

□ 원 저 □

폐암세포주(PC-14)에서 복합항암제 처치시 암세포살해능의 증강에 관한 연구

원자력병원 내과, 분자종양학연구실

이 춘 택

= Abstract =

Enhancement of Cytotoxicity by the Combination of Anticancer Drugs in Human Lung Adenocarcinoma Cell Line (PC-14)

Choon-Taek Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Laboratory of Molecular Oncology,
Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea*

Background : No ideal combination chemotherapy for lung cancer has been established even though lots of combination anticancer chemotherapies have been tried. For the combination of anticancer drugs, the interaction of anticancer drugs is very important but unpredictable factor. In this experiment, we designed and tested new experiment to measure the interaction of two anticancer drugs using MTT assay in an attempt to predict clinical response of the combination regimen.

Methods : With human lung adenocarcinoma cell line (PC-14), the cytotoxic effect of cisplatin, adriamycin, mitomycin C and etoposide were measured by *in vitro* chemosensitivity test (MTT assay). The combined cytotoxic effects of combination of two drugs were also measured in every combination of the drug concentrations and analyzed the interaction by Anova analysis of two way factorial design.

Results : Four individual drugs showed cytotoxic effects on PC-14 by dose dependent fashion. Comparison of two drug combinations revealed that mitomycin C + cisplatin and adriamycin + cisplatin combinations showed stronger synergistic cytotoxic effects.

Conclusion : From this experiment, we suggest two combinations of mitomycin C + cisplatin and adriamycin + cisplatin as chemotherapeutic regimens for unresectable non-small cell lung cancer. Furthermore, this experimental design could be applied to other types of cancer requiring combination anticancer chemotherapy.

Key words : Lung cancer, Combination chemotherapy, MTT assay, Cytotoxicity

서 론

최근 들어 흡연인구의 증가와 대기오염의 심화로 폐암의 발생이 꾸준히 증가하여 1992년 통계에 의하면 한국인의 남자에서 폐암이 위암, 간암에 이어 제3위의 암이 되었으며¹⁾ 향후 계속 증가하리라 생각된다. 폐암은 초기에는 암의 특이적인 증상이 없어 대부분 발견당시 근치수술이 불가능한 제IIIb 혹은 IV기이며, 절제가 가능하여 수술을 받았던 환자도 재발이 많아 예후가 지극히 불량한 암으로 알려져 있다. 폐암은 생물학적, 병리학적 특성에 따라 비소세포폐암과 소세포폐암으로 구분되는데 비소세포폐암이 전체의 70-80%를 차지한다. 절제불능이거나 수술 뒤 재발한 비소세포폐암의 치료는 방사선치료 및 항암화학요법이 주가 되고 있다²⁾. 비소세포폐암의 화학요법에 널리 이용되는 항암제로는 cisplatin, adriamycin, mitomycin-C, 및 etoposide 등이 있다. 최근의 폐암의 항암치료는 2제 또는 3제의 항암제를 복합적으로 투여하고 있는데 한 복합화학요법의 효과를 판정하는데는 제 1, 2, 3상의 임상연구를 하여야 하므로 오랜 시간이 걸리고 연구대상의 차이로 정확한 평가가 어렵고 연구자마다 결과가 달라 최선의 복합화학요법을 결정하는데 어려움이 많았다. 최근 항암제감수성 테스트에 대한 연구가 진행되면서 MTT검사³⁾, clonogenic assay⁴⁾, DiSC검사⁵⁾ 등으로 체외에서 항암제의 암세포살해능을 평가할 수 있게 되었다. 나아가 복합하는 약의 종류에 따른 항암효과의 변화를 실험실적으로 예측할 수 있다면 현재까지의 임상실험의 경험에 의존하는 복합항암화학요법의 효과를 미리 예측할 수 있어 큰 도움이 되리라 생각된다. 이에 본 연구에서는 항암제 감수성검사인 MTT assay를 이용하여 폐암세포주에서 2제 복합투여시 항암효과의 변화를 예측하는 모델을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 PC-14는 사람의 폐선암세포주로 RPMI-1640 + 10% fetal calf serum(FCS) + penicillin 100U/ml, streptomycin 100ug/ml의 배양액으로 배양하였다. 세포는 세포배양플라스크 내의 세포농도에 따라 3-4일에 1번씩 계대배양하였다. 사용된 항암제인 cisplatin (동아제약)은 0.5mg/ml, adriamycin (동아제약)은 1mg/ml, mitomycin C (Hyowa-Hakko Kogyo Co.)는 1mg/ml, etoposide (동아제약)는 1mg/ml의 저장용액을 만들어 -70℃에 보관하였다가 실험직전에 RPMI-FCS로 필요한 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. MTT용액 (Sigma, USA)은 phosphate buffered saline으로 5mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 갈색병에 넣어 4℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

가. 단세포부유액의 준비

PC-14는 부유상태로 자라는데 지수성장기에 있는 PC-14를 20회 정도 pipetting을 하여 단세포부유액을 만들었다. 세포수는 hemocytometer로 측정하였으며 이때 trypan blue염색으로 세포의 생존율이 95% 이상임을 확인하였다.

나. MTT assay에 의한 세포살해능의 측정

MTT 검사는 Mosmann의 방법³⁾을 약간 변형하여 사용하였다. 한 well에 들어갈 5×10^3 개의 세포를 단독약물투여시에는 135ul에, 2제약물투여시에는 120ul가 되도록 RPMI-FCS에 희석하여 96well plate

Table 1. Combination administration of cisplatin and adriamycin

Cisplatin Adriamycin	0	0.1	0.3	1.0	3.0	10.0ug/ml
0	v	v	v	v	v	v
0.01	v	v	v	v	v	v
0.03	v	v	v	v	v	v
0.1	v	v	v	v	v	v
0.3	v	v	v	v	v	v
1.0ug/ml	v	v	v	v	v	v

에 넣은 후 4시간 배양후 각 well에 cisplatin은 최종 농도가 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 및 10.0ug/ml가 되도록 약제를 15ul 투여하고 adriamycin, mitomycin C는 최종농도가 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 및 1.0ug/ml가 되도록 투여하였으며 etoposide는 최종농도가 0.3, 1.0, 3.0, 10.0 및 30.0ug/ml가 되도록 투여하였다. 복합투여시에는 2가지 약제를 같이 투여하였다. 약제 투여후 4일간 5% CO₂ incubator에서 배양한 다음 MTT용액을 한 well당 15ul씩 넣고 다시 4시간 배양하였다. 배양후 acid isopropanol (0.04N, Merck, Germany)을 각 well에 150ul 씩 넣고 20 회 정도의 강한 pipetting으로 formazan결정을 용해시킨후 분광광도계 (Minireader II, Dynastech Lab. USA)를 사용하여 570nm에서 광학농도(O. D.)를 측정하였다. 한 농도에서의 실험은 3well에서 측정하여 평균치를 사용하였으며 모든 실험은 3회 반복하여 평균치와 표준편차를 구하여 사용하였다⁶⁾.

다. 세포살해능의 평가

세포살해능은 대조군의 광학농도에 대한 실험군의 광학농도의 비율을 구하여 % 생존율로 표시하였으며 3 회 반복하여 평균 및 표준편차를 구하였다.

라. 두 가지 약제의 복합투여시 암세포살해능의 측정

두 종류의 약제를 각각 6단계의 농도의 모든 조합에서 투여하여 PC-14의 생존율을 MTT검사에 의해 측정하였다(Table 1).

각 well의 실험은 3배수로 실시하여 평균치를 암세

포의 생존율로 정하였으며 이런 실험을 3회 반복하여 실시하였다.

마. 통계처리

SAS 통계프로그램을 이용하여 이원배치법(two-way factorial design)으로 Anova analysis of variance를 이용하여 두 인자 (두 종류의 항암제)간의 상호작용 (interaction)을 측정하였다.

$$(A + B) = (A) + (B) + (A \times B)^* + E$$

*(A × B) : interaction between A and B

** Positive interaction : synergism between A and B

Negative interaction : antagonism between A and B

$$*** F(5, 25; 0.05) = 2.62$$

F value > 2.62 : means presence of interaction (positive or negative)

F value < 2.62 : means absence of interaction (simple additive effect)

결 과

1. 항암제 단독 투여시의 PC-14의 생존율

Cisplatin을 단독투여시 PC-14는 0.1ug/ml에서

60.3%의 생존율을 보였고 0.3ug/ml에서는 39.8%, 1.0ug/ml에서는 25.7%, 3.0ug/ml에서는 15.1% 및 10.0ug/ml에서는 12.8%의 생존율을 보였다 (Fig. 1).

Adriamycin을 단독투여시에는 PC-14는 0.01 ug/ml에서 93.6%, 0.03ug/ml에서는 81.2% 0.1 ug/ml에서는 39.2%, 0.3ug/ml에서는 26.8% 및 1.0ug/ml에서는 14.6%의 생존율을 보였다(Fig. 2).

Mitomycin C를 단독투여시 PC-14는 0.01ug/ml에서 59.6%, 0.03ug/ml에서는 39.9%, 0.1ug/ml에서는 30.4%, 0.3ug/ml에서는 22.3% 및 1.0 ug/ml에서는 14.1%의 생존율을 보였다(Fig. 3).

Etoposide(VP-16)을 단독투여시 PC-14는 0.3ug/ml에서 94.4%, 1.0ug/ml에서는 86.1%, 3.0 ug/ml에서는 62.6%, 10.0ug/ml에서는 38.0% 및 30.0ug/ml에서는 31.5%의 생존율을 보였다(Fig. 4).

2. 2종류의 항암제를 복합투여시의 항암효과

Cisplatin, adriamycin, mitomycin C 및 etoposide는 사람의 폐암세포(PC-14)에 2제씩 복합투여시 positive interaction(synergistic effect)의 암세포 살해능의 증가를 보였다(Table. 2). 그 중 cisplatin과 mit- omycin C를 복합투여시 가장 강한 positive interaction을 보였으며 (Fig. 5), cisplatin과 adriamycin을 복합투여시 두 번째로 강한 positive interaction을 보였다 (Fig. 6). 그러나 adriamycin과 etoposide를 복합투여시에는 positive interaction을 보였으나 6종류의 조합중 가장 약하였다 (Fig. 7).

고 찰

수술로 근치적 치료가 불가능한 폐암의 치료에는 방사

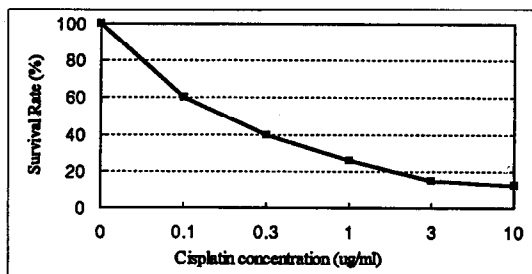


Fig. 1. Antitumor effect of cisplatin on PC-14

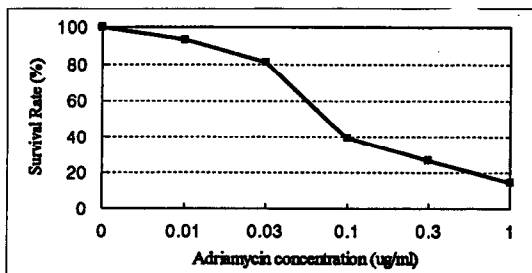


Fig. 2. Antitumor effect of adriamycin on PC-14

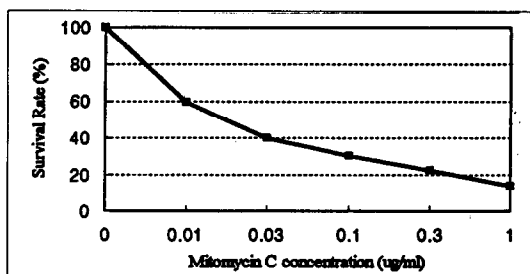


Fig. 3. Antitumor effect of mitomycin C on PC-14

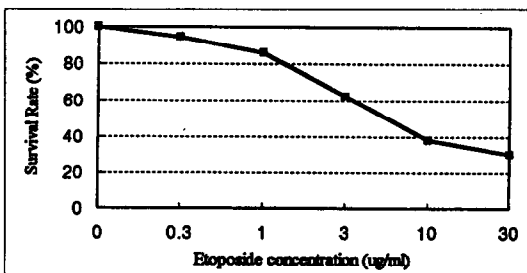


Fig. 4. Antitumor effect of etoposide on PC-14

Table 2. Statistical analysis of interaction between two drugs

Drug Combination	D.F.*	F— value	Rank
Cisplatin+ Adriamycin	25	26.27	2
Cisplatin+Mitomycin C	25	36.51	1
Cisplatin+Etoposide	25	13.50	5
Adriamycin+Mitomycin C	25	22.40	3
Adriamycin+Etoposide	25	13.23	6
Mitomycin C+Etoposide	25	14.72	4

*D.F. : degree of freedom

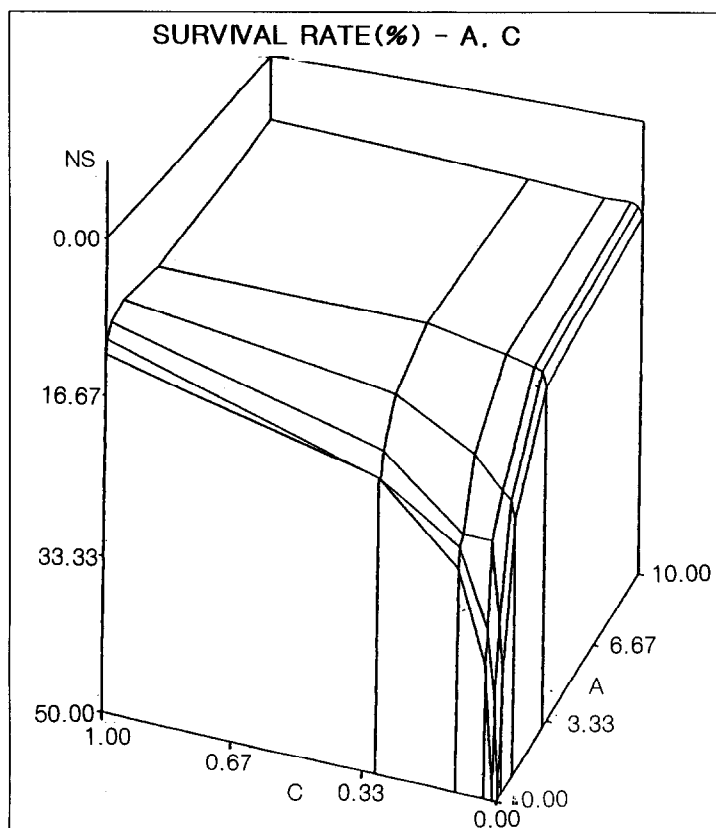


Fig. 5. Three dimensional diagram of drug interaction between cisplatin (A) and mitomycin(C).

Z axis means survival of PC-14

Drug interaction can be estimated by the curvature of dose-survival curve surface. Flat surface means no interaction. Convex surface means positive interaction(synergism). Concave surface means negative interaction(antagonism).

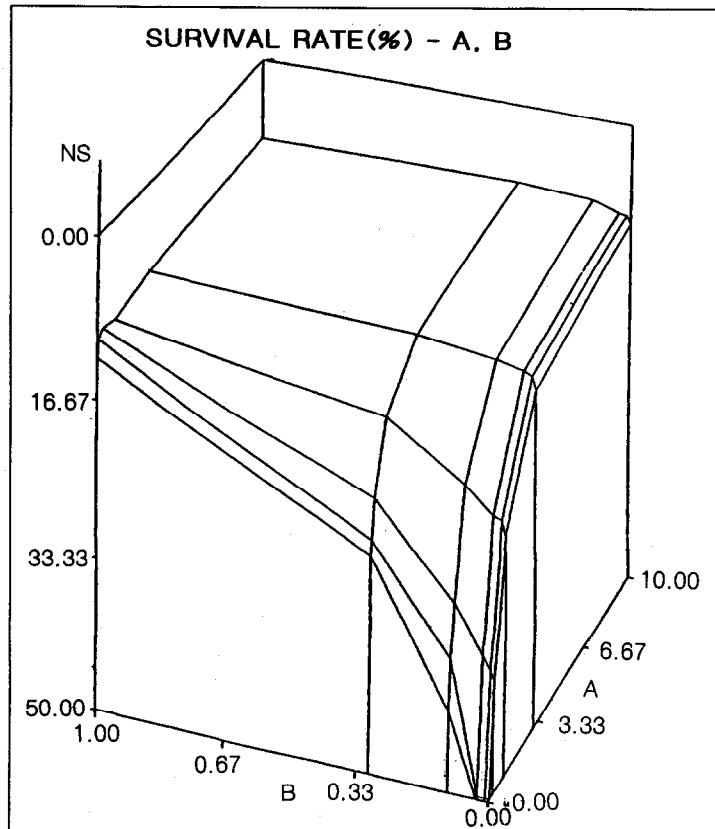


Fig. 6. Three dimensional diagram of drug interaction between cisplatin (A) and adriamycin (B)

선요법 및 항암화학요법이 주된 치료법이 되고 있다. 소세포폐암에서의 항암화학요법의 가치는 확립되어 있으나 비소세포폐암에서의 항암화학요법의 역할은 아직 확립되지 못하고 있으나 최근 여러 종류의 항암제의 복합요법 및 새로운 항암제의 개발로 많은 임상연구가 보고되고 있으며 향후 큰 발전이 있으리라 기대되고 있다. 폐암에서의 항암화학요법도 다른 암과 마찬가지로 단일항암제의 투여보다는 2제 이상의 항암제를 같이 투여하는 복합화학요법이 주를 이루고 있다. 복합항암화학요법시 약물 선택하는 기준을 보면 첫째 각 단일 약제가 해당 암에 효과가 있어야 하며 둘째 여러 계열의 항암제가 효과가 있을 때는 부작용이 적은 항암제를 택하며 복합시에는 부작용이 겹치지 않는 항암제들을 선택해야 되며 셋째 각 항암제는 적

절한 양과 스케줄에 따라 투여해야하며 넷째 복합항암화학요법은 일정간격을 두고 투여되어야 한다는 점이다⁷⁾. 여기서 각각 효과가 있는 두 종류이상의 항암제를 투여시에는 약제상호작용에 의해 상승효과를 보일 수도 있고 혹은 억제효과를 보일 수도 있다. 이는 약제의 작용기전에 의해 추정할 수 있으나 객관적으로 측정하기가 어려웠다. 항암제감수성을 측정하는 MTT 검사 등이 개발되면서 각종 암세포에 대한 항암제감수성의 측정이 가능해지면서 이를 임상에 응용하고자 하는 시도가 많이 있어 왔다. 특히 항암제의 감수성이 높은 암에서 각 환자에서 얻은 암세포를 체외에서 배양하여 항암제감수성검사를 통해 항암효과가 높은 항암제들을 선택하여 항암화학요법을 시도하는 연구도 있다⁸⁾.

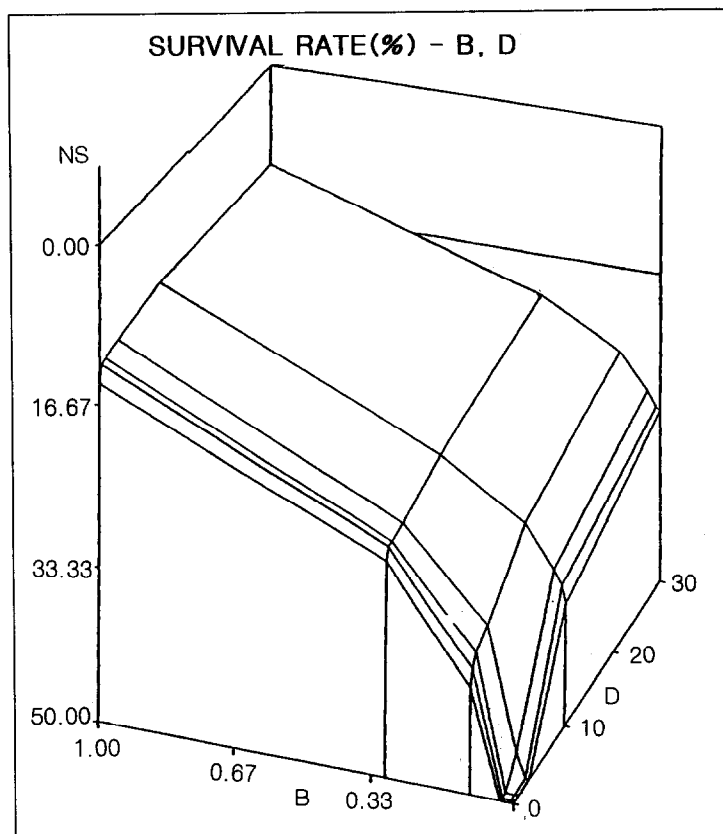


Fig. 7. Three dimensional diagram of drug interaction between adriamycin (B) and etoposide (D)

또한 암세포를 대상으로 2제의 항암제를 복합투여 시 각각 항암제를 단독으로 투여하였을 때에 비해 단순히 두 약제의 항암작용의 합으로만 항암효과가 나타나는지 혹은 두 약제의 상호작용에 의해 항암효과가 상승 혹은 억제되는지를 측정하는 것이 중요하다. 과거에는 전통적으로 isobologram⁹⁻¹²⁾을 이용하여 측정하였으나 시간이 많이 걸리는 것이 단점이었다. 본 연구에서는 SAS통계프로그램을 이용한 이원배치법을 이용하여 측정하였다. 즉 앞서 설명한 복합화학요법의 원칙을 지키며 복합화학요법시 약제를 정할 때 항암효과의 강한 상승을 보이는 약제의 선택을 가능케 해주었다. 본 연구 결과를 보면 비소세포폐암세포를 대상으로 두 약제를 투여시 모든 조합에서 항암효과의

상승을 보였으나 특히 cisplatin과 mitomycin C의 조합 및 cisplatin과 adriamycin의 조합에서 강한 상승효과를 보여 두 약제의 조합이 임상실험에 바람직한 조합이 되리라는 것을 추정할 수 있었다. 물론 체외항암제감수성검사의 결과와 임상실험의 결과와 꼭 일치한다고 할 수는 없다. 그러나 현재 비소세포폐암의 항암치료에 널리 이용되고 가장 높은 치료반응율을 보이는 MVP (mitomycin C + vinblastine 혹은 vindesine + cisplatin)^{13,14)}에 이미 mitomycin C와 cisplatin의 조합은 널리 사용되고 있으며 cisplatin과 adriamycin의 조합도 이미 CAP (cytoxan + adriamycin + cisplatin)¹⁵⁾에서 이미 사용되고 있어 본 실험의 결과가 임상결과와 일치

할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 나아가 이번 연구는 여러 종류의 암에서 복합화학요법시 항암제를 선택할 때 새로운 한가지의 선택기준이 될 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구중 통계처리를 도와 주신 이화여자대학교 계산통계학과 신동완교수님, 수원대 산업공학과 오근태교수님과 연구 전반에 대해 조언을 주신 울산의대 내과 홍원선교수님께 감사드립니다.

요 약

연구배경 :

수술적 절제가 불가능한 폐암환자에서 복합화학요법의 역할이 최근 증대되고 있으나 아직 가장 이상적인 복합화학요법은 확립되지 않고 있다. 두 종류 이상의 항암제를 복합투여시 약제간의 상호작용에 의해 항암효과의 상승 혹은 억제될 수 있으나 이를 예측하기가 어려웠다. 본 연구에서는 MTT 검사를 이용하여 두 약제를 여러 농도에서 복합투여후 살해능의 변화를 관찰하였다.

방 법 :

사람의 폐선암세포인 PC-14를 이용하여 cisplatin, mitomycin C, adriamycin 및 etoposide를 여러 농도에서 단독 또는 두 약제를 복합투여하여 항암효과의 변화를 MTT 검사로 측정하고 두 약제 복합투여시의 상호 작용의 결과를 이원배치법을 이용한 Anova분석을 이용하여 측정하였다.

결 과 :

위의 네종류의 약제는 단독투여시 농도에 비례하는 암세포살해능을 보였고 두 약제를 복합투여시 모든 조합에서 암세포살해능의 상승효과를 보였으며 특히 mitomycin C와 cisplatin 및 adriamycin과 cisplatin을 복합투여시 상승효과가 강하게 나타났다.

결 론 :

위의 결과로 비소세포폐암의 복합화학요법시 mitomycin C와 cisplatin 혹은 adriamycin과 cisplatin을 같이 사용할 경우 항암효과의 극대화를 얻을 수 있으리라 기대된다. 나아가 이번 연구의 디자인은 복합항암화학요법을 필요로 하는 모든 종류의 암에 적용되어 최대항암효과를 얻을 수 있는 약제선정에 도움이 될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 안동희: 암등록사업과 암으로 인한 사망—연도별 추이. 대한의학협회지 36:292, 1992
2. Ginsberg RJ, Vokes EE, Raven A: Section 2. Non-small cell lung cancer. Chapter 30. Cancer of the lung, In DeVita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA (Ed.) Cancer principle and practice of oncology. 5th Ed., p858, Philadelphia, Lippincott-Raven 1997
3. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth 65:55, 1983
4. Von Hoff DD, Kronmal R, Salmon SE, et al. A southwest oncology group study on the use of human tumor cloning assay for predicting response in patients with ovarian cancer. Cancer 67:20, 1991
5. Bosanquet AG, Bell PB: Enhanced ex vivo sensitivity testing of chronic lymphocytic leukemia using refined DiSC assay methodology. Leuk Res 1996(in press)
6. Hong WS, Kim CM, Lee C-T, Lee JO, Kang TW. Modification of adriamycin-induced cytotoxicity by recombinant human interferon-gamma and/or verapamil in human stomach cancer cells. J Kor Med Sci 7:236, 1992

7. DeVita VTJr: Chapter 17. Principle of cancer management: chemotherapy, *In* DeVita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA (Ed.) Cancer Principle and practice of oncology. 5th Ed., p333, Philadelphia, Lippincott-Raven 1997
8. Fruehauf JP, Bosanquet AG: In vitro determination of a drug response: a discussion of clinical applications. PPO updates 12:1, 1993
9. Steel GG, Peckham MJ: Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. In J Radiat Oncol 5:85, 1979
10. Barenbaum MC: Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. Adv Cancer Res 35:269, 1981
11. Balkwill, Moodie: Positive interactions between human interferon and cyclophosphamide or adriamycin in a human tumor model system. Cancer Res 44:904, 1984
12. Kano Y, Narita T, Suzuki K, Akutsu M, Suda K, Sakamoto S, Miura Y. The effects of ICRF-154 in combination with other anticancer agents in vitro. Br J Cancer 66: 281, 1992
13. Ruckdeschel JC, Finkelstein DM, Ettinger DS, Creech RH, Mason VA, Ross RH, Vogels A : A randomized trial of the four most active regimens for metastatic non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 4:14, 1986
14. 이상구, 임영혁, 이춘택, 김형건, 손태용, 유영진, 천은미, 강윤구, 김영환, 이진오, 강태웅. 진행성 비소세포폐암에서의 mitomycin C, vinblastine 및 cisplatin (MVP)의 3제 복합화학요법의 효과. 대한암학회지 27:84, 1995
15. Lad T, Rubinstein L, Sadeghi A: The benefit of adjuvant treatment of resected locally advanced non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 6:9, 1988