

새로운 악성 Brenner 종양 세포주 확립

김정중^가, 송종경[,], 김대훈[,], 강수익^{*}, 김윤진[†], 김성훈[†], 김훈재[†], 김태영[†], 김욱[†]

. . . * . † . † . † . † . †

Establishment of a novel malignant Brenner tumor cell line

Hyun Jung Kim, M.D., Min Jong Song, M.D., Dae Hoon Kim, M.D., Eun Suk Kang, M.D.*, Oh Youn Jin[†],
Sung Hoon Kim, M.D.[†], Jae Hoon Kim, M.D.[†], Young Tae Kim, M.D.[†], Jae Wook Kim, M.D.[†]*Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College,***Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University College of Medicine,**[†]Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea***Objective:** Ovarian cancer is the most lethal disease among gynecologic malignancies. Although many efforts have been made to explore the mechanisms involved in its development, the genetic events in the pathogenesis of ovarian cancer are still unclear. We characterized a cell line (designated OHK) established from a malignant Brenner tumor cell.**Methods:** The cells were obtained during the operation of a 43-year-old Korean woman with ovarian cancer. The OHK cells continuously propagated in vitro over a period of about 36 months and, to date, have undergone over 200 passages, without being infected by either Mycoplasma or any bacteria. We measured the doubling time of OHK cells. To investigate the tumorigenicity of OHK, cells were inoculated subcutaneously into the back of nude mice. Several tumor markers were analyzed using culture media and lysates of cytosol. Morphology and ultrastructure were analyzed by phase-contrast microscopy and electron microscopy. OHK was also analyzed for gene mutation, the typing of human leukocyte antigen and Flow cytometric cell cycle analysis and DNA index.**Results:** They proliferated in a monolayered sheet showing a pavement-like arrangement without suppression by intercellular contacts. They also formed epithelial cell lining in shapes of polymorphism and polygons. Doubling time was 38.4 hour which was relatively slow compared to other cancer cells. Microscopic view revealed intranuclear infoldings which are typical in malignant Brenner tumors. The OHK cells secreted significantly high level of CA 125 into the culture medium. A 215th codon at exon 4 of p53 was mutated to C/C in OHK. BRCA 1 was a wild type and polymorphisms were detected in exons 2, 10, 11, 14 and 17 of BRCA 2. The cells showed aneuploidy with DNA index of 1.589 measured by flow cytometry. When transplanted into nude mice, OHK cells successfully induced tumor which was histopathologically resembled malignant Brenner tumor.**Conclusion:** These results strongly suggest that OHK is a typical cell line of malignant Brenner tumor. This may provide a useful cellular resource for studying the pathogenesis of malignant Brenner tumor.**Key Words:** Malignant brenner tumor, Cell lines

서론

악성 Brenner 종양은 보통 양성 Brenner 종양과 이행 세포암이 동시에 보이는 상피성 난소암의 한 아형으로, 평균 발병 연령은 55세이다. 육안적으로는 일부 고

: 2005. 5. 19.

E-mail: jaehoonkim@yumc.yonsei.ac.kr

형성에 유두형성 부분이 있고 조직학적으로는 침습성 이행상피세포를 보이는데, 다양한 종류의 항암화학치료를 하고 있으나 완치는 힘든 실정이다.¹ 그러므로 악성 Brenner 종양의 발병기전이나 치료를 위해 in vitro 실험을 통한 종양의 특성 파악이 필요하다.

악성 종양의 발생원인 및 특성을 파악하여 암의 치료를 도모할 수 있는 방법을 찾는 실험적 방법은 시험관내 암세포주 배양 및 유지에서 출발한다고 할 수 있다.² 암세포의 배양은 정상세포와 종양세포의 형태와 기능 비교를 위한 유익한 자료를 제공할 수 있으며, 암세포의 배양 과정을 통해 종양의 성장 속도 및 분화도, 호르몬 생산 및 의존성 여부, 암표지 항원의 발현 및 분비, 면역학적 진단 및 치료 등 종양세포의 특징을 확인할 수 있다.^{3,4} 암세포의 단기간 배양 (short-term culture)은 그리 어렵지 않지만, 장기간 배양 (long-term culture) 할 경우에는 지속적인 계대와 배양액 공급에도 불구하고 세포의 원상태를 유지하는 것이 어렵다. 특히 암환자 조직을 이용한 일차 배양에서 수많은 실험배양을 시행하여도 불멸화된 세포주를 얻기는 힘들며,⁵ 암세포의 분화에 관련된 특성이 장기간 배양과정에서 없어지기도 한다. 이러한 이유로, 지금까지 여러 난소암 세포주들이 보고되고 있음에도 불구하고 난소암 세포주들에서 나타나는 생물학적 이상 발현 규명에 적합한 단일 난소암 세포주는 없으며,³ 특히 악성 Brenner 종양 세포주의 경우에는 지금까지 단 한 종만이 보고되어 있으나, 악성 Brenner 종양 고유의 특성이 완전히 유지되었는지 밝혀지지 않았다.⁶

이에 본 연구에서는, 악성 Brenner 종양으로부터 계대배양에 성공한 새로운 세포주의 특성 규명을 위하여 시험관내 성장 특성, 세포의 형태학적 특성과 초미세 구조, 종양표지물질 분비, 인체백혈구 항원의 규명, 발암 유전자들의 변이여부 및 생체내 종양형성 능력을 검색하였다.

연구대상 및 방법

1. Brenner 종양 조직의 기원

이 연구는 가톨릭중앙의료원 임상연구관리 규정과 헬싱키 선언을 준수하여 성빈센트병원의 임상연구윤리위원회 (IRB)의 인준을 거친 뒤 환자에게서 동의서 (informed consent)를 받은 후에 진행되었다. 확립된 난소암 세포주는 2002년 3월 난소암 진단을 받은 43세 여자 환자에서 추출된 종양조직으로부터 유래되었으며, 임상병기는 FIGO 분류상 IIIc기였다. 환자는 전자궁적 출술 및 양측 자궁부속기 절제술, 골반과 부대동맥 임파절 절제술, 그리고 대망 절제술을 시행받았다. 조직학적 소견은 악성 Brenner종양이었다.

2. 일차 배양 과정 및 세포 배양의 조건

수술 중 추출된 난소암 조직은 소독된 60 mm tissue culture dish (Falcon, Bedford, MA, USA)에서 섬유 및 괴사조직을 최대한 절제해낸 후 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)에서 1-2 mm² 절편이 되도록 분쇄한 후 15% 우태아 혈청 (FBS: fetal bovine serum, Gibco, Grand island, NY, USA), 2 mM sodium bicarbonate, penicillin 100 IU/mL, 그리고 streptomycin 100 µg/mL이 함유된 Medium 199 (Gibco, Grand island, NY, USA)와 MCDB 105 (Sigma, St. Louis, MO) 1:1 혼합 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양시켰다. 단층 배양된 세포들이 배양기 바닥에 75% 정도 덮였을 때 PBS로 2회 세척을 한 뒤, 1 mM EDTA가 함유된 0.25% Trypsin으로 처리하여 계대 (passage) 시켰다. 계대할 종양세포주의 mycoplasma 감염 여부를 mycoplasma detection kit (i-MycoPCR mycoplasma detection kit, intron)를 이용하여 3개월 간격으로 조사하였다.

3. 배양세포의 형태학적 관찰

배양된 세포들은 위상차 현미경으로 관찰하였다. 투과 전자현미경 표본제작을 위하여 0.1 M PBS 완충액 (pH 7.4)으로 조정된 Karnovsky 고정액 (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.5% CaCl₂)

으로 6시간 이상 전고정한 후 0.1 M PBS buffer로 2시간 수세 (washing) 후 1.33% OsO₄로 2시간 후 고정하였다. 후 고정된 시료는 0.1 M PBS로 10시간 수세한 뒤 alcohol을 이용하여 탈수한 후 propylene oxide에 10분간 치환하였다. 이어서 EPON mixture (EPON 812, MNA, DDSA, DMP30)와 propylene oxide를 1:1로 혼합하여 18시간 항온배양하고 EM OVEN에서 35°C (6시간), 45°C (12시간) 및 60°C (24시간)의 포매과정 (Embedding)을 거친 뒤 Block을 꺼내 트리밍하였다. Ultramicrotome을 이용하여 조직을 0.25 µm 두께로 절단하고 1% toluidin blue로 염색한 뒤 광학현미경으로 관찰한 다음 전자현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 정하여 80-90 nm 두께로 절단하였다. 절편을 Uranyl acetate와 lead citrate로 각각 10분씩 염색한 후 TEM (transmission electron microscope-Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

4. 성장 속도 계산

성장특성을 파악하고자 FBS의 농도에 따른 성장곡선을 Cell Titer 96 Aqueous one Solution cell proliferation Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 측정하였다. 96 well plate의 각 well당 3×10³의 세포를 100 µl의 배지에 잘 섞어서 분주한 후 2일 간격으로 6일 동안 측정하였다. 측정시 20 µl의 MTS solution을 96 well plate의 각 well에 넣고, 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 490 nm에서 ELISA reader (EL311, Bio-tek Instruments, New York, NY, USA)기를 이용하여 OD값을 측정하였다. 배가시간 (population doubling time)은 성장곡선으로부터 구하였다.

5. 종양표지 물질 분비능 검사

2×10⁶개의 세포를 3일간 증식시킨 후 그 배양액을 이용하여 종양표지 물질인 CA-125, CA19-9, carcinoembryonic antigen (CEA), 그리고 CA15-3의

분비여부를 EIA (enzyme immunoassay) 방법으로 검사하였다. 측정은 3회 이상 반복 실시하였다.⁵

6. 인체 백혈구 항원 (human leukocyte antigen) 검사

HLA ABC DNA typing은 allele specific PCR (polymerase chain reaction)-SSOP (sequence specific oligonucleotide probe) 방식을 이용하였고, HLA DR DNA typing은 allele specific PCR-SBT (sequencing based typing) 방식을 이용하여 검사하였다.⁵

7. 유전자 변이 검사

배양 세포에서 발암유전자인 c-myc, n-myc과 종양억제 유전자인 BRCA1, BRCA2, 그리고 p53의 exon 4, 5, 6, 7, 8, 9의 변이여부를 검사하였다. BRCA1, BRCA2, 그리고 p53 exon 4-9는 PCR-DHPLC (PCR based denaturing high performance liquid chromatography)를 이용하여 조사하였으며, c-myc과 n-myc 변이 조사에는 competitive PCR을 이용하였다.⁴

8. 세포내 DNA양 측정

DNA 양은 cycle TESTTM plus DNA reagent kit (Becton dickinson)를 이용하여 유식세포 분석기로 측정하였다. 5×10⁵개의 세포들을 말초혈액 단핵세포들과 2 : 1의 비율로 섞은 후 250 µl의 solution A (trypsin buffer)를 첨가하여 실온에서 10분간 배양하였다. 200 µl의 solution B (trypsin inhibitor and RNase buffer)를 첨가한 후 실온에서 10분간 배양하였고, 200 µl의 cold solution C (propidium iodide stain solution)를 각각 첨가하고 잘 섞은 후 4°C에서 10분간 배양하였다. 50 m nylon mesh로 여과시킨 다음, 유식세포분석기 (flow cytometer)로 DNA index를 측정하였다. 배수성 측정은 DNA index로 표현하였으며, 인체 말초혈액 백혈구들이 DNA 이배성의 교정 기준으로 사

용되었고, 이배체 백혈구의 DNA index는 1.0이었다. DNA index (DI)는 간질세포의 G0/G1 channel 수에 대한 종양세포의 G0/G1 channel 수의 비율로 계산하였다.

10. 누드마우스에서 종양형성능력 측정

생후 4-5주된 10마리의 누드마우스 (athimic nu/nu on BALB/c background)의 피하부위에 trypan blue dye로 염색하여 검사상 생존도가 95% 이상인 5×10^6 개의 세포를 200 μ l의 PBS에 섞어 주사하였다. 주사 후 2일 간격으로 7주간 종양 크기를 측정하였다. 3주 후 누드마우스로부터 적출한 종양조직에서 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

결 과

1. 추출된 종양조직세포의 형태학적 관찰

양측 난소 모두 악성 Brenner 종양이었으며, 좌측 난소의 종양의 크기는 11.2×7.5 cm였다. 유사분열은 고배율상 약 20개를 나타냈고, 종양의 괴사, 림프관 침윤, 정맥 침윤은 보이지 않았다. 간질 침윤과 핵주위 침윤 소견이 있었으나, 임파절 전이는 발견되지 않았다. 조직학적 소견으로는 조밀한 섬유성 기질들이 상피세포를 둘러싸고 있으며, 크고 둥근 세포핵과 호산구성 세포질이 관찰되었다 (Fig. 1).

2. 세포주의 확립

세포 배양 시작 후 5일이 지나 세포성장이 관찰되기 시작했다. 세포들은 flask에 부착되어 서로들 사이에 중첩되어 성장하였으나 접촉에 의한 억제 현상은 관찰되지 않았다. 초기 배양 시작 후 14일째 첫 계대가 시행되었으며 현재까지 3년간 200계대 이상까지 진행되었다.

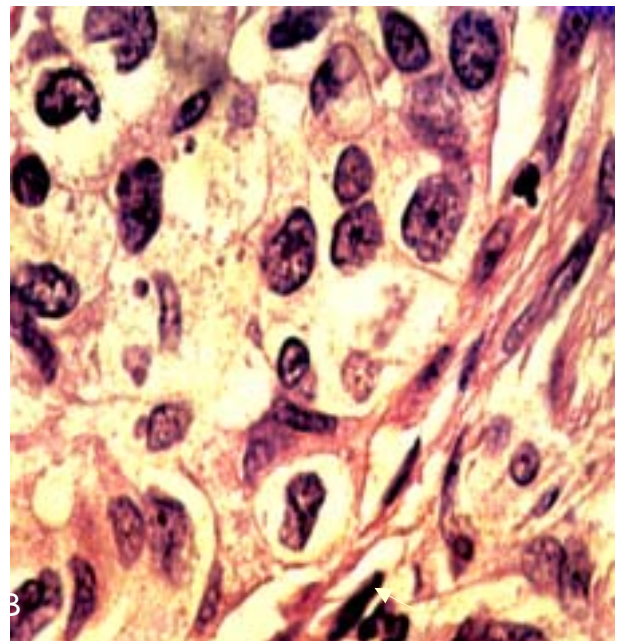
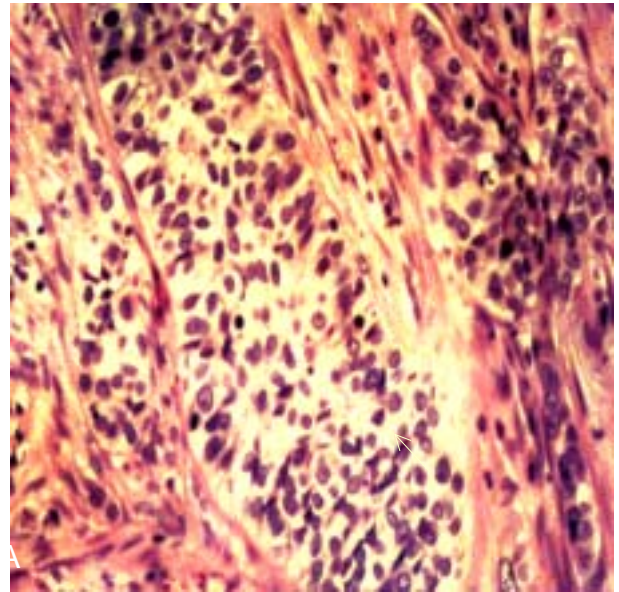


Fig. 1. Histopathologic finding of malignant Brenner tumor. Ovarian tumor mass which was dissected from the patient were stained with hematoxylin-eosin. A. Scattered foci of well-differentiated tumor was surrounded by dense fibrotic stroma (40 \times). B. High magnification view shows large round nuclei and several nucleoli. The epithelial cells are polygonal and of the squamoid type, with pale, eosinophilic cytoplasm and oval nuclei having distinct nuclei and longitudinal grooving, a "coffee-bean appearance" (400 \times).

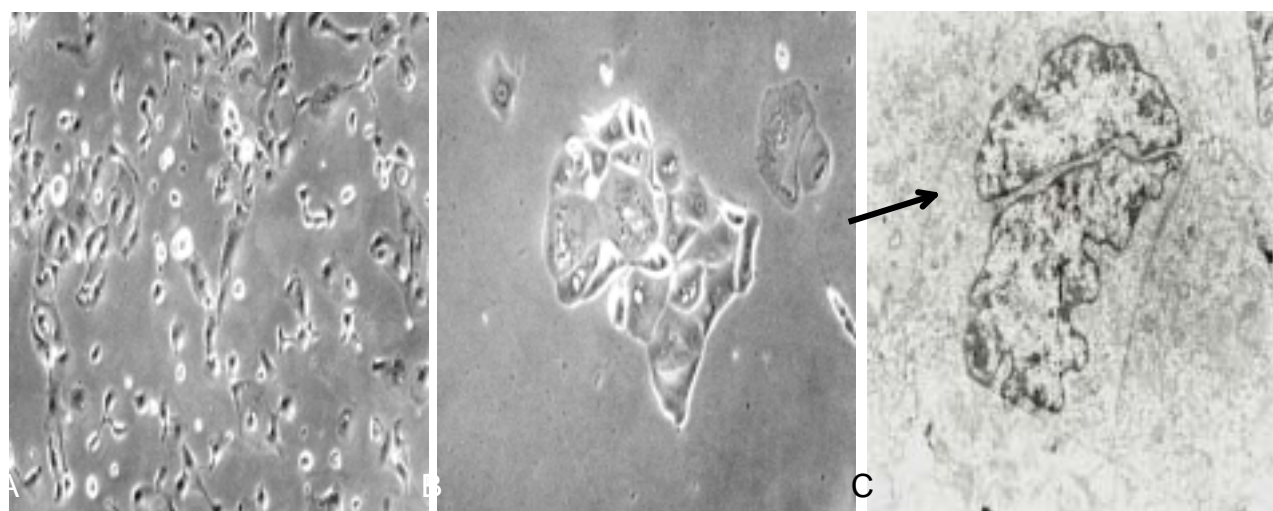


Fig. 2. Microscopic findings of OHK cell line.

A cell line (OHK) which was successfully established from malignant Brenner tumor was examined using phase contrast (A, B) and electron microscopy (C). OHK showed polygonal shape with a large round nucleus (B) and infolding of the nuclear membrane, a specific feature of malignant Brenner tumor (C, arrow). Magnifications. A, 40x; B, 400x; C, 20,000x.

3. 형태학적 특징

위상차 현미경 소견으로는, 단층으로 배양된 세포간의 접촉에 의한 억제 현상이 없었으며, 큰 핵을 가지고 있는 다각형 형태의 상피성 형태로 나타났다 (Fig. 2A, B). 전자 현미경 소견 상에서는, 세포의 핵과 세포질 비율 (nucleus-cytoplasmic ratio)이 높게 나타났으며 악성 Brenner 종양세포의 특징인 핵의 주름 (nuclear groove)이 접힌 (infolding) 형태로 관찰되었다 (Fig. 2C).

4. 성장 특성

OHK 세포주는 10%와 15% FBS에서 유사한 지수성장 곡선을 보여주었고, 세포 증식의 배가 시간은 약 38.4 시간이었다 (Fig. 3).

5. 종양표지 물질 검사

계대배양 후 3일간 배양시킨 배양액으로부터 종양표지 물질을 검사한 결과, CA125가 유의하게 높게 측정되

었으나 ($P < 0.05$), CA15-3, CA19-9 및 CEA는 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

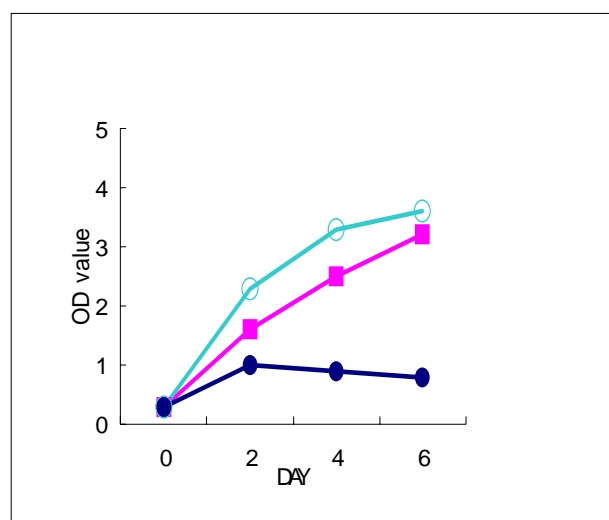


Fig. 3. Growth curve of OHK cell line.

OHK cells (3×10^3) were cultured in 96 well tissue culture plates in the media containing 0 (), 10 () or 15% () FBS, and cell number was estimated at the indicated times as described in Materials and Methods. Doubling time of OHK cells was 38.4 hr in the media containing 10% FBS.

Table 1. Concentraion of tumor markers released in the conditioned media

Tumor marker [#]	OHK
CA 125	149.9*
CA 15-3	0.4
CA 19-9	<2.0
CEA	<0.5

OHK cells were cultured for 3 days, and the concentration of the released tumor markers were measured as described in Materials and Methods. When compared to the normal serum level, OHK released significantly higher concentration of CA125.

*P<0.05, compared to the normal serum level (<35 U/mL).

6. 인체 백혈구 항원 (human leukocyte antigen) 검사

Allele specific PCR genotyping 방식을 이용하여 배양세포의 human leukocyte antigen을 분석한 결과 HLA class I phenotype들은 A, B와 Cw로 나타났으며, HLA class II allele specificity들은 Allele 1에서 DRB1*15, Allele 2에서 DRB1*15로 나타났다 (Table 2).

Table 2. HLA typing of OHK cell line

Locus	Allele 1	Allele 2
HLA A	A*0201	A*2402
HLA B	B*4001	B*5201
HLA C	Cw*0401	Cw*0501
HLA DR	DRB1*15	DRB1*15

7. 종양 유전자의 변이 검사

1) p53

p53 유전자 exon 4의 215번째 codon인 G/G가 OHK에서 C/C로 변이되었으며, exon 5-9는 wild type과 동일하였다.

2) BRCA1과 BRCA2

OHK의 BRCA 1은 wild type이었으며, OHK의 BRCA 2에서는 exon 2, 10, 11, 14와 17에서 Table 3과 같은 다형성 (polymorphism)이 관찰되었다 (Table 3).

3) c-myc과 n-myc

OHK 세포주에서 c-myc 유전자와 n-myc 발암 유전자들의 변이는 관찰되지 않았다.

8. 유식세포 분석기를 이용한 세포내 DNA양 측정

OHK의 DNA index는 1.589로 비배수성(aneuploid)인 4배체 이하 (hypotetraploid)로 나타났다 (Table 4).

9. 종양형성 능력과 종양세포의 조직학적 관찰

OHK 세포주를 누드마우스의 피하에 주사한 후 종양의 형성을 관찰하였다. 5일째에 0.5 cm² 였으며, 21일째에는 평균 종괴의 크기는 2.4 cm² 였다. 조직학적 소견으로는 다각형 형태의 상피 세포들이 편평형의 호산구성 세포질과 크고 둥근 핵, 그리고 Brenner 종양의 특징 소견인 특징적인 핵의 주름 (grooving)이 관찰되었다 (Fig. 4).

Table 3. Polymorphism of BRAC 2 gene in OHK cell line

Mutation	Mutation type	Mutation effect
Exon 2: G203A (5'UTR)	Polymorphism	Polymorphism
Exon 10: C1342A (His 372 Asn)	Missense mutation	Polymorphism
Exon 11: A3624G (Lys 1132 Lys)	Polymorphism	Polymorphism
Exon 11 : 7069 + 80 del TTAA	Polymorphism	Polymorphism
Exon 14: A7470G (Ser 2414 Ser)	Polymorphism	Polymorphism
Exon 17: 8034-14 T to C	Polymorphism	Polymorphism
Exon 22: 8983-66 T to C	Polymorphism	Polymorphism

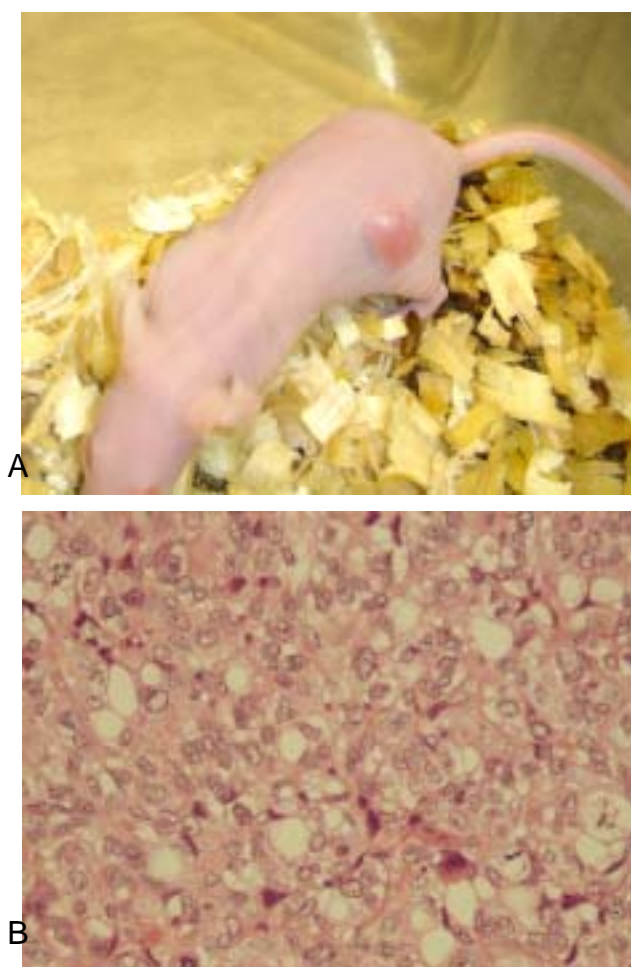


Fig. 4. Tumorigenic effect of OHK cell line. OHK cells (5×10^6) were subcutaneously injected into the back of nude mice, and the formation of tumor mass was examined. At 21 days after the transplatation, tumor size reached 2.4 cm² (A), and microscopically, solid and partially cystic epithelial nests which were surrounded by bundles of tightly-packed spindle-shaped cells were shown (B) (400 \times).

고찰

악성 Brenner 종양은 상피성 난소암에 포함되지만, 모든 난소암 중 1% 미만에 해당되는 드문 암이며, 지금까지 단 한 종의 세포주가 보고되었으나, 아직 확실하게 그 특성이 규명되지 않았고,⁶ 또한 배양과정 중에 여러 가지 변화가 나타나는 종양세포주의 특성상 새로운 악성 Brenner 종양 세포주의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 또다른 악성 Brenner 종양 세포주인 SNU-840⁶과 비교해 볼 때 DNA 양 측정, p53, BRCA 1, 2 유전자 변이 및 종양형성능력에 대한 여러 연구를 통하여 악성 Brenner 종양 세포주에 대해 더 많은 정보를 얻을 수 있었다.

또한 배양세포를 누드마우스에 이종이식시킨 후 약 3주만에 종괴가 형성되었고, 이 종괴 조직의 병리학적 형태가 원래의 악성 Brenner 종양과 유사한 결과를 보인 것으로 보아, 본 연구에서 확립한 OHK가 악성 Brenner 종양의 특성을 갖고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

같은 종류의 암이라도 oncogene, tumor suppressor gene, 또는 mismatch repair gene 등에서 변이 정도가 각각 다르게 나타나며 또한 항암제에 대한 감수성 역시 달라 표준화된 치료에 대한 환자의 예후는 다 다르다. 이는 암의 분류가 기존의 병리학적 형태에서 유전적 분류로 바뀌어야 함을 뜻한다. 그래서 우리는 여러 가지 종양 관련 유전자들의 변이를 조사하였다.

Apoptosis는 세포괴사와는 달리 에너지를 필요로 하는 능동적 사망이고, 이를 조절하는 유전자 중 가장 중

요한 것으로 p53, bcl-2, c-myc 등이 있는데, 그 중 가장 잘 알려지고 많은 연구의 대상이 되고 있는 것은 p53 암 억제 유전자이다. p53은 난소암에서 81% 정도에서까지 이상이 나타나고, 특히 p53의 점 돌연변이는 불량한 예후와 관련이 있다고 보고되었다. 지금까지 보고된 대부분의 p53 유전자 변이는 missense type이었다. 가장 빈번한 변이가 일어나는 exon은 5에서 8사이였는데, 이는 p53 분자의 가장 기능적인 부위를 암호화하는 것으로 알려져 있다.⁷ 본 연구 결과에서는 p53 유전자의 exon 4의 215번째 codon인 G/G wild type이 OHK에서 C/C로 변이되었고, exon 5-9는 wild type을 나타냈다. BRCA 1 유전자는 최근 유전성 유방암/난소암에서 종양 억제유전자로서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있으나 그 생화학적 성상이나 기능에 관해서는 아직 정확히 알려져 있지 않다. 90% 이상의 유전성 유방암/난소암 증후군 환자 군에서 BRCA 1 유전자의 변이가 발견되며 또한 BRCA 1 유전자의 변이가 있는 경우 60세까지 유방암과 난소암이 발병될 가능성은 각각 54%, 30%인 것으로 보고되었다.⁸ 실험 결과, OHK의 BRCA 1은 wild type을 나타냈다.

한편 BRCA 2 유전자는 1994년 Wooster 등에 의해 BRCA 1과 연관되지 않은 가족성 유방암 환자의 연관 분석을 통해 최초로 알려졌다. 전체 유전성 유방암 가계의 약 30%가 BRCA 2 유전자와 연관되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 BRCA 1과 BRCA 2의 germline mutation이 있는 여성의 경우, breast/ovarian cancer syndrome이 발생하는 것이 알려져 있다.

최근 미국의 몇몇 medical center에서 BRCA 1, BRCA 2 및 기타 유전성 암유전자에 대한 유전자 검사를 시행하고 있으며, 이는 BRCA 1, BRCA 2 돌연변이를 조기에 진단하여 유전성 난소암을 조기 예방, 치료하기 위함이다.

OHK의 BRCA 2에서는 exon 2, 10, 11, 14, 17, 22에서 polymorphism이 나타났으며, 그 중 Exon 10의 1342번째 염기서열은 C가 A로 바뀐 homozygote로 아미노산 histidine이 asparagine으로 치환되는 missense mutation을 보였다.

난소암은 CA125와 질식 초음파를 병합하여 양성 예측율을 10-20%까지 보고하고 있다. CA125는 상피성 난소암에서 상대적으로 특이성을 가진 종양표지물질로 OHK에서 높은 수치로 측정되는 것을 확인하였다.

종양세포의 증식능을 정량화하려는 여러 연구 중 유세포 분석을 통한 DNA 정량 검사가 많이 쓰인다. 그동안의 연구에 의하면 난소암에서 비배수성 종양이 이배수성 종양에 비해 분화도나 병기가 더 높고 불량한 예후를 보이는 것으로 보고되고 있다.⁹ 합성기 분율(S phase fraction)이 높으면 종양의 공격능이 증가한다고 보고하고 있으며, 특히 난소암에서는 이배수성 종양에 비해 비배수성 종양에서 높은 합성기 분율을 보인다고 하였다.¹⁰

본 실험 결과, OHK 세포주는 비배수성이었으나, 합성기 분율이 상대적으로 낮았다. 이는 OVCAR-3나 SKOV-3와 같은 알려진 세포주에 비해 상대적으로 느린 배가 시간과 일치하는 것으로 생각된다.¹¹

또한 OHK를 누드마우스에 이종이식시켜 종양의 형태학적 변화를 분석한 결과, 형성된 종양조직은 본래의 조직소견과 유사하게 나타나 OHK의 높은 종양형성 능력을 보여주었다.

본 연구에서는 한국 여성의 악성 Brenner 종양 조직을 채취한 후 세포배양을 통하여 다양한 세포주의 특성을 지닌 악성 Brenner 종양 세포주 (OHK)를 확립하였다. 아형별로 치료법을 다르게 적용시키는 현재의 조류로 볼 때 본 세포주를 이용한 실험은 항암제 민감도 실험 또는 병리기전 실험 등에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Kataoka A, Nishida T, Imaishi K, Sugiyama T, Yakushiji M. Malignant Brenner tumor of the ovary: two cases of unusual histologic features of relapsed tumors. *J Obstet Gynaecol* 1995; 21: 249-56.
2. Golombick T, Dansey R, Bezwoda WR, Rosendorff J. Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cell lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth characteristics, biochemical, and cytogenetic studies. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 447-54.

3. Nayak SK, Kakati S, Harvey SR, Malone CC, Cornforth AN, Dillman RO. Characterization of cancer cell lines established from two human metastatic breast cancers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36: 188-93.
4. Yuan Y, Kim WH, Han HS, Lee JH, Park HS, Chung JK, et al. Establishment and characterization of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 378-87.
5. Kim JW, Lee CG, Cho YH, Kim JH, Kim SJ, Kim HK, et al. CUMC-6, a new diploid human cell line derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 230-40.
6. Park SH, Park SY, Kim DW, Chun YH. Chromosomal aberrations in ovarian malignant brenner tumor cell line using chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 118: 151-3.
7. Nigro SJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
8. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678-701.
9. Rutgers DH, wils IS, Schaap AH, van Lindert AC. DNA flow cytometry, histological grade, stage, and age as prognostic factors in human epithelial ovarian carcinomas. *Pathol Res Prac* 1987; 182: 207-13.
10. Hansson J, Tribukait B, Lewensohn R, Ringborg U. Flow cytofluorometric DNA analyses of metastases of human malignant melanomas. *Anal Quant Cyto* 1982; 4: 99-104.
11. 이종승, 조남훈, 김영태, 김성훈, 노종환, 김재욱. 상피성 난소암에서 핵 DNA 정량검사와 cyclin A의 예후적 의의. *대한산부회지* 2004; 47: 1309-16.

= 국문초록 =

목적: 난소암은 가장 치명적인 악성 부인과 질환으로 알려져 있다. 발생기전을 포함한 많은 연구에도 불구하고, 아직까지 난소암의 유전적 병인은 불분명한 상태이다. 따라서 보다 나은 연구 성과를 위해, 특정 질병을 잘 표현하는 세포주 모델은 연구에 있어서 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 난소암 환자의 조직으로부터 계대 배양에 성공한 악성 Brenner 종양 세포주 (OHK로 명명)의 특성을 규명하고자 하였다.

연구 방법: OHK 세포주는 배양과정 중 마이코플라스마 (mycoplasma)와 세균의 오염 없이 3년간 200 계대 이상 계속해서 배양되었다. OHK 세포의 증식배가 시간을 측정하였고, OHK의 종양형성능력을 조사하기 위해 세포를 누드마우스의 등에 피하접종시켰다. 세포를 키우는 배지를 이용하여 몇 개의 종양 포지지를 연구하였고, 위상차 현미경과 전자 현미경을 통해 세포의 형태학적 특성과 초미세 구조를 분석하였다. 또한 OHK의 유전자변이검사와, 인체 백혈구항원의 검색과 유식세포 분석기를 이용한 세포내 DNA 양 측정도 시행하였다.

결과: OHK 세포주의 증식배가 시간은 38.4시간이었고, 위상차 현미경 소견에서 단층으로 배양된 암세포는 상호간의 접촉에 의한 억제현상 없이 포장도로 같은 배열 (pavement-like arrangement), 다형성 및 다각형 형태를 갖는 상피성 형태를 보였으며, 전자현미경 소견에서는 악성 Brenner 종양의 특징인 핵 내에 주름 (nuclear groove)이 접힌 형태 (infolding)가 관찰되었다. 또한, 종양표지 물질 비교에 있어서, OHK 세포주는 난소 종양표지 물질인 CA 125의 배지내 농도가 149.9 U/mL로 더 높게 측정되었다. 종양 억제 유전자 검사에서, p53 유전자의 exon 4의 215번째 코돈 (codon)이 C/C로 변이되었으며, BRCA 1은 wild type이었으나 BRCA 2에서는 exon 2, 10, 11, 14, 17에서 다형성 (polymorphism)이 관찰되었다. 암세포 내 DNA index는 1.589로서 비배수성 (aneuploid)을 보였다. 배양세포를 누드마우스의 등에 피하접종시킨 결과, 조직병리학적 형태가 원래의 악성 Brenner 종양과 유사한 것으로 보아 OHK 세포주가 악성 Brenner 종양에서 유래한 것임을 알 수 있었다.

결론: 이러한 결과들은 OHK가 전형적인 악성 Brenner 종양 세포주임을 제시하였고, 향후 난소암의 치료와 연구에 유용한 실험적 모델이 될 수 있을 것으로 사료된다.

중심단어: 악성 Brenner 종양, 세포주