

## 항고형암제의 활성평가를 위한 *in vitro* 삼차원 암세포 배양계의 확립

이상학 · 이주호 · 구효정<sup>†</sup>

가톨릭대학교 의과대학 연구원 임상연구지원센터 연구개발부  
(2004년 8월 12일 접수 · 2004년 10월 6일 승인)

### Establishment of *in vitro* 3-Dimensional Tumor Model for Evaluation of Anticancer Activity Against Human Solid Tumors

Sang-Hak Lee, Joo-Ho Lee and Hyo-Jeong Kuh<sup>†</sup>

Catholic Research Institutes of Medical Science, The Catholic Univ. of Korea, Seoul

(Received August 12, 2004 · Accepted October 6, 2004)

**ABSTRACT**—For the efficient determination of activity against solid tumors, an *in vitro* tumor model that resembles the condition of *in vivo* solid tumors, is required. The purpose of this study was to establish a rapid culture method and viability assay for an *in vitro* 3-dimensional tumor model, multicellular spheroid (MCS). Among 12 human cancer cell lines, a few cell lines including DLD-1 (human colorectal carcinoma cells) formed fully compact MCS which was adequate for *in vitro* viability assay. DLD-1 MCS showed steady growth reaching 700  $\mu$ m diameter after 11 day culture. DLD-1 cells grown as MCS showed significant increase in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase compared to the monolayer cells (73.9% vs 45.7%), but necrotic regions or apoptotic cells were not observed. The cells cultured as MCS showed resistance to 5-FU (10.3 fold higher IC<sub>50</sub>) compared to monolayers, however, tirapazamine (a hypotxin) showed similar activity in both culture systems. In summary, MCS may be a valid *in vitro* model for activity screening of anticancer agents against human solid tumors and also exploitable for studying molecular markers of drug resistance in human solid tumors.

**Key words**—Multicellular spheroids, DLD-1, 5-fluorouracil, Tirapazamine, Solid tumor

고형암에 대한 화학요법이 혈액암에서와는 달리 기대이하의 효능을 나타내는 원인은 고형암 특유의 항암제에 대한 내성(chemoresistance)이다. 가장 널리 인식되어온 기전은 다약제 내성(multidrug resistance, MDR)으로서 구조적 또는 기전적으로 관련이 없는 약물 군에 대해 내성이 관찰되는 현상을 말하며, 세포막수송 단백질(P-glycoprotein, P-gp)이 이들 약물의 유출(drug efflux)을 촉진시켜 일어나게 된다.<sup>1)</sup> 지난 20년간 P-gp 및 그 유전자인 *mdr1*에 대해 많은 연구가 수행되고 많은 저해제들이 개발되었지만, 고형암의 항암제 내성을 효과적으로 극복하지는 못하였다. 현재까지 항암제 내성에 대한 전임상 연구는 P-gp 과발현과 같은 단일세포 내에서 유래하는 단일세포 내성(unicellular resistance)모델, 즉, 단층세포 배양계(monolayer)에서 장시간 또는 고농도의 약물 노출에 의해 유도되는 내성모델을 이용하여 왔다. 임상에서는 2배 정도의 약물 내성이 유도되더라도 항암약물 치료가 실패하는 반면, 단일세포내성 모델에서는 10배 내지 1000배의 높은 수준의 내성이 유도되기 때문에 이러한 모델

에서 얻어지는 연구결과를 임상으로 이행시키기 어렵다.

따라서 항암제에 대한 고형암의 내성은 단순한 약물수송 단백질에 의한 내성이 아닌 고형암의 구조형태학적, 세포생물학적, 분자유전학적인 특징들이 종합적으로 작용하여 내성을 유발하는 것으로 인식되고 있으며, 이를 다세포 내성(multicellular resistance, MCR)이라 한다.<sup>2)</sup> 다세포 내성은 암세포가 그들의 미세환경(microenvironment)과 접촉하여 유도되는 항암제에 대한 내성기전이다. 즉, 고형암 조직의 특징인 i) 세포의 삼차원적 집단형태, ii) 암세포간의 밀접한 상호작용, iii) 세포와 세포외기질(extracellular matrix, ECM)간의 상호작용 등이 약물의 조직 내 침투와 세포주기조절 또는 세포자연사유도에 관련된 세포내 신호전달경로에 직접적인 영향을 미치게 되고 결과적으로 항암제에 의한 암세포의 성장 억제나 사멸이 감소되게 된다.<sup>3,4)</sup>

이러한 다세포 내성을 나타내는 고형암종에 대해 유효한 신약을 개발하기 위해서는 고형암의 특성을 최대한 반영하는 *in vitro* 실험 모델을 이용하여 임상에서 효능을 나타낼 가능성이 큰 항암후보물질을 선별하는 것이 필요하다. 흔히 사용되는 *in vitro* 단층세포 배양계는 약물의 효능 검색계로서 신속하다는 장점이 있으나, 인체 고형암의 생체내 조건을

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)590-2422, E-mail : hkuh@catholic.ac.kr

반영하지 못하므로 고행암에 유효한 항암후보물질의 발굴에는 적절하지 않다. 고행암의 생체내 특성을 재현할 수 있는 *in vitro* 다세포배양 실험계로서 다세포 구상체(multicellular spheroid, MCS)가 Sutherland에 의해 1970년 처음으로 소개되었고,<sup>5-7)</sup> 이후 많은 연구자들에 의해 그 응용성에 대한 긍정적인 결과들이 보고되어 왔다.<sup>8-11)</sup>

본 연구는 고행암에 유효한 항암후보물질 발굴을 위한 검색계로서 MCS를 이용하기 위해 96-well plate에서 신속배양법 및 정량적 항암활성 측정법을 수립하고자 하였다. 여러 가지 인체 암세포주의 MCS를 수립하여 형성특성을 비교해 보았고, 인체 직장암세포주인 DLD-1의 MCS를 이용하여 MCS의 형태 및 성장특성을 관찰하였다. 이 DLD-1의 MCS에서 5-fluorouracil(5-FU)과 tirapazamine의 항증식효과를 측정하여 데이터의 정량성 및 재현성을 확인하였으며, 단층세포 배양계에서의 결과와 비교 평가함으로써 항암후보물질의 전임상 효능 검색계로서 MCS의 유효성을 평가하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

5-Fluorouracil(5-FU)은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, tirapazamine(TPZ)은 Sanofi-Synthelabo(Malvern, PA, USA)에서 제공받았다. 5-FU와 TPZ는 DMSO를 이용하여 용해시키고, 세포배양배지를 이용하여 적절히 희석하여 사용하였다. Seaplaque agarose는 Cambrex Bio Science(Rockland, ME, USA)에서 구입하였으며, 세포배양에 사용된 시약은 Gibco BRL(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. Methanethiosulfonate(MTS)는 Promega(San Luis Obispo, CA, USA)로부터 구입하였고, 기타 시약은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 세포주와 단층세포 배양

인체 비소세포폐암 세포주 A549, PC-14는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받았고, 인체 외음부암세포주 A431, 인체 직장암세포주 DLD-1, 인체 유방암세포주 MCF-7, 인체 위암세포주 SNU-216, SNU-484, SNU-601 및 AGS는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받았다. 인체 두경부암세포주인 PCI-1, PCI-13, PCI-50은 서울대학교 성명훈 교수님으로부터 분양 받았다. A549, A431, PCI-1, PCI-13, PCI-50 세포주는 10% FBS, penicillin(100 unit/ml), streptomycin(100 mg/ml)이 함유된 DMEM에 배양하였고, PC-14, DLD-

1, MCF-7, SNU-216, SNU-484, SNU-601 및 AGS는 같은 조성의 RPMI1640으로 배양하였다. 배양기에는 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 공급하였고, 37°C의 온도와 95%의 습도가 유지되도록 하였다.

### 다세포 구상체(Multicellular spheroid, MCS) 배양 및 관찰

Liquid overlay 방법을 이용하여 MCS를 형성하였다.<sup>12)</sup> Seaplaque agarose로 코팅된 바닥이 U자 형태인 96-well plate에 단세포부유액(single cell suspension)을 접종하여 하루 동안 방치한 후, 다음날부터는 plate를 교반해 주면서 배양하였다. 주입하는 세포수는 0.1 ml/well의 배양액에 10,000 개를 선택하였다. 배양 3일부터 격일로 50 µl/well씩 배지를 교환해 주면서 MCS가 형성되는 과정을 현미경 하에서 매일 관찰하였다.

MCS의 외부 형태를 관찰하기 위해 scanning electron microscopy(SEM)을 이용하였다. 간략히 서술하면, 1% glutaraldehyde-1% paraformaldehyde액(PBS, pH 7.2)에 배양된 MCS를 1시간 동안 전고정하고, 1% osmium tetroxide(PBS, pH 7.2)에 1시간 동안 후고정하였다. 이를 에탄올과 아세톤으로 탈수한 다음, 다시 isoamylacetate로 치환하고, 임계점 건조기로 건조하였다. 건조된 MCS를 gold coating한 다음 JSM-5410 LV(Jeol, Japan)로 관찰하였다.

MCS의 단면 관찰을 위해서는 semithin section과 파라핀 포매 절편을 이용하였다. 상기한 semithin section을 얻기 위해서는 SEM의 샘플처리방법에서와 같은 고정과 탈수단계를 거친 다음, Epon 812에 포매하였다. 포매된 MCS의 절편(2 µm)을 얻은 뒤, toluidine blue로 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다. 파라핀 포매 절편을 제조하기 위해 MCS를 4% 포르말린으로 하루이상 4°C에서 고정하였다. 포르말린을 제거하고 인산완충액으로 세척한 후에 에탄올로 탈수시켰다. 이후 xylene:paraffin(v/v) 혼합물에 50분 동안 방치 후, paraffin으로 포매하고 5 µm 두께로 절단하여 절편을 얻어 hematoxylin과 eosin 염색을 하였다.

### 다세포 구상체의 성장 및 세포주기 분포 측정

배양세포의 성장율은 methanethiosulfonate(MTS) assay를 이용하여 측정하였다. MCS를 agarose가 코팅되어 있지 않은 용기로 옮겨준 뒤, 새 배양액 100 µl/well과 MTS 20 µl/well을 첨가하여 4시간 동안 재배양 시킨 후, 약 3분 동안 교반하여 균일한 반응액을 얻은 다음, ELISA를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포주기 분포 변화 측정을 위해서는 해당 일에 세포들을

수집하여 인산완충액으로 세척한 후, trypsin-EDTA(0.25% w/v)를 첨가하여 얼음 상에서 1시간 동안 방치하였다. 이후 trypsin-EDTA를 제거하고 배양기에서 5분 동안 처리하여 단세포부유액으로 만든 후 70% 에탄올로 고정한 후 분석 시까지 -20°C 냉동고에서 보관하였다. 분석 당일 세포들을 인산완충액으로 세척한 다음, 50 µg/ml의 RNase A와 50 µg/ml의 propidium iodide를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후, FACScan™(Becton & Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였고, 통계분석은 Modfit®(Verity, Topsham, ME, USA)을 이용하였다.

**항증식 효과 측정 및 분석**

항증식 효과는 상기 다세포 구상체 성장 측정에서와 동일한 방법을 이용하였다. 단층세포(1500 cells/well) 또는 MCS를 5-FU 또는 TPZ에 96시간 동안 노출 시킨 후 MTS assay를 적용하였다. 세포생존율(Eq. 1)과 E<sub>max</sub> 모델(Eq. 2)을 이용하여 IC<sub>50</sub>, 저항분율 등의 파라미터를 산출하였다.

$$\% \text{ Survival} = \left( \frac{\text{mean absorbance of treated cells}}{\text{mean absorbance of control cells}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\% \text{ Survival} = (100 - R) \times \left( 1 - \frac{[D]^m}{K_d^m + [D]^m} \right) + R \quad (\text{Eq. 2})$$

여기에서 [D]는 약물 농도, K<sub>d</sub>는 흡광도에서 50%의 감소를 유발하는 약물 농도(i.e. IC<sub>50</sub>), m은 Hill-type coefficient, 및 R은 저항분율(residual unaffected fraction, the resistance fraction)이다.

**결 과**

**다세포 구상체의 수립**

7일 동안 배양된 MCS의 형태를 광학현미경과 SEM을 이용하여 관찰 하였을 때 A431, PCI-1, DLD-1, SNU-484는 치밀한 형태의 MCS를 형성하였고(Table I, Figure 1), 그 외 A549, PC-14, PCI-13, PCI-50, MCF-7, SNU-216, SNU-601, AGS는 치밀하지 않은 응집물을 형성하거나 부분적으로 치밀한 형태의 MCS를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다(Table I).

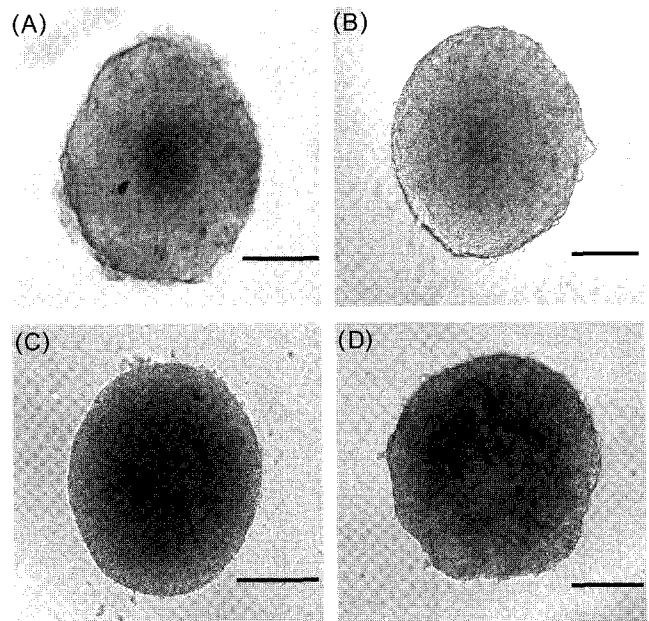
**DLD-1 다세포 구상체의 성장**

치밀한 형태의 MCS를 형성한 네 가지 세포주들 중에서 DLD-1을 선택하여 7일 동안 배양한 후 SEM을 이용하여 외부형태를 살펴보고, semithin section과 파라핀 포매 절

**Table I—Three-Dimensional Growth Characteristics of Several Human Cancer**

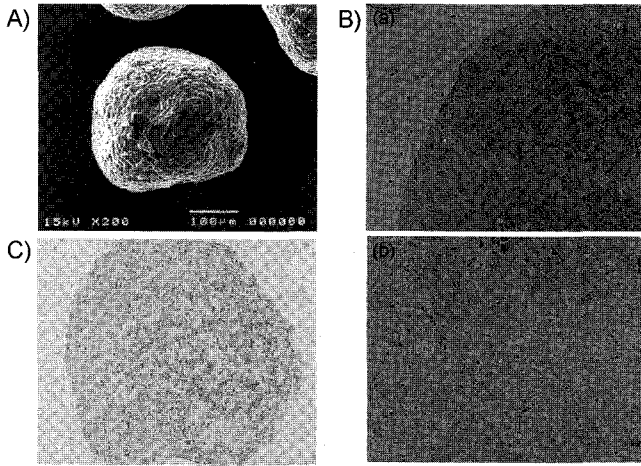
Cell line		Aggregation
Origin	Name	
Lung	A549	A <sub>cluster</sub>
	PC-14	A <sub>loose</sub>
Breast	MCF-7	S <sub>partly</sub>
Vulva	A431	S <sub>full</sub>
	PCI-1	S <sub>full</sub>
Head & Neck	PCI-13	S <sub>partly</sub>
	PCI-50	S <sub>partly</sub>
Colon	DLD-1	S <sub>full</sub>
	SNU-484	S <sub>full</sub>
Gastric	SNU-216	A <sub>loose</sub>
	SNU-601	A <sub>loose</sub>
	AGS	A <sub>loose</sub>

A<sub>loose</sub>, aggregate of cells loosely attached to each others; A<sub>cluster</sub>, aggregate containing a fraction of clustered cells; S<sub>partly</sub>, partly compact spheroid; S<sub>full</sub>, fully compact spheroid.

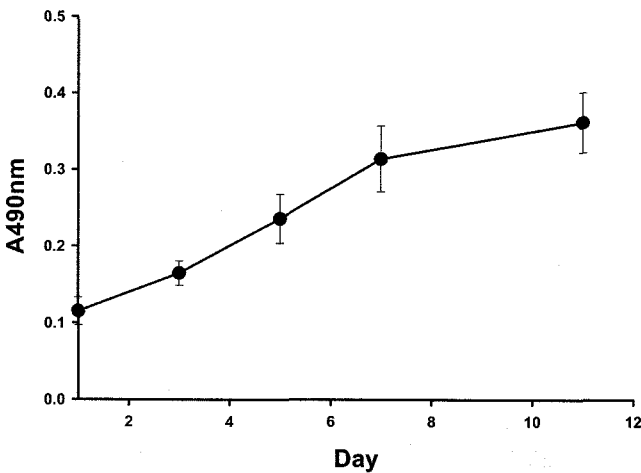


**Figure 1—Phase contrast micrographs of multicellular spheroids formed with several human cancer cell lines. Each spheroid was grown for 7 days using the liquid-overlay technique (bar=200 µm). (A) SNU-484 (525 µm), (B) DLD-1 (579 µm), (C) PCI-1 (475 µm) and (D) A431 (592 µm).**

편을 이용하여 단면을 관찰하여 보았다. 구상체로 형성된 MCS 전체에 걸쳐서 단단하게 결합된 형태를 관찰하였으며 (Figure 2A), 중심부에서는 괴사(necrosis)가 관찰되지 않았다 (Figure 2B, 2C). DLD-1 MCS는 11일까지 배양하여 약 700 µm의 크기를 얻을 수 있었으며, 구상체 반경 내 세포층 수는 23층이었다. DLD-1 MCS의 성장속도는 배양 7일까지



**Figure 2**—Morphology of multicellular spheroids of DLD-1 human colon cancer cell lines grown for 7 days. A) Scanning electron micrographs, B) Semithin section (a) Peripheral region of MCS (b) center of MCS and C) H&E stained paraffin embedded sections.

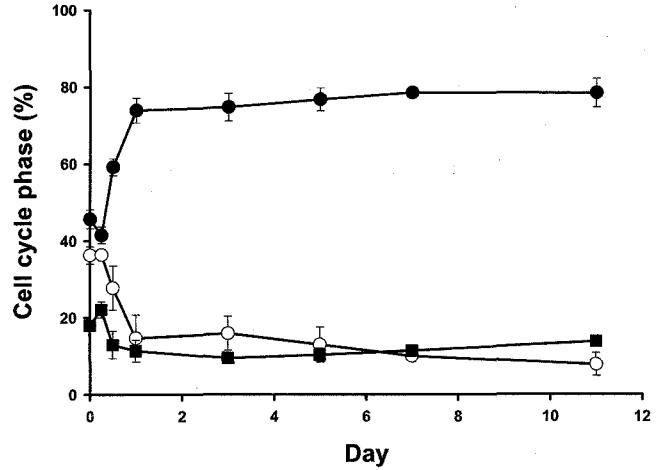


**Figure 3**—A representative growth curve of multicellular spheroids of DLD-1 cells. The growth of MCS of DLD-1 cells was determined using MTS assay over 11 days after plating.

약 4.3일의  $t_D$ (doubling time)을 나타내었으나, 이후에는 성장곡선의 기울기가 둔화되는 것으로 관찰되었다(Figure 3).

**다세포 구상체의 세포주기 분포**

DLD-1 세포를 MCS로 배양하기 시작한지 6시간부터 배양 11일까지 시간간격을 두고 세포주기 분포를 측정하였다. MCS를 형성하면서  $G_0/G_1$ 이 증가하고, S는 감소하는 경향을 나타내었다. 지수 증식기에 있는 단층배양 된 세포의 경우 (day 0) 세포주기 분포는  $G_0/G_1$ 이 45.7%, S는 36.3%,  $G_2/M$ 은 18.0%이었으나, 배양 1일 내에 급격하게  $G_0/G_1$ 이 증가하여 73.9%에 이르렀으며, 이후 배양 11일까지 제1일에서의



**Figure 4**—The cell cycle distribution of DLD-1 cells grown as MCS. Cell cycle distribution was determined by using flow cytometry. (●;  $G_0/G_1$  phase, ○; S phase, ■;  $G_2/M$  phase)

세포주기분포를 유지하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4).

**5-FU 및 TPZ의 항증식효과**

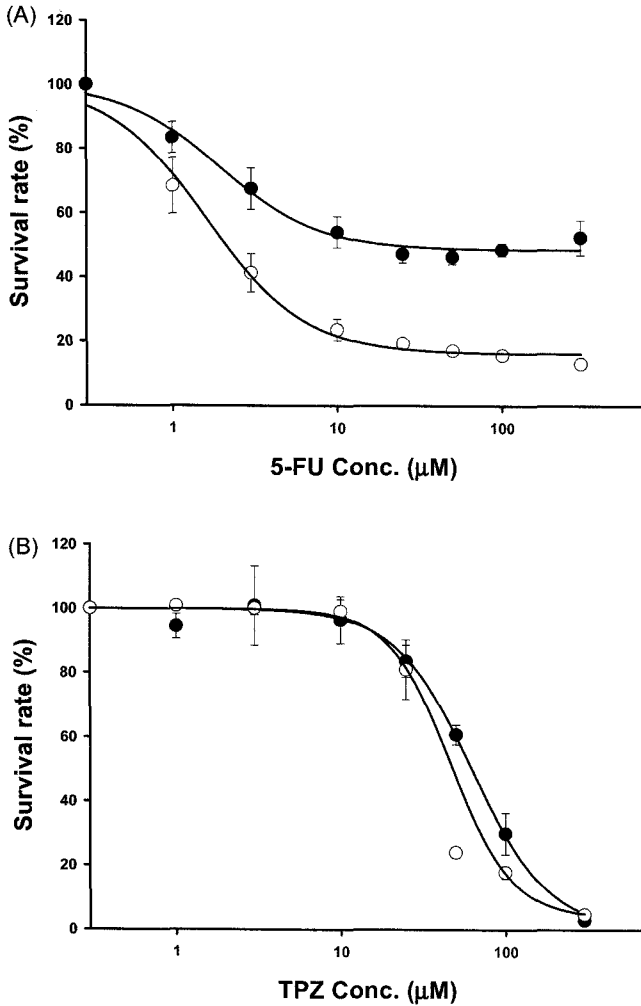
DLD-1의 단층세포 배양과 MCS 배양에서 5-FU와 TPZ의 항증식효과를 측정하였다. DLD-1 세포를 5-FU에 96시간 동안 노출시켰을 때 10  $\mu$ M 이상의 농도에서도 생존율이 감소하지 않는 저항분율이 두 가지 배양형태에서 모두 관찰되었는데, MCS 배양에서 48.5%로 관찰되어 단층세포 배양시의 16.2%보다 3배 높았다.  $IC_{50}$ 은 단층세포 배양과 MCS 배양에서 각각 2.1  $\mu$ M, 21.6  $\mu$ M로 계산됨으로써, 5-FU에 대해서 MCS 배양세포가 약 10.3배 정도의 내성을 나타내었다(Figure 5.A).

TPZ의 경우에 있어서는 5-FU와는 달리 저항분율이 거의 관찰되지 않았다(단층세포 배양과 MCS 배양에서 각각 3.7%와 0.0%).  $IC_{50}$ 은 단층세포 배양과 MCS에서 각각 48.0  $\mu$ M, 62.6  $\mu$ M로서, DLD-1 세포는 MCS로 배양 시 TPZ에 대해 약 1.3배 정도의 내성을 갖는 것으로 관찰되었다(Figure 5.B).

**고 찰**

본 연구는 다세포 내성을 유지하는 *in vitro*에서 정량적으로 항암활성을 측정할 수 있는 모델을 수립하고자 MCS를 96-well plate에서 배양하고 암세포에 대한 항증식효과를 측정하는 방법을 시도하였다.

본 실험에서는 여러 가지 인체 암세포주를 이용하여 MCS를 수립하여 형태적 특성을 비교해 보았다(Table I, Figure



**Figure 5**—Dose-response curves of 5-FU (A) and TPZ (B) in DLD-1 cells grown as monolayer (○) and MCS (●). Cells were exposed for 96 hr and viability was determined immediately after the drug exposure.

1). 세포주에 따라서 MCS를 형성하는 능력의 차이를 보이는 것을 관찰하였는데, 결합력이 약한 세포 응집물 또는 부분적으로 치밀한 형태의 MCS를 형성하는 세포주들에서는 약한 수준의 물리적인 힘에 의해서도 그 형태가 쉽게 부서지는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 세포와 세포 또는 세포와 세포외기질간의 상호작용에 직접적으로 관련된 인자들의 발현과 연관되어 있으며, 특히 세포부착인자(cell adhesion molecule, CAM)들이 세포의 삼차원적 구조 형성과 직접적으로 관련이 있음이 보고되고 있다.<sup>13)</sup> 치밀하지 않은 MCS를 형성하는 세포들주들에서는 세포의 성장이나 항증식 효과를 측정하기 위하여 본 실험에서 사용한 여러 가지 방법들을 적용하는데 많은 어려움이 있었으며, 특히 MTS assay에서 agarose가 코팅되어 있지 않은 용기로 옮겨주는 과정에서 균일한 크기의 세포 응집물을 얻을 수 없었기 때문에

실험간의 오차가 매우 컸다(자료 미제시).

인체 직장암 세포주인 DLD-1의 MCS에서도 마찬가지로 SEM을 통해 치밀한 형태의 구상체가 형성됨을 확인할 수 있었고(Figure 2A), semithin section과 H&E 염색을 통해 단층세포 배양계와는 달리 등근형태의 세포들이 치밀하게 MCS를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2B, 2C). 세포간의 접촉에 관여하는 tight junction이나 desmosome 또는 gap junction은 세포의 삼차원적 구조형성에 기여할 뿐만 아니라, 항암제에 대해서 내성을 유발하는 하나의 요인으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 인체 위암세포주인 SNU-484를 MCS로 배양하여 그 단면을 관찰한 결과 단층세포 배양계에서의 방추체(spindle) 형태와는 반대로 원형(round)의 세포들이 치밀한 형태의 MCS를 형성하는 것을 확인할 수 있었으며, TEM을 통한 관찰에서 tight junction과 desmosome 등을 확인할 수 있었다(자료 미제시).

DLD-1의 MCS를 이용하여 성장 특성을 살펴본 결과는 단층세포 배양계에서처럼 빠른 증식속도를 보이지는 않았지만, 배양일 경과에 따라 지속적인 성장을 보였고(Figure 3), 이는 MCS의 크기변화 측정 결과에서도 알 수 있었다(자료 미제시). MCS의 성장에 대한 수학적 모델인 Exponential-Gompertzian Tumor Growth Model에서는 여러 가지 암세포주를 단층세포 배양과 MCS 배양 그리고 생체내에서의 성장을 각각 비교하였는데, 생체내 암세포와 MCS의 성장 특징이 매우 유사하였으며, 단층세포 배양에서는 이들의 성장 특징과는 다르다는 것을 보여주었다.<sup>14,15)</sup>

MCS로 배양하였을 경우 G<sub>1</sub> 주기의 세포분율이 크게 증가하였는데(Figure 4), 이는 MCS의 내부에 존재하는 정지세포(quiescent cell)들의 존재 때문이며, cyclin-dependent kinase inhibitor인 p27<sup>Kip1</sup> 단백질의 과발현이 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17)</sup> 산소와 영양분의 부족으로 인하여 세포주기의 G<sub>1</sub>에서 성장이 감소되어 있는 정지세포의 경우에는 산소와 영양분의 공급이 충분한 환경으로 바뀌게 되면 세포주기가 원활하게 진행되며 세포의 성장 또한 회복되게 된다.<sup>18)</sup> 이러한 정지세포의 존재는 생체내 암조직의 특징이며, 항암제 또는 방사선 치료에 대한 내성의 이유로 알려져 있으므로 이러한 생체내 특성을 유지하는 MCS 배양계를 이용하여 얻는 실험결과가 임상 응용성이 크고 유효할 것으로 생각된다.

본 연구에서 5-FU를 96시간 동안 처리하였을 경우 DLD-1 세포가 MCS 배양계에서 단층세포 배양에서보다 10배 이상의 내성을 나타내는 것으로 관찰되었다(Figure 5.A). 5-FU에 대한 고형암의 내성요인으로는 타겟효소(Thymidylate synthase)의 과발현, 약물의 활성화와 대사(Dihydropyrimidine

dehydrogenase, Thymidine phosphorylase, Thymidine kinase) 및 약물수송의 저해뿐만 아니라 DNA 손상복구(hMLH1), 세포주기 조절(p53, p21, cyclin E, cyclin D) 및 세포사멸(Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Death receptor)에 관련된 인자들의 변화가 보고되고 있다.<sup>19)</sup> 이에 반해 다세포 내성 요인으로는 비교적 적은 수의 논문이 발표되었는데, 세포와 세포 또는 세포와 ECM과의 접촉에 따른 세포 내 integrin 또는 E-cadherin의 발현 증가,<sup>20)</sup> p27<sup>Kip1</sup> 및 HSP27 단백질의 발현 증가, topoisomerase II의 발현 감소, NAD(P)H, quinone acceptor oxidoreductase의 발현 증가 등도 항암제에 대한 감수성을 저하시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>21)</sup> 따라서 이러한 인자들을 포함하여 단층세포 배양계와 MCS 배양에서 발현의 차이를 보이는 인자들을 탐색하여 5-FU에 대한 다세포 내성원인 인자를 규명할 수 있을 것이다.

TPZ는 저산소환경에서 세포독성이 향상되는 생체환원성(bioreductive) 항암제의 일종이다.<sup>22,23)</sup> 암조직에서 정상조직보다 낮은 산소분압이 보고되면서 이러한 약제 개발의 이론적 밑바탕이 되었으며, 산소농도가 낮은 소위 저산소분압 암조직(hypoxia tumor)은 방사선 치료와 세포독성항암제에 내성을 나타내기 때문에<sup>24)</sup> 그 유용성에 대한 기대가 커지고 있다. 비혈관조직의 산소 투과거리는 0.25 mm인 것으로 알려져 있으므로<sup>25)</sup> 본 실험의 MCS는 배양 7일(570  $\mu$ m) 정도부터 다양한 산소분압의 세포군으로 구성될 것으로 생각된다. 암조직내로의 TPZ 침투가 제한적이라는 보고가 있으므로,<sup>26)</sup> TPZ의 암조직내 유효농도는 낮을 것으로 생각되나 저산소분압에서 TPZ의 세포독성이 상승되어 결과적으로 단층세포 배양계에서와 유사한 항증식효과가 관찰된 것으로 생각된다(Figure 5.B).

## 결 론

본 연구에서는 고행암에 유효한 항암후보물질 발굴을 위한 검색계로서 MCS 배양계를 수립하였다. 96-well plate를 이용하여 신속한 복수배양이 가능하도록 하였으며, 또한 MTS법을 적용하여 간편하고도 정량성이 높은 활성측정법을 수립하였다. 12개의 인체암세포들 중에서 DLD-1을 포함한 4개의 세포주가 전체적으로 치밀한 형태의 MCS를 형성하였다. DLD-1 MCS는 11일 배양시 700  $\mu$ m의 크기까지 성장하였으며, 단층세포 배양과 비교하여 세포주기의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>이 현저하게 증가하였으나, 괴사 또는 세포사멸은 관찰되지 않았다. MCS로 배양된 DLD-1 세포는 단층 배양계와 비교하여 5-FU에 대해서 10배 이상의 높은 내성을 나타내었으나, tirapazamine에 대해서는 유사한 감수성을 보였다. 이상의 실험

결과들을 종합하여 MCS는 항고형암제의 정량적 효능검색계로서 유용할 뿐 아니라, 고행암의 약물내성 표지자 발굴에도 이용이 가능할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(과제번호 02-PJ2-PG1-CH12-0002)과 과학기술부 원자력연구개발중·장기계획사업의 지원(과제번호 M20242040002-04A0904-00210)에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) H. Thomas and H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, **10**, 159-65 (2003)
- 2) B. Desoize and J.C. Jardillier, Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit. Rev. Oncol/Hematology*, **36**, 193-207 (2000).
- 3) H. Jaeschke, Cellular adhesion molecules : regulation and functional signification in the pathogenesis of liver diseases. *Am. J. Physiol.*, **36**, G602-11 (1997).
- 4) P.A.J. Henricks and F.P. Nijkamp, Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *Eur. J. Pharmacol.*, **344**, 1-13 (1998).
- 5) R.M. Sutherland, W.R. Inch, J.A. McCredie and J. Kruuv, A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumor model. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **18**, 491-5 (1970).
- 6) W.R. Inch, J.A. McCredie and R.M. Sutherland, Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth*, **34**, 271-82 (1970).
- 7) R.M. Sutherland, J.A. McCredie and W.R. Inch, Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **46**, 113-20 (1971).
- 8) W. Mueller-Klieser, Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **113**, 101-22 (1987).
- 9) R.M. Sutherland, Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*, **8**, 177-84 (1988).
- 10) R. Knuechel and R.M. Sutherland, Recent developments in research with human tumor spheroids. *Cancer J.*, **3**, 234-43 (1990).
- 11) R. Bjerkvig, M. Lund-Johansen and K. Edvardsen, Tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. *Curr. Opin. Oncol.*, **3**, 223-9 (1997).
- 12) A. Frankel, S. Man, P. Elliott, J. Adams and R.S. Kerbel, Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-

341. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 3719-28 (2000).
- 13) G. Rainaldi, A. Calcabrini, G. Arancia and M.T. Santini, Differential expression of adhesion molecules (CD44, ICAM-1 and LFA-3) in cancer cells grown in monolayer or as multicellular spheroids. *Anticancer Res.*, **19**, 1769-78 (1999).
- 14) R. Demicheli, R. Foroni, A. Ingrosso, G. Pratesi, C. Soranzo and M. Tortoreto, An exponential-Gompertzian description of LoVo cell tumor growth from *in vivo* and *in vitro* data. *Cancer Res.*, **1**, 6543-6 (1989).
- 15) R. Demicheli, G. Pratesi and R. Foroni, The exponential-Gompertzian tumor growth model: data from six tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*. Estimate of the transition point from exponential to Gompertzian growth and potential clinical implications. *Tumori.*, **30**, 189-95 (1991).
- 16) St Croix B., V.A. Florenes, J.W. Rak, M. Flanagan, N. Bhattacharya, J.M. Slingerland and R.S. Kerbel, Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat. Med.*, **2**, 1204-10 (1996).
- 17) R.S. Kerbel, St Croix B., V.A. Florenes and J. Rak, Induction and reversal of cell adhesion-dependent multicellular drug resistance in solid breast tumors. *Hum. Cell*, **9**, 257-64 (1996).
- 18) E. Sham and R.E. Durand, Cell kinetics and repopulation mechanisms during multifraction irradiation of spheroids. *Radiother. Oncol.*, **46**, 201-7 (1998).
- 19) R.M. Mader, M. Muller, G.G. Steger, Resistant to 5-Fluorouracil. *Gen. Pharmacol.*, **31**, 661-6 (1998).
- 20) R.C. Bates *et al.*, Apoptosis induced by inhibition of intracellular contact. *J. Cell Biol.*, **125**, 403-15 (1994).
- 21) R.M. Phillips, A. de la Cruz and R.D. Traver *et al.*, Increased activity and expression of NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase in confluent cell cultures and within multicellular spheroids. *Cancer Res.*, **54**, 3766-71 (1994).
- 22) E.M. Zeman, J.M. Brown, M.J. Lemmon, V.K. Hirst and W.W. Lee, SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **12**, 1239-42 (1986).
- 23) J.M. Brown, SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br. J. Cancer*, **67**, 1163-70 (1993).
- 24) M. Hockel, K. Schlenger, M. Mitze, U. Schaffer and P. Vaupel, Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin. Radiat. Oncol.*, **6**, 3-9 (1996).
- 25) I.R. Freshney, Culture of animal cells. *New York Alan R. Liss, Inc.*, 297-307 (1987).
- 26) R.E. Durand and P.L. Olive, Evaluation of bioreductive drugs in multicell spheroids. *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **22**, 689-92 (1992).