

# 분자생물학적 방법에 의한 세포 독성 측정

정화진\* · 김동욱\*\*†

\*이화여자대학교, \*\*목포대학교

## I. 서 언

세포 독성의 측정은 세포 배양법 또는 세포를 이용한 분자생물학적 실험법의 진보에 따라, 세포 생물학에 있어서 기본적인 방법론으로 더욱 더 중요시되고 있다. 가장 오래전부터 사용되어온 방법으로는 세포의 수를 측정하는 것이다. 일반적으로 접착세포 (attached cell)의 경우, trypsin-EDTA용액으로 단일세포를 만든 후, 그 일부에 trypan blue등을 이용한 색소 배제법에 의해 현미경으로 살아있는 세포만을 측정한다. 또한, DNA 합성량을 세포 증식의 지표로 하는 방법으로, DNA 복제에 필요한 전구체인 thymidine에 방사선 동위원소를 labelling하는 방법이 이용되고 있다. 다른 방법으로는, 분열시 증식 가능한 세포의 비율을 나타내는 cloning 형성법, 부유세포나 죽장세포의 증식을 조사하는 한천내 cloning 형성법, DNA 합성, 증식에 관련된 단백질에 대한 항체를 이용한 Flow cytometer에 의한 해석법등이 활용되고 있다.

지금까지 세포 독성을 측정하는 쉬운 방법으로, 방사성 물질을 표식 하는 방법이 널리 이용되어져 왔다. 이 방법은 비교적 많은 샘플을 취급할 수 있는 장점은 있지만, 방사성 물질을 사용하기 위한 특별한 시설과 환경이 요구되므로 지금은 방사성 물질을 사용하지 않는 방법들이 많이 이용되고 있다.

최근에는 세포증식인자, 사이토카인에 의한 세포 증식 효과의 연구, 화학요법제 또는 각종 약제의 안전성의 검토를 위해 스크리닝이 필요한 경우, 특히 초대 배양세포나 고가의 약제를 이용하는 경우에는 짧은 시간에 적은 양의 샘플 사용으로 대량의 샘플을 측정 할 수 있는 새로운 방법들이 요구되어 왔다.

따라서 여기서는 세포 독성 측정법 중, 일반적인 세포의 수를 측정하는 색소 배제법 (방법 1), 방사성 물질을 이용하지 않고, 다량의 샘플을 단시간에 측정할 수 있는 간편한 방법으로 MTT 법 (방법 2)과 그 실험 예를 소개한다. 또한, 방사성 물질을 이용하는 방법 (방법 3), DNA 합성을 지표로 방사성 물질을 사용하지 않는 방법으로서, BrdU를 이용한 방법 (방법 4)과, 새로운 가능성을 가진 세포 증식과 형태를 동시에 관찰할 수 있는 형광색소를 이용하는 방법 (방법 5)에 대하여도 기술한다.

†Corresponding author: (Phone) +82-61-450-2663 (E-mail) dbkim@mokpo.ac.kr

## II. 측정방법

### 1. 색소 배제법(色素 排除法 : Dye-exclusion test)

이 방법은 trypan Blue 등의 색소에 의해 살아있는 세포는 염색되지 않지만 죽은 세포는 염색되는 것을 이용한 방법으로, 세포수와 세포의 생사가 판명된다. 따라서, 세포 부유액에 트리판 블루를 가해서 염색한 후, 혈구계산판(Hemocytometer) 위에 옮긴 후, 현미경을 이용하여 세포수를 센다. 그때 파란색으로 염색된 것이 죽은 세포, 염색되지 않은 것이 살아있는 세포이다. 이 방법은 다른 장치가 필요없이 현미경만 있으면 관찰할 수 있는 장점이 있다.

#### 1) 장치 및 기구

- (1) 혈구계산판 (Hemocytometer)
- (2) Cover glass
- (3) 현미경
- (4) T25, T75 flask 또는 100 mm culture dish (세포배양 용기)

#### 2) 시약

- (1) tryphan blue 시약 (최종 농도; 3 mg/ml)
- (2) PBS (-) : Ca, Mg free PBS
- (3) Trypsin-EDTA soln.

#### 3) 조작

- (1) 세포를 배양용기에 배양후, trypsin-EDTA 용액 (3 ml)을 첨가하여 접착세포를 부유시키고, cell damage를 방지하기 위하여 배양액 2 ml를 첨가한다.
- (2) 15 ml conical tube에 배양액 및 부유세포를 넣고 원심분리 (3,000 rpm, 10 min.)
- (3) 원심분리후 상층액을 aspirator를 이용하여 뽑아 낸 후, 배양액 1 ml를 첨가하고 피펫을 이용하여 단일세포로 만든다.
- (4) 세포 부유액에 tryphan blue액을 0.1 ml를 첨가후 잘 흔들고 실온에서 5-10분간 염색.
- (5) 세포 부유액을 혈구계산판에 20  $\mu$ l씩 떨어 뜨린후, cover glass덮는다.
- (6) 현미경으로 염색된 세포와 염색되지 않은 세포수를 센다.

#### 4) 혈구계산판에 의한 세포수의 계산

- (1) 혈구계산판 및 cover glass를 80% ethanol 용액으로 세척
- (2) 세포현탁액을 20  $\mu$ l 취해 계산판 정중앙에 떨어 뜨린후, cover glass를 덮는다.
- (3) 현미경 (X100)에서 계산판 3 mm $\times$ 3 mm 내의 전세포를 계수기로 count한다.
- (4) 혈구계산판은 상하 2개의 chamber로 형성되어 있고 chamber당 9개분획(4 $\times$ 4=16 소분획)으로 형성되어 있으므로 계산판의 전세포수에 따라 chamber당 4분획 또는 9분획(

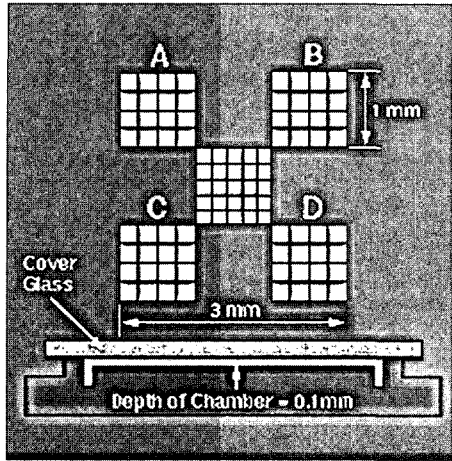


Fig. 1. 혈구계산판의 현미경상

전구간의) 세포를 센다. 그림 1의 경우는 9개 분획중 A, B, C, D의 4분획만의 세포수를 센 경우이다. 계산판 면적은 각 분획 0.01 cm<sup>2</sup>, 깊이 0.01 cm이므로 실제세포의 양은 9×10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>이 된다. 따라서 세포 현탁액의 세포수는(분획의 세포수/분획수) ×10<sup>4</sup>개/ml가 된다.

만일, 그림 1과 같이 4개의 분획 (A,B,C,D)에 세포가 72개 있다면(72/4)×10<sup>4</sup> cells/ml 가 되어 1.8×10<sup>5</sup> cells/ml로 된다.

세포수가 많아 세포 현탁액을 희석했을 경우 희석 배수를 곱해주면 된다.

$$\text{세포 생존률} = \frac{A}{A+B}$$

A : 살아있는(염색되지 않은) 세포 수

B : 죽은(파란색으로 염색된) 세포 수

## 5) 비교

- (1) 세포간의 결합력이 강한 세포인 경우, trypsin-EDTA용액을 이용하여 잘 분산시켜 단일 세포로 만들어야 한다.
- (2) 세포 수에 따라 용액량의 증감이 가능하다.
- (3) 염색액으로는 trypan blue 대신에 에리스론 B(0.02%), 예오진 Y(0.015%)액을 사용할 수도 있다.

## 2. MTT법

MTT법은 살아있는 세포막의 미토콘드리아내에서의 탈수소효소를 측정하여, 상대적인 세포량을 측정하는 방법이다. 1983년 Mosman에 의해 개발되었고, 세포의 생사, 세포의 활성화도 까지 확인이 가능하다. 진노란색인 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide]가 세포막의 미토콘드리아내 탈수소효소에 의해, 불용성의 암청색 MTT formazan으로 환원된다. 이 MTT formazan의 생성물을 측정함으로써, 세포의 생존률을 구할 수 있다.

세포증식 능력이나 세포생존 능력을 발색 측정으로 정량하기 위한 시약이다. 생세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 테트라졸리움(tetrazolium)염이 formazan 색소로 변환하는 것을 기본으로 하여 [3H]-thymidine 결합 측정법 대신에 non-RI로 측정할 수 있다. 배지에 첨가한 테트라졸리움염은 미토콘드리아의 호흡사슬에 존재하며 생존세포에만 활성이 있는 succinate-tetrazolium-reductase에 의해 formazan 색소로 변환한다. 생세포수가 증가하면 시료 중의 미콘드리아 탈수소효소의 전체의 활성이 증가하여 이 효소활성의 증가가 formazan색소의 생성증가를 유도하기 때문에 formazan 색소와 배지중에서 대사활성이 있는 세포의 수는 직선적인 상관관계를 나타내게 된다.

이 측정법은 세포를 세정하거나 결합할 필요가 없고, 미량 배양에서 ELISA reader에 의한 데이터 해석까지 동일한 microtiter plate에서 시행할 수 있는 장점이 있다. 또 증식능력이나 약제감수성 측정법에서 세포증식과 생존능력을 non-RI로 분광광도계로 정량할 수도 있다.

### 1) 특징

- (1) 방사성 동위원소를 사용하지 않는다.
- (2) 흡광도가 생존 세포수와 강한 상관관계가 있다.

### 2) 용도

- (1) 성장인자, cytokines, mitogens, nutrients에 반응하는 세포증식 능력의 측정
- (2) 항암제나 다른 약제 등의 세포독성이나 세포정지성이 있는 화합물의 해석
- (3) 성장저해 항체나 생체 mediators의 평가

### 3) 실험방법

#### (1) 장치 및 기구

- ① 96 well plate
- ② Micro plate reader

#### (2) 시약

- ① MTT액 (최종 농도; 5 mg/ml)
- ② PBS
- ③ 3차 증류수
- ④ DMSO

#### (3) 조작

- ① 세포를 1 ml당  $2.5 - 5 \times 10^4$  개로 희석한 다음, 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 seeding 한 후, 24시간 동안 incubation한다.
- ② 배지를 버리고 PBS로 2회 세척한다.
- ③ 새 배지를 넣고 sample을 처리한다. (duplicate 또는 triplicate)
- ④ 세포 상태를 관찰한 뒤, incubator에 넣고 원하는 시간만큼 incubation한다.

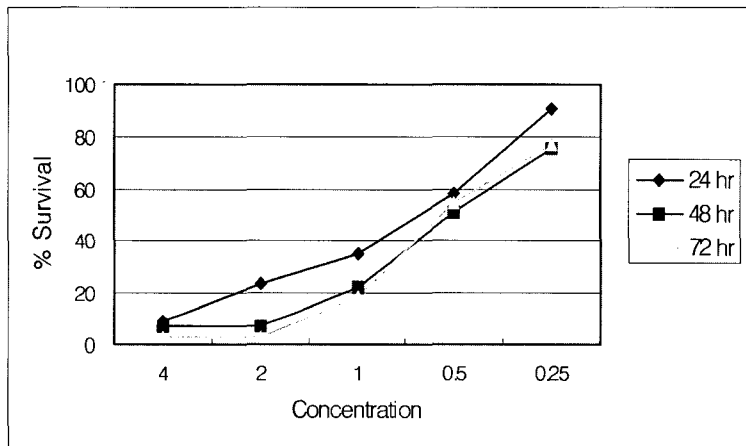
zero day control은 sample을 처리하지 않고 바로 (5)의 조작을 한다.

- ⑤ 세포 상태를 관찰한 뒤, 배지를 버리고 새로운 배지를 넣는다.
- ⑥ 배지에 MTT stock solution 20  $\mu$ l를 넣는다. (10배 희석)
- ⑦ Plate를 잘 흔들어 준 후 incubator에 넣어 4시간 동안 incubation한다.
- ⑧ 배지를 버리고 공기 중에서 잠시 말린다.
- ⑨ DMSO 200  $\mu$ l을 넣어 well 바닥에 붙은 formazan을 녹인다.
- ⑩ Shaker로 plate를 충분히 흔들어 주어 formazan을 완전히 녹인 다음, 570 nm에서 흡광도를 측정한다. DMSO로 blank를 잡아 주고 흡광도를 측정한다.

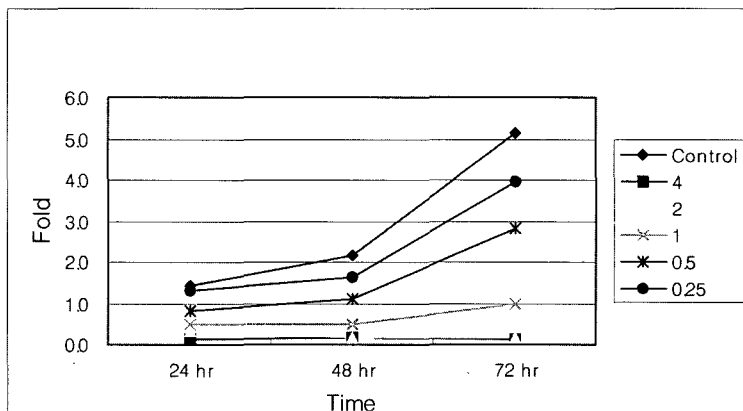
(4) 계산

① 세포 생존률

Control group에 대하여 sample을 처리한 group이 어느 정도인지 확인한다.



- ② zero day control을 기준으로 흡광도가 몇 배 증가하였는지를 계산한다. zero day를 1로 나타내므로, 1 이하로 나타나는 것은 cytotoxic하고, 1 이상이나 control에 비해서는 낮게 나타나는 경우에는 cytostatic하다고 할 수 있다.



(5) 비교

- ① Seeding하는 세포 수는 세포 종류에 따라 다르다. Seeding 후 72시간이 지난 다음 control에서의 흡광도 값이 1.5를 넘지 않는 범위로 잡는다.
- ② 정확한 측정치를 위해서는 생성물을 잘 용해시키는 것도 중요하다.
- ③ MTS, XTT, WST-1, WST-8등의 tetrazolium염을 사용할 경우에는 이들에 적합한 파장을 선택해야 한다.

### 3. [<sup>3</sup>H]-thymidine을 이용한 측정법

이 방법은 일정 시간 [<sup>3</sup>H]-thymidine으로 세포를 표식한 후 DNA에 결합되지 못한 프리의 방사성 화합물질을 씻고, liquid scintillation counter로 tritium (<sup>3</sup>H)의 수를 측정하는 것이다. 이 방법은 비교적 많은 샘플을 분석할 수 있는 장점은 있지만, 방사성 물질을 사용하기 위해서는 특별한 시설과 환경문제가 대두되는 관계로 현재는 방사성 물질을 사용하지 않는 방법이 많이 개발되고 있다.

#### 1) 장치 및 기구

- (1) 96 well plate
- (2) Micro plate reader

#### 2) 시약

- (1) [<sup>3</sup>H]-thymidine
- (2) CMF-PBS
- (3) 5% TCA
- (4) KOH

#### 3) 조작

- (1) 세포를 1 ml당 2.5 - 5×10<sup>4</sup> 개로 희석한 다음, 60 mm dish에 seeding 한 후, 24시간 동안 incubation한다.
- (2) 배지를 버리고 PBS로 2회 세척한다.
- (3) 새 배지를 넣고 sample을 처리한다.
- (4) 세포 상태를 관찰한 뒤, incubator에 넣고 원하는 시간만큼 incubation한 후, 0.037 MBq ml [<sup>3</sup>H]-thymidine으로 labeling한 후 6시간 배양한다.
- (5) 배지를 버리고 CMF-PBS로 2회 세척한다.
- (6) 세포를 모아 균질화한다.
- (7) DNA 활성을 확인한 후, 차가운 5% TCA를 가해 얼음에서 20분간 둔다.
- (8) 5% TCA용액으로 세척 후, 다시 physiological saline으로 세척한다.
- (9) 세포를 KOH용액으로 분해한다.
- (10) Liquid scintillator로 radioisotope 활성을 측정한다.

#### 4. BrdU를 이용한 ELISA법

이 방법은 방사성 물질 [<sup>3</sup>H]-thymidine을 사용했던 종래법의 문제점을 개선하기 위해, 증식 중인 세포의 DNA에 thymidine의 analog로써 BrdU(5-bromo-2deoxyuridine)를 넣고, DNA에 들어간 BrdU를 항BrdU 모노클로날항체를 사용하여 ELISA로 측정하는 것에 의해, 세포증식을 측정하는 것이다.

##### 1) 장치 및 기구

- (1) 96 well plate
- (2) Micro plate reader

##### 2) 시약

- (1) PBS
- (2) 세포 고정액; 70% EtOH/0.5 M HCl (사용전 -20°C 보관)
- (3) BrdU표식 시약 (4°C 보관)
- (4) Buffer; PBS 10배 농축액 (4°C 보관)
- (5) Nuclease 희석액 (4°C 보관)
 

Tris buffer;	66 mmol/l
MgCl <sub>2</sub> ;	0.66 mmol/l
2-mercaptoethanol;	1 mmol/l
- (6) Nuclease; 50% 글리세롤/1.3 ml 증류수 (w/v), (-20°C 보관)  
사용할 때 Nuclease 희석액으로 100배 희석.
- (7) Peroxidase 표식 항BrdU항체; 1.2 ml 증류수에 녹임 (4°C 보관).  
사용시 BSA (10 mg/ml)를 포함하는 PBS에서 100배 희석시킨다.
- (8) 기질액; Peroxidase의 기질 (ABTS) 용액 (차광 4°C 보관).

##### 3) 조작

- (1) 세포를 1 ml당 2.5-5×10<sup>4</sup> 개로 희석한 다음, 96 well plate에 200 μl씩 seeding 한 후, 24시간 동안 incubation한다.
- (2) 배지를 버리고 PBS로 2회 세척한다.
- (3) 새 배지를 넣고 sample을 처리한다. (duplicate 또는 triplicate)
- (4) 세포 상태를 관찰한 뒤, incubator에 넣고 원하는 시간만큼 incubation한 후, BrdU표식 시약을 10 μl가해 2-18 시간 배양한다.
- (5) 배지를 버리고 PBS로 2회 세척한다.
- (6) 세포를 고정액으로 고정한다 (-20°C, 30 min)
- (7) 세포를 PBS로 3회 세척한다.
- (8) Peroxidase 표식 항BrdU항체 100 μl를 가한 후, 37°C에서 30분간 incubation한다.

- (9) 세포를 buffer 250  $\mu$ l로 3회 세척한다.
- (10) ABTS용액 100  $\mu$ l를 가해 실온에서 15분간 방치한다.
- (11) 490, 405 nm에서 흡광도를 측정한다.

4) 계산 ; 세포 생존률 =  $\frac{A}{B}$

A : Sample의 흡광도

B : Control의 흡광도

#### 5) 비고

- (1) Seeding하는 세포 수는 세포 종류에 따라 다르며, 배양 시간 또한 예비 실험을 통해 결정할 필요가 있다.
- (2) 녹색의 발색 반응이 일어나는데, 시그널이 약하다면 기질중감제를 ABTS용액에 첨가시켜 반응을 해보아도 좋다.

### 5. DNA량을 기준으로 한 새로운 측정법

이 방법은 slide glass위에서 세포의 형광량을 측정해서 얻은 데이터로 세포의 위치를 기억하게 하기위해, 사이토그램상의 점을 지정하면 stage가 이동하여 그에 대응하는 세포가 현미경에 나타남으로써, 세포의 상태 및 형태까지 동시에 관찰할 수 있는 방법이다. 5분간 5,000개 정도의 세포를 해석할 수 있으므로, 짧은 시간에 다량의 sample을 분석할 수 있다.

#### 1) 장치 및 기구

- (1) Laser scanning cytometer
- (2) Slide glass
- (3) Cover glass
- (4) 염색 beam

#### 2) 시약

- (1) EtOH
- (2) PBS
- (3) PI/RNase용액; PI (1 mg/ml) -- 0.5 ml  
RNase (10 mg/ml) -- 0.2 ml  
PBS -- 9.3 ml

#### 3) 조작

- (1) 적당한 농도의 세포 현탁액을 slide glass위에 seeding 한 후, 24시간 동안 incubation 한다.



- (2) Slide glass를 PBS로 3회 세척한다.
- (3) EtOH로 고정한다 (15분).
- (4) Slide glass를 PI/RNase용액에 실온에서 30분간 담귀 DNA를 형광염색한다.
- (5) Slide glass를 PBS로 3회 세척한다.
- (6) Cover glass를 덮는다.
- (7) Laser scanning cytometer로 측정한다.

#### 4) 비교

- (1) DNA함량과 peak에 대한 수치를 가지고서 각 세포주기에 대한 해석까지 동시에 할 수 있다.
- (2) 세포증식에 대한 측정만이 아니라 분자생물학적 연구에 의한 세포증식의 해석법으로 새로운 가능성을 기대할 수 있다.

### 참고문헌

1. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods* 65 : 55-63.
2. Koike, M., K. Ishino, T. Ikuta, N. Huh, and T. Kuroki. 1995. Growth enhancement of normal human keratinocytes by the antisense oligonucleotide of retinoblastoma susceptibility gene. *oncogene* 10(1) : 117-122.

## *Cell proliferation and Cytotoxicity Assays*

*Hwa-Jin Chung\* and Dong-Wook Kim\*\*†*

*\*College of Pharmacy, EWha Womans Univ.,*

*\*\*Division of Bioscience & Biotechnology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea.*

*+82-61-450-2663, dbkim@mokpo.ac.kr*