

## DMBA로 유발된 흰쥐 악성 섬유성조직구종 (MFH)의 세포학적 기원

— Cell cloning에 의한 세포주에 대한 면역  
조직화학적 및 전자현미경적 검색 —

고신대학교 의과대학 병리학교실

박 명 선 · 정 해 진 · 허 만 하

### Characterization of Principal Component Cell of DMBA induced Rat Malignant Fibrous Histiocytoma

— With Cell Culture and Cloning —

Myeng Sun Park, M.D., Hae Jin Jeong, M.D. and Man-Ha Huh, M.D.

Department of Pathology, Kosin University Medical Center

This experiment was performed to elucidate the cytologic origin of chemically induced MFH in Wistar rats. The tumor was produced by injections of DMBA(9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene). With the produced MFH, cell culture and cloning were performed, followed by establishment of a cell strain, which was investigated by immunohistochemical and electron microscopic studies. The results were as follows. A) By immunohistochemistry of the tumor tissue, fibroblastic cells were positive for MEP-1(specific antibody for fibroblastlike cell of MFH, Takeya, 1993) and Anti-hPH( $\beta$ )(Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ ), but negative for TRPM-3 and F4/80. Histiocytelike cells were positive for TRPM-3 and F4/80, but negative for MEP-1 and Anti-hPH( $\beta$ ). In immunoelectron microscopy, normal spleen macrophage showed linear reactivity in cell membrane for TRPM-3, whereas histiocytelike cells of the tumor disclosed negative reaction. B) At 5 weeks of the primary tumor cell culture, the cells exhibited typical storiform pattern of MFH. C) The established cell strain revealed immunoreactivity for MEP-1 and Anti-hPH( $\beta$ ), but negative for TRPM-3. The cloned tumor cells showed morphologic characteristics of undifferentiated fibroblastic cell. Latex particle (0.80  $\mu$ m size) phagocytosis was negative in the cloned cell strain. The results of the current study support the concept that principal component cells of MFH is of fibroblastic cell origin. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 574~585)

**Key Words:** Malignant fibrous histiocytoma, Histogenesis, Cell strain, MEP-1, Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$

접 수: 1996년 12월 21일, 게재승인: 1997년 4월 8일

주 소: 부산시 서구 암남동 34, 우편번호 602-702

고신의대 부속 복음병원 해부병리과, 박명선

## 서 론

악성 섬유성조직구종(malignant fibrous histiocytoma, MFH)은 성인 연부조직의 육종중 가장 빈도가 높은 악성 종양이다. 조직소견상 그 구성 세포의 종류도 다양하여 병리학적으로 흥미 있는 종양이다. 1963년 Ozzello등<sup>1</sup>이 MFH라는 개념을 처음 소개한 이후 MFH의 성상과 조직 발생을 밝히려는 많은 노력들이 있어왔으나, 아직 이 종양에 대한 정확한 성상, 특히 조직 발생(histogenesis)에 대한 의견이 다양하고, 통일된 지견에 이르지 못하고 불확실한 상태에 있다. 현재까지 제안되어지고 있는 MFH의 조직발생에 관한 주된 학설로는 ① 조직구 기원설, ② 미분화 간엽세포 기원설 및 ③ 섬유아세포 기원설이 있다. 조직구 기원설은 조직 배양 소견에 기초하여 조직구와 섬유모세포간의 이행이 가능하다는 연구와 구성세포가 HLA-DR에 양성반응을 나타내었다는 사실을 그 기초로 삼고 있다. 미분화 간엽세포 기원설은 전자현미경적 검사를 근거로 미분화 간엽세포가 간세포(stem cell)로써 조직구와 섬유모세포 양쪽으로 분화할수 있다는 주장이다. 섬유아세포 기원설은 전자현미경적 소견을 토대로 MFH는 섬유모세포의 종양으로써 비 종양성의 조직구가 섞여 나타난다는 주장이다.

이러한 배경하에 MFH의 주된 구성세포를 밝히고, 그 세포의 세포 생물학적 성상을 조사하여 MFH의 병리학적 성격을 조직 발생차원에서 밝히고자 본 연구를 시행하였다. 이를 위하여 Wistar 흰쥐에 DMBA (9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene)를 사용하여 실험적으로 종양을 유발하였고, 형성된 종양의 진단을 위해 육안적 및 조직학적 검사, 면역조직화학적 및 전자현미경적 검사를 시행하였다. 또 종양조직의 일부를 무균적으로 채취, 배양하여 단일 세포 클로닝 과정을 거쳐 세포주(cell strain)를 획득하여 면역조직화학적 및 전자현미경적 검사를 시행하여 그 성상과 발생기원을 밝히고자 하였다. 아울러 이 세포주에 대한 기능적 검사로 라텍스 파티클에 대한 탐식작용을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 종괴의 생성

이 연구에 이용된 동물은 생후 6주된 200 g가량의 Wistar 수컷 흰쥐 25마리였다. 이들 쥐의 좌측 슬관절에 2% DMBA(9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene, Sigma,

St. Louis, MO, USA) 파라핀 용액 0.1 ml를 4주 간격으로 3회씩 주사한 후 4~8개월에 걸쳐 촉진 및 방사선 촬영으로 종양 형성과 발육 상태를 추적 관찰하였다. 종양이 약 4 cm에 이를 때 실험동물을 희생시켰다. 대조군으로 파라핀만을 주사한 Wistar 흰쥐를 5개월 후에 희생시켜 비교하였다.

### 2. 일반적인 육안적 및 조직학적 검색

생성된 종양을 적출하여 육안적 형태를 관찰하고, 통상의 조직표본 제작방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정된 다음 파라핀에 포매하였다. 포매조직은 4~6  $\mu$ m 두께로 박절한 후 헤마톡실린-에오진 염색을 시행하여 광학 현미경하에서 관찰하였다.

### 3. 종양 조직의 면역조직화학적 및 면역 전자현미경적 검색

종양조직의 일부를 동결절편과 파라핀에 포매된 종양 조직 절편을 탈파라핀하여 TRPM-3(Biomedical antigen Co., Augst, Switzerland), F4/80(Biomedical antigen Co., Augst, Switzerland), Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ (Fuji chemical Industries Ltd., Toyama, Japan), MEP-1 (Takeya의 제작 제공, Second Department of Pathology, Kumamoto University School of Medicine, Japan)을 일차항체로 하여 Avidin Biotin Complex 방법으로 염색을 시행하였다.

면역 전자현미경적 검사를 위하여 종양조직의 일부를 0.5×0.5×0.2 cm 가량의 크기로 박절하여 4% periodate-lysine-paraformaldehyde(PLP) 고정액에 6시간 이상 담근후 5% 자당을 첨가시킨 PBS(phosphated buffered saline)에서 두시간 이상 세척하고, 20% 자당과 5% 글리세롤을 첨가시킨 PBS에서 세척하였다. 조직을 OCT 화합물에 넣어 드라이 아이스 아세톤에서 동결시킨 후 20  $\mu$ m 두께로 절편하였다. PBS에 잠시 담근 후 비특이 항체의 제거를 위하여 정상 면양 혈청에서 3시간 이상 반응시킨 후 1차 항체로 TRPM-3를 PBS에 약 500배 희석하여 조직을 담근 후 12시간 이상 반응시켰다. PBS에서 6시간동안 3차례 PBS를 교환하면서 잘 세척한 후 peroxidase-conjugated anti-mouse IgF(ab')<sub>2</sub>를 PBS에 500배 희석하여 조직을 담근 후 12시간 이상 반응시켰다. 동결 절편한 조직에 발색과 산소 발생으로 인한 세포 손상을 줄이기 위하여 1% glutaraldehyde로 약 15분간 재고정을 하였다. PBS로 세척후 3,3'-diaminobenzidine으로 30분간 발색시키고, 0.01M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.05M Tris buffer, pH 7.6, containing 0.01M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에서 3분간

peroxidase와 반응시킨 후 PB에서 1시간 세척하였다. 1% OsO<sub>4</sub>으로 30분간 후고정하고, 알코올로 점진적인 탈수를 한 후 gelatin capsule을 사용하여 epoxy resin에 포매시켰다. 포매 조직을 초박절편으로 제작하여 nickel grid에 부착한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 양성 대조군으로 정상 비장을 이용하였다.

#### 4. 종양 조직의 전자현미경적 검색

종양조직의 일부를 1×1×1 mm의 크기로 세절하여 2% glutaraldehyde로 1~4°C에서 2시간동안 고정 한 후 0.1M PB로 세척한 다음 계열 에탄올로 탈수 과정을 거친 후 propylene oxide(PO)로 치환하였다. Luft방법<sup>2</sup>에 의해 Poly/Bed 812 resin으로 포매하여 37°C에서 12시간, 45°C에서 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 μm 두께로 박절하여 현상한 다음 toluidine blue로 염색하여 관찰부위를 선택하였다. 초박절편으로 제작된 조직은 nickel grid에 부착시킨 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 5. 종양 세포의 분리 및 배양

종양 조직의 일부를 무균적으로 조작하여 박절한 후 trypsin-EDTA로 약 20분간 처리하여 세포를 분리시켰다. 세포부유액을 3~4회의 원심분리를 통해 세척한 다음 항생제와 10% 우태아 혈청이 보충된 RPMI-1640 배양액에 부유시켜서 배양병에 분주하여 37°C 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 1~2일에 한번 교환하였고, 세포성장이 융합성일때 계대배양을 시행하였다.

#### 6. 단일 세포 클로닝(single cell cloning)

배양하던 세포를 일부 trypsin-EDTA를 이용하여 분리한 후, 0.33% Noble agar(Difco, Detroit, Michigan)를 함유한 RPMI-1640배지에 세포수 1×10<sup>3</sup> cell/ml로 부유시켰다. 부유액 3 ml를 6-well plate에 분주한 후, 0.5% agar RPMI-1640배지 4 ml를 첨가하여 반경화(semisolidification)시켜서 배양하였다. 배양 2주후 각 집락을 새로운 배양병에 이식하였다. 이러한 과정을 한차례 더 반복하여 하나의 세포주(cell strain)를 획득하였다.

#### 7. 세포주에 대한 면역조직화학적 검색

클론화된 세포에서도 종양조직에서의 마찬가지로 TRPM-3, F4/80, Anti-prolyl 4-hydroxylase β, 그리고 MEP-1을 일차항체로한 면역 조직화학적 검색을 시행하였다.

#### 8. 세포주에대한 전자현미경적 검색

배양 중이던 세포 주를 분리하여 PBS로 세척한 후 1,000 rpm에서 10분간 원침시켜 부유액 2 cc당 2% glutaraldehyde 10 cc를 넣어 4°C에서 전고정 시켰다. 고정된 세포를 다시 1,000 rpm에 10분간 원침시켜 3회 PBS로 세척한 후 부유액 2 cc당 2% OsO<sub>4</sub> 2 cc를 넣어 4°C에서 후고정 시켰다. 다시 1,000 rpm에서 10분간 원침시켜 PBS로 3회 세척한 후 부유액 2 cc당 1% agar-용액 1~2 cc를 첨가하여 2~3 mm크기의 agar 블록을 만들었다. 알코올로 점진적인 탈수를 한 후 propylene oxide(PO)로 치환하여 Epon으로 포매하였다. 포매조직을 초박절편으로 제작하여 nickel grid에 부착한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 9. 라텍스 파티클에 대한 식작용 검사(latex particle phagocytosis)

획득한 세포주를 chamber slide에서 라텍스 파티클(0.80 μm size, Sigma, USA) 0.5 ml를 함유한 RPMI-1640 배지로 37°C에서 60분간 배양한 후, 상층 배지를 버리고 세포가 바닥에 붙어있는 chamber slide를 Giemsa 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 결 과

#### 1. 종괴 생성

Wistar 흰쥐 25마리중 16마리에서 좌측 슬 관절에 DMBA를 주사한지 4~8개월경에 약 4 cm 크기의 종괴가 발생하였고, 나머지 9마리는 종괴가 생성되던 중 사망하였다. 파라핀만을 주사한 대조군에서는 주사후 8개월까지 종괴가 형성되지 않았다.

#### 2. 종괴의 육안적 및 조직학적 검사

표피의 케양을 동반한 종괴가 좌측 슬 관절 주위에 평균 5×4×4 cm크기로 관찰되었는데, 절단면상 다분엽형(multilobulation)의 회백색을 띤 육질성 종괴로 주변조직과의 경계는 비교적 분명하였으나, 일부

에서는 주변 골격근으로의 침투소견도 관찰되었다. 관절면의 미란이나 골 파괴 소견은 관찰되지 않았다. 종괴의 중앙부위는 심한 괴사를 보였고, 출혈부위도 일부 관찰되었다(Fig. 1). 조직학적으로 악성 섬유성 조직구종의 다섯 가지 유형중 대부분은 storiform-pleomorphic형이고 일부에서는 거세포형과 염증성형을 보이는 곳도 관찰되었다. 주요 구성세포들은 방추형으로 샘자 차마퀴모양으로 배열되어 있는 섬유모세포양 세포와 난원형의 뚜렷한 핵을 보이는 다각형의 조직구양 세포들이고, 이들 외에도 기괴한

거대 세포(bizarre giant cell), 세포와 핵이 작고 난원형을 보이는 비분화 간엽세포, 그리고 림프구나 형질세포등의 염증세포들도 관찰되었다(Fig. 2, Fig. 3).

### 3. 종양 조직의 면역 조직 화학적 및 면역 전자 현미경적 검색

종양조직의 대부분을 차지하는 방추형의 세포들은 MFH의 섬유모세포양 세포에 특이성을 갖는 MEP-1과, 교원섬유 생성능을 알기 위한 Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ 염색에서 상양성 반응을 보였고, 쥐의 대식세포의 세포막에 특이성을 보이는 TRPM-3과 F4/80에 음성 반응을 나타내었다. 일부의 다각형의 세포들은 MEP-1과 Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ 에는 양성 반응을, 그리고 TRPM-3에는 일부 양성 반응을 나타내었고, F4/80에 대해서는 약 양성 반응을 나타내었다. HLA-DR 염색에서 종양을 구성하고있는 거의 전 세포가 모두 양성 반응을 나타내었다(Table 1, Fig. 4, 5).

TRPM-3를 이용한 면역 전자현미경적 검색에서는 정상 비장내의 대식세포는 세포막에 양성으로 염색된 반면, 종양조직에서 조직구양 세포의 형태학적 특징을 가진 세포에서는 양성 반응을 확인할 수 없었다(Fig. 6).

### 4. 종양 조직의 전자현미경적 검색

광학현미경하에서 관찰되었던 구성세포들은 모두 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 섬유모세포양 세포는(Fig. 7) 약간 함입되거나 방추형의 핵을 갖고

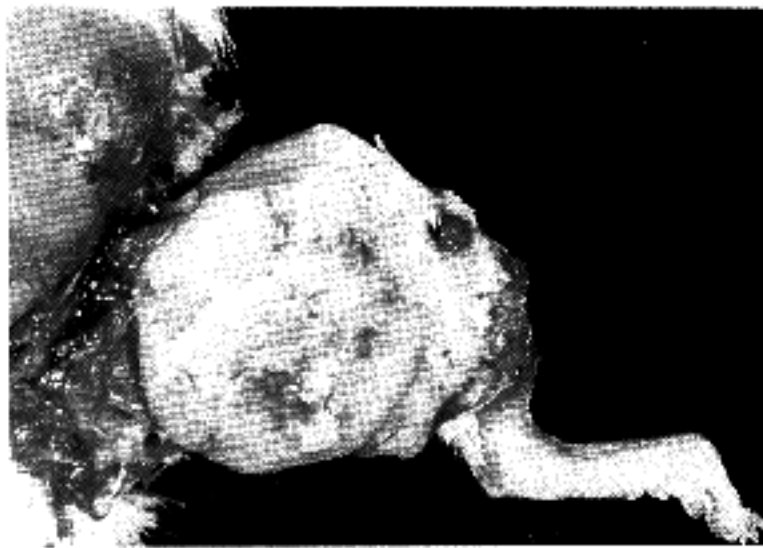


Fig. 1. Section of the mass shows fleshy, multilobulated, gray-white, 4×5 cm sized tumor which is well demarcated from surrounding tissue but show focal infiltration to adjacent skeletal muscle. Severe necrosis and hemorrhagic foci are seen in central area of the tumor.

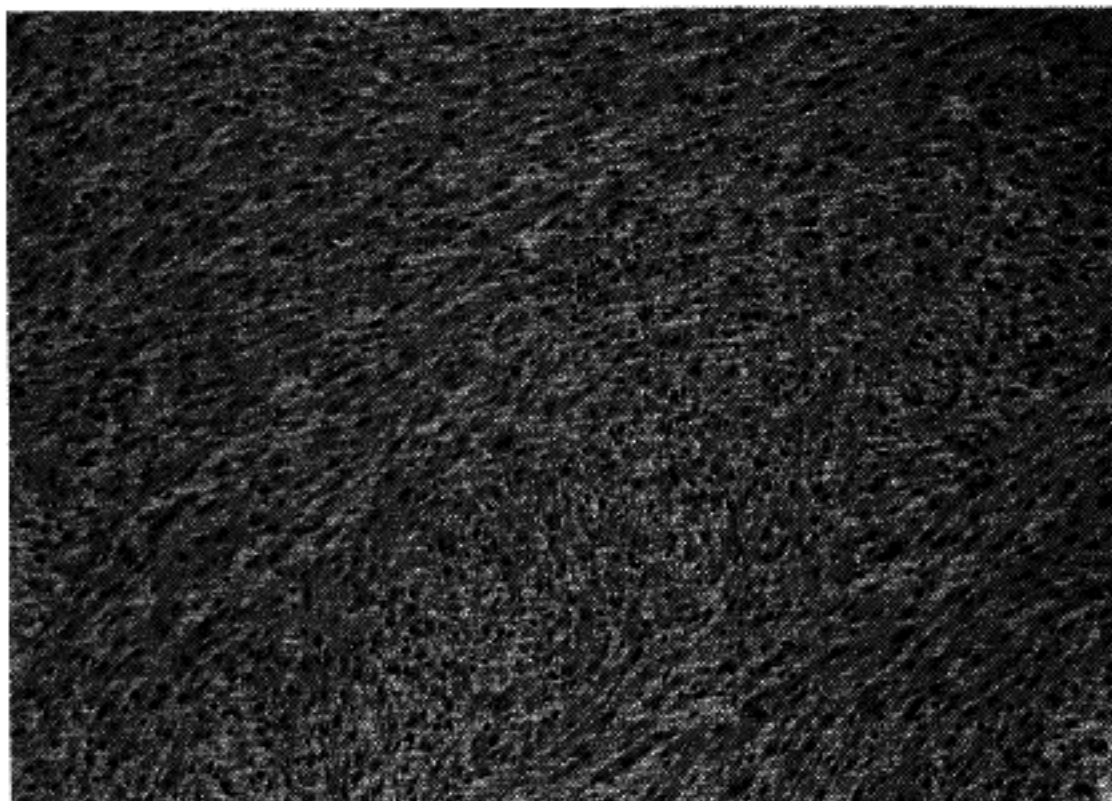
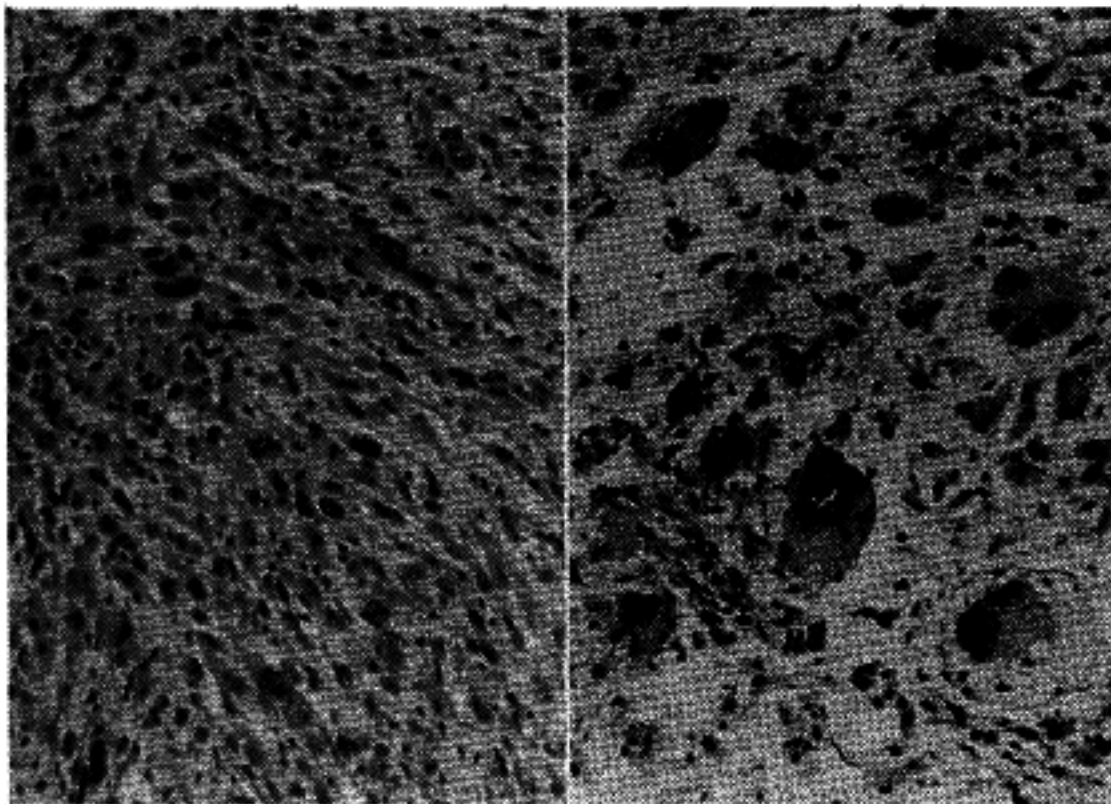


Fig. 2. Microscopically most areas disclose a distinct storiform pattern at lower magnification.

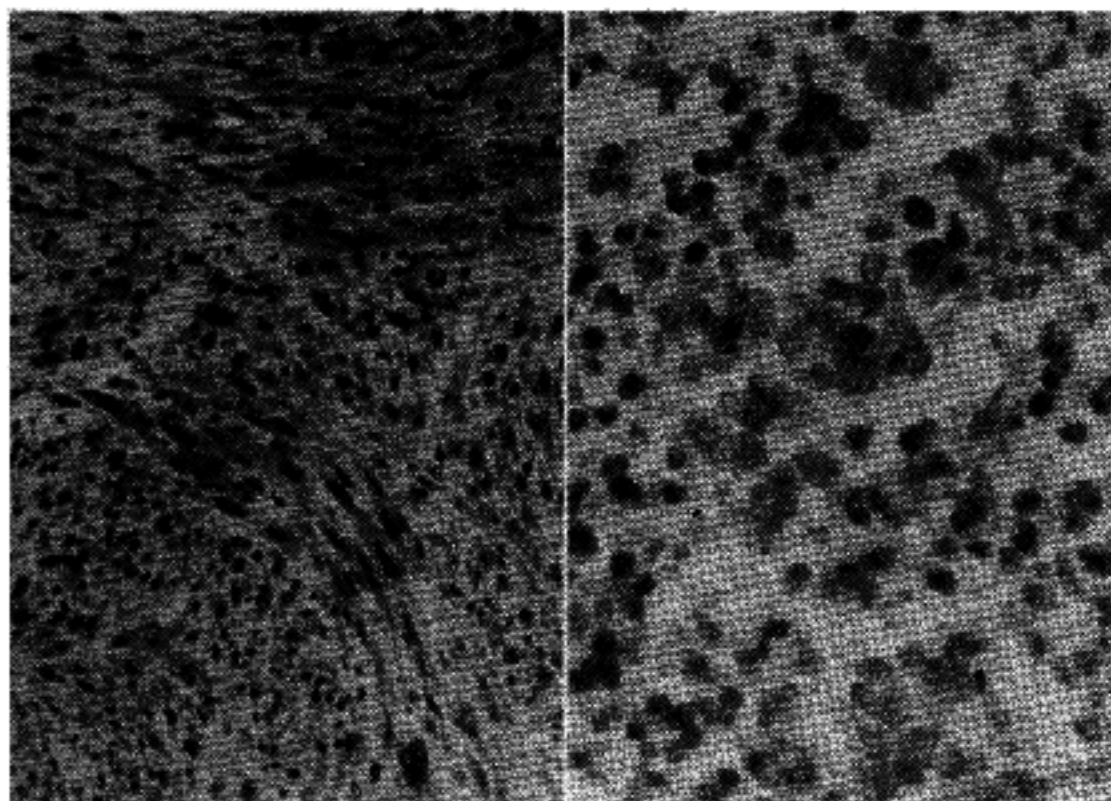
**Table 1.** Immunohistochemical studies in tumor tissue

	Fibroblastlike cell	Histiocytelike cell
MEP-1	+	-
TRPM-3	-	-
F4/80	-	-/-
Anti-prolyl 4-hydroxylase $\beta$	+	-
HLA-DR	+	-

있으며, 세포질 내에 조면세포질 내세망이 잘 발달되어 있고, 세포 표면에는 소수의 짧고 넓은 돌기가 관찰되었다. 조각구양 세포는(Fig. 8) 난원형 또는 신형의 핵이 관찰되는데, 핵의 가장자리에 염색질이 모여있고, 세포질 내에는 다수의 리소솜과 식세포성 공포들 그리고 소수의 지방 소적들이 관찰되었다. 세포 표면에는 미세융모나 위축이 관찰되었다. 섬유모세포양 세포와 조각구양 세포의 특성을 함께 공유한 중간세포가 자주 관찰되었다. 다핵 거대세포는



**Fig. 3.** At higher magnification, most component cells are pleomorphic cells(Left). Multinucleated giant cells are conspicuous in some area(Right).



**Fig. 4.** In immunohistochemical studies of the tumor tissue, fibroblastlike cells show positive reactivity for MEP-1(Left). Histiocytelike cells and fibroblastlike cells show positive reactivity for HLA-DR(Right).

크고 풍부한 세포질을 갖고, 핵이 2개 내지 4개정도 되며, 핵의 모양이나 세포질내 소기관의 모양이 조적구양 세포와 많은 유사점을 갖고 있지만 미토콘드리아가 풍부한 것과 조면세포질 내세망이 많은 점은 섬유모세포양 세포와 유사하게 보였다. 미분화 세포는 비교적 작고, 둥근 핵과 소수의 세포 소기관만이 관찰되어 핵대 세포질 비가 높고, polyribosome만 풍부하게 관찰되었다. 그 외에도 지방 소체를 세포질 내에 풍부하게 갖고 있는 황색종 세포와, 세포

질내에 국소적인 치밀체를 가진 근섬유모 세포도 소수 관찰되었다.

5. 종양 세포의 배양

종양세포의 배양 1주일째 세포들이 배양병 바닥의 1/5가량을 배우며 자랐다. 일부에서는 군집을 이루고, 일부는 낱알의 세포들이 방추형의 섬유모세포양 세포의 모양을 나타내며, 위족(pseudopod)을 내면서 바닥에 붙어 자랐다. 세포 배양 2주일째 세포들

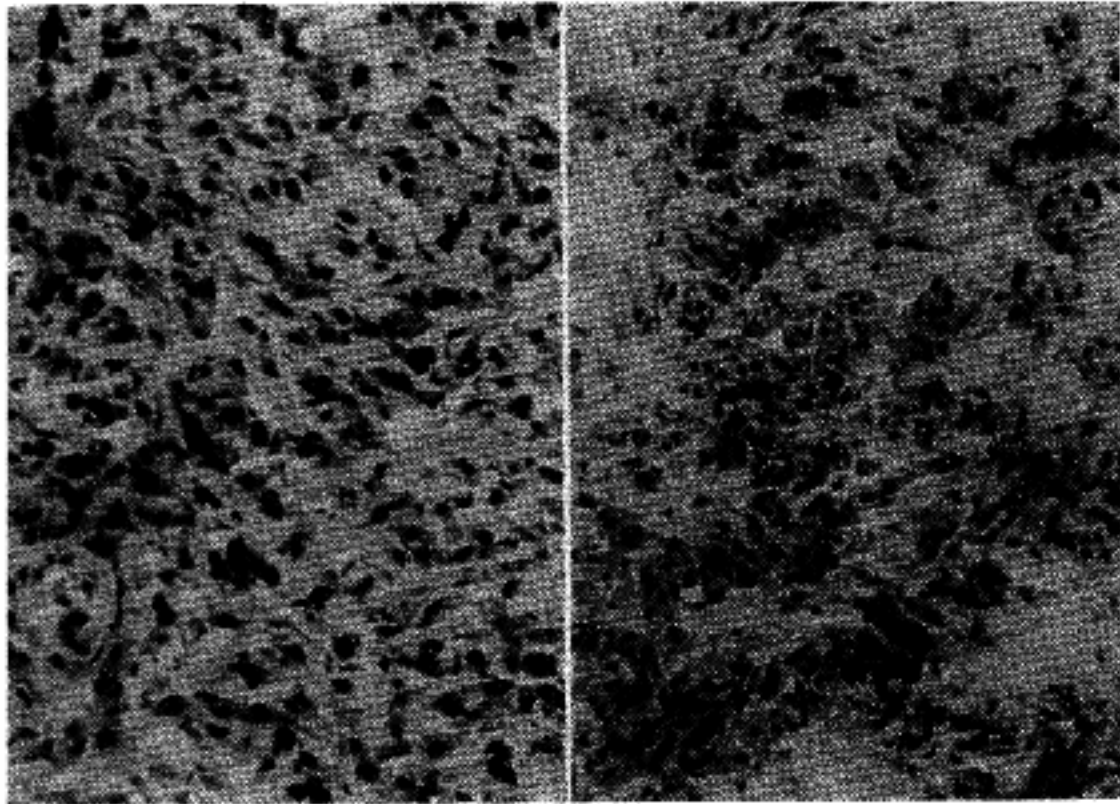


Fig. 5. In immunohistochemical studies of the tumor tissue, histiocytelike cells show positive immunoreactivity for TRPM-3(Left) and weak positive immunoreactivity for F4/80(Right).

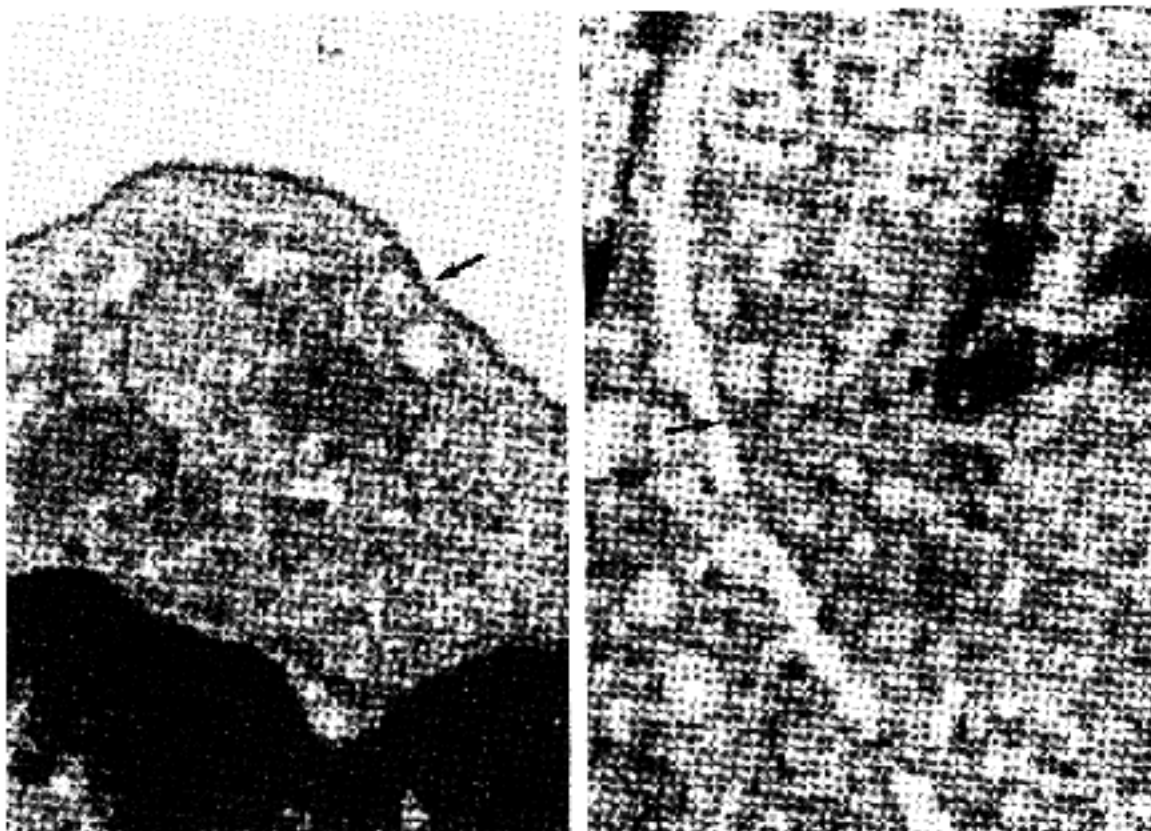


Fig. 6. In immunoelectron microscopic study, cell membrane of macrophage of normal rat spleen shows linear reactivity(arrow) for TRPM-3(Left, original magnification,  $\times 75,000$ ), whereas histiocytelike cell of the tumor tissue shows negative reaction(arrow) (Right, original magnification,  $\times 36,000$ ).

은 거의 단층을 형성하였고, 저배율소견상 차바퀴 모양을 보였다. 구성세포들은 방추형의 섬유모세포양 세포가 대부분이었고, 세포질 내에 다수의 공포를 갖고 있는 조직구양 세포들과 통통하거나 다각형의 거대세포들이 소수 섞여 있었다. 3차례의 계대 배양후에도 세포성장 양상은 여전히 차바퀴모양을 보였고, 구성세포들도 거의 변화가 없었다(Fig. 9).

### 6. 단일 세포 클로닝

단일 세포 클로닝을 시행한 세포들(Fig. 10)도 역

시 배양 2주일이 경과한 이후 차바퀴모양의 성장 양상을 보였으며, 구성세포들은 방추형 세포가 주류를 이루었고, 단층을 형성할 때에 가서 소수의 다각형의 세포들과 거대세포들이 관찰되었다.

### 7. 세포주에 대한 면역 조직 화학적 검색

클론화된 배양 세포들은 거의 모두 방추형의 세포들로서 MEP-1과 Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ 에 강양성 반응을 보인 반면 TRPM-3에 대해서는 음성 반응을 보였다(Table 2, Fig. 11).

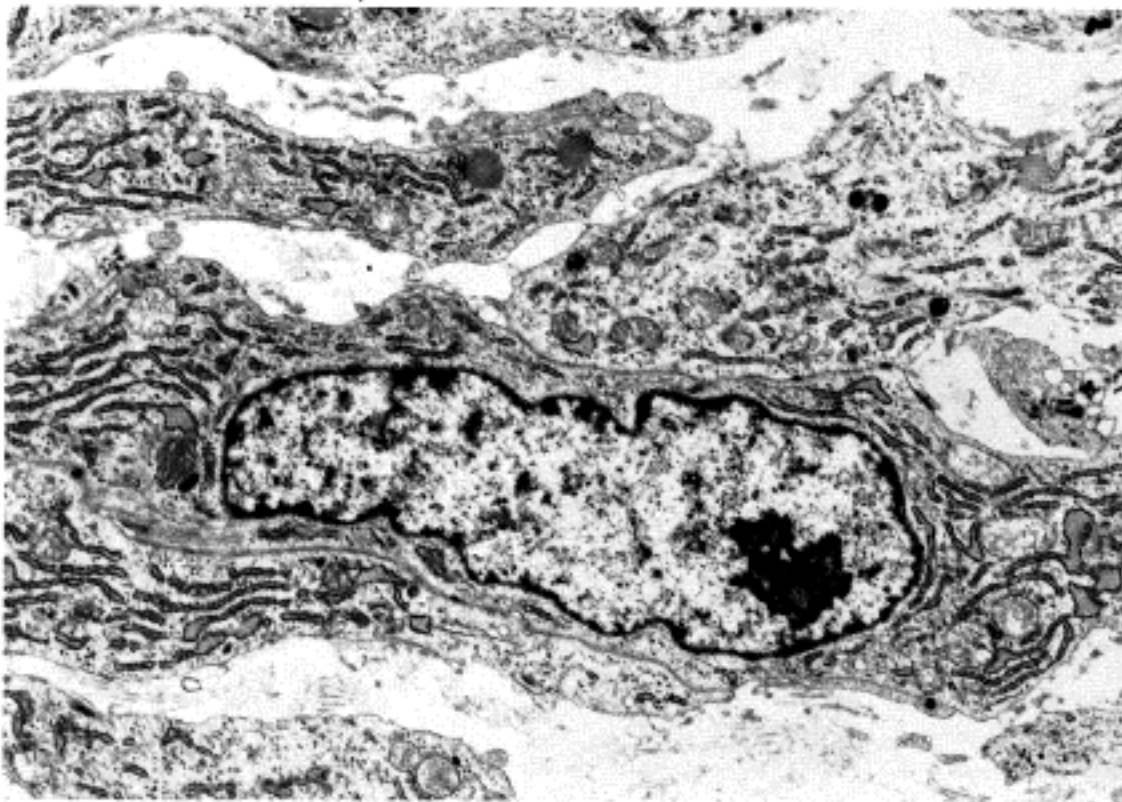


Fig. 7. Electronmicrograph of fibroblastlike cell from the tumor tissue. Elongated shape, smooth unrippled cell membrane, slender nuclei with prominent nucleoli, well developed RER(original magnification,  $\times 8,000$ ).

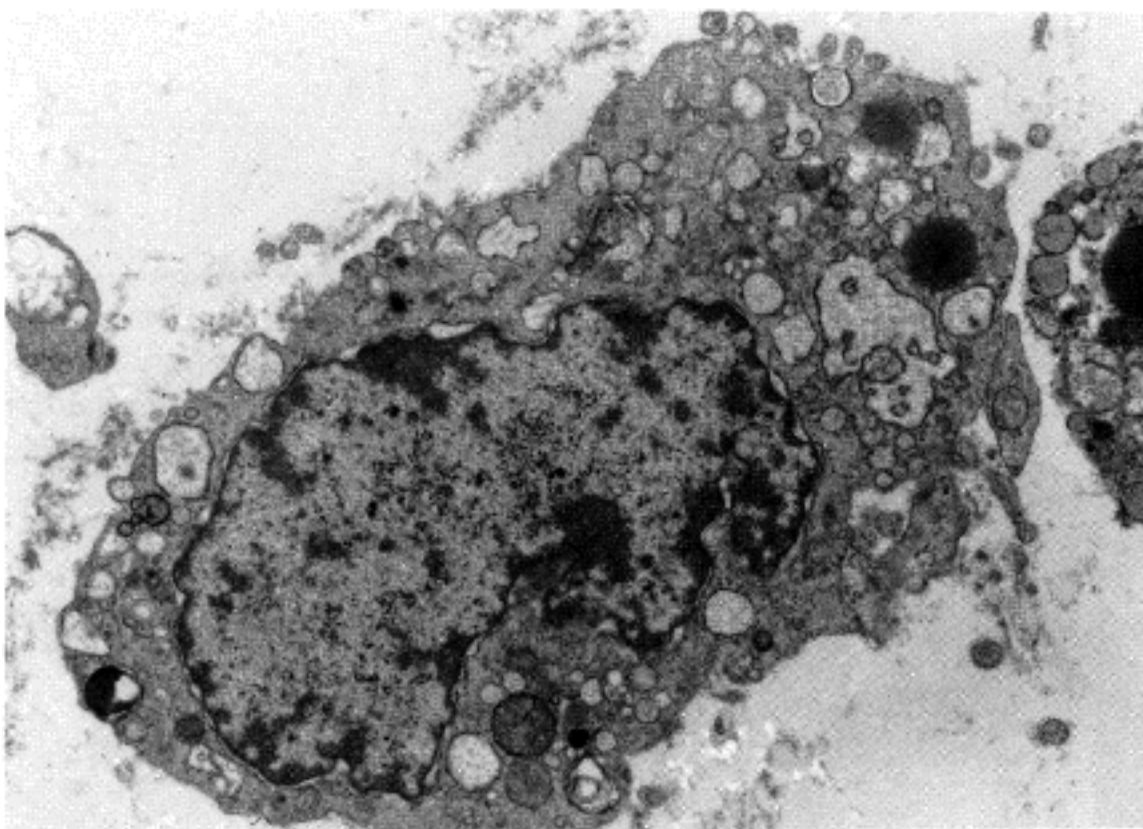


Fig. 8. Electronmicrograph of histiocyte-like cell from tumor tissue. Various in shape, ruffled cell margins, oval, spherical nuclei, bulky cytoplasm with well developed Golgi complex & multiple lysosomal bodies(original magnification,  $\times 10,000$ ).

**Table 2.** Immunohistochemical studies of cloned cell strain

MEP-1	+
Anti-prolyl 4-hydroxylase $\beta$	+
TRPM-3	-

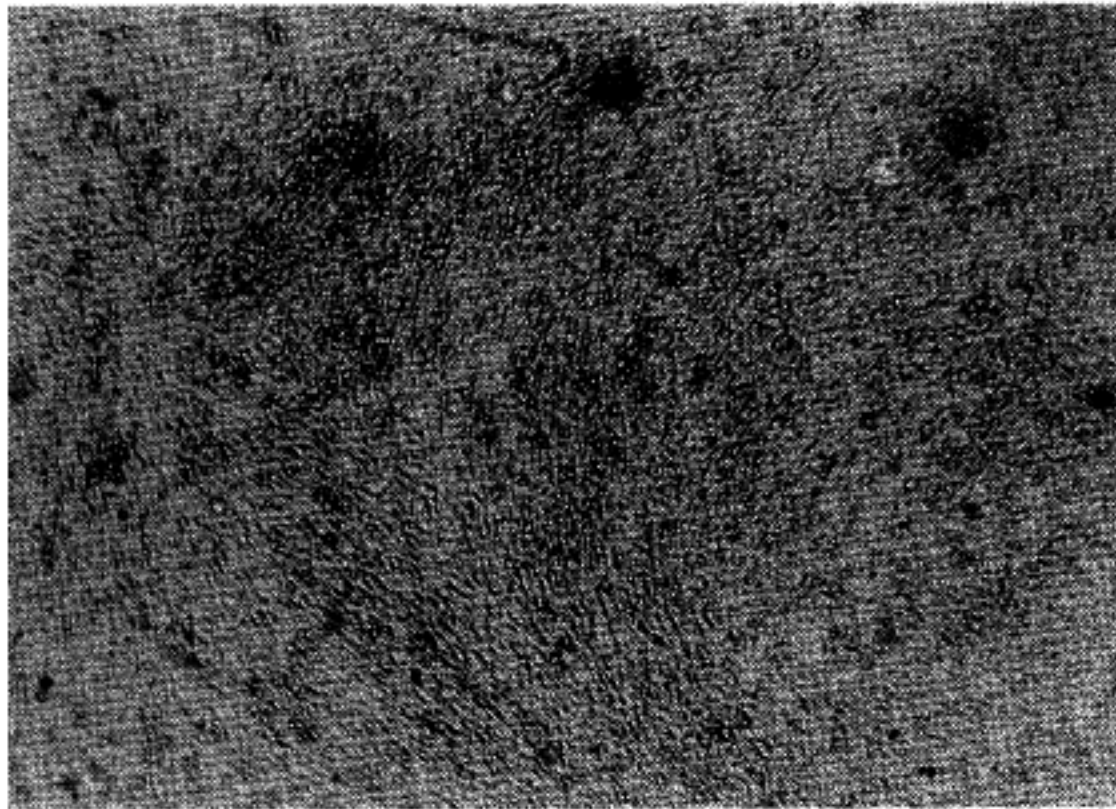
**8. 세포주에 대한 전자현미경적 검색**

방추형의 핵과 세포질내에 조면세포질 미세망이

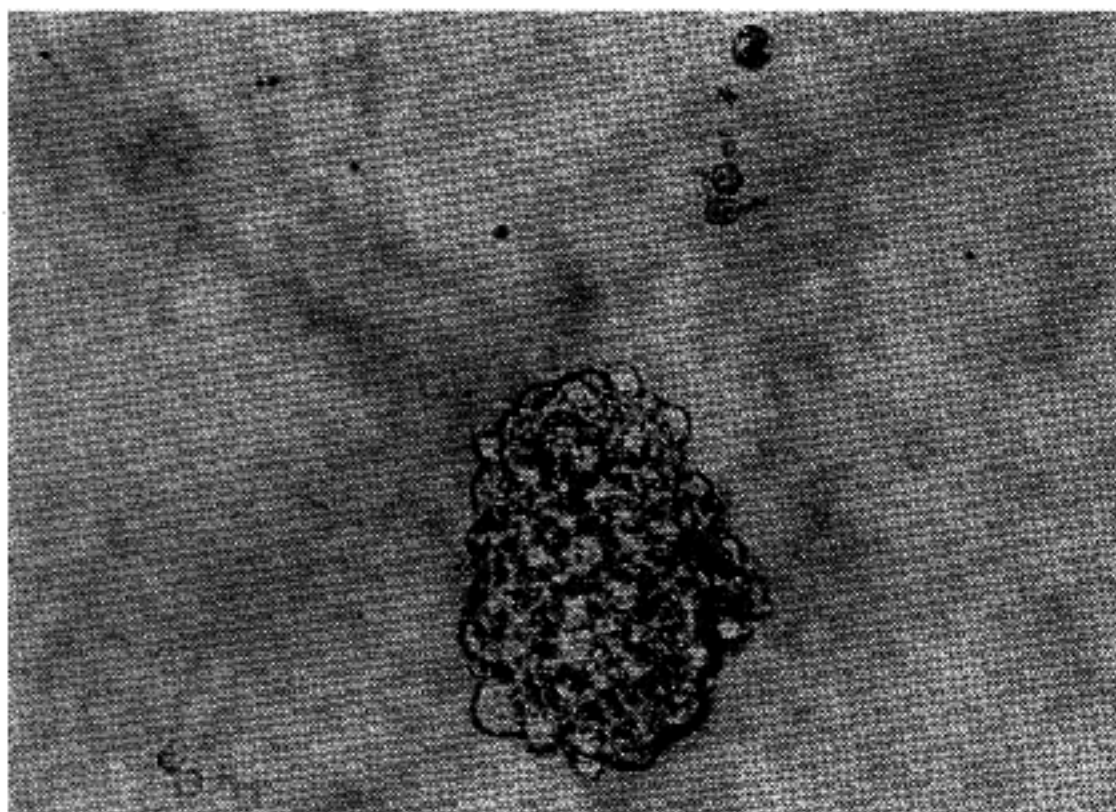
비교적 잘 발달되어 있으며, 세포 표면은 늘기가 적은 배반한 모양을 나타내어 섬유보세포의 모양을 나타내었다(Fig. 12).

**9. 라텍스 파티클에 대한 식작용 검사**

라텍스 파티클을 함유한 배양액에서 배양한 세포주를 Giemsa 염색으로 관찰하였으나, 식작용의 증기를 갖는 세포들은 관찰되지 않았다.



**Fig. 9.** At 5 weeks of primary culture, cultured cells show storiform growth pattern which was characteristics of the tumor tissue.



**Fig. 10.** At 2 weeks of single cell cloning, one colony of tumor cells was formed in RPMI-1640 media containing Noble agar.



### 고찰

MFH는 성인에서 가장 흔한 연부 조직 악성 종양<sup>3</sup>으로써 조직학적 스펙트럼이 광범위한 특징을 가지고 있다. 이에따라 MFH를 몇가지 조직학적 유형으로 분류하는 시도<sup>4</sup>가 외과 병리학적으로 이루어져 있다.

이러한 바탕위에서 그 구성세포의 종류, 나아가서

MFH의 기원세포를 밝히려는 학문적 시도는 지속되어왔다. 종양 세포의 조직배양 연구와 광학 그리고 전자 현미경적 관찰을 통한 MFH의 연구에 의하면<sup>1,2,5-11</sup>, 이 종양을 구성하는 세포들은 크게 7가지로 보고되고 있다. 즉, 섬유모세포양 세포, 조직구양 세포, 중간세포, 근섬유모세포양 세포, 황색종세포, 다핵 기대세포 그리고 미분화세포들이다. 가장 흔한 유형인 storiform-pleomorphic 형에서는 섬유모세포양 세포와 조직구양 세포가 주종을 이루고 있는 가운

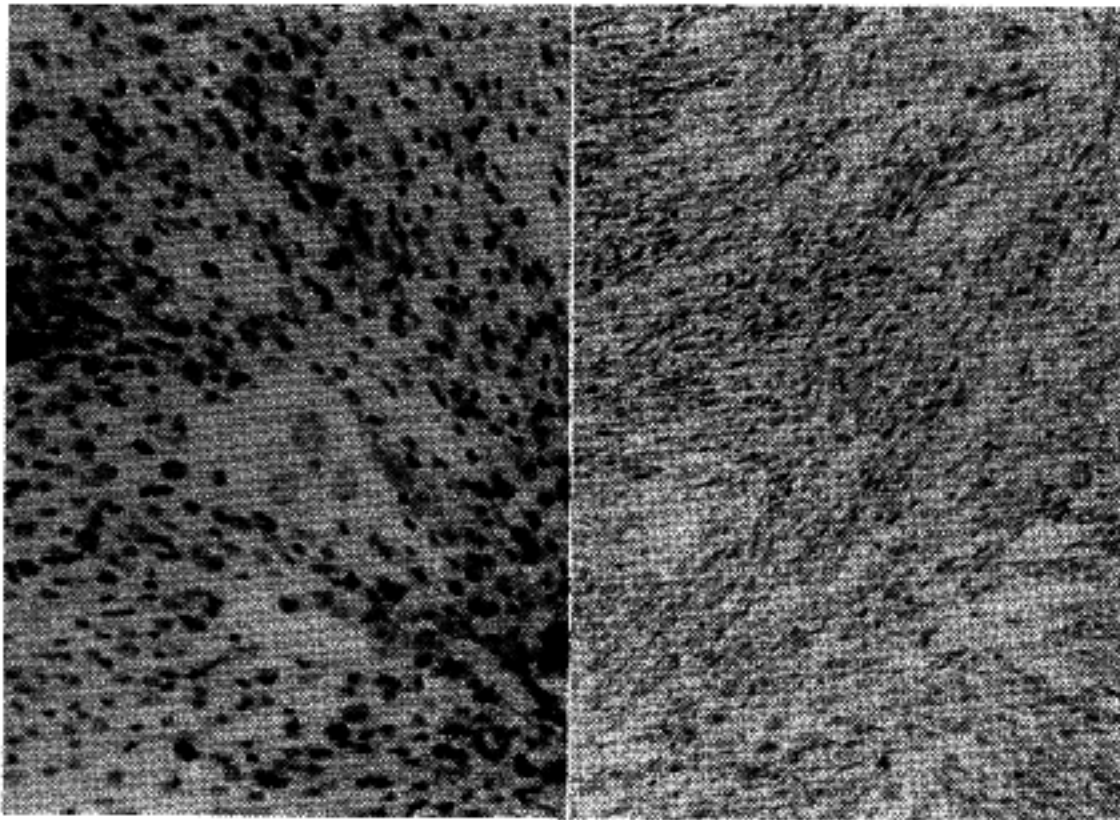


Fig. 11. In immunocytochemical studies of the cell strain, all cells show strong immunoreactivity of cytoplasm for MEP-1(Left) and Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ (Right).

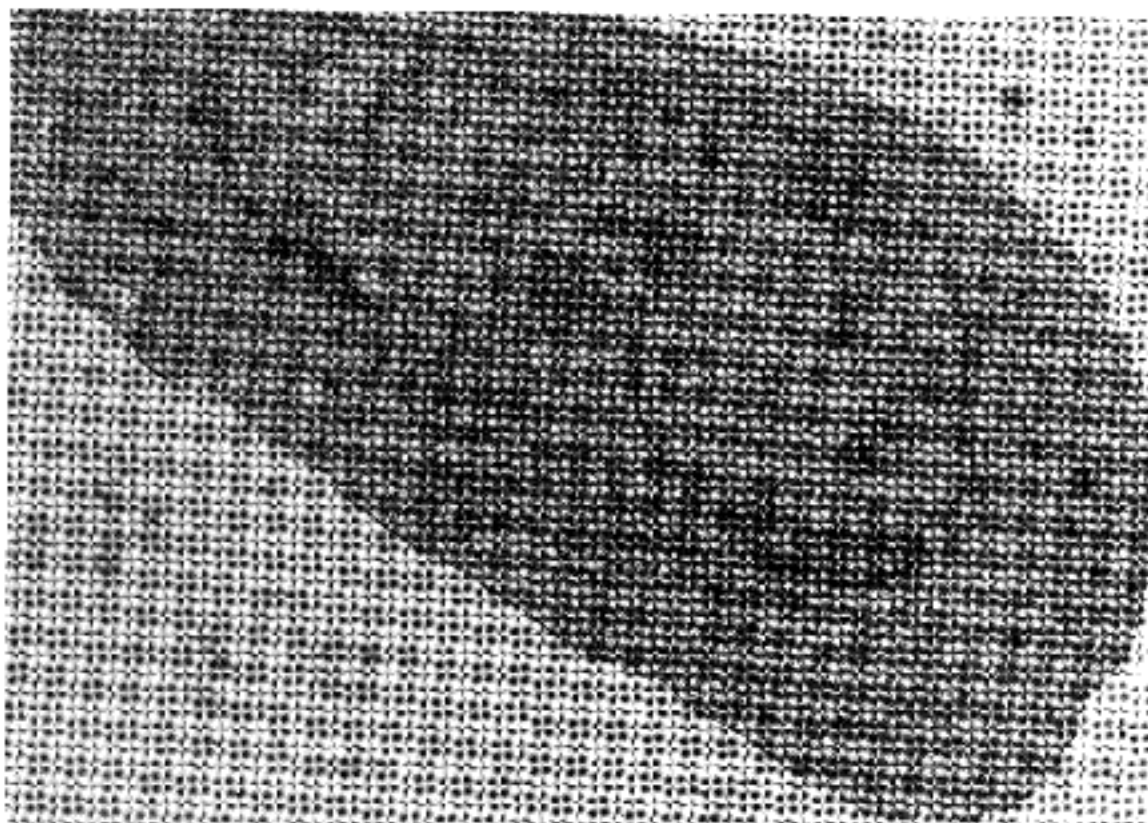


Fig. 12. Ultrastructurally, a cloned cell shows fibroblastlike appearance. Abundant cytoplasmic RER and unruffled smooth cell membrane(original magnification,  $\times 24,000$ ).

데 그 이외의 세포들이 다양하게 혼재되어 나타난다. 이렇게 MFH의 다양한 구성세포들과 다양한 조직학적 양상으로 인하여 MFH의 발생기원에 대한 다양한 견해들이 생기게 되었고, 현재까지도 논란의 대상이 되고 있다.

본 연구에서는 방향성 탄수화물의 일종인 DMBA를 이용하여 실험적으로 MFH를 유발시켜<sup>12</sup> 다각적인 연구 접근으로 이 종양의 발생 기원을 밝히고자 하였다. MFH의 기원세포를 밝히려는 시도는 전자현미경적 계량적 측정<sup>13,14</sup> 등 다양한 방법으로 이루어져 왔으나 그 가운데서 종양 세포 배양으로 접근한 업적은 Iwasaki 등<sup>15</sup>의 연구와 Takeya 등<sup>14,16</sup>의 연구 외에 몇몇 연구들<sup>6,11,17</sup>이 있으나 비교적 드물다. Iwasaki 등<sup>15</sup>의 연구는 인체의 MFH를 대상으로 세포배양을 하여 MFH의 조직 발생을 밝히려하였고, MFH의 세포배양상의 특징<sup>15,17</sup>은 배양세포들이 단층을 이룰 때에 세포들의 배열양상이 종양지체의 조직학적 특징과 미찬가지로 차바퀴 모양의 배열양상을 나타낸다 하였다. 또한 그 구성세포들도 방추형 세포, 다각형 세포, 그리고 기괴한 거대세포들로 구성되어 이들이 서로 혼재되어 나타난다고 하였다. 본 실험에서도 배양 세포들의 배열상이 차바퀴 모양을 보이고 구성 세포의 종류가 거의 동일하였다. 인간과 쥐라는 종의 차이에도 불구하고 나타나는 소견이 유사한 점은 흥미있는 사실이다. Tsuchiya 등<sup>14</sup>은 쥐의 MFH 세포를 배양하여 MFH의 기원 세포가 섬유모세포라 하였다. 이러한 결론은 첫째 배양을 통하여 획득한 세포주와 종양세포를 이식하여 얻은 종양에서 MFH의 섬유모세포양 세포에 특이성을 보이는 MEP-1에 양성 반응을 보인 점, 둘째 DNA 유세포측정과 간접 면역형광법 검사에서도 MEP-1 양성인 세포가 증식력이 높게 나타난 점에 그 근거를 둔 것이다. 본 연구에서도 종양 세포주가 MEP-1에 양성반응을 보여 Tsuchiya 등<sup>14</sup>의 세포배양을 통한 연구 결과와 일치하는 소견을 보였다.

구성세포들의 전자현미경적 특징을 살펴보면, 인간<sup>13,18,19</sup>과 동물모델<sup>5,9,14,20,21</sup>에서 많은 보고들이 발표되어 있는데, 섬유모세포양 세포는 길쭉하고, 매끄러우며, 굴곡이 적은 세포막, 불규칙하게 길어진 핵, 그리고 뚜렷한 핵인을 갖고 있으며, 세포질내에 조면세포질 내세망이 풍부하고, 확장된 수조가 많이 관찰된다. 조직구양 종양 세포는 주름진 세포막과 다량의 세포 돌기를 나타내며, 핵은 난원형 내지는 만입된 모양이고, 핵인은 뚜렷하지 않다. 세포질내에 리소솜이 풍부하고, 골지체가 현저하게 나타나

며, 조면세포질 내세망은 국소적으로 소량 관찰된다. 중간 세포는 섬유모세포의 특성과 조직구의 특성을 공유한 세포이고, 미분화세포는 작고 둥글며 매끄러운 세포표면과 둥근핵이 관찰되고, 세포질내에는 세포 소기관이 소량밖에 없다. 거대세포는 풍부한 세포질을 갖고, 핵이 2~4개 정도 되는데, 핵의 모양이나, 세포질내 소기관의 모양이 조직구양 세포와 유사점이 많지만, 미토콘드리아와 조면세포질 내세망이 풍부하여 섬유모세포의 모양도 많이 취한다. 황색종 세포는 많은 지방 소적들로 인하여, 빈공간이나 높은 전자밀도를 갖는 균질성의 물질로 나타나고, 세포막은 조직구양 세포가 섬세한 사상족으로 나타나는 반면 거친 위쪽으로 나타난다. 일설에는 죽어가는 섬유모세포가 황색종 세포를 닮았다는 주장<sup>22</sup>도 있다. 근섬유모세포는 섬유모세포의 특성을 나타내는 세포로써 섬유원속들이 국소적인 치밀체(dense body)를 이루거나 세포막하(subplasmalemmal)에 나타나는 것을 특징으로 하고 종종 기저판과 포음세포가 관찰된다. 이러한 특징들을 보이는 세포들이 어떤 비율로 존재하는가에 대하여 인간의 MFH<sup>13</sup>에서와 쥐의 MFH<sup>14</sup>에서 연구되어 있다. 본 연구에서는 종양조직의 전자현미경적 검색 뿐만 아니라 세포 배양을 통하여 얻어진 세포주에 대하여도 전자현미경적 검색을 시행하였다.

악성 섬유성조직구종에 대한 면역 조직화학적 검색<sup>10,11</sup>중에서 아직은 진단적으로 적용할만한 가치를 지닌 것은 없지만, 대개 단핵세포나 대식세포계열에 대한 반응성을 나타내기 보다는 섬유모세포에 대한 반응성을 나타내는 결과를 보이고 있다. HLA-DR에 양성반응을 보인다는 것으로 조직구 기원설을 주장<sup>23</sup> 하기도 하지만, HLA-DR이 조직구에 특이도가 없고, 내피세포나 자극된 섬유모세포에서도 존재한다는 설<sup>24</sup>이 있다. 최근 쥐의 MFH의 섬유모세포양 세포에만 특이성을 보이는 MEP-1<sup>14</sup>이라는 단일 클론성 항체가 Takeya 교수에 의해 개발되었고, 이 항체를 이용하여 MFH가 섬유모세포기원이라는 주장을 하고 있다. 쥐의 대식세포에 특이성을 갖는 TRPM-3<sup>25</sup>라는 단일 클론성 항체도 개발되어 있다. 본 연구에서도 MEP-1, TRPM-3, HLA-DR 등을 이용한 면역조직화학적 검색을 시행하였다.

현재까지 대두된 발생 기원설로 세가지의 원칙적인 가설이 있기는 하지만, Mirra<sup>26</sup>의 경우 MFH를 등급 3 또는 등급 4의 섬유육종이라는 견해를 피력하였다.

먼저, 조직구 기원설은 1961년 Kauffman과 Stout<sup>27</sup>가

처음 제안하였고, 조직 배양 조건에 기초한 Ozzello 등<sup>1</sup>, Yumoto 및 Morimoto<sup>28</sup>의 연구들에서 섬유모세포양 종양 세포가 특성의 섬유모세포로써 조직구에서 기원하였고, 조직구로의 이행이 가능하다고 하였다. 이 외에도 조직구가 섬유모세포로 이행되는 소견을 관찰한 보고<sup>29</sup>들이 조직구 기원설을 지지하였다. 하지만, 이러한 결론들이 대부분 섬유성조직구종의 배양에서 조직구양 세포와 섬유모세포양 세포의 비율을 관찰하는것에 근거를 두고 있기때문에 조직구가 섬유모세포양 세포로 분화하는 것인지, 섬유모세포양 세포의 복제력이 커서 섬유모세포양 세포의 비율이 높아지는 것인지에 대한 구별이 어렵다. 두번째 가설인 미분화 간엽세포 기원설은 Fu 등<sup>4</sup>이 전자현미경적 검색을 근거로 미분화 간엽세포가 간세포로써 조직구와 섬유모세포 양쪽으로 분화한다는 주장이다. 그러나, 대식세포의 개체발생학적 개념에 근거해볼때, 간엽세포에서 바로 조직구로 분화한다는 것에는 의문의 여지가 있다. 왜냐하면, 조직구는 골수나 태아 조혈에 있어서 혈구형성 간세포(hemopoietic stem cell)에서 유래한다는 개념이 널리 받아들여지고 있기때문이다. 세번째 가설인 섬유모세포 기원설은 Hoffman과 Dickersin<sup>18</sup>이 전자현미경적 소견을 토대로하여 MFH는 섬유모세포의 종양으로써 비 종양성의 조직구가 섞여 나타난다고 주장하였고, MFH로 분류된것 중 적어도 일부는 섬유육종이라는 것이다. 최근 연부조직에 대한 단행본<sup>30</sup>에서도 섬유모세포 기원설이 더욱 유력한 것으로 받아들여지고 있다.

## 결 론

MFH의 기원 세포를 밝히고자 흰쥐에 실험적으로 MFH를 유발시킨 악성 세포를 배양하여, 세포주를 수립하고 이 세포주의 성상을 세포 생물학적으로 조사하여 다음과 같이 요약한다.

- 1) 종양조직 자체의 면역 조직화학적 검색에서 종양조직의 대부분을 차지하는 방추형의 세포가 MFH의 섬유모세포양 세포에 특이성을 나타내는 MEP-1에 양성반응을 나타내었다.
- 2) 교원섬유 생성능을 밝히는 Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ 에 양성반응을 나타내었다.
- 3) 쥐의 대식세포에 대해 특이성을 나타내는 TRPM-3과 F4/80에 대하여는 일부 조직구양 세포에서만 양성반응을 보였으나 세포주에서는 음성반응을 보였다.

4) 면역 전자현미경적 검색에서도 정상 비장의 대식세포의 세포막에는 TRPM-3에 양성으로 염색되었으나, 종양세포 중에서 전자현미경적으로 조직구의 특징을 보이는 세포의 세포막에서는 TRPM-3에 음성반응을 나타내었다.

5) 세포배양 5주경에 그 배양 성상이 MFH의 조직에서 관찰할 수 있었던 것과 같은 차바퀴 모양과 유사한 형태를 나타내었다.

6) 일차 세포배양과 클론화된 세포의 배양에서, 섬유모세포양 세포로만 자라던 세포들이 거의 단층을 이룰 즈음이 되었을때 조직구양 세포가 출현하였지만, 이러한 조직구의 특성을 갖는 세포들도 섬유모세포양 세포와 마찬가지로 MEP-1과 Anti-prolyl 4-hydroxylase  $\beta$ 에 대해 양성반응을 나타내었고, TRPM-3나 F4/80에 대하여는 음성 반응을 보였다.

7) 라텍스 파티클에 대한 식작용검사에서도 분명한 세포의 식작용 활동을 관찰할 수 없었다.

8) 획득된 세포주에 대한 전자현미경적 관찰에서 조면세포질 내세망이 발달되고 세포막이 비교적 매끈한 섬유모세포와 유사한 모양을 보였다.

이상의 결과로 미루어 DMBA로 유발한 흰쥐 연부조직의 MFH의 기원세포는 조직구가 아니라 섬유모세포양 세포일 것으로 생각된다. 이러한 결론은 사람의 MFH에 있어서도 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구에 사용된 MEP-1항체를 공여해 주신 일본 구마모토(Kumamoto)의과대학 제 2 병리학 교실(주임교수 T.Tsuchiya)의 모토히로 다케야(Motohiro Takeya) 교수께 진심으로 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Ozzello L, Stout AP, Murray MR. Cultural characteristics of malignant fibrous histiocytoma and fibrous xanthomas. *Cancer* 1963; 16: 331-44.
2. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
3. Weiss SW, Enzinger FM. Malignant fibrous histiocytoma; an analysis of 200 cases. *Cancer* 1978; 41: 2250-66.
4. Kearney MM, Soule EH, Ivins JC. Malignant fibrous histiocytoma.; a retrospective study of 167 cases. *Cancer* 1980; 45: 167-78.
5. Fu YS, Gabiani G, Kaye GI, Lattes R. Malignant soft

- tissue tumor of probable histiocytic origin(Malignant fibrous histiocytomas); General considerations and tissue culture studies. *Cancer* 1975; 35: 176-98.
6. O'Brien JE, Stout AP. Malignant fibrous xanthomas. *Cancer* 1964; 17: 1445-55.
  7. Iwasaki H, Kikuchi M, Takii M, Enjoji M. Benign and malignant fibrous histiocytoma of the soft tissues: Functional Characterization of the cultured cells. *Cancer* 1982; 50: 520-30.
  8. Kindblom L-G, Jacobsen K, Jabcobsen M. Immunohistochemical invastigation of tumors of supposed fibroblastic-histiocytic origin. *Hum Pathol* 1982; 13: 834-49.
  9. Magnusson B, Kindblom L-G, Angervall L. Enzyme histochemistry of malignant fibroblastic histiocytic tumors. *Appl Pathol* 1983; 1: 223-40.
  10. Roholl PJM, Kleyne J, van Basten CDH, van der Putte SCJ, van Unnik JAM. A study to analyze the origin of the tumor cells in malignant fibrous histiocytomas. : a multiparametric characterization. *Cancer* 1985; 56: 2809-15.
  11. Shirasuma K, Sugiyama M, Miyazaki T. Establishnebt and Characterization of neoplastic cells from a malignant fibrous histiocytoma; a possible stem cell line. *Cancer* 1985; 55: 2521-32.
  12. Sakamoto K. Malignant fibrous histiocytoma induced by intra-articular injection of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in the rat; pathological and enzyme histochemical studies.. *Cancer* 1986; 57: 2313-22.
  13. Fukuda T, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Malignant fibrous histiocytoma of soft parts; An ultrastructural quantitative study. *Ultrastructural Pathol* 1988; 12: 117-29.
  14. Tsuchiya T, Takahashi K, Takeya M, Hosokawa Y, Hattori T, Takagi K. Immunohistochemical, quantitative immunoelectron microscopic, and cytofluorometric characterization of chemically induced rat MFH. *Am J Pathol* 1993; 143: 431-45.
  15. Iwasaki H, Isayama T, Ohijimi Y, et al. Malignant fibrous histiocytoma; A tumor of facultative histiocytes showing mesenchymal differentiation in cultured cell lines. *Cancer* 1992; 69: 437-47.
  16. Takeya M, Yamashiro S, Yoshimura T, and Takahashi K. Immunophenotypic and Immunoelectron Microscopic Characterization of Major Constituent Cells in Malignant Fibrous Histiocytoma Using Human Cell lines and Their Transplanted Tumors in Immunodeficient Mice. *Lab Invest* 1995; 72: 679-88.
  17. Genberg M, Mark J, Hakelius L, Ericsson J, Nister M. Origin and relationship between different cell types in malignant fibrous histiocytoma. *Am J Pathol* 1989; 135: 1185-96.
  18. Hoffman MA, Dickersin GR. Malignant fibrous histiocytoma; an ultrastructural study of eleven cases. *Human Pathol* 1983; 14: 913-22.
  19. Alguacil-Garcia A, Unni KK, Goellner JR. Malignant fibrous histiocytoma. ; an ultrastructural study of six cases. *Am J Clin Pathol* 1978; 69: 121-9.
  20. Maruyama H, Mii Y, Emi Y, Masuda S, et al. Experimental studies on malignant fibrous histiocytomas; II. Ultrastructure of malignant fibrous histiocytomas induced by 4-(hydroxyamino)-quinoline 1-oxide in rat. *Lab Invest* 1983; 48: 187-98.
  21. Kato T, Takeya M, Takagi K, Takahashi K. Chemically Induced Transplantable Malignant Fibrous Histiocytoma of the Rat. *Lab Invest* 1990; 62: 635-45.
  22. Gabbiani G, Fu YS, Kaye GI, Lattes R, Majo G. Epithelioid sarcoma; a light and electron microscopic study suggesting a synovial origin. *Cancer* 1972; 30: 486-99.
  23. Roholl PJM, Kleyne J, Van Unnik JA. Characterization of tumor cells in malignant fibrous histiocytomas and other soft tissue tumors, in comparison with malignant histiocytes. II. Immunoperoxidase Study on Cryostat Sections. *Am J Pathol* 1985; 121: 269-74.
  24. Wood GS, Beckstead JH, Turner RR, Hendrickson MR, Kempson RL, Warnke RA. Malignant fibrous histiocytoma tumor cells resemble fibroblasts. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 323-35.
  25. Takeya M, Hsiao L, Takahashi K. A new monoclonal antibody, TRPM-3, binds specifically to certain rat macrophage populations; Immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. *J Leukocyte Biology* 1987; 41: 187-95.
  26. Mirra JM. Malignant fibrous histiocytoma-fact or fancy? *J Jpn Orthop Assoc.* 1994; 68: S1010-1.
  27. Kauffman SL, Stout AP. Histiocytic tumors(fibrous xanthoma and histiocytoma) in children. *Cancer* 1961; 14: 469-82.
  28. Yumoto T, Morimoto K. Experimental approach to fibrous histiocytoma. *Acta Pathol Jpn* 1980; 30: 767-78.
  29. Kouri J, Ancheta O. Transformation of macrophages into fibroblasts. *Exp Cell Res* 1972; 71: 168-76.
  30. Enzinger FM, Weiss SW. Soft tissue tumors. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1995: 511-22.