

Development of Glioblastoma In Vivo Model for the Research of Brain Cancer Diagnosis and Therapy

Seonghee Kang, Bosun Kang*

Lab of Radiation Convergence Science, Department of Radiological Science, College of Medical Science, Konyang University*

뇌암 진단 및 치료 연구를 위한 교모세포종 동물모델 개발

강성희, 강보선*

방사선융합연구소, 건양대학교 방사선학과*

Abstract

The research was carried out to develop a animal model of malignant brain tumor for the researches in glioblastoma multiform (GBM) diagnosis and therapy. C6 cells were transplanted into the right striatum of SD rat using stereotactic instrument for the development. The developed animal model was verified by MRI and H&E stain assay of anatomicohistological examination. The MRI observations showed that the tumor developed at the injection site at the 7 days after glioblastoma inoculation. At 14 days post inoculation, the tumor grew to a large volume occupying almost a half of the right cerebral hemisphere. It was confirmed that the expression of excessive mitosis and pleomorphism in anatomicohistological examination. The developed animal model must be necessary and useful tool for the in vivo level research in the development of the new modality for the diagnosis and therapy of brain cancer.

Keyword : Glioblastoma multiform, in vivo model, allograft, C6 cell, stereotactic inoculation

요 약

본 연구는 교모세포종 (Glioblastoma multiform, GBM)에 대한 방사선 진단학적/치료학적 연구에 필수적으로 필요한 악성뇌종양 동물모델을 개발하기 위해 수행되었다. 악성뇌종양 동물모델 개발을 위해 뇌정위 기구(stereotactic instrument)를 이용하여 C6 세포(Glioblastoma cell line)를 SD rat의 우측 선조체 내에 동종이식하였다. 개발된 동물모델의 검증을 위해 MRI와 해부조직학적 검사방법을 이용하였다. 해부조직학적 검사방법으로는 H&E 염색법을 이용하였다. MRI를 이용한 종양 형성 검사에서 C6 세포 이식 7일 후 종양 형성이 확인되었고, 14일 후에는 이식한 우측 뇌의 대부분이 종양으로 변화한 것을 확인하였다. 해부조직학적 검사에서는 과세포 발현 및 다형성 세포에 의해 형태학적 변화가 발생하는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서 개발된 악성뇌종양 동물모델은 in vivo level에서 교모세포종에 대한 방사선 진단학적 기술 개발 및 새로운 치료법 개발을 위한 필수적인 도구로서 활용될 수 있을 것이다.

중심단어 : 교모세포종, 동물모델, 동종이식, C6 세포, 정위적 수술

I. INTRODUCTION

교모세포종(Glioblastoma multiforme, GBM)은 전체 뇌 종양의 12~15 %를 차지하고, 뇌 교종의 50~60 %를 차지하는 뇌에 발생하는 단일 종양 중 가장 많이 발생하는 종양이다^[1]. 또한, 교모세포종은 예후가 매우 나빠서 외과적 수술, 방사선 치료, 항암요법 등과 같은 복합적 치료에도 불구하고 평균생존기간이 1년 미만이며 대부분 사망한다^[2].

이러한 측면에서 볼 때, 교모세포종 환자의 기대수명과 삶의 질을 향상시키고, 교모세포종의 효과적 치료를 위해서는 현재 시행 중인 외과적 수술, 방사선치료, 항암요법 등과 같은 기존 치료방법의 개선이 필요하다^[3]. 전 세계적으로 수많은 연구자들이 교모세포종의 진단 및 치료와 관련하여 많은 연구 결과를 발표하고 있고, 임상 실험 이전에 in vitro, in vivo level에서의 연구가 수없이 진행되고 있다^[4]. 특히, 세포 실험 단계와 임상 시험 단계 사이에 위치한 실험동물을 이용한 연구결과는 매우 중요하며, 이러한 단계에서 개발된 복합적 치료방법이 임상시험의 교두보 역할을 하고 있다. 그러므로, 교모세포종에 대한 진단학적 기술 개발 및 혁신적인 치료법 개발과정에 수행되는 실험동물연구를 위해 교모세포종 동물모델의 개발은 필수적이라 할 수 있다.

일반적으로, 다양한 특정질환을 가진 동물모델을 개발하기 위해 많은 연구자들이 nude mouse/rat을 이용한 이종이식(xenograft) 방법을 사용한다^[5]. 이러한 nude mouse/rat는 선천적으로 FOXN1(Forkhead box protein N1) 유전자가 없기 때문에 흉선이 없고, 그로 인해 면역력이 없으며, 면역학적 연구에 많이 이용이 되는 실험동물이다^[6]. 특히, 유전자 구조가 다른 동물의 기관, 조직, 세포등을 이식할 경우 거부반응이 거의 나타나지 않기 때문에 다양한 분야에서 연구되고 있다. 하지만, 이러한 nude mouse/rat와 같은 면역결핍 실험동물의 경우 일반 실험동물에 비해 가격이 비싸고, 수명이 짧기 때문에 연구를 진행함에 있어 경제적, 시간적 한계를 가지고 있다^[7].

본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 C6 세포를 이용한 동종이식(allograft) 방법으로 뇌암 동

물모델을 개발하고자 하였다. C6 세포는 host가 rat인 glioblastoma cell line 중 하나로서, 면역억제된 nude mouse/rat을 사용하지 않아도, 공급체와 수용체가 동종이계의 관계에 있으므로 조직적합항원의 부적합에 의한 동종이식편 거부반응이 나타나지 않는다^[8]. 다시 말해서, C6 세포를 이용한 동종이식 방법으로도 악성 뇌종양 rat 모델의 개발이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 뇌정위 기구(stereotactic instrument)를 이용하여 C6 세포를 rat의 우측 striatum 내에 동종 이식하여 악성 뇌종양 동물모델을 개발하였다.

II. MATERIAL AND METHOD

1. 세포 및 실험동물

본 연구에 사용된 C6 세포 (신경교모세포종)는 한국 세포주은행으로부터 분양받아 5 % CO₂, 37°C 환경의 세포배양기에서 배양하였다. Fig. 1 세포배양배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)과 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 1 % penicillin/streptomycin b를 혼합하여 사용하였다. 뇌암 동물모델 제작 시 실험동물은 6주령 SD (Sprague Dawley) rat을 사용하였다.

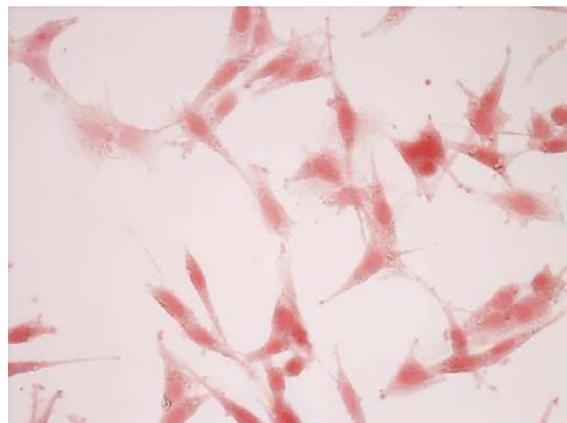


Fig. 1. Microscopic image of Glioblastoma line C6.

2. 뇌암 동물모델 제작 도구

뇌암 동물모델 제작을 위해 뇌정위 기구(Thomas recording, Germany), Hamilton syringe, micro injector, micro-surgical forceps, scissors, mosquito를 사용하였다.

두개골에 burr hole을 만들기 위하여 마이크로 드릴을 사용하였다. 마이크로 드릴은 1 mm 이하 직경의 burr hole을 만들 수 있다. C6 세포를 SD rat의 뇌에 이식하기 위해 Fig. 2에 나타난 뇌정위 기구를 사용하였고, 26 G의 Hamilton syringe와 micro injector를 이용하여 C6 세포를 주입하였다.



Fig. 2. Micro-instruments used for surgical experiments.

3. 수술 전 마취

뇌암 동물모델 제작을 위해 SD rat의 마취에는 ketamine (80~100 mg/kg)과 xylazine (10mg/kg)을 혼합하여 복강 내로 주사하였다. 마취제 주입 후 약 2~3분 후 실험동물은 마취상태가 되고, 마취시간은 40~50 분 가량 지속된다.

4. 뇌암 세포의 동종이식

뇌암 동물모델 제작에 있어 가장 중요한 부분은 뇌암 세포를 정확한 위치(선조체)에 주사해야 한다는 것이다. 뇌암 세포의 동종이식방법은 다음과 같다. 우선, 마취된 SD rat을 stereotactic instrument에 고정시킨 후 수술 부위를 소독한 후 Fig. 3a에 보인 바와 같이 mass를 이용하여 두개골 위의 피부를 정중시상선을 따라 절개한다. 피부를 절개하고 나면 관상 봉합선과 시상 봉합선의 교차부위인 bregma를 쉽게 찾을 수 있다. Bregma는 뇌의 입체 정위 수술시 기준점이 되는 부분으로, Fig. 3b에 보인 바와 같이 bregma를 기준으로 앞쪽으로 1 mm, 가쪽으로 3.1 mm 위치에 마이크로 드릴을 이용하여 직경 1 mm 이하의 burr hole를 제작한다. 그 이후에, Fig. 3c와 같이 26 G의 Hamilton syringe를 이용하여 경질막으로부터 4.5mm 깊이 C6 세포를 주

입한다.

동종이식에 사용되는 C6 세포의 준비는 다음과 같다. 세포배양접시에 배양 중인 C6 세포의 세포배양배지를 모두 제거한 후, PBS (Phosphate buffered saline)를 이용하여 세척한다. 그 이후에, 1 ml의 1X trypsin을 처리하고 2~3분간 5 % CO₂, 37 °C incubator에 배양한다. 배양시간 이후에 세포가 배양접시에서 분리되었는지 현미경으로 검경한 후 2 ml의 배양배지와 섞은 후 1,000 rpm으로 3분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액은 모두 제거하고, 1 ml의 배양배지를 섞어 세포를 잘 풀어 준 후 hemacytometer를 이용하여 세포수를 계산한다.



Fig. 3. Development process of glioblastoma in vivo model.

동종이식에 사용되는 C6 세포의 주입량은 10 μ l의 cDMEM (10 % FBS, 1 % p/s)에 1×10^6 개의 세포를 잘 풀어서 주입하며, 세포 주입 시 micro injector를 이용하여 0.5 μ l/min의 속도로 세포를 주입한다. 주입속도가 너무 느리면 실험동물이 마취에서 깨어나는 문제가 발생 할 수 있으며, 주입속도가 빠르면 뇌압의 증가로 세포가 유출될 수 있기 때문에 적정 주입 속도를 유지

해야 한다. 세포주입이 끝난 후 hamilton syringe는 바로 제거하지 않고, 세포의 유출을 방지하기 위하여 5~10분 가량 뇌실 내 삽입 상태를 유지한다. 10분 후, hamilton syringe를 제거하고, bone wax를 이용하여 burr hole을 잘 막아준다. 그 이후에, Fig. 3d와 같이 절개부위를 봉합하고, 오염방지를 위해 소독 및 치료약을 피부 표면에 발라준다.

5. 뇌암 동물모델의 해부/조직학적/진단학적 검사

뇌암 세포 이식 후 7일, 14일, 21일 후 뇌를 적출하여 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색 및 MRI를 통하여 뇌암의 형성 및 해부/조직학적 특성을 분석하였다.

먼저, H&E 염색을 위해 동종 이식 후 일정 기간이 지난 동물을 호흡마취 한 후 심장 좌심실에 butterfly needle을 이용하여 PBS를 주입하여 체내 혈액을 제거한다. 체내 혈액을 모두 제거한 후, 4% formaldehyde를 좌심실을 통하여 동일하게 주입하여 내부고정을 한다. 이러한 perfusion 과정 이후에 두개골을 제거하고 뇌를 적출한다. 적출한 뇌는 PBS에 희석한 4% formaldehyde에 24시간 동안 고정한다. 고정 과정 이후에 파라핀 블록으로 제작하여 5 μm의 두께로 마이크로 section 하여 슬라이드를 제작한 후 H&E 염색을 한다.

뇌암 동물모델의 뇌종양 형성 및 시간에 따른 종양 크기의 변화는 정읍 첨단방사선 연구소의 소형 동물용 MRI (7.0 T, Bruker, Germany)를 이용하여 관찰하였다. MRI 촬영 시 parameter는 다음과 같다 : Field of view (FOV) 40 mm, slice thickness 1 mm, multiple echo times (TE) 13.0 ms, repetition time (TR) 2000.0 ms, flip angle (FA) 180.0 deg, NEX 1, scan time 6 m 24 s.

III. RESULT

1. MRI를 이용한 진단학적 검사를 통한 뇌암 동물 모델 개발의 검증

교모세포종 세포를 이용한 뇌암 동물모델 개발 시 이식한 rat C6 세포가 신경성 영역에서 정상적으로 성장하는지를 MRI를 통해 검증하였다. 본 실험에서 사

용된 C6 세포는 host가 rat이므로, 면역결핍 실험동물 혹은 면역억제제와 같은 약물을 투여하지 않았다. Fig. 4는 C6 세포 이식 7일 후에 촬영한 MRI 영상이다. 영상에서 보이는 것처럼 이식된 C6 세포는 striatum 내에 위치하여 정상적으로 종양으로 성장한 것을 알 수 있다.

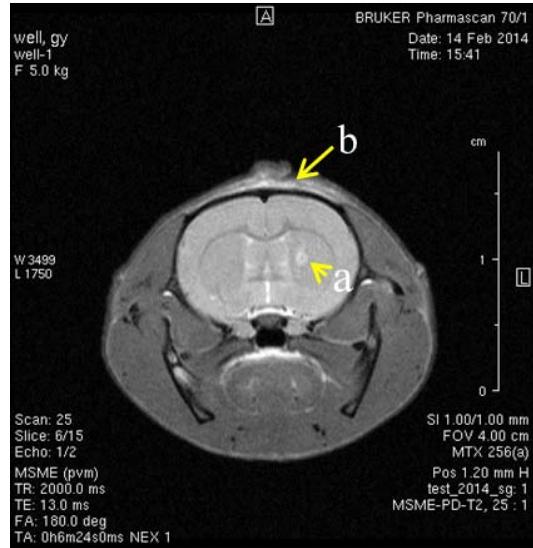


Fig. 4. In vivo T2-weighted MR brain image of a rat bearing C6 cells. Image taken at 7 days post inoculation.

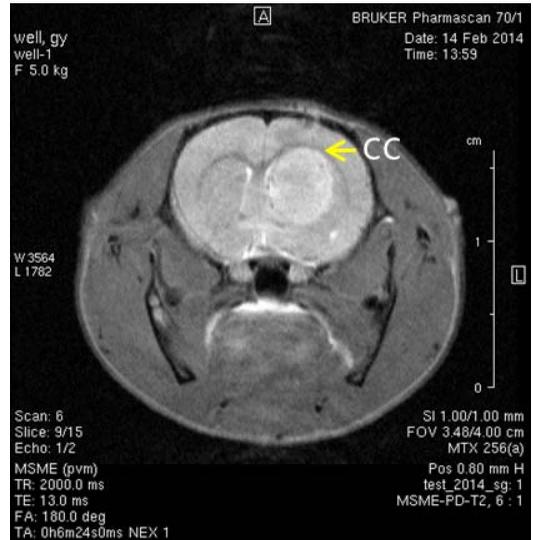


Fig. 5. In vivo T2 weighted MR brain image of a rat bearing C6 cells. Image taken at 14 days post inoculation.

특히, Fig. 4에서 화살표 (a)가 가리키는 것과 같이 striatum 이외의 다른 해부학적 구조에서는 종양이 형

성되지 않는다는 것을 확인 할 수 있다. 이는 뇌정위 기구를 이용하여 정밀하게 striatum 위치에만 종양세포가 이식 된 것을 의미한다. 또한, bone wax에 의해 두개골 내 burr hole이 차단되어 Fig. 4에서 화살표 (b)가 가리키는 것과 같이 종양세포의 유출이 없었음을 확인하였다.

Fig. 5는 C6 세포 이식 14일 후 촬영한 MRI 영상이다. 영상에서 보이는 바와 같이 이식 후 14일이 지나면 striatum 뿐만 아니라 종양세포를 이식한 우측 뇌의 대부분이 종양으로 변한 것을 알 수 있다. 특히, 우측 뇌의 subventricular zone (SVZ) 역시 종양에 의해 형태학적으로 종양과 구분하기 어려울 정도로 종양이 성장한 것을 확인 할 수 있다. 또한, 우측 뇌의 corpus callosum (CC)는 종양에 의해 좌측 뇌의 CC와 비교해 상대적으로 밀려나 있는 것을 알 수 있다.

2. 해부조직학적 검사를 통한 뇌암 동물모델 개발의 검증

C6 세포 이식 14일 후 뇌암 동물의 뇌를 적출하여 해부조직학적 검사를 실시하였다. Fig. 6와 Fig. 7은 H&E 염색을 통하여 적출된 뇌를 해부조직학적으로 검사한 결과이다. Fig. 6에서 보이는 것과 같이 C6 세포가 이식된 뇌암 동물의 뇌에서는 암의 대표적 형태학적 특징인 과세포분열이 발생한 것을 확인 할 수 있다. 또한 거대세포와 같은 다형성 세포 역시 발생한다. 특히 Fig. 7a에서 보인바와 같이 정상적인 해부학적 구조가 종양이 형성된 이후 Fig. 7b와 같이 형태학적으로 구분이 불가능해지는 것을 알 수 있다. 이러한 형태학적 변화는 종양이 형성되고 시간이 증가함에 따라 뇌의 전반적인 모든 부위에서 발생하는 것으로 확인 되었다. Fig. 8에 보이는 바와 같이 이식 후 21일이 지나면 뇌암 세포를 이식한 우측 뇌의 대부분이 암세포로 성장한 것을 볼 수 있으며, MRI 영상을 통해 관찰한 Fig. 5의 결과와 동일하게 종양에 의해 우측 뇌가 해부학적 구조를 분별하기 어려울 정도로 비정상적으로 변화한 것을 관찰할 수 있다. 또한, 종양이 점차 성장함에 따라 좌측 뇌의 SVZ이 점차 밀려나고 있음을 알 수 있다.

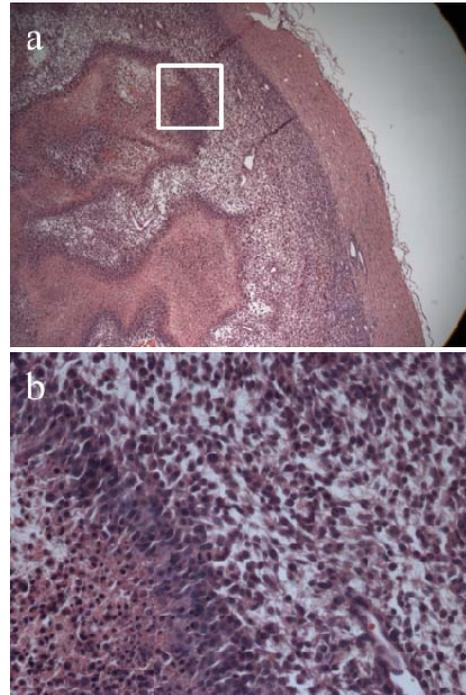


Fig. 6. (a) Tumor characterized by hyper-cellularity and multinucleate gigantic cells. (b) High power image of the striatum region outline in a.

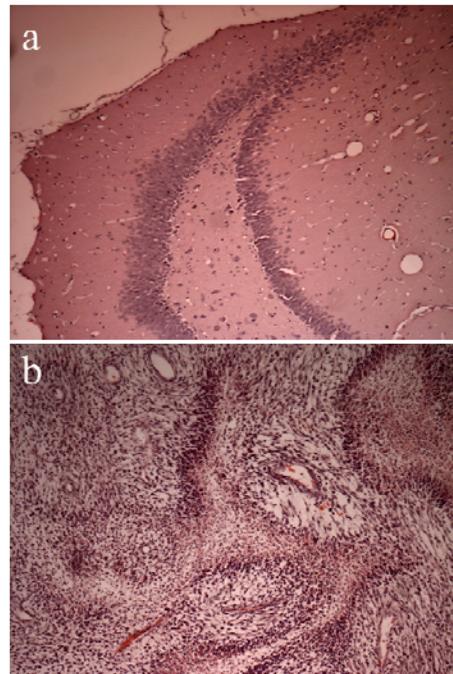


Fig. 7. H&E stain image of glioblastoma in vivo model. (a) normal brain, (b) at 14 days post inoculation. (the change of anatomical structure)



Fig. 8. H&E stain image of glioblastoma in vivo model. Image taken at 21 days post inoculation.

3. 생존수명과 행동학적 관찰을 통한 뇌암 동물모델 개발의 검증

본 연구결과에서 뇌암 동물모델의 평균수명은 21~24일로 측정되었으며, 종양세포 이식 후 20일이 지나면 대부분의 동물모델에서 경련, 구토와 같은 행동학적 장애와 체중감소, 안구출혈과 같은 증상이 발생하는 것을 확인하였다. 그리고 이식 후 24일이 지나면 모든 동물모델이 사망하게 되는데 이는 종양이 성장함에 따라 뇌압이 증가하고, 종양에 의한 뇌의 기능적 손실(인지, 운동 장애 발생)에 의해 사망하는 것으로 추정된다.

IV. DISCUSSION

최근, 국내의 암환자의 증가로 인해 환자의 삶의 질 향상과 더불어 암에 대한 진단학적 기술 및 혁신적 치료기술의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 복합적 의료기술의 개발을 위해서는 *in vitro/in vivo* 단계에서의 연구가 활발히 진행되어야 하고, 임상의학적 검증이 이루어져야 한다^[11]. 특히, 임상 전단계인 *in vivo* 실험은 세포단위에서 진행된 연구결과와 검증단계이자 임상 의학에 적용하기 바로 전 단계로서 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 *in vivo* 단계의 연구를 진행함에 있어 해당 질병을 가진 실험동물의 개발 및 확보는 필수적이다. 하지만, 뇌암 동물모델의 경우 혈액뇌장벽(blood brain barrier, BBB)에 의해 화학적 약물을 통한 인위적인 종양의 형성이 어려울 뿐만 아니라 이종

이식 방법을 이용할 경우 항원항체 반응에 의해 이식편거부방응이 발생하게 된다^[9]. 이러한 이식편거부방응 문제를 해결하기 위해서는 FK-506(Tacrolimus), FTY720(fingolimod), 15-deoxyspergualin, cyclosporine A(CsA)과 같은 면역억제제를 이용하거나, 선천적으로 면역결핍된 실험동물을 사용해야 한다^[10]. 하지만, 이러한 방법들은 부작용이 심하고, 경제적 비용이 발생하게 된다. 따라서, 본 연구에서는 동종이식 방법을 이용한 뇌암 동물모델을 개발함으로써 이식편거부방응 문제를 해결하고 경제적 비용과 부작용을 줄여서 뇌암에 대한 진단적 기술 개발 및 혁신적 치료기술 개발의 기초적 연구 자료로 사용하고자 한다.

본 연구에서 C6 세포를 이용한 동종이식방법으로 개발된 뇌암 동물모델은 이식 7일 후 striatum에 종양이 형성된 것을 확인 할 수 있었고, 시간이 증가함에 따라 종양의 크기가 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 종양이 가지는 병리학적 특성인 다형성 세포 및 과세포 분열이 발생하는 것을 해부조직학적 방법으로 검증하였으며, 시간에 따른 종양 크기의 변화는 MRI를 이용한 진단학적 검사방법으로 검증하였다. 본 연구결과에서 정상 rat의 평균 수명은 대략 1.5~2년임에 비해 뇌암 동물모델의 평균수명은 21~24일로 측정되었으며, 종양세포 이식 후 20일이 지나면 대부분 행동학적 장애와 병리학적 증상이 발생하는 것을 확인하였다. 그리고 이식 후 24일이 지나면 모든 동물모델이 사망하게 되는데 이는 종양이 성장함에 따라 뇌압이 증가하고 뇌의 기능적 손실 발생하기 때문에 사망하는 것으로 추정된다. 또한, 종양세포의 이식 시 주입속도가 빠를 경우 뇌압이 증가하면서 종양세포가 뇌 밖으로 유출되고, 반대로 주입속도가 느릴 경우 동물이 마취상태에서 깨어나는 경우가 발생하게 되므로 주입 시간은 20 분(0.5 ul/min) 이내로 하며, bone wax를 이용하여 burr hole을 잘 막아주지 않으면 이식한 세포가 뇌 밖으로 유출되어 종양이 형성하지 않음을 확인하였다.

V. CONCLUSION

본 연구에서는 C6 세포와 뇌정위 기구를 이용한 동종이식 방법으로 뇌암 동물모델을 개발하고 진단학적

/해부조직학적 방법을 통하여 종양형성을 확인하였다. 동종이식 방법을 이용하여 개발된 뇌암 동물모델은 기존 이종이식 방법을 이용한 방법에 비해 경제적 비용을 절감하고 동물에게 부여되는 면역결핍억제제에 의한 부작용을 줄일 수 있으며, 면역결핍 실험동물이 가지는 복합적 질병에 대한 노출 문제를 해결할 수 있을 것이다. 본 연구에서 개발된 뇌암 동물모델은 암에 대한 방사선 진단학적 기술 개발과 혁신적 치료 기술 개발을 위한 다양한 연구에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

This work was supported by the Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI) grant (Grant No. 79085-13) funded by Korea government (Ministry of Science, ICT and Future Planning).

Reference

- [1] Xie H, Zhu Y, Jiang W, Zhou Q, Yang H, Gu N, "Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo", *Biomaterials*, Vol. 32, pp. 495-502, 2010
- [2] Ghose A, Lim G, Husain S, "Treatment for glioblastoma multiforme: current guidelines and Canadian practice", *Current oncology(toronto. Ont)*, Vol. 17, pp.52-58, 2010
- [3] Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, "Radiotherapy for glioblastoma in the elderly", *New england journal of medicine*, Vol. 356, pp. 1527-1535, 2007
- [4] Brehar FM, Ciurea AV, Chivu M, Zarnescu O, Radulescu R, Dragu D, "The development of xenograft glioblastoma implants in nude mice brain", *Journal of medicine and life*, Vol. 1, pp. 275-286, 2008
- [5] Kaye AH, Morstyn G, Gardner I, Pyke K, "Development of a xenograft glioma model in mouse brain", *Cancer research*, Vol. 46, pp. 1367-1373, 1986
- [6] Eicher C, Dewerth A, Kirchner B, Warmann SW, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S, "Treatment effects of the multikinase inhibitor sorafenib on hepatoblastoma cell lines and xenografts in NMRI-Foxn1 nu mice", *Journal of the International Association for the Study of the Liver*, Vol. 32, pp. 574-581, 2012
- [7] Salzman M, Scott EW, Schepp Rs, "Transplantable canine glioma model for use in experimental neuro-oncology", *Neurosurgery*, Vol. 11, pp. 372-381, 1982
- [8] Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L, "Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models", *Clinical cancer research*, Vol. 9, pp. 4227-4239, 2003
- [9] Borlongan CV, Lind JG, Dillon-Carter O, Yu G, Hadman M, Cheng C, "Intracerebral xenografts of mouse bone marrow cells in adult rats facilitate restoration of cerebral blood flow and blood-brain barrier", *Brain research*, Vol. 1009, pp. 26-33, 2004
- [10] Maeda A, Goto M, Zhang J, Bennet W, Groth C, Korsgren O, "Immunosuppression with FTY720 and cyclosporine A inhibits rejection of adult porcine islet xenografts in rats", *Transplantation*, Vol. 75, pp. 1409-1414, 2003
- [11] Seonghee Kang, Jeonghwan Kim, Dokyung Kim, Bosun Kang, "A Research on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles' Toxicity to U373MG Cell and its Effect on the Radiation Survival Curve", *Journal of the Korean Society of Radiology*, Vol. 6, No. 6, pp. 507-513, 2012.