

두경부악성종양세포주의 항암제감수성시험에 관한 실험적 연구

전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

진 우 정

CHEMOSENSITIVITY OF CANCER CELLS TO ANTICANCER DRUGS USING DYE EXCLUSION ASSAY, [3H] THYMIDINE INCORPORATION, AND CLONOGENIC ASSAY

Woo-Jeong, Jin D. D. S., M. S., Ph. D.

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

The in vitro predictive tests in cancer chemotherapy of cancer cell lines to anticancer drugs were determined using novel dye exclusion assay [NDEA], [3H] thymidine incorporation, and clonogenic assay [CA]. Antitumor effect of Bleomycin, Cis-platin, Vinblastine, Methotrexate to HEp-2, B16 cell lines using rapid assays was compared with [CA] in this study.

In dye exclusion assay of B 16 cell line, cancer cells were sensitive to Bleomycin at all concentrations, to Vinblastine at the level of peak plasma concentration [PPC], $\times 1/10$ [PPC] ($P < 0.05$). And Bleomycin revealed relatively good cytotoxicity than that of CDDP and vinblastine at $\times 10$ [PPC], ($P < 0.05$).

HEp-2 cells were resistive to methotrexate at the level of $\times 100$ [PPC] ($P < 0.05$)

In [3H] thymidine incorporation assay, B 16 cells were sensitive to Bleomycin, CDDP, Vinblastine at the level of [PPC], $\times 10$ [PPC] ($P < 0.01$).

Dose-dependent drugs of bleomycin, CDDP were more sensitive than Vinblastine at high concentration ($P < 0.05$).

In clonogenic assay, HEp-2 cell line was sensitive to three drugs of all concentrations except $\times 1/10$ [PPC] of CDDP. B 16 cell line was sensitive to all drugs ($P < 0.01$).

In comparison of chemosensitivity tests among three assays, the results were correlated ($\gamma = 0.99$, $P < 0.05$).

* 이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학육성)과제
학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

암의 치료에 있어 화학요법을 포함하는 병용요법이 선호되고 화학요법 또한 보조적 개념에서 적극적인 치료 개념으로 변화를 보이고 있어 효과적인 항암제를 선택하기 위한 항암제 감수성시험의 분석법¹⁻⁵⁾은 그 역할의 증대와 함께 팔목할 만한 변화를 보여왔다. 항암제의 세포독성도를 평가하는데 생세포 염색을 이용한 염색배제법^{6,7)}, 방사선전전물질을 이용한 핵산 및 단백질합성측정법⁸⁾, 증식능력이 있는 간세포의 정량측정법인 집락형성분석법^{9,10)}들은 그간 감수성시험의 연구과정에서 논의되어온 문제점들을 상호 보완하고 개선한 흔적이다.

단기간분석 및 시술의 간편함으로 세포독성도측정에 용이한 방법인 염색배제법은 생세포와 사세포의 이중염색을 통한 개선으로 사세포 구별은 물론 Bioassay에 나타나는 정상세포와의 감별에 정확도를 더하는 분석법⁷⁾으로 선호도를 높히고 있으며, 세포대사능력의 변화로 세포독성을 파악하는 분석법으로 대사에 관여하는 효소의 활성도를 측정하거나, 최종산물의 양에 접근하는 succinic dehydrogenase inhibition 검사(SDI assay)¹¹⁾, MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)분석법^{12,13)}, radiolabeled nucleosides incorporation법이 여전히 빠르고 정확한 감수성분석법으로 다용되고 있다.

종양간세포분석법은 [DEA]와 [MTT]분석에서 측정하는 증식된 종양세포의 양적인 변화가 아닌 증식능력이 있는 간세포의 증감을 평가하는 방법인 인체종양간세포분석법(Human Tumor Stem Cell Assay, HTSTA), 인체종양집락분석법(Human Tumor Clonogenic Assay, HCTA)으로 인체종양 집락형성효율을 높이기 위해 이중한천배지법에 의한 종양간세포의 집락형성환경을 개선해온 Hamburger와 Salmon^{14,15)}의 분석법이 여전히 유효하나 분석능을 향상시키기 위한 꾸준한 연구가 진행되고 있다.

분석법의 특성에 따른 적용예를 판단하고 감수성 시험방법 간의 결과에 대한 상관관계를 알기 위한 연구로 항암제감수성시험에서 발생하는 문제점을 보완하고, 한 분석법이 가지는 장점을 살리는 비교 연구가 최근 항암제감수성시험의 발전에 기여하는 바가 크다.

본 실험은 두경부 악성종양세포주 HEp-2와 melanoma B 16 세포주를 이용하여 수종의 항암제의 세포독성도를 염색배제법, 이중염색에 의한 Dye Exclusion Assay[DEA], Radiolabeled Nucleosides Incorporation Assay[RNIA], [HTCA]의 방법으로 평가하고 항암제의 임상적용능력, 세포주의 특성, 상호방법간의 상관도를 분석하고 다음의 지견을 얻어 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

실험재료

1. 세포주

인체두경부 악성종양세포주 HEp-2와 murine melanoma B 16을 10% fetal bovine serum[FBS](M. A. Bioproducts, Walkersville, MD)이 포함된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640(GIBCO, Grand Island, N. Y.) 배양액을 사용하여 계대배양하였고, 0.4% trypan blue(GIBCO)에 의한 염색배제법으로 생존을 측정과 필요한 세포수를 산정하여 항암제의 역가, 세포증식정도의 판정을 위한 예비 실험을 시행한 후, 본 실험을 실시하였다.

2. 항암제

약물농도의존형인 Bleomycin sulfate(Nippon Kayaku), Cis-platinum (Bristol-Myers, S. A. E)와 시간의존형인 Vinblastine sulfate(Lilly and Company, Indianapolis, Ind)와 Methotrexate(Choong wae Co.)를 배양액과 혼합하여 사용하고 실험기간 중에는 -70°C 냉암소에 유지시켰다. 실험에 필요한 약제의 농도는 혈중최고농도(Peak Plasma Concentration, PPC)를 중심으로 1/10배, 10배로 구분하였고, Methotrexate는 약의 역가판정을 위해 PPC의 250배까지 실험에 이용하였다(Table. 1, Fig. 1).

Table. 1. Concentration of anticancer drugs used for in vitro chemosensitivity test

Drug—Concentration	(µg/ml)		
	A	B*	C
Bleomycin sulfate	0.2	2	20
CDDP	0.2	2	20
Vinblastine sulfate	0.5	5	50
Methotrexate	0.4	4	40

* Peak Plasma Concentration [PPC]

실험방법

1. 실험세포농도에 따른 세포성장도 및 집락형성을 평가

HEp-2, B 16세포주를 여러 세포농도(1×10^4 , 5×10^4 , 10^5 /well)에서 배양시켜 지수성장기(log phase)의 세포수를 확인하고, [CA]에서는 50-100/well의 colony 형성율을 세포수산정의 기준으로 정하였다.

2. 염색배제분석방법[DEA]

B 16, HEp-2세포주를 culture flask(Nunclon, Roskilde, Denmark)사용하여 RPMI 1640 배양액으로 배양한 후, culture flask에 부착된 세포들의 분리를 위해 0.25% trypsin-0.05M EDTA용액을 처리하고, 각 세포주를 원심판으로 옮겨 RPMI 1640 배양액과 혼합하여 3회 원침(200×G, 10분)하고 분리된 세포를 세척한다.

Methotrexate를 RPMI 1640 배양액에 1, 10, 100, 1000µg/ml의 농도가 되도록 조절하여 HEp-2, B 16 세포주와 함께 95% 습도, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 유지한 후에 동일한 방법으로 2회 원침하여 항암제를 세척한다.

직경 16mm, 24 well multidish(Costar)의 각 간에 3×10^5 세포수와 RPMI 1640 2ml을 혼합하고 세포주와 Methotrexate 각 농도를 구별하여 상기 조건 하에서 5일간 배양한다. 다시 각 well 속의 세포를 0.25% trypsin 0.05M EDTA로 10분간 처리하여 분리하고 원침판에 옮겨 phosphate buffered saline [PBS]용액을 첨가하여 원침하고 최종 원침판 하층의 세포와 PBS 1ml를 혼합현탁액을 만든다.

세포 현탁액과 trypan blue를 각각 20µl씩 96 microwell plate(Nunclon)에 옮겨 염색한 후 혈구계산반으로 세포수를 측정하였다.

3. 이중염색법에 의한 [DEA]

세포를 16mm 24 well multidish에 5×10^4 cells/well에 분주하고, Bleomycin, CDDP, Vinblastine 각 농도에 따라 배양한 후 원침판을 이용하여, 2회 세척한 후 배양액과 함께 5일간 배양한다.

2% Fast green-0.15M NaCl 1ml와 5×10^5 cell/ml를 vortex mixer로 혼합하고, 10분후 Pasteur pipet으로 현탁액을 만들어 0.4ml를 cytospin centri-

fuge에서 7분간(1200rpm) 유지시켜 세포를 slide에 옮긴다.

고정액을 사용하지 않고 Hematoxylin and eosin stain을 한 후 7.5% ethanol에 2회 감근 후 95%, 100% alcohol, Xylene의 담금과정을 거쳐 balsam으로 cover slip을 위치하여 각 슬라이드 당 500 cells이상 유지되었음을 확인하고, Light microscope으로 H-E stain된 생세포와 밝은 green의 사세포를 측정하고 종양생세포의 백분율을 계산하였다.

% of living tumor cell

$$= \frac{\text{No. of living tumor cell}}{\text{No. of living tumor cell} + \text{No. of dead cell}} \times 100$$

4. [3H] thymidine incorporation

실험에 적절한 세포수를 확인하고 96 well microtiter plate에 각 well 당 10^4 cells의 밀도로 항암제 A, B, C 농도가 혼합된 배양액에서 각각 72시간 배양시킨다. 배양종료 4시간 전에 각 well에 1µCi[3H] thymidine(New Research Product, Dupont, MA.)을 넣고 incubator에 유지 후 B 16 세포주를 glass fiber filter paper(Skatron, Liver, Norway)에 흡착건조시킨다. Scintillation tube에 fiber disc를 넣고 scintillation cocktail(New Research Product, Dupont) 5 ml와 함께 용해된 세포현탁액을 liquid scintillation counter를 이용하여 방사성능을 측정하였다.

5. 집락분석법 Clonogenic assay[CA]

B 16, HEp-2 세포주 배양 후 혈구계산법으로 실험에 필요한 세포수를 산정한 후에 double layer soft agar법에 의해 직경 16mm, 24 well multidish 각 well의 하층에 enriched McCoy's 5A(GIBCO) 배양액과 0.5% agarose(M. A. Bioproducts), 각 농도에 따른 Bleomycin, CDDP, Vinblastin으로 1ml의 혼합층을 만들고 상층에는 CMRL 1066(GIBCO) 배양액과 0.3% agarose, B 16, HEp-2 세포주 10^5 개를 혼합한 0.5ml 상층부의 이중한천배지를 형성하였다.

95% 습도, 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 2주일간 배양하였으며, colony formation efficiency [CFE]의 관찰을 위해 inverted microscope(Zeiss 4×, 10×)으로 1주에 3회 확인하였고, 14일째 독립위상차현미경으로 집락수를 측정하여 대조군과 비교하였다.

III. 실험성적

1. 세포성장능력평가

실험실 조건하에서 세포성장속도의 관찰을 위한 배양기간 중에 HEp-2, B 16세포주의 적절한 세포수를 혈구계산법으로 계산하여, 10^4 , 5×10^4 , 10^5 세포수를 5일간 배양하고, 10^4 , 5×10^4 세포수를 분주하였을 때 적절한 성장능력을 확인하였으며, [CA]에서 well당 분주수를 10^5 세포수로 정하였다(Fig. 1).

2. 염색배제법

B 16 세포주는 Methotrexate의 1/2 표준농도인 $2\mu\text{g/ml}$ 에서 감수성을 보이기 시작하여 [PPC]에서 4×10^4 세포수를 보였으나 ($P < 0.05$), HEp-2 세포주에서는 Methotrexate $200\mu\text{g/ml}$ 에서 유의성을 보여 ($P < 0.05$) 약제에 대한 높은 내성을 보였다(Table. 2.).

3. 이중염색법에 의한 [DEA]

fast green에 염색된 사세포와 H-E stain에 의한 적색생세포를 측정계산하여 본 결과 대조군의 생세포백분율은 $90 \pm 0.05\%$ 이었으며, 대조군과 비교시 Bleomycin의 모든 농도와 Vinblastine A, B 농도에서 감수성을 보였다($P < 0.05$).

Bleomycin은 저농도에서 CDDP보다 감수성이 우수하고 [PPC]에서는 Vinblastine이 Bleomycin보다 높은 감수성을 보였고, $\times 10$ [PPC]에서 Bleomycin보다 CDDP가 우수하였다($P_{1/2} < 0.05$)(Fig. 2).

4. [^3H] thymidine incorporation 분석

항암제의 세포독성능력평가를 하여 본 결과 bleomycin의 [PPC] 농도에서 유의성을 보였으며($P < 0.05$), bleomycin의 C 농도, CDDP와 Vinblastine의 B, C 농도에서 감수성에서 모두 감수성이 높게 나타났다($P < 0.01$). CDDP는 Bleomycin과 비교하여 볼때에 B 농도($P < 0.01$), C 농도($P < 0.05$) 모두 우수하였으며 C 농도에서 Vinblastin보다 우수하였다($P < 0.05$)(Fig. 3).

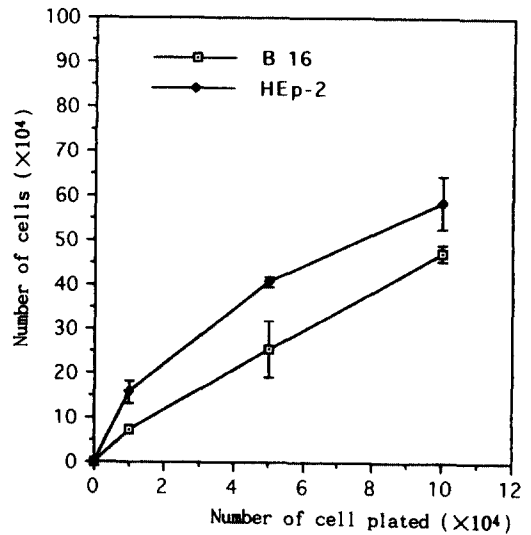


Fig. 1. Number of cells at various plating cell numbers of HEp-2 and B 16 cell lines.

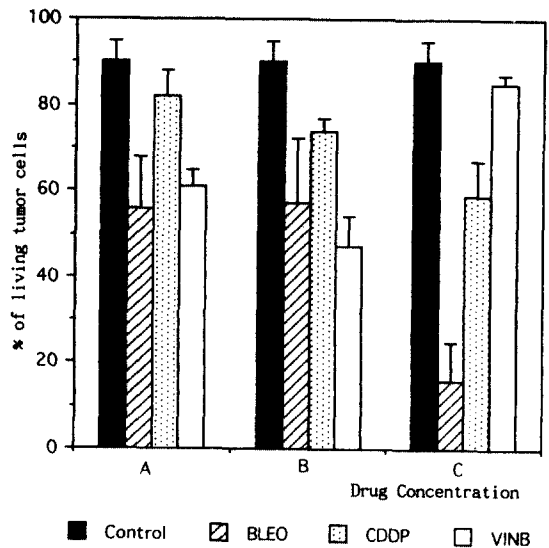


Fig. 2. Cytotoxicity graph for B 16 cell line exposed to differing concentrations of Bleomycin, CDDP, Vinblastine for 1 hour exposure. Cell viability was determined by double staining dye exclusion assay.

$$\% \text{ of living tumor cell} = \frac{\text{Viable cell}}{\text{Viable cell} + \text{Dead cell}} \times 100$$

Table. 2. Effect of methotrexate on HEP-2 and B 16 cell lines in dye exclusion assay

Tumor	Concentration($\mu\text{g}/\text{dl}$)	No. of Cells($\times 10^4$, Day 5)
HEP-2	0	$74.50 \pm 40.31^+$
	1	22.50 ± 5.66
	10	15.00 ± 2.83
	10^2	3.00 ± 1.41
	10^3	$0.10 \pm 0.00^*$
B 16	0	58.50 ± 30.41
	1	24.25 ± 12.37
	10	$1.50 \pm 1.41^*$
	10^2	$0.75 \pm 0.35^*$
	10^3	$0.01 \pm 0.00^*$

* Statistically significant($P < 0.05$)

+ Mean \pm S. D. in triplicate

5. 집락분석법[CA]

HEP-2, B 16 세포주 모두 항암제의 각 농도에 대해 감수성을 보였으며, 50% 집락형성억제능력을 보였고 시간의존형의 약제의 평가가 확인될 수 있었다($P < 0.01$). HEP-2의 집락형성율은 0.01%, B 16세포주는 0.04%이었으며 고농도에서 Vinblastine과 CDDP, Bleomycin간에 약제간의 차이가 인정되지 않았다(Fig. 4, 5).

IV. 총괄 및 고안

악성종양 환자에게 항암제가 적용되는 기초실험 단계에서의 과정과 병리조직학적 분류에 따른 종양 세포 진단명을 약제선택의 기준으로 설정하여 임상 경험으로 사용되어온 단독 또는 병합 항암제 요법에 의한 화학 요법의 문제점으로, 약제의 임상 적용단계 시험과정에서 실험동물의 선택, 감수성 검사의 효

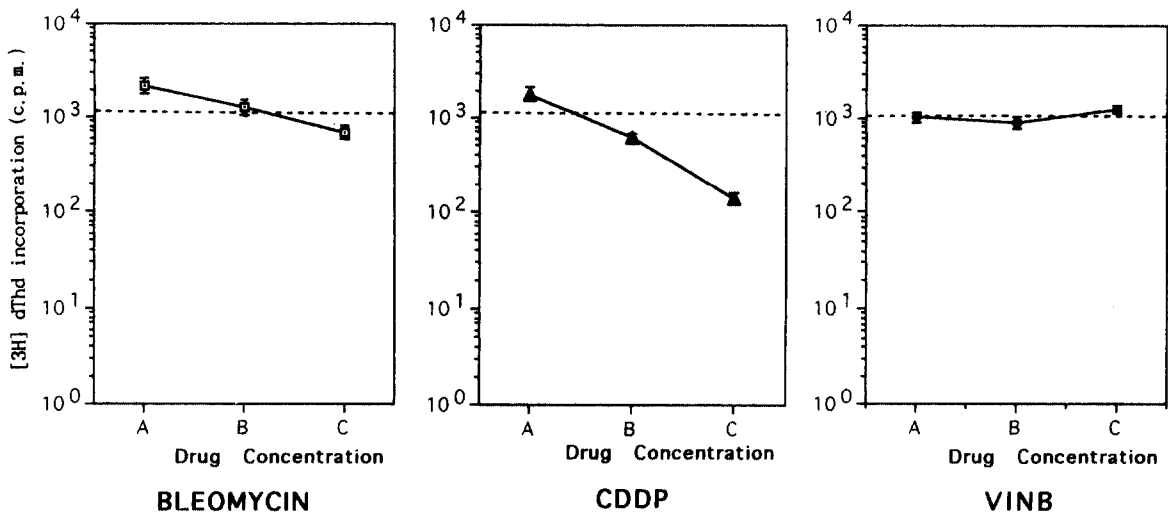


Fig. 3. Anticancer drug sensitivity curve for B 16 cell line incorporation of [3H] thymidine as a function of drug concentration for Bleomycin, CDDP, and VINB. Dotted line represent inhibition of [3H] thymidine incorporation by 60% of respective control values.

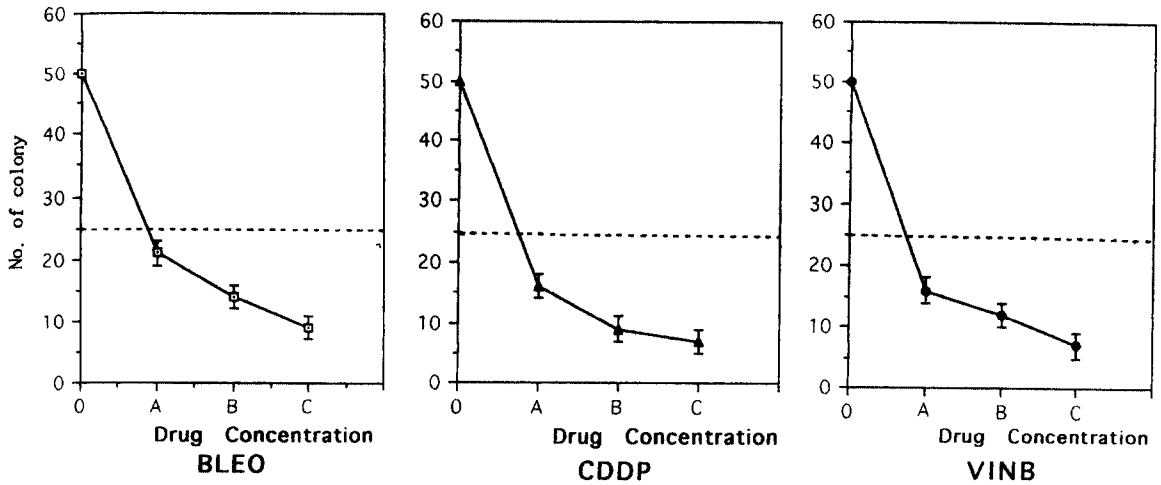


Fig. 4. Anticancer drug sensitivity curve for B 16 cell line in clonogenic assay. Dotted line represent inhibition of colony formation by 50% of respective control values.

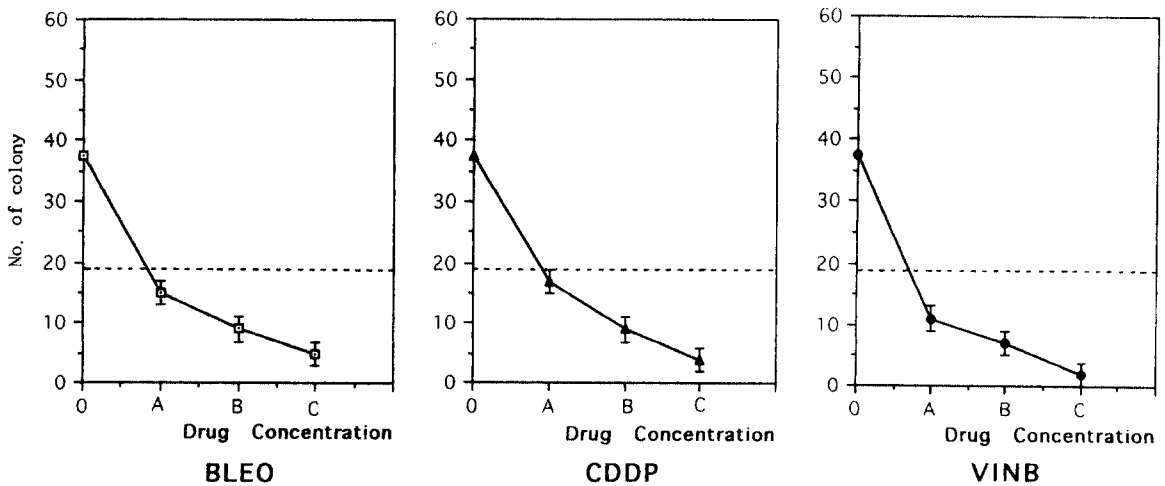


Fig. 5. Anticancer drug sensitivity curve for HEP-2 cell line in clonogenic assay. Dotted line represent inhibition of colony formation by 50% of respective control values.

을성, 인체 개개의 암세포가 보유하는 Heterogeneity 등이 지적되어 각 과정에서 정밀도를 높이기 위한 연구가 꾸준히 있어 왔다²⁻⁵.

집락형성 분석법(clonogenic assay, CA)^{9,10,14}이나 MTT분석법은 항암 물질의 개발 과정에서 세포 독성도의 screening검사, 종양세포의 생물학적 특성

등에 이용되는 방법이며, 악성종양 세포의 개인적 차이가 인정된 후로 항암제 요법의 효율성을 높이기 위해 시행되어온 chemosensitivity test 방법의 지속적인 개발은 임상 효율을 높이는데 기여함은 물론, 기초 연구의 비교 검증에 이용되거나 표준 검사로 채택되어 활용되는 상호 발전적 현상을 보여왔다¹⁶.

인체 수립세포주를 사용하여 실험실 감수성 시험을 통한 세포독성의 평가는 동일한 악성종양 세포수를 확보하여 종양의 특성이 유지된 상태에서 항암제의 상태와 생체내에서 항암 효율을 관찰할 수 있는 장점이 인정되나 실험실 조건의 제한된 상태와 생체내에서 항암 효과의 발현과 얼마나 상관도를 갖는가에 대한 비교 연구가 진행되어 감수성 판정에 약 70%, 내성을 보이는 경우의 90% 예측율로 생체 실험의 감수성 시험전환의 현상을 보이고 있으나⁵⁾, 이 방법도 또다른 문제들이 제기되어 in vivo, in vitro 실험의 장점을 지향하는 경향을 보이고 있다.

감수성 시험의 신속성에 우위를 보이는 염색배제법은 초생체염색에서 색소가 보유하는 독성으로 인한 세포독성 효과의 증가, 시험기간이 연장될 때 생세포 염색효과, in vivo Bioassay를 시행할 때 정상세포 염색으로 인한 종양세포의 불명확성 등의 단점이 있으나 집락생성율이 낮아 [HTCA] 감수성 시험 방법을 택할 수 없을 때 유리한 방법이다^{6,7)}.

Weisenthal이 생세포와 사세포의 명확성을 위해 시행한 이중염색법은 기존 염색배제법의 단점을 보완한 방법으로 타 분석법과 비교하여 높은 연관성을 보이고 있다. 본 실험에서 약제의 농도평가, 세포 성장능력의 관찰을 위해서는 trypan blue에 의한 염색배제법을 이용하였고 세포독성도 평가에 이중염색법에 의한 novel dye exclusion assay(NDEA)를 시행하였다(Fig. 2)(Table. 2).

[SDI]¹¹⁾, [MTT]^{17,18)}, [RNIA]¹⁹⁾, [CA]의 분석법은 각 well 또는 petridish에 분주된 세포가 증식되고 세포독성에 의해 사멸되는 총량의 평가가 이루어지나 [DEA]에서의 임의의 세포수 측정처럼 [NDEA]에서도 cytospin에 의해 slide에 옮겨진 세포들중에 현미경 상의 임의의 구역에 한정된 생세포와 사세포의 비율에 의존하여 세포독성을 측정하게 되므로 평가가 어려웠고 다량의 세포밀집지역의 측정에 많은 시간이 소요되어 [CA]에서의 automatic particle counter의 필요성을 느끼었으나 세포 밀집정도, 형태의 다양성으로 적용시키는데 한계를 느끼었다. [NDEA]에서 관찰된 특징으로는 이중염색에 의한 생세포와 사세포의 구별로 특징이 용이하였으나 cytospin의 이용과 염색과정을 거치는 동안 세포의 파괴가 있을 것으로 추측되고 실제 현미경 상에서 사세포의 잔재가 보이며 사세포 수에서 제외됨으로

약간의 오차를 예상하여야 할 것으로 생각된다. 고 농도에서 CDDP의 감수성 효과가 보이는 것파 [PPC]에서 vinblastin의 약효가 인정되었으나 농도의존형과 시간의존형의 구별이 현저하게 보이지는 않았다¹⁹⁾.

Radiolabeled Nucleosides Incorporation Assay (RNIA) 또는 Miniaturized Improved Nucleic acid precursor Incorporation assay [MINI assay]²⁰⁾인 [3H] thymidine Incorporation assay 역시 [DEA], [NDEA], [MTT] 등과 함께 단기간 분석방법의 장점을 가지나 긴 세포 주기를 갖는 종양에 있어 대사의 저하로 DNA 전구물질의 이용율이 낮고²⁰⁾, 분석과정 중의 세포 손상이나 항암제의 접촉에 의한 자극으로 인해 일시적인 대사 중단으로 Incorporation양의 감소를 보일 수 있으며 생체 분석에 이용될 경우 종양세포와 혼합된 정상 세포가 DNA전구물질 이용하므로 [RNI] 총량이 증가될 수 있는 단점이 있다²¹⁾. 정상세포의 핵산대사에 의한 [RNI]의 변화를 보완하기 위해 Friedman²²⁾은 Salmon의 이중한천 배지를 이용 종양세포를 배양하고 방사성전구물질을 투여하므로 상층부에만 선택적으로 증식하는 종양 세포만이 대사과정에 관여하여 [HTCA]의 결과와 비교하여 볼때 61예중 54예에서 일치함을 보고하였다. 또한 Wada 등은 millipore막을 피개한 이중한천배지에 3일간 배양하여 [3H] thymidine uptake 양을 측정 93%의 내성 예견과 67%의 감수성 예견을 보고하였다²³⁾.

본 실험에서는 세포주를 이용함으로써 종양세포 전체가 대사에 관여하여 정상 세포 혼합에 따른 문제는 없었으나 Rupniak의 보고처럼 [DEA], [CA]와 비교할때 단순한 정량적 평가를 하는데 그 의의를 둘 수 있다²⁴⁾. 실험의 결과에서 [NDEA]보다는 감수성 정도가 두드러졌으며 CDDP는 B, C 농도에서 [NDEA]와 같이 Bleomycin보다 우수하였고 C 농도%서도 vinblastine보다 높은 감수성을 보여 유사한 결과를 보여주고 있다.

증식 능력이 있는 종양간세포의 증감을 평가는 [HTSCA], [HTCA]는 종양의 성장이나 치료후 재발, 암의 전이에 직접적인 관여를 하는 간세포의 변화를 측정하므로 가장 이상적인 평가 방법이 될 수 있으나 16% 시험가능율의 두경부 악성종양을 비롯하여 0.1-0.001%의 비교적 낮은 집락형성율을 보여 적용의 한계가 있다²⁵⁾. [CFE]를 높이기 위해

Growth factor^{26,27}, Hormones²⁸의 첨가와 배양액중 agar의 변화²⁹, 산소농도³⁰, Bioassay에서 Macrophage와의 혼합배양^{31,32} 및 생체 조직의 분리시 DNase, pronase, collagenase 등 효소의 선택에 개선을 주어 팔목할 만한 발전을 가져왔으며^{33,34} 특히 Von Hoff³⁵, Lathan³⁶ 등의 capillary tube를 이용한 [HTCA]는 분석에 필요한 세포수를 포함한 실험의 규모를 줄이고 [CFE]를 높이어 정확성에 기여하므로 집락형성 분석법의 장점을 살리는데 기여하였다. 본 실험에서는 HEp-2보다 B 16의 집락형성이 돋보였으며 clump artifact는 발견되지 않았고 하층의 항암제의 지속 노출로 시간의존형 약제의 효과를 확인할 수 있었다.

배양기의 multidish나 tube에서 시행되어지는 감수성 시험의 결과와 임상적용시 예견의 상관도를 높이기 위해 생체 실험의 요구가 높아졌으며 Bogden^{37,38}의 Subrenal capsular(SRC) assay는 대표적 예이다. 1mm³ 종양세포를 신장피막하 이식후 항암제 투여에 따른 크기의 변화를 측정하는 SRC 분석법은 단기간 분석이 가능하고 생체모델을 설정함으로써 인체에 유사한 조건을 얻을 수 있어 높은 예견이 가능하다고 보고하였다. Griffin³⁹은 85%의 예견을 보고하고 82%의 감수성 판정과 94% 내성판정율을 관찰하였다.

면역억제 조건인 mice나 Athymic nude mice에 인체종양세포를 이식할때 xenograft의 생착율은 30-50%로 향후 감수성 시험에 유효한 방법이나 정상세포와의 경계선 구별이 어렵고 외과적 시술의 난이도가 높으며 삼차원적인 정량분석에 의한 방법이 보완되지 않아 개선의 여지가 있는 것으로 생각된다^{40,41,42}.

Gorelik, Ovejera⁴³ 등은 종양조직편의 SRC 위치의 어려움과 성장능력을 높이기 위해 Damon Biotech의 반투과막의 1mm 직경 microcapsule을 이용하여 종양세포를 넣어 nude mice, 또는 C57BL/6 mice에 이식시켜 감수성 시험을 시행하였고 Noso⁴⁴ 등은 nude mouse를 모델로 하고 [3H] thymidine을 투여 분석하는 nude mouse isotopic assay를 보고하였다.

세포독성도의 지표로서 neutral red assay^{45,46,47}이나 ¹⁴C glucose가 ¹⁴C CO₂로 치환되는 양의 분석을 시도한 radiometric법과 같이 세포 대사의 과정에서 새로운 감수성 시험법의 개발이나⁴⁸, 세포의 형태

변화에 초점을 맞춘 cell image analysis(CIA)법⁴⁹, cell image processor⁵⁰ 등의 이용은 [DEA]나 현미경으로 외형을 보아 세포독성도를 측정한 초기 방법의 꾸준한 개선의 결과이며 nuclear damage assay⁵¹나 세포의 열방출향으로 세포의 생존율을 측정하는 microcalorimetry에 의한 분석법⁵²은 새로운 시도로 감수성 시험의 영역을 넓혀 가고 있다. 최근 flow cytometry를 이용하여 DNA histogram의 분석, Fluorescein diacetate[FDA] 염색법으로 종양세포의 악성도와 항암제의 세포 독성효과를 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 세포생존율과 세포주기를 평가하여 항암제의 효율을 판별하는 이런 진보된 감수성 시험의 개발은 기존의 타 분석법과의 상관관계를 통해 검토되어 신속한 활용이 요구된다^{53,54,55}. 본 실험은 임상에 적용되고 보완되어 계속 발전하고 있는 세 종류의 분석법을 비교하고 서로 상관관계가 인정되었음을 관찰하여, 생세포 분석에 경쟁적으로 적용할 수 있음을 보았고 실험을 통한 지식의 축적으로 향후 개발되고 있는 방법의 비교 검토와 분석법의 개선 및 감수성 검사의 창출에 기여할 것이다.

V. 결 론

악성종양세포주 HEp-2와 B 16을 이용하여 이중 염색법의 [DEA], [3H] thymidine incorporation, [CA] 등의 분석법에 의한 수종의 항암제감수성 시험을 시행하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. [DEA]에서 B 16 세포주는 Bleomycin의 모든 농도와 Vinblastine의 $\times 1/10$ [PPC], [PPC] 농도에 감수성을 보였으며($P < 0.05$), 고농도에서 Bleomycin은 CDDP와 Vinblastine 보다 높은 감수성을 나타냈었고($P < 0.05$), HEp-2 세포주는 Methotrexate에 내성을 보였다.
2. [3H] thymidine incorporation 측정법에서 B 16 세포주는 Bleomycin의 [PPC] 농도($P < 0.05$)를 포함한 모든 약제의 [PPC], $\times 10$ [PPC] 농도에서 높은 감수성을 보였으며($P < 0.01$), 고농도에서 vinblastine은 농도의존형인 Bleomycin과 CDDP 보다 낮은 감수성을 보였다($P < 0.05$).
3. [CA]에서 HEp-2 세포주는 CDDP의 $\times 1/10$ [PPC] 농도를 제외한 모든 농도에서, B 16 세

포주는 모든 약제에서 감수성을 보였다($P < 0.01$).

4. [DEA], [3H] thymidine incorporation, [CA] 간에 상관관계가 인정되었다($\gamma = 0.99, P < 0.05$).

References

1. Ambrose FJ, Andrews RD, Easty DM, Field EO, Wylie JA : Drug assays on cultures of human tumor biopsies. *Lancet* 1 : 24-25, 1962.
2. Yarnell M, Ambrose EJ, Shepley K, Tchao R : Drug assays on organ culture of biopsies from human tumors. *Br. Med. J.* 2 : 490-491, 1964.
3. Mattern J, Volm M : Clinical relevance of predictive tests for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 9 : 267-298, 1982.
4. Drewinko B, Patchen M, Yang LY, et al. : Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferation human tumor cells. *Cancer Res.* 41 : 2328-2333, 1981.
5. Bertelsen CA, Sondak VK, Mann BD, et al. : Chemosensitivity testing of human solid tumors. A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. *Cancer* 53 : 1240-1245, 1984.
6. Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, et al. : Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exptl. Cell. Res.* 97 : 275-280, 1976.
7. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, et al. : A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.* 43 : 749-757, 1983.
8. Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y, et al. : Rapid assay for calculating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res.* 42 : 2159-2164, 1982.
9. Hamburger AW, Salmon SE : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197 : 461-463, 1977.
10. Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, et al. : Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298 : 1327, 1978.
11. Mitsudomi T, et al. : Chemosensitivity testing of human lung cancer tissues using the succinate dehydrogenase inhibition test. *Anticancer Research* 10(4) : 987-990, 1990.
12. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 : 55, 1983.
13. Carmichael J, DE Graft WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay. *Cancer Res.* 47 : 936-943, 1987.
14. Hamburger AW, Salmon SE : Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. Clin. Invest.* 60 : 856-854, 1977.
15. Salmon SE, Von Hoff DD : In vitro evaluation of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Semin. Oncol.* 8 : 377-285, 1981.
16. Shoemaker RH, et al. : Application of a human tumor colony forming assay to new drug screening. *Cancer Res.* 45 : 2145-2153, 1985.
17. Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG : A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br. J. of Cancer* 62 : 189-194, 1990.
18. Carmichael J, Mitchell JB, DE Graft WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, Glatstein E, Minna JD : Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. of Cancer* 57 : 540-547, 1988.
19. Ichihashi H, Sako T, Akiyama S : Colony assay for clinical application. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 12(8) : 1560-1565, 1985.
20. Kondo T : Prediction of response of tumor and host to cancer chemotherapy. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 34 : 251-256, 1971.
21. Knock FE : Qualitative and quantitative in vitro

- sensitivity tests for cancer chemotherapy. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 34 : 247–249, 1971.
22. Friedman HM, Glaubiger DL : Assessment of in vitro drug sensitivity of human tumor cells using (3H) thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res.* 42 : 4683–4689, 1982.
 23. Wada T, Alciyoshi T, Nakamura Y. : A Simplified tritiated thymidine incorporation assay for chemosensitivity testing of human tumors *European Journal of Cancer & Clinical oncology* 24(9) : 1421–1424, 1988.
 24. Rupniak HT, Dennis LY, Hill BT : An intercomparison of invitro assays for assessing cytotoxicity after a 24 hour exposure to anti-cancer drugs *Tumori.* 69 : 37–42, 1983.
 25. Shoemaker RH, Wolpert-DeFilippes MK, Makuch RW, Venditti JM : Application of the human tumor clonogenic assay to drug screening. *Stem. Cells* 1 : 308, 1982.
 26. Hamburger AW, White CP, Brown RW : Effect of epidermal growth factor on proliferation of human tumor cells in soft agar. *JNCI* 67 : 825–830, 1981.
 27. Pathak MA, et al. : Effect of epidermal growth factor on clonogenic growth of primary human tumor cells. *Int. J. Cancer* 30 : 745–750, 1982.
 28. Calvo F, Carney DN, Brower JH, Minna JD : Hormone supplemented media for cloning breast cancer : Increased colony formation without alteration of chemosensitivity. *Br. J. Cancer* 48 : 683–688, 1983.
 29. Courtenay VD, Mills J : An in vitro colony assay for human tumours grown in immune-suppressed mice and tested in vivo with cytotoxic agents. *Br. J. Cancer* 37 : 264–268, 1978.
 30. Gupta V, Krishan A : Effect of oxygen concentration on the growth and drug sensitivity of human melanoma cells in soft-agar clonogenic assay. *Cancer Res.* 42 : 1005–1007, 1982.
 31. Buick RN, Fry SE, Salmon SE : Effect of host cells in human malignant effusions. *Br. J. Cancer* 41 : 695–699, 1980.
 32. Hamburger A, White CP : Interaction between macrophages and human tumor clonogenic cells. *Stem Cells* 1 : 209–223, 1981.
 33. Pavelic ZP, Slocum HK, Rustum YM, Creaven PJ, Karakousis C, Takita H : Colony growth in soft agar of human melanoma, sarcoma, and lung carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods. *Cancer Res.* 40 : 2160–2164, 1980.
 34. Pavelic ZP, Slocum HK, Rustum YM, Creaven PJ, Nowak NJ, Karakousis C, Takita H, Mittelman A : Growth of cell colonies in soft agar from biopsies of different human solid tumors. *Cancer Res.* 40 : 4151–4158, 1980.
 35. Von Hoff DD, Forseth BJ, Huong M, et al. : Improved plating efficiencies for human tumors cloned in capillary tubes versus petri dishes. *Cancer Res.* 46 : 4012–4017, 1986.
 36. Lathan : In vitro drug sensitivity testing with agar containing capillaries, *Anticancer research (JC : 59)* 10(4) : 1075–1078, 1990.
 37. Bogden AE, Von Hoff DD : Comparison of the human tumor cloning and subrenal capsule assays. *Cancer Res.* 44 : 1087–1090, 1984.
 38. Griffin TW, Bogden AE, Reich SD, et al. : Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy *Cancer* 52 : 2185–2192, 1983.
 39. Iwagaki H, Fuchimoto S, Orita K : Comparison of the subrenal capsular assay and succinate dehydrogenase inhibition test. *J. of Medicine Experimental and Theoretical* 20(3–4) : 251–260, 1989.
 40. Shorthouse AJ, Smyth JF, Steel GG, Ellison M, Mills J, Peckham MJ : The human tumour xenograft—a valid model in experimental chemotherapy ? *Br. J. Surg.* 67 : 715–722, 1980.
 41. Giuliani FC, Zirvi KA, Kaplan NO : Therapeutic response of human tumor xenografts in athymic mice to doxorubicin. *Cancer Res.* 41 : 325

- 335, 1981.
42. Rofstad EK, Brustad T : Effect of hyperthermia on human melanoma cells heated either as solid tumors in athymic nude mice or in vitro. *Cancer* 50 : 1304–1308, 1982.
 43. Gorelik E, et al. : Microencapsulated tumor assay : New short term assay for in vivo evaluation of the effects of anticancer drugs on human tumor cell lines. *Cancer Res.* 47(21) : 5739–5747, 1987.
 44. Noso Y, et al. : Clinical studies on a new screening assay for anticancer agents using nude mice and isotopic evaluation. *Cancer Res.* 47 (23) : 6418–6422, 1987.
 45. Borenfreund E, et al. : Comparisons of two in vitro cytotoxic assays. The neutral red(NR) and Tetrazolium MTT test. *Toxic in vitro* 1 : 1–6, 1988.
 46. Borenfreund E, et al : Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Letters.* 24 : 119–124, 1985.
 47. Borenfreund E, et al. : Rapid chemosensitivity assay with human normal and tumor cells in vitro. *In vitro cellular & Developmental Biology* 26(11) : 1030–1034, 1990.
 48. Arteaga CL, et al. : A radiometric method for evaluation of chemotherapy sensitivity : results of screening a panel of human breast, cancer cell lines. *Cancer Res.* 47(23) : 6248–6253, 1987.
 49. Etievant C, et al. : The combination of the tetrazolium derivative reduction (Mtt) and digital cell image analysis to monitor in vitro the cytotoxicity of antineoplastic drugs. *Anticancer Res.* 11(1) : 305–311, 1991.
 50. Kiss R, et al. : A new assay to evaluate cell growth and drug sensitivity in culture using a cell image processor. *Anticancer Res.* 8(4) : 765–774. 1988.
 51. Sekiyas, et al. : A newly developed in vitro chemosensitivity test(nuclear damage assay) : Application to ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 40(2) : 138–143, 1991.
 52. Kinura T, et al. Prediction of the cytotoxic effects of some antineoplastic drugs on cultured T-lymphoma cells by microcalorimetry. *Cytobios.* 63(252) : 7–13m 1990.
 53. Kawamotok, et al. : New sensitivity test using flow cytometry. *Journal of Neuro. Oncology* 6 (4) : 361–370, 1988.
 54. Herveijer H, Vanden Engh G, Nooter K : A rapid and sensitive flow cytometric method for the detection of multidrug-resistant cells. *Cytometry* 10(4) : 463–468, 1989.
 55. Morgan SA, et al. : Flow cytometric analysis of Hoechst 33342 uptake as an indicator of multidrug-resistance in human lung cancer. *Br. J. of Cancer* 60(3) : 282–287, 1989.

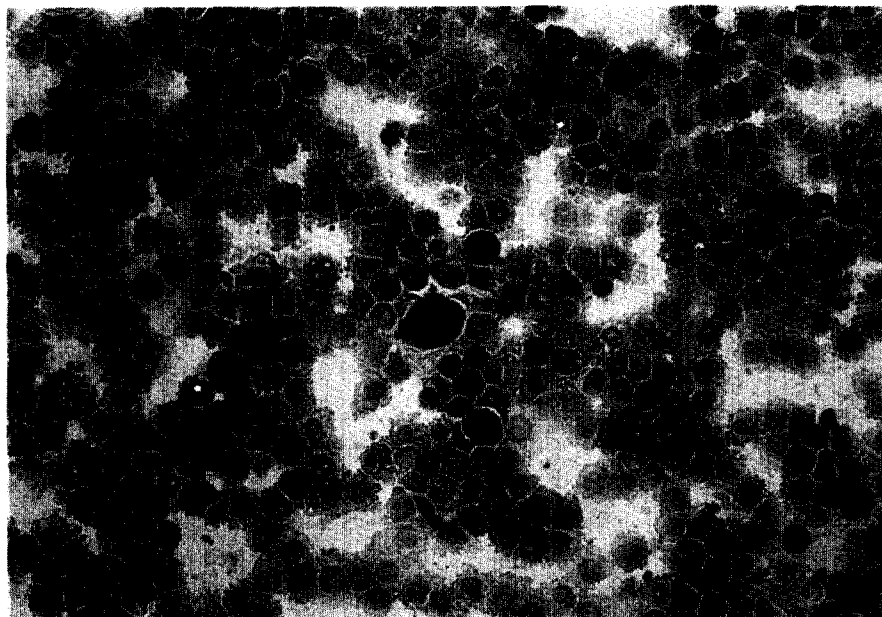


Fig. 6 Control group

Photomicrograph of cytopspining B 16 cell line. Hematoxyphilic living cells and green-colored dead cells are visible. (Novel dye exclusion test, original magnification $\times 200$, percentage of living cell = 90%)

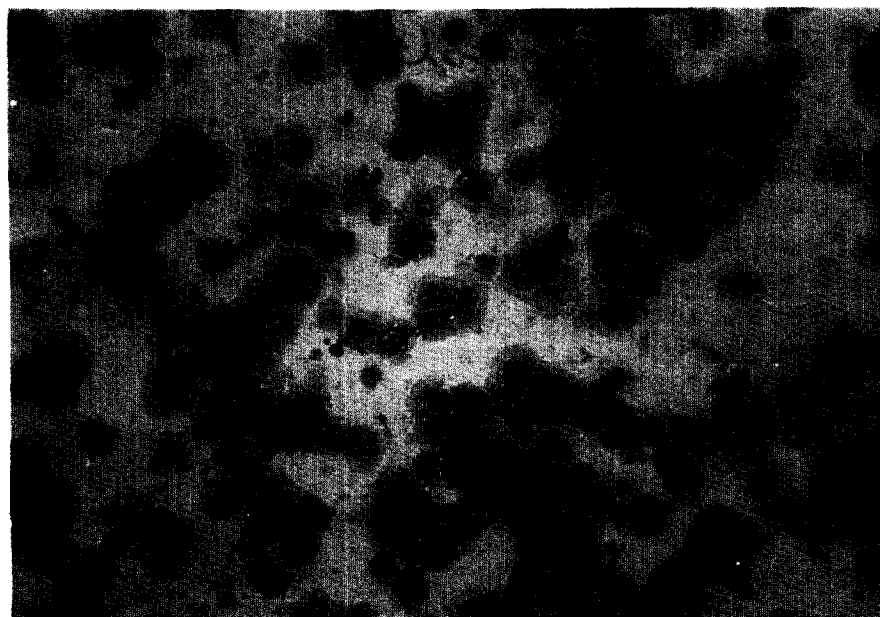


Fig. 7 Bleomycin A group

Photomicrograph of cytopspining B 16 cell line. Hematoxyphilic living cells and green-colored dead cells are visible. (Novel dye exclusion test, original magnification $\times 200$, percentage of living cell = 56%)



Fig. 8 CDDP A group

Photomicrograph of cytopspining B 16 cell line. Hematoxyphilic living cells and green-colored dead cells are visible. (Novel dye exclusion test, original magnification $\times 200$ percentage of living cell = 82%)



Fig. 9 Vinblastine A group

Photomicrograph of cytopspining B 16 cell line. Hematoxyphilic living cells and green-colored dead cells are visible. (Novel dye exclusion test, original magnification $\times 200$, percentage of living cell = 61%)

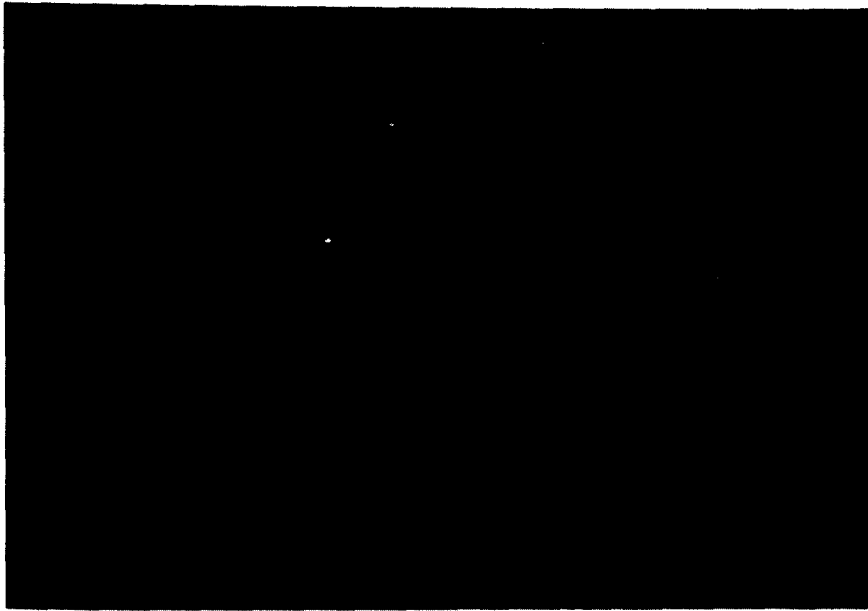


Fig. 10 Typical appearance of B 16 colonies in soft agar at 14 days of growth. (Stem cell assay, original magnification $\times 200$)

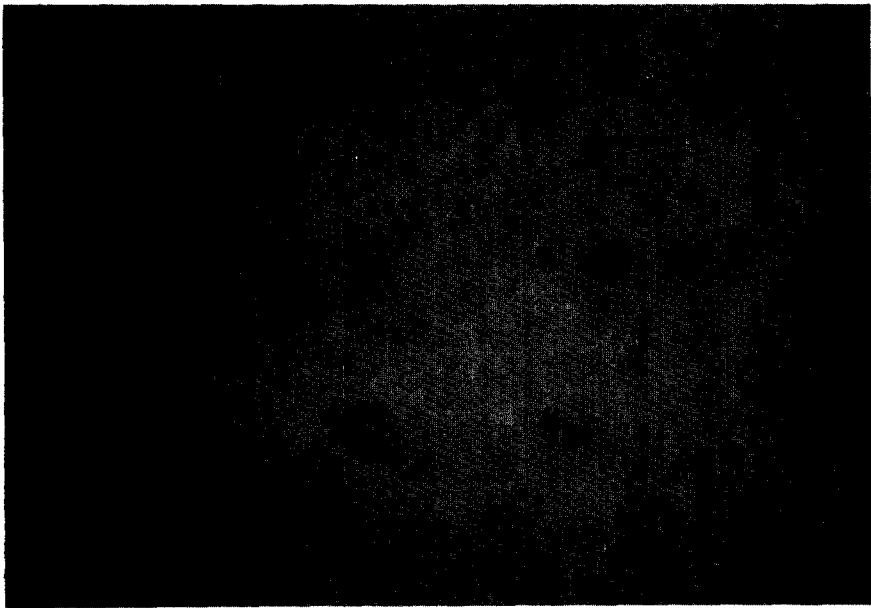


Fig. 11 Typical appearance of HEp-2 colonies in soft agar at 14 days of growth. The smaller particles may be subcolonies. (Stem cell assay, original magnification $\times 100$)