

# 사람 대장암 세포주의 [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose 섭취의 특징

서울대학교 의과대학 핵의학교실

김채균 · 정준기 · 정재민 · 이명철 · 고창순

= Abstract =

## Characteristics of [<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose Uptake in Human Colon Cancer Cells

Chaekyun Kim, Ph.D., June-Key Chung, M.D., Jae Min Jeong, Ph.D.  
Myung Chul Lee, M.D. and Chang-Soon Koh, M.D.

*Department of Nuclear Medicine, Seoul National University  
College of Medicine, Seoul, Korea*

Cancer tissues are characterized by increased glucose uptake. <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose(FDG), a glucose analogue is used for the diagnosis of cancer in PET studies. This study was aimed to compare the glucose uptake and glucose transporter 1(GLUT1) expression in various human colon cancer cells. We measured FDG uptake by cell retention study and expression of GLUT1 using Western blotting. Human colon cancer cells, SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5, were used. The cells were incubated with 1 μCi/ml of FDG in HEPES-buffered saline for one hour. The FDG uptake of SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 were 16.8±1.36, 12.3±5.55 and 61.0±2.17cpm/μg of protein, respectively. Dose-response and time-course studies represent that FDG uptake of cancer cells were dose dependent and time dependent. The rate of FDG uptake of SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 were 0.29±0.03, 0.21±0.09 and 1.07±0.07cpm/min/μg of protein, respectively. Western blot analysis showed that the GLUT1 expression of SNU-C5 was significantly higher than those of SNU-C2A and SNU-C4. These results represent that FDG uptake into human colon cancer cells are different from each other. In addition, FDG uptake and expression of GLUT1 are closely related in human colon cancer cells.

**Key Words** : FDG uptake, Glucose transporter, Human colon cancer cell, Western blotting

### 서 론

종양세포는 해당작용(glycolysis) 향진에 의해 정상 세포에 비해 포도당 섭취가 증가함은 널리 알려진 사실이며, 이러한 현상은 빨리 성장하는 종양에 더욱 두

드러진다. 최근 종양 진단을 위해 포도당 유사체인 FDG를 이용한 Positron Emission Tomography (PET) 검사가 많이 사용되고 있으며 예민도와 정확도가 높다<sup>1-3)</sup>.

각 조직 또는 종양의 종류에 따라 FDG 섭취를 비교한 연구들도 보고되어 있으며, 각 조직과 종양의 FDG 섭취는 조직과 종양의 종류에 따라 현저한 차이

이 연구는 1997년 서울대학교병원 지정진료연구비(02-97-001)의 보조로 이루어졌음.

책임저자: 정준기 (우)135-710 서울시 종로구 연건동 28 서울대학교 의과대학 핵의학교실 Tel: 760-3376 Fax: 745-7690

가 있다<sup>4)</sup>. Wahl 등은 마우스에서 FDG가 주로 뇌, 심장, 근육, 폐, 종양에 다량 분포되며, 종양 세포로는 흑색종 HTB63, 버키프립암 RAJI, 신세포암 UMRC3 세포에서 섭취가 높음을 보고하였다<sup>4)</sup>. 대장암(결장암과 직장암)은 한국인에서 최근 발생빈도가 증가하는 암으로 암환자 가운데 발생빈도 4위의 암이다. 최근 대장암에서 FDG 축적이 증가된다는 사실이 밝혀졌으며, 대장암 수술전 병기 결정 및 재발성 직장암 진단에 사용되었다<sup>5-7)</sup>.

본 연구에서는 유사한 특성을 가진 동일 조직의 종양에 대한 비교 연구는 많이 되어있지 않음에 착안하여 사람의 대장암 세포주 가운데 그 특성이 유사한 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5를 사용하여 세포 수준에서 FDG 섭취의 양상을 연구하였다. SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5는 서울대학교 의과대학 암연구소에서 수립한 우리 나라 사람의 대장암 세포주이다. 이들 세포는 형태상 epithelial 세포이며, 배양 plate 표면에 단층(monolayer)으로 부착하여 성장하는 미분화성(poorly differentiated) 세포이다<sup>8)</sup>. 또한 포도당 섭취의 중요 기작인 포도당 수송체 1(GLUT1)의 발현의 차이를 비교하여 간접적으로 FDG 섭취와 포도당 수송체의 발현 사이의 관계를 연구하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주 및 배양조건

사람의 대장암 세포주, SNU-C2A(KCLB 000C2A), SNU-C4(KCLB 000C4), SNU-C5(KCLB 000C5)를 한국세포주은행에서 분양 받았다. 세포는 penicillin (100U/ml), streptomycin(100 µg/ml)과 10% fetal calf serum(FCS; Gibco, USA)을 포함한 RPMI 1640 배지(Gibco, USA)를 넣어 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 2. FDG 섭취

세포를 48 well plate에 0.5ml(1×10<sup>6</sup>/ml) 씩 분주, 6 시간 배양하여 세포를 plate 표면에 부착하도록 하였다. 세포 배양액을 제거하고 plate에 부착된 세포를 HEPES-buffered saline(HBS; 140mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 2.5mM MgSO<sub>4</sub> and 20mM HEPES, pH 7.4)으로 세척하여 잔류하는 배

지성분을 제거하였다. HBS에 희석시킨 1 µCi/ml 농도의 FDG를 0.5 ml씩 가하여 37°C에서 1시간 배양하였다. FDG 용액을 제거한 후 HBS로 3번 세척하여 잔류 FDG를 완전 제거하였다. 세포를 1% SDS 용액으로 용해시킨 후 섭취 FDG 양을 감마카운터(Cobra II, Packard, USA)로 측정하였다. FDG의 시간차이에 따른 반감기에 의한 감쇄는 감마카운터에서 자동보정되었다.

시간에 따른 FDG 섭취양상은 1 µCi/ml의 FDG를 사용하여 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180분에서의 섭취를 측정하였다. 용량별 FDG 섭취는 각 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5 µCi/ml 농도의 FDG를 같은 방법으로 첨가하였다. 또한 세포수의 증가에 따른 FDG 섭취 양상은 각 세포를 1×10<sup>5</sup>/ml, 5×10<sup>5</sup>/ml, 1×10<sup>6</sup>/ml, 2×10<sup>6</sup>/ml의 세포를 사용하여 비교하였다.

본 실험에 사용한 FDG는 TR13 cyclotron (Ebc, Canada)에서 생산된 fluorine-18을 사용하여 nucleophilic substitution법으로 서울대학교병원 핵의학 과에서 조제하였다. FDG 섭취량은 실험에서 1×10<sup>6</sup>/ml 의 세포를 0.5ml씩 사용하였으나 세포마다 plate 표면에 부착시간과 정도가 다른 점을 고려하여 단백질을 정량하여 cpm/µg of protein으로 나타내었다<sup>9-11)</sup>. 시료 중의 단백질의 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시료로 Lowry 법으로 측정하였다.

### 3. 세포막 분획의 분리

세포를 150mm polystyrene petri dish(Corning, USA)에 분주 후 RPMI 배지에서 배양하였다. 부착된 세포를 HBSS(without Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup>)으로 세척한 후 scraper(Sigma, USA)로 긁어모았다. 세포를 0.5% Nondiet P-40, aprotinin(10 µg/ml), antipain (5 µg/ml), pepstatin(5 µg/ml), benzimidazole-HCl (5 µg/ml)과 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)을 포함한 Tris-buffered saline(pH 7.5)을 넣고 Dounce homogenizer를 사용하여 세포를 터트렸다. 용해된 세포를 2,000rpm으로 10분 원심분리하여, 침전물에 Tris-buffered saline를 넣고 다시 터트리는 과정을 반복 한 후 2,000rpm으로 10분 원심분리하였다. 원심분리 상층액을 5,000rpm에서 10분 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 17,000rpm, 45분 원심분

리하여 침전 분획을 얻었다. 침전을 phosphate buffered saline에 현탁하여 전기영동 시료로 사용하였다. 시료 중의 단백질의 양은 BSA를 표준시료로 Lowry 방법으로 측정하였다.

#### 4. Western blotting을 이용한 세포막 포도당 수송체 1 발현의 측정

세포막 분획을 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동으로 분리한 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 전이하였다. Nitrocellulose membrane을 blocking solution에 넣어 실온에서 1시간 진탕 배양하여 비특이결합 부위를 차단하였다. Nitrocellulose membrane을 Tris-buffered saline-Tween 20(TBS-T)으로 세척 후 rabbit anti-GLUT1 항체와 실온에서 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane을 TBS-T로 세척 후 2차 항체인 HRP-labelled anti-rabbit 항체와 실온에서 1시간 반응하였다. 잘 세척한 membrane을 ECL Western blotting detection 시약(Amersham, England)과 1분 동안 반응시켰다. 반응한 membrane을 ECL hyperfilm(Amersham, England)에 적당 시간(15초-30분) 노출하여 산화된 luminol의 작용에 의한 GLUT1 발현을 측정하였다.

## 결 과

### 1. FDG 섭취량의 차이

사람 대장암 세포주인 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5를 RPMI 1640에서 배양하였다. 이들 세포는 plate 표면에 부착하여 상피세포의 형태로 자랐다 (Fig. 1). 배지를 제거한 plate 표면에 부착한 세포를 HBS로 세척한 후 HBS에 희석한 FDG와 1시간 배양하였을 때 그 섭취량은 각각  $16.8 \pm 1.36$ ,  $12.3 \pm 5.55$ ,  $61.0 \pm 2.17$ cpm/ $\mu$ g of protein으로 SNU-C5가 다른 세포에 비해 현저히 높은 섭취를 보였다(Fig. 2).

### 2. FDG 섭취 양상

SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 세포의 FDG 섭취는 시간의 경과에 따라 증가하여 반응 2시간까지는 FDG의 섭취가 증가되었으나 2시간 이후는 증가율이 둔화되며, 그후 시간이 흘러도 FDG 섭취는 거의 변화가 없거나 오히려 감소하였다(Fig. 3). FDG의 세포내 섭취율은 본 연구에서 주로 측정된 1시간까지의 섭취가 linear 하므로 1시간까지의 섭취로부터 계산하였으며, SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 각각  $0.29 \pm$

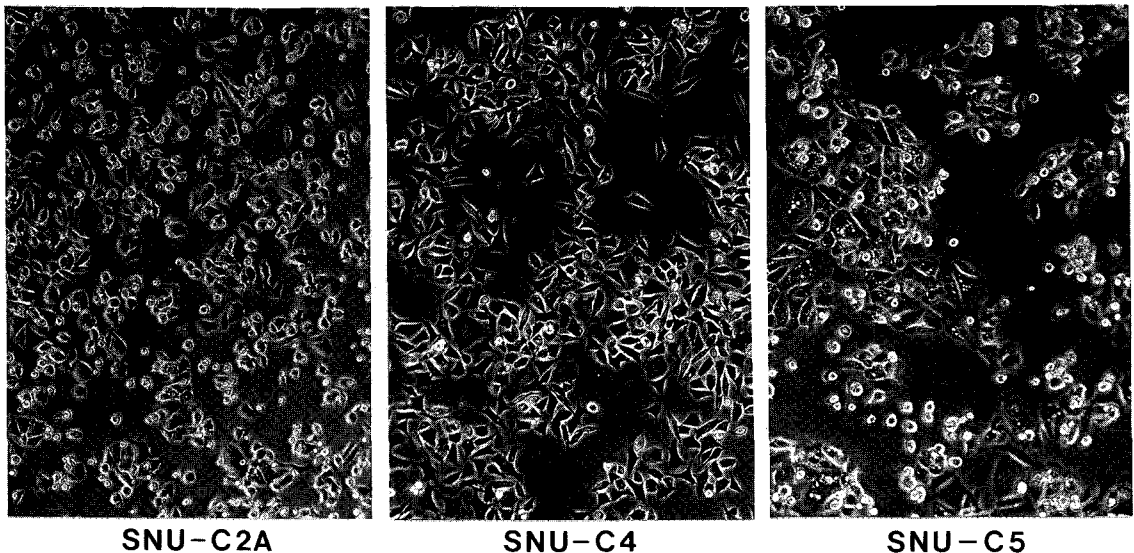


Fig. 1. Light micrographs of SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 cells which were cultured in RPMI 1640. These cells are characterized by typical epithelial growth and adherence. Magnification,  $\times 200$ .

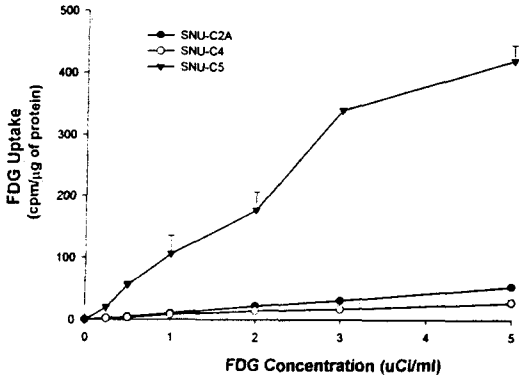


Fig. 2. FDG uptake by SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 cells after 1 hour incubation with 0.5 μCi FDG in 0.5ml HEPES-buffered saline. Values are mean ± SD, n=3. Similar results were obtained in seven independent experiments.

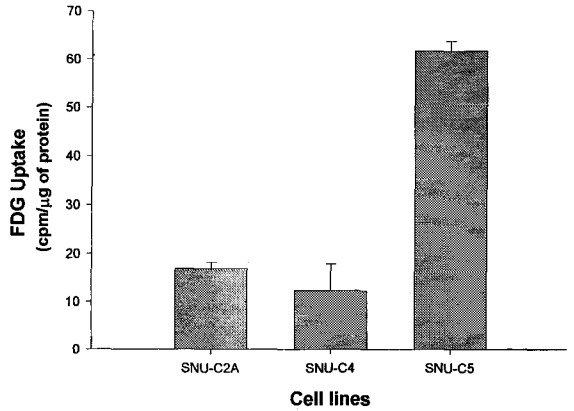


Fig. 4. FDG uptake by SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 cells at different concentration of FDG.  $5 \times 10^5$  cells were incubated with final concentrations of 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5 and 5 μCi/ml of FDG in HEPES-buffered saline. Values are mean ± SD, n=3. Similar results were obtained in four independent experiments.

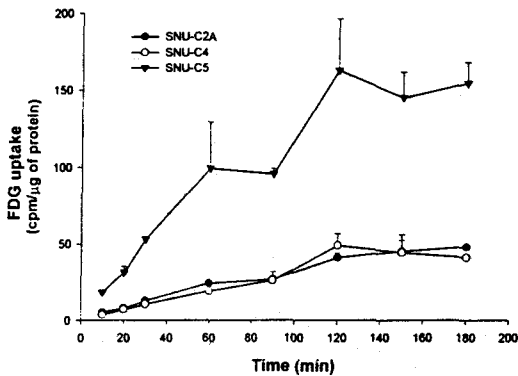


Fig. 3. Time course of FDG uptake of SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 cells.  $5 \times 10^5$  cells were incubated with 1 μCi of FDG in 0.5ml HEPES-buffered saline. Values are mean ± SD, n=3. Similar results were obtained in four independent experiments.

0.03,  $0.21 \pm 0.09$ ,  $1.07 \pm 0.07$  cpm/min/μg of protein 이었다. 또한 FDG 농도가 증가함에 따라 세포의 FDG 섭취는 증가하였다. SNU-C2A, SNU-C4는 FDG가 다량 존재해도 섭취는 많이 증가하지 않았으나 SNU-C5는 FDG 농도 증가에 따라 섭취능도 현저히 증가되었다(Fig. 4). 세포수의 증가에 따른 FDG 섭취는 세포농도  $1 \times 10^5$ /ml,  $5 \times 10^5$ /ml,  $1 \times 10^6$ /ml,  $2 \times 10^6$ /ml에서 SNU-C2A는 496cpm, 2027cpm, 2787cpm, 3706cpm, SNU-C4는 126cpm, 707cpm, 1412cpm, 4947cpm, SNU-C5는 595cpm, 2003cpm,

6202cpm, 11794cpm으로 세포수의 증가에 비례하여 증가하였다.

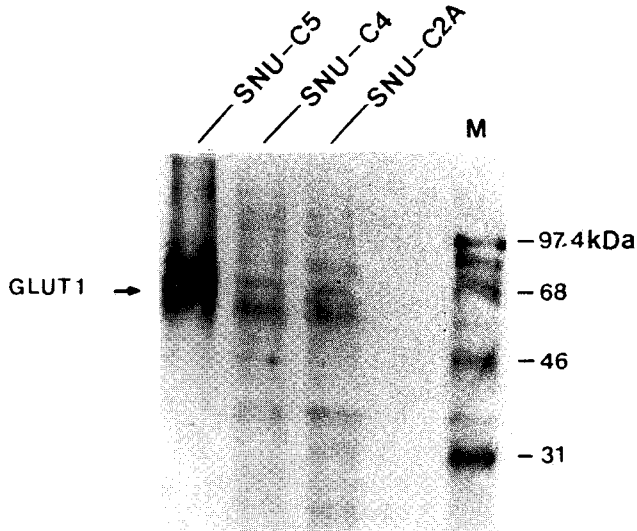
## 2. 포도당 수송체(GLUT1)의 발현

각 세포의 세포막분획을 분리하여 SDS-PAGE와 Western blotting을 하였다. 대장암 세포주의 세포막 분획 시료는 Rabbit anti-GLUT1 항체에 의해 몇몇 비특이성 band를 보이기도 하였으나 57 kDa의 GLUT1 band가 현저히 나타났다. SNU-C5의 세포막 성분은 SNU-C2A, SNU-C4 비하여 현저히 높은 GLUT1 발현을 보였다(Fig. 5).

## 고 찰

종양세포는 특징적으로 증가된 포도당 섭취와 대사를 나타낸다. 세포의 포도당 섭취는 주로 세포막 포도당 수송체에 의한 섭취의 증가와 해당작용의 향진에 기인한다. 포도당 유사체인 FDG의 섭취를 이용한 PET 검사가 종양 및 여러 질환의 진단에 많이 쓰임에 따라 핵의학 분야에서 세포의 포도당 섭취에 관한 많은 연구가 진행되었다<sup>12-14</sup>.

본 연구에서 사용한 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 세포는 각 세포의 포도당 섭취량이 차이가 있었다.



**Fig. 5.** Detection of GLUT1 protein in SNU-C2A, SNU-C4 and SNU-C5 cells by Western blotting. Ten micrograms of cell membrane preparations were electrophoresised on 10% SDS-PAGE. GLUT1 expression was significantly higher in SNU-C5 than in SNU-C2A and SNU-C4.

SNU-C2A와 SNU-C4는 비슷한 정도의 포도당 섭취를 보였으며, SNU-C5는 다른 세포에 비하여 4-5배 이상의 높은 섭취를 보였다. 일반적으로 FDG 섭취는 종양 세포의 배가시간(doubling time)과 세포 증식과 밀접한 관계가 있다. Park 등은 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 세포의 배가시간이 각각 82, 27, 64시간이라고 보고하였다<sup>8)</sup>. 본 연구에서 FDG 섭취와 Park 등이 보고한 배가시간과는 관련이 없었으며, Haberkorn 등도 비슷한 결과를 보고하였다<sup>14)</sup>.

시간에 따른 FDG 섭취는 Haberkorn 등이 methylnitrosourea로 Sprague-Dawley 백서에서 유도한 암(carcinoma)의 연구에서 FDG의 표준섭취계수(standardized uptake value; SUV)가 수분 이내에 거의 최대값에 도달하며, 더 이상 시간이 경과해도 팔목할만한 섭취 증가가 관찰되지 않음을 보고하였다<sup>14)</sup>. 그러나 본 연구에서는 1시간까지는 시간 경과에 따라 현저한 증가를 보였고, 그 증가는 2시간까지 계속 되었으나 그 이후 증가율이 둔화되거나 오히려 감소하였다(Fig. 3).

포도당 섭취의 중요 요인이 되는 포도당 수송체는 종양에서 발현이 증가되었으며, 발현 양상은 세포들간의 차이가 심하다. 포도당 수송체는 erythrocyte형 (GLUT1), liver형(GLUT2), brain형(GLUT3), mu-

scle이나 fat형(GLUT4), small bowel형(GLUT5)으로 분류된다. 사람의 두경부 평편세포암에서 GLUT 1, 3의 농도와 mRNA 발현증가가 보고되었고 유암조직에서 현저한 GLUT 1의 증가 및 약간의 GLUT 2, 4 증가가 보고되었다<sup>15, 16)</sup>. 수막종과 신경교종에서 GLUT 1, 3의 mRNA 발현이 증가되었고 소화기암과 췌장암에서 GLUT 1, 2, 3가 증가하였으며, 간암에서 GLUT 1이 증가하였다<sup>17, 18)</sup>.

포도당 수송체 가운데 일반적으로 모든 세포에 분포하고 많은 암세포에서 두드러진 증가가 보고된 GLUT1을 측정하였다. SNU-C5는 다른 세포에 비하여 GLUT1의 발현이 현저히 많았으며 이 결과는 FDG 섭취가 SNU-C5에서 현저히 높은 결과와 일치하였다. 따라서 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 세포의 포도당 섭취는 GLUT1의 발현과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 또한 다른 연구에서 이들 세포의 GLUT1 mRNA 발현을 조사한 결과 GLUT1 단백질 발현과 유사한 결과를 나타내었다(미보고 관찰).

본 연구는 FDG PET을 이용한 종양의 진단이 급증함에도 불구하고 유사한 특성을 가진 종양 세포의 FDG 섭취에 대한 비교 연구가 부족한 점에 착안하였다. 사람 대장암 세포 중에서 세포 특성이 유사한

SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5를 이용하여 세포 수준에서 FDG 섭취 양상과 속도 및 포도당 수송체 1의 발현을 측정하였다. 그 결과 각 세포의 FDG 섭취량과 발현된 GLUT1의 양 사이에는 밀접한 관계가 있음을 나타내었다. 또한 비록 세포 기원과 특성이 유사한 세포라도 FDG 섭취량, 섭취속도 등이 다르며, 이들 세포의 배가시간과 FDG 섭취량은 비례하여 일치하지는 않았다.

## 요 약

종양세포는 포도당섭취 및 포도당 대사가 정상세포에 비해 증가된 특징을 가진다. 포도당 유사체인 [<sup>18</sup>F] fluorodeoxyglucose(FDG)의 섭취를 이용한 PET 검사가 종양의 진단에 많이 쓰이고 있다. 이 연구에서는 유사한 성질을 가진 사람의 대장암 세포주간의 FDG 섭취량 및 섭취 속도의 차이점을 비교하고, 그 포도당 수송체의 발현의 관련성을 규명하고자 한다. 사람대장암 세포 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5를 이용하여 FDG 섭취를 측정하였다. 또한 세포의 포도당 섭취에 중요 역할을 하는 포도당 수송체 1(GLUT1)의 발현을 Western blotting으로 비교하였다.  $1 \times 10^6$ /ml의 대장암 세포에 HEPES-buffered saline에 희석한  $1 \mu\text{Ci/ml}$  FDG를 가하여 37°C에서 1시간 배양하였을 때 SNU-C2A( $16.8 \pm 1.36\text{cpm}/\mu\text{g}$  of protein), SNU-C4( $12.3 \pm 5.55$ ), SNU-C5( $61.7 \pm 2.17$ ) 섭취를 보였다. 시간당 FDG의 섭취는 SNU-C2A( $0.29 \pm 0.03\text{cpm}/\text{min}/\mu\text{g}$  of protein), SNU-C4( $0.21 \pm 0.09$ ), SNU-C5( $1.07 \pm 0.07$ )이었으며, 시간이 경과함에 따라 비례하여 증가하였다. Western blotting으로 측정된 GLUT1은 SNU-C5의 경우 다량 발현되었으나 SNU-C2A와 SNU-C4는 소량 발현되었다. 따라서 SNU-C2A, SNU-C4, SNU-C5 세포는 이들 세포가 비록 유사한 특징을 가졌지만 FDG 섭취량과 섭취 속도 및 GLUT1의 발현이 다르고, 이들 세포의 배가시간(doubling time)은 FDG 섭취와 상관관계가 없었다. 이들 세포의 FDG 섭취와 GLUT1의 발현은 밀접한 상관관계가 있었다.

## 참 고 문 헌

1) Kazuo K, Taiju M, Takehiko F, Masatoshi I, Jun

- H, Kichi I, Ren I, Tatsuo I: *Differential diagnosis of lung tumor with positron emission tomography: A prospective study. J Nucl Med* 1990;31:1927-1933
- 2) Strauss LG, Conti PS: *The applications of PET in clinical oncology. J Nucl Med* 1991;32:521-526
- 3) Yonekura Y, Benua RS, Brill AB, Som P, Atkins HL: *Increased accumulation of 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F] fluoro-D-glucose in liver metastases from colon cancer. J Nucl Med* 1982;23:1133-1137
- 4) Wahl RL, Hutchins GD, Buchsbaum DJ, Liebert M, Grossman HB, Fisher S: *<sup>18</sup>F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose uptake into human tumor xenografts. Cancer* 1991;67:1554-1550
- 5) Kim EE, Tilbury RS, Haynie: *Positron emission tomography in clinical oncology. Cancer Bull* 1988;40:158-164
- 6) Falk PM, Gupta NC, Thorson AG, Frick MP, Boman BM, Christensen MA, Blatchford GJ: *Positron emission tomography for preoperative staging of colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum* 1994;37:153-156
- 7) Ito K, Kato T, Tadokoro M, Ishiguchi T, Oshima M, Ishigaki T, Sakuma S: *Recurrent rectal cancer and scar: differentiation with PET and MR imaging. Radiology* 1992;182:549-552
- 8) Park J-G, Oie HK, Sugarbaker PH, Henslee JG, Chen T-R, Johnson BE, Gazdar A: *Characteristics of cell lines established from human colorectal carcinoma. Cancer Res* 1987;47:6710-6718
- 9) Wilson CM, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A: *Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. FEBS* 1995;368:19-22
- 10) Sarkar HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR: *Expression of the human erythrocyte glucose transporter in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5463-5467
- 11) Shimizu Y, Shimazu T: *Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin and norepinephrine in primary culture of brown adipocytes. Biochem Biophys Res Comm* 1994;202:660-665
- 12) Zasadney KR, Whal RL: *Standardized uptake values of normal tissues at PET with 2-[fluorine-<sup>18</sup>]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Variation with body weight and a method for correction. Radiology* 1993;189:847-850
- 13) Slosman DO, Pittet N, Donath A, Polla BS: *Fluorodeoxyglucose cell incorporation as an index of cell proliferation: evaluation of accuracy in cell*

- culture. Eur J Nucl Med* 1993;20:1084-1088
- 14) Haberkorn U, Ziegler SI, Oberdorfer F, Trojan H, Haag D, Peschke P, Berger MR, Altmann A, van Kaick P: *FDG uptake, tumor proliferation and expression of glycolysis associated genes in animal tumor models. Nucl Med Biol* 1994;21: 827-834
- 15) Mellanen P, Minn H, Grenman R: *Expression of glucose transporters in head and neck tumors. Internal J Cancer* 1992;56:622-629
- 16) Brown R, Wahl R: *Overexpression of GLUT1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. Cancer* 1993;72:2979-2985
- 17) Glick R, Unterman T, Lacson R: *Identification of insuline-like growth factor(IGF) and glucose transporter 1 and 3 mRNA in CNS tumors. Regul Pept* 1993;48:251-256
- 18) Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H: *Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. Biochem Biophy Res Comm* 1990;170:223-230