

Methylthiazol Tetrazolium Assay를 이용한 소아백혈병환자 단핵세포의 항암제 감수성 검사

계명대학교 의과대학 소아과학교실

박선미 · 최병규 · 홍승아 · 강진무 · 김흥식

Chemosensitivity Test Using Methylthiazol Tetrazolium Assay in Mononuclear Cells of Pediatric Leukemic Patients

Sun Mi Park, B.A., Byung Kyu Choe, M.D., Seung Ah Hong, M.D.,
Chin Moo Kang, M.D., Heung Sik Kim, M.D.

*Department of Pediatrics,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea*

Abstract : Leukemia can be treated with various methods using diverse agents according to the prognostic factors. Chemosensitivity test was assessed with methylthiazol tetrazolium (MTT) assay. Mononuclear cells were harvested from the bone marrow of the leukemic patients and control group, then separated and incubated with 6 drugs for 96 hours. Then cells were incubated with MTT for 6 hours. Optical densities were calculated and LD50 (drug concentration lethal to 50% of the cells) were compared. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells were more sensitive to cytarabine, etoposide and arsenic trioxide than acute myelocytic leukemia (AML) cells. In the age group of 2—10 year, ALL cells were more sensitive to etoposide and arsenic trioxide than AML cells and control group. In the age over 10 year group, ALL cells were not sensitive to any agents. AML cells showed sensitivity to etoposide in the age over 10 year group. ALL cells from female patients were more sensitive than cells from male patients. Cells were more sensitive to adriamycine, cytarabine, mistletoe extract and arsenic trioxide in the group whose initial WBC counts were less than 50,000/mm³ compared to the group whose initial WBC counts were over 50,000/mm³. Using MTT assay, author could compare and confirm the effect of conventional and alternative chemotherapeutic agents in pediatric leukemic cells.

Key Words : Chemosensitivity, Children, Leukemia, MTT

서 론

백혈병은 소아에서 발생하는 악성종양의 33%를 차지하는 가장 많은 질병이다. 1960년대까지는 불치병으로 생각되어 왔으나, 1970년대 이후 면역학적 표현형과 세포유전학적 분석의 발달로 효과적인 항암제를 임상에 적절히 선택할 수 있게 되었을 뿐 아니라 현대적인 보조요법의 발달, 여러 가지 약제를 사용하는 병합요법의 확립, 중추신경계의 예방 및 치료, 조혈모세포이식술의 응용 등으로 인해 치료성적이 크게 향상되어, 소아 급성 림프구성 백혈병의 장기 생존율은 80%에 육박하고 있으며, 급성 골수구성 백혈병의 장기 생존율도 60%까지 증가하였다 [1-4]. 그러나 여전히 20-40%에서는 처음부터 약제에 반응하지 않거나 재발로 인하여 치료에 어려움이 있으며, 이러한 경우의 치료에는 보다 더 적극적인 항암제 선택을 위한 연구가 필요하다. 항암제를 선택하는데 있어 주로 경험적으로 결정하여 왔으나 근래에는 환자의 암세포를 얻어 실험실에서 항암제에 대한 감수성 검사를 하여 이를 응용하고 있다.

항암제 감수성 검사법 중 tetrazolium 염색을 이용한 MTT assay법은 세포증식과 세포독성을 검사하는데 유용하다고 알려져 있다 [5]. Tetrazolium 염인 MTT는 생존하고 있는 세포에 의해서만 분해되

므로, 이 반응은 약제의 선별검사에 사용되고 있다. 즉 수용성 염인 MTT를 불용성 침전물인 보랏빛의 formazan으로 환원시키는데 (Fig. 1), 미토콘드리아 효소인 succinate dehydrogenase를 필요로 한다 [6]. MTT assay를 이용한 백혈병 세포의 항암제 감수성 검사는 1980년 후반 백혈병 환자에 적용하여 항암제 치료 후 반응과 검사결과가 일치한다는 보고 [7,8]가 있는 이래, 재발된 백혈병 환자의 약제 선택에도 사용되기 시작하였다 [9,10]. 1994년 Kaspers 등 [11]은 처음 진단된 153명의 급성 림프구성 백혈병과 급성 골수구성 백혈병환자에 MTT test를 시행하여 표준 병합요법 치료 후 내성 발현 여부를 미리 예측하여, 보다 효율적인 약제 선택과 예후 위험인자의 선별도 가능하다고 보고하였다. MTT assay는 재현성이 뛰어나고 결과를 신속하게 얻을 수 있을 뿐 아니라 분석과정이 반자동화 되어 있어 간편하게 사용할 수 있다. 그리고 한 환자의 세포에서 한번에 10-20개의 약제를 검사할 수 있다는 장점들 때문에 종양세포의 항암제에 대한 감수성 평가법으로 유용하게 사용되고 있다 [4].

이 연구에서 사용한 Abnoba는 다양한 숙주나무에 반기생하는 식물인 미슬토의 추출물인데, 미슬토는 겨우살이 또는 한방에서 상기생이라 알려져 있다. 예전부터 미슬토 추출물은 인체 면역체계에 변화를

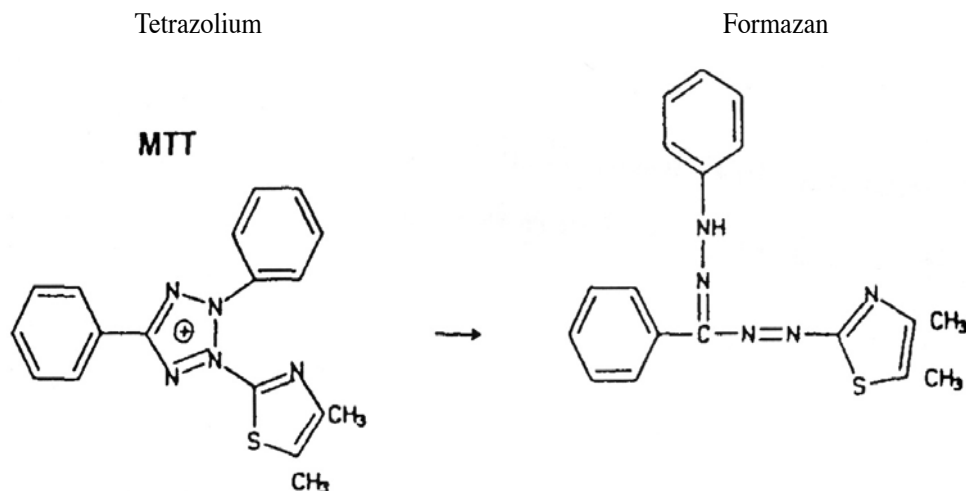


Fig. 1. Structures of MTT tetrazolium and formazan.

가져오는 작용이 있다고 알려져 있으며[12,13], 악성 림프종, 다발성 골수종, 백혈병과 같은 악성 종양의 치료, 악성 종양의 일차 치료 후 재발을 방지할 목적 등에 사용되고 있다[14,15].

삼산화이비소(As_2O_3)는 재발성 또는 불응성 급성 전골수성 백혈병에 효과적인 치료제로 이용되고 있으며[16-19], Agaricus는 백혈병 세포의 증식에 영향을 미친다는 보고가 있으며[20], 건강보조제로 사용되기도 한다. 소아백혈병 환자에서는 MTT를 이용한 Agaricus의 연구가 미흡한 실정이다.

이 연구에서는 소아백혈병의 예후에 영향을 주는 백혈병의 표현형, 진단 당시의 나이, 성별, 백혈구 수에 따라 adriamycin(ADR), cytarabine(Ara-C), etoposide(VP16), Abnoba viscum, arsenic trioxide(As_2O_3), Agaricus 등 6가지 약제에 대해 MTT assay를 이용한 항암제의 감수성 검사를 시행하여 각 약제들의 효과를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험대상

1997년 8월부터 2005년 7월까지 계명대학교 동산의료원 소아과에 입원한 백혈병환자를 대상으로 하였으며, 급성 림프구성 백혈병(ALL) 27례, 급성 골수구성 백혈병(AML) 7례이었다. ALL은 남아 10례, 여아 17례이었으며 연령은 4개월에서 15세사이로 남아의 중앙연령은 5세, 여아의 중앙연령은 8세이었다. AML은 남아 5례, 여아 2례이었고, 연령은 6세에서 11세사이로 중앙연령은 남아, 여아 모두 9세이었다. 진단당시 백혈구 수는 $1,130/mm^3$ 에서 $429,600/mm^3$ 으로 중앙값은 $13,610/mm^3$ 이었다. 골수모세포는 ALL에서 49%, 50.8% 각 1례이었고, AML에서는 26%, 45%, 54% 각 1례이었으며 나머지는 모두 70% 이상이었다. 백혈구 수가 mm^3 당 5만 이하인 경우가 21례, 5만 이상인 경우가 7례이었다(Table 1). 대조군은 골수 침범이 없었던 13례를 대상으로 하였다.

2. 실험에 사용한 약제

실험에 사용한 약제는 adriamycin(ADR, 보령제약, 한국), cytarabine(Ara-C, 중외제약, 한국), etoposide(VP16, 동아제약, 한국), Abnoba viscum(Heilmittel, Germany), arsenic trioxide(As_2O_3 , Sigma Aldrich, USA), Agaricus(실험실 조제)였으며, 각 약제별로 농도를 달리하여 ADR과 Ara-C는 $1 \mu g/mL$, VP16는 $20 \mu g/mL$, Abnoba는 $100 \mu g/mL$, As_2O_3 는 $10^{-4} M$, Agaricus는 $100 mg/mL$ 의 농도로 사용하였다.

3. 단핵세포의 분리

시험관에 헤파린 전처리 후 백혈병환자와 대조군의 골수 또는 말초혈액을 수집하여 Ficoll Paque Plus(Amersham, Sweden)를 이용하여 2,500 rpm에서 25분간 원심분리한 후 단핵세포를 분리하였다. 분리한 단핵세포를 RPMI-1640(Gibco, USA)으로 2회 세척 후 실험에 이용하였다.

4. MTT assay

세척한 단핵세포를 10% fetal bovine serum(Hyclone, Canada), 1% penicillin/streptomycin(Gibco, USA)이 함유된 RPMI-1640 media로 10^7

Table 1. Profile of patients

	ALL (n=27)	AML (n=7)
Age (year)		
< 2	1	-
2-10	21	4
> 10	5	3
Sex		
Male	10	5
Female	17	2
Initial WBC ($/mm^3$)		
< 50,000	7	6
> 50,000	20	1

cell/mL의 농도로 희석하여 96 well plate에 100 μ L 씩 분주하였다. ADR(1 μ g/mL), Ara-C(1 μ g/mL), VP16(20 μ g/mL), Abnoba(100 μ g/mL), As₂O₃(10⁻⁴ M), Agaricus(100 mg/mL)는 고농도에서 저농도로 2배수로 희석하여 7단계로 나누어 100 μ L 씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에 4일간 배양하였다. 이때 blank에는 배지(200 μ L)만 넣고 대조군에는 약제를 첨가하지 않고 세포(100 μ L)와 배지(100 μ L)만 넣었다. 4일간 배양 후 MTT를 50 μ L 첨가하여 6시간 배양 후 각 well당 30 μ L의 배지가 남도록 상청액을 제거하고, DMSO를 150 μ L 씩 첨가하여 570 nm에서 microphotometer(Bio-rad, Japan)로 흡광도(OD)를 측정하였다.

5. 항암제 감수성 비교

백혈병 세포의 생존율은(약제를 넣은 군의 OD / 대조군의 OD) x 100의 방법으로 구하였다. 50%의 세포생존율을 보이는 약제 농도를 LD50으로 하고, 약제 농도에 따른 반응곡선에서 LD50을 산출하였으며, 백혈병 환자와 대조군의 LD50의 중앙값을 구하여 항암제 감수성을 비교하였다.

성 적

1. 백혈병 세포의 종류에 따른 항암제 감수성 비교

전체 백혈병 세포군에서 Ara-C, VP16의 2가지 약제가 대조군에 비해 항암제에 대한 감수성이 높았다. ALL세포는 다른 군들에 비해 Ara-C, VP16, As₂O₃에 감수성이 높았고, AML세포는 다른 군들에 비해 Abnoba, Agaricus에 감수성이 있음을 관찰할 수 있었다(Table 2).

2. 나이에 따른 항암제 감수성 비교

2세 이하는 ALL 1례밖에 없어서 비교하기 어려웠으며, 2—10세 사이의 환자에서는 ADR을 제외한 Ara-C, VP16, Abnoba, As₂O₃, Agaricus에서 백혈병군이 대조군보다 항암제 감수성이 높았다. ALL세포는 VP16, As₂O₃에서 AML세포보다 항암제 감수성이 높았고, AML세포는 Abnoba, Agaricus에서 ALL세포보다 감수성이 높았다. 10세 이상의 나이군에서 ALL세포는 다른 군들에 비해 감수성이 높은 약제가 없었으며, AML세포에서 VP16에 대한 항암제의 감수성이 높게 나타났다(Table 3).

Table 2. Comparison of LD50 according to type of leukemia

Drug*	Control		ALL		AML	
	No §	LD50	No	LD50	No	LD50
ADR	7	0.02	16	0.02	5	0.02
Ara-C	6	0.06	18	0.03	6	0.04
VP16	6	0.14	13	0.04	4	0.09
Abnoba	9	0.59	8	0.75	1	0.23
As ₂ O ₃ +	6	2.15	13	1.95	4	2.69
Agaricus ‡	3	1.94	9	0.79	2	0.18

*: μ g/mL; +: 10⁻⁴M; ‡: mg/mL; §: Number of samples tested; ||: Drug concentration lethal to 50% of cells; ADR: adriamycin; Ara-c: cytarabine; VP16: etoposide; Abnoba: abnoba viscum; As₂O₃: arsenic trioxide.

Table 3. Comparison of LD50 according to age

Drug*	Age (year)	Control		ALL		AML	
		No §	LD50	No	LD50	No	LD50
ADR	< 2	1	0	-	-	-	-
	2-10	6	0.02	11	0.02	2	0.02
	> 10	-	-	5	0.00	3	0.02
Ara-C	< 2	1	1	1	0.02	-	-
	2-10	4	0.06	15	0.04	4	0.04
	> 10	1	0.01	2	1.29	2	0.10
VP16	< 2	2	0.51	1	0.02	-	-
	2-10	3	0.14	11	0.05	3	0.12
	> 10	1	0.03	1	0.02	1	0.00
Abnoba	< 2	6	0.35	1	2.19	-	-
	2-10	3	0.87	6	0.67	1	0.23
	> 10	1	0.59	1	0.60	-	-
As ₂ O ₃ †	< 2	3	0.89	-	-	-	-
	2-10	2	4.18	12	1.68	1	3.76
	> 10	1	1.80	1	2.79	3	2.22
Agaricus‡	< 2	2	1.45	-	-	-	-
	2-10	1	1.94	7	0.79	2	0.18
	> 10	-	-	2	0.87	-	-

*: $\mu\text{g/mL}$; †: 10^{-4}M ; ‡: mg/mL ; §: Number of samples tested; ||: Drug concentration lethal to 50% of cells; ADR: adriamycin; Ara-c: cytarabine; VP16: etoposide; Abnoba: abnoba viscum; As₂O₃: arsenic trioxide.

3. 성별에 따른 항암제 감수성 비교

ALL세포에서는 Ara-C를 제외한 약제에서 여아의 항암제 감수성이 높았다. AML세포는 ADR, VP16, As₂O₃에서 여아의 항암제 감수성이 높았다 (Table 4).

4. 백혈구 수에 따른 항암제 감수성 비교

ALL세포와 AML세포의 비교에서 백혈구 수가

mm³당 5만 이하인 경우 ALL세포에서 감수성이 높은 약제는 VP16, As₂O₃이었고, AML세포에서는 Ara-C, Abnoba, Agaricus이었다. 백혈구 수가 5만 이상인 경우 ALL세포에서는 Ara-C와 VP16에 감수성을 보였고, AML세포에서는 Agaricus에 감수성을 보였다.

ALL세포에서 백혈구 수가 mm³당 5만 이하인 경우 감수성이 높은 약제는 Ara-C, Abnoba, As₂O₃이었고, ADR은 감수성이 같았고, VP16과 Agaricus는 mm³당 5만 이상인 경우에 감수성이 높았다. 그러나

Table 4. Comparison of LD50 according to sex

Drug*	Sex	Control		ALL		AML	
		No §	LD50	No	LD50	No	LD50
ADR	M	5	0.02	6	0.03	3	0.04
	F	2	0.03	10	0.01	2	0.01
Ara-C	M	5	0.04	6	0.03	4	0.04
	F	1	0.07	12	0.05	2	0.11
VP16	M	5	0.14	6	0.05	3	0.12
	F	1	0.14	7	0.04	1	0.06
Abnoba	M	8	0.47	4	0.96	-	-
	F	1	1.23	4	0.44	1	0.23
As ₂ O ₃ ⁺	M	5	1.80	4	2.76	3	3.16
	F	1	5.86	9	1.41	1	2.22
Agaricus [‡]	M	2	1.45	2	2.17	2	0.18
	F	1	1.94	7	0.54	-	-

*: $\mu\text{g/mL}$; +: 10^{-4}M ; #: mg/mL ; §: Number of samples tested; ||: Drug concentration lethal to 50% of cells; ADR: adriamycin; Ara-c: cytarabine; VP16: etoposide; Abnoba: abnoba viscum; As₂O₃: arsenic trioxide.

AML에서는 백혈구 수가 mm^3 당 5만 이상인 경우가 1례밖에 되지 않아 비교하기 어려웠다(Table 5).

고 찰

소아 백혈병은 백혈병의 이형, 진단당시의 나이, 백혈구 수, 성별, 면역표현형 및 염색체 형에 따라 예후가 달라지며, 항암제 선택 또한 예후 결정에 중요한 요소로 작용한다. 1970년대 이후 여러 복합요법의 발달로 생존율이 급성 림프구성 백혈병에서는 80%, 급성 골수구성 백혈병에서는 60%까지 증가되었으나[1-4], 재발이나 내성이 생긴 경우 여전히 치료에 어려움이 있으며, 이 경우에는 효율적인 약제 선택을 위해 항암제 감수성 검사의 필요성이 증가하게 된다. 항암제에 대한 반응율은 대다수의 고통함에 서 복합요법을 사용하더라도 일반적으로 30-40%에 불과하여 화학요법에 반응하지 않는 환자는 암으

로부터의 고통은 물론 항암제 부작용에 의한 고통도 함께 겪게 된다. 또한 부적절한 항암제의 선택은 효과적인 항암제에도 교차내성을 유발할 수 있다는 보고가 있어 적절한 항암제의 선택은 암치료에 필수적이라 하겠다[21].

효율적인 항암제의 선택을 위하여 암세포를 약제에 노출시킨 후 형태 변화를 관찰하는 dye exclusion assay [22], 세포의 분열증식 능력을 측정하는 clonogenic assay [23] 등 다양한 항암제 감수성 검사가 시도되어 왔다. Dye exclusion assay는 빠른 시간안에 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있으나 결과가 주관적이며 임상 결과와 일치되는율이 적고 세포의 생활력을 측정하는 민감도가 낮은 반면 [22], clonogenic assay는 결과를 얻기까지 검사기간이 오래 걸리고 다량의 암세포가 필요하며 colony형성의 plating efficiency가 0.1%이하로 매우 낮아 실험의 준비와 진행에 경비가 많이 드는 단점이 있다 [23]. MTT assay는 1983년 Mosmann [5]에 의하

Table 5. Comparison of LD50 according to leukocyte count at diagnosis

Drug*	WBC (/mm ³)	ALL		AML	
		No §	LD50	No	LD50
ADR	<50,000	10	0.02	5	0.02
	>50,000	6	0.02	-	-
Ara-C	<50,000	8	0.03	5	0.02
	>50,000	10	0.04	1	0.87
VP16	<50,000	4	0.05	3	0.06
	>50,000	9	0.04	1	0.94
Abnoba	<50,000	5	0.60	1	0.23
	>50,000	3	0.89	-	-
As ₂ O ₃ +	<50,000	7	1.41	4	2.69
	>50,000	6	2.33	-	-
Agaricus [‡]	<50,000	4	0.99	1	0.34
	>50,000	5	0.54	1	0.02

*: $\mu\text{g/mL}$; †: 10^{-4}M ; ‡: mg/mL ; §: Number of samples tested; ||: Drug concentration lethal to 50% of cells; ADR: adriamycin; Ara-c: cytarabine; VP16: etoposide; Abnoba: abnoba viscum; As₂O₃: arsenic trioxide.

여 개발되었는데, 실험방법이 비교적 간단하고 반자동화되어 있어 객관적인 결과를 쉽게 정량화할 수 있고 검사기간도 4일내지 6일 정도로 비교적 짧다는 이점이 있다. 그리고 항암제 감수성 검사에 적용하여 disc assay와 일치한다는 임상 결과가 발표되었다 [7]. 채성희 등 [24]은 간세포종 세포주에서 MTT test를 시행하여 약제농도와 시간에 비례하여 세포 생존율이 감소한다는 보고를 하였다. 박재갑 등 [25]은 MTT assay로 림프킨 활성화 살해세포 (LAK cell)의 활성도를 측정한 바 있다.

이 연구에서도 MTT assay를 이용하여 소아 백혈병의 치료에 영향을 미치는 예후인자들에 따라 ADR, Ara-C, VP16, Abnoba, As₂O₃, Agaricus 등 6가지 약제로 항암제 감수성 검사를 시행하였다.

Abnoba는 겨우살이 추출물로 Abnoba의 여러 성분 중 mistletoe lectin I, II, III 등이 암세포에서 리소좀의 단백질 생산을 억제하여 세포독성 작용을 유도하며, 면역 체계에서는 IL-1, IL-2, IL-6,

TNF- α 의 분비와 NK-cell과 대식작용의 활성도를 증가시키고 세포 고사를 증가시킨다고 한다 [12,13]. 또한 미솔토 추출물을 악성 암 환자에서 사용하여 암의 진행을 억제하는데 상당한 효과를 얻었다는 보고가 있다 [12,13].

Agaricus는 들버섯속 송이과에 속하는 버섯으로 식용으로 쓰일 뿐 아니라 면역 증가 활성물질도 함유되어 있어 항종양효과, 제암효과, 암 예방효과, 혈당강화작용, 혈압강하, 콜레스테롤 저하 등의 생리활성 기능을 나타내기 때문에 암이나 성인병에 대한 예방 및 개선 효과가 기대되는 약제라 할 수 있다 [26]. 지정환 등 [27]은 Agaricus 추출물로 실험을 한 결과 만성 골수성 백혈병세포주, 유방암세포주 등에서 암세포 성장 억제효과가 있다고 보고하였다.

이 연구에서 ALL 세포는 Ara-C, VP16, As₂O₃에 감수성이 높으며 AML세포는 Abnoba, Agaricus에 감수성이 있었고, 2-10세 사이의 AML세포에서도 Abnoba와 Agaricus에 감수성을 보였으므로 항

후 AML환자에 Abnoba와 Agaricus를 선택적으로 사용할 경우 효과가 있을 것으로 생각된다. 특히 AML의 치료에는 유지요법의 필요성에 대해 논란이 있는 실정으로[2,3] 잔존세포가 적고 면역 증강이 필요한 상태에서 Abnoba와 Agaricus의 사용에 이론적 근거가 될 수도 있을 것으로 판단된다. 그리고 실제 골수이형성증후군 1례와 AML환자 2례에서 Abnoba를 사용하여 수년간 재발되지 않고 관해가 유지된 예를 경험한 바 있으며, 항암치료가 끝난 AML의 유지요법의 개념으로 Abnoba를 응용할 수 있을지에 대해 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

ALL환자의 경우 2세 이하와 10세 이상의 경우 예후가 나쁜 것으로 알려져 있으며, 한태웅 등[28]은 ALL에서 MTT test를 시행한 결과 10세 이상과 2세 이하 군에서 항암제 감수성이 낮게 나타난 약제가 많은 것으로 보고하였다. 이 연구에서도 10세 이상인 환자의 ALL세포는 다른 군들에 비해 항암제 감수성이 낮은 경우가 많았다. 10세 이상인 환자의 AML세포는 VP16에 감수성이 높았다. 다른 보고에서도 VP16은 10세 이하에서는 AML세포보다 ALL세포에서 감수성이 높았으나, 10세 이상의 경우 AML세포에 더 높은 감수성을 보였으며, AML 치료에 흔히 쓰이는 약제인 Ara-C와 비슷한 감수성을 보였다[18,28].

ALL환자는 남자에서 고환 재발이 흔하고, T cell type 백혈병의 발병률이 높으며, 백혈구수가 증가되어 있고, 장기 비대나 림프절 종대, 상부 종격동에 압종이 있는 경우가 많아 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다[29]. 이 연구에서도 ALL세포군은 남자에서 Ara-C를 제외한 대부분의 약제에 대해 감수성이 낮게 나타났다.

백혈병의 예후 인자 중 진단당시의 백혈구 수가 예후 결정에 중요한데, ALL에서는 20% 정도에서 백혈구 수가 5만 이상으로 보고 되고 있으며 이들은 예후가 좋지 않다고 알려져 있다[30,31]. 이 연구에서는 ALL세포는 AML세포에 비해 백혈구 수가 mm^3 당 5만 이하일 때 VP-16, As_2O_3 에 항암제 감수성이 높았으며, 5만 이상일 때는 Ara-C, VP16에 대해 감수성이 있는 것으로 관찰되었으므로 백혈구 수가 증

가 된 ALL에 이들 약제를 추가하여 사용한다면 효과가 나타날 수 있을 것으로 여겨진다. ALL세포에서 백혈구수가 mm^3 당 5만 이상인 경우에 5만 이하인 경우보다 VP16과 Agaricus가 항암제 감수성이 높아서 향후 백혈구 증가가 심한 환자에서 Agaricus나 VP16을 우선적으로 사용하면 백혈구 증가로 인한 합병증을 줄일 수 있을지는 관찰이 필요할 것이다.

백혈병의 예후에 영향을 주는 백혈병의 형, 나이, 성별, 초기 진단당시 백혈구 수에 따라 MTT assay를 시행하여 항암제 감수성을 비교하였고 항암제와 대체요법제의 효과를 확인하였다. 아직 실험 대상 수가 적어 통계적인 유의성을 얻지는 못하였으나, 앞으로 더 많은 예에서 지속적인 연구를 시행하여, MTT assay를 이용한 항암제 감수성 검사와 약제 내성 유전자 연구를 병행함으로써 백혈병의 치료에 도움이 되리라고 생각된다.

요 약

백혈병 환아와 골수 침범이 없었던 질환을 가졌던 환아의 단핵세포를 분리해 MTT assay를 이용하여 백혈병의 예후에 영향을 주는 백혈병의 형, 진단 당시 나이, 성별, 백혈구 수에 따라 ADR, Ara-C, VP16, Abnoba, As_2O_3 , Agaricus를 사용하여 항암제 감수성 검사를 시행하고 각 약제들의 효과를 알아 보았다. ALL세포는 Ara-C, VP16, As_2O_3 에서 AML세포는 Abnoba, Agaricus에 감수성이 있었다. 2-10세의 ALL세포는 VP16, As_2O_3 에서 AML세포는 Abnoba, Agaricus에서 감수성이 높았다. 10세 이상의 ALL세포는 감수성이 높은 약제가 없었으며, AML세포는 VP16의 감수성이 높았다. 성별로는 ALL세포에서는 Ara-C를 제외한 약제에서 여아의 항암제 감수성이 높았다. AML세포는 ADR, VP16, As_2O_3 에서 여아의 항암제 감수성이 높았다. 백혈구 수치가 5만 이하인 경우 ALL세포에서 감수성이 높은 약제는 VP16, As_2O_3 였고, AML세포에서는 Ara-C, Abnoba, Agaricus였다. 백혈구 수치가 5만 이상인 경우 ALL세포에서는 Ara-C와 VP16에 감수성을 보였고, AML세포에서는 Agaricus에 감수성

을 보였다. MTT를 이용한 항암제 감수성 검사는 감수성이 있는 항암제를 선택하여 치료성적의 향상을 도모하고 효과 없는 항암제를 사용할 때 발생 가능한 항암제 내성 획득의 위험을 줄이는데 도움이 되리라 추측되며, 향후 더 많은 예에서 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;**12**:3-12.
2. Creutzig U, Ritter J, Zimmermann M, Reinhardt D, Hermann F, Berthold F, *et al.* Improved treatment results in high-risk pediatric acute myeloid leukemia patients after intensification with high-dose cytarabine and mitoxantrone. *J Clin Oncol* 2001;**19**:2705-13.
3. Stevens RF, Hann IM, Wheatley K, Gray RG. Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1998;**101**:130-40.
4. Kaspers GJL, Veerman AJP. Clinical significance of cellular drug resistance childhood leukemia. In: Reinhold U, Tilgen W, editors. *Chemosensitivity Testing in Oncology*. Berlin, Springer-Verlag; 2003,p.196-220.
5. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55-63.
6. Slater TF, Sawyer B, Strauli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochem Biophys Acta* 1963;**77**:383-93.
7. Hongo T, Fujii Y, Igarashi Y. An *in vitro* chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia. *Cancer* 1990;**65**:1263-72.
8. Twentyman PR, Fox NE, Rees JK. Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay. *Br J Haematol* 1989;**71**:19-24.
9. Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Smers LA, Van Wering ER, *et al.* *In vitro* cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;**90**:2723-9.
10. Pieters R, Loonen AH, Huismans DR, Broekema GJ, Dirven MW, Heyenbrok MW, *et al.* *In vitro* drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 1990;**76**:2327-36.
11. Kaspers GJ, Kardos G, Pieters R, Van Zantwijk CH, Klumper E, Hahlen K, *et al.* Different cellular drug resistance profiles in childhood lymphoblastic and non-lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1994;**8**:1224-9.
12. Bussing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of Viscum album L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res* 1999;**19**:23-8.
13. Doser C, Doser M, Hulsen H, Mechelke F. Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and of purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells. *Arzneimittelforschung* 1989;**39**:647-51.
14. Stein GM, Schietzel M, Bussing A. Mistletoe in immunology and the clinic [short review]. *Anticancer Res* 1998;**18**:3247-9.
15. Stein GM, Pfuller U, Schietzel M. Viscotoxin-free aqueous extracts from European mistletoe (*Viscum album L.*) stimulate activity of human granulocytes. *Anticancer Res* 1999;**19**:2925-8.
16. Sun HD, Ma L, Hu XC, Zhang TD. Treatment of acute promyelocytic leukemia by Ailing-1 therapy with use of syndrome differentiation of traditional Chinese medicine. *Chin J Comb Trad Chin Med West Med* 1992;**12**:170-1.
17. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, *et al.* United States

- multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001;**19**:3852-60.
18. 송기영, 박진휘, 조윤정, 백원기, 권기영, 김홍식 외. 급성 전골수성 백혈병에 대한 Arsenic Trioxide (As₂O₃)의 항암 작용. *소아과* 2000;**43**:327-34.
 19. 박진휘, 김홍식, 강진무. Arsenic Trioxide (As₂O₃)로 관해된 급성 전골수구성 백혈병 1례. *소아과* 2000;**43**:1132-6.
 20. Koyama Y, Katsuno Y, Miyoshi N, Hayakawa S, Mita T, Muto H, *et al.* Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom boletopsis leucomelas in U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;**66**:784-9.
 21. Cohen JS, Lyon RC, Chen C, Faustino PJ, Batist G, Shoemaker M, *et al.* Differences in phosphate metabolite levels in drug-sensitive and -resistant human breast cancer cell lines determined by 31P magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 1986;**46**:4087-90.
 22. Fass L, Fefer A. The application of an *in vitro* cytotoxicity test to studies of the effects of drugs on the cellular immune response in mice. I. Primary response. *J Immunol* 1972;**109**:749-53.
 23. Salmon SE, Buick RN. Preparation of permanent slides of intact soft-agar colony cultures of hematopoietic and tumor stem cells. *Cancer Res* 1979;**39**:1133-6.
 24. 채성희, 김홍식, 강진무, 박근수, 김명성, 김준식 외. Hepatoblastoma Cell Line의 항암제 감수성 검사. *대한소아혈액종양학회지* 1995;**2**:248-58.
 25. 박재갑, 권오중, 김선희, 김진복, 한문희. MTT방법을 이용한 림프킨 활성화 살해세포(LAK Cell) 활성도 측정에 관한 연구. *대한암학회지* 1987;**19**:68-78.
 26. Fujimiya Y, Kobori H, Oshiman K, Soda R, Ebina T. Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 1998;**45**:246-52.
 27. 지정환, 김미남, 최근표, 정차권, 함승식. 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill) 추출물의 항돌연변이원성 및 세포독성 효과. *한국식품과학회지* 2000;**32**:1371-8.
 28. 한태웅, 정수경, 김홍식, 강진무. 소아 백혈병 세포의 항암제 감수성 검사. *소아과* 1999;**42**:1111-21.
 29. Crist WM, Pullen DJ, Rivera GK. Acute lymphoid leukemia. In: Fernbach DJ, Vietti TJ, editors. *Clinical Pediatric Oncology*. 4th ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc; 1991,p.305-35.
 30. Creutzig U, Ritter J, Schellong G. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in study AML-BFM-83 as compared with study AML-BFM-78. *Blood* 1990;**75**:1932-40.
 31. Buckley JD, Chard RL, Baehner RL, Nesbit ME, Lampkin BC, Woods WG, *et al.* Improvement in outcome for children with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer* 1989;**63**:1457-65.