

# Hepatoblastoma Cell Line의 항암제 감수성 검사

계명대학교 의과대학 소아과학교실, 임상병리학교실\*  
안동성소병원 소아과<sup>#</sup> 및 안동대학교 식품영양학과<sup>+</sup>

채성희<sup>#</sup> · 김흥식 · 강진무 · 박근수 · 김명성  
김준식 · 조민정 · 전효진\* · 권정숙<sup>+</sup>

= Abstract =

## Chemosensitivity Test in Hepatoblastoma Cell Line

Sung Hee Chae<sup>#</sup>, M.D., Heung Sik Kim, M.D., Chin Moo Kang, M.D.  
Geun Soo Park, M.D., Myung Sung Kim, M.D., Jun Sik Kim, M.D.  
Min Jung Cho, B.A., Hyo Jin Chun\*, M.D. and Chong Suk Kwon<sup>+</sup>, ph.D.

*Department of Pediatrics, Department of Clinical pathology\*, Keimyung University,  
School of Medicine, Taegu, Korea, Andong Presbyterian Hospital<sup>#</sup>,  
Department of Food and Nutrition, Andong National University<sup>+</sup>*

**Background:** Hepatoblastoma is the most frequent malignant hepatic tumor in children which has been treated with surgery, radiation and chemotherapy. To increase the cure rate, in vitro drug sensitivity test might be needed. Recently we established a hepatoblastoma cell line (KPH1). This cell line could be useful as a model in drug sensitivity studies of hepatoblastoma.

**Methods:** KPH<sub>1</sub> cells are continuously cultured with RPMI media (10% FCS) in a incubator in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were exposed with adriamycin, vincristine and VP-16 for 1 hr at the concentration of 0.1, 1.0 and 10 µg/ml. Cell viability was observed using trypan blue dye exclusion method. Chemosensitivity test was assessed with the MTT assay. Ninety six-well microplate contained 100 µl cell suspension with the drugs was incubated for 4 days. Then 50 µl MTT solution was added for 6 hours. The formazan crystals formed by living cells were dissolved with DMSO (150 µl). The optical density (OD) was measured with a microplate spectrophotometer at 565nm. The OD was linearly related to cell number. Cell line (KPH1, K562, Raji and EU1) survival and LD<sub>50</sub> (drug concentration lethal to 50% of the cells) were calculated and cell cycle assay was done using flow cytometry.

**Results:** Cell viability decreased due to higher concentration and longer exposure to the drugs. KPH1 cell line showed sensitivity to the drugs such as adriamycin, vincristine and VP-16 which are also clinically effective to the patients. Adriamycin had synchronizing effect of KPH1 cell line to S phase.

**Conclusion:** KPH1 cell line could be used as an experimental model of cancer chemosensitivity test. Further study to evaluate the chemosensitivity with multiple drugs and tumor cells from patients will be needed.

---

**Key Words:** Chemosensitivity test, Hepatoblastoma cell line

## 서 론

## 대상 및 방법

Hepatoblastoma는 소아에서 가장 흔한 원발성 간암으로서 수술, 방사선 요법 및 화학요법 등의 치료방법이 있으나 병기가 진행된 경우에는 치료에 대한 반응이 좋지 않다. 치료효과를 향상시키기 위해서는 고용량의 항암제를 투여하여야 되나, 이 경우에는 골수 기능의 저하에 의한 백혈구와 혈소판이 감소함으로써 감염과 출혈의 빈도가 증가되는 부작용이 초래될 수 있다<sup>1)</sup>.

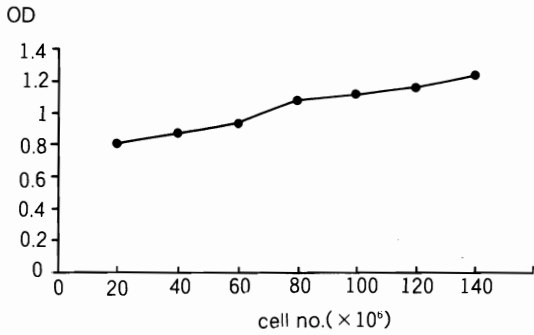
최근 Kaspers<sup>2)</sup>는 급성 백혈병에서 항암제에 대한 감수성 및 저항성 검사를 실시한 결과 예후 불량인 자들을 보유한 환자의 백혈병 세포가 항암제에 저항성을 나타내어 in vitro 검사 결과와 임상양상이 서로 일치함을 보고하였다. 따라서 백혈병에서의 항암제 감수성검사는 불필요한 항암제를 피하고 감수성이 있는 항암제를 선택하여 치료성적의 향상을 도모하고, 과다투여의 우려가 있는 항암제의 용량을 줄임으로써 정상세포에 대한 약제의 독성을 줄이는데 도움이 되리라 추측된다. 또한 이러한 백혈병에서의 항암제 감수성 검사는 다른 종류의 암종에서도 적용이 가능하리라 사료되며, 이미 수립된 세포주에 대한 항암제 감수성 검사는 실제 환자에 응용하기 위한 전구실험으로써 좋은 본보기가 될 수 있을 것이다.

이에 Kim등<sup>3)</sup>이 간아세포종 환자에서 세포주를 확립하여 형태적 특징과 염색체 이상 소견을 보고한 바 있는 KPH1세포주를 이용하여 수종의 항암제에 대한 trypan blue dye exclusion법에 의한 세포 생존율, MTT assay법에 의한 항암제 감수성 검사 및 유세포 분석(flow cytometric assay)법에 의한 세포주기를 검사하여 수종의 다른 세포주의 성격과 비교함으로써 간아세포종 세포주의 항암제에 대한 특성을 알아보고자 하였다.

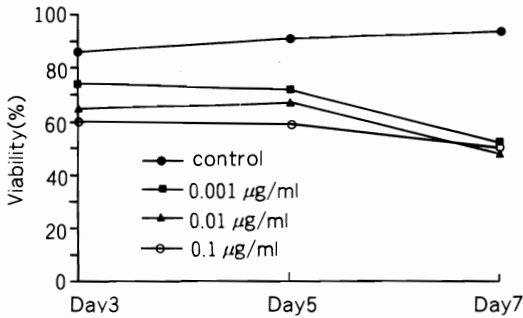
Hepatoblastoma cell line KPH1은 동산의료원 소아과에서 Hepatoblastoma 환자의 늑막강에 전이된 암세포를 배양하여 확립된 세포주로 RPMI media (10% FCS)에 계속 계대 배양중이다. 세포 생존율 검사는 trypan blue dye exclusion법으로 측정하였다<sup>4,5)</sup>. 즉 세포에 trypan blue를 넣으면 죽은 세포는 trypan blue가 침투되어 푸른색으로 변하는 것을 보고 전체 세포수에 대한 살아 있는 세포의 비율로 생존율을 구하는 방법으로 세포수를 10<sup>5</sup>/ml로 하여 petri dish에 넣고 여기에 adriamycin, vincristine, VP-16을 각각 0.1, 1.0, 및 10 µg/ml의 농도로 하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 1시간 동안 반응시킨후 PBS에 세척하여 6시간, 24시간 및 72시간후 세포의 생존율을 hemocytometer를 이용하여 구하였다.

항암제의 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다<sup>6,7)</sup>. 이 방법의 원리는 황색의 수용성인 MTT가 살아 있는 세포에 들어가서 mitochondria에 의하여 자색의 물에 녹지 않는 formazan으로 변화되는 것을 이용한다. 즉 세포농도를 10<sup>6</sup>/ml로 하여 96 well plate에 100 µl(10<sup>5</sup>개) 넣은 후 vincristine, adriamycin, VP-16, Ara-C, 6-TG, prednisolone, L-asparaginase등의 약제를 농도별로 100 µl 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 4일간 배양한다. 이때 blank에는 배지만 넣고 대조군에는 세포와 media만 넣는다. 약제의 각 농도를 3배수로 microwell에 넣어 4일간 배양하고 MTT를 50 µl(0.1 ng) 넣은 후 incubator에 6시간 추가로 배양하여 상청액을 조심스럽게 제거하고 DMSO를 넣는다. DMSO는 세포를 용해시켜 세포내의 formazan crystal을 유리시킨다. 분광광도계를 이용하여 565 nm에서 흡광도(이하 OD라 함)를 측정한다. OD는 KPH1 세포주에 MTT를 넣어 2일간 배양한 후 그림과 같이 세포수에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

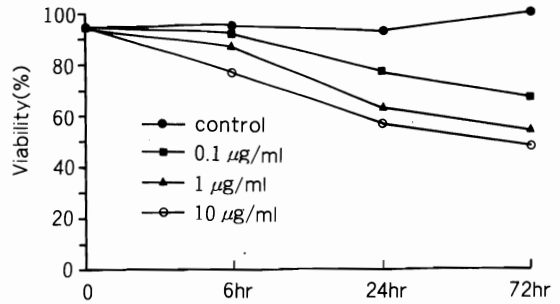
세포 생존율은 treated well OD/control well OD



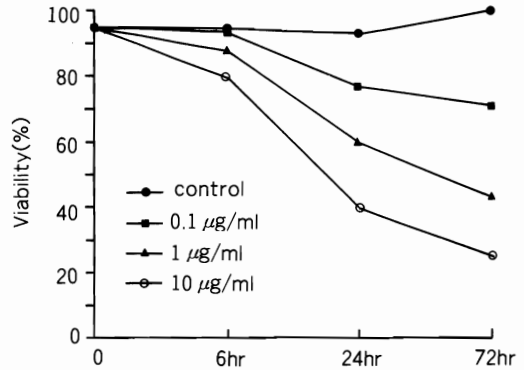
**Fig. 1.** Relationship between cell number and OD (2 day culture) OD: optical density.



**Fig. 2B.** Viability after application of low dose adriamycin.



**Fig. 2A.** Viability after application of adriamycin.



**Fig. 3A.** Viability after application of vincristine.

×100(%)로 구하고 약제 농도별 세포독성을 모눈 종이에 표시하였으며 50%의 세포 생존율을 보이는 약제 농도인 LD<sub>50</sub>을 구하였다. MTT assay는 hepatoblastoma cell line인 KPH1, erythroleukemia 세포주인 K562, Burkitt lymphoma 세포주인 Raji 그리고 acute biphenotypic leukemia 세포주인 EU1에서 시행하여 비교하였다. 세포 주기는 세포 농도를 10<sup>5</sup>/ml로 하여 0.1, 1.0 및 10 μg/ml의 약제 농도에 노출시키고 일정기간 후 유세포분석기를 이용하여 검사하였다<sup>8)</sup>.

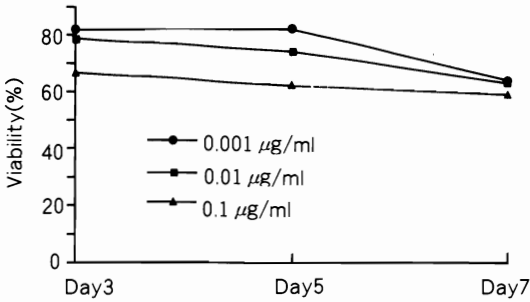
## 결 과

Adriamycin에 1시간 노출후의 세포 생존율은 약

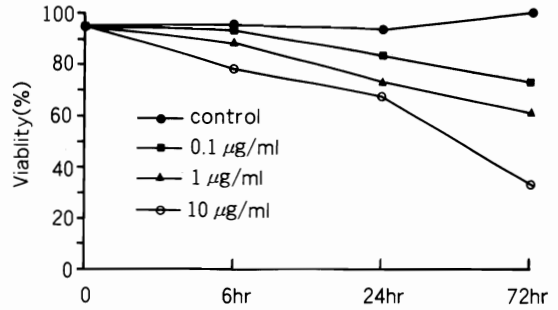
제 농도 0.1, 1.0 및 10 μg/ml에서 모두 시간이 지남에 따라 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 2A). 약제의 농도를 0.001, 0.01 및 0.1 μg/ml로 낮게 하여 지속적으로 약제에 노출(3, 5 및 7일)한 후에도 세포 생존율은 감소하였다(Fig. 2B).

Vincristine에 1시간 노출후에도 약제의 농도에 따라 그리고 시간이 지남에 따라 세포 생존율이 감소하였다(Fig. 3A). Vincristine의 농도를 0.001, 0.01 및 0.1 μg/ml로 낮게 하여 지속적으로 노출(3, 5 및 7일) 후에도 시간이 지남에 따라 세포 생존율이 감소하였다(Fig. 3B).

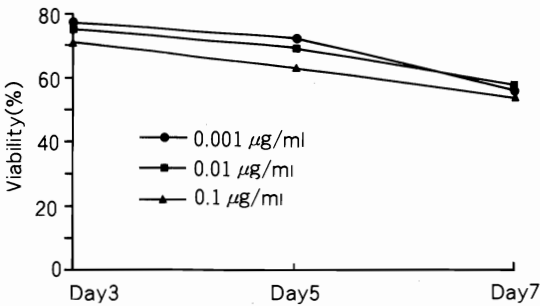
VP-16에 1시간 노출후에도 농도에 따라, 시간이 지남에 따라 세포 생존율은 대조군에 비하여 감소하였고(Fig. 4A), 약제농도를 0.001, 0.01 및 0.1 μg/ml



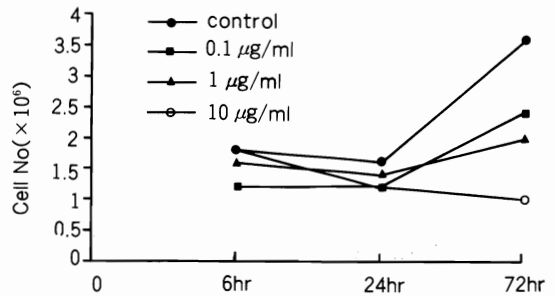
**Fig. 3B.** Viability after application of low dose vincristine.



**Fig. 4A.** Viability after application of VP-16.



**Fig. 4B.** Viability after application of low dose VP-16.



**Fig. 5.** Cell number after application of adriamycin.

로 하여 지속적으로 노출(3, 5 및 7일) 후에도 용량에 비례하여 세포 생존율이 감소하였다(Fig. 4B).

Adriamycin 사용후 총세포수는 24시간까지는 별변화를 보이지 않았으나 72시간에는 약제농도 0.1 및 1.0 µg/ml에 노출된 경우는 세포수가 증가하였고 10 µg/ml에 노출된 경우에는 세포수가 증가하지 않았다(Fig. 5).

각 약제에 대한 반응을 4가지 세포주를 이용하여 조사하였다. MTT assay에 의한 KPH1, K562, Raji 및 EU1 세포주의 항암제 감수성 검사 결과는 다음과 같았다. Adriamycin에 대한 감수성은 모든 세포주가 비교적 높은 경향을 보였으며 이중 KPH1이 가장 감수성이 높았고 LD<sub>50</sub>가 0.04 µg/ml이었다(Fig. 6).

Vincristine 사용후에는 대체로 감수성이 높고

KPH1 세포주는 LD<sub>50</sub>가 0.04 µg/ml 정도이었다(Fig. 7). VP-16에는 EU1 세포주가 가장 감수성이 높고 다음으로 KPH1 세포주가 감수성이 높았다(Fig. 8).

6-MP에 대하여는 EU1 세포주가 감수성이 높았고 KPH1, K562 및 Raji는 거의 비슷한 결과를 보였다(Fig. 9). 6-TG에서도 EU1 세포주가 감수성이 높고 다음이 KPH1이었으며 K562와 Raji 세포주는 비슷하였다(Fig. 10).

Prednisolone에는 모든 세포주에서 감수성이 낮았으나 LD<sub>50</sub>는 EU1 세포주가 가장 낮아 타세포주에서보다는 비교적 prednisolone에 감수성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 11). L-asparaginase에서는 EU1과 Raji세포주가 감수성이 높았고 KPH1과 K562 세포주는 비교적 감수성이 낮았다(Fig. 12).

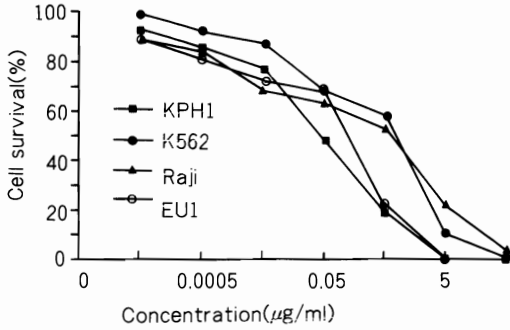


Fig. 6. Cell line response to adriamycin.

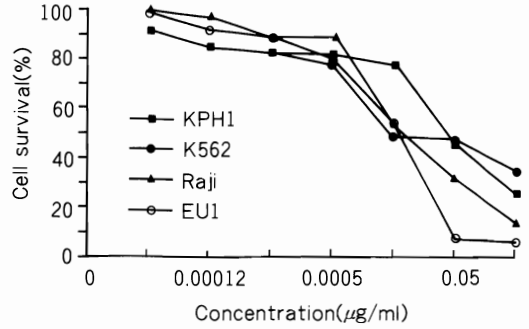


Fig. 7. Cell line response to vincristine.

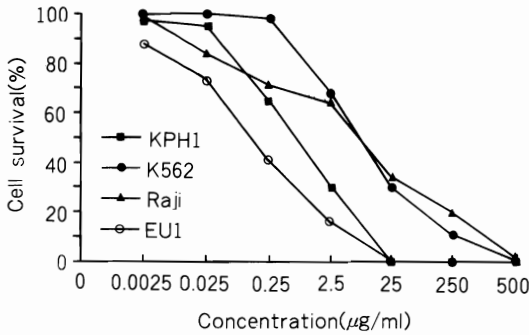


Fig. 8. Cell line response to VP-16.

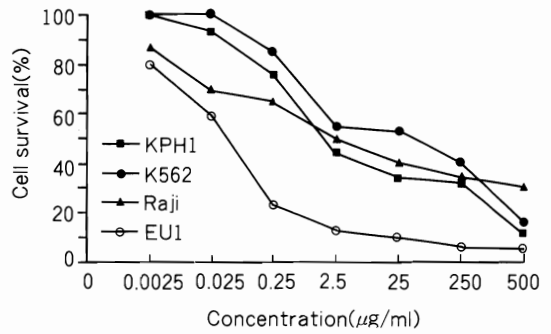


Fig. 9. Cell line response to 6-mercaptopurine.

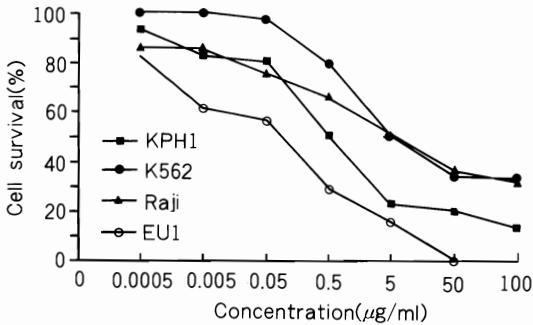


Fig. 10. Cell line response to 6-thioguanine.

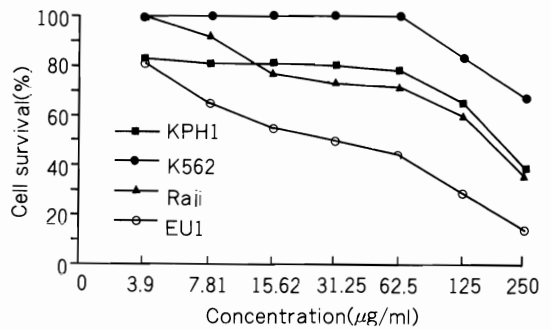


Fig. 11. Cell line response to prednisone.

Dexamethasone에서도 prednisolone과 같이 세포주에 대한 감수성이 적은 것으로 나타났다(Fig. 13). Cytosine arabinoside(Ara-C)에는 EU1 세포주는 매우 감수성이 높게 나타났으나 다른 세포주들은

모두 감수성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 14).

Methotrexate에서는 EU1 세포주는 감수성이 있는 것처럼 나타나고 다른 세포주들은 감수성이 없는 것처럼 나타났으나 약제 농도에 따른 효과가 거

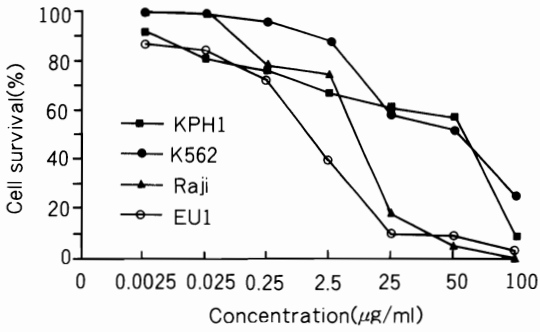


Fig. 12. Cell line response to L-asparaginase.

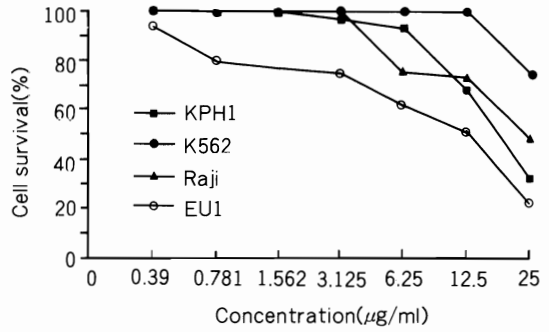


Fig. 13. Cell line response to dexamethasone.

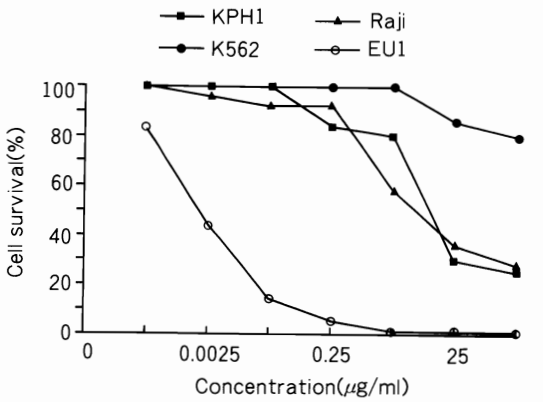


Fig. 14. Cell line response to cytosine arabinoside.

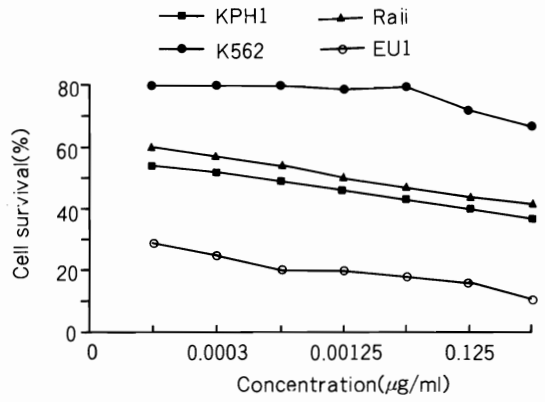


Fig. 15. Cell line response to methotrexate.

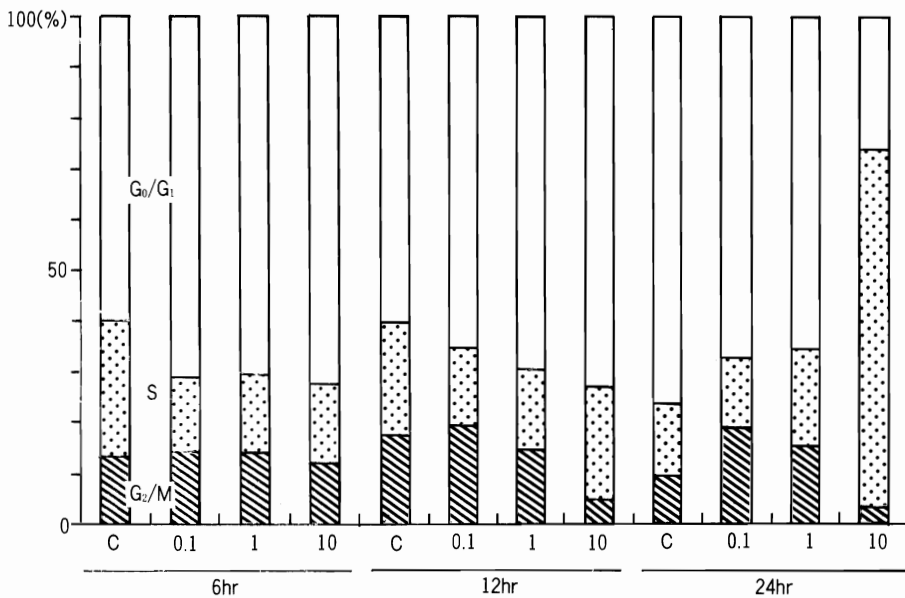
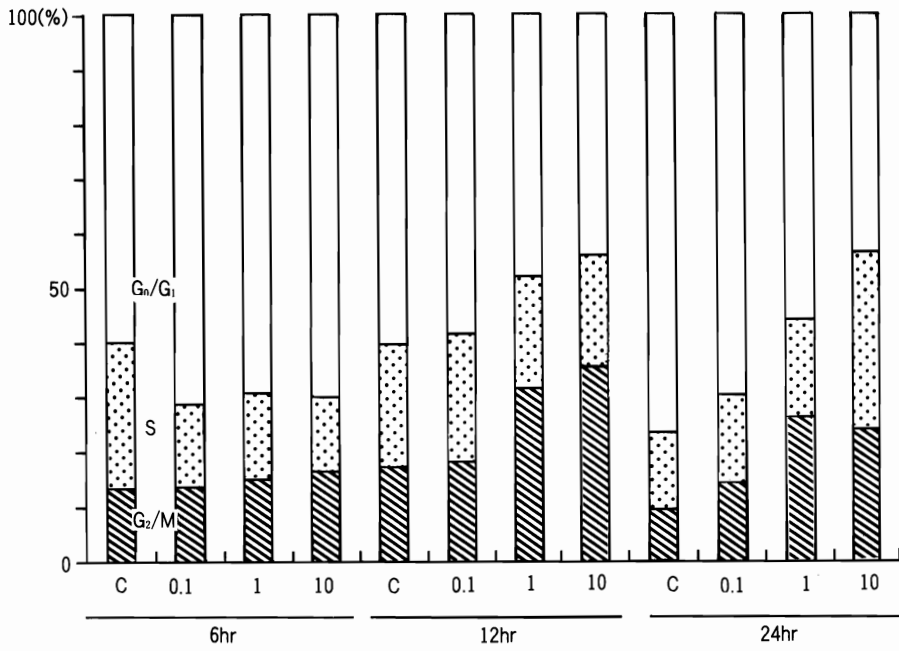
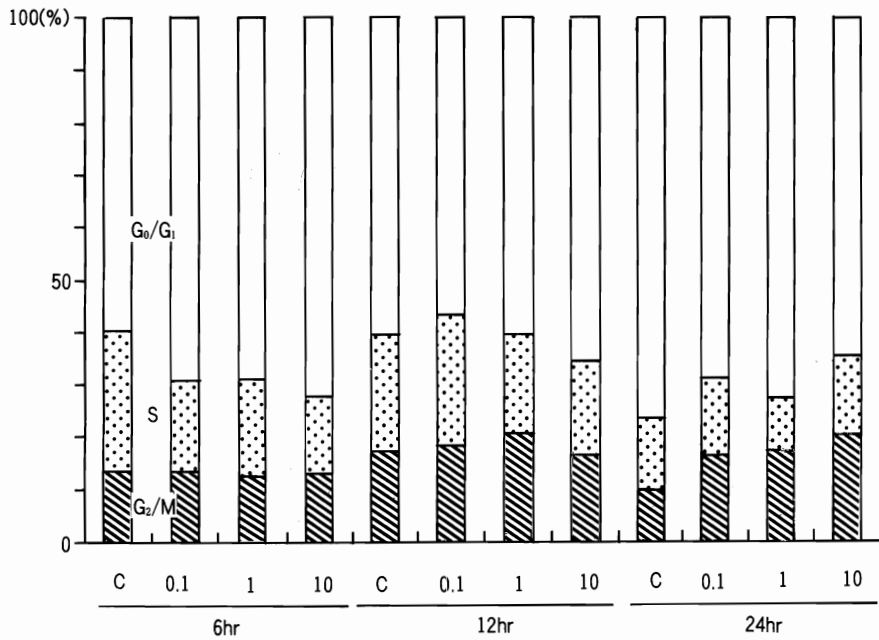


Fig. 16. Cell cycle change according to the concentration of adriamycin (μg/ml) and time sequence. C: control



**Fig. 17.** Cell cycle change according to the concentration of vincristine( $\mu\text{g/ml}$ ) and time sequence. C: control.



**Fig. 18.** Cell cycle change according to the concentration of VP-16( $\mu\text{g/ml}$ ) and time sequence. C: control.

**Table 1.** LD<sub>50</sub>( $\mu\text{g/ml}$ ) of cell lines

Cell line	DET	VP-16	Ara-C	6TG	6MP	PDN	ADR	L-asparaginase	VCR
KPH1	18	1.15	16	0.5	2.05	150	0.044	56.7	0.044
K562		13		5	70		1.1	50	0.0046
Raji	23	13.5	10	11	2.5	141.7	0.9	11.5	0.011
EU1	10	0.12	0.0022	0.11	0.055	28	0.17	1.9	0.0046

DET: Dexamethasone, PDN: Prednisolone  
 ADR: Adriamycin, L-asparaginase  
 VCR: Vincristine

의 없었다(Fig. 15).

세포주에 대한 각 약제들의 LD<sub>50</sub>을 Table 1에 나타내었다. KPH1은 vincristine, adriamycin, 6-TG, VP-16 등에서 비교적 LD<sub>50</sub> 수치가 낮아 감수성이 있는 것으로 보이며 K562는 vincristine과 adriamycin에 감수성이 있고 Raji는 vincristine, adriamycin에 감수성을 보였고, EU1 세포주는 dexamethasone, prednisolone 이외에는 대체로 감수성이 높은 것으로 나타났다. 세포 주기의 변화는 adriamycin과 VP-16, vincristine 세가지 약제 사용후에 관찰하였다. Adriamycin 사용후 약제 농도에 따라 시간이 지남에 따라 S phase가 대조군에 비하여 감소하였다가 증가하였다(Fig. 16). Vincristine 사용후에는 GM phase가 늘어나는 경향을 보여주었으나 24시간에는 S phase가 증가하였고(Fig. 17), VP-16 사용후에는 일정한 양상을 볼 수 없었다(Fig. 18).

## 고 찰

항암제의 항암 효과는 형태 변화를 관찰하거나<sup>9)</sup>, 세포의 생활력을 측정하는 dye exclusion assay<sup>4)</sup> 또는 세포의 분열증식 능력을 측정하는 clonogenic assay<sup>10,11)</sup> 등의 방법이 알려져 있다. 형태 변화 관찰법은 암세포를 약제에 노출후 형태의 변화를 관찰하는 방법으로 시간이 짧게 걸리나 결과가 주관적이고 임상 결과와 일치되는율이 적으며 세포의 생

활력을 측정하는 dye exclusion assay는 민감도가 낮으며 clonogenic assay는 성장 특성이 다른 종양 개개 세포에 대한 약제 효과를 반영할 수 있으나 세포들의 집락 형성이 잘 이루어지지 않는 단점이 있다<sup>15)</sup>. Bird등<sup>12)</sup>에 의하여 개발된 Disc assay는 시간이 오래 걸리고 검사자의 주관적 견해가 개입될 가능성이 크다고 한다. Menke-Mollers등<sup>13)</sup>은 DNA measurement assay로 neuroblastoma 세포의 항암제 감수성 검사를 하였던 바, P-glycoprotein 양성인 세포주가 음성인 세포주보다 vinca alkaloid에 내성이 있다는 결과를 보여주었고 이것이 stem cell assay보다 시간이 적게 소요되는(4~7일) 장점이 있음을 보고하였다.

그러나 이들의 방법은 세포주에서 시행되었고 monolayer culture를 하여야 하기 때문에 실제 환자의 암세포로 이용 가능성은 어려울 것으로 생각된다. MTT assay는 Mosmann<sup>6)</sup>에 의하여 기술되었고 그 원리는 살아 있는 세포는 가용성인 황색의 tetrazolium이 불용성인 자색의 formazan으로 침전되는 것을 이용하는 방법이다. 최근 Kaspers등<sup>2)</sup>과 Pieter등<sup>14)</sup>은 백혈병 세포에서 항암제 내성검사를 하여 그 성적이 임상적인 예후 불량인자와 일치한다는 발표를 하였다. 즉 예후 불량인자가 있을 때와 재발한 경우의 백혈병 세포가 실험실 내에서 항암제에 내성을 나타내고 이는 임상 치료 결과와 상관관계가 있다고 하였다. Twentyman등<sup>7)</sup>도 MTT와 Disc assay를 비교하여 서로 상관관계가 좋다고 하



였다. 저자들은 암세포에서 항암제 감수성 검사를 하여 임상에 이용하기 위한 전 단계로 KPH1 세포주에 대한 세포 생존율과 항암제 감수성 검사를 시행하고 세포 주기검사를 하여 비교해 보고 앞으로 hepatoblastoma에 대한 항암제 치료 지침이 될 수 있을지를 관찰하였다.

약제에 노출후 세포의 생존율은 adriamycin, vincristine, VP-16등 일반적으로 hepatoblastoma 환아 치료에 사용하는 약제들을 사용하여 관찰하였다. 세 약제 모두에서 1시간 약제 노출후 시간이 6, 24, 72시간 지남에 따라 약제 농도에 따라 세포 생존율이 대조군에 비하여 감소하였다. 그 정도는 vincristine 사용후에 가장 뚜렷한 것 같으나 약제의 작용 농도가 서로 차이가 있으므로 약제간 비교는 곤란할 것으로 생각된다. 약제의 농도를 더욱 낮게 하여 0.001  $\mu\text{g/ml}$ 부터 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 3일, 5일 및 7일간 지속적으로 노출시켰던 바 세포 생존율은 감소하였으나 고농도에 1시간 노출을 했을 때 보다 정도가 완만하였고 제7일에는 약제 농도에 관계없이 생존율이 adriamycin은 60% 근처에서 vincristine과 VP-16은 70% 근처에서 고정되었다. Adriamycin에 1시간 노출후 세포의 수는 약제 농도가 가장 높았던 10  $\mu\text{g/ml}$  이외에는 오히려 증가하였다. 이런 결과로 보면 실제 임상에서 고농도의 약제를 사용하는 것이 암세포 살해에 더 효과적이라는 것을 시사해 주고 있다.

이들 약제들에 대한 MTT assay 결과를 K562, Raji, EU1등의 백혈병 세포와 비교하였다. 먼저 KPH1 세포수에 따른 발색의 정도(optical density, OD)를 본 결과 배양 2일후에 세포수에 따라 OD가 증가하였다. 다른 연구자들도 세포수와 발색정도가 일치하였다고 하며 검사의 기간과는 관계가 없었다고 한다<sup>7)</sup>. 약제 농도에 따라 세포 생존율이 비례하여 감소하였고 LD<sub>50</sub>는 adriamycin과 vincristine에서는 0.044  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Adriamycin 사용후에는 백혈병 세포주보다 KPH1 세포주가 더 감수성이 있었고 vincristine 사용후에는 백혈병 세포주들이

KPH1 세포주보다 더 감수성이 예민하였다. VP-16 사용후에는 biphenotypic leukemia 세포주인 EU1이 가장 감수성이 있었고 다음이 KPH1 세포주이었다. 실제 hepatoblastoma 환자에서 치료에 기본이 되는 약제는 adriamycin과 vincristine이므로<sup>1)</sup> 세포주에서 MTT assay의 결과가 이들 약제에 예민한 것으로 보아 임상에 사용 가능하리라 생각되고 LD<sub>50</sub>을 보면 백혈병에 주로 사용하는 6-TG나 VP-16도 다른 세포주에 비하여 비교적 예민하므로 이들 약제를 임상 치료 계획에 포함시킬 수 있을 것으로 생각된다. 차후에 실제 환자에서 얻은 시료를 가지고 여러가지 약제를 혼합하여 실험을 하고 약제 내성 유전자 연구가 병행되게 되면 환자 치료에 더욱 도움이 될 것이다<sup>15,16)</sup>.

약제에 노출후 세포주기를 관찰한 결과 adriamycin사용후에는 시간이 지남에 따라 S phase가 대조군에 비하여 감소하였다가 증가하는 것을 볼 수 있었고 vincristine 사용후에는 G2/M phase가 증가하고 24시간에는 S phase도 증가하였으며 VP-16에서는 일정한 양상이 없었다.

세포주기의 변화를 보기 위해서는 세포 주기를 동일시기로 고정(synchronization) 시켜서 실험해 보아야 할 것으로 생각된다<sup>17)</sup>. 세포 주기를 고정하려면 배양액에서 serum을 제거하거나 성장 인자를 제거하는 방법이 있고 Lovastatin을 적용하면 정상 세포와 암세포 모두가 G1 phase에 synchronization 된다고 한다<sup>18,19)</sup>.

Katano등<sup>8)</sup>은 소아 백혈병에서 Ara-C 사용후 S phase가 감소함을 보고하였다. Tobey등<sup>17)</sup>도 CHO 세포주에 hydroxyurea와 Ara-C를 적용시켰을 때 세포들이 G1과 S phase의 경계에 속하게 되고 bleomycin을 적용하였을 때는 G2 phase에 모이게 되는 것을 보고하였다. 실험 결과에서 adriamycin 사용후 S phase가 늘어나는 것은 세포가 약제에 의하여 S phase에 synchronization 되었을 가능성이 큰 것으로 생각된다. Mortensen등<sup>20)</sup>은 promyelocytic leukemia 세포주인 HL60에서 thymidine 처리

후 S phase에 synchronization 된다고 하였다. KPH1 세포주에서도 세포 주기를 고정한 후에 약제 처리하는 것이 약제에 의한 세포 주기 변화를 보는 데 더 도움이 될 것으로 생각된다.

## 결 론

Hepatoblastoma 세포주인 KPH1을 이용하여 수종의 항암제에 대한 세포생존율, 감수성 검사 및 세포 주기검사를 시행하였다. KPH1 세포는 약제의 농도가 증가함에 따라 그리고 시간이 지남에 따라 생존율이 감소하였고, adriamycin, vincristine, VP-16, 6-TG에 감수성이 높았다. 이와같이 임상에 사용하는 약제와 항암제 감수성이 일치하므로 KPH1 세포주를 hepatoblastoma의 항암제 연구 모델로 이용 가능하리라 생각되며 향후 hepatoblastoma의 치료 약제에 adriamycin과 vincristine을 근간으로 하여 VP-16과 6-TG도 이용가능할 것으로 생각되나 실제 환자에서의 연구와 항암제 내성 유전자와 병합된 연구가 필요할 것으로 생각된다. 세포의 주기는 adriamycin에 노출후 S phase가 증가되는 효과를 보였으나 세포를 동일주기화(synchronization) 한후 약제에 노출하여 비교하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Pizzo PA, Poplack DG: *Principles and practice of pediatric oncology*. 2nd ed. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1993, p 697-711
- 2) Kaspers GJL: *Drug resistance in newly diagnosed childhood leukemia a prospective in vitro study*. Thesis, Free University, Amsterdam, The Netherlands, 1993
- 3) Kim HS, Kang CM, Chun HJ: *Morphologic and cytogenetic characteristics of a hepatoblastoma cell line(KPH)*. *Proceeding ASCO*, 1993, 1459
- 4) 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: 1. Primary response*. *J Immunol* 109: 749-753, 1972
- 5) 박정규, 임동균, 국윤호 등: 인형 암세포주에 대한 Doxorubicin의 *in vitro* chemosensitivity에 관한 연구. *대한암학회지* 22: 61-65, 1990
- 6) Mosmann T: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983
- 7) Twentymann PR, Fox NE, Rees JKH: *Chemosensitivity testing of fresh leukemia cells using the MTT colorimetric assay*. *Br J Hematol* 71: 19-24, 1989
- 8) Katano N, Tsurusawa M, Niwa M, et al: *Flow cytometric determination with Bromodeoxyuridine/DNA assay of sensitivity of S phase cells to Cytosine arabinoside in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 11: 411-416, 1989
- 9) Wright JC, Plummer-Cobb J, Gumport S, et al: *Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer*. *N Engl J Med* 257: 1207-1211, 1957
- 10) Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA: *Mouse myeloma tumor stem cells. A primary cell culture assay*. *J Natl Cancer Inst* 46: 411-422, 1971
- 11) Matsushima Y, Kanzawa F, Hoshi A, et al: *Time-schedule dependency of the inhibiting activity of various anticancer drugs in the clonogenic assay*. *Cancer Chemother Pharmacol* 14: 104-107, 1985
- 12) Bird MC, Bosanquet AG, Forskitt S, et al: *Semimicro adaptation of a 4-day differential staining cytotoxicity (Disc) assay for determining the in vitro chemosensitivity of hematological malignancies*. *Leukemia Research* 10: 445-449, 1986
- 13) Menke-Mollers I, Berthold F: *In vitro sensitivity of human neuroblastoma cells to antineoplastic drugs*. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 15(Suppl.

- A): 47-53, 1993
- 14) Pieter R, Kaspers GJL, Klumper E, et al: *Clinical Relevance of in vitro drug resistance testing in childhood acute lymphoblastic leukemia: The state of the art. Med Ped Oncol* 22: 299-308, 1994
- 15) Rothenberg M, Ling V: *Multidrug resistance: Molecular biology and clinical relevance. J Natl Cancer Inst* 81: 907-913, 1989
- 16) 이경영, 박재갑, 아디 가르다 등: 인체 암세포주의 MDR<sub>1</sub> 유전자 발현도와 항암제 감수성에 관한 연구. *대한암학회지* 1: 37-47, 1990
- 17) Tobey RA, Crissman HA: *Use of flow micro-fluorometry in detailed analysis of effects of chemical agents on cell cycle progression. Cancer Research* 32: 2726-2732, 1972
- 18) Fantes P, Brooks R: *The cell cycle. 1st ed. Oxford IRL Press, 1993 p 1-24*
- 19) Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, et al: *Synchronization of tumor and normal cells from G<sub>1</sub> to multiple cell cycles by lovastatin. Cancer Research* 51: 3602-3609, 1991
- 20) Mortensen BT, Hartmann NR, Christensen IJ, et al: *Synchronization of the human promyelocytic cell line HL 60 by thymidine. Cell Tissue Kinet* 19: 351-364, 1986
-