MTT 법을 이용한 사람 골육종과 상피암 세포주들에 대한 항암제 감수성 검사

全北大學校 齒科大學 口腔顎顔面外科學教室
朴勝五 · 辛曉根 · 金晤煥

CHEMOSENSITIVITY TEST OF HUMAN OSTEOSARCOMA AND EPIDERMOID CARCINOMAS USING MTT ASSAY

Sung-Oh Park, D. D. S., M. S. D., Hyo-Keun Shin, D. D. S., Ph. D.,
Oh Whan-Kim, D. D. S., Ph. D.

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry,
Chonbuk National University

Three anticancer agents which are different in time or dosage dependence as well as in phase specificity, namely mitomycin and adriamycin from natural products, and widely used synthetic drug 5 fluorouracil(5-FU), were evaluated for their chemosensivitity on the five different cancer cell lines-Four epidermoid carcinomas originated from larynx, cervix, skin and gut were used toghether with one osteosarcoma as the target cells of single and combined administration of anticancer drugs.

Semiautomated tetrazolium dye assay(MTT) appears to offer an attractive option for chemosensitivity of the head and neck cancers since it is a simple, valid and inexpensive method of assessing chemosensitivity for large samples in a short time.

The results obtained form this study were as follows.

1. *Good correaltions were obtained with the results of the MTT test and those of ^3H thymidine uptake assay.*
2. *LD_{50} values of HIST and St.Ca. which showed relatively high doubling time on adriamycin were 30 μg/ml and 15 μg/ml while those of HeLa, HEp-2 and KHOS/NP were 2.1 μg/ml, 4.8 μg/ml, and 6.8 μg/ml respectively.*
3. *The LD_{50} value of 5-FU on five cancer cells were very high ranging from 15mg/ml to almost indefinite number, which means 5-FU is very resistant to epidermoid carcinomas or osteosarcoma examined in this study.*
4. *Mitomycin was relatively effective showing 80% cancer killing effect on HeLa, 70% on St. Ca. and 50% on HEp-2 at the high concentrations used.*
5. *Adriamycin was the most effective showing 90% cancer cell killing effect on KHOS/NP, 98% on HeLa, 80% both on HEp-2 and St. Ca. The least susceptible cancer cells toward adriamycin was HIST having only 55% cell killing effect at the high cincentration.*
6. *Combined therapy of adriamycin and 5-FU was more effective than single administration in all the cases examined. Most effective synergism was observed on St. Ca. at the low concentration, showing 21 times higher than each single administration.*

I. 서 론

최근 눈부신 발전으로 암치료 방법중 중요한 자리를 차지하고 있는 화학요법은 많은 개선과 발전에도 불구하고 화학약제의 독성문제는 해결하지 못했고 더욱이 약제독성에 대한 개별 암세포의 감수성 문제 또한 해결해야할 과제로 남아있다[1-10].

서로 형질을 달리하는 변종세포의 집단인 암의 상이성은 다양한 요인에 기인되며 더구나 항시 변경될 수 있는 잠재력을 갖고 있을 뿐 아니라 실제 치료 목적에서 신중히 고려해야 할 사실은 각 암세포는 각종 항암제에 대한 감수성이 각기 다르다는 점이다[11-14]. 그리하여 아직까지도 항암제의 유효율은 대다수의 고형암에서 복합요법에도 불구하고 일반적으로 30~40%에 불과하여 화학요법에 반응하지 않는 환자는 암으로 부터의 고통은 물론 항암제 부작용에 의한 고통도 크게 받게된다. 유효한 항암제에 대한 교차내성도 사용과정 중에 유발될 수 있다는 보고가 있어[16-23] 적절한 항암제 선택을 위한 감수성 검사는 필수적이라 하겠다. 그러나 이들 항암효과를 판정하는 검사법이 다양하므로, 결과 판정에 주관적인 견해가 덜 반영되고 결과의 판정시간이 짧으며 경제적이고 다량의 시료를 동시에 측정할 수 있는 방법을 도입하여 이미 확립된 암세포주들을 대상으로, 어떤 종류의 암에 어떤 항암제가 효과가 있는지를 임상적용에 있어 시험관 내에서 종양세포의 패널을 사용하여 예측하게 한다면 임상적 의의가 큰 기초자료를 제공하게 될 것이다.

본 연구는, 비록 생물학적 특성이 다소 본래의 암조직과는 다를 수 있으나 검사시 정상세포의 오염에 대한 위험이 없고 시험관내에서 생존능이 높으며 실험의 재현성을 쉽게 유지할 수 있는 확립된 암세포주 중 여러장기에서 유래된 상피암 세포주 4가지와 골육종 KHOS/NP을 대상으로 세포주기, 시간, 용량의 의존성이 각각 다르며 자연산물인 mitomycin과 adriamycin 및 합성제제로 널리 오래 쓰여온 5 fluorouracil(5-FU)를 항암제로 선정하여 단독 및 병용요법에 대한 효과를 검사 판정하여 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 항암제

항암제는 mitomycin, adriamycin, 및 5-FU의 주사용 제제를 사용하였다(Table 1). 이들 항암제의 동결 건조형을 실험전 최고 실험농도의 10배 농축용액을 만들어 각각 2mℓ씩 무균적으로 분할하여 −70℃에 보관한 후 실험 직전에 녹여 phosphate buffered saline(PBS)에 각각의 실험 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 악성 종양 세포주 및 세포 배양

본 실험에서는 사람의 골육종 세포주인, KHOS/NP, 사람의 후두기원인 상피암 세포주 HEp-2, 자궁외막 기원인 HeLa, 피부기원인 HIST, 위장기원인 St. Ca을 사용했으며(Table 2) 이들 세포주는 모두 56℃에서 30분동안 열로 불화성화 시킨 fetal bovine serum(FBS)이 함유되고 streptomycin과 penicillin이 각각 100mg/mℓ와 100μl로 함유된 Roswell Park Memorial Institude 1640배양액(RPMI 1640)으로 5% CO_2와 100% 습도가 유지된 37℃의 CO_2배양기

Table 1. Anticancer drugs used and their characteristics

Drugs	Characteristics
5-Fluorouracil	Cell cycle and phase specific(S phase)
	Time dependent synthetic drug
	Cell mediated humoral immunity inhibitor
Mitomycin	Cell cycle and phase specific(G_1)
	Dose dependent natural product
Adriamycin	Anthacycle class antitumor antibiotics
	Non immunosuppresive
	Dose dependent natural product
	Most toxic

Table 2. Caner cell lines used.

ATCC	CRL1544	KHOS / NP	Human Osteosarcoma
ATCC	CCL23	HEp-2	Human Epidermoid Carcinoma, Larynx
ATCC	CCL2	HeLa	Human Epidermoid Carcinoma, cervix
YCI	513	HIST	Human Epidermoid Carcinoma, skin
YCI	521	St.Ca	Human Epidermoid Carcinoma, gut

에서 배양하였다.

3. 세포성장 실험

실험에 사용한 세포는 지수적 성장기에 있는 세포를 사용하였다. 즉, 4×10^6 cells / mℓ을 일정기간 아무 처치없이 동일 조건에서 자라게한 후 2시간 간격으로 200μl씩 취하여 동량의 5% tryphan blue로 잘 섞어 살아있는 세포수를 측정하였다. 이상의 세포생존의 실험은 모두 3개 well의 평균가를 이용하여 평가하였다.

4. 세포생존능의 측정

1) ^{3}H-thymidine 흡수법

배양된 세포주들은 1-10×10^6 cell / mℓ가 되도록 농도를 조절한 다음 96 well microtiter plate에 100 μl씩 채운 후 CO_2 5% 37℃에서 24시간 배양시킨다. 이때 항암제의 효과를 보기 위하여 각 약물을 첨가시킨 후 48시간 동안 배양시키고 배양종료 4시간전에 well당 1μci ^{3}H-thymidine(specific activity : 2.0 ci / n mol New Research product, Dupont, Ma)를 가하여 세포를 glass fiber filter paper(Skatron, Liver, Norway)에 흡착시켜 건조시킨 후 scinitillation tube에 fiber disc를 넣고 5mℓ scinitillation cocktail (New Research product, Dupont)에 용해시켜 liquid scintillation counter로 분영하는 세포의 DNA 합성에 참여한 방사능을 측정하였다[24].

2) MTT assay에 의한 항암제의 항암효과 판정

항암제에서 암세포 성장에 미치는 영향은 MTT 검정법(methylthiazol terazolium bromide)을 이용하여 측정하였다. MTT검정법은 살아있는 세포의 mitochondria에 있는 탈수소효소에 의해 생성된 blue fomazan결정을 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹여서 발색시켜 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

이것은 well당 MTT용액(2mg / ml medium)을 25 μm씩 넣어 37℃, 5% CO_2 항온기에서 2시간 반응시킨 후 배지는 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 well당 100μl씩 넣어 5분간 plate shaker에서 blue formazan 결정을 용해시킨 다음 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\%\ \text{Cytotoxicity} = 1 - \frac{\text{실험군의 흡광도의 평균치}}{\text{대조군의 흡광도의 평균치}} \times 100$$

이며,

LD_{50}값은 50% cytotoxicity를 나타내는 항암제의 용량으로 표시하였다.

III. 실험성적

항암제의 감수성 검사를 할 경우 고농도를 단시간 처리하는 것과 정상농도를 지속적으로 처리하는 방법이 있는데 본 연구에서는 실험상에 오차를 줄일뿐 아니라 가능한 임상조건과 비슷한 조건을 택하기 위하여 임상적용 혈중농도와 그 10배 및 1/10배 희석농도를 지속적으로 적용시키는 방법을 택하였다. 그후 이들을 저농도, 적정농도로, 고농도로 표시하였다.

1. MTT 측정법의 양호성

지금까지 시험관내 항암제 감수성의 결과 판정법으로 DNA 합성능을 직접 측정하는 ^{3}H thymidine DNA uptake법이 가장 정확한 것의 하나로 생각되어 왔으나 고가의 장비가 필요하고 비경제적이며 무엇보다 방사능 오염물질로 인한 폐기처리등의 문제가 대두된 지금 이 방법에 대처할 다른 측정법을 도입하는 것이 시급하다.

Fig. 1은 HEp-2 cell을 대상으로 MTT법을 시행하고 이를 collagenase으로 처리하여 부유시킨 후 ^{3}H thymidine uptake법으로 DNA합성능을 측정한 결과를 비교한 것으로 큰 상관관계가 있었다. 살아있는 세포수를 증가시킴에 따라 흡광도 값의 변화를 살펴본 결과 Fig. 2에서와 같이 세포수의 증가에 따라 흡광도도 증가됨이 관찰되었다.

2. Doubling time

검사시 사용된 세포수 및 항암제 작용시간은 각 세포주의 세포수와 formazan색소 형성관계 및 세포 성장곡선의 결과를 근거로 각 세포주들의 doubling time을 구하여 사용하였는데 세포주들은 10시간대의 비교적 성장이 빠른 것과 30시간대의 느린 것으로 나눌 수 있었고 이 결과는 Fig. 3－8과 Table 3에서 나타난 바와 같이 KHOS / NP 9.5시간, HEp-2 11시간, HeLa 12시간, HIST 32.5시간, St.Ca. 34.5시간이었다.

3. LD_{50}

항암제의 표적 암세포주를 50% 치사시킨 항암제의 용량을 LD_{50}로 표시하였는데 이는 Table 4.와 Fig. 14－16에서 표시한 바와 같이 St.Ca.는 5-FU에 거의 반응하지 않았고($LD_{50} \fallingdotseq \infty$, Fig. 9) 사용한 암세포주 중 가장 효과적이었던 HeLa도 5-FU에 저항성이 있어서 LD_{50}값이 15mg / ml(Fig. 10)로 매우 높았다. 5-FU St.Ca.에는 거의 무한대로서 완전히 반응이 없음을 보여주었으나(Fig. 9) 반면 mitomycin에 대한 St.Ca.의 LD_{50}값은 7.8μg / ml(Fig. 16), St.Ca. 15.0 μg / ml(Fig. 15), HEp-2에 4.8μg / ml(Fig. 13), KHOS / NP가 6.8μg / ml(Fig. 14) 그리고 HeLa가 가장 예민해서 2.1μg / ml이었다(Fig. 9～13).

Table 3. Doubling time of human cancer cells.

Cancer Cells	Hours
KHOS / NP	9.5
HEp-2	11.0
HeLa	12.0
HIST	32.5
St. Ca.	34.50

Table 4. LD_{50} value of adriamycin on cancer cells.

Cancer Cells	LD_{50}(UG / ml)
HeLa	2.1
HEp-2	4.8
KHOS / NP	6.8
St. Ca.	15.0
HIST	30.0

4. 단독요법

항암제들이 각각의 암세포주에 미치는 치사효과를 살펴보면, 가장 오래 사용되어왔고 널리 쓰이는 5-FU는 Fig. 17에서 같이 전체적으로 농도변화에 따른 항암효과에서 크게 다르지 않았고 이는 시간 의존성인 5-FU로서는 당연한 결과인 것으로 본 실험에서도 나타났다. 암세포주 별로 보면 HEp-2는 혈중농도나 그 1 / 10과 10배 농도의 5-FU에 모두 30～35 %의 세포독성을 보였고 KHOD / NP는 10～20%, St.Ca.는 거의 효과가 없어서 모든 농도에서 5% 미만이었으며 HeLa의 경우는 12.5μg / ml에서는 5% 였으나 그 10배 농도에서는 32%로 세포독성이 증가되었고 100배 농도에서도 같이 효과를 보였다.

자연산물로서 G_1 phase에 특이성있는 mitomycin은 DNA와 결합하여 RNA합성을 저해하는 항암제인데 단독 투여만으로는 별로 효과가 없는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 18). KHOS / NP, HEp-2, HIST에서 혈중농도와 저농도, 고농도 모두에서 50% 미만의 세포독성을 나타내었고 특히 KHOS / NP의 경우 20 % 미만으로 효과가 없는 것이 나타났고 가장 예민한 HeLa조차도 저농도에서 10%였던 것이 혈중농도에서 30% 세포독성 효과를 보였고 고농도에서도 80% 정도 밖에 독성효과가 없었다(Fig. 18). 단독투여로 가장 큰 효과를 보인 adriamycin의 경우 Fig. 19에 표시한 바와 같이 HIST를 제외한 모든 암세포주에 대하여 혈중농도에서 80% 이상의 세포독성 효과를 가져왔는데 이를 adriamycin 농도별로 살펴보면 저농도, 혈중농도, 고농도 각각에서 HEp-2는 20%, 50 %, 80%의 세포독성 효과를 가져온 반면 St.Ca.는 2%, 18%, 80%였으며 골육종 세포주인 KHOS / NP는 2%, 30%, 50%였으며 가장 효과가 적었던 HIST에서는 2%, 30%, 50%였고, 가장 효과가 있었던 것으로 나타난 HeLa에서는 35%, 90%, 98%의 암세포 치사효과를 나타내서 HeLa에 좋은 항암제임을 알 수 있었다.

5. 병용요법

Fig. 20은 adriamycin과 5-FU의 병용효과를 본 것으로서 가장 효과가 적은 KHOS / NP는 고농도에서도 55%의 치사율을 보였고 HIST는 60%, St.Ca.는 75%였으며 후두 상피암 세포주인 HEp-2의 경우 저농도에서는 5%였으나 혈중농도에서 53% 그리고

고농도에서도 83% 암세포 치사율을 보였으며 가장 효과가 있었던 HeLa의 경우 농도 증가에 따라 10%, 60%, 100% 암세포 치사율을 나타냈다.

Fig. 21은 HIST에 대한 adriamycin과 5-FU의 단독 및 병용 효과를 농도별로 비교한 것으로서 모든 농도에서 병용요법이 단독 사용시보다 효과가 좋았음을 보여주었고 KHOS/NP의 경우 Fig. 22에서 표시한 바와 같이 병용요법이 adriamycin 단독 사용시보다 오히려 효과가 적어 이는 KHOS/NP가 adriamycin에 특히 예민한 세포주임을 알 수 있었고, 병용요법시 단독 사용시보다 오히려 효과가 없었던 것은 병용효과를 볼 때는 각각의 항암제 농도를 단독시의 1/2로 사용했기 때문에 이 세포주에 예민한 adriamycin의 용량이 단독시보다 1/2로 감소되었기 때문이라 생각한다.

Fig. 23에서 보여준 St.Ca.의 경우 대체로 병용요법이 단독 사용시 보다는 효과적이었지만 저농도에서는 adriamycin, 5-FU의 단독 사용시는 거의 효과가 없다가 병용투여로 42%까지 암세포 독성효과가 증가된 것은 병용요법시 좋은 상승효과를 보였음을 시사한다.

Fig. 24에서 나타난 HEp-2의 경우 병용투여는 저농도를 제외한 모든 경우 단독투여보다 효과적이었으며 5-FU의 농도에 따른 암세포치사율을 보이지 않았고 그 효과도 30%선에 머물러 있었으나 adriamycin은 농도에 따른 암세포 치사율이 20%, 50%, 85%로 증가 되었음을 알 수 있었다.

HeLa의 경우 Fig. 25에 나타난 바와 같이 병용요법이 저농도에서 10%였으나 혈중농도에서는 60%, 고농도에서는 거의 100%의 항암효과를 보여 HeLa에 매우 예민한 것을 나타냈다. Adriamycin은 단독 투여가 HeLa에 예민했던 것을 감안할 때 5-FU와의 병용투여시 adriamycin의 양이 1/2로 줄어서 세포독성을 감소시킨 점을 감안하면 HeLa의 adriamycin과 5-FU는 좋은 효과를 가져왔음을 볼 수 있었다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

악성 종양세포의 생존과 그 생존율에 미치는 항암제 감수성 검사방법으로는 항암제 효과에 의한 형태학적 변화를 관찰하는 법과 색소배제법, 종양세포의 집락분석 및 방사능 측정법과 종양세포내 대사변화율을 측정하는 법등이 있는데 지금까지는 ^{3}H Thymidine이 DNA에 전입되는 방사능 양을 측정하므로써 DNA합성능을 직접적으로 비교해 본 H^3 Thymidine uptake법[32-37]이 가장 정확한 것으로 생각되었으나 이는 고가의 장비가 필요하고 비경제적이며 특히 방사능 물질의 요염으로 인한 환경저해 문제 때문에 이를 대치할 다른 실험적 방법이 있다면 두경부종양 치료를 위한 항암제 선택시 사전 항암제 감수성검사의 실시용으로 유효하게 쓰일 것이다.

Fig. 1에서 보여준 바와 같이 MTT assay는 ^{3}H Thymidine uptake법과 강한 양의 상관관계를 가지고

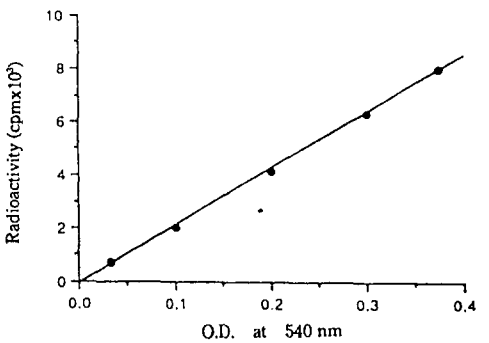

Fig. 1. Correlation between the optical density value measured by MTT assay and the radioactivity expressed by count per minute of ^{3}H thymidine uptake in HEp-2 cells.

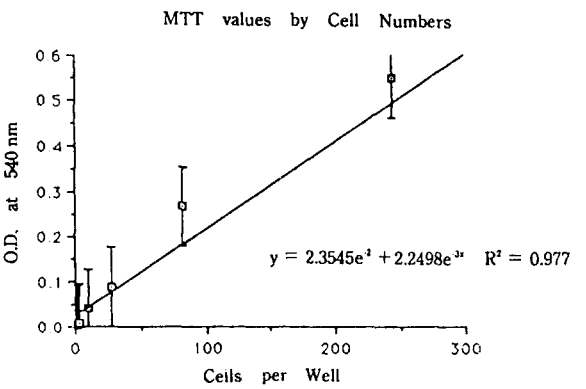

Fig. 2. Optical density measured by MTT assay is proportional to the number of the cancer cells used.

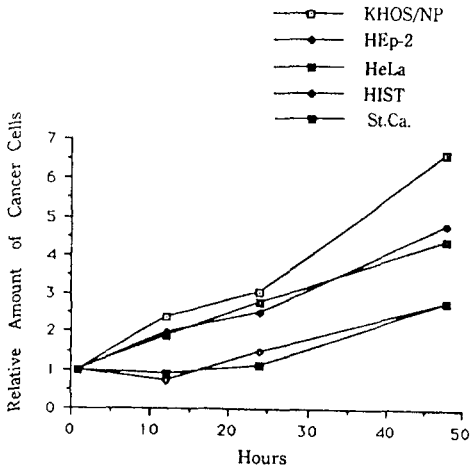

Fig. 3. Doubling time of all the cancer as expressed by the relative amount of cancer cells.

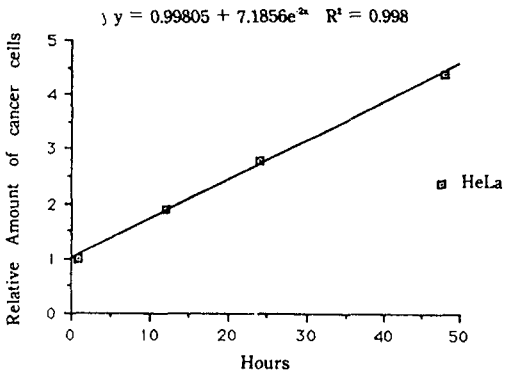

Fig. 6. Doubling time of HeLa expressed by the relative amount of cancer cell numbers.

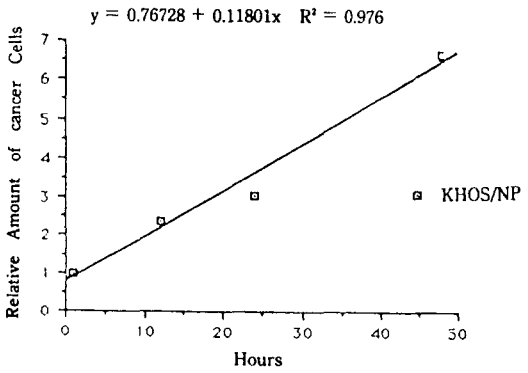

Fig. 4. Doubling time of KHOS / NP expressed by the relative amount of cancer cell numbers.

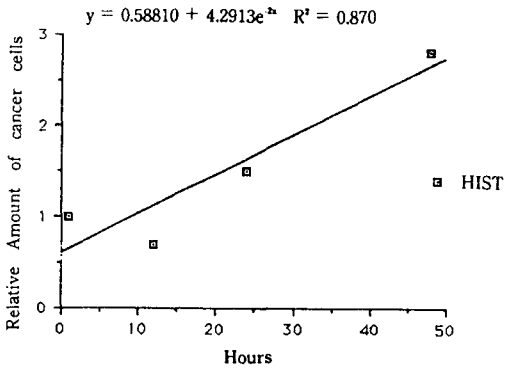

Fig. 7. Doubling time of HIST expressed by the relative amount of cancer cell numbers.

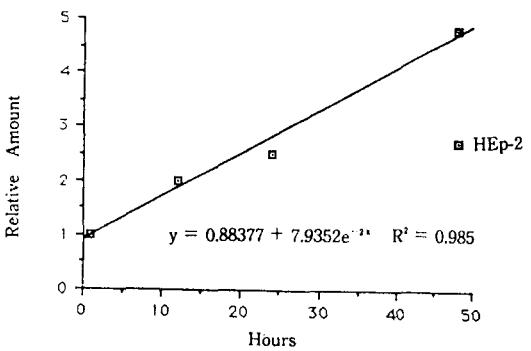

Fig. 5. Doubling time of HEp-2 expressed by the relative amount of cancer cell numbers.

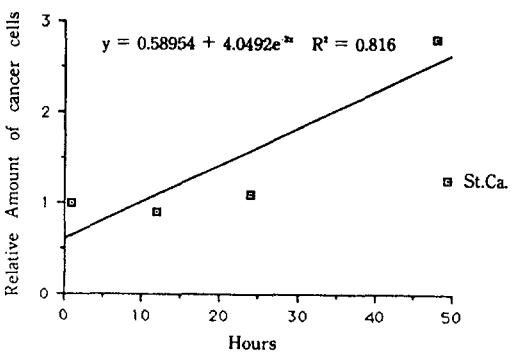

Fig. 8. Doubling time of St.Ca. expressed by the relative amount of cancer cell numbers.

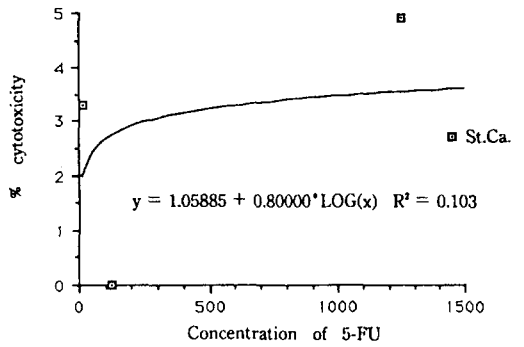

Fig. 9. LD_{50} value of 5-FU on St.Ca. cancer cells.

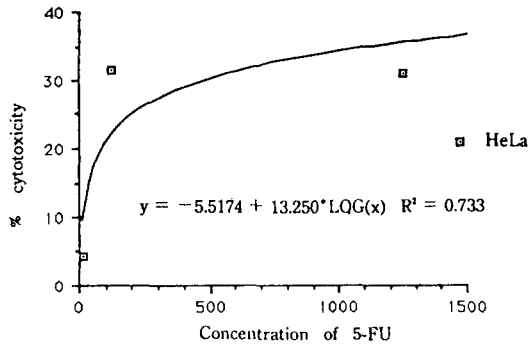

Fig. 10. LD_{50} value of 5-FU on HeLa cancer cells.

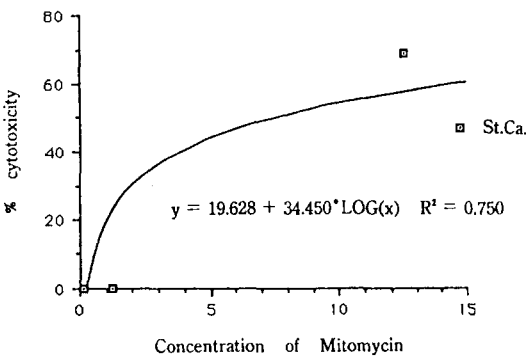

Fig. 11. LD_{50} value of mitomycine on St.Ca. cancer cells.

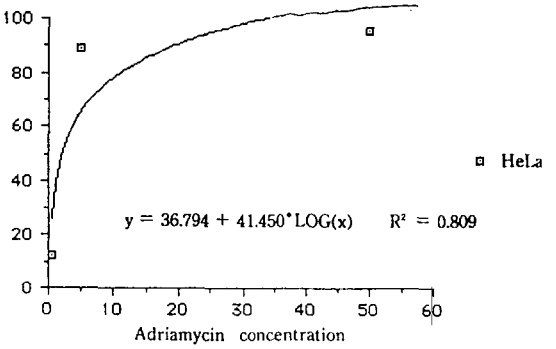

Fig. 12. LD_{50} value of adriamycin on HeLa cancer cells.

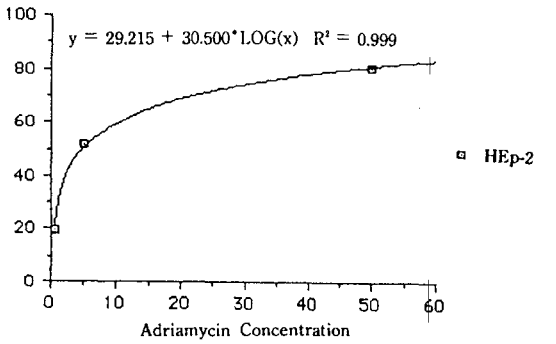

Fig. 13. LD_{50} value of adriamycin on HEp-2 cancer cells.

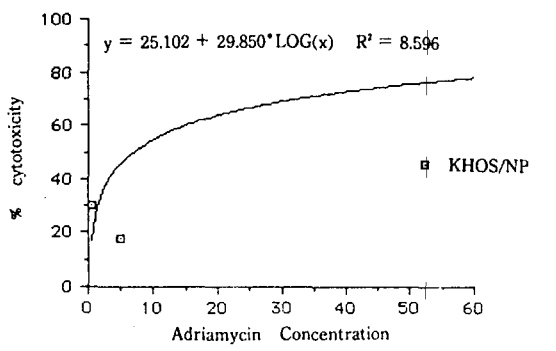

Fig. 14. LD_{50} value of adriamycin on KHOS / NP cancer cells.

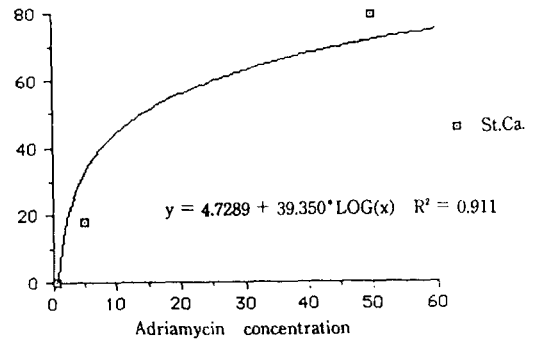

Fig. 15. LD_{50} value of adriamycin on St.Ca. cancer cells.

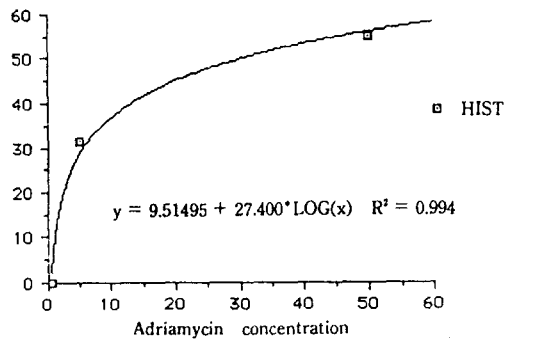

Fig. 16. LD_{50} value of adriamycin on HIST cancer cells.

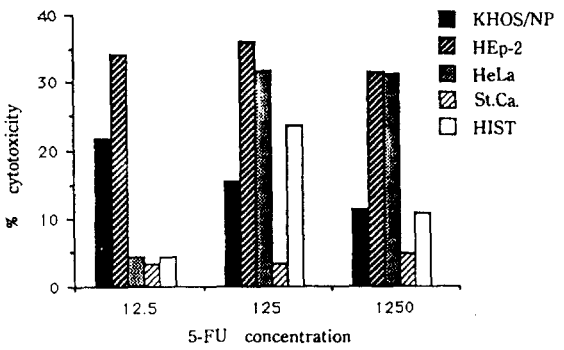

Fig. 17. % Cytotoxicity of 5-FU on the five different cancer cell lines used in this study.

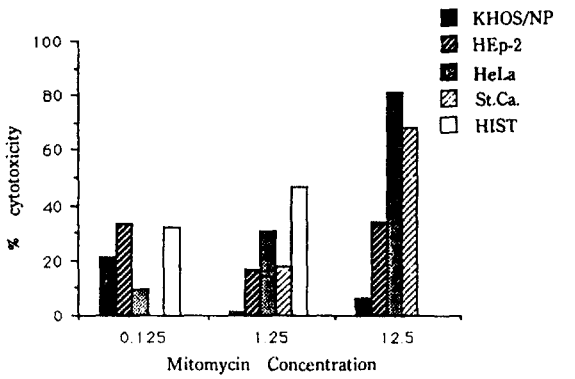

Fig. 18. % Cytotoxicity of mitomycin of the five different cancer cells used in this study.

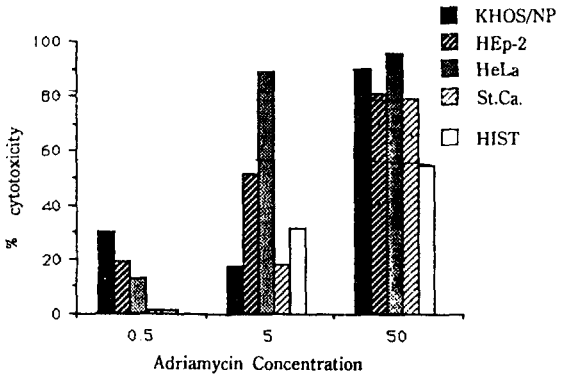

Fig. 19. % Cytotoxicity of adriamycin of the five different cancer cells used in this study.

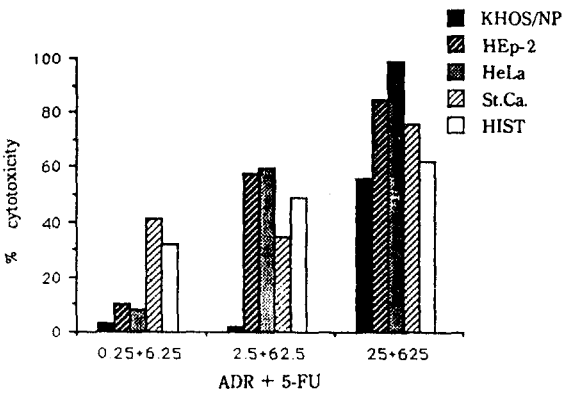

Fig. 20. % Cytotoxicity of adriamycin and 5-FU on the five different cancer cells used in this study.

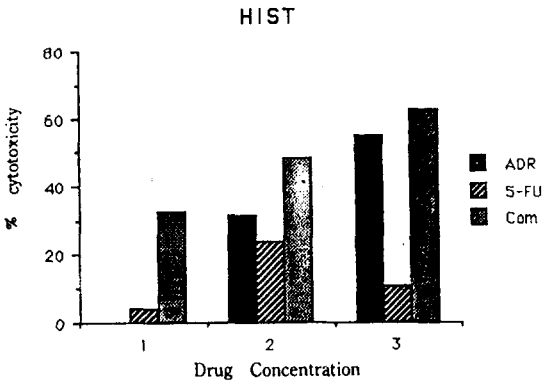

Fig. 21. The effect of single and combination therapy of 5-FU and adriamycin on HIST.

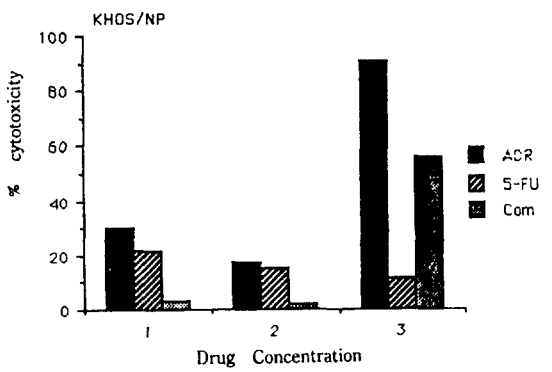

Fig. 22. The effect of single and combination therapy of 5-FU and adriamycin on KHOS /NP.

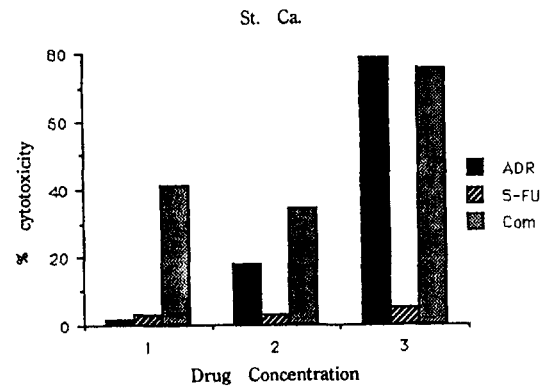

Fig. 23. The effect of single and combination therapy of 5-FU and adriamycin on St. Ca.

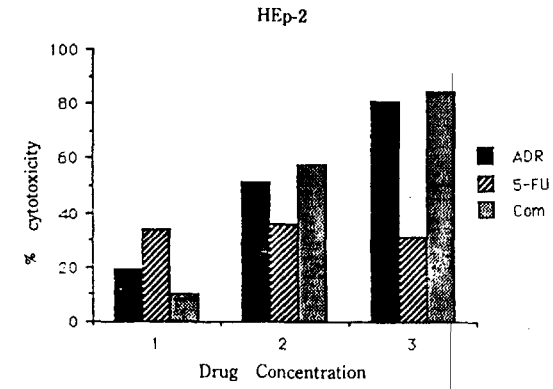

Fig. 24. The effect of single and combination therapy of 5-FU and adriamycin on HEp-2.

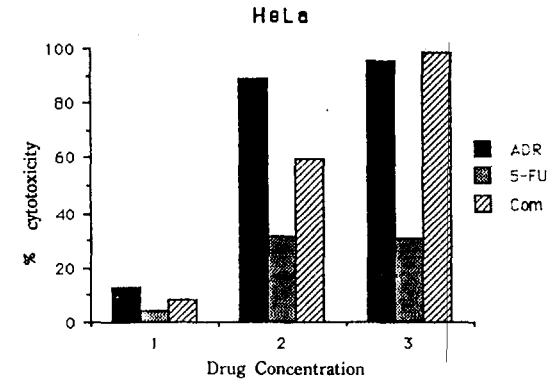

Fig. 25. The effect of single and combination therapy of 5-FU and adriamycin on HeLa.

있음이 관찰되었으므로 이 후 방사능 오염의 우려가 없고 경제적이며 다량의 시료를 단시일에 간단히 측정할 수 있는 MTT법을 여러 항암요법제의 효과 판정을 위한 악성종양세포 생존능 검사에 이용하므로써 기존 항암제 선택 방법이었던 경험과 병리조직학적 소견에 의한 판정등에서 벗어나 환자 개인이 갖는 세포적 특성을 고려한 후 각 환자에 특이성있는 항암제를 선택할 수 있다면 화학요법에 큰 발전을 가져오게 될 것이다[38-41].

유효한 약제를 선택할 때는 환자의 암조직에서 직접 암세포를 분리하여 감수성검사를 함으로써 항암화학요법 시작 전에 실험실에서 감수성 검사를 해보아 유효약제를 미리 알 수 있다면 암치료율을 극대화 시키고 부작용을 극소화시킬 수 있을 것이며

치료결과를 다소 미리 예측할 수 있는데 큰 의의가 있을 것이다. 그러나 이 방법은 암세포 분리시 정상세포의 혼합을 제거하는 기술적 방법의 제한과 가장 적절한 배양조건을 찾는 일도 어려워 배양조건에 따른 결과 차이등이 우려되며 환자에서 생검으로 얻은 조직으로 부터 분리된 제한된 암세포로 좋은 결과를 얻기 위해서는 사전에 확립된 암세포주를 이용한 감수성검사에 대한 기초자료를 충분히 갖는 일이 필요할 것이다[38-41].

확립된 암세포주를 이용하는 방법은 비록 생물학적 성상이 그 종류의 종양의 성질을 그대로 대변할 수 없다고 하더라도 검사시 정상세포의 오염이 없다는 장점과 시험관내에서 높은 생존도를 유지할 수 있어 비용과 시간이 적게들며 실험의 재현성이 높아 항암제 선별 및 유효약제 선택의 기초연구에 널리 사용되기 때문이다[42].

본 연구는 골육종 세포주나 여러 장기에서 유래된 상피암세포주달을 대상으로 그들의 본 실험실 조건에서의 생존능을 쉽게 파악하기 위하여 먼저 doubling time을 구해 보았는데 10시간대의 빨리 자라나는 세가지 암세포주로 30시간대로 비교적 늦게 자라는 암세포주가 대별됨을 보였다.

항암제로서는 자연산물에서 고른 두가지와 가장 널리 오래 쓰여온 합성제제인 5-FU를 사용하였고 이를 고른 이유는 세포주기에 특이성있는 G_1 phase에 특이한 mitomycin과 S phase에 특이한 5-FU, phase에 비특이적이며 최근 가장 효과가 큰 것으로 알려진 adriamycin을 사용하였고 5-FU는 시간의존성이며 adriamycin과 mitomycin을 용량의존성의 특성등이 있어 여러 특성을 고려하여 가장 특이한 배합이라고 생각되는 세가지를 선택하여 각각에 대한 단독 및 병용투여 효과를 관찰하였다.

먼저 이들 골육종 및 상피암 세포주들에 대한 이들 항암제들의 LD_{50}값을 구하여 쓴 바 이들 LD_{50}값이 St.Ca.에서 5-FU에(Fig. 14) 반응이 없음을 알았고 HeLa에는 15588μg/ml로 나타나서 5-FU는 이들 세포주에 매우 큰 저항성이 있어 유효한 약제가 아님을 알았다. 사용한 모든 암세포에 가장 예민한 것으로 나타난 항암제는 adriamycin이었고 그 값은 HeLa에 2.1, St.Ca. HEp-2에 4.5, KHOS/ NP에는 6.8, St.Ca.에 15, 그리고 HIST에서 30μg/ml에 빨리 자라는 암세포주에 LD_{50} 7μg/ml 미만으로써 빨리 자라는 암세포주 일수록 adriamycin에 예민한 것을 알 수 있었고 반면 30시간대에 doubling time을 갖고 있는 HIST와 St.Ca.의 LD_{50}의 값은 커서 성장이 느릴수록 adriamycin에 덜 예민한 것을 알 수 있었다.

단독으로 사용한 항암요법제의 경우 5-FU은 HeLa을 제외한 모든 암세포주에서 30%미만의 세포독성 효과를 나타내어 본 연구에서 살펴본 바로는 유효한 약제가 아님을 알 수 있었고 가장 효과가 좋은 것으로 나타난 HeLa에서도 저농도, 혈중농도, 고농도에서 골육종 및 상피암 세포들에게 모두 30~35%의 세포독성을 나타냈을 뿐이다. 농도에 따른 항암효과의 증가가 없는 것은 5-FU가 시간 의존성 항암제이므로 사용된 농도보다는 시간에 더 예민함을 나타낸 자료가 되었으며 본 연구에서는 혈중 정상농도를 24시간 처리했으므로 작용시간이 짧아 약제효과가 감소되어 나타난 실험 착오도 아님을 알 수 있었다(Fig. 17). adriamycin과 mitomycin의 경우에는 농도 증가에 따른 항암효과의 증가가 확실히 관찰되었고 mitomycin에서 가장 효과가 있었던 HeLa가 농도 증가에 따라 10%, 30%, 80%의 암세포 독성효과를 가져온 데 비하여(Fig. 18) adriamycin의 경우에는 15%, 50%, 97%로 adriamycin이 훨씬 더 효과가 큰 항암요법제 임을 알 수 있었고 이러한 현상은 사용한 모든 세포주에서도 관찰되었고 adriamycin에 대한 반응효과는 고농도에서 HEp-2, 및 St. Ca.가 80% 정도, KHOS/NP가 90%였고 가장 효과가 적은 것으로 나타난 HIST에서는 55%였다. 따라서 사용한 모든 암세포주에서 단독 투여시는 adriamycin이 가장 좋은 암세포 치사효과를 나타낼 수 있음을 알았다.

단독요법 보다는 병용투여시 세포독성효과가 8~66%까지 증가되고 적정 생존기간도 6~12개월로 증가됨이 보고되어 있으므로 본 실험실 내에서의 직접적인 암세포에 대한 작용의 효과를 관찰해 본바 5-FU와 adriamycin 병용투여의 전체적인 양상이 Fig. 20에 표시된 바와 같이 저농도, 정상혈중농도, 고농도로 증가됨에 따라 후두상피암 세포주인 HEp-2는 10%, 58%, 83%로 암세포 독성효과가 증가되었고 HeLa에서는 10%, 60%, 98%로 증가되었고, HIST에서도 30%, 50%, 60%의 독성효과가 나타내었다.

병용요법시 단독 투여시보다 가장 효과가 양호한 것으로 나타난 HEp-2의 경우도 Fig. 24에서 살펴보면 adriamycin 단독 투여시 농도 증가에 따라 20%, 50%, 80%였었고 5-FU는 농도 의존이 아니고 시간 의존형 항암제이므로 모든 농도에서 30~35% 정도 밖에 암세포 치사효과가 없었지만 병용투여로 그 효과도 혈중농도에서 60%였고 10배인 고농도에서 87%로 증가되었을 뿐 아니라 병용투여시에는 단독 투여시보다 항암제 용량이 각각 1/2로 감소시킨 점을 감안할 때 암세포 치사작용이 큰 만큼 정상세포에 대한 독성도 커서 부작용이 많은 adriamycin의 양을 절반으로 감소시켰음에도 항암효과는 adriamycin 단독 투여시 보다 증가되었다는 장점이 있음을 알 수 있었다.

이런 양상은 HIST, HeLa, St.Ca.에서도 비슷하게 관찰되었고 특히 Fig. 23의 St.Ca.에서 저농도일때 병용효과의 현저한 상승효과가 관찰되어 비록 절대적인 효과는 낮다 하더라도 adriamycin이나 5-FU 단독 사용시에는 각각 2% 미만이었던 독성효과가 병용투여로 20배 이상인 40% 증가됨이 관찰된 점은 재미있는 현상이었다.

이상의 결과들로 병용요법은 단독요법보다 본 연구에 사용된 사람 상피암과 골육종등 5가지 모두에서 그 효과가 증가되었고 그 양상은 암세포주에 따라 다소 달랐음을 알 수 있어서 환자에서 직접 채취된 암세포에 대한 감수성 검사의 필요성을 절실하게 하였다.

V. 결론

후두 및 여러 장기에서 유래된 상피암 세포주 4가지와 골육종 세포주인 KHOS/NP를 대상으로 하고 항암제로는 농도와 시간의 의존성 및 세포주기의 특성이 다를 뿐 아니라 자연산물과 합성제제로 그 성질이 다른 항암제 세가지를 골라 이들의 단독 및 병용투여시 암세포 독성효과를 관찰하였다.

특히 본 연구에서는 앞으로의 구강 악안면 분야의 암세포 연구와 항암 화학요법제의 선별 및 BRM 효과 판정등 여러 암연구에 객관적이며 간편한 측정 방법을 제시하고자 방사성 동위 원소를 이용하여 암세포의 DNA합성을 측정하는 ^{3}H Thymidine법과 생존세포의 효소활성을 측정하므로서 항암제 투여로 인한 암세포 치사효과를 쉽게 판정할 수 있는 MTT법을 비교 관찰함으로써 단시간내 다량의 시료를 간편하고 반자동화된 객관적 방법으로 판정할 수 있는 경제적인 검사법을 제시하였다.

본 연구의 결론은 다음과 같다.

1. MTT법은 사용된 암세포수에 비례하여 그 흡광도의 값이 유의성이 있게 증가될 뿐 아니라 ^{3}H thymidine uptake법과 큰 상관관계가 있었다.
2. 본 연구에 사용한 암세포주중 doubling time이 30시간대로 비교적 긴 HIST와 St.Ca.의 adriamycin에 대한 LD_{50}의 값은 30μg/ml 및 15μg/ml로 그 값이 높은 반면 doubling time이 10시간대로 짧았던 세가지 암세포주의 LD_{50}값은 적어서 HeLa에서는 2.1μg/ml, HEp-2에서는 4.8μg/ml, KHOS/NP에서는 6.8μg/ml로 나타났다.
3. 항암제에 대한 각종 상피암 세포주와 골육종 세포주의 LD_{50}값은 각각 달라 5-FU가 St.Ca.에는 전혀 반응이 없었으며 HeLa에서는 15488μg/ml로 높은 반면 mitomycin은 St.Ca.에 7.6μg/ml로 나타났고 5-FU는 사용한 모든 세포주에 큰 저항성을 보여 거의 작용하지 않았으며 그 중 가장 효과가 있었던 HEp-2와 HeLa에서도 30~35%의 감수성을 보였을 뿐이었다.
4. Mitomycin은 고농도 사용시 HeLa에서도 80%, St.Ca.에서 70%로 비교적 효과가 있었으나 HEp-2에서는 50%였고 KHOS/NP에서는 거의 효과가 없었으며 HIST에서는 혈중농도에서 50%의 항암효과를 보였다.
5. 단독투여시 전반적으로 adriamycin의 효과가 가장 좋아서 고농도 사용시 KHOS/NP는 90%, HeLa는 98%, HEp-2와 St.Ca.는 80%의 암치사율을 보였으며 가장 효과가 낮았던 HIST의 경우도 55%의 세포독성이 있었다.
6. Adriamycin과 5-FU 병용요법은 단독투여시 보다 전반적으로 효과가 좋아 고농도에서 KHOS/NP에 50%, HEp-2에 82%, HeLa에서는 100%, St.Ca.에서 75%였고 HIST에서는 60%이었다. 병용요법이 특히 효과적이었던 경우는 저농도 때의 St.Ca.에 대한 것으로서 단독 투여시 2%미만이였던 암세포 치사율이 병용요법시 21배나 그 효과가 증가되는 상승효과를 보였다.

참고문헌

1. Fisher B : Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. Cancer 54 : 2609, 1984.
2. Kim SH : Clinical comparison with drug sensitivities by the human tumor clonogenic assay. J. Kor. Cancer Assoc. 21 : 11, 1989.
3. Park CG, Lim DK, Kook YH, Cha CR, & Paik CG : In vitro chemosensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines. J. Kor. Cancer Assoc. 22 : 61, 1990.
4. Willson JKV, Bittner GN, Oberley TD, Meisner LF, & Weese JL : Cell culture of human colon adenomas and carcinomas. Cancer Res. 47 : 2704, 1987.
5. Teicher BA, Holden SA, Kelly MJ, Shea TC, Cucchi CA, Rosowsky A, characterization of human squamouns carcinoma cell line resistent to cis-diamminedichloroplatinum(II). Cancer Res. 47 : 388, 1987.
6. Lee NK : The response of human bladder cancer cell line to cytotoxic drugA comparison of colony formation assay and isotope uptake assay. JKMA. 31 : 435, 1988.
7. Hongo T, Fujii Y, & Igarashi : An In vitro chemosensitivity test for the screening anti-cancer drug in childhood leukemia. Cancer 65 : 1263, 1990.
8. 이창혁, 이봉기, 이원형, 김주덕 : 시험관 및 생체내 암세포(S-180YS)의 adriamycin에 대한 내성세포의 염색체 분포특성. 연세의대 논문집. 16 : 180, 1983.
9. 공경덕, 이상욱, 한병훈, 서승연, 구자영, 허만하, 박병채 : 진행성 위암에 대한 5-FU, Adriamycin 및 Cisplatin(FAC) 병용화학요법의 치료효과. 대한암학회지. 22 : 144, 1990.
10. Goodman GE, Yen YP, Cox TC, & Crowley J : Effect of verapamil on in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. Cancer Res. 47 : 2295, 1987.
11. 이경영, 박재갑, 아디 가즈다, 로리골드스타인, 황이숙, 김진복 : 인체암세포주의 MDRI 유전자 발현도와 항암제 감수성에 관한 연구. 대한암학회. 22 : 37, 1990.
12. 고은희, 심우남, 이원형, 고윤웅, 박용준, 김주항, 노재경, 김병수 : 암세포의 항암제 감수성 검정에 있어서 누드 마우스의 효용. 연세의대 논문집. 20 : 15, 1987.
13. Weisenthal LM, Lippman ME, Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays Lanur. Treat. Rep. 6 : 616-631, 1985.
14. Roper PR, Drewinko B : Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. Cancer Res. 36 : 2182, 1976.
15. 유윤용, 이진호 : 5-fluorouracil-cisplatin(FP) 병용화학여법제의 liposomes 이용의 실험연구(II). 대한암학회. 20 : 53, 1988.
16. Sariben E, Kohn KW, Zlotogorski C, Laurent G, D'Incalci M, Day III R, Smith BH, Kornblith PL, & Erickson LC : DNA cross-linking response of human malignant glioma cell strains to chloroethylnitrosoureas, cisplatin, and diaziquone. Cancer Res. 47 : 3988, 1987.
17. 사람종양세포주에 대한 rHu-αA의 시험관내 및 생체내 항암효과. 대한면역학회지. 9 : 259, 1987.
18. Kirkpatrick DL, Duke M, & Goh TS : Chemosentivity testing of fresh human leukeima cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye(MTT) assay. Leuk. Res. 14 : 459, 1990.
19. Mickish G, Fajta S, Keihauer G, Schlick E, Tschada R, & Alken P : Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay(MTT). Urol. Res. 18 : 131, 1990.
20. Maehara Y, Kohnos S, Emi Y, Sakaguchi Y, & Sugimachi K : In vitro chemosensitivity test-succinate dehydrogenase inhibition(SDI) test. Rinsho. Byori. 38 : 14, 1990.
21. Hongo T, Fujii Y, & Igarashi Y : An in vitro chemosensitivity test for the screening of anticancer drug in childhood leukemia. Cancer. 65 : 1283, 1990.

22. Park JG, Kramer BS, Lai SL, Goldstein LJ, & Gazdar AF : Chemosensitivity patterns and expression of human multidrug resistance-associated MDRI gene by human gastric and colorectal carcinoma cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 82 : 193, 1990.
23. Young WK : In vitro chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. Neurosurg. Rev. 12 : 197, 1989.
24. Elprana D, Schwachofer J, Kuijpers W, Van Den Broek P, & Wagemer DJ : Cytotoxic drug sensitivity of squamous cells carcinoma as predicted by an in vitro testing model. Anticancer Res. 9 : 1089, 1989.
25. Colony Assay in predicting chemotherapectic drug response in murine bladder cancer. Cancer 1983. 52 : 619−625.
26. Sato A, Kubota T, Shimoyama Y, Ishibiki K, & Abo O : MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy. J. Surg. Oncol. 42 : 28, 1989.
27. Sargent JM, & Taylor CG : Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia. Br. J. Cancer. 60 : 206, 1989.
28. Ford CH, Richardson VJ, & Tsaltas G : Comparison of tetrazolium colorimetic and ^{3}H-uridine assay for in vitro chemosensitivity testing. Cancer Chemother. Pharmacol. 24 : 295, 1989.
29. Coley HM, Twentyman PR,* Workman P : Identification of anthracyclin in multidrug-resistant cell lines, and further resistance modification by verapamoil and cyclosporin A. Cancer Chemother. Pharmcol. 24 : 284, 1989.
30. Hida T, Ueda R, Takahashi T, Watanabe H, Kato T, Suyama M, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T : Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a new developed 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) hybrid assay. Cancer Res. 49 : 4785, 1989.
31. Plumb JA, Milroy R, & Kaye SB : Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-demethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a nobel tetrazolium-based assay. Cancer Res. 49 : 4435, 1985.
32. Friedman HM, & Glaubiger DL : Assessment of in vitro drug sensitivity of human tumor cells using ^{3}H thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. Cancer Res. 42 : 4663, 1982.
33. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, & Mitchell JB : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of radiosensitivity. Cander Res. 47 : 943, 1987.
34. Albert DS, & Chen HSG : Tubular summary of pharmacokinetic parameters relavant to in vitro drug assay in S. E. Salmon(ed), cloning of human tumor stem cells. P. 355−359, New York, Alan R. Liss. Inc. 1980.
35. Durkin WJ, Chanta Vk & Balch CM : A methodological approach to the prediction of anticancer drug effect in humans. Cancer Res. 39 : 402, 1979.
36. Hansen MB, Nielsen SE, & Berg K : Reexamination and further development of a precise and rapid method for measuring cell growth / cell kill. J Immunol Methods. 119 : 203, 1989.
37. Hamburger AW : Used of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. J Natl Cancer Inst. 66 : 981, 1981.
38. Hanauske AR, Hanauski U, & Von Hoff DD : The human tumor cloning assay in cancer research and therapy. Current problem in cancer. 12 : 4, 1985.
39. Heppner GH, Dexter DL, & DeNucci T : Heterogeneic in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of single mammary tumor. Cancer Res. 38 : 3758, 1978.
40. Park Ch, Savin MA, & Hoogstraten B : Improved growth of in vitro colonies in human acute leukemia with feeding culture method. Cancer

Res. 37 : 4595, 1977.

41. Salmon SE, Hamburger AW, & Soehnlen B : Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer druge. New Engl. J. Med. 198 : 1321, 1978.

42. Tveit KM, Phil A, Do cell lines in vitro reflect properties of the tumors of origin ? A study of lines derived from human melanoma tenografts. Br. J. Caner. 1981, 44 : 775－785.