

# 세포독성측정법

노은정 · 김영식<sup>†</sup>

서울대학교

## I. 서 언

새로운 항암제 개발을 위한 효능검색이나 기존에 개발된 항암제의 감수성을 알아보기 위하여 동물실험 등 생체에의 적용 단계 이전에 생체 밖에서의 약물의 종양세포 억제력을 알아보는 과정을 거쳐야 한다. 가장 직접적이고 이상적인 방법은 세포에 trypan blue 등을 처리한 후 현미경과 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포를 세는 것이지만 많은 시간과 노력이 요구되므로 간단하게 측정하려는 여러 가지 방법들이 개발되어 왔다. 항암제의 *in vitro* 약효 검색법에는 증식력이 큰 간세포를 대상으로 하는 집락형성 분석법(clonogenic assay)과 모든 암세포에 대한 세포독성을 측정하는 단기적 항암제 감수성 검사법(short-term chemosensitivity test)이 있다. 집락형성 분석법은 clone의 형성정도를 이용하는 방법으로서 약물효능 검색에 많이 사용되었으나 단일 세포 부유액의 준비가 어렵고, 세포의 종류에 따라 clone 형성정도가 다르기 때문에 실험자의 기준에 따라 결과가 달라질 수 있으며 결과를 얻기까지 많은 시간이 소요되는 등의 단점 때문에 1차 검색에는 적합하지 않다. 단기 검사법은 항암물질 처리 후 생존 암세포(viable cell)의 수를 비처리 대조군과 비교하는 것으로, 생존세포수의 측정방법에 따라 trypan blue가 살아있는 세포에는 염색되지 않는 점을 이용한 색소 배제법(dye exclusion assay), 살아있는 세포에서 환원된 형태의 <sup>51</sup>Cr이 산화된 형태로 변화되는 점을 이용하여 세포 용해시 유출되는 <sup>51</sup>Cr-표지된 단백질(<sup>51</sup>Cr-labeled protein)을 측정하는 법(<sup>51</sup>Cr release assay), 대사효소 측정법(SDI inhibition test) 등의 여러 가지 방법이 과거에는 많이 사용되었으나 시간과 노력이 많이 필요하고 실험조작의 자동화가 곤란하여 대량검색에는 적합하지 않다. 따라서 현재는 Tetrazolium-based colorimetric 검색법(MTT 검색법)이 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 sulforhodamin B protein 검색법(SRB 검색법)과 더불어 널리 사용되고 있다. MTT 검색법의 과정 중 생성된 formazan의 용해단계를 생략한 방법으로서 MTT의 변형물질인 XTT, MTS 등을 이용한 방법이 개발되어 사용되고 있으나 MTT 검색법에 비하여 background가 높고 값이 비싼 단점이 있다. MTT 검사법은 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용되지만, 성장인자에 대한 세포의 감수성 실험 등에도 대단히 유용하게 사용될 수 있다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-2-740-8929 (E-mail) kims@plaza.snu.ac.kr

## II. 분석방법

### 1. MTT 검색법

MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 검색법은 생존 암세포의 탈수소 효소작용을 이용하여, 항암물질에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 실험법이다.

노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan 으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하여 formazan crystal로 침전되는 정도를 흡광도로 측정한다.

MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 그러나 측정할 well의 세포의 농도가 너무 낮거나 높은 범위에 있으면 살아있는 세포의 농도와 흡광도 사이의 직선적인 비례관계가 성립되지 않게 되므로 최적의 세포농도를 결정하는 과정을 거쳐야 한다. 항암제를 세포배양 배지에 투여한 후 배양한 암세포는 항암제의 농도에 따라서 항암제를 투여하지 않고 순수한 배지에서 배양한 암세포에 비해 생존세포의 비율이 감소한다. 그 감소되는 비율은 항암제의 종류, 약제에 대한 암세포의 감수성과 약제의 농도에 따라 달라지며, 사멸되지 않고 대사적 활성이 있는 세포는 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 알 수 있다. 항암제에 대한 감수성은 항암제를 처리하지 않은 well의 흡광도에 대한 항암제처리 well에서의 백분율로 비교한다. 4 일 간의 배양 후 살아있는 암세포의 농도를 비처리군(대조군)에 비해 50%로 줄일 수 있는 항암제의 농도를 IC<sub>50</sub>이라고 하며 실제의 실험에서는 오차를 줄이기 위해 각 칸의 8 well에 동일 검체를 처리하여 얻은 결과의 평균값을 이용하여 계산한다. MTT의 여러 장점 가운데서 기존에 사용하던 <sup>51</sup>Cr release assay 등과 비교하여 가장 특이할 만한 점은 96-well plate에 사용함으로써 흡광도의 측정을 동시에 시행할 수 있고 결과의 해석을 반자동화함으로써 대량 검체에 대한 검색시 시간과 노력을 대폭 절감할 수 있다는 점이다.

#### 1) 장치 및 기구

- (1) 96-well plate
- (2) ELISA plate reader
- (3) hemocytometer

#### 2) 시약

- (1) 배지(media for cell culture)  
RPMI 1640 또는 DMEM 배지에 10% 송아지 혈청(fetal bovine serum)과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용한다.
- (2) penicillin-streptomycin 혼합용액

## 세포독성측정법

penicillin(10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액을 배지에 100배 희석하여 사용한다.

(3) Trypsin-EDTA 용액

10× 농축용액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동 보관하여 사용한다.

(4) MTT 용액

PBS에 녹여서 필터처리하고 빛에 민감하기 때문에 은박지 차광하여 4°C에 보관한다.

(5) DMSO(dimethyl sulfoxide)

### 3) 조작

(1) 본 실험에 앞서 각 세포주마다 MTT assay에 사용할 각 well의 적정 접종세포수를 (optimal seeding density)를 결정한다. 세포 종류마다 그리고 처리하는 기간마다 다르기 때문에 미리 적절한 흡광도가 나오도록 세포주에 맞게 세포 농도와 처리기간을 결정해야 한다.

(2) 세포를 96-well plate에 적당한 양으로 각 well에 동일하게 접종한다.

(3) 항암검색의 대상이 되는 물질을 각 well에 첨가한다.

(4) 암세포와 검체가 접종된 plate를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다.

(5) MTT 용액을 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양한다.

(6) 배지를 제거하고 여기에 DMSO를 넣는다.

(7) 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

## 2. SRB 검색법

SRB 검색법은 생존 세포의 단백질을 sulforhodamine B dye로 염색하여 흡광도를 측정함으로써 생존세포수를 간접적으로 추산하는 방법으로 MTT 검색법에서와 같이 96-well plate와 분광광도계를 이용한다. 흡광도는 각 well에 존재하는 총 단백질의 양을 나타내는데 이는 그 well에 남아있는 생존세포들의 수와 비례한다. 항암제 처리군에서의 OD<sub>540</sub>값을 비처리군(대조군)의 평균 OD<sub>540</sub>값에 대한 백분율 값을 산출하는데 이 백분율은 대조군과 비교한 항암제 처리군의 세포 생존율에 해당하는 값이다. MTT 검색법과 마찬가지로 자동화가 가능하며 실험 감도 (sensitivity)는 MTT 검색법과 거의 비슷하나 조작 과정의 측면에서 대량검색에 더욱 유리한 것으로 평가되고 있다.

### 1) 장치 및 기구

(1) 96-well plate

(2) ELISA plate reader

(3) hemocytometer

## 2) 시약

### (1) 배지

RPMI 1640 또는 DMEM 배지에 10% 송아지 혈청과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용한다.

### (2) penicillin-streptomycin 혼합용액

penicillin(10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액을 배지에 100배 희석하여 사용한다.

### (3) Trypsin-EDTA 용액

10× 농축용액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동보관하여 사용한다.

### (4) 0.4% SRB염색용액

SRB를 1% acetic acid에 0.4%로 녹여 사용한다.

### (5) TCA(trichloroacetic acid) 고정액

100% TCA(6.1 N)를 증류수로 희석하여 사용한다.

## 3) 조작

- (1) 본 실험을 하기 전 각 세포주마다 각 well의 적정 세포수를 결정한다. 이 세포수는 약물처리하지 않은 대조군에서 SRB처리 후의 OD<sub>540</sub>값이 1.2-1.4에 이를 수 있는 충분한 값이다.
- (2) 실험에 사용할 세포들을 trypsin-EDTA용액으로 유착 면으로부터 분리시키고 세포현탁액을 만든다.
- (3) 96-well plate의 각 well에 예비실험에서 결정된 적정수의 세포가 포함된 세포 현탁액을 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한다.
- (4) 검색물질을 PBS로 희석하여 각 well에 넣어준 뒤 48시간 동안 배양한다.
- (5) 각 well에 4°C에 보관해 두었던 cold 50% TCA를 천천히 가한다.
- (6) 잠시 기다린 후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1 시간 동안 고정시킨다.
- (7) 고정이 끝난 후 증류수로 5회 이상 세척한다.
- (8) 0.4% SRB용액을 가하여 상온에서 30분 이상 염색한다.
- (9) 염색이 끝난 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 잘 건조시킨다.
- (10) 10 mM unbuffered Tris용액으로 SRB dye를 녹여낸다.
- (11) microplate reader로 490-590 nm의 범위에서 흡광도를 측정한다.

## 3. Crystal violet 검색법

Crystal violet 검색법은 dye가 살아있는 세포의 핵을 염색하여 살아있는 세포의 수를 결정하는 방법이다. 항암제를 처리한 세포에 crystal violet reagent를 첨가하고 배양한 후에 보라색으로 염색된 세포의 수를 595 nm에서 흡광도를 측정한다.

1) 장치 및 기구

- (1) 96-well plate
- (2) ELISA plate reader
- (3) hemocytometer

2) 시약

- (1) 배지(media for cell culture)  
RPMI 1640 또는 DMEM 배지에 10% 송아지 혈청(fetal bovine serum)과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용한다.
- (2) penicillin-streptomycin 혼합용액  
Penicillin (10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액을 배지에 100배 희석하여 사용한다.
- (3) Trypsin-EDTA 용액  
10x농축용액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동 보관하여 사용한다.
- (4) methanol-acetic acid 혼합용액  
Methanol과 acetic acid 3:1로 혼합하여 사용한다.
- (5) 0.5% crystal violet 용액  
Crystal violet을 에탄올에 녹여 증류수로 희석하여 사용한다.
- (6) 10% acetic acid 용액

3) 조작

- (1) 적정수의 세포를 well에 동일하게 분주한다.
- (2) 검색대상 시료를 다양한 농도로 처리한다.
- (3) 37°C 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 적정시간 동안 배양한다.
- (4) Methanol/acetic acid(3:1) 용액으로 세포를 상온에서 1시간 동안 고정시킨다.
- (5) 고정시킨 세포를 0.5% crystal violet 용액으로 1시간 동안 염색한다.
- (6) 염색이 끝난 세포를 10% acetic acid에 녹여서 595 nm에서 흡광도를 측정한다.

4. Neutral Red 검색법

Neutral red(3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride) 검색법은 살아 있는 세포의 리소좀에 neutral red가 결합하여 살아있는 세포의 수를 결정하는 방법이다. 세포에 시험하고자 하는 항암검색 물질을 처리한 후 neutral red로 처리하여 살아있는 세포의 수를 추산하는 방법으로 급성독성 검색에 많이 이용된다. 비교적 실험방법이 간단하고 빠르며 경제적인 장점이 있다.

1) 장치 및 기구

- (1) 96-well plate
- (2) ELISA plate reader
- (3) hemocytometer

2) 시약

- (1) 배지  
RPMI 1640 또는 DMEM 배지에 10% 송아지 혈청과 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용한다.
- (2) penicillin-streptomycin 혼합용액  
Penicillin(10,000 units/ml)과 streptomycin(10 mg/ml)의 혼합액을 배지에 100배 희석하여 사용한다.
- (3) Trypsin-EDTA 용액  
10×농축용액을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동보관하여 사용한다.
- (4) Neutral red 용액  
배지에 희석하여 사용한다.
- (5) 1% CaCl<sub>2</sub>/0.5% formaldehyde 혼합용액  
증류수에 희석하여 사용한다.
- (6) 1% acetic acid/50% ethanol 혼합용액  
증류수에 희석하여 사용한다.

3) 조작

- (1) 적정수의 세포가 들어있는 세포 현탁액을 만들어 96-well plate에 가한다.
- (2) 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다.
- (3) 배지를 갈아준 뒤 검색하고자 하는 시료를 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다.
- (4) 배지를 제거하고 neutral red dye를 배지에 희석하여 가한다.
- (5) 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 동안 배양한다.
- (6) 배지를 제거하고 1% CaCl<sub>2</sub>/0.5% formaldehyde 혼합액으로 세척한다.
- (7) 1% acetic acid/50% ethanol용액으로 dye를 녹인다.
- (8) 상온에 10분 동안 둔 뒤 microplate shaker를 사용하여 잘 섞이도록 해준다.
- (9) microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

**참고문헌**

- 1. 박재갑, 1993, 항암제의 검색방법. 전통약물로부터의 신약개발 연구법 pp. 174(윤혜숙, 장일무 편집) 서울대학교 천연물과학연구소.

2. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bolesch, S. Kenney, and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 : 1107.
3. Robert, K. Y., Z. Cheng, and C. C. Cheng. 1988. Screening and evaluation of anticancer agents. *Exptl. Clin. Pharmacol.* 10(2) : 67.
4. Shoemaker, R. H., M. K. Wolpert-DeFilippes, D. H. Kern, M. M. Lieber, R. W. Makuch, N. R. Melnick, W. T. Miller, S. E. Salmon, R. M. Simon, J. M. Venditti, and D. D. Von Hoff. 1985. Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Res.* 45 : 2145.
5. Roper, P. R. and B. Drewinko. 1976. Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* 36 : 2182.
6. Weisenthal, L. M., J. A. Marsden, P. L. Dill, and C. K. Macaluso. 1983. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.* 43 : 749.
7. Von Hoff, D. D., B. Forseth, and L. E. Wafel. 1985. Use for a radiometric system to screen for antineoplastic agents: Correlation with a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 45 : 4032.
8. Machara, Y., H. Anai, H. Masuda, R. Tamada, K. Sugimachi, and K. Inokuchi. 1985. *In vitro* chemosensitivity of various human tumors evaluated by the SDI (succinate dehydrogenase inhibition) test. *Gan To Kagaku Ryoho* 12 : 2018.
9. Carmicael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, 1987. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47 : 936.
10. Park, J. G., B. S. Kramer, Carmicael, J. Steinberg, J. M. Collins, J. D. Minna, and A. F. Gazdar. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* 47 : 5878.
11. Niles, R. M., M., McFarland, M. B., Weimer, A., Redkar, Y. M., Fu, G. G. Meadows. 2003. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Letters* 190 : 157

## *In vitro Anticancer Screening*

*Eun Jung Noh and Yeong Shik Kim<sup>†</sup>*

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea  
+82-2-740-8929, kims@plaza.snu.ac.kr*