

Epstein-Barr Virus에 감염된 환아의 골수에서 B세포주(KEB₁)의 확립과 특성

계명대학교 의과대학 소아과학교실¹, 면역학교실², 진단검사의학교실³, 해부병리학교실⁴

김대훈¹ · 최병규¹ · 홍승아¹ · 김홍식¹ · 강진무¹
박종욱² · 하정숙³ · 류남희³ · 김재룡³ · 권건영⁴

Establishment and Characteristics of the B Cell Line (KEB₁) from the Bone Marrow Cells of the Patient Infected with Epstein-Barr Virus

Dae Hoon Kim, M.D.¹, Byung Kyu Choe, M.D.¹, Seung Ah Hong, M.D.¹
Heung Sik Kim, M.D.¹, Chin Moo Kang, M.D.¹, Jong Wook Park, M.D.²
Jung Sook Ha, M.D.³, Nam Hee Ryoo, M.D.³
Jae Ryong Kim, M.D.³ and Keun Young Kwon, M.D.⁴

*Department of Pediatrics¹, Department of Immunology²,
Department of Laboratory Medicine³, Department of Pathology⁴,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Background : Cell lines can be established when the cells are clonally selected and propagated continuously in vitro culture system. Recently we established a B cell line (KEB₁) from the bone marrow cells of the patient infected with Epstein-Barr virus (EBV).

Methods : The patient's initial platelet count was 1,000/ μ L and peripheral blood smear showed atypical lymphocytes accounting 20% of the differentials of WBC. Antibodies to EBV and PCR for EBV were positive but heterophil antibody was negative. Mononuclear cells were obtained by Ficoll-paque separation and suspended in RPMI media with 10% FCS. After incubation in 37°C, 5% CO₂ incubator, cells grew continuously and finally immortalized to B cell line.

Results : Cells showed abundant, clear basophilic cytoplasms and a few vacuoles. Cells had granular reaction in PAS stain and were positive to B cell antibodies. Immunohistochemical stain showed positive expression for EBV antibody. Electron microscopic finding of cultured cells showed several viral particles, and immunoelectron microscopic finding showed electron dense expression. Immunophenotyping of cultured cells was positive for B lymphoid lineage, and karyotypings had hypotetraploidy. Cells expressed MAGE and SSX gene. Cytotoxicity showed relative resistance to mistletoe and several chemotherapeutic agents compared to leukemic cell line.

Conclusion : KEB₁ cell line was established from the bone marrow cells of the patient with infectious mononucleosis. The characteristics of the cell lines including morphology, immunophenotype, karyotype, gene analysis (MAGE, SSX) and chemosensitivity were analyzed. There should be further studies of these cell lines including gene analysis, telomerase activity and

접수: 2004년 11월 5일, 수정: 2004년 11월 24일
승인: 2004년 12월 3일
교신저자: 김홍식, 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 소아과학교실
Tel: 053)250-7516, Fax: 053)250-7783
E-mail: kimhs@dsmc.or.kr

Correspondence to: Heung Sik Kim, M.D.
Department of Pediatrics, Keimyung University School of Medicine
194 Dongsan-dong, Jung-gu, Daegu, 700-712, Korea
Tel: +82-53-250-7516, Fax: +82-53-250-7783
E-mail: kimhs@dsmc.or.kr

cytokine production. This cell line might be helpful to establish another normal lymphocyte cell line and to predict the toxicity of chemotherapy. (Korean J Hematol 2004;39:233~242)

Key Words : Cell Line, Bone marrow, Epstein-Barr virus, Chemosensitivity

서 론

세포를 실험실내에서 배양한 후 한가지 세포군이 선택적으로 증식하게 될 때 계대배양을 하여 계대배양이 지속적으로 이루어지면 세포주로 확립이 되지만 대부분의 정상세포는 세포주로 발전되지 않는다.^{1,2)} 정상적인 인간 섬유모세포를 배양해보면 생존기간동안 정배수체 (euploid)를 유지하다가 위기가 오면 분열을 중지하고 인체 아교세포 (glial cell)들도 비슷한 양상을 보인다.³⁾ 반면에 표피세포 (epidermal cell)은 배양 기술이 발전되어 생존기간이 점차 길어져서 지속적인 성장을 하고,⁴⁾ 이런 특성은 생체내에서의 자기재생능력과 관계 있을 것으로 추정된다.¹⁾ 세포주는 계대수가 증가되면서 사멸하기도 하고 변형되어 지속적인 세포주로 불멸화 될 수도 있다. 불멸화 되는 것은 실험실내에서 자연적으로 이루어지기도 하고 화학적으로 또는 바이러스에 의해 유도되기도 한다.¹⁾ 세포주는 주로 암세포에서 이루어지나 Epstein-Barr virus (EBV) 감염 후 또는 핵산 전달 감염 (transfection)된 후에도 가능하다. Gjerset 등⁵⁾은 EBV에 의해 변형된 림프모세포양세포의 지속적인 배양도 가능하다는 보고를 하였고 근래 B lymphoblastoid cell line (LCL)을 확립하여 그들의 염색체와 텔로메라아제 활성도에 대한 연구⁶⁾와 LCL에서 세포표현과 시토카인 생성에 대한 보고⁷⁾도 있으나 이들 세포들의 형태에 대한 연구는 보고가 드물고 환자의 세포를 직접 배양하여 세포주를 형성한 보고는 없었으며 형태학적인 분석과 염색체 분석 및 항암제에 대한 감수성 검사를 시행한 예도 없었다. 세포가 변형되면 형태학적 그리고 역동적인 변화가 일어나서¹⁾ 세포주에서 일어나는 염색체변화는 보통 홀배수체 (aneuploid)로 염색체수가 두배수체 (diploid)에서 네배수체 (tetraploid) 사이이고 같은 세포주의 집단에서도 염색체수가 다를 수도 있다.¹⁾ B LCL 세포주의 형태와 특성을 분석함으로서 차후 EBV 핵산전달감염 B-LCL 확립에 도움이 될 수 있을 것이며 B-LCL을 확립해 두게 되면 환자에게 반복적인 체혈을 하는 대신 이 세포주로 여러 가지 유전자 검사 등을 지속적으로 시행 할 수 있게 될 것이다. Melanoma antigen gene (MAGE)은 고형암에서 주로 표현되고 백혈병에서는 T 세포형에서 발현되며 정상 B세포에서는 발현되지 않았다.⁸⁾ Shichijo 등⁹⁾은 EBV에 의해 변형 (trans-

form)된 B세포주에서 양성으로 나타난다는 보고를 하였다. Cancer tests antigen (CTA) 중의 하나인 synovial sarcoma on X chromosome (SSX) gene은 급성골수구성백혈병에서는 발현되지 않고 급성림프구성백혈병 환자 일부에게서 발현되고 있다.¹⁰⁾ 이들 MAGE와 SSX gene을 검사해 보면 이세포주의 특성을 이해하는데 도움이 될 것이다. 그리고 이 세포주를 이용하여 항암제에 대한 감수성 검사를 시행해 보아 항암제의 정상세포에 대한 독성을 예측할 수 있는 지표로도 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

연구자들은 EBV에 의한 전염성 단핵구증 환아의 골수 단핵구를 배양 후 세포주를 확립하여 그 특성을 분석해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 골수의 채취

골수의 채취는 2000년 3월에 계명대학교 동산의료원에 입원하였던 3세 여아로부터 시행되었다. 이 환아의 입원 당시 주소는 하루 동안의 점상 출혈과 잇몸 출혈이었다. 진찰상 목에 림프선이 촉지되고 잇몸 출혈이 있었으며 피부의 점상출혈이 있었다. 검사상 혈색소 12.7g/dL, 백혈구 8,220/ μ L (중성구 28%, 림프구 45%), 혈소판 1,000/ μ L 이었고 말초혈액 도말 검사상 비정형 림프구가 20%이었고 골수검사에서는 거핵구 전구세포가 증가되어 있었다. 혈소판항원 양성이었으며, 면역글로불린은 IgG 4,225mg/dL (정상치 800~1,700), IgA 163mg/dL (정상치 68~378), IgM 326mg/dL (정상치 60~263), IgE 859IU/mL (정상치 <100)으로 IgG, IgM, IgE 가 증가되어 있었다. 3개월 후 다시 시행하여서는 IgG 1,848.6mg/dL와 IgE 129.0 IU/mL로 증가되어 있었고 IgA는 감소되어 있었다. 바이러스 검사상 IgM herpes/CMV/Rubella (음성/양성/음성), EBNA (양성), VCA IgG (양성), VCA IgM (양성), heterophil Ab (음성), EBV에 대한 혈액 PCR (양성)이었고 림프구아형검사에서 CD3 63.02%, CD4 12.45%, CD8 52.84%이었고 CD4/CD8은 0.2로 감소되어 있었고 HLA typing은 A 24/-, B 7/52, Cw 7/-, DR 1/15이었다. 경부 초음파 검사에서 다수의 병적인 림프절 종대가 관찰되었다. 염색체 검사는 46, XX로 정상 여아의 형이였고 전

열성 단핵구증으로 진단하여 면역글로불린을 5일간(400 mg/kg/day), prednisolone을 12일간 사용 후 임상양상이 호전되고 혈소판이 정상으로 되어 퇴원하였으며 퇴원 후 3개월에 홍역으로 한번 더 입원하였고 이후는 천식 증상으로 소아과 외래에서 추적 관찰 중이다.

2. 세포주의 확립

환아의 골수천자액을 Ficoll-paque상에서 원심하여 골수 단핵세포를 분리하고 세척한 후 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 2×10^6 /mL개를 부유시켜 25cm² 플라스크에 넣어 37°C 5% CO₂에서 배양하였고 매주 배지를 교환하던 중 세포가 지속적으로 자라 세포주를 형성하였다 (KEB₁). 배지의 교환은 플라스크 내에서 2.5mL의 배지를 떨어내고 2.5mL의 새로운 배지를 첨가하였다.

3. 세포주의 특성

이 세포를 cytocentrifuge하여 Wright stain과 PAS stain하고 B세포 및 EBV에 대한 면역 조직 화학염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였고 전자현미경(TEM, IEM)으로도 관찰하였다.

FACSVantage (Fluorescence activated cell sorter, Becton Dickinson, 미국)를 이용하여 세포 면역 표현형을 조사하였고 염색체 검사를 시행하였다. 세포의 배지를 교환하기 전의 부유액을 이용하여 면역전기이동법(immuno-electrophoresis)으로 면역 글로불린 생성 여부를 관찰하였고 MAGE와 SSX gene을 검사하고 MTT assay¹¹⁾를 이용하여 각종 항암제에 대한 독성검사를 시행하였다.

4. B 세포 및 EBV에 대한 면역조직화학 검사

Cytospin한 슬라이드를 30% 과산화수소와 100% 메탄올의 혼합액(1:9)에서 15분간 처리하고 수세하였다. 항원성 회복을 위하여 시티르산염(citrate) 완충액(0.01 M, pH 6.0)에 담구어 5분간 두 차례 열을 가하여 실온에서 20분간 냉각시킨 후 인산염 완충용액(phosphate buffered solution, PBS)으로 수세하였다. 일차항체인 B세포와 EBV를 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. LSAB kit peroxidase (DAKO, 미국)를 사용하여 biotinylated link anti-mouse antibody로 37°C에서 20분간 반응시킨 후 PBS로 수세하고 streptavidin biotin 합성체로 37°C에서 20분간 반응시키고 PBS로 수세하였다. Immidazol과 3,3-diaminobezidine tetrachloride (DAB,

DAKO, 미국) chromogen을 완충용액 1mL당 DAB 1 drop 비율로 혼합 발색시킨 후 증류수로 수세하고 May-eer's hematoxylin으로 대조염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰하였다.

5. 투과전자현미경 관찰

세포주를 cytocentrifuge한 슬라이드에 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1M 인산염 완충용액으로 세척한 후 1% 오스뮴용액에서 2시간 동안 고정을 하고 세척한 후 계열 에탄올로 탈수를 하였다. Epon 혼합물을 젤라틴 캡슐에 넣어 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 열중합을 시켰다. 블록을 박절하여 초박절편을 그리드에 부착한 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 한 후 H-7100형 투과전자현미경(Hitachi, 일본)으로 관찰하였다.

6. 면역전자현미경법에 의한 EBV 발현

Cytospin한 슬라이드를 30분 정도 실온에서 방치하고 10% 인산염 완충용액으로 씻은 후 5% 정상 흰쥐 혈청으로 비특이성 반응을 차단시켰다. 일차 단클론 항체인 EBV를 사용하여 4°C의 습한 용기 내에서 하룻밤 두었다가 10% 혈장/인산염 완충용액으로 수세한 후 0.5% glutaraldehyde으로 고정하고 biotinylated anti-mouse IgG (Vectastatin elite kit, DAKO, 미국)를 사용하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 0.1M 인산염 완충 용액으로 수세하고 avidin-biotin 혼합용액(ABC elite kit, Vector, 미국)으로 37°C에서 30분간 작용시켰다. 10% 설탕/인산염 완충 용액으로 수세하고 DAB를 사용하여 3-5분간 발색시킨 후 수세하였다. 2% osmium tetroxide로 후고정한 후 계열 에탄올로 탈수하고 epon으로 역위포매하여 60°C에서 3일간 열중합을 시킨 후 블록을 초박절편을 그리드에 부착한 다음 염색을 하지 않고 H-7100형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

7. 면역표현형 검사

골수배양 세포주에 대한 세포의 면역표현형 검사는 유세포분석 직접면역형광법으로 하였으며 anti-CD3, anti-CD5, anti-CD7, anti-CD10, anti-CD13, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD33, anti-CD41, anti-CD45 그리고 anti-HLA-DR 단클론성 항체

(Dinona, Seoul, Korea)를 이용하여 염색하였다. 각각의 항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 phycoerythrin (PE) 형광을 띠었기 때문에 2색 염색으로 인한 분석을 하였다. 유세포 분석기는 FACSVantage를 사용하였고 argon ion laser에 의해 488nm 파장에서 세포 분석을 하였으며 검체당 50,000개 세포를 수집하였다.

8. 염색체 검사

배양한 세포주에서 덜어낸 검체 5mL에 10 μ g/mL colcemid를 0.01mL 첨가하고 다시 10분 배양한 후 수획하고 0.075 M KCl 저장 용액으로 10분 처리 후 고정 (methanol : acetic acid=3 : 1) 단계를 거쳐 슬라이드를 제조하였다. 염색은 Wright 염색액으로 G-분엽을 실시하였으며, 클론의 인정과 염색체 명명은 international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN)¹²⁾의 기준에 따랐다.

9. MAGE 및 SSX assay

배양된 세포에서 total RNA를 trizol을 이용하여 추출하였다. MAGE와 SSX 유전자 발현의 검출은 iC&G사(한국)의 Cancer Hunter Kit, 즉 8종의 MAGE isotype (MAGE-1, -2, -3, -4a, -4b, -5a, -5b 및 -6)의 발현을 한번의 RT-nested PCR법으로 동시에 검출하는 MAGE 1-6 assay와 SSX-1에서 SSX-9 까지 9종의 SSX isotype의 발현을 한번의 RT-nested polymerase chain reaction법으로 동시에 검출하는 SSX 1-9 assay를 사용하였다. 간기하면, total RNA 2 μ g을 RT premix에 첨가하고 DW로 총량을 20 μ L로 조정한 후 42°C에서 60분, 94°C에서 3분간 열처리하여 역전사 후 역전사 반응물 2 μ L를 PCR mix-1에 첨가하고 94°C에 10분간 열처리하여 cDNA를 변성시킨 뒤 94°C 30초, 57°C 45초, 72°C 45초로 30 cycle을 반응시킨 후 72°C에서 5분간 치치하여 1차 PCR을 완료하였다. 1차 PCR 산물을 PCR mix-2를 10 μ L 첨가한 후 94°C에 10분간 열처리하여 cDNA를 변성시키고 1차 때와 같은 온도로 하여 2차 PCR을 완료하였다. 1% agarose gel에 PCR 산물을 접종하고 전기영동한 뒤 UV transilluminator를 이용하여 증폭된 DNA 띠를 관찰하였다.

10. MTT assay

항암제 감수성검사는 몇 가지 항암제와 mistletoe를 이용하여 KEB₁ 세포주와 KEB₁과 비슷한 양상으로 배양되고 있는 KEB₂ 세포주 그리고 급성 림프구성 백혈병 세포주인

89-48과 KL을 이용하여 methylthiazol tetrazolium test (MTT)를 시행하였다. 세포주 2×10⁶/mL개를 96 well에 100 μ L씩 분주하고 약제는 고농도에서 저농도로 1/2배수로 희석하여 100 μ L씩 넣고 4일간 배양한 뒤 PBS에 희석된 MTT (2mg/mL) 용액 0.1mg (50 μ L) 씩을 각 well에 넣고 다시 6시간 배양한 후 원심분리하여 상청액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150 μ L씩 넣고 10분간 방치한 후 600nm에서 microplate photometer (Bio-rad, 일본)로 optical density (OD)값을 측정하였다. 각 약제당 3배수로 한 OD의 평균값을 약제 OD값으로 산정하였고 3개의 well은 배지만 넣어두고 또 다른 3개 well에는 세포와 배지를 섞어 OD 측정 시 대조군으로 하였다. 세포 생존율은 각 약제농도의 OD에서 대조군 OD를 나누어 구하였다. 세포가 50% 생존하는 약제 농도인 LD50를 구하여 분석에 이용하였다.

결 과

배양된 세포주는 Wright-Giemsa 염색에서 정상 림프구와 다른 모습을 보였고 크기가 큰 세포들은 비정형 림프구의 모양을 하였다. 고배율 ($\times 1,000$)에서는 세포질은 풍부하고 투명하며 푸른빛을 띠고 가장자리에서 더 선명한 푸른빛을 띠고 있었으며 몇 개의 공포를 볼 수 있었다. 핵은 둥글고 염색질은 다양하며 정상적인 큰 림프구보다는 조밀하지 않았으며 핵 주변에 밝은 부분이 있었다(Fig. 1). Periodic acid-Schiff (PAS) 염색에 양성으로 상당부분의 세포들은 약내지 중등도 과립성 양성반응을 보였다(Fig. 2). B세포 항체로 염색하였을 때 B세포의 항체에 양성이

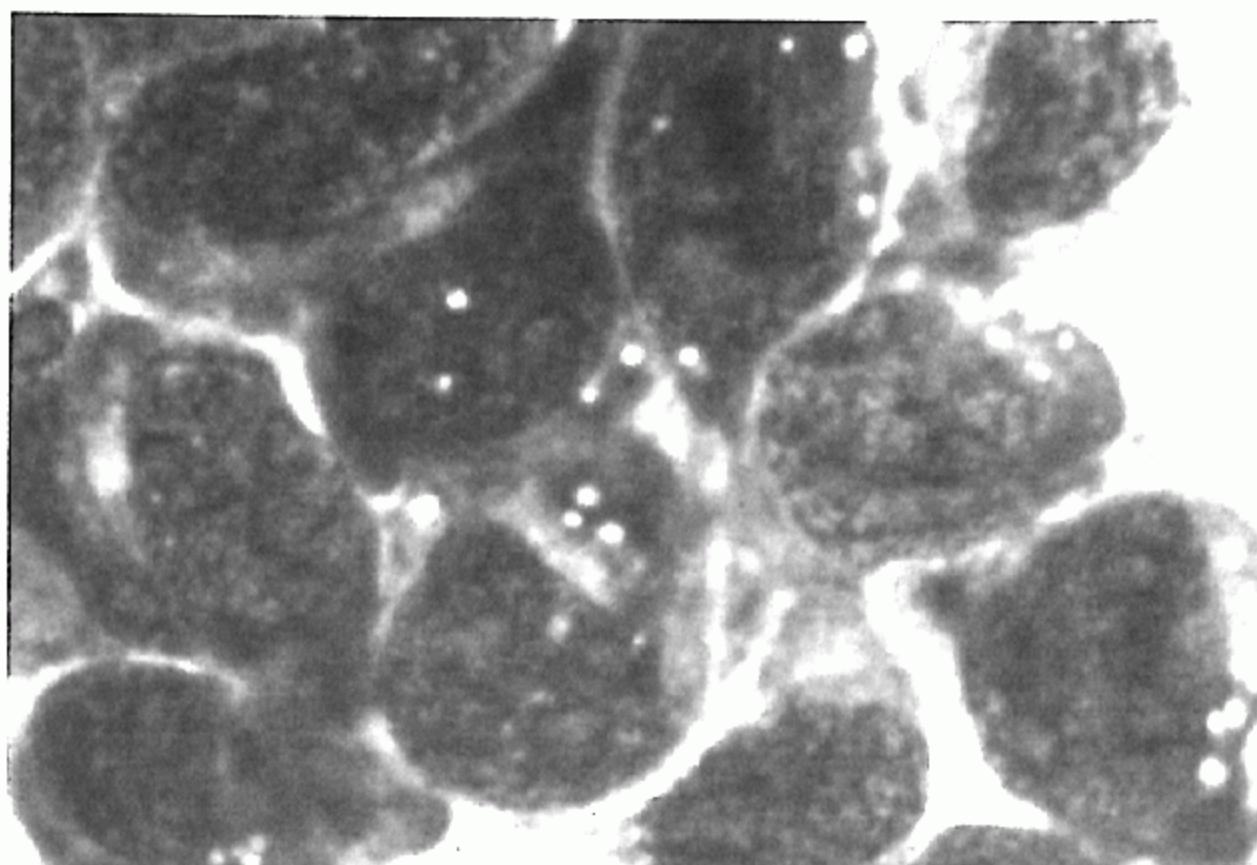


Fig. 1. Light microscopic finding of the cultured cell lines (Wright-Giemsa stain, $\times 1,000$). The cytoplasm is abundant, clear and moderately basophilic, especially close to the edges of the cells and contains a few vacuoles. The nucleus is oval, and the chromatin is delicate and less dense than in normal large lymphocytes. There is a light perinuclear zone.

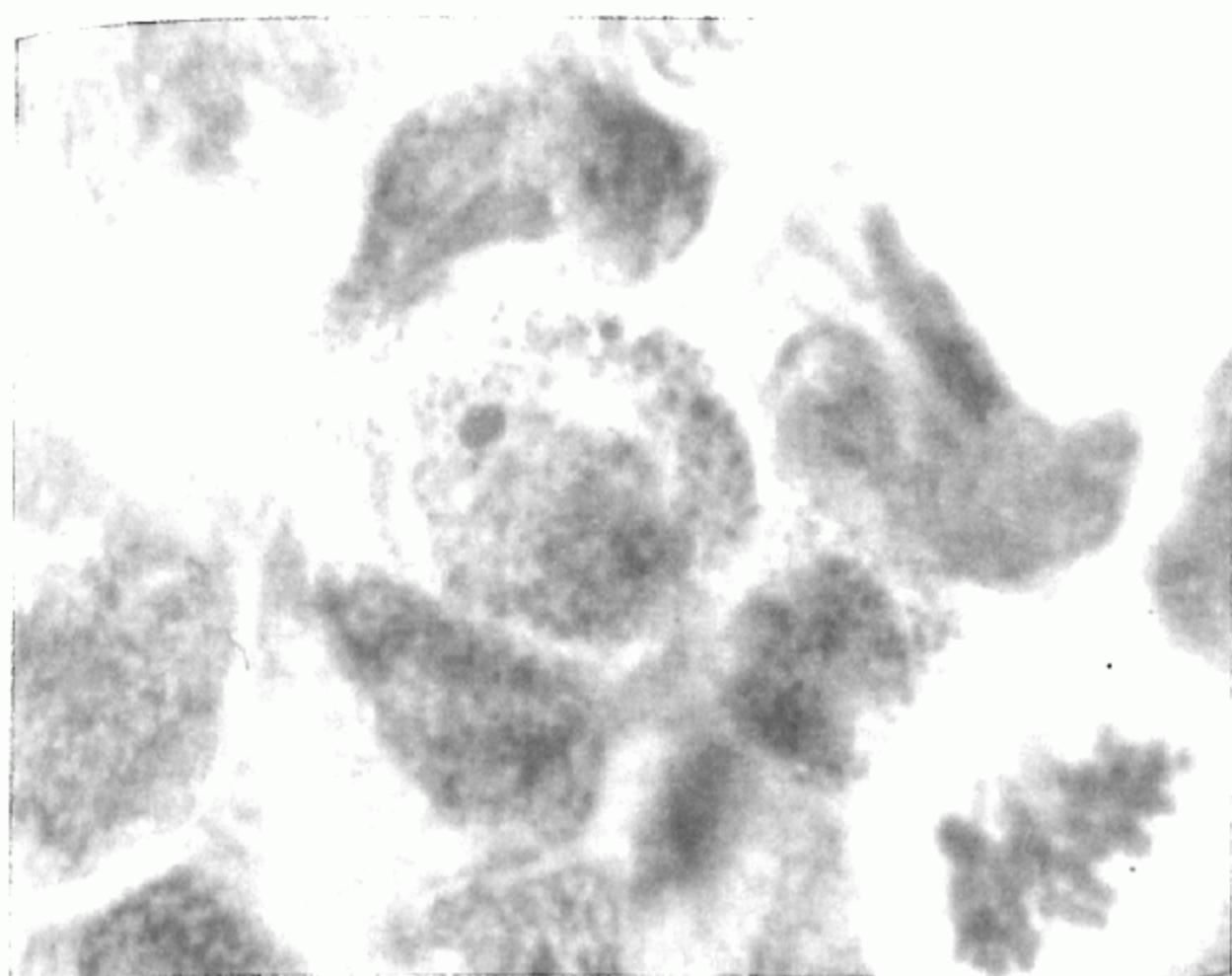


Fig. 2. Light microscopic finding of the cultured cell lines (PAS stain, $\times 1,000$). A large proportion of the cells show weak to moderately strong granular reaction.

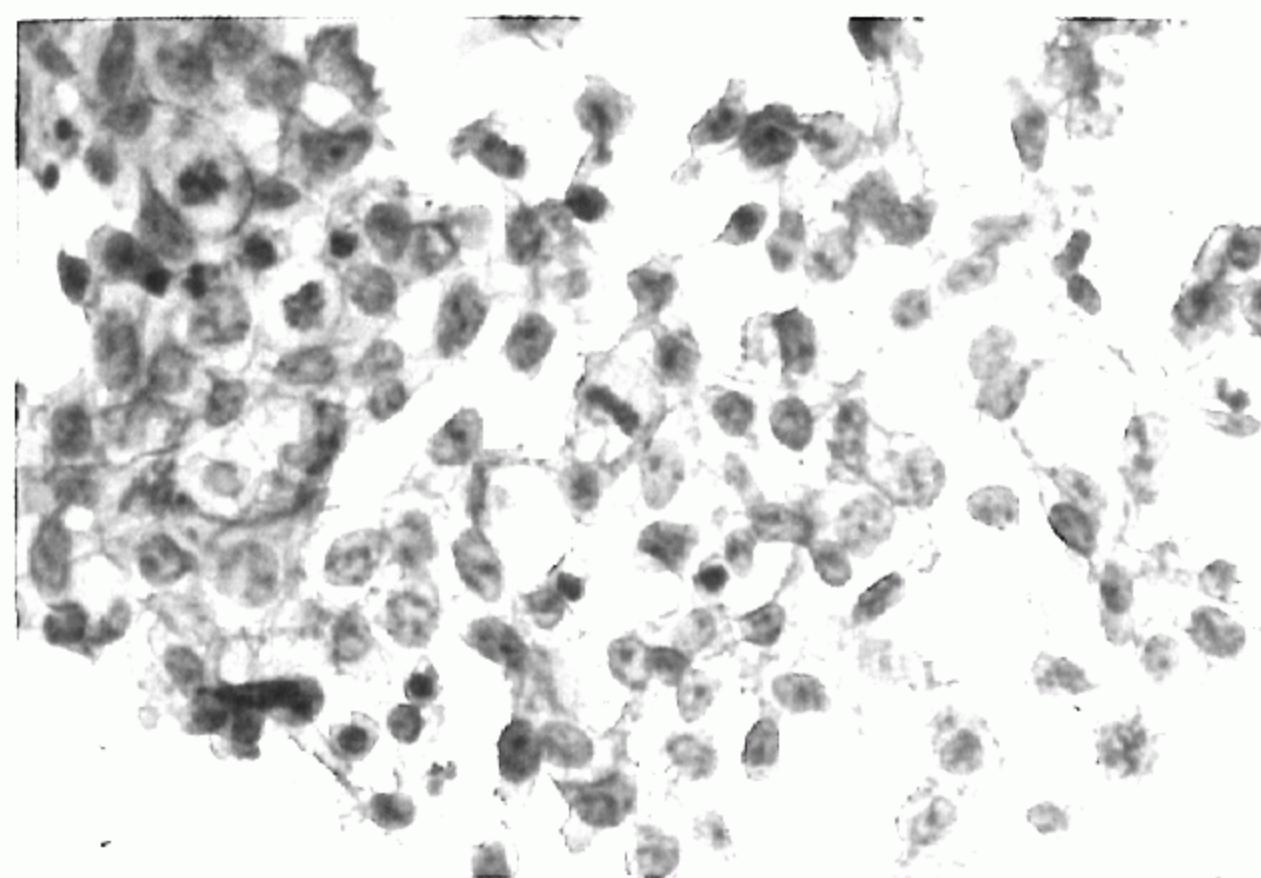


Fig. 3. Light microscopic finding of the cultured cell lines for B cell antibody (L26, DAKO, USA, $\times 400$). Cultured cells show positive expression for B-cell antibody.

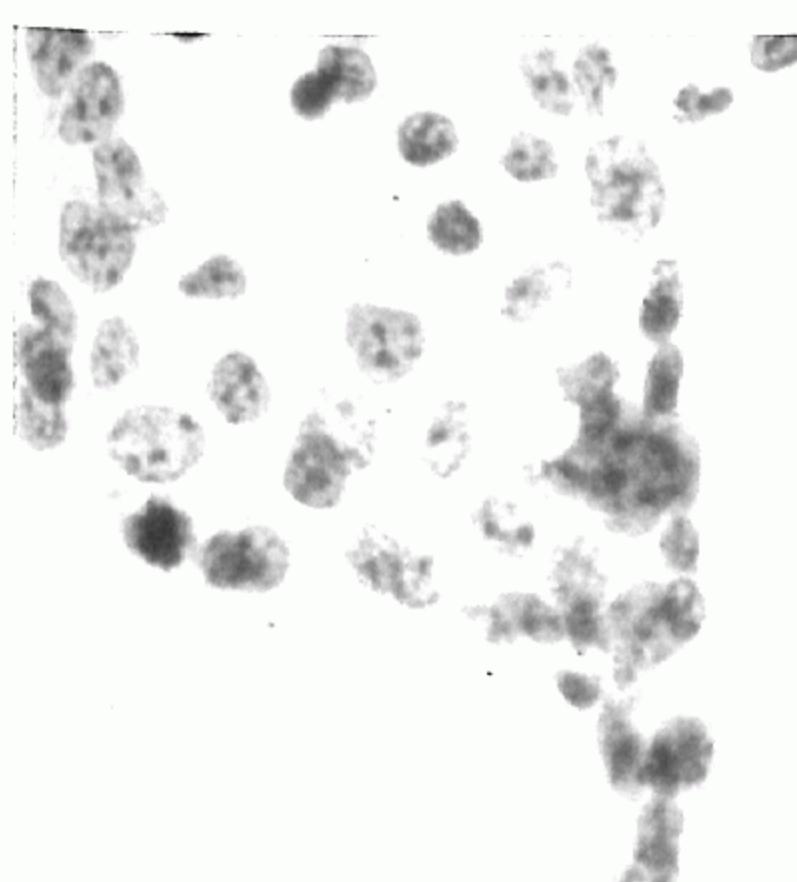


Fig. 4. Immunohistochemical stain of the cultured cells for EBV antibody (PE2 Novo Castra, $\times 400$). Cells show focally positive expression for EBV antibody.

었고(Fig. 3), EBV 항체를 이용한 면역 조직 염색에서는 EBV 항체에 국소적인 양성반응을 보였다(Fig. 4). 전자현

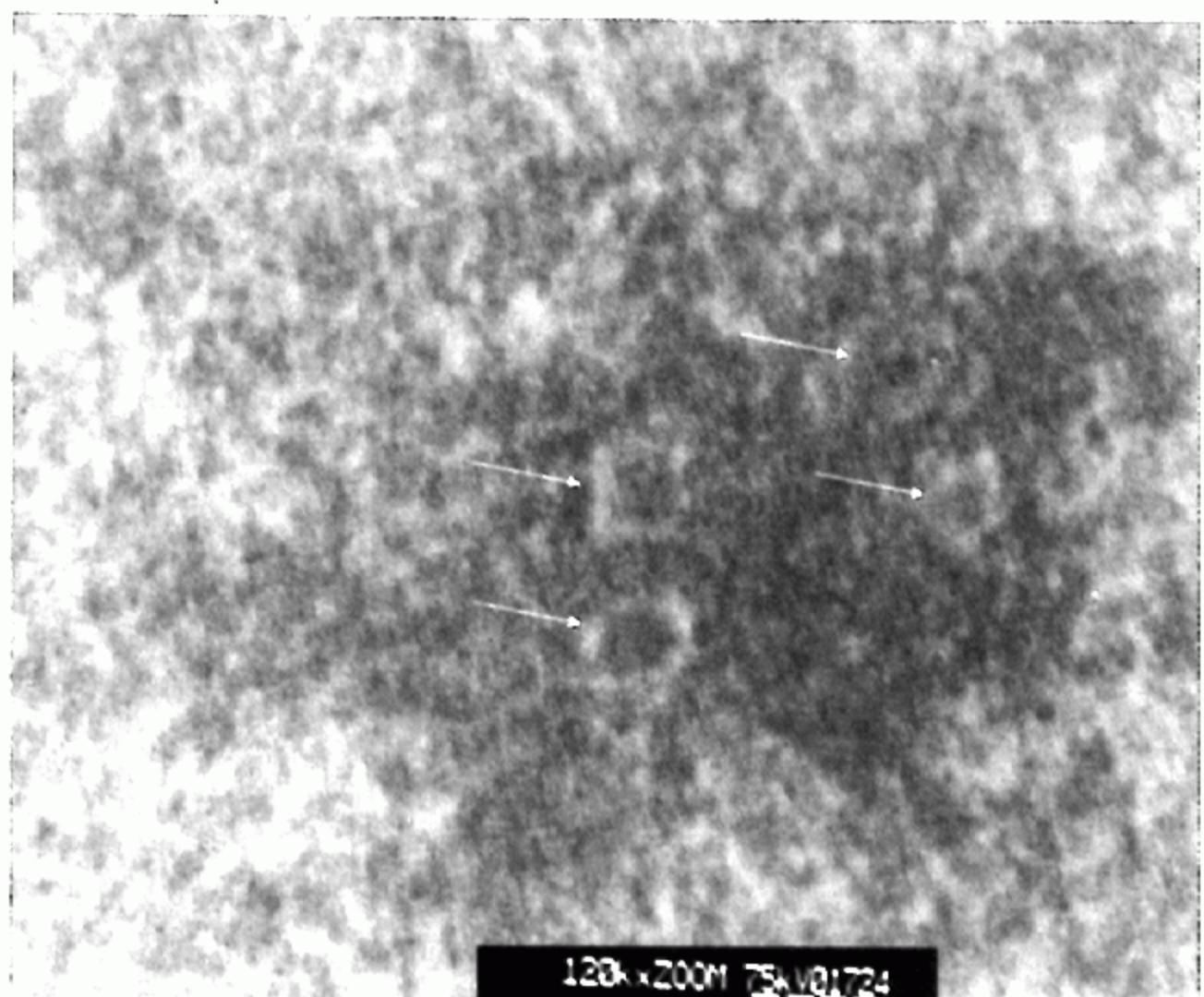


Fig. 5. Transmission electron microscopic finding of the cultured cell lines (original magnification, $\times 120,000$). Cell shows several round-shaped viral particles (arrows).



Fig. 6. Immunoelectron microscopic finding for EBV antibody (original magnification, $\times 4,200$). Electron dense expression is showing in the nuclei of cultured cell.

미경 검색에서 둥근 모양의 몇 개의 바이러스 입자를 볼 수 있었고(Fig. 5), 면역전자현미경 검색에서는 배양된 세포의 핵 내에 EBV 항체에 대해서 진한 전자 발현을 볼 수 있었다(Fig. 6). FACS를 이용한 면역 표현형에서는 B 림프 구계인 CD19 99.75%, CD20 99.65%, CD22 99.74%였고 HLA-DR 98.85%였으며 범백혈구 표현형인 CD45는 99.55%로 나타났다(Fig. 7). 염색체검사에서는 89, XXX, der(X)t(X;3) (p22.3;q21), +del(2) (q31) $\times 2$, -6, -7, -9, -14, -21[13]/90, idem, +del(2) (q31) $\times 2$ [2]로 27가지 클론이 관찰되었고, 모든 분열세포가 다양한 구조적, 수적 이상이 동반된 저사배체성(hypotetraploidy) 핵형을 보여(Fig. 8) 환아에서 검사했을 때의 정상이었던 염색체

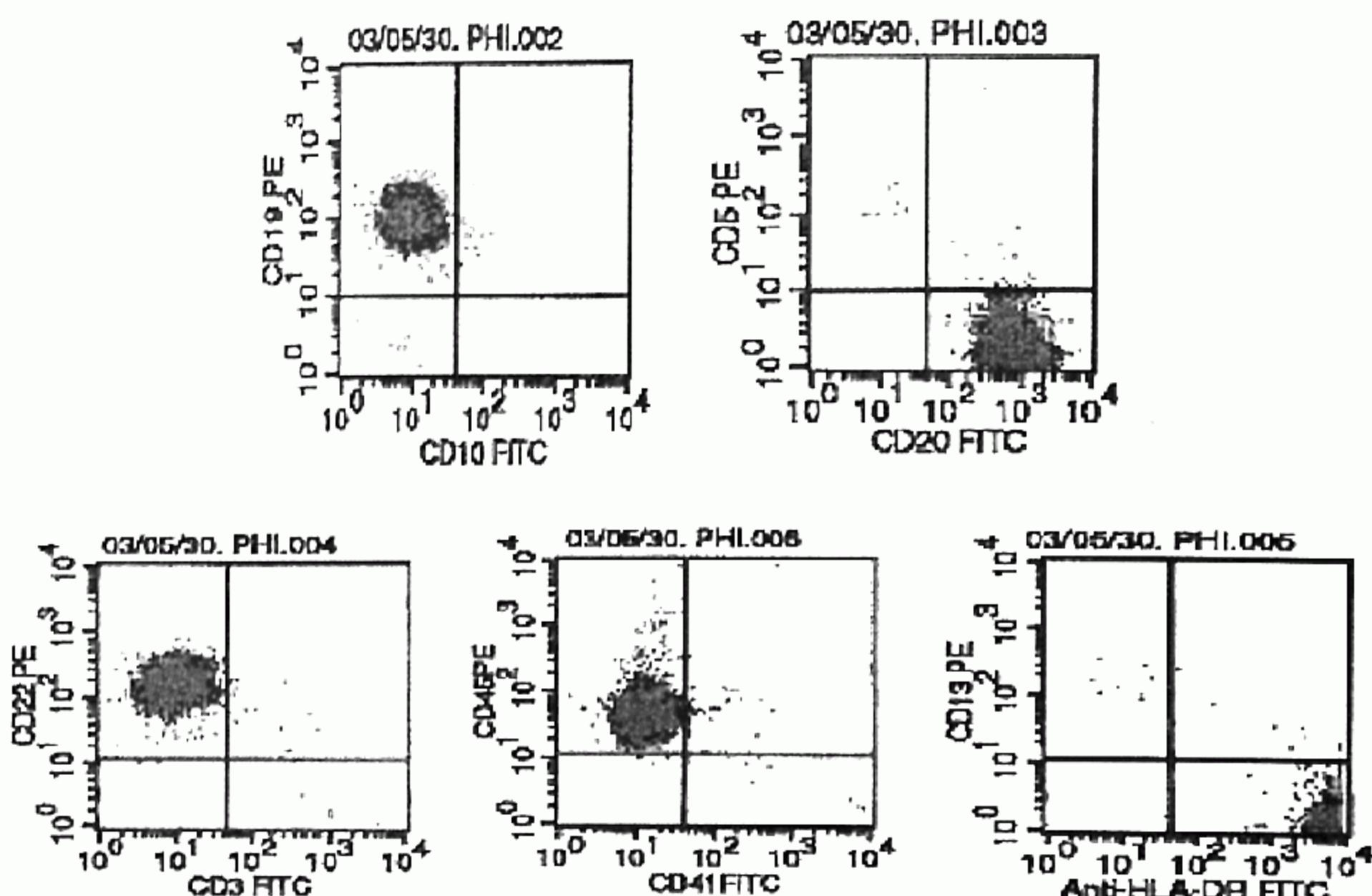


Fig. 7. Immunophenotype of the KEB₁ cell line. Cell shows positive reaction to CD19, CD20, CD22, CD45 and HLA-DR.

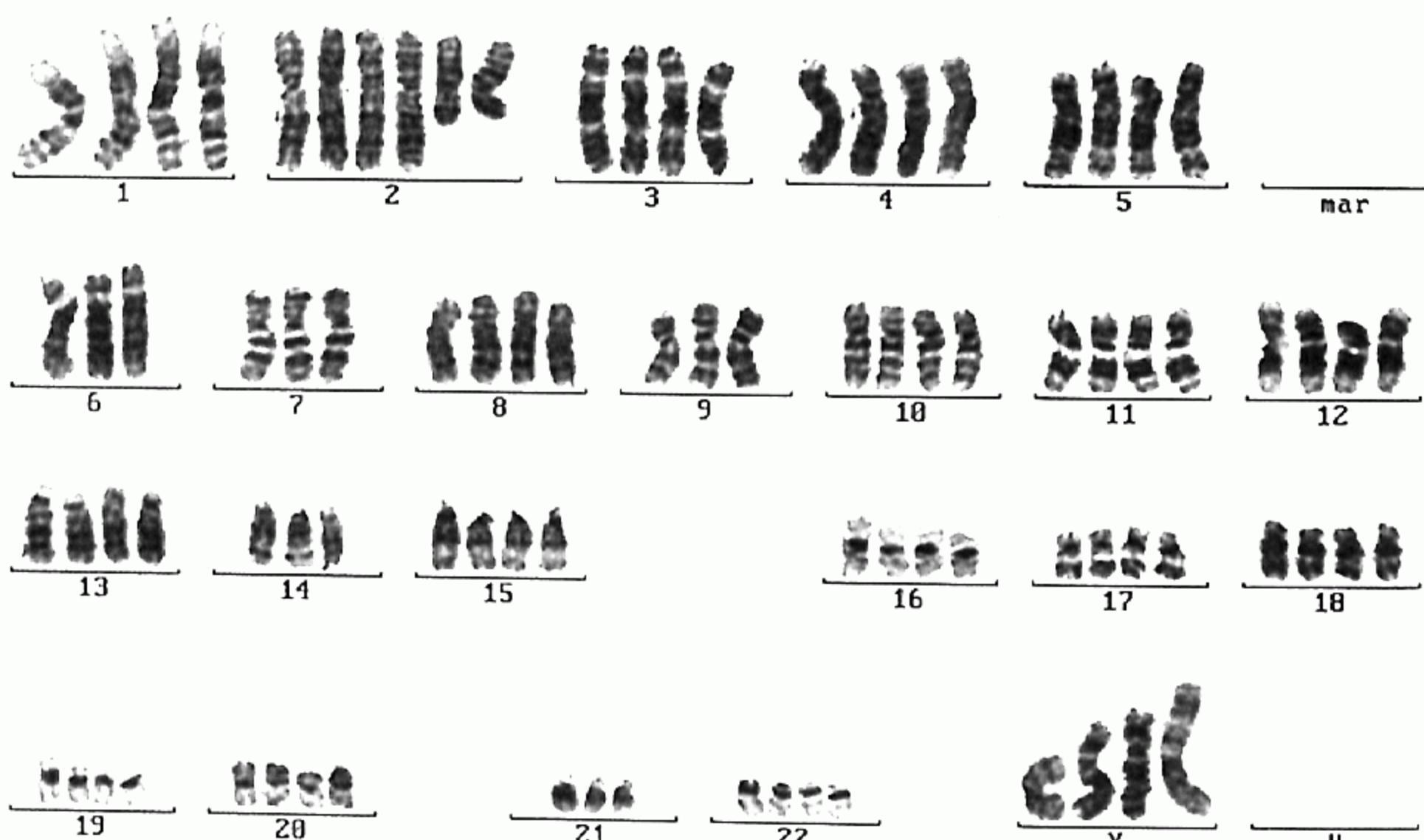


Fig. 8. Representative hypotetraploid karyotype of the KEB₁ cell line (G-banding, Wright stain).

와 차이가 있었다. 면역전기영동을 이용한 면역 글로불린 검사에서는 배지와 차이가 없어 면역글로불린 생성은 없는 것으로 판단되었다. MAGE 검사와 SSX 검사에서는 백혈병 세포주인 Raji, 89-48, KL과 EBV 세포주인 KEB₁과 KEB₂ 모두 양성이었다(Fig. 9). MTT assay를 이용한 세포 독성 검사에서 mistletoe에서는 백혈병 세포주인 89-48과 KL의 LD50가 각각 593ng/mL, 531ng/mL로 KEB₁의 LD50인 4,530ng/mL에 비해 낮았고, KEB₂는 가장 높은 약제 농도에서도 50% 이상의 세포 생존을 보였다. 이는 EBV 세포주인 KEB₁과 KEB₂가 백혈병 세포주에 비해 내

성을 나타냄을 보여주는 것이라 할 수 있다(Fig. 10). Adriamycin에서도 EBV 세포주 KEB₁과 KEB₂는 백혈병 세포주(89-48, KL)보다는 예민하지 않았고(Fig. 11) etoposide, cytosine arabinoside, vincristine에서도 비슷한 반응을 보였으나 prednisone에서는 백혈병 세포주와 비슷한 반응을 보였다(자료 제시되지 않음).

고 쳤 .

Simian virus 40 (SV40) 같은 DNA 종양 바이러스는 형

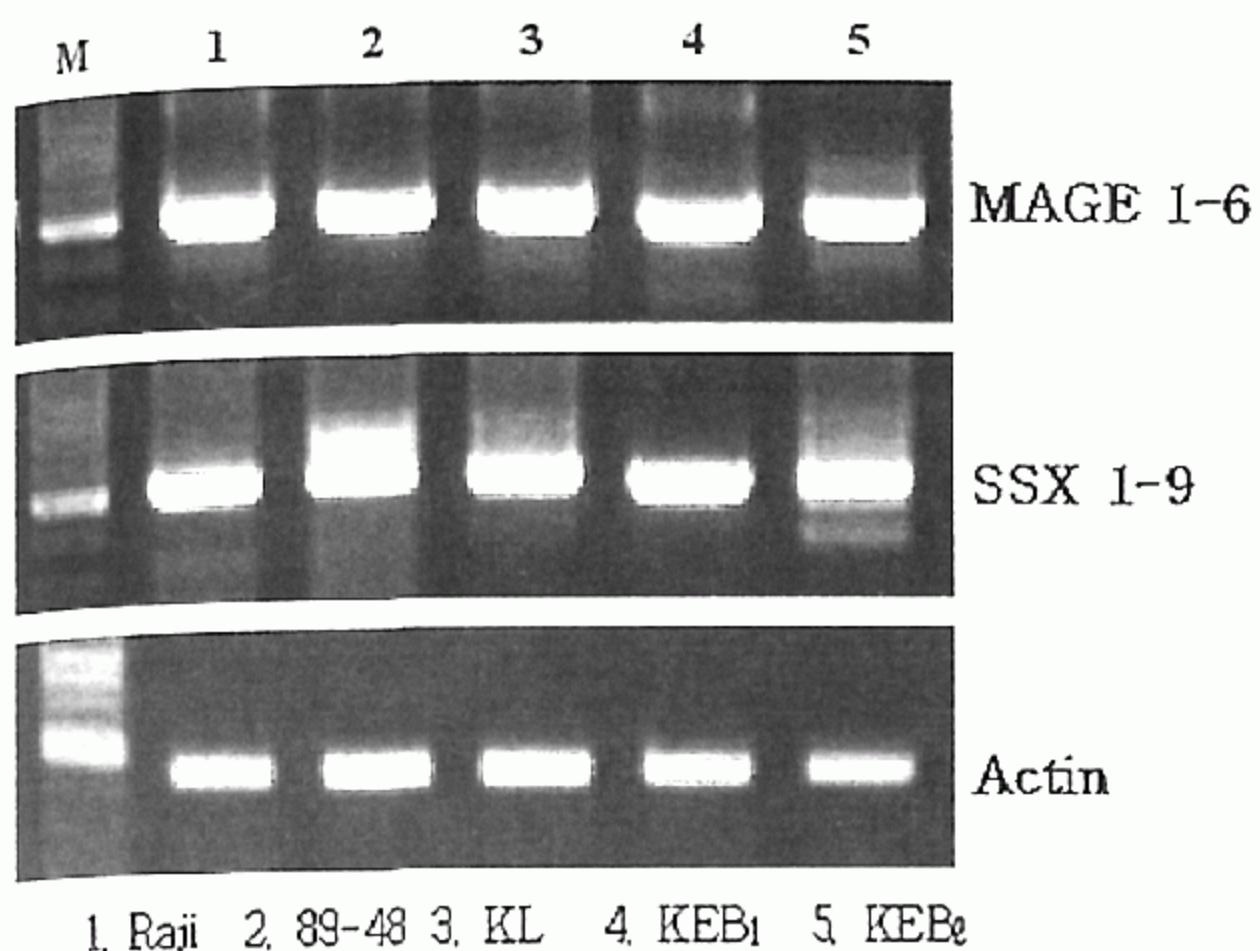


Fig. 9. MAGE and SSX reaction of the KEB₁ cell line. Leukemic cell line (Raji, 89-48, KL), KEB₁ and KEB₂ showing positive reaction to MAGE and SSX.

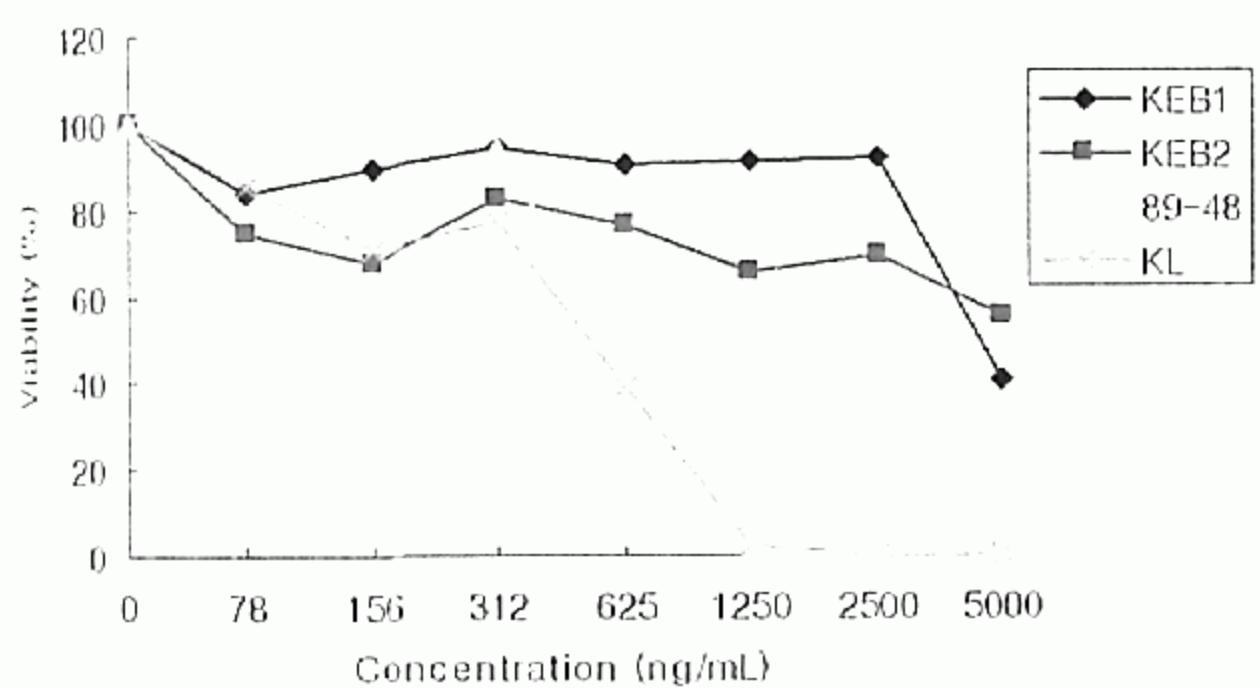


Fig. 10. Chemosensitivity of the KEB₁ cell line (mistletoe). KEB₁ and KEB₂ cell line to mistletoe showing relative resistance compared to leukemic cell line (89-48, KL).

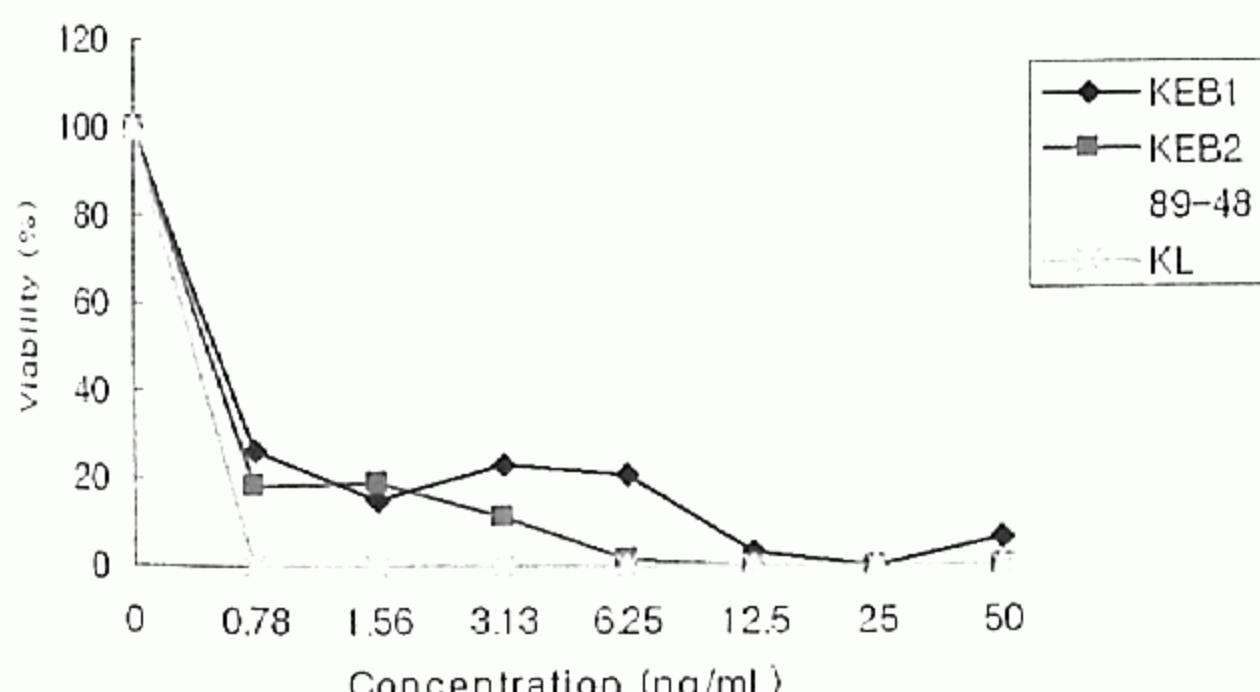


Fig. 11. Chemosensitivity of the KEB₁ cell line (adriamycin). KEB₁ and KEB₂ cell line to adriamycin showing relative resistance compared to leukemic cell line (89-48, KL).

질전환(transformation)에 의하여 세포의 수명이 연장되고 그 중 극히 일부는 무한정 증식하게 된다. EBV에 의하여 형질전환된 cell line도 무한정 증식하여 불멸화 될 수 있다.¹³⁾ 불멸화(immortalize)라는 용어는 EBV에 의하여 형질전환된 LCL이 적어도 160계대 이상 증식이 지속될 때 사용하여야 한다고 하였다.¹³⁾ 연구자들이 사용한 KEB₁ 세

포주는 2000년 3월부터 배양하기 시작하여 3년 6개월 이상 지속적으로 자라고 있어 190계대 이상으로 불멸화 되었다고 할 수 있을 것이다.

EBV는 herpes DNA 바이러스로 전염성 단핵구증과 Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease 등의 원인이 된다.^{14~16)} EBV가 B세포에 침입하여 B세포를 불멸화시키지만 초감염에서는 T세포의 반응으로 균형을 이루어 잠재상태로 있게 되고 이 때는 말초 혈 B세포에서는 잘 발견되지 않으며 면역상태가 정상인 숙주에서는 증상을 나타내지 않는다.^{17, 18)} EBV가 주로 구강 상피를 통하여 침범하면 virus가 증식하면서 세포가 파괴되고 주변 조직으로 퍼져 혈액내로 들어가 말초혈 B 림프구에 감염되고 이때 반응을 하는 CD8+ T세포의 수가 증식되어 비정형лим프구로 표현되고 CD4+/CD8+비가 역전된다.¹⁹⁾ 이 환아에서도 입원 당시 CD4가 12.45%, CD8이 52.84%로 CD4/CD8비가 0.2로 감소되어 있었다. 이 환아에서 입원 당시 면역 글로불린은 증가되어 있었다. 이는 아마도 면역 글로불린을 생성하는 세포들의 증식이 있었기 때문으로 생각된다. Yarchoan 등²⁰⁾은 AIDS 환자에서 B세포가 EBV에 의하여 면역글로불린 형성을 증가한다는 보고를 하였다. 이 환아에서 2주 후 퇴원 당시에는 혈소판수는 입원 당시 1,000/ μ L에서 154,000/ μ L로 증가되었고 이 당시 면역글로불린은 아직 증가된 상태이었으나 3개월 뒤 회복된 후에는 IgG와 IgE가 증가되어 있고 IgA는 감소되었다. EBV의 PCR 검사에 양성이었고 항체 검사에서 EBNA, VCA IgG, VCA IgM은 양성이었으며 이종항체는 음성이어서 급성 초감염은 아니고 최근에 있었던 초감염이거나 재활성화된 상태로 생각되었고¹⁹⁾ CMV에서도 양성을 보였다.

이들 세포들이 세포주로 확립된 이후에는 EBV에 의한 비정형 림프구와 비슷한 모양을 하고 PAS에 양성이었으며 B세포 항체와 EBV 항체를 이용한 면역조직화학검사에서 양성반응을 보였고 전자현미경에서도 양성반응을 보였다. Vazirabadi 등²¹⁾은 latent membrane protein (LMP-1)이라는 viral oncprotein이 EBV에 감염된 세포에서 표현되고 이들에서 바이러스가 신호전달체계를 활성화시키면 세포들이 지속적으로 증식한다고 하였다. 또한 Rowe²²⁾는 EBV가 B림프구에 감염되면 viral nuclear protein과 plasma membrane protein을 표현하여 증식을 유도하고 조절한다고 하였다. 이렇게 하여 B세포가 바이러스에 감염되어 virus를 생성하고 세포 융해가 일어나기 전에 세포수가 증식되면 세포가 불멸화 된다고 한다. 연구자들의 세포주는 광학현미경에서 비정형림프구의 모양을 보였고 세포질 내에 공포가 나타난 것은 Burkitt lymphoma 세포의 특성과

유사하였다. 전자현미경에서는 바이러스의 입자를 볼 수 있었고 면역전자현미경에서도 핵 내에 진한 전자 표현을 나타내었다. EBV의 유전사 검사는 시행하지 않았으므로 차후에 검사해 보는 것이 좋을 것으로 생각된다.

LCL을 확립하기 위하여 cyclosporin을 첨가하거나²³⁾ virus 상청액과 세포의 비를 다양하게 섞어서 세포주를 확립할 수 있었다는 보고^{24, 25)}가 있다. 연구자들은 단핵구 배양에 이 세포주의 상청액을 첨가하여 배양을 시도하였으나 현재까지는 별 의미 있는 결과를 얻지 못하였다. 향후 이 세포주의 상청액과 세포와의 비를 다양하게 하거나 cyclosporin을 첨가하여 LCL 세포주 확립에 이용하면 성공할 확률을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

환아의 염색체는 정상이었으나 이 세포주의 염색체는 저사배체성 양상을 보였다. Doepker 등²⁶⁾은 EBV에 의해 변형된 LCL세포주에서 구조이상(translocation, deletion, isochromosome)이 X염색체와 1-3, 5, 6, 9 및 11번 염색체에서 일어나고 염색체수는 48개로 이 세포주의 원래 염색체가 정상이었던 것과는 차이를 보여 이후로도 염색체가 변화할 가능성이 있다고 하였다. 연구자들의 예에서처럼 세포주의 염색체가 저사배체성을 보인 예는 보고가 없었고 KEB₁ 세포주는 현재 몇 가지의 염색체 변화를 보이는 세포가 혼합되어 있었으며 앞으로 더 변화할 가능성도 있을 것이다. 향후 96 well에 단세포 배양을 하여 한 가지 세포군만 분리하여 염색체 검사를 시행하게 되면 염색체 변화를 더 잘 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

MAGE 검사는 폐암 등의 종양세포가 있을 때 양성으로 나오므로²⁷⁾ 객담을 이용한 폐암 정기검진에 사용되고 있다. 이 세포주는 백혈병 세포주와 함께 MAGE에 양성을 보였다. 현재까지 MAGE gene은 고형암에서 주로 표현되고 백혈병에서는 T 세포형과 EBV에 의한 LCL에서 양성으로 표현되고^{8, 9)} SSX gene도 고형암에서 주로 표현되고 백혈병에서는 급성 림프구성 백혈병의 일부에서 발현된다고 하였으나¹⁰⁾ LCL에 대한 보고는 없었다. 연구자의 결과에서는 SSX에서도 백혈병 세포주와 함께 양성 반응을 보여 지속적인 관찰이 필요하다고 생각된다. Honma 등²⁸⁾은 Werner syndrome과 Bloom syndrome 환자에서 확립된 LCL에서 세포 배양 등 다양한 전자, 모자이크 양상을 관찰하였고 sister chromatid exchange는 Bloom syndrome에서 더 빈도가 높았으며 세포독성검사에서 Bloom syndrome의 LCL이 항암제에 내성을 보여주었다고 한다. 그러나 Werner syndrome은 다른 결과를 보였다. 연구자들의 세포주에서는 백혈병 세포주보다 대체로 항암제에 내성을 보였다. 이는 아마도 LCL 세포주가 정상세포주이므로 백혈병 세포주보다 항암제에 대한 민감도가 약해서 항암제

에 내성을 보였을 가능성이 있으므로 앞으로 이 세포주로 정상 세포에 대한 부작용을 검사하는 지표로 삼아 항암제 개발에 모델로 사용할 수도 있을 것으로 생각된다. KEB₁ 세포주가 다른 항암제에서와 달리 prednisone에는 민감한 반응을 보여 임상적으로 prednisone 사용 후 증상이 호전된 것과 일치된 반응을 보였다. 향후 새로운 LCL 세포주를 확립하게 되면 유전자분석, MAGE와 SSX 검사, 항암제 감수성 검사를 지속적으로 행하고 telomerase 활성도와 유전자 검사를 시행하는 것이 필요할 것이며 이 세포주를 냉동, 해동 후 그리고 장기계대배양 후 세포들의 특성이 규명되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 세포배양에서 한가지 세포군이 선택적으로 증식되면 세포주로 발전되지만 정상세포에서는 지속적인 성장이 어렵다. EBV에 감염된 환아의 골수 단핵 세포를 배양하여 세포주(KEB₁)를 확립하여 그 특성을 알아보자 하였다.

방 법 : 2000년 3월 계명대학교 동산의료원에 EBV 감염으로 입원하였던 3세 여아에서 얻은 골수 단핵 세포를 분리한 후 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에 배양하여 세포주를 얻어 형태학적인 특성, 면역표현형, 염색체 검사, MAGE, SSX 검사를 하고 MTT assay를 이용한 세포독성 검사를 하였다.

결 과 : 이들 세포들은 광학현미경에서 비정형 림프구와 비슷한 모양을 하였으며 PAS 양성이었고 B세포 항체에 양성이었으며 면역조직화학염색에서 EBV 항체에 대해서 양성을 보였다. 전자현미경검사에서 바이러스 입자를 보였고 면역전자현미경 검색에서 EBV에 대해 양성 발현을 보였다. 이 세포주는 CD19, CD20, CD22, CD45, HLA-DR 양성이었고 B세포의 면역 표현형을 하였다. 염색체 검사에서는 저사배체성을 보였다. 면역글로불린 형성은 없었고 MAGE와 SSX에 양성이었으며 MTT assay를 이용한 세포독성검사에서 백혈병 세포주에 비하여 내성을 보였다.

결 론 : 전염성 단핵구증 환아의 골수 단핵구를 배양하여 세포주(KEB₁)를 확립하여 이 세포주의 형태학적인 특성, 면역표현형, 염색체 검사, MAGE, SSX 유전자 검사 및 항암제 독성 검사를 시행하여 분석하였다. 이 세포주는 앞으로 유전자 연구, telomerase 활성도, cytokine 생성여부 등에 대한 분석을 필요로 하고 이 세포주의 상청액을 이용하여 정상 림프구의 불멸화된 세포주를 확립할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 항암제 감수성 검사를 시행하여 항암제의 독성을 예측하는 보조치료로 삼을 수 있을 것으로 생각

된다.

참 고 문 헌

- 1) Freshney RI: *Culture of animal cell*. 3rd ed. New York, Wiley-Liss, 1994, pp12
- 2) Hayflick L, Moorhead PS: *The serial cultivation of human diploid cell strains*. *Exp Cell Res* 25:585-621, 1961
- 3) Ponten J, Westermark B: *Cell generation and aging of nontransformed glial cells from adult humans*. In Fedoroff S, Hertz L (eds): "Advances in Cellular Neurobiology, vol.1" New York, Academic Press pp209-227
- 4) Green H, Kehinde O, Thomas J: *Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5665-5668, 1979
- 5) Gjerset R, Yu A, Haas M: *Establishment of continuous cultures of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells at diagnosis*. *Cancer Res* 50:10-14, 1990
- 6) Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, Ide T, Furuichi Y, Sugimoto M: *Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus*. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 30-34, 2001
- 7) Wroblewski JM, Copple A, Batson LP, Landers CD, Yannelli JR: *Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs)*. *J Immunol Methods* 264:19-28, 2002
- 8) Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Miyajima J, Sagawa K, Itoh K: *Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia*. *Cancer Immunol Immunother* 41:90-103, 1995
- 9) Shichijo S, Yamada A, Sagawa K, Inamoto O, Sakata M, Nagai K, Itoh K: *Induction of MAGE genes in lymphoid cells by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine*. *Jpn J Cancer Res* 87:751-756, 1996
- 10) Niemeyer P, Tureci O, Eberle T, Graf N, Psfreundshah M, Sahin U: *Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemia*. *Leuk Res* 27:655-660, 2003
- 11) Han TW, Jung SK, Kim HS, Kang CM: *Chemosensitivity test of childhood leukemic cells*. *Korean J Pediatr* 42:1111-1121, 1999
- 12) Mitelman F, ed.: *An international system for human cytogenetic nomenclature (1995)*. Basel, S Karger, 1995, pp1-114
- 13) Sugimoto M, Goto M: *Incorrect use of "Immortalization" for B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus*. *J Virol* 73:9690-9691, 1999
- 14) Ohshima K, Suzumiya J, Ohga S, Ohgami A, Kikuchi M: *Integrated Epstein-Barr virus (EBV) and chromosomal abnormality in chronic active EBV infection*. *Int J Cancer* 71:943-947, 1997
- 15) Rickinson AB: *Chronic, symptomatic Epstein-Barr-virus infection*. *Immunol Today* 7:13-14, 1986
- 16) Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J: *Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. *N Engl J Med* 32:502-506, 1989
- 17) Campe H, Jaeger G, Abou-Ajram C, Nitschko H, Griebel M, Montoya C, Klare B, Koszinowski U: *Serial detection of Epstein-Barr virus DNA in sera and peripheral blood leukocyte samples of pediatric renal allograft recipients with persistent mononucleosis-like symptoms defines patients at risk to develop post-transplant lymphoproliferative disease*. *Pediatr Transplant* 7:46-52, 2003
- 18) Bayliss GJ, Wolf H: *Epstein-Barr-virus-induced cell fusion*. *Nature* 287:164-165, 1980
- 19) Behrman E, Kliegman M, Jenson B: *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia, Saunders, 2003, pp1062-1066
- 20) Yarchoan R, Redfield RR, Broder S: *Mechanism of B cell activation in patients with acquired immunodeficiency syndrome and related disorders. Contribution of antibody-producing B cells, of Epstein-Barr virus-infected B cells, and of immunoglobulin production induced by human T cell lymphotropic virus, type III/lymphadenopathy-associated virus*. *J Clin Invest* 78:439-447, 1986
- 21) Vazirabadi G, Geiger TR, Coffin WF 3rd, Martin JM: *Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) and lytic LMP-1 localization in plasma membrane-derived extracellular vesicles and intracellular virions*. *J Gen Virol* 84(Pt 8):1997-2008, 2003
- 22) Rowe DT: *Epstein-Barr virus immortalization and latency*. *Front Biosci* 4:D346-371, 1999
- 23) von Knebel Doeberitz M, Bornkamm GW, zur Hausen H: *Establishment of spontaneously outgrowing lymphoblast lines with Cyclosporin A*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 172:87-99, 1983
- 24) Liao SX, Wang YT, Yang YL, Li Y, Huang FF, Hao BT, Wang ZC, Zhu WY, Si YM, Wang YJ: *Establishment of permanent lymphoblastoid cell lines of patients with abnormal chromosome karyotype*. *Yi Chuan Xue Bao* 29:303-306, 2002
- 25) Mevissen ML, Kwekkeboom J, Goormachtig E, Lindhout E, de Groot C: *Improvement of EBV transformation and cloning efficiency of human B cells using culture supernatants from lymphoblastoid cell lines*. *Hum Antibodies Hybridomas* 4:66-73, 1993
- 26) Doepler CL, Livingston GK, Schumann BL, Srivas-

- tava AK: *Structural and numerical chromosomal aberrations in a metabolically competent human lymphoblast cell line (MCL-5)*. *Mutagenesis* 13: 275-280, 1998
- 27) Yook DS, Shin HS, Choi P, Kim JH, Shin SH, Ok CH, Cho HM, Jang TW, Jung MH, Park JW, Jeon CH: *Expression of MAGE in the induced sputum of lung cancer patients*. *Tubercul Resp Dis* 53:265-274, 2002
- 28) Honma M, Tadokoro S, Sakamoto H, Tanabe H, Sugimoto M, Furuichi Y, Satoh T, Sofuni T, Goto M: *Chromosomal instability in B-lymphoblastoid cell lines from Werner and Bloom syndrome patients*. *Mutat Res* 520:15-24, 2002