

유방암 조직 배양세포에서의 항암제 감수성 검사

단국대학교 의과대학 외과학교실

박 윤 준 · 류 진 우

Chemosensitivity Test in Human Breast Cancer

Yoon Joon Park, M.D. and Jin Woo Ryu, M.D.

Department of General Surgery, College of Medicine, Dankook University, Chungnam, Korea

Purpose: Breast cancer ranks as the second most frequent cancer in women in Korea, and the rate is gradually increasing. Compared to European countries and USA., the Korean breast cancer occurs at a younger age (mean age: 47) than in western countries (mean age: 60). We suppose that there is some biological differences between Korean and western breast cancer. This study was designed to determine the target chemotherapy agents for use on individual patients and define target patients for chemotherapy during the post-op period. Additionally, we desired to acquire primary data for further proteomic analysis of patients.

Methods: Twenty-one patients with breast cancer were entered in this study. Tumor specimens were taken and informed consent was obtained for use of the samples in drug sensitivity testing. MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] assay was able to be preformed in 16 patients (success rate, 76.2 percent). We used four drugs including Adriamycin, Epirubicin, 5-FU, and Taxol.

Results: In the axillary lymph node negative group, 5-FU (56.62%) and Taxol (53.85%) were sensitive drugs. There were no sensitive drugs in the p53 over-expression group. In the wild p53 group, 5-FU was the only sensitive drug. 5-FU was sensitive in both the ER and PR positive groups. Taxol was sensitive in the c-erbB2 low expression group.

Conclusion: We obtained the results for chemosensitivity of breast cancer of Korean women. 5-FU and Taxol were relatively sensitive drugs, however we believe further data should be collected and added to obtain complete chemosensitivity results. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:27-30)

Key Words: Breast cancer, Chemosensitivity

중심 단어: 유방암, 항암제 감수성 검사

서 론

유방암은 현재 우리 나라에서 여성암 중 2위를 차지하며 유방암학회의 보고에 의하면 매년 증가하는 추세이다. 특히 우리 나라 여성의 유방암은 30대의 젊은 여성에서부터 발생이 급격히 증가하며 평균 암 발생 연령이 40대로 서구 사회의 60대와는 현격한 차이가 있다.(1) 이러한 젊은 연령층에서의 발병은 심각한 사회 경제적 및 가정의 손실을 초래하게 된다. 유방암의 치료로는 수술 및 방사선요법 등 국소적 치료 외에 전신 항암 치료요법이 매우 중요하다. 전신 항암 치료는 현재까지 많은 약제와 치료 방법의 개발로 향상된 치료 성적을 보고하고 있으나, 유방암 환자의 약 70%에서 부분적 치료 효과를 포함한 결과를 보이며, 약 30%의 환자에서는 효과를 보지 못하고 있다. 더욱이 항암제는 독성과 부작용이 매우 심한 경우가 대부분이며 치료 용량에 따라 생명을 위협하기도 한다. 이런 이유로 약제 투여의 결정을 위한 예후인자 등에 대한 많은 연구가 수행되어 왔으나 현재까지 만족할 만한 결과는 거의 없었다. 항암제의 효과적 투여를 위한 연구로 개개인의 개체적인 암의 생물학적 특성과 항암제의 감수성에 대한 연구는 여러 종류의 암에서 시행되어 왔으며,(2,3) 우리 나라에서도 위암, 대장암 등의 몇몇 연구가 있었다.(4-6) 본 연구는 우리 나라 여성의 유방암에서는 어떠한 항암제에 반응을 보이는가를 알고자 많이 사용하는 항암제 네 가지를 사용하여 유방암 조직에서 배양한 세포를 대상으로 항암제 감수성 검사를 하였으며, 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

책임저자 : 류진우, 충남 천안시 안서동 산 16

☎ 330-714, 단국대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 041-550-3933, Fax: 041-550-3905

E-mail: gsryu@anseo.dankook.ac.kr

접수일 : 2001년 11월 13일, 게재승인일 : 2001년 11월 27일
본 논문은 2001년도 단국대학교 교수연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

본 논문은 2001년 추계 외과학술대회에서 구연되었음.

방 법

1) 실험재료

단국대학교 부속병원 일반외과에서 유방암 수술(변형근치 유방절제술 및 유방보존수술)을 받은 환자 중에서 감수성 검사에 동의한 환자 21명의 조직에서 유방암 세포를 배양하였으며 세포 배양에 성공한 16예를 대상으로 하였다.

2) 항암제

항암제로는 5-FU, Taxol, Adrimycin, Epirubicin을 사용하고 각 항암제는 완전배지에 혈장농도의 10배가 되도록 하였다. 각 항암제의 농도는 5-FU 100 μ g/ml, Taxol 0.0365 μ g/ml, Adrimycin 4 μ g/ml, Epirubicin 18.6 μ g/ml로 하였다. 완전배지는 RPMI 1640 조직 배양액에(Gibco, Grand Island, NY, USA) 10% 우 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% penicillin-streptomycin solution을 혼합하여 사용하였다.

3) 실험 방법

(1) 암세포의 분리: 수술 후 얻은 신선한 조직을 수술용 가위를 이용하여 2 mm³ 정도로 자르고 collagenase (2 mg/ml, Sigma), hyaluronidase (10 U/ml, Sigma)을 조직이 담길 만큼 넣고 37°C shaking water bath에서 1시간 동안 효소반응시켰다. 효소 분해 후 1,500 rpm에서 2회 원심분리하여 남아 있는 효소를 완전히 제거한 후, 효소 처리된 조직을 200 mesh (74 μ m) 체를 통과시켜 단일 세포가 되도록 하였다. 적혈구 및 죽은 세포를 제거하기 위하여 위에서 얻은 세포현탁액을 100% Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 10 ml, 75% Ficoll-Hypaque 15 ml에 넣고 1,500 rpm에서 30분간 원심분리하여, 75% Ficoll층에 모인 암세포를 취하였다.

분리된 암세포에 포함되어있는 fibroblast, endothelium, normal cell의 성장을 억제하면서 암세포를 배양하기 위하여 48시간 동안 배양액 RPMI 1640에 2.5% FBS, insulin (100 mg/L), sodium selenite (67 μ g/L), sodium transferrin (55 mg/L)을 넣고 배양하였다. 선택적으로 배양된 암세포를 취하여 완전배지로 세포수를 1 \times 10⁶/ml가 되도록 희석하고 trypan blue dye로 세포생존율을 확인하였다.

(2) MTS assay: 완전배지에 희석된 세포 현탁액을 96 well plate에 100 μ l (1 \times 10⁵/ml)씩 넣고 혈장의 10배 농도로 희석된 항암제를 25 μ l씩 넣고 96시간 동안 가습된 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 항암제를 포함하지 않고 암세포만이 배양된 well을 대조군으로 하고, 100 μ l의 PMS (phenazine methosulfate)에 2 ml의 MTS용액을 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 혼합하고 각 well의 490/650 nm에

서 반응 생성물인 formazan의 흡광도를 측정하는 것으로 하여 암세포에 대한 항암제의 sensitivity를 저해율(%)로 표현하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left(1 - \frac{\text{mean OD in drug treated wells}}{\text{mean OD in control wells}}\right) \times 100$$

저해율이 50% 이상을 약제 양성반응으로 판정하였다.

결 과

1) 약제의 평균 억제율(max \times 10)

5-FU 47.99%, Taxol 51.68%, Adrimycin 20.85%, Epirubicin 21.47%로 Taxol에서 50% 이상의 억제율을 보였다.

2) 임상적, 병리적 예후인자와의 관계

종양의 크기에 따른 약제의 감수성 결과, T1군에서 5-FU에 한하여 항암제로 인한 종양억제 효과가 있었으며 (70.00%) 액와 림프절 전이와의 관계에서 림프절 전이 음성인 군에서 5-FU (56.62%)와 Taxol (53.85%)에 대하여 종양억제 효과를 보였다(Table 1).

3) p53, c-erbB2, Estrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR) 발현과 항암제 감수성의 관계

p53과 발현군의 경우 모든 약제에서 항암제로 인한 암세포의 억제가 이루어지지 않았으며, p53 정상군의 경우 5-FU에 대하여(51.20%) 종양억제 효과를 보였다. c-erbB2 경우 저발현군에서 Taxol에(51.94%) 억제 효과를 볼 수 있었다. ER의 경우 ER 양성군에서 5-FU에 억제효과가 있었으며(63.05%), PR의 경우도 PR 양성군에서 5-FU에 억제효과가 있었다(56.36%)(Table 2).

4) 병리 조직학적 분화도와 항암제 감수성의 관계

병리 조직학적 등급이 I, II인 경우 5-FU (60.29%, 59.6%)

Table 1. Pathological parameters and Inhibition rates using MTS assay

Tumor size	5-FU	Taxol	Adrimycin	Epirubicin
T1*	70.00	44.33	37.48	32.95
T2*	41.17	40.76	18.35	11.49
T3*	42.61	10.44	10.44	2.6
Lymph node				
Negative	56.62	53.85	26.07	35.71
Positive	39.27	49.50	15.62	4.85

*Tumor size \leq 2 cm; * Tumor size $>2 \sim 5$ cm; * Tumor size >5 cm.

Table 2. Prognostic factors and Inhibition rates using MTS assay

	5-FU	Taxol	Adrimycin	Epirubicin
Estrogen receptor				
Negative	43.41	47.42	21.58	13.78
Positive	63.05	32.16	32.16	35.75
Progesterone receptor				
Negative	42.14	46.97	8.31	3.05
Positive	56.36	47.54	34.33	22.31
p53				
Low expression	51.20	48.78	23.56	21.15
Over-expression	35.31	43.28	14.83	3.07
c-erbB2				
Low expression	38.89	45.21	13.68	0.08
Over-expression	48.72	51.94	22.93	25.49

Table 3. Histologic grades and Inhibition rates using MTS assay

	5-FU	Taxol	Adiamycin	Epirubicin
Grade I	60.29	17.65	41.18	26.47
Grade II	59.6	53.36	36.54	23.4
Grade III	32.59	37.16	25.04	6.15

및 Taxol (53.36%)에서 암세포의 억제에 있었으며, 분화가 III등급인 경우 항암제에 반응이 없었다(Table 3).

고 찰

유방암의 치료에 있어 전신 항암 요법의 필요성은 절대적이다. 그동안 항암제의 발달과 투여요법 등의 변화 등으로 유방암의 생존율 증가 및 치료 결과의 향상을 가져왔다.(7) 그러나 현재까지도 이러한 치료법의 발전에도 불구하고 진행성 유방암 환자의 경우 약 20~30% 환자에서 항암제의 치료 효과를 보지 못하며, 심한 독성 부작용을 겪을 뿐이다. 항암제의 독성 부작용은 개인 및 민족적 특성에 따라 편차가 있으며, 사용하고 있는 치료 용량에 따라 생명의 위협까지 그 독성이 매우 중대하다. 이런 이유로 환자 예후결정인자에 대한 많은 연구가 수행되었으며,(8,9) 이러한 연구를 바탕으로 항암제의 선택적 투여를 결정하려 하였으나 현재까지 만족할 만한 결과는 없었다.

개개인의 개체적인 암의 생물학적 특성과 항암제 감수성을 관련짓는 연구로 우리 나라에서는 세포주를 이용한 위암, 폐암 및 대장암에서(4,5,10) 항암제의 감수성 검사가 연구되었으며, 양과 김(11)은 약제감수성 검사 방법에 대한 연구를 발표하였다. 약제 감수성에 대한 검사로 Yamaue

등(12)은 암 조직에서 암세포의 선택적 분리와 MTT 분석 방법을 사용하여 보고하였으며, Kochli 등(3)은 부인과 종양과 유방암에서 약제감수성 검사에 사용되는 여러 방법에 대한 검토를 발표하였다. 우 등(13)은 소 세포 폐암 세포주에서 본 연구와 같은 MTS 방법을 이용하여 아포토시스 관련 유전자인 p53, bcl-2 단백질 발현과 약제감수성 검사 결과를 비교 연구하여, p53 발현과는 관계없으나 bcl-2 단백질 발현은 항암제 내성과 관련됨을 보고하였다. 본 연구에서는 유방암 조직에서 배양한 세포를 대상으로 하여 항암제의 감수성을 보았다. p53 유전자 변이형인 단백질 과발현 군에서는 사용한 네 종류의 항암제에 모든 내성을 보였으며, p53 정상유전자 발현 군에서는 5-FU에 대하여 종양억제 효과를 보였다(51.20%). 이는 정상 p53 유전자의 경우 항암제에 의한 암세포의 아포토시스 경로의 활성화로 암세포가 사멸 억제됨을 예측할 수 있다. 종양 유전자인 c-erbB2와의 관계에서, 본 연구의 경우 c-erbB2 저발현군에서 Taxol에 대하여 종양억제 효과(51.94%)를 보였으며, 이런 결과는 암세포의 진행 및 전이에 관련 있다고 알려진 c-erbB2 유전자의 경우 과발현군에서 좋지 않은 예후를 예측할 수 있으며 치료방법의 변화가 필요함을 시사한다. 유방암의 예후인자인 림프절 전이와 항암제 감수성과의 관계에서는, 좋은 예후인자인 림프절 전이 음성인 군에서 5-FU (56.62%)와 Taxol (53.85%)에서 종양억제 효과를 보였다. 본 연구에서는 5-FU와 Taxol이 Anthracycline 계열의 항암제보다 의미 있는 종양억제 효과를 보였다. Pegram 등(14)은 항암제 치료에 내성을 보였던 진행성 유방암 환자에서 anti-p185 HER2 단일 클론항체와 Cisplatin을 병용 투여하여 항암제 감수성을 높였다고 보고하였다. 본 연구에서 유방암 예후인자인 ER/PR의 발현과의 관계에서는, ER 양성과 PR 양성에서 5-FU(ER/PR: 63.06/56.36)에서 종양억제 효과를 보여, ER, PR 양성인 환자에서 5-FU를 이용한 항암치료를 좋은 예후를 예상할 수 있었다.

결 론

유방암에서 항암제 감수성 검사는 실제 환자 치료의 결정에 중대한 역할을 한다. 그러나 유방암 환자 치료의 경우 일차적 항암제 치료 방법을 통한 항암제의 감수성 결과를 예측할 수 있으며, 이러한 이유로 개별적 항암제에 대한 in vitro chemosensitivity가 많이 연구되지 않았다. 그러나 향후 발전되는 Proteomics 등의 기초적 연관자료로서 개별적 항암제의 in vitro chemosensitivity 등이 중요한 자료가 될 것이다. 본 연구는 이에 대한 실험적 연구로 제한된 종류의 약제 및 증례를 이용하였으며, 향후 연구의 폭과 깊이를 넓혀 의미 있는 연구 결과가 있어, 우리 나라 여성의 유방암에 대한 기본적 자료가 마련되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- 1) The Korean Breast Cancer Society. Clinical characteristics of Korean breast cancer patients in 1998. *J Korean Med Sci* 2000; 15:569-79.
- 2) Yamaue H, Tanimura H, Nakamori M, Noguchi K, Iwahashi M, Tani M, et al. Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Dis Colon Rectum* 1996;39:416-22.
- 3) Kochli OR, Sevin BU, Averette HE, Haller U. Overview of currently used chemosensitivity test systems in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib Gynecol Obstet* 1994; 19:12-23
- 4) Yook JH, Ahn BY, Koo GH, Seo H, Jeong CS, Oh ST, et al. In vitro chemosensitivity test for the evaluation of efficiency of hyperthermia in gastrointestinal cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 1999;31:931-8.
- 5) Kang YS, Noh DY, Park JG, Choe KJ. Synergistic effect of Cisplatin and 5-Fluorouracil against gastric and colon cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 1990;22:490-504.
- 6) Chung KS, Hong CG, Moon SH, Lee JJ, Choi CS, Lee KS. Chemosensitivity test using the MTT assay in human gastric adenocarcinoma. *J Korean Surg Soc* 1995;49:479-83.
- 7) Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. Commentary, meeting highlights: International Consensus Panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1601-8.
- 8) Bast RC, Desch CE, Ravdin PM, Smith TJ. Clinical practice guidelines of the use of tumor markers in breast cancer and colorectal cancer: Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1996;14:2843-77.
- 9) Elledge RM. Assessing p53 status in breast cancer prognosis: where should you put the thermometer if you think p53 is sick? *J Natl Cancer Inst* 1996;88:141-3.
- 10) Kim JH, Kim BS, Choi JJ, Kim KM, Yoo NC, Choi JH, et al. Effects of verapamil, and Cyclosporin A for the modulation of multidrug resistance in human lung cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 1993;25:225-35.
- 11) Yang DH, Kim JP. An experimental study of in vitro chemosensitivity tests using human cancer cell lines. *J Korean Cancer Assoc* 1989;21:376-405.
- 12) Yamaue H, Tanimura H, Tsunoda T, Tani M, Iwahashi M, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric Assay. *Eur J Cancer* 1991;27:1258-63.
- 13) Woo IS, Park MJ, Park YS, Jang SW, Yeo MA, Park SH, et al. Expression of p53, bcl-2 protein in small cell lung cancer (SCLC) cell lines in relation to sensitivity to chemotherapy. *J Korean Cancer Assoc* 2000;32:904-10.
- 14) Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p 185 HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16:2659-71.