJ, Nicolay K, Lee KC, Sud S, Neeley C, et al. Synergy between anti-CCL2 and docetaxel as determined by DW-MRI in a metastatic bone cancer model. *J Cell Biochem* 2009;107:58-64
24. Song HT, Jordan EK, Lewis BK, Liu W, Ganjei J, Klaunberg B, et al. Rat model of metastatic breast cancer monitored by MRI at 3 tesla and bioluminescence imaging with histological correlation. *J Transl Med* 2009;7:88



## A Bone Metastasis Nude Mouse Model Created by Ultrasound Guided Intracardiac Injection of Breast Cancer Cells: the Micro-CT, MRI and Bioluminescence Imaging Analysis<sup>1</sup>

Young Jin Park, M.S.<sup>1,2</sup>, Eun Hye Song, B.S.<sup>1,3</sup>, Seol Hwa Kim, M.S.<sup>1</sup>, Sang Hyun Choi<sup>4</sup>,  
Ho-Taek Song, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>, Jin-Suck Suh, M.D., Ph.D.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiology, Research Institute of Radiological Science, College of Medicine, Yonsei University,

<sup>2</sup>National Core Research Center, Yonsei University,

<sup>3</sup>BK21 Project, College of Medicine, Yonsei University, <sup>4</sup>Korean Minjok Leadership Academy

**Purpose:** The purpose of this study was to develop a nude mouse model of bone metastasis by performing intracardiac injection of breast cancer cells under ultrasonography guidance and we wanted to evaluate the development and the distribution of metastasis in vivo using micro-CT, MRI and bioluminescence imaging.

**Materials and Methods:** Animal experiments were performed in 6-week-old female nude mice. The animals underwent left ventricular injection of  $2 \times 10^5$  MDA-MB-231Bo-Luc cells. After injection of the tumor cells, serial bioluminescence imaging was performed for 7 weeks. The findings of micro-CT, MRI and the histology were correlated with the 'hot' lesions seen on the bioluminescence imaging.

**Results:** Metastasis was found in 62.3% of the animals. Two weeks after intracardiac injection, metastasis to the brain, spine and femur was detected with bioluminescence imaging with an increasing intensity by week 7. Micro-CT scan confirmed multiple osteolytic lesions at the femur, spine and skull. MRI and the histology were able to show metastasis in the brain and extraskelatal metastasis around the femur.

**Conclusion:** The intracardiac injection of cancer cells under ultrasonography guidance is a safe and highly reproducible method to produce bone metastasis in nude mice. This bone metastasis nude mouse model will be useful to study the mechanism of bone metastasis and to validate new therapeutics.

**Index words :** Breast Neoplasm  
Disease Model, Animal  
Luminescent Measurement  
Magnetic Resonance Imaging  
Neoplasms Metastasis

Address reprint requests to : Ho-Taek Song, M.D., Ph.D., Department of Radiology, College of Medicine, Yonsei University  
250 Seongsanno, Seodaemun-gu, Seoul 120-752 Korea.  
Tel. 82-2-2228-2370 Fax. 82-2-393-3035 E-mail: hotsong@yuhs.ac