

항암제 내성 위암 세포주 SNU-1의 내성생성기전에 관한 연구

영남대학교 의과대학 생화학교실
김정희 · 강미화 · 김재룡

서 론

암의 치료로는 크게 수술적 방법에 의한 적출, 항암제에 의한 화학요법, 방사선치료 및 면역학적 치료법 등을 들 수 있다. 그중에서도 항암제에 의한 치료가 가장 기대할 수 있는 방법중의 하나이다. 항암제의 치료에 있어 약제내성 형성이 큰 문제가 되고 있으며 항암제에 약제 내성이 생긴 암의 치료를 해결하기 위해 많은 연구자들이 연구를 하고 있다. 1982년 Tsuruo¹⁾은 P388 mouse leukemia cell로 adriamycin과 vincristine의 세포내 증가 시의 약제내성 연구와 그들의 해결을 위하여 verapamil 같은 calcium antagonist의 사용등에 관한 연구를 하였으며^{2,3)}, Cano와 Riordan (1987)⁴⁾이나 Nogae (1987)⁵⁾도 실험실에서 동물 암세포 배양으로 이와 비슷한 연구를 하였다. 한 약제에 대해서 내성을 가지게 되면 구조와 작용기전이 다른 여러 약제에 대해서도 내성을 가지게 되며 이를 복합내성이라 한다^{6,7)}. 내성 생성 기전은 내성세포는 감수성세포에 비해 세포내로 들어온 항암제를 세포밖으로 많이 배출시키므로서 일어난다고 하였다⁸⁻¹⁰⁾. 결국 항암제가 세포내로 들어오거나 하고 하는 과정은 세포막의 P-glycoprotein의 과량생성이 원인이라는 보고들^{11,12)}도

있다. P-glycoprotein은 분자량이 170,000 정도이며 약제내성으로 나타나는 중요한 특징으로 세포막 P-glycoprotein의 증식과 그에 대한 연구를 위하여 1986년 Hamada와 Tsuruo¹³⁾은 난소 암세포의 내성세포에 대한 monoclonal antibody를 만들어서 단백질의 성질이나 특성들을 연구 보고 하였으며 다른 연구자들은 P-glycoprotein은 분자량이 170-180KDa에 걸쳐 있으며 내성 암세포의 약의 이동 기전이나 증식에 직접 혹은 간접으로 영향을 미친다고 보고하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾

아울러 유전자를 살펴보면 내성세포의 염색체들은 double minute chromosome(DMs) 또는 homogeneously staining region(HSR)이 나타나는데 이는 특정 유전자의 증폭을 의미한다.^{17,18)} 그러나 암세포 종류마다 이러한 염색체의 양상이 나타나는 정도가 다르며 이들 유전자가 나타나는 단백질이나 기전들은 잘 알려지지 않고 있다. 현재 많은 동물 암세포들의 복합내성 연구에서 유전자의 변화를 관찰하였고 약제내성에 관계되는 유전자로 *mdr1* gene을 보고하고 있다.^{19,20)} 본 연구는 한국인에서 흔한 위암 세포주 SNU-1을 이용하여 *in vitro* system을 통해 각종 항암제의 내성 생성을 유발하고 내성이 생긴 세포에서 각종 항암제의 감수성과 내성 생성 정도 및 그 기전의 일부를 연구 보고 하는 바이다.

이 논문은 '89년도 문교부 학술 연구비'에 의한 논문임

실험재료 및 방법

실험재료 : 본 실험에 사용한 stomach cancer cell line 인 SNU-1 세포주는 서울의대 박재갑 교수로부터 분양 받았으며, MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide : Thiazoly blue), colcemid, trypsin(1 : 250), DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma사, RPMI 1640은 Gibco, Iron supplemented bovine serum은 Hyclone사 제품을 사용하였으며 항암제로서 adriamycin, vincristine, 5-fluorouracil, cisplatin, etoposide, cyclophosphamide, dactinomycin, daunorubicin, aclarubicin, epirubicin, vinblastine, methotrexate는 미국 제약회사에서 판매되는 제품을 사용하였다.

세포의 배양 및 항암제 내성 세포 유도 : SNU-1은 10% iron supplemented bovine serum과 50 μ g/ml의 gentamicin이 첨가된 RPMI 1640을 배양액으로 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂incubator에서 3-4일 간격으로 배양액을 교환하였다. 항암제 내성세포의 유도를 위해 96well plates에 5 \times 10⁵/ml의 세포를 0.2ml씩 넣고, adriamycin을 1 \times 10⁻⁹M, 1 \times 10⁻⁸M, 1 \times 10⁻⁷M, 1 \times 10⁻⁶M의 농도로 상승하였다. 3일 간격으로 항암제가 든 배양액을 교환한 뒤 최대의 항암제 농도에서 자라는 세포를 24well plates로 옮기고 다시 25cm² 세포배양용기로 옮겨 항암제가 포함된 배양액에서 계속 배양하였다. Adriamycin 농도 1 \times 10⁻⁷M에서 내성이 생긴 세포를 SNU-1/ADR이라고 하였으며 내성생성 기간은 약 6개월 정도 소요되었다.

세포, 성장 곡선 및 doubling time의 측정 : SNU-1과 SNU-1/ADR을 2000rpm에서 5분간 원심분리하여 모은 후 이를 4 $^{\circ}$ C로 냉각한 PBS 용액(0.2g KCl, 0.2g KH₂PO₄, 8.0g NaCl 1.144g Na₂HPO₄/l)으로 2번 세척후 각각 5 \times

10³, 1.5 \times 10⁴, 2.5 \times 10⁴, 5 \times 10⁴ cells/ml로 희석하여 96well plates에 well 당 0.2ml씩 분주하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 매일 같은 시간에 MTT assay를 시행하여 흡광도 값으로 성장 곡선을 구하였고 cell doubling time을 다음 식에서 구하였다²¹⁾.
doubling time = 96시간 / (log₂[Abs at 96hr] - log₂[Abs at 0 time])

Abs : Absorbance value

MTT assay : MTT를 PBS용액에 2mg/ml 농도로 녹이고 0.45 μ m filter로 여과하였다. 96 well plates에 4일간 키운 세포 well당 0.2ml가 든 세포 용액에 MTT를 50 μ l 씩 넣고 4시간 후 220 μ l의 상층액을 제거하고 DMSO를 250 μ l 첨가하여 형성된 MTT formazan을 녹였다.

Gilford 2600 spectrophotometer를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항암제 내성 확인과 다른 항암제와의 내성 비교 : SNU-1과 SNU-1/ADR을 PBS용액에서 3번 세척 후 RPMI 1640에 희석하여 96 well plates에 well당(200 μ l) 각각 5000cells, 7500 cells가 되게 분주하였다. 항암제를 0.15M NaCl에 녹인 후 각각을 농도별로 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 4일 배양한 후 MTT assay를 시행하여 흡광도를 측정하였다.

대조군으로는 동일 plate 의 well에 세포를 분지 후 약제를 첨가하지 않고 MTT assay를 시행하였으며 약제 농도에 따른 세포 생존 정도는 대조군의 흡광도와 비교하여 % control로 나타내었다. 각 세포들의 항암제에 대한 내성정도는 흡광도가 50% 감소되는 농도(IC₅₀)를 비교하여 결정하였다¹⁷⁾.

염색체 검사 : SNU-1, SNU-1/ADR을 mid log phase로 배양한 후 colcemid를 80 ng/ml되게 첨가하고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포를 15ml 원심분리관에 모은 후 PBS 용액으로 3번 세척하였다. 37 $^{\circ}$ C의 75mM KCl 5ml를 넣고 37 $^{\circ}$ C항온

수조에서 15분간 배양하였다. 2000rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 -20°C 고정액(methanol:acetic acid=3:1)을 5ml씩 첨가하였고 다시 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 고정과정을 5번 반복하고 세포를 0.2ml의 고정액에 분산시킨 후 -20°C , 70% ethanol속에서 담구어둔 glass slide위에 떨어뜨려 말린 후 Giemsa 염색으로 염색체를 확인하였다²³⁾. 염색체의 관찰은 Olympus BH-2 광학 현미경으로 배율 1000 \times 에서 관찰 후 사진 촬영하였다.

성 적

사람의 위암 세포주 SNU-1에 대한 세포의 내성 생성은 adriamycin(ADR)의 농도 10^{-8}M

에서 시작하여 10^{-7}M 에까지 상승시켜 내성 세포주를 만들었고 내성 세포주는 SNU-1/ADR로 표기하였으며 각각의 세포에 대해 성장 곡선을 도.1로 나타내었다. SNU-1 세포는 각 세포의 농도에 따라 MTT assay에서 2일이 지난 후 자라기 시작하여 5-6일 사이 가장 잘 성장 하였다. 6일 이후에는 성장 속도가 약간 늦어지는 성향을 보이며, SNU-1/ADR 세포는 2.5×10^4 cell/ml 농도 이상에서 성장 속도가 상승하였다. 각 세포에 대해 96시간 동안의 성장시의 MTT assay로 doubling 수를 계산하여 표. 1에 나타내었다. SNU-1 세포는 doubling 시간이 평균 27.2 시간이었고 doubling 수는 평균 3.56이었다. SNU-1/ADR은 평균 doubling 시간이 52.2 시간이었고 doubling 수는 1.85 이었다. 도. 1과 표. 1의 도표를 종합

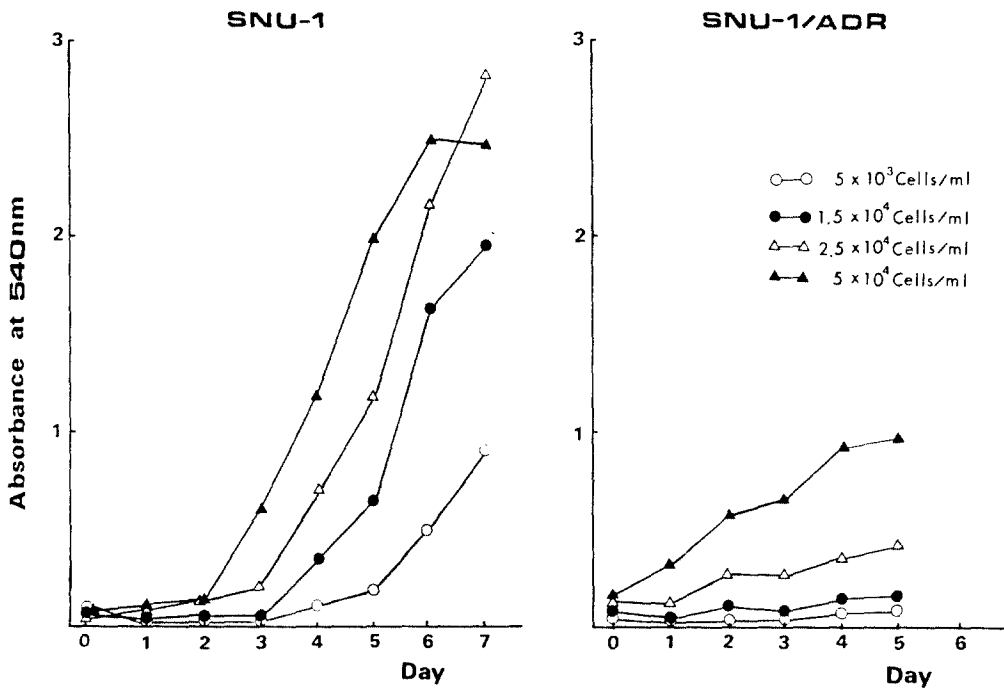


Fig. 1. Growth profile of SNU-1 and SNU-1/ADR by MTT assay. The mark on the curve is represented the number of starting cell, 5×10^3 cells/ml (○-○), 1.5×10^4 cells/ml (●-●), 2.5×10^4 cells/ml (△-△), 5×10^4 cells/ml (▲-▲), in culture

Table 1. Doubling time and doubling number of SNU-1 and SNU-1/ADR within 96 hrs.

Number of Cell (per ml)	SNU-1		SNU-1/ADR	
	Doubling time	Doubling number	Doubling time	Doubling number
5×10^3	29.5	3.25	—	—
1.5×10^4	23.9	4.02	55.4	1.73
2.5×10^4	29.5	3.25	45.3	2.12
5×10^4	25.8	3.72	56.0	1.71

Doubling time(hr) = $96 / (\log_2 \text{Absorbance after 96 hrs} - \log_2 \text{Absorbance at 0 time})$

Doubling number = $96 / \text{doubling time}$

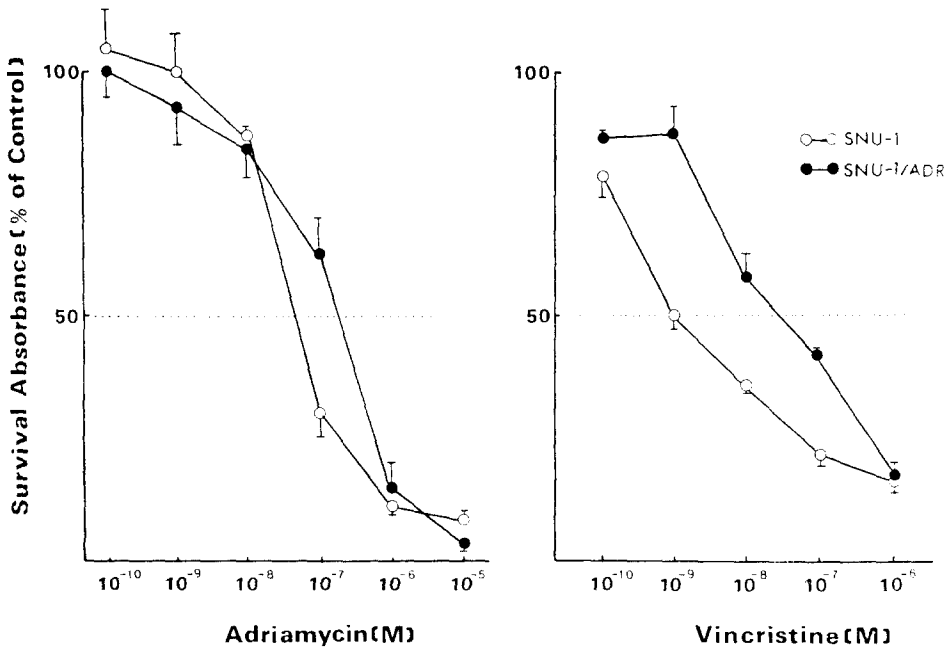


Fig. 2. Survival curve about drug sensitivity of adriamycin and vincristine in SNU-1 (○-○) and SNU-1/ADR (●-●) cells. The survival of cells are represented fractional absorbance about % of control by MTT assay, and compared with drug concentration of 50% reduction (IC_{50}).

하여 각 내성 검사 시의 assay 당 세포수를 SNU-1은 2.5×10^4 cell/ml로, SNU-1/ADR은 3.5×10^4 cell/ml로 정하였다.

위암 세포와 Adriamycin 내성 세포의 항암제의 감수성 검사는 생존 세포의 효소를 측정하여 나타내었으며 항암제 농도에 따라 생존 세포의 정도를 대조군과 비교하여 %로 나타

내었으며 생존율 50%에서의 약제 농도(IC_{50})를 서로 비교하였다.

도. 2에서 adriamycin, vincristine, 도. 3에서 dactinomycin, daunorubicin, etoposide, epirubicin 등의 약제에 대한 생존세포의 IC_{50} 값은 SNU-1보다 SNU-1/ADR인 세포가 더욱 높은 약제 농도에서 내성을 보이고 있다

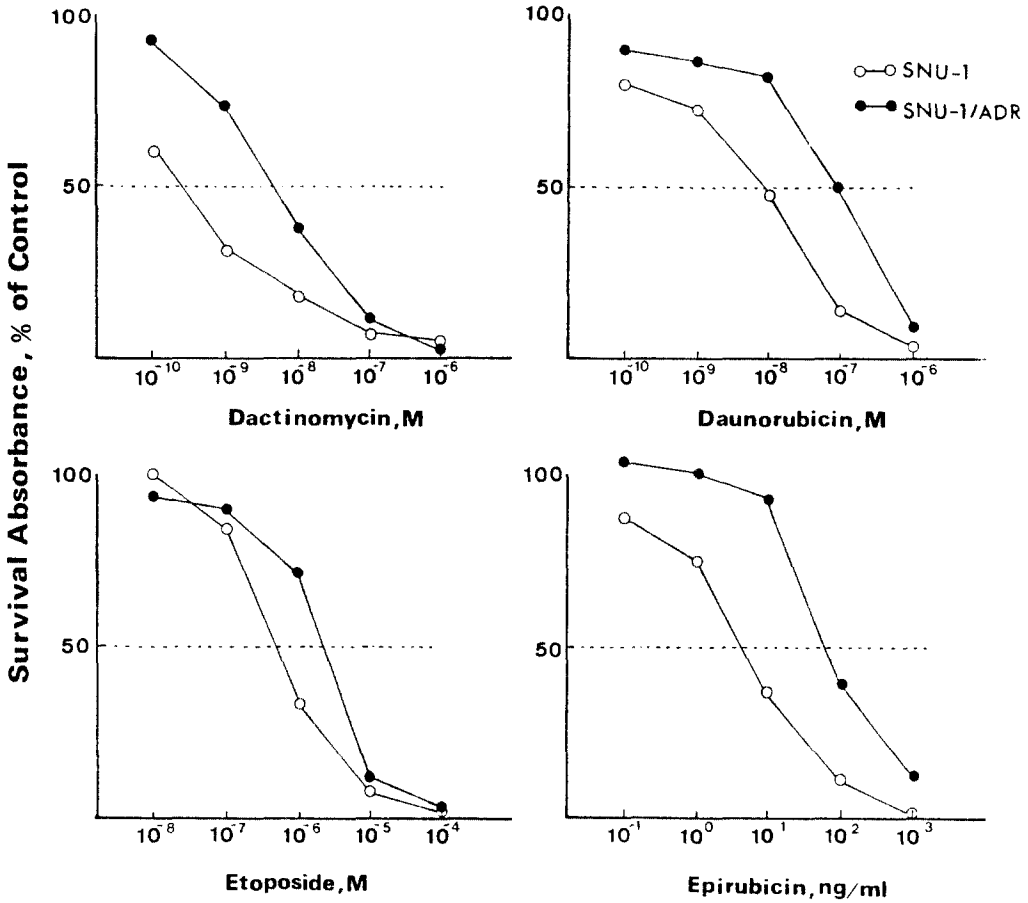


Fig. 3. Survival curve about drug sensitivity of dactinomycin, daunorubicin, etoposide, and epirubicin in SNU-1 (○-○) and SNU-1/ADR (●-●) cells. The number of starting cells are 2.5×10^4 cells/ml.

각 약제들에 대한 이들의 IC_{50} 값을 비교하여 relative resistance(RR)를 구한 것을 표. 2에 열거하였으며 RR는 adriamycin이 7.76인데 비해 vincristine 29.5, etoposide 4.46, dactinomycin 21.37, daunorubicin 14.12, vinblastine 31.62 이상이며 epirubicin은 17.78로 나왔으며 5-fluorouracil, cisplatin, cyclophosphamide, vinblastine, methotrexate, aclaru-

bicin들의 RR는 아주 낮게 관찰되었다.

암세포와 내성 생성 세포간의 유전자의 차이를 염색체를 검사하여 두 세포의 chromosome을 도. 4에 나타내었다. A는 SNU-1 세포이고, B는 내성세포 SNU-1/ADR 세포의 염색체이며 B에는 A에서 나타나지 않는 새로운 유전자인 double minute chromosomes이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

Table 2. Cross resistance in various anticancer drugs in Adriamycin-resistant human stomach cancer SNU-1 cell.

Drugs	IC ₅₀		Relative resistance
	SNU-1(M)	SNU-1/ADR(M)	
Adriamycin	2.14×10^{-8}	1.66×10^{-7}	7.76
Vincristine	1.00×10^{-9}	2.91×10^{-8}	29.50
5-Fluorouracil	3.98×10^{-6}	3.98×10^{-6}	1.00
Cisplatin	8.70×10^{-7}	5.01×10^{-7}	0.58
Etoposide	4.47×10^{-7}	2.00×10^{-6}	4.46
Cyclophosphamide	2.51×10^{-3}	2.51×10^{-3}	1.00
Dactinomycin	2.24×10^{-10}	4.79×10^{-9}	21.37
Daunorubicin	7.08×10^{-9}	1.00×10^{-7}	14.12
Vinblastine	1.0×10^{-11}	3.16×10^{-10}	>31.62
Methotrexate	3.16×10^{-8}	3.16×10^{-8}	1.00
Epirubicin	3.98ng/ml	70.79ng/ml	17.78
Aclarubicin	1.41ng/ml	2.63ng/ml	1.86

IC₅₀: Drug concentration of 50% reduction in absorbance.

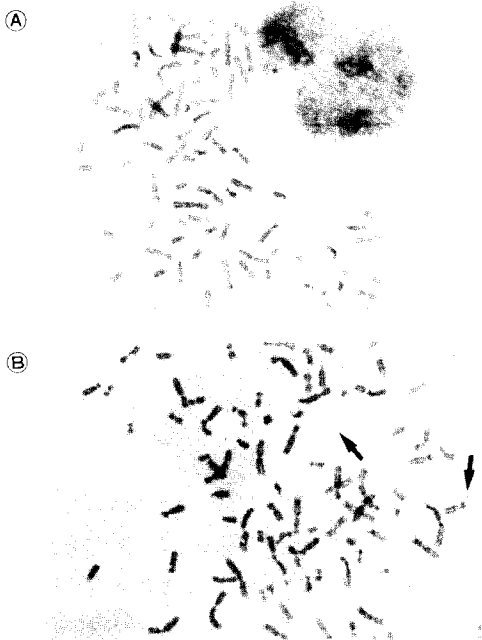


Fig. 4. Representative metaphase spread of SNU-1(A) and SNU-1/ADR(B). The arrows indicate the double minute chromosomes(DMs) that are appeared in SNU-1/ADR cell only.

고 찰

복합 약제내성 세포란 한 약제에 대해 약제 내성이 생겼을때 작용기전이 다른 약제에 대해서도 내성을 가지는 것을 의미하며 최근 항암 화학요법에서 이러한 내성이 악성종양 환자의 치료에 커다란 장애요인으로 인식되고 있다^{7,8,24}. 항암제 내성은 *in vitro* model system에서 관찰되어 왔으며 세포막의 glycoprotein의 변화가 암세포내의 약의 축적을 감소시키는 특징으로 알려져 있으며 최근 P-glycoprotein expression에 대한 molecular biology 쪽으로 많이 연구되고 있으나^{25,26} 아직 정확한 기전은 잘 모른다.

본 연구는 이러한 항암제 약제내성 생성기전과 특성을 관찰하기 위한 연구로 한국인의 위암에서 분리한 위암세포로 ATCC에 등록된 세포주를 사용하였으며 adriamycin에 내성세포주를 얻었다. 이는 adriamycin 농도 10^{-8} M

에서 시작하여 $10^{-7}M$ 에 해당하는 내성세포 SNU-1/ADR을 얻었다. 세포의 생존도를 측정하기 위한 방법으로는 세포 생존을 trypan blue 염색으로 현미경에서 직접 관찰하는 방법, 생존 세포의 mitochondrial dehydrogenase 효소를 측정하여 흡광도를 측정하는 MTT assay법²⁰⁾, agar plate에 세포를 배양하여 colono-genic assay로 colony를 측정하는 법 등이 있으나 여기서는 MTT assay를 위하여 암세포와 내성세포에 대해 성장모양과 일정시간 내의 세포수를 변화시켜 doubling time과 doubling number를 계산하고 도. 1의 성장곡선에서 4일 간의 성장까지를 정하였고 표. 1에 선 그 기간내의 doubling time과 doubling number에서 SNU-1은 2.5×10^4 cells/ml 농도로 정하였고 SNU-1/ADR 세포는 MTT에 대한 약제 감수성이 낮아 성장속도가 느리며 7.5×10^4 cells/ml 농도로 시작하였다. Adriamycin 약제내성인 위암세포와 다른 항암제에 대한 상호교차 내성을 관찰하기 위하여 내성 아닌 위암세포의 약제에 대한 감수성 검사를 하여 상호간의 내성 정도를 검사하여 도. 2, 도. 3 및 표. 2에 도시하였으며 도. 2의 adriamycin 감수성에선 내성 생긴 약제가 훨씬 높은 농도에 까지 생존되었고 50% 생존에서 IC_{50} 차와 비교하여 relative resistance(RR)는 7.76 이었고 Vincristine에 대한 RR는 29.5 였다. 그러나 처음 약제 내성 세포를 만들기 위하여 vincristine 등을 동시에 배양했으나 SNU-1의 vincristine 내성은 잘 생기지 않았으나, adriamycin 내성 생성시에는 vincristine 에 대하여 쉽게 교차내성이 생긴 것을 관찰할 수 있었다. 이는 etoposide, dactinomycin, daunorubicin 및 epirubicin 역시 교차내성이 많이 생긴 약제에 속하며 vinblastine은 SNU-1 대해선 $10^{-11}M$ 이하의 아주 낮은 농도에서도 IC_{50} 이 관찰되지 않았으나 SNU-1/ADR 예선 $3.16 \times 10^{-10}M$ 에서도 쉽게 IC_{50} 를 관찰한 것은 역시

교차내성의 확인을 가능케 하였다. 그러나 그 외의 5-fluorouracil, cisplatin, cyclophosphamide, methotrexate, aclarubicin등에 대해선 거의 변화를 관찰할 수 없었다. 그러므로 이러한 항암제의 교차내성 혹은 복합내성 생성은 암세포의 종류나 개체에 따라 다양할 뿐 아니라 약제의 종류에 따라 다를 수 있으므로 임상에서 항암제의 선별에 많은 주의를 요할 것으로 생각된다. 유전자의 이상증식으로 정상 암세포에서 없는 double minute chromosome (DMs)이나 homogenous staining regions (HSR)을 들 수 있으며 1986년 Tsuruo등⁷⁾은 adriamycin 내성 생성된 사람의 myelogenous leukemia K562에서 세포막 P-glycoprotein의 분석과 함께 cytogenic analysis 에서 DMs와 HSR을 확인 보고하였다. 그 외에도 Gros등은 multidrug resistant chinese hamster cell 에서 역시 DMs 유전자를 확인 보고 하였다. 본 연구에서도 drug resistant SNU-1/ADR 세포에서는 DMs를 확인 할 수 있었다. 그래서 이러한 내성 암세포는 내성이 생기지 않는 세포의 유전자와 다르다는 것을 알 수 있었고, 앞으로 karyotyping 후 banding technique를 이용하여 유전인자의 변화를 더 세밀히 연구해야겠으며, 세포막의 glycoprotein의 변화외에도 약제내성 세포 생성시의 대사 기전에 대한 문제를 해결하는 것이 앞으로의 과제로 남아있다.

요 약

암의 화학요법에 있어서 내성생성으로 인한 치료의 장애가 암 치료 실패의 중요 원인이 되며, 본 연구는 암세포의 항암제에 대한 내성 생성에 대한 특성을 연구 보고하였다. 사람의 위암세포주 SNU-1 에 대한 내성 유발을 위하여 세포배양액에 adriamycin(ADR) 농도를 $10^{-8}M$ 에서 $10^{-7}M$ 에 까지 적용시켜 내성세포

주를 얻어 SUN-1/ADR로 나타내었으며 세포 성장은 SUN-1에서는 2일 부터 6일까지 서서히 상승하였고 SNU-1/ADR은 5×10^3 cells/ml 농도 이상에서 상승을 보였다. 각 세포의 doubling 시간과 doubling 수를 비교하였으며 SNU-1은 doubling 시간이 평균 27.2 시간 doubling 수가 3.56번이었으며, SNU-1/ADR은 52.2 시간 1.85번으로 내성세포가 더욱 성장이 왕성한 것을 관찰할 수 있다. MTT assay를 위하여 4일 간의 성장으로 세포의 적절한 생존도를 관찰하였다. SNU-1과 내성세포주 SNU-1/ADR을 각 항암제에 대한 약제 감수성 검사를 실시하였으며 약제농도 50%에서 생존도(IC₅₀)를 비교하여 상관내성도(relative resistance: RR)를 측정하였으며 vinblastine이 31.62이상으로 가장 높고, vincristine이 29.5, dactinomycin 21.37, epirubicin 17.78, daunorubicin 14.12였고, adriamycin 7.76이었으며 etoposide 4.46이었다. 그 외의 약제 5-fluorouracil, cisplatin, cyclophosphamide, methotrexate, aclarubicin은 감수성이 낮았다. 위의 결과로 RR가 높은 약제들에 대해서는 multidrug resistance(복합내성)의 존재를 의미한다고 할 수 있으며 내성생성 SNU-1/ADR 세포주의 염색체의 검사에서 double minute chromosome(DMs)을 확인함으로써 내성 생성 세포를 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. : Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.*, 42 : 4730-4733, 1982.
2. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. : High calcium content of pleiotropic drug-resistant P388 and K562 leukemia and chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, 44 : 5095-5099, 1984.
3. Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. : Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41 : 1967-1972, 1981.
4. Cano-Gauci, D.F. and Riordan, J.R. : Action of calcium antagonists on multidrug-resistant cells. *Biochem. Pharmacol.*, 36 : 2115-2125, 1987.
5. Nogae, I., Kikuch, J., Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Shiraishi, N. and Kuwano, M. : Potentiation of vincristine by vitamin against drug-resistant mouse leukemia cells. *Br. J. Cancer*, 56 : 267-272, 1987.
6. Fojo, A., Hamilton, T.C., Young, R.C. and Ozols, R.F. : Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer*, 60 : 2075-2080, 1987.
7. Tsuruo, T., Iida-Satio, H., Kawabata, H., Oh-hara, T., Hamada, H. and Utakoji, T. : Characteristics of resistance to adriamycin in human myelogenous leukemia K562 resistant to adriamycin and in isolated clones. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 77 : 682-692, 1986.
8. Allavena, P., Grandi, M., D'Incalci, M., Geri, O., Giuiani, F.C. and Mantovani, A. : Human tumor cell lines with pleiotropic drug resistance are efficiently killed by interleukin-2 activated killer cells and by activated monocytes. *Int. J. Cancer*, 40 : 104-107, 1987.

9. Ma, D.D.F., Davey, S.M., Dowden, G., Harman, D.H., Isbister, J.P., Scurr, R.D., Mackertich, S.M. and Bell, D.R. : Detection of a multidrug resistant phenotype in acute nonlymphoblastic leukemia. *Lancet*, 17 : 135-137, 1987.
10. Sen, S., Teester, L.D. and Kuo, T. : Specific gene amplification associated with consistent chromosomal abnormality in independently established multidrug resistant chinese hamster ovary cells. *Chromosoma(Berl)*, 95 : 117-125, 1987.
11. Cornwell, M.M., Tsuruo, T., Gottesman, M.M. and Pastan, I. : ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *FASEB*, 0892-6638 : 51-54, 1987.
12. Safa, A.R., Glover, C.J., Sewell J.L., Meyers, M.B., Biedler, J.L. and Felsted, R.L. : Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.*, 262 : 7884-7888, 1987.
13. Hamasa, H. and Tsuruo, T. : Functional role for the 170- to 180-KDa glycoprotein specific to drug resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82 : 7785-7789, 1986.
14. Danks, M.K., Matzger, D.W., Ashmun, R. A. and Beck, W.T. : Monoclonal antibodies to glycoproteins of vinca alkaloid-resistant human leukemic cells. *Cancer Res.*, 45 : 3220-3224, 1985.
15. Cornwell, M.M., Safa, A.R., Felsted, R.L., Gottesman, M.M. and Pastan, I. : Membrane vesicles from multidrug resistant human cancer cells contain a specific 150- to 170-KDa protein detected by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83 : 3847-3850, 1986.
16. Riordan, J.R. : Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.*, 254 : 12701-12705, 1979.
17. Gros, P., Neriah, Y.B., Croop, J.M. and Housman, D.E. : Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 323 : 728-731, 1986.
18. Erikson, J.M., Tweedie, D.J., Ducore, J.M. and Prough, R.A. : Cytotoxicity and DNA damage caused by the azoxy metabolites of procarbazine in L1210 tumor cells. *Cancer Res.*, 49 : 127-133, 1989.
19. Ito, Y., Tanimoto, M., Kumazawa, T., Okumura, M., Morishima, Y., Ohno, R. and Saito, H. : Increased P-glycoprotein expression and multidrug resistant gene (mdr1) amplification are infrequently found in fresh acute leukemia cells. *Cancer*, 63 : 1534-1538, 1989.
20. Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M. M. and Pastan, I. : Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 3004-3008, 1987.
21. Carmichael, J. D., Degraff, W.G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47 : 936-942, 1987.
22. Ko, M. W. : A study for the chemosensi-

- vity testing of gynecological malignant cell lines using MTT assay. PhD thesis, 1-47, 1987.
23. Burholt, D. R., Shackney, S. E., Ketlerer, D. M., Pollice, A. A., Smith, C. A., Brown, K. A., Giles H. R., and Schepart, B. S. : Karyotyping evolution of a human undifferentiated large cell carcinoma of the lung in tissue culture. *Cancer Res.*, 49 : 3355-3361, 1989.
 24. Riordin, J. R. : Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.*, 254 : 12701-12705, 1979.
 25. Zamora, J. M., and Beck, W. T. : Chloroquine enhancement of anticancer drug cytotoxicity in multidrug resistant human leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.* 35 : 4303-4310, 1986.
 26. Martinsson, T. and Levan, G. : Localization of the *mdr*-associated 170 kDa P-glycoprotein gene to mouse chromosome 5 and to homogeneously staining regions in *mdr* mouse cells by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 45 : 99-101, 1987.
 27. Gerlach, J. H., Endicott, J. A., Juranka, P. F., Henderson, G., Sarangi, F., Deuchars, K. L. and Ling, V. : Homology between P-glycoprotein and a bacterial hemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, 324 : 458-489, 1986.
 28. Hamburger, A. W., Salmon, S. E., Kim, M. B., Trent, J. M., Soehnlen, B. J., Alberts, D. S., and Schmidt, H. J. : Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. *Cancer Res.*, 38 : 3488-3444, 1978.

-Abstract-

Study for Metabolism of Resistant Production in Anticancer drug Resistant Stomach Cancer Cell SNU-1

Jung Hye Kim, Mi Wha Kang and Jae Ryong Kim

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

Development of drug resistance in tumors during treatment is a major factor limiting the clinical use of anticancer agents. When tumor cells acquire resistance to anticancer drug, they show cross-resistance to other antitumor agents.

In the present study, SNU-1 cell was induced adriamycin 10^{-7} M drug resistance, SNU-1/ADR, in vitro culture system. We got the doubling time and number for viability test during 96 hours by MTT assay. To investigate the cross resistance of various anticancer drugs in human stomach cancer cell SNU-1 and SNU-1/ADR, We compared IC_{50} (drug concentration of 50% reduction) and the relative resistance (RR). SNU-1/ADR was expressed multidrug resistant with vinblastine (RR: >31.62), vincristine (RR: 29.50), dactinomycin (RR: 21.37), epirubicin (RR: 17.78), daunorubicin (RR: 14.12), adriamycin (RR: 7.76), and etoposide (RR: 4.46), and other drugs, 5-fluorouracil, cisplatin, cyclophosphamide, methotrexate, and aclarubicin, have not cross resistant with adriamycin.

There was double minute chromosome in SNU-1/ADR by karyotyping although this change was not seen in SNU-1.