

## 다층 배양된 암세포에서 파클리탁셀의 항증식효과 분석

강춘모 · 이주호 · 차정호\* · 구효정†

가톨릭대학교 의과대학 생명의과학과, \*해부학교실

(2005년 11월 21일 접수 · 2006년 2월 9일 승인)

### Anti-proliferative Effect of Paclitaxel in Multicellular Layers of Human Cancer Cells

Choon-Mo Kang, Joo-Ho Lee, Jung-Ho Cha\* and Hyo-Jeong Kuh†

Department of Biomedical Sciences, \*Department of Anatomy, College of Medicine,  
The Catholic Univ. of Korea, Seoul 137-401, Korea

(Received November 21, 2005 · Accepted February 9, 2006)

**ABSTRACT** – Human solid tumors exhibit a multicellular resistance (MCR) resulting from limited drug penetration and decreased sensitivity of tumor cells when interacting with their microenvironments. Multicellular cultures represent solid tumor condition *in vivo* and provide clinically relevant data. There is little data on antitumor effect of paclitaxel (PTX) in multicellular cultures although its MCR has been demonstrated. In the present study, we evaluated antiproliferative effects of PTX in multicellular layers (MCL) of DLD-1 human colorectal carcinoma cells. BrdU labeling index (LI), thickness of MCL, cell cycle distribution and cellular uptake of calcein were measured before and after exposure to PTX at 0.1 to 50  $\mu$ M for 24, 48 and 72 hrs. BrdU LI and thickness of MCL showed a concentration- and time-dependent decrease and the changes in both parameters were similar, i.e., 34.2% and 40.6% decrease in BrdU LI and thickness, respectively, when exposed to 50  $\mu$ M for 72 hr. The DLD-1 cells grown in MCL showed increase in %G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and resistance to cell cycle arrest and apoptosis compared to monolayers. Calcein uptake in MCL did not change upon PTX exposure, indicating technical problems in multicellular system. Overall, these data indicate that antitumor activity of PTX may be limited in human solid tumors (a multicellular system) and MCL may be an appropriate model to study further pharmacodynamics of PTX.

**Key words** – Multicellular layers, BrdU stain, Paclitaxel, Cell cycle, Fluorescence dye

고형암에 대한 약물의 항암효과는 암조직 중 유효 약물 농도와 암세포의 약물 감수성의 함수이다. 인체 고형암내에서 약물의 유효농도 유지는 암조직 내의 확산율, 약물대사, 암조직 구성물과의 결합 등과 같은 여러 가지 요인들에 의해 제한받는다.<sup>1)</sup> 또한 고형암의 특성인 불균일한 혈관분포와 간질압력(interstitial pressure)의 증가로 인해 암조직 내 약물의 침투와 분포가 제한되고 암조직으로부터의 약물소실 속도가 증가되어 조직 내 충분한 약물농도를 얻기 어렵다.<sup>2)</sup> 한편 인체 고형암 조직 내 암세포는 그 주위의 미세 환경(microenvironment) 즉, 동종 또는 이종세포 및 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 접촉하게 되면서 다세포내성(multicellular resistance, MCR)을 유도하게 된다. 즉, 주위 미세 환경 요소들과의 접촉을 통해 세포주기와 세포자연사를 조절하는 세포 내 신호전달 경로가 직접적인 영향을 받

기 때문에 외부로부터의 성장 저해 혹은 세포사멸 자극에 대한 반응의 정도가 감소된다.<sup>3)</sup> 항암제 내성연구의 주요 이슈로 부상하게 된 이러한 다세포내성은 밀착 형태의 치밀한 삼차원 구조로 인한 약물의 침투제한과도 연관되며 내부의 저산소증 및 괴사 상태에서 세포들이 항암제에 대한 저항성을 갖게 되는 현상도 포괄한다.<sup>4,9)</sup>

현재까지 약물의 항암활성과 그 기전 및 분자유전학적 약효결정인자 탐색 등의 연구 분야에서 *in vitro* 실험계로서 암세포의 단층배양 또는 현탁배양계가 이용되어왔다. 이는 신속성, 비용절감 및 편리성 등에서 장점을 가지고 있으나, 앞서 언급한 고형암의 특성을 배제한 배양계로서 여기에서 얻어진 결과들이 임상적 의미를 충분히 가지지 못한다는 치명적인 단점이 있다. 이로 인해 신약이나 병용요법을 개발하는 과정에서 *in vitro* 실험 결과가 *in vivo* 또는 임상연구로 연계되지 못하고 그 가치가 축소되고 있다. 따라서 고형암의 *in vivo*의 특성을 재현할 수 있는 삼차원적 *in vitro* 다세포 배양계가 여러 가지 방법으로 개발, 연구되어 왔다. *In vitro*

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

다세포실형계 중의 하나인 다층암세포배양계(multicellular layers, MCL)는 고형암 조직 내 항암제의 침투 및 확산을 연구할 수 있는 모델로서 항암제의 투과분포와 약효의 상관성을 연구하는데 유용하게 이용되고 있다.<sup>10)</sup> Tirapazamine의 조직 중 대사정도가 약물투과도를 결정하는 요인 중 하나임이 다층암세포배양계를 이용한 연구에서 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 다층암세포배양계에서 발견되는 세포외기질 성분들이 *in vivo*(이종이식) 암조직에서와 유사하며, 같은 약물에 대해서도 다세포계를 구성하는 세포주에 따라서 조직투과에 차이가 관찰되었다.<sup>1)</sup>

파크리탁셀은 세포분열 시 미세소관(microtubule)의 중합(polymerization)/해중합(depolymerization)반응을 방해하여 미세소관을 과다 안정화시킴으로써 세포주기의 G<sub>2</sub>/M기의 진행 저해로 암세포 분열을 억제한다.<sup>11-13)</sup> 파크리탁셀은 여러 암종에서 우수한 항암 효과를 보이지만 조직 내로의 침투가 제한적임이 알려져 있는데, 즉 단세포층에 비해 다세포층과 *in vitro* histoculture(조직배양계)에서 파크리탁셀의 투과속도가 현저히 저하됨이 보고되었다.<sup>15,16)</sup> 이러한 다세포계에서의 구조적 특성에 의한 파크리탁셀의 투과장애는 세포자연사 유도효과로 제거될 수 있어 노출시간이 증가함에 따라 파크리탁셀의 투과가 증진된다고 보고된 바 있다.<sup>17,18)</sup> 약물침투 장애 외에 고형암 고유의 내부 미세 환경과의 상호작용 즉 세포 간 또는 세포-세포외기질 상호작용에 의해서도 암세포의 약물 감수성의 저하가 유도될 수 있는데<sup>17,18)</sup> DLD-1 세포에서 파크리탁셀의 IC<sub>50</sub>(MTT assay)은 다세포구상체에서 단세포배양계보다 92배 높은 것으로 보고되어 파크리탁셀이 다세포내성을 나타내는 약물임을 알 수 있다.<sup>15)</sup> 단세포배양계에서의 파크리탁셀의 효능에 대해서는 많은 연구결과가 보고되었으나, 다세포계에서의 결과는 매우 부족한 실정이므로 본 연구에서는 S phase 분율의 변화(BrdU LI), 세포층의 성장억제도(세포층의 두께), 세포주기 분포의 변화 및 형광염료의 분포를 측정하는 방법 등을 이용하여 인체 고형암세포의 다층배양계에서 파크리탁셀의 항증식 효과를 분석하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 재료

파크리탁셀은 Bristol-Myers Squipp Company(New York, NY, 미국)에서 제공받았고, Transwell insert®(세공크기: 0.4 μm, insert 지름: 6.5 mm)는 Corning Costar(Acton, MA, 미국)에서 구입하였다. 세포 배양에 사용된 시약 중 배지 RPMI 1640은 Gibco BRL(Rockville, MD, 미국)에서, FBS는 Welgene Inc.(Sugar Land, TX, 미국)에서 구입하였다.

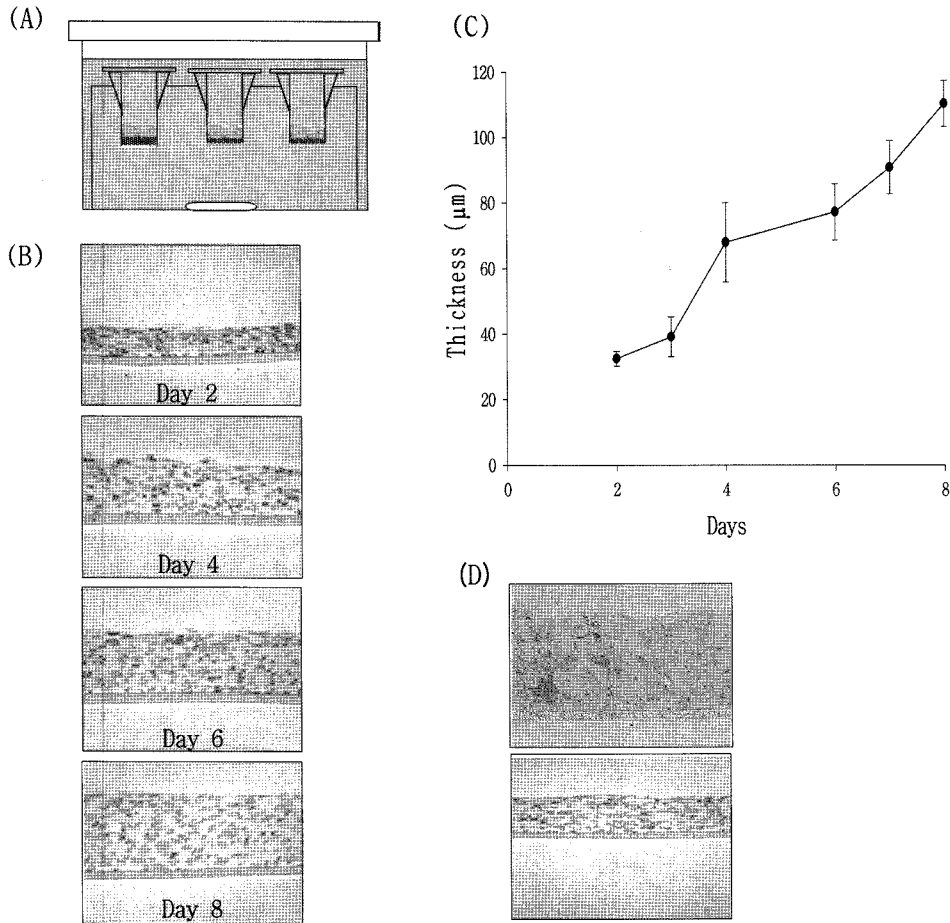
면역염색 및 FACS 분석에 이용된 시약으로 bromodeoxyuridine(BrdU)와 propidium iodide(PI)는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였고, BrdU에 대한 1차 항체(monoclonal mouse anti-bromodeoxyuridine)는 Dako Cytomation(Carpinteria, CA, 미국)에서, BrdU에 대한 2차 항체(donkey anti-mouse IgG)와 normal donkey serum은 Jackson ImmunoResearch Inc.(Baltimore, PA, 미국)에서 구입하였다. 공초점 형광현미경 사용 시 이용된 시약인 ethidium homodimer-1(ethD-1)과 calcein acetylmethylester(calcein-AM)은 Molecular probes사(Eugene, OR, 미국)에서 구입하였다. 면역염색 시 필요한 formaldehyde와 NaOH는 Junsei Chemical사(Tokyo, 일본)것을 이용하였고 기타 시약들은 모두 Sigma Chemical에서 구입하였다.

### 단층세포 배양

인체 대장암 세포주인 DLD-1은 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 분양받았다. DLD-1 세포는 10% FBS, penicillin G(0.06 g/L), streptomycin sulfate(0.1 g/L), HEPES(4.78 g/L), sodium pyruvate(0.11 g/L), 그리고 NaHCO<sub>3</sub>(2.0 g/L)이 함유된 RPMI-1640으로 배양하였다. 배양기에는 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기를 공급하였고, 온도 37°C, 습도 95%가 유지되도록 하였다. 세포의 성장이 80%의 합류상태(confluence)에 이르면 trypsin-EDTA(0.05% w/v)를 처리한 후 계대배양 하였다.

### 다층암세포 배양계의 형성 및 시료염색

자체 제작한 다층암세포배양계(Multicellular layers, MCL) 배양용기(Figure 1A, 82×57×48 mm; width×length×height, V=150 mL)내에서 Transwell insert를 이용하여 다층암세포 배양계를 배양하였다. 간략하게 기술하면, Transwell insert의 상위 챔버(top chamber, TC)에 3×10<sup>5</sup>개/200 μL의 세포를 접종하고 5시간 동안 세공막(Transwell polycarbonate membrane)에 부착시켰다. 이후 insert의 상위 챔버에 100 μL의 배지를 더 가하여 상위 챔버 안의 총 배지량이 300 μL가 되도록 하였고, 배양용기에는 100 mL의 배지를 채워 insert의 세공막이 배양기의 배지에 잠기도록 하였다. 5시간이 경과된 후 다시 50 mL의 배지를 배양용기에 더 가하여 배양용기 안의 배지의 양을 총 150 mL로 채운 다음 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 교반기를 이용하여 배양하였다. 배양상태를 확인하기 위해서는 insert를 4% formaldehyde로 4°C에서 4시간 동안 고정 후 탈수시키고, 파라핀으로 포매하였다. 파라핀 포매된 다층암세포배양계는 5 μm의 두께로 절편하고 이것을 hematoxylin으로 염색하였다. 또한 배양상태를 확인하기 위해 semi-thin section도 이용하였는데 이때에는 다층암세포배



**Figure 1**—Growth of DLD-1 cells grown as multicellular layers (MCL) using Transwell insert®. (A) A schematic diagram of culture device for MCL. 6 inserts were placed in a culture jar (dimension: 82×57×48 mm, w×l×h). (B) Representative paraffin sections of MCL stained with hematoxylin. (C) A growth curve of MCL until 8 days with initial plating density of  $3 \times 10^5$  cells. (n=3) (D) Comparison between a semi-thin section (upper panel) and a paraffin section (lower panel) of 5-day-old MCLs.

양계를 1% glutaraldehyde-1% paraformaldehyde액(in PBS, pH 7.2)에서 1시간 전고정 및 1% osmium tetroxide(in PBS, pH 7.2)에서 1시간의 후고정과정을 거친 후 이를 에탄올과 아세톤으로 탈수시켰다. 탈수된 샘플을 다시 Epon 812로 포매하여 절편(2 µm)을 얻어서 toluidine blue로 염색하고, 광학현미경 하에서 관찰하였다. 다층암세포배양계의 두께 측정은 전체 절편 중 대표적인 부분을 세군데 선정하여 성장 속도를 평가하였는데 집안렌즈의 격자를 micrometer로 보정한 후 각 시료의 두께를 측정하였다.

**다층암세포배양계에서 파크리타셀의 항암활성 측정**

5일 배양한 다층암세포배양계를 어댑터(6-well 내 Transwell insert 지지 장치)가 장착된 6-well plate에 옮긴 후 상위 챔버에 파크리타셀(0, 0.1, 1, 10, 50 µM)을 포함한 배지 200 µL를 주입하고 72시간까지 배양하였다. 미리 정해진 약물

노출시간 종료 후 각 insert 상위 챔버 안의 약물이 포함된 배지를 제거하고, 다시 다층암세포배양계 배양용기에 옮겨 1일 추가 배양하였다. 1일 추가배양 후 다층암세포배양계를 0.07 N NaOH로 용해시킨 100 µM BrdU 용액에 12시간 동안 노출시킨 다음 고정 및 파라핀 포매하여 5 µm의 두께로 표본을 만들었다. BrdU 면역염색을 위해서는 합수과정 후 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 0.06 mg/mL trypsin(0.1% CaCl<sub>2</sub>가 함유된 0.05 M tris buffer에 조제, PH 7.6)에서 각각 10분간 처리하였고, 2 N HCl을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 충분히 수세하였다. 다음으로, donkey normal serum(1:10)을 30분간 처리하고 1차 항체(monoclonal mouse anti-mouse IgG, 1:100)로 4°C에서 12-16시간, 2차 항체(donkey anti-mouse IgG, 1:100)로 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 마지막으로 3,3'-diaminobenzidine substrate(1:10)으로 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조염색하였다.

BrdU에 의해 염색된 S-phase 세포들의 비율을 구하기 위해서는 Image analysis 소프트웨어인 Optimas 6.5를 이용하여 BrdU로 염색된 핵의 면적과 hematoxylin으로만 염색된 면적을 각각 측정하였고 다음의 식을 이용하여 산출하였다(Eq. 1).

$$\text{BrdU LI}(\%) = \frac{\text{Anti-BrdU 로 염색된 핵의 면적}}{\text{염색된 핵의 총면적}} \times 100 \text{ ----- (Eq. 1)}$$

형광염색을 위해서는 약물 처리 후 1일 추가 배양된 다중암세포배양계의 상위 챔버에 4  $\mu\text{M}$  calcein-AM(EX/EM=494/517 nm)과 8  $\mu\text{M}$  ethD-1(EX/EM=528/617 nm)의 혼합용액 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 세포층과 함께 세공막을 insert로부터 잘라내어 슬라이드에 장착시키고 공초점 형광현미경으로 관찰하였다. 광학절편(optical sectioning)을 통해 각 절편마다 형광이미지를 얻고 CAS program (written by Todd Clark Brelje, University of Minnesota, ver 4.02)을 이용하여 평균필드 형광세기(Mean field fluorescent intensity,  $I_{\text{mean}}$ )를 구하고 각 샘플 내  $I_{\text{mean}}$ 이 최고에 도달하는 절편의 형광세기(maximum mean intensity,  $I_{\text{mean,max}}$ )를 결정하여 대조군과 비교하였다.

세포주기 분포 측정을 위해서는 약물처리 후 PBS로 수세하고, trypsin-EDTA(0.05% w/v)를 첨가하여 얼음 위에 방치하였다. 1시간 후 trypsin-EDTA를 제거하고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 5분간 배양하여 단세포로 현탁시킨 후, 70% 에탄올로 고정하여 분석 시까지 -20°C 냉동고에서 보관하였다. 분석 당일에 세포들을 PBS로 수세하고, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 RNase A와 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PI를 첨가하여 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. FACScan™(Becton & Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, 미국)으로 데이터를 얻은 후, Modfit® (Verity, Topsham, ME, 미국)을 이용하여 세포주기 분포를 분석하였다.

### 이미지 분석 및 통계분석

BrdU 염색 이미지 분석에 이용한 Optimas 6.5는 Media Cybernetics, Inc.(Silver Spring, MD, 미국)에서 제공된 프로그램을 사용하였다. 데이터의 통계분석(이원분산분석, 다중비교)에는 SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, 미국)을 사용하였다.

## 결 과

### DLD-1 세포의 다중배양계

Transwell insert를 이용하여 DLD-1 인체대장암 세포를

다층으로 8일까지 배양하면서 다중암세포배양계의 형성 및 성장을 파라핀 절편으로 관찰하였다(Figure 1B). 형성된 다층세포의 두께는 2일에 약 32.5  $\mu\text{m}$ 이었으며 빠른 성장을 보여 8일에는 약 110.3  $\mu\text{m}$ 의 두께로 성장하였다(Figure 1C). 다중암세포배양계의 두께 증가로 측정된 성장배가시간(doubling time,  $T_D$ )은 배양 초기(4일 까지)에는 약 2일이었고, 시간이 경과(5일 이후)함에 따라 약 4일로 성장속도가 둔화됨을 확인할 수 있었다(Figure 1B). 또한 괴사(necrosis) 부위는 관찰되지 않았으며, 세공막으로부터의 거리에 따라 세포의 형태에 다소 차이가 있었다. 세공막에 가까운 부위에서는 둥근 모양의 세포형태가 관찰되었고, 세공막에서 멀어지는 부위일수록 세포들은 납작하게 퍼진 모양을 이루고 더 밀집되어 있는 것을 확인하였다.

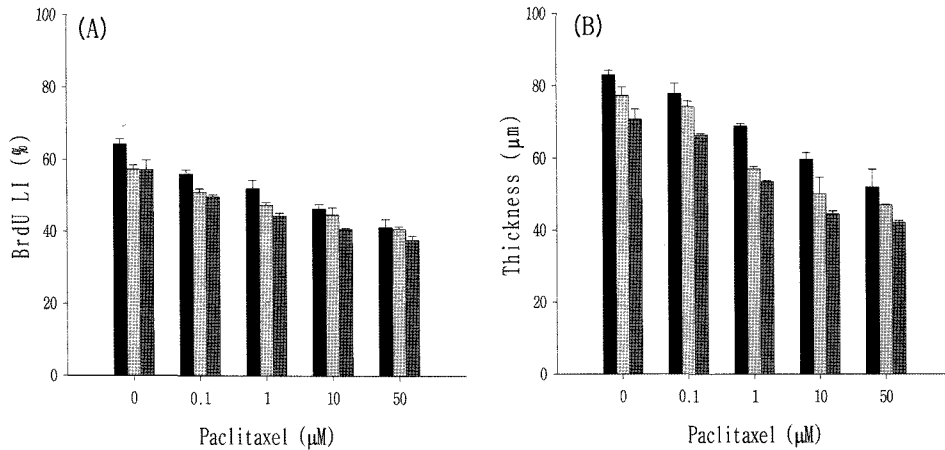
다중암세포배양계를 파라핀(paraffin section) 또는 Epon으로 포매하여 얻은 절편(semi-thin section)을 각각의 염색과정을 거친 뒤 세포층수 및 두께를 비교하였다(Figure 1D). 5일 배양된 다층의 파라핀 절편 두께는 약 60.1  $\mu\text{m}$ 로 측정되었으나 semi-thin section으로 만들어진 다세포층의 두께는 약 156  $\mu\text{m}$ 로서 semi-thin section이 파라핀 절편에 비해 약 2.6배 두껍게 관찰되었다.

### 파크리탁셀의 항증식 효과

다층으로 배양된 DLD-1 세포를 파크리탁셀에 노출시킨 후 BrdU로 표지된 세포비율(BrdU LI)의 변화를 구하였다(Figure 2A). 파크리탁셀에 24시간 노출시킨 경우 0.1, 1, 10 및 50  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 대조군에 비해 BrdU LI는 각각 12.8, 19.0, 27.8, 35.9%가 감소되었고, 48시간과 72시간의 경우에도 유사한 결과가 관찰되었다. 이원분산분석 결과, 농도와 시간에 따른 BrdU LI의 변화에 대해 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나( $p < 0.05$ ), 두 인자간의 교호작용은 없었다( $p = 0.505$ ). BrdU LI는 모든 농도군에서 통계적으로 유의한 감소를 보였고 노출시간의 증가에 따라라도 유의한 감소를 보였다( $p < 0.05$ ).

다중암세포배양계의 파라핀 절편에서 대표적인 세 부위의 세포층 두께를 측정하여 두께변화를 확인함으로써 파크리탁셀의 항증식효과를 측정하였다(Figure 2B). 세포층의 두께 변화에 대해 이원분산분석 시 농도와 시간에 대한 통계적 유의성은 보였으나( $p < 0.05$ ) 교호작용은 보이지 않았다( $p = 0.713$ ). 농도증가에 따라 0.1  $\mu\text{M}$ 을 제외한 모든 농도군에서 유의성있는 감소를 나타냈으며 노출 시간 증가에 따라서는 모든군에서 통계적 유의성을 보이며 감소하였다( $p < 0.05$ ).

파크리탁셀에 72시간 노출한 경우, 0.1, 1, 10 및 50  $\mu\text{M}$



**Figure 2**—Anti-proliferative activity of paclitaxel against DLD-1 cells grown as MCL when determined by labeling index (% LI) of BrdU (A) and thickness of MCLs (B). Cells were exposed to paclitaxel for 24 hr (■), 48 hr (▣) and 72 hr (▤). Error bars represent SE of three independent experiments. Concentration- and exposure time-dependent decrease were statistically significant in all groups compared to control for BrdU LI (A) and thickness (B). (Statistical significance was tested using two-way ANOVA and Tukey multiple comparison).

의 농도에서 대조군과 비교하여 BrdU LI는 13.1, 22.5, 29.0 및 34.2%의 감소율을, 두께변화는 6.20, 24.5, 37.2, 40.6%의 감소율을 보였다. 즉, BrdU LI와 세포층 두께의 변화로 측정된 파크리탁셀의 항증식효과를 비교할 때 감소 비율은 유사하였다.

**파크리탁셀의 세포주기 분포 영향**

DLD-1 세포의 다층배양계를 파크리탁셀에 노출시킨 후 세포주기 분포변화를 확인하여 이를 단층배양계와 비교하였다(Figure 3). 약물을 처리하지 않은 대조군에서는 단층배양계에 비해 다층배양계에서 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기(49.5±2.7% vs 70.1±2.5%)는 증가하고, S기(30.5±3.4 vs 13.1±1.3%)와 G<sub>2</sub>/M기(18.8±1.1% vs 14.8±1.1%)는 감소하였다. 약물 노출시 동일 농도군 내 노출시간에 따른 세포주기 분포는 유의하게 다르지 않았으므로 평균값을 구하여 평가하였다. 다층배양계에서 파크리탁셀 1 μM과 50 μM에 노출 시 대조군에 비교한 세포주기의 변화율은 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>에서 각각 12.0%와 24.1% 감소하였고 S기에서는 1 μM에서만 29.0% 증가하였으며, G<sub>2</sub>/M기는 50 μM에서만 56.1% 증가하였다(Figure 3A). 단층배양계에서 0.1 μM의 파크리탁셀 노출 시 세포주기의 변화율은 대조군에 비해 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기는 27.9% 감소하였고, S기는 22.0% 증가하였다. 따라서 DLD-1 세포의 세포주기 분포는 다층으로 배양함에 따라 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기에 세포가 축적되는 것으로 나타났고 파크리탁셀에 의한 G<sub>2</sub>/M기의 증가는 다층배양계를 50 μM에 노출시킨 경우에서만 관찰되었으며 단층배양계의 경우는 1 μM 이상에서는 세포주기 분포를 분석할 수 없었다.

한편 괴사나 세포사멸에 의해 DNA 양이 감소되면 G<sub>1</sub>기

앞에 세포자연사를 나타내는 피이크(Sub G<sub>1</sub> 또는 hypodiploid DNA peak)가 나타난다. 단층배양 된 DLD-1 세포를 파크리탁셀 1 μM에 노출시켰을 때 sub G<sub>1</sub> 분율로 측정된 세포사 유도 효과는 다층배양계에 비해 현저히 증가되었고 세포주기 분포 분석을 할 수 없을 정도로 세포자연사가 유도되었다(Figure 3B). 약물에 노출되지 않은 경우에 두 배양계에서 관찰된 sub G<sub>1</sub> 분율은 2.00% 이내였고(단층: 1.28%, 다층: 2.00%), 단층배양된 DLD-1 세포가 파크리탁셀 0.1 μM에 노출된 경우에는 약 10.9%의 sub G<sub>1</sub> 분율이 관찰되었으나 다층배양계에서는 이보다 훨씬 높은 농도인 1 μM와 50 μM에 노출 시 각각 7.62±1.2% 및 10.1±2.2%의 sub G<sub>1</sub> 분율이 관찰되어 다층배양된 세포에서 세포사유도가 감소됨을 제시하였다(Figure 3).

**Calcein-AM/EthD-1으로 평가한 파크리탁셀의 항증식 활성**

파크리탁셀의 항증식효과를 평가하기 위한 방법으로 calcein-AM과 ethD-1을 이용하여 생존 세포와 사멸 세포(세포막 기능상실)의 분포를 측정하였다(Figure 4). 공초점 형광 현미경으로 광학 절편(optical sectioning)을 얻고 각 절편 내의 calcein-AM과 ethD-1의 형광 강도(평균필드강도, mean field intensity, I<sub>mean</sub>)를 측정하였다. 세포 표면으로부터의 거리(위치)에 따른 평면 내 형광 강도(I<sub>mean</sub>)의 분포를 분석한 후 약 60~100 μm 부근에서 관찰되는 최고 필드형광강도, 즉 I<sub>mean, max</sub>(maximum mean intensity)값을 구하고 약물 노출에 따른 변화율을 추적하였다. Figure 4A에서 보는 바와 같이, ethD-1의 I<sub>mean, max</sub> 모든 실험군에서 대조군에 비해 현저한 증가가 관찰되었으나(1.4배~4.5배) 농도 또는 노출시간

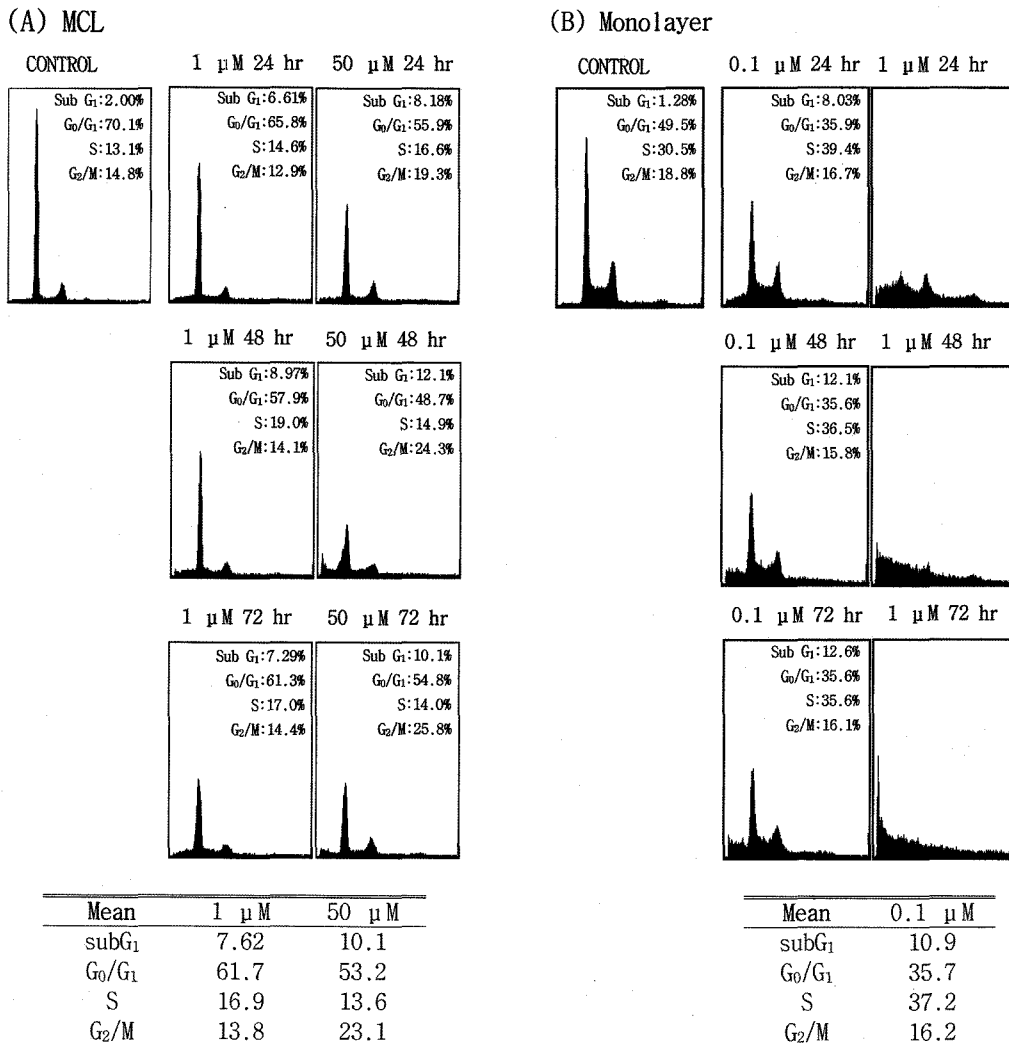


Figure 3—Representative DNA histograms of DLD-1 cells grown as MCLs (A)(n=3) and monolayers (B)(n=2) before and after paclitaxel exposure. The % distribution is indicated in each histogram and the mean of each concentration level was shown below.

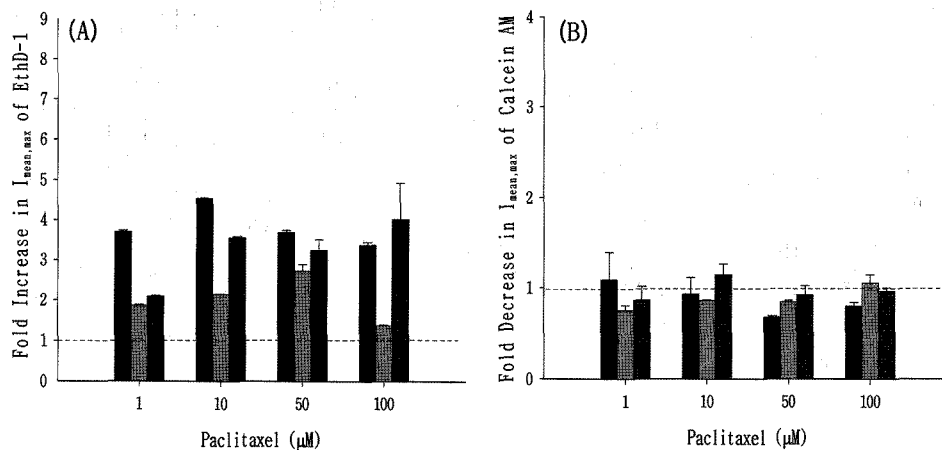


Figure 4—The cytotoxicity of paclitaxel in MCL measured using distribution of calcein-AM and ethD-1. Cells were exposed to paclitaxel for 24 hr (■), 48 hr (▣) and 72 hr (▤). Optical sections of 10  $\mu$ m thickness were obtained through the MCL for ethD-1 (A) and calcein-AM (B). The broken line through 1 indicates  $I_{mean,max}$  of untreated controls.

의존적인 변화 추이는 관찰되지 않았다. 한편 calcein-AM의 경우에는 모든 약물 농도(1, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ )와 노출시간(24, 48, 72시간)에서  $I_{\text{mean,max}}$ 가 대조군과 비교하여 차이를 보이지 않았다.

## 고 찰

파크리타셀의 항증식효과는 단층세포배양계와 다세포배양계간에 차이를 보이는 것으로 지적되고 있다. DLD-1 및 MCF-7 세포의 다세포구상체(multicellular spheroids: MCS)를 파크리타셀에 1시간 노출 시  $IC_{50}$ 은 단세포에서보다 90 배 이상 증가됨이 보고 된 바 있다.<sup>15)</sup> 본 논문에서는 다세포 삼차원 배양계인 다층암세포배양계(MCL)에서 파크리타셀의 항증식 활성을 평가하고 이를 단층배양계의 결과와 비교하고자 하였다.

다층 배양이 상대적으로 용이한 인체 대장암 세포주 DLD-1을 선택하고 배양조건을 개선하기 위해 기존에 이용하던 24-well plate 대신 자체 제작한 배양용기를 사용하였다. 이전 배양조건(Transwell insert를 24-well plate내에 장착)에서는 문헌에 보고 된 바와 유사하게 3일 배양 시 약 23  $\mu\text{m}$ , 8일 배양 시에는 약 45  $\mu\text{m}$ 의 두께를 형성하였다.<sup>15,19)</sup> 반면에 자체 제작한 배양용기는 150 mL의 배지를 교반(40회/1분)할 수 있게 설계하여 충분한 배지 공급과 산소분압의 유지가 가능하도록 한 결과 성장속도가 약 2배 증가하였다. 즉, 다층의 두께가 3일 배양 시 39.2  $\mu\text{m}$  그리고 8일 배양 시 110  $\mu\text{m}$ 으로 성장하여 배양조건이 개선됨을 확인할 수 있었다(Figure 1C).

본 실험에서는 5일 배양한 DLD-1 세포의 다층암세포배양계(두께: 약 60.1 $\pm$ 9.39  $\mu\text{m}$ , 세포층수: 9층)를 이용하였는데 Epon으로 포매하여 얻은 semi-thin section에서 측정된 다층의 두께는 약 156  $\mu\text{m}$ 으로서 파라핀 포매한 경우(60.1  $\mu\text{m}$ )에 비해 2.6배의 차이를 보였고, 고정과정 없이 공초점 형광현미경을 이용하여 측정된 두께(약 170  $\mu\text{m}$ )와 유사하였다. 이러한 결과는 Epon으로 포매하였을 경우에 다층세포조직의 형태 변형 없이 배양상태를 확인할 수 있음을 의미하며 파라핀 포매에 의해 조직 형태의 변형 및 압축이 일어나는 것으로 판단된다. 이러한 현상은 파라핀 포매 전과 후의 다세포구상체의 두께가 8-25%의 차이를 보인다는 보고와도 일치하는 것이다.<sup>20)</sup>

다층으로 배양된 DLD-1 세포에서 파크리타셀의 항증식효과는 BrdU LI(%)와 두께변화를 이용하여 측정했을 때 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 최고 농도인 50  $\mu\text{M}$ 에 72시간 노출된 경우, BrdU LI(%)와 두께변화는 대조군 대비 34.2%와

40.6%의 감소율을 나타내었다. BrdU LI(%)에 비교하여 두께변화가 다소 큰 감소율을 보였는데 이는 성장분율의 저하와 함께 세포의 소실에 의해 두께의 감소가 유도되기 때문으로 생각된다. 다른 대장암 세포주인 HCT-116의 다층배양계를 epirubicin에 노출시킨 경우에 BrdU LI(%)는 약물 노출조건에 따라 약 50%까지, 두께는 약 44%까지 감소됨이 보고되었다.<sup>21)</sup> 본 논문의 파크리타셀의 결과와 비교할 때 두께의 감소율은 유사하였으나 BrdU LI의 감소율은 낮았으며 이는 파크리타셀(세포분열저해)과 epirubicin(DNA 합성 저해)의 활성기전 차이를 반영한다고 생각된다.

인체 대장암 세포주 DLD-1의 파크리타셀에 대한 세포주기와 세포자연사 유도 결과는 파크리타셀에 대한 감수성에 대한 두 배양계의 차이를 분명하게 보여준다(Figure 3). 대조군에서의 세포주기 분포는 단층배양계에 비해 다층배양계에서  $G_0/G_1$ 기는 증가하고 S기와  $G_2/M$ 기에서는 감소하는 현상을 나타내었는데 이는 대장암 세포주인 HT-29와 SW620 세포의 다층배양계와 단층배양계에서의 결과와 유사하였다.<sup>22)</sup> 이러한 결과는 다세포계 내 세포의 성장 패턴이 달라짐을 의미하며 EMT-6(쥐 유방암 세포주) 세포를 다세포구상체로 배양했을 경우에도 다세포구상체의 내부에 존재하는 세포들에서  $G_1$  주기의 축적이 관찰되었고, 이는 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p27<sup>kip1</sup> 단백질의 과발현과 연관되어 있는 것으로 보고된 바 있다.<sup>23)</sup>

파크리타셀은 세포내 미세소관의 정상적 중합/해중합 주기를 방해하여 미세소관의 과다 안정화로  $G_2/M$ 기 진행 저해와 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>12-14)</sup> 또한 세포주기와는 독립적인 경로에 의해 세포자연사가 유도되는 것으로도 보고되고 있다.<sup>24)</sup> 전형적인 파크리타셀의  $G_2/M$ 기 진행 저해는 다세포배양계에서 고농도(50  $\mu\text{M}$ ) 노출 시에만 유도되었고, 세포주기의 붕괴(abrogation)는 관찰되지 않았다. 반면 단층세포배양계에서는 1  $\mu\text{M}$ 에 노출된 경우, 24시간 내에 세포주기 분포의 붕괴가 나타났다. 파크리타셀 0.1  $\mu\text{M}$ 에 노출된 단층배양계에서와 50  $\mu\text{M}$ 에 노출된 다세포배양계에서 sub  $G_1$  분율이 관찰됨으로써(10.9 $\pm$ 1.8% vs 10.1 $\pm$ 2.2%) 배양조건 내 세포간의 접촉 등에 의해 세포사에 대한 감수성이 50배 정도 변화될 수 있음을 제시한다. 본 연구팀의 이전 연구결과에서도 인체 비소세포폐암세포인 A549 xenograft의 조직배양(histoculture) 시 파크리타셀의 항증식 활성이 단층배양계에 비해 현저히 감소가 관찰되었으며 이와 더불어 세포주기효과의 차이도 관찰되었다.<sup>25)</sup> 자궁암 세포주인 A2780과 HEY의 세포주기를 분석한 보고에서 10  $\mu\text{M}$ 의 파크리타셀에 18시간 노출 시  $G_2/M$ 기 축적이 단층배양계에 비해 다층배양계에서 낮고, sub  $G_1$  세포(hypodiploid DNA peak)도

유도되지 않았다고 보고되기도 했다.<sup>26)</sup>

기존에 알려진 세포의 생존율을 평가하는 방법으로 본 실험에서 이용한 BrdU 조직화학염색에 의한 방법이나 방사성 동위원소를 이용한 방법이 알려져 있다.<sup>27,28)</sup> 이러한 방법들은 장시간의 준비과정이 필요한 반면에, calcein-AM/ethD-1을 이용한 방법은 살아있는 세포에서 단시간 내에 분석이 가능하고 샘플준비과정 중 발생할 수 있는 세포 손상 없이 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다.<sup>29)</sup> EthD-1은 사멸 세포를 확인하는 염료로 손상된 세포막을 통해 세포 안에 축적되고 DNA와 결합함으로써 형광을 나타낼 수 있으며 calcein-AM은 생존 세포를 확인하는 소수성 염료로서 세포막을 통과하며 세포내 존재하는 에스테르 가수분해효소(esterase)에 의해 유리되는 calcein으로부터 형광을 나타낸다.<sup>30)</sup> 다세포층으로 배양된 DLD-1 세포를 파크리타셀에 노출시켰을 때 ethD-1의 형광강도는 대조군과 비교하여 현저한 차이를 보였으나 calcein의 형광강도는 차이를 보이지 않았다. EthD-1의 경우에도 약물 농도와 노출시간 증가에 대한 변화는 관찰되지 않았다. Calcein의 분포가 대조군에 비해 약물처리 군에서 감소되지 않은 것은 휴지기 상태의 세포가 재활성화 되면서 calcein의 형광강도가 높아졌기 때문으로 생각된다. 즉, 파크리타셀에 노출된 DLD-1 세포의 다세포층에서 약물 농도 및 노출시간에 따라 두께가 감소되었는데(최고 40.6%) 이는 약물노출 종료 후 1일 추가 배양시에 휴지기 상태의 다세포층배양계 내부 세포들이 보다 원활한 배지 및 산소공급을 받을 수 있는 환경이 조성되고 이에 따라 다시 성장기 세포로 재활성화됨으로써 세포질 내 에스테르 가수분해 효소활성이 증가함에 따른 결과라고 추측된다. Calcein-AM과 ethD-1 염료를 이용한 분석 방법은 다세포층에서 파크리타셀의 항증식효과를 세포의 포매 및 절편과정 없이 단시간 내에 확인할 수 있는 유용한 방법이지만 보다 정량적인 결과를 얻기 위해서는 다세포실험계와 관련된 기술적인 문제점들, 즉, 다세포층 내로의 염료 투과도의 개선, 세포층 내부에서 발생하는 형광의 흡수 및 분산에 의한 겉보기 형광 저하 현상(fluorescent attenuation) 등이 보정되어야 하며 이를 위한 보완연구가 필요할 것으로 사료된다.<sup>28,29)</sup>

본 연구는 다세포배양계에서 DLD-1 세포에 대한 파크리타셀의 항증식효과를 분석하기 위해 BrdU LI와 세포층 두께의 변화, 세포주기분포 및 calcein과 ethD-1의 분포변화를 측정하였다. 다세포층에서 파크리타셀에 의한 BrdU LI와 세포층 두께 감소는 1.0~50  $\mu$ M 범위에서 최고 40%까지 관찰되었으나 이는 단세포배양계에서 측정된 파크리타셀의 항증식효과(IC<sub>50, 72h</sub>=40 nM)와는 큰 차이를 보이는 것이다.<sup>19)</sup> 또

한 다세포배양계에서 세포의 G<sub>2</sub>/M기 축적은 고농도(50  $\mu$ M)에 노출시킨 경우에서만 확인할 수 있었으며 이때 sub G<sub>1</sub> 분율도 동반 상승함이 관찰되었고 이 두 효과 모두 단세포배양계에 비해 현저하게 저하되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 파크리타셀의 효능이 다세포계(고형암)에서 제한될 수 있음을 제시하며 파크리타셀의 효능을 증가시킬 수 있는 약물 병용 또는 투여 용법 수립에 대한 연구도 다세포계를 이용하여 이루어져야함을 시사한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부(A020436) 및 과학기술부(M104140-30001-05N1403-00111)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) I.F., Tannock, C.M. Lee, J.K. Tunggal, D.S. Cowan and M.J. Egorin, Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **8**(3), 878-84 (2002).
- 2) C.H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras and A. Ostman, High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, **4**(10), 806-13 (2004).
- 3) B. Desoize and J. Jardillier, Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**, 193-207 (2000).
- 4) J. Carlsson, E. Daniel-Szolgay, G. Frykholm, B. Glimelius, A. Hedin and B. Larsson, Homogeneous penetration but heterogeneous binding of antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma HT-29 spheroids, *Cancer Immunol. Immunother.*, **30**, 269-76 (1989).
- 5) T. Nederman, J. Carlsson and K. Kuoppa, Penetration of substances into tumour tissue. Model studies using saccharides, thymidine and thymidine-5'-triphosphate in cellular spheroids, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **22**, 21-5 (1988).
- 6) C. Soranzo, G. Della Torre and A. Ingrosso, Formation, growth and morphology of multicellular tumor spheroids from a human colon carcinoma cell line (LoVo), *Tumori.*, **31**, 459-67 (1986).
- 7) R.E. Durand, Radioprotection by WR-2721 in vitro at low oxygen tensions: implications for its mechanisms of action, *Br. J. Cancer*, **47**, 387-92 (1983).
- 8) T. Sasaki, M. Yamamoto, T. Yamaguchi, and S. Sugiyama, Development of multicellular spheroids of HeLa cells cocultured with fibroblasts and their response to X-irradiation, *Cancer Res.*, **44**, 345-51 (1984).
- 9) R.E. Wilson, P.C. Keng, and R.M. Sutherland, Drug



- resistance in Chinese hamster ovary cells during recovery from severe hypoxia, *J. Nat. Cancer Inst.*, **16**, 1235-40 (1989).
- 10) D.S. Cowan, K.O. Hicks and W.R. Wilson, Multicellular membranes as an in vitro model for extravascular diffusion in tumours, *Br. J. Cancer (Suppl.)*, **27**, S28-31 (1996).
  - 11) K.O. Hicks, Y. Fleming, B.G. Siim, C.J. Koch and W.R. Wilson, Extravascular diffusion of tirapazamine: effect of metabolic consumption assessed using the multicellular layer model, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **42**(3), 641-9 (1998).
  - 12) J. Parness and S.B. Horwitz, Taxol binds to polymerized tubulin *in vitro*, *J. Cell Biol.*, **91**, 479-487 (1981).
  - 13) E. Roussel, M.M. Belanger and J. Couet, G2/M blockade by paclitaxel induces caveolin-1 expression in A549 lung cancer cells: caveolin-1 as a marker of cytotoxicity, *Anticancer Drugs*, **15**, 961-967 (2004).
  - 14) K. Torres and S.B. Horwitz, Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent, *Cancer Res.*, **58**, 3620-3626 (1998).
  - 15) K.M. Nicholson, M.C. Bibby and R.M. Phillips, Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids, *Eur. J. Cancer*, **33**, 1291-1298 (1997).
  - 16) H.J. Kuh, S.H. Jang, M.G. Wientjes, J.R. Weaver and J.L. Au, Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human solid tumor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**(2), 871-80 (1999).
  - 17) B. St. Croix and R.S. Kerbel, Cell adhesion and drug resistance in cancer, *Curr. Opin. Oncol.*, **9**(6), 549-56 (1997).
  - 18) R.C. Bates, L.F. Lincz and G.F. Burns, Involvement of integrins in cell survival, *Cancer Metastasis Rev.*, **14**(3), 191-203 (1995).
  - 19) J.-W. Lee, Evaluation of activity of anticancer agents using multicellular layer of human cancer cells, *M.S. Thesis for Medical Science*, Catholic University (2003).
  - 20) R.M. Sutherland, B. Sordat, J. Bamat, H. Gabbert, B. Bourrat and W. Mueller-Klieser, Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma, *Cancer Res.*, **46**(10), 5320-9 (1986).
  - 21) A.H. Kyle, L.A. Huxham, A.S. Chiam, D.H. Sim and A.I. Minchinton, Direct assessment of drug penetration into tissue using a novel application of three-dimensional cell culture, *Cancer Res.*, **64**(17), 6304-9 (2004).
  - 22) J.M. Padron, C.L. van der Wilt, K. Smid, E. Smitskamp-Wilms, H. H. Backus, P.E. Pizao, G. Giaccone and G.J. Peters, The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **36**(2-3), 141-57 (2000).
  - 23) B. St Croix, V.A. Florenes, J.W. Rak, M. Flanagan M, N. Bhattacharya, J.M. Slingerland and R.S. Kerbel, Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents, *Nat. Med.*, **2**, 1204-10 (1996).
  - 24) W. Fan, Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 1215-1221 (1999).
  - 25) J.-K. Park, S.-Y. Kim and H.-J. Kuh, Pharmacodynamics of Antitumor Activity of Paclitaxel in Monolayers and Histocultures of Human NSCLC Cells, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**, 361-367 (2005).
  - 26) F. Andrea, B. Robert and S. Robert, Kerbel, Abrogation of taxol-induced G<sub>2</sub>-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids, *Cancer Research*, **57**, 2388-2393 (1997).
  - 27) M. Haji-Karim and J. Carlsson, Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin, *Cancer Res.*, **38**(5), 1457-64 (1978).
  - 28) A.J. Franko and R.M. Sutherland, Oxygen diffusion distance and development of necrosis in multicell spheroids, *Radiat. Res.*, **79**(3), 439-53 (1979).
  - 29) M. Wartenberg and H. Acker, Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy, *Micron.*, **26**(5), 395-404 (1995).
  - 30) B. Jonsson, G. Liminga, K. Csoka, H. Fridborg, S. Dhar, P. Nygren and R. Larsson, Cytotoxic activity of calcein acetoxymethyl ester(Calcein/AM) on primary cultures of human haematological and solid tumors, *European Journal of Cancer*, **32A**(5), 883-997 (1996).