

□ 원 저 □

비소세포폐암 세포주에서 고용량 Cisplatin 세포독성에 대한 Glutathione의 효과

조선대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*

이승일, 부귀범, 장대용, 정기영,
서정균, 이병래*, 정중훈

= Abstract =

The Effect of Glutathione on High Dose Cisplatin-Induced Cellular Toxicity in Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines

Seung Il Lee, M.D., Gwi Beom Boo, M.D., Dai Yong Jang, M.D.,
Ki Young Chung, M.D., Jeoung Gyun Seo, M.D.,
Byeong Lai Lee, M.D.*, Jong Hoon Chung, M.D.

*Departments of Internal medicine and Biochemistry**
College of Medicine, Chosun University, Kwangju, Korea

Background : This study was designed to examine how glutathione, one of the nucleophilic sulfur compounds, effects the cisplatin cellular toxicity in the non-small cell lung cancer cell lines and normal lung epithelial cell line.

Method : Three cultured cell lines, the lung adenocarcinoma cell(NCI-H23), the lung squamous carcinoma cell (SK-MES-1) and the normal lung epithelial cell(L-132) line were exposed to various concentrations of cisplatin with or without glutathione. The relative viability was estimated as a means of measuring the cisplatin cellular toxicity using the MTT method.

Results : In NCI-23, the response to cisplatin was sensitive but glutathione markedly increased the relative survival of the tumor cells by removing the antitumor effect of cisplatin. In both SK-MES-1 and L-132, the responses to cisplatin were less sensitive, and the chemoprotective effect of glutathione compared to an equal

Address for correspondence :

Seung Il Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Chosun University Hospital

588 Seosuk-dong, Dong-gu, Kwangju, 501-140, Korea

Phone : 062-220-3033 Fax : 062-234-9653 E-mail : silee@mail.chosun.ac.kr

cisplatin dose was significantly higher in L-132 than in SK-MES-1 ($p < 0.05$).

Conclulsion : The protective effects of glutathione on cisplatin-induced cellular toxicity is more significant in normal lung epithelial cells than in squamous carcinoma cells. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2002, 52 : 463-474)

Key words : Glutathione, High-dose cisplatin, Non-small cell lung cancer cell lines, Cellular toxicity

서 론

비소세포폐암은 전체 폐암의 75%를 차지하고 최근의 분자생물학적 발전에도 불구하고 5년 생존율이 미미하여 예후가 별로 좋지 않은 암이다. 대부분 병기가 3기 이상의 진행된 상태에서 진단되어 수술할 시기를 놓치는 경우가 많아서 항암요법 또는 방사선 요법이 주된 치료가 된다. Cisplatin(CDDP)은 alkylating 계열 항암제의 일종으로 광범위한 항암효과를 가지고 있어 폐암뿐 아니라 두경부암, 난소암, 소화기암, 골육종 등의 연부조직암에서 최근 활발히 사용되고 있다. Cisplatin의 충분한 항암효과를 기대할 수 있는 용량을 결정하는데 중요한 것이 용량 제한성(dose-limiting) 부작용으로, 결국 악성종양세포와 정상세포를 구분할 수 없어 발생하게 되며 이는 한번의 고용량(single high dose) 및 축적되는 용량(cumulative dose) 모두에서 생길 수 있다. 흔하게 발생할 수 있는 용량 제한성 부작용으로는 신독성, 신경독성, 소화기독성, 이독성, 골수독성 등이 있으며, 이중 가장 심각한 결과를 초래할 수 있는 것은 신독성과 신경독성이다. 신독성은 충분한 수액요법과 이뇨제사용으로 최소화할 수 있으나 신경독성은 200-350mg/m²이상의 용량에서는 대부분에서 발생하게 된다^{1, 2, 5-7}.

최근 화학적 보호제제(chemoprotectants)들을 사용하여 이러한 cisplatin의 용량 제한성 부작용들을 최소화시키면서 고용량의 cisplatin을 시도해 항암효과를 강화시키려는 연구가 많이 시행되고 있다. 구핵성 황(nucleophilic sulfur)물질들을 함유한 제제들로 glutathione, amifostine, thiosulfate 등이 있는데, cisplatin독성을 최소화 할 수 있는 강력한 효과를 가

지고 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 두가지 비소세포폐암세포주(폐선암과 폐편평상피암)와 정상폐포상피세포주에서 각각 단계적으로 cisplatin용량을 고용량으로 증량시키면서 세포독성효과를 먼저 비교하고 다시 glutathione을 함께 투여하였을 때 glutathione이 고용량 cisplatin의 세포독성에 미치는 효과를 각 세포주들에서 비교해 알아보고자 하였다. 이와 함께 고용도로 투여한 cisplatin의 항암효과에 최소한으로 영향을 미치면서 정상폐포상피세포에 대한 cisplatin에 의한 세포독성을 보호할 수 있는 적절한 glutathione의 농도를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 세포의 배양

폐선암 세포주(Human lung adenocarcinoma cell; NCI-H23), 폐편평상피암세포주(human lung squamous carcinoma cell; SK-MES-1) 및 정상폐포상피세포주(human lung epithelial cell; L-132) 모두 3가지 세포주를 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 L-132 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin (100U/ml), streptomycin (100U/ml) 및 nystatin(25ug/ml)등을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지에서, NCI-H23과 SK-MES-1 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), penicillin (100U/ml), streptomycin (100U/ml) 및 nystatin (25ug/ml) 등을 함유한 RPMI-1640 배지에서 CO₂ 배양기로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

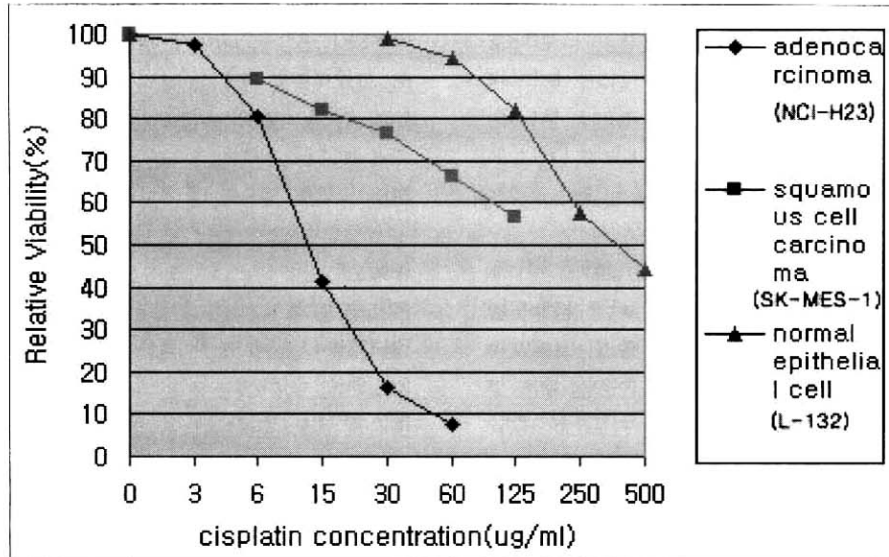


Fig. 1. Comparison the relative viability among three cell lines exposed to varying concentration of cisplatin.

2. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)에 의한 HRPE 세포 독성 측정

Cisplatin에 의한 세포 독성은 MTT법을 이용하여 측정하였다. 즉 배양된 세포에 MTT를 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하여 4시간동안 배양시킨 후 배양액을 제거하고, Hank's balanced salt solution (HBSS)로 3회 세척한 후 MTT 용해액[50% N,N-dimethylformamide(v/v); 20% sodium dodecyl sulfate(W/v), pH4.7] 200ml를 첨가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

배양한 세포를 배양용기에 각각 옮겨 3일간 배양한 후 cisplatin을 넣어주었는데 세포주들마다 항암제에 대한 감수성에 따라 마지막 최고농도를 달리 하였으며 각각 NCI-H23은 0, 3, 6, 15, 30, 60 $\mu\text{g/ml}$, SK-MES-1은 0, 6, 15, 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 그리고, L-132는 0, 30, 60, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도들의 cisplatin을 함유한 배양액으로 24시간 배양 후 배양

액을 교환하여 24시간 더 배양한 후 MTT 법으로 cisplatin에 의한 세포독성을 측정하였다.

또한 glutathione의 세포주들에 대한 영향은 배양한 세포를 배양용기들에 각각 옮겨 배양한 후 cisplatin(NCI-H23 : 0, 3, 6, 15, 30, 60 $\mu\text{g/ml}$, SK-MES-1 : 0, 6, 15, 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$; L-132 : 0, 30, 60, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 glutathione(NCI-H23 : 0, 20, 50, SK-MES-1 and L-132 : 0, 100, 250 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가한 배양액으로 24시간 배양 후 배양액을 교환하여 24시간 더 배양한 후 MTT를 시행하여 cisplatin의 세포독성과 함께 이에 대한 glutathione의 세포보호효과를 측정하였다.

3. 결과 분석

모든 실험은 4회 동일 실험을 시행하여 모든 측정결과는 평균 표준편차로 표시하였고, 실험결과의 분석은 SPSS 10.0에서 ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 판정하였다.

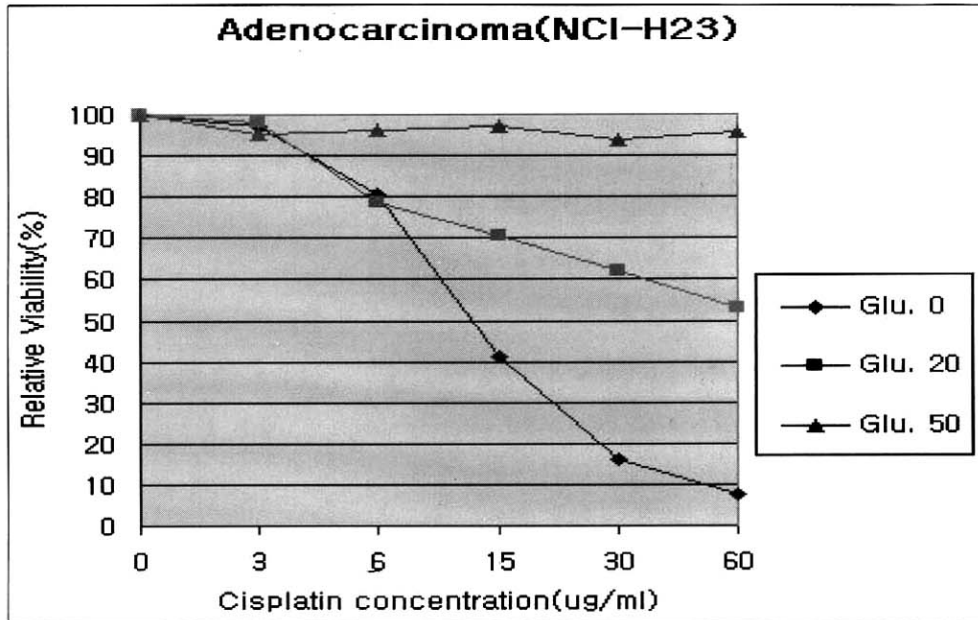


Fig. 2. The relative viability of adenocarcinoma cell line (NCI-H23) exposed to varying concentration of cisplatin \pm glutathione.

결 과

본 연구에서 선택한 세포주는 폐선암세포주(human lung adenocarcinoma cell ; NCI-H23) 및 폐편평상피암세포주(human lung squamous carcinoma cell ; SK-MES-1) 및 정상폐상피세포주(human lung epithelial cell ; L-132)로 3종류였다. Cisplatin을 투여한 후 각 세포주들의 세포생존율은 cisplatin을 투여하지 않았을 때의 생존율을 대조치로 하여 비교하였는데 cisplatin을 주지않을 때 생존율을 100%로 잡고 각각 cisplatin농도 투여시의 생존율을 그에 대한 백분율로 표시한 상대적인 생존율을 사용하여 비교하였다.

1. cisplatin 농도에 따른 세포생존율

먼저 glutathione의 투여 없이 cisplatin만 투여한 경우에서 각 세포주에 따른 cisplatin의 단계적인 농도 증량후 상대적 세포생존율을 구하였다. 폐선암세포주

의 경우 cisplatin 15 μ g/ml농도에서 41.1%만이 생존하였고, 60 μ g/ml농도에서 7.8%만이 생존하여 항암효과가 비교적 민감한 반응을 보인 반면 폐편평상피암세포주에서는 60 μ g/ml의 농도에서 66.2%, 125 μ g/ml로 증량시 56.7%의 생존율을 보였다. 정상폐상피세포주에서는 cisplatin 60 μ g/ml의 농도에서 94.3%의 생존율로 거의 반응이 없었고 500 μ g/ml의 아주 높은 고농도로 올려서야 44.5%의 생존율을 보이며 cisplatin에 의한 세포독성효과를 보였다(Fig. 1).

2. cisplatin과 glutathione 함께 투여시 폐선암세포주의 생존율

Glutathione을 각각 농도의 cisplatin과 함께 투여한 경우에서 상대적 세포생존율을 비교해보면 세포주들간에 차이가 심하였는데, 폐선암세포주에서는 cisplatin의 세포독성에 민감하게 반응하면서 또한, glutathione에 의한 항세포독성효과도 두드러지게 나타났고 다른 세포주와 상이한 효과를 보였다. 폐선암세포

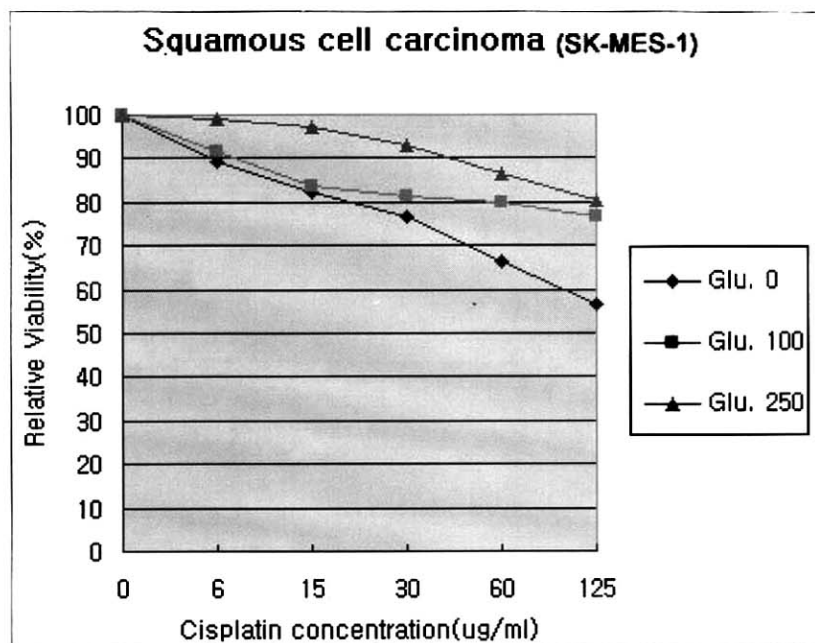


Fig. 3. The relative viability of squamous cell carcinoma line (SK-MES-1) exposed to varying concentration of cisplatin \pm glutathione.

주의 생존율이 41.1%로 절반이상의 암세포가 죽는 cisplatin 15 μ g/ml 농도에서 glutathione을 20, 50 μ g/ml 농도로 같이 투여하였을 때 상대적 암세포생존율이 각각 70.4%, 94.3%로 증가하였고, 암세포생존율이 7.8%로 대부분의 암세포가 죽는 cisplatin 60 μ g/ml의 농도에도 glutathione을 20, 50 μ g/ml 농도로 같이 투여하였을 때 52.9%, 95.5%로 암세포생존율의 직선적인 증가를 보여서 glutathione이 cisplatin의 항암효과를 상쇄시켜버리는 부정적인 결과를 보였다(Fig. 2).

3. cisplatin과 glutathione 함께 투여시 폐편평상피 암세포주의 생존율

폐편평상피암세포주에서는 cisplatin 농도 6, 15, 30 μ g/ml에서 glutathione을 주기 전 각각 89.3%, 82.2%, 76.5%의 암세포생존율을 보였는데 glutathione을 폐선암보다 많은 100 μ g/ml로 투여하였을 때 각

각 91.8%, 83.8%, 81.5%로 1.5-5%의 약간의 생존율 증가를 보였다. Glutathione을 250 μ g/ml로 더 증량하면 각각 99.1%, 97.2%, 93.2%로 glutathione을 주기 전보다 9.8-16.7%로 암세포생존율이 증가하여 glutathione이 cisplatin의 세포독성효과를 감소시켰다. Cisplatin 농도를 60, 125 μ g/ml로 더 높였을 때도 glutathione을 주기전 각각 66.2%, 56.7%의 암세포생존율이 glutathione을 100 μ g/ml로 함께 투여할 때 80%, 76.6%, glutathione을 250 μ g/ml로 더 높여 투여할 때 86.6%, 80.5%로 glutathione을 주기전 보다 13.8%에서 크게는 23.8%의 증가를 보이며 glutathione이 cisplatin의 세포독성효과를 감소시켰다(Fig. 3).

4. cisplatin과 glutathione 함께 투여시 정상폐상피 세포주의 생존율

정상폐상피세포주에서는 glutathione을 주기 전에

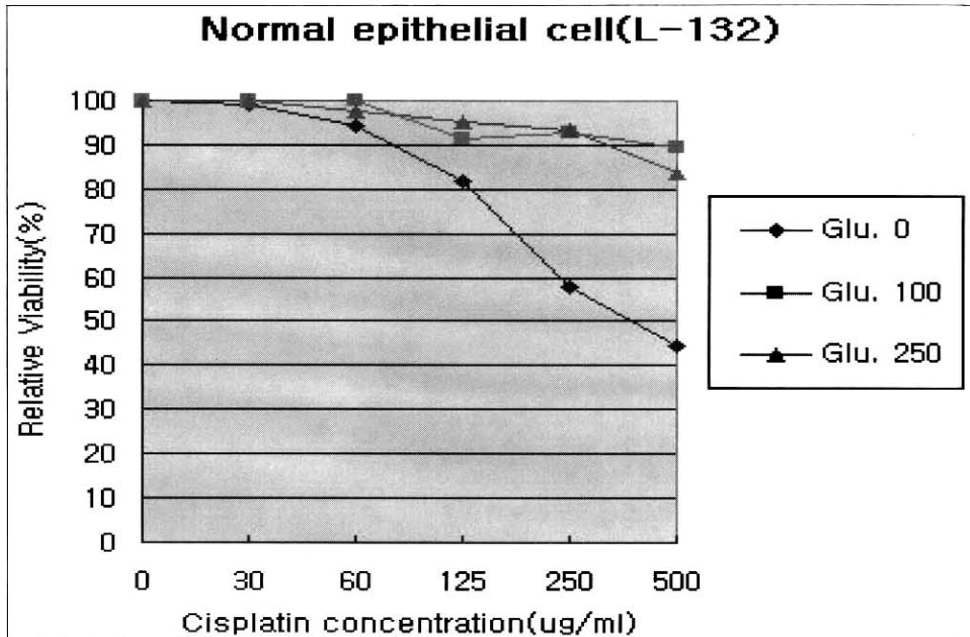


Fig. 4. The relative viability of normal epithelial cell line (L-132) exposed to varying concentration of cisplatin \pm glutathione.

cisplatin농도 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 로 주면 세포생존율이 98.9, 94.3, 81.9%로 약간의 세포들이 죽었는데 이들 농도에서 glutathione을 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 으로 각각 같이 투여하면 91.5%-100%까지 생존율이 증가되었다. 더 높은 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 cisplatin농도에서는 정상폐상피세포주에서도 57.9, 44.5%로 생존율이 낮아졌는데 glutathione을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함께 투여하면 각각 93, 89.6% 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 투여하면 93.1, 83.9%로 생존율들이 증가되었고 다른 세포주들 보다 더 큰 세포보호효과를 보였고 투여한 glutathione의 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 250 $\mu\text{g/ml}$ 으로 더 올려도 세포보호효과는 비슷하였다(Fig. 4).

이상의 결과에서 폐선암세포주에서는 항암제의 반응이 좋은 반면 함께 투여한 glutathione이 오히려 cisplatin의 항암효과를 상쇄시켜버린 결과로 나와 이는 glutathione이 cisplatin에 대한 암세포의 내성을 유발하였다고 볼 수 있다.

5. 각각 같은 농도의 cisplatin과 glutathione 투여하에서 폐편평상피암세포주와 정상폐상피세포주의 비교

폐선암세포주는 결과들의 너무 차이가 심해 비교하기가 힘들고 결국 폐편평상피암세포주와 정상폐상피세포주 두가지를 같은 cisplatin농도와 glutathione농도에서 비교하였다. 정상폐상피세포주에서 glutathione의 고농도 cisplatin에 의한 세포독성에 대한 보호효과가 더 큰 것으로 나타났고 ANOVA test에서도 통계적으로 $p < 0.05$ 수준에서 의의가 있는 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 5).

고 찰

항암제 투여에 의해서 이차적으로 발생하는 용량-제한성 독성은 항암제의 효과가 암세포와 정상세포를 구

Table 1. Comparison the relative survival in equally varying cisplatin doses between squamous cell carcinoma cell line and normal lung epithelial cell line(%). Glutathione protection to normal cell from cisplatin toxicity is more significantly effective than that of squamous carcinoma cell.(ANOVA, $p < 0.05$).

Squamous cell carcinoma(SK-MES-1) (%)							Normal lung epithelial cell(L132)(%)						
Glutathione 0 $\mu\text{g/ml}$							Glutathione 0 $\mu\text{g/ml}$						
cis.	1	2	3	4	AV	SD	cis.	1	2	3	4	AV	SD
125	56.9	50.0	61.2	58.5	56.7	4.8	125	89.1	81.2	80.2	76.8	81.8	5.2
60	64.9	59.2	69.7	71.0	66.2	5.3	60	88.4	94.6	99.2	94.8	94.2	4.5
30	78.8	71.6	77.3	78.1	76.4	3.3	30	99.3	98.7	1.0	97.4	98.8	1.1
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	0.0	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	0.0
Glutathione 100 $\mu\text{g/ml}$							Glutathione 100 $\mu\text{g/ml}$						
cis.	1	2	3	4	AV	SD	cis.	1	2	3	4	AV	SD
125	73.0	78.9	77.5	77.1	76.6	2.5	125	94.0	93.9	97.0	97.3	95.6	1.8
60	74.1	82.0	85.3	78.5	80.0	4.8	60	101.3	99.3	95.0	95.9	97.6	2.5
30	79.3	82.7	86.0	77.9	81.5	3.6	30	99.3	102.0	101.0	98.6	99.3	0.9
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	0.0	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	0.0
Glutathione 250 $\mu\text{g/ml}$							Glutathione 250 $\mu\text{g/ml}$						
cis.	1	2	3	4	AV	SD	cis.	1	2	3	4	AV	SD
125	86.2	78.9	80.0	77.2	80.6	3.9	125	84.3	93.9	95.1	92.9	91.5	4.9
60	87.7	85.2	84.0	89.0	86.5	2.3	60	103.3	101.3	102.1	98.1	99.5	1.0
30	97.1	93.0	90.0	93.1	93.3	2.9	30	99.3	102.1	104.9	96.8	99.0	1.5
0	100.0	10.0	100.0	100.0	100	0.0	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100	0.0

*Abbreviation- AV : average, SD : standard deviation, cis. : cisplatin concentration($\mu\text{g/ml}$)

분하지 못해 나타난다. 항암제의 용량-제한성 독성을 경감시키려는 시도가 최근 상당한 발전을 가져왔다. 화학적 보호제들(chemoprotectants)이 그것인데 이들 제제의 목적은 항암제의 항암효과에 큰 변화를 주지 않으면서 정상세포에 대한 치명적인 용량-제한성 독성을 줄이는 것이다. 최근 cisplatin, alkylating agents, anthracyclines 등의 항암제들의 정상조직세포를 손상시키는 정확한 기전이 이해되면서 더욱 활발하게 연구되고 있다. 특히, 구핵성 황복합체(nucleophilic sulfur compound)들이 강력한 화학적 보호제로 알려지게 되었으며, 이들 제제로는 glutathione, amifostine, sodium thiosulfate가 있으며 이들은

cisplatin 유도성 신경독성, 신장독성 및 골수독성에 대한 보호효과가 있다. 구핵성 황복합체(nucleophilic sulfur compound) 이외의 화학적 보호제들의 예로는 anthracycline 유도성 심장독성에 대한 보호효과가 있는 dexrazoxane, oxazaphosphorine(ifosfamide, cyclophosphamide) 유도성 요로계 상피세포독성에 대한 보호효과가 있는 mesna를 들 수 있다^{1, 2, 12, 14}. Cisplatin(CDDP)은 alkylating agent의 범주에 속하는 항암제로 작용기전은 크게 두 가지를 들 수 있는데 먼저 주 기전으로 DNA의 같은 가닥내의 두 개의 인접한 guanine에 공유결합해서 교차결합(cross-link)의 형성과 분해를 하면서 DNA 합성을 저해하고

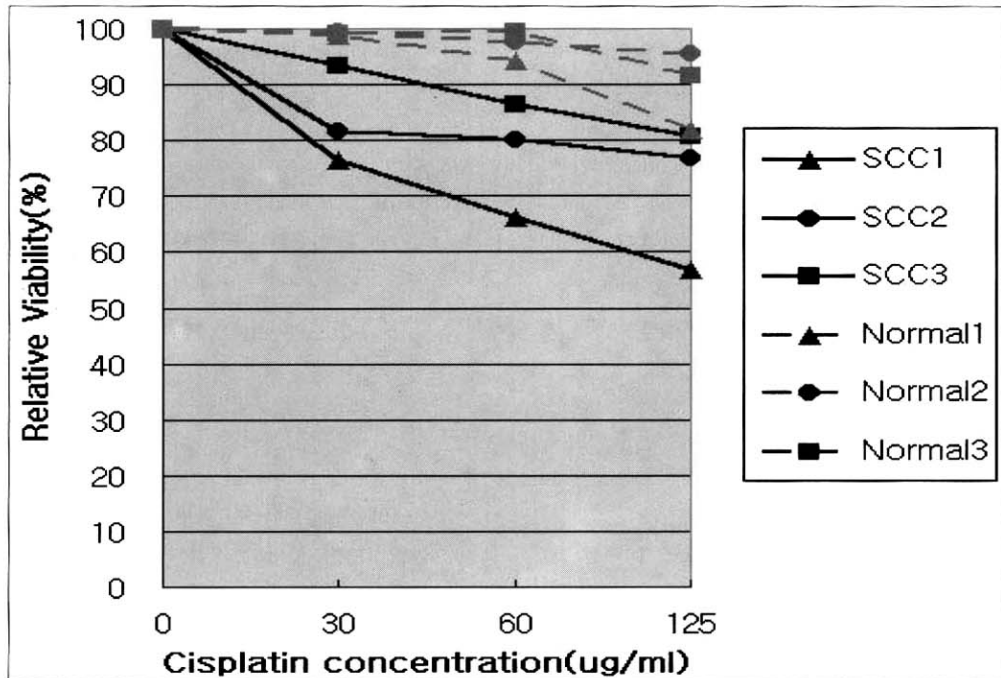


Fig. 5. Comparison the relative survival in equally varying cisplatin doses between squamous cell carcinoma cell line and normal lung epithelial cell line. (%)

*SCC1 : squamous cell carcinoma cell line, glutathione 0 $\mu\text{g/ml}$,
 SCC2 : squamous cell carcinoma cell line, glutathione 100 $\mu\text{g/ml}$,
 SCC3 : squamous cell carcinoma cell line, glutathione 250 $\mu\text{g/ml}$,
 Normal1 : normal lung epithelial cell line, glutathione 0 $\mu\text{g/ml}$,
 Normal2 : normal lung epithelial cell line, glutathione 100 $\mu\text{g/ml}$,
 Normal3 : normal lung epithelial cell line, glutathione 250 $\mu\text{g/ml}$.

이중나선구조를 변형시켜 항암작용을 낸다. 또 하나의 기전으로는 cisplatin을 포함한 대부분의 alkylating 제제에서 보일 수 있는 비특이적인 기전으로 산소유리기같은 강한 반응성 구핵성 중간체 (reactive nucleophilic intermediate)의 형성을 매개로한 세포독성이며, 이들이 DNA내의 guanine의 N7 위치같은 구핵성의 목표물에 공유결합하여 나타난다^{14,15}. 바로 후자의 기전이 구핵성 황복합체가 작용하는 기전으로 이런 반응성 중간체들에 대신 이들 제제가 구핵성 목표로 작용하여서 항암제로 인한 정상세포의 독성을 억제할 수 있다. 이러한 구핵성 황복합체들로는 본 연구에서

사용된 glutathione을 포함해서, 비교적 광범위하게 골수독성억제, 신독성억제 그리고 약간의 신경독성 억제효과가 있는 amifostine과 세포내 보다는 세포외의 cisplatin에 주로 작용하여서 난소암에서 신독성의 예방을 위한 복강내 투여 경로로 사용되는 sodium thiosulfate가 있다^{3,4,13}.

본 연구에서 사용한 구핵성 황복합체의 하나인 glutathione(γ -Glu-Cys-Gly, GSH)은 자유 sulfhydryl(SH)기를 가진 tripeptide로 자연상태에서 포유동물 세포들의 주된 세포내 thiol 물질이다. 이의 세포독성 보호효과에 대한 정확한 작용은 아직 논쟁이

될만한 내용이 많이 있다. 하지만 현재까지 알려진 바로는 여러 가지 기전을 통해 나타나는데 첫째로 glutathione peroxidase의 활성화된 형태로 유지하면서 독성 peroxides를 감시하고, 두 번째로 cisplatin과 같은 세포독성물질과 세포내 복합체를 형성하여 이의 독성을 감소시키고 반면, DNA의 기능은 유지시킨다. 세 번째로 몇가지 이온통로의 역학(예, K^+ 통로)에 작용하여 생물학적인 세포의 항상성을 유지시킨다. 몇몇 연구에서는 암세포주에서 platinum 복합체가 glutathione 생성의 주된 효소인 γ -glutamyl transpeptidase(γ -GT)의 유전자표현이 상향조절(upregulate)되어 그 결과 세포내의 glutathione 양이 증가된다고 하였고 이는 보상적인 기전으로 여겨진다^{2, 8, 9, 15}. Glutathione을 외부에서 투여하여 세포외 농도를 높여 주게 되면 이는 주로 신장에 축적이 되고 또한 신경조직에도 축적이 되어 세포보호효과를 나타낸다.

세포배양과 동물모델의 연구들에서 cisplatin 세포독성에 glutathione을 함께 투여하였을 때 투여 안했을 때와 비교해 항암효과를 줄이지 않는 것으로 보고가 되고 주로 신독성과 신경독성 빈도의 감소를 보고하였다^{16, 17}.

임상실험으로도 여러 연구가 되었는데 소규모의 임의의 II상 또는 III상의 몇가지 연구를 보면 Parnis 등은 22명의 난소암환자에서 cisplatin 40mg/m²/day를 2시간동안 주입하고 cisplatin 투여 직전에 glutathione 1.5g/m²로 투여해, 2일 또는 3일 동안 투여하였으나 심각한 이독성으로 연구가 중단되었고, 다른 2개의 임의의 연구(난소암환자 각각 54명과 33명)에서도 cisplatin 50 또는 75mg/m²(축적용량 450mg/m²)로 단독으로 주고 15분전에 glutathione 2.5g을 투여하였는데 다른 독성에는 효과가 없고 신경독성의 감소의 경향만을 보이고 확실한 결론을 내리지 못했다. 고무적인 결과가 나온 연구로는 2가지 연구가 있었다^{19, 20, 21}. 첫째 연구로 Cascinu 등은 50명의 진행성위암환자에서 일주단위로 30분동안 cisplatin 40mg/m², epirubicin, fluorouracil, 6S-leucov-

orin and 과립세포구축인자(granulocyte colony-stimulating factor)를 병합하여 9주간하고 그 후 반응이 있거나 정적상태를 유지한 환자들을 대상으로 다시 6주간 더 치료하였다. 환자들은 첫날 cisplatin 투여 전에 placebo 또는 glutathione 1.5g/m², 2일에 5일간에는 glutathione 600mg/m²을 투여하였다. 9주째 임상적인 신경병증은 placebo군 25명 중 9명이 발생하였는데 반해, glutathione군 25명 중 한명도 발생하지 않았고, 6주를 더 치료한 15주째에는 placebo군 18명 중 16명, glutathione군 24명 중 4명으로 glutathione군에서 탁월한 신경합병증에 대한 보호효과를 보였다. Placebo군에서 신경합병증이 발생한 환자에서는 정중신경, 척골신경 그리고 장판지(sural) 신경의 잠복기(latency)와 활동전위진폭(action potential amplitude)의 심각한 장애를 보였다. 항암제에 대한 관해율에서도 52% 대 76%으로 glutathione을 투여한 군에서 유의있는 증가가 있었다¹. 두 번째 연구로 Bowman¹⁸ 등은 151명의 새로 진단된 난소암 환자에서 술후 cisplatin 100mg/m² glutathione 3g/m²을 매 3주간격으로 6회 시행하였다. 신독성은 glutathione군 74명중 11명, placebo군은 77명중 26명, 1내지 2기의 신경독성은 각각 38%와 49%, 전체 항암제에 대한 반응율은 73%와 62%로 glutathione군에서 좋은 결과를 보였고 전체 생존율은 결과를 기다리고 있는 중이다.

본 연구에서는 폐암세포주를 사용한 실험에서 폐선암세포주와 편평상피폐암세포주에서 실제 임상에서 cisplatin에 대한 합병증이 잘 발생하는 조직의 신경세포나 신세포는 아니지만 정상폐상피세포주를 암세포주와의 비교대상으로 하여 cisplatin에 대한 세포독성을 서로 비교하려고 하였다.

결과는 세포주들간에서 cisplatin에 의한 세포독성 효과 및 glutathione에 의한 세포보호효과 모두에서 서로 차이를 보였다. 폐선암세포주의 경우는 cisplatin 15 μ g/ml 농도에서 41%만이 생존하여 좋은 감수성을 보였으나 편평상피폐암세포주와 정상폐상피세포주에서는 각각 cisplatin 125와 250 μ g/ml 이상의

아주 높은 농도로 올려야만 50%에 가까운 세포가 죽는 것으로 나타나 감수성의 차이를 보였다. 같은 비소세포폐암인 폐선암과 폐편평상피세포암에서의 이러한 차이는 각각 암세포마다 항암제의 세포독성에 대한 내성이 발현되는 정도에 차이가 있었다고 볼 수 있다. 또한 세포주마다 cisplatin 세포독성에 glutathione에 의한 세포보호효과의 차이도 glutathione이 항암제의 효과에 대한 내성을 유발하는 정도가 세포주마다 다르므로 생겼다고 생각할 수 있다. 현재까지 알려진 cisplatin에 대한 암세포의 내성의 기전으로는 첫 번째로 다제약제내성유전자(multidrug-resistant gene)에 의해 표현된 P-당단백질(P-glycoprotein)을 매개로 한 ATP 의존성 세포외 배출 펌프(efflux pump)에 의한 약물의 세포외로의 방출로 인해 세포내의 목표로 도달되지 못해 발생된다는 보고가 있고, 또 하나 기전은 산소유리기 제거물질(oxygen free radical scavenger)들이 세포내에서 항암제의 세포독성의 일부 기전에 관여하는 산소유리기들과 결합해서 이들을 해독함으로써 내성이 발생된다는 보고도 있다^{10, 22, 23}. 그러므로 본 연구에서 폐선암세포주의 경우에는 이러한 glutathione의 투여가 cisplatin의 내성을 조장했다고 볼 수 있다.

편평상피암세포주와 정상폐상피세포주에서 cisplatin 세포독성에 대한 glutathione이 나타낸 효과의 비교는 같은 cisplatin농도인 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 비교하였을 때 두 세포주 모두에서 생존율이 상승되었으나 상대적으로 같은 cisplatin 농도에서 정상세포가 많이 살아남고 glutathione을 100 $\mu\text{g/ml}$ 정도만 투여하여도 90-100%의 높은 생존율로의 상승을 보이면서 이러한 결과가 통계적으로도 유의한 결과를 보여 분명히 정상폐상피세포에서 암세포보다 더 세포독성에 대한 보호효과가 있다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 고용량으로 cisplatin을 주고 glutathione을 함께 주었을 때 cisplatin의 항암효과에 최소한으로 작용하면서 정상폐상피세포에 다른 암세포들보다 항세포독성효과를 보이는 적절한 증량된 cisplatin의 농도와 glutathione의 농도를 알아보려고 하였다.

세포배양액에서의 cisplatin농도와 실제 임상에서 환자들에게서 투여하고 있는 cisplatin용량은 체내분포, 대사, 배설 등 많은 변수가 있어 직접적으로는 비교해 볼 수는 없지만 실제 임상에서 비소세포암의 경우 한 cycle에서 1일 투여시 70-120mg/m² 용량의 cisplatin을 투여했을 때 종양의 직경이 50%이상이 감소하는 부분적 관해 이상을 보이는 경우가 20-40% 정도인 점으로 보면 본 연구에서 폐선암이 cisplatin 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 41.1%, 폐편평상피세포암이 cisplatin 125 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 56.7% 감소되는 걸로 봐서 cisplatin농도 6, 15, 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 농도가 적정농도로 여겨지며 그 이상의 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 는 상당한 고농도의 cisplatin농도라고 할 수 있다. 여기서 결과가 너무 극단적으로 나온 폐선암의 경우는 제외하고 폐편평상피암과 정상폐상피세포에서 본 연구의 결과들에서 비교했을 때 cisplatin을 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 정도 수준으로 올리고 glutathione을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도는 정도로 주었을 때가 적절할 것으로 보인다.

본 연구의 단점으로는 in vitro 연구의 한계점으로 첫 번째로 비소세포폐암세포와의 비교대상을 실제 임상에서 cisplatin의 부작용이 잘 발생하는 부위인 신경세포, 신세포, 골수세포 등에서의 비교가 아니었다는 것인데 이는 정상폐상피세포를 이용해서 간접적으로 비교를 대신했으며 이는 차후 in vivo 실험을 통한 연구가 필요하리라 생각된다. 두 번째로는 세포주마다 너무 심한 cisplatin에 대한 감수성과 glutathione의 세포보호효과 차이가 나서 더 많고 다양한 세포주들을 사용한 연구와 함께 또한 많은 비소세포폐암환자를 대상으로한 in vivo 연구가 필요하리라 사료된다.

요 약

배 경 :

전체 폐암의 75%를 차지하고 있는 비소세포폐암의 항암요법은 Cisplatin을 근간으로 하여 최근 여러 가지 새로운 항암제들이 개발되어 사용하고 있다. Ci-

splatin의 충분한 항암효과를 기대할 수 있는 용량을 결정하는데 중요한 것이 용량 제한성(dose-limiting) 부작용으로, 결국 악성종양세포와 정상세포를 구분할 수 없어 발생하게 되며 이는 한번의 고용량(single high dose) 및 축적되는 용량(cumulative dose) 모두에서 생길 수 있어 최근 화학적 보호제들을 사용하여 이러한 cisplatin의 용량 제한성 부작용들을 최소화시키면서 고용량의 cisplatin을 시도해 항암효과를 강화시키려는 연구가 많이 시행되고 있다.

방 법 :

비소세포폐암세포주(폐선암과 폐편평상피암)와 정상 폐포상피세포주에서 각각 단계적으로 cisplatin용량을 고용량으로 증량시키면서 세포독성효과를 먼저 비교하고 다시 glutathione을 함께 투여하였을 때 glutathione이 고용량 cisplatin의 세포독성에 미치는 효과를 각 세포주들에서 비교하였다.(SPSS 10.0 ANOVA test $p < 0.05$)

결 과

폐선암세포주는 결과의 차이가 심해 비교하기가 힘들나 나타난 결과로 볼 때 glutathione의 투여는 cisplatin의 항암효과를 상쇄시켜 임상에서 투여하는 데는 문제가 있을 것으로 생각된다. 폐편평상피암세포주와 정상폐상피세포주 두가지를 같은 cisplatin농도와 glutathione농도에서 비교하였는데 Cisplatin농도는 0, 30, 60, 125 $\mu\text{g/ml}$ 의 4단계의 농도에서 비교하였고 결과는 편평상피폐암세포주에서는 glutathione농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 76.6-81.5%, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 80.5-93.2% 정도로 생존율을 나타내고 정상폐상피세포주에서 glutathione농도 100, 250 $\mu\text{g/ml}$ 모두에서 91.5-100% 까지 90%이상의 생존율을 유지하였다. (ANOVA test $p < 0.05$)

결 론 :

glutathione은 정상폐상피세포주에서 고농도 cisplatin에 의한 세포독성에 대한 보호효과가 크다.

참 고 문 헌

1. Cascinu S, Cordella L, Del Ferro E. Neuroprotec-

tive effect of reduced glutathione on cisplatin-bound chemotherapy in advanced gastric cancer : a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Oncol 1996;13:26-32.

2. Hoekman K, van der Vijgh WJF, Vermorken JB. Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer. Drugs 1999;57:133-55.
3. Kemp G, Rose P, Lurain J, Berman M, Manetta A, Roulet B. Amifostine pretreatment of protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities : Results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. J Clin Oncol 1996;14:2101-12.
4. Planting AST, Vermorken JB, Catimel G. Randomized phase II study of weekly cisplatin with or without amifostine in patients with advanced head and neck cancer. Eur J Cancer 1995;31A: 85-6.
5. Castello MA, Dominici C, Clerico A. A pilot study of 5-day continuous infusion of high-dose cisplatin and pulsed etoposide in childhood solid tumors. Am J Pediatr Hematol Oncol 1988;10: 103.
6. Higa GM, Wise TC, Crowell EB. Severe disabling neurologic toxicity following cisplatin retreatment. Ann pharmacother 1995;29:134-7.
7. Haupt R, Perin G, Dallorso S, Garre ML, Sobrero A. Very high dose cis-platinum(450mg/sq m) in an infant with rhabdomyosarcoma. Anticancer Res 1989;9:427-8.
8. Schunemann HJ, Muti P, Freudenheim JL, Armstrong D, Browne R, Klocke RA. Oxidative stress and lung function. Am J Epidemiol 1997; 146:939-48.
9. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. Eur Respir J 2000;16:534-54

10. Komiya S, Gebhardt MC, Mangham DC, Inoue A. Role of glutathione in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res* 1998;16:15-22.
11. Bier H, Hoffmann T, Eickelammann P, Hafner D. Chemosensitivity of head and neck squamous carcinoma cell lines is not primarily correlated with glutathione level but is modified by glutathione depletion. *J cancer Res Clin Oncol* 1996;122:653-8.
12. Robert T. Dorr. Chemoprotectants of cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 1991;18(Supple 2):48-58.
13. Howell SB, Pfeifle CL, Wung WE. Intraperitoneal cisplatin with systemic thiosulfate protection. *Ann Intern Med* 1982;97:845-51.
14. Links M, Lewis C. Chemoprotectants : a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 1999;57:293-308.
15. Elakawi Z, Zdanowics J, Creaven PJ. Induction to gamma glutamyl transpeptidase mRNA by platinum complexes in a human ovarian carcinoma cell line. *Oncol Res* 1996;8:415-23.
16. Hamers FPT, Braklee JH, Cavaletti E. Reduced glutathione protects against cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Cancer Res* 1993;53:544-9.
17. Cavaletti G, Minoia C, Schieppati M. Protective effects of glutathione on cisplatin neurotoxicity in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:771-6.
18. Bowman A, Perren T, Wikinson P. Effect of adding glutathione to cisplatin in the treatment of stage I-IV ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995;71(Suppl X X IV):14.
19. Parnis FX, Coleman RE, Harper PG, Pickering D, Topham C, Whittington JR. A randomised double blind placebo controlled clinical trial assessing the tolerability and efficacy of glutathione as an adjuvant to escalating doses of cisplatin in the treatment of advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1721.
20. Bogliun G, Marzorati L, Marzola M. Neurotoxicity of cisplatin +/- reduced glutathione in the first line treatment of advanced ovarian cancer. *Int J Gynaecol Cancer* 1996;6:415-9.
21. Colombo N, Bini S, Micelli D. Weekly cisplatin +/- glutathione in relapsed ovarian carcinoma. *Int J Gynaecol Cancer* 1995;5:81-6.
22. Sangeetha P, Das UN, Koratkar R, Suyaprabha P. Increase in free radical generation and lipid peroxidation following chemotherapy in patients with cancer. *Free Radic Biol Med* 1990;8:15-9.
23. Spitz DR, Phillips JW, Adams DT, Sherman CM. Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin : the significance of increased catalase activity and total glutathione in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts. *J Cell Physiol* 1993;156:72-9.