

## Comparative Evaluation of Colon Cancer Stemness and Chemoresistance in Optimally Constituted HCT-8 cell-based Spheroids

Seung Joon Lee<sup>1</sup>, Hyoung-Kab Kim<sup>2</sup>, Hyang Burm Lee<sup>3</sup> and Yuseok Moon<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Mucosal Exposome and Biomodulation, Department of Biomedical Sciences, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 50612, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

<sup>3</sup>Division of Food Technology, Biotechnology and Agrochemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

<sup>4</sup>Research Institute for Basic Sciences and Medical Research Institute, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received June 1, 2016 / Revised August 24, 2016 / Accepted October 4, 2016

Cancer is a complex disease heterogeneously composed of various types of cells including cancer stem-like cells responsible for relapse and chemoresistance in the tumor microenvironment. The conventional two-dimensional cell culture-based platform has critical limitations for representing the heterogeneity of cancer cells in the three-dimensional tumor niche *in vivo*. To overcome this insufficiency, three-dimensional cell culture methods in a scaffold-dependent or -free physical environment have been developed. In this study, we improved and simplified the HCT-8 colon cancer cell-based spheroid culture protocol and evaluated the relationship between cancer stemness and responses of chemosensitivity to 5-Fluorouracil (5-FU), a representative anticancer agent against colon cancer. Supplementation with defined growth factors in the medium and the culture dish of the regular surface with low attachment were required for the formation of constant-sized spheroids containing CD44<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup> colon cancer stem cells. The chemo-sensitivities of CD44<sup>+</sup> cancer stem cells in the spheroids were much lower than those of CD44<sup>-</sup> non-stem-like cancer cells, indicating that the chemoresistance to 5-FU is due to the stemness of colon cancer cells. Taken together, the inflammation and oncogenic gut environment-sensitive HCT-8 cell-based colon cancer spheroid culture and comparative evaluation using the simplified model would be an efficient and applicable way to estimate colon cancer stemness and pharmaceutical response to anticancer drugs in the realistic tumor niche.

**Key words** : Cancer stem cell, chemoresistance, colon cancer, 5-Fluorouracil (5-FU), spheroid

### 서 론

암은 간질세포, 신호전달 물질, 다양한 세포 외 기질로 구성된 비균질적 미세환경과의 상호작용에 의해 발생하는 복잡한 질병이다[2]. 고형암은 암세포뿐만 아니라 혈관, 염증세포, 섬유아세포로 구성되어 있고 비정상적인 조직 발생과정과 비슷하다[19]. 대장암은 유전적 요인 외에, 식이 등을 포함한 외부 환경으로부터 노출된 다양한 스트레스의 축적으로 인해 발생하는 환경적 질환으로 정의되고 있다. 대장 및 소장 상피와 연결된 혈관은 간문맥과 정맥으로 연결되어 간, 폐를 비롯한 다양한 장기로 침습, 전이가 활발하기 때문에 대장암은 전체 암 중에서 사망률이 3번째로 높다[12, 16, 17]. 외과적 수술, 방사선 치료, 화학 항암치료 등은 여전히 일반적인 항암치료

로 널리 처치되고 있지만, 화학 항암치료에 대한 내성은 효과적인 암 치료의 주요 걸림돌이 되고 있다. 이는 고형암의 비균질적인 특질과 암 미세환경과의 상호작용에 대한 이해의 부족과 이를 대변할 수 있는 시스템의 부적합성과 관련이 있다. 악성종양은 종양개시세포(tumor-initiating cell)로써 자가재생(self-renewal) 능력이 있는 암 줄기세포를 비균질적으로 구성하고 있고, 이는 암의 발생과 전이, 항암내성의 주요 원인으로 작용한다[1, 5, 15]. 세포 표면 단백질인 CD44와 CD133은 대표적인 대장암 줄기세포 표지인자로서[7, 18], 이 단백질들이 과발현되어 있는 암세포는 약물저항성이 높고, 치료 후 예후도 좋지 않았다[17, 20]. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)도 장 상피 줄기세포 및 대장암 줄기세포에서 발현되는 주요 암 줄기세포 표지 인자로 알려져 있다[11].

부착성 대장암 세포주를 활용한 약물의 효능 시험은 간단하고 효과적인 플랫폼으로 널리 활용되어 왔다. 하지만, 2차원 배양 세포 기반 시스템은 암의 비균질적인 세포구성, 간세포(stromal cell) 및 세포 외 기질과 상피 암 간의 상호작용을 대변하기에 한계가 있고, 인체 세포 기반 효능실험과 동물실험 간의 결과가 일치하지 않는 문제를 내포하고 있어 생체 내 약물의 항암효과를 검증하는데 한계가 있었다[3]. 최근, 3차

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-8094, Fax : +82-55-382-8090

E-mail : moon@pnu.edu

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

원 배양, 기질세포를 비롯한 다양한 세포들과의 공배양으로 조성된 세포 기반 플랫폼을 활용해 이러한 한계를 극복하면서 보다 생체에 근접한 약물 반응을 확인하고자 하는 시도들이 활발하다. 그 중 가장 간단하고 대표적인 방법이 스페로이드 (Spheroid) 배양세포인데, 비부착성 scaffold 및 matrix 표면 위에서도 포배 상태로 또 부유 상태와 같이 다양한 물리적 환경에서 3차원 배양하는 방법들이 개발되었다[8]. 스페로이드 세포는 proliferating, quiescent, apoptotic, hypoxic, necrotic 세포 등 다양한 세포들로 구성되어 있어, 생체 내 존재하는 세포의 비균질성을 효과적으로 대표할 수 있다[14]. 현재, 필요 성장인자 및 필수 영양분 등의 다양한 배양배지 조성에 따른 다양한 생체 유사 스페로이드 배양세포들이 보고되어 있다.

이 연구에서는 대장암 세포주의 3차원 스페로이드 배양법을 간단하고 경제적인 방법으로 최적화하기 위해, 물리적 배양환경과 배양배지 구성에 따른 스페로이드 형태형성 및 암 줄기세포군의 증가 양상을 비교하였다. 특히, 3차원 스페로이드 배양배지의 경제성을 고려하여 일반적인 소 배아 혈청(FBS) 기반 배지를 이용하여 약물스크리닝이 광범위하게 시도되고 있으나, 그 효율성 측면에서 좀더 정밀한 진단이 요구 된다[4, 22, 23] 본 연구는 최근의 FBS 기반 배지를 활용한 검증법과 줄기세포 배양배지를 비교하고 대장암 치료에 널리 쓰이는 5-Fluorouracil (5-FU)에 대한 화학적 감응성 변화를 비교 분석함으로써 암 줄기세포가 5-FU에 대한 화학적 감수성 저해의 원인이 되고 항암제 내성의 잠재적 위험성을 내포하고 있음을 검증하였다. 대장암은 유전적 요인 외에 점막 내의 식이, 염증 및 감염 환경성 질환의 측면이 타 종양보다 강하기 때문에 본 연구는 다양한 대장암 세포주 중 감염, 염증 및 식이 반응성이 가장 큰 HCT-8세포주를 기반으로 평가를 진행하였다[6, 9, 10]. 이를 기반으로 하여 대장암 스페로이드 세포 기반 항암제 약물반응을 검증하기 위한 효과적 시험법으로 쉽게 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

HCT-8 대장암 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양은 10% 소 배아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 5% 혼합항생제(50 units/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신)가 포함된 RPMI 1640(웰진, 한국) 배양액을 기본으로 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 항습 배양기에서 배양하였다. 경제적인 스페로이드 (spheroid) 배양법 최적화를 위해, 2% agarose를 RPMI 배지에 녹여 도포한 6-well 배양접시 및 비부착성 배양접시(ultralow attachment 6-well plate, Costar, #3471)를 사용하였다. 스페로이드 배양을 위해서, HCT-8 대장암 세포주(2.5×10<sup>5</sup>)를 분주하고 정상 배양배지 및 줄기세포 배양배지[B27 supplement

(Gibco, #4231); 20 ng/ml basic FGF (PEPROTECH, #100-18B); 20 ng/ml EGF (BD science); 5% 혼합항생제; DMEM/F12 (웰진, 한국) 환경 하에서 형성된 스페이로드 세포가 균일하게 분산되도록 유지하면서 6일간 배양하였다. 배양된 대장암 스페로이드 세포는 크기변화, 균일한 형태 형성 정도 및 암 줄기세포의 증가 유무로 검증하였다.

### Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR)

RiobEx (GeneAll, 서울, 한국)를 이용하여 정상 배양세포와 스페로이드 배양세포로부터 전체 RNA를 추출하고 reverse transcription을 통해 확보한 cDNA를 주형으로하여 대장암 줄기세포 표지인자 특이적 primer로 각 표지인자의 발현 정도를 비교 분석하였다. Primer정보 및 RT-PCR 조건은 다음과 같다. Nanog (62°C, 35 cycles): Forward, 5'-ATACCTCAGCC TCCAGCAGA-3'; Reverse, 5'-CATTAAAGGCCTTCCCCAG CA-3'; Sox2 (62°C, 35 cycles): Forward, 5'-AACCAGCGCAT GGACAGTTA; Reverse, 5'-GACTTGACCACCGAACCCAT-3'

### 세포 자가사멸 분석

HCT-8 세포(8×10<sup>5</sup>)를 60 mm 배양접시에 분주하여 이틀간 배양한 부착성 암세포와, 2.5×10<sup>5</sup> 세포를 비부착성 배양접시에 분주하여 스페로이드 배양한 스페로이드 세포에 각각 DMSO와 375 μM 5-FU (Fluoruracil)를 2일 동안 처리하고 배양배지와 세포를 모두 수거하여, 0.25% 트립신 처리 후 단일세포 단위로 준비하였다. Annexin 염색 용액(BD Pharmingen, 556454)으로 현탁시킨 세포에 5 μl Annexin V (BD Pharmingen) 및 100 μg/ml PI (ImmunoChemistry Technologies)로 표지한 후 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 분석하였다.

### 암 줄기세포 분석

스페로이드 세포에 존재하는 암 줄기세포 유무를 대장암 줄기세포 표지인자인 CD44 및 CD133 항체로 면역염색한 후 유세포 분석기를 통해 확인하였다. 배양한 스페로이드 세포를 트립신 처리하여 단일 세포단위로 분리한 후 10% FBS의 DMEM/F12 배지로 트립신 활성을 저해하고, PBS (인산염완충용액)로 씻어준다. FITC가 결합된 CD44 항체(BD Pharmingen) 및 APC가 결합된 CD133 항체(MACS, Miltenyi Biotec) 3 μl를 FACS염색 용액(eBioscience, 00-4222-57) 100 μl로 현탁시킨 세포에 각각 첨가한 후, 4°C에서 15분간 면역염색 시킨다. PBS로 희석한 후 유세포 분석기(Becton Dickinson FACS Canto II BD Bioscience, San Joes, CA, 미국)를 통해 분석하고 정량화하였다.

### 통계분석처리

통계적 유의성을 검증하기 위해 각 두 그룹 간 unpaired

t-test를 수행하였다.  $p < 0.05$ 수치를 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다. \*\*\*은  $p < 0.001$ 을 의미한다.

### 결과 및 고찰

#### 균일한 비부착성 환경과 한정 성분 배지 환경 하에서 향상된 스페로이드 형성

다양한 대장암 세포주 가운데 HCT-8 세포는 염증성 및 감염성 환경에 대하여 다른 대장암세포보다 민감성이 매우 강한 것으로 알려져 있다[6, 9, 10]. 이 세포를 기반으로 비균질적인 암의 특질을 *ex vivo*에서 구현하고 암 줄기세포의 효과를 확인하기 위해[4], 검증된 기존의 다양한 세포 활용 스페로이드 배양 방법으로부터 보다 경제적이면서 간소화된 최적의 스페로이드 배양방법을 확립하고자 부유형태의 스페로이드 배양법을 개선하는 데 중점을 두었다. 대장암 세포의 스페로이드 배양기법을 최적함으로써 대장암 줄기세포가 존재하는 고힘암

의 비균질적인 특질을 재현하고, 간소화된 암 줄기세포 기반 항암제 내성 모니터링 플랫폼을 확립하고자 하였다(Fig. 1). 우선 agarose로 도포된 배양접시에서 정상배지(complete RPMI, cRPMI, FBS 기반 배지) 및 B27 supplement와 성장인자(bFGF, EGF)가 포함된 줄기세포 배양 배지에서 배양한 스페로이드의 형태변화를 관찰하였다. 줄기세포 배양배지에서 형성된 스페로이드 세포는 cRPMI배지의 경우보다 상대적으로 큰 구형의 스페로이드가 형성되었다(Fig. 2A). 3차원 스페로이드 배양을 위한 경제적인 물리적 배양 환경을 조성하고자 agarose 도포 배양접시에서 배양된 스페로이드 및 상업화되어 있는 비부착성 배양접시에서 스페로이드 형성 형태분석을 하였다. Fig. 2B에서 보듯이, 비부착성 배양접시에서 배양된 스페로이드는 균일한 구형의 형태를 나타낸 반면 agarose 도포 배양접시의 경우, 균일한 크기가 아닌 응집된 스페로이드 클러스트들이 다수 관찰되었다. 이는 수작업으로 조성된 agarose 도포를 통해 세포의 부착 저해 환경 조성 시 표면의 불균일

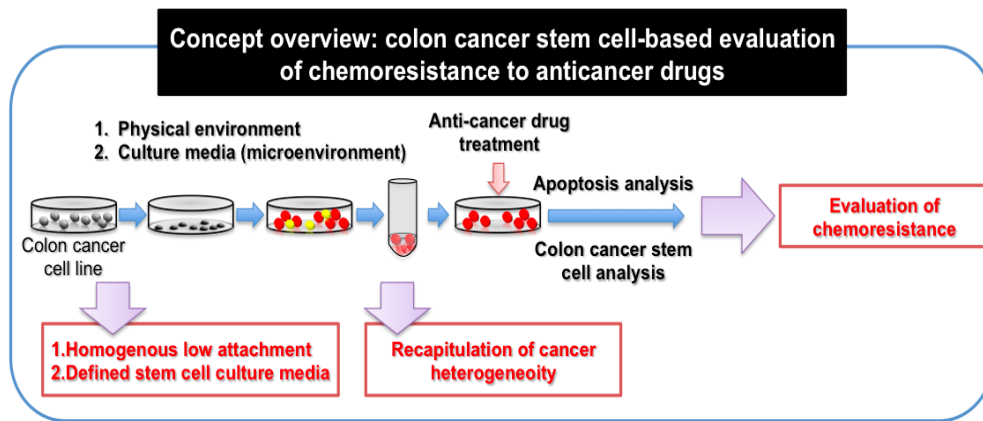


Fig. 1. Overview of research. Scheme and rationale of the present study was summarized.

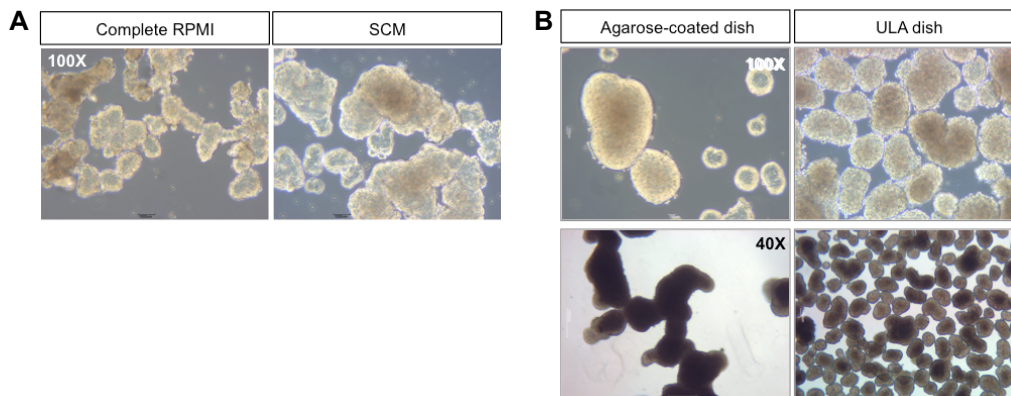


Fig. 2. Effect of physical environment and exogenous ingredients on colon spheroid formation (A) In order to compare spheroid formation state in different exogenous ingredients-containing medium based on the suspended culture method, HCT-8 were cultivated with complete RPMI (cRPMI) or stem cell culture medium (SCM) in the 2% agarose-coated culture dish for 6 days. (B) HCT-8 cells were cultured in the different physical environments, 2% agarose-coated plate and commercialized ultra-low attachment plate with cRPMI for 6 days and formed spheroid cells were compared with regard to sphere shape and their homogeneity.

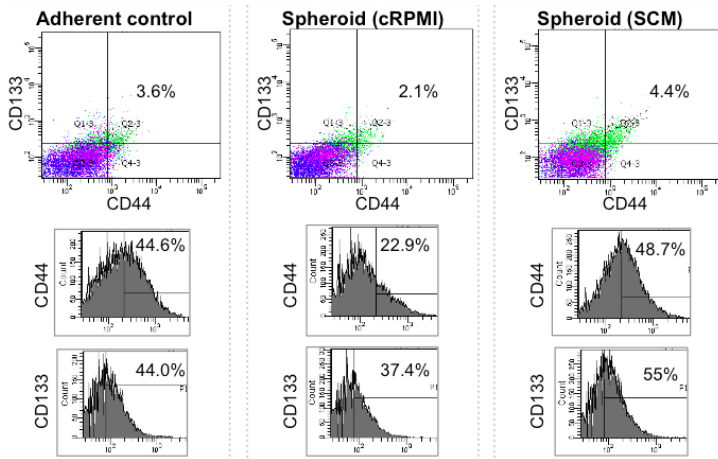


Fig. 3. Comparison of colon cancer stem cell population in spheroid cells formed by complete RPMI and stem cell culture media (SCM). In order to compare composition of colon cancer stem cell population in the spheroids cultured in cRPMI or SCM, six day-cultivated spheroids on the ULA plates were immunostained with CD44-FITC and CD133-APC and then CD44 and CD133-positive cells were evaluated by flow cytometry. These results were presented by histogram and dot plot as the percentile.

성, 가장자리와 중앙 간 표면고저의 차이 때문인 것으로 판단된다. 이 결과들은 다수의 균일한 대장암세포 스페로이드 배양을 위해서는 균질적인 물리적 배양환경 조성, 필수 성장인자로 구성된 줄기세포 배양배지가 보다 최적환경임을 시사한다.

**스페로이드 배양 세포의 암 줄기세포군 증가**

줄기세포 배양배지에 의해 배양된 세포들이 보다 균질된 구형의 스페로이드 형태를 갖추는 것과 실제 생체 내 암의 비균질적인 특질인 암 줄기세포군의 변화양상과 직접적인 관련성이 존재하는 지 검증하였다. CD44 및 CD133은 세포막 단백질로서 대장암 줄기세포를 포함한 다양한 암 줄기세포의 표지인자로 이용된다. cRPMI 정상배지 및 줄기세포 배양 배지에서 각각 조성된 스페로이드 세포에서 암 줄기세포군의 변화를 CD44 및 CD133 표지인자로 면역염색한 다음 유세포 분석을 통해 분석, 정량하였다. HCT-8 대장암 세포는 기본적으로 CD44 발현 세포들이 다소 존재한다(Fig. 3). 줄기세포 배양배지에서 배양한 스페로이드는 cRPMI 정상배지의 경우에 비해 CD44+, CD133+ 암 줄기세포군이 유의성 있게 증가해 있음을 확인할 수 있었다. 이는 3차원 배양을 위한 균질적인 물리적 환경(비부착성 배양접시) 및 한정된 성장인자 기반 외부 배양 환경(줄기세포 배양배지)이, 암 줄기세포군이 비균질적으로 존재하는 암의 특질을 효과적으로 대변할 수 있는 스페로이드 세포 배양을 위한 개선된 조건임을 시사한다(Fig. 3). cRPMI 정상배지에서는 스페로이드 형성을 하였음에도 불구하고 줄기세포군의 증가와는 상관성이 낮음을 보여준다. 또한, 정상 배양세포와 스페로이드 배양세포 간의 세포 특성을 재확인하기 위하여 semi-quantitative PCR 및 real-time PCR을 수행하였다. 정상 배양세포와 최적 배양조건에서 배양한 스페로이드 세포를 장 상피 줄기세포 인자인 Ring finger protein 43 (Rnf43) 및 stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1)과 대장암 줄기세포 표지인자인 SRY (sex determining region Y)-box 2 [Sox2]와 Nanog의 발현 변화를 확인하였다. 정상 배양세포에 비해 스페로이드 배양세포에서 대장암 줄기세포 표지

인자인 Nanog 및 Sox2의 발현이 유의성 있게 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A, Fig. 4B). 하지만, 장 상피 줄기세포 표지인자의 발현량은 정상 배양세포 및 스페로이드 배양세포 간 큰 차이가 없었다(Fig. 4A). 이러한 일련의 결과들은 최적화된 대장암 스페로이드 세포 배양을 통해, 암세포에 비균질적으로 존재하는 대장암 줄기세포의 발현을 효과적으로 구현할 수 있음을 보여준다.

**2차원 및 3차원 배양세포의 항암제에 대한 감수성과 암 줄기세포 변화**

HCT-8 대장암세포로부터 암 줄기세포를 확립하여 항암제에 대한 감수성과 암 줄기세포와의 상관관계를 확인하기 위해 HCT-8 세포로 배양된 부착세포 및 스페로이드 배양세포에 각각 대장암 치료제로 사용되는 항암제 5-Fluorouracil (5-FU)을 처리하였다. DMSO를 처리한 대조구와 비교해 볼 때 부착 부착암세포(Adherent)의 경우 Annexin V+, Propidium Iodide+ 자가사멸 세포군이 유의성 있게 증가하였다(2.23/24.73%=16.20배). 반면 스페로이드 세포의 경우, 대조구에 비해 5-FU에 대한 세포사멸 효과가 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다(11.08/7.68%=1.43배)(Fig. 5A). 이는 생체 내 환경과 유사한 3차원 스페로이드 세포에서 항암제에 대한 화학적 감수성이

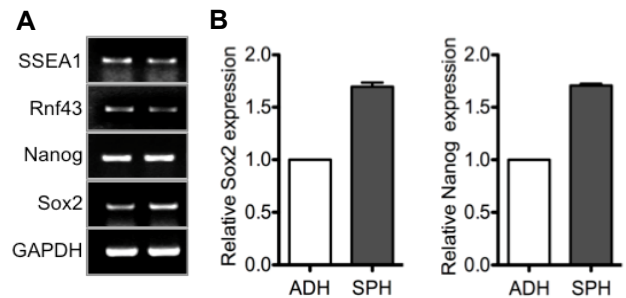


Fig. 4. Cellular mRNA levels were measured using semi-quantitative RT-PCR (A) and real-time PCR (B) with stem cell markers and colon cancer stem cell markers in HCT-8 adherent (ADH) and spheroid (SPH) cells.

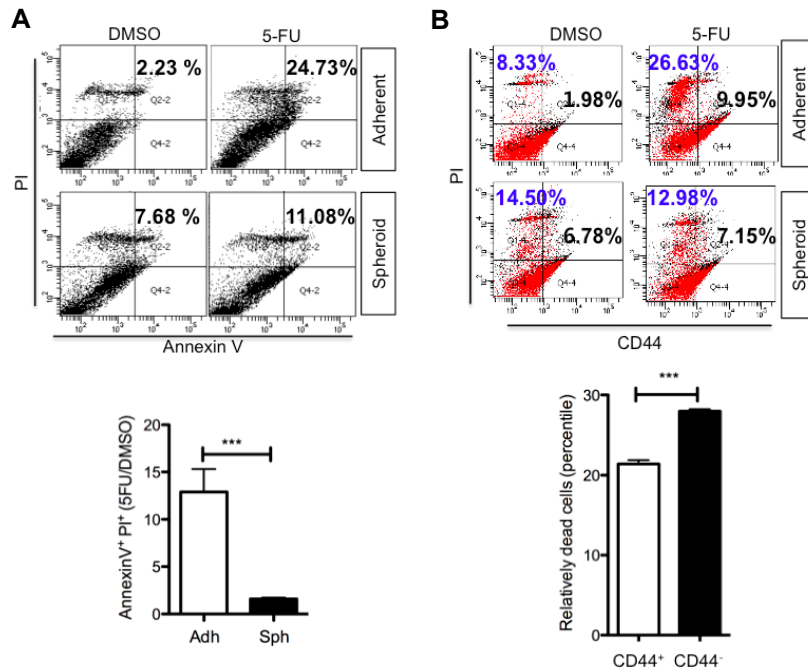


Fig. 5. Evaluation of chemosensitivity and its relevance with cancer stemness of the spheroid-forming and adherent cancer cells in response to 5-Fluorouracil (5-FU). (A) Adherent and spheroid HCT-8 cells were treated with 375  $\mu$ M 5-FU for 48 h and apoptosis was assessed by flow cytometry with Annexin V and propidium iodide (PI). Percentile statistically represented average values from six-independent experiments. Relative changes in apoptosis of 5-FU-treated group to DMSO treatment group were presented in the form of ratio from six-independent experiments (lower). (B) Normal adherent and spheroid cells were treated with 375  $\mu$ M 5-FU for 48 hr and relevance of cancer stem cell population with chemo-sensitive cells were analyzed by flow cytometry with CD44-FITC and PI. Both of dead colon cancer stem cells (CD44<sup>+</sup> and PI<sup>+</sup>) and dead cells except colon cancer stem cell population (CD44<sup>-</sup> and PI<sup>+</sup>) were statistically analyzed in the form of average percentile (upper). PI<sup>+</sup> late apoptotic cells of either CD44<sup>+</sup> or CD44<sup>-</sup> in the both normal adherent and spheroid cells were calculated by following equations: [(5-FU/DMSO) of spheroid / (5-FU/DMSO) of adherent] X100(%).

저해되었음을 시사한다. 배양된 스페로이드 세포가 항암제 내성을 획득한 원인이 암 줄기세포군의 변화와 관련 있는 지 확인하기 위하여, 대장암 세포의 대표적인 암 줄기세포 표지인자인 CD44-FITC 항체와 Propidium Iodide로 염색하여 사멸세포군의 구성변화를 확인하였다. 5-FU를 처리한 부착 암세포에서, 사멸된 세포 중 CD44<sup>+</sup> 암 줄기세포군은 유의성 있는 증가를 보였다(9.95/1.98%=5.04배). 반면, 스페로이드 배양세포의 경우, 사멸된 암 줄기세포군의 증가가 둔감하였다(7.15/6.78%=0.68배)(Fig. 5B). 또한, CD44<sup>+</sup> 세포의 항암제에 대한 사멸효과는 부착성 정상 암세포(26.63/8.33%=3.20배)에 비해 스페로이드 배양세포(12.98/14.50%=0.54배)에서도 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 5B). 이를 바탕으로 CD44<sup>+</sup> 및 CD44<sup>-</sup> 세포군의 5-FU에 대한 화학적 감수성 변화를 분석한 결과, 부착 암세포 대비 스페로이드 배양세포의 CD44<sup>+</sup> 세포군의 사멸 빈도는 21.14%로, CD44<sup>-</sup>(암 줄기세포를 제외한 세포) 세포군 상대적 사멸빈도인 27.97% 보다 통계적으로 유의성 있게 낮았다(Fig. 5B, 하단). 이는 CD44<sup>+</sup>로 대변되는 암 줄기세포군의 화학적 감수성이 부착 암세포에 비해 낮음을 의미하고, 항암제 내성의 잠재적 위험성을 더 높게 내재하고 있음을 알 수 있다.

또한 스페로이드 배양세포를 활용한 항암제의 화학적 감수성 검증 시험법으로 유효함을 시사하는 것이기도 하다. 비균질적인 고형암에 대한 생물학적 이해를 위해, 개선된 배양조건으로 조성된 3차원 스페로이드 배양세포가 보다 정확한 생물학적 정보를 줄 수 있을 것으로 기대할 수 있는 부분이다. 2차원 배양세포 기반 약물 개발은 생체 내 환경을 고려한 암 모델링에 한계가 있고 암 줄기세포를 포함한 암의 비균질적 특성을 표현하지 못한다. 인체 생리활성에 근접한 적합한 암 연구 모델의 부재는 암의 재발과 전이, 항암제 내성에 대한 암 치료의 한계를 극복하기 위한 연구에 어려움을 주고 있다. 이를 개선하기 위해 다양한 방법으로 3차원 배양 플랫폼 기반 약물 시험법 및 암 모델링 방법들이 연구되고 있다. 본 연구에서는 경제적이고 최적화된 대장암 스페로이드 세포 배양방법에 기초하여 대장암 줄기세포가 항암제에 대한 감수성 변화의 주요 원인이 됨을 검증하였다. 스페로이드 배양세포의 특성변화를 살펴보면, 배아줄기세포 및 장 상피 줄기세포 표지인자로 활용되는 SSEA-1의 발현과 장 상피 줄기세포 표지인자인 Rnf43의 발현에는 큰 변화가 없었다. 하지만, 정상 배양세포에 비해 스페로이드 배양세포에서 CD44<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> 대장암 줄기세



포가 증가했다(Fig. 3). 보고되어 있는 다양한 대장암 특이 줄기세포 인자들의 발현 변화 검증이 추가적으로 뒷받침 되어야 할 여지는 있지만, Sox2 및 Nanog와 같이 종양 개시 능력이 존재하는 암 줄기세포 표지인자가 특이적으로 증가한 것은 본 연구에서 최적화된 스페로이드 배양기법이 대장암 줄기세포가 존재하는 대장암의 비균질성을 재현할 수 있음을 시사하는 것으로 판단된다(Fig. 4A, Fig. 4B). 상피 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 표지인자들은 암 줄기세포에서도 발현되는 특성을 보인다. 하지만, 종양 개시 능력을 가지고 있어서 암 줄기세포를 대변할 수 있는 특이적 표지인자를 통해 줄기세포와 암 줄기세포의 성질을 검증하여 구분짓고 있다[13, 15, 21].

본 연구에서는 5-FU에 대한 암 세포의 항암제 내성 효과가 대장암 줄기세포에 기인한 것임을 확인하고 이 검증실험을 통해, 암 줄기세포를 매개로 한 고형암의 항암제 감수성 및 항암 내성을 연구하는 방법론으로 유용하게 활용될 수 있음을 제시하였다. 간단한 방법으로 최적화된 대장암 스페로이드 배양법과 이를 기반으로 한 항암제 내성 검증 시험 플랫폼으로 쉽게 활용될 수 있다는 점에서 그 의미가 있다고 하겠다.

### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

### References

- Abdullah, L. N. and Chow, E. K. 2013. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin. Transl. Med.* **2**, 3.
- Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W. R. and Polyak, K. 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* **6**, 17-32.
- Birgersdotter, A., Sandberg, R. and Ernberg, I. 2005. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 405-412.
- Breslin, S. and O'Driscoll, L. 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today* **18**, 240-249.
- Cho, R. W. and Clarke, M. F. 2008. Recent advances in cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 48-53.
- Choi, H. J., Kim, J., Do, K. H., Park, S. H. and Moon, Y. 2013. Prolonged NF-kappaB activation by a macrophage inhibitory cytokine 1-linked signal in enteropathogenic Escherichia coli-infected epithelial cells. *Infect. Immun.* **81**, 1860-1869.
- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y. and Chen, Q. 2008. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6751-6760.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. and Yang, L. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 207-218.
- Fluckiger, A., Dumont, A., Derangere, V., Rebe, C., de Rosny, C., Causse, S., Thomas, C., Apetoh, L., Hichami, A., Ghiringhelli, F. and Rialland, M. 2016. Inhibition of colon cancer growth by docosahexaenoic acid involves autocrine production of TNFalpha. *Oncogene* **35**, 4611-4622.
- Howard, A., Tahir, I., Javed, S., Waring, S. M., Ford, D. and Hirst, B. H. 2010. Glycine transporter GLYT1 is essential for glycine-mediated protection of human intestinal epithelial cells against oxidative damage. *J. Physiol.* **588**, 995-1009.
- Huang, E. H., Hynes, M. J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J. Z., Wicha, M. S. and Boman, B. M. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* **69**, 3382-3389.
- Jin, K., Gao, W., Lu, Y., Lan, H., Teng, L. and Cao, F. 2012. Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review). *Oncol. Lett.* **3**, 11-15.
- Keysar, S. B. and Jimeno, A. 2010. More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2450-2457.
- Kim, J. B. 2005. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 365-377.
- Kozovska, Z., Gabrisova, V. and Kucerova, L. 2014. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed. Pharmacother.* **68**, 911-916.
- Manfredi, S., Lepage, C., Hatem, C., Coatmeur, O., Faivre, J. and Bouvier, A. M. 2006. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann. Surg.* **244**, 254-259.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S. and Dick, J. E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445**, 106-110.
- Ong, C. W., Kim, L. G., Kong, H. H., Low, L. Y., Iacopetta, B., Soong, R. and Salto-Tellez, M. 2010. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* **23**, 450-457.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. and De Maria, R. 2007. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115.
- Shackleton, M. 2010. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 85-92.
- Weiswald, L. B., Bellet, D. and Dangles-Marie, V. 2015. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* **17**, 1-15.
- Yang, Z., Wang, Z., Fan, Y. and Zheng, Q. 2012. Expression of CD133 in SW620 colorectal cancer cells is modulated by the microenvironment. *Oncol. Lett.* **4**, 75-79.

## 초록 : 적정 구성 배양 HCT-8 기반 대장암 스페로이드의 암 줄기세포능 및 항암제 내성 평가의 비교 평가 연구

이승준<sup>1</sup> · 김형갑<sup>2</sup> · 이항범<sup>3</sup> · 문유석<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 의학전문대학원 의과학과, <sup>2</sup>경남과학기술대학교 환경공학과, <sup>3</sup>전남대학교 농식품생명화학부, <sup>4</sup>부산대학교 기초과학연구소 및 의학연구소)

암은 비균질적으로 구성된 세포집합체로 간질세포 및 세포 외 기질로 구성된 미세환경과 상호작용에 의해 발병, 전이, 심화되는 복잡한 질병이다. 하지만, 기존의 2차원 배양 세포 기반 플랫폼이 3차원적 생체 환경과 암의 비균질성을 대표하기 힘든 한계를 극복하기 위해 스페로이드 배양 세포를 비롯한 다양한 플랫폼 개발이 활발해지고 있다. 본 연구에서는 특히 감염, 염증 및 식이적 환경성 영향력에 민감한 HCT-8 대장암 세포주를 기반으로 하여 3차원 스페로이드 배양법을 보다 효과적인 방법으로 개선하고, 대장암 스페로이드 세포를 기반으로 암의 비균질적인 특질과 항암내성 연구의 간단하고 개선된 플랫폼을 제시하고자 하였다. 3차원 배양법 최적화를 위해 물리적 배양환경 조성과 배양배지 구성에 따른 스페로이드 형태형성을 비교 분석하고 암 줄기세포군의 증가 양상을 확인한 결과, 필수요소로 구성된 제한 배지와 균일한 형태의 비부착성 표면 배양접시에서 배양된 스페로이드가 균일한 형태의 구형을 형성하고 암 줄기세포군이 증가함을 확인하였다. 대장암 스페로이드 세포를 기반으로 대장암 치료제인 5-Fluorouracil (5-FU)에 대한 화학적 감응성 변화를 측정된 결과, 암 줄기세포가 5-FU에 대한 화학적 감수성 저해의 원인이 되며, 최적배양 조건에서 암 줄기세포의 약제 내성의 표현이 증대되었다. 이는 암 줄기세포의 항암제 내성에 대한 잠재적 위험성을 내포하는 것으로, 이 방법론은 감염, 염증 및 식이적 요인과 연관된 대장암 스페로이드 세포 기반 항암제 약물반응을 검증하기 위해 효과적이면서 간소한 시험법으로 활용될 수 있을 것이다.