

# 골수침윤과 말초혈액에 파종을 보인 한국인 악성 림프종 환자의 말초혈액으로부터 수립한 EBV-음성 악성 림프구성 종양 B-세포주의 수립 및 특성

조선대학교 의과대학 병리학<sup>1</sup>, 내과<sup>2</sup>, 치료방사선과<sup>3</sup>, 약리학<sup>4</sup> 및  
전남대학교 의과대학 병리학교실<sup>5</sup>

전호종<sup>1</sup> · 이미자<sup>1</sup> · 정유경<sup>1</sup> · 박유환<sup>2</sup>  
정춘해<sup>2</sup> · 오윤경<sup>3</sup> · 최철희<sup>4</sup> · 정상우<sup>5</sup>

## Establishment and Characterization of an Epstein-Barr Virus-negative B-cell Line from a Patient with Dissemination of Peripheral Blood and Bone Marrow by Malignant Lymphoid Cell

Ho Jong Jeon, M.D.<sup>1</sup>, Mi Ja Lee, M.D.<sup>1</sup>, Yu Kyung Jeong, M.D.<sup>1</sup>,  
Yoo Hwan Park, M.D.<sup>2</sup>, Choon Hae Chung, M.D.<sup>2</sup>, Yoon Kyung, Oh M.D.<sup>3</sup>,  
Chul Hee Choi, M.D.<sup>4</sup> and Sang Woo Cheong, M.D.<sup>5</sup>

Department of the Pathology<sup>1</sup>, Internal Medicine<sup>2</sup>, Therapeutic Radiology<sup>3</sup>,  
Pharmacology<sup>4</sup>, Chosum University Medical School and  
Department of Pathology<sup>5</sup>, Chonnam National University Medical School, Kwangju, Korea

A human malignant lymphoid cell line(JeKo-1) was established from a Korean patient with retroperitoneal tumor presenting peripheral blood and bone marrow involvement by malignant lymphoid cells. This cell line was established from peripheral blood, and the cell line had the identical immunophenotypic features as malignant cells from the peripheral blood. The established cell line had features of a mature B-cell phenotype with no evidence for commitment to other lineages. The JeKo-1 grows in suspension with a doubling time of 33 hours. By light and electron microscopic examination, the established cells had a follicular center showing, a small, cleaved, lymphoid appearance, and had a large amount of cytoplasm containing few vacuoles and an irregular cytoplasmic membrane. Immunophenotypic analyses with monoclonal antibodies using flow cytometry showed a monoclonal IgM kappa and CD5<sup>-</sup> B-cell phenotype. The cells were non-reactive for T-cells and myeloid/monocyte antigens, and no evidence of Epstein-Barr virus nuclear antigen by polymerase chain reaction. DNA analysis showed a hypodiploid stemline with a DNA index of 0.83. The established cells were strongly reactive for bcl-2 and c-myc onco-protein, but lacked expression of multidrug resistance gene protein, p-glycoprotein by Western blot analysis. Karyotypic analysis of JeKo-1 showed 40-41 chromosomes. This cell line should be a valuable tool to study the dissemination of malignant

접 수 : 1996년 4월 3일, 게재승인 : 1996년 5월 20일

주 소 : 광주시 동구 서석동 375, 우편번호 501-759

조선대학교 의과대학 병리학교실, 전호종

\*본 연구는 1993년 조선대학교 우수연구소 지원 연구비(CRF-93-204)에 의하여 수행되었음.

lymphoma into the peripheral blood and bone marrow. (Korean J Pathol 1996; 30: 792 ~ 809)

**Key Words:** Lymphoma cell line, Follicular center cell, B-cell, IgM kappa, Epstein-Barr virus-negative

## 서 론

병리조직학적으로 다양한 형태의 악성 림프종이나 형태학적으로 다양한 형의 백혈병 그리고 기타 골수나 림프조직을 구성하고 있는 세포에서 기원한 종양세포의 세포주 수립에 관한 이론 및 기술의 발전은 이들 질병의 병태생리나 종양의 발생기원세포 및 종양 발생기전을 밝히는 연구에 지대한 공헌을 하였다<sup>1-12</sup>.

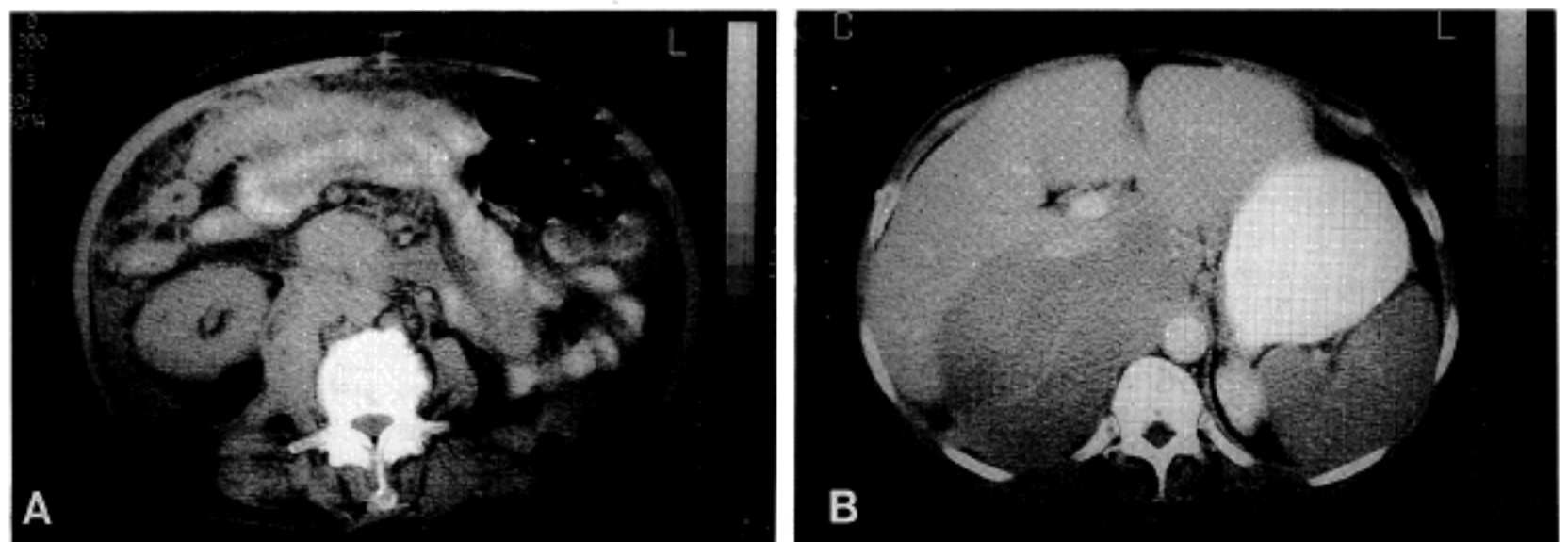
아프리카형 Burkitt 림프종으로 부터 수립된 림프종 세포주의 특성에 대하여 1964년 Epstein등<sup>13,14</sup>이 처음으로 보고한 후 다양한 형태학적 특성을 지닌 악성 림프종과 백혈병환자의 말초혈액, 림프절, 비장 및 악성 삼출액(malignant effusions)으로 부터 세포주의 수립이 많이 이루어졌다<sup>1-12,15,16</sup>. 실험관외에서 림프계 세포가 지속적인 증식을 하기 위해서는 Epstein-Barr virus(EBV)의 존재가 필수적인 것으로 생각하였던 시기가 있었으나<sup>17</sup> 이는 EBV-계놈 음성의 Burkitt 림프종 세포가 수립됨으로서 이러한 개념은 바뀌게 되었다<sup>18-23</sup>. 그러나 EBV-음성의 악성 림

프종에 관한 세포주 수립은 매우 어렵다고 알려져 있으며 현재까지 수립된 EBV-음성 악성 림프종 세포주의 특성에 관한 보고는 그리 흔하지 않다<sup>1,3-9,12</sup>.

한국인에서 발생한 악성 림프종이나 백혈병 환자의 종양세포로부터 수립된 세포주에 관한 국내의 문헌 보고는 현재까지 없으며 특히 세포주 수립이 극히 어렵다고 알려진 EBV-계놈 음성의 B 세포 림프종의 세포주 수립에 대한 연구보고는 현재까지 국내에서는 전무한 실정이다. 저자들은 후복막에서 발생한 EBV-계놈 음성의 B 세포 악성 림프종 세포가 골수에 전이하고 말초혈액에 과종을 초래한 78세 한국인 여성의 말초혈액으로부터 종양세포를 분리한 후 세포주 수립에 성공하였기에 수립된 세포주의 특성에 관하여 보고하고자 한다.

## 증 례 보 고

78세 한국여성이 1994년 3월 22일 우측 옆구리의 동통과 식후 심와부 복통을 주소로 입원하였다. 전산화 단층 촬영 검사상 후복막에 종괴가 관찰되었는데 이종괴는 후복막의 우측 신장주위의 우, 전,



**Fig. 1a.** Relatively well defined low attenuated mass with bulged contour and displaced portal vein in right lobe of liver posteriorly. Also noted enlarged spleen with diffuse low density, suggesting infiltrative disease.

**Fig. 1b.** Poorly defined and irregularly margined mass showing enhancement and necrotic area in right side posterior pararenal space. Invasion to right psoas muscle, inferior vena cava and uncinus process of pancreas.

후 방형으로 퍼져 있었으며 내장때과 대동맥주변의 림프절 그리고 횡장주위의 림프절이 크게 종대된 소견을 보였다. 간우엽의 후방에서 종괴의 음영이 관찰되었으며 비장은 전체적으로 침윤성 비대를 보였다(Fig. 1a, 1b). 흉부사진 검사상 흉부는 정상이었으나 말초혈액 검사와 골수흡인 검사에서 종양세포를 관찰하였다. 말초혈액은 백적아구성 빈혈(leukoerythroblastic anemia)상을 보였고 백혈구수는  $45,000/mm^3$ 으로 증가되어 있었다. 백혈구의 differential count상 악성 림프구성 종양세포 70%, 간상 중성구 10%, 분엽성 중성구 4%, 림프구 10%, 단구 5% 그리고 호산구 1%이었다. 악성 림프구성 세포는 면역세포화학적 검사상 leukocyte common antigen(LCA)과 L26 그리고 CD19에 양성이었으며 IgM, kappa감쇄항원이 확인되어 B 세포 악성 림프종이 골수에 전이를 일으키고 말초혈액에 과종을 초래한 결과라고 판단하였다. 골수 흡인 검사상 골수세포들은 과세포성 골수(hypercellular marrow)의 소견을 보였으며 거대핵세포의 수는 감소를 보였다. 심상 조혈전구세포는 관찰되지 않았으며 골수의 대부분은 악성 림프구성 종양세포로 완전히 대체되어 있었다.

말초혈액과 흡인한 골수에서 관찰한 악성 림프구성 종양세포의 형태학적 특징은 그 크기가 15~40  $\mu m$ 로서 다양하였고 세포연은 불규칙하였으며 세포질은 풍부하였고 Wright염색상 푸른빛을 띄고 있었다. 소수의 종양세포는 세포질과 핵내에 공포를 지

니고 있었으며 내다수 종양세포의 핵은 분할되어 있거나(cleaved) 절흔된(notched) 상태이었으며 염색질은 미세하였고 1~2개의 분명한 핵소체를 지니고 있었다. 일부세포의 핵은 이분되어 있거나(bisceted) 또는 다엽상(multilobulated)을 띄고 있었다(Fig. 2a, 2b). 골수흡인 세포에 대한 면역세포화학적 검색결과 말초혈액의 악성 림프구성 종양세포를 대상으로 시행한 검사결과와 동일하게 LCA, L26, CD19에 양성반응을 보였다. 후복막에서 기원한 종괴의 생검은 환자의 거부로 실시하지 못하였기 때문에 후복막 종괴의 병리조직학적 진단은 확인하지 못하였으나 말초혈액과 골수흡인 생검에서 관찰된 종양세포의 형태학적 특징과 면역세포화학적 검색결과를 종합하여 판단해 볼때 후복막에서 기원한 종괴는 B세포 악성 림프종으로 추측하였으며 병리조직학적 형은 어포 중심세포에서 기원한 악성 림프구성 종양으로 추상하였다. 이들 악성 림프구성 종양세포는 골수에 전이를 초래하였고 설국에는 말초혈액에 가지 과종하였을 가능성이 크다고 저자들은 판단하였다. 골수생검을 시행하였는데 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매되어 처리된 종양세포의 형태학적 특징은 말초혈액과 골수흡인 검사에서 관찰된 종양세포의 형태와 유사하였으며 시행한 면역조직화학적 검사상 종양세포는 LCA, L26, MB2에 양성반응을 보였다(Fig. 3a, 3b).

환자의 병기(stage)는 IV로 결정하였으며 종양은

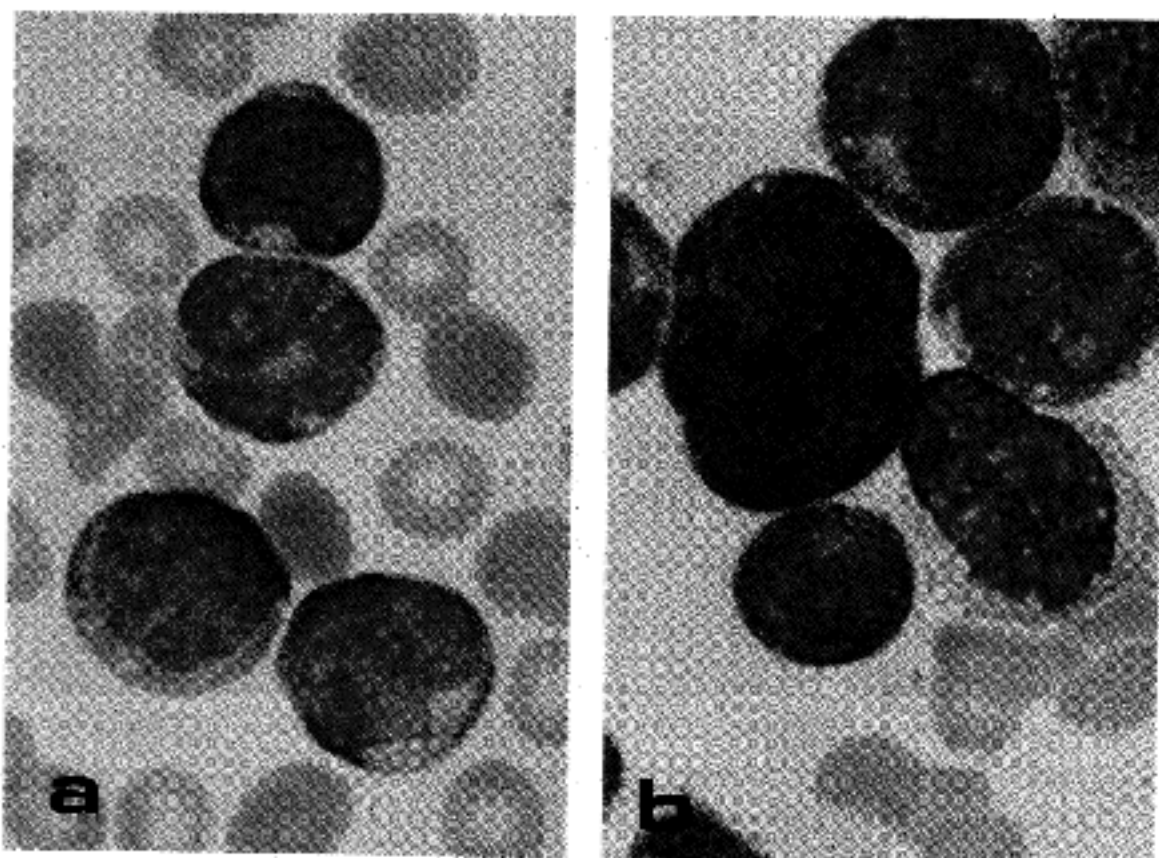


Fig. 2. Peripheral blood disclosed atypical lymphocytes showing notched or cleaved nuclei and conspicuous one or two nucleoli(a; left). Bone marrow aspiration biopsy showed atypical lymphoid cell proliferation. The individual cells showed notched or cleaved nuclei and multilobulation containing conspicuous nucleoli(b; right).

매우 급격히 진행하였고 환자는 화학요법을 거부하였으며 진단받은 후 14일째인 1994년 4월 12일 양측성 흉막 삼출액과 복수 그리고 심장 정지로 환자는 사망하였다. 부검은 실시하지 못하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 세포주의 수립과 유지

1994년 3월 30일 환자의 말초혈액으로부터 종양 세포의 수립을 시작하였다. 악성 림프구성 종양세포의 분리는 heparin으로 처리한 환자의 말초혈액 10 ml로 부터 Ficoll-Hypaque(Histopaque-1077, Sigma)을 이용한 밀도구배 원심분리로 분리하였다. 분리한 세포는 HBSS(Hanks balanced salt solution, Sigma)에서 2회 씻은 후 RPMI1640배지(Gibco, Grand Island, NY, USA), Ham's F-12 (Sigma), HBSS를 2:1:1의 비율로 혼합한 후 56°C에서 30분간 연처리한 fetal bovine serum(FBS, Gibco, BRL)을 20%되게 배지에 첨가한 후 100 units/ml의 penicillin G, 100 µg/ml의 streptomycin과 250 ng/ml의 amphotericin B를 혼합하여 25 cm<sup>2</sup>의 배양용기(Falcon, Becton-Dickinson, New Jersey, USA)에 배지 1 ml당 5×10<sup>6</sup>의 세포밀도로 분주하여 7.5% CO<sub>2</sub>배양기내의 36.5°C에서 배양하였다. 배지의 교환은 1주에 2회 교환하였다.

### 2. Plating Efficiency

0.3% 한천(Bio-Rad)에 20% FBS를 첨가하여 제작

한 배지를 35 mm 페트리접시(Falcon, USA)에 분주한 다음 수립된 세포를 페트리접시 면적(cm<sup>2</sup>)당 20개가 되게 분주하여 7.5% CO<sub>2</sub>배양기내 36.5°C에서 배양하였으며 형성된 세포의 집락(colony)은 14일 후에 세수하였다. 이를 10회 반복하였다. Plating efficiency는 형성된 세포 집락을 배지에 분주한 세포의 수로 나누다음 100을 곱하여 계산하였다.

### 3. 수립된 세포주의 형태학적 검사

(1) 광학현미경적 소견: 부유배양세포를 자동 도말표본장치(Sakura, Tokyo, Japan)를 이용하여 도말표본을 제작하였고 이를 아세톤에서 10분간 고정한 후 Wright염색을 실시하였다.

(2) 전자현미경적 소견: 세포의 pellets을 만든 후 4°C의 인산완충액의 3% glutaraldehyde에 24시간동안 일차 고정한 다음 4°C의 1% OsO<sub>4</sub>에서 1시간 동안 후 고정하였다. 제일별 알코올에서 탈수과정을 거친 후 epoxy resin에 포매한 다음 초미세박절편을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 다음 JEM 2000FXII 전자현미경으로 관찰하였다.

### 4. 면역표현형 검색

(1) 면역세포화학적 염색을 이용한 면역표현형 검색: 말초혈액과 골수흡인검사 및 골수생검으로부터 제작된 도말표본과 포브말린에 고정하여 파라핀에 포매된 파라핀절편과 수립된 세포주를 SCID(severe combined immunodeficiency) mouse에 이종이식하여

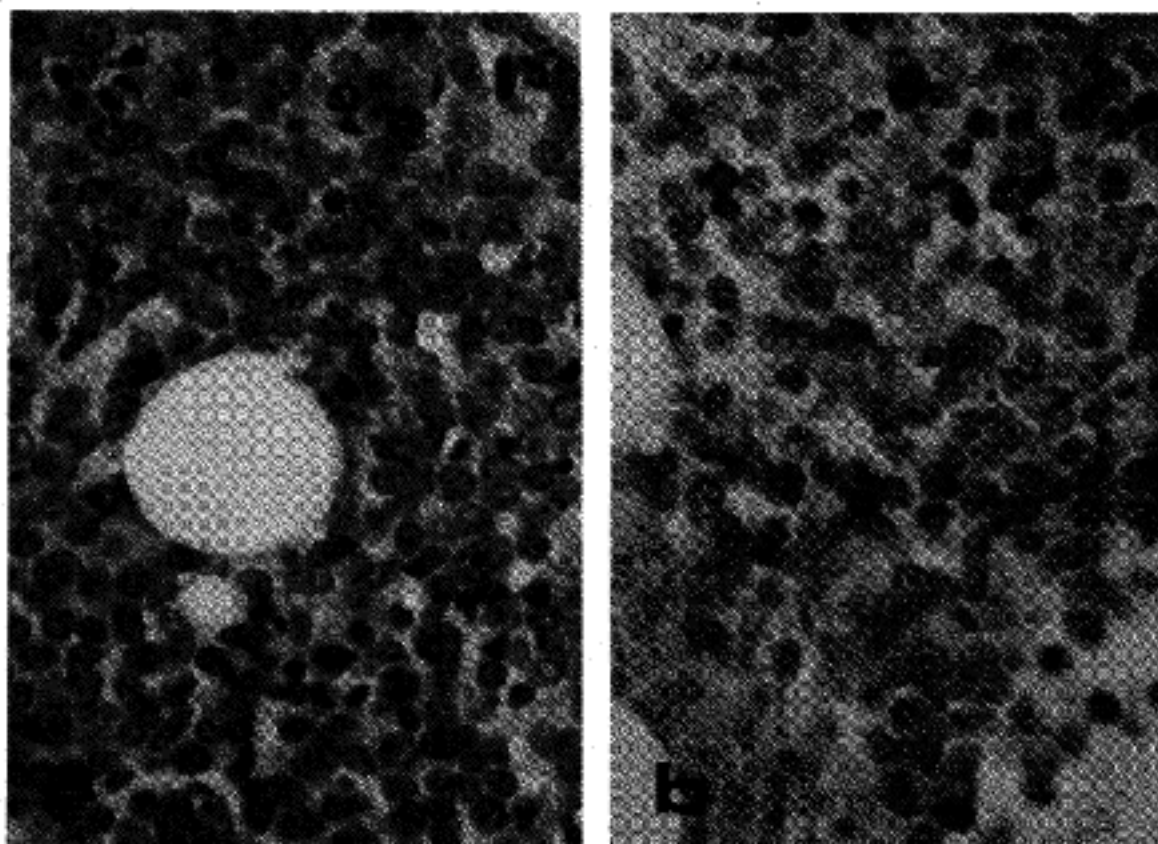


Fig. 3. Bone biopsy disclosed diffuse infiltration of large and small lymphoid cells. The large cells showed irregular nuclear membrane and conspicuous nucleoli (a: left, ×250). Immunohistochemical stain of bone biopsy for MB2 showing reactivity of infiltrating lymphoid cells(b:right, ×250).



Table 1. Primary antibodies used in this study

Antibodies	Specificity	Working dilution	Commercial Source
NA1/34 (CD1)	Cortical thymocytes	1 : 50	Dako
MT910 (CD2)	T cells, most NK cells	1 : 50	Dako
Anti-Leu 4 (CD3)	T cells	1 : 20	BD
Anti-Leu 3a (CD4)	Helper/inducer T cells	1 : 20	BD
DK23 (CD5)	Mature T cells, mantle B lymphocytes	1 : 50	Dako
DK24 (CD7)	Mature T cells	1 : 50	Dako
Anti-Leu 2a (CD8)	Cytotoxic/suppressor T cells	1 : 20	BD
Anti-CALLA (CD10)	pre-B cell subset	1 : 30	Dako
Anti-Leu M5 (CD11c)	Monocytes, granulocytes macrophages	1 : 1	BD
My 7(g-1) (CD13)	Myeloid cells	1 : 50	Dako
Anti-Leu M3 (CD14)	Monocytes, macrophages, granulocytes, dendritic cells	1 : 20	BD
Anti-Leu 11b (CD16)	Fc- $\gamma$ RIIIA/Fc- $\gamma$ RIIIB	1 : 20	BD
Anti-Leu 12 (CD19)	precursor B and B cells	1 : 20	Dako
IF8 (CD21)	precursor and mature B cells	1 : 50	Dako
Ber-H2 (CD30)	Hodgkin and RS cells	1 : 10	Dako
Anti-Leu M9 (CD33)	Pan myeloid, monocytic cells	1 : 20	BD
MT1 (CD43)	T cells, granulocytes, monocytes	1 : 20	BS
LCA (CD45RB+CD45)	Lymphocytes, some histiocytes	1 : 25	Dako
MB1 (CD45RA)	B cells	1 : 1	BG
UCHL1 (CD45RO)	Activated T cells, Thymocytes	1 : 25	Dako
Anti-Leu 19 (CD56)	NK cells, some T cells	1 : 50	Dako
HLA-DR	Monocytes, macrophages, activated T cells, B cells	1 : 20	BD
Anti-IgG	anti-human surface IgG	1 : 10	Dako
Anti-IgM	anti-human surface IgM	1 : 10	Dako
Anti-Kappa	anti-human kappa light chain	1 : 10	Dako
Anti-Lambda	anti-human lambda light chain	1 : 10	Dako
Lysozyme	PMNL, monocytes, histiocytes	1 : 500	Dako
$\alpha$ 1-antitrypsin	Same as the above	1 : 400	Dako
c-myc	anti-human c-myc oncoprotein	1 : 100	OS
bcl2	anti-human bcl2 oncoprotein	1 : 20	Dako
p-glycoprotein	anti-human p-glycoprotein	1 : 1000	C

BD: Becton-Dickinson, BS: Bio-science, BG: BioGenex, OS: Oncogene Science, C: Centocore, RS: Reed-Sternberg cells, PMNL: polymorphonuclear leukocytes

형성된 종괴의 동결 절편조직 및 파라핀절편에 대하여 면역세포화학적 검색을 실시하였다. B 림프구를 동정하기 위한 일차항체는 L26, CD19, CD20, CD45RA, IgG, IgM, kappa 경쇄, lambda 경쇄, CD10 등 이었으며 T 림프구를 동정하기 위한 일차항체는 CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD43 CD45RO를 사용하였다. 단핵구 및 과립구를 동정하

기 위한 항체는 CD11C, lysozyme,  $\alpha$ 1-antitrypsin을 사용하였다. 기타 CD45(LCA), CD30(BerH2)을 사용하여 종양세포에 대한 면역표현형을 검색하였다.

(2) 유세포 계측기를 이용한 면역표현형 검색: 유세포 계측기를 이용한 말초혈액과 골수흡인 세포 그리고 수립된 세포주의 세포에 대한 면역표현형 검사는 FACscan(Becton-Dickinson, USA)을 이용하여

분석하였다. 면역형광염색은 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 부착된 CD3, CD4, CD10, CD13, CD16, CD19, CD21항원을 직접법에 의하여 그리고 CD5은 간접법에 염색한 후 검색하였고 phycoerythrin(PE)이 부착된 CD8, CD11C, CD13, CD16, CD19, CD33, CD56, HLA-DR를 염색하여 검색하였다. 각세포는 CD3/CD19, CD19/HLA-DR의 조합으로 검색하였으며 사용한 일차 항체는 Table 1에 자세히 기술하였다.

### 5. bcl-2 및 c-myc 종양유전자 단백질검출

배양중인  $10^6$ 개의 세포를 0.25% saponin(Sigma, USA)과 1% paraformaldehyde가 함유된 4°C 인산완충액에 고정시킨 후 인산완충용액에서 2회 씻은 다음 bcl-2(Dako, 1:20)와 c-myc(Oncogene Science, 1:100) 종양유전자 단백질의 일차항체를 4°C에서 30분간 부치시키고 이어 FITC-conjugated goat antimouse IgG (BioSource, 1:20희석)를 4°C에서 30분간 부치시켜 FACscan에서 분석하였다.

### 6. 면역글로부린 분석

세포질과 세포막표면에 존재하는 면역글로부린을 검색하기 위하여 직접법에 의하여 면역형광염색을 시행한 후 FACscan을 이용하여 면역글로부린의 isotype을 검색하였다. 세포질에 있는 면역글로부린(cytoplasmic immunoglobulin)을 염색하기 위해서 배양중인  $10^6$ 개의 세포를 0.25% saponin, 1% paraformaldehyde가 함유된 인산완충용액에서 5분간 고정 후 FITC가 부착된 IgG, IgM, kappa 경쇄의 일차항체와 RPE가 부착된 lambda 경쇄의 일차항체를 이용하여 분석하였다.

### 7. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen(EBNA) 검색

EBNA에 대한 검색은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 검색하였다. PCR반응 혼합액은 100  $\mu$ l이었으며 여기에는 수립된 세포주에서 유출한 DNA 1  $\mu$ g, 50pM의 oligonucleotide primer 1, 2, 20 mM의 4dNTP(Boehringer Mannheim, Germany), 10X reaction buffer(USB, Amersham, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>(USB, Amersham, USA), 2.5Unit Taq DNA polymerase(USB, Amersham, USA), 170  $\mu$ g/ml의 bovine serum albumin(Janssen, Belgium)을 포함하였다. 이들 혼합액에 100  $\mu$ l의 mineral oil을 첨가하였으며 사용된 DNA 증폭기기는 DNA Thermoblock (Biometra, Germany)이었으며 30cycle을 반복하였다.

DNA predenaturation은 95°C에서 350초, annealing

은 45°C에서 120초, elongation은 63°C에서 120초, denaturation은 90°C에서 60초 그리고 마지막회의 post-elongation은 63°C에서 420초를 시행하였다. Oligonucleotide primer는 EBNA-2A Bam hY fragment(5' CCA CCA GCA GCA CCA GCA CA 3'; 5' GGT GGC CAC CAT GGT GGC CC 3')이었다. 양성대조군으로서는 Raji, PTLC-1<sup>11</sup> 세포주에서 유출한 DNA를 사용하였다.

PCR product의 18 ml를 3% Nusieve/1% Seakem (FMC, USA)한천에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide에 염색한 후 자외선 등(UV/DNA photographic system SL III, Vilber Lourmat TFP-20M, France)에서 확인하였다. 분자 크기 표식자는  $\phi$ 174RF DNA/Hae III fragment(Gibco,USA)를 이용하였다.

### 8. DNA Index 및 Parameter 검사

DNA index를 검사하기 위해서 배양중인  $10^6$ 개의 세포를 인산 완충용액에서 2회 씻은 후 4°C의 100% 에탄올에서 30분간 고정한 후 37°C에서 40분간 RNase로 처리하였다. 세포를 propidium iodide(50 mg/ml, Sigma)에 염색한 후 세포주기와 DNA index를 FACscan을 이용하여 검색하였으며 대조군으로서는 정상 닭의 적혈구를 사용하였다.

### 9. 염색체 검사

수립된 세포의 염색체 이상유무를 검사하기 위하여 배양중에 있는 세포에 colcemid 0.05  $\mu$ g/ml를 1시간 동안 가하여 배양한 후 0.075 mol/l potassium chloride를 가한 후 메탄올과 빙초산을 3:1로 혼합하여 세포를 고정하였다. 고정액을 3회 반복하여 처리한 다음 에탄올로 유리슬라이드위에 세포부유액을 떨어뜨린 후에 건조시켜 Giemsa염색을 하여 광학현미경하에서 염색체수를 확인하였다.

### 10. Western blot analysis를 이용한 Multidrug resistant gene단백(p-glycoprotein)의 검색

단백유출은 인산 완충액에 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 10  $\mu$ g/ml leupeptin(Sigma), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS가 함유된 용액을 이용하였다. DNA는 초음파처리(sonification)에 의하여 분절하였고 단백질농도는 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 결정하였으며 우혈청 알부민으로 표준화하였다. Western blotting 기법은 Towbin등의 방법<sup>24</sup>을 약간 변형하여 이용하였다. 유출 총단백을 Laemli 방법<sup>25</sup>에 의하여 0.1% SDS가 함유된 7%(w/v) polyacrylamide slab 한천에서 전기영동한 후 nitrocellulose

filter에 옮겨 5% nonfat dry milk로 tris-buffered saline-Tween 20(TBT-T)에서 진탕기내에서 1시간동안에 걸쳐 차단시켰다. 실온에서 TBS-T로 15분간 1회, 5분간씩 2회에 걸쳐 nitrocellulose filter를 씻은 후 단클론항체인 p-glycoprotein(C219, 1:1000, Centocor)을 1시간동안 부치시킨 후 TBT-T를 이용하여 세척하였

다. 여기에 HRP-labelled sheep antimouse IgG(1:2000, Sigma)로 1시간동안 반응시킨 후 15분간 1회, 5분간 4회씩 TBS-T로 씻었다.

여기에 enhanced chemiluminescence(ECLtm, Amersham)를 사용하였고 동량의 detection solution 1과 2를 혼합한 후 filter에 covering (0.125 ml/cm<sup>2</sup>)하여 1

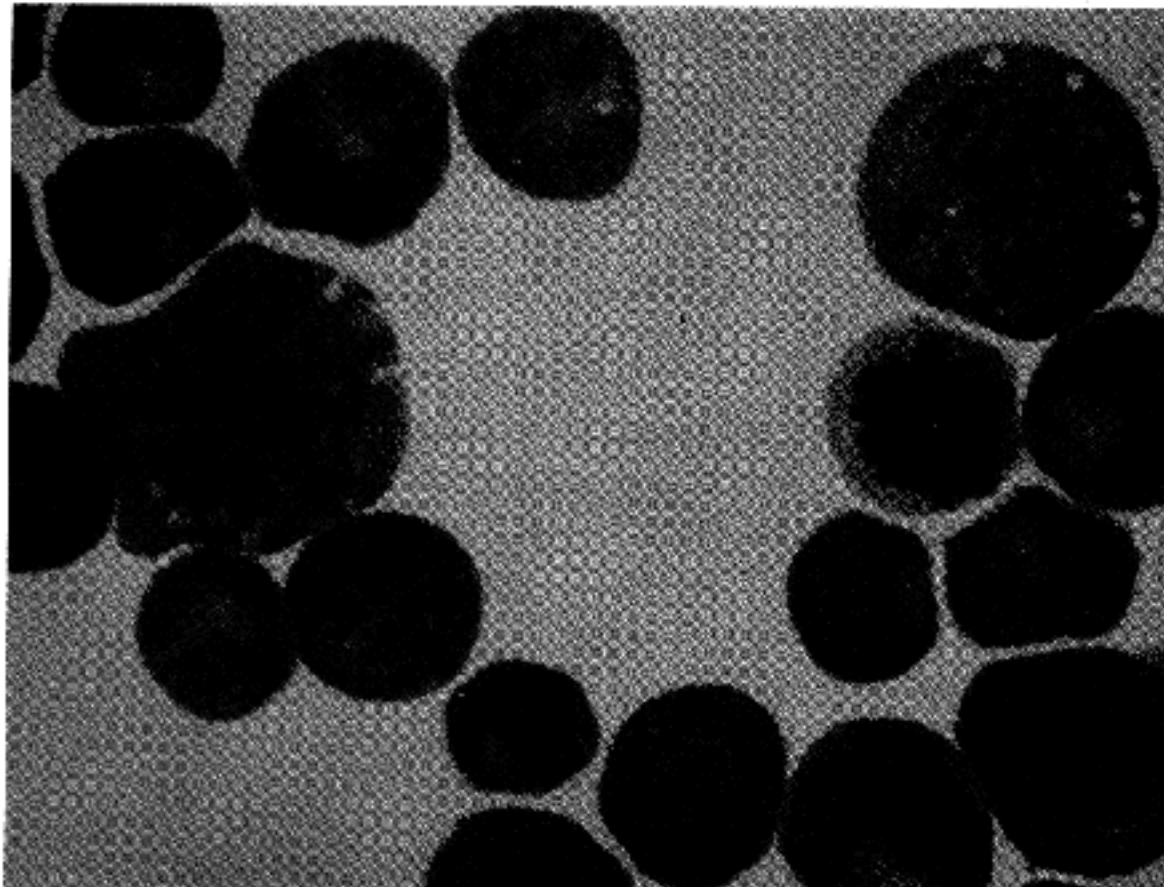


Fig. 4. Established JeKo-1 cell line showed large and small cell populations. The large cells showed round to oval nuclei devoid of nucleoli and numerous vacuoles in the cytoplasm. The small cells showed notched or cleaved nucleus and conspicuous nucleoli. Mitosis were frequently observed(oil immersion).

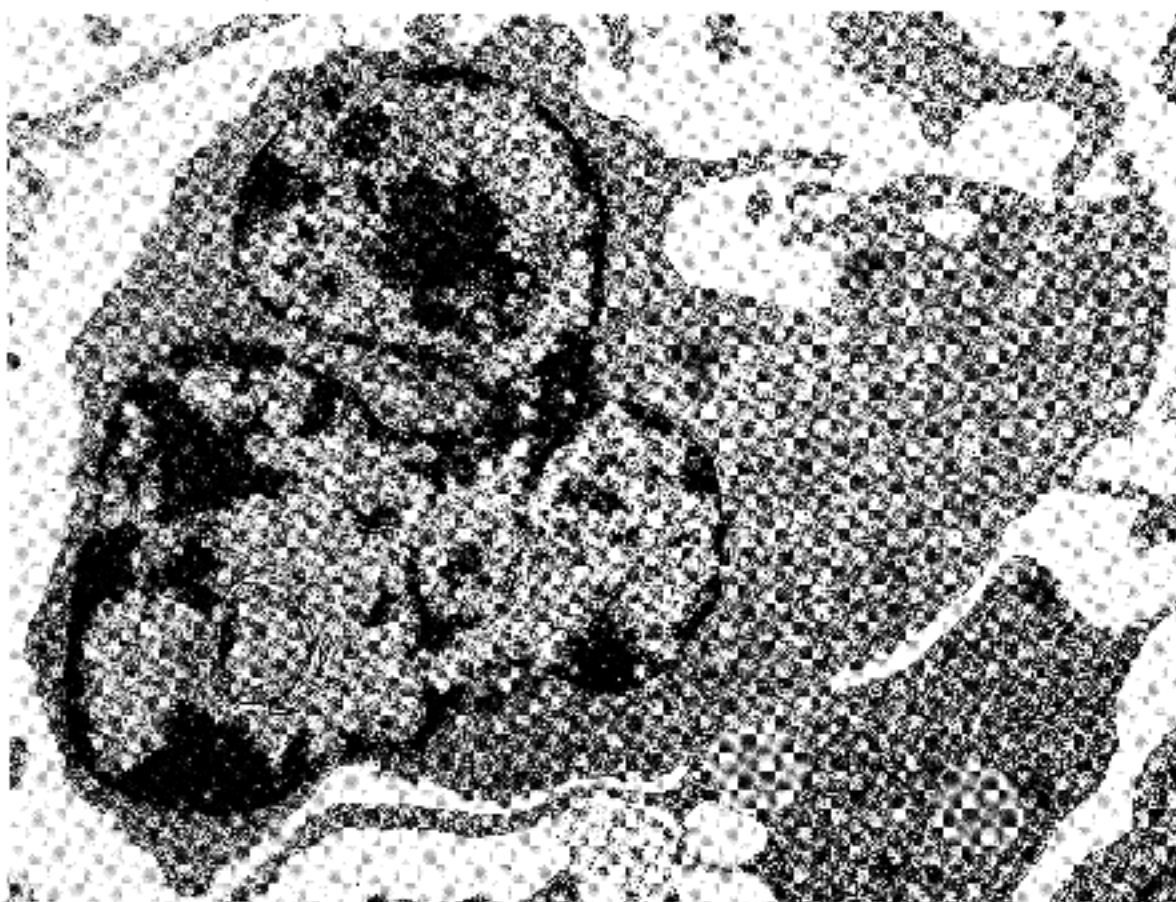


Fig. 5. Electron microscopic finding of the established JeKo-1 cells showed cleaved nuclei containing nucleoli. Lipid droplets and well developed mitochondria were observed in the cytoplasm (original magnification  $\times 2,800$ ).



분간 실온에서 반응시켜 X-선 필름에 감광시킨 후 확인하였다.

#### 11. 수립된 세포주의 이종이식

수립된 세포를( $5 \times 10^6/0.1$  ml in  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  free

PBS) 생후 4주일 된 수컷 SCID mouse (FOX Chase SCIDTM, CB-17/ICR Crl-SCID, Charler River, USA)의 복강내에 이식시킨 후 2~3개월 후 도살하여 종양의 형성 유무를 관찰하였다. 형성된 종양세포를

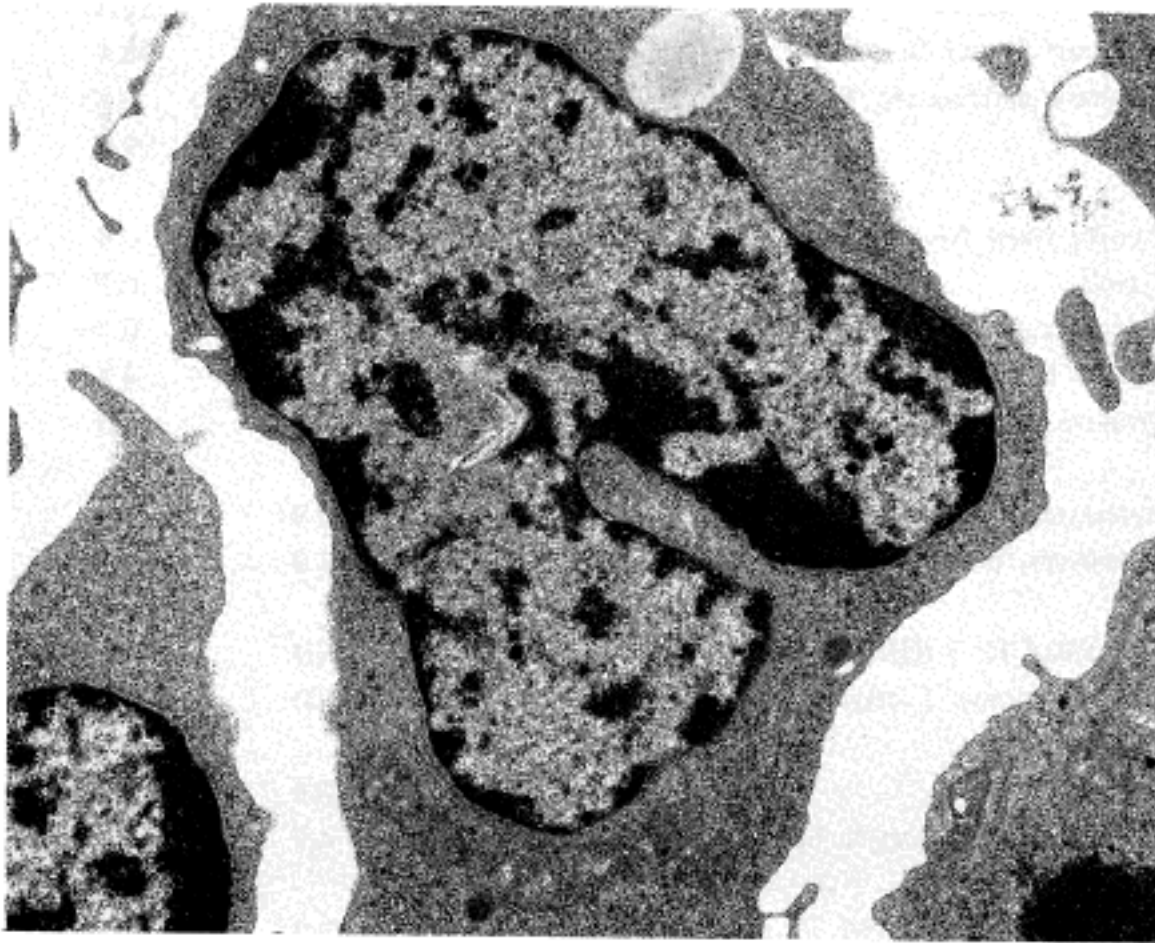


Fig. 6. Electron microscopic finding of JeKo-1 cells showed large cleaved cells devoid of nucleoli and less well developed cytoplasmic organelles. Lipid droplets were frequently observed (original magnification  $\times 2,800$ ).

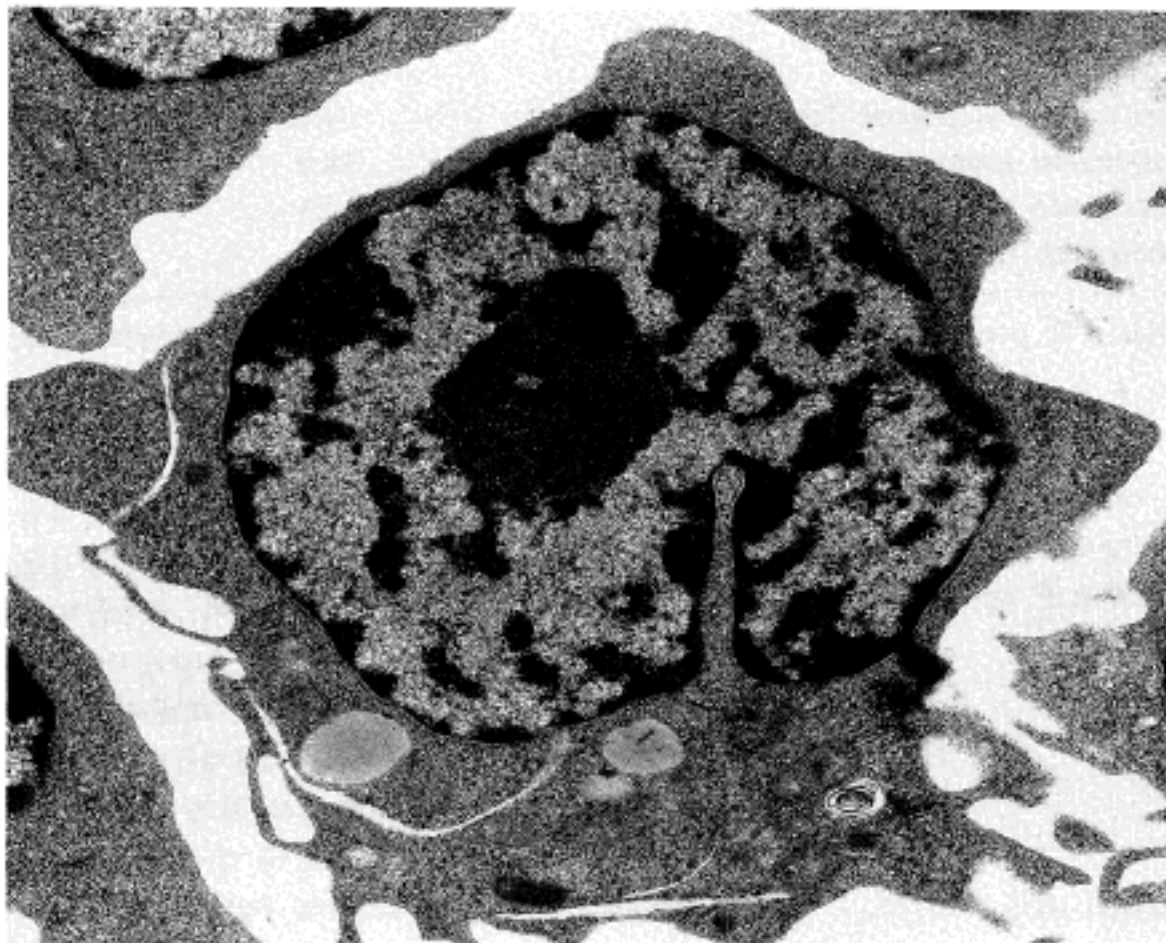


Fig 7. Electron microscopic finding of the Jeko-1 cells showed noticed nuclei showing centrally located nucleoli and less developed cytoplasmic organelles and lipid droplets in the cytoplasm(original magnification  $\times 2,800$ ).



Table 2. Marker studies of original lymphosarcoma leukemic cells and the established JeKo-1 cell line by flow cytometry

Marker	CD	Specificity	Original LSLC (PB)	JeKo-1 cell line (% positive cells)
<b>B-cells</b>				
CALLA	CD10	pre-B cell subset	28.9	51.3
Leu 16	CD19	precursor B and B cells	72.4	98.4
	CD21	precursor and mature B cells	0.9	0.8
Leu 16/HLA-DR			87.5	99.9
<b>T-cells</b>				
Leu 5	CD2	T cells, most NKcells	3.4	0.8
Leu 4	CD3	T cells	4.9	0.7
Leu 3a	CD4	Helper/inducer T cells	2.8	0.1
Leu 1	CD5	Mature T cells, thymocytes	5.4	4.8
Leu 2a	CD8	Cytotoxic/suppressor T cells	0.3	0.0
<b>Monocyte/macrophage</b>				
Leu M5	CD11c	Monocytes, granulocytes macrophages	2.9	0.9
Leu M3	CDw14	Monocytes, macrophages, granulocytes, dendritic cells	1.9	1.3
<b>NK-cells</b>				
Leu 11b	CD16	Fc- $\gamma$ RIIIA/Fc- $\gamma$ RIIIB	ND	0.4
Leu 19	CD56	NK cells, some T cells	ND	0.4
<b>Myeloid</b>				
My 7(g-1)	CD13	Myeloid cells	0.9	0.1
Leu M9	CD33	Pan myeloid, monocytic cells	4.9	6.0
<b>Surface Ig</b>				
IgM		anti-human surface IgM	98.7	99.9
Kappa		anti-human kappa light chain	99.6	99.6
Lambda		anti-human lambda light chain	2.5	1.9
IgG		anti-human surface IgG	2.1	1.7
<b>Cytoplasmic Ig</b>				
IgM		anti-human cytoplasmic IgM	99.4	99.7
Kappa		anti-human kappa light chain	98.9	99.9
Lambda		anti-human lambda light chain	2.3	1.2
IgG		anti-human cytoplasmic IgG	1.9	1.7

LSLC: lymphosarcoma cell leukemia, PB: peripheral blood, ND: not done CALLA: common acute lymphoblastic leukemia antigen

동결절편과 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 절편을 이용하여 Hematoxylin-Eosin염색과 면역조직 화학적 염색방법을 이용하여 종양세포의 면역표현형을 검색하였다.

## 결 과

### 1. JeKo-1 세포주 수립

악성 림프구성 종양세포를 분리하여 배양을 시작

한지 2개월 후에 종양세포는 매우 느리게 증식을 시작하였다. 세포는 부유 상태로 증식하였고 배양용기의 바닥에는 부착을 보이지 않았으며 세포들끼리 엉겨붙는 clump도 형성하지 않았다. 종양세포는 매우 느린 속도로 증식하였고 첫번째 계대배양(sub-culture)은 처음 배양을 시작한 후 2.5개월만에 실시하였다. 세포는 5번째의 계대배양시 처음 배양을 시작한지 4개월에 점차 증식의 속도가 증가되었다. 15번째의 계대배양시에 배지내 20% FBS를 10%로 바

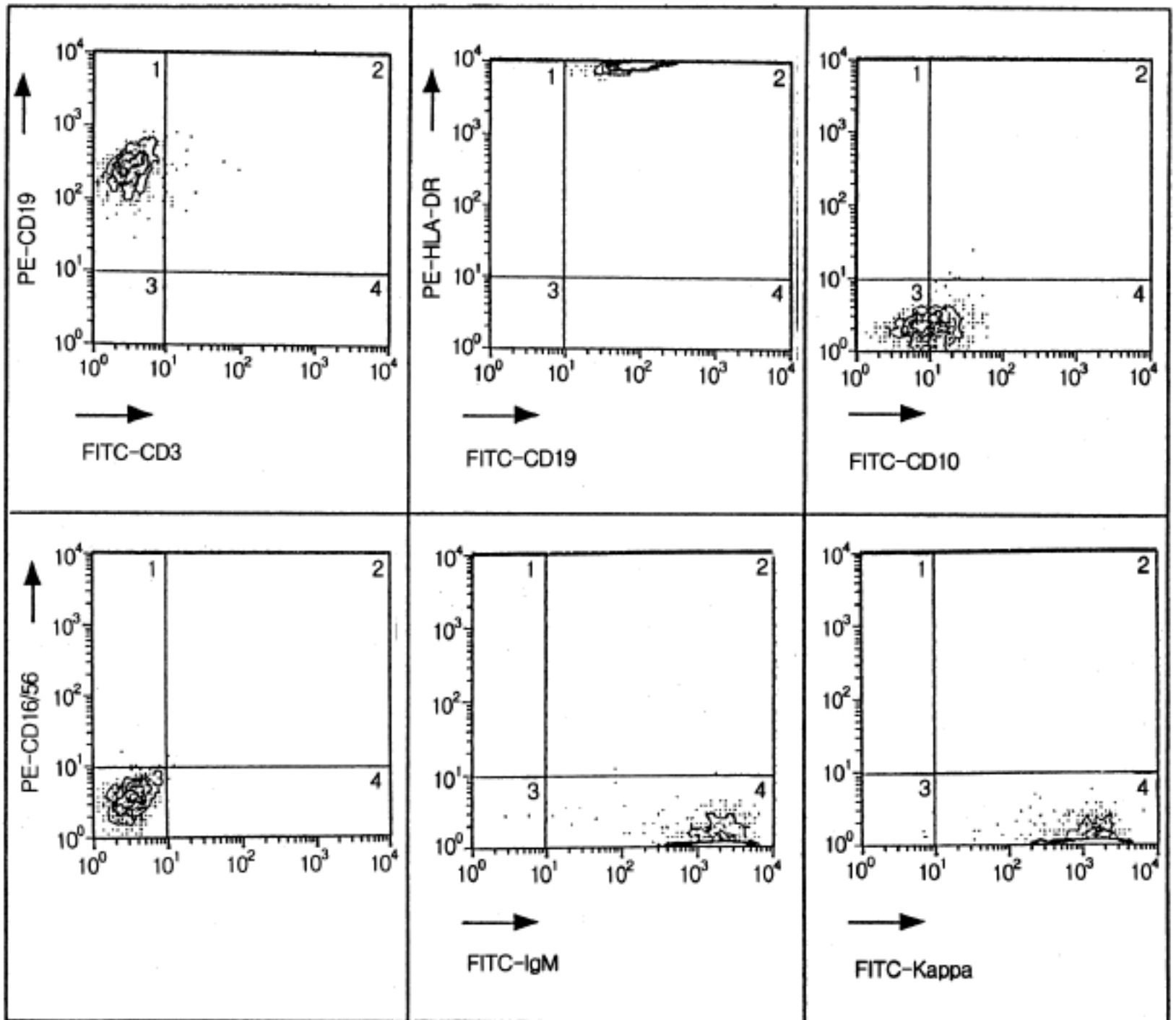


Fig. 8. Flow cytometric analysis of the FITC-CD3, FITC-CD19/PE-HLA-DR, PE-CD16/56, FITC-IgM and FITC-kappa light chain.

꾸어 배양하였으며 현재까지 종양세포는 74 passage를 거쳤고 세포의 배가시간(doubling time)은 33시간으로 수립된 세포주의 명은 JeKo-1 세포주라 명명하였다.

## 2. 형태학적 소견

도말표본의 Wright 염색결과 광학현미경적으로 JeKo-1 세포의 핵은 크고 불규칙하였으며 미세한 염색질로 구성되어 있었고 핵소체는 관찰되지 않았다. 핵막은 현저한 indentation을 보였다. 세포질은 풍부하였으며 큰 공포가 관찰되기도 하였다(Fig. 4). 초미세형태학적 검사상 세포의 핵막은 뚜렷한 분할(cleave)을 보였고 핵소체는 불분명하였다. 세포질내

소기관의 발달은 빈약하였고 지방적은 간혹 관찰되었다(Fig. 5, 6, 7). 0.3% 한천배지상에서 10회 반복적으로 실시하여 관찰한 plating efficiency는 0.67이었다.

## 3. 면역표현형

JeKo-1 세포주에 대한 면역표현형의 결과는 Table 2에 자세히 기록하였다. 세포주는 환자의 말초혈액과 골수흡인검사에서 나타난 면역표현형과 일치한 CD19 항원에 양성반응(말초혈액의 악성 림프구성 종양 세포 72.4%, 세포주 JeKo-1 98.4%)을 나타내는 단클론 B 림프구 세포이며 IgM, kappa형으로 세포질(IgM 99.7%, kappa 경쇄 99.9%)과 세포막(IgM 99.9%,

kappa 경쇄 99.6%)에서 확인되었다. 종양세포 및 수 림프 세포주는 HLA-DR에 양성반응(말초혈액 악성 림프구성 종양세포 87.5%, 세포주 JeKo-1 99.9%)을 보였고(Fig. 8) CD13, CD16, CD33, CD56 그리고 T 림프구 및 단구 표식자인 CD3, CD4, CD8, CD11, CDw13, CDw14, MY9등에 모두 음성반응을 보였으며 mantle zone림프종의 감별항원인 CD5은 4.8%의 양성율을 보였다.

JeKo-1세포의 면역표현형에 관한 결과는 매 3개월마다 검색한 결과에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다.

**4. EBNA검출**

PCR에 의하여 검색된 EBNA는 음성이었다.

**5. DNA Index 및 Parameter의 검색**

FACscan을 이용한 DNA분석상 hypodiploid stemline을 보였으며 DNA index는 0.83이었다(Fig. 9).

**6. 염색체 검사결과**

염색체수는 40개/16, 41개/3으로 심한 수자의 감소를 보였다.

**7. Bcl-2 및 c-myc 유전자 종양 단백질검색 결과**

Bcl-2는 99%에서 c-myc은 94%에서 양성반응을 보

였다(Fig. 10).

**8. Multidrug resistant gene단백(p-glycoprotein)의 검색 결과**

p-glycoprotein을 이용한 Western blot 분석결과 음성이었다.

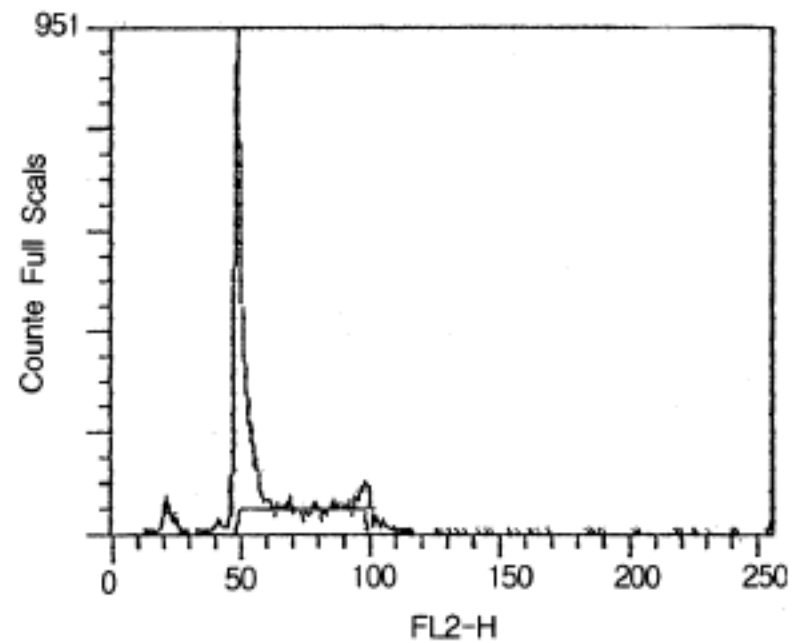


Fig. 9. Analysis of the DNA contents by flow cytometry using propidium iodide. JeKo-1 cells were a hypodiploid DNA stemline with DNA index of 0.83

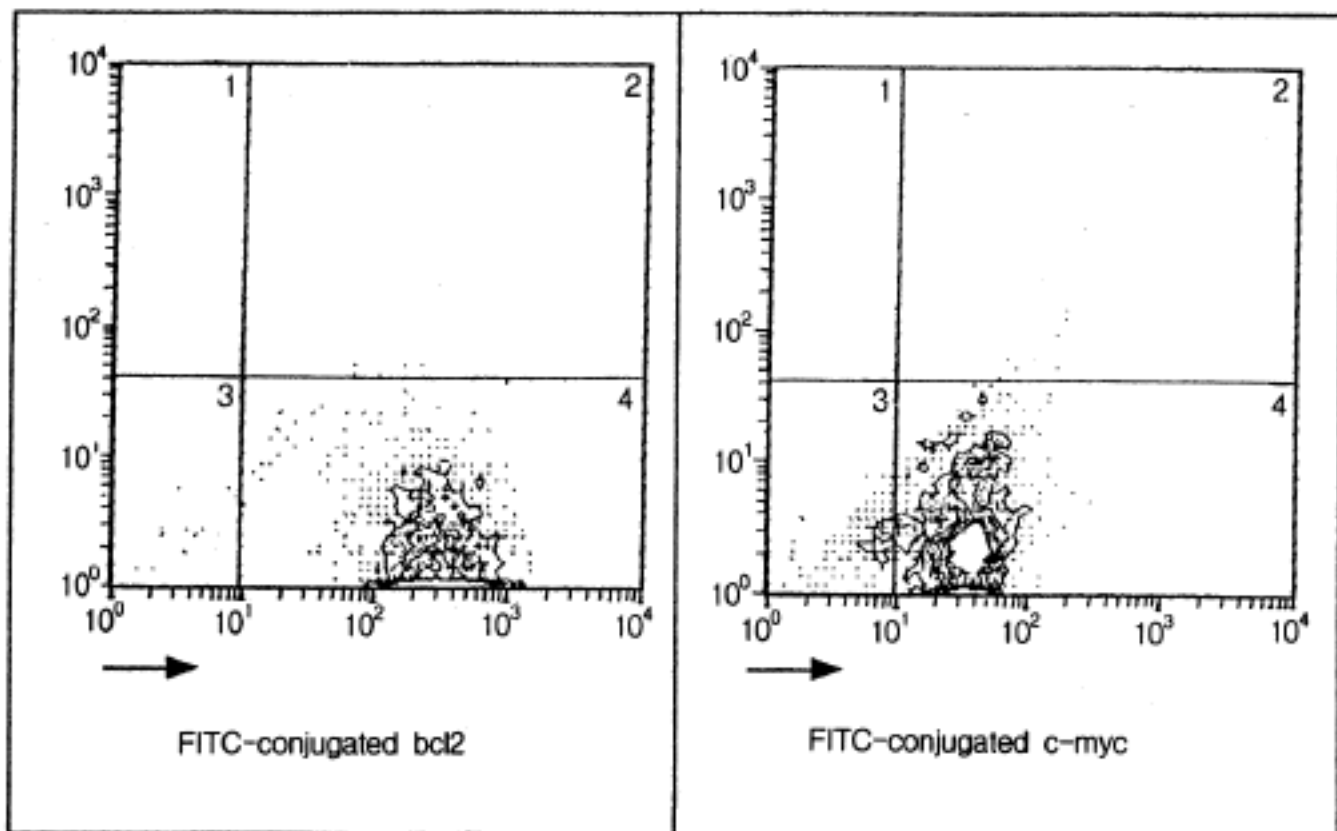


Fig. 10. Flow cytometric analysis of the FITC-bcl2 and FITC-c-myc oncoprotein by direct immunofluorescence staining. JeKo-1 cells showed 99% of bcl2 and 94% of c-myc oncoprotein reactivity.



### 9. 수립된 세포주의 이종이식 결과

이종이식을 한 SCID mouse의 8마리 모두에서 종양형성이 관찰되었으며 주로 장간막에서 종양의 증식 및 종괴의 형성이 관찰되었으며 종양세포는 위 장관 벽과 장간막에 침윤을 일으켰으며 고환, 부고환, 췌장, 신장, 비장, 횡경막등에 종양침윤이 관찰되었다(Fig. 11).

종양세포는 미만성으로 증식하였고 계계세포의 염색질은 미세하였고 핵소체는 관찰되지 않았다. 종양세포의 미전형적인 핵분열은 매우 흔히 관찰되었으며 응고괴사형태를 보이는 종양세포도 흔히 관찰되었다(Fig. 12, 13).

전자 현미경적 검색결과 종양세포는 수립된 세포주의 전자 현미경적 소견과 일치하였다.



Fig 11. Heterotransplanted JeKo-1 cells to SCID mouse showed tumor formation and infiltrated to testis, epididymis, pancreas, kidney, spleen, spinal cord, bone marrow and gastrointestinal tract.

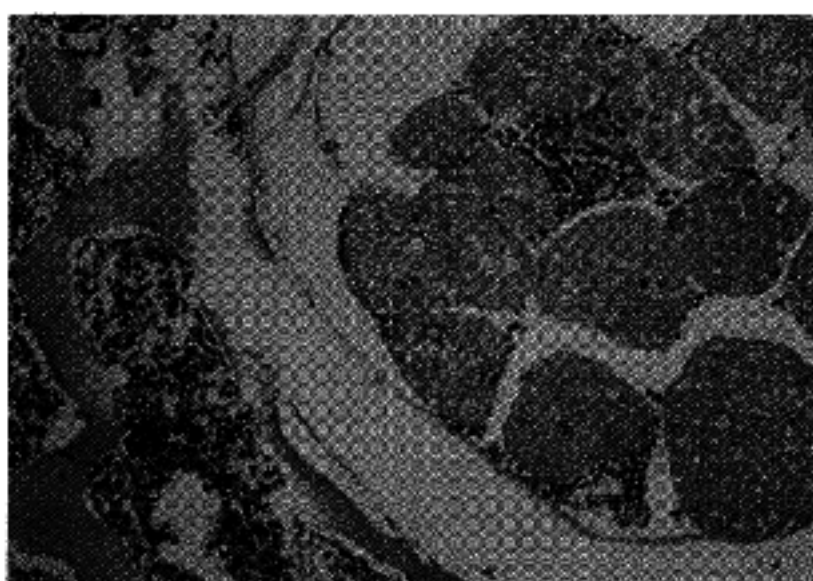
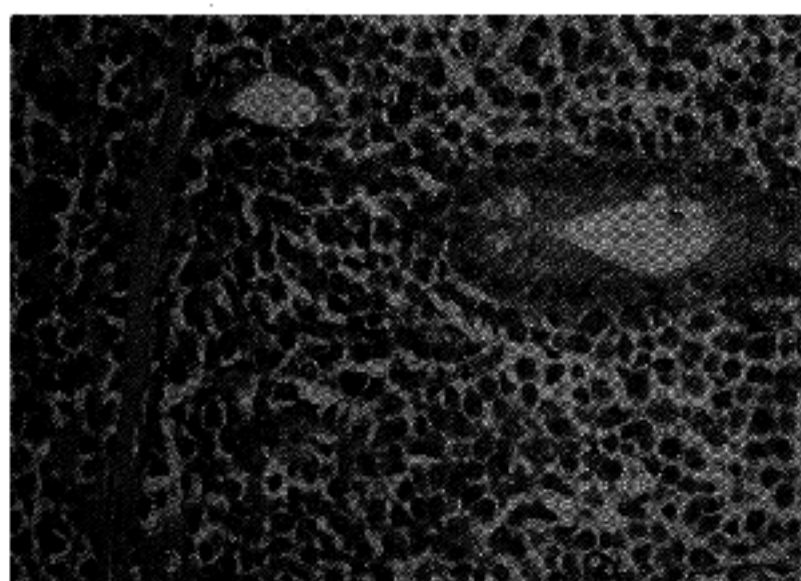
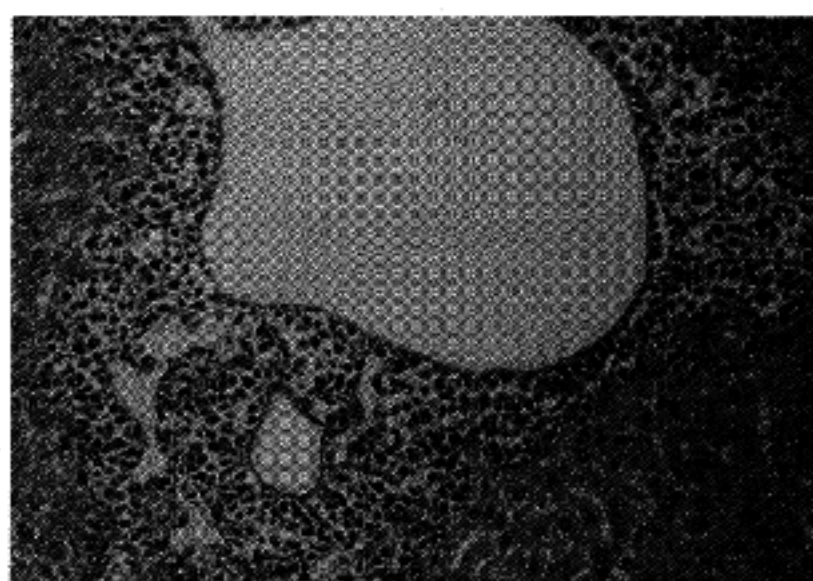


Fig. 12. Light microscopic findings of the tumor tissues from heterotransplanted SCID mouse showed infiltration into the diaphragm (upper left,  $\times 100$ ), portal area in liver (upper right,  $\times 200$ ), gastrointestinal tract (lower left,  $\times 200$ ) and spinal cord and bone marrow (lower right,  $\times 200$ ).

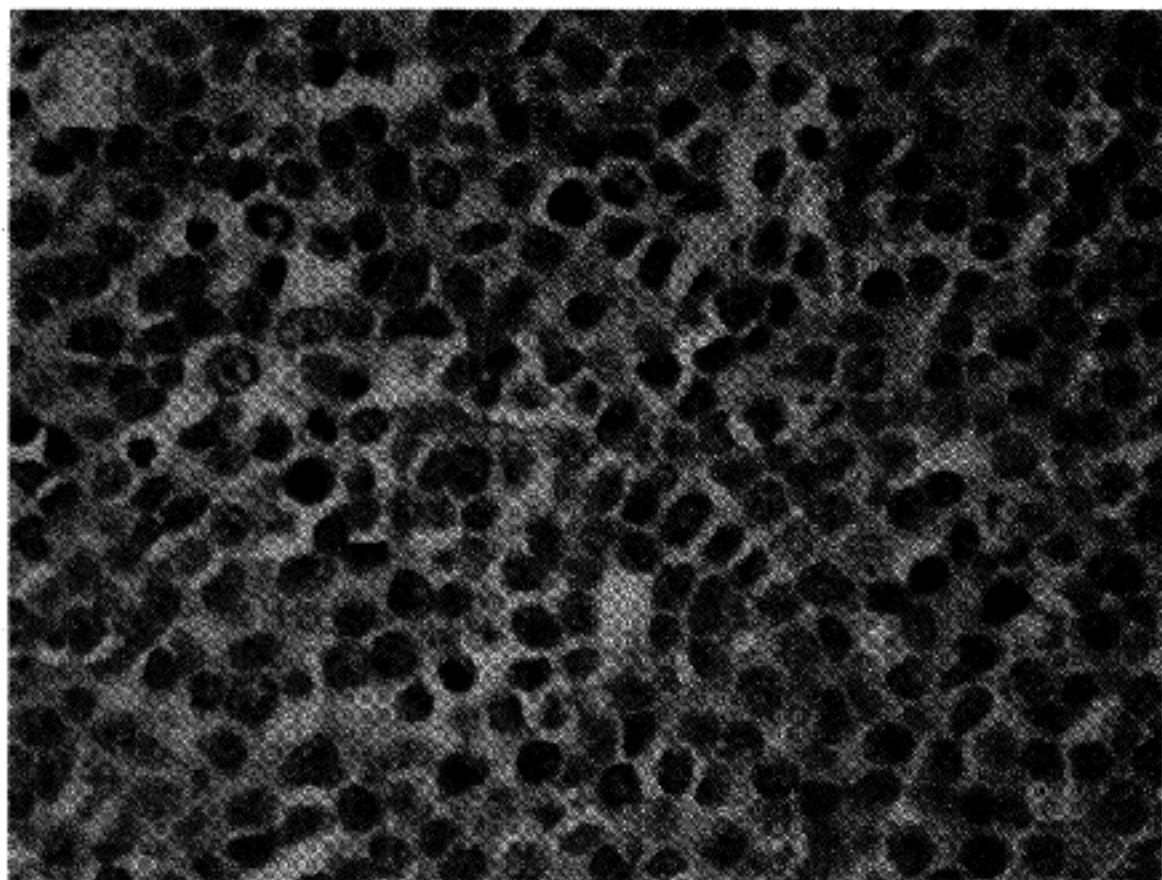


Fig. 13. Higher magnification of heterotransplanted tumor tissue showed diffuse infiltration of neoplastic lymphoid cells showed mixed populations of large and small cells( $\times 400$ ).

## 고 찰

JeKo-1 세포는 후복막에서 기원하여 골수와 말초혈액에 과종을 나타낸 악성 림프구성 종양 환자의 말초혈액으로부터 수립한 세포주이다. 이들 세포는 EBNA에 음성인 성숙 B 세포 림프구성 종양세포이며 형태학적 특징과 면역표현형이 환자의 말초혈액과 골수에서 관찰된 악성 림프구성 종양세포의 면역세포화학적 검색결과와 동일하기 때문에 수립된 JeKo-1 세포는 악성 림프구성 종양세포에서 기원한 세포임을 확인하였다.

말초혈액에서 관찰된 악성 림프구성 종양세포와 수립한 JeKo-1 세포의 세포질이나 세포막에서 발현된 항원의 검색결과는 Table 2에 자세히 기록하였다. 이들 세포는 세포막이나 세포질에서 IgM, kappa 경쇄를 나타내며 대다수 종양세포의 세포막에서는 CD19 항원에 양성반응을 보였으나 CD10 항원은 말초혈액의 악성 림프구성 종양세포의 경우 29%에서, 그리고 수립된 세포주에서는 51%의 양성율을 보였다. 이는 아마도 CD10에 양성을 나타낸 종양세포의 부분적인 증식이라고 판단하였다. CD10 항원은 pre-B 세포, B 세포 subset 그리고 면역아세포에서 발현한다고 알려져 있다. Pre-B세포는 세포질내 mu ( $\mu$ ) 중쇄(heavy chain)를 함유하나 세포표면에는 면역글로부린을 갖지 못하다가 미성숙 초기 B 세포 단

계에서 세포표면에 IgM을 발현하기 시작하고 더불어 유전자 재배열(gene rearrangement) 과정을 거쳐 B 세포는 세포표면에 IgD를 획득한 후 중쇄를 switch 하여 isotype인 IgG, IgA, IgE등을 갖게 된다. 이러한 세포표면과 세포질내에서 관찰된 항원의 표식자에 관한 지식을 바탕으로 수립한 JeKo-1 세포주의 기원을 생각해 볼때 JeKo-1 세포의 기원은 아마도 성숙한 B 세포가 여포 중심 세포(follicular center cell)의 발달과정에서 관찰되는 세포의 표현형과 합당하기 때문에 여포 중심 세포에서 기원한 종양 세포라고 판단하였다.

JeKo-1 세포는 EBV의 수용체라고 알려진 CD21 항원에 대하여 0.8~0.9%에서 양성반응을 보였고 EBNA에 음성을 보였기 때문에 JeKo-1 세포는 EBV 감염으로 인하여 세포의 불멸화(immortalization)를 초래한 세포의 증식이 아님을 확인하였다. 1971년 Miller등<sup>17</sup>은 실험관외에서 림프증식성 질환이나 악성 림프종의 세포주 수립에 EBV가 반드시 존재하여야 림프구 또는 림프구성 종양의 세포주 수립이 가능하다는 이론을 전개하였으나 EBV-음성 림프구성 세포주<sup>18,19</sup>가 수립됨으로서 이러한 이론은 바꾸어지게 되었다. EBV는 인체의 B 세포에 CD21 분자를 수용체<sup>26-29</sup>로 감염을 초래하며 시험관 밖에서 인위적으로 EBV를 B 세포에 감염시키면 B 세포는 꾸준한 증식을 초래하여 세포의 불멸화를 초래하는 것으로 알려져 있다<sup>17</sup>. 따라서 EBV에 감염된 세포주의

수립은 시험관외에서 비교적 쉽게 세포의 불멸화를 통하여 이루어 질 수 있으나 EBV-음성 세포주의 수립, 특히 악성 림프구성 백혈병의 세포주 수립은 매우 어렵다고 알려져 있으며 현재까지 수립된 세포주에 대한 문헌보고는 흔하지 않다<sup>1,3-9,12</sup>.

본 연구에서 수립한 JeKo-1 세포주는 EBV-음성 악성 림프구성 종양세포로부터 수립한 세포이며 현재까지 국내에서는 악성 림프종으로 부터 세포주 수립에 성공하였다는 문헌보고는 없으며 더구나 EBV-음성의 악성 림프구성 종양의 세포주 수립에 관한 문헌보고 역시 현재까지 전무한 실정이다. 따라서 한국인에서 발생한 악성 림프구성 종양환자의 말초혈액으로 부터 수립한 EBV-음성 림프구성 종양 세포주인 JeKo-1은 악성 림프구성 종양세포의 증식과 분화 특히 골수와 말초혈액에 파종을 초래하는 기전등에 관하여 많은 정보를 줄 수 있는 종양세포주라고 저자는 생각한다.

악성 림프종의 종양세포가 말초혈액이나 골수에 파종을 일으킴으로서 초래되는 림프육종세포 백혈병(lymphosarcoma cell leukemia)은 종양세포가 골수에서 20% 이상 관찰되고 말초혈액에 파종을 초래하여 말초혈액내에 악성 림프구성 종양세포의 림프구 증가증을 초래하는 것으로 정의 될 수 있다<sup>30,31</sup>. 악성 림프종 종양세포가 골수나 말초혈액에 파종을 초래하는 기간동안에 종양세포의 클론 표식자(clonal marker)는 맨 처음에 기원한 종양세포의 클론과 동일하게 유지된다고 알려져 있다<sup>32,34</sup>. 따라서 JeKo-1 세포와 환자의 말초혈액과 골수에서 관찰된 종양세포의 면역표현형의 일치는 상기한 이론을 뒷받침한다고 생각한다. 특히 환자의 후복막에서 발생한 종양으로 부터 생검을 시행하지 못하였기 때문에 이들 종양에 대한 병리조직학적 분류나 형태학적 진단 그리고 종양세포의 면역조직화학적 특성을 규명하지 못하여 골수나 말초혈액에 파종을 초래한 림프구성 종양세포의 기원을 원칙적으로는 확인하지 못한 점이 있으나, 골수나 말초혈액에 파종을 초래한 종양세포에 대한 면역세포화학적 검색은 이들 종양세포가 림프구성 기원의 종양임을 확인 하는데 부족함이 없다. 다만 생검을 시행하지 않았기 때문에 후복막에서 기원한 림프구성 종양의 병리조직학적 분류나 형태학적 특징은 규명할 수가 없었다.

림프육종세포 백혈병을 초래하는 악성 림프종의 조직유형은 다양할 수 있으나 그중에서도 특히 소림프구 림프종(small lymphocytic lymphoma), 결절성 또는 미만성 소분할(small cleaved) 세포 림프종과 대세포 림프종(large cell lymphoma)이 림프육종세포 백

혈병을 잘 초래한다고 알려져 있다<sup>35-37</sup>. 소분할 세포 림프종이 백혈병 전환을 초래할 경우 종양세포는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL)의 림프모구보다는 보다 잘 분화된 형태학적 특징을 지니고 있다. 이들 백혈병 전환을 일으킨 종양세포는 급성 림프구성 백혈병의 림프모구에 비하여 그 크기가 보다 크고 세포질이 풍부하며 핵은 절흔(notched)되어 있거나 주름이 지어있고 핵소체는 현저하며 염색질은 보다 진하고 거칠게 관찰된다. 대세포 림프종이 말초혈액으로 파종을 초래하는 율은 소분할세포 림프종이 말초혈액으로 파종을 초래하는 율보다 낮고 예후도 보다 좋지 않다고 알려져 있다<sup>35-37</sup>. 이들 세포들은 형태학적으로 매우 크고 다수의 핵소체와 호염기성의 세포질을 갖는 다형태의 중심모세포로 구성되어 있다. 연령적으로 볼때 30세 이하의 대세포 림프종 환자의 경우, 연령이 높은 환자에 비하여 더 높은 비율로 백혈병전환이 관찰된다고 알려져 있다<sup>38,39</sup>. 따라서 본 연구에서 수립된 JeKo-1 세포주의 기원 세포는 말초혈액과 골수에서 관찰된 종양세포의 모든 특징을 고려해 볼때 면역세포화학적 특성과 연관되는 여포 중심세포의 발달과정중에 있는 세포에서 기원하였다고 저자들은 추정하였으며 mantle cell 림프종과의 감별은 pan-T 세포 항원인 CD5가 음성을 보여 면역표현형으로는 감별이 가능하였으나<sup>40-42</sup>, 생검을 시행하지 않았기 때문에 형태학적으로는 감별이 어려웠다.

JeKo-1 세포는 염색체검사에서 40~41개의 염색체를 보이는 세포이며 banding 기법을 이용한 보다 자세한 핵형 검사(karyotypic analysis)는 실시하지 못하였다. 유세포 계측기를 이용하여 검사한 DNA index는 0.82의 hypodiploid DNA stemline으로서 이는 40~41개의 염색체 소견과 일치한다고 판단하며 염색체의 이상은 추후 보다 더 자세한 연구를 시행하여야 한다고 생각한다.

Multidrug resistant(MDR) 유전자 생성물은 화학요법에 대한 종양세포의 저항을 나타내는 물질이다. 이들 물질은 염색체 7q21에 있는 mdr-1 유전자 생성물인 170-kd 단백질로 세포막에서 관찰되는 p-glycoprotein이다<sup>43,44</sup>. 이들 물질이 종양세포에서 과다 발현되면 사용한 화학요법에 대하여 efflux pump<sup>45,46</sup>로 작용함으로써 세포질내 화학요법의 농도를 낮추어 종양세포가 화학요법의 세포 독성으로 부터 벗어나 결국 화학요법의 실패를 초래한다고 알려져 있다<sup>47</sup>. MDR의 과다발현은 난소종양<sup>48</sup>, 유방종양<sup>49</sup>, 대장암<sup>50</sup>등의 다양한 종양세포에서 관찰되었는데 최근에 Mohammad등<sup>9</sup>은 de novo로 multidrug resistance



를 보이는 인체에서 발생한 B 세포 림프종으로부터 수립한 세포주를 보고 하였다. 본 실험에서 수립한 JeKo-1에 대하여 Western blot분석을 이용한 MDR에 대한 단백질 검색에서 p-glycoprotein은 검출되지 않았다.

악성 림프종, 특히 Burkitt형에서 염색체의 이상<sup>51-53</sup>은 흔히 관찰된다고 알려져 있다. 현재까지 악성 림프종에서 보고된 이들 염색체의 이상은 첫째, c-myc proto-oncogene 이 위치해 있는 염색체 8q24와 면역글로부린 중쇄가 위치하여 있는 염색체 14q32의 특이한 상반 전좌(reciprocal translocation), t(8;14)(q24;q32), 둘째 면역글로부린의 kappa 경쇄가 위치한 염색체 2p12과 c-myc proto-oncogene이 위치하여 있는 염색체 8q24의 상반 전좌, t(2;8)(p12;q24) 그리고 셋째로, c-myc oncoprotein이 위치해 있는 8q24와 면역글로부린 lambda 경쇄가 위치해 있는 22q11과의 상반전좌, t(8;22)(q24;q11)등이 있다. 이러한 전좌 결과, 염색체 이상과 악성 림프종 특히 Burkitt 림프종과의 연관관계를 보고한 대다수 보고에서 myc proto-oncogene이 면역글로부린의 증강부위(enhancer)의 근처에 위치하게 됨으로서 myc은 정상적인 조절기능을 벗어나 높게 전사되어 DNA와 결합을 초래 할 수 있는 핵단백으로 작용하여 종양증식을 초래 할 수 있다고 알려져 있으나, 종양형성에 대한 myc 유전자 생성물의 정확한 기능은 알려져 있지 않다<sup>51</sup>. 본 실험에서 형광 면역검사법을 이용하여 유세포 계측기에서 측정 한 c-myc oncoprotein은 JeKo-1 대다수의 세포에서 강한 양성율을 보였다.

면역글로부린의 중쇄 위치인 14q32와 bcl2 oncoprotein이 위치한 18q21의 전좌, t(14;18)(q32;q21)가 초래되면 결과적으로 bcl2는 정상적인 조절기능을 벗어나 높은율로 전사되어 나타나는데 이러한 변화는 저등급의 악성 여포성 림프종과 상관관계가 있다고 알려져 있다<sup>7</sup>. van Ooteghem등<sup>12</sup>은 복합성 전좌, t(8;14;18), t(14;18)(q32;q21), t(8;14)(q24;q32)를 초래하고 bcl2 유전자 재배열을 초래한 악성 림프종의 새로운 세포주를 수립하여 보고하기도 하였다.

본 연구에서는 핵형 분석(karyotypic analysis)을 정확히 하지 못하였기 때문에 많은 염색체의 이상에 관한 정보를 얻지 못하였으므로 추후 보다 더 자세한 연구가 필요하다고 생각한다. SCID mouse에 이종이식하여 형성된 종양세포는 미만성으로 증식하였고 많은 비전형적인 세포 분열과 함께 골수를 비롯한 많은 장기에 전이와 침윤을 초래하였으며 말초혈액에서도 이식한 악성 림프구성 종양세포가 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 수립한 악성 림프구

성 종양세포주 JeKo-1은 골수에 쉽게 전이를 초래하여 말초혈액에 파종을 다른 악성 림프구성 종양에 비하여 쉽게 초래한 EBV-음성, IgM, kappa 경쇄형의 세포주라고 판단한다.

## 결 론

후복막에서 발생한 악성 림프구성 종양이 골수에 전이를 일으키고 말초혈액에 파종을 초래한 병기 IV의 78세 한국인 여성의 말초혈액으로 부터 악성 림프구성 종양 세포주 수립을 성공하였기에 보고하였다. 수립된 세포는 Epstein-Barr virus-음성의 IgM, kappa연쇄형의 성숙 B 세포이며 여포중심세포에서 기원한 종양세포로 추정한다. 현재까지 수립된 종양 세포는 74 passage에 달하며 배가시간은 33시간, plating efficiency는 0.67이며 hypodiploid stemline을 보이는 DNA index 0.83으로서 염색체 수는 40~41개 이었다. Bcl2 및 c-myc 종양유전자 단백질은 99% 및 94%에서 각각 양성으로 나타났으며 Western blot 분석을 이용한 p-glycoprotein검사는 음성이었다. 이 종이식은 검색한 SCID mouse 8 마리 모두에서 종양형성이 관찰되었고 골수를 비롯한 각종 장기에 종양침윤이 관찰되었다.

이세포는 JeKo-1이라 명명하였다. JeKo-1 세포는 골수에 쉽게 전이를 초래하고 말초혈액에 파종을 초래하는 악성 림프종의 기전을 밝히는데 귀중하게 사용될 수 있는 악성 림프구성 종양세포주라고 생각하며 보다 자세한 염색체의 핵형검사가 이루어져 형태학적 특징과 면역표현형 그리고 종양유전자 단백질과의 연관관계를 밝혀야 한다고 생각한다.

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 실험을 보조해 주신 의학연구소 고혜영선생님과 전자현미경실의 김일선생님 그리고 유세포계측검사에 도움을 주신 전남대학교 부속병원의 서동환선생님께 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
2. Van Den Berghe H, Parloir C, Gosseye S, Englebienne

- V, Gornu G, Sokal G. Variant translocation in Burkitt Lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1979; 1: 9-14.
3. Magrath IT, Freeman CB, Pizzo P, et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen II. Surface markers. *JNCI* 1980; 64: 477-83.
  4. Dillman RO, Handley HH, Royston I. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell line from a patient with a diffuse large cell lymphoma. *Cancer Research* 1982; 42: 1368-73.
  5. TH'ng KH, Garewal G, Kearney L, et al. Establishment and Characterization of three new malignant lymphoid cell lines. *Int J Cancer* 1987; 39: 89-93.
  6. Gauwerky CE, Hoxie J, Nowell PC, Croce CM. Pre-B-cell leukemia with a t(8:14) and a t(14:18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene* 1988; 2: 431-5.
  7. Mohamed AN, Al-Katib A. Establishment and Characterization of a human lymphoma cell line (WSU-NHL) with 14;18 translocation. *Leukemia Research* 1988; 10: 833-43.
  8. Mohamed AN, Mohammad RM, Koop BF, Al-Katib A. Establishment and Characterization of a new human Burkitt's lymphoma cell line(WSU-BL). *Cancer* 1989; 64: 1041-8.
  9. Mohammad RM, Mohamed AN, Kukuruga M, Smith MR, Al-Katib A. A human B-cell lymphoma line with a de novo multidrug resistance phenotype. *Cancer* 1992; 69: 1468-74.
  10. Yoshizawa K, Kiyosawa K, Yamada S, et al. Establishment of Epstein-Barr Virus-associated lymphoma cell line SUBL with t(2;3) (p11;q27) from a liver transplant patient. *Cancer genet Cytogenet* 1993; 71: 155-63.
  11. Kawashima K, Hayashi K, Ohnoshi T, Teramoto N, Kimura I. Epstein-Barr virus-associated post-transplant non-Hodgkin's lymphoma: Establishment and characterization of a new cell line. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 1080-6.
  12. van Oo teghem RBC, Smit EME, Beishuizen A, Lambrechts AC, Blij-philipsen Mrd, Smilde TJ, Hagemeyer A. A new B-cell line showing a complex translocation(8;14;18) and Bcl2 rearrangement. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 74: 87-94.
  13. Epstein MA, Barr YM. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 252-3.
  14. Pulvertaft RJ. Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet* 1964; 1: 238-40.
  15. Nilsson K, Ponten J. Classification and biological nature of established human haematopoietic cell lines. *Int J Cancer* 1975; 15: 321-41.
  16. Nilsson K, Klein G. Phenotypic and cytogenetic characteristics of human B-lymphoid cell lines and their relevance for the aetiology of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 1982; 37: 319-80.
  17. Miller G. Human lymphoblastoid cell lines and Epstein-Barr virus: A review of their interrelationships and their relevance to the aetiology of leukoproliferative disorders in man. *Yale J Biol Med* 1971; 43: 358-84.
  18. Epstein AL, Henle W, Henle G, Hewestson J, Kaplan H. Surface marker characteristics and Epstein-Barr virus studies of two established North American Burkitt's lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 228-32.
  19. Klein G, Lindahl T, Jondal M, Leibold W, Menzes J, Nilsson K, Sundstrom C. Continuous lymphoid cell lines with B-cell characteristics that lack Epstein-Barr virus genome, derived from three human lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3283-8.
  20. Magrath IT, Pizzo PA, Whang-Peng J, et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen: I. Physical, cytogenetic and growth characteristics. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 465-76.
  21. Magrath IT, Freeman CB, Pizzo PA, et al. Characterization of lymphoma-derived cell lines: Comparison of cell lines positive and negative for Epstein-Barr virus nuclear antigen: II Surface markers. *J Natl Cancer Inst.* 1980; 64: 477-83.
  22. Phillip I, Phillip T, Farvot M, et al. Establishment of lymphomatous cell lines from bone marrow samples from patients with Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 1984; 73: 835-40.
  23. Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-74.
  24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc Nat'l Acad Sci* 1979; 76: 4350-4.
  25. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>40</sub>. *Nature*

- 1970; 227: 680-5.
26. Fingerroth JD, Weiss JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4510-6.
  27. Frade RM, Barel M, Ehlin-Herniksson B, Klein G. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1490-3.
  28. Nemerow GR, Wolfert R, McNaughton ME, Cooper NR. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 1985; 55: 347-51.
  29. Weiss JJ, Tedder TF, Fearon DT. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the CR2 receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 881-5.
  30. Schnitzer B, Loesel LS, Reed RE. Lymphosarcoma cell leukemia: a clinicopathologic study. *Cancer* 1970; 26: 1082-96.
  31. Corne SE. Non-Hodgkin's lymphomas in leukemic phase: clinicopathologic correlations. *Am J Med* 1980; 69: 667-73.
  32. Adults KA. Detection of small number of monoclonal B lymphocytes in the blood of patients with lymphoma. *New Engl J Med* 1979; 300: 1401-5.
  33. Ligler FS, Smith RG, Kettman JR, Hernandez JA, Himes JB, Vitetta ES, Uhr JW, Frenkel EP. Detectopm pf tumor cells in the peripheral blood of nonleukemic patients with B-cell lymphoma: analysis of "clonal excess". *Blood* 1980; 55: 792-801.
  34. Smith BR, Weinberg DS, Robert NJ, Towle M, M.S, Luther E, Pinkus GS, Ault KA. Circulating monoclonal B-lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1984; 311: 1476-81.
  35. Mintzer DM, Hauptman SP. Lymphosarcoma cell leukemic and other non-Hodgkin's lymphomas in leukemic phase. *Am J Med* 1983; 75: 110-20.
  36. Koziner B, Filippa DA, Mertelsmann R, Gupta S, Clarkson B, Siegal FP. Characterization of malignant lymphomas in leukemic phase by multiple differentiation markers of mononuclear cell: Correlation with clinical features and convetional morphology. *Am J Med* 1977; 63: 556-67.
  37. Oaooaoirt H, Winter WJ, Hicks EB. Follicular lymphoma. A reevaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based a survey of 253 cases. *Cancer* 1956; 9: 792-821.
  38. Nathwani BN, Diamond LW, Winberg CD, Hwn Kim, Bearman RM, Glick JH, Jones SE, Gams RA, Nissen NI, Rappaport. H. Lymphoblastic lymphoma: A clinicopathologic study of 95 patients. *Cancer* 1981; 48: 2347-57.
  39. Rosen PJ, Feinstein DI, Pattengale PK, Tindle BH, Williams AH, Cain MJ, Bonorris JB, Parker JW, Lukes RJ. Convolutd lymphocytic lymphoma in adults. A clinicopathologicentity. *Ann Intern Med* 1978; 89: 319-24.
  40. Fisher RI, Dahlberg S, Nathwqni BN, Banks PM, Miller TP, Grogan TM. A clinical analysis of two indolent lymphoma entities: Mantle cell lymphoma and marginal zone lymphoma(including the mucosa-associated lymphoid tissue and monocytoid B-cell subcategories): A southwest oncology group study. *Blood*. 1995; 85: 1075-82.
  41. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 1994; 84: 1361-92.
  42. Pittaluga S, Wlodarska I, Stul MS, el al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathological studyt of 55 cases. *Histopathology* 1995; 26: 17-24.
  43. Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance on human cancer. *New Engl J Med* 1987; 316: 1388-93.
  44. Bass F, Jongsma APM, Broxterman HJ, et al. Non-p-glycoprotein mediated mechanisms for multidrug resistance precedes p-glycoprotein expression during in vitro selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Res* 1990; 50: 5392-8.
  45. Cornwall MM, Gottesman MM, Pastan I. Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug resistant KB cells. *J Biol Chem*. 1986; 261: 7921-8.
  46. Safa AR, Gloer CJ, Meyers MB, Biedler JL, Felted RL. Vinblastine photoaffinity labelling of a high molecular weigh surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 6137-40.
  47. van der Blik AM, Borst P. Multidrug resistnce. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 165-203.
  48. Bell DR, Gerach JH, Kartner N, Buick RN, Ling V. Detection of p-glycoprotein in ovarian cancer: A molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1985; 3: 311-5.
  49. Fuqua SAW, Moretti-Rojas IM, Schneider SL, McGuire WL. P-glycoprotein expression in human breast can-



- cer cells. *Cancer Res* 1987; 47: 2103-6.
50. Dalton WS, Cress AE, Alberts DS, Trent JM. Cytogenetic and phenotypic analysis of human colon carcinoma cell line resistant to mitoxantrone. *Cancer Res* 1987; 48: 1882-8.
51. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
52. Berger R, Bernheim A, Weh HJ, Flandrin G, Daniel MT, Brouet JT, Colbert N. A new translocation in Burkitt's tumor cells. *Hum Genet* 53: 111-2.
53. Van Den Berghe H, Parloir H, Gosseye S, Englebienne V, Cornu G, Sokal G. Variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1979; 1: 9-14.
54. Croce CM, Nowell PC. Molecular basis of human B-cell neoplasia. *Blood* 1985; 65: 1-7.
-