대한외과학회지 : 제 63 권 제 1 호
Vol. 63, No. 1, July, 2002

□ 원 저 □

동소이식을 이용한 위암의 전이모델

[1]국민건강보험공단 일산병원 외과, 연세대학교 의과대학 [2]외과학교실, [3]암전이 연구센터

김용일[1,3] · 형우진[2] · 정현철[3] · 이면희[2] · 라선영[3] · 노재경[3] · 노성훈[2,3]

Metastatic Model of Human Gastric Cancer by Orthotopic Transplantation

Yong Il Kim, M.D.[1,3], **Woo Jin Hyung,** M.D.[2], **Hyun Chul Chung,** M.D.[3], **Myun Hee Lee**[2], **Sun Young Rha,** M.D.[3], **Jae Kyoung Rho,** M.D.[3] and **Sung Hoon Noh,** M.D.[2,3]

Purpose: The metastatic animal model of human cancer is important from a practical point of view in the research of cancer metastasis, because it resembles the original tumors morphologically, biologically and biochemically. We developed the animal model to investigate the clinically relevant metastasis of gastric cancer which is the leading cause of death in Korea.

Methods: Seven to eight-week-old specific-pathogen-free (SPF) BALB/c-nu mice were used. We developed an orthotopic transplantation model using the tissue obtained from an inoculation of the gastric cancer cell suspension (YCC-3) into a subcutaneous layer of mice. The mice were kept in laminar-flow cabinets under SPF condition and inspected everyday.

Results: Mice were sacrificed 8 12 weeks after the operation when they showed either a measurable mass or signs of distress. The metastatic pattern of this animal model was very similar to that of human gastric cancer. At autopsy, the local growth of the gastric cancer, lymph node metastasis and any distant metastasis were noted.

Conclusion: We developed an animal model for human gastric cancer metastasis that will enhance our understanding of the biology of cancer metastasis and it will contribute to the development of the research and treatment of cancer metastasis. **(J Korean Surg Soc 2002;63:30-34)**

Key Words: Orthotopic transplantation, Gastric cancer, Metastasis

중심 단어: 동소이식, 위암, 전이

책임저자 : 노성훈, 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
㉾ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-361-5549, Fax: 02-313-8289
E-mail: sunghoonn@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2002년 5월 20일, 게재승인일 : 2002년 6월 7일

[1]Department of Surgery, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital, Ilsan, Departments of [2]Surgery and [3]Cancer Metastasis Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

암전이 동물 모델은 암전이 기전은 물론 종양의 성장과 전이 과정을 단계별로 연구할 수 있고, 항암제 치료의 효과에 대한 반응을 생체에서 직접 반복 실험할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 인체에서 발생하는 종양의 진전과 전이과정을 충실하게 재현할 수 있는 동물모델을 개발하는 것은 매우 중요하다. 현재까지 우리 나라의 경우 한국인에서 호발하는 위암의 국소 진전 및 전이과정의 연구조건을 충족하는 적절한 실험동물 모델에 대한 보고가 없는 실정이다.

이에 저자들은 인간의 위암세포주를 쥐의 피하에 접종하는 방법으로 형성된 고형암 조직을 동소이식하여, 위암의 국소증식 및 전이와 관련된 연구를 수행할 수 있는 실험동물 모델을 만들고자 하였다.

방 법

1) 실험동물

마우스는 연세대학교 임상의학 연구센터 실험동물부에서 공급하는 specific pathogen free (SPF) 조건의 BALB/c-nu mice로서 성성숙이 발현된 생후 7 8주 된 것을 이용하였다. 대상 마우스의 체중은 20 gm 내외였고, 암/수는 구별하지 않았다. 멸균된 물과 사료(PicoLab, PMI, U.S.A.)를 공급하였고, 사육과 수술은 실험동물부 규정을 준수하여 SPF 조건의 무균실에서 시행되었다.

고형암 구축을 위해 위암세포주를 생후 8주 된 누드마우스(22.3 gm, BALB/c-nu mouse, ♂)의 피하에 접종하였고, 동소이식 모델을 만들기 위해 8마리의 누드마우스를 사용하였다. 1세대 동소이식 모델(1st passage, P1)을 위해 생후 8주 된 두 마리의 누드마우스(BALB/c-nu mouse ♀ 22 gm,

BALB/c-nu mouse ♀ 21 gm)를 사용하였고, 2세대 동소이식 모델(2nd passage, P2)은 1세대 동소이식 모델에서 얻어진 고형암을 생후 7주 된 6마리의 암컷 누드마우스의 위벽 장막하층에 이식하여 구축하였다.

2) 마취 및 회복

해리성 마취제(dissociative anesthetics)인 ketamine hydrocholoride (Parke-Davis & Co. U.S.A., 50 mg/ml, 5 16 mg/kg)와 xylazine hydrochloride (BAYER Korea Co., 23.32 mg/mL, 2.5 mg/kg)를 1 : 1로 혼합하여 근육주사하거나 복강 내 투여하는 방법으로 마취를 하였고, 체온의 하강으로 인한 실험동물의 사망을 예방하기 위해 수술 후 마취에서 회복될 때까지 백열전구를 이용하여 체온을 36°C로 유지시켰다.

3) 위암 세포주 및 신선 암조직의 형성과 획득

위암 세포주는 고도 진행성 위암 환자의 복수로부터 구축된 YCC-3를 이용하였다. 세포주의 접종은 1×10^7 종양세포를 0.1 ml phosphate buffered saline (PBS)에 혼합하여 세포부유액(tumor cell suspension)을 만든 후 생후 8주 된 누드마우스(22.3 gm, BALB/c-nu mouse, ♂)의 배부 피하에 시행하였다. 세포주를 접종한 후 12주에 누드마우스를 안락사시킨 후 고형암을 절제하였다. 오염을 막기 위해 무균상태에서 고형암을 절제하였으며, 수술 전 허혈시간(ischemic interval)에 의한 조직 손상을 최소화하기 위해 절제된 조직은 즉시 Penicillin-Streptomycin (Penicillin 5000 uints-Streptomycin 5,000 ug/ml, GibcoBRL)과 PBS를 1 : 50으로 혼합한 용액에 담아 저온보관하였다. 동소이식을 위해 종양 내 괴사부분과 암종주변의 정상 조직을 제거한 후 직경 3 mm 크기의 절편을 만들어 이용하였다.

4) 동소이식 수술

마취 후 베타딘과 알코올을 이용하여 복벽을 소독한 후, 좌상복부에 약 1 cm 크기의 피부절개를 시행한 후 복벽근층과 복막을 노출시켰다. 개복 후 간의 좌엽 후방에 위치한 위를 복강 밖으로 꺼내어 수술시야를 확보하였다(Fig. 1).

위의 하부 대만측 장막을 26 gauge 바늘로 절개하여 장막하층을 노출시킨 후 준비된 신선암 조직절편을 장막하층에 위치시킨 후 6 0 vicryl로 고정하였다(Fig. 1).

동소이식 후 종양표면이 복벽절개부에 접촉되지 않도록 복강내로 넣은 후 4 0 vicryl을 이용하여 피부→복막→복막→피부의 순으로 복벽전체를 단층 봉합하였다.

5) 실험동물의 관찰

이식 후 매일 쥐의 상태를 관찰하였고 수술 후 2주째부터 주 2회 체중과 이식된 종양의 증식여부를 8 12주까지 관찰 기록하였다. 안락사 전 종양의 크기 측정은 복벽외부에서 Digimatic caliper (TN-008M, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 급격한 체중의 감소나 이식된 종양의 증식이 육안적으로 복벽 외부에서 확인될 경우 안락사를 시행하여 종양의 증식 및 전이 여부를 관찰하였다.

결 과

YCC-3 세포주(1×10^7개)를 피하에 접종하였던 누드마우스(BALB/c-nu mouse, ♂, 22.3 gm)의 경우 접종 후 5주째부터 피하에 형성된 고형암을 관찰할 수 있었고, 12주째 체중이 15.9 gm까지 감소하였고 악액질(cachexia) 상태가 되어 안락사시킨 후 해부를 시행하였다. 고형암의 크기는 9.8×8.2 mm였고, 복강내 장기에 암종의 전이소견은 없었다.

절제된 고형암의 절편을 이식한 1세대(P1) 전이모델 누드마우스(BALB/c-nu ♀ 22 gm, BALB/c-nu ♀ 21 gm)의 경우, 한 예는 이식 후 4주째 6.6 mm, 6주째 7.4 mm까지 복부종괴가 증식하였고, 10주째 안락사 후 해부를 하였다. 해부소견상 동소이식을 시행한 위에서 국소증식과 더불어 간, 복막, 림프절 전이 소견이 관찰되었다. 다른 예는 2주째 6.1 mm의 복부 종괴가 관찰되었고, 8주째 16 mm까지 종괴가 증식되었으며 10주째 사망하였다. 해부 소견상 동소이식 부위에 종괴의 국소증식과 림프절 전이가 관찰되었으나 간이나 폐 등으로의 혈행전이는 없었다.

2세대(P2) 동소이식 모델의 경우 9 15주 사이에 안락사 후 해부를 시행하였다. 2세대 모델에서는 1예를 제외한 모든 예에서 국소증식 및 림프절 전이가 관찰되었고, 국소증식은 선상피세포가 있는 위의 하부와 대망에서 관찰되었으며, 편평상피로 이루어진 전위(forestomach)에서는 관찰할 수 없었다. 종양이 점막층까지 침윤한 경우가 1예에서 있었으며, 점막층 침윤을 보인 경우 침윤이 있는 점막부위에 궤양이 관찰되었다(Fig. 2). 현미경 소견상 종양의 중앙부위에

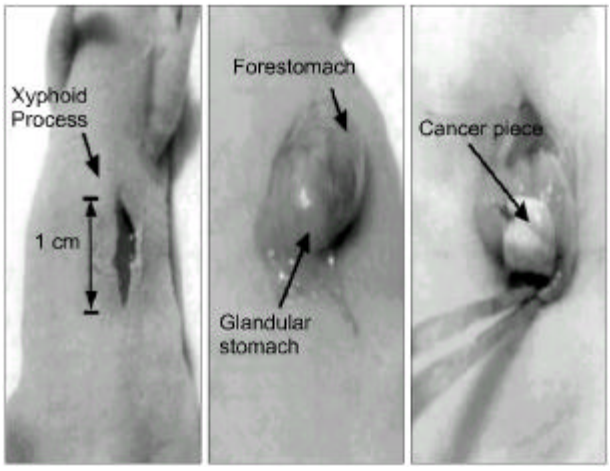

Fig. 1. Abdominal cavity exposure and fixation of tumor tissue.

Table 1. Characteristics of local growth and metastasis after orthotopic transplantation of tumor

Case	Sex	Wt* (gm)	Age (wks†)	Implant site	Passage	Implant material	Autopsy time (wks)¶	Local growth	LN mets‡	Liver mets	Peritoneal mets	Other findings
1	♂	22.3	8	SC§	P0	Cell	12	+	−	−	−	
2	♀	22.0	8	OT‖	P1	Tissue	10	+	+	+	+	
3	♀	21.0	8	OT	P1	Tissue	10	+	+	−	−	
4	♀	15.8	7	OT	P2	Tissue	15	+	+	+	−	Spleen mets
5	♀	15.3	7	OT	P2	Tissue	9	−	−	−	−	
6	♀	15.8	7	OT	P2	Tissue	10	+	+	+	−	
7	♀	14.5	7	OT	P2	Tissue	12	+	+	+	−	
8	♀	17.9	7	OT	P2	Tissue	9	+	+	+	−	Pancreas invasion
9	♀	14.2	7	OT	P2	Tissue	13	+	+	+	−	

*Wt = weight; † wks = weeks; ‡ mets = metastasis; § SC = subcutaneous implantation; ‖ OT = orthotopic transplantation; ¶ Autopsy time = autopsy time after OT.

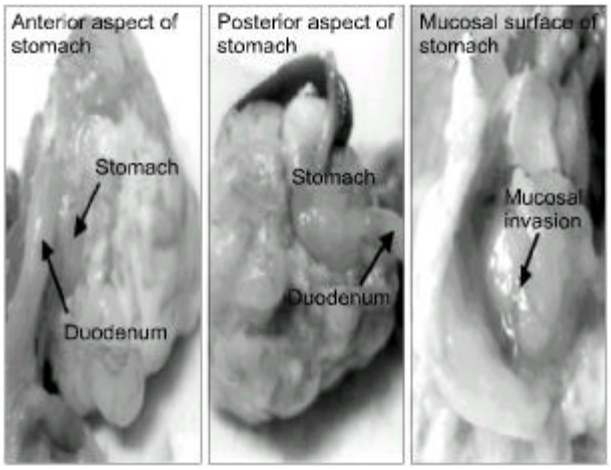

Fig. 2. Gastric wall invasion of gastric cancer tissue transplanted orthotopically.

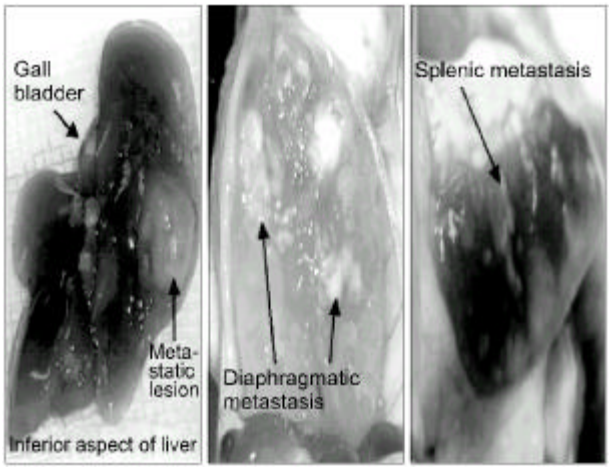

Fig. 3. Distant metastasis to liver, diaphragm and spleen.

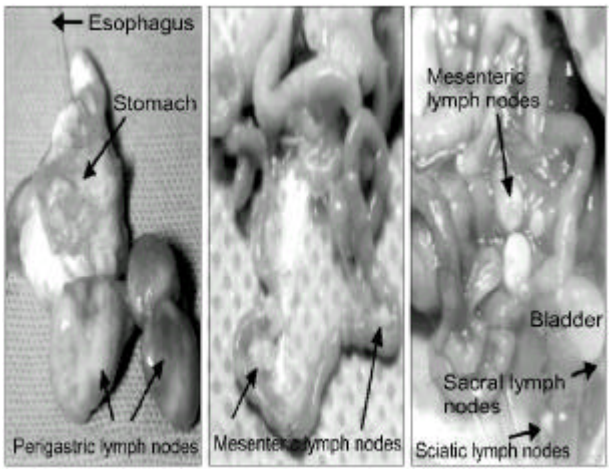

Fig. 4. Pattern of lymph node metastasis in orthotopic transplanted animal model.

서 궤사소견이 있었고, 조직학적으로 분화도가 나쁜 소견을 보였다.

혈행전이는 간, 비장에서 관찰되었고, 간전이의 경우 1세대 모델에서 1예(1/2), 2세대 모델에서 5예(5/6)가 관찰되었다(Fig. 3).

복막전이는 횡격막측 복막에 전이가 있었던 경우가 1예였고(Fig. 3), 종양의 직접 침윤에 의한 췌장 전이가 1예에서 있었다(Table 1).

림프절 전이는 대만부, 소/대장간막, 요부, 천골부, 좌골부에서 관찰되었고, 림프절 전이 개수와 전이림프절의 크기는 개체에 따라 차이를 보였다. 현미경 소견상 림프절의 조직학적 특성을 알 수 없을 정도로 암세포의 침윤이 심한 경우가 1예에서 있었다(Fig. 4).

고 찰

복잡한 암전이 과정을 단계적으로 밝히기 위해서는 인간에서 발생하는 종양의 전이과정을 충실하게 표현할 수 있고, 동일한 실험의 반복이 가능하며, 종양의 성장양상과 전이과정을 단계별로 연구할 수 있는 동물모델을 구축하는 것이 중요하다.

1941년 Lorenz와 Stewart(*1*)가 쥐에서 다발성 소장암 동물모델을 만든 이래, Carcinogen을 이용한 다양한 실험모델이 만들어졌고,(*2-4*) 그 후 세포의 배양기법의 발달로 종양세포주를 이용한 실험모델과,(*5*) 신선 종양조직을 동종장기에 직접 이식하는 동소이식 모델이 개발되었다.(*6-9*)

실험동물 모델에서 마우스를 주로 이용하는 가장 중요한 이유는 마우스의 유전적 특성을 다양한 근치교배를 통하여 실험에 적절한 유전자의 특성을 갖도록 혈통의 조작이 비교적 용이하고, 생체에서 전이과정의 생물학적 변화를 연구할 수 있으며, 전이와 관련된 새로운 치료법의 시도가 가능하기 때문이다. 특히 누드마우스의 경우 인간의 암조직을 직접 이식하는 이종간의 조직이식이 가능하여 실험동물 모델로 유용하게 이용되고 있다. 누드마우스를 이용한 이종간의 암조직 이식은 나이, 혈통, 건강상태가 중요하며, 성별에 관련해서는 특별한 보고가 없다.(*10*) 나이와 연관되어 어린 쥐를 이용하는 것이 T 림프구와 관련이 없는 항체의 활성화가 적어 유리한 것으로 보고되고 있으나, 실제 동소이식 모델의 경우 성성숙(sexual development) 이전의 누드마우스를 이용하면 마취 및 수술과 관련된 합병증이나 감염 등으로 수술 후 관리에 어려움이 있어 성성숙 발현 이후의 마우스를 이용하는 것이 적합하다. 혈통은 순종 누드마우스 보다는 누드마우스와 일반 마우스의 교배종중 표현형이 누드마우스인 잡종을 많이 이용하는데, 전이와 관련된 면역학적 측면에서는 잡종이 상대적으로 강한 거부반응을 나타낼 수 있어 불리하지만, 원격전이가 생길 때까지의 기간인 수술 후 8 12주까지 감염이나 실험실 환경에 잘 견딘다는 점에서 유리하다. 건강상태와 관련하여 간염에 감염된 누드마우스의 경우 이식된 조직에 매우 강한 거부반응을 보이는데, 이는 누드마우스가 T 림프구는 없더라도 완전한 면역결핍 상태는 아니고, T 림프구와 관련이 없는 항체에 대해서는 거의 정상적인 면역반응을 보이기 때문이다.(*10*) 그 외 종양세포를 사멸시키는 거식세포(macrophage)와 자연살해세포(natural killer cell) 등도 이식된 조직이나 세포에 대한 거부반응에 관여하는 것으로 보고되고 있다.(*10*)

현재 이용되고 있는 실험동물 모델구축 방법에는 ① 종양세포주를 마우스의 피하에 이식하는 단순하면서 간편한 이소이식, ② 종양세포주를 마우스의 동종장기에 직접 접종하는 세포주 동소이식, ③ 마우스의 피하에 1차로 종양세포주를 접종한 후 피하에서 형성된 고형암을 다른 마우스의 동종장기에 이식하는 간접 동소이식(indirect orthotopic transplantation), ④ 인간에서 얻어진 신선 암조직을 마우스의 피하에 이식하는 방법, ⑤ 인간에서 얻어진 신선 암조직을 마우스의 동종장기에 이식하는 동소이식(orthotopic transplantation) 등이 이용되고 있다.

종양세포주를 이용하여 마우스의 피하에 종양세포를 접종시키는 방법은 간편하고 고형암의 유발이 쉬운 반면 종양세포의 증식과 성장이 피하에서만 국소적으로 일어나 주변장기로의 직접침윤이나 종양의 원격전이를 볼 수 없는 단점이 있어 암의 전이연구에 부적합하다.(*11*)

인체에서 발생한 암종으로부터 얻은 세포주를 마우스의 위, 장, 간 등에 직접 접종하는 방식의 세포주 동소이식은 세포외 기질(extracellular matrix)이 없이 세포만 이식하게 되어 종양의 분화 및 안정적인 종양의 성장을 알기가 어렵다. 또한 원발암 조직에서 나타나는 세포와 세포간의 상호작용(cell to cell interaction)의 차단으로 인해 암세포주가 고형암을 형성했더라도 원발암과는 다르기 때문에 감소된 전이능력을 보인다.(*8,12*)

마우스의 피하에 종양세포주를 접종한 후 얻은 고형암을 다른 마우스의 동종장기(암세포주를 구축한 원발암 장기)에 이식하는 간접 동소이식(indirect orthotopic transplantation) 방법은 종양조직의 특징인 종양세포의 이질성(heterogenicity of tumor cell population)이 없는 단점이 있다. 또한 피하 및 동종장기에 두 차례에 걸쳐 이식함으로 인해 세포와 세포간, 세포와 기질 사이에서 나타나는 단백질의 변조(modulation)로 인해 원발암의 특징적인 증식양상이나 전이과정과는 다소 차이를 보일 수 있으나, 비교적 원발암과 유사한 침윤과 전이과정을 관찰할 수 있는 전이모델로서 유용하게 이용될 수 있다.

인간에서 얻어진 암종의 절편을 직접 마우스의 피하에 이식하는 방법은 종양세포의 이질성(heterogenicity of tumor cell population)은 물론 원격전이, 복막파종 등의 연구에 부적합하다.

인체에서 얻어진 암조직 절편을 마우스의 동종장기에 직접이식하는 동소이식법은 동물실험 모델 중 인체에서 발생하는 암을 연구하기에 가장 적합한 방법으로, 종양의 직접침윤, 림프절전이, 혈행전이, 복막파종 등 전이모델로서 유용할 뿐 아니라, 종양세포의 이질성(heterogenicity of tumor cell population)과 세포외 기질 간의 관계를 규명하기에 유용한 실험모델이다.(*15,16*) 그러나 동일조건의 같은 조직을 반복적으로 얻을 수 없고, 동결 보관된 조직을 이용할 경우, 세포 외 기질의 동결로 인해 암세포가 손상될 수 있기 때문에 같은 모델을 반복적으로 만드는 데 한계가 있다.

저자들은 간접 동소이식을 이용해 전이모델을 개발하였다. 동소이식이 시행된 실험모델 8예 중 7예에서 국소증식과 림프절 전이가 관찰되었고, 6예(75%)에서는 원격전이

소견을 보였으며, 이 중 2예는 비장 또는 췌장으로 중복전이 소견을 관찰할 수 있어 동소이식은 비교적 안정된 종양의 착상률과 전이소견을 보이는 전이모델이라고 사료된다. 또한 동소이식 1세대의 경우 긴 착상기간이 필요하고, 다음 세대로 연속적인 이식이 진행되면서 종양의 성장이 보다 빠르고 안정적인 것으로 보고되고 있는데,(*15,16*) 저자들의 경우 마우스의 피하에 암세포주를 접종한 후 형성된 고형암을 이용하여 동소이식 함으로써 더욱 안정적인 모델을 구축할 수 있었다. 실험모델 8예 중 2예에서는 전이소견을 관찰할 수 없었는데, 다른 보고에서도 마우스를 이용한 동소이식 실험모델에서 국소진전이나 전이가 약 30%에서는 나타나지 않는 것으로 보고되고 있어 유사한 결과였다.(*7*) 이는 마우스의 면역학적 반응 외에도 이식된 암조직 내에서 나타날 수 있는 이질성도 관련이 있을 것으로 사료된다.(*10*)

저자들은 위암세포주를 이용하여 구축한 고형암으로 동소이식 모델을 성공적으로 개발하였고, 동일 세포주를 이용하여 고형암을 반복적으로 구축할 수 있어 안정된 전이모델의 개발이 가능하였다. 이러한 동소이식을 통한 전이모델은 위암에서 전이의 생물학적 연구 및 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

저자들이 개발한 위암전이 모델은 신선암조직을 동소 이식함으로써 기존의 in vitro나 in vivo에서 할 수 없었던 암종의 국소 증식에서 전이까지의 전과정을 실험동물을 통해 직접적인 방법으로 반복 시행할 수 있어, 인간에서 발생하는 암의 자연경과 및 치료의 연구에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1, 2, 5, 6-dibenzathracene and 2-0-methylcholanthrene. J Natl Cancer Inst 1941;1:17-40.
2) Walpole AL, Williams M, Roberts DC. The carcinogenic action of the carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2-dimethyl-4-aminodiphenyl. Br J Ind Med 1952;9:255-63.
3) Laquer GL. The induction of intestinal neoplasia in rats with the glycoside cycasin and its aglycone. Vrichows Arch Pathol Anat Histopathol 1965;340:151-63.
4) Ryser HJ. Chemical carcinogenesis. N Engl J Med 1971;285:721-34.
5) Jessup JM, Giavazzi R, Campbell D, Cleary KR, Morikawa K, Hostetter R, et al. Metastatic potential of human colorectal carcinomas implanted into nude mice: Prediction of clinical outcome in patients operated upon for cure. Cancer Res 1989;49:6906-10.
6) Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award lecture. Cancer Res 1990;50:6130-8.
7) Furukawa T, Kubota T, Watanabe M, Kitajima M, Hoffman RM. Orthotopic transplantation of histologically intact clinical specimens of stomach cancer to nude mice: Correlation of metastatic sites in mouse and individual patient donors. Int J Cancer 1993;53:608-12.
8) Furukawa T, Fu X, Kubota T, Watanabe M, Kitajima M, Hoffman RM. Nude mouse metastatic model of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. Cancer Res 1993;53:1204-8.
9) Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5645-9.
10) Fidler IJ. The bilology of cancer metastasis and implications for therapy. Curr Probl Surg 1987;137-209.
11) Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K, Fidler IJ. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. Cancer Res 1986;46:1928-33.
12) Hoffman RM. Three-dimensional histoculture: origins and application in cancer research. Cancer Cells 1991;3:86-92.
13) Naito S, Eschenbach AC, Giavazzi R, Fidler IJ. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. Cancer Res 1986;46:4109-15.
14) Liotta LA. Tumor invasion and metastases Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. Cancer Res 1986;46:1-7.
15) Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE. Establishment of human colon carcinoma lines in nude mice. Exp Cell Biol 1979;47:136-44.
16) Mattern J, Wayss K, Haag D, Toomes H, Volm M. Different growth rates of lung tumors in man and their xenograft in nude mice. Eur J Cancer 1980;16:289-91.