

## Cholecystokinin 길항제인 L-364,718이 시험관내 췌장암세포 성장에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 약리학교실\* 및 소화기병연구소

송시영 · 정재복 · 강진경 · 박인서 · 김경환\*

= Abstract =

### Effect of Cholecystokinin Receptor Antagonist, L-364,718 on the Growth of Human Pancreatic Carcinoma Cells Cultured in Vitro

Si Young Song, M.D., Jae Bock Chung, M.D., Jin Kyung Kang, M.D.,  
In Suh Park, M.D. and Kyung Hwan Kim, M.D.\*

*Department of Internal Medicine and Pharmacology,\* Institute of Gastroenterology,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background/Aims:** It has been reported that some gastrointestinal regulatory peptides including cholecystokinin(CCK) may act as growth modulators of pancreatic cancer and CCK antagonists have antitumor effect. However, there have been still debates on the role of CCK antagonists. This study was done to answer the questions: "Does L-364,718 inhibit the growth of cultured pancreatic cancer cells?", "What is the growth inhibitory mechanism and is it cell-cycle specific?", and finally, "Does the combination with L-364,718 and 5-fluorouracil(5-FU) have a synergistic effect on the growth inhibition?" **Methods:** Using Panc-1 and Capan-2 cells, the effects of caerulein, L-364,718 and 5-FU were evaluated, respectively and combined effect of L-364,718 and 5-FU measured. To evaluate the effect of L-364,718 on DNA synthesis and cell cycles, [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake and flow cytometric analysis were performed. The in vitro cytotoxicity was measured by MTT assay and an isobologram model used to analyze the synergism. **Results:** The both cells, especially Capan-2 cells, grew faster in a medium of CCK supplementation. Dose-dependent growth inhibition of both cells was noted by L-364,718. The IC<sub>50</sub> of Panc-1 and Capan-2 cells were 2.43x10<sup>-5</sup> M/L and 3.25x10<sup>-5</sup> M/L, respectively. The IC<sub>50</sub> of 5-FU on Panc-1 and Capan-2 cells were 13.83 µg/ml and 2.19 µg/ml, respectively. [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake of both cells decreased dose-dependently by L-364,718. The proportion of S phase cells decreased and that of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>

접수: 1996년 8월 20일, 승인: 1996년 11월 4일

연락처 : 송시영, 서울특별시 서대문구 신촌동, 신촌세브란스병원 내과  
본 논문은 1993년도 연세대학교 의과대학 교수연구비 보조로 이루어졌음

361-5114

phase cells increased dose-dependently by L-364,718. When L-364,718 was combined with 5-FU, a synergistic effect was observed in 62.5% in Capan-2 cells, however 14.3% in Panc-1 cells. **Conclusions:** L-364,718 has a antitumor effect on pancreatic cancer cells cultured in vitro and its synergistic effect with certain anticancer agent can be expected. The antiproliferative effect of L-364,718 is considered as the inhibition of DNA synthesis, which cause the blockage of G0/G1 phase of cell cycle. (Korean J Gastroenterol 1996; 28:861-873)

**Key Words :** Pancreas cancer cells, Cholecystokinin receptor antagonist, L-364,718, Antitumor effect

## 서 론

서구에서 췌장암은 소화기암 중에서 대장암 다음으로 빈번히 발생하는 드물지 않은 악성종양이나 아직까지 우리나라에서는 드문 질환이다. 최근 일본에서는 그 발생빈도가 점차 증가하고 있으며, 국내에서도 점차 서구화되는 생활양상의 변화로 미루어 보아 이와 유사한 양상을 보일 것으로 생각된다.<sup>1,2</sup> 췌장암 환자의 대부분은 진단당시에 이미 암이 진행되어 근치적절제가 불가능하고, 근치적절제를 시행하더라도 5년 생존율이 5-10% 정도에 불과하여, 항암약물요법 등의 보존적치료에 의존하게 되는 경우가 대부분인 예후가 매우 불량한 악성종양이다.<sup>3</sup> 지금까지 췌장암의 항암약물요법에는 5-fluorouracil(이하 5-FU로 약함), adriamycin, mitomycin C, streptozotocin, vincristine, CCNU, tamoxifen, interferon 및 leucovorin 등의 다양한 약제가 사용되어 왔으나 그 반응율은 약 15% 정도에 불과하여 생존율을 높이기 위한 새로운 약제 또는 새로운 병합요법의 개발이 요망된다.<sup>4,7</sup>

췌장암의 원인은 아직 확실하지 않으나, 고칼로리식이 및 과도한 불포화지방산의 섭취와 밀접한 관련이 있는데, 이는 위장관 호르몬 중 특히 cholecystokinin(이하 CCK로 약함)의 분비 증가에 의해 췌장세포의 증식이 촉진되며 nitrosamine과 같은 발암물질에 대한 감수성을 증가시켜서 췌장암이 발생할 것으로 생각되고 있다.<sup>8-10</sup> 이미 실험적으로도 CCK가 췌장세포의 증식을 초래하며, 백서에서 bombesin 및 cerulein이 azaserine에 의한 암발생과정 중 초기단계를 촉진시키는 것으로 규명되었다.<sup>9,11-13</sup> 또한 시험관내 배양된 췌장암세포 및 nude mouse에 이식된 종양세포의 성장이 CCK

투여에 의해 촉진된다는 보고들은 CCK가 종양의 발생은 물론 이미 발생한 종양세포의 성장에도 필수적인 요소로 작용함을 시사한다.<sup>14-15</sup> 이는 췌장암의 성장억제를 위한 CCK 길항제의 역할을 기대케 하나 아직까지 그 효과는 확실하지 않다.<sup>16-18</sup>

저자 등은 췌장암 치료를 위한 보다 효과적인 새로운 약제를 규명하기 위한 일환으로, 시험관내 배양된 인체 췌장암 세포를 대상으로 CCK 길항제 중 가장 강력하며 기존의 proglumide보다 백만배 이상의 CCK 수용체에 대한 친화력을 갖고 있다고 알려진 L-364,718의 종양세포 성장 억제효과를 알아보고, 성장을 억제한다면 그 기전이 무엇인지를 규명하며, 췌장암에서 흔히 사용되는 항암제인 5-FU과 병합하여 사용하였을 경우 항암효과에 미치는 영향을 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

#### 가. 대상세포주 및 세포배양

인체 췌장암세포로 Capan-2(American Type Culture Collection, HTB 80) 및 Panc-1(American Type Culture Collection, CRL 1469)를 사용하였다. Capan-2 세포는 McCoy's 5a medium을, Panc-1 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(JR Scientific & Hazleton Biologic Inc., USA)을 기본배양액으로 하여 56°C에서 30분간 열처리한 10%의 우태아 혈청(fetal calf serum; Commonwealth Serum Laboratories, Australia)과 100 IU/ml의 penicillin 및 100 µg/ml의 streptomycin을 첨가한 배양액으로 25 cm<sup>2</sup> plastic flask(Coster, USA)에 넣어 5% CO<sub>2</sub>, 37°C

에서 배양하였다.

#### 나. 시험약제

CCK agonist로 cerulein(Sigma, U.S.A)을 이용하였다. Cerulein은 증류수에 용해시킨 후 0.22  $\mu\text{m}$  filter( $\mu$  Star, Costar, USA)에 통과시켜 멸균시킨 후 즉시 사용하였다. CCK 길항제로는 L-364,718을 사용하였으며, 사용하기 24시간 전에 멸균증류수에 용해한 후 0.22  $\mu\text{m}$  filter에 통과시킨 다음 냉장 보관하여 사용하였다. 항암제로는 5-FU(한국로슈)를 이용하였으며 냉장보관 후 멸균증류수에 용해하여 사용하였고, 모든 약제들은 우태아 혈청을 함유한 배양액으로 사용시 마다 연속 희석하여 실험하였다.

## 2. 방법

### 가. 세포생존율 검사

실험세포수의 결정 및 약제에 대한 생존율 판정을 위해 Carmichael 등<sup>19,20</sup> 이 제시한 방법에 준하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 검사를 시행하였다. 배양된 각 세포주의 culture flask에 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)(JR Scientific & Hazleton Biologic Inc., USA)를 처리하여 부착된 세포를 분리한 다음 10% 우태아 혈청을 함유한 배양액으로 3회 세척하여 단일세포 부유액을 만들었다. Trypan blue로 염색한 후 hemocytometer로 세포수를 계산한 다음 96 well microtiter plate(Costar, USA)의 각 well에 일정수의 세포를 배양액 180  $\mu\text{l}$ 에 생리식염수 20  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 한 후 일정기간 계속 배양하였다. 약제의 효과 판정을 위해서 세포를 넣은 다음날 여러 실험 농도의 약제를 생리식염수 20  $\mu\text{l}$ 에 녹여 첨가하여 well 당 200  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 후 일정기간 배양하였다. 생존율 검사시에는 96 well plate를 꺼내어 MTT(Sigma, USA) 용액(2 gm/ml)을 각 well에 50  $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 4시간 동안 배양한 다음, 450 g에서 5 분간 원심분리하여 바닥에 있는 formazan 결정이 제거되지 않도록 주의하면서 30  $\mu\text{l}$ 가 남을 때까지 상층의 배양액을 제거하였다. 100% dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma, USA) 용액을 각 well에 150  $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 formazan 결정이 용해될

때까지 약 10 분간 진탕한 다음 multiwell spectrophotometer(Berhinger ELISA Processor II, Germany)를 이용하여 540 nm의 파장에서 색소흡수율(absorbance, optical density)을 측정하였다. 생존율은 아래의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소흡수율} - \text{기준 색소흡수율}} \times 100$$

### 나. 실험세포수 결정

지수성장을 보이는 실험세포수를 구하기 위하여, 각 세포주를 96 well plate의 well 당  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$  및  $5 \times 10^4$  개의 세포를 넣어 배양하여 매일 한 plate 씩 MTT 검사를 시행하였다. 마지막 날 까지 지수적으로 색소흡수율이 증가하는 부분 중 색소흡수율이 세포수 색소흡수율 상관곡선의 직선부에서 가장 높은 조건이 되는 처음의 well당 세포수를 실험세포수로 하였다. Capan-2 및 Panc-1 세포주 모두 실험세포수는 well당  $10^4$ 개 이었다.

### 다. Cerulein이 세포 성장에 미치는 효과

Cerulein이 췌장암 세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 96 well plate의 8개의 column의 각 well에 각 세포주의 실험세포수를 배양액 180  $\mu\text{l}$ 에 섞어서 넣고 다양한 농도의 cerulein을 각각 2개의 column에 첨가하며, 나머지 4개의 column에는 cerulein을 첨가하지 않은 대조군을 만들었다. Capan-2 및 Panc-1 세포를 분주한 날로부터 7일 까지 매일 한 plate씩 MTT 검사를 시행하였으며 매 검사시 마다 검사당일의 대조군의 생존율을 100%기준으로 하여 cerulein의 각 농도에 따른 생존율을 계산하였다.

### 라. L-364,718의 세포성장 억제효과

매 96 well plate의 12 column 중 10 column의 각 well에 앞서 결정된 실험세포수의 Capan-2 및 Panc-1 세포를 배양액 180  $\mu\text{l}$ 와 섞어서 넣고 나머지 2 column에는 대조군을 만든 후 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. 다양한 농도의 L-364,718를 첨가하여 일정기간 동안 배양한 다음 MTT 검사를 시행하였으며 농도에 따른 색소흡수율을 측정하여 생존율

을 계산하였다. 가로축에는 CCK의 대수농도(log concentration)를 세로축에는 생존세포의 백분율을 표시하여 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선회귀(linear regression)를 시행하여 얻어진 공식에 의해 50% 성장억제농도(IC<sub>50</sub>)을 산출하였다.

#### 마. 5-FU의 세포성장 억제효과

96 well plate를 준비하여 매 plate의 12 column 중 10 column에 Capan-2 및 Panc-1 세포의 실험세포수를 180  $\mu$ l의 배양액에 섞어서 넣고 나머지 2 column에는 동일한 세포수를 넣은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것 및 세포를 넣지 않은 배양액 180  $\mu$ l와 생리식염수 20  $\mu$ l를 섞은 것의 두가지 대조군을 만든 후 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되게 하였다. 5-FU를 최종농도가 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 및 50  $\mu$ g/ml 되게 각 well에 첨가한 후 일정기간 동안 배양한 다음 MTT 검사를 시행하였다. 가로축에는 5-FU의 대수농도를 세로축에는 생존세포의 백분율을 표시하여 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선회귀를 시행하여 얻어진 공식에 의해 IC<sub>50</sub>을 산출하였다.

#### 바. L-364,718과 5-FU 병합투여 효과

Capan-2 및 Panc-1 세포에서 5-FU의 IC<sub>50</sub>을 기준으로 각 약제를 생리식염수 10  $\mu$ l에 녹여서 각 well에 첨가할 때 최종농도가 IC<sub>50</sub>의 4배, 2배, 1배, 0.7배, 0.5배, 0.3배, 0.2배, 0.1배, 0.07배, 0.05배, 0.02배, 0.01배 및 0배가 되도록 13가지 농도를 만들었다. 96 well plate를 준비하여 매 plate의 12개의 column 중 2개의 column에는 대조군을 만들고 나머지 10개의 column에는 각 well에 배양액 180  $\mu$ l에 섞어서 실험세포수를 넣은 후 24시간 동안 배양하여 암세포가 부착되도록 하였다. 앞서 준비한 L-364,718 및 5-FU 각각의 13가지 농도를 서로 조합하여 총 169개의 농도조합을 만든 후 동일조합의 약제를 5개씩의 well에 첨가하여 일정기간 동안 배양한 다음 MTT 검사를 시행하여 생존율을 구하였다.

#### 사. L-364,718이 체장암세포의 [<sup>3</sup>H]-thymidine 섭취에 미치는 효과

24 well plate의 각 well에 실험세포수를 분주하여

24시간 동안 배양한 후 각 세포주의 50% 성장억제농도를 기준으로 다양한 농도의 L-364,718을 첨가한 후 각각 2시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간 동안 배양한 다음 세포를 수확하여 수확된 세포수를 trypan blue 염색법으로 측정하였다. 각각의 농도의 약제로 처리한 후의 생존세포를 96 well plate의 각 well에 실험세포수씩 분주한 다음 [<sup>3</sup>H]-thymidine 1  $\mu$ Ci를 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. Cell harvester(Skatron Inc., USA)로 세포를 glass fiber filter paper에 수집한 다음 건조시켜 scintillation vial에 cocktail solution(toluene, pop, popop powder) 및 각 membrane을 넣고 beta scintillation counter(Beckman, LS 5000 TA, USA)로 [<sup>3</sup>H]-thymidine 섭취량을 측정하였다.

#### 아. L-364,718이 체장암세포의 세포주기에 미치는 영향

Capan-2 및 Panc-1 세포를 G1/S기에 synchronization 하기 위해 10% 우태아혈청이 함유된 배지에 48시간 배양한 후 0.5% 우태아 혈청이 함유된 배지에 배양한 다음 다시 10% 우태아 혈청이 함유된 배지에 배양하였다. 실험세포수를 25 cm<sup>2</sup> flask에 각각 분주하여 24시간 배양한 다음 다양한 농도의 L-364,718 용액을 첨가하고 L-364,718 첨가시간을 기준으로 하여 2시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 추가 배양하였다. 세포 부유액을 5분간 500 g로 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 5 ml의 phosphate buffered saline(PBS) 또는 구연산 완충액(250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate; pH 7.6)으로 2번 세척한 후 세포수를 측정하고 나일론망(pore size; 53  $\mu$ M, Spectrum, U.S.A.)에 여과시켰다. 다시 원심분리하여 얻은 세포 pellet에 100  $\mu$ l의 구연산 완충액을 첨가하여 부유시키고 450  $\mu$ l의 용액(A)(trypsin 15 mg, stock solution to 500 ml)을 첨가하여 흔들면서 10분간 실온에서 혼합하였다. 375  $\mu$ l의 용액(B)(trypsin inhibitor 250 mg, ribonuclease A 50 mg, stock solution to 500 ml)을 첨가하고, 끝으로 375  $\mu$ l의 용액(C)(PI 208 mg, spermine tetrahydrochloride 580 mg, stock solution to 500 ml)을 첨가하고 혼합하였다. 세포응집을 방지하기 위하여 26 gauge 주사침과 나일론망에 여과시키고 빛을 차단시킨 상태

로 4°C로 냉장보관하였다가 유식세포측정기(FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry System, U.S.A.)로 세포주기를 분석하였다. 이때 최소: 10<sup>4</sup>개 이상의 세포를 측정하였고 얻어진 DNA histogram에 대한 결과는 이배수성(diploid)인 경우는 S기가 20% 미만일 때에는 RFIT(Rectangle Fit) program을, S기가 20% 이상일 때에는 SFIT(S phase Fit) program을, 그리고 사배수성(tetraploid)인 경우에는 POLY(Polynomial) program을 각각 이용하여 세포증식주기의 G0/G1기, S기 및 G2/M기의 백분율을 산출하였다.

### 3. 자료분석

#### 가. 50% 세포성장 억제농도의 측정

각 세포주에 약제를 첨가하여 일정기간 동안 배양한 후 MTT 검사로 색소흡수율을 구하여 생존율을 계산하였다. 가로축에는 각 약제의 농도(linear scale)를 세로축에는 생존세포의 백분율을 표시하여 곡선의 생존율-농도 상관관계를 도식화한 다음 직선관계로 나타내기 위해 각 약제의 농도를 대수로 환산한 후 Machintoshi computer의 Cricket graph를 이용하여 직선회귀를 시행하여 얻어진 공식에 의해 IC<sub>50</sub>을 산출하였다.

#### 나. 병합투여의 효과판정

L-364,718과 5-FU 병합투여 효과는 기하학적인 분석방법인 isobologram model에 의하여 평가하였다. Isobologram이란 함께 사용된 약제들의 동일한 효과를 나타내는 농도조합으로 그려지는 곡선으로서 두 약제 간의 상호작용의 두 극단, 즉 두 약제가 전혀 별개의 독립된 양상으로 작용하는 경우(mode I)과 이와 반대로 서로 의존적으로 작용하는 경우(mode II)로 그려지는 곡선에 의해 3개의 구역으로 분할한 후, 실제 두 약제를 병합한 결과를 도식화하여 두 가지 곡선으로 둘러싸인 부가구역내에 위치할 경우에는 부가작용으로, 부가구역의 좌하귀에 위치하면 상승작용, 우상귀에 위치하면 길항작용으로 병합효과를 판정하는 방법이다.<sup>21</sup>

#### 다. 자료처리 및 통계학적 분석

각 세포주에서 단일 약제에 대한 생존율, IC<sub>50</sub> 및 병합효과 판정을 위해서는 Machintoshi computer의 Excel 및 Cricket graph를 사용하여 산출 및 도식화 하

고, 통계적인 처리는 IBM computer의 SPSS program을 사용하여 t-test를 시행하였다.

## 결 과

### 1. Cerulein이 세포성장에 미치는 효과

Cerulein이 세포성장에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 Capan-2 및 Panc-1 세포에 다양한 농도의 cerulein을 첨가한 후 분주한 날로부터 7일 까지 매일 생존율을 측정하였으며, 매 검사시마다 검사당일 대조군의 생존율을 100% 기준으로 하여 cerulein의 각 농도에 따른 생존율을 계산하였다. Capan-2 세포에서는 10<sup>9</sup> M/L 및 10<sup>8</sup> M/L의 농도에서는 cerulein을 첨가하지 않았던 경우의 생존율과 별다른 차이가 없었으나 10<sup>7</sup> M/L 및 10<sup>6</sup> M/L 를 첨가하였을 때 5일 후 생존율은 대조군의 생존율에 비해 각각 145.8 % 및 176.7 %로 현저히 증가되었다(Fig. 1A). Panc-1 세포에서는 10<sup>9</sup> M/L, 10<sup>8</sup> M/L 및 10<sup>7</sup> M/L 의 농도에서는 cerulein을 첨가하지 않았던 경우와 차이가 없었으나 10<sup>6</sup> M/L 를 첨가하였을 때 5일 후 생존율은 대조군의 생존율에 비해 143.7%로 증가되었다(Fig. 1B).

### 2. L-364,718의 세포성장 억제효과

Capan-2 및 Panc-1 세포 모두에서 L-364,718의 농도를 증가시키에 따라 농도에 비례하여 성장이 현저히 억제되었으며 Panc-1 세포에서의 성장억제율이 Capan-2 세포에 비해 다소 높은 경향을 보였다(Fig. 2). L-364,718의 IC<sub>50</sub>은 Capan-2는 3.25 X 10<sup>-5</sup> M/L, Panc-1은 2.43 X 10<sup>-5</sup> M/L 이었다(Table 1). 대조군의 생존율을 100% 기준으로 하였을 때 Capan-2 및 Panc-1 세포에서 L-364,718의 농도에 따른 생존율은 Table 2와 같았다.

### 3. 5-FU의 세포성장 억제효과

대상세포주 모두 첨가한 5-FU 농도에 비례하여 성

Table 1. IC<sub>50</sub> of L-364,718 on each cell line

Cell lines	IC <sub>50</sub> of L-364,718
Panc-1	(2.43 + 0.39) X 10 <sup>-5</sup> M/L
Capan-2	(3.25 + 0.43) X 10 <sup>-5</sup> M/L

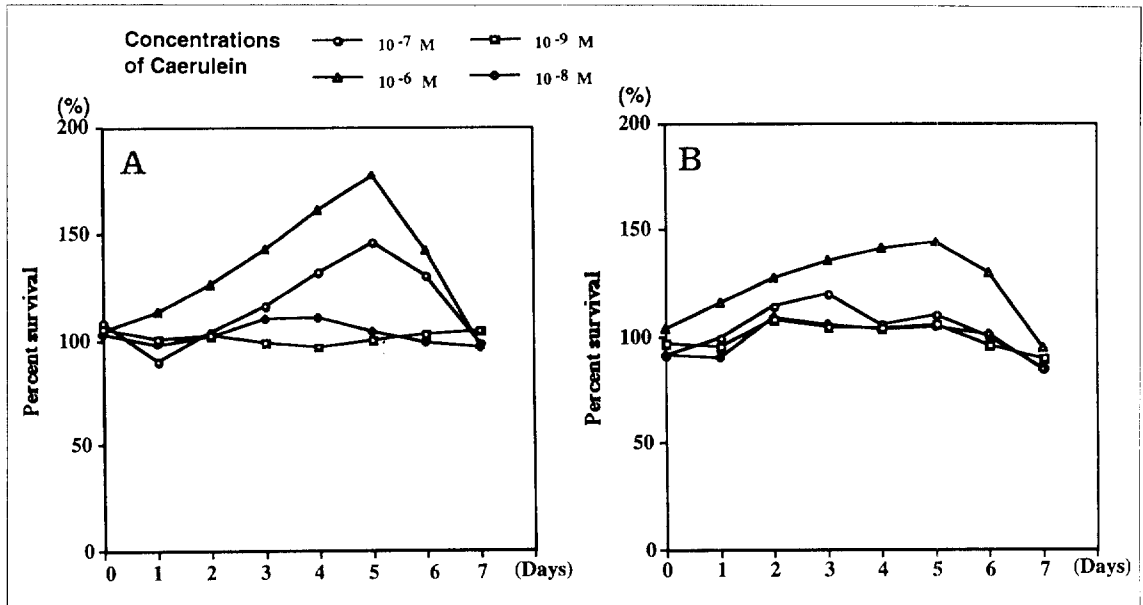


Fig. 1. Percent survival of the Capan-2(A) and Panc-1(B) cells at different concentrations of the caerulein

Table 2. Percent survival of Capan-2 and Panc-1 cells according to the various doses of L-364,718

	Control	0.01 X	0.1 X	0.5 X	0.7 X	1 X	2 X	4 X
Capan-2	100 %	99.9 %	89.5 %	63.4 %	58.3 %	48.6 %	36.8 %	2.8 %
Panc-1	100 %	99.8 %	82.6 %	63.0 %	54.8 %	48.3 %	37.2 %	4.1 %

Values are represented as mean.

X : IC<sub>50</sub> of L-364,718 in Capan-2 or Panc-1 cells

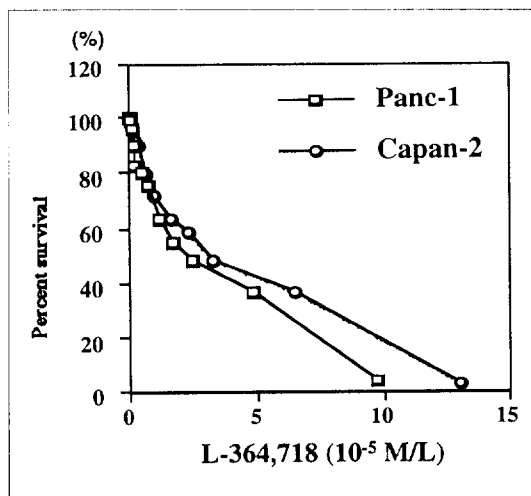


Fig. 2. Percent survival of Capan-2 and Panc-1 cells at different concentrations of L-364,718

Table 3. IC<sub>50</sub> of 5-fluorouracil on each cell line

Cell lines	IC <sub>50</sub> of 5-fluorouracil
Panc-1	13.83 + 4.8 μg/ml
Capan-2	1.19 + 0.56 μg/ml

장이 억제되었으며 Capan-2 세포에서의 억제율이 Panc-1 세포에 비해 현저히 높았다(Fig. 3). 5-FU의 IC<sub>50</sub>은 Capan-2 및 Panc-2 세포에서 각각 2.19 μg/ml 및 13.83 μg/ml 이었다(Table 3).

#### 4. L-364,718 및 5-FU 병합투여 효과

L-364,718 및 5-FU을 병합투여한 후 isobologram 분석법에 의해 병합효과를 판정하였다. Capan-2 세포에서는 총 8개의 isobole을 얻을 수 있었으며 이중 5개

(62.5%)는 상승구역에 위치하였으나 2개(25.0%)는 부가구역에, 1개(12.5%)는 길항구역에 위치하였다(Fig. 4A). 한편, Panc-1 세포에서는 7개의 isobole 중 1개(14.2%)만이 상승구역에 위치하였고 3개(42.9%)는 부가구역에 3개(42.9%)는 길항구역에 위치하여(Fig. 4B), Capan-2 세포에서 현저한 상승효과가 관찰되었다.

5. L-364,718이 췌장암세포의 [<sup>3</sup>H]-thymidine 섭취에 미치는 효과

L-364,718이 DNA 합성에 미치는 영향을 알아보기

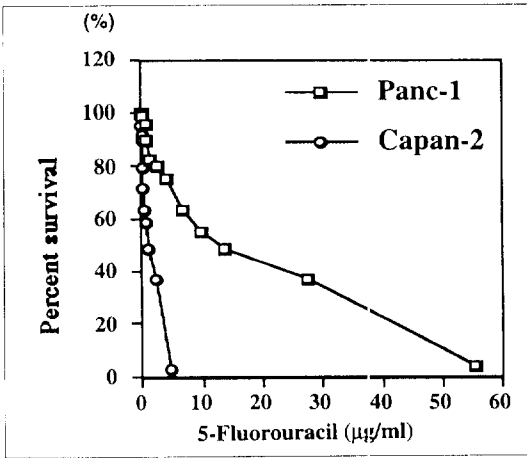


Fig. 3. Percent survival of Capan-2 and Panc-1 cells at different concentrations of 5-fluorouracil

위하여 다양한 농도의 약제를 첨가한 후 [<sup>3</sup>H] thymidine 섭취율을 검사하였다. L-364,718을 첨가하지 않고 배양한 경우를 기준으로 하여 각 농도별 [<sup>3</sup>H]-thymidine 섭취 억제량을 백분율로 환산하였을 때 Capan-2 및 Panc-1 세포 모두에서 L-364,718 첨가한 후 96 시간까지 첨가한 L-364,718의 농도에 비례하여 [<sup>3</sup>H] thymidine 섭취량이 감소하였다(Fig. 5).

6. L-364,718이 췌장암세포의 세포주기에 미치는 영향

Capan-2 세포에서는 L-364,718 첨가후 24시간까지는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않다가 48시간 이후 부터는 각각의 세포주기 분획의 차이가 관찰되었다. IC<sub>50</sub>의 1배 및 2배의 L-364,718을 첨가한 경우는 대조군 및 IC<sub>50</sub>의 0.1배 및 0.5배를 첨가한 경우에 비해서 현저히 G0/G1기의 감소, S기의 증가가 관찰되었으며 G2/M기에서의 차이는 뚜렷하지 않았다(Fig. 6A). 반면에 Panc-1 세포에서 24시간까지는 L-364,718을 첨가한 경우가 대조군에 비해서 G0/G1기 분획의 증가, S기 분획의 감소 및 G2/M기 분획이 감소하는 경향을 보였으나 48시간 이후 부터는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 6B).

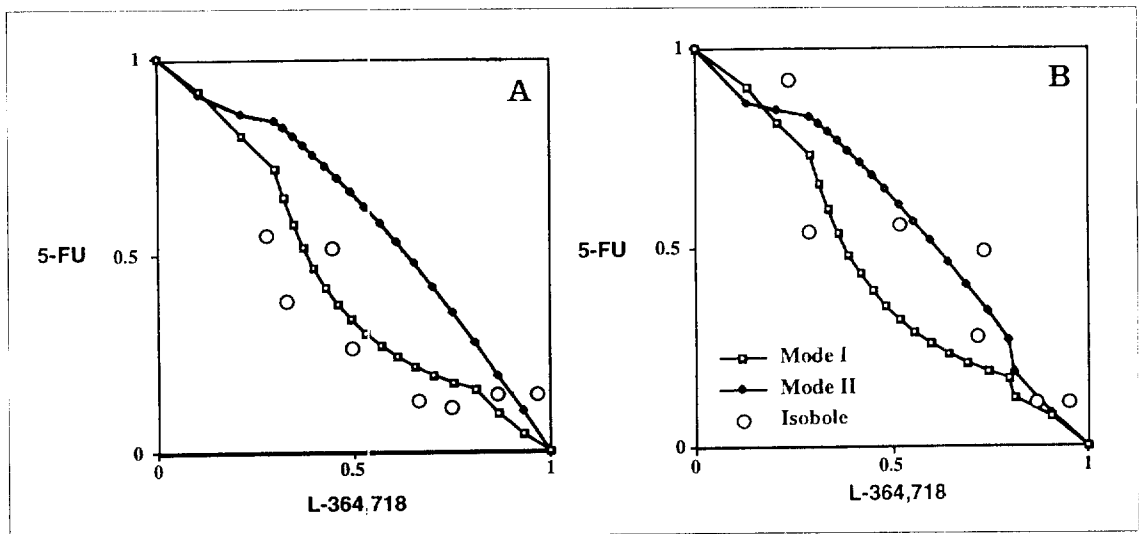


Fig. 4. Isobolograms of L-364,718 and 5-fluorouracil in Capan-2(A) and Panc-1(B) cells

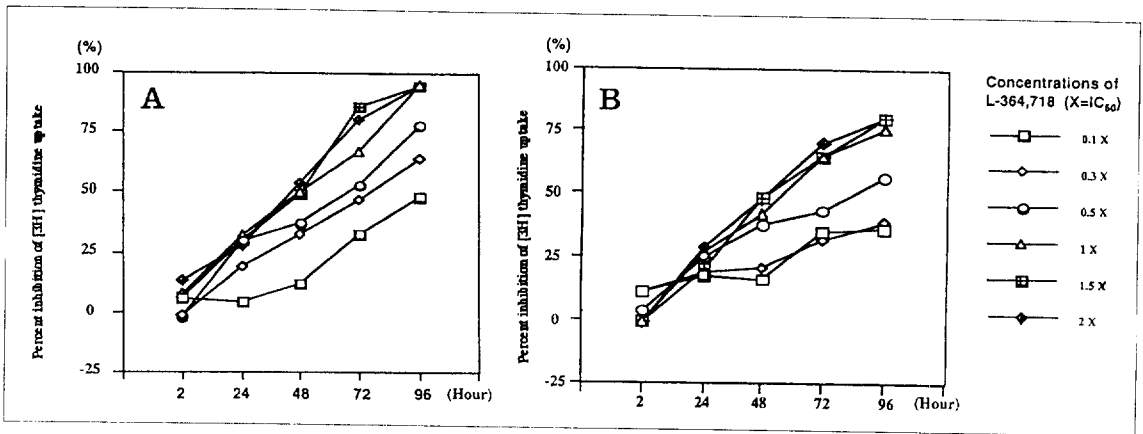


Fig. 5. Percent inhibition of [<sup>3</sup>H] thymidine uptake of Capan-2(A) and Panc-1 cells at various concentrations of L-364,718

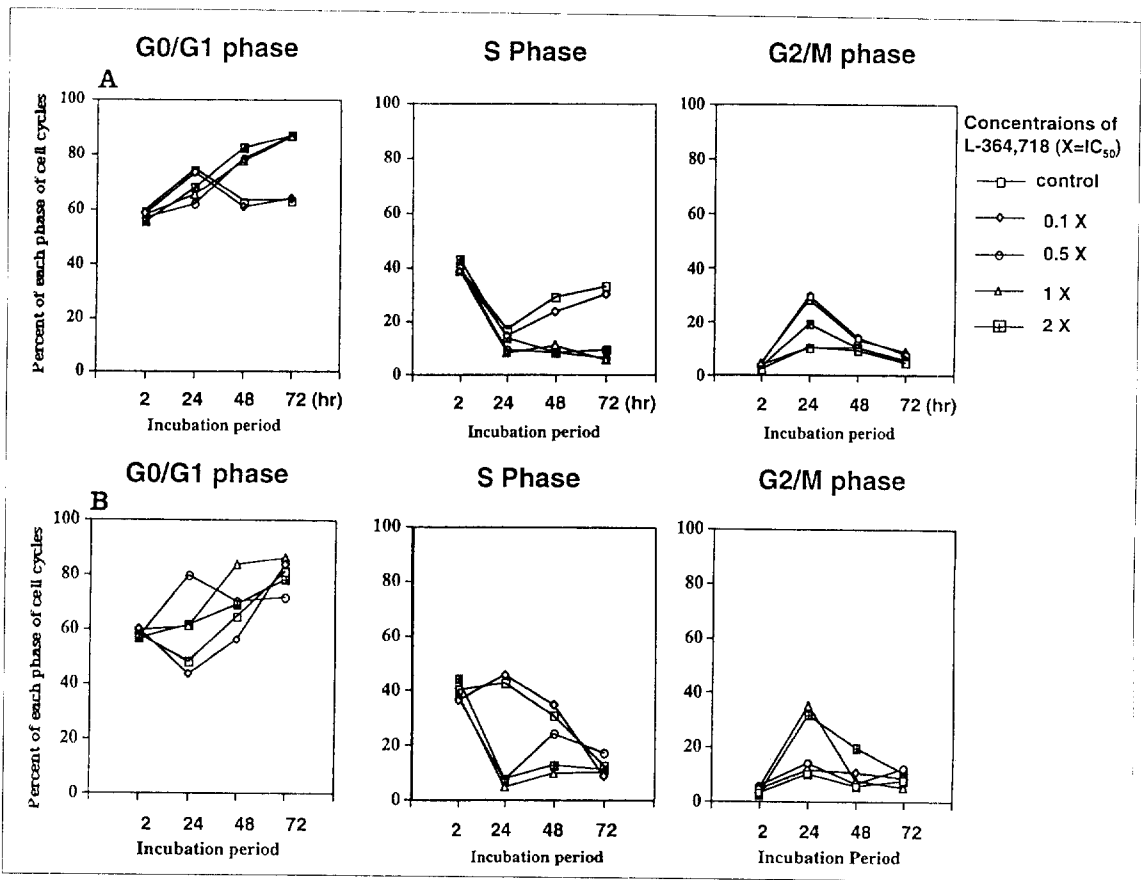


Fig. 6. Changes of each phase of cell cycles in Capan-2(A) and Panc-1(B) cells according to the concentration of L-364,718



## 고 찰

CCK는 십이지장 및 공장의 I cell이라 불리는 신경내분비 세포에서 생성되며 수소이온, 지방, 아미노산 등의 자극에 의해 혈중으로 분비된다. 분비된 CCK는 췌장의 선방세포 및 담낭근세포의 수용체와 결합하여 췌액분비 및 담낭수축을 유발하며, secretin의 생물학적 활성도를 증가시키고, 위배출의 지연, 소장운동의 증가 등 다양한 작용을 한다. 또한 췌세포 증식효과와 아울러 췌세포의 DNA, RNA 및 단백질 합성을 촉진시키는데, 이는 CCK가 정상 췌세포의 성장 및 분화에 관여함은 물론 췌장암의 발생 및 성장에도 영향을 줄 수 있는 조절인자로 작용할 가능성이 있음을 추측케 한다. 췌장암 발생에 있어서 소화관호르몬의 역할에 대해서는 보고자에 따라 차이가 있으나 백서에서 azaserine에 의한 췌장암 발생과정 중 초기단계를 cerulein과 bombesin이 촉진시키고, hamster의 췌장암 발생에 CCK, cerulein 및 secretin이 관여한다고 알려져 있다.<sup>11-13</sup> 인체에서는 고칼로리 식이 및 과도한 불포화지방산 섭취에 따른 CCK 분비 증가에 의해 췌세포의 증식이 촉진되며 nitrosamine과 같은 발암물질에 대한 감수성을 증가시켜서 췌장암이 발생할 것으로 생각되고 있다.<sup>8-10</sup> 이와같이 CCK는 췌장암 발생에 관여함과 아울러 이미 발생한 췌장암의 성장도 촉진시킨다고 알려져 있으며, 시험관내에서나 nude mouse에 이식한 췌장암 세포의 성장이 CCK에 의해 촉진됨이 보고되었다.<sup>22-24</sup> 그러나 지금까지의 보고는 모두 생리적인 농도에 비해 매우 높은 농도의 CCK에 의해 성장 촉진 효과를 관찰할 수 있었기 때문에 실제 생리적 농도의 CCK에 의한 효과에 대해서는 다소 의문점이 있어왔다. 최근 Funakoshi 및 Kono<sup>25</sup>는 KP-1N 및 KP-1NL 췌장암 세포에서  $10^{-11}$  -  $10^{-10}$  M의 생리적 농도의 CCK를 첨가하였을 때에도 종양세포의 성장이 촉진되었다고 하였다. 이는 실제 인체에서 생리적인 농도의 CCK에 의해서도 췌장암의 성장이 촉진될 수 있음을 시사하는 소견으로 주목 받고 있다. 본 연구에서는 Capan-2 및 Panc-1 세포 모두 cerulein을 첨가하였을 때 성장이 촉진되었으나 생리적인 농도에 비해서는 현저히 높은 농도에서 성장이 촉진되었기 때문에 Funakoshi 및 Kono<sup>25</sup>의 결과와는 차이

가 있었다. 그러나 인체내에서는 CCK의 농도가 항상 일정하지 않고 식사와 관련하여 많은 차이를 보일 수 있으므로 시험관내 실험 결과가 인체내의 상태를 그대로 반영할 수 없다는 점을 고려해야 할 것으로 생각된다.

유방암 또는 전립선암에서 암세포 세포막에 존재하는 steroid 호르몬 수용체의 유무에 따른 항호르몬제의 효과가 입증된 이래, 췌장암 등의 소화관암에서도 steroid 또는 peptide 호르몬과 종양 성장과의 관련성에 대한 관심이 증가되고 있다. 췌장암세포에 CCK, secretin 및 VIP 등의 수용체가 존재함이 이미 보고되었고, 인체 또는 동물의 췌장암세포 성장에 CCK, pancreastatin, SMS201-995(somatostatin 유사체), bombesin, estrogen, testosterone, progesterone 등과 같은 호르몬의 역할에 대한 보고가 있어 왔다.<sup>26-29</sup> 이와같은 결과는 유방암 또는 전립선암에서와 같이 췌장암에서도 성장억제를 위하여 CCK와 같은 다양한 항호르몬제의 효과를 기대케 하나 아직 그 역할은 확실하지 않다. Douglas 등<sup>18</sup>은 백서에서 CCK 길항제인 lorglumide가 azaserine에 의해 형성된 전암병소의 성장을 억제한다고 하였으며, Smith 등<sup>9</sup>은 췌장암세포를 이식한 누드마우스에서 지방섭취를 적게 또는 과도하게 공급한 후 강력한 CCK 길항제인 L364,718을 투여하였던 바 지방섭취율이 높은 경우에서 종양 성장이 의미있게 촉진되었으며 L-364,718에 의해 종양성장이 억제됨을 보고하였다. Alexander 등<sup>30</sup>은 흉선을 제거한 백서에 이식한 CCK 수용체 양성 인체 췌장암세포의 성장이 CCK 길항제인 MK-329에 의해 억제되었다고 하였으며, Funakoshi 및 Kono<sup>25</sup>도 KP-1N 및 KP-1NL 췌장암 세포의 성장이 CCK 수용체 길항제인 CR 1505에 의해 억제되었다고 하였다. 그러나 Abbruzzese 등<sup>31</sup>은 CCK 수용체 양성 여부를 확인하지 않은 18예의 췌장암 환자에서 MK-329(10-20 mg)를 단독 투여하였던 바 항종양효과, 통증억제효과 및 영양상태 모두에서 뚜렷한 호전이 없었으며, 부작용으로 경미한 오심, 구토, 설사 및 복통 등이 발생하였다고 보고하는 등 다른 견해를 보고하여 아직까지 췌장암에서 CCK의 역할은 확실하지 않다. 또한 CCK 길항제가 종양세포의 성장을 억제하는 기전은 DNA 합성 억제에 의한 것으로 생각되고 있으나 아직까지 세포주기에 특이성이 있는 지 또는 다른 항암약

물요법제와 병합하였을 때 상승효과가 있는지 여부에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

CCK 길항제는 cyclic nucleotide 유도체, 아미노산 유도체, C 말단부를 포함한 유도체 및 benzodiazepine 고리 유도체 등의 4가지로 구분된다. 1985년 Chang 등<sup>32</sup>은 미생물인 *Aspergillus alliaceus*에서 기존의 proglumide 보다 CCK 수용체에 대한 친화력이 300-400배 강한 물질을 발견하여 Asperlicin이라 명명하였다. 이 약물은 5 phenyl-1,4-benzodiazepine 고리를 함유하고 있는데 tryptophan과 결합하여 경구투여가 가능한 보다 강력하고 다양한 CCK 길항제의 합성이 가능하게 되었다. 이중 L-364,718은 기존의 proglumide 보다 CCK 수용체에 대한 친화력이 백만배 이상으로 가장 강력한 길항제로 알려져 있으며 본 연구에서도 L-364,718을 이용하였다.

시험관내 감수성 검사를 위해서는 재현성이 뛰어나고 민감하며 많은 양의 자료를 분석하기에 효율적인 방법인 MTT 검사법을 이용하여 L-364,718의 종양세포 성장억제를 조사하였다. Capan-2 및 Panc-1 세포 모두에서 첨가한 L-364,718의 농도에 비례하여 성장이 억제되었으며, 50% 성장억제 효과농도는 Capan-2에서는  $3.25 \times 10^{-5}$  M/L, Panc-1은  $2.43 \times 10^{-5}$  M/L 이었다. 이는 CCK가 Capan-2 및 Panc-1 세포 모두의 성장에 관여하며 CCK 길항제의 의해 성장이 억제되고 Panc-1 세포가 Capan-2 세포에 비해 CCK 억제제에 대해 다소 민감함을 의미한다.

L-364,718의 항종양효과 기전은 확실하지 않은데, Smith 등<sup>16</sup>은 췌장암세포인 SW-1990을 이식한 백서에서 L-364,718을 투여한 군이 투여하지 않았던 경우에 비해서 종양내 단백질 및 DNA 함량이 적었다고 하였다. 한편 Niederau 등<sup>33</sup>도 비록 췌장암에서의 실험은 아니지만 백서에서 serine protease 억제제인 camostatate를 투여한 후 췌세포 증식효과를 관찰한 결과 camostatate를 투여한 백서에서 췌세포의 현저한 증식효과를 관찰할 수 있었으며 이는 혈중 CCK의 분비 증가에 기인하고 CCK 수용체 길항제인 CR 1409 (proglumide 유도 CCK 수용체 길항제)를 투여하였을 때 camostatate의 췌세포 증식효과를 차단시키며 췌세포의 단백질 및 DNA 함량이 감소하였다고 하였다. 그러나 Smith 등<sup>16</sup> 및 Niederau 등<sup>33</sup>은 이와같은 효과가

L-364,718 또는 CR 1409 등의 직접적인 영향이라기 보다는 세포 성장을 촉진시키는 CCK에 대한 길항작용 때문으로 생각된다고 하였으며 CCK 수용체 길항제가 직접적으로 항종양효과를 갖고 있는지는 확실하지 않다.

저자 등도 L-364,718이 췌장암 세포의 DNA 합성에 어떠한 영향을 주는지를 알아보기 위하여 다양한 농도의 L-364,718을 첨가한 후 [<sup>3</sup>H] thymidine 섭취율을 검사하였던 바, Capan-2 및 Panc-1 세포 모두에서 L-364,718 첨가한 후 96 시간까지 첨가한 L-364,718의 농도에 비례하여 [<sup>3</sup>H] thymidine 섭취량이 감소하여 (Fig. 6), L-364,718의 항종양효과가 종양세포의 DNA 합성 억제에 의함을 확인할 수 있었다. 본 연구는 앞서의 Smith 등<sup>16</sup> 및 Niederau 등<sup>33</sup>의 실험과 같이 생체내 실험이 아니고 시험관내 배양된 췌장암세포를 사용하였는데 비록 세포 배양을 위해 첨가한 혈청내에 미량의 CCK가 포함되어 있음을 감안하더라도 동물실험과 같이 지속적으로 분비되는 CCK에 의한 세포성장 촉진 효과를 배제할 수 있기 때문에 L-364,718의 DNA 합성 억제 효과가 췌장암 세포에 대한 보다 직접적인 영향에 의한 것을 추측케 소견이라 생각되며 향후 추가 연구가 필요하다.

저자 등은 L-364,718의 항종양효과가 세포주기에 특이적인지를 알아보았는데, Capan-2 세포에서는 L-364,718을 첨가한 경우가 대조군에 비하여 G0/G1기의 감소 및 S기 증가가 현저하였으나 G2/M기에서의 차이는 뚜렷하지 않았다. Panc-1 세포에서는 24시간까지는 L-364,718을 첨가한 경우가 대조군에 비해서 G0/G1기 분획의 증가, S기 분획의 감소 및 G2/M기 분획이 감소하는 경향을 보였으나 48시간 이후 부터는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다. 이와같이 각 세포주에서 세포주기에 미치는 영향이 다양한 세포 성장 억제효과가 세포주기에 특이적이지 않기 때문에 생각된다.

악성종양의 항암약물요법을 위해서는 약제에 대한 내성을 최소화하고 항암효과를 증가시키기 위해 2가지 이상 약제의 병합요법을 널리 이용하고 있다. 그러나 약제-종양-개체 사이에 작용하는 여러 요인들 때문에, 가장 이상적인 효과를 얻을 수 있는 약제를 선택하거나 투여방법을 결정하기란 쉽지 않으며, 병합요법의 대부

분은 단지 경험적인 방법에 의존하여 사용되고 있다. 췌장암에서도 5-FU, mitomycin C, adriamycin, cisplatinum, BCNU, CCNU, streptozotocin 등 다양한 약제들의 2제 또는 3제 병합요법이 시도되고 있으나 그 반응율은 높지 않다. 이중 가장 많이 사용되고 있는 약제는 5-FU로서 체내에서 대사되어 5-fluoro-2'-deoxy-5'-mono-phosphate(5-FdUMP)로 전환된 후 thymidylate synthase와 강하게 결합하여 deoxy-thymidine triphosphate (dTTP) 형성을 억제하는 것이 주된 항암기전인데, 세포주기에 특이성을 갖고 있는 약제로 S기에 있는 세포들에 대한 독성이 강하다.

두가지 이상 약제의 병합요법의 효과를 판정하기 위해서는 시험관내실험 및 동물실험이 이용되고 있는데, 시험관내실험에는 각 약제의 효과를 산술적으로 합하여 병합효과가 각각의 약제의 효과를 더한 것보다 크거나 혹은 작으면 상승 혹은 길항작용이 있는 것으로 간주하는 산술적인 방법인 additivity model과, 사용된 약제들의 동일한 효과를 나타내는 농도의 조합에 의해 그려지는 곡선 중 서로 별개의 독립된 양상으로 작용할 경우와 이와 반대로 서로 의존적으로 작용할 경우에 의해 그려지는 두 곡선에 의해 구분되는 구역을 이용하는 기하학적인 방법인 isobologram model이 있다. 약제의 용량-반응 관계가 직선의 상관관계에 있을 경우에는 산술적인 방법을 적용할 수 있으나 대부분의 생물학적 약제의 용량-반응 관계는 대부분 비직선인 S자형이므로 isobologram model을 이용한 기하학적 분석이 바람직하다. 본 연구에서는 L-364,718과의 병합효과를 판정하기 위해서 항암약물요법제 중 가장 많이 사용되고 있는 약물인 5-FU을 이용하여 두 약제간에 상승작용 유무를 확인하기 위하여 isobologram model을 이용하여 판정하였다.

Capan-2 세포에서는 총 8개의 isobole을 얻을 수 있었으며 이중 5개(62.5%)가 상승구역에 위치하였으나 Panc-1 세포에서는 7개의 isobole 중 2개(14.2%)만이 상승구역에 위치하여 Capan-2 세포에서 현저한 상승효과가 관찰되었다. 이와같이 세포에 따라 상이한 차이를 보이는 이유는 각각의 종양세포에 따른 생물학적 차이에 기인할 것으로 추측되며 CCK 수용체 존재 유무 확인 등의 추가 연구가 필요하다.

시험관내 병합투여시 상승작용이 있더라도 인체에

서는 항암제의 흡수, 대사과정 및 독성 등의 여러 요인들이 작용할 수 있으므로 임상적으로 반드시 동일한 효과를 얻을 수는 없다는 문제점이 있다. 그러나 이러한 시험관내 실험결과는 임상에서의 항암제 병합치료의 한 지침이 될 수 있음은 분명하며, 본 연구에서 Capan-2 세포에서 높은 상승효과가 관찰되었음은 앞으로 췌장암 환자에서 항암약물치료로 L-364,718 및 5-FU을 포함한 다른 항암제와 병합요법의 임상적 이용이 기대된다.

## 요 약

**목적:** Chelecystokinin(CCK)은 정상 췌세포의 성장을 촉진시키는 것은 물론 시험관내 배양된 췌장암세포 및 nude mouse에 이식된 암세포의 DNA, RNA 및 단백질 합성을 촉진시킨다고 알려져 있는데 이는 CCK가 종양세포의 성장에 필수적인 요소로 작용함을 시사하며, CCK 수용체 길항제 투여에 의한 종양의 성장억제효과를 기대케 한다. 현재까지 시험관내 배양된 췌장암 세포의 성장이 CCK수용체 길항제 투여에 의해 억제되었다는 몇몇 보고가 있었으나 그 작용기전은 확실하지 않으며 아직까지 CCK수용체 길항제와 항암약물요법제와의 병합투여효과를 관찰한 보고는 없었다. 저자들은 배양된 인체 췌장암세포에서 CCK수용체 길항제 중 기존의 proglumide 보다 백만배 이상의 길항효과가 있다고 알려진 benzodiazepine계 약물인 L-364,718의 항암효과 및 작용기전을 알아보고 성장억제 효과가 있다면 소화관암에서 흔히 사용되고 있는 항암제인 5-FU와 병합투여하였을 때 항암효과에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 인체 췌장암세포로는 Capan-2 및 Panc-1 세포를 이용하였으며, 체외항암제 감수성검사는 MTT 검사법을, 두 약제의 병합효과는 isobologram 분석법에 의해 판정하였다. [<sup>3</sup>H] thymidine 섭취검사 및 유식세포분석(flow cytometry)을 이용하여 DNA 합성 및 세포주기에 미치는 영향을 알아보았다. **결과:** Capan-2 및 Panc-1 세포 모두에서 L-364,718의 농도를 증가시킴에 따라 농도에 비례하여 성장이 억제되었으며, 50% 성장억제 효과농도는 Capan-2는 3.25 X 10<sup>-5</sup> M/L, Panc-1은 2.43 X 10<sup>-5</sup> M/L 이었다. 5-FU의 50% 성장억제 효과농도는 Capan-2 및 Panc-2 세포에

서 각각 2.19  $\mu\text{g/ml}$  및 13.83  $\mu\text{g/ml}$  이었다. CCK agonist인 caerulein이 세포성장애 미치는 효과를 관찰 하였던 바,  $10^{-6}$  M/L 농도의 caerulein을 첨가시 Capan-2 및 Panc-1 세포의 5일 후 성장율이 대조군 (100%)에 비하여 각각 143.7% 및 176.7% 로 현저한 성장 촉진효과가 관찰되었다. L-364,718 및 5-FU을 병 합투여한 후 isobologram 분석법에 의해 병합효과를 판정한 결과, Capan-2 세포에서는 8개의 isobole 중 5 개(62.5%) 에서 상승효과를 관찰할 수 있었으나 Panc-1 세포에서는 7개의 isobole 중 1개(14.3%) 만이 상승구역에 위치하였다. L-364,718이 DNA 합성에 미 치는 영향을 알아보기 위하여 [ $^3\text{H}$ ] thymidine 섭취검사 를 시행하였던 바 첨가한 농도에 비례하여 [ $^3\text{H}$ ] thymidine 섭취량이 감소하였다. 각 세포주에 50% 성 장억제 효과농도의 L-364,718을 첨가한 후 유식세포분 석을 시행한 결과 L-364,718 의 항종양 효과는 세포주 기에 특이적이지 않았다. 결론: 이상의 결과로 CCK 수용체 길항제인 L-364,718은 췌장암세포에 대해 항종 양효과가 있으며 증식억제 작용기전은 DNA 합성 억제 에 기인하기 때문으로 생각되고, L-364,718과 5-FU의 병합투여시 Capan-2 세포에서 높은 상승효과가 관찰되 었음은 앞으로 췌장암 환자에서 항암약물치료로 L-364,718 및 5-FU을 포함한 다른 항암제와 병합요법 의 임상적 이용이 기대된다.

**색인단어:** 췌장암, Cholecystokinin 길항제, L-364,718, 항종양효과

### 참 고 문 헌

1. Manabe T, Tobe T. Progress in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer- the Kyoto University experience. *Hepato-Gastroenterol* 1989;36:431-436.
2. Ghadirian P, Simard A, Baillargeon J, Boyle P. Nutritional factors and pancreatic cancer in the francophone community in Montreal, Canada. *Int J Cancer* 1991;47:1-6.
3. Kellokumpu-Lehtinen P, Huovinen R, Tuominen J. Pancreatic cancer. Evaluation of prognostic factors and treatment results. *Acta Oncologica* 1989;28:

- 481-484.
4. Whittington R, Solin L, Mohiuddin M, et al. Multimodality therapy of localized unresectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 1984;54:1991-1999.
5. Pazdur R, Ajani J, Abbruzzese JL, et al. Phase II evaluation of fluorouracil and recombinant alpha-2a-Interferon in previously untreated patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 1992;70:2073-2076.
6. Scheithauer W, Pfeffel F, Kornek G, Marczell A, Wiltshcke C, Funovics J. A phase II trial of 5-fluorouracil, leucovorin, and recombinant alpha-2b-Interferon in advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 1992;70:1864-1866.
7. Geoffroy F, Grem JL. Chemotherapy of advanced gastrointestinal cancer. *Current Opinion in Oncology*. 1994;6:427-434.
8. Haddock G, Carter DE. Aetiology of pancreatic cancer. *Br J Surg* 1990;77:1159-1166.
9. Smith JP, Solomon TE, Bagheri S, Kramer S. Cholecystokinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci* 1990;35:1377-1384.
10. DiMugno EP. Early diagnosis of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Med Clin North Am* 1988; 72:979-992.
11. Fekete M, Zalatnai A, Comaru-Schally AM, Schally AV. Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 1989;4:521-528.
12. Liehr RM, Melnykovych G, Solomon TE. Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2. *Gastroenterology* 1990;98:1666-1674.
13. Longnecker DS, Jamieson JD, Asch HL. Regulation of growth and differentiation in pancreatic cancer. *Pancreas* 1989;4:256-262.
14. Smith JP, Kramer ST, Solomon TE. CCK stimulates growth of six human pancreatic cancer cell lines in serum-free medium. *Reg Peptides* 1991;32:341-349.
15. Smith JP, Kramer ST, Cheung JY. Effects of

- cholecystokinin on cytosolic calcium in human pancreatic cancer cells. *Reg Peptides* 1991;36:299-310.
16. Smith JP, Kramer S, Bagheri S. Effects of a high-fat diet and L364,718 on growth of human pancreas cancer. *Dig Dis Sci* 1990;35:726-732.
  17. Hudd C, LaRegina MC, Devine JE et al. Response to exogenous cholecystokinin of six human gastrointestinal cancers xenografted in nude mice. *Am J Surg* 1989;157:386-394.
  18. Douglas BR, Woutersen RA, Jansen JBMJ, Jong AJL, Rovati LC, Lamers CBHW. Modulation by CR-1409(Lorglumide), a cholecystokinin receptor antagonist, of trypsin inhibitor-enhanced growth of azaserine-induced putative preneoplastic lesions in rat pancreas. *Cancer Res* 1989;49:2438-2441.
  19. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47:936-942.
  20. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 1987;47:943-946.
  21. 송시영, 김원호, 전미연, 등. Desferoxamine이 시험관 내 인체 간암세포 성장에 미치는 영향. *대한내과학회지* 1994;47:359-380.
  22. Smith JP, Barrett B, Solomon TE. CCK stimulates growth of five human pancreatic cancer cell lines in serum-free medium [Abstract]. *Gastroenterology* 1987;92:1646.
  23. Frazier ML, Pathak S, Wang ZW, et al. Establishment of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line, MDAPanc-3. *Pancreas* 1990;5:8-16.
  24. Smith JP, Mohesky C, Barrett B, et al. CCK stimulates growth of human pancreatic cancer [Abstract]. *Dig Dis Sci* 1986;31:1150.
  25. Funakoshi A, Kono A. Growth inhibition of human pancreatic cancer cells by cholecystokinin receptor antagonist in tissue culture and in nude mice. *Gastroenterologia Japonica* 1992;27:78-82.
  26. Fekete M, Zalatnai A, Comaru-Schally AM, Schally AV. Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 1989;4:521-528.
  27. Greenway BA. Carcinoma of the exocrine pancreas: a sex hormone responsive tumour? *Br J Surg* 1987;74:441-442.
  28. Liebow C, Hierowski M, DuSapin K. Hormonal control of pancreatic cancer growth. *Pancreas* 1986;1:44-48.
  29. Clemente F, Scemama JL, Ruellan C, Estival A. Human pancreatic cancer cells in culture: An approach to their hormonal regulation and differentiation. *Front Gastrointest Res* 1986;12:28-39.
  30. Alexander RW, Upp JR Jr., Singh P, Hugh T, Poston GJ, Townsend CM Jr. Asperlicin inhibits the growth of a xenografted human pancreatic carcinoma [Abstract]. *Gastroenterology* 1987;92:1293.
  31. Abbruzzese JL, Gholson CF, Daugherty K, et al. A pilot clinical trial of the cholecystokinin receptor antagonist MK-329 in patients with advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 1992;7:165-171.
  32. Chang RS, Lotti VJ, Monaghan RL, et al. A potent nonpeptide cholecystokinin antagonist selective of peripheral tissues isolated from *Aspergillus alliaceus*. *Science* 1985;230:177-179.
  33. Niederau C, Liddle RA, Williams JA, Grendell JH. Pancreatic growth: interaction of exogenous cholecystokinin, a protease inhibitor, and a cholecystokinin receptor antagonist in mice. *Gut* 1987;28:63-69.