

마우스에서 타액선암 동위종양 모델 제작을 위한 실험적 연구

박영욱 · 정성훈

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:81-93)

AN EXPERIMENTAL STUDY FOR ESTABLISHMENT OF ORTHOTOPIC SALIVARY TUMOR MODELS IN MICE

Young-Wook Park, Seong-Hoon Chung

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kangnung National University

Purpose: Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a relatively rare tumor that arises in glandular tissues of the head and neck region and sometimes has a protracted clinical course with perineural invasion and delayed onset of distant lung metastasis. Treatment failure of salivary ACC is most often associated with perineural and hematogenous tumor spread. However, very little has been known about the cellular and molecular mechanisms of perineural invasion and hematogenous distant metastasis of parotid ACC. This study was designed to develop an orthotopic tumor model of parotid adenoid cystic carcinoma in athymic nude mice.

Experimental Design: A melanoma cell line was injected into the parotid gland of athymic mice to determine whether such implantation was technically feasible. A parotid ACC cell line was then injected into the parotid gland or the subcutaneous tissue of athymic mice at various concentrations of tumor cells, and the mice were thereafter followed for development of tumor nodule. The tumors were examined histopathologically for perineural invasion or regional or distant lung metastasis. We used an oral squamous cell carcinoma cell line as control.

Results: Implantation of tumor(melanoma) cell suspension into the parotid gland of nude mice was technically feasible and resulted in the formation of parotid tumors. A parotid ACC cell line, ACC3 showed no significantly higher tumorigenicity, but showed significantly higher lung metastatic potential in the parotid gland than in the subcutis. In contrast, mucosal squamous cell carcinoma cell line doesn't show significantly higher lung metastatic potential in the parotid gland than in the subcutis. The ACC tumor established in the parotid gland seemed to demonstrate perineural invasion of facial nerve, needs further study.

Conclusion: An orthotopic tumor model of salivary ACC in athymic nude mice was successfully developed that closely recapitulates the clinical situations of human salivary ACC. This model should facilitate the understanding of the cellular and molecular mechanisms of tumorigenesis and metastasis of salivary ACC and aid in the development of targeted molecular therapies of salivary ACC.

Key words: Adenoid cystic carcinoma, Orthotopic tumor model, Lung metastasis, Cellular and molecular mechanisms

I. 서 론

선양낭성암종(adenoid cystic carcinoma, ACC)은 악하선, 설하선, 그리고 소타액선에서 가장 호발하는 악성종양으로서, 원주종(cylindroma)으로도 불리운다¹⁾. 중장년층에 호발하며, 여성에서 약간 더 빈발한다는 보고도 있다²⁾. 임상적으로 발육이 완

만한 종양이지만 신경조직 침투로 인한 국소 동통이 나타나거나, 특히 이하선에 발생하였을 경우 안면신경 마비를 동반하는 경우가 많다. 조직학적 특성에 따라 관(tubular), 사상체(cribriform), 충실(solid) 형으로 세분되어 임상적으로는 충실형이 가장 예후가 불량한 것으로 알려져 있다³⁾. 표준 치료책은 수술에 이은 술후 부가적 방사선 요법으로 한 연구결과 이 치료방식으로 85%의 원발성 병소 조절과 89%, 67.4%, 39.6%의 5, 10, 15년 disease specific survival을 나타내었다⁴⁾. 이와 같이 장기생존율이 비교적 낮은 것은 선양낭성암종의 타 두경부암과는 확연히 구분되는 암생물학적 특징 때문이다. 즉 종양세포의 성장속도가 완만하여 지연성 원격전이(delayed distant metastasis)가, 특히 폐에 발생되고 신경주변 조직에 침투하는 경향이 있어 임상적으로 경과가 길고 예후가 불량한 증례들이 있다⁵⁾.

박 영 욱

210-702 강원도 강릉시 지변동 123번지
강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook Park

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University
Jibyeon-dong 123, Kangnung-city, Gangwon-do, 210-702, South Korea
Tel: 82-33-640-3139 Fax: 82-33-640-3113
E-mail: ywpark@kangnung.ac.kr

* 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호 : A06-0174-AL1018-06N1-00010A).

한 연구에 의하면 원격전이 발생된 35명의 선양낭성암 환자들에 대한 분석결과 2/3에서 폐전이가, 12%에서 간병소가 관찰되었으며, 원격전이는 초기치료 10-20년 후에도 발생된 예가 있었다⁶. 폐전이 병소는 단방성으로 발생되어 천천히 증식할 경우에는 외과적 절제술로 양호한 결과를 나타내기도 하나 대부분의 증례에서 혈관성 전이의 특징인 다발성 전이 병소를 형성하며, 특히 골조직에 암세포가 퍼졌을 경우에는 예후가 매우 불량하다⁷. 선양낭성암의 경우 대부분의 타액선암이 그러하듯이 암세포의 분열주기가 빠르지 않아 원격전이 병소의 치료를 위한 효과적인 화학요법은 아직 확립되지 못했다⁸. 따라서 전이성, 재발성 병소의 치료를 위한 새로운 기법을 개발할 필요성이 절실하다. 이를 해결하기 위하여 선양낭성암 종의 주변조직 침습(invasion)과 전이기전을 암생물학적으로 규명하여야 하며, 이 같은 연구를 통하여 효과적인 표적치료(targeted therapy)를 위한 표적분자 물질이 확인될 것이다. 이와 같은 일련의 연구를 위해서는 인간암을 표준화, 계량화할 수 있는 효과적인 동물모델을 확립하는 것이 최우선 과제이다.

인체암의 이종이식은 햄스터의 험낭(cheek pouch), 기니아 피그의 안전수방(anterior chamber of the eye)에서의 예와 같이 면역학적 이점이 있는 동물들에게 시도되어 왔다. 흉선이 없어 면역능이 최소화된 누드 마우스에 인체의 종양을 이종이식하는 방법은 인체암의 조직형태학적 특성을 유지한 상태에서 증식시킬 수 있는 가장 효과적인 방법이다. 생물학적 모델의 가치는 모델의 안정성에 좌우되는 바 이식 종양의 안정성을 고려할 때 그 기준은 계대배양 후의 지속적인 종양 성장; 종양 성장률; 종양 성장의 부위와 양상; 종양의 현미경 소견; 그리고 종양에 대한 숙주 반응 등이다. 누드 마우스를 이용한 연구에서 종양의 이식률과 성장 속도, 성장의 양상 그리고 종양 성장 인자들의 차이에도 불구하고 유사한 결과들이 도출되는 것은 누드 마우스를 이용한 종양 시스템이 안정되기 때문이다⁹.

인체 종양을 누드 마우스에 이종이식 하는 방법은 크게 종양 조직을 이식하는 방법과 배양된 종양 세포주를 이식하는 방법이 있다. 누드 마우스에 종양 조직을 이식할 때에는 멸균된 환경에서 신선 종양 조직을 1-5 gm 크기로 절제 후 다시 1-2 mm²로 잘게 절편화하여 적정량의 종양 현탁액 으로 만들어 13-16 게이지의 비교적 큰 주사침을 사용하여 피하 조직에 주입한다. 이때 종양 조직을 잘 관찰하여 중심의 괴사된 부위나 출혈 부위 그리고 세포 성분이 적은 부위는 제외하는 것이 바람직하다. 이와 같이 종양 조직을 직접 이식하는 방법은 종양의 미세환경 요소들을 같이 이식해 준다는 장점이 있지만 비교적 작고 섬세한 선조직 등에서의 이식이 기술적으로 불가능하여 피하 종양모델은 제작할 수 있지만 동위 종양모델(orthotopic tumor model)은 제작하기 어렵다는 단점이 있다.

동위 종양모델이란 종양이 기원된 같은 조직에 종양을 이종이식하여 유도된 종양을 갖고 있는 모델을 말하며 이식시의 기술적 문제로 종양 조직보다는 종양 세포를 이식하게 된다. 이미 알려진 바와 같이 배양된 인체 종양 세포주는 종양 연구의 필수적인 요소이며, 세포주로부터 유래되어 누드 마우스에

유도된 종양이 외과적 절제 표본으로부터 직접 이식되어 형성된 종양과 종양세포의 형태, 세포내 미세구조, 염색체 분석, 조직조건 등에서 다르지 않은 것으로 알려져 있다¹⁰. 또한 배양된 종양 세포주를 이식하는 것이 종양 조직을 이식하는 것보다 이식 성공율이 높은 것으로 보고되었다¹¹. 본 연구에서는 비교적 미세한 조직인 누드 마우스의 이하선에 타액선암의 동위 종양모델을 제작하기 위하여 인체 타액선암으로부터 수립된 세포를 이식하고자 하였다.

악성종양의 침윤성은 암세포의 운동성, 이주성, 단백분해 효소의 발현 여부와 연관되며¹²⁻¹⁵, 전이능은 혈액세포와 반응하여 해부학적 경계를 통과하는 능력과 관계된다¹⁶⁻¹⁸. 누드 마우스의 피하조직에 이식된 대부분의 인체 종양은 기관 전이가 잘 일어나지 않는다. 반면에 성공적으로 제작된 많은 동위 종양모델에서는 인간암의 임상적 침투와 전이 양상이 모사되는 것으로 보고되었다¹⁹⁻²². 즉 이종이식된 종양의 주변조직 침투와 원격 전이 여부는 이식 장소, 종양의 존재 시간, 종양의 기원과 본태, 이식 숙주의 미생물학적, 면역학적, 유전적 요인들이 중요하게 작용한다고 여겨지고 있다. 본 연구를 통하여 확립된 타액선 동위종양이 인간암에서와 유사하게 성공적으로 주변조직 침투와 원격 전이를 일으키는지를 검증하고자 한다.

타액선암의 경우 국내외적으로 종양의 발생과 특징적인 임상적 증상을 야기시키는 인자들에 대한 체계적인 연구가 부족하다. 타액선 암종의 생물학적 특성을 규명한 지금까지의 연구는 대부분 수술표본에서 종양성장과 관련된 인자들의 단백질 발현도와 임상병리학적 지표라든지 예후인자들과의 상관관계에 관한 것들이다. 이는 타액선암 세포주 확립의 어려움과 신뢰할만한 실험모델의 부재 때문이다. 이에 본 연구에서는 임상적으로 신경조직 침투와 혈관성 폐전이가 문제가 되는 타액선암의 연구를 위하여 인간 타액선암의 전이 양상을 재현할 수 있는 동물모델을 제작하고자 한다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 세포주 및 세포배양

예비실험에서 누드 마우스에서의 종양발생능(tumorigenicity)이 검증된 흑색종(melanoma) 세포주인 B16BL6를²³ 사용하였다. 타액선 선양낭성암 세포주로는 49세 남자환자의 이하선 선양낭성암종으로부터 확립된 ACC3가 실험에 이용되었다. 또한 본 실험에 사용된 대조군 세포주로는 구강점막 편평상피세포암으로부터 확립된 세포주인 MDA1986을 사용하였다²⁴.

선양낭성암 세포주는 15% 우태혈청, L-glutamine, 비타민(Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, U.S.A.), 페니실린-스트렙토마이신(Flow Laboratories, Rockville, MD, U.S.A.)이 함유된 RPMI-1640 배양액에서 단일배양층으로 유지되었다. B16BL6와 MDA1986은 10% 우태혈청, sodium pyruvate, nonessential amino acids, L-glutamine, 비타민(Life Technologies, Inc., Grand

Island, NY, U.S.A.), 페니실린-스트렙토마이신(Flow Laboratories, Rockville, MD, U.S.A.)이 함유된 DMEM 배양액에서 단일배양층으로 유지되었다. 세포들은 모두 5% CO₂, 95% 공기 상태로 37°C에서 배양되었다.

2. 실험동물과 세포접종액 처리

생후 6-8주된 흑색 마우스와 생후 8-12주된 수컷 누드 마우스가 실험에 이용되었다. 누드 마우스는 병원성 미생물이 존재하지 않는 환경에서, 방사선 멸균처리된 사료와 고압증기 처리된 물로 사육하였다. 생체내 이종이식을 위한 세포 부유액 (cell suspension)을 만들기 위하여 95% 이상의 활성을 유지한 배양세포만을 이용하였으며 이는 트립산 블루 염색으로 확인하였다. 배지에 포화상태에 이르지 않은 암세포를 트립산 처리 (0.25% 트립산+0.02% EDTA) 후 정해진 수만큼을 30 μ l의 Ca²⁺과 Mg²⁺가 함유되지 않은 HBSS(Hanks' balanced salt solution)에 부유시켰다.

3. 이하선에의 종양세포 이식술 (Orthotopic Parotid Injection Technique)

누드 마우스의 이하선 조직내에 일정 부피를 가진 암세포 부유액을 주입하여 실험적으로 종양을 발생시키는 것이 기술적으로 가능한지를 결정하기 위하여 악성도가 높은 흑색종 세포주를 이용하여 예비실험을 수행하였다. 먼저 발생학, 해부학적으로 영장류와 차이가 있는 설치류에서 이하선을 확인하기 위하여 마우스의 두경부 영역에 존재하는 선조직들을 해부학적으로 확인하고 조직학적으로 관찰하였다.

이하선 확인 후, 10⁴ 개와 5 \times 10⁴ 개의 흑색종 세포주를 각각 5마리의 흑색 마우스의 이하선에 이종이식하였다. 즉 쏘디움 펜토바비탈 복강내 마취 (50mg/kg body weight) 후 험부를 알코올 솜으로 소독하였다. 미세가위로 전이개 부위에 절개선을 가하고 절개부의 하방에 위치하는 이하선에 손가락으로 가벼운 압력을 가하여 이하선 조직을 절개 부위로 노출시킨 후, 30게이지의 피하 주사침을 이용하여 암세포 부유액 30 μ l를 새지 않도록 조심스럽게 주입하였다. 암세포 부유액 주입 후 절개부는 1개의 금속 클립을 이용하여 봉합하였다. 실험동물에서의 종양발생 여부는 암세포 이종이식 후 3주간 면밀히 관찰되었다.

4. 피하조직에의 종양세포 이식술 (Subcutaneous Flank Injection Technique)

실험에 이용된 타액선 암세포가, 기원된 원발부위와 유사한 마우스의 동위 조직인 타액선에 이종이식 되었을 때 성장 이점이 있는지를 결정하기 위하여, 인간의 이하선에서 유래된 선양낭성암 세포주와 대조군 세포주인 구강 편평상피세포암

세포주를 실험동물의 이하선과 옆구리 피하조직에 이종이식하였다. 즉 실험군(ACC3)과 대조군(MDA1986)에서 각각 5 \times 10⁴(Group1), 5 \times 10⁴(Group2), 1 \times 10⁵(Group3), 5 \times 10⁴(Group4), 1 \times 10⁴(Group5), 1 \times 10⁵(Group6)의 암세포를 군당 5마리의 누드 마우스의 이하선과 옆구리 피하조직에 이종이식하였다. 이하선에의 암세포 부유액 주입은 전술한 바와 같이 시행하였다. 암세포 부유액 주입 후, 터지지 않고 잘 형성된 수포(bleb)를 통하여 성공적인 암세포 주입을 확인할 수 있다. 누드 마우스의 옆구리 부위 피하조직에 암세포 주입시에는 숙련이 되면 마취는 필요치 않다. 정해진 수의 암세포를 50 μ l의 HBSS에 부유시켜 1ml 시린지와 30게이지 주사침을 이용하여 누드 마우스의 우측 옆구리 부위의 피하조직층 내에 주입하였다. 암세포 이종이식 후 실험동물은 종양이 인지될 때까지 매일 관찰되었고, 종양 발생 후에는 1주일에 2회 종양의 증식을 기록하였다. 종양의 크기는 캘리퍼를 이용하여 그 장경과 단경을 cephalad-to-caudad/left-to-right 로 측정, 기록하였다. 종양의 부피는 다음의 공식으로 산출하였다²⁵; (장경) \times (단경)² \times $\pi/6$, $\pi=3.14$.

5. 실험동물 부검 및 조직학적 관찰

실험동물을 혈관성 원격전이 일어날 수 있는 기간을 고려하여 암세포 이식 후 8주 시점에서 희생하였다. CO₂를 이용하여 안락사 시킨후 원발성 종양을 절제하여 그 무게를 측정하였다. 종물을 이등분하여 반은 헤마톡실린-에오신 염색을 위하여 포르말린 고정 후 파라핀에 포매하였고, 나머지 반은 향후의 지속적인 연구를 위하여 OCT 화합물(Miles Inc., Elkhart, IN, U.S.A.)에 포매하여 액체질소로 급냉 후 -70°C에 보관하였다. 경부 임과절과 양쪽 폐, 그리고 간조직까지 조직학적 관찰을 위하여 절제 후 포르말린에 고정 후 일반 현미경을 통하여 전이 병소의 발생 유무를 검사하였다. 폐조직에의 전이 병소 발생 여부 결정 시에는 작은 전이 병소를 놓치지 않기 위하여, 한 개체의 폐조직에서 최소 25 μ m 이상 차이를 두고 5개의 슬라이드 표본을 만들어 검사하였다.

6. 통계분석

실험동물에서 암세포주의 종양발생능과 부위에 따른 (orthotopic/parotid Vs ectopic/subcutis) 종양 발생에의 영향을 평가하기 위하여 exact logistic regression을 이용하여 통계 분석을 시행하였다. Regression model에는 암세포 부유액에서의 세포 희석률 (1 \times 10³~5 \times 10⁴)의 영향과 세포 주입 부위 (이하선 : 피하조직)에 대한 항목이 포함되었다. 부위별 영향에 대한 유의성 평가 시 유의수준은 0.05로 하였다. 또한 희생시 각 군내에서 종양세포의 이식 부위에 따른 종양 부피의 비교는 Wilcoxon nonparametric test로 검정하여 역시 유의수준 0.05이하에서 그 차이를 인정하였다.

Ⅲ. 연구결과

1. 암세포의 이하선내 이종이식술 (예비실험)

이하선을 확인하기 위하여 누드 마우스의 두경부에 존재하는 선조직들을 해부학적으로 고찰하고, 절제 후 조직학적으로 관찰한 결과 (Fig. 1)과 같은 소견을 보였다. 누드 마우스의 안면부 측면 중앙부에 있는 선조직은 누선이며 이하선은 누선의 하부에 경부 쪽으로 치우쳐 피하 지방층에 매몰되어 존재하였다. 이하선에 10^4 개와 5×10^4 개의 흑색종 세포주를 이종이식하고 이하선 종양 발생 여부를 3주간 관찰한 결과 암세포 이식 3주 후 10^4 개의 암세포를 이식한 5마리중 4마리에서, 그리고 5×10^4 개의 암세포를 이식한 5마리 모두에서 이하선 흑색종이 성장되었다 (Fig. 2). 종양의 발생은 9마리에서 모두 암세포 이식 후 6-7일경에 인지되었으며, 이후 세포주의 강한 악성도로 인하여 급속히 성장하였다.

2. 타액선암 세포주의 이종이식 소견

(1) 동위종양 모델의 확립 및 동위종양의 조직학적 소견

인간 타액선 암세포가 미세환경이 유사한 누드 마우스의 이하선 조직 내에 이종이식되었을 때 피하에 이식한 경우와 비교하여 암생물학적으로 차이점이 있는지를 결정하기 위하여, 차별화된 수의 타액선암 세포주를 누드 마우스의 이하선과 피하에 이식 후 8주간 관찰하고 희생하였다. 먼저 이종이식된 ACC 세포주는 누드 마우스의 이하선에서 동위종양을 형성하였다 (Fig. 3-A). 외과적으로 이하선 종양을 노출시킨 결과 종물은 이하선 내에서 성장되고 있음을 보여주었다 (Fig. 3-B). 조직학적으로도 종물의 주변부에 이하선 조직이 관찰되어 이하선 내에서 성공적으로 발생된 동위종양의 소견을 보여주었다 (Fig. 3-C,D). 그러나 암세포의 증식 양상은 인간암에서 볼 수 있는 것과 같이 관구조물이나 스위스 치즈 형태의 사상체를 형성하는 소견은 없었고 충실형에 가까운 암세포 증식상을 보여주었다 (Fig. 3-C). 고배율 사진에서 종양세포의 활발한 분열상을 볼 수 있다 (Fig. 3-E).

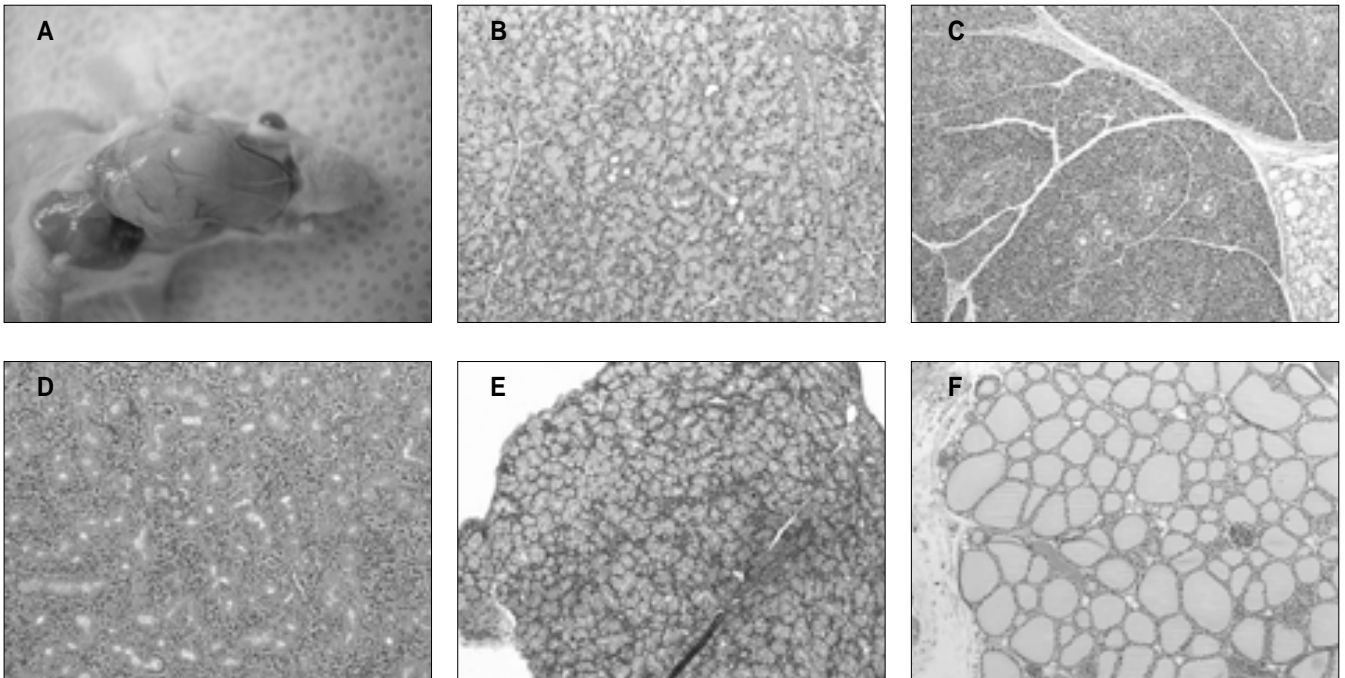


Fig. 1. Glandular structures in the head and neck area of nude mice.

- A : Normal anatomical features in lateral view of the head and neck area of nude mice. We can see the lacrimal gland and the parotid gland. We can also detect upper and lower branches of motor divisions of facial nerve.
- B : Histologic features of the lacrimal gland of nude mice (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- C : Histologic features of the parotid gland of nude mice (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- D : Histologic features of the mandibular gland of nude mice (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- E : Histologic features of the lingual gland of nude mice (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- F : Histologic features of the thyroid gland of nude mice (H&E staining, original magnification $\times 40$).

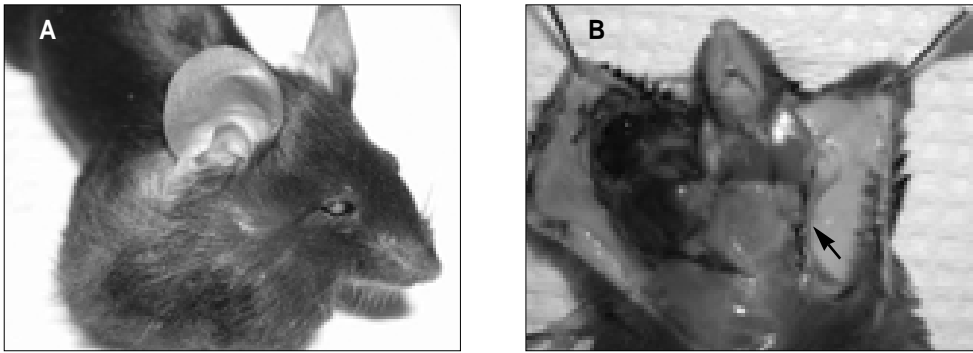


Fig. 2. Parotid tumor of a black mouse.

- A : Gross features of the parotid melanoma. A huge tumor was developed 3 weeks after the injection of melanoma cells (cell number : 5×10^4) into the parotid gland of a black mouse.
B : Dissected view of the tumor-bearing mouse. We can see the huge parotid melanoma of right parotid gland and a pigmented mandibular lymph node (arrow) in the left-sided neck.

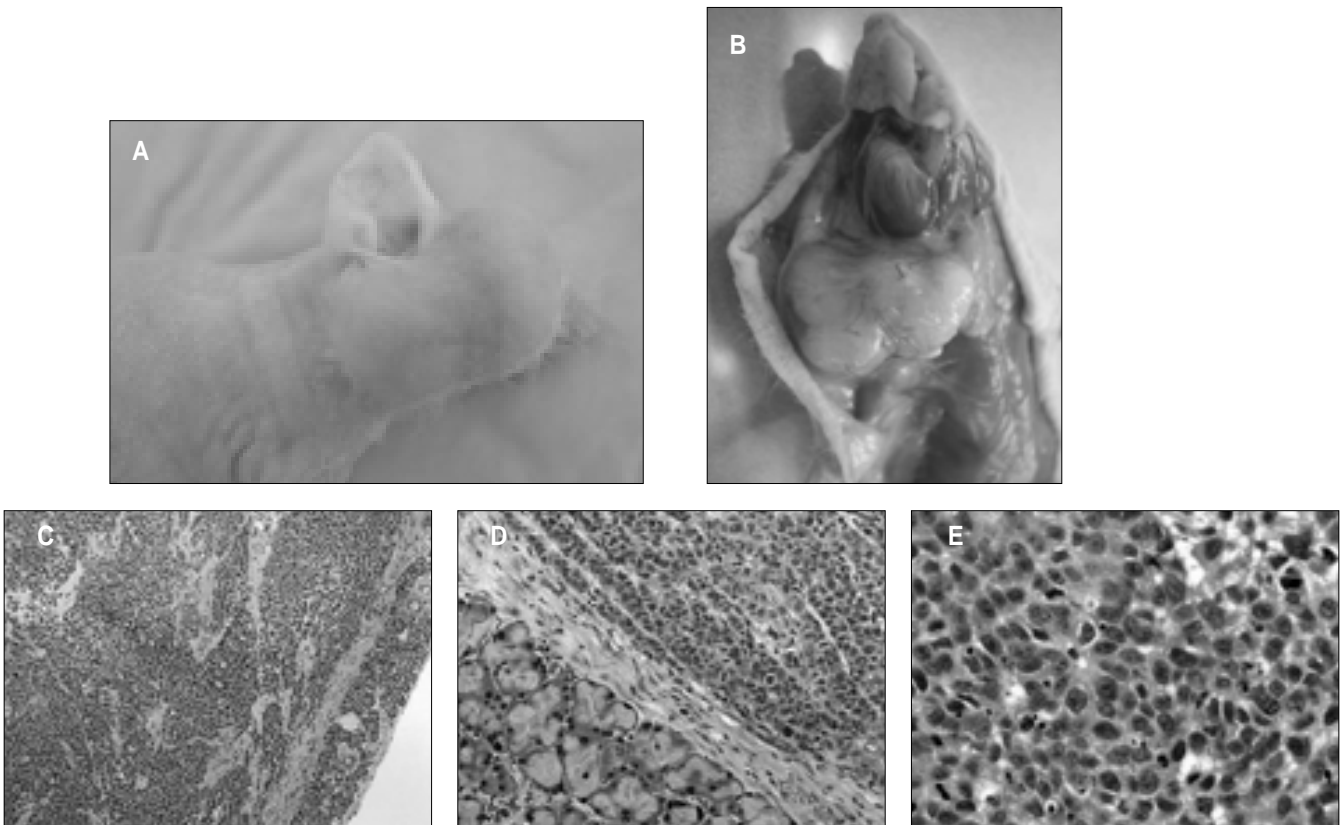


Fig. 3. Orthotopic tumor model of parotid ACC in nude mice.

- A : A huge parotid tumor was developed after the injection of human adenoid cystic carcinoma cells (cell number : 5×10^5) into the parotid gland of a nude mouse.
B : Dissected view of a tumor-bearing mouse. We can see the multiple nodular mass in the parotid gland.
C-E : Histologic features of the orthotopic parotid tumor. Normal glandular tissues were displaced to the periphery of the tumor mass, which developed in the center of the parotid gland. We also detect the characteristics of the tumor cells of human adenoid cystic carcinoma, which were transplanted to mouse (H&E staining, original magnification $\times 40$:C, $\times 100$:D, and $\times 200$:E).

(2) 종양발생능

타액선암 세포주를 마우스에 이종이식했을 때 관찰기간 중 세포농도에 따른 종양발생능은 (Table 1)과 같다. 즉 동위조직 (이하선)과 이소조직(피하)내에서, 상대적 고농도인 1,2군에서는 100%의 종양발생율을 보였으며, 상대적 저농도인 5,6군에서는 종양이 발생되지 않았다. 3군의 경우 이하선 조직과 피하

조직에서 타액선암 세포주의 종양발생능은 동일하였으며, 4군에 있어서는 동위조직 내에서 60%, 이소조직 내에서 40%의 종양발생율을 나타내었다. 즉 원발부위의 종양발생율은 세포 농도에는 영향을 받았지만, 각 군에서 이식 부위에 따른 차이는 없는 것으로 분석되었다.

Table 1. Tumorigenicity, incidence of regional and distant metastasis in the experimental group (adenoid cystic carcinoma cells)

	Subcutis Injection (N=5)			Parotid Injection (N=5)		
	Primary Tumor	Lymph Nodes	Lung	Primary Tumor	Lymph Nodes	Lung
Group1 (5 × 10 ⁶)	5	0	0	5	0	1 [†]
Group2 (5 × 10 ⁵)	5	0	0	5	0	2 [†]
Group3 (1 × 10 ⁵)	3	0	0	3	0	0
Group4 (5 × 10 ⁴)	2	0	0	3	0	0
Group5 (1 × 10 ⁴)	0	0	0	0	0	0
Group6 (1 × 10 ³)	0	0	0	0	0	0

† : P<0.05 (Exact logistic regression)

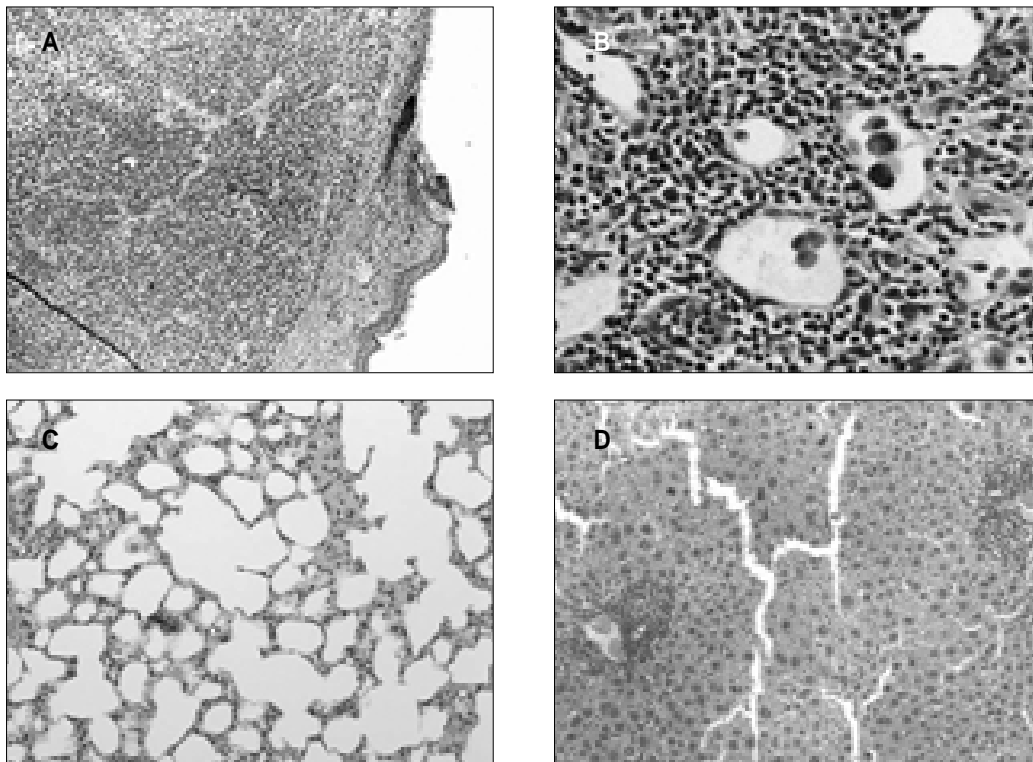


Fig. 4. Histologic features of the subcutaneous tumor of salivary adenoid cystic carcinoma.

- A : Transplanted human ACC cells successfully developed tumor mass in the subcutis of a mouse (H&E staining, original magnification ×40).
- B : Normal architecture of lymph node was disrupted in the inguinal lymph node, which located in the vicinity of the subcutaneous tumor. But there were no tumor cells. Instead of tumor cells, immune related cells were infiltrated in the hyperplastic lymph nodes (H&E staining, original magnification ×200).
- C : We couldn't detect distant metastatic lesion in the lung (H&E staining, original magnification ×100).
- D : There was also no visceral metastasis in the liver (H&E staining, original magnification ×40).

(3) 피하종양의 관찰 소견

조직학적으로 타액선암 피하 종양의 소견은 (Fig. 4A)와 같아 동위종양과 유사한 소견을 보여주었다. 피하 종양 주변의 서혜부에서 적절한 임파선에는 암세포의 전이 없이 면역관련 세포들이 유입되는 소견을 보였다 (Fig. 4B). 원격 전이 여부는 폐 및 간에서 평가하였는데 모든 개체에서 원격 전이의 소견은 관찰되지 않았다 (Fig. 4C, D).

(4) 원발종양의 증식능

인간 타액선암으로부터 확립되어 마우스에 이종이식된 선양낭성암 세포들은 조직학적으로 선양낭성암종의 특징적인 소견을 나타내지 않았다. 즉 관 구조물이라든지 스위스 치즈 모양의 구조물은 관찰되지 않았으며 종양세포들이 군집을 이루어 증식하는 충실형과 유사한 소견을 보였다. 부피로 측정된 종양성장의 차이는 종양발생율이 50% 이상을 보인 1-3군에서만 비교, 분석한 결과 전반적으로 타액선암 세포주는 이하선 조직과 피하조직에 이식되었을 때 그 성장속도에 있어서의 차이는 인정되지 않았다.

(5) 임파절 전이능

타액선암 세포주는 피하 종양 형성 후나 이하선 종양 형성 후 모두의 경우에서 주변 임파절 전이의 소견을 보이지 않았다 (Table 1). 암세포 이식 8주 후의 부검 시 동위종양의 경우 동측 임파절의 크기가 상당히 증가된 경우가 많았으나 (Fig. 5-A) 조직학적 관찰 결과 암세포의 증식이 아닌 면역관련 세포들의 증식으로 판명되었다 (Fig. 5-C, D). 세포농도나 이식부위에 따른 임파절 전이능의 차이는 없는 것으로 분석되었다.

(6) 신경조직 침투능

타액선암 세포주를 이하선에 이종이식 한 결과 동위종양 형성 후 주변조직에 침투하는 양상을 나타내었다. 1군중 1마리에서 뇌로 침투하는 소견을 보였다 (Fig. 6-A). 안면신경과의 관계에 있어서는 부검시 안면신경 가지가 종양과 유착되어 있는 소견은 없었으나 (Fig. 6-B), 조직학적 관찰시 종양세포들이 신경세포 쪽으로 침투해 들어가는 양상을 보였다 (Fig. 6-C, D). 이와는 대조적으로 구강점막 편평상피세포암 세포주를 이하선에 이식하여 발생한 이하선 종양에서는 암세포들이 신경 조직

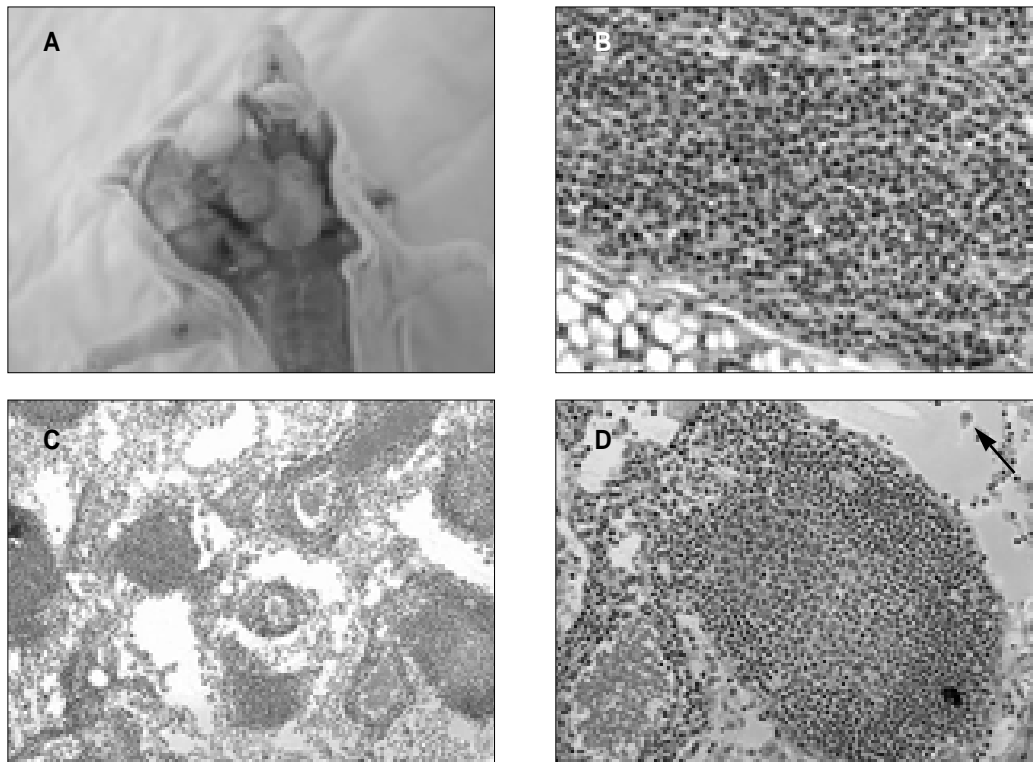


Fig. 5. Gross and histologic features of cervical lymph nodes of a tumor-bearing mouse.

- A : Gross features of central neck of the mouse. We can see the hyperplastic mandibular lymph nodes (arrow) of right-sided neck.
- B : Histologic features of a normal mandibular lymph node from left-sided neck (H&E staining, original magnification ×100).
- C : Histologic features of the hyperplastic lymph nodes. Normal structures of lymph node were disrupted (H&E staining, original magnification ×40).
- D : There were a lot of infiltrating immune-related cells (arrow) in the hyperplastic lymph nodes (H&E staining, original magnification ×100).

이나 신경 주변조직에 침투해 들어가는 양상을 보이지 않고, 종양세포들이 신경조직과 분리되어 있는 소견을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6-E).

(7) 혈관성 원격 전이능

실험군 중 이하선 종양의 1군에서 1개체, 2군에서 2개체에서 혈관성 원격전이인 폐전이 병소가 발생하였다 (Table 1). 폐전

이 병소는 육안적으로도 확인 가능하였으며 (Fig. 7-A) 조직학적으로 폐의 혈관 주변으로 종양세포들이 증식하는 소견을 보였다 (Fig. 7-B, C). 이와는 대조적으로 피하종양의 경우 혈관성 원격전이의 소견을 보이지 않았다 (Fig. 7-D). 즉 1군과 2군에서 피하종양에서 보다는 동위종양에서 혈관성 원격 전이가 증가되었다 ($P < 0.05$).

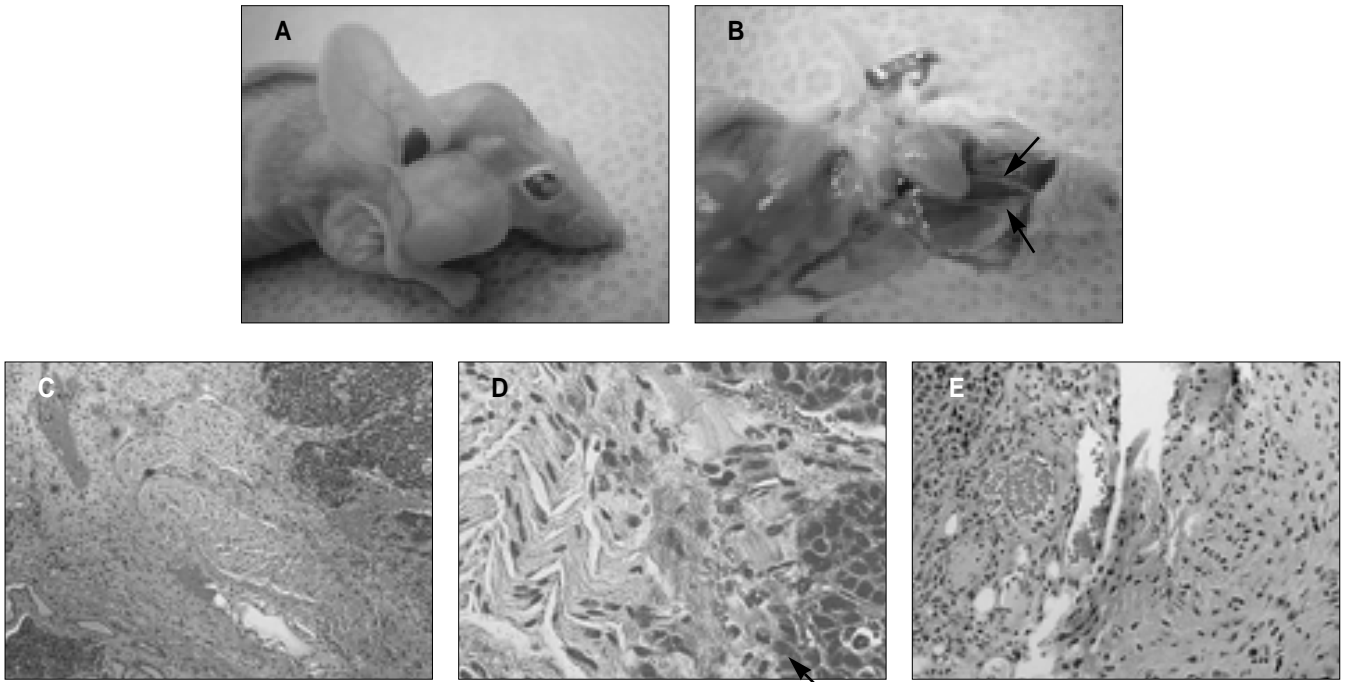


Fig. 6. Invasive characteristics of ACC orthotopic tumor.

- A : A mouse of experimental group, had invasive brain lesion from the parotid tumor at the time of sacrifice.
- B : Dissected view showing the relation of tumor mass with facial nerve. The motor branches of the facial nerve (arrow) was displaced and movable.
- C : Histologic features of the facial nerve. We can see nerve tissues and tumor mass (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- D : In higher magnification, ACC tumor cells (arrow) were migrated to the nerve tissues (H&E staining, original magnification $\times 200$).
- E : But, in the control mouse, which received SCC cells, tumor mass and nerves were completely separated (H&E staining, original magnification $\times 100$).

Table 2. Tumorigenicity, incidence of regional and distant metastasis in control group (squamous cell carcinoma cells)

	Subcutis Injection (N=5)			Parotid Injection (N=5)		
	Primary Tumor	Lymph Nodes	Lung	Primary Tumor	Lymph Nodes	Lung
Group1 (5×10^6)	4	0	0	4	0	0
Group2 (5×10^5)	5	0	1 [†]	5	1 [†]	0
Group3 (1×10^5)	4	0	0	5	1 [†]	0
Group4 (5×10^4)	4	0	0	3	0	0
Group5 (1×10^4)	3	0	0	2	0	0
Group6 (1×10^3)	0	0	0	0	0	0

[†] : $P < 0.05$ (Exact logistic regression)

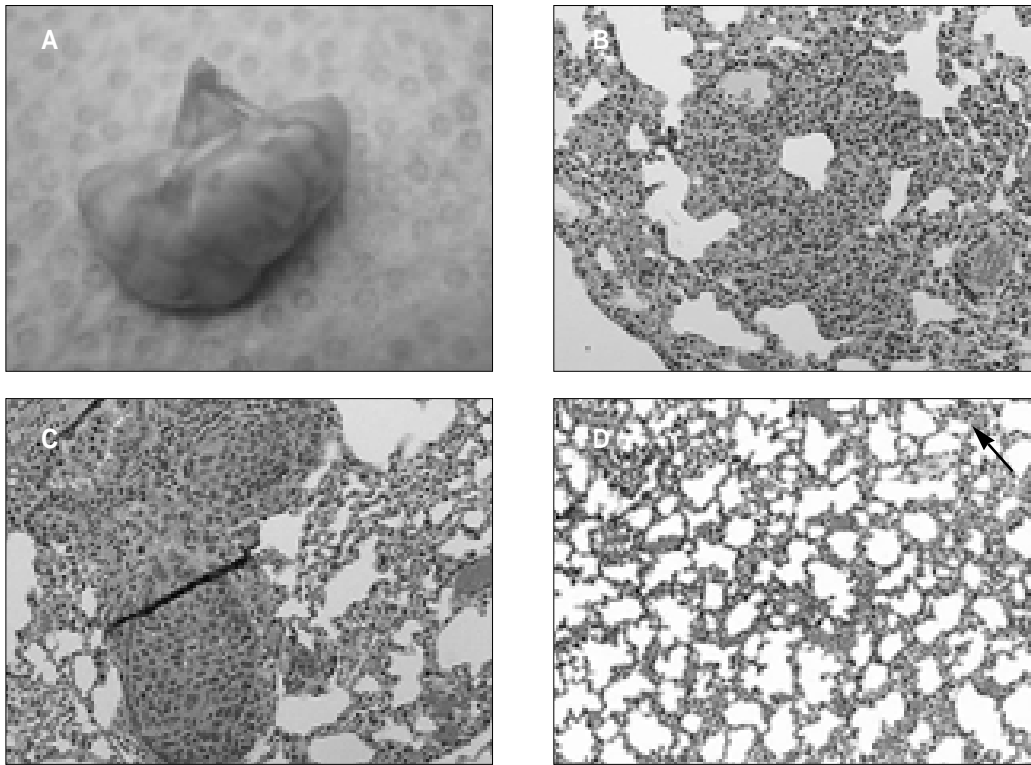


Fig. 7. Distant metastatic characteristics of ACC orthotopic tumor.

- A : Gross feature of a lobe of the lung in the experimental group. White, hard consistency means metastatic lesions in the lung.
- B,C : Histologic features of the metastatic lung lesions. Usually, around blood vessels in the lung, metastatic tumor masses were developed, which means vascular metastasis (H&E staining, original magnification $\times 100$).
- D : In the contrary, the lungs of mice in the control group had no metastatic lesions (H&E staining, original magnification $\times 40$).

3. 구강점막 편평상피세포암 세포주의 이종이식 소견

(1) 종양발생능

구강점막 편평상피세포암 세포주를 이하선과 피하에 이식했을 때 관찰기간 중 세포농도에 따른 종양발생능은 (Table 2)와 같았다. 즉 이하선에서 1군(80%), 2군(100%), 3군(100%), 4군(60%), 5군(40%), 6군(0%)의 종양발생율을 보였으며, 피하에서 1군(80%), 2군(100%), 3군(80%), 4군(80%), 5군(60%), 6군(0%)의 종양발생율을 보였다. 실험군 (타액선암)에서와 같이 대조군에서도 원발부위의 종양발생율은 세포농도에는 영향을 받았지만, 각 군에서 이식 부위에 따른 차이는 없는 것으로 분석되었다.

(2) 원발종양의 조직학적 소견 및 증식능

조직학적으로 편평상피세포암이 이하선 내에 성공적으로 발생된 소견을 볼 수 있으며 (Fig. 8-A), 종물 내에는 각질 진주 (keratin pearl)와 같은 구조물들이 관찰되어 분화도가 좋은 편평상피세포암종의 특징을 잘 보여주고 있다 (Fig. 8-B). 피하 편평

상피세포암도 조직학적으로 전형적인 편평상피세포암의 특성을 나타내었다 (Fig. 9-A, B). 세포주의 악성도가 높아 종물은 전반적으로 실험군인 타액선암 세포주 이식군보다 급격히 성장하였다. 이식 부위에 따른 차이는 종양발생율이 50%를 넘어서 1-4군에서만 비교한 결과 이하선 종양과 피하 종양간의 부피 차이는 없는 것으로 분석되었다.

(3) 전이능, 주변조직 침투능

대조군인 구강 편평상피세포암 세포주의 경우 선양낭성암 종 세포주와는 달리 이하선 종양 형성 후 2, 3군에서 각 1개체에서 경부 임파절 전이의 소견을 보였으며 (Fig. 8-C) 폐전이도 발생하지 않았다 (Fig. 8-D). 전이된 임파절 종물 역시 조직학적으로 편평상피세포암의 특성을 유지하였다. 피하에 이식한 경우에는 주변 임파절 전이는 없었으나 (Fig. 9-C), 2군의 1개체에서 폐전이 병소가 발생되었다 (Fig. 9-D). 또한 이하선 편평상피세포암의 경우 전술한 바와 같이 뇌, 안면신경 등으로의 신경조직 침투 소견은 관찰되지 않았다 (Fig. 6-E).

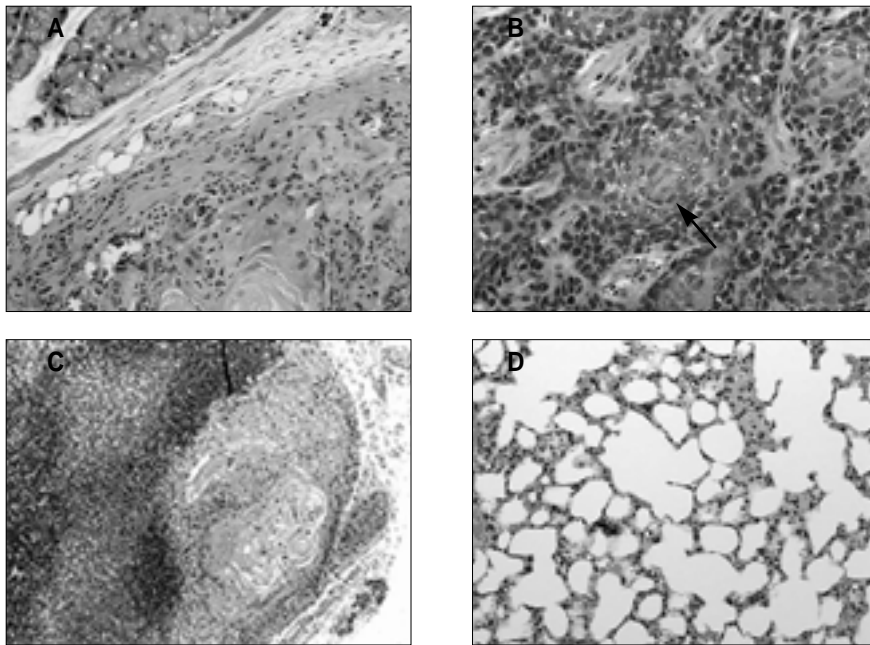


Fig. 8. Histologic features of parotid SCC in nude mice.

- A : Squamous cell carcinoma was developed within the parotid gland of a nude mouse (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- B : We can see the characteristic features (keratin pearl, arrow) of SCC (H&E staining, original magnification $\times 100$).
- C : Two mice of the control group showed lesions indicating regional lymph node metastasis. In the periphery within a mandibular lymph node, tumor cells were grown (H&E staining, original magnification $\times 40$).
- D : But, There were no distant metastatic lesions in the control group (H&E staining, original magnification $\times 40$).

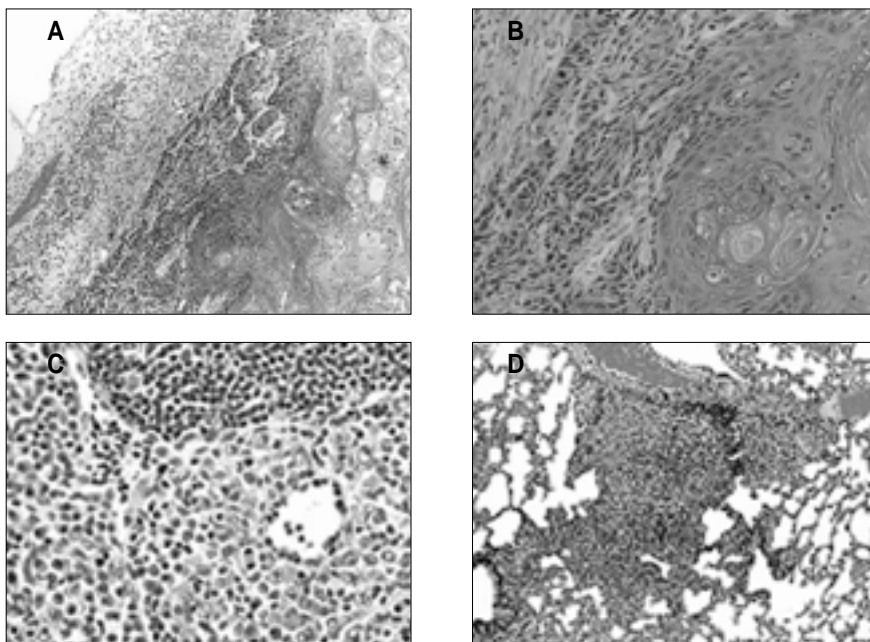


Fig. 9. Histologic features of subcutaneous SCC.

- A,B : Typical squamous cell carcinoma was developed within subcutaneous tissue of a nude mouse (H&E staining, original magnification $\times 40$:A, $\times 100$:B).
- C : Subcutaneous SCC didn't metastasize to regional lymph nodes (H&E staining, original magnification $\times 100$).
- D : But interestingly only one mouse out of 30 mice, which had received SCC cells in their flank area, developed metastatic lung lesion at the time of sacrifice (H&E staining, original magnification $\times 40$).

IV. 총괄 및 고찰

본 연구를 통하여 저자 등은 이하선 선양낭성암종의 동위종양 모델을 마우스에 확립하였다. 제작된 누드 마우스의 이하선 동위종양은 피하종양과는 달리 인간 이하선 선양낭성암종의 임상적, 암생물학적 특성을 모사하고 재현하는 소견을 보였다. 즉 조직학적으로 신경조직으로 침투하는 소견을 보여주기기도 하였으며, 특히 주변 임파절 전이보다는 혈관성 폐전이 양상을 나타내어 의미있는 결과를 도출하였다.

본 실험을 위하여 먼저 마우스의 타액선의 하나인 이하선의 위치를 확인하고자 마우스의 두경부에 존재하는 선조직들을 해부학적으로 고찰하였다. 마우스와 같은 설치류의 경우 인간인 영장류와 비교하여 두경부 구조물들의 상대적 위치에 있어 다소간의 차이점을 알 수 있었다. 즉 누선이 상대적으로 후방에 위치하여 귀 전방부에 존재하였으며, 이하선의 경우 하악골 상행지의 마약한 발달로 하악골을 감싸기 보다는 경부의 측면에서 피하 지방조직에 매몰되어 있는 듯한 양상으로 존재하여 혼동의 여지가 있었다.

조직학적으로는 이하선의 경우 누선과 달리 간질조직이 매우 발달되어 있었으며 분비관(duct)들이 다양한 크기로 더 많이 존재하였다. 악하선의 경우 경부의 중앙에 양쪽으로 존재하여 평면 해부학적으로 갑상선과 혼동될 수 있다. 갑상선의 경우 경부의 띠 근육(strap muscle) 심부의 기관(trachea) 양측면에 존재하며, 조직학적으로도 특징적인 낭 구조물(follicle)의 존재로 확인이 가능하였고, thyroxine에 대한 면역조직화학염색으로 검증할 수 있다. 이하선 선양낭성암종의 주요 침투로인 안면신경의 경우 마우스에 있어서는 인체와 달리 안면근에 분포하는 운동신경 분지가 2개만이 존재하여 각각 상분지(upper branch), 하분지(lower branch)로 명명하였다. 또한 두경부 악성 종양의 파급로인 경부 임파절의 경우 마우스의 경우 육안으로 분명하게 확인 가능한 임파절은 악하선의 상부와 외측으로 3-4개 정도가 존재하였으며(Fig. 2-B) 경정맥을 따라 분포하는 임파절들은 경부 외측 근육의 심부에 위치하며 그 크기가 매우 작았다. 따라서 본 연구에서 임파절 전이 여부는 동측과 반대측의 악하부 임파절 2개씩 개체당 총 4개를 대상으로 그 전이 여부를 결정하였다.

해부학적 고찰에서 이하선의 경우 피하 지방조직에 매몰되어 존재하며 그 구조적 특성상 누선과 같은 원형 구조물이 아니고 다수의 엽 구조물을 형성하고 있어 실제 암세포를 주입하기 위한 공간이 그리 충분하여 보이지 않았다. 따라서 예비 실험을 통하여 누드 마우스에서 종양발생능이 입증된, 악성도가 높은 세포주인 흑색종 세포주를 이용하여 암세포 부유액 주입의 기술적 가능성을 확인하였다. 예비실험 결과 30개 이하니들을 통하여 암세포 부유액을 누출 없이 이하선에 주입할 수 있는 술기를 터득하였고, 주입된 흑색종 세포는 이하선 내에서 성공적으로 종물을 형성하였다. 예비실험의 목적상 경부 임파절 전이 여부에 대해서는 조직학적으로 확인하지 않았지만 부검 소견에서 이하선 흑색종 주변이나 반대측의 경부 임

파절에 흑색종 전이 병소를 시사하는 검은 착색(pigmentation)을 관찰할 수 있었다.

암세포 주입의 기술적 가능성을 확인한 후, 실제 타액선암 세포주를 이용한 본 실험을 진행하였다. 타액선암 종양 모델을 확립하기 위하여 저자 등은 선양낭성암, 점액유표피암(mucoepidermoid carcinoma), 타액선관암종(salivary ductal carcinoma) 등의 실제 수술 환자의 조직에서 종양세포의 일차배양을 수차례 시도하였으나 타액선 암세포의 경우 일차 배양배지에 부착하는 능력이 떨어지는 것 같고, 배양배지에서 성장속도가 느리며, 세균이나 진균 감염을 극복하더라도 섬유아세포의 증식속도를 극복하지 못하는 경우가 많았고, 또한 섬유아세포와 분리하는 단계에서 트립신 처리 후 더 이상의 성장이 이루어지지 않는 경우가 많아 세포주 확립에 많은 어려움이 있었다. 그나마 확립된 세포의 경우 마우스에서 종양발생능이 없었다.

ACC 세포주는 중국, 일본의 실험실에서 개발되어 왔으나 연구하는 그룹이 많지 않아 지금까지 확립된 세포주는 몇몇에 불과하다^{26,28}. 본 실험에 이용된 세포주(ACC3)는 49세 남자환자의 이하선에 발생된 선양낭성암종으로부터 일본 니가타 치과대학 병리과의 Takashi Saku 교수가 제작한 것으로²⁹ 저자가 검증해 본 결과 누드 마우스에서 종양발생능이 있어 본 실험에 적용하였다.

본 실험에서 물리적으로 이하선 동위종양은 제작되었으나 조직학적으로 인간 선양낭성암종의 조직학적 특성, 즉 스위스 치즈 모양의 반복적 소낭포강의 형성이라든지 관 구조물의 형성, 전형적인 실질형의 암세포 증식상 등을 확인하기 어려워 세포주의 계대배양 과정에서 선양낭성암종의 암생물학적 특성이 유지되고 있는지가 의심되기도 하였다. 이와 같이 배양 과정에서 변형되었을 가능성이 있는 암세포주(transformed cell line)의 주입을 통해 제작된 실험동물 모델은 인간암의 생물학적 특성을 재현하지 못할 가능성도 있다. 이 같은 한계점을 극복하기 위하여 이종이식을 통한 동물모델 제작 시 고형종양을 분절화하여 종물 전체를 이식하기도 한다³⁰. 이 경우 외과적 절제 표본을 통해 종양의 미세환경을 같이 이식해 준다는 장점이 있으나 이식 성공률이 세포주 이식에 비교하여 떨어지고, 본 연구에서와 같이 마우스의 이하선과 같이 용적이 작은 조직에는 성공적으로 이식하기가 불가능한 경우가 많으며, 이식 후 발생한 종양의 정량적 비교가 어렵다는 문제점이 있다고 생각된다.

암세포 이종이식을 통한 마우스 종양 모델의 제작에 있어 암세포의 수나 농도에 대해서는 제시된 기준은 없다. 물론 세포주의 특성에 따라 다르겠지만 통상적으로 한 부위에 10^6 개의 세포를 이식하는 것이 종양 발생을 위한 적정 세포수로 생각되며, 실험의 목적에 따라 다르겠지만 너무 많은 수의 암세포를 이식할 경우 원발 종양의 부하가 너무 커져 실험동물이 실험기간을 버티지 못한다든지 전이가 발생되지 않는 문제점이 발생할 수 있다. 이러한 점들을 고려하여 본 실험에서 세포수를 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 개로 산정하였다. 이하선 동위종양에서 각 군의 세포수에 따른 종양발생율을 분석해 보면 본 세포주의 이

하선 동위종양 제작을 위한 적정 세포수는 1×10^6 개(3군)과 5×10^6 개(2군) 사이라고 생각되며 이는 이후의 본 종양모델을 이용한 항종양제제의 치료실험이나 생존율 실험의 기준이 될 것이다.

제시된 결과와 같이 본 실험에서의 선양낭성암 세포주는 이하선에서 피하 부위와 비교하여 종양발생율이 더 높다고 여겨 지지는 않는다. 편평상피세포암에 대한 설암종 동위종양 모델 제작에 대한 연구에서는 인간 암세포를 실험동물의, 종양이 기원된 동일한 조직에 이종이식 하였을 경우 피하에 이식한 경우와 비교하여 그 종양발생율이 더 높다는 결과를 제시하였다^{24,31}. 본 연구결과 선양낭성암 세포주가 원발성 부위인 이하선 조직내에서 종양발생율이 피하조직과 유사한 것은 세포주 자체의 요인일 수도 있고, 전술한 바와 같이 이하선의 위치가 혈행이 풍부한 부위가 아닌 피하지방층에 위치한 것이 종양발생에 영향을 미칠 수도 있다고 고찰하였다. 또한 타액선암 동위종양 모델의 경우 부피로 계측된 종양성장의 비교에서 동위종양과 피하종양의 성장속도가 차이를 보이지 않는 점은 주목할 만하다. 즉 이 같은 관찰을 통해 선양낭성암 세포가 종양의 임상적, 암생물학적 특성을 발현하는 요인들에 영향을 미치는 고유한 이하선 조직내의 미세환경에 친화도가 더 있을 수 있다는 가설을³² 검증하고자 하였으나 본 타액선 종양모델에서는 의의가 없는 것으로 판명되었다. 추후 연구를 통하여 타액선 암종에서 악성 표현형에 영향을 미칠 수 있는, 종양세포와 숙주의 발생기관 사이의 상호관계에 관하여 규명하여야 할 것으로 고찰하였다.

동위종양 모델의 가치는 임상적 상황을 재현하는 자발적 전이가 가능하다는 점이며 이를 통해 전이의 분자생물학적 기전을 연구할 수 있으며, 자연스럽게 전이 병소의 치료책을 다각도로 시도해 볼 수 있다. 또한 부가적으로 전이 병소로부터 암세포주를 다시 반복 확립함으로써 전이성이 확립된 세포주를 제작할 수 있다³³⁻³⁵.

본 연구결과에서도 피하종양의 경우 혈관성 폐전이 병소가 발생되지 않았지만 동위종양의 경우 실험대상인 30개체 중 원발성 이하선 종양이 성공적으로 발생한 16개체 중 3개체에서 폐전이 병소가 유도되었다. 이 같은 차이점은 두경부 부위와 피하의 임파계와 혈행이 다르다는 해부학적 요인에 따른 것일 수도 있다. 하지만 대조군 세포주의 경우 경부 임파절 전이가 야기되었으나 선양낭성암 세포주의 경우 경부 임파절 전이 없이 폐전이 병소만이 유도되었다는 점은 주목할만 하다. 부검 시 많은 개체의 동위종양군에서 암세포가 주입된 우측 경부 임파절 1-2개의 크기가 상당히 증가된 소견을 보여 암세포의 임파절 전이를 의심하였다. 그러나 조직학적 검사 결과 경부 임파절의 부종은 암세포의 증식이 아닌 형질세포(plasmacyte), 중성백혈구(neutrophil) 등 면역관련 세포의 유입으로 인한 것으로 판명되었다. 대부분의 두경부암과는 달리 주변 임파절 전이 없이 원격 폐전이가 발생한 것은 선양낭성암종의 임상적 전이 양식이 정확히 실험동물에서 모사된 것이며, 이는 전이 기전의 암생물학적 요인이 크게 작용하였음을 시사한다. 본

실험에서 대조군 피하종양 2군의 한 개체에서 폐전이 병소가 관찰되었는데 이는 전혀 예상치 못했던 결과로 아마도 적용된 세포주의 특성인 악성도에 기인한 것으로 결론지었다.

ACC의 또 다른 특징은 암세포가 신경의 신경주막(perineurium)을 따라 퍼지는 경향이 강하다는 점이다. 일단 신경주막강에 들어간 종양은 신경조직을 따라 먼 거리에까지 이를 수 있어 이로 인하여 종종 국소재발이 야기된다. 이 경우 수술 시 원발 절제부위는 음성절제연을 보이지만 신경의 근위단(proximal) 쪽에 국소재발을 야기시키는 종양이 존재하게 된다. 종양이 삼차신경의 감각신경에 침범했을 경우 동통, 저감각증, 감각이상증의 임상증상을 보이며, 안면신경의 운동신경에 침범했을 경우 전형적으로 안면마비 증상을 나타낸다. 수술 시 신경절제와 함께 술후 방사선 조사로 국소부위 재발을 예방할 수도 있지만 신경조직 병소가 동반된 ACC 환자의 완치 방법은 역시 임상가들에게는 관심의 대상이다. 실제 후향적 연구에서 ACC의 신경 침범은 치료실패의 주 원인으로 보고되었다³⁶. ACC의 신경조직 침범은 임상적으로 인식되었지만 그 분자생물학적 기전은 이해되지 못하고 있다. 이에 저자 등은 임상표본에 대한 분석과 타액선 동위종양 모델의 개발을 통한 연구로 ACC의 신경조직 침투에 대한 세포학적, 분자생물학적 기전을 밝히고자 하였다.

본 실험결과 부검 시의 소견으로는 마우스의 안면신경 가지가 이하선 종물과 유착되어 있다고 볼 수 없었으나 조직학적으로 실험군 세포주의 경우 대조군 세포주와 비교하여 신경조직과 종물과의 관계가 긴밀하게 유지되고 고확대 사진에서 종양세포가 신경조직 쪽으로 유입되어 들어가는 소견을 보였다. 하지만 이 같은 육안적 소견만으로 성공적인 신경침투 동물모델이 확립되었다고 판단하기는 어려우며 추후 종양세포의 신경조직 부착물질의 분비 여부라든지 침투와 관련된 인자들의 발현 여부 등의 분자생물학적 연구가 이루어져야 할 것이다. 이 외에도 실험군 동위종양군의 한 개체에서 실험기간 말기에 뇌조직으로의 침투가 발생되었는데 이는 안면신경로를 통한 종양세포의 파급이라기 보다는 암세포 주입 시 이하선 표면으로의 암세포액 누출을 염려하여 주사침이 너무 깊이 자입되어 이하선 심부의 조직에 종양이 발생되면서 쉽게 뇌강으로 파급된 것으로 여겨진다.

V. 요약 및 결론

결론적으로 본 연구진은 마우스를 통하여 이하선 선양낭성암종의 동위종양 모델을 제작하였고, 동위종양의 성장이나 전이 양상을 고찰하였다. 특히 본 이하선 동위종양 모델은 신경조직 침투 양상은 분명하지 않았으나, 혈관성 폐전이 병소를 성공적으로 유도하였다. 따라서 본 동물모델을 통하여 이하선 선양낭성암종의 발생과 폐전이에 관련된 세포학적, 분자생물학적 기전을 규명할 수 있을 것이며 더 나아가 폐전이 병소의 치료를 위한 실험을 진행할 수 있을 것이다.

Acknowledgement

본 실험이 이루어질수 있도록 세포주를 공여하여 준 Dr. Jeffrey N. Myers (Department of Head and Neck Surgery, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. Houston. Texas. U.S.A.)께 감사의 뜻을 전하는 바이다.

참고문헌

- Stephan Ariyan, Cancer of the head and neck, 1st ed, St. Louis: The C.V. Mosby Co, 1987.
- Spiro RH: Salivary neoplasms, overview of a 35 year experience with 2,807 patients. *Head Neck Surg* 1986;8:177.
- Araujo VC, Loducca SV, Sousa SO, Williams DM, Araujo NS: The cribriform features of adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and inegrin expression. *Ann Diagn Pathol* 2001;5:330.
- Fordice J, Kershaw C, El-Naggar, Goepfert H: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality.? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:149-152.
- Batsakis JG, Luna MA, el-Naggar A: Histopathologic grading of salivary gland neoplasms. III. Adenoid cystic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:1007.
- Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR: Adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer* 1986;57:312.
- Maciejewski A, Szymczyk D, Wierzgonn J: Outcome of surgery for adenoid cystic carcinoma of head and neck region. *J Cranio-maxillofac Surg* 2002;30:59.
- Kawashima M: Chemoradiotherapy for head and neck cancer: current status and perspectives. *Int J Clin Oncol* 2004;9:421.
- Fidler IJ: Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1986;5:29-49.
- Hendrickson EA: The SCID mouse: relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993;143:1511.
- Kubota T: Metastatic models of human cancer xenografted in mice: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 1994; 56:4.
- Khazaie K, Schirrmacher V, Lichtner RB: EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12:255.
- Chang C, Werb Z: The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biol* 2001; 11:S37.
- Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Yang Z, Clayman GL, Hong WK, et al: Suppression of epidermal growth factor receptor, mitogen-activated protein kinase, and Pak1 pathway and invasiveness of human cutaneous squamous cancer cells by the tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Mol Cancer Ther* 2003;2:345.
- Craven RJ, Lightfoot H, Cance WG: A decade of tyrosine kinases: from gene discovery to therapeutics. *Surg Oncol* 2003;12:39.
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W: Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947.
- Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Clein-Szanto A, Litwins S, Herlyn M: Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1999;5:775-782.
- Fu XY, Theodorescu D, Kerbel RS, Hoffman RM: Extensive multi-organ metastasis following orthotopic onplantation of histologically-intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. *Int J Cancer* 1991;49:938.
- Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ: Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metas Rev* 1999;17:279.
- Umeda M, Komatsubara H, Nishimatsu N, Oku N, Shibuya Y, Yokoo S, et al: Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma line of the salivary gland which is serially transplantable and spontaneously metastasises to the lung in nude mice. *Oral Oncol* 2002 38:30-34.
- Kim S, Park YW, Schiff BA, Doan DD, Yazici Y, Jasser SA, et al: An Orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:1713-1721.
- Fidler IJ: Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 1973;242:148-149.
- Myers JN, Holsinger FC, Jasser SA, Bekele BN, Fidler IJ: An orthotopic nude mouse model of oral tongue squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:293-298.
- Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD: Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 2004;64:7977-7984.
- He RG, Zhang XS, Zhou XJ, Wang Z, Zhang XL, Qiu WL: The establishment of human salivary glands (ACC2, ACC3) and a study of morphology. *West Chin J Stomatol* 1988;6:1-4.
- França CM, Jaeger MMM, Jaeger RG, Araújo NS: The role of basement membrane proteins on the expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in an adenoid cystic carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2000;36:248-252.
- Umeda M, Yokoo S, Komori T, Nishimatsu N, Shibuya Y, Fujioka M: Experimental model of invasion and metastasis by orthotopic transplantation of oral squamous and adenoid cystic carcinomas into the tongue of nude mice. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2001;39:376-380.
- Cheng J, Irie T, Munakata R, Kimura S, Nakamura H, He RG, et al: Biosynthesis of basement membrane molecules by salivary adenoid cystic carcinoma cells: an immunofluorescence and confocal microscopic study. *Virchows Arch* 1995;426:577-586.
- An Z, Jiang P, Wang X, Moossa AR, Hoffman RM: Development of a high metastatic orthotopic model of human renal cell carcinoma in nude mice: benefits of fragment implantation compared to cell-suspension injection. *Clin Exp Metastasis* 1999;7:265-270.
- Holsinger FC, Doan DD, Jasser SA, Swan EA, Greenberg JS, Schiff BA, et al: Epidermal growth factor receptor blockade potentiates apoptosis mediated by paclitaxel and leads to prolonged survival in a murine model of oral cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:3183-3189.
- Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D: Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 1994;13:209.
- Dinney CP, Fishbeck R, Singh RK, Eve B, Pathak S, Brown N, et al: Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol* 1995;154:1532-1538.
- Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ: In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1999;1:50-62.
- Lensch R, Gotz C, Andres C, Bex A, Lehmann J, Zwergel T, et al: Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice. *Int J Oncol* 2002;21:695-706.
- Airolidi M, Fornari G, Pedani F, Marchionatti S, Gabriele P, Succo G, et al: Paclitaxel and carboplatin for recurrent salivary gland malignancies. *Anticancer Res* 2000;20:3781.