

## In-vitro와 Ex-vivo MTT Assay를 통한 직장암의 방사선치료 감수성 예측 가능성 검증

원자력의학원 방사선치료기술연구팀\*, 방사선종양학과<sup>†</sup>, 세포유전조직재생연구팀<sup>‡</sup>, 서울여자대학교 식품·미생물공학과<sup>§</sup>

김지은\* · 김미숙<sup>†</sup> · 강창모<sup>‡</sup> · 김종일<sup>§</sup> · 신혜경\* · 최철원<sup>†</sup> · 서영석<sup>†</sup> · 지영훈<sup>†</sup>

**목적:** 암환자의 방사선 치료 전 방사선에 대한 감수성을 미리 측정할 수 있다면 임상적으로 많은 도움이 될 것이다. 본 연구는 전 임상 실험을 통하여 MTT assay가 세포집락 측정기법과 비교해서 방사선 감수성을 예측할 수 있고, 직장암 환자의 조직에 사용할 수 있는지 가능성을 확인하고자 하였다.

**대상 및 방법:** 대장암 세포 주인 HCT-8, LoVo, CT-26, WiDr을 이용하여 세포집락 측정기법을 통해 세포생존곡선 및 2 Gy에서의 세포생존확률(SF<sub>2</sub>)을 구하였다. 세포 주 자체를 대상으로 MTT assay를 시행하는 실험(*in vitro*) 및 환자의 암 조직과 같은 상태를 만들기 위하여, 누드 마우스에 세포 주를 주입하여 암 조직을 형성한 후 *in vitro*와 같은 방식으로 MTT assay를 시행(*ex vivo*)하였다. 이 두 실험에 대한 흡광도 값에 따른 저해율(inhibition rate, %)을 구하였다.

**결과:** SF<sub>2</sub> 및 세포생존곡선에 따르면 CT-26 및 LoVo가 HCT-8, WiDr에 비해 방사선에 민감하였다(p<0.05). *In vitro* MTT assay 결과 WiDr, HCT-8, LoVo와 CT-26의 방사선 저해율이 각각 17.3%, 21%, 30%, 56.5%를 나타내었다. 또한 *ex vivo* MTT assay의 저해율은 HCT-8, WiDr, LoVo와 CT-26에서 각각 23.5%, 26%, 38%, 53%를 나타내었다. 통계적인 차이를 감안하였을 때 세포생존곡선을 통해 얻은 방사선 감수성의 결과와 동일한 순서를 가졌다.

**결론:** 4개의 세포 주의 방사선의 감수성의 순서가 세포집락 측정기법 및 *in vitro*와 *ex vivo* MTT assay 결과에서 거의 일치함을 보였다. 이는 직장암 환자에서 MTT assay를 통해 방사선 감수성을 예측할 수 있는 가능성을 제시하였다.

**핵심용어:** 세포집락 측정기법, MTT assay, 방사선 감수성

### 서론

암환자의 방사선 치료 전 암세포의 방사선에 대한 감수성을 미리 측정할 수 있다면 임상적으로 많은 도움이 될 것이다. 항암요법에 대하여는 항암제 감수성을 측정하기 위한 방법이 시도되고 있는 반면, 방사선치료에 대한 감수성을 측정할 수 있는 방법은 흔치 않은 실정이다. 세포의 방사선 감수성 측정의 표준으로 세포집락 측정(clonogenic assay) 기법을 사용하며 이는<sup>1,2)</sup> 종양이나 재증식 능력을 가

진 정상 조직에서 유래한 세포가 *in vitro*에서 성장해 형성하는 세포집락을 측정하는 것이다.<sup>3,4)</sup> 그러나 이 방법은 단일 세포 부유액의 준비가 어렵고, 세포의 종류에 따라 세포집락 형성 정도가 매우 낮아 실험치를 구하기 힘든 점, 실험을 진행하여 결과를 얻을 때까지 10일 이상의 결과가 소요되므로 환자를 대상으로 하는 임상용 감수성 측정 방법으로 사용하기에는 한계가 있다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay는 실험방법이 비교적 간단하고 반자동화되어 있어 객관적인 결과를 쉽게 정량화할 수 있고 실험기간도 3일 내지 5일 정도로 비교적 짧은 이점이 있다. 따라서 항암제 선별이나 암 기초 연구에 널리 사용되고 있는 실정이다. 본 연구는 임상에서 항암제 감수성 측정에 MTT assay를 이용한다는 점에 착안하여 수술 전 방사선 치료를 시행하는 직장암 환자의 방사선 감수성 예측에 사용할 수 있을 지를 확인하기 위하여,

이 논문은 2008년 6월 13일 접수하여 2008년 7월 9일 채택되었음.

책임저자: 김미숙, 원자력의학원 방사선종양학과

Tel: 02)970-1264, Fax: 02)970-2412

E-mail: mskim@kcoch.re.kr

이 논문은 2007년 원자력의학원 일반사업 연구비에 의하여 이루어짐.

전 임상 실험을 통하여 가능성을 검증하고자 하였다. 즉 여러 개의 대장암 세포 주의 세포집락 형성을 통해 방사선 감수성을 알아내고 이 감수성의 순서와 MTT assay를 시행하여 얻은 방사선 감수성간에 상관 관계가 존재한다면 임상에서 MTT assay 사용할 수 있을 것이다. 또한 환자의 암 조직을 직접 채취하는 것과 흡사한 조건을 만들기 위하여 대장암 세포 주를 마우스에 주입하여 종양을 형성시킨 후 이를 채취하고 방사선을 조사하여 MTT assay를 시행한 후 얻은 방사선에 대한 저해율(inhibition rate, %)이 기존의 세포집락 측정기법을 통한 감수성과 상관관계가 있는지 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포 주 및 세포배양조건

본 실험에서는 결장의 선암종인 HCT-8, LoVo, CT-26 및 WiDr 등 총 4개의 세포 주를 사용하였다(Table 1). HCT-8과 LoVo는 American Type Culture Collection (ATCC)에서, CT-26과 WiDr은 한국 세포 주 은행으로부터 구입하였다. HCT-8 세포 주는 Horse serum (Gibco, New York, NY, USA) 10% 및 penicillin 10  $\mu$ L/mL 함유 RPMI1640으로 배양하였으며, LoVo 세포 주는 FBS 10% 및 penicillin 10  $\mu$ L/mL 함유 RPMI1640으로 배양하였다. CT-26과 WiDr은 FBS 10% 및 penicillin이 10  $\mu$ L/mL 함유 DMEM으로 배양하였다. 모든 세포 주는 5% CO<sub>2</sub>, 100% 습도로 37°C의 배양기에서 배양하였다.

### 2. 세포집락 측정기법(clonogenic assay) 및 생존 분획

각각의 세포 주를 단세포 현탁액으로 만든 후 trypan blue 염색을 통해 계수하여 95% 이상이 단세포임을 확인하였으며, 직경 60 mm 배양접시 3개에 각각 선량에 따라 0 Gy: 250개, 2 Gy: 250개, 4 Gy: 500개, 6 Gy: 1,000개, 8 Gy: 2,000개의 세포를 넣고 밤새 배양하였다. 세포가 안정적으로 배양접시에 부착된 것을 확인 후, 감마선 조사장치

인 GC-3000 Elan (MDS Nordion, Ontario, Canada. 선량률: 3 Gy/min)을 사용하여 각각의 선량대로 방사선을 조사한 후 육안으로 세포집락이 확인될 때까지 약 7일에서 10일 동안 배양하였다. 세포집락 형성 후 -20°C에 2시간 이상 보관해 둔 고정액(100% methanol)으로 10분간 고정하고 0.4%의 crystal violet 시약으로 30분간 염색한 후 세포집락을 계수하였다. 생존 분획(surviving fraction, SF)은 각 선량별 3개의 배양 접시의 세포집락 갯수의 평균을 이용하여, 다음 식으로 구하였다.

SF=배양 접시의 세포집락 갯수/심은 세포 수×(세포집락 형성률/100)

2 Gy에서의 생존분획(SF<sub>2</sub>)을 각 세포 별 방사선 민감도 순서에 반영하였다.

### 3. MTT assay

#### 1) 세포 주를 이용한 실험(*In vitro*)

MTT 시약은 Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide를 최종 농도 5 mg/mL가 되도록 PBS에 녹인 후 빛을 차단하고 4°C에 보관하였다. 각각의 세포 주를 단세포 현탁액으로 만든 후 계수하여 직경 60 mm 배양접시에 2×10<sup>5</sup>개씩 넣고 밤새 배양하였다. 세포가 안정적으로 배양접시에 부착된 것을 확인 후, 각각의 선량대로 방사선을 조사하였다. 방사선량 및 배양시간은 예비실험에서 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 및 30 Gy를 조사한 후 시간에 따른 MTT 저해율의 최적화를 본 연구<sup>5)</sup>를 토대로 하여 실제 임상에 적용 가능하다고 판단되는 10 Gy와 20 Gy의 조사량 및 48시간의 배양 시간을 선택하였다. 대조군, 10 Gy 및 20 Gy의 세 그룹으로 나누어 각각의 그룹 당 세 개의 배양접시를 사용하였다. 방사선 조사 48시간 후 배양액과 MTT 시약이 약 10 : 1의 비율이 되도록 MTT 시약을 첨가하여 2시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 배양접시에 100% DMSO 3 mL를 첨가하여 세포에 흡수된 MTT formazan을 녹여내고 96-well 배양접시에 100  $\mu$ L씩 분주하여 scanning multiwell spectrophotometer (Boitek instruments Inc., Burlington, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3개 well의 평균 흡광도를 결과로 사용하였다.

#### 2) Mouse에 형성시킨 종양조직을 이용한 실험(*Ex vivo*)

각각의 세포 주를 단세포 현탁액으로 만든 후 계수하였으며, PBS 50  $\mu$ L 당 1×10<sup>6</sup>개의 세포가 되도록 준비한 현탁액을 50  $\mu$ L 씩 누드 마우스(4주령)의 등에 주입하였다. 마우스에서 직경 1×1 cm 크기 이상의 종양세포 덩어리가 형

Table 1. The Characteristics of the Cell Line

Name	Species	Tumor site	Histopathology	Source
HCT-8	Human	Colon	Adenocarcinoma	ATCC*
LoVo	Human	Colon	Metastatic adenocarcinoma	ATCC*
CT-26	Murine	Colon	Metastatic	KCLB <sup>†</sup>
WiDr	Human	Colon	Adenocarcinoma	KCLB <sup>†</sup>

\*American type culture collection, <sup>†</sup>Korean Cell Line Bank

성될 때까지 약 2주 동안 관리하였으며, 경추 탈골 후 종양덩어리를 취하였다. 종양덩어리를 수술용 메스를 이용하여 0.2~0.5 cm 정도 크기의 조직으로 자른 후 3 mL의 배양액에 담아 방사선을 0 Gy, 10 Gy, 20 Gy 세 그룹으로 나누어 조사하였다. 방사선 조사 후 조직에 accumax 용액 (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, USA)을 가하여 단일세포로 만든 후 세포 수를 측정하였다. 96-well 배양접시에 각 그룹별로 하나의 well 당  $1 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ L (배양액)의 세포를 넣은 후 48시간 동안 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 방사선 조사 48시간 후 배양액과 MTT 시약이 약 10 : 1의 비율이 되도록 MTT 시약을 첨가하여 2시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 well당 100% DMSO 100  $\mu$ L를 첨가하여 세포에 흡수된 MTT formazan을 녹여내고 scanning multiwell spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3개 well의 평균 흡광도를 결과로 사용하였다.

4. 통계 처리

1) 세포집락 측정기법

각 세포 주의 세포생존곡선은 방사선량에 따라 구한 세포의 생존 분획의 관계를 linear quadratic 모형의 수식인  $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ 에 따라  $\alpha$  (linear inactivation coefficient; Gy-1)와  $\beta$  (quadratic inactivation coefficient; Gy-2)를 excel 프로그램을 통하여 구하였다. 또한 각 세포 주의 방사선 감수성을 비교하기 위하여 2 Gy 에서의 생존 세포 확률(SF<sub>2</sub>)을 구하였다. 각 군간의 통계학적 차이는 SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) 모수 검증(Anova test)을 통하여 구하였다.

2) MTT assay

MTT assay의 흡광도를 이용한 방사선에 대한 저해율은

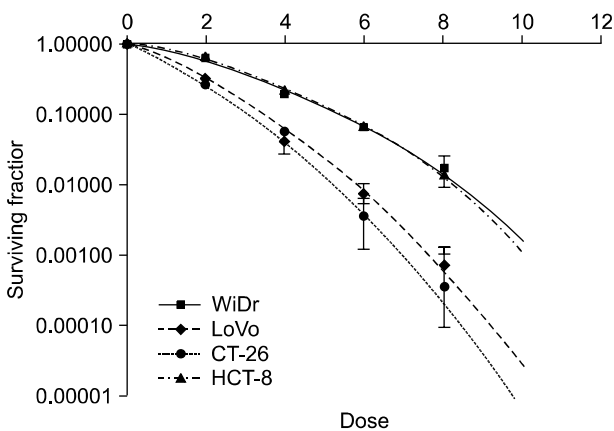


Fig. 1. The radiation survival curve from clonogenic assay for HCT-8, LoVo, CT-26 and WiDr cells.

각 세포별 방사선을 조사하지 않은 그룹의 흡광도 값을 기준으로 하였을 때, 방사선을 조사한 각 그룹의 흡광도 값의 비율을 계산한 것으로 다음의 공식을 이용하여 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{방사선 조사 그룹 흡광도} / \text{방사선을 조사하지 않은 그룹 흡광도}) \times 100 (\%)$$

각 군간의 통계학적 차이는 SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) 비모수 검증(Mann-Whitney test)을 통하여 구하였다.

결 과

1. 세포집락 측정기법

각 세포 주별 집락 형성률(Plating efficiency, PE)을 구하고, 각 방사선량에 대한 세포 생존 확률을 구하여 세포생존곡선을 완성하였다. HCT-8, LoVo, WiDr 그리고 CT-26 세포 주의 집락형성률은 각각 54%, 47%, 49%, 45%였다. SF<sub>2</sub>는 CT-8과 WiDr의 경우 그 값이 각각 0.650과 0.607로서 통계학적으로 차이를 보이지 않았다(p=0.61). LoVo와 CT-26 역시 SF<sub>2</sub> 값이 각각 0.324와 0.267로서 통계학적 차이를 보이지 않았다(p=0.38). 하지만 LoVo와 CT-26에 비하여 HCT-8와 WiDr의 방사선 감수성이 낮았다(p=0.001)(Fig. 1).

2. MTT assay

*In vitro* 및 *ex vivo* 실험의 MTT assay를 통해 얻은 흡광도 값은 Table 2와 같다. *In vitro* 실험의 흡광도에 따른 방사선 저해율을 구한 결과 WiDr, HCT-8, LoVo, CT-26의 순으로 그 값이 높아짐을 볼 수 있었으며(Fig. 2), 세포생존곡선과 마찬가지로 Lovo와 CT-26에 비하여 HCT-8과 WiDr의 방사선 감수성이 낮았다(p=0.04). *Ex vivo* 실험에서는

Table 2. The Absorbance (540 nm) from MTT Assay *In vitro* and *Ex vivo*

Cell lines	Absorbance ( <i>In vitro</i> )			Absorbance ( <i>ex vivo</i> )		
	Control	10 Gy	20 Gy	Control	10 Gy	20 Gy
HCT-8	0.132 (±0.002)	0.107 (±0.002)	0.104 (±0.004)	0.377 (±0.014)	0.328 (±0.016)	0.288 (±0.021)
Lovo	0.191 (±0.01)	0.141 (±0.008)	0.134 (±0.005)	0.661 (±0.020)	0.510 (±0.047)	0.410 (±0.004)
CT-26	0.416 (±0.003)	0.185 (±0.004)	0.181 (±0.001)	0.464 (±0.012)	0.337 (±0.010)	0.217 (±0.029)
WiDr	0.194 (±0.005)	0.162 (±0.006)	0.161 (±0.009)	0.544 (±0.001)	0.467 (±0.055)	0.402 (±0.008)

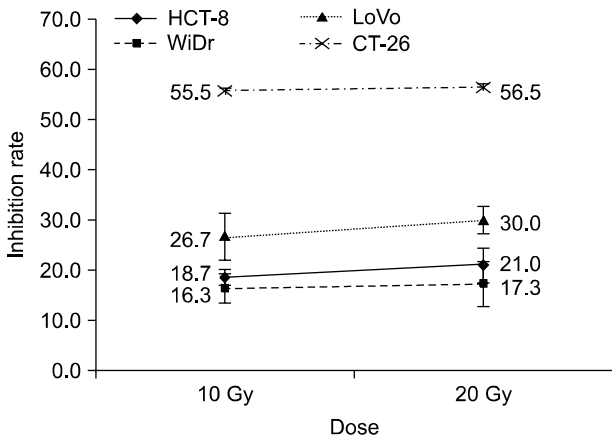


Fig. 2. The inhibition rate from MTT assay *in vitro*.

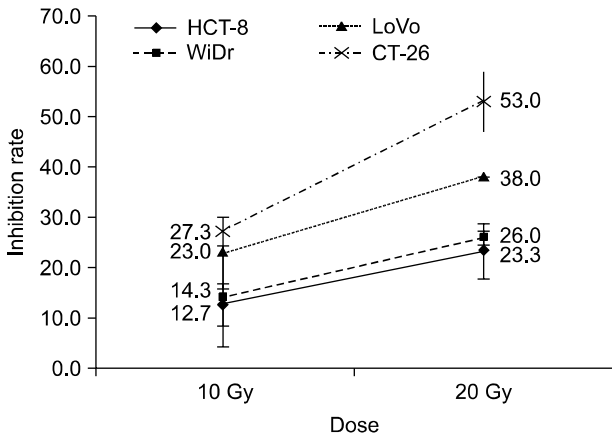


Fig. 3. The inhibition rate from MTT assay *ex vivo*.

HCT-8, WiDr, LoVo, CT-26의 순으로 그 값이 높아짐을 확인하였으며(Fig. 3), 역시 Lovo와 CT-26에 비하여 HCT-8와 WiDr의 방사선 감수성이 낮았다( $p=0.05$ ).

### 3. 세포집락 측정기법과 MTT assay의 비교

Table 3에서 *in vitro*와 *ex vivo* 실험을 통해 얻은 20 Gy에서의 MTT assay의 저해율을 감수성 순서에 따라 표시하였다. 또한 세포집락 측정기법에서의 방사선 감수성에 따른 순서 및 SF<sub>2</sub>를 표기하였다. SF<sub>2</sub>에 따른 방사선 감수성이 높은 순서는 HCT-8, WiDr, LoVo, CT-26의 순이었으며, MTT assay의 저해율을 통해 감수성이 높은 순서는 *in vitro*에서 WiDr, HCT-8, LoVo, CT-26 순서였으며, *ex vivo*에서는 HCT-8, WiDr, LoVo, CT-26의 순이었다.

Table 3. Correlation among Colon Cancer Cell Lines between Clonogenic Assay and MTT Assay

Radio-sensitivity	Clonogenic assay (SF <sub>2</sub> )	MTT assay (Inhibition rate at 20 Gy)	
		<i>In vitro</i>	<i>Ex vivo</i>
Resistant	HCT-8 (0.650)	WiDr (17%)	HCT-8 (24%)
	WiDr (0.608)	HCT-8 (21%)	WiDr (26%)
	LoVo (0.325)	LoVo (30%)	LoVo (38%)
	CT-26 (0.267)	CT-26 (57%)	CT-26 (53%)
Sensitive			

### 고안 및 결론

방사선요법은 암치료에 중요한 일익을 담당하고 있으며, 특히 국소치료요법으로 암세포가 국소에 국한되거나 주위 조직침윤 및 주위 임파절 전이가 있는 경우까지 포괄적으로 치료할 수 있는 장점이 있다. 환자 개인별 방사선에 대한 암세포의 감수성은 방사선 치료 효과에 중요한 영향을 준다. 본 연구는 생검이 가능한 직장암 환자를 대상으로 MTT assay를 통한 환자의 방사선 감수성 예측 가능성을 전 임상 실험을 통하여 확인하고자 하였다.

방사선에 의한 세포사는 세포의 생존에 필수적인 DNA와 세포막과 관련된 것으로 알려져 왔다. 따라서 방사선을 받은 세포는 세포 분열이 일어날 때 죽거나 세포고사(아포토시스)의 과정을 거쳐 죽게 된다. 본 실험에 사용된 MTT assay는 세포 내 미토콘드리아 외막의 탈수소효소작용에 의하여 노란색 수용성의 MTT tetrazolium이 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 대사가 왕성한 살아있는 세포의 농도를 반영한다. 이 방법은 비교적 간편하고, 객관적 결과를 쉽게 정량화할 수 있어 실험실에서 세포사의 측정에 많이 사용되고 있다. 또한 MTT assay는 실험결과가 신속하며 검사에 필요한 세포수가 dye exclusion이나 세포집락 측정기법보다 적어도 되므로, 임상 적용이 용이한 장점을 가진다.<sup>6~8</sup>) 그런데 MTT의 환원은 아스코르빈산, 말론산, 로테논 등의 여러 화학물질에 직·간접적 영향을 받기 때문에 배양조건과 실험여건 등에 예민하고, 미토콘드리아의 탈수소효소 활성도가 종양세포에 따라 차이가 있을 수 있다는 단점도 있다.<sup>9</sup>) 현재 이런 단점에도 불구하고 MTT assay는 개인별 암종에 대한 항암제의 감수성을 측정하기 위하여

위암, 유방암 또는 대장암 등에서 사용되고 있다. 즉 수술로 제거된 암종에 유력한 항암제를 처리하여 이들간의 얻어진 MTT 의 저해율을 평가함으로써 여러 항암제에 대한 개인 암종별 감수성의 순서를 정하는 방법이다. Kabeshima 등<sup>10)</sup>과 Yamaue 등<sup>11)</sup>은 대장암 환자를 대상으로, Xu 등<sup>12)</sup>은 유방암 환자를 대상으로 MTT assay 방법이 임상에서 항암제 감수성 검사로 사용할 수 있는지 등을 검증하였다. 이 논문에 의하면 대장암 및 유방암 환자에서 MTT assay 의 저해율 정도에 따라 항암제의 감수성을 예측 할 수 있다는 결론을 도출하였다. 그러나 검체마다 반응도가 상이하였거나, 기존에 잘 알려진 예후 인자들과는 일반적으로 상관관계가 없는 문제점이 보고 되었다. 결국 MTT assay 를 통한 항암제의 감수성 검사의 가능성은 확인하였으나 이 방법을 통하여 생존율을 증가 시킬 수 있는지에 대한 해답은 향후 잘 계획된 많은 수의 환자를 통한 전향적 연구를 필요로 하고 있다.

본 연구에서는 대장암 세포 주인 HCT-8, LoVo, CT-26 및 WiDr에서 세포집락 측정 기법을 통한 생존 세포의 확률과 MTT assay를 통한 방사선에 의한 생존 저해율에 따른 결과를 비교하여, 두 방법 간의 방사선 감수성의 순서는 큰 차이가 없이 거의 일치함을 확인하였다. 이는 두 방법을 통한 방사선 감수성 결과가 상관관계를 보임으로써 임상적용이 어려운 세포집락 측정기법 대신 10 Gy 및 20 Gy를 조사한 후 저해율을 구하는 MTT assay를 이용하여 방사선 감수성을 예측할 수 있는 임상 적용 가능성을 제시하였다. 또한 단일 세포 주를 조직으로 형성시켜 실험을 진행한 *ex vivo* 방법을 통하여, 환자의 생검 조직을 채취하여 방사선 조사 후 MTT assay를 적용할 수 있다는 임상 연구의 가능성을 확인하였다.

MTT를 이용한 방사선의 감수성 검사에 대한 연구는 Slavotinek<sup>13)</sup> 및 홍 등<sup>14)</sup>에 의하여 이루어졌다. 이들은 각 세포 주마다 성장 속도의 차이가 있기 때문에 최적의 배양 시간이 다르고 이에 따른 결과가 다르게 나타나므로, MTT assay를 이용하여 방사선 조사 후의 세포생존을 측정하기 위해서는 각 세포 주의 최적 배양시간 조건을 찾는 것이 필수적이며 이 조건 하에서 MTT assay를 시행해야 방사선에 의한 세포 민감성 측정에 이용될 수 있다고 보고하였다. 그러나 Ramsay 등<sup>15)</sup> 및 Taghian 등<sup>16)</sup>의 발표에 의하면 유방암의 림프구를 이용한 MTT assay 및 뇌암, 편평상피암, 육종 등을 이용한 MTT assay 의 결과가 *in vitro* 및 임상적 결과와 잘 연계 되지 않다고 발표하였다. 이와 같은 이견 및 현재까지 MTT assay 외 다른 많은 실험 방법<sup>17~21)</sup> 역시 임상 적용에 실패한 이유는 방사선 치료 시 여러 요

인이 작용하여 민감도를 결정하기 때문이라고 생각할 수 있다.

따라서 실제 임상에서 직장암의 민감도 측정에 MTT assay를 적용 하기 위하여 다음과 같은 문제에 대한 연구를 필요로 한다. 10 Gy 및 20 Gy의 용량이 임상에서 방사선 감수성을 반영할 수 있는지 여부와 본 연구에서 사용한 배양시간이 적절한지에 대한 임상 연구를 필요로 한다. 또한 본 논문은 세포주 및 세포주를 누드 마우스에 주입하여 종양을 형성한 후 채취하였으므로 비교적 종양이 동질의 성질을 가지고 있어 검체마다 상이한 결과를 가져오지 않았다. 그러나 실제 임상에서는 암조직이 암세포 및 정상 섬유세포로 구성되어 있고 피사 부분 및 저산소 부분이 복합되어 있으므로 조직의 일부를 채취하여 실험을 하였을 때 검체마다 상이한 결과가 나올 수 있는 지에 대한 연구가 필요하다. 또한 세포에 대한 방사선의 감수성 결정에는 종양 자체의 민감도를 결정하는 내부 요인(*intrinsic factor*) 및 저 산소압을 비롯한 환경요인의 변수(*extrinsic factor*)가 함께 관여한다. 세포의 내부 요인은 DNA 의 손상과 이를 복구하는 시스템과 관련된 일련의 복잡한 작용이다.<sup>22)</sup> 이런 복잡한 작용에서 MTT assay는 내부요인의 민감도를 반영할 여지가 있으나, 외부요인에 대한 변수는 전혀 고려되지 않는다. 따라서 환경 요인 변수에 대한 연구가 함께 병행되어야 정확한 민감도 측정이 될 것이다. 즉 방사선 치료 전 직장암 환자를 대상으로 MTT assay를 이용한 방사선 감수성을 예측할 수 있을지 여부는 많은 임상 연구가 이루어진 후에 결론 내릴 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Hill BT. Use of continuous human tumor cell lines to evaluate drugs by clonogenic assays. In: Dendy PP, Hill BT, eds. Human Tumor Drug Sensitivity Testing *in vitro*. New York: Academic Press. 1983:129-146
2. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science (Wash. DC) 1977;197:461-463
3. Bertonecello I, Bradley TR, Campbell JJ, et al. Limitations of the clonal agar assay for the assessment of primary human ovarian tumor biopsies. Br J Cancer 1982;45:803-811
4. Alley M, Lieber MM. Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. Br J Cancer 1984;49:225-233
5. Kim JE, Kim MS, Kang CM, et al. A study for the radiosensitivity using MTT assay. 5<sup>th</sup> symposium of Korean Society of Radiation Bioscience. 2006.12.1. Seoul, Korea
6. Finlay GJ, Wilson WR, Baguley BC. Comparison of *in vitro* activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. Eur J Cancer Clin Oncol 1986;22:655-662

7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity. *Cancer Res* 1987;47:936-942
8. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987;47:943-946
9. Black MM, Speer FD. Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst* 1954;14:1147-1158
10. Kabeshima Y, Kubota T, Watanabe M, Hasegawa H, Furukawa T, Kitajima M. Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3033-3037
11. Yamaue H, Tanimura T, Nakamori M, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Dis Colon Rectum* 1996;39:416-422
12. Xu JM, Song ST, Tang ZM, et al. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53:77-85
13. Slavotinek A, McMillan TJ, Steel CM. Measurement of radiation survival using the MTT assay. *Eur J Cancer* 1994;30A:1376-1382
14. Hong SM, Kim IH. The optimal condition of performing MTT assay for the determination of radiation sensitivity. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2001;19:163-170
15. Ramsy J, Birrell G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:339-344
16. Taghian A, DuBois W, Budach W, Baumann M, Freeman J, Suit H. In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:99-104
17. Zaffaroni N, Benini E, Gornati D, Bearzatto A, Silvestrini R. Lack of a correlation between p53 protein expression and radiation response in human tumor primary cultures. *Stem Cells* 1995;13:77-85
18. Bristow RG, Brail L, Jang A, et al. P53-mediated radioresistance does not correlate with metastatic potential in tumorigenic rat embryo cell lines following oncogene transfection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:341-355
19. Griffon G, Marchal C, Merlin JL, Marchal S, Parache RM, Bey P. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. *Eur J Cancer* 1995;31:85-91
20. Dunst J, Gebhart E, Neubauer S. Can an extremely elevated radiosensitivity in patients be recognized by the in-vitro testing of lymphocytes? *Strahlenther Onkol* 1995;171:581-586
21. West CM, Davidson SE, Roberts SA, Hunter RD. Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 1993;68:819-823
22. Szumiel I. Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. *Radiat Res* 2008;169:249-258

---

Abstract

---

## The Use of MTT Assay, *In Vitro* and *Ex Vivo*, to Predict the Radiosensitivity of Colorectal Cancer

Ji Eun Kim\*, Mi-Sook Kim, M.D., Ph.D.<sup>†</sup>, Chang Mo Kang, Ph.D.<sup>†</sup>, Jong Il Kim, Ph.D.<sup>§</sup>, Hye Kyung Shin\*, Chul Won Choi, M.D.<sup>†</sup>, Young-Seok Seo, M.D.\*<sup>†</sup> and Young-hoon Ji, Ph.D.<sup>†</sup>

\*Laboratory of Radiation Treatment Research, <sup>†</sup>Department of Radiation Oncology, <sup>‡</sup>Laboratory of Cytogenetics and Tissue Regeneration, Korea Institute of radiological and Medical Sciences, <sup>§</sup>Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul, Korea

**Purpose:** The measurement of radiosensitivity of individuals is useful in radiation therapy. Unfortunately, the measurement of radiation survival using a clonogenic assay, which is the established standard, can be difficult and time consuming. The aim of this study is to compare radiosensitivity results obtained from the MTT and clonogenic assays, and to evaluate whether the MTT assay can be used on clinical specimens.

**Materials and Methods:** HCT-8, LoVo, CT-26, and WiDr were the colon cancer cell lines used for this study. The clonogenic assay was performed to obtain the cell survival curves and surviving fractions at a dose of 2 Gy (SF<sub>2</sub>) as the standard technique for radiosensitivity. Also, the MTT assay was performed for each of the cell lines (in vitro). To simulate clinical specimens, the cell lines were inoculated into nude mice, removed when the tumors reached 1 cm in diameter, and chopped. Next, the tumors were subjected to the same process involved with the MTT assay in vitro. The inhibition rates (IR) of 10 Gy or 20 Gy of irradiation for in vitro and ex vivo were calculated based on the optical density of the MTT assay, respectively.

**Results:** According to SF<sub>2</sub> and the cell survival curve, the HCT-8 and WiDr cell lines were more resistant to radiation than LoVo and CT-26 ( $p < 0.05$ ). The IR was measured by in vitro. The MTT assay IR was 17.3%, 21%, 30% and 56.5% for the WiDr, HCT-8, LoVo and CT-26 cell lines, respectively. In addition, the IR measured ex vivo by the MTT assay was 23.5%, 26%, 38% and 53% in the HCT-8, WiDr, LoVo and CT-26 tumors, respectively.

**Conclusion:** The radiosensitivity measured by the MTT assay was correlated with the measures obtained from the clonogenic assay. This result highlights the possibility that the MTT assay could be used in clinical specimens for individual radiosensitivity assays.

---

**Key Words:** Clonogenic assay, MTT assay, Radiosensitivity